

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00804453.8

A61K 9/127

A61K 38/19

A61K 39/39

A61P 37/00

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1230151C

[22] 申请日 2000.1.26 [21] 申请号 00804453.8

[30] 优先权

[32] 1999.1.27 [33] EP [31] 99101479.6

[86] 国际申请 PCT/EP2000/000597 2000.1.26

[87] 国际公布 WO2000/044349 英 2000.8.3

[85] 进入国家阶段日期 2001.8.30

[71] 专利权人 概念股份公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 G·切瓦科 A·乔普拉

审查员 卢立明

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 6 页 说明书 35 页 附图 14 页

[54] 发明名称 通过皮肤的非侵入性接种的透皮疫苗

[57] 摘要

本发明涉及用于预防性或治疗性疫苗的非侵入性透皮给予与超变形性载体结合的抗原的新型疫苗。疫苗包含(a)透皮载体,该载体是穿透剂,(b)能特异性释放或特异性诱导细胞因子或抗细胞因子活性或本身发挥该活性的化合物,和(c)抗原、变应原、抗原混合物和/或变应原混合物。本发明还涉及给哺乳动物进行疫苗接种以获得保护性或治疗性免疫应答的方法。

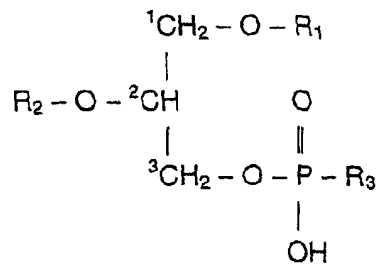
I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种透皮疫苗，它包含

(a)一种透皮载体，该载体呈微小液滴形式，这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或物质的两种不同形式的膜状包衣包围，所述物质或物质形式在水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍，

其中形成载体的聚集性物质中溶解度较低的物质选自下组：生物来源的脂质或脂质类物质，或是相应的合成的脂质或经修饰的脂质，这些脂质具有以下化学式的纯的磷脂类

10



其中 R_1 和 R_2 是脂族链， C_{10-20} -酰基或烷基，或部分不饱和的脂肪酸残基、油酰基、棕榈油酰基、反油酰基、亚油烯基、亚麻基、亚麻酰基、花生四烯酰基、牛痘基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基和硬脂酰基链，

15 其中 R_3 是氢、2-三甲基氨基-1-乙基、2-氨基-1-乙基、 C_{1-4} 烷基、羧基取代的 C_{1-5} 烷基、羟基取代 C_{2-5} 烷基、羧基和羟基取代的 C_{2-5} 烷基、或羧基和氨基取代的 C_{2-5} 烷基，以及氨基、环己六醇、鞘氨基醇或所述物质的盐，

所述脂质还选自甘油酯、类异戊二烯脂质、类固醇、硬脂酸精或甾醇、含硫或糖脂质、或任何其它形成双层的脂质、半质子化液态脂肪酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、鞘磷脂或其它鞘磷脂、鞘糖脂、神经节苷脂或其它糖脂或合成脂质，相应的鞘氨基醇衍生物，或其它糖脂，其中在二酰基和二链烯酰基化合物中两条相同或不同的链可以与骨架酯化，或以醚键与骨架相连，

25 其中在悬浮液中有较高溶解度且增加液滴适应性的物质是非离子型、两性离子型、阴离子型或阳离子型表面活性剂，其选自脂肪酸或脂肪醇，烷基-三/二/甲基-铵盐，烷基硫酸盐，胆酸、脱氧胆酸、甘氨酸、甘氨脱氧胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺胆酸的单价盐，酰基或烷酰基-二甲基-氨基氧化物，烷基或烷酰基-N-甲基葡萄糖酰胺，

N-烷基-N,N-二甲基甘氨酸, 3-(酰基二甲基氨基)-链烷磺酸盐, N-酰基-磺基甜菜碱, 聚乙二醇-辛基苯基醚, 聚乙烯-酰基醚、聚乙二醇-异酰基醚、聚乙烯-酰基醚、聚乙二醇-缩水山梨糖醇-酰基醚、聚羟乙烯-酰基醚或相应的酯, 或多乙氧基化的蓖麻油 40, 缩水山梨糖醇-单烷基化物, 酰基或烷酰基-N-甲基葡萄糖酰胺, 烷基硫酸盐, 脱氧胆酸钠, 甘氨酸脱氧胆酸钠, 油酸钠, 酒石酸钠, 溶血磷脂, 正-酰基-甘油磷脂酸、-磷酸甘油或-磷酸丝氨酸, 或相应的短双链磷脂或有表面活性的多肽;

从而使溶解度较大的物质或物质形式的均相团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述物质两种形式组成的非均相团聚体的平均直径小于溶解度较小的物质或物质形式的均相团聚体的平均直径, 和/或其中溶解度较大的组分有使液滴增溶的趋势, 且其中这些组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99 摩尔%或对应于非增溶液滴的饱和浓度的 99 摩尔%, 无论哪一个更高, 和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比血红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍; 其中透皮载体悬浮或分散在水性溶剂中;

(b)特异性释放或特异性诱导产生细胞因子或抗细胞因子活性或其本身发挥这种活性的化合物, 其中发挥细胞因子活性的化合物选自 IL-4, IL-3, IL-2, TGF, IL-6, IL-7, TNF, IL-1 α 和/或 IL-1 β , IL-12、IFN- γ 、TNF- β 、IL-5 或 IL-10、IFN- α 、I 型干扰素, 它的抗细胞因子抗体或相应的活性片段; 和

(c)抗原、变应原、抗原混合物和/或变应原混合物, 其中所述抗原是天然形式的或片段化或衍生处理后病原体或变应原的一部分, 变应原是异源或内源的、衍生自微生物、动物或植物, 或属于人造和/或刺激性无机物质, 或是经机体免疫系统错误加工或与机体免疫系统接触的人体部分或组分,

其中抗原总浓度为穿透剂总重量的 0.001-40 重量%, 选择每一个表现出细胞因子活性的化合物的使用浓度, 使其比用所选抗原剂量和免疫佐剂一起通过注射制剂进行测试或进行体外测试的对应试验中所确定的最适浓度高 1000 倍。

2. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比血红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 10 倍。

3. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中表现出或诱导出细胞因子或抗细胞因子活性的化合物以及抗原与穿透剂相结合。

4. 根据权利要求 1 或 3 所述的疫苗, 其中溶解度较低的自聚集性分子是极性脂质, 溶解度较高的组分是表面活性剂分子, 或是有足够溶解度的极性脂质形式。

5. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中穿透剂的平均直径在 30-500 纳米之间。

6. 根据权利要求 5 所述的疫苗, 其中穿透剂的平均直径在 40-250 纳米之间。

7. 根据权利要求5所述的疫苗,其中渗透剂的平均直径在50-200纳米之间。
8. 根据权利要求5所述的疫苗,其中渗透剂的平均直径在60-150纳米之间。
9. 根据权利要求1所述的疫苗,其中人或动物皮肤用的制剂中的液滴总重量为总重量的0.01-40重量%。
- 5 10. 根据权利要求9所述的疫苗,其中人或动物皮肤用的制剂中的液滴总重量为总重量的0.1-30重量%。
11. 根据权利要求9所述的疫苗,其中人或动物皮肤用的制剂中的液滴总重量为总重量的5-20重量%。
12. 根据权利要求1所述的疫苗,其中抗原总浓度为渗透剂总重量的0.01-30重
10 量%。
13. 根据权利要求12所述的疫苗,其中抗原总浓度为渗透剂总重量的0.1-20重量%。
14. 根据权利要求12所述的疫苗,其中抗原总浓度为渗透剂总重量的0.5-10重量%。
- 15 15. 根据权利要求1所述的疫苗,该疫苗还包含
(da)低分子量化学刺激剂;和/或
(db)病原体的提取物或化合物或其片段。
16. 根据权利要求1所述的疫苗,其中发挥细胞因子活性的化合物是IFN- α 或IFN- β 。
- 20 17. 根据权利要求1所述的疫苗,其中抗原衍生自病原体。
18. 根据权利要求17所述的疫苗,其中所述病原体选自胞外细菌,在宿主细胞内存活并复制的细菌和病毒,在宿主细胞内繁殖的真菌,寄生虫,外寄生物,或布鲁氏菌属、霍乱病原体、嗜血菌属和引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体,引起动物或人体各种肿瘤形成、自身免疫疾病或与其它不一定由病原体感染
25 引起的病理状况有关的病原体。
19. 根据权利要求18所述的疫苗,其中所述胞外细菌选自葡萄球菌、链球菌、脑膜炎球菌、淋球菌属、奈瑟氏菌属、大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、假单胞菌、白喉杆菌、百日咳博德特氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、BCG、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、诺氏梭菌和腐烂梭菌。
- 30 20. 根据权利要求18所述的疫苗,其中所述在宿主细胞内存活并复制的细菌和病毒选自分支杆菌、单核细胞增生李斯特菌、逆转录病毒、腺病毒、肝炎病毒、人免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花禽痘、流感、麻疹、腮腺炎和脊髓灰质炎病毒、巨细胞

病毒、鼻病毒。

21. 根据权利要求 18 所述的疫苗, 其中所述寄生虫选自原生动物和蠕虫。

22. 根据权利要求 18 所述的疫苗, 其中所述外寄生物选自蜱和螨。

23. 根据权利要求 18 所述的疫苗, 其中所述布鲁氏菌属选自马尔他布鲁氏菌、
5 流产布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、狗布鲁氏菌、木鼠布鲁氏菌、羊布鲁氏菌。

24. 根据权利要求 18 所述的疫苗, 其中所述霍乱病原体是霍乱弧菌。

25. 根据权利要求 18 所述的疫苗, 其中所述嗜血菌属选自伴放线菌素嗜血菌、
大叶性肺炎嗜血菌。

26. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中选择每一个表现出细胞因子活性的化合物的
10 的使用浓度, 使其比用所选抗原剂量和免疫佐剂一起通过注射制剂进行测试或进行体
外测试的对应试验中所确定的最适浓度高 100 倍。

27. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中选择每一个表现出细胞因子活性的化合物的
的使用浓度, 使其比用所选抗原剂量和免疫佐剂一起通过注射制剂进行测试或进行体
外测试的对应试验中所确定的最适浓度高 50 倍。

28. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中选择每一个表现出细胞因子活性的化合物的
15 的使用浓度, 使其比用所选抗原剂量和免疫佐剂一起通过注射制剂进行测试或进行体
外测试的对应试验中所确定的最适浓度高 20 倍。

29. 根据权利要求 15 所述的疫苗, 其中病原体提取物或化合物是脂多糖、海藻
糖-二霉菌酸酯、胞壁酰二肽、或其它与病原体膜的免疫学活性部分相同的多糖或多
20 肽, 细菌外毒素和内毒素, 具有 ADP-核糖基化活性的组分, 肽聚糖、梭菌毒素、纯
化的结核杆菌蛋白质、LT-R192G、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白 I、B 型脑膜炎奈
瑟氏球菌的外膜蛋白; 或细菌或病毒核酸。

30. 根据权利要求 29 所述的疫苗, 其中所述细菌外毒素和内毒素选自霍乱毒素
和大肠杆菌的不耐热毒素。

31. 根据权利要求 29 所述的疫苗, 其中所述细菌或病毒核酸是含有非甲基化 CpG
25 二核苷酸的寡核苷酸。

32. 根据权利要求 29 所述的疫苗, 其中所述脂多糖是脂质 A。

33. 根据权利要求 29 所述的疫苗, 其中所述脂多糖是单磷酸脂质 A。

34. 根据权利要求 15 所述的疫苗, 其中衍生自病原体的病原体化合物浓度在比
30 采用该抗原的对应的注射制剂所用浓度低 10 倍到高 1000 倍之间。

35. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中表皮给予的免疫佐剂浓度与注射的免疫佐
剂浓度相差 0.5-100 倍。

36. 根据权利要求 35 所述的疫苗, 其中表皮给予的免疫佐剂浓度与注射的免疫佐剂浓度相差 1-50 倍。

37. 根据权利要求 35 所述的疫苗, 其中表皮给予的免疫佐剂浓度与注射的免疫佐剂浓度相差 2-25 倍。

5 38. 根据权利要求 15 所述的疫苗, 其中所述低分子量刺激剂选自变应原性金属离子、酸、碱、刺激性液体、脂肪醇、脂肪胺、脂肪醚、脂肪磺酸盐、磷酸盐等, 或其它合适的溶剂或两亲物, 或选自能增强皮肤渗透的表面活性剂, 及其组合物。

39. 根据权利要求 15 所述的疫苗, 其中选择低分子量刺激剂的浓度, 使其比在相同或相当对象上进行独立测试时因局部刺激而被认为不能接受的浓度低至少 2 倍。

10 40. 根据权利要求 39 所述的疫苗, 其中选择低分子量刺激剂的浓度, 使其比在相同或相当对象上进行独立测试时因局部刺激而被认为不能接受的浓度低至少 5 倍。

41. 根据权利要求 39 所述的疫苗, 其中选择低分子量刺激剂的浓度, 使其比在相同或相当对象上进行独立测试时因局部刺激而被认为不能接受的浓度低至少 10 倍。

15 42. 根据权利要求 15 所述的疫苗, 其中变应原包括吸入变应原、食物和药物变应原、接触变应原、以及注射、侵入性和贮存变应原。

43. 根据权利要求 42 所述的疫苗, 其中所述吸入变应原包括花粉、孢子、少量动物毛发、皮肤、羽毛、天然或合成的织物、小麦、房屋灰尘和螨。

20 44. 根据权利要求 42 所述的疫苗, 其中所述注射、侵入性和贮存变应原选自常驻于肠胃的蠕虫、棘球蚴、旋毛虫、和植入物。

45. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中免疫过程中的抗原应用剂量与注射剂量相差 0.1-100 倍。

46. 根据权利要求 45 所述的疫苗, 其中免疫过程中的抗原应用剂量与注射剂量相差 0.5-50 倍。

25 47. 根据权利要求 45 所述的疫苗, 其中免疫过程中的抗原应用剂量与注射剂量相差 1-20 倍。

48. 根据权利要求 45 所述的疫苗, 其中免疫过程中的抗原应用剂量比注射所用剂量高不到 10 倍。

30 49. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中穿透剂应用量在 0.1-15 毫克/平方厘米之间。

50. 根据权利要求 49 所述的疫苗, 其中穿透剂应用量在 0.5-10 毫克/平方厘米之间。

51. 根据权利要求 49 所述的疫苗, 其中穿透剂应用量在 1-5 毫克/平方厘米之间。

52. 根据权利要求 1 所述的疫苗, 其中所述抗原是纯的或纯化抗原。

53. 一种试剂盒, 它包含装在瓶子或其它包装形式中的至少一个剂量的权利要求 1 项所述的疫苗。

5 54. 根据权利要求 53 所述的试剂盒, 它还包含至少一种抗原或变应原的一个可注射剂量,

其中所述抗原衍生自病原体, 所述病原体选自胞外细菌, 在宿主细胞内存活并复制的细菌和病毒, 在宿主细胞内繁殖的真菌, 寄生虫, 外寄生物, 或布鲁氏菌属、霍乱病原体、嗜血菌属和引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体, 引起动物或人体各种肿瘤形成、自身免疫疾病或与其它不一定由病原体感染引起的病理状况有关的病原体;

10

其中所述变应原是异源或内源的、衍生自微生物、动物或植物, 或属于人造和/或刺激性无机物质, 或是经机体免疫系统错误加工或与机体免疫系统接触的人体部分或组分。

15 55. 权利要求 1 所述的疫苗在制备用于使哺乳动物产生保护性免疫应答的药物上的用途。

通过皮肤的非侵入性接种的透皮疫苗

5

本发明涉及预防或治疗接种目的用于非侵入性透皮给予和超级可变形性载体相连的抗原的新的疫苗。该疫苗包含：(a)一种透皮载体，该载体是以微小液滴形式悬浮或分散于水性溶剂中的穿透剂，该液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或物质的两种不同形式的膜状包衣包围，所述物质或物质形式在较佳的水性液体介
10 质中的溶解度相差至少 10 倍，从而使溶解度较大的物质或物质形式的均相团聚体平均直径、或由所述两种物质或所述物质两种形式组成的非均相团聚体的平均直径小于溶解度较小的物质或物质形式的均相团聚体的平均直径，和/或其中溶解度较大的组分有使穿透性液滴增溶的趋势，且其中这些组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99 % (摩尔) 或对应于非增溶液滴的饱和浓度的 99 % (摩尔)，无论哪一个更高，和/或其中
15 在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍，更佳的低至少 10 倍，理想的是低 10 倍以上；(b) 特异性释放或诱导产生细胞因子或抗细胞因子活性或本身发挥该活性的化合物；和(c) 抗原或变应原。本发明还涉及哺乳动物的相应治疗性或预防性疫苗接种的方法。

在本说明书整个篇幅中引述了数篇文献。本文引用的每一份文献(包括生产商说
20 明书等)均纳入本文作为参考；然而，这并不是承认所有引用的文献的确是本发明的现有技术。另外纳入本文作为参考的还有以 IDEA AG 名义提交的名称为“经鼻输送/用高适应性载体免疫”的待批申请的全部公开内容。

皮肤是微生物最容易接近的，但是由于角质层的存在，也最难进入体内。皮肤角质层是进化产生的一种优化的屏障，它很象血管壁，因为它含有松弛的、紧密充塞的
25 且横向重叠的细胞，从而使角质层中的基础细胞瓦片状基元重复 20-30 次。而且，皮肤中细胞之间的接触部分被密集而组织良好的脂类混合物密封。因此，角质层不仅保护生物体以防感染，而且还阻止通过皮肤有效地吸收抗原。这一事实从过敏角度来看是有利的，但却使目前通过完整皮肤进行免疫或接种不能成功。

市场上任何透皮输药装置中最大的药物小于 350Da (Cevc, G. “通过皮肤输送药物”，*Exp. Opin. Invest. Drugs* (1997) 6:1887-1937)，因为只有这样的分子能通过皮肤中自身密封的细微孔。后者在亲水性时宽度通常小于 1 纳米，或当呈疏水性时宽度更窄。因此，诸如蠕虫等生物利用它们“钻孔”通过器官的生化机理来穿过皮肤进入体内。

皮肤中天然存在的微小损伤和支路(皮脂单位)也被可利用。然而,它们仅占皮肤表面的0.1%-0.5%,因此对透皮输送没有很大贡献,但细菌通常利用该途径来进行局部感染(Strange, P., Skov, L. Lisby, S., Nielsen, P.L., Baadsgard, O. "施加在完整的正常皮肤和特应性皮肤上的葡萄球菌肠毒素 B 引起皮炎", Arch. Dermatol. (1996) 132:27-33)。

- 5 只有少数半抗原在皮肤上引起皮肤免疫应答。这证实大量局部沉积的半抗原的足够小的分子能大量进入皮肤。然后,这些半抗原首先刺激器官,最终可能引起过敏和接触性皮炎(Kondo, S., Sauder, D.N "变应性接触性皮炎中的表皮细胞因子" J.Am. Acad. Dermatol. (1995) 33:786-800; Nasir, A., Gaspari, A.A. "接触性皮炎,临床展望和基础机理" Clin. Rev. Allergy and Immunol. (1996) 14: 151-184)。对于低分子量化学物质或与皮肤刺激物(如皮肤渗透增强剂)组合的药物,该问题最严重(Cevc, 1997, 同上)。大分子很少对皮肤有变应原性,因为它们通过该屏障的能力有限。对高度免疫原性卵白蛋白(Wang, L-F, Lin, J.-Y., Hsieh, K.-H., Lin, R.-H. "表皮接触蛋白质抗原在小鼠中主要诱导产生 Th2 样应答和 IgE 产生" J. Immunol. (1996) 156:4079-4082)或对霍乱毒素(Glenn, G.M., Rao, M. Matyas, (1998) 391:851; Glenn, G.M., Scharton-Karsten T, 10 Vasell R, Mallet C.P., Hale T.L.和 Alving C.R. "用霍乱毒素透皮免疫保护小鼠抵抗致死性粘膜毒素攻击", J. Immunol (1998) 161:3211-3214)的 Th2 应答只有在表皮(epicutaneous)接触大量此类蛋白质后才有可能发生,而且相当弱。而且,除去皮肤角质层是分别在96%或43%的表皮经处理的 C57BL/6 小鼠中产生针对编码人癌胚抗原或人 GM-CSF 基因的腺病毒的可检测量特异性抗体的先决条件(Deng, H, Qun, L., 20 Khavari, P.A. "可持续的皮肤基因输送" Nature Biotechnology (1997) 15:1388-1390)。

