

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 9/127

A61K 38/19 A61K 39/39

A61K 38/28

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00805395.2

[43] 公开日 2002 年 4 月 10 日

[11] 公开号 CN 1344155A

[22] 申请日 2000.1.26 [21] 申请号 00805395.2

[30] 优先权

[32] 1999.1.27 [33] EP [31] 99101480.4

[86] 国际申请 PCT/EP00/00598 2000.1.26

[87] 国际公布 WO00/44350 英 2000.8.3

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.21

[71] 申请人 概念股份公司

地址 德国慕尼黑

[72] 发明人 G·切瓦科 A·乔普拉

J·施蒂伯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

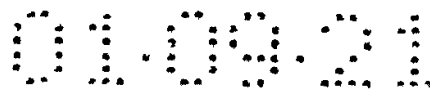
权利要求书 8 页 说明书 41 页 附图页数 24 页

[54] 发明名称 用高适应性的载体经鼻输送/免疫接种

[57] 摘要

本发明涉及利用载有大分子的特殊设计的高适应性的载体将所述分子输送通过鼻粘膜。制备该制剂的一个目的是实现非侵入地系统性输送治疗性多肽、蛋白质和其它大分子；另一个目的利用鼻腔进入体内然后到达脑部来按情形克服血-脑屏障。第三个目的是通过经鼻给予抗原或变应原来成功实现保护性或耐受性免疫接种。

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



权 利 要 求 书

1. 穿透剂作为药物活性化合物、抗原、变应原、抗原混合物和/或变应原混合物经鼻给药的载体的用途，该穿透剂以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中，这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或一种物质的两种不同形式的膜状包衣包围，所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍，从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述一种物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径，和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势，且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99%(摩尔)，两者取高者，和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍，更佳的低至少 10 倍，理想的是低 10 倍以上。

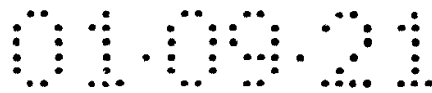
2. 穿透剂在制备经鼻给药的药物，较佳的是疫苗组合中作为载体的用途，该穿透剂以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中，这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或一种物质的两种不同形式的膜状包衣包围，所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍，从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述一种物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径，和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势，且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99%(摩尔)，两者取高者，和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍，更佳的低至少 10 倍，理想的是低 10 倍以上。

3. 穿透剂与药物活性组分或变应原或抗原联合用于制备可经鼻给药的药物组合物的用途，该穿透剂以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中，这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或一种物质的两种不同形式的膜状包衣包围，所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍，从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述一种物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径，和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势，且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99%(摩尔)，两者取高者，和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或

具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍, 更佳的低至少 10 倍, 理想的是低 10 倍以上, 所述药物组合物用于治疗感染性疾病、内分泌失调、较佳的是垂体功能衰退、糖尿病、甲状腺机能亢进、甲状腺炎、最佳的是 Hashimoto's 甲状腺炎、亚急性甲状腺炎; 肾上腺疾病, 较佳的是 Addison's 疾病、继发性肾上腺机能不全、Cushing's 综合征; 肠胃道疾病, 较佳的是 Crohn's 疾病、结肠炎; 出血性疾病, 较佳的是血友病、白细胞减少症、高嗜酸性综合征; 肌肉骨骼和结缔组织疾病, 较佳的是类风湿性关节炎、Sjögren's 综合征、Bechet's 综合征、狼疮、硬皮病、多肌炎/皮肌炎、风湿性多肌痛和暂时性关节炎、结节性动脉周围炎、Wegener's 肉芽肿病、混合型结缔组织疾病、强直性脊柱炎、牛皮癣关节炎、骨关节炎、Paget's 疾病、坐骨神经痛、粘液囊炎、肌腱炎或腱鞘炎、上髌炎、纤维肌痛、嗜酸性面部炎; 神经性疾病, 较佳的是疼痛、呃逆、晕眩、癫痫发作疾病、睡眠失调、暂时性缺血性发作、脊髓损伤、脱髓鞘病、神经根疾病、重症肌无力; 肿瘤疾病; 精神疾病, 较佳的是药物依赖性、神经官能症、心境障碍、精神分裂疾病、妄想疾病; 和/或用于妇科领域, 较佳的是治疗痛经、绝经、慢性排卵停止、卵巢早衰、子宫内膜异位、不育; 和/或用于免疫学领域, 较佳的是移植排斥、脱敏、变应原免疫治疗或预防性疫苗接种。

4. 一种经鼻给药的药物组合物, 它包含载体, 该载体是以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中的穿透剂, 这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或一种物质的两种不同形式的膜状包衣包围, 所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍, 从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述一种物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径, 和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势, 且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99% (摩尔) 或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99% (摩尔), 两者取高者, 和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍, 更佳的低至少 10 倍, 理想的是低 10 倍以上, 所述组合物还包括药物活性组分、变应原、抗原、抗原混合物和/或变应原混合物。

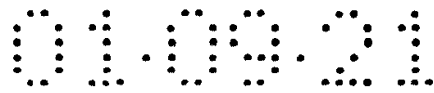
5. 根据权利要求 3 所述的用途或权利要求 4 所述的药物组合物, 其中药物活性组分是肾上腺皮质抑制药、肾上腺素抑制药、雄激素或抗雄激素、抗寄生虫药、合成代谢药、麻醉药或止痛药、回苏药、抗变应药、抗心律不齐药、抗动脉硬化药、抗哮喘药和/或支气管解痉药、抗生素、抗感染剂、抗抑郁药和/或抗精神病药、抗糖尿病药、解毒药、止吐药、抗癫痫药、抗纤溶药、抗抽搐药或抗胆碱能药、酶、辅酶或对应的酶抑制剂、抗组胺药(及其组合)或抗高渗药、抗低渗药、抗凝血药、抗霉菌药、



抗肌无力药、和抗阿尔茨海默疾病或帕金森疾病的药物、ACS 治疗药、消炎药、解热药、抗风湿性药、抗脓毒药、呼吸回苏药或呼吸刺激剂、支气管扩张药、强心药、化疗药、冠状动脉扩张药、细胞抑制药、利尿药、神经节封闭药、促糖皮质激素、抗流动药、止血药、安眠药、免疫球蛋白或其片段或任何其它免疫活性物质，如免疫调节剂、生物活性碳水化合物(衍生物)、避孕药、抗偏头痛药、皮质醇、肌肉弛缓药、麻醉药、神经治疗药、(多)核苷酸、安定药、神经传递介质、(多)肽(衍生物)，鸦片制剂、眼药、拟(副)交感神经药或抗(副)交感神经药、蛋白质(衍生物)、牛皮癣/神经性皮炎药、扩瞳药、精神刺激药、鼻药、诱导睡眠药、镇静药、解痉药、结核菌抑制药、泌尿药、血管收缩药或血管扩张药、病毒抑制药、伤口愈合物质、酒精滥用制剂、抗惊厥剂、抗肿瘤药、抗风湿性药、食欲抑制药、生物学应答调节剂、血液调节剂、骨代谢调节剂、心脏保护药、心血管药、中枢神经系统刺激药、酶、勃起机能不良治疗药、促生育药、肠胃道药、痛风制剂、激素、高血钙治疗药、低血钙治疗药、免疫抑制剂、偏头痛制剂、晕动病产品、多发性硬化治疗药、肌肉弛缓药、营养剂、眼用制剂、骨质疏松制剂、耳用制剂、抗副交感神经药、拟副交感神经药、前列腺素、精神治疗药、呼吸性制剂，镇静剂和安眠药、皮肤和粘膜药、戒烟辅助药、抗交感神经药、震颤药、尿路药、阴道药、晕眩药、免疫活性物质(如免疫调节剂，如细菌提取物或细胞壁组分，如霍乱毒素、不耐热毒素、单磷酸脂质 A 或细胞因子诱导剂，或激素如胸腺素、胸腺肽、胸腺生成素，或植物免疫刺激剂如海胆亚目的根、胰葜的根、白色雪松叶尖的提取物，或合成的免疫调节剂如喹啉衍生物、合成的肽类、嘧啶、脂肽类或细胞因子类或免疫抑制剂，以及信号转导抑制剂如环孢菌素 A、FK506、FTY720、雷帕霉素)，或上述制剂活性的抑制剂(拮抗剂)或促进剂(激动剂)，或所述活性物质的任何组合。

6. 根据权利要求 3 所述的用途或权利要求 4 所述的药物组合物，其中抗原衍生自病原体。

7. 根据权利要求 3 所述的用途或权利要求 4 所述的药物组合物，其中所述病原体属于胞外细菌，包括形成脓的球菌，如葡萄球菌属和链球菌属、革兰阴性菌如脑膜炎球菌和淋球菌属、奈瑟菌属、革兰阴性菌，包括肠微生物如大肠杆菌、沙门菌、志贺氏菌、假单胞菌、白喉杆菌、百日咳博德特菌和革兰阳性菌(如鼠疫杆菌，BCG)，尤其是厌氧菌，如梭菌属(破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、诺氏梭菌、腐烂梭菌)；在宿主细胞内生存并复制的细菌和病毒，包括分支杆菌(如结核杆菌)和单核细胞增生李斯特菌，逆转录病毒和腺病毒，包括但不局限于肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等，在宿主细胞内繁殖的真菌，寄生虫，包括动物寄生虫，如原生动物



和蠕虫，以及外寄生物，如蜱和螨，或布鲁菌属(如马尔他布鲁菌、流产布鲁菌、猪布鲁菌、狗布鲁菌、木鼠布鲁菌、羊布鲁菌)、霍乱病原体(例如霍乱弧菌)、嗜血菌属如伴放线菌素嗜血菌、大叶性肺炎嗜血菌以及引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体，或引起不一定要由微生物感染引起的动物或人体各种肿瘤形成、自身免疫疾病和其它病理学状况的真核细胞或其部分。

5 8. 根据权利要求 3 所述的用途或权利要求 4 所述的药物组合物，其中抗原以纯化的形式或甚至更佳的以纯的形式使用。

10 9. 根据权利要求 3 所述的用途或权利要求 4 所述的药物组合物，其中抗原是肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等，在宿主细胞内繁殖的真菌，寄生虫，包括动物寄生虫如原生动物和蠕虫，以及外寄生物如蜱和螨，或布鲁氏菌属、包括霍乱病原体、嗜血菌属以及引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体，或引起并非由微生物感染所致的动物或人体各种肿瘤的形成、自身免疫疾病和其它病理学状况的真核细胞或其部分。

15 10. 根据权利要求 3 所述的用途或权利要求 4 所述的药物组合物，其中变应原是内源或异源的、微生物、动物或植物来源的物质，或是属于人造的和/或刺激性无机物质种类，或是经机体免疫系统不正确加工或与其接触的人体部分或组分。

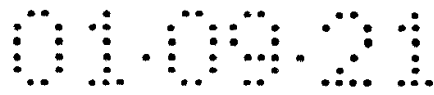
20 11. 根据权利要求 3 所述的用途或权利要求 4 所述的药物组合物，其中变应原属于吸入变应原种类，包括但不局限于各种花粉、孢子、小片动物毛发、皮肤、羽毛、天然和合成的织物、小麦、房屋灰尘，包括螨；另外还有，食物和药物变应原；接触变应原；注射、侵入性或贮存变应原，如各种寄居于肠胃的蠕虫、棘球蚴、旋毛虫等、部分植入物质。

25 12. 根据权利要求 1-3 和 5-11 任一项所述的用途或权利要求 4-9 任一项所述的药物组合物，它还包含能释放或诱导细胞因子或抗细胞因子活性的化合物或本身能发挥该活性的化合物。

13. 根据权利要求 12 所述的用途或药物组合物，其中发挥细胞因子活性的化合物是 IL-4、IL-3、IL-2、TGF、IL-6、TNF、IL-1 α 和/或 IL-1 β 、I 型干扰素，较佳的是 IFN- α 或 IFN- β 、IL-12、IFN- γ 、TNF- β 、IL-5 或 IL-10。

30 14. 根据权利要求 12 所述的用途或药物组合物，其中所述具有抗细胞因子活性的化合物是抗细胞因子抗体或其对应的活性片段、衍生物或类似物。

15. 根据权利要求 4 所述的用途或药物组合物，其中表现出或能诱导细胞因子或抗细胞因子活性的化合物以及药物活性组分或抗原或变应原与穿透剂结合。



16. 根据权利要求 1-15 任一项所述的用途或权利要求 4-15 任一项所述的药物组合物，其中不易溶解的自身聚集性分子是脂质，较佳的是极性脂质，较易溶解的组分是表面活性剂或极性/碱性脂质的一些较易溶解的形式。

5 17. 根据权利要求 1-16 任一项所述的用途或权利要求 4-16 任一项所述的药物组合物，其中较易溶解的组分是待输送通过屏障的药物，所述药物具有与不易溶解的穿透剂组分，通常以物理或化学复合物的形式，形成共同的大结构趋势。

10 18. 根据权利要求 1-17 任一项所述的用途或权利要求 4-17 任一项所述的药物组合物，其中较易溶解的组分具有使穿透剂液滴增溶的趋势，其存在的浓度不超过使液滴分解所需浓度的 99%(摩尔)，或者不超过非增溶液滴中饱和浓度的 99%(摩尔)，两者取高者，低于前一相对浓度的 50%的数值是特别有用的，数值低于 40%相对浓度或大约等于以及低于 30%相对浓度是更佳的，而对于不能用较易溶解的组分来使液滴增溶的情况，超过上述相对浓度高达 2 倍的相对浓度是最佳的。

15 19. 根据权利要求 1-18 任一项所述的用途或权利要求 4-18 任一项所述的药物组合物，其中不易溶解的穿透剂组分是极性脂质，较易溶解的组分是表面活性剂或表面活性剂样分子或脂质的这种形式，对于本发明目的较佳的是极性脂质是充分可溶的这种形式。

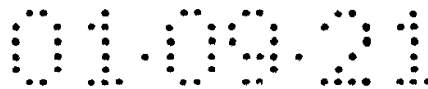
20 20. 根据权利要求 1-19 任一项所述的用途或权利要求 4-19 任一项所述的药物组合物，其中穿透剂的平均直径在 25-500 纳米之间，较佳的在 30-250 纳米之间，更佳的在 35-200 纳米之间，特别佳的在 40-150 纳米之间。

20 21. 根据权利要求 1-20 任一项所述的用途或权利要求 4-20 任一项所述的药物组合物，其中在人或动物鼻中使用的制剂中的穿透剂浓度为该制剂总干重的 0.001-20 重量%，特别是在 0.01-15 重量%之间，更佳的在 0.1-12.5 重量%之间，最佳的在 0.5-10 重量%之间。

25 22. 根据权利要求 1-21 任一项所述的用途或权利要求 4-21 任一项所述的药物组合物，其中支持介质如缓冲液选用生物相容性溶液，该溶液的渗透活性与浓度在 1-500mM 范围内、较佳的在 10-400mM 之间、更佳的在 50-300mM 之间、最佳的在 100-200mM 之间的单价电解液类似，或该溶液提供实际上足够的穿透剂稳定性以及实际上足够能运输通过屏障的速度。

30 23. 根据权利要求 1-22 任一项所述的用途或权利要求 4-22 任一项所述的药物组合物，其中药物或制剂的相对浓度为穿透剂总量的 0.001-40 重量%之间，特别在 0.01-30 重量%之间，更佳的在 0.1-25 重量%之间，最佳的在 0.5-15 重量%之间。

24. 根据权利要求 1-23 任一项所述的用途或权利要求 4-23 任一项所述的药物组



合物，其中支持药物和载体的介质是 pH 值在 4-10 之间、更通常在的在 5-9 之间、最通常在的在 6-8 之间的生物相容性缓冲液。

25. 根据权利要求 1-24 任一项所述的用途或权利要求 4-24 任一项所述的药物组合物，其中在该制剂中加有添加剂，以减少该系统对化学、生物或环境应力的敏感性，
5 这些添加剂包括抗氧化剂、对不希望的酶反应的拮抗剂、冷冻防护剂、杀微生物剂等，或该系统重要的物理性质如制剂粘稠度等的调节剂。

26. 根据权利要求 1-25 任一项所述的用途或权利要求 4-25 任一项所述的药物组合物，其中所选择的依靠高适应性载体非侵入性通过鼻给药的药物或制剂的相对剂量，与通过注射达到所需生物效果的相应的药物或制剂的剂量相差 0.1-500 倍，较通常的
10 为 0.5-250 倍，更佳的在 1-100 倍之间。

27. 根据权利要求 1-26 任一项所述的用途或权利要求 4-26 任一项所述的药物组合物，其中每个鼻孔施加的穿透剂剂量为 0.01-15 毫克，更通常在的在 0.1-10 毫克范围内，更佳的为每个鼻孔 0.5-5 毫克。

28. 根据权利要求 1-27 任一项所述的用途或权利要求 4-27 任一项所述的药物组
15 合物，其中通过采用不同的给药量，控制所选制剂或药物的给药效力和生物学效果。

29. 根据权利要求 1-28 任一项所述的用途或权利要求 4-28 任一项所述的药物组合物，其中所述制剂用计量输送装置来给药。

30. 根据权利要求 1-29 任一项所述的用途或权利要求 4-29 任一项所述的药物组合物，其中选择不同的给药体积，以控制所选制剂或药物的给药效率和生物学效果。

20 31. 根据权利要求 1-30 任一项所述的用途或权利要求 4-30 任一项所述的药物组合物，其中在给予制剂前 24 小时，较佳的在将所得制剂给予鼻内前 360 分钟，更佳的前 60 分钟，还要佳的前 30 分钟，在悬浮液中的穿透剂中加入药物或制剂。

32. 根据权利要求 1-31 任一项所述的用途或权利要求 4-31 任一项所述的药物组合物，其中输送装置安装在治疗部位上。

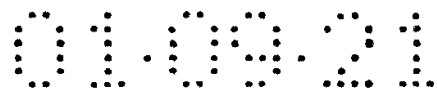
25 33. 根据权利要求 1-32 任一项所述的用途或权利要求 4-32 任一项所述的药物组合物，其中装置中分别加入穿透剂以及与其结合的分子，尤其是生物制剂。

34. 根据权利要求 1-33 任一项所述的用途或权利要求 4-33 任一项所述的药物组合物，其中药物活性组分是用于神经系统给药的。

35. 根据权利要求 34 所述的用途或药物组合物，其中神经系统是脑。

30 36. 根据权利要求 1-35 任一项所述的用途或权利要求 4-35 任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物是疫苗。

37. 根据权利要求 36 所述的疫苗，它还包含病原体提取物或来自病原体的化合



物或其片段或衍生物。

38. 根据权利要求 37 所述的疫苗，其中所述病原体提取物或化合物选自肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等，在宿主细胞内繁殖的真菌，寄生虫，
5 包括动物寄生虫如原生动物和蠕虫，以及外寄生物如蜱和螨，或布鲁菌属、包括霍乱病原体、嗜血菌属以及引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体。

39. 根据权利要求 36-38 任一项所述的疫苗，它还包含佐剂。

40. 根据权利要求 38 或 39 所述的疫苗，其中所述佐剂是脂多糖，如脂质 A 或其衍生物或修饰物如单磷酸脂质 A，或其类似物如蔗糖的脂肪衍生物，索状因子海藻
10 糖-二霉菌酸酯、胞壁酰二肽、或其它与微生物膜的免疫学活性部分相同或相似的多糖或多肽；微生物提取物，包括细菌外毒素和内毒素，较佳的是霍乱毒素或大肠杆菌不耐热毒素，A-链衍生物，具有 ADP-核糖基化活性的组分，肽聚糖、梭菌毒素、LT 全毒素、纯化的结核杆菌蛋白质衍生物、LT-R192G、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白 I 或 B 群脑膜炎奈瑟球菌的外膜蛋白 GBOMP、细菌或病毒核酸，如含有非甲基化
15 CpG 二核苷酸的寡核苷酸。

41. 根据权利要求 36-40 任一项所述的疫苗，它包含 MPL 和 IL-12 的混合物或 GM-CSF 和 IL-4 的混合物。

42. 根据权利要求 36-41 任一项所述的疫苗，其中对依靠高适应性载体非侵入性
20 通过鼻内给予的免疫原/抗原的相对剂量进行选择，使其与通过注射获得所需生物效果的相应的免疫原/抗原的剂量相差 0.01-100 倍，较通常在 0.05-75 倍之间，更佳的在 0.1-50 倍之间。

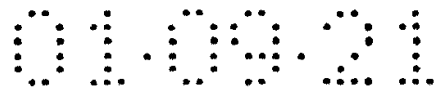
43. 根据权利要求 39-42 任一项所述的疫苗，其中经鼻给予的佐剂浓度比采用类似抗原的相应的皮下注射制剂所用浓度低 10 倍到高 1000 倍之间，更通常的，经鼻给予的免疫佐剂浓度与注射的免疫佐剂浓度相差 0.5-100 倍，更佳的相差 1-50 倍，最佳
25 的相差 2-25 倍。

44. 一种容器，它包含权利要求 4-43 任一项所述的药物组合物。

45. 一种试剂盒，它包含权利要求 4-43 任一项所述的药物组合物的至少一个容器。

46. 一种使哺乳动物产生保护性免疫应答的方法，该方法是用权利要求 36-43 任
30 一项所述的疫苗对所述哺乳动物进行疫苗接种。

47. 根据权利要求 46 所述的方法，其中选择不同的给药量以控制所用免疫原剂量和疫苗接种结果。



48. 根据权利要求 46 或 47 所述的方法，其中在给药前一天，较佳的是在将所得制剂给予鼻内之前 360 分钟、更佳的前 60 分钟，还要佳的前 30 分钟，在不含抗原的穿透剂悬浮液中加入抗原与其结合。

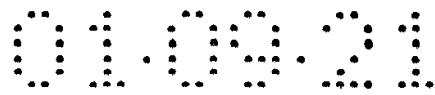
49. 根据权利要求 46-48 任一项所述的方法，其特征在于给予至少一剂疫苗。

5 50. 根据权利要求 49 所述的方法，其中给予所述疫苗作为加强疫苗接种。

51. 根据权利要求 46-50 任一项所述的方法，其中当采用非变应原性抗原时，疫苗应用次数在 2-10 次之间，宜在 2-7 次之间，更通常的最多 5 次，最佳的最多 3 次，或在变应原情况下需要如此多次数，这些次数是获得根据合适评价方法确定的所需免疫耐受性或认为尝试失败所需要的。

10 52. 根据权利要求 48-51 任一项所述的方法，其中后续接种之间的时间间隔选择为 2 周-5 年，通常为 1 个月至 3 年，更通常为 2 个月至 1 年半。

53. 根据权利要求 46-52 任一项所述的方法，其中对携带免疫原通过明确屏障各个孔的穿透剂流通量进行测定，其与横跨该屏障的合适的驱动力或压力呈函数关系，然后用特征曲线方便地描述这些数据，进而用该特征曲线优化制剂或进一步的应用。



说明书

用高适应性的载体经鼻输送/免疫接种

5

本发明涉及借助负载有大分子的特殊设计的、高适应性的载体将该大分子运输通过鼻粘膜。制备这类制剂的一个目的是实现非侵入性全身输送治疗性多肽、蛋白质和其它大分子；另一个目的是利用鼻腔进入机体然后到达脑部以偶尔克服血液-脑屏障。第三个目的是通过鼻内给予抗原或变应原，实现成功的保护性或致耐受性免疫接种。

10

在本说明书整个篇幅中引述了数篇文献。本文引用的每一份文献(包括生产商说明书等)均纳入本文作为参考；然而，这并不是承认所有引用的文献的确是本发明的现有技术。另外纳入本文作为参考的还有以 IDEA AG 名义提交的名称为“通过皮肤的非侵入性接种”的待批申请的全部公开内容。

15

在过去的 10 年中，经鼻输送已经被广泛使用并反复讨论作为全身输送药物、尤其是输送通常必须注射的肽和蛋白质的备选方案。经鼻输送吸引人的另一个理由是鼻输送避免了首先通过肝的作用(尽管在鼻腔内的降解问题产生了假的初次通过效果)(Sarkar, 1992)。后一困难促进了对化学或重组结构肽或蛋白质的修饰，以提高其稳定性，最大程度地减小大分子在鼻中的酶促断裂(Wearley, 1991)。

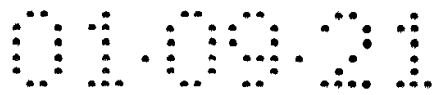
20

一些早期的评论家(Illum, 1991; Wearley, 1991)预计吸收增强剂支持的经鼻肽输送将为蛋白质和肽治疗剂的给药提供方便有效的方法。然而，更近期的研究者则抱不太乐观的态度(Harris, 1993)。经鼻输送的肽代谢迅速和非线性药物动力学(Wearley, 1991)是其部分原因。其它原因是鼻粘膜表现出的解剖学和时间上的屏障(Sarkar, 1992)，尤其是目前用于鼻输送的大多数(如果不是全部)方法有不能忍受的副作用。这对于以产生保护性免疫应答为目的经鼻输送化合物也是如此，这是比常规注射所遇到的更加自然的抗原呈递方式。经鼻免疫接种实验观察到的不良副作用主要是因为鼻输送制剂中除抗原外还存在免疫佐剂(如霍乱毒素(CT)或其 B 片段，大肠杆菌不耐热蛋白质、匙孔血蓝蛋白或具有 ADP 核糖基化活性的其它物质)，和/或具有增强渗透活性的分子。免疫佐剂可能有毒性，而抗原对受免疫接种对象有刺激性。而且，用非特异性刺激剂不能获得免疫应答的选择性。另外，经鼻给予抗原后产生的免疫应答有很大差异，这

25

可能是很难将免疫原沉积到转运通过屏障阻力最小的鼻腔部位上。

人鼻腔的总体积为 15 毫升，总表面积为 150 平方厘米(如果计算表面褶皱的话可超过 1 平方米)，其被粘液和厚 2-4 毫米的粘膜覆盖。大多数腔表面的内衬为柱状细胞、



杯状细胞和睫状立方细胞组成的呼吸性上皮。形成的渗透性屏障与口腔屏障有关，它与口腔屏障相通，并被角质化屏障组织覆盖。在任一情况下，屏障中的细胞是紧密集聚的，通常以专门的胞内脂质排列结构密封。另外，在任一情况下，通过局部使用损害这些脂质密封的质量和集聚的物质，和/或增加分子分配进入屏障的可能性的物质，可降低透性屏障。与口中遇到的状况不同，鼻子中的异物被纤毛清除到鼻咽部，平均速度为 5 毫米/分钟。鼻腔上部是一个例外，它没有纤毛，而是被假性分层嗅神经上皮覆盖。鼻的上皮下含有密集的血管网，鼻子的静脉血可直接进入体循环。

当用于高分子量物质输送时，迄今鼻输送途径还不成功。使用渗透增强剂不能充分改善该状况，这很大原因是因为这些物质通常难以被耐受，用途受限。经鼻输送药物产生的药效也有很大差异。其主要原因是，沉积部位或输送细节不一致，以及粘液分泌和粘膜纤毛清除作用的变化；尤其是在受治疗对象有过敏、枯草热和普通感冒存在时，后一情况变得复杂(Harris, 1993)。粘膜中的蛋白质降解也很重要(Sarkar, 1992)。尽管如此，仍用布舍瑞林、加压素、缩胆囊素、降钙素、生长激素和有关的物质(如 GHRH)、促红细胞生成素、G-CSF、干扰素、胰岛素、促性腺激素释放激素(GnRH)和加压素类似物作了许多研究。下文简要综述这些研究的结果。

大分子药物通过鼻子的系统性输送

海沙瑞林(Hexarelin)(GH 类似物; 分子量约为 800)。对于鼻内给予的海沙瑞林(约 18 微克/千克)的 GH 反应并不明显高于注射 1 微克 GHRH/千克所诱导的反应(Ghigo 等人, 1996)。另一方面，前一种处理没有明显修饰 IGF-1，但是增加了 IGFBP-3 的水平。用药物进行口腔处理稍稍但明显增加了 IGF-1 和 IGFBP-3 的水平(Ghigo 等人, 1996)。

