



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109172819 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810841490.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2012.07.27

A61K 39/39(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 47/59(2017.01)

61/513,527 2011.07.29 US

A61K 47/64(2017.01)

61/513,496 2011.07.29 US

A61K 39/385(2006.01)

61/513,526 2011.07.29 US

A61P 37/04(2006.01)

(62)分案原申请数据

201280037441.8 2012.07.27

(71)申请人 西莱克塔生物科技公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 大卫·H·阿尔特罗伊特

康林·奥尼尔 彼得·伊雷因斯基

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 彭鲲鹏 郑斌

权利要求书2页 说明书53页

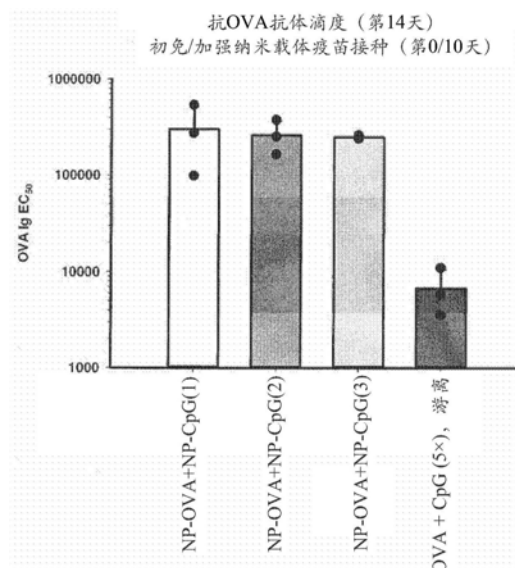
序列表1页 附图7页

(54)发明名称

产生体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的合成纳米载体

(57)摘要

本申请涉及产生体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的合成纳米载体。披露了用于在一名受试者中产生体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的方法和相关组合物。



1. 一种方法,包括:

鉴别需要对一种第一蛋白质的一种体液和细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 免疫应答的一名受试者,和

向该受试者给予一种组合物,该组合物包含被偶合到该第一蛋白质的一群合成纳米载体;

其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸。

2. 一种方法,包括:

向该受试者给予一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体;

其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,并且其中该组合物根据一种疫苗接种方案给予。

3. 一种方法,包括:

向该受试者给予一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体;

其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,并且其中该组合物根据一种方案给予,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

4. 如权利要求2或3所述的方法,其中该方法进一步包括鉴别需要对该第一蛋白质的一种体液和细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 免疫应答的一名受试者。

5. 如权利要求1或3所述的方法,其中该组合物根据一种疫苗接种方案给予。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其中该组合物根据一种方案给予,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中该组合物以有效产生对该第一蛋白质的一种体液和CTL免疫应答的量给予。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中该组合物进一步包含一种或多种佐剂。

9. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括给予一种或多种佐剂。

10. 如权利要求8或9所述的方法,其中该一种或多种佐剂包括模式识别受体的刺激剂或激动剂、矿物盐、明矾、与肠细菌的单磷酸脂质 (MPL) A组合的明矾、**MPL®** (AS04)、AS15、皂甙、QS-21、Quil-A、ISCOM、ISCOMATRIX™、MF59™、**Montanide®** ISA 51、**Montanide®** ISA 720、AS02、脂质体和脂质体配制品、AS01、合成的或特别制备的微颗粒和微载体、淋病奈瑟菌或沙眼衣原体的源于细菌的外膜泡、壳聚糖颗粒、贮存形成剂、**Pluronic®**嵌段共聚物、特异性修饰或制备的肽、胞壁酰二肽、氨基烷基氨基葡萄糖苷4-磷酸酯、RC529、细菌类毒素、毒

素片段、Toll样受体2、3、4、5、7、8、9的激动剂和/或其组合；腺嘌呤衍生物；免疫刺激DNA；免疫刺激RNA；咪唑并喹啉胺、咪唑并吡啶胺、6,7-稠合环烷基咪唑并吡啶胺、1,2-桥接咪唑并喹啉胺；咪喹莫特；瑞喹莫德；DC表面分子CD40的激动剂；I型干扰素；聚I:C；细菌脂多糖(LPS)；VSV-G；HMGB-1；鞭毛蛋白或其部分或衍生物；包含CpG的免疫刺激DNA分子；从坏死细胞释放的促发炎刺激物；尿酸盐晶体；补体级联的活化组分；免疫复合物的活化组分；补体受体激动剂；细胞因子；或细胞因子受体激动剂。

## 产生体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的合成纳米载体

[0001] 本申请是申请日为2012年7月27日、申请号为“201280037441.8”、发明名称为“产生体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的合成纳米载体”的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请PCT/US2012/048670的中国国家阶段申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请在35U.S.C.§119下要求各自于2011年7月29日提交的美国临时申请61/513,496、61/513,526以及61/513,527的权益,其中每一项的全部内容通过引用结合在此。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及用于在受试者中产生体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的方法和相关组合物。通常,用合成纳米载体组合物产生体液和CTL免疫应答,这些合成纳米载体组合物包含一种蛋白质,该蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位。

### 背景技术

[0005] 经典地,疫苗已经促进了一个部分的免疫系统,例如产生由对一种抗原的抗体组成的一种体液免疫应答,或可替代地,活化对一种抗原的一种CTL应答。额外地,常规疫苗通常不以最佳方式靶向感兴趣的细胞(如APC)的作用位点。需要用于最佳地有效地活化这些部分的免疫系统以有效地产生免疫应答和/或减少脱靶效应和毒性的方法和组合物。

### 发明内容

[0006] 在此提供了用于在一名受试者中产生体液和CTL免疫应答的方法和相关组合物。在一个方面,提供了一种方法,该方法包括鉴别需要对一种第一蛋白质的一种体液和CTL免疫应答的一名受试者,和向该受试者给予一种组合物,该组合物包含被偶合到该第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸。在另一个实施例中,DLS分布的平均值通过在此提供的这种方法的实例中的任一者测定。此类实例在下文进行更详细描述。在一个实施例中,该组合物以有效产生对该第一蛋白质的一种体液和CTL免疫应答的量给予。

[0007] 在另一个方面,提供了一种方法,该方法包括向该受试者给予一种组合物,该组合物包含一群被偶合到一种第一蛋白质的合成纳米载体;其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,并且其中

该组合物根据一种疫苗接种方案给予。

[0008] 在另一个方面,提供了一种方法,该方法包括向该受试者给予一种组合物,该组合物包含一群被偶合到一种第一蛋白质的合成纳米载体;其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位;其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,并且其中该组合物根据一种方案给予,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

[0009] 在一个实施例中,在此提供的这些方法进一步包括鉴别需要对该第一蛋白质的一种体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的一名受试者。在另一个实施例中,该组合物根据一种疫苗接种方案给予。在又一个实施例中,该组合物根据一种方案给予,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

[0010] 在另一个实施例中,该组合物进一步包含一种或多种佐剂。在另一个实施例中,该方法进一步包括给予一种或多种佐剂。在另一个实施例中,该一种或多种佐剂包括模式识别受体的刺激剂或激动剂、矿物盐、明矾、与肠细菌的单磷酸脂质(MPL)A组合的明矾、MPL®(AS04)、AS15、皂甙、QS-21、Quil-A、ISCOM、ISCOMATRIX™、MF59™、Montanide® ISA 51、Montanide® ISA 720、AS02、脂质体和脂质体配制品、AS01、合成的或特别制备的微颗粒和微载体、淋病奈瑟菌(N.gonorrhoeae)或沙眼衣原体的源于细菌的外膜泡、壳聚糖颗粒、贮存形成剂、Pluronic®嵌段共聚物、特异性修饰或制备的肽、胞壁酰二肽、氨基烷基氨基葡萄糖苷4-磷酸酯、RC529、细菌类毒素、毒素片段、Toll样受体2、3、4、5、7、8、9的激动剂和/或其组合;腺嘌呤衍生物;免疫刺激DNA;免疫刺激RNA;咪唑并喹啉胺、咪唑并吡啶胺、6,7-稠合环烷基咪唑并吡啶胺、1,2-桥接咪唑并喹啉胺;咪喹莫特;瑞喹莫德;DC表面分子CD40的激动剂;I型干扰素;聚I:C;细菌脂多糖(LPS);VSV-G;HMGB-1;鞭毛蛋白或其部分或衍生物;包含CpG的免疫刺激DNA分子;从坏死细胞释放的促发炎刺激物;尿酸盐晶体;补体级联的活化组分;免疫复合物的活化组分;补体受体激动剂;细胞因子;或细胞因子受体激动剂。在又一个实施例中,该一种或多种佐剂包括Toll样受体2、3、4、7、8或9的激动剂。在再另一个实施例中,该一种或多种佐剂包括一种咪唑并喹啉或氧代腺嘌呤。在一个实施例中,该咪唑并喹啉包括瑞喹莫德或咪喹莫特。

[0011] 在另一个实施例中,该一种或多种佐剂被偶合到该群合成纳米载体的这些合成纳米载体。

[0012] 在再另一个实施例中,该组合物进一步包含另一群合成纳米载体或该方法进一步包括给予另一群合成纳米载体,并且该一种或多种佐剂被偶合到该另一群合成纳米载体的这些合成纳米载体。

[0013] 在另一个实施例中,该一种或多种佐剂不被偶合到一种合成纳米载体。

[0014] 在另一个实施例中,该组合物进一步包含一种或多种额外的抗原或该方法进一步包括给予一种或多种额外的抗原。在一个实施例中,该一种或多种额外的抗原包括至少一个体液表位和/或至少一个MHC I类限制性表位。在另一个实施例中,该一种或多种额外的抗原包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至

少一个MHC I类限制性表位不是相同表位。在一个实施例中,该一种或多种额外的抗原包括一种第二蛋白质。在另一个实施例中,该一种或多种额外的抗原包括一个体液表位和/或一个MHC I类限制性表位。在再另一个实施例中,该一种或多种额外的抗原包括一个体液表位和一个MHC I类限制性表位。在又另一个实施例中,该一种或多种额外的抗原包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位。

[0015] 在一个实施例中,该一种或多种额外的抗原被偶合到这些合成纳米载体。

[0016] 在另一个实施例中,该组合物进一步包含另一群合成纳米载体或该方法进一步包括给予另一群合成纳米载体,并且该一种或多种额外的抗原被偶合到该另一群合成纳米载体的这些合成纳米载体。

[0017] 在再另一个实施例中,该一种或多种额外的抗原不被偶合到一种合成纳米载体。

[0018] 在一个实施例中,这些合成纳米载体和/或其他合成纳米载体包括一种聚合纳米颗粒、一种金属纳米颗粒、一种树枝状聚合物、一种巴克球、一种纳米线、一种病毒样颗粒或一种肽或蛋白质颗粒。在另一个实施例中,这些合成纳米载体和/或其他合成纳米载体包括一种或多种聚合物。在又另一个实施例中,该一种或多种聚合物包括一种聚酯、聚氨基酸、聚碳酸酯、聚缩醛、聚缩酮、多糖、聚乙基噁唑啉或聚乙烯亚胺。在再另一个实施例中,该一种或多种聚合物包括一种聚酯。在一个实施例中,该聚酯包括一种聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或聚己内酯。在另一个实施例中,该聚酯被偶合到一种聚醚。在又另一个实施例中,该聚醚包括聚乙二醇。

[0019] 在一个实施例中,该第一蛋白质和/或一种或多种额外的抗原是与癌症、一种感染或传染病或一种非自身免疫或退行性疾病相关的抗原。在另一个实施例中,该第一蛋白质和/或一种或多种额外的抗原是与人类免疫缺陷性病毒(HIV)、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染相关的抗原。

[0020] 在另一个实施例中,该受试者患有或有风险患有癌症、一种感染或传染病或一种非自身免疫或退行性疾病。在又另一个实施例中,该受试者患有或有风险患有HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染。

[0021] 在再另一个实施例中,所产生的这些体液和CTL免疫应答是临床上有效的。在一个实施例中,这些免疫应答可在该受试者中有效治疗或预防癌症、一种感染或传染病或一种非自身免疫或退行性疾病。在另一个实施例中,这些免疫应答可在该受试者中有效治疗或预防HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染。

[0022] 在一个实施例中,该组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。

[0023] 在另一个实施例中,该组合物是无菌的。

[0024] 在另一个实施例中,该组合物从一种冻干形式复水。

[0025] 在另一个方面,提供了一种剂型,该剂型包含所提供的这些组合物中的任一者。

[0026] 在又另一个方面,提供了一种疫苗,该疫苗包含所提供的这些组合物和剂型中的任一者。

[0027] 在又另一个实施例中,该组合物通过静脉内、经口、皮下、经肺、鼻内、皮内、经粘膜、粘膜内或肌肉内给予来给予。

[0028] 在再另一个方面,提供了一种方法,该方法包括将在此提供的这些组合物中的任一者给予一名对其有需要的受试者。在一个实施例中,该受试者是一名人类。在另一个实施例中,该受试者患有或有风险患有癌症。在再另一个实施例中,该受试者患有或有风险患有一种感染或传染病。在又另一个实施例中,该受试者患有或有风险患有一种非自身免疫或退行性疾病。在又另一个实施例中,该受试者患有或有风险患有HIV。在另一个实施例中,该受试者患有或有风险患有疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种α病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染。

[0029] 在这些在此提供的方法中的任一者的一个实施例中,所提供的这些组合物中的任一者可以根据一种疫苗接种方案向一名受试者(如一名人类)给予。

[0030] 在该在此提供的方法中的任一者的另一个实施例中,所提供的这些组合物中的任一者可以根据一种方案向一名受试者给予,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

[0031] 在另一个方面,所提供的这些方法中的任一者可以进一步包括评估该受试者中的该体液和CTL免疫应答。用于评估该体液和CTL免疫应答的这些方法可以是在此提供的这些方法中的任一者。

[0032] 在又另一个方面,提供了一种方法,该方法包括制备在此提供的这些组合物中的任一者和评估一种体液和CTL免疫应答的产生。在一个实施例中,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的合成纳米载体,该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位。在另一个实施例中,被偶合到该第一蛋白质的该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂和/或该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸。

[0033] 在一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于治疗或预防中。

[0034] 在另一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于在此提供的这些方法中的任一者中。

[0035] 在又一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于疫苗接种中。

[0036] 在再另一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于在一名受试者中对该第一蛋白质产生一种体液和CTL免疫应答。在一个实施例中,这些免疫应答是临床上有效的。在另一个实施例中,这些免疫应答可各自有效获得针对一种疾病的免疫性。

[0037] 在另一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于治疗或预防以下的一种方法中:癌症、一种感染或传染病、一种非自身免疫或退行性疾病、HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染。

[0038] 在再另一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于一种治疗或预防方法中,该方法包括通过静脉内、经口、皮下、经肺、鼻内、皮内、经粘膜、粘膜内或肌肉内给予来给予。

[0039] 在又一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于制造一种药剂(例如一种疫苗),用于在此提供的这些方法中的任一者中。

[0040] 在另一个方面,提供了一种组合物,该组合物如关于在此提供的这些组合物或方法中的任一者定义而使用,其中该组合物是在此提供的这些组合物中的任一者。

## 附图说明

[0041] 图1示出了在一个初免与一个加强(在第28天)疫苗接种方案之后第12、26、43以及



57天产生的抗体滴度。

[0042] 图2示出了在一个初免与一个加强(在第14天)疫苗接种方案之后第26和34天产生的抗体滴度。

[0043] 图3示出了被偶合到卵白蛋白(OVA)的合成纳米载体对局部记忆CTL应答的诱导。

[0044] 图4示出了被偶合到卵白蛋白的合成纳米载体对中心CTL应答的诱导。

[0045] 图5示出了具有卵白蛋白和佐剂的合成纳米载体组合物对中心CTL诱导的诱导。

[0046] 图6示出了在一个初免与两个加强(在第14和28天)疫苗接种方案之后第25和42天产生的抗体滴度。

[0047] 图7示出了由NC-R848+NC-OVA在单次注射之后产生的抗体滴度。示出了每个实验组的单独的滴度和平均值。纳米载体=NC=NP。

[0048] 图8示出了在用NC-R848+NC-OVA单次免疫之后的体内特异性细胞毒性。示出了每个组的平均值与标准偏差。

[0049] 图9示出了在用携带CpG与OVA的纳米载体对比游离CpG(5×)与OVA(5×)免疫后的抗卵白蛋白抗体滴度。

[0050] 图10示出了通过用携带CpG与OVA的纳米载体对比游离CpG(5×)与OVA(5×)免疫在引流淋巴结和脾脏中对OVA特异性CTL应答的诱导。

[0051] 图11示出了在用携带CpG与OVA的纳米载体对比游离CpG(5×)与OVA(5×)免疫后的全身地诱导的体外OVA特异性CTL的扩增。左侧Y轴(暗条纹条):SIINFEKL(SEQ ID NO:1)特异性CD8<sup>+</sup>细胞在扩增后的分数;右侧Y轴(亮条纹条):以扩增后与扩增前SIINFEKL(SEQ ID NO:1)特异性CTL的比例形式呈现的扩增潜力。

## 具体实施方式

[0052] 在详细说明本发明之前,应当理解本发明并不局限于具体举例说明的材料或工艺参数,因为这些当然可以变化。还应当理解在此使用的术语只是为了说明本发明的特定实施例的目的,并且不打算对使用替代性术语描述本发明进行限制。

[0053] 在此引用的所有公布、专利以及专利申请,无论上文还是下文,都出于所有目的特此通过引用以其全文结合在此。

[0054] 除非发明内容另外明确规定,否则如在本说明书和所附权利要求书中所使用,单数形式“一个/一种(a/all)”和“该(the)”包括复数指示物。举例来说,提及“一种聚合物”包括两种或更多种此类分子的混合物或单个聚合物种类的不同分子量的混合物,提及“一种合成纳米载体”包括两种或更多种此类合成纳米载体的混合物或多个此类合成纳米载体,提及“一种DNA分子”包括两种或更多种此类DNA分子的混合物或多个此类DNA分子;提及“一种佐剂”包括两种或更多种此类佐剂分子的混合物或多个此类佐剂分子,等等。

[0055] 如在此所使用,术语“包含(comprise)”或其变体,如“包含了(comprises)”或“包含着(comprising)”意在表明包括任何列举的整体(例如,一个特点、元件、特征、特性、方法/工艺步骤或限制)或整体的群组(例如,多个特点、多个元件、多个特征、多个特性、多个方法/工艺步骤或多个限制),但是不排除任何其他整体或整体的群组。因此,如在此所使用,术语“包含着”是包含性的但是不排除额外的、未列举的整体或方法/工艺步骤。

[0056] 在这些在此提供的组合物和方法中的任一者的实施例中,“包含着”可用“基本上

由……组成 (consisting essentially of)”或“由……组成 (consisting of)”来替换。短语“基本上由……组成”在此用以要求限定的一个或多个整体或步骤,以及不实质上影响所要求的发明的特征或功能的那些。如在此所使用,术语“组成 (consisting)”用以表明仅存在所列举的整体 (例如,一个特点、元件、特征、特性、方法/工艺步骤或限制) 或整体的群组 (例如,多个特点、多个元件、多个特征、多个特性、多个方法/工艺步骤或多个限制)。

[0057] A. 前言

[0058] 用治疗性或预防性疫苗治疗具挑战性的疾病 (如HIV、疟疾、乙型肝炎以及癌症) 可以由组合的体液与CTL免疫应答增强,或在一些情况下需要组合的体液与CTL免疫应答。虽然已经提议了疫苗方法用于产生一种组合的CTL与体液免疫应答,但替代的方法可以在临床功效、安全性和/或可制造性方面提供有价值的改善。在此提供了用于使用合成纳米载体组合物的方法,和相关组合物,认为这些组合物先前尚未显示可产生强烈并且有效的体液和CTL免疫应答。此类组合物可以有效地靶向感兴趣的免疫细胞以产生更有效的免疫应答。

[0059] 诸位发明人已经意外地并且令人惊讶地发现,通过实践在此披露的本发明,可以克服以上指出的问题和限制。具体地说,已经意外地并且令人惊讶地发现,有效的体液和CTL免疫应答可以由合成纳米载体产生,一种蛋白质被偶合到这些合成纳米载体,该蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸。因此,在一个方面,提供了一种方法,该方法包括给予这种组合物。在一个实施例中,该方法包括鉴别需要对一种第一蛋白质的一种体液和CTL免疫应答的一名受试者,和向该受试者给予一种组合物,该组合物包含此类合成纳米载体。在一些实施例中,该组合物的量可有效产生对该第一蛋白质的一种体液和CTL免疫应答。在另一个实施例中,该方法包括根据一种方案向一名受试者给予这种组合物,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

[0060] 在实施例中,所产生的这些免疫应答是临床上有效的。在一些实施例中,给予这些组合物的该受试者可能患有或有风险患有癌症、一种感染或传染病或一种非自身免疫或退行性疾病。在其他实施例中,该受试者可能患有或有风险患有HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染。

[0061] 在其他实施例中,这些组合物根据一种疫苗接种方案向一名受试者 (如一名人类) 给予。

[0062] 现在将在下文更详细地说明本发明。

[0063] B. 定义

[0064] “佐剂”意指不构成一种特异性抗原、但是加强对一种伴随给予的抗原的一种免疫应答的强度和寿命的一种药剂。此类佐剂可以包括但不限于:模式识别受体 (如Toll样受体、RIG-1和NOD样受体 (NLR)) 的刺激剂、矿物盐 (如明矾,与肠细菌 (如大肠杆菌 (*Escherichia coli*))、明尼苏达沙门氏菌 (*Salmonella minnesota*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 或弗氏志贺氏杆菌 (*Shigella flexneri*)) 的单磷酸脂质 (MPL)

A组合的明矾,或分别与MPL®(AS04)、以上提到的细菌的MPL A特异组合的明矾)、皂甙(如QS-21、Quil-A、ISCOM、ISCOMATRIX™)、乳液(如MF59TM、Montanide® ISA 51以及ISA 720)、AS02(QS21+角鲨烯+MPL®)、脂质体和脂质体配制品(如AS01)、合成的或特别制备的微颗粒和微载体(如淋病奈瑟菌(N.gonorrhoeae)、沙眼衣原体和其他细菌的源于细菌的外膜泡(OMV))、或壳聚糖颗粒、贮存形成剂(如Pluronic®嵌段共聚物)、特异性修饰或制备的肽(如胞壁酰二肽)、氨基烷基氨基葡萄糖苷4-磷酸酯(如RC529)、或蛋白质(如细菌类毒素或毒素片段)。“皂甙-胆固醇佐剂”是通过与胆固醇混合而稳定的皂甙佐剂。此类佐剂包括例如ISCOM和ISCOMATRIX佐剂。优选地,在一些实施例中,在此提供的这些合成纳米载体不是或不包括此类佐剂。在其他实施例中,在此提供的这些组合物不包括此类佐剂。