至今未报道过针对上述或其它用于表皮的抗原的保护作用。白喉毒素或破伤风毒素以及牛血清白蛋白(通过将抗原与霍乱毒素施加到 BALB/c 小鼠皮肤上产生(Glenn 等人, 1998 同上))在没有佐剂时只能产生非常微弱的免疫应答抗体。即使在加入霍乱毒素(CT)后,白喉及破伤风抗原的特异性抗体平均滴度也比霍乱毒素本身引起的分别 25 低大约 50 倍和 70-4000 倍(取决于所包含的单个数据点)(Glenn, 等人, 1998, 同上)。对应的滴度绝对值分别为 14 ± 17 和 8 ± 16 ; 抗 BSA 滴度约为 11 ± 11 (平均值 \pm 标准偏差,从公开的图计算出)。这些低滴度没有预防或治疗效果,这表明简单的非侵入性疫苗接种途径并非是直截了当的。同一研究组出版的最近的论文(Glenn 等人, 1998b)证实经鼻攻击后的抗 CT 保护作用,但不能得到通过透皮疫苗接种可获得保护力的结论。

- 30 较早的出版物报道了将蛋白质输送通过皮肤的方法,根据滴度判断,它比上述研究更有效高数个数量级,该方法采用了力学敏感的(mechanosensitive)和水敏感(hydrosensitive)的自调节性载体(Transfersomes)(综述见 Ceve, 1997, 同上)。对于强效

抗原, 其诱导的抗体滴度与皮下照射蛋白质引起的滴度相当; 在 BSA 情况下, 两种例子中的 IgG 滴度绝对值均约为 200(Paul, A., Cevc, G. “非侵入性给予蛋白质抗原, 用牛血清白蛋白表皮免疫” *Vaccine Res.* (1995) 4: 145-164), 对于间隙连接蛋白, 测得滴度在 15000-100000 之间(Paul, A., Cevc, G., Bachhawat, B.K. “利用超变形药物载体用大的蛋白质透皮免疫” *Eur. J. Immunol.* (1995) 25:3521-3524; Paul, A., Cevc, G., Bachhawat, B.K. “利用超变形药物载体 Transfersomes 用整合膜组分间隙连接蛋白来透皮免疫” *Vaccine* (1997) 16:188-195)。另外, 这些出版物中也没有表明产生了保护性免疫应答。

迄今已知, Th1 或 Th2 细胞活性在免疫应答中起重要作用: Th1 细胞还在小鼠中主要促进细胞介导的免疫力、吞噬细胞介导的宿主防御, 而且还产生抗原特异性 IgG2a。相反, Th2 优先支持不依赖于吞噬细胞的宿主应答、IgG1、IgE 和 IgA 免疫球蛋白的产生。

免疫应答的 Th1 或 Th2 基础(即 Th 细胞亚类的分化)不仅取决于细胞因子以及其它调节分子的活性(Luger, T.A., Schwarz, T. “细胞因子和神经内分泌激素在皮肤免疫力和发炎中的作用” *Allergy* (1995) 50:292-302; Lohoff, M., Gessner, M., Bogdan, C., Roellinghoff, M. “Th1/Th2 示范和实验鼠立什曼病” *Arch Allergy Immunol.* (1998) 115:191-202), 而且抗原呈递细胞的性质和抗原用量也起着重要的作用。几乎所有真核细胞都短时产生细胞因子并通过特异性细胞表面受体起作用。实际上, 皮肤中的每个细胞在适当刺激后都能释放出这样的(糖)蛋白因子或表达它们的受体。大多数细胞因子是多能性的, 能相互诱导或影响有关受体的表达。这使得细胞因子在所谓的细胞因子级联反应框架中以协同、附加或拮抗方式起作用(Luger & Schwarz, 1995; 同上)。

不同细胞在皮肤上施加抗原后免疫激活中的作用还未被完全了解(Luger & Schwarz, 1995; 同上; Lohoff 等人, 1998, 同上)。认为在上基部皮肤区域中的朗格罕斯细胞在免疫呈递中起主要作用。这些细胞首先结合并加工抗原, 然后携带着消化的抗原从表皮迁移到淋巴管中, 进而进入邻近的引流淋巴结中。在该过程中, 朗氏细胞经历了表型和功能上的改变, 分化成(淋巴类)树突细胞, 该树突细胞最终向通过内皮小静脉进入淋巴结的原初 CD4⁺T 细胞提供抗原。相反, 皮肤中的其它两种主要类型的抗原呈递细胞(巨噬细胞和 B 淋巴细胞)首先需要激活, 以便呈递抗原和刺激 T 细胞。抗体可通过小静脉内皮细胞呈递给 T 细胞, 可能也可通过皮肤中的某些基底细胞呈递给 T 细胞。

例如, 已知角质细胞可通过产生过多的促炎性细胞因子(包括 IL-1 α , GM-CSF 和 TNF α)加强局部炎症(Pastore, S., Fanales-Belaso, E., Abbanesi, C., Chinni, L.M.,

Giannetti, A., Girolomoni, G. “在特异性皮炎中角质细胞过量产生粒细胞巨噬细胞集落刺激因子：皮肤中树突细胞持续激活的暗示” *J. Clin. Invest.* (1997) 99:3009-3017)。角质细胞衍生的细胞因子对于朗氏细胞成熟变成强效抗原呈递细胞(Nasir & Gaspari, 1996, 同上)也非常关键。角质细胞直接参与抗原呈递的程度还不知道(Kondo & Sauder, 1995, 同上), 但是角质细胞产生抑制性细胞因子(如 IL-10, 无功能的 IL-12 和 TGF β)是已知的事实(Nasir & Gaspari, 1996, 同上)。

皮肤中的成纤维细胞群也含有参与抗原呈递的细胞亚组。例如, 在硬皮病中, 成纤维细胞的一个亚组受到炎症部位细胞因子选择性地募集(Fries, K.M., Blieden, T., Looney, R.J., Sempowski, G.D., Silvera, M.R., Willis, R.A., Phipps, R.P.“成纤维细胞异质性的证据和成纤维细胞亚群在纤维变性中的作用”*Clin. Immuno. Immunopathol.* (1994) 72: 283-292)。

以前已有报道说, 表皮施加抗原产生了与通过口腔或鼻常规给药途径不同的免疫应答。例如, 在皮肤表皮反复接触卵白蛋白后, 产生了显著的抗卵白蛋白 IgE(Wang 等人, 1996, 同上)。在皮肤上用牛血清白蛋白作为模型抗原, 以前已经观察到有异常强烈的 IgA 产生(Paul 等人, 1997, 同上), 但是至今还没有表皮抗原呈递详情与所致免疫应答之间相互关系的一致性描述。

有众多不同的细胞参与抵抗通过皮肤输送的大分子的免疫应答。如上所述, 目前采用的方法还没有建立起令人信服的产生保护性免疫应答的策略。这可能是由于现有技术策略(如注射抗原)不能帮助仔细分析抗原施加到皮肤上所获得的免疫应答以设计出定向的保护性免疫应答。例如, 已知抗原注射(作为损伤或其它种类的皮肤干扰, 包括存在化学刺激物)使皮肤(皮肤不仅是机体中最重的器官, 而且也构成了机体免疫系统的主要部分)释放出各种细胞因子。这使得皮肤免疫应答(该免疫应答对所用抗原的性质也敏感)的强度达到最大, 但是阻止了对免疫应答的微调。高冲击疫苗输送得益于该效果。

用超变形性载体将物质输送通过皮肤与所述高冲击输送方法正好相反, 因为据报道它对皮肤没有影响。认为这是由于这种水敏感性超变形体(也称为 Transfersomes™(Cevc, 1997, 同上)通过被调节成细胞形状的角质细胞(corneocyte)之间的“有效通道”穿透角质层(Schätzlein, A., Cevc, G. “不均匀的角质层细胞堆积和完整皮肤的渗透屏障功能: 用高度可变形性载体(Transfersomes)的高分辨率共焦激光扫描显微镜研究” *Br. J. Dermatol.* (1998) 138:538-592)。据称, Transfersomes 在该过程中优先在最薄弱的接触处将皮肤中的细胞与细胞间脂质推开。这样就产生了看上去平均约 20-30 纳米宽的通道。它们覆盖了几个百分数(约 4%)的皮肤表面(Schätzlein &

Cevc, 1998, 同上), 相邻表面的引流未包括在内。这比正常的支路面积(约 0.1%)大得多, 从而解释了与超变形性载体一起给予抗原(Paul & Cevc, 1995, 同上)或用霍乱毒素作为佐剂(Glenn 等人, 1998a,b, 同上)后测得的抗 BSA 滴度之间量的差别。

载体在皮肤中打开的有效通道看来宽得足以使载体和它们结合的材料通过屏障而不明显干扰器官。然而, 用超变形性载体反复将胰岛素输送通过皮肤没有诱导出抗该蛋白质的抗体(Cevc, G., Gebauer, D., Schätzlein, A. Blume, G. “超柔性泡囊 Transfersomes 具有极低的渗透阻力, 可将治疗量的胰岛素输送通过完整的哺乳动物皮肤” *Biochim. Biophys. Acta* (1998) 1368:201-215)。

因此, 本发明背后的技术问题是建立一种方法来成功地诱导产生医学上有用的透皮免疫应答。本文通过提供权利要求中定义的实施方案, 解决了所述技术问题。

因此, 本发明涉及一种透皮疫苗, 它包含(a)一种透皮载体, 该载体是以微小液滴形式悬浮或分散于水性溶剂中的穿透剂, 该液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或物质的两种不同形式的膜状包衣包围, 所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍, 从而使溶解度较大的物质或物质形式的均相团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述物质两种形式组成的非均相团聚体的平均直径小于溶解度较小的物质的均相团聚体的平均直径, 和/或其中溶解度较大的组分有使穿透性液滴增溶的趋势, 且其中这些组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴的饱和浓度的 99%(摩尔), 无论哪一个更高, 和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍, 更佳的低至少 10 倍, 理想的是低 10 倍以上; (b)特异性释放或特异性诱导产生具有细胞因子或抗细胞因子活性的分子或发挥这种活性的化合物, 两种任一均产生了所需的医学上有用的免疫应答; 和(c)抗原、变应原、抗原混合物和/或变应原混合物。

对于上述高达 99%的数值, 应注意通常采用低于前一相对浓度的 50%的数值。更佳的是选择低于 40 相对%或甚至大约 30 相对%及以下的数值, 而对于不能用溶解度较高的组分来增溶的液滴, 相对浓度宜超过上述浓度 2 倍。

在本发明中, 术语“病原体”指其存在于机体内或机体上将导致或促进病理状态而该病理状态理论上是可受控或受益于预防性、治疗性或辅助性免疫治疗的病原体。它包括导致微生物疾病的病原体, 如胞外细菌, 包括形成脓的球菌, 如葡萄球菌属和链球菌属、革兰阴性菌如脑膜炎球菌和淋球菌属、奈瑟氏菌属、革兰阴性菌, 包括肠微生物如大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、假单胞菌、白喉杆菌、百日咳博德特氏菌和革兰阳性菌(如鼠疫耶尔森氏菌, BCG), 尤其是厌氧菌, 如梭菌属(破伤风梭菌、产

气荚膜梭菌、诺氏梭菌、腐烂梭菌)；在宿主细胞内存活并复制的许多细菌和所有病毒；后一类包括分支杆菌(如结核杆菌)和单核细胞增生李斯特菌，逆转录病毒和腺病毒，包括但不局限于肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)、流感、麻疹、腮腺炎和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等，在宿主细胞内繁殖的各种真菌；寄生虫，包括动物寄生虫，如原生动物和蠕虫，以及外寄生物，如蜱和螨。病原体还包括布鲁氏菌属(如马尔他布鲁氏菌、流产布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、狗布鲁氏菌、木鼠布鲁氏菌、羊布鲁氏菌)、霍乱病原体(例如霍乱弧菌)、嗜血菌属如伴放线菌素嗜血菌、大叶性肺炎嗜血菌以及引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体。本发明中的病原体另外假定还包括，但不局限于，引起动物或人体各种肿瘤形成、自身免疫疾病和其它病理学状况(并非由微生物感染引起)的真核细胞或其部分。某些病原体部分，尤其是各种微生物毒素，具有孔蛋白样性质，因此具有一定的通过粘膜或增加穿透剂膜柔性的能力。

与“释放”或“诱导”联合的术语“特异性”指化合物与能释放细胞因子的细胞相互作用，通过受体介导触发该细胞因子释放或诱导。特异性释放或诱导与非特异性释放或诱导(例如皮内注射获得)相反。

在本发明中，术语“变应原”用来描述内源或异源、动物或植物来源的物质，该物质导致接触该变应原的机体产生不良的免疫应答，通常是产生急性过敏反应。变应性微生物或其部分(如螨的部分)、植物部分(例如花粉)或动物部分(毛发和皮屑)，以及人造的和无机物质属于该类。另一方面，几乎人体的每一部分，如果受到机体免疫系统的不正确加工或接触，会产生自身免疫应答反应，并对该物质产生变应性反应。在采用较窄的解释时，变应原是在体内引起速发型过敏反应的物质、一类或一系列物质，这些反应可通过免疫治疗来减少或消除，无论是否非侵入性通过皮肤。

本发明中术语“(治疗性)疫苗接种”描述了任何类型的治疗性疫苗接种，无论是在患病后为改善临床症状而进行，还是出于预防疾病的目的而进行。该疫苗接种可涉及单次或反复给予本发明疫苗。治疗性接种预防病理学状况和/或改善临床症状。当用作预防制剂时，它通常会产生保护性免疫应答。

免疫接种指任何类型的激发免疫应答反应的方法，而不论所述应答是否是治疗性的。

“抗体”或“免疫球蛋白”指 IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM，包括其所有亚型，如 IgA1 和 IgA2、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。它们的“衍生物”包括可用化学、生物化学和其它方式获得的衍生物，如基因工程改造的抗体衍生物。片段例如包括单链片段、Fc-、Fab-、F(ab)₂-和 Ig 的其它部分，而不论它们是内源、异源、(半)合成还是重组的。

本发明还包括两种或多种上述抗体、衍生物或片段的复合物。

“抗原”是天然形式的或片段化或衍生处理后病原体或变应原的一部分。更通常的，术语“抗原”指大分子或其片段，任何半抗原部分(例如简单的碳水化合物、复杂的碳水化合物、多糖、脱氧核糖核酸)，简言之，是当给予机体时可被机体抗体所有组分识别且可能会诱导产生抗体的任何分子。

本发明中术语“抗原混合物和/或变应原混合物”指至少两种抗原或变应原的组合。预计包含至少一个抗原和至少一个变应原的抗原与变应原的混合物也可用于本发明。

本发明所用的术语“细胞因子”指细胞因子，如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 和它们的所有的亚型如 IL-1 α 和 IL-1 β ，肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(TGF- β 和- α)、I型和II型干扰素(IFN- α 1, IFN- α 2, (IFN- ω)、IFN- β 、IFN- γ)、迁移抑制因子 MIF、c-kit 配体、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、单核细胞巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、趋化因子等以及这些分子的所有功能性衍生物。

能非常好地介导天然免疫力的细胞因子包括I型干扰素(IFN- α 和 IFN- β)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1(IL-1 α 和 IL-1 β)、白介素-6(IL-6)和吸引和激活白细胞的趋化因子。该过程依赖于其中的抗增殖(例如 IFN-s)、促炎(例如 TNF, IL-1)或协同刺激(例如 IL-6)作用。介导淋巴细胞激活、生长和分化的最佳的细胞因子包括白介素 2(IL-2)、白介素-4(IL-4)和转化生长因子(TGF)。因此，这些细胞因子不仅能影响靶标的生长，而且还影响到最终可能会在治疗中起作用的细胞的激活和其它细胞因子的产生。

非常依赖细胞介导应答的介导免疫性炎症的细胞因子是 γ 干扰素(IFN- γ)、淋巴毒素(TNF- β)、白介素-10(IL-10)、白介素-5(IL-5)、白介素-12(IL-12)，可能还有迁移抑制因子。白细胞生长和分化最受白介素-3(IL-3)、c-kit 配体、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞或粒细胞集落刺激因子(M-CSF 或 G-CSF)以及白介素-7(IL-7)的影响。

本文的术语“免疫佐剂”用于描述能支持、增强、刺激、激活、强化或调节所需的细胞或体液免疫应答(尤其是在预防中增强任何种类的抗原特异性免疫应答，以及在治疗中经常支持细胞介导免疫力)的物质。这可通过以下方式来实现，加入合适的细胞因子、其混合物或拮抗剂，或较间接地用化学物质刺激皮肤(该化学物质直接或间接使皮肤或其它涉及的外周组织释放细胞因子)，或催化或加速组织中细胞因子的生物合成然后产生该作用，只要最终结果是提高了疫苗接种成功率，即所用抗原有预

防和/或治疗作用。对有用的细胞因子库有间接贡献的免疫佐剂种类，包括具有变应原潜力的小的化学物质，如某些变应原性(金属)离子，包括但不限于 LiCl、HgCl₂、钼(molibdenum)、酸、碱和其它刺激性化合物，如二环己基甲烷-4,4'-二异氰酸酯、5
5 ditrocarb(二乙基二硫代氨基甲酸酯)、2,4-二硝基氯苯、异丙肌苷、异佛尔酮-二异氰酸酯、左旋咪唑、(苯基)噁唑酮等，Swansonine、西左伏兰(sizofran)、苯二甲酸酐、胸腺生成素(thymopentin)、(脂肪)醇、(脂肪)胺、(脂肪)醚、蓖麻蛋白或其它合适的两亲物，众多表面活性剂和化学皮肤渗透增强剂，以及它们的衍生物或组合物；另外还有(低分子量的)微生物的片段和衍生物，包括脂多糖(如 LPS)、索状因子(海藻糖-二霉菌酸酯)和其它膜结合多糖(当用量充足时)，乙酰基胞壁酰-丙氨酰-异谷氨酰胺和较大的10
10 微生物片段，包括细菌外毒素和内毒素或肠毒素，如霍乱毒素和大肠杆菌的不耐热毒素(HLT)，及其大分子片段，如 A-链衍生物(其大部分(如果不是全部的话)看上去具有 ADP-核糖基化活性)，高效免疫佐剂 LT 全毒素等，细胞壁骨架、减毒细菌如 BCG 等。较不熟知的例子包括梭菌毒素、纯化的结核杆菌蛋白质衍生物、LT-R192G、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白 I、B 型脑膜炎奈瑟氏球菌的外膜蛋白(GBOMP)、其它各种15
15 肽聚糖等。换句话说，免疫佐剂包括能改变抗原摄入或呈递、激活或增强抗原特异性淋巴细胞的增殖、或干扰免疫应答中占优势控制机制的分子(不仅在皮肤中，而且在其它免疫活性组织中)。(ADP-核糖基化细菌肠毒素的粘膜佐剂活性是一个已经确定的已知例子)。另一方面，能改变细胞因子的(相对)浓度的分子或其它免疫佐剂，如抗免疫佐剂抗体或免疫佐剂的激动剂或拮抗剂也是本发明意义中的免疫佐剂。对于影响淋巴20
20 细胞归巢的分子(如各种选择蛋白(LECAMS 如各种 CD62-s)、GlyCAM-1、MaDCAM-1、VCAM-1、ICAM-1、透明质酸等)以及其它趋化因子(如 RANTES 或 MCP-1)也是如此。内源型免疫佐剂还包含组胺、转移因子、吞噬作用激素等。由于许多上述免疫佐剂在以太低、有时太高的浓度或其本身非侵入性免疫接种后没有足够的力量确保所需效果，本文所用佐剂的功能定义包括，对细胞因子浓度和其体内的分布方式更充分地调节导致产生所需的治疗性或预防性免疫应答。如果需要弄清楚，例如可在测定特定细胞因子水平的实验中确定所述调节及其程度。

“免疫辅助操作”指对皮肤的非化学处理，例如对皮肤摩擦、挤压、加热，接触电或力，例如超声、场等，或将非免疫原性制剂注射入皮肤中，只要该处理使皮肤或其它外周有免疫活性的组织释放免疫辅助性化合物，或减少针对所需接种的拮抗剂的作用浓度/作用时间。然而，根据本发明，“免疫辅助操作”也指用免疫调节剂和/或细胞因子和/或细胞因子释放因子(尤其是组胺)预处理皮肤。30
30

