

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 39/02

A01N 43/04 A61K 31/70

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98804722.5

[43]公开日 2000 年 5 月 24 日

[11]公开号 CN 1254292A

[22]申请日 1998.4.30 [21]申请号 98804722.5

[30]优先权

[32]1997.4.30 [33]FR [31]97/05609

[32]1997.12.8 [33]FR [31]97/15731

[86]国际申请 PCT/US98/08890 1998.4.30

[87]国际公布 WO98/48835 英 1998.11.5

[85]进入国家阶段日期 1999.11.1

[71]申请人 梅里厄奥拉瓦克斯公司

地址 法国里昂

[72]发明人 B·居伊 J·哈恩斯勒 C·K·李

R·A·维尔特津

T·P·莫纳斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 谭明胜

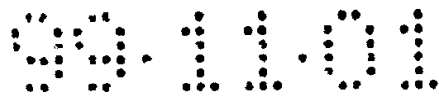
权利要求书 4 页 说明书 27 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 通过膈下内吸收途径使用的抗螺杆菌疫苗
组合物,以及粘膜/非肠道联用免疫方法

[57]摘要

本发明的目标是使用源自螺杆菌的免疫原性物质制备用于诱导抗 螺杆菌的 T 辅助细胞 1(Th1)型免疫应答以防止或治疗哺乳动物的螺 杆菌感染的药用组合物。这具体是通过例如,在哺乳动物的膈下区域通 过内吸收途径或非肠道途径施用药用组合物实现的。本发明还包括用于 治疗或防止螺杆菌感染的粘膜/非肠道免疫方法。

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



权 利 要 求 书

1. 源自螺杆菌的免疫原性物质在制备药物组合物中的应用, 该药物组合物用于诱导针对螺杆菌的 T 辅助细胞 1 (Th1) 型免疫应答从而防止或治疗螺杆菌在哺乳动物中的感染的应用。

5 2. 根据权利要求 1 中的应用, 其中 Th1 - 型免疫应答特征为 (i) 小鼠中 IgG2a : IgG1 的 ELISA 滴定度比率大于或等于 1 : 100, 或者为 (ii) 小鼠中 IgG2a : IgA 的 ELISA 滴定度比率大于或等于 1 : 100。

3. 根据权利要求 2 的应用, 其中 Th1 - 型免疫应答特征为 (i) 小鼠中 IgG2a : IgG1 的 ELISA 滴定度比率大于或等于 1 : 10, 或者 (ii) 10 小鼠中 IgG2a : IgA 的 ELISA 滴定度比率大于或等于 1 : 10。

4. 根据权利要求 3 的应用, 其中 Th1 - 型的免疫应答的特征为 (i) 小鼠中 IgG2a : IgG1 的 ELISA 滴定度比率大于或等于 1 : 2, 或者为 (ii) 小鼠中 IgG2a : IgA 的 ELISA 滴定度比率大于或等于 1 : 2。

5. 源自螺杆菌的免疫原性物质在制备药物组合物中的应用, 该药物组合物用于治疗或防止螺杆菌感染, 上述组合物是用于在哺乳动物, 尤其是灵长类动物, 的位于膈下区域的一部分上通过内吸收途径施用的。

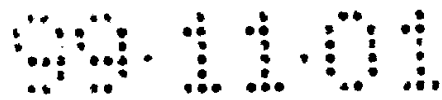
6. 根据权利要求 5 的应用, 其中的组分通过膈下内吸收途径施用 时能诱导 Th1 - 型免疫应答。

20 7. 根据权利要求 5 或 6 的应用, 其中的 Th1 - 型免疫应答的特征为 (i) IgG2a : IgG1 的 ELISA 滴定度比大于或等于 1 : 100, 或者为 (ii) IgG2a : IgA 的 ELISA 滴定度比大于或等于 1 : 100。

8. 根据权利要求 7 的应用, 其中 Th1 - 型免疫应答的特征为: (i) 小鼠中 IgG2a : IgG1 的 ELISA 滴定度比大于或等于 1 : 10, 或者为 (ii) 25 小鼠中 IgG2a : IgA 的 ELISA 滴定度比大于或等于 1 : 10。

9. 根据权利要求 8 的应用, 其中 Th1 - 型的免疫应答的特征为 (i) 小鼠中 IgG2a : IgG1 的 ELISA 滴定度比大于或等于 1 : 2, 或者为 (ii) 小鼠中 IgG2a : IgA 的 ELISA 滴定度比大于或等于 1 : 2。

10. 根据权利要求 1 到 9 中的一项的应用, 其中源自螺杆菌的免疫 30 原性物质选自灭活的螺杆菌细菌, 螺杆菌细胞裂解物, 肽, 源自螺杆菌



的纯化形式的多肽, 含有编码源自螺杆菌的肽或多肽的一段序列并且置于对其表达必需的控制元件的控制之下的 DNA 分子, 和含有编码源自螺杆菌的肽或多肽的一段序列并置于对其表达必需的控制元件的控制之下的疫苗载体。

5 11. 根据权利要求 10 的应用, 其中源自螺杆菌的免疫原性物质为螺杆菌的脲酶的 UreB 或 UreA 亚基。

12. 根据权利要求 10 的应用, 其中源自螺杆菌的免疫原性物质为包含有编码螺杆菌脲酶的 UreB 或 UreA 亚基的一段序列的 DNA 分子或疫苗载体。

10 13. 根据权利要求 10、11 或 12 的应用, 其中免疫原性物质源自 *Helicobacter pylori*。

14. 根据权利要求 5 到 13 中之一的应用, 其中药用组合物是被用于通过严格内吸收途径施用的。

15 15. 根据权利要求 5 到 14 中之一的应用, 其中药用组合物是被用于通过选自皮下途径, 肌肉内途径和皮内途径中之一的内吸收途径施用的。

16. 根据权利要求 5 到 14 中之一的应用, 其中的药用组合物是被通过粘膜途径施用, 接着通过非肠道途径施用。

20 17. 根据权利要求 16 的应用, 其中的药用组合物是被用于通过非肠道途径, 接着通过粘膜途径, 接着通过非肠道途径, 接着通过粘膜途径施用的。

18. 根据权利要求 5 到 17 中之一的应用, 其中的药用组合物是被用于施用在上述哺乳动物的腰部背侧的。

25 19. 根据权利要求 5 到 18 中之一的应用, 其中药用组合物是被用于在同一疗程中通过内吸收途径施用两次或三次, 以防止或治疗螺杆菌感染。

20. 根据权利要求 5 到 18 中之一的应用, 其中免疫原性物质选自灭活的螺杆菌细菌, 螺杆菌细胞裂解物, 源自螺杆菌的纯化的多肽并且和至少一种能促进诱导 Th1 - 型免疫应答的复合物联用。

30 21. 根据权利要求 20 的应用, 其中能促进诱导 Th1 - 型免疫应答的

复合物选自脂质体, 微球, QS-21, DC-chol 和 Bay R1005.

22. 根据权利要求 20 的应用, 其中能够促进 Th1-型免疫应答的诱导的化合物选自 QS-21, DC-chol 和 Bay R1005.

23. 根据权利要求 22 的应用, 其中免疫原性物质和至少两种能促进诱导 Th1-型免疫应答的诱导的复合物联用, 第一种复合物选自脂质体, 微球, 第二种复合物选自 QS-21, DC-chol 和它们的对等物.

24. 根据权利要求 20 的应用, 其中的免疫原性物质是肽或多肽, 它们通过共价键连接到至少一种能促进诱导 Th1-型免疫应答的脂, 从而形成脂肽或含脂的多肽缀合物.

25. 用于防止或治疗哺乳动物螺杆菌感染的方法, 上述方法依次包括以下步骤:

在对上述哺乳动物粘膜施用源自螺杆菌的免疫原性物质; 然后对上述哺乳动物非肠道施用上述源自螺杆菌的免疫原性物质.

26. 权利要求 25 中的方法, 其中粘膜施用进行一次以上.

27. 权利要求 25 中的方法, 其中非肠道施用进行一次以上.

28. 权利要求 25 中的方法, 其中进行粘膜施用是用于激发针对上述源自螺杆菌的免疫原性物质的免疫应答, 进行非肠道施用是用于加强针对上述源自螺杆菌的免疫原性物质的.

29. 权利要求 25 或 28 中的方法, 其中的粘膜施用是口腔施用 (oral administration).

30. 权利要求 25 或 28 中的方法, 其中的非肠道施用是肌肉内施用或皮下施用.

31. 权利要求 25 中的方法, 其中源自螺杆菌的免疫原性物质选自灭活螺杆菌细菌制备物, 螺杆菌细胞裂解物, 肽, 源自螺杆菌的纯化的多肽, 包含有编码源自螺杆菌的肽或多肽的一段序列并且处于对其表达必需的元素的控制之下的 DNA 分子, 和包含有编码源自螺杆菌的肽或多肽的一段序列并且处于对其表达必需的元素的控制之下疫苗载体.

32. 权利要求 31 中的方法, 其中源自螺杆菌的免疫原性物质为螺杆菌脲酶的 UreB 或 UreA 亚基.

33. 权利要求 31 中的方法, 其中源自螺杆菌的免疫原性物质是包

含编码螺杆菌脲酶的 UreB 或 UreA 亚基的序列的 DNA 分子或疫苗载体。

34. 权利要求 31、32 或 33 中的方法，其中免疫原性物质是源自 *Helicobacter pylori* 的。

5 35. 权利要求 25 中的方法，其中粘膜佐剂选自 *Escherichia coli* 热不稳定肠毒素 (LT)，霍乱毒素 (CT)，*Clostridium difficile* 毒素，百日咳毒素 (PT) 以及它们的复合物，亚基，类毒素，源自它们的突变体，上述佐剂与粘膜施用免疫原性物质共同施用。

10 36. 权利要求 25 中的方法，其中的非肠道佐剂选自由矾，QS-21，DC-chol 和 Bay 组成的一组佐剂，上述佐剂与非肠道施用的免疫原性物质共同施用。

说明书

通过膈下内吸收途径使用的抗螺杆菌疫苗
组合物，以及粘膜/非肠道联用免疫方法

- 5 本发明的目的是使用疫苗制备物在哺乳动物中特效诱导针对感染
粘膜的病原有机体保护性免疫反应，具体地说是螺杆菌属
(*Helicobacter*) 细菌。

螺杆菌是细菌的一个属，其特征为革兰氏染色阴性的螺旋状细
菌。其中几个种位于哺乳动物的胃肠道。其中尤其值得一提的是幽门螺
10 杆菌 (*H. pylori*)，*H. heilmanii*，*H. felis* 和鼬鼠螺杆菌 (*H. mustelae*)。
H. pylori 是最经常与人类的感染相关的，但在一些罕见的病例中也可能
分离到 *H. heilmanii* 和 *H. felis*。螺杆菌类型的一种细菌，*Gastrospirillum*
hominis 在人类中也有报道。

螺杆菌对成年人口的感染率在发达国家为 50%，而在发展中国家
15 接近 100%。这表明其为全世界范围的主要感染源。

目前为止，在人类中仅在腹部的粘膜表面，特别是在十二指肠溃
瘍和胃部的火山型伤口附近，发现 *H. pylori*。这种细菌被认为是窦胃炎
(*antral gastritis*) 的原初致病因子并且是发展的溃疡所需的辅助因子
之一。并且，胃癌的发生可能和 *H. pylori* 的作用相关。

