[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 9/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00816263.8

[43] 公开日 2003 年 2 月 26 日

[11] 公开号 CN 1399539A

[22] 申请日 2000.9.22 [21] 申请号 00816263.8

[30] 优先权

[32] 1999. 9.24 [33] GB [31] 9922700.1

[32] 2000. 7. 6 [33] GB [31] 0016647.0

[86] 国际申请 PCT/EP00/09368 2000.9.22

[87] 国际公布 WO01/21152 英 2001.3.29

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.24

[71] 申请人 史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

[72] 发明人 M·弗里德 P·赫尔曼德

V·亨德里克斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 庞立志 郭广迅

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 1 页

[54] 发明名称 含有聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯以及至少一种非离子表面活性剂的佐剂

[57] 摘要

本发明涉及一种新的佐剂系统，包括与至少一种另外的非离子表面活性剂并用的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯表面活性剂。优选所述另外的非离子表面活性剂是辛苯聚糖(TRITON™系列)。本发明提供了所述的新佐剂、包含它们的疫苗、及其制备方法和将其配成疫苗的方法。也提供了本发明的佐剂或疫苗在预防或治疗疾病中的用途。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种佐剂组合物，其包含（a）通式（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯:

$HO(CH_2CH_2O)_n$-A-R

其中，n是1－50，A是键或-C(O)-，R是C_{1-50}烷基或苯基C_{1-50}烷基；和（b）至少一种另外的非离子表面活性剂。

2. 一种根据权利要求1的佐剂组合物，其中所述的另外的非离子表面活性剂是辛苯聚糖。

3. 一种根据权利要求2的佐剂组合物，其中所述的辛苯聚糖是叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100™)。

4. 一种根据权利要求1至3任一项的佐剂组合物，还另外包括聚氧乙烯脱水山梨醇酯或胆酸或其衍生物或者还另外既包括聚氧乙烯脱水山梨醇酯也包括胆酸或其衍生物。

5. 一种根据权利要求1至4任一项的佐剂组合物，其特征在于通式（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯是溶血的。

6. 一种根据权利要求5的佐剂组合物，其特征在于用豚鼠血细胞溶血实验测定聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯的溶血活性度在0.05-0.0001％的范围内。

7. 一种根据权利要求5或6的佐剂组合物，其中用豚鼠血细胞溶血实验测定通式（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯的溶血活性与聚氧乙烯-9月桂基醚或聚氧乙烯-8-硬脂酰醚的溶血活性的差异在10倍之内。

8. 一种根据权利要求1至7任一项的佐剂组合物，包含通式(I)的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯，其中*n*是4－24。

9. 一种根据权利要求8的佐剂组合物，其中*n*是9。

10. 一种根据权利要求1至7任一项的佐剂组合物，包含通式（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯，其中R是C_{8-20}烷基或苯基C_{8-20}烷基。

11. 一种根据权利要求10的佐剂组合物，其中R是C_{12}烷基。

12. 一种根据权利要求1至11任一项的佐剂组合物，包含通式（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯，其中A是键，从而形成醚。

13. 一种根据权利要求1至12任一项的佐剂组合物，包含通式

（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯，其中 A 是-C（O）-，从而形成酯。

14. 一种根据权利要求 1 至 13 任一项的佐剂组合物，其中通式（I）的聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯选自：聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-9-月桂基酯、聚氧乙烯-9-硬脂酰醚、聚氧乙烯-8-硬脂酰醚、聚氧乙烯-4-月桂基醚、聚氧乙烯-35-月桂基醚、聚氧乙烯-23-月桂基醚。

15. 一种佐剂混合物，包含聚氧乙烯-9-月桂基醚和叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100^{TM})。

16. 一种根据权利要求 1 至 15 任一项的佐剂组合物，其中存在的清洁剂的总浓度为 0.001 - 10％。

17. 一种根据权利要求 16 的佐剂组合物，其中清洁剂的总浓度为 0.001 - 1％。

18. 一种根据权利要求 17 的佐剂组合物，其中清洁剂的总浓度为 0.001 - 0.7％。

19. 一种佐剂混合物，包含与至少一种另外的免疫刺激剂联合使用的权利要求 1 至 17 中任一项的佐剂。

20. 一种根据权利要求 19 的佐剂混合物，其中至少一种另外的免疫刺激剂选自：LT、CT、3D-MPL、CpG 和 QS21。

21. 一种根据权利要求 20 的佐剂组合物，其中 CpG 佐剂是：TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (SEQ ID NO.1)。

22. 一种包含聚氧乙烯-9 月桂基醚、叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100^{TM})和 3D-MPL 的佐剂混合物。

23. 一种包含权利要求 1 至 22 任一项的佐剂的疫苗，其还包括抗原。

24. 一种根据权利要求 23 的疫苗，其中所述的抗原选自：人免疫缺陷病毒、水痘带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、人巨细胞病毒、登革热病毒、甲型、乙型、丙型或戊型肝炎、呼吸道合胞病毒、人乳头瘤病毒、流感病毒、Hib、脑膜炎病毒；沙门氏菌属、奈瑟菌属、疏螺旋体属、衣原体属、博德特氏菌属、链球菌属、支原体属、分枝杆菌属、嗜血菌属、疟原虫属或弓形虫属、stanworth 十肽；或肿瘤相关抗原（TMA）、MAGE、BAGE、GAGE、MUC-1、Her-2 neu、LnRH、CEA、PSA、KSA 或 PRAME。

25. 一种根据权利要求 24 的疫苗，其中所述的抗原是来自流感病毒的抗原或抗原制剂。

26. 一种疫苗组合物，包含聚氧乙烯-9 月桂基醚、叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100^{TM})和流感病毒抗原。

27. 一种根据权利要求 23 至 26 任一项的疫苗，其中疫苗是气溶胶或喷雾形式。

28. 一种根据权利要求 23 至 27 任一项的疫苗，用于药物。

29. 权利要求 1 至 22 任一项的佐剂组合物在制备施用于患者粘膜表面或皮肤上的药物中的应用。

30. 聚氧乙烯-9 月桂基醚和叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100^{TM})的混合物在制备施用于患者粘膜表面上的疫苗中的应用。

31. 一种喷雾装置，更具体地是一种双剂量喷雾装置，其中装有权利要求 23 至 27 任一项的疫苗。

32. 权利要求 23 至 27 任一项限定的疫苗组合物在制备用于治疗病毒、细菌、寄生虫感染、过敏或癌症的疫苗中的应用。

33. 一种治疗哺乳动物病原体感染或癌症或过敏或对这些疾病的易感性的方法，包括给哺乳动物施与一种安全且有效量的权利要求 23 至 27 任一项的疫苗组合物。

34. 一种治疗哺乳动物病原体感染或癌症或过敏或对这些疾病的易感性的方法，包括给哺乳动物经粘膜施与一种安全且有效量的权利要求 23 至 27 任一项的疫苗组合物。

35. 一种治疗哺乳动物病原体感染或癌症或过敏或对这些疾病的易感性的方法，包括给哺乳动物经鼻内施与一种安全且有效量的权利要求 23 至 27 任一项的疫苗组合物。

36. 一种制备权利要求 23 至 27 任一项的疫苗组合物的方法，包括将（a）权利要求 1 至 22 任一项的佐剂组合物，（b）药学上可接受的赋形剂，和（c）一种抗原或抗原组合物混合。

说　明　书

含有聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯以及至少一种非离子表面活性剂的佐剂

本发明涉及一种新的佐剂系统，包括与至少一种另外的非离子表面活性剂并用的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯表面活性剂。优选所述另外的非离子表面活性剂是辛苯聚糖（Octoxynol）。本发明提供了所述的新佐剂、包含它们的疫苗、及其制备方法和将其配成疫苗的方法。也提供了本发明的佐剂或疫苗在预防或治疗疾病中的用途。还提供了一种增强使用本发明的佐剂和疫苗的宿主免疫反应的方法。该佐剂用作粘膜佐剂特别有效，但也对全身有效。

