



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103648587 B

(45) 授权公告日 2021.09.17

(21) 申请号 201280018892.7
 (22) 申请日 2012.04.18
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 103648587 A
 (43) 申请公布日 2014.03.19
 (30) 优先权数据
 61/476431 2011.04.18 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2013.10.17
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2012/034012 2012.04.18
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02012/145355 EN 2012.10.26
 (73) 专利权人 乔治亚大学研究基金公司
 地址 美国乔治亚州
 (72) 发明人 D.A.哈恩 R.奎罗斯
 L.M.绍雷恩伯格
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
 代理人 杜艳玲 李进

(51) Int.Cl.
 A61K 39/00 (2006.01)
 A61K 39/39 (2006.01)
 A61P 31/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 1874679 A, 2006.12.06
 CN 1874679 A, 2006.12.06
 Vincent F.M. Segers等. Local delivery of proteins and the use of self-assembling peptides.《Drug Discovery Today》.2007,第12卷(第13/14期),第563-565页.
 U. Le等. (A thermo-sensitive polymeric gel containing a gadolinium(Gd) compound eccapsulated into liposomes significantly extended the retention of the Gd in tumors.《Drug Development》.2008,第34卷(第4期),414.
 刘巍等. Matrigel凝胶和壳聚糖/磷酸甘油凝胶两种支架体外构建组织工程软骨的比较.《江苏医药》.2011,第37卷(第6期),627-629.

审查员 夏颖

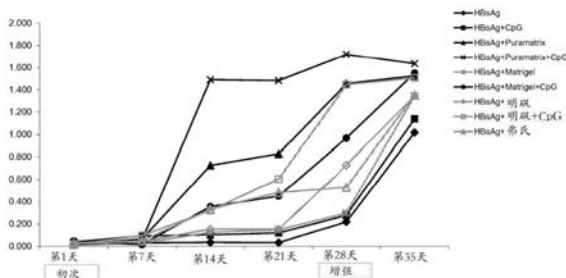
权利要求书1页 说明书23页
序列表2页 附图28页

(54) 发明名称

疫苗递送方法

(57) 摘要

本发明包括一种组合物,该组合物包含作为一种组分的一种浆料基质以及作为第二种组分的一种或多种抗原,这种浆料基质在室温下为液体并且在生理学盐浓度和/或生理学温度下为凝胶。还包括通过给予此类组合物在受试者体内诱导免疫应答并且对受试者接种疫苗的多种方法。



1. 一种组合物, 包含:
自组装肽, 其在室温下为液体并且在生理学盐浓度和/或生理学温度下形成肽水凝胶;
一种或多种抗原; 和
Toll样受体 (TLR) 激动剂,
其中该自组装肽包括肽支架RAD16-I ((RADA) (4); (SEQ ID NO:2)); 和
其中该组合物被配制用于皮下 (sc) 注射和/或肌肉 (im) 注射, 并且
其中该抗原包括肝炎抗原、流感抗原、血吸虫病抗原、和/或burkolderia抗原, 或其抗原片段。
2. 如权利要求1所述的组合物, 其中该自组装肽包括PURAMATRIX, 或其衍生物。
3. 如权利要求1或2所述的组合物, 其中该TLR激动剂包括TLR2激动剂、TLR4激动剂、TLR7激动剂、TLR8激动剂或TLR9激动剂。
4. 如权利要求1或2所述的组合物, 其中该TLR激动剂包括TLR9激动剂。
5. 如权利要求1或2所述的组合物, 其中该TLR激动剂包括CpG寡脱氧核苷酸 (ODN)。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的组合物在制备用于在受试者体内产生免疫应答的药物中的用途。
7. 如权利要求1至5中任一项所述的组合物在制备用于受试者的皮下 (sc) 注射和/或肌肉 (im) 免疫的药物中的用途。
8. 如权利要求1至5中任一项所述的组合物在制备用于向受试者皮下 (sc) 注射和/或肌肉 (im) 递送一种或多种免疫原性抗原的药物中的用途。
9. 如权利要求6至8中任一项所述的用途, 其中该受试者是家畜或伴侣动物。
10. 如权利要求6至8中任一项所述的用途, 其中该受试者是家禽。
11. 如权利要求6至8中任一项所述的用途, 其中该受试者是人类。
12. 如权利要求6至8中任一项所述的用途, 其中该组合物被配制用于初次疫苗接种和/或增强疫苗接种。
13. 如权利要求1至5中任一项所述的组合物在制备用于在牛羊类体内产生抗血吸虫免疫应答的药物中的用途, 其中该一种或多种抗原包括血吸虫抗原。
14. 如权利要求13所述的用途, 其中该TLR激动剂包括牛CpG。
15. 如权利要求13或14所述的用途, 其中该血吸虫抗原包括日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 抗原, 或其抗原片段。
16. 如权利要求13或14所述的用途, 其中该血吸虫抗原包括SjCTPI多肽、SjCTPI-Hsp70多肽、SjC23多肽、和/或SjC23-Hsp70多肽, 或其抗原片段。

疫苗递送方法

[0001] 继续申请数据

[0002] 本申请要求于2011年4月18日提交的美国临时申请序列号No.61/476,431的权益,通过引用将其结合在此。

[0003] 政府资助

[0004] 本发明受到由美国国立卫生研究院授予的、批准号AI071883和AI036657的政府支持。在本发明中政府具有一定的权利。

[0005] 背景

[0006] 疫苗仍然是用于对抗传染病的、最伟大的公众健康单型资产。疫苗递送的目标是以增强抗原递呈细胞激活、抗原摄取及加工的方式递呈疫苗抗原。额外的一个目标是减少引起有效的疫苗特异性应答必需的疫苗接种的数量,尤其是在单一有效剂量的疫苗可获得时。当前,常规的疫苗递送方法使用明矾。在20世纪20年代,铝盐,例如明矾,最先得到许可用于在人类疫苗中作为佐剂。存在对改进的递送模式以及对疫苗配制品中的使用而言安全的佐剂的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明包括一种组合物,该组合物包含作为一种组分的一种浆料基质以及作为另一种组分的一种或多种抗原,这种浆料基质在室温下为液体并且在生理学盐浓度和/或生理学温度下为凝胶。在该组合物的一些方面中,该浆料基质是一种肽水凝胶。在一些方面中,该肽水凝胶包括PURAMATRIX,或其衍生物。在一些方面中,该肽水凝胶包括肽支架RADARADARADA,或其衍生物。在该组合物的一些方面中,该浆料基质包括MATRIGEL,或其衍生物。

[0009] 在该组合物的一些方面中,该组合物进一步包括多种佐剂中的一种。在一些方面中,佐剂包括Toll样受体(TLR)激动剂和/或细胞因子。在一些方面中,TLR激动剂包括TLR4激动剂。在一些方面中,TLR激动剂包括TLR9激动剂。在一些方面中,TLR9激动剂包括CpG寡脱氧核苷酸(ODN)。

[0010] 在该组合物的一些方面中,该组合物进一步包括Toll样受体(TLR)激动剂和/或细胞因子。在一些方面中,TLR激动剂包括TLR4激动剂。在一些方面中,TLR激动剂包括TLR9激动剂。在一些方面中,TLR9激动剂包括CpG寡脱氧核苷酸(ODN)。

[0011] 在该组合物的一些方面中,该抗原包括肝炎抗原、流感抗原、血吸虫病抗原、和/或burkolderia抗原,或其抗原片段。

[0012] 本发明包括在受试者体内产生免疫应答的一种方法,该方法包括向该受试者给予如在此所述的一种组合物。

[0013] 本发明包括使受试者免疫的一种方法,该方法包括向该受试者给予如在此所述的一种组合物。

[0014] 本发明包括向受试者递送一种或多种免疫原性抗原的一种方法,该方法包括向该受试者给予如在此所述的一种组合物。

[0015] 本发明包括向受试者递送一种或多种治疗用抗原的一种方法,该方法包括向该受

试者给予如在此所述的一种组合物。在本发明这些方法的一些方面中,该受试者是家畜或伴侣动物。在本发明这些方法的一些方面中,该受试者是家禽。在本发明这些方法的一些方面中,该受试者是人类。

[0016] 在本发明这些方法的一些方面中,该组合物的给予包括皮下(sc)注射或肌肉(im)注射。

[0017] 在本发明这些方法的一些方面中,该组合物的给予包括作为初次疫苗接种和/或增强疫苗接种的给予。

[0018] 在本发明这些方法的一些方面中,该组合物的给予包括在用多肽疫苗或质粒DNA疫苗初次疫苗接种之后,作为增强疫苗接种的给予。

[0019] 本发明包括在牛羊类体内产生抗血吸虫免疫应答的一种方法,该方法包括向牛羊类给予一种组合物,该组合物包含作为一种组分的一种浆料基质以及作为另一种组分的一种或多种血吸虫抗原,这种浆料基质在室温下为液体并且在生理学条件下为凝胶。

[0020] 本发明包括在牛羊类体内产生抗血吸虫免疫应答的一种方法,该方法包括向牛羊类给予如在此所述的一种组合物,其中一种或多种抗原包括血吸虫抗原。

[0021] 本发明包括在牛羊类体内进行血吸虫病疫苗接种的一种方法,该方法包括给予一种组合物,该组合物包含作为一种组分的一种浆料基质以及作为另一种组分的一种或多种血吸虫抗原,这种浆料基质在室温下为液体并且在生理学条件下为凝胶。

[0022] 本发明包括在牛羊类体内进行血吸虫病疫苗接种的一种方法,该方法包括向牛羊类给予如在此所述的一种组合物,其中一种或多种抗原包括血吸虫抗原。

[0023] 在这些方法的一些方面中,该组合物进一步包括一种或多种佐剂。在一些方面中,佐剂包括Toll样受体(TLR)激动剂和/或细胞因子。在一些方面中,TLR激动剂包括TLR4和/或TLR9激动剂。在一些方面中,TLR9激动剂包括CpG寡脱氧核苷酸(ODN)。在一些方面中,CpG ODN包括牛CpG。在一些方面中,该佐剂包括细胞因子IL-12。

[0024] 在这些方法的一些方面中,该组合物进一步包括Toll样受体(TLR)激动剂和/或细胞因子。在一些方面中,TLR激动剂包括TLR4和/或TLR9激动剂。在一些方面中,TLR9激动剂包括CpG寡脱氧核苷酸(ODN)。在这些方法的一些方面中,CpG ODN包括牛CpG。

[0025] 在这些方法的一些方面中,该血吸虫抗原包括日本血吸虫抗原,或其抗原片段。

[0026] 在这些方法的一些方面中,该血吸虫抗原包括SjCTPI多肽、SjCTPI-Hsp70多肽、SjC23多肽、和/或SjC23-Hsp70多肽,或其抗原片段。

[0027] 在这些方法的一些方面中,该组合物的给予包括作为初次疫苗接种和/或增强疫苗接种的给予。

[0028] 在这些方法的一些方面中,该组合物的给予包括在用SjCTPI-Hsp70质粒DNA疫苗初次疫苗接种之后,作为增强疫苗接种的给予。

[0029] 在这些方法的一些方面中,该方法进一步包括一种或多种抗血吸虫化学治疗剂的给予。

[0030] 在这些方法的一些方面中,该方法证明对血吸虫寄生物传染预防的至少45%效力。

[0031] 本发明包括制造在此描述的组合物的多种方法。

[0032] 术语“和/或”意指所列举元素的一个或全部或任意两个或更多个所列举元素的一

个组合。

[0033] 词语“优选的”和“优选地”是指在某些环境下可以提供某些益处的本发明的实施例。然而,在相同或其他环境下,其他实施例也可以是优选的。此外,一个或多个优选实施例的详述并不意味着其他实施例是无用的,且并不旨在从本发明范围内排除其他实施例。

[0034] 当术语“包括”及其变体在说明书和权利要求书中出现时,这些术语不具有限制性含义。

[0035] 除非另外说明,“一个/一种(“a”或“an”)”、“该(“the”)”、以及“至少一个”可互换使用并且意指一个或多个。

[0036] 同样地在此,端点数值范围的详述包括包含在该范围内的所有数值(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5、等)。

[0037] 在提供值的范围的情况下,应当理解地是除非上下文明确地另外指出,在该范围的上限和下限之间的每个居中值达下限单位的十分之一,并且在所陈述范围内的任何其他陈述的值或居中值都涵盖在本发明之内。这些更小范围的上限和下限可以独立地包含在这些更小的范围之内,并且还涵盖在本发明之内,服从所陈述范围内的任何明确排除的限制。在所陈述的范围包含极限值的一个或两个的情况下,将那些所包含的极限值的一个或两个排除在外的范围也包含在本发明内。

[0038] 对于在此披露的包括离散步骤的任何方法而言,这些步骤可以按任何可行顺序进行。并且,如果适当的话,两个或更多个步骤的任何组合可以同时进行。

[0039] 本发明的以上概述并不旨在描述每个披露的实施例或本发明的每一种实现方式。以下是本说明书的更加更具体示例的示意性实施例。在整个申请书的几个地方,通过实例列举提供了指导,这些实例能以不同组合使用。在每一种情况下,所详述的列举仅用作一个代表性组并且不应当被理解为一个排他性的列举。

[0040] 附图简要说明

[0041] 图1示出了IgA抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10。

[0042] 图2示出了IgM抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10。

[0043] 图3示出了IgG抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10。

[0044] 图4示出了IgG₁抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10。

[0045] 图5示出了IgG_{2a}抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10。

[0046] 图6示出了单次疫苗接种之后(21天)更高的抗HBsAg抗体滴度。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10;使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。

[0047] 图7示出了单次疫苗接种之后(35天)更高的抗HBsAg抗体滴度。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10;使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,* $p < 0.05$ 。

[0048] 图8示出了脾细胞HBsAg再刺激二十四小时之后的细胞因子分布型。所示数据代表一次实验, $n=5$; 使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析, 与单独的抗原进行比较, $*p < 0.05$ 、 $****p < 0.0001$ 。

[0049] 图9示出了脾细胞HBsAg再刺激四十八小时之后的细胞因子分布型。所示数据合并自两个独立的实验, 总数 $n=10$ (对于仅佐剂, $n=5$); 使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析, 与单独的抗原进行比较, 未见统计差异 ($p < 0.05$)。

[0050] 图10示出了脾细胞HBsAg再刺激七十二小时之后的细胞因子分布型。所示数据合并自两个独立的实验, 总数 $n=10$ (对于仅佐剂, $n=5$); 使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析, 与单独的抗原进行比较, $**p < 0.01$ 。

[0051] 图11示出了在HbsAg特异性T细胞应答中, 通过酶联免疫斑点测定法 (ELISpot) 测定的增加的HBsAg特异性细胞介导免疫。所示数据合并自两个独立的实验, 总数 $n=10$; 使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析, 与单独的抗原进行比较, $*p < 0.05$ 。

[0052] 图12示出了通过流式血细胞计数术测定的增加的HBsAg特异性T细胞介导免疫。所示数据合并自两个独立的实验, 总数 $n=10$; 使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析, 与单独的抗原进行比较, $**p < 0.01$ 。

[0053] 图13是一个雷达图, 表示在初次接种24小时之后, 在来自致免疫小鼠 ($n=10$ /组) 的细胞亚群范围内体外细胞因子平衡的普遍程度。可以连接该轴的这些值以形成中央多边形区域, 该区域表示总体细胞因子平衡。该雷达图轴的分析突出显示白细胞对总体细胞因子平衡的贡献。

[0054] 图14A和14B是雷达图, 表示在初次接种48小时之后, 在来自致免疫小鼠 ($n=10$ /组) 的细胞亚群范围内体外细胞因子平衡的普遍程度。图14A呈现TNF和IFN γ 。图14B呈现IL-5和IL-4。每个轴展示每个细胞因子平衡范畴的比例。可以连接每个轴的这些值以形成中央多边形区域, 该区域表示总体细胞因子平衡。增加或减小中央多边形区域反映每一组中更高或更低的炎症性或调控性细胞因子平衡的贡献。

[0055] 图15是一个雷达图, 表示在初次接种72小时之后, 在来自致免疫小鼠 ($n=10$ /组) 的细胞亚群范围内体外细胞因子平衡的普遍程度。可以连接该轴的这些值以形成中央多边形区域, 该区域表示总体细胞因子平衡。该雷达图轴的分析突出显示白细胞对总体细胞因子平衡的贡献。

[0056] 图16A至16D是最初接种之后14与35天之间在致免疫小鼠 ($n=10$ /组) 中诱导的rHepBag特异性抗体的比较。在最初免疫28天之后进行增强, 通过ELISA测定 (酶联免疫吸附测定) 来确定rHepBag特异性抗体水平。图16A呈现来自14天的数据, 图16B呈现来自21天的数据, 图16C呈现来自28天的数据, 并且图16D呈现来自35天的数据。在 $P \leq 0.05$ 处的统计显著性由上标字母 'a'、'b' 和 'c' 表示, 分别用于与rHepBag、Alhydrogel®中的rHepBag以及弗氏 (Freund) 中的rHepBag比较。

[0057] 图17A至17D示出了在用rHepBag加佐剂进行小鼠免疫 ($n=10$ /组) 之后14与35天之间的IgG1:IgG2a比率。在最初免疫28天之后进行增强, 通过ELISA测定来确定rHepBag特异性抗体水平。图17A呈现来自14天的数据, 图17B呈现来自21天的数据, 图17C呈现来自28天的数据, 并且图17D呈现来自35天的数据。

[0058] 图18A和18B示出了在用rNP进行疫苗接种的两个小鼠品系中的增加的抗NP IgG滴

度。图18A示出了C57BL/6小鼠中的滴度。图18B示出了Balb/c小鼠中的滴度。在最后一次疫苗接种四周之后(4wplv),收集血清。

[0059] 图19A和19B示出了在用PR8 WIV进行疫苗接种的C57B1/6小鼠中的增加的抗流感IgG滴度。图19A和图19B表示来自两个独立实验的结果。在最后一次疫苗接种四周之后(4wplv),收集血清。

[0060] 图20A和20B示出了在用PR8 WIV进行疫苗接种的C57B1/6小鼠中的增加的对致死性激发(lethal challenge)的预防。图20A示出了来自一个独立实验的结果,其中致死性激发在30LD₅₀处。图20B示出了来自一个独立实验的结果,其中致死性激发在1000LD₅₀处。

[0061] 图21A-21C示出了在用三种重组伯克霍尔氏菌蛋白抗原与三种不同佐剂(明矾、CFA、或PURAMTRIX凝胶)的混合物免疫的小鼠中的增加的抗伯克霍尔氏菌IgG滴度。图21A示出了在致免疫小鼠中的抗伯克霍尔氏菌蛋白4-9 IgG滴度。图21B示出了在致免疫小鼠中的抗伯克霍尔氏菌蛋白22-11 IgG滴度。图21C示出了在致免疫小鼠中的抗伯克霍尔氏菌蛋白42IgG滴度。

[0062] 图22A和22B示出了在用完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)中的CCA(图22A)以及MATRIGEL加CpG中的CCA(图22B)免疫的小鼠中IgG抗血吸虫CCA蛋白抗体滴度。

[0063] 本发明的示意性实施例的详细说明

[0064] 本发明提供了多种组合物和方法,这些组合物和方法提供了改进的疫苗递送,提供了抗原在疫苗给予部位处改进的局灶性(focal)和持续递送;增强了抗原递呈细胞激活以及抗原摄取和加工。随着本发明,以组合物的形式给予一种或多种致免疫性试剂,该组合物包含一种浆料基质组分,这种浆料基质组分在室温和/或低盐浓度下为液体并且在生理学盐浓度和/或生理学温度下为凝胶。凝胶化可以由脊椎动物(例如,哺乳动物或鸟)的生理学体温诱导。这样一种温度可以是,例如,至少约25摄氏度(°C)、至少约30°C、至少约32°C、至少约35°C、至少约37°C、至少约39°C、或至少约40°C。凝胶化可以由生理学盐浓度诱导。在一些实施例中,可以在毫摩尔盐浓度的存在下,例如,通过大于约0.05摩尔(M)的盐浓度,进行凝胶化。

[0065] 因此,在给予受试者之后,疫苗组合物凝胶或聚合,定位疫苗抗原于单一位点,在该位点处固有抗原递呈细胞可以归巢(home)并开始摄取疫苗抗原。理想地,该浆料基质是一种生物相容性材料,该材料在体内将不会由于与体液或组织相接触而引起不希望的反应,例如像组织死亡、肿瘤形成、过敏性反应、异物反应(排异)、炎症性反应、抗体应答、或凝血。在此,浆料基质还称作“生物医学聚合物水凝胶”、“生物医学水凝胶”、“生物医学聚合物”、“聚合物水凝胶”、“生物相容性聚合物水凝胶”、“生物相容性水凝胶”、“生物相容性聚合物”、或“水凝胶”。如在此使用,“水凝胶”是交联的亲水大分子三维网,能够被溶胀并且结合按重量计约20%至约95%的水。水凝胶是其中液体构成是水的凝胶。如在此使用,凝胶是固体、胶样的材料,该材料可以具有范围从软和弱至硬和强的特性。凝胶是一个实质上稀的交联系统,当处于稳态时,该系统显示不流动。按重量计,凝胶主要是液体,但是由于在该液体内的三维交联网,它们表现得像固体。赋予凝胶结构(硬度)的是流体之内的交联。以此方式,凝胶是固体内液体分子的分散体,其中该固体是连续相并且该液体是不连续相。水凝胶是亲水性聚合物链的网,有时发现为其中水是分散体介质的胶质凝胶。水凝胶是高度吸收性的(它们可以包含超过99.9%的水)、天然或合成的聚合物。由于它们的显著的含水量,水

凝胶还拥有一定程度的、与天然组织非常类似的柔性。

[0066] 在医学技术中可以使用的多种多样生物学聚合物水凝胶中的任一种可以与在此描述的这些方法和组合物一起使用。

[0067] 在一些实施例中,该浆料基质是天然存在的,例如像,纤维蛋白、胶原、弹性蛋白、琼脂糖、甲基纤维素、透明质酸、以及其他天然来源的聚合物。在一些实施例中,该浆料基质是MATRIGEL,或其衍生物。MATRIGEL是提取自小鼠细胞的一种基底膜并且包括层粘连蛋白、胶原IV、巢蛋白(entactin)、巢蛋白(nidogen)、以及蛋白聚糖。已经使用侵入到MATRIGEL中的肿瘤细胞来研究胞外基质受体以及基质降解酶在肿瘤进展和侵入中的参与,并且MATRIGEL也已经用作体外和体内血管生成模型(MATRIGEL胶塞分析)来研究血管生成和抗-血管生成细胞因子和其他底物的活性。MATRIGEL是可商购的,为BD Matrigel™基质。参见万维网:bdbiosciences.com/cellculture/ecm/ecmtypes/index.jsp。