20 因此发展防止或治疗螺杆菌感染的疫苗是非常合乎需要的。

目前，几种螺杆菌的蛋白已被提出做为疫苗抗原的候选。并且通
常建议使用的接种疫苗的方法包括将抗原送达胃粘膜水平，即免疫应答
发生的预期位点，为了达到这些目的，选择了口腔(*oral*)的方式。

同样为了这一目的，即在胃部水平上引导免疫应答，最近提出将
25 抗原送达胃粘膜以外的粘膜，如鼻腔或直肠粘膜，的粘膜位点，例子见
(WO 96/31235)。淋巴细胞被所谓的诱导粘膜区的抗原激活后能选择
性地迁移和循环以到达所谓的效应粘膜区产生免疫应答。

这些方法的变例包括在通过鼻腔途径施用抗原之前通过内吸收途
径进行第一次免疫。

30 对于通过粘膜途径施用的抗原（经常为细菌裂解物或纯化的蛋
白）常常和适当的佐剂如霍乱毒素 (CT) 或来自 *E. coli* 的热不稳定毒
素 (LT) 联用。

当使用粘膜途径时，观察到的体液与应答的类型主要为 IgA 型。这事实表明发生了区域免疫应答。

一些作者很早就考虑过，在保护性效果和强 IgA 型应答之间有很好的相关性 (Czinn *et. al.* Vacinne (1993) 11: 637)。其他人给出了更保守的意见 (Bogstedt *et. al.*, Clin. Exp. Immunol. (1996) 105: 202)。尽管目前为止这一问题还没有真正的定论，对于大多数作者而言诱导特定的 IgA 型抗体似乎是合乎需要的。

通常而言，IgA 的产生意味着 II 型 T 辅助淋巴细胞产生应答 (Th2 应答)。

事实上，一种特定抗原对 T 辅助淋巴细胞的激活可能得到不同亚群的 T 辅助细胞，这些亚群的特征是不同的细胞因子合成类型。

具体而言，Th1 细胞选择性地产生白介素 - 2 (IL - 2) 和干扰素 - γ (TFN - γ)，而 Th2 细胞优先分泌 IL - 4, IL - 5 和 IL - 10。由于它们在产生细胞因子上的分化，这两种类型的 T 辅助细胞扮演两种不同的角色：Th1 细胞促进细胞介导的免疫，如炎症类型的应答；而 Th2 细胞促进 IgA, IgE 和一些 IgG 亚型类型的应答。已知由小鼠 Th1 细胞产生的细胞因子能促进抗体应答，具体地说，IFN - γ 诱导 IgG2a 应答。这样，根据先前技术中的各种研究来看，特征为 IgA 的出现的 Th2 应答对于保护效应如果不是充分的也是必要的。

让人惊奇的是，现在发现 Th2 应答纵然是无害的，还必需诱导高效的 Th1 应答。事实上，现在实验结果表明 Th1 应答比 Th2 应答更易于与保护效应相关。

与最初的探索相反 (D'Elios *et al.*, J. Immunol. (1997) 158: 962)，本申请揭示在免疫时间内诱导炎症型的 Th1 应答的重要性，没有它则不能观察到保护效应。

因此，本发明的目的是：

(i) 衍生于感染哺乳动物的胃十二指肠粘膜的微生物，如从螺杆菌的免疫原性物质在生产用于诱导抗上述微生物，如螺杆菌的 Th1 - 型免疫应答的药用组合物中的应用，这种组合物用以治疗或防止哺乳动物中的感染，如螺杆菌感染；

(ii) 一种方法，该方法用于治疗或防止由有能力感染哺乳动物胃十二指肠粘膜的微生物促进的感染，如螺杆菌的感染。根据这种方法对

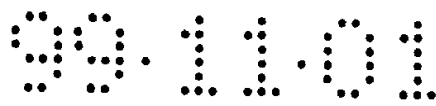
哺乳动物一次或多次施用来源于上述微生物,如来源于螺杆菌的免疫原性物质,从而诱导抗,例如,螺杆菌的免疫应答。

通过比较,例如,在鼠中诱导出的抗螺杆菌的 IgG2a 和 IgG1 的水平(分别为 Th1 应答和 Th2 应答发生的指示)可估计 Th1 应答相对 Th2 应答的水平,从而可为本发明的目的示明有效的 Th1 应答的诱导。事实上,所探索的 Th1 应答通常伴随着 Th2 应答。但是,通常认为相对于 Th1 应答而言 Th2 应答不会明显占主要地位。假如检测 IgG2a 和 IgG1 两种亚型的手段具有相同的敏感性,具体而言,抗 IgG2a 和抗 IgG1 抗体具有相同的敏感性,在小鼠中诱导 IgG2a 和 IgG1 的水平可传统地使用 ELISA 检测。

具体用于测试 IgG2a 和 IgG1 的量的方法与以下描述的不同或相似。聚碳酸酯的 ELISA 板的孔用 100 μ l 螺杆菌,如 *H. pylori*, 的细菌抽提物(约 10 μ g/ml,溶于碳酸缓冲液)包被。ELISA 板在 37 $^{\circ}$ C 温育 2hrs 然后 4 $^{\circ}$ C 过夜。用含 0.05% Tween 20 的缓冲液(PBS/Tween 缓冲液)洗板。每孔用 250 μ l 含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 饱和,以防止抗体的非特异性吸附。在 37 $^{\circ}$ C 温育 1hrs 后,用 PBS/Tween 缓冲液洗板。在小鼠施用诱导抗螺杆菌 Th1 型免疫应答的组分后数天从小鼠采集血清,用 PBS/Tween 缓冲液稀释成浓度序列。每孔加入 100 μ l 稀释液。板在 37 $^{\circ}$ C 保温 90 分钟,洗板,然后按照标准程序测量。例如,用氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG2a 或 IgG1 抗体。加入此抗体后在 37 $^{\circ}$ C 继续温育 90 分钟。洗板后加入适当的底物反应,如标记酶为过氧化物酶时底物为 O-双盐酸苯二胺(O-phenyl-diamine dihydrochloride)。反应通过测定分光光度法吸收的比色法测量。抗血清的 IgG2a 滴定度或 IgG1 滴定度相当于在 490nm 的光吸收为 1.5 时的样品的稀释倍数。

为本发明的目的诱导有效 Th1 应答的标志为小鼠中 IgG2a : IgG1 的 ELISA 滴定度比大于 1/100, 1/50 或 1/20, 最好是大于 1/10, 优选地大于 1/3, 最优选地大于 1/2, 5 或 10。当该比率为 1 左右时, Th1/Th2 应答被认为是混合的或平衡的。当该比率等于或大于 5, Th1 应答被认为是占优势的。

在小鼠中产生 Th1 (或 Th2) 应答是对在人中产生 Th1 (或 Th2) 应答的预测。尽管在小鼠中测量应答类型会更容易一些,在人中也是可以做到的。这可以通过一方面测量 Th1 应答特异的细胞因子的水平,



另一方面测量对随后诱导的 Th2 应答特异的细胞因子的水平。Th1 应答和 Th2 应答相对彼此的水平可以在对两种应答特异的细胞因子水平的基础上（见上文）比如，在 IFN- γ /IL-4 比率的基础上直接测量。

5 作为替代，如果使用了上文描述的测试方法，可以预计反应 IgG2a 的量 ELISA 滴定度应大于或等于 10,000，优选地等于或大于 100,000，特别优选地，应等于或大于 1,000,000；这意味着 Th1 应答很明显。

药用组合物或该方法所针对的哺乳动物最好是灵长类，优选地为人类。

10 通过调整一系列因素，如，施用的途径，可以诱导抗螺杆菌的 Th1 应答。事实表明，使用内吸收途径或非肠道途径可以得到与使用粘膜途径时相似的或更强的保护作用。

相应地，本发明的目的具体地为：

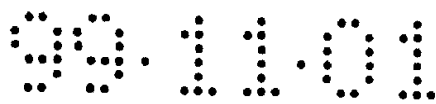
15 (i) 衍生于螺杆菌的免疫原性物质在药用组合物制备中的应用，该药用组合物用于在哺乳动物，尤其是灵长类动物，中的膈下的一部分通过内吸收途径或非肠道途径施用该药用组合物，从而治疗或防止螺杆菌感染。

(ii) 用于在哺乳动物中防止或治疗螺杆菌感染的一种方法，根据该方法，在上述哺乳动物中通过内吸收途径或非肠道途径一次或多次施用至少一种免疫原性物质。

20 与该方法相关，为了诱导所需的免疫应答，免疫原性物质通过内吸收途径或非肠道途径的施用最好重复一次或几次，优选地，至少两次与该方法相关，得到保护效果的一种优选方法具体而言是这样的，根据它免疫原性物质是完全通过内吸收途径或非肠道途径（严格内吸收途径）施用的。“一种免疫原性物质的施用是通过严格内吸收途径进行的方法”是这样定义的：一种不使用内吸收途径以外的施用途径的方法。25 比如，通过内吸收途径和粘膜途径施用免疫原性物质的方法就与以上给出的定义不符合。换言之，“一种免疫原性物质的施用是通过严格内吸收途径进行的方法”应理解为该方法的免疫原性物质的施用只通过内吸收途径，并排除使用任何其它途径，尤其是粘膜途径。

30 依然与该方法相关，通过内吸收途径或非肠道途径施用有利地是在哺乳动物的膈膜以下的部分进行的。

源自螺杆菌的免疫源性制剂最好选自灭活的螺杆菌细菌，螺杆菌



的细胞裂解物或纯化后的源自螺杆菌的肽或多肽制备物。免疫原性物质也可以是多聚核苷酸分子，尤其是一个编码源自螺杆菌的肽或多肽，并且该 DNA 被置于对它在哺乳动物细胞中表达所必须的元件的控制之中；或者替代地，另一包括编码源自螺杆菌的肽或多肽的病毒疫苗载体，并且该载体处于对它在哺乳动物细胞中表达所必须的元件的控制之中。

为了本发明的目的，可以根据精通本工艺的人士所熟知的传统方法制备灭活细菌。细胞裂解物的制备也是类似的适合于预防目的或治疗目的的灭活细菌或细胞裂解物的剂量可由精通本工艺的人士确定并且依赖于几个因素，如疫苗的具体对象，如具体对象的年龄，抗原自身特性，施用的途径与方式，是否使用佐剂以及佐剂的类型等等，这些因素可由精通本工艺的人士确定。通常而言，适当的剂量为约 50 μ g 至约 1mg 裂解物。

源自螺杆菌的肽或多肽可纯化自螺杆菌或者通过遗传工程的方法得到或者替代地通过化学合成的方法得到。对于肽而言后一过程是有利的。“肽”是少于 50 个氨基酸左右的任何氨基酸链。更大时使用术语“多肽”，“多肽”与术语“蛋白质”可以互换使用。对本发明的目的有用的肽或多肽可与天然状态中存在的相同或相似。它的相似性在于它能诱导同一类型的免疫应答，但它包括某些结构变化，比如，突变，加入脂性质的残基或者，作为替代，它可以是一融合形式的多肽或肽。

对预防目的或治疗目的合适的肽或多肽的剂量可由精通本工艺的人士确定并且依赖于一些因素，如疫苗的施用具体对象，如具体对象的年龄，抗原本身的特征，施用的方式和途径，使用或不使用佐剂以及佐剂的类型，这些因素可由精通本工艺的人士确定。通常而言，合适的剂量为 10 μ g 至 1mg，优选地为 100 μ g。

