



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95100893.5

[51]Int.Cl⁶

A61K 39/00

[43]公开日 1995年11月8日

分案原申请号 88102219.5
[22]申请日 88.4.9
[71]申请人 南方研究所
地址 美国阿拉巴马州
共同申请人 UAB研究基金会
[72]发明人 T·R·泰斯 J·K·斯泰斯
R·M·吉利
J·H·埃尔德里奇

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 用于到达派亚氏淋巴结的口服生物活性剂的制法和配方

[57]摘要

本发明有关口服生物活性剂的方法和配方, 这生物活性剂包括将活性剂在一种或多种可生物降解和生物相容的聚合物或共聚物赋形剂中胶囊化以形成微胶囊。这种微胶囊能够不受影响的通过胃肠道且被派亚氏淋巴结所吸收。

1. 一种组合物在制备一种药物中的应用, 所述组合物包含直径为 $10\mu\text{m}$ 或更小的微胶囊, 该微胶囊在可生物降解的生物相容性赋形剂中含有有效量的生物活性成分, 所述药物供动物口服且能够将生物活性剂释放至所述动物的派亚氏淋巴结, 其中所述微胶囊能够被派亚氏淋巴结选择性吸收且能够通过胃肠道而不受降解。

2. 按权利要求1 所述的应用, 其中所述直径是 $5\mu\text{m}$ 或更小。

3. 按权利要求1 所述的应用, 其中所述赋形剂是聚合物。

4. 按权利要求3 所述的应用, 其中所述赋形剂是共聚合物。

5. 按权利要求4 所述的应用, 其中所述赋形剂选自聚乙醇酸、DL-丙交酯和乙交酯混合共聚物、共聚草酸酯、聚己内酯、聚(丙交酯-共-己内酯)、聚酰胺酯、聚原酸酯及聚 β -羟基丁酸。

6. 按权利要求5 所述的应用, 其中所述共聚物赋形剂是聚(DL-丙交酯-共-乙交酯)。

7. 按权利要求1 所述的应用, 其中所述生物活性剂至少一个是原生动动物抗原、病毒抗原、真菌抗原或细菌抗原。

8. 按权利要求7 所述的应用, 其中所述抗原是三硝基苯基钥孔贼血蓝蛋白。

9. 按权利要求8 所述的应用, 其中所述微胶囊的直径介于 1 至 $5\mu\text{m}$ 之间, 所述生物活性剂是三硝基苯基钥孔贼血蓝蛋白, 所述赋形剂是50:50 聚(DL-丙交酯共乙交酯)。

10. 按权利要求1 所述的应用, 其中所述直径为约 $1\mu\text{m}$ 至 $10\mu\text{m}$ 。

11. 按权利要求1 所述的应用, 其中所述直径为约 $1\mu\text{m}$ 至 $5\mu\text{m}$ 。

用于到达派亚氏淋巴结的口服生物活性剂的制法和配方

本发明有关口服生物活性剂的制法和配方。生物活性剂是在一种或多种可生物降解和生物相容的聚合物或共聚物赋形剂中被胶囊化。这种胶囊可使活性剂在不受影响下到达毛囊状的淋巴结亦即动物的派亚氏淋巴结且被此淋巴结所吸收。

利用微胶囊化防止敏感的生物活性剂降解已经众所周知。典型地，生物活性剂是在一种保护膜的材料里被胶囊化。这材料的种类通常是聚合物。胶囊化生物活性剂的方法可以是在活性剂外包上一单层的聚合物材料，或是将活性剂均匀地分散入一聚合物的模型中。微胶囊中的活性剂剂量可以依所需加以改变，范围可从微量到占95%微胶囊的成份。微胶囊的直径也可依所需加以改变，范围由小于1微米至大到3毫米或更多。

派亚氏淋巴结是淋巴小结的聚形体。它位于回肠或肠子下半部，是身体防卫外来细菌感染的重要部位。抗原是促进抗体形成的物质，它包含外来蛋白质或组织。所有抗体属于免疫球蛋白这类。当一个抗体和抗原结合时，他们会变成一种无活性的复合物，因此中和了抗原。