[0068] 在一些实施例中,浆料基质是合成的,例如像,合成的肽水凝胶或自组装肽(sapeptide)支架。在生理学条件下,通过离子自身的互补 β 折叠寡肽的自发组装,形成该sapeptide支架,产生一种水凝胶材料。这些短肽(典型地是具有内部重复序列的约8、约12、约16、约24、或约32个氨基酸残基)在盐水溶液中自组装为三维基质。这些肽特征是两亲性的,具有交替的疏水性和亲水性氨基酸残基;超过12个氨基酸,并且优选至少16个氨基酸;是互补性和结构兼容性的。互补性是指这些肽通过在它们的亲水性侧链之间形成离子对和/或氢键而相互作用的能力,并且结构兼容性是指互补性肽在它们的肽骨架之间维持一个恒定距离的能力。具有这些特性的肽参与分子间相互作用,这导致在二级结构水平上的 β 折叠的形成和稳定以及在三级结构水平上的细丝交织。实例包括但不限于肽家族成员,RAD16-I((RADA)(4))、RAD16-II((RARADADA)(2))、KFE-8((FKFE)(2))、或KLD-12((KLDL)(3))。参见,例如,美国专利5,670,483;Holmes(霍姆斯)等人,2000,Proc Natl Acad Sci USA(《美国国家科学院院刊》);97(12):6728-33;Yokoi(横井)等人,2005,Proc Natl Acad Sci USA(《美国国家科学院院刊》);102(24):8414-9;Liu(刘)等人,2012,Nanoscale(《纳米级》);4(8):2720-7,以及BD PuraMatrix™肽水凝胶,使用指南,目录号354250(SPC-354250-G rev2.0;BD Biosciences(BD生物科学公司),贝德福德,马萨诸塞州)。在一些方面中,肽水凝胶包括精氨酸-丙氨酸-天冬氨酸-丙氨酸(RADA)的肽支架自组装组成部分(building block)。在一些方面中,肽水凝胶包括RADARADARADARADA,或其衍生物。在一些方面中,该肽水凝胶包括PURAMATRIX,或其衍生物。参见,例如,美国专利5,670,483;Holmes(霍姆斯)等人,2000,Proc Natl Acad Sci USA(《美国国家科学院院刊》);97(12):6728-33;Yokoi(横井)等人,2005,Proc Natl Acad Sci USA(《美国国家科学院院刊》);102(24):8414-9;Liu(刘)等人,2012,Nanoscale(《纳米级》);4(8):2720-7,以及BD PuraMatrix™肽水凝胶,使用指南,目录号354250(SPC-354250-G rev2.0;BD Biosciences(BD生物科学公司),贝德福德,马萨诸塞州)。

[0069] 在一些实施例中,生物学聚合物水凝胶可以是体内自发聚合的聚乙二醇(PEG)水凝胶。

[0070] 在一些实施例中,浆料基质,除在脊椎动物或哺乳动物体温和/或生理学盐浓度下凝胶化之外,是随着时间降解和溶解的一种生物可吸收性合成聚合物。此类化合物在体内通过水解作用被自然降解并且作为水溶性单体被吸收。实例包括聚乳酸、聚丙交酯(PLA)、

聚(L-乳酸)、聚-D-丙交酯、聚乙醇酸(PGA)、聚乙交酯及其与乳酸的共聚物(聚(乳酸共乙醇酸)、乳酸与乙醇酸的均聚物和共聚物、聚(DL-乳酸/甘氨酸)共聚物、聚(DL-乳酸共乙醇酸)(PLGA)、聚(DL-乳酸共乙醇酸)(PLGA)、聚(DL-乳酸共乙醇酸)多孔泡沫、聚(氨基酸)聚[氧杂(1-氧代-1,2-乙烷二基)]((C₂H₂O₂)_n;Biovek)、聚(乙交酯共己内酯)、聚(乙交酯-共-三亚甲基碳酸酯)、聚二噁烷酮(PDO、PDS)、聚-对-二噁烷酮、己内酯(也称作2-氧杂环庚烷酮)、ε-己内酯(caprolactone)、6-己内酯(hexanolactone)、己烷-6-内酯、1-氧杂-2-氧代环庚烷丙交酯双聚合物910、聚酐、以及形成自聚(D,L-乳酸共乙醇酸,88:12)(PLGA)或形成自PLGA与聚(L-乳酸)(PLLA)50/50(w/w)共混物的聚原酸酯膜。参见,例如,Schakenraad(斯科肯莱德)和Dijkstra(迪杰斯特拉),1991,Clin Mater(《临床材料》);7(3):253-69;Mooney(穆尼)等人,1997,J Biomed Mater Res(《生物医学材料研究杂志》);37(3):413-20;以及Lu(鲁)等人,2000,Biomaterials(《生物材料》);21(18):1837-45。

[0071] 本发明的组合物包括一种或多种抗原性试剂(在此也称作免疫原)。抗原性试剂可以是给予受试者从而在该受试者体内引起免疫应答的多种多样试剂中的任一种。抗原性试剂可以是衍生自病原体的一种免疫原。该抗原性试剂可以是,例如,肽或蛋白抗原、病毒抗原或多肽、灭活病毒、重组病毒、细菌或寄生抗原、灭活的细菌或寄生虫、全细胞、遗传改性的细胞、肿瘤相关抗原或肿瘤细胞、或糖类抗原。在一些应用中,抗原不是活细胞。在一些实施例中,一种抗原性试剂是一种可溶性抗原。

[0072] 在此描述的一种组合物可以包括为可得多种多样致免疫性试剂中任一种的抗原性试剂作为疫苗组分。此类疫苗可以包括但不局限于,针对不同感染、病毒与寄生虫病的抗原性疫苗组分以及抗肿瘤疫苗组分。抗肿瘤疫苗包括但不局限于,肽疫苗、全细胞疫苗、遗传改性的全细胞疫苗、重组蛋白疫苗或基于由重组病毒载体表达的肿瘤相关抗原的疫苗。在一些实施例中,一种抗原性试剂是一种可溶性抗原。

[0073] 抗原性试剂包括来自,例如,流感嗜血杆菌(*Haemophilis influenza*)、A型或B型流感病毒、肺炎球菌(*Streptococcus Pneumonia*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)抗原(例如像,PA)的细菌抗原。

[0074] 抗原性试剂包括来自,例如,疟原虫或血吸虫寄生虫的寄生虫抗原。疟原虫抗原包括但不局限于来自疟原虫属物种间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、和诺氏疟原虫(*Plasmodium knowlesi*)、*Plasmodium ovale*and、和三日疟原虫(*Plasmodium malariae*)的抗原。血吸虫寄生虫包括但不局限于,日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)、曼氏裂体吸虫(*Schistosoma mansoni*)、以及埃及血吸虫(*Schistosoma haematobium*)。血吸虫抗原可以是血吸虫磷酸丙糖异构酶(CTPI)蛋白或其抗原片段或衍生物,包括但不局限于日本血吸虫、曼氏裂体吸虫、或埃及血吸虫CTPI蛋白或其抗原片段或衍生物。血吸虫抗原可以是血吸虫四螺(tetraspin)23kDa膜内在蛋白(C23)或其抗原片段或衍生物,包括但不局限于日本血吸虫、曼氏裂体吸虫、或埃及血吸虫C23蛋白或其抗原片段或衍生物。这样一种血吸虫抗原可以是稠合到一个或多个额外的抗原决定簇上的嵌合多肽,例如像,热休克蛋白,或其抗原片段或衍生物,包括但不局限于,牛热休克蛋白70(Hsp70)。血吸虫抗原包括,例如,SjCTPI、SjCTPI-Hsp70、SjC23、以及SjC23-Hsp70多肽。抗原可以形成多种其他寄生虫中的任一种,包括但不局限于,动基体目原生动物(kinetoplastid protozoa),例如像Blastocriithidia属、短膜虫属(Criithidia)、

Endotrypanum、匍滴虫属 (Herpetomonas)、利什曼原虫属 (Leishmania)、无膜鞭毛虫属 (Leptomonas)、植生滴虫属 (Phytomonas)、锥虫属 (Trypanosoma)、以及Wallaceina属的原生动物。在优选的实施例中,锥虫属的原生动物包括但不限于克氏锥虫 (*T. cruzi*)、布氏锥虫 (*T. brucei*)、布氏锥虫冈比亚亚种 (*T. b. gambiense*)、以及布氏锥虫罗得西亚亚种 (*T. b. rhodesiense*)。在一些实施例中,利什曼原虫属的原生动物包括,例如,硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*)。值得注意的是锥虫病包括锥体虫病(由锥虫属物种引起的非洲嗜眠病和南美洲查加斯病)和利什曼原虫病(由利什曼原虫属物种引起)。

[0075] 抗原性试剂包括来自以下的病毒抗原,例如,肝炎,例如像,丙肝、乙肝、或甲肝,流感,例如,M2,血细胞凝集素、和/或流感病毒的神经氨酸酶蛋白,包括,例如,A型流感(包括但不限于H5N1和H1N1亚型)、B型流感、和C型流感,呼吸道合胞体病毒 (RSV),狂犬病毒,乳头瘤病毒,麻疹病毒,风疹病毒,水痘病毒,轮状病毒,脊髓灰质炎病毒,水痘带状疱疹病毒 (VZV),以及负链RNA病毒,例如像,副黏液病毒科病毒。副黏液病毒科病毒的实例包括但不限于,人副流感病毒1、人副流感病毒2、人副流感病毒3、人副流感病毒4、人副流感病毒5、腮腺炎病毒、麻疹病毒、人偏肺病毒、人呼吸道合胞病毒、牛呼吸道合胞病毒牛瘟病毒、犬瘟热病毒、海豹温热病毒、新城疫病毒、禽肺病毒、小反刍兽疫病毒 (PPRV)、仙台病毒、梅南高病毒、索托帕拉雅病毒 (*Tupaia paramyxovirus*)、Tioman病毒、Tuhokovirus1、Tuhokovirus2、Tuhokovirus3、亨德拉病毒、尼帕病毒、枪头蛇病毒、Nariva病毒、Salem病毒、J病毒、Mossman病毒、以及Beilong病毒。

[0076] 抗原性试剂可以包括衍生自感染家禽的病原体的一种或多种免疫原。此类免疫原可以衍生自,例如,传染性支气管炎病毒 (IBV)、新城疫病毒 (NDV)、马立克氏病 (Marek's disease (MDV))、(传染性囊虫病 (IBD) 病毒)、传染性喉气管炎 (ILT)、禽呼肠孤病毒、霍乱、禽痘、支原体病、(火鸡和鸡鼻炎)、禽流感、雏鸡传染性颤搐病 (AE)、禽鼻气管炎 (ART)、鸭病毒性肝炎、出血性肠炎、鹅细小病毒、副粘病毒3、鸡贫血病毒 (CAV)、大肠杆菌 (*E. coli*)、丹毒 (*Erysipelas*)、*Reimerella*、鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*)、禽多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、球虫病、减蛋综合征 (EDS) 病毒、火鸡鼻气管炎病毒 (TRTV)、以及痘病毒。抗原性试剂可以包括衍生自感染牛羊类的病原体的一种或多种免疫原,包括但不限于,家牛、水牛、非洲水牛、野牛、以及牦牛。此类免疫原可以衍生自,例如,牛呼吸系统疾病 (BRD) 疫苗,包括但不限于,I型和II型BVDV,牛疱疹病毒1 (BHV-1) 疫苗,包括但不限于,将不导致潜伏性病毒的亚单位疫苗,睡眠嗜血杆菌 (*Haemophilus somnus*) 疫苗, *Mannheimia haemolytica* (溶血曼海姆菌) 疫苗,牛支原体 (*Mycoplasma bovis*) 疫苗,牛轮状病毒疫苗,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K99疫苗,牛冠状病毒 (BCV) 疫苗,肖氏芽孢梭菌 (*Clostridium chauvoei*) (黑脚病) 疫苗,腐败梭菌 (*Clostridium septicum*) 疫苗,污泥梭状芽孢杆菌 (*Clostridium sordelli*) (恶性水肿) 疫苗,诺维氏芽孢梭菌 (*Clostridium novyi*) (黑疫) 疫苗,产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) (肠毒血症) 疫苗,牛传染性角膜结膜炎 (红眼) 疫苗,包括但不限于,牛莫拉氏菌 (*Moraxella bovis*)、衣原体 (*chlamydia*)、支原体 (*mycoplasma*)、无胆甾原体 (*acholeplasma*),或牛传染性鼻气管炎 (IBR) 病毒疫苗,乳腺炎疫苗,包括但不限于,大肠杆菌 J5 疫苗。

[0077] 抗原性试剂可以包括衍生自感染猪的病原体的一种或多种免疫原,包括但不局限

于,猪圆环病毒2型(PCV2)、猪繁殖和呼吸障碍综合征(PRRSV)、呼吸道支原体、猪链球菌(*Streptococcus suis*)、猪冠状病毒、轮状病毒、产肠毒素的大肠杆菌(K88)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumonia*) (APP)、以及猪流感。

[0078] 抗原性试剂可以包括衍生自伯克霍尔氏菌属的一种或多种免疫原,该属是一组几乎无处不在的、革兰阴性的、能动的、强制性的好氧的棒状细菌,包括动物/人类以及植物病原体两者连同一些环境重要的物种。伯克霍尔氏菌由于其致病性成员而广为人知。鼻疽伯克霍尔氏菌(*Burkholderia mallei*)是鼻疽病的原因,鼻疽病是主要发生于马以及相关动物的一种疾病。类鼻疽伯克霍尔氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)是类鼻疽(也称作惠特莫尔氏病)的病原体,类鼻疽是主要发生于热带气候的一种传染病,可以感染人或动物,尤其是在东南亚和澳大利亚北部。洋葱伯克霍尔氏菌(*Burkholderia cepacia*)是患有囊性纤维病的人群中肺梗死的重要病原体。由于其抗生素抗性及其相关性疾病的高死亡率,鼻疽伯克霍尔氏菌和类鼻疽伯克霍尔氏菌被认为是靶向家畜和人的潜在生物战剂。伯克霍尔氏菌抗原包括,例如,三种伯克霍尔氏菌重组蛋白(伯克霍尔氏菌4-9蛋白、伯克霍尔氏菌22-11蛋白、以及伯克霍尔氏菌42蛋白)中的任一种。此类伯克霍尔氏菌抗原可以单独给予或作为任意两种或三种抗原的混合物给予。

[0079] 抗原性试剂可以是目前在麻疹-腮腺炎-风疹(MMR)和(麻疹-腮腺炎-风疹-水痘)(MMRV)疫苗组合中使用的那些中的一种或多种。

[0080] 在一些实施例中,该抗原性试剂是一种多核苷酸疫苗,也就是说,该抗原性试剂作为载体构建体(例如质粒)被递送,导致一旦递送给受试者,多肽抗原即表达。如在此使用,术语“多核苷酸”是指任何长度核苷酸(核糖核苷酸亦或脱氧核苷酸)的聚合型,并且包括双链和单链RNA和DNA。可以直接从天然来源获得多核苷酸,或可以借助于重组技术、酶技术、或化学技术制备。多核苷酸在拓扑学上可以是线形或环形的。多核苷酸可以是,例如,载体(例如表达或克隆载体)的一部分,或一个片段。多核苷酸可以包括具有不同功能的核苷酸序列,包括,例如,编码区以及非编码区,例如调节区。可以利用任何适合的载体递送媒介。不同载体是公开可得的。该载体可以是,例如,处于质粒、柯斯质粒、病毒颗粒、或噬菌体的形式。载体可以是表达载体。通过各种各样的程序,可以将适当的核酸序列插入该载体。一般而言,使用本领域中已知的技术将DNA插入到一个或多个适当的限制性内切核酸酶位点。载体组分通常包括但不局限于一个或多个信号序列、一个复制起点、一个或多个标记基因、一个增强子元件、一个启动子、以及一个转录终止序列。含有这些组分中的一个或多个的适合载体的构建体采用本领域中普通技术人员已知的标准连接技术。

[0081] 在此描述的组合物作为一种疫苗可以是有用的。该疫苗可以是预防性或保护性疫苗。

[0082] 本发明的组合物可以包括具有佐剂活性的一种或多种化合物。这样一种佐剂刺激免疫系统并且增加对疫苗抗原的应答,而本身不具有任何特异性抗原效果。佐剂作用是当与特异性疫苗抗原组合使用时,加速、延长、或增强抗原特异性免疫应答。出于此目的,适合的化合物或组合物包括但不局限于基于铝的佐剂,例如,像,磷酸铝、氢氧化铝(也称为明矾)、磷酸羟基铝、羟基磷酸硫酸铝,以及非铝佐剂,例如,像, QS21、MF59、脂质-A、中性脂质体(neutral liposomes)、微粒,细胞因子例如,像, IL-12, 植物油(plant oil)、动物油、基于例如,矿物油的水包油或油包水乳液,像, Bayol FTM或 Marcol 52TM, 弗氏完全佐剂, 弗氏非

完全佐剂,植物油(vegetable oil),例如,像,维生素E乙酸酯,皂甙,角鲨烯,脂化的氨基酸(“LAA”),和/或TLR激动剂。

[0083] 在一些实施例中,佐剂组分是To11样受体(TLR)配体。在哺乳动物中TLR首次鉴定于1997年。它们构成了对许多病原体的第一防线并且在先天免疫系统的功能中发挥着至关重要的作用。存在许多已知的To11样受体亚类,包括TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12、TLR13、TLR14、TLR15、以及TLR16,并且它们的配体展示了显著的结构变异。TLR激动剂是针对不同To11样受体(TLR)之一的一种分子配体。已知的TLR包括:TLR1(TLR1配体包括三酰基脂蛋白);TLR2(TLR2配体包括脂蛋白、革兰氏阳性肽聚糖、脂磷壁酸、真菌、以及病毒糖蛋白);TLR3(TLR3配体包括双链RNA,如在某些病毒中发现,以及聚I:C);TLR4(TLR4配体包括脂多糖和病毒糖蛋白);TLR5(TLR5配体包括鞭毛蛋白);TLR6(TLR6配体包括二酰基脂蛋白);TLR7(TLR7配体包括小合成免疫改性剂(例如咪喹莫特、R-848、洛索立宾、和溴匹立明)和单链RNA);TLR8(TLR8配体包括小合成化合物和单链RNA);以及TLR9(TLR9配体包括未甲基化的CpG DNA基序)。在此描述了一些TLR配体,但是应理解这些列表不以任何方式限制本发明。TLR配体是商业上广泛可得的。

[0084] 优选的TLR激动剂包括TLR2激动剂、TLR4激动剂、TLR7激动剂、TLR8激动剂、以及TLR9激动剂。LR2涉及来自革兰氏阳性和革兰氏阴性菌,连同支原体和酵母的一系列广泛的微生物分子的识别。TLR2配体包括脂聚糖、脂多糖、脂磷壁酸和肽聚糖。

[0085] TLR4识别革兰氏阴性脂多糖(LPS)和脂质A,其有毒部分。TLR4激动剂包括但不限于,脂多糖(LPS),病毒糖蛋白,单磷酸脂质A(MPL)(Anderson(安德森)等人,2010,Colloids Surf B Biointerfaces(《胶体和表面B,生物界面》);75(1):123-32),吡喃葡萄糖脂质佐剂-稳定的乳液(GLA-SE)(Coler(科勒)等人,2010,PLoS One;5(10):e13677),以及合成的六酰化脂质A衍生物,表示为吡喃葡萄糖脂质佐剂(GLA)(Coler(科勒)等人,2011,PLoS One;6(1):e16333)。

[0086] TLR9由含有未甲基化的CpG序列激活,包括在细菌DNA或合成寡核苷酸(ODN)中发现的那些。此类含有未甲基化的CpG的序列在细菌DNA中高频率存在,但是在哺乳动物DNA中罕见。因此,未甲基化的CpG序列区分哺乳动物DNA与微生物DNA。TLR9激动剂可以是微生物DNA的一种制品,微生物DNA包括但不限于大肠杆菌DNA、无内毒素大肠杆菌DNA、或来自大肠杆菌K12的无内毒素细菌DNA。TLR9激动剂可以是含有未甲基化的CpG基序的一种合成寡核苷酸,在此也称作“CpG-寡脱氧核苷酸”、“CpGODN”、“ODN”、或“CpG”。CpG ODN是短的、单链的、DNA分子,含有胞嘧啶(“C”核苷酸),其后是鸟嘌呤(“G”核苷酸)。“p”典型地是指DNA的磷酸二酯骨架。本发明的TLR9激动剂可以包括已经描述的至少三种类型的刺激性ODN,A型、B型、以及C型中的任一种。CpG-寡脱氧核苷酸可以通过用于多核苷酸的化学合成的标准方法生产,或商购。例如,CPG ODN可以通过InvitroGen公司(圣地亚哥,加利福尼亚州)购买。

[0087] 在此描述的这些组合物可以包括一种或多种细胞因子。细胞因子可以包括但不限于IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-19、IL-20、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子- β (TGF- β)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、和或Flt-3配体。在一些应用中,一种或多种细胞因子可以用作一种佐剂。

[0088] 本发明还包括在受试者体内通过向该受试者给予如在此所述的一种组合物诱导

免疫应答的多种方法。该免疫应答可能会或可能不会赋予保护性免疫。免疫应答可以包括,例如,体液应答和/或细胞介导的免疫应答。体液免疫应答可以包括IgG(包括IgG1、IgG2(包括IgG2a和/或IgG2b)、IgG3、和/或IgG4)、IgM、IgA、IgD、IgE、和/或IgY应答。细胞免疫应答可以包括T细胞激活和/或细胞因子产生。体液或细胞免疫应答的确定可以通过免疫领域中已知的多种方法中的任一种来确定,这些方法包括但不局限于在此描述的那些中的任一种。免疫应答的诱导可以包括免疫系统对传染性病原体的未来激发的启动和/或刺激,从而对未来的感染提供免疫。这样一种免疫应答的诱导可以用作保护性应答,通常导致这些症状的减少。该免疫应答可以增强先天性和/或适应性免疫应答。该免疫应答可以展示更高浓度的抗体与单一的初次免疫。与不使用该浆料基质的免疫相比较,该免疫应答可以示出改变的免疫球蛋白比率和/或改变的炎性细胞因子、I型干扰素、和/或趋化因子的诱导。这样一种改变可以是上升或下降。例如,可以获得与另一种免疫球蛋白同种型相比,一种免疫球蛋白同种型的更高比率(例如,与IgM、IgA、IgD、IgG、或IgE中的任一种相比较,IgM、IgA、IgD、IgG、或IgE中的任一种)或与另一种IgG亚类相比较,一种IgG亚类的更高比率(例如,与IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、或IgG4中的任一种相比较,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、或IgG4中的任一种)。

