



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1338947 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 14

(21) 申请号 00803452. 4

(22) 申请日 2000. 02. 04

(30) 优先权数据

PA199900115 1999. 02. 05 DK

(85) PCT申请进入国家阶段日

2001. 08. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/DK2000/000049 2000. 02. 04

(87) PCT申请的公布数据

W000/45847 EN 2000. 08. 10

(73) 专利权人 爱尔开 - 阿贝优公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

(72) 发明人 H·H·伊普森 J·尤耳达尔拉克

(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 樊卫民

(51) Int. Cl.

A61K 47/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

Gilligan CA et al.. 口服疫苗:

设计和传送. 国外医学药物分册 19

3. 1992, 19(3), 160-163.

Hossein Mirchamsy et al.. Stimulating
role of toxoids-laden liposomes in oral
immunization against diphtheria and tetanus
infection. Biologicals 24. 1996, 24343-350.

审查员 邢振兰

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 27 页

(54) 发明名称

粘膜递送系统

(57) 摘要

此处描述了用于经粘膜递送生物学活性物质的组合物、疫苗、和制剂, 以及包括含氧金属盐的粘膜递送系统。此外, 还描述了产生脊椎动物 (包括人类) 的免疫应答、疫苗接种和治疗的方法, 以及治疗、预防、或减轻变态反应的方法。公开了制备组合物、疫苗、和制剂的方法。组合物和递送系统具有广泛应用。

1. 一种用于经脊椎动物粘膜来口腔递送免疫原性物质的组合物,其由下列组成:

(1) 至少一种免疫原性物质,所述免疫原性物质为天然存在的吸入性变应原或毒液变应原、其同种型、或其经修饰形式,其中所述修饰通过生物素化、脱氨基、马来酸化、一个或多个氨基酸的替代,通过交联,或者通过糖基化来进行;

(2) 由含氧金属盐组成的粘膜递送系统,其中含氧金属盐选自氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、醋酸铝、硫酸铝钾、磷酸钙、酒石酸钙、氢氧化铝与氢氧化镁的混和物、氢氧化铍、氢氧化锌、碳酸锌、硫酸钡、和硫酸锌;和

(3) 任选的制药学可接受的赋形剂。

2. 权利要求1的组合物,其中所述含氧金属盐是氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、酒石酸钙或硫酸锌。

3. 权利要求1的组合物,其中所述吸入性变应原来自树、草、真菌、室尘螨虫、蟑螂、动物毛发或头皮屑。

4. 权利要求1的组合物,其中所述吸入性变应原来自药草。

5. 权利要求1的组合物,其中所述免疫原性物质通过重组或合成技术制备。

6. 权利要求1的组合物,其形式为合剂、片剂、胶囊、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、凝胶、糊剂、糖浆、菱锭、气体、软膏或条状。

7. 权利要求6的组合物,其中所述气体为喷雾剂或气雾剂,所述片剂为咀嚼片或水溶片。

8. 权利要求1的组合物,其中的粘膜是口腔粘膜、舌下粘膜、或胃肠粘膜。

9. 用于经脊椎动物粘膜来口腔递送免疫原性物质的疫苗,其由下列组成:

(1) 至少一种免疫原性物质,所述免疫原性物质为天然存在的吸入性变应原或毒液变应原、其同种型、或其经修饰形式,其中所述修饰通过生物素化、脱氨基、马来酸化、一个或多个氨基酸的替代,通过交联,或者通过糖基化来进行;

(2) 由含氧金属盐组成的粘膜递送系统,其中含氧金属盐选自氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、醋酸铝、硫酸铝钾、磷酸钙、酒石酸钙、氢氧化铝与氢氧化镁的混和物、氢氧化铍、氢氧化锌、碳酸锌、硫酸钡、和硫酸锌;和

(3) 任选的制药学可接受的赋形剂。

10. 权利要求9的疫苗,其中含氧金属盐选自氢氧化铝、磷酸铝、磷酸钙、酒石酸钙和硫酸锌。

11. 权利要求9的疫苗,其中所述吸入性变应原来自树、草、真菌、室尘螨虫、蟑螂、动物毛发或头皮屑。

12. 权利要求9的疫苗,其中所述吸入性变应原来自药草。

13. 权利要求9的疫苗,其中所述免疫原性物质通过重组或合成技术制备。

14. 权利要求9的疫苗,形式为合剂、片剂、胶囊、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、凝胶、糊剂、糖浆、菱锭、气体、软膏或条状。

15. 权利要求14的疫苗,其中所述气体为喷雾剂或气雾剂,所述片剂为咀嚼片或水溶片。

16. 权利要求9的疫苗,其中粘膜是口腔粘膜、舌下粘膜、或胃肠粘膜。

17. 用于经脊椎动物粘膜来口腔递送至少一种免疫原性物质的粘膜递送系统,其中所

述至少一种免疫原性物质为天然存在的吸入性变应原或毒液变应原、其同种型、或其经修饰形式,其中所述修饰通过生物素化、脱氨基、马来酸化、一个或多个氨基酸的替代,通过交联,或者通过糖基化来进行,

其中所述递送系统由含氧金属盐组成,其中含氧金属盐选自氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、醋酸铝、硫酸铝钾、磷酸钙、酒石酸钙、氢氧化铝与氢氧化镁的混和物、氢氧化铍、氢氧化锌、碳酸锌、硫酸钡、和硫酸锌。

18. 权利要求 17 的粘膜递送系统,其中所述吸入性变应原来自树、草、真菌、室尘螨虫、蟑螂、动物毛发或头皮屑。

19. 权利要求 17 的粘膜递送系统,其中所述吸入性变应原来自药草。

20. 权利要求 17 的粘膜递送系统,其中所述免疫原性物质通过重组或合成技术制备。

21. 权利要求 17 的粘膜递送系统,形式为合剂、片剂、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、凝胶、糊剂、糖浆、菱锭、气体、软膏或条状。

22. 权利要求 21 的粘膜递送系统,其中所述气体为喷雾剂或气雾剂,所述片剂为咀嚼片或水溶片。

23. 权利要求 17 的粘膜递送系统,其中粘膜是口腔粘膜、舌下粘膜、或胃肠粘膜。

24. 制备权利要求 1 的组合物或权利要求 9 的疫苗的方法,其通过混和权利要求 17 的粘膜递送系统与免疫原性物质和任选的制药学可接受的赋形剂来实现,所述免疫原性物质为天然存在的吸入性变应原或毒液变应原、其同种型、或其经修饰的形式,其中所述修饰通过生物素化、脱氨基、马来酸化、一个或多个氨基酸的替代,通过交联,或者通过糖基化来进行。

25. 通过权利要求 24 的方法获得的组合物。

26. 通过权利要求 24 的方法获得的疫苗。

27. 权利要求 9-16 中任一项的疫苗在制备用于治疗、预防或减轻过敏状态的药物中的用途。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述药物用于通过口腔粘膜、舌下粘膜或胃肠粘膜施用。

粘膜递送系统

[0001] 本发明涉及用于经粘膜递送生物学活性物质的组合物、疫苗、和制剂,以及包括含氧金属盐的粘膜递送系统。在其它方面,本发明涉及产生脊椎动物(包括人类)的免疫应答、疫苗接种、和治疗方法,以及治疗、预防、或减轻变态反应的方法。此外,本发明涉及含氧金属盐用于制备粘膜递送系统的用途,和通过施用本发明疫苗产生的抗体的用途。此外,本发明涉及制备组合物、疫苗、或制剂的方法,以及由该方法获得的产物。

[0002] 发明背景

[0003] 疾病和各种状态可以以不同方式进行治疗。有时外科手术是唯一的选择,但是大多数状态至少最初是通过对患者施用药物来治疗的,以治愈或减轻疾病和/或症状。还可以将药物作为预防性治疗而给予。

[0004] 有时药物的活性化合物只能配制成注射剂,或者除非胃肠外施用,活性化合物具有很小效果或没有效果。在许多疫苗抗原的情况中,事实正如此。

[0005] 胃肠外治疗必须由内科医师进行。患者需要预约的经历是不方便的,而且给自己注射的经历常常是不愉快的,所有这些一起导致患者不愿服从。

[0006] 本领域已知几种胃肠外递送系统。在大量的教科书中对它们进行了很好的描述。

[0007] 进行了几种尝试以制备包括不能够穿过粘膜的活性化合物之粘膜制剂,由此避免胃肠外途径。然而,市场上这些产品的数目很有限,说明这些努力并不成功。这尤其是这由于生物粘膜处的生物利用度差。

[0008] 发明目的

[0009] 本发明的目的是提供用于经脊椎动物粘膜递送生物学活性物质的递送系统。粘膜递送系统可用于配制用于经粘膜递送生物学活性物质的组合物。设想了利用粘膜递送系统和组合物的广泛的其它应用。尤其是粘膜递送系统可以掺入疫苗中,由此避免传统的胃肠外疫苗接种。

[0010] 由此,根据本发明,以所有患者可接受的、容易的、有效的方式,经粘膜递送生物学活性物质是可能的。

[0011] 由 WO 94/21288(文献 1),了解了包含胶体金属与免疫学毒性生物学活性因子的混和物的组合物。有毒生物学因子选自传染性生物体的细胞因子、生长因子、和糖蛋白,如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、葡萄球菌肠毒素 B、和巨噬细胞集落刺激因子(CSF)。组合物还可以包括佐剂,诸如弗氏完全或不完全佐剂、脂质体、胞壁酸二肽、或明矾。文献还描述了施用有毒生物学活性因子产生针对生物学活性因子的免疫学应答、同时降低由生物学活性因子产生的有毒副作用的方法。组合物优选静脉内、肌肉内、或皮下施用。

[0012] 在 WO 95/05194(文献 2)中,描述了将甲肝病毒衣壳或其粘膜免疫原性片段或表位用于制造粘膜疫苗组合物的使用。将粘膜疫苗组合物施用于患者粘膜表面,以诱导针对甲肝的血清免疫球蛋白 G 抗体的产生。组合物配制用于鼻或支气管粘膜递送。

[0013] 由 JP 65008152 B(文献 3)知晓口服疫苗。口服疫苗由细菌、细菌毒素、病毒、立克次氏体、等等,通过(1)灭活,(2)加入收敛剂沉淀,(3)将沉淀物干燥并制成片剂来制备。由此,目的是提供干燥的片剂,胃液不会将产物灭活。在摘要中,没有提及确保经生物粘膜

递送免疫原性化合物的递送系统。

[0014] 由 GB 2 195 996 (文献 4), 了解了包括有机化合物 (-)-表没食子儿茶精没食子酸作为主要成分的茶叶提取物与活性氢氧化铝的复合物。复合物据说具有抗溃疡活性、抗消化性和抗酸剂活性。配制成组合物的复合物可能适合于口服。虽然组合物意欲口服使用, 但是目的并非是经粘膜递送物质。作用靶是胃的内部。由此, 没有公开或涵盖粘膜递送。

[0015] 由 GB 1 078 879 (文献 5), 了解了包括氢氧化铝的胶体水性可摄取悬浮液和至少一种吸附在氢氧化铝上的消化酶的抗酸剂组合物。组合物意欲口服使用, 但是目的并非是经粘膜递送物质。作用靶是胃的内部。由此, 没有公开或涵盖粘膜递送。

[0016] 由 FR 2 143 588 (文献 6), 了解了用于免疫水禽免于鹅肝炎的疫苗。疫苗可以包括氢氧化铝作为佐剂。疫苗通过注射施用。没有公开或涵盖经粘膜的递送。

[0017] 图的简述

[0018] 图 1 显示了用铝胶 (Alhydrogel®) 悬浮的破伤风类毒素 (Tetanustoxoid) 口服 (p. o.) 免疫的小鼠第 35 天的 IgG1 应答。

[0019] 图 2 显示了用不包括铝胶载体的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 35 天的 IgG1 应答。

[0020] 图 3 显示了用破伤风类毒素腹膜内 (i. p.) 免疫的小鼠 (对照组) 第 35 天的 IgG1 应答。

[0021] 图 4 显示了用铝胶悬浮的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 35 天的 IgG2a 应答。

[0022] 图 5 显示了用不包括铝胶载体的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 35 天的 IgG2a 应答。

[0023] 图 6 显示了用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠 (对照组) 第 35 天的 IgG2a 应答。

[0024] 图 7 显示了用铝胶悬浮的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 56 天的 IgG1 应答。

[0025] 图 8 显示了用不包括铝胶载体的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 56 天的 IgG1 应答。

[0026] 图 9 显示了用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠 (对照组) 第 56 天的 IgG1 应答。

[0027] 图 10 显示了用铝胶悬浮的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 56 天的 IgG2a 应答。

[0028] 图 11 显示了用不包括铝胶载体的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 56 天的 IgG2a 应答。

[0029] 图 12 显示了用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠 (对照组) 第 56 天的 IgG2a 应答。

[0030] 图 13 显示了用铝胶悬浮的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG1 应答。

[0031] 图 14 显示了用不包括铝胶载体的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG1 应答。

[0032] 图 15 显示了用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠 (对照组) 第 70 天的 IgG1 应答。

[0033] 图 16 显示了用铝胶悬浮的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG2a 应答。

[0034] 图 17 显示了用不包括铝胶载体的破伤风类毒素口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG2a 应答。

[0035] 图 18 显示了用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠 (对照组) 第 70 天的 IgG2a 应答。

[0036] 图 19 显示了用铝胶悬浮的梯牧草 (*Phleum pratense*) 口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG1 应答。

[0037] 图 20 显示了用不包括铝胶载体的梯牧草口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG1 应答。

[0038] 图 21 显示了用梯牧草腹膜内免疫的小鼠 (对照组) 的 IgG1 应答。

[0039] 图 22 显示了用铝胶悬浮的梯牧草口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG2a 应答。

[0040] 图 23 显示了用不包括铝胶载体的梯牧草口服免疫的小鼠第 70 天的 IgG2a 应答。

[0041] 图 24 显示了用梯牧草腹膜内免疫的小鼠 (对照组) 的 IgG2a 应答。

[0042] 图 25 显示了第 0、21、22、23 天用梯牧草皮下 (s. c.) 免疫的小鼠第 106 天的特异性 Ig 应答。

[0043] 图 26 显示了第 0 天用梯牧草皮下免疫和第 21、22、23 天口服免疫的小鼠第 106 天的特异性 Ig 应答。

[0044] 图 27 显示了第 0 天用梯牧草皮下免疫和第 21、22、23 天用安慰剂口服免疫的小鼠第 106 天的特异性 Ig 应答。

[0045] 发明详述

[0046] 如上所述,已经进行了多种尝试,以制备适合于经粘膜递送物质的制剂。这些尝试并未取得很大成功。制剂也不怎么有效,或者与其它途径相比,有效性降低。由此,市场上出售的粘膜递送系统种类非常有限,表明这种药学组合物遇到的困难。现在令人惊讶的发现,使用此处要求的粘膜递送系统,经粘膜递送事实上是可能的。

[0047] 由此,一方面,本发明涉及用于经脊椎动物粘膜递送生物学活性物质的组合物,包括 (1) 至少一种生物学活性物质,和 (2) 包括含氧金属盐的粘膜递送系统。

[0048] 术语“生物学活性物质”指其自身具有生物学效应的任何物质,或者影响或与其它物质、体内反应、和 / 或器官相互作用导致生物学效应的任何物质。它还可以是这样一种物质,当存在于一个区室中时,在不同或相同生物学区室中产生生物学效应。

[0049] 在本发明中可以采用广泛的生物学活性物质。这些物质的实例是免疫原性物质、营养物、药物、和遗传物质,及其类似物或衍生物。

[0050] 免疫原性物质的实例是抗原、变应原、类变应原、肽、半抗原、碳水化合物、肽核酸 (PNA, 一类合成的遗传模拟物)、和病毒或细菌物质,及其类似物或衍生物。营养物的实例是维生素、酶、微量元素、和微量矿物质,及其类似物或衍生物。药物的实例是抗体、抗生素、肽、盐、激素、溶血剂 (hemolytics)、止血剂 (haemostatics)、酶、酶抑制剂、精神作用药物、麻醉剂、和巴比妥盐,及其类似物或衍生物。遗传物质的实例是 DNA、RNA、和 PNA。

[0051] 在本文中,术语“类似物或衍生物”意欲包括生物学活性物质的经修饰形式。修饰可以通过化学修饰或合成修饰进行,如通过生物素化、脱氨基、马来酸化、一个或多个氨基酸的替代,通过交联,通过糖基化,或者通过其它重组技术。术语还意欲包括天然存在的突变体、同种型、和反逆 (retroinverse) 类似物。

[0052] 本发明的组合物、制剂、和疫苗的功效与包括至少一种含氧金属盐的粘膜递送系统相关联。

[0053] 含氧金属盐的特征可以由多种理化参数描述,像吸附、溶解度和溶解特性、以等电点 pI (可解离化合物的净电荷为零时的 pH) 测量的离子电荷、解离常数、复合物配位、电子构型、效价、成键轨道和反键轨道、贮存作用、粘附特性、表面特性、颗粒特性、和佐剂活性。

[0054] 认为金属盐的几种特性对于此处所述粘膜递送系统观察到的有益效果是重要的。应当理解,下文的假设不应当限制本发明的范围。

[0055] 递送系统的共同特性是它们保全、保留、递送、和 / 或增强以可用于经粘膜递送的形式可得的生物学活性物质的作用。

[0056] 认为具有生物学价值的物质(生物学活性物质)被含氧金属盐吸附(或偶联),这种吸附作用有助于粘膜递送系统、组合物、制剂、和疫苗的功效。数种因素可能是重要的,或者影响生物学活性物质与含氧金属盐之间的吸附(参阅如 P. M. Callahan 等人,制药学研究 (Pharmaceutical Research) 8(7):851-858, 1991, 文献 7; 和疫苗设计, 亚基和佐剂研究 (Vaccine Design. The Subunit and adjuvant Approach), 文献 8, 此处引入作为参考文献)。

[0057] 这些因素包括 pH、吸附反应进行的时长, 混和条件, 制剂、组合物、和疫苗中各种成分的浓度, 容器、温度、保存、缓冲液、和赋形剂。

[0058] 在本发明的一些方面发现, 生物学活性物质的吸附受金属盐的净 / 总电荷和生物学活性物质的电荷的影响, 二者都依赖 pH。

[0059] 金属盐的 pI 随种类不同一般可以在 2-11 之间变化, 导致不同的最佳偶联 pH 区间。可以采用酸性、碱性、和中性条件, 如对于氢氧化铝的常用形式, 使用 pH6-10; 更酸的区间用于醋酸铝, 更碱的区间用于氢氧化镁。

[0060] 当相关时, 可解离的生物学活性物质的 pI 可能同样在 2-11 的范围内变化, 如对于蛋白质抗原, pI 值通常在 4-9 的范围内。

[0061] 因此, 可以在宽范围的 pH 进行吸附, 但是选择的优选条件是位于含氧金属盐的 pI 与将要吸附的生物学活性物质的平均 pI 之间的 pH, 如含氧金属盐——氢氧化铝的某种形式的 pI 是 9.2, 生物学活性物质——含梯牧草的蛋白质混和物的 pI 位于 4-9 的范围内(对于蛋白质), 在 pH8.3 获得了有效的吸附。

[0062] 对于几种含氧金属盐(如 $Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$), 表面积大, 导致对生物学活性物质的吸附容量大。

[0063] 吸附程度同样随所用金属盐及其工作浓度而变化, 如 Al^{3+} 的工作浓度可以变化, 优选以氢氧化铝配制成 0.035-1000mg/ml, 最优选 0.35-100mg/ml。

[0064] 生物学活性物质的工作浓度可以进一步影响对金属盐的吸附, 而且取决于物质, 可以变化很大。对于蛋白质的工作浓度范围, 优选 0.01-100mg/ml, 最优选 0.01-10mg/ml。

[0065] 递送系统与生物学活性物质之间的相互作用还受吸附步骤过程中及最终制剂中的比率的影响。比率(生物学活性物质的量 / 粘膜递送系统的量, 以重量计)应当在上文的范围内找到。这些范围可能相应的在 0.01-100,000 内变化, 优选 0.01-100, 最优选 1-20。

[0066] 最终制剂应当是这样一种组合物, 含氧金属盐吸附的生物学活性物质的量在 5-99% 的范围内, 更优选加入量的 10-99%。

[0067] 还发现吸附受所选缓冲体系的类型(如 NaCl、 $NaHCO_3$ 、胺类)、缓冲盐浓度(如 0-40% NaCl)、和赋形剂的存在(如甘油 0-70%)的影响。

[0068] 偶联效率依赖反应进行的时长和温度。优选 4-45°C, 更优选 4-20°C, 在此温度进行吸附。偶联的优选时长是 0.1-48 小时, 更优选 12-24 小时。

[0069] 用于偶联和产物保存的容器可以是玻璃和不同的聚合材料。重要的是选择不吸附

产物的容器,如用于蛋白质的制药级玻璃。

[0070] 认为重要的另一种特性是含氧金属盐的溶解度。优选不溶于水的含氧金属盐,以及 25℃的水溶解度不高于 0.01mol/L 的含氧金属盐。更优选不溶性含氧金属盐,或 25℃的水溶解度不高于 0.005mol/L 的含氧金属盐。

[0071] 含氧金属盐还可以具有贮存作用。贮存作用指制剂、组合物、疫苗、或粘膜递送系统将逐渐释放生物学活性物质。生物学交互性活性物质将由此与含氧金属盐一起保留,即与粘膜递送系统一起,并由其逐渐释放。认为这具有大量的有益效果,如延长刺激、有益药物释放、和保护生物学活性物质免受环境条件作用。还认为递送系统的含氧金属盐可能具有某些包载特性,由此保留物质能够经粘膜递送。

