



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102573802 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080046872. 1

代理人 杨帆

(22) 申请日 2010. 08. 12

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

2009/0618 2009. 08. 12 IE

61/233, 170 2009. 08. 12 US

A61K 9/16 (2006. 01)

A61K 9/50 (2006. 01)

A61K 39/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/061791 2010. 08. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02011/018504 EN 2011. 02. 17

(71) 申请人 希格默伊德药业有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 I · 库尔特 B · F · 麦克唐纳德

V · 阿韦尔萨 E · C · 拉维埃尔

M · T · 罗莎

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

权利要求书 5 页 说明书 63 页 附图 6 页

(54) 发明名称

包含聚合物基质和油相的免疫调节组合物

(57) 摘要

一种药物组合物,其包含其中分散着油滴的水溶性聚合物基质,该组合物包含至少一种选自下组的免疫调节剂:佐剂、抗原或其组合。一种制备成型组合物的方法,所述方法包括将水溶性聚合物的水溶液与油基液体混合形成油包水乳液,所述水溶液和油基液体的至少一种中包含抗原或佐剂或其组合,然后引起或允许所得悬液固化成一个或多个珠或其他成形元件。

1. 一种药物组合物,其包含其中分散着油滴的水溶性聚合物基质,该组合物包含至少一种选自下组的免疫调节剂:佐剂、抗原或其组合。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其特征在于,所述免疫调节是接种疫苗、产生耐受或免疫治疗。

3. 如权利要求 2 所述的组合物,其特征在于,所述至少一种免疫调节剂包含在至少一部分所述油滴中。

4. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物用于口服给药。

5. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,本发明组合物包含至少一种抗原和至少一种佐剂。

6. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,调整该组合物以适应口服给药并在肠道中释放所述油滴。

7. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物具有包衣,以提供所述油滴的受控或靶向释放。

8. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含肠溶聚合物,例如 HPMCP。

9. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含一种或多种任选自非离子型表面活性剂的表面活性剂。

10. 如权利要求 9 所述的组合物,其特征在于,所述组合物中所述一种或多种表面活性剂的至少一部分,以及任选全部表面活性剂含量包含于油滴中。

11. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物具有聚合物包衣,例如在结肠中细菌酶存在下降解的聚合物。

12. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含具有不依赖 pH 的聚合物的成孔剂。

13. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含一种或多种药剂,以促进疫苗抗原吸附于粘膜表面和 / 或下方的粘膜淋巴组织、M 细胞、派尔斑或其他免疫相关细胞或细胞系统,或被它们吸收。

14. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述水溶性聚合物选自明胶、琼脂、聚乙二醇、淀粉、酪蛋白、壳聚糖、大豆蛋白、红花蛋白、藻酸盐、结冷胶、角叉聚糖、黄原胶、邻苯二甲酸化明胶、琥珀酰明胶、邻苯二甲酸醋酸纤维、油树脂、聚乙酸乙烯酯、羟丙基甲基纤维素、丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯的聚合产物和聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯和其组合,任选自明胶、琼脂和角叉聚糖。

15. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物是微珠形式。

16. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其特征在于,所述组合物是微珠形式,所述微珠包含抗原和佐剂,任选地所述油滴构成油相且所述油相包含所述微珠的至少一部分抗原含量。

17. 如权利要求 16 所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含肠溶材料,以保护所述抗原和佐剂免遭胃肠道的蛋白质水解作用。

18. 如权利要求 17 所述的组合物,其特征在于,所述肠溶材料形成或包含在外层包衣中,或者包含在基质中,或者兼而有之。

19. 如权利要求 17 所述的组合物,其特征在于,所述肠溶材料形成或包含在外层包衣中且所述组合物不含碱。

20. 如权利要求 16-19 中任一项所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含一种或多种表面活性剂,其任选选自非离子型表面活性剂。

21. 如权利要求 15-19 中任一项所述的组合物,其特征在于,所述微珠的直径为 0.5mm 至 5mm,任选为 0.5mm 至 2.5mm。

22. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物不是下表所列之一:

组成	mg/g
卵清蛋白	6-10
α GalCer	0.1-0.5
蒙塔尼 ISA 720	70-120
拉普菲 M 1944CS	280-320
司盘 85	1-5
吐温 80	1-5
明胶	450-550
D- 山梨糖醇	50-80
NaOH	1-10
HPMCP	30-80

其中 HPMCP 是 (羟基 - 丙基 - 甲基 - 纤维素 - 邻苯二甲酸酯或羟丙基甲纤维素邻苯二甲酸酯,

组成	mg/g
rCTB	1-5
α GalCer	1-5
蒙塔尼 ISA 720	80-120
拉普菲 M 1944CS	250-300
司盘 85	10-20
吐温 80	25-35

明胶	450-550
D- 山梨糖醇	30-60
NaOH	5-10
HPMCP	30-60

其中 rCTB 是霍乱毒素的重组亚单位 B,

组成	mg/g
rCTB	1-5
α GalCer	1-5
蒙塔尼 ISA 720	60-100
拉普菲 M 1944CS	200-260
司盘 85	5-20
吐温 80	20-50
明胶	500-600
D- 山梨糖醇	50-70

23. 一种微珠群,其基本由权利要求 15 至 21 中任一项所述的微珠,或由权利要求 22 与权利要求 15-21 中任一项所述的组合构成。

24. 一种产品,其包含权利要求 15 至 21 中任一项所述的微珠群或权利要求 22 与权利要求 15-21 中任一项所述的微珠群的组合。

25. 一种制备物,其选自权利要求 1-20 中任一项所述的组合物、权利要求 21 所述的群体或权利要求 22 所述的产物,其中所述制备物包含抗原,并且:

调整该制备物以便在结肠或直肠释放所述抗原;和/或
该制备物还包含环孢菌素或另一种免疫抑制剂。

26. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其包含多个任选包衣的水溶性聚合物基质的微珠,该聚合物基质包含含有至少一种免疫调节剂的油滴,其中所述至少一种免疫调节剂包含至少一种疫苗免疫调节剂。

27. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含多个干燥的水包油乳液的微滴,其中所述组合物在所述乳液的油部分中包含至少一种疫苗免疫调节剂。

28. 一种产品,其包含含有其中分散有油滴的水溶性聚合物基质的第一微珠群,和含有其中分散有油滴的水溶性聚合物基质的第二微珠群,其中所述第一和第二微珠群不同,至少所述第一微珠群如权利要求 15-21、25、26 或 27 中任一项所述,或是权利要求 22 与权利要求 15-21 中任一项的组合。

29. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物是选自下组的产品形式:栓剂、阴道栓剂、丸剂、片剂、糊剂和液体,所述产品任选包含多个权利要求 15-21、25、26 或 27 中任一项所述的微珠,或者权利要求 22 和权利要求 15-21 中任一项所述的组合。

30. 一种治疗或预防胃肠道病症的方法,所述病症由感染物质直接或间接地加重或引起,所述方法包括将权利要求 1-24 或 26-28 中任一项所述的组合物给予动物,例如通过口服途径。

31. 一种加强免疫应答的方法,所述方法包括通过口服途径将权利要求 1-24 或 26-28 中任一项所述的疫苗组合物给予动物,该动物接受过非口服的初次免疫。

32. 一种免疫接种或诱导免疫应答的方法,所述方法包括:

使权利要求 1-24 或 26-28 中任一项所述的组合物与粘膜表面,如口腔、内脏、鼻腔、直肠或阴道表面相接触;或者

将权利要求 1-24 或 26-28 中任一项所述的组合物作为饲料或饮料的一部分给予动物或引入鱼类繁殖、进食或居住的水域;或者将权利要求 1-24 或 26-28 中任一项所述的组合物给予动物。

33. 一种在哺乳动物中诱导口服耐受的方法,包括将权利要求 25 所述的制品给予该哺乳动物。

34. 包含分散有油滴的水溶性聚合物的液体水性外相在通过(例如)交联、冷却或加热引起或允许所述水相发生固化,从而制备权利要求 1-28 中任一项所述组合物中的应用。

35. 一种制备免疫调节组合物的方法,所述方法包括将水溶性聚合物的水溶液与油基液体混合形成油包水乳液,所述水溶液和油基液体的至少一种中包含抗原或佐剂或其组合,然后引起或允许所得悬液固化成一个或多个珠或其他成形元件。

36. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述油基液体包含抗原或佐剂或其组合。

37. 如权利要求 35 或 36 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括用肠溶衣和/或其他聚合包衣包被所述珠或其他成形元件。

38. 如权利要求 35-37 中任一项所述的方法,其特征在于,所述成形元件是直径为 0.5mm 至 2.5mm 的珠。

39. 如权利要求 35-38 中任一项所述的方法,其特征在于,所述油基液体具有单一油脂相或是油包水乳液,并且包含聚乙二醇甘油酯和烃(如萜)油以及一种或多种表面活性剂,如非离子型表面活性剂的组合,所述油基液体任选包含聚乙二醇甘油酯,如油酰聚乙二醇甘油酯和角鲨烯,以及一种或多种表面活性剂如非离子型表面活性剂的组合。

40. 如权利要求 35-38 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括将所述成形元件加工成胶囊、片剂、栓剂、阴道栓剂或另一给药剂型。

41. 如前述任一项权利要求所述的主体内容,其特征在于,所述油由任选含有悬浮固体的单一液体油相构成,或者含有其它内部水相。

42. 如前述任一项权利要求所述的主体内容,其特征在于,所述油包含选自下组的一种或多种油:

脂肪酸;脂肪酸酯;聚乙二醇酯;烃油;和类固醇,所述油任选包含聚乙二醇甘油酯和烃(如萜)油,以及一种或多种表面活性剂,如非离子型表面活性剂,例如聚乙二醇甘油酯

如油酰聚乙二醇甘油酯和角鲨烯,以及一种或多种表面活性剂如非离子型表面活性剂的组合。

包含聚合物基质和油相的免疫调节组合物

[0001] 本发明涉及免疫调节组合物,例如疫苗接种组合物,以及制备和通过(例如)口服给药途径递送或给予这类组合物,特别是给到粘膜表面上的方法,以及其他主题内容。

背景技术

[0002] 疫苗接种大部分通过注射进行。注射需要复杂和昂贵的物流基础。例如,通过注射对大量动物,例如牛、猪、禽类及鱼类进行疫苗接种或是不可能,或是极度耗费劳动力。如果可以将疫苗与饲料或水同时给予大量动物,特别是作为通常必须以一定间隔给予的重复剂量时,将在时间和费用方面大有裨益。在工厂到注射地点过程中,注射疫苗通常必须保持低温(保存和运输)。这种所谓的“冷链”是增加成本的另一个物流因素。

[0003] 除因使用针头造成的感染和交叉污染风险外,通过注射进行疫苗接种也对接受人或接受动物造成不适或疼痛,优选其它给药途径。

[0004] 存在口服或经鼻给予的疫苗,透皮疫苗正在开发过程中。然而,出于各种原因,不是所有疫苗有口服给予、鼻内给予等形式,如果更多的疫苗可以通过注射以外的途径给予,将是显著进步。

[0005] 现有的这些口服疫苗通常是活减毒或灭活的全细胞制剂,它们依赖感染物的某些元素通过接触 GI 道中或真皮下的粘膜或粘膜相关淋巴组织(MALT)的其它组分刺激免疫应答。

[0006] 然而,许多现代疫苗包括感染物的亚单位,即使注射时,其本身可能也不具有足以引发所需免疫应答的免疫原性作用。将抗原和免疫刺激剂如佐剂配制在一起提高免疫原性作用,这种现象在所有注射疫苗中都出现。

[0007] 本领域熟知提高动物对疫苗抗原的免疫应答的佐剂体系。同样,将疫苗和药物递送至粘膜表面的体系也是本领域已知的。已记载有若干方法保护疫苗抗原和药物免于被胃酸和消化酶降解,并将抗原吸附于粘膜表面。

[0008] 但由于与将疫苗组分有效递送至粘膜表面和下方粘膜淋巴组织有关的遗留问题,很少使用粘膜递送方式递送疫苗,这些问题与合并各种成分以便在适当部位以活性形式释放的制剂复杂性相关联。鉴于许多病原体通过粘膜表面侵入体内,口服递送产生粘膜免疫应答的疫苗仍然是非常想要实现的目标。

[0009] 实现疫苗的有效口服吸收的障碍包括它们通过肠道上皮细胞质膜的通透性低、对胃肠道(GIT)中肽酶和蛋白酶降解易感,和通过肝和胆从门循环中清除吸收组分。在蛋白质组分的情况下,在胃部酸性环境下易于变性也是口服递送的一个障碍。口服给予疫苗成功引发潜在有益的免疫应答时,抗原剂量常常非常高。

[0010] 产品成本高对经济性有不利影响。

[0011] 因此需要节约剂量的技术。

[0012] 通过包裹到纳米和微米颗粒剂型,例如聚丙交酯(PLA),聚乙丙交酯共聚物(PLGA)或脂质体基体系中和使用肠衣胶囊或片剂以保护大分子疫苗组分免受酸和酶攻击可针对酶降解和酸性攻击提供一些保护。然而,因为递送系统造成进入和穿越肠道上皮细

胞的吸收差,因此将疫苗包裹到颗粒如PLA、PLGA、脂质体或其它颗粒中可能不总是成功。更通常地,即使可将大量抗原和 / 或佐剂递送至合适靶点(例如M细胞和 / 或GIT中的派尔斑),就有效性而言,它们也可能不是合适或优选的物理化学形式(例如适当或充分溶解)。

[0013] 现有技术中包裹和配制口服制剂抗原的例子如下。

[0014] 1994年10月4日授权的Bowersock等的美国专利号5,352,448描述了用于反刍动物的口服疫苗制剂,其在水凝胶基质中包含抗原,所述水凝胶基质保护抗原免于在瘤胃中降解。该基质由甲基丙烯酸和亚甲基双丙烯酰胺交联产生,交联过程在抗原存在下进行,或交联后经再水化后用抗原浸渍。该基质优选通过下述方式造粒:在3-5mm直径的圆柱中进行聚合,然后将所得的固体圆柱体切割成3-5mm厚的圆盘。过硫酸铵和亚硫酸氢钠是聚合引发剂的例子。

[0015] 1997年10月7日授权的Bowersock等的美国专利号5,674,495记载了用于口服给药的疫苗组合物,其中通过以下方法制备包含离散1-100 μm 微粒形式的藻酸盐凝胶:将抗原和藻酸盐溶液喷洒到氯化钙溶液中以使液滴胶凝,或通过将氯化钙加入藻酸盐 / 抗原乳液中。具有与藻酸盐表面有反应性或亲和力的官能团的聚合物可用于包被所述颗粒。聚赖氨酸是这种包衣聚合物的一个例子。可通过以下方法配制该微粒:将其分散到亲水载体基质,如经典水凝胶或藻酸盐凝胶基质中产生载体基质团块(藻酸盐载体基质中的藻酸盐微粒),尺寸范围是2至8mm。可包被所述团块,就好像包被微粒那样。本专利也记载了一种变化形式,其中微粒由含疫苗的明胶制备,在这种情况下明胶微粒由具有非确定油的乳液固化(通过降低温度)产生。用聚-L-赖氨酸包衣使这些明胶颗粒稳定化。

[0016] 1996年3月19日授权的Andrianov等的美国专利号5,500,161记载了通过以下方式制备的微粒:将基本不溶于水的聚合物分散到水溶液中,所述水溶液中溶解、分散或悬浮有待递送物质(如抗原),然后通过冲击力(如剪切凝聚)或化学凝聚方式(例如通过使用电解质、pH改变等)将该聚合物与所述物质凝聚,以形成球状和非球状微粒。虽然本专利所用术语“微粒”指大小范围是1-1000微米的固体颗粒,但最大示范性微粒的直径为20微米。根据本专利,将1至10微米的微粒用于某些生物应用,如疫苗。

[0017] 2000年1月18日授权的See等的美国专利号6,015,576记载了含有抗原的冻干多层脂质体。该脂质体优选大于20nm且小于20 μm ,以保证被巨噬细胞充分加工。在为口服给药包装成丸剂或胶囊(可具有肠衣)之前,冻干脂质体制剂。

[0018] 1998年9月22日授权的Tice等的美国专利号5,811,128记载用于将生物活性剂(特别是疫苗抗原)递送给动物的组合物,其必然涉及将有效量的药剂包裹在生物相容性赋形剂如聚(DL-乙丙交酯共聚物)中形成小于约10微米的微胶囊的步骤。它们通过将抗原水溶液分散到聚合物的二氯甲烷溶液中制备。然后,将该聚合物溶液加入聚(乙烯醇)水溶液中形成水包油乳液,通过离心和冻干从其中收集微胶囊。利用插管针给予微胶囊的悬液。

[0019] 壳聚糖微粒也可用于口服疫苗。Van de Lubben等, J. Drug Target, 2002 记载1.7 μm 壳聚糖微粒,在离体人细胞模型中由M细胞运输。

[0020] Li等, BMC Biotechnology(《BMC生物技术》), 2008 记载了用于递送疫苗的藻酸盐包衣的壳聚糖微粒(初始平均大小为300nm)。通过在白蛋白中孵育所述微粒(所得平均大小为404nm),将抗原(牛血清白蛋白)加载到壳聚糖微粒上。然后,将若干滴加载抗原的

微粒悬液加入藻酸钠溶液中,产生藻酸盐包被(加载抗原)的微粒,将其再次分散到氯化钙中,以便在微粒表面上与藻酸盐层交联(所得的平均尺寸:1324nm)。

[0021] 提高药物和颗粒进入和穿越肠道上皮屏障的递送的一种方式将颗粒制剂靶向肠道的接受部位。例如,Higgins 等在 *Pharmaceutical Research* (《药学研究》) 第 21 卷(2004) 中使用糖蛋白 UEA-1 凝集素的小有机肽模拟物靶向 M 细胞。利用生物素化肽使这些模拟物吸附于加载有荧光素异硫氰酸酯的链霉亲和素聚苯乙烯颗粒,其直径为 0.289 μm 。Roth-Walter 等在 *Vaccine* (《疫苗》) 第 23 卷(2005) 中使用 1-3 μm 大小的加载疫苗的聚乳酸-乙醇酸共聚物微球,所述微球用 α -L-岩藻糖特异性橙黄网胞盘菌(*Aleuria aurantia*)凝集素(AAL)官能化的。这些文献(Higgins 等和 Roth-Walter 等)通过引用全文纳入本文。

[0022] 如上所述的聚乙丙交酯共聚物(PLG)体系经测试有可能用于可注射和口服疫苗制剂,如 Vajdy 等, *Immunology and Cell Biology* (《免疫学和细胞生物学》), 第 82 卷(2004) 所述,通过引用全文纳入本文。该文献也记载将乳液用作注射疫苗佐剂的应用,并指出乳液组分的潜在毒性限制其应用,但佐剂如西龙公司/诺华公司(Chiron/Novartis)的 MF59(角鲨烯水包油乳液)和 GSK 的 AS03(即角鲨烯(10.68 毫克)、DL- α -生育酚(11.86 毫克)和聚山梨酯 80(4.85 毫克))已被注册为,例如,可注射流感疫苗的组分。参见例如, EMEA 网站上有关 Preprandrix™ 的产品信息。

[0023] 可能需要的是能够使用乳液作为口服疫苗制剂的组分(或作为佐剂)。

[0024] 美国专利 5961970(Lowell 等)记载了多个亚微米水包油液滴的乳液形式的疫苗佐剂组合物,所述液滴的粒度范围是约 30nm 至 500nm,用于使固有地或附带地掺入液滴的抗原免疫原性增强。为了实现粘膜免疫,该乳液还可包含粘膜粘附性大分子。选择口服给药途径时,为了利于肠道摄取,可将该乳液包裹到明胶胶囊中或包肠衣,以防止其接触胃液。而且,该乳液可在包裹前冻干,以提高抗原稳定性。所述乳液颗粒具有包含脂质或脂类组合物(如 MCT)的疏水芯,并用两亲和/或非离子型表面活性剂稳定化,该表面活性剂可以是天然的生物相容性表面活性剂如磷脂(如卵磷脂)或药理学上可接受的非天然表面活性剂如吐温-80。该表面活性剂有利于将颗粒维持在所需的大小范围,并防止其聚集。

[0025] 美国专利申请 2001/0043949(Delgado 等)记载了包含生物可降解的合成聚合物颗粒、抗原和在微粒表面上形成包衣的肠溶聚合物的微粒组合物。

[0026] 口服疫苗应优选为固体或基本为固体,以利于加工和储存,提高稳定性(特别是抗原稳定性)并避免对冷链操作的需要-液体的稳定性一般低于固体,而且与固体剂疫苗相比液体需要更精细的填装和防泄漏操作(在容器、小瓶、注射器等中)。

[0027] PCT 申请 WO/2008/122967(希格默德药业有限公司)(Sigmoid Pharma Limited)描述了一种口腔组合物,其包含具有液体、半固体或固体芯的微胶囊,并且其中图 2 为半固体-或固体填充微胶囊/微球的示意图,其中活性成分经增溶或呈混悬液形式,且具有控释聚合物包衣。实施例 20 描述了将水溶液与由角鲨烯(天然不饱和烃)、吉尔湿 44/14(Gelucire 44/14)和拉普菲 MS 1944CS(Labrafil MS 1944CS)构成的油剂混合而制成的挤出乳液药物混悬液的小珠。水溶性活性成分胍苯吡嗪在水相中,并且油相为制剂的 1.12 干重%。

[0028] 例如,Garmise 等,AAP PharmSciTech,第 7 卷(2006)记载了用于鼻内递送的干粉

疫苗。也存在用于口服递送的固体剂疫苗,但较为罕见,主要例子是用传统技术以热灭活霍乱弧菌 (*V. cholera*) 全细胞制成的霍乱疫苗片剂。

[0029] 如果需要将表面活性剂掺入乳液的微胶囊或微球制剂,会产生特定的挑战。在制造过程中需要表面张力来形成和保持胶囊会阻碍或限制表面活性剂的使用,因为表面活性剂引起的表面张力的下降可破坏胶囊的完整性或导致更一体化的剂型,该剂型中需要例如外壳或胶囊层。因此,可能难以用表面活性剂配制液体、乳化或预先溶解的活性物质。

[0030] 可能需要口服给予后疫苗组合物在结肠中释放活性物质(如抗原和佐剂)。这种结肠特异性递送系统必须防止在 GIT 上部释放活性物质,而在到达结肠时释放它们。在药学递送领域,有许多配制方法,包括依赖 pH 和时间的聚合物介导的技术。然而,虽然小肠与结肠之间的 pH 变化得到了充分证实,但差异可能很小并且可能在个体之间有所不同。这可使得 pH 依赖性系统在获取可预测的药物释放分布方面不可靠。时间依赖性系统取决于递送系统在 GIT 中的通过时间。这些系统的主要限制因素是小肠通过时间的体内变化可导致活性物质在小肠(过早)释放或在结肠的末端部(过迟)释放。此类口服药物递送系统的个别接受者的病理生理状态还对这些时间依赖性系统的性能具有显著的影响-患有过敏性肠综合征和炎性肠疾病(包括克隆氏病和溃疡性结肠炎)的患者加速通过结肠。与这些考虑因素无关,进入小肠(幽门)的位点处的剂型尺寸可对 GI 通过时间和/或反应差异性具有显著的影响。

[0031] 肠粘膜免疫网络已经演化出对来自食物来源和共生菌的大量抗原抗原维持相对无反应性或耐受性(或“口服耐受性”)的能力。根据 Friedman 等,PNAS USA 1994 ;91 : 6688-92,口服耐受性是通过产生活性细胞抑制或克隆无反应性介导的,决定因素是抗原口服剂量。口服耐受性为剂量特异性,提高剂量会导致耐受性消失,参见 Nagler-Anderson 等,PNAS USA 1986 ;83 :7443-6。给予低剂量抗原有利于诱导活性细胞调控,参见 Chen 等,1994 Science ;265 :1237-1240。较高剂量有利于诱导克隆无反应性或缺失,参见 Chen 等,1995 Nature ;376 :177-180。在一项具体研究中,将高剂量的髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 给予其 T 细胞携带 MBP 特异性 T 细胞受体 (TCR) 的小鼠导致 T 细胞活化和受体下调 (Benson 等,2000J Clin Invest,106 :1031-1038)。此外,可通过给予免疫佐剂如脂多糖或霍乱毒素亚基 B 提高口服耐受性,这似乎能刺激其它细胞群下调免疫应答 (Khoury 等, J Exp Med 1992 ;176 :1355-64)。

[0032] 已证明,口服耐受性能预防或治疗各种 T- 细胞介导的自身免疫病。例如,在包括 30 位多发性硬化症患者的双盲预试验中,口服给予牛髓磷脂抗原能降低与髓磷脂碱性蛋白发生翻译的 T 细胞的数量,且检测不到毒性 (Werner 等, Science 1993 ;259 :1321-4)。Trentham 等通过向 60 位严重急性类风湿性关节炎患者给予 II 型胶原证明口服耐受性的临床功效 (Trentham 等, Science 1993 ;261 :1727-30)。据报道,在三硝基苯磺酸 (TNBS) 的 Th1 介导的结肠炎动物模型中,给予用 TNBS 半抗原化的结肠提取物能防止发生粘膜炎症 (Neurath 等, J Exp Med 1996 ;183 :2605-16)。在评估给予自体结肠蛋白提取物以治疗中度至重度克罗恩氏病的安全性和有效性的 I 期研究中, Margalit 等证明在 7/10 个对象中显示出安全并诱导缓解 (Am J Gastroenterol 2006 ;101)。其它动物疾病模型,包括中风、阿耳茨海默病和动脉粥样硬化以及 1 型糖尿病,已对粘膜给予的抗原产生反应。

[0033] 在从抗原首次遇到内脏相关性淋巴组织 (GALT) 开始的口服耐受期间诱导或抑制

各种反应,所述内脏相关性淋巴组织是由淋巴结(派尔斑)、上皮绒毛、上皮内淋巴细胞和 GIT 固有层中散在的其它淋巴细胞构成的良好发育的免疫网络。

[0034] 更一般地,固有层是内衬于体内各种管道(如呼吸道、胃肠道和泌尿生殖道)的湿衬里(粘膜)的组件。因此,固有层(更正确的说法是固有层粘膜)是一薄层疏松结缔组织,其位于上皮以下,与上皮一起构成粘膜。小肠和淋巴组织中的固有层含有毛细血管和中央乳糜管(淋巴管)。固有层还含有具有开口于粘膜上皮管道的腺体,其分泌粘液和浆液状分泌物。

[0035] 抗原可在 GALT 水平直接作用,或者可在吸收后发挥作用。口服耐受性和粘膜免疫构成涉及 GALT 中抗原递呈细胞与 T 细胞的相互作用的免疫连续覆盖(continuum)的一部分。可区别 GI 道的不同部分。直肠/结肠是免疫诱导(有序淋巴组织)和效应物位点(弥散固有层)的混合体,而空肠几乎不含免疫诱导位点。这反映在各组织的淋巴组成中:空肠主要含有记忆 CD4⁺T 细胞,而结肠含有较大比例的幼稚 CD4⁺T 细胞(Veazey 和 Lackner, 2006 ;PLOS Medicine ;3 :12-2188-9)。

[0036] 在急性 HIV 感染中,在感染数天内发生快速而深入的 CD4⁺CCR5⁺T 细胞损失,而主要携带幼稚 CD4⁺T 细胞的外周淋巴组织如血液和淋巴结受到的影响较小(Brenchley 等, 2004 J Exp Med 200 :749-759)。Mehandru 等研究了获自近期感染 HIV 的患者以及未感染志愿者的肠道和外周血的淋巴细胞群,显示感染 HIV 后尽早开始高活性抗逆转录病毒治疗(ART)的大部分患者仍然不能获得完全回复到基线水平的肠道 CD4⁺T 细胞,无论该治疗持续多长时间。相反,HIV 感染导致肠道免疫系统的连续激活状态,但在外周淋巴组织中未反映这种现象(Mehandru 等, 2006 ;PLOS Med 3(12) :e484)。Mehandru 等的数据提供证据证明接受 ART 的患者出现肠道炎症和连续感染、CD4⁺T 细胞的破坏和周转。这提示,肠道组织分布更好的药物,以及可能降低或防止粘膜组织中免疫激活的机制可能更有效地对抗 HIV 感染。

