

1. 在人体中引起免疫应答的免疫原性组合物,其包含:
被(ii)肠溶包衣包围的(i)编码异源免疫原性多肽的腺病毒载体,所述肠溶包衣将所述腺病毒载体引导递送至pH为5.8-6.8的人回肠并使其释放,其中所述包衣的阈值pH为5.8-6.8。
2. 如权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣的阈值pH为6.0。
3. 如权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中相比其最初厚度,所述肠溶包衣于pH 5.8-6.8下在110分钟内崩解至少75%。
4. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1。
5. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含Eudragit® L-100。
6. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含Eudragit® L-100和Eudragit® L100-55的混合物。
7. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含Eudragit® L-100、柠檬酸三乙酯和滑石粉。
8. 如权利要求7所述的免疫原性组合物,其包含1-4份Eudragit® L-100、1-2份柠檬酸三乙酯和1-2份滑石粉。
9. 如权利要求1-6中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1和聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的混合物。
10. 如权利要求9所述的免疫原性组合物,其中聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1与聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的比值是1:4至4:1。
11. 如权利要求1-3中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1和聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:2。
12. 如权利要求11所述的免疫原性组合物,其中聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1与聚(甲基丙烯酸-丙烯酸甲酯共聚物)1:2的比值是1:2至2:1。
13. 如权利要求1-3、11和12中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含Eudragit® L-100和Eudragit® S100的混合物。
14. 如权利要求11-13中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含1至4份聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1和聚(甲基丙烯酸-丙烯酸甲酯共聚物)1:2;1至2份柠檬酸三乙酯;以及1至2份滑石粉。
15. 如权利要求1-3中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:2和聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的混合物。
16. 如权利要求15所述的免疫原性组合物,其中聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:2与聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的比值是1:4至4:1。
17. 如权利要求1-3、15和16中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含Eudragit® L-100-55和Eudragit® S100的混合物。
18. 如权利要求15-17中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述肠溶包衣包含1至4份

聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物) 1:2和聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物) 1:2;1至2份柠檬酸三乙酯;以及1至2份滑石粉。

19. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述腺病毒载体还编码dsRNA。

20. 如前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物是压缩片剂的形式。

21. 前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物在制备用于口服递送至人回肠的药物中的用途。

22. 权利要求1-20中任一项所述的组合物在制备用于在人体中引起免疫应答的药物中的用途,其中所述免疫应答对所述免疫原性多肽是特异的。

23. 如权利要求21-22中任一项所述的用途,其中所述药物的施用导致人体产生中和抗体。

用于小肠递送的制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年2月20日提交的美国临时申请第61/942,386号的优先权,将其公开内容整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 疫苗是预防和/或治疗大量疾病和病症(例如,病毒感染、细菌感染、以及癌症)的重要手段。通常,使用注射进行连续接种,由于不方便去接种疫苗的地点以及对注射的反感,降低了参与率。而且,疫苗的注射需要使用无菌药剂盒,如注射器和针,并且需要熟练的专业人员施用。

[0005] 对于流感疫苗,每年进行大规模的活动以收集足够的受精卵,从而收获并加工足够的病毒以满足市场需求。细胞培养物或植物来源的血凝素(HA)可以降低卵获取并加工负担,但是这些方法仍需要昂贵的无菌填装和处理以产生单独的注射器针头,所述注射器针头需要作为生物危害物处理。在流行性疾病期间,学校可能会被关闭并强制社交距离,而大规模的流感免疫通常需要对象在健康门诊部排队注射。对于流感或其它病原体而言,口服疫苗可以通过邮递送出,从而避免大多数人与人的接触。而且,压片是快速卫生的过程,其不需要注射疫苗要求的昂贵的无菌填装和处理过程。

[0006] 可以以非肠胃外方式例如口服或粘膜递送的疫苗描述于美国专利第8,222,224号。

[0007] 发明概述

[0008] 本文提供了对象(人或非人)更有效地接种疫苗的方法和组合物,其涉及将免疫原性生物物质特异性地递送至对象的回肠。因此,本公开提供了更高效且有效的疫苗,并且证明其在人体中的效力。

[0009] 本文提供了用于在对象中引起免疫应答的免疫原性组合物,其包含免疫原性生物物质,所述免疫原性生物物质被将免疫原性生物物质引导递送至对象回肠的物质(agent)包围。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是非人的动物,例如,灵长类、小鼠、大鼠、兔、马、狗、猫或家禽。在一些实施方案中,免疫原性生物物质选自免疫原性多肽(例如病毒样颗粒、糖蛋白、磷蛋白)、碳水化合物和脂类。

[0010] 在一些实施方案中,免疫原性生物物质是编码免疫原性多肽的表达载体。在一些实施方案中,表达载体是病毒载体(例如腺病毒、AAV、逆转录病毒或慢病毒)。在一些实施方案中,病毒载体是减毒的或不能复制的。在一些实施方案中,表达载体包含与编码免疫原性多肽的序列可操作地连接的启动子(例如CMV、SV40早期或晚期、 β -肌动蛋白等)。在一些实施方案中,表达载体还编码双链(dsRNA)。在一些实施方案中,dsRNA编码序列与启动子可操作地连接,例如与可操作地连接免疫原性多肽编码序列的启动子相同的启动子(利用内部核糖体进入位点(IRES))或不同的启动子。

[0011] 在一些实施方案中,免疫原性组合物还包含至少一种佐剂,例如,TLR3激动剂。在一些实施方案中,TLR3激动剂是dsRNA或dsRNA模拟物。

[0012] 在一些实施方案中,将免疫原性生物物质的至少50%在回肠中递送(释放),例如,

施用组合物中存在的免疫原性生物物质的至少60%、70%、75%、80%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,在免疫原性组合物到达回肠之前,引导递送的物质(例如,肠溶包衣或基质)开始溶解,但保留免疫原性生物物质的至少50%,直到免疫原性组合物到达回肠。在一些实施方案中,引导递送的物质维持免疫原性生物物质通过胃、十二指肠以及空肠,但在回肠中释放免疫原性生物物质。

[0013] 在一些实施方案中,引导递送的物质是肠溶包衣。即,免疫原性生物物质被肠溶包衣覆盖。在一些实施方案中,肠溶包衣在 $\text{pH} \geq 5$,例如,5.2、5.5、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、7.0、5.5-6.8、5.8-6.8等时崩解。在一些实施方案中,肠溶包衣选自甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物(例如,1:1),A型;甲基丙烯酸共聚物,C型;甲基丙烯酸共聚物A型和C型的混合物;以及TimeClock®。在一些实施方案中,肠溶包衣不包括邻苯二甲酸乙酸纤维素(CAP)。在一些实施方案中,肠溶包衣具有导致免疫原性生物物质在回肠中释放的厚度。在一些实施方案中,肠溶包衣是甲基丙烯酸共聚物基的,具有每平方米5.5-10毫克的覆盖率。在一些实施方案中,引导递送的物质是无线电控制的胶囊。

[0014] 在一些实施方案中,肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100、柠檬酸三乙酯和滑石,例如,1份、2份、3份、4份或1-4份Eudragit®L-100,1-2份柠檬酸三乙酯以及1-2份滑石。在一些实施方案中,肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1和聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的混合物。在一些实施方案中,聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1与聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的比值是1:4至4:1,例如,1:3、1:2、1:1、2:1、3:1。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100和Eudragit®L 100-55的混合物。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100和Eudragit®L100-55、柠檬酸三乙酯以及滑石,例如,1-4份Eudragit®L-100和Eudragit®L100-55、1-2份柠檬酸三乙酯以及1-2份滑石。在一些实施方案中,肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1和聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:2。在一些实施方案中,聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1与聚(甲基丙烯酸-丙烯酸甲酯共聚物)1:2的比值是1:2至2:1。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100和Eudragit®S100的混合物。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100和Eudragit®S100、柠檬酸三乙酯以及滑石,例如,1-4份Eudragit®L-100和Eudragit®S100、1-2份柠檬酸三乙酯以及1-2份滑石。在一些实施方案中,肠溶包衣包含聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:2和聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的混合物。在一些实施方案中,聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:2和聚(甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物)1:1的比值是1:4至4:1,例如,1:3、1:2、1:1、2:1或3:1。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100-55和Eudragit®S100的混合物。在一些实施方案中,肠溶包衣包含Eudragit®L-100-55和Eudragit®S100、柠檬酸三乙酯以及滑石,例如,1-4份Eudragit®L-100-55和Eudragit®S100、1-2份柠檬酸三乙酯以及1-2份滑石。

[0015] 在一些实施方案中,免疫原性组合物是片剂或胶囊的形式,例如,被肠溶包衣覆盖

的压缩片剂的形式。在一些实施方案中,将免疫原性组合物封装在包含明胶、羟丙基甲基纤维素、淀粉或支链淀粉的聚合胶囊中。在一些实施方案中,免疫原性组合物是直径小于2mm的微粒形式,例如,各微粒被本文所描述的肠溶包衣覆盖。

[0016] 还提供了将免疫原性组合物递送至对象回肠的方法,其包括将如上所述的免疫原性组合物(即,免疫原性生物物质,其被将免疫原性生物物质引导递送至回肠的物质包围,任选地包含佐剂)口服施用至对象。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是非人的动物。在一些实施方案中,所述方法导致对象中的免疫应答比接受未被引导至回肠的相同免疫原性组合物的对象(不同时间的同一对象,或者不同的对象)中的免疫应答高至少10%,例如,至少20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、100%或更多。在一些实施方案中,对象中的免疫应答比接受未被引导至回肠的相同免疫原性组合物的对象(不同时间的同一对象,或者不同的对象)中的免疫应答高至少1.5倍(例如,2倍、2.5倍、5倍或更高)。在一些实施方案中,免疫应答是对免疫原性生物物质具有特异性的抗体的增加。在一些实施方案中,免疫应答是细胞的免疫应答,例如,细胞因子如IFN- γ 的增加。在一些实施方案中,免疫应答是免疫(例如,对象对得到免疫原性生物物质的病毒、细菌等的感染有抗性)。

[0017] 还提供了在对象中引起增加的免疫应答的方法,其包括将如上所述的免疫原性组合物(即,免疫原性生物物质,其被将免疫原性生物物质引导递送至回肠的物质包围,任选地包含佐剂)口服施用至对象,例如,人类对象。在一些实施方案中,相比于接受未被引导至回肠的相同免疫原性组合物的对象(不同时间的同一对象,或者不同的对象)中的免疫应答,免疫应答增加至少10%,例如,至少20%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、100%或更多。在一些实施方案中,相比于接受未被引导至回肠的相同免疫原性组合物的对象(不同时间的同一对象,或者不同的对象)中的免疫应答,对象中的免疫应答增加至少1.5倍(例如,2倍、2.5倍、5倍或更多)。在一些实施方案中,免疫应答是对免疫原性生物物质具有特异性的抗体的增加。在一些实施方案中,免疫应答是细胞的免疫应答,例如,细胞因子如IFN- γ 的增加。在一些实施方案中,免疫应答是免疫(例如,对象对得到免疫原性生物物质的病毒、细菌等的感染有抗性)。

[0018] 附图简述

[0019] 图1. 在给予对象含有rAd-HA-dsRNA的无线电控制胶囊之后7天,在外周血中测量对HA具有特异性的抗体分泌细胞(ASC)。对象被随机分配以在回肠或空肠中释放疫苗(每组N=12)。结果显示,疫苗递送至回肠的12名对象全部能够产生识别HA的抗体分泌B细胞,而给予至空肠的疫苗的12名对象中只有9名能够产生抗原特异性B细胞。回肠的IgA和IgG ASC的平均数量显著高于空肠。

[0020] 图2. 在施用后7天,通过检测IFN- γ 的水平测定对rAd-HA-dsRNA的T细胞应答。相比于75%的空肠递送组,回肠递送组中的所有个体显示较高的IFN- γ 水平。在回肠递送组,平均IFN- γ 水平也显著较高。

[0021] 图3. 在免疫后第0天和第28天测量对流感A/CA/07/2009的微中和抗体(MN)应答。将MN滴度的倍数增加相对于最初MN滴度小于或等于40的个体对象作图。结果显示,相比于空肠递送(10分之6),回肠递送导致免疫后高比例的MN滴度增加的对象(10分之9)。

