



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1972710 B

(45) 授权公告日 2011.09.21

(21) 申请号 200480041791.7

(22) 申请日 2004.12.17

(30) 优先权数据

60/530,527 2003.12.17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.08.17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/042665 2004.12.17

(87) PCT申请的公布数据

W02005/058006 EN 2005.06.30

(73) 专利权人 美国天主教大学

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 文尼加拉·巴沙维斯瓦拉·劳

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 李波 刘玥

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

Ren ZJ 等人. Phage display of intact domains at high copy number: A system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. Protein Science 5. 1996, 51833-1843.

审查员 田甜

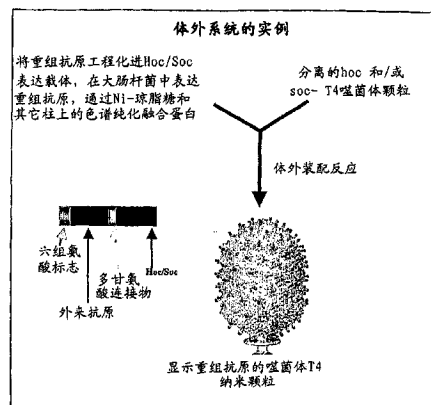
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 7 页

(54) 发明名称

包含噬菌体纳米颗粒的方法和组合物

(57) 摘要

提供了包含噬菌体的组合物和方法。更具体地,本发明包括为有效的抗原和外来颗粒呈递独特设计的新的和定制的 T4 噬菌体。本发明也提供了制备定制的 T4 噬菌体的体外方法。本发明的组合物和方法可以用于有效的疫苗送递系统。



1. 免疫原性组合物,其包含:

(a)Hoc 和 Soc 融合蛋白,其中所述融合蛋白包含融合到 Hoc 或 Soc 蛋白上的外来蛋白;
和

(b)Hoc 和 Soc 阴性的 T4 噬菌体颗粒;

其中 Hoc 和 Soc 融合蛋白体外装载到 Hoc 和 Soc 阴性的 T4 噬菌体颗粒上,其中每个颗粒上存在确定数目的 Hoc 和 Soc 结合位点,并且其中所述 Hoc 和 Soc 融合蛋白以这样的 Hoc 和 Soc 融合蛋白与颗粒的比例装载:即,使得每个颗粒上的 Hoc 融合蛋白的拷贝数是受控制的并且每个颗粒上的 Soc 融合蛋白的拷贝数是受控制的。

2. 权利要求 1 的组合物,其中所述外来蛋白选自:白介素,磷脂酶 A2,内毒素,葡萄球菌肠毒素 B, I 型干扰素, II 型干扰素,肿瘤坏死因子- α 或肿瘤坏死因子- β ,转化生长因子- β ,淋巴毒素,迁移抑制因子,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,单核细胞-巨噬细胞集落刺激因子,粒细胞集落刺激因子,血管上皮生长因子,血管生成素,转化生长因子- α ,热休克蛋白,成纤维细胞生长因子, MART, MAGE, BAGE,突变的 p53,酪氨酸酶,粘蛋白,制管张素,内皮抑制素,血管内皮生长因子,和前列腺特异性的抗原。

3. 权利要求 1 的组合物,还包含药物载体。

4. 制备免疫原性组合物的方法,其包含以下步骤:

(a) 构建 Hoc 和 Soc 融合蛋白;

(b) 分离 Hoc 和 Soc 阴性的 T4 噬菌体颗粒;和

(c) 将 Hoc 和 Soc 融合蛋白体外装载到 T4 噬菌体颗粒上;

其中每个颗粒上存在确定数目的 Hoc 和 Soc 结合位点,并且其中所述 Hoc 和 Soc 融合蛋白在步骤 (C) 中以这样的 Hoc 和 Soc 融合蛋白与颗粒的比例装载:即,使得每个颗粒上的 Hoc 融合蛋白的拷贝数是受控制的并且每个颗粒上的 Soc 融合蛋白的拷贝数是受控制的。

5. 权利要求 4 的方法,其中在步骤 (c) 中将 Hoc 和 Soc 融合蛋白装载到 T4 噬菌体颗粒上包含将 Hoc 和 Soc 融合蛋白与 T4 噬菌体颗粒在反应缓冲液中一起温育。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述反应缓冲液包含 Tris 缓冲盐水,磷酸盐缓冲盐水,或 hepes 缓冲液。

7. 权利要求 4 的方法,其中所述融合蛋白包含融合到 Hoc 或 Soc 蛋白上的外来蛋白。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述外来蛋白选自白介素,磷脂酶 A2,内毒素,葡萄球菌肠毒素 B, I 型干扰素, II 型干扰素,肿瘤坏死因子- α 或肿瘤坏死因子- β ,转化生长因子- β ,淋巴毒素,迁移抑制因子,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,单核细胞-巨噬细胞集落刺激因子,粒细胞集落刺激因子,血管上皮生长因子,血管生成素,转化生长因子,热休克蛋白,成纤维细胞生长因子, MART, MAGE, BAGE,突变的 p53,酪氨酸酶,粘蛋白,制管张素,内皮抑制素,血管内皮生长因子,和前列腺特异性的抗原。

9. 权利要求 4 的方法,其中所述 T4 噬菌体颗粒缺乏 DNA。

10. 权利要求 4 的方法,其中所述 T4 噬菌体颗粒包含 DNA 构建体。

11. 制备免疫原性组合物的方法,其包含以下步骤:

(a) 构建第一种 Hoc 和 Soc 融合蛋白,其具有第一种外来蛋白;

(b) 构建第二种 Hoc 和 Soc 融合蛋白,其具有第二种外来蛋白;

(c) 分离 Hoc 和 Soc 阴性的 T4 噬菌体颗粒;和

(d) 将第一种 Hoc 和 Soc 融合蛋白以及第二种 Hoc 和 Soc 融合蛋白体外装载到 Hoc 和 Soc 阴性的 T4 噬菌体颗粒上；

其中每个颗粒上存在确定数目的 Hoc 和 Soc 结合位点, 并且其中第一种 Hoc 和 Soc 融合蛋白以及第二种 Hoc 和 Soc 融合蛋白在步骤 (d) 中以这样的第一种以及第二种 Hoc 和 Soc 融合蛋白与颗粒的比例装载; 即, 使得每个颗粒上的第一种 Hoc 和 Soc 融合蛋白的拷贝数是受控制的并且每个颗粒上的第二种 Hoc 和 Soc 融合蛋白的拷贝数是受控制的。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述第一种 Hoc 和 Soc 融合蛋白以及第二种 Hoc 和 Soc 融合蛋白在 Hoc 和 Soc 阴性的 T4 噬菌体颗粒上的装载, 促进了第一种外来蛋白和第二种外来蛋白之间的相互作用。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述第一种外来蛋白和第二种外来蛋白之间的相互作用促进了抗体结合位点的呈递。

14. 权利要求 11 的方法, 其中所述第一种外来蛋白包含分支杆菌抗原, 且其中所述第二种外来蛋白包含人免疫缺陷病毒抗原。

15. 权利要求 11 的方法, 其中所述第一种或第二种外来蛋白选自: 白介素, 磷脂酶 A2, 内毒素, 葡萄球菌肠毒素 B, I 型干扰素, II 型干扰素, 肿瘤坏死因子- α 或肿瘤坏死因子- β , 转化生长因子- β , 淋巴毒素, 迁移抑制因子, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 单核细胞-巨噬细胞集落刺激因子, 粒细胞集落刺激因子, 血管上皮生长因子, 血管生成素, 转化生长因子, 热休克蛋白, 成纤维细胞生长因子, MART, MAGE, BAGE, 突变的 p53, 酪氨酸酶, 粘蛋白, 制管张素, 内皮抑制素, 血管内皮生长因子, 和前列腺特异性的抗原。

16. 权利要求 11 的方法, 其中所述第一种外来蛋白和第二种外来蛋白是不同的蛋白。

包含噬菌体纳米颗粒的方法和组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及包含噬菌体的新方法和组合物。更具体地,本发明包括为有效的抗原和外来颗粒呈递独特设计的新的和定制的 T4 噬菌体。本发明的方法和组合物可以用于有效的疫苗递送系统。

[0002] 发明背景

[0003] 在噬菌体展示中,将外来肽、结构域或蛋白融合到结构蛋白上,并暴露于噬菌体壳体的外表面 (Smith, 1985)。丝状噬菌体的外壳蛋白 (M13, fd, 和 f1)、小外壳蛋白 pIII (4-5 拷贝), 和大外壳蛋白 pVIII (2700 拷贝), 已经被广泛地用于产生长度为 6-8 个氨基酸的肽的组合文库 (Smith 和 Petrenko, 1997; Manoutcharian 等, 2001)。还已经开发了使用二十面体噬菌体 λ 和 T7 的其它展示系统 (Maruyama 等, 1994; Danner 和 Belasco, 2001)。这些系统可以展示更大的肽和结构域, 甚至源自靶克隆或 cDNA 文库的全长蛋白 (Hoess, 2002)。外壳体蛋白 gpD (420 拷贝) (Sternberg 和 Hoess, 1995) 和噬菌体 λ 的尾蛋白 gpV (Maruyama 等, 1994), 和噬菌体 T3/T7 的大壳体蛋白 gp10, 已经被用于展示外来序列。通过“生物淘选”和随后的扩增 (Scott 和 Smith, 1990; Smith and Petrenko, 1997), 可以将极少数具有特定生物功能的肽从这些文库中“钓出”。表型和基因型之间的关联, 即在噬菌体外展示的肽和在相同噬菌体内编码它的 DNA 之间的物理关联, 允许快速描绘生物学上令人感兴趣的肽序列。

[0004] 尽管这些展示系统可用, 这些系统的应用中存在明显限制。例如, 使用丝状噬菌体, 某些肽的展示会受到限制, 或不可行, 因为融合的肽必须经大肠杆菌膜分泌, 作为噬菌体组装装置的一部分。由于 pIII 和 pVIII 都是噬菌体组装所必需的, 难以展示大结构域或全长蛋白, 且不妨碍它们的基本生物功能。在展示大肽序列的情况下, 它们的单位噬菌体壳体的拷贝数显著减少, 且不可预知。噬菌体 λ 和 T3 展示系统遇到了类似的大小和拷贝数问题。经常必须使用辅助噬菌体或琥珀型突变体的部分遗传阻遏, 整合野生型蛋白分子和重组体, 以产生有活力的噬菌体 (Hoess, 2002; Manoutcharian 等, 2001; Maruyama 等, 1994)。

[0005] 现有噬菌体展示系统的另一个严重限制是, 它们是基于体内的, 因为重组分子组装到壳体上, 作为噬菌体感染循环的一部分。在这些系统中, 细胞环境中的许多变量会影响组装过程, 导致产生的噬菌体颗粒的质量的极大变异性。非常少的控制可以施加到组装过程上, 不同制备物之间的拷贝数可以以使这些系统高度不可预知的量级变化。

[0006] 展示的抗原的大小和拷贝数对于疫苗开发是特别关键的变量; 因而, 使用噬菌体展示来建立实用疫苗的努力已经受到很大的限制。理想的噬菌体疫苗应当能高密度地展示全长抗原或抗原的所需表位, 无需明显限制大小。它也允许以确定的方式操作展示平台, 以产生可再现质量的颗粒。需要第一个噬菌体系统, 其允许使用噬菌体 T4 颗粒, 有效地和控制地展示全长抗原或靶抗原的表位。也需要噬菌体系统, 其可以定制得到特异性的免疫应答, 例如能产生对超过一种抗原或外来颗粒的免疫应答的噬菌体系统。

