



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104288758 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201410570624. 7

(22) 申请日 2014. 10. 22

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 梁伟 朱明昭 秦焱 周畅
刘志达

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
11430

代理人 郎坚

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

A61K 39/12 (2006. 01)

A61K 9/107 (2006. 01)

A61K 47/34 (2006. 01)

A61K 9/19 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

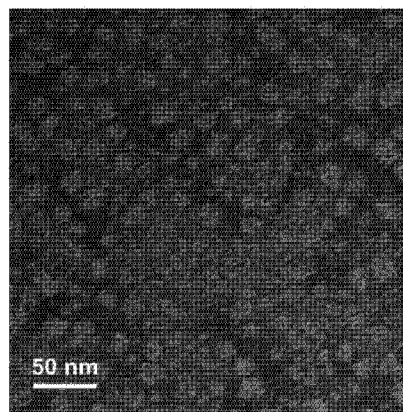
权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

聚乙二醇化磷脂为载体的胶束多肽疫苗

(57) 摘要

本发明涉及一种聚乙二醇化磷脂为载体的胶束多肽疫苗,所述疫苗能够预防或治疗肿瘤,所述的胶束多肽疫苗由聚乙二醇化磷脂(PEG-PE)和多肽疫苗自组装形成,所述的聚乙二醇化磷脂为聚乙二醇(亲水嵌段)通过共价键和磷脂分子(疏水嵌段)上的含氮碱基结合形成的化合物。胶束疫苗的粒径为10~100nm,所述的胶束多肽疫苗中装载的多肽抗原为长度为5~100个氨基酸的多肽疫苗,根据需要,该胶束多肽疫苗还包含调节机体免疫功能的免疫佐剂。



1. 一种胶束多肽疫苗,其特征在于,所述的胶束多肽疫苗由聚乙二醇化磷脂(PEG-PE)和多肽疫苗自组装形成。
2. 根据权利要求1所述的胶束多肽疫苗,其特征在于,
所述的聚乙二醇化磷脂分子中的聚乙二醇亲水嵌段为分子量500~10000的PEG分子,优选为PEG1500~3000,最优选为PEG2000;
所述的多肽疫苗为长度为5~100个氨基酸的多肽疫苗,优选为10~50个氨基酸的多肽疫苗,最优选为20~30个氨基酸的多肽疫苗。
3. 根据权利要求1或2任一所述的胶束多肽疫苗,其特征在于,所述的聚乙二醇化磷脂(PEG-PE)和多肽疫苗的摩尔比为720:4~160,优选摩尔比180:4。
4. 根据权利要求1或2任一所述的胶束多肽疫苗,其特征在于,所述的胶束多肽疫苗进一步包含免疫佐剂,所述的免疫佐剂包括弗氏佐剂、氢氧化铝佐剂、单磷酸脂A(MPLA)佐剂,优选为单磷酸脂A佐剂。
5. 根据权利要求4所述的胶束多肽疫苗,其特征在于,聚乙二醇化磷脂聚合物分子、多肽疫苗、免疫佐剂的摩尔比例范围720:4~160:3~80,优选摩尔比180:4:3。
6. 权利要求1-5任一所述的胶束多肽疫苗的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
步骤(1),以易挥发有机溶剂溶解PEG-PE载体分子、疫苗分子、佐剂分子制备载体分子溶液、疫苗溶液、佐剂溶液;
步骤(2),按目标胶束多肽疫苗中各成分的比例将步骤(1)所获得的载体分子溶液、疫苗溶液、佐剂溶液混匀;
步骤(3),除去步骤(2)所获得的混合溶液中的全部有机溶剂,使载体分子、疫苗分子和佐剂分子形成分布均匀的混合脂膜;
步骤(4),以生理盐水溶解步骤(3)所获得的混合脂膜,温育条件下使脂膜水化均匀,随后室温静置一定时间,获得胶束疫苗溶液;
步骤(5),将步骤(4)的胶束疫苗溶液用0.22 μm的滤膜过滤除菌。
7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,该方法还包括:
步骤(6),向所获得胶束疫苗溶液中添加一定量的冻干保护剂后对胶束疫苗溶液进行冻干,获得胶束疫苗冻干粉剂。
8. 根据权利要求6或7所述的制备方法,其特征在于,
步骤(1)所述的易挥发有机溶剂为,甲醇、氯仿、乙醇或其混合物;
步骤(3)所述的除去有机溶剂的方法为减压水浴加热旋转蒸发;
步骤(4)所述的温育条件为55℃水浴孵育30分钟;
步骤(6)所述的冻干保护剂为0.05g/ml的甘露醇。
9. 一种用于治疗或预防肿瘤的疫苗,所述的疫苗由权利要求1-5任一所述的胶束多肽疫苗和药学上可接受的辅料组成。
10. 权利要求1-5任一所述的胶束多肽疫苗或权利要求9所述疫苗在制备治疗或预防肿瘤的药物中的应用。

聚乙二醇化磷脂为载体的胶束多肽疫苗

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物领域,具体而言,涉及一种以聚乙二醇化磷脂为载体的胶束多肽疫苗,及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 以纳米尺度材料作为载体设计的肿瘤治疗性疫苗是治疗肿瘤的新思路。已有的研究表明,利用纳米尺度材料载体携带蛋白抗原,能够提高抗原的免疫原性,这种现象可能与纳米尺度材料相对巨大的比表面积和复杂的结构有关;同时纳米尺度材料载体对蛋白抗原能够起到一定程度的保护,防止蛋白抗原很快地被血液中的蛋白酶和内网系统降解,有利于蛋白抗原发挥作用;另外,携带有蛋白抗原的纳米尺度材料载体易被抗原呈递细胞(antigen present cells, APCs),特别是树突状细胞(Dendritic Cells, DCs),摄取和加工,从而使DCs处理和呈递大量蛋白抗原,引发更为有效的免疫反应。使用特定的纳米尺度材料包载肿瘤特异性抗原和免疫佐剂组成肿瘤治疗性疫苗,接种肿瘤患者能够刺激患者的免疫系统,产生杀伤肿瘤细胞的免疫反应,减小甚至清除手术或放、化疗后体内残存的肿瘤病灶。

[0003] 目前虽然已经出现多种以纳米尺度材料为载体的肿瘤疫苗设计方案,但都存在一些关键性的技术障碍。以病毒(viruses)、病毒样颗粒(virus-like particles)或病毒颗粒(virosomes)作为载体的肿瘤疫苗(1. Arlen PM, et al. A randomized phase II study of docetaxel alone or in combination with PANVAC-V(vaccinia) and PANVAC-F(fowlpox) in patients with metastatic breast cancer(NCI 05-C-0229). Clin Breast Cancer. 2006 ;7:176 - 179. ;2. Gulley JL, et al. Immunologic and prognostic factors associated with overall survival employing a poxviral-based PSA vaccine in metastatic castrate-resistant prostate cancer. Cancer Immunol Immunother. 2009),虽然能够在使用初期刺激机体产生免疫反应,但由于病毒的蛋白成分本身就是有效的抗原同时组成占优,因此引发的免疫反应主要是针对病毒载体本身的抗原而非病毒载体携带的肿瘤特异性抗原,降低了免疫反应的效率,特别是在肿瘤特异性抗原的抗原性比较弱的情况下,这种效应更为明显;而为了提高治疗性疫苗的免疫治疗效果,通常要进行多次免疫,这种情况下前次免疫引发的针对病毒载体本身的免疫反应(主要是抗体反应),会大大降低后续免疫治疗的效果;此外以常见病毒,例如腺病毒,痘病毒等为载体设计的疫苗,往往因为患者可能的早期病毒感染产生的免疫保护而显著降低疫苗的免疫治疗效果(Huang X, Yang Y. Innate immune recognition of viruses and viral vectors. Hum Gene Ther. 2009 ;20:293 - 301.)。