用奥曲肽(一种抑生长素类似物)鼻粉经鼻处理(高达 2 毫克 TID，对应于 8 天时间内低于 5 微克/升的平均 GH 值)被很好地耐受，只有轻微的副作用，且鼻粘膜没有显著变化。在给予奥曲肽鼻粉数天后，所有患者的临床图片均有改善。发现 GH 和 IGF-1、GH 和 IGFBP-3、IGF-3 和 IGFBP-3、胰岛素和 IGFBP-3、以及胰岛素和 IGF-1 之间在长期(3-6 个月)治疗期间有正相关性(Invitti 等人, 1996)。

缩胆囊素(分子量约为 1050)。缩胆囊素的羧基端八肽(CCK-8)具有与天然缩胆囊素(CCK)相似的功能，但是缺乏受体选择性和代谢稳定性。通过 A 受体亚型调节饱足感可用于治疗肥胖。鼻内给予 Hpa(SO₃H)-Nle-Gly-Trp-Nle-MeAsp-Phe-NH₂ (N-甲基从 Phe 移动到 Asp 的结果)后，还显示出抑制了小猎犬的进食(Pierson 等人, 1997)。

鼻内(10 微克)和静脉内(0.25 微克和 2.5 微克)给予缩胆囊素的八肽衍生物后，CCK-8 显示出影响 20 位健康对象的与听觉行为有关的可能性(AERP)。它对女人的影

响比对男人强(Pietrowsky 等人, 1996)。鼻内给予 10 微克 CCK-8 后的血浆 CCK-8 浓度与静脉内给予 0.25 微克 CCK-8 的浓度相当, 但是远远低于静脉内给予 2.5 微克 CCK-8 引起的浓度(Pietrowsky 等人, 1996)。

5 加压素(分子量为 1054)。将加压素 DGAVP(2 毫克)经鼻和经口给予健康对象持续 1 周。峰水平均在 15 分钟时观察到。所测试的两种给药途径的平均吸收和消除半衰期(分别约 8 分钟和 35-38 分钟)相似, 但是后者仅有 0.7%的相对生物利用率(Westenberg 等人, 1994)。

10 在一双盲交叉研究中, 对象在三种不同的场合下鼻内接受 20IU 的(精氨酸)加压素(AVP), 或静脉内接受 1.5IU 的 AVP 和盐水溶液。在对象执行听觉注意力任务期间, 记录了激惹的可能性(ERP)。在执行任务期间, 加压素的血浆浓度在给予 AVP 后升高, 静脉内给予 AVP 后的升高超过 AVP 静脉内给药后的 2000 倍。与注射相反, 鼻内给予 AVP 大大增加了 ERP 的 P3 组分(Pietrowsky 等人, 1996)。

15 用 DGAVP 经鼻对急性(2 毫克)和慢性病作 2 周治疗(1 毫克/天), 结果揭示, 男性对抽象单词的短期记忆力有所改善, 而女性没有, 但对于学习具体的单词没有积极效果。用 DGAVP 对慢性病(而非急性病)的治疗使男性和女性在记忆比较任务(Sternberg 模式)中搜索数字的反应时间均有所减少(Bruins 等人, 1995)。在另一项不同的人研究中, 精氨酸-加压素(AVP: 3×10 IU)在鼻给药后增强了记忆能力。古怪的(oddball)刺激引发的迟发积极综合症(late positive complex, LPC)不受影响, 而结构编码任务揭示该药物有效。在两个研究中, AVP 吸收导致 P3 组分的头皮分布显著改变(它是 LPC 的一个主要的部分)。因此, 结论是加压素影响中枢神经对刺激的情感内容的处理(Naumann 等人, 1991)。

20 用加压素的亚慢性治疗(40IU/天)显示增进了 2 位老年对象夜里的慢波睡眠(Perras 等人, 1996)。然而, 鼻内给予加压素(DDAVP: 30 或 60 微克)对于人的疼痛知觉没有普遍的效果, 但是观察到其它一些效果(Pohl 等人, 1996)。

25 布舍瑞林(分子量为 1239)。用 GnRH 激动剂布舍瑞林(200 微克, 每天三次, 6 个月, 鼻内)治疗 40 位患子宫内膜异位的妇女和 10 位患子宫平滑肌瘤的妇女, 结果 AFS 平均骨盆评分从 24 降低至 7, 纤维瘤大小减少 69%(Biberoglu 等人, 1991)。

30 降钙素(分子量为 3432)。Ichikawa 等人(1994)得出结论, 从切除卵巢后 1 周开始, 隔天经鼻(5、10、20 和 40U/大鼠)和皮下(5、10 和 20U/千克)给予鲑鱼降钙素 3 周, 结果防止了骨质疏松的变化, 该侵入性方法的效果大约在 2 倍以上。

在一双盲试验中, 研究了鼻内给予鲑鱼降钙素对于 32 位椎间盘脱出而固定的患者的骨周转生化参数的影响(van der Wiel 等人, 1993)。每天两次 200IU 的降钙素剂量

使禁食 2 小时尿液羟基脯氨酸/肌酐之比(OHPr/Cr)增加受到 40%的抑制,使钙/肌酐之比(Ca/Cr)的增加降低 80%。降钙素处理组固定 10 天后血清 1,25-二羟基维生素 D 的减少明显低于安慰剂组(分别为 14%和 29%; $p<0.05$)。然而,鼻内给予的降钙素被很好地耐受,不影响用目视模拟尺测得的疼痛评分(van der Wiel 等人, 1993)。

5 生长激素(GH)释放因子(分子量为 5040)。目前的生长激素替代疗法是每天傍晚皮下(s.c.)注射。该方案不能模拟 GH 分泌的内源性脉冲方式,而此方式对于诱导生长和其它 GH 作用可能是重要的(Laursen 等人, 1996)。

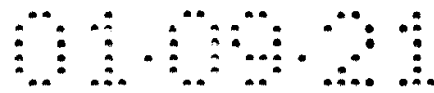
10 为了模拟生长激素的内源性产生,在三种情况下以 0.05、0.10 和 0.20IU/千克的剂量经鼻给予此蛋白质,用二癸酰基-L- α -磷脂酰胆碱作为增强剂(Laursen 等人, 1996)。在其它两种情况下,患者分别接受皮下注射(0.10IU/千克)和静脉内注射(0.015IU/千克)GH。鼻剂量和皮下注射以交叉的设计方案以随机顺序给予。静脉内给药产生了 128 微克/升的短时间血清 GH 峰值。皮下注射后峰值约为 14 微克/升(50%的生物利用率),在三次鼻给药后,分别为 3-8 微克/升(生物利用率在 4%-9%之间)。血清胰岛素样生长因子 I(IGF-I)水平仅仅在皮下注射后显著增加。然而,数据表明经鼻
15 给药很好地模仿了生理性 GH 脉冲。尽管如此,该研究的作者认为 GH 给药对于诱导产生对 GH 的代谢反应的重要性有限(Laurens 等人, 1996)。

20 GHRP-2 是 GHRP 家族中最强的成员之一,它在经口、鼻内和静脉内给药后均有生物活性。例如,对所注射的 GH-释放因子有强烈反应的儿童另行鼻内接受 GHRP-2 后,在每剂 5-20 微克/千克的剂量范围内有显著的但非大量的应答反应(Pihoker 等人, 1995)。

胰岛素(分子量为 5808)。利用吸收增强剂或生物粘附性微球,改善了通过鼻粘膜给予胰岛素溶液的生物利用率低的问题(Gizurason & Bechgaard, 1991; Illum & Davis, 1992)。测得生物利用率大于 10%,但是至今还没有对应的制剂用于后期临床试验。其主要原因看来是常用的渗透增强剂导致鼻粘膜严重的损伤。

25 例如,在给予包含胰岛素和渗透增强剂(牛磺-24,25-二氢夫西地酸钠, STDHF)的粉末制剂后,绵羊的低血糖反应和血清胰岛素水平随 STDHF/胰岛素摩尔比(在 0-16.8 范围内)而增加(Lee 等人, 1991)。其原因是粘液渗透性增加以及胰岛素团聚体大小减小。该粉末的生物利用率为 2.9-37.8%,而含有 STDHF/胰岛素为 8.4/1 混合物的滴剂或喷雾剂分别为 15.7%和 37.4%,与增强剂浓度大致呈比例(Lee 等人, 1991)。然而,
30 为了达到高的生物利用率,不得必须不忍受鼻粘膜的主要变化。

含有增强剂混合物(二癸酰基-磷脂酰胆碱(2 重量%),甘油(1.6 重量%),0.4 重量%分级的椰子油)以及 0.2 重量%胆固醇的 200U 胰岛素/毫升制剂在人体内产生大约 8



%的生物利用率,高剂量(2×3 喷雾,每次 50 微升)测得最高值,但刺激性也最大(Drejer 等人, 1991)。

5 环糊精根据结构和浓度将胰岛素六聚物解离成较小的团聚体。因此,推测六聚物解离是鼻对该多肽吸收较高的原因(Shao 等人, 1992)。为此,报道了各种环糊精的相对效率依次递减为: 二甲基-β-环糊精(DM-β-CD)>α-环糊精(α-CD)>β-环糊精(β-CD)>羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)>γ-环糊精(γ-CD)。吸收促进与鼻粘膜蛋白质和脂质释放之间的直接关系解释了这一次序(Shao 等人, 1992)。

10 对于阳离子型脱乙酰壳多糖为何以浓度依赖性方式增强胰岛素通过大鼠和绵羊鼻粘膜的吸收(大鼠和绵羊中的最适浓度分别高于 0.2%和 0.5%)不大清楚,但该方法的总体效率仅约为 10%(Illum 等人, 1994)。用二癸酰基-L-α-磷脂酰胆碱作为增强剂的鼻胰岛素生物利用率为 4%-9%(Laursen 等人, 1996)。

15 G-CSF(分子量为 19600)。与皮下注射相比,经鼻给予大鼠 rhG-CSF 的相对生物利用率约为 2%,这是从大鼠血浆中免疫活性 rhG-CSF 的浓度以及 t=8 小时时曲线下的面积(AUC)来评估的。白细胞刺激计数提示在 t=48 小时时有 5-10%的利用率。用聚氧乙烯 9-月桂基醚(Laureth-9)使相对生物利用率和药物利用率分别增加 23 倍和 3 倍,但是用甘氨酸胆酸钠时利用率没有增加(Machida 等人, 1993)。

20 在加入或不加入二甲基-β-环糊精赋形剂(作为屏障渗透增强剂)下,调查溶解的重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF, 在 pH4 下)通过家兔鼻子吸收的情况。在两种情况下,蛋白质均被吸收,外周血液中的白细胞总数增加,但是赋形剂显著改善了 rhG-CSF 的吸收(Watanabe 等人, 1993)。随后的药物动力学和药效学研究(Watanabe 等人, 1995)揭示,蛋白质可从溶液中吸收通过鼻腔,尤其在可作为粘膜运载体的α-环糊精(α-CyD)存在下。发现血清 G-CSF 浓度-时间曲线(AUC)下的面积的对数值与血液白细胞增加总数-时间曲线下的面积之间有很好的关系(Watanabe 等人, 1995)。

25 干扰素(分子量为 23000)。通过鼻内给予重组干扰素β丝氨酸(分子量为 18500)治疗 38 位成人的实验性鼻病毒感染,结果显示对于发病率或病情严重程度没有影响,但是确实使病毒释放频率减少 2 倍(第 4 天)至 3 倍(第 6 天)。该药物对于与实验性感冒有关的中耳功能失常也有积极的影响(Sperber 等人, 1992)。

30 促红细胞生成素(分子量为 30400)。将鼻内给予无增强剂的 rh-EPO 的药物利用率与静脉内注射相比较。在低 pH 和低渗性甘露醇溶液中,药物活性得到增强,但是上述两种情况会损害屏障的质量。这使得经鼻施加的药物的生物利用率在 7-4%之间(用不同的网状细胞计数方法估计)(Shimoda 等人, 1995)。

标记的右旋糖酐(分子量为 4100, 9000, 17500)。以 6.5 毫克的剂量经鼻施加,发

现在甘氨酸胆酸盐(3 毫克)存在下可通过粘膜, 血液中的浓度在 6-21 毫微克/毫升之间, 三种分子大小分别对应约为 0.05%, 0.02%和 0.01%(Maitani 等人, 1989)。

综上所述, 现有技术的联合证明, 大分子通过鼻粘膜的可能性随分子量的增加而大大降低。目前为止, 成功通过鼻腔给予的分子大小通常小于 1300Da, 全部小于 5 3500Da。显著转运输只有靠支持性渗透促进剂才能实现, 且在至少在某一浓度范围内与增强剂浓度成比例。以百分点范围计的增强剂浓度可确保高达 30%的药物(或标记)生物利用率, 但是该值更常低于 10%, 典型的只有几个百分点。高效转运将伴随强烈的局部组织损伤。这引起了不舒适的急性副作用, 可能首先会废除鼻渗透性屏障, 反复使用后会引起广泛的上皮角质化, 最终降低经鼻输送的效率。

10 经鼻输送的成功据认为依靠的是使纤毛-杯状、杯状-杯状或纤毛-纤毛细胞的接触松弛, 另外为水的运动打开通道(McMartin 等人, 1987)。因此, 能在渗透性(加入多糖的情况)、生理/化学性(加入表面活性剂的情况)或生物性(加入影响细胞生物化学(包括许多药物)、细胞粘附或转移和细胞表面输送的分子)上支持该过程的方法或物质能改善药物输送通过鼻粘膜。转运通过细胞是可能的, 但可能很少, 除非在某些病毒感染 15 或应用情况下。延长滞留时间并使待转运分子与细胞膜接近的物质, 如高分子电解质的聚合物, 也可用于此目的。后一效应的极限由纤毛运动确定, 纤毛运动每隔约 30 分钟清除粘膜表面并将表面的物质输送至咽喉, 进而到肠胃道。某些颗粒介导的运输据称是依靠了该效应。

20 通过鼻子的颗粒输送

在 BDF1 雌性小鼠中, 吸入的细颗粒(Kanto 土灰尘、飞尘、炭黑、柴油机排放颗粒(DEP)和氢氧化铝(alum))看来起着佐剂的作用, 并加速抗花粉的 IgE 抗体产生; 然而, 颗粒的性质, 吸附抗原的能力和/或其大小似乎在该过程中只起很小的作用 (Maejima 等人, 1997)。

25 根据 Ting 等人(1992)的描述, 中空珠不适合用于经鼻输送, 因为它们会被迅速清除, 且沉积方式各异。因此, 通过喷雾干燥和喷雾去溶剂制得了大小适合于鼻沉积 (10-200 微米)的塌陷的固体珠形式的聚乙烯醇微粒(Ting 等人, 1992)。

尽管有上述发现, 将几种颗粒悬浮液用于鼻内通常会引发针对与颗粒结合的抗原的抗体。

30 这包括所谓的蛋白体, 包括 gp160(Lowell 等人, 1997)或流感病毒蛋白。另一个例子是用包覆了脂质(双)层的聚合的碳水化合物制得的颗粒。

然而, 重要的是要认识到, 在任何鼻摄取研究中, 应考虑和允许二次重新分布。

例如, 纯化的主要 *Parietaria judaica* 变应原在舌下、口服和鼻内给予健康志愿者后的放射活性的生物分布是相似的。这表明测试物质被吞咽并在肠胃道中吸收(Bagnasco 等人, 1997)。在鼻内情况下, 靠粘膜纤毛清除输送至咽部也起了重要作用, 但是示踪物的有关组分给药后在鼻粘膜中停留了 48 小时(Bagnasco 等人, 1997)。

5

口溢出和假阳性结果的危险

蛋白质可在肠胃道中吸收, 虽然是少量。例如, 卵白蛋白(OVA)在胃中吸收, 并且以所用剂量的 0.007-0.008% 和 0.0007-0.002% 的水平从肠胃道进入血液和淋巴循环; 后一情况中较高剂量会导致较高的吸收(Tsume 等人, 1996)。胃吸收几乎是专门提
10 供给血液, 提示胃和小肠之间吸收的机理和/或途径有所不同。与脂质体连接的 OVA 能使摄取提高大约 2-3 倍, 这可能是由于 OVA 的酶促分解较慢。

鼻和口免疫接种的结果常常很相似, 提示前者的部分效果可能是由于抗原溢出进入肠胃道。用作异源 DNA 序列载体的人 5 型腺病毒所得结果说明了这一点(Flanagan 等人, 1997)。

15

经鼻输送入中枢神经组织(CNS)

物质到达脑对于治疗精神病和神经性疾病来说是非常重要的。因此, 测试了几种所选生物活性分子能否经鼻途径输送至 CNS。

到目前为止, 药物通过鼻给药输送至 CNS 几乎还未受到注意(Pesechnik & Price,
20 1996)。与辣根过氧化物酶偶联的麦芽凝集素经证实可被嗅神经细胞所摄取, 导致嗅球中的浓度约为所给予浓度的 0.1%; 可能的原理也许是受体介导 WGA 内吞和随后的跨突触、逆行转移至脑。鼻中病毒感染也可能有类似的机理。

例如, 鼻内滴注水泡性口炎病毒(VSV)(一种负义 RNA 病毒)可能导致小鼠和家兔脑子的致死性感染(Huneycutt 等人, 1994)。在鼻内接种 VSV 12 小时内, 可在同侧嗅球的嗅神经层中检测到该抗原。在接种(p.i.)后 3-4 天内, VSV 已经扩散到滴注 VSV 同
25 侧嗅球的小球和前嗅核中。在嗅小球中, VSV 抗原在粒细胞中比在僧帽细胞中更丰盛。相应地, 僧帽细胞体轴经过的侧嗅束在接种后 7 天内维持 VSV 阴性。在接种后 7 天时, 在延伸至脑干的其他数个区域中检测到病毒蛋白。VSV 免疫反应性的方式支持了嗅小球初始感染的图片, 随后经二心室表面播散并在传输系统的体轴内逆行输送而削
30 弱嗅球的神经调节(Huneycutt 等人, 1994)。

Draghia 等人(1995)已经证实, 在鼻滴注复制缺陷型腺病毒载体 AdRSV β gal 后, 有可能将大肠杆菌 lacZ 基因体内转移到大鼠中枢神经系统结构中。嗅球的僧帽细胞、

前溴核的神经元、天蓝色位置和 postrema 区域能表达 β -半乳糖苷酶至少 12 天(Draghia 等人, 1995)。1 型副流感疫苗病毒也通过感染嗅神经元直接到达中枢神经系统(Mori 等人, 1996)。

5 然而, 非常需要有一种方便、可靠的经鼻输送系统来输送能够且打算要产生保护性免疫应答而不同时产生各种不良副作用的化合物。常见类型的非侵入性应用(包括经口免疫)通常不引起所需的免疫应答。许多可注射的疫苗也不提供最优的抗体同种型模式, 主要是因为抗原以非天然的途径进入体内。由于一般免疫原较大, 经鼻免疫接种仍然是个问题(受到与将药物活性化合物输送通过鼻粘膜相似的限制)。

10 结论是, 尽管现有技术已测试了经鼻输送的各种方法, 但迄今没能提供令人信服地将化合物(如药物活性物质、免疫原/抗原或变应原)输送通过鼻屏障的方便的、有良好耐受性的理论, 尤其是如果所述化合物较大时。本发明权利要求中的实施方案解决了所述技术问题(即提供了合适的系统)。

15 因此, 本发明涉及作为药物活性化合物、抗原、变应原、抗原混合物和/或变应原混合物经鼻给药载体的穿透剂的用途, 该穿透剂以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中, 这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或一种物质两种不同形式的膜状包衣所包围, 所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍, 从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述一种物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径, 和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势, 且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99%(摩尔), 两者取高者, 和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍, 更佳的低至少 10 倍, 理想的是低 10 倍以上。

25 这些化合物、抗原或变应原其自身不能以有实际意义的量穿过鼻粘膜, 不引起不可接受的副作用。

对于上述高达 99% 的数值, 应注意低于前一相对浓度的 50% 的数值是特别有用的, 更佳的是低于 40% 相对浓度或甚至大约 30% 相对浓度及以下浓度, 而对于不能用较易溶解的组分来增溶的液滴, 相对浓度超过上述浓度 2 倍是最佳的。

30 包括实施穿透剂的配方在 DE 41 07 152, PCT/EP91/01596, PCT/EP96/04526 和 DE 44 47 287 中有详细描述, 这些专利均纳入本文作为参考。专利申请 PCT/EP98/06750 给出了有关穿透剂的生产 and 负载各种大分子活性物质(这些分子太大而难以穿透通过屏障)的有用信息, 该申请也纳入本文作为参考。

关于脂质悬浮液的较一般信息可在《脂质体》手册(Gregoriadis, G., 编., CRC Press, Boca Raton, FL, 1-3 卷, 1987)、《作为药物载体的脂质体》(Gregoriadis, G.编辑, John Wiley & Sons, New York, 1988)或实验室手册《脂质体实践方法》(New, R., Oxford-Press, 1989)中找到。常规用于制备生物相容的免疫穿透剂的磷脂性质综述见《磷脂手册》(Cevc, G., 编, Dekker, New York, 1995)。

所述穿透剂的生产温度通常在 0-95℃ 范围内选择。较佳的, 在 10-70℃ 的温度范围内, 更经常的在 15℃-45℃ 之间, 在所有情况下, 该温度均低于重要的配方组分的组成或物理状态发生不可逆变化的温度。这些温度可由本领域技术人员运用其通常所知的知识和本说明书引用的各篇文献中的描述来确定。(备索: 皮肤温度通常约为 32℃。)其它温度范围也可能采用, 最应注意的是含有可冷冻或非挥发性组分、低温或热稳定的配方等的系统。

如果需要维持个别系统组分的完整性和所需性质, 载体制剂可与或不与所连接的抗原一起冷藏(例如在 4℃ 下)。也可在惰性气氛(如氮气)下生产和保藏, 有时是明智的。另外, 利用具有少数双键的物质(即利用不饱和程度低), 通过选择过氧化物-臂组分、加入抗氧化剂、螯合剂和其它稳定化剂, 或通过制备负载了免疫原的穿透剂或从冷冻干燥或干燥的混合物原位制得, 也可延长载体制剂的使用期。

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

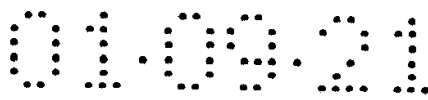
说明书中的“非侵入性给药”或“非侵入性输送”指施加到或输送通过鼻粘膜。

本篇文章中的“鼻给药”指通过直接鼻内插管、自发吸入测试液滴、或将喷雾的测试液体吸入鼻内的方式施加测试物质, 不依赖于充满或沉积的确切部位。

本申请中的术语“穿透”描述了大的物质通过屏障的非扩散性运动。据信该过程涉及穿透剂对屏障中细小孔的适应程度, 也许与屏障阻力临时性选择性地和可逆地下降有关。

“渗透”指穿过半渗透屏障的扩散运动, 其通常由跨屏障的渗透剂浓度梯度来推动。

因此, 穿透剂是一种包含单个分子或一系列分子的物质, 这些分子大得难以渗透通过屏障, 但是却能靠穿透剂对屏障的细小通道(孔)的形状和/或直径的适应能力(即适应性)而通过屏障。该适应能力可从例如以下事实看出: 比孔径大两倍的穿透剂可通过双层但不会变成孔径大小的片段。另一方面, 穿透剂是能渗透通过半渗透屏障(如皮肤)的物质。外场实验中的穿透剂所受推动力与穿透剂的标称大小以及施加的场(该场可天然存在)成比例。在完整的未堵塞皮肤上的这种力据认为来源于横跨角质层的水浓度梯



度,如果该力足够强使得穿透剂变形或/和使屏障中通道变宽,从而避免体积排斥问题,则该力可使穿透剂运动通过屏障(包括皮肤)。

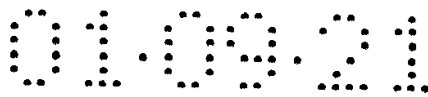
另一方面,渗透剂是一种扩散或至少能扩散通过半渗透屏障的分子。

5 上述穿透剂通常是具有超适应能力的物质,它包含数个组分。所述穿透剂的最广泛含义是能自发通过含有比穿透剂直径小得多的孔的渗透性屏障,从而将物质从施加处输送至屏障任一侧的目标部位的超大分子。为了满足该目的,必须调节穿透剂的性质,最值得注意的是其对屏障中孔的形状和大小的变形能力。这通常在作用于穿透剂中所有分子上的强驱动力或压力的影响下发生。不依靠穿透剂浓度的梯度(例如是通过屏障的水合或外部电势差别)表明可起此种作用。

10 处于(准)亚稳定状态的具有本发明上述特征的脂质团聚体最常作为高度适应性穿透剂起作用,尤其当它们具有一层或几层膜(双层)包围的细微液滴形式时(Cevc 等人, 1997; Cevc 等人, 1998)。由于膜的亚稳定能力,异常高的局部双层弯曲点可能产生在临时性局部膜去稳定的部位,而不损害团聚体的整体完整性。从组成观点看,这些超适应性和自身调节性泡囊通常由合适选择的脂质混合物组成。为了将常规的脂质泡
15 囊、脂质体变成优化的泡囊(Transfersomes),例如可在团聚体膜中加入合适的边缘激活剂(Cevc 等人, 1998)。或者,可使用在与团聚体基础组分复合或结合后改变系统可变形性的分子。常常但不一定,该激活剂属于低于饱和或增溶浓度的表面活性剂种类,在后一情况下会形成混合的分子团。这很重要,因为以混合脂质分子团形式增溶的脂质能通过比分子团直径宽得多的孔,但是不能强迫生物组织的通道打开,然而混合的
20 脂质泡囊却可使通道变宽并通过。对此的假定原理(申请人不希望受该原理的束缚)是,后一类团聚体的大得多的聚集数目变成对外部的推动输送的梯度(如水活性梯度)的更高灵敏度,从而能为屏障中的孔或通道打开提供能量。

从现有技术来看,本发明是特别令人惊奇的,因为超变形脂囊泡看上去不适合经鼻输送,迄今报道它们只有在非阻塞性条件下(即存在强的跨屏障水浓度梯度)(Cevc
25 等人, 1995; Paul 和 Cevc, 1995)才能通过诸如皮肤等屏障,而认为该条件不存在于高度水化的鼻粘膜中。

出人意料地发现,尽管粘膜中和吸入的湿度饱和的空气中含水量很高,但是与高度适应性穿透剂(通常以混合脂囊泡形式)相结合的大分子仍能输送通过鼻粘膜。从几次成功测试的这些载体配方不引起鼻刺激的事实得出结论,推断出上述输送不依赖于
30 破坏屏障(这种破坏是溶液中大分子通过鼻粘膜的更常规输送的原理)。相反,其原理(申请人不希望受该原理的束缚)是,所述运输依赖于载体穿过屏障的能力,该作用不应在非常湿的环境中进行。



本发明还指出，增加作为渗透增强剂的表面活性分子的浓度降低了相应的蛋白质输送通过鼻粘膜的效率，至少当达到载体的增溶点时。该发现是出人意料的，因为现有技术指出经鼻给予的大分子的生物利用率通常随渗透增强剂浓度的增高而增加。

第三个出人意料的发现是，载体介导的大分子输送通过鼻粘膜可能相对有效地介导大分子输送入中枢神经系统(CNS)。当大分子与载体结合时，鼻腔给予药物后不久就可见到相当的流入量。这可能是由于载体连接的药物输送通过鼻粘膜，随后，携带药物的载体被摄入嗅神经，药物可能通过嗅神经逆行运输送至 CNS；已提出了这种假设并用单个分子进行了测试(Pasechnik-V; Price-J. Exp. Opin. Invest. Drugs; 5:1255-1276)；依申请人的知识来判断，迄今该方法还未与微粒联合使用过。另一种解释是，载体介导大分子输送进入鼻周围淋巴系统(据报道该系统与中枢神经系统相沟通)(Kida-S; Pantazis-A; Weller-RO. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 1993; 19:480-448)。