[0007] 噬菌体 T4 已经用于开发多组分疫苗。噬菌体 T4 的壳体是扁长的 (伸长的) 二十面体 (Eiserling, 1983; Black 等, 1994), 其直径约 86nm, 长约 119.5nm (Foldne 等, 2004; 图

1)。它包含 930 拷贝单个的大壳体蛋白 gp23* (46kDa ;图 1 中的蓝色结)。壳体也包含 2 个位于顶角的小壳体蛋白。12 个顶角中的 11 个包含约 55 拷贝 (在每个顶角有一个五邻体) 的小壳体蛋白 gp24* (42kDa ;图 1 中的洋红色结)。第 12 个顶角包含约 12 个相同拷贝 (十二面体) 的小壳体蛋白 gp20 (61kDa ;图 1 未显示)。该顶角也称作门顶角,因为它用作 T4DNA 的进入点和出口点。

[0008] 结构研究已经证实,2 种额外的蛋白,即 Hoc (高抗原性外壳体蛋白,40kDa) 和 Soc (小外壳体蛋白,9kDa) (图 1),在完成壳体组装后添加到壳体上 (Steven 等,1976 ; Yanagida,1977 ;Ishii 和 Yanagida,1975 和 1977 ;Ishii 等,1978,Iwasaki 等,2000)。根据 Fokine 等 (2004) 报道的最新的结构数据,Hoc 以最高达 155 拷贝 / 壳体颗粒存在,而 Soc 以最高达 810 拷贝 / 壳体颗粒存在。最重要的是,这些蛋白不是必需的。在正常实验条件下,任一个基因或两个基因的突变,不会影响噬菌体生产,噬菌体成活力,噬菌体感染性,或噬菌体稳定性。但是,在极端环境条件下 (例如,pH > 10.6,渗透压休克),Hoc 和 Soc 能为壳体提供额外的稳定性。

[0009] 当其它人首次报道 Hoc 和 Soc 时,认为这些蛋白代表新的且令人感兴趣的类别的外壳体蛋白,其能形成外“罩 / 盔甲”,以保护处在生命周期的细胞外阶段的病毒。然而,从它们的发现以后,没有证实其它的噬菌体 / 病毒系统具有这样的非必需的、高拷贝数的、高抗原性的、相对容易操作的外壳体基因。

[0010] Hoc 和 Soc 蛋白的一个有用的特征是,人们可以将外来蛋白或蛋白片段融合到 Hoc 和 Soc 的 N- 和 C- 末端,而不影响 T4 噬菌体功能。实际上,Hoc 和 Soc 融合蛋白的展示不会影响噬菌成活力或感染性 (Jiang 等,1997 ;Ren 等,1996 ;Ren 和 Black,1998)。大多肽链和全长蛋白已经被融合到 Hoc 和 Soc,且在 T4 壳体表面上成功地展示。它们包括 Por-A 环-4 肽 (4kDa),HIV-gp120 V3 环 (5kDa),可溶的 CD4- 受体 (20kDa),抗-卵清溶菌酶结构域 (32kDa),和脊髓灰质炎病毒 VP1 (35kDa), (Jiang 等,1997 ;Ren 等,1996 ;Ren 和 Black,1998)。此外,外来蛋白可以稳定地在壳体上展示,且可以在 4°C 或在高盐浓度存在下保存数周 (Jiang 等,1997 ;Ren 等,1996)。T4 重组纳米颗粒能在小鼠中引起针对展示的抗原的高滴度抗体。

[0011] 以前的策略已经使用不可预知的体内装载外来蛋白到噬菌体壳体上。这已经成为使用噬菌体 M13, λ , T7 和 T4 的噬菌体展示领域的流行范例。在一个体内策略中,蛋白首先在大肠杆菌中表达,然后随着 hoc-soc- 病毒的感染,装载到 T4 上 (Jiang 等,1997)。在第二个体内策略中,通过重组交换,将融合构建体转移进 T4 噬菌体基因组中,在 T4 感染的过程中,表达融合蛋白,并装载到噬菌体 T4 上 ;在该策略中,重组基因和基因产物变成噬菌体 T4 生命周期的一部分 (Jiang 等,1997 ;Ren 等,1996)。体内装载系统的一个主要缺点是,展示的抗原的拷贝数的变异性。这主要是由于抗原体内组装的变化,对其几乎难以控制。例如,感染的细胞中的重组抗原的表达水平随营养和环境条件极大地变化。另外,组装过程对非特异性的细胞内蛋白水解是敏感的。另外,细胞内环境的许多组分之间的相互作用,使它成为不太明确的生产具有一致质量的均匀颗粒的过程。

[0012] 已经概念化了多种基于 Hoc 和 Soc 的组装平台。例如,在授予 Mattson 的美国专利号 6,500,611 中,发明人描述了将报道基团连接到病毒壳体上的一般概念,其中报告部分能通过连接分子识别分析物。但是,Mattson 不能实现将外来蛋白装载到 T4 噬菌体壳体

上的特异性的方法。另外, Mattson 没有证实或提出, 大全长壳体蛋白可以以高密度装载到壳体表面上。而且, Mattson 没有教导或提出 T4 纳米颗粒疫苗组合物, 或任意的这样的组合物可以用作引起免疫原应答的多组分平台。

[0013] 在 Ren 等, *Protein Science*, Sep ;5(9), 1833-43(1996) 的研究中, 作者讨论了 Soc 融合蛋白向称作聚合头部的基于壳体的聚合物的结合。该聚合头部模型特别不适用于开发确定的组装平台和疫苗组合物。最重要的是, 聚合头部不是确定的颗粒。然而, 这些聚合物起因于噬菌体 T4 大壳体蛋白 gp23 的失控生长, 并在它们制备后作为颗粒的非均质混合物存在。例如, 为了均匀地具有 Hoc 和 Soc 结合位点, 必须在含有噬菌体 T4 前头部蛋白酶的粗提物存在下, 体外切割聚合头部聚合物, 以打开 Hoc 和 Soc 的结合位点。后者也需要“聚合头部扩充”, 即能识别壳体蛋白聚合物和建立 Hoc 和 Soc 结合位点的急剧构象变化。得到的切割的、扩充的聚合头部, 会在聚合头部的结构上非均质的混合物上, 具有不明确数目的 Hoc 和 Soc 结合位点, 所述聚合头部的长度可以任意变化, 从数纳米至数微米。与 T4 噬菌体颗粒不同, 这些聚合头部包含平坦的二维结构; 它们含有不同大小和尺寸的 gp23 聚合物的片、密闭片(管)和破裂片等。鉴于聚合头部模型的这种变异性, 使用过度的实验, 不能准确地确定在颗粒上可得到的结合位点的数目。因而, 如果可能, 控制聚合头部上的外来抗原的拷贝数会非常困难。另外, 因为它们的形状, 聚合头部不能包装 DNA, 因而不能用于本领域已知的激发-加强策略。

[0014] 需要用于定制噬菌体的有效的组合物和方法。定制的噬菌体可以用于建立包含定制的噬菌体颗粒的疫苗系统。这样的系统能设计特异性的噬菌体颗粒, 其能引起针对一种或多种抗原或外来颗粒的免疫应答。优选地, 这样的系统应当容易生产和施用。

[0015] 还需要能将特异性的抗原或颗粒靶向暴露或送递给靶细胞的组合物和方法。

[0016] 还普遍需要用于生产抗体的组合物和改良的方法。这些组合物和方法应当能以适用于治疗和诊断制剂的方式容易地且经济地生产。

[0017] 发明简述

[0018] 本发明包含用于生产定制的噬菌体颗粒的有效的组合物和方法。这样的系统能设计特异性的噬菌体颗粒, 后者能引起针对一种或多种抗原或外来颗粒的免疫应答, 且可以用于建立新的疫苗送递系统。另外, 这样的系统容易生产和施用。

[0019] 本发明的独特的组合物和方法能实现噬菌体颗粒的定制, 从而可以特异性地控制在噬菌体上展示的一个抗原(或多个抗原)的数目和选择。这样, 根据要处理的状况, 可以定制根据本文所述的方法构建的噬菌体, 且可以含有特定数目的抗原, 和/或一个特定抗原(或多个抗原)的特定表位。在某些实施方案中, 可以将标记整合到噬菌体上。在某些其它的实施方案中, 可以定制噬菌体以便产生针对超过一种疾病的免疫应答, 其中这样的疾病可以在时间上临近地出现(例如, 可以定制噬菌体用于治疗人免疫缺陷病毒感染以及分支杆菌感染, 因为 AIDS 和结核病经常几乎同时发生)。

[0020] 本发明的疫苗系统也能将特异性的抗原或颗粒暴露或送递给靶细胞。

[0021] 本发明也包含改良的生产抗体的方法。

[0022] 本发明包含定制的噬菌体颗粒和制备它们的方法, 其中这样的方法能以适用于治疗和诊断用途的方式容易地且经济地生产。

[0023] 本发明通过允许可预测地和大规模地体外构建确定的 T4 噬菌体纳米颗粒, 克服

了与噬菌体颗粒的生产有关的以前的体内限制。

[0024] 与以前的聚合头部模型不同,本体外装载系统使用特别确定的 T4 噬菌体颗粒。更具体地,本发明允许以特异的和确定的方式,将 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白装载到 T4 噬菌体颗粒上,以建立许多种 T4 噬菌体纳米颗粒,其可以用于多种不同的用途。

[0025] 本发明提供了新的体外系统,其能实现 T4 壳体表面的全身实验和定制。本文所述的体外系统能制备具有可再现的生物活性的确定的颗粒。重要的是,本文所述的噬菌体构建方法能达到以流水线形式构建多组分疫苗的特定目的:实现基因在短时间段内(例如,1-2 周)向展示的纳米颗粒的转换。

[0026] 在某些实施方案中,可以制备没有任何 DNA 的噬菌体或纳米颗粒(空壳体),或在 T4 基因组中具有克隆的相同外来 DNA(激发-加强策略)。

[0027] 本发明的体外组装系统允许定制的 T4 噬菌体纳米颗粒的迄今为止不可得到的可靠的和大规模的生产。

[0028] 本发明的体外组装系统也允许生产 T4 纳米颗粒,其能将大分子呈递到 T4 噬菌体表面上。这些分子可以引起强烈的体液的和 / 或细胞介导的应答。

[0029] 通过组合展示表面抗原和在噬菌体基因组内具有编码抗原蛋白的 DNA 构建体的本发明的 T4 纳米颗粒,本发明的体外组装系统提供了激发-加强免疫的方法。

