



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104363892 A

(43) 申请公布日 2015.02.18

(21) 申请号 201380016135.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013.02.07

A61K 9/107(2006.01)

(30) 优先权数据

61/596,066 2012.02.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/025204 2013.02.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/119856 EN 2013.08.15

(71) 申请人 传染性疾病研究院

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 克里斯多佛·福克斯

史蒂文·G·里德 苏珊·鲍德温

托马斯·温德维克

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

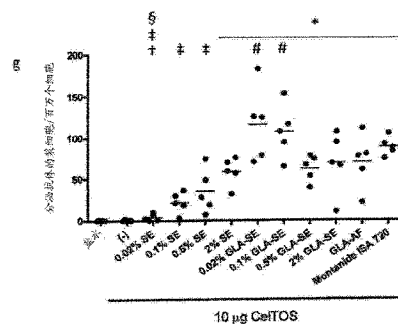
权利要求书2页 说明书43页 附图17页

(54) 发明名称

包含 TLR4 激动剂的改进佐剂制剂及其使用方法

(57) 摘要

公开了用于诱导或增强免疫应答的制剂和方法,包括疫苗和药学组合物。所述制剂通常包含 TLR4 激动剂和浓度为约 0.01% -1% v/v 的可代谢油,其中所述乳剂的疏水:亲水平衡 (HLB) 大于约 9。



*p<0.05 vs. Ag
 #p<0.05 vs. 相同百分比的油 +/- GLA
 \$p<0.05 vs. 2% SE
 †p<0.05 vs. GLA-AF
 ‡p<0.05 vs. Montanide

1. 水包油乳剂,其包含 TLR4 激动剂和可代谢油,其中所述可代谢油以约 0.01% -1% v/v 的浓度存在于所述水包油乳剂中,并且其中所述水包油乳剂的疏水:亲水平衡 (HLB) 大于约 9。

2. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述可代谢油以约 0.01% -0.5% v/v 的浓度存在于所述水包油乳剂中。

3. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述乳剂还包含 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DMPC)。

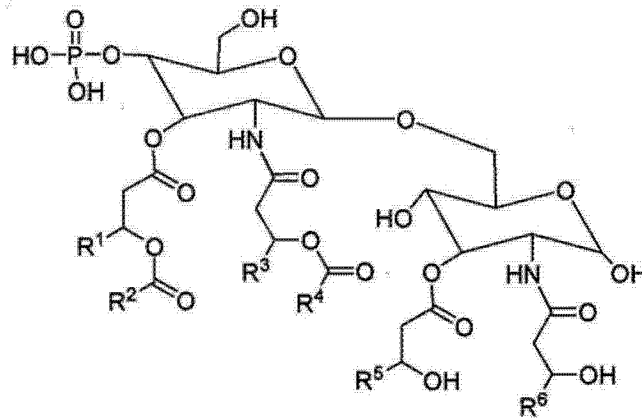
4. 如权利要求 3 所述的水包油乳剂,其中所述乳剂不包含抗氧化剂。

5. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述乳剂的 HLB 大于约 10。

6. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述乳剂的 HLB 为约 9-12。

7. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述 TLR4 激动剂包括 MPL、3D-MPL 或合成 GLA 佐剂。

8. 如权利要求 7 所述的水包油乳剂,其中所述合成 GLA 佐剂具有以下结构:



其中:R¹、R³、R⁵ 和 R⁶ 为 C₁₁-C₂₀ 烷基;并且 R² 和 R⁴ 为 C₁₂-C₂₀ 烷基。

9. 如权利要求 8 所述的水包油乳剂,其中 R¹、R³、R⁵ 和 R⁶ 为 C₁₁ 烷基;并且 R² 和 R⁴ 为 C₁₃ 烷基。

10. 如权利要求 8 所述的水包油乳剂,其中 R¹、R³、R⁵ 和 R⁶ 为 C₁₀ 烷基;并且 R² 和 R⁴ 为 C₈ 烷基。

11. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述乳剂还包含表面活性剂。

12. 如权利要求 11 所述的水包油乳剂,其中所述表面活性剂为普朗尼克 F68。

13. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述可代谢油为角鲨烯。

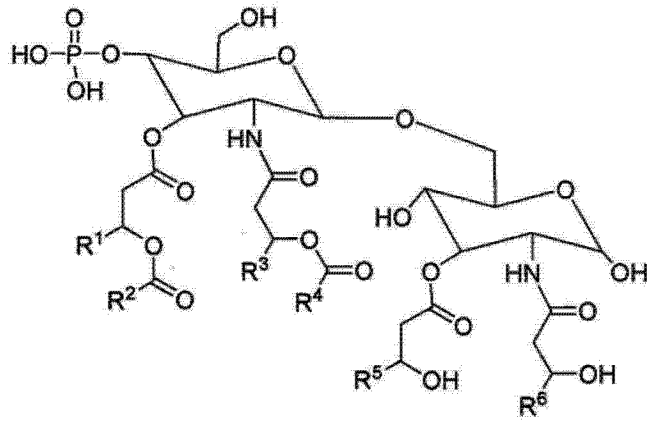
14. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述乳剂还包含抗氧化剂。

15. 如权利要求 14 所述的水包油乳剂,其中所述抗氧化剂为维生素 E。

16. 如权利要求 1 所述的水包油乳剂,其中所述乳剂还包含至少一种抗原。

17. 水包油乳剂,其包含合成 GLA 佐剂、浓度为约 0.01% -1% v/v 的可代谢油和浓度为约 0.002% -2% DMPC 的 DMPC,其中所述乳剂的 HLB 大于约 10。

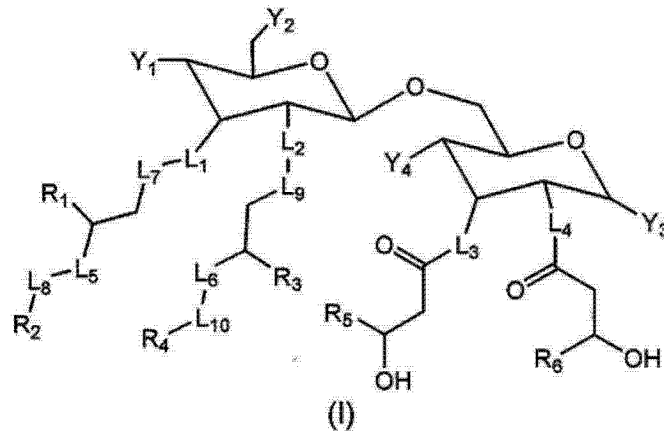
18. 如权利要求 17 所述的水包油乳剂,其中所述合成 GLA 佐剂具有以下结构:



其中：R¹、R³、R⁵ 和 R⁶ 为 C₁₁-C₂₀ 烷基；并且 R² 和 R⁴ 为 C₁₂-C₂₀ 烷基。

19. 如权利要求 18 所述的水包油乳剂，其中 R¹、R³、R⁵ 和 R⁶ 为 C₁₁ 烷基；并且 R² 和 R⁴ 为 C₁₃ 烷基。

20. 如权利要求 17 所述的水包油乳剂，其中所述合成 GLA 佐剂具有以下结构或其药学可接受的盐：



其中：

L₁、L₂、L₃、L₄、L₅ 和 L₆ 相同或不同，并独立地为 -O-、-NH- 或 -(CH₂)-；

L₇、L₈、L₉ 和 L₁₀ 相同或不同，并独立地为不存在或为 -C(=O)-；

Y₁ 是酸官能团；

Y₂ 和 Y₃ 相同或不同，并独立地为 -OH、-SH 或酸官能团；

Y₄ 为 -OH 或 -SH；

R₁、R₃、R₅ 和 R₆ 相同或不同，并独立地为 C₈₋₁₃ 烷基；以及

R₂ 和 R₄ 相同或不同，并独立地为 C₆₋₁₁ 烷基。

21. 如权利要求 20 所述的水包油乳剂，其中 R¹、R³、R⁵ 和 R⁶ 为 C₁₀ 烷基；并且 R² 和 R⁴ 为 C₈ 烷基。

22. 用于刺激个体的免疫应答的方法，其包括向所述个体给予权利要求 1 至 21 中任一所述的水包油乳剂，由此刺激所述个体的免疫应答。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述免疫应答为非特异性免疫应答。

24. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述免疫应答为抗原特异性免疫应答。

25. 如权利要求 22 所述的方法，其中真皮内给予所述水包油乳剂。

包含 TLR4 激动剂的改进佐剂制剂及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2012 年 2 月 7 日提交的第 61/596,066 号美国临时申请的优先权, 该临时申请的内容以引用方式全部并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 发明领域

[0005] 本发明涉及药物和疫苗制剂领域。更具体地, 本文描述的实施方案涉及药物和疫苗制剂, 特别是水包油乳剂, 其中所述组合物包含诸如吡喃葡萄糖脂佐剂 (glucopyranosyl lipid adjuvant, GLA) 的 TLR4 激动剂。

[0006] 相关技术描述

[0007] 高级生物体的免疫系统特征在于为区分外源物 (或“非己”物) 与亲近的或“自身”组分, 这使得外源物诱发免疫应答而“自身”组分被忽略或耐受。免疫应答传统上被表征为体液应答或细胞介导的应答, 其中在体液应答中由称为浆细胞的分化的 B 淋巴细胞产生抗原特异性抗体, 在细胞介导的应答中不同类型的 T 淋巴细胞通过多种机制作用于清除抗原。例如, 能识别特异性抗原的 CD4⁺ 辅助 T 细胞可以通过释放诸如细胞因子的可溶性介质来募集免疫系统的其他细胞从而作出应答以参与免疫应答。同样, 也能识别特异性抗原的 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞可以通过结合到携带抗原的细胞或颗粒并破坏或损伤所述细胞或颗粒来作出应答。通常为诱导宿主所需的免疫应答, 提供根据多种不同制剂的某些疫苗, 这在免疫学领域是已知的。

[0008] 例如, 已经描述了用于配制佐剂组合物的某些乳剂系统, 包括单相或多相乳剂系统。已建议水包油乳剂佐剂自身可用作佐剂组合物 (EP 0399843 B), 水包油乳剂和其他活性剂的组合也已经被描述为用于疫苗的佐剂 (WO 95/17210 ;WO 98/56414 ;WO 99/12565 ;WO 99/11241)。已描述了其他油乳剂佐剂, 诸如油包水乳剂 (美国专利第 5,422,109 号 ;EP 0480982 B2) 和水包油包水乳剂 (美国专利第 5,424,067 号 ;EP 0480981 B)。

[0009] 尽管这些已知方法用于生产乳剂系统以制备佐剂组合物, 但当前的乳剂佐剂组合物仍存在诸多缺点。因此, 需要其他改进的乳剂佐剂组合物, 例如包含 TLR4 激动剂的水包油乳剂制剂。如本文所述, 本发明满足这些需求并提供了其他相关优点。

[0010] 发明简述

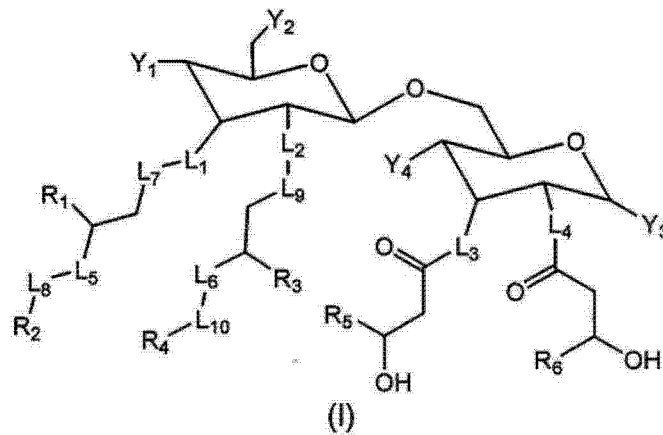
[0011] 根据一方面, 本发明提供了包含 TLR4 激动剂和可代谢油的水包油乳剂, 其中所述可代谢油以约 0.01% -1% v/v 或优选约 0.01% -0.5% v/v 的浓度存在于所述水包油乳剂中, 其中所述水包油乳剂的疏水 : 亲水平衡 (HLB) 大于约 9、或大于约 10、或为约 9-12。

[0012] 本文还提供了包含 TLR4 激动剂、可代谢油和表面活性剂的水包油乳剂, 其中所述可代谢油以约 0.01% -1% v/v 或优选约 0.01% -0.5% v/v 的浓度存在于所述水包油乳剂中。在一些实施方案中, 可代谢油浓度低于 1% v/v。在一些实施方案中, 水包油乳剂的疏水 : 亲水平衡 (HLB) 大于约 9、或大于约 10、或为约 9-12。

[0013] 用于本发明水包油乳剂的 TLR4 激动剂可以选自本领域已知且可得 TLR4 激动剂。在某些具体实施方案中, TLR4 激动剂选自 MPL、3D-MPL 或合成 GLA 佐剂。

[0014] 在一些实施方案中,合成 GLA 佐剂具有以下结构或其药学可接受的盐:

[0015]



[0016] 其中:

[0017] L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 和 L_6 相同或不同,并独立地为 $-O-$ 、 $-NH-$ 或 $-(CH_2)-$;

[0018] L_7 、 L_8 、 L_9 和 L_{10} 相同或不同,并独立地为不存在或为 $-C(=O)-$;

[0019] Y_1 是酸官能团;

[0020] Y_2 和 Y_3 相同或不同,并独立地为 $-OH$ 、 $-SH$ 或酸官能团;

[0021] Y_4 为 $-OH$ 或 $-SH$;

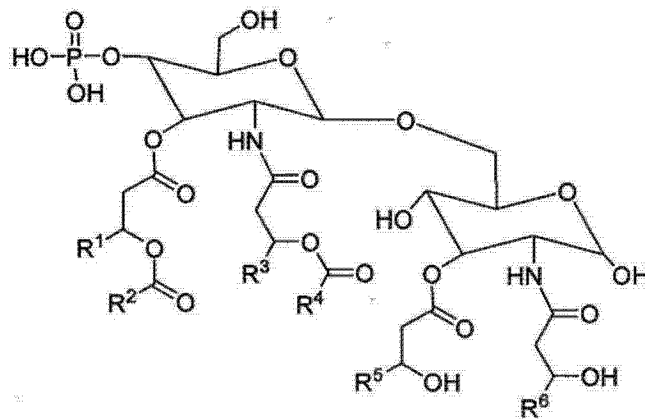
[0022] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 相同或不同,并独立地为 C_{8-13} 烷基;以及

[0023] R_2 和 R_4 相同或不同,并独立地为 C_{6-11} 烷基。

[0024] 在合成 GLA 结构的一些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{10} 烷基;并且 R^2 和 R^4 为 C_8 烷基。

[0025] 例如,在更具体的实施方案中,水包油乳剂包含具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

[0026]

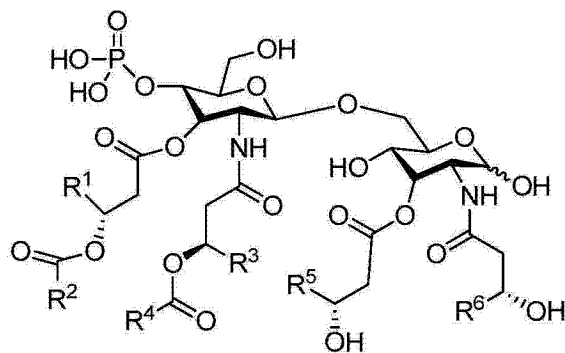


[0027] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 $C_{11}-C_{20}$ 烷基;并且 R^2 和 R^4 为 $C_{12}-C_{20}$ 烷基。在更具体的实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基;并且 R^2 和 R^4 为 C_{13} 烷基。在另一更具体的实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{10} 烷基;并且 R^2 和 R^4 为 C_8 烷基。

[0028] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 $C_{11}-C_{20}$ 烷基;并且 R^2 和 R^4 为 C_9-C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基;并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

[0029] 在某些实施方案中,水包油乳剂包含具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

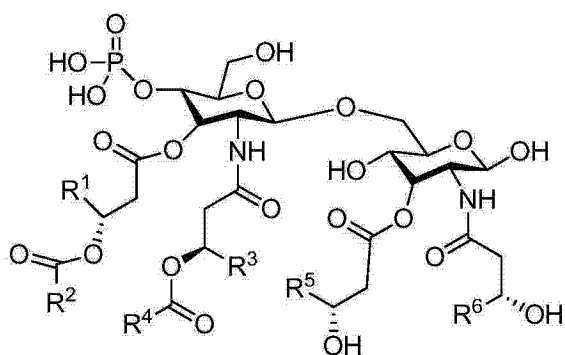
[0030]



[0031] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} - C_{20} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 - C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

[0032] 在某些实施方案中, 水包油乳剂包含具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

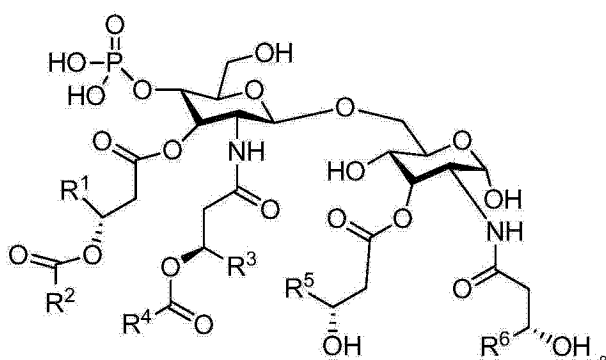
[0033]



[0034] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} - C_{20} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 - C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

[0035] 在某些实施方案中, 水包油乳剂包含具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

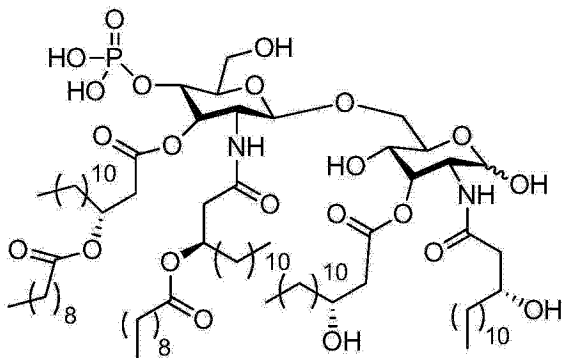
[0036]



[0037] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} - C_{20} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 - C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

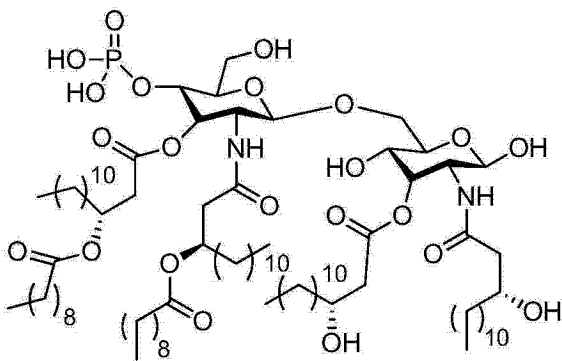
[0038] 在某些实施方案中, 水包油乳剂包含具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

[0039]



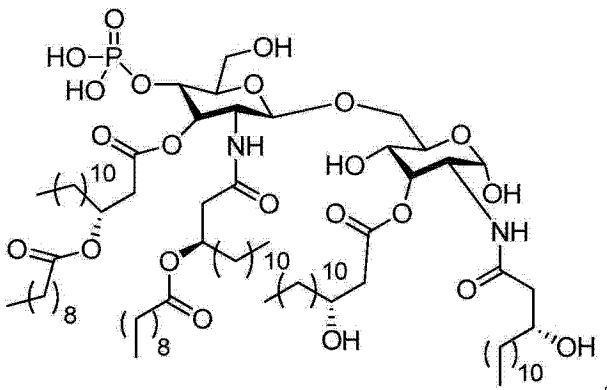
[0040] 在某些实施方案中,水包油乳剂包含具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

[0041]



[0042] 在某些实施方案中,水包油乳剂包含具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

[0043]



[0044] 应理解,本发明的乳剂可以包含对预期作用所必要或所需要的其他组分。例如,在某些实施方案中,本发明的水包油乳剂还包含 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)。在一些实施方案中,水包油乳剂中的 DMPC 是合成的。在一些实施方案中,水包油乳剂包含 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)。在一些实施方案中,水包油乳剂中的 POPC 是合成的。在一些实施方案中,水包油乳剂包含 1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)。在一些实施方案中,水包油乳剂中的 DOPC 是合成的。在其他实施方案中,乳剂还包含表面活性剂,例如普朗尼克 F68。在其他实施方案中,乳剂还包含抗氧化剂,例如维生素 E。

[0045] 用于本发明乳剂的可代谢油可以选自多种可得来源中的任一种。在某些实施方案中,可代谢油包括角鲨烯。在其他实施方案中,可代谢油包括源自酵母的角鲨烯。在其他实

施方案中,可代谢油包括源自酵母的类异戊二烯,其在结构上与角鲨烯不同。

[0046] 当然,应理解,可以在存在一种或多种抗原的情况下使用乳剂,从而诱发抗原特异性免疫应答。或者,可以在不存在抗原的情况下使用乳剂,从而诱发非特异性免疫应答。

[0047] 在另一方面,本发明提供了包含 TLR4 激动剂(例如合成 GLA 佐剂)、可代谢油、以及 DMPC 或 DOPC 的水包油乳剂。在一些实施方案中,水包油乳剂中的可代谢油浓度为约 0.01% -20% (例如约 10%、约 5%、约 2%、约 1%、约 0.5%、约 0.2%)。在一些实施方案中,水包油乳剂中的 DMPC 或 DOPC 浓度为约 0.002% -2%。在一些实施方案中,乳剂的 HLB 大于约 9 或约 10。在一些实施方案中,DMPC 或 DOPC 浓度为约 0.015% -0.25%。在一些实施方案中,乳剂中的 DMPC 或 DOPC 是合成的。

[0048] 在本发明的一个具体实施方案中,提供了水包油乳剂,其包含合成 GLA 佐剂、浓度为约 0.01% -1% v/v 的可代谢油、以及浓度为约 0.002% -2% DMPC 的 DMPC,其中该乳剂的 HLB 大于约 10。在一些实施方案中,DMPC 浓度为约 0.015% -0.25%。

[0049] 本发明还提供了用于刺激个体的免疫应答的方法,其包括向所述个体给予本文所述的水包油乳剂,由此刺激所述个体的免疫应答。当然,所述方法可以用于诱发非特异性免疫应答,其中所述乳剂不包含抗原。更典型地,所述乳剂将包含一种或多种抗原,以使免疫应答为抗原特异性免疫应答。

[0050] 参照下面的详细描述和附图,本发明的这些和其他方面会变得显而易见。此外,本文提及的、更为详细地描述本发明的某些方面的各种参考文献均以引用方式全部并入本文。

[0051] 附图简述

[0052] 图 1. 如 HPLC-CAD 所测量的在 GLA-AF 批次中随时间的 GLA 浓度。点线表示 HPLC 方法的规格上限和规格下限。

[0053] 图 2. 对包含乳剂剂量为 0.02% -2% v/v 油的各种佐剂制剂的 PfCelTOS 疫苗的抗体应答,在第 2 次和第 3 次免疫接种之后所测量。上格从左向右:(a-c) IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体终点滴度,在第 2 次免疫接种后 3 周测量。下格从左向右:(d-f) IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体终点滴度,在第 3 次免疫接种后 3 周测量。(g) 在第 3 次免疫接种后 3 周检测的骨髓中长期存活的分泌抗体的细胞。

[0054] 图 3. 对包含乳剂剂量为 0.5% -2% v/v 油的各种佐剂制剂的 PfCelTOS 疫苗的抗体应答,在第 2 次和第 3 次免疫接种之后所测量。上格从左向右:(a-c) IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体终点滴度,在第 2 次免疫接种后 3 周测量。下格从左向右:(d-f) IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体终点滴度,在第 3 次免疫接种后 3 周测量。(g) 在第 3 次免疫接种后 3 周检测的骨髓中长期存活的分泌抗体的细胞。

[0055] 图 4. 在第 3 次免疫接种后 3 周由 ELISPOT 测定所检测的产生抗原特异性细胞因子的细胞。(a) 产生 IFN- γ 的细胞。(b) 产生 IL-5 的细胞。

[0056] 图 5. 在第 3 次免疫接种后 3 周由多重微珠测定(multiplex bead assay, **Luminex**[®])检测的抗原特异性细胞因子产生。(a) IL-2(b) IL-5(c) IL-10(d) IL-13(e) IL-17(f) IFN- γ (g) TNF- α 。

[0057] 图 6. 佐剂制剂的粒径和分散度。

[0058] 图 7. 在各种贮存温度下的乳剂粒径稳定性。示出了在 (a) 5°C (顶部左图), (b)

RT(顶部右图), (c) 37°C(底部左图)和 (d) 60°C(底部右图)下贮存之后的结果。使用 Malvern Instruments APS 测量粒径, 并且误差条表示来自各乳剂的一批次的三个单独等分部分的标准尺寸偏差。

[0059] 图 8. 乳剂稳定性的激光散射光学分布分析。包含乳剂的比色杯的 25-30mm 区域的积分透射曲线, 在 60°C 下 4 小时内测量。

[0060] 图 9. 乳剂对通过用重组疟疾抗原免疫接种而诱导的抗体应答的作用。用与乳剂一起配制的 PbCSP 抗原对 BALB/c 小鼠进行免疫两次, 所述乳剂包含蛋黄 PC 或合成 PC, 包括 POPC、DOPC 和 DMPC。通过 ELISA 测定抗原特异性 IgG(a)、IgG1(b) 和 IgG2a(c)。n = 5 个 / 组, 并且数据示为来自单个小鼠的数值 (Log_{10}) 和表示均值的条。* = 相对于仅用蛋白的免疫接种 p- 值 < 0.05。

[0061] 图 10. 佐剂制剂在通过用失活裂解 - 病毒流感疫苗 (Fluzone) 免疫接种而诱导的体液免疫应答中的作用。用与乳剂一起配制的 Fluzone 对 BALB/c 小鼠进行免疫, 所述乳剂包含蛋黄 PC 或合成 PC, 包括 POPC、DOPC 和 DMPC。通过 ELISA 测定抗原特异性 IgG(a)、IgG1(b) 和 IgG2a(c)。通过 ELISPOT 测定针对 Fluzone 的分泌 IgG 的骨髓浆细胞 (d)。(a-c) 的结果示为终点滴度 (Log_{10}), 每一点表示单个小鼠并且条表示均值。(d) 的结果也表示各组中的单个小鼠, 条表示均值 ASPC/ 组。* = 相对于仅用疫苗的免疫接种 p- 值 < 0.05, 而 # = 相对于用包含 DMPC 乳剂的疫苗的免疫接种 p- 值 < 0.05。

[0062] 图 11. 通过用与蛋黄 PC 或合成 PC 一起配制的 Fluzone 免疫接种来增强 HI 滴度。用 Fluzone 和各种乳剂对 BALB/c 小鼠进行免疫, 然后在加强后 4 周测定血清 HI 滴度。(a) 针对 Fluzone 的 A/ 所罗门岛 (Solomon Islands) /3/2006 (H1N1) 组分的 HI 滴度。(b) 针对 Fluzone 的 A/ 威斯康辛州 (Wisconsin) /67/2005 (H3N2) 组分的 HI 滴度。数据示为每一个动物的 (Log_2) 滴度, 条表示均值。* = 相对于仅用疫苗的免疫接种 p- 值 < 0.05, 而 # = 相对于用包含 POPC 乳剂或 DMPC 乳剂的疫苗的免疫接种 p- 值 < 0.05。

[0063] 图 12. 在用与乳剂一起配制的 Fluzone 免疫接种之后, 产生 IL-5 的细胞增加。用 (a) 5HAU 的失活 A/ 所罗门岛 /3/2006 (H1N1) 或 (b) 2HAU 的失活 A/ 威斯康辛州 /67/2005 (H3N2) 刺激用 Fluzone 和各种乳剂进行免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞, 并且通过 ELISPOT 测定产生 IL-5 的细胞。数据表示为单个小鼠 / 组的每百万个脾细胞的斑点形成单位 (SFU) 的数量, 条表示均值, n = 5 个 / 组。* = 相对于仅用疫苗的免疫接种 p- 值 < 0.05, 而 # = 相对于用包含 DMPC 乳剂的疫苗的免疫接种 p- 值 < 0.05。