[0037] 已经研究了许多结肠靶向递送系统。这些系统包括:肠压控制型结肠递送胶囊,其依赖于发生在结肠中而非胃和小肠中的蠕动波;pH 敏感聚合物包衣(在上 GIT 中保持完整)与多糖包衣的组合,其仅可通过存在于结肠中的细菌降解;果胶和半乳甘露聚糖包衣,其通过结肠细菌降解;以及偶氮水凝胶,其通过结肠细菌产生的偶氮还原酶逐渐降解。前述四种系统参见 Yang 等, International Journal of Pharmaceutics 235(2002)1-15,其全文以引用方式并入本文中。基于多糖的递送系统特别值得关注-参见例如 Kosaraju, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45 :251-258(2005),其全文以引用方式并入本文中。然而,对于仅依赖于结肠中特定酶活性的系统而言,由于结肠菌丛中的病理紊乱(例如由 pH 变化和细菌酶的量/活性的变化所导致),病情可再次引起药物释放分布的差异性。

[0038] 许多疫苗的成功常常需要多次免疫。在儿科群体中,可能需要多达五次免疫,对于白喉、破伤风和百日咳(DTP)疫苗也是如此,在出生后前六个月期间给予三次,然后在两岁时给予第四剂,在四岁和六岁之间给予最后一次加强剂量。然而,某些疫苗需要额外的加强免疫,即使在已经接受过完整免疫方案的成年人中,例如,破伤风-白喉(Td)疫苗推荐人终生每 10 年加强免疫一次。“初免-加强”原则适用于活减毒疫苗(如口服脊髓灰质炎疫苗)、灭活疫苗(如甲型肝炎疫苗)、重组蛋白质亚基疫苗(如乙型肝炎疫苗)和多糖疫苗(如乙型流感嗜血杆菌疫苗)。在这些疫苗中,初免-加强是‘均质的’,因为后续加强免疫

中使用的疫苗与早先初免中给予的相同。更详细的讨论参见 Curr Opin Immunol. 2009 年 6 月 ;21(3) :346-51. 2009 年 6 月 6 日电子公开,通过引用全文纳入本文。

[0039] 在过去十年中,研究显示初免-加强免疫可通过不匹配的疫苗递送方法而使用相同抗原给予,形成‘异质’初免-加强形式。最有趣和出乎意料的发现是,在许多情况下,异质初免-加强方法比‘均质’初免-加强方法更有效。新型疫苗接种方法,如 DNA 疫苗和病毒载体基疫苗的快速进展明确地进一步扩展了异质初免-加强免疫接种方法的范围,常用的异质初免-加强免疫接种方法包括 DNA 初免,后接重组蛋白、灭活疫苗、病毒载体和 BCG 的加强免疫;病毒载体初免,后接重组蛋白的加强免疫;和 BCG 初免,后接病毒载体的加强免疫。

[0040] 已知有效的 B 细胞介导的免疫和抗体应答常常需要来自 CD4⁺T 细胞的帮助。人们认为,独特的称为 T 滤泡辅助 (T_{fh}) 细胞的 CD4⁺ 效应物 T 细胞亚组能够提供这种帮助。根据 Johnston 等在 2009 年 7 月 16 日于 Science 在线公开的工作 (DOI:10.1126/science.1175870) (通过引用全文纳入本文),在 CD4⁺T 细胞中表达转录因子 Bcl6 是小鼠体内 TFH 分化和 T 细胞帮助 B 细胞的充分必要条件。这些研究也说明,相对而言,作为 Bcl6 拮抗剂的转录因子 Blimp-1 抑制 T_{fh} 分化和帮助,从而防止 B 细胞生发中心和抗体应答。因此,体内需要 T_{fh} 细胞进行适当的 B 细胞应答,并且在 T_{fh} 分化中 Bcl6 和 Blimp-1 起到核心而相反的作用。

发明内容

[0041] 本发明提供一种包含小油滴分散在其中的水溶性聚合物基质的组合物,所述组合物包含用于免疫调节,如疫苗接种的活性成分。所述活性成分是免疫调节剂,在许多实施方式中包含或者是佐剂和/或抗原。该组合物可包含多种活性成分。本发明包括其中活性成分包含在至少一些小油滴中的实施例以及其中小油滴不含活性成分的实施例。小油滴随着包含其的基质溶解于水性介质中而释放。在一个实施例中,小油滴基本上固定在基质中或通过基质固定,并且该固定结构随着基质溶解于水性介质中而丧失。在某些实施例中,油滴可统称为本发明组合物的油相。例如,该组合物可用于口服给予。

[0042] 如本说明书下文所述,所述油滴(油相)可由单一液体油相构成或者是油包水乳液。在任一情况下,认为(不受理论限制)油滴的外部油性介质与组合物的水相(基质相)形成界面;外部油性介质任选含有内部水相以至于所述油滴包含油包水乳液,或不存在这种内部水相以至于所述油滴具有单一液体油相。

[0043] 该组合物可以是微珠形式。所述微珠的直径可以是 0.5mm 至 5mm,例如 0.5mm 至 2.5mm。本发明包括微珠群(例如 10 个或更多个微珠,任选至少 100 个或更多个微珠),其主要由本发明微珠构成或包含本发明微珠。本发明包括含有多个微珠的产品,例如,所含微珠都是本发明微珠;这种产品可能是剂量产品,例如是胶囊、栓剂、阴道栓剂、药囊或片剂。

[0044] 在优选实施方式中,本发明组合物包含至少一种抗原和至少一种佐剂,见下文详述。

[0045] 在另一实施方式中,本发明提供递送免疫接种所用活性物质的载体,该活性物质可以是任何类型,具体是抗原、抗原性物质或佐剂,或其组合。

[0046] 具体说,本发明提供肠/结肠粘膜疫苗组合物和/或免疫治疗剂。因此,本发明组

合物也包括,例如疫苗组合物或免疫治疗剂,以便将免疫调节剂递送至肠道粘膜和 / 或结肠粘膜。本发明还提供用于产生和 / 或诱导口服耐受性的本文所述组合物。

[0047] 本发明还提供多种免疫介导的方法,包括预防疾病、延缓疾病进展和 / 或治疗疾病的方法。这种方式和方法也允许与非免疫介导方法联合使用,例如与非免疫介导治疗剂,如药物小分子或药物大分子的释放(特别是控释)联用,任选用于沿整个肠道和结肠 / 直肠或其中预定部位递送。因此,所述非免疫介导药物可以是“小分子”或“生物剂”。

[0048] 在具体实施方式中,所述疾病是 HIV/AIDS,但本发明不限于此,也考虑到许多其它疾病,例如本文其它地方所述。例如,在 HIV/AIDS 的情况下,本发明允许将这类免疫介导的方式和方法与 ART(抗-逆转录病毒治疗剂)沿整个肠道和结肠 / 直肠或其中预定部位的释放(尤其是控释)联合使用。因此,在一个实施方式中,本发明提供 ART/ 免疫系统调节方法的联用。

[0049] 本发明还涉及治疗病症、预防病症或延缓病症进展,所述病症是感染物直接或间接加重或引起的,特别是胃肠道病症,例如本文其它地方所述的一种或多种病症,其包括将本发明组合物,特别是疫苗组合物给予动物,例如通过口服途径。

[0050] 本发明还提供防止或减少产生针对其它免疫原性药物例如生物剂,如肽或蛋白质治疗剂和抗体的抗体的方式,例如,使患者在接受治疗剂量的相关药物之前耐受该药物。

[0051] 溶出度可影响组合物的物理形式和特征的程度取决于该组合物的初始形状、大小和构成。该组合物具有包衣时,可调整溶出的速率和方式(见下)和 / 或可通过相对于 HPMC 衍生物包含下文所述的延缓剂 / 保护剂进行调整。

[0052] 在一方面,可将本发明描述为干燥水包油(o/w)乳液,该乳液的一个实施方式是非粉末状的。另一种实施方式是例如以珠形式,特别是微珠形式模制和 / 或成形和 / 或挤出。本发明的组合物在模制或成形形式(如微珠)中通常包含多个油滴或小油滴。

[0053] 在另一实施方式中,该组合物包含包被有聚合物以改变其释放特性的珠,例如微珠。因此,本发明组合物可以是无包衣珠或包衣珠,例如包有聚合物的珠的形式;该珠可以是微珠。在相关实施方式中,本发明提供一种疫苗组合物或免疫治疗组合物,其包含多种任选包衣的水溶性聚合物基质的微珠。在一个具体实施方式中,本发明提供一种组合物,其包含多个干燥的水包油乳液的微珠。在本文所述的所有微珠组合物中,本发明包括单个珠,另一方面也包括一群珠。

[0054] 在包含一群珠的疫苗组合物和包含一群珠的免疫治疗组合物的情况下,所述微珠中至少一部分可包含免疫调节活性成分,即免疫调节剂;所述微珠可包含单一活性成分或活性成分的组合,前提是它们包含免疫调节剂,特别是抗原或半抗原。因此,本发明包括组合物,其中第一群微珠包含免疫调节剂,或作为所述第一群中所含的单独活性成分或作为所述第一群中所含的活性成分组合,和不同于第一群的第二群微珠包含可能与所述第一群的活性成分或活性成分组合相同或不同的活性成分(单独活性成分或活性成分的组合);所述第二群可包含作为免疫调节剂或可不含免疫调节剂的活性成分。在一些实施方式中,存在包含活性成分的至少一群微珠(例如包含活性成分的一群、两群或三群,前提是所述组合物中存在至少一种免疫调节剂)和不含活性成分的至少一群微珠。在相关实施方式中,本发明的组合物可包含多个微球或微珠群体。在不同群体之间,活性成分可能相同或不同,存在超过一种活性成分或超过一类活性成分时,不同群体之间的每种活性成分或每种

类型可能相同或不同。

[0055] 在一个特定实施方式中,将一种或多种免疫调节活性成分掺入组合物的油相或干燥乳液中。在另一实施方式中,将一种或多种免疫调节活性成分掺入组合物的水相或干燥乳液中。在相关实施方式中,将所述一种或多种活性成分掺入油相和水相中。这些段落提及的实施方式的一些亚类还掺有非免疫调节活性成分。

[0056] 本发明组合物中特别吸引人的是低水溶性免疫调节活性成分,具体是疫苗活性成分和/或脂溶性化合物(活性成分),其掺入油相带来特定的优点。

[0057] 因此在一方面,本发明涉及将免疫调节活性成分,具体是疫苗活性成分调配成干燥水包油乳液微珠以供口服施用,在所述微珠中,活性成分可掺入乳液的油相中并且珠子可任选地用聚合物包衣。

[0058] 水溶性固定聚合物基质(或在一方面,干燥乳液的水相)在一个实施方式中包含交联水溶性聚合物(例如源自流体水性连续相的化学或物理化学(例如干燥)固化),使得在基质或干燥乳液中,水基本上不存在并且使小油滴固定。在此实施方式中,干燥水相可因此称为固定基质。

[0059] 存在或不存在聚合物包衣时,本发明组合物可包含在接触胃液时保护免疫调节活性成分,具体是疫苗活性成分的组分。例如,这类组分可以防止该组合物在胃中崩解或溶出,并且只有在到达小肠时才发生这种崩解或溶出。该实施方式中的优选组分是只有在某 pH 以上才是水溶性或基本可溶于水的聚合物,如下文中详述的羟丙基甲基纤维素(HPMC)衍生物。与该实施方式相关的任选额外组分是组合物中包含某化合物以将 pH 维持在所述阈值以上。例如,这种包含可能因本发明组合物在生产过程中包含碱性或碱化合物以及具有 pH 依赖性溶解度的聚合物所致。在其它实施方式中,例如,在低于溶出阈值的 pH 下充分分散。在相关实施方式中,可包含某些物质将 pH 维持在溶出阈值以下,以便减缓溶出。

[0060] 因此,在一个实施方式中,本发明提供保护一种或多种活性成分,如蛋白质或肽免遭降解,或使其稳定和/或将这类活性成分递送至结肠的组合物。

[0061] 术语“干燥乳液”通常指内部(不连续)相固定于基本呈固态或固化的外部相形成的乳液。固体外相与水性介质接触时溶解。

[0062] 术语“基质”是本领域中熟知的术语,并且根据上下文通常是指固体、半固体、不溶解的或未溶解的材料,该材料可对组合物提供结构和空间。在一些语境中,术语“基质”可指支架。

[0063] 可通过包括化学方式(例如通过交联)或物理方式(例如通过冷却或加热)在内的各种方式使外相固化。使用术语“干燥”,并非旨在暗示干燥步骤对于产生干燥乳液必不可少(但不排除这种情况),而是指固体或固化水性外相基本上不含水或不含可用水。在这方面,即使在某些实施方式中水基本上不存在于本发明的组合物中(或截留在组合物的基质内),特别是其呈微珠形式时,本文中仍然采用术语“水相”来表示本发明组合物的外(连续)相。然而,本发明组合物的外相是水溶性的并且溶于水性介质。在一个实施方式中,小油滴在水相溶解或接触水性介质时释放。

[0064] 与小油滴有关的术语“释放”是指可自由移动、流出、接合、溶解、(再)乳化等,但实际的移动、流出、接合、溶解、(再)乳化并非所需,即,可能不会出现并且实际上受到以下因素的约束:例如存在包衣。

[0065] 在一个实施方式中,该组合物包含一种或多种表面活性剂,其优选包含或选自下文详述的非离子型表面活性剂。

[0066] 本发明的另一方面是任选聚合物包衣的组成。例如,添加在结肠中出现的细菌酶存在下降解的聚合物(和/或促进包衣中形成孔的聚合物-“成孔剂”)与非pH依赖性聚合物会导致活性形式的疫苗组分在结肠或GI道的其他预定部位基本上可被利用。在一个具体实施方式中,可通过细菌酶降解的上述聚合物为水溶性聚合物。

[0067] 在本发明的一个实施方式中,干燥的乳液形成有效俘获或包裹疫苗抗原的基质或网状结构。

[0068] 在一个实施方式中,本发明提供一种组合物,所述组合物包含具有水溶性聚合物基质材料的固相和分散于该固相中的油相。

[0069] 在一个实施方式中,本发明组合物还包含一种或多种药剂,以促进疫苗抗原吸附于粘膜表面和/或下方的粘膜淋巴组织、M细胞、派尔斑或其他免疫相关细胞或细胞系统,或被它们吸收。吸收增强剂可能如现有技术中所述,例如Swenson,ES和Curatolo,WJ Means to Enhance Penetration(2)Intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs:mechanisms and potential toxicity(提高渗透的方式(2)蛋白质、肽和其它极性药物的肠道渗透增强:机制和潜在毒性).Advanced Drug Delivery Reviews.1992.8:39-92,通过引用将其全文纳入本文。这类物质的一个例子是卵磷脂。这类物质的其它例子是凝集素(Jepson MA等,Advanced Drug Delivery Reviews,第56卷<http://www.sciencedirect.com/science?ob=PublicationURL&tockey=%23TOC%234953%232004%23999439995%23480534%23FLA%23&cdi=4953&pubType=J&view=c&auth=y&acct=C000050221&version=1&urlVersion=0&userid=10&md5=7e6841a71af41249f786a92670a86233>,第4期,2004年3月3日,第511-525页)。也参见Davis IC等,The immunopathology of M cells(M细胞的免疫病理学),Springer Seminars in Immunopathology(施普林格免疫病理学研讨会)第18卷<http://www.sciencedirect.com/science?ob=PublicationURL&tockey=%23TOC%234953%232004%23999439995%23480534%23FLA%23&cdi=4953&pubType=J&view=c&auth=y&acct=C000050221&version=1&urlVersion=0&userid=10&md5=7e6841a71af41249f786a92670a86233>,第4期,421-448。

[0070] 本发明的疫苗组合物使得可能通过粘膜表面进行免疫接种,例如口腔、内脏、鼻腔、直肠或阴道表面。在直肠给药中,所述疫苗组合物可以是栓剂形式。在阴道给药中,所述疫苗组合物可以是阴道栓剂形式,例如是生物可降解的环形式。在口服给药中,所述疫苗组合物可以是药丸或药片的形式(如模制或包含多个微珠)。该组合物也可以是糊剂形式或是流体形式,可采用滴药器或无针注射器给予。本发明疫苗组合物也可以是通过食品和/或水(或饮料)以及给予固体剂的方式进行免疫接种的方法。

[0071] 本发明组合物可用于给予人对象。

[0072] 在某些实施方式中,本发明组合物适合将疫苗给予动物,例如人或选自下组的动物:牛、猪、禽类和鱼类。疫苗可作为饲料或饮料的一部分给予这些动物,或引入鱼类繁殖、进食或居住的水域。可将本发明组合物制成动物、禽类或鱼类饲料的形状,和/或使其含有引诱物,如闪光、气味和/或口味。

[0073] 本发明还提供在患有本文其它地方所述的一种或多种疾病的动物,如鱼类或人或其它哺乳动物中进行免疫接种或诱导免疫应答的方法,包括给予所述动物本发明组合物。给予人时可由患者自己进行、由健康护理工作人员进行给予,或间接地,给予动物时,通过加入食物或饮用水中进行给予。

[0074] 本发明也考虑非哺乳动物包括鱼类或其它水生生命形式的疫苗或免疫接种。

[0075] 本发明的组合物可调配成胶囊、栓剂、阴道栓剂或可用于体外设备或其他健康相关的例如医疗设备或其他设备。

[0076] 本发明还提供制备免疫调节(如疫苗)组合物的方法,包括混合水溶性聚合物基质的水溶液与油基液体以形成油包水乳液,然后使所得悬液固化成一个或多个成形元件,例如珠。活性成分可能最初以油相或液体相或两者兼有的形式存在。

[0077] 在此实施方式中,所述方法优选包括在乳液形成之前向油相中加入一种或多种免疫调节剂,特别是抗原和/或佐剂。在相关实施方式中,所述方法优选包括在乳液形成之前向水相中加入一种或多种免疫调节剂,特别是抗原和/或佐剂。在另一相关实施方式中,可在乳液形成之前将相同或不同的免疫调节剂,具体是抗原和/或佐剂添加到油相或水相或二者中。

[0078] 本发明提供一种疫苗递送组合物,其将疫苗吸附于哺乳动物的粘膜表面,和任选地,疫苗组合物的一些或全部组分吸收后,使疫苗与粘膜相关淋巴组织(MALT)相接触。本发明还提供在给予后导致或实现将疫苗活性成分递呈于哺乳动物的粘膜表面,如MALT的疫苗组合物。

[0079] 本发明的一个实施方式涉及口服给予对抗内脏病原体的疫苗,包括将疫苗递呈或递送到内脏相关淋巴组织(GALT)。

[0080] 本发明的一个实施方式涉及口服给予对抗上呼吸道病原体的疫苗,包括将疫苗递呈或递送到口腔或鼻腔中的粘膜相关淋巴组织。

[0081] 在整个说明书和权利要求书中,词语“包含”和“含有”及其变型是指“包括但不限于”,并且其并不旨在(以及不)排除其他部分、添加剂、组分、整数或步骤。在本申请的说明书和权利要求书中,除非另有说明,单数形式也包括复数含义。具体说,使用不定冠词时,应理解为考虑到复数和单数含义,除非另有说明。

[0082] 应理解,除出现不相容的情况以外,在本发明的特定方面、实施方式或实施例中描述的特征、整数、特性、化合物、化学部分或基团也可应用于本文所述的任何其它方面、实施方式或实施例。本说明书(包括任何所附权利要求、摘要和附图)中公开的特征和/或如此公开的任何方法或工艺步骤可以任何方式组合,除了其中至少一些此类特征和/或步骤相互排斥的组合。本发明不限于任何上述实施方式的细节。本发明延伸至本说明书(包括任何所附的权利要求、摘要和附图)中公开的特征的任一新型组合或任何新型组合,或者延伸至如此公开的任何方法或工艺的步骤的任一新型组合或任何新型组合。

[0083] 读者应注意,与本申请相关的与本说明书同时或之前提交的并且与本说明书一起向公众查阅开放的所有论文和文献,以及所有这些论文和文献的内容均以引用的方式并入本文。

[0084] 至少在多个实施方式中,本发明改善或解决了现有技术中的一个或多个缺点。具体而言,本发明包括能解决现有技术中的多个问题的制剂或组合物。在本发明的各个实施

方式中,在回顾现有技术时述及的某些组分或特征也可包含在本发明组合中。

[0085] 附图简要说明

[0086] 下面参照附图进一步描述本发明的实施方式,其中:

[0087] 图 1 是用图例中标为“LEDDS”的本发明微珠组合物和对比溶液口服免疫的 BALB/c 小鼠的单独终点 IgG 效价图,如实施例 7 所述;

[0088] 图 2 是用图例中标为“LEDDS”的本发明微珠组合物和对比溶液口服免疫的 BALB/c 小鼠的平均终点 IgG 效价图,如实施例 8 所述;

[0089] 图 3 是用本发明微珠组合物和对比溶液口服免疫的 BALB/c 小鼠的平均终点 IgG 效价图,如实施例 8 所述;

[0090] 图 4 是用本发明微珠组合物和对比溶液口服免疫的 BALB/c 小鼠的单独终点 IgG 效价图,如实施例 8 所述;

[0091] 图 5 是进行肠袢实验的小鼠的消化道照片;

[0092] 图 6 是进行肠袢实验的小鼠的大肠照片;和

[0093] 图 7 是包衣微珠的 X 射线断层分析图,该微珠是通过包括通过任选振动喷嘴喷射乳液的方法制备的。

[0094] 发明详述

[0095] 本发明一方面涉及包含免疫调节剂,具体是免疫刺激剂,例如抗原或半抗原的组合物。该组合物适合通过注射以外的途径给予,至少在通过这种非注射途径给予人体或动物体时,通常诱导针对免疫调节剂的免疫应答强于单独给予该免疫调节剂(如抗原或半抗原)时。本发明还涉及包含抗原或抗原群体或抗原组合以及一种或多种下述佐剂的疫苗。马上可以看出,本发明还涉及制备和使用上述免疫调节组合物的方法。

[0096] 本发明范围内包括一种包含小油滴分散在其中的水溶性聚合物基质的药物组合物,所述组合物包含活性成分。该组合物可记载为包含水溶性聚合物基质和油相,其形式为油滴分散于基质中,所述组合物包含活性成分。该活性成分是免疫调节剂,可以是抗原或佐剂。所述组合物中包含一种以上的活性成分。在本发明的一个实施方式中,该组合物中同时包含抗原和佐剂,任选包含一种以上抗原和/或一种以上佐剂。因此,本发明范围内包括(i)含有其中分散有油滴的水溶性聚合物基质的药物组合物,该组合物包含至少一种免疫调节活性成分,该活性成分选自佐剂、抗原或其组合,和(ii)含有水溶性聚合物基质和油相的药物组合物,其形式是油滴分散于基质中,所述组合物包含至少一种免疫调节活性成分,所述活性成分选自佐剂、抗原或其组合。所述油相(即至少一部分油滴)可包含活性成分。

[0097] 活性成分和其它组分在基质和油相之间的分配未知。虽然已知在制备组合物的过程中将组分掺入哪一相(油相或将来的基质相),但不知道在最终组合中该组分会以何种程度改变该相(如果改变的话)。然而,由于在制备过程中将亲油物质添加到油相中,将亲水物质添加到水相(将来的基质)中,认为在固化组合中各组分的至少一部分,有可能全部保持在其初始相中。

[0098] 本发明包括包含一种或多种表面活性剂的组合物,所述表面活性剂任选自非离子型表面活性剂。在某些实施方式中,考虑到一种或多种表面活性剂的至少一部分,任选该组合物的全部表面活性剂含量都在油滴中。(本领域技术人员应理解,当组合物的全部表面

活性剂含量在油滴中时,痕量的表面活性剂可进入基质,阅读该说明书应结合实际,应理解痕量的任何组分可能从组合物的某相进入另一相中)。

[0099] 在整个公开范围中,本发明包括在基质上具有一种或多种包衣的组合物;在某些实施方式中,该组合物具有聚合物包衣(例如单一包衣或两种包衣)。聚合物包衣可用于调节,例如控制活性成分的释放,并且在(例如)结肠细菌酶存在下可降解,或可具有肠衣(这两种类型的包衣可能同时存在)。组合物可包括含有成孔剂的包衣。如本领域所知,成孔剂促进在所需释放部位包衣上形成孔洞。接触释放部位的 GI 道流体时,成孔剂通常可溶。在某些实施方式中,组合物具有包含不依赖 pH 的聚合物和成孔剂的包衣;例如,所述成孔剂可促进在结肠中形成孔洞。组合物可具有包含在结肠中有效的成孔剂的包衣和可在结肠中降解的包衣。

[0100] 本发明组合物可包含一种或多种药剂,以促进疫苗抗原吸附于粘膜表面和/或下方的粘膜淋巴组织、M 细胞、派尔斑或其他免疫相关细胞或细胞系统,或被它们吸收。所用物质是本领域技术人员已知的。这类物质的例子是卵磷脂和凝集素。

[0101] 本发明组合物可能适合口服给予。可调整本发明组合物,使其适合口服给予,任选排除任何其它给药途径。

[0102] 在一个实施方式中,调整该组合物,使其适合口服给予并在肠道中释放油滴。例如,这种组合物的基质中可包含肠溶性聚合物。

[0103] 本发明包括本文所述的组合物,其具有包衣(如单一包衣或两种包衣)以便控释或靶向释放油滴。在一类实施方式中,所述组合物包含肠溶性聚合物例如 HPMC,如 HPMCP。

[0104] 一类组合物包含水溶性基质和油相,其形式是油滴分散在基质中,所述油相包含抗原和佐剂,且所述组合物包含肠溶物质以保护所述抗原和佐剂免遭胃肠道的蛋白质水解作用。肠溶材料可形成外包衣或包含在外包衣中,或者可包含在基质中或油相中,或者可以位于这些位置中两种或三种的组合中(例如,形成外包衣或包含在外包衣中并且包含在油相中)。在一些实施方式中,所述肠溶材料形成外包衣或包含在外包衣中,并且不出现在基质和油相中。

[0105] 如前所述,本发明组合物,包括前两段提及的组合物,可以采取微珠形式,该微珠的直径可以是,例如,0.5mm 至 5mm,例如 0.5mm 至 2.5mm。因此,本发明包括微珠形式的组合物,其中所述油滴构成油相且所述油相包含抗原和佐剂,所述微珠任选还包含肠溶材料以保护所述抗原和佐剂免遭胃肠道蛋白质水解作用,这种肠溶性微珠适合口服给予。在一些实施方式中,肠溶材料形成外包衣或包含在外包衣中,或者包含在基质和/或油相中。在其它实施方式中,所述肠溶材料形成外包衣或包含在外包衣中,且所述组合物不含碱;本说明书包括基质中不含碱的组合物。本发明也包括不含碱,例如基质(水相)中不含碱的组合物。本发明的全部范围包括油相包含一种或多种表面活性剂的实施方式,所述表面活性剂任选自或包含非离子型表面活性剂。

[0106] 如实施例所述,本发明包括具有免疫原性且在口服给予时能有效提供对抗毒性抗原刺激的保护作用的组合物。尚不了解本发明组合物的哪些特征导致实现这种免疫原性作用,但不受理论限制地认为,以液滴形式表现油相可能是一个因素。在这个方面,数据提示液滴较小和免疫刺激作用提高之间可能有联系。也已观察到,将抗原(卵清蛋白)掺入不含油或佐剂的水溶性基质珠中无效,即仅仅保护抗原不足以获得免疫刺激效果。

[0107] 可获得的数据提示,在油相包含抗原和佐剂的组合物中,以液滴形式表现油相和油相中包含抗原可促进免疫刺激效果,据推测是将抗原以小油滴形式递呈给躯体。在该实施方式中佐剂也包含在油滴中,可用于将免疫原性提高到更好水平,因而优选。关于该段提出的理论,提醒读者对本发明的解释不受理论限制。

[0108] 在本发明的另一方面,提供包含第一群微珠和第二群微珠的产品,所述第一群微珠包含其中分散有油滴的水溶性聚合物基质,所述第二群微珠包含其中分散有油滴的水溶性聚合物基质,所述第一和第二群微珠不同,且至少第一群微珠是本发明微珠。这两群微珠可能由本发明微珠组成,且活性成分和 / 或赋形剂不同(例如,释放调节聚合物的存在、不存在、含量、位置和 / 或种类)。该产品可以是药物制剂,例如是胶囊、片剂、栓剂或阴道栓剂,或者是糊剂或流体。

[0109] 本发明一方面涉及包含分散有油滴的水溶性聚合物的液体水性外相在通过(例如)交联、冷却或加热引起或允许所述水相发生固化,从而制备本发明组合物中的应用。

[0110] 本发明还提供一种制备免疫调节(如疫苗)组合物方法,所述方法包括将水溶性聚合物的水溶液与油基液体混合形成油包水乳液,所述水溶液和油基液体的至少一种中包含抗原或佐剂或其组合,然后引起或允许所得悬液固化成一个或多个珠或其他成形元件。

