



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1829917 B

(45) 授权公告日 2010.08.25

(21) 申请号 200480021892.8

CN 1385540 A, 2002.12.18, 全文.

(22) 申请日 2004.07.28

Olaf Tbraenbart, Kandiab

(30) 优先权数据

Ramakrisbnan. Standardiztion of an enzyme immnuassay for the in vitropotency assay of inactivated tissue culture rabies vaccines:determination of the rabies virus glycoprotein with polyclonalantisera. Journal of Biological Standardization17. 1989, 17291-309.

PA200301130 2003.08.05 DK

60/493,020 2003.08.05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.01.27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2004/000514 2004.07.28

(87) PCT申请的公布数据

W02005/022157 EN 2005.03.10

(73) 专利权人 阿尔克-阿贝洛有限公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

Lakshmi Krishnan, Chantal J. Dicaire etal. Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated, and Memory Responses:Comparison toConventional Liposomes and Alum. Infection and Immunity68 1. 2000, 68(1), 54-63.

(72) 发明人 P·A·乌尔特赞 G·伦德

H·H·雅各比 H·H·伊普森

Harm HogenEsch. Mechanisms of stimulation of the immune response byaluminum adjuvants. Vaccine20. 2002, 20S34-S39.

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 陈轶兰

C. J. N. Lacey, H. S. G. Thompson etal. Phase IIa Safety and Immunogenicity of a Therapeuticivaccine, TA-GW, in Persons with Genital Warts. The Journal of Infectious

(51) Int. Cl.

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(续)

(续)

(56) 对比文件

US 4127385 , 1978.11.28, 全文.

审查员 李冰

权利要求书 3 页 说明书 16 页 附图 4 页

(54) 发明名称

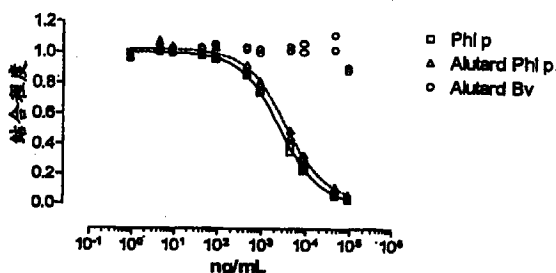
佐剂疫苗的评价

用免疫测定法,后者采用结合到抗体固相上的抗原-特异性的抗体,b) 活化效应细胞的能力,和c) 诱导过敏反应的潜力 ;和 ii) 使用测量结果。

(57) 摘要

本发明涉及体外评价分子抗原和载体的混合物形式的疫苗制剂的免疫活性的方法,其中该混合物包含液相和固相,至少一部分抗原附着在该固相上,该方法包括下述步骤:i) 对疫苗进行一种或多种选自下述的测量:1) 混合物的免疫活性,2) 液相中的抗原的免疫活性,3) 固相中的抗原的免疫活性,4) 处理混合物来从固相置换抗原后,液相中的抗原的免疫活性,和5) 处理混合物来从固相置换抗原后,固相中的抗原的免疫活性,其中免疫活性测量选自:a) 抗体结合能力,使

Phi p或Alutard制剂对IgB与生物素化Phi p的结合的抑制



CN 1829917 B

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

*G01N 33/68* (2006.01)

*A61K 39/00* (2006.01)

(56) 对比文件

Diseases 179, 1999, 179612-618.

A. Hoffmann, A. Jamin et al.

Determination of the allergenic activity of birch pollen and apple prick test solutions by measurement of  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Comparison with classical methods in allergen standardization.

Allergy 54, 1999, 54446-454.

1. 体外评价分子蛋白抗原和氢氧化铝形式的载体的混合物形式的疫苗制剂的免疫活性的方法,其中该混合物包含液相和固相,至少一部分抗原附着在该固相上,该方法包括下述步骤:

i) 对疫苗进行一种或多种选自下述的测量:

- 1) 混合物的免疫活性,
- 2) 液相中的抗原的免疫活性,
- 3) 固相中的抗原的免疫活性,
- 4) 处理混合物来从固相置换抗原后,液相中的抗原的免疫活性,和
- 5) 处理混合物来从固相置换抗原后,固相中的抗原的免疫活性,

其中免疫活性测量选自:a) 抗体结合能力,使用免疫测定法,后者采用结合到抗体固相上的抗原-特异性的抗体,b) 活化效应细胞的能力,和 c) 诱导过敏反应的潜力;和

ii) 使用测量结果评价疫苗的免疫活性。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中将免疫活性测量为抗体结合能力。

3. 根据权利要求 2 的方法,其中使用的或检测的抗体选自 IgA, IgE, IgG, IgM 和其组合。

4. 根据权利要求 3 的方法,其中使用的或检测的抗体是 IgE 和 IgG。

5. 根据权利要求 3 的方法,其中使用的或检测的抗体是 IgE。

6. 根据权利要求 2-5 中的任一项的方法,其中在免疫测定法中测量免疫活性。

7. 根据权利要求 6 的方法,其中免疫测定法是竞争性的免疫测定法。

8. 根据权利要求 1 的方法,其中将免疫活性测量为活化免疫系统的效应细胞的能力。

9. 根据权利要求 8 的方法,其中使用全血进行效应细胞活化。

10. 根据权利要求 8 的方法,其中效应细胞是从生物样品分离的细胞。

11. 根据权利要求 8 的方法,其中效应细胞是从生物样品分离和培养的细胞。

12. 根据权利要求 8 的方法,其中效应细胞是从生物样品分离、培养和修饰的细胞。

13. 根据权利要求 10-12 中的任一项的方法,其中效应细胞选自肥大细胞,嗜碱性粒细胞,嗜酸性粒细胞, T 细胞, B 细胞和抗原呈递细胞,和其组合。

14. 根据权利要求 8-12 中的任一项的方法,其中通过测量效应细胞标志物的水平,测量效应细胞活化能力。

15. 根据权利要求 14 的方法,其中标志物选自分泌性分子,表面分子和细胞内分子。

16. 根据权利要求 15 的方法,其中分泌性分子选自:介质,细胞因子,细胞毒性蛋白和可溶性受体。

17. 根据权利要求 16 的方法,其中测量的介质选自:组胺,白三烯,前列腺素,血栓素,血小板活化因子,主要碱性蛋白, ECF, ECP, EDN, EPO, 缓激肽,腺苷, P 物质,神经激肽 A,补体因子,包括补体片段;5-羟色胺,氧自由基,颗粒体蛋白,和肥大细胞和嗜碱性细胞蛋白酶,包括类胰蛋白酶,糜蛋白酶,羧肽酶和组织蛋白酶。

18. 根据权利要求 17 的方法,其中所述白三烯选自 LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> 和 LTE<sub>4</sub>,前列腺素选自 PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> 和 PGF<sub>2a</sub>,补体因子为 C3d。

19. 根据权利要求 16 的方法,其中测量的细胞因子选自:白细胞介素,造血生长因子,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,干扰素,肿瘤坏死因子相关的分子, Ig 超家族成员,

TGF- $\beta$  家族和趋化因子。

20. 根据权利要求 19 的方法,其中白细胞介素选自 IL-1 至 IL-27,干扰素选自 IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$  和 IFN $\gamma$ ,肿瘤坏死因子相关的分子选自肿瘤坏死因子和淋巴毒素,Ig 超家族成员为 IL-1,趋化因子选自 IL-8 和 RANTES。

21. 根据权利要求 16 的方法,其中测量的细胞毒性蛋白选自:嗜曙红细胞阳离子蛋白,主要碱性蛋白和 EDN。

22. 根据权利要求 15 的方法,其中表面分子选自表面受体和粘附分子。

23. 根据权利要求 22 的方法,其中表面分子选自选择蛋白,整联蛋白,免疫球蛋白超家族,VLA4,CD11B,CD11C,CD18, $\alpha$ -d,CD23,CD69,CD203C/I-NPP3,CD31,CD162,CD162L 和颗粒体蛋白。

24. 根据权利要求 23 的方法,其中免疫球蛋白超家族包括 ICAM-1 和 VCAM-1。

25. 根据权利要求 8-12 中的任一项的方法,其中通过测量 T 细胞增殖,测量效应细胞活化能力。

26. 根据权利要求 1 的方法,其中免疫活性是诱导过敏反应的潜力。

27. 根据权利要求 26 的方法,其中通过测量选自下述的效应细胞过敏反应标志物的水平,测量诱导过敏反应的潜力:组胺,类胰蛋白酶,颗粒体蛋白,白三烯 LTC<sub>4</sub>,CD63,CD69 和 CD203C。

28. 根据权利要求 26 或 27 的方法,其中测量在全血中诱导过敏反应的潜力。

29. 根据权利要求 28 的方法,其中用于测量的全血在测量之前已经从对象中抽出最多 5 小时。

30. 根据权利要求 28 的方法,其中用于测量的全血在测量之前已经从对象中抽出最多 2 小时。

31. 根据权利要求 28 的方法,其中使用调节至体温的全血。

32. 根据权利要求 26 或 27 的方法,包括在从生物样品分离的效应细胞中测量诱导过敏反应的潜力。

33. 根据权利要求 26 或 27 的方法,包括测量诱导过敏反应的潜力:1) 在从生物样品分离的效应细胞中,2) 在从生物样品分离和培养的效应细胞中,或 3) 在从生物样品分离、培养和修饰的的效应细胞中。

34. 根据权利要求 33 的方法,包括在从生物样品分离、培养和修饰的的效应细胞中,测量诱导过敏反应的潜力。

35. 根据权利要求 34 的方法,其中修饰的效应细胞是遗传修饰的细胞或恶性转化的细胞。

36. 根据权利要求 32 的方法,其中效应细胞选自肥大细胞,嗜碱性粒细胞,嗜酸性粒细胞,T 细胞,B 细胞和抗原呈递细胞,和其组合。

37. 根据权利要求 1 的方法,其中对疫苗仅仅测量了液相和固相的混合物的免疫活性。

38. 根据权利要求 1 的方法,其中对疫苗仅仅测量了在处理混合物从固相置换抗原后液相中的抗原的免疫活性。

39. 根据权利要求 1 的方法,对疫苗测量了液相和固相的混合物的免疫活性,和测量了液相中的抗原的免疫活性。

40. 根据权利要求 1 的方法,其中对疫苗测量了液相中的抗原的免疫活性,和测量了固相中的抗原的免疫活性。

41. 根据权利要求 1 的方法,其中置换处理包括使混合物接触含蛋白的试剂或阴离子。

42. 根据权利要求 41 的方法,其中含蛋白的试剂是含有蛋白的体液。

43. 根据权利要求 42 的方法,其中体液是血清。

44. 根据权利要求 41 的方法,其中阴离子是磷酸盐离子。

45. 根据权利要求 1 的方法,其中测量了用于制备疫苗的含有抗原的中间产物的免疫活性,其中疫苗的免疫活性的评价是基于对比由中间产物得到的测量结果和由测量 1)-5) 中的一项或多项得到的测量结果。