[0064] 发明详述

[0065] 本发明在其诸多方面提供了包含 TLR4 激动剂的乳剂组合物, 特别是包含 TLR4 激动剂的水包油乳剂, 以及将其用作佐剂和免疫刺激组合物的相关方法。

[0066] 如本文所讨论的, 本发明的制剂通常包含含有 TLR4 激动剂和可代谢油的水包油乳剂, 其中所述可代谢油以约 0.01% - 1% v/v 或约 0.01% - 0.5% v/v 的浓度存在于所述水包油乳剂中, 并且其中所述水包油乳剂的疏水 : 亲水平衡 (HLB) 大于约 9、或大于约 10、或为约 9-12。

[0067] 用于测定乳剂的 HLB 的方法是本领域已知的。参见例如万维网 firp.ula.ve/archivos/historicos/76_Book_HLB_ICI.pdf 和 chemistscorner.com/hlb-the-easiest-way-to-create-an-emulsion/。

[0068] 用于本发明的油乳剂佐剂可以是天然的或合成的,并且可以是矿物的或有机的。矿物油和有机油的实例对本领域技术人员是显而易见的。

[0069] 在特定实施方案中,本发明的组合物包含水包油乳剂,其中将 TLR4 激动剂并入油相。为了使水包油组合物适于人类给药,乳剂系统的油相优选包含可代谢油。术语可代谢油的含义是本领域熟知的。可代谢可以定义为“能够通过代谢而转化”(Dorland's illustrated Medical Dictionary, W. B. Saunders Company, 第 25 版 (1974))。油可以为任何植物油、食用植物油 (vegetable oil)、鱼油、动物油或合成油,其对接受者是无毒的并且能够通过代谢而转化。坚果 (例如花生油)、种子和谷物是食用植物油的常见来源。还可以使用合成油。

[0070] 在某些例示的实施方案中,本发明的制剂包含以约 0.01% -1% v/v、约 0.01% -0.5% v/v、约 0.5% v/v 或约 0.2% v/v 的浓度存在的可代谢油。在一些实施方案中,可代谢油以低于 1% v/v 的浓度存在。本发明可用的例示的可代谢油包括但不限于角鲨烯、大豆油、芝麻油和辛酸 / 癸酸甘油三酯 (MIGLYCOL 810 油)。在一优选的实施方案中,可代谢油包括角鲨烯。在更具体的实施方案中,可代谢油包括一种或多种源自酵母的类异戊二烯,例如源自酵母的角鲨烯或源自酵母的相关类异戊二烯结构。

[0071] 例如,角鲨烯 (2, 6, 10, 15, 19, 23- 六甲基 -2, 6, 10, 14, 18, 22- 二十四碳六烯) 是不饱和油,其在鲨鱼肝油中大量得到,并且在橄榄油、麦芽 (wheat germ oil)、米糠油和酵母中少量得到,并且所述角鲨烯是用于本发明的优选的油。角鲨烯是由于以下事实而成为可代谢油,即,其是胆固醇生物合成中的中间体 (默克索引, 第 10 版, 登记号 8619)。

[0072] 在其他例示的实施方案中,本发明的某些制剂包含抗氧化剂。可用于本发明的乳剂的例示的抗氧化剂包括但不限于生育酚和抗坏血酸,并且生育酚是优选的。

[0073] 在其他例示的实施方案中,本发明的某些制剂包含表面活性剂。可用于本发明的表面活性剂是 Pluronic F68、Tween80、聚山梨醇酯 80 (CAPMUL POE-0 低 PV 表面活性剂, ABITEC Corp., Janesville, Wis.)、聚乙烯 66012- 羟基硬脂酸酯 (SOLUTOL HS15, BASF Corp., Chicago, Ill.) 以及泊洛沙姆 188 (PLURONIC Q F68 嵌段共聚物, BASF Corp., Chicago, Ill.)、胆酸钠、甘氨酸胆酸盐、磷脂酰胆碱,并且泊洛沙姆 188 是优选的。其他合适的表面活性剂包括鞘脂如鞘磷脂和鞘氨醇,以及磷脂如蛋黄磷脂酰胆碱、1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸乙醇胺、L- α - 磷脂酰乙醇胺和 1, 2- 二棕榈酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱 (DPPC) 或其混合物。DPPC 对于用于人类是可接受的。在一些实施方案中,表面活性剂是 DMPC、DOPC 和 / 或 POPC (包括合成的 DMPC、DOPC 和 POPC)。可以使用一种或多种表面活性剂。

[0074] 此外,在其他例示的实施方案中,本发明的某些制剂具有大于约 9 或大于约 10 或大于约 11 的疏水 : 亲水平衡 (HLB)。在其他相关实施方案中,制剂具有约 9-12、约 10-12 或约 10-11 的 HLB。

[0075] 在某些其他例示的实施方案中,本发明的制剂包括磷脂 1, 2- 二肉豆蔻酰 -sn- 甘油 -3- 磷酸胆碱 (DMPC), 特别是合成的 DMPC。此外,在其中乳剂包含 DMPC 的一些实施方案中,乳剂不包含抗氧化剂。此外,在其中乳剂包含 DMPC 的一些实施方案中,乳剂具有大于约 9、或大于约 10、或大于约 11 的 HLB, 或具有约 9-12、约 10-12、或约 10-11 的 HLB。在制剂包含 DMPC 的情况下,该制剂通常不包含蛋黄磷脂酰胆碱 (PC)。

[0076] 可以向本发明的乳剂添加以使佐剂等渗的试剂包括葡萄糖、甘油、甘露醇、山梨醇、PEG300、PEG400 和聚乙二醇。

[0077] 例示的油乳剂是水包油乳剂，并且特别是水包角鲨烯乳剂。此外，本发明的最优的油乳剂包含抗氧化剂，其优选为油 α -生育酚（维生素 E，EP 0 382 271 B1）。WO 95/17210 和 WO 99/11241 公开了基于角鲨烯、 α -生育酚和TWEEN® 80 的任选与免疫刺激剂 QS21 和 / 或 3D-MPL 一起配制的乳剂佐剂（其如上所讨论）。WO 99/12565 公开了通过向油相添加固醇的对这些角鲨烯乳剂的改进。此外，可以向油相添加甘油三酯如三辛酸精 ($C_{27}H_{50}O_6$)，从而使乳剂稳定 (WO 98/56414)。

[0078] 在稳定的水包油乳剂内得到的油滴的尺寸优选小于 1 微米，其直径可以为基本 30-600nm，优选为基本约 30-500nm，并且最优选为基本 150-500nm，并且特别为约 150nm，如光子相关光谱法所测量的。对此，80% 的油滴（以数量计）应在优选的范围内，更优选大约 90% 且最优选大于 95% 的油滴（以数量计）在定义的尺寸范围内。

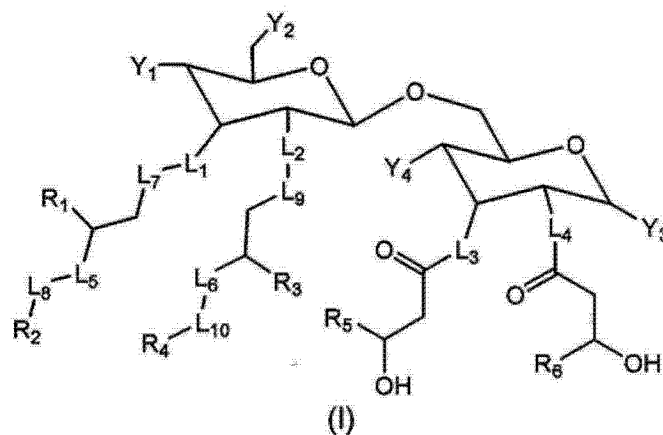
[0079] 制备水包油乳剂的方法是本领域技术人员熟知的。通常，该方法包括将油相与合适的表面活性剂如PBS/TWEEN80®溶液混合，然后使用均化器进行均化。例如，包括使混合物一次、两次或三次通过注射器针头的方法将适于均化小体积的液体。同样地，在微流化器（M110S 微流体机，最大 50 个通路，在 6 巴的最大压力输入（输出压力为约 850 巴）下持续 2 分钟时段）中的乳化过程可以经改变而用于制备更小或更大体积的乳剂。这种改变可以通过常规实验而实现，所述常规实验包括测量所得的乳剂，直至获得具有所需直径的油滴的制剂。

[0080] TLR4 激动剂

[0081] 在某些实施方案中，用于本发明制剂的 TLR4 激动剂包括吡喃葡萄糖脂佐剂 (GLA)，例如在第 US2007/021017、US2009/045033、US2010/037466 和 US 2010/0310602 号美国专利公开中所描述的那些，所述专利的内容通过引用全部并入本文。

[0082] 例如，在某些实施方案中，TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂或其药学可接受的盐：

[0083]



[0084] 其中：

[0085] L_1 、 L_2 、 L_3 、 L_4 、 L_5 和 L_6 相同或不同，并独立地为 $-O-$ 、 $-NH-$ 或 $-(CH_2)-$ ；

[0086] L_7 、 L_8 、 L_9 和 L_{10} 相同或不同，并独立地为不存在或为 $-C(=O)-$ ；

[0087] Y_1 是酸官能团；

[0088] Y_2 和 Y_3 相同或不同，并独立地为 $-OH$ 、 $-SH$ 或酸官能团；

[0089] Y_4 为 $-OH$ 或 $-SH$ ；

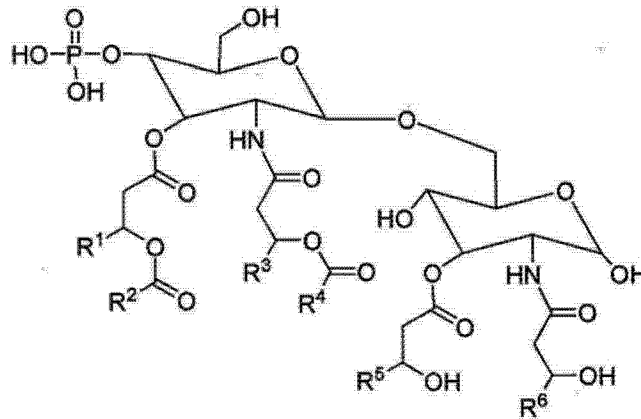
[0090] R_1 、 R_3 、 R_5 和 R_6 相同或不同，并独立地为 C_{8-13} 烷基；以及

[0091] R_2 和 R_4 相同或不同，并独立地为 C_{6-11} 烷基。

[0092] 在合成 GLA 结构的一些实施方案中， R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{10} 烷基；并且 R^2 和 R^4 为 C_8 烷基。

[0093] 例如，在某些实施方案中，TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂：

[0094]



[0095] 在具体的实施方案中， R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 $C_{11}-C_{20}$ 烷基；并且 R^2 和 R^4 为 $C_{12}-C_{20}$ 烷基。

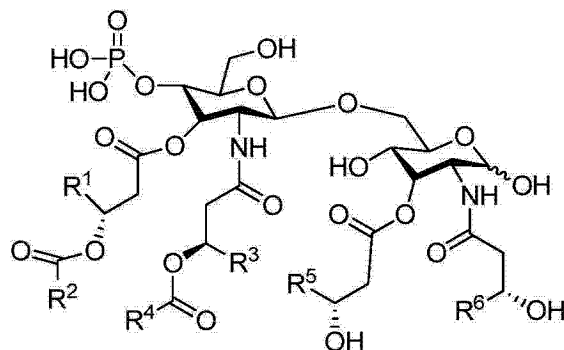
[0096] 在另一具体实施方案中，GLA 具有上述通式，其中 R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_{11} 烷基；并且 R^2 和 R^4 是 C_{13} 烷基。

[0097] 在另一具体实施方案中，GLA 具有上述通式，其中 R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_{10} 烷基；并且 R^2 和 R^4 是 C_8 烷基。

[0098] 在另一具体实施方案中，GLA 具有上述通式，其中 R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 $C_{11}-C_{20}$ 烷基；并且 R^2 和 R^4 是 C_9-C_{20} 烷基。在某些实施方案中， R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基；并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

[0099] 在某些实施方案中，TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂：

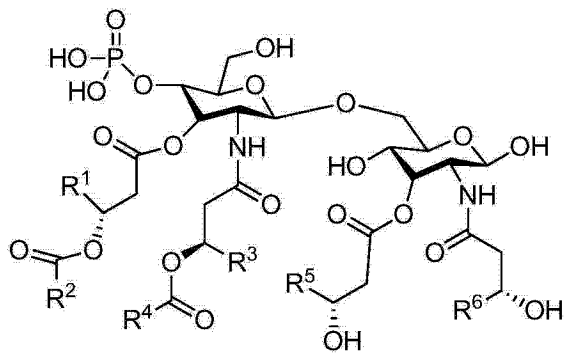
[0100]



[0101] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中， R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 $C_{11}-C_{20}$ 烷基；并且 R^2 和 R^4 为 C_9-C_{20} 烷基。在某些实施方案中， R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基；并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

[0102] 在某些实施方案中，TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂：

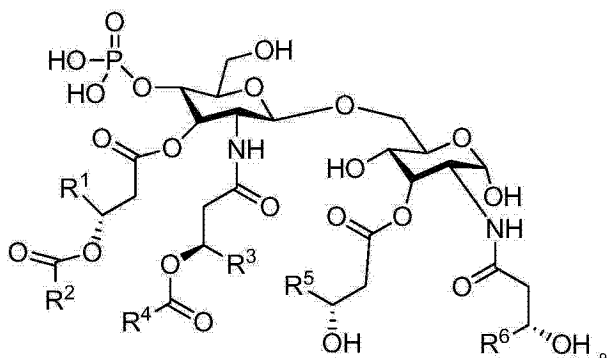
[0103]



[0104] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} - C_{20} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 - C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

[0105] 在某些实施方案中, TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

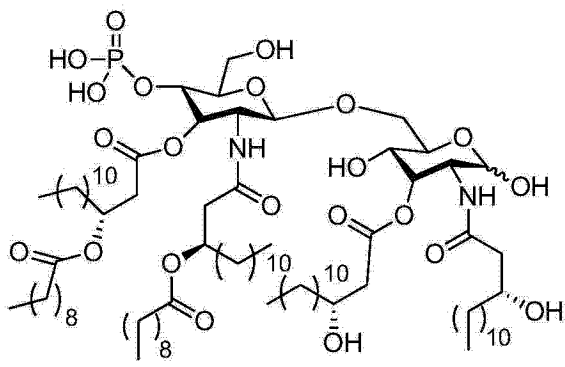
[0106]



[0107] 在上述 GLA 结构的某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} - C_{20} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 - C_{20} 烷基。在某些实施方案中, R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 为 C_{11} 烷基; 并且 R^2 和 R^4 为 C_9 烷基。

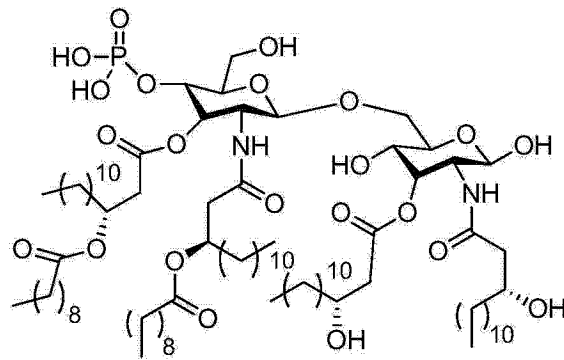
[0108] 在某些实施方案中, TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

[0109]



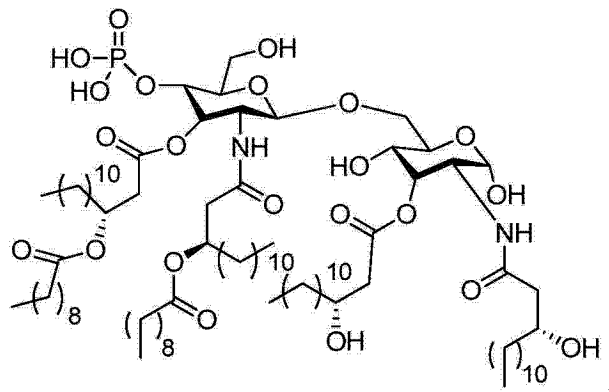
[0110] 在某些实施方案中, TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂:

[0111]



[0112] 在某些实施方案中，TLR4 激动剂是具有以下结构的合成 GLA 佐剂：

[0113]



[0114] 在另一实施方案中，将变性脂质 A 衍生物 (ALD) 并入本发明的组合物。ALD 是脂质 A 样分子，其经改变或构造以使分子呈现脂质 A 的较小副作用或不同副作用。这些副作用包括产热原性、局部 Shwarzman 反应性和毒性，所述毒性是在鸡胚 50% 致死剂量测定 (CELD₅₀) 所评估的，本发明可用的 ALD 包括单磷酸基脂质 A (MLA) 和 3-脱酰基单磷酸基脂质 A (3D-MLA)。MLA 和 3D-MLA 是已知的，并且无需在本文详述。参见例如转让给 Ribi ImmunoChem Research, Inc. 的 1984 年 3 月 13 日公开的美国专利第 4,436,727 号，其公开了单磷酸基脂质 A 及其加工。同样转让给 Ribi ImmunoChem Research, Inc. 的 Myers 等人的美国专利第 4,912,094 号和再审查证书 B1 美国专利第 4,912,094 号实施了 3-脱酰基单磷酸基脂质 A 及其制造方法。这些专利关于 MLA 和 3D-MLA 的公开内容通过引用并入本文。

[0115] 抗原

[0116] 在一些实施方案中，本发明的制剂还包含一种或多种抗原。

[0117] 用于本文描述的疫苗组合物和应用 GLA 的方法的某些实施方案中的抗原可以是个体内免疫应答的诱发或增强所针对的任一靶抗原决定部位、分子（包括生物分子）、分子复合物（包括含有生物分子的分子复合物）、亚细胞集群、细胞或组织。通常，术语抗原指所关注的多肽抗原。然而，如本文所使用的，抗原也可以指编码所关注的多肽抗原的重组构建体（例如，表达构建体）。在某些优选的实施方案中，所述抗原可以是或可以来自与感染、癌症、自身免疫疾病、过敏症、哮喘症或任何其他的状态（其中，抗原特异性免疫应答的激活是理想的或有益的）相关的传染性病原体和 / 或抗原决定部位、生物分子、细胞或组织，或者与其在免疫学上交叉反应。

[0118] 优选地，在某些实施方案中，本发明的疫苗制剂含有能够诱发针对人类或其他哺乳动物病原体的免疫应答的抗原或抗原成分，所述抗原或抗原成分可以包括来自病

毒的成分,诸如来自 HIV-1(如 tat, nef, gp120 或 gp160)、人类疱疹病毒(如 gD 或其衍生物或如来自 HSV1 或 HSV2 的 ICP27 的即刻早期蛋白)、巨细胞病毒((特别是人类)(如 gB 或其衍生物)、轮状病毒(Rotavirus)(包括活力减弱病毒)、爱泼斯坦-巴尔氏病毒(如 gp350 或其衍生物)、水痘带状疱疹病毒(诸如 gp1, II 和 IE63)或者来自诸如乙型肝炎病毒(例如乙型肝炎表面抗原或其衍生物)、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒以及戊型肝炎病毒的肝炎病毒,或者来自其他的病毒病原体,诸如副粘病毒:呼吸道合胞病毒(如 F 和 G 蛋白或其衍生物)、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒(例如 HPV6, 11, 16, 18 等)、虫媒病毒(例如黄热病毒(Yellow Fever Virus)、登革热病毒(Dengue Virus)、蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus)、日本脑炎病毒或流感病毒(全活或灭活病毒、接种在鸡胚或 MDCK 细胞内的裂解流感病毒,或完整流感病毒体(如由 Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920 所描述的)或者是其纯化的或重组的蛋白,诸如 HA, NP, NA 或 M 蛋白或者其组合)。

[0119] 在某些其他优选的实施方案中,本发明的疫苗制剂含有能够诱发针对人类或其他哺乳动物病原体的免疫应答的抗原或抗原成分,所述抗原或抗原成分可以包括来自一种或多种细菌病原体的成分,所述病原体例如奈瑟菌属某些种(*Neisseria* spp),包括淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoea*)和脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*)(例如荚膜多糖和其偶联物、转铁蛋白结合蛋白、乳铁蛋白结合蛋白、PilC、黏附素);化脓链球菌(*S. pyogenes*)(例如 M 蛋白或其片段、C5A 蛋白酶、脂磷壁酸质),无乳链球菌(*S. agalactiae*),变异链球菌(*S. mutans*);杜克雷嗜血杆菌(*H. ducreyi*);莫拉菌属某些种(*Moraxella* spp),包括粘膜炎莫拉菌(*M. catarrhalis*),也称为粘膜炎布兰汉球菌(*Branhamella catarrhalis*)(例如高和低分子量的黏附素及透明质酸酶);博德特菌属某些种(*Bordetella* spp),包括百日咳博德特菌(*B. pertussis*)(例如百日咳杆菌粘附素、百日咳毒素或其衍生物、丝状血凝素、腺苷酸环化酶、菌毛),副百日咳博德特菌(*B. parapertussis*)和支气管败血症博德特菌(*B. bronchiseptica*);分枝杆菌属某些种(*Mycobacterium* spp),包括肺结核分枝杆菌(例如 ESAT6, 抗原 85A、-B 或 -C)、牛型分枝杆菌(*M. bovis*)、麻风分枝杆菌(*M. leprae*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、副结核分枝杆菌(*M. paratuberculosis*)、耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*);军团病杆菌属某些种(*Legionella* spp),包括嗜肺军团菌(*L. pneumophila*);埃希氏菌属某些种(*Escherichia* spp),包括肠毒素性大肠埃希菌(enterotoxigenic *E. coli*)(例如定居因子、不耐热毒素或其衍生物、耐热毒素或其衍生物)、肠出血性大肠埃希菌(enterohemorrhagic *E. coli*)、肠致病性大肠埃希菌(enteropathogenic *E. coli*)(例如志贺(Shiga)毒素样毒素或其衍生物);弧菌属某些种(*Vibrio* spp),包括霍乱弧菌(*V. cholera*)(例如霍乱毒素或其衍生物);志贺菌属某些种(*Shigella* spp),包括索氏志贺菌(*S. sonnei*)、痢疾志贺菌(*S. dysenteriae*)、弗氏志贺菌(*S. flexnerii*);耶尔森菌属某些种(*Yersinia* spp),包括小肠结肠炎耶尔森菌(*Y. enterocolitica*)(例如 Yop 蛋白)、鼠疫耶尔森菌(*Y. pestis*)、假结核耶尔森菌(*Y. pseudotuberculosis*);弯曲杆菌属某些种(*Campylobacter* spp),包括空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*)(例如毒素、黏附素和透明质酸酶)和结肠弯曲杆菌(*C. coli*);沙门菌属某些种(*Salmonella* spp),包括伤寒沙门菌(*S. typhi*)、副伤寒沙门菌(*S. paratyphi*)、猪霍乱沙门菌(*S. choleraesuis*),肠炎沙门菌(*S. enteritidis*);利斯特菌属某些种(*Listeria* spp.),包括单核细胞增生利斯特菌

(*L. monocytogenes*) ;螺杆菌属某些种 (*Helicobacter* spp),包括幽门螺杆菌 (*H. pylori*) (例如尿素酶、过氧化氢酶、空泡素) ;假单胞菌属某些种 (*Pseudomonas* spp),包括铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) ;葡萄球菌属某些种 (*Staphylococcus* spp.),包括金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) ;肠球菌属某些种 (*Enterococcus* spp.),包括粪肠球菌 (*E. faecalis*)、屎肠球菌 (*E. faecium*) ;梭菌属某些种 (*Clostridium* spp.),包括破伤风梭菌 (*C. tetani*) (例如破伤风毒素及其衍生物)、肉毒梭菌 (*C. botulinum*) (例如肉毒菌毒素及其衍生物)、艰难梭菌 (*C. difficile*) (例如梭菌毒素类 A 或 B 及其衍生物) ;芽孢杆菌属某些种 (*Bacillus* spp.),包括炭疽杆菌 (*B. anthracis*) (例如肉毒菌毒素及其衍生物) ;棒杆菌属某些种 (*Corynebacterium* spp.),包括白喉棒杆菌 (*C. diphtheriae*) (例如白喉毒素及其衍生物) ;疏螺旋体属某些种 (*Borrelia* spp.),包括伯氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*) (例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB)、伽氏疏螺旋体 (*B. garinii*) (例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB)、阿弗西尼疏螺旋体 (*B. afzelii*) (例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB)、安德森疏螺旋体 (*B. Andersonii*) (例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB)、赫姆斯疏螺旋体 (*B. hermsii*) ;埃里希体属某些种 (*Ehrlichia* spp.),包括马埃里希体 (*E. equi*) 和人类粒细胞埃里希体病 (the Human Granulocytic Ehrlichiosis) 的媒介 ;立克次体属某些种 (*Rickettsia* spp),包括立氏立克次体 (*R. rickettsii*) ;衣原体属某些种 (*Chlamydia* spp.) 包括沙眼衣原体 (*C. trachomatis*) (例如 MOMP, 肝素结合蛋白),肺炎衣原体 (*C. pneumoniae*) (例如 MOMP, 肝素结合蛋白)、鸚鵡热衣原体 (*C. psittaci*) ;钩端螺旋体属某些种 (*Leptospira* spp.),包括问号钩端螺旋体 (*L. interrogans*) ;密螺旋体属某些种 (*Treponema* spp.),包括苍白球密螺旋体 (*T. pallidum*) (例如罕见的外膜蛋白),齿垢密螺旋体 (*T. denticola*)、猪痢疾密螺旋体 (*T. hyodysenteriae*) ;或其他细菌病原体。

[0120] 在某些其他优选的实施方案中,本发明的疫苗制剂含有能够诱发针对人类或其他哺乳动物病原体的免疫应答的抗原或抗原成分,所述抗原或抗原成分可以包括来自一种或多种寄生虫的成分(参见,例如, John, D. T. and Petri, W. A., Markell and Voge's Medical Parasitology-9thEd. (Markell 和 Voge 的医学寄生虫学-第 9 版), 2006, WB Saunders, Philadelphia ;Bowman, D. D., Georgis' Parasitology for Veterinarians-8thEd. (Georgis 的兽医寄生虫学-第 8 版), 2002, WB Saunders, Philadelphia), 所述寄生虫例如疟原虫属某些种 (*Plasmodium* spp.), 包括恶性疟原虫 (*P. falciparum*) ;弓形虫属某些种 (*Toxoplasma* spp.), 包括人刚地弓形虫 (*T. gondii*) (例如 SAG2, SAG3, Tg34) ;内阿米巴属某些种 (*Entamoeba* spp.), 包括溶组织内阿米巴 (*E. histolytica*) ;巴贝虫属某些种 (*Babesia* spp.), 包括田鼠巴贝虫 (*B. microti*) ;锥虫属某些种 (*Trypanosoma* spp.), 包括克氏锥虫 (*T. cruzi*) ;贾第虫属某些种 (*Giardia* spp.), 包括蓝氏贾第虫 (*G. lamblia*) ;利什曼虫某些种, 包括硕大利什曼虫 (*L. major*) ;肺囊虫属某些种 (*Pneumocystis* spp.), 包括卡氏肺囊虫 (*P. carinii*) ;毛滴虫属某些种 (*Trichomonas* spp.), 包括鞘毛滴虫 (*T. vaginalis*) ;或者来自能够感染哺乳动物的蠕虫, 诸如 : (i) 线虫感染 (包括, 但不限于蠕形住肠绦虫 (*Enterobius vermicularis*)、人蛔虫 (*Ascaris lumbricoides*)、毛首鞭形线虫 (*Trichuris trichuria*)、美洲板口线虫 (*Necator americanus*)、十二指肠钩虫 (*Ancylostoma duodenale*)、班氏吴策线虫 (*Wuchereria bancrofti*)、马来丝虫 (*Brugia malayi*)、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca*

volvulus)、麦地那龙线虫 (*Dracanculus medinensis*)、旋毛线虫 (*Trichinella spiralis*) 和粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*);(ii) 吸虫感染 (包括,但不限于曼森血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、埃及血吸虫 (*Schistosoma haematobium*)、日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)、湄公河裂体吸虫 (*Schistosoma mekongi*)、中华后睾吸虫 (*Opisthorchissinensis*)、并殖吸虫属 (*Paragonimus* sp)、肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*)、姜片吸虫 (*Fasciola magna*)、大片吸虫 (*Fasciola gigantica*));以及(iii) 绦虫感染 (包括但不限于牛肉绦虫和猪肉绦虫)。因此某些实施方案可以涉及包括来自血吸虫属某些种 (*Schistosoma* spp.) 或来自酵母的抗原的疫苗组合物,血吸虫属某些种如曼氏血吸虫、埃及血吸虫和 / 或日本血吸虫,酵母诸如假丝酵母属 (*Candida* spp.), 包括白假丝酵母 (*C. albicans*); 隐球菌属 (*Cryptococcus* spp.), 包括新型隐球菌 (*C. neoformans*)。