派亚氏淋巴结拥有免疫球蛋白A前体B细胞。这些细胞殖生于胃肠道的固有层区和上呼吸道，并且能分化已成熟的免疫球蛋白A合成性血浆细胞。这些血浆细胞有效地分泌抗体分子。Heremans和Bazin的研究中，测量口服抗原老鼠体内免疫球蛋白A的滋长，结果显示有一系列的独特抗原免疫球蛋白A血浆细胞出现。刚开始时出现在肠系膜的淋巴小结，接着出现在腺，最后出现在胃肠道的固有层区域。(Bazin, H.,

Levi, G., 和Doria, G.,免疫球蛋白A 形成抗体细胞对于免疫反应的主要作用, 此免疫反应是在口服接触抗原无菌老鼠的外胃肠淋巴组织中测定。J. Immunol. 105:1049:1970 和Crabbe, P.A., Nash, D.R., Bazin, H. Eyssen, H., 和Heremans, J.F.口服免疫或用铁蛋白非经肠免疫法的无菌老鼠的肠血浆细胞内的免疫球蛋白A 抗体。J. Exp. Med. 130:723, 1969)。因此派亚氏淋巴结很明显的是前体免疫球蛋白A 细胞的来源, 而它在受了抗原体敏感刺激下, 沿着迂回移动通道, 释放的免疫球蛋白A 在远距离的粘膜表面出现。这种迂回方式提供一常见粘膜免疫系统, 即通过持续运送受敏感化的B 细胞到粘膜区域, 以反应肠子附近区域的抗原和潜在的病原。

本发明的特殊重要性是在于有以口服免疫法诱导保护性抗体的能力。动物将抗原消化, 导致独特抗原sIgA抗体出现在支气管或鼻液中已是众所周知。例如, 在用人作实验的研究显示, 口服流行性感疫苗的效率是在鼻分泌物中诱导分泌抗流行性感疫苗抗体。

明显地, 涉及口服性活剂的任何方法或配方, 都有保护活性剂在通过胃肠道时避免降解的设计。如果没有经过特殊设计, 口服剂会以不恰当的量或失效的情况下到达派亚比淋巴结。在没受到保护的形式下, 大量的生物活性剂必须先被消化成一特定有效量才能到达派亚氏淋巴结, 结果是一大部分的活性剂不能被吸收。并且, 为了增加运送活性剂到派亚氏淋巴结, 多次数的口服是必须的。像这种多次数口服高剂量活性剂是既浪费又不方便。

因此, 有必要找出一口服疫苗, 能够有效地刺激粘膜的免疫系统, 且能克服生物活性剂在穿过胃肠道到达派亚氏淋巴结时降解的问题。更特别的需要是找出一方法即运送不会降解的抗体到达派亚氏淋巴结。

本发明是有关利用口服方式运送生物活性剂到动物的派亚氏淋巴结的方法和配方。生物活性剂在可生物降解的和生物相容的聚合物或共聚

物中被胶囊化。胶囊可使生物活性剂在没降解或仅受少量降解的情况下通过胃肠道，使活性剂在到达派亚氏淋巴结时没受到改变且还保持有效量。术语生物相容的定义是：一种聚合物物料不会毒害身体，不会致癌且不会诱发身体组织发炎，该物料应该是可生物降解的意思是，能被生理上的过程降解成能被身体轻易清理掉的物质，并且不会累积在身体中。本微胶囊同时也具有可被派亚氏淋巴结选择性吸收的大小。因此，如何让生物活性剂到达派亚氏淋巴结且被其吸收的问题解决了。

本发明的目的是提供一种动物口服生物活性剂的方法，使生物活性剂能到达派亚氏淋巴结且被其吸收。活性剂能在不失去效能下通过动物胃肠道，刺激粘膜免疫系统。

本发明更进一步的目的是提供一个配方，包括生物活性剂的中心部份和一种具可生物降解及生物相容特性的并且胶囊化于共聚物或共聚物赋形剂，以及它们能如上所述以口服方式应用。

解说执行本发明实施例方法。也就是指，延长对老鼠运送胶囊化在50:50聚(DL-丙交酯共乙交酯)中的抗原trinitrophenyl keyhole limpet hemocyanin。

但是必须注意的是除了聚(DL-丙交酯共乙交酯)之外，其他聚合物也可用。以下举例但不限于此，如：聚乙醇酸，DL-丙交酯和乙交酯混合的共聚物，共聚草酸盐，聚己内酯，聚(丙交酯共乙内酯)，聚酯酰胺，聚原酸酯及聚 β -羟基丁酸。