[0111] 所述制备方法所用的油基液体可包含抗原或佐剂或其组合;在一个实施方式中其包含其组合。在该方法的某些实施方式中,所述水性溶液不含抗原或佐剂或其组合。在所述方法的其它实施方式中,所述水性溶液包含佐剂(在这种情况下油基液体可能不含佐剂或者可能含有佐剂)。本发明包括水性溶液包含抗原的方法的实施方式(在这种情况下所述油基液体可能不含抗原或者可能含有抗原)。

[0112] 所述方法还可包括包被珠或其它成形元件,例如用本文所述包衣材料,例如用肠溶衣和 / 或其它聚合物包衣包被。在一类方法中,所述成形元件是具有本文所述直径,例如 0.5mm 至 2.5mm 的珠。在一个实施方式中,所述方法还包括将成形元件加工成胶囊、片剂、栓剂、阴道栓剂或其它给药剂型。本文其它地方所述的本发明组合物的所有实施方式和特征可适用于上述制备过程及其产物。

[0113] 一个实施方式排除申请人的申请号 PCT/EP2010/056838 的实施例 51-53 的主题内容。因此,在本发明的任选实施方式中,所述组合物不是从 PCT/EP2010/056838 实施例 51-53 中复制的下表的内容:

[0114]

组成	mg/g
卵清蛋白	6-10
α GalCer	0.1-0.5
蒙塔尼 (Montanide) ISA 720	70-120
拉普菲 M 1944CS	280-320

司盘 85	1-5
吐温 80	1-5
明胶	450-550
D- 山梨糖醇	50-80
NaOH	1-10
HPMCP	30-80
组成	mg/g
rCTB	1-5
α GalCer	1-5
蒙塔尼 ISA 720	80-120
拉普菲 M 1944CS	250-300
司盘 85	10-20
吐温 80	25-35
明胶	450-550
D- 山梨糖醇	30-60
NaOH	5-10
HPMCP	30-60
组成	mg/g
rCTB	1-5
α GalCer	1-5
蒙塔尼 ISA 720	60-100
拉普菲 M 1944CS	200-260
司盘 85	5-20
吐温 80	20-50

明胶	500-600
D- 山梨糖醇	50-70

[0115]

[0116]

[0117] 。

[0118] 本文也包括本发明的任选实施方式,其中所述制剂不包含 6-10mg/g 卵清蛋白,或者不包含 1-5mg/g 霍乱毒素的亚基 B,在任一情况下,不包含 D- 山梨糖醇。本文还包括本发明的任选实施方式,其中所述制剂不包含 6-10mg/g 卵清蛋白或 1-5mg/g 霍乱毒素的亚基 B。

[0119] 本发明包括治疗或预防胃肠道病症的方法,所述胃肠道病症是感染物直接或间接加重或引起的,所述方法包括将本发明组合物给予动物,例如通过口服途径。还包括加强免疫应答的方法,包括通过口服途径将本发明疫苗组合物给予动物,该动物接受过非口服途径的初免接种。本发明另一方面涉及免疫接种或诱导免疫应答的方法,所述方法包括使本发明组合物与粘膜表面,如口腔、内脏、鼻腔、直肠或阴道表面相接触,该方法,例如,包括通过口服、经鼻、直肠或阴道途径给予该组合物。还包括免疫接种方法,所述方法包括将本发明组合物作为饲料或饮料的一部分给予动物或引入鱼类繁殖、进食或居住的水域。本发明一方面涉及在动物(例如哺乳动物或鱼类)中免疫接种或诱导免疫应答的方法,所述方法包括将本发明组合物给予该动物。

[0120] 本文所用的首字母缩写“LEDDS”指“液体乳液药物递送系统(Liquid Emulsion Drug Delivery System)”,并指本发明微珠。(虽然本发明微珠本身可被认为是固化的乳液,但应理解人们相信-不受理论限制-该药物递送在体内涉及到液体乳液)。因此,图 1 和 2 中提到的术语“LEDDS”指本发明微珠。

[0121] 本文所用“抗原”定义为引入非人动物或人中时,导致形成针对该抗原的抗体和细胞介导免疫的化合物。

[0122] 本文所用术语“佐剂”被定义为与抗原联用时,通常以非抗原特异性方式增加或改变或修饰所得免疫应答的一种或多种化合物。

[0123] 一些活性成分可同时用作抗原和佐剂。一个例子是霍乱毒素和其衍生物。考虑到这一因素,虽然通常遵守上述定义,但使用这些术语的上下文是解释其含义的最终指南。抗原和佐剂一起或单独可称为“活性成分”。下文中提到活性成分时,也包括其衍生物。

[0124] 还应理解,本发明可用于以单独或各种组合形式递送多种疫苗、抗原或佐剂或其它组分。本文所用术语“抗原”或“佐剂”包括但不限于肽或蛋白质(和其模拟物以及共价、非共价或化学类似物),核酸如 DNA、RNA 或 DNA/RNA 分子或衍生物(如甲基化衍生物)(用以支持基因或其它核酸基疫苗和产生各种免疫治疗剂,包括抗原和核酸基疫苗或免疫治疗剂的实体),它们的引发剂和佐剂,以及合成和分泌治疗性或健康调节性实体的生物体。

[0125] 可使用本发明递送的合适类别的治疗剂包括但不限于肽、蛋白、疫苗和低聚核苷酸,包括其非共价或共价修饰的形式。

[0126] 此外,本发明组合物所包含的活性物质,即免疫调节剂可为溶解度经改进的形式,使得当在结肠或 GI 道的其他部位释放时,其易于或难以被吸收(取决于需要或不需要吸收

的程度)。

[0127] 不需要使所有活性成分溶解于本发明组合物中。根据配方目的,完全溶解、部分溶解或不溶解都是可能的。

[0128] 如上所述,活性成分可为小分子、大分子或生物药剂并且包括任何变体、衍生物或共轭物,其设计用于增强免疫原性、渗透性、增加亲脂性和 / 或增加亲水性等 (或在生物药剂如肽、蛋白、核酸或碳水化合物情况下在只需要非特异性佐剂作用时反直觉地降低免疫原性和增加稳定性)。

[0129] 本文所用的“疫苗”被定义为包含抗原性物质的组合物,具体可能包含修饰的活感染物 (活减毒) 或灭活的感染物,或感染物的某部分 (亚基) (亚基疫苗),所述抗原性物质常常与佐剂一起给予动物,以产生免疫介导作用,如自动免疫、诱导耐受性、破坏耐受性、改变自身免疫疾病的病程等。本文将本发明组合物详细描述为疫苗组合物或免疫调节组合物。除非上下文需要,术语“疫苗组合物”包括不一定是疫苗接种的免疫调节,例如耐受或其它免疫治疗。

[0130] 粘膜包括口腔 (口颊、舌下)、鼻 (鼻腔)、内脏 (肠)、直肠或阴道的粘膜。其它适合应用本发明组合物的粘膜表面可包括眼部 (角膜、结膜) 给药途径。

[0131] 本发明疫苗组合物可通过直接施用、口腔摄入、插入、注射和本领域已知的其它常规方式递送至粘膜表面。以食物或饮料载体给予时,本发明的佐剂 / 疫苗组合物通常包含在载体组合物中,其浓度范围是约 0.0001-10%,在饮料载体情况下单位是重量 / 体积 (w/v),在食物载体情况下单位是重量 / 重量 (w/w),优选分别约 0.01-1.0% w/v 或 w/w。

[0132] 本发明疫苗组合物可以常规固体剂型给予,例如片剂、胶囊剂、粒剂、含片剂和阴道或直肠栓剂 (阴道栓剂)。

[0133] 除非另有说明,本发明组合物的成分、组分、赋形剂等适合免疫调节,如免疫接种的特定目的 (即药学上可接受的),如本文其它地方更详细地讨论。

[0134] 活性成分可掺入和 / 或加入本发明组合物的水相和 / 或油相。

[0135] 抗原

[0136] 本发明所用抗原可能是落入上述定义范围的任何所需抗原。抗原可购得,本领域技术人员能够生产它们。疫苗中包含的一种或多种抗原性部分可以是,例如,修饰的活微生物或灭活的微生物 (如化学或热灭活);或者由微生物或其它细胞包括但不限于肿瘤细胞纯化的天然产物;合成产物;遗传工程改造的蛋白质、肽、多糖或相似产品;或者它们的变应原、抗体或片段。抗原性部分也可以是任选与另一相似或不同的分子实体偶联、混合或结合的蛋白质、肽、多糖、抗体或相似产品的亚基。所述抗原也可以是核酸,例如直接或间接造成免疫应答或者干扰或影响免疫应答的介导过程的 DNA 或 RNA。例如,所述核酸可编码蛋白质抗原。

[0137] 可用于本发明的代表性抗原包括但不限于:衍生自病毒、细菌、真菌、寄生物和其它感染物,包括朊病毒的天然、重组或合成产物。抗原的例子也包括可能需要将其用于预防或治疗性疫苗的人抗原,例如,参与自身免疫病或与其相关的抗原,具体是自体抗原;激素;肿瘤抗原;和变应原。微生物 (如病毒或细菌) 产物可能是该生物体产生的组分,或者可通过 (例如) 酶切诱导产生,或者可以是通过本领域普通技术人员熟知的重组 DNA 技术产生的生物体的组分。

[0138] 抗原性物质可以,例如,衍生自或基于选自下组的感染物:幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*),霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*),肠产毒性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (ETEC),志贺氏菌 (*Shigella* spp.),艰难梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*),轮状病毒和杯状病毒;或者呼吸道感染病原物,包括肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、流感病毒和呼吸道合胞病毒;和性传播生殖器感染的病原物,包括 HIV、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 和单纯疱疹病毒。其它可提取抗原性物质的感染物包括链球菌 (*Streptococcus* spp) 和葡萄球菌 (*Staphylococcus* spp),例如金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)。其它可提取抗原性物质的感染物包括脊髓灰质炎病毒(小儿麻痹症病毒)。

[0139] 本发明组合物可以是,例如用于预防疾病、治疗疾病或延缓疾病进展的疫苗,所述疾病由感染物质、传染物或其它这类物质(包括但不限于上文所列的那些)直接或间接地引起或加重。在某些实施方式中,本发明还提供治疗和/或预防这类疾病或延迟这类疾病进展的方式。

[0140] 佐剂

[0141] 在某些实施方式中,本发明组合物本身具有佐剂性质。然而,无论是否选择这类实施方式,该组合物可包含佐剂,例如但不限于,皂苷、皂苷组分、皂苷的合成组分、ISCOMS、胞壁酰二肽和类似物、普流罗尼克多元醇、海藻糖二霉菌酸酯、含胺化合物、细胞因子和脂多糖衍生物。例如,佐剂可选自神经酰胺(如 α -半乳糖基神经酰胺也称为 α GalCer)、壳聚糖、霍乱毒素如 rCTB(霍乱毒素的重组 B 亚基)、大肠杆菌 (*E. coli*) 不耐热肠毒素如 mLT,寡核苷酸例如寡脱氧核苷酸,如衍生化或未衍生化的 CpG(胞嘧啶磷酸鸟嘌呤)和 ODN1a(脱氧-肌苷/脱氧-胞嘧啶),单磷脂(MPL)如 MPLA,BCG,皂苷,包括来源于皂荚树 (*Quillaja saponaria*) 的那些,例如 QS21 和 QuilA,,Poly I:C(聚次黄嘌呤核甙:聚胞嘧啶核苷酸或聚次黄嘌呤核甙:聚胞嘧啶核苷酸钠盐)等。也包括所有前述物质的衍生物,不管在具体上下文中是否提及衍生物。本文鉴定为佐剂的物质可在本发明中具有或起到其它作用,或者可同时起到一种以上作用。例如,在某些实施方式中, rCTB 也可以起抗原的作用。

[0142] 因此,本发明所用佐剂也可选自任何上述佐剂或佐剂类型的衍生物。佐剂也包括海洋衍生物、海绵等和其衍生物衍生物。通常, toll 样受体配体可作为佐剂添加,包括 LPS、脂蛋白、脂肽、鞭毛蛋白(flagelin)、双链 RNA、非甲基化 CpG 岛和通常由细菌和病毒释放的各种其它形式的 DNA 和 RNA。在一个实施方式中优选 TLR3 和 TLR9 配体。特别考虑到结合抗原递呈细胞上 CD1d 蛋白的物质,以及槲寄生提取物,特别是脱毒的槲寄生提取物。其它考虑的佐剂包括 Wagner 等, PLoS ONE, 2009 年 4 月,第 4 卷,第 4 期所述的 Nod- 样受体(NLR) 配体,通过引用将其全文纳入本文。也考虑到胞壁酰二肽以及 KLKL5KLK,如 Li 等, DNA and Cell Biology, 第 27 卷,第 8 期, 2008 所述,通过引用将其全文纳入本文。还考虑到将 KLKL5KLK 和 ODN1a 联用,如 Schellack 等, Vaccine 24(2006)5461-5472 所述,通过引用将其全文纳入本文。

[0143] 优选的佐剂包括神经酰胺和特异性刺激自然杀伤 T(NTK) 细胞的其它脂质分子(特别是非离子型脂质分子)。神经酰胺由鞘氨醇和脂肪酸构成,在细胞的细胞膜中浓度较高,是构成鞘磷脂(脂质双层中的主要脂类之一)的组成成分之一。神经酰胺可用作,例如调节分化、增殖、程序性细胞死亡(PCD)和细胞凋亡(I型 PCD)的信号转导分子。优选

的神经酰胺包括 α -半乳糖基神经酰胺,包括海绵神经酰胺 (agelasphin) 和衍生物。特别优选的 α -半乳糖基神经酰胺是购自日本船越公司 (Funakoshi) 的称为 KRN7000 的产品,其最初由日本麒麟制药公司 (Kirin Pharmaceuticals) 合成。也考虑将 KRN7000 衍生物用作本发明组合物的组分,详见 Dere 等 (2008), *Organic Letters*, 第 10 卷, 第 20 期, pp4641-4644, 通过引用将其全文纳入本文。特别优选如 Dere 等所述的 α -半乳糖基神经酰胺的巯基化衍生物 (其中糖苷的氧原子被硫原子取代) 以及它和紧密相关衍生物的外消旋物、对映异构体或双立体异构体 (distereoisomer)。

[0144] 在一个实施方式中,本发明组合物中包含一种以上佐剂可能有利于刺激粘膜免疫应答。

[0145] 佐剂的浓度最高达组合物重量的约 5%, 优选小于约 1% 干重, 更优选小于 0.1%。

[0146] 其它活性组分

[0147] 该章节的标题只图方便, 不暗示严格的分类。例如, 在此“其它活性组分”章节中所述的分类、物质或活性成分也可能落入本说明书的另一章节或分类。考虑到某些赋形剂可能有活性且某些活性成分可具有赋形剂特征, 本文所用术语“赋形剂”有时指“另一活性成分”。也考虑到, 该章节和本文其它地方所述的某些物质可起到双重作用, 例如生物粘附剂和佐剂的作用。还考虑到, 该章节所述物质可掺入和 / 或加入本发明组合物的水相和 / 或油相。

[0148] 通常, 本发明预见到除一种或多种主要活性成分 (免疫调节剂, 特别是抗原和 / 或佐剂) 外, 将一种或多种下述物质或物质类型掺入所述组合物。例如, 所述组合物可包含保护剂, 例如蛋白水解酶抑制剂; 粘附实体如粘膜或生物粘附剂; 和吸附增强剂; 益生菌; 使疫苗组分溶解度最大化的赋形剂; 使疫苗组分在小肠、回肠或结肠中的渗透和 / 或吸收最大化, 特别是相对于免疫活性细胞如 M 细胞和 / 或派尔斑的赋形剂。

[0149] 含抗原的本发明组合物可包含一种或多种增强抗原在粘膜表面上吸附和吸收的物质, 如卵磷脂。因此, 本发明疫苗组合物可包含一种或多种增强这类疫苗抗原的吸附和吸收的物质。所述卵磷脂可以是可用于形成脂质体的卵磷脂类脂物质, 如磷脂酰胆碱。磷脂、溶血磷脂、糖脂和中性脂质包含典型的卵磷脂组成。卵磷脂是这样一种分子, 在完全水解时产生两个脂肪酸分子和一个分子的甘油、磷酸和碱性含氮化合物, 通常是胆碱。卵磷脂水解得到的脂肪酸通常是, 但不限于, 油酸、棕榈酸和硬脂酸。磷酸可连接于甘油的 a 位或 3 位, 分别形成 a- 甘油磷酸或 3- 甘油磷酸, 并产生相应的称为 a- 和 3- 卵磷脂的卵磷脂系列物质。

[0150] 市售卵磷脂是通过提取方法从蛋黄、脑组织和大豆获得的。来自鸡蛋的卵磷脂 (卵黄磷蛋白) 和来自大豆的植物卵磷脂以及从牛脑纯化的卵磷脂可用作食品和药物制剂中的乳化剂、抗氧化剂和稳定剂。市售卵磷脂可从多种来源获得, 例如印第安纳州韦恩堡的大豆中心公司 (Central Soya, Fort Wayne, Ind.)。本领域普通技术人员应能够确定适用于所需应用的卵磷脂。

[0151] 本发明也包括阳离子型磷脂如 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰)-3-三甲铵-丙烷 (氯盐), 也称为 DOTAP。

[0152] 本发明还可包含一种或多种益生菌。益生菌是对个体或动物的健康有益的细菌或微生物。常用益生菌的例子包括但不限于: 乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、双歧杆菌属

(Bifidobacterium)、链球菌属 (Streptococcus) 的各种有益菌株等。如果存在,各生物体应以约 10^3 至 10^5 CPU 的浓度给予。可遗传改造这种益生物,以表达需要在动物中引发针对性免疫应答的某些抗原。这类抗原和 / 或提取这些抗原的生物体的例子如上所述。可采用分子生物学熟知技术将这些外源基因引入益生性微生物中。

[0153] 减毒病毒疫苗的浓度包括约 10^3 至 10^9 TCID₅₀/ 动物。该量优选为约 10^4 至 10^7 TCID₅₀/ 动物。灭活抗原或亚基抗原的浓度范围可以是数纳克至数毫克抗原,优选约 1 微克至 1 毫克。

[0154] 就渗透性增强而言,可能的赋形剂包括但不限于中链甘油三酯 (MCT) 如 C8-C20, 癸酸钠、十二酸钠、棕榈酸钠、SNAC、壳聚糖及其衍生物、脂肪酸、脂肪酸酯、聚醚、胆汁盐、羟化酶抑制剂、抗氧化剂 (例如抗坏血酸、柠檬酸、延胡索酸和其它酸) 和 / 或一氧化氮供体,包括与各种活性药物成分共价连接的一氧化氮供体。前述举例在提高回肠渗透性时,例如当免疫应答由 GI 道这一部位的免疫活性细胞介导时引起特别关注。

[0155] 为增强在结肠中的渗透性,典型的赋形剂包括但不限于癸酸钠、十二酸钠、棕榈酸钠、SNAC、壳聚糖及其衍生物、脂肪酸、脂肪酸酯、聚醚、胆汁盐、羟化酶抑制剂、抗氧化剂和 / 或一氧化氮供体,包括与各种活性药物成分共价连接的一氧化氮供体。需要在结肠中进行免疫应答或者本发明疫苗组合物与非疫苗活性成分联用时,这类赋形剂有相关性。

[0156] 该组合物还进一步包含提高回肠和结肠中免疫调节活性成分或其它活性药剂的治疗潜力的赋形剂,包括但不限于吸收限制剂、精油、例如 ω -3 油、天然植物提取物,例如,印楝油、离子交换树脂、细菌可降解的偶联接头如偶氮键、多糖如直链淀粉、瓜尔胶、果胶、壳聚糖、菊糖、环糊精、硫酸软骨素、右旋糖酐、瓜尔胶和刺槐豆胶、核因子 κ B 抑制剂,酸如富马酸、柠檬酸等、以及它们的修饰形式。

[0157] 组合物还可包含赋形剂或其他活性药物或其他成分以提高小肠吸收后的系统性生物利用度,这些成分包括:流出泵抑制剂、包括但不限于 PgP 泵抑制剂和代谢抑制剂,包括但不限于细胞色素 P450 3A 抑制剂。

[0158] 组合物还可包含可降低与小肠吸收相关的任何全身副作用的赋形剂,包括但不限于抗氧化剂,例如类姜黄色素、类黄酮或更具体包括姜黄素、 β -胡萝卜素、 α -生育酚、抗坏血酸盐或拉扎洛依 (lazaroid)。

[0159] 该组合物还可或单独包含抗氧化剂 (如抗坏血酸、柠檬酸、延胡索酸和其它酸)、味道掩蔽成分或光敏成分或光保护性成分。替代地或另外地,这类酸组分与在水相介质中仅在某一 pH 阈值以上溶解的聚合物联用时可用作溶出阻滞剂,所述聚合物包括例如,本文其它地方所述的 HPMC 衍生物。

[0160] 该组合物可进一步或分别包含粘附剂以确保 (如果需要) 例如对于微珠实施例而言,微珠在胃环境中保留或保留较长的时间。根据本发明的微珠还可包含促进或能够降低浮动或密度的材料,例如作为将微珠定位在所需 GI 部位的方式。本发明还可在微珠实施例中具有在胃或其他 GI 部位中溶胀和 / 或聚集的方式。

[0161] 进一步增加向肠上皮屏障内或跨肠上皮屏障递送本发明疫苗组合物的一个实施方式包括包含接受部位靶向手段,即靶向肠道的接受部位如 M 细胞的手段。

[0162] M 细胞是专业抗原采样细胞,发现于内脏相关淋巴组织或派尔斑上皮中,并在从 GIT (胃肠道) 内腔采样外来物质、颗粒和抗原时起到重要作用,导致下游粘膜免疫应答。

“靶向手段”包括靶向 M 细胞,包括 M 细胞的胞转能力的手段。如此靶向本发明组合物的实施方式也具有延长在 GIT 中停留时间,从而提高上皮细胞表面的疫苗局部浓度和促进下方淋巴组织吸收的优势。本发明这类靶向手段的例子是糖蛋白 UEA-1 凝集素的小有机模拟物(参见,例如 Higgins 等,Pharmaceutical Research,第 21 卷,第 4 期,2004,通过引用全文纳入本文)。所述模拟物可掺入本发明组合物的水相或油相,和 / 或可吸附于微珠表面或包含在包衣中(如果存在包衣)。或者,例如,不在包衣中时,可将该模拟物掺入(如分散或溶解于)微珠的水相或油相。另一方法是与链霉亲和素 / 生物素化接头偶联,如本领域所熟知和 Higgins 等所述。其它靶向手段包括靶向 M 细胞的其它分子实体,包括 GM1 受体(霍乱毒素 B 亚基的受体)、唾液酸路易斯 A 抗原、呼肠孤病毒抗原和 IgA 受体的配体。另一个例子是来自可食用“橙皮真菌”的子实体的橙黄网胞盘菌凝集素(AAL),它是结合岩藻糖的凝集素,如 Roth-Walter 等,Vaccine,第 23 卷,2005 所述,通过引用全文纳入本文。可将 AAL 掺入本发明组合物中,就像在其它靶向手段中所述的那样。或者,可激活基质或包衣的表面活性基团(如果有),以通过,例如,碳二亚胺 N- 羟基琥珀酰亚胺偶联于 AAL,如 Roth-Walter 等所述。其它这类靶向手段包括哺乳动物(包括)乳汁蛋白质的组分,例如乳凝集素(lactadherin)或其它整联蛋白样分子和 / 或靶向树突细胞的组分。这类蛋白质可包括人产后乳汁中发现的蛋白质。也考虑将树突细胞靶向物质作为靶向肠道接受部位的手段。

[0163] 在一个实施方式中,特别需要提高本发明组合物的崩解速率时,水相可包含崩解剂。可包含的崩解剂的实施例为藻酸、交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、低取代的羟丙基纤维素和羟乙酸淀粉钠。

[0164] 结晶抑制剂(例如大约 1% 的组合物干重)还可包含在本发明的组合物,优选水相中。一个实施例为羟丙基 / 甲基纤维素(HMC 或 HPMC,羟丙甲纤维素等),其可起到其他作用,例如乳化剂(见上文)或延迟溶出(见下文)。

[0165] 水相还可包含下文包衣章节所述聚合物中的一种。这种包含可以是包含在具有或不具有包衣的组合物中。在不具有包衣的一个实施方式中,这类聚合物可掺入本发明组合物本体,例如分散或溶解到水相中。在此实施方式中,优选选择羟丙基甲基纤维素(HPMC)的一种或多种衍生物,因为这些聚合物具有 pH 依赖性溶解度,因而可包含在基质中延迟溶出,用作包衣的替代品或补充。需要包含在高于胃部 pH 的 pH 下溶解的聚合物。特别优选的例子包括在胃部以下(远端)的肠道上部快速溶解的邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCP)和醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS),HPMCAS 中可电离羧基的存在导致聚合物在高 pH 下溶解(LF 级 > 5.5, HF 级 > 6.8)。这些聚合物可从信越化学工业株式会社(Shin-Etsu Chemical Co. Ltd)商购获得。

[0166] 因此,水相可包含肠溶聚合物(术语“肠溶聚合物”是指与胃部酸性较高的环境相比,优选在肠道酸性较低的环境下可溶的聚合物)。例如,肠溶聚合物可以是任何已知的肠溶性聚合物,例如 HPMCP、乙酸邻苯二甲酸纤维素、乙酸琥珀酸纤维素、邻苯二甲酸甲基纤维素、邻苯二甲酸乙基羟基纤维素、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯、聚乙烯丁酸乙酸酯、乙酸乙烯酯-马来酸酐共聚物、苯乙烯-马来酸单酯共聚物、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物或甲基丙烯酸酯-甲基丙烯酸-丙烯酸辛酯共聚物。

[0167] 水相也可包含碱,例如碳酸氢钠(NaHCO_3)或氢氧化钠(NaOH)或多于一种上述碱

的混合物。在此实施方式中,所述一种或多种碱的含量高达组合物干重的 10%,优选高达 5%,更优选约 1%。这类碱宜包含在水相中。具体说,准备将肠溶材料(如肠溶性聚合物,例如 HPMCP)溶解于水相时,所述水相可包含碱,因为这类聚合物只在碱性 pH 下才溶解。作为将肠溶材料溶解于水相的替代方式,可将一种(或一种以上)加入聚合物基质和/或包含在包衣中。

[0168] 所述水相可包含一种或多种本文其它地方,特别是标题为“活性成分”的章节详述的活性成分等。可在制备过程(见下)将这类活性成分引入油相或水相。它们可溶解于水相或油相或二者,这不依赖在制备期间引入它们的相。

[0169] 本说明书没有表明活性成分或其它实体的定位(油相、基质相或包衣)时,则公开内容不局限掺入位置,应包括所有可能。在这方面,读者将回忆起本文所述的组分在固化组合物的油相和基质相之间的分配是由制备过程和该组分的亲脂性/亲水性推导出来的,而不是观察结果。

[0170] 免疫调节

[0171] 先天性免疫应答细胞如树突细胞(DC)通过称为吞噬作用的过程吞噬病原体。然后,DC 迁移到淋巴结,T 细胞(获得性免疫细胞)在此处等待信号激活。在淋巴结中,DC 将吞噬的病原体“切碎”,然后通过将这些病原体“碎片”偶联于称为主要组织相容性复合物(MHC)的特殊受体将其表达成细胞表面上的抗原。接着,T 细胞可识别这些碎片并进行细胞转化,导致其自身激活。 γ - δ T 细胞具有先天性和获得性免疫应答的特征。巨噬细胞也可以类似的方法激活 T 细胞。在至少一些实施方式中,本发明组合物提供一种将活性成分递送至淋巴系统的手段等。

[0172] 在各种实施方式中,本发明疫苗组合物口服递送时具有以下多种功能中的至少一种,也可能是全部:1) 保护疫苗抗原免遭胃酸和消化酶的降解;2) 将抗原运输到粘膜表面(特别是 GALT);3) 促进抗原吸附于粘膜表面;4) 提高抗原吸收;和 5) 由组合物的佐剂特性提高对抗原的免疫应答。在递送至鼻腔、口腔、阴道和直肠粘膜的情况下,本发明组合物用作将抗原递送和吸附至粘膜表面的系统。一旦吸附于粘膜表面和吸收后,则产生免疫应答。

[0173] 本发明的某些方面和某些组分的组合令人惊讶地改进了疫苗抗原的疫苗递送系统。本发明提供了一种更简单和更有效率的将抗原掺入递送系统,而对疫苗表位无损害或损害很小的方法。可以低成本配制该疫苗制剂,并可作为饲料或水的添加剂或作为口服糊剂或片剂方便地出售。

