



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 90109121.9

[51]Int.Cl⁶

A61K 39 / 00

[45]授权公告日 1996 年 7 月 24 日

[24]颁证日 96.4.13

[21]申请号 90109121.9

[22]申请日 90.9.29

[30]优先权

[32]89.9.29 [33]JP[31]256472 / 89

[73]专利权人 日清制油株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 根路铭国昭 关邦春 大山胜彦

[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

A61K 9 / 16

代理人 李 瑛

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 用于口服的稳定的免疫原组合物的制备方法

[57]摘要

一种用于口服的稳定的免疫原组合物，它包括一种由能使人或动物免疫的免疫原和平均分子量为 80,000—120,000，冻胶强度在 150 (Bloom,g, 6.2 / 3%) 以上的明胶组成的干燥的球状体，而且是肠吸收的。

权 利 要 求 书

1. 一种制备用于口服的稳定的免疫原的方法，该方法包括将平均分子量为 80,000—120,000、冻胶强度在 150 (Bloom, g, 6. 2/3%) 以上的明胶加进含有免疫原的缓冲生理盐水溶液，在低温下混合该混合物，对其加热形成溶液，将该溶液倒入一种不亲水的、生理上无毒的液体中生成一种柔韧的球状体，在低温下干燥形成固体球状体，然后使其能被肠道吸收。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中在混合混合物和干燥柔韧的球状体时的低温为 0℃—10℃。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中在 50℃ 以下加热混合物。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中生理上无毒的液体是蓖麻油、山茶油、大豆油或液态石蜡。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中免疫原的使用量相当于明胶重量的 1/50—1/100,000,000。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所用的免疫原是用子流感、日本脑炎、B 型肝炎、百日咳和非 A 非 B 型肝炎的免疫的。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中用一种肠吸收膜涂覆干燥的球状体。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中用一种肠吸收胶囊包裹干燥的球状体。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中干燥的球状体是一种片剂形态，而且是肠吸收的。

10. 如权利要求 1 所述的方法，该方法还包括加入一种能提高免疫原的免疫性的佐剂。

说明书

用于口服的稳定的免疫原组合物的制备方法

本发明涉及一种用于口服的稳定免疫原组合物。

能够使人或动物免疫的免疫原通常是悬浮在缓冲生理盐水中使用。这种悬浮液被称作疫苗。已知疫苗的例子是失活的疫苗如伤寒疫苗、百日咳疫苗、狂犬病疫苗等，毒性减弱的活疫苗如病原体微生物疫苗活的小儿麻痹症疫苗等，以及类毒素如白喉类毒素、破伤风类毒素等。免疫原很容易受诸如温度、光照、振荡之类的自然因素影响而失活，因为它主要是由蛋白质组成的，因此，在制备和贮存疫苗时需要特别小心。已经知道，为了增强其在贮存期间的稳定性，可将糖类或水溶性明胶（分子量小于20000）加进疫苗中。

由于疫苗通常是通过注射施用的，除了施用上的不便之外，还会产生副作用，如注射部位发红、发烧及肌肉萎缩，或者引起休克等。

为了解决这一问题，有人提出用口服的疫苗制剂形式施用。这种制剂形式的典型例子是粉状或片状制剂，其中，免疫原被支承在固体载体上，如乳糖、蔗糖等（日本公开审查专利申请No502262/1987）。而且还知道，非免疫原的细胞色素C用分子量大于50000的明胶处理后，形成一种复合材料，然后用它配成用于口服的各种类型的制剂（日本公开审查专利申请No37971/1980）。

本发明的目的在于提供一种用于口服的制剂，它使得免疫原能被

口服。从而克服因注射用制剂引起的各种问题，而免疫原的效力并不降低。

按照本发明，提供一种用于口服的稳定的免疫原组合物，它包含一种由能使人或动物免疫的免疫原和平均分子量为 80000—120000 冻胶强度在 150 (Bloom, g. 6.2/3%) 以上的明胶组成的干燥球状体，而且是肠吸收的。

附图的简要说明如下：

图1—6 表示，在实施例1—6 中分别获得的各种干燥球状物的抗原效力变化与各种疫苗在以其原材料形式使用时抗原效力变化相比较的曲线图。

图7—10 表示在实施例1, 2, 6 和12 中分别获得的涂膜干燥球状物的免疫活性与各种疫苗以其原材料形式使用时免疫活性相比较的曲线。干燥的球状物和疫苗均在40℃温度下放置了20天。

在本发明中，上述“能够使人或动物免疫的免疫原”一词包括所有能够用于预防感染性疾病的免疫原。其实例包括失活疫苗（流行性感、日本脑炎、百日咳、三合疫苗、霍乱、肺炎双球菌等）、毒性减弱的活疫苗（小儿麻痹症、麻疹、风疹、流行性腮腺炎、卡介苗、伤寒、天花等）、类毒素（白喉、破伤风、竹叶青属类毒素、伤寒、肉毒杆菌等）和组合疫苗（HA流感、B型肝炎、非A非B型肝炎、疱疹等）。