还有，其他生物活性剂也可采用。以下举例但不限于所举抗原，如接种抗滤过性病毒的抗原，细菌抗原，原虫抗原，真菌疾病如流行性感
冒旁系病毒的抗原，嗜血杆菌属抗原，球杆菌百日咳抗原，奈瑟氏球菌属抗原，淋病抗原，肺炎链球菌抗原，镰状疟虫抗原或致病微生物诱发疾病的抗原，或接种对抗由微生物如驱虫病原所引发疾病的抗体。

I. 显微胶囊

(a) 为派亚氏淋巴结穿透研究制备染色装填微胶囊

香豆素，一非水溶性染料与聚苯乙烯及一种非生物降解聚合物一起微胶囊化。目的是提供可以用来跟随微胶囊穿透入派亚氏淋巴结的彩色微胶囊。制备此微胶囊的方法如下：第一，制备一种聚合物溶液，方法是将4.95克的聚苯乙烯(型号685d, Dow Chemical Compang, Mildand MI)溶解在29.5克二氯甲烷(Reagent Grade, Eastman Kodak., Rochester NY)。然后将0.05克的香豆素(Polysciences, Inc., Warrington, PA)加进调好的聚合物溶液中，并且用一支有磁性的搅拌棒搅拌使香豆素溶解。

在另一容器里，准备10%(重量)的poly (vinyl alcohol)聚(乙烯醇(PVA))水溶液。制备此加工介质的方法是将40克的PVA (VINOL 205c, Air Products and Chemicals, Allenton, PA)溶解入 360克的去离子水中。在制备好的PVA 溶液中，加进 6克二氯甲烷溶液饱和。接着将PVA 溶液倒入一个装备有一支truebore搅拌轴和一个 2.5英寸trflon涡轮推进器的1-L 树脂锅(Ace Glass, Inc., Vineland, NJ)再用-Fisher stedi 速度马达以每分钟 380转数搅拌。

然后，将聚苯乙烯/ 香豆素混合物加入含有PVA 加工介质的树脂锅。该方法是利用其7-mm内径长颈漏斗来引导混合物进入树脂锅。产生稳定的油含于水中的乳状剂，在大气压下搅拌约30分钟以产生适当大小的油微小滴。接著封闭树脂锅，用一个接有气压计和放水阀的水抽吸器将树脂锅内压逐渐减低到 520mm Hg 。锅内物质在减压下搅拌约24小时，使所有二氯甲烷蒸发。在所有二氯甲烷蒸发后，用离心收集硬化的微胶囊，并且在室温的真空室内干燥72小时。

(B) 制备带有抗原的微胶囊

将三硝基苯基- 栓体洞斌形血球(TNP-KLH),水溶性抗原胶囊化在一种可生物相容的，生物溶解的聚酯物聚(DL-丙交酯共乙交酯)中。制备

微胶囊的程序如下：

首先将 0.5克的50:50 聚(DL-丙交酯共乙交酯) 溶入4.0 克的二氯甲烷中制备聚合物溶液。然后将 300微升TNP-KLH 以水溶液(46mg TNP-KLH/ml,在分解后) , 均匀的分散入聚(DL-丙交酯共乙交酯) 溶液中。分散期间必须用Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) 旋转混合物。

在另一容器中将 4.8克PVA 溶于55.2克去离子水中制备8%的PVA 水溶液。PVA 溶解后, 将其加入一个100-mL树脂锅(Kontes Glass, Inc., Vineland, NJ) 。此锅备有一trubebore 搅拌器和 1.5英寸聚四氟乙烯涡轮旋转混合器。将调好的聚合物溶液经由-7-mm 内径漏斗倒入含PVA 配制介质的树脂锅中。倒入过程中, 须以每分钟 650旋转搅拌PVA 溶液。在搅拌锅中形成的油含于水中乳状剂约10分钟后, 将树脂锅中的物质转移到其中装有3.5L去离子水的4-L 烧杯。再用一支2-英寸不锈钢旋转混合器以每分钟 800旋转数搅拌, 搅拌去离子水中形成的微胶囊约30分钟, 离心收集, 再用去离子水冲洗 2次以除去任何残余的PVA , 再用冷冻干燥法收集。该微胶囊是由直径大小约 1到10微米的球状微粒组成。