[0174] 在一些实施方式中,与相关粘膜接触后,例如口服给予后,本发明提供将抗原转运到淋巴结,它们在此处被 T 细胞识别。在其它实施方式中,本发明为抗原提供物理保护,这能延长抗原的递送时间。这意味着,该生物体将长时间接触抗原,使免疫系统更强大,因为它能通过上调获得性免疫应答中产生较高免疫记忆所需的 B 细胞和 T 细胞的产量利用额外时间。在另一实施方式中,本发明提高了在与免疫粘膜如 GALT 接触的部位引起局部反应的能力。在另一实施方式中,本发明诱导炎性细胞因子的释放,不仅帮助将 B 和 T 细胞征集到感染部位,还整体上增加导致免疫细胞净增加的转录事件。在另一实施方式中,本发明通过与辅助细胞上的模式识别受体(PRR),特别是 Toll-样受体(TLR)相互作用提高对抗原的先天性免疫应答。

[0175] 在另一实施方式中,本发明提供初免-加强免疫(包括免疫动物,如人的方法),其中初免疫苗与加强疫苗不匹配,即按照‘异质’初免-加强形式,在加强免疫中使用的抗原与初免中相同或不同。初免或加强剂量(之一)可以是本发明组合物。在更多的具体实施方式中,本发明包括异质初免-加强免疫,包括DNA初免后接重组蛋白、灭活疫苗、病毒载体、BCG或重组修饰的安卡拉牛痘病毒(MVA)加强免疫;病毒载体初免后接重组蛋白加强免疫;和BCG初免后接病毒载体加强免疫;其中本发明组合物用于初免或加强免疫中的至少一次。在一个实施方式中,本发明是用于在动物中引发免疫概况(和/或具有特定免疫概况的免疫应答)的组合物,如上文和本文其它地方所述。在相关实施方式中,本发明提供在非口服(如静脉内)初免后进行口服加强免疫,包括将本发明组合物给予已接受初免的动物如人。

[0176] 本发明还涉及一种在动物中提高IgG1和/或IgG2A应答的方法,所述方法包括将本发明组合物给予事先接受过或未接受过初免的动物。

[0177] 本发明还涉及一种在动物中使免疫应答背离(和/或关闭)TH1型免疫应答的方法,包括将本发明组合物给予事先接受过或未接受过初免的动物。也可采用一种相反的方法,即,使免疫应答趋向(和/或打开)TH1型应答。本发明还涉及一种在动物中使免疫应答背离(和/或关闭)TH2型免疫应答的方法,包括将本发明组合物给予事先接受过或未接受过初免的动物。也可采用一种相反的方法,即,使免疫应答趋向(和/或打开)TH2型应答。

[0178] 在优选实施方式中,本发明组合物包含淋巴靶向和/或淋巴递送组分,以进一步提高免疫应答和任选地降低肝脏清除程度。在另一优选实施方式中,本发明组合物可用于预防或减缓转移,或其它免疫治疗旨在治疗或减缓恶性疾病,例如实体或血液恶性肿瘤的进展。

[0179] 在本发明的另一实施方式中,活性成分(之一)是能够结合DNA和引起其它基因表达,从而造成T辅助细胞发育产生B细胞和抗体的转录因子或其衍生物,如转录因子Bcl6。在一个实施方式变型中,所述组合物包含刺激转录因子Bcl6的产生(例如体内产生)的物质。本发明还包括这类实施方式,其中组合物包含结合Bcl6并阻止其结合DNA的Blimp1或相关蛋白或其衍生物(或其它Bcl6的拮抗剂)-阻止Bcl6结合DNA能够防止TFH细胞的成熟,使B细胞不能生产抗体(使用本发明组合物包括治疗抗体诱导炎症诱发的某些疾病如自身免疫病,如类风湿性关节炎的方法)。因此,掺入这类转录因子、转录因子表达刺激物和/或其拮抗剂的本发明组合物可用于增强疫苗应答,或者相反地阻断自身抗体应答。

[0180] 在本发明的另一应用中,考虑到诱导产生抗体和T细胞。此外,还考虑到本发明包括包含,例如,结合(例如)癌细胞的抗体或其它活性物质和至少一种吸引和结合T细胞的其它活性物质的组合物。这类组合物可用于,例如,杀死癌细胞,本发明也考虑到包含针对某一表位的抗原和针对T细胞标记物的抗原,以使所得的组合物在原位,例如在体内用作双功能抗体(类似于由抗体用于识别T细胞或靶细胞上的抗原的小结合域制备的抗体,所有这些结构域在一条多肽链中连接在一起)。例如,这类双功能抗体可具有两个特异性结合位点,其中一个连接于,例如,T细胞上的CD3抗原,另一个结合于,例如,肿瘤细胞表面上的表面抗原。本发明组合物的一个实施方式用作这类双功能抗体的功能等同物。

[0181] 本发明的一个实施方式还涉及在动物中提高局部抗原特异性 IgA 应答和 / 或全身性 T 细胞应答的方法,所述方法包括将本文所述组合物给予动物。

[0182] 口服耐受性

[0183] 在一个实施方式中,本发明提供利用口服耐受现象(上文中有关现有技术的章节所述)治疗口服自身免疫或炎性疾病的方式。因此,在某些实施方式中,本发明允许相对于以下特征调节口服递送抗原:抗原剂量、抗原特性、先天性免疫系统、宿主的遗传背景和免疫状态、和本文其它地方详细描述粘膜佐剂。在一个具体实施方式中,本发明提供靶向递送至肠道的特定区域,以诱导或破坏口服耐受性。具体说,本发明提供能够,例如在口服给予后,将疫苗活性成分释放至直肠 / 结肠的方式(如组合物),免疫诱导(有序淋巴组织)和效应部位(弥散固有层)的混合体和 / 或浓缩物位于此处(特别是相对于其它 GIT 区段),如上文中有关现有技术的章节所述。此外,本发明提供一种组合物,其防止或减少(如食物)肽和蛋白质的正常摄入,以至于当这类组分到达结肠时,它们激活合适的、所需的、耐受性的或治疗性的免疫应答,例如在这些位置的幼稚 CD4⁺T 细胞中。

[0184] 因此,本发明组合物可用于通过调节口服给予抗原的剂量和 / 或通过提高抗原剂量避免耐受性损失,产生活性细胞抑制或克隆无反应。本发明还提供通过给予患者本发明组合物提高口服耐受性的方式,本发明组合物包含免疫佐剂如脂多糖或霍乱毒素亚基 B,以刺激某些细胞群下调免疫应答。本发明组合物可用于,例如,治疗 T- 细胞介导的自身免疫病。可以用本发明组合物治疗的自身免疫病包括多发性硬化、类风湿性关节炎、结肠炎(包括 Th1 介导的结肠炎)、克罗恩氏病、中风、阿耳茨海默病、动脉粥样硬化和 1 型糖尿病。本发明也能够利用耐受性诱导来防止产生针对肽、蛋白质和抗体治疗剂(生物药物或“生物剂”)的抗体,具体是在给予所述生物药物之前的一个或多个机会中,通过本发明组合物将耐受量的这类治疗剂给予动物如人。

[0185] 诱导口服耐受性所用的组合物可包含选自下组的抗原:(i) 参与自身免疫或其它疾病的抗原,和(ii) 生物治疗剂。抗原和其相关疾病的例子是:

[0186] 关节炎:II 型胶原

[0187] 自身免疫性葡萄膜炎:S- 抗原

[0188] 自身免疫性重症肌无力:鱼雷卷(Torpedo)乙酰胆碱受体

[0189] 胰岛素依赖性糖尿病:胰岛素

[0190] 移植物排斥:同种异体细胞 / 同种异体肽

[0191] 变态反应:饮食中的特定肽 / 蛋白质 / 抗原

[0192] 甲状腺炎:甲状腺球蛋白

[0193] 乳糜泻:组织转谷氨酰胺酶 / 麦醇溶蛋白 / HLA-DQ218

[0194] 多发性硬化:共聚物 I/ 髓磷脂抗原。

[0195] 本发明包括在存在或不存在免疫调节剂的情况下使用疾病或变应原性 - 特异性肽来诱导合适的免疫作用。因此,本发明组合物可包含疾病或变应原性 - 特异性肽,此外,在一些实施方式中,包含一种或多种其它免疫调节剂(如选自免疫抑制剂和佐剂和任选的其它药剂),而在其它实施方式中,该组合物不含其它免疫调节剂。

[0196] 本发明组合物可用于使抗原与内脏相关淋巴组织(GALT)直接接触或在吸收后接触。在一个实施方式中,本发明组合物想要使抗原和 / 或佐剂与 GALT 中的 T 细胞相互作用,

或者促进它们的相互作用。在一个实施方式中,出现此种相互作用的 GI 道的区段是直肠和 / 或结肠。在另一实施方式中,所述区段是几乎没有免疫诱导位点的回肠或其它部位。

[0197] 本发明提供组合物和 / 或制剂,其包含必需配制的抗原性肽(包括任何共价或非共价修饰的肽),含有或不含佐剂和任选的本文其它地方所述的其它成分。这类其它成分,例如渗透增强剂,以及用一层或多层(例如)聚合物任选包裹(如包衣)的本发明组合物允许在肠道或结肠 / 直肠中最合适的位置释放活性成分,其中所述层或聚合物包衣是修饰的。除上文所述和现有技术章节所述的自身免疫和其它疾病外,在一些实施方式中,本发明还提供用于治疗 and / 或预防这类疾病,如乳糖不耐、食物变态反应和全身变态反应的制剂。

[0198] 具体说,本发明提供其中活性成分或物质调节口服耐受性并且可包含其它调节口服耐受性的成分的组合物。这类其它成分可以是谷蛋白或谷蛋白衍生物。

[0199] 诱导口服耐受性的方法可包括在 GI 道下部,例如结肠和 / 或直肠中递送抗原(一种抗原或多种抗原)。该方法的目的是完整地递送抗原(即不显著降解)。此外或或者,可通过在组合物中包含抗原和免疫抑制剂,例如环孢菌素诱导口服耐受性,以便在抗原接触肠道粘膜细胞时,它们呈现更为天然的状态,因而能够诱导耐受性,而不是疫苗 / 免疫加强反应。

[0200] 因此,本发明包括在哺乳动物,如人中诱导口服耐受性的方法,包括:

[0201] 向该哺乳动物给予含有抗原的本发明组合物,该组合物经调整在结肠或直肠中释放所述抗原;和 / 或

[0202] 向该哺乳动物给予含抗原的本发明组合物,所述组合物还含有环孢菌素或其它免疫抑制剂。

[0203] 经调整在结肠或直肠中释放的方式可以是,例如:

[0204] 将该组合物配制成栓剂

[0205] 将该组合物配制成口服给药制剂并包含控释剂。

[0206] 作为控释剂的例子,所述组合物可包含被结肠细菌酶降解的聚合物或直到组合物到达结肠前用作屏障的聚合物(例如,在结肠条件下溶解或降解的聚合物)。可使用在 GI 道中的下行过程中被降解或侵蚀的阻滞聚合物和 / 或包含在结肠条件下溶解或降解的成孔剂的不依赖 pH 的聚合物。该组合物可包含肠溶性聚合物,以防止在胃部降解,并使该组合物只有在进入肠道时才发生进一步的溶出、侵蚀或降解。该段所涉及的聚合物可包含在基质中和 / 或可形成或包含在一个或多个包衣中。

[0207] 在包含免疫抑制剂的组合物的情况下,本发明不受限于免疫抑制剂的种类和释放部位。在一些实施方式中,所述免疫抑制剂在肠道中释放,并任选在 GI 道的一个或多个其它部位(如结肠)释放。在其它实施方式中,所述免疫抑制剂在结肠中释放,并任选在 GI 道的一个或多个其它部位(如肠)释放。

[0208] 使用免疫抑制剂是,它可以是环孢菌素。环孢菌素形成一类通常具有免疫抑制和抗炎活性的多肽。- 最常见的环孢菌素是环孢菌素 A(国际非专利名称为环孢素 A)。环孢菌素的其他形式包括环孢菌素 B、C、D 和 G 以及它们的衍生物。应当理解,本文中术语“环孢菌素”是指若干环孢菌素、其衍生物或前药中的任一者,或上述任何物质的混合物。环孢菌素可通过在制备期间添入油相掺入本发明组合物中。

[0209] 可用于本发明的其它免疫抑制剂是他克莫司、更昔洛韦、依那西普、雷帕霉素、环

磷酸胺、硫唑嘌呤、麦考酚酸吗乙酯、甲氨蝶呤、皮质醇、醛固酮、地塞米松、环加氧酶抑制剂、5- 脂肪氧合酶抑制剂和白三烯受体拮抗剂等等。免疫抑制剂可通过在制备期间添入油相和 / 或水相掺入本发明组合物中。实践中, 相的选择取决于免疫抑制剂在各相中的溶解度。

[0210] 因此, 应理解, 虽然环孢菌素 A 是优选的免疫抑制剂, 但可采用其它免疫调节 / 抑制性实体, 例如甲氨蝶呤来控制免疫细胞, 主要是树突细胞, 将它们维持在或推向诱导粘膜耐受时优选的不成熟状态或幼稚状态。

[0211] 本发明也包括选自下组的制备物: 本发明的组合物、微珠群和产品, 其中所述制备物包含抗原且: (i) 调整所述制备物, 以便在结肠或直肠中释放抗原; 和 / 或 (ii) 所述制备物还包含环孢菌素或其它免疫抑制剂。这类制备物可用于诱导口服耐受性。本文公开的涉及口服耐受性的内容经必要修正后适用于本段所述的制备物。本发明包括在哺乳动物中诱导口服耐受性的方法, 包括将本段所述的制备物给予该哺乳动物。

[0212] 表面活性剂

[0213] 在说明书和权利要求书中, 术语“表面活性剂”作为“表面活性试剂”的缩略词使用。出于本说明书和权利要求书的目的, 认为存在四种主要类型的表面活性剂: 阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子表面活性剂和两性 (两性离子) 表面活性剂。非离子表面活性剂保留完整, 其在水溶液中不具有电荷, 并且不会离解成阳离子和阴离子。阴离子表面活性剂为水溶性的, 其在置于水中时具有负电荷并且会离解成阳离子和阴离子。阳离子表面活性剂在置于水中时具有具有正电荷, 并且也会离解成阳离子和阴离子。两性 (两性离子) 表面活性剂在酸性溶液中带正电荷并且作为阳离子表面活性剂, 或其在碱性溶液中带负电荷并且充当阴离子表面活性剂。

[0214] 表面活性剂还可根据其亲水亲脂平衡值 (HLB) 进行分类, 所述亲水亲脂平衡值为表面活性剂的亲水性或亲脂性程度的量度, 其通过计算分子的不同区域的价值来测定, 如 Griffin 于 1949 年和 1954 年以及随后由 Davies 所描述 (最初是针对非离子表面活性剂)。所述方法将公式应用于整个分子和亲水性与亲脂性部分的分子量, 得到高达 40 的任意 (半经验) 比例, 但通常范围介于 0 与 20 之间。HLB 值为 0 对应于完全疏水性分子, 值为 20 对应于完全由亲水性组分构成的分子。HLB 值可用于预测分子的表面活性剂性质:

[0215]

HLB 值	预期性质
0 至 3	消泡剂
4 至 6	W/O 乳化剂
7 至 9	润湿剂
8 至 18	O/W 乳化剂
13 至 15	典型清洁剂
10 至 18	增溶剂或水溶助长剂

[0216] 尽管将 HLB 数分配给除非离子表面活性剂之外的表面活性剂（体系针对该表面活性剂而发明），阴离子、阳离子、非离子和两性（两性离子）表面活性剂的 HLB 数可能重要性较低，并且通常表示相对或对比数而非数学计算的结果。这就是可具有高于 1 然而，HLB 数可用于描述给定乳液体系的所需应用的 HLB 需求，以达到良好功效。

[0217] 可包含在本发明组合物中的表面活性剂优选地易于扩散或为可扩散的表面活性剂，以利于制备和处理本发明的组合物。这种表面活性剂可以是任何具体类型（离子型、非离子型、两性离子型），并可占组合物干重的 0.01% 至 10%，更优选 0.05 至 5%，理想地在 0.1-1% 范围以内或以外，例如 0.2 至 0.5%。

[0218] 除非另有指示或要求，否则所有百分比和比率均按重量计。

[0219] 在一个实施方式中，优选非离子型表面活性剂。可能的非离子型表面活性剂包括全氟化碳、聚乙二醇十二烷基醚（例如 苳泽 (Brij)，如 苳泽 35）、卖泽和衍生自聚乙氧基失水山梨糖醇和油酸的化合物，包括聚氧乙烯 (20) 失水山梨糖醇单油酸酯（可作为吐温 80 或聚山梨酯 80 获得）和失水山梨糖醇单月桂酸酯的聚氧乙烯衍生物，包括聚氧乙烯 (20) 失水山梨糖醇单月桂酸酯（可作为吐温 20 或聚山梨酯 20 获得）。本发明预见到使用市售产品，在这种情况下，可包含额外组分，主要分子物质如通过引用将其全文纳入本文的 Ayorinde 等 (2000), "Rapid Communications in Mass Spectrometry" (在质谱中的快速交流), 第 14 卷, 第 22 期, 第 2116-2124 页所述。其它可能的非离子型表面活性剂包括失水山梨糖醇（山梨糖醇衍生物）和硬脂酸如十八烷酸形成的酯 [(2R)-2-[(2R,3R,4S)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基]-2-羟乙基](Z)-十八碳-9-烯酸酯，可作为司盘 80 购得。另一种可能的非离子型表面活性剂是失水山梨糖醇三油酸酯，可作为司盘 85 购得。苳泽、卖泽和吐温产品均可购自 ICI。司盘产品可购自西格玛奥德里奇公司 (Sigma Aldrich)。另选的或额外的非离子型表面活性剂或乳化剂是二缩甘露醇一油酸，在制备本发明组合物的方法中，该物质可在自乳化前加入油相或水相，或与本发明组合物的另一组分预混。例如，如果还希望利用角鲨烯作为组合物的组分，可在制备期间用市售油包水乳液将两种组分引入本发明的组合物中，所述油包水乳液包括二缩甘露醇一油酸（蒙塔尼 (Montanide) ISA 720，法国森皮 (Seppic) 有限公司，基于角鲨烯）。

[0220] 特别优选非离子型表面活性剂的混合物。混合物可组合一种或多种上述物质。在一个实施方式中，混合物是具有低 HLB（约 < 3）的第一非离子型表面活性剂和具有高 HLB（约 > 10）的第二非离子型表面活性剂的混合物。在另一实施方式中，第一非离子型表面活性剂是油溶性的，第二非离子型表面活性剂是水溶性的。特别优选的非离子型表面活性剂的组合是聚氧乙烯 (20) 失水山梨糖醇单油酸酯（如吐温 80）和失水山梨糖醇三油酸酯（如司盘 85）。

[0221] 还考虑到其它表面活性剂类型，例如阴离子型表面活性剂，需要注意，在一些实施方式中，该组合物优选不含阴离子型表面活性剂。然而存在时，包含的优选阴离子表面活性剂包括全氟辛酸盐 (PFOA 或 PFO)、全氟辛烷磺酸盐 (PFOS)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、月桂基硫酸铵和其他烷基硫酸盐，聚乙二醇单十二醚硫酸钠，也称为十二烷基醚硫酸钠 (SLES) 和烷基苯磺酸盐。还可以想到阴离子表面活性剂的混合物。

[0222] 在本发明的一个实施方式中，引入时表面活性剂的物理形式在易化本发明组合物的制备中起到作用。因此，虽然可采用液体表面活性剂，但优选利用在室温下呈固体形式

(例如晶体或粉末)(半固体)的表面活性剂,特别是当水相包含明胶时。

[0223] 通常,可使用表面活性剂的混合物以实现本发明组合物的最佳长期稳定性,其中本发明优选短链表面活性剂通常因其有利于短期稳定性(加工助剂);而本发明优选长链表面活性剂通常因其有利于长期稳定性(储藏期助剂)。

[0224] 将阴离子型表面活性剂掺入本发明组合物时,它可以在水相中。然而,作为对水相中表面活性剂的替代(或补充),本发明还设想使用表面活性剂类乳化剂(也称为结晶抑制剂),例如 HPMC(也称为羟丙甲纤维素),尽管设想通常以较小的量对其进行使用以避免高粘度,但其可限制加工选择。

[0225] 可任选包含在水相中的非离子表面活性剂包括泊洛沙姆,它是非离子三嵌段共聚物,由聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中心疏水链侧接两条聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))的亲水链构成。泊洛沙姆可以商品名普流罗尼克™购得。此类表面活性剂或类似的较大聚合物表面活性剂是水溶性的,因此在此处提供作为任选的水相组分。然而,其可用于降低油相的高 HLB 聚合物组分(参见独立章节)的量或作为其替代物,所述组分例如多乙氧基化蓖麻油(聚乙二醇醚),示例如市售克列莫佛™(Cremophor™)。

[0226] 可以类似方式使用的另一种水溶性聚合物表面活性剂为基于甲基丙烯酸和甲基丙烯酸甲酯的阴离子共聚物,其中游离羧基与酯基的比例为大约 1 : 1,且平均分子量为大约 135,000。此类聚合物表面活性剂以商品名尤初吉® L100 (EUDRAGIT® L 100) 得自德固赛(Degussa)。

[0227] 本发明包括一种或多种表面活性剂包含在油相中的实施方式。在一些实施方式中,水相中不掺入表面活性剂。

[0228] 油相

[0229] 可利用药学上合适的任何一种或多种油构建本发明油相(油滴)。油相包含一种或多种药学上可接受的油(不与水混溶的液体),并且可包含其它本文所述的物质;所述其它物质常常可能是亲油或油溶性的,但可能是油包水乳液的内部水相。以本发明组合物的干重计算,油相通常占 10% -85%,优选 15% -50%,更优选 30% -40%。

[0230] 油相可包含选自下组的一种或多种油:脂肪酸;脂肪酸酯;聚乙二醇酯,例如单酯和二酯;烃油,例如天然烃油;和类固醇,如胆固醇。在一个实施方式中,一种或多种油选自脂肪酸;脂肪酸酯;聚乙二醇酯;和烃油。考虑到这类油可占油相的至少 50 重量%。脂肪酸可以是单或多不饱和脂肪酸。脂肪酸酯可以是甘油三酯,以及甘油与脂肪酸和低分子量酸组合形成的酯(特别是三酯),所述低分子量酸如琥珀酸(脂肪酸甘油三酯是甘油酯的一个具体例子)。合适的脂肪酸具有 6-24 个碳原子,特别是长链 C₁₂-C₂₄ 脂肪酸,如 C₁₅-C₂₂ 酸。也应提到中链 C₆-C₁₂ 脂肪酸。烃油可以是萜,特别是三萜,例如,角鲨烯和角鲨烷(角鲨烯是优选的烃油)。含有甘油三酯的油也可含有甘油一酯和/或甘油二酯,例如作为甘油酯含量的一小部分(小于 50 摩尔%)。油相通常包含油的混合物,所述油包括例如,脂肪酸聚乙二醇甘油酯,也称为聚乙二醇甘油酯,它是甘油的脂肪酸单酯、二酯和三酯,以及聚乙二醇的脂肪酸单酯和脂肪酸二酯的混合物;例子是油酰聚乙二醇甘油酯和亚油酰聚乙二醇甘油酯。本文所述的一类油相包括脂肪酸聚乙二醇甘油酯,特别是油酰聚乙二醇甘油酯,例如其含量为油相的至少 15% 重量,任选为至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50% 重量或至少 60%,例如 15% -60%、20% -50%、30% -50% 或 30% -40%。

[0231] 可以单独或组合形式包含在油相中的油包括多不饱和脂肪酸,例如 ω -3 油,如二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳六烯酸 (DHA)、 α -亚油酸 (ALA)。也考虑这类组分的组合,例如 EPA 和 DHA 的 1 : 5 混合物,可以商品名 Epax 6000 购得。

[0232] 油相中可 (单独或组合) 包含的另选或其它油包括胆固醇相关性或胆固醇衍生的油如角鲨烯 (IUPAC 名称 : (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-六甲基二十四碳-2,6,10,14,18,22-六烯)。本文所述的一类油相包括角鲨烯,例如其含量为油相的至少 10% 重量,任选为至少 20%、至少 30%、至少 40% 或至少 50% 重量,例如 10% -50%、10% -40%、15% -40% 或 20% -30%。

[0233] 可在制造期间,使用这类油和其它组分的市售组合将油引入本发明组合物的油相。例如,如果使用角鲨烯,可方便地利用制造中所用的油包水 (w/o) 乳液将其引入组合物 (详见下文)。这类 w/o 乳液宜包含一种或多种乳化剂,在这种情况下本发明组合物中优选存在乳化剂。特别优选水 : 油体积比为 30 : 70 且还含有二缩甘露醇一油酸乳化剂的角鲨烯油包水乳液,例如可以商品名蒙塔尼 ISA720 从森皮公司 (Seppic) 购得的产品。

[0234] 其它可 (单独或组合) 包含的 (另选或额外) 的油包括亚油酰聚乙二醇甘油酯 (聚乙二醇甘油酯),如嘉法狮公司 (Gattefosse) 生产的 Labrafil M 2125CS,油酰聚乙二醇甘油酯 (聚乙二醇甘油酯),如 Labrafil ® M 1944CS,以及辛酰基己酰基聚乙二醇甘油酯如嘉法狮公司生产的 Labrasol。

[0235] 在优选实施方式中,使用一种以上的油,特别优选混合两种油组合物,以提供含有属于两类或更多类的油组分的油相。这类组合的例子可以是油酰聚乙二醇甘油酯 (聚乙二醇甘油酯) 如 Labrafil M 1944CS 和角鲨烯如蒙塔尼 ISA 720 的组合。因此,油相可包含聚乙二醇甘油酯和烃 (如萘) 油的组合。具体油酰包含聚乙二醇甘油酯,如油酰聚乙二醇甘油酯和角鲨烯的混合物。

[0236] 可以单独或组合形式包含在油相中的另选或额外的油包括基于天然甘油三酯的油,包括橄榄油、芝麻油、椰子油、棕榈仁油。特别优选的油包括饱和椰子油和棕榈仁油衍生的辛酸和癸酸脂肪酸以及甘油,例如一系列可获得的且本发明的一种或多种组分可从其中选择的以商品名迈格罗™ (Miglyol™) 提供的那些,包括迈格罗™ 810,812 : (辛酸 / 癸酸甘油三酯);迈格罗™ 818 : (辛酸 / 癸酸 / 亚油酸甘油三酯);迈格罗™ 829 : (辛酸 / 癸酸 / 琥珀酸甘油三酯);迈格罗™ 840 : (丙二醇二辛酸酯 / 二癸酸酯)。注意 : 迈格罗™ 810/812 的区别仅在于 C₈/C₁₀ 的比率,并且由于其 C₁₀ 的含量低,迈格罗™ 810 的粘度和浊点较低。迈格罗™ 系列可从萨索尔工业公司 (Sasol Industries) 商购获得。

[0237] 可包含在本发明油相中的另选或额外的油为中链甘油三酯,例如嘉法狮 (Gattefosse) 生产的具体产品编号为 WL 1349 的 L™L (Labrafac™ Lipophile)。

[0238] 油相还可包括增溶剂 (其还可称为两亲性油或表面活性剂),并且实施例包括多乙氧基化蓖麻油 (聚乙二醇醚),其可通过使环氧乙烷与蓖麻油进行反应来制备。还可将商业制剂用作本发明组合物的增溶剂,例如含有微量组分 (如蓖麻酸的聚乙二醇酯、聚乙二醇和甘油的聚乙二醇醚) 的那些商业制剂。优选实施例为巴斯夫集团 (BASF Corp.) 生产的克列莫佛 (Cremophor),也称为克列莫佛 EL。

[0239] 在本发明的一个实施例中,油相包含不止一种组分。例如,正如所述,油相可包含增溶剂。

[0240] 油相优选还包含活性成分（抗原或佐剂）的增溶剂或助溶剂。合适助溶剂的实施例为 2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇,其可以商品名 Carbitol™、Carbitol 溶纤剂、川斯格妥™(Transcutol™)、Dioxitol™、Poly-solv DE™ 和 Dowanal DE™;或较纯的川斯格妥™ HP(Transcutol™ HP) (99.9) 商购获得。优选嘉法狮生产的川斯格妥 P 或 HP。

[0241] 油相还可为油包水 (w/o) 乳液,使得本发明的组合物变为水包油包水 (w/o/w) 乳液。换言之,理论上认为油相将油递呈给组合物水相（从而至少在制备过程中形成油-水界面）,可能由单一的液体油相构成或包含额外的内部水相。

[0242] 所述油相可包含一种或多种本文其它地方,特别是标题为“活性成分”的章节详述的活性成分等。

[0243] 水相（基质相）

[0244] 固体组合物的水相（或“基质相”）来自制造过程中所用的水性液体,在固体组合物中可包含显著量的水,或者可基本干燥。根据本发明组合物的水相的主要组分（优选介于 20%和 70%之间,更优选介于 30%和 60%之间,更优选介于 35%和 55%之间,按组合物的干重计）为水溶性聚合物基质材料,但还可包括其他组分,如下文所述。

