



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101910198 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 200880124208. 7

A61K 47/48 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 29

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

07021396. 2 2007. 11. 02 EP

US 5425937 A, 1995. 06. 20, 全文.

US 6123934 A, 2000. 09. 26, 全文.

US 3987161 A, 1976. 10. 19, 摘要, 实施例 1.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 07. 02

审查员 钟辉

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2008/009110 2008. 10. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/056280 EN 2009. 05. 07

(73) 专利权人 拜耳知识产权有限责任公司

地址 德国蒙海姆

(72) 发明人 S·霍夫曼 H-J·哈曼 R·费希尔

S·希尔伯格 S·O·沃格尔

H·欣克尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 张萍 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书14页 附图8页

(54) 发明名称

与动物毛发选择性结合的抗体和用于动物的
基于抗体的药物递送系统

(57) 摘要

本发明提供了与动物毛发选择性结合的抗体
和其中可将特定制剂引导至动物毛发的基于抗体
的药物递送系统。这是由以下需求驱动的:增加
动物的外寄生虫治疗的有效治疗时期、降低这些
药物的毒性并改进其释放概况。

1. 选择性结合选自犬、猫和马的一种动物物种的毛发表面结构的抗体,其特征在于其可通过下述来获得:

- a) 用切碎的所述动物物种的毛发免疫小鼠,
 - b) 在第一步骤中分离脾细胞并且与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤并且筛选产生毛发特异性抗体的杂交瘤克隆,
 - c) 在第二步骤中用固定在固体支持物上的毛发结合识别毛发表面上的结构的抗体,和
 - d) 用抗小鼠第二抗体鉴定结合的抗体。
2. 包含根据权利要求 1 的抗体的靶向单独动物物种的药物递送系统。

与动物毛发选择性结合的抗体和用于动物的基于抗体的药物递送系统

[0001] 本发明提供与动物毛发选择性结合的抗体和其中可将特定制剂引导 (directed to) 至动物毛发的基于抗体的药物递送系统。这是由以下需求驱动的: 增加动物的外寄生虫治疗的有效治疗时期、降低这些药物的毒性并改进其释放概况 (profile)。

[0002] 选择两种单克隆抗体, 其对犬的毛发表面显示出高度结合性。重要的是, 没有检测到对人、马或猫的毛发的结合。本文呈现的数据证明, 所选的抗体适合于设计将药物引导至动物毛发的递送系统。

背景技术

[0003] 在很久以前本领域技术人员已经知道抗体与毛发结构的附着 (attachment) 或连接以及那些抗体在与毛发治疗活性物质或含有毛发治疗活性物质的颗粒连接中的有益用途。Widder (美国专利 3, 987, 161) 描述了包含抗体的毛发护理产品, 所述抗体含有从动物获得的血清, 所述动物在其身体被注射哺乳动物 (优选人) 毛发的水性悬浮液时能够在血液中形成抗体。Igarashi 等人 (美国专利 5, 597, 386) 描述了携带毛发染料或含有着色物质的聚合物颗粒 (例如聚苯乙烯颗粒) 的抗毛发抗体, 因此使着色活性物质与人的毛发结合, 以便获得毛发治疗中的益处。该抗体被描述为抗角蛋白抗体, 其是通过向哺乳动物肌肉内注射角蛋白聚合物并通过牛初乳收获抗体而获得的, 其中通过人毛发结构的水解和分解而获得角蛋白。携带染料的颗粒被描述为大分子载体。Koyama 等人 (美国专利 6, 123, 934) 描述了含有与毛发结合的抗体的化妆品组合物以及使用该抗体将乙烯基单体的聚合物或共聚物的胶乳颗粒与毛发结构连接。制剂可以含有阳离子聚合物或其它成分, 以改善或修复毛发结构。在该发明中, 通过注射水解的人毛发或人毛发颗粒 (通过将完整的毛发纤维结构磨碎而得到) 来免疫家禽, 从而获得抗体。在所有这些发明中, 使用人的毛发结构进行免疫, 并获得与角蛋白结合的多克隆抗体。一般来讲, 已经知道可以通过用生物抗原结构来免疫哺乳动物或鸟类以产生抗体, 然后可将抗体用于将与那些抗体直接或间接连接的有益活性物质引导至需要的区域, 例如癌细胞。

[0004] Paluzzi 和合作者 (2004) 已经使用来自羊绒 (cashmere) 的 II 型角蛋白作为抗原来产生物种特异性的单克隆抗体。通过二维免疫印迹测试所选择抗体与分离自羊绒和羊毛的角蛋白的免疫反应性。检测到几个定量和定性差异, 这使得在与其它动物纤维比较时, 能够特异性地鉴别羊绒。但是, 所选则的单克隆抗体与所有样品结合, 在所测试物种之间仅观察到信号强度和蛋白模式上的微小差异。重要的是, 抗体与所提取的角蛋白 I 型和 II 型蛋白结合——没有证明其与毛发表面结合。

[0005] 在兽医领域, 人们可以通过使用含有有益试剂的颗粒而从那些发明中获益, 并且通过使用与动物毛发或动物皮肤结合的抗体将那些试剂靶向毛发角蛋白结构或皮肤结构。当人们考虑选择使用这些颗粒作为在延长的时期内 (即几周、一个月甚至一年) 释放那些药物的物体, 这是特别有用的, 从而保护动物抵抗有害动物 (即, 昆虫例如蚤和蜱), 或者利用其它有益效应, 例如抵制有害昆虫或在这个长时期内治疗皮肤疾病。按一次性施用制

备为此目的而设计的典型制剂,其显示出几个小时至大约四周的有益效应。使用载体系统(例如聚合物颗粒)可以提供显著延长这个时期的选择。使用抗体将那些颗粒与毛发连接可以提供一个选择,以提供活性物质与毛发的连接,该连接持续足够长的时间以允许药物载体在需要的时期内与毛发或皮肤结合(stick)。需要合适的制剂。可用于将那些制剂应用至动物的应用系统是:例如,喷雾剂或所谓的点式(spot-on)或擦式(wipe-on)制剂,其使制剂与动物皮肤或毛皮接触。感兴趣的活性物质可以是例如拟除虫菊酯或一般性杀虫剂,以及全身性药物或行为调节药剂。

[0006] 以上专利中描述的方法可提供获得此类药物递送系统的途径。但是,由于那些发明中描述的抗体以及通过所描述的方法所获得的抗体与毛发角蛋白结构结合,因此出现一个主要的缺点:不论是何种物种,经由喷雾剂或点式制剂将制剂施用于动物时,会产生强烈且持久的与哺乳动物毛发(即角蛋白结构)的结合。因此,人类施用者也可能由于那些携带药物的系统与体毛或头发偶然结合而接受活性物质的剂量。同样,有可能由于抚摸动物而使那些携带药物的活性物质转移至人体,这有时可能会使宠物主人暴露于有侵袭性的活性物质,例如拟除虫菊酯。为了施用安全原因,如果人们可以获得允许选择性靶向某些动物物种的毛发或皮肤的抗体,则将是一个大的优点。如果兽医必需在畜舍(多个物种饲养于其中,并且只有一个物种表现待治疗的疾病,或者仅必需保护一个物种免遭物种特异性害虫(侵害))中使用那些制剂,则获得此类抗体制剂也具有相当大的优点。

[0007] 如果人们使用以上描述的现有技术方法,以获得针对动物毛发的抗体,则本领域技术人员将会预期获得与角蛋白结构结合的抗体。角蛋白普遍存在于所有哺乳动物中,不同物种间的蛋白序列是十分保守的。因此,抗角蛋白抗体将普遍结合至哺乳动物毛发。

[0008] 在本发明中,令人惊奇地发现可以获得物种特异性的毛发结合抗体,其仅与物种特异性动物毛发表面结构结合,而不与人的毛发表面或不同于用其毛发进行免疫的那个物种的物种的毛发表面结合。显而易见地,存在可被那些抗体靶向的物种特异性抗原结构。包含那些抗体以及与那些抗体(作为分子实体或填充入含有药物的颗粒中)连接的药物的携带药物的制剂能够避免以上描述的缺点。

[0009] 本发明实施方式的描述

[0010] 本发明提供了与动物的毛发表面选择性结合的抗体。

[0011] 此类抗体选自多克隆抗体、单克隆抗体或重组抗体,例如全长抗体(full-size antibody)、二聚体分泌性IgA(dimeric secretory IgA)、多聚体IgM(multimeric IgM)及其片段,例如F(ab')₂片段、Fab片段、Fv片段、单链Fv抗体(scFv)、双特异性scFv、双抗体、三链抗体、四链抗体、单结构域抗体(dingle domain antibody)(dAb)、minobody或分子识别单元(MRU),其源自杂交瘤细胞、合成的、半合成的、原态的(naive)和免疫活性的噬菌体库或核糖体展示库,或通过产生全合成设计抗体。

[0012] 本发明的抗体与犬、猫、牛、绵羊、山羊、骆驼、羊驼(lama)和/或马的毛发表面结构选择性结合。

[0013] 本发明进一步提供靶向单独动物物种的包含抗体的药物递送系统,所述抗体能够与所述单独动物物种的毛发表面选择性结合。

[0014] 所述包含抗体的递送系统结合或附着于固体颗粒的表面,从而使这些颗粒与动物的毛发表面结构选择性结合。

[0015] 本发明的药物递送系统按如下方式包含与单独物种的动物毛发选择性结合的抗体的制剂和含有活性成分的颗粒：在第一步中抗体与所述单独动物物种的毛发选择性结合，在第二步中颗粒与偶联于动物毛发的抗体结合。

[0016] 本发明的药物递送系统进一步按如下方式包含与合适的间隔体 (spacer)/ 介质 (mediator)/ 中间偶联剂连接的或化学结合的动物毛发结合性抗体 (hair binding antibody) 的制剂和颗粒的制剂：在第一步中携带抗体的间隔体 / 介质 / 偶联剂通过所述抗体与动物毛发选择性结合，在第二步中颗粒通过与所述间隔体 / 介质 / 偶联剂结合而连接于动物毛发。