本发明的组合物可以由一种含有免疫原的缓冲生理盐水来制备。用来稳定活的小儿麻痹症疫苗的冰冻干燥法是已知的，但我们发现，这样冰冻干燥冻干的疫苗不适于用作本发明的原材料。

构成本发明组合物的明胶，要求其平均分子量为80,000—120,000，冻胶强度在150（Bloom, g. 6.2/3%）以上。即使平均分子量落在上述范围内，但如果冻胶强度低于150，也不能产生稳定性理想的组合物。所用明胶的最大冻胶强度大约为340，而优选的冻胶强度大约为300。假如能满足上述条件，用来制备明胶的原材料不受限制。

本发明的组合物，可以通过将明胶加入一种含有免疫原的缓冲生理盐水而制成，在低温（例如0——10℃，优选4——5℃）下混合，并加热（例如50℃以下，优选40℃以下）以形成溶液。将溶液状态的混合物滴加到一种不亲水的、比重比水小的、生理无毒的液体（例如蓖麻油、山茶油、大豆油，液态石蜡等）中，从而形成柔韧的球体。在这种情况下，该溶液最好保持加热：上述液体的上部被加热，而下部被冷却（例如1——10℃）。

由此获得的柔韧的球状组合物在大气压力和低温条件下（例如0——10℃，优选4——5℃）逐渐干燥，成为坚固的球体。该固体球体的直径不受特殊限制，但以0.5——2.0mm为宜。干燥的球体，其含水量以低于30%为宜，20—10%更好。

由此获得的球体可以直接涂覆一种肠吸收涂布剂，该肠吸收涂布剂是从本领域已知的涂布剂中适当选择出来的。优选的肠吸收涂布剂的例子是甲基丙烯酸共聚物，邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素酯、乙酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素酯，羧甲基乙基纤维素，乙酸邻苯二甲酸纤维素酯，纯化虫胶，白色虫胶，乙基纤维素或甲基丙烯酸氨基烷酯共聚物。

涂覆可以采用流动涂布机或离心成粒机通过膜涂布法进行。由此

获得的肠内吸收球状体可被用作口服制剂。与上述方法不同，还可将制药上合格的赋形剂或稀释剂、粘合剂等加进球状体（没有肠吸收涂层）中，制成片剂，然后再涂覆肠吸收涂布剂。此外，还可将上述球状体放进肠吸收胶囊中制成胶囊制剂。

在制备本发明的球状物时，需要采用相对于所用明胶的量来说少量的免疫原。免疫原的量依所用免疫原的种类而定，不过，通常以相对于1份明胶的大约1/50——1/100,000,000为宜。按照上述方法，可以确保免疫原的稳定性。想象得出，这是由于免疫原用明胶密封，其构型（尤其是存在于病毒、微生物或死微生物中的抗原决定因子的构型）得以维持，而没有化学键合。已经证实，免疫原不会与明胶形成共轭体。

本发明组合物还可以含有佐剂。采用胞壁肽衍生物（例如，欧洲公开专利申请No. 0316934 A2中所公开的 或类脂—A的类似物。添加这些佐剂可以提高本发明组合物的效力，并可减少不同制剂间效力的差异。

在本发明的组合物被口服下去以后，先是肠吸收涂层，然后是明胶在肠道中被溶解，释放出里面的免疫原，接着从肠道中被吸收。可以想象，免疫作用就发生在肠道里的派伊尔（Peyer）斑处。

口服组合物的量，在很大程度上取决于所用免疫原的种类。例如，对流感来说，通常每个成年人一次口服50—20,000 CCA (Chick Red Cell Agglutination)，而且在首次服用后2—4周可随意地以相同方式服用。对B型肝炎来说，通常是第一次每个成年人口服0.1—1.0mg抗原蛋白，在首次服用4周后再次服用，而第三次服用

在首次服用后20——24周进行。因此，服用共进行三次。对于日本脑炎来说，出生6个月以上的人口服10——1000 μ g抗原蛋白二次，间隔1——2周。

下面将结合实施例对本发明作全面说明（不是对本发明进行限定）。

实施例1

(1)干燥球状体的制备

将明胶粉[20g，冻胶强度：300（Bloom, g. 6.2/3%），平均分子量：约100,000，NIPPI有限公司]加入HA流感疫苗（8ml，200 μ g/ml蛋白，HA效力：14000）并在4℃下混合。当搅拌成溶液状时，混合物被加热到40℃。另一方面，将1000ml大豆油倒入1000ml量筒中。然后，其上部（从液面起10cm）被加热到40——50℃，而其下部（从容器底起50cm）被冷却到4℃。用20ml直径为2mm的注射器将保持在40℃的溶液态混合物滴加到装满大豆油的量筒中，随后放置30分钟。将由此获得的胶凝球状体从量筒转移到烧杯里，然后用冷却的丙酮冲洗，以除去豆油。接着，用5000ml冷水反复冲洗约10次，最后用1000ml乙醇水溶液（60%）冲洗。由此获得的胶凝球状体在4℃控温水浴上干燥4——5天，以形成一种直径为0.5——2mm，相对凝胶球状体来说含水量为15%的干燥球状体。