术语“免疫原”指能诱导产生免疫应答的与免疫学载体偶联的半抗原或不含载体

或与载体结合的抗原。

“免疫耐受性”指没有针对抗原的不希望的免疫应答(更通常的是减少)。

Th1(T 辅助细胞 I 型)涉及的抗体包括 IgG2a, IgG2b 和 IgG3。

Th2(T 辅助细胞 II 型)涉及的抗体包括 IgG1 类、IgG4 类和 IgE 类。

- 5 本发明中的术语“物质的两种形式”指同一物质的两种离子化状态或盐形式,该物质的两种不同的复合物等。

“非侵入性给药”或“非侵入性输送”指在生物学施药时施加或输送通过完整的屏障,在本文中是通过完整的皮肤。

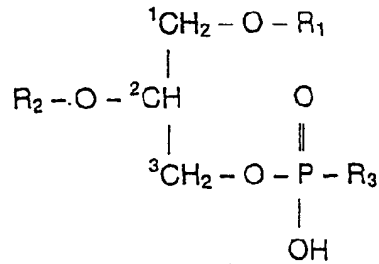
- 10 “穿透”描述了相当大的物质通过屏障的非扩散性运动。该过程通常依赖于穿透剂改变屏障中禁闭的孔,而且还可能涉及引起屏障阻力下降的穿透,例如孔变宽或通道打开;然而,该过程并不主要取决于通过屏障的穿透剂浓度梯度。

“渗透”指通过半渗透屏障的扩散性运动。其主要例子是分子或分子团聚体在渗透性物质浓度梯度影响下输送通过屏障。

- 15 因此,穿透剂是包含一种或一系列分子的物质,这些分子大得不能渗透通过屏障,但是却能靠穿透剂改变屏障的禁闭通道(孔)的形状和/或直径的能力(即适应性)而通过屏障。该改变能力可从例如以下事实看出:比孔径大两倍的穿透剂可通过双层但不变成孔径大小的片段。另一方面,穿透剂是能渗透通过半透屏障(如皮肤)的物质。外场中的穿透剂所受推动力与穿透剂的标称大小以及施加的场(该场可天然存在)成比例。在完整的未堵塞皮肤上的这种力被认为源于横跨角质层的水浓度梯度,如果该力强度
- 20 足以使穿透剂变形或/和使屏障中通道变宽从而避免体积排斥,则该力可使穿透剂运动通过屏障(包括皮肤)。

- 至于进一步的定义,尤其是关于穿透剂的复杂的体变形性、相应的作用机理、感兴趣的穿透剂组分或所选试剂的清单,参见以下授权的或待批的专利(DE 41 07 152, PCT/EP91/01596, PCT/EP96/04526, DE 44 47 287)。关于生产过程以及穿透剂与抗原性(大)分子和/或免疫佐剂(它们太大而不能渗透通过屏障)一起加载的详细信息,可在
- 25 国际专利申请 PCT/EP98/06750 中找到。

- 在形成载体的聚集性物质中溶解度较低的通常是脂质或脂质类物质,尤其是极性脂质,而在悬浮液中有较高溶解度且增加液滴适应性的物质是表面活性剂或具有表面活性剂类似性质。前一组分通常是来自生物来源的脂质或脂质类物质,或是相应的合
- 30 成的脂质或经修饰的脂质,这些脂质通常属于具有以下化学式的纯的磷脂类



其中 R_1 和 R_2 是脂族链, 通常是 C_{10-20} -酰基或烷基, 或部分不饱和的脂肪酸残基, 具体是油酰基、棕榈油酰基、反油酰基、亚油烯基、亚麻基(linolenyl)、亚麻酰基、花生四烯酰基、牛痘基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基和硬脂酰基链, 其中 R_3 是氢、2-三甲基氨基-1-乙基、2-氨基-1-乙基、 C_{1-4} 烷基、羧基取代的 C_{1-5} 烷基、羟基取代 $\text{C}_{2,5}$ 烷基、羧基和羟基取代的 $\text{C}_{2,5}$ 烷基、或羧基和氨基取代的 $\text{C}_{2,5}$ 烷基, 以及氨基、环己六醇、鞘氨基醇或所述物质的盐, 所述脂质还包含甘油酯、类异戊二烯脂质、类固醇、硬脂酸精或甾醇、含硫或糖脂质、或任何其它形成双层的脂质, 尤其是半质子化液态脂肪酸、较佳的选自磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、鞘磷脂或其它鞘磷脂、鞘糖脂(包括脑苷脂、神经酰胺己多糖、硫苷脂、鞘缩醛磷脂)、神经节苷脂或其它糖脂或合成脂质, 尤其是相应的鞘氨基醇衍生物, 或其它糖脂, 其中两条相同或不同的链可以与骨架酯化(在二酰基和二链烯酰基化合物中), 或以醚碱与骨架相连(如在二烷基脂质中)。

所用表面活性剂通常是非离子型、两性离子型、阴离子型或阳离子型, 尤其是脂肪酸或脂肪醇, 烷基-三/二/甲基-铵盐, 烷基硫酸盐, 胆酸、脱氧胆酸、甘氨酸、甘氨酸脱氧胆酸、牛磺脱氧胆酸、牛磺胆酸等的单价盐, 酰基或烷酰基-二甲基-氨基氧化物(aminoxide)(尤其是十二烷基-二甲基-氨基氧化物), 烷基或烷酰基-N-甲基葡糖酰胺, N-烷基-N,N-二甲基甘氨酸, 3-(酰基二甲基氨基)-链烷磺酸盐, N-酰基-磺基甜菜碱, 聚乙二醇-辛基苯基醚(尤其是九乙二醇-辛基苯基醚), 聚乙烯-酰基醚(尤其是九乙烯-十二烷基醚)、聚乙二醇-异酰基醚(尤其是八乙二醇-异十三烷基醚)、聚乙烯-酰基醚(尤其是八乙烯十二烷基醚)、聚乙二醇-缩水山梨糖醇-酰基醚(如聚乙二醇-20-单月桂酸酯(Tween 20), 或聚乙二醇-20-缩水山梨糖醇-单油酸酯(Tween 80))、聚羟乙烯-酰基醚(尤其是聚羟乙烯-月桂酰基、-肉豆蔻酰基、-十六烷基硬脂酰基或-油酰基醚), 如聚羟乙烯-4 或 6 或 8 或 10 或 12 等月桂酰基醚(Brij 系列), 或相应的酯, 如聚羟乙烯-8-硬脂酸酯(Myrij 45)、肉豆蔻酸酯、月桂酸酯、亚油酸酯、亚麻酸酯、棕榈油酸酯或油酸酯型, 或多乙氧基化的蓖麻油 40, 缩水山梨糖醇-单烷基化物(例如 Arlacel 或 Span)(尤其是缩水山梨糖醇-单月桂酸酯、肉豆蔻酸酯、亚油酸酯、亚麻酸酯、棕榈油酸酯或油酸酯), 酰基或烷酰基-N-甲基葡糖酰胺(尤其是癸酰基或月桂酰基-N-甲基葡糖酰

胺), 烷基硫酸盐(如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、油酰基、棕榈油酰基、亚油酰基、亚麻酰基、牛痘基或反油酰基硫酸盐), 脱氧胆酸钠, 甘氨酸脱氧胆酸钠, 油酸钠, 酒石酸钠, 优先具有上述脂族链的脂肪酸, 溶血磷脂(如正十八烯(=油酰基)-甘油磷脂酸、-磷酸甘油或-磷酸丝氨酸), 正-酰基-(例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、油酰基、棕榈油酰基、反油酰基、牛痘酰基、亚油酰基、亚麻酰基)-甘油磷脂酸、-磷酸甘油或-磷酸丝氨酸, 或相应的短双链磷脂, 如十二烷基磷脂酰胆碱或有表面活性的多肽。然而, 重要的是应认识到, 极性脂质与其它两亲性物质的复合物通常会在载体包衣中起表面活性剂作用, 且不同的离子化或盐状态的极性脂质的性质相差很大。因此, 很显然, 在膜中一起混合的同一(极性)脂质的两种不同物理化学状态将产生使本项工作条件满意的高度可变形的载体。

关于磷脂悬浮液的更通常信息可在《脂质体》手册(Gregoriadis, G., Hrsg., CRC Press, Boca Raton, FL, 1-3 卷, 1987)、《作为药物载体的脂质体》(Gregoriadis, G., Hrsg., John Wiley & Sons, New York, 1988)或实验室手册《脂质体实践方法》(New, R., Oxford-Press, 1989)中找到。常规用于制备生物相容的免疫穿透剂的磷脂性质综述见《磷脂手册》(Cevc, G., 编, Dekker, New York, 1995)。

在配制制剂后或应用之前可方便地调节制剂的 pH 值。该调节应能防止单个系统成分和/或药物载体在初始 pH 条件下的劣化而不损害生理相容性。为了中和穿透剂悬浮液, 可以采用生物相容的酸或碱来配制 pH 值在 3-12 之间(通常在 5-9 之间, 更经常的在 6-8 之间)的缓冲液。生理上可接受的酸例如是无机酸(如盐酸、硫酸或磷酸)或有机酸(如羧基链烷酸如乙酸)的稀释水溶液。生理上可接受的碱例如是稀氢氧化钠、适当离子化的磷酸等。

如果需要, 免疫原悬浮液可以在应用前进行稀释或浓缩(例如通过超离心或超滤); 此时或在此之前悬浮液中还可加入添加剂。添加剂通常选自使配方对环境应力敏感性减少的物质, 包括杀微生物剂、抗氧化剂、不希望酶作用的拮抗剂, 冷冻防护剂、增稠剂等。然而, 在任何系统操作后, 都应当检查载体特征, 如果需要, 可重新调节。

本发明惊奇地发现, 与本文所述的超变形性脂质团聚体结合的大分子抗原(免疫穿透剂)能通过人工的多孔屏障以及皮肤, 尽管所述穿透剂的平均直径超过屏障的平均孔/通道直径, 而且该免疫穿透剂能引发治疗性或预防性免疫应答, 只要所述免疫穿透剂与表现出细胞因子活性或能诱导皮肤和/或其它免疫活性器官产生和/或释放细胞因子的化合物结合。或者, 所述化合物能拮抗细胞因子活性。后一实施方案通过阻断其它途径有利地将免疫应答导向 Th1 或 Th2 依赖型免疫应答。本文所述的抗原载

体在该过程之前和期间维持了足够的稳定性。另外，惊奇地发现所产生的免疫应答与施加剂量不成正比，这暗示可以改变抗原的量。应对所述量进行仔细选择以获得最优效果。抗原最适量或最适范围的选择是本领域技术人员在阅读了本说明书后力所能及的。

5 本发明疫苗中用作载体的至少两组分免疫团聚体有高度可变形的优点，更通常的是具有非常柔软的膜的泡囊形式。尽管这些载体在以前已在免疫程序中采用过，但是出人意料的是以前所假定的载体免疫辅助性没能消除加入细胞因子活性化合物或合适拮抗剂(较佳的是 IL-4、IL-10、TGF- β 、IL-5、IL-6、IL-9 和 IL-13)的需要；或在 T 细胞受体预先刺激后，还加入 IL-1 以便获得所需的保护性免疫应答。同样，宜加入
10 IL-12、IFN- γ 和淋巴毒素(LT 或 TNF- β)来促进 Th1 应答，从而有利于细胞介导的免疫应答，并提供治疗病毒和其它寄生虫疾病或促进免疫耐受性的方法。例如，加入 IFN γ 、IL-12 和抗 IL-4 的组合物或单单加入 IL-12 预计会将 Th2 型应答变成 Th1 型。更广地说，在穿透剂介导的免疫接种的情况下，提议在免疫应答开始时增加 IL-12 和 IL-4 的相对量(有利于前者)可用来促进 Th1 应答，反之，IL-2 将支持 NK 和 B 细胞生长，以
15 刺激抗体合成，并在总体上影响 T 细胞依赖性免疫应答的强度。因此，尽管现有技术描述了用合适的载体与抗原以及任选的免疫佐剂组合可诱导产生抗体滴度，但是所得的免疫应答未表现出保护性。

本发明的一个特别的好处是因为惊奇地发现本发明所述穿透剂的转移不会导致皮肤中细胞因子组成的实质性失调。换句话说，这些载体输送通过皮肤本身不会诱导
20 产生细胞因子释放。因此，现在可以进行研究，将能特异性诱导皮肤(或有能力释放细胞因子的其它器官)细胞释放细胞因子的化合物加入本发明的疫苗中，未引发所需的免疫应答。这样就可对所需的免疫应答进行微调。或者，可在本发明疫苗中加入具有或能发挥细胞因子活性的化合物。另外，可采用特异性防止这类细胞因子作用的细胞因子活性拮抗剂。在该实施方案中，宜将免疫应答导向 Th1 或 Th2 途径。重要的是要注意，这些化合物特异性地诱导或释放细胞因子依赖于抗原性质。因此，它们与
25 本发明中非特异性且广泛支持免疫应答的佐剂不同。

总之，应用本发明的疫苗可以微调所需的对给定抗原的免疫应答(当然，抗原特性也起一定作用)。该免疫应答可用例如佐剂触发的非特异性免疫应答来增强。与仅用注射疫苗的现有技术相比，微调免疫应答的选择自由特别有好处，因为注射过程本
30 身严重地非特异性地干扰了皮肤中细胞因子的相对浓度。

对上述标准加以考虑不仅为向皮肤细胞以及外周免疫系统的合适类型的免疫呈递提供了基础(通过载体)，而且也确保这种免疫加工在将体内主要产生抗原中和性抗

体, 将引发细胞介导的免疫应答, 或将导致逐渐产生针对该抗原的耐受性或特异性促进细胞介导的免疫力。

5 本发明还发现, 非侵入性透皮疫苗接种受免疫穿透剂(抗原载体)组合物的影响很大。采用不同纯度的抗原出人意料地导致大大不同的免疫应答。这反映在总滴度相似的生物体诱导了不同水平的保护力的观察结果中, 这可能是因为最终的抗原同种型方式不同而致。

10 另外, 加入常规的低分子量免疫佐剂单磷酸脂质 A 不仅使表皮免疫结果更可靠(以前的出版物中记载所测抗体滴度的标准偏差更小)。而且与以前在小鼠中获得的经验相反, 在免疫载体中采用该免疫佐剂还出人意料地增加了 IgG2b 的分泌(比 IgG2a 低), 但不增强 IgA 的产生。由于 IgG1(它是 Th1 样免疫球蛋白)的存在据推断对抵抗破伤风毒素的保护作用(至少在小鼠中)是必需的, 因此首次揭示了脂质 A 或细菌抗原的作用。对于本发明公开内容的未来医学和商业上的用途, 重要的是要认识到高(特异性)抗体滴度不一定意味着良好的保护结果; 为了获得所需和充分的保护作用, 需要

15 有恰当种类和相当量的某些抗体同种型, 从而提供占优势的 Th1 或 Th2 型免疫应答(见以前的讨论)(视情况而定)。

适合获得所需目的的基础配方是本领域已知的; 更详细的或补充的信息例如参见 DE 41 07 152, PCT/EP91/01596, PCT/EP96/04526, DE 44 47 287。本发明的疫苗不仅仅用于预防性或治疗性疫苗接种, 而且还适用于治疗过敏和获得抵抗微生物(包括在人和兽医中的胞外和胞内细菌、病毒和寄生虫)的免疫力。

20 通过与上述穿透剂结合, 可将抗原(如免疫活性物质)以和渗透剂的物理或化学复合物的形式转运通过屏障。

为了从皮肤中的细胞因子库得到好处, 提议特别有用的疫苗接种方法是先用上述免疫辅助操作预处理器官, 然后将免疫原施加到皮肤上。

25 特别好地是利用对贴剂评价的上述局部免疫应答的读数, 优化进一步给予变应原的细节和过程, 从而积极地影响治疗性或预防性疫苗接种的结果。认为这样的方法可用来很好地达到或改善受测试对象对所施加变应原的免疫耐受性。

如果首次免疫采用侵入性方法(通常用皮下注射或其它一些合适的刺穿/破坏皮肤屏障的方法), 则预计可获得高水平的 IgM, 但是随后的加强免疫可用本发明所述的非侵入性方法来进行。

30 最后, 提出几种优化方法, 这些方法可根据高度可变形性穿透剂来改善免疫原和疫苗接种。较佳的一种方法是测定结合了免疫原的穿透剂通过明确屏障中各个孔的流通量与横跨该屏障的合适的推动力或压力的函数关系, 然后用特征性曲线来描述数

据,再用该曲线来进一步优化制剂或下一步应用。其核心是测定免疫穿透剂通过明确屏障中孔的流动量与横跨屏障的合适的推动力或压力的函数关系,并根据不同数据组的比较结果以特征曲线形式对所得数据进行分析,该特征曲线可用于进一步优化配方或下一步应用。这包括与已知能穿透皮肤的无免疫原穿透剂悬浮液的结果(例如由 Cevc 等人(1998,同上)报道)比较。在一个补充的较佳方案中,测试免疫调节剂或免疫调节程序的各种组合(主要是 Th1 或 Th2 有关的细胞因子产生),然后用这些结果来适当选择最终的治疗或预防应用。

疫苗接种通常在室温下进行,但是较低或较高的温度也是适合的。这对于含有在室温和皮肤或其它屏障温度之间呈刚性的合成物质的制剂特别有意义。

生产温度通常在 0-95℃ 范围内选择。较佳的,在 10-70℃ 的温度范围内,更经常的在 15℃-45℃ 之间,在所有情况下,该温度均低于重要的配方组分发生不可逆的组成或物理状态变化的温度。其它温度范围也有可能,然而,最明显的是含有可冷冻或非挥发性组分的系统、低温或加热稳定的配方等。

如果需要维持系统个别组分的完整性和所需性质,载体配方可与或不与所连接的抗原一起冷藏(例如在 4℃ 下)。在惰性气体(如氮气)下生产和保藏是可以的,有时是敏感的。利用只有少量双键的物质(即利用低的不饱和度),通过加入抗氧化剂、螯合剂和其它稳定化剂,或通过制备特别的免疫穿透剂或从冷冻干燥或干燥的混合物原位制得,也可延长免疫原制剂的使用期。

在本发明疫苗的较佳实施方案中,采用了特异性释放或特异性诱导产生具有细胞因子或抗细胞因子活性的化合物以及将抗原与穿透剂结合。

在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,溶解度较低的自聚集性分子是极性脂质,溶解度较高的组分是表面活性剂或类似于表面活性剂的分子,或是出于本发明目的有足够溶解度的极性脂质形式。

在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,穿透剂的平均直径在 30-500 纳米之间,较佳的在 40-250 纳米之间,更佳的在 50-200 纳米之间,特别佳的在 60-150 纳米之间。

在另一个较佳的实施方案中,本发明涉及一种疫苗,其中人或动物皮肤用的制剂中的液滴总重量为总重量的 0.01-40 重量%,特别是在 0.1-30 重量%之间,更佳的在 5-20 重量%之间。

在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,抗原总浓度为穿透剂总重量的 0.001-40 重量%,特别在 0.01-30 重量%之间,更佳的在 0.1-20 重量%之间,最佳的在 0.5-10 重量%之间。

在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,该制剂还包含(da)低分子量化学刺激剂

和/或(db)来自病原体的低分子量化合物或其片段或衍生物。

在本发明疫苗的还有一个较佳实施方案中,发挥细胞因子活性的化合物是 IL-4, IL-3, IL-2, TGF, IL-6, IL-7, TNF, IL-1 α 和/或 IL-1 β , I型干扰素,较佳的是 IFN- α 或 IFN- β 、IL-12、IFN- γ 、TNF- β 、IL-5 或 IL-10。

- 5 在本发明疫苗的更佳的实施方案中,具有抗细胞因子活性的化合物是抗细胞因子抗体或其对应的活性片段、衍生物或类似物。

本文中的术语“活性片段或衍生物”指所用物质基本上维持或模拟了上述活性。

在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,抗原衍生自病原体。

- 在本发明疫苗的另一特别佳的实施方案中,所述病原体选自胞外细菌,包括形成
10 脓的球菌,如葡萄球菌和链球菌、革兰阴性菌如脑膜炎球菌和淋球菌属、奈瑟氏菌属、革兰阴性菌,包括肠微生物如大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、假单胞菌、白喉杆菌、百日咳博德特氏菌和革兰阳性菌(如鼠疫耶尔森氏菌, BCG),尤其是厌氧菌,如梭菌属(破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、诺氏梭菌、腐烂梭菌);在宿主细胞内存活并复制的
15 细菌和病毒,包括分支杆菌(如结核杆菌)和单核细胞增生李斯特菌,逆转录病毒和腺病毒,包括但不局限于肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)、流感、麻疹、腮腺炎和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等,在宿主细胞内繁殖的真菌,寄生虫,包括动物寄生虫,如原生动物和蠕虫,以及外寄生物,如蜱和螨,或布鲁氏菌属(如马尔他布鲁氏菌、流产布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、狗布鲁氏菌、木鼠布鲁氏菌、羊布鲁氏菌)、霍乱病原体(如霍乱弧菌)、嗜血菌属如伴放线菌素嗜血菌、大叶性肺炎
20 嗜血菌和引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体,引起动物或人体肿瘤形成、自身免疫疾病和其它病理学状况(不一定由微生物感染引起)的病原体。