46. 根据权利要求 1 的方法,其中在制备后立即对疫苗进行测量。

47. 根据权利要求 46 的方法,其中在制备后立即测量疫苗,并在储存一个或多个阶段后测量疫苗,其中疫苗的免疫活性的评价是基于对比前后测量结果。

48. 根据权利要求 1 的方法,其中疫苗的免疫活性的评价是基于对比疫苗的测量结果和先前由相同类型的疫苗或另一类型的疫苗的对应该测量结果。

49. 根据权利要求 1 的方法,其中分子蛋白抗原是变应原。

50. 根据权利要求 49 的方法,其中变应原选自树花粉变应原,草花粉变应原,草本植物花粉变应原,螨变应原,毒液变应原,兽毛和皮屑变应原和食物变应原。

51. 根据权利要求 50 的方法,其中变应原是草花粉变应原。

52. 根据权利要求 50 的方法,其中变应原是尘螨变应原。

53. 根据权利要求 49-52 中的任一项的方法,其中变应原是至少两种不同的变应原种类的混合物。

54. 根据权利要求 49-52 中的任一项的方法,其中变应原是下述形式:提取物,纯化的变应原,修饰的变应原或重组的变应原或重组的变应原的突变体,或其任意组合。

55. 根据权利要求 49-52 中的任一项的方法,其中变应原是提取物的形式。

56. 根据权利要求 55 的方法,其中测量了提取物的两种或多种主要的和 / 或次要的变应原的免疫活性。

57. 根据权利要求 56 的方法,其中另外测量了总提取物的免疫活性。

58. 制备蛋白抗原和氢氧化铝形式的固相载体的混合物形式的疫苗制剂的方法,其中该混合物包含液相和固相,至少一部分抗原附着在该固相上,该方法包括:

i) 混合抗原和载体,

ii) 使用根据权利要求 1-56 中的任一项的方法,测量疫苗的免疫活性,和

iii) 任选地重复步骤 i) 和 ii),直到得到理想的免疫活性。

## 佐剂疫苗的评价

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外评价抗原和固相载体的混合物形式的疫苗制剂的免疫活性的方法,所述的免疫活性包括变应原活性和诱导变态反应的潜力,特别是诱导过敏反应的潜力,其中该混合物包含液相和固相,至少一部分抗原附着在该固相上。

[0002] 发明背景

[0003] 通过混合抗原水溶液和固相载体,例如氢氧化铝凝胶,来生产混合物,其中至少一部分抗原吸附在固相上,且部分抗原或没有抗原是在液相中,可以制备出用于例如皮下注射的疫苗。固相载体可以用作佐剂,即它会加强抗原的免疫应答,尽管不总能完全明白加强的机理。另外,不总能完全明白抗原向固相载体吸附的机理和性质,这可能强烈地依赖于涉及的抗原的类型。但是,理论上,向氢氧化铝凝胶的吸附部分地涉及静电力。对于蛋白,认为磷酸化蛋白的磷酸基团也会与氢氧化铝凝胶相互作用,且可能在一定程度上替换凝胶结构中的氢氧化物基团。

[0004] 结果,吸附的程度随特定的目标蛋白的性质而变化。另外,在抗原是生物材料的提取物的形式时,例如草花粉变应原的提取物,该提取物会含有许多不同的离子和分子,潜在地干扰变应原向固相载体的结合。

[0005] 可以在包含下述步骤的体内方法中,测量免疫活性:将疫苗施用给实验动物,以产生针对抗原的抗体,收集生物样品,和分析样品,以检测产生的抗体的量。通过皮内注射致敏的动物,和通过测量 wheat 和潮红反应的程度范围,可以测试变应原活性和诱导变态反应的潜力 (Kildsgaard 等, Assessment of the in vivo allergenic potency of new allergy vaccines by intradermal testing in sensitised mice, Clinical Immunology and Allergy in Medicine, Proceedings of the 21<sup>st</sup> EAACI Congress 2002, Naples, Italy)。但是,这样的体内方法费力且费时,它们需要使用实验动物,这是不希望的。

[0006] SU-A-1 746 318 公开了定量确定蝉传脑炎疫苗制剂中的抗原的方法,其中抗原吸附在氢氧化铝上,该方法包含使疫苗制剂与过量的特定抗体的磷酸盐缓冲液反应,随后免疫酶促法确定上清液中的抗体的量。使用校准图来获得定量结果。

[0007] Chang 等 (Vaccine 19 (2001) 2884-2889) 公开了能检查溶菌酶向疫苗和间质液中的氢氧化铝凝胶的吸附程度的研究,和它对兔子的免疫应答的作用。用磷酸盐阴离子预处理了疫苗,生成具有 3-90% 吸附度的疫苗。发现在与间质液混合来模仿皮下给药后的 1 小时内,能表现出 3, 35 或 85% 吸附的疫苗的吸附度变成了 40%。根据该结果,抗-溶菌酶抗体反应与具有不同的吸附度的疫苗相同。

[0008] Shi 等 (Vaccine 20 (2002) 80-85) 公开了对间质液改变卵白蛋白向氢氧化铝佐剂的吸附度和溶菌酶向磷酸铝佐剂的吸附度的能力的研究。在 37°C 暴露于淋巴液后,卵白蛋白和溶菌酶几乎完全洗脱。淋巴液从磷酸铝佐剂洗脱溶菌酶的能力不会随疫苗的储存而变化。疫苗在 4°C 储存 11 周后,在暴露于淋巴液的过程中,仅仅洗脱了 60% 吸附到氢氧化铝上的卵白蛋白。

[0009] Iyer 等 (Vaccine 21 (2003) 1219-1223) 公开了下述发现,即卵白蛋白和去磷酸化

的  $\alpha$  酪蛋白会吸附到氢氧化铝疫苗中,但是在暴露于间质液时会被完全洗脱。然而,与蛋白溶液相比,该疫苗产生了免疫增强作用。相比之下, $\alpha$  酪蛋白会完全吸附到氢氧化铝上,在疫苗中和在暴露于间质液后均如此。还对  $\alpha$  酪蛋白观察到了氢氧化铝的免疫增强作用。该结果表明,抗原呈递细胞可以摄入从间质液脱附的抗原以及吸附到含铝佐剂上的抗原。

[0010] Katz 等 (Journal of Virological Methods, 25 (1989) 101-108) 公开了用于评估灭活的氢氧化铝佐剂化的病毒疫苗的抗原含量的 ELISA。称该 ELISA 用于补充体内测试。其它的体外方法包含放射免疫测定法和需要从氢氧化铝脱附抗原的方法。与这些体外方法不同,除了在高氢氧化铝浓度的情况下,该 ELISA 不会受到氢氧化铝的明显干扰。其中提到,以前尝试的完整疫苗的 ELISA 会受到氢氧化铝的极大抑制。该论文阐述了该 ELISA 如何有效的多种解释。在最后的一段中,提出了该方法可以适用于自成一类的氢氧化铝佐剂化的病毒疫苗。Thraenhart 等 (Journal of Biological Standardisation, (1989) 17, 291-309) 公开了通过检测狂犬病病毒糖蛋白进行狂犬病病毒疫苗的体外效价测试的 ELISA。研究了氢氧化铝对效价测量的影响,发现没有影响。

[0011] US-A-4 127 385 (Weeke) 描述了一种方法,它包括将粘附在铝胶上的马鬃和鳞屑的变应原提取物与来自变应性患者的血清相混合,以将血清的游离 IgE 结合到铝胶的变应原上,并随后加入放射性标记的抗-IgE,和测量放射性。其中指出,该方法可以用于确定粘附在铝胶上的变应原提取物的强度或储存寿命。这类现有的免疫测定法具有下述缺点,对变应原非特异性的抗体会以某种程度结合到铝胶-变应原上,并产生错误的测量。

[0012] 分子抗原向固相载体的吸附性质是非常复杂的,且很大程度上还不清楚,且根据抗原的化学和结构性质而在不同的抗原之间变化。另外,固相载体对抗原-特异性的 IgE 和结合到固相载体上的抗原之间的反应的影响是非常复杂的,且尚未完全清楚。因此,迄今为止,认为不可能体外测量现成的包含分子抗原的固相载体疫苗的免疫活性,包括变应原活性和诱导变态反应的潜力,或者至少不可能准确地测量它。因而,直到现在,在测量用于制备现成的固相载体疫苗的分子抗原溶液的免疫活性的基础上,体外评价疫苗的免疫活性已经成为了普通的实践。本发明的目的是,提供体外评价现成的固相载体分子抗原疫苗的免疫活性的方法。

[0013] 发明简述

[0014] 本发明实现了该目的,它涉及下面的方面:

[0015] 体外评价分子抗原和载体的混合物形式的疫苗制剂的免疫活性的方法,其中该混合物包含液相和固相,至少一部分抗原附着在该固相上,该方法包括下述步骤:

[0016] i) 对疫苗进行一种或多种选自下述的测量:

[0017] 1) 混合物的免疫活性,

[0018] 2) 液相中的抗原的免疫活性,

[0019] 3) 固相中的抗原的免疫活性,

[0020] 4) 处理混合物来从固相置换抗原后,液相中的抗原的免疫活性,和

[0021] 5) 处理混合物来从固相置换抗原后,固相中的抗原的免疫活性,

[0022] 其中免疫活性测量选自:a) 抗体结合能力,使用免疫测定法,后者采用结合到抗体固相上的抗原-特异性的抗体,b) 活化效应细胞的能力,和 c) 诱导过敏反应的潜力;和