[0065] 在实施例中,佐剂包括模式识别受体(PRR)(包括但不限于Toll样受体(TLR),特别是TLR 2、3、4、5、7、8、9和/或其组合)的激动剂。在其他实施例中,佐剂包括Toll样受体3的激动剂、Toll样受体7和8的激动剂或Toll样受体9的激动剂;优选地,这些列举的佐剂包括咪唑啉,如R848;腺嘌呤衍生物,如在美国专利6,329,381(住友制药株式会社(Sumitomo Pharmaceutical Company))、比夏迪克(Biggadike)等人的美国公开专利申请2010/0075995或坎伯斯(Campos)等人的WO 2010/018132中披露的那些;免疫刺激DNA;或免疫刺激RNA。在特定实施例中,合成纳米载体合并了化合物作为佐剂,它们是toll样受体(TLR) 7&8的激动剂(“TLR 7/8激动剂”)。有效用的是托马伊(Tomai)等人的美国专利6,696,076中披露的TLR 7/8激动剂化合物,包括但不限于咪唑并喹啉胺、咪唑并吡啶胺、6,7-稠合环烷基咪唑并吡啶胺以及1,2-桥接咪唑并喹啉胺。优选的佐剂包括咪唑莫特和瑞喹莫德(也称为R848)。在特定实施例中,佐剂可以是DC表面分子CD40的激动剂。在某些实施例中,为了刺激免疫性而不是耐受性,合成纳米载体合并了促进DC成熟(对于引发初始T细胞是需要的)和细胞因子(如促进抗体免疫应答的I型干扰素)的产生的佐剂。在实施例中,佐剂还可以包括免疫刺激RNA分子(例如但不限于dsRNA、聚I:C或聚I:聚C12U(可获得为Ampligen®,聚I:C和聚I:聚C12U两者均称为TLR3刺激剂))、和/或在以下中披露的那些:F.海尔(F.Heil)等人,“通过Toll样受体7和8的种属特异性识别单链RNA(Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7and 8)”,《科学》(Science),303(5663),1526-1529(2004);J.沃尔默(J.Vollmer)等人,“通过化学修饰的核糖核苷和寡核糖核苷酸进行的免疫调节(Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides)”,WO 2008033432 A2;A.福斯巴赫(A.Forsbach)等人,“含有特异性序列基元并且靶向Toll样受体8路径的免疫刺激性寡核糖核苷酸(Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s)and targeting the Toll-like receptor 8pathway)”,WO 2007062107A2;E.乌尔曼(E.Uhlmann)等人,“具有增强的免疫刺激活性的修饰的寡核糖核苷酸类似物(Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity)”,美国专利申请公开US 2006241076;G.利普福德(G.Lipford)等人,“免疫刺激性病毒RNA寡核苷酸和用于治疗癌症和感染的用途(Immunostimulatory viral RNA oligonucleotides and use for treating cancer and infections)”,WO 2005097993 A2;G.利普福德等人,“包含G,U的免疫刺激性寡核糖核苷酸、组合物以及筛选法(Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides,compositions,and

screening methods)”, WO 2003086280 A2。在一些实施例中,佐剂可以是TLR-4激动剂,如细菌脂多糖(LPS)、VSV-G和/或HMGB-1。在一些实施例中,佐剂可以包括TLR-5激动剂(如鞭毛蛋白或其部分或衍生物),包括但不限于美国专利6,130,082、6,585,980以及7,192,725中所披露的那些。在特定实施例中,合成纳米载体合并了Toll样受体(TLR)-9的配体,如包含CpG的免疫刺激DNA分子,这些分子诱导I型干扰素分泌并且刺激T和B细胞活化,从而使抗体产生和细胞毒性T细胞应答增加(科瑞格(Krieg)等人,细菌DNA中的CpG基元触发直接B细胞活化(CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation),《自然》(Nature),1995.374:546-549;朱(Chu)等人,CpG寡脱氧核苷酸充当接通T辅助细胞1型(Th1)免疫性的佐剂(CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1(Th1) immunity),《实验医学杂志》(J.Exp.Med.),1997.186:1623-1631;利普福德(Lipford)等人,包含CpG的合成寡核苷酸促进对蛋白质抗原产生的B细胞和细胞毒性T细胞应答:一种新型疫苗佐剂(CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen:a new class of vaccine adjuvants),《欧洲免疫学杂志》(Eur.J.Immunol.),1997.27:2340-2344;罗曼(Roman)等人,免疫刺激DNA序列充当促进T辅助细胞1型的佐剂(Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants),《自然医学》(Nat.Med.),1997.3:849-854;戴维斯(Davis)等人,CpG DNA是用重组乙型肝炎表面抗原免疫的小鼠中特异性免疫的有效增强剂(CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen),《免疫学杂志》(J.Immunol.),1998.160:870-876;利普福德等人,作为免疫细胞活化剂的细菌DNA(Bacterial DNA as immune cell activator),《微生物学趋势》(Trends Microbiol),1998.6:496-500;科瑞格等人的美国专利6,207,646;塔克(Tuck)等人的美国专利7,223,398;凡涅斯特(Van Nest)等人的美国专利7,250,403;或科瑞格等人的美国专利7,566,703。

[0066] 在一些实施例中,佐剂可以是从小细胞释放的促发炎刺激物(例如尿酸盐晶体)。在一些实施例中,佐剂可以是补体级联的活化组分(例如CD21、CD35,等)。在一些实施例中,佐剂可以是免疫复合物的活化组分。这些佐剂还包括补体受体激动剂,如结合到CD21或CD35的分子。在一些实施例中,该补体受体激动剂诱导了合成纳米载体的内生补体调理作用。在一些实施例中,佐剂是细胞因子,它们是由细胞释放并且对细胞-细胞相互作用、通讯以及其他细胞的行为具有特异性作用的小蛋白质或生物因子(在5kD-20kD的范围内)。在一些实施例中,该细胞因子受体激动剂是小分子、抗体、融合蛋白或适体。

[0067] 在实施例中,至少一部分剂量的佐剂可以被偶合到合成纳米载体上,优选地,全部剂量的佐剂被偶合到合成纳米载体上。在其他实施例中,至少一部分剂量的佐剂不被偶合到合成纳米载体上。在实施例中,该用量的佐剂包括两种或更多种类型的佐剂。举例来说,而没有限制,可以组合作用于不同TLR受体的佐剂。作为一个实例,在一个实施例中,可以将TLR 7/8激动剂与TLR 9激动剂组合。在另一个实施例中,可以将TLR 7/8激动剂与TLR 4激动剂组合。在又一个实施例中,可以将TLR 9激动剂与TLR 3激动剂组合。

[0068] “给予”或“给药”意指以药理学上有用的方式提供一种物质(如药物)给一名受试者。

[0069] “有效量”是在此提供的组合物产生一种或多种所希望的应答(如一种或多种所希望的免疫应答)的任何量。这个量可以用于体外或体内目的。出于体内目的,该量可以是临床医生认为可能对需要对单个蛋白质的一种体液免疫应答和一种CTL免疫应答的一名受试者具有临床益处的量。临床医生认为可能对这种受试者具有临床益处的有效量在此还称为“临床有效量”。在实施例中,由在此提供的一种组合物引发的体液免疫应答和CTL免疫应答在这些部分的免疫系统中的每一者中都产生临床作用。在其他实施例中,临床有效量是可以有助于治疗患有的一种疾病或病状的一名受试者的有效量,其中对单个蛋白质的一种体液免疫应答和一种CTL免疫应答将提供益处。在一些实施例中,此类受试者包括患有或有风险患有癌症、一种感染或传染病或一种非自身免疫或退行性疾病的受试者。在其他实施例中,此类受试者包括患有或有风险患有HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染的受试者。

[0070] 有效量包括涉及在此提供的这些组合物之一所给予的产生针对一个体液表位的一种体液免疫应答和针对一个MHC I类限制性表位的一种CTL免疫应答的量。可以通过常规方法监测一名个体的体液和CTL免疫应答。有效产生如在此提供的所希望的免疫应答的量还可以是在此提供的组合物产生一种所希望的治疗终点或一种所希望的治疗结果的量。在一个实施例中,有效量是针对一种疾病或导致如在此提供的一种疾病的药剂提供有效免疫性的量。在另一个实施例中,免疫性在该受试者中持续至少6、12、18、24、36、48、60个或更多个月。在再另一个实施例中,免疫性由于根据一种疫苗接种方案给予在此提供的一种组合物而产生或持续。

[0071] 有效量当然将取决于所治疗的特定受试者;病状、疾病或病症的严重程度;个体患者的参数,包括年龄、身体状况、体型以及体重;治疗持续时间;并行治疗(如果有)的性质;特定给药途径以及健康开业医师的知识和专业技能内的类似因素。这些因素为本领域普通技术人员所熟知,并且可以仅用常规实验方法解决。总体上优选的是使用最大剂量,即根据正确医学判断的最高安全剂量。然而,本领域普通技术人员应了解,出于医学原因、心理原因或实际上任何其他原因,患者可以坚持较低剂量或耐受剂量。

[0072] 总体而言,本发明组合物的剂量可以在从约10 $\mu$ g/kg到约100,000 $\mu$ g/kg的范围内。在一些实施例中,剂量可以在从约0.1mg/kg到约100mg/kg的范围内。在再其他实施例中,剂量可以在从约0.1mg/kg到约25mg/kg、约25mg/kg到约50mg/kg、约50mg/kg到约75mg/kg或约75mg/kg到约100mg/kg的范围内。作为替代方案,剂量可以基于合成纳米载体的数目给予。举例来说,有用的剂量包括每次剂量大于10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup>或10<sup>10</sup>个合成纳米载体。有用的剂量的其他实例包括每次剂量从约1 $\times$ 10<sup>6</sup>到约1 $\times$ 10<sup>10</sup>、约1 $\times$ 10<sup>7</sup>到约1 $\times$ 10<sup>9</sup>或约1 $\times$ 10<sup>8</sup>到约1 $\times$ 10<sup>9</sup>个合成纳米载体。

[0073] “抗原”意指可以产生一种或多种免疫应答的任何抗原。该抗原可以是产生一种体液和/或CTL免疫应答的抗原。此类抗原包括但不限于蛋白质、肽、小分子、寡糖以及碳水化合物。在一些实施例中,这种抗原包括一种非蛋白质抗原(即不是一种蛋白质或肽抗原)。在一些实施例中,产生一种体液免疫应答的抗原包括与一种感染因子缔合的一种碳水化合物。在一些实施例中,产生一种体液免疫应答的抗原包括与一种感染因子缔合的一种糖蛋

白或糖肽。该感染因子可以是一种细菌、病毒、真菌、原生动物或寄生虫。抗原可以是B细胞或T细胞抗原。

[0074] 用于在此提供的本发明方法中的这些合成纳米载体组合物被偶合到一种抗原,该抗原包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位的一种蛋白质,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位。在一些实施例中,此类组合物可以包括一种或多种额外的抗原,该一种或多种额外的抗原也可以受此限制但不一定如此。用于在此提供的方法和组合物中的该一种或多种额外的抗原可以是包括以下的任何抗原:包括体液表位和/或MHC I类限制性表位的抗原。该一种或多种额外的抗原还可以包括MHC II类限制性表位。在其他实施例中,该一种或多种额外的抗原可以是产生一种体液免疫应答的任何抗原。在再其他实施例中,该一种或多种额外的抗原可以是在此描述的T细胞抗原中的任一者,包括一种CD-1限制性抗原。仍在其他实施例中,该一种或多种额外的抗原可以是一种蛋白质、肽、小分子、寡糖以及碳水化合物。

[0075] 在实施例中,包括蛋白质(该蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位)的抗原被偶合到这些合成纳米载体。在其他实施例中,抗原不被偶合到这些合成纳米载体。仍在其他实施例中,抗原被封装在这些合成纳米载体中。“抗原的一种或多种类型”意指共享相同的或实质上相同的抗原特征的分子。

[0076] 在此提供的一种疾病、病症或病状的“相关抗原”是可以针对、由于或结合该疾病、病症或病状;该疾病、病症或病状(或一种症状或其作用)的原因产生一种不希望的免疫应答;和/或可以产生作为该疾病、病症或病状的一种症状、结果或作用的一种不希望的免疫应答的抗原。在一些实施例中,如在癌症的情况下,此类抗原表达于病变的细胞(如癌症或肿瘤细胞)之中或之上但不表达于正常或健康细胞(或非病变的细胞)之中或之上。此类抗原还可以包括一种抗原,该抗原表达于病变的细胞之中或之上和正常或健康细胞(或非病变的细胞)之上,但与表达于正常或健康细胞(或非病变的细胞)之上相比,以更大水平表达于病变的细胞之中或之上。优选地,与在此提供的一种疾病或病状相关的一种抗原的使用不会针对正常或健康细胞产生实质性或有害免疫应答,或将针对该疾病或病状产生胜于针对正常或健康细胞(或非病变的细胞)的任何免疫应答的一种有益免疫应答。在一些实施例中,与在此提供的一种疾病或病状相关的抗原是被偶合到合成纳米载体的蛋白质,这些蛋白质包括体液和/或MHC I类限制性表位。在其他实施例中,此类蛋白质包括一个体液和一个MHC I类限制性表位。在再其他实施例中,此类蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位。抗原(包括前述蛋白质)的实例在此提供在别处。

[0077] “至少一部分剂量”意指剂量的至少某一部分,范围高达包括所有剂量。

[0078] 一名“有风险”的受试者是一名健康开业医师认为有机会患有如在此提供的疾病或病状的受试者。

[0079] “B细胞抗原”意指由B细胞识别或在B细胞中触发一种免疫应答的任何抗原(例如由B细胞或其上的受体特异性识别的抗原)。在一些实施例中,是T细胞抗原的抗原也是B细胞抗原。在其他实施例中,T细胞抗原并不也是B细胞抗原。B细胞抗原包括但不限于蛋白质、肽、小分子、寡糖以及碳水化合物。

[0080] “偶合 (Couple)”或“被偶合 (Coupled)”或“偶合了 (Couples)” (等等) 意指使一个实体 (例如一个部分) 与另一者在化学上缔合。在一些实施例中, 偶合是共价偶合, 意指偶合在两个实体之间存在共价键的情况下发生。在非共价的实施例中, 非共价偶合通过非共价相互作用介导, 这些非共价相互作用包括但不限于电荷相互作用、亲和相互作用、金属配位、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、TT堆积相互作用、氢键相互作用、范德华相互作用、磁相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合。在实施例中, 封装是偶合的一种形式。

[0081] “细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 免疫应答”意指对细胞毒性T细胞、优选对一个表位 (如一个MHC I类限制性表位) 具有特异性的细胞毒性T细胞的任何刺激、诱导或增殖。在实施例中, 该表位是或具有与在此提供的疾病或病状中的任一者相关的一种抗原。用于评估CTL免疫应答的方法为本领域的普通技术人员已知。实例中提供这种方法的实例。

[0082] “剂型”意指在一种培养基、载体、媒剂或装置中的适用于给予一名受试者的一种药理学和/或免疫学活性物质。

[0083] “封装”意指将至少一部分的物质封闭在合成纳米载体内。在一些实施例中, 一种物质被完全封闭在合成纳米载体内。在其他实施例中, 被封装的物质的大部分或全部不暴露于合成纳米载体外的局部环境。在其他实施例中, 不超过50%、40%、30%、20%、10%或5% (重量/重量) 暴露于该局部环境。封装不同于吸收, 吸收是将物质的大部分或全部安置在合成纳米载体的表面上, 并且使得该物质暴露于该合成纳米载体外的局部环境。

[0084] “表位”也称为抗原决定簇, 是抗原的由免疫系统识别、由例如抗体、B细胞或T细胞特异性识别的部分。如在此所用, “体液表位”是由抗体或B细胞识别的表位, 而“MHC I类限制性表位”是由发现于有核细胞上的MHC I类分子向免疫细胞呈递的表位。“MHC II类限制性表位”是由发现于抗原呈递细胞 (APC) 上 (如在专业抗原呈递免疫细胞上, 如在巨噬细胞、B细胞以及树突状细胞上; 或在非造血细胞上, 如肝细胞) 的MHC II类分子向免疫细胞呈递的表位。

[0085] 许多表位为本领域的普通技术人员所熟知, 并且根据本发明的一些方面合适的示例性表位包括但不限于免疫表位数据库 (Immune Epitope Database) ([www.immuneepitope.org](http://www.immuneepitope.org), 维塔R (Vita R), 扎雷布斯基L (Zarebski L), 戈林鲍姆JA (Greenbaum JA), 埃马米H (Emami H), 霍夫I (Hoof I), 萨利米N (Salimi N), 达姆莱R (Damle R), 塞特 (Sette A), 彼得B (Peters B). 免疫表位资料库2.0 (The immune epitope database 2.0). 《核酸研究》(Nucleic Acids Res.) 2010年1月; 38 (数据库专刊): D854-62; 其全部内容以及2011年8月IEDB 2.4版的所有数据库条目和特别是其中披露的所有表位通过引用结合在此) 中列出的那些。表位还可以用公开可获得的算法来鉴别, 这些算法是例如以下文献中所述的算法: 王P (Wang P), 西德尼J (Sidney J), 金姆Y (Kim Y), 塞特A (Sette A), 隆德O (Lund O), 尼耳森M (Nielsen M), 彼得B (Peters B). 2010. 用于HLA DR、DP以及DQ分子的肽结合预测 (peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules). 《BMC生物信息学》(BMC Bioinformatics) 2010, 11: 568; 王P, 西德尼J, 道C (Dow C), 莫特B (Mothé B), 塞特A, 彼得B. 2008. MHC II类肽结合预测的系统评估和共同方法的评估 (A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach). 《PLoS计算生物学》(PLoS Comput Biol). 4(4):

e1000048;尼耳森M,隆德O.2009.NN比对.用于MHC II类肽结合预测的基于人工神经网络的比对算法(NN-align.An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction).《BMC生物信息学》.10:296;尼耳森M,伦德高C(Lundegaard C),隆德O.2007.使用一种新颖稳定矩阵比对方法SMM比对来预测MHC II类结合亲和力(Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align,a novel stabilization matrix alignment method).《BMC生物信息学》.8:238;布伊HH(Bui HH),西德尼J,彼得B,萨蒂亚默西M(Sathiamurthy M),萨尼奇A(Sinichi A),珀顿KA(Purton KA),莫特BR,基萨里FV(Chisari FV),沃特金斯DI(Watkins DI),塞特A.2005.《免疫遗传学》(Immunogenetics).57:304-314;斯图尔尼奥洛T(Sturniolo T),博诺E(Bono E),丁J(Ding J),拉德里扎尼L(Raddrizzani L),图雷西O(Tuereci O),沙欣U(Sahin U),布拉森勒M(Braxenthaler M),加拉齐F(Gallazzi F),普罗蒂MP(Protti MP),塞尼加利亚F(Sinigaglia F),哈默J(Hammer J).1999.使用DNA微阵列和虚拟HLA II类矩阵产生组织特异性和混杂的HLA配体数据库(Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices).《自然生物技术》(Nat Biotechnol).17(6):555-561;尼耳森M,伦德高C,沃宁P(Worning P),劳艾莫勒SL(Lauemoller SL),兰伯思K(Lamberth K),布斯S(Buus S),布伦纳克S(Brunak S),隆德O.2003.使用具有新颖序列图示的神经网络可靠预测T细胞表位(Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations).《蛋白质科学》(Protein Sci)12:1007-1017;布伊HH,西德尼J,彼得B,萨蒂亚默西M,萨尼奇A,珀顿KA,莫特BR,基萨里FV,沃特金斯DI,塞特A.2005.特异性MHC结合预测工具的自动化产生和评估:ARB矩阵应用(Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools:ARB matrix applications).《免疫遗传学》57:304-314;彼得B,塞特A.2005.用稳定矩阵法产生说明生物过程的序列特异性的定量模型(Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method).《BMC生物信息学》6:132;周PY(Chou PY),法斯曼GD(Fasman GD).1978.从蛋白质的氨基酸序列预测其二级结构(Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence).《酶学和分子生物学相关领域的进展》(Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol)47:45-148;埃米尼EA(Emini EA),休JV(Hughes JV),珀洛DS(Perlow DS),博格J(Boger J).1985.通过病毒特异性合成肽诱导A型肝炎病毒中和抗体(Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide).《病毒学杂志》(J Virol)55:836-839;卡普拉斯PA(Karplus PA),舒尔兹GE(Schulz GE).1985.预测蛋白质的链柔性(Prediction of chain flexibility in proteins).《自然科学》(Naturwissenschaften)72:212-213;科拉斯卡AS(Kolaskar AS),唐安卡PC(Tongaonkar PC).1990.一种用于预测蛋白质抗原上的抗原决定簇的半经验法(A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens).《FEBS通讯》(FEBS Lett)276:172-174;帕克JM(Parker JM),郭D(Guo D),霍奇斯RS(Hodges RS).1986.衍生自高效液相色谱肽保留数据的新亲水性等级:所预测的表面残基与抗原性和X射线衍生的可接近位点的相关性(New hydrophilicity scale derived from high-



performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites).《生物化学》(Biochemistry) 25:5425-5432;拉森JE (Larsen JE),隆德O,尼耳森M.2006.用于预测线性B细胞表位的改进的方法(Improved method for predicting linear B-cell epitopes).《免疫组研究》(Immunome Res) 2:2;波诺马连科JV (Ponomarenko JV),伯恩PE (Bourne PE).2007.抗体-蛋白质相互作用:基准数据集和预测工具评估(Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation).《BMC结构生物学》(BMC Struct Biol) 7:64;哈斯特安徒生P (Haste Andersen P),尼耳森M,隆德O.2006.使用蛋白质3D结构预测不连续B细胞表位中的残基(Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures).《蛋白质科学》15:2558-2567;波诺马连科JV,布伊H,李W (Li W),富塞德N (Fusseder N),伯恩PE,塞特A,彼得B.2008.ElliPro:一种用于预测抗体表位的新的基于结构的工具(ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes).《BMC生物信息学》9:514;尼耳森M,伦德高C,布利克T (Blicher T),彼得B,塞特A,爵斯特森S (Justesen S),布斯S以及隆德O.2008.《PLoS计算生物学》.4 (7) e1000107.定量预测肽与具有已知序列的任何HLA-DR分子的结合:NetMHCIIpan (Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan);所述文献中每一者的全部内容都通过引用结合在此用于披露用于鉴别表位的方法和算法。

[0086] “产生”意指本身直接地或间接地(例如但不限于依赖于一方的言词或行动采取一种作用的一个无关第三方)引起针对一个表位发生的作用,如一种免疫应答(如一种体液免疫应答或一种CTL免疫应答)。

[0087] “体液免疫应答”意指引起B细胞产生或刺激和/或抗体产生的任何免疫应答。优选地,体液免疫应答对本发明的组合物内所包含或在实施本发明方法期间所给予的表位具有特异性。用于评估是否诱导一种体液应答的方法为本领域普通技术人员所已知。抗体产生在此被称为“抗体应答”。“抗体滴度”意指产生可测量水平的抗体。优选地,抗体应答或抗体滴度的产生是在人类中。在一些实施例中,抗体是某种同种型的抗体,如IgG或其子类。用于测量抗体滴度的方法在本领域已知并且包括酶联免疫吸附分析(ELISA)。用于测量抗体滴度的方法还在实例中略为详细地进行了描述。优选地,抗体应答或抗体滴度对如在此提供的一个表位具有特异性。在实施例中,抗体应答可以例如被定量为抗体数目、抗体浓度或滴度。这些值可以是绝对的或它们可以是相对的。用于定量一种抗体应答的分析包括抗体捕获分析、酶联免疫吸附分析(ELISA)、抑制液相吸附分析(ILPAA)、火箭免疫电泳(RIE)分析以及线免疫电泳(LIE)分析。当将一种抗体应答与另一种抗体应答相比较时,优选地使用相同类型的数值(例如滴度)和测量方法(例如ELISA)来进行比较。

[0088] 举例来说,用于测量抗体滴度的ELISA方法可以由以下步骤组成:(i)制备ELISA板涂层材料,以使得感兴趣的抗体靶被偶合到基质聚合物或其他合适材料;(ii)在水溶液(如PBS)中制备涂层材料并且将涂层材料溶液递送到多孔板的孔中,以便使涂层沉积到多孔板上过夜;(iii)用洗涤缓冲液(如0.05%吐温-20 (Tween-20)于PBS中)彻底地洗涤多孔板以去除过量涂层材料;(iv)通过施用稀释剂溶液(如10%胎牛血清于PBS中)阻断板的非特异