[0004] 以脂质体为载体的纳米疫苗,载体本身不具有免疫原性,能够有效提高肿瘤特异性抗原的免疫效率,但是,脂质体载体由于尺度和成分的原因,经过皮下接种后其颗粒并不能有效地扩散入引流淋巴结,一部分疫苗成分长时间驻留在接种部位,随之而来的,免疫产生的肿瘤特异性抗原细胞毒性淋巴细胞(Cytotoxic lymphocytes, CTLs)会有

很大一部分迁移至疫苗接种部位而非肿瘤生长部位,大大降低了针对肿瘤的特异性免疫反应 (Hailemichael Y, et al. Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺T cell sequestration, dysfunction and deletion. Nat Med. 2013; 19(4):465-72.)。另外,由于脂质体制备的特点,得到的产物往往均一性较差,颗粒尺度跨度很大,而且批次之间的重复性也一般,在质量控制上存在一定的难度。

[0005] 胶束载体,是一种由同时包含疏水嵌段和亲水嵌段的双亲性聚合物分子自组装成的纳米颗粒,胶束纳米颗粒的组装是聚合物分子在水溶液中自发形成热力学稳定体系,这个过程是由疏水片段从水溶液中撤出并自发堆积聚合引起的自由能降低推动的。与低分子量表面活性剂相比,双亲性聚合物的临界胶团浓度 (critical micelle concentration, CMC) 更低,这使得聚合物胶束更能对抗溶液的稀释,同时,疏水嵌段组成的胶束核结构紧密,在生理环境中被大量体液稀释后,不容易解离,稳定性更好。双亲性聚合物分子的亲水性嵌段大都选用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG),聚乙二醇水溶性良好,具有高度水合特性,在胶束颗粒的外壳区域能够为胶束颗粒提供足够的空间位阻。此外,它的生物相容性良好,是通过 FDA 认证的广泛使用的药用辅料。双亲性聚合物分子的疏水嵌段材料比较丰富,是决定胶束载体载药效率和稳定性的主要因素。根据化学结构不同,疏水嵌段中的亲脂基团可分为三类,聚酯 (polyester) 衍生物,聚氨基酸 (poly(amino acid)) 衍生物和普郎尼克类 (Pluronics)。聚酯类内核嵌段中,聚乳酸 (poly(lactic acid), PLA),聚己内酮 (poly(caprolactone), PCL) 和聚羟基乙酸 (poly(glycolic acid)) 均为 FDA 认可的具有良好生物相容性的材料。聚氨基酸类内核嵌段中,聚天冬氨酸 (poly(aspartic acid), PAsp),聚谷氨酸 (poly(glutamic acid), PGlu),聚赖氨酸 (poly(L-lysine), PLys),聚组氨酸 (poly(histidine), PHis) 等材料已被普遍利用。Pluronics 为聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷组成的三嵌段共聚物,可以表示为 PEO_m-PPOn-PEO_m。

[0006] 聚乙二醇化磷脂是一种新型的双亲性聚合物分子。其亲水嵌段为聚乙二醇,疏水嵌段为磷脂分子。聚乙二醇分子通过共价键与磷脂分子上的含氮碱基结合。目前,聚乙二醇化磷脂作为包载材料主要是用于包载小分子化疗药物,其优点包括:其优点如下:1) 疏水内核磷脂可以包载难溶性药物,大大提高药物的溶解能力;2) 亲水外壳聚乙二醇可以保护胶束内部的药物分子不被外界吸附或降解,能够帮助药物逃逸网状内皮系统的摄取,延长药物循环时间;3) 控制药物的释放,优化药物的体内分布以达到更好的治疗效果(不会引发免疫反应)。但是,有关聚乙二醇化磷脂胶束对蛋白或多肽的包载研究极少,有关聚乙二醇化磷脂制备的胶束作为载体系统开发的肿瘤治疗性疫苗的研究国内外均未见报道。

[0007] 单磷酸脂 A (Monophosphoryl Lipid A, MPLA) 是一类较为常见的免疫佐剂(结构见图 9),其是通过化学修饰来源于沙门氏菌 R595 的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 而得到的新型的免疫佐剂。与 LPS 相比, MPLA 基本保留了免疫刺激能力,但是内毒素毒性大大降低,因此成为了一种更加安全且有效的免疫佐剂,并已被美国 FDA 批准作为免疫佐剂进入临床。与 LPS 发挥作用的分子机制相似, MPLA 也是通过与 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 4 相作用,激活其下游与天然免疫相关的信号通路,激活天然免疫反应,促进干扰素 γ 和肿瘤坏死因子 α 的表达;与此同时活化树突状细胞,进而进一步激活获得性免疫反应。

发明内容

[0008] 本发明涉及一种能够预防和治疗肿瘤的胶束多肽疫苗。

[0009] 本发明所述的胶束多肽疫苗由聚乙二醇化磷脂 (PEG-PE) 和多肽疫苗自组装形成,所述的聚乙二醇化磷脂为聚乙二醇(亲水嵌段)通过共价键和磷脂分子(疏水嵌段)上的含氮碱基结合形成的化合物。

[0010] 本发明所述的聚乙二醇化磷脂分子中的聚乙二醇亲水嵌段为分子量 500 ~ 10000 的 PEG 分子,优选为 PEG1500 ~ 3000,最优选为 PEG2000。

[0011] 本发明所述的胶束疫苗的粒径为 10 ~ 100nm,优选为 10 ~ 50nm,最优选为 20nm。

[0012] 本发明所述的多肽疫苗为长度为 5 ~ 100 个氨基酸的多肽疫苗,优选为 10 ~ 50 个氨基酸的多肽疫苗,更优选为 20 ~ 30 个氨基酸的多肽疫苗,最优选为 E7 多肽或 OT-1 多肽。

[0013] 本发明所述的 E7 抗原多肽为来源于人 16 型乳头瘤病毒 (HPV16) 肿瘤的相关抗原,在 N 端连接一个棕榈酸分子,即 E7₄₃₋₆₂ 序列:棕榈酸 -GQAEPDRAHYNIVTFCKCD ;

[0014] 本发明所述的 OT-1 多肽为来源于卵清蛋白 (OVA) 的 17 个氨基酸的多肽,包含 OVA 蛋白在 H-2Kb 分型小鼠特异性 CTL 表位 OVA257-264,氨基酸序列结构为棕榈酸 -EQLESIINFEKLTWKD。

[0015] 本发明所述的胶束多肽疫苗还可以包含调节机体免疫功能的免疫佐剂,所述的免疫佐剂包括弗氏佐剂、氢氧化铝佐剂、单磷酸脂 A 佐剂,优选为单磷酸脂 A (MPLA) 佐剂。

[0016] 本发明所述的胶束多肽疫苗中,聚乙二醇化磷脂聚合物分子、多肽抗原、免疫佐剂的用量摩尔比例范围 720 :4 ~ 160 :3 ~ 80,最优选摩尔比 180 :4 :3。

[0017] 本发明所述的胶束多肽疫苗制剂为溶液形式或冻干形式。

[0018] 本发明所述的胶束多肽疫苗的制备方法为:

[0019] (1) 以易挥发有机溶剂溶解 PEG-PE 载体分子、疫苗分子、佐剂分子,制备载体分子溶液、疫苗溶液、佐剂溶液;

[0020] (2) 按照特定比例将步骤 (1) 所获得的载体分子溶液、疫苗溶液、佐剂溶液混匀;

[0021] (3) 除去步骤 (2) 所获得的混合溶液中的全部有机溶剂,使载体分子、疫苗分子和佐剂分子形成分布均匀的混合脂膜;

[0022] (4) 以一定量的生理盐水溶解步骤 (3) 所获得的混合脂膜,温育条件下使脂膜水化均匀,随后室温静置一定时间,获得胶束疫苗溶液;

[0023] (5) 将步骤 (4) 所获得的胶束疫苗溶液用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌;

[0024] (6) 根据需要,向步骤 (5) 所获得胶束疫苗溶液中添加一定量的冻干保护剂后对胶束疫苗溶液进行冻干,制备胶束疫苗冻干粉。

[0025] 本发明所述的胶束多肽疫苗的制备方法步骤 (1) 中所述的易挥发有机溶剂为,甲醇、氯仿、乙醇或其混合物。

[0026] 本发明所述的胶束多肽疫苗的制备方法步骤 (3) 中所述的除去有机溶剂的方法优选为减压水浴加热旋转蒸发。

[0027] 本发明所述的胶束多肽疫苗的制备方法步骤 (4) 中所述的温育条件优选为 55 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 分钟。

[0028] 本发明所述的胶束多肽疫苗的制备方法步骤 (6) 中所述的冻干保护剂优选为浓

度为 0.05g/ml 的甘露醇。

[0029] 本发明还涉及所述的胶束多肽疫苗制剂在治疗肿瘤的药物中的应用,所述肿瘤包括非实体瘤与实体瘤,所述应用具体为,通过皮下注射或静脉注射的方式,给予患者一定剂量的所述胶束多肽疫苗制剂。

[0030] 本发明还涉及所述的胶束多肽疫苗制剂在预防肿瘤中的应用,所述肿瘤包括非实体瘤与实体瘤,所述应用具体为,通过皮下注射或静脉注射的方式,给予患者一定剂量的所述胶束多肽疫苗制剂。

[0031] 本发明还涉及一种抗肿瘤疫苗产品,所述的疫苗产品由所述的胶束多肽疫苗和药学上可接受的辅料组成。

[0032] 本发明还涉及所述的胶束多肽疫苗在治疗肿瘤或预防肿瘤的药物中的应用,所述肿瘤包括非实体瘤与实体瘤。

附图说明

[0033] 图 1,胶束 E7 疫苗的透射电镜照片

[0034] 图 2,胶束 E7 疫苗的动态光散射粒径分析

[0035] 图 3,与脂质体装载的 E7 疫苗相比,胶束 E7 疫苗能够高效快速的在皮下扩散

[0036] 图 4,胶束疫苗能够被淋巴结中的树突状细胞和巨噬细胞高效吞噬

[0037] 图 5A、5B,与脂质体纳米颗粒相比,肿瘤胶束疫苗能够高效的刺激巨噬细胞分泌炎症性细胞因子

[0038] 图 6,与脂质体纳米颗粒相比,胶束疫苗能够高效刺激树突状细胞的成熟、活化

[0039] 图 7,胶束 E7 疫苗能够有效产生针对肿瘤特异性抗原的 CTL 反应

[0040] 图 8,胶束 E7 疫苗能够有效降低肿瘤生长速度,延长荷瘤小鼠生存期

[0041] 图 9,胶束 E7 疫苗能够完全预防肿瘤切除手术后的肿瘤复发

[0042] 图 10, MPLA 分子结构

具体实施方式

[0043] 实施例 1,胶束 E7 疫苗的制备

[0044] E7 抗原多肽为来源于人 16 型乳头瘤病毒 (HPV16) 肿瘤相关抗原,在 N 端连接一个棕榈酸分子,即 E7-20 多肽;E7₄₃₋₆₂ 序列:棕榈酸 -GQAEPDRAHYNIVTFCKCD

[0045] 储液配制:

[0046] (1) 向分装完成的每管 1mg 的 E7-20 加入 1mL 无水甲醇配制成浓度为 1mg/mL 的 E7-20 储液;

[0047] (2) 将 MPLA 粉末溶解于甲醇与氯仿 1:2 混合溶液中配制成浓度为 1mg/mL 的 MPLA 储液;

[0048] (3) 称取 30mg PEG-PE 粉末加入 3mL 氯仿溶解配制成 10mg/mL 的 PEG-PE 储液。

[0049] 1. 胶束疫苗溶液制备,按照表 1 的处方制备 10mL 胶束疫苗:

[0050] 步骤 (1) 取 5mL PEG-PE 储液于旋蒸瓶内,准确量取 400 μ L MPLA 储液和 1mL E7-20 储液加入旋蒸瓶,轻轻振摇使之与 PEG-PE 溶液混合均匀;

[0051] 步骤 (2) 于水浴加温条件下真空旋转蒸发仪除去有机溶剂 (转速 90 转 / 分钟,水

浴 40℃), 除去有机溶剂后 PEG-PE 与 MPLA、E7-20 形成分布均匀的薄膜, 于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水;

[0052] 步骤 (3) 加入 10mL 生理盐水, 于 55℃ 水浴孵育 30 分钟水化脂膜, 得外观均一无色透明的胶束 E7 疫苗溶液;

[0053] 步骤 (4) 室温静置 2 小时后, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后 4℃ 储存备用 (可保存两周)。

[0054] 表 1: 胶束 E7 疫苗处方

[0055]

脂类 / 肽 (mol/mol)	脂类 / MPLA (mass/mass)	PEG-PE 溶液浓度	MPLA 溶液浓度	E7-20 溶液浓度
44:1	79:1	5mg/mL	40 μg/mL	100 μg/mL

[0056] 2. 胶束疫苗冻干粉制备, 处方及步骤 (1) ~ (3) 同上;

[0057] 步骤 (4) 室温放置 2 小时后, 准确称取 0.5g 甘露醇加入 10mL 待冻干样品中, 完全溶解后经 0.22 μm 滤膜过滤, 按照每瓶 1mL 分装于无菌小瓶中, 置于 -80℃ 预冻过夜;

[0058] 步骤 (5) 将样品真空冷冻干燥 36 小时 (真空度 0.1mbar), 得到冻干制剂。

[0059] 实施例 2, 脂肪酸化 E7/OT-1 抗原胶束的包封率测定

[0060] 合成带有罗丹明荧光修饰的脂肪酸化 E7 抗原多肽和 OT-1 抗原多肽 (棕榈酸 -EQLESIIINFEKLTWKD), 脂肪酸化的抗原多肽无法溶于水中因而形成悬浊液, 而脂肪酸化抗原多肽被 PEG-PE 胶束装载后则形成稳定的溶液, 由此可以将游离的抗原多肽和装载了抗原多肽的胶束分离开来, 继而根据溶液中游离抗原多肽的含量的变化计算得到有效的抗原多肽包封率, 包封率 = (总抗原量 - 游离抗原量) / 总抗原量 × 100%。