[0089] 本发明还包括通过向受试者给予如在此所述的一种组合物进行疫苗接种的多种方法。此类疫苗接种可以导致未来感染的症状的减少或缓和并且可以预防未来感染。在此描述的这些组合物可以具有治疗和/或预防性应用,作为致免疫性组合物预防和/或缓解感染,使得对新感染的抗性将被增强和/或降低该疾病的临床严重性。通过与RSS相关的症状(包括但不局限于在此描述的那些中的任一种)的减少或缺失,可以证明这种保护。可以使用各种各样的可得测定中的任一种来确定本发明的疫苗接种方法的有效性,这些方法包括但不局限于在此描述的那些中的任一种。

[0090] 在一些应用中,采用一个免疫有效量的至少一种免疫原,这样一个量在正常感染过程中引起实质性减少。免疫原性和有效性能以已知的多种实验系统中的任一种来测定,这些系统包括但不局限于在此描述的那些中的任一种。

[0091] 可以对受试者给予在此描述的这些组合物和方法,用于治疗 and/或预防病毒病,传染病,包括但不局限于细菌、真菌以及寄生性感染,癌症,以及其中一种或多种免疫原的给予是治疗希望的其他疾病。根据本披露的这些方法,一种或多种试剂的给予的效力可以通过本领域中已知的多种参数中的任一种进行评估,这些参数包括但不局限于在此描述的那些中的任一种。这包括,例如,迟发型变态反应对肿瘤抗原增加的测定,恶性肿瘤治疗后复发时间延迟的测定,无复发存活时间增加的测定,治疗后存活增加的测定,肿瘤大小的测定,通过多种方法(包括ELISPOT、FACS分析、细胞因子释放、或T细胞增殖实验)对暴露于疫苗接种抗原后被激活的反应性T细胞数量的测定。

[0092] 例如,可以向患者给予在此描述的这些组合物和方法用于癌症的治疗。抗肿瘤疫苗包括但不局限于,肽疫苗、全细胞疫苗、遗传改性的全细胞疫苗、重组蛋白疫苗或基于由重组病毒载体表达的肿瘤相关抗原的疫苗。待治疗的癌症包括但不局限于,黑色素瘤、基底细胞癌、大肠癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞癌)、白血病、淋巴瘤、肉瘤、卵巢癌、卡波济氏肉瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺肿瘤、原发性脑肿

瘤、胃癌、恶性胰腺胰岛瘤 (insulanoma)、恶性类癌、膀胱癌、皮肤癌前病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性肿瘤的高血钙症、子宫颈癌、子宫内膜癌、成胶质细胞瘤、以及肾上腺皮质癌。在一些方面中,该癌症是原发性癌症。在一些方面中,该癌症是转移性的。如在此使用的,术语“肿瘤”是指哺乳动物体内发现的所有类型的癌症、瘤、或恶性肿瘤。

[0093] 可以通过本领域中熟知的多种参数中的任一种对癌症治疗的效力进行评估。这包括但不限于,肿瘤大小减少的测定,肿瘤生长、蔓延、侵袭、血管化、血管生成、和/或转移抑制的测定,任何转移性病变生长、蔓延、侵袭和/或血管化抑制的测定,免疫系统细胞的肿瘤浸润的测定,和/或迟发型变态反应对肿瘤抗原增加的测定。治疗的效力还可以通过受试者体内复发的延迟或肿瘤进展的延迟的测定或通过该受试者存活率,例如,在治疗一或五年后增加的存活率的测定进行评估。如在此使用,复发是在其明显停止之后,肿瘤或瘤的恢复。

[0094] 如在此使用,除非上下文中另外明确指出,“治疗”以及类似的词语“经治疗的”、“进行治疗”等是用于获得有益或所希望结果(包括并且优选是临床结果)的一种方法。治疗可以包括治疗性和/或预防性治疗。治疗希望的效果包括预防疾病的发生或再发生、缓解症状、减少该疾病的一种或多种直接或间接病理学影响、降低疾病进展速率、疾病状态的缓解或减轻、以及缓解或改善的预后。在一些应用中,如在此描述的一种组合物可以展示一种或多种所希望结果改进的至少约10%、至少约15%、至少约20%、或至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%。

[0095] 如在此使用,一种物质的“有效量”或“治疗有效量”是足以影响一种所希望的生物学效应(如,有益的结果,包括临床结果)的量。对于此处的每一个应用,通过在体外和体内系统中测试已知的化合物,包括在此描述的那些中的任一种,可以经验性地确定治疗有效浓度和量。然后可以从中推测出用于人或其他动物的剂量。根据本发明的这些方法,一种或多种介入的给予的效力可以通过本领域中熟知的多种参数中的任一种进行评估。

[0096] 在一些实施例中,“有效量”是导致至少一个病理学参数减少的一个量。因此,例如,与未接受治疗的个体内所预期的参数下降相比,该量是有效的,从而实现下降的至少约10%、至少约15%、至少约20%、或至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%。

[0097] 本发明还包括制造和使用在此描述的疫苗组合物的多种方法。本披露的这些组合物可以被配制成处于适合于所选择的给予途径的多种形式的药物制品。可以使用多种给予模式中的任一种。例如,给予可以是静脉内、局部、经口、鼻内、皮下、腹膜内、肌肉内、或瘤内。

[0098] 在此描述的疫苗组合物可以采取植入物的形式。这样一种植入物可以被植入到肿瘤内。可以通过多种可得技术中的任一种完成递送,包括,例如,注射、输液、滴注、局部应用、由鼻递送,和/或由导管递送。可以通过使用递送装置或工具,例如针头或导管进行递送。此类递送装置包含在本发明之内。

[0099] 本发明的一种组合物可以与一种或多种额外的治疗介入一起给予。额外的治疗性治疗包括但不限于,手术切除,放射治疗,化疗,激素治疗,抗肿瘤疫苗,基于抗体的疗法,

全身照射,骨髓移植,外周血造血干细胞移植,细胞因子、抗生素、抗微生物剂、抗病毒药物例如AZT、ddI或ddC的给予、化学治疗剂,例如像环磷酰胺、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、阿霉素、长春新碱、异环磷酰胺、顺铂、吉西他滨、白消安、阿糖胞苷、阿霉素、丝裂霉素、环磷酰胺、氨甲喋呤,及其组合的给予。此类给予可以发生于所述疫苗组合物的给予之前、给予过程中、和/或给予之后。

[0100] 如在此使用,术语“受试者”包括但不局限于,人类或非人类脊椎动物。在一些实施例中,受试者是哺乳动物,特别是人类。受试者可以是“个体”、“患者”、或“宿主”。受试者可以包括,例如,人、高等灵长类动物、非人类的灵长类动物、家畜和家养宠物(如狗、猫、牛、马、猪、绵羊、山羊、骡、驴、水貂、和家禽)、实验动物(例如像,小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、和兔)、和野生动物。在一些实施例中,如在此所述的一种疫苗组合物被给予到牛上,包括但不局限于,家牛、水牛、非洲水牛、野牛、以及牦牛。

[0101] 在此所述的这些疫苗组合物可以被给予到家禽上,包括,例如,鸡、火鸡、珍珠鸡、鹧鸪、以及水鸟,例如像鸭与鹅。鸡包括但不局限于母鸡、公鸡、肉鸡、烘烤鸡(roaster)、种鸡、种鸡的后代、和蛋鸡。可以在孵化之前或之后向家禽给予本发明的疫苗。家禽可以在各种年龄段接受疫苗。例如,肉鸡可以在一日龄、卵内,或在2-3周龄卵内接种疫苗。产蛋禽类(laying stock)或繁殖牲畜(reproduction stock)可以在,例如,约6-12周龄进行疫苗接种并且在16-20周龄进行增强疫苗接种。此类产蛋禽类或繁殖牲畜可以在约6、约7、约8、约9、约10、约11、或约12周龄进行疫苗接种。此类产蛋禽类或繁殖牲畜可以在约16、约17、约18、约19、或约20周龄进行增强疫苗接种。此类产蛋禽类或繁殖牲畜的后代可以展示对给予的一种或多种免疫原的抗体滴度,这将预防或缓解该后代中的感染症状。

[0102] 可以根据本领域中已知和使用的方法配制本发明的组合物。本发明的疫苗组合物可以包括盐、缓冲剂、防腐剂防腐剂、或被设计为改进或稳定该组合物的其他物质。疫苗组合物可以包括一种药学上可接受的赋形剂或运载体。如在此使用的,术语“药学上可接受的运载体”是指适合于向人或其他脊椎动物给予的一种物质。对于给予,如果需要的话,在此所述的一种组合物可以是适合缓冲的,并且该组合物用足量的盐水或葡萄糖等渗。在这个方面,可以采用的无菌水介质将是本领域技术人员已知的。此外,对于人类给予,制品应符合FDA所要求的无菌度、热原、和通用安全性和纯度标准。这样一种制品可以是无热原的、可以是无菌的、和/或无内毒素的。

[0103] 本发明的组合物还可以包含一种或多种稳定剂。可以使用的任何适合的稳定剂包括碳水化合物,例如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、糊精、或葡萄糖;蛋白,例如白蛋白或酪蛋白;以及缓冲液,例如碱金属磷酸盐等。当通过冻干法制备干疫苗制品时,稳定剂是特别有利的。这样一种组合物可以包括药学上可接受的运载体或稀释剂。运载体包括,例如,稳定剂、防腐剂和缓冲剂。适合的稳定剂包括,例如,SPGA,碳水化合物(例如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、葡聚糖、谷氨酸酯或葡萄糖)、蛋白(例如干乳清、白蛋白或酪蛋白)或其降解产物。适合的缓冲剂包括,例如,碱金属磷酸盐。适合的防腐剂包括,例如,乙汞硫水杨酸钠,硫柳汞和庆大霉素。稀释剂包括但不局限于,水、水性缓冲液(例如缓冲盐水)、醇、以及多元醇(例如丙三醇)。

[0104] 多种多样的调制剂中的任一种可以包含在于此描述的这些方法和组合物中。如在此使用,“调制剂”是对活组织具有治疗效果的一种试剂。调制剂包括,例如,对于预防和/或

克服疾病和/或促进恢复有效的治疗剂。

[0105] 可以通过多种不同途径中的任一种向受试者给予本发明的疫苗。例如,可以静脉内、腹膜内、皮下、鼻内、经口、经皮、和/或肌内给予疫苗。考虑到本领域中所熟知的因素可以确定适合的剂量方案,这些因素包括,例如,年龄、体重、性别、以及受试者的医学症状;给予途径;所希望的效果;以及所使用的具体共轭物和配制品。该疫苗可以作为单一剂量亦或多剂量给予。当作为多剂量疫苗接种规格给予时,剂量的时间可以遵循本领域中已知的时间表。例如,在初始给予之后,随后可以给予一个或多个增强剂量以维持抗体滴度和/或免疫记忆。

[0106] 本发明的这些方法可以包括体外、离体、或体内方法。如在此使用,“体外”是在细胞培养中并且“体内”是在受试者的身体之内。根据本发明,可以递送分离的免疫原或试剂。如在此使用,“分离的”是指已经从其天然环境中取出的材料,使用重组技术产生,或是化学或酶合成的,并且因此从其天然状态“通过人类之手”改变。

[0107] 本发明包括采用在此描述的这些组合物中的一种或多种的试剂盒。此类试剂盒可以向受试者提供免疫原的给予,从而引起免疫应答。本发明的试剂盒可以包括其他试剂,例如缓冲剂,并且实践本发明所需要的溶液也包含在内。任选地与这样一种或多种容器相关联的可以是通知或印刷的说明书。如在此使用,短语“包装材料”是指用于储藏该试剂盒内容物的一种或多种物理结构。通过已知的方法构建该包装材料,优选地提供一种无菌的、无污染的环境。如在此使用,术语“包装”是指一种固体基质或材料,例如玻璃、塑料、纸、箔片、等,能够在固定限制之内保持一种多肽。本发明的试剂盒还可以包含使用说明书。使用说明书典型地包括描述试剂浓度的具体表达,或至少一种测定方法参数,例如试剂和待混合样品的相对量,试剂/样本混合物的维护时间段,温度,缓冲条件、等。

[0108] 除非另外指明,所有表示组分、分子量的数字,以及在说明书和权利要求书中使用的等要理解为在所有情况下由术语“大约”进行修饰。因此,除非另外指明是相反的,在说明书以及权利要求书中所列举的这些数值参数是近似值,可以取决于寻求由本发明所获得的所希望的特性而改变。非常少的并且不试图限制等效物原则应用到本权利要求书的范围,每一个数值参数至少应该按照报告的有效数字的数量以及通过应用普通的舍入方法来解释。

[0109] 尽管说明本发明的宽范围的这些数值范围和参数是大致值,但在具体实例中列举的数值是报道得尽可能精确的。然而全部数值,固有地包含由于在它们的对应的试验测量中的发现的标准差必然引起的一个范围。

[0110] 本说明示例多个示意性实施例。在整个申请书的几个地方,通过实例列举提供了指导,这些实例能以多种组合使用。在每一种情况下,所详述的列举仅用作一个代表性组并且不应当被理解为一个排他性的列举。

[0111] 本发明通过以下实例进行说明。应理解,具体实例、材料、数量、和程序被广义解释为根据在此列举的本发明的范围和精神。除非指明,所有的标题是为了方便读者,并且不应该被用来限制该标题之后的文本含义。

[0112] 实例

[0113] 实例1

[0114] 新疫苗递送方案驱动增强的、疫苗特异性免疫应答

[0115] 为了增强当使用常规递送方法时所见的疫苗递送,本实例关注提供抗原、加上或减去CpG佐剂,连同一种组分在室温下处于液体状态,但是在35°C注射之后,在生理学条件下形成凝胶库(gel-depot)。这允许抗原和佐剂以浓缩形式被递送,增强抗原递呈细胞活性,并且导致促炎症、疫苗特异性应答。重组乙型肝炎抗原(rHepBag)用作疫苗接种的抗原,并且连同七种不同的疫苗递送方案,针对诱导乙型肝炎特异性抗体和细胞因子评估该递送方法。用处于两种不同类型的凝胶浆料(PURAMATRIX,在此也称作“P1”,以及MATRIGEL,在此也称作“P2”)的rHepBag或用ALHYDROGEL(铝盐)中的rHepBag或与弗氏完全佐剂(CFA)混合的rHepBag对小鼠进行疫苗接种。凝胶浆料和ALHYDROGEL与鼠CpG ODN1826混合+/-。

[0116] 结果示出初次接种24至48小时之后,用凝胶浆料加ODN进行疫苗接种的小鼠具有显著更高的TNF生产,而在24小时处P1显著优于ALHYDROGEL。48小时之后,佐剂P2呈现了有前景的Th2抑制,其中IL-4、IL-5以及IL-10水平的下降与抗原特异性IgG2a在血清中的生产的增加一致。

[0117] 疫苗特异性抗体的分析示出使用或不使用ODN最初接种14天之后,P1驱动高疫苗特异性IgA、IgM和IgG滴度,并且高IgA和IgG滴度维持35天。由于在这项研究中所测试凝胶浆料系统两者都优于常规佐剂,所以这种新的凝胶浆料疫苗递送系统将具有广阔的应用,用于增强对多种当前疫苗(目前仅很少功能)的应答。这种新疫苗递送系统的使用将在针对多种多样从寄生到病毒感染的传染病的疫苗研发领域中进一步研究。

[0118] 材料和方法

[0119] 疫苗和给予途径。在这项研究中使用的试验疫苗生产自重组乙型肝炎抗原,即rHepBag(菲茨杰拉德工业公司(Fitzgerald Industries, Inc.) 马萨诸塞州,美国)。将906-至8-周龄的雌性BALB/c小鼠平均地分成9组,并且分别使其在背部上接受最初的皮下注射(sc),以及4周之后增强注射0.1ml包含5 μ g的rHepBag的溶液,具有5 μ g的rHepBag的0.1ml 50 μ g ODN 1826(InvivoGen有限公司,加利福尼亚州,美国),PURAMATRIX(P1)与5 μ g rHepBag(具有或不具有ODN1826)的0.4ml溶液,MATRIGEL(P2)与5 μ g rHepBag(具有或不具有ODN1826)的0.4ml溶液,250 μ g明矾(Thermo Fisher Scientific, Inc.公司,宾西法尼亚州,美国)与5 μ g rHepBag(具有或不具有ODN 1826)的0.1ml溶液,以及具有5 μ g的rHepBag(1:2)的0.1ml弗氏完全佐剂(西格玛-安德里奇公司(Sigma-Aldrich Co.) 密苏里州,美国)。为了制备一个剂量的浆料,将5 μ g的rHBsAg抗原(在此之前与50 μ g CpG混合或不混合)用MATRIGEL或PURAMATRIX调配至400 μ l的终体积并且在皮下注射之前混合均匀。取决于所需剂量按比例扩大这些量。MATRIGEL和PURAMATRIX购买自BD(富兰克林湖,新泽西州)。

[0120] 细胞因子和抗体评估。增强接种一周之后,分离脾细胞用于细胞因子评估。制备单一细胞悬浮液(1.5×10^6 /ml)并且悬浮于具有盘尼西林-streptomycin(终浓度分别为100U/ml和100 μ g/ml)(西格玛-安德里奇公司,密苏里州,圣路易斯,美国)的1640培养基(RPMI 1640 Thermo Scientific Hyclone公司,犹他州,美国)中。将0.5ml的该单一细胞悬浮液添加到48-孔板(西格玛-安德里奇公司,密苏里州,圣路易斯,美国)中,该板具有0.5ml的培养基、0.5ml的1 μ g/ml的伴刀豆球蛋白A(ConA)或0.5ml的5 μ g/ml的rHepBag并且在5% CO₂、37°C下进行培养。培养24小时和48小时之后,对TNF的水平进行定量;48小时之后,对IL-4和IL-5的水平进行定量;72小时之后,对IL-4和IL-10的水平进行定量;各自重复三次。

细胞因子的百分数-将阳性小鼠进一步使用两个步骤的平台进行转化,该平台包括(1)考虑每组获得值的全部范围,计算每一种细胞因子的总中值;以及(2)针对每一组,使用细胞因子的总中值百分数,建立‘低’和‘高’-细胞因子生产者的概念-阳性细胞作为截止边以将这些个体隔离成两类,命名为‘低’和‘高’-细胞因子生产者。重要地是强调,对于每一组,通过对全部细胞因子给予相同重量并且产生细胞种群来构建总细胞因子特征曲线。

[0121] 培养24小时之后,如通过制造商(BD生物科学公司(圣弗朗西斯科,加利福尼亚州,美国))描述的,使用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的ConA作为阳性对照,还用 3×10^5 和 1.5×10^5 的脾细胞进行IFN γ ELISpot。斑点形成单位(SFU)值表示为重复三次的培养物的平均值减去其个体背景的平均值。

[0122] 从1至6周,每周收集来自小鼠的血样,包括初次免疫之前的一天。将收集自这些血液的血清用于ULISA测定中,用于抗体的检测和定量。

[0123] 用于流式细胞术的T-细胞分析的合成肽。合成肽由生物合成公司(Biosynthesis, Inc.)合成,并且基于相关文献进行选择。S 228-39肽(IPQSLDSWWTSL)是Balb/c小鼠中H2-L^d-限制性且主要的表位。来自每组五只小鼠的脾细胞单独地用 $5\mu\text{M}$ 肽和 $40\text{U}/\text{ml}$ IL-2刺激,用于流式细胞术。

[0124] 统计分析。对于抗体评估,Kolmogorov-Smirnov正态性检验之后,通过Mann-Whitney或Student's t检测,使用GraphPad PRISM软件,4.0版(GraphPad软件公司,加利福尼亚州,美国)分析对比。当P-值是 ≤ 0.05 时,差异被认为是统计学显著的。在多个组之内使用卡方检验来对比‘低’和‘高’-细胞因子生产者频率并且显著性被认为在 $P\leq 0.05$ 处。由于比率量级两倍更低,所以雷达图轴线和多边形区域的对比被认为是显著的。通过比较细胞因子-生产者类别之内组内和组间中央多边形区域,进行以雷达图表格格式呈现的这些结果的数据分析。比率被认为是显著差异的,表明在大小上轴线和多边形区域两倍更低或更高。

[0125] 结果

[0126] 初始结果示出用凝胶浆料加CpG初次疫苗接种14天之后,小鼠具有显著高于用明矾或CFA疫苗接种的小鼠的疫苗特异性IgG2a,而在接种28天之后具有显著更高的IgA、IgM。初次接种14天之后,一种凝胶浆料递送驱动显著高于其他递送方法在增强接种之后达到的疫苗特异性IgG滴度,提示增强接种是不必要的。召回测定示出,与来自凝胶浆料+CpG疫苗接种的小鼠的细胞相比,来自用ALHYDROGEL或CFA疫苗接种的小鼠的脾细胞上调IL-10和IL-4。与CFA中升高的水平相比,在所有的组中,CpG使用降低IL-5水平至背景。未见IFN或TNF水平差异。

[0127] 图1示出了IgA抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数 $n=10$ 。

[0128] 图2示出了IgM抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数 $n=10$ 。

[0129] 图3示出了IgG抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数 $n=10$ 。

[0130] 图4示出了IgG₁抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总数 $n=10$ 。

[0131] 图5示出了IgG_{2a}抗HBsAg抗体滴度的动力学。所示数据合并自两个独立的实验,总

数n=10。

[0132] 图6示出了单次疫苗接种之后(21天)更高的抗HBsAg抗体滴度。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10;使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 。

[0133] 图7示出了单次疫苗接种之后(35天)更高的抗HBsAg抗体滴度。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10;使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,* $p < 0.05$ 。

[0134] 图8示出了脾细胞HBsAg再刺激二十四小时之后的细胞因子分布型。所示数据代表一次实验,n=5;使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,* $p < 0.05$ 、**** $p < 0.0001$ 。

[0135] 图9示出了脾细胞HBsAg再刺激四十八小时之后的细胞因子分布型。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10(对于仅佐剂,n=5);使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,未见统计差异($p < 0.05$)。

[0136] 图10示出了脾细胞HBsAg再刺激七十二小时之后的细胞因子分布型。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10(对于仅佐剂,n=5);使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,** $p < 0.01$ 。

[0137] 图11示出了在HbsAg特异性T细胞应答中,通过酶联免疫斑点测定法(ELISpot)测定的增加的HBsAg特异性细胞介导免疫。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10;使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,* $p < 0.05$ 。

[0138] 图12显示了通过流式血细胞计数术测定的增加的HBsAg特异性T细胞介导免疫。所示数据合并自两个独立的实验,总数n=10;使用邦弗朗尼试验后双因素方差分析,与单独的抗原进行比较,** $p < 0.01$ 。