DNA 分子最好为不能复制并且基本上不能整合到哺乳动物基因组中的质粒。上述的编码序列被置于使其能在哺乳动物细胞中表达的启动子的控制之中。这种启动子可以是普适性的或者是对一种组织特异的。在普适性病毒中值得一提的巨细胞病毒早期启动子(在 US. Patent. no. 4, 168, 068 中有描述)和劳氏肉瘤病毒启动子(Norton 和 Coftin 在 Molec. Cell. Biol. (1985) 5: 281 中有描述)。桥粒蛋白启动子(Liet al. Gene (1989) 78: 244443; Li & Paulin, J. Biol. Chem. (1993) 268: 10403)

是一种选择性启动子，可在肌细胞中和皮肤细胞中表达。对肌肉细胞特异的启动子可为，如，肌球蛋白基因或肌营养不良蛋白基因的启动子。可用于本发明目的的质粒载体在 WO 94/21797 和 Hartikka et. al Human Gene Therapy (1996) 7:1205 中有所描述。

5 用于本发明的目的的一种有用的药用组合物，核苷酸分子，比如，DNA 分子，可以按配方或其它方法配制。配方的选择可以有很大的变化。上述 DNA 可以简单地用带载体或不带载体的生理上可接受的溶液稀释。当使用后者时，上述溶液可以是等渗的或为高渗的，并可具有低离子强度，比如，这些条件可由蔗糖溶液，如 20% 的蔗糖溶液来满足。

10 作为替代，多聚核苷酸可以和促进进入细胞的试剂联用。这可以是 (i) 改变细胞通透性的化学试剂如 bupivacaine (见 WO 94/16737)，或 (ii) 与多聚核苷酸结合并作为载体促进多聚核苷酸的运输的试剂如多聚赖氨酸或多胺，如精胺的衍生物如亚精胺 (见 WO 93/18759)。也可以是融合肽，如 GALA 或短杆菌肽 S (见 WO 93/19768) 或者替代地，
15 源自病毒融合蛋白的肽。

这也可以是阴离子脂类或阳离子脂类。很长时间以来就已知阴离子脂类或中性脂类可以用作运输物质，比如，以脂质体的形式，运送大量复合物，包括多聚核苷酸。对这些脂质体，它们的成分以及制备它们的过程可以在，如 Liposomes: A Practical Approach, RPS NEW
20 Ed. IRL Press (1990) 这本书中找到。

阳离子脂类也已知可用于并被广泛用于多聚核苷酸的运送。值得一提的例子是 Lipofectin™，也称为 DOTMA (氯化 N-[1-(2,3-双油氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氨，N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride)，DOTAP (1,2-双(油氧基)-3-(三甲基-铵)丙烷，1,2-bis(oleyloxy)-3-(trimethyl-ammonio propane)，DDAB (溴化二甲基双十八烷基铵，dimethyldioctadecylammonium bromide)，DOGS (双十八烷基氨基甘氨酸基精胺，dioctadecylamidoglycyl spermine)，和胆固醇衍生物，如 DC-胆 (3-β-(N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨甲酰基)胆甾醇 (DC-chol (3-beta-(N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl) cholesterol)。对这些脂类的描述可见 EP 187,703, WO
30 90/11092, U. S. Patent No. 5,527,928。阳离子脂类优选地和中性脂类

如 DOPE (双油酰磷脂乙醇胺, dioleoylphosphatidylethanolamine), 如, WO 90/11092 中所描述。

5 金微粒或钨钢微粒也可作为运送剂, 如 WO 91/359, WO 93/17706 中所描述和如 Tang, et, al., Nature (1992) 356: 152 中所描述。这些具体的例子中, 多聚核苷酸在氯化钙和精胺存在的情况下被沉淀到微粒上。然后使用无针设备通过高速气流打入皮肤中或表皮中, 如 U. S. Patent Nos. 4, 945, 050 和 5, 015, 580 以及 WO 94/24243 中所描述。

10 使用于接种一具体对象的 DNA 的量依赖于一些因素, 如, 用于表达抗原的启动子的强度, 表达产物的免疫原性, 作为施用对象的哺乳动物的状态 (如体重, 年龄, 和大体的健康状况), 施用的方式, 配方的类型等。具体情况表明通过肌肉内途径施用比通过使用无针设备以及内途径需要更大量的 DNA。通常而言, 在人类成人中用于预防目的或治疗目的的合适剂量为从约 1 μ g 到 5mg, 优选地从约 10 μ g 到约 1mg, 更优选地为从 25 μ g 到约 500 μ g。

15 上述的免疫原性物质中包括病毒载体。具体而言腺病毒和原病毒也包括在源自病毒的载体中, US. Paten No. 4, 920, 209 描述了一种源自腺病毒的载体的例子以及一种构建能用表达编码对本发明的目的有用的肽或多肽的 DNA 分子的载体的方法。可用于相似用途的原病毒为, 如, 牛痘病毒以及黄雀菌素原病毒 (canarypox virus)。它们分
20 别在 U. S. Patenets Nos. 4, 722, 848 和 5, 364, 773 中有所描述 (也见, 如, Tartaglia et. al. Virology (1992) 188: 217 和 Taylor et, al. Vaccine (1995) 13: 539)。能表达对本发明的目的有用的肽或多肽的原病毒可通过同源重组得到, 如 Kieny et. al. Nature (1984) 312: 163 中所描述, 这样使编码肽或多肽的片段被置于适于其在哺乳动物中表达的条件
25 下。也可用细菌载体如胆汁的 Calmette - Guerin 杆菌。

通常而言, 用于预防或治疗目的病毒载体的剂量为约 1×10^4 至约 1×10^{11} , 有利地从约 1×10^7 至约 10×10^{10} , 优选地从约 1×10^7 至约 1×10^9 噬斑形成单位每千克。

30 源自螺杆菌的免疫原性物质可以是任何源自螺杆菌如 *H. pylori* 的多肽。具体而言, 这可以是位于胞质中的多肽, 内膜或外膜的多肽, 或分泌到外部基质的多肽。多种源自螺杆菌的多肽在文献中已有描述, 或者是关于从克隆的或鉴定的基因中推测出的氨基酸序列, 或者是关于从

天然环境中分离的纯化步骤。作为指南，以下文献尤其值得一提：WO 94/26901 和 96/34624 (HspA)，WO 94/09023 (cagA)，WO 96/38475 (HpaA)，WO 93/181150(细胞毒素)，WO 95/27506 和 Hazell et al., J. Gen. Microbiol. (1991) 137: 57 (过氧化氢酶)，FR 2 724 936 (人乳铁蛋白的膜受体)，WO 96/41880 (AlpA)，EP 752 473 (FibA) 和 O'Toole et al., J. Bact. (1991) 173: 505 (TsaA)。其它多肽在 WO 96/40893, WO 96/33274, WO 96/25430 和 WO 96/33220 中也有描述。在能促进抗螺杆菌的免疫应答上，对本发明的目的有用的多肽和这里作为参考文献引用的之一相同或相似。为了满足最后的条件，免疫原性物质也可以是源自作为参考文献引用的多肽的一段肽段。

最好使用螺杆菌脲酶的 UreA 或 UreB 亚基中的一个多肽 (WO 90/4030)。优选地，两者都被使用，可以是以结合成脱辅基脲酶的形式或者替代地以多聚体形式 (见 WO 96/33732)。

类似地，用于本发明目的的疫苗载体或 DNA 分子包括能编码以上描述的任何多肽或肽的序列。

DNA 分子，优选地病毒疫苗载体，也可以在适于在哺乳动物细胞中表达的元件的控制下包括编码细胞因子如淋巴因子，例如白介素-2 或白介素-12 的一段序列。作为这种选择的一种替代方式也包括在包含-DNA 分子或载体的对本发明的目的有用的药用组合物中加入另一分子，或加入编码细胞因子的载体。

对本发明的目的有用的药用组合物可包含单一的免疫原性物质或几种免疫原性物质。比如，一种有利的组分可包括 UreA 和 UreB，(比如，以脱辅基酶的形式)，并同时包括选自以上提及的一种或多种其它多肽。类似地，当涉及一种 DNA 分子或一种疫苗载体时，上述组分可包含几种，每种编码一特定的多肽，或者包含编码几种肽或多肽的单一的 DNA 分子或疫苗载体。

并且，对本发明的目的有用的药用组合物可以含有免疫原性物质自身以外的复合物，这些复合物的性质在一定程度上决定于免疫原性物质，灭活细菌，细胞裂解物，肽，或多肽，DNA 分子或疫苗载体的性质。这样，如上所述，当涉及 DNA 分子时，药用组合物也可包括各种配伍物质。通过内吸收途径或非肠道途径施用，药用组合物还可包括恰当的佐剂，例如，铝化合物，如氢氧化铝，磷酸铝，羟基磷酸铝。通

常，失活的细菌不需要佐剂。对 DNA 分子也是这样的。另一方面，当免疫原性物质是细菌裂解物或纯化的肽或多肽时，佐剂的存在是优选的。最后，当免疫原性物质为疫苗载体时，最好避免使用佐剂以使针对载体本身的免疫应答保持最小。

5 除了铝化合物以外，在本工艺中还存在大量适用于通过内吸收途径或非肠道途径施用的佐剂，精通本工艺的人士可以从中选择最适于他们需要的佐剂，特别是可以促进 Th1 应答或 Th1 + Th2 型平衡应答的复合物。作为指南，尤其值得一提的是脂质体，ISCOMS，微球，蛋白
chochleates，由非离子表面活性剂组成的微团，阳离子两亲性在分散
10 物，油/水乳剂，胞壁酰二肽（MDP）当其衍生物如葡萄糖基胞壁酰二肽（GMDP），苏氨酸基 - MDP，murametide 和胞壁棕榈酸甘油酯，以及 QuilA 和其亚组分，以及各种其它化合物如单磷酸 - 脂 A（MPLA），细胞如 *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* 或 *Shigella flexneri*, 的胞壁的主要脂多糖；gamma - 葡淀粉，calcitriol,
15 loxoribine。

对本发明的目的有用的脂质体可特别从对 pH 敏感的脂质体中选出，如由混合胆固醇半琥珀酸酯（CHEMS）以及二油酰磷脂酰乙醇胺（DOPE）形成的脂质体；含有以融合性著称的阳离子脂类如 3 - β （N - （N, N' - 二甲基氨基乙烷）羧甲酰基）胆固醇（DC - chol）及其类
20 似物（在 U. S. Patent No 5, 283, 185 和 WO 96/14831 中有所描述），溴化二甲基双十八烷基铵（DDAB）和 EP 91645 及 EP 206031 中描述的 BAY，例如 Bay R1005（N - （2 - 脱氧 - 2 - L - 亮氨酸基 - β - D - 吡喃型葡萄糖基） - N - 8 - 癸基十二烷基胺醋酸酯等的脂质体；以及含有 MTP - PE，MDP（muramidyl dipeptide）的亲脂性衍生物的脂质体。
25 这些脂质体可用作佐剂加入到引用的所有的免疫原性物质中。

对本发明的目的有用的 ESCOMS 可具体选自这些复合物：QuilA 或 QS - 21 结合使用的胆固醇以及，供选地，结合使用如磷脂酰胆碱这样的磷脂。这些对于配制含脂的抗原是尤为有利的。

对本发明的目的有用的微球具体地可由如 polylactide - co -
30 glycolide（PLAGA），藻酸盐，脱乙酰壳多糖，polyphosphazene 以及许多其它多聚物形成。