本发明实现的第四个令人惊奇的结果是所述穿透剂使得能成功地较佳的进行大免疫原的保护性经鼻免疫接种。本发明预计或已经表明，除了给药的安全性和稳定性以外，将高适应性的抗原-或免疫原-载体用于免疫治疗目的还能提供常规鼻疫苗接种的所有优点。安全性提高反映在无毒性和无刺激性载体组分的选择上。与单独用来克服鼻屏障的抗原或免疫佐剂相比，特殊设计的载体的较高能力将导致更好的再现性。预计负载有单个抗原的不同载体群可合并入最终的多价疫苗配方中，因此，本发明的技术能满足免疫治疗的趋势。

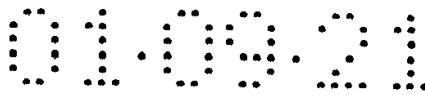
显然，对于后者来说，无毒性和只含生物相容的或天然机体样组分的“柔和的”配方(比对应的抗原注射更快和/或更好地保护机体)是较佳的，将会有很大的商业价值。

根据本发明，建议对穿透剂的特性，尤其是混合的脂质团聚体的可变形性、浓度或组成进行选择，以便控制穿透剂介导的输送的速度或效率。

在优化配方和/或给药的过程中，可以方便地确定载有药物或制剂的穿透剂通过某明确屏障的流量与横跨该屏障起作用的合适的推动力或压力的函数关系，然后用特征性曲线来描述数据，再用该数据来进一步优化制剂或应用。

药学上可接受的制剂形式可以在各种最终配方中，并且，根据给药目的，任选地与不同第二制剂组合。这些制剂在下文中有更详细的描述，例如可以是细菌化合物或其它免疫调剂物。

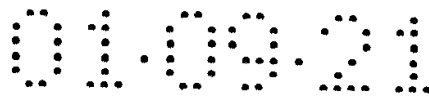
另外，本发明涉及穿透剂在制备经鼻给药的药物，较佳的是疫苗组合中作为载体的用途，该穿透剂以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中，这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或一种物质两种不同形式的膜状包衣所包围，所述物



质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍，从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述一种物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径，和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势，且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99%(摩尔)，两者取高者，和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比血红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍，更佳的低至少 10 倍，理想的是低 10 倍以上。较佳的是所用的这些分子自身不能以有实际意义的量穿过鼻粘膜，不引起不可接受的副作用。

10 在给药前。例如在配制所述药物组合物时，将载体与药物活性组分结合。关于该实施方案和下列实施方案的进一步的说明、优点等的描述，参见本文上述第一实施方案有关的说明。还应理解，在本发明中，一种以上类型的抗原、变应原或药物活性组分或其组合可配入所述药物组合物中。

15 另外，本发明涉及穿透剂与药物活性组分或变应原或抗原联合用于制备可经鼻给药的药物组合物的用途，该穿透剂以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中，这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或某物质两种不同形式的膜状包衣所包围，所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍，从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径，和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势，且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99%(摩尔)，两者取高者，和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比血红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍，更佳的低至少 10 倍，理想的是低 10 倍以上，所述药物组合物可用于治疗感染性疾病、内分泌失调、较佳的是垂体功能衰退、20 糖尿病、甲状腺机能亢进、甲状腺炎、最佳的是 Hashimoto's 甲状腺炎、亚急性甲状腺炎；肾上腺疾病，较佳的是 Addison's 疾病、继发性肾上腺机能不全、Cushing's 综合征；肠胃道疾病，较佳的是 Crohn's 疾病、结肠炎；出血性疾病，较佳的是血友病、白细胞减少症、高嗜酸性综合征；肌肉骨骼和结缔组织疾病，较佳的是类风湿性关节炎、Sjögren's 综合征、Bechet's 综合征、狼疮、硬皮病、多肌炎/皮肌炎、风湿性多肌痛和暂时性关节炎、结节性动脉周围炎、Wegener's 肉芽肿病、混合型结缔组织疾病、25 强直性脊柱炎、牛皮癣关节炎、骨关节炎、Paget's 疾病、坐骨神经痛、粘液囊炎、肌腱炎(tendonitis)或腱鞘炎、上髌炎、纤维肌痛、嗜酸性面部炎(faciitis)；神经性疾病，



5 5 较佳的是疼痛、呃逆、晕眩、癫痫发作疾病、睡眠失调、暂时性缺血性发作、脊髓损伤、脱髓鞘病、神经根疾病、重症肌无力；精神疾病，较佳的是药物依赖性、神经官能症(neuroses)、心境障碍、精神分裂疾病、妄想疾病；用于肿瘤学目的和/或治疗妇科领域的治疗，较佳的是治疗痛经、绝经、慢性排卵停止、卵巢早衰、子宫内膜异位、不育；和/或免疫学领域的治疗，较佳的是移植物排斥、脱敏、变应原免疫治疗或预防性疫苗接种。

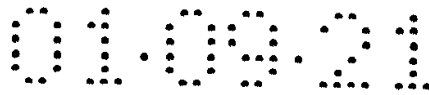
10 在本发明中，术语“变应原”用来描述内源或异源性例如动物或植物来源的物质，该物质导致接触该变应原的机体产生不希望的免疫应答，通常是产生急性过敏反应。变应性微生物或其部分(如螨的部分)、植物部分(例如花粉)或动物部分(毛发和皮屑)，以及人造的和无机物质均属于该类。另一方面，几乎人体的任一部分，如果未被正确加工或接触了机体免疫系统，会产生自身免疫应答，导致对该物质产生变态反应。在采用较狭窄的解释时，变应原是在体内引起速发性过敏反应的一种、一类或一系列物质，这些反应可通过免疫治疗来减少或消除(无论是否非侵入性通过鼻粘膜)。

15 “抗原”是天然形式的或经片段化或衍生处理后的病原体或变应原的一部分。更通常地说，术语“抗原”指大分子或其片段，任何半抗原部分(例如简单的碳水化合物、复杂的碳水化合物、多糖、脱氧核糖核酸)，简言之，是可被机体抗体库识别且当给予该系统时可能会诱导产生抗体的任何分子。大分子抗原定义为已知或据认为其自发通过鼻屏障的量太小不足以达到所需实际目的的大分子抗原。因此，大分子是本身不能以有实际意义的量穿过鼻粘膜而不引起不可接受的副作用的分子。

20 本发明中术语“抗原混合物”或“变应原混合物”指至少两种抗原和/或变应原的组合。预计抗原与变应原的混合物可用于本发明。

25 另外，本发明涉及经鼻给药的药物组合物，它包含载体和药物活性组分，该载体是以微小液滴形式悬浮或分散于溶剂中的穿透剂，这些液滴被一层或数层具有聚集趋势的至少两种不同物质或某物质两种不同形式的膜状包衣包围，所述物质或物质形式在较佳的水性液体介质中的溶解度相差至少 10 倍，从而使较易溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径、或由所述两种物质或所述物质两种形式组成的异质团聚体的平均直径小于较难溶解的物质或物质形式的均质团聚体的平均直径，和/或其中较易溶解的组分有使穿透性液滴增溶的趋势，且其中该组分的含量高达使液滴增溶所需浓度的 99%(摩尔)或对应于非增溶液滴中的饱和浓度的 99%(摩尔)，两者取高者，和/或其中在膜状包衣周围的液滴的弹性变形能量比红细胞或具有液体脂族链的磷脂双层低至少 5 倍，更佳的低至少 10 倍，理想的是低 10 倍以上。

30 在本发明用途或药物组合物的较佳实施方案中，药物活性组分是肾上腺皮质抑制

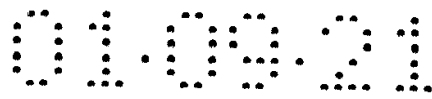


药、肾上腺素抑制药、雄激素或抗雄激素、抗寄生虫药、合成代谢药、麻醉药或止痛药、回苏药、抗变应药、抗心律不齐药、抗动脉硬化药、抗哮喘药和/或支气管解痉药、抗生素、抗感染剂、抗抑郁药和/或抗精神病药、抗糖尿病药、解毒药、止吐药、抗癫痫药、抗纤溶药、抗抽搐药或抗胆碱能药、酶、辅酶或对应的酶抑制剂、抗组胺药及其组合，或抗高渗药、抗低渗药、抗凝血药、抗霉菌药、抗肌无力药、和抗阿尔茨海默疾病或帕金森疾病的药物、ACS 治疗药、消炎药、解热药、抗风湿性药、抗脓毒药、呼吸回苏药或呼吸刺激剂、支气管扩张药、强心药、化疗药、冠状动脉扩张药、细胞抑制药、利尿药、神经节封闭药、促糖皮质激素、抗流动药、止血药、安眠药、免疫球蛋白或其片段或任何其它免疫活性物质，如免疫调节剂、生物活性碳水化合物(衍生物)、避孕药、抗偏头痛药、皮质醇、肌肉弛缓药、麻醉药、神经治疗药、(多)核苷酸、安定药、神经递质、(多)肽(衍生物)，鸦片制剂、眼药、拟(副)交感神经药或抗(副)交感神经药、蛋白质(衍生物)、牛皮癣/神经性皮炎药、扩瞳药、精神刺激药、鼻药、诱导睡眠药、镇静药、解痉药、结核菌抑制药、泌尿药、血管收缩药或血管扩张药、病毒抑制药、伤口愈合物质、酒精滥用制剂、抗惊厥剂、抗肿瘤药、抗风湿性药、食欲抑制药、生物学应答调节剂、血液调节剂、骨代谢调节剂、心脏保护药、心血管药、中枢神经系统刺激药、酶、勃起机能不良治疗药、促生育药、肠胃道药、痛风制剂、激素、高血钙治疗药、低血钙治疗药、免疫抑制剂、偏头痛制剂、晕动病产品、多发性硬化治疗药、肌肉弛缓药、营养剂、眼用制剂、骨质疏松制剂、耳用制剂、抗副交感神经药、拟副交感神经药、前列腺素、精神治疗药、呼吸性制剂，镇静剂和安眠药、皮肤和粘膜药、戒烟辅助药、抗交感神经药、震颤药、尿路药、阴道药、晕眩药、抑制剂(拮抗剂)或其它免疫活性物质(如免疫调节剂，如细菌提取物或细胞壁组分，如霍乱毒素、不耐热毒素、单磷酸脂质 A 或细胞因子诱导剂，或激素如胸腺素、胸腺肽、胸腺生成素，或植物免疫刺激剂如海胆亚目的根、黄芪的根、白色雪松叶尖的提取物，或合成的免疫调节剂如喹啉衍生物、合成的肽类、嘧啶、脂肽类或细胞因子类或免疫抑制药，以及信号转导抑制剂如环孢菌素 A、FK506、FTY720、雷帕霉素)，或上述制剂活性的促进剂(激动剂)，或所述活性物质的任何组合。较佳的是，所述活性组分其自身不能以有实际意义的量通过鼻粘膜，因而没有不可接受的副作用。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，抗原衍生自病原体。

在本发明中，术语“病原体”指通过存在于机体内或机体上的物质，其可导致或促进病理状态而该病理状态理论上可受控或受益于预防性、治疗性或辅助性免疫治疗。

在本发明用途或药物组合物的最佳实施方案中，所述病原体属于胞外细菌种类，



包括形成脓的球菌，如葡萄球菌属和链球菌属、革兰阴性菌如脑膜炎球菌和淋球菌属、奈瑟菌属、革兰阴性菌，包括肠微生物如大肠杆菌、沙门菌、志贺菌、假单胞菌、白喉杆菌、百日咳博德特菌和革兰阳性菌(如鼠疫杆菌，BCG)，尤其是厌氧菌，如梭菌属(破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、诺氏梭菌、腐烂梭菌)；在宿主细胞内生存并复制的细菌和病毒，包括分支杆菌(如结核杆菌)和单核细胞增生李斯特菌，逆转录病毒和腺病毒，包括但不局限于肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等，在宿主细胞内繁殖的真菌，寄生虫，包括动物寄生虫，如原生动物和蠕虫，以及外寄生物，如蜱和螨，或布鲁菌属(如马尔他布鲁菌、流产布鲁菌、猪布鲁菌、狗布鲁菌、木鼠布鲁菌、羊布鲁菌)、霍乱病原体(例如霍乱弧菌)、嗜血菌属如伴放线菌素嗜血菌、大叶性肺炎嗜血菌以及引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体；引起动物或人体各种肿瘤形成、自身免疫疾病和其它病理学状况(并不一定由微生物感染引起)的真核细胞或其部分也属于该类。

最佳的是，抗原(宜为病原体)以纯化的或更佳的形式使用。

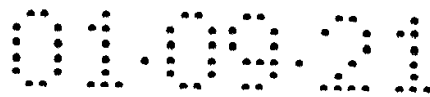
导致主要传染性疾病的病原体如肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等，在宿主细胞内繁殖的各种真菌，寄生虫，包括动物寄生虫，如原生动物和蠕虫，以及外寄生物如蜱和螨，或布鲁菌属、或霍乱病原体、嗜血菌属以及引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体特别优选作为引起动物或人体各种肿瘤形成、自身免疫疾病和其它病理学状况(并非由微生物感染引起)的真核细胞或其部分。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，变应原是内源或异源的、微生物、动物或植物来源的物质，或是属于人造的和/或刺激性无机物质种类，或是经机体免疫系统不正确加工或与其接触的人体部分或组分。

在本发明用途或药物组合物的更佳的实施方案中，变应原属于吸入变应原种类，包括但不局限于各种花粉、孢子、小片动物毛发、皮肤、羽毛、天然和合成的织物、小麦、房屋灰尘，包括螨；另外还有，食物和药物变应原；接触变应原；注射、侵入性和贮存变应原，如各种寄居于肠胃的蠕虫、棘球蚴、旋毛虫等、或部分植入物质等。

在本发明用途或药物组合物的另一个较佳实施方案中，所述药物组合物包含能释放或诱导细胞因子或抗细胞因子活性的化合物或本身能发挥该活性的化合物。

本发明所用的术语“细胞因子”指细胞因子，如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 和其所有的亚型如 IL-1 α 和 IL-1 β ，肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(TGF- β



和- α)、I型和II型干扰素(IFN- α 1, IFN- α 2, (IFN- ω)、IFN- β 、IFN- γ)、迁移抑制因子MIF、c-kit配体、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、单核细胞巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、趋化因子等以及这些分子的所有功能性衍生物。

5 能非常好地介导天然免疫力的细胞因子包括I型干扰素(IFN- α 和IFN- β)、肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1(IL-1 α 和IL-1 β)、白介素-6(IL-6)和吸引并激活白细胞的趋化因子。经鼻给予本发明所述的药物组合物可产生抗增殖(例如用IFN-s)、促炎性(例如用TNF, IL-1)或协同刺激(例如IL-6)作用。介导淋巴细胞激活、生长和分化的最佳的细胞因子包括白介素2(IL-2)、白介素-4(IL-4)和转化生长因子(TGF)。因此,这些细胞因子
10 子不仅能影响靶标生长,而且还影响最终可能会在治疗或预防中起作用的细胞的激活及其它细胞因子的产生。

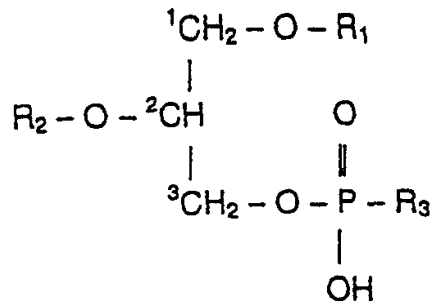
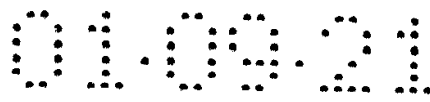
能介导高度依赖细胞介导的反应的免疫性炎症的细胞因子是 γ 干扰素(IFN- γ)、淋巴毒素(TNF- β)、白介素-10(IL-10)、白介素-5(IL-5)、白介素-12(IL-12),可能还有迁移抑制因子。白细胞生长和分化受白介素-3(IL-3)、c-kit配体、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞或粒细胞集落刺激因子(M-CSF或G-CSF)以及白介素-
15 7(IL-7)的影响最大。

较佳的是选择能显示IL-4、IL-2、TGF、IL-6、TNF、IL-1 α 和IL-1 β 、I型干扰素(其中IFN- α 或IFN- β 是最佳的)、IL-12、IFN- γ 、TNF- β 、IL-5或IL-10中的细胞因子活性的化合物。

20 在另一个较佳实施方案中,具有抗细胞因子活性的所述化合物是抗细胞因子抗体或其对应的活性片段、衍生物或类似物。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中,将表现出或能诱导产生细胞因子或抗细胞因子活性的化合物以及药物活性组分或抗原或变应原与穿透剂通过包裹等方法相连,例如,以一种复合性异质团聚体形式。

25 在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中,不易溶解的自身聚集性分子是脂质,较佳的是极性脂质,较易溶解的组分是表面活性剂或极性/碱性脂质的一些更易溶解的形式。前一组分通常来自生物来源或是相应的合成脂质或其修饰物。这些脂质通常属于具有以下化学式的磷脂类



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

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

基硫酸盐(如月桂酰基、肉豆寇酰基、棕榈酰基、油酰基、棕榈油酰基、亚麻酰基、亚油酰基、牛痘基或反油酰基-硫酸盐), 脱氧胆酸钠, 甘氨酸脱氧胆酸钠, 油酸钠, 酒石酸钠, 优先具有上述脂族链的脂肪酸, 溶血磷脂(如正十八烯(=油酰基)-甘油磷脂酸、-磷酸甘油或-磷酸丝氨酸), 正-酰基-(如月桂酰基、肉豆寇酰基、棕榈酰基、油酰基、棕榈油酰基、反油酰基、牛痘酰基、亚油酰基、亚麻酰基)-甘油磷脂酸、-磷酸甘油或-磷酸丝氨酸, 或相应的短双链磷脂, 如十二烷基磷脂酰胆碱, 或有表面活性的多肽。然而, 重要的是应认识到, 极性脂质与其它两亲性物质的复合物通常会在载体包衣中起表面活性剂作用, 且不同的离子化或盐形式的极性脂质的性质相差很大。因此, 很显然, 在膜中混合在一起的同(极性)脂质的两种不同物理化学状态可能产生满足本发明条件的高度可变形的载体。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中, 较易溶解的组分是待输送通过屏障的抗原, 所述抗原具有与不易溶解的穿透剂组分形成共同大结构的趋势(通常以物理或化学复合物的形式)。

在本发明的另一较佳用途或药物组合物中, 较易溶解的组分有使穿透剂液滴增溶的趋势, 其存在的浓度不超过液滴解散所需浓度的 99%(摩尔), 或者不超过非增溶液滴中饱和浓度的 99%(摩尔), 两者取高者, 低于前一相对浓度的 50%的数值是特别有用的, 数值低于 40%相对浓度或大约等于以及低于 30%相对浓度则更佳, 而对于不能用较易溶解的组分来使液滴增溶的情况, 相对浓度最优选超过上述浓度达 2 倍。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中, 不易溶解的穿透剂组分是脂质, 较佳的是极性脂质, 较易溶解的组分是表面活性剂或表面活性剂样分子或对于本发明目的充分可溶的极性脂质的其它形式。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中, 穿透剂的平均直径在 25-500 纳米之间, 较佳的在 30-250 纳米之间, 更佳的在 35-200 纳米之间, 特别佳的在 40-150 纳米之间。

在本发明用途或药物组合物的另一个较佳实施方案中, 在人或动物鼻中使用的配方中的穿透剂浓度为该配方中总干重的 0.001-20 重量%, 特别是在 0.01-15 重量%之间, 更佳的在 0.1-12.5 重量%之间, 最佳的在 0.5-10 重量%之间。

在本发明用途或药物组合物的其它较佳实施方案中, 支持介质(如缓冲液)选用生物相容性溶液, 该溶液的渗透活性与浓度在 1-500mM 范围内(较佳的在 10-400mM 之间, 更佳的在 50-300mM 之间, 最佳的在 100-200mM 之间)的单价电解液类似。或者, 该溶液提供实际上足够的穿透剂稳定性以及实际上足够的通过屏障的转运速度。术语“实际上足够的穿透剂稳定性”指穿透剂稳定性符合合理的产品质量标准。术语“实

践上足够的转运速度”指足够的药物被转运通过屏障而不需要不合理的大施加体积或时间。本领域技术人员无需过多试验即可确定所述足够的穿透剂稳定性和足够的通过屏障的转运速度。

5 在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，药物或制剂的相对浓度在穿透剂总量的 0.001-40 重量%之间，特别在 0.01-30 重量%之间，更佳的在 0.1-25 重量%之间，最佳的在 0.5-15 重量%之间。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，支持药物和载体的介质是 pH 值在 4-10 之间(更常在 5-9 之间，最常在 6-8 之间)的生物相容性缓冲液。

10 在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，在所述组合物中加入添加剂，以减少体系对于化学、生物或环境应力的敏感性，这些添加剂包括抗氧化剂、对不希望的酶反应的拮抗剂、冷冻防护剂、杀微生物剂等，或该系统重要的物理性质(如制剂粘稠度等)的调节剂。

15 在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，通过选择待用高适应性载体来非侵入性给药通过鼻子的药物或制剂的相对剂量，使其与注射达到所需生物效果的相应的药物或制剂剂量相差 0.1-500 倍，较常为 0.5-250 倍，更佳的在 1-100 倍之间。同样，本领域技术人员根据普通的一般知识无需过多试验即可确定后一剂量。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，每个鼻孔所施加的穿透剂剂量为 0.01-15 毫克，更常在 0.1-10 毫克范围内，宜为每个鼻孔 0.5-5 毫克。

20 因此，通过采用不同的施加量，可以控制所选制剂或药物的给药效率和生物学效果。为此可使用各种计量输送装置。

因此，在本发明用途或药物组合物的其它较佳实施方案中，采用计量输送装置给予所述配方。

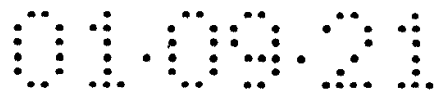
在本发明用途或药物组合物的较佳实施方案中，选择不同的施加体积，以控制所选制剂或药物的给药效率和生物学效果。

25 在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，在给予制剂前 24 小时(较佳的在将所得制剂给予鼻子前 360 分钟，更佳的前 60 分钟，还要佳的前 30 分钟)，使悬浮液中的穿透剂负载药物或药剂。预计该实施方案能提高制剂的稳定性、负载效率，释放动力学、易使用程度、顺应性等。

在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，输送装置装在治疗部位上。

30 在本发明用途或药物组合物的另一较佳实施方案中，输送装置中分别负载有穿透剂以及与其结合的分子(尤其是生物制剂)。

在本发明用途的另一较佳实施方案中，其中药物活性组分是给予神经系统的。



与该实施方案有关的术语“给药”指药物组合物经鼻施加，但是活性组分的靶标部位是神经系统，较佳的是 CNS，最佳的是脑。因此，通过给鼻子施加高度适应性的负载有药物的穿透剂来介导实际上有用的药物通过屏障，可用来输送有意义量的药物，并在中枢神经系统或其它毗邻组织(如眼)中产生该药物的显著浓度。

5 在本发明的另一较佳实施方案中，本发明的药物组合物是疫苗。

所述疫苗可用于治疗性或预防性疫苗接种。

本发明中术语“(治疗性)疫苗接种”描述了任何类型的治疗性疫苗接种，无论是在已患病后为改善临床状况而接种，还是出于预防疾病的目的而接种。这种疫苗接种可能涉及单次或反复给予本发明疫苗。治疗性接种可预防病理学状况和/或改善临床状况。当用作预防剂时，它通常会产生保护性免疫应答。

免疫接种指任何类型的激起免疫应答反应的方法，而不论所述应答是否是治疗性的。

“抗体”或“免疫球蛋白”指 IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM, 包括其所有亚类, 如 IgA1 和 IgA2、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。它们的“衍生物”包括化学、生物化学和其它方式获得的衍生物, 如基因工程改造的抗体衍生物。片段例如包括单链片段、Fc-、Fab-、F(ab)₂-和 Ig 的其它部分, 而不论它们是内源、异源、(半)合成还是重组的。本发明还包括两种或多种上述抗体、衍生物或片段的复合物。

术语“免疫原”指与免疫载体偶联的半抗原、或没有连接或连接了载体的抗原, 它能诱导产生免疫应答。

20 “免疫耐受性”指对某抗原缺乏不希望的免疫应答(更通常的是减少)。

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

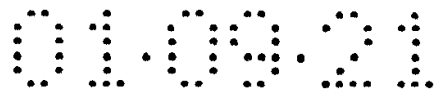
Th2(T 辅助细胞 II 型)涉及的抗体包括 IgG1、IgG4 和 IgE 类。

如上所述, 用本发明疫苗成功地通过鼻子进行免疫接种是采用常规方式给药的疫苗设计中的明显进步, 因为(a)它对于大小和性质不同的各种免疫原非常有效; (b)可与某些细胞因子、介导细胞因子活性的化合物或拮抗细胞因子活性的化合物配制在一起, 以便特异性地诱导相应的免疫应答, 或按需加强或抑制该免疫应答; (c)不依靠用针进行使人不安的注射; 和(d)不引起刺激性副作用。另外, 本发明的疫苗还能成功地实现致耐受性。

本发明还发现:

30 -Tween-SPC 分子团给予的保护作用明显低于本发明疫苗, 提示小的载体或只有表面活性剂对成功的免疫接种是不够的;

-根据吸收测定测得, 口服给予的免疫载体产生的特异性抗体滴度比经鼻给予本



发明疫苗的低；

-本发明的经鼻疫苗与混合分子团相比较在血液中产生了较高特异性的 IgG1 和 IgG2 滴度和相当的 IgG2a 和 IgM 滴度。所有滴度在其峰值时均比用 SPC:胆固醇(1:1)脂质体免疫产生的滴度高。

5 当本发明的经鼻疫苗与细胞因子或免疫佐剂一起配制时，宜使用细菌提取物(的混合物)。本申请中给出的具体离子包括单磷酸脂质 A(MPL)和 IL-12 或 GM-CSF 和 IL-4。然而，理论上本发明的疫苗可以与本文上述的介导、诱导或表现出细胞因子活性的化合物或其拮抗剂一起配制或应用。

较佳的是本发明疫苗还含有病原体提取物或病原体的化合物或其片段或衍生物。

10 最佳的，所述病原体提取物或化合物选自肝炎病毒、(人)免疫缺陷病毒、疱疹病毒、天花(禽痘)病毒、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和脊髓灰质炎病毒、巨细胞病毒、鼻病毒等，在宿主细胞内繁殖的真菌，寄生虫(包括动物寄生虫，如原生动物和蠕虫)，以及外寄生物(如蜱和螨)，或布鲁菌属、包括霍乱病原体(如霍乱弧菌)、嗜血菌属以及引发副伤寒、鼠疫、狂犬病、破伤风和风疹疾病的病原体，

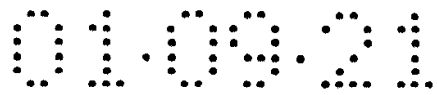
15 另外，所述疫苗宜还包含佐剂。

本文所用的术语“佐剂”用于描述支持、增强、刺激、激活、强化或调节所需细胞型或体液型免疫应答(尤其是增加任何种类的抗原特异性免疫应答作预防性处理，以及通过支持细胞介导的免疫力作治疗性处理时)的物质。这可通过加入合适的细胞因子、其混合物或合适的激动剂和拮抗剂来实现。对有用的细胞因子集群有间接贡献的免疫佐剂类型包括具有变应原性潜力的小的化学物质，如某些变应原性(金属)离子，包括但不局限于 LiCl、HgCl₂、钼(molibdenum)、酸、碱和其它刺激性化合物，如二环己基甲烷-4,4'-二异氰酸酯、ditrocarb(二硫代氨基甲酸二乙酯)、2,4-二硝基氯苯、异丙肌苷、异佛尔酮-二异氰酸酯、左旋咪唑、(苯基)咪唑酮等，Swansonine、西左伏兰(sizofran)、苯二甲酸酐、胸腺生成素(thymopentin)、(脂肪)醇、(脂肪)胺、(脂肪)醚、蓖麻蛋白或其它合适的两亲物，许多表面活性剂和化学渗透增强剂，以及它们的衍生物或组合物；另外还有(低分子量的)微生物的片段或衍生物，包括脂多糖(如 LPS)、索状因子(海藻糖-二霉菌酸酯)和其它多糖或足量使用的与膜结合的多肽，乙酰基胞壁酰-丙氨酰-异谷氨酰胺和较大的微生物片段，包括细菌外毒素和内毒素或肠毒素，如霍乱毒素和大肠杆菌的不耐热毒素(HLT)，及其大分子片段，如 A-链衍生物(其大部分(如果不是全部的话)看上去具有 ADP-核糖基化活性)，高效免疫佐剂 LT 全毒素等，细胞壁骨架、减毒细菌如 BCG 等。较不熟知的例子包括梭菌毒素、纯化的结核杆菌蛋白质衍生物、LT-R192G、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白 I、B 型脑膜炎奈瑟球菌的外

