



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101616687 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 20

(21) 申请号 200780048642. 7

(22) 申请日 2007. 12. 31

(30) 优先权数据

06027120. 2 2006. 12. 29 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 06. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/011477 2007. 12. 31

(87) PCT申请的公布数据

W02008/080628 EN 2008. 07. 10

(73) 专利权人 佩维恩生物技术股份公司

地址 瑞士伊提根

(72) 发明人 克里斯蒂娜·莫泽

安德烈亚斯·卡默

里纳尔多·楚尔布里根

(74) 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有

限公司 11012

代理人 黄泽雄 崔华

(51) Int. Cl.

A61K 39/145 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 92/19267 A1, 1992. 11. 12, 全文.

W0 92/19267 A1, 1992. 11. 12, 全文.

Anke Huckriede 等. The virosome concept for influenza vaccines. <Vaccine>. 2005, 第23卷 (第S1期), S1/26 - S1/38.

Anke Huckriede 等. The virosome concept for influenza vaccines. <Vaccine>. 2005, 第23卷 (第S1期), S1/26 - S1/38.

审查员 张颖

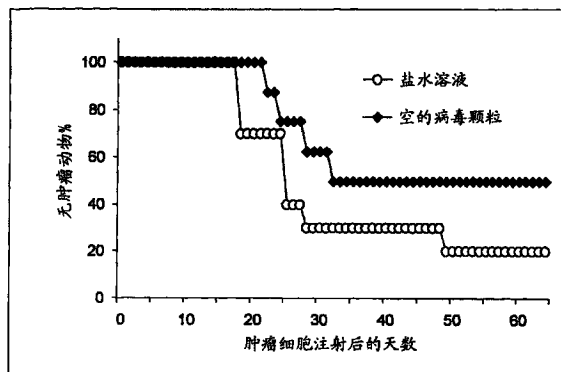
权利要求书1页 说明书22页 附图6页

(54) 发明名称

非特异性免疫刺激剂

(57) 摘要

本发明涉及一种脂囊泡用于制备药物的用途。本发明进一步涉及治疗和 / 或预防疾病或紊乱的方法, 所述方法包括向需要的动物施用所述脂囊泡。



1. 在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的病毒颗粒用于制备药物的用途,所述药物用于非特异性地刺激哺乳动物的免疫反应来防止和 / 或治疗选自黑素瘤、拉克罗斯病毒感染、问号钩端螺旋体感染或单纯性疱疹病毒 2 感染的疾病或紊乱,

其中所述至少一种病毒包膜蛋白是流感病毒包膜蛋白 ;和

其中所述病毒颗粒是空的病毒颗粒,其不包含与所述疾病或紊乱相关的药物或物质。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述至少一种病毒包膜蛋白是血凝集素或神经氨酸酶。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述病毒包膜蛋白是血凝集素和神经氨酸酶。

4. 权利要求 1-3 的任一项的用途,其中所述哺乳动物选自人类、黑猩猩、猕猴、长臂猿、猿猴、恒河猴、小鼠、大鼠、猫、狗、马、兔、反刍动物、猪。

5. 权利要求 4 的用途,其中所述反刍动物选自奶牛、公牛、山羊、绵羊、野牛、水牛、鹿、骆驼和美洲驼。

6. 权利要求 5 所述的用途,其中所述鹿为牡鹿。

7. 权利要求 1-3 的任一项的用途,其中所述药物 :

适合于胃肠外地或局部地施用,和 / 或

被配制或调制为用于注射的溶液、贴片、喷雾剂、栓剂、漱口溶液、锭剂或滴剂。

8. 权利要求 7 的用途,其中所述药物适合于静脉内地、肌内地、皮内地、皮下地、腹膜内地、表面地、口服地、舌下地或通过漱口来施用。

9. 权利要求 1-3 的任一项的用途,其中所述病毒颗粒是免疫增强重构的流感病毒颗粒或嵌合的病毒颗粒。

10. 权利要求 9 的用途,其中所述流感病毒颗粒或嵌合的病毒颗粒是嵌合的流感病毒颗粒。

非特异性免疫刺激剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种脂囊泡用于制备药物的用途,所述药物用于非特异性地刺激动物对疾病或紊乱的免疫反应。本发明进一步涉及非特异性地刺激动物的免疫反应的方法,即,治疗、消除和/或防止疾病或紊乱,所述方法涉及向有需要的动物施用一种脂囊泡。所述脂囊泡在它的脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白。

背景技术

[0002] 希望的是通过机体的免疫系统的非特异性刺激的方式提高针对疾病、特别是针对传染性疾病的抵抗能力。同时,免疫系统对于肿瘤性疾病的抑制和消除的重要性已经变得明显和公认。然而,由于常常为复杂的组合物和不同器官系统的多种相互作用,一般的免疫刺激剂的作用机制是未知的并且受投机性的影响。对先天的防御机制和适应性免疫之间的相互作用的增加的了解已经提供了似乎有了解释。特别是,一种危险信号的感受器系统——*tol1*样受体在二十世纪九十年代的发现,开启了针对高度复杂的、整合的以及多冗余的对抗侵入性微生物的防御机制的研究新领域,其提供了对抗疾病的增强的抵抗力的似乎有理解的而又不完全的解释。

[0003] 一般地,免疫系统可以分成两个部分:先天免疫系统和适应性免疫系统。如名称所表明的,先天免疫系统在出生时存在,提供了针对病原体的第一防御,而不具有对任何一种特定病原体反应和中和的能力。因此,先天免疫系统有时也称为非特异性免疫系统,被描述为非克隆的防御机制,这是因为不需要单独的细胞克隆来实现它的免疫反应。虽然先天免疫系统包括这些结构,如皮肤的酸性包被和完整的表皮本身,它还包括了更复杂的实体,例如补体系统、抗微生物酶系统以及非特异性的介体,例如干扰素和白细胞介素。与后者相关的是一般的炎症性反应,其也在先天免疫中起作用。在细胞水平上,以及在炎症性反应中也部分地涉及的,先天免疫系统包括粒细胞、单核细胞-巨噬细胞系统以及天然杀伤(NK)细胞,后者构成了非特异性的先天免疫反应以及特异性的适应性免疫反应之间的联系的部分。先天免疫反应的区别特征之一是,在它对抗病原体的能力方面它是相对快速的,提供了在初始阶段期间针对病原体的初步保护,在初始阶段中宿主的更为特异性的适应性免疫反应被活化或首次发生。

[0004] 特异性的或适应性免疫反应需要更多时间来活化或发展,因而是在先天免疫反应之后发生。在适应性免疫反应的过程中,宿主根据对病原体的过去的或新的经验,或两者的结合来对抗病原体。适应性免疫反应本身可以是细胞的(即,与特定的细胞克隆如细胞毒性T细胞(CTC)的细胞毒性活性相关),或是体液的(即,与特定的B细胞克隆产生的抗体相关),或两者的结合,细胞的或体液的适应性免疫反应的哪个分支的优势性部分地取决于释放的细胞因子的特定混合物。抗原递呈细胞(APC)从外周组织进入淋巴器官的迁移触发了特异性免疫反应,并且也对T和B淋巴细胞实现的后期记忆功能负责,每一种淋巴细胞的克隆群体按需要被扩增。在对抗原的初始暴露时发展的这种记忆功能显著地缩短了适应性免疫系统在后期确定针对相同抗原的特异性防御所需的反应时间。

[0005] 说明先天和适应性免疫之间的特征和关系的图表在附图 6 中示出。

[0006] 已经在文献中描述了许多潜在的免疫增强子,从小的合成分子(聚 I:C,左旋咪唑)到活的微生物(短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)),并包括细菌成分与矿物油(弗氏佐剂)或无机盐(氢氧化铝镁/磷酸盐)的混合物,以及近来的,调节免疫性的重组蛋白质(例如,细胞因子,针对细胞受体的抗体)。这些物质已经主要地用作疫苗的佐剂,即,与特定的抗原组合,目的是增强针对所述疫苗的抗原成分相关的疾病的免疫性/抵抗力。在大量的已知免疫刺激剂中,仅非常少的是用于人类疫苗的实际被接受的佐剂(明矾盐、病毒颗粒、MF59、RC529)。大多数方法没有发展超越纯粹的临床前研究,遗留了相关的规范(安全性、毒性)以及经济性(生产成本、产品情况)方面未解决。其他佐剂处于临床开发的各个阶段(例如,细菌毒素、皂角苷衍生物、LPS 和脂质 A 衍生物、CpG、纳米颗粒),或仅被认可用于兽医用途(例如,ISCOMS、GERBU)。难题是达到刺激效应和反应发生性之间的可接受的平衡,因而产生有害反应的可能性。新开发的佐剂带有意外的副作用的附加风险,例如用来自大肠杆菌(*E. coli*)的热不稳定毒素作为鼻部流感疫苗的佐剂所观察到的。

[0007] 被批准用于特定疫苗的佐剂都没有用于以非特异性方式刺激疾病抵抗力,例如,作为独立的产品。

[0008] 越来越多的功能性食品或食品添加剂产品在市场上出现,声称提高疾病抵抗力,而又常常基于玄奥的论据而不是科学证据。这些产品在超市中没有限制地销售,它们的应用途径通常是口服。它们的组合物可以从定义明确的维生素或微量元素混合物到来自有机物质(植物、微生物、动物)的复杂提取物,包括含有活微生物(例如,含有 *L. casei* *defensis* 的 Actimel®)的所谓的益生菌剂。

[0009] 另一类别的疫苗样产品例如 **Broncho-Vaxom®**、**Buccalin®** 和 **Uro-Vaxom®** 是注册的医药产品。这些是可作为非处方(“OCT”)药物或作为处方药物可获得的,具有确切的适应症来销售,例如,用于呼吸道和下尿路道的感染的预防和治疗。它们由通常与相应疾病相关的灭活的细菌类型的特定混合物组成。与“真实的”预防性疫苗鲜明对比,为了疾病预防和治疗,治疗方案预计在延长的时间中每天口服应用。这些产品在临床前模型中显示了保护效应,并记载了在人类中的效果(T 细胞活化、提高的干扰素反应和 IgA 水平),虽然作用方式仍然是不清楚的。

[0010] **Baypamun®/Zylexis®** (Pfizer) 是兽医学用途的可注射免疫刺激剂的实例。该产品含有灭活的羊副痘病毒作为活性成分,被推荐用于宠物和农畜中传染性疾病或应激诱导的疾病的预防和治疗。对照研究显示了在几种物种(牛、马、猫、狗、猪)中临床症状的降低水平上的效力。非特异性免疫刺激效果归因于细胞因子、特别是干扰素的诱导。根据产品单,免疫刺激效果起始于注射后数小时并持续直到 14 天。这些动力学在特异性免疫预防起效太晚的情况中对于感染的畜群的治疗是理想的。在动物中观察到的积极效果引起了在人类中 **Zylexis®** 的适应症外(off-label)使用,甚至于对抗卫生部门的建议,主要是在癌症患者中。

[0011] 干扰素被广泛地用作非病原体特异性的、至少部分有效的抗病毒治疗(病毒性肝炎)。静脉内(i. v.)给予重组蛋白质,增强/模拟针对病毒感染的天然非特异性反应的多种效应物功能之一。然而,干扰素的使用由于严重的副作用、高成本和长的治疗持续时间而被限制。

[0012] 一种合成的咪唑噻唑衍生物,左旋咪唑(Ergamisol®),是与氟尿嘧啶组合使用来治疗结肠癌的抗生素药物。它最初作为人类和动物中的驱蠕虫剂被开发和使用。它针对蠕虫的作用机制被很好地记载了。在治疗结肠癌中,机制被记录了但不完全清楚。左旋咪唑已经显示了具有免疫刺激性质。它还偶尔用于治疗黑素瘤和头颈癌症。

[0013] WO 2006/085983 公开了病毒佐剂用于增强对免疫原的免疫反应的用途。描述的病毒佐剂是复制性的但增殖缺陷的病毒颗粒,含有修饰或未修饰形式的病毒基因组。使用这样的病毒颗粒作为非特异性免疫刺激剂的缺点是,至少部分病毒基因组必须以不能预见的效果被导入患者中。进一步的,被导入患者中的病毒颗粒必须是具有复制能力的。

[0014] 病毒颗粒是由脂质和至少一种病毒包膜蛋白组成的、通过体外过程产生的半合成的复合物。脂质是从卵或植物纯化的或是合成地产生的,脂质的一部分来自提供所述包膜蛋白的病毒。实质上,病毒颗粒代表了重构的、空的病毒包膜,常常来自一种或多种流感病毒,缺少包含源病毒的遗传物质的核壳体。一种类型的病毒颗粒是免疫增强(immunopotentiating) 重构的流感病毒颗粒(“IRIV”),其带有包埋在其脂质膜中的流感血凝集素(“HA”)—一种在流感与目标细胞的融合中起到关键作用的流感包膜蛋白。病毒颗粒不能复制,但是是纯的融合活性的囊泡。因此,病毒颗粒,如脂质体一样,一般被用于将物质(例如,免疫原性分子、药物和/或基因)递送到目标细胞。但是不同于脂质体,在由病毒包膜蛋白,例如对于 IRIV 来说是 HA,所触发的病毒颗粒内容物的细胞内释放之后,病毒颗粒提供了对细胞的有效进入的优点。此外,由于活性的病毒包膜蛋白掺入到它们的膜中,病毒颗粒在被细胞摄取之后立即将它们的内容物释放到细胞质中,从而防止在内涵体的酸性环境中治疗物质的降解(US 6040167)。

[0015] 与病毒样粒子(VLP)相比,病毒颗粒在合适的表达系统中蛋白质的重组表达时不会自发地形成,而是作为受控的体外过程的结果,这容许病毒颗粒的大规模工业生产。产生的病毒颗粒含有主要由合成的脂质组成的脂双分子层,而 VLP 由细胞脂质制成,大多数时候不形成双分子层。此外,对于病毒颗粒来说,单独的成分即脂质、病毒蛋白质的含量可以根据最终产物的需求来改变。

[0016] 在希望刺激针对与特定疾病或紊乱相关的抗原的免疫反应时,病毒颗粒在疫苗接种的领域中已经是特别有用的。在这些情况下,抗原一般被包裹在病毒颗粒中或结合到病毒颗粒上,然后病毒颗粒将该抗原递送到要接种的宿主免疫系统。通过递送的特定抗原,产生的预防和/或治疗效果对于与该抗原相关的疾病或紊乱必然是特异性的。