[0022] 图4. 使用微晶纤维素和淀粉制备片剂,具有10%硫酸钡作为不透射线材料。这些片剂被包被上Eudragit L100®肠溶包衣,并且通过经口胃管给予雌性食蟹猴(cynomolgus

macaque)。在施用之后随时间进行X-射线照射。A. 胃中的片剂,用箭头指向片剂。B. 一小时之后,片剂在肠中可见,脊柱左边的白点,用箭头指向它。在后面的两小时内,其在肠中溶解,并且无法被看见。

[0023] 图5. 在各自免疫之后7天,在第7天和第35天记录ASC的数量。在第0天和第28天,背景ASC极小,并且未绘制。用水平线显示各治疗组7天的平均应答。

[0024] 图6. 个体对象的MN滴度的倍数增加。黑色阴影柱表示在28天至56天滴度上升的地方,而浅色阴影柱表示最初免疫之后的应答。在MN的两倍增加处画线以指示哪些对象具有可检测的中和抗体应答。安慰剂组中无对象应答,而在低剂量组中3名对象以及在高剂量组中7名对象在免疫之后对流感具有2倍或更大的中和抗体应答。安慰剂N=10,低剂量和高剂量N=11。

[0025] 图7. 单次口服免疫之后的抗体应答。A. 显示个体对象免疫前后(分别在第0天和第28天)的HAI抗体滴度。B. HAI几何平均滴度(GMT)相对于时间。在免疫后0个月、1个月和6个月测量HAI滴度以评价抗体应答的持久性。C. 显示个体对象免疫前后的MN滴度。D. 免疫后的ASC应答。免疫之后7天记录IgG和IgA ASC的数量(每 10^6 个PMBC)。

[0026] 发明详述

[0027] 本发明人发现,将免疫原性生物物质递送至小肠的特定部分(即,回肠)导致比所述物质未被靶向或被靶向至不同位置时大得多的治疗应答。这允许设计更有效的疫苗,降低材料的成本,并降低对接受者的副作用。

[0028] I. 定义

[0029] 术语“免疫原性”指物质在宿主中引起免疫应答(体液或细胞介导的)的能力。免疫原性物质对宿主而言通常是“外来的”,例如,来自不同的物种,或者来自细菌、病毒或真菌。非外来的物质例如在自身免疫应答的情况下可以是免疫原性的。某些癌细胞的特异性物质可被开发为免疫原性物质,其允许宿主的免疫系统攻击癌症。

[0030] 术语“生物物质”指核酸、多肽、糖蛋白、碳水化合物、脂类或其修饰形式(例如甲基化的、糖基化的、可检测标记的)。生物物质与小分子药物的区别在于它们可通过生物方法(包括重组技术)而不是化学合成产生。然而,生物物质可以被化学修饰,或者包含非天然的核苷酸或氨基酸。生物物质还可以是非天然的,例如,重组或嵌合的实体。

[0031] 本文使用的“免疫原性生物物质”指直接作为抗原的物质(例如,被T细胞受体或抗体识别),或者一旦在细胞中表达作为抗原的物质。例如,免疫原性生物物质可以包括编码免疫原性多肽的表达载体。

[0032] 术语“抗原”指多肽、糖蛋白、脂蛋白、脂类、碳水化合物或被T细胞受体和/或抗体结合的其它物质(例如,被识别为“外来的”)。抗原通常源自细菌、病毒或真菌来源。术语“源自”表示,抗原本质上以其在其天然抗原环境中存在的形式存在,或者已将其修饰以在某些条件下表达、以只包括大部分免疫原性部分或者以移除其它可能有害的相关组分等。

[0033] 本文所描述的组合物“免疫原性有效剂量或量”是引起或调节对选择用于接种疫苗的抗原具有特异性的免疫应答的量。免疫应答包括体液免疫应答和细胞介导的免疫应答。可以治疗性或预防性地使用免疫原性组合物以治疗或预防任何阶段的疾病。

[0034] “体液免疫应答”由血液的无细胞组分例如血浆或血清介导;血清或血浆从一个个体向另一个体的转移传递了体液免疫力。体液免疫应答通常是B细胞介导的,例如,抗体的

产生。

[0035] “细胞介导的免疫应答”由抗原特异性淋巴细胞介导；抗原特异性淋巴细胞从一个个体向另一个体的转移传递了免疫力。细胞介导的免疫应答至少部分由T细胞介导，并且例如可以通过检测T细胞特异的细胞因子或T细胞生长的增加被检测到。

[0036] “回肠”是与十二指肠和空肠一起形成小肠的三段中最长的。其组成空肠和盲肠之间的末端部分。

[0037] 肠溶包衣是应用于口服药物的屏障，其阻止内部的治疗剂在胃和十二指肠的低pH环境（~pH 3）中被消化。

[0038] 诸如肠溶包衣、基质或胶囊的物质据说能保留封装或包埋的治疗剂，这时治疗剂的最初施用量的至少60%，例如，至少约70%，75%，80%，85%，90%，95%或100%保持封装或包埋在所述物质内。诸如肠溶包衣或基质的物质通常被设计为在某些条件下崩解并释放治疗剂。例如，在厚的或化学上更复杂的包衣的情况下，崩解可以是逐步的。一旦肠溶包衣的厚度相比于最初的施用厚度减少至少10%，例如，至少25%、50%或75%，包衣被称为“崩解”。崩解不是绝对的术语，因为根据条件，其可在不同的时间进程内发生。例如，设计于pH 6.5下5分钟内崩解的包衣可以于pH 6下崩解，尽管缓慢（例如，1小时内）。崩解不一定表示封装或包埋的治疗剂被释放。然而，在肠溶包衣或基质完全崩解之前治疗剂可以开始释放。

[0039] 本文使用的关于例如核酸、蛋白或载体的术语“嵌合”或“重组”表示，核酸、蛋白或载体已通过引入异源核酸或蛋白或者改变天然核酸或蛋白被修饰。因此，例如，嵌合和重组的载体包括在载体的天然（非嵌合或非重组）形式内不存在的核酸序列。嵌合的病毒表达载体指包含编码异源（例如，免疫原性）多肽的核酸序列的病毒表达载体。

[0040] “表达载体”指重组或合成产生的核酸构建体，具有一系列指定的允许特定核酸在宿主细胞中转录的核酸元件。表达载体可以是质粒、病毒或核酸片段的一部分。通常，表达载体包含与启动子可操作连接的待转录的核酸。病毒表达载体通常是不复制的或减毒的。病毒来源的载体可以包括表达期望序列所需的表达载体的组分，但省略参与例如复制或其它致病作用的组分。

[0041] 本文使用的术语“启动子”和“表达控制序列”是指指导核酸转录的核酸控制序列。启动子序列通常靠近转录的起始位点，如在聚合酶II型启动子情况下的TATA元件。启动子还可包括远端的增强子或阻遏元件，其可位于距转录起始位点多达数千个碱基对处。启动子包括组成型启动子和诱导型启动子。“组成型”启动子是在大多数环境和发育条件下有活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调控下有活性的启动子。术语“可操作地连接”指核酸表达控制序列（如启动子或转录因子结合位点的排列）和第二核酸序列之间的功能连接，其中表达控制序列指导对应于第二序列的核酸的转录。

[0042] 术语“异源的”，当提及核酸的部分使用时，表示核酸包含两个或更多个在自然界彼此相同的关联中不存在的子序列。例如，核酸通常以重组方式产生，其具有两个或更多个来自不相关基因的序列，所述序列被排列以组成新功能核酸，例如，来自一种来源的启动子和来自另一来源的编码区。类似地，蛋白的异源部分指示蛋白包含两个或更多个在自然界彼此相同的关联中不存在的子序列（例如，融合蛋白）。异源的核酸或蛋白是在具体的自然环境中不存在的核酸或蛋白，例如，在人体细胞中的异源小鼠蛋白。

[0043] 在本文可互换使用的术语“核酸”和“多核苷酸”指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物。所述术语涵盖了基因、cDNA、RNA和寡核苷酸(短的多核苷酸)。所述术语涵盖了含有已知的核苷酸类似物或者修饰的骨架残基或连接的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的以及非天然存在的,其与参照核酸具有类似的结合特性,并且其以与参照核苷酸类似的方式进行新陈代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性-磷酸甲酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。术语“核苷酸”通常指核酸单体。

[0044] 除非另有指示,特定的核酸序列还涵盖了其保守修饰的变体(例如,简并密码子置换)和互补序列,以及明确指出的序列。具体地,简并密码子置换可通过产生这样的序列来实现:在所述序列中,一个或多个选择(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基置换(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994))。

[0045] 本文所描述的组合物“治疗剂量”或“治疗有效量”或“有效量”是预防、减轻、减缓或降低疾病和病症的症状的严重性的量,所述疾病和病症与选择用于接种疫苗的抗原来源(例如,病毒、细菌、寄生虫或癌症)相关。

[0046] 术语“抗体”指特异性地结合并识别抗原的由免疫球蛋白基因编码的多肽或其片段。免疫球蛋白序列包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区序列,以及极大数量的免疫球蛋白可变区序列。轻链被归类为 κ 或 λ 。重链被归类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其依次分别限定了免疫球蛋白类型,IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0047] T细胞指特定的淋巴细胞类型,其表达由基因家族编码的特异性受体(T细胞受体)。公认的T细胞受体基因包括 α 、 β 、 δ 和 γ 基因座,并且T细胞受体通常(但不普遍)识别MHC加短肽的组合。T细胞通常被广泛地归类为辅助性T细胞(CD4+)和细胞毒性T细胞(CD8+)。抗体由B细胞例如抗体分泌细胞(ASC)天然产生。成熟的B细胞可以是初始的、浆B细胞(活化的和抗体生成的)、记忆的、B-1、边缘区B细胞、滤泡B细胞和调节性B细胞。

[0048] 适应性免疫应答指T细胞和/或B细胞和/或抗体识别抗原。

[0049] 抗原递呈细胞(APC)是能够将免疫原性肽或其片段递呈至T细胞以激活或增强免疫应答的细胞。APC包括树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、单核细胞以及可被工程化为有效APC的其它细胞。可以但不必须对此类细胞进行遗传修饰以增加递呈抗原的能力、改善T细胞应答的激活和/或维持、自身具有抗肿瘤作用和/或与接受者免疫兼容(即,匹配的HLA单体型)。APC可以分离自包括以下的多种生物流体和器官中的任一种:骨髓、外周血、肿瘤和癌周的组织,并且可以是自体的、同种异体的,同基因的或异基因的细胞。APC通常利用来自主要组织相容性(MHC)基因座的受体将短的多肽递呈至T细胞。

[0050] 佐剂是非特异性的免疫应答增强子。合适的佐剂包括,例如,霍乱毒素、单磷酸脂A(MPL)、弗式完全佐剂、弗式不完全佐剂、Quil A和Al(OH)。佐剂也可以是引起APC活化并通过像Toll样受体的第二信号转导分子增强T细胞递呈的那些物质,例如,双链RNA(dsRNA)、dsRNA模拟物、细菌鞭毛、LPS、CpG DNA以及细菌脂肽(最近评述于[Abreu et al., *J Immunol*, 174(8), 4453-4460(2005)])。

[0051] 在本文可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白”指氨基酸的聚合物。所述术语适

用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0052] 术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来修饰的那些氨基酸,例如,羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构(即,与氢、羧基、氨基和R基结合的碳)的化合物,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲基甲硫氨酸砷。此类类似物具有修饰的R基(例如,正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指这样的化学化合物:其具有不同于氨基酸的一般化学结构的结构,但以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用。

[0053] 氨基酸在本文可以通过其公知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来表示。同样地,核苷酸可以通过其通常接受的单字母代码来表示。

[0054] “保守修饰的变体”适用于氨基酸序列和核酸序列二者。就特定的核酸序列而言,保守修饰的变体指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者如果所述核酸不编码氨基酸序列,则保守修饰的变体指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何指定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU均编码氨基酸丙氨酸。因此,在丙氨酸由密码子指定的每一位置,将密码子改变为任何所描述的对应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其为保守修饰变异的一种。本文的编码多肽的每一核酸序列还描述了核酸的每一可能的沉默变异。技术人员将认识到,可以修饰核酸中的各密码子(除了AUG和TGG,所述AUG通常是甲硫氨酸的唯一密码子,所述TGG通常是色氨酸的唯一密码子)以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的各沉默变异隐含于各描述的序列中。