除了避开了由于“惧针”而注射疼痛及对患者产生相关副作用的影响之外，粘膜接种疫苗是有吸引力的，因为已经表明对于动物来说，粘膜给予抗原可更高效率促使粘膜表面产生保护性反应，而粘膜表面是许多病原体的进入通道。此外，已经表明粘膜接种疫苗，例如鼻内接种，不仅可在鼻粘膜，而且也在远处粘膜部位引起粘膜免疫性，如生殖器粘膜（Mestecky, 1987,《临床免疫学杂志》（Journal of Clinical Immunology）, 7, 265-276; McGhee 和 Kiyono,《传染性药剂及疾病》（Infectious Agents and Disease）, 1993,2, 55-73）。尽管对这一领域进行了许多研究，适合对人使用的安全和有效的粘膜佐剂仍有待确定。本发明提供了一个解决这一问题的方法。

已经描述了某些非离子表面活性剂的医疗用途。例如，已描述了鼻内给予聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯以增强鼻腔吸收胰岛素（Hirai等 1981,《国际药剂学杂志》（International Journal of Pharmaceutics）, 9,165-172; Hirai 等 1981,《国际药剂学杂志》（International Journal of Pharmaceutics）, 9, 173-184）。

已有聚氧乙烯烷基醚作为油乳液或丙烯酸聚合物佐剂的成分的描述(JP 05 201877; US 3,919, 411)。

其它非离子表面活性剂已经被用于疫苗配制剂。例如，包含聚氧乙烯蓖麻油或辛酸/葵酸甘油酯、与聚氧乙烯脱水山梨醇单酯和抗原的混合物的疫苗制剂，在粘膜局部给予之后，能够引起全身免疫反应（WO94/17827）。该专利申请公开了非离子表面活性剂 TWEEN20™

（聚氧乙烯脱水山梨醇单酯）和 Imwitor742™（辛酸/葵酸甘油酯）联合，或 TWEEN20™ 和聚氧乙烯蓖麻油联合使用在鼻内免疫接种后能够增强全身免疫反应。在文献（Gizurarson 等 1996 《疫苗研究》（Vaccine Research），5,69-75; Aggerbeck 等 1997,《疫苗》（Vaccine），15,307-316;Tebbey 等, Viral Immunol 1999；12 (1)：41-5）中描述了该配制剂针对鼻内给予抗原的免疫反应增强作用的详细情况。

非离子表面活性剂已经以一种方式形成了非离子表面活性剂囊泡（公知的 NISV, US 5,679,355）。这种非离子表面活性剂的配制剂，常常在胆固醇存在下，形成双类脂层囊泡，它在内层水相中或双类脂层本身中残存抗原。

国际专利申请 WO96/36352（US 5,653,987）描述了一种液体药物制剂，它包含至少两种吸收增强剂和水，主要为口服胰岛素的传送，其中每次吸收增强剂的量是以总配制剂的 1－10％ w/w 的浓度存在。

表面活性剂常常用于油乳剂佐剂的配制剂全身给予，起稳定油液滴的作用。例如，聚氧乙烯脱水山梨醇酯（TWEEN™）和脱水山梨醇脂肪酸酯（SPAN™）用于稳定水乳胶中的油（EP 0 399 843 B, WO 95/17210）。

本申请人在这里给出惊人的发现，聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯，与至少一种另外的非离子表面活性剂并用，一起作为有效的疫苗佐剂发挥作用。有利的是，该组合物可全身给予，但当疫苗组合物采用粘膜给予时，也能有效诱导全身免疫反应。本发明粘膜给予疫苗诱导的免疫反应可能至少与传统疫苗全身注射后观察到的免疫反应一样高。

本发明提供了安全有效的佐剂，它易于生产，并包括至少一种聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯和至少一种另外的非离子表面活性剂。本发明中使用的表面活性剂可以是水溶液或可形成颗粒结构的悬浮液，如囊泡或胶束(micelle)。优选该表面活性剂是水溶液或胶束的形式。

可被配入本发明的疫苗和佐剂的聚氧乙烯醚或酯包括通式(I)的分子：

$HO(CH_2CH_2O)_n$-A-R

其中，n 是 1－50，A 是键或-C (O)-，R 是 C_{1-50} 烷基或苯基 C_{1-50} 烷基。

因而，本发明的一个方案包括一种疫苗配制剂，该配制剂包含通式（I）的聚氧乙烯烷基醚，其中 n 为 1 至 50，优选 4－24，更优选 6－12，最优选 9；成分 R 是 C_{1-50}，优选 C_4-C_{20} 烷基，更优选 C_{12} 烷基。聚氧乙烯醚浓度应在 0.1-20％的范围，优选 0.1-10％，更优选 0.1-1％的范围。合适的聚氧乙烯醚选自下组：聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-9-硬脂酰醚、聚氧乙烯-8-硬脂酰醚、聚氧乙烯-4-月桂基醚、聚氧乙烯-35-月桂基醚和聚氧乙烯-23-月桂基醚。

更优选，所述聚氧乙烯烷基醚是聚氧乙烯-9-月桂基醚（laureth 9）。聚氧乙烯月桂基醚的替换术语或名称在 CAS 注册中公开。聚氧乙烯-9-月桂基醚的 CAS 注册号是：*9002-92-0*。聚氧乙烯醚，如聚氧乙烯月桂基醚在《Merck 索引》（第 12 版：条目 7717，Merck & Co. Inc.,Whitehouse Station，新泽西州，美国；ISBN 0911910-12-3)中公开，所述治疗用途包括：局部麻醉；止痒；和硬化剂活性。作为一类，这类聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯是非离子表面活性剂。环氧乙烷与十二烷醇反应可形成 Laureth 9，平均有 9 个环氧乙烷单位。在一个实施例中，使用了一个这样的通式（I）的表面活性剂的混合物，本发明的文章中意指 n = 混合物中所有表面活性剂中存在的环氧乙烷单位的平均数。

表面活性剂中聚氧乙烯部分的长度与烷基链长度的比率（即 n：烷基链长度的比率），影响这类清洁剂(detergent)在水介质中的溶解度。因而，本发明的佐剂可以是溶液或可以形成微粒结构，如胶囊或囊泡。作为溶液，本发明的佐剂安全，采用例如通过一层 0.22μm 膜而易于消毒，给予(administer)简单，并可以通过简单方式制造，而无需与均一微粒结构的形成相关的 GMP 和 QC 许可(issue)。一些聚氧乙烯醚，如 laureth 9，能够形成无囊泡溶液。然而，聚氧乙烯-8 棕榈酰醚（$C_{18}E_8$）能够形成囊泡。因而，尤其期望聚氧乙烯-8 棕榈酰醚的囊泡与至少一种另外的非离子表面活性剂联合使用，以形成本发明的佐剂。

优选，本发明的佐剂化合物中存在的聚氧乙烯烷基醚成分具有溶血活性。聚氧乙烯烷基醚的溶血活性可体外测定，参考下述方法，以不引起红细胞溶解的清洁剂(detergent)的最高浓度来表示：