[0023] ii) 使用测量结果,评价疫苗的免疫活性。

[0024] 制备抗原和固相载体的混合物形式的疫苗制剂的方法,其中该混合物包含液相和固相,至少一部分抗原附着在该固相上,该方法包括:

[0025] i) 混合抗原和载体,

[0026] ii) 使用评价根据本发明的疫苗制剂的免疫活性的方法,测量疫苗的免疫活性,和

[0027] iii) 重复步骤 i) 和 ii),直到得到理想的免疫活性。

[0028] 可以通过根据本发明的疫苗制剂的制备方法得到的疫苗。

[0029] 本发明是基于新的和意外的发现,即实际上可以使用例如常规的竞争性免疫测定法、组胺释放测定法和 T 细胞增殖测定法,对现成的固相载体(例如凝胶)疫苗进行免疫活性的测量,且固相载体不会阻止进行有效的和有意义的测量,所述的免疫活性包括变应原活性和诱导变态反应的潜力,特别是诱导过敏反应的潜力。更具体地,本发明是基于新的和意外的发现,即当将免疫活性测量为抗体结合能力时,通过使用结合在抗体固相上的抗体,可以避免固相载体对测量的干扰影响。认为其原因是,抗体固相能阻止抗体向抗原-固相载体系统的非特异性结合。该发现是意外的,因为可以适当地预期,结合到抗体固相上的抗体难以接触抗原-固相载体系统的抗原。同样的考虑适用于下述情形,其中将免疫活性测量为活化效应细胞的能力,其中抗原-特异性的抗体结合在效应细胞上,例如肥大细胞和嗜碱性粒细胞,它们类似于颗粒状的抗体固相。

[0030] 本发明另外基于下述认识,即通过下述方式可以消除抗原向固相载体吸附性质的复杂性和不确定性和一种类型的抗原区别于另一种类型的变异性的问题:1) 通过对比用相同类型的抗原的历史结果得到的测量结果,2) 通过将保藏的疫苗的测量结果与新鲜制备的疫苗的结果相关联,和/或 3) 通过测量疫苗的多种特征参数,包括抗原在液相和固相之间的分布和抗原向固相载体的吸附强度,得到疫苗的详细表征。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 显示了使用 Ph1 p 提取物溶液(Ph1 p)作为参照和使用 Bet v 提取物(Alutard Bv)作为阴性对照,吸附到氢氧化铝凝胶上的 Ph1 p 提取物(Alutard Ph1 p)抑制 IgE 与生物素化 Ph1 p 提取物结合的能力。

[0033] 图 2 显示了吸附到氢氧化铝凝胶佐剂上的 Ph1 p 提取物变应原形式的疫苗(疫苗 A)、沉降后疫苗 A 的上清液、和沉降后疫苗 A 的固相中的组胺释放水平。

[0034] 图 3 显示了吸附到氢氧化铝凝胶佐剂上的 Ph1 p 提取物变应原(+明矾)和溶液中的 Ph1 p 提取物变应原(-明矾)形式的疫苗的组胺释放水平。

[0035] 图 4 显示了使用 CD69 作为标记,4 种 Ph1 p 提取物铝凝胶,其上清液,2 种 Ph1 p 提取物溶液,和纯化的在溶液中的 Ph1 p1 和 Ph1 p5 的 T 细胞刺激。

[0036] 图 5-6 显示了变应原从分别包含变应原 Ph1 p1 和 Ph1 p5 的氢氧化铝凝胶疫苗(Alutard)中的置换(脱附)。

[0037] 发明详述

[0038] 抗原

[0039] 关于本发明,"抗原"指任意的免疫原性的物质,即任何能活化免疫系统的物质。

[0040] 关于本发明,"分子抗原"指单分子或单分子的混合物形式的任何物质,其中单分子可以是例如蛋白、碳水化合物、核苷酸和脂类,以及它们的类似物和衍生物。表述"分子抗原"不包括病毒和微生物细胞,例如细菌和真菌细胞。



[0041] 抗原可以特别选自变应原、药物、营养物和核苷酸,以及它们的类似物或衍生物。

[0042] 抗原的实例是变应原、类变应原、肽、半抗原、碳水化合物和肽核酸 (PNA, 一种合成的遗传模拟物), 以及它们的类似物或衍生物。营养物的实例是维生素、酶、痕量元素和痕量矿物质, 以及它们的类似物或衍生物。药物的实例是抗体、抗生素、肽、盐、激素、溶血剂、止血剂、酶、酶抑制剂、psycopharmica、麻醉剂和巴比妥酸盐, 以及它们的类似物或衍生物。

[0043] 在上下文中, 术语类似物或衍生物意在包括生物活性物质的修饰形式。通过化学修饰或合成修饰, 例如通过生物素化作用、脱氨基作用、maleination、一个或多个氨基酸的置换, 通过交联, 通过糖基化, 或通过其它的重组技术, 可以进行修饰。该术语也意在包括天然存在的突变、同种型和逆反类似物。

[0044] 抗原可以优选地选自:

[0045] 营养物, 象维生素例如维生素 B12, 维生素 B6, 维生素 A, 维生素 E, 维生素 D, 维生素 D3, 铁, 和叶酸;

[0046] 酶, 例如尿激酶, TPA (组织纤溶酶原激活物), 凝血因子 VIII, 和链激酶;

[0047] 免疫原性物质, 例如天然的、重组的或修饰的蛋白或其片段, 抗原, 变应原 (参见下面), 类变应原, 肽, 碳水化合物, 任选地灭活的或减毒的细菌或病毒的组分, RNA, DNA, PNA, 寄生物, 或毒素, 例如源自下述的:

[0048] 破伤风类毒素, 白喉类毒素, 霍乱毒素 A 和 B 亚基, 风疹, 棒状病毒 (狂犬病), 粘病毒, 副粘病毒象副流感病毒, 流行性腮腺炎和麻疹, 微小 RNA 病毒象脊髓灰质炎病毒, 柯萨奇病毒, 艾柯病毒和鼻病毒, 呼肠孤病毒, 痘病毒象天花病毒, 痘苗病毒和牛痘病毒, 乳多空病毒象多瘤病毒, 乳头瘤病毒和 SV-40, 腺病毒, EBV 象单核细胞增多症病毒, 细小病毒象 HPV B19, 疱疹病毒象单纯疱疹病毒, 和带状疱疹病毒 (水痘病毒), 巨细胞病毒 (CMV), 虫媒病毒象黄热病和登革热, 逆转录病毒象 HIV, 肝炎病毒象甲型肝炎, 乙型肝炎和丙型肝炎, 流感嗜血杆菌 B 型, 分枝杆菌属象结核分枝杆菌, 牛型分枝杆菌, 非洲分枝杆菌, 田鼠分枝杆菌, 鸟分枝杆菌, 胞内分枝杆菌, 坎沙西分枝杆菌, 戈登分支杆菌, 副结核分枝杆菌, 和鼠麻风分枝杆菌, 疏螺旋体属象布氏疏螺旋体, 尤其是广义的布氏疏螺旋体和狭义的布氏疏螺旋体, 嘎氏疏螺旋体, 阿氏疏螺旋体, 达氏疏螺旋体和回归热疏螺旋体, 百日咳杆菌 (百日咳), 沙门氏菌属象鼠伤寒沙门氏菌和伤寒沙门氏菌, 密螺旋体属象苍白密螺旋体, 钩端螺旋体属, 弯曲菌属象空肠弯曲菌, 螺杆菌属象幽门螺杆菌, 假单胞菌属, 军团菌属, 奈瑟氏菌属象淋病奈瑟氏菌和脑膜炎奈瑟氏菌, 衣原体属象沙眼衣原体, 肺炎衣原体和鹦鹉热衣原体, 肠杆菌属, 克雷伯菌属, 耶尔森菌属, 弧菌属象霍乱弧菌, 加德纳氏菌属, 立克次氏体属, 梭状芽胞杆菌属象艰难梭菌, 肉毒梭菌和破伤风梭菌, 乳杆菌属, 李斯特菌属, 和支原体属象肺炎支原体人支原体, 恶性疟原虫, 和杜氏利什曼原虫,

[0049] 霉菌和真菌, 例如枝孢属, 链格孢属, 曲霉属, 担子菌纲, 白色念珠菌, 和青霉菌属,

[0050] 类变应原, 例如戊二醛修饰的变应原复合物;

[0051] 药物, 例如  $\beta$ -内酰胺例如青霉素, 含有磺胺的制剂, 酶, 酶抑制剂例如乙酰胆碱酯酶抑制剂, 激素例如 LHRH, 雌激素, 胰岛素和人生长激素, 溶血剂 / 止血剂例如肝素, 和促红细胞生成素  $\alpha$  或  $\beta$ , psycopharmica 例如锂, 麻醉剂例如吗啡, 和巴比妥酸盐;

[0052] 遗传物质, 例如 DNA, RNA, 和 PNA;

[0053] 其它药物, 象与癌症有关的化合物, 例如 TNF  $\alpha$ , LHRH 类似物, 细胞抑制药, 和抗癌

抗体,例如针对乳腺癌细胞的抗体,例如针对 HER-2 受体,针对结肠癌细胞和 B 细胞淋巴瘤细胞的抗体,例如针对恶性 B 细胞上的 CD20 的抗体;

[0054] 其它化合物,例如糖,甘露聚糖和凝集素;

[0055] 以及它们的类似物或衍生物。

[0056] 在本发明的一个优选的实施方案中,抗原是变应原。在本发明的一个优选的实施方案中,变应原是已经报道能依赖它们重复地暴露于个体来诱导变态反应(即 IgE 介导的反应)的任何天然存在的蛋白。天然存在的变应原的实例包括花粉变应原(树-,草本植物,野草-,和草花粉变应原),昆虫变应原(吸入剂,唾液和毒液变应原,例如螨变应原,蟑螂和蠓变应原,hymenoptera 毒液变应原),动物毛发和皮屑变应原(来自例如狗,猫,马,大鼠,小鼠等),和食物变应原。重要的来自树、草和草本植物的花粉变应原源自:山毛榉目, Oleales, 松目和悬铃木科的分目,特别包括桦树(桦属),桤木(桤木属),榛子(榛属),角树(鹅耳枥属)和橄榄(橄榄属),雪松(柳杉和桧属),法国梧桐(法国梧桐属);Poales 目,特别包括黑麦草属、梯牧草属、早熟禾属、狗牙根属、鸭茅属、绒毛草属、藜草属、黑麦属和高粱属的草;Asterales 和 Urticales 目,特别包括豚草属、艾属和墙草属的草本植物。其它重要的吸入变应原是来自己表皮螨属和 Euroglyphus 的屋尘螨,储存螨例如 Lepidoglyphus、甜食螨属和食酪螨属的那些;来自蟑螂、蠓和跳蚤的那些,例如小蠊属,大蠊属,摇蚊属和 Ctenocephalides;和来自哺乳动物的那些,例如猫,狗和马,毒液变应原,包括源自针刺或叮咬昆虫的那些,例如来自膜翅目昆虫分类目的那些,包括蜜蜂(超家族蜜蜂科),黄蜂(超家族黄蜂科),和蚂蚁(超家族蚂蚁科)。重要的来自真菌的吸入变应原特别是源自链格孢属和枝孢属的那些。