对本发明的目的有用的 protein chochleates 可选自具体由胆固醇

以及，供选地，磷脂如磷脂酰胆碱形成的。这些对于配制含脂的抗原尤其有利。

对本发明的目的有用的由非离子表面活性剂组成的微团可具体由 1-单-棕榈酰基-甘油，胆固醇，和 dicetylphosphate 混合物形成，它们是传统脂质体的替代物并可用于配制所有引用的免疫原性物质。

对本发明的目的有用的油/水乳剂可具体选自 MF59 (Biocine - Chiron)，SAF1 (Syntex) 和 montanides ISA51 和 ISA720 (Seppic)。

对本发明的目的有用的佐剂可以是源自南美洲的树 *Quillaja Saponaria Molena* 的树皮的一个组分；例如一种通过 HPLC 色谱纯化得到的一个组分，QS-21，如 US. Patent No. 5,057,540 中所描述。由于 QS-21 可能具有一些毒性，将其与脂质，尤其是基于固醇的脂质体，一起使用也许是有利的，如 WO 96/33739 中所描述。

最后，佐剂效果也可通过在本发明的目的有用的肽或多肽中加入脂类而得到。这样的肽或多肽通过共价键和能促进诱导 Th1-型免疫应答的脂或含脂化合物连接以形成含脂的脂肽或多肽缀合物，这可以通过精通本工艺的人士所熟知的几种方法达到。例如，可以使用 EP 431 327 中描述的化合物如 N-棕榈酰基-S-2,3-(二棕榈酰基氧基)丙基牛胱氨酰丝氨酰基丝氨酸) (N-palmitoyl-S-2,3-

(bispalmitoyoxyl) propylcysteinylseryl serine (Pam₃CSS))，它通过已知的方式与肽或多肽的 N-末端结合。

根据本发明的方法或应用的治疗或预防效果可以根据标准方法评定，例如通过测量免疫应答的诱导或测量治疗性免疫或保护性免疫的测量。上述测量可以通过，例如，鼠/*H. felis* 模型以及 Lee et al., Eur. J. Gastroenterology & Hepatology (1995) 7: 303 或 Lee et al., J. Infect. Dis. (1995) 172: 161 中描述的程序进行。精通本工艺的人士将意识到在鼠模型中 *H. felis* 可由另一螺杆菌的种替代。比如，源自 *H. pylori* 的免疫原性物质的效果最好使用适用于鼠的 *H. pylori* 菌株。效果可通过与对照组比较胃部组织的感染程度(通过测量脲酶活性，细菌量或者胃炎的状况)而确定。与对照组相比感染减轻时则治疗效果或保护效果存在。

对本发明的目的有用的药用组合物可通过传统方式制造。具体而言，其可以用可药用的稀释液或载体配制，例如用水或盐溶液。通常而

言，可以根据施用的方式与路径以及根据药疗实践选用稀释液或载体。这在此领域的一本标准参考书，Remington's Pharmaceutical Sciences, 中有描述。

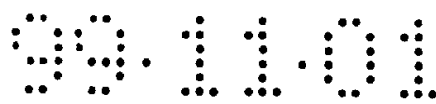
5 根据本发明的方法以及对此目的有用的组分可用于治疗或预防，i. a., 螺杆菌的感染并从而治疗或防止和这些感染相关的胃十二指肠疾病，包括急性，慢性或萎缩性胃炎，以及消化性溃疡，例如胃或十二指肠溃疡。

10 使用的内吸收途径可以是非肠道途径，可以选用静脉内途径，肌肉内途径，皮内途径或表皮内途径以及皮下途径；然而后四种途径比静脉内途径更受欢迎。特别建议使用肌肉内途径和皮下途径。在所有的情况下，对药用组合物的使用可在位于一个个体的膈下的施用位点进行。例如腰部背侧即为一个适合的施用位点。

15 为了得到保护效果或治疗效果，由施用，例如，通过膈下内吸收途径，对本发明的目的有用的药用组合物组成的施用操作可重复一次或几次，在每次施用之间保留一定的时间间隔；时间间隔的范围在一周或一个月。对时间间隔的精确确定是在精通本工艺的人士的能力之内并根据各种因素，如免疫原性物质的特性，具体对象的年龄等等，而变化。在此具体例子中，施用途径是严格内吸收途径类型。通过非限制性说明的方法，这里将提及一种接种方案，它包括在腰部背侧区域通过皮下途
20 径三次施用脱辅基脲酶，每次施用之间的间隔为 2 至 4 个星期。

根据一替代方式，可以设想以严格内吸收施用方式操作，但在构成接种程序的步骤中使用不同的免疫原性物质。通过非限制说明的方法，这里将提及一种严格内吸收途径的接种方案，包括三步：第一次施用（激发）包括施用编码，例如 UreA 或 UreB 的 POX 载体，接着两次连
25 绵施用（促进）脱辅基脲酶。

因此，通常而言，本发明的目标为一种用于治疗或防止螺杆菌感染的药用组合物，其包括连续施用，几种产品，每种产品被配制成适于在膈下内吸收途径施用，并且每种产品包含一种源自螺杆菌的免疫原性物质，上述免疫原性物质分别独立地选自灭活螺杆菌细菌制备物，螺杆菌细胞裂解物，肽纯化形式的来自螺杆菌的多肽，包含编码源自螺杆菌
30 的肽或多肽的序列并置于其表达所必需的元件的控制之下的 DNA 分子。上述药用组合物优选地这样提供：第一个产品包含肽或多肽，第二



个产品包含 DNA 分子或疫苗载体, DNA 分子或疫苗的编码序列编码第一产品中包含的肽或多肽。

最后, 一种替代的接种程序包括几种时间上错开的施用, 例如, 在一个星期或一个月的时间间隔之内 (由精通本工艺的人士决定), 上述程序包括通过膈下内吸收途径的第一次施用以及通过鼻腔内途径之外的粘膜途径的第二次施用, 例如通过眼睛, 口腔。例如, 口腔途径或胃途径或肺途径或肠途径或直肠途径或阴道途径或尿道途径。通过非限制性说明的方法, 这里将提及一种接种程序, 它包括通过膈下内吸收途径施用 DNA 分子或疫苗载体, 然后通过胃途径施用多肽。上述 DNA 分子或疫苗载体优选地编码通过胃途径施用的多肽。

因此, 通常而言本发明的目标为一种用于治疗或防止螺杆菌感染的药用组合物, 它包含用于连续施用的几种产品, 其中一种产品被配制或适于通过膈下内吸收途径施用, 另一种产品被配制或适于通过鼻腔内途径以外的途径施用。每一种产品含有一种源自螺杆菌的免疫原性物质, 上述免疫原性物质分别独立地选自灭活螺杆菌细菌制备物, 螺杆菌细胞裂解物, 肽, 纯化形式的来自螺杆菌的多肽, 包含编码源自螺杆菌的肽或多肽的序列并置于其表达所必需的元件的控制之下的 DNA 分子, 以及包含编码源自螺杆菌的肽或多肽的序列并且置于其表达所必需的元件的控制之下的疫苗载体。上述药用组合物优选地这样提供: 第一个产品包含肽或多肽, 第二个产品包含 DNA 分子或疫苗载体, DNA 分子或疫苗载体的编码序列编码第一种产品中的肽或多肽。

用于通过粘膜途径施用的疫苗载体可以选自以上描述的那些。并且, 可以选自细菌载体如 *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus* 和 *Streptococcus*。

可用作活疫苗载体的 *Vibrio cholerae* 的无毒突变株在, 例如, Mekalanos et al. Nature (1983) 306: 551 和 U. S. Patent. No. 4, 882, 278 中 (突变株中编码两个等位基因 *ctxA* 的大部分区域已被缺失, 从而不能产生有功能的毒素), 和 WO 94/1533 (通过缺失得到的缺少有功能的 *ctxA* 和 *attRS1* 序列的突变) 中有所描述。如 WO 94/19482 中所描述, 这些菌株可通过遗传工程改造表达外源抗原。

遗传工程改造或其它改造的用于重组表达外源抗原的 *Salmonella typhimurium* 的减毒菌株以及它们作为疫苗的应用在 Nakayama et. al.,

BioTechnology (1988) 6: 693 和 WO 92/11361 中有所描述。

其它用作疫苗载体的细菌在 High et al. EMBO (1992) 11: 1991 和 Sizemore et al., Science (1995) 270: 299 (*Shigella* & *flexneri*); Medaglini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1995) 92: 6868
5 (*Streptococcus gordonii*); 和 Flynn J. L. Cell. Mol. Biol. (1994) 40(Suppl. I): 31, WO 88/6626, WO 90/0594, WO 91/13157, WO 92/1796 和 WO 92/21376 (Calmetre - Guerin bacillus) 中有描述。

在细菌载体中, 编码源自螺杆菌的肽或多肽的 DNA 序列可以被插入到细菌基因组中或替代地保持自由状态, 由质粒携带。显然, 该序列
10 被置于对其在细菌载体中表达所必需的元件的控制之下。

这些用于通过粘膜途径施用的细菌载体可和合适的佐剂联用。这样的佐剂可选自细菌毒素, 例如霍乱毒素 (CT), *E. coli* 的热不稳定毒素 (LT), *clostridium difficile* 毒素, 以及百日咳毒素 (PT), 或者是源自这些毒素的复合物, 亚基, 类毒素, 突变型。例如, 可能使用
15 纯化的天然霍乱毒素的 B 亚基 (CTB)。如果这些毒素的片段, 同源物, 衍生物及融合物保留其佐剂活性的话也同样适用。优选地, 选用毒性减小的突变型。这些突变型在, 例如 WO 95/17211 (CT Arg - 7 - Lys 突变), WO 96/6627 (LT Arg - 192 - Gly 突变), 和 WO 95/34333 (PT Arg - 9 - Lys 和 Glu - 129 - Gly 突变) 中有所描述。其它具有以下突变
20 中至少一种的 LT 突变型也可使用: Ser - 63 - Lys, Ala - 69 - Gly, Glu - 110 - Asp 和 Glu - 112 - Asp。

其它化合物, 如 MPLA, PLGA, DC - chol 和 QS - 21 也可在粘膜途径中用作佐剂。

本发明还包括治疗或防止螺杆菌例如 (*H. pylori*) 感染的免疫方
25 法, 涉及粘膜 (例如口腔, 鼻腔内, 胃内, 肺内, 肠内, 直肠内, 眼, 阴道或尿道) 施用, 接着是非肠道 (例如肌肉内, 皮下, 皮内, 粘膜内, 静脉内或腹膜内) 施用。在这些方法的一个例子中, 先进行粘膜施用以激发对一种抗原的免疫应答, 然后进行非肠道施用以加强对该抗原的免疫应答。这些方法的其它例子包括交替使用非肠道施用与粘膜施用。例
30 如, 可以使用以下方式: 肌肉内施用, 胃内加鼻腔内联合施用, 精通本工艺者很容易确定使用的抗原, 配方, 佐剂, 施用方式, 特定的粘膜途径与非肠道途径, 以及剂量。这些方法中调整这些参数以适于应用的具

体例子上文已给出。

在上文的描述中，提及的基本上是螺杆菌感染以及通过阻止和预防的手段与其作斗争的方法。上文所声明的原理和方法在细节上做必要的修正后能被应用到任何其它感染位置为胃，十二指肠或小肠的微生物的感染上。