[0017] 病毒颗粒可以进一步同时用几种不同的 B 细胞和 T 细胞表位(Poltl-Frank 等(1999),《临床实验免疫学》(Clin. Exp. Immunol.) 117,496;Moreno 等,(1993).《免疫学杂志》(J. Immunol.) 151,489) 加载,包括普遍的 T 辅助细胞表位(Kumar 等(1992),《免疫学杂志》148,1499-1505) 和本领域技术人员已知的其他表位。因而,病毒颗粒是现代疫苗接种中高度有效的佐剂,具有作为抗原递送工具的优越的性质,和强大的免疫原性潜力,而同时将副作用的风险最小化。

[0018] 病毒颗粒是功能性的,因为它们的膜融合活性精密地模拟了良好地定义的完整病毒的低 pH 值依赖性膜融合活性,其是由病毒包膜蛋白单独地介导的。像病毒一样,病毒颗粒通过受体介导的内吞作用或调理作用被快速地内在化。与病毒系统相比,病毒颗粒是安全的,因为病毒颗粒缺少亲本病毒的传染性的核壳体。因而,病毒颗粒代表了用于各种不同

物质的递送的有前景的载体系统,所述物质被包裹在它们的水性内部中,或共同重构到它们的膜中。此外,在病毒颗粒膜内不同受体的共同重构容许病毒颗粒对不同的细胞或组织的靶向。通过将抗原添加到病毒颗粒的表面,或通过将抗原包裹在病毒颗粒的腔内或与病毒颗粒一起发挥佐剂效果的脂质体的腔内,病毒颗粒主要被用作疫苗。

[0019] 病毒颗粒是从流感病毒包膜重构的,利用了与它们的病毒对应物相同的细胞受体介导的内吞作用 (Hernandez 等 (1996),《细胞和发育生物学年鉴》(AnnuRev Cell Dev Biol)12,627-661)。流感病毒与内涵体的受体结合和膜融合活性已知是由较大的病毒包膜糖蛋白 HA 介导的 (Bungener 等 (2002),《脂质体研究杂志》(J Liposome Res)12,155-163; Huckriede 等 (2003),《疫苗》(Vaccine)21,925-931)。类似于病毒载体,内涵体的腔中中度酸性 pH 值触发了病毒颗粒与内涵体膜的融合,因而释放包裹的材料如 DNA、RNA 或蛋白质到 APC 的胞质液中。因而,包裹在病毒颗粒中的外源抗原可以接近 I 类 MHC 途径而不需要从头开始的蛋白质合成。不是所有的病毒颗粒都可能与内涵体膜融合,因而一部分被认为对于 II 类 MHC 途径是可利用的。

[0020] 基于空 IRIV 的针对流感的商业上可获得的疫苗 (INFLEXAL® V) 已经显示了是非常有效和安全的 (Gluck 等 (1994),《柳叶刀》(Lancet)344,160-163)。病毒颗粒作为与流感之外的其他特定疾病相关的抗原的递送系统的潜力已经展现可用于核酸和肽的疫苗,例如,用于疟疾 (Poltl-Frank 等 (1999),《临床实验免疫学》117,496-503) 和甲型肝炎 (Holzer 等 (1996)《疫苗》14,982-986),例如使用 EPAXAL®。新近的报导还断定,与病毒颗粒一起皮下 (s. c.) 施用的合成肽疫苗能够诱导强烈的 CTL 免疫性 (Amacker 等 (2005),《国际免疫学》(Int Immunol)17,695-704)。

[0021] WO 2004/045582 描述了,在合适的体外条件下,空的病毒颗粒 (即,既不含也不带有感兴趣的抗原性分子) 可以被制备来与含有或带有这样的分子的脂质体融合。当含有或带有抗原性分子的产生的融合颗粒被施用给宿主时,引发的针对抗原性分子的特异性免疫反应要大于这种抗原性分子在单独的脂质体中施用的情况。类似地,在 EP 05027624.5 中,描述了空病毒颗粒与带有或含有抗原性分子且在溶液中作为非融合的、独立实体存在的脂质体的组合,能够将宿主免疫应答强化到与用单独的含抗原脂质体所实现的相比更大的程度。

[0022] Huckriede 等 (2005),《疫苗》23S1, S1/26-S1/38 综述了 IRIV 作为流感疫苗的用途,以及包裹各种疾病特异性抗原的 IRIV 作为针对所述抗原相关的特定疾病的疫苗的用途。在每种情况下,IRIV 被用作疫苗对抗特定疾病的能力与 IRIV 之中或之上抗原的存在相联系,其中所述抗原与要免疫的特定疾病相关。

[0023] 然而,与病毒颗粒在抗原性分子的直接递送方面或在强化宿主对抗这些抗原性分子的免疫反应中的佐剂活性一样高效的是,在现有技术中描述的病毒颗粒活性本质上是特异性的,意思是它在预防、治疗和 / 或消除由所递送抗原性分子的性质来要求或限定的特定疾病或紊乱方面表现了自己。

[0024] 根据上述的,需要进一步的免疫刺激剂,其不涉及引入潜在危险的病毒基因组以及将病毒颗粒复制到患者中,但是其能够以广泛的、区室非依赖的方式发动免疫系统。这样的免疫刺激剂必须是安全的,基于被证明的作用机制,并且在它们的活性方面是可靠的。

[0025] 解决这一需求是本发明的目的。

发明内容

[0026] 现在令人惊讶地发现的是,在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡,例如病毒颗粒,可以用于引发免疫系统对抗疾病和紊乱的刺激,所述疾病和紊乱不与衍生出所述至少一种病毒包膜蛋白的亲本病毒相关。这是令人惊讶的,因为这样的脂囊泡既不带有也不含有所述至少一种病毒包膜蛋白之外的、与任何特定疾病相关的任何抗原性分子,或药物。然而,发明人发现这种空的脂囊泡在引发非特异性保护效应方面是有效的,甚至是在缺少任何其他药物或与这些疾病相关的物质的情况下也是如此。

[0027] 因此,本发明的一个方面涉及在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡用于制备药物的用途,所述药物用于非特异性地刺激动物的免疫反应来预防、治疗和 / 或消除疾病或紊乱。

[0028] 本发明的进一步的方面涉及在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡,其用于非特异性地刺激动物的免疫反应来预防、治疗和 / 或消除疾病或紊乱。

[0029] 本发明的进一步的方面涉及非特异性地刺激动物的免疫反应来预防、治疗和 / 或消除疾病或紊乱的方法,其包括向所述动物施用在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡。

[0030] 根据本发明的用途的脂囊泡在此在下文中详细描述。

[0031] 不受理论的限制,发明人将所观察到的令人惊讶的效果归因于以下事实,即,本发明的脂囊泡以至少一种病毒包膜蛋白的形式向宿主免疫系统呈递了病原体相关的分子模式 (“PAMP”)。这种 PAMP 的呈递经由局部感受器 (tol1 样受体等等) 的刺激,其然后引起先天免疫系统的活化,而警告了免疫系统。这种活化看起来以独立于任何特定疾病的方式完成,这是通常预期由适应性免疫系统的 T 细胞和 / 或 B 细胞区室内特定的克隆亚群的活化所进行的。作为这种全局性免疫刺激的结果,免疫系统被带入临时的戒备状态,减少了对微生物学威胁的响应时间,提高了非特异性即时 (先天) 反应的数量,增强了特异性适应性免疫的随后的发展,在继而发生全身感染的情况下,降低了与这种感染相关的症状的严重度。实质上,然后,本发明的脂囊泡作为某种快速免疫性 “叫醒呼叫”,来提高针对大范围疾病的抵抗力持续有限的时间。

[0032] 在此在下文附随的实施例中将显示的是,发明人已经证明了在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的 (空的) 脂囊泡可以用于减低疾病的严重度。特别地,已经显示的是,在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡,即在此定义的裸脂囊泡,在施用后仅数小时引发了免疫刺激性作用。这种作用的发动是十分快速的,当然比由特异性、即适应性免疫反应预期引起的任何免疫刺激性作用更为快速。进一步显示的是,对于预先用上述脂囊泡治疗的动物所感染的疾病,与未治疗的动物对照相比,被治疗的动物中这种疾病的严重度以及病程被降低了。最后,虽然这种作用是短暂的,但观察到对于多种不同的疾病,展现了利用这种脂囊泡所实现的免疫增强作用的非特异性性质。

[0033] 如在此使用的,术语 “脂囊泡” 是指边界是脂双分子层并限定了具有大约 20-1000nm、优选的 20-500nm、更优选的 80-500nm、再更优选的 100-200nm 的直径的腔的球体。最优选的,脂囊泡的直径是约 150nm。在此使用的 “脂囊泡” 是指在其脂质膜中具有至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡,属于称为 “蛋白脂质体” 的化合物类别。

[0034] 如在此使用的,用语“在其脂质膜中”是指经由蛋白质分子内的跨膜 / 锚定结构域,或经由提供锚定功能的共价连接的亲油性分子,或经由非共价的缔合,通过直接地与脂双分子层的成分或与锚定在脂双分子层中的分子,病毒包膜蛋白对脂囊泡的物理附着,因而,对于结合到脂囊泡可以融合的细胞上的相应受体是可用的。

[0035] 如在此使用的,术语“病毒包膜蛋白”是指由有包膜病毒编码的任何蛋白质,本发明中使用的脂囊泡部分地或完全地衍生自所述有包膜病毒,并且所述蛋白质存在于其脂质膜中。在很多情况下(但不总是),病毒包膜蛋白是外病毒粒表面的部分,并且与宿主生物体相互作用,例如,与细胞表面的受体或与可溶的分子相互作用。虽然“病毒包膜蛋白”在某些情况下可以代表与亲本病毒相关的免疫原性或抗原性分子,本发明中使用的脂囊泡的病毒包膜蛋白不是以引发针对该蛋白质的任何种类的特异性免疫反应的意图来掺入的,而是在发生特异性免疫反应之前触发至少一种立即的、非特异性的危险信号。针对所述病毒包膜蛋白的先存的特异性免疫明确地不会消除在本发明的意义上包膜蛋白的功能。病毒包膜蛋白有时作为“病毒融合蛋白”起作用,其实质上是指与“病毒融合促进蛋白质”相同的东西,意思是这样的蛋白质在病毒或病毒颗粒与目标细胞的融合中起到作用。

[0036] 如在此使用的,术语“免疫反应”是指动物对至少一种疾病或紊乱的提高了的抵抗力,包括对多种疾病或紊乱的同时抵抗力。免疫反应是人类和其他高等动物中的生理反应,以保护机体对抗外来物质和 / 或它的病理性的自身物质(例如,在癌症、自体免疫疾病或紊乱的情境中)。

[0037] 如在此使用的,术语“非特异性”、“不特异性”等等是指脂囊泡针对与衍生所述至少一种病毒包膜蛋白的病毒不相关或不是由其所引起的至少一种疾病或紊乱的一般免疫刺激活性。衍生脂囊泡的脂质膜中病毒包膜蛋白的病毒在此被称为“亲本病毒”。“非特异性”免疫刺激因而是指预防、对抗和 / 或消除不由亲本病毒引起的许多疾病或紊乱中的任何一种或多种。在此描述的非特异性免疫刺激的标志是,在脂囊泡的施用之后它的发动是非常快速的。这种短暂的非特异性免疫刺激一般在施用脂囊泡之后大约短于 5 天,但可以甚至更短发生,例如,低于 4 天、低于 3 天、低于 2 天、低于 1 天,或甚至在施用脂囊泡之后数小时内。

[0038] 反之,“特异性”免疫刺激活性是指免疫系统的刺激,来防止、对抗和 / 或消除与亲本病毒相关或由亲本病毒引起的特定疾病或紊乱。这种免疫刺激的发动是缓慢的,例如,在大约两周。

[0039] 举例来说,利用在其脂质膜中包含来自亲本病毒 A 的病毒包膜蛋白的脂囊泡,来制备药物以引起针对疾病 A(与亲本病毒 A 相关或由亲本病毒 A 引起)的免疫刺激,将是引发“特异性”免疫刺激活性的实例。相比之下,利用相同的脂囊泡来制备药物以防止、对抗(即,治疗)和 / 或消除疾病 B(不与亲本病毒 A 相关或不由亲本病毒 A 引起)将是引发“非特异性”或“不特异性”免疫刺激性活性的实例。这也适用于相同病毒的不同毒株。举例来说,由带有属于相同病毒种类(在此是流感)的另一特定毒株(例如, H3N2 或 H5N1)的病毒包膜蛋白的脂囊泡所引起的、针对病毒的一个特定毒株(例如,流感 H1N1)的免疫刺激,将因此被认为是非特异性免疫增强。

[0040] 如在此使用的,术语“治疗的”、“治疗”等等是指在对抗已经感染的、或怀疑已经感染的至少一种疾病或紊乱中采取的行动,不考虑是否已经出现任何相应的症状。因而,

“治疗”和“治疗的”是指处理、消除或至少改善受治疗者中的疾病或紊乱,从而,如果已经存在症状,症状被缓解,如果还没有出现症状,这些症状的发作在严重度上被降低或完全被排除。

[0041] 如在此使用的,术语“预防的”、“预防”、“防止”、“防预”等等,是指当受治疗者不被怀疑已经感染了疾病,但是在当前或将来存在着感染特定疾病或紊乱的增高的危险或预期时,防止受治疗者感染疾病所采取的行动。该术语进一步是指,当受治疗者已经接受了针对特定疾病的疫苗接种 / 免疫、然而其效果不是持久的之时,防止受治疗者感染任何疾病所采取的行动。因而,如在此使用的,只要所讨论的受治疗者不具有任何疾病症状但是预计可能感染特定的疾病或紊乱,行动将被适当地称为“预防性的”或“防预的”。如果在脂囊泡的至少一次初始使用之后,尽管开始没有怀疑特定的疾病或紊乱存在于受治疗者中,结果该受治疗者实际感染了特定的疾病或紊乱,起初被适当地称为“预防性的”行动可以变为“治疗的”。反之,如果持续超过了治愈特定的疾病或紊乱,起初适当地称为“治疗的”行动性质上变为“预防性的”或“防预的”。