1. 豚鼠新鲜血液，用磷酸盐缓冲盐水（PBS）在台式离心机中洗涤3次。重新制成悬浮液至初始体积后，用PBS进一步稀释10倍。

2. 将50μl该血液悬液加入到800μl含稀释2倍的清洁剂的PBS中。

3. 8小时后，肉眼或通过测定上清液的光密度评估溶血作用。出现红色上清液，在570nm吸收光表明存在溶血。

4. 结果用不再发生溶血的第一次清洁剂稀释液的浓度来表示。

该生物学方法固有的实验可变性中，本发明的聚氧乙烯烷基醚或通式（I）的表面活性剂，优选具有溶血活性，约0.5-0.0001％之间，更优选0.05-0.0001％之间，甚至更优选0.005-0.0001％之间，和最优选0.003-0.0004％之间。理想地，所述聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯应与聚氧乙烯-9月桂基醚或聚氧乙烯-8硬脂酰醚的溶血活性相似（即在10倍差异内）。

对于聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯中加入的至少一种另外的非离子表面活性剂，可以是具有合适的表面活性能力的任何清洁剂。合适的清洁剂在“表面活性剂系统”，Ed: Attwood和Florence (1983, Chapman和Hall)中描述。

优选非离子表面活性剂不是落入通式（I）中的那些，如辛苯聚糖（octoxynol）和聚氧乙烯脱水山梨醇酯。尤其优选的辛苯聚糖包括Triton X-45,叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton X-100), Triton X-102, Triton X-114, Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305, Triton N-57, Triton N-101, Triton N-128。特别优选Triton X-100。辛苯聚糖系列，包括叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(TRITONX100^{TM})在《Merck 索引》的条目6858 (1162页，第12版, Merck & Co. Inc.,Whitehouse Station, 新泽西州，美国; ISBN 0911910-12-3)中描述。

其它优选非离子表面活性剂是聚氧乙烯脱水山梨醇酯，这些酯，包括聚氧乙烯脱水山梨醇一油酸酯（TWEEN80^{TM}），在《Merck 索引》的条目7742 (1308页，第12版，Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, 新泽西州，美国; ISBN 0911910-12-3)中有描述。辛苯聚糖和聚氧乙烯脱水山梨醇酯都可从Sigma Inc.购买。优选聚氧乙烯脱水山梨醇酯是聚氧乙烯脱水山梨醇一油酸酯（TWEEN80^{TM}）。

本发明最优选的佐剂包括聚氧乙烯烷基醚和辛苯聚糖，如 叔辛基

苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100™)。任选所述混合物可进一步包括聚氧乙烯脱水山梨醇酯，如聚氧乙烯脱水山梨醇一油酸酯(TWEEN80™)。最优选，所述聚氧乙烯烷基醚是聚氧乙烯-9-月桂基醚，和所述辛苯聚糖是叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100™)。向这些配制剂中，可加入离子型清洁剂，如胆汁盐或胆酸的衍生物。

因而，佐剂配制剂可包括聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯（通式 I），辛苯聚糖，任选地包括聚氧乙烯脱水山梨醇酯，和任选地包括胆汁盐或胆酸衍生物。本配制剂的优选方案包括聚氧乙烯-9 月桂基醚、叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100™)、聚氧乙烯脱水山梨醇一油酸酯和脱氧胆酸钠。

聚氧乙烯烷基醚或酯，如聚氧乙烯-9 月桂基醚，在本发明佐剂中的典型浓度将在 0.001-20％的范围，优选 0.001-10％和更优选 0.001-1％，和最优选 0.001-0.8％或约 0.5％（w/v）。加入其中的另外的非离子表面活性剂不是聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯。每个另外的非离子表面活性剂典型地将在最终疫苗配制剂中以 0.001-20％的浓度存在，更优选 0.01-10％，最优选最多达约 2％（w/v）。若存在两种所述的另外的非离子表面活性剂，优选它们在最终配制剂中以每种最多达约 2％的浓度存在，典型地以每种最多达约 0.6％的浓度存在。若存在 3 种或更多另外的非离子表面活性剂，它们通常以每种最多达约 1％的浓度存在，典型地每种微量至高达约 0.2％或 0.1％。表面活性剂的任何混合物可存在于根据本发明的疫苗配制剂中。非离子表面活性剂，如上面讨论的那些表面活性剂在最终疫苗组合物中优选浓度如下：辛-或壬-苯氧基聚氧乙醇（octyl-或 nonylphenoxy polyoxyethanols），如 Triton X-100™ 或 Triton 系列中的其它清洁剂：从 0.001％-20％，优选 0.001％-10％，更优选 0.001-1％，最优选 0.005－0.1％（w/v）；和若存在聚氧乙烯脱水山梨醇酯，如 Tween 80™：0. 01-1 %，更优选约 0. 1 % (w/v)。

本发明的疫苗或佐剂配制剂中清洁剂的总浓度，包括聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯和一种或多种另外的非离子表面活性剂，典型的范围是 0.001-40％，优选在 0.001 至 20％之间，更优选在 0.001 至 10％之间，仍更优选在 0.001 至 1％之间，最优选在 0.001 至 0.7％(w/v)之间。

通过粘膜途径给予本发明的疫苗制剂，如口腔/颊/肠/阴道/直肠或

鼻粘膜途径，可用于保护或治疗易患病或已患病的哺乳动物。这种给药方式可以是小液滴、喷雾或干粉形式。雾化或烟雾化的疫苗配制剂也构成本发明的一部分。口服给药的肠道制剂如抗胃胶囊(gastro resistant capsule)和粒剂、直肠或阴道给药的栓剂也构成本发明的一部分。本发明也可用于增强应用于皮肤（经皮或皮下传输）的抗原的免疫原性。另外，本发明的佐剂可经非肠道途径给予，例如肌内或皮下给药。当用于鼻内接种时，优选本发明的疫苗的性质是溶血性的。

根据给药途径，可使用多种给药装置。例如，鼻内给药使用的喷雾装置，如可使用商售的 Accuspray™（Becton Dickinson）。

优选鼻内给药的喷雾装置是其性能不依赖于使用者施加的压力的装置。已知的这些装置是有压力极限的装置。只有当达到压力极限时，液体才从喷嘴流出。这些装置更易于形成小液滴液量规整的喷雾。本发明适用的有压力极限的装置是现有技术已知的，例如在 WO91/13281 和 EP311 863B 中有述。这种装置可从 Pfeiffer GmbH 购买到。

优选鼻内装置产生的小液滴（用水做液体来测定）范围在 1 至 200 μm，优选 10 至 120 μm。小于 10 μm 有被吸入的危险，因此小于 10 μm 的小液滴最好不超过大约 5%。120 μm 以上的小液滴不能象较小的小液滴一样很好地扩散，因此超过 120 μm 的小液滴最好不超过大约 5%。

双剂量传输(bi-dose delivery)是用于本发明疫苗的鼻内传输装置的进一步优选特征。双剂量装置含有一个疫苗剂量的两个亚剂量(subdose)，一个亚剂量给予一个鼻孔。

本发明进一步提供了一个试剂盒(kit)，包括此处所述的含有本发明疫苗配制剂的鼻内给药装置。

对于某些疫苗配制剂，可包括其它疫苗成分。同样本发明的佐剂配制剂也可包括胆汁酸和胆酸的衍生物。优选胆酸衍生物是其盐，更优选是其钠盐。胆汁酸及其衍生物的实例包括胆酸本身，脱氧胆酸、牛磺脱氧胆酸（盐）、鹅脱氧胆酸、石胆酸、熊去氧胆酸、猪去氧胆酸和前述胆汁酸的甘油－、牛磺－、氨基丙基-1-丙磺-、氨基丙基-2-羟基-1-丙磺-衍生物，或 N,N-双（3D 葡糖酸氨基丙基）脱氧胆胺。特别优选的实例是可存在于最终疫苗制剂中的脱氧胆酸钠（NaDOC）。

优选，当本发明的佐剂配制剂是水溶液形式或无泡(non-vesicular)