20

25

30



膜蛋白(GBOMP)、其它各种肽聚糖等。换句话说,免疫佐剂包括能改变抗原的摄取或呈递、激活或增加抗原特异性淋巴细胞的增殖、或干扰免疫应答中显性控制机制的分子(不仅在鼻子中,而且在其它有免疫能力的组织中)。(ADP-核糖基化细菌肠毒素的粘膜佐剂活性是一个已经确定的已知例子)。另一方面,改变细胞因子的(相对)浓度的分子或其它免疫佐剂,如抗免疫佐剂抗体或免疫佐剂的其它激动剂或拮抗剂也是本发明意义中的免疫佐剂。对于影响淋巴细胞归巢的分子(如各种选择蛋白(LECAMS 如各种 CD62-s)、GlyCAM-1、MadCAM-1、VCAM-1、ICAM-1、透明质酸等)以及其它趋化因子(如 RANTES 或 MCP-1)也同样如此。内源性免疫佐剂还包含组胺、转移因子、吞噬作用激素等。由于许多上述免疫佐剂不具备在以太低、有时太高的浓度或其本身非侵入性免疫接种后不能确保所需效果的足够效力,因此本文所用佐剂的功能定义包括,对细胞因子浓度和其体内的分布方式更充分地调节导致产生所需的治疗性或预防性免疫应答。如果需要弄清楚,必须在测定特异性细胞因子水平的实验中用本领域技术人员已知的方法来测定所述调节及其程度。

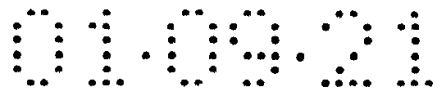
在本发明疫苗的另一个较佳实施方案中,所述佐剂是脂多糖,如脂质 A 或其衍生物或修饰物(如单磷酸脂质 A)或其类似物(如蔗糖的脂肪衍生物),索状因子(海藻糖-二霉菌酸酯)、胞壁酰二肽、或其它与微生物膜的免疫学活性部分相同或相似的多糖或(多)肽;微生物提取物,包括细菌外毒素和内毒素,较佳的是霍乱毒素或大肠杆菌的不耐热毒素, A-链衍生物,具有 ADP-核糖基化活性的组分,肽聚糖、梭菌毒素、LT 全毒素、纯化的结核杆菌蛋白质衍生物、LT-R192G、酿脓链球菌的纤连蛋白结合蛋白 I 或 B 群脑膜炎奈瑟球菌的外膜蛋白(GBOMP)、细菌或病毒核酸,如含有非甲基化 CpG 二核苷酸的寡核苷酸。

最佳的本发明疫苗包含 MPL 和 IL-12 的混合物或 GM-CSF 和 IL-4 的混合物,当采用纯的细胞因子及其诱导物时。

在本发明疫苗的另一较佳实施方案中,对利用高适应性载体非侵入性通过鼻子给予的免疫原/抗原的相对剂量进行选择,使其与注射获得所需生物效果的相应的免疫原/抗原剂量相差 0.01-100 倍,较通常在 0.05-75 倍之间,更佳的在 0.1-50 倍之间。同样,本领域技术人员可根据普通的一般知识无需过多试验即可确定后一剂量。

根据本发明还优选,在所述疫苗中经鼻给予的佐剂的浓度比采用类似抗原的相应的皮下注射制剂所用浓度低 10 倍到高 1000 倍之间,更通常的,经鼻给予的免疫佐剂浓度与注射的免疫佐剂浓度相差 0.5-100 倍,更佳的相差 1-50 倍,最佳的相差 2-25 倍。

本发明还涉及包含上述药物组合物的容器。单位剂量可根据所需应用来确定。



另外，本发明还涉及包含至少一个含有上述药物组合物的容器的试剂盒 (package)。本发明的试剂盒可包含本发明药物组合物的一个、两个、三个、四个或更多个小管/单位。

5 最后，本发明涉及一种对需要治疗的患者进行治疗的方法，该方法包括经鼻给予上述任一药物组合物。

本发明还涉及一种使哺乳动物产生保护性或耐受性免疫应答的方法，该方法是用上述疫苗对所述哺乳动物进行疫苗接种。

在本发明方法的较佳实施方案中，选择不同的给药量以控制免疫原施加剂量和疫苗接种结果。为此可用各种计量装置。

10 在本发明方法的一个较佳实施方案中，在给药前一天，较佳的是在将所得配方给予鼻子之前 360 分钟(更佳的前 60 分钟，还要佳的前 30 分钟)，在不含抗原的穿透剂悬浮液中加入与其结合的抗原。

在本发明方法的另一较佳实施方案中，给予至少一剂疫苗。

15 本发明方法的这一实施方案包括反复给予本发明疫苗。反复给药包括在鼻子中反复给药，或在鼻子中给予一次或多次并与例如常规的肠胃外给药相联合。在这种联合情况下，本发明试剂盒宜包括含有本发明疫苗的一个或多个容器、安瓿或其它类型的单元。

在本发明方法的特别佳的实施方案中，选择后续接种之间的时间间隔为 2 周-5 年，通常为 1 个月至 3 年，更通常为 2 个月至 1 年半。

20 在另一个较佳的实施方案中，提倡反复给予免疫原，以最大程度地提高治疗性疫苗接种的最终效果。当采用非变应原性抗原时，建议免疫接种次数在 2-10 次之间，通常在 2-7 次之间，更通常的最多 5 次，最佳的最多 3 次，或在变应原情况下需要如此多次数，这是实现所需免疫耐受性(如上所述或用其它一些合适的评价方法来确定)或认为尝试失败所必需的。在对象首次接受免疫后，后续接种之间的时间间隔宜为 2 周
25 -5 年，通常为 1 个月至 3 年，更通常为 2 个月至 1 年半。啮齿类动物(如小鼠)和家兔宜在 2 周间隔内免疫，灵长类动物(如猴子和人)需要在 3-6 周间隔时间内加强接种。

在本发明方法的另一较佳实施方案中，对携带免疫原通过明确屏障各个孔的穿透剂流通量进行测定，其与横跨作用于该屏障的合适推驱动力或压力呈函数关系，然后用特征性曲线方便地描述这些数据，进而用该特征性曲线优化制剂或进一步的应用。

30 本申请全篇引用的文献的公开内容纳入本文作为参考。另外纳入本文作为参考的是以 IDEA AG 的名义提交的题目为“通过皮肤的非侵入性接种”的待批申请的全部公开内容。

附图说明：

图 1 说明了用载体经鼻给予胰岛素在胰岛素依赖型糖尿病患者中的效果，图中插入了静脉内注射快速作用胰岛素(Actrapid, Novo-Nordisk)的结果作为参考。

5 图 2 说明了利用 Transfersomes 鼻内给予胰岛素后健康志愿者体内的糖动力学。图中插入了静脉内注射类似配方的插图作为参考。

图 3a 和 3b 提供了用健康志愿者进行的测定的其它实施例，在鼻内给予胰岛素制剂后有较差的性质，认为是因为载体释放药物的速度太慢。

10 图 4 说明了鼻内给予的与 Transfersomes 结合的细胞因子能影响破伤风类毒素经鼻免疫的结果。

图 5 说明了经鼻给予 Transfersomes 中的药物后胰岛素衍生的放射活性在小鼠中生物学分布。

图 6 给出了在小鼠中测定干扰素的相应结果。

15 图 7 说明了改变团聚体大小和/或可变形性对于用各种混合的分子团、Transfersomes 或载有 TT 的脂质体处理的小鼠体内的 TT 特异性免疫应答的影响。a 图和 b 图显示了抗体同种型模式，c 图给出了总抗体滴度，用吸光度变化表示。

图 8 揭示了改变抗原剂量(在高剂量范围内)对于用 TT 经鼻免疫小鼠(利用含有或没有脂质 A 衍生物作为免疫佐剂的 Transfersomes)的(小)影响。在图 a 中给出了总吸光度测定的结果。图 b 显示了相应的滴定曲线，图 c 给出了有关的抗体同种型。

20 图 9 用类似的方式组织，以比较采用不同抗原剂量和纯度的鼻内、口服或皮下给予 TT 的结果。

图 10: 给出了几个实验的动物保护(存活)数据进行比较，其中比较了几个剂量和给药途径。

25 图 11 显示了各种细胞因子或其组合对于通过 Transfersomes 经鼻给予 TT 的小鼠免疫应答的影响的一系列数据，并给出皮下注射的数据用作比较。图 a 给出了吸光度和滴度数据，图 b 含有同种型分布结果。

图 12 涉及低分子量和高分子量免疫佐剂(脂质 a 类似物和白介素-12)联合的效果。

图 13 说明了微生物来源的特异性细胞因子诱导剂的效果。为此目的采用霍乱毒素(CT)。

30 图 14 显示了大肠杆菌不耐热毒素作为免疫佐剂的效果。

图 15 说明了用两种抗原(破伤风类毒素和霍乱类毒素)组合获得的结果。

下列实施例描述了本发明。

实施例

实验总体安排和样品制备

常规的泡囊脂质体包含磷脂酰胆碱(SPC; Nattermann Phospholipids, Rhone-Poulenc Rorer, Cologne, Germany)。

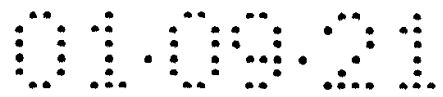
将脂质悬浮在缓冲液中，然后该悬浮液通过几个聚碳酸酯膜(孔径分别为 800 纳米、400 纳米、200 纳米和 100 纳米) 以使最终的泡囊大小分布范围变窄，制得含 10 重量%脂质的多层泡囊形式的悬浮液。如果需要，根据以后的步骤之后光学检查或动态光散射判断，重复挤压数次(最高达 5 次)。在一些情况下，首先将泡囊挤压成直径约为 50 纳米，然后冻融三次，再次使泡囊因泡囊间融合而扩大。随后，让配方在压力下通过一个微孔滤膜(100 纳米; Poretics, CA)，制得多层或单层泡囊的最终悬浮液。

用于所述实施例的高适应性穿透剂通常是具有一个或数个双层的超变形泡囊(Transfersomes™)的形式。它们包含磷脂酰胆碱和(生物)表面活性剂(胆酸盐或聚山梨醇酯(Tween 80))的混合物和各种有生物活性的组分如胰岛素、干扰素、白介素或 GC-SF。

上述穿透剂可通过使磷脂与合适的膜软化剂(如胆酸盐或聚山梨醇酯)混合来制得(在水性缓冲液或乙醇的情况下); 偶尔可采用氯仿。在后两种情况下，得到了类似的结果，在真空(10Pa, 过夜)下蒸发掉溶剂。然后使所得脂质膜与缓冲液(pH 约为 7)水合，得到基本上 10 重量%的脂质悬浮液。如脂质体中所述，主要用孔径更小的滤膜通过连续的挤压将泡囊变成最终所需的大小。Transfersomes 的最终大小与脂质体相似。

改变表面活性剂与脂质之比被认为会影响混合脂质双层的可变形性: 表面活性剂浓度越高，所得团聚体越能适应，最高可达到混合的脂质膜因表面活性剂浓度大高而变得不稳定的浓度。此时，混合的团聚体恢复变成分子团，由于分子团内部的可压缩性低，分子团不再容易地改变其形状。没有表面活性剂或其它一些边缘活性组分的泡囊通常称为脂质体，其膜的可屈曲性比更易变形的混合脂质泡囊小至少 10 倍，因此是后者的方便的负对照。其它明显的对照是:

混合的脂质分子团含有的组分与对应的高适应性穿透剂类似，只是比例不同，从而使边缘活性组分(通常是，但不一定是表面活性剂)的浓度高于增溶浓度值。为了制备所述分子团，在水相中混合各个组分，使它们相互作用，直至脂质混合物变得光学澄清(即增溶，通过光学检查或 400 纳米-600 纳米下的吸光度测定来判断)。



实验在志愿者身上进行

为了测试胰岛素载体在人体内的生物活性，在两位测试对象鼻子中使用新鲜制备的测试配方。第一位对象是血糖正常的(男性，74 公斤，173 厘米，45 岁)，第二位对象是 C-肽阴性 IDDM 患者(女性，62 公斤，167 厘米，26 岁)。测试人员在给予胰岛素前 6-12 小时之间禁食。

按照血液葡萄糖浓度的临时变化，每隔 10-15 分钟从两个臂的手指取 5-30 微升的样品。在初步测试期后(在此期间测定了“正常”的血糖浓度和/或其变化)，用常规无计量的喷雾器以一系列 150 微升的喷气将负载胰岛素的载体悬浮液(Transfersulin)喷入每个鼻孔内。注意最大程度地减少测试制剂溢出到咽喉中或防止所述制剂从鼻中滴落。

采用市售的血糖计(Accutrend™, Boehringer-Mannheim)来测定血糖浓度。每个时间点作三次独立的读数，除非当标准偏差太高时需要重复测定。

测试制剂基本上如专利申请 PCT/EP98/06750 中所述那样制得。简言之，根据界面吸附，在具有所述组成的平均直径约为 100-150 纳米的高适应性穿透剂悬浮液中加入药物，制备后 24 小时内使用。测得该制剂中药物-与载体的结合在 60-70%之间。

为了将负载药物的悬浮液给予鼻内，将制备物装入市售的喷雾器中(具有手驱动的泵，垂直取向的喷嘴，平均喷雾体积为 150 微升)。每个鼻孔每次喷一次，同时测试对象轻轻吸气。

喷雾总数与施加剂量成函数关系(在该情况下：2)。据报道，在 10-20%病例下液体立即溢出进入咽喉或部分从鼻子中漏出。未发现诸如局部刺激、喷嚏等副作用。

实施例 1

28.4 毫克/毫升大豆磷脂酰胆碱

9.5 毫克/毫升大豆磷脂酰甘油

62.1 毫克/毫升 Tween 80

磷酸盐缓冲液，pH7.4

人重组胰岛素，50IU/毫升

(购自 Actrapid 100 HM™, Novo-Nordisk)

施加剂量：每个鼻孔约 5IU

健康对象测得的结果显示在图 1 中。在两次给予含药物的载体后，显示出系统血糖浓度有短暂的降低(实心标记)，在 20-30 分钟后达到最大降低，在任一情况下大约 1 小时后返回到处理前值。所见葡萄糖水平的变化对应于一独立实验中在静脉内注射药

物后所测得降低量的大约 8.5%(插图: 空心标记)。然而, 第一次应用的再现性有待改进, 因缺乏给药技巧产生偏差故而不如第二次给药的成功。

在经鼻给予高适应性穿透剂中的胰岛素后, 受试者报告没有刺激或其它不适感觉。

5

实施例 2:

在 IDDM 患者中应用负载有胰岛素的高适应性载体

高适应性穿透剂:

如实施例 1 中所给的

10

应用剂量: 每个鼻孔 25IU

试验准备和试验如前一实施例所述那样进行。在前一天下午 10 点, 最后一次给予剂量为 22IU 的常规胰岛素(Monotard™, Novo-Nordisk)。另外, 在测试当天, 鼻内给予与高适应性药物载体结合的胰岛素之前, 用长效胰岛素来稳定受试对象。

图 2 说明了所述 IDDM 患者进行实验的结果。由于该受试对象缺乏内源性胰岛素产生, 因此治疗前血糖浓度稍稍高于正常值, 但相对恒定。用超适应性载体鼻内给药所产生的变化形状与其说是峰形, 不如说是台阶形(实心标记), 在 75 分钟内完成。这恰好是 IDDM 患者所希望的。在同一受试者不同时期静脉内注射作用迅速的胰岛素 (Actrapid™, Novo-Nordisk)的结果(插图: 空心标记)确证了该结论。根据这些数据, 估计鼻胰岛素的表观生物利用率约为 4%, 因此比实施例 1 中报道的略低。这可能与下文实施例所述的不同配方之间的假定的药物释放差异有关。

20

根据受试者的报告, 经鼻给予载体结合的胰岛素没有引起局部和全身性不良副作用。

实施例 3-5:

25

与次优载体结合的胰岛素
载体

如前面的实施例, 但是认为由于所选的这批胰岛素对载体的亲和力较高, 使得药物吸附变得不可逆, 从而不易释放药物。

应用剂量: 50IU, 50IU

30

图 3 描述了用几种不同的泡囊悬浮液进行测试的结果, 表明用这些载体经鼻给予的胰岛素没有作用。所调查的血糖正常的受试者中的血糖浓度在给药前、给药期间以及给药后至少几个小时内保持一样。这提示仅仅存在载体或其组分不足以提高经鼻施

加的大分子(如胰岛素)的生物利用率。为了获得所需的生物效果,载体必须有足够的释放药物速度,这些速度可在专门的活体外实验中用常规的蛋白质结合解离技术来确定。

5 动物实验

实施例 6-9:

将标记的胰岛素输送通过受试小鼠的鼻粘膜

高适应性穿透剂:

87.4 毫克/毫升大豆磷脂酰胆碱(SPC)

10 12.6 毫克/毫升 50% 电离的胆酸

磷酸盐缓冲液, 50mM, pH6.5

人重组胰岛素(Actrapid™, Novo-Nordisk)

购自 Amersham 的标记的胰岛素

(345 微升, 含有 1.08 微克胰岛素和 1.725 毫克 BSA)

15 将 ¹²⁵I-标记的胰岛素(210 微升)与 210 微升人重组胰岛素(Actrapid™, Novo-Nordisk, 100HM)混合, 离心纯化两次, 以除去未结合的标记(它们扩散通过屏障比整个药物分子更快、更好)。将 100 微升所得溶液与 150 微升磷酸盐缓冲液混合, 使 pH 约为 7。蛋白质溶液和脂质一起加工, 通过反复挤压通过 100 纳米孔滤膜, 使最终泡囊大小约为 150 纳米。

20 将从当地供应商得到的 NMRI 品系小鼠(36-51 克)置于吊笼内, 每组 4-6 只。动物可以自由接近标准的食物和水。每只小鼠的每个鼻孔接受 2.5 微升含有胰岛素的标记的穿透剂悬浮液。然后用全身照相机评价总放射活性的减少至少两次。在不同的时间处死小鼠, 取出所有主要器官, 分开进行测定。在取出器官后, 和分离头部后两步骤测定尸体。另外测定排泄物和笼子中的放射活性。

25 图 4 给出了不同时间点的结果。图中表明, 从机体上回收得到了大量经鼻给予的放射活性, 甚至在分离去除肠胃道后, 尤其是在给予悬浮液后 1 小时期间。在 0.5 小时的血中放射活性值在 9-2% 的范围内, 特异性浓度从开始时的 3%/毫升降至结束时的 0.7%/毫升。鼻中的活性从 0.5 小时的 10.4% 降至 8 小时的 0.3%。肝数值为 0.5 小时后 2.3%, 在 1 小时达到最大值 2.8%, 4 小时后约为 1%。8 小时后, 肝中的残余量
30 约为 0.4%。相对较高的肝数值提示颗粒(即穿透剂)通过屏障随后被摄入网状内皮系统。

对应的 CNS 值为 0.1% 和 0.03%。脑中的最大值在第一和第二小时之间测得, 分

别约为 0.11% 和 0.14，总计每克器官约为 0.3%。这些表观上低的数值与更常规的药物输送入 CNS 的结果相比是可喜的，例如，当用转铁蛋白-受体来输送药物时 (Pasechnik & Price, 1996)，产生的数值低于注射剂量的 0.5%，每克器官约为 0.15%。就麦胚凝集素而言，在嗅球中发为 0.1%。

5

实施例 10-11

高适应性穿透剂

87.4 毫克/毫升大豆磷脂酰胆碱(SPC)

12.6 毫克/毫升 50% 电离的胆酸

10

磷酸盐缓冲液，50mM, pH6.5

人重组胰岛素(Actrapid™, Novo-Nordisk)

购自 Amersham 的标记的胰岛素

在一个有关的实验中，如前一实施例所述，将 345 微升 ¹²⁵I-标记的胰岛素与 345 微升冷的 Actrapid™(Novo-Nordisk)混合，并纯化两次。加入 200 微升磷酸盐缓冲液后，
15 将 150 微升所得溶液与脂质混合，挤压至最终的泡囊大小。每个鼻孔施加的剂量为 3 微升。1 小时后处死小鼠，固定，切成薄的切片，用全身放射照相术观察。用不含胰岛素的溶液进行比较。

上述实验结果(未显示)揭示，在鼻区域内累积了大量标记(如所预计的)，有大量溢出进入肠胃道，在膀胱内有非常高的密度，而且在肝内也有一些放射活性(看来载体
20 衍生物要稍稍高于不含胰岛素的)。

实施例 12-13:

标记的 γ 干扰素输送通过受试小鼠的鼻粘膜

高适应性穿透剂

25

86.6 毫克/毫升大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.4 毫克/毫升胆酸钠

磷酸盐缓冲液，10mM, pH7.2(标称)

1 毫克 IFN- γ /毫升悬浮液

(100 μ Ci/毫升悬浮液，3-¹²⁵I-酪氨酰- γ -IFN)

30

应用剂量：每个鼻孔 5 微升

如前面的实施例所述，安置 NMRI 品系小鼠(36 \pm 0.6 克)，并仔细照顾。在应用测试制剂前，如上所述使动物镇静。然后通过细导管给予两滴 5 微升测试制剂，使总剂

量为 1 毫克脂质。此后，将动物置于分开的笼内，以防相互污染。

发现 2 小时后血中测得的放射活性相当施加剂量的大约 2.5%，肝浓度约为 2%，结肠浓度约为 2.5%。此时，从胃中(37%)和笼子加上排泄物中(32%)回收到最多的放射活性。

- 5 在用高适应性、负载有蛋白质的混合脂质-表面活性剂泡囊给药后 1 小时，根据获得的放射活性判断，中枢神经系统(CNS)中约有经鼻施加总剂量的 0.06%。

实施例 14-19:

将细胞因子输送通过受试小鼠的鼻粘膜

- 10 高适应性穿透剂

37.7 毫克/毫升大豆磷脂酰胆碱(SPC)

62.3 毫克/毫升聚山梨醇酯(Tween 80)

磷酸盐缓冲液, 10mM, pH6.5

作为抗原的破伤风类毒素(2 毫克/毫升)

- 15 γ -干扰素(IFG- γ)

粒细胞-单核细胞-集落刺激因子(GM-CSF)

白介素-4(IL-4)

白介素-12(IL-12)

应用剂量: 每个鼻孔 3 微升

- 20 从 National Institute of Nutrition(Hyderabad, India)获得 Swiss 白化小鼠(18-20 克)。在首次免疫接种时，小鼠为 8-12 周龄。将抗原单独或与各种细胞因子组合(两者均被认为至少部分与载体结合)按先后次序置于动物鼻子前，让动物鼻子吸入。从后眼眶收集血样，在用 ELISA 测定空白样品后，通过测定 492 纳米吸光度，用针对所用抗原的特异性抗体进行试验。

- 25 图 6 所示的上述测定结果提示，在简单地给予免疫载体后测得，基于高适应性抗原载体的疫苗接种配方中所有测试细胞因子的存在，均使血清吸光度比未受调节的数值有所提高。相对的差别很可能是本实施例特定实验体系中所用的受试免疫调剂剂不同的生物效力的结果，而并非表明大分子输送通过鼻粘膜的速度不同。

- 30 GM-CSF/IL-4 组合所产生的血清吸光度 100%的增加是显著的，因为已知聚山梨醇酯或磷脂酰胆碱(不包括大豆)其本身能显著增强渗透能力。因此，有理由假定，所观察到的效果不仅是因为抗原分子(摩尔质量为 150kDa)输送通过鼻粘膜，而且还证实至少一部分共同给予的细胞因子已经以生物活性形式通过了屏障。

实施例 20-21:

高适应性穿透剂

如同实施例 14-19, 只是没有细胞因子

5 破伤风类毒素(2 毫克/毫升)

混合的脂质分子团

14.8 毫克/毫升大豆磷脂酰胆碱(SPC)

85.2 毫克/毫升聚山梨醇酯(Tween 80)

磷酸盐缓冲液, 10mM, pH6.5

10 破伤风类毒素抗原(2 毫克/毫升)

应用剂量: 每个鼻孔 3 微升

如实施例 14-19 所述进行实验。

经实施例 14-19 的混合脂质分子团处理过的动物的免疫应答显然比内鼻施加高适应性脂囊泡中的抗原所测得的差, 尽管后者所含 Tween 80 的量比前者少。如果表面
15 活性剂由于其皮肤渗透增强剂的作用导致大分子输送通过鼻粘膜, 那么将预计得到恰恰相反的实验结果。

这提示高适应性载体(混合脂囊泡)通过药物渗透以外的机制将大分子输送通过鼻粘膜。

20 实施例 22-29:

团聚体大小(稳定性)效果

高度可变形的含有 NaCh 的泡囊(Transfersomes™)

89.3 毫克大豆磷脂酰胆碱

10.7 毫克胆酸钠(NaCh)

25 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5

含有 NaCh 的(混合脂质)分子团, 1 型

65 毫克大豆磷脂酰胆碱

35 毫克胆酸钠

0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5

30 含有 NaCh 的(混合脂质)分子团, 2 型

31.6 毫克大豆磷脂酰胆碱

68.5 毫克胆酸钠

- 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5 .
 含有 Tw 的高度可变形性泡囊, Transfersomes™ 1 型
 37.7 毫克大豆磷脂酰胆碱
 62.3 毫克 Tween 80 (Tw)
- 5 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5
 含有 Tw 的高度可变形性泡囊, Transfersomes™ 2 型
 64.5 毫克大豆磷脂酰胆碱
 35.5 毫克 Tween 80
 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5
- 10 含有 Tw 的(混合脂质)分子团, 1 型
 13.2 毫克大豆磷脂酰胆碱
 86.8 毫克 Tween 80
 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5
 含有 Tw 的(混合脂质)分子团, 2 型
- 15 7 毫克大豆磷脂酰胆碱
 93 毫克 Tween 80
 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5
 0.10
 脂囊泡(脂质体)
- 20 65 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)
 35 毫克胆固醇
 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, pH6.5
 破伤风类毒素(2 毫克/毫升; 自制)所用剂量
 每只小鼠每次免疫 40 微克(20 微升)TT
- 25 用体外生长的破伤风梭菌培养物的培养基滤液作为纯化的抗原。纯的类毒素购自
 Accurate Antibodies, NY, USA。

30 为了测试团聚体性质在配方中的效果, 制备了三类团聚体: 包含柔性膜的较大泡囊(直径在 100-200 纳米之间)(Transfersomes)、包含较硬膜的较大泡囊(脂质体)和小得多的分子团(直径小于 50 纳米)。选用后者来模拟用洗涤剂作为鼻粘膜渗透增强剂的较常规方法。

在测试的 8 个配方中, Transfersomes 给出了最佳的平均结果, 但是绝对滴度始终非常低, 这可能是由于抗原不纯。混合脂质分子团在产生 IgA 方面最有效, 但是就

IgG2a 和 IgM 而言与其它团聚体没有本质差别, 而就 Ig2b 而言, 它们与 Transfersomes 相当。对动物保护起决定作用的 IgG1 水平只在用 Transfersomes 来输送 TT 通过鼻子时才有显著增加(见图 7a)。