并且声明，所有在本申请中引用或发表的文件作为参考被结合于其中。

下文参照附图说明本发明。

图 1 与实施例 1 相关，示明对唾液腺中 (Fig1A) 和胃中 (Fig1B) 的局部应答的研究。上述局部应答是通过 ELISPOT 的方法评估的。上述 ELISPOT 方法是指通过皮下途径 (SC) 在腰下左后部 [a 和 c] 或颈部 [b 和 d] 10 天 (一次) 施用豚酶并随后通过鼻腔内途径 (N) 和胃内途径 (IG) 在第 28 天 [a 和 b] 或在第 28 天和第 56 天 [c 和 d] 促进应答之后测量诱导出的抗豚酶 IgA，用斑点数/ 10^6 细胞表示

(Fig1A) 或表现出 2 IgA 斑点/鼠的产生应答的人鼠数表示 (Fig1B)。

图 2 与实施例 1 相关，示明接触致病性感染物后的豚酶活性水平。上述活性是在杀死小鼠 4 小时后测量的。上述小鼠分别在第 0 天第 28 天和第 56 天已通过胃内途径 [(a) 和 (c)] 或腰下左后侧部分皮下途径 (b) 接受过三次灭活细菌。在实验 (c) 中细菌制备物中还加入 10 μ g 霍乱毒素。实验 (d) 和 (e) 分别为阳性与阴性对照。

图 3 相应于实施例 1，示明接受致病性感染物后的豚酶活性水平。上述豚酶活性是在杀死小鼠 4 小时后测量的。上述小鼠分别在第 0 天，第 28 天和第 56 天接受了三次：(a) 包在大约 80% DC-chol 中的豚酶制剂，施用于腰部背侧的肌肉中；或 (b) 含有霍乱毒素佐剂的豚酶制剂，通过胃内途径施用，实验 (c) 与 (d) 分别为阳性与阴性对照。

图 4 相应于实施例 1，示明接触致病性感染物后的豚酶活性水平。上述豚酶活性是在杀死小鼠后 4 小时测量的。上述小鼠分别在第 0 天，第 28 天和第 56 天接受了三次：(a) 含有霍乱毒素佐剂的豚酶制剂，通过胃内途径施用或 (b) 含有 QS-21 佐剂的豚酶制剂，通过腰下左后侧的皮下途径施用。实验 (c) 和 (d) 分别为阳性与阴性对照。

图 5 示明进行实施例 2 中的免疫程序后猴子血清中诱导出的免疫球蛋白的量，用 ELISA 滴定度表示。组成了含有 4 只猴子的一个对照

组以及三个测试组，每个测试组含有 8 只猴子，每个测试组分成为两个含有 4 只猴子的分组，一个分组只接受灭活的 *H. pylori* 制剂（1，2 和 3），另一分组接受灭活的 *H. pylori* 制剂和重组的脲酶（1u，2u 和 3u）。组 1 和组 1u 的施用程序为〔鼻腔加胃内，4 次〕；组 2 和组 2u 的施用程序为〔肌肉内，4 次〕；组 3 和组 3u 相应于施用程序〔鼻腔加胃内；肌肉内；鼻腔加胃内，肌肉内〕。ELISA 滴定度测量三次：第 0 天为第一次（白带），第 42 天第二次（阴影带），第 78 天第三次（黑带）。

图 6A 和 6B 示明 4 小时后用 Jatrox 实验（Procter & Gamble）测量的脲酶活性（Fig6A）以及感染 *H. pylori* 后进行 A-H 治疗的小鼠的细菌载量：〔A: LT 加脲酶，口腔；B: QS-21 加脲酶，颈部非肠道途径；C: QS-21 加脲酶，腰部非肠道途径；D: 单独的 QS-21，腰部区域皮下途径；E: Bay R1005 加脲酶，颈部非肠道途径；F: Bay R1005 加脲酶，腰部区域非肠道途径；G: 单独 Bay R1005，腰部区域皮下途径（对照）；H: 盐，腰部区域皮下途径（阳性对照）〕I 代表阴性对照。

图 7 示明小鼠进行粘膜激发/非肠道加强方案，使用脲酶免疫诱导对 *H. pylori* 致病物感染最有效的保护的结果。小鼠或者口腔 25 μ g 脲酶加 5 μ g LT 或非肠道途径施用含或不含 100 μ g 矾佐剂的 10 μ g 脲酶。如图所示小鼠先口腔施用脲酶加 LT，三个星期后通过非肠道途径或口腔途径施用两次促进剂量。最后一次免疫后两个星期小鼠接触 *H. pylori* 致病物，并在接触两个月后安乐死。尸体剖检时径向切下三分之一的胃，匀浆，并培养 *H. pylori*。

图 8 示明恒河猴与 *H. pylori* 致病物接触时脲酶免疫的效果。猴子通过非肠道途径（100 μ g 脲酶加 1mg 血清或 800 μ g Bay）或通过粘膜引发（口腔 4mg 脲酶加 100 μ g LT）非肠道促进（脲酶加血清）方案免疫。上述第二种免疫方法中前三次每三星期一次并在第一次引发后的第 20 个星期施用第四次。在最后一次促进施用后猴子，与致病感染物接触。接触后十个星期实行安乐死，从每只动物的胃部收集十孔活组织并培养以确定 *H. pylori* 菌落情况。以上每个符号代表每只猴子的 10 只培养的平均 CFU。线代表治疗组的 CFU 中间值。

图 9 示明与 *H. pylori* 致病感染物接触后免疫与未免疫的恒河猴的胃炎值。

猴子三星期后用 4mg 脲酶加 100 μ g LT 口腔激发免疫。第一次激发施用后 20 个星期进行两次非肠道施用。猴子在最后一次促进施用后与致病感染物接触。猴子在接触后 10 个星期实行安乐死，在胃体，窦和胃体的窦连接处取 2cm² 的样品用 10% 的缓冲福尔马林固定，包埋在石蜡中并且用 H & E 染色。通过对染色部分的显微检查给出特征为淋巴细胞，浆细胞和多形核细胞浸润的胃炎的胃炎值。

图 10 示明与 *H. pylori* 致病感染物接触后免疫与非免疫的恒河猴的上皮变化。接触三个星期后猴子用 4mg 脲酶加 100 μ g LT 口腔激发免疫。接着每三个星期一次 100 μ g 脲酶加 1mg 血清共两次。在第一次激发免疫后的 20 个星期施用一次脲酶加矾。10 个星期后猴子安乐死，从胃体，窦，胃体的窦连接处取 2cm² 的样品，用 10% 的缓冲福尔马林固定，石蜡包埋并 H & E 染色。上皮变化，定义为组织变形，萎缩或/和组织增生，可通过对染色样品的显微检查评定，以上的每个符号代表每只猴的三个区域的平均胃炎值。

15

实施例 1: 小鼠中的免疫研究

1A - 材料与方法

小鼠:

6 - 8 星期大的雌鼠由 Janvier (法国) 提供，在整个实验中使用无菌材料；鼠笼用 “isocaps” 保护；小鼠用过滤处理的水与辐射处理的食物喂养。

20

施用程序:

在每个实验中，小鼠接受三次相同的产品；每次间隔 28 天 (0, 28, 56 天)。产品的施用是通过鼻腔途径 (对醒着的老鼠多达 50 μ l)，通过口腔途径 (300 μ l 于 0.2M NaHCO₃ 中，用胃饲管)，或通过皮下途径 (300 μ l，颈部皮下或腰部左侧的皮下)。在一些情况下，未麻醉小鼠的腰部背侧肌肉进行肌肉接种 (50 μ l)。通过鼻腔，皮下或肌肉途径施用 10 μ g 脲酶，或通过口腔途径施用 40 μ g。对于灭活的细菌制备物，通过皮下途径或口腔途径施用 400 μ g 细胞。

30

抗原和佐剂

如 WO 96/31235 中的实施例 5 所描述, *H. pylori* 的脱辅基脲酶可在 *E. coli* 中被表达与纯化。在本文的其余部分, 脱辅基脲酶被简称为脲酶。

灭活的 *H. pylori* 细菌 (WC) 制备物是这样制备的: 一瓶冻存的细菌 ATCC 43579 在 75cm² 的烧瓶 (Costar) 中用两相介质稀释。该介质包含固体成分 (10ml Columbia 琼脂 (BioMerieux 加 6% 绵羊血) (BioMerieux)) 和液体成分 (3ml TSB, BioMerieux)。烧瓶放在含有微需氧菌 (BioMerieux) 的袋子 (generbag) 中, 轻缓摇动 37℃ 温育 48 小时。然后分析培养物 (迁移性, 脲酶, 过氧化氢酶, 氧化酶产物) 并 3,000rpm 4℃ 离心 20 分钟 (或者收集几个烧瓶后再离心)。沉淀重悬浮于含 1% 福尔马林 (37% 福尔马林, Sigma) 的 PBS (BioMerieux) 中。调整体积使终浓度达到 2mg/ml (离心之前在 600nm O.D. 为 1 的 1ml 相当于 377μg 蛋白)。该产物 4℃ 轻轻地混合 4 小时, 用 PBS 洗 3 次, 最终的溶液被浓缩至 100μg 蛋白/50μl。分装后的样品保存于 -70℃。

含有脲酶的 DC-chol 脂质体如下制备。首先, 为了得到一层干的含有 100mg DC-chol (R-Gene Therapeutics) 和 100mg DOPC (二油酰磷脂酰胆碱) (Avanti Polar Lipids) 的膜薄膜, 这些产品以粉状混合后溶于 5ml 氯仿中。溶液用旋转蒸发仪在真空下挥发。这样得到的容器壁上的脂质体至少在高真空度下干燥了 4 个小时。与此平行 20mg 冻干的脲酶和 100mg 蔗糖稀释于 13.33ml 的 20mM Hepes 缓冲液 pH 7.2 中。10ml 这样的溶液 (含 1.5mg 脲酶和 0.75% 蔗糖) 过滤通过 0.22μm 的 Millex 滤器然后用于重新水化脂膜。该悬浮液搅拌 4 小时后挤出 (10 次通过 0.2μm 多聚碳酸酯膜) 或微流化 (microfluidized) (在 500kPa 的压力下 10 次通过 Microfluidics Co Y10 microfluidizer)。这样即可得到脂质体悬液。内包的脲酶为 10% 到 60%。将蔗糖浓度调到 5% 后 (每 10ml 加入 425mg 蔗糖) 将悬液冻干。使用前, 冻干粉用一定体积的水或缓冲液溶解后用不连续蔗糖密度梯度 (0, 30%, 60%) 纯化, 以得到内包的脲酶总脲酶的 70% 以上的制备物。

在粘膜中用作佐剂的霍乱毒素的量为 10μg/剂脲酶或细菌制剂。

用作佐剂的 QS-21 (Cambridge Bioscience; Aquila) 的量为 15μg/

剂脲酶。

攻击

在第二次促进后两个星期，小鼠通过胃饲管加入 300 μ l 适于小鼠的一株 *H. pylori*，菌株 ORV 2002，的悬液（ 1×10^7 活菌悬于 200 μ l PBS；OD₅₅₀ 吸收为 0.5）。没有接受抗原而作为对照的一组也同样被攻击。

对攻击的分析

接触后四个星期，该鼠被拉断颈椎而被杀死。胃部被取出以测量脲酶活性与作组织学分析。脲酶活性在 4 至 24 小时后（OD_{550 nm}）用 Jatrox 实验测试（Procter & Gamble）24 小时后仍为阴性的小鼠被标明。

用 ELISPOT 测量局部抗体应答（唾液腺与胃）

ELISPOT 实验根据 Mega et al. J. Immunol. (1992) 148:2030 进行。酶标板用 50 μ g/ml 的 *H. pylori* 蛋白抽提物包被。