[0121] 对于结核分枝杆菌,其他优选的特异性抗原例如 Th Ra12、Tb H9、Tb Ra35、Tb38-1、Erd14、DPV、MTI、MSL、mTTC2 和 hTCC1 (WO 99/51748)。针对结核分枝杆菌的蛋白还包括融合蛋白及其变体,其中结核分枝杆菌的至少两种、优选三种多肽融合成较大的蛋白。优选的融合物包括 Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI、DPV-MTI-MSL、Erd14DPV-MTI-MSL-mTTC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、DPV-MTI-MSL-mTTC2、TbH9-DPV-MTI (WO 99151748)。可以使用的其他抗原包括 US 2010/0129391 和 WO 2008/124647 所述的抗原、抗原合并物和融合蛋白。

[0122] 对于衣原体最优选的抗原包含例如高分子量蛋白 (HWMP) (WO 99/17741)、ORF3 (EP 366 412) 以及推定的膜蛋白 (Pmps)。疫苗制剂的其他衣原体抗原可以选自在 WO 99128475 中描述的组。优选的细菌疫苗包含来自包括肺炎链球菌的链球菌属某些种的抗原 (例如荚膜多糖及其偶联物、PsaA、PspA、链球菌溶血素、胆碱结合蛋白) 和蛋白抗原肺炎链球菌溶血素 (*Biochem Biophys Acta*, 1989, 67, 1007; Rubins 等人, *Microbial Pathogenesis* (微生物致病机理), 25, 337-342), 以及其突变的去毒衍生物 (WO 90/06951; WO 99/03884)。其他优选的细菌疫苗包含来自嗜血菌属 (*Haemophilus* spp.) 的抗原,包括流感嗜血杆菌 B 型 (*H. influenzae* type B) (例如 PRP 及其偶联物), 不可分型流感嗜血杆菌,例如 OMP26、高分子量黏附素、P5、P6、蛋白质 D 和脂蛋白 D, 以及丝束蛋白和丝束蛋白衍生肽 (美国专利第 5, 843, 464 号) 或多重拷贝变体或其融合蛋白。

[0123] 乙型肝炎表面抗原衍生物在本领域是公知的,其包括在欧洲专利申请 EP-A414374、EP-A-0304578 和 EP198474 中描述的那些 PreS1、Pars2S 表面抗原等。在一个优选方面,本发明的疫苗制剂包含 HIV-1 抗原、gp120,特别是在 CHO 细胞中表达时。在另外的实施方案中,本发明的疫苗制剂包含本文上面限定的 gD2t。

[0124] 在本发明优选的实施方案中,含有要求保护的佐剂的疫苗包含的抗原来自被认为是生殖器疣病因的人类乳头瘤病毒 (HPV) (HPV6 或 HPV11 及其他), 以及是宫颈癌病因的 HPV 病毒 (HPV16、HPV18 及其他)。生殖器疣预防或治疗性疫苗的特别优选形式包含 L1 颗粒和壳粒,以及包含选自 HPV6 和 HPV11 蛋白 E6、E7、L1 和 L2 的一个或多个抗原的融合蛋白。融合蛋白某些优选的形式包括 WO 96/26277 中公开的 L2E7, 以及 GB 9717953. 5 (PCT/EP98/05285) 中公开的蛋白 D(1/3)-E7。优选的 HPV 宫颈感染或癌症的预防性或治疗性疫苗组合物可以包含 HPV 16 或 18 的抗原。例如, L1 或 L2 抗原单体,或者作为病毒样颗粒 (VLP) 共同呈现的 L1 或 L2 抗原,或者在 VLP 或壳粒结构内单独呈现的单独的 L1 蛋白。这

些抗原、病毒样颗粒和壳粒本身是已知的。参见例如 W094/00152, W094/20137, W094/05792 和 W093/02184。

[0125] 其他早期蛋白可以单独地被包括或者作为诸如 E7、E2 或优选例如 F5 的融合蛋白；特别优选的实施方案包括包含 L1E7 融合蛋白的 VLP (W0 96/11272)。特别优选的 HPV16 抗原包含与蛋白 D 载体融合的早期蛋白 E6 或 E7 以形成来自 HPV16 的蛋白 D-E6 或 E7 融合物，或其组合；或者包含 E6 或 E7 与 L2 的组合 (W0 96/11272)。可选择地，HPV16 或 18 的早期蛋白 E6 和 E7 可以呈现为单分子，优选蛋白 D-E6/E7 融合物。这类疫苗可任选地包含来自 HPV18 的 E6 和 E7 蛋白的任一者或两者，优选以蛋白 D-E6 或蛋白 D-E7 融合蛋白或蛋白 DE6/E7 融合蛋白的形式。本发明的疫苗另外还包含来自其他 HPV 菌株的抗原，优选来自 HPV31 或 33 菌株。

[0126] 本发明的疫苗还包含来自导致疟疾的寄生虫的抗原。例如，来自恶性疟原虫的优选抗原包括 RTS, S 和 TRAP。RTS 是杂交蛋白，包含恶性疟原虫的环孢子 (CS) 蛋白的基本上全部的 C-末端部分，后者通过乙型肝炎表面抗原的 preS2 部分的四个氨基酸连接于乙型肝炎病毒表面 (S) 抗原。其完整结构在国际专利申请号 PCT/EP92/02591 中公开，该国际申请公布号为 W0 93/10152，要求英国专利第 9124390.7 号申请的优先权。当在酵母中表达时，RTS 作为脂蛋白颗粒产生，且当它与来自 HBV 的 S 抗原共表达时，它产生了称为 RTS, S 的混合颗粒。

[0127] 在以 W0 90/01496 公布的国际专利申请号 PCT/GB89/00895 中描述了 TRAP 抗原。本发明的优选实施方案是疟疾疫苗，其中抗原制剂包含 RTS, S 和 TRAP 抗原的组合。可能是多级疟疾疫苗的组分的候选物的其他疟原虫抗原是恶性疟原虫 MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 钳合蛋白 (Sequestrin), PfEMPI, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27125, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230, 以及在疟原虫属某些种中的它们的类似物。

[0128] 因此，本文公开的某些实施方案涉及来自诸如细菌、病毒或真菌的至少一种传染型病原体的抗原，所述病原体包括放线细菌，诸如结核分支杆菌和麻风分支杆菌或另外的分支杆菌；细菌诸如沙门菌属、奈瑟球菌属、疏螺旋体属、衣原体属或博德特菌属的成员；病毒诸如单纯疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、猫免疫缺陷病毒 (FIV)、巨细胞病毒、水痘带状疱疹、肝炎病毒、爱泼斯坦-巴尔氏病毒 (EBV)、呼吸道合胞病毒、人乳头状瘤病毒 (HPV) 以及巨细胞病毒；HIV 诸如 HIV-1 或 HIV-2；真菌诸如曲霉菌、芽生菌、球孢菌和肺孢子菌，或者酵母，包括假丝酵母属，诸如白色念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、葡萄牙念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌；寄生虫诸如原生动物，例如疟原虫属，包括恶性疟原虫、间日疟原虫、三日疟原虫和卵圆疟原虫；或者另外的寄生虫，诸如棘阿米巴、溶组织内阿米巴、管圆线虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、隐孢子虫 (Cryptosporidium)、埃及吸血虫、钩虫线虫、溶组织内阿米巴、结肠内阿米巴、迪斯帕内阿米巴、哈特曼内阿米巴、波氏内阿米巴、班氏吴策线虫、贾第虫以及利什曼虫的一种或多种。

[0129] 例如，在含 GLA 的疫苗实施方案中含有来自疏螺旋体属的抗原，所述抗原可以包括核酸、病原体来源的抗原或抗原制剂、重组产生蛋白或肽，以及嵌合融合蛋白。一种这样的抗原是 OspA。OspA 借助其在宿主细胞内的生物合成可以是载脂形式的完全成熟的蛋白 (Lipo-OspA)，或者可选择地可以是非载脂的衍生物。这种非载脂衍生物包括非载脂

NS1-OspA 融合蛋白,其具有流感病毒的非结构蛋白(NS1)的N-末端的前81个氨基酸,以及完整的OspA蛋白,且另一种MDP-OspA是携带3个附加的N-末端氨基酸的OspA的非载体形式。

[0130] 鉴别具有或疑似有患本文所述传染性病原体感染的危险的个体的组合物和方法在本领域是已知的。

[0131] 例如,细菌结核分支杆菌导致肺结核(TB)。该细菌通常侵袭肺脏,但也可以侵袭肾脏、脊柱和脑。如果不能恰当治疗的话,TB疾病可以是致死性的。当被传染的人打喷嚏或咳嗽时,这种疾病可以在人与人之间播散。在2003年,美国报道的TB病例超过了14,000例。

[0132] 尽管结核通常可以采用长期的抗生素治疗来控制,但这种治疗不足以预防该疾病的播散并引起了关于抗生素抗性菌株的潜在选择的担忧。被传染的个体在一段时间内可以无症状的,但有传染性。此外,尽管依从治疗方案是关键,但患者行为难以监测。一些患者不能完成治疗过程,这导致了无效治疗和耐药性的发生(例如美国专利7,087,713)。

[0133] 目前,活细菌疫苗是诱导针对肺结核的保护性免疫的最有效的方法。用于这一目的的最常见的分支杆菌(Mycobacterium)是卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin)(BCG),牛型分支杆菌的无毒力株。然而,BCG的安全性和功效是争议的来源,且有些国家,如美国并不给全民接种。通常使用皮肤测试来完成诊断,其包括结核菌素PPD(蛋白纯化的衍生物)的皮内暴露。抗原特异性T细胞反应导致了注射后48、72小时在注射部位的可测量的硬结,这提示已暴露于分支杆菌抗原。但是敏感性和特异性一直是该测试的难题,并且接种了BCG的个体不能与受感染的患者区分开(例如,美国专利7,087,713)。

[0134] 尽管巨噬细胞一直作为肺结核杆菌免疫的主要效应器,但T细胞是所述免疫的优势诱导细胞。T细胞在保护肺结核杆菌感染中的重要作用在AIDS患者中被示例:由于与人类免疫缺陷病毒(HIV)感染有关的CD4T细胞的耗竭,AIDS患者体内通常会出现肺结核分支杆菌。已表明,分支杆菌反应性CD4T细胞是干扰素- γ (IFN- γ)强大的产生细胞,其也已被进一步表明触发小鼠体内巨噬细胞的抗分支杆菌效应。尽管IFN- γ 在人体内的作用是不清楚的,但已有研究表明1,25-二羟基-维生素D3单独地或与IFN- γ 或肿瘤坏死因子- α 联用激活人巨噬细胞以抑制肺结核分支杆菌感染。此外,已知IFN- γ 激活人巨噬细胞以产生1,25-二羟基-维生素D3。类似地,已表明,IL-12在激发对肺结核分支杆菌感染的抗性中发挥作用。对肺结核分支杆菌感染的免疫学的综述,参见Chan and Kaufmann, in Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control(肺结核:发病机理、保护和控制), Bloom(ed.), ASM Press, Washington, D. C. (1994)。

[0135] 诊断肺结核或诱导抗肺结核的保护性免疫的现有的化合物和方法包括多肽和编码这种多肽的DNA分子的应用,所述多肽含有一种或多种分支杆菌蛋白的至少一种免疫原部分。含有这种多肽或DNA序列以及适当的检测试剂的诊断试剂盒可以用于检测患者和生物样本中的分支杆菌感染。也提供了针对这种多肽的抗生素。此外,这种化合物可以配制于疫苗和/或药物组合物中,用于抗分支杆菌感染的免疫。(美国第6,949,246和6,555,653号专利)。

[0136] 二十世纪60年代,在世界上很多地方都消灭了疟疾,但这种疾病仍持续存在,并出现了耐药的新致病株。疟疾在90多个国家是主要的公共卫生问题。10例疟疾中有9例出现在撒哈拉以南非洲(sub-Saharan Africa)。超过1/3的世界人口正面临危险,且每年

有 350 至 500 百万的人感染疟疾。今年有 45 百万怀孕妇女面临感染疟疾的危险。在那些已经被感染的个体中,每年有超过 1 百万被感染个体死于可预防的疾病。那些死亡者中主要是非洲的儿童。

[0137] 疟疾通常是在人被受感染的雌疟蚊 (*Anopheles mosquito*) 叮咬时传播。蚊子必须通过汲取已经感染了疟疾的人的血被感染后才能传播疟疾。疟疾由寄生虫导致,且该病的临床症状包括发热和流感样不适,诸如寒战、头痛、肌肉疼痛和疲倦。这些症状可以伴有恶心、呕吐和腹泻。疟疾也可以导致由红细胞的损失引起的贫血和黄疸。一种类型的疟疾,恶性疟疾,如果不能及时治疗的话,可能导致肾衰、惊厥、意识模糊、昏迷和死亡。

[0138] 个体中疟疾的体外诊断方法是已知的,其包括将从个体采集的组织或生物学流体与分子或多肽组合物接触(在允许体外免疫应答在所述组合物和存在于组织或生物流体中的抗体之间发生的条件下),以及形成的抗原抗体复合物的体外检测(参见,例如,美国专利 7,087,231),其中所述分子或多肽组合物包括一个或多个多肽序列,其携带由恶性疟原虫的传染活性导致的蛋白的一个或多个 T 抗原决定部位的全部或部分。

[0139] 已经描述了重组恶性疟原虫 (3D7)AMA-1 胞外区的表达和纯化。先前的方法已经产生了高纯化的蛋白,其保留了天然分子的折叠和二硫键。重组的 AMA-1 可以用作诊断试剂以及用于抗体制备,和作为蛋白单独用于或作为疫苗的一部分用于预防疟疾。(美国专利 7,029,685)

[0140] 本领域已经描述了编码种属特异性的间日疟原虫疟疾肽抗原的多核苷酸,所述抗原是分泌入感染后的易感哺乳动物宿主血浆内的蛋白或蛋白片段,这样产生针对这些抗原的单克隆或多克隆抗体。所述肽抗原、单克隆抗体和/或多克隆抗体用于诊断疟疾的测定中被利用,以及用于确定是否间日疟原虫是导致感染的种属。(美国专利 6,706,872) 也已经报道了种属特异性的间日疟原虫疟疾肽抗原,其是分泌入感染后的敏感哺乳动物宿主血浆内的蛋白或蛋白片段,这样产生针对这些抗原的单克隆或多克隆抗体。所述肽抗原、单克隆抗体和/或多克隆抗体在用于诊断疟疾的测定中被利用,以及被用于确定是否间日疟原虫是导致感染的种属(参见,例如,美国专利 6,231,861)。

[0141] 通过产生高纯度蛋白的方法也已经表达了重组的恶性疟原虫 (3D7)AMA-1 胞外区,其保留了天然分子的折叠和二硫键。所述重组的 AMA-1 用作诊断试剂,以及用作疫苗用于抗体产生(美国专利 7,060,276)。同样已知的是重组恶性疟原虫 (3D7)MSP-1₄₂ 的表达和纯化,其保留了天然分子的折叠和二硫键。重组的 MSP-1₄₂ 用作诊断试剂以及用作疫苗用于抗体产生。(美国专利 6,855,322)。

[0142] 因此根据这些和相关的公开内容,已知检测人类疟疾感染的诊断方法,以鉴定具有或疑似有患疟疾传染性病原体感染的危险的个体。具体地,例如,将血液样本与含有 3-乙酰基嘧啶腺嘌呤二核苷酸 (APAD)、底物(例如,乳酸盐或乳酸)以及缓冲液合并。该试剂被设计为检测由疟疾寄生虫产生的独特的糖分解酶的存在。已知该酶是寄生虫乳酸脱氢酶 (PLDH)。使用上述试剂,很容易区别 PLDH 与宿主的 LDH。所述试剂与寄生虫感染的血液样本合并导致了 APAD 的还原。但是 APAD 不被宿主 LDH 还原。然后通过多种技术,包括光谱、荧光测定、电泳或比色分析来检测还原的 APAD。以上述方式检测还原的 APAD 提供了疟疾感染的阳性指示(例如美国专利 5,124,141)。在另一种诊断疟疾的方法学中,包含特征性氨基酸序列的多肽源自恶性疟原虫抗原 GLURP,并可在检测样本中被针对所述多

肽或与其反应的特异性抗体所识别。(美国专利 5,231,168)

[0143] 利什曼病是世界范围内的寄生虫病,在印度次大陆、非洲和拉丁美洲频繁流行,是世界卫生组织开发疫苗的优先考虑对象。不同疾病的复合,利什曼寄生虫导致了内脏器官的致命感染以及严重的皮肤病。利什曼病最具破坏性的形式中的一种是鼻和嘴的毁容感染。利什曼病例的数量越来越多,目前在许多地区以难于控制。作为 HIV 感染的结果,利什曼病在一些发达地区也处于上升状态,特别是在南欧。可利用的药物是有毒性的、昂贵的,并需要长期的每日注射。

[0144] 利什曼虫是定居于免疫系统的巨噬细胞或白血细胞的原生动物寄生虫。这种寄生虫通过小的吸血昆虫(沙蝇)的叮咬传播,所述昆虫由于定居于地球上的广大地区,难以控制。

[0145] 内脏利什曼病是该病三种表现形式中最危险的。据估计每年发生约 500,000 例内脏形式(黑热病(kala-azar)或“致死疾病”)的新病例。超过 200 百万的人目前处于感染内脏利什曼病的危险中。超过 90%的内脏利什曼病例发生在印度、孟加拉国、苏丹、巴西和尼泊尔。大多数死亡发生在儿童。患有皮肤形式的那些人通常是永久的毁容。

[0146] 利什曼虫感染难以诊断,并且通常涉及组织活检样本的组织病理学分析。然而已经开发了几种血清学和免疫学诊断测定。(美国专利 7,008,774;Senaldi 等人,(1996)J. Immunol. Methods 193:95;Zijlstra 等人,(1997)Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91:671673;Badaro 等人,(1996)J. Inf. Dis. 173:758761;Choudhary, S. 等人,(1992)J. Comm. Dis. 24:3236;Badaro, R. 等人,(1986)Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:7278;Choudhary, A. 等人,(1990)Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84:363366;和 Reed, S. G. 等人,(1990)Am. J. Trop. Med. Hyg. 43:632639)。前鞭毛体释放代谢产物进入培养基以产生条件培养基。这些代谢产物是宿主免疫原性的。参见 Schnur, L. F. 等人,(1972)Isrl. J. Med. Sci. 8:932942;Sergeiev, V. P. 等人,(1969)Med. Parasitol. 38:208212;El-On, J. 等人,(1979)Exper. Parasitol. 47:254269;和 Bray, R. S. 等人,(1966)Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 60:605609;美国专利第 6,846,648 号,美国专利 5,912,166;美国专利 5,719,263;美国专利 5,411,865)。

[0147] 世界范围内大约有 40 百万人感染导致 AIDS 的病毒 HIV。每年约 3 百万人死于该病,他们中的 95%是在发展中国家。每年有接近 5 百万的人感染 HIV。目前在撒哈拉以南非洲,该病的负担最重,但它正在向诸如印度、中国和俄罗斯的其他国家快速传播。这种流行病在少数民族人口中蔓延最快。在美国,从 1981 年起,已经报道了超过 950,000 例的 AIDS。AIDS 袭击处于多产的年纪的人。由于生物学和社会原因,妇女患 HIV/AIDS 的危险增加。

[0148] AIDS 由人类免疫缺陷病毒(HIV)导致,所述病毒杀死和破坏人体免疫系统的细胞,并且进行性破坏人体对抗感染和某些癌症的能力。HIV 最普遍的传播是通过与受感染的伴侣进行无保护的性交。对这一问题最有力的解决方案是预防病毒的播散。实现这一目的的一条途径是制备安全、有效和负担得起的 HIV 疫苗。在世界范围内,处于 HIV 感染高风险中的 5 个患者中不到 1 个采取了有效的预防。

[0149] 诊断 HIV 感染的方法是已知的,包括通过患者样本的病毒培养、确定的核酸序列的 PCR,以及检测患者血清中抗-HIV 抗体的存在的抗体测试(参见例如,美国专利第 6,979,535 号,第 6,544,728 号,第 6,316,183 号,第 6,261,762 号,第 4,743,540 号)。

[0150] 根据本文公开的某些其他实施方案,疫苗组合物和相关的制剂以及应用方法可以包括来自癌细胞的抗原,其可以用于癌症的免疫治疗学治疗。例如,佐剂制剂可以利用肿瘤排斥抗原,诸如前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌或黑色素瘤癌的排斥抗原。示例性的癌症或癌细胞来源的抗原包括 MAGE1、3 和 MAGE4 或其他 MAGE 抗原如在 W099/40188 中公开的那些、PRAME、BAGE、Lage(也被称为 NY Eos1)SAGE 和 HAGE(WO 99/53061)或 GAGE(Robbins and Kawakami,1996Current Opinions in Immunology8,pps 628-636;Van den Eynde 等人,International Journal of Clinical&Laboratory Research(1997&1998);Correale 等人(1997),Journal of the National Cancer Institute89,p. 293。癌抗原的这些非限定性实例表达于诸如黑色素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌的多种肿瘤类型中。参见,例如美国专利第 6,544,518 号。

[0151] 依照某些本文公开的实施方案,适于与 GLA 一起使用的其他肿瘤特异性抗原包括但不限于肿瘤特异性或肿瘤相关性神经节苷脂类,如 GM₂ 和 GM₃ 或其与载体蛋白的偶联物;或者在 GLA 疫苗组合物中使用的用于诱发或增强抗癌免疫应答的抗原可以是自身肽激素,诸如用于许多癌症的治疗的全长促性腺激素释放激素(GnRH, WO 95/20600),一种 10 个氨基酸长的短肽。在另一个实施方案中,使用了前列腺抗原,诸如前列腺特异性抗原(PSA)、PAP、PSCA(例如,Proc. Nat. Acad. Sci. USA95(4)1735-17401998)、PSMA 或在优选的实施方案中的称为前列腺酶(Prostase)的抗原。(例如,Nelson 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1999)96:3114-3119;Ferguson 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA1999. 96, 3114-3119;WO 98/12302;美国专利第 5,955,306 号;WO 98/20117;美国专利第 5,840,871 号和第 5,786,148 号;WO/004149。从 W098/137418 和 WO/004149 中可知其他的前列腺特异性抗原。另一种是 STEAP(PNAS 96 14523 14528 7-12 1999)。

[0152] 用于本发明的背景下的其他肿瘤相关抗原包括:Plu-1(J Biol. Chem274(22)15633-15645,1999)、HASH-1、Hash-2、Cripto(Salomon et al Bioessays199,21:61-70,美国专利第 5,654,140 号)和 Criptin(美国专利第 5,981,215 号)。此外与癌症治疗疫苗特别相关的抗原也包括酪氨酸酶和存活蛋白。

[0153] 本文公开的涉及包含癌抗原的含有 GLA 的疫苗组合物的实施方案可以用于对抗由肿瘤相关抗原表达表征的任何癌症,诸如 HER-2/neu 表达或其他癌症特异性或癌症相关抗原。

[0154] 诊断具有或疑似有患癌症危险的个体中的癌症可以通过众多本领域公认的方法学中的任一种来完成,这可以依赖于包括临床表现、癌症的进展程度、癌症类型或其他因素而变化。癌症诊断学的实例包括患者样本(例如,血液、皮肤活检、其他组织活检、手术样本等)的组织病理学检测、组织细胞化学检测、免疫组织细胞化学检测和免疫组织病理学检测,对限定的遗传(例如,核酸)标志物的 PCR 检测,对循环中的癌相关抗原或携带所述抗原的细胞的血清学检测,或对限定的特异性抗体的血清学检测,或者本领域技术人员熟悉的其他方法学。参见,例如,美国专利第 6,734,172 号;6,770,445 号;6,893,820 号;第 6,979,730 号;第 7,060,802 号;第 7,030,232 号;第 6,933,123 号;第 6,682,901 号;第 6,587,792 号;第 6,512,102 号;第 7,078,180 号;第 7,070,931 号;JP5-328975;Waslylyk 等人,1993Eur. J Bioch. 211(7):18。

[0155] 本发明的某些实施方案的疫苗组合物和方法可以用于预防或治疗自身免疫疾病,

其包括疾病、状态或病症,其中宿主或个体的免疫系统不利地介导针对“自身”组织、细胞、生物分子(例如,肽、多肽、蛋白、糖蛋白、脂蛋白、蛋白脂质、脂质、糖脂、诸如 RNA 和 DNA 的核酸、低聚糖、多聚糖、蛋白聚糖、糖胺聚糖等等,以及个体细胞和组织的其他分子组分)或抗原决定部位(例如,特异性的免疫限定识别结构,诸如被抗体可变区互补决定区(CDR)或被 T 细胞受体 CDR 识别的那些)的免疫应答。

[0156] 因此自身免疫疾病的特征在于涉及细胞或抗体的异常免疫应答,其在任一种情形下都针对正常的自组织。哺乳动物的自身免疫疾病通常分类为两种不同类型中的一种:细胞介导的疾病(即 T-细胞)或抗体介导的病症。细胞介导的自身免疫疾病的非限定性实例包括多发性硬化、风湿性关节炎、桥本甲状腺炎、I 型糖尿病(青少年型糖尿病)和自身免疫性葡萄膜视网膜炎(uvoretinitis)。抗体介导的自身免疫病症包括但不限于重症肌无力、系统性红斑狼疮(或 SLE)、甲状腺机能亢进、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性血小板减少症、自身免疫性哮喘、冷球蛋白血症、血栓性血小板减少性紫癜、原发性胆管纤维硬化和恶性贫血。与系统性红斑狼疮有关的抗原是小核核糖核酸蛋白(snRNP);与甲状腺机能亢进有关的抗原是促甲状腺激素受体、甲状腺球蛋白和甲状腺上皮细胞的其他组分(Akamizu 等人,1996;Kellerman 等人,1995;Raju 等人,1997 和 Texier 等人,1992);与天疱疮有关的抗原是类钙粘蛋白(cadherin-like)天疱疮抗原,诸如桥粒芯糖蛋白 3 和其他黏附分子(Memar 等人,1996;Stanley,1995;Plott 等人,1994;and Hashimoto,1993);以及与血栓性血小板减少性紫癜有关的抗原是血小板抗原。(参见,例如,美国专利 6,929,796;Gorski 等人(Eds.),Autoimmunity(自身免疫),2001,Kluwer Academic Publishers,Norwell,MA;Radbruch and Lipsky,P.E.(Eds.)Current Concepts in Autoimmunity and Chronic Inflammation(自身免疫和慢性炎症的现代观点)(Curr. Top. Microbiol. and Immunol.(微生物学和免疫学的现代观点))2001,Springer,NY.)

[0157] 自身免疫参与 80 多种不同的疾病,包括 1 型糖尿病、多发性硬化、狼疮、风湿性关节炎、硬皮病和甲状腺疾病。对于大多数自身免疫疾病缺乏有关发病率的有力的量化评估。20 世纪 90 年代末完成的最新研究表明自身免疫疾病是美国第三位最常见的主要疾病;且最常见的自身免疫疾病影响了超过 8.5 百万美国人。该疾病流行的目前估值是美国人口的 5%到 8%。大多数自身免疫疾病倾向于侵袭女性。可能获得自身免疫疾病的女性是男性的 2.7 倍多。女性更易感自身免疫疾病;男性看起来比女性具有更高水平的天然杀伤细胞活性。(Jacobsen et al,Clinical Immunology and Immunopathology,84:223-243,1997.)