[0245] 虽然本发明设想了水溶性聚合物基质材料的混合物,优选本发明的组合物包含实质上为单一材料或本文所述材料中的材料类型的基质材料和/或可在无需将附加聚合物组分添加到水相中的情况下固化的基质。

[0246] 在一个实施例中,水溶性聚合物基质材料可为选自以下的一种或多种:明胶、琼脂、聚乙二醇、淀粉、酪蛋白、壳聚糖、大豆蛋白、红花蛋白、海藻酸盐、结冷胶、角叉菜胶、黄原胶、邻苯二甲酸化明胶、琥珀酰明胶、邻苯二甲酸醋酸纤维、油树脂、聚乙酸乙烯酯、羟丙基甲基纤维素、丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯的聚合产物和聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯以及上述任一种的任何衍生物。

[0247] 在一个优选的实施例中,聚合物基质材料为水胶体,即胶体体系,其中胶体颗粒分散在水中并且可根据可用水的量而呈不同的状态,如凝胶或溶胶（液体）。优选使用与不可逆性（单一状态）水胶体相对的可逆性水胶体（例如琼脂、明胶等）。可逆性水胶体可以凝胶和溶胶状态存在,并且通过添加或排除热量而改变状态。明胶为热可逆的再水合胶体并且是特别优选的。还可以想到明胶衍生物,例如,琥珀酰或邻苯二甲酸化明胶。可根据本发明使用的水胶体包括来源于天然源的那些:例如,角叉菜胶（从海藻中提取）、明胶（从牛、猪、鱼或植物来源提取）、琼脂（得自海藻）和果胶（从柑橘皮、苹果和其他水果提取）。不基于动物的水胶体对于某些应用是优选的,例如施用给素食者或出于宗教原因而不愿食用动物产品的个体。关于角叉菜胶的用途,参考美国专利申请 2006/0029660A1 (Fonkwe 等人),其全部内容以引用方式并入本文中。在一个实施方式中,水溶性聚合物选自明胶、琼脂和角叉聚糖（具体是明胶或琼脂）,或者在另一实施方式中是其中两种或所有三种的组合。

[0248] 在一个实施方式中,水相可称为组合物的固定水相,按照本发明的一个实施方式优选是凝胶,即基本上稀释的交联体系,其处于稳态时不流动。固化水相的内部网状结构可源于物理或化学键,以及微晶或可在伸展流体（如水）内保持完整的连接。

[0249] 在替代的优选实施例中,聚合物基质为非水胶体胶。实施例为藻酸的交联盐。例如,从褐藻壁中提取的海藻酸钠胶的水溶液在接触二价和三价阳离子时具有公认的胶凝性能。典型的二价阳离子为钙离子,通常呈氯化钙水溶液的形式。此实施例中优选的是交联

或胶凝通过与此类多价阳离子,特别是钙离子反应而产生。

[0250] 在替代的优选实施例中,聚合物基质为呈生物凝胶形式的壳聚糖,其可有或无添加剂,如美国专利 4,659,700(强生(Johnson & Johnson));Kumar Majeti N.V.Ravi,反应性和功能性聚合物(Reactive and Functional Polymers),46,1,2000;和 Paul 等人,ST.P.Pharma Science,10,5,2000 中所述,这三个文献的全部内容以引用的方式并入本文。还可以想到壳聚糖衍生物,例如硫醇化实体。

[0251] 在其中明胶为本发明聚合物基质的实施例中,据此参考“勃鲁姆强度(bloom strength)”,其为对凝胶或明胶强度的量度,由 O.T.Bloom 于 1925 年提出。该试验测定探针(通常具有 0.5 英寸的直径)使凝胶表面挠曲 4mm 而不对其造成破坏所需的重量(以克计)。结果以勃鲁姆(Bloom)(等级)表示并且通常在介于 30 和 300 勃鲁姆之间的范围。为了对明胶进行勃鲁姆试验,将 6.67%明胶溶液在试验之前于 10℃下保持 17-18 小时。

[0252] 根据本发明,在其中明胶为聚合物基质的实施例中,优选使用的勃鲁姆强度介于 200 和 300 之间,优选介于 210 和 280 之间的凝胶。

[0253] 根据本发明,在其中明胶为水溶性聚合物基质材料的实施例中,明胶可通过多种方式获得。例如,其可通过胶原材料(如动物的表皮、白结缔组织或骨骼)的部分水解得到。A 型明胶主要来源于经酸处理的猪皮,并且表现出介于 pH 7 和 pH 9 之间的等电点,而 B 型明胶来源于碱处理的骨骼和动物(牛)表皮并且表现出介于 pH 4.7 和 pH 5.2 之间的等电点。A 型明胶在某种程度上是优选的。用于本发明的明胶还可来源于冷水性鱼类的表皮。A 型和 B 型明胶的共混物可用于本发明中,以获得具有微珠制备所需的粘度和勃鲁姆强度特性的明胶。

[0254] 商业明胶可得自西格玛化学公司(Sigma Chemical Company)(美国密苏里州圣路易斯(St.Louis, Mo. USA))或得自 Nitta(<http://www.nitta-gelatin.com>)。

[0255] 例如当要掺入本发明组合物的活性成分具有温度不稳定性或其活性可在暴露于较高温度时受到影响时,优选的是较低温度的明胶(或明胶衍生物或明胶与熔点降低剂的混合物)或其他能够在较低温度下固化的聚合物基质(例如上述藻酸钠)。

[0256] 根据本发明,在其中明胶为聚合物的实施例中,起始明胶材料优选地在制备之前经改性以通过将增塑剂或软化剂添加到明胶中来制备“软明胶”,从而调节本发明组合物的硬度。添加增塑剂使得柔软性和柔韧性提高,这可有利于优化溶出和/或进一步加工,例如包衣。本发明的可用增塑剂包括甘油(1,2,3-丙三醇)、D-山梨糖醇(D-葡萄糖醇)、山梨糖醇 BP(非结晶山梨糖醇溶液)或 D-山梨糖醇和脱水山梨糖醇水溶液(例如 Andidriborb 85/70)。还可以想到其他或类似的低分子量多元醇。也可使用聚乙二醇,但其为次优选的,并且实际上特别优选的本发明组合物不含或基本上不含 PEG 或其衍生物。甘油和 D-山梨糖醇可得自美国密苏里州圣路易斯的西格玛化学公司或法国罗盖特公司(Roquette)。

[0257] 软化剂(如果使用)的理想掺入比例为最高达 30%,优选最高达 20%且更优选最高达 10%的本发明组合物的干重,甚至更优选介于 3%和 10%之间,并且最优选介于 5%和 8%。

[0258] 如上文有关表面活性剂的章节所详述,本发明组合物优选包含一种或多种表面活性剂,更具体地,所述组合物的至少一部分表面活性剂含量,例如全部表面活性剂含量包含在油相中。某些表面活性剂可充当增塑剂或软化剂或反之亦然。软化剂的理想掺入比例为

本发明组合物干重的最高达 15%，优选最高达 10% 且更优选最高达 8%，甚至更优选介于 2% 和 8% 之间，并且最优选介于 3% 和 6%。

[0259] 优选的表面活性剂是吐温 80（聚山梨酯 80）。

[0260] 形状、尺寸和几何形状

[0261] 本发明的组合物可成形为无限数量的形状和尺寸。在以下描述组合物制备方法的章节中，给出了各种方法，包括将流体乳液浇注或引入到其硬化或可使其硬化的模具中。因此，通过构建适当的模具（例如形状为圆盘、丸剂、片剂或栓剂）可使组合物成形为任何形式。然而，不一定要使用模具。例如，本发明组合物可以液滴或珠子的形式挤出，所述液滴或珠子硬化或被硬化。

[0262] 因此，组合物可呈如下所述制成的球体或类球体的形状。优选地，本发明的组合物的形式为大致球体形的无缝珠，尤其是微珠。微珠表面不存在接缝在例如进一步加工（例如包衣）中是个优点，因为其允许更一致的包衣。微珠中不存在接缝还提高了微珠溶出的一致性。

[0263] 可对根据本发明的微珠的优选尺寸或直径范围进行选择，以避免微珠经口服施用时在胃中保留。较大剂型在胃中保留不同的时间并且仅随食物一起通过幽门括约肌，而较小的颗粒通过幽门与食物无关。因此，选择正确的尺寸范围（参见下文）使得可更准确地预测给药后的疗效，即免疫应答。与单个一体化的大口服剂型（例如，传统的压缩丸剂）相比，释放到 GI 道中的多个微珠（如本发明所预期）允许较大肠腔内的分散，从而经由与较大的上皮区域接触而增强吸附和吸收；防止发炎（如发现具有 NSAID）并且实现了较大的局部覆盖（例如，这对在 GI 道的某些部分如小肠、回肠或结肠中靶向免疫细胞如 M 细胞而言可能是需要的）。

[0264] 本发明的组合物优选地为一体化，这是指内部（即截面）是均匀的。这对于微珠实施例是特别优选的。

[0265] 在呈微珠形式的本发明实施例中，微珠的直径范围通常为 0.5mm 至 10mm，上限优选为 5mm，如 2.5mm。特别适宜的上限为 2mm，特别优选 1.7mm。下限可优选为 1mm，例如 1.2mm，更优选 1.3mm，最优选 1.4mm。在一个实施方式中，直径为 0.5-2.5mm，例如 1mm-2mm。

[0266] 在一些实施方式中，本发明微珠是单分散的。在其它实施方式中，本发明微珠不是单分散的。“单分散”指对多个微珠（如至少 100 个，更优选至少 1000 个）而言，微珠直径的变异系数（CV）为 35% 或更低，任选 25% 或更低，例如 15% 或更低，如 10% 或更低，任选 8% 或更低，如 5% 或更低。一类具体的聚合物微珠的 CV 为 25% 或更低。本说明书提及，CV 定义为 100 乘以（标准差）除以平均值，其中“平均值”是平均粒径，标准差是粒度的标准差。可利用筛确定 CV。

[0267] 本发明包括微珠 CV 为 35% 且平均直径为 1mm 至 2mm，如 1.5mm 的微珠。本发明也包括 CV 为 20% 且平均直径为 1mm 至 2mm，如 1.5mm 的微珠，以及 CV 为 10% 且平均直径为 1mm 至 2mm，如 1.5mm 的微珠。在一类实施方式中，90% 珠子的直径为 0.5mm-2.5mm，如 1mm-2mm。

[0268] 本发明的组合物的另一可能形式为半球形珠，两个半球形珠可任选地在平面处接合以形成具有单个两个不同半块的微珠，所述半块各具有不同的组成，如果需要的话，例如各包含不同的活性成分或具有相同的活性成分但具有不同的（例如）赋形剂，以实现两个半球体之间的渗透性、增溶作用、吸附、吸收或释放概况的区分。例如，一侧可包含活性成

分如抗原 / 佐剂,另一侧可包含生物粘附剂。在该实例中,一侧或两侧还可包含 pH 调节剂或其它保护剂,例如免于胃部溶出的保护剂。

[0269] 可进一步开发本发明组合物采取微珠形式的实施方式,以通过(例如)压制(含有药物制剂领域技术人员认为合适的油或粉末基粘合剂和 / 或填料,可选地包含额外量的与本发明组合物中相同的 API 或不同 API) 多个微珠产生大量微珠,与相同形状的单一模制形式相比,这些微珠在不同条件下以不同速率崩解。较大的(例如压制)整体本身可呈多种形状,包括丸形、片形、胶囊形、栓剂形等。该形式的微珠实施例所解决的问题是通常存在于填充粉末或小丸的硬胶囊中的“死空间”(位于固定的颗粒内容物上方)和 / 或“空隙空间”(在颗粒内容物成分之间)。在此类具有死空间 / 空隙空间的小丸或粉末填充的胶囊中,患者需要吞服比不含此类死空间的胶囊更大的胶囊。本发明此实施例的微珠易于压缩成胶囊,以采用可能需要的任何胶囊或外壳的内部形式,从而留下大大减小的(如基本上不存在)死空间 / 空隙空间。

[0270] 本发明的组合物的另一可能形式为作为胶囊,其中组合物的芯体为固体(例如胃内滞留浮料,例如,碳酸氢盐 (biocarbonate salt) 或流体(气体或液体)。如果芯体为液体,则其可包含与以上所述相同或不同的活性成分和 / 或赋形剂。与上述半球形珠类似,此类胶囊具有组成不同且密封以保持内部流体的两个半球。如果希望芯体为含水液体,可包括球体内表面上的非水性材料内层(如内膜层),使得内层可防止含水芯与胶囊的内表面进行接触。在中间层存在或不存在的条件下,芯可为本发明的组合物的变型形式,使得微珠实施例中的本发明组合物包含由根据本发明的第一组合物制成的芯,和由根据本发明的第二组合物制成的胶囊。

[0271] 虽然本发明的微珠实施例本身为以上认定的问题提供了一些列解决方案,但其也可用作更复杂形式的起点,例如通过将微珠用作其上可施加附加材料层的独特种粒,正如(如药物科学)领域的技术人员所熟知。附加层的材料可包含与本文所述相同或不同的活性成分和 / 或相同或不同的赋形剂。这类变化形式能够差异化地释放相同或不同活性成分,并有利于包含多个固定剂量的联合疫苗。

[0272] 本发明组合物还可用于舌下免疫接种,在这种情况下可形成微珠,例如,如上所述地压制成适合插入舌下的扁平形状(如盘状或圆盘状)。包含生物粘附剂与本发明的这一实施方式特别相关。或者,除使用微珠外,预珠化的制剂可模制成用于插入舌间的扁平形状,例如圆盘或盘状。

[0273] 本发明的组合物在其外表面可具有附加材料包衣。此包衣可以多种方式施加,如下名为“包衣”的章节更具体地描述。

[0274] 其他特性

[0275] 在某些实施例中,本发明的组合物包含一种或多种成分、组分、赋形剂、构造特征、功能特征或上述现有技术的其他方面。

[0276] 各组分,包括抗原和佐剂的相对和绝对浓度可通过用已知方法和模型在动物中测试制剂加以确定,测试从低剂量的制剂开始,随后提高剂量并监测免疫应答。确定最优剂量时,应考虑以下因素,如品种、年龄、大小、是否存在干扰性母体抗体。

[0277] 为了根据物理化学性质总结本发明的数量有限的实施方式,上文所述和本文其它地方所述的组合物还可以具有以下一种或多种性质:在水中基本上游离、凝胶状态、固态、

不溶解、非粉末化、形成、成型和不在溶液中。

[0278] 除非几何形状设计为包括水性隔室（例如 w/o/w 形式或具有液体芯的胶囊形式），希望本发明的组合物基本上或实质上干燥，例如包含小于 5 重量%，优选小于 1 重量%的游离水。微珠优选是均一的，但加工条件可变化（参见下文）以实现例如不均一性，例如，较硬的表皮和较软的芯中所具有的朝向芯的充分固定的小油滴与珠表面相比较少。根据本发明的组合物的较大（例如非珠状）形式或形状可经特别设计以体现此不均一性。

[0279] 低游离水含量是本发明组合物的某些实施例的区别特征。可例如通过市售仪器（如使用 TA Q 系列仪器的 TGA Q 500），采用热重分析（TGA）来测定游离水含量。TGA 测定与温度有关的重量变化。例如，TGA 方法可包括例如以每分钟 20℃进行的 20 至 400℃的温度扫描℃，其中含水量得自约 100 摄氏度时的样品重量损失。

[0280] 在一个实施例中，本发明的组合物的小油滴均匀分散在固化水相中（或在一些实施例中分散在水溶性聚合物基质材料中），并且相邻小油滴之间基本上不存在接合。因此，乳液优选地在固化期间保持。相邻小油滴优选仅在本发明组合物再水合时接合（如果存在的话）。

[0281] 在某些实施方式中，本发明人相信，水溶性聚合物基质如明胶可能有助于将颗粒维持于所需的大小范围内并防止其聚集或接合。

[0282] 根据工艺参数，液滴尺寸可广泛围地变化，例如从 10nm 到 100 μm（直径），例如 300-700nm，或 700nm-30 μm。然而，发明人 / 申请人已发现在某些实施方式中有利的是将液滴尺寸维持在 100nm 至 10 μm，例如 0.5 μm 至 7.5 μm 的范围内。在一些实施方式中，特别优选的范围是 0.75 μm 至 5 μm，例如 1 μm 至 3 μm 或 4 μm。具有高单分散性（低多分散性）的液滴可适用较窄的范围。如果液滴大小基本相同，则液滴群是单分散的，而具有较宽大小分布的液滴群是多分散的。

[0283] 我们不认为这一段是必要的。这解释了光散射测量的理论，这可能不是有关疫苗递送的专利所必需的。

[0284] 在一些实施方式中，优选高单分散性（低多分散性），在其他实施方式中，优选低单分散性（高分散性）。不希望受推测的限制，本发明人认为在某些实施方式中，多分散性更高的体系，较小液滴（例如在 20nm 至 20 μm 的范围）优选被细胞吸收，而较大液滴（> 20 μm）在吸收较小液滴的细胞附近产生浓度梯度，进而有利于这种吸收。

[0285] 本发明的组合物通常在模制或成形形式如微珠内包含多个油滴或小油滴，所述微珠可通常包含数百或数千个与通常来源于微米级颗粒的粉末不同的液滴，所述微米级颗粒通常在喷雾干燥期间较小的小油滴接合之后与单个或少数油滴或小油滴结合。虽然不排除粉末实施例，但本发明的组合物（如果为颗粒）优选包含比粉末颗粒大的颗粒，使得组合物呈非粉末形式。

[0286] 在其中本发明呈微珠形式的实施例中，多个微珠可存在于单一剂型中，例如包含于单个硬胶囊中，该硬胶囊在例如胃中释放微珠。或者，微珠可存在于小药囊或其他容器中，所述小药囊或其他容器允许微珠喷洒到食物上或饮料中，或经由给药管（如鼻胃管或十二指肠给药管）施用。或者，例如，如果将多个微珠压缩成单个片剂（如本文其他地方所述），则微珠可作为片剂施用。或者，可将微珠填充（例如压缩）到专用瓶盖中或填充到专用瓶盖内的空间中或密封容器（或待密封容器）的其它部分中，使得在旋拧瓶盖时，微珠被

释放到瓶中的流体中或其他内容物中或小瓶中,使得珠在于这些内容物中搅拌或不搅拌的情况下均可分散(或溶解)。一个实施例为由意大利米兰的哈门那国际药业公司(Humana Pharma International)(HPI)S.p.A生产的SDC(智能递送瓶盖(Smart Delivery Cap))。还想到有关或类似的方法,以(例如)将微胶囊定时释放至反应器、给药环境如槽、培养箱等。

[0287] 如此提供的微珠可呈单一类型(群体)或多种类型(群体),所述群体之间在关于本文所述的一种或多种特征方面不同,例如不同的活性成分或不同的赋形剂或不同的物理几何形状、经包衣、经多层包衣、未经包衣等。

[0288] 在一个实施方式中,本发明可使用具有立即释放(IR)特征和/或没有包衣、仅有肠溶包衣或具有设计仅在有限时间中防止珠子释放和/或溶出的包衣的微珠。(或者,可将延迟释放能力引入具有或不具有包衣的组合物本体中)。在另一个实施例中,本发明允许微珠具有延迟或持续释放(SR)特性,例如带有包衣,如本文在其他地方,特别是在名称为“包衣”的章节中更详细地所述。本发明还提供了其中速释微珠与持续释放或控释(CR)微珠以可变的IR:SR/CR比率组合的实施例。速释微珠可与持续释放或控释微珠组分以下比率(w/w,以效力计),例如10%速释(IR)+90%持续释放(SR)/控释(CR)微胶囊;20% IR+80% SR/CR;30% IR+70% SR/CR;40% IR+60% SR/CR以及50% IR+50% SR/CR。

[0289] 用于制备本发明组合物的方法

[0290] 读者应注意,参考涉及实施例的本章节至关重要。

[0291] 用于制备本发明组合物的基本方法是将选择为水溶性聚合物基质材料(例如明胶、树胶、海藻酸盐等,如本文其他地方更一般地描述,并且在任何情况下任选地与上述组分混合)的聚合物的流体形式(优选溶液)与油相混合,以形成均一流体乳液。考虑到所需最终组合物(如本文其他地方所述),油相和水相可以1:6-10,优选大约1:7或1:8的比例混合(混合可通过搅拌或其他搅动方式进行)。通常,仅需使用本领域的技术人员熟悉的磁力系统或机械系统(例如顶置式搅拌器)轻轻搅拌组分,以实现乳化。优选连续搅拌。可利用任何适当的实验室搅拌装置或工业级搅拌器来达到该目的,例如,磁力搅拌器(Stuart生产)或顶置式搅拌器(KNF或Fisher生产)。

[0292] 在其中聚合物基质实质上包含明胶且添加山梨糖醇的实施例中,聚合物基质的水相这样制备:通过将适量的山梨糖醇(和表面活性剂,如果需要的话)加入水中,加热至大约60-75°C直至呈溶液,然后添加明胶,尽管添加次序和时间选择并非关键。典型的“明胶溶液”包含15-25%(优选17-18%)的明胶;75%-85%(优选77-82%)的水外加1-5%(优选1.5%至3%)的山梨糖醇。

[0293] 然而,形成乳液的温度的选择取决于各种因素,包括活性药物成分的温度不稳定性和并入明胶中的增塑剂的量、明胶的类型以及其他因素。然而一般而言,将明胶溶液(尤其就标准或规定明胶)保持在60°C-70°C,以使其保持流体状态。

[0294] 本发明组合物中包含其他亲水或水溶性组分时,可将它们加到水相中,然后乳化。佐剂的例子是CpG、 α -Gal-Cer和聚I:C,它们是亲水的,并且可以水溶液的形式购得。在表面活性剂中,也可以先将水溶性实体如吐温80掺入水相中。然而,同样可能将这些水溶性组分掺入油相中,例如,受限产生油包水(w/o)乳液,然后将此种w/o乳液适当地分散到水相中,产生w/o/w乳液,最初产生的w/o乳液被认为是符合该实施方式目的的油相。在此

实施方式中,特别优选的“油”相是通过混合以下 4 种组分获得的(因此该“油”相实际上含有水性组分):

[0295] - 油酰聚乙二醇甘油酯(聚乙二醇甘油酯)

[0296] - 具有二缩甘露醇一油酸的角鲨烯

[0297] - 聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇单油酸酯

[0298] - 失水山梨糖醇三油酸酯。

[0299] 完整的油相通常含有活性成分,如抗原。

[0300] 根据市售组分,所述“油”相可(例如)包含 60-80%拉普菲、20%-30%蒙塔尼 ISA 720、0.01-1%吐温 80 和 0.01-1%司盘 85。

[0301] 所述油相可(例如)包含脂肪酸聚乙二醇甘油酯,特别是油酰聚乙二醇甘油酯,例如其含量是油相的至少 15%重量,任选含量是至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%重量,或至少 60%,例如 15%-60%、20%-50%、30%-50%或 30%-40%。油相的平衡可包括角鲨烯、表面活性剂和一种或多种活性成分,例如,选自抗原和佐剂的活性成分。油相可由单一油相构成,或者可以是油包水乳液。

[0302] 本文所述的一类油相包括角鲨烯,例如其含量为油相的至少 10%重量,任选为至少 20%、至少 30%、至少 40%或至少 50%重量,例如 10%-50%、10%-40%、15%-40%或 20%-30%。油相的平衡可包括脂肪酸聚乙二醇甘油酯,特别是油酰聚乙二醇甘油酯、表面活性剂和一种或多种活性成分,例如,选自抗原和佐剂的活性成分。油相可由单一油相构成,或者可以是油包水乳液。

[0303] 因此应理解,无论是具有单一油酰或是油包水乳液的油相,均可包含聚乙二醇甘油酯和烃(如萜)油的组合,以及一种或多种表面活性剂,如非离子型表面活性剂。具有单一油酰或是油包水乳液的具体油相包含聚乙二醇甘油酯,如油酰聚乙二醇甘油酯和角鲨烯的组合,以及一种或多种表面活性剂,如非离子型表面活性剂。

[0304] 本发明包括含有表面活性剂二缩甘露醇油酸酯的油相,包含二缩甘露醇油酸酯是本文所述或要求保护的所有组合物和油相的一个选择。

[0305] 抗原和/或佐剂也可加入该“油”相。优选将该方法用于可能不耐热的某些成分,因为它允许更高的加工温度,例如乳化温度,而不发生(或只发生有限)降解。

[0306] 当明胶是水溶性聚合物基质时,例如,当要掺入本发明组合物的活性成分具有温度不稳定性时,可通过使用较低熔点的明胶(或明胶衍生物或明胶与熔点降低剂的混合物)或其他聚合物基质材料如藻酸钠使乳化步骤的加工温度降低至所需目标温度,例如 37℃。或者,可通过使用适当设备或机械装置在较高温度下加工温度不稳定性活性成分,所述设备或机械装置限制温度不稳定性活性成分与较高温度介质接触的时间。例如,如果明胶液滴是通过机器挤出并立即冷却(例如在冷却浴中冷却)而形成,则可使用另外的适当引入管件将温敏活性成分引入流体明胶溶液(并且混合物可立即均一),之后不久便从成珠喷嘴喷出或使用其他方法,从而限制将活性成分与较高温度的明胶的接触时间,以降低活性成分的任何热依赖性降解的程度。此方法可采用任何适当的装置,例如匀化器(如螺旋匀化器以及挤出型装置,如 WO 2008/132707(希格默伊德药业(Sigmoid Pharma))中所述,其整体以引用方式并入本文中。

[0307] 例如在工艺过程开始时(与油相混合前),可在将其他成分如聚合物基质材料和

增塑剂（如果包含）加入水相溶液的同时，方便地将其他表面活性剂，如阴离子型表面活性剂加入水相。在制备期间引入水相的表面活性剂的物理形式在促进制备根据本发明的组合物方面可起一定的作用。因此，虽然可采用液体表面活性剂，但优选利用在室温下呈固体形式（例如晶体或粉末）的表面活性剂，特别是当水相包含明胶时。以所需适当用量添加表面活性剂，以实现所需和上述比例。一般而言，这导致水相中表面活性剂的存在量介于 0.8% 和 1%（按重量计）之间。

[0308] 如文中所述，该水相也可包含下文中有包衣的章节所述的聚合物之一，无论最终组合物是否具有包衣。因此，在与油相混合之前，可在将其他成分加入水相溶液的同时，方便地将羟丙基甲基纤维素（HPMC）的一种或多种衍生物如邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素（HPMCP）加入水相。

[0309] 例如在工艺过程开始时（与油相混合前），可在将其他成分如聚合物基质材料、增塑剂和额外表面活性剂（如果包含）加入水相溶液的同时，方便地将一种或多种碱如碳酸氢钠（ NaHCO_3 ）或氢氧化钠（ NaOH ）或一种以上这类碱的混合物加入该水相。水相中可包含碱，以便溶解肠溶性物质（例如肠溶性聚合物，如 HPMCP）。在一些实施方式中（参见实施例 22），已发现不宜包含 NaOH ，推测在这种情况下高 pH 对佐剂 α GalCer 有害。因此，在具有高 pH 的水性制剂中不宜使用 α GalCer。在一个实施方式中，含有 α GalCer 的水相的 pH 不超过 10；在另一实施方式中，该 pH 不超过 9；在另一实施方式中，该 pH 不超过 8。本发明包括包含 α GalCer 的水相不含无机碱的实施方式和其不含碱的实施方式。

[0310] 可能需要在本发明的所有实施方式中避免高 pH 水相，因为可能产生有害后果。在一个实施方式中，水相的 pH 不超过 10；在另一实施方式中，该 pH 不超过 9；在另一实施方式中，该 pH 不超过 8。本发明包括水相不含无机碱的实施方式和其不含碱的实施方式。本发明包括制剂不含无机碱的实施方式。本发明包括水相不含碱的实施方式。本发明包括制剂不含碱的实施方式。

[0311] 应考虑到，pH 非常低的水相也可能有害，例如不低于 4，或者在其它实施方式中，不低于 5 或不低于 6。因此，所述水相，任选制剂，可不含酸。因此，可能需要水相具有接近中性的 pH，例如 4 至 10，任选 5 至 9，例如 6 至 8。

[0312] 制剂中需要包含肠溶性保护剂或需要避免具有足够溶解肠溶性保护剂的高 pH 的水相时，可在聚合物基质中提供和 / 或在包衣中包含肠溶性材料（例如肠溶性材料的组合）。