[0030] 因此,本发明的一个目的是,提供用于新的和定制的噬菌体的方法和组合物。

[0031] 本发明的另一个目的是,提供包含定制的噬菌体的疫苗递送系统。

[0032] 本发明的另一个目的是,提供包含噬菌体的疫苗递送系统,其中用特异性的抗原、抗原表位、标志物、标记、蛋白、外来颗粒等,定制这样的噬菌体。

[0033] 本发明的另一个目的是,提供疫苗递送系统,其包含纳米颗粒,后者具有特别确定的尺寸和装载融合蛋白等实体的能力。

[0034] 本发明的另一个目的是,提供疫苗递送系统,其包含纳米颗粒,后者进行了定制,用于引起一种或多种特异性的免疫应答。

[0035] 本发明的另一个目的是,提供定制的递送载体,其能将特定抗原或其它分子呈递、暴露或递送给需要的靶。

[0036] 本发明的另一个目的是,提供新的疫苗递送系统,其可以肌肉内、静脉内、透皮、口服或皮下施用。

[0037] 本发明的另一个目的是,提供单个的 T4 纳米颗粒,其能提供针对单一或多种疾病的基于免疫的保护。

[0038] 本发明的另一个目的是,提供单个的疫苗组合物,其能提供针对许多不同疾病的基于免疫的保护。

[0039] 本发明的另一个目的是,提供 T4 纳米颗粒组合物,其能展示大的抗原性分子和引起对这些分子的免疫应答。

[0040] 本发明的另一个目的是,提供激发-加强免疫的方法,其中 T4 噬菌体颗粒能递送展示在噬菌体颗粒表面上的抗原以及编码各种抗原分子的 DNA 构建体。

[0041] 本发明的另一个目的是,提供 T4 噬菌体组装平台,许多分子可以依靠它进行相互作用,以暴露不同的抗原结构域,或生成其它的抗原性分子。

[0042] 阅读下面公开的实施方案的详细描述和所附权利要求书后,可以明白本发明的这

些和其它目的,特征和优点。

[0043] 附图简述

[0044] 图 1 简要描述了噬菌体 T4 壳体的冷冻 -EM 重构的颜色编码的表面图示:(a) 垂直于 5- 折叠轴的视图。gp23^{*} 显示为蓝色, gp24^{*} 为洋红色, Soc 为白色, Hoc 为黄色, 尾为绿色;(b) 门顶角朝向观察者, 沿着 5- 折叠轴的视图; 重构的尾部分显示为绿色。该图从 Fokine 等, 2004 [现有技术] 重新制作。

[0045] 图 2 简要描述了本发明的体外组装系统和得到的展示重组抗原的 T4 噬菌体纳米颗粒。

[0046] 图 3(A) 提供了如正文所述的 HIV-p24-Hoc 融合构建体的示意图。P24 是 HIV 壳的大壳体亚基, 该 HIV 壳包围着感染必需的 HIV 基因组的 2 个分子和其它蛋白(例如, 逆转录酶, 整合酶)和核酸(例如, 色氨酸 tRNA 引物)组分。(B) 显示了 p24-Hoc 蛋白的表达和纯化。

[0047] 图 4 显示了 HIV-p24-Hoc 在 hoc⁻soc⁻T4 噬菌体颗粒上的体外组装, 以建立 p24T4 纳米颗粒。

[0048] 图 5 显示了 p24-Hoc 结合 hoc⁻soc⁻T4 纳米颗粒的特异性。

[0049] 图 6 解释了在 hoc⁻soc⁻T4 纳米颗粒上展示的 p24-Hoc 的稳定性。

[0050] 图 7(A) Hoc-p24 融合构建体的示意图。(B) Hoc-p24 蛋白的表达和纯化。

[0051] 图 8 解释了 (A) HIV tat-Hoc 和 (B) HIV nef-Hoc (箭头) 在 hoc⁻soc⁻噬菌体 T4 纳米颗粒上的体外组装。

[0052] 图 9 显示了炭疽 PA-Hoc 在 T4 噬菌体纳米颗粒上的体外组装。

[0053] 图 10 显示了多种抗原在 hoc⁻soc⁻T4 纳米颗粒上的体外组装:(A) tat-Hoc 和 p24-Hoc;(B) nef-Hoc 和 p24-Hoc;(C) tat-Hoc, nef-Hoc, 和 p24-Hoc。

[0054] 图 11 显示了在免疫后不同的时间点展示在 T4 纳米颗粒上的 p24 的免疫原性。

[0055] 图 12 显示了 T4- 展示的 PA-Hoc 的免疫原性。

[0056] 图 13 证实, p24-T4 纳米颗粒能引起强烈的细胞应答。

[0057] 详细描述

[0058] 参考下面详细描述的本文包含的特定具体实施方案, 可以更容易地理解本发明。尽管已经参考其某些实施方案的特定细节, 描述了本发明, 并不意味着这些细节应当视作对本发明的范围的限制。在本文中提及的参考文献的完整文本, 在此整体引作参考, 包括 2003 年 12 月 17 日提交的美国临时申请系列号 60/530, 527。

[0059] 目前可得到的基于噬菌体的疫苗系统是有限的, 因为它们不能根据展示的抗原的体积或特性被定制。本发明是第一个噬菌体系统, 其能使用噬菌体 T4 颗粒, 实现多种抗原(包括全长重组抗原)的有效且控制的展示。本文所述的生产定制的 T4 噬菌体纳米颗粒的组合物和方法, 能生产独特的特异性的疫苗。另外, 本发明的 T4 噬菌体纳米颗粒是特别合乎需要的, 因为它们能促进免疫应答, 而单个的蛋白或其它分子不能。

[0060] 本发明包含定制的 T4 噬菌体纳米颗粒和体外制备 T4 噬菌体纳米颗粒的方法。更具体地, 制备 T4 噬菌体纳米颗粒的方法包含体外组装系统, 其使用融合到另一种分子上的 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒和 Hoc 和 / 或 Soc 蛋白或其片段。该分子可以包含具有化学和 / 或生物活性的任何分子, 包括但不限于蛋白, 蛋白片段, 氨基酸, 抗原, 脂类, 抗体, 碳

水化合物,酶,细胞因子或趋化因子或其它炎症介质。通过本领域的技术人员已知的任何方法,可以将分子融合到 Hoc 和 / 或 Soc 上。当该分子融合到 Hoc 和 / 或 Soc 蛋白或其片段上时,得到的产物包含 Hoc 和 / 或 Soc 融合分子。在本发明的一个实施方案中,融合到 Hoc 和 / 或 Soc 上的分子是蛋白,例如外来蛋白,从而建立 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白。图 2 解释了体外组装系统的一个实施方案和得到的 T4 纳米颗粒。在图 2 中,建立了 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白,其包含外来抗原(显示为红色)和 Hoc 和 / 或 Soc 蛋白(显示为蓝色)。纯化后,这些 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白与纯化的 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒相组合。得到的 T4 纳米颗粒能展示,例如,融合到 Hoc(在 T4 纳米颗粒中显示为黄色结)上的外来抗原(红色结)。在该图中解释的 T4 纳米颗粒源自 soc⁻T 噬菌体(Andrei Fouine 和 Michael Rossmann 博士,Purdue University 赠送)的冷冻-EM 重构。

[0061] 为了建立本发明的 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白实施方案,将 Hoc 和 / 或 Soc 蛋白或其片段的 N- 或 C- 末端融合到蛋白等外来分子或实体。在本发明的某些实施方案中,将六组氨酸标志序列添加到融合蛋白的 N- 末端,以允许通过 Ni- 琼脂糖柱色谱单步纯化蛋白-Hoc 和 / 或 Soc 重组蛋白。本领域的技术人员能认识到,代替六组氨酸- 标志,可以使用许多其它的本领域已知用于纯化重组蛋白的标志,包括但不限于谷胱甘肽转移酶(GST),麦芽糖结合蛋白(MBP),FLAG,血凝素(HA),和绿荧光蛋白(GFP)。本发明还包含外来蛋白和 Hoc 或 Soc 蛋白之间的通用连接序列。在某些实施方案中,连接物是无结构的连接物。尽管不希望受下面理论的约束,认为连接序列能使外来蛋白结构域对 Hoc 或 Soc 折叠或向壳体表面的组装的干扰最小化,反之亦然。在某些实施方案中,无结构的连接物优选地包含聚甘氨酸连接物(pro-gly-gly),但是许多本领域已知的具有不同长度和序列的连接物(有结构的和无结构的)可以与本发明相容。

[0062] 使用许多方法,可以构建本发明的 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白实施方案。本领域的技术人员能明白,多种遗传和蛋白工程方法可用于构建 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白。例如,通过重叠延伸(SOE)策略,可以使用 PCR- 指导的剪接,以构建编码需要的融合蛋白的基因构建体(Kuebler 和 Rao,1998 ;Rao 和 Mitchell,2001)。该策略需要 4 种寡核苷酸(引物 1-4)和 3 个连续的 PCR,且是构建重组构建体的快速、有力的策略。使用该策略,可以构建相当复杂的基因构建体,并在一天中完成多个基因融合。为了包含根据本发明的某些实施方案的六组氨酸标志序列,可以将基因构建体框架内插入 T7 表达载体的六组氨酸标志。

[0063] 本发明的 T4 噬菌体颗粒包含确定的扁长的(伸长的)二十面体,其直径约 70-140nm,长约 90-150nm。在一个具体的实施方案中,本发明包含 T4 噬菌体颗粒,其包含确定的扁长的(伸长的)二十面体,其直径约 86nm,长约 119.5nm。为了允许 Hoc 和 / 或 Soc 结合 T4 噬菌体颗粒的壳体,本发明使用 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体突变体,其不能表达 Hoc 和 / 或 Soc 蛋白;因而,该突变体在它的壳体表面不含有 Hoc 和 / 或 Soc 蛋白。通过本领域已知的多种方法(Karam,J.D.(编),MolecularBiology of Bacteriophage T4. ASM Press, Washington, D.C 中的附录),可以实现建立 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体突变体的方法。为了用于本发明的体外系统,需要分离 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒,且应当是基本上纯的。通过本领域已知的任何方法,可以分离这些 T4 噬菌体颗粒,但是通过例如如 Aebi 等,1976, 和 Mooney, D. T., 等(1987) J Virol. 61, 2828-2834 所述的蔗糖梯度纯化,可以达到足够的分离和纯化。

[0064] 纯化根据本发明的某些实施方案的 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白和分离 hoc⁻ 和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒后,通过新的体外组装系统,将纯化的 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白组装或“装载”到纯化的 hoc⁻ 和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒上,以建立 T4 纳米颗粒。装载包含将 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白置于 hoc⁻ 和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒附近,以便 Hoc 和 / 或 Soc 蛋白结合 T4 噬菌体壳体表面。为了促进 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白向 hoc⁻ 和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒的装载,将纯化的组分在反应缓冲液中温育约 1-120min,优选约 20-90min,更优选约 40-70min,更优选约 30-60min。在该温育阶段中,反应缓冲液温度可以变化,但是优选地是约 25-45℃,更优选约 32-42℃,更优选约 37℃。关于反应缓冲液,本领域已知的许多缓冲液可以与本发明相容。例如,合适的反应缓冲液可以包含 Tris 缓冲盐水,其 pH 为 7-8,或优选地, pH 为 7.2-7.8,更优选地, pH 为 7.3-7.5,更优选地, pH 为约 7.4。其它合适的反应缓冲液可以包括本领域的技术人员已知的那些,例如,磷酸盐缓冲盐水,hepes 缓冲液等,其在许多盐浓度,和 / 或在有许多缓冲组分,例如甘油,蔗糖,离子和非离子型去污剂。

[0065] 将 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白与 hoc⁻ 和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒在反应缓冲液中温育后,通过本领域的技术人员已知的方法,从反应缓冲液取出 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白-hoc⁻ 和 / 或 soc⁻T4 噬菌体纳米颗粒。例如,可以在 5,000-40,000rpm 离心反应混合物(其包含纯化的 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白,纯化的 hoc⁻ 和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒,反应缓冲液,和新形成的 T4 纳米颗粒)20-100min,优选地在约 10,000-20,000rpm 离心 40-80min,更优选地在约 13,000-16,000rpm 离心 55-65min。也可以通过柱色谱或梯度离心技术,回收颗粒。在离心或回收步骤后,抛弃含有未结合的 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白的上清液,用反应缓冲液或其它合适的缓冲液,洗涤含有新形成的 T4 纳米颗粒的沉淀,以去除所有未结合的融合蛋白。