[0158] 当免疫系统将自身组织错认为异物而启动不恰当的攻击时,就发生了自身免疫疾病。机体可受到自身免疫疾病不同方式的侵袭,包括,例如肠道(克罗恩氏疾病)和脑(多发性硬化)。已知自身抗体攻击自身细胞或自身组织以损伤它们的功能,并由此导致自身免疫疾病,并且已知在自身免疫疾病真正发生(例如,临床体征和症状出现)之前就可以在患者的血清中检测出自身抗体。因此自身抗体的检测可以早期发现或识别自身免疫疾病的存在或发展为自身免疫疾病的风险。基于这些发现,已经发现了针对自身抗原的多种自身抗体,并且在临床检验中已经测量了针对自身抗原的自身抗体(例如,美国专利 6,919,210,6,596,501,7,012,134,6,919,078),而其他的自身免疫诊断学可能涉及相关代谢产物的检测(例如,美国专利第 4,659,659 号)或免疫学活性(例如,美国专利第 4,614,722 号和第 5,147,785 号,第 4,420,558 号,第 5,298,396 号,第 5,162,990 号,第 4,420,461 号,第

4, 595, 654 号, 第 5, 846, 758 号, 第 6, 660, 487 号)。

[0159] 在某些实施方案中, 本发明的组合物特别适用于治疗老人和 / 或免疫低下患者, 包括肾透析个体、化疗和 / 或放疗个体、接受移植者等。这些个体通常显示对疫苗的减弱的免疫应答, 因此使用本发明的组合物能够增强这些个体达到的免疫应答。

[0160] 在其他实施方案中, 用于本发明的组合物中的一种抗原或多种抗原包括与呼吸系统疾病有关的抗原, 诸如由细菌感染 (例如, 肺炎球菌感染) 导致或加剧的那些疾病, 用于预防和治疗诸如慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的状态。COPD 的生理学定义是在患慢性支气管炎和 / 或肺气肿的患者存在不可逆的或部分可逆的呼吸道阻塞 (Am J Respir Crit Care Med. 1995Nov ;152(5Pt2):S77-121)。COPD 的恶化经常是由细菌 (例如, 肺炎球菌) 感染引起的 (Clin Microbiol Rev. 2001Apr ;14(2):336-63)。

[0161] TLR

[0162] 如本文描述的, 本发明的某些实施方案涉及疫苗组合物和免疫佐剂组合物, 包括药物组合物, 所述组合物包括一种或多种钟样受体激动剂 (TLR 激动剂)。钟样受体 (TLR) 包括天然免疫系统的细胞表面跨膜受体, 其赋予宿主细胞早期识别多种保守的微生物分子结构的能力, 所述分子结构可以存在于众多传染性病原体内部或表面。(例如, Armant 等人, 2002Genome Biol. 3(8):reviews(综述)3011.1-3011.6; Fearon 等人, 1996Science272:50; Medzhitov 等人, 1997Curr. Opin. Immunol. 9:4; Luster2002Curr. Opin. Immunol. 14:129; Lien 等人 2003Nat. Immunol. 4:1162; Medzhitov, 2001Nat. Rev. Immunol. 1:135; Takeda 等人, 2003Ann Rev Immunol. 21:335; Takeda 等人 2005Int. Immunol. 17:1; Kaisho 等人, 2004Microbes Infect. 6:1388; Datta 等人, 2003J. Immunol. 170:4102)。

[0163] 诱导 TLR-介导的信号转导以促进通过天然免疫系统的免疫应答的启动可以通过 TLR 激动剂来实现, 所述 TLR 激动剂与细胞表面的 TLR 结合。例如, 脂多糖 (LPS) 可以通过 TLR2 或 TLR4 的 TLR 激动剂 (Tsan 等人, 2004J. Leuk. Biol. 76:514; Tsan 等人, 2004Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286:C739; Lin 等人, 2005Shock24:206); 聚 (肌苷-胞苷) (聚 I:C) 可以通过 TLR3 的 TLR 激动剂 (Salem 等人, 2006Vaccine24:5119); CpG 序列 (含有未甲基化的胞嘧啶-鸟嘌呤或“CpG”二核苷酸基序的寡聚脱氧核苷酸, 例如, CpG7909, Cooper 等人, 2005AIDS19:1473; CpG10101 Bayes 等人 Methods Find Exp Clin Pharmacol27:193; Vollmer 等人 Expert Opinion on Biological Therapy5:673; Vollmer 等人, 2004Antimicrob. Agents Chemother. 48:2314; Deng 等人, 2004J. Immunol. 173:5148) 可以通过 TLR9 的 TLR 激动剂 (Andaloussi et al., 2006Glia54:526; Chen 等人, 2006J. Immunol. 177:2373); 肽聚糖可以是 TLR2 和 / 或 TLR6 的激动剂 (Sobol 等人, 2006Biol. Reprod. 75:131; Nakao 等人, 2005J. Immunol. 174:1566); 3M003(4-氨基-2-(乙氧甲基)- α , α -二甲基-6, 7, 8, 9-四氢-1H-咪唑[4, 5-c]喹啉-1-乙醇水合物, 分子量 318Da, 来自 3M Pharmaceuticals, St. Paul, MN, 其也是相关化合物 3M001 和 3M002 的来源; Gorden 等人, 2005J. Immunol. 174:1259) 可以是 TLR7 激动剂 (Johansen2005Clin. Exp. Allerg. 35:1591) 和 / 或 TLR8 激动剂 (Johansen2005); 鞭毛蛋白可以是 TLR5 激动剂 (Feuillet 等人, 2006Proc. Nat. Acad. Sci. USA103:12487); 且丙肝抗原可以作为通过 TLR7 和 / 或 TLR9 的 TLR 激动剂 (Lee 等人, 2006Proc. Nat. Acad. Sci. USA103:1828; Horsmans

等人, 2005Hepatol. 42:724)。其他的 TLR 抗原是已知的(例如, Schirmbeck 等人, 2003J. Immunol. 171:5198), 且依照本文描述的某些实施方可以使用其他的 TLR 抗原。

[0164] 例如, 借助于背景知识(参见, 例如, 美国专利第 6, 544, 518 号申请), 已知含有未甲基化的 CpG 二核苷酸("CpG") 的免疫激活型寡核苷酸可以作为通过全身和粘膜两种途径给药时的佐剂(WO 96/02555, EP 468520, Davis 等人, J. Immunol, 1998. 160(2):870-876; McCluskie and Davis, J. Immunol., 1998, 161(9):4463-6)。CpG 是存在于 DNA 中的胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸基序的缩写。CG 基序在免疫激活中的重要作用由 Krieg, Nature 374, p5461995 阐明。详细的分析已经表明 CG 基序必须是在某一序列背景下, 且这些序列在细菌 DNA 中是常见的, 但在脊椎动物 DNA 中罕见。所述免疫激活序列通常是: 嘌呤、嘌呤、C、G、嘧啶、嘧啶; 其中所述二核苷酸 CG 基序不是甲基化的, 但已知其他未甲基化 CpG 序列具有免疫激活性, 且可以用于本发明的某些实施方案中。当 CpG 配制于疫苗中时, 它可以在游离的溶液中与游离的抗原(WO 96/02555; McCluskie and Davis, 见上述)一起给药, 或与抗原共价偶联(PCT 公布号 WO 98/16247), 或者与诸如氢氧化铝的载体配制(例如, Davis 等人见上述, Brazolot-Millan 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95(26), 15553-8)。

[0165] 用于本发明的佐剂或疫苗的优选寡核苷酸优选包含由至少三个、更优选至少 6 个或多个核苷酸分开的两个或多个二核苷酸 CpG 基序。本发明的寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在优选的实施方案中, 寡核苷酸中的核苷酸间是二硫代磷酸酯或更优选硫代磷酸键, 尽管磷酸二酯和其他的核苷酸间键都在包括带有混合核苷酸间键合的寡核苷酸的本发明的范围内。在美国专利第 5, 666, 153, 5, 278, 302 和 W095/26204 中描述了产生硫代磷酸寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法。

[0166] 优选的寡核苷酸的实例具有在下述公开文献中公开的序列; 对于某些本文公开的实施方案, 所述序列优选含有硫代磷酸修饰的核苷酸间键合:

[0167] CPG7909: Cooper 等人, "CPG7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. (CPG7909 佐剂在抗逆转录病毒治疗的 HIV 感染的成年人中改善乙型肝炎病毒疫苗的血清保护)". AIDS, 2005Sep23; 19(14):1473-9。

[0168] CpG10101: Bayes 等人, "Gateways to clinical trials(临床试验途径)". Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2005Apr; 27(3):193-219。

[0169] Vollmer J., "Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9 (TLR9 的免疫激活性 CpG 寡聚脱氧核苷酸配体的药物开发进展)", Expert Opinion on Biological Therapy. 2005May; 5(5):673-682。

[0170] 可选择的 CpG 寡核苷酸可以包括上文引用的公开文献中描述的优选序列变体, 其不同在于具有无意义(inconsequential)的核苷酸序列置换、插入、删除和/或添加。本发明的某些实施方案中使用的 CpG 寡核苷酸可以通过本领域已知的任何方法合成(例如 EP 468520)。可以利用自动合成仪方便地合成这些寡核苷酸。所述寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在优选的实施方案中, 寡核苷酸中的核苷酸间键是二硫代磷酸酯, 或更优选地是硫代磷酸键, 尽管磷酸二酯也在本发明涉及的实施方案范围内。也涉及包含不同核苷酸间键合的寡核苷酸, 例如, 混合的硫代磷酸磷酸二酯。也可以使用稳定寡核苷酸的其他核苷酸间键。

[0171] 辅佐剂

[0172] 本文提供的某些实施方案包括疫苗组合物和免疫佐剂组合物,包括药物组合物,所述组合物除了 GLA,含有至少一种辅佐剂,该辅佐剂指这种组合物中具有不同于 GLA 的佐剂活性的组分。具有所述佐剂活性的辅佐剂包括一种成份,其在给予诸如人类(例如人类患者)、非人类的灵长类、哺乳动物或具有公认的免疫系统的另一种高等真核生物体的个体时能够改变(即,以统计学上显著的方式增加或降低;以及在某些优选的实施方案中,增强或增加)免疫应答的能力和寿命。(参见,例如,Powell and Newman, "Vaccine design-The Subunit and Adjuvant Approach(疫苗设计-亚单位和佐剂方法)",1995,Plenum Press, New York)。在本文公开的某些实施方案中,GLA 和期望的抗原,以及任选地一种或多种辅佐剂可以因此改变,例如诱发或增强针对期望的抗原的免疫应答,所述抗原可以与 GLA 同时给药,或者可以在时间和/或空间上(例如,在不同的解剖学部位)分开给药。但某些发明实施方案并不限制于此,还涉及在不包括指定抗原的组合物中的 GLA 的给药,但所述组合物还可以包括一种或多种 TLR 激动剂、辅佐剂、咪唑并喹啉免疫应答调节剂以及双茎环免疫调节剂(dSLIM)。

[0173] 因此如上所述,辅佐剂包括除了 GLA 之外具有佐剂作用的成分,诸如皂苷和皂苷类似物,包括 QS21 和 QS21 类似物(参见,例如,美国专利第 5,057,540 号;EP0362279B1;WO95/17210)、明矾、诸如番茄素的植物碱、诸如(但不限于)皂苷、聚山梨醇酯 80、司盘 85 和硬脂酰酪氨酸的去垢剂、一种或多种细胞因子(例如,GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF- α , IFN- γ)、咪唑并喹啉免疫应答调节剂以及双茎环免疫调节剂(dSLIM, 例如,Weeratna 等人,2005Vaccine23:5263)。

[0174] 在例如美国专利 6,544,518, Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996Phytomedicine2:363-386), 美国专利第 5,057,540 号, Kensil, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12(1-2):1-55 和 EP 0 362 279 B1 中讲述了包含皂苷的去垢剂。包含 Quil A 部分(皂苷)的称为免疫激活复合物(ISCOMS)的微粒结构是溶血的,且已经用于疫苗的制备中(Morein, B., EP 0 109 942 B1)。据报道,这些结构具有佐剂活性(EP 0109 942 B1;WO 96/11711)。这些溶血皂苷 QS21 和 QS17(QuilA 的 HPLC 纯化部分)已经作为有效的系统佐剂被描述,且在 U. S. Pat. No. 5,057,540 和 EP 0 362 279 B1 中公开了它们的制备方法。这些参考文献中也描述了 QS7(Quil-A 的非溶血部分)作为系统疫苗的有效佐剂的用途。在 Kensil 等人(1991. J. Immunology146:431-437)中还描述了 QS21 的用途。QS21 和聚山梨醇酯或环式糊精的组合也是已知的(WO 99/10008)。在 WO 96/33739 和 WO 96/11711 中描述了包含诸如 QS21 和 QS7 的 QuilA 部分的微粒佐剂系统。已经用于系统接种疫苗研究的其他皂苷包括来自诸如丝石竹属(Gypsophila)和肥皂草属(Saponaria)的其他植物品种的那些(Bomford 等人, Vaccine, 10(9):572-577, 1992)。

[0175] 七叶树皂角素(Escin)是与用于本文公开的实施方案的佐剂组合物中的皂苷有关的另一种去垢剂。七叶树皂角素在默克索引(第 12 版:第 3737 条目)中被描述为皂苷的混合物,存在于马栗树(horse chestnut tree),欧洲七叶树(Aesculus hippocastanum)的籽中。描述了它通过层析和纯化(Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213(1953)),以及通过离子交换树脂(Erbring 等人, 美国专利第 3,238,190 号)的分离。七叶树皂角素部分(也称为七叶皂甙)已经被纯化并已显示出具有生物学活性(Yoshikawa M 等人(Chem Pharm Bull(Tokyo)1996August;44(8):1454-1464))。毛地黄皂苷是另一种去垢剂,也在默克索

引(第12版,第3204条目)中被描述为皂苷,其来自毛地黄 (*Digitalis purpurea*) 的籽,并依照 Gisvold 等人, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1934, 23, 664 和 Rubenstroth-Bauer, *Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621 描述的方法被纯化。

[0176] 用于本文公开的某些实施方案中的其他辅佐剂包括嵌段共聚物或生物可降解聚合物,其涉及本领域相关技术人员熟悉的一类聚合化合物。可以包括在 GLA 疫苗组合物内或 GLA 免疫佐剂内的嵌段共聚物或生物可降解聚合物的实例包括普流罗尼克® L121 (BASF Corp., Mount Olive, NJ; 参见,例如, Yeh 等人, 1996 *Pharm. Res.* 13:1693; 美国专利第 5,565,209 号)、CRL1005 (例如, Triozzi 等人, 1997 *Clin. Canc. Res.* 3:2355)、聚(乳酸-乙醇酸共聚物) (PLGA)、聚(乳酸) (PLA)、聚-(D,L-丙交酯-共-乙交酯) (PLG)、以及聚 I:C。(参见,例如, Powell and Newman, "Vaccine design-The Subunit and Adjuvant Approach (疫苗设计-亚单位和佐剂方法)", 1995, Plenum Press, New York)

[0177] 某些实施方案涉及包括油的 GLA 疫苗和 GLA 免疫佐剂,所述油在某些此类实施方案中可以促进辅佐剂活性,在其他的此类实施方案中可以附加地或选择地提供药学上可接受的载体或赋形剂。已知许多合适的油,基于本发明公开内容其可以被选择包含在疫苗组合物和免疫佐剂组合物中。举例来说,此类油的实例包括但不限于角鲨烯、角鲨烷、矿物油、橄榄油、胆固醇和二缩甘露醇单油酸酯。

[0178] 诸如咪唑并喹啉免疫应答调节剂的免疫应答调节剂在本领域也是已知的,并可以作为辅佐剂包括在本发明公开的某些实施方案中。某些优选的咪唑并喹啉免疫应答调节剂包括(作为非限定性实例)雷西莫特 (R848)、咪喹莫特和嘎德莫特 (Hemmi 等人, 2002 *Nat. Immunol.* 3:196; Gibson 等人, 2002 *Cell. Immunol.* 218:74; Gorden 等人, 2005 *J. Immunol.* 174:1259); 这些和其他的咪唑并喹啉免疫应答调节剂在适当的条件下,也可以具有本文描述的 TLR 激动剂活性。其他的免疫应答调节剂是基于核酸的双茎环免疫调节剂 (dSLIM)。可以在 Schmidt 等人, 2006 *Allergy* 61:56; Weihrauch 等人 2005 *Clin. Cancer Res.* 11(16):5993-6001; Modern Biopharmaceuticals, J. Knablein (Editor). John Wiley & Sons, December 6, 2005. (183 至约 200 页讨论了 dSLIM) 中,以及从 Mologen AG (Berlin, FRG: [2006 年 8 月 18 日在 <http://www.mologen.com/English/04.20-dSLIM.shtml> 的在线检索] 中发现被涉及用于本发明公开的某些实施方案中的 dSLIM 的具体实例。

[0179] 如上文所述,与本文所述的 GLA 一起使用的一种辅佐剂可以是铝辅佐剂,其通常被称为“明矾”。明矾辅佐剂基于下述:羟基氧化铝、磷酸羟铝,或各种专利盐 (proprietary salts)。使用明矾辅佐剂的疫苗可以包括用于破伤风菌株、HPV、甲型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒的疫苗以及本文描述的其他抗原。铝辅佐剂是有优势的,因为它们具有良好的安全记录、能放大抗体应答、稳定抗原并且用于大规模生产相对简单。(Edelman 2002 *Mol. Biotechnol.* 21:129-148; Edelman, R. 1980 *Rev. Infect. Dis.* 2:370-383.)

[0180] 可以与 GLA 结合用于有效的免疫刺激的其他辅佐剂包括皂苷和皂苷类似物,包括 QS21 以及在本文被称为 QS21 类似物的产生相似作用的结构相关化合物。QS21 已经被公认为是优选的辅佐剂。QS21 可以包含来自智利皂荚树 (*Quillaja Saponaria Molina*) 的树皮、经 HPLC 纯化的非毒性部分。在美国专利第 5,057,540 号中公开了 QS21 的制备。(还可参见美国专利第 6,936,255 号,第 7,029,678 号和第 6,932,972 号)

[0181] 在某些实施方案中, GLA 也可以与被称为 ISCOMS 的“免疫激活复合物”(例如美

国专利第 6,869,607 号,第 6,846,489 号,第 6,027,732 号,第 4,981,684 号)结合,包括皂苷来源的 ISCOMATRIX®,其可以从例如 Iscotec (Stockholm, Sweden) 和 CSL Ltd. (Parkville, Victoria, Australia) 商购。

[0182] 重组表达构建体

[0183] 依照本文公开的某些实施方案, GLA 疫苗组合物可以含有至少一种重组表达构建体,其包含可操作连接于编码抗原的核酸序列的启动子。在某些另外的实施方案中,所述重组表达构建体存在于诸如腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、慢病毒、痘病毒或逆转录酶病毒载体的病毒载体中。制备和使用这些表达构建体和载体的组合物和方法是本领域已知的,例如依照 Ausubel 等人 (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology (新编分子生物学实验指南), 2006 John Wiley & Sons, NY, 用于本文提供的多肽抗原的表达。通常可以在例如美国专利第 6,844,192 号;第 7,037,712 号;第 7,052,904 号;第 7,001,770 号;第 6,106,824 号;第 5,693,531 号;第 6,613,892 号;第 6,875,610 号;第 7,067,310 号;第 6,218,186 号;第 6,783,981 号;第 7,052,904 号;第 6,783,981 号;第 6,734,172 号;第 6,713,068 号;第 5,795,577 和 6,770,445 号以及别处找到用于某些本发明公开的实施方案中的重组表达构建体的非限定性实例,以及适用于本文提供的多肽抗原表达的教导。

[0184] 免疫应答

[0185] 本发明因此提供了在能够启动免疫应答的宿主内改变(即,例如,相对于本领域的技术人员熟悉的适当对照,以统计学上显著的方式增强或降低)免疫应答的组合物。正如本领域的普通技术人员已知的,免疫应答可以是宿主免疫状态的任何积极的改变,其可以包括参与宿主免疫状态的维持和/或调节的一种或多种组织、器官、细胞或分子的结构或功能的任何改变。通常,可以通过多种公知的参数的任一种检测免疫应答,这些参数包括但不限于体内或体外的下述检测:可溶性免疫球蛋白或抗体的检测;诸如细胞因子、淋巴因子、趋化因子、激素、生长因子等可溶性介质以及其他可溶性小肽、碳水化合物、核苷和/或脂质介质的检测;由免疫系统中细胞改变的功能或结构特性确定的细胞激活状态的变化,例如细胞增殖、改变的运动性、诸如特异性基因表达或溶细胞行为的专门活性诱导;通过免疫系统的细胞的细胞分化,包括改变的表面抗原表达谱或凋亡的启动(程序性细胞死亡);或者任何其他可以检测免疫应答存在的标准。

[0186] 免疫应答通常被认为是,例如,通过宿主免疫系统的细胞和组织在分子和细胞水平上区分自身结构和异己结构,但本发明不应局限于此。例如,免疫应答还可以包括由自身分子、细胞或组织的免疫识别导致的免疫系统状态变化,这可以伴随诸如免疫系统组分的典型调节的许多正常状态,或者可以存在于诸如在自身免疫和退行性疾病中观测到的不适当的自身免疫应答的病理状态。作为另一个实例,除了诱导特定免疫系统活性的上调(诸如抗体和/或细胞因子产生,或者细胞介导的免疫激活)外,免疫应答还可以包括可检测的免疫的抑制、消弱或任何其他的下调,这可以由选择的抗原、抗原给药途径、特异耐受诱导或其他因素导致的。

[0187] 可以通过本领域的普通技术人员易于熟悉的许多公知的免疫学测定的任一种来建立由本发明的疫苗诱导的免疫应答的检测。这些测定包括,但不必限于体内或体外的下述检测:可溶性抗体的检测;诸如细胞因子、淋巴因子、趋化因子、激素、生长因子等可溶性介质以及其他可溶性小肽、碳水化合物、核苷和/或脂质介质的检测;由免疫系统中

细胞改变的功能或结构特性来确定的细胞激活状态的变化,例如细胞增殖、改变的运动性、诸如特异性基因表达或溶细胞行为的专门活性诱导;通过免疫系统的细胞的细胞分化,包括改变的表面抗原表达谱或凋亡的启动(程序性细胞死亡)。进行这些和类似测定的操作步骤是公知的,并且可以在例如 Lefkovits(Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques(免疫学方法手册:全面的技术读物资料),1998;也可参见 Current Protocols in Immunology(免疫学实验指南);还可参见,例如,Weir, Handbook of Experimental Immunology(实验免疫学手册),1986Blackwell Scientific, Boston, MA; Mishell and Shigii(eds.) Selected Methods in Cellular Immunology(细胞免疫学方法精选),1979Freeman Publishing, San Francisco, CA; Green and Reed, 1998Science281:1309 和其中引用的参考文件)中找到。

[0188] 抗原反应性 T 细胞增殖的检测可以通过多种已知的技术实现。例如, T 细胞增殖可以通过测量 DNA 合成的速率来检测,且抗原特异性可以通过控制暴露于候选的抗原反应性 T 细胞的刺激物(诸如,例如,特异性期望的抗原-脉冲抗原呈递细胞或对照抗原-脉冲抗原呈递细胞)来测定。被刺激增殖的 T 细胞显示了增加的 DNA 合成速率。测量 DNA 合成速率的经典方式是,例如,通过用含氘的胸腺嘧啶脉冲标记 T 细胞培养物,所述含氘的胸腺嘧啶是掺入新合成的 DNA 的核苷前体。掺入的含氘胸腺嘧啶的量可以用液体闪烁谱仪来测定。检测 T 细胞增殖的其他方式包括测量白介素-2(IL-2)产生的增加、Ca²⁺流出或染料摄取,诸如 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-联苯-四唑。可选择地,可以测量淋巴因子(诸如干扰素- γ)的合成,或者可以定量应答特定抗原的 T 细胞的相对数目。

[0189] 例如,可以通过采用诸如放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、平衡透析或包括 Western 印迹的固相免疫印迹的体外方法学,测定来自用本发明的疫苗处理的宿主的样本(例如,包含免疫球蛋白的样本,诸如血清、血浆或血液)来检测抗原特异性抗体的产生。在优选的实施方案中,ELISA 测定还可以包括用靶抗原特异性的固相单克隆抗体进行靶抗原的抗原捕获固定,例如,以增加该测定的敏感性。例如,使用商业途径容易得到的方法、装置和试剂(例如 Sigma, St. Louis, MO; 还参见 R&D Systems2006Catalog, R&D Systems, Minneapolis, MN),通过酶联免疫吸附测定(ELISA)也可以容易地检测可溶性介质(例如,细胞因子、趋化因子、淋巴因子、前列腺等)的详细结果。

[0190] 许多其他的免疫学参数可以使用本领域公知的常规测定来监测。这些可以包括,例如,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)测定、继发性体外抗体应答、利用已确立的标志物抗原系统进行各种外周血细胞或淋巴样单核细胞亚群的流式免疫细胞荧光测定分析、免疫组织化学或其他相关的测定。例如,可以在 Rose 等人(Eds.), Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th Ed. (临床实验室免疫学手册,第 5 版), 1997American Society of Microbiology, Washington, DC 中找到这些和其他测定。

[0191] 因此,本发明涉及本文提供的疫苗和佐剂组合物能够诱发或增强宿主的至少一种免疫应答,所述免疫应答选自 T_H1-型 T 淋巴细胞反应、T_H2-型 T 淋巴细胞反应、细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)反应、抗体应答、细胞因子反应、淋巴因子反应、趋化因子反应以及炎症反应。在某些实施方案中,免疫应答可以包含下述中的至少一种:一种或多种细胞因子的产生,其中所述细胞因子选自干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α);一种或多种白介素的产生,其中所述白介素选自 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、

IL-12、IL-13、IL-16、IL-18 和 IL-23；一种或多种趋化因子的产生，其中所述趋化因子选自 MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、CCL4 和 CCL5；以及选自记忆性 T 细胞反应、记忆性 B 细胞反应、效应 T 细胞反应、细胞毒性 T 细胞反应以及效应 B 细胞反应的淋巴细胞反应。参见，例如 WO 94/00153；WO 95/17209；WO 96/02555；U. S. 6, 692, 752；U. S. 7, 084, 256；U. S. 6, 977, 073；U. S. 6, 749, 856；U. S. 6, 733, 763；U. S. 6, 797, 276；U. S. 6, 752, 995；U. S. 6, 057, 427；U. S. 6, 472, 515；U. S. 6, 309, 847；U. S. 6, 969, 704；U. S. 6, 120, 769；U. S. 5, 993, 800；U. S. 5, 595, 888；Smith 等人，1987J Biol Chem. 262:6951；Kriegler 等人，1988Cell53:4553；Beutler 等人，1986Nature320:584；U. S. 6, 991, 791；U. S. 6, 654, 462；U. S. 6, 375, 944。

[0192] 药物组合物

[0193] 本文提供了包含本文所述的水包油乳剂的组合物（包括药物组合物）。在一些实施方案中，组合物还包含药物可接受的载体、赋形剂或稀释剂。在一些实施方案中，药物组合物是疫苗组合物。向个体给予本文所述的组合物以刺激个体的免疫应答（包括非特异性反应和抗原特异性反应）。在一些实施方案中，个体是哺乳动物（例如包括家畜（牛、猪、山羊、马等）和宠物（猫、狗等）或人）。在一些实施方案中，个体为恒温动物。

[0194] 药物组合物通常包含 GLA（可从 Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL 购买；产品号 699800），且还可以包含本文提供的与药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂结合的一种或多种组分，其选自抗原、TLR 激动剂、辅佐剂（任选地包括细胞因子、咪唑并喹啉免疫应答调节剂和 / 或 dSLIM）和 / 或重组表达构建体。

[0195] 因此，在某些方面，本发明涉及 GLA “单治疗”，其中如本文所述的，GLA 被配制于基本上没有其他抗原的乳剂中，并被给予个体以激活免疫应答，例如非特异性免疫应答，由此治疗或预防疾病或其他状态，诸如生物体导致的感染。在一个实施方案中，例如，本发明的组合物和方法采用了单磷酸二糖用于激活个体的免疫应答。在另一特定实施方案中，所述组合物和方法使用脂质 A 的 2-单酰形式来激活个体的免疫应答。在另一特定实施方案中，GLA 采用了喷雾形式，任选地以试剂盒的形式提供。

[0196] GLA 可以优选配制于本文所述的稳定的乳剂中。在一个特定的实施方案中，例如，提供了在基本上没有其他抗原的稳定乳剂中包含脂质 A 衍生物的组合物。在另一个特定的实施方案中，提供了适用于哺乳动物的包含 3-酰基单磷酸脂质 A 的衍生物的组合物，其中 2 位氨基具有单酰链，且该组合物基本上没有其他抗原。