[0061] 按照表 2 和表 3 的配比, 制备含不同比例多肽的胶束, 制备工艺方法同实施例 1 所述的胶束疫苗溶液制备步骤方法。将制备得到的不同比例胶束疫苗溶液, 经过 14000g 高速离心 30 分钟, 分离非溶解状态的游离的抗原多肽和溶液中的胶束包载的抗原。根据多肽标记的罗丹明荧光的最大激发波长为 535nm, 最大发射波长 590nm, 通过荧光法分光光度法检测溶液中的抗原含量, 继而根据公式计算得到有效的抗原多肽包封率 (结果见表 2、表 3 第三行)。可见, 当 PEG-PE 与脂肪酸修饰多肽的质量比例大于或等于 10:1 的条件下包封率约为 100%。

[0062] 表 2: 不同的 PEG-PE 与 E7 抗原多肽质量比条件下的胶束包封率

[0063]

脂:肽 (w/w)	50:1	20:1	10:1	5:1	2:1	1:1
脂:MPLA (w/w)	100:1	100:1	100:1	100:1	100:1	100:1
包封率 (%)	100.00	100.00	100.00	97.99	67.76	25.48

[0064]

[0065] 表 3: 不同的 PEG-PE 与 OT-1 抗原多肽质量比条件下的胶束包封率

[0066]

脂:肽 (w/w)	50:1	20:1	10:1	5:1	2:1	1:1
脂:MPLA (w/w)	100:1	100:1	100:1	100:1	100:1	100:1
包封率 (%)	100.00	100.00	100.00	91.76	40.10	27.91

[0067] 实施例 3, 胶束多肽疫苗的物理性状表征

[0068] 1、透射电子显微镜对胶束 E7 疫苗的形态观察

[0069] 将实施例 1 中制备的胶束 E7 疫苗溶液用去离子水稀释, 使 PEG-PE 浓度稀释至

0.1mg/mL,取 10 μ L 的样品溶液,滴加到经过辉光放电亲水化处理的镀碳膜铜网上,吸附 30 秒后用滤纸吸掉样品溶液,滴加 10 μ L 的醋酸双氧铀(浓度为 2% (w/v)) 染色 30 秒,滤纸吸干染色液,用透射电子显微镜(Tectai20) 观察负染后的胶束形态。结果如图 1 所示,透射电镜观察胶束疫苗是呈均一、球形的纳米颗粒。

[0070] 2、动态光散射法对胶束 E7 疫苗粒径分析

[0071] 将实施例 1 中制备的胶束 E7 疫苗溶液用去离子水稀释,使 PEG-PE 浓度稀释至 1mg/mL。将样品混匀后静置 2 小时。取 20 μ L 样品加入经去离子水清洗大于 3 次的石英比色杯中,避免产生气泡。用擦镜纸将比色杯透光部分擦拭干净,放入动态光散射仪(271-DPN) 的样品池,预热至设定温度 25 $^{\circ}$ C,设定方法检测时间为每次 10 秒,每组检测 10 次。结果如图 2 所示,动态光散射分析显示胶束的粒径分布在 10-20nm 之间。

[0072] 实施例 4,接种后的皮下扩散行为分析

[0073] 1、样品制备:

[0074] (1) 罗丹明 E7 溶液制备

[0075] 取 20 μ L 的 10mg/mL 罗丹明标记的脂肪酸化 E7 多肽(序列:棕榈酸-GQAEPDRAHYNIVTFCKCD,罗丹明标记在氨基酸 K,合成于吉尔生化有限公司)的 DMSO 储液,加入 0.980mL 无菌水中,得到浓度为 0.2mg/mL 的荧光多肽溶液。

[0076] (2) 胶束罗丹明 E7 制备

[0077] 称取 10mgPEG-PE 粉末溶于 1mL 氯仿于试管中,取 0.2mL 罗丹明标记的脂肪酸化 E7 多肽的甲醇溶液(1mg/mL),使胶束中,按照实施例 1 的方法轻轻振摇其混合均匀,氮气吹干使其形成均匀薄膜,于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水分。加入 1mL 生理盐水,于 55 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 分钟水化脂膜,得浅紫色均一透明的溶液,其中荧光多肽浓度为 0.2mg/mL。室温静置 2 小时后,经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0078] (3) 脂质体罗丹明 E7 制备

[0079] 分别取 7mg DPPC、3mg 胆固醇分别溶于氯仿中后混合于试管,取 0.2mL 的罗丹明标记的脂肪酸化 E7 多肽的甲醇溶液(1mg/mL),氮气吹干使其形成均匀薄膜,真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分,加入 1mL 生理盐水水化,55 $^{\circ}$ C 温水浴 30 分钟,其间超声处理 1 分钟。之后用 Mini-Extruder (Avanti) 挤出仪经过孔径为 0.4 μ m 的聚碳酸脂滤膜挤压,至少 11 次过滤挤压,最终得到粒径 400nm 左右的脂质体,其中荧光多肽浓度为 0.2mg/mL。

[0080] 2、实验分组与结果

[0081] 裸鼠 9 只,分为 3 组,每组 3 只。分别用上述几种制剂在裸鼠肩部相同位置皮下注射 100 μ L 样品。在注射后的 0,1,3,6,24 小时,4 天,6 天,7 天,以活体成像观察荧光制剂在小鼠体内的扩散情况。

[0082] 结果如图 3 所示,可见:

[0083] (1) 脂肪酸化 E7 抗原在水溶液中溶解度较差,因此在注射位点皮下局部滞留现象明显;

[0084] (2) 胶束抗原多肽疫苗,在皮下扩散速度较快,扩散范围较大;

[0085] (3) 脂质体抗原多肽疫苗,与胶束抗原多肽疫苗相比,脂质体的皮下局部的滞留时间长,较难扩散。

[0086] 综上,说明胶束是更为适合皮下给药的制剂形式。

[0087] 实施例 5, 引流淋巴结分布

[0088] 1、样品制备：

[0089] (1) FITC 标记的 PEG-PE 胶束制备：

[0090] 称取 10mg PEG-PE 粉末溶于 1mL 氯仿于试管中, 取 0.6mL FITC-PEG-PE (FITC 标记的 PEG-PE) 氯仿储液 (1mg/mL), 使胶束中 FITC-PEG-PE 分子相对于全部的 PEG-PE 分子的摩尔比为 5%, 按照实施例 1 的方法轻轻振摇其混合均匀, 氮气吹干使其形成均匀薄膜, 于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水分。加入 1mL 生理盐水, 于 55°C 水浴孵育 30 分钟水化脂膜, 得亮黄色均一透明的溶液。室温静置 2 小时后, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌后 4°C 储存备用。

[0091] (2) 罗丹明标记的脂质体制备：

[0092] 分别取 7mg DPPC、3mg 胆固醇分别溶于氯仿中后混合于试管, 取 50 μL Rhodamine-PE (罗丹明标记的 PE 分子) 氯仿储液 (2mg/mL), 使 Rho-PE 相对于全部的脂质分子的质量比为 1%, 氮气吹干使其形成均匀薄膜, 真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分, 加入 1mL 生理盐水水化, 55°C 温水浴 30 分钟, 其间超声处理 1 分钟。之后用 Mini-Extruder (Avanti) 挤出仪分别经过孔径为 0.4 μm , 0.1 μm 的聚碳酸酯滤膜挤压, 至少 11 次过滤挤压, 最终得到粒径 100nm 左右的单室脂质体。