[0066] 本发明的 T4 噬菌体具有下述优点:具有确定的拷贝数的 Hoc 和 Soc 结合位点(每个颗粒结合了共约 965 个拷贝)。利用这样大数量的确定的结合位点,T4 噬菌体能提供独特的平台,依靠它,可以定制特定分子或多个分子的展示。如图 4,7,和 9 所示,通过在上述温育阶段之前或过程中,操纵体外组装反应中各组分(即,操纵 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白与 T4 噬菌体颗粒的比例),可以控制结合到 T4 噬菌体颗粒上的融合蛋白的拷贝数。实施例 7 解释了该实例。类似地,通过在体外组装系统中使用 2 种或多种 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白,和通过调节不同的融合蛋白与 T4 噬菌体颗粒的摩尔比,可以控制结合到 T4 噬菌体颗粒上的融合蛋白的比例,以建立确定的 T4 纳米颗粒。例如,给定的 T4 纳米颗粒可以展示出 HIV 抗原 tat 和 nef 以及其它融合蛋白的组合。通过在温育阶段之前或过程中,改变 tat-Hoc 和 nef-Hoc 融合蛋白与噬菌体颗粒的比例,可以相应地改变展示的融合蛋白的比例。实施例 8 提供了这样的蛋白的其它细节。

[0067] 使用体外组装系统,可以构建许多不同的 T4 纳米颗粒组合物,其可以用于多种用途。例如,本发明的某些实施方案能产生体液的和细胞介导的免疫应答,因而可以用作单或多组分疫苗制剂。在这些不同的疫苗制剂中,Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白的外来蛋白可以包含能在 T4 噬菌体颗粒表面上展示的抗原性蛋白。各种抗原包括,但不限于,白介素-1("IL-1"),白介素-2("IL-2"),白介素-3("IL-3"),白介素-4("IL-4"),白介素-5("IL-5"),白介素-6("IL-6"),白介素-7("IL-7"),白介素-8("IL-8"),白介素-10("IL-10"),白介素-11("IL-11"),白介素-12("IL-12"),白介

素-13(" IL-13"), 脂质 A, 磷脂酶 A2, 内毒素, 葡萄球菌肠毒素 B 和其它毒素, I 型干扰素, II 型干扰素, 肿瘤坏死因子 (TNF- α 或 β), 转化生长因子-(" TGF- β "), 淋巴毒素, 迁移抑制因子, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(" CSF"), 单核细胞-巨噬细胞 CSF, 粒细胞 CSF, 血管上皮生长因子(" VEGF"), 血管生成素, 转化生长因子(" TGF- α "), 热休克蛋白, 血型的碳水化合物部分, Rh 因子, 成纤维细胞生长因子, 和其它炎症和免疫调节蛋白, 核苷酸, DNA, RNA, mRNA, 有义物, 反义物, 癌细胞特异性的抗原; 例如 MART, MAGE, BAGE, 和热休克蛋白 (HSP); 突变的 p53; 酪氨酸酶; 粘蛋白, 例如 Muc-1, PSA, TSH, 自身免疫抗原; 免疫治疗药物, 例如 AZT; 和血管发生和抗-血管发生的药物, 例如制管张素, 内皮抑制素, 和碱性成纤维细胞生长因子, 和血管内皮生长因子 (VEGF), 前列腺特异性的抗原和甲状腺刺激激素, 或其片段。如上所述, 通过在温育阶段之前或过程中, 调节 Hoc 和 / 或 Soc⁻ 抗原融合蛋白与 Hoc⁻ 和 / 或 Soc⁻T4 噬菌体颗粒的摩尔比, 可以调整 T4 纳米颗粒, 以在 T4 噬菌体颗粒壳体上展示单个抗原, 多个抗原, 和 / 或确定比例的抗原。见图 9 和 10。

[0068] 在本发明的某些实施方案中, 可以使用体外组装系统来建立 T4 纳米颗粒, 其能同时展示与一种或几种传染病相对应的多种抗原。更具体地, 通过使用本文所述的体外组装系统, 可以在同一壳体表面上同时展示例如 HIV 和炭疽抗原, 允许配制针对 HIV 和炭疽的疫苗。在另一个实施方案中, 可以针对在时间上同时或临近地表现的疾病和障碍, 定制纳米颗粒。例如, 许多 AIDS 患者患有许多其它的疾病, 例如结核病。定制的纳米颗粒可以含有人免疫缺陷病毒以及分枝杆菌的抗原 (或抗原的多种表位)。在一个替代实施方案中, 可以使用体外组装系统来建立 T4 纳米颗粒, 其能在同一壳体上同时展示一种或多种抗原的多个表位。

[0069] 在另一个实施方案中, 可以在构建 Hoc 和 / 或 Soc 基因融合构建体的过程中, 在靶序列导入定点组合突变 (关于组合诱变策略, 见 Rao 和 Mitchell (2001))。使用该策略, 抗原突变体集合的表达和它们在 T4 纳米颗粒或多个 T4 纳米颗粒上的组合展示, 能允许构建多变异疫苗, 其对几种传染性病原体株或能对宿主选择压力产生突变体的传染性病原体 (例如, HIV) 是有效的。

[0070] 在另一个实施方案中, 可以构建 T4 纳米颗粒组合物, 其能在它的表面上展示相互作用的分子。例如, 使用本领域的技术人员已知的方法, 可以构建第一种 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白, 其包含融合到第一种外来蛋白上的 Hoc 和 / 或 Soc。类似地, 可以构建第二种 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白, 其包含融合到第二种外来蛋白上的 Hoc 和 / 或 Soc。通过使用本文公开的体外组装系统, 可以将第一种和第二种 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白装载到 T4 噬菌体颗粒表面上。在某些实施方案中, 第一种和第二种外来蛋白可以分别地存在各种免疫表位。另外, 第一种和第二种外来蛋白可以直接地或通过可以加入组装反应混合物中的另一种蛋白或分子组间接地相互作用。该实施方案的 T4 纳米颗粒组合物可以例如为本发明的各种 T4 纳米颗粒组合物赋予其它的免疫原性。不希望受下述理论的约束, 第一种和第二种外来蛋白之间的相互作用可以例如暴露其它表位, 从而增强免疫应答。在一个有关的实施方案中, 第一种外来蛋白可以具有酶活性, 而第二种外来蛋白可以用作第一种外来蛋白的底物或配体。在该实施方案中, 第二种蛋白的切割, 可以导致许多生物效应, 包括但不限于在 T4 纳米颗粒表面上展示其它的表位。另外, 在这样的实施方案中, 切割的蛋白可以是例如细胞因子或趋化因子, 其可以进一步调控免疫应答。尽管上面的实施方案提及第一种和第二种

外来蛋白,本发明也包括类似的实施方案,其依赖于多种不同的外来蛋白。例如,第三种外来蛋白和第四种外来蛋白也可以分别地展示其它表位,和/或在 T4 噬菌体颗粒表面上相互作用。本领域的技术人员已知的蛋白工程技术,允许操纵用于多种特定用途的在这些实施方案中展示的分子组分的结构和之间的距离。这是特别重要的,因为考虑的复合物能模拟或等于通过特异性的相互作用后发生的构象转换而体内形成的天然复合物。这样的复合物可能产生特异性的免疫应答,后者会干扰传染性病原体和宿主细胞之间的相互作用(例如,靶宿主细胞的 HIV 感染),干扰多组分毒素分子产生致死毒性(例如,炭疽致死毒素和水肿毒素的形成)。

[0071] 在本发明的另一个实施方案中, T4 纳米颗粒可以包含第二层分子,其展示在第一层展示的蛋白上。在该实施方案中, Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白可以包含第一层,和用作组装第二层分子组分的连接的 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白的外来蛋白。这样,展示的第一层蛋白可以用作展示第二层蛋白的结合位点,所述第二层蛋白能与这些第一层结合位点相互作用。例如, T4 纳米颗粒结合的炭疽 PA63 可以用于捕获炭疽致死毒素和水肿毒素(未融合到 Hoc 或 Soc),或融合到 LF 或 EF 的 N-末端 PA63 结合结构域上的外来蛋白。在另一个实施方案中,可以设计靶向特定细胞或组织类型的 T4 纳米颗粒。更具体地,通过展示 Hoc 和 / 或 Soc-配体融合体,其中配体是对细胞和 / 或组织类型特异性的,人们可以将本发明的 T4 纳米颗粒靶向某些细胞或组织,以引起许多选择性的细胞或组织反应。通过本领域的技术人员已知的任意方法,可以开发这样的 Hoc 和 / 或 Soc-配体融合体分子。一旦被开发出来,可以使用本文公开的体外组装系统,将 Hoc 和 / 或 Soc-配体融合体分子装载到 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体颗粒上,以建立能展示配体的 T4 纳米颗粒。各种配体包括但不限于能结合 CD4,趋化因子受体, GM-1 受体, Toll-样 / 病原体识别受体, DC-记号受体, 细胞因子受体, Fc 受体,或互补受体或其片段的配体。

[0072] 在本发明的另一个实施方案中,可以使用重组 DNA 技术和 T4 遗传学,以将外来 DNA 包装进 T4 纳米颗粒的基因组中(Rao 等,1992;Clark 等 FEMS Immunology and Medical Microbiology 40(2004)21-26;March 等 Facets 22(2004)1666-1671)。因而,除了在 T4 纳米颗粒表面上展示 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白外,编码抗原或 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白的外来 DNA 构建体存在于 T4 纳米颗粒中。在某些实施方案中,这种独特的 T4 纳米颗粒平台技术可以用作激发-加强递送系统。通常,通过质粒 DNA 接种得到的免疫应答较差且不一致;因而,需要多次注射和大量的 DNA 和蛋白来增强免疫应答。相反地,该实施方案的 T4 纳米颗粒可以将蛋白和 DNA 组分同时递送到同一抗原呈递细胞,从而潜在地诱导更强烈的免疫应答。例如,使用本领域已知的噬菌体遗传学和分子生物学技术,可以将 DNA 构建体插入在强哺乳动物启动子例如 CMV(巨细胞病毒)启动子控制下的 T4 噬菌体的基因组中,后者能表达包含 HIV 抗原 nef 的融合蛋白(即,该 DNA 构建体能表达 nef-Hoc 融合蛋白)。或者,通过使用特化的 T4 包装系统(Leffers, G. 和 Rao, V. B. (1996), A discontinuous beadful packaging model for packaging less than headful length DNA molecules by bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 258, 839-850),可以用多个拷贝的连环外来 DNA 构建体替代整个噬菌体 T4 基因组。通过在本发明的体外组装系统中,将这些遗传修饰的 T4 噬菌体与例如融合蛋白(其包含融合到 HIV 抗原 nef 上的 Hoc)一起温育,可以建立新的 T4 纳米颗粒,其内部包含编码特定抗原的 DNA,且对应的抗原展示在壳体表面的外面。如本领域的

技术人员能明白的,可以预见该实施方案的许多组合,包括在内部克隆且在外部表达的多个基因。

[0073] 在另一个实施方案中,可以使用本发明的 T4 纳米颗粒来实现免疫应答的进一步调控。例如,可以将多种炎症介质整合到 T4 纳米颗粒平台上,其能扩大免疫应答。这样的炎症介质包括,但不限于,各种细胞因子,例如白介素,淋巴因子,肿瘤坏死因子,和干扰素,以及其它炎症介质例如趋化因子。使用本发明的体外组装系统,可以在 T4 纳米颗粒表面上展示这些炎症介质,其是全长或功能基序和结构域,或者,在其它实施方案中,可以将编码炎症介质的 DNA 构建体整合进 T4 噬菌体的基因组中。