[0197] 在某些其他实施方案中，药物组合物是包含 GLA 和抗原的疫苗组合物，另外还可以包含本文提供的与药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂结合的一种或多种组分，其选自 TLR 激动剂、辅佐剂（包括例如细胞因子、咪唑并喹啉免疫应答调节剂和 / 或 dSLIM）等和 / 或重组表达构建体。

[0198] 示例性的载体在使用的剂量和浓度对受者无毒。对于基于 GLA 加核酸的疫苗，或者对于包含 GLA 和抗原的疫苗，每千克体重给予约 0.01 μ g 至约 100mg，通常是通过皮内、皮下、肌肉内或静脉内途径或通过其他途径给予。

[0199] 优选的剂量是约 1 μ g/kg 至约 1mg/kg，特别优选的是约 5 μ g/kg 至约 200 μ g/kg。对本领域的技术人员显而易见的是，给药的数量和频率依赖于宿主的反应。用于治疗用途的“药学上可接受的载体”是药学领域公知的，且在例如 Remingtons Pharmaceutical

Sciences(雷明顿药物科学), Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985) 中被描述。例如,可以使用生理学 pH 的无菌盐水和磷酸缓冲盐。防腐剂、稳定剂、染料以及甚至调味剂都可以提供在药物组合物中。例如,苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯可以作为防腐剂加入。同在上在 1449。此外,可以使用抗氧化剂和悬浮剂。同上。

[0200] “药学上可接受的盐”指本发明的化合物的盐,其来自所述化合物和有机酸或无机酸(酸加成盐)或者有机或无机碱(碱加成盐)的合并物。本发明的组合物可以以游离碱或盐的形式使用,两种形式都被认为是在本发明的范围内。

[0201] 药物组合物可以是允许该组合物给予患者的任何形式。例如,所述组合物可以是固体、液体或气体(气溶胶)的形式。给药的典型途径包括,但不限于,口部的、表面的、肠胃外的(例如舌下的或经颊的)、舌下的、直肠的、阴道的以及鼻内的(例如作为喷雾剂)。本文使用的术语肠胃外的包括电离子导入(例如 U. S. 7, 033, 598 ;7, 018, 345 ;6, 970, 739)、超声波导入(例如, U. S. 4, 780, 212 ;4, 767, 402 ;4, 948, 587 ;5, 618, 275 ;5, 656, 016 ;5, 722, 397 ;6, 322, 532 ;6, 018, 678)、热的(例如 U. S. 5, 885, 211 ;6, 685, 699)、被动透皮(例如 U. S. 3, 598, 122 ;3, 598, 123 ;4, 286, 592 ;4, 314, 557 ;4, 379, 454 ;4, 568, 343 ;5, 464, 387 ;UK Pat. Spec. No. 2232892 ;U. S. 6, 871, 477 ;6, 974, 588 ;6, 676, 961)、微针(例如 U. S. 6, 908, 453 ;5, 457, 041 ;5, 591, 139 ;6, 033, 928)给药,且还包括皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内、海绵窦内(intracavernous)、鞘内(intrathecal)、外耳道内(intrameatal)、尿道内注射或输注方法。在特定的实施方案中,本文描述的组合物(包括疫苗和药物组合物)通过选自电离子导入、微气穴(microcavitation)、超声波导入或微针的技术皮内给药。

[0202] 如此配制药组合物以使在将该组合物给予患者时,包含其中的活性成分是生物可利用的。给予患者的组合物采用一个或多个剂量单位的形式,其中,例如,药片可以是单一剂量单位,以气溶胶形式的本发明的一种或多种化合物的容器可以有多个剂量单位。

[0203] 对于口服给药,可以存在赋形剂和/或粘结剂。实例是蔗糖、高岭土、淀粉糊精、藻酸钠、羧甲基纤维素和乙基纤维素。着色剂和/或调味剂可以存在。可以使用涂层。

[0204] 组合物可以是液体形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳剂或悬浮剂。作为两个实例,所述液体可以口服给药或通过注射递送。当意欲口服给药时,优选的组合物包含甜味剂、防腐剂、染色/着色剂以及增味剂的一种或多种。在意欲通过注射给药的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲液、稳定剂和等渗剂的一种或多种。

[0205] 本文使用的液体药物组合物药物组合物,无论是以溶液、悬浮液的形式或其他相似的形式,都可以包括下述载体或赋形剂的一种或多种:诸如注射水、盐水溶液、优选生理盐水、林格液、等渗氯化钠的无菌稀释液,诸如角鲨烯、角鲨烷、矿物油、二缩甘露醇单油酸酯、胆固醇和/或合成的单和二甘油酯的可以作为溶剂或悬浮介质的不挥发性油,聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其他溶剂;诸如苯甲醇或尼泊金甲酯的抗菌剂;诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠的抗氧化剂;诸如乙二胺四乙酸的螯合剂;诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐的缓冲液以及诸如氯化钠或葡萄糖的张力调节剂。肠胃外制剂可以装入安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多次剂量瓶内。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0206] 在特别的实施方案中,本发明的药物或疫苗组合物包含小于 0.2 μ m 的稳定水悬浮液,且进一步包含选自磷脂、脂肪酸、表面活性剂、去垢剂、皂苷、含氟脂(fluorodated

lipids) 等的至少一种组分。

[0207] 在另一个实施方案中,本发明的组合物以可以雾化的方式配制。

[0208] 在疫苗或药物组合物中包括诸如递送载体的其他组分也可以是理想的,所述递送载体包括但不限于铝盐、油包水型乳剂、生物可降解油载体、水包油型乳剂、生物可降解微胶囊以及脂质体。在上文也描述了用于所述载体中的另外免疫激活物质(辅佐剂)的实例,其可以包括 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷酰胺(MDP)、葡聚糖、IL-12、GM-CSF、 γ 干扰素和 IL-12。

[0209] 尽管本发明的药物组合物可以使用本领域的技术人员已知的任何合适的载体,但载体的类型依赖给药方式和是否需要持续释放而变化。对于肠胃外给药,诸如皮下注射,载体优选包含水、盐水、乙醇、脂肪、蜡或缓冲液。对于口服给药,可以使用上述载体的任一种或固体载体,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。也可以使用生物可降解的微球体(例如聚乳酸酯(poly(lactic acid)))作为本发明的药物组合物的载体。例如在美国专利第 4,897,268 号和第 5,075,109 号中公开了合适的生物可降解的微球体。在这点上,大于约 25 微米的微球体是优选的。

[0210] 药物组合物(包括 GLA 疫苗和 GLA 免疫佐剂)也可以含有诸如缓冲液的稀释液,诸如抗坏血酸的抗氧化剂、低分子量(少于约 10 个残基)的多肽、蛋白质、氨基酸、包括葡萄糖、蔗糖或糊精的碳水化合物,诸如 EDTA 的螯合剂,谷胱甘肽和其他稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是示例性的适当的稀释液。优选地,使用适当的赋形剂溶液(例如,蔗糖)作为稀释液可以将产品配制成冷冻干产物。

[0211] 如上文所述,在某些实施方案中,本发明包括能够递送编码期望的抗原的核酸分子的组合物。这种组合物包括重组病毒载体(例如,逆转录病毒(参见 WO 90/07936, WO 91/02805, WO 93/25234, WO 93/25698 和 WO 94/03622)、腺病毒(参见 Berkner, *Biotechnology* 6:616-627, 1988; Li 等人, *Hum. Gene Ther.* 4:403-409, 1993; Vincent 等人, *Nat. Genet.* 5:130-134, 1993; and Kolls 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:215-219, 1994)、痘病毒(参见美国专利第 4,769,330 号;美国专利第 5,017,487 号;和 WO 89/01973))、络合到聚阳离子分子的重组表达构建体核酸分子(参见 WO 93/03709),以及与脂质体结合的核酸(参见 Wang 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851, 1987)。在某些实施方案中, DNA 可以连接到杀死的或灭活的腺病毒(参见 Curiel 等人, *Hum. Gene Ther.* 3:147-154, 1992; Cotton 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6094, 1992)。其他合适的组合物包括 DNA-配体(参见 Wu 等人, *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989)和脂质-DNA 组合物(参见 Feigner 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989)。

[0212] 除了直接的体内操作,也可以采用间接体内(ex vivo)操作,其中将细胞从宿主取出,修饰并置入相同的宿主动物或另外的宿主动物。显然,本领域技术人员可以利用上述组合物的任一种将编码抗原的核酸分子导入间接体内环境中的组织细胞。用于病毒的、物理的和化学的摄取方法的操作是本领域公知的。

[0213] 因此,本发明用于增强或诱发宿主、患者或细胞培养物的免疫应答。如本文使用的,术语“患者”指任何温血动物,优选人类。患者可以罹患传染性疾病、诸如乳腺癌的癌症或自身免疫疾病,或者可以是正常的(即,没有可检测的疾病和/或感染)。“细胞培养物”是含有免疫活性细胞或免疫系统的分离的细胞(包括,但不限于,T 细胞、巨噬细胞、单核细

胞、B 细胞和树突状细胞)的任何制备物。所述细胞可以通过本领域普通技术人员公知的多种技术来分离(例如聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-hypaque)密度离心)。细胞可以(但不必须)从罹患癌症的患者中分离出,且可以重新导入治疗后的患者。

[0214] 在某些实施方案中,意欲肠胃外或口服给药的液体组合物应该含有一定量的 GLA 疫苗组合物以达得合适的剂量。通常,该量是组合物中抗原重量的至少 0.01%。当意欲口服给药时,该量可以在组合物重量的 0.1%至约 70%变动。优选的口服组合物含有约 4%至约 50%的抗原。优选的组合物和制剂如下制备:使肠胃外剂量单位含有 0.01%至 1%重量比的活性成分。

[0215] 药物组合物可以用于表面给药,在这种情况下,载体可以适宜地包括溶液、乳剂、药膏或凝胶基质。所述基质,例如,可以包括下述中的一种或多种:矿脂、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、诸如水和乙醇的稀释液,以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于用于表面给药的药物组合物中。如果计划透皮给药,组合物可以包括透皮贴片或电离子导入装置。表面制剂可以含有来自约 0.1%至约 10% w/v(每单位体积的重量)的抗原(例如 GLA-抗原疫苗组合物)或 GLA(例如免疫佐剂组合物;GLA 可以从 Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL 处得到;例如产品号 699800)的浓缩物。

[0216] 意欲直肠给药的组合物,可以采用例如栓剂的形式,其在直肠内溶化并释放出药物。用于直肠给药的组合物可以含有作为合适的无刺激赋形剂的油脂性基质。这种基质包括,但不限于,羊毛脂、可可油和聚乙二醇。在本发明的方法中,疫苗组合物/佐剂可以通过使用插入物、珠子、延时释放制剂、贴片或快速释放制剂来给药。

[0217] 某些实施方案也涉及包含本文描述的 GLA 疫苗组合物和/或 GLA 免疫佐剂组合物的试剂盒,其可以以一种或多种容器提供。在一个实施方案中,GLA 疫苗组合物和/或 GLA 免疫佐剂组合物的所有组分共同存在于单个容器内,但本发明的实施方案并不限制于此,还可以涉及两个或多个容器,其中,例如,GLA 免疫佐剂组合物与抗原组分分离,互不接触。通过非限定的理论,认为在一些情况下,GLA 免疫佐剂组合物的单独给药是有益的,而在另一些情况下,这种给药与抗原的给药在时间上和/或空间(例如在不同的解剖部位)上分开是有益的,仍在另一些情况下,个体的给药是有益地给予本文所述的 GLA 疫苗组合物,其包含抗原和 GLA,以及任选地,最好还是本文所述的其他组分。

[0218] 所述试剂盒实施方案的容器可以是任何合适的容器,器皿、小瓶、安瓿、管子、杯子、盒子、瓶子、长颈瓶、罐、盘、单孔或多孔器械的孔、槽、桶等等,或者其他装置,本文公开的组合物可以在其中放置、储存和/或转运,并易于移走其中的内容物。通常,这种容器可以由与目的用途相兼容的材料制造,从中可以容易地实现包含的内容物的回收。这种容器的优选实例包括玻璃和/或塑料密封的或可重新密封的管子和安瓿,包括具有橡胶隔膜的那些或其他密封的装置,其使用针和注射器与内容物的回抽兼容。例如,这样的容器可以由玻璃或化学兼容的塑料或树脂制成,该玻璃或化学兼容的塑料或树脂可以由一种材料制成,也可以是涂覆由这种材料,该材料允许容器中的物质的有效回收和/或保护这种物质免受例如诸如紫外线或温度极限的降解条件的影响,或防止包括微生物污染物的不必要的污染物进入。容器优选地为无菌的或可灭菌的,并且由可与任何载体、赋形剂、溶剂、媒介物等兼容的材料制成,这样可被用于悬浮或溶解本文所描述的疫苗组合物和/或免疫佐剂组合物和/或抗原和/或重组表达构建体等等。

[0219] 下面提供的实施例用于说明而非限制。

实施例

[0220] 实施例 1

[0221] 乳剂佐剂剂量滴定及 TLR4 激动剂制剂对重组疟疾疫苗免疫原性的作用

[0222] 导论

[0223] 水包油 (o/w) 乳剂已经安全且成功地用作现代疫苗中的佐剂。最显著的 o/w 乳剂是 **MF59®** 和 **AS03®**，其分别由 Novartis 和 GSK Biologicals 生产。这两种佐剂均包含在最终疫苗制剂中约 2.5% v/v 的角鲨烯 [1]。然而，直至最近，仅公开了少数与选择这种角鲨烯浓度的启示相关的报道 [2-4]。此外，最近的研究表明 MF59 的稀释不损害流行性流感疫苗临床试验中的免疫应答 [5]。如果通过降低角鲨烯剂量来维持佐剂活性，则可能会降低 o/w 乳剂的局部反应原性。此外，疫苗成本会降低，同时可用的佐剂供应会增加，由此在资源贫乏的国家中使疫苗和佐剂生产变得更切实可行。

[0224] 重组疟疾抗原 PfCe1TOS (用于动合子和孢子体的遍布恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 细胞的蛋白) 与乳剂佐剂 (**Montanide®** ISA720) 的组合已经在异源攻击模型的 60% 的小鼠中表现出保护效能 [6]。PfCe1TOS 抑制孢子体运动和肝细胞感染性，并且可成为下一代疟疾疫苗的重要组分。细胞免疫应答和体液免疫应答对保护效能均为重要的 [6, 7]。

[0225] 在这项工作中，我们评价了基于角鲨烯的稳定乳剂 (SE) 佐剂在对 PfCe1TOS 的体液细胞免疫应答和细胞免疫应答方面的剂量作用。此外，我们研究了在疫苗制剂中包含合成 TLR4 激动剂 (吡喃葡萄糖脂佐剂, GLA) 的作用。我们表明在 GLA-SE 中小于 2% v/v 的角鲨烯浓度可以诱发与 2% v/v 角鲨烯浓度相同的佐剂应答。该发现对于疫苗佐剂生产和给药以及可能对油浓度更敏感的给药新途径 (例如皮内给药) 而言具有重大意义。此外，我们表明存在 GLA 使免疫应答朝向 Th1- 型应答发展，诱发更高水平的 IgG2a 抗体滴度、产生 IFN- γ 的细胞和长期存活的分泌抗体的浆细胞，这对于疫苗效能可能是重要的。

[0226] 材料和方法

[0227] 免疫制剂。鲨鱼肝脏角鲨烯 ($\geq 98\%$ 纯度) 购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。甘油和 α -生育酚购自 Spectrum Chemical (Gardena, CA)。泊洛沙姆 188 (**Pluronic®** F68) 得自 BASF (Ludwigshafen, Germany) 或 Spectrum Chemical。蛋黄磷脂酰胆碱 (蛋黄 PC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC) 和吡喃葡萄糖脂佐剂 (GLA) 得自 Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL)。磷酸铵缓冲剂组分也得自 J. T. Baker。可以通过制成单独的水相和油相来制备乳剂制剂。将泊洛沙姆 188、甘油和缓冲剂组分通过搅拌来溶解在水相中，而蛋黄磷脂酰胆碱通过超声处理和加热来溶解在油相中。然后用 Silverson Heavy Duty Laboratory Mixer Emulsifier (3/4 英寸管状方形孔高剪切筛选附加装置；East Longmeadow, MA) 以约 7,000RPM 将水相和油相 (10% v/v 油) 混合 10 分钟，从而产生粗制乳剂。通过 Microfluidics M110P (Newton, MA) 高压均化器以约 207MPa (约 30,000psi) 处理粗制乳剂，持续 12 个工作循环。通过在有机溶剂中将 GLA 与 DPPC 以 4.2:1 摩尔比预混合，然后溶剂蒸发和用超纯水水合，从而形成 GLA 的水性悬浮液。约 70°C 的水浴超声处理形成纳米颗粒水性悬浮液 GLA-AF。在整个免疫接种方案期间，在 5°C 通过尺寸和 GLA 浓

度来监测制剂。通过前述的动态光散射来测量粒径 [8]。GLA 浓度由 HPLC-CAD 监测 [9]。在免疫接种当天,将乳剂用 PBS 稀释至指定的油浓度,并且与抗原和 GLA-AF(若适用的话)混合。**Montanide®** ISA720 购自 Seppic Inc. (Fairfield, NJ),并且通过在免疫接种前与 30% v/v 水相混合而制备。整个文本中,乳剂剂量是指油在最终疫苗制剂中的 % v/v ;油与乳化剂之比在所有剂量下保持恒定。在 Walter Reed Army Institute of Research 开发并生产密码子协调化的重组抗原 PfCe1TOS,并将其提供至 IDRI 作为磷酸盐缓冲剂中的纯化主体,这承蒙 Dr. Evelina Angov 的好意。

[0228] 免疫学方法

[0229] 使用 Prism (GraphPad 软件, La Jolla, CA) 测定终点滴度,然后在稀释下测定曲线拟合(可变斜率)值,终点滴度对应于如之前 [10] 所述的以 $C = \bar{X} + SDf$ 测定的截止值(C),其中 \bar{X} 是平均值且 SD 是负血浆对照板的标准偏差,且 f 是 99.9% 置信水平下的乘数。如果上述测定的截止值小于 0.10D,则指定该截止值为 0.10D。在个别情况下,单个板的孔显示在最高稀释附近的异常高的读数。通过采用 Grubb 检验在 99% 置信水平,对疑似值与上述稀释附近的 4 次稀释进行对比,从曲线拟合排除这些值 [11]。

[0230] 结果

[0231] GLA-AF 和 SE 是稳定的纳米颗粒制剂 [12]。GLA-AF 是 GLA 和磷脂颗粒的水性纳米悬浮液。SE 是基于角鲨烯的纳米乳剂,通常以 2% v/v 角鲨烯用于免疫接种。为了促进乳剂剂量滴定并同时保持 GLA 浓度恒定,将 GLA-AF 添加至指定浓度的 SE,然后立即对标记为 GLA-SE 的实验组进行免疫接种。用于本研究的制剂批次的平均粒径为 88nm-98nm,并示于表 1 中。在图 1 中示出 GLA 在不同批次的 GLA-AF 中随时间的浓度,证明了在下述体内研究的持续时间及至少 6 个月内 TLR 激动剂浓度的稳定性。**Montanide®** ISA720 是油包水佐剂,其通常以 70% v/v 角鲨烯用于免疫接种,并且先前表明在疟疾攻击模型中 PfCe1TOS 的显著无菌保护 [6]。**Montanide®** ISA720 因此用作下述免疫原性研究的正对照。

[0232] 用 PfCe1TOS 疫苗组合物对 BALB/c 小鼠进行免疫 3 次,并且注射之间为 3 周。图 2 示出在第 2 次和第 3 次免疫接种之后全部 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体终点滴度。在第 3 次免疫接种(图 2d-f)之后,SE 剂量滴定的影响是明显的,即,0.02% SE 组与 2% SE 组相比,全部 IgG、IgG1 和 IgG2a 应答降低。0.1% 和 0.5% SE 组也表现出比 2% SE 组更低的 IgG2a 应答。然而,添加 GLA 可能消除这种 SE 剂量滴定作用:所有 GLA-SE 组不管乳剂剂量如何,均诱发相同的 IgG、IgG1 和 IgG2a 应答。实际上,GLA-AF 组(不含乳剂)与 GLA-SE 组相比诱发相同的抗体应答。明显地,与不含 GLA 的相同疫苗组合物相比,GLA(无论是 SE 还是 AF)的存在诱发更强的 IgG2a 应答。**Montanide®** 组表现出最高的 IgG1 应答,尽管与 2% SE 或 0.5% GLA-SE 组相比并非显著不同。在第 2 次免疫接种之后的抗体应答表现出与上述类似的形式,尽管总体滴度略微更低(图 2a-c)。此外,多个 GLA-SE 组与 GLA-AF 相比表现出显著更高的 IgG2a 和 IgG1 应答。最后,与仅抗原的组相比,包含 GLA(SE 或 AF)、**Montanide®** 或 2% SE 的疫苗诱发骨髓中较高数量的分泌抗体的浆细胞(图 2g)。有趣地,与最大 2% SE 剂量相比,0.02% SE 表现出降低水平的分泌抗体的浆细胞,反映出 IgG 抗体终点滴度。

[0233] 在另一实验中,采用较窄范围的 SE 剂量滴定(0.5% -2%),并且研究细胞应答及体液应答。在图 3 中,示出在第 2 次和第 3 次免疫接种之后测量的全部 IgG、IgG1 和 IgG2a

抗体终点滴度。在第3次免疫接种（图3d-f）之后，所有佐剂的组与单独抗原相比表现出更高的总IgG应答。然而，0.5%剂量的SE与单独抗原相比不能诱发更高的IgG1抗体，并且所有SE剂量与单独抗原相比不能诱发更高的IgG2a应答。相反，所有含GLA的组与单独抗原相比表现出更高的IgG、IgG1和IgG2a应答。与不含GLA的相同组合物相比，GLA显著增加所有组中的IgG2a应答。尽管Montanide®组与所有其他组相比表现出显著更高的IgG1滴度，但0.5%和1%SE剂量的GLA-SE组与Montanide®组相比诱发更高的IgG2a应答。相似的形式在第2次免疫接种（图3a-c）之后是明显的，但与第3次免疫接种后的结果相反，0.5%SE剂量诱发了高IgG1应答。由含GLA或Montanide®的疫苗诱发更高数量的分泌抗体的浆细胞（图3g），尽管在多个SE浓度中剂量滴度作用是不明显的。

[0234] 通过细胞因子ELISPOT测定来研究细胞应答。与单独抗原、GLA-AF、不含GLA的SE、或Montanide®组相比，1%或2%SE剂量的GLA-SE组诱发更高水平的产生IFN- γ 的细胞（图4a）。相反，GLA-SE组表现出可忽略水平的分泌IL-5的细胞（图4b），而2%SE组与单独抗原的组或Montanide®组相比诱发更高水平的分泌IL-5的细胞。相似趋势在多重细胞因子微珠分析结果中是明显的，其中由GLA-SE组诱导Th1细胞因子IFN- γ 的产生，而增加的Th2细胞因子如IL-5、IL-10和IL-13与不含GLA的乳剂组相关（图5）。2%SE剂量诱发最高的Th2细胞因子细胞应答（例如IL-5和IL-13）。

[0235] 讨论

[0236] 将GLA包含在上述疫苗组合物中使免疫应答朝向Th1偏性发展，如显著更高的IgG2a抗体和IFN- γ 产生所证明。尽管在先前Ce1TOS研究中未发现总抗体产生与保护效能相关，但未进行抗体同种型分析[6, 7]。因此，不清楚更高的IgG2a抗体产生是否表示保护能力的增加。然而，IFN- γ 产生可能与疫苗效能相关[6, 7]。因此，GLA-SE佐剂可能是用于在Ce1TOS疫苗中产生保护效能的良好候选者。我们此处注意到乳剂对于IFN- γ 产生可能是必要的（即，GLA-SE组），而GLA-AF组诱发的抗体滴度在第3次免疫接种之后与GLA-SE组相似。有趣地，乳剂剂量从2%降低至1%未降低GLA-SE组中的IFN- γ 或抗体产生。最后，与单独抗原相比，包含GLA还诱导显著更高的长期存活的分泌抗体的细胞。整体上，GLA使免疫应答朝向Th1偏性发展，并且在骨髓中诱导更高数量的分泌抗体的浆细胞，尽管似乎小于2%的乳剂浓度对于这些作用可为足够的。

[0237] 在不含GLA的乳剂组中，降低的佐剂浓度的作用更加不明显。因此，与在2%SE组中相比，在1%SE组中产生IL-5的细胞的水平更低，并且与仅用抗原相比，仅2%SE组表现出更高量的IL-13。在抗体终点滴度、尤其在最低乳剂浓度组（0.02%SE）中展示出乳剂剂量滴定的作用。所述最低乳剂浓度组与2%SE组相比诱发更低的IgG、IgG1和IgG2a以及更低水平的分泌抗体的浆细胞。然而，0.5%和1%的SE浓度与最大2%SE剂量相比诱发相似水平的IgG和IgG1抗体滴度以及相似水平的分泌抗体的浆细胞。然而，对于更低浓度的SE、尤其在0.02%的最高稀释下，总体免疫应答可能略微降低。

[0238] 疫苗中乳剂浓度的降低可具有多种应用，例如节约成本、降低局部反应原性、供替代的递送途径以及促进幼儿的免疫。我们已经表明在存在TLR激动剂的情况下，包含低量乳剂的佐剂可产生与最大2%油乳剂剂量相同的免疫应答。最近临床研究已评价了使用著名的水包油乳剂产品MF59®和AS03（二者均准许在欧洲使用）的佐剂剂量作用，尽管两

种制剂都不包含 TLR 激动剂。因此,流行性流感疫苗临床试验发现典型的约 2.3%油剂量的 **MF59®**佐剂可降低一半(但不降低到 1/4)而不损害免疫原性,并仍满足流行性疫苗许可的欧洲标准 [5]。此外,在试验参与者中未指出注射位点疼痛的剂量依赖性降低。相反,在 6-36 月龄的儿童中采用季节性流感抗原和剂量为 0.125、0.25、0.5 或全剂量的 **MF59®**的研究在不同佐剂剂量之间未发现反应原性差异 [4]。抗体应答遵循依照佐剂浓度的剂量反应,但所有制剂在第 2 次免疫接种之后均满足欧洲人用医药产品委员会 (CHMP) 标准。

[0239] 在另一流感临床试验中评价了两种不同剂量的 AS03(包含全剂量的 2.5%角鲨烯和 2.5% α -生育酚的 AS03A 对包含半剂量的 AS03B),其中推断尽管由两种不同佐剂剂量诱发的初始免疫应答是相同的,但更高佐剂剂量在接种疫苗后第 182 天测量的反应持久性略微更好 [3]。此外,41-64 年龄组在更低佐剂剂量下表现出显著降低的抗体应答。最后,与全剂量相比,在更低佐剂剂量下记录了中等的疼痛降低。总之, **MF59®**和 AS03 临床研究证明佐剂剂量滴定的作用可依赖于每一疫苗组合物及其预期接受者。

[0240] 结论

[0241] 含 GLA-SE 佐剂的 PfCe1TOS 疫苗在 BALB/c 小鼠中诱发强 Th1-型免疫应答(包括与包含 **Montanide®** ISA720 的 PfCe1TOS 疫苗相比更高的 IFN- γ 产生)。乳剂剂量可以从 2%降低至 1%,而不损害 GLA-SE 佐剂组的免疫原性。总之,SE 组(不含 TLR4 激动剂 GLA)中乳剂剂量的降低表现出稍微降低的免疫原性,尤其在最低的佐剂剂量稀释(0.02%)下。来自使用具有 GLA-SE 佐剂的 PfCe1TOS 的保护研究的结果正被编辑成后续出版物,并且 2012 年正制订 I 期临床试验的计划。

[0242] 参考文献

[0243] [1]Fox CB. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules*2009 ;14:3286-312.

[0244] [2]Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, van Hoogevest P, Van Nest G. MF59: design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. In: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*. New York: Plenum Press, 1995: 277-96.

[0245] [3]Langley JM, Frenette L, Ferguson L, Riff D, Sheldon E, Risi G 等人, Safety and cross-reactive immunogenicity of candidate AS03-adjuvanted prepandemic H5N1 influenza vaccines: A randomized controlled phase 1/2 trial in adults. *J Infect Dis*2010 ;201:1644-53.