5 相对来说, 含有效力较低的洗涤剂(皮肤渗透增强能力较低)的混合分子团是效率较低的“免疫载体”(见图 7b), 就 IgG2a 和 IgM 而言, Tw 含量较高的更易变形的 Transfersomes 是出色的, 就 IgG1 和 IgG3 而言则与 Tw 含量较低不易变形的 Transfersomes 相似, 就 IgA 和 IgG2b 而言与含有 Tw 的混合分子团一样有效。测定值小是所关注的原因, 然而这可通过采用较纯的抗原来很好地克服。

10 着眼于血清中所有特异性抗 TT 抗体的累积滴度, 脂质体是初次和成熟的应答反应中较为有效的“免疫载体”(可能是由于未结合的 TT 的作用), 而富含 Tw 的混合分子团最差。NaCh Transfersomes 在后一免疫应答反应中最好(对照图 7c)。

实施例 30-35:

抗原剂量和纯度的影响

15 高度可变形的泡囊(Transfersomes)

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

与 SPC 有关的 \pm 0.04 摩尔%单磷酸脂质 A(LA)

0.9 毫升磷酸盐缓冲液, 10mM, pH6.5

20 破伤风类毒素(TT, 从当地购得, 用超滤纯化)

每只小鼠每次免疫接种 0 微克, 40 微克或 80 微克 TT

为了获得部分纯化的抗原, 使该滤液通过 10kDa 的截留膜, 用 pH6.5 的磷酸盐缓冲液充分洗涤; 在该过程中, 培养物滤液被浓缩 15 倍。

25 图 8a 描述了剂量依赖性结果。利用 Transfersomes 将 TT 给药通过鼻子给予后血清吸光度的 TT 特异性增加揭示, 在没有 LA 时, 初次和以后的免疫应答中有正的剂量依赖性, 而 LA 的存在使该趋势逆转。对于滴度和特异性抗体同种型分布, 获得了类似但不相同的图片(对照图 8b 和 8c)。存活数据表明在每一情况下均有良好的保护作用。总之, 这提示利用高度可变形的载体来非侵入性经鼻免疫所需的剂量比成功地将 TT 非侵入性经皮肤给予所需的量低得多。

30 抗原纯度的影响。比较图 8c 和 7a 和 7b 中显示的数据, 表明当非侵入性施加类毒素时, 抗原纯度对小鼠对抗破伤风毒素的免疫应答水平有很强的影响。

实施例 36-46:

给药途径

高度可变形的泡囊, NaCh Transfersomes™

如实施例 1-8 所述

5 破伤风类毒素与 NaCh 悬浮液混合

20 毫克/毫克胆酸钠, 在 pH7 的磷酸盐缓冲液中

破伤风类毒素剂量: 每次免疫接种 40 微克 TT; 每次免疫接种 5 微克 TT, 10 微克 TT, 20 微克 TT, 40 微克 TT。

10 用与前述实施例所述相同的实验步骤, 在经鼻、经口和皮下给予抗原后, 测定抗体特异性血清吸光度、对应的抗体滴度和同种型分布, 以及动物抵抗破伤风毒素的保护水平。

结果显示在图 9 中。图 9 表明在侵入性和非侵入性给予抗原后, 血清吸光度的增加最终是相当的(图 9a)。然而, 后一情况中的滴度明显较低(除了初次应答中)。令人感兴趣的是, 皮下注射只是在第二次加强接种后产生了优良的结果, 而 TT 与胆酸盐(可作为鼻渗透增强剂)的组合在总抗体滴度中始终是较好的。其可能的原因是 IgG2b 浓度高(从图 9b 看出)。注射最有效地诱导了 IgG1 和 IgM 型抗体。

20 动物均能通过上述 TT 疫苗接种得到很好地保护, 但只是在两次加强后; 相反, 在鼻接种情况下, 一次加强就足够了(数据未显示)。在鼻接种情况下, 但当不注射抗原时, 采用剂量低 4-8 倍的纯化 TT 能提供足够的保护作用(对照图 10)。

实施例 47

低分子量佐剂(脂质 A)的效果

高度可变形的免疫调节的 TT-Transfersomes™:

如实施例 9-14

25 破伤风类毒素: 2 毫克/毫升, 每次免疫用 20 微升或 40 微升, 对应于 40 微克或 80 微克 TT

30 认为共同给予免疫活性(通常是免疫增强性)分子对于呈递与载体相连的 TT 给机体是有益的。为了具体证实该结论, 比较了采利用含有或不含有单磷酸脂质 A(LA)(它是已知能引发产生 TNF 的众所周知的免疫刺激剂)的 Transfersomes 进行 TT 的非侵入性免疫呈递的结果。然而, 对于所用的相对高剂量的抗原, 没有发现强的依赖性。在任一情况下均达到了相当高的滴度和预防性免疫应答, 而用受益于 LA 存在的纯化的 TT 却并非如此。

实施例 48-53:

高分子量免疫调节剂(细胞因子)

高度可变形的泡囊, Tw Transfersomes™:

5 如实施例 1-8 所述, 加上

各种细胞因子(γ -干扰素, GM-CSF, IL-4, IL-12)

(0.05 毫克 IFN- γ ; 0.004 毫克 GM-CSF; 0.004 毫克/毫升 IL-4, 0.004 毫克/毫升 IL-12)

10 破伤风类毒素, 2 毫克/毫升, 对应于每只小鼠每次免疫接种 40 微克 TT(纯化的, 自制的)

研究了细胞因子个别和组合的效果。结果示于图 5。图 5 提示, GM-CSF 加上 IL-4 的组合能支持小鼠体内产生抗 TT 抗体, IFN- γ 、IL-12 以及 IL-4 可能也可以(参照图 11a)。除了使用 IL-12 的情况外(它只对 IgG2b 的产生有强烈影响), 就 IgM 和 IgA 而言看到有最强的效果。只有 GM-CSF 和 IL-4 的组合强烈增加了与保护有关的 IgG1, 15 而 IgG3 则不受影响。注射对于 IgG1 最佳(参照图 11b)。

实施例 54-58:

低分子量佐剂和高分子量佐剂组合(LA + IL-12)的效果

高度可变形泡囊, NaCh Transfersomes™,

20 如实施例 1-8 所述, 加上

每毫升免疫悬浮液 0.4 毫克 IL-12

与 SPC 有关的 0.04 摩尔%单磷酸脂质 A(LA)

破伤风类毒素(纯化的), 对应于每只小鼠每次免疫接种 40 微克 TT

25 低分子量和高分子量免疫佐剂的混合物确证了实施例 25-31 所讨论的效果。结果示于图 12, 该结果显示在免疫应答的早期, 该组合的免疫增强作用特别强, 该组合在任何情况下均优于单用 LA。

实施例 59-71:

细菌壁组分, 霍乱毒素作为佐剂:

30 高度可变形泡囊, NaCh Transfersomes™(Tfs),

TfsC

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

0.9 毫升磷酸盐缓冲液, 10mM, pH6.5

0.1 毫升乙醇

TfsT

5

36 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

64 毫克 Tween 80

0.9 毫升磷酸盐缓冲液, 10mM, pH7

霍乱毒素(CT; Sigma, Neu-Ulm), 如所指定, 每次免疫接种 2 微克

破伤风类毒素(TT, 纯; Accurate antibodies), 2 毫克/毫升

10

在 4-6 只 Swiss 白化小鼠的两个鼻孔内, 以 T 型 Transfersomes(TfsT)每次免疫接种每只小鼠采用的剂量为 0 微克 TT, 1 微克 TT, 5 微克 TT, 10 微克 TT, 20 微克 TT, 40 微克 TT(在 CT 不存在时)和 0.5 微克 TT、1 微克 TT、5 微克 TT(采用 CT 时), 以 C 型 Transfersomes(TfsC)免疫接种的剂量为 0.5 微克 TT。另外, 在阳性对照组的每只小鼠相应部位每次免疫接种皮下注射 TfsT 的 20 微克 TT。免疫接种在第 1、14、28 天进行。

15

当每次免疫接种的抗原剂量超过 20 微克时, 施加在鼻内的抗原的保护效果良好; 较低的剂量产生不充分的保护力、但能检测到保护作用(参照图 13)。当霍乱毒素(CT)和破伤风类毒素一起加入测试配方中时, 以最低的测试剂量(每次免疫 0.5 微克)下就已经获得了不依赖于超变形载体组分的优良保护作用。在施加到皮肤上的配方含有

20

CT 的所有测试组中, 保护作用均是完全的。

实施例 72-74:

大肠杆菌不耐热毒素(HLT)作为免疫佐剂

高度可变形的泡囊, Transfersomes™:

25

TfsC

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

0.9 毫升磷酸盐缓冲液, 10mM, pH6.5

不耐热毒素(HLT, SIGMA, Neu-Ulm), ≤1 毫克/毫升, 如果需要, 加上

30

破伤风类毒素(TT, 纯, Accurate antibodies) 2 毫克/毫升

或

TfsT

36 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

64 毫克 Tween 80

0.9 毫升磷酸盐缓冲液, 10mM, pH7

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

5 破伤风类毒素(TT, 纯, Accurate antibodies) 2 毫克/毫升

制备了抗原载体, 所有实验(用 Swiss 白化小鼠)和试验如前面实施例所述那样进行。将一系列不同的 HLT 剂量(每次应用约 50 毫微克到数微克)与每次应有浓度大约 100 毫微克至 10 微克的 TT 联用。在大多数情况下, 小鼠免疫接种所用剂量对应于 0.5 微克/小鼠/鼻内免疫和 0.1-0.5 微克 HLT/小鼠/鼻内免疫, 阳性对照为皮下注射 0.5 微克

10 TT。

如图 14 所示, 与没有佐剂的皮下注射相比, 作为佐剂的 HLT 使抗 TT 滴度提高。体液应答依赖于剂量, 即用较高剂量的 HLT 实现了较高的抗 TT 滴度。然而, 此相关性并非线性, 而是显示了最大值(数据未显示)。

高剂量和低剂量免疫佐剂的抗破伤风毒素攻击的保护作用同样有效。

15 这提示, 佐剂应在鼻中与 Transfersomes 联用, Transfersomes 最高剂量是在常规侵入性(皮下)免疫接种所用剂量的下端(low-end)范围内; 对于在该系列中测试的大多数(如果不是全部)免疫佐剂, 免疫-Transfersomes 在鼻中使用的最低剂量也应低 1-2 个数量级。

20 实施例 75

含有破伤风类毒素和霍乱毒素作为抗原的二价疫苗接种

高度可变形的泡囊, Transfersomes™:

86.3 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

13.7 毫克胆酸钠(NaChol)

25 0.9 毫升磷酸盐缓冲液, 10mM, pH6.5

霍乱毒素(CT, SIGMA, Neu-UIm), ≤ 1 毫克/毫升,

破伤风类毒素(TT, 纯, Accurate antibodies) 2 毫克/毫升

或

TfsT

30 36 毫克大豆磷脂酰胆碱(SPC)

64 毫克 Tween 80

0.9 毫升磷酸盐缓冲液, 10mM, pH7

霍乱毒素(CT, SIGMA, Neu-UIm), ≤ 1 毫克/毫升

破伤风类毒素(TT, 纯, Accurate antibodies) 2 毫克/毫升

关于配方及其配制、泡囊性质、动物实验以及下列试验的详情见上文有关实施例。

- 5 本实验系列的主要结果是, 加入配方中作为佐剂的霍乱毒素也可以实际上相关的量诱导抗 CT 抗体形成。该效果可以(但不是必须)用足量的 CT 和 TT 浓度来实现以确保抵抗破伤风毒素攻击的良好保护力。图 15 比较了用相同载体中的 TT 和 CT 免疫接种的相同小鼠的抗 TT 和抗 CT 滴度。该图揭示了含有一种以上抗原的 Transfersomes™ 可作为至少二价疫苗基础的可能性。

参考文献

- Bagnasco-M; Mariani-G; Passalacqua-G; Motta-C; Bartolomei-M; Falagiani-P; Mistrello-G; Canonica-GW "通过非注射途径给予健康人的主要 *Parietaria judaica* 变应原(Par j 1)的吸收和分布动力学" *J-Allergy-Clin-Immunol.* 1997; 100:122-9
- 5 Biberoglu-K; Gursoy-R; Yildiz-A "用促性腺素释放剂量激动剂布舍瑞林治疗雌激素依赖型妇科病" *Gynecol-Endocrinol.* 1991; 5:109-22
- Bruins-J; Hijman-R; Van-Ree-JM "在青年男性和女性志愿者中用脱甘氨酸-[Arg8]加压素进行急性和慢性治疗的效果" *Peptides.* 1995; 16:179-86
- Cevc-G "通过皮肤的药物输送" *Exp. Opin. Invest. Drugs(1997)* 6:1887-1937
- 10 Cevc-G; Gebauer-D; Schätzlein-A; Blume-G "超柔性泡囊 Transfersomes 具有极低的渗透阻力, 可将治疗量的胰岛素输送通过完整的哺乳动物皮肤" *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1368:201-215
- Draghia-R; Caillaud-C; Manicom-R; Pavirani-A; Kahn-A; Poenaru-L "利用鼻灌输将基因输送入大鼠中枢神经系统" *Gene-Ther.* 1995;2:418-23
- 15 Drejer-K, Baag-A, Bech-K, Hansen-P, Sorensen-AR, Mygind-N. *Diab. Med.* 1992, 9:335-340
- Flanagan-B; Pringle-CR; Leppard-KN "表达猿免疫缺陷病毒 Gag 抗原的重组人腺病毒能诱导小鼠长期免疫应答" *J-Gen-Virol.* 1997; 78:991-7
- Gizurarson-S; Bechgaard-E "鼻内给予人胰岛素" *Diabetes-Res-Clin-Pract.* 1991 年
- 20 5月; 12: 71-84
- Ghigo-E; Arvat-E; Gianotti-L; Grottoli-S; Rizzi-G; Ceda-GP; Boghen-MF; Deghenghi-R; Camanni-F "鼻内或经口短期给予海舍瑞林(一种合成的六肽)不能使老人的生长激素反应性脱敏" *Eur-J-Endocrinol.* 1996;135:407-12
- Harris-AS "综述: 经鼻给予肽提供的临床机会" *J-Drug-Target.* 1993;1:101-16
- 25 Huneycutt-BS; Plakhov-IV; Shusterman-Z; Bartido-SM; Huang-A; Reiss-CS; Aoki-C "经鼻接种后水泡性口炎病毒蛋白在 BALB/c 小鼠脑子中的分布: 免疫组织化学分析" *Brain-Res.* 1994; 635:81-95
- Hussain-A; Hamadi-S; Kagashima-M; Iseki-K; Dittert-L "提高肽的亲脂性是否增强它们的鼻吸收?" *J-Pharm-Sci.* 1991; 80:1180-1
- 30 Ichikawa-M; Nakamuta-H; Hoshino-T; Ogawa-Y; Koida-M "经鼻给予鲑鱼降钙素在 1 型骨质疏松大鼠中的抗骨质疏松效果: 与皮下给药的比较" *Biol-Pharm-Bull.* 1994;17:911-3

- Illum-L “经鼻输送肽和蛋白质” *Trends-Biotechnol.* 1991;9:284-9
- Illum-L; Davis-SS “鼻内胰岛素临床药物动力学” *Clin-Pharmacokinet.* 1992 年 7 月; 23: 30-41
- Invitti-C; Fatti-L; Camboni-MG; Porcu-L; Danesi-L; Delitala-G; “用奥曲肽经鼻粉末
5 长期治疗对于肢端肥大患者生长激素, 胰岛素样生长因子 I、胰岛素样生长因子结合
蛋白 1 和 3 的血清水平的影响” *Cavagnini-F J-Endocrinol-Invest.* 1996;19:548-55
- Kida-S; Pantazis-A; Weller-RO. “SF 从大鼠蛛网膜下腔直接流入鼻淋巴管。解剖
学、组织学和免疫学意义” *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1993;19:480-448
- Laursen-T; Grandjean-B; Jorgensen-JO; Christiansen-JS “经鼻给予 GH 缺陷型患者
10 三种不同剂量的生长激素(GH)的生物利用率和生物活性: 与静脉内和皮下给药的比
较” *Eur-J-Endocrinol.* 1996;135:309-15
- Machida-M; Sano-K; Arakawa-M; Hayashi-M; Awazu-S “大鼠鼻粘膜吸收重组人粒
细胞集落刺激因子(rhG-CSF)” *Pharm-Res.* 1993; 10:1372-7
- Maejima-K; Tamura-K; Taniguchi-Y; Nagase-S; Tanaka-H “各种细颗粒对于吸入日
15 本雪松花粉变应原的小鼠 IgE 抗体产生的效果的比较” *J-Toxicol-Environ-Health.*
1997;52:231-48
- Maitani-Y; Machida-Y, Nagai-T “分子量和电荷对于家兔经鼻吸收葡聚糖和 DEAE-
葡聚糖的影响” *Int.J.Pharmaceut.* 1989;49:23-27
- McMartin-C; Hutchinson-LEF; Hyde-R; Peterrs-GE. “从鼻腔吸收药物和大分子的
20 结构性需求的分析” *J.Pharm. Sci.* 1987;76:535-540
- Mori-I; Nakakuki-K; Kimura-Y “温度敏感型副流感 1 型疫苗病毒通过感染嗅神经
元直接进入中枢神经系统” *J-Gen-Virol.* 1996; 77:2121-4
- Naumann-E; Bartussek-D; Kaiser-W; Fehm-Wolfsdorf-G “加压素和认知过程: 两个
行为有关的潜在性研究” *Peptides.* 1991; 12:1379-84
- 25 Pasechnik-V; Price-J “用蛋白质载体将大分子药物输送至 CNS” *Exp. Opin. Invest.*
Drugs 1996,5:1255-1276
- Paul-A; Cevc-G “非侵入性给予蛋白质抗原: 用 Transfersomes 中的牛血清白蛋白
透皮免疫接种” *Vaccine Res.* 1995;4:145-164
- Paul, A., Cevc, G. “非侵入性给予蛋白质抗原, 用牛血清白蛋白表皮免疫接种”
30 *Vaccine Res.* (1995) 4: 145-164.
- Perras-B; Molle-M; Born-J; Fehm-HL “经鼻给予加压素 3 个月期间的睡眠和注意
症状, 两位老人的前导研究。” *Peptides.* 1996;17:1253-5

- Pietrowsky-R; Struben-C; Molle-M; Fehm-HL; Born-J “经鼻给予和静脉内给予加压素后的脑潜在变化：鼻脑直接通道对于肽在人体中效果的证据” *Biol-Psychiatry*. 1996;39:332-40
- Pihoker-C; Middleton-R; Reynolds-GA; Bowers-CY; Badger-TM “静脉内和鼻内给予身材矮小儿童生长激素释放肽-2 的诊断研究” *J-Clin-Endocrinol-Metab*. 1995;80:2987-92
- Pohl-J; Arnold-H; Schulz-A; Pause-BM; Schulte-HM; Fehm-Wolfsdorf-G “加压素类似物对人疼痛感知的调节作用” *Peptides*. 1996;17:641-7
- Sarkar-MA “鼻粘膜中的药物代谢” *Pharm-Res*. 1992;9:1-9
- Shimoda-N; Maitani-Y; Machida-Y; Nagai-T “剂量、pH 和同渗容摩对于大鼠鼻内吸收重组人促红细胞生成素的影响” *Biol-Pharm-Bull*. 1995;18:734-9
- Sperber-SJ; Doyle-WJ; McBride-TP; Sorrentino-JV; Riker-DK; Hayden-FG “干扰素 β 丝氨酸在实验型鼻病毒感染中的耳科影响” *Arch-Otolaryngol-Head-Neck-Surg*. 1992;118:933-6
- Ting-TY; Gonda-I; Gipps-EM “经鼻输送聚乙烯醇微粒。I. 通过喷雾干燥和喷雾退溶产生” *Pharm-Res*. 1992;9:1330-5
- Tsume-Y; Taki-Y; Sakane-T; Nadai-T; Sezaki-H; Watabe-K; Kohno-T; Yamashita-S “肠胃道吸收蛋白质进入血液和淋巴循环的定量评价” *Biol-Pharm-Bull*. 1996;19:1332-1337
- Watanabe-Y; Matsumoto-Y; Yamaguchi-M; Kikuchi-R; Takayama-K; Nomura-H; Naruyama-K; Matsumoto-M “经鼻给予家兔后重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)和血白细胞吸收动力学” *Biol-Pharm-Bull*. 1993;16:93-5.
- Watanabe-Y; Matsumoto-Y; Kikuchi-R; Kiriya-M; Nakagawa-K; Nomura-H; Maruyama-K; Matsumoto-M “经鼻给予家兔后重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)的药效学和药物动力学” *J-Drug-Target*. 1995;3:231-8
- Wearley-LL “通过非侵入性途径输送蛋白质和肽的最新进展” *Crit-Rev-Ther-Drug-Carrier-Syst*. 1991; 8:331-94
- Westenberg-HG; Hijman-R; Wiegant-VM; Laczi-F; Van-Ree-JM “经鼻和口服给予健康对象后血浆中的 DGAVP 药效学” *Peptides*. 1994;15:1101-4
- van-der-Wiel-HE; Lips-P; Nauta-J; Kwakkel-G; Hazenberg-G; Netelenbos-JC; van-der-Vijgh-WJ “鼻内降钙素在短期固定期间鼻内降钙素抑制增加的骨重吸收：鼻内降钙素对于骨周转生物化学参数的影响的 双盲研究” *J-Bone-Miner-Res*. 1993;8:1459-65

说明书附图

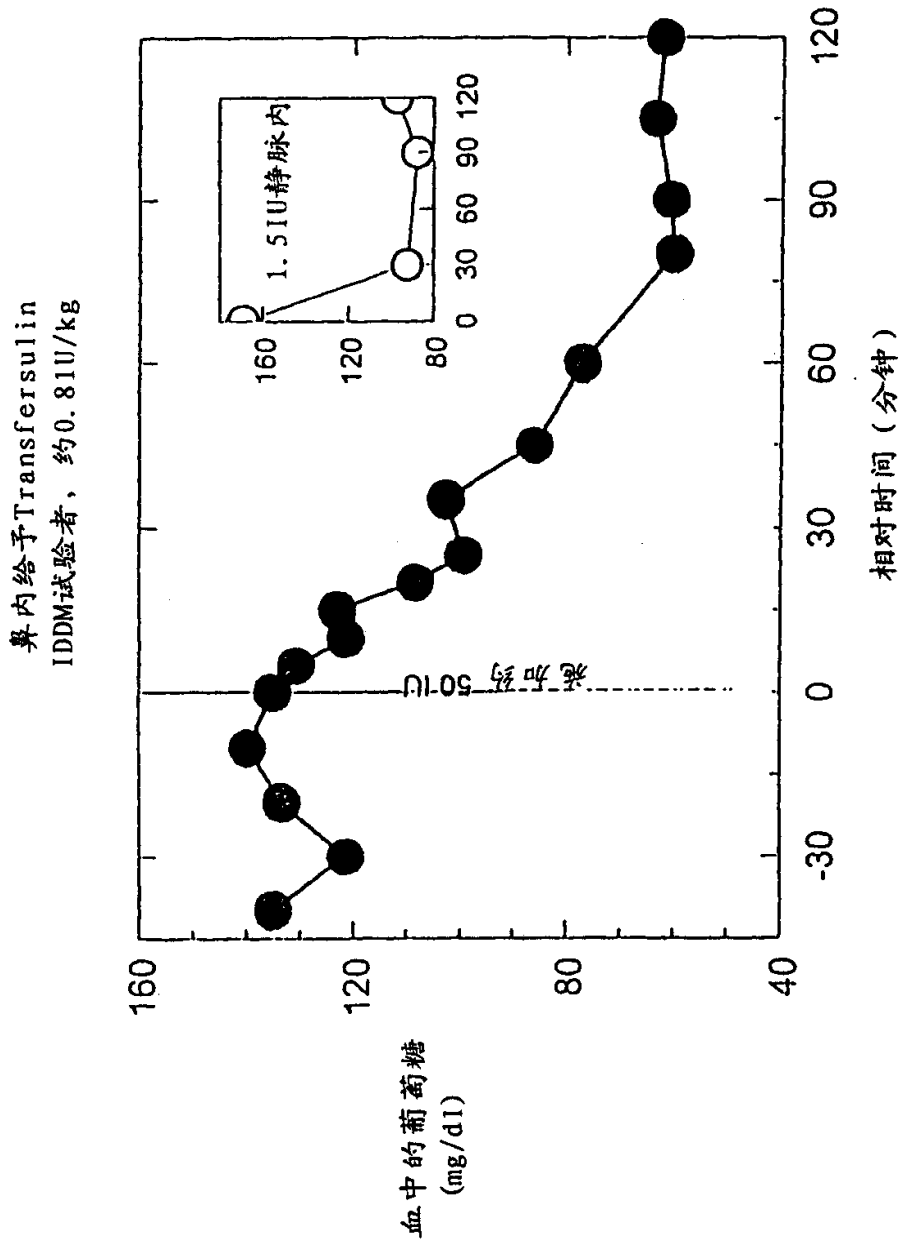


图 1

鼻内给予Transfersulin
血糖量正常的测试者, 约0.15U/kg (2x)

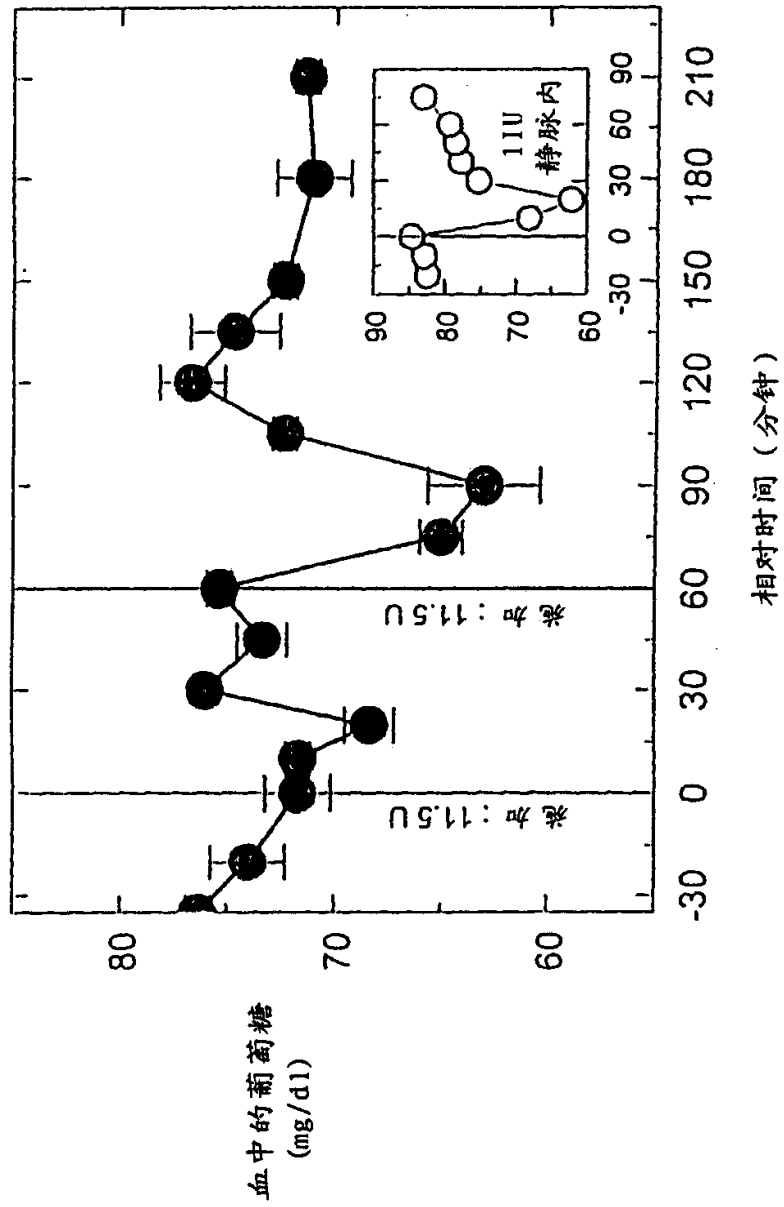


图 2

鼻内给予Transfersulin
血糖量正常的测试者, 约0.15U/kg (2x)