- 在本发明疫苗的较佳实施方案中,变应原是内源或异源的、微生物、动物或植物来源的物质,该物质导致接触该变应原的机体产生急性过敏反应,许多这样的变应原来自螨、花粉、动物毛发或皮屑,或是人造的和/或刺激性无机物质,或是未经机体
25 免疫系统正确加工或与其接触的人体部分或组分。

在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,选择每一个具有细胞因子活性的化合物的所用浓度,使其比用所选抗原和免疫佐剂一起通过皮下注射所测试的或体外测试所确定的最适浓度高 1000 倍,较佳的高 100 倍,更通常的高 50 倍,还要佳的是高 20 倍。

- 在本发明疫苗的不同较佳实施方案中,病原体提取物或化合物是脂多糖、索状
30 因子(海藻糖-二霉菌酸酯)、胞壁酰二肽、或其它与病原体膜免疫学活性部分相同或相似的(多)糖或(多)肽;病原体提取物,包括细菌外毒素和内毒素,较佳的是霍乱毒素或大肠杆菌的不耐热毒素(HLT), A-链衍生物(具有 ADP-核糖基化活性的组分),肽聚

糖、梭菌毒素、纯化的结核杆菌蛋白质衍生物、LT-R192G、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白 I、B 型脑膜炎奈瑟氏球菌的外膜蛋白(GBOMP)或细菌或病毒核酸,如含有非甲基化 CpG 二核苷酸的寡核苷酸。

5 在本发明特别佳的实施方案中,所述脂多糖是脂质 A 或其衍生物和修饰物,如单磷酸脂质 A 或其类似物,如蔗糖的脂肪衍生物。

在本发明疫苗的另一特别佳的实施方案中,衍生自病原体的病原体化合物的浓度比采用类似抗原的相应的注射剂所用浓度低 10 倍到高 1000 倍之间,更通常的,表皮给予的免疫佐剂浓度与注射的免疫佐剂浓度相差 0.5-100 倍,更佳的相差 1-50 倍,最佳的相差 2-25 倍。

10 在本发明疫苗的还有一个较佳实施方案中,低分子量刺激剂选自变应原性金属离子、酸、碱、刺激性液体、(脂肪)醇、(脂肪)胺、(脂肪)醚、(脂肪)磺酸盐、磷酸盐等,或其它合适的溶剂或两亲物,或选自通常能增强皮肤渗透的表面活性剂类似分子,及其衍生物或组合物。

15 在本发明疫苗的较佳实施方案中,选择低分子量刺激剂的浓度,使其比在相同或相当对象上进行独立测试时因局部刺激(经常用于测试刺激剂的方法和标准品测得)而被认为不能接受的浓度低至少 2 倍,更通常的低 5 倍,还要佳的低 10 倍或更多。

20 在本发明疫苗的另一特别佳的实施方案中,变应原属于吸入变应原类,包括各种花粉、孢子、少量动物毛发、皮肤、羽毛、天然或合成的织物、小麦、(房间)灰尘,包括螨;食物和药物变应原;接触变应原;注射、侵入性和贮存变应原,如各种(常驻于肠胃的)蠕虫、棘球蚴、旋毛虫等、部分植入物质等。

在本发明疫苗的较佳实施方案中,抗原应用剂量与免疫过程中的注射剂量相差 0.1-100 倍,常在 0.5-50 倍范围内,更佳在 1-20 倍之间,理想的是比注射所用剂量高不到 10 倍。

25 在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,穿透剂应用量在 0.1-15 毫克/平方厘米之间,更通常在 0.5-10 毫克/平方厘米之间,较佳的在 1-5 毫克/平方厘米之间。对于容易达到的或遮蔽的机体区域(如胸部或背部、手臂、颈侧面如耳后或头皮区域),用不同的给药面积来控制免疫原应用量也是有利的。

在本发明疫苗的不同较佳实施方案中,所述抗原是纯的或纯化的抗原。在本发明疫苗中采用高度纯化的抗原已经证实对于产生保护性免疫应答是特别有利的。

30 本发明还涉及一种试剂盒,它包括装在瓶子或其它包装形式中的至少一个剂量的疫苗。

根据本发明的一个较佳实施方案,该试剂盒包括上述抗原的至少一个注射剂量。

本发明还涉及一种使哺乳动物产生保护性免疫应答的方法,该方法包括用上述疫苗对所述哺乳动物进行接种。

在本发明方法的另一较佳实施方案中,选择不同的处理面积,以控制免疫原的施加剂量以及治疗性疫苗接种的结果。

- 5 在本发明方法的一个更佳的实施方案中,在给药的前一天,较佳的给予皮肤所述制剂前 360 分钟(更佳为 60 分钟、还要佳为 30 分钟),将抗原加入无抗原的穿透剂悬浮液中与穿透剂结合。

- 10 在本发明方法的另一较佳实施方案中,在用免疫辅助性操作对器官进行预处理后,将本发明疫苗施加到皮肤上,所述操作例如包括:对皮肤进行摩擦、挤压、加热,使皮肤接触电或力的作用,如超声场等,或将非免疫原性制剂注射入皮肤中,只要该处理能使皮肤或其它有免疫活性的外周组织释放免疫辅助性化合物,或减少针对所需疫苗的拮抗剂的作用浓度/作用时间。

- 15 在本发明方法的较佳实施方案中,免疫原以非堵塞性贴剂形式施加。该实施方案也可用于评价皮肤对表皮给予的穿透剂悬浮液中的免疫原的反应,皮肤至少在开始时对该免疫原有过敏,从而产生了急性局部过敏反应(例如可从产生的皮肤发红、刺激等看出)。

在本发明方法的另一较佳实施方案中,给予至少一剂疫苗。

- 20 本发明方法的这个实施方案包括反复给予本发明疫苗。反复给予包括在皮肤上反复给予,或在皮肤上给予一次或多次并与例如肠胃外给药相联合。在这种情况下,本发明所用试剂盒宜包括含有本发明疫苗的一个或多个容器。

在本发明方法的特别佳的实施方案中,所述疫苗以加强接种形式给予。

- 25 在本发明方法的最佳实施方案中,初次免疫采用侵入性方法,通常用皮下注射或其它一些合适的刺穿/破坏皮肤屏障的方法,而随后的至少一次加强免疫采用非侵入性方式。

在本发明方法的较佳实施方案中,当采用非变应原性抗原时,疫苗应用次数在 2-10 次之间,较佳的在 2-7 次之间,更佳的多至 5 次,最佳的 3 次,或在变应原情况下接种如此次数,这是实现所需免疫耐受性(根据合适的评价方法来测定)或认为尝试失败所必需的。

- 30 在本发明方法的特别佳的实施方案中,选择随后的接种间隔的时间为 2 周-5 年之间,通常为 1 个月至 3 年,更通常为 2 个月至 1 年半。在更佳的实施方案中,提倡反复给予免疫原以使治疗性疫苗接种最终效果达到最大。当采用非变应原性抗原时,建议疫苗接种次数在 2-10 次之间,通常在 2-7 次之间,更常多至 5 次,最佳的 3

次，或在变应原情况下接种如此次数，这是实现所需免疫耐受性(用上述或其它合适的评价方法来测定)或认为尝试失败所必需的。在对象首次接受免疫后，随后的接种时间间隔宜为2周-5年，通常为1个月至3年，更通常为2个月至1年半。啮齿类动物(如小鼠)和家兔宜在2周间隔内免疫，灵长类动物(如猴子和人)需要在3-6周间隔时间内加强接种。

在本发明方法的较佳实施方案中，测定携带免疫原通过明确的屏障的各个孔的穿透剂流通量与横跨作用于该屏障的合适推动力或压力的函数关系，然后用特征曲线方便地描述该数据，进而用该特征曲线优化制剂或下一步的应用。

最后，本发明涉及上述透皮载体，能特异性释放或特异性诱导细胞因子或抗细胞因子活性或发挥该活性的化合物，抗原或变应原，以及任选的微生物的提取物或化合物或其片段或衍生物和/或低分子量化学刺激剂，用于制备诱导保护性或致耐受性免疫应答的疫苗的用途。

附图说明：

图 1：混合的分子团对 Transfersomes。该图给出了经含有纯化 TT 的混合分子团或 Transfersomes 进行表皮免疫接种的动物存活数据，以描述团聚体大小(稳定性)的效果，因为过度失稳定的 Transfersomes 通常会崩解成混合的脂质分子团。

图 2：脂质体对 Transfersomes。在图 2 中，比较了对施加在皮肤上的携带纯化 TT 的常规脂囊泡(脂质体)和超变形脂囊泡(Transfersomes)的免疫应答。在上图中给出了血清中相应的特异性抗体的浓度(用吸收值表示)的信息。

图 3：抗原剂量的影响。该图描述了增加抗原剂量对于利用 Transfersomes(SPC:NaChol(3.75:1)，加有抗原和单磷酸脂质 A(LA))表皮免疫接种结果的影响。结果用吸收值变化、抗体滴度或动物存活以及对应的特异性抗体同种型数据表示。抗原剂量为 10、20、40 和 80 微克。每组用 6 只动物，没有抗原的组用 4 只动物。

图 4：抗原纯度的影响。该图揭示了抗原纯度对于用 Transfersomes(SPC:NaCh(3.75:1))中的 80 微克破伤风类毒素和单磷酸脂质 A(LA)表皮免疫接种结果的影响，包括动物存活的时间依赖性的信息。所有数据在第二次加强免疫后 7 天获得。

图 5：表皮对皮下免疫。该图比较了用含 TT 的 Transfersomes 进行反复侵入性(皮下)免疫和非侵入性(表皮)免疫接种的结果，包括动物存活、血清浓度(用吸收值表示)、特异性抗体滴度和抗体分布方式的数值。

图 6: 预注射的影响。该图描述了皮肤预处理(非特异性攻击)对随后用 Transfersomes(SPC: 吐温 80 1: 1)介导 TT 输送通过皮肤的免疫应答的影响。预注射组的小鼠在给予 40 微克抗原前 24 小时进行注射。预注射采用盐水、10% SPC:NaCh(4.5:1)的空白 Transfersomes(Pre-empty Tfs)、以及不完全的 Freund 佐剂各 0.1 毫升。本实验中的所有小鼠均在第二次加强免疫后 7 天用剂量为 50 倍 LD₅₀ 的毒素攻击。

图 7: 诸如单磷酸脂质 A 的佐剂效果。该图侧重于较低分子量免疫调节剂单磷酸脂质 A(LA)和 TT 一起在 Transfersomes 中输送通过完整皮肤的佐剂效果。

图 8: 诸如细胞因子 IL-12 的佐剂效果。该图证明了细胞因子白介素-12(IL-12)和 TT 一起靠 Transfersomes 输送通过皮肤(表皮)的免疫辅助性能。

图 9: 诸如细胞因子的免疫调节剂的效果。该图涉及各种细胞因子对小鼠对非侵入性输送通过皮肤的 Transfersomes 中不纯破伤风类毒素(TT)抗原应答反应的免疫调节作用。

图 10: 诸如霍乱毒素(CT)的免疫佐剂效果。该图表示当载体中还包括 10 微克支持特异性抗体产生的霍乱毒素(CT)时, 皮肤经 Transfersomes(SPC:NaCh 3.75:1)中的纯破伤风类毒素(TT)处理的小鼠的刺激免疫应答的实验证据, 以及动物抵抗破伤风毒素致死性攻击的保护力。每组用 4-6 只动物。星号表示 4 只小鼠中有 1 只瘫痪。

图 11: 诸如大肠杆菌的不耐热毒素(HLT)的佐剂效果。该图描述了用大肠杆菌的不耐热毒素作为免疫佐剂。

图 12: 组胺对于 Transfersomes 皮肤上免疫后的抗破伤风滴度和存活的影响。该图描述了用组胺作局部皮肤预处理与用 Transfersomes 透皮施加抗原相结合的免疫调节效果。

图 13: 皮下引导对于表皮加强免疫后的抗破伤风滴度和存活的影响。该图描述了皮下引导对于抗破伤风滴度以及表皮接种宿主存活的影响。

图 14: 二价疫苗: 对与 Transfersomes 一起皮肤上给药的两种抗原的抗破伤风应答和抗霍乱应答。该图显示了用破伤风类毒素和霍乱毒素作为抗原进行二价疫苗接种的效果。

下面的实施例对本发明作了说明, 但对本发明没有限制作用。

实验总体安排和样品制备

从 National Institute of Nutrition(Hyderabad, India)获得 Swiss 白化小鼠(18-20 克)。在首次免疫时, 小鼠为 8-12 周龄, 它们通常按 4-6 只一组放在吊笼内。动物可以自由

接近标准食品和水。免疫前一天，仔细刮去小鼠背上施加疫苗区域的毛。用高精度滴定管将抗原施加到皮肤表面上，使其部分变干。为了防止免疫原被磨去，将动物转移到单个的动物笼中，使它们在那里每次表皮给药后呆 18 小时。

在包括免疫接种的操作期间，用通用的麻醉方法使测试动物无应力和安静。为此，
5 注射 Ketavet 和 Rompun 的混合物，在每只小鼠腹腔内注射 0.3 毫升含 0.0071% Rompun(Bayer, Leverkusen, Germany) 和 14.3 毫克/毫升 Ketavet(Parke-Davis, Rochester, N.Y)的等渗 NaCl 溶液。这通常使动物沉睡大约 2 小时。

免疫原

本工作中研究的超变形性免疫-载体或免疫-穿透剂(免疫-Transfersomes)通常具有
10 (数层)双层泡囊的形式。它们含有生物相容的(磷)脂质，如磷脂酰胆碱和(生物)表面活性剂，如胆酸钠或多山梨醇酯(Tween 80)，维持该高度团聚体可变形性的不同组成是可能的。其它组分是具有多用途免疫辅助活性的单磷酸脂质 A，以及所需的指定的抗原。

常规的泡囊脂质体包含大豆磷脂酰胆碱(SPC; Nattermann Phospholipids, Rhone-
15 Poulenc Rorer, Cologne, Germany)，它如下所述制得。首先，真空干燥(10Pa, 过夜)有或没有佐剂单磷酸脂质 A(MLA, 相对于 SPC 为 0.04%摩尔)的有机脂质溶液。所得脂

质膜用含破伤风类毒素(2.0 毫克/毫升; Accurate Antibodies, NY, USA)的磷酸缓冲液(pH=6.5)水化, 得到 10%(重量)的脂质悬浮液。将脂囊泡悬浮液粗品挤压通过一系列 800 纳米、400 纳米和 200 纳米孔径的聚碳酸酯膜, 以使最终的泡囊大小分布范围变窄。

- 5 如前所述(Paul 等人, 1995, 同上), 制备可高度可变形的泡囊 Transfersomes。简言之, 使 SPC 乙醇溶液与胆酸钠(Merck, Darmstadt, Germany)(3.75/1 摩尔/摩尔)以及佐剂(如果需要)混合。将混合物分散在 10mM 磷酸缓冲液(pH=6.5)中。在溶液中加入破伤风类毒素, 使 1 毫升悬浮液按需有 0.25-2.0 毫克蛋白质。然后, 对泡囊悬浮液冻融三次。随后, 使制剂在压力下通过微孔滤膜(200 纳米; Poretics, CA)。为了检查泡囊
- 10 生产的重复性, 测定每一制备物 400 纳米的光密度, 确认大致是恒定的。

通过改变表面活性剂与脂质之比, 可控制泡囊团聚体的可变形性, 其浓度最高为膜因表面活性剂浓度高而变得不稳定变成分子团形式的浓度。不加入表面活性剂的脂囊泡通常称为脂质体, 其膜的可屈曲性比 Transfersome 低至少 10 倍, 将它用作负对照。

- 15 脂质总浓度通常为 10%重量, 除非另有所述。抗原浓度通常(但不是必需)约为 1 毫克/毫升。含有杀微生物药的缓冲液提供了此大批量相。对于其它合适的组合物, 专家可直接参见我们实验室的其它出版物和专利。

- 免疫接种可用不同的配方来进行, 包括没有抗原的超变形泡囊; 然后, 这些泡囊含有破伤风类毒素(有或没有脂质 A)且不含免疫原。每一制剂在 6 只小鼠上进行试验,
- 20 除非另有所述。

- 在皮下免疫的情况下, 给每只小鼠注射 40 微克免疫原。对于非侵入性给药, 在每只小鼠上背部完整皮肤上给予 1 微克-80 微克与不同载体结合的破伤风类毒素。所有非注射的制剂用高精度移液管施加, 使其干燥; 在此期间, 小鼠被放在隔离的笼子内, 以最大程度地减小施加物的磨损(例如由于鼠背相互摩擦而引起)。每两周(即在第
- 25 14 天和 28 天)对动物加强免疫; 因此, 整个免疫方案由三剂组成, 包括初次免疫和两次加强免疫。

在第 7、21 和 35 天从动物的后眼眶取血。首先使收集的血液凝块。在微量离心机中简单离心后, 分离血清, 在 56°C 下去除补体 30 分钟, 然后-20°C 保藏至测定抗体总浓度和特异性抗体同种型。

- 30 吸光度测定采用标准的 UV-vis 分光光度计。

用 ELISA 测定血清中破伤风类毒素(TT)特异性抗体。用 ELISA 以习惯方式测定抗破伤风抗体的水平, 通常一式两份。简言之, 用包被缓冲液(碳酸钠/碳酸氢钠, pH=9.6)

5 配的等份抗原(100 微升, 每毫升含有 10 微克 TT)包被 ELISA 板(maxisorp: NUNC, Germany)37°C 3 小时。孔先用 200 微升/孔的洗涤缓冲液洗涤两次, 然后, 于 37°C 用含 2% 牛奶的洗涤液(1000 毫升中有 8 克氯化钠、1.45 克二水磷酸氢二钠、0.2 克磷酸二氢钾、0.2 克氯化钾和 0.05% Tween-20)封闭 3 小时。在用每孔 200 毫升的洗涤缓冲液洗涤一次后, 使平板与各种稀释度(1/50-1/6400)的测试血清培育。4°C 培育过夜后, 用每孔 200 微升的洗涤缓冲液洗涤平板 3 次, 与 100 微升第二抗体培育。在测定 IgG、IgA 或 IgM 的量时, 采用辣根过氧化物酶(hrp)偶联的合适的抗 Ig。37°C 培育 3 小时后, 用每孔 200 微升的洗涤缓冲液洗涤平板三次, 用邻苯二胺作为 hrp 底物显色。为用于此目的, 以磷酸柠檬酸缓冲液(pH4.5)配制 0.4 毫克/毫升的邻苯二胺, 且每毫升中有 10 0.4 微升过氧化氢。2 分钟后, 加入 50 微升 2N 硫酸终止反应。测定 492 纳米下的吸光度。

15 用于检测各种同种型的方法也以 ELISA 为基础。它依靠的是过氧化物酶标记的、亲和纯化的对 IgG1(1: 1000)、IgG2a(1:1000)、IgG2b(1:1000)以及 IgG3(1: 200)有特异性的第二抗体(均从 ICN ImmunoBiologicals 获得)。其它第二抗体包括与辣根过氧化物酶连接的 IgA(1: 1000)和 IgM(1: 1000)(Sigma, Neu-Ulm, Germany)。相应标记的抗小鼠 IgE 购自 PharMingen(san Diego, CA)。同样, 使抗原吸附到测试板上, 在洗去过量抗原后与测试血清一起培育。随后, 在 6 个不同的板之一中加入 100 微升合适的特异性第二抗体溶液, 以分别测定抗 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM。37°C 培育平板 3 小时, 如上段中所述那样进行。

20 用抗原(破伤风毒素)进行体内攻击。在第 35 天, 皮下注入(s.c.)50 倍 LD₅₀ 的破伤风毒素, 对试验动物进行攻击。(LD₅₀ 的实际值在分开的试验中固定, 在此期间, 一组 16 只重量匹配的动物用增加量的毒素进行皮下攻击, 测定存活数)。为了测定接种动物中的急性 TT 毒性, 在第一次攻击后 4 天, 记录这些试验小鼠的临床状况。