[0072] 本发明的另一种特性是对生物学活性物质的保护。通过在微环境中维持生物学活性物质的理想 pH,由此预防酸降解或保护免受酶降解,从而使得物质能够经粘膜递送。

[0073] 此外,一些含氧金属盐具有缓冲能力。这可以在递送系统中产生体内微环境,保护生物学活性物质免受可降解环境作用。在分别有酸和酶降解风险的胃或肠中,这可能是有利的。

[0074] 粘膜递送系统的含氧金属盐的另一种特性可以是它们粘附在粘膜上的能力,或它们可能施加于胃肠运动的影响,如使之放慢。由于增加了延长生物学活性物质与靶组织(粘膜)相互作用的时间的可能性,由此导致生物学活性物质经粘膜的转运增加,所以通过肠的时间延长可能是有利的。同样,含氧金属盐/粘膜递送系统的粘膜粘附特性可能能够影响其它功能,如能够导致更快进行和期望应答效果的粘膜佐剂特性。具有佐剂特性的不同化合物描述于如文献 8,第 7 章。

[0075] 还认为本发明的粘膜递送系统/含氧金属盐能够设计具有对特异粘膜组织的特异偏爱,如肠相关淋巴组织(GALT)和派伊尔氏淋巴集结(Peyers patch),进一步增强活性物质在相关靶位点(粘膜组织)的递送,参照 EP 266119(文献 9)。对于几种含氧金属盐(如 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 AlPO_4 、 Ca_3PO_4),颗粒大小的范围在 0.5–15 μm 之间。

[0076] 观察到生物学活性物质与胃肠道免疫活性组织之间能够进行相互作用,导致细胞和最终的体液系统应答。

[0077] 本发明的粘膜递送系统用于经粘膜递送生物学活性物质。优选的粘膜包括鼻粘膜、胃肠粘膜、和舌下粘膜。

[0078] 合适的含氧金属盐的实例是如阳离子选自 Al、K、Ca、Mg、Zn、Ba、Na、Li、B、Be、Fe、Si、Co、Cu、Ni、Ag、Au、和 Cr 的含氧金属盐。

[0079] 含氧金属盐化合物的阴离子可以是有机或无机阴离子,或者有机和无机阴离子的组合。合适的含氧金属盐的实例是如阴离子选自硫酸盐、氢氧化物、磷酸盐、硝酸盐、碘酸氧、溴酸盐、碳酸盐、水合物、醋酸盐、柠檬酸盐、草酸盐、和酒石酸盐,及其混和形式的含氧金属盐。含氧金属盐还包括配位复合物。配位复合物的定义在如《化学和物理学手册》(The Handbook of Chemistry and Physics,第 56 版, B 部分,第 7 章,1975–76,文献 10)中给出。

[0080] 在本文中,表述“混和形式”意欲包括各种阴离子的组合,以及与如氯化物和硫化物的组合。虽然递送系统包括含氧金属盐,但是也涵盖可以用另一组 VIA 原子(诸如 S、Se、或 Te)代替氧。

[0081] 根据本发明使用的含氧金属盐可以是配制成粘膜递送系统后提供期望效果的任何含氧金属盐。这种含氧物质的实例是氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、醋酸铝、硫酸铝钾、磷酸钙、酒石酸钙、Maalox(氢氧化铝与氢氧化镁的混和物)、氢氧化铍、氢氧化锌、碳酸锌、硫酸锌、和硫酸钡。

[0082] 最优选氢氧化铝、磷酸铝、醋酸铝、磷酸钙、酒石酸钙、和硫酸锌。

[0083] 生物学活性物质可以优选选自

[0084] 营养物,像维生素,诸如维生素 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;

[0085] 酶,诸如尿激酶、TPA(组织型纤溶酶原激活剂)、凝集因子 VIII、和链激酶;

[0086] 免疫原性物质,诸如天然的、重组的、或经修饰的蛋白质或其片段、抗原、变应原(参照下文)、类变应原、肽、与适当载体(像 KLH 即钥孔贼血蓝蛋白或破伤风类毒素)缀合的半抗原、碳水化合物、任选经灭活或减毒的细菌或病毒及其成分、RNA、DNA、PNA、寄生虫或逆转录病毒、寄生物、支原体、或毒素,如破伤风类毒素、白喉类毒素、霍乱毒素 A 和 B 亚基、风疹、弹状病毒(狂犬病)、肌病毒、副肌病毒(像副流感病毒、腮腺炎、和麻疹)、小核糖核酸病毒(像脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒、和鼻病毒)、呼肠孤病毒、痘病毒(像小痘病毒、痘苗病毒、和牛痘病毒)、乳头多瘤空泡病毒(像多瘤病毒、乳头瘤病毒、和 SV40)、腺病毒、EBV(像单核细胞增多症病毒)、细小病毒(像 HPV B19)、疱疹病毒(像单纯疱疹病毒和带状疱疹病毒即水痘病毒)、巨细胞病毒(CMV)、虫媒病毒(像黄热病和登革热)、逆转录病毒(像 HIV)、肝炎病毒(像甲肝、乙肝、和丙肝)、B 型流感嗜血菌、分支杆菌(*Mycobacterium*)(像肺结核分支杆菌(*M. tuberculosis*)、牛型分支杆菌(*M. bovis*)、非洲分支杆菌(*M. africanum*)、田鼠分支杆菌(*M. microti*)、鸟分支杆菌(*M. avium*)、胞内分支杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分支杆菌(*M. kansasii*)、戈登氏分支杆菌(*M. gordonae*)、副结核分支杆菌(*M. paratuberculosis*)、和鼠麻风分支杆菌(*M. lepramurium*))、疏螺旋体属的种(*Borrelia* spp.)(像布氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*, 特别是 *B. burgdorferi sensu lato* 和 *B. burgdorferi sensu stricto*)、嘎氏疏螺旋体(*B. garinii*)、阿氏疏螺旋体(*B. afzelii*)、达氏疏螺旋体(*B. duttoni*)、和回归热疏螺旋体(*B. recurrentis*))、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)(百日咳)、沙门氏菌属的种(*Salmonella* spp.)(像鼠伤寒沙门菌(*S. typhimurium*)和伤寒沙门菌(*S. typhi*))、密螺旋体属的种(*Treponema* spp.)(像苍白密螺旋体(*T. pallidum*))、细螺旋体属的种(*Leptospira* spp.)、弯曲杆菌属的种(*Campylobacter* spp.)(像空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*))、螺杆菌属的种(*Helicobacter* spp.)(像幽门螺杆菌(*H. pylori*))、假单胞菌属的种(*Pseudomonas* spp.)、军团菌属的种(*Legionella* spp.)、奈瑟菌属的种(*Neisseria* spp.)(像淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoea*)和脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*))、衣原体属的种(*Chlamydia* spp.)(像沙眼衣原体(*C. trachomatis*)、肺炎衣原体(*C. pneumonia*)、和鹦鹉热衣原体(*C. psittae*)、肠杆菌属的种(*Enterobacter* spp.)、克雷白菌属的种(*Klebsiella* spp.)、耶尔森菌属的种(*Yersinia* spp.)、弧菌属的种(*Vibrio* spp.)(像霍乱弧菌(*V. cholerae*))、加德纳菌属的种(*Gardnerella* spp.)、立克次氏体属的种(*Rickettsia* spp.)、梭菌属的种(*Clostridium* spp.)(像艰难梭菌(*C. difficile*)、肉毒梭菌(*C. botulinum*)、和破伤风梭菌(*C. tetani*))、乳酸杆菌属的种(*Lactobacillus* spp.)、李斯特杆菌属的种(*Listeria*

spp.)、和支原体属的种 (*Mycoplasma* spp.) (像肺炎支原体 (*M. pneumoniae*)、人型支原体 (*M. hominis*)、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、和杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*))、霉菌、和真菌 (诸如芽枝霉属 (*Cladosporium*)、链格孢属 (*Alternaria*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、担子菌纲 (*Basidiomycetes*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*)、和青霉属 (*Penicillium*)) 的衍生物; 类变应原, 诸如经戊二醛修饰的变应原复合物; 药物, 诸如 β -内酰胺类 (如青霉素)、含磺胺制剂类、酶类、酶抑制剂类 (如乙酰胆碱酯酶抑制剂)、激素类 (如 LHRH、雌激素、胰岛素、和人类生长激素)、溶血剂类 / 止血剂类 (如肝素和促红细胞生成素 α 或 β)、精神作用药物 (如锂)、麻醉剂类 (如吗啡)、和巴比妥酸盐类; 遗传物质, 诸如 DNA、RNA、和 PNA;

[0087] 其它药物, 像癌症相关化合物, 诸如 $\text{TNF } \alpha$ 、LHRH 类似物、和细胞抑制剂;

[0088] 其它化合物, 诸如糖类、甘露聚糖类、和凝集素类;

[0089] 及其类似物或衍生物。

[0090] 本发明的组合物有助于经体内任何部位粘膜的递送。因此, 组合物可以经口服、鼻、阴道、舌下、眼、直肠、尿道、乳房内、肺、耳 (即经耳)、或口腔 (颊) 途径施用。

[0091] 组合物可以适当的以喷雾剂、气雾剂、合剂、片剂 (有或无肠衣包裹)、胶囊 (硬的或软的, 有或无肠衣包裹)、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、咀嚼片、水溶片、滴剂、凝胶、糊剂、糖浆、乳膏剂、菱锭 (粉剂、颗粒、片剂)、滴注液、气体、吸入剂、软膏、条状、植入物 (耳、眼、皮肤、鼻、直肠、或阴道)、乳房内药剂、阴道药剂 (vagitories)、栓剂、或子宫药剂 (uteritories) 的形式存在。

[0092] 另一方面, 本发明涉及用于经脊椎动物粘膜递送免疫原性物质的疫苗, 包括 (1) 至少一种免疫原性物质和 (2) 包括含氧金属盐的粘膜递送系统。疫苗的免疫原性物质可以优选选自天然的、重组的、或经修饰的蛋白质或其片段、抗原类、变应原类、类变应原类、肽类、半抗原类、肽类、碳水化合物类、任选经灭活或减毒的病毒、任选经灭活或减毒的细菌、RNA、DNA、PNA、逆转录病毒类、寄生虫类或寄生物、支原体、和毒素, 及其类似物或衍生物。疫苗可以以喷雾剂、气雾剂、合剂、片剂 (有或无肠衣包裹)、胶囊 (硬的或软的, 有或无肠衣包裹)、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、咀嚼片、水溶片、滴剂、凝胶、糊剂、糖浆、乳膏剂、菱锭 (粉剂、颗粒、片剂)、滴注液、气体、吸入剂、软膏、条状、植入物 (耳、眼、皮肤、鼻、直肠、或阴道)、乳房内药剂、阴道药剂、栓剂、或子宫药剂的形式存在, 适合于经口服、鼻、阴道、舌下、眼、直肠、尿道、乳房内、肺、耳、或口腔途径的递送。疫苗可以适合于如疫苗接种或过敏接种 (脱敏), 预防或减轻过敏状态。

[0093] 本发明还涉及用于经脊椎动物粘膜递送营养物的制剂, 包括 (1) 至少一种营养物和 (2) 包括含氧金属盐的粘膜递送系统。营养物优选选自维生素、盐、酶、微量元素、和微量矿物质。制剂可以优选以喷雾剂、气雾剂、合剂、片剂 (有或无肠衣包裹)、胶囊 (硬的或软的, 有或无肠衣包裹)、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、咀嚼片、水溶片、滴剂、凝胶、糊剂、糖浆、乳膏剂、菱锭 (粉剂、颗粒、片剂)、滴注液、气体、吸入剂、软膏、条状、植入物 (耳、眼、皮肤、鼻、直肠、或阴道)、乳房内药剂、阴道药剂、栓剂、或子宫药剂的形式存在, 适合于经口服、鼻、阴道、舌下、眼、直肠、尿道、乳房内、肺、耳 (经耳)、或口腔途径递送。

[0094] 另一方面, 本发明涉及用于经脊椎动物粘膜递送药物的制剂, 包括 (1) 至少一种药物和 (2) 包括含氧金属盐的粘膜递送系统。药物可以优选选自抗体类、抗生素类、肽类

及其衍生物、盐类、激素类、溶血剂类、和止血剂类。在优选的实施方案中,药物选自 β -内酰胺类(如青霉素)、含磺胺制剂类、酶抑制剂类(如乙酰胆碱酯酶抑制剂)、激素类(如LHRH、雌激素、胰岛素、和人类生长激素)、溶血剂类/止血剂类(如肝素和促红细胞生成素 α 或 β)、精神作用药物(如锂)、麻醉剂类(如吗啡)、和巴比妥酸盐类。制剂可以适当的以喷雾剂、气雾剂、合剂、片剂(有或无肠衣包裹)、胶囊(硬的或软的,有或无肠衣包裹)、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、咀嚼片、水溶片、滴剂、凝胶、糊剂、糖浆、乳膏剂、菱锭(粉剂、颗粒、片剂)、滴注液、气体、吸入剂、软膏、条状、植入物(耳、眼、皮肤、鼻、直肠、或阴道)、乳房内药剂、阴道药剂、栓剂、或子宫药剂的形式存在,适合于经口服、鼻、阴道、舌下、眼、直肠、尿道、乳房内、肺、耳(经耳)、或口腔途径施用。

[0095] 还有一个方面,本发明涉及用于经脊椎动物粘膜递送遗传物质的制剂,包括(1)遗传物质、病毒物质、或细菌物质,和(2)包括含氧金属盐的粘膜递送系统。遗传物质可以优选选自RNA、DNA、和PNA,及其类似物或衍生物。制剂可以适当的以喷雾剂、气雾剂、合剂、片剂(有或无肠衣包裹)、胶囊(硬的或软的,有或无肠衣包裹)、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、咀嚼片、水溶片、滴剂、凝胶、糊剂、糖浆、乳膏剂、菱锭(粉剂、颗粒、片剂)、滴注液、气体、吸入剂、软膏、条状、植入物(耳、眼、皮肤、鼻、直肠、或阴道)、乳房内药剂、阴道药剂、栓剂、或子宫药剂的形式存在,适合于经口服、鼻、阴道、舌下、眼、直肠、尿道、乳房内、肺、耳(经耳)、或口腔途径施用。

[0096] 用于经脊椎动物粘膜递送生物学活性物质的粘膜递送系统同样形成本发明的一部分。这种递送系统包括至少一种含氧金属盐。金属盐可以是配制成递送系统后提供期望效果的任何含氧金属盐。在优选的实施方案中,含氧金属盐的阳离子选自Al、K、Ca、Mg、Zn、Ba、Na、Li、B、Be、Fe、Si、Co、Cu、Ni、Ag、Au、和Cr。在优选的实施方案中,含氧金属盐的阴离子选自硫酸盐、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,及其混和形式。这种含氧物质的实例是氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝、醋酸铝、硫酸铝钾、磷酸钙、酒石酸钙、Maalox(氢氧化铝与氢氧化镁的混和物)、氢氧化铍、氢氧化锌、碳酸锌、硫酸钡、和硫酸锌。

[0097] 粘膜递送系统可以优选以喷雾剂、气雾剂、合剂、片剂(有或无肠衣包裹)、胶囊(硬的或软的,有或无肠衣包裹)、悬浮液、分散体、颗粒、粉剂、溶液、乳剂、咀嚼片、水溶片、滴剂、凝胶、糊剂、糖浆、乳膏剂、菱锭(粉剂、颗粒、片剂)、滴注液、气体、吸入剂、软膏、条状、植入物(耳、眼、皮肤、鼻、直肠、或阴道)、乳房内药剂、阴道药剂、栓剂、或子宫药剂的形式存在,适合于经口服、鼻、阴道、舌下、眼、直肠、尿道、乳房内、肺、耳(经耳)、或口腔途径施用。

[0098] 本发明还涉及用于经脊椎动物粘膜递送生物学活性物质的方法,包括对脊椎动物(包括哺乳动物,特别是人)施用上述组合物。

[0099] 本发明具有大量的重要应用。

[0100] 重要应用领域的一个实例是疫苗领域。科学家的一项主要成就是开发了用于预防危及生命的疾病(如破伤风或肺结核)的疫苗。疫苗接种传统的是通过皮下或肌肉内途径进行。通过本发明,经粘膜途径的疫苗接种事实上是可能的。据此,本发明涉及产生或改变脊椎动物(包括人)体内免疫应答的方法,包括对脊椎动物施用此处定义的疫苗。此外,本发明涉及脊椎动物(包括人)的疫苗接种或治疗,包括对脊椎动物施用此处定义的疫苗、制

剂、或组合物。

[0101] 在本文中,术语“免疫应答”包括特异性抗体和 / 或 B 和 T 细胞活性,抗体来自 IgA、IgD、IgE、IgG、和 IgM 类及其亚类。术语还意欲包括其它血清或组织成分。由于佐剂活性,应答可能称为关于混和的或倾斜的 Th1 或 Th2 型的 T 细胞活性(文献 8,第 7 章)。在体液中,可能产生血清学和 / 或分泌型抗体。

[0102] 疫苗接种的概念是基于免疫系统的两个基本特征,即特异性和记忆效应。疫苗接种将引发接受者的免疫系统,而且通过重复接触相同蛋白质,免疫系统将处于更强烈应答攻击(例如微生物感染)的状态。疫苗是意欲在接受者体内产生这种保护性免疫应答的免疫接种中使用的蛋白质混和物。保护将只包括疫苗中存在的成分和同源抗原。

[0103] 具体而言,可能对流感嗜血菌 B 疫苗、流感疫苗、麻疹疫苗、甲肝和乙肝疫苗、BCG(肺结核)疫苗、白喉疫苗、破伤风疫苗、脑膜炎疫苗、日本脑炎疫苗、霍乱疫苗、风疹疫苗、腮腺炎疫苗、肺炎疫苗、脊髓灰质炎疫苗、狂犬病疫苗、黄热病疫苗、甲状腺(Thyphoid)疫苗、HIV 疫苗、疟疾疫苗及针对寄生虫的其它疫苗、疱疹 I 和 II 疫苗、血吸虫疫苗感兴趣。同样,可能对组合疫苗特别感兴趣。这种组合疫苗的实例是白喉-破伤风-百日咳-脊髓灰质炎疫苗、麻疹-腮腺炎-风疹疫苗、甲肝和乙肝疫苗。

[0104] 本发明的重要应用领域的另一个实例是过敏反应治疗领域,包括预防和减轻过敏反应。

[0105] 众所周知,遗传学易感个体变得对个体所接触到的由各种环境来源产生的抗原敏感(过敏)。当先前过敏的个体再次接触相同或同源变应原时,发生过敏反应。过敏应答的范围从花粉热、鼻传导病(rhinoconductivitis)、鼻炎、和哮喘到应答如蜜蜂或大黄蜂刺或者昆虫咬的全身过敏和死亡。反应是立即的,而且可以由多种过敏性变应原引起,诸如由草、树、杂草、昆虫、(室尘)螨虫、食物、药物、化学药品、和香水来源的化合物。

[0106] 为了消除强烈的过敏反应,通常通过小心的控制和重复注射变应原,来使患者脱敏。过敏患者接触侵犯性变应原直至达到维持剂量的这种疗法一旦达到维持水平常常持续很长时间。也就是说,特异性变应原接种包括比健康人传统疫苗接种方案次数更多的注射。

[0107] 传统的疫苗接种由引发剂量及一段时间后的加强免疫来进行。对于大多数疫苗,每 5-10 年必须重复加强接种,从而使免疫学记忆维持完整。

[0108] 由于过敏患者体内正在发生免疫应答,因此与其它类型的接种相比,变应原接种是复杂的。这种免疫应答的特征是存在变应原特异性 IgE,其主要作用是在接触变应原后释放变应性症状。因此,使用来自天然来源变应原的变应原接种具有固有的风险,即极度危及患者生命的副作用。

[0109] 根据本发明,设计了用于治疗、预防、或减轻过敏反应的方法,包括对脊椎动物(包括人)施用此处定义的疫苗。

[0110] 免疫原性物质可以适当的衍生自尤其是由树、草、药草、真菌、室尘螨虫、蟑螂、和动物毛发及头皮屑产生的吸入性变应原。来自树、草、和药草的重要花粉变应原是由分类学上的目山毛榉目(Fagales)、木犀目(Oleales)、和松目(Pinales),包括尤其是桦属(Betula)、桤木属(Alnus)、榛属(Corylus)、鹅耳枥属(Carpinus)、和橄榄属(Olea),早熟禾目(Poales),包括尤其是黑麦草属(Lolium)、梯牧草属(Phelum)、早熟禾属(Poa)、狗牙根属(Cynodon)、鸭茅属(Dactylis)、和黑麦属(Secale)的草,菊目(Asterales)和荨麻目

(Urticales), 包括尤其是豚草属 (*Ambrosia*) 和艾属 (*Artemisia*) 的药草。来自真菌的重要的吸入变应原是尤其是诸如由链格孢属 (*Alternaria*) 和支孢霉属 (*Cladosporium*) 产生。其它重要的吸入变应原来自室尘螨虫的尘螨属 (*Dermatophagoides*)、蟑螂、和哺乳动物, 诸如猫、狗、和马。此外, 本发明的重组变应原可以衍生自毒液变应原, 包括由诸如来自膜翅目 (*Hymenoptera*) 昆虫 (包括蜜蜂、黄蜂、和蚂蚁) 刺或咬产生的变应原。