[0093] 2. 试验方法

[0094] 将 27 只雌性 C57BL/6 小鼠, 分成 3 组, 每组 9 只, 分别在肩部两侧各皮下注射 50 μL 的 FITC 胶束疫苗、罗丹明脂质体疫苗, 以注射生理盐水作为空白对照。在注射后 1, 2, 3 天分别从各组取 3 只小鼠, 分离两侧的腋下淋巴结于 1.5mL 的 EP 管中, 用眼科直剪将淋巴结轻轻剪碎后, 每管加 200 μL 消化液 (7.5ml RPMI1640 培养基, 2% 胎牛血清, 0.5mg/ml 胶原酶 IV, 40U/ml 脱氧核糖核酸酶 I, 10mM HEPES), 经 37°C 消化 30 分钟后, 每管加 4mL 完全培养基中和, 经过 70 μm 筛网, 500g 离心 5 分钟, 收集细胞用 FACS buffer 重悬, 至 5×10^5 细胞/mL。细胞悬液按照说明书中比例加入 CD11c-APC 抗体 4°C 孵育 30 分钟, 用 FACS buffer 洗一次, 流式细胞分选技术分析荧光阳性的淋巴结 DC 细胞比例。

[0095] 结果与结论: 与脂质体相比, 胶束能够更多的被淋巴结树突细胞吞噬。且在接种 2 天后淋巴结内吞噬胶束的树突细胞比例达到最多。说明胶束比脂质体更加靶向淋巴结树突细胞 (图 4)。

[0096] 实施例 6, MPLA 胶束体外刺激巨噬细胞实验

[0097] 样品制备：

[0098] (1)、按照实施例 1 所述方法制备胶束 E7 疫苗溶液: 取 1mL PEG-PE 储液于试管内, 准确量取 100 μL MPLA 储液和 200 μL E7-20 储液加入试管, 轻轻振摇使之与 PEG-PE 溶液混合均匀; 氮气吹干除去有机溶剂后 PEG-PE 与 MPLA、E7-20 形成分布均匀的薄膜, 于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水; 加入 10mL 生理盐水, 于 55°C 水浴孵育 30 分钟水化脂膜, 得外观均一无色透明的溶液。其中 MPLA 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0099] (2)、按照与 (1) 相同的方法制备胶束 MPLA 溶液: 取 10mg PEG-PE 粉末分别溶于氯仿中后混合于试管, 另取 100 μL MPLA 储液加于该试管中, 混合均匀后, 氮气吹干使其形成均匀薄膜, 真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分, 加入 4mL 生理盐水水化, 55°C 温水浴 30 分钟。

[0100] (3)、与(1)相同浓度的MPLA对照:取100 μ L的MPLA储液于试管中,以氮气吹干有机溶剂,在真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分。加入1mL生理盐水水化,55 $^{\circ}$ C温水浴30分钟,其间超声处理5-10分钟,制备成为100 μ g/mL的MPLA混悬液。

[0101] (4)、以薄膜水化法联合挤出法制备MPLA脂质体,制备方法:分别取7mg DPPC、3mg胆固醇分别溶于氯仿中后混合于试管,另取100 μ L MPLA储液加于该试管中,混合均匀后,氮气吹干使其形成均匀薄膜,真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分,加入1mL生理盐水水化,55 $^{\circ}$ C温水浴30分钟,其间超声处理1分钟使脂膜脱离。之后利用Mini-Extruder(Avanti)挤出法分别经过孔径为0.4 μ m,0.1 μ m的聚碳酸酯滤膜,至少11次过滤,最终得到100nm左右的单室脂质体。

[0102] (5)、与(4)相同脂含量的空载脂质体,制备方法:分别取7mg DPPC、3mg胆固醇分别溶于氯仿中后混合于试管,氮气吹干使其形成均匀薄膜,真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分,加入1mL生理盐水水化,55 $^{\circ}$ C温水浴30分钟,其间超声处理1分钟使脂膜脱离。之后利用Mini-Extruder(Avanti)挤出仪分别经过孔径为0.4 μ m,0.1 μ m的聚碳酸酯滤膜,至少11次过滤,最终得到100nm左右的单室脂质体。

[0103] 小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7(购自中国科学院细胞库)用含10%优质胎牛血清的DMEM培养基培养,培养条件5%二氧化碳,温度37 $^{\circ}$ C。将细胞接种于12孔板,细胞计数 3×10^6 /mL,每孔1mL培养基,待贴壁过夜后进行处理,

[0104] 处理方式(1):生理盐水作为空白对照,MPLA,胶束疫苗,MPLA胶束为实验组,各实验组中MPLA的作用终浓度为100ng/mL。各对照组中载体量或溶剂量与对应的实验组一致,细胞经过处理2小时后收集培养基上清,ELISA检测培养基上清中细胞外分泌的细胞TNF- α 以及其他细胞因子的浓度,结果见图5A。

[0105] 处理方式(2):生理盐水作为空白对照,载体对照组为空载胶束和空载脂质体,MPLA,MPLA胶束,MPLA脂质体为实验组。各实验组中MPLA的作用终浓度为100ng/mL。各对照组中载体量或溶剂量与对应的实验组一致,细胞经过处理3小时后收集培养基上清,ELISA检测培养基上清中细胞外分泌的细胞TNF- α 以及其他细胞因子的浓度,结果见图5B。

[0106] 结果与结论:MPLA为TLR4受体的配体,促炎性细胞因子TNF- α 的分泌量反映了巨噬细胞被MPLA的激活程度。MPLA胶束与胶束疫苗具有相当的活化细胞能力(图5A),与MPLA相比能够更大程度的激活巨噬细胞,而脂质体不能提高MPLA的刺激作用,胶束MPLA增强了MPLA的佐剂活化巨噬细胞的效率(图5B)。

[0107] 实施例7,胶束多肽疫苗的体外刺激树突状细胞实验

[0108] 骨髓诱导的树突细胞(BMDC)的获取方法如下:6-8周龄雌性C57BL/6小鼠一只,取股骨、胫骨骨髓于无菌PBS中,将吹散的细胞悬液经过70 μ m筛网过滤,裂解红细胞并用PBS洗1-2遍,将细胞种于100mm(或90mm)培养皿中,细胞数 2×10^6 /10mL/皿。培养基成分:RPMI-1640,10%FBS,青霉素100U/ml,链霉素100 μ g/ml,2mM L-谷氨酰胺,50 μ M β -巯基乙醇,rmGM-CSF(重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)200U/mL,rmIL-4(重组小鼠白细胞介素4)200U/ml。培养条件:5%二氧化碳,温度37 $^{\circ}$ C。培养基第3天补液10mL,第6天换液10mL。经过8天的诱导,收集所有的悬浮细胞,经流式细胞分选技术分析鉴定,以CD11c(树突细胞表面标记物分子)作为DC细胞标志物,DC细胞纯度为90%以上。

[0109] 按照实施例 6 中样品制备方法制备 PEG-PE 空载胶束, MPLA 混悬液、MPLA 胶束, 胶束疫苗溶液, 其中 MPLA 浓度均为 $100 \mu\text{g/mL}$ 。将培养 8 天的骨髓诱导的树突细胞收集并接种于 24 孔板中, 细胞计数 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 每孔培养基总量 1mL。接种后直接用制备好的样品处理, 以溶剂生理盐水作为空白对照组, 空载胶束作为载体对照组, MPLA、MPLA 胶束和胶束疫苗为实验组, 各实验组中 MPLA 的作用终浓度为 100ng/mL 。各对照组中载体量或溶剂量与对应的实验组一致。经过 24 处理后, 收集细胞培养基上清和细胞。ELISA 检测培养基上清中细胞外分泌的细胞 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 的浓度, 流式细胞分选技术分析成熟 DC 的表面标志物的表达程度。