[0055] 关于氨基酸序列,技术人员将认识到,对改变、添加或缺失编码序列中单一氨基酸或小百分比氨基酸的核酸、肽、多肽或蛋白序列的个别置换、缺失或添加,如果改变导致氨基酸被化学类似的氨基酸置换,则是“保守修饰的变体”。提供功能上类似氨基酸的保守置换表是本领域公知的。此类保守修饰的变体另外不排除本发明的多态变体、种间同系物和等位基因。

[0056] 以下八组各自含有能彼此保守置换的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸I、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见,例如,Creighton,Proteins(1984))。

[0057] 短语“选择性(或特异性)杂交”指复杂混合物(例如,总细胞DNA或RNA或者文库DNA或RNA)中的互补(或大部分互补)核苷酸的结合、成双螺旋或杂交。

[0058] 多核苷酸可以包含天然的序列(即,编码个别多肽或dsRNA或其部分的内源序列)或者可以包含这样的序列的变体。多核苷酸变体可以含有一个或多个置换、添加、缺失和/或插入,使编码多肽的至少一种生物活性(例如,免疫原性)相对于包含天然抗原的多肽没有减弱。多核苷酸变体可以含有一个或多个置换、添加、缺失和/或插入,使编码dsRNA的佐剂活性相对于不含有置换、添加、缺失和/或插入的dsRNA没有减弱。变体与编码天然多肽或

其部分或者dsRNA的多核苷酸序列优选地呈现至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0059] 在两个或更多个多核苷酸或多肽序列的背景下,术语“相同的”或百分比“同一性”指当利用下述序列比较算法之一或通过手动比对和视觉检查在比较窗或测量的指定区域内进行最大一致性比较和比对时,两个或更多个序列或子序列相同或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,指定区内50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性)。则将此序列称为“基本相同的”。该定义还指测试多核苷酸序列的互补性。任选地,同一性在长度至少约10至约100、约20至约75、约30至约50个氨基酸或核苷酸的区域内存在。

[0060] “对照”样本或值指作为参照(通常是已知的参照)的样本,用于与测试样本比较。例如,测试样本可以取自例如测试化合物或处理存在的测试状态,并且与来自例如测试化合物不存在(阴性对照)或已知化合物存在(阳性对照)的已知状态的样本比较。在本公开的背景下,阴性对照的实例是来自自己知的健康(未感染)个体的生物样本,而阳性对照的实例是来自自己知的感染患者的生物样本。对照还可以代表从大量测试或结果获得的平均值或范围。本领域技术人员将认识到,对照可被设计用于评估任意数目的参数。例如,对照可被设计来比较基于药理学数据(例如,半衰期)或治疗度量的治疗益处(例如,益处和/或副作用的比较)。对照可被设计用于在体外应用。本领域技术人员将理解,哪一些对照在指定情况下有价值,并且能够分析基于与对照值比较的数据。对于确定数据的显著性,对照也是有价值的。例如,如果指定参数的值在对照中广泛地不同,则测试样本中的变化将不被认为是显著的。

[0061] 术语“诊断”指对象患有诸如感染或癌症的病症的相对可能性。类似地,术语“预后”指某种未来后果可能在对象中发生的相对可能性。如医学诊断领域的技术人员所了解的,所述术语并非意指是绝对的。

[0062] 术语“疗法”、“治疗”和“缓解”指症状严重性的任何减轻。在感染的背景下,治疗可以指传染物质的减少、减轻的症状等。在治疗癌症的情况中,治疗可以指,例如,减小肿瘤大小、减少癌症细胞的降低数目、生长速率、转移活性,减少非癌细胞的细胞死亡等。术语“治疗”和“预防”并非意指绝对的术语。治疗和预防可以指传染物质的任何相对的减少或明显不存在、发作的延迟、症状的缓解、患者存活的改善、存活时间或存活率的增加等。治疗和预防可以是完全的(传染物质或瘤细胞的水平不可检测)或部分的,使患者中存在的传染物质或瘤细胞比在无当前所描述的免疫原性生物物质的情况下出现的传染物质或瘤细胞少。可以将治疗的效果与未接受治疗的个体或个体集合比较,或者与治疗之前或治疗期间不同时间的同一患者比较。在一些方面,例如与施用之前的个体或与未经历治疗的对照个体相比,感染或疾病的严重性降低至少10%。在一些方面,感染或疾病的严重性降低至少25%、50%、75%、80%或90%或者在一些情况下,使用标准的诊断技术不再能检测到。

[0063] “对象”、“患者”、“个体”以及相似的术语可被互换地使用并且指哺乳动物,如人和非人的灵长类、以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪和其它哺乳类物种,除非另有指明。所述术语不一定表示对象已被诊断具有特定的疾病,但是通常指在医学监督下的个体。患者可以是寻求治疗、监测、调整或改变既有治疗方案等的个体。

[0064] II. 免疫原性生物物质

[0065] 免疫原性生物物质是在宿主(例如人宿主)中引起免疫应答的任何生物物质。因此免疫原性生物物质可以是多肽(例如糖蛋白、磷蛋白或其它修饰形式)、碳水化合物、脂类、多核苷酸(例如染色质、甲基化多核苷酸或其它修饰形式)。在一些实施方案中,免疫原性生物物质直接地引起免疫应答,例如,自身是靶免疫原(抗原)。在一些实施方案中,免疫原性生物物质是编码靶免疫原的多核苷酸。例如,当编码靶抗原的多核苷酸在抗原递呈细胞(APC)中表达时,针对表达的抗原发起免疫应答。免疫原性生物物质可以单独地,与第二、第三和/或第四免疫原性生物物质组合(例如,在多靶标预防疫苗的情况下),和/或与佐剂组合施用以增加免疫应答。

[0066] A. 表达载体

[0067] 用于本文所描述的用途的表达载体可以包括病毒来源的载体,例如,重组的腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、修饰的牛痘安卡拉(MVA)载体以及慢病毒(例如,HSV-1来源的)载体(参见,例如,Brouard et al. (2009) *British J. Pharm.* 157: 153)。治疗用途的病毒来源载体通常是不复制的或减毒的。例如,在腺病毒载体的情况中,可以修饰腺病毒基因组以移除E1和E3基因。对于产生,可以将复制缺陷载体施用至表达E1基因的细胞,使重组腺病毒(rAd)由细胞产生。可以将该rAd收集并用于单轮的感染以将转基因组合物递送至哺乳动物内另外的细胞,以便引起对编码多肽抗原的免疫应答。

[0068] 合适的病毒载体的实例包括腺病毒5,所述腺病毒5包括,例如,E1/E3区缺失的Ad5和E4区缺失的Ad5。其它合适的腺病毒载体包括毒株2、口服测试的毒株4和7、肠腺病毒40和41、以及足以递送抗原并引起对转基因抗原适应性免疫应答的其它毒株(例如Ad34、Ad26或Ad35) [Lubeck et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 86 (17), 6763-6767 (1989); Shen et al., *J Virol*, 75 (9), 4297-4307 (2001); Bailey et al., *Virology*, 202 (2), 695-706 (1994)]。病毒载体不需要分离自人,但可以来自非人类,如黑猩猩腺病毒3(ChAd3) (参见,例如,Colloca et al. (2012) *Sci. Transl. Med.* 4:115; Stanley et al. (2014) *Nat. Med.* doi:10.1038/nm.3702)。在一些实施方案中,腺病毒载体是活的不复制腺病毒载体(如E1和E3缺失的rAd5)、减毒活腺病毒载体(如E1B55K缺失病毒)或具有野生型复制的活腺病毒载体。

[0069] 如本文所描述的待使用的表达载体中的转录和翻译控制序列可以由病毒源提供。例如,常用的启动子和增强子源自例如 β 肌动蛋白、腺病毒、猴病毒(SV40)以及人巨细胞病毒(CMV)。例如,允许在CMV启动子、SV40早期启动子、SV40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺瘤病毒启动子、劳氏肉瘤病毒启动子、转导物启动子或在哺乳动物细胞中显示表达有效的其它启动子的指导下表达蛋白的载体是适合的。可以使用另外的病毒和非病毒启动子、控制序列和/或信号序列,条件是此类控制序列与待转染的宿主细胞兼容。

[0070] B. 免疫原

[0071] 用于本文所述用途的免疫原可以源自抗原,如,例如,病毒抗原、细菌抗原、癌抗原、真菌抗原或寄生虫抗原(对于本文所描述的可以使用的抗原列表参见,例如,美国专利第8,222,224号)。

[0072] 如本文所述可以使用的具体抗原的实例是源自以下的抗原:流感病毒(例如HA、NA、M1、NP),人类免疫缺陷病毒(HIV,例如,gag、pol、env等)、人类乳头瘤病毒(HPV,例如,衣壳蛋白如LI),委内瑞拉马脑脊髓炎(VEE)病毒,EB病毒(Epstein Barr virus),单纯疱疹病

毒(HSV),人疱疹病毒,鼻病毒,柯萨奇病毒,肠道病毒,A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、E型肝炎和G型肝炎(HAV、HBV、HCV、HEV、HGV,例如,表面抗原),腮腺炎病毒,风疹病毒,麻疹病毒,脊髓灰质炎病毒,天花病毒,狂犬病毒和水痘-带状疱疹病毒。

[0073] 合适的病毒抗原还包括病毒非结构蛋白,例如,由不编码结构多肽的病毒核酸所编码的蛋白,不同于组成衣壳的蛋白或围绕病毒的蛋白。非结构蛋白包括促进病毒核酸复制、病毒基因表达或翻译后加工的那些蛋白,如,例如,来自委内瑞拉马脑脊髓炎(VEE)病毒、东方型马脑脊髓炎(EEE)病毒或塞姆利基森林病毒的非结构蛋白1、2、3和4(分别是NS1、NS2、NS3和NS4)。

[0074] 细菌抗原可以源自,例如,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermis*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)、单核细胞增多性李氏菌(*Listeria monocytogenes*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)、博氏疏螺杆菌(*Borrelia burgdorferi*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridium difficile*)、伤寒沙门氏杆菌(*Salmonella typhi*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、鼠疫耶尔森氏杆菌(*Yersinia pestis*)、淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、苍白螺旋体(*Treponema pallidum*)、支原体(*Mycoplasma sp.*)、嗜肺性军团病杆菌(*Legionella pneumophila*)、斑疹伤寒立克次氏体(*Rickettsia typhi*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)和痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*) (例如,霍乱毒素B亚基、霍乱毒素共调节菌毛(TCP));幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylorii*) (例如,VacA、CagA、NAP、Hsp、过氧化氢酶、脲酶);大肠杆菌(例如,热不稳定肠毒素、菌毛抗原)。

[0075] 寄生虫抗原可以源自,例如,蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、利什曼原虫(*Leishmania sp.*)、锥体虫(*Trypanosoma sp.*)、毛滴虫(*Trichomonas sp.*)、疟原虫(*Plasmodium sp.*) (例如,恶性疟原虫表面蛋白抗原,如pfs25、pfs28、pfs45、pfs84、pfs48/45、pfs230、Pvs25和Pvs28);血吸虫(*Schistosoma sp.*);结核分枝杆菌(例如,Ag85、MPT64、ESAT-6、CFPI0、R8307、MTB-32MTB-39、CSP、LSA-1、LSA-3、EXP1、SSP-2、SALSA、STARP、GLURP、MSP-1、MSP-2、MSP-3、MSP-4、MSP-5、MSP-8、MSP-9、AMA-1、1型整合膜蛋白、RESA、EBA-175和DBA)。

[0076] 真菌抗原可以源自,例如,足癣(*Tinea pedis*)、体癣(*Tinea corporis*)、股癣(*Tinea cruris*)、甲癣(*Tinea unguium*)、卡氏枝孢霉(*Cladosporium carionii*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、假丝酵母(*Candida sp.*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)。

[0077] 癌抗原包括例如在结肠癌、胃癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、皮肤癌(例如,黑素瘤)、白血病或淋巴瘤中表达或过表达的抗原。示例性的癌抗原包括,例如,HPV L1、HPV L2、HPV E1、HPV E2、胎盘碱性磷酸酶、AFP、BRCA1、Her2/neu、CA 15-3、CA 19-9、CA-125、CEA、Hcg、尿激酶型纤溶酶原激活剂(Upa)、纤溶酶原激活剂抑制剂、CD53、CD30、CD25、

C5、CD11a、CD33、CD20、ErbB2、CTLA-4。对于另外的癌靶标，参见Sliwowski&Mellman (2013) Science 341:6151。