[0017] 本发明进一步提供药物递送系统，其按如下方式包含动物毛发结合性抗体的制剂和合适的间隔体 / 介质 / 中间偶联剂连接或附着于其表面的颗粒的制剂：在第一步中抗体与动物毛发选择性结合，在第二步中携带间隔体 / 介质 / 偶联剂的颗粒通过与所述抗体结合而连接于动物毛发。

[0018] 本发明的药物递送系统按如下方式包含与动物毛发选择性结合的抗体以及颗粒：抗体和颗粒可以存在于对动物施用的单一制剂中；或可以存在于两种不同的制剂 (I) 和 (II) 中，在紧邻对动物施用前将其混合；或者可以按如下方式存在于两种不同的制剂 (I) 和 (II) 中：在第一步中对动物施用制剂 (I)，稍后在第二步中对动物施用制剂 (II)。

[0019] 药物递送系统包含颗粒，其可以含有或可以不含以下物质：对动物有益的活性成分或药剂，即药物；杀虫剂；毛发或皮肤护理剂；保护经处理的动物免受有害害虫动物（例如昆虫）侵袭的驱除剂 (repellent agent)；气味改变剂 (smell modifying agents)；或改变经处理的动物或其它未经处理，但与被施用该处理的动物相互作用的个体动物的行为的药剂。

[0020] 颗粒可含有对动物有益的活性成分或药剂，其浓度适合于它的治疗或有益目的，即 0.01% -99.9%。

[0021] 本发明的药物递送系统是这样的系统：其中颗粒本身含有对动物有益的活性成分或药剂，即药物；杀虫剂；毛发或皮肤护理剂；保护经处理的动物免受有害害虫动物侵袭的驱除剂；气味改变剂；或改变经处理的动物或其它未经处理，但与被施用该处理的动物相互作用的个体动物的行为的药剂。

[0022] 颗粒的直径可以是 0.001 μm 至 10 μm ，优选为 0.1 μm 至 2 μm 。

[0023] 在对动物施用单一治疗后，本发明的药物递送系统允许保护所述动物抵抗疾病，持续治疗动物疾病，或者允许动物从持续延长时期（即从几个小时至 365 天）的所述活性物质效应中受益。

[0024] 本发明的药物递送系统进一步按如下方式包含与动物毛发选择性结合的抗体的制剂和对动物有益的药剂：有益试剂按如下方式直接或通过间隔体 / 介质 / 偶联剂与所述抗体连接 / 偶联 / 结合：所述活性物质与所述抗体或间隔体 / 介质 / 偶联剂的连接被动物毛皮 (fur) 或皮肤的环境条件所中断 (broken)，从而释放活性物质或活性物质的一部分或活性物质 - 抗体结构的一部分，以实现其对动物的有益效应。

[0025] 药物递送系统按如下方式起作用：在延长的时期内，活性物质与抗体或间隔体 / 介质 / 偶联试剂的结合被随机中断，从而允许保护所述动物抵抗疾病，持续治疗动物疾病，或者允许动物从持续延长时期（即从几个小时至 365 天）的所述活性物质效应中受益。

[0026] 本文描述的递送系统包含与动物毛发特异性结合的抗体或所述抗体的制剂，其中所述抗体以合适的结合强度，按如下方式与动物毛发结合：与动物毛发结合的抗体量以及附着于所述抗体的活性成分的量保持足够大，以在延长的时期内，甚至在动物毛皮与水接触几次之后（例如通过洗澡或淋雨）或在用含有表面活性剂的溶液洗涤动物之后，维持所需的有益效应。

[0027] 即使将其于 4℃ 保存在含有水和至多 50% 的与水混溶的有机溶剂的溶液之中，持续长达 24 小时的时期，本发明的抗体能够保持其与动物毛发选择性结合的能力和特异性。

[0028] 即使将其配制或保存在含有其它毛发处理化合物（即，表面活性剂，非离子、阴离子或阳离子聚合物和与水混溶的醇，其浓度为毛发护理制剂中通常所施用的浓度）的水溶液中，抗体仍能够保持其与动物毛发选择性结合的能力和特异性。

[0029] 在优选的实施方式中，递送系统包含本发明抗体，所述抗体另外直接或通过合适的间隔体 / 介质 / 中间体偶联试剂结合或附着于固体颗粒表面，从而使这些颗粒与动物毛发选择性结合。

附图说明

[0030] 图 1 显示了抗体 B7.3 和 B18-4.3 在人和犬的毛发上的结合。使用微量滴定板过滤 ELISA 使单克隆抗体与各种犬的品种毛发和人的毛发结合（5ng 抗体在 1mg 毛发 / 孔上）。使用与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 Fc 和 ABTS 底物进行检测。所有样品重复分析三次，计算标准差。WHT = 西高地梗犬（Westhighland terrier）。

[0031] 图 2 是两种抗体 B7.3 和 B18-4.3 的 SDS-PAGE 的免疫印迹。抗体 B7.3 显示预期的重链和轻链尺寸，而抗体 B18-4.3 具有两个较短的重链片段，这是由 B18-4.3 的重链基因中的突变所引起的。

[0032] 图 3 显示了加载至具有抗生物素蛋白表面的珠粒（beads）上的生物素化的 B18-4.3 的流式细胞计量术图像。红线（第二个峰）显示了由与 B18-4.3 结合的山羊抗小鼠藻红蛋白所引起的位移（shift），这表明抗体与珠粒结合。

[0033] 图 4 显示了荧光珠粒通过抗体 B18-4.3 与犬的毛发结合。a：0.8 μm 链霉抗生物素蛋白表面修饰的珠粒（与 FITC 偶联）通过生物素化的 B18-4.3 与西高地梗犬的毛发结合。b：1 μm 偶联了中性抗生物素蛋白（neutravidin）的荧光球（fluosphere）通过生物素化的 B18-4.3 与比格犬（Beagle）的毛发结合，所述毛发经过以下预处理：在 60℃ 下，用含有 300mM KBr 的 Tris- 缓冲液（pH 8.8）进行洗涤。

[0034] 图 5 显示了毛发的共焦显微镜分析。抗体 B18-4.3 主要与毛发薄片（hairflakes）的边缘结合。通过山羊抗小鼠 Alexa488 进行检测。

[0035] 图 6 显示了通过抗体 B7.3 和 B18-4.3 识别的抗原结构的分析。用含有 300mM KBr 的 Tris- 缓冲液（pH 8.8）洗涤西高地梗犬的毛发，通过丙酮沉淀将该洗涤级分（wash fraction）浓缩。通过免疫印迹分析经富集的毛发表面蛋白（eHSP）。通过一抗 B7.3 或 B18-4.3，然后通过山羊抗小鼠 AP 标记的二抗并用 NBT/BCIP 染色来检测抗原。

[0036] 图 7a 和 b 显示了毛发特异性抗体 B7.3 和 B18-4.3 与犬、猫、马和人的毛发的结合。

[0037] 图 8 证明了具备（equipped）抗体的微粒与犬毛发的充分结合，与之对比的是与人毛发的差的结合。

[0038] 图 9 显示了表面连接了犬毛发特异性抗体 B18-4.3 和 B7.3 的混合物且含有荧光染料的聚苯乙烯微粒,其与比格犬毛发结合。含有染料的微粒用作结合指示剂,其与相同类型的含有杀螨剂的微粒一起施用。进行该实验,以便显示物种特异性的毛发结合抗体以及具备抗体的微粒作为控释药物载体,以保护犬抵抗蜱的示例性应用。施用之后立刻获取图像,图像显示了对应于用蜱侵扰犬以后 2 天,微粒在一些毛发样品上的结合。

[0039] 图 10 显示了施用制剂 7 天以后微粒与犬毛发的结合。

[0040] 图 11a 和 b 显示了施用制剂 14 天以后微粒与犬毛发的结合。

[0041] 图 12a、b 和 c 显示了即使在施用 42 天以后,仍然可以在犬毛发上见到微粒,这证明了抗体介导的微粒与犬毛发的结合的持续性。

[0042] 图 13 显示了即使在对犬毛发施用制剂 63 天以后,仍然可以在毛发表面见到微粒。

[0043] 单克隆毛发特异性抗体的产生和选择

[0044] 通过将小鼠免疫然后使用杂交瘤技术来产生动物毛发特异性抗体。使用匀浆器将切自比格犬的毛发切碎。切碎的 (shredded) 毛发长度大约为 200 μm 。

[0045] 用切碎的比格犬毛发将两只小鼠免疫。将最多 80 μg 毛发样品 (= 20 μL 切碎的毛发) 与 40 μL GERBU 佐剂和 50 μL 1x PBS 混合,并用于免疫。在 10 月 11 日、10 月 25 日、11 月 3 日和 11 月 28 日将小鼠免疫四次,在 12 月 2 日将小鼠杀死。分离脾细胞并与骨髓瘤细胞融合,以产生杂交瘤。将递增稀释液中的细胞吸移 (pipetting) 至 96 孔微量滴定板中以进行有限稀释。为了筛选产生毛发特异性抗体的杂交瘤克隆,建立新的 ELISA 方案 (setup)。将部分裂解的毛发 (在室温下置于 Shindai 反应剂中 10 分钟,然后进行匀浆并重悬浮于碳酸盐缓冲液中) 包被至低结合性 96 孔微量滴定板上。加入杂交瘤细胞培养上清液之后,使用与辣根过氧化物酶 (HRPO) 偶联的山羊抗小鼠 (GAM) 二抗检测特异性抗体的结合。鉴定出总共 23 个与毛发样品结合的多克隆杂交瘤克隆 (B1-23)。但是,由于包被的是部分裂解的毛发,所以选择与存在于毛发内部的抗原结合的抗体以及与毛发表面上的抗原结合的抗体两者。

[0046] 为了鉴定识别毛发表面上的结构的结合者,使用基于 Eppendorf 的 ELISA 测试来自单克隆杂交瘤系的抗体。用 1 滴胶水 (glue) 将 20-50 根人或动物毛发固定于 Eppendorf 管的底部,用 PBS 中的 2% (w/v) BSA 将非特异性结合位点封闭。将杂交瘤上清液或 10 μg 纯化的单克隆抗体转移至管中并在室温下孵育 30 分钟。洗涤之后,使用山羊抗小鼠二抗 (以 HRPO 标记) 检测特异性结合,并在室温下孵育 20 分钟。最后,使用 2,2'-连氨基-双 3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 反应剂 (作为 HRPO 的底物) 显现结合。30 秒后在 OD 405 处测定显色。