[0057] 在本发明的一个更优选的实施方案中,变应原是 Bet v 1, Aln g1, Cor a 1 和 Car b 1, Que a 1, Cry j 1, Cry j 2, Cup a 1, Cups 1, Jun a 1, Jun a 2, Jun a 3, Ole e 1, Lig v 1, Pla l 1, Plaa 2, Amb a 1, Amb a 2, Amb t 5, Art v 1, Art v 2 Par j 1, Par j 2, Par j 3, Sal k 1, Ave e 1, Cyn d 1, Cyn d 7, Dac g 1, Fesp 1, Hol l 1, Lol p 1 和 5, Pha a 1, Pas n 1, Phl p 1, Phl p 5, Phl p 6, Poa p 1, Poa p 5, Sec c 1, Sec c 5, Sor h 1, Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Der p 7, Der m 1, Eur m 2, Gly d1, Lep d 2, Blo t 1, Tyr p 2, Bla g 1, Bla g 2, Per a 1, Feld 1, Can f 1, Can f 2, Bos d 2, Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Musm 1, Rat n 1, Apis m 1, Api m 2, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 5, Dolm 1, Dil m 2, Dol m 5, Pol a 1, Pol a 2, Pol a 5, Sol i 1, Soli 2, Sol i 3 和 Sol i 4, Alt a 1, Cla h 1, Asp f 1, Bos d 4, Mald 1, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Arah 4, Ara h 5 或它们中的任一个的分子育种的改组(shufflant)杂合体。

[0058] 在本发明的最更优选的实施方案中,变应原是草花粉变应原或尘螨变应原或豚草变应原或雪松花粉或猫变应原或桦树变应原。

[0059] 在本发明的另一个实施方案中,疫苗包含至少 2 种不同种类的变应原,其源自相同的变应原来源或源自不同的变应原来源,例如草组 1 和草组 5 变应原或螨组 1 和组 2 变应原,它们分别来自不同的螨和草种类,杂草抗原象短的和巨大的豚草变应原,不同的真菌变应原象链格孢属和枝孢属,树变应原象桦树,榛子,角树,橡树和桤木变应原,食物变应原象花生,大豆和牛奶变应原。

[0060] 掺入疫苗中的变应原可以是下述形式：提取物，纯化的变应原，修饰的变应原，重组的变应原或重组的变应原的突变体。变应原提取物可以天然地含有同一变应原的一个或多个同种型，而重组的变应原典型地仅代表变应原的一个同种型。在一个优选的实施方案中，变应原是提取物的形式。优选地，测量提取物的两种或多种主要的和 / 或次要的变应原的免疫活性。另外，还可测量总提取物的免疫活性。

[0061] 在另一个优选的实施方案中，变应原是重组的变应原。在另一个优选的实施方案中，变应原是天然存在的低 IgE- 结合突变体或重组的低 IgE- 结合突变体。

[0062] 变应原可以以等摩尔量存在，或者变应原存在的比例可以是在 1 : 1 至 1 : 40、优选 1 : 1 至 1 : 20、更优选 1 : 1 至 1 : 10 的范围内。

[0063] 在本发明的另一个实施方案中，低 IgE 结合变应原是根据 W099/47680 或 W002/40676 的变应原和在 ALK-Abe116A/S 的尚未公开的专利申请“*Allergen mutants*”中的变应原。

[0064] 固相载体

[0065] 固相载体可以是能与抗原形成共价的和 / 或非共价的附着的任何水不溶的物质，其中非共价的附着包括例如粘附、包含、包封和偶联。

[0066] 载体可以是凝胶形成剂，包括含氧的金属盐和包封剂，脂质体，水包油乳状液和 ISCOM，优选含氧的金属盐。

[0067] 优选地，载体是佐剂。

[0068] 合适的含氧的金属盐的实例是例如这样的，其中阳离子选自 Al, K, Ca, Mg, Zn, Ba, Na, Li, B, Be, Fe, Si, Co, Cu, Ni, Ag, Au, 和 Cr。

[0069] 含氧化合物的阴离子可以有机的或无机的阴离子，有机的和无机的阴离子的组合。合适的含氧的金属盐的实例是例如这样的，其中阴离子选自硫酸盐，氢氧化物，磷酸盐，硝酸盐，碘酸盐，溴酸盐，碳酸盐，水合物，醋酸盐，柠檬酸盐，草酸盐和酒石酸盐，以及它们的混合形式。含氧的金属盐还包含配位络合物。配位络合物的定义参见例如 *The Handbook of Chemistry and Physics* 第 56 版，B 部分，第 7 章 (1975-76)。

[0070] 在上下文中，表述“混合形式”意在包括各种阴离子的组合以及与例如氯化物和硫化物的组合。

[0071] 尽管输送系统包含含氧的金属盐，预期氧可以被另一 VIA 组原子例如 S, Se 或 Te 替代。

[0072] 要根据本发明使用的含氧的金属盐可以是任何含氧的金属盐，当配制进粘膜输送系统中时，其能提供理想的作用。这样的含氧物质的实例是氢氧化铝，磷酸铝，硫酸铝，硫酸铝钾，磷酸钙，Maa1ox (氢氧化铝和氢氧化镁的混合物)，氢氧化铍，氢氧化锌，碳酸锌，氯化锌和硫酸钡。优选的含氧的金属盐是氢氧化铝，磷酸铝和磷酸钙。

[0073] 派尔集合淋巴结是位于小肠、大肠和阑尾的壁中的淋巴结的集合，且是身体抵抗感染剂和其它对身体而言外来的物质的粘附和穿透的重要部分。派尔集合淋巴结也称作集合淋巴滤泡 (folliculi lymphaticaggregati)。在呼吸道、直肠、鼻腔、口腔、咽、泌尿生殖道、大肠和身体的其它粘膜组织中，可以发现类似的集合淋巴滤泡。所述的组织可以总称为与粘膜相关淋巴样组织 (MALT)。

[0074] 已经证实，派尔集合淋巴结和 MALT 可以有效地摄入配制成具有适当大小和合适

的物理化学性质的微胶囊的药学活性物质。

[0075] 微胶囊的应用,包含保护药物活性物质免受降解的优点,这不但在剂型的生产和保藏过程中,还在给患者施用活性物质的过程中。当活性物质是变应原时,这是特别重要的。使用微囊化来保护敏感的生物活性物质免受降解,已经成为众所周知的。典型地,将生物活性物质包封在众多保护壁材料中的任一种中,通常本质上是聚合物。要包封的试剂可以包有聚合材料的单层壁(微胶囊),或者可以均匀地分散在聚合基质中(微球)。(此后,术语“微胶囊”指微胶囊和微球,术语“包封”和“微囊化”应当相应理解)。根据需要,可以改变微胶囊内的物质的量,从较小的量至高达微胶囊组成的95%或更多。微胶囊的直径优选地小于 $20\mu\text{m}$ ,更优选地小于 $15\mu\text{m}$ ,更优选地小于 $10\mu\text{m}$ ,最优选地为 $1-10\mu\text{m}$ 。

[0076] 包封剂可以是任意的可生物降解的试剂,优选聚合的试剂。优选地,第一种包封剂选自聚丙交酯,聚丙交酯-聚(乙二醇),聚(DL-丙交酯-共聚-乙交酯),聚(乙交酯),共聚草酸酯,聚己酸内酯,聚(丙交酯-共聚-己内酯),聚(酰胺酯,聚原酸酯和聚(8-羟丁酸),和聚酐,最优选聚(DL-丙交酯-共聚-乙交酯)。包封剂的其它实例是聚(丁基-2-氰基丙烯酸酯),聚(3-羟基丁酸酯)和富马酸和癸二酸的聚酐共聚物,聚(FA:SA)。另外,合适的根据本发明使用的包封剂包括源自动物或植物蛋白的那些,例如明胶,糊精和大豆,小麦和欧车前子蛋白;树胶例如阿拉伯胶,瓜尔豆胶,琼脂和黄原胶;多糖;淀粉和改性淀粉,alignates;羧甲基纤维素;角叉菜胶;葡聚糖;果胶;合成的聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;和多肽/蛋白或多糖复合物例如明胶-阿拉伯胶复合物。在本发明的一个实施方案中,使用了两种或多种包封剂。优选地,选择包封剂,使微粒成为疏水的。认为疏水的微粒能更容易地被MALT摄入,或者通过MALT引起它的作用。

[0077] 水包油乳状液的实例是MF59,它是水包角鲨烯的乳状液。

[0078] 脂质体是球形泡囊的水性悬浮液,所述的泡囊是以双层结构组织的磷脂。脂质体一般由磷脂和胆固醇组成。可以使用任意的磷脂来制备脂质体疫苗。合适的磷脂的一个实例是二棕榈酰基磷脂酰胆碱。脂质体疫苗组合物实例是二棕榈酰基磷脂酰胆碱,胆固醇,二乙酰磷酸酯和抗原。根据大小和性质,将脂质体分成:小型单层囊泡型脂质体(SUV),大型单层囊泡型脂质体(LUV),LUV/反相蒸发(REV),挤出的大型单层囊泡型脂质体(LUVET),多层脂质体(MLV),冷冻和融化多层脂质体(FT-MLV),稳定的pluerilamellar囊泡型脂质体(SPLV)。