[0111] 需要理解, 术语“衍生自”包括天然存在的物质及其同种型。此外, 物质可以通过重组或合成技术的方法制备。特异性变应原成分对本领域技术人员是知道的, 包括如山毛榉目的 *Bet v1* (疣皮桦 (*Betula verrucosa*), 桦树)、*Aln g1* (欧洲桤木 (*Alnus glutinosa*), 桤木)、*Cora1* (*Corylus avelana*, 榛树)、和 *Car b1* (欧洲鹅耳枥 *Carpinus betulus*, 鹅耳枥)。其它是 *Cry j1* (松目)、*Amb a1* 和 2、*Art v1* (菊目)、*Par j1* (荨麻目)、*Ole e1* (木犀目)、*Ave e1*、*Cyn d1*、*Dac g1*、*Fes p1*、*Hol l1*、*Lol p1* 和 5、*Pas n1*、*Phl p1* 和 5、*Poa p1*、2、和 5、*Sec c1* 和 5、和 *Sor h1* (各种草的花粉)、*Alt a1* 和 *Cla h1* (真菌)、*Der f1* 和 2、*Der p1* 和 2 (室尘螨虫, 分别是法氏皮螨 (*D. farinae*) 和特嗜皮螨 (*D. pteronyssinus*))、*Bla g1* 和 2、*Per a1* (蟑螂, 分别是德国小蠊 (*Blattella germanica*) 和美洲大蠊 (*Periplaneta americana*))、*Fel d1* (猫)、*Can f1* (狗)、*Equ c1*、2、和 3 (马)、*Apis m1* 和 2 (蜜蜂)、*Ves g1*、2、和 5、*Pol a1*、2、和 5 (所有黄蜂)、和 *Sol i1*、2、3、和 4 (火蚂蚁)。

[0112] 此外, 本发明可以用于兽医应用。实例是如促黄体激素释放激素 (LHRH) (治疗或疫苗接种) 的递送、变应原接种或治疗 (如跳蚤、室尘螨虫)、健康蠕虫疾病、口蹄疫、寄生虫、脚跟 (foot rot)、喷嚏疾病、狂犬病、猪瘟、和维生素缺乏的治疗。接受本发明组合物/制剂的动物包括猫、狗、鸟、家禽、牛、羊、马、其它产毛皮家畜、和鱼。

[0113] 需要理解, 本发明的组合物、制剂、疫苗、和粘膜递送系统还可以包括佐剂、赋形剂、或者适合于制剂的其它添加剂或成分。这些佐剂、赋形剂、和其它添加剂或成分对本领域技术人员是知道的, 包括尤其是溶剂、乳化剂、湿润剂、增塑剂、着色物质、填料、防腐剂、粘度调节剂、缓冲剂、粘膜粘附和生物粘附物质、等等。制剂策略的实例对本领域技术人员是众所周知的。粘膜粘附和生物粘附物质的实例是凝集素、纤维素或丙烯酸聚合物、壳聚糖及其衍生物、天然树胶、和聚丙烯酸酯。

[0114] 在本发明的各种产品中尤其可以使用下列佐剂: 白细胞介素 (如 $IL-1\beta$ 、 $IL-2$ 、 $IL-7$ 、 $IL-12$ 、 $INF\gamma$)、Adju-Phos[®]、葡聚糖、抗原制剂、霍乱全毒素、脂质体、DDE、DHEA、DMPC、DMPG、DOC/Alum 复合物、弗氏不完全佐剂、ISCOMs[®]、LT 口服佐剂、胞壁酰二肽、单磷酸脂质 A、胞壁酰三肽、和磷脂酰乙醇胺 (参阅《疫苗设计, 亚基和佐剂研究》(Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach), 第 7 章, 文献 8)。

[0115] 同样, 本发明的递送系统、疫苗、或制剂的施用可以与其它步骤或途径 (即通过胃肠外或其它途径施用物质) 组合。施用的次序、顺序、或间隔可以任意变化。

[0116] 在本发明的一个实施方案中, 递送系统可以用于加强对先前胃肠外施用的疫苗接种的应答。加强剂量可以优选经口服、口腔、舌下、或鼻途径施用 (至鼻、口、喉、或肠中的免疫活性组织)。

[0117] 认为患者最愿意接受经口服途径的施药。鼻途径提供了施用的最小体积, 而口腔/舌下途径和直肠途径具有中间特性。因此, 这些途径, 即口服、鼻、口腔、舌下、和胃肠, 是优选的。

[0118] 将要施用的生物学活性物质的合适量取决于讨论的物质、需要治疗的疾病或状态,进一步取决于讨论的脊椎动物的年龄、体重、和状态。找到最佳剂量仅仅是本领域技术人员常规实验的问题。

[0119] 本领域技术人员还知道,经粘膜施用的药物通常需要包含超过 100 倍的大剂量。为了接种目的口服施用桦树变应原显示,为了获得临床免疫治疗效果所使用的量是胃肠外治疗的 3 个数量级 (Taudorf, 1992, 文献 11)。与其它报告一致,关于局部 (如舌下) 免疫治疗的 EAACI 意见书同样显示使用了很大剂量 (文献 12)。众所周知的肽药物也是这种情况,如肽去氨加压素的生物利用度,经口施用和经鼻施用分别相当于胃肠外施用的 1% 和 10%。

[0120] 通过口服施用低于先前实验预期的量的生物学活性物质,此处提供的递送系统就能够获得有效应答。

[0121] 粘膜与胃肠外途径服药的差异可以随物质和途径变化很大。优选的剂量是胃肠外生物相当剂量的 0.1-100 倍,最优选 1-10 倍。

[0122] 在其它方面,本发明涉及通过此处所述粘膜递送系统与生物学活性物质,任选包括一种或多种制药学可接受的赋形剂混和,用于制备此处所述组合物、疫苗、或制剂的方法。因此,本发明还涉及可以通过此处所述方法获得的此处所述组合物、疫苗、或制剂。

[0123] 含生物学活性物质的 (水) 相通过将此物质溶解,或者将此物质的浓缩液用水 (任选包含缓冲液、盐、溶剂、或赋形剂) 稀释而形成。

[0124] 含氧金属盐的 (水) 悬浮液或凝胶通过向干燥形式的含氧金属盐中加入水 (任选包含缓冲液、盐、溶剂、或赋形剂),或者向预先平衡的预先形成的凝胶中加入水 (任选含缓冲液、盐、赋形剂) 而形成。

[0125] 制剂任选通过这些混和物中的一种与适当量的缓冲相 (任选包含盐、溶剂、或赋形剂) 混和,并在搅拌或混和条件下以受控速度逐步加入其它混和物,从而获得含固相的浓缩制剂。

[0126] 将浓缩制剂静置,任选进行适当时间的搅拌。

[0127] 然后可以进行过滤、沉淀,或者任选地用水稀释,所述水任选含缓冲液、盐、溶剂、或赋形剂,从而产生最终的药制剂。

[0128] 合适的缓冲液、盐、溶剂、或赋形剂优选生物学可接受的,如制药学可接受的,且是惰性的或者对于破坏生物学活性物质的结构或含氧金属盐固相 (如凝胶或这些物质间的复合物) 的结构完整性是惰性的。

[0129] 本发明由下文的非限制性实施例进一步例示。通过实施例,观察到了免疫应答,从而进一步明确了生物学活性物质是经粘膜转运的。细胞免疫应答一方面依赖经粘膜的递送,另一方面依赖巨噬细胞和 / 或其它抗原呈递细胞对物质的可获得性。因此,本发明的功效已经被证明。

[0130] 实施例

[0131] 下面是一些关于实验的一般性描述。

[0132] 动物

[0133] 小鼠是来自 **Bomholtgård** (DK-8920Ry, 丹麦) 的雌性 BALB/c A 小鼠,在服药期开始时是 6-8 周龄。将它们关在聚碳酸酯笼中,每只笼子 8 只小鼠。铺垫软木屑。所有动

物可以随意接触食物和水。食物是来自 Chr. Petersen A/S (DK-4100 Ringsted, 丹麦) 的完全啮齿类饮食。

[0134] 动物对照组

[0135] 阳性对照组:

[0136] 通过腹膜内 (i. p.) 途径的免疫被用于阳性对照组, 已知这种方法在几次注射后诱导强烈的免疫应答。

[0137] 生物学活性物质 (免疫原)

[0138] 实施例 1 和 5:

[0139] 破伤风类毒素 (Tetanus toxoid) 由 Statens Serum Institut (DK-2300 哥本哈根, 丹麦) 含 2.31 或 3.0mg 蛋白质 /ml 的各批次获得。每次剂量在 0.25ml 中含 30 μ g 破伤风类毒素。

[0140] 实施例 2、3、和 4

[0141] 梯牧草 (Phleum pratense) (phl p) 花粉提取物由 ALK-Abell6A/S (2970-Hørsholm, 丹麦) 如下文所述获得、蛋白质含量 85.7% (w/w) 的批次获得。每次剂量在 0.25ml 中含预定蛋白质含量 50 μ g 的梯牧草提取物, 相当于 100,000 标准质量单位 (SQ)/ml。

[0142] 梯牧草提取物的制备

[0143] 将梯牧草 (Allergon AB, 瑞典, 或 Biopol Inc., 美国) 的花粉在 1:10 (w/v) 0.5M NaCl 中提取 4 小时, 于 3-8°C 温和混匀。然后通过离心和随后 0.22 μ m 筛的过滤除去花粉。然后将澄清的提取物在蒸馏水中透析 72 小时, 并冻干 (参照文献 13)。

[0144] 含氧金属盐

[0145] 下面叙述的摩尔浓度用于最终的制剂。

[0146] 在实施例 3 中, 氢氧化铝 $\text{Al}(\text{OH})_3$, 0.045-0.05M Al^{3+} (1.25mg Al^{3+} /ml) 或 0.04-0.045M Al^{3+} (1.13mg Al^{3+} /ml)。由 1.3% 铝胶 $\text{\textcircled{R}}$ (Superfos, DK-2950 Vedbaek, 丹麦) 配制。

[0147] 磷酸钙 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0.034M Ca^{2+} 。由磷酸钙佐剂 (Superfos, DK-2950 Vedbaek, 丹麦) 配制。

[0148] 磷酸铝 AlPO_4 , 0.05M Al^{3+} 。由 Adju-phos $\text{\textcircled{R}}$ (Superfos, DK-2950 Vedbaek, 丹麦) 配制。

[0149] 醋酸铝 $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_5\text{Al}$, 0.05M Al^{3+} 。由碱性醋酸铝 (Sigma, 美国) 配制。

[0150] 酒石酸钙 $\text{CaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 0.05M Ca^{2+} 。由 L-(+)-酒石酸钙水合物 (Sigma, 美国) 配制。

[0151] 硫酸锌 ZnSO_4 , 0.01M Zn^{2+} 。由硫酸锌七水合物 (Sigma, 美国) 配制。

[0152] 组合物 / 制剂 / 疫苗的准备

[0153] 如下配制测试制剂 / 组合物 / 疫苗:

[0154] 根据本发明, 用于递送生物学活性物质、包括含氧金属盐的粘膜递送系统如下文所述形成。

[0155] 实施例 1 和 2:

[0156] 将免疫原 (变应原提取物或破伤风类毒素) 溶解或稀释至最终制剂浓度的 10 倍。将 1/10 体积的免疫原溶液与 7/10 体积的古柯 (Coca) 0.0 缓冲液 (0.25% 碳酸氢钠和

0.5%氯化钠)混和。缓慢加入 2/10 体积的 1.3%铝胶。在用于对照组的制剂中,接受不含铝胶的免疫原,铝胶用古柯 0.0 缓冲液代替。

[0157] 这些制剂的保存时间不得超过 3 周。将包括含氧金属盐和破伤风类毒素的制剂保存于 4℃。所有其它制剂保存于 -22℃。

[0158] 实施例 3、4、和 5:

[0159] 将免疫原(变应原提取物或破伤风类毒素)溶解或稀释至最终制剂浓度的 10 倍。将金属盐溶解或稀释至最终制剂浓度的 5 倍(以阳离子为准)。将 1/10 体积的免疫原溶液与 2/10 体积的金属盐缓慢混和,并于 4℃搅拌过夜。第二天缓慢加入 7/10 体积的古柯 0.0 缓冲液(0.25%碳酸氢钠和 0.5%氯化钠)。

[0160] 在用于对照组的制剂中,接受不含免疫原的金属盐,免疫原用古柯 0.0 缓冲液代替。

[0161] 在用于对照组的制剂中,接受不含金属盐的免疫原,金属盐用古柯 0.0 缓冲液代替。

[0162] 这些制剂的保存时间不得超过 3 周。将包括含氧金属盐和破伤风类毒素的制剂保存于 4℃。所有其它制剂保存于 -22℃。

[0163] 服药

[0164] 实施例 1、2、3、和 5:

[0165] 口服(p. o.)施用:

[0166] 分两个阶段处理动物,每次 14 天,间歇 4 周。由此,根据这种安排,第 0-13 天每天一次对动物施药,第 14-41 天休养,第 42-55 天每天一次施药。通过口腔管饲法施用(直接递送至胃)制剂/疫苗/组合物 0.25ml/剂(即破伤风类毒素或梯牧草)。服药时,不麻醉小鼠。

[0167] 腹膜内施用:

[0168] 动物间隔 14 天接受 3 剂(腹膜内),0.25ml/剂。服药时,不麻醉小鼠。

[0169] 实施例 4:

[0170] 根据表 4,对动物皮下(s. c.),或者皮下或口服施用 0.25ml 制剂/疫苗/组合物。

[0171] 血液取样

[0172] 由眼窝静脉采集血样,并通过 ELISA 单个分析血清。

[0173] ELISA

[0174] 实施例 1、2、和 5 进行直接包被 ELISA。实施例 3 和 4 进行夹层 ELISA。

[0175] 平板

[0176] 实施例 1、2、3、4、和 5:

[0177] MaxiSorp® F96, NUNC, 丹麦。

[0178] 加入下文所述所有试剂至总体积 100 μ l/孔。

[0179] 抗原

[0180] 实施例 1 和 5:

[0181] 破伤风类毒素 10 μ g 蛋白质/ml,由 Statens Serum Institut(哥本哈根,丹麦)含 2.31 或 3.0mg 蛋白质/ml 的各批次获得。

[0182] 实施例 2:

[0183] 梯牧草花粉提取物 3 μ g 蛋白质 /ml, 由 ALK-Abell6A/S(**Hørsholm**, 丹麦) 如下文所述获得、蛋白质含量 85.7% (w/w) 的批次获得。

[0184] 实施例 3 和 4:

[0185] 第一层: 3 μ g/ml 兔抗梯牧草 (ALK-Abell6A/S, **Hørsholm**, 丹麦)。

[0186] 第二层: 梯牧草提取物 30 μ g/ml, (由 ALK-Abell6A/S(**Hørsholm**, 丹麦) 蛋白质含量 85.7% (w/w) 的批次获得)。

[0187] 阳性对照

[0188] 实施例 1 和 5:

[0189] 来自单克隆破伤风 IgG2a 抗体 5.1G11E5E3 的蛋白质 A (Statens Serum Institut, 哥本哈根, 丹麦)。

[0190] 实施例 2、3、和 4:

[0191] 用梯牧草的花粉提取物腹膜内免疫的 BALB/c A 小鼠的血清库 (**Bomholtgård**, Ry, 丹麦)。

[0192] 阴性对照

[0193] 实施例 1 和 2:

[0194] 未免疫的 8 月龄 BALB/c A 小鼠的血清库 (**Bomholtgård**, Ry, 丹麦)。

[0195] 实施例 3、4、和 5:

[0196] 未免疫的 4 月龄 BALB/c A 小鼠的血清库 (**Bomholtgård**, Ry, 丹麦)。

[0197] 二抗

[0198] 实施例 1 和 2:

[0199] 生物素抗小鼠 IgG1 (Pharminogen, 荷兰),

[0200] 生物素抗小鼠 IgG2a (Pharminogen, 荷兰),

[0201] 生物素兔抗小鼠 Ig, P0260 (DAKO, 丹麦)。

[0202] 实施例 3、4、和 5:

[0203] 生物素抗小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 美国)。

[0204] 底物

[0205] 实施例 1 和 2:

[0206] 过氧化物酶缀合的链霉亲和素 (DAKO, 丹麦)。

[0207] 实施例 3、4、和 5:

[0208] 3,3',5',5- 四甲基联苯胺 (TMB) (Sigma, 美国)。

[0209] 免疫读数仪

[0210] 实施例 1、2、3、4、和 5:

[0211] EL 340 生物动力学读数仪 (Bio-Tek Instruments)。

[0212] 分析步骤

[0213] 实施例 1 和 2:

[0214] 将平板用相应抗原包被过夜。加入单个动物或对照动物的血清样品。将抗体-抗原反应进行过夜。第二天, 加入二抗和底物。然后在免疫读数仪中于 470nm 对平板读数。

[0215] 实施例 5:

[0216] 如实施例 1 和 2 所述, 除了在加入血清前将平板用牛血清清蛋白封闭。于 450nm

对平板读数。

[0217] 实施例 3 和 4：

[0218] 将平板用抗体包被过夜。将第一层和第二层的抗体-抗原反应进行 1 小时。加入血清样品。将此抗体-抗原反应进行 2 小时，随后加入二抗和底物。然后在免疫读数仪中于 470nm 对平板读数。

[0219] 分析血清的免疫球蛋白

[0220] 实施例 1 和 2：

[0221] 为了检验产生的免疫应答，对于 Th1/Th2 表型，测定 IgG 亚类。选择 IgG1 作为 Th2 应答的标记物，选择 IgG2a 作为 Th1 应答的标记物。

[0222] 对实施例 1 和 2 的所有样品分析 IgG1 和 IgG2a 的存在。这些实验的 ELISA 稀释曲线显示于图 1-24。

[0223] 通过特异性抗 Ig 测定特异性 Ig。

[0224] 实施例 3、4、和 5：

[0225] 分析血样的特异性 Ig。

[0226] 发现进一步例示于表 3-5 和图 25-27。

[0227] 实施例 1

[0228] 用破伤风类毒素免疫

[0229] 如上文所述进行破伤风类毒素的口服和腹膜内（对照动物）免疫。使用 3 个测试组，每组 8 只动物。一组接受口服剂量的如上文所述制备的抗原-氢氧化铝 (0.045-0.05M) 制剂 / 组合物 / 疫苗。一组接受口服剂量的不包括含氧金属盐粘膜递送系统的抗原。一组（对照动物）如上文所述用抗原-氢氧化铝 (0.045-0.05M) 制剂 / 组合物 / 疫苗腹膜内免疫。获得的结果显示于下文的表 1。

[0230] 结果以“阳性应答小鼠数目 / 组中小鼠总数”表述。“总 Ig”表示特异性 Ig。

[0231] 阳性应答

[0232] 如果至少在两个连续稀释度血清的 OD 值大于阴性对照血清的 OD 值，则认为应答是阳性的。

[0233] 结果描述于图 1-18。

[0234] 表 1

[0235]

	口服 破伤风类毒素 和氢氧化铝			口服 破伤风类毒素 无氢氧化铝			腹膜内 破伤风类毒素		
	总 Ig	IgG1	IgG2a	总 Ig	IgG1	IgG2a	总 Ig	IgG1	IgG2a
破伤风类毒素 第 35 天		4/8	3/8		4/8	1/8		8/8	8/8
破伤风类毒素 第 56 天		5/8	4/8		1/8	1/8		8/8	8/8
破伤风类毒素 第 70 天	6/8	7/8	4/8	2/8	2/8	1/8	8/8	8/8	8/8

[0236] 如表 1 和图 1-18 所示,口服免疫、具有所见特异性 Ig 水平的阳性应答小鼠的数目(第 70 天)与观察到的腹膜内免疫的阳性应答小鼠的数目相当。

[0237] 此外,应答表型(IgG1 和 IgG2a)显示均有 Th1 和 Th2 应答。

[0238] 总之,实施例 1 显示了使用口服免疫的发明的可行性,免疫原性物质由破伤风类毒素例示,粘膜递送系统由氢氧化铝例示。

[0239] 此外,观察到免疫应答的发现显示使用本发明经粘膜递送生物学活性物质是可能的。

[0240] 实施例 2

[0241] 用梯牧草免疫

[0242] 如上文所述用来自梯牧草的变应原进行免疫。使用 3 个测试组,每组 8 只动物。一组接受口服剂量的用如上文所述制备的含氢氧化铝的粘膜递送系统制备的抗原。一组接受口服剂量的不包括含氧金属盐粘膜递送系统的抗原。一组如上文所述用抗原-氢氧化铝制剂/疫苗腹膜内免疫。获得的结果显示于下文的表 2。结果以“阳性应答小鼠数目/组中小鼠总数”表述。“总 Ig”表示特异性 Ig。

[0243] 阳性应答

[0244] 如果至少在两个连续稀释度血清的 OD 值大于阴性对照血清的 OD 值,则认为应答是阳性的。

[0245] 结果描述于图 19-24。

[0246] 表 2

[0247]

	口服 梯牧草 和氢氧化铝			口服 梯牧草 无氢氧化铝			腹膜内 梯牧草		
	总 Ig	IgG1	IgG2a	总 Ig	IgG1	IgG2a	总 Ig	IgG1	IgG2a
梯牧草 第 70 天	7/8	4/8	2/8	2/8	2/8	1/8	8/8	8/8	8/8

[0248] 表 2 显示了使用或不用含氢氧化铝的粘膜递送系统,用梯牧草口服免疫后,在血清中具有特异性 Ig 水平的小鼠数目(第 70 天)。阳性应答小鼠的数目与腹膜内免疫后观察到的阳性应答小鼠的数目可比。