[0078] C. 佐剂

[0079] 在一些实施方案中，组合物还包含至少一种佐剂。合适的佐剂包括，例如，脂类和非脂类化合物、霍乱毒素 (CT)、CT B亚基、CT衍生的CTK63、大肠杆菌热不稳定肠毒素 (LT)、LT衍生的LTK63、Al(OH)₃、以及例如在W02004/020592, Anderson and Crowle, Infect. Immun. 31 (1) : 413-418 (1981), Roterman et al., J. Physiol. Pharmacol., 44 (3) : 213-32 (1993), Arora and Crowle, J. Reticuloendothel. 24 (3) : 271-86 (1978) 和Crowle and May, Infect. Immun. 38 (3) : 932-7 (1982)) 中所描述的多离子有机酸。合适的多离子有机酸包括例如，6,6'-[3,3'-二甲基[1,1'-联苯]-4,4'-二基]双(偶氮)双[4-氨基-5-羟基-1,3-萘-二磺酸] (伊文斯兰) 和3,3'-[1,1'-联苯]-4,4'-二基双(偶氮)双[4-氨基-1-萘磺酸] (刚果红)。本领域技术人员将了解，多离子有机酸可以用于与任何施用类型联合的任何基于核酸的接种疫苗方法。

[0080] 还可以使用TLR-3激动剂 (例如，dsRNA及其模拟物，如polyI:C、polyA:U和polyI:polyC)。TLR-3激动剂包括例如短发夹RNA、病毒来源的RNA、可形成双链或短发夹RNA的短片段RNA、以及短干扰RNA (siRNA)。在一些实施方案中，TLR-3激动剂是病毒来源的dsRNA，例如，源自辛德比斯病毒的dsRNA或dsRNA病毒中间体 (Alexopoulou et al. (2001) Nature 413:732)。在一些实施方案中，TLR-3激动剂是短发夹RNA。短发夹RNA序列通常包含通过接头序列连接的两条互补序列。具体的接头序列不是本发明的关键方面。可以使用任何合适的接头序列，只要其不干扰两条互补序列结合形成dsRNA。当TLR-3激动剂在体外或体内与应答细胞 (例如，树突状细胞、外周血单核细胞或巨噬细胞) 接触时，其可以导致促炎细胞因子的释放 (例如IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- α 、IFN- β)。

[0081] 其它合适的佐剂包括局部的免疫调节剂，如咪唑啉家族的成员，如，例如，咪唑莫特和瑞喹莫德 (参见，例如，Hengge et al., Lancet Infect. Dis. 1 (3) : 189-98 (2001))。

[0082] 另外合适的佐剂可商购获得，例如，另外的基于铝的佐剂 (例如，Alhydrogel、Rehydragel、磷酸铝、Algammulin)；基于油的佐剂 (弗式不完全佐剂和完全佐剂 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.)、Specol、RIBI、TiterMax、Montanide ISA50或Seppic MONTANIDE ISA 720)；基于非离子嵌段共聚物的佐剂、细胞因子 (例如，GM-CSF或Flat3配体)；Merck佐剂65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.)；AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.)；钙盐、铁盐或锌盐；酰化酪氨酸的不溶悬浮液；酰化的糖；阳离子或阴离子衍生化多糖；聚磷腈；生物可降解的微球体；单磷脂A和Quil A。细胞因子，如GM-CSF或白细胞介素2、白细胞介素7或白细胞介素12也是合适的佐剂。血蓝蛋白 (例如，钥孔血蓝蛋白) 和血赤藓素也可被用作佐剂。多糖佐剂如，例如，几丁质、壳聚糖和脱乙酰基几丁质作为佐剂也是合适的。其它合适的佐剂包括胞壁酰二肽 (MDP、N乙酰基胞壁酰L丙氨酰D异谷酰胺) 细菌肽聚糖及其衍生物 (例如，苏氨酸-MDP和MTPPE)。BCG和BCG细胞壁骨架 (CWS) 可用作佐剂，含或不含海藻糖二霉菌酸酯。可以使用海藻糖二霉菌酸酯本身 (参见，例如，美国专利第4,579,945号)。脱毒内毒素也可以单独或与其它佐剂联合作为佐剂 (参见，例如，美国专利第4,866,034号；第4,435,386号；第4,505,899号；第4,436,727号；第4,436,728号；第4,505,900号和第4,520,019号)。皂角苷QS21、QS17、QS7也可用作佐剂 (参见，例如，美国专

利第5,057,540号;EP 0362 279;WO 96/33739和WO96/11711)。其它合适的佐剂包括 Montanide ISA 720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, Calif., United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、SBAS系列佐剂(例如,SBAS-2、SBAS-4或SBAS-6或其变体,可获自 SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium)、Detox (Corixa, Hamilton, Mont.) 以及RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.)。

[0083] 也考虑了将超抗原在本发明中作为佐剂使用。超抗原包括葡萄球菌外蛋白,如来自金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的 α 、 β 、 γ 和 δ 肠毒素,以及 α 、 β 、 γ 和 δ 大肠杆菌外毒素。常见的葡萄球菌肠毒素被称作葡萄球菌肠毒素A (SEA) 和葡萄球菌肠毒素B (SEB), 肠毒素通过E (SEE) 来描述 (Rott et al, 1992)。还可以使用酿脓链球菌B (SEB)、产气梭状芽胞杆菌 (*Clostridium perfringens*) 肠毒素 (Bowness et al., 1992)、来自酿脓链球菌的细胞质膜相关蛋白 (CAP) (Sato et al, 1994) 以及来自金黄色葡萄球菌的中毒性休克综合征毒素1 (TSST1) (Schwab et al, 1993)。

[0084] 对于本文提供的药物组合物,佐剂可被设计来诱导例如主要是Th1型或Th2型的免疫应答。高水平的Th1型细胞因子(例如,IFN- γ 、TNF- α 、IL-2和IL-12)倾向于促成对施用抗原的细胞介导免疫应答的诱导。相比之下,高水平的Th2型细胞因子(例如,IL-4、IL-5、IL-6和IL-10)倾向于促成体液免疫应答的诱导。口服递送本文提供的包含免疫原性多肽的组合物之后,通常引起包括Th1型和Th2型应答的免疫应答。

[0085] III. 靶向递送系统

[0086] 目前所描述用于回肠递送的组合物和方法可依赖于合适的包衣、基质和装置,如下文所描述的那些。

[0087] A. 肠溶包衣、基质和装置

[0088] 肠溶包衣用于屏蔽来自胃的低pH环境的物质并且延迟封闭物质的释放直到其到达消化道后段的期望靶标。肠溶包衣是已知的,并且可商购获得。实例包括pH敏感聚合物、生物可降解聚合物、水凝胶、缓释系统以及渗透递送系统(参见,例如,Chourasia&Jain (2003) J. Pharm. Pharmaceutical Sci. 6:33)。

[0089] 胃肠道(GIT)的pH从胃中的非常酸(pH~2)进展至回肠中的更接近中性(pH~5.8-7.0)。可以使用在回肠中或就在回肠之前溶解的pH敏感性包衣。实例包括Eudragit® L和S聚合物(5.5-7.0的阈值pH范围);聚醋酸乙烯苯二甲酸酯(pH 5.0)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯50和55(分别是pH 5.2和5.4)和邻苯二甲酸乙酸纤维素(pH 5.0)。Thakral et al. (2013) Expert Opin. Drug Deliv. 10:131评述了用于回肠递送的Eudragit®制剂,特别是确保于pH \leq 7.0递送的L和S的组合。Crotts et al. (2001) Eur. J Pharm. Biol. 51:71描述了具有合适崩解特性的Eudragit®制剂。Vijay et al. (2010) J. Mater. Sci. Mater. Med. 21:2583评述了用于在pH 6.8下回肠递送的基于丙烯酸(AA)-甲基丙烯酸甲酯(MMA)的共聚物。

[0090] 对于回肠递送,聚合物包衣通常于约pH 6.8溶解并且允许在约40分钟内完全释放(参见,例如,Huyghebaert et al. (2005) Int. J. Pharm. 298:26)。为了实现该目的,可以使治疗物质由不同的包衣层覆盖,例如,以便最外层保护所述物质通过低pH条件,并且当片剂离开胃时溶解,以及当所述片剂进入增加的pH时至少一个内层溶解。用于递送至末端回肠的分层包衣的实例描述于例如WO2013148258。

[0091] 生物可降解的聚合物(例如,果胶、偶氮聚合物)通常依赖于在GIT中生活的微生物群落的酶活。相比于较前的区段,回肠栖息了大量的细菌,包括乳酸菌和肠道菌。

[0092] 渗透控释的口服递送系统(OROS®;Alza)是在水性条件下在一定时间内降解的渗透系统的实例。可以处理此类材料以具有其它包衣或不同的厚度,从而特异性地递送至回肠(参见,例如,Conley et al. (2006) Curr. Med. Res. Opin. 22:1879)。

[0093] 在W02000062820中报导了递送至回肠的组合聚合物。实例包括具有柠檬酸三乙酯(2.4mg/胶囊)的Eudragit® L100-55(25mg/胶囊)、以及Povidone K-25(20mg/片剂),随后是Eudragit® FS30D(30mg/片剂)。可以施加pH敏感聚合物以实现向回肠的递送,如上文所描述的,例如甲基丙烯酸共聚物(例如聚(甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物)1:1)、邻苯二甲酸乙酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯、聚醋酸乙烯苯二甲酸酯、乙酸纤维素偏苯三酸酯、羧甲基乙基纤维素、虫胶或其它合适的聚合物。包衣层还可以由对其它的腔组件(如细菌的降解)而不是pH敏感的成膜聚合物组成,或者由当与另一成膜聚合物混合时具有这样敏感性的组分组成。提供延时释放至回肠的此类组分的实例是包含偶氮键的聚合物,诸如果胶的多糖及其盐,半乳甘露聚糖、直链淀粉和软骨素,二硫化物聚合物以及糖苷。

[0094] 可以将具有不同pH、水和酶促敏感性的组分组合使用以将治疗组合物靶向至回肠。包衣厚度还可以用来控制释放。组分还可以用来形成基质,在基质中包埋治疗组合物。通常参见,Frontiers in Drug Design&Discovery (Bentham Science Pub.2009) vol.4。

[0095] B. 频率或无线电控制的胶囊

[0096] 作为溶解包衣和基质的替代,位点特异性递送可以经由取决于外部产生的信号而释放的胶囊。早期的模型由高频(HF)信号引起释放,如Digenis et al. (1998) Pharm. Sci. Tech. Today 1:160中所公开的。最初的HF胶囊概念后来已被更新,并且结果被市售为InteliSite®。更新胶囊是射频激活的非崩解递送系统。胶囊的放射性标记允许经由γ闪烁扫描术确定胶囊在GI道的特定区域内的位置。当胶囊到达GI道中的期望位置时,外部激活打开胶囊药物库的一系列窗口。

[0097] 在一些实施方案中,可以将免疫原性生物物质封闭在无线电控制的胶囊中,以便一旦胶囊到达回肠,其被追踪并发出信号。在一些实施方案中,在检测或不检测的情况下,胶囊在施用后指定的时间发出信号,所述指定的时间对应于胶囊预期到达回肠的时间。

[0098] C. 制剂

[0099] 药物组合物可被用于本文所描述的预防和治疗目的。如上所解释的,药物组合物可被制备来保护免受胃的降解,使施用的免疫原性生物物质到达期望的位置。用于口服递送的DNA和药物的微囊化方法描述于例如US2004043952。

[0100] 免疫原性药物组合物可以含有免疫原性生物物质(例如,免疫原性多肽、或编码免疫原性多肽的多核苷酸)的药学可接受的盐。此类盐可由药学可接受的无毒碱制备,包括有机碱(例如,伯胺、仲胺、叔胺的盐以及碱性氨基酸)和无机碱(例如,钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐和镁盐)。盐的一些具体实例包括磷酸盐缓冲盐水和生理盐水(例如,用于摄取、鼻内递送或注射)。

[0101] 对于药物释放的技术原因或计时控制,制剂的延时释放包衣或另外的包衣可以含

有对腔的条件不敏感的其它成膜聚合物。被用于此目的的材料包括但不限于：单独或在混合物中使用的糖、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠等。