[0246] [4]Cioppa GD, Vesikari T, Sokal E, Lindert K, Nicolay U. Trivalent and quadrivalent MF59-adjuvanted influenza vaccine in young children: A dose- and schedule-finding study. *Vaccine*2011 ;29:8696-704.

[0247] [5]Keitel W, Groth N, Lattanzi M, Praus M, Hilbert AK, Borkowski A 等人, Dose ranging of adjuvant and antigen in a cell culture H5N1 influenza vaccine: Safety and immunogenicity of a phase 1/2 clinical trial. *Vaccine*2010 ;28:840-8.

[0248] [6]Bergmann-Leitner ES, Mease RM, De La Vega P, Savranskaya T, Polhemus M, Ockenhouse C 等人, Immunization with pre-erythrocytic antigen CelTOS from

Plasmodium falciparum elicits cross-species protection against heterologous challenge with Plasmodium berghei. PLoS One 2010 ;5:e12294.

[0249] [7] Bergmann-Leitner ES, Legler PM, Savranskaya T, Ockenhouse C, Angov E. Cellular and humoral immune effector mechanisms required for sterile protection against sporozoite challenge induced with the novel malaria vaccine candidate CeLTOS. Vaccine 2011 ;29:5940-9.

[0250] [8] Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS. Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. Vaccine 2011 ;29:9563-72.

[0251] [9] Anderson RC, Fox CB, Dutilleul TS, Shaverdian N, Evers TL, Poshusta GR 等人, Physicochemical characterization and biological activity of synthetic TLR4 agonist formulations. Coll Surf B: Biointerfaces 2010 ;75:123-32.

[0252] [10] Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. J Immunological Methods 1998 ;221:35-41.

[0253] [11] Hibbert DB, Gooding JJ. Data Analysis for Chemistry. New York: Oxford University Press, 2006.

[0254] [12] Coler RN, Bertholet S, Moutaftsi M, Guderian JA, Plessner Windish H, Baldwin SL 等人, Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. PLoS ONE 2011 ;6:e16333.

[0255] 实施例 2

[0256] 磷脂组合物在疫苗佐剂乳剂中的免疫调节和物理作用

[0257] 导论

[0258] 水包可代谢油的乳剂已证明是安全且有效的疫苗佐剂、营养补充剂和药物递送载体。存在各种乳化剂组合物, 并且角鲨烯是优选的用于疫苗佐剂应用的可代谢油 (1-3)。常用的乳化剂包括 **Pluronic[®]**、**Tweens[®]**、**Spans[®]** 和磷脂。乳化剂选择基于乳化剂稳定能力和 / 或生物活性, 因为乳化剂按照定义是膜活性的, 并且已表明具有与免疫刺激相关的多种生物活性 (4)。

[0259] 卵磷脂及其主要组分磷脂酰胆碱 (PC) 已成功用作安全且有效胃肠外递送的乳剂中的乳化剂。或许磷脂乳化剂最广泛的用途是施用静脉内营养物补充剂 (5), 例如在 **Intralipid[®]** (即大豆油 / 蛋黄卵磷脂乳剂) 中。然而, 可存在与作为乳化剂的蛋黄卵磷脂 (或蛋黄 PC) 相关的一些缺点, 并且用合成磷脂替代源自蛋黄的磷脂是有利的。首先, 存在显著结构异质性: 蛋黄 PC 包含至少 17 种不同的 PC 物质 (6), 而各种合成 PC 以 99% 纯度市售。其次, 蛋黄卵磷脂由多个单不饱和及多不饱和酰基链构成, 其易于氧化降解, 而各种合成 PC 由饱和酰基链构成, 并且因此是化学更稳定的 (7)。再次, 蛋黄磷脂源自动物来源, 而非合成生产的。

[0260] 我们先前已公开了由蛋黄 PC 稳定的角鲨烯乳剂的物理稳定性曲线 (8, 9)。此外, 我们表明合成 POPC (蛋黄 PC 的主要成分) 与蛋黄 PC 相比向角鲨烯乳剂提供相同的稳定

性。然而,未评价其他合成 PC。合成的均质磷脂已变成广泛可得的,并且现在相对廉价。通过适当选择合成磷脂,可以优化乳化剂的化学稳定性及乳剂的物理稳定性。还必须解决生物等效性;先前已经表明疫苗佐剂乳剂中乳化剂的来源或纯度的变化显著影响疫苗效力(10, 11)。在本稿件中,我们寻求 1) 通过评价包含其他合成 PC(除 POPC 外)的角鲨烯乳剂的物理稳定性来扩展我们先前的工作;以及 2) 在疟疾和流感疫苗制剂的情形下比较合成 PC 乳剂以及蛋黄 PC 乳剂的生物活性。

[0261] 材料和方法

[0262] 佐剂制剂。从 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO) 购买鲨鱼肝脏角鲨烯($\geq 98\%$ 纯度)。蛋黄磷脂酰胆碱(蛋黄 PC)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(POPC)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC) 和 1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DLPC) 以 99% 纯度得自 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL)。所有乳剂制剂通过高压均化器高速混合油相(包含角鲨烯和磷脂)和水相制备,如先前所述(8)。磷脂的最终浓度为 25mM。在 5°C、室温(RT)、37°C 和 60°C 下监测制剂的稳定性 6 个月。如先前所述的那样进行粒径、 ζ 电位、粘度、溶血性和光散射光学分布测量(8)。简言之,通过将每一乳剂的等分部分以 1:100 倍稀释于水中并通过动态光散射(Malvern Zetasizer APS) 来测量散射强度-偏差尺寸平均值(Z-avg),从而在指定的时点下测定粒径。通过将每一乳剂的等分部分以 1:20 倍稀释于水中,并通过微量电泳(Malvern Zetasizer Nano-ZS) 来测量 ζ 电位,从而在乳剂制造后立即测量 ζ 电位。从 5°C 贮存中取出每一乳剂的 20mL 样品,并使其平衡至室温,然后通过旋转粘度计(Brookfield DV-E) 来测量粘度。按照先前公开的技术(12) 的修改版本来分析乳剂溶血活性;将来自人类志愿者的红血球悬浮液在盐水中与每一乳剂混合约 20min,然后将样品离心,将上清液稀释入乙醇:HCl(39:1, v:v) 混合物,并且在 398nm 测量吸光度。使用 870-nm 激光和电荷耦合检测器(LUMiReader),在 60°C 下,对未稀释的乳剂样品每 10min 采集激光散射光学分布测量值,持续 4 小时。

[0263] 免疫接种、血清采集和免疫学分析。雌性 6-7 周龄 BALB/c 小鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA) 通过在每一后四头肌肌肉注射来进行免疫。测试两种不同的抗原:1) 2007-2008Fluzone 失活裂解病毒疫苗,包含典型的流感病毒株 A/ 所罗门岛 /2/2006(H1N1)、A/ 威斯康辛州 /67/2005(H3N2) 和 B/ 马来西亚 (Malaysia) /2506/2004; 以及 2) 重组伯氏疟原虫(Plasmodium berghei) 环孢子蛋白(PbCSP),其是使用由 Walter Reed Army Institute of Research 开发的密码子协调化构建体而内部生产的。流感和疟疾疫苗制剂、免疫接种方案和血清采集如先前所述(8),但流感抗原剂量为 0.02 μ g 总 HA。在特定无病原体条件下并依据 IDRI 动物护理和使用委员会的规程和指导来进行所有步骤。

[0264] 抗体应答。使小鼠免疫两次,间隔三周。分析血清的抗原特异性 IgG、IgG1、IgG2a 抗体,以及血细胞凝集抑制(HI) 抗体活性,如先前所述,通过与标准曲线比较来指定主观抗 PbCSP 单位,而测定流感抗体的终点滴度(8)。骨髓 ELISPOT 测定用于测定在使用或不使用前述佐剂(具有小幅修改)的 Fluzone 加强免疫接种之后四周采集的样品中疫苗特异性的长期存在的分泌抗体的浆细胞的诱导(13)。

[0265] 抗原特异性细胞因子反应。用大鼠抗-小鼠 IL-5 捕获 Ab(eBioscience, San

Diego, CA) 来涂覆 MultiScreen96-孔过滤板 (Millipore, Bedford, MA), 并在 4 °C 孵育过夜。将板用 PBS 洗涤, 在室温下用 RPMI1640 和 10% FBS 封闭至少 1 小时, 然后再次洗涤。在第二次 Fluzone 注射之后四周, 收集脾脏。制备单细胞悬浮液, 使用单独培养基、concanavilin A (0.75 μ g/ml)、5 血细胞凝聚单位 (HAU) 失活 A/ 所罗门岛 /2/2006 (H1N1) 或 2HAU 失活 A/ 威斯康辛州 /67/2005 (H3N2) 一式两份地以 2×10^5 个细胞 / 孔接种, 在 37 °C 48 小时。然后, 将板用 0.1% PBS-Tween20 洗涤, 并与生物素结合的大鼠抗-小鼠 IL-5 二级 Ab (eBioscience) 一起孵育过夜。使用 VectaStain ABC 抗生物素蛋白过氧化物酶结合物和 Vectastain AEC 底物试剂盒, 根据制造商的规程 (Vector Laboratories) 来开发过滤器。通过用去离子水洗涤板来停止反应, 在黑暗中干燥板, 并使用自动 ELISPOT 读数器 (C. T. L. Serie3A Analyzer, Cellular Technology Ltd.) 计数斑点。使用 ImmunoSpot® 软件 (CTL Analyzer LLC) 分析数据。

[0266] 统计学分析. 所有小鼠实验分析每时点每组的 5 个单独的动物。使用 ANOVA 和 Tukey 多次比较检验, 比较 ELISPOT 计数和 \log_{10} -转化抗体滴度。使用 \log_2 -转化 HI 滴度, 通过 ANOVA 和 Tukey 多次比较检验来比较 HI 滴度。

[0267] 结果

[0268] 乳剂的物理稳定性。表 1 描述了用于该研究的乳化剂的组成。蛋黄 PC 是具有多种酰基链长度和饱和度的异质磷脂酰胆碱混合物, 尽管主要组分已确定为 POPC (6, 14)。相反, 表 1 所示的合成磷脂是高度纯的 ($\geq 99\%$), 并且作为脂质集合具有明确的主相转变温度 (T_m)。均包含单不饱和酰基链的 DOPC 和 POPC 具有低相转变温度 ($< 0^\circ\text{C}$), 这是因为不饱和和链给予的堆积无序。包含单不饱和及多不饱和酰基链的蛋黄 PC 也具有低 T_m 。DLPC 由饱和和酰基链组成, 但其长度仅为 12 个碳, 这导致低 T_m 。DMPC、DPPC 和 DSPC 具有更长的饱和酰基链 (分别为 14、16 和 18 个碳), 并且其相转变温度根据链长而增加。例如, DPPC 构型在室温下为高度有序的凝胶相, 而在 41 °C 以上, 脂质形成特征为更加堆积无序的液晶相, 这归因于温度诱导的酰基链构型变化 (15)。

[0269] 表 2 显示乳剂在其制造后即刻的物理和血液相容性。粘度值与水相似 (约 1cP), 表明这些乳剂中的低油含量 (当测量粘度是为 10% v/v, 但稀释至 2% v/v 以用于免疫接种)。 ζ 电位值对于采用低 T_m 值磷脂 (例如 DOPC、DLPC) 的乳剂是负的, 而具有较高 T_m 磷脂的乳剂是正的 (DSPC、DPPC)。当与 RBC 悬浮液一起孵育时乳剂均不显示显著的溶血活性, 尽管 DLPC 乳剂与其他乳剂相比似乎是稍微更加溶血的。

[0270] 我们最近报道了在 5 °C 或室温下贮存的合成 POPC-角鲨烯乳剂的粒径稳定性与蛋黄 PC-角鲨烯乳剂相比是相同或改进的 (9)。我们寻求通过用除 POPC 之外的其他合成磷脂制造角鲨烯乳剂来扩展该工作; 图 1 示出在不同温度下贮存的乳剂的粒径稳定性。早前报道了 POPC 的初始尺寸 (9); 此处, 我们已监测此相同批号的长期稳定性, 以与其他合成 PC 乳剂比较。物理外观的明显的异常现象 (例如相分离) 将乳剂描述为直观不稳定。考虑到来自所有温度的数据, DMPC 和 POPC 乳剂展示出与所研究的其他乳剂相比更大的粒径稳定性。最小粒径变化在 5 °C 是明显的, 并且粒径渐变随着温度增加而明显 (图 1)。相对地, DOPC 乳剂液滴尺寸变化在 5 °C 是最小的, 但在更高的贮存温度下是显著的。DPPC 乳剂稳定性高度依赖于温度。当在 DPPC T_m (41 °C) 以上贮存时, DPPC 乳剂与其他乳剂相比表现出良好的稳定性。然而, 在低于 T_m 的三个贮存温度下, DPPC 乳剂是直观不稳定的, 或表现出与更

稳定的乳剂相比更大的粒径变化。有趣地,包含最短的饱和链乳化剂的 DLPC 乳剂在所有四种贮存温度下于早期时点是直观不稳定的。DSPC 乳剂在所有贮存温度下于 6 个月时点之前也变成直观不稳定的。尺寸多分散性值在更稳定的乳剂之间是相似的(补充图 1)。

[0271] 激光散射光学分布提供了与乳剂稳定性相关的补充信息。乳剂由于乳油化、凝聚等产生的变化被检测为通过乳剂的垂直剖面的光透射的变化(8)。在 60°C 下,每 10 分钟测量乳剂的激光散射光学分布,持续 4 小时的时段(补充图 2)。为了比较来自不同乳剂的数据,在图 2 中绘制样品垂直剖面的特定区域(25mm 至 30mm)之间的积分透射。积分透射的降低表明凝聚或粒径生长,因为更大的颗粒会散射更多的光,使更少的光传输至检测器。积分透射的增加通常代表乳油化或相分离。DMPC 乳剂与 POPC 或 DOPC 乳剂相比表现出微小变化,表明在该温度下的优异稳定性。这些光学分布数据证实了上述粒径和直观稳定性观察结果。未示出 DLPC、DPPC 和 DSPC 乳剂,因为这些乳剂在进行光学分布测量之前已被归类为在 5°C 下直观不稳定的。

[0272] 总之,物理稳定数据表明在合成脂质中,DMPC 和 POPC,以及 DOPC(在较少程度上)是角鲨烯油的最有效乳化剂。在混合乳剂与失活流感疫苗之后的粒径和 SDS-PAGE 分析表明良好的相容性(数据未示出)。因此,随后评价上述稳定的合成 PC 乳剂连同蛋黄 PC 乳剂在小鼠模型中的生物活性。

[0273] 乳剂选择性增强对重组疟疾蛋白的抗体应答。在仅使用蛋白的第二次免疫接种或使用蛋白与乳剂制剂的组的第二次免疫接种之后 2 周,在单独的小鼠血清中测量针对重组疟疾抗原伯氏疟原虫环孢子蛋白(PbCSP)的抗体应答。与仅接受蛋白的小鼠相比,在存在乳剂的情况下注射 PbCSP 来免疫的小鼠中,抗-PbCSP IgG 抗体水平显著更高(图 3a, p -值 < 0.05)。与仅用蛋白来免疫的小鼠相比,在用 PbCSP 和蛋黄 PC、POPC 和 DMPC 乳剂进行免疫的小鼠中, IgG1 抗体也更高(图 3b, p -值 < 0.05)。相反,在抗 PbCSP IgG2a 抗体水平中未检测到各组之间的差异(图 3c, p -值 > 0.05)。这些数据表明通过在暴露于抗原期间包含乳剂来选择性增强抗原特异性 IgG1 抗体。

[0274] 乳剂增强对流感蛋白的抗体应答。我们先前观察到用与包含源自蛋黄的 PC 的乳剂一起配制的 Fluzone 注射的动物中的抗体应答提升(8, 13),但未研究当包含合成脂质时是否观察到这些作用。为确定乳剂是否提升对天然流感蛋白的抗体应答,我们在存在或不存在包含天然或合成脂质的乳剂制剂的情况下用低剂量的 Fluzone 疫苗来免疫小鼠。与仅用流感疫苗的疫苗接种相比,接受 Fluzone 和乳剂配制剂的所有组的全部 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体滴度是更高的(图 4)。

[0275] 我们还评估了乳剂制剂对骨髓内分泌抗原特异性抗体的浆细胞(ASPC)的产生的作用,因为这些长期存活的细胞在抗原暴露之后长时段分泌抗体并可提供长期保护的基础。整体上,我们的结果表明在多种乳剂制剂组中产生相似数量的 ASPC。然后,仅有包含 DOPC 乳剂的疫苗与单独的 Fluzone 疫苗相比诱导显著更高数量的长期存活的浆细胞(图 4d)。

[0276] 血细胞凝聚抑制(HI)试验是流感疫苗效能的有意义的预测指标,并且所述 HI 具有通常认为足以提供保护的滴度(16)。为测定乳剂制剂是否可以产生能增强 Fluzone 疫苗所提供保护的更高品质抗体,我们比较了仅用 Fluzone,或 Fluzone 和多种乳剂制剂接种疫苗的小鼠的 HI 滴度。当在最终免疫接种之后 4 周进行测量时,乳剂制剂的添

加与单独 Fluzone 疫苗相比诱导了针对 A/ 所罗门岛 /3/2006 (H1N1) 和 A/ 威斯康辛州 /67/2005 (H3N2) 疫苗组分的更高的 HI 滴度 (图 5)。针对 A/ 所罗门岛 /3/2006 (H1N1) 组分, 包含乳剂的所有疫苗诱导比单独 Fluzone 更高的 HI 滴度。针对 A/ 威斯康辛州 /67/2005 (H3N2) 组分, 蛋黄 PC 和 DOPC 乳剂诱导比单独 Fluzone 更高的 HI 滴度。

[0277] 另外实验表明, 除了 DMPC 乳剂之外, 来自通过 Fluzone 加乳剂进行免疫的小鼠的增加数量的抗原特异性 T 细胞与来自仅通过 Fluzone 免疫的小鼠的细胞相比分泌更高水平的 IL-5 (图 6, p- 值 < 0.05)。总之, 抗体和细胞因子分泌数据表明由包含这些乳剂的疫苗诱发了增加的 Th2 型免疫应答。

[0278] 讨论

[0279] 不管合成或源自蛋黄的 PC 用作乳化剂组分, 在等同物中提高了用疟疾和流感疫苗诱发的抗体应答。该发现对于基于合成组分 (而非天然组分) 持续开发 PC- 乳化乳剂而言是有意义的。文献已经表明该类型的组分替代的生物等效性为何不应认为是准许的; 存在多个实例, 当一种磷脂乳化剂被另一种磷脂乳化剂替代时已导致生物活性的差异。例如, Yasuda 等人发现由合成磷脂酰胆碱组成的脂质体当与基于合成脂质的抗原一起腹腔内免疫小鼠时表现出免疫原性 (如脾脏中分泌抗体的细胞的数量所指示的) 与脂质相转变温度之间的直接关联; 发现更高的相转变与增加的免疫原性直接相关 (17)。相转变温度与免疫原性之间的这种关联在当前工作中是不明显的, 尽管由于乳剂稳定性差而在免疫学方面未评价具有最高相转变温度的磷脂 (DPPC 和 DSPC)。在乳化剂来源的重要性的另一实例中, 对水包油疫苗佐剂乳剂 **Montanide®** ISA51 的最近临床试验结果揭示用植物来源的材料替换动物来源的乳化剂可能已成为显著降低体内效能的原因 (11)。在本工作中的免疫学数据证明用由不同天然或合成磷脂酰胆碱制成的乳剂辅助的流感和疟疾疫苗诱发相似的抗体应答。此外, 用于该工作的乳剂的定性免疫原性与文献报道相符; 例如, 乳剂 (包含 TLR 激动剂) 与单独抗原相比可能仅诱导 IgG2a 反应的适度增加 (18)。在使用流感疫苗的实验中的乳剂之间的细微差异是明显的, 表明脂质乳化剂可以在生物作用方面略微不同。然而, 总之, 可能的是, 在简单重组抗原疟疾疫苗或更复杂的失活裂解病毒流感疫苗的情形下, 蛋黄 PC 可以被合成磷脂替换而对生物活性没有不利作用。

[0280] 除了生物活性, 考虑物理乳剂稳定性也是重要的, 因为其涉及乳化剂酰基链结构。已经偶尔报道了纯化 PC 分子不能有效地稳定乳剂 (19)。例如, DOPC:DPPC:DPPE 合成混合物当用于乳化全氟化碳时不产生与用蛋黄卵磷脂观察到乳剂同样稳定的乳剂 (20)。然而, 其他报道 (21) 容易地驳倒了纯合成 PC 不能有效地乳化的断言, 所述其他报道澄清稳定性取决于油和乳剂二者的结构和性质 (22)。乳化剂的自发曲率或堆积结构决定了其在稳定乳剂方面的效力 (21)。乳化剂自发曲率或堆积受以下影响: a) 磷脂相行为; b) 脂质酰基链的不饱和度; 和 c) 磷脂在油中的混溶性 (21)。在本工作中, 脂质相转变的重要性是明显的, 因为基于尺寸和视觉外观, 具有最高相转变温度的包含磷脂的乳剂 (DPPC 和 DSPC) 在大部分贮存温度下不是稳定的。有趣地, DPPC 仅当在其主相转变温度以上贮存时才产生稳定的乳剂。然而, 相转变温度并非物理稳定性的唯一决定因素; 注意的是, 即使 DMPC 具有更高的相转变温度, DMPC 乳剂与 DLPC 乳剂相比表现出良好的稳定性 (在所有贮存温度下, 包括相转变以上和以下的温度)。因此, 由以下事实证明乳剂-油相互作用的复杂性, 即, 不能仅基于磷脂相转变温度、酰基链长度或饱和来预测本工作所述的乳化剂的稳定性。同样

地,在三辛酸甘油酯乳剂的情形中难以预测脂质相转变温度和酰基链结构对乳剂稳定性的作用;DLPC、DMPC 和 DPPC 乳剂与 DSPC、1,2-二亚油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱和 DOPC 乳剂相比更加稳定(23)。

[0281] 可以通过两种机制发生乳剂液滴尺寸生长:Ostwald 熟化(Laplace 压差使油分子从较小液滴扩散至较大液滴)或凝聚(分开的油液滴合并并且形成单个液滴)(24)。因为角鲨烯在水中是基本不溶的,因此 Ostwald 熟化不太可能是本工作乳剂中尺寸生长的原因(25-28)。因此,凝聚可能是此处报道的尺寸生长的机制。预期凝聚速率随温度变高而增加,这归因于扩散速率增加和液滴相互作用事件,并且此处所示的尺寸数据与该预期相符。经由良好堆积的界面层向油滴未提供有效的空间或静电稳定的乳化剂可能是凝聚速率增加的原因。我们的发现表明,总体上,不饱和脂质乳化剂比饱和脂质乳化剂在稳定角鲨烯乳剂方面更有效,但产生高度稳定的乳剂的 DMPC 例外,尽管其仅包含饱和酰基链。这再次强调了仅基于磷脂乳化剂的相转变和酰基链结构难以预测乳化剂稳定性。

[0282] 最后,我们注意到,在该稿件中示出的多个物理表征数据与先前文献报道充分相关。例如,先前已经报道了液晶相脂质对凝胶相脂质的更大负 ζ 电位值的关系;这归因于在液相膜中增加的无序和堆积缺陷导致极性首基暴露并允许溶液氟离子的更多可用的结合位点(29,30)。此外,DLPC 乳剂的稍微增加的溶血趋势符合来自文献的另一报道,即,DLPC 和其他短链磷脂通过脂质相分离经由在脂质双层中产生非特异性孔来诱导溶血,允许离子渗透(31)。

[0283] 结论

[0284] 在本工作中,表明包含角鲨烯油和合成磷脂乳化剂(即 DMPC 或 POPC)的疫苗佐剂制剂在多个温度下展现出长期粒径稳定性。通常,蛋黄 PC 和合成 PC 乳剂与简单重组疟疾抗原或失活裂解病毒流感疫苗的组合诱导相似的免疫应答。因此,用合成磷脂酰胆碱替代蛋黄磷脂酰胆碱不导致疫苗佐剂生物活性损失。我们实验室正在进行的工作将比较角鲨烯-磷脂乳剂与其他类型的非磷脂表面活性剂结构(即聚山梨醇酯 80 和泊洛沙姆 188)的稳定性和免疫原性。

[0285] 参考文献

[0286] 1. Fox CB. Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery. *Molecules*. 2009 ;14:3286-312.

[0287] 2. Reddy LH, Couvreur P. Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy. *Adv Drug Del Rev*. 2009 ;61:1412-26.

[0288] 3. Brito LA, Chan M, Baudner B, Gallorini S, Santos G, O'Hagan DT 等人, An alternative renewable source of squalene for use in emulsion adjuvants. *Vaccine*. 2011 ;29:6262-8.

[0289] 4. Yang YW, Wu CA, Morrow WJW. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine*. 2004 ;22:1524-36.

[0290] 5. Forchielli ML, Bersani G, Tala S, Grossi G, Puggioli C, Masi M. The spectrum of plant and animal sterols in different oil-derived intravenous emulsions. *Lipids*. 2010 ;45:63-71.

[0291] 6. Vernooij EAAM, Kettens-van den Bosch JJ, Crommelin DJA. Rapid

determination of acyl chain position in egg phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid Comm Mass Spec.* 1998 ;12:83-6.

[0292] 7. deMan JM. Chemical and physical properties of fatty acids. In: Chow CK, editor. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Boca Raton, FL: CRC Press ;2008. p. 17-46.

[0293] 8. Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS. Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine.* 2011 ; 29:9563-72.

[0294] 9. Fox CB, Lin S, Sivananthan SJ, Dutill TS, Forseth KT, Reed SG 等人, Effects of emulsifier concentration, composition, and order of addition in squalene-phosphatidylcholine oil-in-water emulsions. *Pharm Dev Technol.* 2011 ; 16:511-9.

[0295] 10. Hilleman MR. Personal historical chronicle of six decades of basic and applied research in virology, immunology, and vaccinology. *Immunol Rev.* 1999 ; 170:7-27.

[0296] 11. Rosenberg SA, Yang JC, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Schwarz SL 等人, Different adjuvanticity of incomplete Freund's adjuvant derived from beef or vegetable components in melanoma patients immunized with a peptide vaccine. *J Immunother.* 2010 ;33:626-9.

[0297] 12. Bock TK, Muller BW. A novel assay to determine the hemolytic activity of drugs incorporated in colloidal carrier systems. *Pharm Res.* 1994 ;11:589-91.

[0298] 13. Baldwin SL, Shaverdian N, Goto Y, Duthie MS, Raman VS, Evers T 等人, Enhanced humoral and Type 1 cellular immune responses with Fluzone adjuvanted with a synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion. *Vaccine.* 2009 ; 27:5956-63.

[0299] 14. Vernooij EAAM, Brouwers JFHM, Kettenes-van den Bosch JJ, Crommelin DJA. RP-HPLC/ESI MS determination of acyl chain positions in phospholipids. *J Sep Sci.* 2002 ;25:285-9.

[0300] 15. Fox CB, Uibel RH, Harris JM. Detecting phase transitions in phosphatidylcholine vesicles by Raman microscopy and self-modeling curve resolution. *J Phys Chem B.* 2007 ;111(39):11428-36.

[0301] 16. Falsey AR. Half-dose influenza vaccine. *Arch Intern Med.* 2008 ; 168:2402-3.

[0302] 17. Yasuda T, Dancey GF, Kinsky SC. Immunogenicity of liposomal model membranes in mice: Dependence on phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci.* 1977 ;74:1234-6.

[0303] 18. Baudner BC, Ronconi V, Casini D, Tortoli M, Kazzaz J, Singh M 等人, MF59 emulsion is an effective delivery system for a synthetic

TLR4agonist (E6020). *Pharm Res.* 2009 ;26:1477-85.

[0304] 19. Mikrut B. Case study: formulation of an intravenous fat emulsion. In: Burgess DJ, editor. *Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing, and Performance*. Boca Raton, FL: Taylor and Francis ;2005. p. 415-25.

[0305] 20. Yoon JK, Burgess DJ. Interfacial properties as stability predictors of lecithin-stabilized perfluorocarbon emulsions. *Pharm Dev Tech.* 1996 ;1:333-41.