[0110] 结果: 树突细胞为疫苗在体内的主要效应细胞, 树突细胞表面 CD80 (树突细胞活化标志分子) 分子的表达以及 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 等细胞因子的分泌反映了树突细胞的活化程度。实验证明胶束 MPLA 与 MPLA 相比能够更有效的激活树突细胞 (图 6)。

[0111] 实施例 8, 胶束 E7 疫苗免疫活化杀伤性 T 细胞 (CTL) 实验

[0112] 样品制备:

[0113] (1)、按照实施例 1 方法制备胶束 E7 疫苗溶液。所得胶束疫苗中成分 PEG-PE 浓度 2.5mg/mL , MPLA 浓度为 $25 \mu\text{g/mL}$, E7-20 浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 。

[0114] (2)、制备无载体装载的 MPLA 与 E7-20 混合对照组。取 $100 \mu\text{L}$ 的 MPLA 储液, $200 \mu\text{L}$ 的 E7-20 储液均匀混合于试管中, 以氮气吹干有机溶剂, 在真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分。加入 4mL 生理盐水, 55°C 温水浴 30 分钟水化脂膜, 其间间歇性超声处理 5-10 分钟, 制备成为 MPLA 浓度为 $25 \mu\text{g/mL}$, E7-20 浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ 的混悬液。

[0115] (3)、以薄膜水化法联合挤出法制备脂质体疫苗。制备方法: 分别称取 7mg DPPC、 3mg 胆固醇分别溶于氯仿中后混合于试管, 另取 $100 \mu\text{L}$ MPLA 储液、 $200 \mu\text{L}$ 的 E7-20 储液加于该试管中, 混合均匀后, 氮气吹干使其形成均匀薄膜, 真空干燥器中过夜彻底去除有机溶剂和水分, 加入 4mL 生理盐水水化, 55°C 温水浴 30 分钟, 其间超声处理 3 分钟使脂膜脱离。之后利用 Mini-Extruder (Avanti) 挤出法分别经过孔径为 $0.4 \mu\text{m}$, $0.1 \mu\text{m}$ 的聚碳酸酯滤膜, 至少 11 次过滤, 最终得到 100nm 左右的单室脂质体。

[0116] 作为对照的为 (2) 所述无载体 MPLA+E7-20, (3) 所述脂质体疫苗。

[0117] 将雌性 C57BL/6 小鼠分 3 组, 每组 3 只, 疫苗接种方式采用皮下多点注射每只鼠 $100 \mu\text{L}$, 以生理盐水溶液作为空白对照组, 其他实验各组 MPLA 的给药剂量为 $125 \mu\text{g/kg}$, E7 的给药剂量为 $250 \mu\text{g/kg}$, 胶束和脂质体两种制剂所含脂的给药剂量为 12.5mg/kg 。6 天后分离小鼠淋巴结, 过 $70 \mu\text{m}$ 筛网, 将淋巴结细计数调整为 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 于圆底 96 孔板。加 $3 \mu\text{g/mL}$ brefeldin A (BFA) 和 $5 \mu\text{g/mL}$ E7₄₉₋₅₇ (氨基酸序列为 RAHYNIVTF) 共孵育 6h 后收集细胞。调整细胞浓度为 1×10^6 , 先加 CD8 抗体 20 分钟。染色后的细胞经过 4% 多聚甲醛固定 15 分钟, 0.1% tritonX100 通透 10 分钟后, 进行胞内染色, 加 IFN γ 抗体孵育 20 分钟。流式细胞分选技术分析淋巴结 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞中特异性激活的 $\text{IFN}\gamma^+\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞所占的百分比。

[0118] 结果: 胶束多肽疫苗比脂质体疫苗引起更强的特异性 CTL 反应 (图 7)。

[0119] 实施例 9, 胶束多肽疫苗的免疫治疗效果评价实验

[0120] 样品制备:

[0121] (1) 按照实施例 1 的方法制备 10mL 胶束 E7 疫苗溶液, 其中各成分浓度分别为

PEG-PE :5mg/mL, MPLA :40 μ g/mL, E7-20 :100 μ g/mL。

[0122] (2) 制备 10mL 与 (1) 同浓度的 MPLA/PEG-PE 胶束。取 5mL PEG-PE 储液于旋蒸瓶内, 准确量取 400 μ L MPLA 储液加入旋蒸瓶, 轻轻振摇使之与 PEG-PE 溶液混合均匀, 于真空旋转蒸发仪上去有机溶剂 (氯仿和甲醇), 转速 90r/min, 水浴 40 $^{\circ}$ C, 抽干有机溶剂后 PEG-PE 与 MPLA、E7-20 形成分布均匀的薄膜, 于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水分。加入 10mL 生理盐水, 于 55 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 分钟水化脂膜, 得外观均一无色透明的溶液。室温静置 2 小时后, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0123] (3) 制备 10mL 与 (1) 同浓度的 E7/PEG-PE 胶束。取 5mL PEG-PE 储液于旋蒸瓶内, 准确量取 1mL E7-20 储液加入旋蒸瓶, 轻轻振摇使之与 PEG-PE 溶液混合均匀, 于真空旋转蒸发仪上去有机溶剂 (氯仿和甲醇), 转速 90r/min, 水浴 40 $^{\circ}$ C, 抽干有机溶剂后 PEG-PE 与 MPLA、E7-20 形成分布均匀的薄膜, 于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水分。加入 10mL 生理盐水, 于 55 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 分钟水化脂膜, 得外观均一无色透明的溶液。室温静置 2 小时后, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0124] 取 30 只雌性 C57BL/6 小鼠肩部皮下接 TC-1 细胞, 每只接 5×10^4 细胞。接瘤后第 8 天, 按照肿瘤大小平均将其分为 4 组, 每组 5 或 6 只。第 8 天在小鼠生长肿瘤同侧相邻部位皮下接种各组疫苗, 以生理盐水作为空白对照, 实验组为胶束疫苗, 以及两个对照组 MPLA/PEG-PE 胶束和 E7/PEG-PE 胶束。皮下免疫接种注射剂量 100 μ L/ 只, 给药剂量分别为 PEG-PE :25mg/kg, MPLA :200 μ g/kg, E7-20 :500 μ g/kg。以相同的方式在第 11, 15, 18 天各接种一次。自第 8 天起至第 40 天监测肿瘤体积, 并记录小鼠的生存期。

[0125] 结果: 与空白对照组相比, 三个治疗组对肿瘤的生长都有一定的抑制作用, 以胶束 E7 疫苗组的效果最为显著, 其中有两只出现肿瘤消退的现象。小鼠的生存期记录显示, MPLA/PEG-PE 胶束组和 E7/PEG-PE 胶束组两个对照组与空白对照组生存期无显著差异, 但胶束 E7 疫苗组能够显著延长小鼠生存期, 有效地控制肿瘤的生长 (图 8)。

[0126] 实验例 10, 胶束疫苗预防手术后肿瘤复发评价实验

[0127] 样品制备:

[0128] (1)、按照实施例 1 的方法制备 10mL 胶束 E7 疫苗溶液, 其中各成分浓度分别为 PEG-PE :5mg/mL, MPLA :40 μ g/mL, E7-20 :100 μ g/mL。

[0129] (2)、制备 10mL 与 (1) 同浓度的胶束 MPLA:

[0130] 取 5mL PEG-PE 储液于旋蒸瓶内, 准确量取 400 μ L MPLA 储液加入旋蒸瓶, 轻轻振摇使之与 PEG-PE 溶液混合均匀;

[0131] 于真空旋转蒸发仪上去有机溶剂 (氯仿和甲醇), 转速 90r/min, 水浴 40 $^{\circ}$ C, 抽干有机溶剂后 PEG-PE 与 MPLA、E7-20 形成分布均匀的薄膜, 于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水分;

[0132] 加入 10mL 生理盐水, 于 55 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 分钟水化脂膜, 得外观均一无色透明的溶液。室温静置 2 小时后, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

[0133] (3)、制备 10mL 与 (1) 同浓度的不含 MPLA 的胶束 E7:

[0134] 取 5mL PEG-PE 储液于旋蒸瓶内, 准确量取 1mL E7-20 储液加入旋蒸瓶, 轻轻振摇使之与 PEG-PE 溶液混合均匀;

[0135] 于真空旋转蒸发仪上去有机溶剂 (氯仿和甲醇), 转速 90r/min, 水浴 40 $^{\circ}$ C, 抽干有

机溶剂后 PEG-PE 与 MPLA、E7-20 形成分布均匀的薄膜,于真空干燥器内过夜彻底除去残留的有机溶剂和水分;

[0136] 加入 10mL 生理盐水,于 55℃ 水浴孵育 30 分钟水化脂膜,得外观均一无色透明的溶液,室温静置 2 小时后,经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后 4℃ 储存备用。

[0137] 预防手术后肿瘤复发评价动物实验:

[0138] (1) 取 20 只雌性 C57BL/6 小鼠分成两组,肩部皮下接种 50000TC-1 肿瘤细胞。

[0139] (2) 接种后 21 天,肿瘤大小在 500mm³ 时进行外科手术切除肿瘤,缝合伤口,用碘伏进行局部皮肤消毒处理。

[0140] (3) 免疫预防组在肿瘤切除后,皮下接种 100 μ L 胶束疫苗,给药剂量分别为 PEG-PE :25mg/kg, MPLA :200 μ g/kg, E7-20 :500 μ g/kg ;另外一组以生理盐水作为空白对照组。

[0141] (4) 以相同的方式分别在第 7 天和第 14 天各加强接种一次,记录小鼠肿瘤出现情况。

[0142] (5) 第 42 天时,给两组没有出现肿瘤复发的小鼠皮下再接种 2×10⁵TC-1 肿瘤细胞。记录小鼠肿瘤出现情况。

[0143] 结果与结论:与空白对照组相比,胶束疫苗的接种对肿瘤手术切除后的肿瘤复发具有完全的抑制作用。结果如图 9 所示,胶束疫苗能够完全抑制手术切除后肿瘤的复发,在术后 42 天额外再继续接种肿瘤细胞的情况下,给药组依然能够在术后 70 天完全抑制肿瘤的生长。

[0144] 最后需要说明的是,以上实施例仅用于帮助本领域技术人员理解本发明的实质,并不解释为对本发明保护范围的限制。

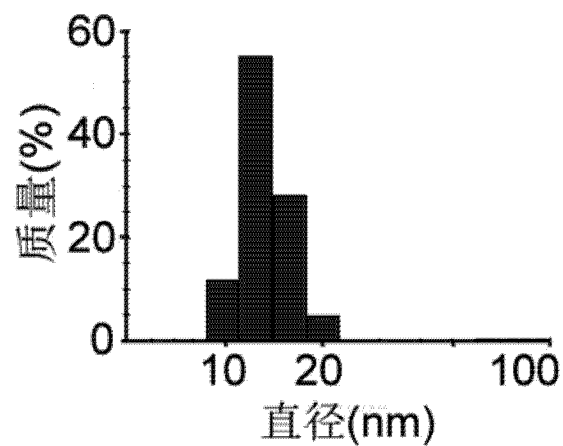
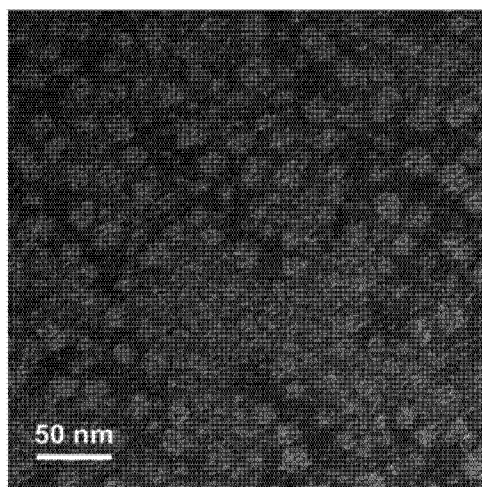