测定带有抗原微胶囊中TNP-KLH 成份(即微胶囊内装填料) 的方法如下: 在12-mL 离心管内称出10mg 带有抗原的微胶囊。加3.0mL 二氯甲烷到管内, 并旋涡动以溶解聚(DL-丙交酯共乙交酯), 然后再加3.0mL 去离子水到管内并且剧烈地旋涡动 1分钟, 离心分离离心管中的成份, 分出有机层和水层。

将水层转移到-10-mL容积定量烧瓶, 再将去离子水加入烧瓶直到记号处。TNP-KLH 在烧瓶中的数量和TNP-KLH 在微胶囊内的数量, 可用蛋白质检定算出。依照重量计算, 微胶囊含有0.2%TNP-KLH 。

II . 生物性研究

(A) 老鼠

BALB/C老鼠，8 到12周大，采用于本研究中。

(B) Trinitrophenyl-Keyhole Limpet Hemocyanin

血蓝蛋白来自Keyhole Limpet (KLH) *Megathura Crenulata*是采购于Calbio chem (San Diego, CA)。依照Rittenburg和Amkraut 的程序 (Rittenburg, M.B. 和Amkraut, A.A. trinitrophenyl-hemocyanin, 三硝基苯基-血蓝蛋白的免疫性：生产初级和次级抗半抗原沉淀素 *J. Immunol.* 97:421;1966)。置换率是分光光度测定为TNP₆₆₁-KLH，这是在 350nm波长下使用15400 莫耳消光系数，并对在这波长下的KLH 释放采用30%校正 (Rittenburg, M.B. 和Amkraut, A.A. 三硝基苯基-血蓝蛋白的免疫性：生产初级和次级抗半抗原沉淀素 *J. Immunol.* 97:421; 1966)。

(C) 免疫

微胶囊和非微胶囊TNP-KLH 以10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原浓度悬浮在 8份过滤灭菌的自来水和 2份碳酸氢钠(7.5%溶液)。先将受试的老鼠禁食一整夜，再以插管针经由胃部插管法灌入0.5mL 的混悬液 (Babb, J.L., Kiyono, H., Michalek, S.M.和McGhee, J.R. LPS免疫反应规则：抑制口服 T-dependant 抗原的免疫反应, *J. Immunol.* 127:1052;1981)。

(D) 生物液的收集

1. 血清

在穿刺后眼眶丛，以核校用的毛细吸量管收集血液。血块形成后，集中血清并用离心机除去红血球和血小板，用热使失去活力，并保存在 -70°C 直到检定时。

2. 肠分泌物

在每15分钟的间隔将老鼠灌上 4滴(0.5mL) 灌洗液(25mM 氯化钠，40mM硫酸钠，10mM氯化钾，20mM碳酸氢钠和48.5mM聚乙烯乙二醇，530

mosM渗透性) (Elson, C.O., Ealding, W. and Lefkowitz, J. 一种灌洗技术允许在老鼠肠分泌物中重覆测量免疫球蛋白A 抗体J. Immunol. Meth. 67:101;1984)。在灌入最后一滴灌洗液的15分钟后, 老鼠已被麻醉。再过15分钟用肌肉注射 0.1mg 毛果芸香素。注射后10到20分钟, 刺激肠内含物排泄。将此排泄物收集在装有3mL 溶液的陪替氏皿中, 该皿中含有0.1mg/mL大豆胰蛋白酶抑制剂(Sigma, st Louis, MO)在50mMEDTA的溶液。剧烈地旋转陪替氏皿离心分离移出悬浮物, 将悬浮物转移到一圆底的聚碳酸离心管中。在采用高速离心沉淀作澄清作用以前, 必须加入30 μ L 苯甲基磺酰氟化物(PMSF, Sigma)。澄清后, 再加进20 μ L 苯甲基磺酰氟化物和20 μ L 1% 叠氮钠, 使在胎儿小牛血清(FCS)中形成10% 溶液以提供对任何维持蛋白质酶的替代物。

3. 唾液

与肠排泄物的同时有大量的唾液分泌。用毛细管作用将0.25mL唾液收集到巴斯德吸管, 在澄清以前必须加入大豆胰蛋白酶抑制剂, 苯甲基磺酰氟化物, 叠氮化钠和FCS, 每种各20 μ L。