25 未受保护的小鼠在 24 小时后显示出瘫痪症状, 在至少 36 小时后导致死亡。在攻击后 4 天内未产生瘫痪或其它异常症状的动物认为有抵抗破伤风的免疫力。

用对应于 50 倍 LD₅₀ 的毒素剂量每月攻击所有免疫的小鼠, 攻击至少半年, 以测试长期免疫力。

实施例 1-2

30 团聚体大小(稳定性)效果

高度可变形性泡囊(Transfersomes™: IDEA):

87.4 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

- 12.6 毫克胆酸钠(NaChol)
 相对于 SPC 为 0.04%摩尔的单磷酸脂质 A(MLA, LA)
 0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5
 0.1 毫升乙醇
- 5 (混合的脂质)分子团:
 65 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)
 35 毫克胆酸钠(NaChol)
 相对于 SPC 为 0.04%摩尔的单磷酸脂质 A(MLA)
 0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5
- 10 0.1 毫升乙醇
 破伤风类毒素(2 毫克/毫升; Accurate Antibodies), 每只小鼠每次免疫用 40 微克
 (20 微升)或 80 微克(40 微升)TT 的剂量
 施加区域: 每只小鼠上背部的 1 平方厘米或 2 平方厘米为 40 微克或 80 微克 TT。
 为了测试制剂稳定性对各种表皮给予制剂的免疫学性质的效果, 制备两种团聚
 15 体: 较大的泡囊(直径在 100 纳米-200 纳米之间)和较小的分子团(直径小于 50 纳米)。
 预计选择后者, 在次优条件下可能从前者产生后者(由于脂质降解或团聚体组成不合
 适)。
 492 纳米的血清吸光度反映的抗体滴度显示在图 1 中。它们表明混合的脂质分子
 团的抗原载体效果比加有相同量 TT 的超变形混合脂囊泡(Tfs)差。含有强度较低的洗
 20 涤剂的混合分子团(皮肤渗透增强能力较低)的免疫应答调节剂效果更低。
 动物保护力数据揭示了如图 1 下图所示的类似的趋势。
- 实施例 3-4:
 团聚体可变形性效果
- 25 常规的脂囊泡(脂质体):
 100 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)
 相对于 SPC 为 0.04%摩尔的单磷酸脂质 A(MLA)
 0.5 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5
 2 毫克/毫升破伤风类毒素(Accurate Antibodies)
- 30 高度可变形的泡囊(Transfersomes™):
 87.4 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)
 12.6 毫克胆酸钠(NaChol)

相对于 SPC 为 0.04% 摩尔的单磷酸脂质 A(MLA)

0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

0.1 毫升乙醇

每只小鼠每次免疫采用的破伤风类毒素剂量为 40 微克或 80 微克 TT

- 5 施加区域: 每次免疫在每只小鼠上背部的 1 平方厘米或 2 平方厘米为 40 微克或 80 微克 TT。

用常规泡囊获得的结果与用高度可变形性泡囊测得的数据不同: 简单的脂质体不能通过屏障中的窄孔, 也不能引发高的抗体滴度。相反, 具有高屈曲性和可变形性、因而更适合的膜的泡囊显示出更容易移动通过屏障中的窄孔, 根据血清吸光度测定的
10 结果(比较图 2), 它施加在完整皮肤上后产生了显著量的抗体。

实施例 5-10

抗原剂量效果

高度可变形的泡囊

- 15 86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

相对于 SPC 为 0.04% 摩尔的单磷酸脂质 A(MLA)

0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

0.1 毫升乙醇

- 20 破伤风类毒素(TT; Accurate Antibodies, New York, USA)浓度:

空的、0.25 毫克/毫升、0.5 毫克/毫升、1 毫克/毫升、2 毫克/毫升, 每只小鼠每次免疫 0 微克、10 微克、20 微克、40 微克或 80 微克 TT

施加区域: 每次免疫在每只小鼠上背部的 1 平方厘米给予 0 微克、10 微克、20 微克、40 微克, 和 2 平方厘米给予 80 微克 TT。

- 25 该系列实验的结果在图 3 中有所描述。该图清楚地表明, 对于表皮给予的超变形性载体中的破伤风类毒素的免疫应答随破伤风类毒素剂量的增加而增加。这反映在血清吸光度(每次免疫最高达 20 微克剂量), 特异性抗体滴度(每次免疫最高达 40 微克的剂量)和存活数据(对于每次免疫高达 80 微克的剂量没有饱和)上。

- 30 除 IgG1(强烈表明应答饱和)和 IgG2b(饱和度可能在每次免疫 40 微克-80 微克之间)外, 同种型分布方式不清楚。IgM 显示了类似于 IgG1 的剂量依赖性。IgG2a 得到的图令人困惑。

实施例 11-13

抗原纯度的影响

高度可变形的泡囊:

如实施例 5-10 所述(只是用不纯的 TT 处理的组不接受免疫佐剂脂质 A)

5 破伤风类毒素: 2 毫克/毫升, 对应于每只小鼠每次免疫 80 微克 TT。

施加面积: 上背部 2 平方厘米。

当类毒素已经非侵入性地施加到皮肤上时, 抗原纯度对小鼠产生抵抗破伤风类毒素的保护力有很大影响。(用注射抗原获得的类似结果没有显示)。

为了证实上述内容, 首先用体外培养的破伤风梭菌培养基滤液作为不纯的抗原。

10 为了获得部分纯化的抗原, 使该滤液通过 10kDa 的截留膜, 用 pH6.5 的磷酸缓冲液充分洗涤; 在该过程中, 培养滤液被浓缩 15 倍。纯化的类毒素购自 Accurate Antibodies, NY, USA。

用标称剂量相同的不纯抗原、添加单磷酸脂质 A 的部分纯化的抗原或加入单磷酸脂质 A 的纯化抗原免疫 Swiss 白化小鼠(n=6)。抗原始终与类似的 Transfersomes
15 结合。后者的组成及其制备方法如前面的实施例所述。免疫方案详情、取血时间、攻击和分析详情也与上述实施例相似。

结果显示在图 4 中。图 4 说明了抗原纯度在决定抗 TT 免疫应答的性质和强度中所起的作用。图 4 中显示的数据还表明, 特异性抗体滴度的吸光度并不是治疗(即, 表皮疫苗接种的预防效果)的可靠预测器。这是因为特异性抗体同种型中有很大的差别, 如果采用足够纯的抗原, 它只含有与 Th2 样 IgG1 组分相比很大部分的 Th1 样
20 IgG2b(另见第 12 页)。

实施例 14-15:

表皮和皮下给药的比较

25 高度可变形的泡囊 Transfersomes™(IDEA):

如实施例 5-10 所述

破伤风类毒素剂量:

每次表皮免疫用 80 微克 TT

(用 2 毫克 TT/毫升, 施加面积为 2 平方厘米)

30 每次皮下免疫用 40 微克 TT(用 2 毫克 TT/毫升)

用与实施例 1-4 所述大致相同的实验步骤, 测定抗体-特异性血清滴度、抵抗破伤风类毒素的动物保护作用水平以及不同特异性抗体同种型的相对出现率。

结果显示在图 5 中。尽管在侵入性和非侵入性给予抗原后，血清吸光度的免疫接种依赖性增加是相当的，但是在后一情况中，初次免疫后的滴度低 6 倍，第二次加强免疫后低 8 倍。同样，尽管 Th2 的 TT 特异性水平表明 IgG1 在本实验的两个分枝中是相似的，但是其它抗体亚型的特异性读数，尤其是 IgG2a 以及在较早时间 IgG2b 分别比抗原注射后高 25 倍和 3 倍。然而，试验小鼠在随后注射的通常致死剂量的破伤风毒素攻击下存活的可能性与抗原给药途径无关(至少在本系列试验方案中)。

实施例 16-17

用佐剂处理皮肤(预先注射)的效果

10 高度可变形的泡囊 Transfersomes™(IDEA):

89.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

10.7 毫克胆酸钠(NaChol)

相对于 SPC 为 0.04% 摩尔的单磷酸脂质 A(MLA)

0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

15 0.1 毫升乙醇

每只小鼠用破伤风类毒素, 2 毫克/毫升, 对应于 80 微克 TT/用不纯的抗原对每组 6 只 Swiss 白化小鼠进行免疫

施加面积: 上背部上的 2 平方厘米

20 将与 Transfersomes 结合的大分子透皮输送通过皮肤看来是非常柔和的; 因此, 如果抗原用量较少或不纯, 它不能触发免疫系统发生 Th2-样免疫应答。为了改变这种情况, 可以(预先)刺激皮肤, 使器官在经超变形泡囊进行实际的非侵入性给予抗原之前释放出相应的信息分子。为此, 我们预先向施加部位注射了 0.1 毫升盐水、或非抗原性泡囊的轻微配方, 后者在使用前一天从类似于抗原携带泡囊的生物可降解物质制得。对于其它对照, 还可在免疫载体施加到皮肤上之前 24 小时将不完全的 Freund 佐剂注射入不同动物中。

图 6 给出了结果的说明性例子。图 6 揭示, 经注射预处理的小鼠中的特异性抗体滴度比作为对照的施加在皮肤上的载体配方更高, 保护作用得到改进。不完全 Freund's 佐剂的效果令人惊奇地低。

30 值得注意的是, 血清吸收度或特异性抗体滴度与表明保护性疫苗接种效果的动物存活没有相关性。

实施例 18-21:

低分子量佐剂(脂质 A)的影响

高度可变形的免疫调节的 TT-Transfersomes™(IDEA):

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

5 相对于 SPC 为 0.04%摩尔的单磷酸脂质 A(MLA)

0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

0.1 毫升乙醇

高度可变形的标准的免疫泡囊, TT-Transfersomes™(IDEA):

如上所述, 但是不加入 LA

10 破伤风类毒素: 2 毫克/毫升 每次免疫接种用 20 微升或 40 微升, 相当于 40 微克或 80 微克 TT

施加面积: 1 平方厘米或 2 平方厘米, 分别在上背部。

我们认为, 当已经通过屏障的 TT 载体将抗原呈递给机体时, 为了获得所需的针对抗原的免疫学作用, 免疫活性(通常是免疫增强性)分子必须存在于皮肤内。为了证实该结论, 我们比较了有或没有熟知的免疫刺激剂(例如, 单磷酸脂质 A(LA), 已知它引发体内产生 TNF)时通过 Transfersomes 来非侵入性地免疫呈递 TT 的结果。采用两种不同的抗原剂量。在任一情况下, 均能获得充分的滴度和可测定的预防性免疫应答(部分免疫力)。

20 血清吸光度如预计的那样增加(比较图 7)。相反, 用较低剂量看到的 LA 效果比较高剂量好。这可能是试验差异, 或反映了剂量对局部免疫数据作用曲线的非线性关系。例如, 佐剂可能仅在低剂量范围内有效, 而在高剂量方案中, 系统是准饱和的, 使得佐剂在试验设定范围内进一步增强免疫应答几乎不可能。在本系列试验中, 较高的 TT 剂量与单 LA 联合应用, 获得了抵抗 50LD₅₀ 的正常致死性攻击的完全的动物保护作用。

25 还观察到, 与没有 LA 的组相比, 有 LA 的组的 Th1-细胞因子 IgG2b 较高。这一差别在低剂量时更为显著(相差 4 倍), 而在高剂量下只观察到增强 2 倍。主要存在的是 Th2-细胞因子 IgG1, 除了 IgG2b 提供相当保护作用的低剂量 LA 组之外。

实施例 22-23

30 高分子量佐剂 IL-12 细胞因子的影响

高度可变形的泡囊 Transfersomes™(IDEA):

如实施例 5-10 所述, 每毫升免疫原悬浮液有 0.01 毫克 IL-12。

破伤风类毒素，2 毫克/毫升，对应于每只小鼠每次免疫用 80 微克 TT
(如实施例 9-11 所述经部分纯化)

施加面积：Swiss 白化小鼠上背部的 2 平方厘米。

为了研究细胞因子对于用破伤风类毒素进行非侵入性表皮疫苗接种结果的影响，
5 每只小鼠采用单磷酸脂质 A 与 0.4 微克 IL-12 的组合。每只小鼠给予 80 微克 IL-12 以
及加有破伤风类毒素和单磷酸脂质 A 的 Transfersomes。免疫方案详情、取血时间、
破伤风毒素最终攻击与上述相同。

一系列试验的结果描述在图 8 中。证实结论是，在表皮给予 TT 后免疫呈递期间
10 皮肤中促 Th2 细胞因子的存在积极地影响疫苗接种的结果。这可从血清吸收度、特异
性抗体滴度以及试验动物存活可能性看出。

通过将 IL-12 以外的细胞因子掺入免疫原配方中，验证了实施例 22-23 讨论的效
果。结果显示在图 9 中。

实施例 24-25:

15 高分子量佐剂(IFN- γ 和 GM-CSF+IL-4)的影响

高度可变形的泡囊 Transfersomes™(IDEA):

如实施例 5-8 所述，加上

每毫升免疫原悬浮液有 0.05 毫克 IFN- γ 和 0.004 毫克 GM-CSF 和 0.004 毫克 IL-4
破伤风类毒素，2 毫克/毫升，对应于每次免疫每只小鼠 80 微克 TT(不纯的)

20 施加面积：Swiss 白化小鼠上背部的 2 平方厘米

用不同细胞因子的混合物也证实了实施例 22-23 所讨论的效果。结果显示在图 10
中。

实施例 28-29

25 加强免疫的影响(免疫应答的成熟)

在前述大多数实施例中，无论在免疫期间何时测定吸光度，都观察到了一致的模
式。与初次免疫后获得的应答相比，每一次加强都使免疫应答增加(见图 3、4、5、6、
7、8)。初次应答的特征是主要为 IgM，第一次加强后逐渐出现 IgG，第二次加强后出
现了更多量的 IgG，同时 IgM 消失。这种典型的同种型模式意味着免疫应答的亲合力
30 成熟。在该过程，特异性抗体混合物的平均亲和力随反复免疫而增加。

各种表皮疫苗接种实验的结果提示，将侵入性初次疫苗接种与非侵入性二次(加
强)免疫组合起来是有利的。

实施例 30-72

Transfersomes 使皮肤体外释放细胞因子

高度可变形的泡囊(C 型 Transfersomes):

- 5 87.4 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)
 12.6 毫克胆酸钠(NaChol)
 0.9 毫升磷酸缓冲液, 50mM, pH7.3
 2.5 微升

高度可变形的泡囊(T 型 Transfersomes):

- 10 50 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)
 50 毫克聚乙二醇-20-缩水山梨糖醇-单油酸酯(Tween 80)
 0.9 毫升磷酸缓冲液, 50mM, pH6.5
 2.5 微升

正对照 A:

- 15 2.5 微升 5%十二烷基硫酸钠(SDS)

正对照 B:

100 微升脂多糖(LPS; 10^5 U/ml)

负对照:

2.5 微升磷酸缓冲盐溶液(PBS)

- 20 所有产物均不稀释进行测试。

细胞类型: 采用形成具有致密角质层的多层上皮的正常人角质化细胞; 组织学揭示与体内人表皮非常相似。

方法: 将角质细胞接种到化学组成确定的、有添加物的培养基中 0.63 平方厘米的聚碳酸酯滤膜插入物上, 在气液界面处培育 17 天。

- 25 测试测定: 用微量移液管加入给定量的各测试产品, 用小的无菌装置均匀分散在 8 个重建表皮的角质层表面上。于 37°C、5%CO₂ 下培育培养物 24 小时。用 0.5 毫升 PBS 洗涤一式四份的培养物(只是 LPS 处理的细胞一式两份培育), 37°C、5%CO₂ 下在 300 微升 0.5 毫克/毫升 MTT 上培育 3 小时。

- 30 采用待测定的每种免疫调节剂特异性的 ELISA 试剂盒(R&D systems UK; Quantikine)定量测定组织下基质中的炎性介质(IL 1 α 、IL2、IL4、IL8、IL10、IFN- γ 和 TNF- α)的释放。

	IL1- α (pg/ml) 平均值 \pm 标准偏差	IL8(pg/ml) 平均值 \pm 标准偏差	TNF- α (pg/ml)
负对照(PBS, n=2)	5.1 \pm 0.5	<31	不能检测到
正对照 A(SDS 5%, n=2)	314.2 \pm 6.1	147.5 \pm 32	不能检测到
正对照 B(LPS, n=1)	32.0	5161	113.4
Transfersomes C(02- 05, n=2)	12.3 \pm 0.9	68.3 \pm 16.8	不能检测到
Transfersomes T (TT0009/175, n=2)	11.7 \pm 1.2	50.8 \pm 14.0	不能检测到
Transfersomes O (TT0017/15,n=2)	185.5 \pm 170.1	58.4 \pm 27.0	不能检测到

Transfersomes O 观察到有较大标准偏差可以解释为该产品难以在重建表皮角质层上均匀地分散。

当细胞与含有 LPS(它是确定的免疫佐剂)的正对照接触后, TNF- α 水平升高到 113.43pg/ml 的水平。

- 5 在细胞与 Transfersomes 培育后, IL 8 的浓度超过检测下限 2 倍, 在一个例子中在 95%置信水平下没有意义(在另一个例子中几乎没有意义), 但是这二种状况与含有免疫佐剂 LPS 的正对照所观察到的增加(提供了高 167 倍的数值)相比都可以忽略。

- 10 非特异性刺激剂 SDS 使皮肤细胞释放出大量 IL-1 α 进入体外培养基。有这样的可能, 即, 与 Transfersomes O 培育的细胞释放出一定的量, 包含高浓度的有潜在刺激性的油酸, 但是后一试验系统所得结果中大的标准偏差使得结论不牢靠。

其它测试的 A 型和 B 型 Transfersomes 的 IL-1 α 浓度变为本底水平的大约 2 倍。与负对照相比, 该差别在统计学上有意义, 但是在实践中是可以忽略的, 因为含有 LPS 的正对照所观察到的增加超过 60 倍。

- 15 IFN- γ 、IL-2、IL-4 或 IL10 没有升高至可测定的水平, 提示在任何其它测试条件下没有释放出这些细胞因子。

总之, 上述发现提示 Transfersomes 不释放细胞因子, 也不诱导皮肤细胞产生这些分子。这解释了当用这些载体将抗原或变应原输送通过皮肤并引发治疗性或预防性免疫应答时需要使用免疫佐剂/调节剂的原因。

- 20 实施例 73-82:

细菌细胞壁组分霍乱毒素作为特异性免疫佐剂:

高度可变形的泡囊 Transfersomes™:

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

5 0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

霍乱毒素(CT; Sigma, Neu-UIm), 每次免疫 10 微克, 如果需要, 加上

破伤风类毒素(TT, 纯的; Accurate Antibodies) 2 毫克/毫升

在 4-6 只 Swiss 白化小鼠上背部的 2 平方厘米区域内, 表皮给予的剂量分别为每次免疫每只小鼠 0 微克 TT(负对照)、1 微克 TT、5 微克 TT、10 微克 TT、20 微克 TT、
10 40 微克 TT(用 CT 的情况下)和 80 微克 TT(没有 CT); 在正对照组每只小鼠相应部位每次免疫皮下注射 20 微克 TT。将未免疫的小鼠用作另一负对照。

当测试配方中加入霍乱毒素与破伤风类毒素结合时, 表皮给予抗原的保护效果十分优异。没有该免疫佐剂的配方产生了较差的保护作用, 这可通过 1/4(25%)的动物在用破伤风毒素攻击后瘫痪的事实来证明。

15 图 10 的结果揭示, 每次免疫给予超过 20 微克的抗原确保了完全的保护作用, 而其它测试佐剂或佐剂处理却不是这样(见前面的实施例)。较少的抗原给药量提供了类似的定性影响, 但是不足以保证所有测试小鼠都存活(除每次免疫接受 5 微克 TT 的测试组外)。(这暗示每次免疫 1 微克-15 微克之间的 TT 剂量属于过渡区。)然而, 霍乱毒素的其它剂量可能是同样或甚至是更有利的。

20

实施例 83-85:

大肠杆菌不耐热毒素(HLT)作为免疫佐剂

高度可变形的泡囊 Transfersomes™:

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

25 13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

不耐热毒素(HLT, SIGMA, Neu-UIm), 1 微克/毫升, 如果需要, 加上

破伤风类毒素(TT, 纯的; Accurate Antibodies) 2 毫克/毫升

采用不同的佐剂/抗原相对浓度来测试最常用的一种 ADP 核糖基化酶透皮疫苗
30 接种的效果。如前面的实施例所述, 制备 Transfersomes。其它的试验细节(动物居所; 抗原给药; 滴度测定)如上所述。