(2)电泳

对上述明胶、HA流感抗原和涂膜前干燥的球状体，在电泳时采用SDS—聚丙烯酰胺凝胶，我们证实，明胶表现出较宽的斑点，H

A流感抗原出现单一斑点，干燥的球状体在与明胶和HA流感抗原的斑点一致的位置出现两个斑点。

由以上结果可以断定，明胶与HA流感抗原不形成共轭体。

(3)肠吸收涂覆

然后，用下列表1 中所列配方的肠吸收膜涂布剂涂覆干燥的球状体。

表1 肠吸收膜涂布剂配方

甲基丙烯酸共聚物L	5 份重量
聚乙二醇4 0 0	0 .5 份重量
乙醇	4 5 份重量
二氯甲烷	4 5 份重量
水	4 .5 份重量

合 计

1 0 0 份重量

实施例2 ——6

用B型肝炎疫苗、日本脑炎疫苗、百日咳疫苗、非A、非B型肝炎疫苗和流感失活疫苗，以表2 中所列的浓度用与实施例1 相同的方法分别获得干燥的球状体和涂膜的干燥球状体。

表2 制剂使用的疫苗的浓度

实施例	疫苗	用于制剂的浓度($\mu\text{g/ml}$ 蛋白质)
2	B型肝炎	3 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 蛋白质
3	日本脑炎	5 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 蛋白质

4	百日咳	80 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 蛋白质
5	非A非B型肝炎	10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 蛋白质
6	流感(失活的)	600 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 蛋白质

实施例7 ——10

用HA流感疫苗和不同冻胶强度的明胶(平均分子量: 大约100,000)用与实施例1 相同的方法制成干燥球状体。

将每种干燥的球状体(0.1 g) 溶解在含胶原酶的5 ml 磷酸盐缓冲液中, 用小鸡红血球进行HA(血细胞凝集素)测试, 以测定其抗原效力。

测试结果如表3 所示, 由此可以看出, 任何用冻胶强度超过150的明胶制成的干燥球状体, 都能保持足够的HA效力。

表3

实施例	冻胶强度	HA效力(取3 次的平均值)
比较例	100	16.0
7	150	85.3
8	200	85.3
9	250	106.7
10	300	106.7

实施例11

除了干燥的球状体(相对凝胶球状体量的含水量为15%)以外,

还制备了含水量分别为明胶球状物量30%、40%和50%的干燥球状体。

对在40℃下放置了20天的每一种干燥球状体进行HA测试。结果，含水量为30%的干燥球状体表现出106.7的HA效力，而实施例1的球状体表现出128.0的HA效力。

相反，含水量为40%和50%的干燥球状体分别表现出64.0和42.7的HA效力，证明这种含水量不合适。

实施例12

用与实施例1相同的方法制备一种含有HA流感的干燥球状体，除此之外，加入100 mg / ml 浓度的胞壁酰二肽作为佐剂。

对这种干燥球状体进行HA测试，结果HA效力为106.7。从该测验结果中看不出HA效力的明显下降（参见实施例10）。

稳定性测定：

对在实施例1——6中获得的干燥球状体（在涂膜之前）在40℃温度下放置期间抗原效力的保持力进行了测定。对每一种干燥的球状物相应的以原材料形式使用的疫苗的抗原效力保持力也进行了测定，以进行比较。如图1——6所示，实施例1—6中任何一个干燥的球状体的抗原都得到稳定的保持。

免疫性测定：

对实施例1，2，6和12的干燥球状体进行涂膜处理，然后在40℃温度下放置20天。然后，用下述方法进行免疫性测定。用各种干燥的球状物通过口服对小鼠进行免疫，然后每周采集一次血液。

用ELISA法(酶标记免疫吸附测定法) 测定所采集的每种血液的血清中存在的IgG量。 以在415 nm波长处吸收为基础的结果如图7——10所示。为了进行比较还用制备上述各种干燥球状物相应的疫苗进行了测试。