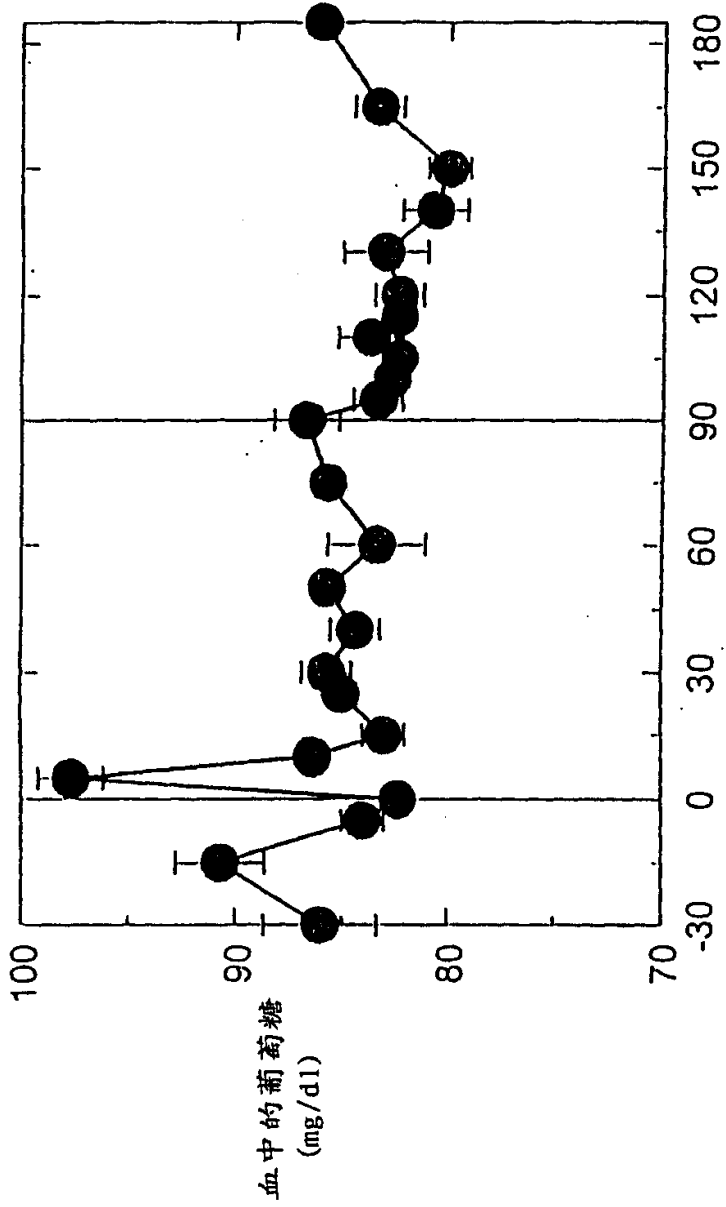


图 3a

鼻内给予Transfersulin
IDDM试验者, 约0.41U/kg

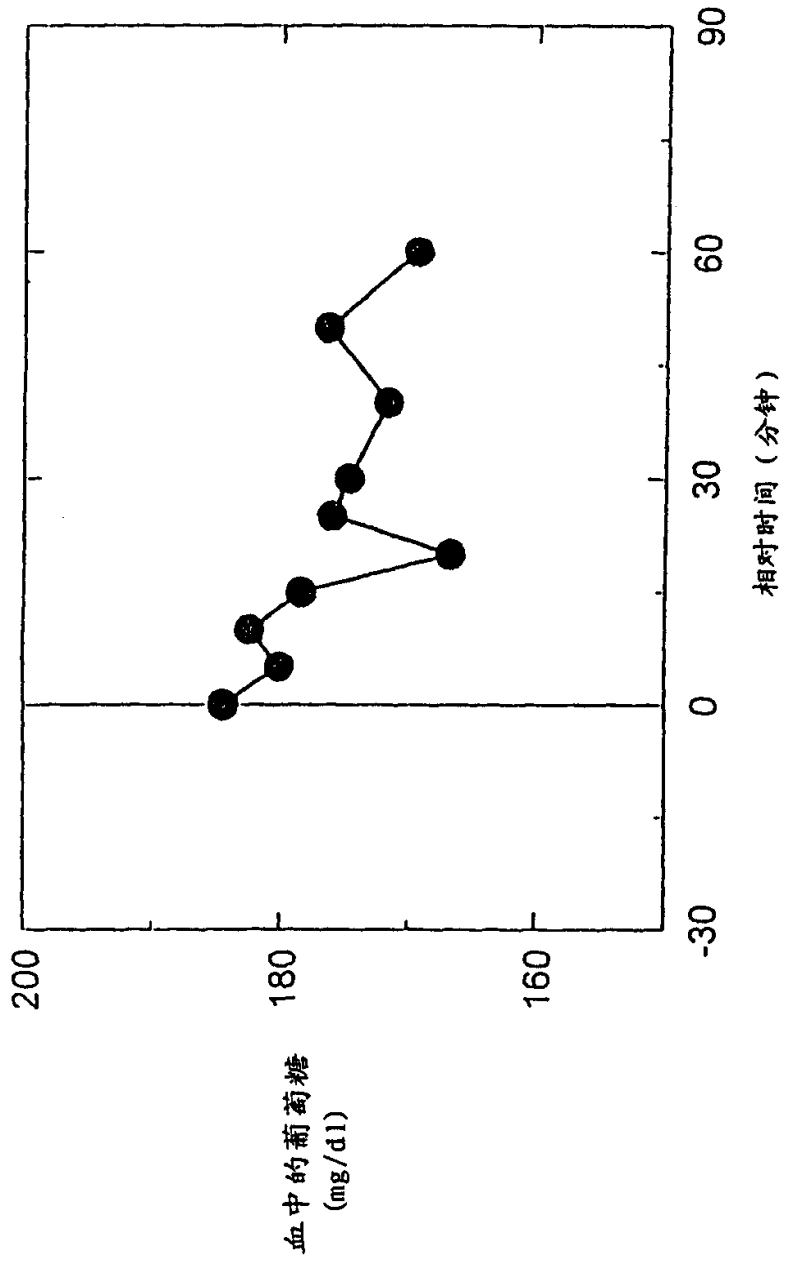
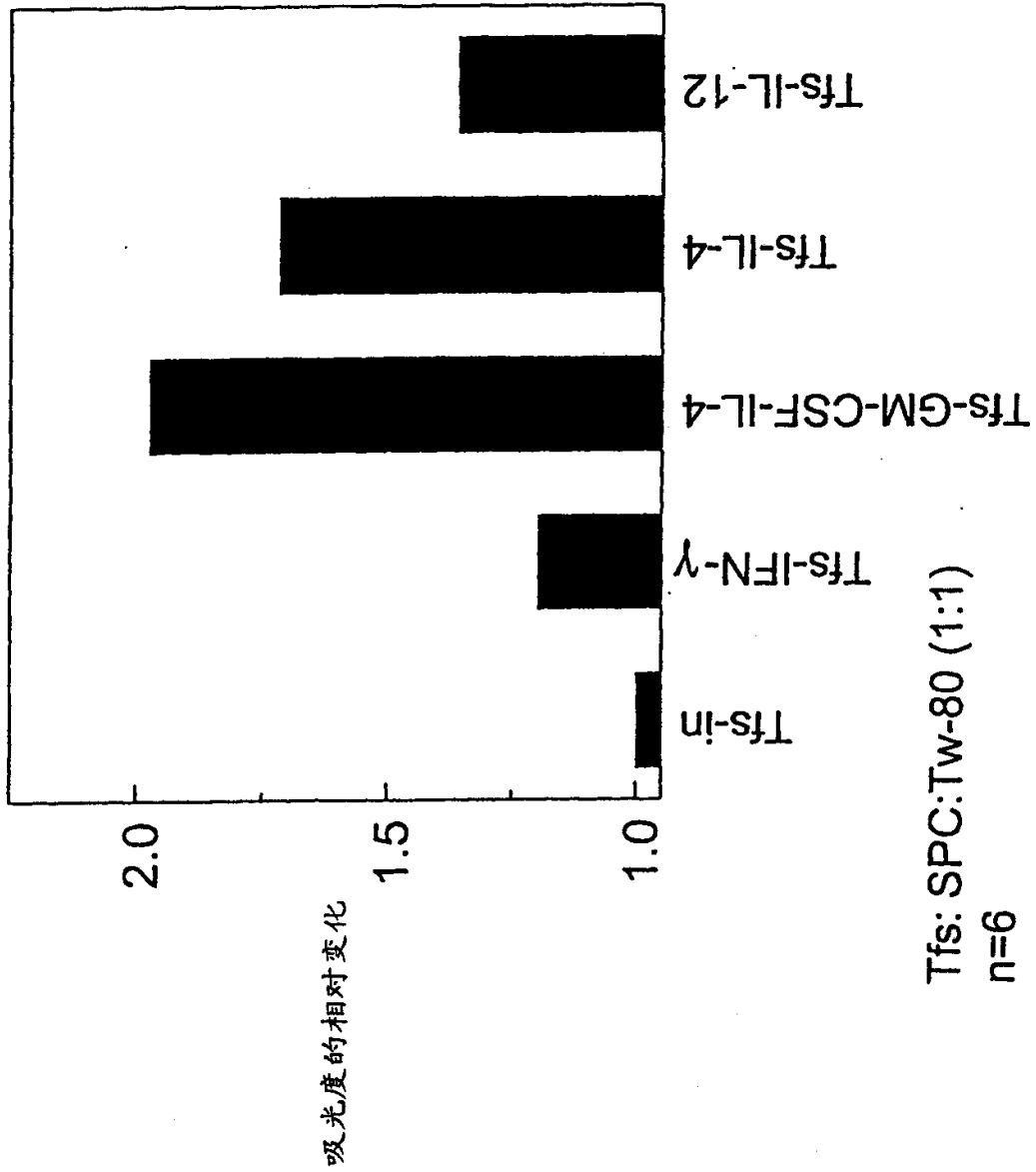


图 3b

经鼻给予的细胞因子对于特异性免疫应答的影响
第1次加强 + 7天



01.09.21

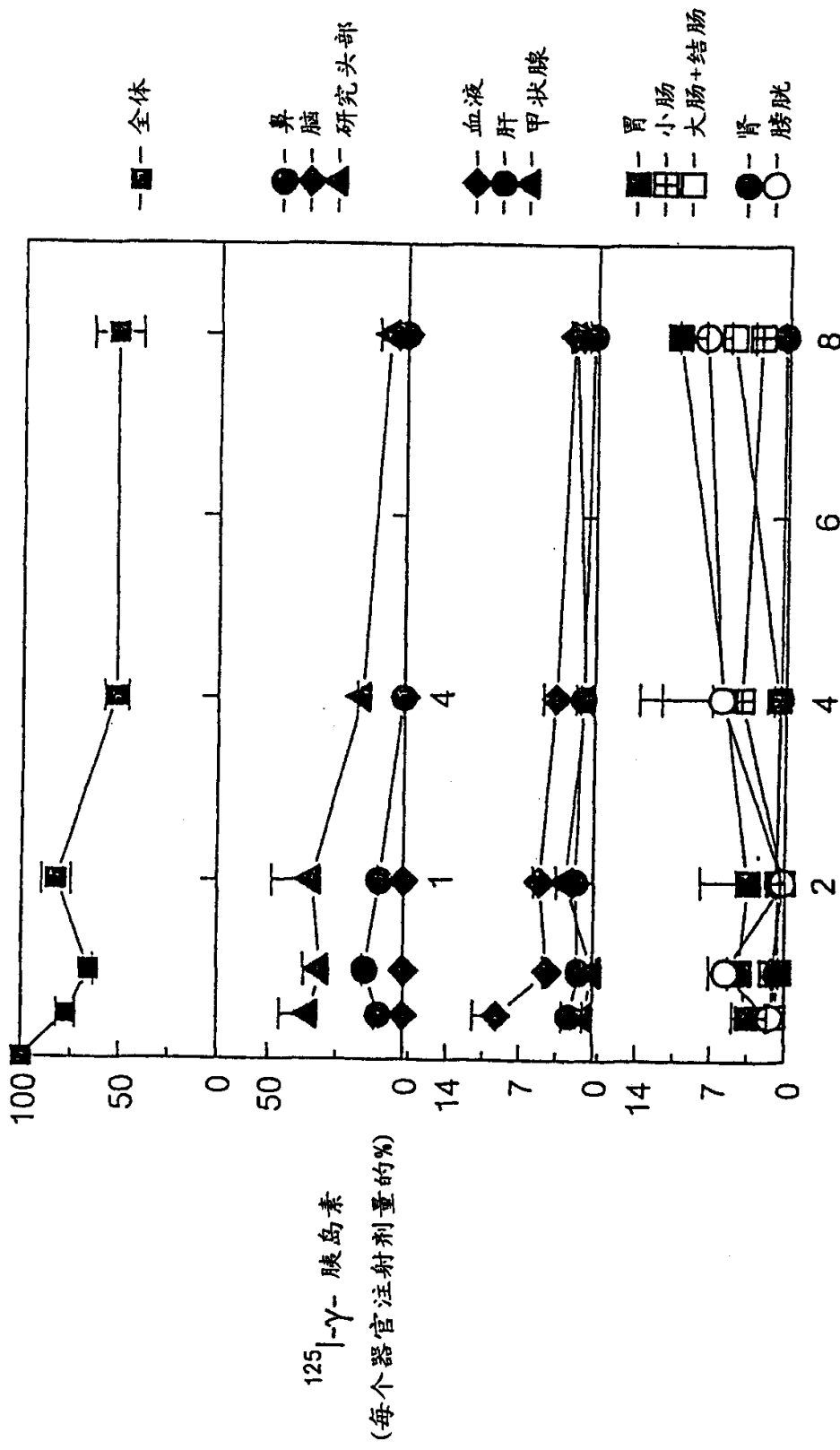


图 5

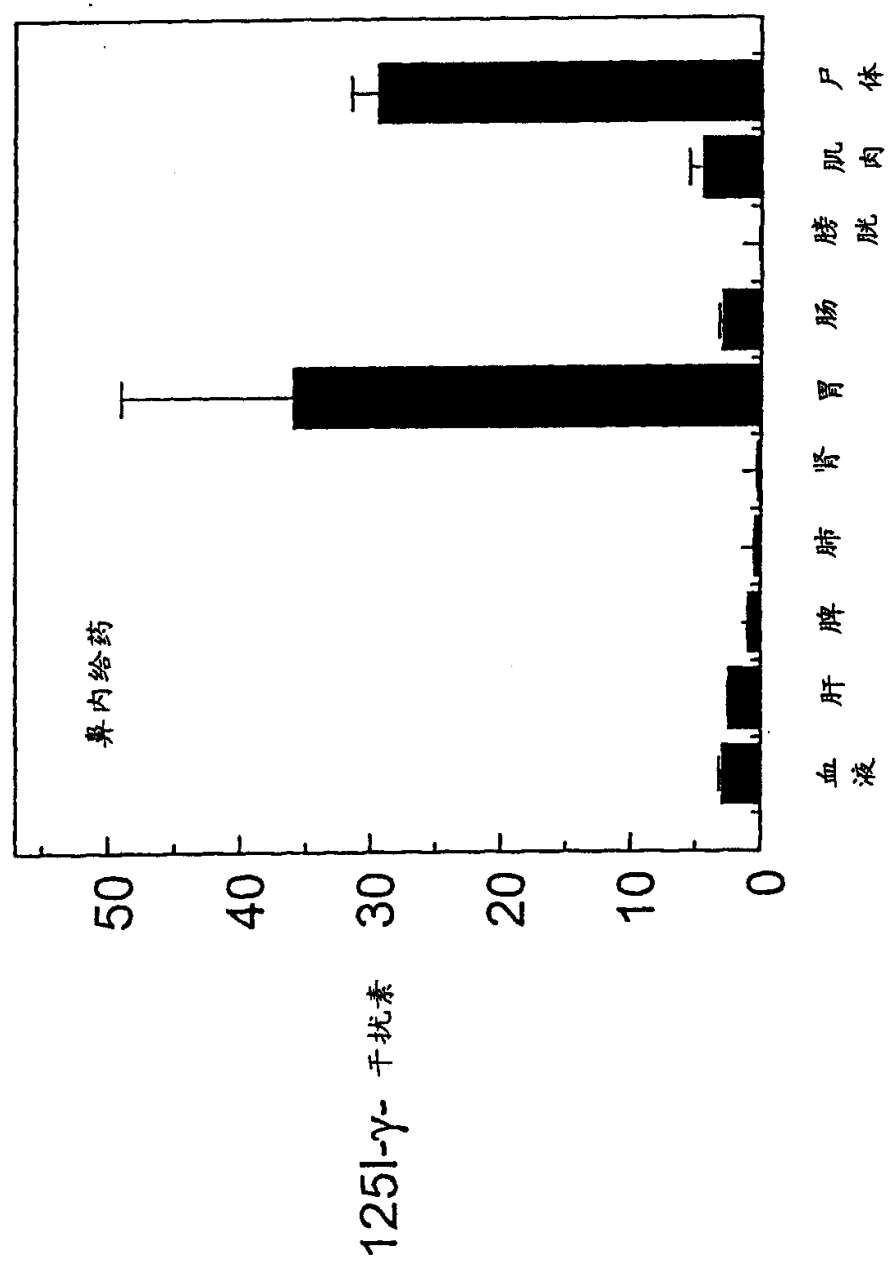
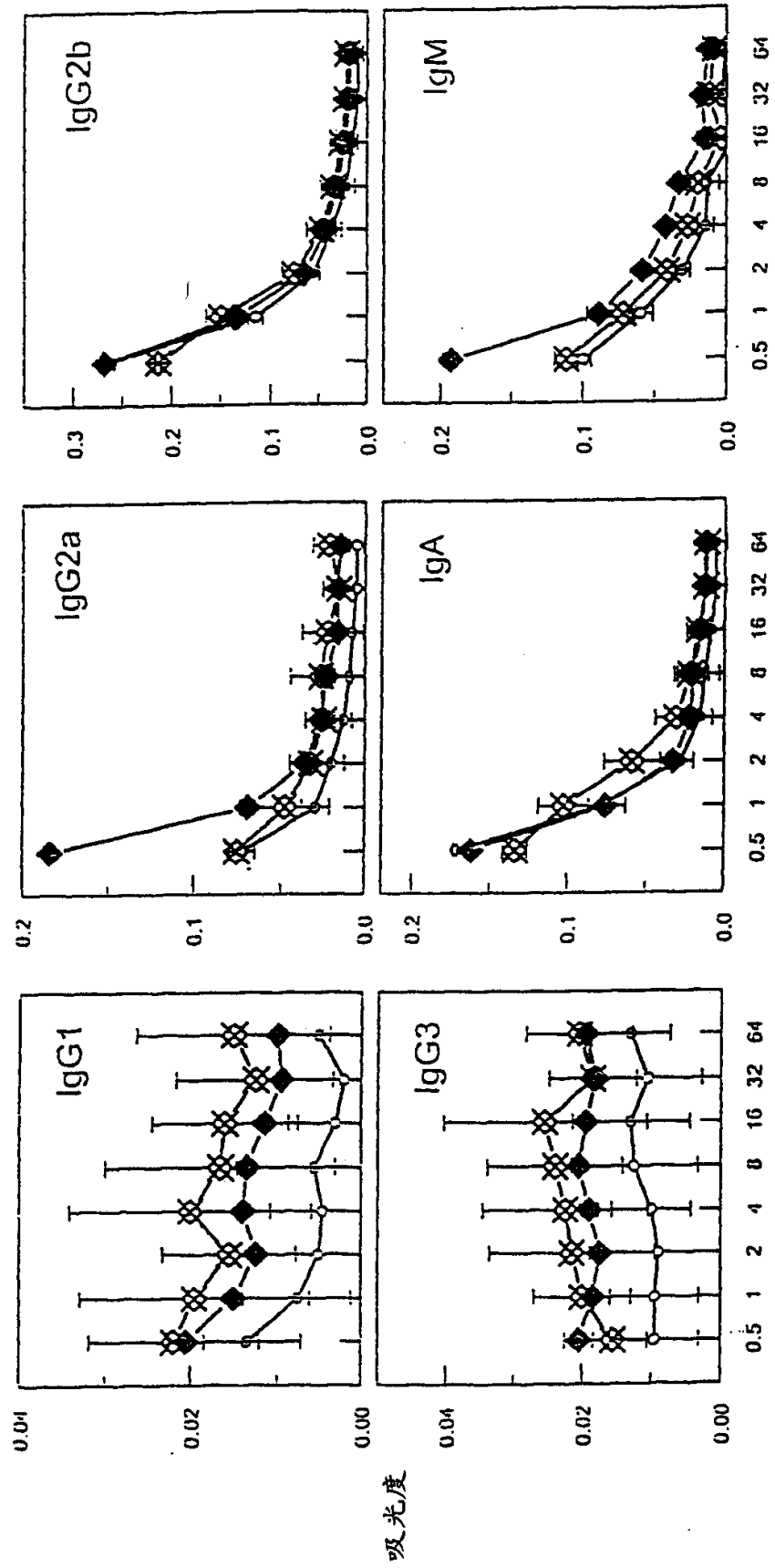


图 6

鼻内给药：破伤风类毒素 (TT, 不纯)

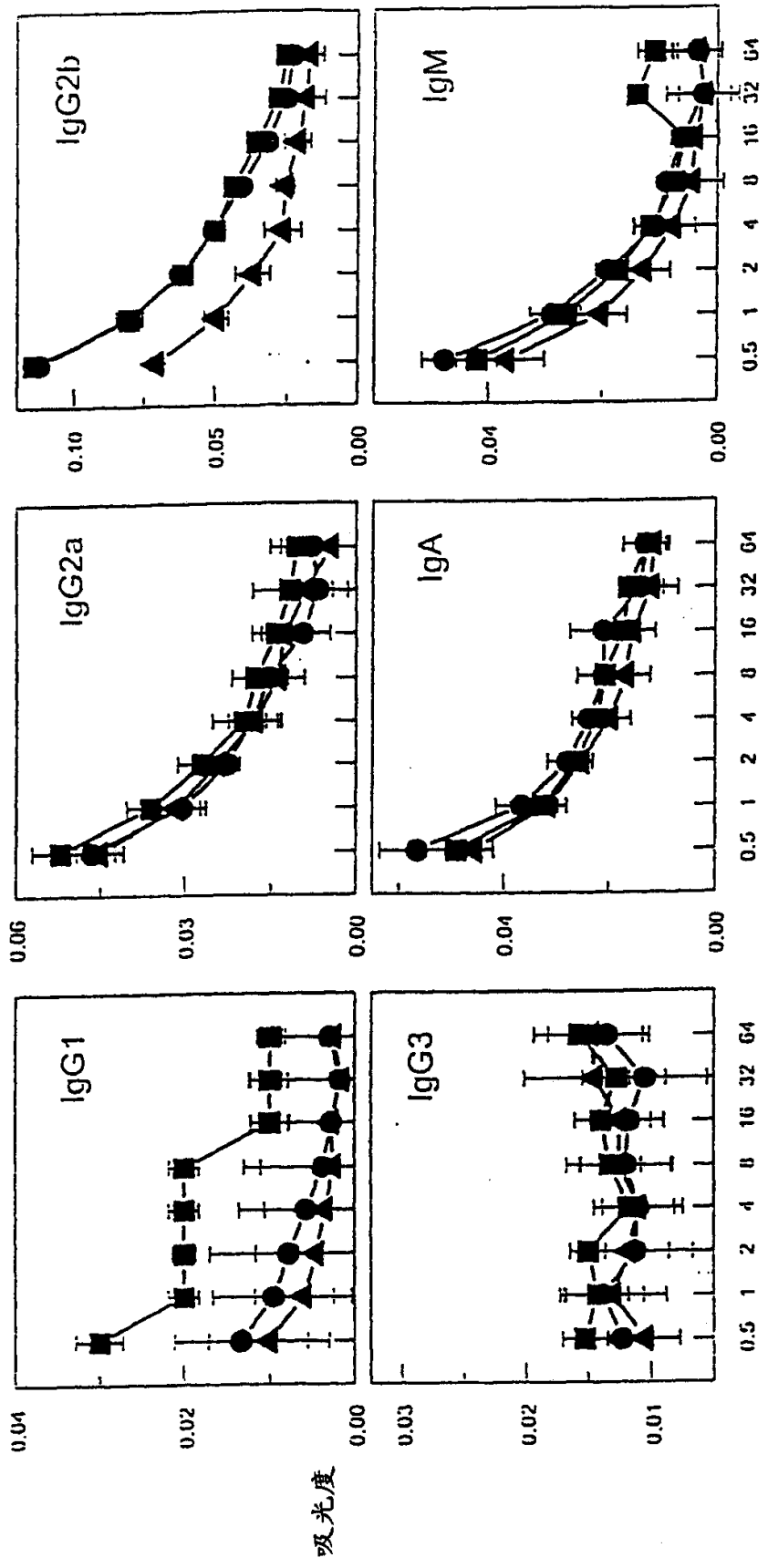


抗血清稀释度的倒数 $\times 10^2$

—○— 混合分子团-SPC: Tw-80 (1: 4) 微克类毒素
 —◆— SPC:Tw-80 (1:1)-40 微克类毒素
 —⊗— SPC:Tw-80 (3:1)-40 微克类毒素

图 7a

鼻内免疫：破伤风类毒素 (TT, 不纯)



抗血清稀释度的倒数 $\times 10^2$

所有组的抗原剂量：每只小鼠40微克

—■— SPC:NaCl (4.5:1)
 —●— 混合分子团 (SNa 1:1)
 —▲— SPC:胆固醇 (1:1)