[0079] 皂苷是称作ISCOM(免疫刺激复合物)的众多脂类混合物的活性组分。皂苷是源自Quilaja saponaria树的树皮的甾醇和三萜类糖苷。ISCOM的实例是Quil A和Qs-21。

[0080] 从固相置换抗原

[0081] 在本发明的一个实施方案中,置换处理包括使混合物接触含蛋白的试剂。认为置换潜势随着蛋白的电化学电荷的增加而增加,因而带电的蛋白是优选的。可以使用任意的蛋白来从固相载体中置换出抗原。优选的含蛋白的试剂是体液,例如淋巴液、间质液、血浆、血清、体液的纯化的级分,和从体液分离出的蛋白,例如人血清白蛋白(HAS)。优选地,体液是血清。使用体液来从固相载体置换抗原,可以模拟体内条件,该条件是给药后疫苗要经历的。

[0082] 在第二个实施方案中,置换处理包括使混合物接触阴离子,例如磷酸盐离子,柠檬酸盐离子,乳酸盐离子,醋酸盐离子,硫酸盐离子,硼酸盐离子和草酸盐离子,优选磷酸盐离

子。

[0083] 优选地,在4-10、更优选5-9和最优选6-8的pH,进行置换。优选地,在32°C -42°C、更优选35°C -39°C和最优选36°C -38°C的温度,进行置换。

[0084] 抗体结合能力的测量

[0085] 关于本发明,表述“抗体结合能力”指在疫苗中可以用于抗体结合的B细胞表位的水平。使用任意的合适的方法或能进行这样的测量的免疫测定法,可以测量疫苗制剂的抗体结合能力,其中抗体结合在抗体固相上。合适类型的测定法包括:1)测定法,其中待测抗原被动地附着在固相上,和2)测定法,其中待测抗原被偶联在固相上的第一种抗原-特异性的抗体捕获。对于这2种类型1)和2)测定法,附着在固相上的抗原可以:a)与第二种抗原-特异性的抗体反应,或b)与修饰的抗原反应。

[0086] 当使用选项a)时,i)第二种抗原-特异性的抗体可以是标记的(直接测定),或ii)它可以与标记的抗-抗体反应,所述的抗-抗体对第二种抗原-特异性的抗体是特异性的(间接测定)。当使用选项b)时,修饰的抗原可以是标记的,或者适于与标记偶联,例如通过连接物系统。这样的连接物系统的一个实例是生物素-抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白系统。

[0087] 标记可以是在免疫测定中常用的任何合适的标记系统,包括产色标记、发光标记、化学发光标记、酶标记、放射性标记、荧光标记和吸收标记,优选化学发光标记。

[0088] 在本发明的一个优选的实施方案中,(iv)标记化合物是化学发光的化合物,其共价地连接到抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其功能衍生物上。

[0089] 化学发光的标记优选地是吡啶化合物,例如二甲基吡啶酯(DMAE)。

[0090] 第一种和第二种抗原-特异性的抗体和抗-抗体都可以相互独立地是单克隆的或多克隆的。

[0091] 类型2)a)的测定法一般称作夹心测定法或双位测定法。当在加入修饰的抗原之前允许待测抗原连接到固相上时,类型b)的测定法一般称作抑制测定法。当在连接到固相上之前混合待测抗原和修饰的抗原时,类型b)的测定法一般称作竞争测定法。

[0092] 在本发明的一个优选的实施方案中,免疫测定法是竞争测定法或抑制测定法,优选竞争测定法。

[0093] 在一个优选类型的竞争免疫测定法中,根据含有抗原的疫苗抑制标准化的生物素化的抗原和抗原-特异性的IgE之间的结合的程度,测量疫苗的免疫活性。该免疫测定法包括下述步骤:1)混合含有抗原的疫苗制剂和生物素化的抗原,形成抗原混合物,2)将抗原混合物和偶联到抗体固相(例如颗粒载体,例如顺磁颗粒)上的抗原-特异性的IgE一起温育,形成免疫复合物,和3)任选地洗涤,随后将免疫复合物与用吡啶酯标记的链霉抗生物素蛋白一起温育,和4)洗涤,随后测量发出的光的量。使用例如ADVIA Centaur(Bayer),可以进行该免疫测定法。

[0094] 合适的免疫测定法的实例是基于ELISA的测定法和RAST。

[0095] 在用于实现本发明方法的另一个合适的免疫测定法中,1)使定量的抗原-特异性的抗体与待测的抗原疫苗反应,2)在得到的反应混合物中,将液相与固相分离,和3)测量液相中的未结合的抗体的剩余量。使用用于定量抗体的任意的常规方法,可以测量液相中的抗体。在该免疫测定法的变体中,在测量未结合的抗体之前,液相未与固相分离。

[0096] 在免疫测定法中使用的或检测的抗体的类型,决定了测量的表位的类型。因而,根据使用的或检测的抗体的类型,例如 IgA, IgE, IgG 和 IgM,可以选择性地分别测量 IgA, IgE, IgG 和 IgM 表位。在本发明的一个优选的实施方案中,使用的或检测的抗体选自 IgA, IgE, IgG, IgM 和其组合。在本发明的一个具体的实施方案中,使用的或检测的抗体是 IgE 和 IgG 两者。在本发明的一个优选的实施方案中,使用的或检测的抗体是 IgE。

[0097] 抗体固相

[0098] 抗体固相可以是在免疫测定法常用的任意固相,包括微量滴定板和颗粒,例如顺磁颗粒。

[0099] 测量活化效应细胞的能力

[0100] 在本发明的方法的一个优选的实施方案中,将免疫活性测量为活化免疫系统的效应细胞的能力。

[0101] 在本发明的一个实施方案中,将全血用于效应细胞的活化。在第二个实施方案中,效应细胞是从生物样品分离的细胞。在第三个实施方案中,效应细胞是从生物样品分离并培养的细胞。在第四个实施方案中,效应细胞是从生物样品分离、培养和修饰(例如遗传修饰)的细胞。

[0102] 优选地,效应细胞选自肥大细胞,嗜碱性粒细胞,嗜酸性粒细胞, T 细胞, B 细胞和抗原呈递细胞(APC),和其组合。其它优选的效应细胞是修饰的效应细胞,即源自效应细胞且至少具有效应细胞的一些特征的细胞,包括遗传修饰的细胞和恶性转化的细胞。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,通过测量效应细胞标志物的水平,测量效应细胞活化能力。标志物优选地选自分泌性分子、表面分子和细胞内分子。优选地,分泌性分子选自介质,细胞因子,细胞毒性蛋白和可溶性受体。

[0104] 待测介质的实例是选自下述的介质:组胺,白三烯(LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> 和 LTE<sub>4</sub>),前列腺素(PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> 和 PGF<sub>2a</sub>),血栓素,血小板活化因子(PAF),主要碱性蛋白(MBP), ECF, ECP, EDN, EPO, 缓激肽,腺苷, P 物质,神经激肽 A,补体因子(例如 C3d),包括补体片段;5-羟色胺,氧自由基,颗粒体蛋白(basogranulin),和肥大细胞和嗜碱性粒细胞蛋白酶,包括类胰蛋白酶,糜蛋白酶,羧肽酶和组织蛋白酶。

[0105] 待测细胞因子的实例是选自下述的细胞因子:白细胞介素(IL-1 至 IL-27),造血生长因子,粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(例如 GM-CSF),干扰素(IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ ),肿瘤坏死因子(TNF)相关的分子(TNF 和淋巴毒素), Ig 超家族成员(IL-1), TGF- $\beta$  家族和趋化因子(IL-8, RANTES 和其它的)。用于测量下述的细胞因子的测定法是广为人知的:IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 。

[0106] 待测的细胞毒性蛋白的实例是选自下述的细胞毒性蛋白:嗜曙红细胞阳离子蛋白(ECP),主要碱性蛋白(MBP)和 EDN。

[0107] 优选地,表面分子选自表面受体和粘附分子,例如选择蛋白,整联蛋白和免疫球蛋白超家族(ICAM-1, VCAM-1), VLA4, CD11B, CD11C, CD18 和  $\alpha$ -d。已知在效应细胞中受到抗原活化而上调或下调的表面分子是 CD23, CD69, CD203C(I-NPP3), CD31, CD162 和 CD162L。其它的表面分子包括颗粒体蛋白。

[0108] 优选地,效应细胞标志物是组胺,类胰蛋白酶,颗粒体蛋白,白三烯 LTC<sub>4</sub>, CD63, CD69 和 CD203C。例如,可以在待测组胺和它的酶缀合物之间的竞争的基础上,在基于 ELISA

的方法中,测量组胺,所述组胺的酶缀合物组胺-碱性磷酸酶用作向包被在微孔上的抗体结合的示踪剂。单胺组胺太小,不能完全占据抗体上的结合位点。因此,已经得到了针对修饰的组胺的高亲和力单克隆抗体。必须以与缀合物的组胺相同的方式,衍生样品中的组胺。在弱碱性的 pH 下,使用酰化剂,可以容易地和可再现地实现该目的。当加入微量滴定孔中时,样品中的酰化的组胺和组胺-碱性磷酸酶缀合物会竞争结合有限数目的抗体位点。温育后,冲洗孔,以去除未结合的组分。然后,通过加入发色底物(pNPP),测量结合的酶活性。颜色的强度相反地取决于样品中的组胺浓度。在用标准物得到的标准曲线的基础上,可以计算出浓度。使用可以从"IMMUNOTECH"(Marseille, France)得到的试剂盒,可以实现该酶免疫测定法。

[0109] 在本发明的第二个实施方案中,通过测量 T 细胞增殖,测量了效应细胞活化能力。通过基于 <sup>3</sup>H-胸苷掺入的方法或荧光标记的减少,可以测量 T 细胞增殖,使用从致敏的对象的血液新鲜分离的白细胞,或使用建立的变应原-特异性的 T-细胞系,可以进行测量。另外,通过 ELISA 或基于珠子的方法,通过分析细胞上清液,可以研究活化的细胞的细胞因子生产。

[0110] 通过流式细胞仪分析 T-细胞表达不同表面受体,例如 CD25,26,27,39,45 RA/0,69,70,96,97,108,109,134(OX40),153,154(OX40L),166,178(FasL),183(CXCR3),212(IL-12Rb1),223,它们在 T-细胞活化过程中的不同时间点受到上调或下调,可以研究 T-细胞活化的早期事件。