[0047] 通过基于 Eppendorf 的 ELISA 鉴定出两种单克隆抗体。将这些抗体 (命名为 B7.3 和 B18-4.3,其显示出对动物毛发表面的特异性结合) 纯化并关于其对不同毛发样品的特异性进行表征。

[0048] 单克隆抗体的纯化

[0049] 通过蛋白 G 或者通过超滤沉淀从杂交瘤培养上清液中纯化单克隆抗体 B7.3 和 B18-4.3。纯化蛋白的产率为 0.1 至 1.1mg/mL。纯化的抗体用于后续分析。

[0050] 单克隆抗体的表征

[0051] 抗体结合 - 基于 Eppendorf 的 ELISA

[0052] 为了定性确认纯化的单克隆抗体 B7.3 和 B18-4.3 与毛发表面的结合,使用了基于 Eppendorf 的 ELISA。抗体 B7.3 和 B18-4.3 与约克夏梗犬 (Yorkshire terrier) 的毛发特异性结合。重要的是,没有检测到与人毛发的结合。

[0053] 使用以下毛发样品进行了另外几个基于 Eppendorf 的 ELISA:人、马、猫、雪纳瑞犬/拉布拉多犬混种 (Schnauzer/Labrador mix)、澳大利亚牧羊犬、洗涤前和洗涤后的贵宾犬 (Poodle) (3 个样品)、洗涤前和洗涤后的约克夏梗犬 (4 个样品)、洗涤前和洗涤后的西高地梗犬 (2 个样品)。

[0054] 表 1 中列出了基于 Eppendorf 的 ELISA 的总结。数据显示,两种单克隆抗体均与来自五个犬物种的毛发表面特异性结合。当使用人、马或猫的毛发时,没有观察到结合,这证明所选的抗体对于犬毛发具有强烈的特异性。似乎单克隆抗体 B18-4.3 比 B7.3 具有更强的针对犬毛发的结合活性。在不同的毛发样品之间存在一些微小的变化。在进行 ELISA 之前对毛发的处理降低了所有测试抗体的结合活性,但是仍然存在结合的抗体。

[0055] 表 1:基于 Eppendorf 的 ELISA 测试结果。- = 无结合, + = 低结合 ($OD < 1$), ++ = 中等结合 ($OD > 1 < 3$), +++ = 高度结合 ($OD > 3$), * = 洗涤后。

[0056]

抗体	人	马	猫	雪纳瑞/ 拉布拉多犬	澳大利亚牧羊犬	贵宾犬			约克夏梗犬				西高地梗犬	
						1	2	3	1	2	3	4	1	2
B7.3	-	-	-	+	+	++ *	++ +*	++ **	+	++ *	+	+	++ +*	++ +
B18-4.3	-	-	-	+++	+++	++ +*	++ +	++ +	++ +*	++ +	+	++ *	++ +	++ +

[0057] 抗体结合和功能性 (functionality)

[0058] 建立了另一种 ELISA,以能够定量比较两种抗体 B7.3 和 B18-4.3 与毛发的结合。将犬的毛发切成 2-5mm 长的小段并溶于 PBS (5mg/ml) 中。将 200 μ l 的这种悬浮液吸移入 96 孔微量滴定过滤板 (Multiscreen HTS,膜孔径 1.2 μ m, Millipore) 的每个孔中。通过离心将缓冲液和底物进行交换,以致在这些程序中微量滴定过滤板中的毛发不会减少。

[0059] 在预备实验中将 1mg 毛发 (= 孔) 结合的最大抗体量确定为 5-10ng (取决于犬的品种和抗体)。因此,多数实验以 2.5 或 5ng/ 孔进行。

[0060] 为了检查两种抗体与各种犬品种的毛发的结合,用以下犬的毛发进行了微量滴定过滤板 ELISA:西高地梗犬、德国牧羊犬 (来自腹部的毛发)、约克夏梗犬混种、爱尔兰塞特犬 (Irish setter)、德国硬毛梗犬 (Germanwired-hair terrier)、松狮犬 (Chow-chow)、贵宾犬、小明斯特兰德犬 (smallMunsterlander)、比格犬、德国牧羊犬 (来自背部区域的毛发)、霍夫瓦尔特犬 (Hovawart)、西施犬 (Shih-tzu)、狐狸犬 (Spitz)、边境柯利牧羊犬 (Border collie)、拉布拉多犬、Mongrel (来自背部的毛发)、Mongrel (来自腹部的毛发)、伯瑞犬 (Briard)、澳大利亚牧羊犬。在该测试中还包括人的毛发。获得的所有数值相对于

西高地梗犬进行校正（图 1）。

[0061] 还使用共焦显微镜,通过免疫荧光成像来证明纯化的抗体与毛发表面的结合。例如,抗体 B7.3 显示出与约克夏梗犬毛发的强烈结合。当仅应用 ALEXA564 标记的山羊抗小鼠二抗时,没有观察到荧光,这证明了 B7.3 对于毛发表面的特异性。在应用抗体前,用丙酮处理毛发,导致荧光信号减少。当用温和的去污剂洗涤毛发样品时也观察到相似的结果。

[0062] 抗体的完整性、稳定性和功能性

[0063] 为了证实抗体重链和轻链的完整性,通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对纯化的蛋白进行分析。抗体 B7.3 具有预期大小的完整的重链和轻链,而抗体 B18-4.3 的两条重链带均比全长重链小（大约 44 和 47kDa,而不是 55kDa）（图 2）。这些突变的重链之一是 C2 结构域末端处的移码突变的结果,移码突变产生早熟的终止密码子（premature stop codon）。另一条突变的重链的起源仍然未知。没有观察到 B7.3 和 B18-4.3 重链的降解产物,这证明了纯化抗体的完整性。

[0064] 为了分析稳定性,使用基于 Eppendorf 的 ELISA 在异丙醇的存在下进行单克隆抗体的结合试验。在 30%（v/v）异丙醇的存在下,经 4 个月的时期,在 4℃ 下,单克隆抗体 B7.3 显示出稳定的结合。于 4℃ 将抗体保存在 40% 或 50%（v/v）异丙醇中时,仍然存在与犬毛发的结合,这证明了该蛋白的高度稳定性。此外,在 22℃ 下,在 20%（v/v）异丙醇的存在下,抗体 B7.3 是稳定的。

[0065] B18-4.3 的稳定性更佳。在 40%（v/v）异丙醇的存在下,该单克隆抗体在 4℃ 下储存 4 个月时间后,显示出与毛发的稳定结合。

[0066] 另外,在含有 6%（v/v）Luviskol VA 64W（BASF）、5%（v/v）LuviquatPQ 11PN（BASF）、0.3%（v/v）Pluracare E400 PEG-8（BASF）、0.2%（v/v）Q2-5220 树脂（Dow Corning）和 15%（v/v）异丙醇的制剂溶液中测试了单克隆抗体的稳定性和功能性。在 4℃ 下,在制剂中储存 3 天之后,使用基于 Eppendorf 的 ELISA 测试了抗体的结合,其表明,B7.3 和 B18-4.3 在制剂中具有高度稳定性。

[0067] 抗体结合能力（capacity）

[0068] 为了确定最大结合能力,使用确定数目的约克夏梗犬毛发（20 根,每根长 20mm）,以基于 Eppendorf 的 ELISA 对 B18-4.3 的稀释液进行测试。每个 Eppendorf 管中的毛发表面积对应于 3.15mm²。根据 ELISA,2.5-5.0ng 的抗体 B18-4.3 与 3.15mm² 的毛发表面结合。

[0069] 抗体的生物素化

[0070] 为了分析结合伴侣（binding partners）对抗体功能性的影响,使纯化的单克隆抗体生物素化,然后与抗生物素蛋白珠粒结合,通过 FACS 分析进行证实（图 3）。使用基于 Eppendorf 的 ELISA 分析与犬毛发的结合。通过与 HRP0 偶联的抗生物素蛋白检测生物素化的抗体 B7.3 和 B18-4.3 的结合,其证明生物素化和结合伴侣不影响抗体的功能性。

[0071] 抗体与珠粒的融合

[0072] 为了分析与珠粒偶联的单克隆抗体的结合,用含有 0.5%（v/v）吐温 20 的 1x PBS 预处理来自西高地梗犬的毛发,以除去污染物和非紧密固定的抗原结构。然后,施用生物素化的抗体 B18-4.3（0.8mg/mL）,并使用链霉抗生物素蛋白包被的 FITC 荧光珠粒（Kisker）检测结合的抗体。珠粒尺寸为 0.8μm。此外,将生物素化的抗体 B18-4.3 偶联至链霉抗生物素蛋白包被的 FITC 荧光珠粒,将复合物施用到毛发样品,以分析结合（图 4a）。

[0073] 实验显示,即使在 60℃下,用含有 300mM KBr 的 Tris- 缓冲液 (pH 8.8) 将毛发洗涤预处理,加载于 1 μ m 偶联了中性抗生物素蛋白的荧光球 (fluosphere) (Invitrogen) 上的生物素化的 B18-4.3 仍然显示出对比格犬毛发的高度结合。这表明了毛发表面上抗原的高度稳定性 (图 4b)。

[0074] 在 2 μ m 珠粒的情况下,这种效应较不显著,这可能表明加入的珠粒被毛发表面上存在的几种抗体结合。重要的是,用 10 μ m 珠粒进行的实验是阴性的。由于在洗涤程序过程中损失珠粒,所以没有观察到染色。

[0075] 通过共焦显微镜进行的毛发样品分析表明,抗体主要与毛发薄片的边缘结合 (图 5)。

[0076] 抗体结合位点的鉴定

[0077] 表 1 中显示的结果表明,通过使用温和去污剂洗涤毛发样品可以去除至少一部分表面抗原。抗原结构的去除导致抗体结合减少。但是,仍然可以检测到抗体结合,这证明相当大部分的抗原保持与毛发表面连接。