[0074] 本发明的另一个实施方案包含缺乏包装的 DNA 的 T4 纳米颗粒。例如,通过本领域的技术人员已知的方法操纵 T4 遗传学(例如,基因 16 和 17 中的包装缺陷性突变),可以生产缺乏包装的 DNA 的 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体突变体(Rao 和 Black, 1985)。使用本发明的体外装载系统,然后可以将 Hoc 和 / 或 Soc 融合蛋白装载到 hoc⁻和 / 或 soc⁻T4 噬菌体突变体上,以建立缺乏 DNA 的 T4 纳米颗粒。当 DNA 的存在是生物安全所关注的时,可以使用该实施方案的 T4 纳米颗粒作为含有 DNA 的 T4 纳米颗粒的替代物。因为该实施方案不会影响 T4 噬菌体壳体表面的分子成分,可以将该策略与许多本文公开的实施方案组合使用。

[0075] 本发明的另一个实施方案包含多种 T4 纳米颗粒的混合物。在该实施方案中,可以将根据本文所述的任一个实施方案的 T4 纳米颗粒与本发明的其它的不同的 T4 纳米颗粒相混合。例如,针对炭疽和 HIV 的疫苗组合物可以包含在一组 T4 纳米颗粒上分开展示的 HIV- 抗原和在另一组 T4 纳米颗粒上分开展示的炭疽抗原,每组纳米颗粒都使用本发明的体外组装系统建立。使用该方案,可以例如建立单个的多组分疫苗制剂,后者针对多种感染不同的疾病。

[0076] 在另一个实施方案中,通过特异性的相互作用,采用展示的分子来检测病原体 / 组分,也可以将本发明的 T4 纳米颗粒系统开发成独特的分子诊断系统。

[0077] 在另一个实施方案中,展示的抗原可以产生额外的(协同的)应答,例如抗毒素效应 + 免疫应答。例如,展示的抗原可以同时用作抗毒素以及有效的疫苗。在炭疽孢子攻击的情况下,抗生素治疗以及疫苗施用是必需的。抗生素的立即使用会抑制(消除)正在发生的炭疽芽胞杆菌细菌感染的发展。但是,一部分孢子可以保留在身体内数周(或数月),并造成后续感染。因而,为了中和后面的感染,接种疫苗也是必需的。用展示抗毒素(例如,LF 和 / 或 EF 的 PA63- 结合 N- 末端结构域)的噬菌体 T4 免疫,通过妨碍致死毒素和水肿毒素的形成,可以立即中和初步感染的毒性作用。结构域的高密度展示(在 Soc-LF 结构域融合体的情况下,810 个拷贝 / 壳体)可以用作多价毒素抑制剂,从而极大地增强结合 PA63 的亲合力,并中和毒素形成(Nourez, M., Kane, R. S., Mogridge, J., Metallo, S., Deschatelets, P., Sellman, B. R., Whitesides, G. M. 和 Collier, R. J. (2001) Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nature Biotech.* 19, 958-961)。单独的或与其它 T4 纳米颗粒(例如,PA-Hoc-T4)相组合(同时施用)的相同 T4 颗粒,也可以用作疫苗,其能产生中和免疫应答,并消除由延迟的孢子萌发造成的后续感染。

[0078] 制剂

[0079] 使用已知的技术,可以将本发明的疫苗递送系统制备在生理上可接受的制剂中,例如药学上可接受的载体中。例如,定制的噬菌体颗粒可以与药学上可接受的赋形剂相组

合,以形成免疫原组合物。

[0080] 或者,可以在介质中施用噬菌体颗粒,所述介质具有对靶位点,例如肿瘤或感染的特异性。

[0081] 可以以固体、液体或气雾剂的形式施用本发明的疫苗递送介质。固体组合物的实例包括丸剂,乳膏,和可植入的剂量单位。可以经口服施用丸剂。可以表面地施用治疗乳膏。可以局部地施用可植入的剂量单位,例如,在肿瘤部位,或可以植入,用于全身释放治疗组合物,例如,皮下施用。液体组合物的实例包括适于肌肉内、皮下、静脉内、动脉内注射的制剂,和适于表面和眼内施用的制剂。气雾剂制剂的实例包括施用到肺部的吸入制剂。

[0082] 通过标准的施用途径,可以施用噬菌体组合物。通常,通过表面、口服、直肠、鼻或肠胃外(例如,静脉内,皮下,或肌肉内)途径,可以施用组合物。另外,可以将组合物掺入持续释放基质,例如可生物降解的聚合物,该聚合物植入在需要递送的地方附近,例如,在肿瘤的部位。该方法包括施用单剂,以预定的时间间隔施用重复的剂量,和持续施用预定的时间段。

[0083] 如本文使用的,持续释放基质是由材料制成的基质,所述材料通常是能通过酶或酸/碱水解或通过溶解降解的聚合物。一旦插入身体,酶和体液会作用于基质。需要的持续释放基质选自生物相容的材料,例如脂质体,聚交酯(聚交酯酸),聚乙醇酸交酯(乙醇酸的聚合物),聚交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物),聚酐,聚(正)酯,多肽,透明质酸,胶原,硫酸软骨素,羧酸,脂肪酸,磷脂,多糖,核酸,多氨基酸,氨基酸例如苯丙氨酸,酪氨酸,异亮氨酸,多核苷酸,聚乙烯基丙烯,聚乙烯吡咯酮和硅酮。优选的可生物降解的基质是聚交酯、聚乙醇酸交酯或聚交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)之一的基质。

[0084] 疫苗组合物的剂量依赖于待治疗的状况,使用的具体组合物,和其它临床因素,例如患者的体重和状况,和施用途径。

[0085] 待治疗的疾病和状况

[0086] 本文所述的方法和组合物可以用于治疗人和动物疾病和过程,包括但不限于细菌性疾病,真菌性疾病,立克次氏体病,衣原体病,病毒性疾病,寄生虫感染,性传播疾病,结节病,和朊病毒病。本文所述的方法和组合物也可以用于治疗需要免疫应答的任何疾病或障碍。

[0087] 下面的实施例解释了本发明的各种实施方案和方面,但不应当理解为以任何方式限制本发明的范围。尽管下面的实施例采用 Hoc 融合构建体,本发明也可以容易地延伸到展示 Soc 融合体。更具体地,T4 纳米颗粒可以在壳体表面上容纳约 810 个拷贝的 Soc 分子,使用体外组装系统,可以将它们都替换为融合到 Soc 上的抗原。另外,T4 纳米颗粒主题可以延伸到包括对大壳体蛋白自身(930 个拷贝)、大尾蛋白 gp18(144 个拷贝)的修饰,使它成为疫苗开发的高度通用的系统。

[0088] 实施例 1

[0089] p24-Hoc 的构建、过表达和纯化

[0090] 通过编码 pro-gly-gly 连接序列的 DNA 序列,将与全长 p24 多肽(225 个氨基酸,24kDa)相对应的 DNA 片段连接到 hoc 基因的 5' - 末端。如上所述,p24 是 HIV 壳的大壳体亚基,其包裹 HIV 基因组的 2 个分子和其它蛋白(例如,逆转录酶,整合酶)和核酸(例如,色氨酸 tRNA 引物)组分,其对感染是必需的。这可以通过 Kuebler 和 Rao,1998 公开的

SOE 策略来实现。构建体向 T7 表达载体 pET15b 的 BamHI 位点的框内插入 (Novagen Inc. Madison, WI, USA), 会导致由六组氨酸标志组成的 26 氨基酸序列向 p24-Hoc 蛋白序列的 N-末端的结合 (图 3(A))。通过 IPTG 诱导, 能使表达的 66kDa 六 His-p24-Hoc 融合蛋白占总大肠杆菌细胞蛋白的约 10% (图 3b), 且 80% 表达的蛋白归入可溶级分。通过 Ni-琼脂糖柱上的色谱, 可以将蛋白纯化至 90% 纯度 (图 3(B))。从 1 升培养物, 得到约 8-10mg 纯化的 p24-Hoc。在图 3(B) 中, 在 4-20% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳样品, 并用考马斯蓝染色; 泳道 1 和 2 对应着 p24-Hoc 的 IPTG 诱导之前 (0 小时) 或之后 (3 小时) 的大肠杆菌样品。注意到 IPTG 诱导 (箭头) 后 66kDa p24-Hoc 条带的出现。泳道 3 和 4 显示了 Ni-琼脂糖柱色谱后纯化的蛋白级分。

[0091] 实施例 2

[0092] T4 纳米颗粒的体外组装

[0093] 为了将重组抗原组装或“装载”到 T4 噬菌体颗粒表面上, 将约 2×10^{10} 蔗糖梯度-纯化的 hoc⁻soc⁻T4 纳米颗粒与在 TMG 缓冲液 (50mM 磷酸钠缓冲液, pH7.0, 75mM NaCl 和 1mM MgSO₄) 中的递增量的纯化的 HIV-p24-Hoc 一起在 37°C 温育约 60min。然后, 将得到的 T4 纳米颗粒在 14,000rpm 沉淀 60min, 弃去未结合的上清液级分。用过量的缓冲液洗涤颗粒沉淀 2 次, 以去除所有未结合的或非特异性地捕获的蛋白。通过 4-20% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和考马斯蓝染色, 分析所有样品, 原料, 未结合的和结合的级分, 和对照品。参考图 4, HIV-p24-Hoc 和 Hoc 结合位点的比例标示在图的顶部。泳道如下: St, 起始 p24-Hoc; Su, 结合后在上清液中的 p24-Hoc; Ph, 噬菌体纳米颗粒。图左侧的第一个 C-Ph 泳道代表组装前的对照噬菌体纳米颗粒。剩下的“Ph”泳道对应着以标示的比例组装重组抗原后的噬菌体纳米颗粒。在其它实施例中维持该凝胶装载次序。St 和 Su 泳道中的条带是更微弱的, 因为仅仅约 1/10 样品体积可以装载到凝胶上, 这是由于每个孔的有限容量 (20ul)。如图 4 所示, p24-Hoc 被有效地组装到 hoc⁻soc⁻颗粒上, 形成体外系统中的 T4 纳米颗粒。当与对照 hoc⁻soc⁻T4 颗粒 (图左侧的第一个 c-Ph 泳道) 相比较时, 在与 p24-Hoc 温育后, 出现了与 p24-Hoc 多肽相对应的新条带 (箭头) (对应着箭头, Ph 泳道在比例 1 : 5.1 : 10, 1 : 25, 和 1 : 50)。条带的强度随着 p24-Hoc : Hoc 结合位点的比例的增加而增加, 表明通过控制 p24-Hoc : Hoc 结合位点的比例, 可以控制装载程度。

[0094] 实施例 3

[0095] 体外组装系统的特异性和稳定性

[0096] p24-Hoc 和 hoc⁻soc⁻T4 纳米颗粒之间的结合相互作用是高度特异性的。图 5 解释了该特异性。使用实施例 2 的实验设计, 将 T4 纳米颗粒与单独的 p24 (泳道 2-4) 或 p24 和 p24-Hoc 的混合物 (泳道 5-7) 一起温育。当与对照噬菌体 (泳道 1, C-Ph) 相比较时, p24 仅仅在与 Hoc 融合时结合颗粒 (泳道 5-7)。注意到, 没有发生明显的 p24 结合。p24-Hoc 的位置标有箭头。这些结果表明, 与 Hoc 多肽或其片段的融合, 是结合 T4 颗粒所必需的。无论是对照蛋白 BSA (66kDa) 还是炭疽 PA (89kDa), 都没有显示出向 T4 颗粒的明显结合 (数据未显示)。