[0102] 可以将诸如分散剂、着色剂、颜料、另外的聚合物(例如,聚(丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯))、抗粘着剂和消泡剂的添加物包含在包衣层。可以添加其它的化合物以增加膜的厚度并减少酸性胃液扩散进核心材料。包衣层还可以含有药学可接受的增塑剂以获得期望的机械性能。此类增塑剂例如但不限于三乙酰甘油酯、柠檬酸酯、苯二甲酸酯、癸二酸二丁酯、十六醇、聚乙二醇、甘油单酯、聚山梨醇酯或其它增塑剂以及其混合物。对于各配方,并且涉及选择的聚合物、选择的增塑剂和所述聚合物的施加量,可以优化增塑剂的量。

[0103] 可以将本领域已知的其它合适的药物成分用于本发明的药物组合物。合适的载体包括例如,水,生理盐水,醇,脂肪,蜡,缓冲液,诸如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖和碳酸镁的固体载体,或生物可降解的微球体(例如,聚乳酸、聚甘醇酸酯)。合适的生物可降解的微球体公开于例如美国专利第4,897,268号;第5,075,109号;第5,928,647号;第5,811,128号;第5,820,883号。可以将免疫原性多肽和/或载体表达载体封装在生物可降解的微球体内或者与微球体的表面结合。

[0104] 此类组合物还可以包含非免疫原性缓冲液(例如中性的缓冲盐水或磷酸盐缓冲盐水)、碳水化合物(例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖)、甘露糖醇、蛋白、多肽或氨基酸(如甘氨酸)、抗氧化剂、抑菌剂、螯合剂(如EDTA或谷胱甘肽)、佐剂(例如氢氧化铝)、悬浮剂、增稠剂和/或防腐剂。可选地,可以将本发明的组合物配制为冻干物。使用公知的技术,还可以将化合物封装在脂质体内。

[0105] IV. 免疫应答和疫苗

[0106] 本文所描述的用于回肠递送的药物组合物被设计来从个体引起对药物组合物中包含的免疫原性生物物质具有特异性的免疫应答。药物组合物可以作为疫苗预防性或治疗性地使用以避免或减少病毒感染、细菌感染、寄生虫感染、真菌感染或癌症。药物组合物可被用来在任何阶段,例如,癌前阶段、癌症阶段或转移性阶段进行治疗,或者被用来预防疾病或感染。

[0107] 例如,本文所描述的组合物可被用来预防或治疗感染,如流感、肝炎或HIV,或者用于癌症的预防或治疗。在此类方法中,通常将药物组合物施用至可能患有疾病、病症或感染的个体或者可能未患有疾病、病症或感染的个体。在一些实施方案中,在施用之前,例如,使用本领域通常接受的标准来诊断疾病、病症或感染。例如,通过测量来自患者的样本中的病毒滴度可以诊断病毒感染,通过检测来自患者的样本中的细菌可以诊断细菌感染,以及通过检测恶性肿瘤的存在可以诊断癌症。可以在手术移除原发肿瘤之前或之后和/或治疗(如施用放射疗法或常规化疗药物)之前或之后施用药物组合物。

[0108] 免疫疗法是典型的主动免疫疗法,其中,治疗依赖于,伴随免疫应答修饰剂(例如,免疫原性生物物质)的施用,体内刺激内源宿主免疫系统以针对例如肿瘤或者细菌或病毒感染的细胞起反应。

[0109] 本文所描述的预防或治疗组合物的施用频率以及剂量将因个体不同而不同,并且使用标准的技术可以很容易确定。通常,在52周时段内可以施用1至52次剂量。在一些实施方案中,1个月的间隔施用3次剂量,或者每2-3个月施用2-3次剂量。在一些实施方案中,可

以同时或依次地施用多于一种抗原的组合,例如,含有针对流感的各亚型或亚型内多个分枝的个别组分的每年一次的流感疫苗。在一些实施方案中,间隔更长,如一年一次,例如,基于特定的流行毒株的每年一次的流感疫苗。其后,可以定期地给予加强接种。替代方案可适合于个体患者以及特定的疾病和病症。

[0110] 合适的剂量是当如上所述施用能够促进例如抗肿瘤、抗病毒或抗菌免疫应答的免疫原性生物物质的量,并且其是在本底(未治疗的)水平之上至少15-50%,或者在非回肠靶向治疗的水平之上至少5-50%(例如,5%、10%、20%、30%、50%、1.5倍、2倍或更高)。通过测量患者中的抗肿瘤抗体或细胞溶解型T细胞的疫苗依赖性产生可以监测此类应答,所述细胞溶解型T细胞能够在体外杀死例如患者的肿瘤细胞、患者的病毒感染细胞或患者的细菌感染细胞。与未接种疫苗的患者或接受非回肠靶向治疗的患者相比,在接种疫苗的患者中,此类疫苗还可以产生导致改善的临床结果(例如,完全或部分或更长的无病存活、降低的病毒滴度)的免疫应答。

[0111] 大体上,合适的剂量和治疗方案提供了足以提供治疗和/或预防益处的量的活性化合物。可以通过与用非回肠靶向治疗进行治疗的患者或未治疗患者相比,在治疗患者中确立改善的临床结果(例如,减少的或阴性的病毒滴度、更频繁的缓解、完全或部分或更长的无病存活)来监测这样的应答。通常,使用上文所描述的标准增殖、细胞毒性或细胞因子分析可以评价此类免疫应答,其可以使用获自治疗前后患者的样本来进行。

[0112] 例如,免疫原性多肽和体液中对免疫原性多肽具有特异性的抗体之间形成的免疫复合物的检测可被用来监测疗法例如对免疫原性多肽相关的疾病或病症的效力。对于免疫复合物,使用已知的方法,可以分析取自起始疗法(例如,回肠靶向疗法)之前以及之后个体的体液样本。简言之,比较两个样本中检测的免疫复合物的数目。第二样本(靶向疗法后)中的免疫复合物的数量相对于第一样本(靶向疗法前)的显著变化反映了成功的疗法。

实施例

[0113] 将小分子递送至肠的药物方法是已知的,但是对将大的生物物质递送至肠用于适当免疫识别的能力知之甚少。小鼠没有能力吞咽药丸,所以在动物模型中用片剂进行研究是困难的。而且,递送疫苗载体以引起对转基因抗原应答的最佳位置的定位在人体中还没有被表征。在绵羊中,空肠被证明是引起对腺病毒编码转基因抗原的免疫应答的最有效靶标(Mutwari et al. (1999) *Immunology* 97:455)。这里,我们显示了使用改善的用于递送生物物质的人口服剂型进行若干人或非人灵长类研究的结果。

[0114] 实施例1

[0115] 为了确定小肠的哪一区域诱导对抗原的免疫应答最有效,在人体中进行了测试。将无线电控制的胶囊给予健康的正常志愿者,其中疫苗在小肠的前段(空肠)或小肠的后段(回肠)释放。使用无线电控制的胶囊递送小分子药物已有描述,但是没有描述疫苗的递送(Digenis et al. (1991) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7:309)。

[0116] 疫苗由表达来自A/CA/04/2009的流感抗原HA的重组腺病毒(rAd-HA-dsRNA)组成(参见,例如,US2012/0244185)。在第0天,向各对象给予总计 10^{11} 个感染单位(IU)。在疫苗施用之后的第0天和第7天,通过抗体分泌细胞(ASC)分析来测量外周血中的循环前浆B细胞的数量。结果仅测量了识别抗原HA的ASC的数量。

[0117] 结果显示,在各治疗组中,在免疫之后7天可以测量到ASC(图1)。平均应答在回肠给药组中比空肠给药组中高。第0天的背景ASC可忽略。对于回肠,在第7天观察到 $340+/-111$ (标准误差) IgG和 $74+/-18$ IgA ASC的平均值。对于空肠,平均且标准误差应答是 $118+/-30$ IgG和 $28+/-8$ IgA ASC。回肠组显著不同于安慰剂(对于IgA ASC,在第7天 $P=0.03$,对于IgG ASC,趋于更高, $p=0.07$)。与绵羊中的结果相反,在人体中的结果表明,在引起IgG或IgA抗体应答方面,回肠递送比空肠递送更有效。

[0118] 还通过使用ELISPOT®分析检测干扰素- γ 的释放(IFN- γ)来测定T细胞应答。图2显示,施用后7天,相比于空肠给药组中的8/12,回肠给药组中12/12具有增加的IFN- γ 水平。此外,相比于空肠给药组,IFN- γ 水平在回肠给药组中显著较高。

[0119] 测量对流感A/CA/07/2009的微中和(MN)抗体滴度。增加的MN抗体水平指示中和抗体应答。在排除最初中和抗体应答大于40的对象之后(Faix et al. (2012) PloS One 7: e34581),将MN滴度的倍数增加相对于个体对象作图。对于回肠递送疫苗,具有正增加的对象数量是10分之9,而对于空肠递送疫苗是10分之6(图3)。几何平均滴度(GMT)在两组之间相似,回肠GMT从22上升至92,而空肠GMT从18上升至90。结果表明,在诱导对流感的中和抗体应答方面,回肠释放更可靠,其可能导致保护免受流感的百分比对象更大。

[0120] 实施例2

[0121] 使用微晶纤维素(PH-101,FMC)和淀粉(Starch 1500,Colorcon)手工制造片剂,其掺入10%硫酸钡作为不透射线材料,含有煅制氧化硅作为助流剂以及硬脂酸镁作为片剂润滑剂。使用10%包衣固体重量增加作为是否添加肠溶包衣的指导,在盘状包衣机中,将直径7.14mm和重量150mg的片剂包被上Eudragit®L-100;包衣固体含有4份Eudragit®聚合物与1份柠檬酸三乙酯和1份滑石。作为肠溶包衣性能的最初测试,使用经口的胃管给予四只食蟹猴片剂。经口的胃管是实心刚性的,但是沿中部是空心的用于徐徐滴入液体。其在刚性管的引导端具有可弯曲的硅胶管,所述硅胶管在适当的位置可以容纳小片剂。管和药丸装置往下穿过受控制猴的食道,直到引导端穿过贲门括约肌并进入胃。用橙汁冲洗将药丸冲入胃。在设定的时间点进行X-射线照射,并检查片剂的位置和溶解情况。表1总结了结果。

动物	时间和药丸位置			
	1 小时	2 小时	3 小时	4 小时
[0122] 1	胃	胃	胃	肠
2	胃	肠	肠	溶解
3	肠	肠	溶解	溶解
4	胃	胃	肠	溶解

[0123] 图4显示,片剂在胃的低pH环境中完全是完整的;不存在片剂过早溶解的迹象。虽然对于猴来说很大,但是片剂能够穿过胃完整进入肠。在肠中,它们以合理的速率溶解并且在4只猴子的3只中完全溶解。在第4只猴子中,药丸在3小时之后的某一时刻离开胃,并且在最后的x-射线照射时还没有溶解。总之,选择以可接受的方式起作用的片剂以及Eudragit®L-100包衣,用于未来的人类研究。

[0124] 实施例3

[0125] 完成第1期,连续的入选临床研究,其中用随机的和安慰剂对照的组群评价基于重组Ad血清型5 (rAd5) 的针对H1季节流感的口服疫苗的安全性和免疫原性。实施例1中描述了rAd5载体(具有来自A/C A/04/2009的HA的rAd-HA-dsRNA)。研究具有大约3个月的有效期,并且根据可适用的良好临床实践指南、美国联邦法规和国际协调会议规范进行。在讨论风险之后,从所有对象获得知情同意书。在给予对象药物之前,得到IRB的批准。

[0126] 在Lonza Biologicals (Houston, TX) 的 Wave®袋 (GE Healthcare, Waukesha, WI) 中产生良好生产规范 (GMP) 级rAd-HA-dsRNA。通过离子交换层析,随后通过缓冲液更换进行纯化。将纯化载体与赋形剂混合,冻干,然后使用微晶纤维素和淀粉作为压片物在Lonza压片。使用Vector HiCoater®LDCS-5包衣机 (Vector Freund, Cedar Rapids, IA), 用Eudragit®L 100 (Evonik Industries, Darmstadt, Germany) 将片剂包被上肠溶包衣。将终产物释放在一起,并且通过标准IU分析进行滴定。将安慰剂制备为类似大小和形状的片剂,其含有150mg微晶纤维素,无肠溶包衣。针对引起对转基因的免疫应答的能力,研究比较了 10^9 个IU治疗对象、 10^{10} 个IU治疗对象和安慰剂治疗对象。在第0天和第28天,给予对象片剂。