[0078] 用含有 300mM KBr 的 Tris- 缓冲液 (pH 8.8) 洗涤西高地梗犬的毛发并将此洗涤级分浓缩时,结果得到富集毛发表面蛋白 (eHSP) 的制剂。使用两种抗体 B7.3 或 B18-4.3 中的任一种,通过 SDS-PAGE 和免疫印迹对这些 eHSP 进行分析。结果显示 B7.3 与大小为 32KDa 和 38KDa 的结构结合,而 B18-4.3 在 21KDa、28KDa 和 40KDa 处检测三条带 (图 6)。因此,两种抗体具有不同的特异性。

[0079] 可变抗体链的克隆

[0080] 为了得到单克隆抗体的遗传信息,克隆了决定抗体结合特异性的可变抗体结构域。进行了以下步骤:

- [0081] • 从杂交瘤克隆中分离 RNA
- [0082] • 逆转录为 cDNA
- [0083] • 通过 PCR 从抗体重链和轻链扩增可变区
- [0084] • 使用剪接重叠延伸 (SOE)PCR,通过短的接头片段将两个可变结构域融合
- [0085] • 将单链抗体 (scFv) 片段克隆进入细菌载体
- [0086] • 转化细菌
- [0087] • 分离质粒并测序

[0088] 通过测序证实 scFvB7.3 和 scFvB18-4 基因的完整性。

[0089] 对 ScFvB18-4 测试其与犬毛发的结合。通过 ELISA 证明单独的 scFvB18-4 或通过生物素-抗生物素蛋白与珠粒偶联的 scFvB18-4 与毛发样品的结合。

[0090] 毛发特异性抗体 B7.3 和 B18-4.3 与犬、猫、马和人毛发的结合

[0091] 通过 ELISA 将每个毛发样品测量三次。图表给出样品的平均值和标准差。平行地进行两个 ELISA,每个图表是一个 ELISA 的结果。当相同的样品同时出现在两个图表 (西高地梗犬、欧洲家猫) 中时,使用一个毛发样品吸移入两个 ELISA 板。

[0092] 每孔吸移入 1mg 毛发。用 PBS 中的 2% (w/v) 奶粉进行封闭 1 个小时。使用 PBS 中的浓度为 50ng/ml 的 B7.3 或 B18-4.3 作为一抗,其中每个孔使用 100 μ l 抗体溶液。在室温下孵育 1 个小时。二抗是与过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 (抗 IgG、IgM 和 IgA);将抗体在 PBS 中进行 1 : 5000 稀释,每个孔使用 100 μ l。在室温下孵育 1 个小时。最后每个孔

以 100 μ l 底物 ABTS 孵育 42 分钟。在 405nm 处读取所得的颜色反应。在各个步骤之间用 200 μ l 的 PBS-T 将板洗涤两次。作为对照,将每种毛发样品的三个孔用非特异性小鼠抗体孵育,其它处理如上所述。对于相同的毛发样品,从以 B7.3 和 B18-4.3 获得的结果中减去每个对照的平均值(图 7)。

[0093] 马毛发特异性抗体的产生

[0094] 通过将小鼠免疫然后使用杂交瘤技术来产生马毛发特异性抗体。将来自马的毛发用 PBS-T 洗涤(1xPBS,吐温 20,0.05%)并使用匀浆器切碎。切碎的毛发长度大约为 200 μ m。

[0095] 用洗涤的、切碎的马毛发将两只小鼠免疫。将最多 80 μ g 毛发样品(= 20 μ L 切碎的毛发)与 40 μ L GERBU 佐剂和 50 μ L 1x PBS 混合,并用于免疫。在 7 月 8 日、7 月 22 日、8 月 5 日、8 月 18 日、8 月 26 日和 9 月 8 日将小鼠免疫六次,在 9 月 10 日将小鼠杀死。分离脾细胞并与骨髓瘤融合,以产生杂交瘤。用如上所述的 ELISA 方案筛选产生马毛发特异性抗体的多克隆杂交瘤克隆。将 1x PBS 中的切碎的马毛发包被至低结合性 96 孔微量滴定板上。加入杂交瘤细胞培养上清液之后,使用与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗小鼠(GAM)二抗检测特异性抗体的结合。为了检测抗体与毛发的结合,使用 ABST 底物,孵育 30 分钟后在 405nm 处测定吸光度。鉴定出总共 21 个与毛发样品结合的多克隆杂交瘤克隆(HF 1-21)。但是,由于包被的是切碎的毛发,所以选择与存在于毛发内部的抗原结合的抗体和与毛发表面上的抗原结合的抗体两者;培养单个细胞,以进一步产生单克隆。

[0096] 为了鉴定识别毛发表面上的结构的结合者,使用微量滴定过滤板 ELISA(参见抗体结合和功能性,第 10 页)测试来自单克隆杂交瘤系的抗体。将 0.3mg 马、犬、猫和人的毛发加入到微量滴定过滤板上的单独的孔中,与每个待测试单克隆的 100 μ L 杂交瘤上清液平行孵育。如上所述进行测试。通过使用经辣根过氧化物酶(HRPO)标记的二抗和 2,2'-连氨基-双 3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)反应剂(作为 HRPO 的底物)来显现结合的抗体。在室温下孵育 30 分钟后在 405nm 处测量显色。可以看到抗体 HF 17.6 与马毛发的清晰的特异性结合(相比于犬、猫和人的毛发);低信号可能是由于制剂中抗体较少,因为仅在选择单克隆 2 天之后就进行测试,存在很少的产生抗体的细胞。

[0097] 表 2:单克隆抗马毛发抗体 HF 17.6 与四个不同物种毛发的结合。如上所述进行 ELISA。评价抗体 HF17.6 与马、犬、猫和人的毛发的结合。给出的数值是用 ABTS 孵育 30 分钟后在 405nm 处的吸光度(减去背景)。

[0098]

克隆	对切碎的马毛发的 ELISA 中,在 405nm 处的吸光度	对切碎的犬毛发的 ELISA 中,在 405nm 处的吸光度	对切碎的猫毛发的 ELISA 中,在 405nm 处的吸光度	对切碎的人毛发的 ELISA 中,在 405nm 处的吸光度
HF17.6	0.081	0.007	0	0

[0099] 猫毛发特异性抗体的产生

[0100] 通过将小鼠免疫然后使用杂交瘤技术来产生猫毛发特异性抗体。使用匀浆器将切自欧洲短毛猫的毛发切碎。切碎的毛发长度大约为 200 μ m。

[0101] 用切碎的猫毛发将两只小鼠免疫。将最多 80 μ g 毛发样品 (= 20 μ L 切碎的毛发) 与 40 μ L GERBU 佐剂和 50 μ L 1x PBS 混合, 并用于免疫。在 7 月 1 日、7 月 15 日、7 月 29 日、8 月 12 日、8 月 26 日和 9 月 1 日将小鼠免疫六次, 在 9 月 3 日将小鼠杀死。分离脾细胞并与骨髓瘤融合, 以产生杂交瘤。用如上所述的 ELISA 方案筛选产生猫毛发特异性抗体的多克隆杂交瘤克隆。将 1x PBS 中的切碎的猫毛发包被至低结合性 96 孔微量滴定板上。加入杂交瘤细胞培养上清液之后, 使用与辣根过氧化物酶 (HPR) 偶联的山羊抗小鼠 (GAM) 二抗检测特异性抗体的结合。为了检测抗体与毛发的结合, 使用 ABST 底物, 孵育 30 分钟后在 405nm 处测定吸光度。鉴定出总共 73 个与毛发样品结合的多克隆杂交瘤克隆 (C2 1-73)。但是, 由于包被的是切碎的毛发, 所以选择与存在于毛发内部的抗原结合的抗体, 以及与毛发表面上的抗原结合的抗体两者。为了选择与猫毛发特异性结合的抗体, 6 天之后在人毛发上进行相同类型的 ELISA。下表中给出的吸光度证明相比于人毛发, 与猫毛发的优异结合, 这表明在多克隆杂交瘤克隆中产生了猫毛发特异性抗体。

[0102] 表 3: 通过 ELISA 分析多克隆抗猫毛发的抗体与猫或人的毛发的结合。如上所述进行 ELISA。孵育 30 分钟后测定 ABTS 的吸光度 (未减去背景)。Abs = 吸光度。

[0103]

克隆	对切碎的猫毛发的 ELISA 中, 在 405nm 处的 Abs	对碎的人毛发的 ELISA 中, 在 405nm 处的 Abs
C2-2	0.89	0.26
C2-32	0.93	0.24
C2-43	0.99	0.27
C2-45	0.92	0.22
C2-47	1.15	0.2
C2-50	0.86	0.22
C2-68	0.93	0.2

[0104] 实施例

[0105] 在下面的部分中, 提供了本发明的有用实施方式的例子。其证明通过与犬毛发选择性结合的抗体附着至犬毛皮的含有药物的微粒如何能够在延长的时期内保护动物抵抗有害昆虫 (在本例子中为蜚) 而没有刺激皮肤的副作用。

[0106] 将市售的局部用寄生虫杀虫剂制剂施用到动物毛发的一种常见方法是使用所谓的“点式”制剂, 其中将小体积的含有药物的溶液铺展 (deployed) 至动物的颈部皮肤上, 其具有经常引起对皮肤的严重刺激的缺点。抗有害昆虫的保护时期受到限制, 例如在蜚的情况下通常为 4 周。其它类型的具有分子分散的杀螨剂的制剂存在同样的问题。

[0107] 显示当抗体与微粒的表面偶联时, 保留了抗体的独特性质——与毛发发生物种特异性结合。证明抵抗蜚的效力 (杀螨剂效力 > 90%) 持续至少 3 至 4 周。可显示降至 >