[0042] 如在此使用的,术语“药学的”是指组合物和 / 或药物的特征,其使得它们适合于向活的动物、优选人类施用。

[0043] 如在此使用的,术语“强化”、“免疫增强”、“刺激”、“免疫刺激”、“免疫刺激性”等等,在(空的)脂囊泡的上下文中可互换地使用,是指脂囊泡或其对上文定义的非特异性的免疫功能的作用。

[0044] 在此使用的,术语“病毒颗粒”是指重构的病毒包膜,其可以来自多种病毒,但是其缺少源病毒的传染性的核壳体和遗传物质。病毒颗粒是特定类型的脂囊泡,在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白。由于它的组成,这样的结构属于称为“蛋白脂质体”的化合物种类,其中脂质膜中的蛋白质是病毒来源的。也就是说,病毒颗粒由病毒或非病毒来源的膜脂质与一种或多种病毒包膜蛋白的混合物组成。

[0045] 如在此使用的,术语“疾病”和“紊乱”是指机体或精神的异常,其引起不适、功能障碍或痛苦,被分类为传染性的、非传染性的、肿瘤性的、免疫的或代谢的紊乱或疾病。

[0046] 如在此使用的,对于脂囊泡、特别是对于病毒颗粒,术语“裸的”或“空的”可互换地使用。该术语是指下述事实,即,这样表征的囊泡或病毒颗粒除了所述至少一种病毒包膜蛋白之外在它们的脂双分子层之中或之上不含有疾病特异性抗原,它们也不带有任何疾病特异性抗原。因而,“裸的”或“空的”脂囊泡,例如“裸的”或“空的”病毒颗粒,是指这样称谓的囊泡 / 病毒颗粒中含有的唯一蛋白质或多肽是上文定义的所述至少一种病毒包膜蛋白。在这种情境中注意到的是,用于生产在此的上文中描述的脂囊泡例如病毒颗粒的已知过程很少地容许所有杂质的完全脱除。因而,脂囊泡,例如病毒颗粒,可以包含在其制备中涉及的物质的残余痕量(例如,痕量的洗涤剂),并将仍然被适当地理解为是在上文的意义上的“裸的”或“空的”,只要这样的痕量物质不引发上文的意义上“特异性的”任何免疫反应。

[0047] 如在此使用的,术语“佐剂”(作为名词或形容词来使用)表示二级物质,其与对预定的预防和 / 或治疗效果负责的一级的、活性物质组合地(不一定同时地)施用。“佐剂”物质因而本身不显现预防和 / 或治疗效果,但是支持、促进或强化一级的、活性物质显现的预防和 / 或治疗效果。

[0048] 物质的名称或作为“佐剂”的效果取决于使用该物质的特定情境,或取决于显现该

效果的特定情境,而不是取决于物质或效果本身的内在性质。因而,可以在一种情况下作为上文意义上的“佐剂”的物质可能在另一种情况中作为活性试剂,这取决于预期的或显现的预防和/或治疗效果。通过举例,虽然在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡(例如,病毒颗粒)已经在本领域中描述为佐剂,这种脂囊泡在本发明的上下文中不适合称为佐剂,因为非特异性免疫刺激活性是归功于这种囊泡。在此,脂囊泡是活性剂,而支持、促进或强化脂囊泡的非特异性预防和/或治疗效果的另一种二级物质可以被适当地称为佐剂。

[0049] 在其脂质膜中包含至少一种病毒包膜蛋白的脂囊泡有益地可以是病毒颗粒。

[0050] 病毒颗粒的制备是本领域的技术人员公知的。例如,在 EP 538437 中,或作为选择在 Mischler 和 Metcalfe(2002),《疫苗》20,B17-23 中描述了制备病毒颗粒的适合的方案,通过引用合并在此。

[0051] 举例来说,在用辛乙二醇单十二烷基醚溶解例如完整的流感病毒、沉降核壳体(病毒糖蛋白和脂质将保留在上清液中)和用疏水性树脂(Bio-Beads SM2)除去上清液中的洗涤剂之后,可以从原始的病毒膜脂和刺突糖蛋白重构病毒颗粒(WO 92/19267)。

[0052] 含有来自亲本病毒的不同毒株的 HA 的病毒颗粒的制备可以用那些亲本病毒的各种数量的、包括等量的蛋白质来进行。有益地,亲本病毒包膜蛋白例如 HA 可以用非离子型洗涤剂辛乙二醇单十二烷基醚来溶解。在用 Bio-Beads SM2 除去洗涤剂之后,可以形成含有不同类型的包膜蛋白的病毒颗粒。

[0053] 特别优选的病毒颗粒形式是免疫增强重构的流感病毒颗粒(“IRIV”或“流感病毒颗粒”)。这些是从磷脂和流感病毒表面糖蛋白的混合物制备的、具有约 150nm 的平均直径的单层囊泡,但是它们不含有任何病毒核酸。流感病毒的血凝集素(“HA”)膜糖蛋白在流感病毒颗粒的作用方式中起到作用。流感病毒的这种主要抗原是融合诱导成分,其促进向免疫感受态细胞的抗原递送。

[0054] 可以有益地衍生所述至少一种病毒包膜蛋白的流感病毒亚型有流感 H1N1、流感 H1N2、流感 H2N2、流感 H3N2、流感 H3N8、流感 H5N1、流感 H5N2、流感 H5N3、流感 H5N8、流感 H5N9、流感 H7N1、流感 H7N2、流感 H7N3、流感 H7N4、流感 H7N7、流感 H9N2 和/或流感 H10N7。进一步的,所述至少一种病毒包膜蛋白可以有益地来自流感 A/Bangkok/1/79、流感 A/Beijing/32/92、流感 A/Brazil/11/78、流感 A/California/7/2004(H3N2)、流感 A/Chile/1/83、流感 A/Christchurch/4/85、流感 A/England/42/72、流感 A/Fujian/411/2002(H3N2)、流感 A/Guizhou/54/89、流感 A/Hong Kong/1/68、流感 A/Johannesburg/33/94、流感 A/Leningrad/360/86、流感 A/Mississippi/1/85、流感 A/Moscow/10/99(H3N2)、流感 A/New Caledonia/20/99(H1N1)、流感 A/Panama/2007/99-RESVIR-17)、流感 A/Philippines/2/82、流感 A/PortChalmers/1/73、流感 A/Scotland/840/74、流感 A/Shangdong/9/93、流感 A/Shanghai/11/87、流感 A/Sichuan/2/87、流感 A/Singapore/6/86、流感 A/Sydney/5/97、流感 A/Texas/1/77、流感 A/USSR/90/77、流感 A/Victoria/3/75、流感 A/Wisconsin/67/2005(H3N2)、流感 A/Wuhan/359/95、流感 A/Wyoming/3/2003 X-147)、流感 B/Hong Kong/330/2001、流感 B/Jilin/20/2003、流感 B/Malaysia/2506/2004、流感 B/Shanghai/361/2002、流感 A/Beijing/262/95、流感 B/Victoria/98926/70、流感 B/Singapore/222/79、流感 B/

USSR/100/83、流感 B/Yamagata/16/88、流感 B/Panama/45/90、流感 B/Hong Kong/5/72、流感 B/AnnArbor/1/86、流感 A/Bayern/7/95、流感 B/Shangdong/7/97) 和 / 或 B/Jiangsu/10/2003。

[0055] 流感病毒颗粒包含球形的脂质膜,基本上由磷脂组成,优选地来自磷脂酰胆碱(PC)和/或磷脂酰乙醇胺(PE)。与脂质体相比,流感病毒颗粒含有插入到磷脂双分子层膜中的功能性的病毒包膜糖蛋白HA和/或神经氨酸酶(“NA”)。生物学活性的HA不仅为病毒颗粒制剂赋予了结构稳定性和均匀性,而且通过维持病毒的融合活性显著地促进了免疫学性质。虽然不能排除的是HA和/或NA可能被宿主免疫系统识别为外源的抗原,但任何这样的识别将仅能够触发对于亲本流感病毒特异性的免疫刺激性反应。相比之下和如上文阐述的,本发明的发明人令人惊讶地确定了,虽然提供了针对亲本病毒的特异性保护,空的脂囊泡,例如空的病毒颗粒也同时地触发了能够增强宿主免疫系统对抗一种疾病或紊乱的非特异性反应,所述疾病或紊乱不与该亲本病毒相关或不由该亲本病毒引起,或者,不与在病毒包膜蛋白来自超过一种亲本病毒的情况下的多种亲本病毒相关或不由其引起。

[0056] 流感病毒颗粒充当了非特异性地增强免疫反应的有效和高效的方式。它们也已具有极好的安全性(Schaad等(2000),《抗微生物剂和化学治疗》(Antimicrob Agents Chemother)44,1163-1167;Gluck等(2000),《传染病杂志》(J. Infect. Dis.)181,1129-1132),意味着它们很好地适用于用于人类中的非特异性免疫刺激的药物。

[0057] 在用例如辛乙二醇单十二烷基醚溶解灭活的流感病毒、沉降核壳体(病毒糖蛋白和脂质将保留在上清液中)和用疏水性树脂(Bio-Beads SM2)除去上清液中的洗涤剂之后,可以从原始的病毒膜脂和刺突糖蛋白重构流感病毒颗粒。制备流感病毒颗粒的方案在WO 92/19267中给出了,对于普通的病毒颗粒在WO 04/071492中给出了。

[0058] 虽然有益的是至少一种病毒包膜蛋白来自流感病毒,另外地或作为选择,本发明中使用的脂囊泡包含来自流感以外的其他病毒种类的一种或多种病毒包膜蛋白。例如,脂囊泡可以包含选自,例如,水泡性口膜炎病毒(VSV)G蛋白、塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus, SFV)E1蛋白、仙台病毒F蛋白、呼吸道合胞体病毒(RSV)F或G蛋白或丙型肝炎病毒(HCV)E蛋白的一种或多种病毒包膜蛋白。

[0059] 本发明中使用的脂囊泡还可以是嵌合的病毒颗粒,意思是它含有来自至少两种不同的病毒毒株的病毒包膜蛋白,例如血凝集素,例如来自流感毒株X-31和A/Sing或任何上述的病毒毒株。另外,也可以使用其他已知的病毒包膜蛋白,例如水泡性口膜炎病毒(VSV)G蛋白、塞姆利基森林病毒(SFV)E1蛋白,或仙台病毒F蛋白,来自呼吸道合胞体病毒(RSV)的G蛋白或F蛋白,或丙型肝炎病毒(HCV)E蛋白,等等,来构建能够经历连续的和独立的融合事件的嵌合病毒颗粒。

[0060] 本发明中使用的脂囊泡优选地包含选自由阳离子脂质、合成脂质、糖脂、磷脂胆固醇或其衍生物构成的组的脂质。磷脂优选地包含具有不同脂肪酰基组成的磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酸、心磷脂和磷脂酰肌醇。阳离子脂质优选地选自由下列构成的组:DOTMA(N-[(1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化物)、DOTAP(N-[(1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化物)、DODAC(N,N-二油酰基-N,N-二甲基铵氯化物)、DDAB(双十二烷基二甲基铵溴化物)、TC-Chol(胆甾烯基-N-(三甲基铵乙基)氨基甲酸氯化物)、DC-Chol(胆甾烯基-N-(二甲基铵乙基)氨基甲酸氯

化物)或其他阳离子胆固醇衍生物,以及十八胺或其他脂肪胺等等。它们可以在与 PC(磷脂酰胆碱)的混合物中配制为小的单层脂质体。本发明中使用的脂囊泡优选地可以包含卵衍生的 PC(卵磷脂),以及更优选的,1-油烯基-3-棕榈酰基-rac-甘油基-2-磷脂酰乙醇胺。

[0061] 优选的,本发明中使用的脂囊泡包含膜脂质,例如磷脂酰胆碱、磷脂酰己醇胺、磷脂酰丝氨酸和/或胆固醇衍生物。在最优选的实施方式中,所述脂囊泡进一步包含阳离子脂质,例如,阳离子脂质优选选自下列构成的组:DOTMA(N-[(1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵氯化物)、DOTAP(N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基铵氯化物)、DODAC(N,N-二油酰基-N,N-二甲基铵氯化物)、DDAB(双十二烷基二甲基铵溴化物)、TC-Chol(胆甾烯基 N-(三甲基铵乙基)氨基甲酸氯化物)、DC-Chol(胆甾烯基 N-(二甲基铵乙基)氨基甲酸氯化物)、或其他阳离子胆固醇衍生物,和十八胺或其他脂肪胺,DPPE(二棕榈酰磷脂酰乙醇胺)、DOGS(二油酰基-甘油基-琥珀酸酯)、DOSPA(2,3-二油酰氧基-N-[2(精胺羰酰胺基)]乙基-N,N-二甲基-1-丙胺基三氟醋酸酯)、DOSPER(1,3-二油酰氧基-2-(6-羧基精基)丙酰胺)、THDOB(N,N,N,,N'-四甲基-N,N'-二(2-羟乙基)-2,3-二油酰氧基-1,4-丁基二铵碘化物)、DOPA(二油酰基-sn-甘油基-磷酸酯)、DOTP(二辛基 *tere*-邻苯二甲酸酯)、DOSC(二油酰基-琥珀酰-甘油)、DOTB(二油酰基-e-(4'-三甲基氨)-丁酰基-sn-甘油)、DOPC(二油酰基-sn-甘油基-磷酸胆碱)等等特别优选的,所述阳离子脂质选自阳离子胆甾烯基衍生物,如 TC-Chol(胆甾烯基 N-(三甲基铵乙基)氨基甲酸)或 DC-Chol(胆甾烯基 N-(二甲基铵乙基)氨基甲酸)。

[0062] 本发明中使用的脂囊泡的膜优选的包含对于膜的总脂质含量 1.9 到 37mol% 的 DC-Chol 或 TC-Chol。在特别优选的实施方式中,膜中 DC-Chol 或 TC-Chol 的含量是膜的总脂质含量的 1.9 到 16mol% 之间。膜的其余脂质含量优选地由磷脂,最优选的磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺以 4 : 1 的比例组成。另外,膜可以含有足以确保脂囊泡的融合活性的一定量的 HA。