的悬浮液形式时，具有优越性。这种配制剂易于重复制造，也易于消毒（通过具有 450 或 220nm 孔径的膜终端过滤）并且易于以喷雾形式经鼻粘膜给药，同时佐剂的复杂物理结构不发生降解。聚氧乙烯-9 月桂基醚与 TRITON-X 100™ 联用配成水溶液（也可存在小微团）。

本发明的一个方案，提供了一种诱发(inducing)或增强宿主免疫反应的方法，包括将抗原与本发明的佐剂混合，并给宿主施用所述混合物。优选，所述宿主的给药途径是通过粘膜表面，更优选通过鼻粘膜。当通过鼻粘膜给予混合物时，优选混合物以喷雾形式给予。在一个优选的诱发免疫反应的方法中，通过鼻内给予本发明的疫苗来诱导全身免疫反应。优选增强免疫反应的方法可以使用疫苗的初次剂量或加强剂量，并优选该疫苗包含流感抗原或抗原制剂(antigenic preparation)。在这些方法中，鼻粘膜给药的优选佐剂配制剂是聚氧乙烯烷基醚和辛苯聚糖联合使用，例如优选聚氧乙烯-9 月桂基醚和叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇 (TRITON X100™)联合，任选所述佐剂联合剂中额外包括聚氧乙烯脱水山梨醇酯（例如一油酸酯，TWEEN 80™）和/或胆汁盐或胆酸衍生物，如脱氧胆酸钠。

预知本发明的组合物可用于配制含有多种广泛来源的抗原的疫苗。例如，抗原可包括人、细菌或病毒核酸、病原体衍生的抗原或抗原制剂、肿瘤衍生的抗原或抗原制剂，包括 GnRH 和 IgE 肽、重组产生的蛋白或肽和嵌合融合蛋白。

优选本发明的疫苗配制剂含有一种能引起抗人病原体(human pathogen)的免疫反应的抗原或抗原组合物，该抗原或抗原组合物衍生自 HIV-1、（如 tat，nef，gp120 或 gp160），人疱疹病毒，如 gD 或其衍生物或立即早期蛋白如来自 HSV1 或 HSV2 的 ICP27、巨细胞病毒（（尤其是人巨细胞病毒）（如 gB 或其衍生物）、轮状病毒（包括活性减毒病毒）、EB 病毒（如 gp350 或其衍生物）、水痘带状疱疹病毒（Varicella Zoster Virus）（如 gpI、II 和 IE63）、或来自肝炎病毒如乙型肝炎病毒（例如乙型肝炎表面抗原或其衍生物）、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒，或来自其它病毒病原体，如副粘病毒：呼吸道合胞病毒（如 F 和 G 蛋白或其衍生物）、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒（例如 HPV6,11,16,18,..）、黄病毒属（如黄热病毒、登革热病毒、蜱媒脑炎病毒、日本脑炎病毒）或生长

在卵或 MDCK 细胞中的流感病毒（活性完整(whole)或灭活病毒、分裂流感病毒(split influenza virus)、或 Vero 细胞或完整(whole)流感病毒颗粒(whole flu virosomes) （如 R. Gluck,《疫苗》（Vaccine），1992,10, 915-920 中描述）或纯化的或其重组蛋白，如 HA, NP, NA，或 M 蛋白，或它们的混合物(combination)）、或来自细菌病原体如奈瑟菌属，包括淋病奈瑟氏球菌和脑膜炎奈瑟氏球菌 (例如胶囊多糖及其共轭物(conjugate)、转铁蛋白结合蛋白、乳铁蛋白结合蛋白、PilC、粘附素)；酿脓链球菌(例如 M 蛋白或其片段、C5A 蛋白酶、脂磷壁酸质)、无乳链球菌、变异链球菌；杜克氏嗜血杆菌；莫拉氏菌属,包括卡他莫拉氏菌，也包括已知的卡他布兰汉氏菌(例如高和低分子量的粘附素和透明质酸酶)；博德特氏菌属,包括百日咳博德特氏菌(例如 pertactin、百日咳毒素或其衍生物、丝状血凝素、腺苷酸环化酶、菌毛)、副百日咳博德特氏菌和支气管炎博德特氏菌；分枝杆菌属，包括结核分枝杆菌(例如 ESAT6、Antigen 85A,-B or-C 抗原)、牛分枝杆菌、麻风分枝杆菌、 鸟分枝杆菌、副结核分枝杆菌、耻垢分枝杆菌;军团菌属，包括嗜肺军团菌；埃希氏菌属，包括产肠毒性大肠杆菌 (例如定居因子、热不稳定毒素或其衍生物、热稳定毒素或其衍生物)、肠出血性大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌(例如志贺菌毒素样毒素或其衍生物)；弧菌属，包括霍乱弧菌 (例如霍乱毒素或其衍生物)；志贺氏菌属，包括宋内氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌、弗氏志贺氏菌；耶尔森氏菌属，包括小肠结肠炎耶尔森氏菌 (例如 Yop 蛋白)，鼠疫耶尔森氏菌、假结核耶尔森氏菌；弯曲杆菌属,包括空肠弯曲杆菌 (例如毒素、粘附素和透明质酸酶) 和大肠弯曲杆菌；沙门氏菌属，包括伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌；李斯忒氏菌属，包括单核细胞增生李斯忒氏菌；螺杆菌属，包括幽门螺旋杆菌(例如尿素酶、过氧化氢酶、 空泡毒素)；假单胞菌属，包括铜绿假单胞菌；葡萄球菌属，包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌 ；肠球菌属,包括粪肠球菌、屎肠球菌；梭菌属，包括破伤风梭菌 (例如破伤风毒素及其衍生物)、肉毒梭菌 (例如肉毒素及其衍生物)，艰难梭菌(例如梭菌毒素 A 或 B 及其衍生物)；芽孢杆菌属,包括炭疽芽孢杆菌(例如肉毒杆菌毒素(botulinum toxin)和其衍生物)；棒状杆菌属，包括白喉杆菌 (例如白喉毒素和其衍生物)；疏螺旋体属，包括布氏疏螺旋体(例如 OspA,OspC, DbpA, DbpB)、嗄氏疏

被认为是造成生殖器瘤的原因的人乳头瘤病毒(HPV)的抗原,(HPV6或HPV 11 和其它),和HPV病毒是形成子宫颈癌的原因(HPV16,HPV 18 和其它)。

特别优选的生殖器瘤预防或治疗疫苗形式包括L1微粒或壳粒,以及优选的融合蛋白形式,其包括一种或多种选自HPV6和HPV11蛋白E6、E7、L1和L2的抗原。

最优选的融合蛋白形式是:WO96/26277 中公开的 L2E7 和GB9717953.5(PCT/EP98/05285)中公开的D(1/3)-E7蛋白。

优选的用于预防或治疗 HPV 子宫颈感染或 HPV 子宫颈癌的疫苗,其组分可包括HPV16或18抗原。例如,L1或L2抗原单体、或L1或L2抗原作为一种病毒样微粒(VLP)同时出现,或单独L1蛋白在VLP或衣壳粒结构中单独出现。这种抗原、病毒样微粒和衣壳粒本身是已知的。例如参见 WO94/00152,WO94/20137,WO94/05792 和WO93/02184。

另外的早期蛋白,例如优选的E7、E2或E5可单独或作为融合蛋白被包括;特别优选方案包括包含有 L1E7 融合蛋白的 VLP(WO 96/11272)。

特别优选的HPV 16抗原包含与D蛋白载体融合的早期蛋白E6或E7以形成来自HPV16的蛋白D-E6或E7融合蛋白,或它们的混合物(combination);或E6或E7与L2的混合物(WO 96/26277)。

或者,HPV 16或18早期蛋白E6和E7,可存在于一个单个分子中,优选蛋白D-E6/E7 融合。这种疫苗可任选地包括来自HPV 18 的E6或E7蛋白二者之一或二者均有,优选蛋白D-E6 或蛋白 D-E7 融合蛋白或蛋白 D E6/E7 融合蛋白的形式。