70%的效力持续另外 4 周,这可能是由颗粒的持续释放特性造成的。同样描述了将抗体与微粒表面上的官能团连接的有用方法和对动物毛皮的合适的施用方法。

[0108] A) 含有药物的微粒的组成及制备

[0109] 颗粒由聚合物制成。由于它们的尺寸介于 1-10 μm ,它们在毛皮上不可见。将活性成分包胶囊(encapsulated),并通过扩散持续释放。可以通过颗粒设计(聚合物类型、分子量、添加剂)在宽范围内控制释放。用连接抗体必需的官能团(例如胺或羧基)将颗粒表面改性。

[0110] 在优选的实施方式中,通过溶剂蒸发技术将颗粒复合(compounded)。因此,活性成分(在本实施例的情况下为拟除虫菊酯氯苯氟菊酯(3-[2-氯-2-(4-氯苯基)乙烯基]-2,2-二甲基环丙烷羧酸酐(4-氟-3-苯氧基苯基)甲酯,CAS Nr. 69770-45-2))和聚合物(在本例中为聚苯乙烯)溶解于二氯甲烷。将乳化剂(含有与聚苯乙烯相容(混溶)的聚合物链段和用作亲水乳化部分(moeity)的羧基基团 COOH 的共聚物)分散在水中。然后在 Ultra Turrax 搅拌器的帮助下将油相分散在水中,用 Microfluidizer 将混合物匀浆。通过显微镜控制液滴的尺寸。可以将 pH 设定为碱性范围,以便促进乳化。然后将乳液边搅拌边加热至 60°C。在该温度下蒸发二氯甲烷。乳液变成悬浮液,其中游离 COOH 提供亲水表面。可以通过粒度仪(mastersizer)控制粒度。通过 HPLC 分析活性成分的量。在本给定实施例的情况下,固体聚苯乙烯微粒中氯苯氟菊酯的含量为 18% m/m。将这种微粒的制剂编号定为 7c_6+7_EE。

[0111] 用相同的方式制备加载有荧光染料(在本例中为 Uvitex(2,5 噻吩二基(thiophenediyl)双(5-叔丁基-1,3 苯并噁唑),CAS No. 7128-64-5,435nm)的微粒。用染料替换活性成分。这些颗粒的功能是使抗体介导的微粒与毛皮的结合显现,因为可以容易地用荧光显微镜将它们检测。

[0112] 在另一个实施方式中,通过浸泡方法加载微粒。向 10ml 的 15%聚苯乙烯微粒分散体(用表面 COOH 基团改性)中加入 2.4ml 含有适量氯苯氟菊酯的二氯甲烷相。然后在环境温度下振荡 24 小时。然后在减压(150-50mbar)下蒸发溶剂二氯甲烷。将分散体反复离心,并用乙醇/水混合物洗涤沉淀,以去除未包胶囊的和表面结合的氯苯氟菊酯。重新离心后,将沉淀重新分散于水中并冻干。编号为 BU 163 的微粒中含有 9% m/m 的药物。

[0113] B) 抗体与微粒表面的连接

[0114] 通过以下方法实现毛发特异性抗体与药物递送颗粒的偶联:

[0115] 通过加入特定量的 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC;2mM)将羧酸根改性颗粒(carboxylate modified particles)活化。然后通过加入 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS;5mM)使活化形式稳定。该活化的酯复合物与来自抗体的伯胺和仲胺反应,从而在颗粒和抗体之间形成共价酰胺键合。在微粒类型 7c_6+7_EE 的情况下,将 80ml 2.18% m/V 溶液与 29ml 抗体溶液混合,所述抗体溶液中含有 69.6mg 抗体混合物(B7.3/B18-4.3 的比率 = 1 : 1)。用相似的方式使 BU 163 具备抗体。

[0116] 该方法描述于文献中(Hermanson, G. T. :Bioconjugate techniques. Academic press, San Diego, 1996)。

[0117] C) 抗体介导的微粒与犬毛皮(fur)的特异性偶联

[0118] 通过活性成分的光谱检测给出具备抗体的微粒与犬毛皮特异性结合的证据。将多

孔板部分填充等量 (mg) 的犬和人的毛发。孔的底部是孔径为 30-40 μm 的过滤器。然后在那些含有毛发的孔中填充含有携带抗体的微粒 7c_6+7_EE 的悬浮液。然后将多孔板离心, 以便通过将上清分散体压迫通过 30-40 μm 孔而去除液体和所有未结合的颗粒。未与毛发结合的颗粒因为粒度仅为 1-10 μm 而通过过滤器。结合于毛发上的颗粒保持附着在孔内的毛发上。用含有 0.05% 吐温 20 的缓冲液将毛发洗涤 5 次。每次洗涤之后, 通过离心再次去除缓冲液。在这之后, 向孔中加入乙腈 (其溶解药物, 但不溶解毛发或多孔板的材料)。乙腈将所有包胶囊的药物从微颗粒中提取出来。先前通过 HPLC 证明了活性成分的定量去除。然后将孔底没有洞的透明多孔板置于含有毛发的多孔板下面。其由仅显示很少 UV 吸光度的聚合物制成。将乙腈离心进入透明多孔板的孔中。可以通过 268nm 处的 UV 光检测乙腈溶液中的活性成分。校准后, UV 读数器能够检测存在于孔中的药物的量, 因此间接证明微粒附着于犬或人的毛发。与毛发连接的微粒越多, UV 信号越强。这个相关性是线性依赖的 (图 8)。

[0119] 图 (图 8) 证明相当大量的具备抗体的微粒与犬毛发结合。犬毛发取自几个不同品种 (德国牧羊犬、柯利牧羊犬、梗犬 (terrier)、狐狸犬 (spitz)、雪纳瑞 - 拉布拉多犬混种、柯利, $n = 3$)。相反, 只有少量的微粒与人毛发结合 (三位不同女性, 未处理的未染色的头发, $n = 3$), 这证明当抗体与微粒表面结合时, 保持了抗体的活性毛发结合结构域的物种选择性。还证明抗体与动物毛发的结合强度足够强, 以经受至少 5 次缓冲液洗涤循环。

[0120] 仪器: ELISA: SynergyTMHT, BioTek; 显微镜: Biozero BZ-8100E, Keyence

[0121] C) 作为喷雾制剂, 对动物毛皮施用

[0122] 在制剂的一个有用实施方式中, 将具备抗体的含有药物的微粒作为喷雾制剂对动物毛皮施用。

[0123] 在给出的实施例中, 对犬施用 6mg 包胶囊的氯苯氟菊酯/kg 体重。比格犬平均重量为 11kg。由于微粒中药物浓度为 18% m/m, 因此对动物施用 367mg 具备抗体的微粒 7c_6+7_EE (含有 66mg 氯苯氟菊酯)。取决于颗粒的活性成分浓度和所需的药物量, 这个数值将变化。对于颗粒 BU 163 来说, 使用 733mg, 因为药物含量为 9% m/m。将 100mg 荧光颗粒和计算量的载有药物的微粒分散于适量的水中。在本实施例情况中, 使用 30ml 水。加入少量表面活性剂 (在本实施例中为 0.01% 吐温 20), 以促进制剂在有时油腻 (fatty) 的犬毛发上铺展。将该分散体填充入配备泵式喷雾器头的普通瓶子中, 所述喷雾器头适合于喷洒颗粒悬浮液而不阻塞阀门, 并且是现成的 (ready to use)。

[0124] 在犬毛皮上到处均匀喷洒分散体, 允许微粒均匀分布至犬毛发上。

[0125] E) 体内研究: 抵抗犬上的蜱 (褐犬蜱 (Rhipicephalus sanguineus)) 的功效

[0126] 本研究的目标是评价两种不同的喷雾制剂 (含有通过抗体与犬毛皮结合的载有氯苯氟菊酯的微粒) 对经褐犬蜱 (Rhipicephalus sanguineus) 实验性侵扰的犬的抗蜱功效 (表 4)。

[0127] 本研究中使用 9 只犬, 每组三只犬, 共三组。在整个研究时期, 将每只犬圈养于单独的笼子中。

[0128] 在研究日 (SD)-1, 肌肉注射大约 0.1ml/kg BW 盐酸氯胺酮 (Ketaminhydrochlorid) (Ketamin®10%) 与大约 0.1ml/kg BW 盐酸赛拉嗪 (Xylazinhydrochlorid) (Xylazin®2%) 的组合, 使所有的犬镇静。在镇静过程中所有犬以胸骨或侧面斜躺在地板上, 将 50 只褐犬

蜱 (Rhipicephalus sanguineus) (25 ♀, 25 ♂) 释放到犬的背上。犬睡觉 1 至 1.5 小时, 从而防止在蜱能够附着之前将其除掉。

[0129] 在 SD 0, 通过对全身表面的充分 adspersion/ 触诊来测定蜱侵扰率 (但不去除蜱): 头、耳、颈、侧区 (lateral areas)、肩胛骨至尾基 (base of tail) 的背部长条 (dorsal strip)、尾和肛门区域、前腿和肩部、后腿、胸至后腿内侧的腹部区域、脚。对所有活的附着的雌性蜱进行计数, 基于蜱的数目, 将犬随机分配为三个研究组。

[0130] 蜱计数后第 0 天进行处理。对照组的犬不进行处理, 用作阴性对照组。对两个处理组的犬剂量给予 IVP (Investigational Veterinary Product) 一次。每个 IVP 体积为 30ml, 含有 66mg 的氯苯氟菊酯作为活性成分。与体重无关, 每只犬均接受总共 30ml 的量。在犬站立条件下, 将 IVP 均匀喷洒至每只犬的全身。

[0131] 表 4: 用于体内实验的微颗粒制剂综述以及关于剂量的信息

[0132]

组	IVP	剂量 [mg/kg BW]	总施用体积
1	7c_6+7_EE	6 mg/kg BW; 犬平均体重 11kg → 66mg/犬	30 ml
2	BU 163		
3	对照	n.a.	n.a.