[0306] 21. Kabalnov A, Tarara T, Arlauskas R, Weers J. Phospholipids as emulsion stabilizers: phase behavior versus emulsion stability. *J Coll Inter Sci.* 1996 ; 184:227-35.

[0307] 22. Mollet H, Grubenmann A. *Formulation Technology: Emulsions, Suspensions, Solid Forms*. Verlag: Wiley-VCH ;2001.

[0308] 23. Nii T, Ishii F. Properties of various phosphatidylcholines as emulsifiers or dispersing agents in microparticle preparations for drug carriers. *Coll Surf B: Biointerfaces.* 2004 ;39(1-2):57-63.

[0309] 24. Fox CB, Anderson RC, Dutill TS, Goto Y, Reed SG, Vedvick T. Monitoring the effects of component structure and source and formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions. *Coll Surf B: Biointerfaces.* 2008 ; 65:98-105.

[0310] 25. Bibette J, Morse DC, Witten TA, Weitz DA. Stability criteria for emulsions. *Phys Rev Lett.* 1992 ;69(16):2439.

[0311] 26. Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Coll Inter Sci.* 2004 ;107(2-3):125-55.

[0312] 27. Dalgleish DG. Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends Food Sci Tech.* 1997 ;8(1):1-6.

[0313] 28. McClements DJ. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Crit Rev Food Sci Nutri.* 2007 ;47:611-49.

[0314] 29. Tatulian SA. Binding of alkaline-earth metal cations and some anions to phosphatidylcholine liposomes. *Eur J Biochem.* 1987 ;170:413-20.

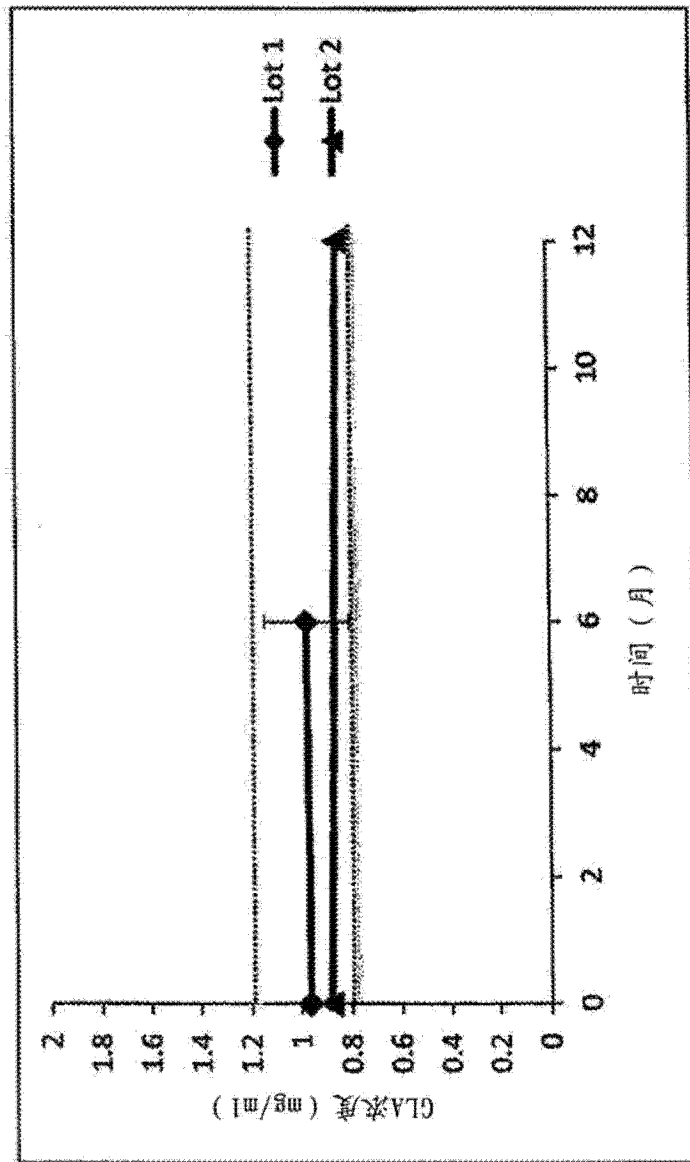
[0315] 30. Tatulian SA. Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1983 ; 736:189-95.

[0316] 31. Tanaka Y, Mashino K, Inoue K, Nojima S. Mechanism of human erythrocyte hemolysis induced by short-chain phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholine. *J Biochem.* 1983 ;94:833-40.

[0317] 本说明书中引用的和 / 或列于申请记录表中的上述所有美国专利、美国专利申请公布、美国专利申请、国外专利、国外专利申请和非专利的公开出版物均通过引用方式整体并入本文。

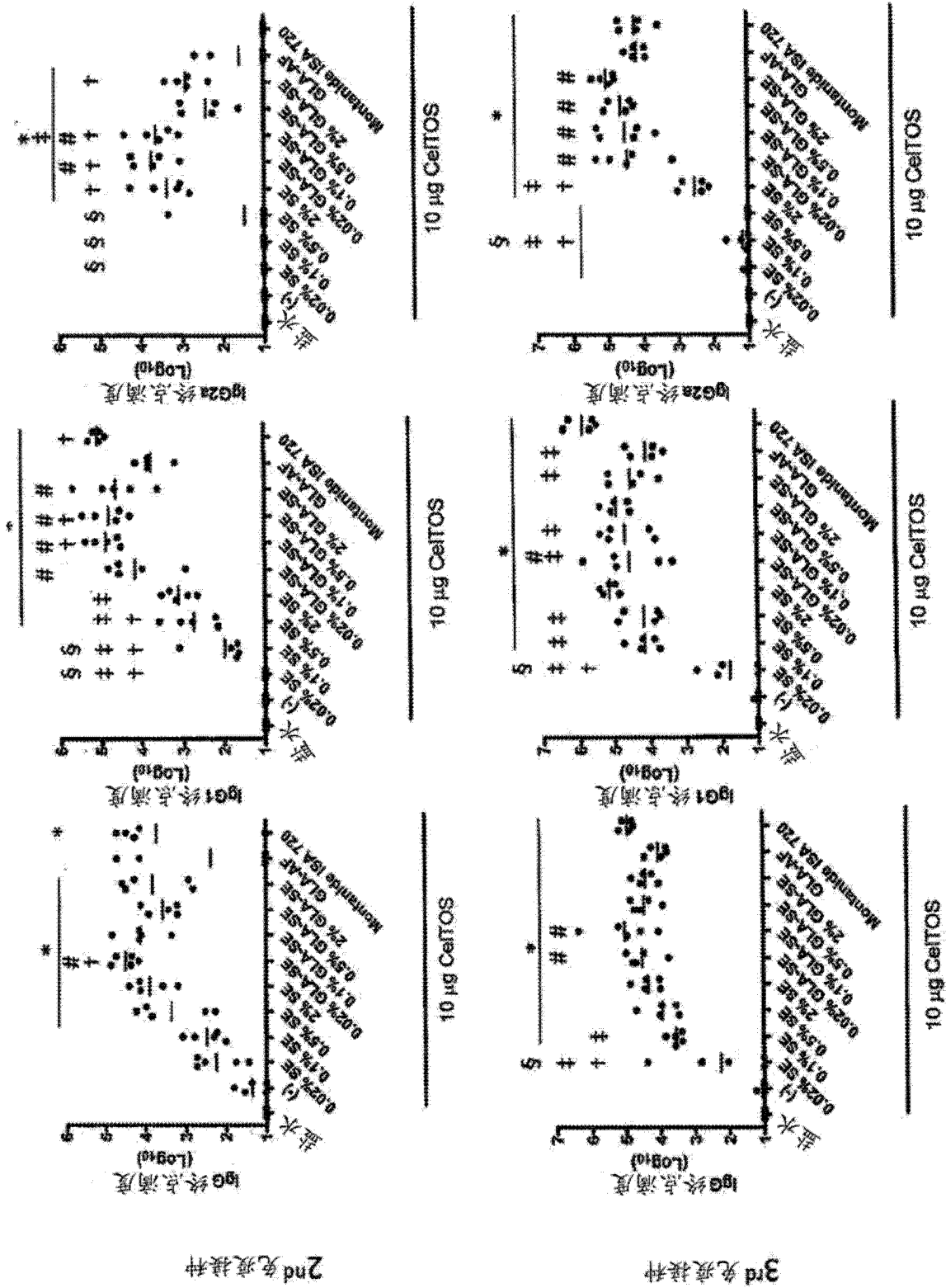
[0318] 通过上述,可以理解,尽管本文以示例的目的描述了本发明的具体实施方案,但在不背离本发明的精神和范畴内可以做出各种变化。因此,除受所附的权利要求书限制外,本

发明不受其他限制。



通过HPLC的GLA-AF稳定性

图 1



*p<0.05 vs. Ag, #p<0.05 相同百分比的油 +/- GLA, \$p<0.05 vs. GLA-AF, †p<0.05 vs. Montanide

图 2(a ~ f)

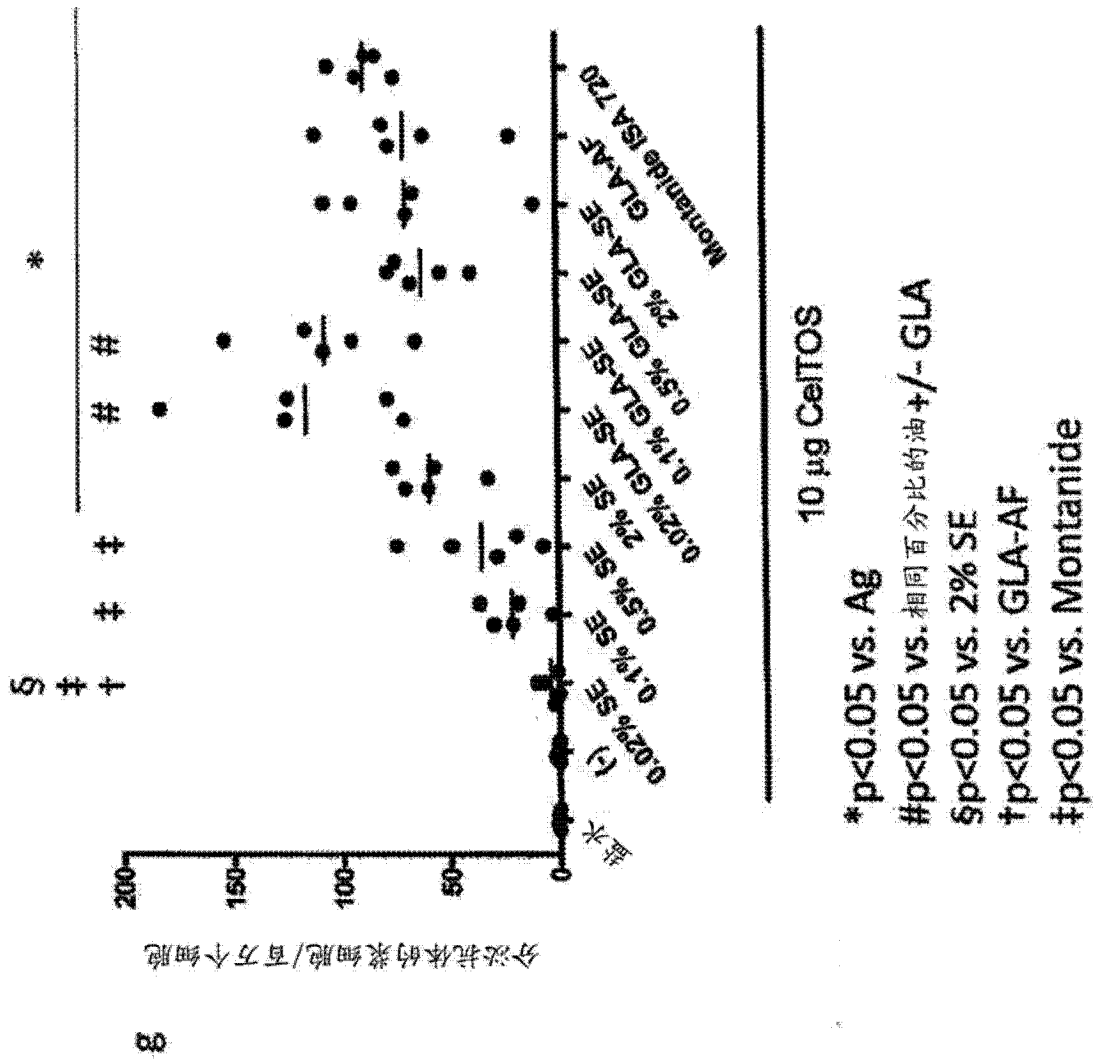
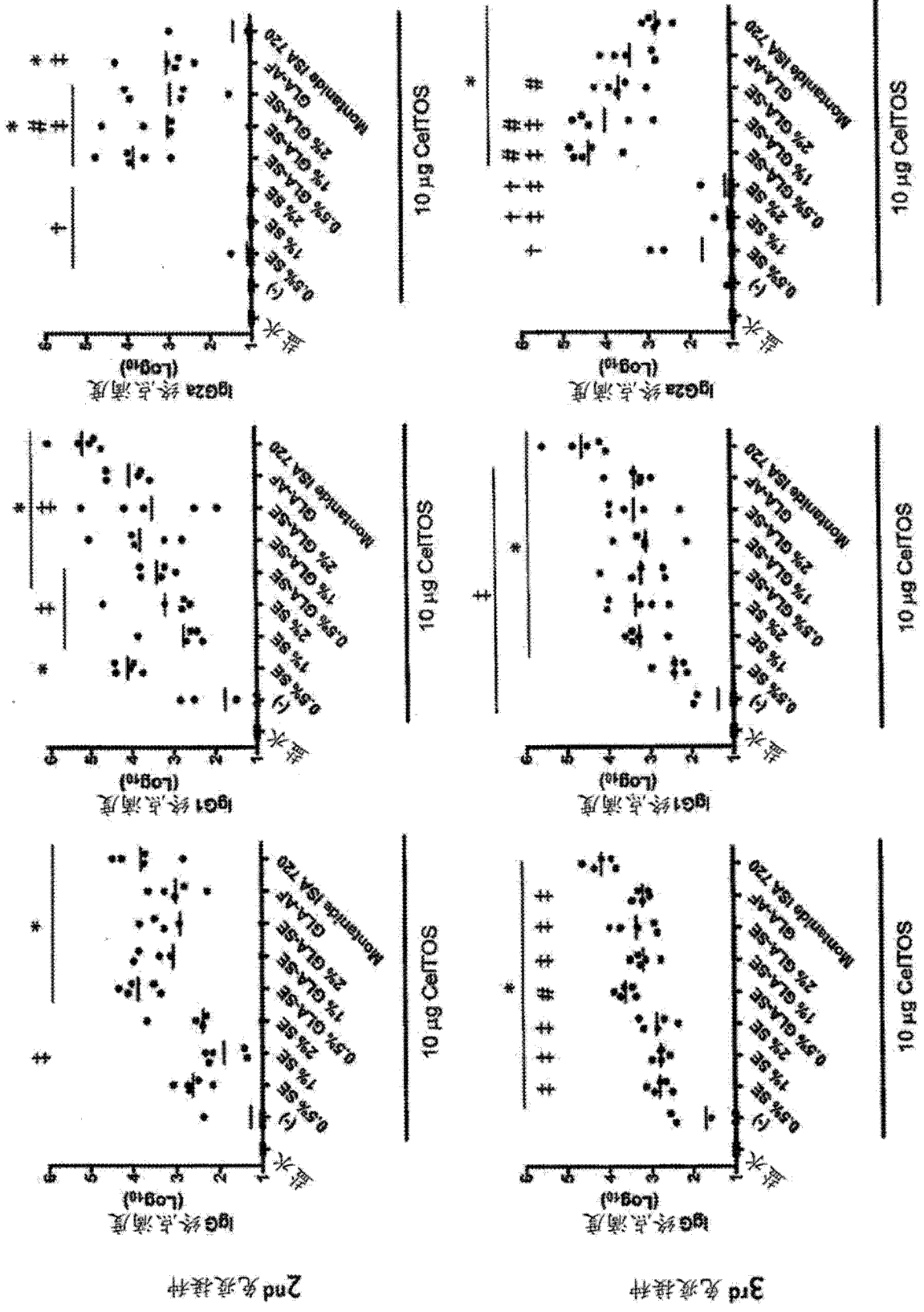


图 2g



*p<0.05 vs. Ag, #p<0.05 vs. 相同百分比的油 +/- GLA, †p<0.05 vs. GLA-AF, ‡p<0.05 vs. Montanide

图 3(a ~ f)

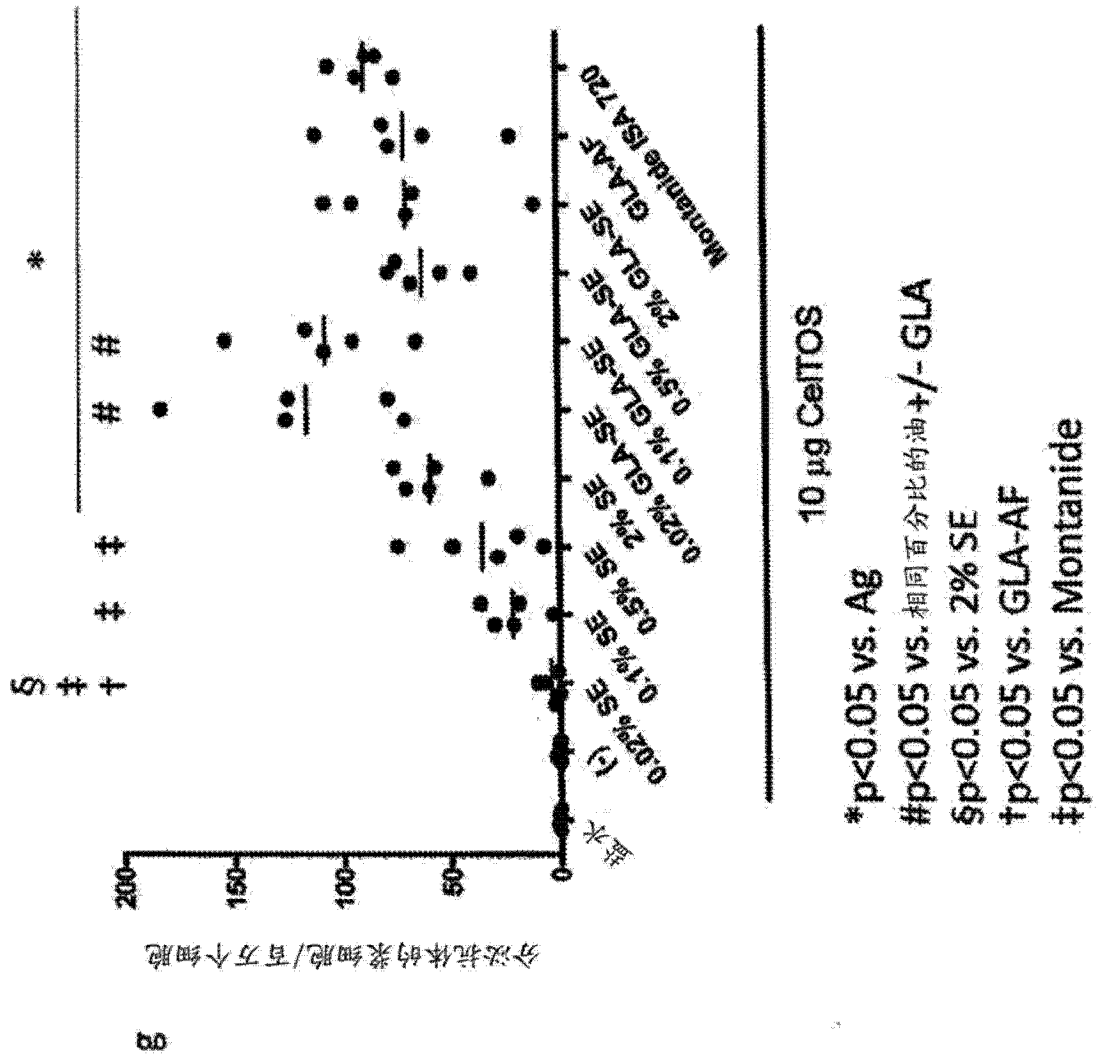


图 3g

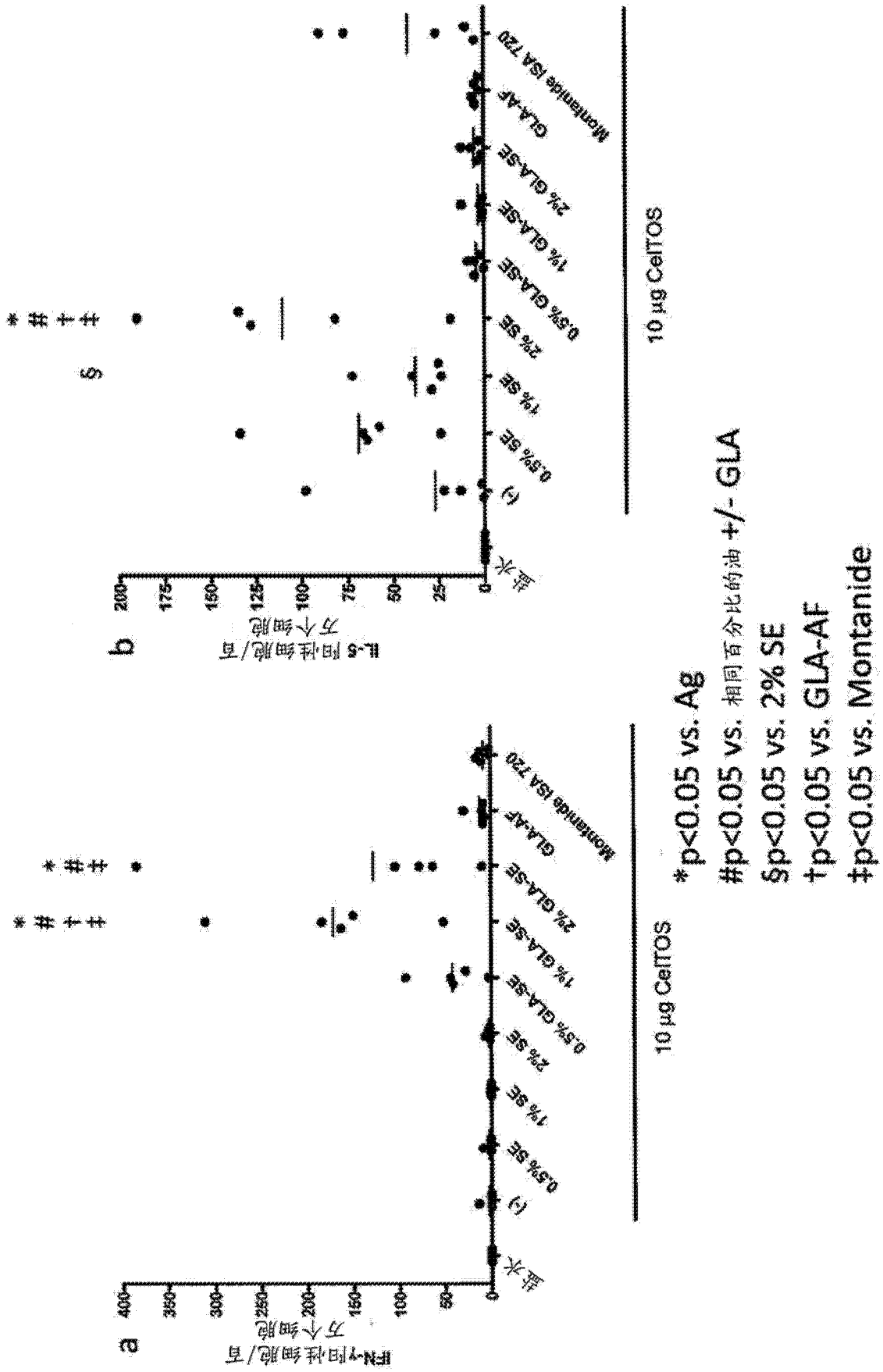
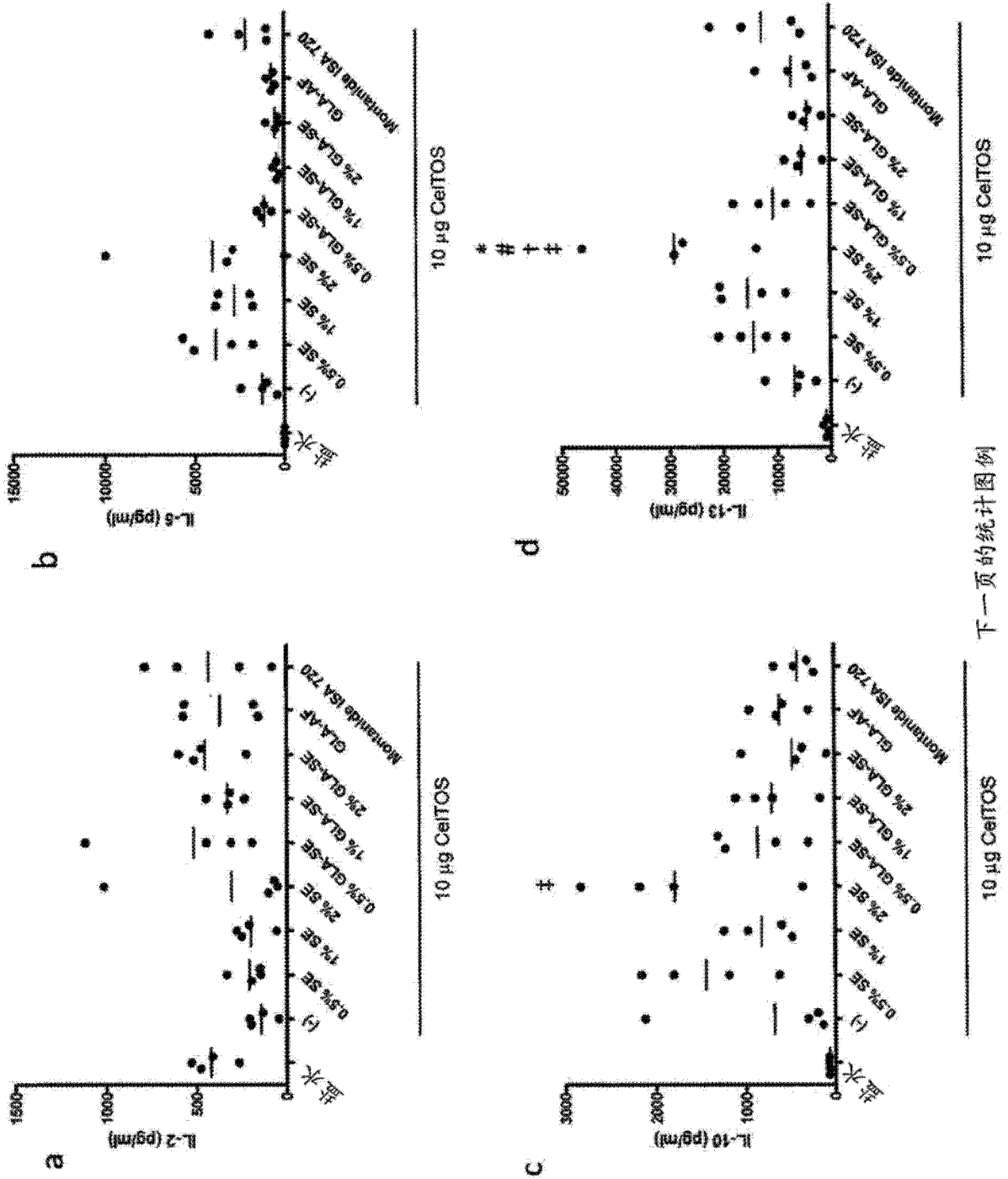