性结合；(v) 用洗涤缓冲液从板洗涤阻断/稀释剂溶液；(vi) 视需要用稀释剂稀释含有抗体和适当标准物(阳性对照)的一个或多个血清样品以获得使ELISA应答适当地饱和的浓度；(vii) 连续稀释多孔板上的血浆样品，以便涵盖适用于产生ELISA应答曲线的浓度范围；(viii) 孵育板以提供抗体-靶结合；(ix) 用洗涤缓冲液洗涤板以去除未与抗原结合的抗体；(x) 添加适当浓度的在相同稀释剂中的二级检测抗体，如能够结合初级抗体的生物素偶合的检测抗体；(xi) 与所施用的检测抗体一起孵育板，接着用洗涤缓冲液洗涤；(xii) 添加将与发现于生物素标记的抗体上的生物素结合的酶(如抗生蛋白链菌素-HRP(辣根过氧化物酶))并且进行孵育；(xiii) 洗涤多孔板；(xiv) 添加一种或多种基质(如TMB溶液)到板；(xv) 当完成彩色显影时，施用终止溶液(如2N硫酸)；(xvi) 在关于基质的特定波长(450nm，扣除在570nm下的读数)下读取板孔的光学密度；(xvi) 将合适的多参数曲线拟合应用于数据，并且将半数最大有效浓度(EC50)定义为曲线上获得板标准物的半数最大OD值处的浓度。

[0089] “鉴别”是使得临床医生识别受试者是可以受益于在此提供的方法和组合物的受试者的任何作用或作用组。优选地，所鉴别的受试者是需要对单个蛋白质的一种体液免疫应答和CTL免疫应答的受试者。此类受试者包括患有或有风险患有在此提供的疾病或病状中任一者的任何受试者。作用或作用组可以是本身直接地或间接地(例如但不限于依赖于一方的言词或行动采取一种作用的一个无关第三方)。

[0090] “感染”或“传染病”是由微生物、病原体或其他因子(如细菌、真菌、朊病毒或病毒)引起的任何病状或疾病。

[0091] “合成纳米载体的最大尺寸”意指一种纳米载体沿着该合成纳米载体的任一轴测量的最大尺寸。“合成纳米载体的最小尺寸”意指一种合成纳米载体沿着该合成纳米载体的任一轴测量的最小尺寸。举例来说，对于球形合成纳米载体，合成纳米载体的最大和最小尺寸应该是实质上一致的，并且应该是其直径的大小。类似地，对于立方形合成纳米载体，合成纳米载体的最小尺寸应该是它的高度、宽度或长度中最小的那个，而合成纳米载体的最大尺寸应该是它的高度、宽度或长度中最大的那个。在一个实施例中，基于样品中合成纳米载体的总数，样品中至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的合成纳米载体的最小尺寸等于或大于100nm。在一个实施例中，基于样品中合成纳米载体的总数，样品中至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的合成纳米载体的最大尺寸等于或小于5 $\mu$ m。优选地，基于样品中合成纳米载体的总数，样品中至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的合成纳米载体的最小尺寸大于110nm，更优选大于120nm，更优选大于130nm，并且再更优选大于150nm。本发明的合成纳米载体的最大尺寸与最小尺寸的纵横比可以取决于实施例而变化。举例来说，合成纳米载体的最大尺寸与最小尺寸的纵横比可以从1:1到1,000,000:1、优选从1:1到100,000:1、更优选从1:1到10,000:1、更优选从1:1到1000:1、再更优选从1:1到100:1、并且又更优选从1:1到10:1变化。优选地，基于样品中合成纳米载体的总数，样品中至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的合成纳米载体的最大尺寸等于或小于3 $\mu$ m、更优选等于或小于2 $\mu$ m、更优选等于或小于1 $\mu$ m、更优选等于或小于800nm、更优选等于或小于600nm、并且再更优选等于或小于500nm。在优选的实施例中，基于样品中合成纳米载体的总数，样品中至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的合成纳米载体的最小尺寸等于或大于100nm、更优选等于或大于120nm、更优选等于或大于130nm、更优选等于或大于140nm、并且仍更优选等于或大于150nm。通过将这些合成纳米载体悬浮在一种液体(通常是水性)介质中，并且使

用动态光散射 (DLS) (例如使用一台Brookhaven ZetaPALS仪器) 获得合成纳米载体尺寸的测量值。举例来说, 可以将合成纳米载体的悬浮液从水性缓冲液中稀释到纯化水中以达到约0.01到0.1mg/mL的最终合成纳米载体悬浮液浓度。可以将该稀释的悬浮液在一个合适的比色皿中直接制备, 或转移到该比色皿中以用于DLS分析。然后可以将该比色皿放置在DLS中, 使之平衡到受控的温度, 并且然后扫描充分的时间以在介质的粘度和样品的折射率的适当输入的基础上获得稳定并且可再现的分布。然后报告有效直径, 或分布的平均值。合成纳米载体的“尺寸”或“大小”或“直径”意指使用动态光散射获得的粒度分布的平均值。

[0092] “MHC”是指主要组织相容性复合体, 一种见于大多数脊椎动物中的编码MHC分子的大基因组区域或基因家族, 这些MHC分子展示在细胞表面上的经加工蛋白质的片段或表位。细胞表面上MHC:肽的呈递允许由免疫细胞、通常是T细胞监视。存在两大类MHC分子:I类和II类。通常, I类MHC分子发现于有核细胞上并且将肽呈递于细胞毒性T细胞。II类MHC分子发现于某些免疫细胞 (主要是巨噬细胞、B细胞以及树突状细胞, 统称为APC) 上。MHC区域中最知名的基因是编码细胞表面上的抗原呈递蛋白的予组。在人类中, 这些基因被称为人类白细胞抗原 (HLA) 基因。

[0093] “药学上可接受的赋形剂”意指与所列举的合成纳米载体一起使用以配制这些组合物的药理学上非活性的材料。药学上可接受的赋形剂包括本领域中已知的多种材料, 包括但不限于糖类 (如葡萄糖、乳糖等)、防腐剂 (如抗微生物剂)、复水助剂、着色剂、盐水 (如磷酸盐缓冲的盐水) 以及缓冲液。

[0094] “一种或多种蛋白质”意指所具有的分子量典型地大于1000道尔顿的包含主要通过相邻氨基酸残基的羧基与氨基之间的肽键接合在一起的氨基酸残基的化合物。蛋白质还可以包括额外的键结结构, 如二级结构、三级结构等等。出于不同的目的, 如稳定或偶合, 蛋白质中的某些肽键可以由其他键类型替代。当偶合到合成纳米载体时, 优选地, 存在偶合到每个合成纳米载体的多个复本的蛋白质。

[0095] “方案”是指给一名受试者的一种或多种物质的任何给药方案。给药方案可以包括给药的量、频率和/或模式。在一些实施例中, 这种方案可以用于向一名或多名测试受试者给予本发明的一种或多种组合物。然后可以评估这些测试受试者中的免疫应答以确定该方案是否可有效产生一种或多种所希望的免疫应答。不是或除了前述免疫应答, 还可以评估任何其他治疗性和/或预防性作用。可以使用在此提供的或以其他方式本领域中已知的方法中的任一者来确定一种方案是否具有一种所希望的作用。举例来说, 可以从已经根据一种特定方案给予了在此提供的一种组合物的一名受试者获得一群细胞, 以便确定特异性免疫细胞、细胞因子、抗体等是否产生、活化等。对于检测免疫细胞的存在和/或数目的有用的方法包括但不限于流式细胞学方法 (例如FACS) 和免疫组织化学方法。用于免疫细胞标记的特异性染色的抗体和其他黏合剂是可商购的。此类试剂盒典型地包括用于多种抗原的着色试剂, 这些着色试剂允许对来自一群不同类的细胞的所希望的细胞群体进行基于FACS的检测、分离和/或定量。

[0096] “受试者”意指动物, 包括温血哺乳动物, 如人类和灵长类动物; 禽类; 家庭驯养动物或农用动物, 如猫、狗、绵羊、山羊、牛、马以及猪; 实验动物, 如小鼠、大鼠以及天竺鼠; 鱼; 爬行动物; 动物园动物和野生动物; 等。

[0097] “一种或多种合成纳米载体”意指在自然中未发现的、并且具有小于或等于5微米

大小的至少一个尺寸的离散物体。白蛋白纳米颗粒通常被包括为合成纳米载体,然而在某些实施例中,合成纳米载体并不包括白蛋白纳米颗粒。在实施例中,合成纳米载体不包括壳聚糖。在某些其他实施例中,合成纳米载体不包括壳聚糖。在其他实施例中,本发明的合成纳米载体不是基于脂质的纳米颗粒。在其他实施例中,本发明的合成纳米载体不包括磷脂。

[0098] 合成纳米载体可以是但不限于一个或多个基于脂质的纳米颗粒(在此也称为脂质纳米颗粒,即构成其结构的大多数物质是脂质的纳米颗粒)、聚合物纳米颗粒、金属纳米颗粒、基于表面活性剂的乳液、树枝状聚合物、巴克球、纳米线、病毒样颗粒(即主要由病毒结构蛋白质构成但不具有感染性或具有低感染性的颗粒)、基于肽或蛋白质的颗粒(在此也称为蛋白质颗粒,即构成其结构的大多数物质是肽或蛋白质的颗粒)(如白蛋白纳米颗粒)和/或使用纳米材料的组合产生的纳米颗粒(如脂质-聚合物纳米颗粒)。合成纳米载体可以具有多种不同的形状,包括但不限于球状、立方形、金字塔形、长方形、圆柱形、环形等。根据本发明的合成纳米载体包括一个或多个表面。可以适用于本发明的惯例中的示例性合成纳米载体包括:(1) 格里夫(Gref)等人的美国专利5,543,158中披露的生物可降解纳米颗粒,(2) 索尔兹曼(Saltzman)等人的已公布的美国专利申请20060002852的聚合纳米颗粒,(3) 德西蒙(DeSimone)等人的已公布的美国专利申请20090028910的用平版印刷法建构的纳米颗粒,(4) 冯安德里安(von Andrian)等人的W0 2009/051837的披露,(5) 佩纳德斯(Penades)等人的已公布的美国专利申请2008/0145441中披露的纳米颗粒,(6) 德洛斯里奥斯(de los Rios)等人的已公布的美国专利申请20090226525中披露的蛋白质纳米颗粒,(7) 西贝(Sebbel)等人的已公布的美国专利申请20060222652中披露的病毒样颗粒,(8) 巴赫曼(Bachmann)等人的已公布的美国专利申请20060251677中披露的与核酸偶合的病毒样颗粒,(9) W02010047839A1或W02009106999A2中披露的病毒样颗粒,(10) P. 保利赛利(P. Paolicelli)等人,“可以有效地缔合并递送病毒样颗粒的经过表面修饰的基于PLGA的纳米颗粒(Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles)”,《纳米医学》(Nanomedicine), 5(6): 843-853 (2010) 中披露的纳米沉淀的纳米颗粒,或(11) 美国公布2002/0086049中披露的凋亡细胞、凋亡小体或合成或半合成模拟物。在实施例中,合成纳米载体可以具有大于1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7、或大于1:10的纵横比。

[0099] 具有等于或小于约100nm、优选等于或小于100nm的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含具有使补体活化的羟基的表面,或可替代地包含主要由不是使补体活化的羟基的部分组成的表面。在一个优选的实施例中,具有等于或小于约100nm、优选等于或小于100nm的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含实质上使补体活化的表面,或可替代地包含主要由不实质上使补体活化的部分组成的表面。在一个更优选的实施例中,具有等于或小于约100nm、优选等于或小于100nm的最小尺寸的根据本发明的合成纳米载体不包含使补体活化的表面,或可替代地包含主要由不使补体活化的部分组成的表面。在实施例中,合成纳米载体排除了病毒样颗粒。在实施例中,当合成纳米载体包括病毒样颗粒时,这些病毒样颗粒包括非天然佐剂(意指VLP包含除VLP制造期间所产生的天然存在的RNA以外的佐剂)。在实施例中,合成纳米载体可以具有大于1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7、或大于1:10的纵横比。

[0100] “T细胞抗原”意指由T细胞识别并且触发T细胞中的免疫应答的任何抗原(如这样

一种抗原：该抗原通过与I类或II类主要组织相容性复合体分子(MHC)结合或与CD1复合体结合的抗原或其一部分的呈递而被T细胞或NKT细胞上的T细胞受体特异性地识别)。在一些实施例中，是T细胞抗原的抗原也是B细胞抗原。在其他实施例中，T细胞抗原并不也是B细胞抗原。T细胞抗原通常是蛋白质或肽。T细胞抗原可以是刺激CD8+T细胞应答、CD4+T细胞应答或两者的抗原。因此，在一些实施例中，纳米载体可以有效地刺激两种类型的应答。

[0101] 在一些实施例中，T细胞抗原是T辅助细胞抗原(即通过刺激辅助性T细胞，可以产生对一种B细胞抗原、优选一种无关的B细胞抗原的增强的应答的抗原)。在实施例中，T辅助细胞抗原可以包括一种或多种获自或衍生自以下物质的肽：破伤风类毒素、埃-巴二氏病毒、流感病毒、呼吸道合胞体病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、巨细胞病毒、腺病毒、白喉类毒素或PADRE肽(从赛特(Sette)等人的美国专利7,202,351的工作中知晓)。在其他实施例中，T辅助细胞抗原可以包括一种或多种脂质或糖脂，包括但不限于： $\alpha$ -半乳糖苷神经酰胺( $\alpha$ -GalCer)、 $\alpha$ -键联的鞘糖脂(来自鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* spp.))、半乳糖苷二酰基甘油(来自伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*))、脂磷酸聚糖(来自杜氏利什曼虫(*Leishmania donovani*))以及磷脂酰肌醇四甘露糖苷(PIM4)(来自麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*))。对于作为T辅助细胞抗原有用的额外的脂质和/或糖脂，参看V.塞昂多罗(V. Cerundolo)等人，“开发疫苗接种策略中的不变NKT细胞(Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies.)”，《自然免疫学评论》(Nature Rev Immun), 9:28-38(2009)。在实施例中，CD4+T细胞抗原可以从一个来源(如一个天然来源)获得的CD4+T细胞抗原的衍生物。在此类实施例中，CD4+T细胞抗原序列(如与MHC II结合的那些肽)可以与从该来源获得的抗原具有至少70%、80%、90%或95%的一致性。在实施例中，T细胞抗原、优选T辅助细胞抗原可以被偶合到合成纳米载体或与合成纳米载体解除偶合。在一些实施例中，T细胞抗原被封装在这些组合物的合成纳米载体中。

[0102] “疫苗”意指改进了对具体病原体或疾病的免疫应答的物质的组合物。疫苗典型地含有刺激受试者的免疫系统以将特异性抗原识别为外来物质并且将它从受试者身体消除的因子。疫苗还建立了免疫‘记忆’，因此如果一个人再次受到激发，抗原将会被快速识别并且被应答。疫苗可以是预防性的(例如阻止由任何病原体引起的以后的感染)、或治疗性的(例如用于治疗癌症的针对肿瘤特异性抗原的疫苗)。在实施例中，疫苗可以包含根据本发明的剂型。

[0103] “疫苗方案”或“疫苗接种方案”是一种或多种疫苗接种的计划，该计划包括疫苗剂量的数目和计时。通常，疫苗接种方案旨在针对一种疾病或病状的发展获得免疫性。优选地，疫苗方案是通过体液和CTL部分的免疫系统获得免疫性的疫苗方案。

[0104] C. 用于本发明方法的组合物

[0105] 在此提供了用于有效的体液和CTL免疫应答产生的方法和相关组合物。已经发现，偶合有一种蛋白质的合成纳米载体可以用于产生有效并强烈的体液和CTL免疫应答，该蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位，该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位，其中这些合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂，并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸。所提供的这些组合物可以用于多种所希望的临床终点，如用于疫苗接种。

[0106] 根据本发明,可以使用多种多样的合成纳米载体。在一些实施例中,合成纳米载体是球形或球状体。在一些实施例中,合成纳米载体是平坦的或板状的。在一些实施例中,合成纳米载体是立方体或立方形。在一些实施例中,合成纳米载体是卵形或椭圆形。在一些实施例中,合成纳米载体是圆柱体、圆锥或金字塔。

[0107] 在一些实施例中,希望使用一群在大小、形状和/或构成方面相对一致的合成纳米载体,这样每一合成纳米载体具有类似特性。举例来说,基于合成纳米载体的总数,至少80%、至少90%或至少95%的合成纳米载体可以具有落在合成纳米载体的平均直径或平均尺寸的5%、10%或20%之内的最小尺寸或最大尺寸。在一些实施例中,一群合成纳米载体就大小、形状和/或构成而论可以是不均匀的。

[0108] 合成纳米载体可以是实心的或空心的,并且可以包括一个或多个层。在一些实施例中,每一层相对于另一或其他层都具有独特的构成和独特的特性。为了给出但是一个实例,合成纳米载体可以具有一个核/壳结构,其中核是一层(例如一个聚合物核)并且壳是一个第二层(例如一个脂质双层或单层)。合成纳米载体可以包括多个不同的层。

[0109] 在一些实施例中,合成纳米载体可以包括金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒等。在一些实施例中,非聚合的合成纳米载体是非聚合组分的聚集体,如金属原子(例如金原子)的聚集体。

[0110] 在一些实施例中,合成纳米载体可以任选地包括一种或多种脂质。在一些实施例中,合成纳米载体可以包括一种脂质体。在一些实施例中,合成纳米载体可以包括一个脂质双层。在一些实施例中,合成纳米载体可以包括一个脂质单层。在一些实施例中,合成纳米载体可以包括一种胶束。在一些实施例中,合成纳米载体可以包括一个核,该核包含由一个脂质层(例如脂质双层、脂质单层等)环绕的一种聚合物基质。在一些实施例中,合成纳米载体可以包括一个非聚合核(例如金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒性颗粒、蛋白质、核酸、碳水化合物等),该核由一个脂质层(例如脂质双层、脂质单层等)环绕。

[0111] 在一些实施例中,合成纳米载体可以包括一种或多种聚合物。在一些实施例中,这种聚合物可以由一个涂层(例如脂质体、脂质单层、胶束等)环绕。在一些实施例中,这些合成纳米载体的不同的要素(即组分)可以与聚合物偶合。

[0112] 在一些实施例中,一个组分可以与一个聚合物基质共价缔合。在一些实施例中,共价缔合通过连接物介导。在一些实施例中,一个组分可以与一个聚合物基质非共价缔合。举例来说,在一些实施例中,一个组分可以被封装在聚合物基质内、被聚合物基质环绕、和/或被分散遍及聚合物基质。可替代地或额外地,一个组分可以通过疏水性相互作用、电荷相互作用、范德华力等与聚合物基质缔合。

[0113] 常规地,已知多种多样的聚合物和从这些聚合物形成聚合物基质的方法。总体而言,聚合物基质包括一种或多种聚合物。

[0114] 在此提供的这些合成纳米载体可以是聚合纳米载体。聚合物可以是天然的或非天然的(合成的)聚合物。聚合物可以是均聚物或包括两种或更多种单体的共聚物。在序列方面,共聚物可以是随机的、嵌段的,或包括随机序列与嵌段序列的组合。典型地,根据本发明的聚合物是有机聚合物。

[0115] 在一些实施例中,这些合成纳米载体包括一种或多种聚合物,该一种或多种聚合物包括一种聚酯、聚碳酸酯、聚酰胺或聚醚或其单元。在其他实施例中,该聚合物包括聚(乙

二醇) (PEG)、聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)或一种聚己内酯或其单元。在一些实施例中,优选该聚合物是生物可降解的。因此,在这些实施例中,优选如果该聚合物包括一种聚醚(如聚(乙二醇))或其单元,那么该聚合物包括一种聚醚与一种生物可降解聚合物的一种嵌段共聚物,以使得该聚合物是生物可降解的。在其他实施例中,该聚合物不仅仅包括一种聚醚或其单元,如聚(乙二醇)或其单元。该一种或多种聚合物可以被包含在聚合的合成纳米载体内或可以被包含在许多其他不同类型的合成纳米载体中。

[0116] 适用于本发明中的聚合物的实例还包括但不限于聚乙烯、聚碳酸酯(例如聚(1,3-二噁烷-2-酮))、聚酸酐(例如聚(癸二酸酐))、聚富马酸丙酯、聚酰胺(例如聚己内酰胺)、聚缩醛、聚醚、聚酯(例如聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙交酯-共-乙交酯、聚己内酯、聚羟基酸(例如聚( $\beta$ -羟基烷酸酯))、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯以及聚胺、聚赖氨酸、聚赖氨酸-PEG共聚物以及聚(乙亚胺)、聚(乙亚胺)-PEG共聚物。

[0117] 在一些实施例中,根据本发明的聚合物包括根据21C.F.R. §177.2600已通过美国食品与药品管理局(FDA)批准用于人类的聚合物,包括但不限于聚酯(例如聚乳酸、聚(乳酸-共-乙醇酸)、聚己内酯、聚戊内酯、聚(1,3-二噁烷-2-酮));聚酸酐(例如聚(癸二酸酐));聚醚(例如聚乙二醇);聚氨酯;聚甲基丙烯酸酯;聚丙烯酸酯;以及聚氰基丙烯酸酯。

[0118] 在一些实施例中,聚合物可以是亲水性的。举例来说,聚合物可以包含阴离子基团(例如磷酸根、硫酸根、羧酸根);阳离子基团(例如季胺基);或极性基团(例如羟基、硫醇基、胺基)。在一些实施例中,包括亲水性聚合物基质的合成纳米载体在该合成纳米载体内产生亲水性环境。在一些实施例中,聚合物可以是疏水性的。在一些实施例中,包括疏水性聚合物基质的合成纳米载体在该合成纳米载体内产生疏水性环境。聚合物的亲水性或疏水性的选择可以影响被合并(例如偶合)在合成纳米载体内的物质的性质。

[0119] 在一些实施例中,聚合物可以用一个或多个部分和/或官能团修饰。根据本发明,可以使用多个部分或官能团。在一些实施例中,可以用聚乙二醇(PEG)、用碳水化合物、和/或用衍生自多糖的非环状聚缩醛修饰聚合物(巴比索夫(Papisov), 2001,《ACS研讨会系列》(ACS Symposium Series), 786:301)。可以使用格里夫(Gref)等人的美国专利第5543158号或冯安德里安(Von Andrian)等人的WO公布W02009/051837中的全部传授内容进行某些实施例。

[0120] 在一些实施例中,可以用脂质或脂肪酸基团修饰聚合物。在一些实施例中,脂肪酸基团可以是丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山萘酸或二十四烷酸中的一种或多种。在一些实施例中,脂肪酸基团可以是棕榈油酸、油酸、异油酸、亚油酸、 $\alpha$ -亚油酸、 $\gamma$ -亚油酸、花生四烯酸、二十碳烯酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或芥酸中的一种或多种。

[0121] 在一些实施例中,聚合物可以是聚酯,包括包含乳酸和乙醇酸单元的共聚物,如聚(乳酸-共-乙醇酸)和聚(丙交酯-共-乙交酯,在此统称为“PLGA”;和包含乙醇酸单元的均聚物,在此称为“PGA”;以及包含乳酸单元的均聚物,如聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D,L-乳酸、聚-L-丙交酯、聚-D-丙交酯以及聚-D,L-丙交酯,在此统称为“PLA”。在一些实施例中,示例性聚酯包括例如聚羟基酸;PEG共聚物和丙交酯与乙交酯的共聚物(例如PLA-PEG共聚物、PGA-PEG共聚物、PLGA-PEG共聚物以及其衍生物。在一些实施例中,聚酯包括例如聚(己内



酯)、聚(己内酯)-PEG共聚物、聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)、聚(丝氨酸酯)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、聚[ $\alpha$ -(4-氨基丁基)-L-乙醇酸]以及其衍生物。

[0122] 在一些实施例中,聚合物可以是PLGA。PLGA是一种生物相容的并且生物可降解的乳酸与乙醇酸的共聚物,并且多种形式的PLGA的特征在于乳酸:乙醇酸的比率。乳酸可以是L-乳酸、D-乳酸或D,L-乳酸。可以通过改变乳酸:乙醇酸的比率调整PLGA的降解速率。在一些实施例中,根据本发明,将使用的PLGA的特征在于乳酸:乙醇酸比率是约85:15、约75:25、约60:40、约50:50、约40:60、约25:75或约15:85。