[0127] 在最初剂量之后第0天和第7天,以及在第二次剂量之后第28天和第35天(在第28天递送第二次剂量),通过ASC分析测量外周血中的循环前浆B细胞的数量。结果显示,在治疗组中,各次免疫之后7天,可以测量到ASC计数,但是安慰剂组中不可以(图5)。平均应答在第7天较高,并且在高剂量组中比低剂量组中高。第0天和第28天的背景ASC可忽略,以及对于安慰剂组,在所有的时间点均可忽略。对于高剂量组,在第7天和第35天分别测量到 105 ± 33 和 27 ± 12 ASC的平均值。对于低剂量组,在第7天和第35天,平均ASC分别是 41 ± 32 和 14 ± 8 。在第7天和第35天,安慰剂组分别具有 0.3 ± 0.3 和0的平均值。高剂量组显著高于安慰剂(第7天和第35天,分别是 $P=0.01$ 和 $P=0.05$)。

[0128] 通过MN分析测量对流感的中和抗体应答。在相对于安慰剂对照的治疗组中,结果显示MN滴度的剂量依赖性增加(图6)。高剂量组中具有至少2倍增加的MN应答者的频率显著不同于安慰剂组(通过费舍尔精确检验得到 $P=0.003$),而低剂量趋于更高,但是未显著高于安慰剂($P=0.2$)。在排除MN滴度大于40的对象之后,在剩余对象中计算几何平均滴度(GMT)(表2)。还计算了第56天的几何倍数滴度应答(GMFR)(表2)。这些结果表明,通过口服免疫产生对流感的中和抗体滴度,其中在高剂量组中,在免疫之后GMT具有大于3倍的增加。这些结果表明,L 100包被片剂可被用于向肠递送疫苗。

组	N	GMT D0	GMT D28	GMT D56	GMFR
[0129] 安慰剂	8	14.1	14.1	14.1	1
低剂量	10	12.3	14.1	16.2	1.3
高剂量	7	15.6	36.2	53.8	3.4

[0130] 实施例4

[0131] 我们体外测试了肠溶包衣的参数以确定不同pH和包衣百分比情况下的溶解时间。在到达回肠之前,在低pH的胃部暴露(如同在胃中),以及随后经过增加的pH梯度(如同存在于十二指肠和空肠中)之后,数据为回肠递送提供了指导。

[0132] 用如上所述制备的150mg片剂测试片剂崩解,所述片剂利用作为有机溶剂悬液施加的 Eudragit®L100、Eudragit® L100-55或者L100和L100-55聚合物的1:1 (w/w) 混合

物,用8%、10%或12%的总固体重量增加进行包被。一式两份,于37℃,将用各包衣聚合物制备的且具有各水平的包衣施加的片剂在VanKel Bio-Dis III往复圆筒溶解试验装置中以每分钟下降10次(DPM)的往复速率预暴露于USP模拟胃液(SGF,pH 1.6,无胃蛋白酶)120分钟。然后将片剂转移至USP模拟肠液(SIF,pH 6.8,无胰酶)。观察片剂的崩解,并且两次片剂完全崩解的时间被记录到最接近的5分钟。数据表明,崩解时间受聚合物组成和厚度二者的影响,并且提供关于适当选择包衣组合物以影响片剂离开胃之后包衣的行为的指导。

	包衣聚合物	指定包衣水平下的崩解时间(分钟)		
		8%	10%	12%
[0133]	L100	20	30	45
	L100/L100-55	15	20	30
	L100-55	10	20	25

[0134] 用150mg片剂测试pH对崩解时间的影响,所述片剂用Eudragit®LI 00或Eudragit®LI 00-55包被至10%总固体重量增加。通过将USP SIF(无胰酶)的pH调节至涵盖USP说明书6.8的值来制备一系列的缓冲液。将片剂于37℃、10DPM下预暴露于USP SGF(无胃蛋白酶)120分钟,然后转移至pH更改的USP SIF溶液。观察片剂的崩解,并且完全崩解的时间被记录到最接近的5分钟。数据表明,崩解速率受环境pH的影响,并且两种聚合物之间有差异。再者,结果可用于适当的选择包衣组合物以实现将药物保留通过胃和小肠上部。

	SIF 的 pH	pH 下聚合物崩解的时间(分钟)	
		Eudragit L100	Eudragit L100-55
[0135]	5.4	250	145
	6	110	60
	6.4	55	45
	7	30	20

[0136] 实施例5

[0137] 我们进行了第1期,连续的入选研究,其中用随机的和安慰剂对照的组群评价基于重组Ad血清型5(rAd5)的针对H1季节流感的口服疫苗的安全性和免疫原性。如本文所述,将含有疫苗的片剂进行包被以在回肠中溶解。数据显示,在引起对流感的中和抗体应答方面,口服片剂疫苗将与既有的疫苗有竞争性。

[0138] 在第0天和第28天测量血凝抑制(HAI)应答(图7A)。安慰剂治疗的对象没有血清转化,但是一名安慰剂对象漏筛了并在第0天具有较高的值。疫苗对象中没有一个人具有>20的起始HAI滴度。在免疫之后,疫苗组中的9名对象达到了血清保护水平(HAI>40)(图7A)。所述组的几何平均滴度(GMT)是61.1(95%CI:30-124),相对于7.9的最初GMT(95%CI:6-11)有7.7倍几何平均倍数上升(GMFR)。在11名4倍上升者中(92%),9名血清转化(SC),其他2名对象显示HAI滴度从5至20的4倍增加。在4倍应答者的数量方面,相对于安慰剂,疫苗组具有统计学显著的增加(11相对于0,通过费舍曼精确检验, $P<0.0000$)。相对于第0天的11.0的GMT(95%CI:5-23),安慰剂对象在第28天具有11.9的GMT(95%CI:6-25)。

[0139] 通过检测免疫之后180天的HAI应答来测量抗体应答的持久性。在疫苗免疫组中,75%(12名中有9名)的对象在第28天被血清保护,以及75%(12名中有9名)的对象在第180天仍被血清保护。绘制HAI GMT(图7B),并且在免疫后28天至180天,发现GMT降低28%。

[0140] 通过MN分析测量对流感的中和抗体应答。观察到治疗组中MN滴度相对于安慰剂对

照的显著增加(图7C)。疫苗治疗组中的4倍MN应答者的频率显著不同于安慰剂组,其中相对于安慰剂组中的0名,在疫苗治疗组中有11名对象应答(通过费舍曼精确检验得到 $P < 0.0000$)。

[0141] 在排除本底MN滴度(和HAI滴度)大于40的对象之后,如下述表中所示,在第0天和第28天,在剩余对象中计算几何平均滴度(GMT)。在第28天,疫苗组的GMT上升至247(95CI:89-685),而在安慰剂中GMT 9.6无上升(95CI:5-18)。这些计算对疫苗组没有影响,因为对象中没有具有一个具有较高的最初MN或HAI滴度。这些结果表明,通过口服免疫产生对流感的中和抗体滴度,在疫苗治疗组中,免疫之后的GMT具有大于20倍的增加。

分析	组	N	GMT D0	GMT D28	GMFR	SC
[0142] HAI	安慰剂	11	8.3	8.8	1.1	0%
	疫苗	12	7.9	61.1	7.7	75%
MN	安慰剂	9	9.3	9.6	1.0	N/A
	疫苗	12	8.6	247	29	N/A

[0143] 为了测量对HA的总的抗体应答,在免疫后的第0天和第7天,通过ASC分析测量外周血中的循环前浆B细胞的数目。结果显示,在疫苗治疗组中,在第7天可靠地测量到ASC(图7D)。在第0天,背景ASC通常可忽略。对于疫苗治疗组,在第7天,发现每 1×10^6 个PBMC存在992(+/-标准误差209,95%CI:532-1452) IgG ASC和337IgA ASC(+/-标准误差104,95%CI:117-580)的平均值,其中12名对象中只有1名对象具有不可检测的ASC应答。在第7天,安慰剂组不具有IgA斑点,但是一名对象具有较高的背景弥散以及比正常观察的斑点小的可测量IgG ASC应答。在第7天,在引起IgG或IgA ASC应答的能力方面,治疗组显著不同于安慰剂(通过T检验,分别得到 $P = 0.0007$ 和 $P = 0.008$)。

[0144] 回顾性地测量免疫前后对象的抗载体滴度。口服免疫之后,很少的疫苗治疗对象具有对Ad5的中和抗体应答的增加,其导致相比于安慰剂治疗对象中1.0倍GM倍数上升,GM中和抗体滴度2.6倍的增加。在疫苗组中,HAI和MN应答对于个体对象趋于类似。8名对象在免疫之前是Ad5阴性的,4名对象在免疫之前是Ad5阳性的。Ad5阳性的一名对象没有HAI血清转化,然而,Ad5阳性的一名对象在研究的任何对象中具有最高HAI滴度增加(64倍)。该同一对象具有362倍的MN滴度增加,而在免疫前后均没有Ad5中和抗体滴度的任何增加。对于用片剂疫苗免疫的对象,在起始Ad5滴度相对于倍数MN应答(或HAI应答)之间没有观察到相关性。

[0145] 而且,本公开的片剂疫苗在室温稳定大于270天,并且可耐受短期的较高温度偏离,其使得该方法技术上可行。

[0146] 实施例5讨论

[0147] US军队进行了独立的研究以在军队全体人员中测量季节性疫苗活动对中和抗体应答的影响,并且在解释了启动MN滴度在40以上的对象之后,报道了三价灭活疫苗(TIV)注射之后5.6的MN滴度GMFR以及在减毒活流感疫苗(LAIV)鼻内施用之后2.2的GMFR(Faix et al. (2012) PloS one 7:e34581)。在另一研究中,对于一次注射45 μ g HA蛋白(无佐剂),发现针对H1N1的SC率是45%(Gordon et al. (2012) Vaccine 30:5407),而在又一研究中,在1次剂量的裂解疫苗之后,H1N1疫苗是高度免疫原性的,观察到78%的SC率(Greenberg et al. (2009) 361:2405)。

[0148] 与用注射疫苗观察到的可变结果相反,在本研究中,在第29天,针对12名疫苗治疗对象,计算MN GMFR,其中92%的对象显示MN滴度大于4倍的上升。在本发明的片剂研究中,疫苗治疗对象之间的HAI SC率是75%,其中超过92%的对象具有HAI滴度的4倍上升(图7A)。MN滴度比HAI滴度高。可能的是,MN分析更灵敏,或者在头部之外,口服的基于rAd的疫苗引起的中和应答比蛋白注射疫苗强。

[0149] 用注射的商业疫苗引起HAI应答,但是已知HAI滴度衰退。例如,非HIV感染志愿者在免疫后1至6个月具有67%的GMT HAI滴度下降(Crum-Cianflone et al. (2011) Vaccine 29:3183)。类似地,对于入选的具有血清阴性HAI滴度(<1:10)的HIV阴性对象,血清保护对象的百分比从75%下降至56%。流行性流感疫苗的研究也显示了持久性的下降。在AS03禽流感疫苗研究中,在2次疫苗剂量之后,GMT达到563,但是在免疫后6个月,GMT下降至18,减少96%(Leroux-Roels et al. (2010) Vaccine 28:849)。在本发明的片剂疫苗研究中,血清保护对象的百分比在免疫后1个月和6个月时维持恒定的75%,以及HAI GMT的滴度下降不太显著,仅显示28%的减少(图7B)。一种可能性是,对于基于载体的疫苗,由于增加的T细胞应答,持久性更好。

[0150] 实施例5材料和方法

[0151] 临床方案和入选.在45天的入选期内,针对血凝抑制(HAI)滴度,对对象进行预筛。为了符合研究条件,参与对象必须具有 $\leq 1:20$ 的最初HAI滴度,年龄在18-49岁之间,并且健康状况良好。试验的有效期贯穿28天,监测安全性的随访期持续1年。

[0152] 24名对象入选。入选的所有对象在有效期以及监测期的180天完成安全性和免疫原性评估。

[0153] 随机化和掩码(Masking).研究被设计以在给予单剂量的 1×10^{11} 个感染单位(IU)的12名对象与给予安慰剂对照的12名对象中评价疫苗(VXA-A1·1)。有3名连续入选的前哨(sentinel)疫苗治疗对象,其中各对象不再频繁地每24小时给予一次。在监测疫苗相关的毒性一周之后,将治疗组群中的剩余对象(9)与12名安慰剂对照一起随机分配。通过电脑产生的分配进行随机分配,以及由非盲的药剂师将隐藏信息的研究药物分配至盲的工作人员。所有研究点的工作人员以及直接涉及免疫学分析或临床安全性评估的人员对治疗分配仍然是盲的。所有对象在研究中是盲的。