对 Swiss 白化小鼠进行免疫, 给药剂量为每只小鼠每次表皮给予 20 微克 TT 和

1-2 微克 HLT，正对照为皮下注射 0.5 微克 TT。结果示于图 11。

与没有佐剂皮下注射抗原或与没有佐剂在皮肤上用 Transfersomes 给予 TT 的情况相比，发现当用 HLT 作为佐剂时，抗 TT 滴度有所提高。发现抵抗破伤风毒素正常致死攻击的体液应答和保护作用与剂量有关，较高的 HLT 剂量有较高的抗 TT 滴度和改进的存活率。测得的结果(数据未显示)提示，有用的 HLT 剂量范围从 100 毫微克/剂开始，而在该系列测试所用实验条件下实际上有用的最好剂量约高 100 倍。这表明，与表皮给予的 Transfersomes 结合使用的佐剂剂量的上限与常规侵入性(皮下)免疫所用剂量的数量级相当，至多高 10 倍；我们认为实际下限比常规皮下剂量小 1-2 个数量级。故提出其它有关免疫佐剂也应有类似的关系。

10

实施例 86-87:

用组胺进行局部预处理

高度可变形的泡囊 Transfersomes™:

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

15

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

0.9 毫升磷酸缓冲液，10mM, pH6.5

破伤风类毒素(TT, 纯的; Accurate Antibodies) 2 毫克/毫升

1 毫克/毫升组胺溶液，以 10mM, pH6.5 的磷酸缓冲液配制

20 为了测试其它方式对于免疫应答调节的效果，在用 Transfersomes 皮肤上刚要给予抗原之前或前 15 分钟在表皮免疫部位将 10 微克组胺溶液注入小鼠该部位。预计这将诱使皮肤释放细胞因子，和/或对非侵入性透皮免疫接种的结果有其它一些积极的作用。为了验证该假设，如前面实施例所述制备了 Transfersomes，并如上文所述用 Swiss 白化小鼠进行此实验(只是用组胺进行预处理)。

25 图 12 证实了上述假设。结果显示有良好的体液应答，且组胺注射与表皮免疫之间需要有一段时间，以获得抵抗破伤风毒素攻击的合理的保护作用。与皮肤上用 Transfersomes 中的 TT 在没有佐剂下所测得的结果相比，表明注射组胺有助于加强动物免疫应答。

实施例 88-89:

30

初次免疫和加强免疫的不同的给药途径

高度可变形的泡囊 Transfersomes™:

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

霍乱毒素(CT; SIGMA, Neu-UIm), 每次免疫 0-1 微克,

破伤风类毒素(TT, 纯的; Accurate Antibodies) 2 毫克/毫升

5 关于泡囊制备和动物实验的详细描述可在前述实施例中找到。

初次免疫的给药剂量为皮下单独注射 20 微克 TT, 或 0.5 微克 TT 加上 1 微克 CT。但加强免疫采用表皮给药。如前面所提示的, 该组合大大提高了疫苗接种的效果。

10 抗 TT 滴度高得足以产生 100% 的抵抗破伤风毒素攻击的保护作用(图 13)。与前面用不含佐剂的 TT-Tfs 在皮肤上进行的实施例的数据相比, 清楚地证实皮下/表皮疫苗联合接种方案是有用的。

因此, 结果提示, 应用于皮肤上的加有抗原的 Transfersomes™为侵入性给予抗原提供了吸引人的补充方法, 这对于加强免疫来说应当是特别重要的。

实施例 90:

15 用破伤风类毒素和霍乱毒素作为抗原进行二价疫苗接种

高度可变形的泡囊 Transfersomes™:

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

0.9 毫升磷酸缓冲液, 10mM, pH6.5

20 霍乱毒素(CT; Sigma, Neu-UIm), 每次免疫 10 微克,

破伤风类毒素(TT, 纯的; Accurate Antibodies) 2 毫克/毫升

霍乱毒素不仅作为佐剂而提高了抗 TT 应答(见前述实施例), 而且它本身也是抗原。因此, 当该佐剂以某一浓度使用时, 它可起第二抗原的作用。然而, 佐剂性能与免疫原性并不线性相关, 这为优化疫苗接种结果(以及在副作用和诱导产生变态反映方面)提供了令人感兴趣的可能性。用 Transfersomes 中的 CT 在小鼠中进行测试研究, 我们发现每次应用 CT 剂量在不到 50 毫微克到至少 10 毫微克之间对于本申请所述目的是有用的。

25

皮肤经过不同体积测试制剂处理(对应于 10 微克 TT 和 10 微克 CT)的小鼠产生了抗霍乱毒素抗体, 表明 CT 有抗原性。这证实超变形泡囊有潜力制备含一种以上抗原的 Transfersomes™至少两价疫苗。

30

图 14 显示了预先用相同载体中的 TT 和 CT 进行免疫的小鼠所测得的 TT 和 CT 滴度。

文献

- Cevc, G. “将药物输送通过皮肤”, *Exp.Opin. Invest. Drugs* (1997) 6: 1887-1937
- Cevc, G., Gebauer, D., Schätzlein, A. Blume, G. “超柔性泡囊 Transfersomes 具有极低的渗透阻力, 可将治疗量的胰岛素输送通过完整的哺乳动物皮肤” *Biochim. Biophys. Acta* (1998) 1368:201-215.
- 5 Deng, H, Qun, L., Khavari, P.A. “可持续的皮肤基因输送” *Nature Biotechnology* (1997) 15:1388-1390.
- Fries, K.M., Blieden, T., Looney, R.J., Sempowski, G.D., Silvera, M.R., Willis, R.A., Phipps, R.P. “成纤维细胞异质性的证据和成纤维细胞亚群在纤维变性中的作用” *Clin. Immun. Immunopathol.* (1994) 72: 283-292.
- 10 Glenn, G.M., Rao, M. Matyas, G.R., Alving, C.R. “霍乱毒素使皮肤免疫变得可行” *Nature* (1998a) 851:391.
- Glenn, G.M., Scharon-Karsten T, Vasell R, Mallet C.P, Hale T.L和 Alving C.R. “用霍乱毒素透皮免疫保护小鼠抵抗致死性粘膜毒素攻击”, *J. Immunol* (1998) 161:3211-3214.
- 15 Kondo, S., Sauder, D.N “变应性接触性皮炎中的表皮细胞因子” *J.Am. Acad. Dermatol.* (1995) 33:786-800.
- Lohoff, M., Gessner, M., Bogdan, C., Roellinghoff, M. “Th1/Th2 示范和实验小鼠立什曼病” *Int. Arch Allergy Immunol.* (1998) 115:191-202.
- 20 Luger, T.A., Schwarz, T. “细胞因子和神经内分泌激素在皮肤免疫力和发炎中的作用” *Allergy* (1995) 50:292-302.
- Nasir, A., Gaspari, A.A. “接触性皮炎, 临床展望和基础机理” *Clin. Rev. Allergy and Immunol.* (1996) 14: 151-184.
- Pastore, S., Fanales-Belaso, E., Abbanesi, C., Chinni, L.M., Giannetti, A., Girolomoni, G. “在特应性皮炎中角质细胞过量产生粒细胞巨噬细胞集落刺激因子: 皮肤中树突细胞持续激活的暗示” *J. Clin. Invest.* (1997) 99:3009-3017.
- 25 Paul, A., Cevc, G. “非侵入性给予蛋白质抗原, 用牛血清白蛋白表皮免疫” *Vaccine Res.* (1995) 4: 145-164.
- Paul, A., Ceve, G., Bachhawat, B.K. “利用超变形药物载体用大的蛋白质透皮免疫” *Eur. J. Immunol.* (1995) 25:3521-3524.
- 30 Paul, A., Cevc, G., Bachhawat, B.K. “利用超变形药物载体 Transfersomes 用整合膜组分间隙连接蛋白来透皮免疫” *Vaccine* (1997) 16:188-195.

Schätzlein, A., Ceve, G. “不均匀的角质层细胞堆积和完整皮肤的渗透屏障功能：用高度可变形性载体(Transfersomes)的高分辨率共聚焦激光扫描显微镜研究” *Br. J. Dermatol.* (1998) 138:538-592。

Strange, P., Skov, L. Lisby, S., Nielsen, P.L., Baadsgard, O. “施加在完整的正常皮肤
5 和特应性皮肤上的葡萄球菌肠毒素 B 引起皮炎”, *Arch. Dermatol.* (1996) 132:27-33。

Wang, L-F., Lin, J.-Y., Hsieh, K.-H., Lin, R.-H. “表皮接触蛋白质抗原在小鼠中诱导产生主要的 Th2 样应答和 IgE 产生” *J. Immunol.* (1996) 156:4079-4082。

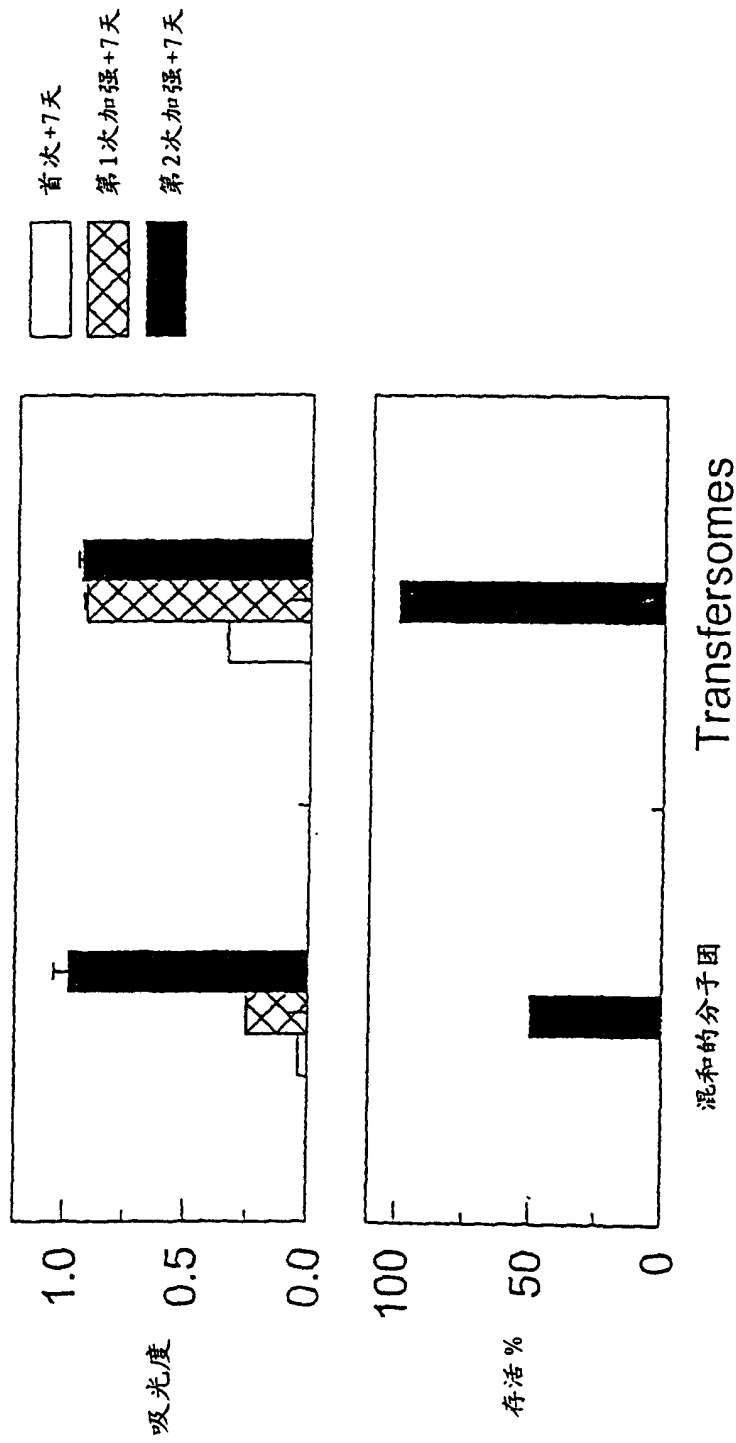


图 1

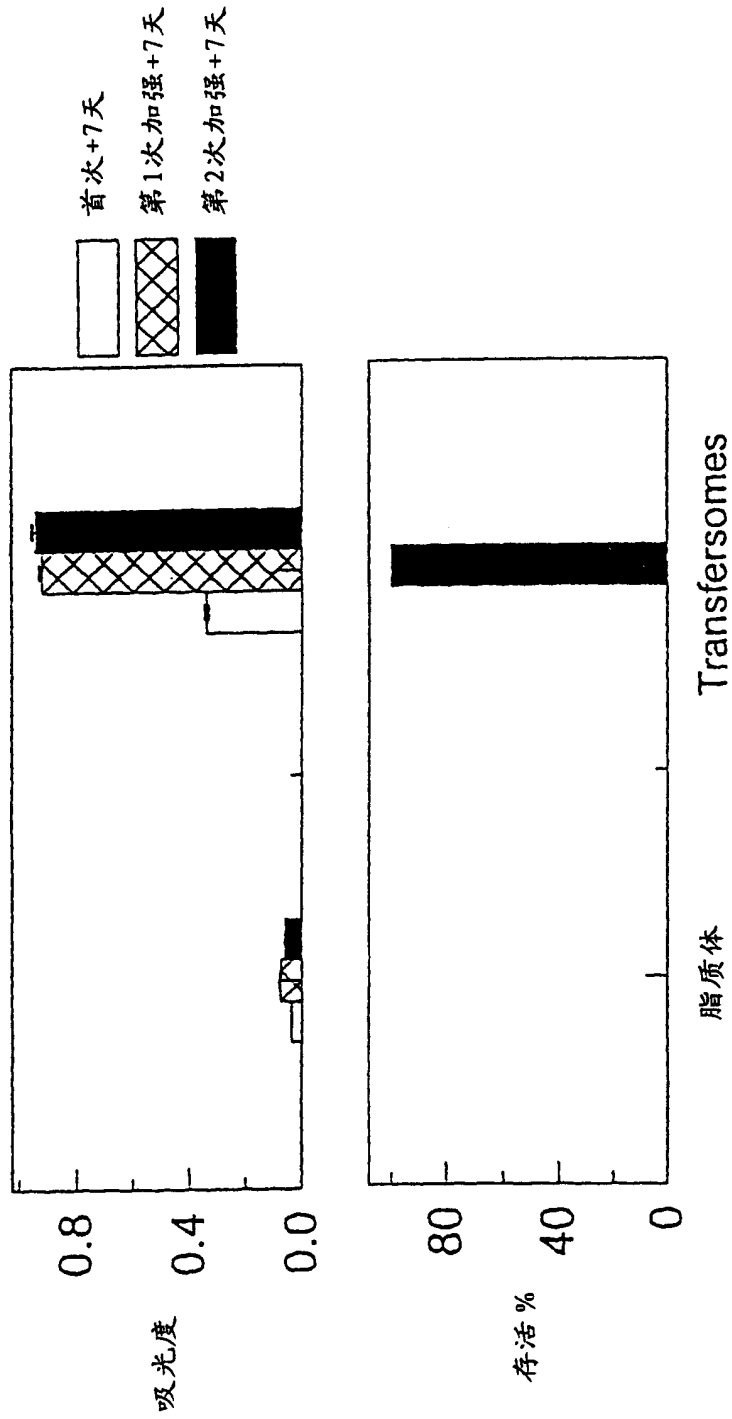
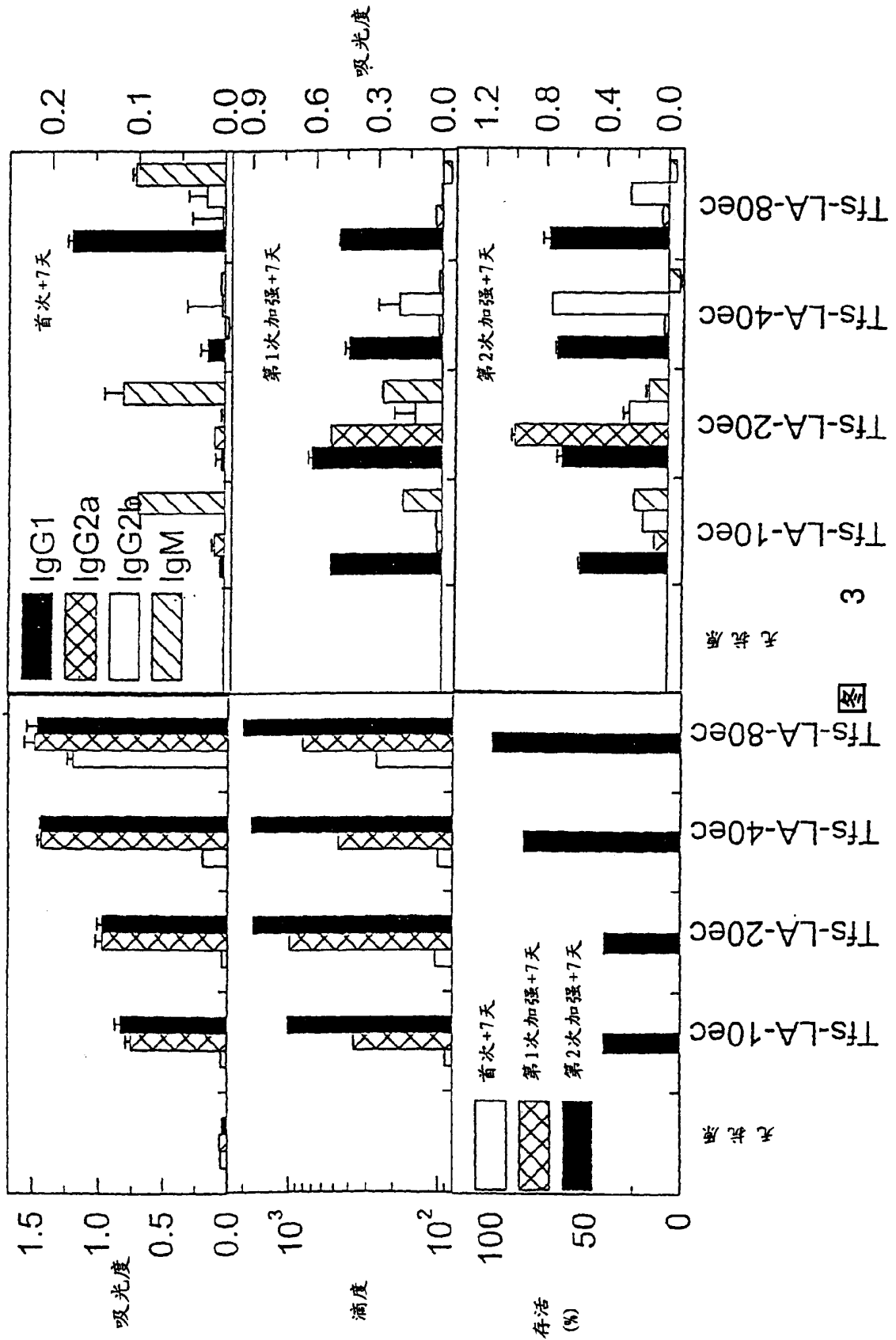