[0111] 通过抗原呈递细胞(APC)的分化和活化阶段,可以影响 T-细胞的活化,前者可以通过流式细胞仪分析下面的表面分子进行研究:CD14,25,26,40,80/86,83,105,166。

[0112] 最后,通过 CD25,26,39,80/86,97,126,138 的表面表达和不同的抗体同种型的表面表达以及分泌,可以描述疫苗对 B-细胞活化的免疫作用。作为一个另外的替代方案,通过 Taqman 分析、基因芯片分析或进行基因表达的定量的其它方法,可以在 mRNA 水平研究大多数上述参数。

[0113] 测量诱导过敏反应的潜力

[0114] 疫苗的施用,包含某种程度的会引起 IgE 介导的副作用例如过敏反应的风险。在本发明的方法的一个具体的方面,将疫苗制剂的免疫活性测量为诱导过敏反应的潜力。优选地,通过测量效应细胞过敏反应标志物的水平,测量了诱导过敏反应的潜力,所述的标志物选自上述的效应细胞标志物。优选地,效应细胞过敏反应标志物是组胺,类胰蛋白酶,颗粒体蛋白,白三烯 LTC<sub>4</sub>, CD63, CD69 和 CD203C。组胺由肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放。通过例如上述的基于 ELISA 的方法,可以测量组胺。另外,使用基于玻璃纤维的测定法,可以测量组胺。

[0115] 在本发明该方面的一个优选的实施方案中,测量了在全血中诱导过敏反应的潜力。优选地,在测量之前,用于测量的全血已经从对象中抽出最多 5 小时、更优选地 2 小时。

[0116] 优选地,与计算的体内比率相对应的比率混合疫苗和全血,所述的体内比率会作为将疫苗剂量偶然意外施用到对象血流中的结果而在对象中发生。另外,优选地,使用调节至体温的全血。

[0117] 在本发明的一个替代实施方案中,测量了诱导过敏反应的潜力:1) 在从生物样品分离的效应细胞中,2) 在从生物样品分离和培养的效应细胞中,或 3) 在从生物样品分离、

培养和修饰的的效应细胞中,例如遗传修饰的。

[0118] 优选地,效应细胞选自肥大细胞,嗜碱性粒细胞,嗜酸性粒细胞, T 细胞, B 细胞和抗原呈递细胞 (APC), 和其组合。其它优选的效应细胞是修饰的效应细胞,即源自效应细胞且至少具有它的一些特征的细胞,包括遗传修饰的细胞和恶性转化的细胞。遗传修饰的细胞可以是例如经遗传修饰以表达一种或多种蛋白的细胞,所述的蛋白在天然细胞中不表达,包括胞内蛋白和表面蛋白,例如受体蛋白。恶性转化的细胞可以是例如癌细胞系,例如能在没有刺激的情况下连续体外生长的癌细胞。

[0119] 免疫活性测量 1)-5)

[0120] 在本发明的一个实施方案中,对疫苗仅仅测量了液相和固相的混合物的免疫活性(测量 1))。

[0121] 在本发明的第二个实施方案中,对疫苗仅仅测量了在处理混合物从固相置换抗原后,液相中的抗原的免疫活性(测量 4))。

[0122] 在本发明的第三个实施方案中,对疫苗测量了液相和固相的混合物的免疫活性(测量 1)),和测量了液相中的抗原的免疫活性(测量 2))。

[0123] 在本发明的第四个实施方案中,对疫苗测量了液相中的抗原的免疫活性(测量 2)),和测量了固相中的抗原的免疫活性(测量 3))。

[0124] 在本发明的第五个实施方案中,对疫苗测量了液相和固相的混合物的免疫活性(测量 1)),和测量了在处理混合物从固相置换抗原后液相中的抗原的免疫活性(测量 4))。

[0125] 疫苗的免疫活性的评价

[0126] 本发明的方法的一个优选的实施方案是这样的,其中测量了用于制备疫苗的含有抗原的中间产物的免疫活性,包括变应原活性和诱导变态反应的潜力,例如诱导过敏反应的潜力,其中疫苗的免疫活性的评价是基于对比由中间产物得到的测量结果和由测量 1)-5) 中的一项或多项得到的测量结果。优选地,在制备后立即测量疫苗。

[0127] 本发明的另一个优选的实施方案是这样的,其中在制备后立即测量疫苗,并在储存一个或多个时期后测量疫苗,其中疫苗的免疫活性的评价是基于对比前后测量结果。

[0128] 本发明的另一个优选的实施方案是这样的,其中疫苗的免疫活性的评价是基于对比疫苗的测量结果和以前由相同类型的疫苗或其它类型的疫苗获得的相应测量结果。

[0129] 疫苗

[0130] 进行本发明的方法的疫苗制剂可以是任意的现成的制剂,它是抗原和固相载体的混合物的形式,其中该混合物包含液相和固相,一部分抗原附着在该固相上,或用于制备现成的制剂的任何这样的制剂。

[0131] 现成的制剂可以用于肠胃外施用和粘膜施用。

[0132] 肠胃外施用包括静脉内的、肌肉内的、关节内的、皮下的、真皮内的、表皮的 / 透皮的和腹膜内的施用。可以配制经注射给药的疫苗,以适用于通过针头注射或无针注射。

[0133] 粘膜施用包括经口的、鼻的、阴道的、舌下的、眼的、直肠的、尿的 (urinal)、乳腺内的、肺的、耳的 (即通过耳朵) 或口含的施用。

[0134] 疫苗可以是喷雾剂、气雾剂、混合物、悬浮液、分散系、乳状液、凝胶、糊剂、糖浆剂、乳剂、软膏剂、植入物 (耳朵,眼睛,皮肤,鼻子,直肠和阴道)、乳腺内的制剂、阴道栓剂 (vagitories)、栓剂或 uteritories 的形式。



[0135] 制备疫苗的方法

[0136] 本发明还涉及制备抗原和固相载体的混合物形式的疫苗制剂的方法,其中该混合物包含液相和固相,至少一部分抗原附着在该固相上,该方法包括:

[0137] i) 混合抗原和载体,

[0138] ii) 使用根据权利要求 1-49 中的任一项的方法,测量疫苗的免疫活性,和

[0139] iii) 任选地重复步骤 i) 和 ii),直到得到理想的免疫活性。

[0140] 另外,本发明涉及疫苗制剂,它可以通过根据本发明的疫苗制剂的制备方法得到。

[0141] 定义

[0142] 表述“体外方法”指无需免疫实验动物即可实现的方法。

[0143] 表述“免疫活性”免疫系统的任何反应,包括变应原活性和诱导变态反应的潜力,包括诱导过敏反应的潜力。

[0144] 表述“变应原活性”指 IgE 结合活性。

[0145] 表述“固相载体”指能与抗原形成共价的和 / 或非共价的附着的任何水不溶的物质,其中非共价的附着包括例如粘附、包合、包封和偶联。

[0146] 表述疫苗的“固相”和“液相”指由将固相载体在液体中的悬浮液分离成固相和液相的分离过程得到的相,该分离过程是例如离心、提取或简单的沉降。

[0147] 表述“附着”指任何共价的和 / 或非共价的结合,其中非共价的结合包括例如粘附、包合、包封和偶联。

[0148] 方法和材料

[0149] 铝凝胶佐剂变应原疫苗的制备

[0150] 将冻干的变应原溶解在水性缓冲液中,并稀释至需要的浓度。在搅拌下,将“铝胶”(1,3%)加入得到的变应原溶液中,然后加入无菌水。使得到的溶液静置至次日,然后在搅拌下缓慢地加入缓冲液,生成最终的变应原氢氧化铝凝胶。

[0151] 实施例

[0152] 实施例 1

[0153] 关于溶液中的变应原和吸附在氢氧化铝凝胶佐剂上的变应原的 IgE 抑制试验

[0154] 方法

[0155] 在 ADVIA centaur 装置上,进行了 IgE 抑制试验。将抑制剂(在溶液中的抗原或抗原凝胶佐剂疫苗)的系列稀释(用 TECAN(P-05-07F294)进行)与固定量的生物素化的抗原一起混合,再与固相吸附的 IgE 一起温育。根据在与吡啶酯标记的链霉抗生物素蛋白一起温育后发射出的光,估计结合到固相上的生物素化变应原的量。在 Excel 中处理原始数据,并转移到 GraphPad Prism v. 4.0 中,进行最后的分析(曲线拟合,绘图和统计对比)。使数据拟合一个 4 参数的对数函数(方程 1):

$$[0156] \quad Y = B + \frac{T - B}{1 + 10^{(\log_{10} EC50 - \log_{10} X) \cdot HillSlope}} \quad (1)$$

[0157] 并且,如果各拟合的 HillSlope (HS) 没有显著差异,则认为拟合的曲线是平行的。从受共同 HS 估计约束的拟合,估计了 EC50。EC50 表示产生 50%抑制时的浓度。

[0158] 结果

[0159] 使用上述的 IgE 抑制试验,测试了 Ph1 p 变应原和 Bet v 变应原凝胶佐剂疫苗的

免疫活性。结果如图 1 所示。

[0160] 图 1 显示了吸附在氢氧化铝凝胶上的 Ph1 p 提取物 (Alutard Ph1p) 抑制 IgE 向生物素化 Ph1 p 提取物结合的能力,使用 Ph1 p 提取物溶液 (Ph1 p) 作为参照,使用 Betv 提取物 (Alutard Bv) 作为阴性对照。

[0161] 在溶液中的变应原提取物是用于制备凝胶佐剂疫苗的提取物,并用于对比目的。

[0162] 从图 1 可以得到下面的结论:由于 Ph1 p 提取物凝胶的最大抑制潜力对应着 Ph1 p 提取物溶液的最大抑制潜力,可以认为本发明的 IgE 抑制免疫测定法能测量 Ph1 p 提取物凝胶的免疫活性的特异性的全部水平和全部范围。阴性对照 Bet v 提取物凝胶未显示出抑制活性。

[0163] 如从图 1 可以看出的,变应原凝胶疫苗的抑制曲线稍微向右偏移,偏移的曲线的线路与变应原溶液的线路平行。这意味着,需要更高浓度的凝胶配制的变应原,才能得到相同的抑制程度。