本发明的疫苗还可包括来自其它 HPV 株的抗原,优选来自HPV6,11,31,33或 45株的抗原。

本发明的疫苗进一步包括来自可引起疟疾的寄生虫抗原。例如,优选抗原来自恶性疟原虫,包括RTS,S和TRAP。RTS是一种杂交蛋白,包括恶性疟原虫的环状子孢子(CS)蛋白的基本上所有 C-末端部分,其通过乙型肝炎表面抗原的 PreS2 部分的四个氨基酸,与乙型肝炎病毒的表面(S)抗原连接。在国际专利申请PCT/EP92/02591中公开了它的全部结构,公开号WO93/10152,权利要求优先权是英国专利申请

螺旋体(例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB)、阿氏疏螺旋体(例如 OspA, OspC, DbpA, DbpB)、*B. andersonii* (例如 OspA,OspC, DbpA, DbpB)、赫氏蜱疏螺旋体；埃里希氏体属，包括马埃里希氏体和人颗粒细胞性埃里希氏病的病原体；立克次体属，包括立氏立克次体；衣原体属,包括砂眼衣原体 (例如 MOMP,肝磷脂结合蛋白)、肺炎衣原体(例如 MOMP, 肝素结合蛋白)，鹦鹉热衣原体；钩端螺旋体属，包括问号钩端螺旋体；密螺旋体属，包括苍白密螺旋体 (例如稀有外膜蛋白、齿垢密螺旋体、猪痢疾密螺旋体；或来自寄生虫，例如疟原虫属，包括恶性疟原虫；弓形虫属，包括鼠弓形虫(例如 SAG2, SAG3, Tg34)；内阿米巴属，包括溶组织内阿米巴；巴贝虫属,包括田鼠巴贝虫；锥虫属,包括克氏锥虫 ；贾第鞭毛虫属，包括蓝氏贾第鞭毛虫；利什曼虫属,包括大型利什曼虫；肺囊虫属，包括卡氏肺囊虫； 毛滴虫属,包括阴道毛滴虫；血吸虫属,包括曼氏血吸虫；或来自酵母，例如念珠菌属，包括白色念珠菌；隐球菌属，包括新型隐球菌（*C. neoformans*）。

优选细菌疫苗包括来自链球菌属，包括肺炎链球菌（例如胶囊多糖和其共轭物、PsaA, PspA, 链球菌溶血素、胆碱结合蛋白)和肺炎球菌溶血素蛋白抗原(Biochem Biophys Acta, 1989,67,1007; Rubins 等,《微生物病理》（Microbial Pathogenesis），25,337-342)，和其突变解毒衍生物 (WO 90/06951; WO 99/03884)。其它优选细菌疫苗包括来自嗜血菌属，包括 B 型模式种流感嗜血菌（例如 PRP 及其耦合物）、非成型(non typeable)流感嗜血菌，例如 OMP26 的抗原、高分子量粘附素(adhesins)、P5、 P6、D 蛋白和脂蛋白 D、和肌动蛋白和肌动蛋白衍生肽(US 5,843,464)或其多拷贝变异体或融合蛋白。其它优选细菌疫苗包括来自卡他莫拉氏菌（包括其外膜囊泡，和 OMP106(WO 97/41731)) 和来自 B 型脑膜炎奈瑟氏球菌（包括其外膜囊泡，和 NspA (WO 96/29412)）的抗原。

乙型肝炎表面抗原衍生物是现有技术中熟知的，并包括其它的在欧洲专利申请 EP-A-414 374; EP-A-0304 578 和 EP 198-474 中提出的那些 PreSl, PreS2 S 抗原。在一个优选方案中，本发明的疫苗配制剂包括 HIV-1 抗原、gp120，尤其是当它们在 CHO 细胞中表达时。在进一步的方案中，本发明的疫苗配制剂包括如上文定义的 gD2t。

在本发明的一个优选方案中，疫苗含有权利要求的佐剂，包括来自

No.9124390.7。当它在酵母中表达时，产生脂蛋白颗粒 RTS，当它与 HBV 的 S 抗原协同表达时，产生已知的混合微粒 RTS,S。TRAP 抗原在国际专利申请 No. PCT/GB89/00895 中有描述，其公开号为 WO 90/01496。本发明的一个优选方案是疟疾疫苗，其中抗原制剂包括 RTS,S 和 TRAP 抗原的混合物。可能作为各阶段疟疾疫苗候选成分的其它疟原虫抗原是恶性疟原虫 MSP1, AMA1,MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 钳合蛋白, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3,STARP, SALSA, PfEXPl, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfsl6, Pfs48/45, Pfs230 及其疟原虫属的类似物。

本配制剂也可含有一种抗肿瘤抗原，并可用于免疫治疗法治疗癌症。例如，发现佐剂配制剂可与肿瘤排斥抗原合用，如前列腺、胸部、结肠直肠、肺、胰腺、肾或黑色素瘤癌症的排斥抗原。实例抗原包括用于治疗黑色素瘤的 MAGE 1 和 MAGE 3 或其它 MAGE 抗原，PRAME,BAGE 或 GAGE (Robbins 和 Kawakami, 1996, 《免疫学中的最新见解》(Current Opinions in Immunology) 8, 628-636 页; Van den Eynde 等人,《临床和实验室研究的国际杂志》(International Journal of Clinical & Laboratory Research) (发表于 1997); Correale 等人 (1997), 《全国癌症协会杂志》 (Journal of the National Cancer Institute) 89, 293 页。事实上，在广范围的肿瘤类型中都能表达这些抗原，例如黑色素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌。其它肿瘤特异性抗原适于与本发明的佐剂一同使用，包括但不限于前列腺特异性抗原 (PSA) 或 Her-2/neu, KSA (GA733), MUC-1 和癌胚抗原 (CEA)。根据本发明的一个方案，提供了一种疫苗，包括一种根据本发明的佐剂组合物和一种肿瘤排斥抗原。

另外的所述的抗原还可以是自身肽激素，如全长促性腺激素释放激素(GnRH, WO 95/20600)，它是长为 10 个氨基酸的短肽，可用于治疗许多癌症，或应用于免疫切除。

能预知本发明的组合物可用于配制含有来自疏螺旋体属的抗原的疫苗。例如，抗原可包括核酸、病原体衍生的抗原或抗原制剂、重组产生的蛋白或肽和嵌合融合蛋白。特别地该抗原是 OspA。OspA 可以是宿主细胞 (大肠杆菌 (E. Coli)) 定义的完整成熟蛋白 (full mature protein) 的脂化形式(Lipo-OspA)或非脂化衍生物。这种非脂化衍生物

包括非脂化 NS1-OspA 融合蛋白，它具有流感病毒的非结构蛋白（NS1）的前 81 个 N 端氨基酸，和完全 OspA 蛋白；以及另一种，MDP-OspA 是 OspA 的非脂化形式，带有 3 个另外的 N 端氨基酸。

本发明的疫苗可用于过敏的预防或治疗。这种疫苗可包括过敏原特异性抗原（例如 Der p1）和过敏原非特异性抗原（例如来自人 IgE 的肽，包括但不限于 stanworth 十肽(EP 0 477 231 B1)）。