图 4



下一页的统计图例

图 5

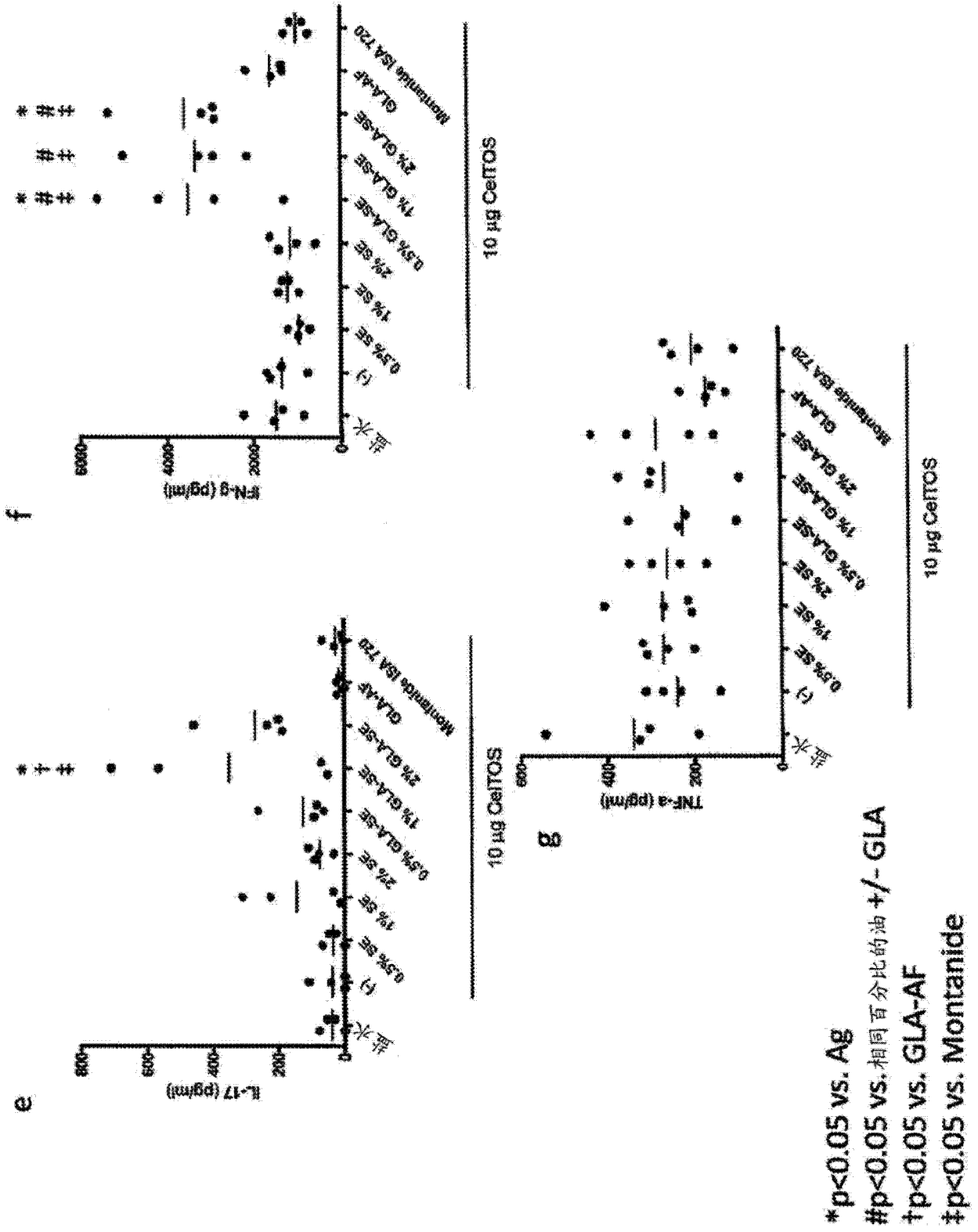


图 5

表1. 佐剂制剂的粒径和分散性

制剂	批次号 #	尺寸 (Z-avg, nm)	Pdl
GLA-AF	1	87.9 ± 1.6	0.248 ± 0.005
GLA-AF	2	91.8 ± 1.7	0.233 ± 0.009
SE	1	95.3 ± 1.9	0.039 ± 0.015
SE	2	97.7 ± 1.9	0.067 ± 0.013

图 6

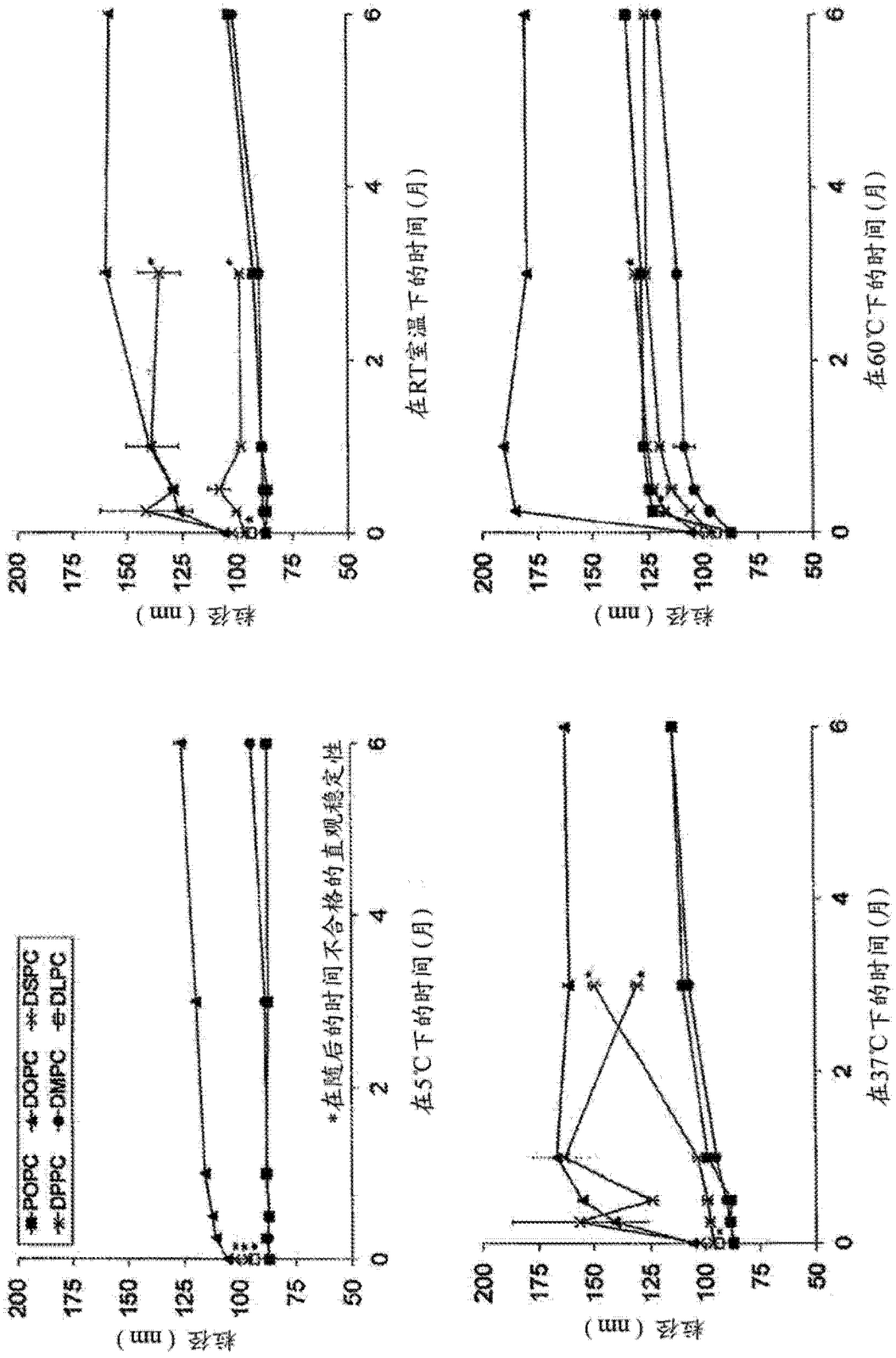


图 7

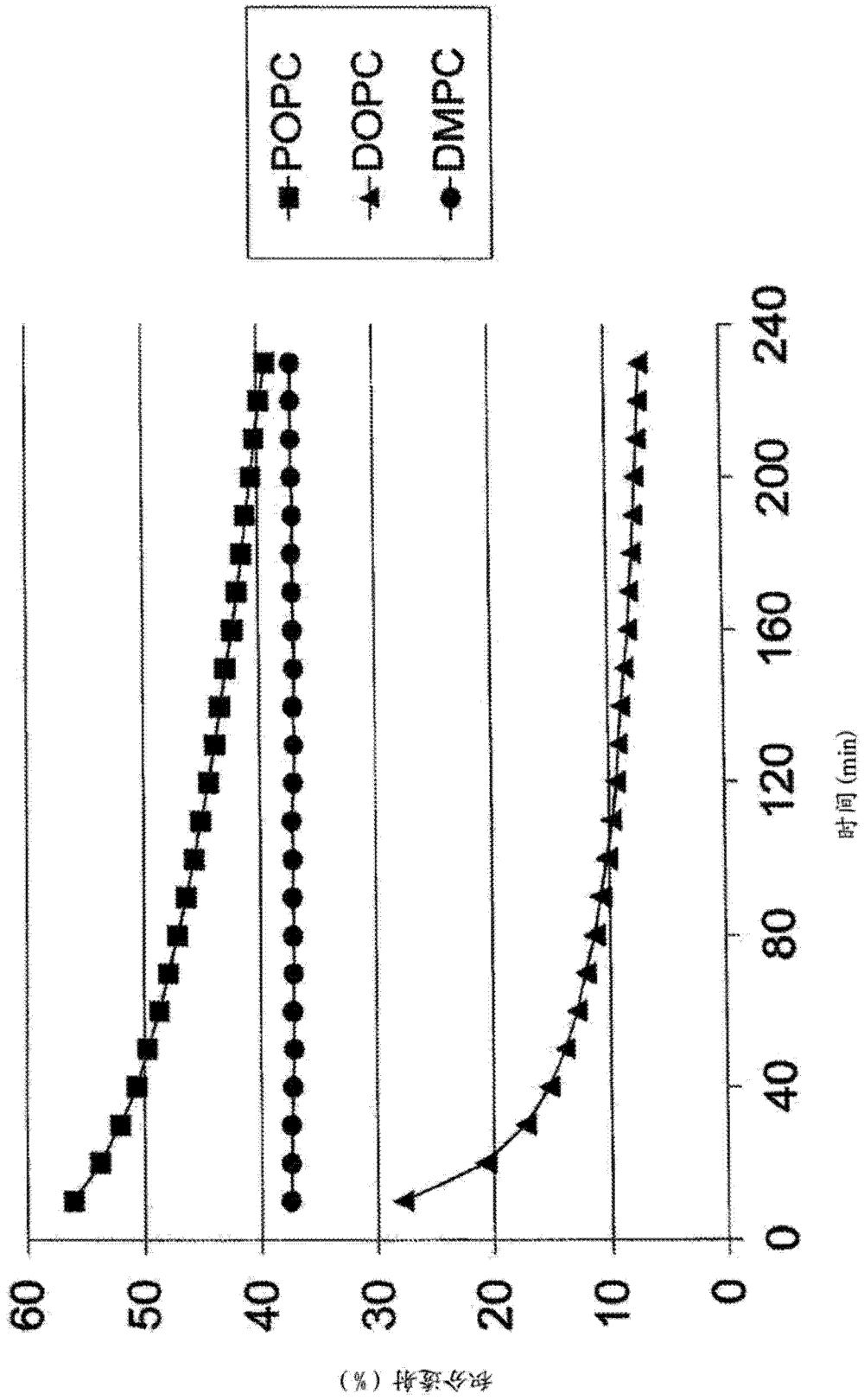


图 8

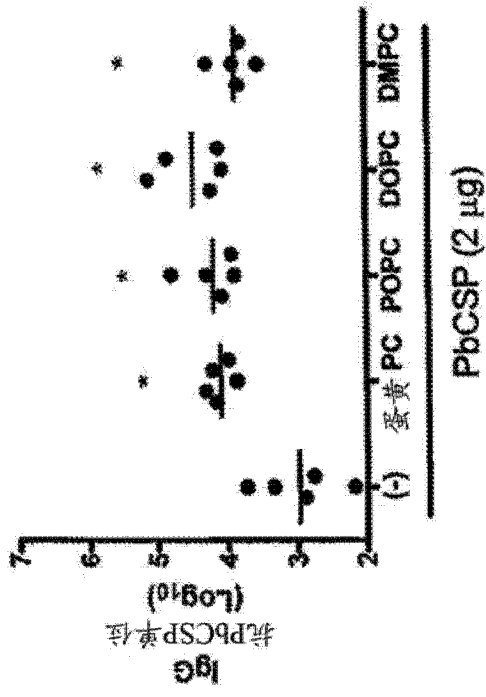


图 9a

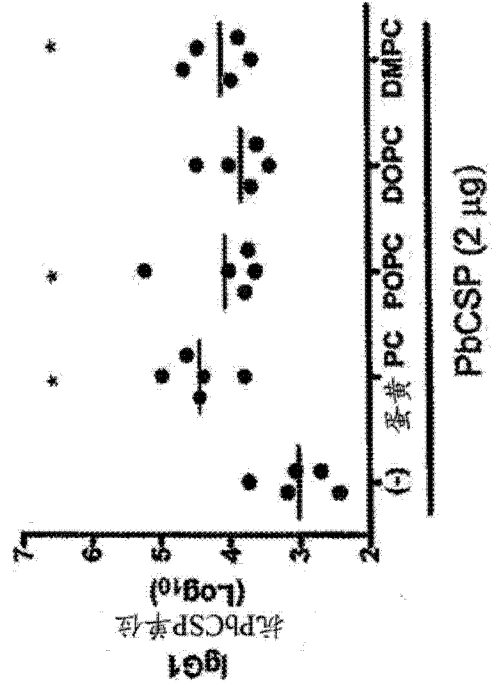


图 9b

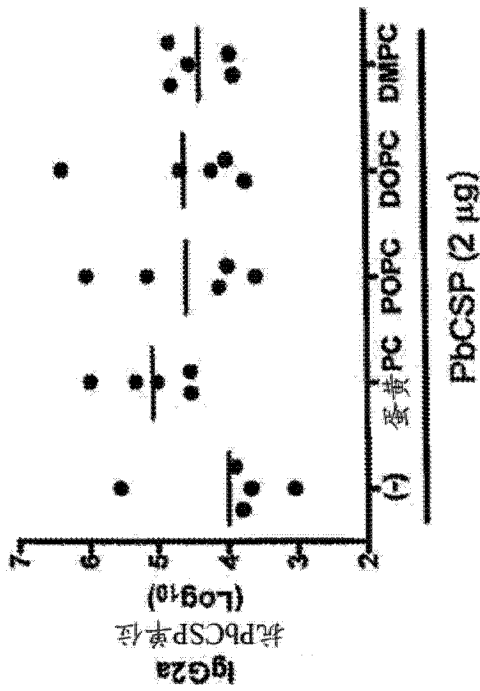


图 9c

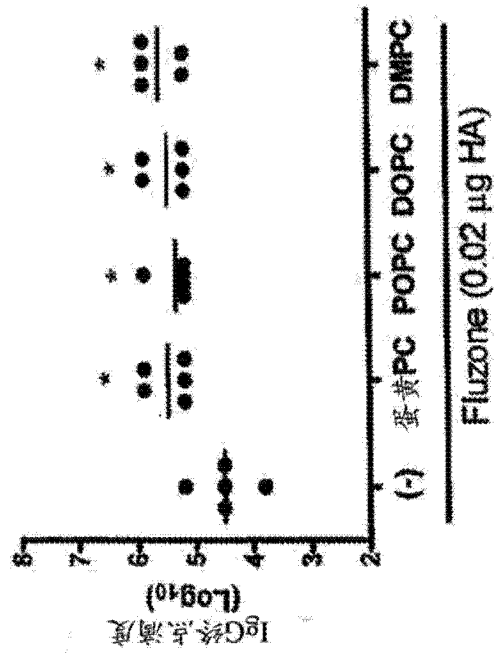


图 10a

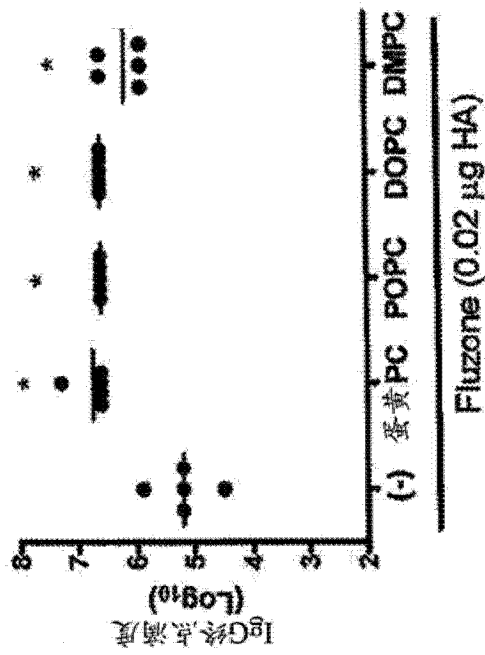


图 10b

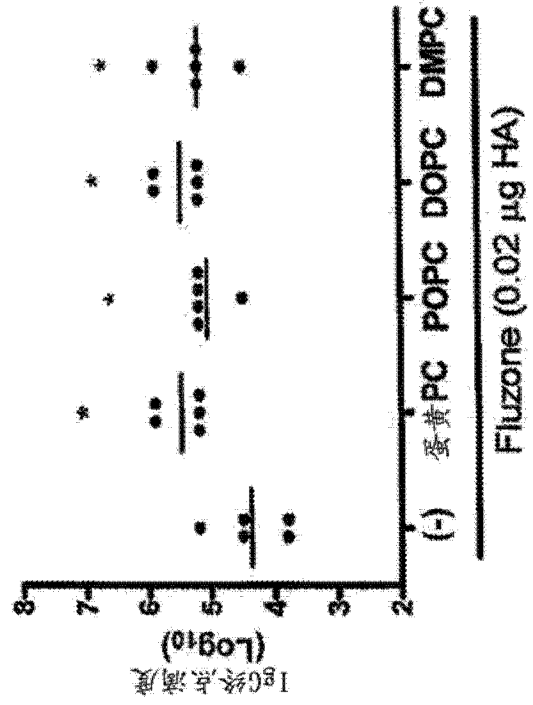


图 10c

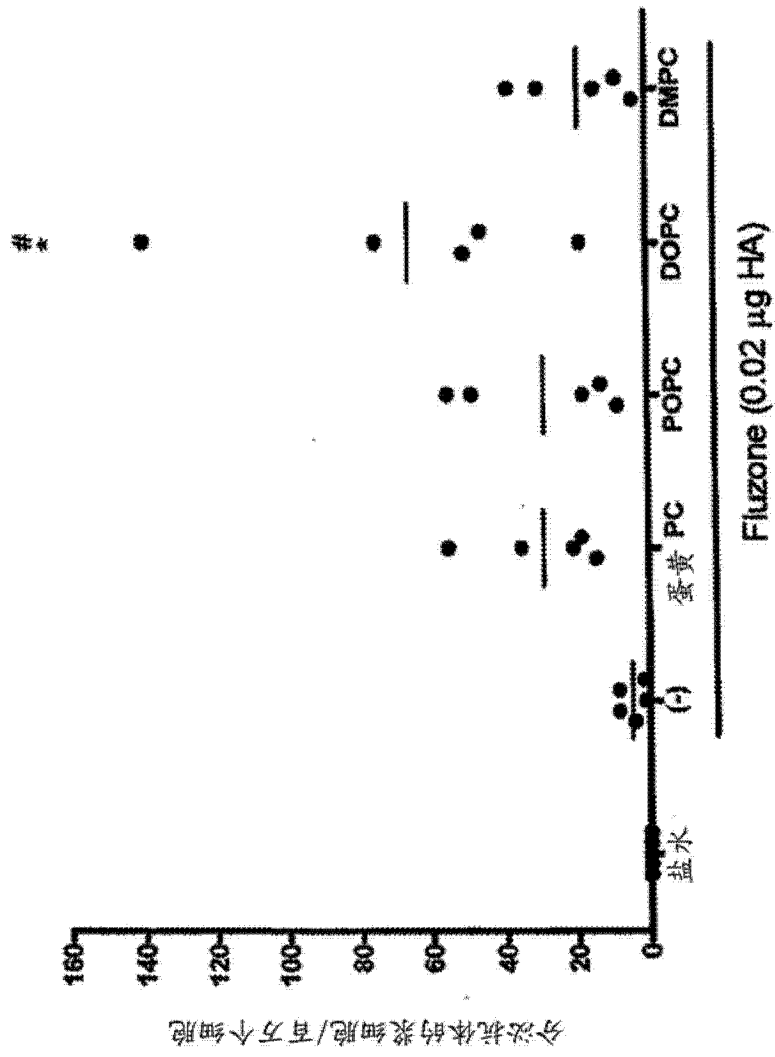


图 10d

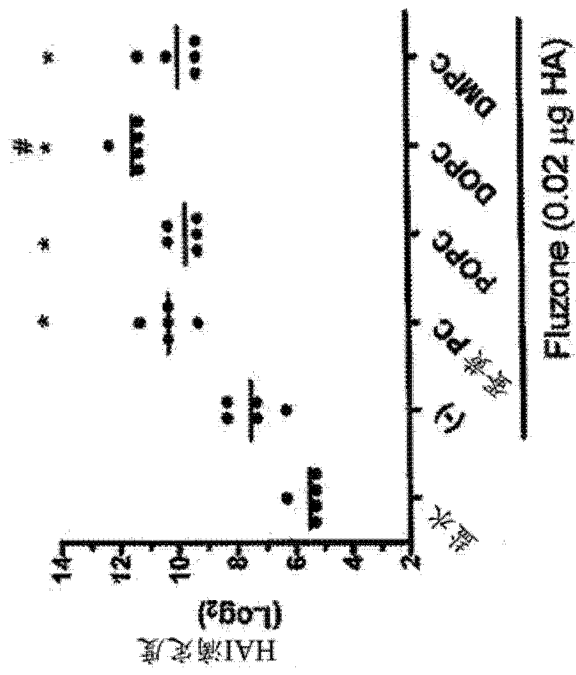


图 11a

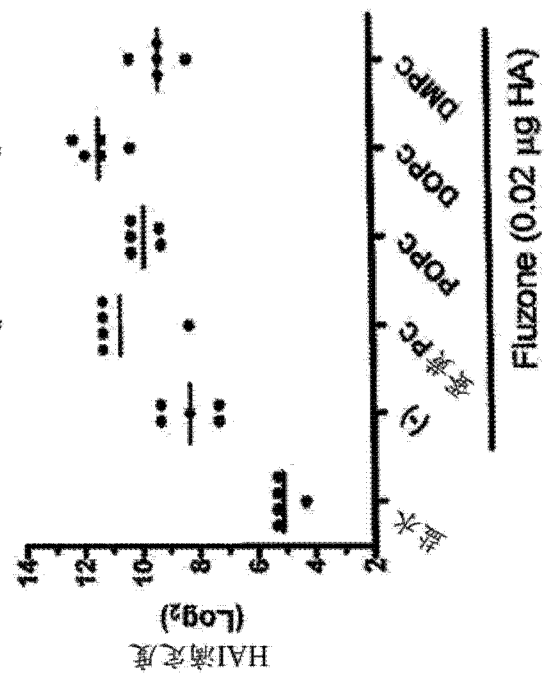


图 11b

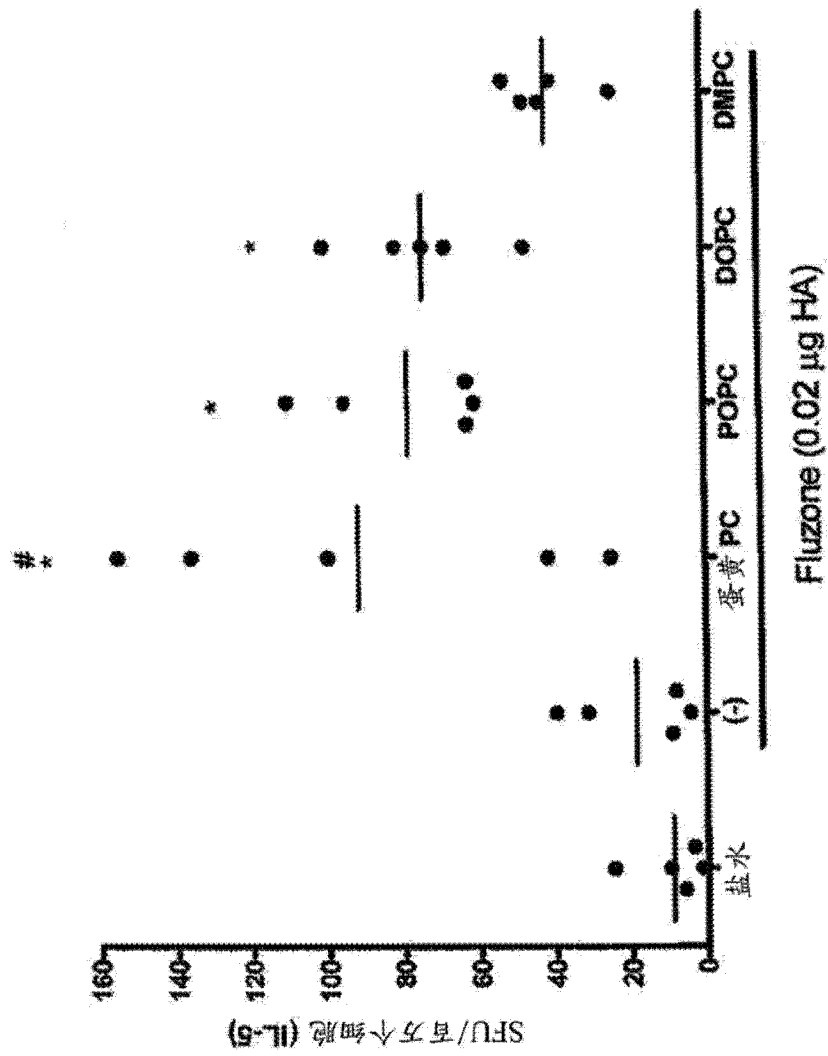


图 12a

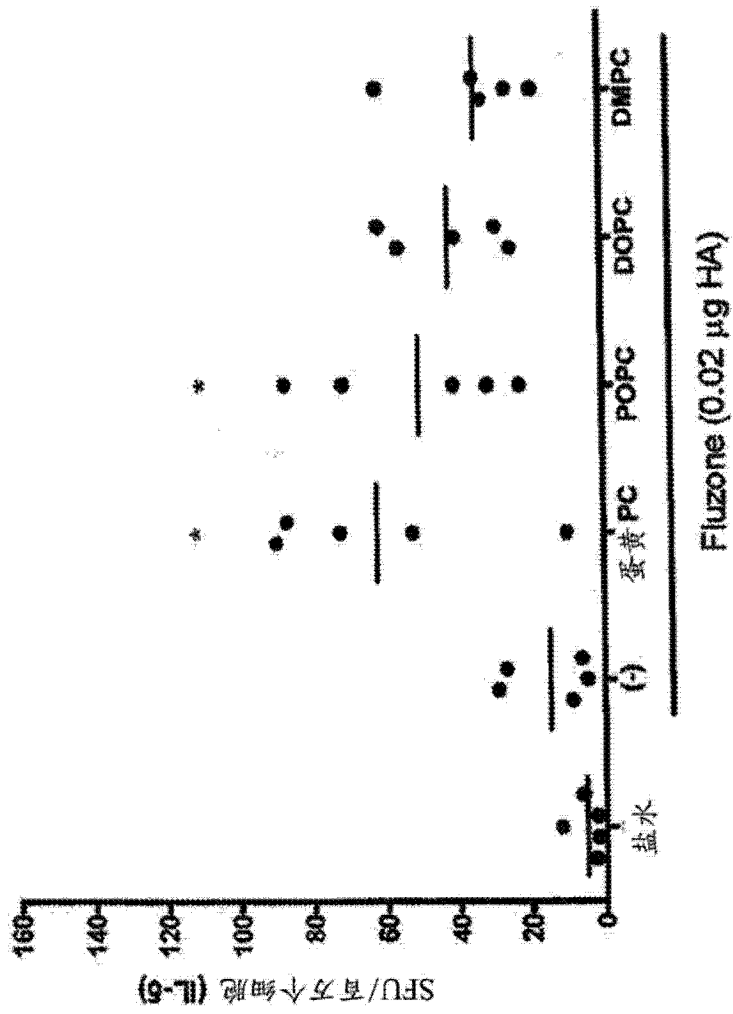


图 12b