[0139] 用rHepBag刺激增加脾细胞细胞因子分泌。为了测量疫苗诱导的细胞免疫应答,增强接种一周之后处死小鼠并且对脾细胞进行培养(使用或不使用 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 终浓度的rHepBag)。通过ELISA测量细胞因子水平。应用低和高生产者的概念来研究更广泛范围的细胞因子并且离体估计循环白细胞的细胞因子特征曲线。出于这个目的,如在别处描述的(Vitelli-Avelar(维特利-拉尔)等人,2008,Scand J Immunol(《斯堪的纳维亚免疫学杂志》);68(5):516-25),计算每一个细胞因子阳性细胞亚群的总中值,取每组获得值的整体范围。将每个细胞因子阳性细胞群的总中值百分数用作截止边以将这些个体隔离成两类,命名为‘低’和‘高’-细胞因子生产者,如在表1中所示。

[0140] 这些数据证明用ODN 1826接种的小鼠在24小时内未示出TNF生产,但当ODN 1826与佐剂P1或P2关联时,显著比例的小鼠展示超过截止边的TNF值,如在图13中所示($P < 0.011$)。尽管ALHYDROGEL,当与ODN 1826关联或未关联时,诱导显著量的‘高’-TNF生产者,但是用佐剂P1(无CpG)接种的小鼠全部展示超过截止的值,并且这一值显著高于铝胶(Alhydrogel)组($P < 0.001$)。当佐剂P1、P2、ALHYDROGEL和弗氏(Freund)示出可比较数量的‘高’-TNF生产者时,48小时之后,未观察到这一相同结果(图,14A和14B)($P < 0.001$)。

[0141] 此外,当用佐剂P2免疫的大多数小鼠落入‘低’-IL-4和IL-5生产者区域时,48小时之后,发现了IL-4和IL-5生产的有趣数据($P < 0.05$)。不同地,用佐剂P1接种的大多数小鼠呈现两种细胞因子的高生产($P < 0.002$)。如在图15中所示,72小时之后,佐剂P1继续呈现

‘高’-IL-4生产者,与ODN1826相关联或不相关联,并且在ALHYDROGEL或弗氏免疫之后发现这一相同结果($P < 0.001$)。而且,数据证明先前用佐剂P2或佐剂P2加ODN1826免疫的大多数小鼠展示低于截止边的IL-10的值,显著低于用rHepBag(与ODN1826相关联或不相关联)免疫的小鼠($P < 0.05$)。

[0142] 表1基于在用rHepBag*刺激的脾细胞培养中检测到的细胞因子总中值截止的高细胞因子生产者受试者的频率

细胞因子	总中值截止	高细胞因子生产者(%)								
		rHepB ag	rHepB ag + ODN	P2 中的 rHepB ag	P2 中的 rHepBa g + ODN	P1 中的 rHepB ag	P1 中的 rHepBa g + ODN	铝胶中的 rHepBag	铝胶中的 rHepBag + ODN	弗氏中的 rHepB ag
24h										
TNF	0.009 (0.00-1.26)	40	0	40	25 ^b	100 ^{a,c,d}	40 ^b	75 ^a	80 ^b	40
48 h										
TNF	12.96 (0.73-16.41)	20	40	50 ^a	56 ^b	50 ^a	30	67 ^a	60 ^b	80 ^a
IFN γ	0.00 (0.00-3.89)	50	50	50	56	40	60	33	30	20
IL-4	0.00 (0.00-0.00)	20	0	10 ^a	0	40 ^a	0	33 ^a	0	50 ^a
IL-5	0.00 (0.00-5.98)	40	10	20 ^a	0	80 ^a	0	67 ^a	0	80 ^a
72 h										
IL-4	0.00 (0.00-7.23)	40	10	30	0	90 ^{a,c}	30 ^b	89 ^a	0	80 ^a
IL-10	41.57 (0.00-179.00)	70	40	50 ^a	11 ^b	80	30	56	30	80

[0144] *数据表示为小鼠的百分数,展示在适应性免疫细胞内,细胞因子细胞高于或等于针对每一细胞群计算的总中值截止的百分数。在 $P \leq 0.05$ (χ^2) 处的统计显著性由上标字母‘a’、‘b’、‘c’、‘d’、和‘e’表示,分别用于与rHepBag、rHepBag+ODN、Alhydrogel中的rHepBag、Alhydrogel中的rHepBag+ODN以及弗氏中的rHepBag比较。PURAMATRIX (P1) 和 MATRIGEL (P2)。

[0145] 在用rHepBag和佐剂P1与P2疫苗接种的小鼠体内的持续体液应答。在免疫之前和之后每周收集血清,从而通过ELISA测试特异性同种型抗体滴度。用两种佐剂P1与P2疫苗接种的小鼠在初次接种后两周内发展出抗-rHepBag IgG抗体 ($P < 0.002$)。在用P1(与ODN关联或不关联)疫苗接种的小鼠中达到最高的抗-rHepBag抗体滴度,并且这些应答显著大于用ODN、明矾或弗氏佐剂的免疫 ($P < 0.001$)。在体内得出的IgG1:IgG2a比率表示两种佐剂的不同模式。在初次接种14至35天之后,佐剂P1驱动具有高IgG1水平的Th2应答。然而,由P2加ODN得出的应答是一个混合系统而非纯Th1或Th2应答,其中IgG1和IgG2a水平在整个时间线期间上调。参见图17A-17D。

[0146] 在初次接种14天之后,佐剂P1+/-ODN的组合即诱导IgA和IgM滴度的上调,并且该体液应答分别维持到35天和21天 ($P < 0.04$)。在14天和35天期间,该佐剂优于弗氏佐剂并且对于IgA、IgM和IgG ($P < 0.02$) 的生产,对于前3周,优于ALHYDROGEL。额外地,对于增强疫苗接种之后的全部Ig的生产,佐剂P1和P2两者都被证明优于弗氏佐剂 ($P < 0.02$)。参见图16A-

16D。

[0147] 讨论

[0148] 这个实例示出初次接种24至48小时之后,用P1亦或P2凝胶浆料加ODN进行疫苗接种的小鼠具有显著更高的TNF生产,而在24小时处P1显著优于ALHYDROGEL。48小时之后,佐剂P2呈现了有前景的Th2抑制,其中IL-4、IL-5以及IL-10水平的下降与抗原特异性IgG2a在血清中的生产的增加一致。

[0149] 疫苗特异性抗体的分析示出使用或不使用ODN最初接种14天之后,P1驱动高疫苗特异性IgA、IgM和IgG滴度,并且高IgA和IgG滴度维持35天。由于在这项研究中所测试凝胶浆料系统两者都优于常规佐剂,这种新的凝胶浆料疫苗递送系统将具有广阔的应用,用于增强对多种当前疫苗(目前仅很少功能)的应答。这种新疫苗递送系统的使用将在针对任何种类从寄生到病毒感染的传染病的疫苗研发领域中进一步研究。

[0150] 实例2

[0151] 流感病毒疫苗接种

[0152] 遵循在前述实例中更加详细描述的方法,将C57/BL和Balb/c小鼠用重组核蛋白(rNP)流感病毒抗原与明矾、CpG、或PURAMATRIX和CpG浆料一起给予进行免疫。为了制备一个剂量的浆料,将10ug的rNP抗原(在此之前与50ug CpG混合或不混合)用PURAMATRIX调配至200u1的终体积并且在皮下注射之前混合均匀。取决于所需剂量按比例扩大这些量。如在图18B中所示的,与用rNP(与佐剂明矾或CpG一起给予)疫苗接种的小鼠相比,用rNP(与PURAMATRIX和CpG浆料一起给予)疫苗接种的Balb/c小鼠抗-流感病毒IgG滴度增加。图18A示出了C57BL/6小鼠中的抗-流感病毒IgG滴度。在最后一次疫苗接种四周之后(wplv),确定抗-流感病毒IgG滴度。

[0153] 再一次,遵循在前述实例中更加详细描述的方法,将C57B1/6小鼠用灭活的全流感A病毒(H1N1)株系PR8(与明矾、PURAMATRIX浆料、或PURAMATRIX和CpG浆料一起给予)进行免疫。作为对照,额外的小鼠仅用PR8灭活的全病毒(WIV)进行免疫。为了制备一个剂量的浆料,将15ug的PR8抗原(在此之前与50ug CpG混合或不混合)用PURAMATRIX调配至200u1的终体积并且在皮下注射之前混合均匀。取决于所需剂量按比例扩大这些量。PR8(WIV)是来自Charles River公司的福尔马林灭活的流感病毒A/PR/8/34(H1N1),rNP是来自Imgenex公司的重组人流感病毒A(A/PR/8/34/Mount Sinai(H1N1)区段5)核蛋白NP。

[0154] 如在图19中所示,与用PR8 WIV(与佐剂明矾或仅PURAMATRIX而无CpG的浆料一起给予)疫苗接种的小鼠相比,用PR8 WIV(与PURAMATRIX和CpG浆料一起给予)疫苗接种的C57B1/6小鼠血清抗-流感病毒IgG滴度增加。在最后一次疫苗接种四周之后(wplv),确定抗-流感病毒IgG滴度。图19示出来自两个独立实验的结果。

[0155] 如图20中所示,在用PR8WIV疫苗接种的C57B1/6小鼠中观察到了增强的保护,不受致死性激发伤害。图20A示出了来自一个独立实验的结果,其中致死性激发在30LD₅₀处,并且图20B示出了来自一个独立实验的结果,其中致死性激发在1000LD₅₀处。

[0156] 实例3

[0157] 伯克霍尔氏菌疫苗接种

[0158] 遵循在前述实例中更加详细描述的方法,将小鼠用三种不同伯克霍尔氏菌重组蛋白(伯克霍尔氏菌4-9蛋白、伯克霍尔氏菌22-11蛋白、以及伯克霍尔氏菌42蛋白)的混合物

(与三种不同佐剂制品(明矾、弗氏完全佐剂(CFA)、或PURAMATRIX和CpG浆料)中的一种一起给予)进行免疫。为了制备一个剂量的PURAMATRIX+CpG浆料,将75ug的伯克霍尔氏菌蛋白抗原(在此之前与50ug CpG混合或不混合)调配至200ul PURAMATRIX的终体积并且在皮下注射之前混合均匀。取决于所需剂量按比例扩大这些量。作为对照,额外的小鼠仅用明矾、仅用CFA、或PURAMATRIX+CpG浆料(无抗原)进行免疫。

[0159] 伯克霍尔氏菌属(以前是假单胞菌属一部分)属名是指一组几乎无处不在的、革兰阴性的、能动的、强制性的好氧的棒状细菌,包括动物/人类以及植物病原体两者连同一些环境重要的物种。伯克霍尔氏菌由于其致病性成员而广为人知。鼻疽伯克霍尔氏菌(*Burkholderia mallei*)是鼻疽病的原因,鼻疽病是主要发生于马以及相关动物的一种疾病。类鼻疽伯克霍尔氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)是类鼻疽(也称作惠特莫尔氏病)的病原体,类鼻疽是主要发生于热带气候的一种传染病,可以感染人或动物,尤其是在东南亚和澳大利亚北部。洋葱伯克霍尔氏菌(*Burkholderia cepacia*)是患有囊性纤维病的人群中肺梗死的重要病原体。由于其抗生素抗性及其相关性疾病的高死亡率,鼻疽伯克霍尔氏菌和类鼻疽伯克霍尔氏菌被认为是靶向家畜和人的潜在生物战剂。

[0160] 图21示出在用三种伯克霍尔氏菌重组蛋白(伯克霍尔氏菌4-9蛋白、伯克霍尔氏菌22-11蛋白、以及伯克霍尔氏菌42蛋白)的混合物免疫的小鼠中的抗伯克霍尔氏菌IgG滴度。图21B示出了在致免疫小鼠中的抗伯克霍尔氏菌蛋白4-9IgG滴度。图21A示出了在致免疫小鼠中的抗伯克霍尔氏菌蛋白22-11IgG滴度。图21C示出了在致免疫小鼠中的抗伯克霍尔氏菌蛋白42IgG滴度。示出了在用仅明矾、明矾+蛋白混合物、仅弗氏完全佐剂(CFA)、CFA+蛋白混合物、仅PURAMATRIX+CpG浆料、以及PURAMATRIX凝胶+蛋白混合物免疫之后的抗体滴度。如通过特异性血清抗体水平测量的,与用明矾或CFA疫苗接种相比,观察到针对三种蛋白中的两种(作为凝胶疫苗组合物与puramatrix一起给予)的增加的免疫应答。确切地,与用明矾或CFA疫苗接种相比,当作为凝胶疫苗与PURAMATRIX一起给予时,观察到针对伯克霍尔氏菌4-9蛋白(图21B)和伯克霍尔氏菌22-11蛋白(图21A)的增加的抗伯克霍尔氏菌IgG滴度。分析了激发数据。

[0161] 实例4

[0162] 兽用疫苗

[0163] 遵循先前实例中更详细地描述的程序,本发明可与多种兽用疫苗中的任一种一起使用。本发明的疫苗组合物、递送方法,以及递送系统将提供许多优势,以及更好的商业家畜工业价值,包括但不限于,改进的效力、在生产周期早期阶段递送,以及通过仅单剂量的给予为整个生产周期提供保障的效力。

[0164] 本发明的组合物、递送方法,以及递送系统可以用于猪的免疫。可以使用本发明的组合物、方法以及系统给予猪的疫苗包括但不限于,猪圆环病毒2型(PCV2)疫苗、猪繁殖和呼吸障碍综合征(PRRSV)、呼吸道支原体疫苗、猪链球菌(*Streptococcus suis*)疫苗、猪冠状病毒疫苗、轮状病毒疫苗、肠毒性大肠杆菌(*Escherichia coli*) (K88)疫苗、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumonia*) (APP)疫苗、以及猪流感疫苗。参见,例如,万维网:merck-animal-health.com/species/pigs/vaccines.aspx,“用于猪群的疫苗接种(Vaccinations for the Swine Herd),”阿拉巴马州合作推广系统出版ANR-902,阿拉巴马州A&M大学和奥本大学(在万维网上可获得:[22](http://aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0902/ANR-</p></div><div data-bbox=)

0902.pdf),以及“猪疫苗接种程序(“Pig vaccination programs),”PRIME FACT出版社944,2009年9月(在万维网上可获得:dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0009/301500/Pig-vaccination-programs.pdf),关于可获得的疫苗、以及猪的此类疫苗的给予的更详细信息。

[0165] 本发明的组合物、投递方法以及递送系统可以用于牛的免疫,包括但不限于,家牛、水牛、非洲水牛、野牛、以及牦牛。可以使用本发明的组合物、方法以及系统给予牛的疫苗包括但不限于,牛呼吸系统疾病(BRD)疫苗,包括但不限于,I型和II型BVDV,牛疱疹病毒1(BHV-1)疫苗,包括但不限于,将不导致潜伏性病毒的亚单位疫苗,睡眠嗜血杆菌(*Haemophilus somnus*)疫苗,*Mannheimia haemolytica*(溶血曼海姆菌)疫苗,牛支原体(*Mycoplasma bovis*)疫苗,牛轮状病毒疫苗,大肠杆菌(*Escherichia coli*)K99疫苗,牛冠状病毒(BCV)疫苗,肖氏芽孢梭菌(*Clostridium chauvoei*)(黑脚病)疫苗,腐败梭菌(*Clostridium septicum*)疫苗,污泥梭状芽胞杆菌(*Clostridium sordelli*)(恶性水肿)疫苗,诺维氏芽孢梭菌(*Clostridium novyi*)(黑疫)疫苗,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)(肠毒血症)疫苗,牛传染性角膜结膜炎(红眼)疫苗,包括但不限于,牛莫拉氏菌(*Moraxella bovis*)、衣原体(*chlamydia*)、支原体(*mycoplasma*)、无胆甾原体(*acholeplasma*),或牛传染性鼻气管炎(IBR)病毒疫苗,乳腺炎疫苗,包括但不限于,大肠杆菌J5疫苗。

[0166] 在一些应用中,本发明的组合物、递送方法以及递送系统可以用于牛羊类的一个或多个血吸虫病抗原的给予。此类血吸虫抗原可以衍生自,例如,日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*),曼氏血吸虫(*Schistosoma monsoni*),或埃及血吸虫(*Schistosoma haematobium*)。血吸虫抗原可以是血吸虫磷酸丙糖异构酶(CTPI)蛋白或其抗原片段或衍生物,包括但不限于日本血吸虫、曼氏裂体吸虫、或埃及血吸虫CTPI蛋白或其抗原片段或衍生物。血吸虫抗原可以是血吸虫四螺(tetraspin)23kDa膜内在蛋白(C23)或其抗原片段或衍生物,包括但不限于日本血吸虫、曼氏裂体吸虫、或埃及血吸虫C23蛋白或其抗原片段或衍生物。这样一种血吸虫抗原可以是耦合到一个或多个额外的抗原决定簇上的嵌合多肽,例如像,热休克蛋白,或其抗原片段或衍生物,包括但不限于,牛热休克蛋白70(Hsp70)。

[0167] 参见,例如,“肉牛畜群健康疫苗接种计划(Beef Cattle Herd Health Vaccination Schedule)”Powell(鲍威尔)等人,阿肯色大学,农业部,农业和自然资源出版物FSA3009(可在万维网上获得:uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-3009.pdf),“如何接种疫苗(How to Vaccinate),”俄克拉何马州合作推广服务,农业科学与自然资源部,出版物号350(可在万维网上获得:ansci.colostate.edu/pdf_files/YLE/Dairy7_vaccinate.pdf),以及“牛疫苗及其使用(Cattle Vaccines and Their Use),”肉牛手册出版设BCH-3015(可在万维网上获得:iowabeefcenter.org/Beef%20Cattle%20Handbook/Vaccines_Cattle.pdf),关于可获得的疫苗、以及牛的此类疫苗的给予的更详细信息。

[0168] 本发明的疫苗组合物、递送方法以及递送系统还可以用于伴侣动物的疫苗接种,包括但不限于猫和狗,例如像,用细小病毒疫苗对狗进行免疫,用于转移母源性免疫力。

[0169] 给予途径包括但不限于皮下(SC)或肌内(im)注射。用本发明的组合物、方法以

及递送系统疫苗接种,在单剂量给予后,将产生快速、更长久的保护。

[0170] 实例5

[0171] 家禽疫苗

[0172] 遵循先前实施例中更详细地描述的程序,本发明可以用作递送系统,用于多种家禽用疫苗中的任一种,包括但不限于,用于传染性支气管炎 (IB)、新城疫 (ND)、马立克氏病 (Marek's disease)、(染性囊病 (IBD) 病毒、传染性喉气管炎 (ILT)、禽呼肠孤病毒、霍乱、禽痘、支原体病、(火鸡和鸡鼻炎)、禽流感、雏鸡传染性颤搐病 (AE)、禽鼻气管炎 (ART)、鸭病毒性肝炎、出血性肠炎、鹅细小病毒、副粘病毒3、鸡贫血病毒 (CAV)、大肠杆菌 (E.coli)、丹毒 (Erysipelas)、Reimerella、鸡毒支原体 (*Mycoplasma gallisepticum*)、禽多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、球虫病的疫苗。

[0173] 给予途径包括但不限于皮下 (SC) 或肌肉 (im) 注射。用皮下注射,疫苗被注射进入皮肤和下面的组织之间的空间。典型地,在家禽中的应用位置在颈部后侧的松弛皮肤中。用肌肉注射,疫苗制品被沉积在大量的肌肉中。典型地,胸部肌肉亦或大腿肌肉被用于此目的。疫苗接种可以包括日龄幼体,小母鸡,蛋鸡,种鸡,肉鸡,和/或展示鸟类的接种。典型地,蛋鸡和种鸡接种早于产蛋期,并且然后在产蛋期内每6到8周接种灭活的疫苗。这不仅仅保护他们免受疾病,而且通过母源性抗体传递给后代。可以接种的家禽,包括但不限于,鸡、火鸡、以及水禽,例如像,鸭以及鹅。

[0174] 实例6

[0175] 血吸虫病免疫

[0176] 小鼠用弗氏完全佐剂亦或或MATRIGEL加CpGs中的血吸虫蛋白抗原CCA免疫小鼠。抗-CCA IgA抗体滴度通过ELISA确定。数据如图22A(完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)中的CCA)和图22B(MATRIGEL加CpGs中的CCA)所示。两只小鼠被各自抗原制品免疫。在用弗氏完全佐剂中的CCA免疫的小鼠免疫之后0、8、16、以及19天,以及在用MATRIGEL加CpGs中的CCA免疫的小鼠免疫之后0、8、16、24、32、以及40天收集血清样品。ELISA数据清晰地示出,在用MATRIGEL加CpGs免疫的小鼠中,CCA特异性抗体的更高滴度。

[0177] 实例7

[0178] 水牛的血吸虫病疫苗接种

[0179] 血吸虫病是一种感染了世界范围内超过2亿人的寄生虫病。血吸虫病相关残疾的重新评估,结合近来全球范围内的血吸虫感染信息,表明血吸虫病的真正负担远大于以前的估计。在亚洲,特别是中国,病原体是日本血吸虫。不同于非洲种类,曼氏血吸虫和埃及血吸虫,日本血吸虫是一种动物传染性寄生虫,通过牛,特别地是水牛,在中国占人类血吸虫传播的约75%。减少水牛中的血吸虫感染的干预将增强它们的健康同时减少人类的疾病传播。在中国的许多地区目前的防治规划包括人类和水牛的同时的吡喹酮(PZQ)治疗;虽然这已经示出总患病率的减小,但是它需要持久的大规模的既耗时又昂贵的治疗。一种更可持续性选项将是开发一种减少来自牛的日本血吸虫传播的疫苗,替代牛的化学疗法。确实的数学建模(威廉姆斯(Williams)等人,2002,Acta Trop(《热带学报》),82(2):253-262)已经证明在水牛群中减少日本血吸虫感染,单独或与PZQ组合使用预防性疫苗具有45%功效,应随时间的推移减少平衡患病率并可能导致长期可持续性控制血吸虫病。这种双管齐下的

基础干预将长期地显著减少血吸虫病的传播,增强牛的健康和生长,并且可能会减少在农村人口中的整体发病率。参见达达拉 (Da' Dara) 等人,2008,Vaccine (《疫苗》);26 (29-30) : 3617-3625,将其通过引用以其全文结合在此。