[0249] 此外,应答类型(IgG1 和 IgG2a)符合腹膜内免疫的观察结果。由此可见根据本发明的免疫产生与腹膜内免疫相似的免疫状态。

[0250] 总之,实施例 2 显示了使用变应原免疫接种的本发明的可行性,免疫原性物质由梯牧草例示,含氧金属盐由氢氧化铝例示。

[0251] 此外,表 2 所示结果显示了完整免疫原经粘膜的摄取和随后以保留其三维结构的形式向相关细胞(B 细胞)的展示。具有基本上保守的三维结构的生物学活性物质的递送据信对依赖 B 细胞的抗体应答是必需的。使用其它递送系统、经胃肠道的递送,常常诱导大蛋白质和肽的变性,随后破坏三维结构和 B 细胞表位,众所周知的草变应原现象(参照文献 11)。

[0252] 实施例 3

[0253] 用梯牧草免疫

[0254] 以两种不同的包括粘膜递送系统(含氢氧化铝)的制剂用 Ph1 P 进行免疫。使用 4 个测试组,每组 8 只动物。一组接受梯牧草,如上文所述制备的含 1.13mg Al/ml 氢氧化铝的制剂。一组接受梯牧草,如上文所述制备的含 1.25mg Al/ml 氢氧化铝的制剂。对照组平行接受相同量的粘膜递送系统(含氧金属盐)制剂,1.13mg Al/ml 和 1.25mg Al/ml,无变应原。结果以“阳性应答小鼠数目/组中小鼠总数”表述。

[0255] 阳性应答

[0256] 如果至少在两个连续稀释度血清的 OD 值大于阴性对照血清的 OD 值,则认为应答是阳性的。

[0257] 表 3

[0258]

氢氧化铝制剂	施用途径	应答
1.25mg/ml+ 梯牧草 第 70 天	口服	5/8
1.25mg/ml 第 70 天	口服	1/8
1.13mg/ml+ 梯牧草 第 70 天	口服	6/8
1.13mg/ml 第 70 天	口服	1/4

[0259] 总之,实施例 3 显示了可以应用含不同浓度含氧金属盐的各种制剂。金属盐浓度可以进行最优化。在这个实施例中,免疫原性物质由梯牧草例示,含氧金属盐由氢氧化铝例示,使用两种不同的浓度。

[0260] 实施例 4[0261] 使用不同的施用方案用梯牧草免疫

[0262] 用来自梯牧草的变应原进行免疫。

[0263] 根据表 4 和上文“服药”所述,免疫 3 个测试组,每组 8 只动物。

[0264] 阳性应答

[0265] 单个分析各组小鼠的血清,并通过各个稀释度的 OD 读数(图 25-27)显示获得的稀释曲线。在测量点的顶部,应用了显示该组几何学平均值的一条线。由于 1 组 8 只小鼠是在两块 ELISA 板上进行分析的,在每张图上显示由阳性对照获得的两条线。如果不同服药的小鼠组的血清的相同稀释度的 OD 应答存在显著差异,则认为应答是阳性的。

[0266] 结果进一步形象化于图 25-27。

[0267] 表 4

[0268]

组	施用途径	服药时间	疫苗制剂
1 皮下 4 次	皮下 皮下	第 0 天 第 21、22、23 天	氢氧化铝和梯牧草
2 皮下 1 次 + 口服 3 次有活性	皮下 口服	第 0 天 第 21、22、23 天	氢氧化铝和梯牧草
3 皮下 1 次 + 3 次安慰剂	皮下 口服	第 0 天 第 21、22、23 天	氢氧化铝无梯牧草 安慰剂

[0269] 由图 25-27 的比较可见,第 2 组的阳性应答小鼠数目显著高于第 3 组。第 1 组作为阳性对照,因此阳性应答小鼠数目显著高于第 2 组和第 3 组。

[0270] 总之,实施例 4 显示了通过不同施用途径的组合,用有活性的而非安慰剂制剂诱导强烈的免疫应答是可能的。此外,诱导出现更早、诊断性水平更高的应答是可能的,且/或是很一致的。

[0271] 当与传统免疫方案组合应用时,本发明可以用于产生加强免疫。或者,不同的施用途径可以有利的用于改善免疫。

[0272] 在这个实施例中,生物学活性物质由梯牧草例示,含氧金属盐由氢氧化铝例示。

[0273] 实施例 5[0274] 在粘膜递送系统中使用不同的含氧金属盐用破伤风类毒素免疫

[0275] 使用不同的含氧金属盐(参照上文)(作为粘膜递送系统的成分)配制的破伤风类毒素进行免疫。根据上文所述方案,免疫了 22 组,每组 8 只小鼠。使用了 6 种不同的含氧金属盐,以相当于 1.25mg/ml 氢氧化铝的阳离子摩尔量选择制剂。如上文所述,所有的含氧金属盐与破伤风类毒素一起配制。步骤可以进一步优化,尤其是例如反应时间、相对浓度、和/或 pH。

[0276] 阳性应答

[0277] 如果由第 70 天(口服)或第 35 天(腹膜内)采集的血清测量的 OD 值比由阴性对照组测量的相应信号至少高 0.5 个吸收单位,则认为应答是阳性的。

[0278] 表 5

[0279]

含氧金属盐	口服破伤风类毒素 MDS IgG 第 70 天	口服破伤风类毒素 无 MDS IgG 第 70 天	口服 MDS 无破伤风类毒素 IgG 第 70 天	腹膜内破伤风类毒素 MDS IgG 第 35 天
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5/7	1/8	0/8	8/8
AlPO_4	8/8		0/8	8/8
ZnSO_4	3/8	1/8	0/8	8/8
$\text{Al}(\text{OH})_3$	7/8	0/8	0/8	8/8
$\text{CaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	7/8	0/8	0/8	7/7
$\text{Al}(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})_2$	6/8		0/8	8/8

[0280] MDS 表示粘膜递送系统。

[0281] 由表 5 可见,用与含氧金属盐配制的抗原制剂免疫的所有组诱导免疫应答的小鼠数目比用不包括含氧金属盐的抗原或不包括抗原的含氧金属盐免疫的对照组大。当腹膜内使用时,所有组合物 / 制剂 / 疫苗诱导一致的免疫应答。

[0282] 总之,实施例 5 显示了当用于本发明的粘膜递送系统时,广泛的含氧金属盐抗原有效诱导免疫应答。在这个实施例中,免疫原性物质由破伤风类毒素例示,金属盐分别由氢氧化铝、磷酸钙、磷酸铝、硫酸锌、酒石酸钙、和醋酸铝例示。

[0283] 参考文献

[0284] 1. WO 94/21288(Assay Research 公司)

[0285] 2. WO 95/05194(Medeva Holdings B. V.)

[0286] 3. JP 65008152B(摘要)(Yaoi, H.)

[0287] 4. GB 2195996(Mitsui Norin 有限公司)

[0288] 5. GB 1078879(Parke, Davis & Company)

[0289] 6. FR 2143588(Herman Schettler)

[0290] 7. P. M. Callahan 等人, 制药学研究 (Pharmaceutical Research) 8(7) :851-858, 1991

[0291] 8. “疫苗设计。亚基和佐剂研究”,第 7、8、和 9 章, M. F. Powell 和 M. J. Newman 编, 1995, Plenum Press

[0292] 9. EP 266119(南方研究所和 UAB 研究基地)

[0293] 10. 化学和物理学手册,第 56 版, B 部分, 第 7 章, 1975-1976

[0294] 11. E. Taudorf :“口的免疫治疗”, 博士论文, 1992, **Lægeforeningens** Forlag, 哥本哈根, 丹麦

[0295] 12. EAACI 意见书 :“局部免疫治疗”, 1998, EAACI 免疫治疗小组委员会和 ESPACI 免

疫治疗委员会

[0296] 13. Ipsen 和 **Lowenstein**, 变应性和临床免疫学杂志 (The Journal of Allergy and Clinical Immunology) 72(2) :150-159, 1983

图 1

用铝胶悬浮的破伤风类毒素口服免疫
的小鼠第 35 天的 IgG1 应答

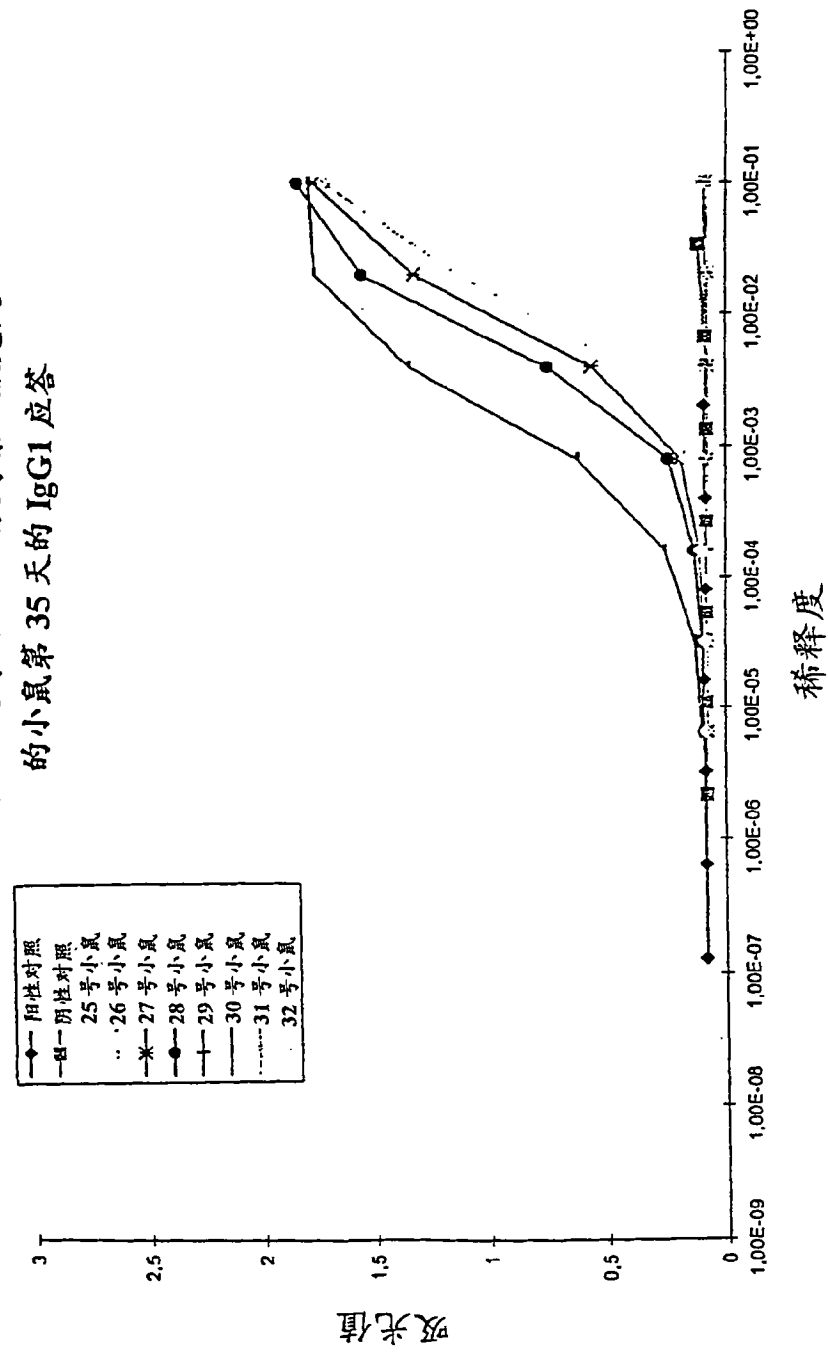


图 2

用不包括铝胶载体的破伤风类毒素口服
免疫的小鼠第 35 天的 IgG1 应答

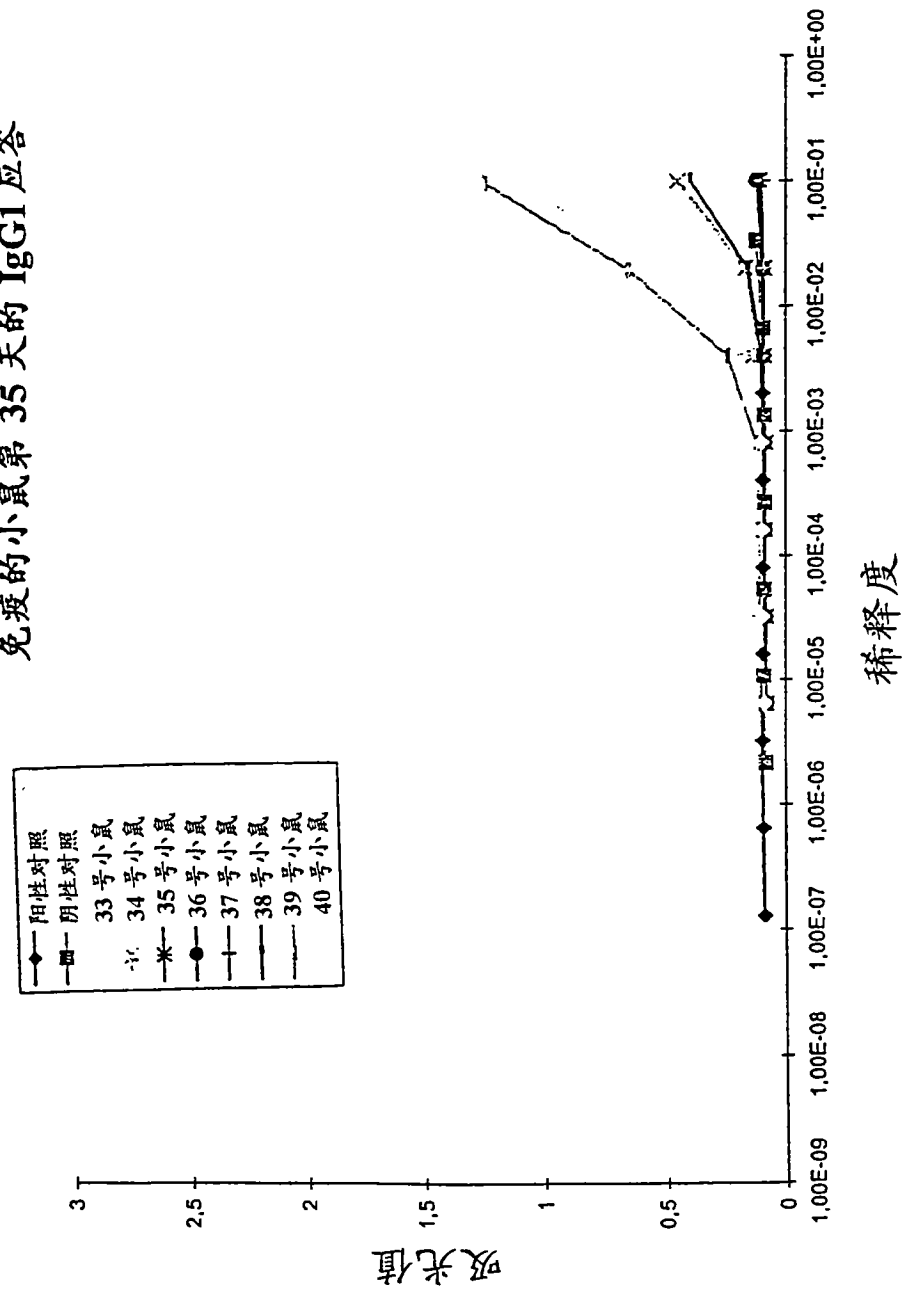


图 3

用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠 (对照组)

第 35 天的 IgG1 应答

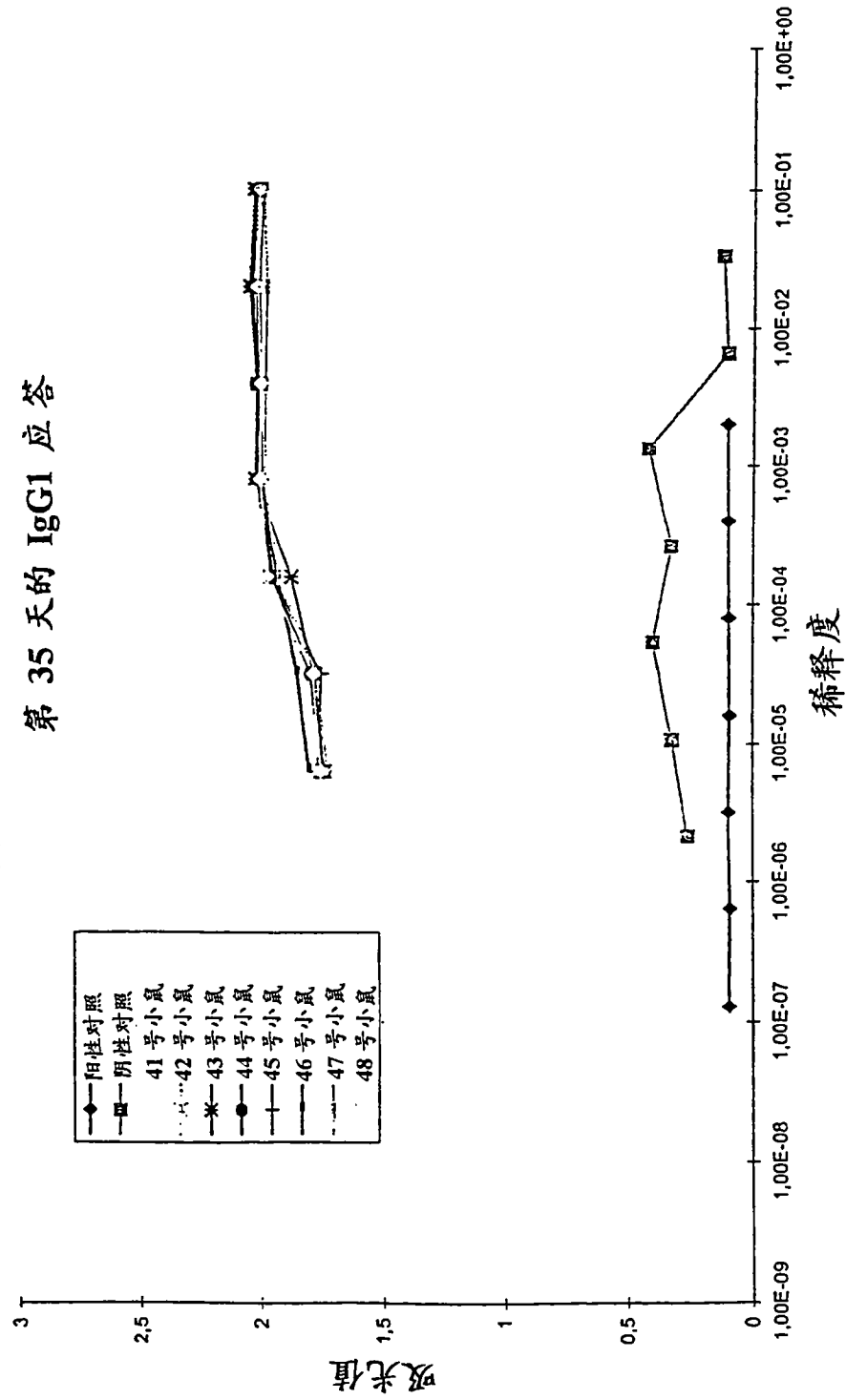
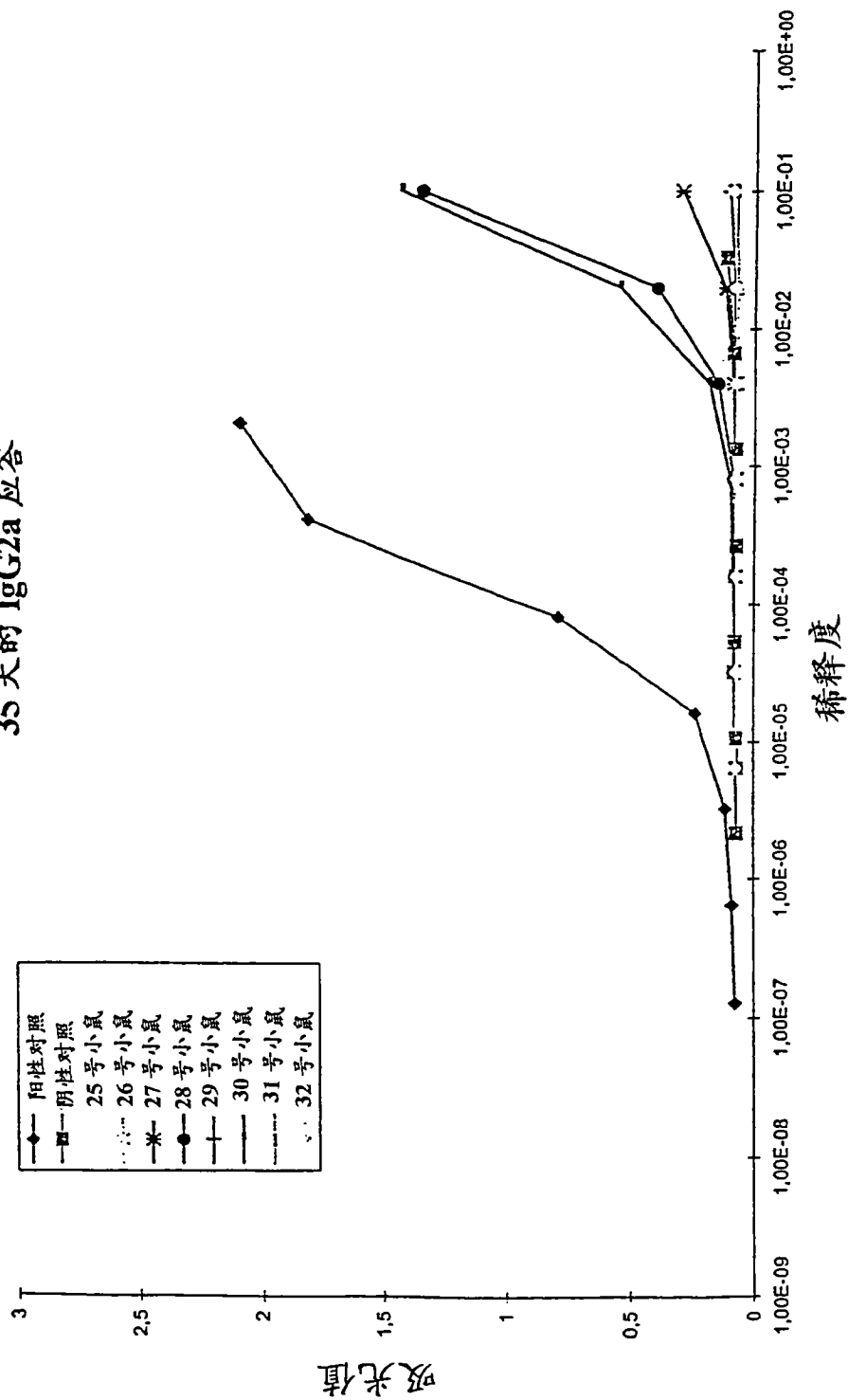