[0133] n. a. 不适用

[0134] 在进行处理的当天 (研究日 SD 0), 在处理之后 2 小时和 4 小时观察犬的不良事件 (adverse events)。所有的犬均对处理良好耐受。在 SD 2, 按照与 SD 0 相同的方式对蜱进行计数, 但是将蜱去除。将蜱鉴定为自由的或附着的、充血的 (engorged) 或非充血的 (unengorged)、活的或死的蜱。在有规律的间隔内, 以相同的方式对每只犬进行重新侵扰, 48 小时后按所述方式进行蜱的计数。所选的间隔为处理后 1、3、7 和 9 个周, 例如在 SD 5、20、48、和 61 进行蜱的侵扰, 两天之后在 SD 7、22、50 和 63 进行蜱的计数。

[0135] 除了每个蜱计数日 (侵扰后 48 小时) 之外, 以有规律的间隔获取每只犬的 100mg 毛发。从犬的全身获取毛皮样品: 肩、背、从尾部开始处、臀部, 并通过荧光显微镜进行调查。在施用制剂之后第 2、7、14、42 和 63 天获取毛发样品。

[0136] 在蜱计数程序的过程中对所有的犬进行详细的一般健康情况观察。特别注意皮肤刺激。在整个研究过程中没有观察到由于处理导致的皮肤刺激。

[0137] 蜱计数用于评价 IVP 的功效。用按照指南 EMEA/CVMP/005/00-Final 中描述的推荐用于控制测试的修改的 Abbott 公式来计算百分比功效:

[0138]

$$\% \text{功效} = (N2 - N1) / N2 \times 100$$

[0139] N1 = 用 IVP 处理的组的几何平均蜱计数

[0140] N2 = 对照组的几何平均蜱计数

[0141] “蜱计数”定义为“代表处理失败的蜱”。在测定治疗功效的情况下 (SD 2), 只有活蜱被认为是处理失败, 而在测定预防功效的情况下 (其余所有的计数时间点), 活蜱和死的

充血的蜱被认为是处理失败。

[0142] 如果在处理和每周重新侵扰 48 小时之后功效达到 $> 90\%$ ，则认为活性成分是高有效度的。应该经 3-4 周时期给出功效。

[0143] 表 5：计算的功效 [%]

[0144]

组	SD 2	SD 7	SD 22	SD 50	SD 63
处理组 1	97.2	100	97.4	78.3	56.2
处理组 2	63.4	94	97.4	85.2	29.4

[0145] 实现了在 3-4 周时期中显示超过 90% 的功效的最低目标（表 5）。鉴于颗粒中氯苯氟菊酯的高浓度，这种施用形式显然保护动物免受皮肤刺激。

[0146] 处理后 (post treatment) 50 天以后，降低的功效仍然是显著的。 ≥ 50 天的研究期以后从微粒释放的氯苯氟菊酯可能不足以在动物皮肤上保持活性水平的氯苯氟菊酯。试验的最初几周期间的更好保护可能是由于某一部分的游离氯苯氟菊酯和早期来自颗粒的较高扩散率（由于基质内高浓度的氯苯氟菊酯）造成的。

[0147] 通过荧光成像，可以检测持久附着于犬毛皮的微粒。可显示，微粒通过抗体结合在整个实验期中保持附着于毛发（图 9 至 13）。注意，荧光染料标记的颗粒仅用作指示剂，其仅代表制剂中微粒总数目的 20%。随着时间推移，能够检测到的颗粒减少，部分原因是它们掉落下来，部分原因是荧光染料由于持续暴露于阳光而被漂白。

[0148] F) 得自实施例的结论

[0149] 所描述的实施例证明了本发明的一个非常有用的实施方式：适合于长时间内控制药物释放的含有药物的微粒装置，其中抗体与动物毛发（在本例中为犬的毛发）特异性结合。本发明的此项应用有多个优点：

[0150] ——其允许将寄生虫杀虫剂靶向特定的哺乳动物物种，因此当施用制剂时或者当不同的物种相互作用时（例如玩耍或舔），显著降低交叉施用或药物转移至例如人或其它哺乳动物物种的危险。

[0151] ——其允许将药物引导至动物毛皮，因此避免与皮肤大量接触，这降低了皮肤刺激或严重皮肤损伤的可能性。

[0152] ——将单一物种特异性抗体通过 COOH 、 NH_2 或其它基团与不同微粒表面连接并将微粒铺展至毛皮，该一般性原则允许为单一制剂选择各种不同的微粒类型（包含具有不同释放概况的不同药物的不同聚合物）。其允许在分散体中组合不同类型的微粒，因此将在其它形式上可能化学不相容的药物组合在单一制剂中。

[0153] ——合适微粒与适当药物释放概况的使用允许将药物功效延长至几周或几个月（取决于颗粒和药物类型），因此提供了将常见的局部施用液体杀虫剂和其它药物制剂的功效期显著延长的可能性。

[0154] ——微粒附着于动物毛发的强度足以克服与水的充分接触甚至是温和洗涤，例如当动物在下雨天气下闲逛或在池塘中游泳一段时间。在这种情况下，常规制剂通常需要重新施用。