[0063] 共乳化剂也可以使用,来改善脂囊泡的刚性和/或封闭性。共乳化剂的实例有带电的或中性的胆固醇酯,如硫酸胆固醇,具有固醇骨架的衍生物,例如植物来源的衍生物,例如谷甾醇、豆甾醇,和其混合物。

[0064] 本发明中使用的脂囊泡例如可以通过与 WO 97/41834 的实施例 1 到 3 和 6 中公开的制备含 DOTAP 的病毒颗粒的过程的任一个相类似的过程来获得,只是 DOTAP 被 DOSPER 替代,最终的病毒颗粒膜中的 DOSPER 浓度如 WO 97/41834 中公开的适当地调整,特别是,按照病毒颗粒的总脂质含量的重量不超过 70%。基本上,当前的脂囊泡的制备方法可以包括以下步骤:

[0065] a) 制备缓冲溶液,其包含非离子型洗涤剂,并进一步包含 DOSPER 和其他脂质以及至少一种病毒包膜蛋白;

[0066] b) 根据总的膜脂质将脂质浓度调整到按照 DOSPER 的重量 5 到 30%,以及调整到所述其他脂质的重量 95%到 70%的平衡,所述其他脂质包含磷脂酰胆碱(PC)或其衍生物,以及任选的磷脂酰乙醇胺(PE)和/或除 DOSPER 以外的阳离子脂质;和

[0067] c) 通过透析或通过用微载体珠子处理溶液,除去洗涤剂,引起所述脂囊泡的形成。

[0068] 所述(至少一种)疾病或紊乱可以是传染性的、非传染性的、肿瘤性的、免疫的或

代谢的疾病或紊乱。在一个实施方式中,本发明的用途需要对健康受治疗者应用本发明中使用的脂囊泡,所述健康受治疗者面临对一种或多种传染性疾病或紊乱的临时提高的暴露,或对怀疑暴露于一种或多种传染性疾病或紊乱之后立即的、但在症状的出现或诊断结论的确认之前,(仍然)健康的受治疗者。相对于受治疗者的治疗或预防性的行动的分类在上文中讨论了。

[0069] 本发明的用途也可以应用于一种或多种已经存在的疾病或紊乱的治疗,任选地作为这样的疾病或紊乱的特定治疗的独立的补充。在这种情境中值得注意的是在此描述的脂囊泡实现的免疫增强的非特异性。在此,非特异性意味着可以同时对抗、消除和/或防止多种疾病或紊乱。进一步的,同时解决的疾病和/或紊乱的数量原则上是无限的。这是相对现有的疫苗接种方案的明显的优点,现有方案中被预防、治疗和/或消除的疾病和/或紊乱限于所制备的特定疫苗或疫苗混合物中存在的特定抗原的数量和种类。

[0070] 根据一个实施方式,至少一种传染性疾病或紊乱可以是病毒疾病或紊乱、细菌疾病或紊乱、真菌疾病或紊乱、寄生虫疾病或紊乱,或朊病毒疾病或紊乱。

[0071] 根据另一个实施方式,所述病毒传染性疾病或紊乱可以有益地选自 AIDS、AIDS 相关综合征、水痘(禽痘)、伤风、巨细胞病毒感染、科罗拉多蜱传热、登革热、Ebola 出血热、流行性腮腺炎、生殖器疣、手足口疫、肝炎、单纯性疱疹、带状疱疹、HPV、流感(Flu)、拉沙热病、米珠、Marburg 出血热、传染性单核细胞增多症、Mumps、脊髓灰质炎、渐进性的多灶的脑白质病(leukencephalopathy)、狂犬病、风疹、SARS、天花(痘)、病毒性脑炎、病毒性胃肠炎、病毒性脑膜炎、病毒性肺炎、西尼罗河病、黄热病。这些和其他病毒传染性疾病或紊乱是由 RSV、脊髓灰质炎病毒、风疹病毒、登革热病毒、黄病毒科、冠状病毒科、呼肠孤病毒科、狂犬病病毒、副粘病毒科(例如,腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞体病毒,等等)、正粘病毒科(例如,A、B 和 C 型流感病毒,等等)、猿免疫缺陷病毒(SIV)、HAV、HBV、HCV、HDV、HEV、HPV、HSV、HIV、CMV、EBV、脊髓灰质炎病毒、禽痘、布尼亚病毒(例如,La Crosse 病毒)引起的。

[0072] 根据进一步的实施方式,所述细菌传染性疾病或紊乱可以有益地选自炭疽病、细菌性脑膜炎、布鲁氏杆菌病、弯杆菌病、猫抓病、霍乱、白喉、流行性斑疹伤寒、淋病、脓疱病-军团病、麻风病(汉森病)、钩端螺旋体病、李氏杆菌病、Lyme 病、类鼻疽、MRSA 感染、诺卡氏菌病、白喉(百日咳)、瘟疫、肺炎球菌肺炎、鹦鹉热、Q 热、洛基山斑疹热(RMSF)、沙门氏菌病、猩红热、志贺氏菌病、梅毒、破伤风、沙眼、肺结核、兔热病、伤寒、斑疹伤寒;尿路感染。这些和其他细菌传染性疾病或紊乱是由白喉棒杆菌、破伤风杆菌、百日咳杆菌、脑膜炎奈瑟氏球菌,包括脑膜炎球菌血清型 A、B、C、Y 和 W135,嗜血杆菌属 B 型流感(Hib)和幽门螺杆菌引起。

[0073] 根据另一个实施方式,真菌传染性疾病或紊乱可以有益地选自曲霉病、芽生菌病、假丝酵母病、球孢子菌病、隐球菌病、组织胞浆菌病、皮癣菌病。

[0074] 根据另一个实施方式,寄生虫传染性疾病或紊乱可以有益地选自非洲睡眠病、阿米巴病、蛔虫病、巴贝虫病、恰加斯氏病、华支睾吸虫病、隐孢子虫病、囊尾蚴病、裂头绦虫病、麦地那龙线虫病、包虫病、蛲虫病、片吸虫病、姜片虫病、丝虫病、自由生活变形虫感染、贾第鞭毛虫病、颚口线虫病、膜壳绦虫病、等孢子球虫病、黑热病、利什曼病、疟疾、后殖吸虫病、蝇蛆病、盘尾丝虫病、虱病、蛲虫感染、疥疮、血吸虫病、绦虫病、弓蛔虫病、弓形体病、旋毛虫病、旋毛线虫病、鞭虫病、锥虫病。

[0075] 根据另一个实施方式,朊病毒传染性疾病或紊乱可以有益地选自可传播的海绵状脑病、牛海绵状脑病、克雅氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、库鲁病。

[0076] 根据另一个实施方式,肿瘤性疾病或紊乱可以是癌症。例如癌可以是肉瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、黑素瘤、腺瘤、癌瘤、恶性合胞体瘤、胃泌素瘤、嗜铬细胞瘤、泌乳素瘤或神经瘤。

[0077] 特别地,癌可以有益地选自:成年人急性淋巴母细胞性白血病;儿童急性淋巴母细胞性白血病;急性骨髓性白血病;肾上腺皮质癌;儿童肾上腺皮质癌;AIDS 相关的癌;AIDS 相关的淋巴瘤;肛门的癌;基底细胞癌;肝外的胆管癌;膀胱癌;骨癌,骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤;脑干胶质瘤;成年人脑肿瘤;脑癌(例如,脑干胶质瘤;小脑星形细胞瘤;脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤;室管膜瘤;髓母细胞瘤;幕上原始神经外胚层肿瘤;视觉传导路和下丘脑的胶质瘤);乳腺癌(男性和女性);支气管腺瘤/类癌瘤;伯基特氏淋巴瘤;类癌瘤肿瘤;胃肠道类癌瘤;未知的原生癌瘤;原发的中枢神经系统淋巴瘤;子宫颈癌;儿童期癌;慢性淋巴细胞性白血病;慢性粒性白血病;慢性脊髓增生病;结肠癌;结肠直肠癌;皮肤 T 细胞淋巴瘤,阿利贝尔氏病和赛谢综合征;子宫内膜癌;室管膜瘤;食道癌;肿瘤的尤文氏家族;颅外的生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;肝外的胆管癌;眼睛癌(例如眼内的黑素瘤眼癌以及成视网膜细胞瘤);胆囊癌;胃(胃)癌;胃肠道类癌瘤;胃肠基质肿瘤(GIST);颅外的生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;卵巢生殖细胞肿瘤;妊娠期的滋养叶瘤;胶质瘤;(例如脑干胶质瘤,脑星形细胞瘤,视觉传导路和下丘脑的胶质瘤);毛细胞白血病;头和颈部癌;原发的肝细胞(肝脏)癌;何杰金氏淋巴瘤;咽下部的癌;眼内的黑素瘤;胰腺癌(小岛细胞癌瘤);皮肤多发性出血性肉瘤;肾脏(肾脏细胞)癌;咽喉癌;急性白血病(例如成淋巴细胞白血病,急性骨髓性白血病,慢性淋巴细胞性白血病,慢性粒性白血病,毛细胞白血病);唇和口腔癌;肝癌(原发的和转移性的);非小细胞肺癌;小细胞肺癌;爱滋病-相关的淋巴瘤;伯基特氏淋巴瘤;皮肤的 T 细胞淋巴瘤;何杰金氏淋巴瘤;非何杰金氏淋巴瘤;原发的中枢神经系统淋巴瘤;瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Macroglobulinemia, Waldenstrom's);骨恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤;髓母细胞瘤;黑素瘤;眼内的(眼)黑素瘤;默克尔细胞癌瘤;间皮瘤;隐性的原发的转移性鳞状颈部癌;多发性内分泌瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞赘生物;阿利贝尔氏病;脊髓发育不良综合征;骨髓增生异常/骨髓及外骨髓增殖性疾病;慢性粒性白血病;骨髓性白血病;多发性骨髓瘤;慢性的脊髓增生病;鼻腔以及鼻窦癌;鼻咽癌;成神经细胞瘤;口咽癌;骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞肿瘤;卵巢低恶性潜力肿瘤;胰腺癌;小岛细胞胰腺癌;鼻窦以及鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;成松果体细胞瘤以及幕上的原始神经外胚层肿瘤,儿童期;垂体瘤;浆细胞赘生物/多发性骨髓瘤;胸膜肺的胚细胞瘤;妊娠和乳腺癌;妊娠和何杰金氏淋巴瘤;原发的中枢神经系统淋巴瘤;前列腺癌;直肠癌;肾盂和输尿管的移行细胞癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤;唾液腺癌;肿瘤的尤文氏家族;软组织肉瘤;子宫的肉瘤;赛谢综合征;皮肤癌(非黑素瘤);皮肤癌(黑素瘤);默克尔细胞皮肤癌;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;转移性的鳞状细胞癌;原发的隐性的鳞状颈部癌;胃(胃)癌;幕上的原始神经外胚层肿瘤;皮肤 T 细胞淋巴瘤;睾丸癌;胸腺瘤;胸腺瘤和胸腺癌瘤;甲状腺癌;妊娠期的滋养叶瘤;未知原发位点的癌瘤;未知的原发位点的癌;异常儿童期癌;尿道癌;子宫内膜的子宫癌;子宫的肉瘤;阴

道癌；外阴癌；瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症；韦尔姆斯氏瘤；和妇女的癌。

[0078] 根据进一步的实施方式，所述动物是哺乳动物。哺乳动物优选的是人类、黑猩猩、猕猴、长臂猿、猿猴、恒河猴、小鼠、大鼠、猫、狗、马、兔、骆驼、美洲驼、反刍动物、马或猪。优选的反刍动物可以是奶牛、公牛、山羊、绵羊、野牛、水牛、鹿或牡鹿。

[0079] 在进一步的实施方式中，所述药物适合于下列方式施用：肌内地、皮内地、静脉内（例如，通过注射）、皮下地、腹膜内地、胃肠外、表面地、气管内地、耳内地、关节内地、眼内地、局部地、通过贴片（例如，作为皮肤贴片）、通过喷雾（例如，作为鼻部喷雾）、口服地（例如，作为片剂、胶囊、锭剂、糖衣丸）、通过栓剂（例如，作为直肠栓剂或阴道栓剂）、通过滴剂（例如作为滴眼剂）或粘膜地（例如，鼻内地、舌下地，通过漱口或通过吮吸锭剂）。因此，所述药物可以被配制或调制为用于注射的溶液、贴片、喷雾、栓剂、漱口溶液、锭剂或滴剂。施用可以是单剂量的，或根据需求指示，以指导临床医师认为合适的时间间隔多剂量的。皮内的、肌肉内的、皮下的和静脉内的和粘膜的施用是优选的，皮内的施用是特别优选的。

[0080] 根据另一个实施方式，在此上文描述的脂囊泡以容许向患者重复施用的形式来制备。本发明的脂囊泡与其他化合物例如佐剂或免疫刺激剂的组合可以协同地增强总体效果。脂囊泡的数量和类型、刺激的位点、共刺激信号（感染、对过敏原的暴露，等等）确定了总体效果。效果是短暂的，大约在数小时到数周。所实现的效果的持续时间取决于给药数量、给药时间、所选的给药途径、以及所施用的药物的组成。

[0081] 在一个实施方式中，上文在此描述的脂囊泡以一定形式制备，所述形式允许它在个体对病原体的暴露之前和 / 或之后多次施用。理想地，容许在暴露之前和 / 或之后 3-7 天的时间窗口内多次施用的形式的脂囊泡的制备是期望的，容许在暴露之前和 / 或之后 5 天的窗口内多次施用的形式是优选的。特别优选的是脂囊泡的形式，其容许在暴露之前 5 天和暴露之后 5 天的施用窗口内多次施用，换句话说总共 10 天。然而，这个窗口实际上难以规定，因为暴露的确切时间点很少是明确知道的。在这种情况下，施用窗口可以相对于怀疑的或预期的暴露来计算。

[0082] 在进一步的实施方式中，脂囊泡的制剂是这样的，以容许在暴露前和 / 或暴露后的施用窗口内一天一次地施用。然而，脂囊泡可以这样配制，从而容许按需要在施用窗口内更频繁地或更不频繁地施用。例如，脂囊泡可以在暴露前和 / 或暴露后施用窗口内每天一次、两次、三次、四次或五次地施用。同样地，在暴露前和 / 或暴露后施用窗口内不同天的这些施用频率的组合也是可能的。