图 1

图 2

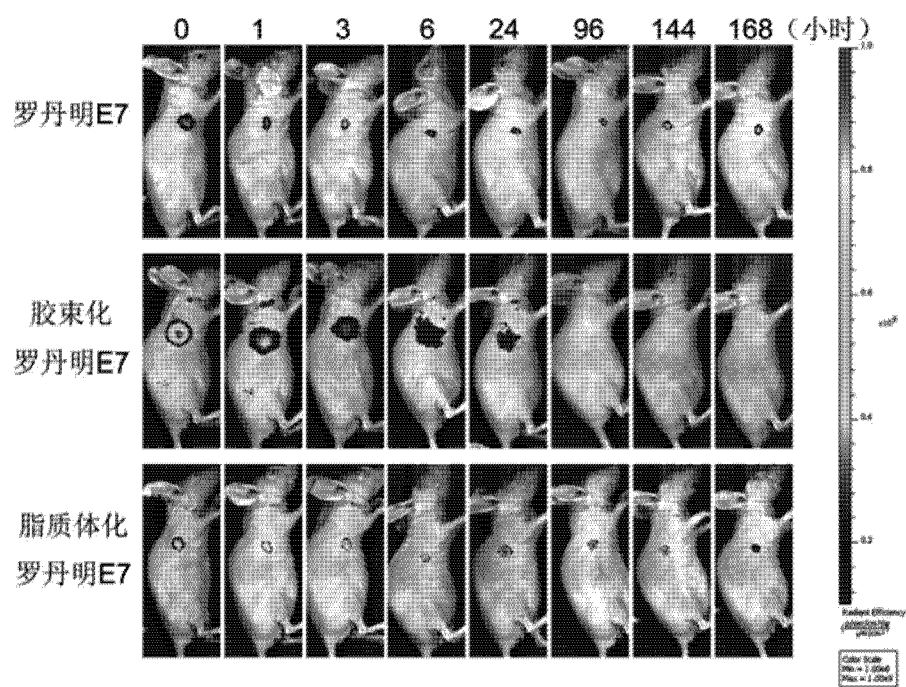


图 3

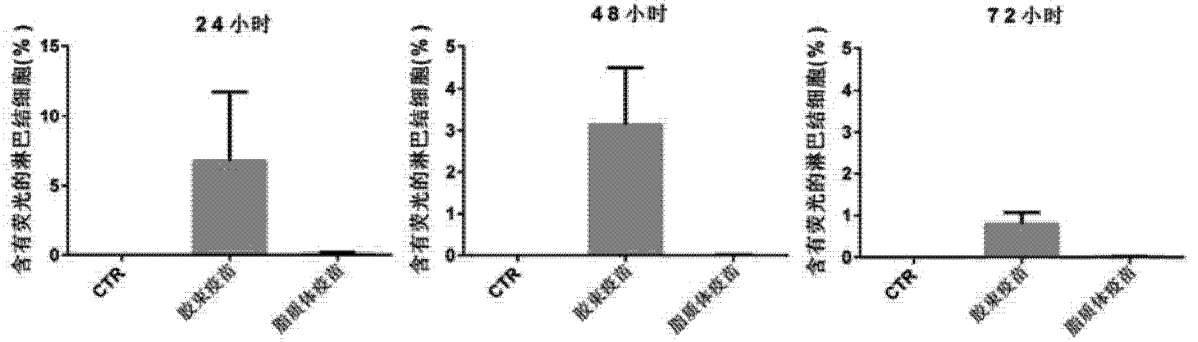


图 4

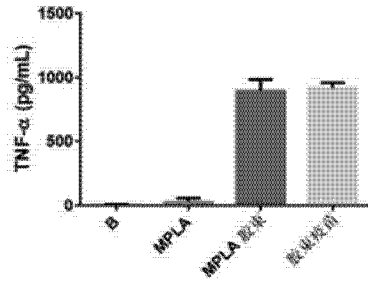


图 5A

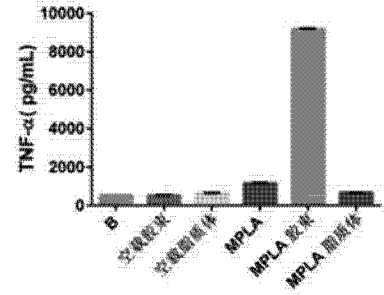


图 5B

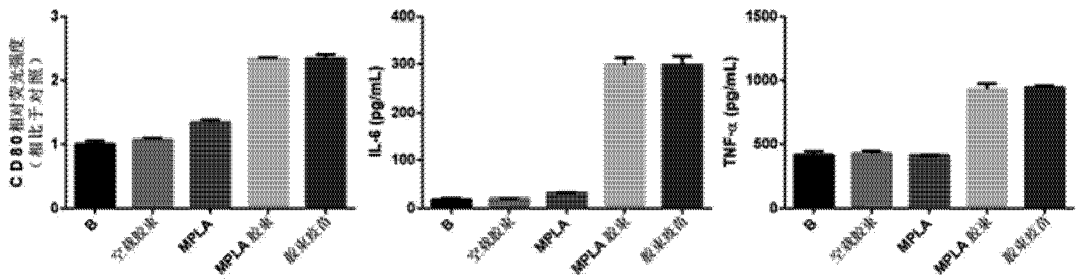


图 6

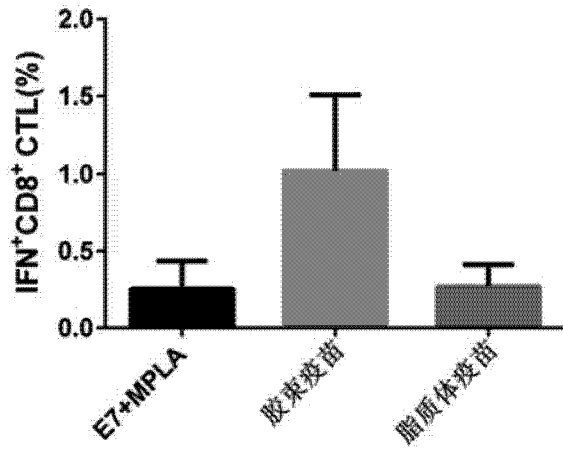


图 7

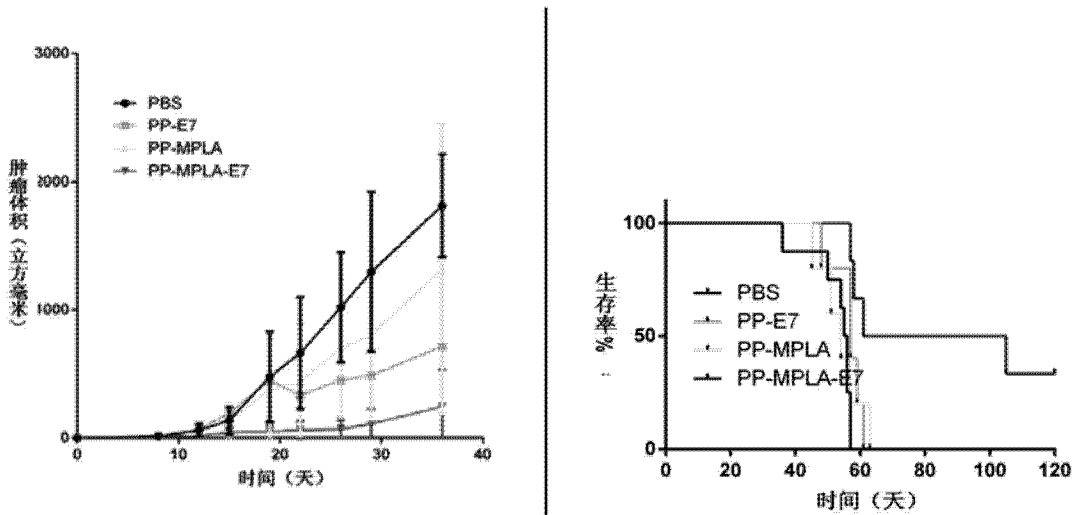


图 8

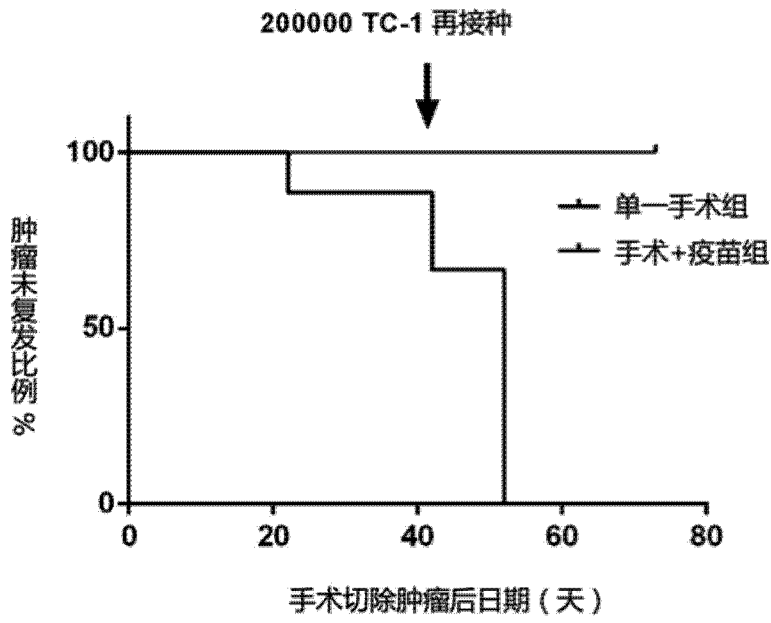


图 9

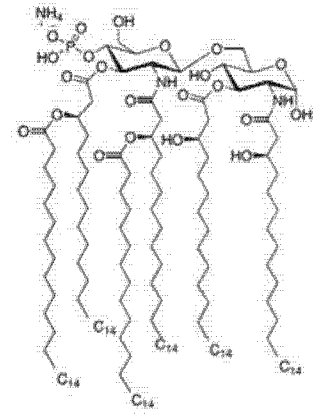


图 10