[0180] 抗原-PURAMATRIX组合物如在此所述将被应用于携带日本血吸虫抗原的家畜的免疫。对于这些试验,所有动物将被给予带有SjCTPI-Hsp70质粒DNA疫苗的初次接种(在达达拉 (Da' Dar) 等人,2008,Vaccine (《疫苗》);26 (29-30) :3617-3625中更详细地描述)。水牛将用一种重组SjCTPI蛋白、PURAMATRIX、以及牛的CpG的组合物增强免疫。确切地,100ug的重组SjCTPI加牛的CpG将在PURAMATRIX中混合,得到一个约0.50ml/动物的总注射体积。这将注射进入到水牛/以及牛的肩部。仅有一个单一的增强接种将给予动物。

[0181] 诱发的体液和细胞免疫反应,包括抗-SjCTPI IgG抗体反应,将是确定的。增强之后,动物将受到激发,受到尾蚴以及疫苗效力的激发,并且疫苗效力通过测量每克粪便的卵的数量的减少,肝组织中卵数量的减少,毛蚴数量的减少,以及蠕虫负担的减少而确定。这些测定的方法更详细地在达达拉 (Da' Dara) 等人,2008,Vaccine (《疫苗》);26 (29-30) : 3617-3625中描述。

[0182] 在菲律宾的第一次试验已经在菲律宾进行到第2年,如上所述,有400头水牛或牛已经被增强。在菲律宾萨马的第二次试验将包括1500头水牛或牛。在中国的第三次试验将包括600头水牛或牛。

[0183] 以puramatrix组合物的形式(具有或不具有佐剂,例如像,CpG或IL-12),用血吸虫多肽(例如像,SjCTPI、SjCTPI-Hsp70、SjC23、或SjC23-Hsp70多肽)组合物进行免疫的水牛和牛可以用作血吸虫病在亚洲的新的防治规划的基础。这样的规划,除了用吡喹酮(PZQ)治疗之外,将包括用部分保护性疫苗(例如SjC23-Hsp70和SjCTPI-Hsp70)进行的水牛疫苗接种作为减少家畜中产卵寄生虫数量的手段,导致可测量的患病率、强度、以及日本血吸虫传播的下降。

[0184] 在此引用的所有专利、专利申请、以及出版物和电子可得材料的完整披露(包括,例如,提交到例如,GenBank和RefSeq中的核苷酸序列,以及提交到例如,SwissProt数据库,PIR,PRF,PDB中的氨基酸序列,以及来自GenBank和RefSeq中的注释编码区的翻译)通过引用结合。在本申请披露和通过引用结合在此的任何文件的一个或多个披露之间存在任何不一致的情况下,以本申请披露为准。已经给出的前述详细说明和实例仅出于理解清晰性。不应从中理解到任何不必要的限制。本发明不局限于所显示和描述的这些精确细节,对于本领域普通技术人员而言,变体将明显地包含在由权利要求所限定的本发明之内。除非指明,所有的标题是为了方便读者,并且不应该被用来限制该标题之后的文本含义。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.
- [0003] HARN, Donald A.
- [0004] QUEIROZ, Rafaella
- [0005] MCEWEN, Lisa
- [0006] <120> 疫苗递送方法
- [0007] <130> 235.01840201
- [0008] <140> PCT/US2012/034012
- [0009] <141> 2012-04-18
- [0010] <150> US 61/476,431
- [0011] <151> 2011-04-18
- [0012] <160> 6
- [0013] <170> PatentIn version 3.5
- [0014] <210> 1
- [0015] <211> 4
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 人工的
- [0018] <220>
- [0019] <223> 合成的自组装肽支架的组成部分 (building block)
- [0020] <400> 1
- [0021] Arg Ala Asp Ala
- [0022] 1
- [0023] <210> 2
- [0024] <211> 16
- [0025] <212> PRT
- [0026] <213> 人工的
- [0027] <220>
- [0028] <223> 合成的自组装RAD16-I肽支架
- [0029] <400> 2
- [0030] Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
- [0031] 1 5 10 15
- [0032] <210> 3
- [0033] <211> 16
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 人工的
- [0036] <220>
- [0037] <223> 合成的自组装RAD16-II肽支架
- [0038] <400> 3