图 7b

鼻内免疫：破伤风类毒素 (TT, 不纯)
载体大小和可变形性的影响

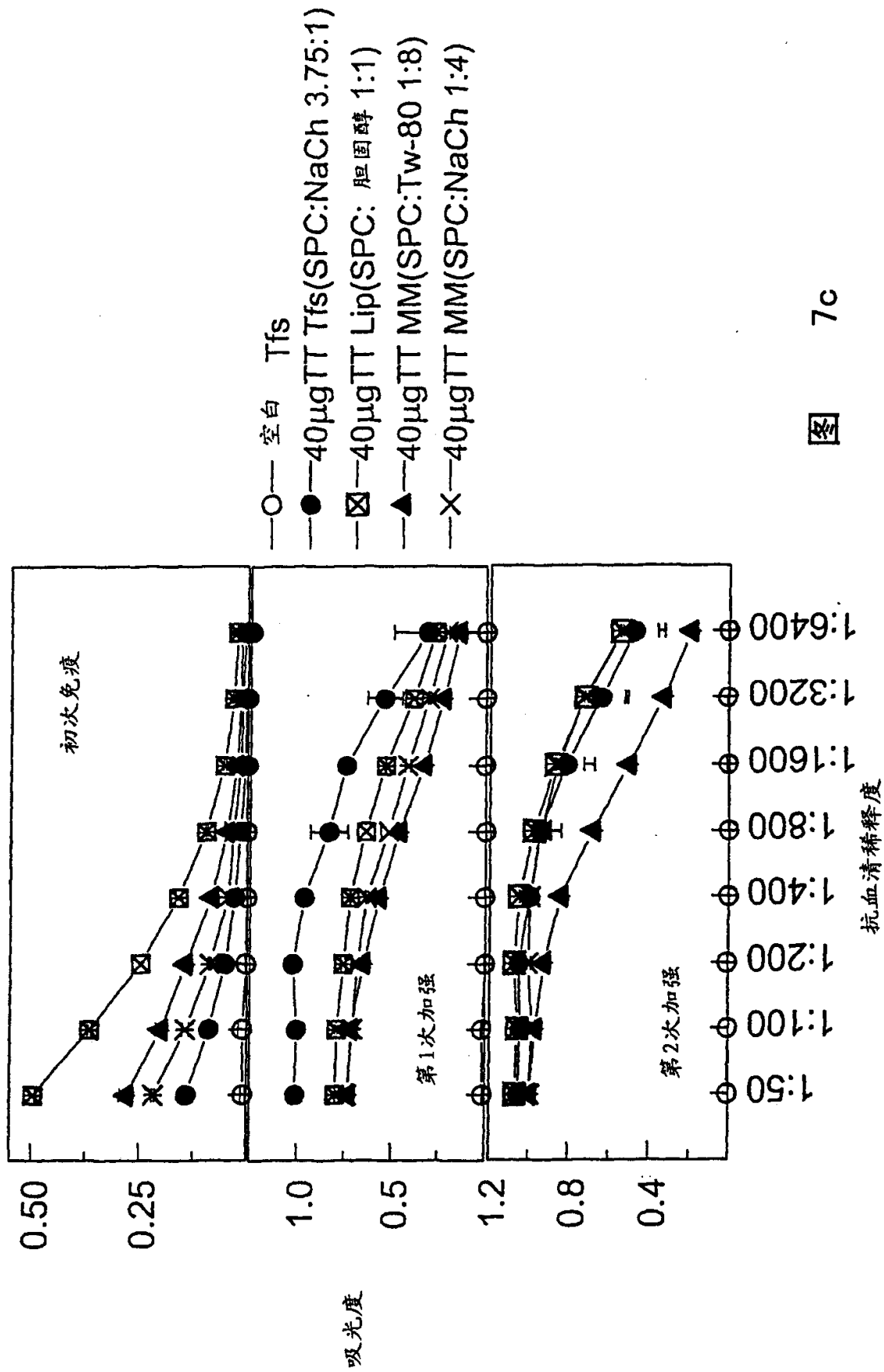


图 7c

鼻内免疫：破伤风类毒素 (TT, 纯化的)
剂量效应

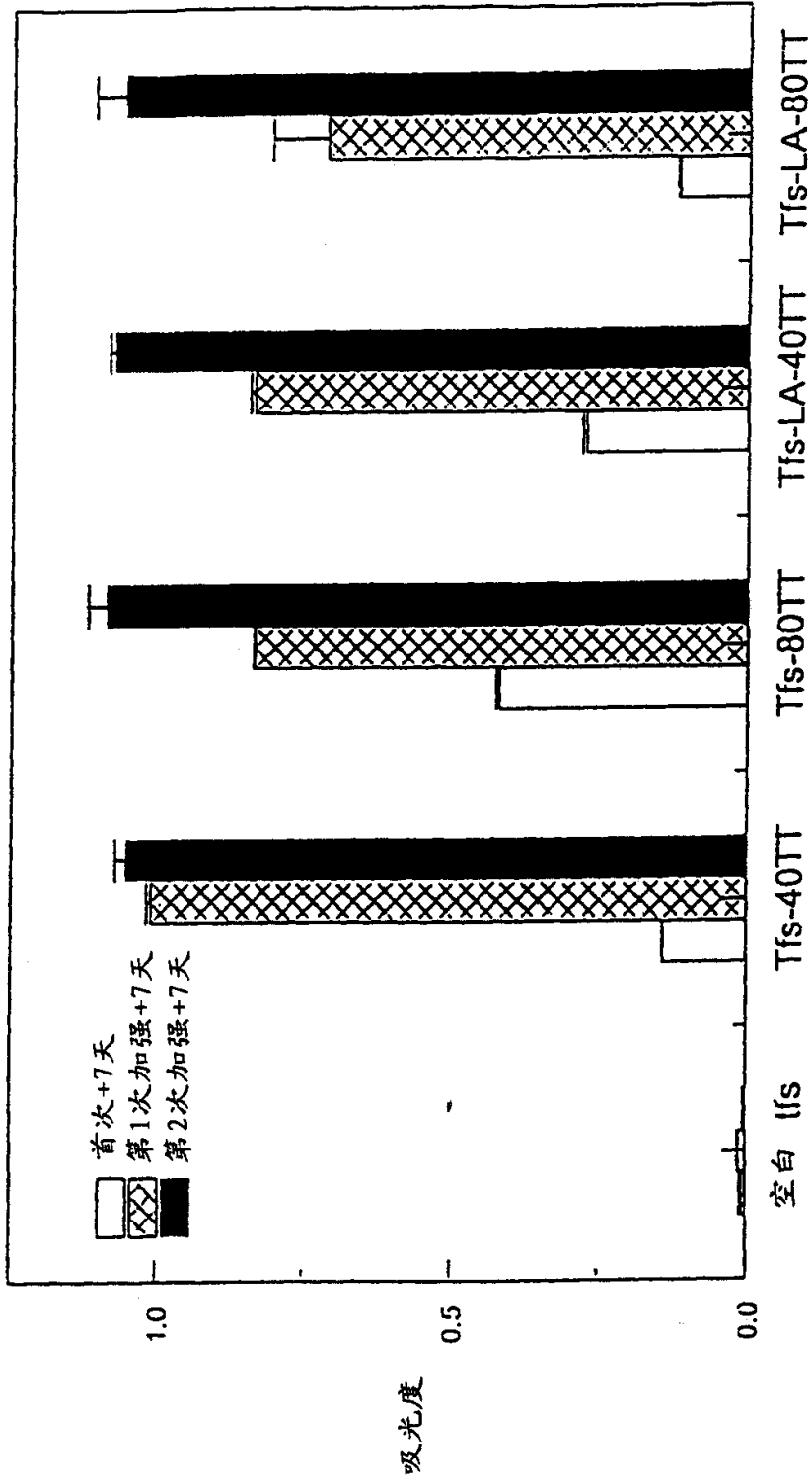


图 8a

鼻内免疫：破伤风类毒素 (TT, 纯化的)，抗原剂量的效应

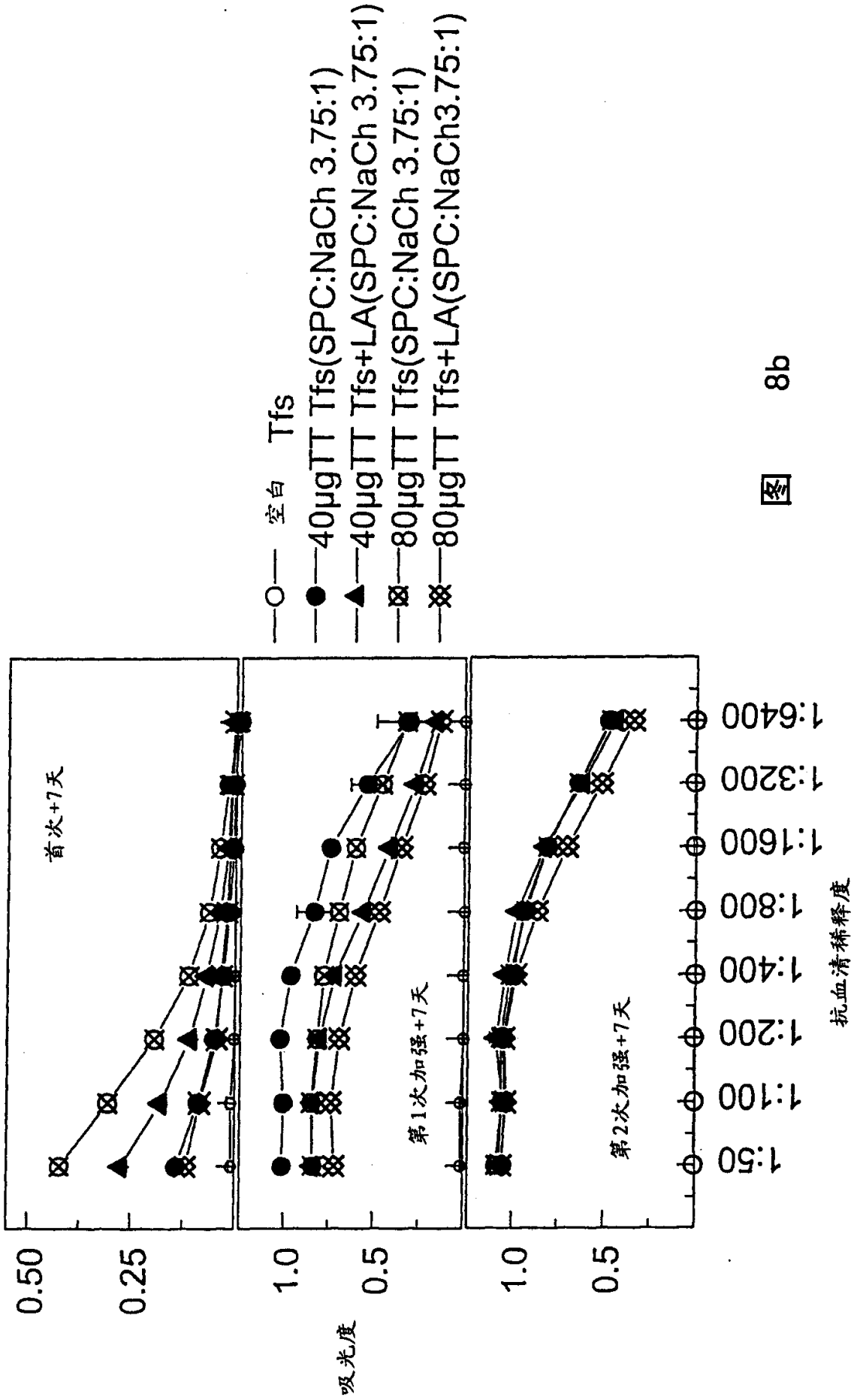


图 8b

鼻内免疫：破伤风类毒素 (TT, 纯化的)，剂量效应

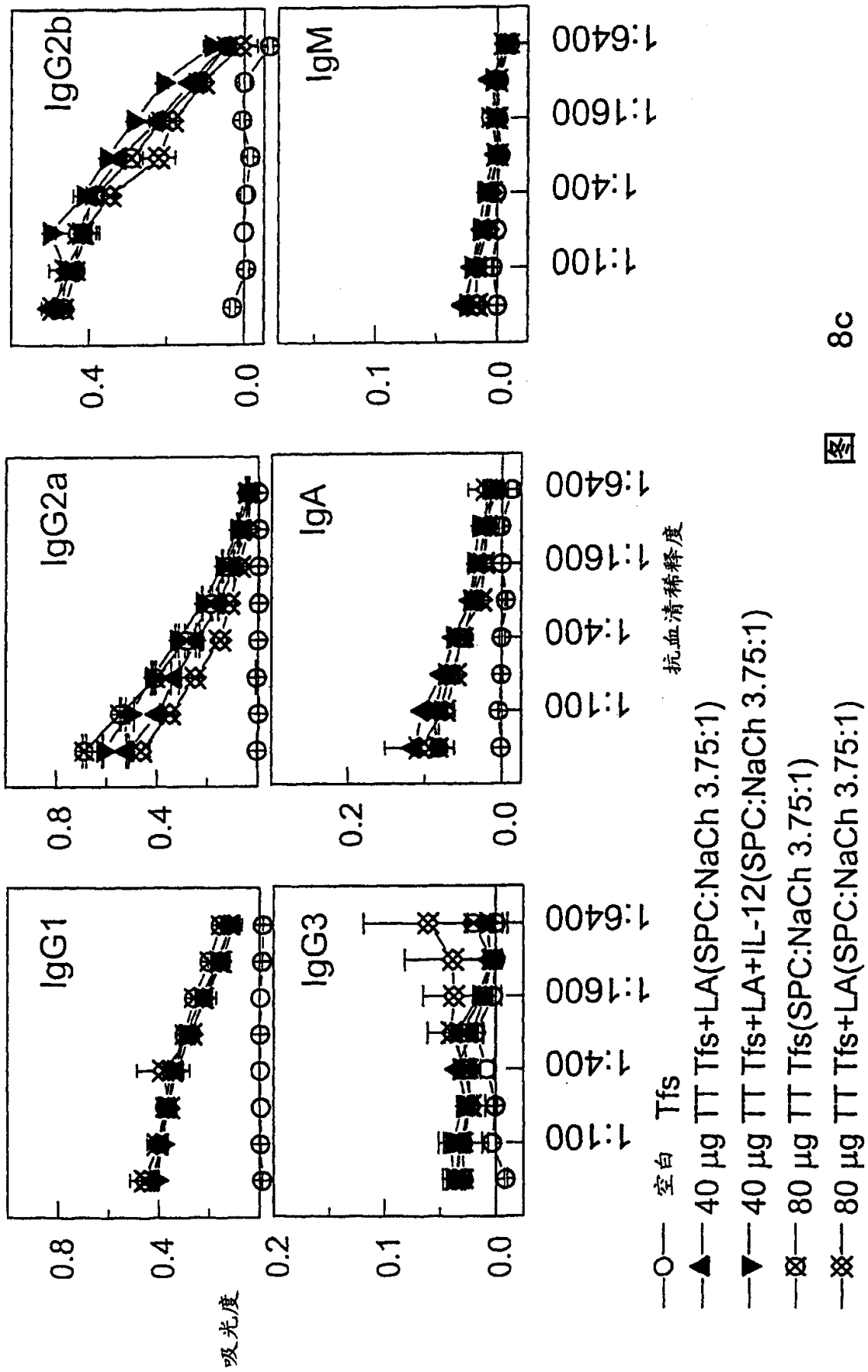


图 8c

非侵入性免疫：破伤风类毒素 (TT, 纯化的)
施加途径的效果

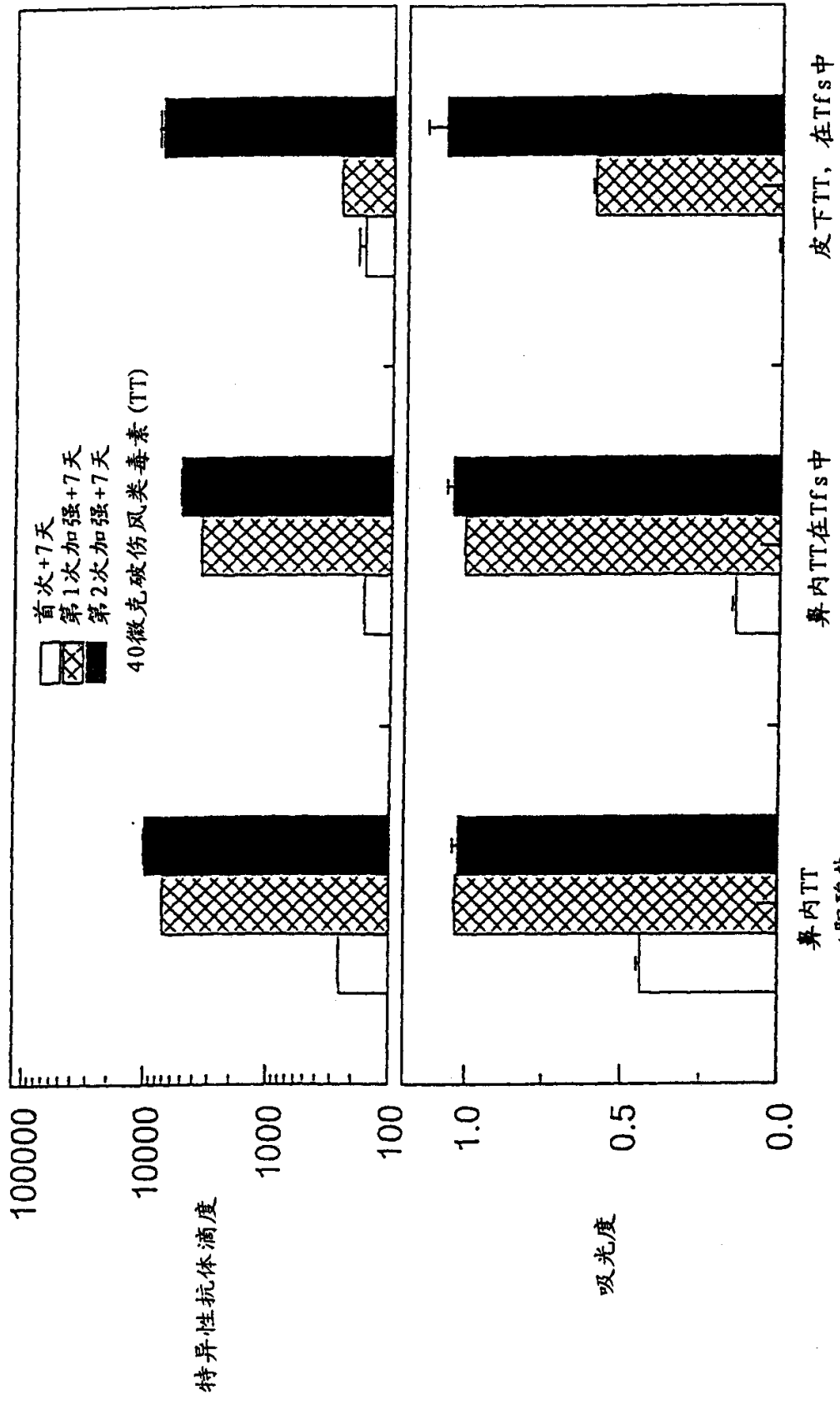


图 9a

非侵入性免疫：破伤风类毒素 (TT, 纯化的)
施加途径的效果

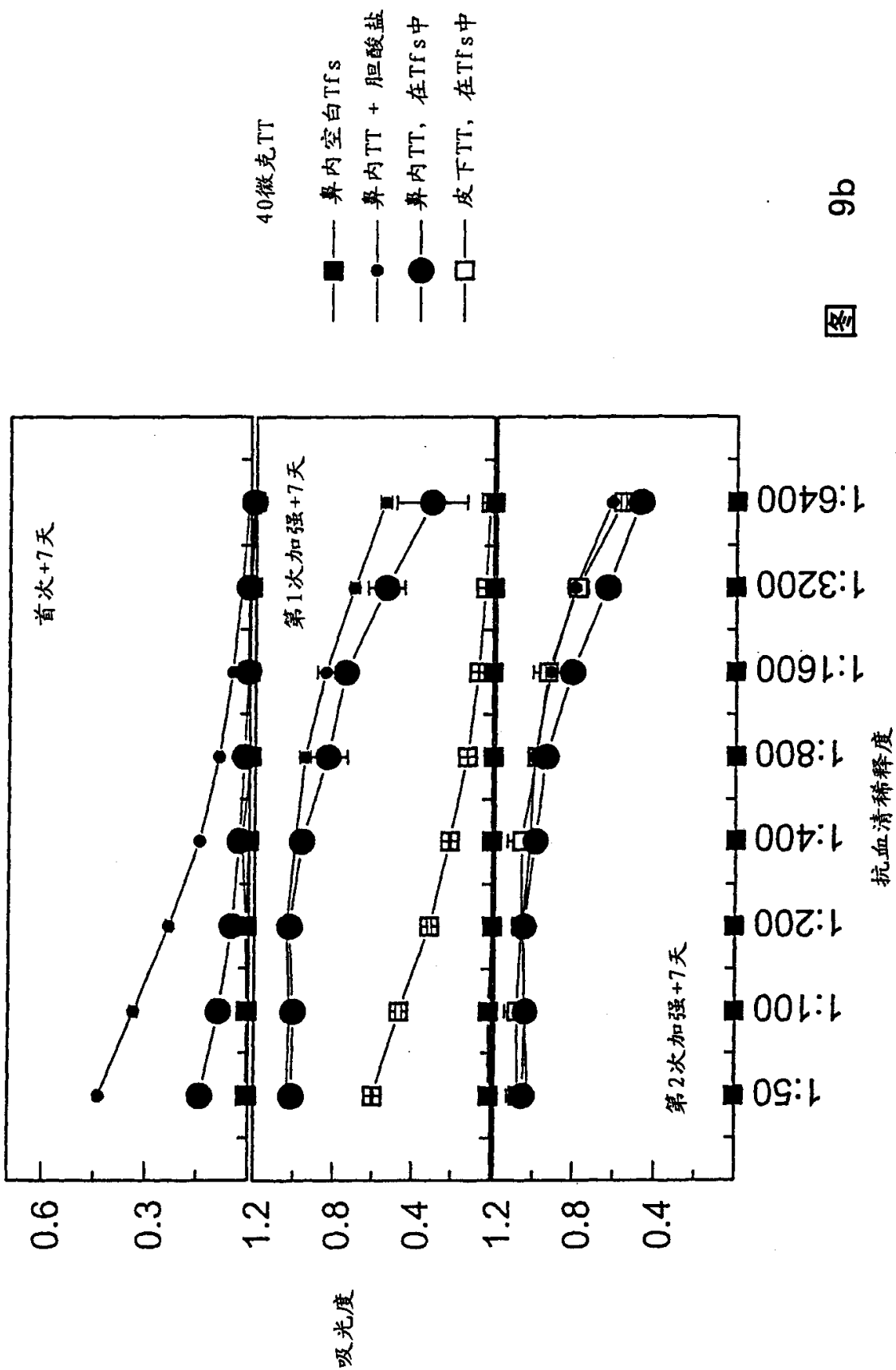


图 9b

010011

抗原特异性同种型 (抗体): 鼻内/皮下
40微克破伤风类毒素 (TT), 超滤

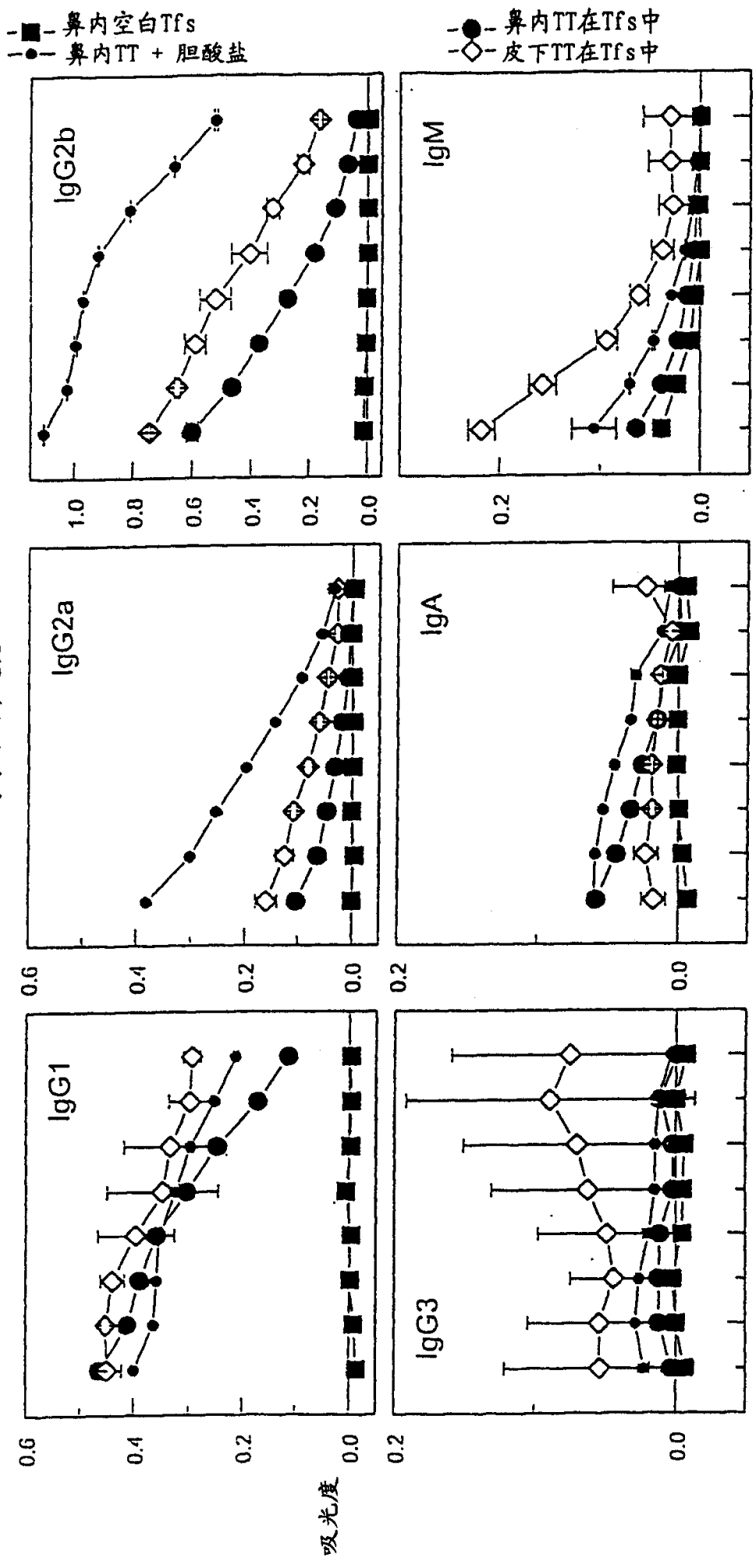


图 9C

抗血清稀释度

鼻内免疫：破伤风类毒素 (TT)
给药剂量和途径的效果

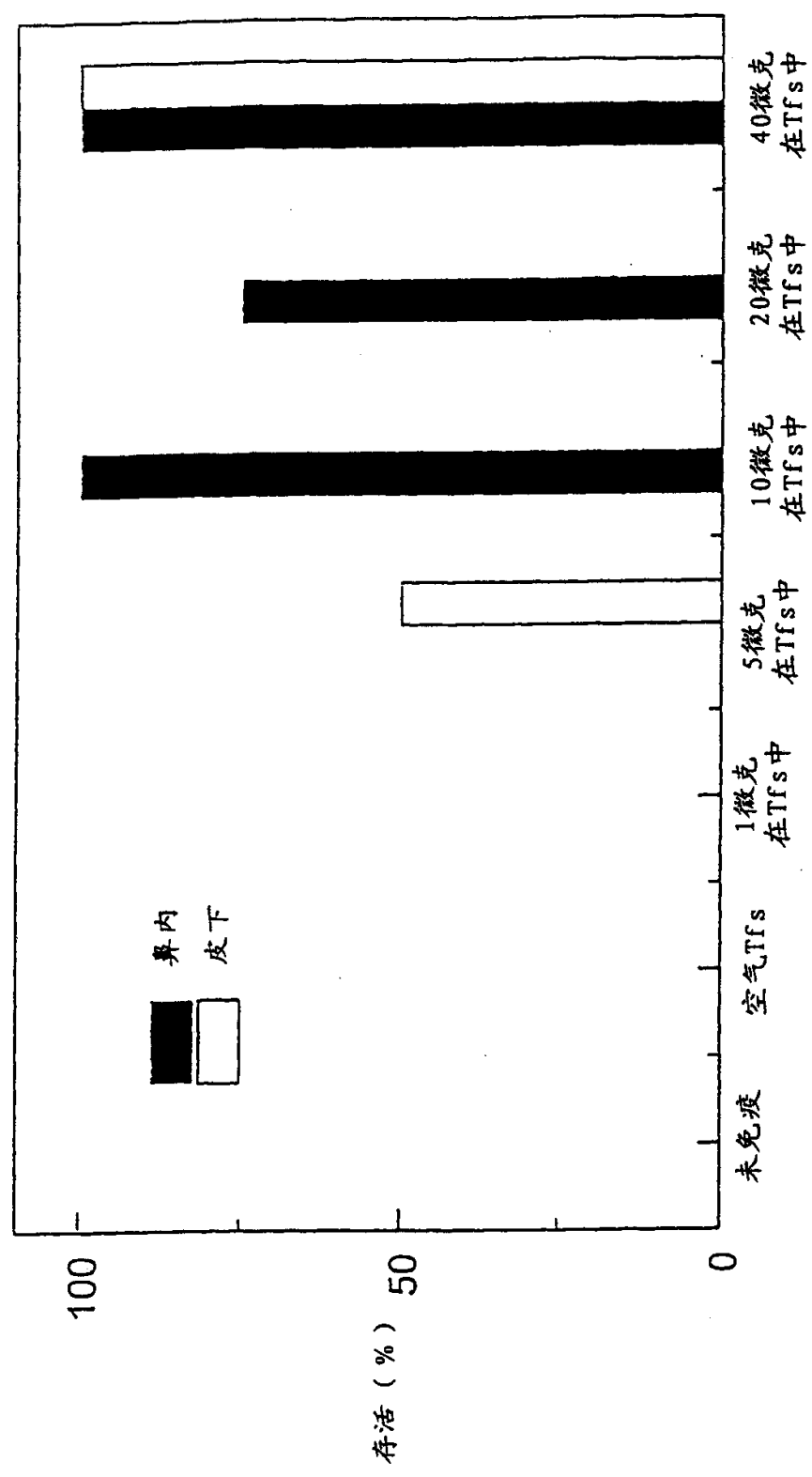