本发明最优选的疫苗和诱发免疫反应的方法，包括流感病毒抗原。灭活流感病毒制剂可由常规含胚卵方法得到，或可通过任何一种用组织培养使病毒生长的新传代方法(new generation method)得到。用于使病毒生长的合适细胞底物包括，比如狗肾细胞，如 MDCK 或来自 MDCK 的克隆的细胞、MDCK 样细胞、猴肾细胞，如 AGMK 细胞，包括非洲绿猴肾细胞、或其它任何适于产生用于制备疫苗目的的流感病毒的细胞类型。合适的细胞底物包括人细胞，如 MRC-5 细胞。合适的细胞底物不限于细胞系；例如原代细胞，比如鸡胚成纤维细胞也可包括在内。流感病毒抗原制剂可通过大量商售的处理方法中任何一种而得到，如专利 DD 300 833 中描述的分裂流感抗原处理方法。可购买得到的分裂流感包括 SmithKline Beecham 销售的 Fluarix™，同样 Fluarix 与本发明的佐剂联合使用构成本发明优选的疫苗。

根据本发明的流感疫苗优选一种多价流感疫苗，包括两种或更多流感株。更优选它是一种包含 3 株的三价疫苗。传统流感疫苗通常包括流感的三种株，两个 A 株和一个 B 株。然而，本发明并不排斥例如可能对流行情况有益的单价疫苗。一种单价大流行性流感疫苗将很可能含有来自单一 A 株的流感抗原。

因此，一种优选的疫苗配制剂包括卵或组织培养流感抗原，优选分裂流感抗原，一种聚氧乙烯烷基醚和至少一种另外的非离子表面活性剂，可视需要地包括胆汁盐或胆酸的衍生物。这种疫苗的优选方案包括分裂流感病毒抗原、聚氧乙烯-9 月桂基醚和 TRITON-X 100™。任选地，这种最优选的疫苗可进一步包括一种聚氧乙烯脱水山梨醇酯，如 TWEEN80™和/或脱氧胆酸钠。

每种疫苗剂量中的蛋白量被选定为能够诱发免疫保护性反应而在典型疫苗中不产生明显的不利副作用的剂量。这一剂量会随着使用的特异性免疫原及其如何产生(presented)而变化。一般来说，期望每一剂

量包括 1 - 1000μg 蛋白，优选 1-500μg，优选 1-100μg，最优选 1-50μg。一个特定疫苗的最佳剂量可以通过标准研究确定，包括观察受试者相称的免疫反应。初次疫苗接种后，受试者可接受一个和几个充分间隔开的加强免疫接种。

本发明的一个优选方案是通过另外的非离子表面活性剂能协同增强聚氧乙烯烷基醚的佐剂作用。在这点上，从联用混合的佐剂配制剂产生的免疫反应程度高于每一成分单独使用时各自所产生的免疫反应之和，即可观察到协同作用。另一情况，当低剂量的聚氧乙烯醚和另外的非离子表面活性剂产生明显的免疫反应，而甚至当单独使用一种或每个成分都不能产生明显或可检测到的免疫反应时，也可观察到协同作用。

本发明的一个方案是佐剂和疫苗配制剂，其包含聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯和至少一种另外的非离子表面活性剂，其中疫苗中存在的抗原不包载在非离子表面活性剂泡囊之内。

本发明的疫苗也可通过口服途径给予。在这种情况下，药学上可接受的赋形剂也可包括碱性缓冲液或肠溶包被或微粒。本发明的疫苗也可通过阴道途径给予。在这种情况下，药学上可接受的赋形剂也可包括阴道霜剂和栓剂的乳化剂、聚合物如 CARBOPOL®，和其它已知的稳定剂。本发明的疫苗也可通过直肠途径给予。在这种情况下，药学上可接受的赋形剂也可包括现有技术中已知的用于形成直肠栓剂的蜡和聚合物。

本发明的配制剂可用于预防和治疗目的。因此，本发明提供了一种治疗哺乳动物感染性疾病或癌症、或过敏、或自身免疫性疾病的方法，或治疗这些疾病的易感性的方法。本发明的进一步方案提供了一种佐剂混合物(adjuvant combination)和此处所述的用于药物的疫苗。疫苗的制备通常在《疫苗的新趋势及进展》（New Trends and Developments in Vaccines），Voller 等编，University Park 出版，巴尔的摩，马里兰州，美国，1978 中有述。

本发明的一个方案涉及非离子表面活性剂例如通式（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯和辛苯聚糖在制备佐剂配制剂中的应用。本发明也涉及通式（I）的聚氧乙烯烷基醚或聚氧乙烯烷基酯、辛苯聚糖和抗原在制备疫苗配制剂中的应用。如所述方法制备的所述佐剂和

疫苗可视需要进一步包括聚氧乙烯脱水山梨醇酯。在本发明的所有这些方案中，优选聚氧乙烯烷基醚是聚氧乙烯-9 月桂基醚，优选的辛苯聚糖是叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton X-100™)。

在本发明一个可选择的相关方案中，本发明的佐剂可进一步与其它佐剂联合使用，包括霍乱菌毒素及其 B 亚单位、大肠杆菌热不稳定的肠毒素 LT 及其 B 亚单位 LTB、和它们的解毒型如 mLT；单磷酸类脂 A(Monophosphoryl Lipid A)和其非毒性衍生物 3-O-脱酰单磷酸类脂 A(3D-MPL，在英国专利 GB 2,220,211 中有描述)、免疫学活性皂苷片段，如来自南美 Quillaja Saponaria Molina 树的树皮的 Quil A 及其衍生物（例如 QS21, US 专利 5,057,540),和寡核苷酸(oligonucleotide)佐剂系统 CpG (如 WO 96/02555 中描述),尤其是 $^{5'}$TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT$^{3'}$ (SEQ ID NO. 1)。

在本技术方案中，特别优选聚氧乙烯烷基醚（如聚氧乙烯-9 月桂基醚）、另外的非离子表面活性剂（如叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton X-100™）和 3-O-脱酰单磷酸类脂 A (3D-MPL)的佐剂混合物。该优选方案可进一步视需要地包括聚氧乙烯脱水山梨醇酯如 TWEEN80 ™，和/或胆汁盐或胆酸衍生物如脱氧胆酸钠。特别优选包括该佐剂配制剂和流感抗原、尤其是分裂流感抗原的疫苗。

下列实施例用于解释但不限制本发明。

实施例

实施例 1，用于检测血清(sera)中抗体（Ab）反应的方法

ELISA（酶脱免疫吸附测定）测定猴流感－特异性血清 Ig Abs

用 PBS 稀释β-丙酸内酯 (BPL)灭活流感病毒(由 SSD GmBH 厂家，Dresden，德国提供) 1 μg/ml HA ，50 μl/孔（μl/well）来包被 Maxisorp Nunc 免疫平板(immunoplate)，在 4℃下过夜。平板中的空位点用饱和缓冲液：PBS 含 1 % BSA、0. 1 % 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(TWEEN 20)填封（1 小时，37℃）。接着，作为标准曲线加入的参考血清的连续的 2 倍稀释液（在饱和缓冲液中，50μl/孔）（具有中点滴定度(titer)的血清用 ELISA 单位/ml 表示，被列入 A 行)和血清样本(从 1/100 稀释度开始并被列入 B 到 H 行），37℃培养 1 小时 30 分钟。接着用洗涤缓冲液（PBS, 0.1 % 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(TWEEN 20）)洗涤（×3）平板。然后，在饱和缓冲液将生物素化山

羊抗－人 Ig(goat anti-human Ig) (Amersham) 稀释到 1/3000, 37℃培养（50μl/孔）1 小时 30 分钟。冲洗 3 次，随后添加抗生物素蛋白链菌素－辣根过氧化物酶结合物(Amersham)，洗涤平板 5 次并用 50μl/孔的指示缓冲液(revelation buffer)（OPDA 0.4 mg/ml (Sigma) 和 H_2O_2 0. 03%在 50mM pH 4. 5 柠檬酸盐缓冲液中）在室温下培养 20 分钟。加入 50μl/孔 H_2SO_4 2N，终止指示。用 Biorad 3550 免疫阅读器(immunoreader)在 492 和 630nm 得到光学密度读数。用 SoftMaxPro 软件的 4 参数数学方法计算抗体滴定度。