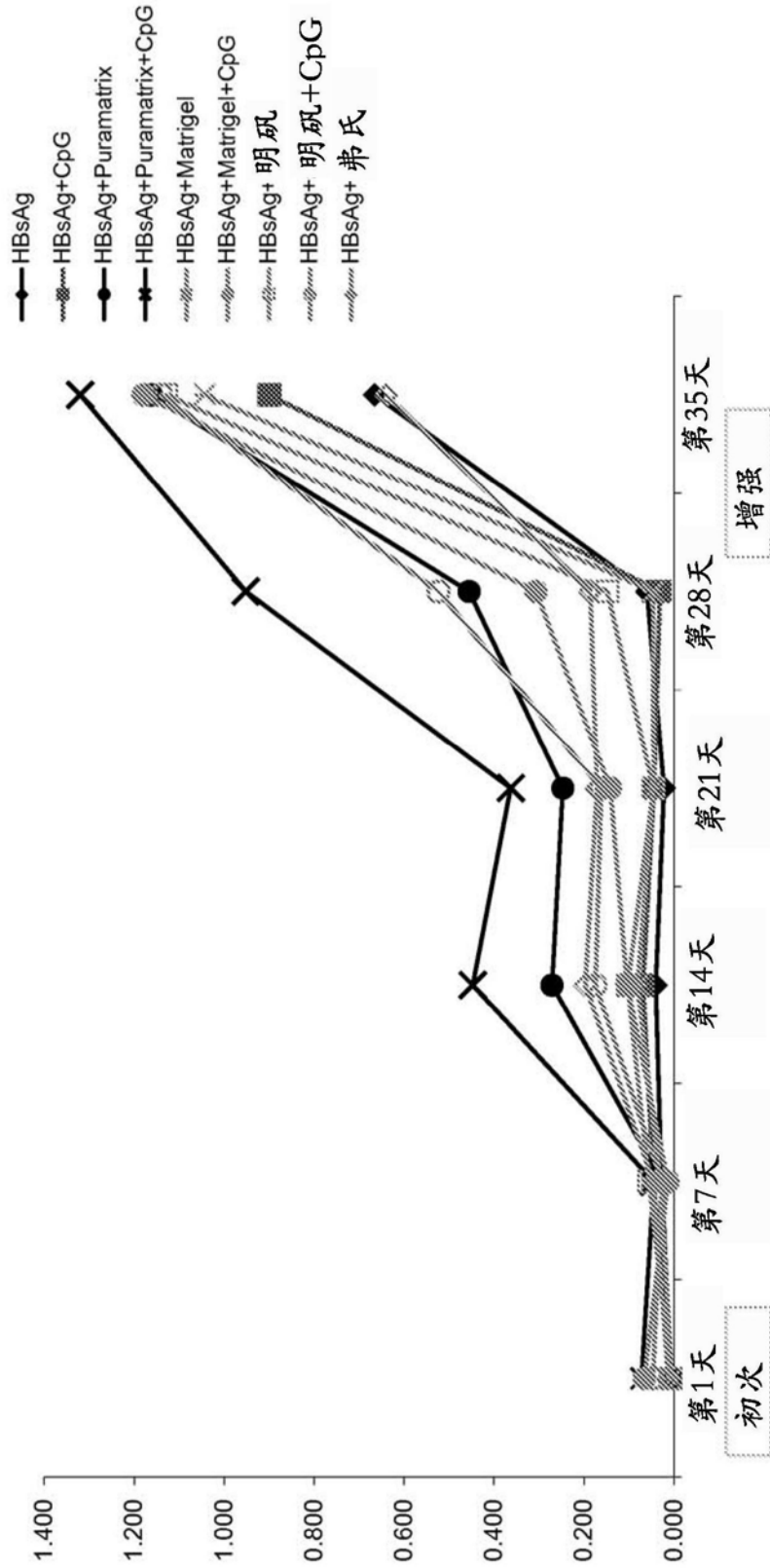


图1

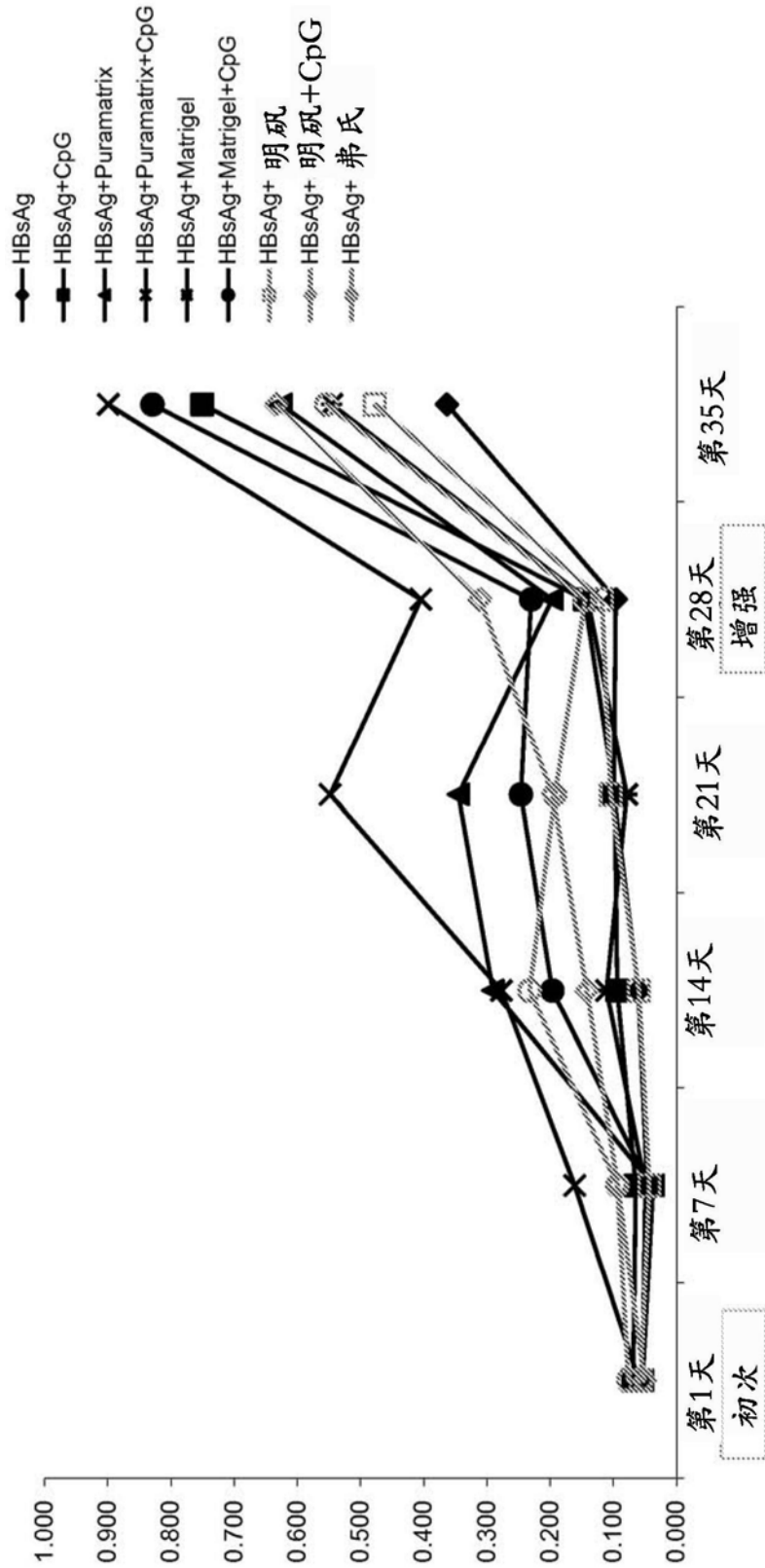


图2

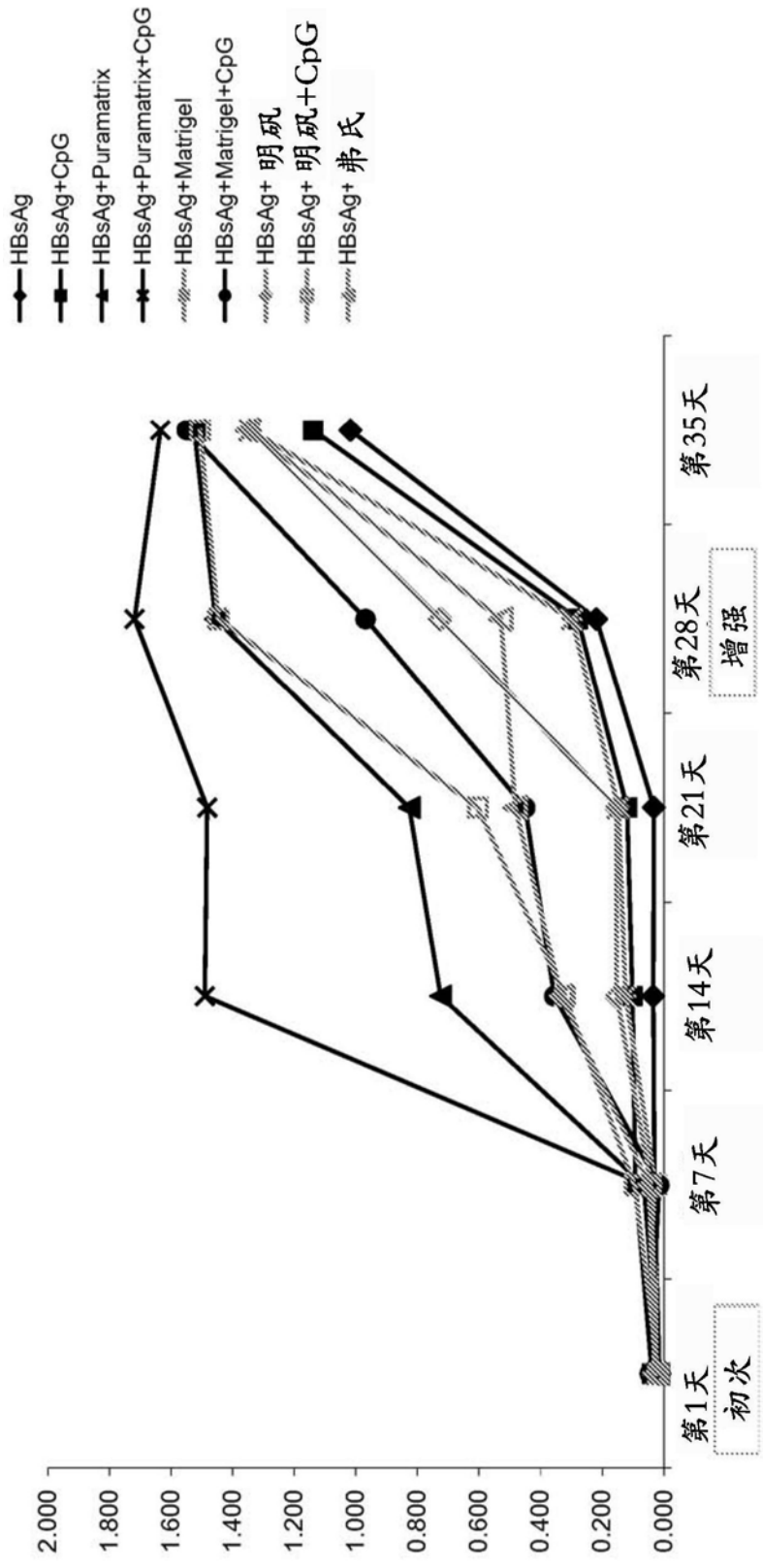


图3

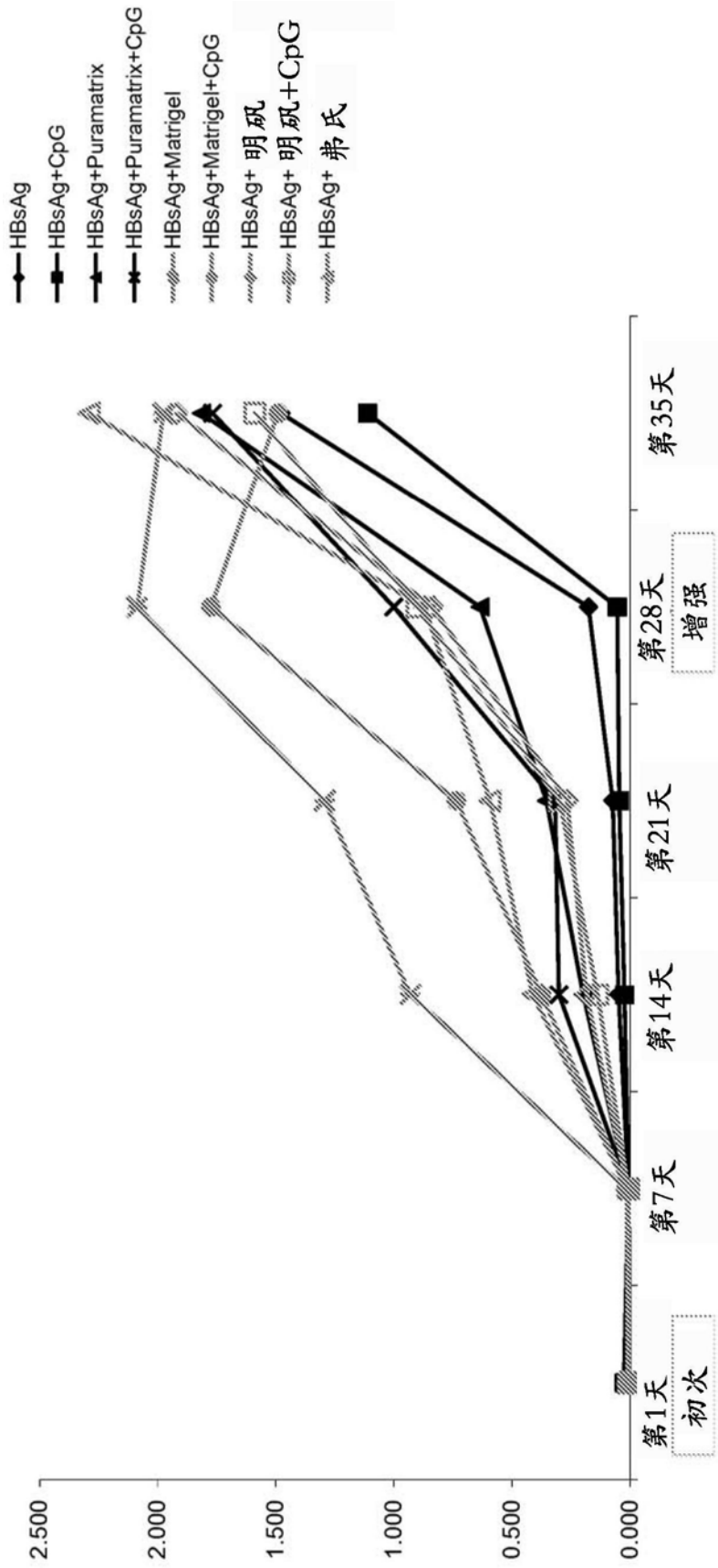


图4

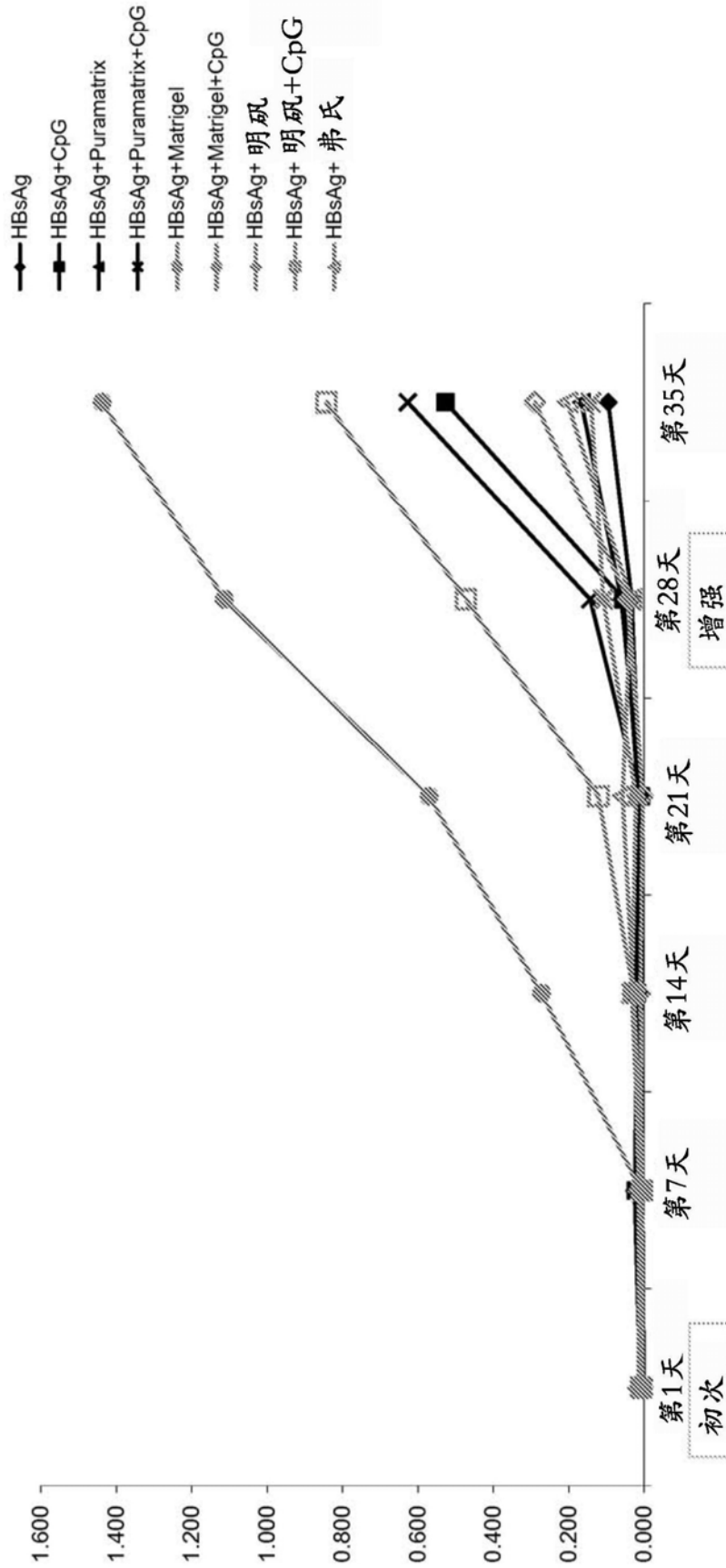


图5

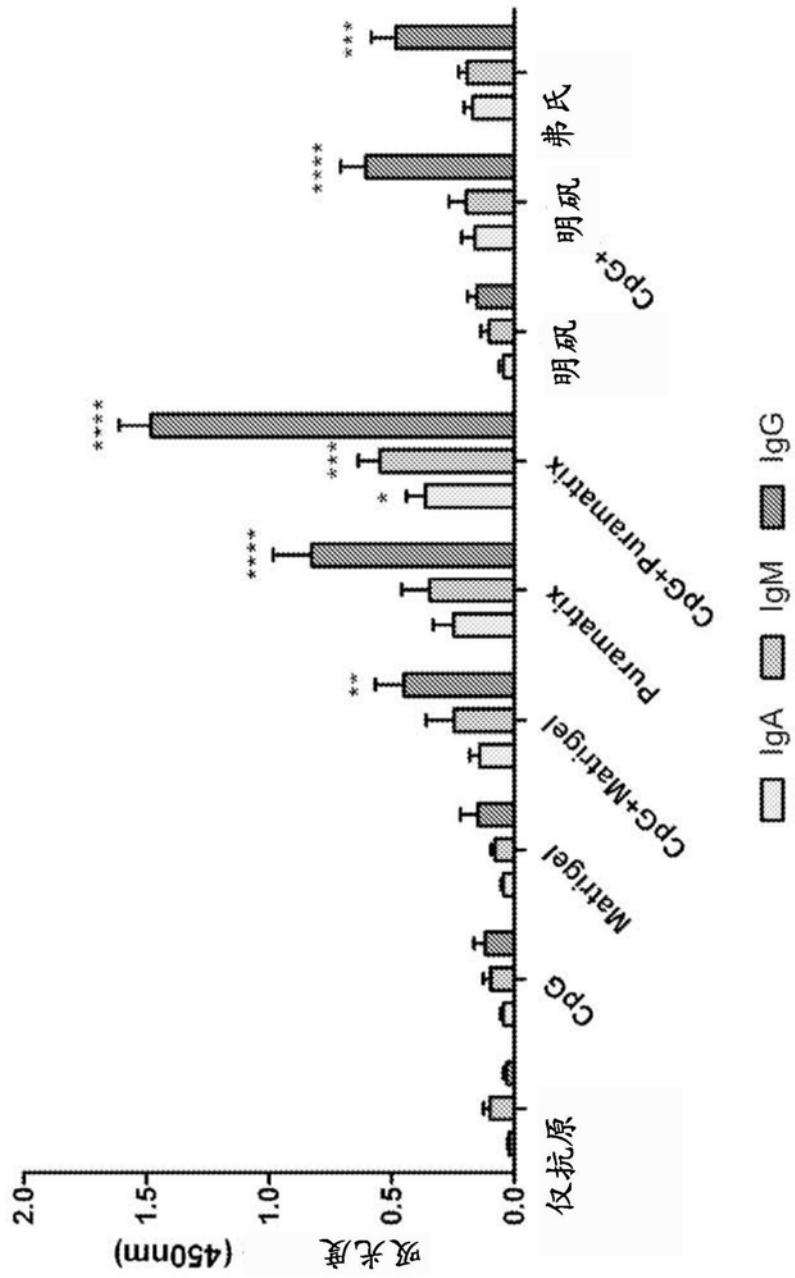


图9

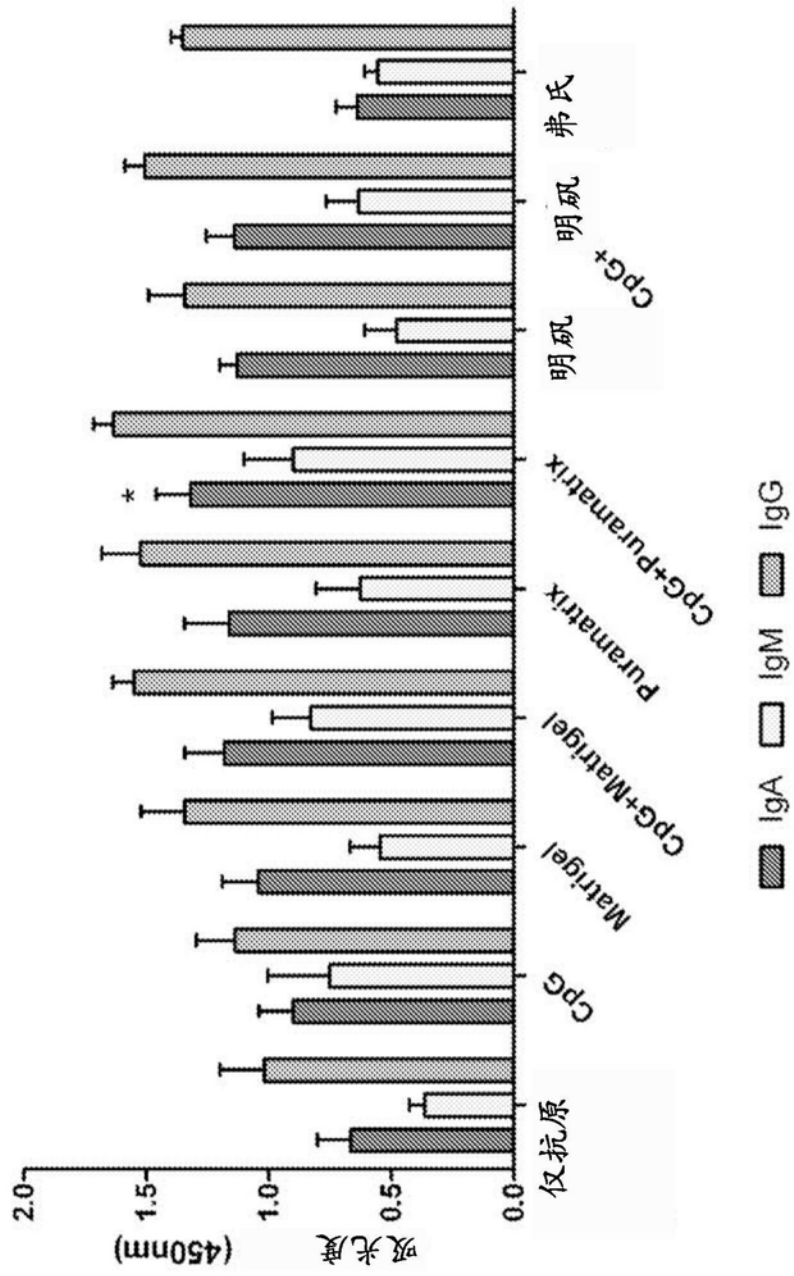


图7

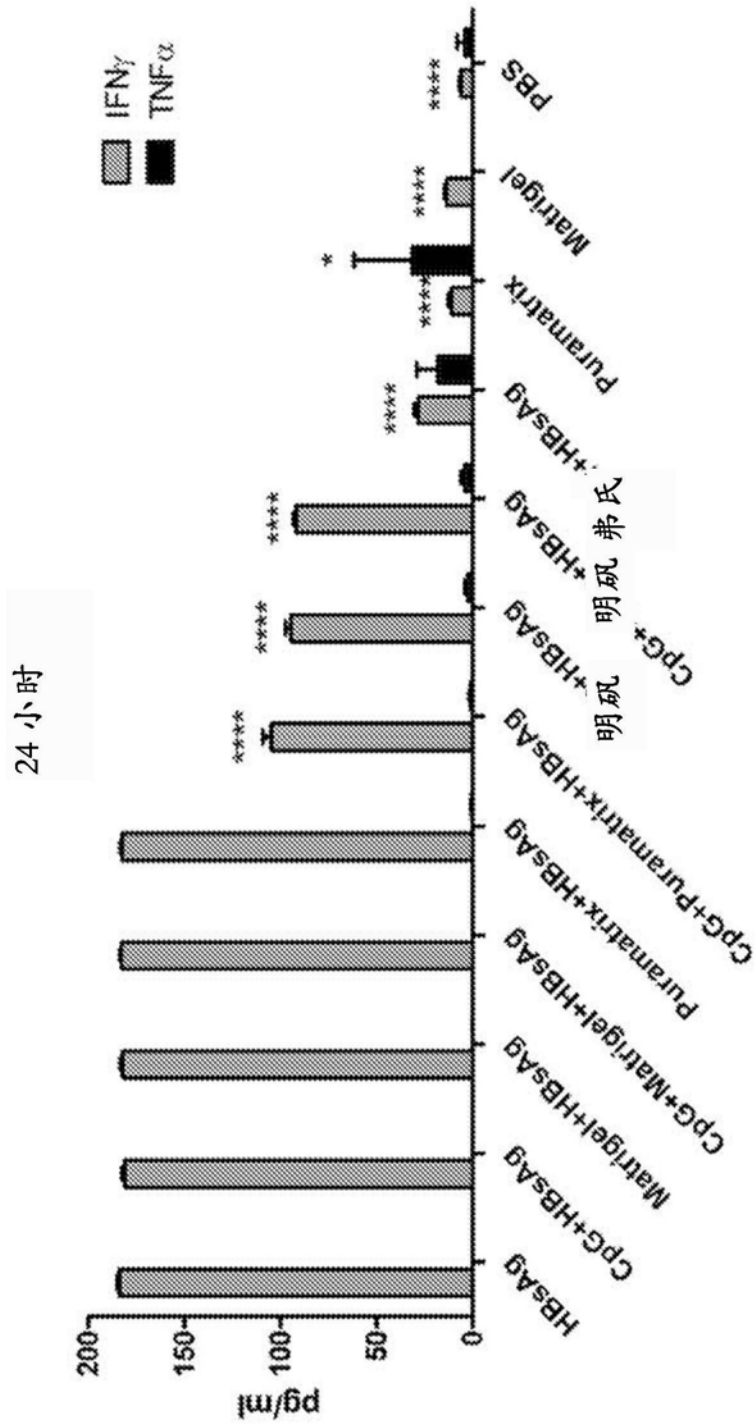


图8

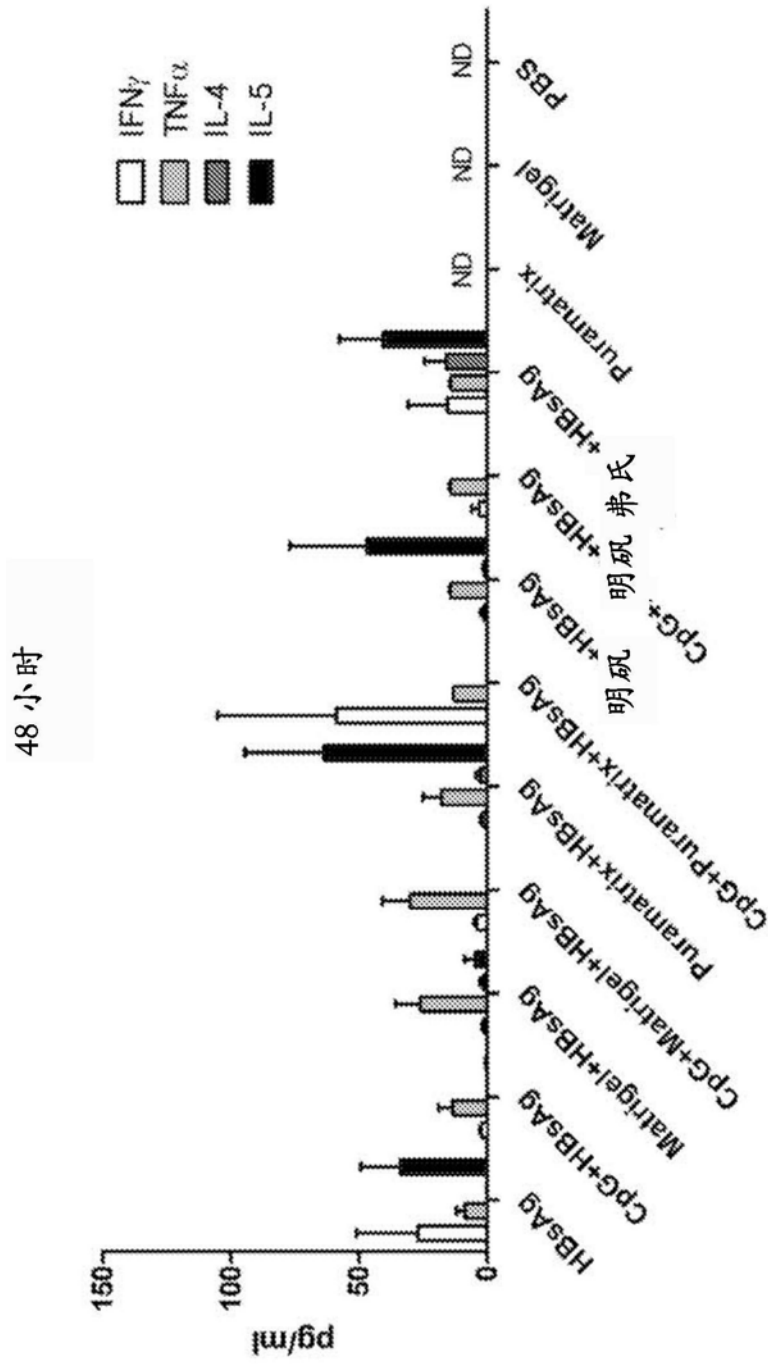


图9

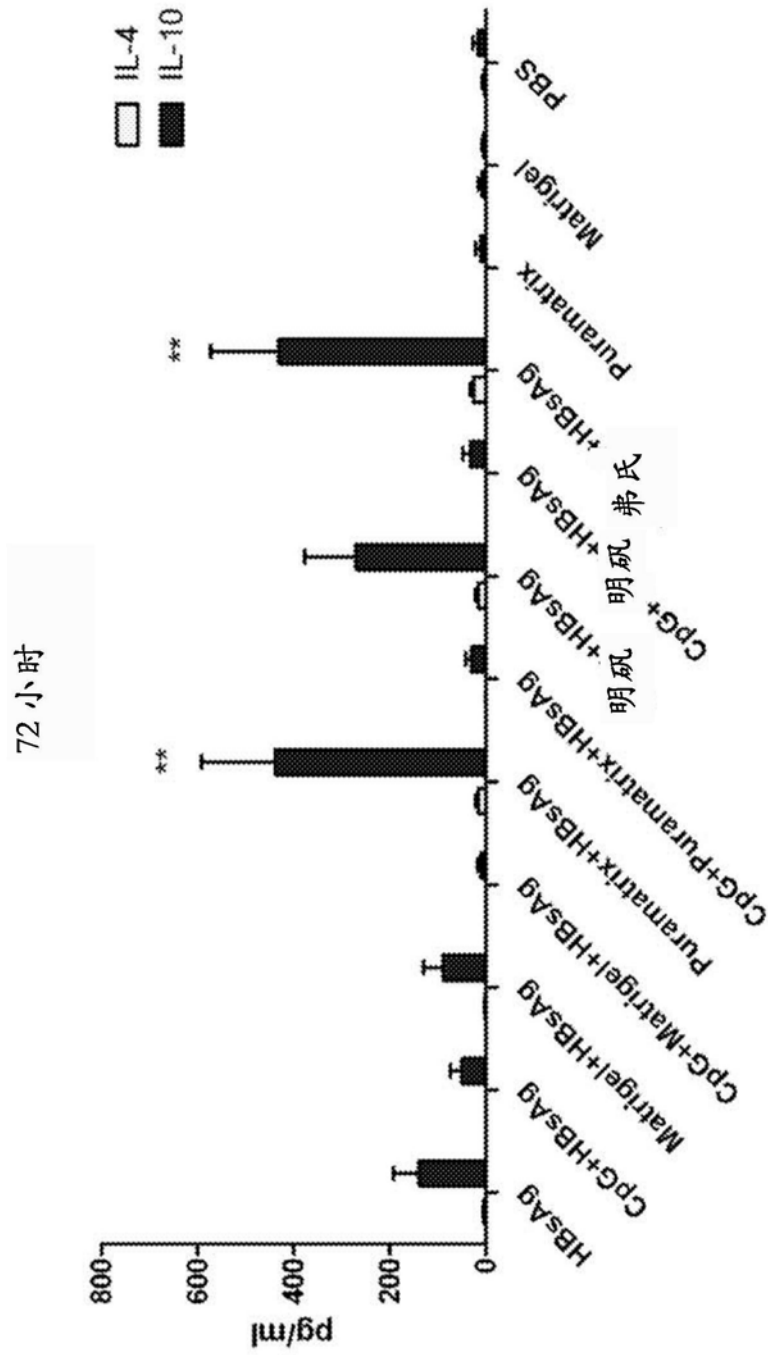


图10

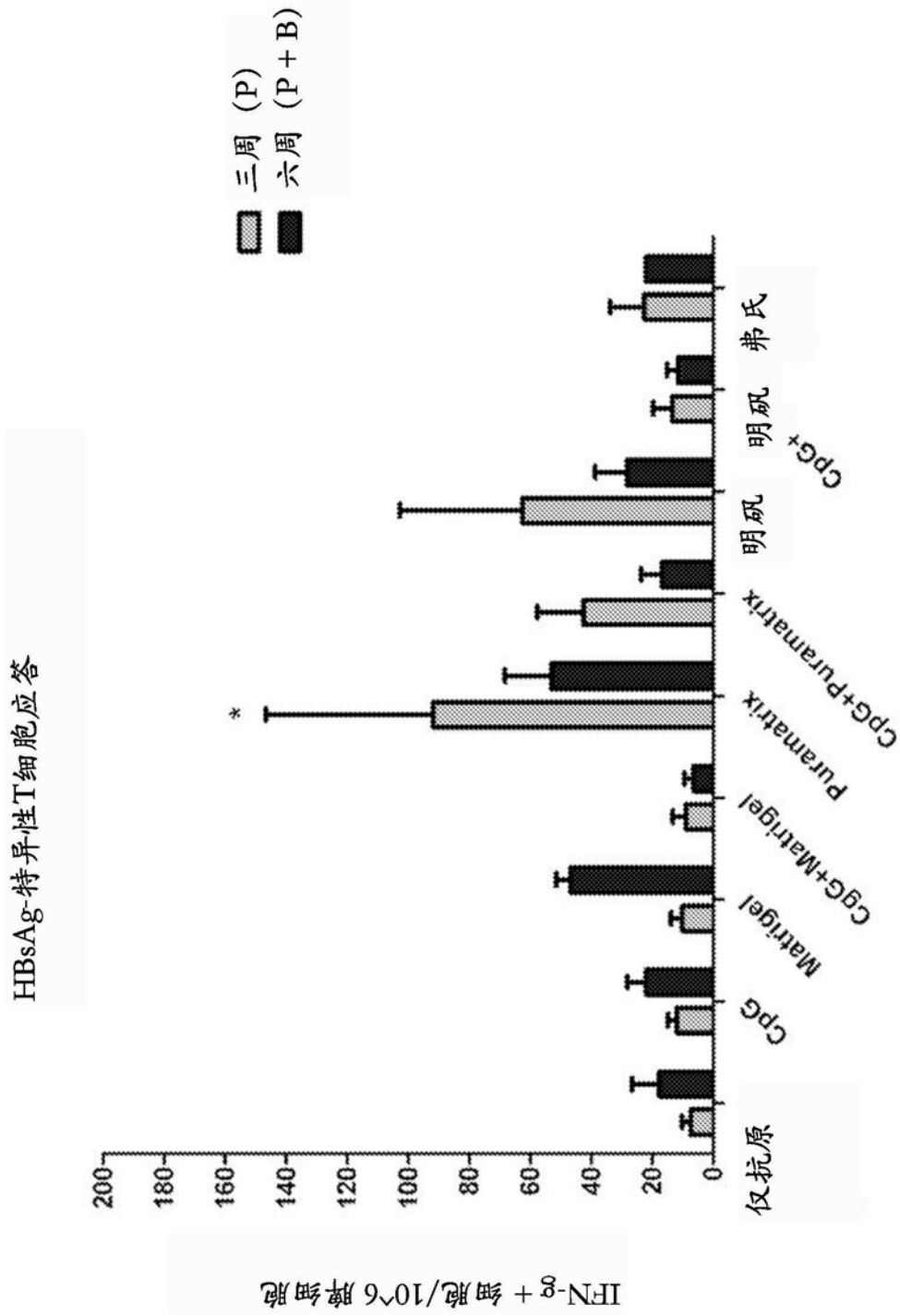


图11

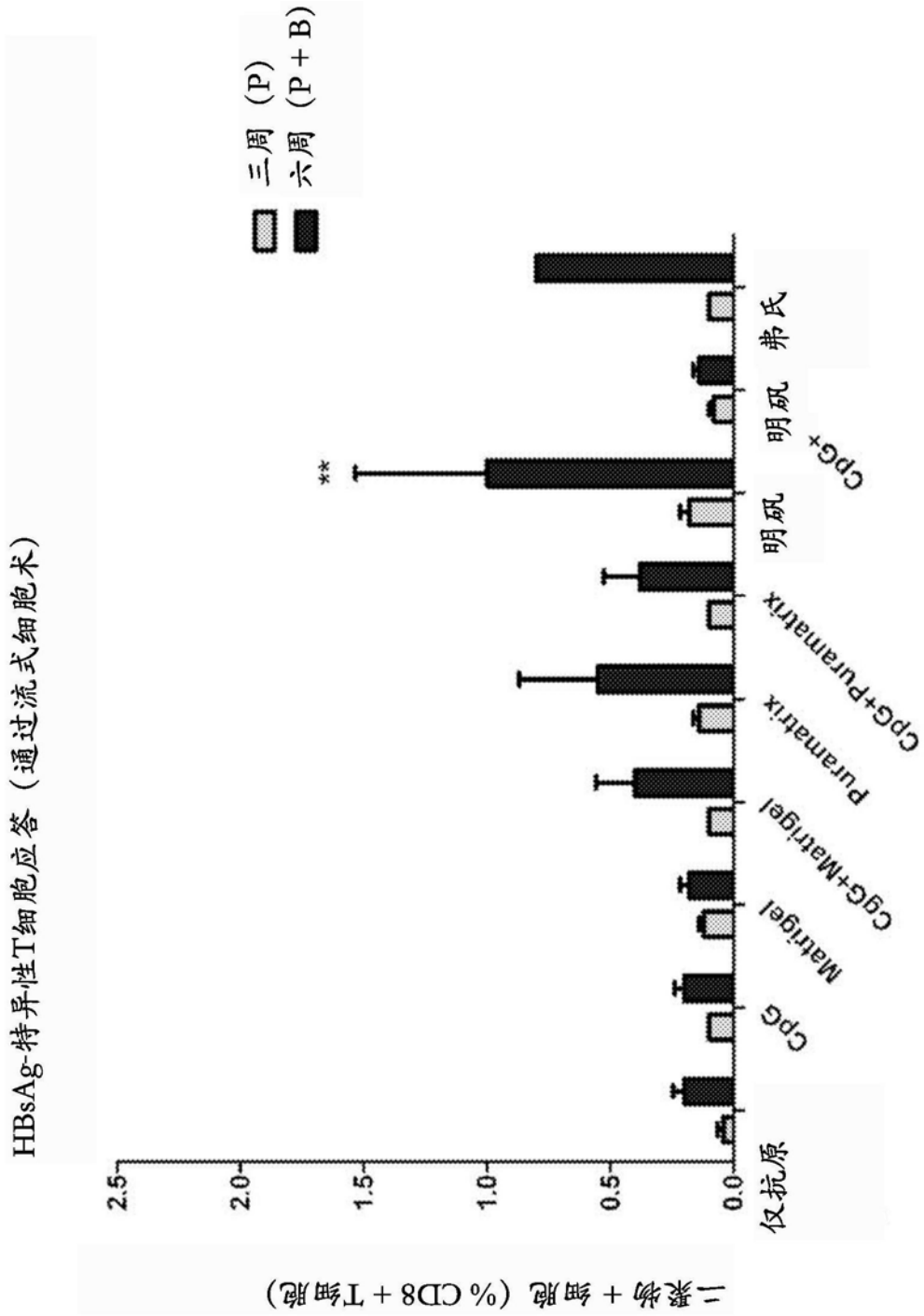