[0083] 含有上在此上文描述的脂囊泡的药物被配制在药学上可接受的制品中。这些制品通常可以含有药学上可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、兼容载体、补充性免疫增效剂，例如佐剂和细胞因子，以及任选的其他治疗试剂。要施用的脂囊泡的优选数量取决于要预防、治疗和 / 或消除的疾病或紊乱。一般地，从约 1ng/kg 到约 100mg/kg 的剂量被认为是有效的，所述 kg 是指被治疗的动物的体重。优选的范围被认为是约 10ng/kg 到约 10 μ g/kg。绝对数量将取决于多种因素，包括选择用于施用的组合物、施用是在单剂量还是在多剂量中（参见上文）、以及个体患者的参数，包括年龄、机体状况、大小、体重和疾病的阶段。

[0084] 施用的途径和方式将取决于要预防、治疗和 / 或消除的疾病或紊乱的阶段或严重程度而变化，由熟练的医师来确定。含有在此上文描述的脂囊泡的药物一般地适合于胃肠外施用。在此，药物包含溶解或悬浮在可接受的载体、优选的水性载体中的脂囊泡。可以使用

多种水性载体,例如,水、缓冲的水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸等等。这些组合物可以通过常规的公知灭菌技术来灭菌,或可以无菌过滤。产生的水溶液可以被封装来照原样使用,或被冻干,冻干的制品在施用之前与无菌溶液组合。

[0085] 所述在此上文描述的脂囊泡的药物可以另外含有药学上可接受的辅助物质,按照近似的生理条件所需的,例如 pH 值调整和缓冲剂、渗透度调整试剂、润湿剂等等,举例来说,醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、单月桂酸山梨醇酐酯、油酸三乙醇胺酯,等等。制备可胃肠外施用的化合物的实际方法对于本领域技术人员来说是已知的和显而易见的,例如在“雷明顿:药学科学与实践(‘雷明顿药学’)(Remington:The Science and Practice of Pharmacy(“Remington’s Pharmaceutical Sciences”))Gennaro AR 编辑,第 20 版,2000:美国威廉斯·威尔金斯出版公司”中更详细地描述了,通过引用合并在此。

[0086] 含有在此上文描述的脂囊泡的药物可以被配制,从而容许以口服给药形式施用,例如,作为片剂、胶囊(各自包括延时释放和持续释放制剂)、丸剂、粉剂、微粒、酞剂、酞剂、溶液、悬浮液、糖浆和乳剂,或通过注射。例如,对于片剂或胶囊形式的口服施用,活性药物成分可以与口服的、无毒的药学上可接受的惰性载体例如乙醇、甘油、水等等组合。

[0087] 类似地,含有在此上文描述的脂囊泡的药物可以被配制,从而容许静脉内地(通过丸剂或输注方法)、腹膜内、皮下、有或者没有闭塞的表面地或肌肉注射来施用。在优选的实施方式中,根据本发明的用途制备的药物被肌内地、皮下地、皮内地、粘膜地或穿表皮地施用。所有这些形式是药物领域普通技术人员公知的。

[0088] 施用含有在此上文描述的脂囊泡的药物的给药方案根据多种因素来选择,包括例如,物种、年龄、体重、性别和患者的医学状况、要预防、治疗和/或消除的疾病或紊乱的阶段和严重程度,以及采用的脂囊泡的特定类型。普通技术人员的医师可以容易地确定和开处方所需药物的有效量,来防止、对抗或延滞恶性肿瘤或传染性疾病或紊乱的发展。实现处在产生效力而没有毒性或具有可接受的毒性的范围内药物浓度方向的理想精确度,需要基于脂囊泡对目标位点的利用率的动力学的方式。这种过程涉及考虑脂囊泡的分布、平衡和消除,是处于熟练医师的能力之内的,可以在不超出常规实验的情况下解决。

[0089] 含有在此上文描述的脂囊泡的药物的日剂量可以在每成年人每天 10ng/kg 到约 10 μg/kg 的脂囊泡范围内变动。对于口服施用,根据本发明的用途制备的药物优选地以片剂的形式提供,其含有 0.001 到 1,000mg、优选的 0.001、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、10、20、50、100 毫克的脂囊泡,用于在治疗的过程中根据患者的体征和症状来症状性调整剂量。根据本发明的用途的实施方式制备的药物中脂囊泡的有效量通常以约 0.0001mg/kg 到约 50mg/kg 体重每天的剂量水平来提供。更特别地,范围是约 0.0001mg/kg 到 7mg/kg 体重每天。

[0090] 此外,含有在此上文描述的脂囊泡的药物可以被配制,以便容许以鼻内形式、或经由普通技术人员已知的穿表皮途径来施用。如果制剂容许以穿表皮递送系统的形式施用,施用剂量在整个给药方案中将是持续的而不是间歇的。

[0091] 根据本发明的用途制备的药物可以与实现药物的控制释放中有一类可生物降解的聚合物联结,例如,聚乳酸、聚 ε-己内酯、多羟基丁酸、聚正酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯和水凝胶的交联的或两亲的块共聚物。

[0092] 用于表面施用的根据本发明的用途制备的药物的适合的制剂可以是,例如,适合

于向皮肤施用的溶液、乳膏剂、软膏剂、凝胶、洗液、香波、或气雾剂的形式。含有根据本发明的用途制备的药物的这些表面药物组合物通常包括,在与药学上可接受的载体的混合物中,按重量计算约 0.02%到 5%的活性化合物,即,脂囊泡。

[0093] 一般地,包含在此上文描述的脂囊泡的药物一般包含 0.02wt%、0.05wt%、0.08wt%、1wt%、1wt%和 2wt%之间、2wt%、2wt%和 3wt%之间、3wt%、3wt%和 4wt%之间、4wt%、4wt%和 5wt%之间、或 5wt%的脂囊泡。

[0094] 不论施用根据本发明的用途制备的药物的途径,它要以有效量来施用。有效量是药物制品的数量,其单独地或与进一步的药剂一起地,刺激期望的非特异性免疫刺激性反应。

[0095] 此外,当希望或必需时,合适的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂也可以掺入到按照本发明的用途制备的药物中。适合的粘合剂包括,无限制地,淀粉、明胶、天然的糖类例如葡萄糖或 β -乳糖、玉米甜味剂、天然的和合成的胶,例如阿拉伯胶、黄芪胶或海藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇、蜡等等。这些剂型中使用的润滑剂包括,无限制地,油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、醋酸钠、氯化钠,等等。崩解剂包括,无限制地,淀粉、甲基纤维素、琼脂、斑脱土、黄原胶,等等。

[0096] 按照本发明的用途制备的药物的液体形式可以通过悬浮或分散剂来适当地调味,例如合成的和天然的胶,例如,黄芪胶、阿拉伯胶、甲基纤维素,等等。可以采用的其他的分散剂有甘油等。对于胃肠外施用,无菌的悬浮液和溶液是期望的。一般含有适合的防腐剂的等渗的制品,当希望静脉内施用时被采用。含有活性药物成分的表面制品可以与本领域公知的多种载体材料混合,例如,乙醇、芦荟真性凝胶、尿囊素、甘油、维生素 A 或 E 油、矿物油、PPG2 十四烷酰丙酸酯等等,来形成,例如,醇溶液、表面的清洁剂、清洁霜、皮肤凝胶剂、皮肤洗液、以及乳膏剂或凝胶制剂中的香波。

[0097] 在一个实施方式中,按照本发明的用途制备的药物可以进一步包含至少一种佐剂,增强和/或调节免疫反应,例如先天免疫反应, Th1 或 Th2 反应。通过活化巨噬细胞和/或刺激特定的淋巴细胞集,适合的佐剂可以增强免疫学反应。适合的佐剂可以是适合于病原体识别受体 (PRR) 的活化的任何配体。免疫反应强化化合物被分类为佐剂 (在上文所定义的意义) 或细胞因子。佐剂可以通过提供抗原的储备 (细胞外地或巨噬细胞内)、活化巨噬细胞和刺激特定的淋巴细胞集来增强免疫学反应。

[0098] 许多种类的佐剂是本领域公知的;特定的实例包括弗氏 (完全和不完全的) 佐剂、分支杆菌例如 BCG、母牛分枝杆菌 (*M. vaccae*) 或短小棒状杆菌、霍乱毒素或破伤风毒素、大肠杆菌热不稳定毒素、quil 皂角苷混合物例如 QS-21 (SmithKline Beecham)、MF59 (Chiron) 和各种的油/水乳剂 (例如 IDEC-AF)。可以使用的其他佐剂包括,但不限于无机盐或矿物质凝胶,例如氢氧化铝、磷酸铝和磷酸钙;表面活性物质,例如溶血卵磷脂、复合多元醇、聚阴离子、肽、钥孔血蓝素、和二硝基酚,免疫刺激性分子,例如皂角苷、胞壁酰二肽和三肽衍生物,短核酸延伸例如 CpG 二核苷酸、CpG 寡核苷酸、单磷酸基脂质 A 和聚磷腈,颗粒和微粒佐剂,例如乳剂、脂质体、螺旋体或免疫刺激复合佐剂。

[0099] 由于它们的淋巴细胞刺激性质,细胞因子也是有用的。对于这些目的有用的许多细胞因子是本领域普通技术人员已知的,包括白细胞介素 -2 (IL-2)、IL-12、GM-CSF 和许多其它的。此外,来自趋化因子家族的配体,例如 RANTES (活化 T 细胞表达和分泌的调节因

子)、革兰氏阳性细菌的脂蛋白、酵母细胞壁成分、双链 RNA、革兰氏阴性细菌的脂多糖、鞭毛蛋白、富含 U 的单链病毒 RNA、抑制物 6f 细胞因子信号转导小干扰 RNA (SOCS siRNA)、Pan DR 表位 (PADRE) 和其混合物是适合的。

[0100] 对于防上、治疗和 / 或消除癌和 / 或转移,含有在此上文描述的脂囊泡的药物可以被制备,从而容许与为表面施用所采用的药学上可接受的载体一起施用。另外,对于防上、治疗和 / 或消除癌、肿瘤和 / 或转移,或病毒感染,按照本发明的用途制备的药物可以与在治疗这些恶性肿瘤中有用的其他试剂一起使用。对于使用超过一种活性试剂的组合治疗,在活性试剂可以同时施用时,活性试剂可以同时地施用,或它们可以在错开的时间单独地施用。

[0101] 要理解的是,在此上文阐述的各个实施方式的组成要素在本发明的任何特定方面内、以及在本发明的一个或多个方面之间自由地彼此组合。例如,虽然特定实施方式的组成要素可能在脂囊泡用于药物制备的用途的上下文中正式地讨论,容易理解的是,这个实施方式的组成要素可以与该用途的上下文中讨论的其他实施方式的组成要素自由地组合。进一步的,在用途的上下文中讨论的相同组成要素将被理解适合于涉及相同脂囊泡的治疗方法,以及与来自这种治疗方法的上下文中讨论的实施方式的组成要素自由地组合。

[0102] 附图简要说明

[0103] 附图 1 裸的病毒颗粒对小鼠中肿瘤生长的影响。附图显示了在小鼠中监视肿瘤生长的结果,小鼠已经注射了肿瘤细胞,随后每周地注射,两个样品之一:盐水溶液作为对照(空心圆形)以及空的病毒颗粒(实心菱形)。结果显示了,与用对照注射的相比,在实验周期的结束时,用裸的,即空的病毒颗粒注射产生了显著更多的无肿瘤小鼠。

[0104] 附图 2 裸的病毒颗粒对拉克罗斯病毒 (La Crosse virus) 的发展的保护效果。附图显示了监视用拉克罗斯病毒攻击的小鼠的存活率的结果。小鼠在病毒攻击之前注射了四种样品之一:包裹了编码拉克罗斯病毒糖蛋白的 DNA 的病毒颗粒(空心三角形);孔的病毒颗粒(实心菱形);单独的 DNA 载体,所述载体包含表达拉克罗斯病毒糖蛋白的 DNA(空心正方形);单独的 DNA 载体,所述载体缺少表达拉克罗斯病毒糖蛋白的 DNA(空心圆形)。结果表明,与缺少表达拉克罗斯病毒糖蛋白的 DNA 的 DNA 载体对照相比,用裸的病毒颗粒治疗产生了改善的存活率。

[0105] 附图 3A、3B 空的病毒颗粒对问号钩端螺旋体感染的发展的保护效果。附图显示了监视用细菌问号钩端螺旋体攻击的沙鼠的存活率的结果。在细菌攻击之前,沙鼠已经注射了空的流感病毒颗粒(阴影的菱形)。作为阴性对照,攻击“未治疗的”沙鼠(空心圆形)。

[0106] 附图 4 HSV-2 攻击实验的实验设计概观。附图显示了在 HSV-2 的致死攻击之前和之后皮内地和鼻内地多次施用空的病毒颗粒。

[0107] 附图 5A 与 PBS 对照和 HSV 疫苗治疗的小鼠相比,空的病毒颗粒对于 HSV-2 感染的发展中总体存活率的影响。10 只小鼠的组在 0 天用施用到阴道的 HSV-2 G 毒株攻击。皮内地 (“i. d.”, 空心三角形) 和鼻内地 (“i. n.”空心圆形) 施用空的病毒颗粒。接受 PBS 对照的小鼠的存活率以实心菱形显示,在攻击前 34 和 20 天接受 HSV 疫苗的小鼠的存活率以实心正方形显示。结果表明,与 PBS 治疗的、对照治疗的小鼠相比,用空的病毒颗粒治疗产生了改善的存活率。令人惊讶地,在用空的病毒颗粒皮内地治疗的小鼠中观察到的存活率等于在先接受 HSV 特异性疫苗接种的小鼠中观察到的。进一步的,鼻内地接受空的病毒