图 4

用铝胶悬浮的破伤风类
毒素口服免疫的小鼠第
35 天的 IgG2a 应答



用不包括铝胶载体的破伤风
类毒素口服免疫的小鼠
第35天的 IgG2a 应答

图 5

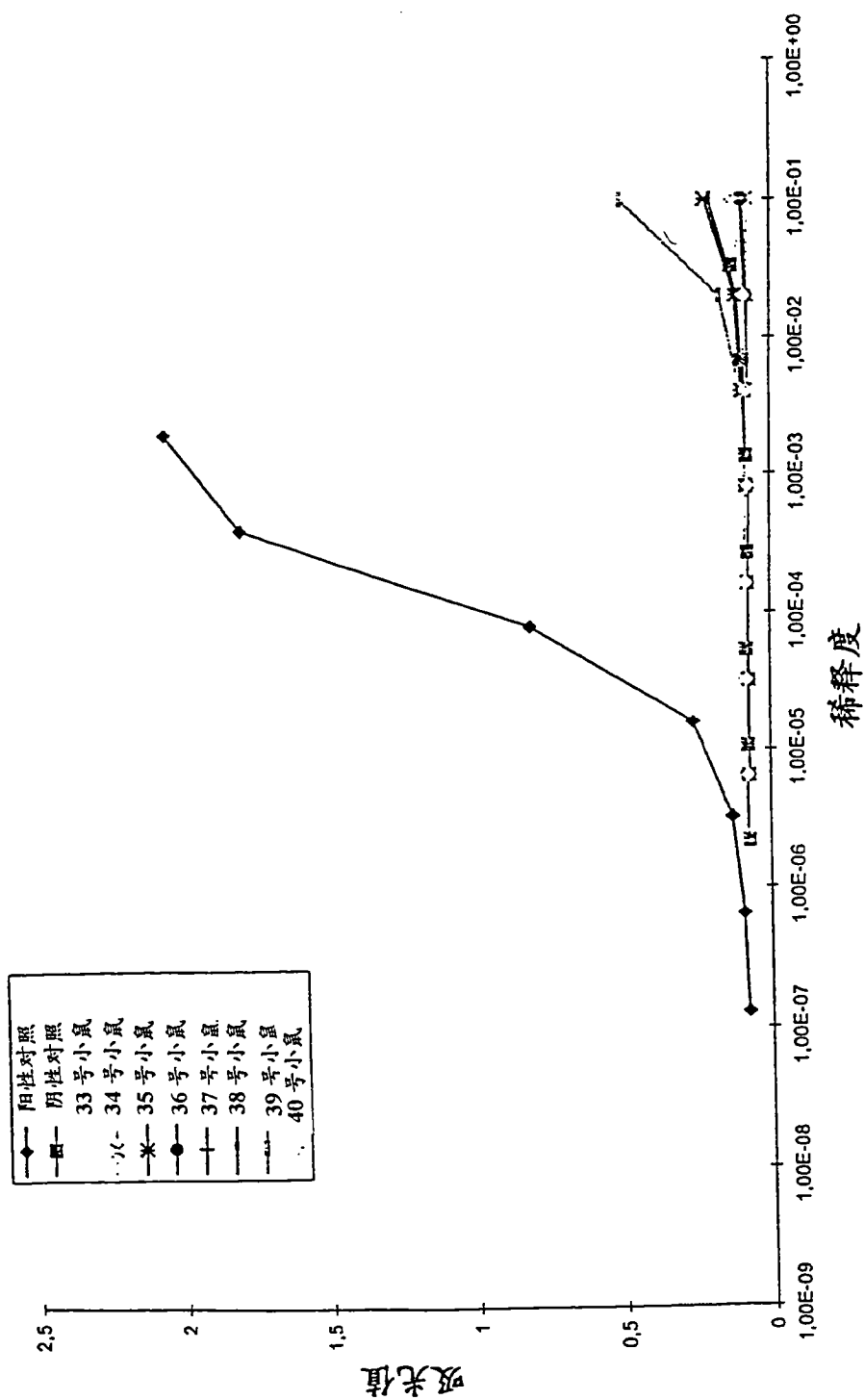


图 6

用破伤风类毒素腹膜内
免疫的小鼠 (对照组)
第 35 天的 IgG2a 应答

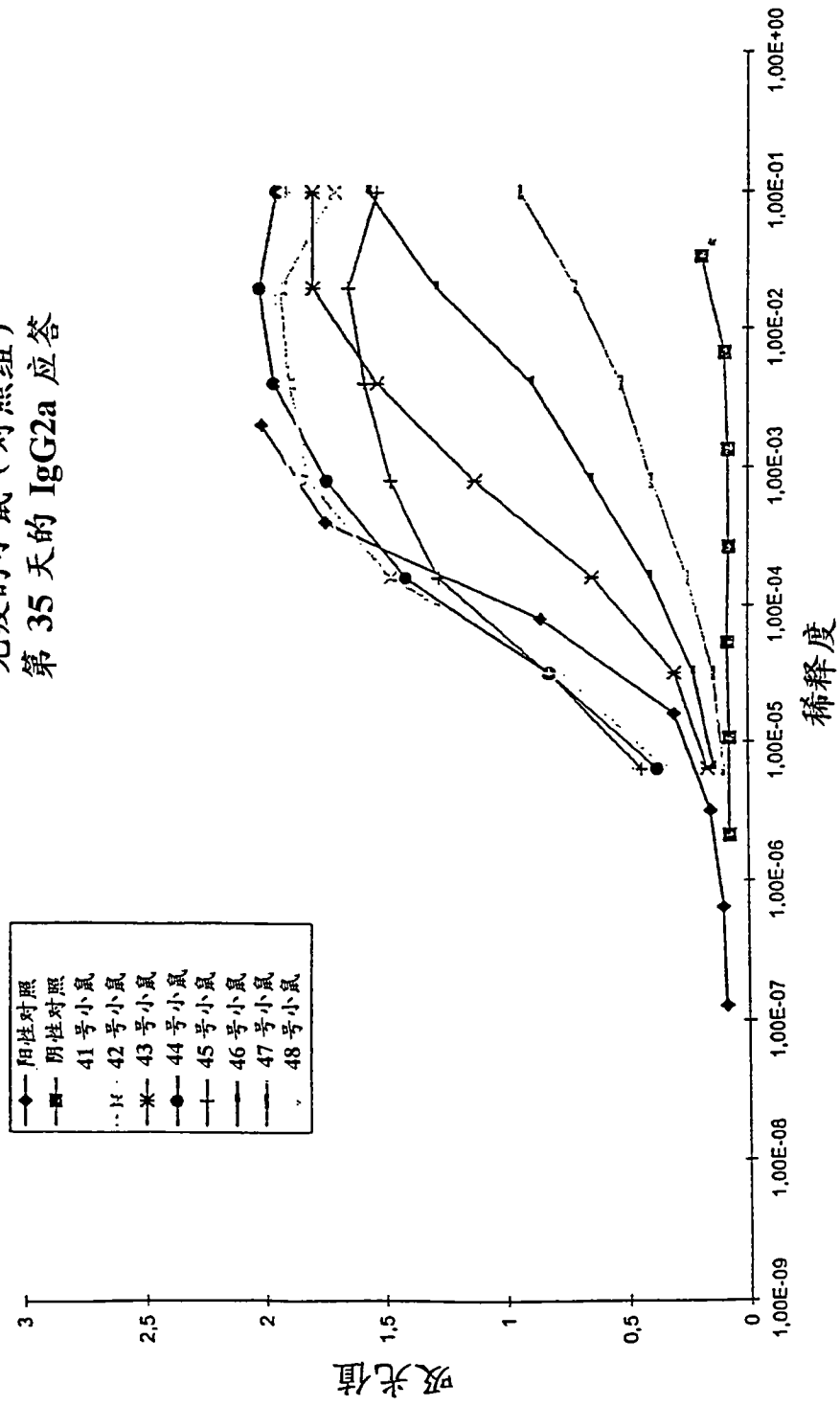


图 7

用铝胶悬浮的破伤风类
毒素口服免疫的小鼠
第 56 天的 IgG1 应答

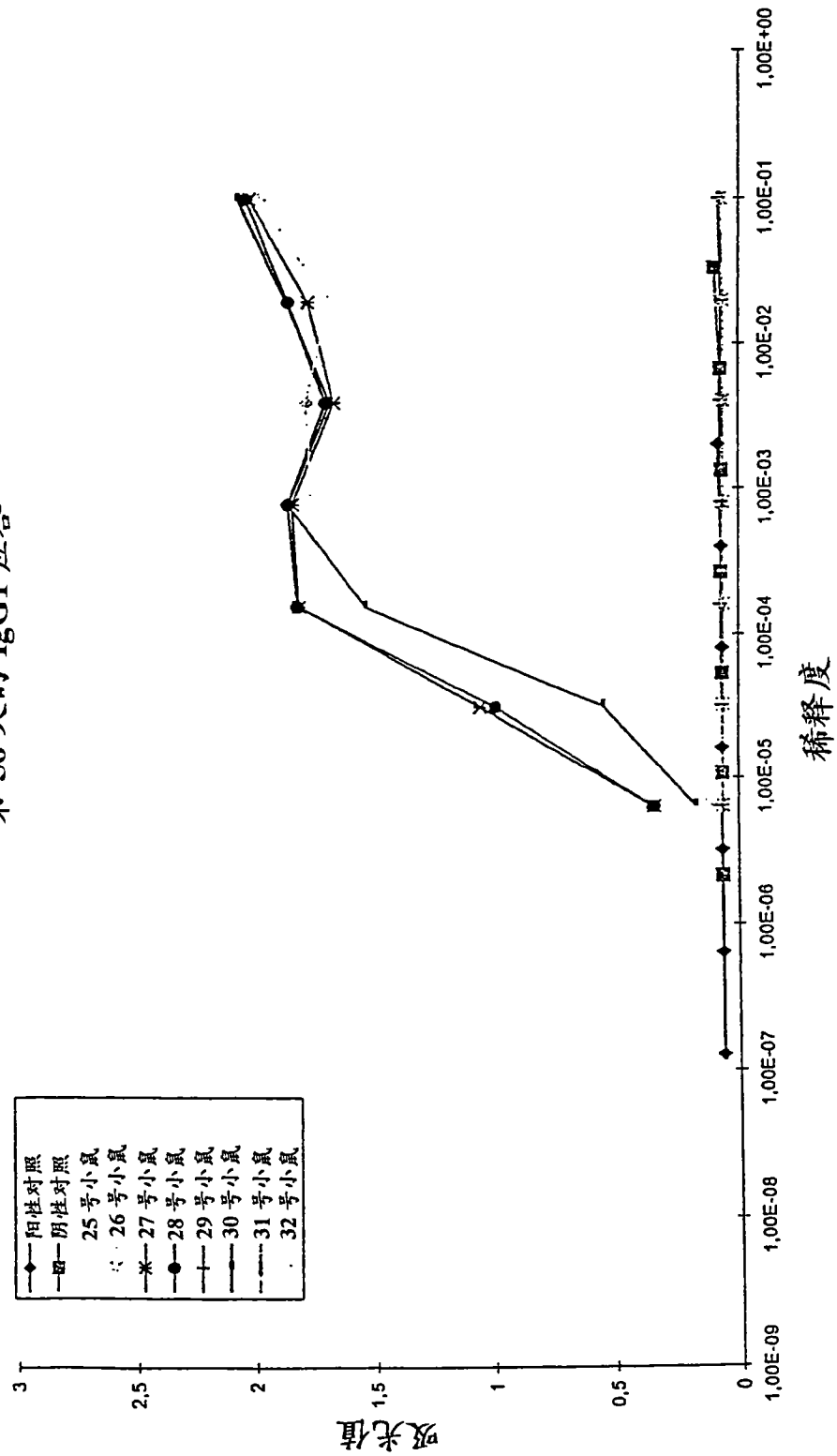


图 8

用不包括铝胶载体的
破伤风类毒素口服免疫的小鼠
第 56 天的 IgG1 应答

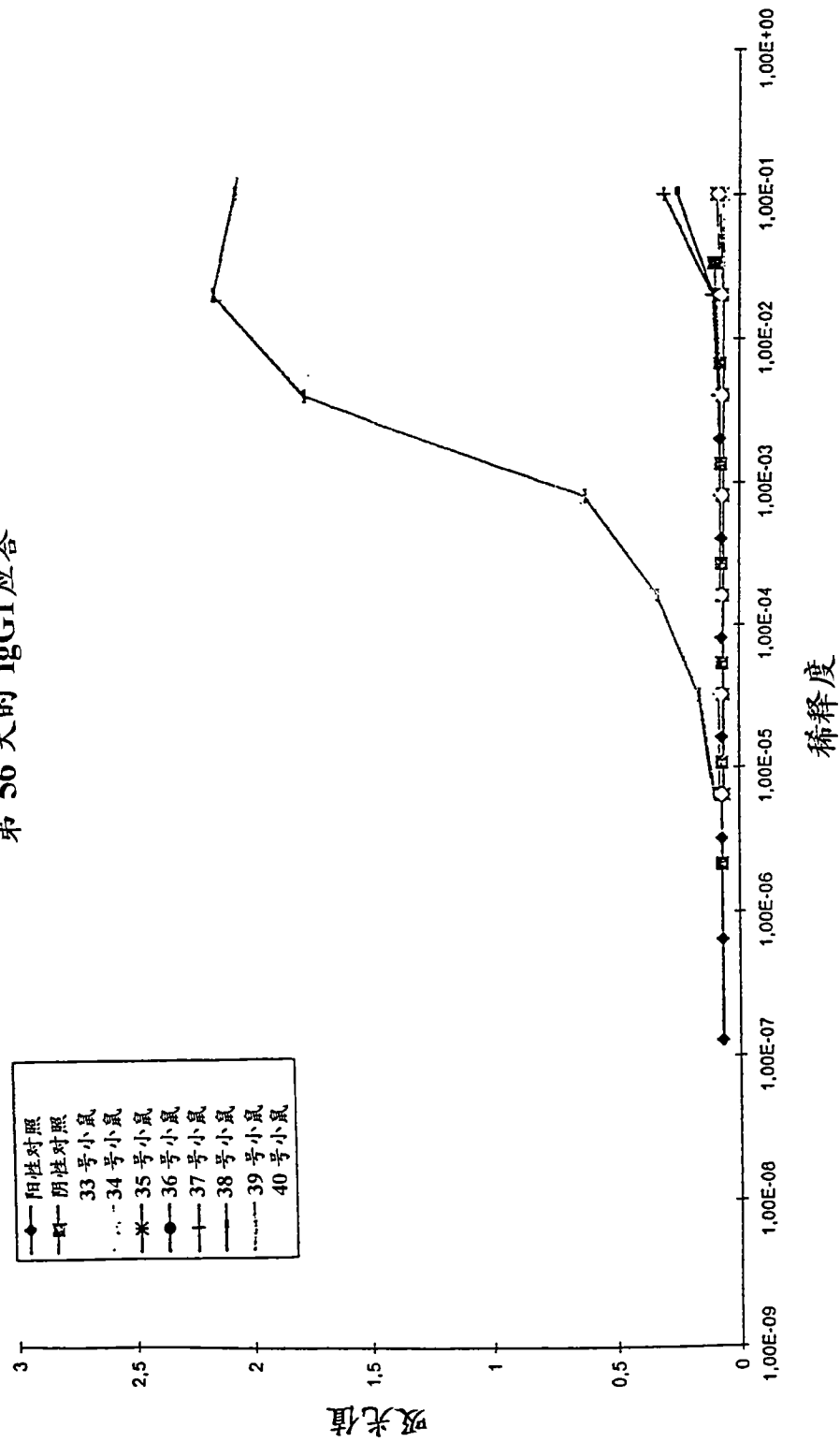
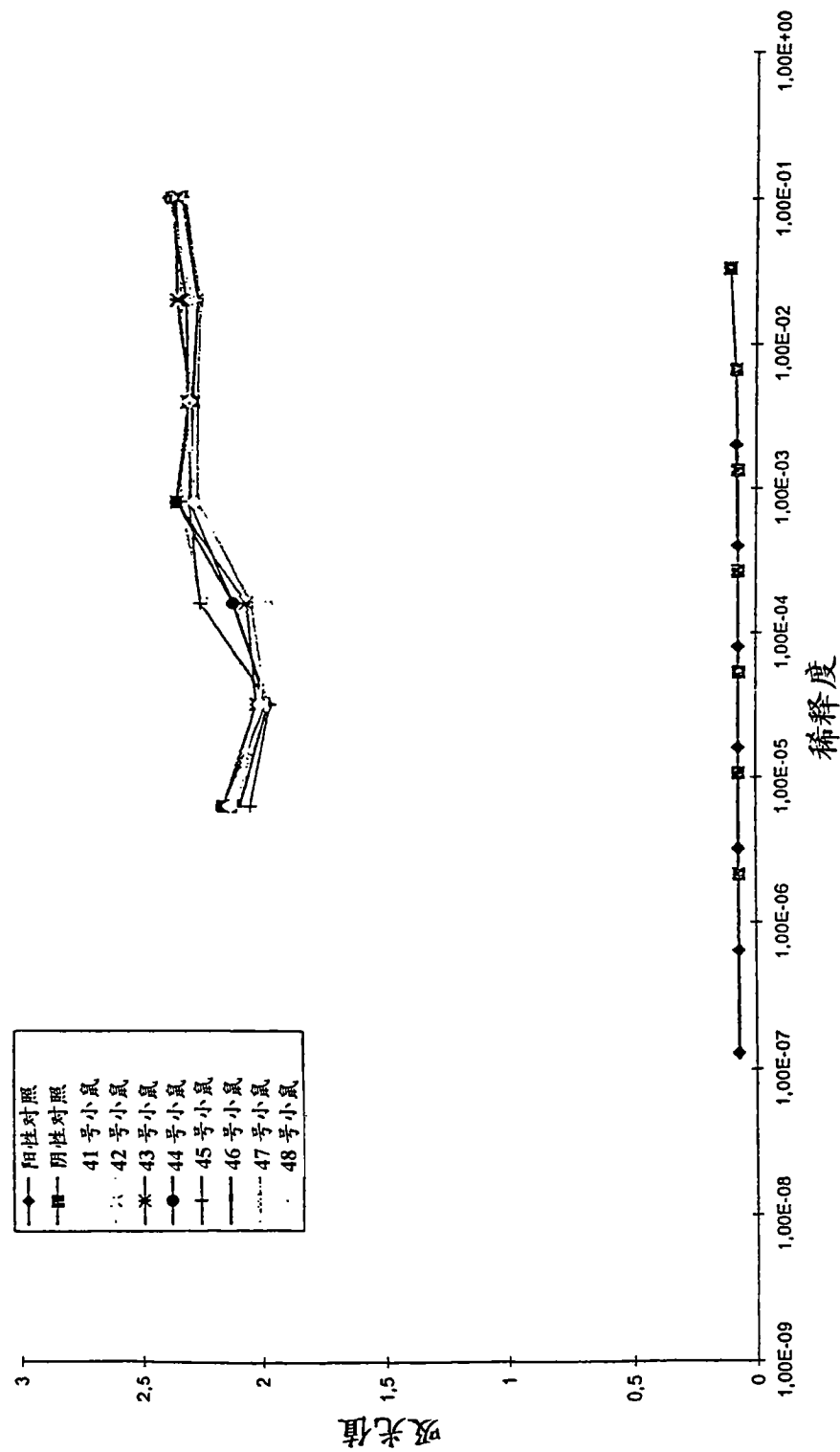
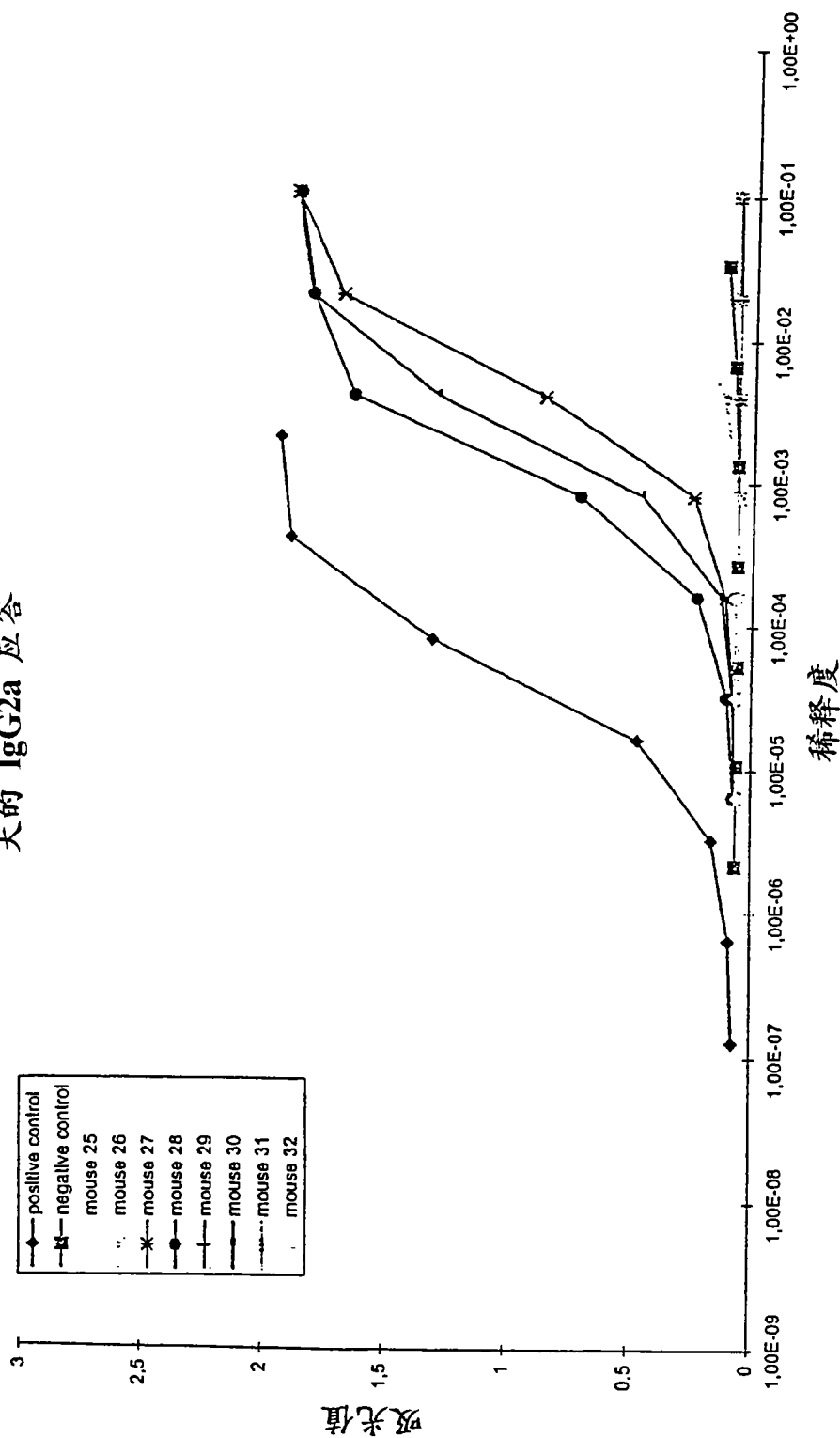