为了检测胃部的抗体应答水平，我们对方法做如下改进：胃的一半用切入组织的自动设备（McIllwain Laboratories, Gilford, UK）切成 1mm² 的小块，然后用中性蛋白酶（2mg/ml, Boehringer Mannheim）消化。上述中性蛋白酶溶于改进的 Joklik 溶液中（加入了 10% 马血清（Gibco），谷氨酰胺和抗生素）。在 37 $^{\circ}$ C 轻轻消化 4 次每次半个小时。这样消化的细胞在每一步之后用 70 μ m 的滤膜（Falcon）过滤，然后用补充了 5% 胎牛血清（FCS）的 RPMI 1640（Gibco）洗 3 次，并在覆盖着硝酸纤维素膜（Millipore）的板上用相同的溶液保温至少 4 个小时（100 μ l 每孔，4 孔），大约每半个胃可得到 1 至 3×10^5 个细胞（体积大的细胞及巨噬细胞不算在内）。

生物素标记的 IgA 和链霉亲和素 - 生物素标记的过氧化物酶复合物来自 Amersham。斑点在加入底物 AEC（Sigma）后显现出来，并且板一干就在显微镜下记数（16 倍或 40 倍放大）。四个孔中的 IgA 斑点的平均值可由此计算出并表示为斑点数/ 10^6 细胞。

ELISA 分析应答

ELISA 分析根据标准程序进行 (生物素标记的偶联物及链霉亲和素 - 过氧化物酶购自 Amersham, OPD (O - phenyl - diamine dihydrochloride) 底物来自 Sigma)。酶标板用溶于碳酸缓冲液的 *H. pylori* 抽提物 (5 μ g/ml) 包埋。在每个实验中使用抗 *H. pylori* 的鼠对照血清。滴度相应于在 490nm 的 OD 值为 1.5 时的稀释倍数之倒数。

1B - 结果

结果由上文所述的图 1 至 4 以及下文的陈述示明:

图 1 示的使用皮下途径时, 如果施用部位为鼠的后部, 即腰后区域, 时, 在唾液腺和胃部的区域应答的结果会提高很多。

在说明图 2 至图 4 之前, 应当注意到, 这些图示明的结果是来自含佐剂的抗原, 并且是通过胃内途径施用的。此实验被称为标准参考实验因为之前工艺中 CT/IG 联用得到的结果是目前最好的。

图 2 比较了不带佐剂的灭活细菌制剂通过胃内途径施用和通过皮下途径施用的结果。它清楚地表明, 在腰下区域通过皮下途径施用时可得到好很多的结果。进而, 通过皮下途径施用后的结果与标准参考实验相同或略好些, 在标准参考实验中与霍乱毒素佐剂联用通过胃内途径施用。

进而, 参照图 2 中的实验 (a) 到 (e) 中豚酶活性的结果。上述结果是在杀死小鼠 4 个小时以后得到。图 2 表明, 在小鼠死后 24 个小时豚酶活性仍然为阴性小鼠数分别为 (a) 0/8, (b) 4/8, (c) 4/8, (d) 0/8, (e) 10/10。这跟前段中的结论一致, 即实验 (b) 的结果与标准参考实验中得到的结果相似。

图 3 表明包入 DC - chol 脂质体的豚酶制剂并通过腰下区域皮下途径施用得到的结果与标准参考实验一样好。

进而, 参照图 3 中的实验 (a) 到 (d) 中豚酶活性的结果。上述结果是在杀死小鼠 4 小时后得到的。图 3 表明在小鼠死后 24 个小时豚酶活性仍为阴性的小鼠数分别为 (a) 5/10, (b) 4/10, (c) 0/10, (d) 10/10。这与前段中的结论是一致的, 即实验 (a) 得到的结果与标准参考实验的结果相似。

图 4 与 QS - 21 佐剂联用的豚酶制剂通过腰下区域皮下途径施用得到的结果与标准参考实验的一样好。

进而，参照图 4 中的实验 (a) 到 (d) 中的脲酶活性的结果。上述结果是在杀死小鼠 4 小时后得到的，图 4 表明在小鼠死后 24 个小时脲酶活性仍为阴性的小鼠数分别为 (a) 1/8, (b) 5/8, (c) 0/8, (d) 10/10。这与前段的结论一致，即实验 (b) 得到的结果与标准参考实验相似。

下表给出了上文的实验中诱导出的 IgA, IgG1 和 IgG2a 的量。上述实验的结果在图 2 到图 4 已经以脲酶活性以及死后 4 到 24 小时内脲酶活性的 OD 小于 0.1 的小鼠数的形式给出。IgA, IgG1 以及 IgG2a 的量用 ELISA 滴定度的方式给出。

	脲酶 CT IG	WC IG	WC CT IG	WC SC	脲酶 DC-chol 脂质体 SC	脲酶 QS - 21 SC
IgA	45	91	107	63	0	1
IgG1	65700	1920	349	1273146	620000	2970399
IgG2a	20200	399	3440	42900	321000	1136095
OD<0.1 4 小时	5/10	0/8	5/8	6/8	5/10	5/8
OD<0.1 24 小时	4/10	0/8	4/8	4/8	5/10	5/8

实施例 2: 猴子中的免疫实验

2A - 材料与方法

猴子

本实验中使用了 28 只 2 岁的猴子 (*Macaca fascicularis*) (Mauritus)。在进行以下的各种免疫程序之前，活组织检查表明它们中大部分都长期感染了类似 *Gastrospirillum hominis* (GHLO) 或 *H. heilmanii* 的微生物。

施用程序

由于几乎所有的这些猴子都感染了 GHLOs 决定测试不同的程序在治疗中的效果。总结如下表

组别	第 0 天	第 21 天	第 42 天	第 63 天
1 和 1u	IN + IG	IN + IG	IN + IG	IN + IG
2 和 2u	IM	IM	IM	IM
3 和 3u	IM	IN + IG	IM	IN + IG

特别指出，肌肉内施用途径是在腰部背侧的肌肉中进行的。

5 抗原和佐剂

由于 GPOLs 与 *H. pylori* 之间有交叉反应，选择单独使用灭活的 *H. pylori* 细菌如实施例 1A 中所述或根据实施例 1A 中所参考的文献制备的重组脲酶联用。

- 10 E. coli 的热不稳定毒素 (LT) (Sigma) 或霍乱毒素的 B 亚基 (CTB) (Pasteur Merieux serums & vaccins) 被用作粘膜途径的佐剂而 DC-chol 被用作非肠道途径的佐剂。DC-chol 粉末简单地用抗原制备物重新水化。

使用的剂量如下表：

途径	微生物	脲酶	DC-chol	LT	CTB
IG	400 μ g	2.5mg	-	25 μ g	-
IN	400 μ g	400 μ g	-	25 μ g	25 μ g
IM	400 μ g	100 μ g	400 μ g	-	-

15

活组织检查，脲酶测试和细菌学/组织学研究：

每只猴在免疫前或免疫后（第三次促进施用后一个月）进行活组织检查。利用活组织检查进行脲酶测试和组织学研究。

- 20 脲酶活性通过 Jatrox 试剂盒 (Procter & Gamble) 测定。活性水性如下文进行估计：第 3 级，粉红色在 10 分钟内出现；第 2 级，粉红色在加入试剂后 10 分钟至 30 分钟之间出现；第 1 级，粉红色在 30 分钟至 4 个小时出现；第 0 级，4 小时后无粉红色或很弱。

组织学研究使用的是福尔马林固定的活组织样品。细菌量这样定量：无细菌 (0)；少量螺杆菌型的细菌 (0.5)；较多细菌 (1)；相

当多细菌（2）；很多细菌（3）。一级之间的区别（比如从1到2）相当于多5倍的细菌。

用 ELISA 测试分析应答

5 ELISA 测试如实施例 1A 中所描述。

2-B 结果

10 下表是关于免疫前后的细菌量，是用两种实验测试的：（i）通过测量脲酶活性和（ii）通过实行组织学研究。与此相关的结果在第3栏至第6栏中示出。最后三栏表明各组（对照组，组1，2或3）在免疫前后细菌量变化的情况（→）表示的是根据两种测试细菌量均不变化的猴子；（↑）和（↓）分别表明在至少一种测试中细菌量减少或增加，而另一种测试显示细菌量不变。当两次测试的结果显示相似的变化时，向上或向下的箭头为两个。

15

20

25

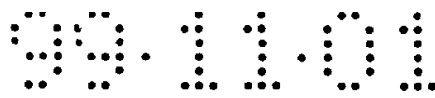
猴子	组别	脲酶活性		组织学		变化		
		免疫前	免疫后	免疫前	免疫后	↓	↑	↓
H282	C	2-2	3-2	2	3-2			
J005	C	2-2	2-1	2	1-0	1/4	1/4	2/4
J852	C	0-0	2-0	0	1-1			(2/4↑↑)
J476	C	0-0	2-0	0	1-1			

H799	1	2-2	2-2	2	2-2			
J845	1	2-2	3-2	2	2-1			
J205	1	1-1	2-2	0	1			
J328	1	2-2	1-2	3	3-2	1/8	5/8	2/8
J197	1u	2-2	3-2	2	3			(1/8↑↑)
H025	1u	2-2	2-2	1	1-1			
G460	1u	2-2	3-2	3	2-3			
J607	1u	2-2	2-2	2	2			
H549	2	3-3	2-2	3	2-3			
H622	2	3-3	1-1	2	2-3			
H504	2	3-3	1-1	2	2-1			
H798	2	1-1	0-1	1	1-1			
J367	2u	2-2	2-1	3	2-3	6/8	1/8	1/8
G486	2u	2-2	2-2	1	2-2			
J522	2u	2-2	0-0	2	2-2			
G722	2u	3-3	2-0	2	2-3			

H820	3	3-3	2-2	3	2-2			
J557	3	2-2	1-0	2	1-2*			
H588	3	2-2	2-0	3	1-2			
J153	3	3-3	3-3	2	3-3			
H480	3u	2-2	2-2	2	3-3	5/8	0	3/8
J344	3u	3-3	2-0	3	2-2	(3/8↓↓)		
H710	3u	2-2	2-2	2	3-3			
J262	3u	3-3	2-2	3	3-2			

因此，本发明通过严格粘膜途径免疫程序的组的结果和阴性对照组基本相同。另一方面，通过肌肉途径和粘膜内途径混合程序免疫或者通过严格肌肉内途径免疫的组可观察到细菌量显著减少。这强调了免疫条件尤其是免疫次数；因此，建议使用在膈下区域应用非肠道途径的免疫程序，以得到保护性效果。

这些结果应极正确地与图3中的血清中抗体水平的结果联系在一



起。该图表明通过严格粘膜途径的免疫方案得到的结果与阴性对照组(1和1u)的结果非常相似。另一方面,通过混合粘膜与肌肉内途径(2和2u)的免疫方案以及,更好的,通过严格肌肉内途径的方案(3和3u)使诱导出比对照组强很多的抗体水平成为可能。

5 这样,强血清应答可能与保护性效果相关,而相反弱应答与缺乏保护性效果相关。

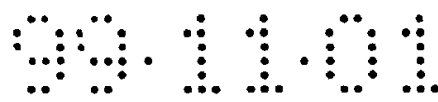
可能得到既定效果(强血清应答以及保护性效果)的免疫条件包括使用膈下区域的非肠道途径或使用 Th1 佐剂。