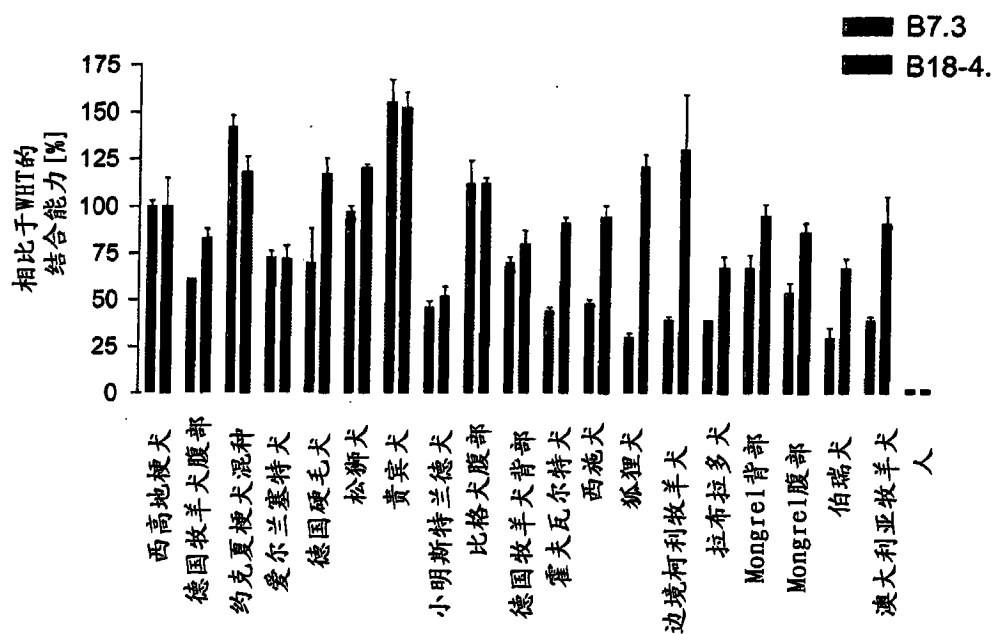


图 1

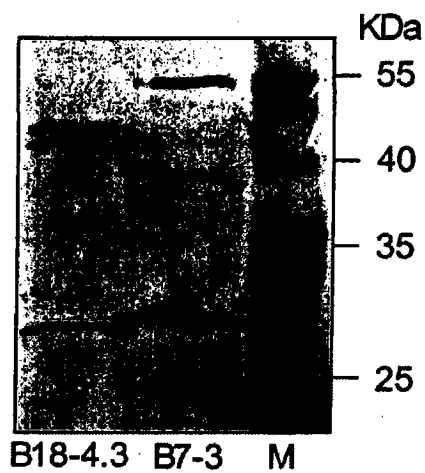


图 2

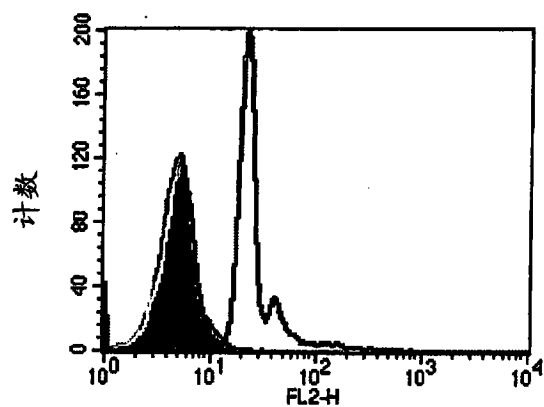


图 3

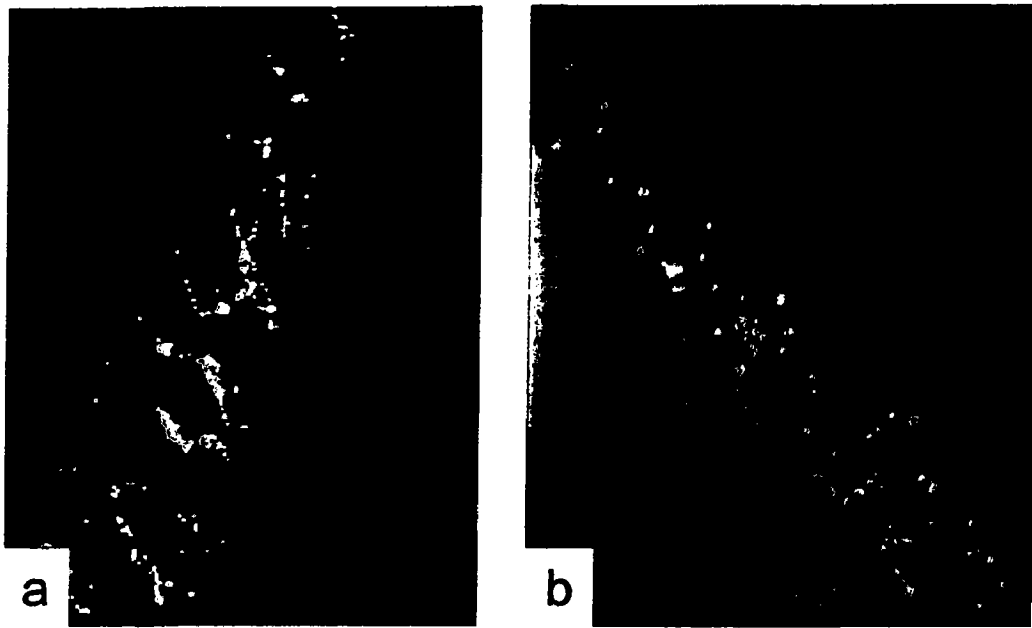


图 4

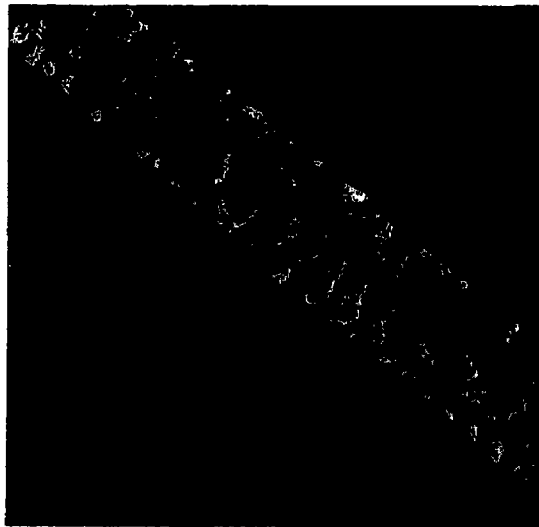
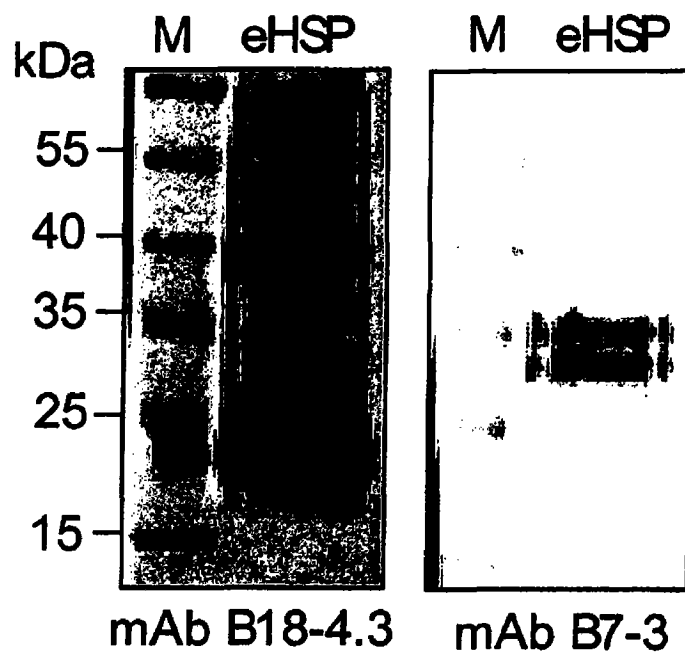