[0313] 通常（但不一定），不需要加热油相，活性成分和上述其他油相组分在室温下添加，搅拌至澄清。添加适量的油相活性成分（例如抗原和 / 或佐剂）以实现本文其他地方和实施例中所述的目标比例。搅拌可持续进行数分钟至数小时，甚至过夜，这取决于具体的活性成分。

[0314] 通过在搅拌条件下（如上所述）将油相加入加热的水相中形成乳液，固化包括冷却时，例如在使用明胶的情况下，加热水相。然后，所得乳液具有上述固化微珠的组合物但仍然含水。

[0315] 然后将乳液倒入或引入模具或其他容器中，或倾倒在薄片上或薄片之间，或逐滴递送（或挤出）到另一流体中，使得含有水相的聚合物基质在固化时呈所需模具、容器、薄片或液滴 / 珠的形式。优选进行模具成形，例如立即形成珠状。

[0316] 或者,对于模制,可采用专业机械装置(例如)以形成上述半球形珠(参见上述名称为“形状、尺寸和几何形状”的章节),其中本发明呈半球形珠的形式。可使用专业装置、通过接合两个这样的半球体制成单个珠子(即单个珠子具有两个不同的半块),在所述专业装置中,两种不同乳液流过其中且通常具有圆形横截面的两个管接合在一起,之后不久挤出点或喷嘴(其可振动)进入具有平壁的单双腔管中,所述平壁分离两种乳液流且防止两种乳液进行接触直到挤出点。因此使一直到挤出点的接合双腔管的横截面看起来呈两个半圆。在操作中,两种半球形乳液流在挤出时合并形成单个、大致球形的珠子,使得标准液滴被射出/挤出以固化。也可能使用专用移液器,其中两个空腔在尖头前不远处连接,以便将两个腔体中同时排出的流体乳液混合在一起。

[0317] 固化可以多种方式(取决于基质的聚合物)发生,例如,通过改变模具、容器、薄片、液滴/珠等周围的温度或通过施加固化流体或使溶液硬化,使得模制形状胶凝或固化。

[0318] 在本发明的组合物呈微珠形式的优选实施例中,可通过(例如)使用移液器和将流体乳液手动逐滴滴加到引起固化的流体中来形成微珠。

[0319] 在可通过升高或降低温度实现固化的情况下,可调节固化流体的温度以实现所需速率的固化。例如,当明胶用作聚合物基质时,固化流体的温度低于乳液的温度,从而引起聚合物基质的固化。在这种情况下,将固化流体称为冷却流体。

[0320] 在可通过化学方式(例如通过在接触固化流体的组分时诱导交联)实现固化的情况下,可调节此类组分在固化流体中的浓度和/或其温度(或其他特性或含量)以实现所需速率和固化程度。例如,如果将海藻酸盐选作聚合物基质,则固化流体的一种组分可为能够诱导海藻酸盐交联和随后固化的含钙实体(例如,氯化钙)。或者,相同或类似的含钙实体可在成珠之前并入(例如分散)到流体乳液的水相中,并且(例如)通过对乳液逐滴落入或引入其中的固化流体施加较高或较低的来引发诱导交联。为了所得微珠特性,可通过控制钙离子利用度(浓度)和其他物理条件(要注意的是温度)来改变此类静电交联。固化流体可为气体(例如,空气)或液体或两者。例如,当将明胶用作聚合物基质时,固化流体可最初为气态(例如通过冷空气的液滴),然后为液态(例如进入冷却液的液滴)。可施加相反的次序,同时也可单独使用气态或液态冷却流体。或者,流体可喷洒冷却,其中将乳液喷洒到冷却气体中以引起固化。

[0321] 就明胶或其他设计用于形成固定基质的水溶性聚合物而言,优选的是固化流体为非水性液体(例如,中链甘油三酯、矿物油或优选具有低 HLB 的类似物,以确保最低程度的润湿),其可适宜放置在浴器(冷却浴)中以接收乳液在固化形成珠时的液滴。使用非水性液体使得在选择进行冷却的温度时具有较大的灵活度。

[0322] 当采用液体冷却浴时,其通常保持在小于 20°C,优选保持在 5-15°C 的范围内,更优选保持在 8-12°C(当将标准明胶用作聚合物基质时)。如果将甘油三酯选作冷却浴中的冷却流体,则优选实施例为得自沙索(Sasol)的迈格罗 810。

[0323] 如果将明胶选作聚合物基质,则对适当温度范围进行考虑以确保明胶以适当的速率固化,从而避免在活性成分为蛋白质的情况下(例如)蛋白质三级结构的破坏。

[0324] 如果将海藻酸盐选作聚合物基质,则制备微珠的典型方法涉及将其中如上所述分散有小油滴的 3%海藻酸钠溶液滴加到 4°C 的含有 0.1M 氯化钙的交联浴中,以生成海藻酸钙(此方法可称作“扩散凝结(diffusion setting)”,因为据信钙可扩散到微珠中引起交

联或凝结(setting))。使用注射器泵、手动移液器或 Inotech 机器,可通过本文其他地方所述可振动的无菌针或其他喷嘴(例如,如果使用泵则以 5mL/h)产生或挤出液滴。可通过 4.5mm 管件向整个针向下施加介于 15 和 20L/分钟之间的气流,以减小液滴尺寸(如果需要)。然后可将新形成的微珠在氯化钙浴中搅拌最多一小时。

[0325] 使用海藻酸盐时的替代方法是内部胶凝,其中钙离子在其活化之前分散在水相中,以便引起水胶体颗粒的胶凝。例如,这可通过添加会引起海藻酸盐交联的离子的非活性形式实现,然后通过离子充分分散结束后的例如 pH 的变化来活化所述离子的非活性形式(参见 Glicksman,1983a;Hoefler,2004,二者均以引用的方式并入本文)。在需要快速凝胶和/或扩散方法可导致 API 因其扩散到交联浴中而损失的情况下,此方法特别有用。

[0326] 在成形、模制或成珠后,可洗涤所得形状或形式,然后在适当时干燥。就在固化流体中固化的微珠而言,上述制备方法的任选最后步骤因此包括从固化流体中移除固化微珠。例如,通过收集到能通过其排出固化流体(如 MCT)并保留珠子的网袋中完成这一过程。然后通过下述方法去除额外流体:离心后任选洗涤(例如用乙酸乙酯),然后干燥珠子去除水或游离水。这一过程可通过本领域中已知的任何合适的方法实现,例如使用圆筒烘干机(例如可为 Spherox 系列设备(如果使用)的一部分的 Freund 圆筒烘干机),温空气介于 15°C 和 25°C 之间,优选大约 20°C,从而通过空气蒸发或带走水分。将明胶用作聚合物基质(例如用作水性固定相的主成分)在大多数情况下需要干燥步骤,并且对于微珠,这优选地通过如上所述在空气中进行干燥来实现。如上文更详细地描述,将所得组合物(本发明的组合物)基本上干燥。

[0327] 就其中乳液液滴可在上述成珠方法的第一步骤中形成的方式而言,上述方法的变型是可能的,包括通过手动或自动移液法将液滴引入多种固化流体中。

[0328] 通常,微珠可这样产生:可通过在流体 o/w(或 w/o/w)乳液与适当固化流体(例如,气体或流体)之间施加表面张力以形成最终珠的球形或大致球形形状。

[0329] 或者,可通过经由孔口或喷嘴射出或挤出流体 o/w 乳液来制备微珠,所述孔口或喷嘴具有一定的直径且任选地经受选定的振动频率和/或重力流。可使用的机器的实施例如为 Freund Spherox、ITAS/Lambo、Globex 或 Inotech 工艺设备。材料适合低温和高压挤出时,可使用另选的挤出器。

[0330] 按照可希望制备根据本发明的微珠对 Spherox 机器(Freund 生产)的操作描述于美国专利 5,882,680(Freund),其全部内容以引用方式并入本文中。优选地选择大约 10-15RPM 的振动频率,但最终选择(以及独立选择的振幅)取决于待成珠状的乳液的粘度。如果选择聚合物基质在较低温度下固化,则可适于将到孔口/喷嘴的管线保持在一定的温度,以保持溶液的流动性。

[0331] Spherox 机器(和其他机器)可适于利用双同心腔喷嘴来确保两种流体(形成芯体的内腔中的流体和形成胶囊的外腔中的流体)的同时挤出。根据所述方法之一使形成胶囊的流体固化。可希望或不希望形成芯体的流体易于固化而得到本发明组合物的特定实施例。

[0332] 适应此方式的上述机械装置可用于制备呈胶囊形式的本发明组合物,其中组合物的芯填充有流体(气体或液体),如以上名称为“形状、尺寸和几何形状”的章节所述(注意:与胶囊材料类似,芯可以为组合物,即使任选为不同的组合物(根据本发明),即,易于

通过上述方法之一而固化)。如果希望球体的内表面上并入中间内层(例如非水性材料的内膜层),则可采用三腔喷嘴和适当管件,其中所述中间层在室温下适宜为固体。因此,在连续层的柔软度/硬度方面,组合物可例如描述为固体:固体(就两层而言)或固体:固体:固体(就3层而言)或液体/半液体:固体:固体(就3层而言)。

[0333] 前述段落描述了未包衣珠的形成。优选本发明的优选实施例具有包衣珠(其在本文的其他地方更详细地描述)。此类包衣可为单层包衣或多层包衣且可以多种方式施加(参见独立章节)。

[0334] 图7是有包衣微珠(在这种情况下不包含本发明的活性成分)的X射线断层分析图,该微珠是通过包括经如上所述任选振动的喷嘴喷射乳液的方法制备的,从中可以看出内部结构基本均一。

[0335] 关于上述使用两个同心孔口(中央和外部)的方法(通过任选振动的喷嘴射出乳液),外部流体可(在微珠外部)形成聚合物材料的包衣(聚合物包衣),其可包含活性成分或可赋予微珠控释特性,并且内层(芯)可为根据本发明的组合物。优选使用由Freund生产的Spherex机器(参见授予Freund的美国专利5,882,680,该专利的全部内容以引用方式并入本文中)。

[0336] 使用Spherex机器可使珠子尺寸(直径)达到非常高的单分散性。因此,本发明包括但分散的微珠,即直径的变异系数(CV)小于20%,例如小于15%,通常小于10%,任选小于8%,例如小于5%的微珠。例如,在通常100g中,97g微珠批料的直径介于1.4和2mm之间。可通过本领域中已知的用于移除/筛选不同粒度颗粒的方法实现所需粒度范围。例如,可通过使批料首先通过例如2mm网且随后通过1.4mm网来移除/筛选出较大/较小的珠。

[0337] 如果希望对微珠包衣,则1.4至2mm的直径范围为良好的粒度(如果较小,包衣机的喷雾器可能会绕过微珠;如果过大,则珠可能难以流体化,流体化对于实现一致包衣而言是必需的)。

[0338] 虽然加工条件可进行变化(例如,通过改变流体乳液、固化流体的温度和组分在这些流体中的浓度,以及允许发生某些工序(包括干燥)的时间),但微珠优选内部(即在截面上)均一,即一体化。尽管当前并非优选,但此类变化可应用于微珠制备的情况中,以实现不均一性,例如,较硬的表皮和较软的芯中所具有的朝向芯的充分固定的小油滴与珠表面相比较少。根据本发明的组合物的较大(例如非珠状)形式或形状可经特别设计以体现此不均一性。然而,当前优选的是根据本发明且在微珠实施例内的内部均一的组合物,这可通过使用均一介质(分散良好的乳液)进行成珠/成滴而受益。待成珠状的乳液中的此类均一性可有助于避免影响对称性的干燥条件。

[0339] 包衣

[0340] 本发明的组合物可用于如本文其他地方所述的应用。例如,本发明组合物可用于免疫接种动物,例如人、其他哺乳动物、鸟类或鱼类。需要将组合物加入鱼类居住的水域以对鱼进行免疫接种时,本发明组合物可在聚合物基质中包含赋形剂或组分,以减缓或防止疫苗在鱼类摄入之前在水中溶出。或者,可施加包衣以防止或减缓或延迟疫苗的释放,和/或延迟或防止水溶性基质的溶出。

[0341] 加入饲料(例如,用于免疫接种动物)或通过口服途径直接给予(口服递送活性

疫苗组分或成分)时,该成分宜立即释放(立即释放概况),或在一定延迟后释放和/或在延长时间内释放(延迟释放和/或缓释概况)。就立即释放而言,组合物,例如微珠形式的组合物可能未被包衣,含有阻滞剂/保护剂或被包肠衣以抵抗胃酸并在小肠内立即释放。

[0342] 或者或此外,如果需要控释(即,延迟、延长或部位靶向释放等),或如果需要非介质依赖性释放,可根据本发明对组合物,如微珠形式的组合物施加包衣。施加适当的包衣可(例如,如果需要结肠释放)使得大约小于10%的活性成分在4小时溶出(在溶出介质中),然后在随后的24小时内以接近最大溶出度(接近100%)瞬时释放(突然释放)。可存在许多替代的靶向模式,该实施例仅用于进行说明。

[0343] 因此,根据本发明的一个实施例,组合物呈微球的形式,所述微球的至少些带有包衣(即,经包衣)以便控制活性成分从组合物,如微珠形式的组合物中释放。在一个实施例中,包衣为薄膜,而在另一个实施例中,其为膜。包衣、薄膜或膜包含一种或多种优选具有聚合物性质的物质(例如,甲基丙烯酸酯等;多糖等,如下文更详细地描述)或不止一种此类物质组合,其任选地包含其他赋形剂或活性成分(描述于例如以上关于活性成分的章节)。可施加一种以上包衣,其中额外包衣与第一包衣的聚合物类型相同或不同。聚A-赖氨酸是这种包衣,例如第二包衣。全氟碳也可用作包衣,例如第二包衣。全氟碳可用作稳定化膜。

[0344] 就聚合物的组合而言,可选择组合以实现药物释放和/或包衣致孔和/或微珠在包衣内暴露中所需的延迟(或其他变化),从而使药物流出和/或固定基质溶出。在一个实施例中,将两种类型的聚合物合并到同一聚合物材料中,或作为施加至微珠的不同包衣来提供。

[0345] 先前已说明本发明的组合物可包含不止一个微珠群体。在包衣实施例内,群体之间的差异可能在于包衣,即,两个(或更多个)微珠群体可能在许多方面不同,其中一处不同为包衣(例如,存在或组成、或包衣的数量)。

[0346] 包衣可按下述方式施加且可根据厚度和密度而变化。包衣的量由本发明的干燥组合物(例如微珠)中所添加(获得)的附加重量限定。重量增加率优选为珠干重的0.1%至50%,优选1%至15%,更优选为3%至10%。

[0347] 聚合物包衣材料可包含甲基丙烯酸共聚物、聚甲基丙烯酸铵酯共聚物或其混合物。甲基丙烯酸共聚物,例如尤初吉™ S(EUDRAGIT™ S)和尤初吉™ L(EUDRAGIT™ L)(赢创)特别适合。这些聚合物是耐胃酸或肠溶性聚合物。其聚合物薄膜不溶于纯水和稀酸。根据其羧酸含量,其在较高的pH下溶解。EUDRAGIT™ S和EUDRAGIT™ L可用作聚合物包衣中的单一组分或者以任意比例联用。通过使用这些聚合物的组合,聚合物材料可在多种pH水平(例如尤初吉™ L和尤初吉™ S分别溶解的pH之间的水平)下表现出溶解度。

[0348] 下文使用的商标“尤初吉(EUDRAGIT)”是指甲基丙烯酸共聚物,特别是由赢创以尤初吉™(EUDRAGIT™)出售的那些。

[0349] 所述包衣可包含的聚合物材料包含主要比例的(例如,大于聚合物包衣总含量的50%)至少一种药学上可接受的水溶性聚合物,和任选次要比例的(例如小于聚合物总含量的50%)至少一种药学上可接受的水不溶性聚合物。或者,膜包衣可包含的聚合物材料包含包衣主要比例的(例如,大于聚合物总含量的50%)至少一种药学上可接受的水不溶性聚合物,和任选次要比例的(例如小于聚合物总含量的50%)至少一种药学上可接受的水溶性聚合物。

[0350] 聚甲基丙烯酸铵酯共聚物例如尤初吉™ RS(EUDRAGIT™ RS)和尤初吉™ RL(EUDRAGIT™ RL)(赢创)适用于本发明。这些聚合物在纯水、稀酸、缓冲液、或整个生理学 pH 范围的消化液中不溶解。聚合物在水和消化液中溶胀而不依赖 pH。在溶胀状态中,其随后可透过水和溶解的活性剂。聚合物的渗透性取决于聚合物中丙烯酸乙酯(EA)、甲基丙烯酸甲酯(MMA)和甲基丙烯酸氯化三甲胺基乙酯(TAMC1)基团的比例。例如,EA:MMA:TAMC1 比例为 1:2:0.2 的聚合物(尤初吉™ RL)与比例为 1:2:0.1 的聚合物(尤初吉™ RS)相比更具渗透性。尤初吉™ RL 的聚合物为高渗透性的不溶性聚合物。尤初吉™ RS 的聚合物为低渗透性的不溶性薄膜。

[0351] 氨基甲基丙烯酸酯共聚物可以任意所需比例组合,该比例经调节以调节活性成分释放速率。例如,可使用尤初吉™ RS:尤初吉™ RL 为 90:10 的比率。或者,尤初吉™ RS:尤初吉™ RL 的比率可为约 100:0 至约 80:20,或约 100:0 至约 90:10,或其间的任何比率。在此类制剂中,渗透性较低的聚合物尤初吉™ RS 通常占聚合物材料的大多数,溶解度较高的 RL 溶解时产生间隙,溶质可通过间隙与微珠进行接触,从而使预溶解的药物活性以受控方式逸出。

[0352] 在聚合物材料内甲基丙烯酸氨基酯共聚物可与甲基丙烯酸共聚物组合,以实现以活性成分释放和/或包衣致孔和/或微珠在包衣内暴露中所需的延迟,从而使药物流出和/或固定或水溶性聚合物基质溶出。可使用范围为约 99:1 至约 20:80 的聚甲基丙烯酸铵酯共聚物(例如尤初吉™ RS)与甲基丙烯酸共聚物的比率。还可将两种类型的聚合物合并到同一聚合物材料中,或作为施加至微珠的不同包衣来提供。

[0353] 尤初吉™ FS 30D(Eudragit™ FS 30D)是由甲基丙烯酸、丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯构成的阴离子水基丙烯酸聚合物分散体且 pH 敏感的。此聚合物包含较少的羧基,因而在较高的 pH(>6.5)下溶解。此类体系的优势在于易于采用常规粉末层压(powder layering)和流化床包衣技术,在合理的加工时间内大规模制备。

[0354] 除了上述尤初吉™ 聚合物之外,许多其他共聚物也可用于控制药物释放。这些聚合物包括甲基丙烯酸酯共聚物,例如尤初吉™ NE(EUDRAGIT™ NE)和尤初吉™ NM(EUDRAGIT™ NM)系列。关于尤初吉™ 聚合物的进一步信息参见"Chemistry and Application Properties of Polymethacrylate Coating Systems(聚甲基丙烯酸酯包衣体系的化学性质与应用性质)",Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms(药物剂型的水性聚合物包衣),James McGinity 编,arcel Dekker Inc.,New York,第 109-114 页,其整体以引用方式并入本文中。

[0355] 羟丙基甲基纤维素(HPMC)的几种衍生物也具有 pH 依赖性溶解度,并可用于本发明进行包衣(代替如上所述作为阻滞剂/保护剂的用途或除此以外)。它们包括在肠道上部快速溶解的邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCP),醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS),存在可离子化羧基造成该聚合物在高 pH 下溶解(LF 级>5.5 和 HF 级>6.8)。这些聚合物可购自信越化学工业株式会社(Shin-Etsu Chemical Co.Ltd)。

[0356] 根据本发明,特别优选使用聚合物包衣物质,该物质在其溶出分布和/或其释放掺入本发明微珠的活性成分的能力方面不依赖于 pH。已经给出来实施例(例如尤初吉 RS 和 RL)。非 pH 依赖性聚合物包衣物质的另一实施例为乙基纤维素,特别是亚微米至微米粒度范围(例如粒度为约 0.1 至 10 微米)的乙基纤维素的分散体,其在乳化剂如油酸铵的辅助

下均匀悬浮于水中。乙基纤维素分散体可任选地且优选地包含增塑剂,例如,癸二酸二丁酯或中链甘油三酯。此类乙基纤维素分散体可例如根据美国专利 No. 4, 502, 888 进行制备,该专利以引用方式并入本文中。适用于本发明且可商购获得的一种此类乙基纤维素分散体由美国宾夕法尼亚州西点卡乐康 (Colorcon of West Point) 以商标苏丽丝® (Surelease®) 市售。在此市售产品中,乙基纤维素颗粒例如与油酸和增塑剂混合,然后任选地挤出和熔融。然后任选地在高剪切混合器中在例如一定压力下,使熔融增塑的乙基纤维素在例如氨水中直接乳化。油酸铵可原位形成(例如)以稳定或形成增塑的乙基纤维素颗粒的分散体。然后可添加额外的纯化水以达到最终固体含量。还可参见美国专利 No. 4, 123, 403, 其以引用方式并入本文中。

[0357] 下文使用的商标“苏丽丝® (Surelease®)”是指乙基纤维素包衣材料,例如,亚微米至微米粒度范围(例如粒度为约 0.1 至 10 微米)的乙基纤维素的分散体,其在乳化剂如油酸铵的辅助下均匀悬浮于水中。具体而言,本文使用的商标“苏丽丝®”是指由卡乐康 (Colorcon) 以商标苏丽丝®市售的产品。

[0358] 苏丽丝®分散体成膜聚合物、增塑剂和稳定剂的组合的实施例,其可用作包衣以根据 pH 相对不敏感的可再现概况调节活性成分释放速率。主要的药物释放方式是通过苏丽丝®分散体膜的扩散且受薄膜厚度的直接控制。特别优选使用苏丽丝®,并且可增加或降低作为包衣的苏丽丝®的施加量,以调节包衣微珠的溶出。

[0359] 本发明还设想使用苏丽丝 (Surelease) 与其他包衣组分如果胶或海藻酸钠(例如可以商品名纽特丽™ (NutraTeric™) 获得的海藻酸钠)的组合。

[0360] 除上述尤初吉™和苏丽丝®聚合物,还可使用其他肠溶性或 pH 依赖性聚合物。这些聚合物可包括:邻苯二甲酸酯、丁酸酯、琥珀酸酯和/或苯六甲酸酯类(mellitate)。这种聚合物包括但不限于:醋酸邻苯二甲酸纤维素、醋酸琥珀酸纤维素、纤维素邻苯二甲酸氢酯(cellulose hydrogen phthalate)、醋酸三苯六甲酸纤维素(cellulose acetate trimellitate)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素、醋酸邻苯二甲酸酯淀粉(starch acetate phthalate)、醋酸邻苯二甲酸酯直链淀粉(amylose acetate phthalate)、聚邻苯二甲酸酯乙酸乙烯酯(polyvinyl acetate phthalate)和聚邻苯二甲酸丁酸乙烯酯(polyvinyl butyrate phthalate)。此外,如果相容,可共混聚合物的任意组合以提供额外的控释或靶向释放分布。

[0361] 包衣可进一步包含至少一种可溶性赋形剂以提高聚合物材料的渗透性。适当地,至少一种可溶性赋形剂选自:可溶性聚合物、表面活性剂、碱金属盐、有机酸、糖和糖醇。所述可溶性赋形剂包括但不限于:聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、氯化钠,表面活性剂如月桂基硫酸钠和聚山梨酯,有机酸如乙酸、己二酸、柠檬酸、富马酸、戊二酸、苹果酸、琥珀酸和酒石酸,糖如右旋糖、果糖、葡萄糖、乳糖和蔗糖,糖醇如乳糖醇、麦芽糖醇、甘露醇、山梨糖醇和木糖醇、黄原胶、糊精和麦芽糊精。在一些实施方式中,可使用聚乙烯吡咯烷酮、甘露醇和/或聚乙二醇作为可溶性赋形剂。以聚合物的总干重计,至少一种可溶性赋形剂的用量约为 1-10 重量%。

[0362] 释放速率的调节,例如产生释放延迟或延长,可通过许多方式实现。机制可依赖于或不依赖肠道中的局部 pH,也可依赖于局部酶活性以实现所需效果。调节释放的制剂的例子是本领域已知的,例如参见美国专利 3, 845, 770 ;3, 916, 899 ;3, 536, 809 ;3, 598, 123 ;

4,008,719 ;5,674,533 ;5,059,595 ;5,591,767 ;5,120,548 ;5,073,543 ;5,639,476 ;5,354,556 ;和 5,733,566,这些专利均以引用方式整体并入本文。

[0363] 所述包衣(或任何其他包衣或第二包衣),特别是在适合动物(包括鱼类)疫苗的实施方式中,也可包含掩蔽味道的或提升味道的赋形剂,例如掩蔽或提升疫苗组合物的味道的赋形剂。即儿科疫苗制剂来说,掩蔽味道的或提升味道的赋形剂也可包含在组合物和/或包衣中。包衣或包衣内的组合物中可包含颜料(如染料,特别是食品或药品中可接受的染料),以便,例如,使该组合物对儿童或动物有吸引力,例如用于禽类的颜料和用于鱼类的闪烁物质。包衣中还可包含结合外来体的整联蛋白或整联蛋白样实体,如乳凝集素(lactadherin)等,树突细胞等物质(或实际上包含在本发明组合物本体内)。

[0364] 具有与微珠表面有反应性或亲和力的官能团的聚合物可用于包被所述微珠,即用作包衣剂。具体说,珠子包含藻酸盐时,对藻酸盐有亲和力的聚合物可用作包衣剂。聚赖氨酸是这类包衣聚合物的一个例子,抗原和/或佐剂包含核酸抗原时宜包含它。

[0365] 如上所述,苏丽丝由于其非 pH 依赖性溶出特性而为特别优选的聚合物包衣。然而,发明人/申请人已发现难以选择适量(重量增量)的苏丽丝来实现最佳溶出。已经发现的是过多苏丽丝导致不完全(或过慢)溶出,而过少则导致过快溶出。

[0366] 在具体实施方式中,优选向苏丽丝™中加入通常被细菌酶(任选或或者被胰酶或其他相关酶)降解的第二聚合物(如多糖,特别是杂多糖)。

[0367] 因此,本发明提供旨在将活性有效成分(抗原和/或佐剂)释放到结肠中的组合物,该活性有效成分是乙基纤维素(优选配有乳化剂如油酸铵和/或增塑剂如癸二酸二丁酯或中链甘油三酯)和易被结肠中常见的细菌酶降解的多糖的组合。此类多糖包括硫酸软骨素、果胶、葡聚糖、瓜尔胶和淀粉酶、壳聚糖、凝集素等以及前述任意物质的衍生物。发明的此实施例中特别优选的多糖为果胶。

[0368] 该包衣可包含乙基纤维素(优选配有乳化剂如油酸铵和/或增塑剂如癸二酸二丁酯或中链甘油三酯)和多糖的组合,所述多糖易于被通常存在于结肠中的细菌酶降解;所述组合物可包含液体载体,例如水。

[0369] 如果水溶性多糖(WSP)为果胶,则苏丽丝™与果胶的比例的理想范围是 90 : 10 至 99 : 1,优选 95 : 5 至 99 : 1,更优选 98 : 2 至 99 : 1。具有包衣时,可改变重量增加率和苏丽丝™和 WSP 之间的比率,以调整本发明包衣和组合物的行为。优选的重量增加率为 0 至 30% (优选 5 至 10%);苏丽丝与果胶比例范围为 95 : 5 至 99.5 : 0.5,优选 97 : 3 至 99 : 1(包括端值)。

[0370] 虽然上述重点在于使活性成分从根据本发明的微珠中延长和/或持续释放,但也考虑未包衣或仅包肠溶衣的微珠,提供早期小肠 API 释放中,足够的肠包衣和/或阻滞剂/保护剂含量仅在于防止微珠在胃中溶出。

[0371] 优选地,在用合适的聚合物包衣(如本文其他地方更详细地描述)包覆前并在施加任何额外包衣剂之前对微珠进行干燥。

[0372] 包衣过程可通过任何合适的装置进行,例如通过使用将聚合物包衣的溶液(如以上具体描述)施加至微珠的包衣机。用于包衣的聚合物可由厂商以现成的溶液提供以便直接使用或可在使用前按照厂商的说明进行制备。

[0373] 适当的包衣机为本领域的技术人员所知,包括例如带孔包衣锅或流化床系统,例

如 GLATT、Vector、ACCELACOTA、Diosna、O' Hara 和 / 或 HICOATER 工艺设备。最优选的是用于“底喷”构造中的 MFL/01 流化床包衣机 (Freund)。

[0374] 典型的包衣条件如下：

[0375]