[0123] 在一些实施例中,聚合物可以是一种或多种丙烯酸聚合物。在某些实施例中,丙烯酸聚合物包括例如丙烯酸与甲基丙烯酸的共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰基乙酯、甲基丙烯酸氨基烷酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基酰胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸酐)、甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)共聚物、聚丙烯酰胺、甲基丙烯酸氨基烷酯共聚物、甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物、聚氰基丙烯酸酯以及包含一种或多种上述聚合物的组合。丙烯酸聚合物可以包括丙烯酸和甲基丙烯酸酯与低含量季铵基团的全聚合共聚物。

[0124] 在一些实施例中,聚合物可以是阳离子型聚合物。总体而言,阳离子型聚合物能够缩合和/或保护核酸(例如DNA或其衍生物)的带负电的链。包含胺的聚合物(如聚(赖氨酸)(泽纳(Zauner)等人,1998,《先进药物递送评论》(Adv. Drug Del. Rev.), 30:97;和卡巴诺夫(Kabanov)等人,1995,《生物结合化学》(Bioconjugate Chem.), 6:7)、聚(乙亚胺)(PEI;博塞夫(Boussif)等人,1995,《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci.), 美国(USA), 1995, 92:7297)以及聚(酰胺基胺)树枝状聚合物(库沃斯卡-拉塔罗(Kukowska-Latallo)等人,1996,《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci.), 美国, 93:4897;唐(Tang)等人,1996,《生物结合化学》, 7:703;以及汉斯勒(Haensler)等人,1993,《生物结合化学》, 4:372))在生理pH值下带正电,与核酸形成离子对,并且在多种细胞系中介导转染。在实施例中,这些合成纳米载体可以不包括(或可以排除)阳离子型聚合物。

[0125] 在一些实施例中,聚合物可以是带有阳离子侧链的可降解聚酯(普特南(Putnam)等人,1999,《大分子》(Macromolecules), 32:3658;巴雷拉(Barrera)等人,1993,《美国化学会志》(J. Am. Chem. Soc.), 115:11010;权(Kwon)等人,1989,《大分子》, 22:3250;林(Lim)等人,1999,《美国化学会志》, 121:5633;以及周(Zhou)等人,1990,《大分子》, 23:3399)。这些聚酯的实例包括聚(L-丙交酯-共-L-赖氨酸)(巴雷拉等人,1993,《美国化学会志》, 115:11010)、聚(丝氨酸酯)(周等人,1990,《大分子》, 23:3399)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(普特南等人,1999,《大分子》, 32:3658;和林等人,1999,《美国化学会志》, 121:5633)以及聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(普特南等人,1999,《大分子》, 32:3658;和林等人,1999,《美国化学会志》, 121:5633)。

[0126] 这些和其他聚合物的特性以及用于制备其的方法在本领域中是熟知的(参看例如美国专利6,123,727;5,804,178;5,770,417;5,736,372;5,716,404;6,095,148;5,837,752;5,902,599;5,696,175;5,514,378;5,512,600;5,399,665;5,019,379;5,010,167;4,806,621;4,638,045;以及4,946,929;王(Wang)等人,2001,《美国化学会志》, 123:9480;林等人,2001,《美国化学会志》, 123:2460;朗格尔(Langer), 2000,《化学研究评述》(Acc. Chem. Res.), 33:94;朗格尔,1999,《控释杂志》(J. Control. Release), 62:7;以及乌利



希 (Uhrich) 等人, 1999, 《化学评论》(Chem. Rev.), 99:3181)。更总体而言, 《聚合物科学以及聚合物胺和铵盐的简明百科全书》(Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts), 戈萨尔斯 (Goethals) 编, 培格曼出版社 (Pergamon Press), 1980; 《聚合原理》(Principles of Polymerization), 奥迪安 (Odian), 约翰威利父子出版公司 (John Wiley & Sons), 第四版, 2004; 《当代聚合物化学》(Contemporary Polymer Chemistry), 奥科克 (Allcock) 等人, 普伦蒂斯霍尔出版社 (Prentice-Hall), 1981; 戴明 (Deming) 等人, 1997, 《自然》(Nature), 390:386; 以及美国专利 6,506,577、6,632,922、6,686,446 以及 6,818,732 中描述了用于合成某些合适聚合物的多种方法。

[0127] 在一些实施例中, 聚合物可以是直链或分支链聚合物。在一些实施例中, 聚合物可以是树枝状聚合物。在一些实施例中, 聚合物可以彼此实质上交联。在一些实施例中, 聚合物可以实质上不交联。在一些实施例中, 聚合物可以根据本发明使用而不进行交联步骤。进一步理解的是, 合成纳米载体可以包含嵌段共聚物、接枝共聚物、共混物、混合物、和/或任何上述和其他聚合物的加合物。本领域的普通技术人员应认识到在此列出的聚合物代表可以根据本发明使用的聚合物的示例性不详尽清单。

[0128] 在一些实施例中, 合成纳米载体可以任选地包括一种或多种两亲实体。在一些实施例中, 两亲实体可以促进具有增加的稳定性、改进的均匀性或增加的粘性的合成纳米载体的制造。在一些实施例中, 两亲实体可以与脂质膜 (例如脂质双层、脂质单层等) 的内表面缔合。本领域中已知的多种两亲实体适用于制造根据本发明的合成纳米载体。此类两亲实体包括但不限于磷酸甘油酯; 磷脂酰胆碱; 二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC); 二油烯基磷脂酰基乙醇胺 (DOPE); 二油烯基氧丙基三乙基铵 (DOTMA); 二油酰基磷脂酰胆碱; 胆固醇; 胆固醇酯; 二酰基甘油; 二酰基甘油琥珀酸酯; 二磷脂酰基甘油 (DPPG); 十六烷醇; 脂肪醇, 如聚乙二醇 (PEG); 聚氧乙烯-9-月桂基醚; 表面活性脂肪酸, 如棕榈酸或油酸; 脂肪酸; 脂肪酸甘油单酯; 脂肪酸甘油二酯; 脂肪酸酰胺; 脱水山梨糖醇三油酸酯 (Span®85) 甘氨酸酯; 脱水山梨糖醇单月桂酸酯 (Span®20); 聚山梨醇酯 20 (Tween®20); 聚山梨醇酯 60 (Tween®60); 聚山梨醇酯 65 (Tween®65); 聚山梨醇酯 80 (Tween®80); 聚山梨醇酯 85 (Tween®85); 聚氧乙烯单硬脂酸酯; 表面活性素; 泊洛沙姆; 脱水山梨糖醇脂肪酸酯, 如脱水山梨糖醇三油酸酯; 卵磷脂; 溶血卵磷脂; 磷脂酰丝氨酸; 磷脂酰肌醇; 鞘磷脂; 磷脂酰乙醇胺 (脑磷脂); 心磷脂; 磷脂酸; 脑苷脂; 双十六烷基磷酸酯; 二棕榈酰磷脂酰甘油; 硬脂酰胺; 十二烷胺; 十六烷胺; 乙酰基棕榈酸酯; 蓖麻油酸甘油酯; 硬脂酸十六烷基酯; 肉豆蔻酸异丙酯; 泰洛沙泊 (tyloxapol); 聚(乙二醇) 5000-磷脂酰乙醇胺; 聚(乙二醇) 400-单硬脂酸酯; 磷脂; 具有高表面活性剂特性的合成的和/或天然的洗涤剂; 脱氧胆酸酯; 环糊精; 离液序列高的盐; 离子对试剂; 以及其组合。两亲实体组分可以是不同两亲实体的混合物。本领域的普通技术人员应认识到这是具有表面活性剂活性的物质的示例性的非详尽清单。任何两亲实体都可以用于制造根据本发明使用的合成纳米载体中。

[0129] 在一些实施例中, 合成纳米载体可以任选地包括一种或多种碳水化合物。碳水化合物可以是天然的或合成的。碳水化合物可以是衍生的天然碳水化合物。在某些实施例中, 碳水化合物包括单糖或二糖, 包括但不限于: 葡萄糖、果糖、半乳糖、核糖、乳糖、蔗糖、麦芽

糖、海藻糖、纤维二糖 (cellbiose)、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸、葡糖胺、半乳糖胺以及神经氨酸。在某些实施例中,碳水化合物是一种多糖,包括但不限于支链淀粉、纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素 (HPMC)、羟基纤维素 (HC)、甲基纤维素 (MC)、右旋糖酐、环葡聚糖、糖原、羟乙基淀粉、卡拉胶、多聚糖 (glycon)、直链淀粉、壳聚糖、N,0-羧甲基壳聚糖、藻胶和海藻酸、淀粉、甲壳质、菊糖、魔芋、葡萄糖甘露聚糖 (glucommannan)、石耳素、肝素、透明质酸、凝胶多糖以及黄原胶。在实施例中,这些合成纳米载体并不包括(或特异性地排除)碳水化合物,如多糖。在某些实施例中,该碳水化合物可以包括一种碳水化合物衍生物,如一种糖醇,包括但不限于甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、麦芽糖醇以及乳糖醇。

[0130] 用于根据本发明的方法中的组合物包含合成纳米载体与药学上可接受的赋形剂(如防腐剂、缓冲液、盐水或磷酸盐缓冲的盐水)的组合。可以使用常规药物制造和混合技术制造这些组合物,以实现有用的剂型。在一个实施例中,将合成纳米载体与防腐剂一起悬浮于无菌的供注射用的盐水溶液中。

[0131] 在实施例中,在制备作为载体的合成纳米载体以用于疫苗中时,用于将组分偶合到合成纳米载体的方法可以是有用的。如果组分是小分子,那么在组装合成纳米载体之前将组分连接到聚合物上可能具有优势。在实施例中,制备具有用于将组分偶合到合成纳米载体上的表面基团的合成纳米载体也可能是一个优势,该制备通过使用这些表面基团而不是将组分连接到聚合物上并且随后在建构合成纳米载体时使用这个聚合物结合物来进行。

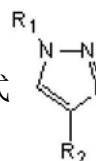
[0132] 在某些实施例中,偶合物可以是共价连接物。在实施例中,根据本发明的组分可以通过1,2,3-三唑连接物共价偶合到外表面上,该连接物通过纳米载体表面上的叠氮基与包含炔基的组分进行1,3-偶极环加成反应或通过纳米载体表面上的炔烃与包含叠氮基的组分进行1,3-偶极环加成反应形成。此类环加成反应优选在铜(I)催化剂以及合适的Cu(I)-配体和将Cu(II)化合物还原成催化活性的Cu(I)化合物的还原剂存在下执行。这种Cu(I)催化的叠氮-炔烃环加成反应(CuAAC)也可以称为点击反应。

[0133] 额外地,共价偶合物可以包括共价连接物,它包括酰胺连接物、二硫基连接物、硫醚连接物、脲连接物、酰肼连接物、亚胺或肟连接物、脲或硫脲连接物、脒连接物、胺连接物以及磺酰胺连接物。

[0134] 酰胺连接物通过一种组分上的胺与一种第二组分(如纳米载体)的羧酸基团之间的酰胺键形成。连接物中的酰胺键可以用被适当保护的氨基酸或抗原或佐剂以及被活化的羧酸(如被N-羟基琥珀酰亚胺活化的酯)使用任何常规酰胺键形成反应制备。

[0135] 二硫基连接物通过在例如R1-S-S-R2的形式两个硫原子之间形成二硫(S-S)键制备。二硫键可以通过包含硫醇基/巯基(-SH)的抗原或佐剂与聚合物或纳米载体上另一个被活化的硫醇基或包含硫醇基/巯基的纳米载体与包含被活化的硫醇基的组分进行硫醇交换形成。

[0136] 三唑连接物(特别是R1和R2可以是任何化学实体的形式



过连接到一个第一组分(如纳米载体)上的叠氮基与连接到一个第二组分上的末端炔烃的

1,3-偶极环加成反应制备。1,3-偶极环加成反应在具有或不具有催化剂的情况下、优选在有通过1,2,3-三唑官能团连接两种组分的Cu(I)催化剂的情况下执行。这种化学方法详细地描述在夏普勒斯(Sharpless)等人,《德国应用化学》(Angew.Chem.Int.Ed.),41(14),2596,(2002)和梅尔达尔(Meldal)等人,《化学评论》(Chem.Rev.),2008,108(8),2952-3015中,并且经常称为“点击”反应或CuAAC。

[0137] 在实施例中,制备了一种聚合物,它在聚合物链末端包含叠氮基或炔基。然后使用这种聚合物制备合成纳米载体,其方式为使得多个炔基或叠氮基安置在该纳米载体的表面上。可替代地,合成纳米载体可以通过另一种途径制备,并且随后用炔基或叠氮基官能化。组分在炔基(如果聚合物包含叠氮基)或叠氮基(如果聚合物包含炔)存在下制备。然后在具有或不具有催化剂下允许组分与纳米载体通过1,3-偶极环加成反应进行反应,该催化剂将组分通过1,4-二取代的1,2,3-三唑连接物共价偶合到颗粒上。

[0138] 硫醚连接物通过以例如R1-S-R2的形式形成硫-碳(硫醚)键制备。硫醚可以通过用一种第二组分(如纳米载体)上的烷基化基团(如卤基或环氧基)使一种组分上的硫醇基/巯基(-SH)烷基化来制备。硫醚连接物还可以通过一种组分上的硫醇基/巯基与作为迈克尔受体(Michael acceptor)的一种第二组分(如包含顺丁烯二酰亚胺基或乙烯砜基的聚合物)上的缺电子烯基进行迈克尔加成(Michael addition)来形成。以另一种方式,硫醚连接物可以通过一种组分上的硫醇基/巯基与一种第二组分(如聚合物或纳米载体)上的烯基进行自由基硫醇-烯反应来制备。

[0139] 腙连接物通过一种组分上的酰肼基与该第二组分(如纳米载体)上的醛/酮基进行反应来制备。

[0140] 酰肼连接物通过一种组分上的肼基与该第二组分(如纳米载体)上的羧酸基团进行反应来形成。此类反应总体上使用类似于形成酰胺键的化学方法(其中羧酸用活化试剂活化)执行。

[0141] 亚胺或肟连接物通过一种组分上的胺或N-烷氧基胺基(或氨氧基)与该第二组分(如纳米载体)上的醛或酮基进行反应来形成。

[0142] 脲或硫脲连接物通过一种组分上的胺基与该第二组分(如纳米载体)上的异氰酸酯或异硫氰酸酯基进行反应来制备。

[0143] 脒连接物通过一种组分上的胺基与该第二组分(如纳米载体)上的酰亚胺酯基进行反应来制备。

[0144] 胺连接物通过一种组分上的胺基与该第二组分(如纳米载体)上的烷基化基团(例如卤基、环氧基或磺酸酯基)进行烷基化反应来制备。可替代地,胺连接物还可以通过一种组分上的胺基与该第二组分(如纳米载体)上的醛或酮基在合适的还原试剂(如氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠)存在下进行还原胺化来制备。

[0145] 磺酰胺连接物通过一种组分上的胺基与该第二组分(如纳米载体)上的磺酰基卤化物(如磺酰氯)基团进行反应来制备。

[0146] 砜连接物通过亲核试剂与乙烯砜进行迈克尔加成来制备。乙烯砜或亲核试剂可以位于纳米载体的表面上或被连接到组分上。

[0147] 组分还可以与纳米载体通过非共价结合方法结合。举例来说,带负电的组分可以与带正电的纳米载体通过静电吸附结合。包含金属配体的组分还可以与包含金属络合物的

纳米载体通过金属-配体络合物结合。

[0148] 在实施例中,组分可以在组装合成纳米载体之前连接到聚合物(例如聚乳酸-嵌段-聚乙二醇)上,或可以形成合成纳米载体而使得反应性或可活化基团在其表面上。在后一情况下,可以制备组分以使它具有与由合成纳米载体的表面呈递的连接化学结构相容的基团。在其他实施例中,可以使用合适的连接物将组分连接到VLP或脂质体上。连接物是能够将两个分子偶合在一起的化合物或试剂。在一个实施例中,连接物可以是同双官能或杂双官能试剂,如海尔曼森(Hermanson)2008中所述。举例来说,可以在EDC存在下用同双官能连接物己二酸二酰肼(ADH)处理表面上包含羧基的VLP或脂质体合成纳米载体,形成具有ADH连接物的相应合成纳米载体。随后使所得被ADH连接的合成纳米载体与包含酸基的组分通过NC上的ADH连接物的另一端结合,产生相应的VLP或脂质体肽结合物。

[0149] 对于可用的结合方法的详细描述,参看海尔曼森G T(Hermanson G T),《生物结合技术》(Bioconjugate Techniques),第2版,学术出版公司(Academic Press, Inc.)出版,2008。除共价连接以外,组分还可以通过吸附于预成型的合成纳米载体上来偶合,或它还可以通过在形成合成纳米载体期间进行封装来偶合。

[0150] 在一些实施例中,可以分离一种组分,如一种抗原或佐剂。分离是指使要素从其天然环境分开并且以足以允许其鉴别或使用的量存在。这意味着,例如,要素可以(i)通过表达克隆选择性地产生或(ii)如通过色谱法或电泳进行纯化。分离的要素可以是但不必是实质上纯的。因为分离的要素可以与药物制剂中的药学上可接受的赋形剂混合,所以要素可以仅占该制剂的小重量百分比。尽管如此,该要素是分离的,因为它已经与生物系统中它可能缔合的物质分开,即与其他脂质或蛋白质分离。在此提供的任何要素可以是分离的。在此提供的任何抗原可以按分离的形式包括在组合物中。

[0151] D. 使用和制造合成纳米载体组合物的方法

[0152] 合成纳米载体可以使用本领域中已知的多种多样的方法来制备。举例来说,合成纳米载体可以由如以下的方法形成:纳米沉淀、使用射流通道的流动聚焦、喷雾干燥、单一和双重乳液溶剂蒸发、溶剂萃取、相分离、研磨、微乳液工序、微制造、纳米制造、牺牲层、简单和复杂的凝聚以及本领域普通技术人员熟知的其他方法。可替代地或额外地,已经描述了单分散半导体、传导性、磁性、有机以及其他纳米材料的水性和有机溶剂合成(普莱伊亚诺(Pellegrino)等人,2005,《微小》(Small),1:48;默瑞(Murray)等人,2000,《材料科学评论年报》(Ann.Rev.Mat.Sci.),30:545;以及特林达迪(Trindade)等人,2001,《化学材料》(Chem.Mat.),13:3843)。文献中已经描述了额外的方法(参看例如达保罗(Doubrow)编,“医学和药学中的微胶囊和纳米颗粒(Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy)”,CRC出版社(CRC Press),博卡拉顿(Boca Raton),1992;马西威兹(Mathiowitz)等人,1987,《控释杂志》(J.Control.Release),5:13;马西威兹等人,1987,《反应性聚合物》(Reactive Polymers),6:275;以及马西威兹等人,1988,《应用聚合物科学杂志》(J.Appl.Polymer Sci.),35:755;美国专利5578325和6007845;P.保利赛利(P. Paolicelli)等人,“可以有效地缔合并递送病毒样颗粒的经过表面修饰的基于PLGA的纳米颗粒(Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles)”,《纳米医学》(Nanomedicine),5(6):843-853(2010))。

[0153] 希望时,可以使用多种方法将不同的物质封装于合成纳米载体中,这些方法包括但不限于C.阿斯特提(C.Astete)等人,“PLGA纳米颗粒的合成和表征(Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles)”,《生物材料科学杂志聚合物版》(J.Biomater.Sci.Polymer Edn),第17卷,第3期,第247-289页(2006);K.阿沟司达奇斯(K.Avgoustakis),“被聚乙二醇化的聚(丙交酯)与聚(丙交酯-共-乙交酯)纳米颗粒:制备、特性以及在药物递送中的可能应用(Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible ApplicationS in Drug Delivery)”,《当前药物递送》(Current Drug Delivery),1:321-333(2004);C.瑞斯(C.Reis)等人,“纳米封装I.用于制备负载药物的聚合物纳米颗粒的方法(Nanoencapsulation I.Methodsfor preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles)”,《纳米医学》,2:8-21(2006);P.保利赛利等人,“可以有效地缔合并且递送病毒样颗粒的经过表面修饰的基于PLGA的纳米颗粒”,《纳米医学》,5(6):843-853(2010)。可以使用适合用于将物质封装在合成纳米载体中的其他方法,包括但不限于在安格(Unger)的美国专利6,632,671(2003年10月14日)中披露的方法。

[0154] 在某些实施例中,通过纳米沉淀方法或喷雾干燥来制备合成纳米载体。可以改变在制备合成纳米载体中使用的条件以产生具有所希望的大小或特性(例如疏水性、亲水性、外部形态学、“粘性”、形状等)的颗粒。制备合成纳米载体的方法和使用的条件(例如溶剂、温度、浓度、空气流速等)可以取决于有待偶合到合成纳米载体上的物质和/或该聚合物基质的构成。

[0155] 如果通过任何以上方法制备的颗粒具有在希望的范围之外的大小范围,那么可以例如使用一个筛网来定颗粒尺寸。

[0156] 合成纳米载体的要素可以例如通过一个或多个共价键偶合到整体合成纳米载体上或可以借助一个或多个连接物偶合。使合成纳米载体官能化的额外的方法可以由以下文献改编而来:索尔兹曼(Saltzman)等人的已公布的美国专利申请2006/0002852、德西蒙(DeSimone)等人的已公布的美国专利申请2009/0028910或默西(Murthy)等人的已公布的国际专利申请W0/2008/127532A1。

[0157] 可替代地或额外地,合成纳米载体可以直接地或间接地通过非共价相互作用偶合到要素上。在非共价的实施例中,非共价偶合通过非共价相互作用介导,这些非共价相互作用包括但不限于电荷相互作用、亲和相互作用、金属配位、物理吸附、主客体相互作用、疏水性相互作用、 $\pi$ - $\pi$ 堆积相互作用、氢键相互作用、范德华相互作用、磁相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用和/或其组合。此类偶合可以安排在一种合成纳米载体的一个外表面或一个内表面上。在实施例中,封装和/或吸附是偶合的一种形式。

[0158] 在实施例中,合成纳米载体可以与佐剂通过在同一媒剂或递送系统中混合而组合。此类佐剂可以包括但不限于矿物盐(如明矾,与肠细菌(如大肠埃希氏杆菌(如大肠杆菌)、明尼苏达沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌或弗氏志贺氏杆菌)的单磷酸脂质(MPL)A组合的明矾或分别与MPL®(AS04)、以上提到的细菌的MPL A特异性组合的明矾)、皂甙(如QS-21、Quil-A、ISCOM、ISCOMATRIX™)、乳液(如MF59™、Montanide® ISA 51以及ISA 720)、AS02(QS21+角鲨烯+MPL®)、脂质体和脂质体配制品(如AS01)、合成的或特别制备的微粒和微载体(如淋病奈瑟菌、沙眼衣原体和其他细菌的衍生自细菌的外膜泡(OMV))、或壳聚糖颗

粒、贮存形成剂(如Pluronic®嵌段共聚物)、特异性修饰或制备的肽(如胞壁酰二肽)、氨基烷基氨基葡萄糖苷4-磷酸酯(如RC529)、或蛋白质(如细菌类毒素或毒素片段)。此类其他佐剂的剂量可以使用常规剂量范围研究来确定。

[0159] 在实施例中,这些合成纳米载体可以与分别地不同时间点和/或在不同身体部位和/或通过不同的免疫路径给予的与偶合到纳米载体(有或无佐剂,利用或不利用另一种递送媒介)上的那些不同、类似或相同的抗原组合,或与分别地不同时间点和/或在不同身体部位和/或通过不同的免疫路径给予的另一种携带抗原和/或佐剂的合成纳米载体组合。