猴流感－特异性血清 Abs 的血细胞凝集抑制（HAI）活性

为了消除灵长类动物血清中的血细胞凝集的非特异性抑制作用，这些（25μl）用 100μl 氯化(chlorure)钙/硼酸钙/硼酸钠混合溶液在 37℃培养过夜，所述混合溶液每 ml 霍乱弧菌神经氨酸酶(Boerhinger Mannheim)含有 400 受体破坏酶单位。加入 2.5%柠檬酸钠溶液 75μl 后，在 56℃加热血清 30 分钟。加入 50μl PBS 溶液将血清最后稀释到 $1/10^{th}$。接着，在 96 孔 Greiner 平板上用 25μl PBS（从 1/10 开始，连续 2 倍稀释）稀释 25μl 处理过的血清。在室温（RT）和搅拌下用 30 分钟以 4 血细胞凝集单位浓度（即比激发红细胞凝集的最后一次低 4 倍的稀释度）加入 BPL 灭活完整病毒（25μl/孔）。接着在 RT 下用 1 小时加入鸡红细胞（25μl/孔）。最后平板在 4℃下保存过夜再读数。HAI 滴定度相当于抑制病毒诱导的血细胞凝集的最后血清稀释度的倒数。

ELISA 测定小鼠破伤风类毒素（TT）特异性血清 IgG

用在 PBS 中（在平板的 B 至 H 行）稀释的 1 μg/ml 抗原（Behring 提供的 TT）的 50 μl/孔来包被 Maxisorp Nunc 免疫平板，或用在 PBS（A 行）中 5μg/ml 纯化的山羊抗－小鼠(goat anti-mouse)Ig（Boerhinger）的 50μl 包被平板，在 4℃下过夜。平板中的空位点用饱和缓冲液：PBS（含 1 % BSA、0. 1 % 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯 (TWEEN 20)和 4 % 标准小牛血清（NBS））填封（1 小时，37℃）。接着，加入作为一个标准曲线的 IgG 同型(isotype)混合物的连续 2 倍稀释液（在饱和缓冲液中，50μl/孔）（使用 Sigma 的小鼠单克隆抗体 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的混合物，从 200ng/ml 开始并被列入 A 行）和血清样本（从 1/100 稀释度开始并被列入 B 到 H 行），在 37℃培养 1 小时 30

分钟。接着用洗涤缓冲液（PBS, 0.1 % 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(TWEEN 20)）洗涤（×3）平板。然后，在饱和缓冲液中稀释到 1/5000 中的生物素化山羊抗－小鼠 IgG(Amersham)，在 37℃培养（50μl/孔）1 小时 30 分钟。冲洗 3 次，随后添加抗生物素蛋白链菌素－辣根过氧化物酶结合物(Amersham)，洗涤平板 5 次并用 50μl/孔的指示缓冲液（OPDA 0.4 mg/ml (Sigma) 和 H_2O_2 0. 03 %在 50mM pH 4. 5 柠檬酸盐缓冲液中）在室温下培养 20 分钟。加入 50μl/孔 H_2SO_4 2N，终止指示。用 Biorad 3550 免疫阅读器在 492 和 630nm 处得到光密度读数。用 SoftMaxPro 软件的 4 参数数学方法计算抗体滴定度。

实施例 2，laureth 9 与 TWEEN80 和 TritonX100 的联合使用共同对已接触抗原的恒河猴鼻内流感疫苗的免疫原性的影响

用喷雾装置（麻醉下）给恒河猴每个鼻孔灌注含在 100μl PBS 中的每株 β-丙酸内酯灭活的 A/北京/262/95 和 B/哈尔滨/7/94 流感病毒 25μg HA。28 天后，用 200μl 溶液（每个鼻孔 100μl，用喷雾装置输送）给猴子（4 或 5 只/组）鼻内（麻醉下）加强剂量，溶液在 A: 聚氧乙烯-9-月桂基醚 0.5% (L9)中；或在 B: 聚氧乙烯-9-月桂基醚 0.5%+ TWEEN80 (0. 11%) + triton-X-100 (0.074%)中含有 30μg HA/BPL－灭活 A/北京/262/95 和 B/哈尔滨/7/94 流感病毒株；或通过 C: 肌内注射 15μgHA/流感疫苗株，疫苗株含有与 A 和 B 相同的株。病毒抗原在由厂商(SSD GmBH, Dresden, 德国)提供的种子库的卵中生长。如实施例 1 所述测定血清中 HAI 和 IgAb 反应。结果用加强免疫后提高 4 倍 Ab 的动物所占的百分比来表示。

以往用 0.5％聚氧乙烯-9-月桂基醚的经验表明该配制剂对诱导抗流感全身免疫反应有效。然而，如表 1 所示，通过添加另外的非离子表面活性剂可显著改善佐剂辅助性(adjuvanticity)水平。这样当用 TWEEN80 和 triton-X-100 补充聚氧乙烯-9-月桂基醚时，该配制剂能够象经典非肠道途径流感疫苗一样有效地增强预先已建立的全身性 Ig Ab 反应。

还测定血细胞凝集抑制（HAI）反应（表 2），再一次，最好的鼻内配制剂仍然是补充了 TWEEN80 和 triton-X-100 的聚氧乙烯-9-月桂基醚。该配制剂与传统非肠道途径疫苗的免疫原性相同。

表 1，猴血清 Ig 反应

IgELISA 抗体	Ab 升高 4 倍血清转化（%）至:	
组	A/北京/262/95	B/哈尔滨/7/94
A	0	0
B	100	100
C	75	75

表 2，猴血清 HAI 滴定度

HAI 抗体	Ab 升高 4 倍血清转化（%）至:	
组	A/北京/262/95	B/哈尔滨/7/94
A	0	0
B	20	0
C	25	0

实施例 3: 比较用 laureth 9 加 TWEEN80 和 triton-X-100 配制成的鼻内给予分裂流感疫苗与已被批准使用的传统非肠道途径疫苗（Fluarix™）对健康成年受试者的免疫原性。

评估用 laureth 9 加 TWEEN80 和 triton-X-100（A）配制的卵源分裂流感抗原的鼻内配制剂，并与 Fluarix™/α-Rix®（B）进行比较。含有三种灭活分裂病毒抗原的配制剂由 1998/1999 季 WHO 推荐株制备。用于施与疫苗的装置是来自 Becton Dickinson 的 Accuspray™ 鼻内注射器，该装置与传统注射器工作原理类似，但具有一个含螺旋形通道的特殊针尖，当给活塞施加压力时，它可以产生喷雾。每个鼻孔被喷入 100μl 配制剂。

配制剂的成分

鼻内配制剂（A）含有下列灭活分裂病毒体:

1. 30μg HA A/北京/262/95 (H1N1)

2. 30μg HA A/悉尼/5/97 (H3N2)

3. 30μg HA B/哈尔滨/7/94

和磷酸盐缓冲生理盐水 pH7.4±0.1、0. 1%TWEEN80、0. 015%Triton-

X-100、0.0045%脱氧胆酸钠和低于 35μg/ml 的乙基汞硫代水杨酸钠。

一个制剂的体积是 200μl（每个鼻孔 100μl 亚剂量）。

配制剂 A 中辅助入佐剂 laureth 9 以使终浓度达到 0.5%（w/v）。

对比物 Fluarix™/α-Rix®（B）是 SmithKlineBeecham Biologicals 的商售灭活三价分裂流感疫苗，肌内给药，剂量是 500μl。