颗粒的小鼠展现了 25 天存活率,其仅比在先接受 HSV 特异性疫苗接种的小鼠中观察到的低 10%。

[0108] 附图 5B 与 PBS 对照和 HSV 疫苗治疗的小鼠相比,空的病毒颗粒对于 HSV-2 感染的发展中临床分值的影响。10 只小鼠的组在 0 天用施用到阴道的 HSV-2 G 毒株攻击。皮内地 (“i. d.”, 空心三角形) 和鼻内地 (“i. n.”空心圆形) 施用空的病毒颗粒。接受 PBS 对照的小鼠的临床分值以实心菱形显示,在攻击前 34 和 20 天接受 HSV-2 疫苗的小鼠的临床分值以实心正方形显示。结果表明,与对 HSV-2 病毒的暴露(攻击)之后用 PBS 对照治疗的小鼠相比,用空的病毒颗粒治疗的小鼠经历了较低严重的疾病症状。值得注意的,在通过皮内的给药途径接受空的病毒颗粒的小鼠中疾病症状的严重度仅仅稍逊于早先接受 HSV 特异性疫苗的小鼠中的。

[0109] 附图 6 显示了免疫系统的先天和适应性分支之间的某些特征和相互关系的概述图表。

[0110] 提供本发明的特定实施方式和随后的实施例来表现请求权利的发明的效力,而不被解释为限制本发明的范围。对于所提及的特定材料,其仅仅是为了举例的目的,而不是限制本发明。除非另作说明,使用了生物化学和分子生物学的操作,例如在 Voet,《生物化学》(Biochemistry), Wiley, 1990 ;Stryer,《生物化学》, W. H. Freeman, 1995 ;Bodanszky,《肽化学 - 实践手册》,第二版, Springer-Verlag, Berlin, 1993 ;Sambrook 等,《分子克隆》,冷泉港实验室, 2001 ;Ausubel 等编辑,《现代分子生物学技术》(Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons, 2000 中阐述的那些。本领域技术人员可以开发相当的方法或反应物而不运用发明性的能力并且不背离本发明的范围。

[0111] 要理解的是,在此处描述的组合物和操作中可以进行许多改变,而仍然处于本发明的范围内。本发明的意图是,这些改变包括在本发明的范围之内。

[0112] 实施例 1(制备实施例):在制备和工作实施例中使用的试剂

[0113] 试剂:八乙二醇-单-(n-十二烷基)乙醚(OEG, C₁₂E₈) 购自 Fluka Chemie GmbH-(Buchs, Switzerland)。蔗糖(Eur. Phar.) 购自 Merck(Dietikon, Switzerland)。蛋磷脂酰胆碱(PC) 获自 Lipoid(Cham, Switzerland)。1-油酰基-3-棕榈酰-rac-甘油基-2-磷酸乙醇胺获自 Bachem(Bubendorf, Switzerland)。Bio-Beads SM2 购自 Bio-Rad Laboratories(Glattbrugg, Switzerland)。胆甾烯基 N(三甲基铵乙基)氨基甲酸氯化物(TC-chol) 购自 Merck Eprova(Schaffhausen, Switzerland)。

[0114] 流感病毒 A/Singapore/6/86(A/Sing) 毒株和其他流感 A 毒株,在有胚鸡蛋的尿囊腔中增殖(Gerhard, W. (1976),《实验医学杂志》144:985-995), 获自 Berna Biotech AG(Bern, Switzerland), 如 Skehel, J. 等, (1971),《病毒学》44:396 所描述的纯化。根据 Bottcher(Bottcher 等(1961),《分析化学学报》(Anal. Chim. Acta)24, 203) 测定血凝集素/磷脂比例,在用 Ball 描述的 Coomassie 提取方法(Ball(1986),《分析生物化学》(Anal. Biochem.)155, 23) SDS-PAGE 之后的 HA 定量。

[0115] 实施例 2(制备实施例):作为流感病毒颗粒的标准病毒颗粒的制备

[0116] 对于 4ml 的最终体积,32mg 的卵 PC 和 8mg 的 OPPE 溶于 3ml 的 PBS、100mM OEG(PBS/OEG) 中。灭活的流感 A/Singapore/6/86 病毒或另一种流感 A 毒株的 2mg 的 HA 在 100,000×g 在 4℃离心 1 小时,团粒溶解在 1ml 的 PBS/OEG 中。洗涤剂溶解的磷脂和病毒

被混合并超声 1 分钟。这种混合物在 $100,000 \times g$ 在 18°C 离心 1 小时。利用两次 1.5g 湿润的 SM2 Bio-Beads 在室温下各摇动 1 小时,通过除去洗涤剂来形成病毒颗粒。新形成的病毒颗粒然后无菌过滤 ($0.22 \mu\text{m}$)。

[0117] 实施例 3(制备实施例):含有 TC-Chol 的病毒颗粒的制备

[0118] 含有 TC-Chol 的病毒颗粒通过洗涤剂去除方法来制备。对于 4ml 的最终体积,32mg 的卵 PC 和 8mg 的 OPPE 和 5mg 胆甾烯基 N-(三甲基铵乙基)氨基甲酸氯化物 (TC-Chol) 溶于 2.6ml 的 PBS、100mM OEG (PBS/OEG) 中。灭活的流感 A/Singapore/6/86 病毒或另一种流感 A 毒株的 2mg 的 HA 在 $100,000 \times g$ 在 4°C 离心 1 小时,团粒溶解在 1ml 的 PBS/OEG 中。洗涤剂溶解的磷脂和病毒与 0.4ml 的 50% (w/v) 蔗糖混合并超声 1 分钟。该混合物在 $100,000 \times g$ 在 18°C 离心 1 小时。利用两次 1.5g 湿润的 SM2 Bio-Beads 在室温下各摇动 1 小时,通过除去洗涤剂来形成病毒颗粒。新形成的病毒颗粒然后无菌过滤 ($0.22 \mu\text{m}$) 并在无菌的玻璃小瓶中等分。闭合的小瓶在 -70°C 冷冻,然后在 -40°C 20 小时和 10°C 2 小时冻干。闭合的小瓶冷冻保存待用。

[0119] 实施例 4(工作实施例):使用空的病毒颗粒的非特异性免疫刺激降低了小鼠中的肿瘤负荷

[0120] 在用于治疗用途的癌症疫苗的开发的情境中进行了以下实验。疫苗预定在肿瘤已经在机体内发展时施加。意图是病毒颗粒的免疫增强针对肿瘤的特异性免疫反应,到达足以完全消除生长的肿瘤细胞的水平。

[0121] 八到十周龄雌性 C5781/6 小鼠用含有 $1 \mu\text{g}$ 血凝集素的灭活的流感病毒预先免疫,来模拟预先免疫的人中的情况,所述人在生命的某个早期时间天然地感染了流感。三周以后,皮下地注射 10,000 个 B16 肿瘤细胞。两天后,开始使用约 1-25mg 空的病毒颗粒每公斤体重的免疫,每隔一星期地持续 9 周。

[0122] 实验包括两个治疗组。各个相应的组中的小鼠如下地治疗:

[0123] 组 1:磷酸盐缓冲盐水(附图 1 中的“盐水溶液”;空心圆形);

[0124] 组 2:标准(空的)病毒颗粒,由蛋衍生的磷脂和溶解的流感包膜组成(附图 1 中“空的病毒颗粒”;实心菱形)。

[0125] 在治疗期间,紧密地监视动物的肿瘤发展。发展了明显的肿瘤的小鼠被安乐死。因此,研究的读取结果是整个观察期间每个组的无肿瘤小鼠的数量。结果在附图 1 中示出。可以从附图 1 中看出的,用空的病毒颗粒治疗的小鼠的 50% 被显著地保护(附图 1 中的实心菱形;“空的病毒颗粒”),而用盐水对照治疗的小鼠的仅 20% 是无肿瘤的(附图 1 中的空心圆形;“盐水溶液”)。

[0126] 总之,裸的病毒颗粒的施用在显著数量的肿瘤负荷小鼠中引起了肿瘤的根除。

[0127] 实施例 5(工作实施例):使用裸的病毒颗粒的非特异性免疫刺激提高了感染拉克罗斯病毒的小鼠的存活率

[0128] 最初进行该实验来评估病毒颗粒作为针对拉克罗斯病毒的基于 DNA 的疫苗的递送工具。编码拉克罗斯病毒 (VR1012-G1G2) 的病毒糖蛋白的质粒 DNA 被包装到病毒颗粒中,以提高质粒摄取和病毒抗原表达。所施用的对照之一是裸的病毒颗粒。

[0129] 缺少 I 型干扰素受体 (IFNAR-I-/- 小鼠) 的遗传修饰的小鼠对于病毒感染是更敏感的,因而是拉克罗斯病毒的适合的攻击模型。小鼠针对流感来预先免疫以模拟预先免疫

的人类中的情况,该人在生命的某一早先时间天然地感染了流感,原型拉克罗斯病毒疫苗(或以下表明的对照制剂)的单一剂量在十天后施用。在4周后进行200,000传染单位的剂量的活病毒攻击。在感染后24天监视动物的存活率。以下几组被包括在实验中:

[0130] 1. 与病毒颗粒组合的表达拉克罗斯糖蛋白的DNA载体(附图2中“具有DNA疫苗的病毒颗粒”;空心三角形)

[0131] 2. 没有DNA的病毒颗粒(附图2中“空的病毒颗粒”;实心菱形)

[0132] 3. 单独的DNA载体,表达拉克罗斯病毒糖蛋白的载体(附图2中的“单独的DNA疫苗”;空心正方形)

[0133] 4. 单独的DNA载体,不表达拉克罗斯病毒糖蛋白的载体(附图2中的“空的DNA疫苗”;空心圆形)

[0134] 研究的结果在附图2中示出。可以从附图2中看出的,当单独施用时,空的病毒颗粒提供了与表达拉克罗斯病毒糖蛋白的DNA载体同样好的保护。在每种情况下,60%的动物被保护。比较起来,接受DNA载体加病毒颗粒的组显示了70%的保护率。作为阴性对照,施用了不表达拉克罗斯病毒糖蛋白的DNA载体。这仍然产生了30%的保护率。

[0135] 免疫和攻击之间的三周间隔是适应性免疫的发展所必需的,但是它可能不太适合评定裸的病毒颗粒显现的非特异性保护效果。尽管这种不太适合的施用,然而,虽然不像包裹了拉克罗斯病毒衍生的DNA的病毒颗粒一样有效,使用裸的(即空的)病毒颗粒的初次免疫仍然引发了与对照相比足以改善存活率达约30%的非特异性免疫刺激效果。

[0136] 实施例6(工作实施例):使用裸的病毒颗粒的非特异性免疫刺激提高了感染细菌问号钩端螺旋体的沙鼠的存活率

[0137] 实验在开发针对问号钩端螺旋体的预防性疫苗的情境中进行。使用了两种不同攻击剂量的问号钩端螺旋体。病毒颗粒如实施例2中所列的来制备(“空的流感病毒颗粒”)。

[0138] 在用活的细菌攻击前两周免疫沙鼠。如独立的附图3A和3B中标明的,用不同剂量的病原体进行攻击。

[0139] 1. 阴性对照:未治疗的动物(附图3A和3B中的阴性对照;空心圆形)

[0140] 2. 空的病毒颗粒(附图3A和3B中“空的流感病毒颗粒”;阴影菱形)

[0141] 结果在附图3A和3B中示出。从附图3A和3B可以看出,虽然没有动物幸免于细菌感染,预先用空的病毒颗粒治疗的动物比未治疗的对照动物生存更久。

[0142] 实施例7(工作实施例):使用裸的病毒颗粒的非特异性免疫刺激提高了感染单纯性疱疹病毒2(“HSV-2”)的小鼠中疾病的存活率并降低了严重度

[0143] 进行实验来评估和确认流感病毒颗粒对于传染性疾病的非特异性保护效果,所述传染性疾病与病毒颗粒的抗原成分是完全不相关的。在当前的实验中,HSV-2被用作攻击病原体。实验方案基于在小鼠中对单纯性疱疹病毒2型(HSV-2)建立的攻击模型。所有实验中使用的小鼠是在实验开始时6-8周龄的BALB/c小鼠。

[0144] 当前实验中使用的病毒颗粒是如上文的实施例2中的描述制备的。实验的途径包括每天的临床分值和存活率。病毒颗粒的保护效果通过接受病毒颗粒的组和接受磷酸盐缓冲盐水的对照治疗(“PBS”)的组来比较。此外,HSV-2攻击包括阳性对照组,其接受常规的减毒活疫苗,所述减毒活疫苗被设计以诱导具有已知保护效果的特异性(适应性的)免疫。

[0145] 在特异性疫苗的情况中,已经重复地展现了病毒颗粒的佐剂效果通过先存的免疫被实质上增强。因而,决定在所有实验中使用预先免疫的动物。为此,在用重悬浮在 PBS 中含有 $1\mu\text{g}$ HA 的纯化的灭活流感病毒肌肉注射攻击之前 4 周免疫动物。如在实施例 4 中说明的,当前实验中的小鼠也用含有 $1\mu\text{g}$ 血凝集素的灭活的流感病毒预先免疫,来模拟预先免疫的人中的情况,所述人在生命的某个早期时间天然地感染了流感。

[0146] 病毒颗粒应用的时机是基于该假定,病毒颗粒提供的非特异性保护效果很可能是短暂的。在用 HSV-2 攻击之前和之后短期的重复施用,因而似乎是检测非特异性效果的最合理的方法。同时,所选择的病毒颗粒施用和 HSV-2 攻击之间的选定时间间隔(5 天或更短)对于完全强化针对流感的特异性免疫(7-14 天)是明显太短的,从而排除了随后的分析中观察到的任何效果可能归因于由于病毒颗粒 HA 蛋白质的针对流感的特异性免疫的可能性。应用的病毒颗粒剂量从 20 到 40 微克 HA,代表了对于所选的应用途径技术上可能的接近最大剂量。

[0147] 用于疫苗对照小鼠的活的减毒疫苗根据早先建立的时间表和剂量来施用。在研究的第 0 天用 8,000 噬斑形成单位(“pfu”)的减毒 HSV KOS 株在小鼠的右爪垫中两次皮内地免疫小鼠,在第 14 天用 400,000 pfu 强化。这些动物不针对流感预先免疫,以免特异性免疫的可能的干扰。攻击前一周,所有的组接受 5 mg 醋酸甲羟孕酮(Depo Provera 150, Pfizer)的髂腹股沟下注射来阻断它们的月经周期。

[0148] 在第 34 天,所有小鼠用 $10\mu\text{l}$ 体积施用到阴道致死病毒剂量(1000pfu)的 HSV-2 G 毒株来攻击,随后每天记录临床症状和存活率。