[0160] 合成纳米载体群可以使用传统的药物混合方法组合以形成根据本发明的药物剂型。这些方法包括液体-液体混合,其中两种或更多种各自包含一个或多个纳米载体子组的悬浮液被直接组合或通过一个或多个包含稀释剂的容器被集合在一起。因为合成纳米载体还可以用粉末形式生产或储存,所以可以进行干燥的粉末-粉末混合,因为可以将两种或更多种粉末再悬浮于共同的介质中。取决于纳米载体的特性和其相互作用潜力,一种或另一种混合途径可能也有优势。

[0161] 包含合成纳米载体的典型组合物可以包括无机或有机缓冲液(例如磷酸、碳酸、乙酸或柠檬酸的钠盐或钾盐)和pH值调节剂(例如盐酸、氢氧化钠或氢氧化钾、柠檬酸或乙酸的盐、氨基酸和其盐)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、 $\alpha$ -生育酚)、表面活性剂(例如聚山梨醇20、聚山梨醇80、聚氧乙烯9-10壬基酚、去氧胆酸钠)、溶液和/或低温/冻干稳定剂(例如蔗糖、乳糖、甘露糖醇、海藻糖)、渗透调节剂(例如盐类或糖类)、抗菌剂(例如苯甲酸、苯酚、庆大霉素)、防沫剂(例如聚二甲基硅酮)、防腐剂(例如硫柳汞、2-苯氧乙醇、EDTA)、聚合物稳定剂和粘度调节剂(例如聚乙烯吡咯烷酮、泊洛沙姆488、羧甲基纤维素)、以及共溶剂(例如甘油、聚乙二醇、乙醇)。

[0162] 根据本发明的组合物包含与药学上可接受的赋形剂组合的合成纳米载体。可以使用常规药物制造和混合技术制造这些组合物,以实现有用的剂型。适合于实施本发明的技术可以在《工业混合手册:科学和惯例》(Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice),爱德华L.保罗(Edward L. Paul),维克多A.阿蒂莫-奥本格(Victor A. Atiemo-Oheng)以及苏珊妮M. 克里斯塔(Suzanne M. Kresta)编,2004约翰威利父子公司(John Wiley & Sons, Inc.);和《制药学:剂型设计科学》(Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design),第2版M.E.奥顿(M.E. Auten)编,2001,邱吉尔利文斯通(Churchill Livingstone)中找到。在一个实施例中,将合成纳米载体与防腐剂一起悬浮于无菌的供注射用的盐水溶液中。

[0163] 应理解的是,合成纳米载体的组合物可以按任何合适方式制造,并且本发明决不限于使用可以使用在此描述的方法制造的组合物。适当方法的选择可能需要注意被关联的特定要素的特性。

[0164] 在一些实施例中,合成纳米载体在无菌条件下制造或最后进行灭菌。这可以确保所得组合物是无菌的并且是非感染性的,因此当与非无菌的组合物相比时,改进了安全性。这提供了有价值的安全措施,特别是当接受合成纳米载体的受试者具有免疫缺陷、正在遭受感染和/或易受感染时。在一些实施例中,取决于配制策略,合成纳米载体可以被冻干并且储存在悬浮液中或呈冻干粉末形式历经较长时间而无活性损失。

[0165] 本发明的组合物可以通过多种途径来给予,包括但不限于皮下、鼻内、经口、静脉内、腹膜内、肌肉内、经粘膜、经粘膜、经舌下、经直肠、眼用、经肺、皮内、透皮、经皮或皮内或通过上述途径的组合。给药途径还包括通过吸入或经肺气雾剂给药。用于制备气雾剂递送系统的技术为本领域技术人员所熟知(参看例如夏拉(Sciarra)和柯蒂(Cutie),“气雾剂(Aerosols)”,《雷明顿医药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第18版,1990,第1694-1712页;通过引用结合)。

[0166] 根据本发明,剂型的剂量包含不同量的合成纳米载体群和不同量的蛋白质和/或佐剂和/或额外的抗原。剂型中存在的合成纳米载体和/或蛋白质和/或佐剂和/或额外的抗原的量可以根据存在的要素的性质、打算实现的治疗益处以及其他此类参数变化。在实施例中,可以进行剂量范围研究以建立剂型中存在的合成纳米载体群的最佳治疗量和蛋白质和/或佐剂和/或额外的抗原的量。在实施例中,合成纳米载体和蛋白质和/或佐剂和/或额外的抗原以在向受试者给药后有效产生对蛋白质和/或额外的抗原的免疫应答的量存在于剂型中。有可能可以使用常规剂量范围研究和技术确定在受试者中有效产生免疫应答的量。剂型可以用多种频率给予。在一个优选的实施例中,剂型的至少一次给予足以产生药理学上相关的应答。在更优选的实施例中,利用剂型的至少两次给予、至少三次给予或至少四次给予来确保药理学上相关的应答。

[0167] 在此描述的组合物和方法可以用于诱导、增强、抑制、调节、引导或再引导免疫应答。在此描述的组合物和方法可以用于诊断、预防和/或治疗以下病状,如癌症、传染病、代谢性疾病、退行性疾病、非自身免疫疾病、HIV、疟疾、乙型肝炎或在此提供的任何其他病症和/或病状。

[0168] 传染病的实例包括但不限于病毒性传染病,如AIDS、禽痘(水痘)、普通感冒、细胞肥大病毒感染、科罗拉多蜱传热、登革热、埃博拉出血热、手足口病、肝炎、单纯疱疹、带状疱疹、HPV、流感(Flu)、拉沙热、麻疹、马尔堡出血热、感染性单核细胞增多症、腮腺炎、诺如病毒、脊髓灰质炎、进行性多灶性脑白质病、狂犬病、风疹、SARS、天痘(天花)、病毒性脑炎、病毒性胃肠炎、病毒性脑膜炎、病毒性肺炎、西尼罗病以及黄热病;细菌性传染病,如炭疽、细菌性脑膜炎、肉毒中毒、布鲁氏菌病、弯曲菌病、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、李斯特菌病、莱姆病、类鼻疽、风湿热、MRSA感染、诺卡氏菌病、百日咳(Pertussis/Whooping Cough)、瘟疫、肺炎球菌肺炎、鹦鹉热、Q热、落矶山斑疹热(RMSF)、沙门氏菌病、猩红热、志贺氏杆菌病、梅毒、破伤风、沙眼、结核病、土拉菌病、伤寒、斑疹伤寒以及尿路感染;寄生虫传染病,如非洲锥虫病、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、囊虫病、裂头绦虫病、麦地那龙线虫病、棘球蚴病、蛲虫病、片吸虫病、姜片虫病、丝虫病、自由生活阿米巴感染、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、弓形虫病、旋毛虫病(Trichinellosis/Trichinosis)、鞭虫病、滴虫病以及锥虫病;真菌传染病,如曲霉菌病、芽生菌病、念珠菌病、球孢子菌病、隐球菌病、组织胞浆菌病、香港脚(脚癣)以及股癣;朊病毒传染病,如阿尔珀斯病、致命性家族性失眠症、杰茨曼-斯脱司勒-史茵克综合症(Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome)、库鲁症以及变异的克罗伊茨费尔特-雅各布病(Variant Creutzfeldt-Jakob disease)。



[0169] 癌症的实例包括但不限于乳癌；胆道癌；膀胱癌；脑癌，包括成胶质细胞瘤和成神经管细胞瘤；子宫颈癌；绒膜癌；结肠癌；子宫内膜癌；食道癌；胃癌；血液学赘瘤，包括急性淋巴细胞性和骨髓性白血病，例如B细胞CLL；T细胞急性成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤；毛细胞白血病；慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤；AIDS相关白血病和成人T细胞白血病/淋巴瘤；上皮内赘瘤，包括博文氏病 (Bowen's disease) 和佩吉特氏病 (Paget's disease)；肝癌；肺癌；淋巴瘤，包括何杰金氏病 (Hodgkin's disease) 和淋巴细胞性淋巴瘤；成神经细胞瘤；口腔癌，包括鳞状细胞癌；卵巢癌，包括从上皮细胞、基质细胞、生殖细胞以及间充质细胞产生的那些；胰腺癌；前列腺癌；直肠癌；肉瘤，包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤以及骨肉瘤；皮肤癌，包括黑色素瘤、梅克尔细胞癌、卡波济氏肉瘤、基底细胞癌以及鳞状细胞癌；睾丸癌，包括生殖瘤，如精原细胞瘤、非精原细胞瘤 (畸胎瘤、绒膜癌)、基质肿瘤以及生殖细胞肿瘤；甲状腺癌，包括甲状腺腺癌和髓样癌；以及肾癌，包括腺癌和维尔姆斯氏瘤。

[0170] 代谢性疾病的实例包括但不限于碳水化合物代谢、氨基酸代谢、有机酸代谢、脂肪酸氧化和线粒体代谢、卟啉代谢、嘌呤或嘧啶代谢、类固醇代谢的病症、溶酶体线粒体作用、过氧化体作用、溶酶体储存、尿素循环病症 (例如N-乙酰基谷氨酸合成酶不足、氨甲酰基磷酸合成酶不足、鸟氨酸氨甲酰基转移酶不足、克林诺琥珀酸尿症 (crginosuccinic aciduria)、瓜氨酸血症、精氨酸酶不足)、氨基酸病症 (例如非酮性高甘氨酸血症、酪氨酸血症 (I型)、槭糖尿病)、有机酸血症 (例如异戊酸血症、甲基丙二酸血症、丙酸血症、I型戊二酸尿、I&II型戊二酸血症)、线粒体病症 (例如羧化酶不足、线粒体肌病、乳酸性酸中毒 (丙酮酸脱氢酶复合物不足)、先天性乳酸性酸中毒、线粒体呼吸链不足、胱氨酸病、高雪氏病 (Gaucher's disease)、法布里病 (Fabry's disease)、庞贝病 (Pompe's disease)、I型粘多糖病、II型粘多糖病、VI型粘多糖病)。

[0171] 退行性疾病的实例包括但不限于间充质/中胚层退行性疾病、肌肉退行性疾病、内皮退行性疾病、神经退行性疾病、退化性关节炎 (例如骨关节炎)、退化性心脏病的主要类型 (例如冠心病、先天性心脏病、风湿性心脏病、心绞痛)、神经退行性疾病 (例如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease)、肌肉萎缩性侧索硬化、弗里德赖希氏共济失调 (Friedreich's ataxia)、亨廷顿病 (Huntington's disease)、路易体病 (Lewy body disease)、帕金森病 (Parkinson's disease)、脊髓性肌萎缩)、神经肌肉失调 (例如肌营养不良、杜氏肌营养不良、面肩胛肱型肌营养不良、强直性肌营养不良、先天性肌病、家族性心肌病、扩张型心肌病、肥厚型心肌病、限制性心肌病或冠状动脉疾病)。

[0172] 在此提供的用于偶合到合成纳米载体的蛋白质和/或额外的抗原可以是与在此提供的疾病或病状中的任一者相关的抗原。这些抗原包括与癌症、感染或传染病或退化性或非自身免疫疾病相关的抗原。还包括与HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种α病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染相关的抗原。

[0173] 癌症抗原的实例包括HER 2 (p185)、CD20、CD33、GD3神经节苷脂、GD2神经节苷脂、癌胚抗原 (CEA)、CD22、牛奶粘蛋白核心蛋白、TAG-72、路易斯A抗原、卵巢相关抗原 (如OV-TL3和MOv18)、由抗体9.2.27识别的高Mr黑色素瘤抗原、HMG-2、SM-3、B72.3、PR5C5、PR4D2



等。其他实例包括MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV (DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白 (ADAbp)、FAP、亲环蛋白b、结肠直肠相关抗原 (CRC) --C017-1A/GA733、癌胚抗原 (CEA) 和其免疫原性表位CAP-1和CAP-2、etv6、aml1、前列腺酸性磷酸酶 (PAP)、前列腺特异性抗原 (PSA) 和其免疫原性表位PSA-1、PSA-2以及PSA-3、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、T细胞受体/CD3- $\zeta$ 链、肿瘤抗原的MAGE家族 (例如MAGE-I或MAGE-II家族) (例如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、肿瘤抗原的GAGE家族 (例如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、HER2/neu、p21ras、RCAS 1、 $\alpha$ -胎蛋白、E-钙粘蛋白、 $\alpha$ -连环蛋白、 $\beta$ -连环蛋白以及 $\gamma$ -连环蛋白、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白 (APC)、胞衬蛋白、联接蛋白37、Ig-个体基因型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒性产物 (如人类乳头状瘤病毒蛋白)、肿瘤抗原的Smad家族、Imp-1、P1A、EBV编码的核抗原 (EBNA) -1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7、CD20以及c-erbB-2。

[0174] 在另一个实施例中,与感染或传染病相关的抗原与在此提供的任何感染因子相关。在一个实施例中,感染因子是以下各科的病毒:腺病毒科、细小核糖核酸病毒科、疱疹病毒科、嗜肝DNA病毒科、黄病毒科、反转录病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、乳头瘤病毒科、弹状病毒科、披膜病毒科或细小病毒科。在再另一个实施例中,感染因子是腺病毒、柯萨奇病毒、A型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、埃-巴二氏病毒、人类巨细胞病毒、人类疱疹病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、黄热病毒、登革热病毒、西尼罗病毒、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼吸道合胞体病毒、人类偏肺病毒、人类乳头瘤病毒、狂犬病病毒、风疹病毒、人类博卡病毒或细小病毒B19。在又一个实施例中,感染因子是以下各属的细菌:博德特氏菌属、疏螺旋体属、布鲁氏菌属、弯曲杆菌属、衣原体属和披衣菌属、梭菌属、棒状杆菌属、肠球菌属、埃希氏杆菌属、弗朗西斯氏菌属、嗜血杆菌属、螺杆菌属、军团杆菌属、钩端螺旋体属、李斯特菌属、分枝杆菌属、支原体属、奈瑟菌属、假单胞菌属、立克次体、沙门氏菌属、志贺氏杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、密螺旋体属弧菌属或耶尔森氏菌属。在另一个实施例中,感染因子是百日咳杆菌、伯氏疏螺旋菌、牛布鲁氏菌、狗布鲁氏菌、羊布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、空肠弯曲杆菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、鹦鹉披衣菌、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、土拉弗朗西斯氏菌、流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌、嗜肺军团杆菌、问号钩端螺旋体、单核细胞增多性李斯特菌、麻风分枝杆菌、结核分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、肺炎支原体、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、绿脓假单胞菌、立氏立克次体、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、宋内氏志贺氏杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、酿脓链球菌、苍白密螺旋体、霍乱弧菌或鼠疫耶尔森氏菌。在另一个实施例中,感染因子是以下各属的真菌:念珠菌属、曲霉属、隐球菌属、组织胞浆菌属、肺囊虫属或葡萄穗霉属。在再另一个实施例中,感染因子是白色念珠菌、烟曲霉、黄曲霉、新型隐球菌、罗氏隐球菌、浅白隐球菌、加特隐球菌、荚膜组织胞浆菌、伊氏肺囊虫或黑葡萄穗霉。

[0175] 在又一个实施例中,与感染或传染病相关的抗原是包括以下的抗原:VI、VII、E1A、E3-19K、52K、VP1、表面抗原、3A蛋白、衣壳蛋白、核衣壳、表面突出物、跨膜蛋白、UL6、UL18、UL35、UL38、UL19、早期抗原、衣壳抗原、Pp65、gB、p52、潜伏的核抗原-1、NS3、包膜蛋白、包膜蛋白E2结构域、gp120、p24、脂肽Gag (17-35)、Gag (253-284)、Nef (66-97)、Nef (116-145)、Pol (325-355)、神经氨酸酶、核衣壳蛋白、基质蛋白、磷蛋白、融合蛋白、血球凝集素、血球凝集素-神经氨酸酶、糖蛋白、E6、E7、包膜脂蛋白或非结构蛋白(NS)。在另一个实施例中,抗原包括百日咳毒素(PT)、丝状血球凝集素(FHA)、百日咳粘附素(PRN)、菌毛(FIM 2/3)、VlsE;DbpA、OspA、Hia、PrpA、MltA、L7/L12、D15、0187、Vir.J、Mdh、AfuA、L7/L12、外膜蛋白、LPS、A型抗原、B型抗原、C型抗原、D型抗原、E型抗原、FliC、FliD、Cwp84、 $\alpha$ -毒素、 $\theta$ -毒素、果糖1,6-磷酸氢盐-醛缩酶(FBA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPD)、丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)、延伸因子-G(EF-G)、假定蛋白(HP)、T毒素、类毒素抗原、荚膜多糖、蛋白质D、Mip、核蛋白(NP)、RD1、PE35、PPE68、EsxA、EsxB、RD9、EsxV、Hsp70、脂多糖、表面抗原、Sp1、Sp2、Sp3、甘油磷酸二酯磷酸二酯酶、外膜蛋白、陪伴-引导蛋白、荚膜蛋白(F1)或V蛋白。在又一个实施例中,抗原是包括以下的抗原:荚膜糖蛋白、Yps3P、Hsp60、主要表面蛋白质、MsgC1、MsgC3、MsgC8、MsgC9或SchS34。

[0176] 实例

[0177] 实例1:合成纳米载体配制品批号1

[0178] 材料

[0179] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(Worthington Biochemical Corporation)(瓦萨大道(Vassar Avenue)730号,湖木市(Lakewood),新泽西州(NJ)08701,产品代码3048)。合成了PLGA-R848,它具有约5,200Da、由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制成并且具有12.7%w/w结合的R848含量。合成了PLA-PEG-烟碱,它具有约5,000Da的由烟碱封端的PEG嵌段和约19,000Da的DL-PLA嵌段。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(SurModics Pharmaceuticals)(汤姆马丁路(Tom Martin Drive)756号,伯明翰市(Birmingham),亚拉巴马州(AL)35211,产品代码100DL 2A)。聚乙烯醇( $M_w=11,000-31,000$ ,87%-89%水解的)购自杰帝贝柯公司(件号U232-08)。

[0180] 方法

[0181] 溶液如下制备:

[0182] 溶液1:在10mM磷酸盐缓冲液中的20mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0183] 溶液2:在二氯甲烷中的50mg/mL PLGA-R848、25mg/mL PLA-PEG-烟碱、25mg/mL PLA。通过将每种聚合物以100mg/mL分别地溶解于二氯甲烷中,然后通过添加2份PLGA-R848溶液到1份每种PLA-PEG-烟碱溶液和PLA溶液中来混合这些溶液,来制备该溶液。

[0184] 溶液3:在100mM磷酸盐缓冲液(pH8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0185] 溶液4:70mM磷酸盐缓冲液,pH8。

[0186] 首先,使用溶液1和溶液2产生初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1(0.2mL)与溶液2(1.0mL),并且使用一个必能信数字式声波仪(Branson Digital Sonifier)250在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过向初级乳液中添加溶液3(2.0mL)并且接着使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理40秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲溶液(30mL)的一个50mL开口烧杯

中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以13,823g旋转一小时,去除上清液,并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0187] 表1:纳米载体表征

[0188]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	R848 (w/w %)	卵 白 蛋 白 (w/w %)
1	214	4.0	1.1

[0189] 实例2:合成纳米载体配制品批号2

[0190] 材料

[0191] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州08701,产品代码3048)。卵白蛋白肽323-339酰胺乙酸盐购自巴亨美洲公司(Bachem Americas Inc.)(柏市街(Kashiwa Street)3132号,托伦斯(Torrance),加利福尼亚州(CA)90505,产品代码4065609)。合成了PLGA-R848,它具有约5,200Da、由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制成并且具有12.7%w/w结合的R848含量。合成了PLA-PEG-烟碱,它具有约5,000Da的由烟碱封端的PEG嵌段和约19,000Da的DL-PLA嵌段。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。聚乙烯醇(Mw=11,000-31,000,87%-89%水解的)购自杰帝贝柯公司(件号U232-08)。

[0192] 方法

[0193] 溶液如下制备:

[0194] 溶液1A:在10mM磷酸盐缓冲液中的40mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0195] 溶液1B:在稀盐酸水溶液中的40mg/mL卵白蛋白肽酰胺323-339。

[0196] 溶液2:在二氯甲烷中的50mg/mL PLGA-R848、25mg/mL PLA-PEG-烟碱、25mg/mL PLA。通过将每种聚合物以100mg/mL分别地溶解于二氯甲烷中,然后通过添加2份PLGA-R848溶液到1份每种PLA-PEG-烟碱溶液和PLA溶液中来混合这些溶液,来制备该溶液。

[0197] 溶液3:在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0198] 溶液4:70mM磷酸盐缓冲液,pH 8。

[0199] 使用溶液1A和溶液2产生第一初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1A(0.2mL)与溶液2(1.0mL),并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。使用溶液1B和溶液2产生第二初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1B(0.2mL)与溶液2(1.0mL),并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。将约1/2的第二初级乳液从其压力管移出并且舍弃,并且然后将1/2的第一初级乳液(0.500mL)添加到该管中以产生两种初级乳液的总体积是约1mL的1:1混合物。然后通过向初级乳液中添加溶液3(2.0mL)并且接着使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理40秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲溶液(30mL)的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以13,823g旋转一小时,去除上清液,

并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0200] 表2:纳米载体表征

[0201]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	R848 (w/w %)	卵白蛋白蛋白质 (w/w %)	卵白蛋白肽 (w/w %)
2	234	3.9	0.3	2.3

[0202] 实例3:合成纳米载体配制品批号3

[0203] 材料

[0204] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州(NJ) 08701,产品代码3048)。合成了PLGA-R848,它具有约5,200Da、由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制成并且具有12.7%w/w结合的R848含量。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有2,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约19,000Da的DL-PLA嵌段。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。聚乙烯醇(Mw=11,000-31,000,87%-89%水解的)购自杰帝贝柯公司(件号U232-08)。

[0205] 方法

[0206] 溶液如下制备:

[0207] 溶液1:在10mM磷酸盐缓冲液中的20mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0208] 溶液2:在二氯甲烷中的50mg/mL PLGA-R848、25mg/mL PLA-PEG-OMe、25mg/mL PLA。通过将每种聚合物以100mg/mL分别地溶解于二氯甲烷中,然后通过添加2份PLGA-R848溶液到1份每种PLA-PEG-OMe溶液和PLA溶液中来混合这些溶液,来制备该溶液。

[0209] 溶液3:在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0210] 溶液4:70mM磷酸盐缓冲液,pH8。

[0211] 首先,使用溶液1和溶液2产生初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1(0.2mL)与溶液2(1.0mL),并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过向初级乳液中添加溶液3(2.0mL)并且接着使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理40秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲溶液(30mL)的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以13,823g旋转一小时,去除上清液,并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0212] 表3:纳米载体表征

[0213]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	R848 (w/w %)	卵白蛋白
---------	-----------	--------------	------

[0214]

			(w/w %)
3	217	4.3	0.8

[0215] 实例4:合成纳米载体配制品批号4

[0216] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州08701,产品代码3048)。卵白蛋白肽323-339酰胺乙酸盐购自巴亨美洲公司(柏市街3132号,托伦斯,加利福尼亚州90505,产品代码4065609)。合成了PLGA-R848,它具有约5,200Da、由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制成并且具有12.7%w/w结合的R848含量。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有2,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约19,000Da的DL-PLA嵌段。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。聚乙烯醇(Mw=11,000-31,000,87%-89%水解的)购自杰帝贝柯公司(件号U232-08)。

[0217] 方法

[0218] 溶液如下制备:

[0219] 溶液1A:在10mM磷酸盐缓冲液中的40mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0220] 溶液1B:在稀盐酸水溶液中的40mg/mL卵白蛋白肽酰胺323-339。