图 2



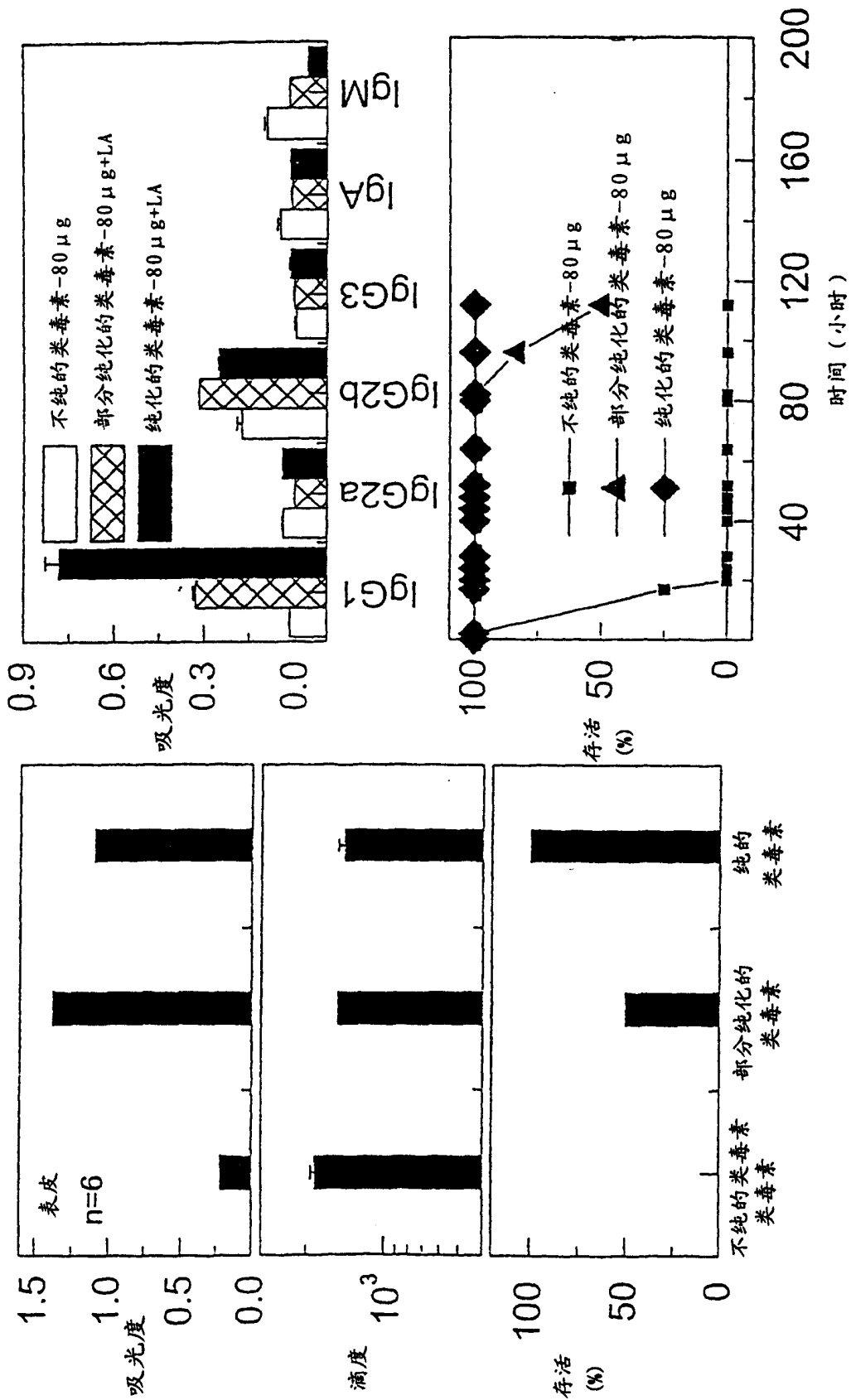
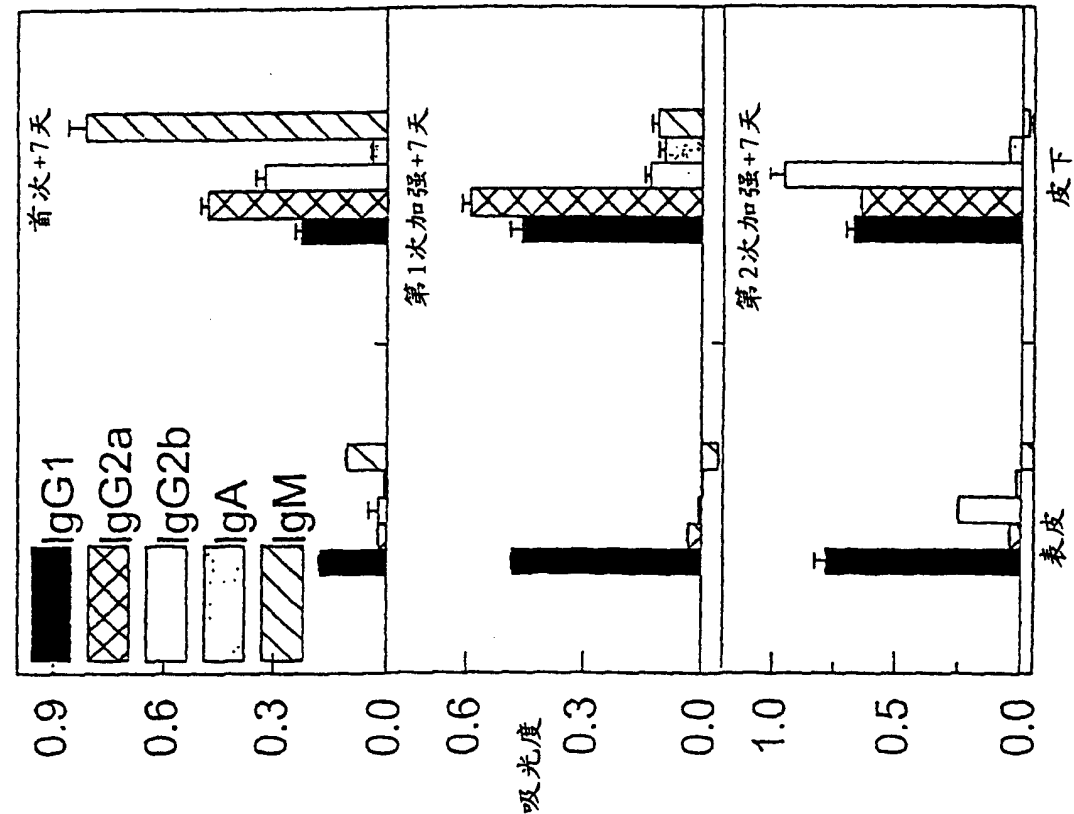
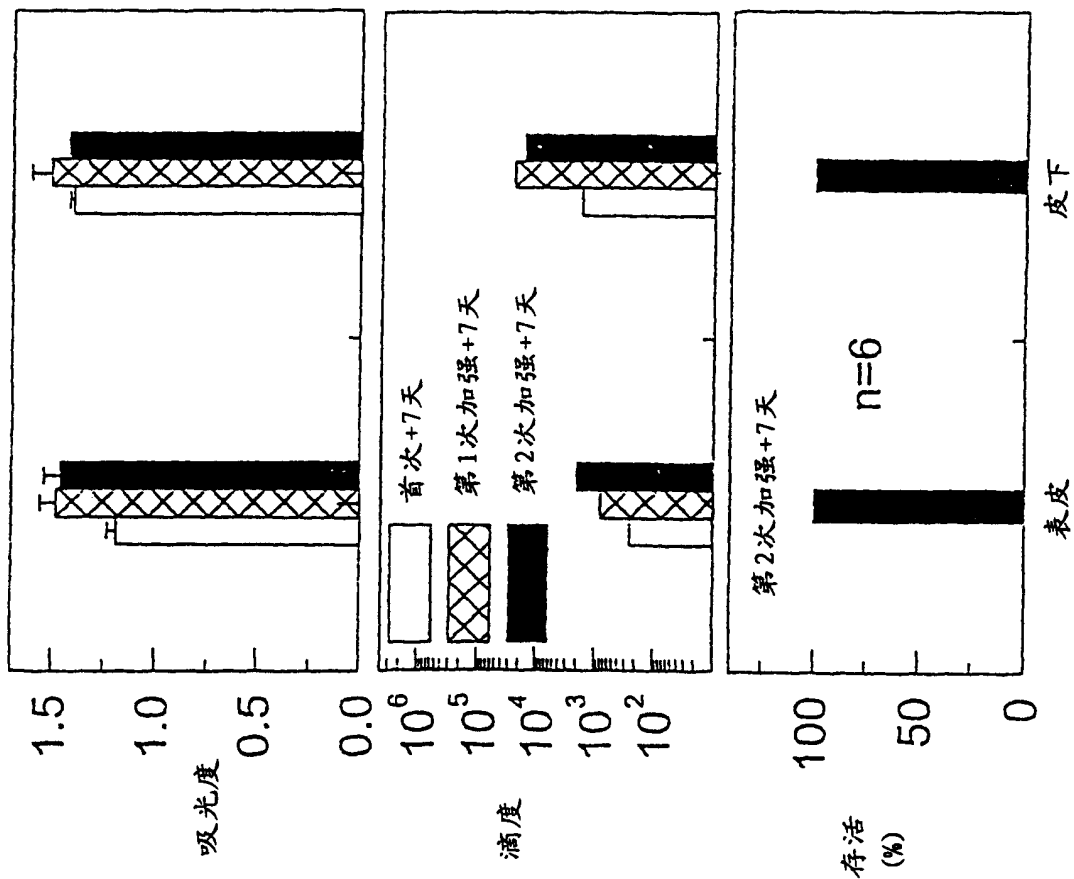


图 4



纯的破伤风类毒素

5



纯的破伤风类毒素

图

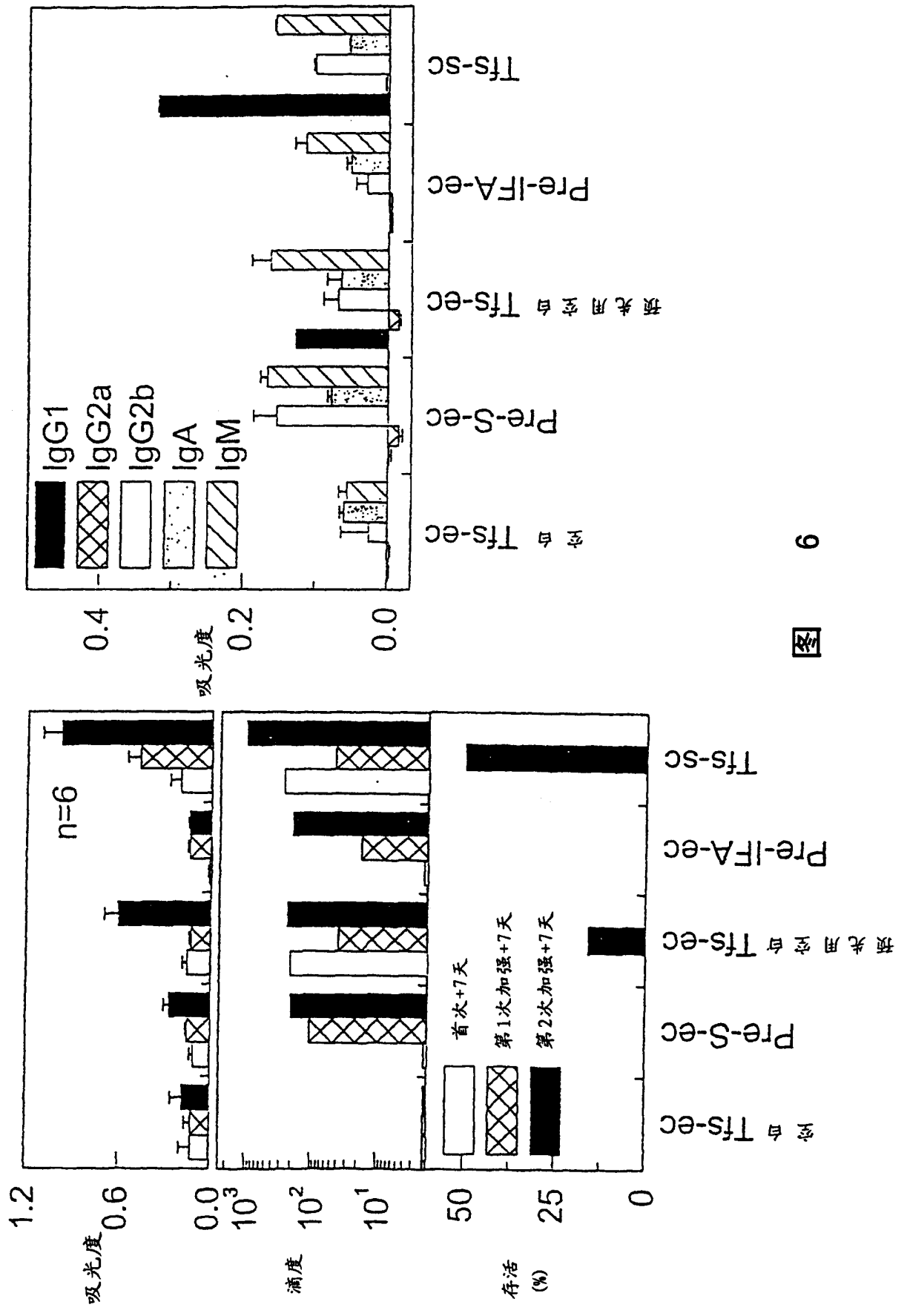
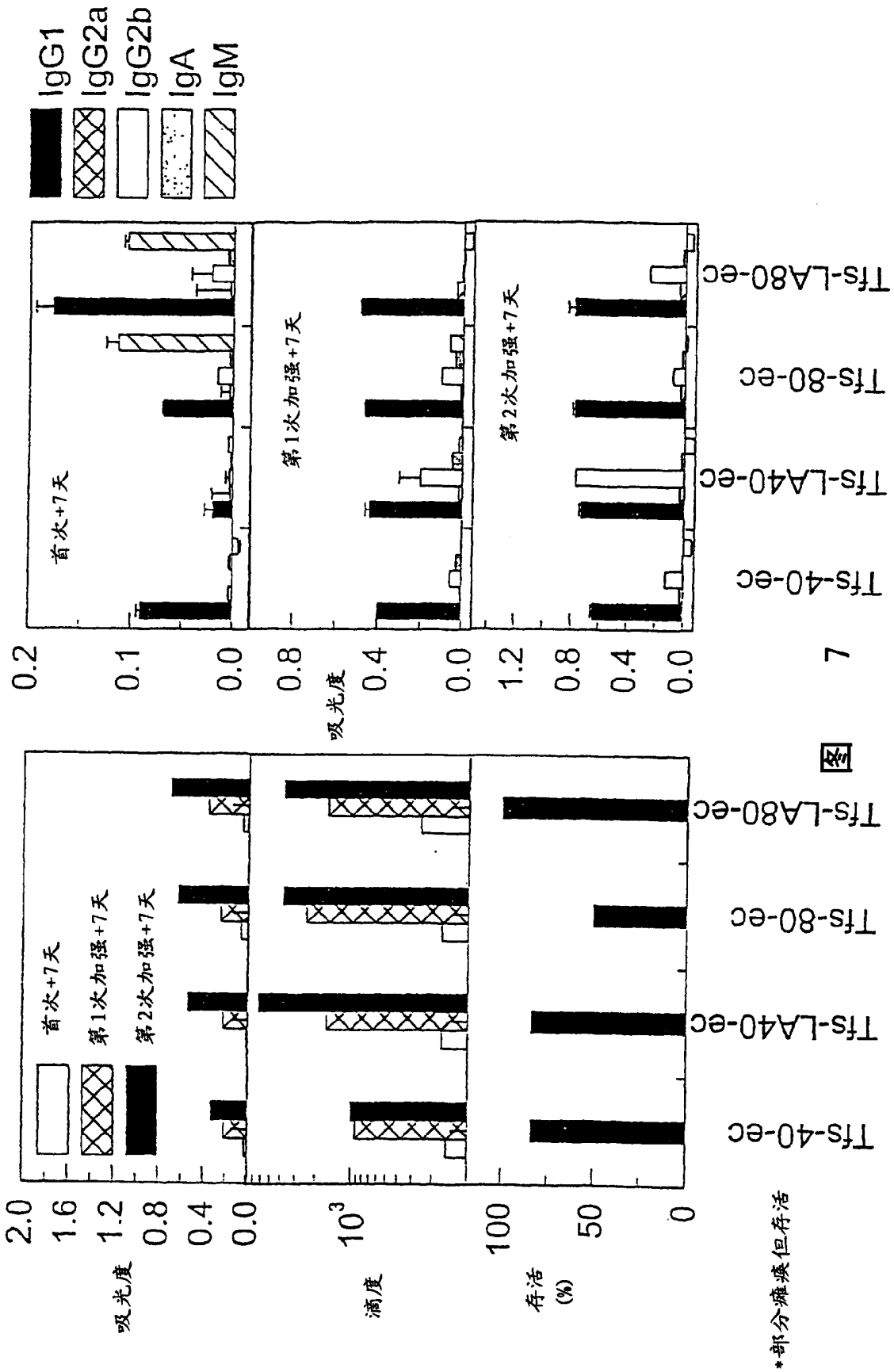