工艺参数	数值
流化气流 (lpm (升 / 分钟))	150-200
进口空气温度 (°C)	30-70
出口空气温度 (°C)	26-42
产品温度 (°C)	26-42
雾化气压 (巴)	10/13
喷雾速率 (RPM)	2 5

[0376] 无论是作为聚合物包衣的一部分或独立于包衣,可采用药物科学领域中的常规方法、通过附加药物层对本发明的微珠进行包衣,以产生具有一个或多个层的组合物,每层含有一种或多种活性药物或其他成分 / 赋形剂 (如本文其他地方所述)。如果需要,可以在药物压层后施加聚合物包衣。这种方法使得包含其他活性成分的疫苗或者具有协同或简单的加合疗效的药物的抗原载量增加。

[0377] 本发明的任选包衣的微珠可在其按照上述方式制备之后直接进行调配。在一个替代实施例中,希望对微珠和 / 或最终固体剂型产品赋予不同的性质。一种根据本发明实现这一点的方式是通过制粒 (例如) 以改善微珠与如上所述的其他组分的粉末混合物相对于粘结剂的流动。可通过添加液体 (例如粘结剂或溶剂溶液) 且进行如现有技术所述的制粒步骤来获得完整或破碎微珠的颗粒。较大量的制粒液体产生较窄的粒度范围以及较粗糙和较硬的颗粒,即,细粒状颗粒的比例降低。选择用于获得给定粒度所需的最佳量以使批间差异降至最低。根据此实施例,湿法制粒可用于改善流动性、压缩性、生物利用度、均一性、静电性质和本发明的组合物作为固体剂型提供时的稳定性。通过制粒液体的量和进料速率确定颗粒的粒度。湿法制粒可用于改善流动性、压缩性、生物利用度和低剂量共混物的均一性、粉末的静电性质和剂型的稳定性。根据此实施例的湿法制粒法可采用低或高剪切混合器,在其中将低粘度液体 (优选水) 添加到此前与剩余的包括微珠的制剂干燥混合的包含粘结剂的粉末共混物。可利用的替代制粒方法包括高剪切、挤出和常规的湿法制粒。

实施例

[0378] 以下实施例旨在进一步说明本发明和其优选实施方式。它们并不以任何方式限制本发明。除非另有说明,本说明书中使用的所有百分数和比例均以重量计算。

[0379] 实施例中制备或测试的珠子的直径约为 1mm 至 2mm。

[0380] 实施例 1

[0381] 如上所述合并以下组分:作为油的蒙塔尼和角鲨烯与作为表面活性剂的拉普菲 M

1944CS、司盘 85 和吐温 80 混合形成具有水性元素的油相,如 w/o 乳液。

[0382] 实施例 1a

[0383] Oil 1 was composed of: 油 1 的组成:角鲨烯 (49.5 % w/w)、拉普菲 M 1944CS (49.5%)、吐温 80 (0.5%) 和司盘 85 (0.5%)。拉普菲 M 1944CS 被描述为 HLB 值为 4 的油酰聚乙二醇甘油酯 (聚乙二醇甘油酯),据报道主要由基于油酸和亚油酸 (C18) 和 PEG 化衍生物的甘油三酯构成。吐温 80 是聚山梨酯 80 的注册商标 (CAS 登录号 9005-65-6)。吐温 80 是聚乙烯山梨糖醇酯,假定有 20 个环氧乙烷单元、1 个山梨糖醇和 1 个油酸作为主要脂肪酸时,计算分子量为 1,310 道尔顿。司盘 85 (CAS 登录号 26266-58-0) 基于非离子型表面活性剂 (失水山梨糖醇酯和乙氧基化失水山梨糖醇酯),其 HLB 值为 1.8。司盘是克罗达国际公司 (Croda International PLC) 的注册商标。

[0384] 实施例 1b

[0385] 油 2:蒙塔尼 ISA 720 (24%)、角鲨烯 (24%)、拉普菲 M 1944CS (51%)、吐温 80 (0.5%) 和司盘 85 (0.5%)。蒙塔尼 ISA 720 是可代谢油佐剂。它含有天然可代谢油中的二缩甘露醇油酸酯,并且是基于角鲨烯的油包水二缩甘露醇油酸酯制剂。

[0386] 实施例 1c

[0387] 油 3 的组成是:约 75%拉普菲 M 1944CS、24.8%蒙塔尼 ISA 720、0.1%吐温 80 和 0.1%司盘 85。

[0388] 实施例 1d

[0389] 油 4 的组成是:约 67.2%拉普菲 M 1944CS、24%蒙塔尼 ISA 720、4%吐温 80 和 4.8%司盘 85。

[0390] 实例 2-6

[0391] 按照上文有关制备的章节所述,使用油 3 (实施例 1c) 制备以下无包衣的疫苗组合物。在以下实施例中,卵清蛋白 (OVA) 用作模式抗原,正如本领域已知的那样它在动物中刺激免疫应答,但应答较弱。内毒素含量小于 1EU/mg。

[0392] 实施例 2

[0393] 在室温下将卵清蛋白 (OVA) 溶解于 $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ 缓冲液 ($\text{pH} = 9.6$),浓度为 0.04% 重量,然后加入 HPMCP (1.79% 重量) 和 D- 山梨糖醇 (2.55% 重量)。最后,溶解上述成分,将该溶液加热到 65°C 并加入 16.91% 重量浓度的明胶。本段提及的百分数是占全部水溶液的重量百分数。

[0394] 明胶完全溶解后,在搅拌条件下将油 3 加入明胶溶液,重量比为 1 : 7。然后,通过移液器挤出所得的乳液,在中链甘油三酯中冷却 / 固化形成珠,然后萃取干燥。

[0395] 下表中给出干燥后该制剂的组成。

[0396]

OVA 001/B 干燥的珠	mg/g
卵清蛋白	8.03
拉普菲 M 1944CS	291.65

蒙塔尼 ISA 720	94.60
司盘 85	2.07
吐温 80	1.99
D- 山梨糖醇	71.14
NaHCO ₃	8.33
NaOH	0.85
HPMCP	49.79
明胶	471.56

[0397] 实施例 3

[0398] 聚 I:C (聚次黄嘌呤核甙：聚胞嘧啶核苷酸) 和 CpG (胞嘧啶磷酸鸟嘌呤) 用作佐剂。它们可以市售形式获得,即以水溶液形式获得,先产生油包水 (w/o) 乳液,然后将该乳液分散到含有 OVA、D- 山梨糖醇、HPMCP 和明胶的水相中,从而将其掺入油相 (油 3)。

[0399] 明胶溶液的组成与实施例 2 所述相同。明胶溶液和油相 (含有佐剂水溶液) 以 7 : 1 的比例混合。按照实施例 2 所述技术制备珠。下表给出珠的组成 (以干重计)。

[0400]

OVA 002/B 干燥的珠	mg/g
卵清蛋白	8.33
拉普菲 M 1944CS	255.04
蒙塔尼 ISA 720	82.75
司盘 85	1.79
吐温 80	1.74
CpG	2.06
聚 I:C	2.53
NaHCO ₃	8.94
NaOH	0.92
D- 山梨糖醇	76.35

HPMCP	53.44
明胶	506.12

[0401] 实施例 4

[0402] α GalCer 用作佐剂。在室温下将其分散到油 3 中,浓度为 0.1% w/w。然后,以 1 : 7 的比例 (w/w) 混合油相和水相 (与实施例 2 所述组成相同)。按照实施例 2 所述技术制备珠。

[0403]

OVA 003/B 干燥的珠	mg/g
卵清蛋白	8.06
α GalCer	0.04
拉普菲 M 1944CS	291.92
蒙塔尼 ISA 720	94.70
司盘 85	2.03
吐温 80	1.99
NaHCO ₃	8.33
NaOH	0.85
D- 山梨糖醇	71.09
HPMCP	49.76
明胶	471.24

[0404] 实施例 5

[0405] MPLA 用作佐剂。在室温下将其分散到油 3 中,浓度为 0.3% 重量。然后将油相加入水相 (比例 1 : 7),如上所述产生珠。

[0406]

OVA 004/B 干燥的珠	mg/g
卵清蛋白	8.02
MPLA	1.19
拉普菲 M 1944CS	291.27

蒙塔尼 ISA 720	94.50
司盘 85	2.06
吐温 80	1.98
NaHCO ₃	8.32
NaOH	0.85
D- 山梨糖醇	71.06
HPMCP	49.73
明胶	471.02

[0407] 实施例 6

[0408] Quil A(皂荚树(Quillaja saponaria)A)用作佐剂。在室温下将其分散到油 3 中,浓度为 2%重量。然后将油相加入水相(比例 1 : 7),如上所述产生珠。

[0409]

OVA 005/B 干燥的珠	mg/g
卵清蛋白	8.56
Quil A	8.01
拉普菲 M 1944CS	286.51
蒙塔尼 ISA 720	92.19
司盘 85	2.00
吐温 80	1.95
NaHCO ₃	8.32
NaOH	0.85
D- 山梨糖醇	71.03
HPMCP	49.71
明胶	470.86

[0410] 实施例 7

[0411] 在本实施例中,将实施例 2-6 的微珠给予小鼠(以监测模式抗原卵清蛋白的免疫原性),并比较仅包含 OVA 或还包含已确定的强效粘膜佐剂霍乱毒素(CT)的溶液诱导的免

疫应答。

[0412] 连续两天用以下物质口服免疫 BALB/c 小鼠：单独卵清蛋白（200 微克 / 小鼠）或卵清蛋白 + 碳酸氢盐缓冲液配制的霍乱毒素（CT；10 μ g / 小鼠）或 4 微珠 / 小鼠 / 天的卵清蛋白（OVA）安慰剂、油 3 配制的 OVA，油 3 配制的 OVA+MPLA，油 3 配制的 OVA+ α GalCer，油 3 配制的 OVA+QuilA，油 3 配制的 OVA+CpG+ 聚（I:C）。2.5 周后，所有小鼠用相同的系列免疫进行加强免疫。第二轮口服免疫后 2.5 周，所有小鼠经腹膜内（i. p.）给予卵清蛋白（50 微克 / 小鼠）和明矾进行加强免疫。一组小鼠用 OVA 进行 i. p. 免疫，明矾作为对照。通过 ELISA 在血清样品上测定 OVA- 特异性 IgG 抗体应答，这些样品是恰好在第二轮口服免疫前（(a) 第一系列口服免疫后）、恰好在用 OVA 和明矾进行 i. p. 最终加强免疫前（(b) 第二系列口服免疫后）或最后一次 i. p. 加强免疫后一周（(c) 用 OVA 和明矾进行 i. p. 加强免疫后）收集的。结果表示为每组 3-5 只小鼠的单独和平均终点效价（+S. E.）（见图 1 和 2）。

[0413] 实施例 8

[0414] 免疫 BALB/c 小鼠，并在血清样品上测定 OVA 特异性 IgG 抗体效价，所述样品是按照实施例 7 所述的方法收集的。结果表示为单个小鼠的 IgG 终点效价，其中各组小鼠的平均值用实线表示。

[0415] 恰好一个系列口服免疫后，在用含有卵清蛋白和油 3 以及和 MPLA、 α GalCer 或 QuilA 佐剂的微珠免疫的小鼠血清中观察到卵清蛋白特异性 IgG 抗体略有增加（图 3a 和 4a）。

[0416] 两轮口服免疫后，来自用含油 3 的微珠口服免疫的所有小鼠的 OVA 特异性 IgG 抗体强烈增加。相反，口服用安慰剂的微珠和 OVA 口服免疫的小鼠血清中 IgG 没有增加，表明微珠制剂中存在油 3 能诱导强烈的 IgG 应答（图 3b 和 4b）。

[0417] 具体地，两轮口服免疫后发现 α GalCer 佐剂在微珠中是有效佐剂。相反，用单独卵清蛋白或卵清蛋白 + CT 溶液进行口服免疫产生的 IgG 抗体应答可变。（图 3b 和 4b）。

[0418] 第二轮口服免疫后 17 天，所有小鼠经腹膜内（i. p.）给予 OVA 和明矾进行加强免疫。最强的抗 - 卵清蛋白 IgG 抗体出现在含有 OVA 和油 3 以及 α GalCer 佐剂的微珠进行口服初免、并进行 i. p. 加强免疫的小鼠中。所有用该配方免疫的小鼠都显示强烈的 IgG 抗体应答。利用无佐剂或含有 MPLA 或 QuilA 佐剂的含有 OVA 和油 3 的微珠配方口服免疫，并进行 i. p. 加强免疫的小鼠也具有强 IgG 效价，但其应答的变化性高于用微珠和 α GalCer 进行口服初免的小鼠（图 3c 和 4c）。

[0419] 实施例 9

[0420] 在下列实施例中，油相和水相以范围为 1：6-10，优选大约 1：7 或 1：8 的比例混合，同时采用磁力搅拌器（Stuart 生产）持续轻轻地搅拌组分。这样制备水相（明胶、山梨糖醇、HPMCP、NaHCO₃ 和 NaOH）：将适量山梨糖醇、HPMCP、NaHCO₃ 和 NaOH 加入水中，加热至约 60-75°C 直到溶解，然后加入明胶。“明胶溶液”包含 15-25%（优选 17-18%）的明胶；75% -85%（优选 77-82%）的水外加 1-5%（优选 1.5%至 3%）的山梨糖醇。将明胶溶液保持在 60°C -70°C 以使其保持流体状态。在室温、搅拌条件下将表面活性剂（如司盘 85 和 / 或吐温 80）加入油中，从而制备油相。添加适量的卵清蛋白（参见下表）以实现目标比例。将油相（或 w/o 乳液）加入加热的水相（明胶溶液）中搅拌 1 至 2 小时形成乳液。然后，所得乳液（或 w/o/w 乳液）具有固化微珠的组合物但仍然含水。一旦形成乳液，就立

刻开始成珠步骤,通过使用移液器和将流体乳液手动滴入温度范围保持在 8-12℃的进行固化的 MCT(冷却流体)中。然后通过网袋收集珠,通过所述网袋排出油且保留珠,离心除去过量的油然后用乙酸乙酯洗涤,然后干燥。采用 Freund 圆筒烘干机进行干燥,温空气介于 15℃和 25℃之间。制备具有以下组成的未包衣微珠。

[0421]

组分	下限(毫克/克)	上限(毫克/克)
卵清蛋白	8.0	8.6
明胶	470	510
D-山梨糖醇	71	76
HPMCP	49	54
NaHCO ₃	8.0	9.0
NaOH	0.8	0.9
蒙塔尼 ISA 720VG	82	95
拉普菲 M 1944CS	255	300
司盘 85	1.8	2.0
吐温 80	1.7	2.0
CpG	0	2.0
聚 I:C	0	2.5
α GalCer	0	0.04
MPLA	0	1.2
Quil A	0	8.0

[0422] 含有 OVA 作为模式抗原的优选配方如下：

[0423]

组分	下限(毫克/克)	上限(毫克/克)
卵清蛋白	8.0	8.6
明胶	470	490
D-山梨糖醇	71	73

HPMCP	49	51
NaHCO ₃	8.0	9.0
NaOH	0.8	0.9
蒙塔尼 ISA 720VG	90	95
拉普菲 M 1944CS	285	295
司盘 85	1.9	2.1
吐温 80	1.9	2.1
α GalCer	0.04	0.61

[0424] 实例 10-13

[0425] 产生这些实施例的方式与实施例 9 相同,所用油 3 与实施例 1c 相同。在大约 70°C 的温度下将 α GalCer 溶解于 NaHCO₃/NaOH 缓冲液 (pH = 9.64), 然后加入 OVA、D- 山梨糖醇、HPMCP 和明胶。所用浓度在不同实施例中略有不同,将在各实施例中标出。

[0426] 实施例 10

[0427] 水相各组分所用的浓度如下:

[0428]

组分	浓度 (% w/w)
明胶	22.97
HPMCP	2.39
D- 山梨糖醇	3.39
α GalCer	0.19
OVA	3.91

[0429] 注:产生本实施例的珠时不使用油相。

[0430]

		g	mg/g	%
OVA 012/B	明胶	0.574	780.70	78.07

对照例	HPMCP	0.060	81.46	8.15
	D-山梨糖醇	0.085	115.41	11.54
	NaOH	0.001	1.36	0.14
	NaHCO ₃	0.005	6.79	0.68
	OVA	0.010	13.60	1.36
	aGalCer	0.001	0.68	0.07
	总计	0.74		100.00

[0431] 实施例 11

[0432] 水相各组分所用的浓度如下：

[0433]

组分	浓度 (% w/w)
明胶	22.97
HPMCP	2.39
D-山梨糖醇	3.39
aGalCer	0.29
OVA	3.94

[0434] 以 6.5 : 1 的比例混合上述明胶相和油相（油 3）。

[0435]

		g	mg/g	%
OVA 013/B	蒙塔尼 ISA 720	0.118	95.98	9.60
油 3	拉普菲 M1944CS	0.367	299.53	29.95
	吐温 80	0.002	2.00	0.20
	司盘 85	0.003	2.40	0.24
	明胶	0.574	468.34	46.83
	HPMCP	0.060	48.87	4.89

	D- 山梨糖醇	0.085	69.23	6.92
	NaOH	0.001	0.81	0.08
	NaHCO ₃	0.005	4.07	0.41
	OVA	0.010	8.16	0.82
	aGalCer	0.001	0.61	0.06
	总计	1.23		100.00

[0436] 实施例 12

[0437] 在该实施例中,油相称为油 MF59。这是指文献中所述的 MF59 佐剂(参见例如, Schultze 等, Vaccine 26(2008)3209-3222,通过引用将其全文纳入本文)。实施例所用的角鲨烯购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)。本实施例中,将来自文献佐剂(在水中制成)的油组分外推至无水组成,所得组成如下:

[0438]

		%
MF59 油	角鲨烯	81.14
	吐温 80	9.43
	司盘 85	9.43

[0439] 水相各组分所用的浓度如下:

[0440]

组分	浓度 (% w/w)
明胶	22.97
HPMCP	2.39
D- 山梨糖醇	3.39
aGalCer	0.17
OVA	3.98

[0441] 以 1 : 5.6 的比例混合油相和水相。

[0442]

		g	mg/g	%
OVA 014/B	角鲨烯	0.398	324.48	32.45

油 MF59	吐温 80	0.046	37.71	3.77
	司盘 85	0.046	37.71	3.77
	明胶	0.574	468.34	46.83
	HPMCP	0.060	48.87	4.89
	D- 山梨糖醇	0.085	69.23	6.92
	NaOH	0.001	0.81	0.08
	NaHCO ₃	0.005	4.07	0.41
	OVA	0.010	8.16	0.82
	aGalCer	0.001	0.61	0.06
	总计	1.23		100.00

[0443] 实施例 13

[0444] 在该实施例中, aGalCer 的硫醇衍生物 (标为 aGalCer-S) 用作佐剂。使用 0.1M NaOH 溶液代替 NaHCO₃/NaOH 缓冲液来制备水相。

[0445] 水相各组分所用的浓度如下：

[0446]

组分	浓度 (% w/w)
明胶	22.53
HPMCP	2.38
D- 山梨糖醇	3.33
aGalCer-S	0.19
OVA	3.95

[0447] 以 1 : 7 的比例混合油相 (油 3) 和水相。

[0448]

		g	mg/g	%
OVA 015/B	蒙塔尼 ISA 720	0.118	96.56	9.66
油 3	拉普菲 M1944CS	0.367	301.36	30.14

	吐温 80	0.002	2.01	0.20
	司盘 85	0.003	2.41	0.24
	明胶	0.566	464.82	46.48
	HPMCP	0.060	49.13	4.91
	D-山梨糖醇	0.084	68.68	6.87
	NaOH	0.007	5.92	0.59
	OVA	0.010	8.29	0.83
	aGalCer-S	0.001	0.82	0.08
	总计	1.22		100.00

[0449] 实例 14-21

[0450] 在下述实施例中,用作抗原 / 佐剂的 CTB(rCTB- 霍乱毒素的重组亚基 B) 获自 SBL 疫苗公司 (SBL Vaccin AB) 并以市售形式,即 9mg/ml 的 PBS 缓冲液使用。

[0451] 采用 rCTB 作为抗原的优选配方见下表。

[0452]

组分	下限 (毫克 / 克)	上限 (毫克 / 克)
rCTB	2.1	6.9
明胶	470	560
D-山梨糖醇	46	58
蒙塔尼 ISA 720VG	85	100
拉普菲 M 1944CS	230	250
司盘 85	10	18
吐温 80	30	45
α GalCer	0.8	1.9

[0453] 实施例 14

[0454] 按照实施例 13,0.1M NaOH 溶液用作水相。

[0455] 水相各组分所用的浓度如下：

[0456]

组分	浓度 (% w/w)
明胶	22.52
HPMCP	2.39
D-山梨糖醇	3.33
aGalCer	0.17

[0457] 以 1 : 7 的比例混合水相和油相 (油 3), 然后加入 0.211ml rCTB 溶液、对应于 1.9mg 固体 rCTB, 进一步搅拌所得的混合物, 然后按照前述技术产生珠。

[0458]

		g	mg/g	%
CTB 001/B	蒙塔尼 ISA 720	0.119	98.07	9.81
油 3	拉普菲 M1944CS	0.371	306.06	30.61
	吐温 80	0.002	2.04	0.20
	司盘 85	0.003	2.45	0.25
	明胶	0.564	465.24	46.52
	HPMCP	0.060	49.18	4.92
	D-山梨糖醇	0.083	68.74	6.87
	NaOH	0.007	5.93	0.59
	CTB	0.0019	1.57	0.16
	aGalCer	0.001	0.72	0.07
	总计	1.21		100.00

[0459] 实施例 15

[0460] 按照实施例 14 所述制备本实施例, 唯一的区别是使用 α GalCer-S 代替 α GalCer 用作佐剂。

[0461]

CTB 002/B	蒙塔尼 ISA 720	0.119	98.01	9.80
油 3	拉普菲 M1944CS	0.372	305.87	30.59

	吐温 80	0.002	2.04	0.20
	司盘 85	0.003	2.45	0.25
	明胶	0.565	465.37	46.54
	HPMCP	0.060	49.19	4.92
	D-山梨糖醇	0.084	68.76	6.88
	NaOH	0.007	5.93	0.59
	CTB	0.0019	1.56	0.16
	aGalCer-S	0.001	0.82	0.08
	总计	1.21		100

[0462] 实施例 16

[0463] 在本实施例中,油 4(组成如实施例 1d 所述)用作油相。在水相中,使用含有 0.5% 吐温 80 作为表面活性剂的 0.1M NaOH 溶液。 α GalCer 用作佐剂,并在大约 70°C 时溶解于水相,浓度为 0.04%,然后加入 HPMCP(1.71%)、D-山梨糖醇(1.7%)和明胶(17.03%),保持相同温度以溶解。以 1 : 7 的比例混合水相和油相,最后加入 rCTB 溶液(0.300ml,对应于 2.7mg)。然后按照前述技术产生珠。

[0464]

		g	mg/g	%
CTB 003/B	蒙塔尼 ISA 720	0.123	98.67	9.87
油 4	拉普菲 M1944CS	0.336	268.09	26.8
	吐温 80	0.042	33.56	3.36
	司盘 85	0.019	15.53	1.55
	明胶	0.596	476.35	47.64
	HPMCP	0.060	48.11	4.81
	D-山梨糖醇	0.061	47.95	4.79
	NaOH	0.011	8.79	0.88
	CTB	0.0027	2.16	0.22

	aGalCer	0.001	0.80	0.08
	总计	1.25		100

[0465] 实施例 17

[0466] 如实施例 16 所述制备本实施例。唯一的区别是 α GalCer 的浓度加倍。

[0467]

		g	mg/g	%
CTB 004/B	蒙塔尼 ISA 720	0.123	98.43	9.84
油 4	拉普菲 M1944CS	0.335	267.42	26.74
	吐温 80	0.042	33.65	3.37
	司盘 85	0.019	15.49	1.55
	明胶	0.595	474.83	47.48
	HPMCP	0.060	48.11	4.81
	D- 山梨糖醇	0.062	49.55	4.96
	NaOH	0.011	8.78	0.88
	CTB	0.003	2.15	0.22
	aGalCer	0.002	1.6	0.16
	总计	1.25		100.00

[0468] 实施例 18

[0469] 在本实施例中,水相具有与实施例 16 相同的组成。不使用油相。

[0470]

		g	mg/g	%
CTB 005/B	吐温 80	0.019	21.09	2.11
无油相	明胶	0.754	828.45	82.85
	HPMCP	0.060	65.9	6.59
	D- 山梨糖醇	0.061	66.34	6.63
	NaOH	0.014	15.27	1.52

	CTB	0.002	2.2	0.22
	aGalCer	0.0007	0.77	0.08
	总计	0.91		100.00

[0471] 实施例 19

[0472] 如实施例 17 和 18 所述制备本实施例,唯一的区别是不用 α GalCer。水相各组分的浓度如下:

[0473]

组分	%重量 / 重量 (w/w)
明胶	17.12
D- 山梨糖醇	1.72
HPMCP	1.72
吐温 80	0.43
NaOH	0.32

[0474] 以 1 : 7 的比例混合油相 (油 4) 和水相。最后加入 0.300ml rCTB 溶液。

[0475]

		g	mg/g	%
CTB 006/B	蒙塔尼 ISA 720	0.120	96.48	9.65
油 4	拉普菲 M1944CS	0.334	267.9	26.79
	吐温 80	0.040	32.03	3.2
	司盘 85	0.022	17.32	1.73
	明胶	0.596	478.87	47.88
	HPMCP	0.060	48.2	4.82
	D- 山梨糖醇	0.060	48.2	4.82
	NaOH	0.011	8.84	0.88
	CTB	0.0027	2.17	0.22
	总计	1.24		100

[0476] 实施例 20

[0477] 在本实施例中,含有 0.5%吐温 80 的 PBS 缓冲液用作水相。在 70℃溶解 α GalCer(0.06% w/w),然后加入 D-山梨糖醇(1.74%)和明胶(17.51%)。以 1:9 的比例将油相(油 4)加入上述水相中。最后,将 0.300ml rCTB 溶液加入上述混合物,产生珠。

[0478]

		g	mg/g	%
CTB 008/B	蒙塔尼 ISA 720	0.095	87.5	8.75
油 4	拉普菲 M1944CS	0.256	236.83	23.68
	吐温 80	0.037	34.28	3.43
	司盘 85	0.015	13.73	1.37
	明胶	0.604	557.71	55.77
	D-山梨糖醇	0.060	55.45	5.55
	盐(来自 PBS 缓冲液)	0.011	10.17	1.02
	CTB	0.0027	2.5	0.25
	α GalCer	0.002	1.85	0.19
	总计	1.08		100

[0479] 然后用尤特奇(Eudragit)L30-D 55 包被上述珠,以实现 5.5%的重量增加。

[0480] 实施例 21

[0481] 在本实施例中,纯化水用作水相,其中含有吐温 80(0.52%)、D-山梨糖醇(1.67%)和明胶(17.25%)。油相是油 4,其中在室温下分散 α GalCer(0.51%)和冻干的 rCTB(1.83%)。接着,以 1:9 的比例混合油相和水相。

[0482]

		g	mg/g	%
CTB 009/B	蒙塔尼 ISA 720	0.096	85.29	8.53
油 4	拉普菲 M1944CS	0.262	232.05	23.21
	吐温 80	0.047	41.6	4.16
	司盘 85	0.020	17.89	1.79
	明胶	0.63	560.47	56.05
	D-山梨糖醇	0.061	54.11	5.41

	CTB	0.0076	6.73	0.67
	α GalCer	0.002	1.86	0.19
	总计	1.12		100

[0483] 正如前述实施例,接着用尤特奇 L 30-D 55 包被珠。实现的重量增量为 6.3%。

[0484] 实施例 22

[0485] 本实施例通过利用霍乱毒素进行的鼠肠环试验证明,本发明制剂能针对抗原刺激的有效提供免疫保护。该实施例采用霍乱毒素刺激,如 Tokuhara D 等, (2010)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 :8794-8799 所述。

[0486] 利用各种霍乱毒素 B 亚基 (CTB) 制剂对小鼠进行口服免疫。在某些制剂中, α -半乳糖基神经酰胺 (也称为 α GalCer) 用作佐剂。测试的制剂是:

[0487] PBS

[0488] 单独的 CTB 溶液

[0489] CTB 溶液和霍乱毒素 (最强效的粘膜佐剂)

[0490] CTB 溶液和 α GalCer

[0491] 油 3 中的 CTB, 无 α GalCer 珠制剂

[0492] 油 3 中的 CTB, 和含 NaOH 珠形式的 α GalCer

[0493] 油 3 中的 CTB, 和不用 NaOH 的珠制剂中的 α GalCer。

[0494] 制剂 (v) 是 CTB 006/B (实施例 19)。制剂 (vi) 是 CTB 004/B (实施例 17)。制剂 (vii) 是 CTB 009/B (实施例 21)。