[0221] 溶液2:在二氯甲烷中的50mg/mL PLGA-R848、25mg/mL PLA-PEG-OMe、25mg/mL PLA。通过将每种聚合物以100mg/mL分别地溶解于二氯甲烷中,然后通过添加2份PLGA-R848溶液到1份每种PLA-PEG-OMe溶液和PLA溶液中来混合这些溶液,来制备该溶液。

[0222] 溶液3:在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0223] 溶液4:70mM磷酸盐缓冲液,pH 8。

[0224] 使用溶液1A和溶液2产生第一初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1A(0.2mL)与溶液2(1.0mL),并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。使用溶液1B和溶液2产生第二初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1B(0.2mL)与溶液2(1.0mL),并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。通过将0.6mL每种初级乳液转移到一个第三玻璃压力管中将两种初级乳液部分组合,以产生两种初级乳液的总体积是约1.2mL的1:1混合物。然后通过向初级乳液中添加溶液3(2.0mL)并且接着使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理40秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲溶液(30mL)的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以13,823g旋转一小时,去除上清液,并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0225] 表4:纳米载体表征

[0226]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	R848 (w/w %)	卵白蛋白蛋白 质 (w/w %)	卵白蛋白肽 (w/w %)
4	213	3.8	0.3	0.8

[0227] 实例5:合成纳米载体配制品批号5

[0228] 材料

[0229] SIINFEKL (SEQ ID NO:1) (卵白蛋白肽[257-264]) 购自巴亨美洲公司(柏市街3132号,托伦斯,加利福尼亚州90505,产品代码H-4866)。卵白蛋白肽323-339酰胺乙酸盐购自巴亨美洲公司(柏市街3132号,托伦斯,加利福尼亚州90505,产品代码4065609)。合成了PLGA-R848,它具有约4,500Da、由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制成并且具有15%w/w结合的R848含量。合成了PLA-PEG-烟碱,它具有约5,000Da的由烟碱封端的PEG嵌段和约17,000Da的DL-PLA嵌段。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。聚乙烯醇 ( $M_w=11,000-31,000$ , 87%-89%水解的) 购自杰帝贝柯公司(件号U232-08)。

[0230] 方法

[0231] 溶液如下制备:

[0232] 溶液1A:在DMSO中的200mg/mL SIINFEKL (SEQ ID NO:1)。

[0233] 溶液1B:在稀盐酸水溶液中的20mg/mL卵白蛋白肽酰胺323-339。

[0234] 溶液2:在二氯甲烷中的50mg/mL PLGA-R848、25mg/mL PLA-PEG-烟碱、25mg/mL PLA。通过将每种聚合物以100mg/mL分别地溶解于二氯甲烷中,然后通过添加2份PLGA-R848溶液到1份每种PLA-PEG-烟碱溶液和PLA溶液中来混合这些溶液,来制备该溶液。

[0235] 溶液3:在100mM磷酸盐缓冲液 (pH8) 中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0236] 溶液4:70mM磷酸盐缓冲液, pH8。

[0237] 使用溶液1A和溶液2产生第一初级 (S/O) 乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1A (0.025mL) 与溶液2 (1.0mL), 并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。使用溶液1B和第一初级乳液产生连续初级 (W1/(S/O)) 乳液。将溶液1B (0.25mL) 添加到包含第一初级乳液的小玻璃压力管中, 并且然后使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过向连续初级乳液中添加溶液3 (2.0mL) 并且接着使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理40秒, 从而形成二级 ((S+W1)/O/W2) 乳液。将二级乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲溶液 (30mL) 的一个50mL开口烧杯中, 并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中, 以13,823g旋转一小时, 去除上清液, 并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中, 从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序, 并且然后将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中, 得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0238] 表5:纳米载体表征

[0239]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	R848 (w/w %)	SIINFEKL (SEQ ID NO:1 ) 肽 (w/w %)	卵白蛋白 323-339 肽 (w/w %)
---------	-----------	-----------------	---	---------------------------

[0240]

5	236	4.2	0.9	1.6
---	-----	-----	-----	-----

[0241] 实例6:合成纳米载体组合物产生了高抗体滴度和强抗原特异性CTL活性

[0242] 进行第3和第4体内 (C57BL/6小鼠) 免疫研究。将递送TLR激动剂 (R848) 和包埋的卵白蛋白蛋白质 (OVA) 的以上聚合纳米载体配制品 (3号) 引入, 并且产生高抗体滴度 (例如约  $1e6$  的抗OVA IgG滴度) 和来自局部淋巴和脾细胞的强抗原特异性CTL活性。

[0243] 在指定日期使经过免疫的小鼠出血, 并且在标准ELISA中使用测试血清的连续稀释来测量针对卵白蛋白的抗体。使用生物素化的山羊抗小鼠Ig作为检测抗体 (BD生物科学公司 (BD Biosciences), 圣地亚哥 (San Diego), 加利福尼亚州 (CA))。基于滴定曲线测定  $EC_{50}$ 。CTL活性如下测量。在用纳米载体制剂或蛋白质对照物最终注射 (皮下 s.c 或鼻内 i.n.) 之后4-5天, 将引流淋巴结 (LN) 移出, 用胶原蛋白酶处理, 进行均质化, 洗涤, 并且用  $10-100$  个单位/ml的IL-2孵育4-5天。然后对所得细胞群体进行计数, 并且将其用作细胞毒性分析中的效应细胞。用SIINFEKL (SEQID NO:1) 肽或EG.7-OVA细胞 (用卵白蛋白稳定转染) 冲击致敏的同基因EL-4细胞充当具有完整EL-4细胞的靶, 提供背景对照。经24小时 ( $37^{\circ}C$ ) 使用CytoTox-ONETM均质膜完整性分析 (Homogenous Membrane Integrity Assay) (普洛麦格 (Promega), 麦迪逊 (Madison), 威斯康星州 (WI)) 根据制造商的建议测量不同效靶比下的细胞毒性。

[0244] 表6. 纳米载体的配方

[0245]

抗原	OVA蛋白
TLR激动剂	PLGA-R848 (50%)
基质聚合物1	PLA-PEG (25%)
基质聚合物2	100DL 2A (25%)

[0246] 表7. 实验1布局

[0247]

组号	经以下各物免疫	NC 批号	R848 负载 (%)	Ova 蛋白负载 (%)	Ova 肽负载 (%)
----	---------	-------	-------------	--------------	-------------

[0248]

1	NC (卵白蛋白; 无记忆肽)	1	4.0	1.1	N/A
2	NC (卵白蛋白; +记忆肽)	2	3.9	0.3	2.3
3	NC (卵白蛋白; 无记忆肽)	3	4.3	0.8	N/A
4	NC (卵白蛋白; +记忆肽)	4	3.8	0.3	0.8
5	卵白蛋白 (100 μg) +20 μg 游离 CpG	N/A	N/A	100 μg	N/A
6	卵白蛋白 (100 μg) +100 μg 明矾	N/A	N/A	100 μg	N/A

[0249] 表8.实验2布局



[0250]

组号	经以下各物 免疫	途径	NC 批 号	R848 负 载 (%)	Ova 蛋 白 载 负 (%)	Ova 肽 负 载 (%), 类型
1	NC ( SIINFEKL ( SEQ ID NO:1) +记忆 肽)	S.c.	5	4.2	N/A	1.6- 肽 0.9- SIINFEKL ( SEQ ID NO:1)
2	NC ( 卵白蛋 白 ; 无记忆 肽)	S.c	3	4.3	0.8	N/A
3	NC ( SIINFEKL ( SEQ ID NO:1) +记忆 肽)	I.n.	5	4.2	N/A	1.6- 肽 0.9- SIINFEKL ( SEQ ID NO:1)

[0251]

4	NC ( 卵白蛋 白 ; 无记忆 肽)	I.n.	3	4.3	0.8	N/A
---	---------------------------	------	---	-----	-----	-----

[0252] 实例7:合成纳米载体配制品批号6

[0253] 材料

[0254] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州08701)。产品代码LS003054。在普林斯顿全球合成中心(Princeton Global Synthesis)(乔治帕特森路(George Patterson Drive)300号206室,布里斯托尔(Bristol),宾夕法尼亚州(PA)19007)专门制造约7,800Da的PLGA-R848(聚-D/L-丙交酯-共-乙交酯,4-氨基-2-(乙氧基甲基)- $\alpha$ , $\alpha$ -二甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇酰胺),该PLGA-R848由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制造并且具有8.5%w/w结合的瑞喹莫德含量。批号PGS 16-52。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段(通过<sup>1</sup>H-NMR(21kDa的Mn))。EMPROVE®聚乙烯醇5-88,USP(85%-89%水解的,粘度是4.3-5.7mPa.s)购自EMD化学公司(EMD Chemicals Inc.)(民主南路(South Democrat Road)480号,吉布斯镇(Gibbstown),新泽西州(NJ)08027,件号1.41354)。磷酸盐缓冲的盐水1×(PBS1×)。来自联发科公司(Mediatech Inc.)(发现大街

(Discovery Blvd.) 9345号, 马纳萨斯 (Manassas), 弗吉尼亚州 (VA) 20109)。产品代码21-040-CV。

[0255] 方法

[0256] 溶液如下制备:

[0257] 溶液1: 在室温下在PBS 1X中制备20mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0258] 溶液2: 通过在化学通风橱中将PLA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA。

[0259] 溶液3: 通过在化学通风橱中将PLA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA-PEG-OMe。

[0260] 溶液4: 通过在化学通风橱中将PLGA-R848以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA-R848。

[0261] 溶液5: 在100mM磷酸盐缓冲液 (pH 8) 中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0262] 溶液6: 70mM磷酸盐缓冲液, pH 8。

[0263] 一式两份地制备这批, 然后在洗涤之后组合。首先, 通过混合溶液1到4产生初级 (WI/O) 乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1 (0.2mL)、溶液2 (0.50mL)、溶液3 (0.25mL) 以及溶液4 (0.25mL), 并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液5 (2.0mL) 到初级乳液中, 涡旋以产生粗分散液, 并且然后使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理60秒, 从而形成二级 (W1/O/W2) 乳液。将二级乳液添加到包含溶液6 (30mL) 的一个50mL开口烧杯中, 并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中, 以21,000rcf旋转45分钟, 去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中, 从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序, 并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中, 得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0264] 表9: 纳米载体表征

[0265]

纳米载体ID	有效直径 (nm)	TLR激动剂, w/w%	抗原, w/w%
6	252.1	R848, 4.4	OVA蛋白质, 4.3

[0266] 实例8: 合成纳米载体配制品批号7

[0267] 材料

[0268] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司 (瓦萨大道730号, 湖木市, 新泽西州08701)。产品代码LS003054。在普林斯顿全球合成中心 (乔治帕特森路300号206室, 布里斯托尔, 宾夕法尼亚州19007) 专门制造约7,800Da的PLGA-R848 (聚-D/L-丙交酯-共-乙交酯, 4-氨基-2-(乙氧基甲基)- $\alpha$ ,  $\alpha$ -二甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇酰胺), 该PLGA-R848由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制造并且具有8.5%w/w结合的瑞喹莫德含量。批号PGS 16-52。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药 (汤姆马丁路756号, 伯明翰市, 亚拉巴马州35211, 产品代码100DL2A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物, 它具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段 (通过<sup>1</sup>H-NMR (21kDa的Mn))。EMPROVE®聚乙烯醇5-88, USP (85%-89%水解的, 粘度是4.3-5.7mPa.s) 购自EMD化学公司 (民主南路480号, 吉布斯镇, 新泽西州08027, 件号1.41354)。磷酸盐缓冲的盐水1× (PBS 1×)。来自联发科公司 (发现大街9345号, 马纳萨斯, 弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0269] 方法

[0270] 溶液如下制备:

[0271] 溶液1:在室温下在PBS 1×中制备5mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0272] 溶液2:通过在化学通风橱中将PLA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA。

[0273] 溶液3:通过在化学通风橱中将PLA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA-PEG-OMe。

[0274] 溶液4:通过在化学通风橱中将PLGA-R848以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA-R848。

[0275] 溶液5:在100mM磷酸盐缓冲液 (pH 8) 中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0276] 溶液6:70mM磷酸盐缓冲液, pH 8。

[0277] 一式两份地制备这批,然后在洗涤之后组合。首先,通过混合溶液1到4产生初级(WI/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1 (0.2mL)、溶液2 (0.50mL)、溶液3 (0.25mL) 以及溶液4 (0.25mL),并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液5 (2.0mL) 到初级乳液中,涡旋以产生粗分散液,并且然后使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理60秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含溶液6 (30mL) 的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以21,000rcf旋转45分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0278] 表10:纳米载体表征

[0279]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	TLR 激动剂 , w/w %	抗原, w/w %
7	240.6	R848, 4.2	OVA 蛋白, 1.3

[0280] 实例9:合成纳米载体配制品批号8

[0281] 材料

[0282] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州08701)。产品代码LS003054。在普林斯顿全球合成中心(乔治帕特森路300号206室,布里斯托尔,宾夕法尼亚州19007)专门制造约7,800Da的PLGA-R848(聚-D/L-丙交酯-共-乙交酯,4-氨基-2-(乙氧基甲基)- $\alpha$ , $\alpha$ -二甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇酰胺),该PLGA-R848由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制造并且具有8.5%w/w结合的瑞喹莫德含量。固有粘度是0.21dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段(通过<sup>1</sup>H-NMR (21kDa的Mn))。EMPROVE®聚乙烯醇5-88,USP (85%-89%水解的,粘度是4.3-5.7mpa.s)购自EMD化学公司(民主南路480号,吉布斯镇,新泽西州08027,件号1.41354)。磷酸盐缓冲的盐水1× (PBS 1×)。来自联发科公司(发现大街9345号,马纳萨斯,弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0283] 方法

[0284] 溶液如下制备:

[0285] 溶液1:在室温下在PBS 1X中制备20mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0286] 溶液2:通过在化学通风橱中将PLA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA。

[0287] 溶液3:通过在化学通风橱中将PLA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA-PEG-OMe。

[0288] 溶液4:通过在化学通风橱中将PLGA-R848以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA-R848。

[0289] 溶液5:在100mM磷酸盐缓冲液 (pH 8) 中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0290] 溶液6:70mM磷酸盐缓冲液, pH 8。

[0291] 一式两份地制备这批,然后在洗涤之后组合。首先,通过混合溶液1到4产生初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1 (0.2mL)、溶液2 (0.50mL)、溶液3 (0.25mL) 以及溶液4 (0.25mL),并且使用必能信数字式声波仪250在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液5 (2.0mL) 到初级乳液中,涡旋以产生粗分散液,并且然后使用必能信数字式声波仪250在30%的振幅下进行声处理60秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含溶液6 (30mL) 的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以21,000rcf旋转45分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0292] 表11:纳米载体表征

[0293]

纳米载体 ID	有效直径 (nm)	TLR 激动剂 ,	抗原, w/w %
---------	-----------	-----------	-----------

[0294]

		w/w %	
8	238.6	R848, 3.9	OVA 蛋白, 8.0

[0295] 实例10:合成纳米载体组合物产生了高抗体滴度和强抗原特异性CTL活性

[0296] 递送R848和OVA的合成纳米载体作为阳性比较对照物 (由高剂量的PS-CpG外加6x更高剂量的游离OVA组成) 在产生中心 (脾脏) OVA特异性CTL应答并且还产生强 (或更强) OVA特异性体液应答方面是成功的。

[0297] 在用纳米载体制剂或对照物皮下注射之后4-5天,将引流淋巴结 (LN) 移出,用胶原蛋白酶处理,进行均质化,洗涤,并且用10-100个单位/ml的IL-2孵育4-5天。然后对所得细胞群体进行计数,并且将其用作细胞毒性分析中的效应细胞。用SIINFEKL (SEQ ID NO:1) 肽或EG.7-OVA细胞 (用卵白蛋白稳定转染) 冲击致敏的同基因EL-4细胞充当具有完整EL-4细胞的靶,提供背景对照。经24小时 (37℃) 使用CytoTox-ONE™均质膜完整性分析 ((普洛麦格, 麦迪逊, 威斯康星州) 根据制造商的建议测量不同效靶比下的细胞毒性。

[0298] 表12

[0299]

组号	用以下各物免疫	NC 批号	佐剂 (μg)	OVA (μg)
1	NC-OVA-R848	6	R848 (4.4)	4.3
2	NC-OVA-R848	7	R848 (4.2)	1.3
3	NC-OVA-R848	8	R848 (3.9)	8.0
4	OVA + CpG	N/A	CpG, 20 μg	50

[0300] 实例11:在单次注射NC-OVA+NC-R848混合物之后对纳米载体封装的抗原的体液和细胞免疫应答的测量发展

[0301] 材料-批号9

[0302] 在普林斯顿全球合成中心(乔治帕特森路300号206室,布里斯托尔,宾夕法尼亚州19007)专门制造约7,800Da的PLGA-R848(S-205)(聚-D/L-丙交酯-共-乙交酯,4-氨基-2-(乙氧基甲基)-α,α-二甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇酰胺),该PLGA-R848由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制造并且具有8.5%w/w结合的瑞喹莫德含量。固有粘度是0.19dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约28,000Da的PLA嵌段的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自塞莫迪克斯制药(产品代码100DL mPEG 50005CE)。**EMPROVE®**聚乙二醇4-88,USP(85%-89%水解的,粘度是3.4-4.6mPa.s)购自EMD化学公司(民主南路480号,吉布斯镇,新泽西州08027)。磷酸盐缓冲的盐水1×(PBS 1×)。来自联发科公司(发现大街9345号,马纳萨斯,弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0303] 方法批号9

[0304] 溶液如下制备:

[0305] 溶液1:通过称出2:1:1重量比的PLGA-R848、PLA以及PLA-PEG-OMe粉末,并且然后将混合的聚合物溶解于二氯甲烷中,获得100mg/1 mL的总聚合物浓度,来制备PLGA-R848。

[0306] 溶液2:在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的35mg/mL聚乙烯醇。

[0307] 通过混合溶液1与2,并且然后产生粗乳液,随后产生细乳液,来产生O/W乳液。用溶液2(8mL)通过18G乳化针10次来将溶液1(2mL)粗乳化。通过将粗乳液装载到经过初免和冰水冷却的高压均质机(Microfluidics LV1)中并且以5000psi进行三次通过来制造细乳液。将精细O/W乳液添加到包含1×PBS(60mL)的一个100mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌超过2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以75,600rcf旋转35分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。以1×或2×相同规模再重复纳米载体形成工艺三次。将四份悬浮液组合,并且然后通过0.22微米PES注射过滤器过滤,并且然后冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0308] 材料-批号10

[0309] 在普林斯顿全球合成中心(乔治帕特森路300号206室,布里斯托尔,宾夕法尼亚州

19007) 专门制造约7,800Da的PLGA-R848 (S-205) (聚-D/L-丙交酯-共-乙交酯,4-氨基-2-(乙氧基甲基)- $\alpha,\alpha$ -二甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇酰胺),该PLGA-R848由3:1丙交酯与乙交酯比率的PLGA制造并且具有8.5%w/w结合的瑞喹莫德含量。固有粘度是0.19dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码100DL 2A)。具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约28,000Da的PLA嵌段的PLA-PEG-OMe嵌段共聚物购自塞莫迪克斯制药(产品代码100DL mPEG 50005CE)。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88,USP (85%-89%水解的,粘度是3.4-4.6mPa.s) 购自EMD化学公司(民主南路480号,吉布斯镇,新泽西州08027)。磷酸盐缓冲的盐水1 $\times$  (PBS 1 $\times$ )。来自联发科公司(发现大街9345号,马纳萨斯,弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0310] 方法-批号10

[0311] 溶液如下制备:

[0312] 溶液1:通过在化学通风橱中将PLGA-R848以100mg/1 mL二氯甲烷溶解来制备PLGA-R848。

[0313] 溶液2:通过在化学通风橱中将PLA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA。

[0314] 溶液3:通过在化学通风橱中将PLA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA-PEG-OMe。

[0315] 溶液4:在100mM磷酸盐缓冲液(pH8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0316] 通过混合溶液1到4,并且产生粗乳液,随后产生细乳液,来产生初级(O/W)乳液。首先将溶液1(1mL)、溶液2(0.5mL)以及溶液3(0.5mL)组合,并且然后通过用溶液4(8mL)在50mL烧杯中以350rpm一起搅拌两分钟并且通过重复吸取而粗乳化。通过将粗乳液装载到经过初免的高压均质机(Microfluidics LV1)中并且以5000psi进行三次通过来制造细乳液。将O/W细乳液添加到包含1 $\times$ PBS(30mL)的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌超过2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以75,600rcf旋转35分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1 $\times$ 中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。然后将纳米载体悬浮液通过0.22微米PES注射过滤器过滤,并且然后冷冻储存于-20 $^{\circ}$ C下直到使用。材料-批号11

[0317] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州08701)。产品代码LS003054。具有75%丙交酯与25%乙交酯含量并且固有粘度是0.24dL/g的PLGA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码7525DLG 2.5A)。固有粘度是0.2dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(产品代码100DL 2A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88,USP (85%-89%水解的,粘度是3.4-4.6mPa.s) 购自EMD化学公司(民主南路480号,吉布斯镇,新泽西州08027)。磷酸盐缓冲的盐水1 $\times$  (PBS 1 $\times$ )。来自联发科公司(发现大街9345号,马纳萨斯,弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0318] 方法-批号11

[0319] 溶液如下制备:

[0320] 溶液1:在室温下在PBS 1 $\times$ 中制备50mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0321] 溶液2:将PLGA、PLA以及PLA-PEG-OMe以2:1:1重量比称出,并且在化学通风橱中将

其溶解于二氯甲烷中,获得100mg/1mL的最终总聚合物浓度。

[0322] 溶液3:在100mM磷酸盐缓冲液 (pH8) 中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0323] 溶液4:70mM磷酸盐缓冲液, pH 8。

[0324] 首先,通过混合溶液1与2产生初级 (W1/O) 乳液。在1L烧杯中使用顶置式混合器将溶液1 (66mL) 与溶液2 (264mL) 组合并且形成粗乳液。将粗乳液转移到定制的温度控制的均质化容器中,并且使用高剪切力转子定子均质化。然后将1/2的初级乳液转移到包含330mL溶液3的烧杯中,并且用顶置式混合器混合,来形成二级 (W1/O/W2) 粗乳液。然后使二级粗乳液返回到定制均质化容器中,并且使用高剪切力均质化为细乳液。然后将二级乳液添加到包含溶液4 (3.2L) 的经过净化的6L容器中,并且在室温下振荡过夜以蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以75,600rcf旋转35分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤悬浮的纳米载体部分 (各自30mL)。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,获得靶纳米载体浓度。将悬浮液过滤并且冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0325] 通过100μg NC-OVA与100μg NC-R848的包含4.3μg R848和6.2μg OVA (每只小鼠) 的混合物使C57BL/6雌性小鼠 (2-3只/组) 免疫一次。在纳米载体接种之后第4、7、10以及14天,使小鼠出血,并且通过ELISA测定其针对OVA的抗体 (IgG) 滴度。额外地,在相同时间点,通过由代表OVA (SIINFEKL (SEQ ID NO:1)) 的主要CTL表位并且差异性由CSFE标记的肽冲击致敏的同基因脾细胞注射 (i.v.) 小鼠。次日,将来自经过免疫的小鼠的脾细胞取出,并且通过FACS进行分析,并且将所测定的每只动物中的特异性细胞毒性与经过PBS注射的 (未处理) 动物中的基本细胞毒性水平相比 ( $\% = 100 \times [1 - \text{RR未处理} / \text{RR免疫}]$ )。

[0326] 用NC-OVA+NC-R848单次免疫导致快速诱导细胞和体液免疫应答,前者早在注射后四天检测出并且然后持续至少十天,在第7天达峰值,并且后者在注射后七天检测出并且在接种后10天达到显著性水平。