实施例13：肠吸收的涂覆

用下列配方的肠吸收膜，以相当于球状体重量的1.5%的用量涂覆本发明的球状体。

乙酸琥珀酸羟丙	
基甲基纤维素酯	2.5 份重量
虫胶	0.5 份重量
滑石	0.3 份重量
脂肪酸甘油酯	0.3 份重量
乙醇	25.0 份重量
二氯乙烷	适 量

合 计	100 份重量
-----	---------

实施例14

用下列配方的肠吸收涂布剂，以相当于球状体重量的10%的用量涂覆本发明的干燥球状体。

邻苯二甲酸羟丙基	
甲基纤维素酯	5.0 份重量

虫胶	0 . 5 份重量
脂肪酸甘油酯	0 . 5 份重量
乙醇	4 5 . 0 份重量
二氯乙烷	适 量

合 计	1 0 0 份重量
-----	-----------

然后，再用下列配方的膜，以相当于干燥球状体重量的10%的用量涂覆已经过上述涂覆的干燥球状物。

乙酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素酯	2 . 5 份重量
虫胶	0 . 5 份重量
滑石	0 . 3 份重量
脂肪酸甘油酯	0 . 3 份重量
乙醇	2 5 . 0 份重量
二氯乙烷	适 量

合 计	1 0 0 份重量
-----	-----------

实施例1 5

将下列成分压制成片

干燥的球状体	2 0 份重量
乳糖	7 0 份重量
淀粉	适 量

硬脂酸镁盐

0 . 5 份重量

合 计

1 0 0 份重量

然后，用与实施例1 相同配方的肠吸收膜，以相当于片剂重量5 % 的量涂覆由此获得的片剂。