(E) 化学免疫试剂

特别为鼠的IgM, IgG 和IgA_o用商业获得的固态吸收和亲合纯化的 polyclonal goat IgG 抗体, (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)。根据他们恰当的结合单克隆抗体和骨髓细胞瘤蛋白质的能力, 可测出他们在放射免疫测定的独特性。

(F) 固相放射免疫测定

使用氯胺T 方法将纯化抗体标上不含载体的Na ¹²⁵I (Amersham)。(Hunter, W.M.放射性免疫测定In: Handbook of experimental Immunology, M.Weir(编者)。Blackwell Scientific Publishing, Oxford. p. 14.1; 1978)。在Immulon Removawell测定条上(Dynatech)涂TNP(三硝基苯), 此三硝基苯与牛血清蛋白(BSA)在BBS 中过夜在 4°C 下以每mL/

μg 比例结合。对照条不涂上任何东西，但所有条子都在BBS 中用1% BSA 在室温下隔离 2小时。BSA 是用来作所有样本和标记 ^{125}I 试剂的稀释剂。将生物样品液稀释到含有 1至1000ng/mL 异型独特抗原的抗体，再将生物液样本加入 3次往返洗过的管中，然后在室温下培养 6小时，洗后将1,000,000cpm标记 ^{125}I 独特异型的抗免疫球蛋白加入每个管中，并且在 4°C 中培养过夜。水洗除去未结合的 ^{125}I 抗体后，管在 γ -5500 的分光计中计数(Beckman Instruments, Inc., San Ramon, CA)。使用二倍系列稀释标准血清(Miles Scientific, Naperville, IL) 放在覆有 $1\ \mu\text{g}$ /管独特异型抗体的管上进行校准。此标准血清含有已知免疫球蛋白数量。校准曲线和未知的补入是通过电脑获得，电脑程序是采用“Logit-log”或“Four Parameter Logistic” BASIC 程序(RIA001及RIA004)。本程序在Biomedical Computing Technology Center 中有(Vanderbilt Medical Center, Nashville, TN)。

(G) 结果

1. 制备的染色装填微胶囊穿入派亚氏淋巴结

调查微胶囊进入与肠有关的淋巴网状组织的数量和穿透时受到的大小限制，是让老鼠口服带有荧光染料香豆素的聚苯乙烯微胶囊。在没有麻醉且断过食的BALB/C老鼠，用一喂食针，送进0.5mL 的100mg/mL混悬液入老鼠胃中。此混悬液是各式各样大小的荧光胶囊(直径小于 $5\ \mu\text{m}$ 或8 到 $50\ \mu\text{m}$)泡在自来水中制成。老鼠在服用的不同时间(0.5, 1 和2 小时后)会死掉，然后将小肠切除并分离出 1公分含有分散好派亚氏淋巴结的肠子。冲洗腔管部分，翻出并且快速冷冻。

制备冷冻部份，用荧光显微镜查验由肠腔管吸收入派亚氏淋巴结的微胶囊数目，地点和大小。虽然微胶囊夹陷在绒毛中，避免了胶囊被冲洗掉，除了派亚氏淋巴结外在任何点都没有看见有穿入组织的现象。在口服半小时后，观察到微胶囊在近侧的派亚氏淋巴结，而非远侧。当时

间加长，微胶囊会被蠕动动作运送，2小时内他们通过胃肠道，并出现在回肠的派亚氏淋巴结。微胶囊主要是周边式的存在。远离派亚氏淋巴结圆顶中心。这种情形给人一种印象，就是蠕动时夹陷在圆顶和邻近绒毛帮助了胶囊被吸收。虽然在派亚氏淋巴结中看到了一些直径达到10 μm 的粒子，被吸收最多的还是直径小于5 μm 的微胶囊，而且在查验的期间中，它们还是所发现最深入派亚氏淋巴结的胶囊。本结果说明，直径在1到5 μm 的微胶囊被快速地且选择性地由肠腔管吸收入派亚氏淋巴结。这建议由生物降解膜物质组成的微胶囊可当作是一个有效方法以运送抗原到肠有关的淋巴组织诱发粘膜表面的免疫性。