图12

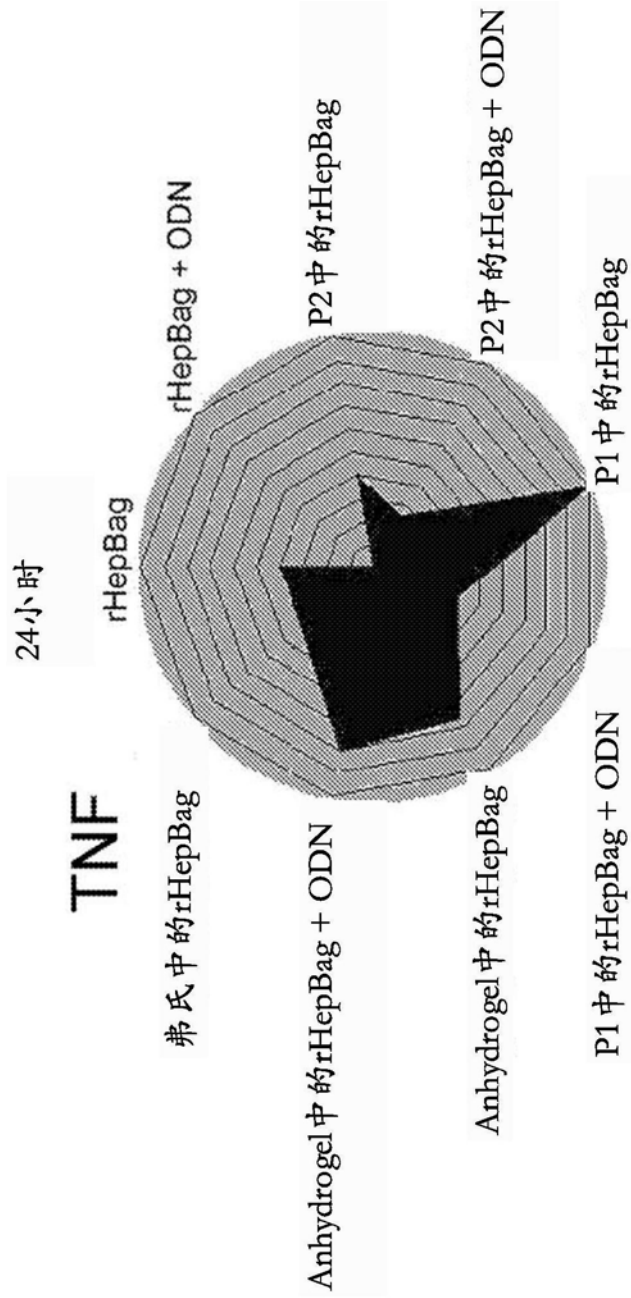


图13

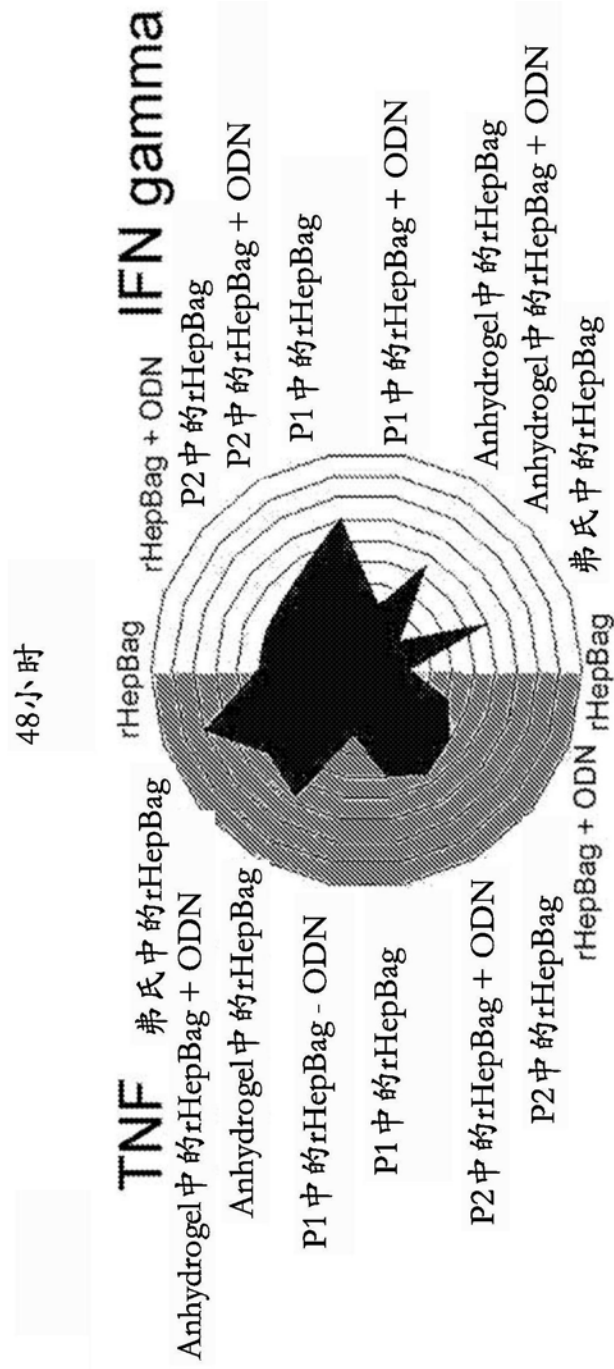


图14A

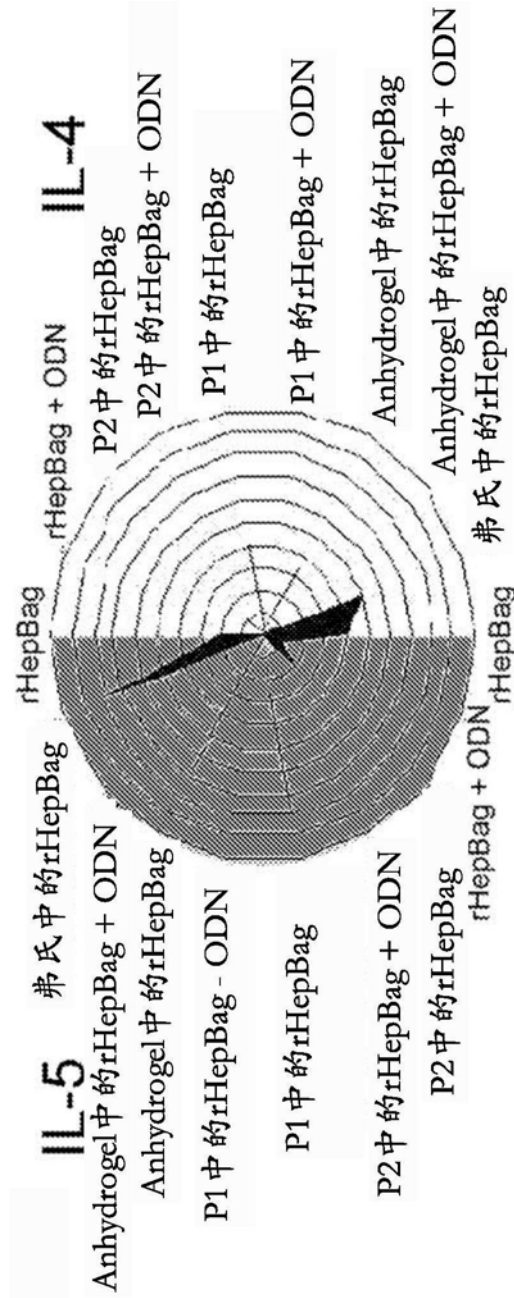


图14B

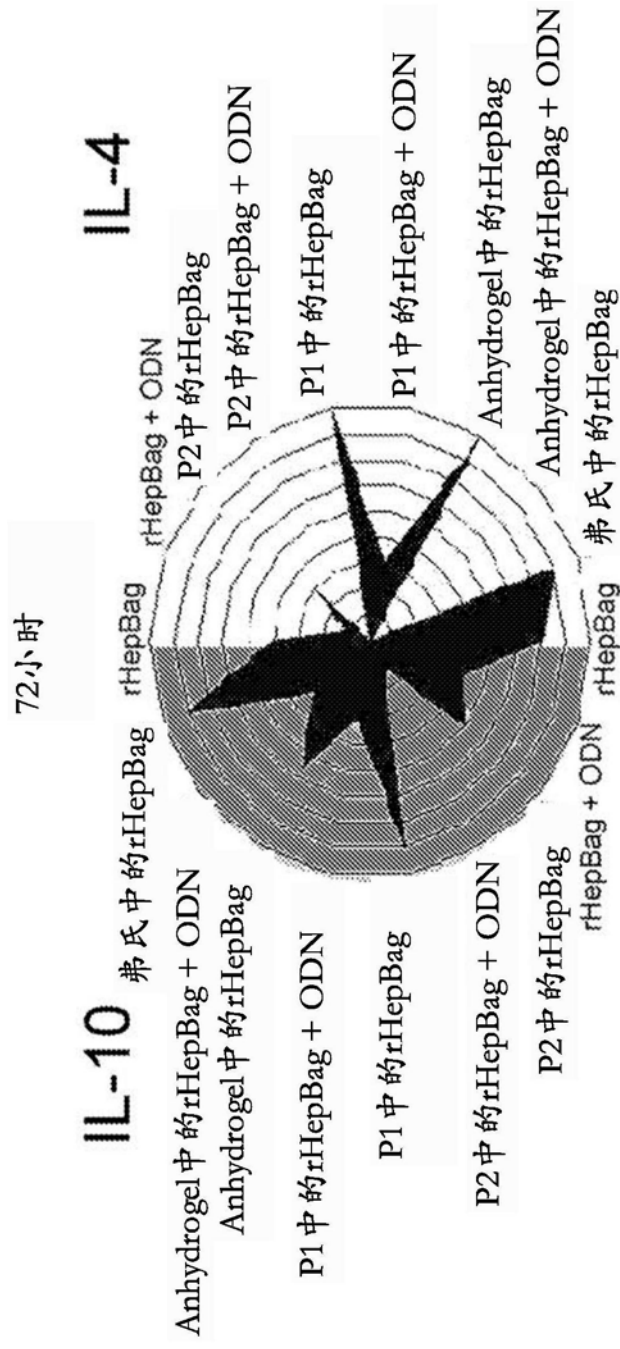


图15

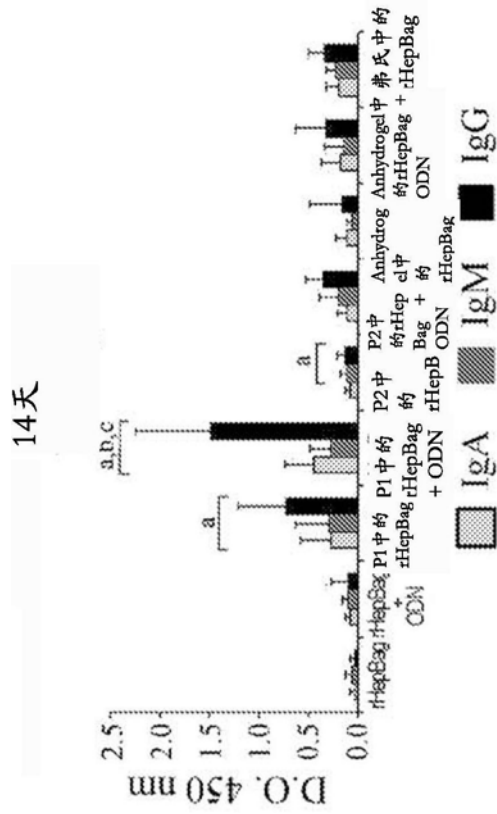


图16A

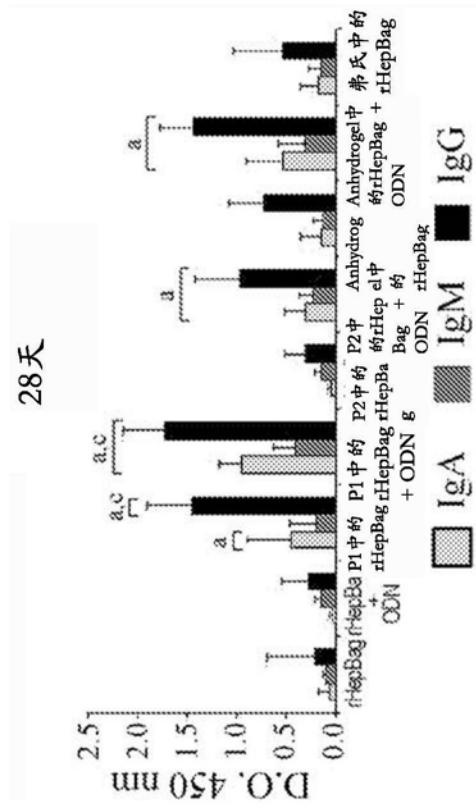


图16B

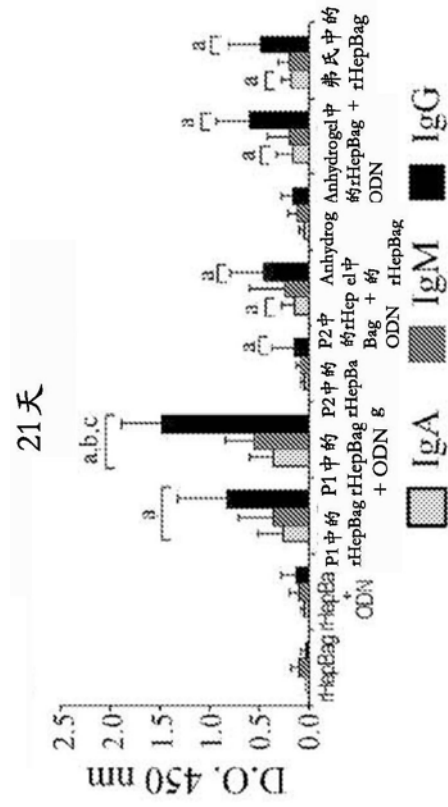


图16C

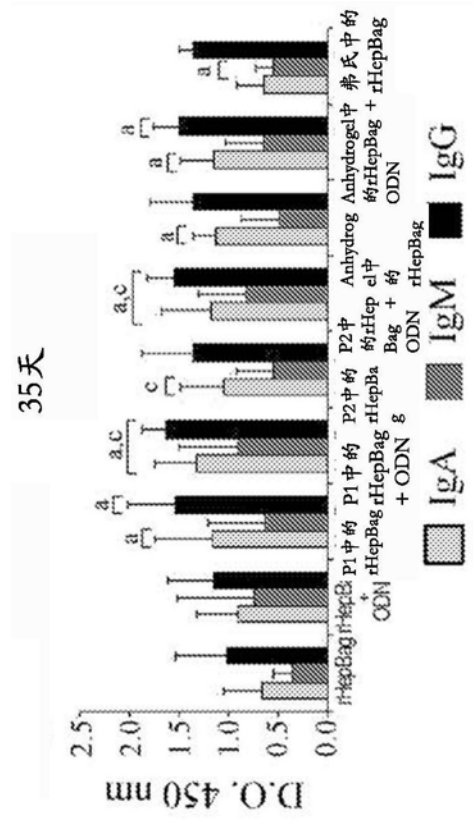


图16D

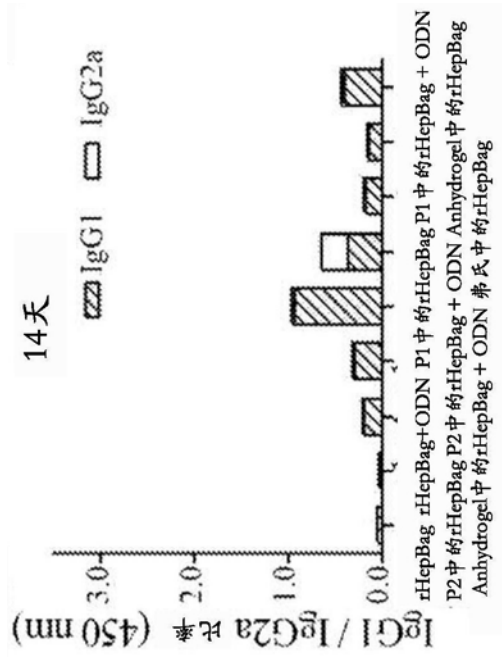


图17A

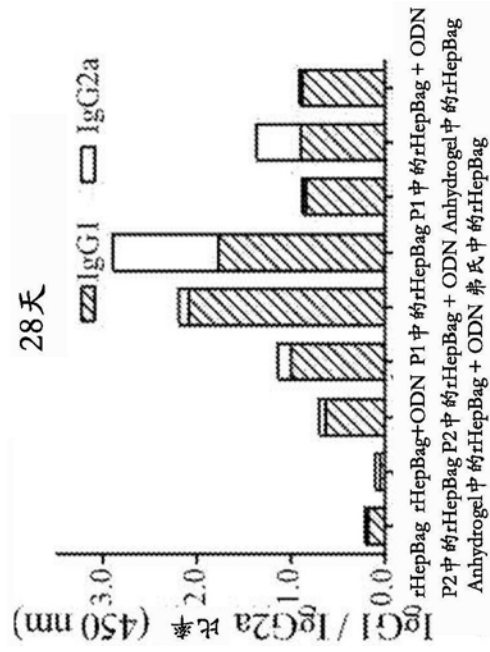


图17B

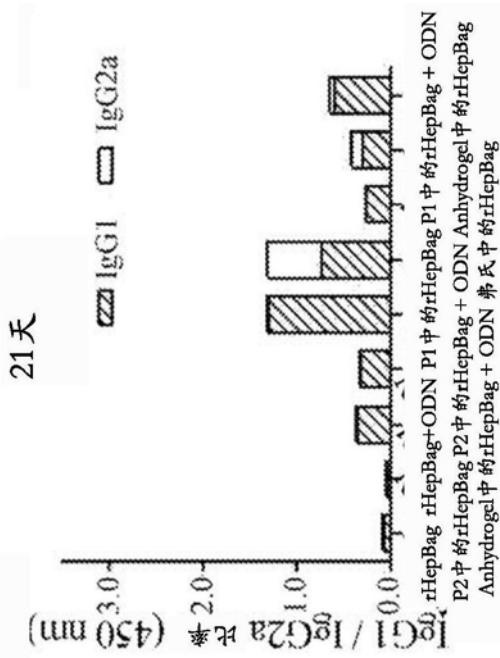


图17C

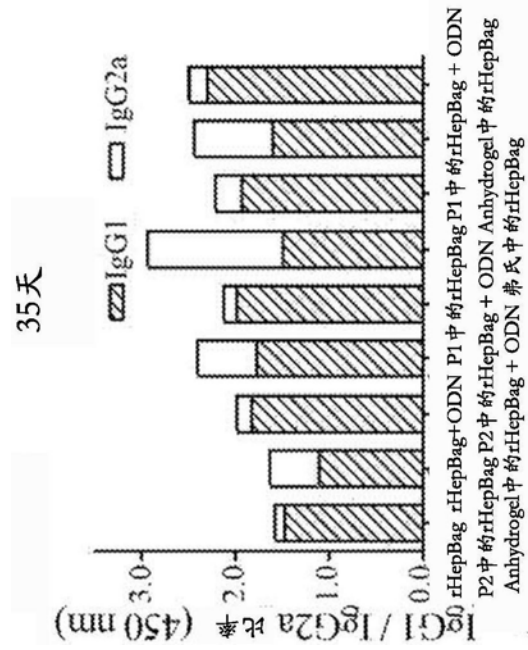