图 1

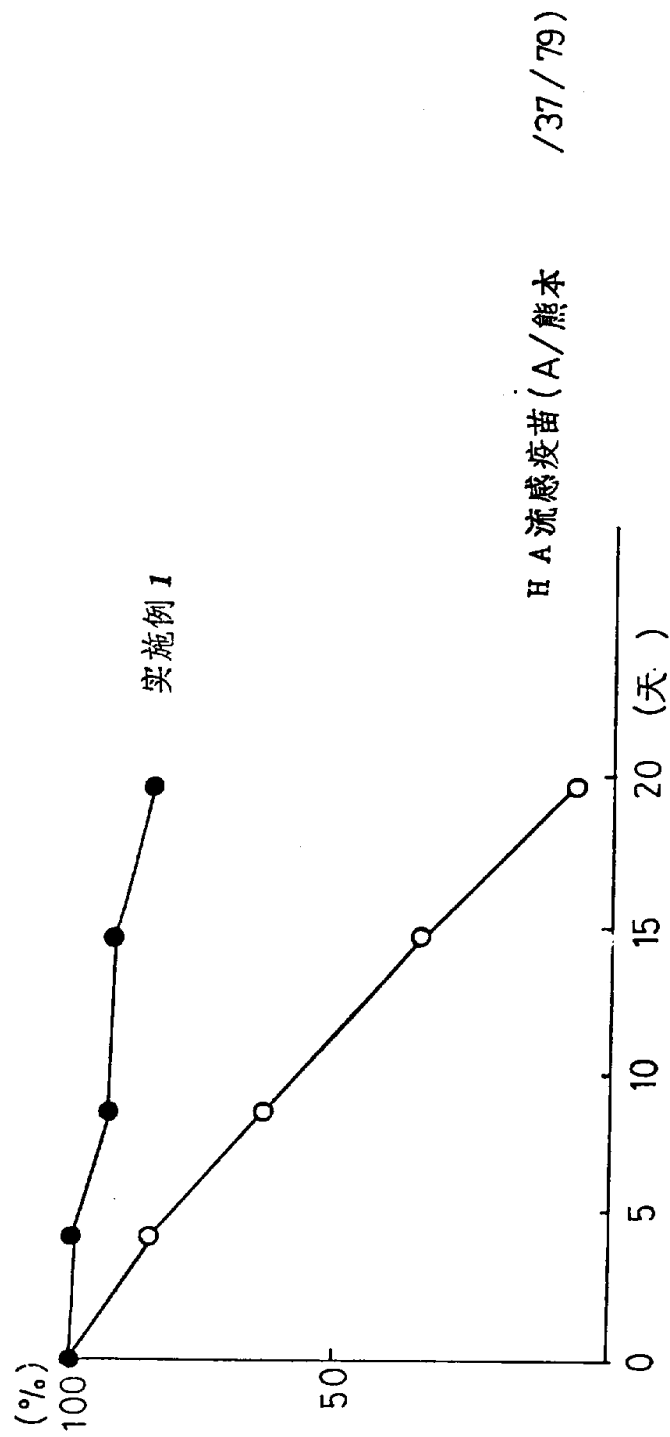


图 2

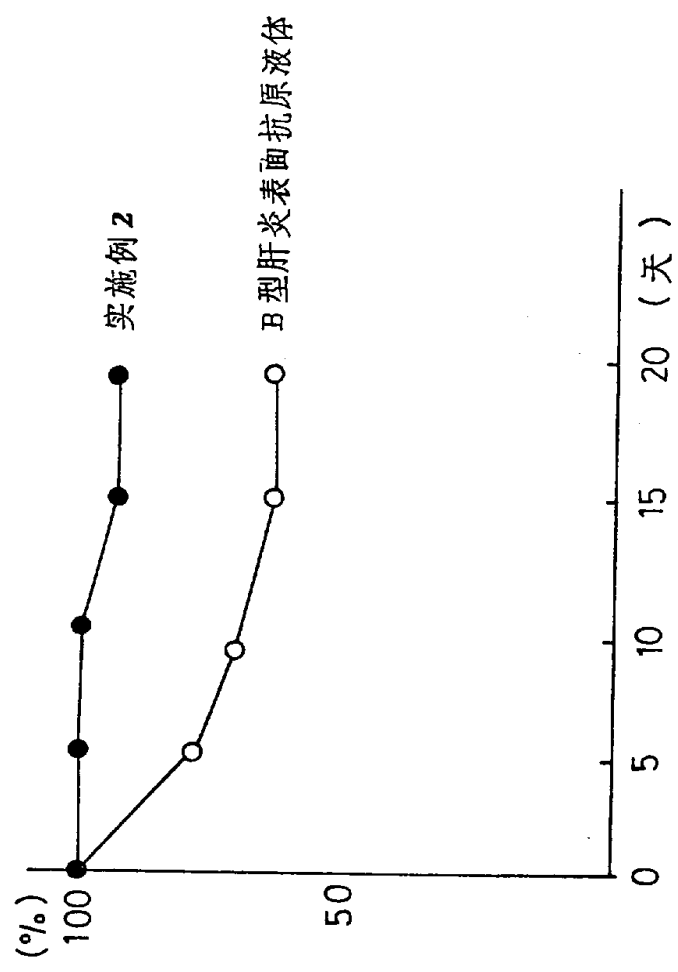


图 3

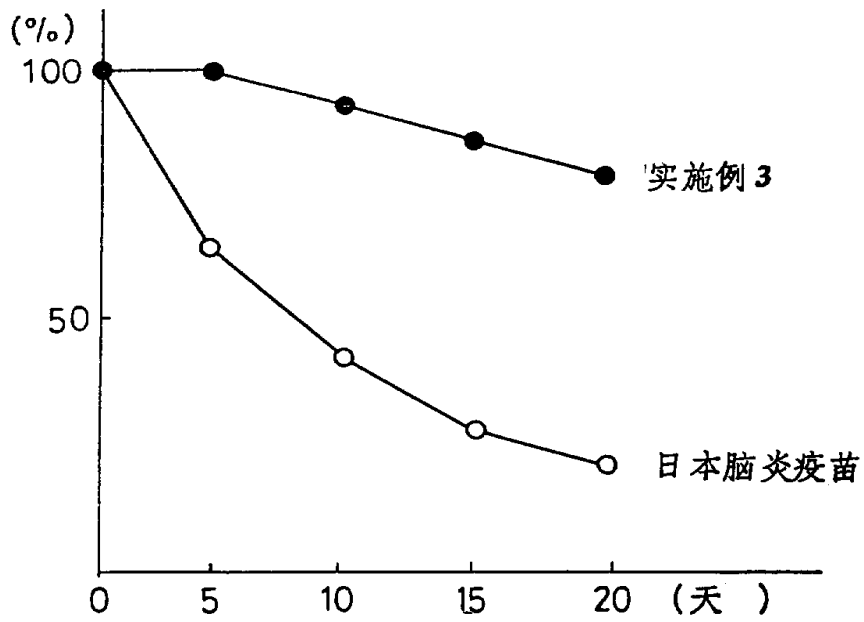


FIG. 4

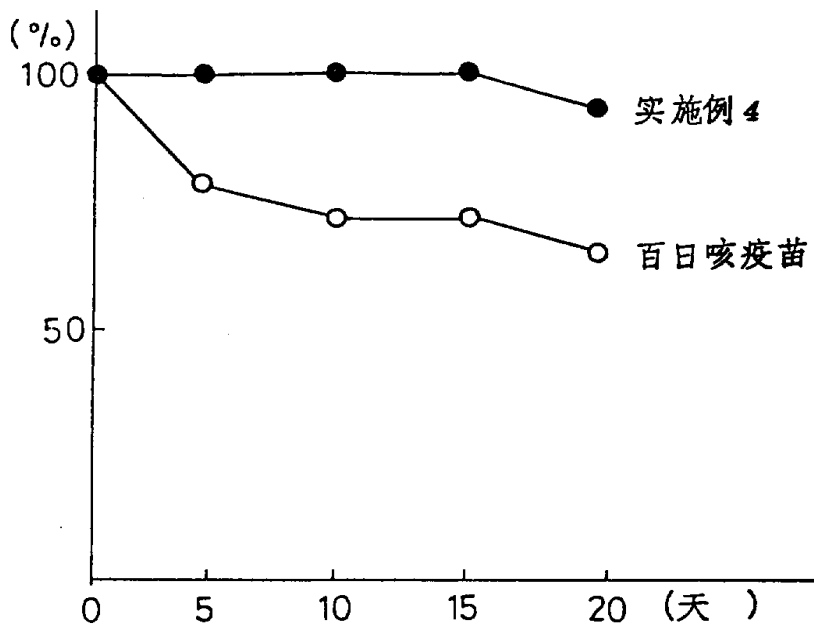


图 5