图 5



免疫印迹

图 6

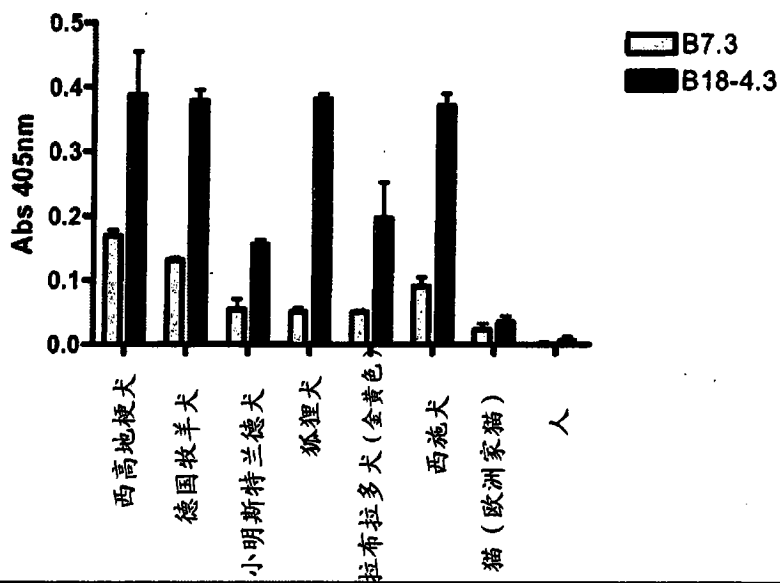


图 7a

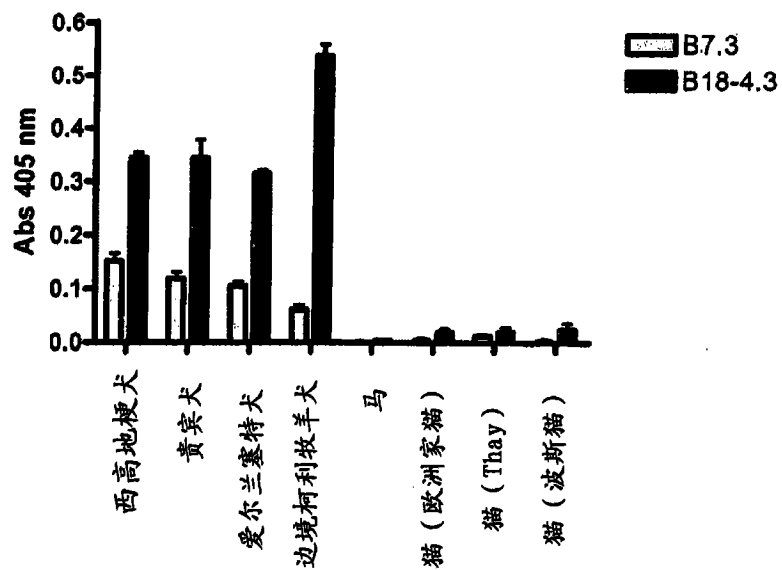


图 7b

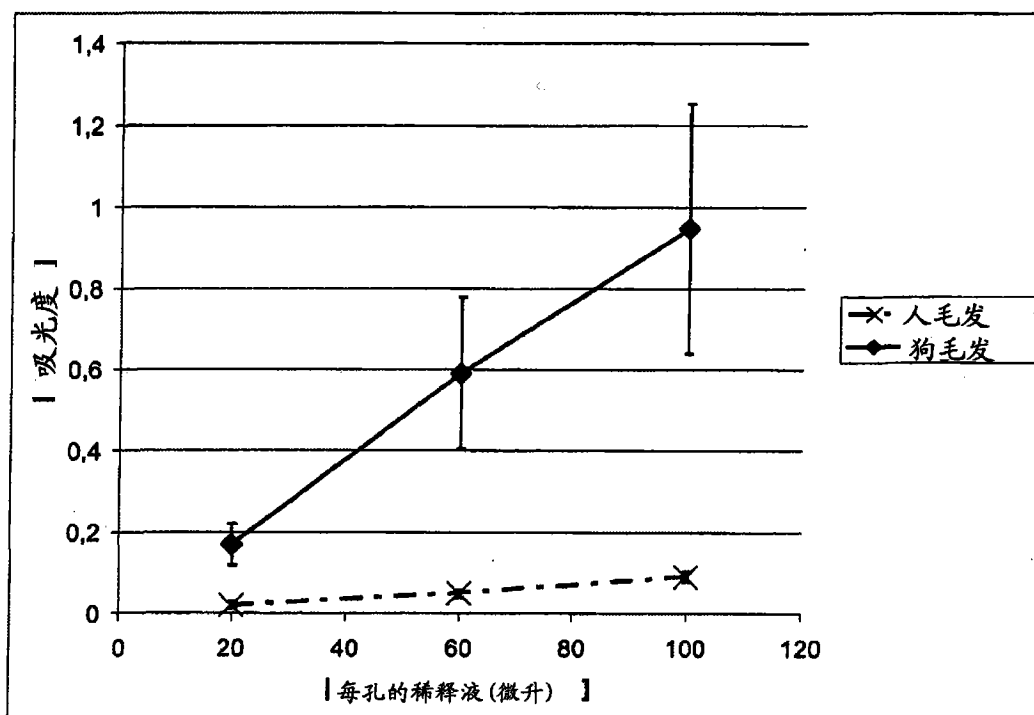


图 8



图 9 :施用后 2 天



图 10 :施用后 7 天

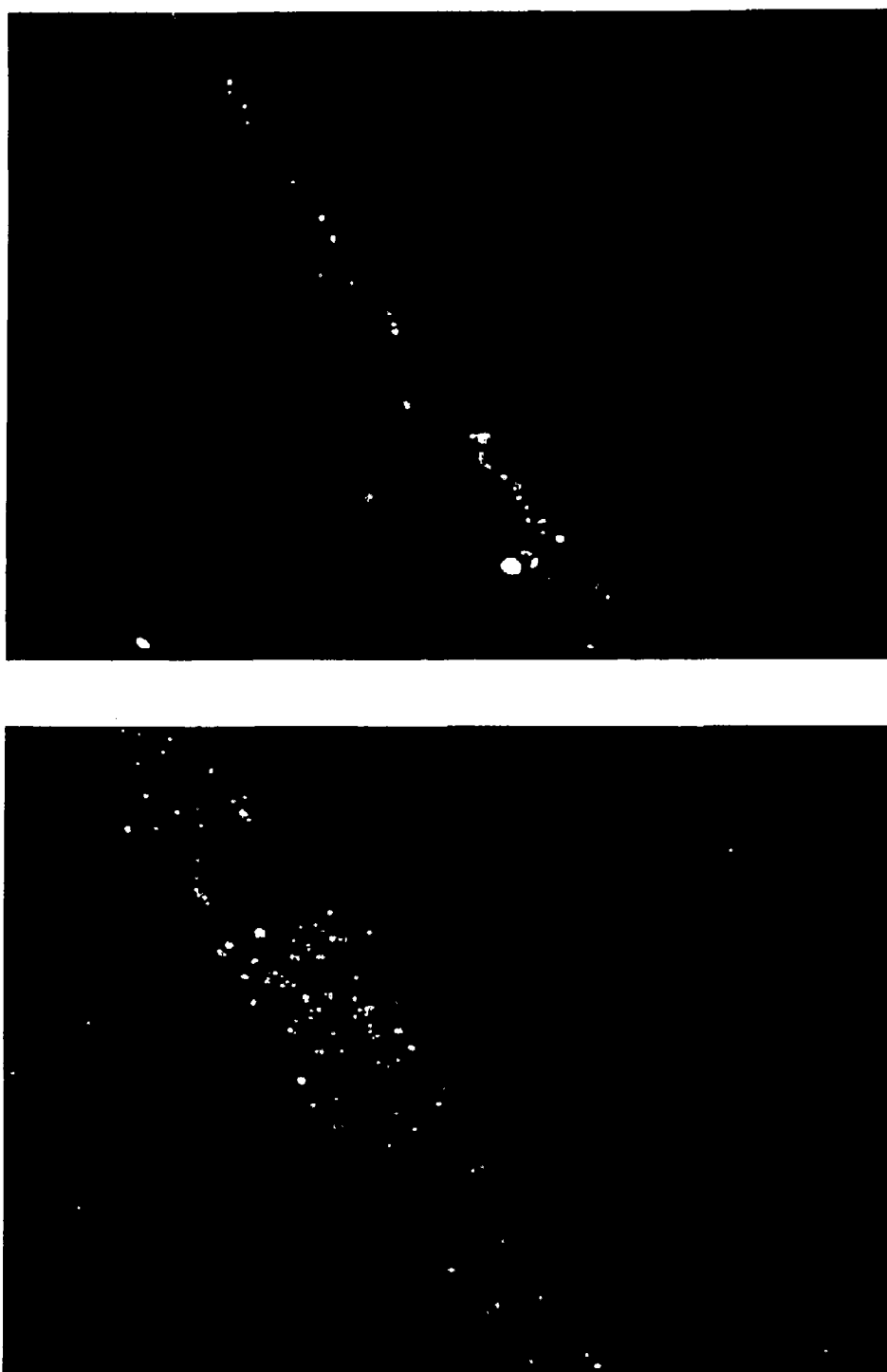


图 11 a(上)b(下):施用后 14 天

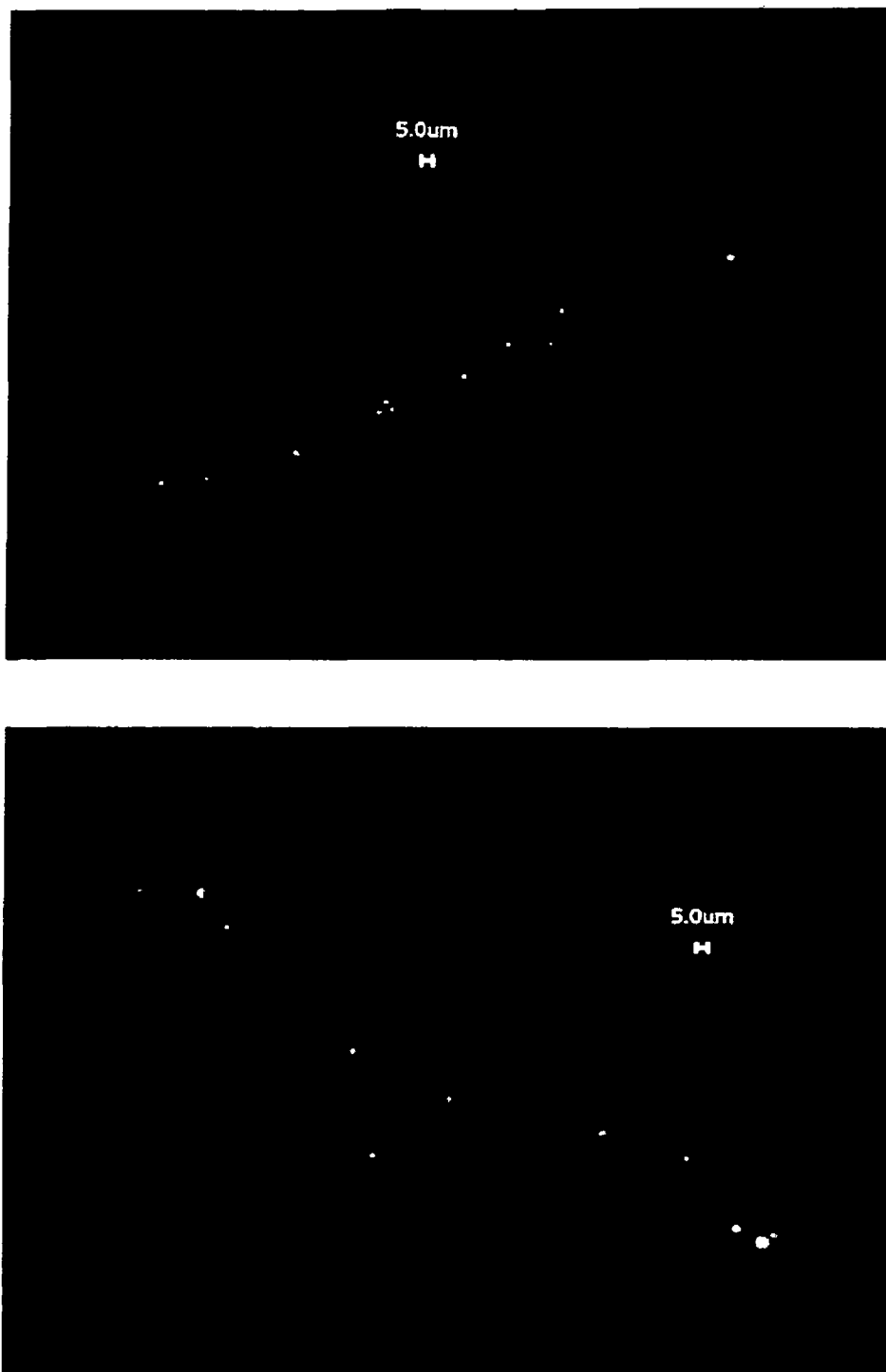


图 12 a 和 b :施用后 42 天

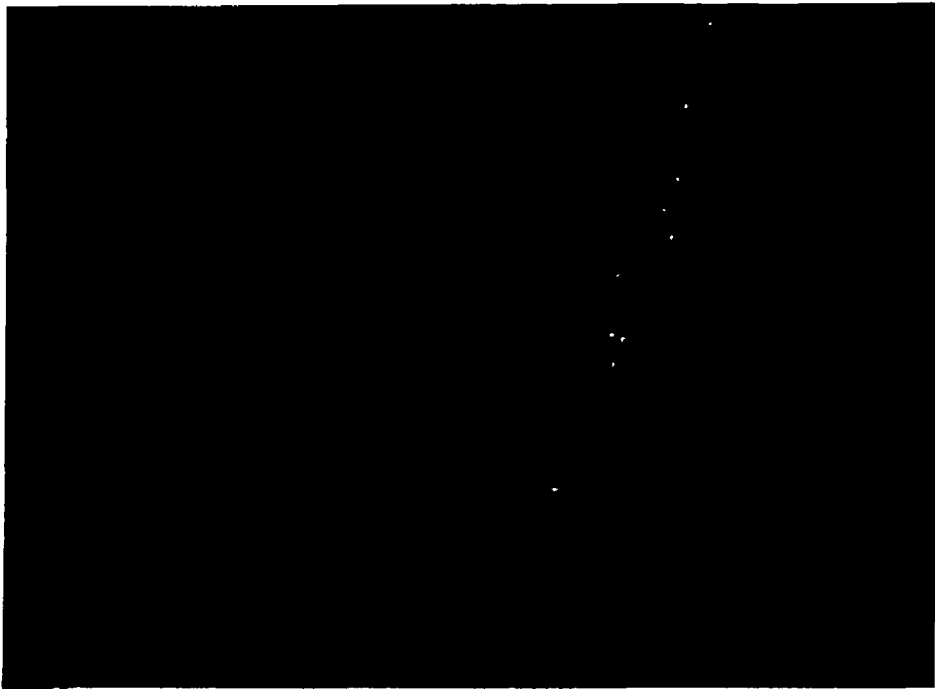


图 12c :施用后 42 天

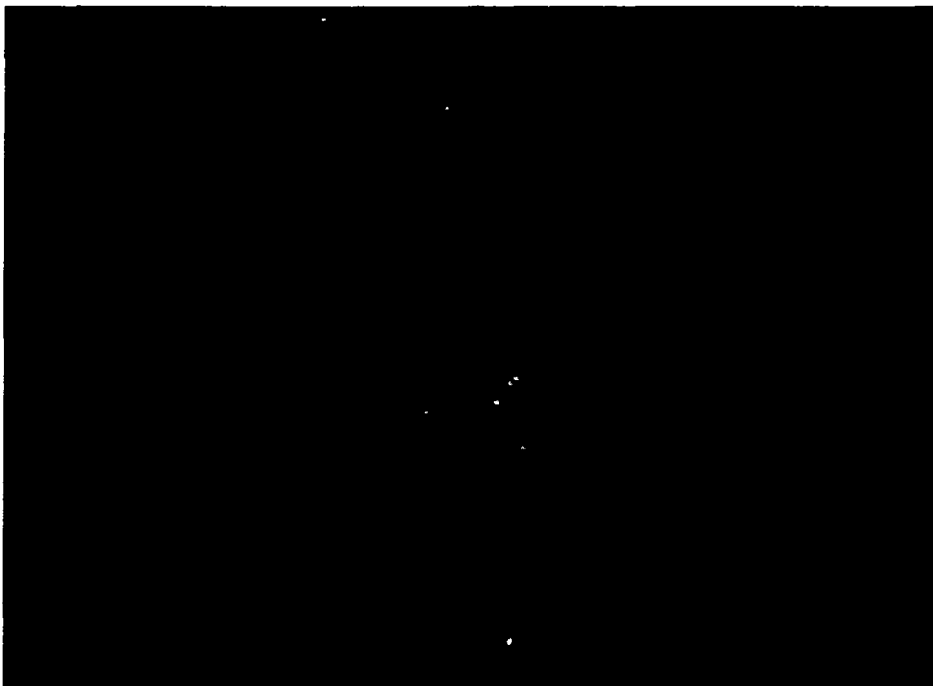


图 13 :施用后 63 天