图17D

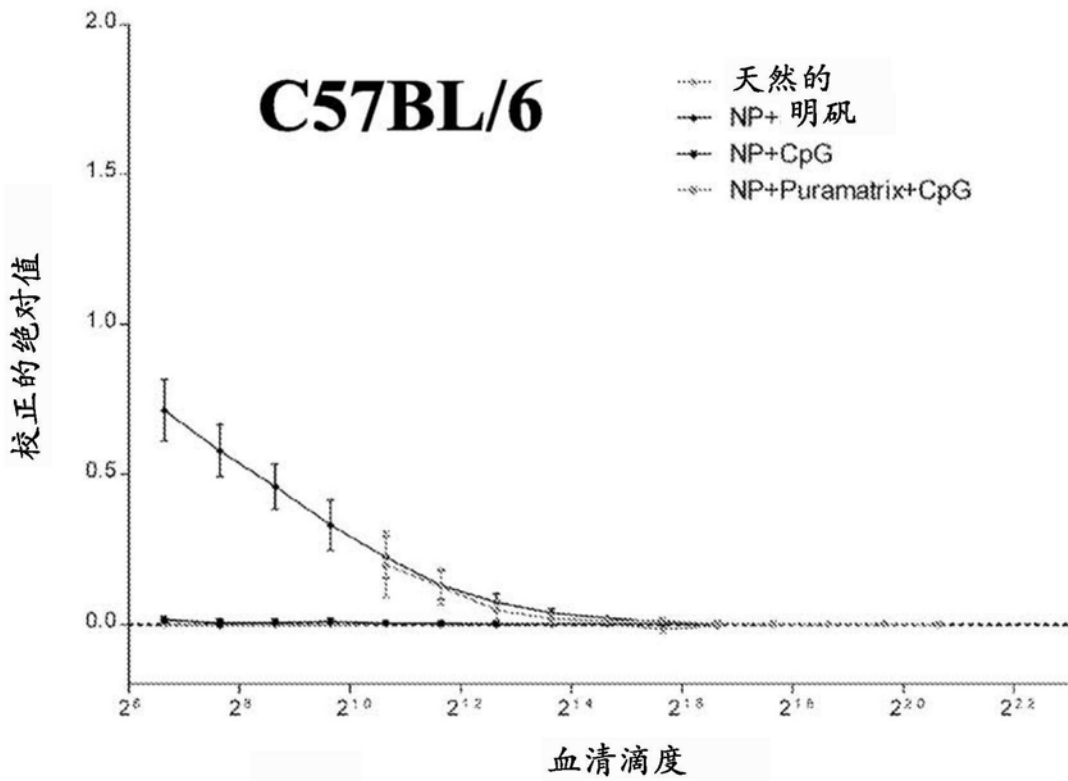


图18A

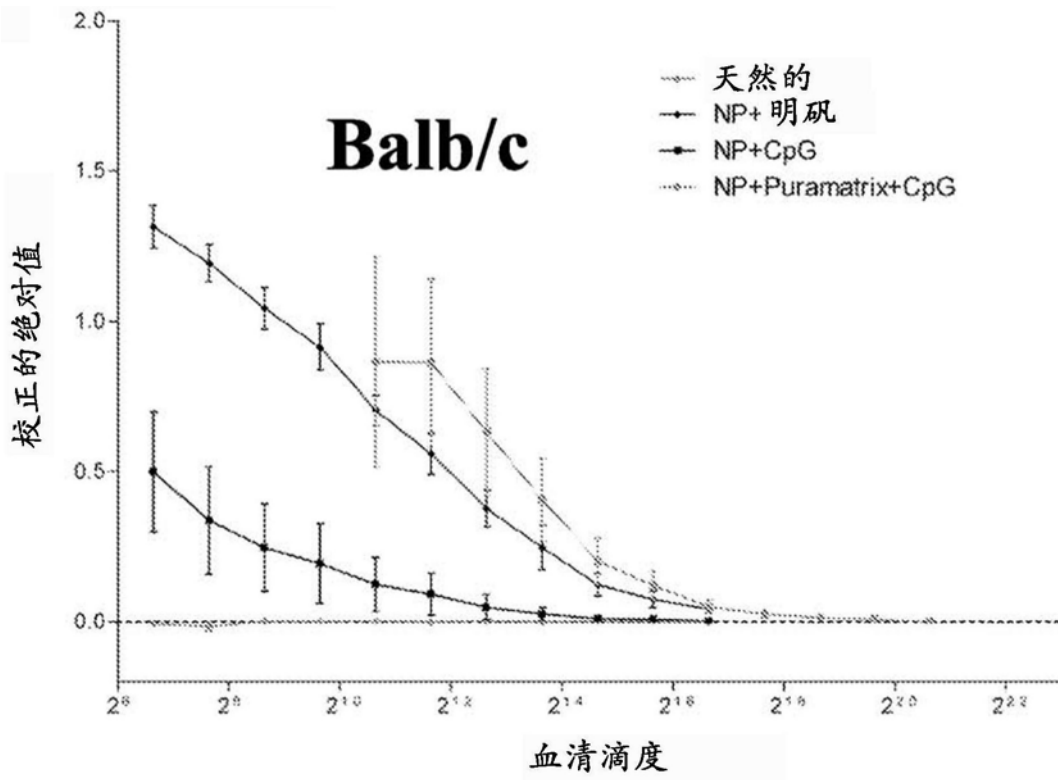


图18B

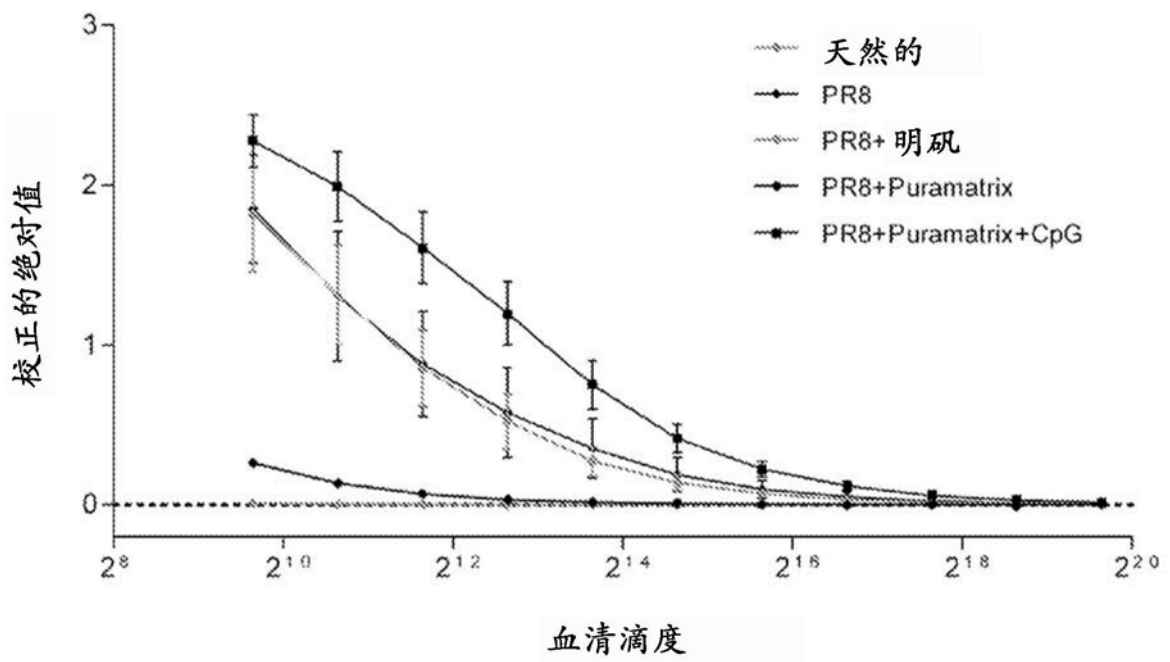


图19A

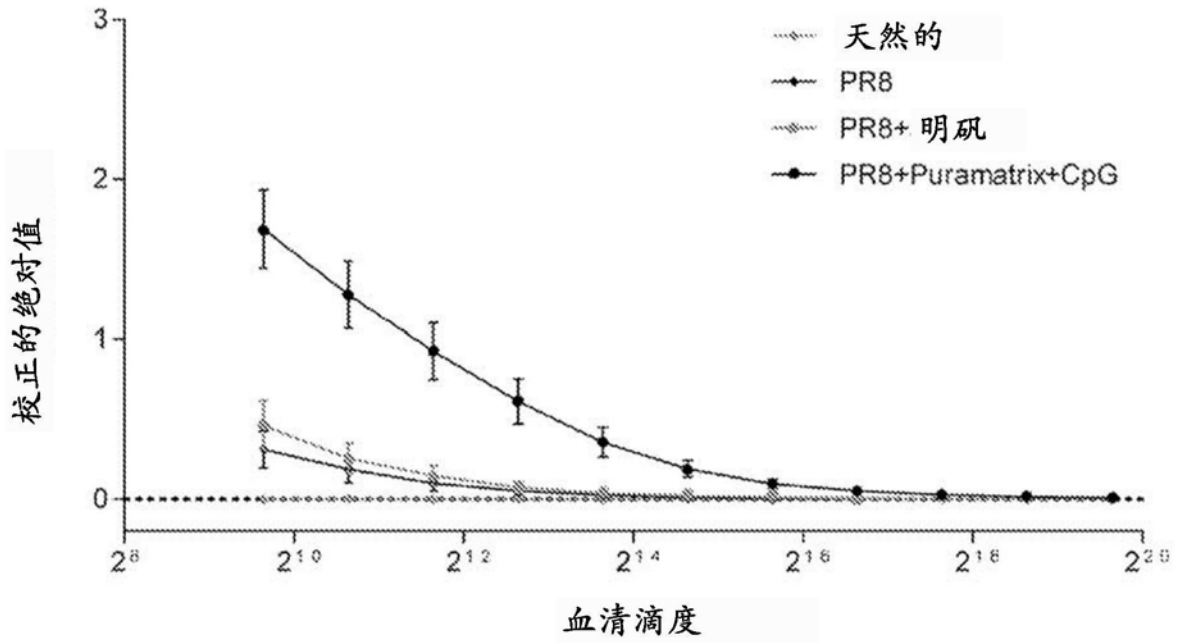


图19B

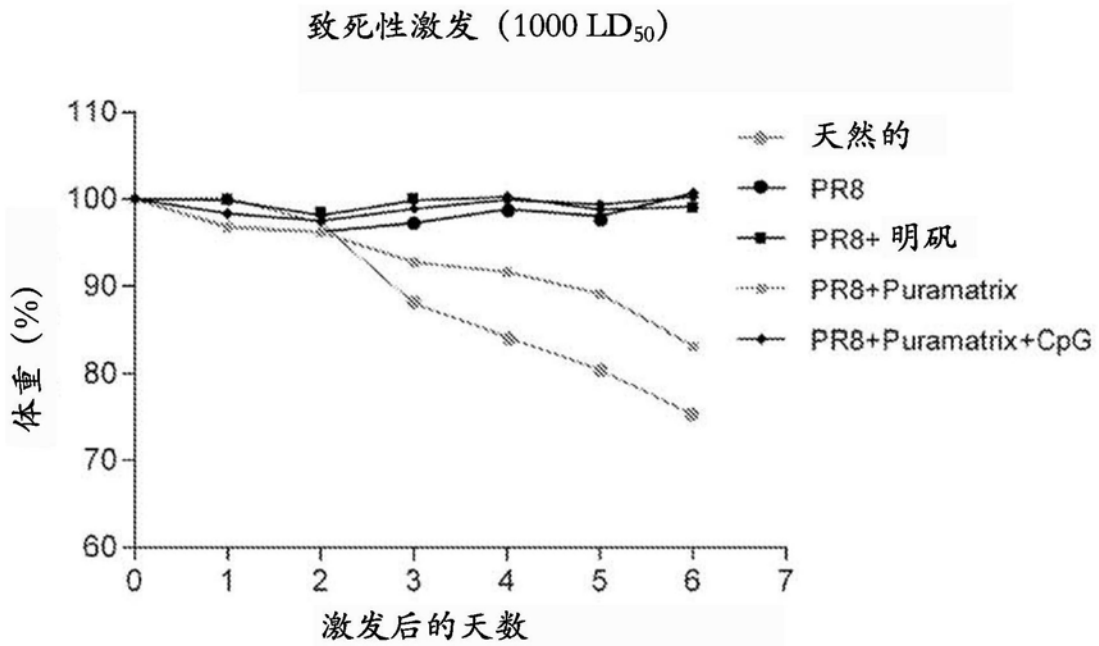


图20A

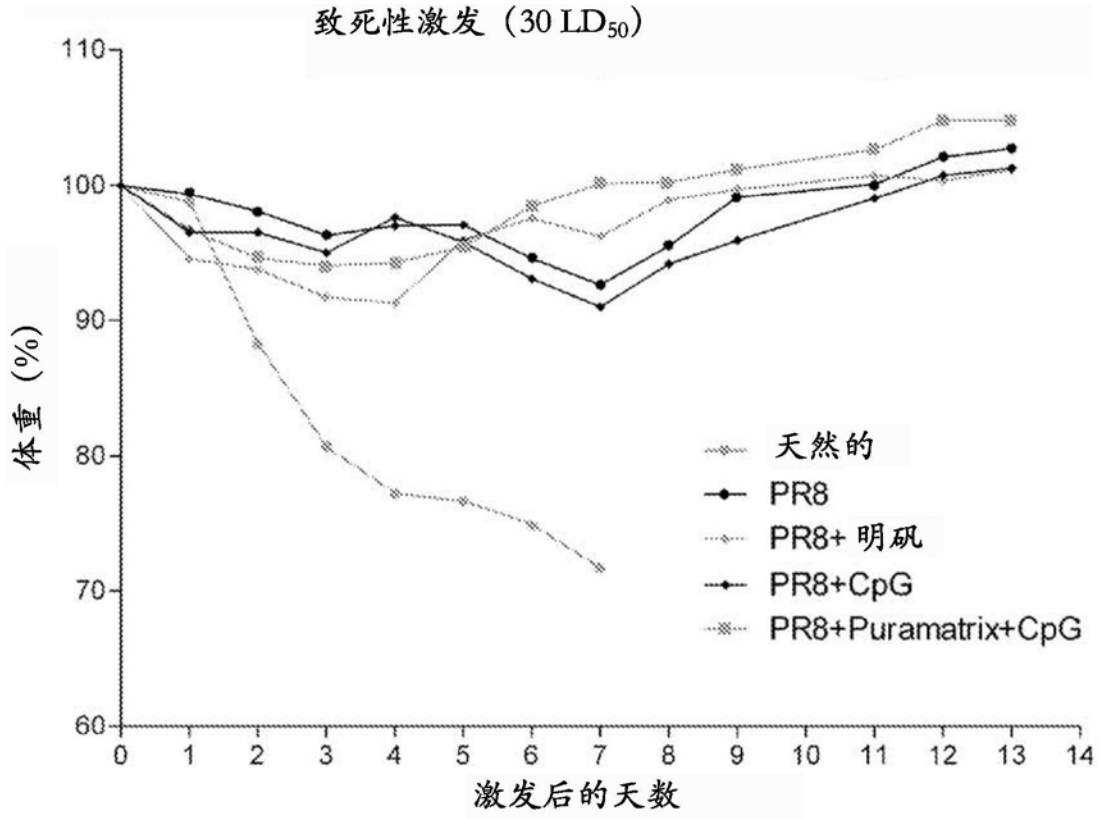


图20B

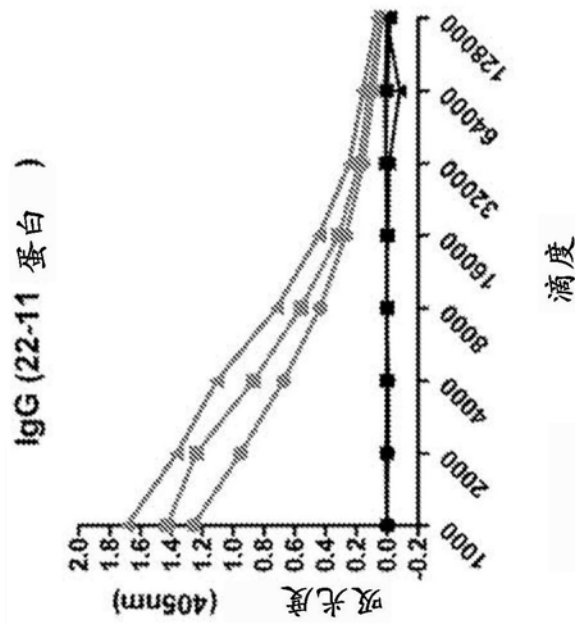


图21A

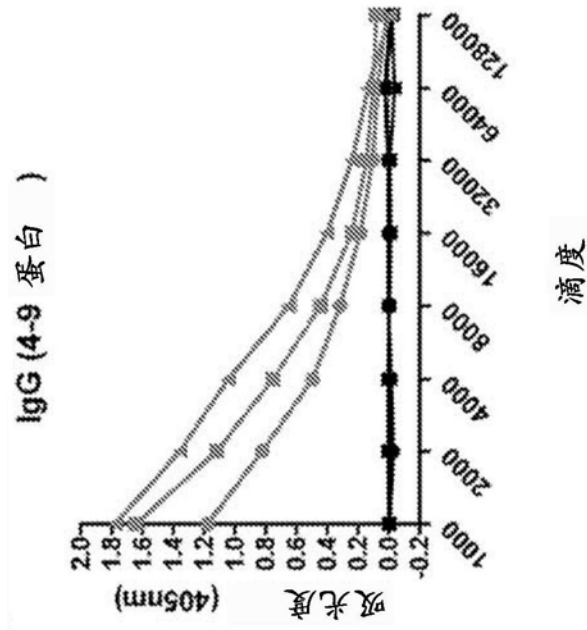


图21B

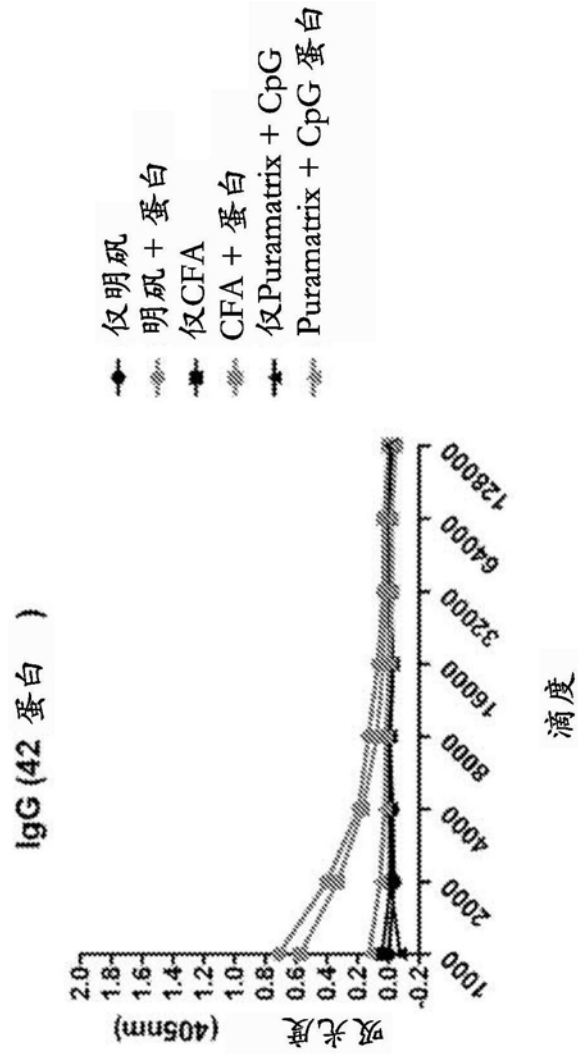


图21C

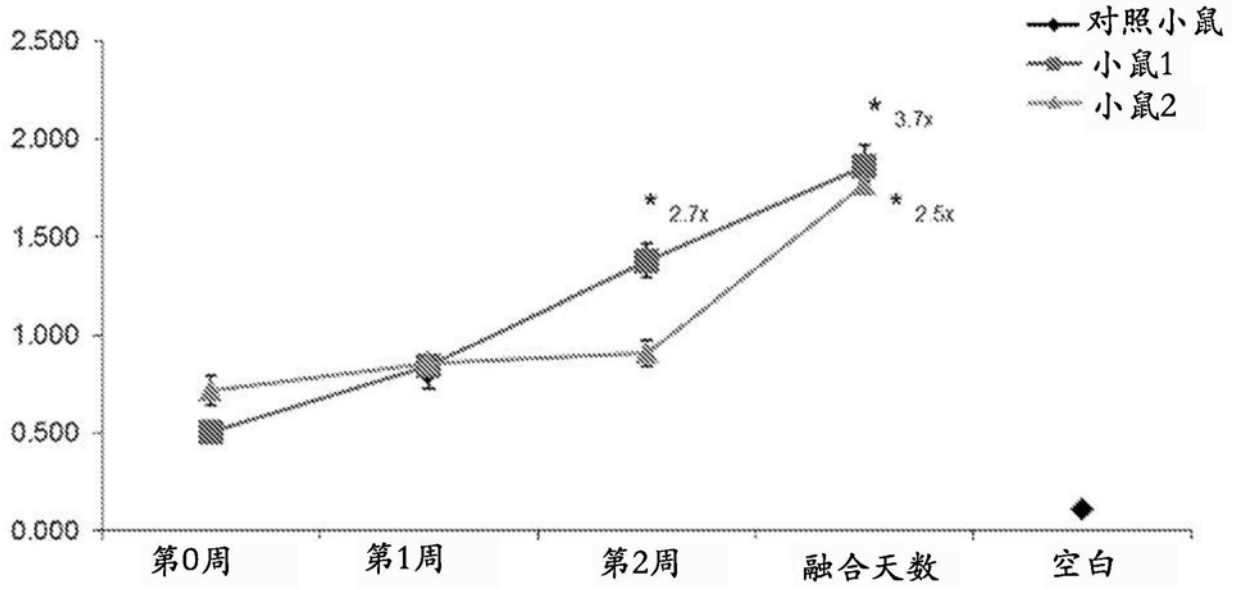


图22A

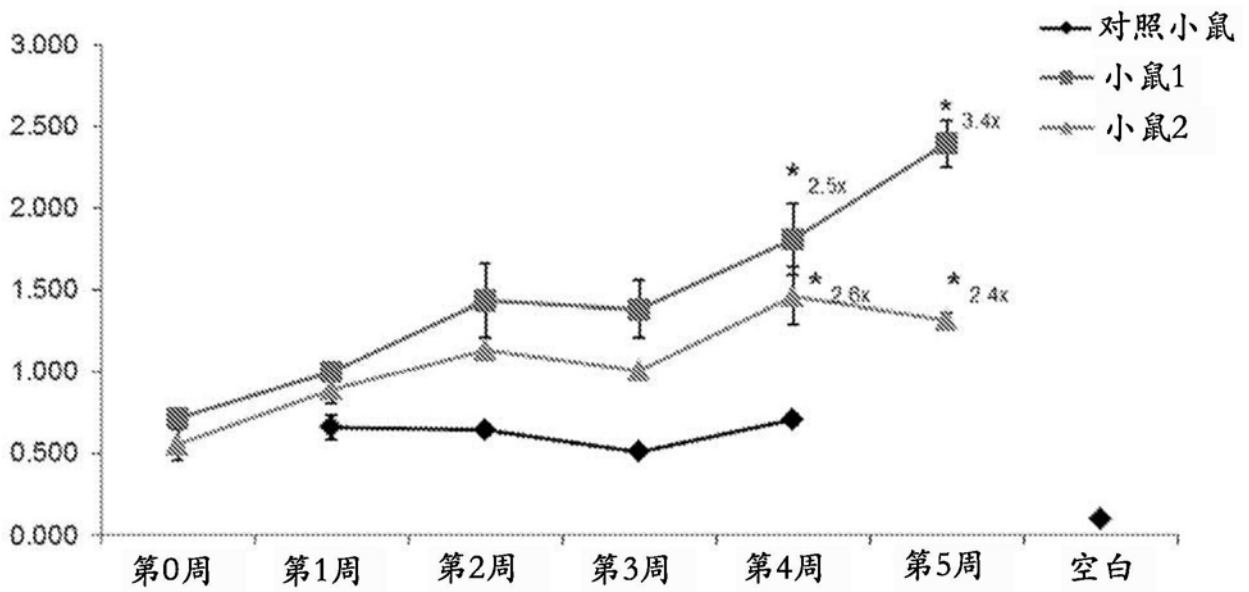


图22B