图 9
用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠
(对照组)第 56 天的 IgG1 应答



用铝胶悬浮的破伤风类
毒素口服免疫的小鼠第 56
天的 IgG2a 应答

图 10



用不包括铝胶载体的破伤
风类毒素口服免疫的小鼠
第56天的IgG2a应答

图 11

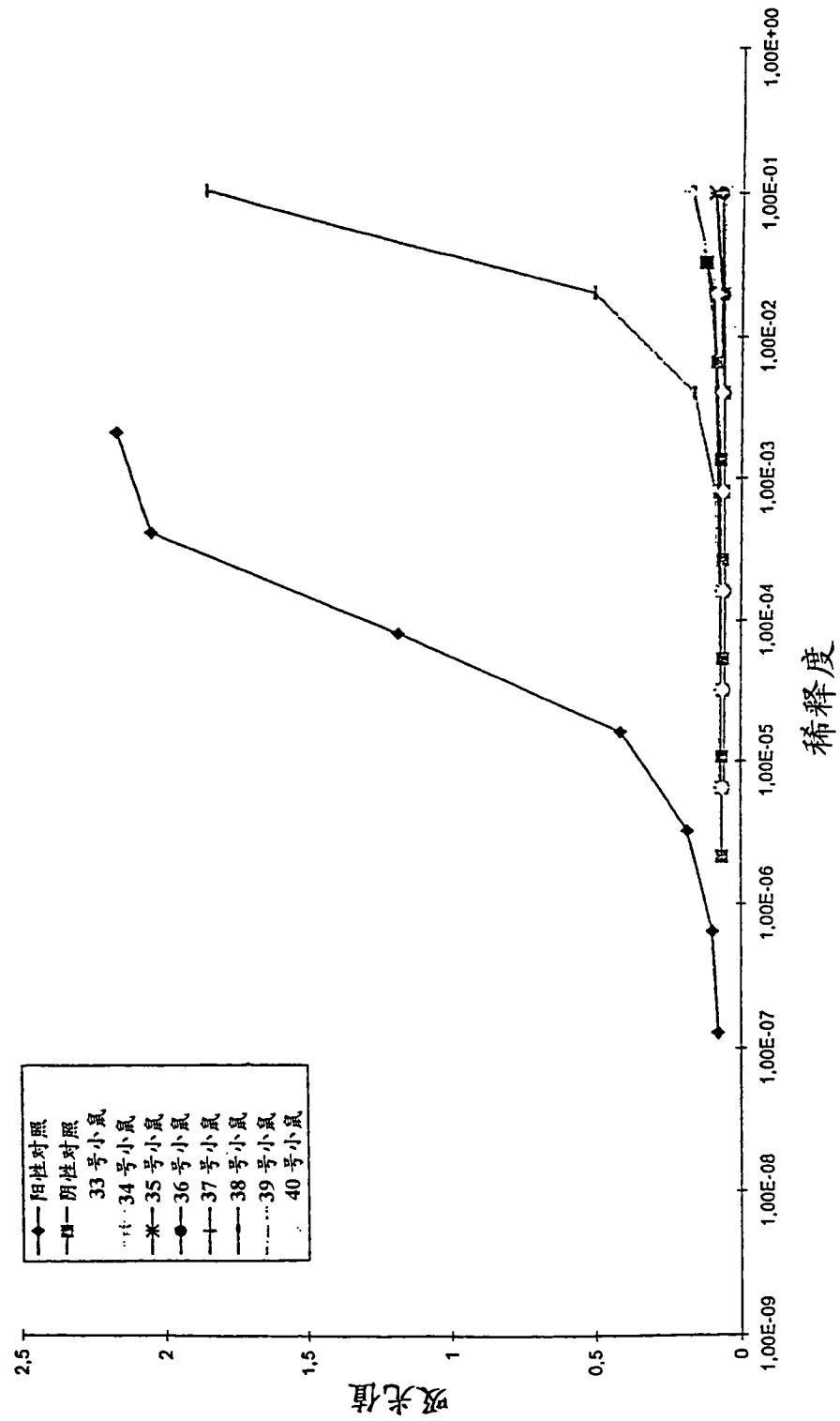
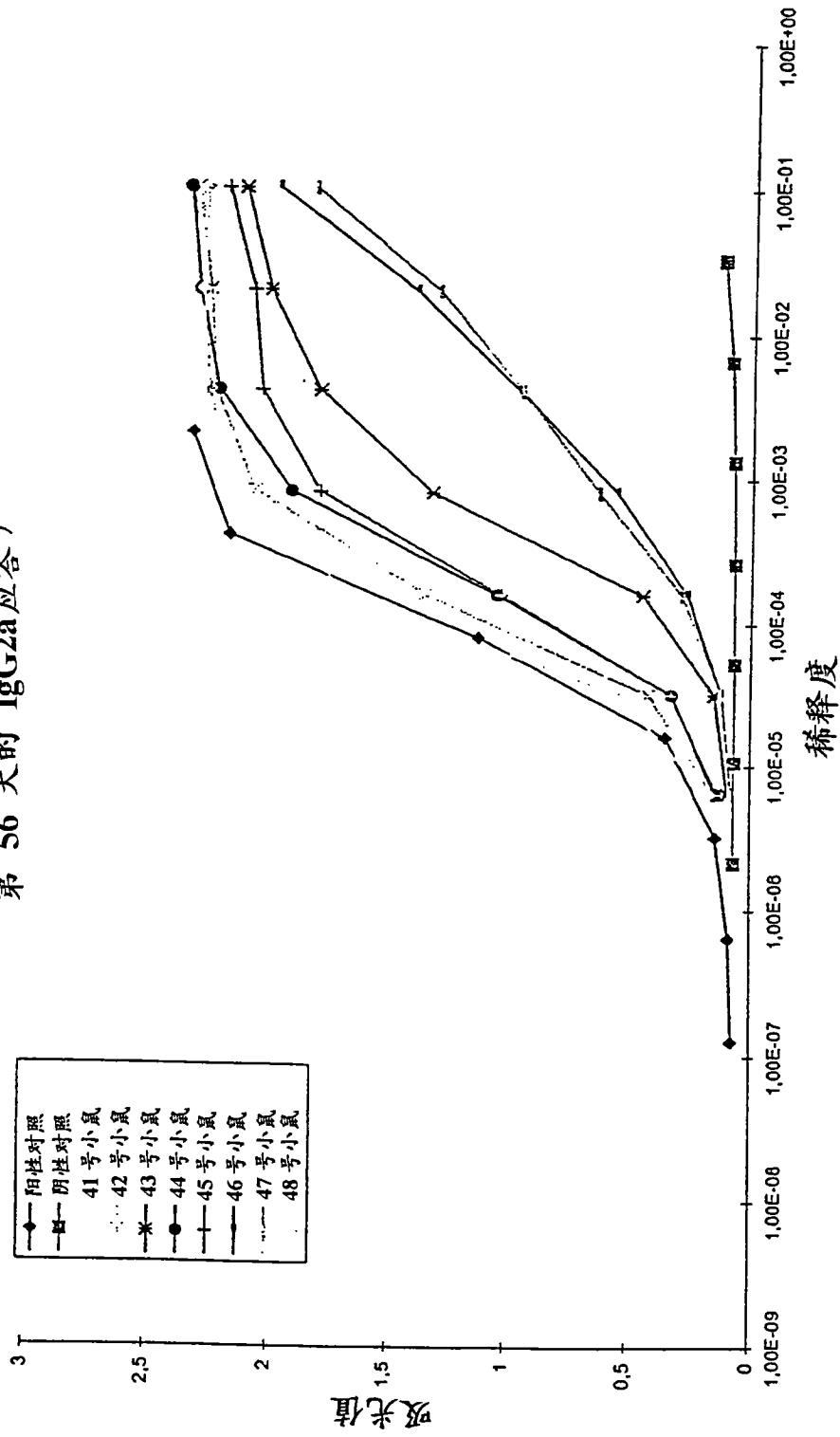


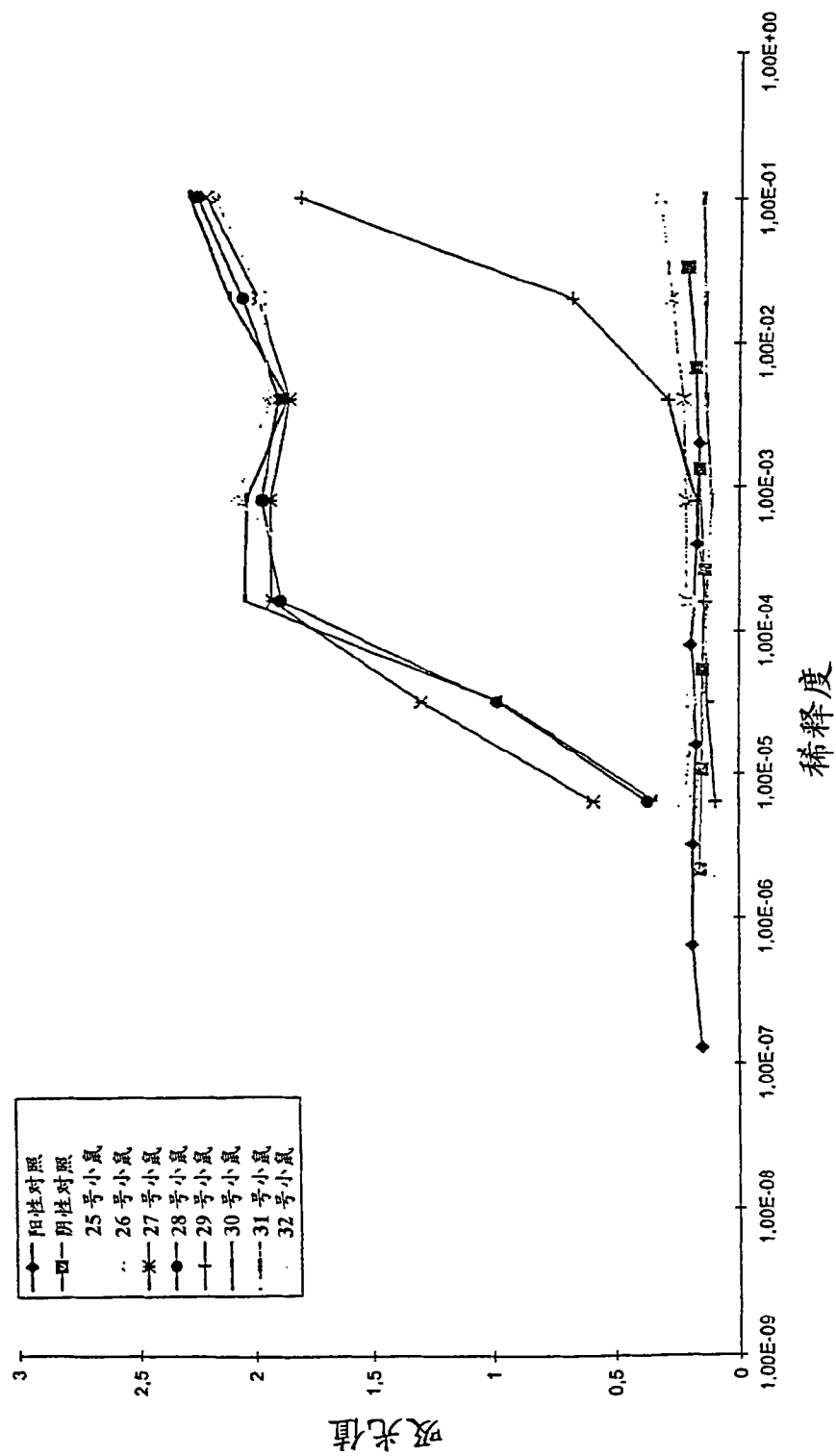
图 12

用破伤风类毒素腹膜
内免疫的小鼠 (对照组)
第 56 天的 IgG2a 应答)



用铝胶悬浮的破伤
风类毒素口服免疫的小鼠
第 70 天的 IgG1 应答

图 13



用不包括铝胶载体的破伤
风类毒素口服免疫的小鼠
第 70 天的 IgG1 应答

图 14

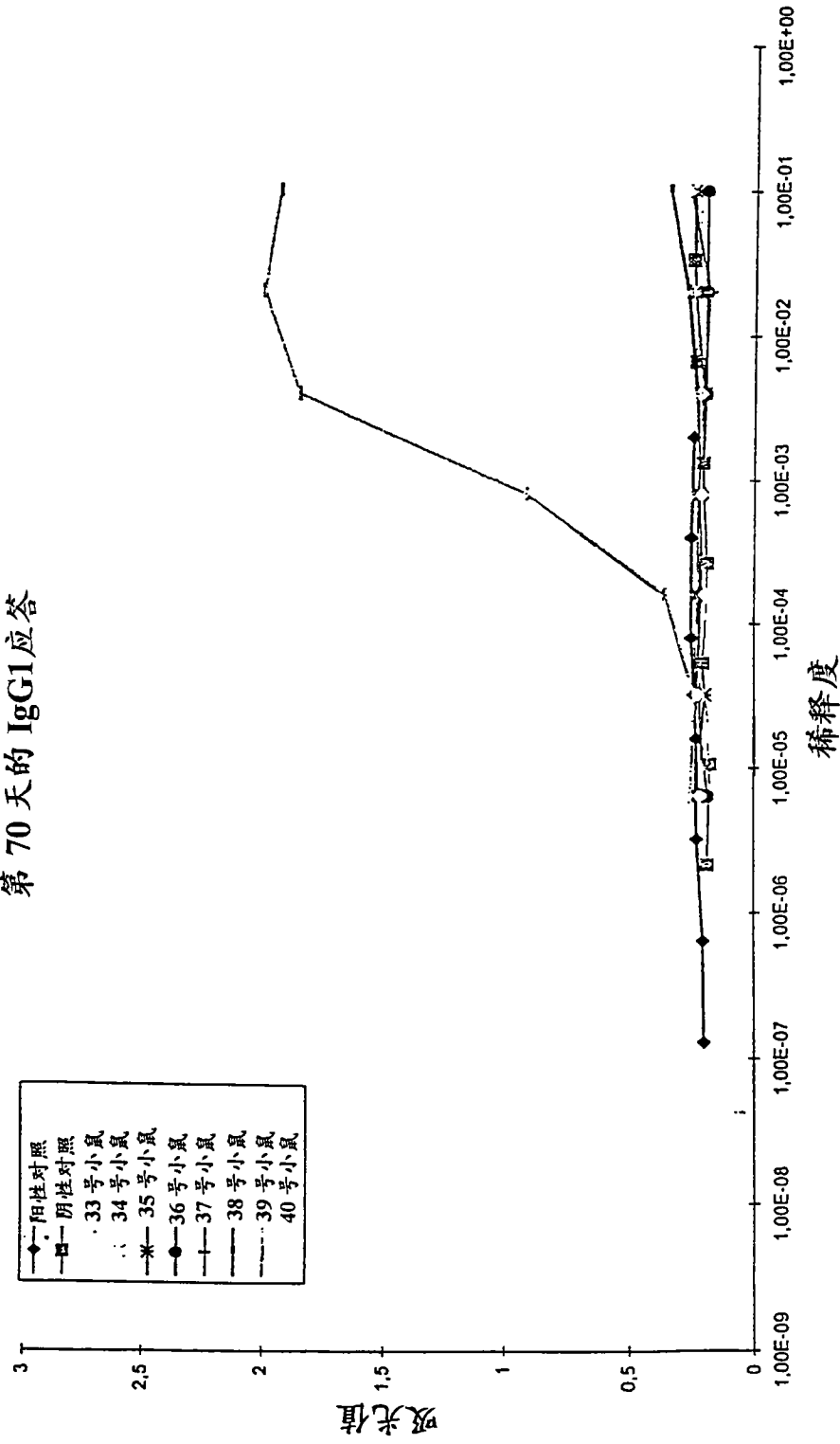


图 15
用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠
(对照组) 第 70 天的 IgG1 应答