[0149] 用病毒颗粒或 PBS 对照治疗的概述在附图 4 中示出。如附图 4 所示,小鼠在 HSV-2 挑战自己之前和之后接受总共五剂空的病毒颗粒或 PBS 对照。特别地,在 HSV-2 攻击前施用空的病毒颗粒或 PBS 对照一次,而其余四次在攻击之后施用。在甲苯噻嗪(Xylazine)的镇静($0.3\text{mg}/\text{动物}$)下进行鼻内的应用, $10\mu\text{l}$ 施加到每个鼻孔中,对于每次鼻内的应用总共 $20\mu\text{g}$ HA 的剂量。每次皮内应用包括含有 $40\mu\text{g}$ HA 的 $40\mu\text{l}$ 注射。

[0150] 在攻击之后,每天观察动物,根据公开的计分方案(Natuk 等(2006),《病毒学杂志》80(9),4447-57)对每个动物分配临床分值。临床计分方案如下在表 1 中示出,更高的临床分值等级表明更严重的疾病症状,更低的临床分值等级表明较低严重的疾病症状。

[0151] 表 1:根据 Natuk 等(2006)的临床计分方案

[0152]

症状	临床分值
没有疾病病征	0
阴道的红斑	1
阴道的红斑和水肿	2
阴道的疱疹病变	3

生殖器溃疡,毛发损失,一侧麻痹	4
双侧性的麻痹或死亡	5

[0153] 显示麻痹的垂死动物进行安乐死。攻击后 25 天观察动物。随后分析原始数据中对于存活率和每天的临床分值的组间差异。利用 Wilcoxon 秩和检验进行统计分析,例如在 " Statistische Prinzipien fiir medizinische Projekte " (" Statistical principles for medical projects "), J. Husler & H. Zimmermann ;第 4 版,2006 ;Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern ;116-121 页中公开的。

[0154] 关于以下几组的小鼠在攻击后 0-25 天的存活率的结果在附图 5A 中示出 :

[0155] 1. 接受 PBS 对照的小鼠 (附图 5A 中 "PBS" ;实心菱形) ;

[0156] 2. 接受活的减毒 HSV 特异性疫苗的小鼠 (附图 5A 中的 "疫苗 (HSVKOS)" ;实心正方形) ;

[0157] 3. 通过皮内的给药途径接受空的病毒颗粒的小鼠 (附图 5A 中 "病毒颗粒皮内施用" ;空心三角形) ;和

[0158] 4. 通过鼻内途径施用接受空的病毒颗粒的小鼠 (附图 5A 中 "病毒颗粒鼻内施用" ;空心圆形)。

[0159] 附图 5A 清楚地显示了,在 HSV 攻击之后 PBS 治疗的对照小鼠的 25 天存活率仅是 50%,而 HSV 疫苗治疗的小鼠的是 100%,令人惊讶地,经由皮内的途径施用裸的病毒颗粒在 25 天时产生了针对 HSV 感染的 100% 的存活率,这相当于 HSV 特异性预先免疫所提供的保护。经由鼻内途径施用的空的病毒颗粒提供的保护仅是稍差的,在 90%。总的说来,然后,可以断定的是,空的 / 裸的病毒颗粒能够提供针对疾病的保护,所述疾病不与病毒颗粒之中或之上包含的病毒包膜蛋白相关 ;即,空的 / 裸的病毒颗粒能够引发非特异性的免疫强化。进一步的,所引发的免疫增强的量是特异性的预先免疫所提供的相同量的。

[0160] 在附图 5A 的情境中与如上所述的同组小鼠的临床分值相关的结果在附图 5B 中示出。附图 5B 清楚地显示了,在 HSV 攻击之后 PBS 治疗的对照小鼠的 25 天临床分值是约 3.5 (更严重的),而 HSV 疫苗治疗的小鼠的是稍微超过 1 (较不严重的)。重要地,相对于 PBS 治疗的对照小鼠,皮内施用的空的病毒颗粒降低了疾病症状的严重度,几乎达到与早先用 HSV 特异性疫苗治疗的小鼠相应的水平。相比之下经由鼻内途径施用接受空的病毒颗粒的小鼠经历了疾病症状,其严重度仅稍微低于 PBS 对照治疗的小鼠所经历的。因此看起来,与空的病毒颗粒的鼻内施用相比,空的病毒颗粒的皮内的施用具有更强力的免疫增强效果。

[0161] 总的说来,可以断定的是,相对于也感染 HSV 但接受 PBS 对照而不是裸的病毒颗粒的小鼠,空的病毒颗粒的皮内的和鼻内的施用提高了小鼠中对 HSV 感染的存活率,降低了小鼠中这种感染的严重度。这种非特异性保护效果通过两种测量皮内地施用空病毒颗粒比鼻内地施用空病毒颗粒更大,利用皮内施用的病毒颗粒实现的保护效果相当于或仅稍微低于特异性 HSV 疫苗所实现的。这种保护是非特异性的,因为施用的空病毒颗粒带有来自流感的病毒包膜蛋白 (HA),而没有 HSV 特异性抗原。最后,要注意的是,上述实验中使用的攻击剂量相应于 1 LD₅₀ ("50%致死量",意味着此时的剂量下 50% 的动物预计死亡)。更高