[0327] 实例12:递送CpG和OVA的合成纳米载体

[0328] 材料-批号12

[0329] 具有钠抗衡离子的P0-1826DNA寡核苷酸购自欧力多工厂 (Oligo Factory) (杰弗里大道 (Jeffrey Avenue) 120号,霍利斯顿 (Holliston), 马萨诸塞州 (MA) 01746), 该寡核苷酸具有含核苷酸序列5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' (SEQ ID NO:2) 的磷酸二酯主链。具有54%丙交酯与46%乙交酯含量并且固有粘度是0.24dL/g的PLGA购自塞莫迪克斯制药 (汤姆马丁路756号, 伯明翰市, 亚拉巴马州35211, 产品代码5050DLG 2.5A)。具有约2,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约88,000Da的75%丙交酯/25%乙交酯PLGA嵌段的PLGA-PEG-OMe嵌段共聚物购自塞莫迪克斯制药 (产品代码7525DLG PEG 20007E-P)。EMPROVE® 聚乙烯醇4-88, USP (85%-89%水解的, 粘度是3.4-4.6mPa.s) 购自EMD化学公司 (民主南路480号, 吉布斯镇, 新泽西州08027)。磷酸盐缓冲的盐水1× (PBS 1×)。来自联发科公司 (发现大街9345号, 马纳萨斯, 弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0330] 方法-批号12

[0331] 溶液如下制备:

[0332] 溶液1:通过以40mg/1mL的包含250mg胆酸钠/1mL无内毒素水的水溶液溶解来制备P0-1826。

[0333] 溶液2:通过在化学通风橱中将PLA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA。

[0334] 溶液3:通过在化学通风橱中将PLGA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA-PEG-OMe。

[0335] 溶液4:在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0336] 溶液5:70mM磷酸盐缓冲液,pH8。

[0337] 通过混合溶液1到3,并且产生粗乳液,随后产生细乳液,来产生初级(W/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1(0.2mL)、溶液2(0.5mL)以及溶液3(0.5mL),通过重复吸取粗乳化,并且使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液4(3.0mL)到初级乳液中,涡旋以产生粗分散液,并且然后使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在30%的振幅下进行声处理60秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将W1/O/W2细乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲液(30mL)的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以21,000rcf旋转90分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。然后将纳米载体悬浮液通过0.22微米PES注射过滤器过滤,冷冻储存直到测定浓度,并且然后调节浓度并且冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0338] 材料-批号13

[0339] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州08701)。产品代码LS003054。具有75%丙交酯与25%乙交酯含量并且固有粘度是0.2dL/g的PLGA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码7525DLG 2A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段(通过<sup>1</sup>H-NMR(21kDa的Mn))。EMPROVE®聚乙烯醇4-88,USP(85%-89%水解的,粘度是3.4-4.6mPa.s)购自EMD化学公司(民主南路480号,吉布斯镇,新泽西州08027)。磷酸盐缓冲的盐水1×(PBS 1×)。来自联发科公司(发现大街9345号,马纳萨斯,弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0340] 方法-批号13

[0341] 溶液如下制备:

[0342] 溶液1:在室温下在PBS 1×中制备50mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0343] 溶液2:通过在化学通风橱中将PLGA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA。

[0344] 溶液3:通过在化学通风橱中将PLA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA-PEG-OMe。

[0345] 溶液4:在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0346] 溶液5:70mM磷酸盐缓冲液,pH 8。

[0347] 首先,通过混合溶液1到3产生初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1(0.2mL)、溶液2(0.75mL)以及溶液3(0.25mL),并且使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液4(3.0mL)到初级乳液中,涡旋以产生粗分散液,并且然后使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在30%的振幅下进行声处理60秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含溶液5(30mL)的一个50mL开口烧



杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以21,000rcf旋转130分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0348] 材料-批号14

[0349] 卵白蛋白蛋白质购自沃辛顿生物化学公司(瓦萨大道730号,湖木市,新泽西州08701,产品代码LS003054)。具有76%丙交酯与24%乙交酯含量并且固有粘度是0.69dL/g的PLGA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码7525DLG 7A)。固有粘度是0.22dL/g的PLA购自塞莫迪克斯制药(产品代码100DL 2A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88, USP (85%-89%水解的,粘度是3.4-4.6mPa.s)购自EMD化学公司(民主南路480号,吉布斯镇,新泽西州08027)。磷酸盐缓冲的盐水1× (PBS 1×) 购自联发科公司(发现大街9345号,马纳萨斯,弗吉尼亚州20109)。产品代码21-040-CV。

[0350] 方法-批号14

[0351] 溶液如下制备:

[0352] 溶液1:在室温下在PBS 1×中制备50mg/mL卵白蛋白蛋白质。

[0353] 溶液2:通过在化学通风橱中将PLGA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA。

[0354] 溶液3:通过在化学通风橱中将PLGA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA。

[0355] 溶液4:通过在化学通风橱中将PLA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLA-PEG-OMe。

[0356] 溶液5:在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0357] 溶液6:70mM磷酸盐缓冲液,pH 8。

[0358] 首先,通过混合溶液1到4产生初级(W1/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1(0.2mL)、溶液2(0.5mL)、溶液3(0.25mL)以及溶液4(0.25mL),并且使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液5(3.0mL)到初级乳液中,涡旋以产生粗分散液,并且然后使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在30%的振幅下进行声处理60秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将二级乳液添加到包含溶液6(30mL)的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以25,600rcf旋转45分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。将悬浮液冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0359] 材料-批号15

[0360] 具有钠抗衡离子的P0-1826DNA寡核苷酸购自欧力多工厂(杰弗里大道120号,霍利斯顿,马萨诸塞州01746),该寡核苷酸具有含核苷酸序列5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' (SEQ ID NO:2)的磷酸二酯主链。具有54%丙交酯与46%乙交酯含量并且固有粘度是0.24dL/g的PLGA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号,伯明翰市,亚拉巴马州35211,产品代码5050DLG 2.5A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物,它具有约5,000Da的由甲醚封端的

PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88, USP (85%-89%水解的, 粘度是3.4-4.6mPa.s) 购自EMD化学公司(民主南路480号, 吉布斯镇, 新泽西州08027)。胆酸钠购自西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich LLC.) (云杉大街(Spruce St.) 3050号, 圣路易斯(St. Louis), 密苏里州(MO) 6310, 产品代码C6445-100G)。磷酸盐缓冲的盐水1× (PBS 1×) 购自联发科公司(发现大街9345号, 马纳萨斯, 弗吉尼亚州20109, 产品代码21-040-CV)。

[0361] 方法-批号15

[0362] 溶液如下制备:

[0363] 溶液1: 通过以40mg/1mL包含150mg KCl/1mL无内毒素水的水溶液溶解来制备P0-1826。

[0364] 溶液2: 通过将干粉末在室温下以200mg/1mL 1×PBS溶解来制备胆酸钠。

[0365] 溶液3: 通过在化学通风橱中将PLGA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA。

[0366] 溶液4: 通过在化学通风橱中将PLGA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA-PEG-OMe。

[0367] 溶液5: 在100mM磷酸盐缓冲液(pH 8)中的50mg/mL聚乙烯醇。

[0368] 溶液6: 70mM磷酸盐缓冲液, pH 8。

[0369] 通过混合溶液1到4, 并且产生粗乳液, 随后产生细乳液, 来产生初级(W/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1 (0.25mL)、溶液2 (0.25mL)、溶液3 (0.5mL) 以及溶液4 (0.5mL), 通过重复吸取粗乳化, 并且使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液5 (3.0mL) 到初级乳液中, 涡旋以产生粗分散液, 并且然后使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在30%的振幅下进行声处理60秒, 从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将W1/O/W2细乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲液(30mL)的一个50mL开口烧杯中, 并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中, 以21,000rcf旋转90分钟, 去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中, 从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序, 并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中, 得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。然后将纳米载体悬浮液冷冻储存直到测定浓度, 并且然后调节浓度并且冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0370] 材料-批号16

[0371] 具有钠抗衡离子的P0-1826DNA寡核苷酸购自欧力多工厂(杰弗里大道120号, 霍利斯顿, 马萨诸塞州01746), 该寡核苷酸具有含核苷酸序列5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' (SEQ ID NO:2)的磷酸二酯主链。具有54%丙交酯与46%乙交酯含量并且固有粘度是0.24dL/g的PLGA购自塞莫迪克斯制药(汤姆马丁路756号, 伯明翰市, 亚拉巴马州35211, 产品代码5050DLG 2.5A)。合成了PLA-PEG-OMe嵌段共聚物, 它具有约5,000Da的由甲醚封端的PEG嵌段和约21,000Da的PLA嵌段。**EMPROVE®**聚乙烯醇4-88, USP (85%-89%水解的, 粘度是3.4-4.6mPa.s) 购自EMD化学公司(民主南路480号, 吉布斯镇, 新泽西州08027)。磷酸盐缓冲的盐水1× (PBS 1×) 购自联发科公司(发现大街9345号, 马纳萨斯, 弗吉尼亚州20109, 产品代码21-040-CV)。

[0372] 方法-批号16

[0373] 溶液如下制备:

[0374] 溶液1:通过以40mg/1mL包含150mg KCl/1mL无内毒素水的水溶液溶解来制备PO-1826。

[0375] 溶液2:在100mM磷酸盐缓冲液 (pH 8) 中的100mg/mL聚乙烯醇。

[0376] 溶液3:通过在化学通风橱中将PLGA以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA。

[0377] 溶液4:通过在化学通风橱中将PLGA-PEG-OMe以100mg/1mL二氯甲烷溶解来制备PLGA-PEG-OMe。

[0378] 溶液5:在100mM磷酸盐缓冲液 (pH 8) 中的100mg/mL聚乙烯醇。

[0379] 溶液6:70mM磷酸盐缓冲液, pH 8。

[0380] 通过混合溶液1到4,并且产生粗乳液,随后产生细乳液,来产生初级(W/O)乳液。在小玻璃压力管中组合溶液1(0.25mL)、溶液2(0.25mL)、溶液3(0.5mL)以及溶液4(0.5mL),通过重复吸取粗乳化,并且使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在50%的振幅下进行声处理40秒。然后通过添加溶液5(3.0mL)到初级乳液中,涡旋以产生粗分散液,并且然后使用必能信数字式声波仪250在冰浴上在30%的振幅下进行声处理60秒,从而形成二级(W1/O/W2)乳液。将W1/O/W2细乳液添加到包含70mM磷酸盐缓冲液(30mL)的一个50mL开口烧杯中,并且在室温下搅拌2小时以允许二氯甲烷蒸发并且纳米载体形成于悬浮液中。通过将纳米载体悬浮液转移到一个离心管中,以21,000rcf旋转90分钟,去除上清液并且将球粒再悬浮于磷酸盐缓冲的盐水中,从而洗涤一部分悬浮的纳米载体。重复此洗涤程序,并且然后将球粒再悬浮于PBS 1×中,得到具有以聚合物计10mg/mL的标称浓度的纳米载体悬浮液。然后将纳米载体悬浮液冷冻储存直到测定浓度,并且然后调节浓度并且冷冻储存于-20℃下直到使用。

[0381] 递送CpG和OVA的合成纳米载体在快速抗体诱导能力方面比游离的高剂量CpG和OVA(游离CpG和游离OVA都以5×更高剂量使用)优越,并且在诱导局部和全身性抗原特异性CTL方面与同样高剂量的游离CpG和游离OVA相比同样成功或优越。

[0382] 用纳米载体结合的CpG(ODN 1826)和OVA的三种组合对三只动物的群组(C57BL/6小鼠,雌性)进行免疫(初免-加强,第0和10天;后肢,皮下)进行免疫,平行地用5倍过量的游离CpG和OVA免疫。将NC-CpG的三种不同配制品与NC-OVA的相同配制品一起使用(关于细节,参看表13)。在第二次免疫后第4天,将动物杀死并且取用其血清、引流(腿窝)淋巴结(LN)以及脾脏。使用来自经过免疫的小鼠的血清来测定针对卵白蛋白的抗体滴度,该抗体滴度在标准ELISA中用测试血清的连续稀释来测量。使用生物素化的山羊抗小鼠Ig作为检测抗体(BD生物科学公司,圣地亚哥,加利福尼亚州)。基于滴定曲线测定EC50。与5倍更高剂量的游离CpG和OVA相比,与NC-OVA组合的所有NC-CpG配制品都诱导出超过30倍更高的针对OVA的早期抗体应答。

[0383] 平行地,通过FACS分析在引流LN(局部地)或脾脏(全身地)中离体(无体外扩增)评估OVA特异性CTL的诱导。简单地说,将两种组织用胶原蛋白酶处理,均质化,洗涤,使用台盼排除法(Trypan exclusion)(康特尼斯(Countess),英杰(Invitrogen),美国加利福尼亚州(CA,USA))计数细胞,并且用与荧光染料偶合的抗体或MHC I类限制性五聚物标记,该荧光染料能够识别对MHC I类限制性免疫显性OVA衍生的肽SIINFEKL(SEQ ID NO:1)具有特异性的表面CD8(T细胞标记)、CD19(B细胞标记)以及T细胞受体(TCR)。然后通过FACS分析分化细胞群体,其中展现CD8表达(CD8<sup>+</sup>)、无CD 19表达(CD19<sup>-</sup>)并且与MHC I类复合的SIINFEKL(SEQ

ID NO:1) 结合 (SIINFEKL<sup>+</sup> (SEQ ID NO:1)) 的那些细胞被视为代表OVA特异性CTL的主要物质。与5倍更高量的游离CpG和OVA相比,所用的至少一种NC-CpG配制品当与NC-OVA偶合时具有相等或更高的局部地和全身地产生短期CTL的能力。值得注意的是,不同NC-CpG配制品已经尤其针对对纳米载体结合的卵白蛋白抗原诱导局部或全身性CTL应答中的任一者有益。

[0384] 此外,还通过用经丝裂霉素处理的EG7-OVA细胞(用卵白蛋白稳定转染的同基因细胞)刺激使来自经过免疫的动物的经纯化的脾细胞体外扩增(100u/mL IL-2),这应导致OVA特异性CD8<sup>+</sup>细胞优先扩增。在体外孵育的第11天,将扩增的培养物如上文所述进行标记并且通过FACS分析。与由5×剂量的游离CpG和OVA诱导的那些相比,所测试的所有NC-CpG配制品都导致以更高扩增潜力诱导Ag特异性CTL。值得注意的是,一种CpG配制品(NC-CpG)具有对于CTL扩增来说尤其强的潜力,并且在离体分析时和在体外扩增后,另一种(NC-CpG)的全身性CTL诱导水平均已经超过了游离的高剂量CpG和OVA。

[0385] 表13.用于测试由纳米载体结合的CpG和OVA对比游离的CpG和OVA诱导的体液和细胞免疫应答的实验布局。

[0386]

组号	用以下各物免疫	NC 批号	CpG (μg)	OVA (μg)	方案
1	NC-OVA + NC-CpG (1)	12 号 /13 号	4.0	10	0/10 d
2	NC-OVA + NC-CpG (2)	14 号 /15 号	4.0	10	相同
3	NC-OVA + NC-CpG (3)	14 号 /16 号	4.0	10	相同
4	OVA + CpG (游离)	N/A	20	50	相同

[0387] 本方面还涉及以下实施方案:

[0388] 1.一种方法,包括:

[0389] 鉴别需要对一种第一蛋白质的一种体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的一名受试者,和

[0390] 向该受试者给予一种组合物,该组合物包含被偶合到该第一蛋白质的一群合成纳米载体;

[0391] 其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸。

[0392] 2.一种方法,包括:

[0393] 向该受试者给予一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体;

[0394] 其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,并且其中该组合物根据一种疫苗接种方案给予。

[0395] 3.一种方法,包括:

[0396] 向该受试者给予一种组合物,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体;

[0397] 其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,并且其中该组合物根据一种方案给予,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

[0398] 4.如实施方案2或3所述的方法,其中该方法进一步包括鉴别需要对该第一蛋白质的一种体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的一名受试者。

[0399] 5.如实施方案1或3所述的方法,其中该组合物根据一种疫苗接种方案给予。

[0400] 6.如实施方案1或2所述的方法,其中该组合物根据一种方案给予,该方案先前显示在一名或多名测试受试者中产生对该第一蛋白质具有特异性的一种体液和CTL免疫应答。

[0401] 7.如实施方案1-6中任一项所述的方法,其中该组合物以有效产生对该第一蛋白质的一种体液和CTL免疫应答的量给予。

[0402] 8.如实施方案1-7中任一项所述的方法,其中该组合物进一步包含一种或多种佐剂。

[0403] 9.如实施方案1-7中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括给予一种或多种佐剂。

[0404] 10.如实施方案8或9所述的方法,其中该一种或多种佐剂包括模式识别受体的刺激剂或激动剂、矿物盐、明矾、与肠细菌的单磷酸脂质(MPL)A组合的明矾、**MPL®**(AS04)、AS15、皂甙、QS-21、Quil-A、ISCOM、ISCOMATRIX™、MF59™、**Montanide®** ISA 51、**Montanide®** ISA 720、AS02、脂质体和脂质体配制品、AS01、合成的或特别制备的微颗粒和微载体、淋病奈瑟菌或沙眼衣原体的源于细菌的外膜泡、壳聚糖颗粒、贮存形成剂、**Pluronic®**嵌段共聚物、特异性修饰或制备的肽、胞壁酰二肽、氨基烷基氨基葡萄糖苷4-磷酸酯、RC529、细菌类毒素、毒素片段、Toll样受体2、3、4、5、7、8、9的激动剂和/或其组合;腺嘌呤衍生物;免疫刺激DNA;免疫刺激RNA;咪唑并喹啉胺、咪唑并吡啶胺、6,7-稠合环烷基咪唑并吡啶胺、1,2-桥接咪唑并喹啉胺;咪唑莫特;瑞喹莫德;DC表面分子CD40的激动剂;I型干扰素;聚I:C;细菌脂多糖(LPS);VSV-G;HMGB-1;鞭毛蛋白或其部分或衍生物;包含CpG的免疫刺激DNA分子;从坏死细胞释放的促发炎刺激物;尿酸盐晶体;补体级联的活化组分;免疫复合物的活化组分;补体受体激动剂;细胞因子;或细胞因子受体激动剂。

[0405] 11.如实施方案10所述的方法,其中该一种或多种佐剂包括Toll样受体2、3、4、7、8或9的激动剂。

- [0406] 12.如实施方案10所述的方法,其中该一种或多种佐剂包括一种咪唑并喹啉或氧代腺嘌呤。
- [0407] 13.如实施方案12所述的方法,其中该咪唑并喹啉包括瑞喹莫德或咪喹莫特。
- [0408] 14.如实施方案8-13中任一项所述的方法,其中该一种或多种佐剂被偶合到该群合成纳米载体的这些合成纳米载体。
- [0409] 15.如实施方案8-13中任一项所述的方法,其中该组合物进一步包含或该方法进一步包括给予另一群合成纳米载体,并且其中该一种或多种佐剂被偶合到该另一群合成纳米载体的这些合成纳米载体。
- [0410] 16.如实施方案8-13中任一项所述的方法,其中该一种或多种佐剂不被偶合到一种合成纳米载体。
- [0411] 17.如实施方案1-16中任一项所述的方法,其中该组合物进一步包含一种或多种额外的抗原。
- [0412] 18.如实施方案1-16中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括给予一种或多种额外的抗原。
- [0413] 19.如实施方案17或18所述的方法,其中该一种或多种额外的抗原包括一种第二蛋白质。
- [0414] 20.如实施方案17-19中任一项所述的方法,其中该一种或多种额外的抗原包括一个体液表位和/或一个MHC I类限制性表位。
- [0415] 21.如实施方案20所述的方法,其中该一种或多种额外的抗原包括一个体液表位和一个MHC I类限制性表位。
- [0416] 22.如实施方案20或21所述的方法,其中该一种或多种额外的抗原包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位。
- [0417] 23.如实施方案17-22中任一项所述的方法,其中该一种或多种额外的抗原被偶合到这些合成纳米载体。
- [0418] 24.如实施方案17-22中任一项所述的方法,其中该组合物进一步包含或该方法进一步包括给予另一群合成纳米载体,并且其中该一种或多种额外的抗原被偶合到该另一群合成纳米载体的这些合成纳米载体。
- [0419] 25.如实施方案17-22中任一项所述的方法,其中该一种或多种额外的抗原不被偶合到一种合成纳米载体。
- [0420] 26.如实施方案1-25中任一项所述的方法,其中这些合成纳米载体和/或其他合成纳米载体包括一种聚合纳米颗粒、一种金属纳米颗粒、一种树枝状聚合物、一种巴克球、一种纳米线、一种病毒样颗粒或一种肽或蛋白质颗粒。
- [0421] 27.如实施方案1-26中任一项所述的方法,其中这些合成纳米载体和/或其他合成纳米载体包括一种或多种聚合物。
- [0422] 28.如实施方案27所述的方法,其中该一种或多种聚合物包括一种聚酯、聚氨基酸、聚碳酸酯、聚缩醛、聚缩酮、多糖、聚乙基噁唑啉或聚乙烯亚胺。
- [0423] 29.如实施方案27或28所述的方法,其中该一种或多种聚合物包括一种聚酯。
- [0424] 30.如实施方案29所述的方法,其中该聚酯包括一种聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳

酸-共-乙醇酸)或聚己内酯。

[0425] 31.如实施方案29或30所述的方法,其中该聚酯被偶合到一种聚醚。

[0426] 32.如实施方案31所述的方法,其中在该聚醚中包括聚乙二醇。

[0427] 33.如实施方案1-32中任一项所述的方法,其中该第一蛋白质和/或一种或多种额外的抗原是与癌症、一种感染或传染病、一种非自身免疫或退行性疾病、HIV、疟疾、利什曼病、人类丝状病毒感染、披衣病毒感染、 $\alpha$ 病毒感染、沙粒病毒感染、布尼亚病毒感染、黄病毒感染、人类乳头瘤病毒感染、人类A型流感病毒感染、乙型肝炎或丙型肝炎相关的抗原。

[0428] 34.如实施方案1-33中任一项所述的方法,其中该受试者患有或有风险患有癌症、一种感染或传染病或一种非自身免疫或退行性疾病。

[0429] 35.如实施方案34所述的方法,其中该受试者患有或有风险患有HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染。

[0430] 36.如实施方案1-35中任一项所述的方法,其中所产生的该体液和该CTL免疫应答是临床上有效的。

[0431] 37.如实施方案36所述的方法,其中该体液和该CTL免疫应答在该受试者中有效治疗或预防癌症、一种感染或传染病或一种非自身免疫或退行性疾病。

[0432] 38.如实施方案37所述的方法,其中该体液和该CTL免疫应答有效治疗或预防HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染。

[0433] 39.如实施方案1-38中任一项所述的方法,其中该组合物进一步包含一种药学上可接受的赋形剂。

[0434] 40.如实施方案1-39中任一项所述的方法,其中该组合物是无菌的。

[0435] 41.如实施方案1-40中任一项所述的方法,其中该组合物从冻干形式复水。

[0436] 42.如实施方案1-41中任一项所述的方法,其中该组合物是一种剂型。

[0437] 43.如实施方案1-42中任一项所述的方法,其中该组合物是一种疫苗。

[0438] 44.如实施方案1-43中任一项所述的方法,其中该组合物通过静脉内、经口、皮下、经肺、鼻内、皮内、经粘膜、粘膜内或肌肉内给予来给予。

[0439] 45.一种组合物,包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于治疗或预防中。

[0440] 46.一种组合物,包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于如实施方案1-44中任一项所限定的方法中。

[0441] 47.一种组合物,包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于疫苗接种中。

[0442] 48.一种组合物,包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于在一名受试者中对该第一蛋白质产生一种体液和CTL免疫应答。

[0443] 49.一种组合物,包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于治疗或预防癌症、一种感染或传染病、一种非自身免疫或退行性疾病、HIV、疟疾、利什曼病、一种人类丝状病毒感染、一种披衣病毒感染、一种 $\alpha$ 病毒感染、一种沙粒病毒感染、一种布尼亚病毒感染、一种黄病毒感染、一种人类乳头瘤病毒感染、一种人类A型流感病毒感染、一种乙型肝炎感染或一种丙型肝炎感染的一种方法中。