[0164] 实施例 2

[0165] 吸附在氢氧化铝凝胶佐剂上的变应原的组胺释放试验

[0166] 方法

[0167] 在待测组胺和它的酶缀合物之间的竞争的基础上,在基于 ELISA 的方法中,测量了组胺,所述酶缀合物组胺-碱性磷酸酶用作向包被在微孔上的抗体结合的示踪剂。单胺组胺太小,不能完全占据抗体上的结合位点。因此,已经得到了针对修饰的组胺的高亲和力单克隆抗体。必须以与缀合物的组胺相同的方式,衍生样品中的组胺。在弱碱性的 pH 下,使用酰化剂,可以容易地和可再现地实现该目的。当加入微量滴定孔中时,样品中的酰化的组胺和组胺-碱性磷酸酶缀合物会竞争结合有限数目的抗体位点。温育后,冲洗孔,以去除未结合的组分。然后,通过加入发色底物 (pNPP),测量了结合的酶活性。颜色的强度相反地取决于样品中的组胺浓度。在用标准物得到的标准曲线的基础上,可以计算出浓度。使用可以从 "IMMUNOTECH" (Marseille, France) 得到的试剂盒,可以实现该酶免疫测定法。

[0168] 目的:

[0169] 在类似于偶然意外将疫苗施用到血流中的情况下的体内条件的条件下,用氢氧化铝配制的变应原的组胺释放。通过测量在未稀释的加入了疫苗的全血中的组胺释放,可以实现该目的。刺激后,将细胞旋转沉下来,分离出含有组胺的上清液。然后,使用 Immunotech ELISA 试剂盒 2015,测量了组胺浓度。

[0170] 试剂和材料:

[0171] Pipes 缓冲液 pH7.4 BB LAB97350

[0172] 14ml Falcon PP 试管

[0173] Venojekt 肝素稳定化的血液玻璃 VT-100SH

[0174] PP 聚丙烯圆底培养试管 :Elkay 12×75mm

[0175] 0002053001

[0176] PP 塞子

[0177] Immunotech ELISA 试剂盒 2015

[0178] ELISA 洗涤器 ELP-40

[0179] ELISA 读数器 EL-340,配有 KC4 程序

- [0180] 具有用于平板的转子的离心机:Sigma 3-15
- [0181] 培养箱 37°C
- [0182] Coca 0.5%
- [0183] 摇床 Titramax 1000
- [0184] 各种单-、8- 和 12- 通道吸移管
- [0185] 释放:
- [0186] 将肝素稳定化的全血预热至 37°C。在 Coca 缓冲液中,以 1 : 200 稀释各种疫苗和对照品的等分试样。将 2  $\mu$  l 吸入 Falcon 试管中,以 1 : 500 稀释在新鲜抽取的未稀释的全血中。在 37°C 温育 30 分钟。
- [0187] 离心:
- [0188] 在 800  $\times$  g 离心试管 10 分钟。收集上清液,使用组胺 ELISA 组胺进行测定。
- [0189] ELISA 检测:
- [0190] 1. 样品和标准品的乙酰化:
- [0191] 将标准品吸入平板中,后者含有样品
- [0192] +25  $\mu$  l 乙酰化缓冲液,通过吸管加入
- [0193] +25  $\mu$  l 乙酰化试剂
- [0194] 2. 用 12 通道吸移管进行充分混合,将 50  $\mu$  l 转移到预包被的 ELISA 平板中。
- [0195] 3. 向每孔加入 200  $\mu$  l 组胺缀合物
- [0196] 4. 在 2-8°C 冰箱中温育
- [0197] a :在摇床上 > 2timer
- [0198] 或 b :不摇动 > 18timer
- [0199] 5. 使用上面的洗涤缓冲液,在 ELISA 洗涤器程序 " Bot-wa-no-res12 " 上洗涤;
- [0200] 6. 向每孔加入 200  $\mu$  l 颜色底物
- [0201] 7. 在摇床上,在 18-25°C (covered) 温育 30 分钟;
- [0202] 8. 通过加入 50  $\mu$  l 终止溶液,终止反应;
- [0203] 9. 在 405nm,在配有 KC4 的读数器上读数;
- [0204] 10. 通过标准曲线的线性拟合,在 KC4 中计算浓度。
- [0205] 结果
- [0206] 在第一个实验中,使用上述的组胺释放试验,测试了下述形式的疫苗:吸附到氢氧化铝凝胶佐剂上的 Ph1 p 提取物变应原(疫苗 A),沉降后疫苗 A 的上清液,和沉降后疫苗 A 的固相。如下得到了上清液和固相样品:使疫苗 A 在小瓶中静置 3 天,沉淀凝胶相,用注射器分别从小瓶顶部和小瓶底部取出样品。结果如图 2 所示。
- [0207] 如从图 2 中可以看出的,仅仅非常小量的变应原存在于上清液中,几乎所有的变应原都存在于疫苗的凝胶相中。这指示着有效的和安全的储存 (depot) 疫苗。
- [0208] 在第二个实验中,使用上述的组胺释放试验,测试了下述形式的疫苗:吸附到氢氧化铝凝胶佐剂上的 Ph1 p 提取物变应原 (+ 明矾),和 Ph1 p 提取物变应原溶液 (- 明矾)。结果如图 3 所示。
- [0209] 如从图 3 中可以看出的,变应原凝胶疫苗引起的组胺释放处于与变应原溶液相同的水平,因而本组胺试验能测量凝胶疫苗的全部变应原活性。

[0210] 实施例 3

[0211] 关于吸附到氢氧化铝凝胶佐剂上的变应原的 T 细胞增殖试验

[0212] T- 细胞试验：

[0213] 通过流式细胞仪分析表面受体 CD69 的 T- 细胞表达, 所述的 CD69 在 T- 细胞活化过程中的不同时间点受到上调, 研究了 T- 细胞活化的早期事件。流式细胞仪分析的基础是, 荧光缀合的抗- 表面标志物抗体向细胞表面的结合, 和随后通过 FACS 分析检测各细胞上的荧光强度水平。

[0214] 测试了 Ph1 p 提取物疫苗和储存 14 个月、8 个月、4 个月和 1 个月的 Ph1 p 提取物疫苗的上清液。另外, 测试了 2 种 Ph1 p 提取物 (IMP1 和 IMP 4), 纯化的 Ph1 p1 和纯化的 Ph1 p5 溶液。超抗原 (SEB) 和介质 (med) 用作参照。

[0215] 结果：

[0216] 4 种不同的 T- 细胞系用完整的草疫苗或离心后得到的疫苗上清液刺激。在生产结束后, 疫苗保存了 1-14 个月, 使用表达 CD69 的 T- 细胞 (CD3+) 百分比作为读数。结果如图 4 所示, 它清楚地证实了, 不同龄的疫苗能诱导可比较的 T- 细胞活化, 且可以区分完整疫苗和相关上清液的潜力。另外, 完整疫苗能以与粗提取物 (IMP1 和 4) 相同的水平诱导 T- 细胞活化。包含纯化的变应原 Ph1 p 1、Ph1 p 5 和超- 抗原 SEB 作为对照。在随后的实验中, 证实了没有变应原的氢氧化铝凝胶不能诱导在变应原- 特异性的 T- 细胞上的 CD69 表达。

[0217] 实施例 4

[0218] 吸附到氢氧化铝凝胶佐剂上的变应原的置换 (脱附)

[0219] 材料：

[0220] 测试了 2 种包含变应原 Ph1 p 1 和 Ph1 p 5 的氢氧化铝凝胶疫苗 (Alutard)。使用的置换剂是：200mM 磷酸盐 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ) 缓冲液 pH 7.4, 其 (在样品疫苗中) 稀释至 5.0mM 或 50mM 磷酸盐缓冲液, 从来自非变应性的个体的样品构建的血清库 (AG-525-) 或含有 5mM 磷酸盐的血清库。

[0221] 方法：

[0222] 如下进行置换：使疫苗 (1mL) 与适当体积的 200mM 磷酸盐缓冲液混合, 产生 5 或 50mM 的最终磷酸盐浓度, 并在 37°C 温育 1 或 20 小时；或者用单独的血清库、或用血清库和适当体积的 200mM 磷酸盐缓冲液进行 1 : 1 稀释, 产生 5mM 的最终磷酸盐浓度。温育后, 离心 (10min, 4000rpm) 样品, 收获上清液, 在 -20°C 保藏备用。同样离心用作参照或 0 点的样品, 在 -20°C 保藏上清液备用。

[0223] 从抑制实验中, 确定了各变应原 Ph1 p 1 和 Ph1 p 5 的量, 简而言之：使用生物素化的纯化的变应原 (被纯化的变应原抑制), 从抑制试验得到了每种变应原的标准曲线。使数据拟合一个 4 参数的对数函数 (方程 1), 并使用方程 1 和对每种变应原确定的参数, 将对给定置换上清液测试的抑制能力转化成变应原浓度。然后, 相对于与置换剂的稀释度, 校正所有估计的浓度, 所有报告的数字都指 1mL 疫苗中的量。

$$[0224] \quad Y = B + \frac{T - B}{1 + 10^{(\log_{10} EC50 - \log_{10} X) * HillSlope}} \quad (1)$$

[0225] 结果：

[0226] 使用下面的命名, 在图 5 和 6 中显示了结果：

[0227] 无 :表示没有处理样品,1 : 1 :表示用人血清进行置换,摩尔数字指磷酸盐缓冲液的终浓度。另外,标示了温度。所有的数字都代表着原始样品(校正了稀释度)中的量。

[0228] 如从图 5 和 6 可以看出的,Ph1 p 1 从氢氧化铝凝胶的置换,远远低于 Ph1 p 5 的置换。但是,在 2 种情况下,置换水平都较低。这指示着有效的和安全的储存 (depot) 疫苗。