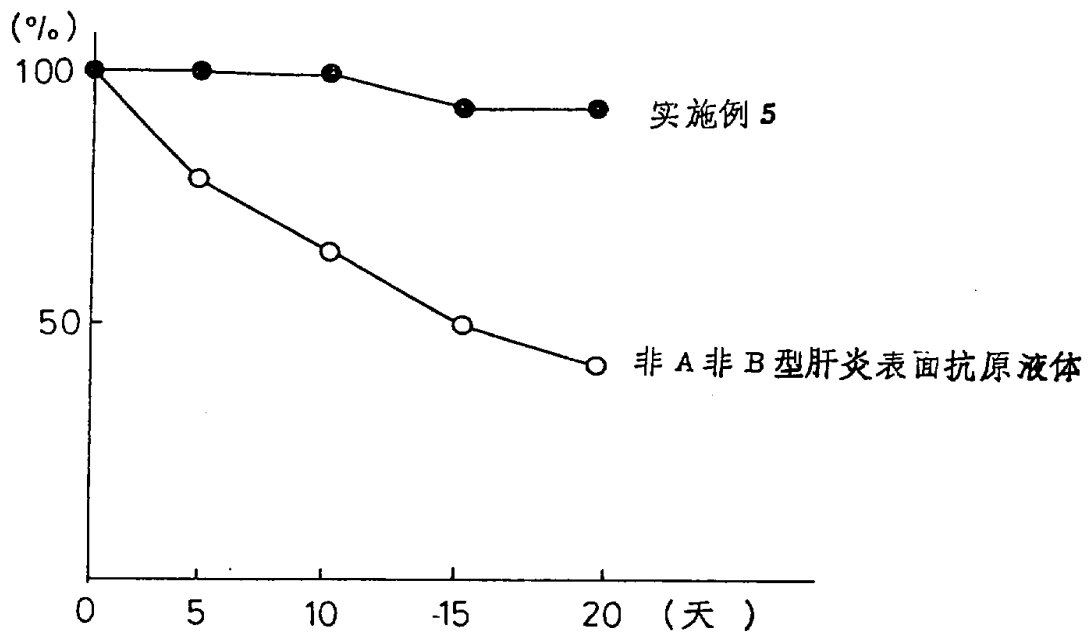


图 6

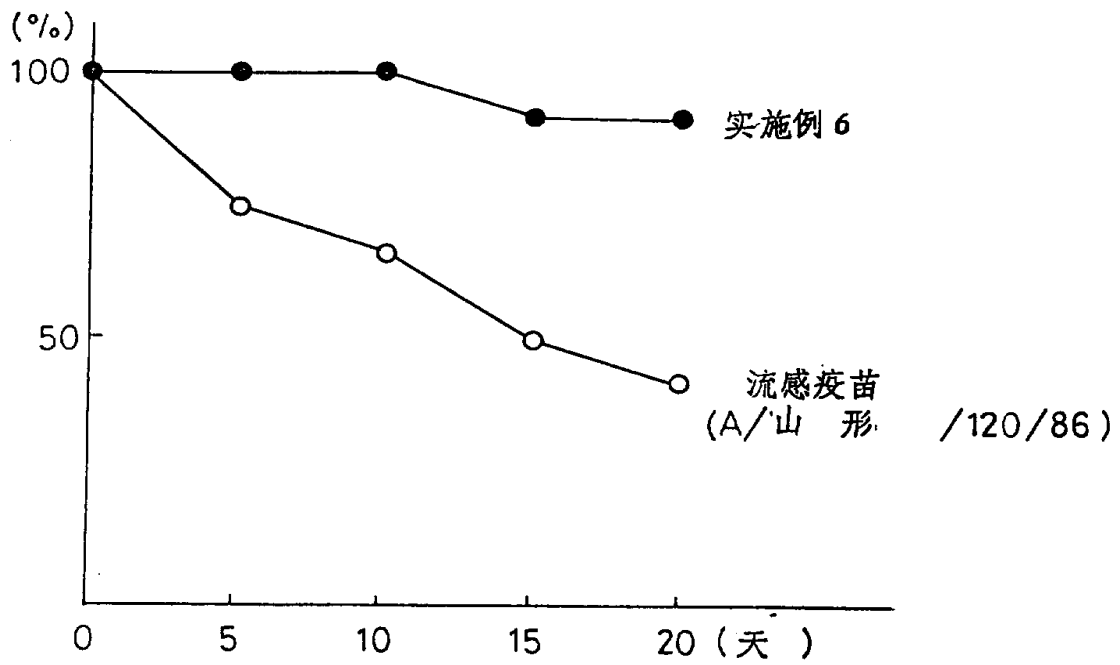


图 7

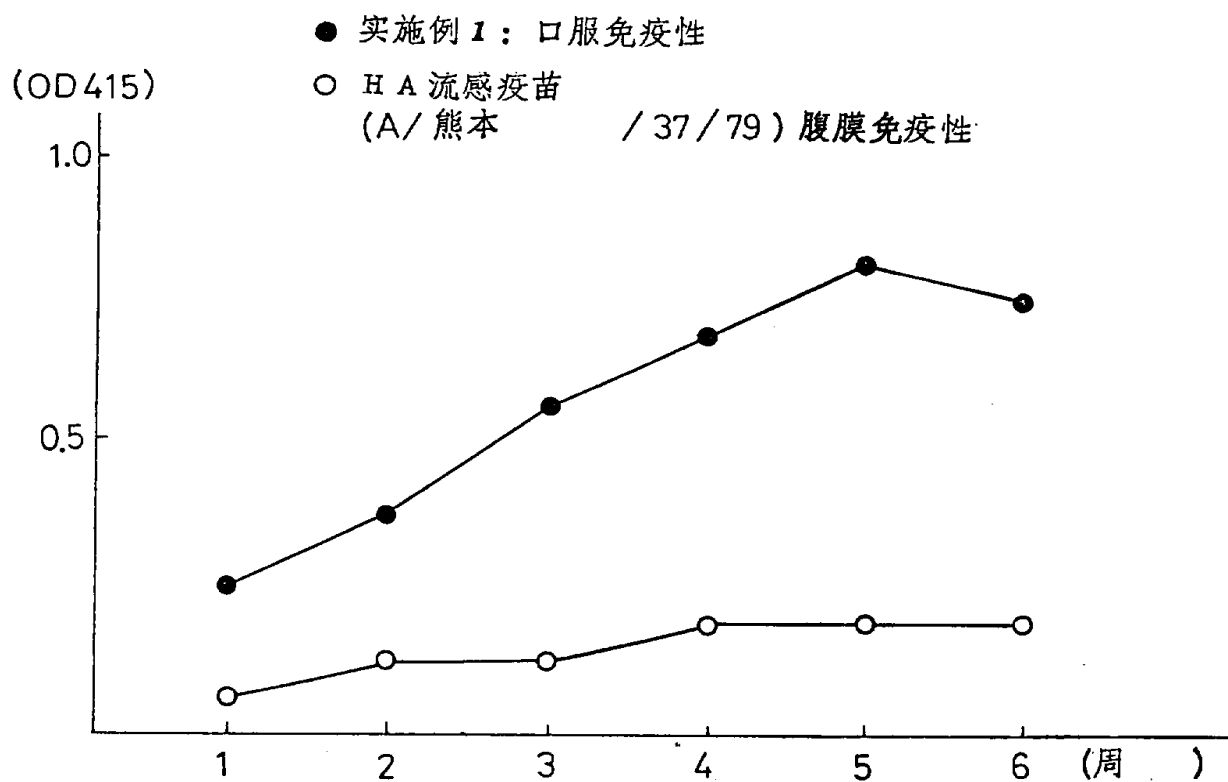


图 8

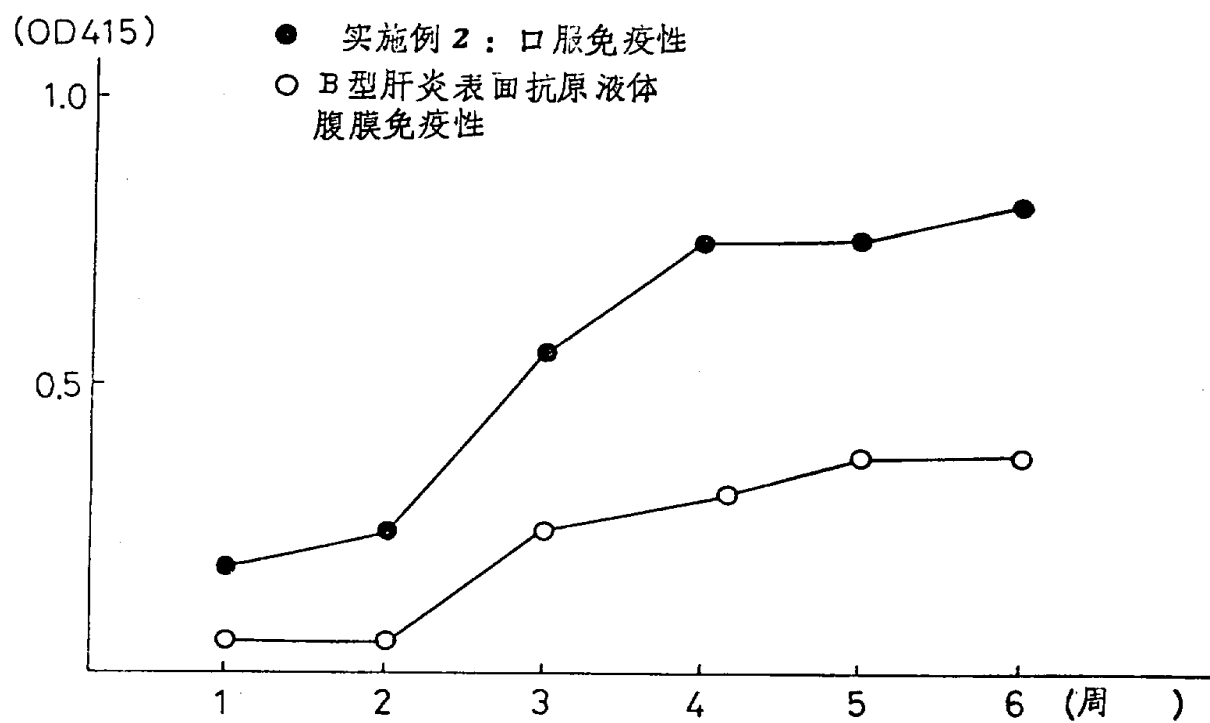


图 9

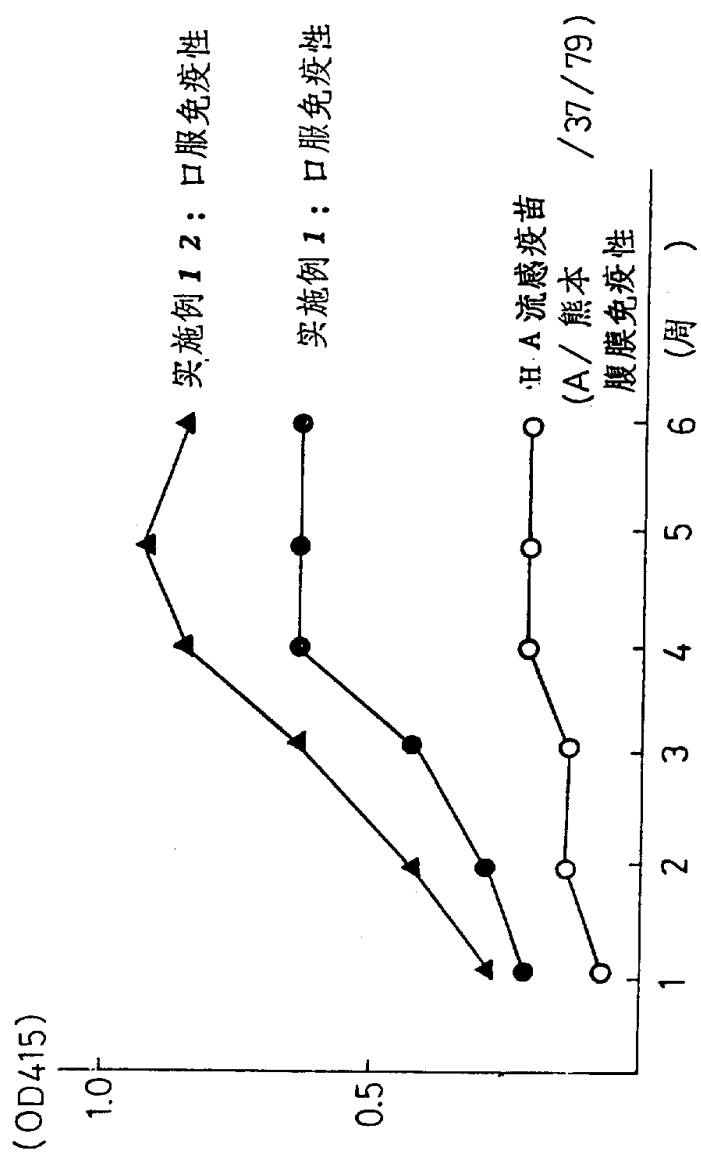


图 10