[0444] 50.一种组合物,包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于一种治疗或预防方法中,该方法包括通过静脉内、经口、皮下、经肺、鼻内、皮内、粘膜内、经粘膜或肌肉内给予来给予。

[0445] 51.一种组合物的用途,该组合物包含被偶合到一种第一蛋白质的一群合成纳米载体,其中该第一蛋白质包括至少一个体液表位和至少一个MHC I类限制性表位,该至少一个体液表位与该至少一个MHC I类限制性表位不是相同表位,其中该群合成纳米载体不包括一种皂甙-胆固醇佐剂,并且其中该群合成纳米载体使用动态光散射获得的粒度分布平均值具有从20nm到250nm的最大尺寸,该组合物用于制造一种药剂、例如一种疫苗,用于如实施方案1-44中任一项所限定的方法中。

[0446] 52.一种如实施方案45-50中任一项所限定而使用的组合物或如实施方案51所述的用途,其中该组合物如实施方案1-44中任一项所限定。



## 序列表

<110> Selecta Biosciences, Inc.西莱克塔生物科技公司  
 Altreuter(阿尔特罗伊特), David(大卫)  
 O'Neil(奥尼尔), Conlin(康林)  
 Ilyinskii(伊雷因斯基), Petr(彼得)

<120> 产生体液和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答的合成纳米载体

<130> S1681.70029

<140>

<141> 2012-07-27

<150> 61/513,496

<151> 2011-07-29

<150> 61/513,526

<151> 2011-07-29

<150> 61/513,527

<151> 2011-07-29

<160> 2

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 2

Thr Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Ala

1 5 10 15

Cys Gly Thr Thr

20

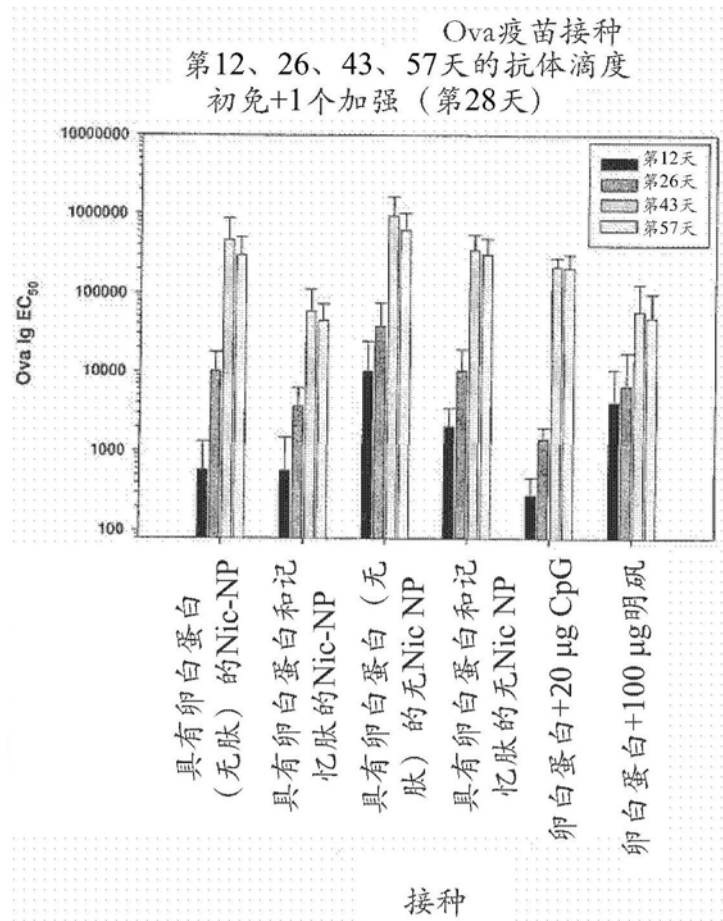


图1

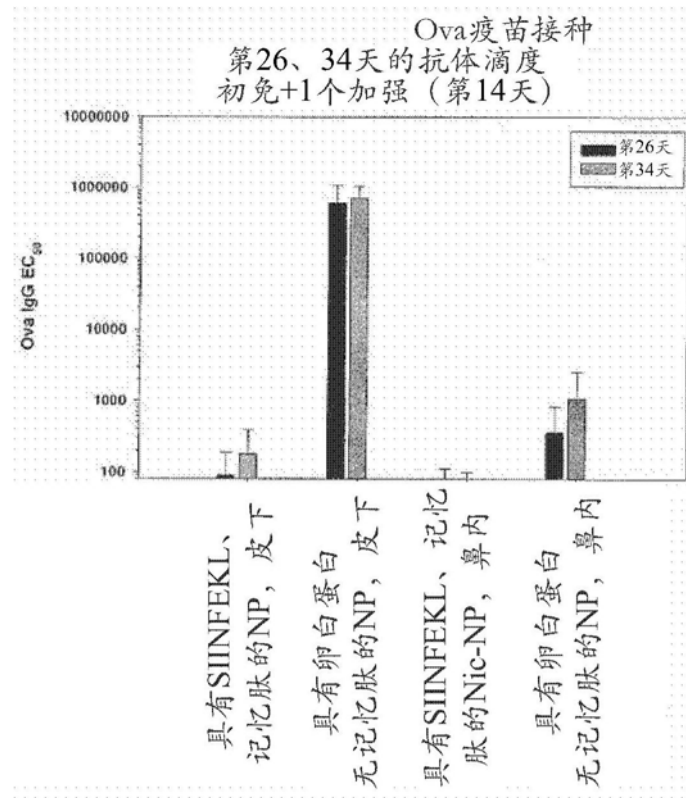


图2

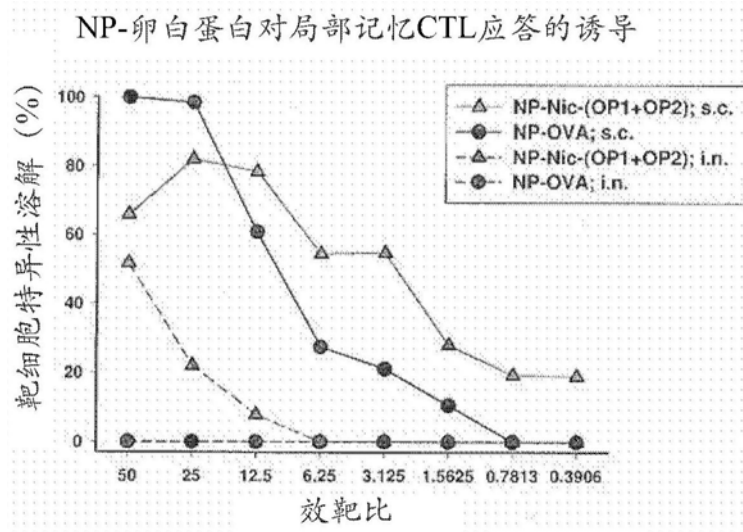


图3

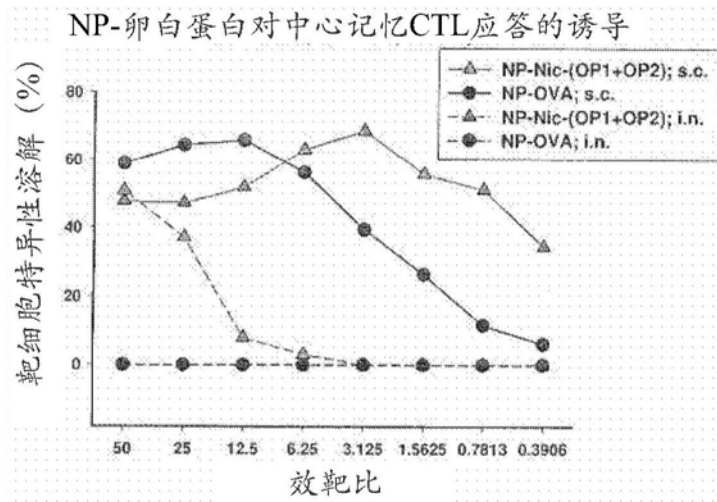


图4

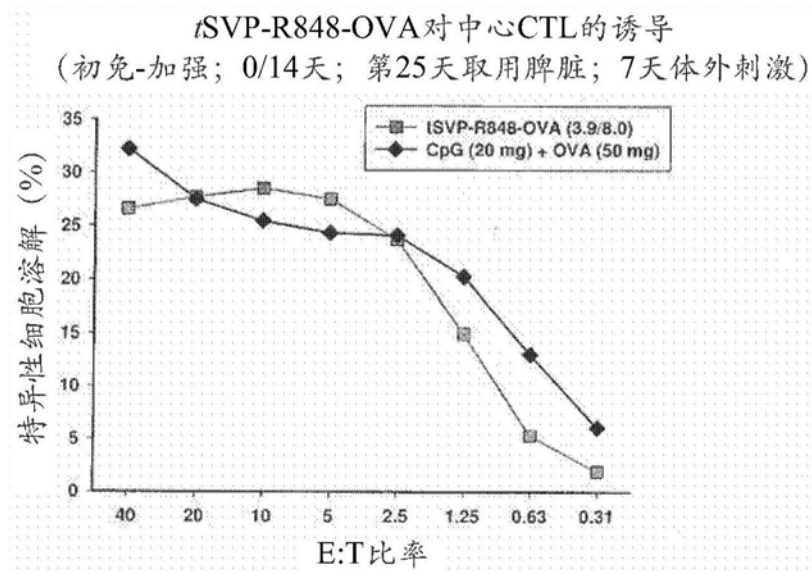


图5

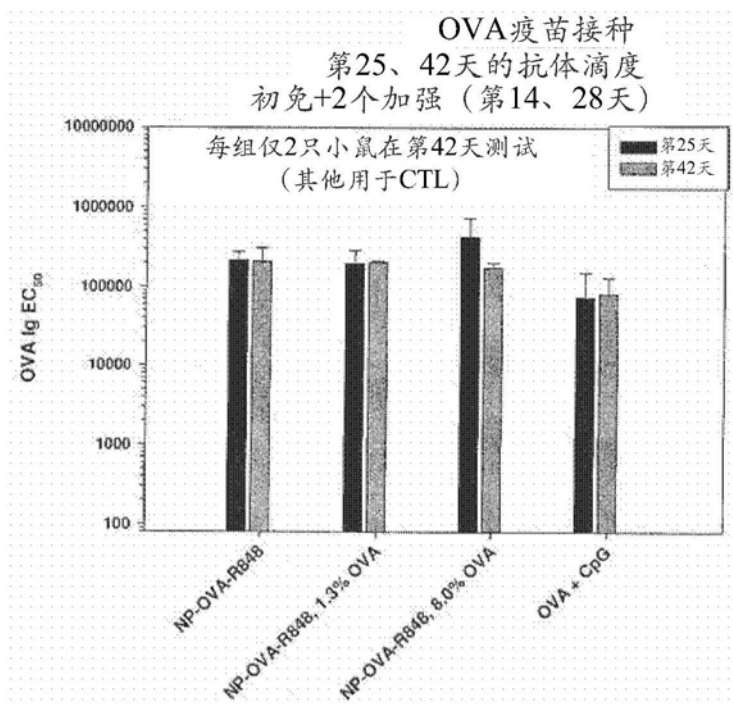


图6

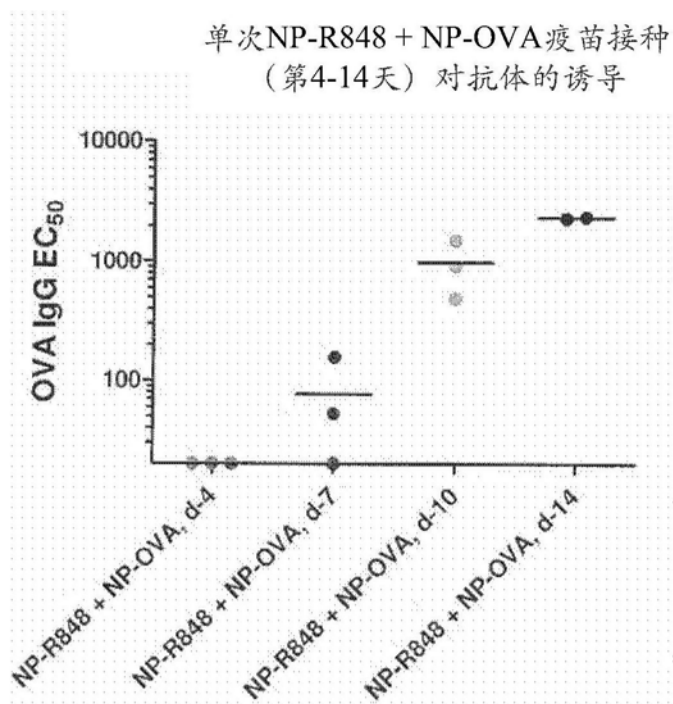


图7

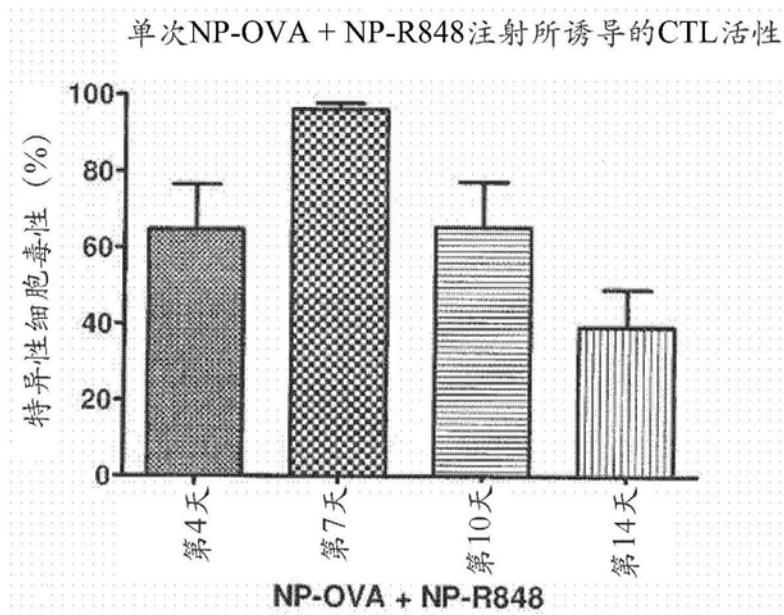


图8

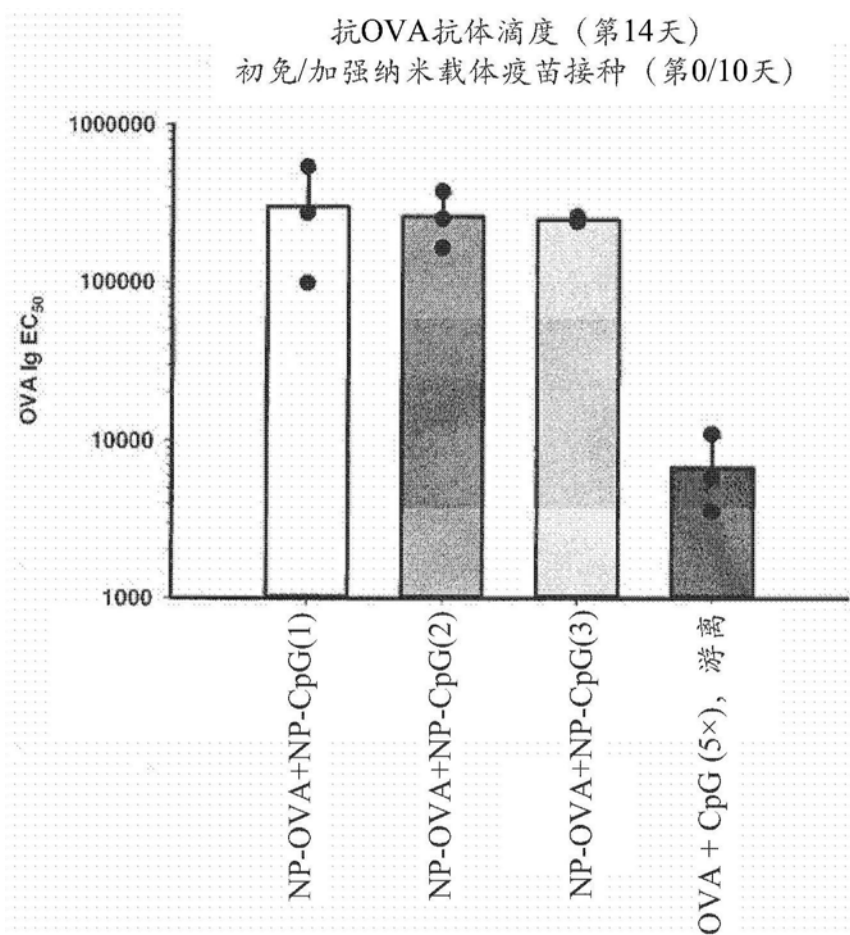


图9

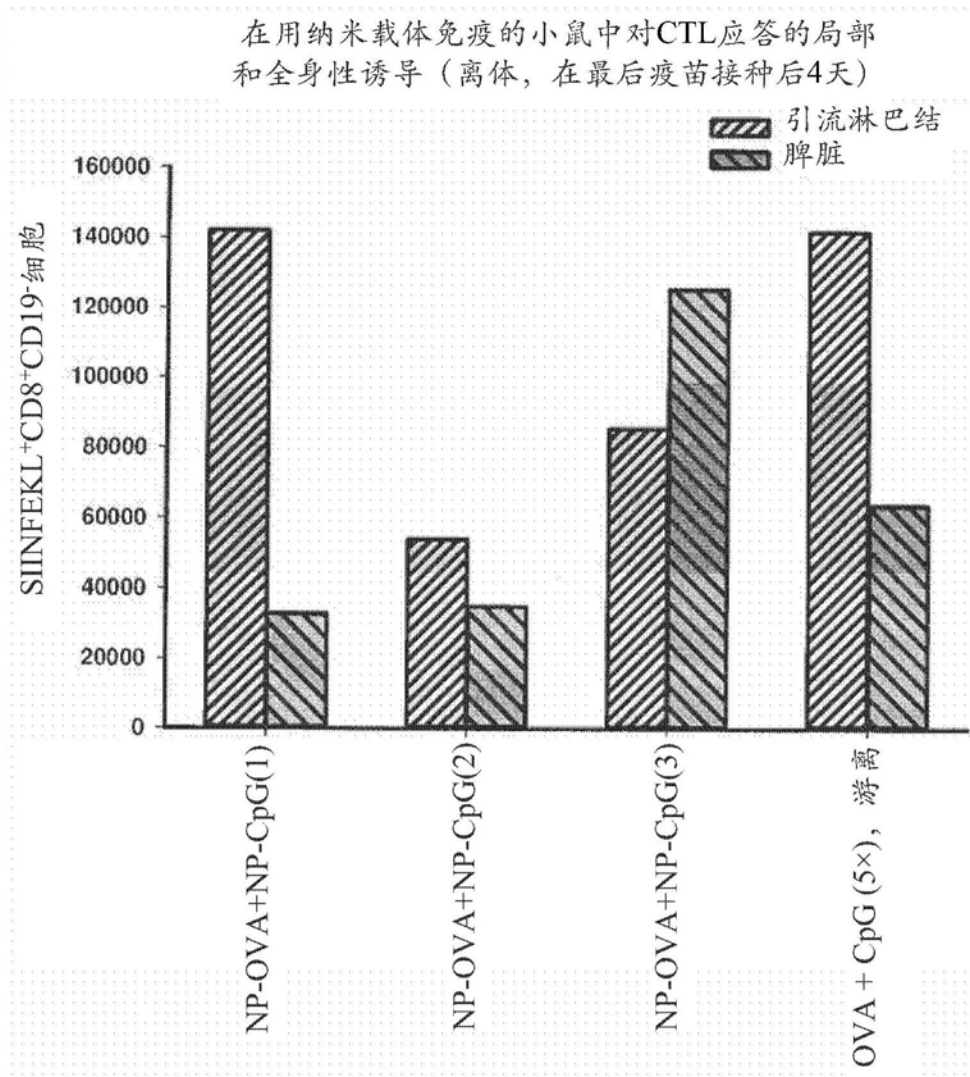


图10

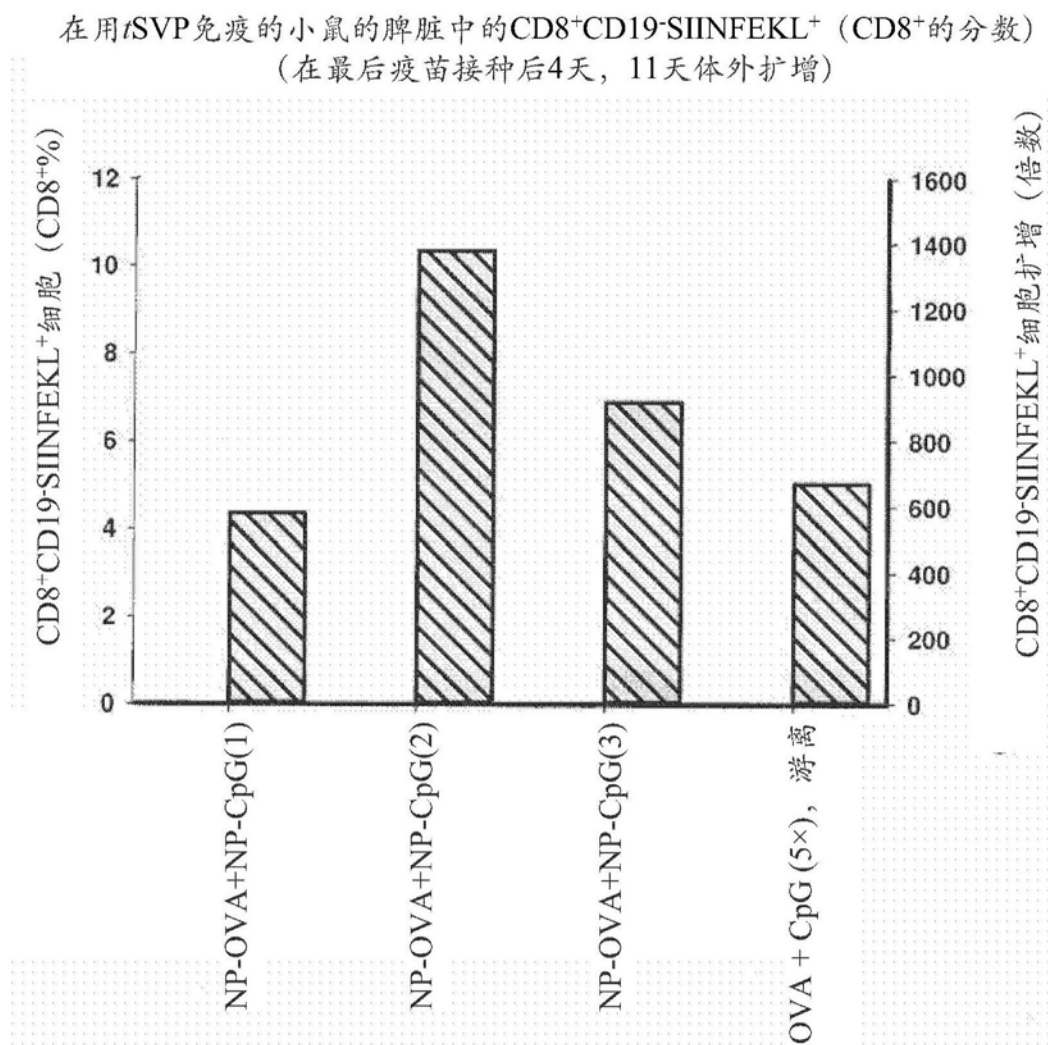


图11