Phlp 或 Alutard 制剂对 IgE 与生物素化 Phlp 的结合的抑制

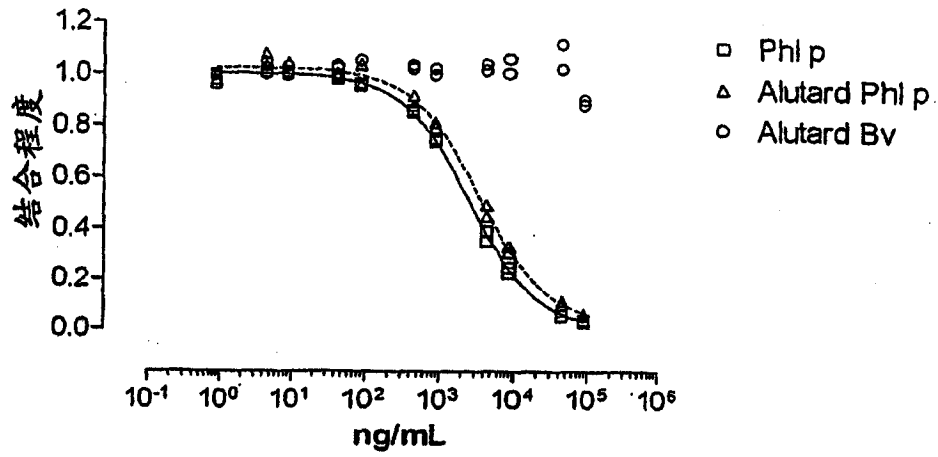


图 1

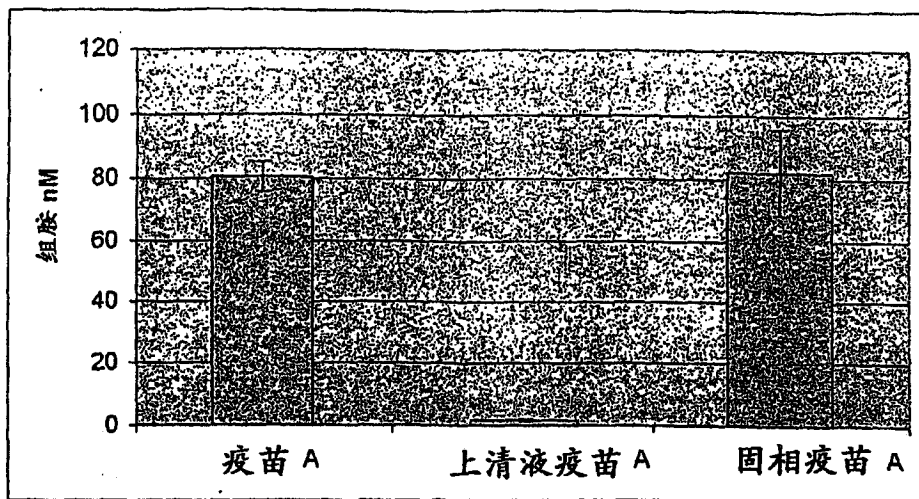


图 2

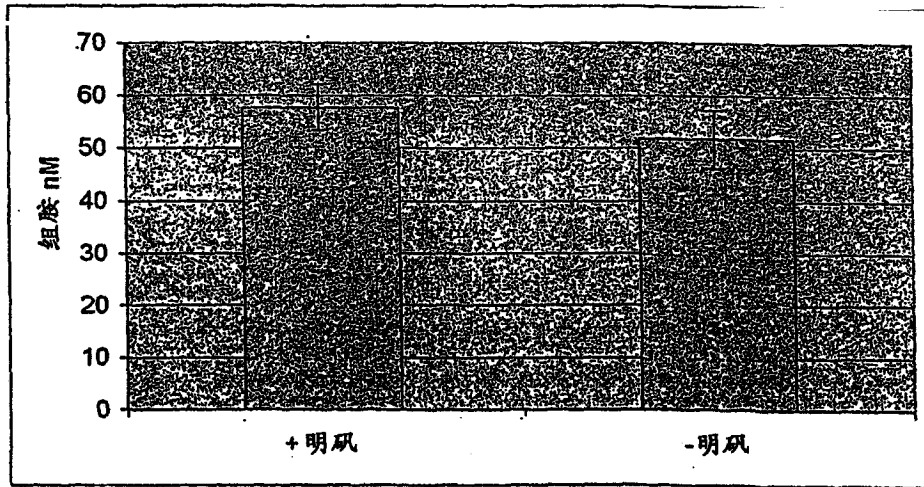


图 3

Ph1p疫苗所致的早期T细胞活化  
6小时

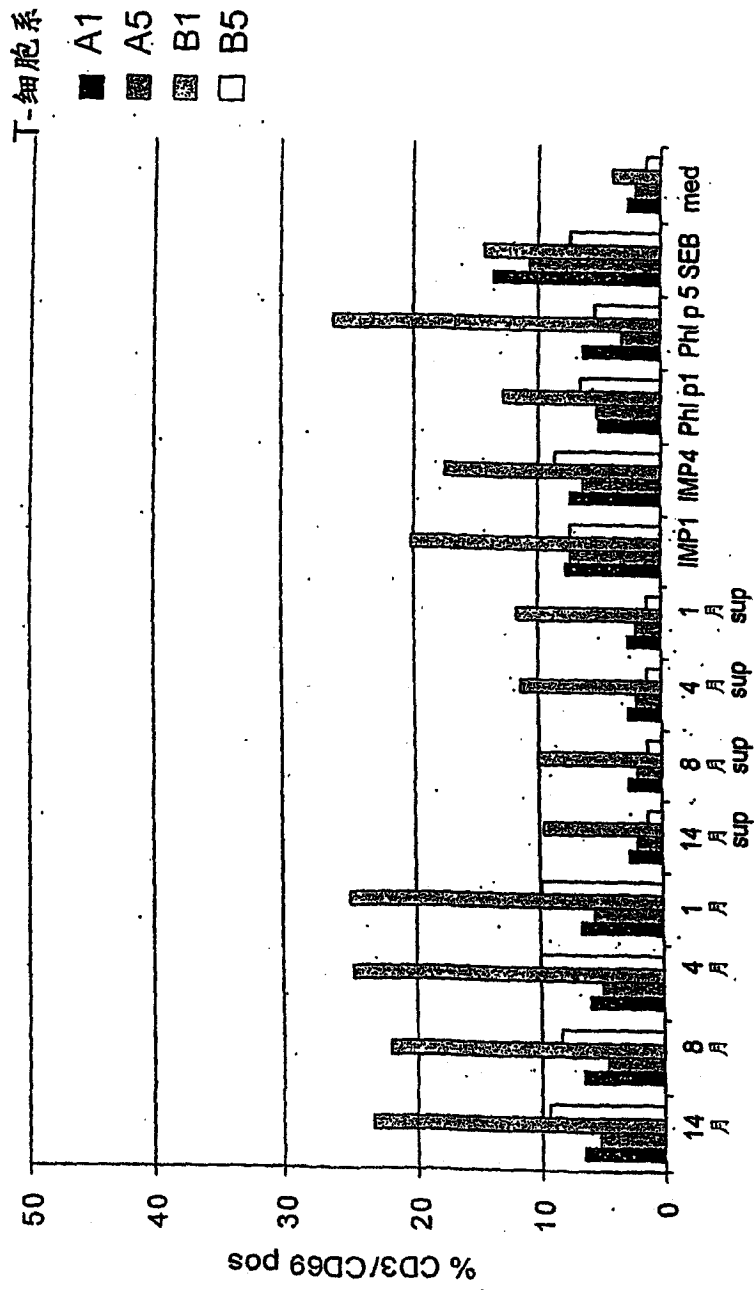


图4

Alutard 脱附  
Ph1p1



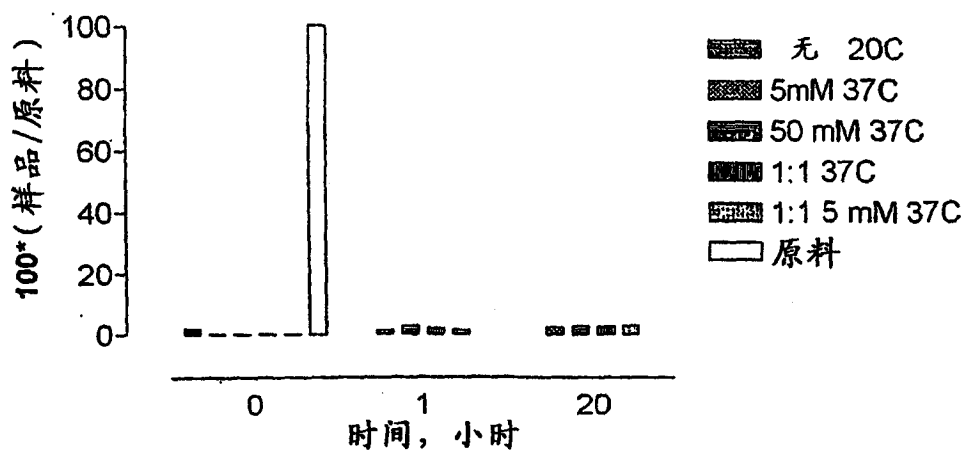


图 5

Alutard 脱附  
Phlp5

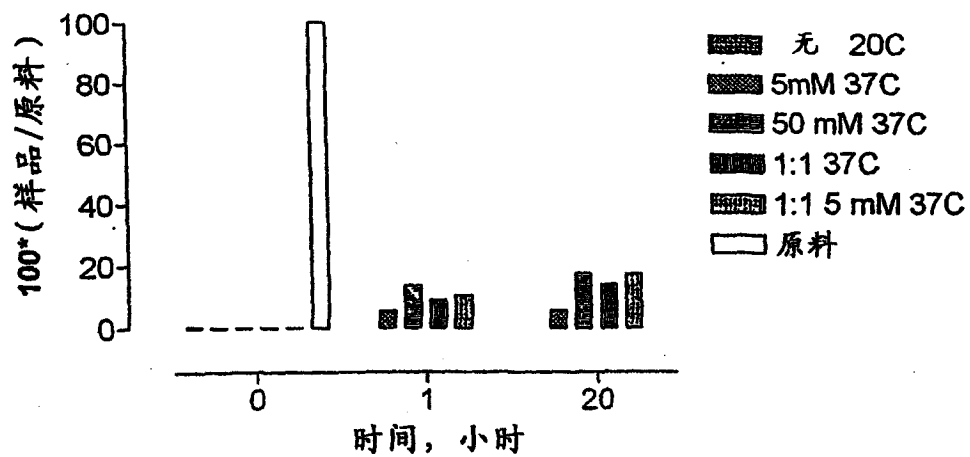


图 6