的攻击剂量或更强毒攻击毒株可以产生更明显的结果。另外,空的病毒颗粒的应用的剂量和时间表是推测的。因此,观察到的保护效果可能不反映空的病毒颗粒的完全的保护潜力。

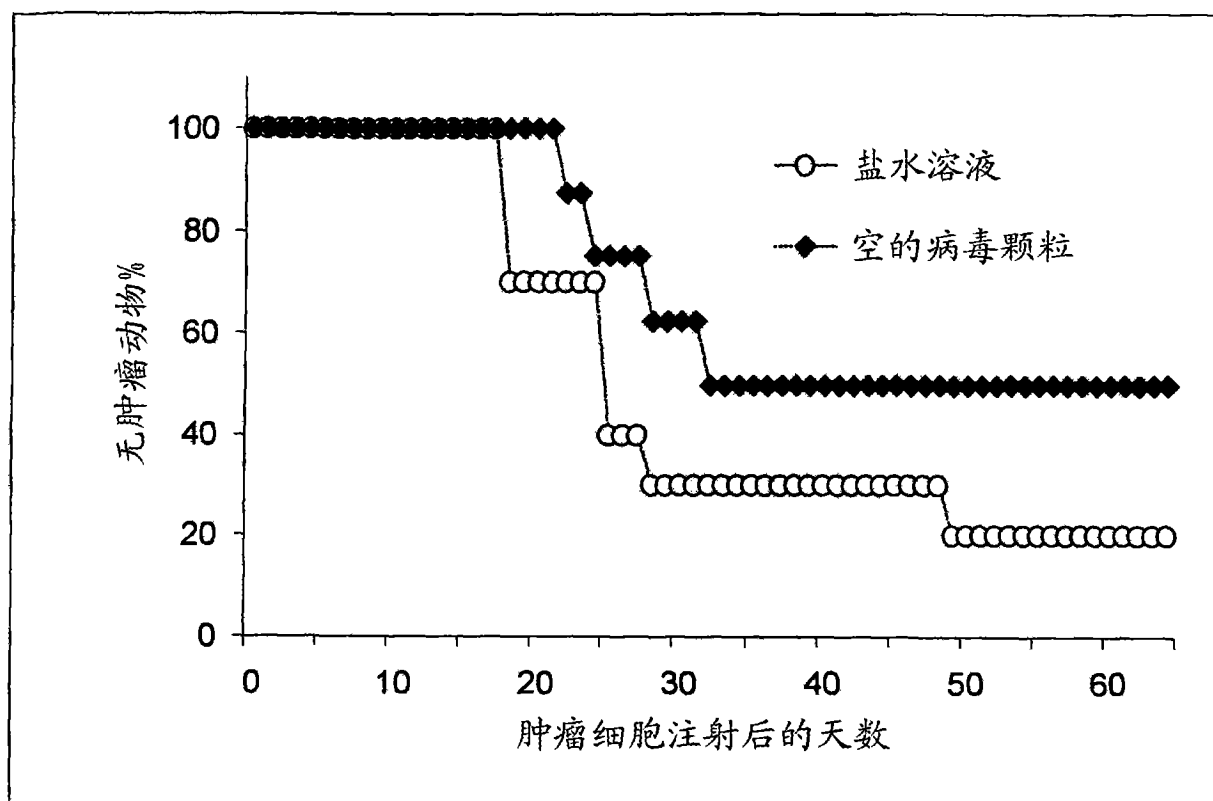


图 1

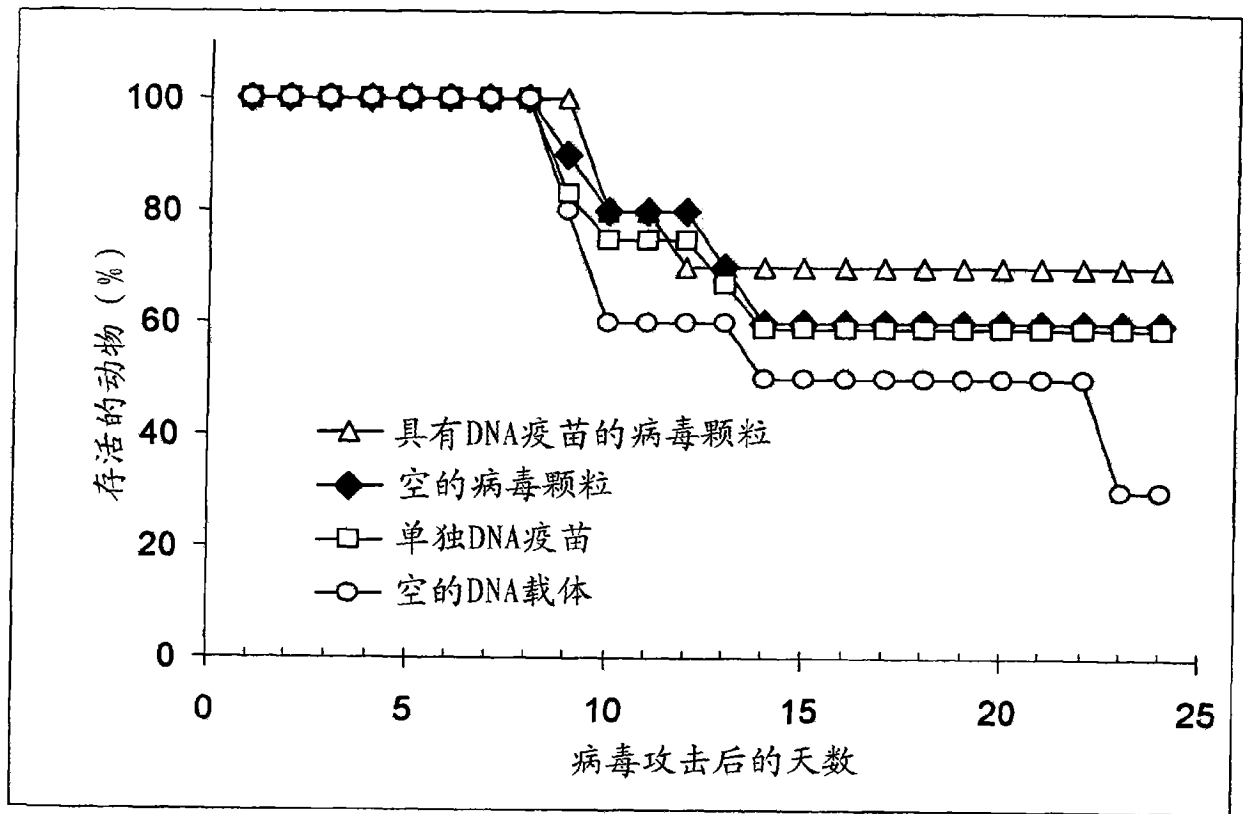


图 2

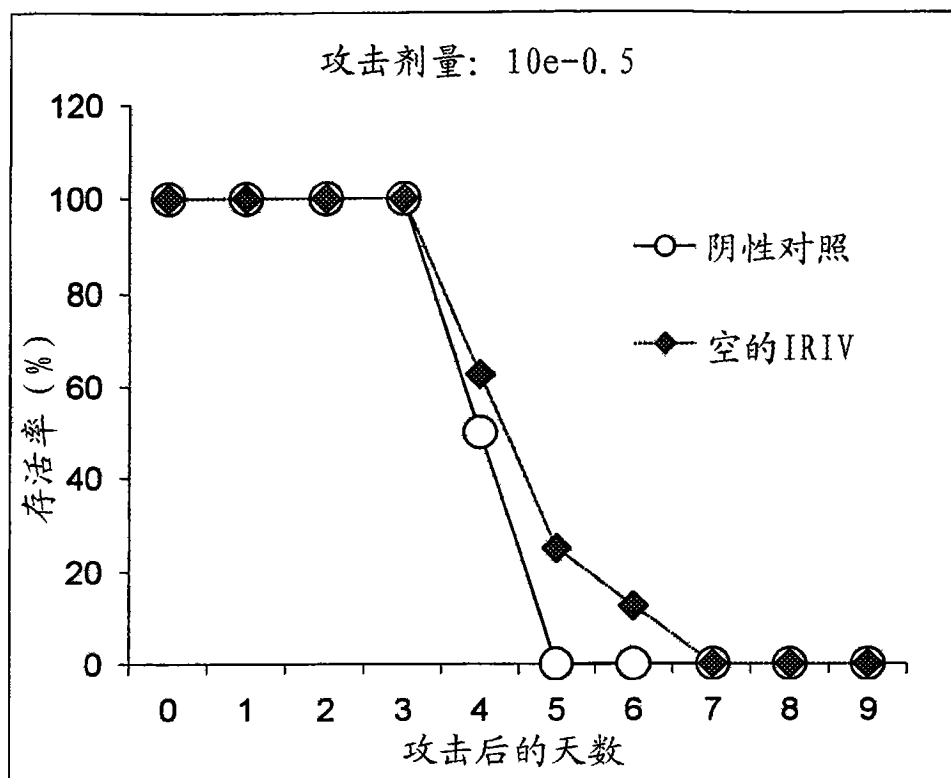


图 3A

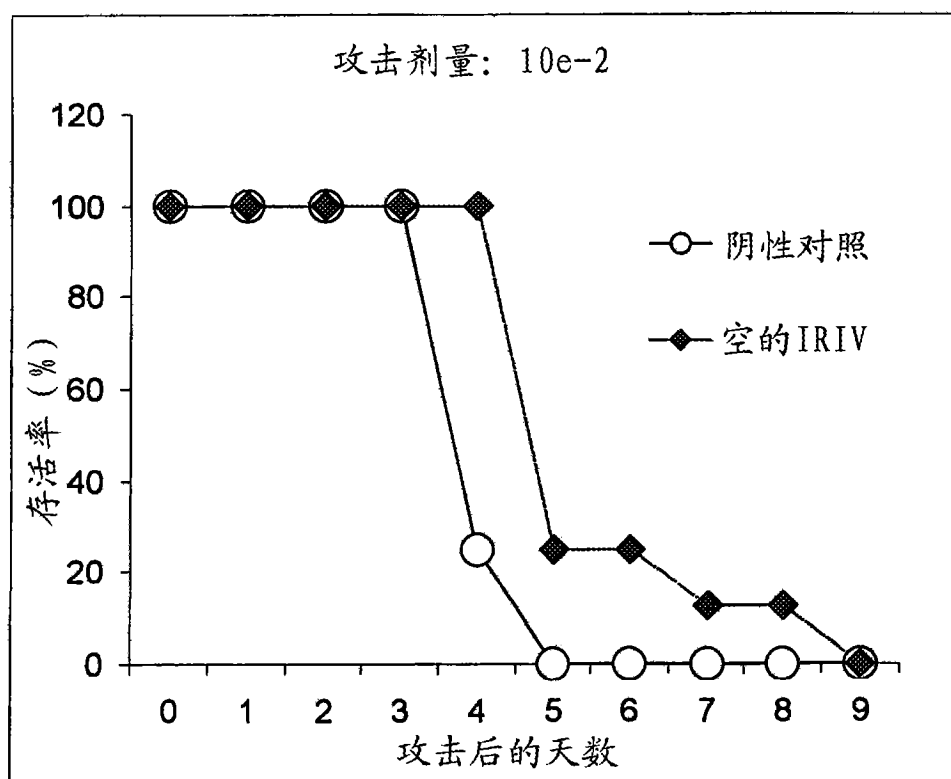


图 3B

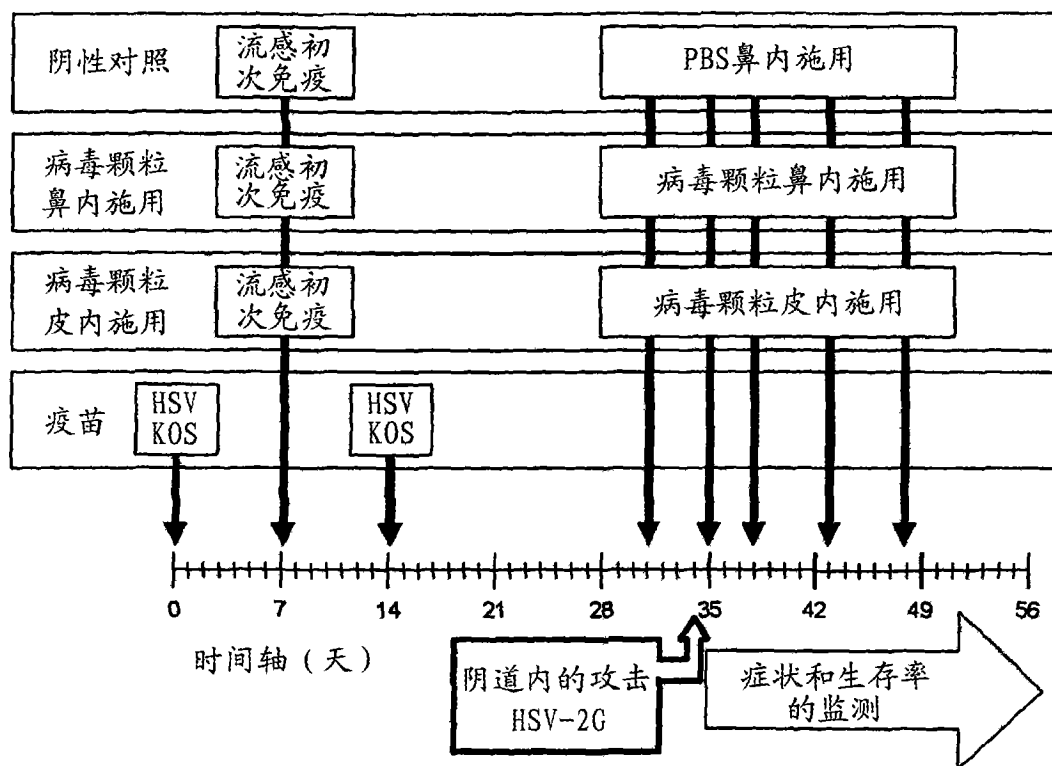


图 4

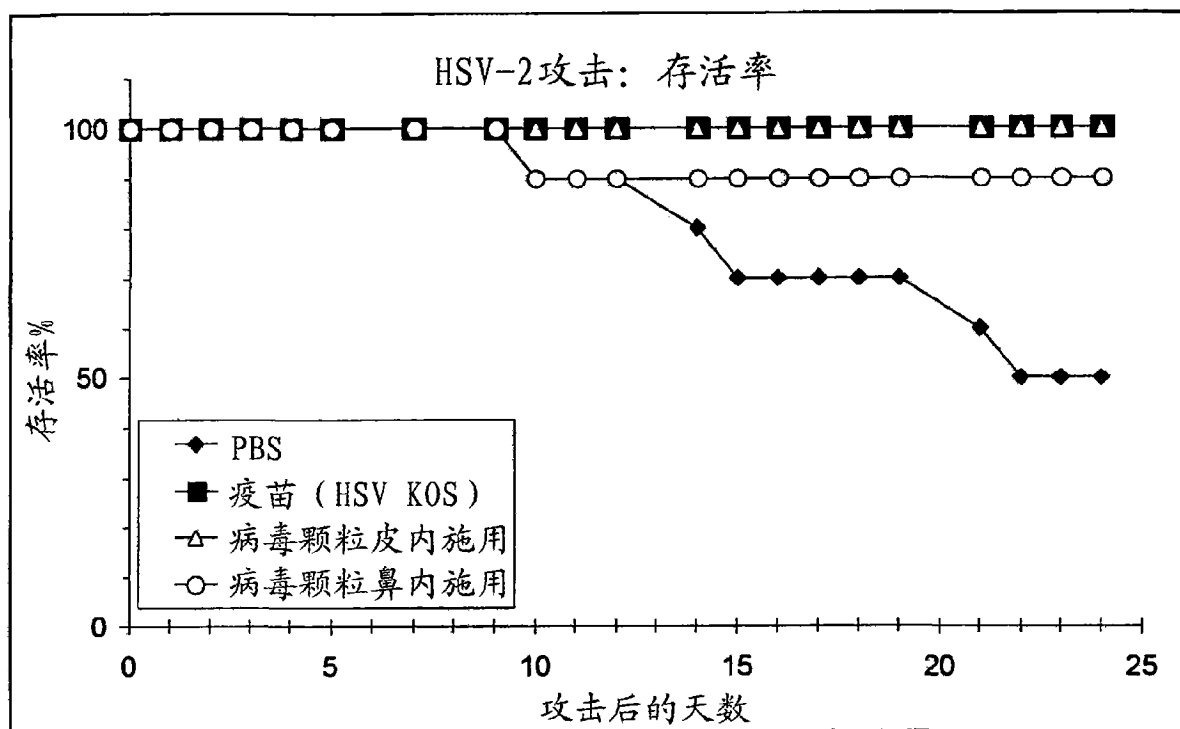


图 5A

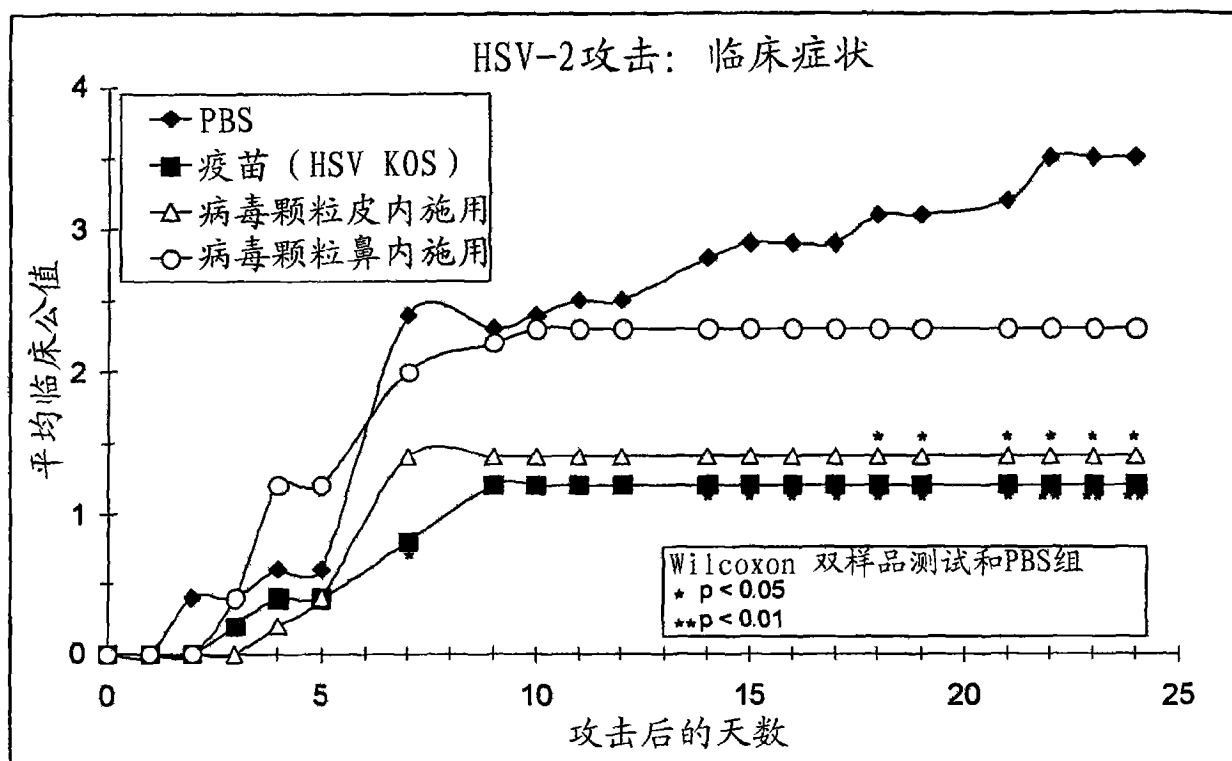


图 5B

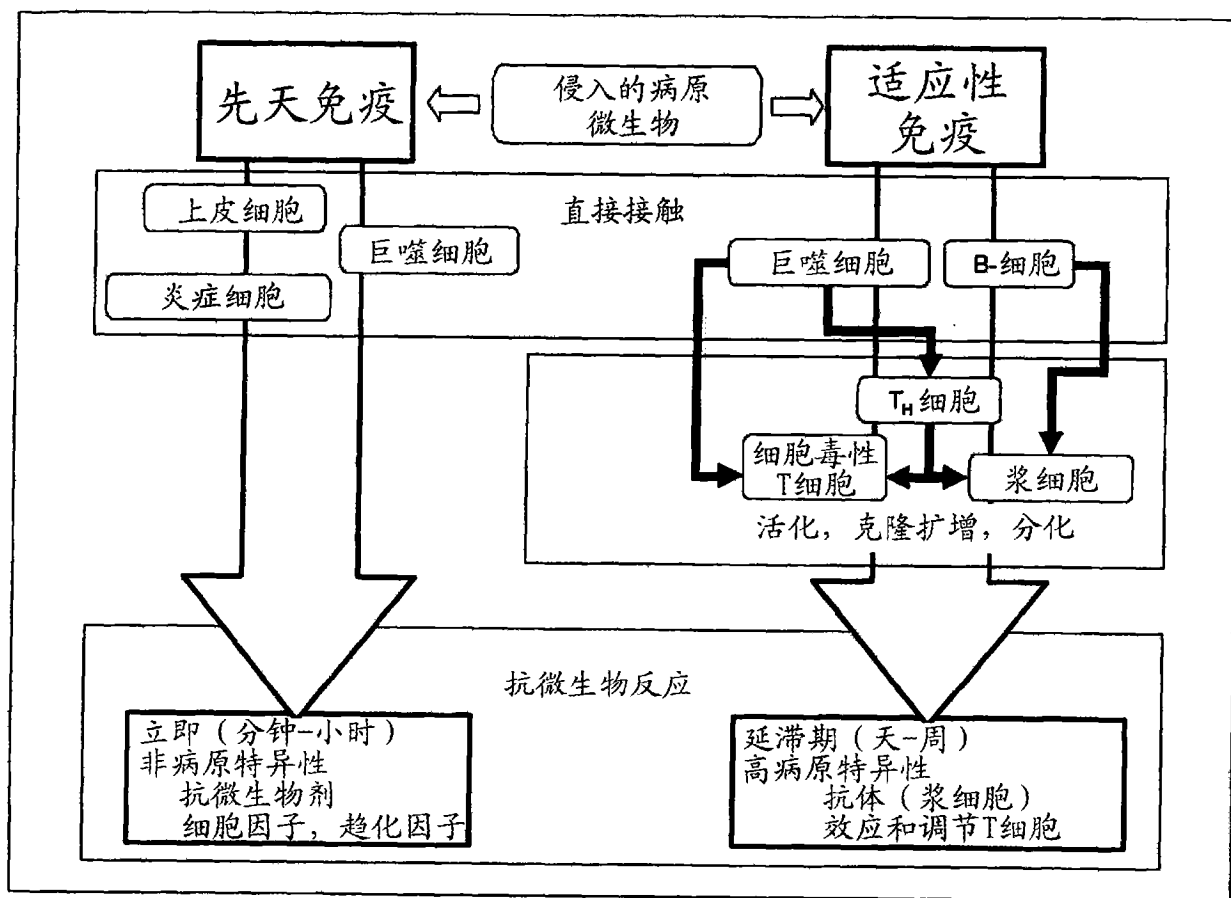


图 6