10 实施例 3: 治疗小鼠的 *H. pylori* 感染

为了治疗小鼠模型中的 *H. pylori* 感染,我们比较了通过皮下途径(SC)和通过粘膜途径免疫的效果。

OF1 小鼠用 10^6 个菌落形成单位(cfu)的 *H. pylori* OR2001 菌株感染。一个月以后,为了确认感染已经很好地建立了,每 100 只小鼠随机
15 杀死 10 只并测试四分之一整胃的脲酶活性。由于所有的结果都是阳性的,小鼠被免疫(10 只每组),每次间隔 3 星期。上述免疫是这样进行的:或者皮下施用 $10\mu\text{g}$ 佐剂以 $15\mu\text{g}$ QS-21 (Aquila) 或 $400\mu\text{g}$ Bay R1005 佐剂(Bayer)的脲酶;或者用 $40\mu\text{g}$ 混有 $1\mu\text{g}$ LT 的脲酶
20 口腔施用。对于两个用非肠道途径施用的佐剂或者在颈部施用以达到身体上部的淋巴节或者在腰部施用,以达到身体下部的淋巴节。10 只小鼠不感染也不免疫,作为阴性对照,而阳性对照的小鼠则在皮下(腰部区域)接受盐溶液 QS-21, 或 Bay 佐剂。

免疫一个月之后,所有的老鼠都被杀死并取出胃,通过测定脲酶活性(每组 10 只中的 10 只都被分析)和定量培养(10 只中的 5 只被
25 分析)而确定细菌定居的程度。图 6A(脲酶测试)和 6B(培养)示明,在腰部区域的皮下用脲酶佐以 QS-21 免疫的小鼠感染基本上已消失(45 只中的 4 只在定量培养实验中为阴性。与未免疫的小鼠相比,在颈部皮下佐以 QS-21 免疫的小鼠以及口腔接受脲酶加 LT 的小鼠的感染减小 10 到 100 倍。Bay 佐剂诱导出相同的减小,在腰部区域免疫的
30 小鼠中尤其显著。



在同样的这些小鼠中进行的组织病学实验并未显示比对照更大面积的胃炎。

在我们先前的预防性研究中观察到（实施例 1），受保护的小鼠的血清中两种抗体亚型 IgG1 和 IgG2 的水平很高，这代表了 Th2/Th1 均衡应答。进而，在腰部区域皮下免疫的小鼠具有最高水平的 IgA，这显示粘膜应答。

这些结果表明，定位的内吸收免疫能治疗小鼠的获得性 *H. pylori* 感染，并且使用佐剂诱导 Th1/Th2 均衡的粘膜应答对于达到该目标是有利的。

10

实施例 4：引起小鼠的抗 *H. pylori* 感染的脲酶免疫中的粘膜激发/非肠道加强策略

用粘膜激发/非肠道加强策略体免疫 Swiss Webster 小鼠。口腔施用单一剂量的 25μg 重组 *H. pylori* 脲酶(脲酶)和 5μg *Escherichia coli* 热不稳定肠毒素 (LT) 作为激发。三个星期以后小鼠通过非肠道途径施用两剂 100μg 脲酶加 100μg 明矾加强。剂与剂之间间隔 3 个星期。与未免疫的对照相比，通过这种激发/加强策略免疫的小鼠 *H. pylori* 菌落形成单位中值 (CFUs) 减小 2000 倍 (图 7)。这种策略的免疫比 3 剂粘膜疫苗免疫更有效。三剂粘膜免疫可使菌落减少 1000 倍。单一激发剂量的口腔施用的脲酶加 LT 只使 *H. pylori* CFUs 中值减小 10 倍，面非肠道施用不含佐剂的脲酶的加强只使 CFUs 中值减小 2 倍。

这种免疫方案被用于免疫恒河猴使之抵抗用 *H. pylori* 进行的攻击。

25 实施例 5:

恒河猴，*H. pylori* 血清学阴性，经四倍疗法 (quadruple therapy) 治疗并通过对胃部活组织样品的培养与活组织检查确定无 *H. pylori* 感染。19 只猴子被随机分成 4 组：4 只接受假免疫，5 只接受重组 *H. pylori* 脲酶 (脲酶) 疫苗，上述疫苗通过肌肉内途径以矾 (氢氧化铝，Rehydragel) 为佐剂施用，5 只通过口腔途径，以 *Escherichia coli* 热

不稳定肠毒素 (LT) 做为佐剂, 接受脲酶疫苗作为激发剂量, 随后是两次通过非肠道途径, 以矾为佐剂, 施用脲酶疫苗, 5 只猴子通过肌肉内途径以 Bay 为佐剂接受脲酶疫苗。前三次接种每次三个星期, 第四次在第 20 星期施用。

5 最后一次接种后一个星期, 猴子用 *H. pylori* 攻击。猴子在接触后 10 个星期被杀死, 尸体 时, 在胃部 10 处 (1 处贲门, 2 处胃体, 3 处胃体-胃窦连接处, 3 处胃窦, 1 处幽门) 取样, 即 5mm 直径打孔取出的活组织样用于细菌培养。在胃的 5 个区域取出其它样品用作组织病理学研究。

10 尽管由于实验目的的攻击, 所有的猴子都感染了 *H. pylori*, 但是经脲酶加 LT 粘膜激发并随后 3 次脲酶加矾非肠道加强而免疫的小鼠与假免疫的对照小鼠相比, 菌落数在统计学上有明显减少 ($p = 0.05$, Wilcoxon 检验) (图 8), 假免疫的对照组的 CFU 中值为 1.3×10^4 (从 1.5×10^3 到 1.8×10^5 CFU), 与之相比, 通过粘膜激发/非肠道促进方案接受疫苗的猴子的 CFU 中值减少了 20 倍以上 (5.8×10^2 CFU, 从 1.0×10^2 到 6.7×10^2 CFU)。

接受粘膜激发/非肠道加强方案的脲酶疫苗的组的猴子在感染 *H. pylori* 致病物质有类似的胃炎 (图 9) 和上皮变化 (图 10), 没有证据表明接种增强了胃炎或上皮恶化。

20 与接受粘膜激发/非肠道加强方案的猴子相反, 通过非肠道途径施用脲酶加 Bay 免疫的猴子在菌落上与假免疫的对照相比并无差别 ($p = 1.00$) 而用脲酶加矾免疫的猴子显示部分效果 ($p = 0.33$) (图 8) 由于胃部样品被其它细菌严重污染, 接受脲酶加 Bay 这一组的一只猴子没有培养的数据。

25 这些结果显示, 使用脲酶加 LT 激发并随后用脲酶加矾加强的方案免疫对于在非人灵长类中防止 *H. pylori* 感染是有效的。选择这种方案是基于以下原理的: 免疫系统必须被激发以对粘膜感染产生应答, 即利用适当的佐剂进行粘膜免疫。然而, 一旦建立了恰当的免疫应答之后, 更传统的佐剂, 如矾, 可被用于非肠道免疫以加强应答。这种方案不仅
30 比单纯体的粘膜方案更有效, 而且它用的抗原比较少。因为非肠道抗原