免疫原性研究

用开放、对照和随机化研究评价鼻内分裂流感疫苗的免疫原性，该疫苗是由补充了 TWEEN80 和 triton-X-100 的 laureth 9 配制而成，并与传统非肠道途径疫苗（即 Fluarix™）相比较。20 个健康成年受试者（年龄 18－40 岁）接受一个剂量的 Fluarix™，10 个受试者接受一个剂量（两个亚剂量，每个鼻孔一个亚剂量）的鼻内流感疫苗。

连续 8 天以求得产生局部和全身症状，关于安全性和反应原性，两种疫苗都能被很好忍受。没有报道与接种疫苗相关的严重副作用。

疫苗的免疫原性测定是：通过评估血清血细胞凝集抑制（HI）滴定度来确定血清转化率（对于每一疫苗株，其定义是与第 0 天相比，第 21 天血清 HI 滴定度至少增加到 4 倍的疫苗所占百分比）、转化因数（对于每一疫苗株，其定义是与第 0 天相比，第 21 天的血清 HI 几何均数滴定度（GMT）增加到倍数）和血清保护率（其定义是，免疫接种后（对于每一疫苗株）血清 HI 滴定度≥40 的疫苗所占百分比，接受其作为保护的指示）。另外，用酶联免疫吸附实验（ELISA）测定粘膜 IgA 抗体反应。

接种一个剂量的 Fluarix™或鼻内配制剂后 21 天，HI 血清阳性、血清转化和血清保护率可见表 3。

表 3：接种一个剂量后 21 天 HI 血清阳性、血清转化和血清保护率：

株	组	时间	N	血清阳性		血清保护		血清转化	
				n	%	n	%	n	%
A/北京	鼻内疫苗加有 Laureth 9	天 0	20	5	25.0	1	5.0		
		天 21	20	19	95.0	10	50.0	15	75.0
	Fluarix™	天 0	19	4	21.1	3	15.8		
		天 21	19	19	100.0	18	94.7	19	100.0
A/悉尼	鼻内疫苗加有 Laureth-9	天 0	20	16	80.0	4	20.0		
		天 21	20	20	100.0	19	95.0	15	75.0
	Fluarix™	天 0	19	14	73.7	1	5.3		
		天 21	19	19	100.0	18	94.7	16	84.2
B/哈尔滨	鼻内疫苗加有 Laureth-9	天 0	20	18	90.0	11	55.0		
		天 21	20	20	100.0	19	95.0	12	60.0
	Fluarix™	天 0	19	17	89.5	11	57.9		
		天 21	19	19	100.0	19	100.0	15	78.9

血清阳性（n，%）：滴定度≥10 的受试者数量和百分比

血清保护（n，%）：滴定度≥40 的受试者数量和百分比

血清转化（n，%）：从 0 到 21 天滴定度增加到至少 4 倍的受试者数量和百分比

表 4 可见，在 21 天和 0 天之间（1 个剂量），特异性/总粘膜 IgA 抗体比率增加到 2 倍或 4 倍的受试者所占百分比。

表 4：在 21 天和 0 天之间（1 个剂量），特异性/总 IgA 比率增加到 2 倍或 4 倍的受试者所占百分比

株	组	N	增加到2倍 (%)	增加到4倍 (%)
A/北京	Laureth-9	20	50.0	20.0
	Fluarix™	19	52.6	26.3
A/悉尼	Laureth-9	20	55.0	25.0
	Fluarix™	19	47.4	5.3
B/哈尔滨	Laureth-9	20	15.0	10.0
	Fluarix™	19	26.3	5.3

总结

上面制表中的免疫原性结果表明给予一个剂量的鼻内配制剂与传统非肠道途径疫苗(Fluarix™)后 21 天，产生的血清阳性、血清转化和血清保护水平相似。一个剂量之后，鼻内配制剂通常比传统非肠道途径疫苗(Fluarix™)产生的粘膜 IgA 反应更好。

实施例 4，laureth 9 与 Triton X100 合用对已接触抗原的小鼠鼻内破伤风类毒素疫苗的免疫原性的影响

在本实施例中，我们评价了向低剂量和次于最佳剂量的 Laureth－9 中加入 Triton X100 后，对鼻内增强破伤风类毒素（TT）－特异性血清抗体的作用。雌性 balb/c 小鼠肌内给予 20%（2×50μl）人用剂量的商售 DTPa 疫苗(Diptheria，破伤风，无细胞百日咳疫苗：INFANRIX™ SmithKline Beecham，比利时）。一个月后，用含 5μg TT 的 A：PBS；B：0.5%聚氧乙烯-9 月桂基醚；C：0.1%聚氧乙烯-9 月桂基醚；D：0.1%聚氧乙烯-9 月桂基醚+0.02% Triton X100 给小鼠鼻内加强剂量(麻醉下，每个鼻孔 5μl)，或用 E：通过肌内加强注射 DTPa 疫苗(2×50μl)。加强后两周，分析血清的 TT-特异性 IgG。

如图 1 所示，与 0.5%的剂量相反，低剂量 Laureth－9（0.1%）不能有效增强对 TT 的加强反应。然而，通过补充 Triton X100(p<0.0001)可大大改善这一配制剂的辅佐性。引起的抗体反应与商售 DTPa 疫苗诱导的反应相似。

balb/c小鼠对TT产生的血清IgG

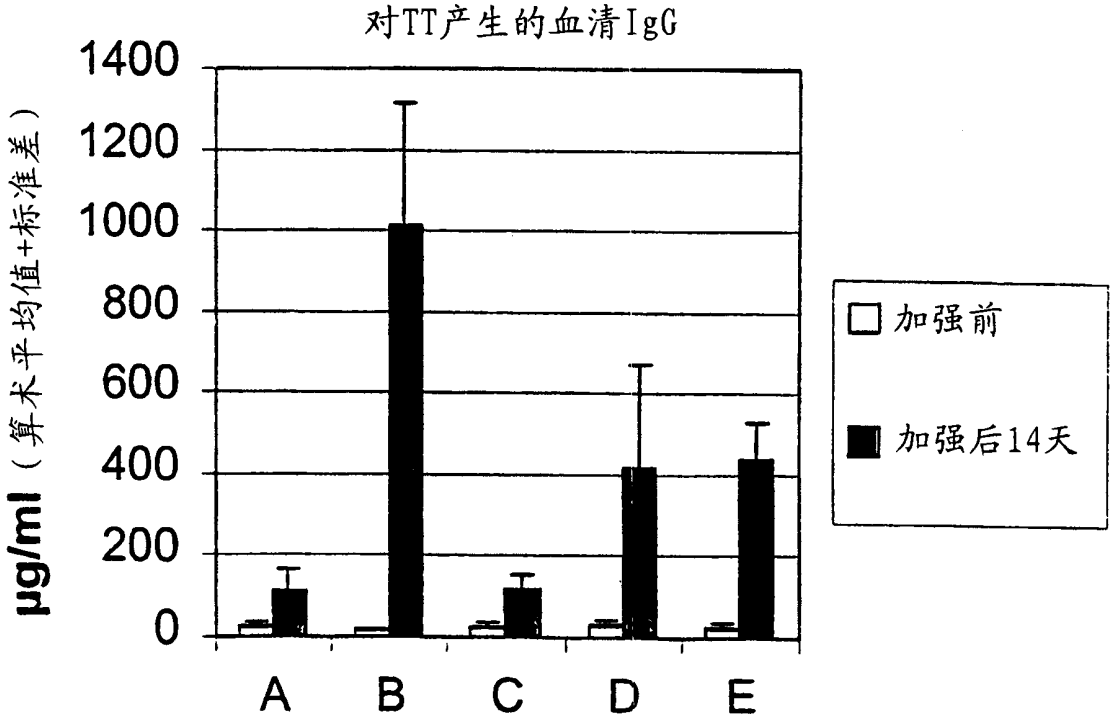

图 1