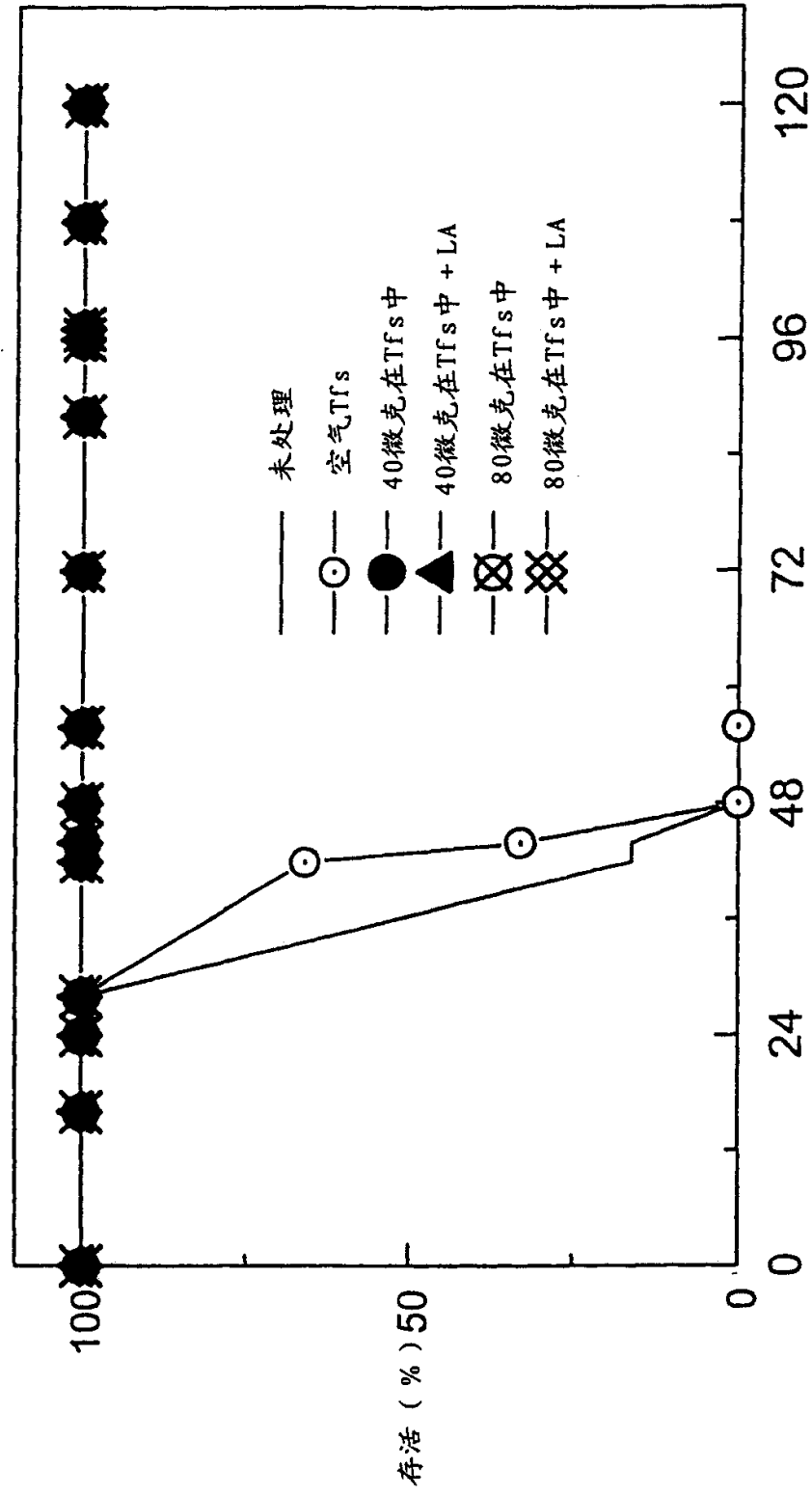


图 10a

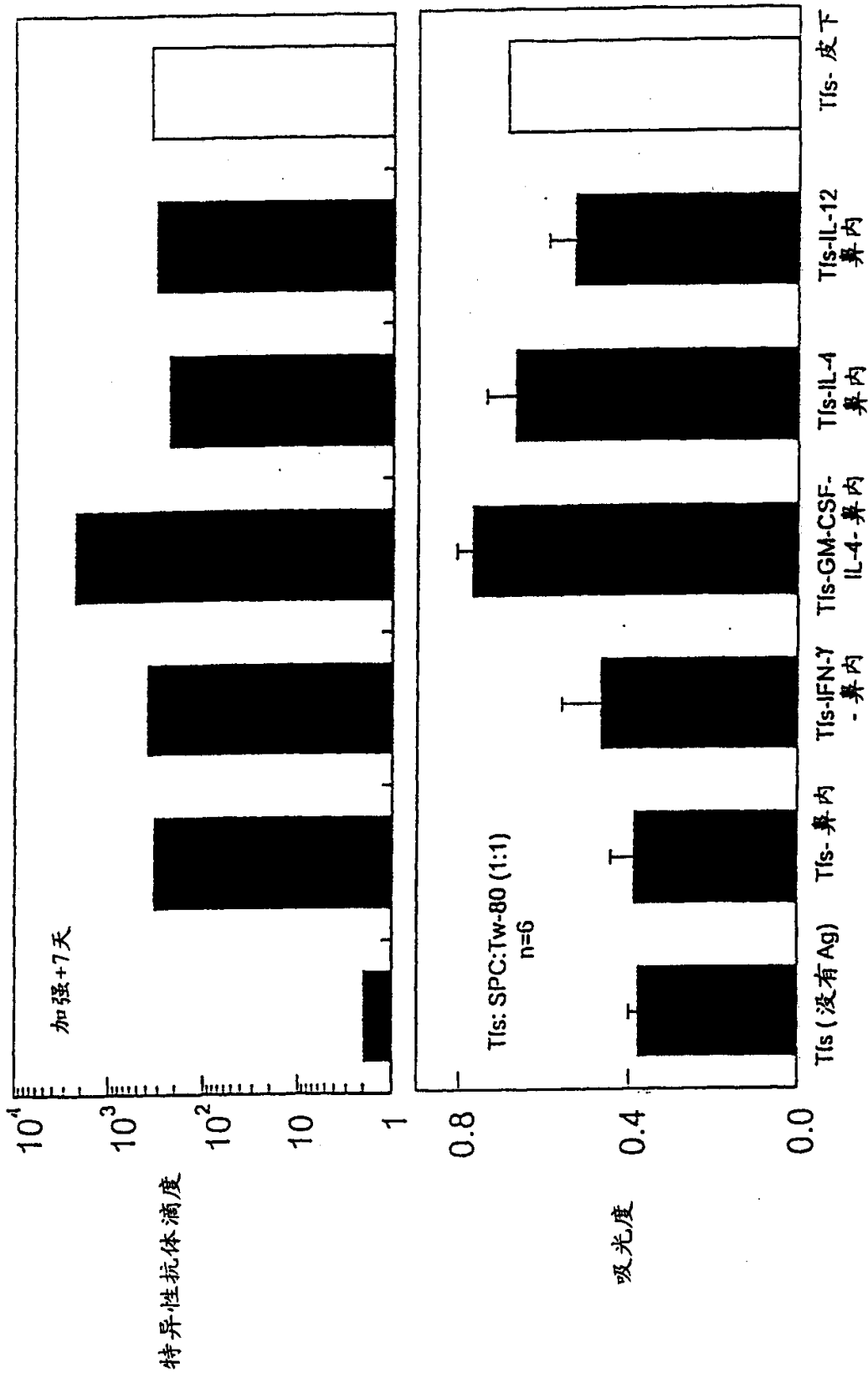
鼻内免疫：破伤风类毒素(TT, 纯化的)剂量效果



攻击后时间 (小时)

图 10b

鼻内免疫：破伤风类毒素 (TT, 不纯)
免疫调节剂的效果



图

11a

0000000000

鼻内免疫：破伤风类毒素(TT, 不纯, 40微克)免疫调节剂的效果

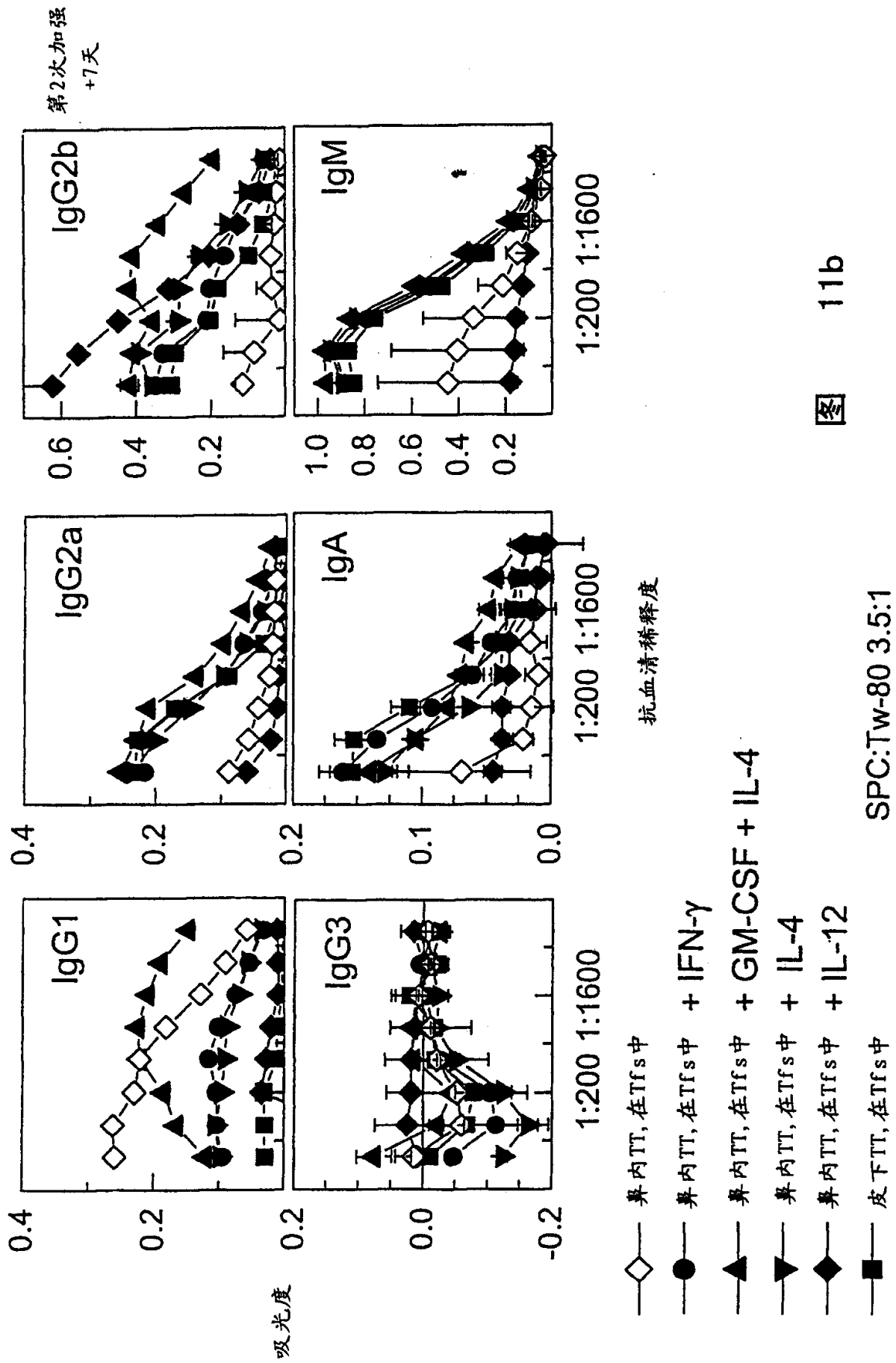


图 11b

鼻内免疫：破伤风类毒素(TT, 纯化)
免疫增强剂的效果

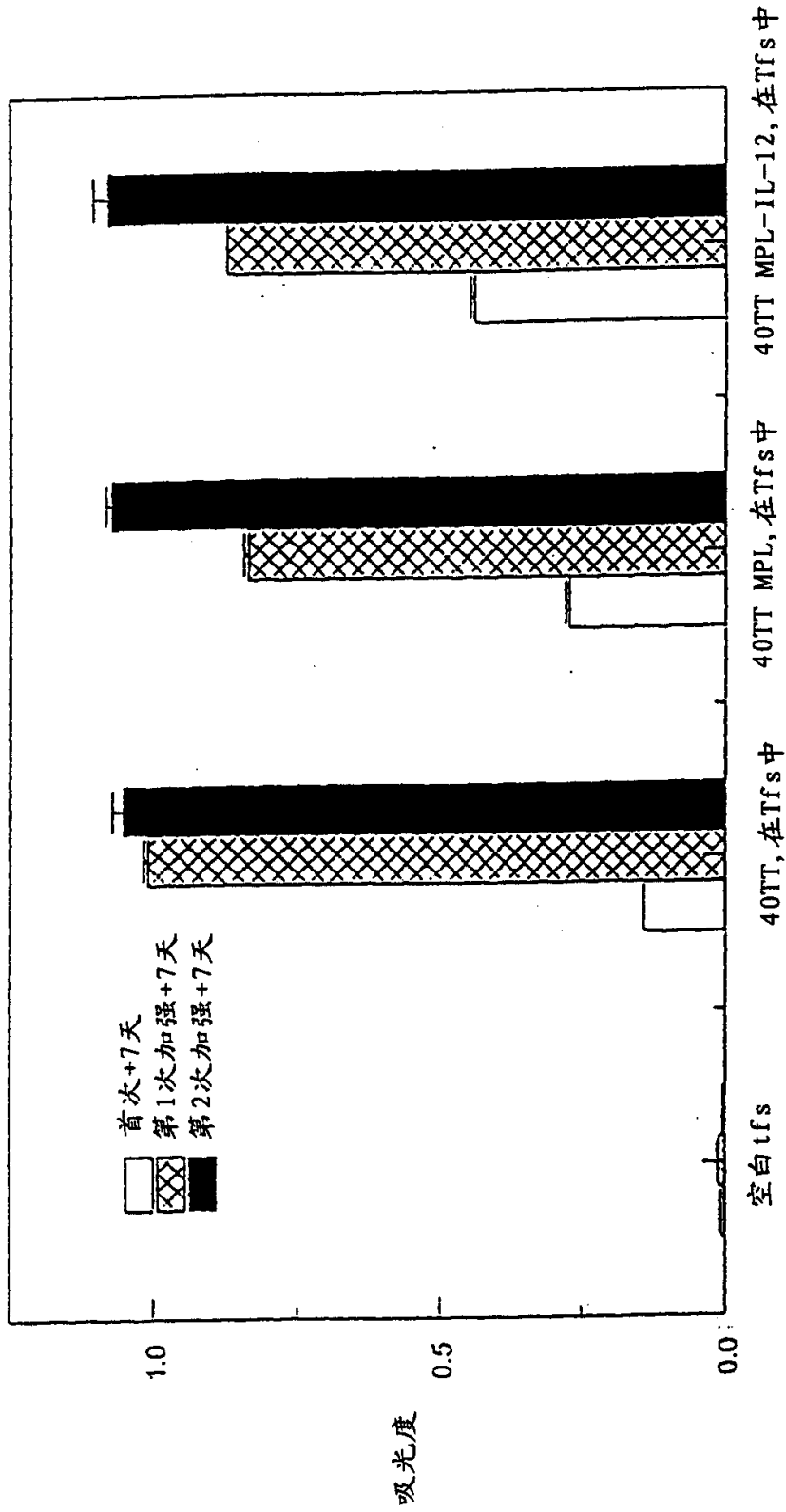


图 12

细菌佐剂霍乱毒素 (CT) 使针对破伤风类毒素 (TT) 的鼻免疫应答增强

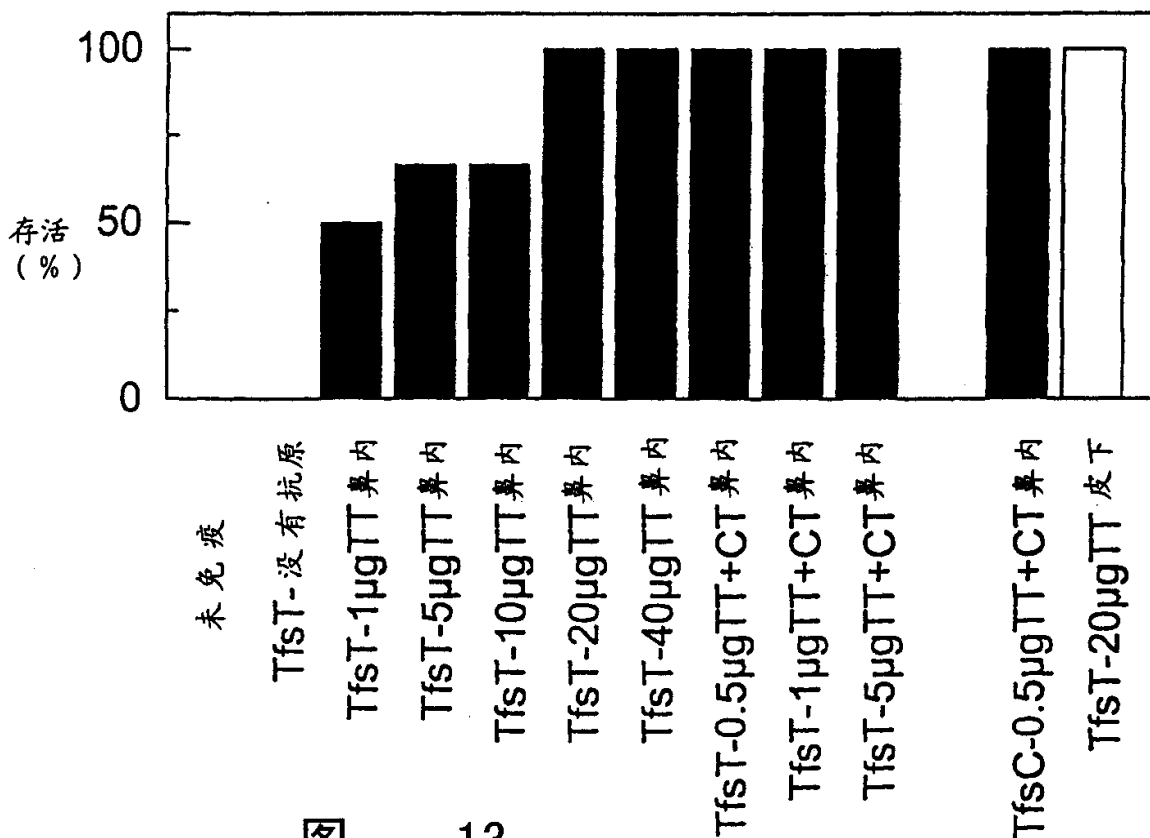
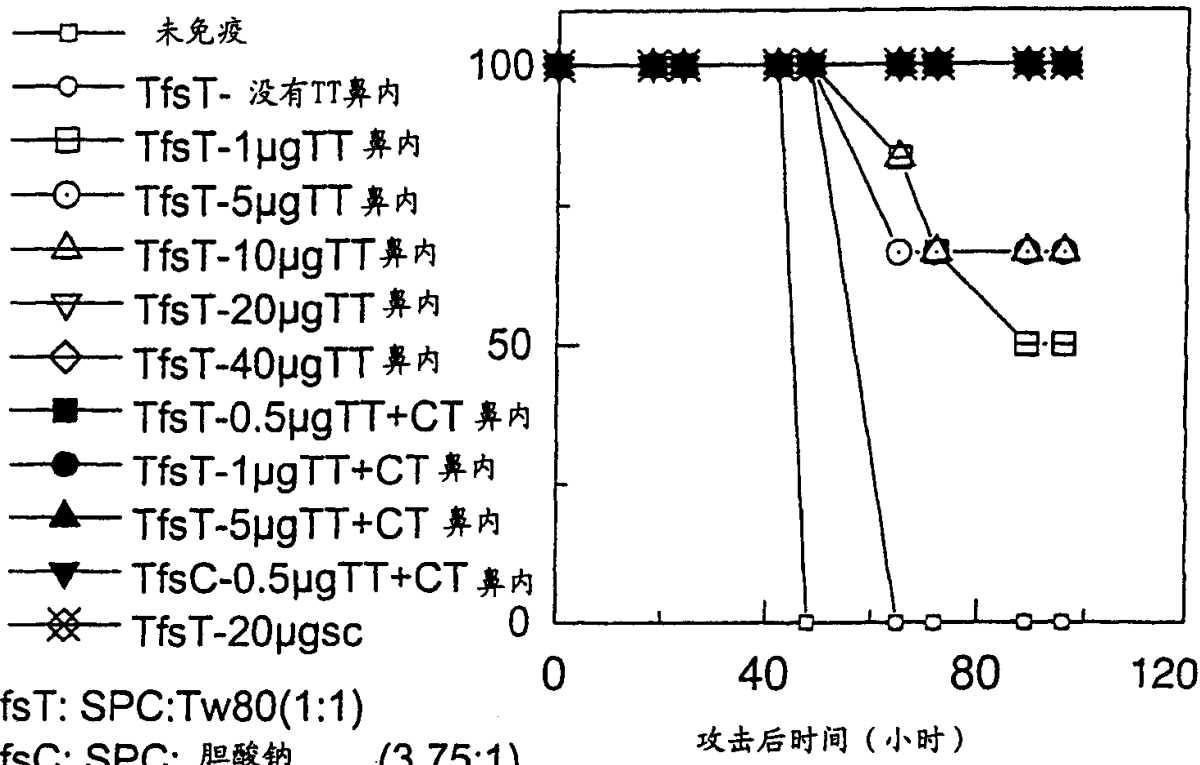


图 13

大肠杆菌的不耐热毒素(LT)的佐剂效果

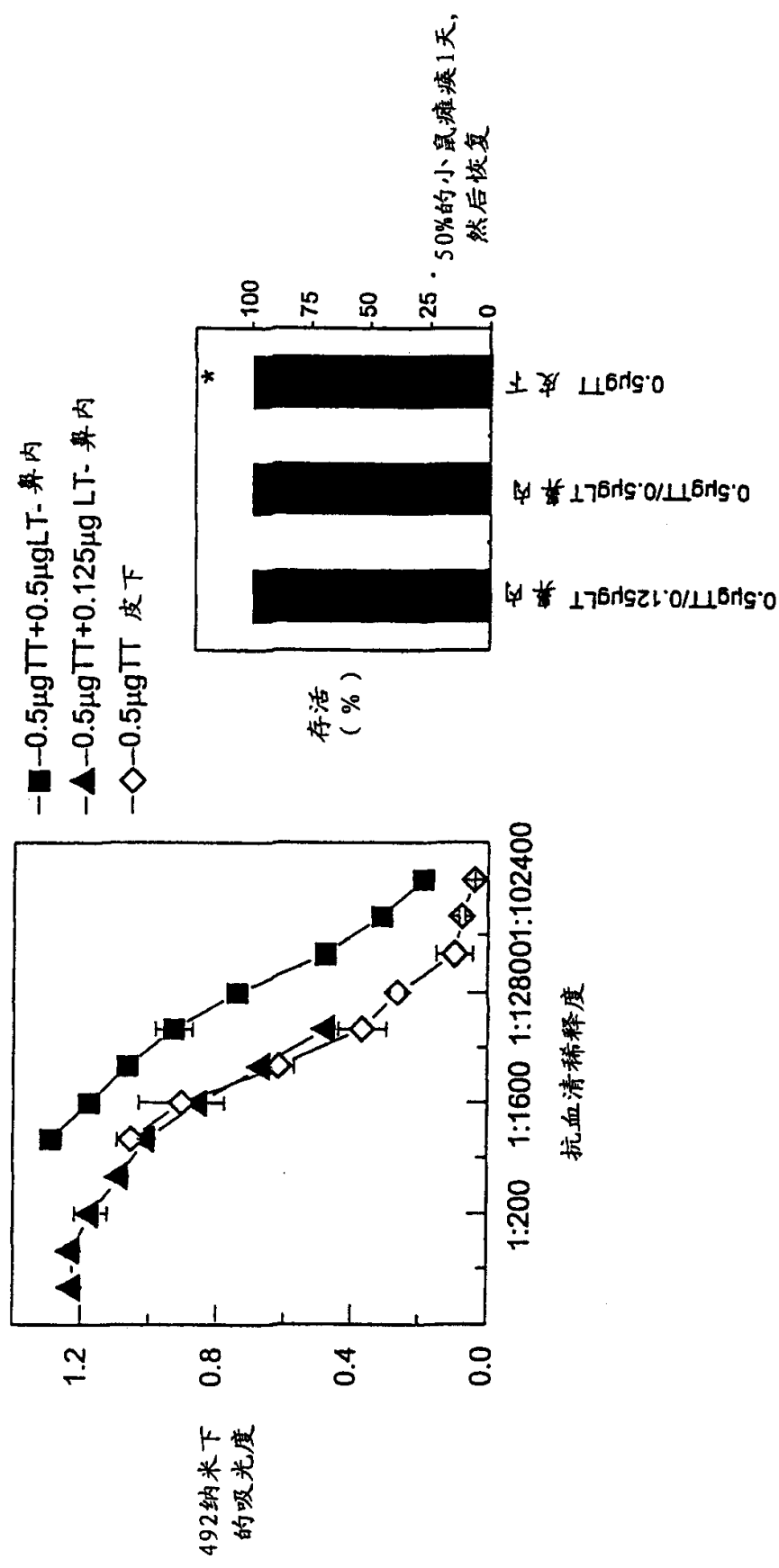


图 14

二价疫苗：对于鼻内给予的Transfersomes中的抗原的
抗破伤风类和抗霍乱应答

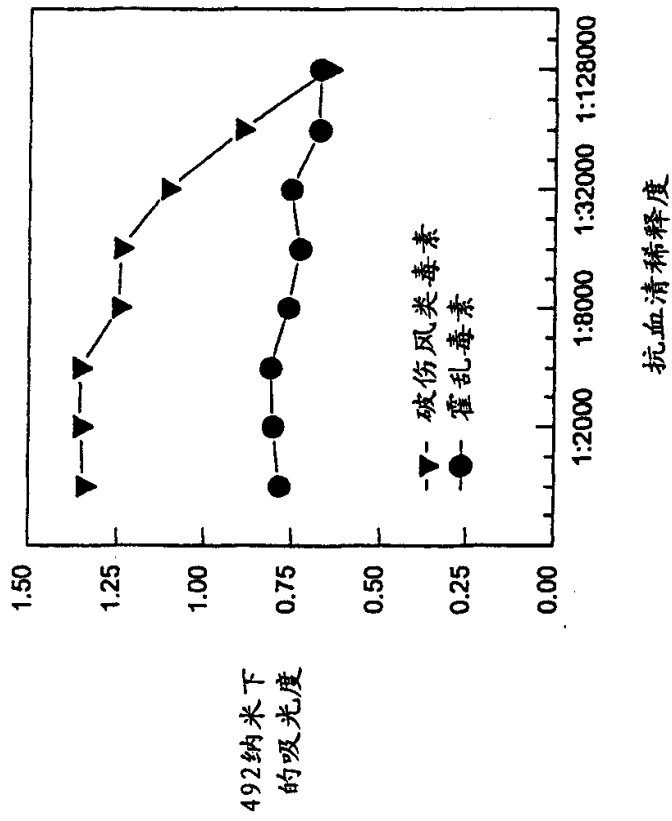


图 15