[0097] 通过用 pH2.0 缓冲液或 6M 尿素处理 p24-T4 纳米颗粒, 评价展示的 p24-Hoc 和 T4 噬菌体颗粒之间的相互作用的稳定性, 并检测任一种结合的抗原是否解离。更具体地, 用 TMG 缓冲液 (泳道 2) 或 pH2 缓冲液 (泳道 3) 或 3M 尿素 (泳道 4) 洗涤 p24-Hoc 结合的 T4

纳米颗粒 (图 6)。颗粒的 SDS-PAGE 表明,结合的 p24-Hoc 对两种处理都是稳定的。泳道 C-Ph 展示了对照 hoc⁻soc⁻ 噬菌体。p24-Hoc 的位置标有箭头。因为在这些实验中没有明显的解离,这些数据表明,展示的抗原能牢固地结合 T4 噬菌体颗粒 (图 6)。

[0098] 实施例 4

[0099] Hoc 的 N- 或 C- 末端在展示 p24 中的应用

[0100] Hoc 的 N- 和 C- 末端都可以用于展示 p24。例如,除了实施例 1 所述的 N- 末端融合蛋白外,构建了反向 C- 末端融合蛋白。为了建立 C- 末端融合蛋白,通过编码 pro-gly-gly 连接序列的 C- 末端-连接的 DNA 序列,将与全长 p24 多肽相对应的 DNA 框内连接到 hoc 基因的 3' - 末端。hoc 基因的 5' - 末端连接到编码六组氨酸标志蛋白序列的序列 (图 7(A))。以与 N- 末端融合相同的方式,表达和纯化六 His-Hoc-p24 (图 7B;泳道 1 和 2 分别对应着 p24-Hoc 的 IPTG 诱导之前 (0 小时) 或之后 (3 小时) 的大肠杆菌样品。注意到 IPTG 诱导 (箭头) 后 66kDa p24-Hoc 条带的出现。泳道 3 和 4 显示了 Ni- 琼脂糖柱色谱后纯化的蛋白级分)。

[0101] 体外组装实验证实, Hoc-p24 能有效地组装到壳体表面上 (图 7(C)), 表明 N- 和 C- 末端融合都不能损害 Hoc 向壳体的结合。参考图 7(C), 实验细节与实施例 2 相同, 例外是, 纯化的 Hoc-p24 用于结合实验。Hoc-p24 与 Hoc 结合位点的比例, 标示在图的顶部。注意到纳米颗粒中的新 p24-Hoc 条带的出现 (箭头)。泳道如下: St, 起始 p24-Hoc; Su, 结合后在上清液中的 p24-Hoc; c-ph, 对照噬菌体纳米颗粒; Ph, 在顶部标示的不同比例的噬菌体纳米颗粒。在 4-20% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上电泳图 (B) 和图 (C) 的样品, 并用考马斯蓝染色。

[0102] 实施例 5

[0103] 展示的抗原的拷贝数

[0104] 如通过激光密度测定 (Molecular Dynamics Inc.) 所定量的, p24-Hoc 或 Hoc-p24 的最大拷贝数是约 900p24-Hoc 分子/T4 纳米颗粒。这与凝胶过滤实验一致 (数据未显示), 表明过表达的 Hoc 蛋白在溶液中以六聚体存在。因而, 对于每个 gp23 六聚体, 可能存在 1 个结合的抗原的六聚体。用许多 HIV 抗原和炭疽保护抗原, 也已经观察到了相同的行为 (见下面的实施例)。鉴于重组抗原在 T4 纳米颗粒上的高密度展示和通过改变体外组装反应中的组分的比例控制拷贝数的能力 (图 4-7), 可以构建用于多种用途的多种 T4 纳米颗粒。

[0105] 实施例 6

[0106] tat 和 nef 在 T4 纳米颗粒上的展示

[0107] 通过用其它 HIV 抗原 tat (10kDa)-Hoc 和 nef (30kDa)-Hoc 构建融合体, 评价了体外系统对抗原展示的广泛适用性。认为 tat 和 nef 都是针对 HIV 的疫苗开发的重要靶物。使用如实施例 2 所述的体外组装系统, 进行了 T4 纳米颗粒的组装。参考图 8, 泳道如下: st, 起始 tat/nef-Hoc; su, 结合后在上清液中的 tat/nef-Hoc; ph, 噬菌体纳米颗粒; " c-" 代表对照。这些数据清楚地证实, 两种抗原都能以与 p24-Hoc 相同的拷贝数, 有效地展示在 T4 纳米颗粒上 (图 (A) :tat; 图 (B) :nef)。

[0108] 实施例 7

[0109] 炭疽保护抗原的展示

[0110] 来自炭疽芽胞杆菌的 83kDa 保护抗原 (PA) 是三组分炭疽毒素的关键组分。它已

经成为开发针对潜在的生物恐怖分子炭疽攻击的有效重组疫苗的主要靶。本文所述的 T4 纳米颗粒平台适用于展示 125kDaPA-Hoc 融合蛋白。

[0111] 使用本发明的体外组装系统,过表达 PA-Hoc 融合蛋白,最多至约 15% 的总大肠杆菌蛋白,并通过 Ni-琼脂糖色谱纯化。参考图 9,以凝胶顶部所示的比例,将约 10^{10} 个 hoc⁻soc⁻T4 噬菌体颗粒(泳道 1)与 PA-Hoc(箭头)一起温育。组装后,在 4-20% SDS-PAG 上电泳样品,并用考马斯蓝染色。上清液(未结合的)(泳道 5,7,9,11,13,15,17,19,21,23)和噬菌体结合的(泳道 6,8,10,12,14,16,18,20,22,24)PA-Hoc 证实了 PA-Hoc 向 T4 纳米颗粒上的有效装载。泳道 1-3,标准品;泳道 1, hoc⁻soc⁻ 噬菌体;泳道 2,纯化的 PA-Hoc;泳道 3,纯化的 PA。象 83kDa PA 一样大的多肽以与 p24 相同的高密度展示的事实暗示,对 T4 纳米颗粒上展示的蛋白的大小,没有基本的显示。其它的噬菌体展示系统都没有表现出与本文所述的体外 T4 系统一样的强烈。

[0112] 实施例 8

[0113] 多种抗原的展示

[0114] 在有 2 种抗原(tat-Hoc 和 p24-Hoc,或 nef-Hoc 和 p24-Hoc)或 3 种抗原(p24-Hoc, tat-Hoc,和 nef-Hoc)存在下,实现了本发明的体外组装系统。参考图 10,泳道如下:st,起始蛋白;su,结合后剩余在上清液中的蛋白;ph,噬菌体;c-,对照。箭头表明结合的抗原的位置。这些数据证实,多种抗原可以象用单个抗原独立地进行一样容易地装载到壳体表面上(图 10(A),(B),和(C))。改变添加的抗原的比例,可以相应地改变壳体表面上的抗原的拷贝数(图 10(C),数据未显示)。定量数据表明,测试的所有蛋白都表现出相似的结合亲和力,表明融合的抗原不能明显地影响 Hoc 向纳米颗粒的结合。

[0115] 实施例 9

[0116] p24-Hoc T4 纳米颗粒的免疫原性

[0117] 为了测试 T4 纳米颗粒的免疫原性,在第 0,3,和 6 周,用在噬菌体 T4 上展示的 $< 1 \mu\text{g}$ p24-Hoc 免疫 BALB/C 小鼠。使用杆状病毒-表达的 p24 作为包被抗原,通过酶联免疫吸附测定(ELISA),对各血清样品,一式三份地分析 p24-特异性的 IgG 抗体。将数据表示为终点滴度,滴度定义为能产生超过背景值 2 倍的 OD 读数的最高稀释度。在每个血清稀释度,从含有抗原的三个孔的吸光度减去缺少抗原的三个孔的平均吸光度后,计算滴度。图 11 显示了几何平均终点抗体滴度,符号代表各小鼠血清滴度。

[0118] 如图 11 所示, p24-Hoc-T4 纳米颗粒在小鼠中是高免疫原的。单独用 $10 \mu\text{g}$ 可溶的 p24 免疫的小鼠,诱导了较差的抗体应答(在第 6 周,滴度小于 800,数据未显示)。但是,当它在 T4 纳米颗粒上展示时,用 $< 1 \mu\text{g}$ 展示的抗原,得到了 p24-特异性的抗体滴度的 100-倍增加,从而证实了 p24-T4 纳米颗粒的强免疫原性。如图 11 所示,用 Hoc-p24-T4 纳米颗粒,得到了最高达 200,000 的终点滴度。而且,诱导的抗体更持久,且甚至在免疫后 37 周,得到了 50,000 的滴度。用 p24-Hoc T4 颗粒(数据未显示)和 PA-Hoc T4 颗粒(见下面),得到了类似的结果。重要的是,注意到直接注射重组纳米颗粒,没有添加任何佐剂。因而, T4 纳米颗粒,除了它们作为疫苗送递介质的作用外,显然提供了佐剂作用,从而产生对展示的抗原的强抗体滴度。

[0119] 实施例 10

[0120] PA-Hoc T4 纳米颗粒的免疫原性

[0121] 用展示的炭疽 PA-Hoc T4 纳米颗粒的独立免疫原性实验,证实了 T4 纳米颗粒确实能引起强抗体应答。参考图 12,该图显示了在免疫后 8 周的 CBA/J 小鼠中的 PA-特异性的 IgG 血清抗体。条柱代表几何平均滴度。(注:误差条指示着数据范围,N = 10)。给小鼠肌肉内注射 PA-Hoc-T4, PA-明矾,和许多对照品(每组 10 小鼠)。在每种情况下,给每只小鼠注射相当于 1.2 μ g 的抗原。展示在 T4 纳米颗粒上的 PA-Hoc,产生了最好的抗体滴度。T4-展示的 PA 的几何平均终点抗体滴度是 450,000,而用 PA 和作为佐剂的氢氧化铝免疫的小鼠具有 156,000 的几何平均终点滴度。因而,没有添加任何佐剂的 T4 纳米颗粒产生了比用明矾作为佐剂高约 3- 倍的抗体滴度。这些数据表明,T4 纳米颗粒是高免疫原的,可以用作测试炭疽抗原制剂的有价值的平台。

[0122] 实施例 11

[0123] 细胞应答

[0124] 为了检查对 T4 纳米颗粒的细胞应答,在第二次加强后 4 周,收集脾和淋巴结细胞,并制备单细胞制品。通过氘化胸苷 (3H-Tdr) 掺入,分析细胞的 T 细胞增殖反应。将细胞与不同浓度的杆状病毒-表达的 p24(实心圆圈)或不同浓度的无关抗原卵清蛋白(空心圆圈)一起温育 72 小时。在培养阶段的最后 16 小时,用 3H-Tdr 脉冲处理细胞。然后,将细胞收获到玻璃纤维过滤器上。处理过滤器,并在 β 平板计数器上计数。将数据表示为刺激指数,其代表用抗原脉冲处理的淋巴细胞培养物中的 3H-Tdr 与单独用培养基脉冲处理的淋巴细胞培养物中的 3H-Tdr 的比例。认为 3 或更大的刺激指数是阳性反应。