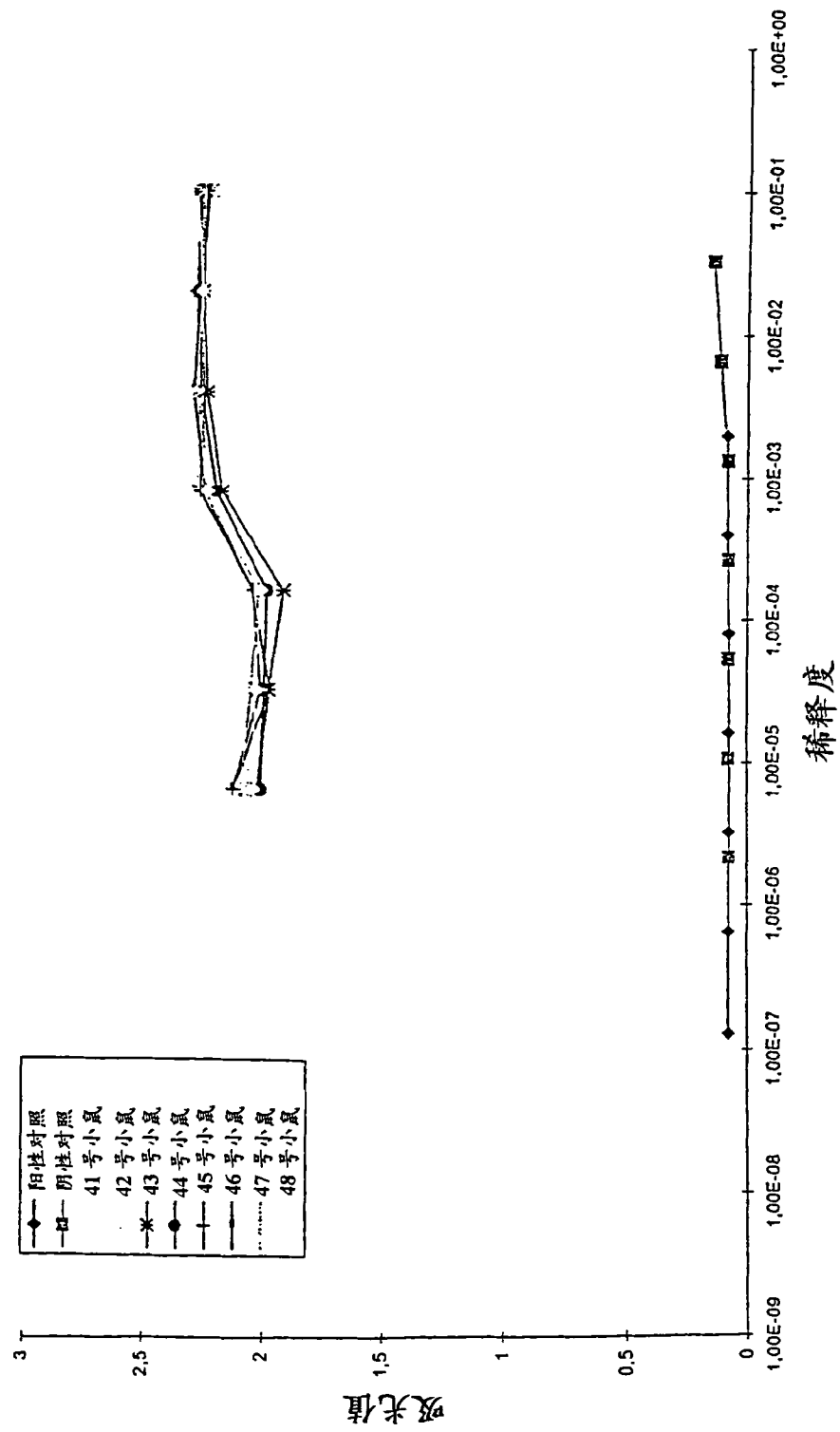


图 16

用铝胶悬浮的破伤风类毒素口服
免疫的小鼠第 70 天的 IgG2a 应答

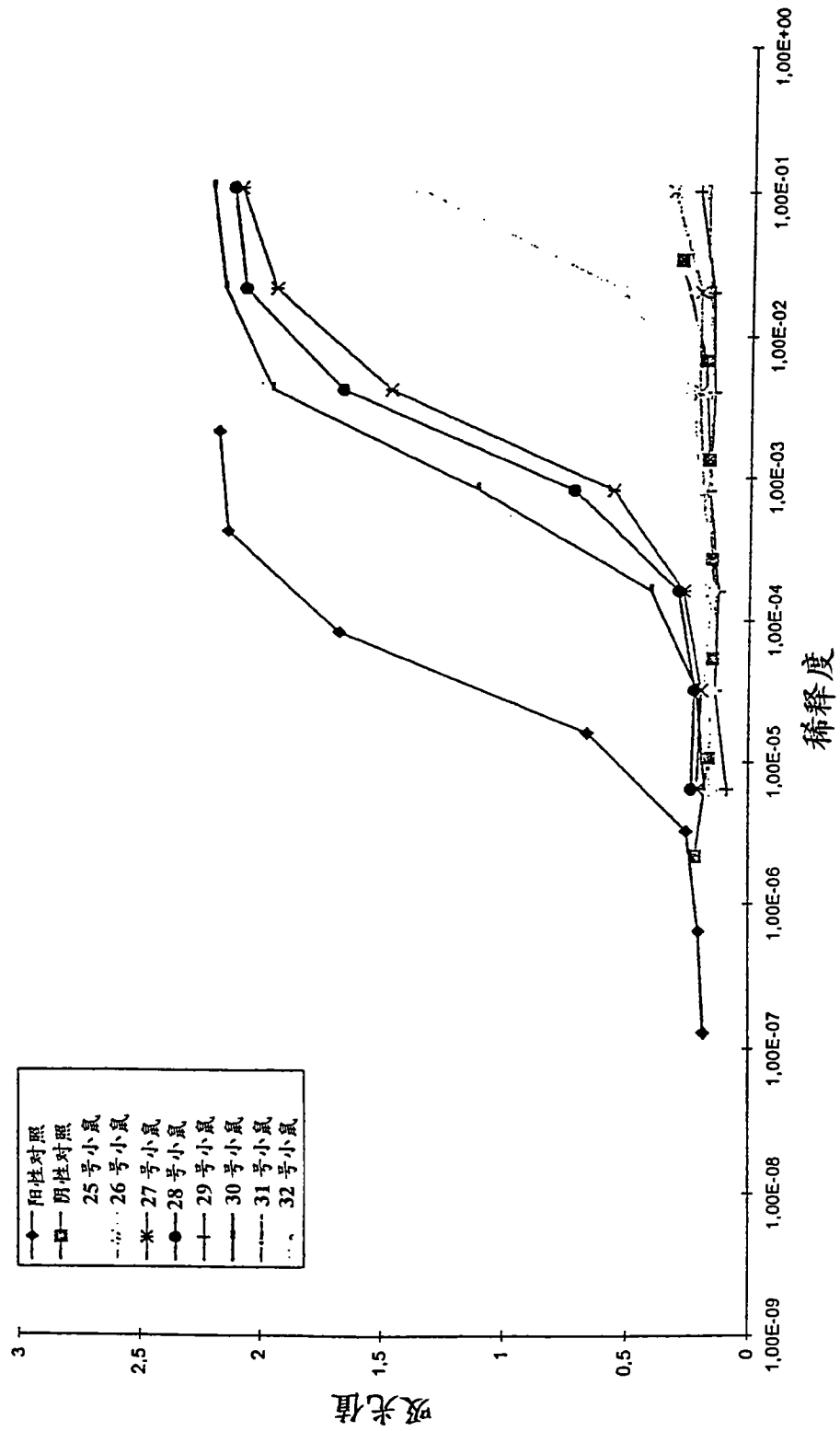
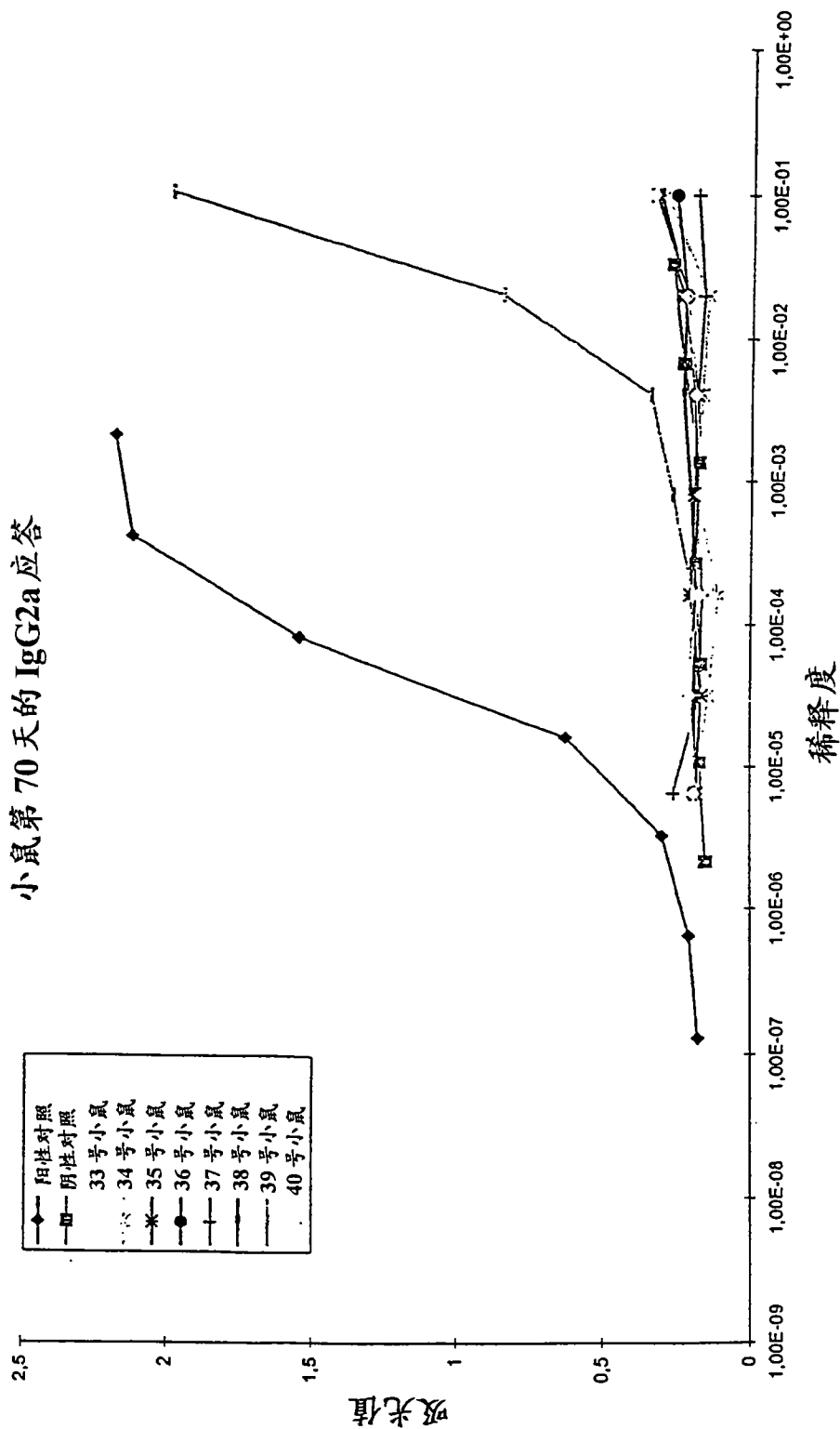


图 17

用不包括铝胶载体
的破伤风类毒素口服免疫的
小鼠第 70 天的 IgG2a 应答



用破伤风类毒素腹膜内免疫的小鼠
(对照组)第 70 天的 IgG2a 应答

图 18

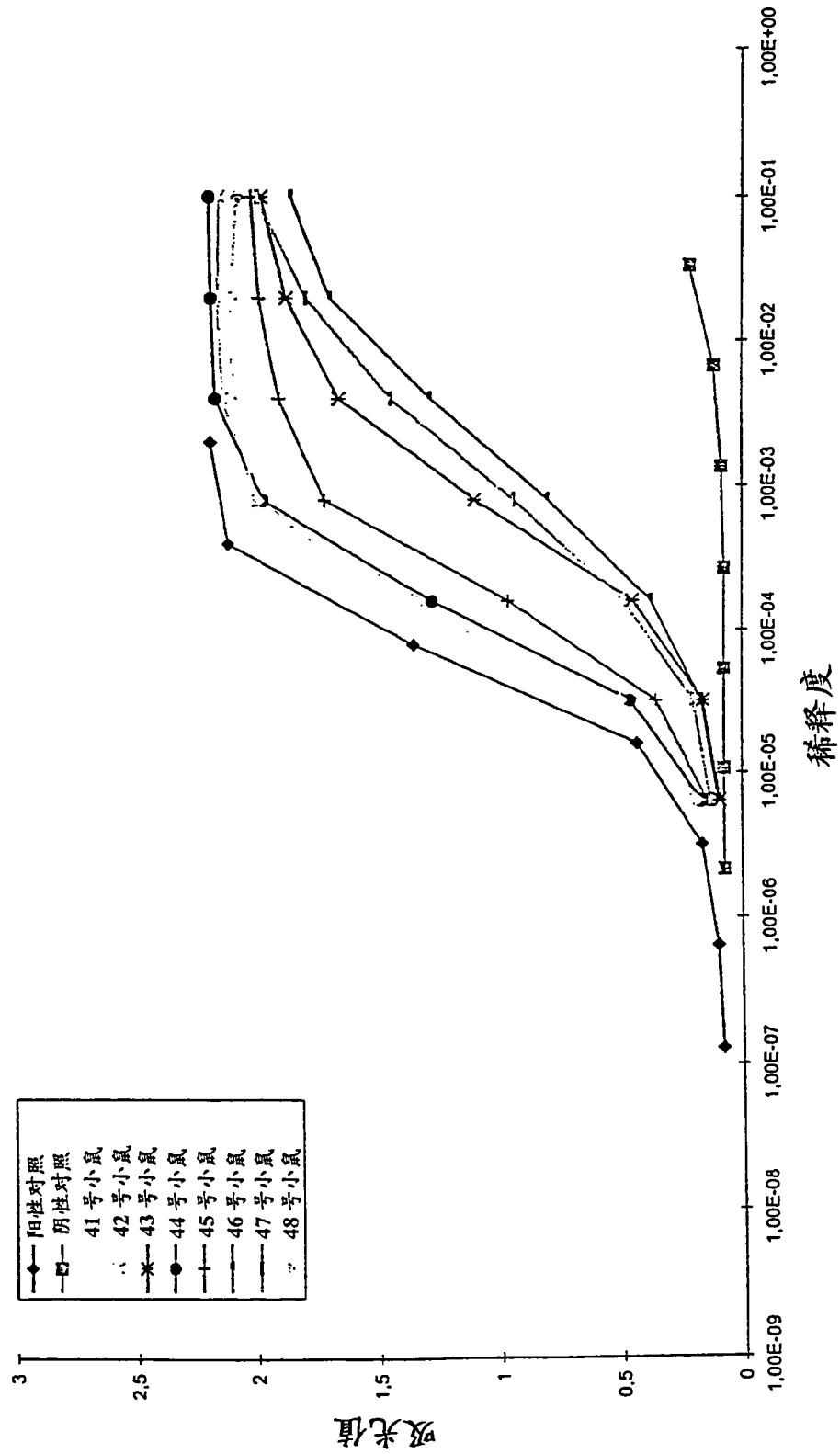


图 19

用铝胶悬液的梯牧草口服免疫
的小鼠第 70 天的 IgG1 应答

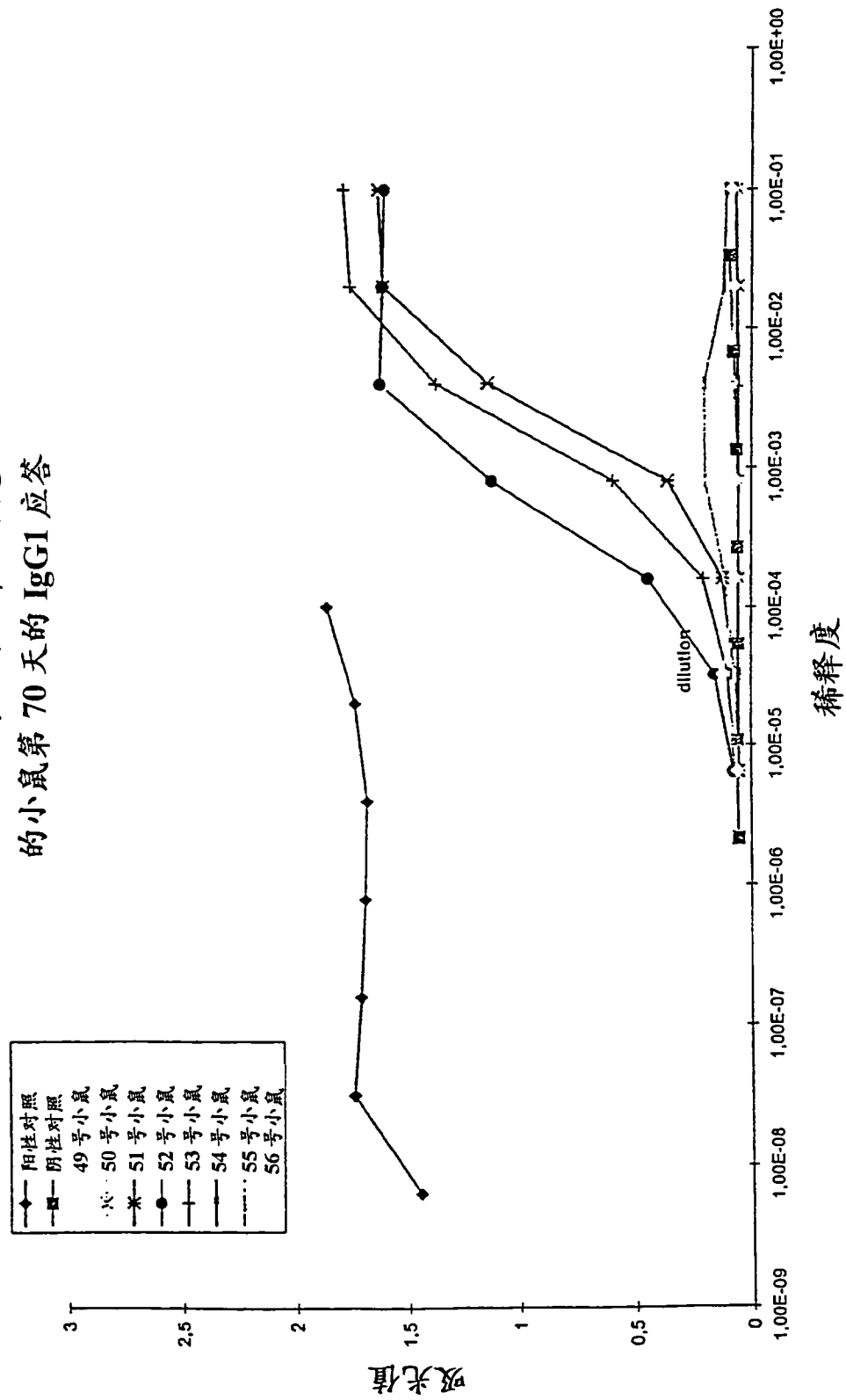


图 20

用不包括铝胶载体的梯牧草口服
免疫的小鼠第 70 天的 IgG1 应答

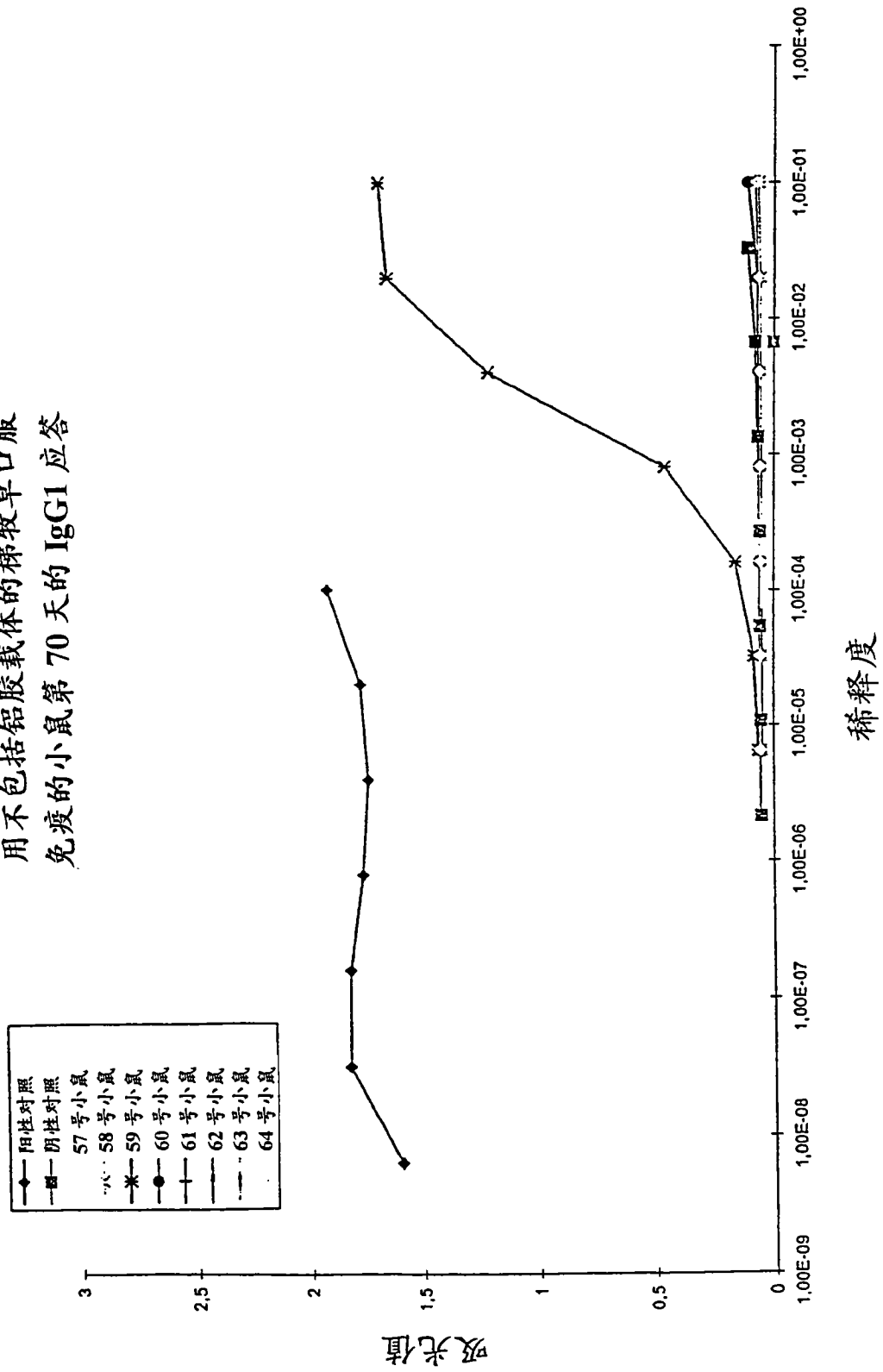


图 21

用梯牧草腹膜内免疫的小鼠 (对照组)