[0495] 在第 0、2 和 4 周, 连续 2 天用单独的 CTB (20 μ g/ 小鼠) 或混有霍乱毒素 (CT; 10 μ g/ 小鼠) 或 α GalCer (15 μ g/ 小鼠) 溶液的 CTB, 或者用上述配方口服免疫 BALB/c 小鼠。最后一次免疫接种后一周, 所有小鼠通过口服强饲给予 20 μ g 霍乱毒素。12 小时后, 处死小鼠并切除消化道。切除的消化道和切除的大肠分别见图 5 和 6。图 5 显示小鼠流体淤积, 特别是小鼠盲肠中。除非小鼠被有效免疫, 否则递送霍乱毒素会导致肠道中出现明显的流体淤积 (代表人的腹泻)。从图 5 中可观察到, 仅用 PBS 或 CTB 免疫的小鼠中出现显著的流体淤积。相反, 用本发明制剂免疫的小鼠中流体淤积较少。特别地, 含有用不含 NaOH 的油 3 配制的 CTB+GalCer 的珠免疫的小鼠中, 流体淤积显著减少; 这种效果与利用阳性对照佐剂霍乱毒素观察到的效果相当。图 6 显示同一小鼠的大肠。正常的团块形成表明有保护作用, 而在组 (i) 和 (ii) (PBS, CTB) 中可观察到团块形成差, 再次表明腹泻。从图 6 中可观察到含有用不含 NaOH 的油 3 配制的 CTB+GalCer 的珠制剂免疫的小鼠大肠中团块形成正常, 说明具有抵抗霍乱毒素的保护作用。

[0496] 本发明还涉及下述主题内容:

[0497] 1. 一种药物组合物, 其包含其中分散着油滴的水溶性聚合物基质, 该组合物包含至少一种选自下组的免疫调节活性成分: 佐剂、抗原或其组合。

[0498] 2. 如条目 1 所述的组合物, 其特征在于, 所述免疫调节是接种疫苗、产生耐受或免疫治疗。

[0499] 3. 如条目 2 所述的组合物, 其特征在于, 所述活性成分并入所述小油滴的至少一

些中。

[0500] 4. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述油滴随着包含它们的基质溶解于水性介质而释放。

[0501] 5. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物用于口服给药。

[0502] 6. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,本发明组合物包含至少一种抗原和至少一种佐剂。

[0503] 7. 如前述任一条目所述的口服给予的组合物,其用于肠道 / 结肠粘膜递送和 / 或用于免疫调节,例如诱导口服耐受。

[0504] 8. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述活性成分沿整个肠道和结肠 / 直肠释放,或释放至沿整个肠道和结肠 / 直肠的预先确定的部位。

[0505] 9. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物具有包衣以改变溶出速率和方式。

[0506] 10. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物还包含阻滞剂 / 保护剂,如 HPMC 衍生物。

[0507] 11. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含多个任选包衣的水溶性聚合物基质的微珠,该聚合物基质含有油滴,其中所述至少一种活性成分包含至少一种疫苗活性成分。

[0508] 12. 如前述任一项权利要求所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含多个干燥水包油乳液的微珠,其中所述组合物包含至少一种疫苗活性成分。

[0509] 13. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含多个任选包衣的干燥水包油乳液的微珠,其中至少一些所述微珠(如第一群)包含活性成分(或一种以上活性成分),任选的其他珠(如第二群)包含活性成分(或一种以上活性成分),或某一群可不含活性成分。

[0510] 14. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含保护至少一种活性成分免于接触胃液的组分,例如,仅在某一 pH 以上可溶于水或基本可溶于水的聚合物,如羟丙基甲基纤维素(HPMC)的衍生物。

[0511] 15. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含一种或多种表面活性剂,其优选为非离子型表面活性剂。

[0512] 16. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物具有聚合物包衣,例如在结肠中细菌酶存在下降解的聚合物。

[0513] 17. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含具有不依赖 pH 的聚合物的成孔剂。

[0514] 18. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含一种或多种药剂,以促进疫苗抗原吸附于粘膜表面和 / 或下方的粘膜淋巴组织、M 细胞、派尔斑或其他免疫相关细胞或细胞系统,或被它们吸收。

[0515] 19. 如前述任一条目所述的组合物,其特征在于,所述组合物是栓剂、阴道栓剂、丸剂、片剂、糊剂或流体剂形式。

[0516] 20. 一种疫苗递送组合物,其将疫苗吸附于哺乳动物的粘膜表面,且任选地,疫苗组合物的一些或全部组分吸收后,使疫苗与粘膜相关淋巴组织(MALT)相接触。

- [0517] 21. 一种治疗或预防胃肠道病症的方法,所述胃肠道病症是感染物直接或间接加重或引起的,所述方法包括将前述任一条目所述的组合物给予动物,例如通过口服途径。
- [0518] 22. 一种加强免疫应答的方法,所述方法包括通过口服途径将条目 1-20 所述的疫苗组合物给予动物,该动物以非口服途径接受过此种初次免疫。
- [0519] 23. 一种制备条目 1-20 中任一项所述组合物的方法,其中分散有油滴的液体水性外相发生固化,例如通过交联、冷却或加热固化。
- [0520] 24. 一种免疫接种方法,包括使条目 1-20 中任一项所述的组合物与粘膜表面,如口腔、内脏、鼻腔、直肠或阴道表面相接触。
- [0521] 25. 一种免疫接种方法,所述方法包括将前述任一条目所述的组合物作为饲料或饮料的一部分给予动物或引入鱼类繁殖、进食或居住的水域。
- [0522] 26. 一种在动物中进行免疫接种或诱导免疫应答的方法,所述动物包括例如鱼类或哺乳动物和 / 或患有本文其它地方所述的一种或多种疾病,包括将条目 1-20 中任一项所述的组合物给予所述动物。
- [0523] 27. 一种制备免疫调节 (如疫苗) 组合物的方法,包括混合水溶性聚合物基质的水溶液与油基液体以形成油包水乳液,然后使得或允许所得悬液固化成一个或多个成形元件,例如珠。
- [0524] 28. 一种疫苗递送组合物,其将疫苗吸附于哺乳动物的粘膜表面,且任选地,疫苗组合物的一些或全部组分吸收后,使疫苗与粘膜相关淋巴组织 (MALT) 相接触。
- [0525] 29. 口服给予对抗内脏病原体的疫苗,包括将疫苗递呈或递送至内脏相关淋巴组织 (GALT)。
- [0526] 30. 口服给予对抗上呼吸道病原体的疫苗,包括将所述疫苗递呈或递送至口腔或鼻腔中的粘膜相关淋巴组织。

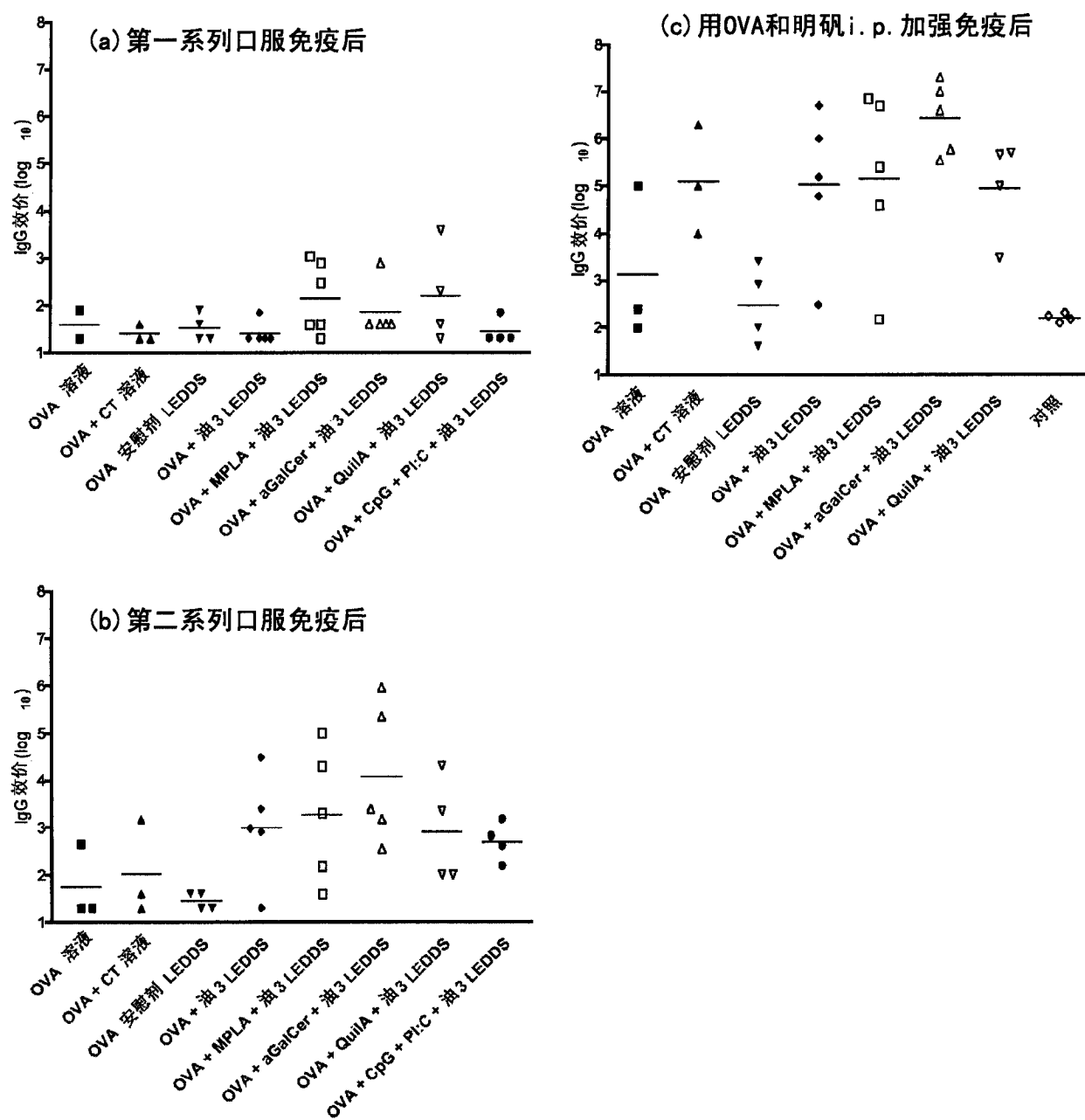


图 1

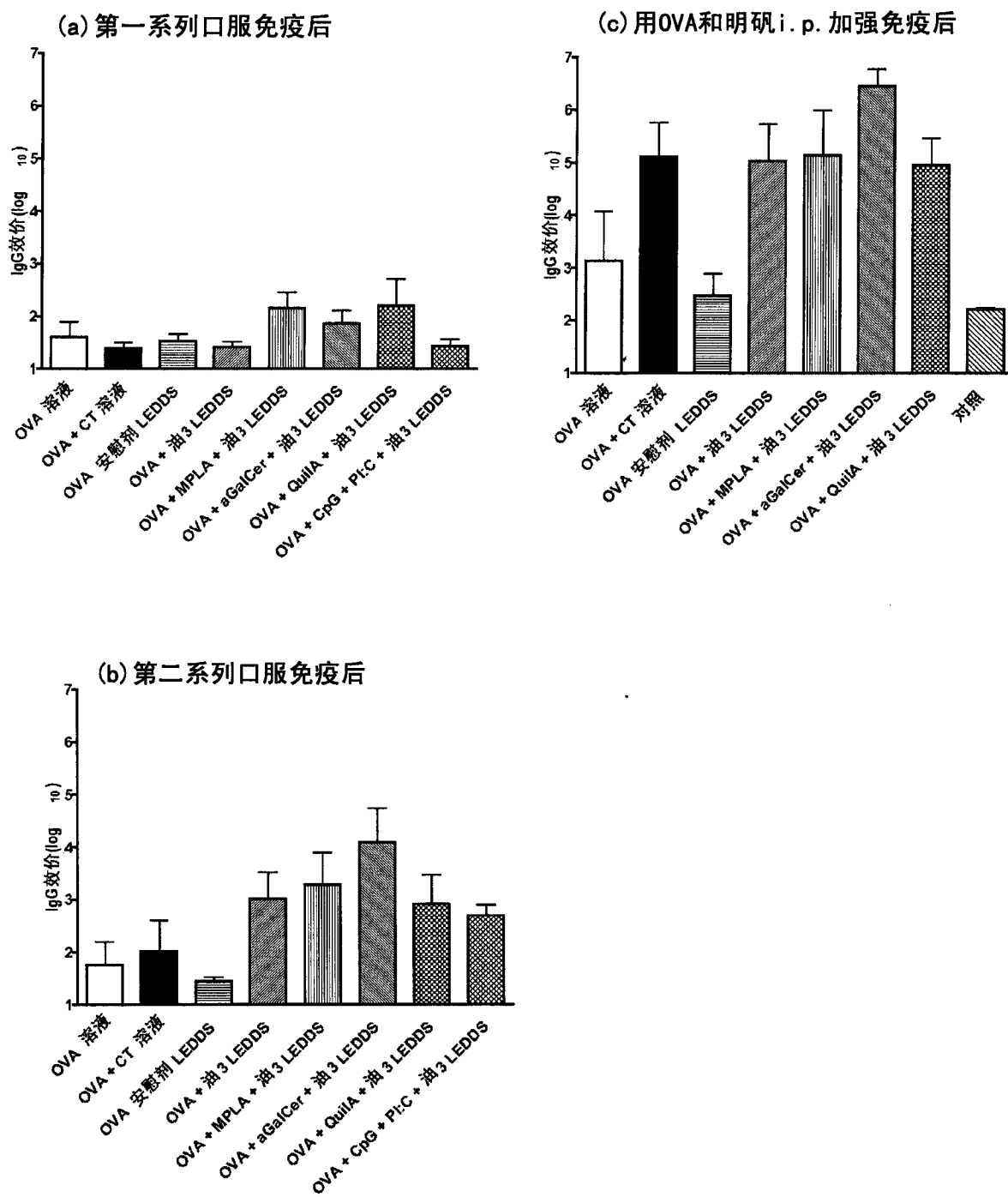


图 2

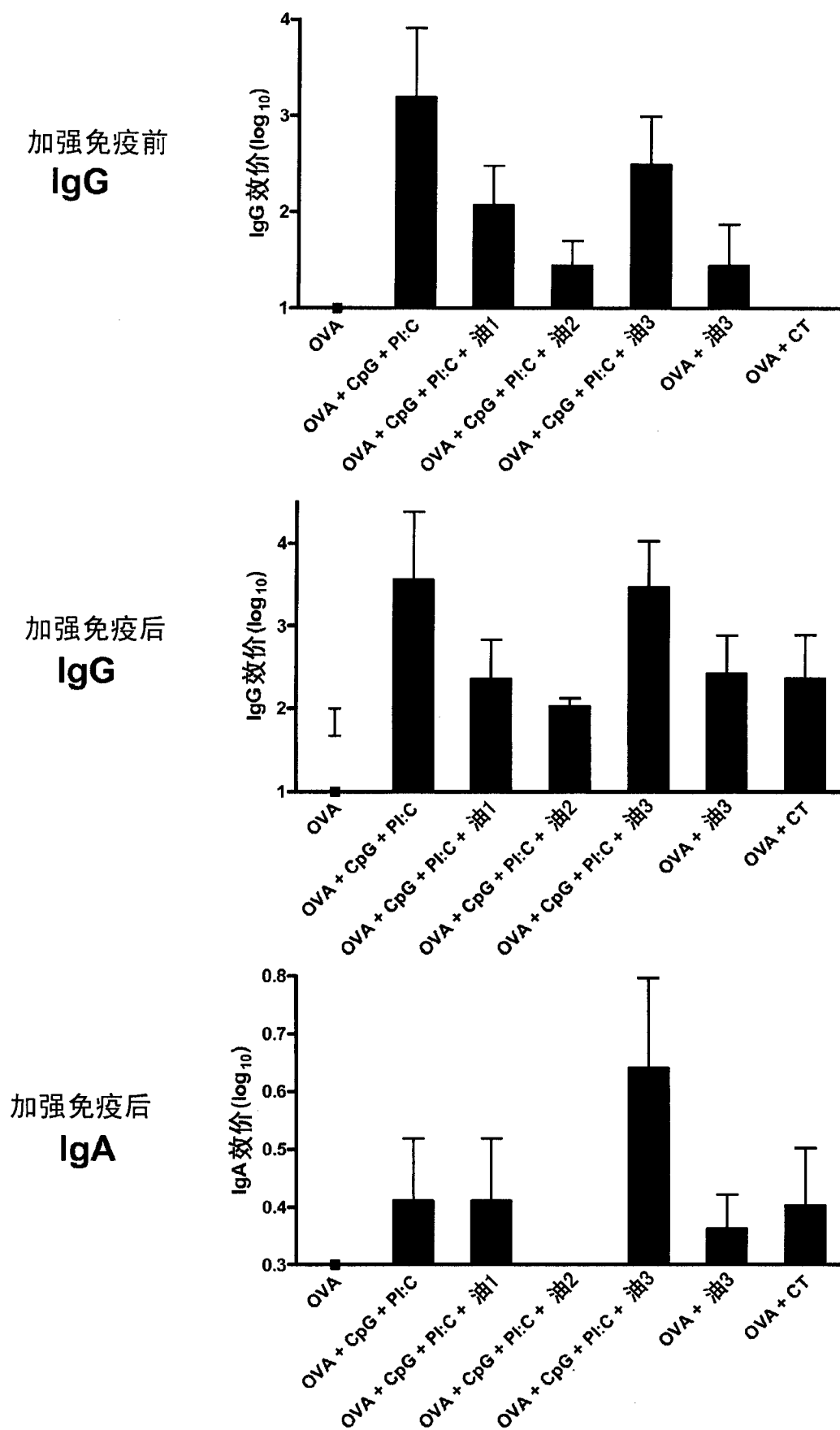


图 3

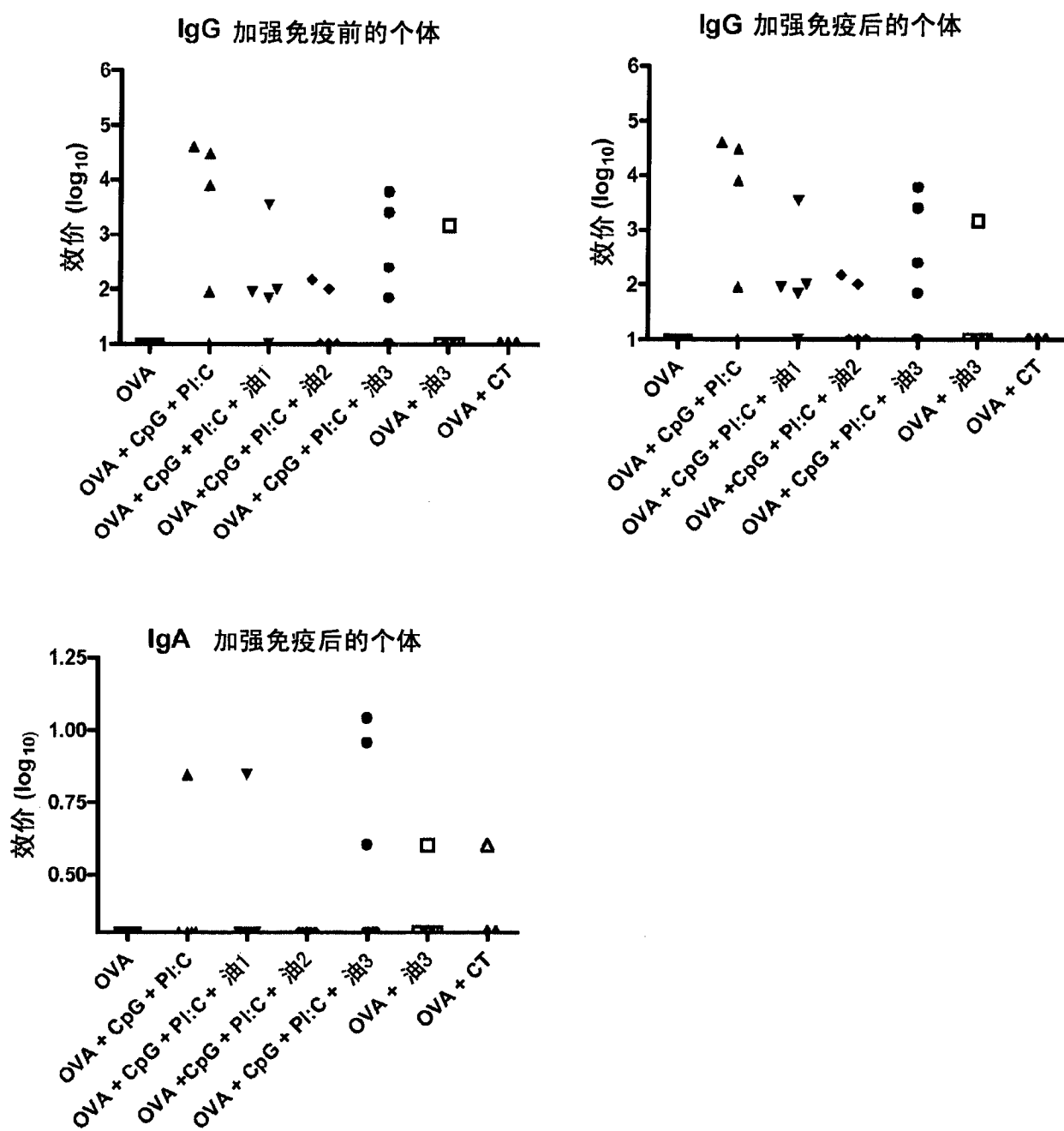


图 4

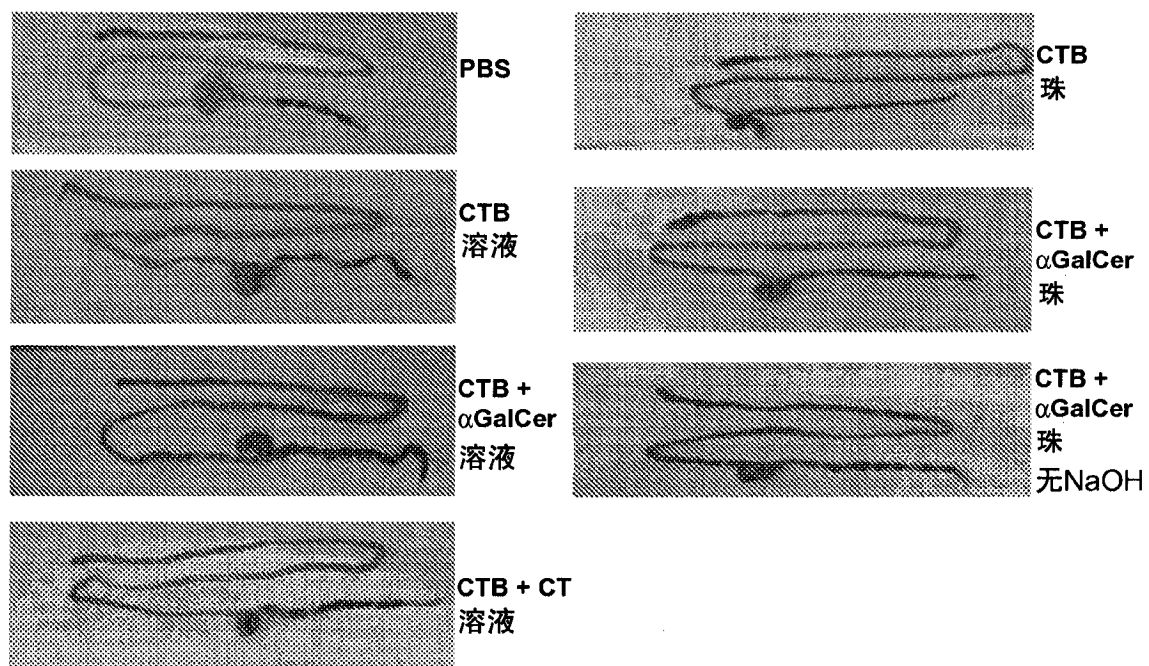


图 5

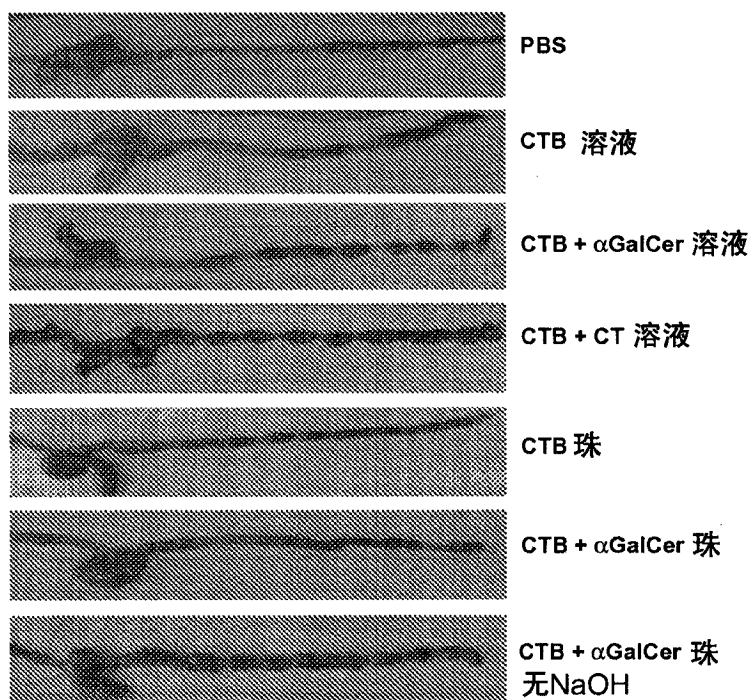


图 6

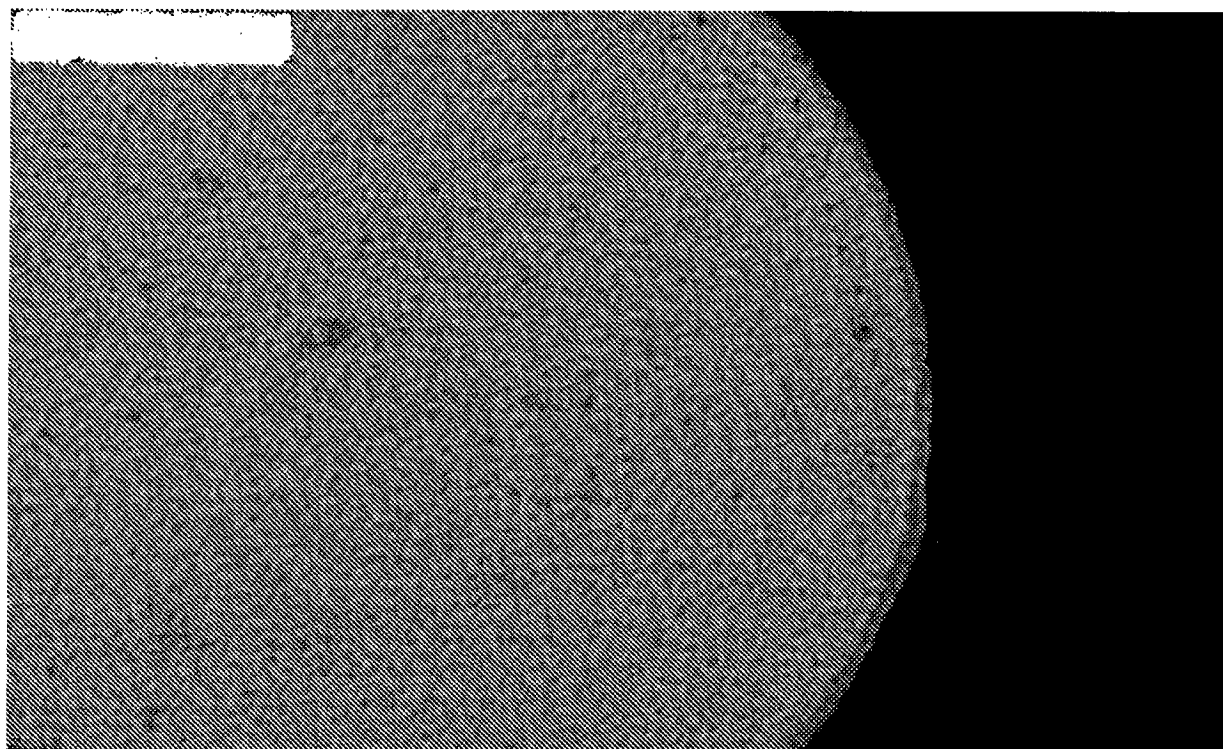


图 7