2. 用带抗原可生物降解微胶囊作口服疫苗

用聚(DL-丙交酯共乙交酯)共聚物作外围物料来制造含有半抗原蛋白质抗原(TNP-KLH)。依大小分开微胶囊并将直径在1到5 μm 范围内的胶囊选出来作评估。这些显微胶囊依重量计含有0.2%抗原。胶囊在被消化时能成为有效抗原运送系统，其方式是将0.5mL的10mg/mL混悬液(10 μg 抗原)在碳酸氢钠缓冲的无菌自来水中经胃培养4天。为了作比较，另一组老鼠也同样的采用口服免疫方法服进0.5mL没有胶囊的TNP-KLH溶液(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。对照组老鼠群只口服稀释物。

在最后一次免疫的第14天和第28天，血清，唾液和肠分泌物从每一组断食的5只老鼠获得。这些样品用独特异型放射免疫检定法来测定独特TNP的级数和所有免疫球蛋白M，免疫球蛋白G和免疫球蛋白A的异型抗原的抗体(见表1)。唾液和肠分泌物样品含有抗原几乎都是免疫球蛋白A级。本结果与过去研究一致且提供证据，证明用来收集分泌液的程序中没有造成血清的污染。没有任何一种免疫纪录导致所有各级免疫球蛋白在目前所测试液体中有明显改变。微量但可测出的自然发生IgM和IgG异构型抗-TNP抗体，被侦测到存在血清中，血清中的IgA异构型，和受免疫对照组老鼠的肠分泌物中。然而使用相同剂量的30 μg 微胶囊

化TNP-KLH 连续超过 3天会造成独特抗原IgA 抗体出现在对照组老鼠的分泌物和血清中所有的异构型在免疫后的第14天(看表一中最后一栏)。在免疫后第28天抗体会增加更高。相反的口服相同数量无胶囊化抗原,在任何种测验过的液体中,不具有诱导任何异型独特抗体效力。

(H) 显著性

本研究结果在几方面值得注意。第一,显著的独特抗原IgA 抗体被诱发出现在血清和粘膜分泌物中。这种反应在一般使用的免疫法中少见或根本没有。因此本免疫方法应会促使免疫性显著的强化在粘膜,肛门入口处或在针对一些细菌和病毒病原的病理区。第二,微胶囊化抗原的制备是一种在口服时有效的免疫原;相反地当口服相同数量无胶囊抗原体,则缺乏有效免疫原。因此,微胶囊会惊人的增进效用,这点可由派亚氏淋巴结增加吸收的量来推定。第三,免疫反应的诱导期似乎是持久的。当在没有赋形剂时,蛋白质抗原系统免疫法的特征是在 7天到14天内是抗体顶峰,而口服含抗原微胶囊,第28天所诱发的反应高于第14天。这说明壁膜材料的生物腐蚀和抗原释放发生于延长期间内,也因此诱发更持久的反应。

表 1 以膠囊化的口服免疫法誘發獨特抗体出現在老鼠的
血清和粘膜分泌物中

免 疫 原	免 疫 後 的 時 間	免 疫 後 生 物 的 樣 品	免 疫 球 蛋 白 的 樣 品					
			免 疫 球 蛋 白 M		免 疫 球 蛋 白 G		免 疫 球 蛋 白 A	
			总 数	Anti-TNP	总 数	Anti-TNP	总 数	Anti-TNP
对 照 組	14 天	腸 分 泌 物 唾 液 血 清	< 1 < 40 445,11	< 1 < 10 6	62 < 40 5,503,726	< 1 < 10 37	79,355 2,651 1,470,553	25 < 10 32
非 膠 囊 化 TNP-KLH	14 天	腸 分 泌 物 唾 液 血 清	4 < 40 298,733	1 10 11	131 < 40 6,000,203	< 1 < 10 29	64,985 1,354 1,321,986	17 < 10 21
微 膠 囊 化 TNP-KLH	14 天	腸 分 泌 物 唾 液 血 清	3 < 40 360,987	< 1 < 10 1,461	130 < 40 5,788,813	< 1 < 10 572	95,368 1,461 1,411,312	222 88 1,077
非 膠 囊 化 TNP-KLH	28 天	腸 分 泌 物 唾 液 血 清	< 1 < 40 301,223	< 1 < 10 21	94 < 40 5,788,813	< 1 < 10 67	88,661 1,278 1,375,332	64 < 10 63
微 膠 囊 化 TNP-KLH	28 天	腸 分 泌 物 唾 液 血 清	4 < 40 320,192	< 1 < 10 1,904	122 < 40 5,901,503	2 < 10 2,219	82,869 1,628 1,277,505	422 130 1,198