第 70 天的 IgG1 应答

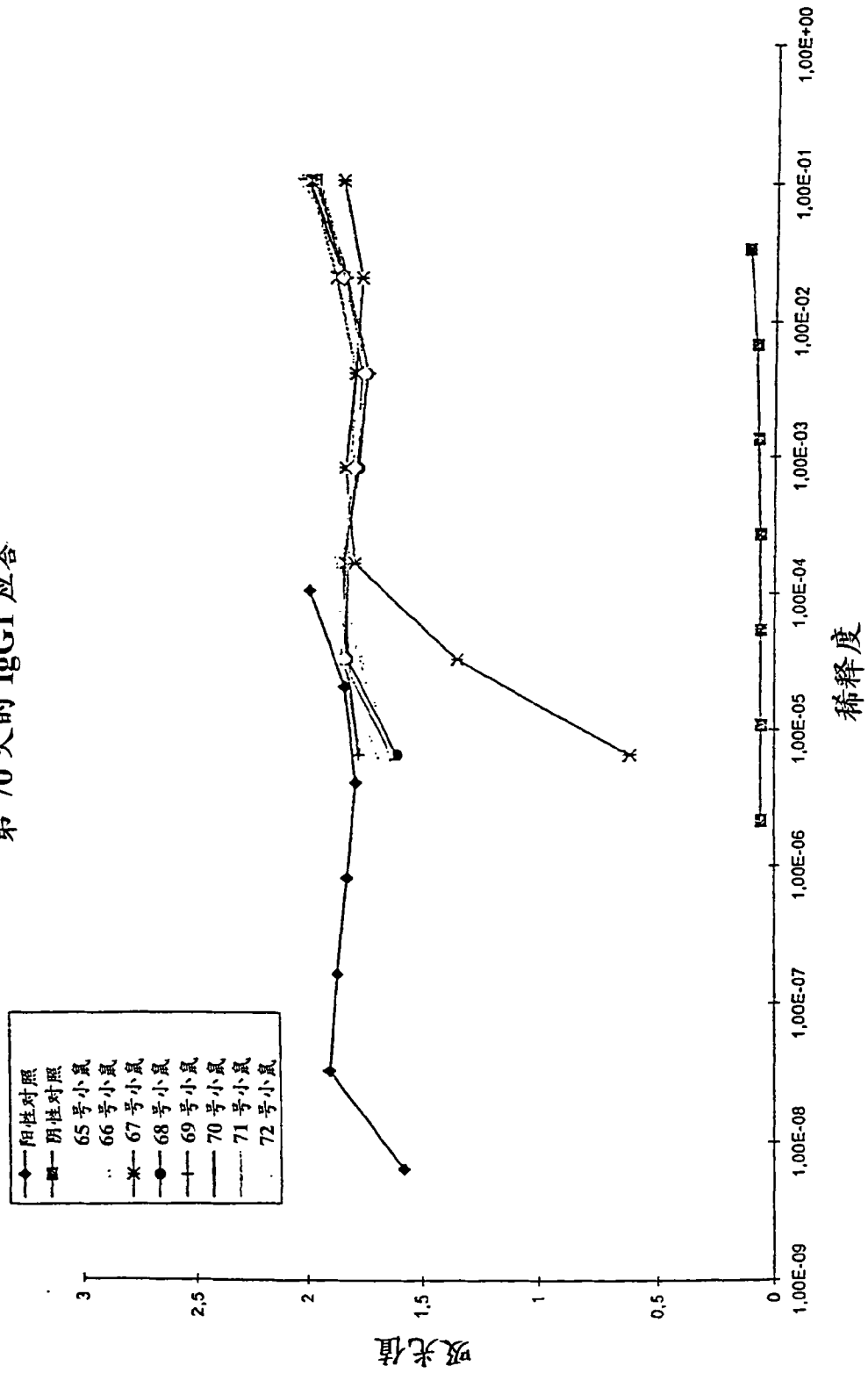


图 22

用铝胶悬浮的梯牧草口服免疫的
小鼠第 70 天的 IgG2a 应答

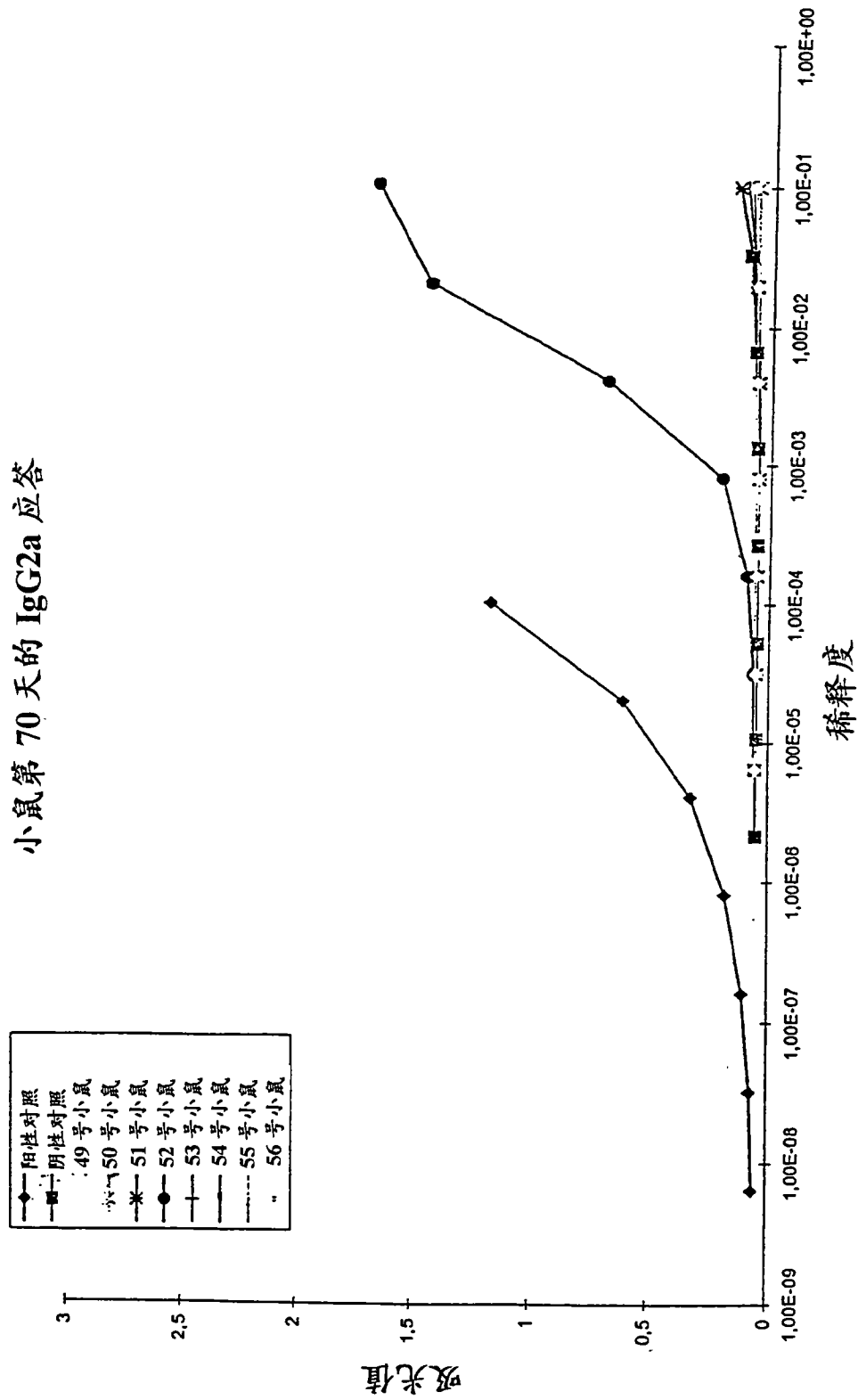


图 23

用不包括铝胶载体的梯牧草口服免疫的
小鼠第 70 天的 IgG2a 应答

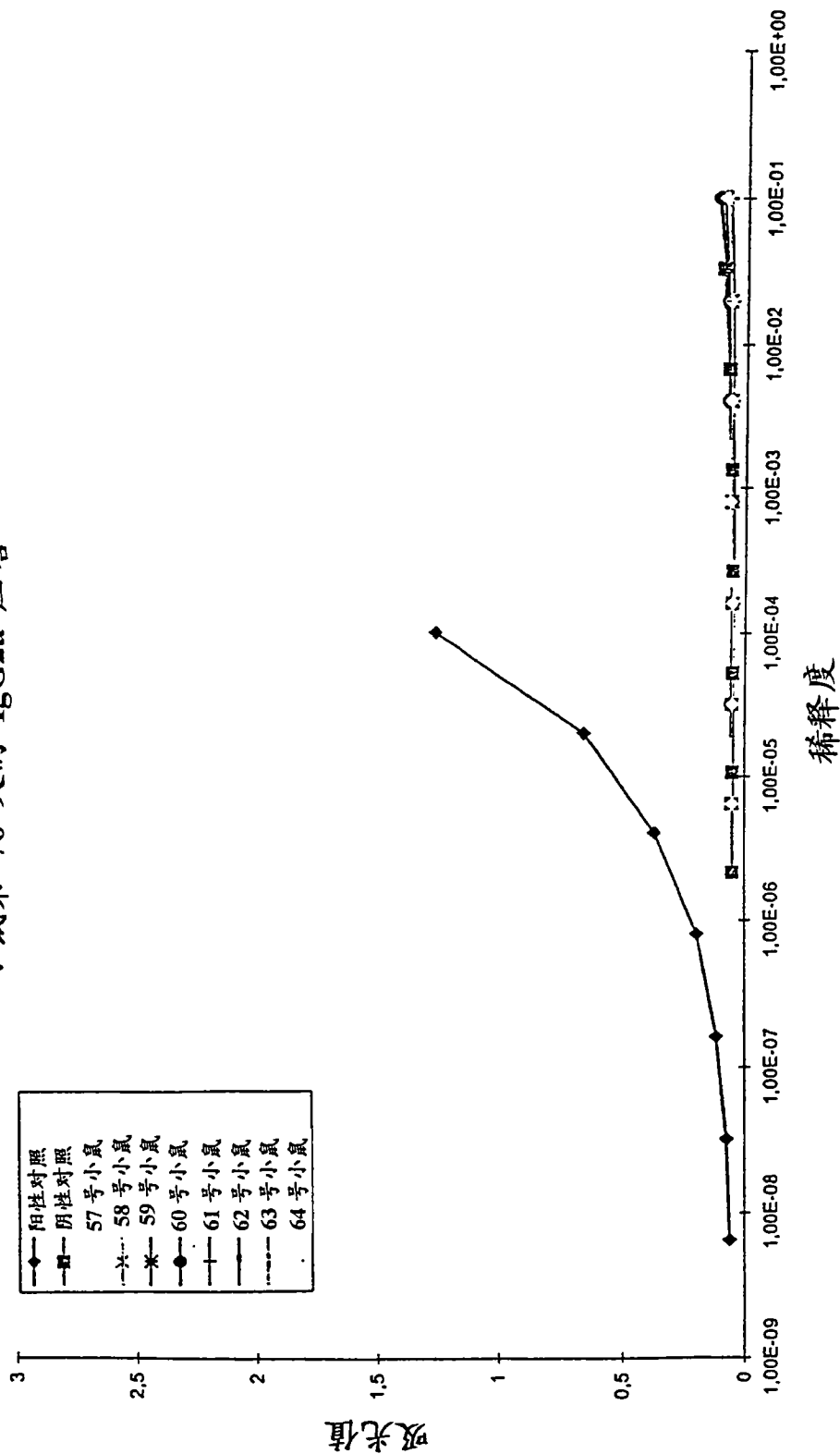


图 24

用梯牧草腹膜内免疫的小鼠 (对照组)
第 70 天的 IgG2a 应答

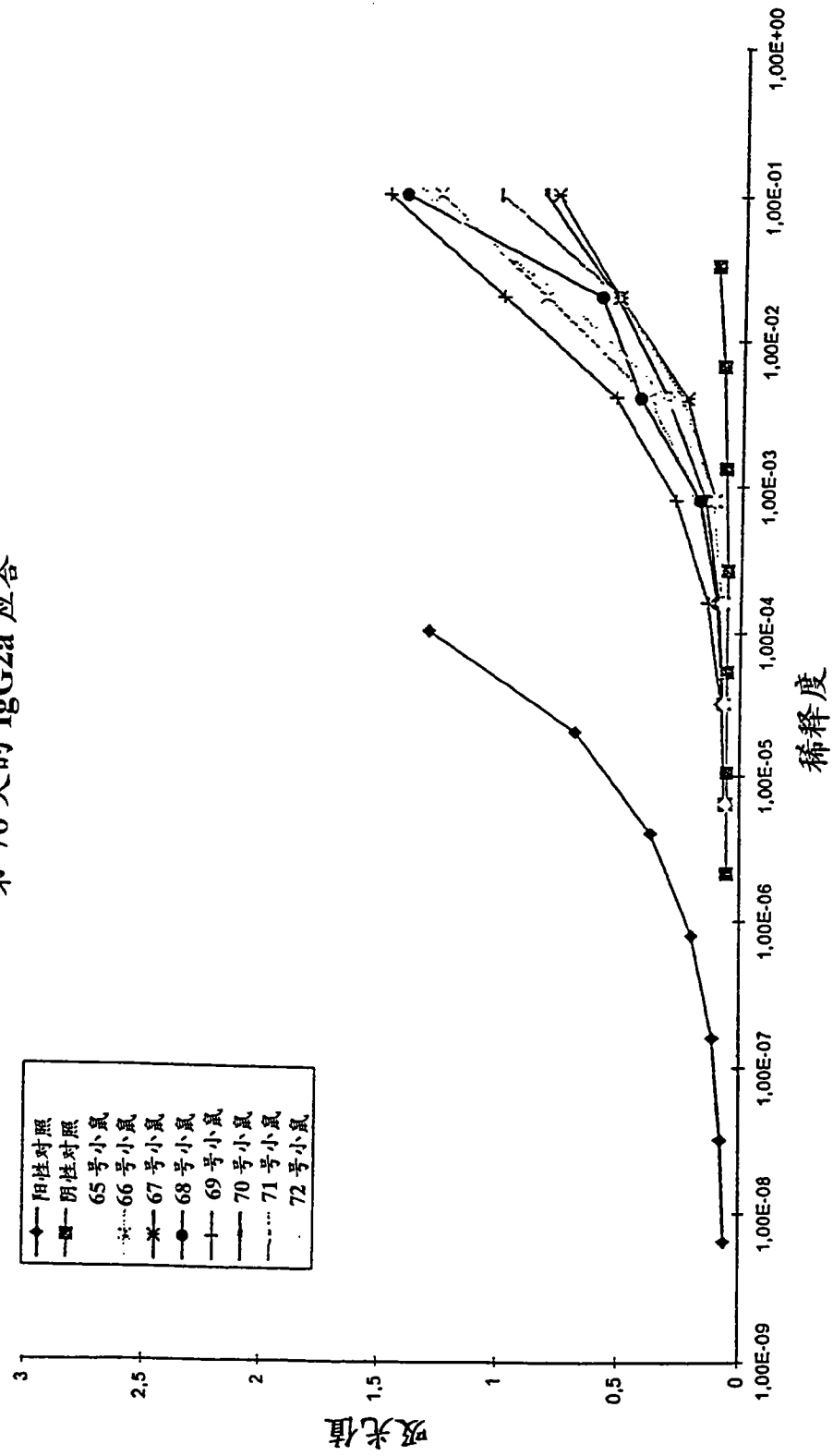


图 25

4 次皮下免疫梯牧草

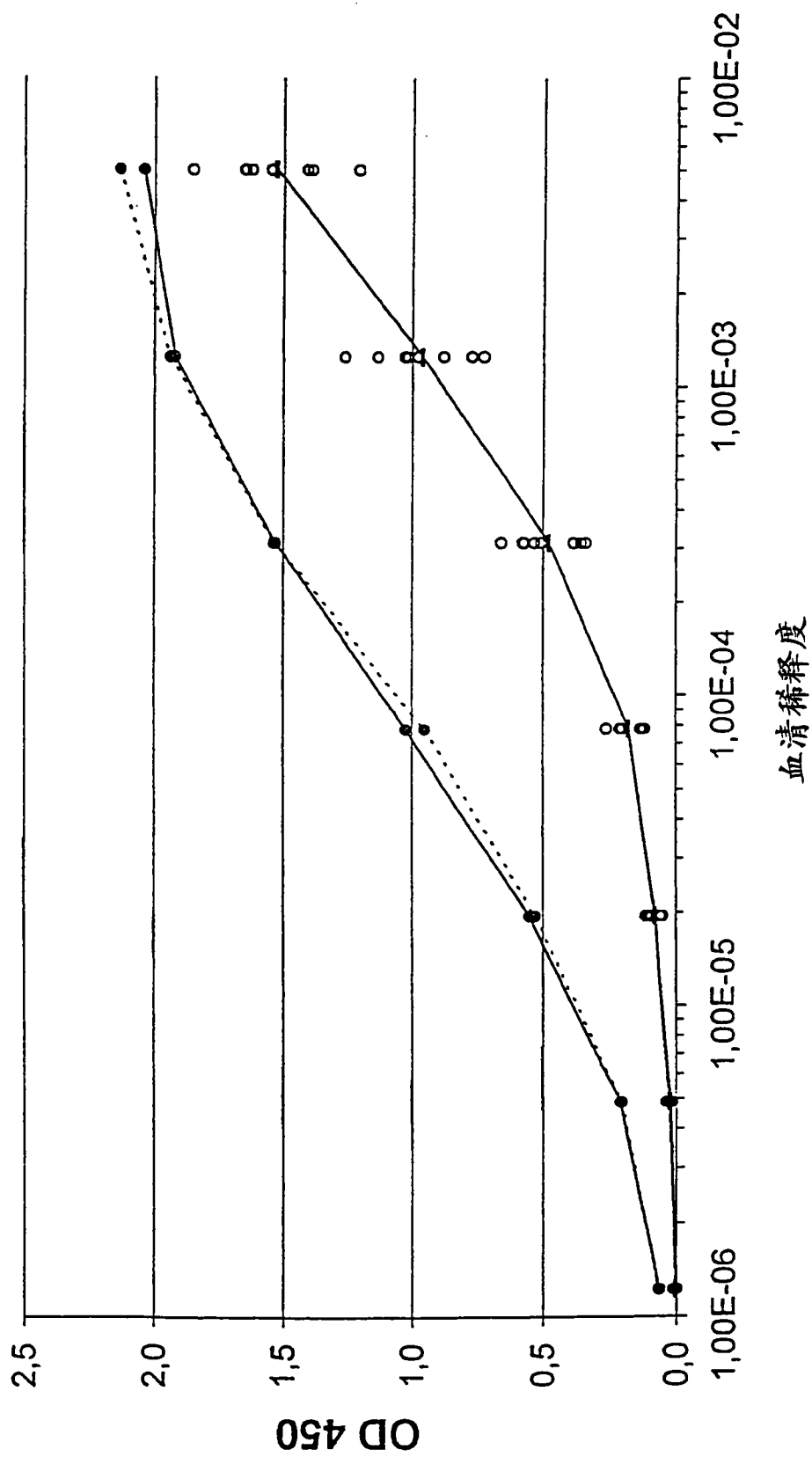


图 26

1 次皮下和 3 次口服免疫梯牧草

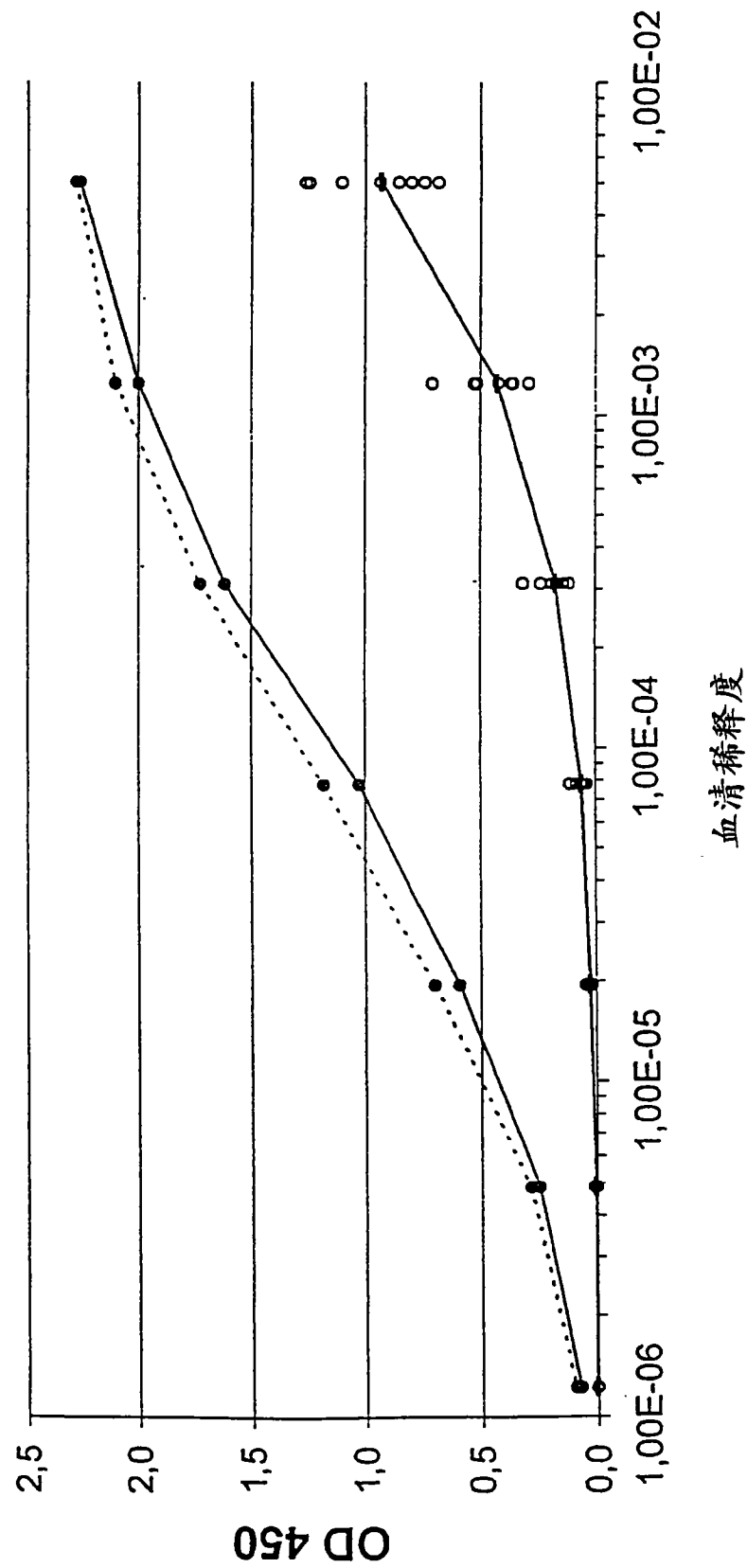


图 27

1 次皮下免疫梯牧草和 3 次安慰剂