[0125] 如图 13 所示,本发明的 T4 纳米颗粒引起了强细胞应答。关于抗体应答,单独用 p24 免疫的小鼠没有诱导任何增殖反应。相反地,在有 1-10 μ g 杆状病毒表达的 p24 存在下,来自用在 T4 上展示的 p24-Hoc 或 Hoc-p24 免疫的小鼠的脾细胞诱导了强烈的 T 细胞应答(图 13)。在 10 μ g/ml 的抗原浓度,得到了 80-100 的刺激指数。用淋巴结细胞得到了类似的增殖反应(数据未显示)。未接触过抗原的小鼠没有诱导任何 p24-特异性的增殖 T 细胞应答,从而证实得到的应答是特异性的。在所有情况下,阴性对照抗原卵清蛋白没有诱导任何增殖反应(图 13)。仅仅来自用 p24-Hoc-T4 或 Hoc-p24-T4 免疫的小鼠的脾和淋巴结细胞,诱导了 IL-4 和 IFN- γ (数据未显示)。铬释放测定证实,从用 p24-Hoc-T4 或 Hoc-p24-T4 免疫的小鼠得到的脾细胞表现出了大约 18-22% 抗原-特异性的裂解(数据未显示)。综合考虑上面的实施例,这些结果表明,在噬菌体 T4 上展示的 p24 可以诱导强烈的体液和细胞介导的免疫应答,且不需要添加任何外来佐剂来增强它的免疫原性。