[0154] 疫苗.rAd载体(非复制Ad5)携带编码HA(A/CA/04/2009)转基因的DNA,所述DNA的表达由CMV启动子驱动,以及分子dsRNA发夹由单独的启动子驱动。GMP药物物质在Lonza Biologicals(Houston,TX)的Wave袋(GE Healthcare,Waukesha,WI)中产生。通过离子交换层析,随后通过缓冲液更换进行纯化。将纯化的载体与赋形剂混合,冻干,然后使用微晶纤维素和淀粉作为压片物在Lonza压片。使用Vector Hi-Coater系统(Vector Freund,Cedar Rapids,IA),用Eudragit L100®(Evonik Industries,Darmstadt,Germany)将片剂包被上肠溶包被。将终产物释放在一起,以及通过Lonza的标准IU分析进行滴定。安慰剂被制备为类似大小和形状的片剂,其含有150mg微晶纤维素,无肠溶包衣。

[0155] 端点.该研究的主要端点是安全性,以及次要端点是整个有效期的免疫原性,主要是HAI滴度和HAI血清转化。另外的免疫学端点包括MN滴度和ASC。在安慰剂组中存在5例不良事件,在疫苗组中有4例,在严重性方面其全部是1级。在本研究中,没有报道严重的不良事件。

[0156] PBMC的分离和低温保藏.将血液收集在K₃EDTA Vacutainer®管(BD, Franklin Lakes, NJ),并且同一天使用Lymphoprep™管(Axis-Shield, Norway)分离PBMC。根据生产商的说明书(Cellular Technology Ltd[CTL], Shaker Heights, OH),使用无血清试剂将PBMC冻融。

[0157] 抗体分泌细胞(ASC).根据生产商的说明书(Mabtech, Mariemont, OH),针对IgG和IgA分泌B细胞操作酶联免疫吸附(ELISpot)试剂盒。在含CTL测试培养基的三个重复孔中培养细胞(每孔 1.5×10^4 至 5×10^5 个细胞)以优化斑点。使用生物素化试剂盒(Pierce, Rockford, IL),对HA蛋白(Protein Sciences Corp, Meriden, CT)进行生物素化并定量。

[0158] 抗体分析.得到HAI和微中和(MN)滴度并分别针对MDCK来源的A/CA/07/2009和卵来源的A/CA/07/2009进行测量。如调控建议所提出的,HAI和MN滴度小于10被标示为5。

[0159] 统计分析.进行非配对学生t检验来检验组间的显著性差异。如文中所述,双尾费舍曼精确检验用来确定观察到的频率对于一些分析来说是否不同。对于两种检验,p值 ≤ 0.05 被认为是显著的。对于测量的值,提供95%的置信区间(95CI)。

[0160] 应理解,本文所描述的实例和实施方案仅出于示例的目的,以及鉴于此将会暗示本领域技术人员作出多种修饰或改变,并且所述多种修饰或改变被包括在本申请的精神和权限以及所附权利要求书的范围内。为了所有目的,将本文所引用的所有出版物、专利、专利申请、网址以及数据库登录入口通过引用整体在此并入。