图 6



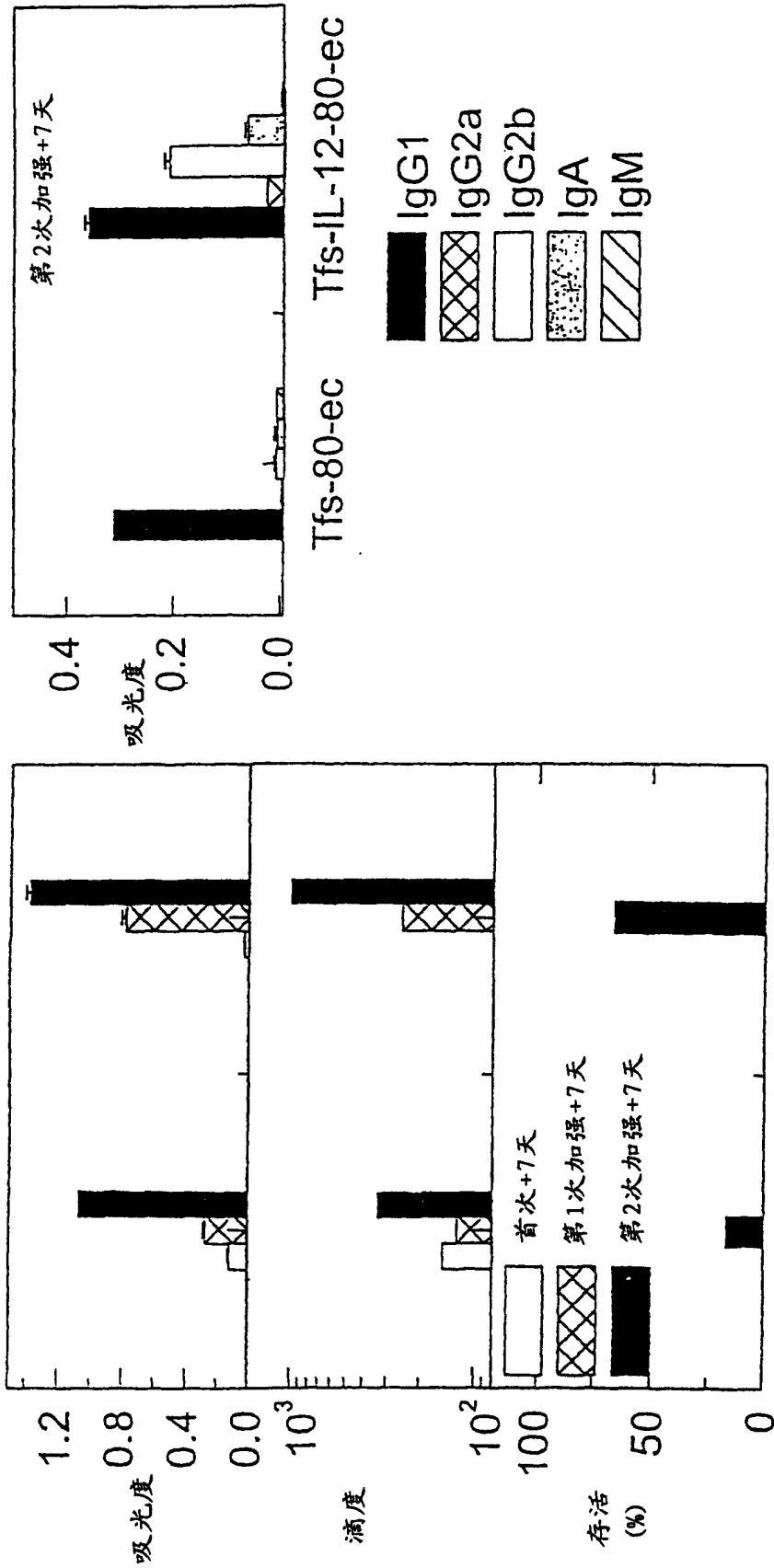


图 8

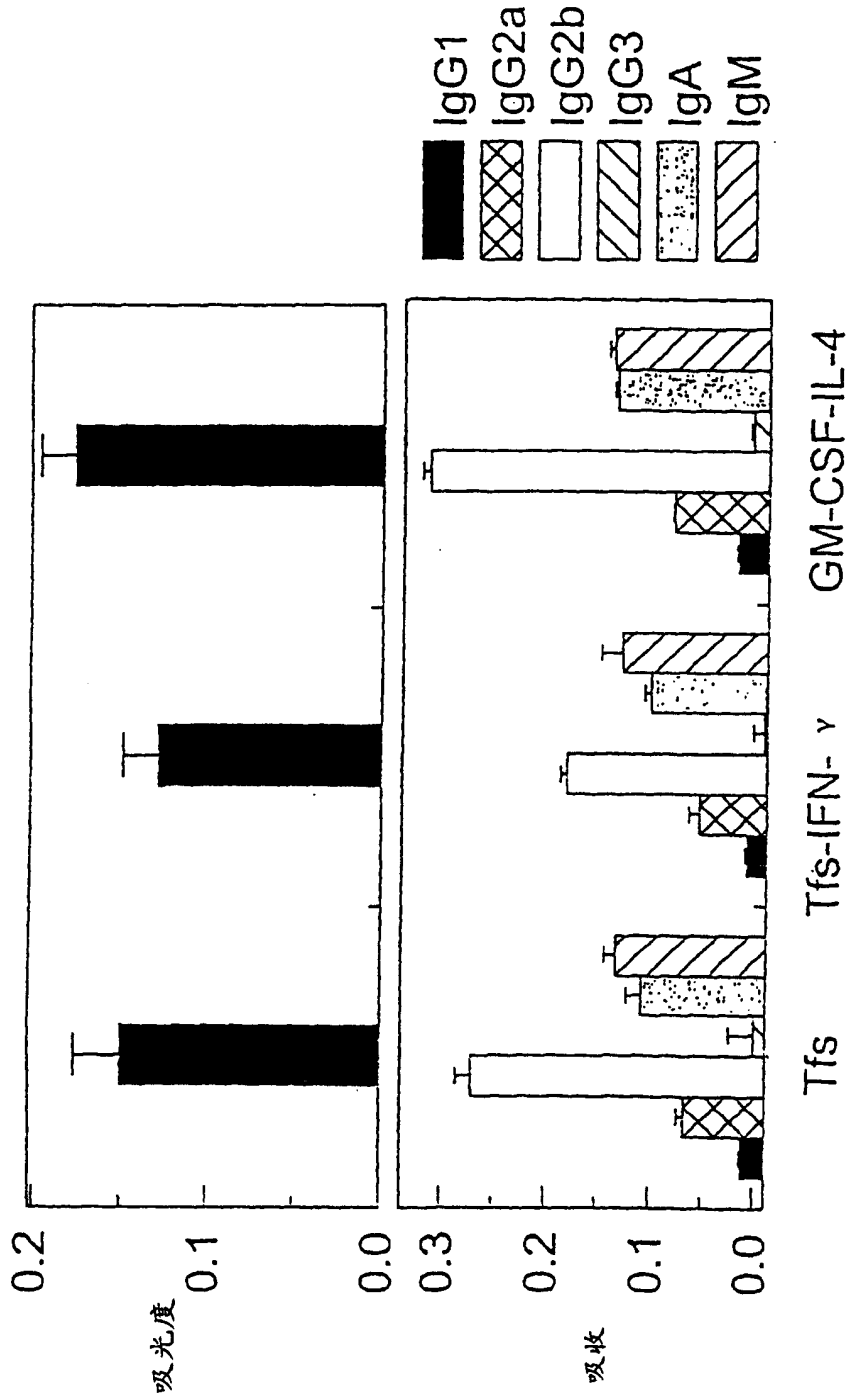


图 9

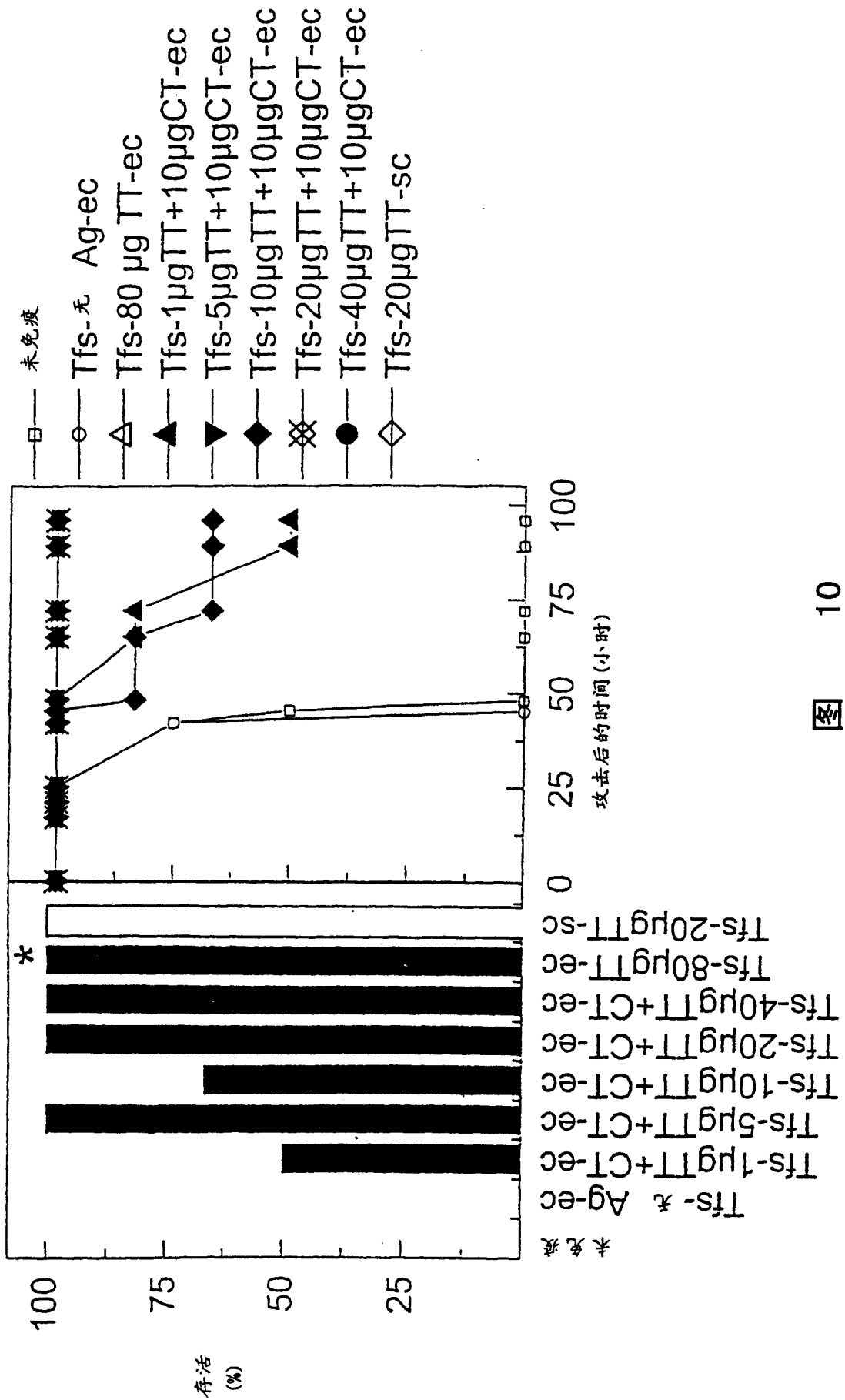


图 10

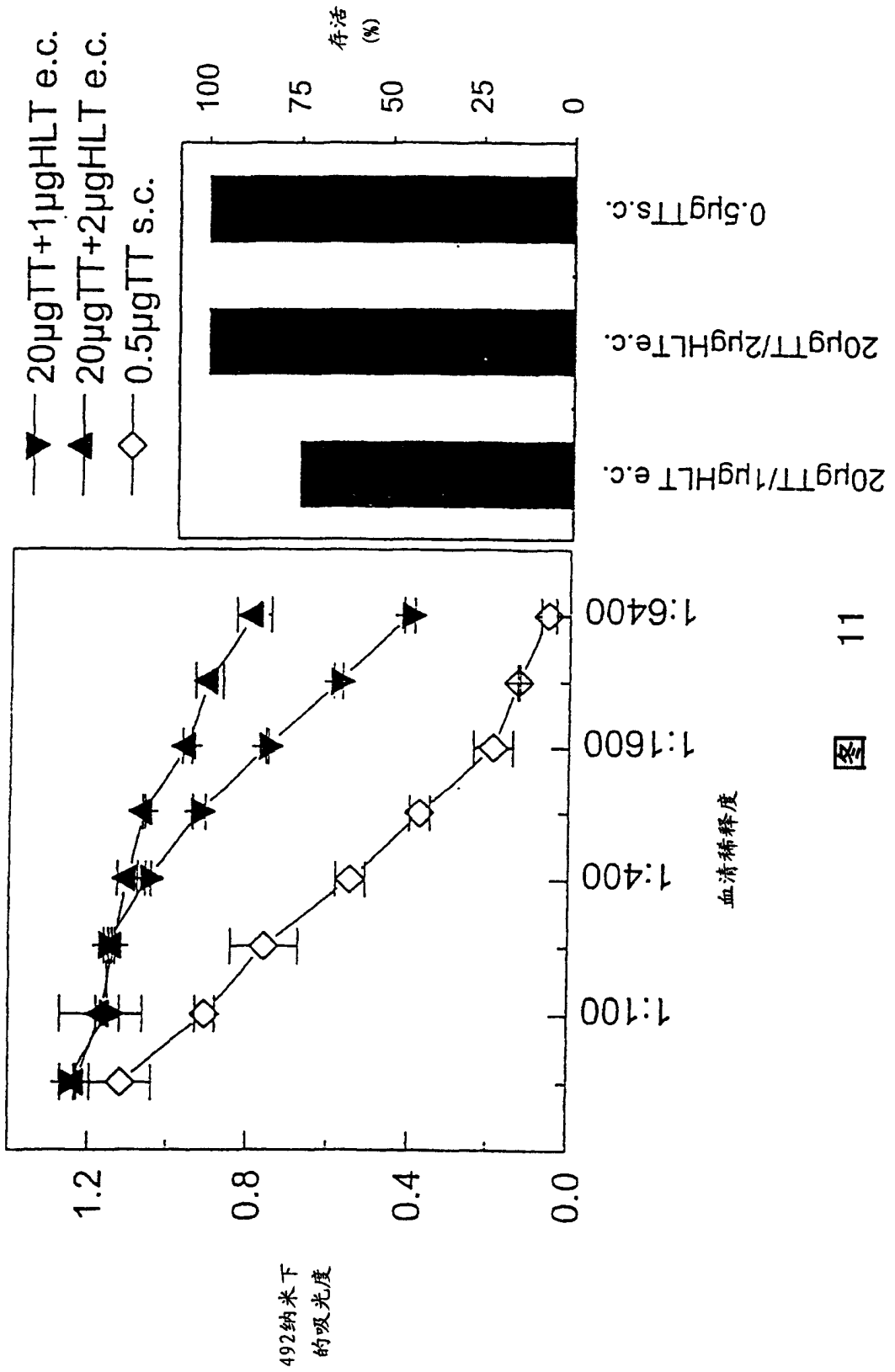


图 11

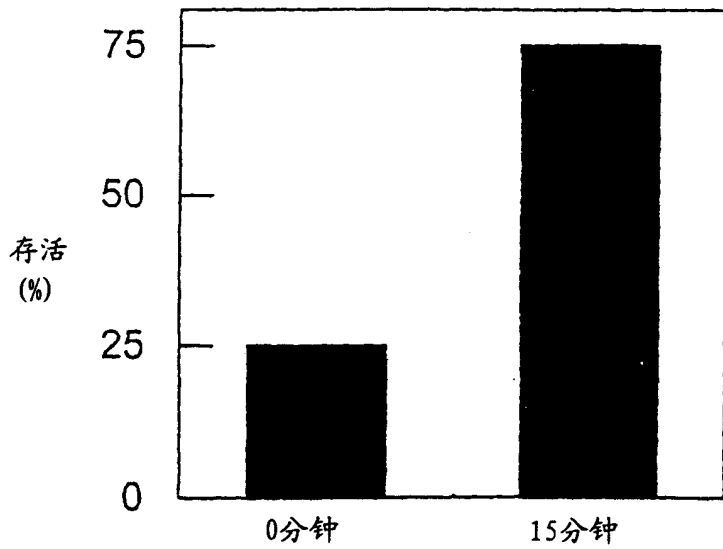
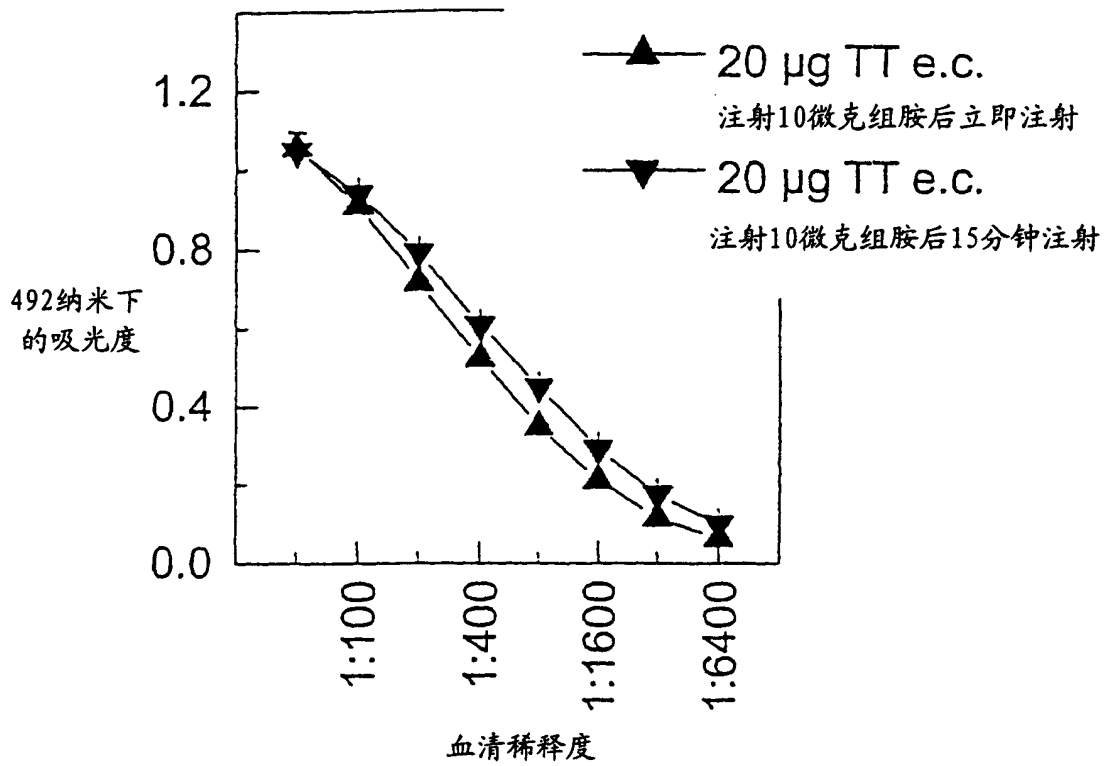


图 12

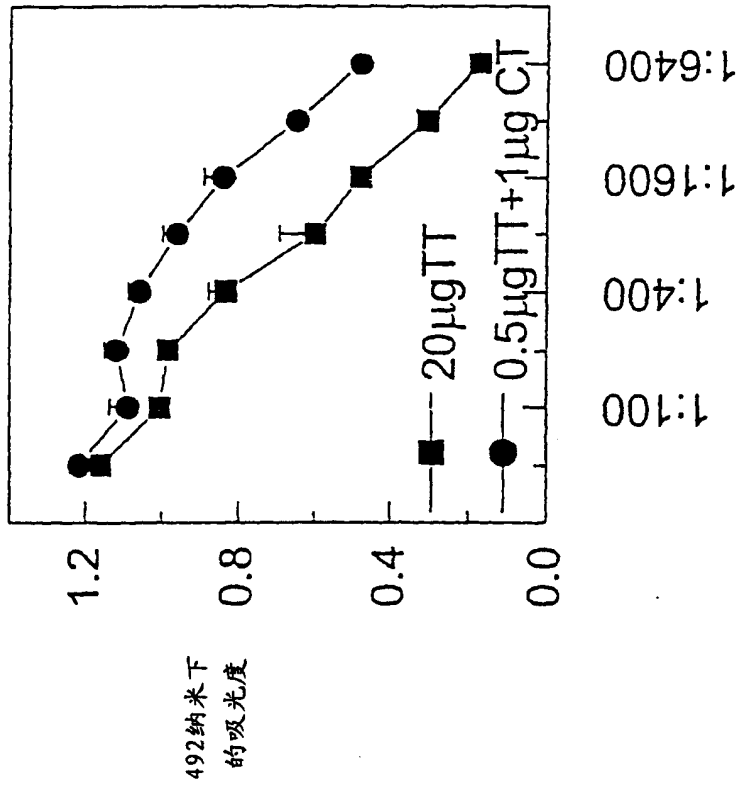
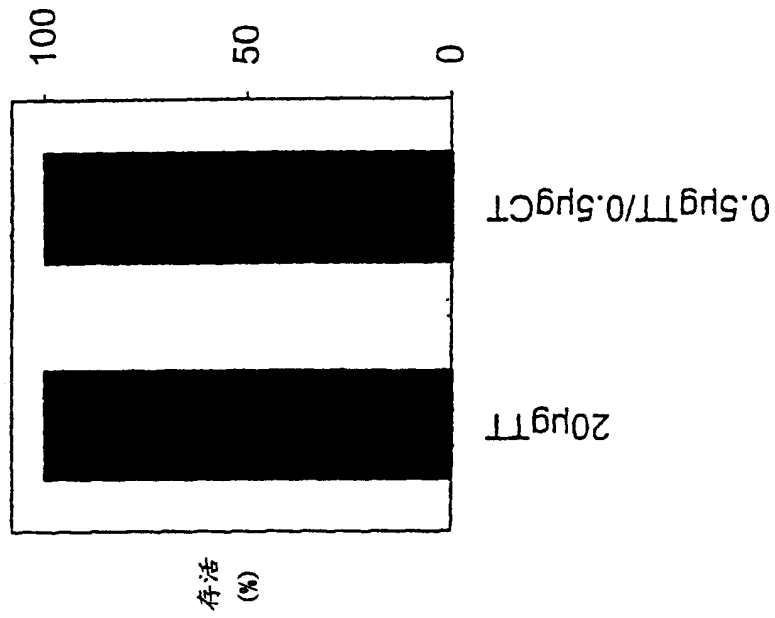


图 13

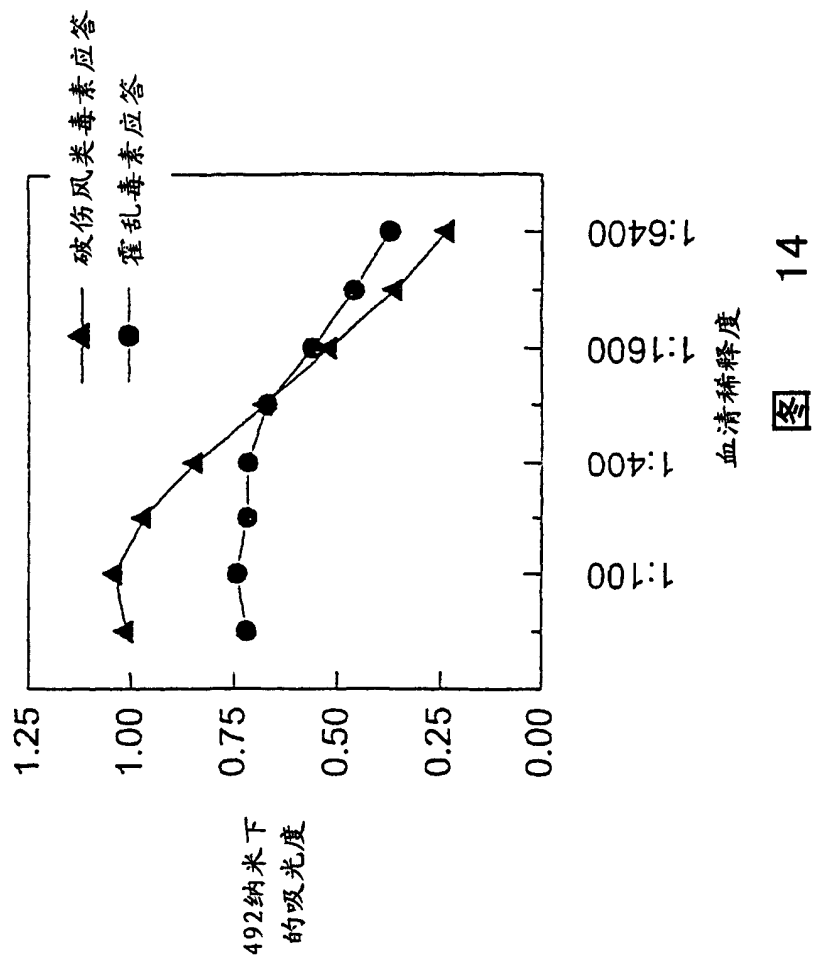


图 14