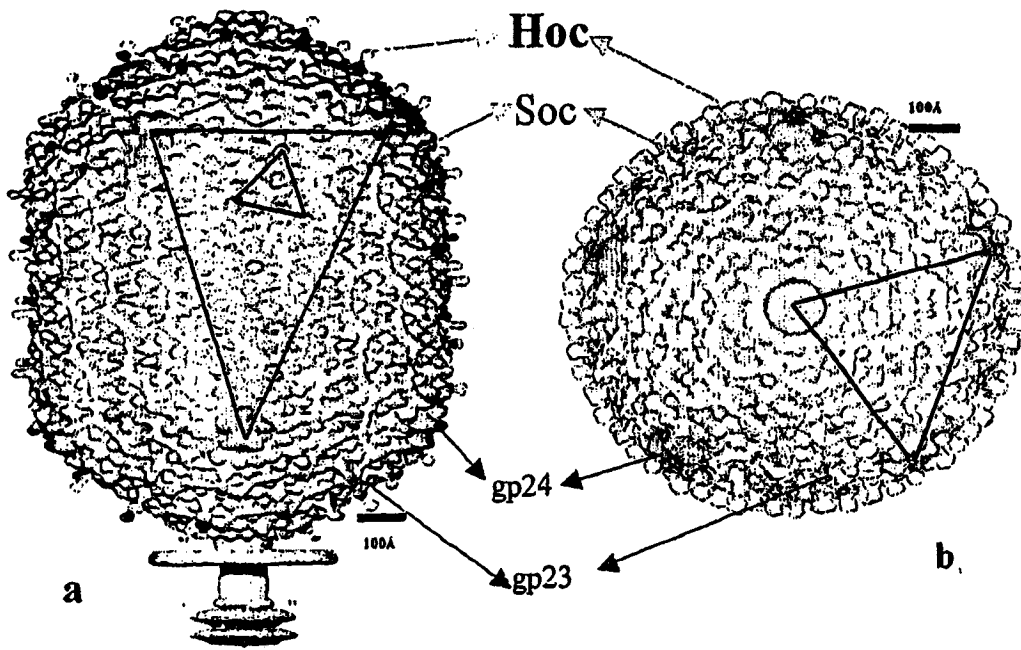


图 1

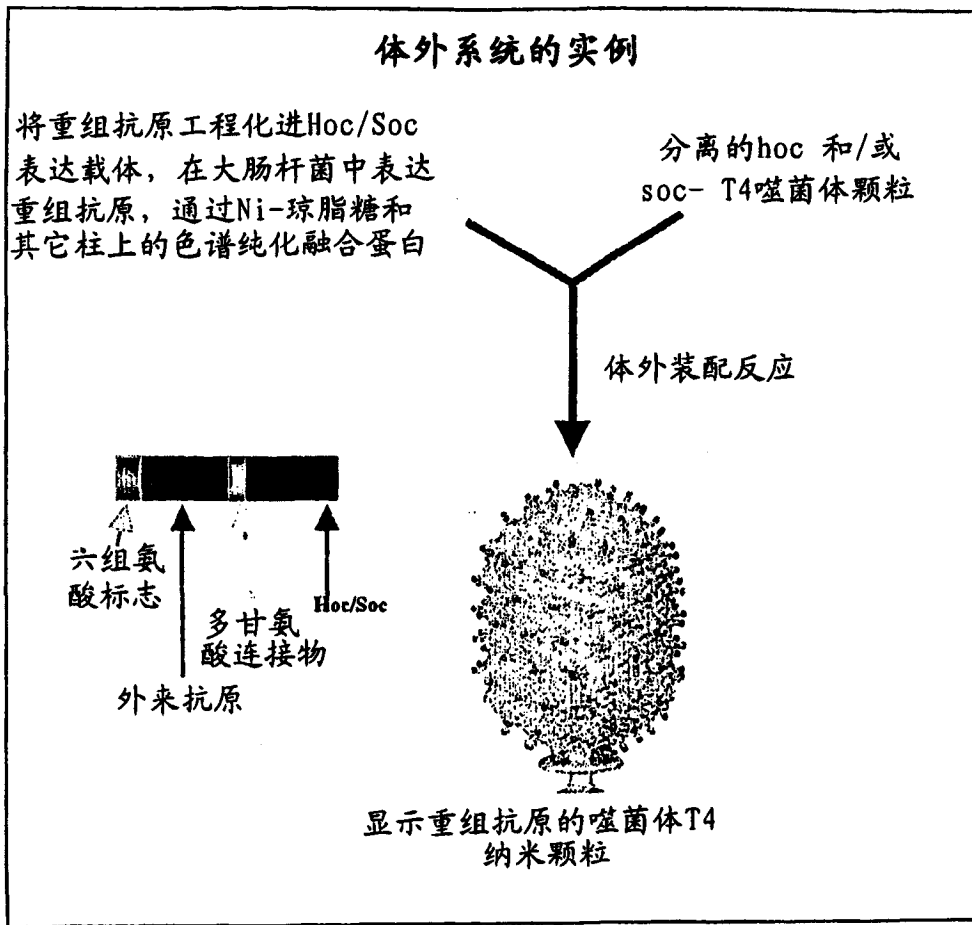


图 2

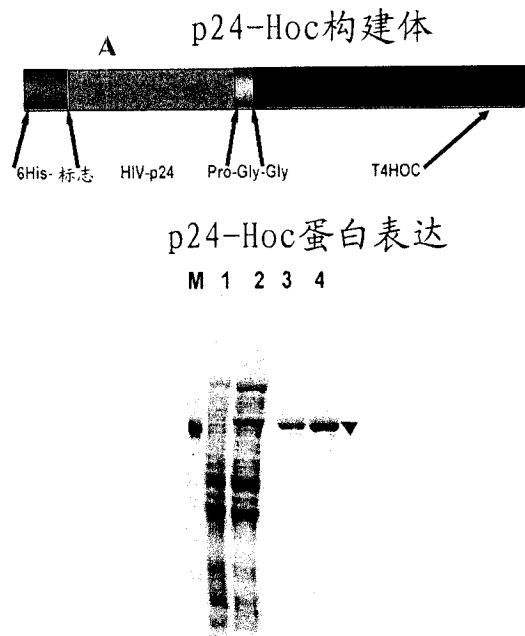


图 3

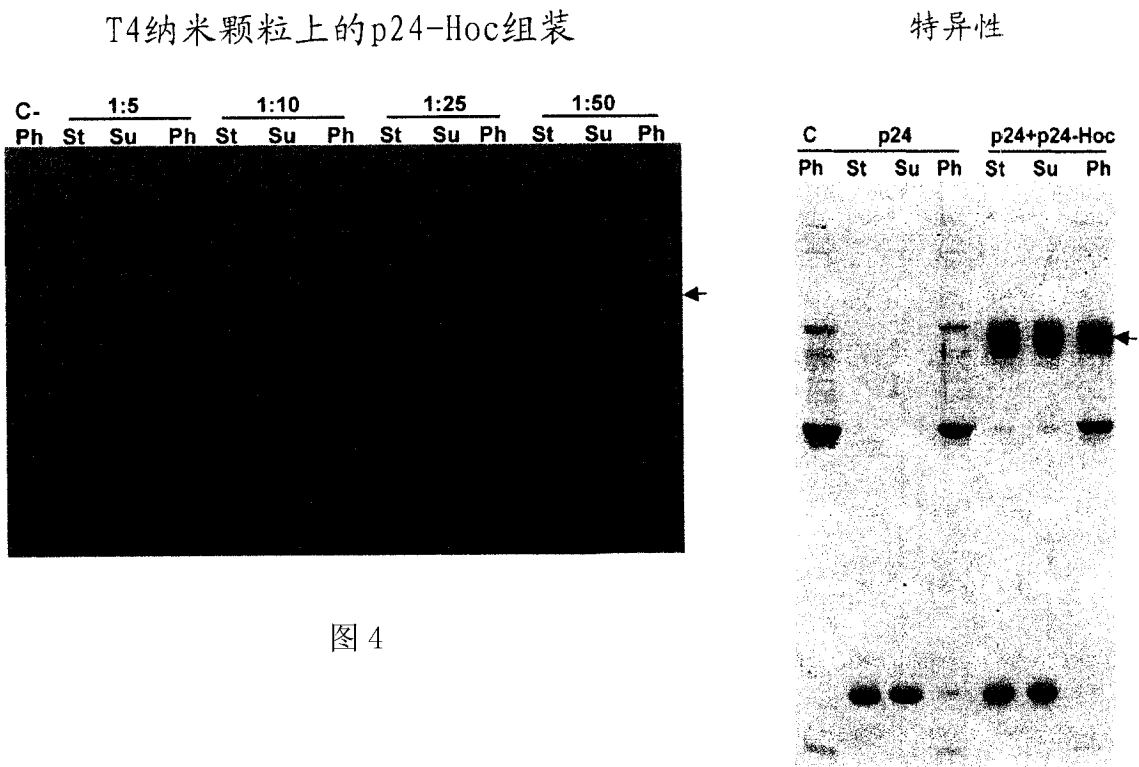


图 4

图 5

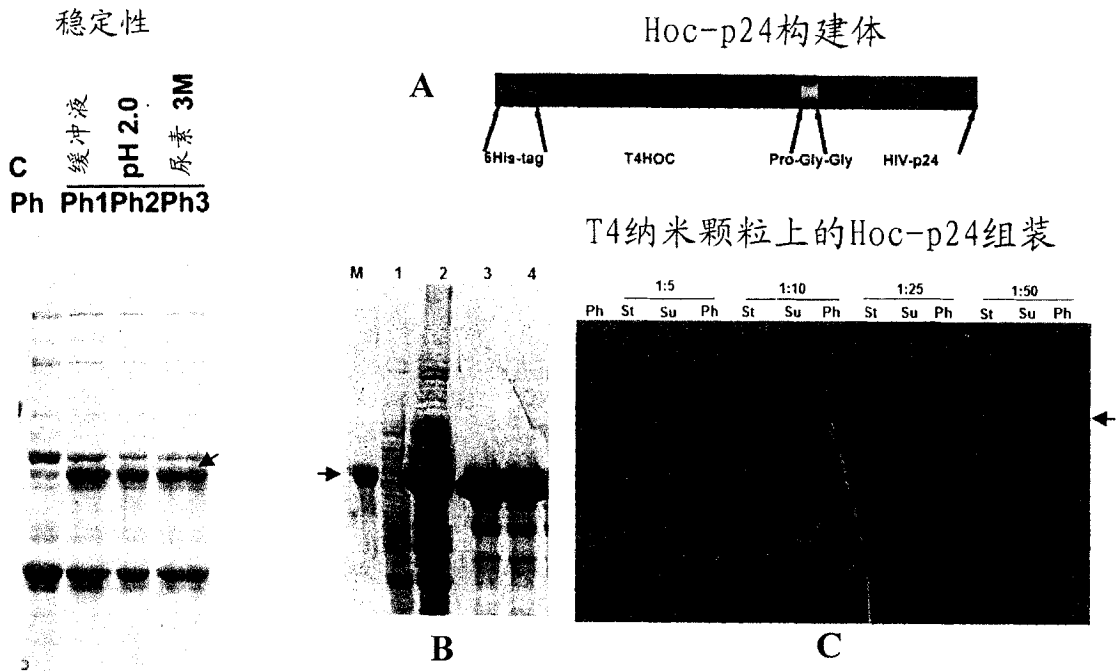


图 7

图 6

HIV tat-Hoc和nef-Hoc展示

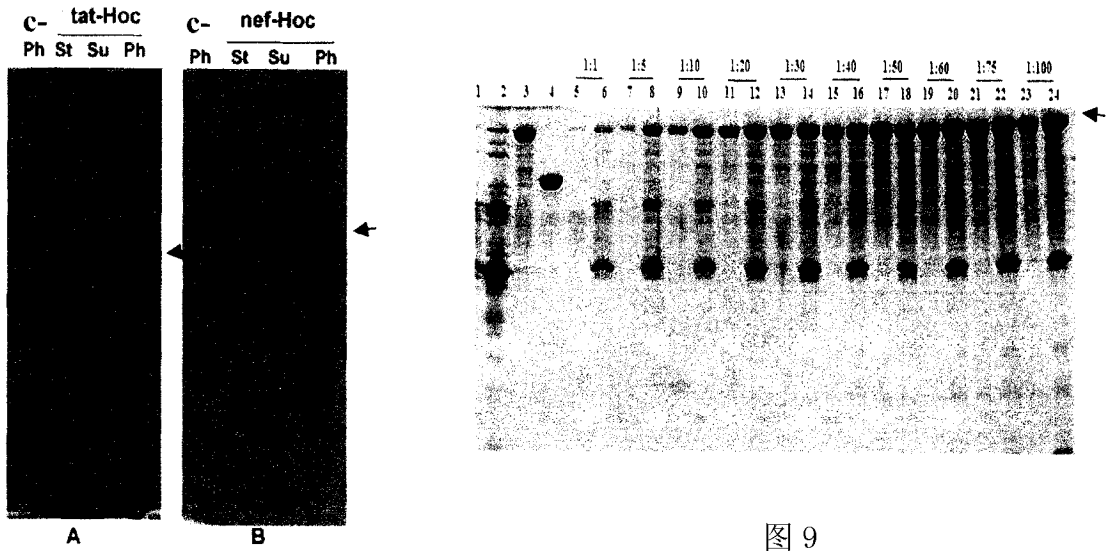


图 9

图 8

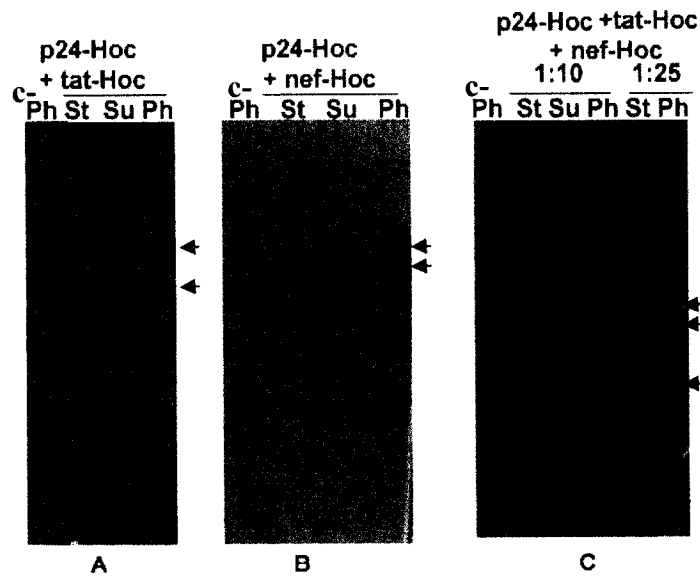


图 10

p24特异性的IgG抗体

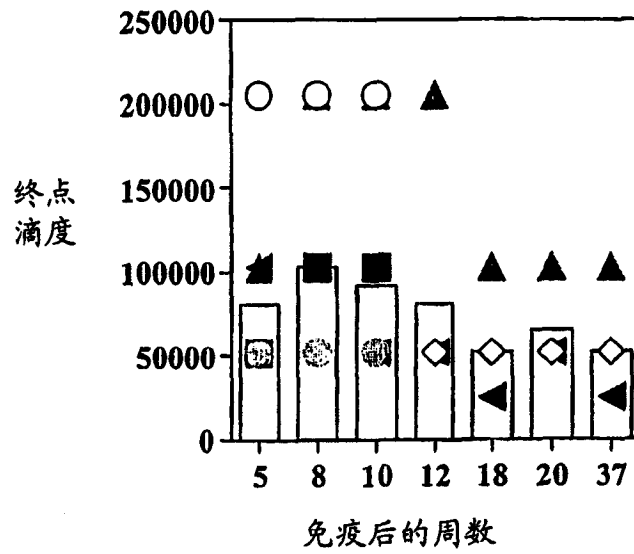


图 11

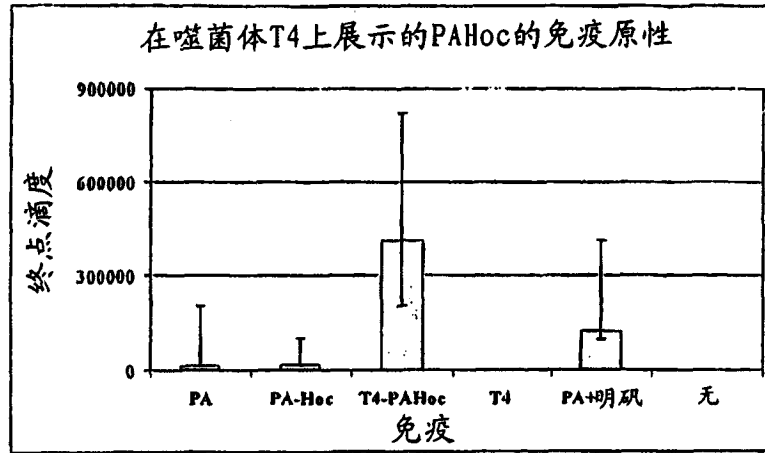


图 12

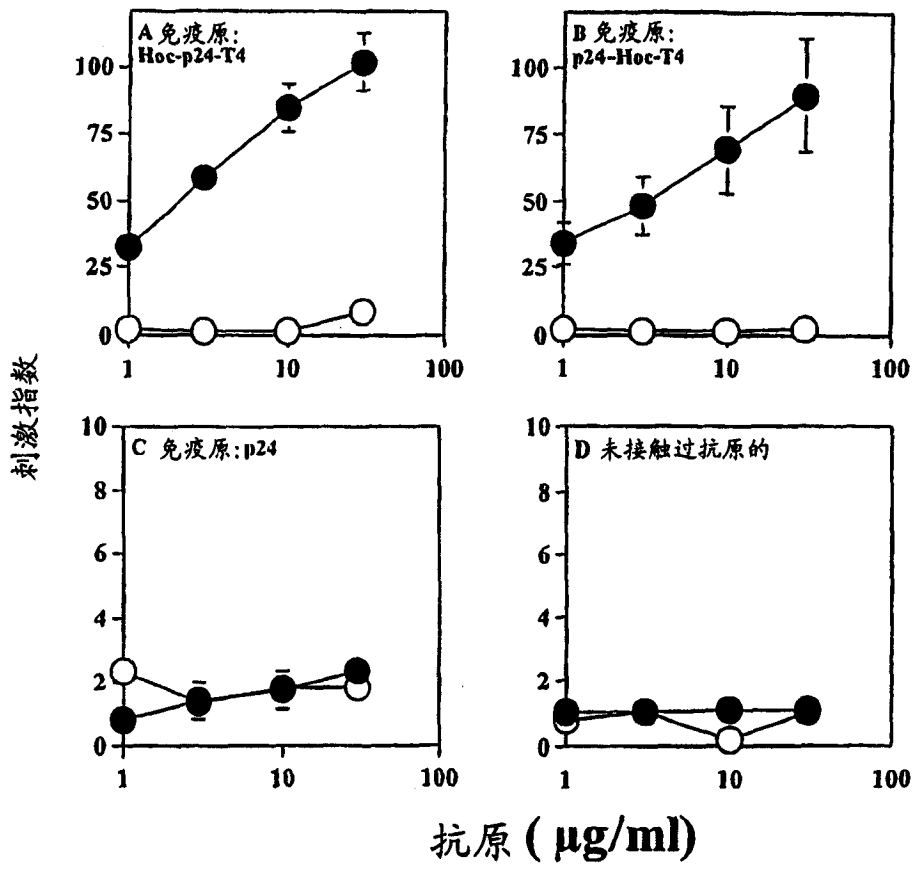


图 13

专利名称(译)	包含噬菌体纳米颗粒的方法和组合物		
公开(公告)号	CN1972710B	公开(公告)日	2011-09-21
申请号	CN200480041791.7	申请日	2004-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	美国天主教大学		
申请(专利权)人(译)	美国天主教大学		
当前申请(专利权)人(译)	美国天主教大学		
[标]发明人	文尼加拉巴沙维斯瓦拉劳		
发明人	文尼加拉·巴沙维斯瓦拉·劳		
IPC分类号	A61K39/00 C12Q1/70 A01N63/00 G01N33/53 A61K39/07 A61K39/12 A61K39/21 A61K39/295 C07K14/16 C12N7/00 C12N15/10 C12N15/86 C12Q1/68 C40B40/02		
CPC分类号	A61K39/07 A61K2039/64 C12N2740/16222 A61K2039/5256 C12N2740/16234 C07K2319/21 C12N2795/10121 C07K2319/735 A61K39/21 A61K2039/645 C12N2795/10143 C07K14/005 C12N2740/16322 C12N7/00 A61K2039/6075 C12N15/1037 C40B40/02 A61K2039/627 C12N2740/16034 A61K39/295 C12N2740/16334 C12N15/86 A61K39/12 A61K2039/55505 A61K2039/57 A61K2039/70 C07K2299/00 C07K2319/00		
代理人(译)	李波 刘玥		
审查员(译)	田甜		
优先权	60/530527 2003-12-17 US		
其他公开文献	CN1972710A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了包含噬菌体的组合物和方法。更具体地，本发明包括为有效的抗原和外来颗粒呈递独特设计的新的和定制的T4噬菌体。本发明也提供了制备定制的T4噬菌体的体外方法。本发明的组合物和方法可以用于有效的疫苗送递系统。