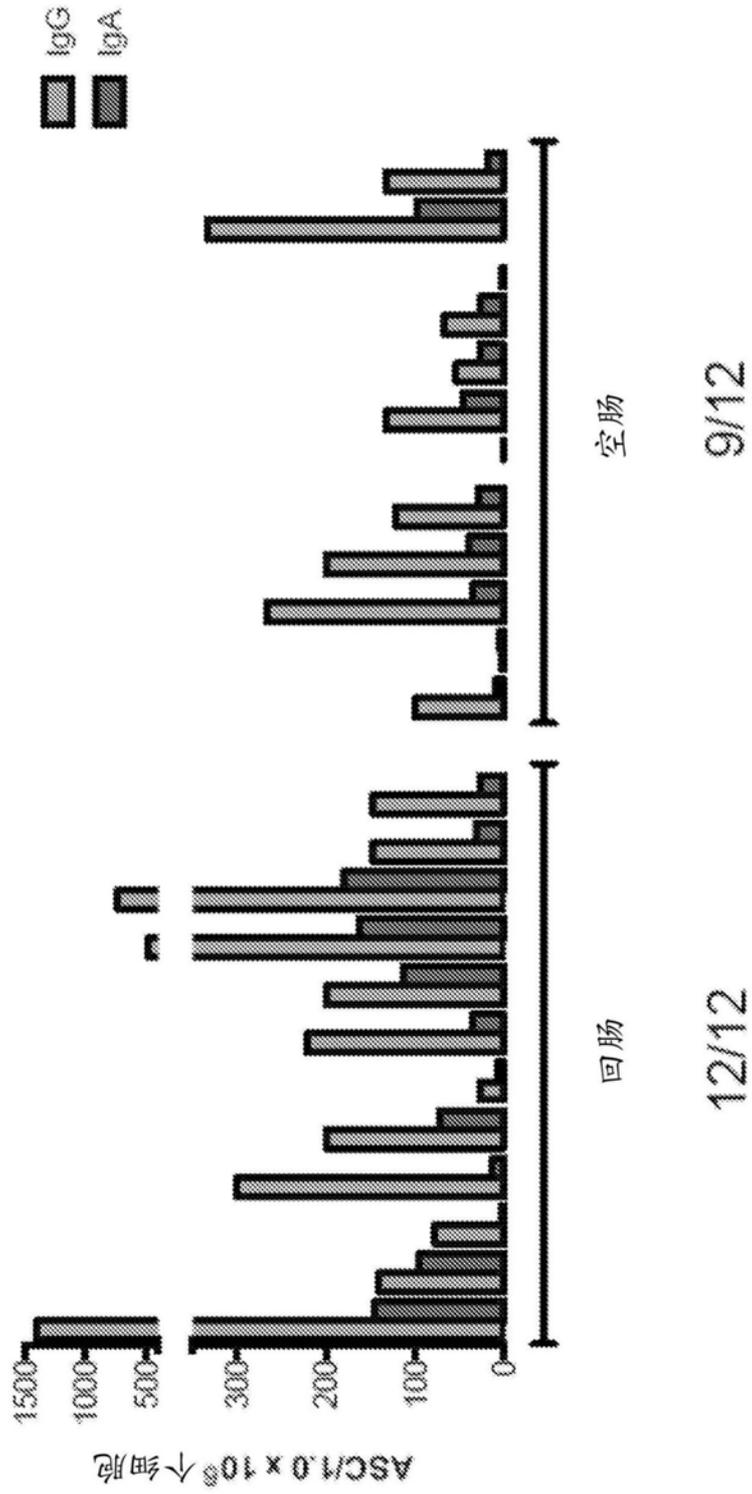


图1

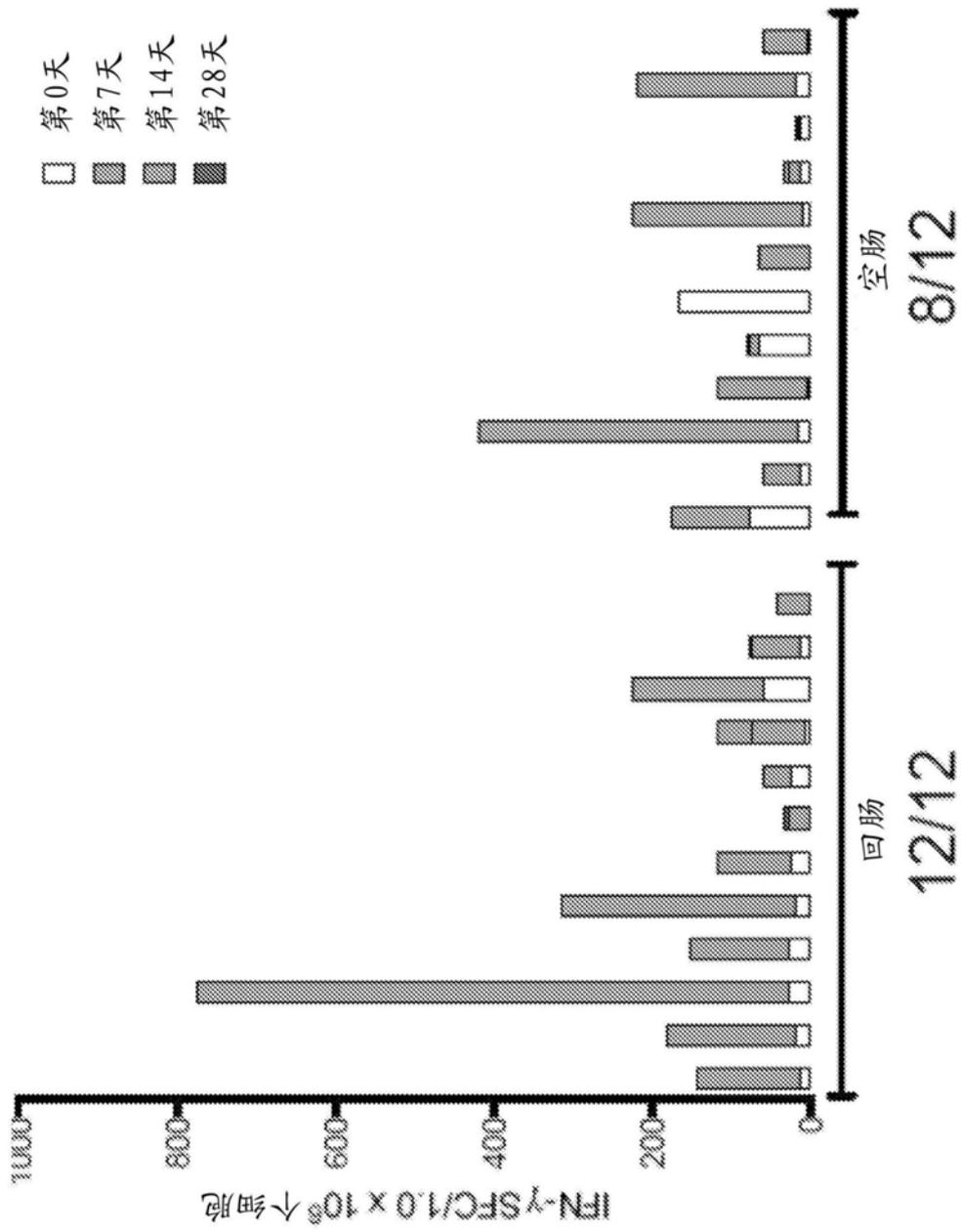


图2

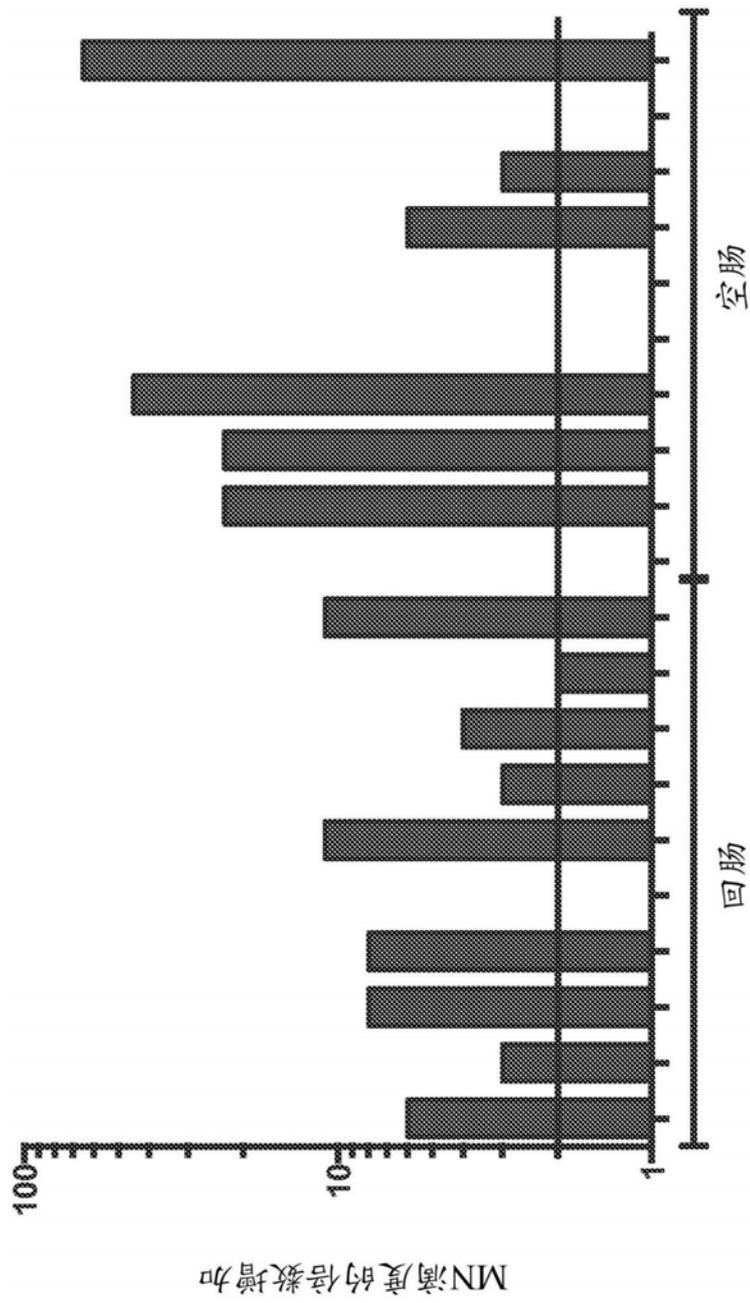


图3

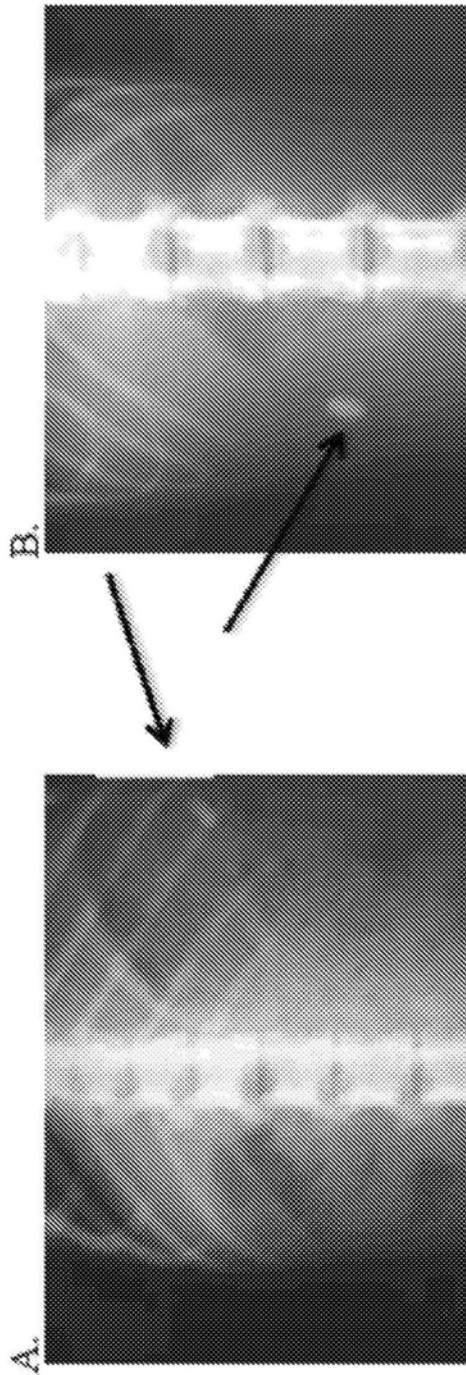


图4

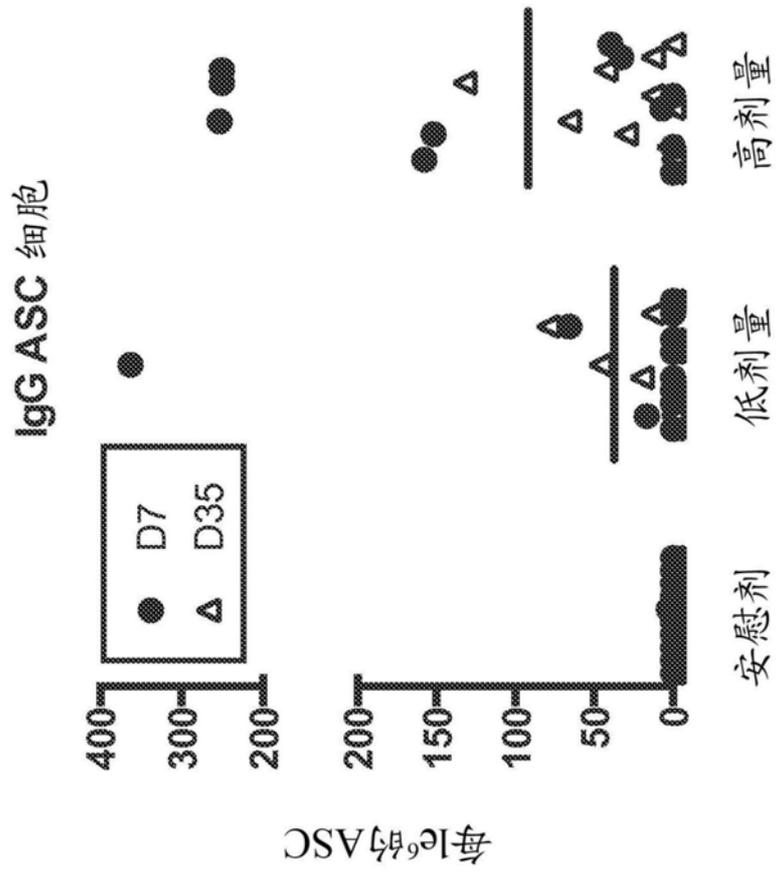


图5

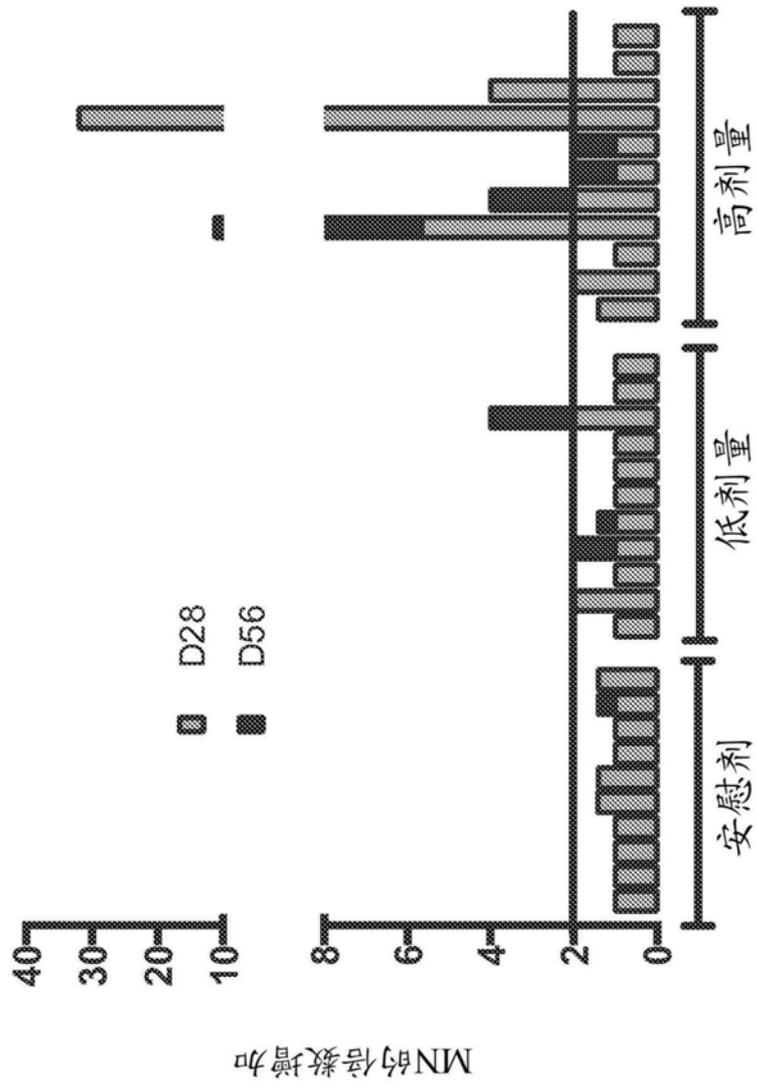


图6

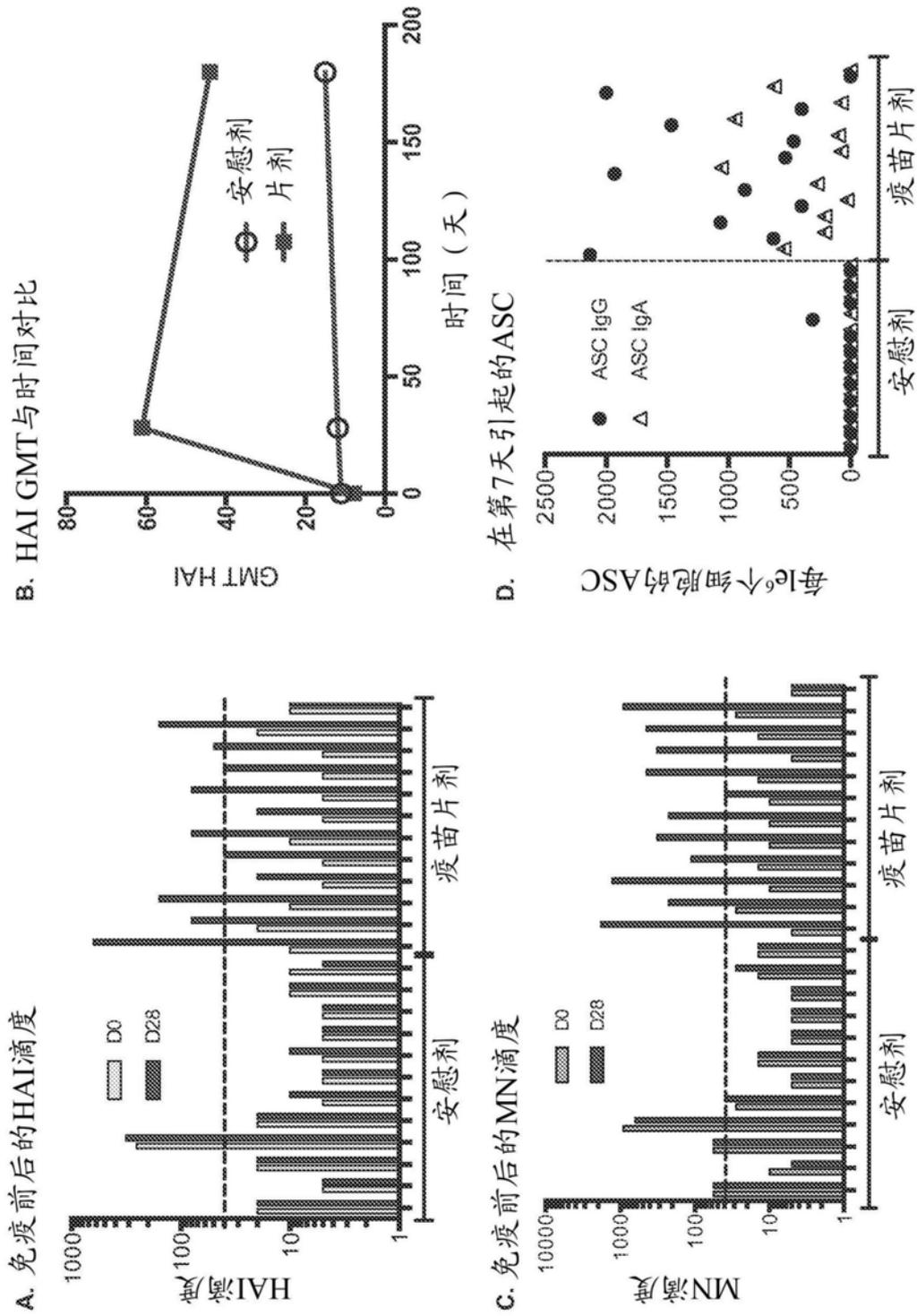


图7