的剂量（100 μ g 脲酶）可以比粘膜剂量（4mg）少很多。

其它实施例包括在随后的权利要求书中。

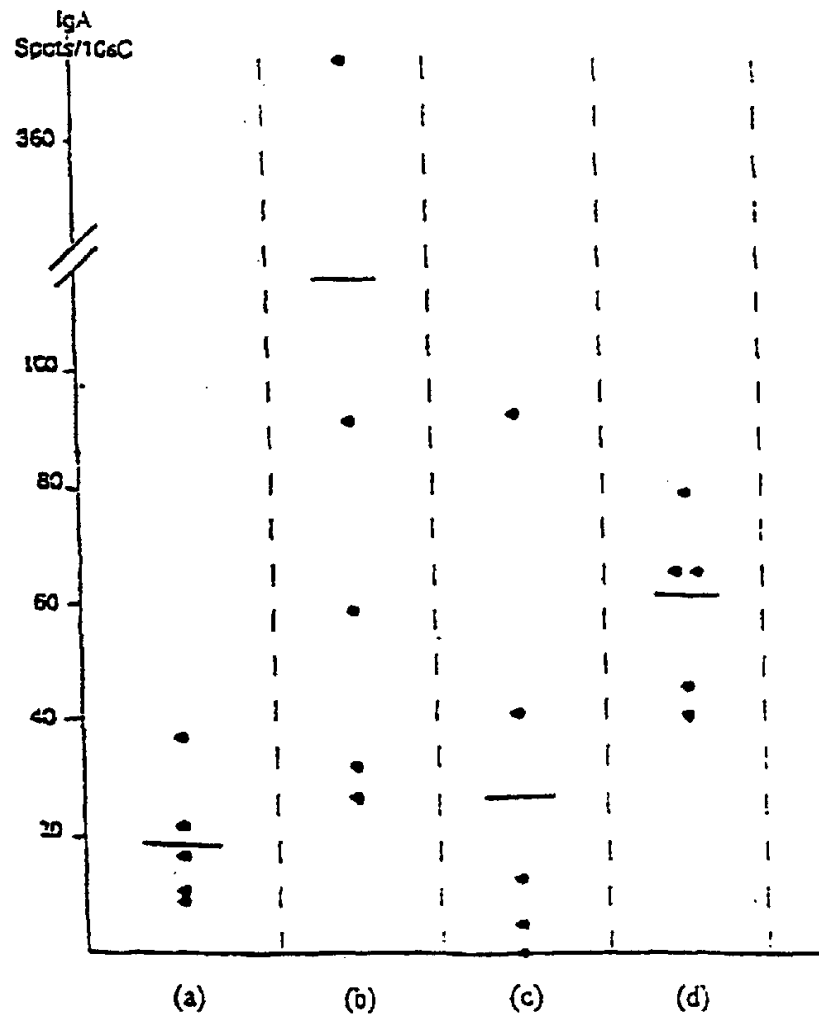


图 1A

99.11.01

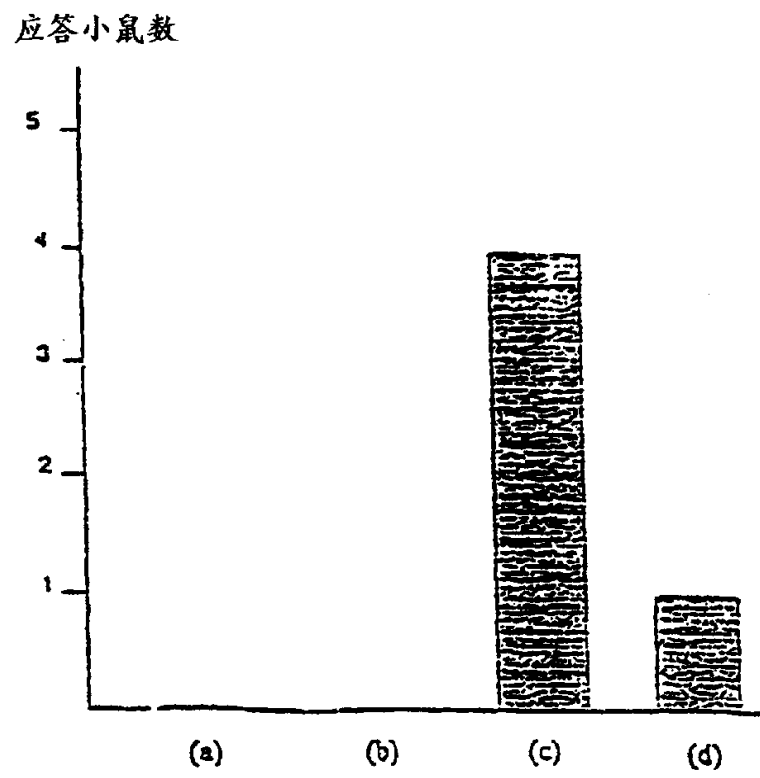


图 1B

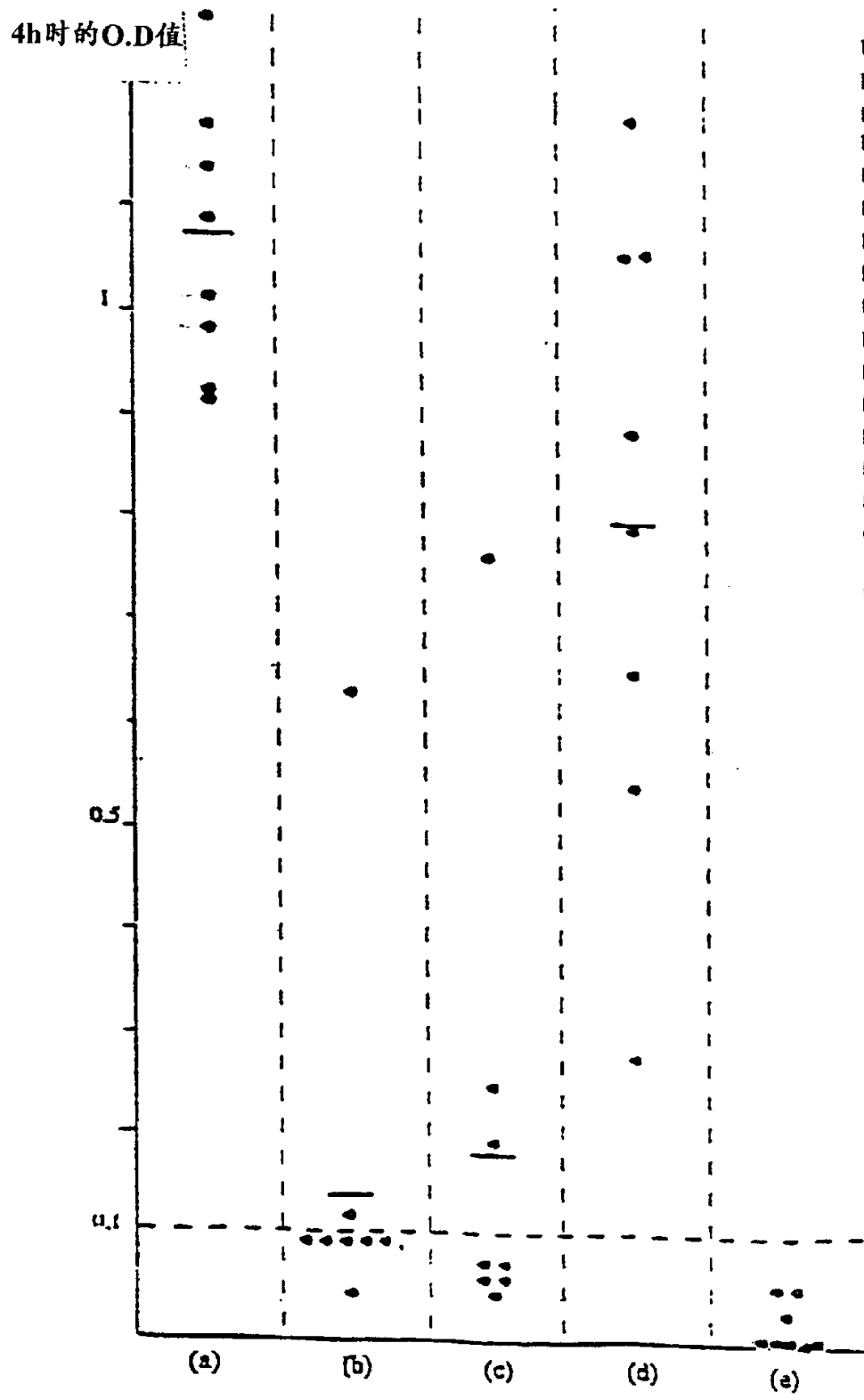


图 2

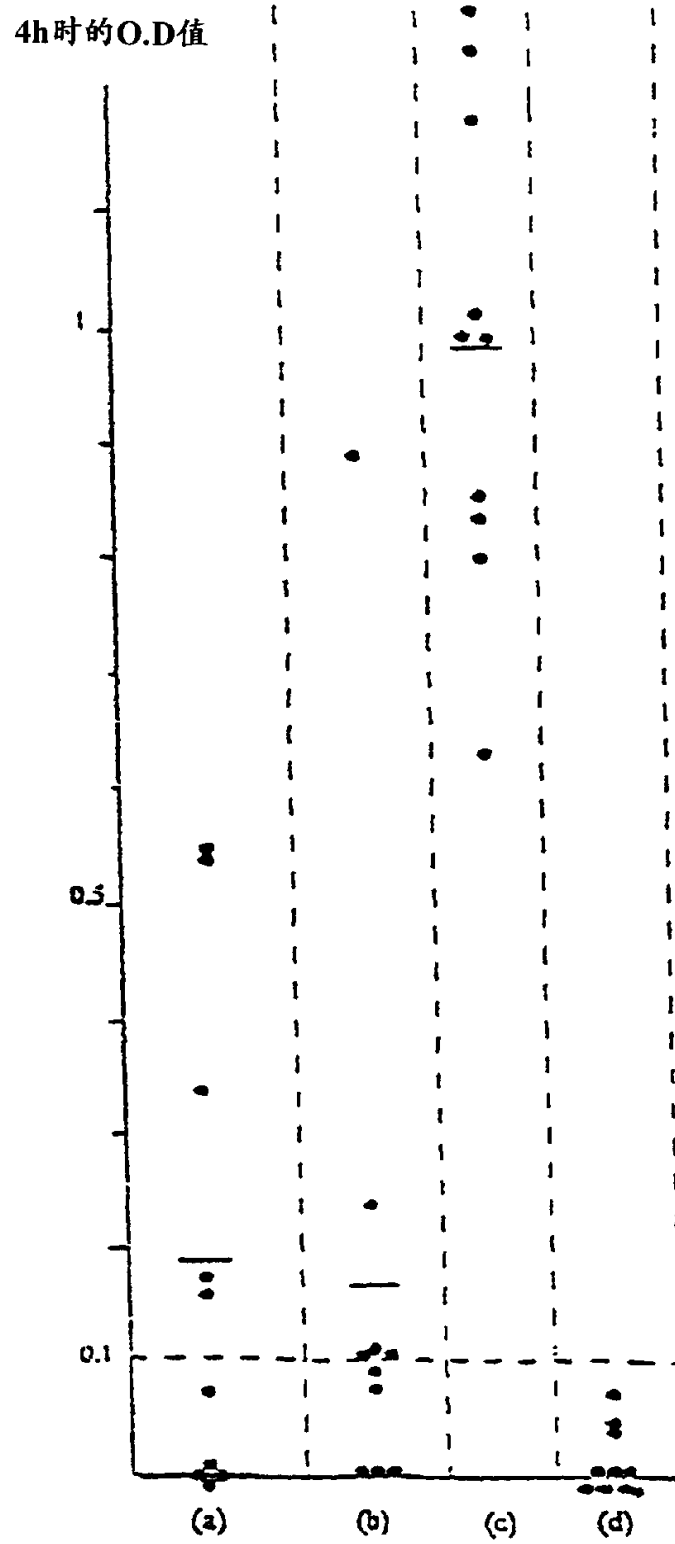


图 3

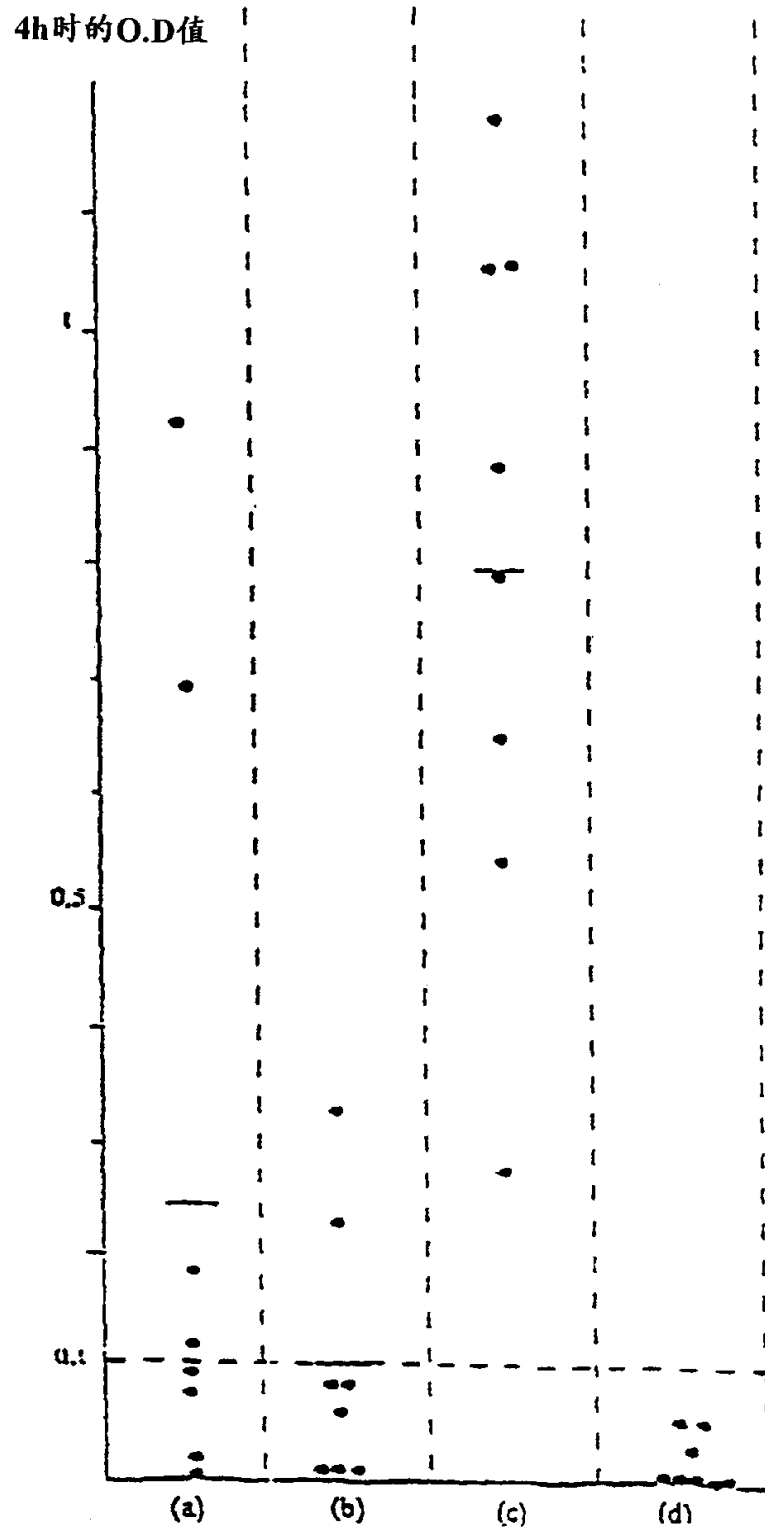
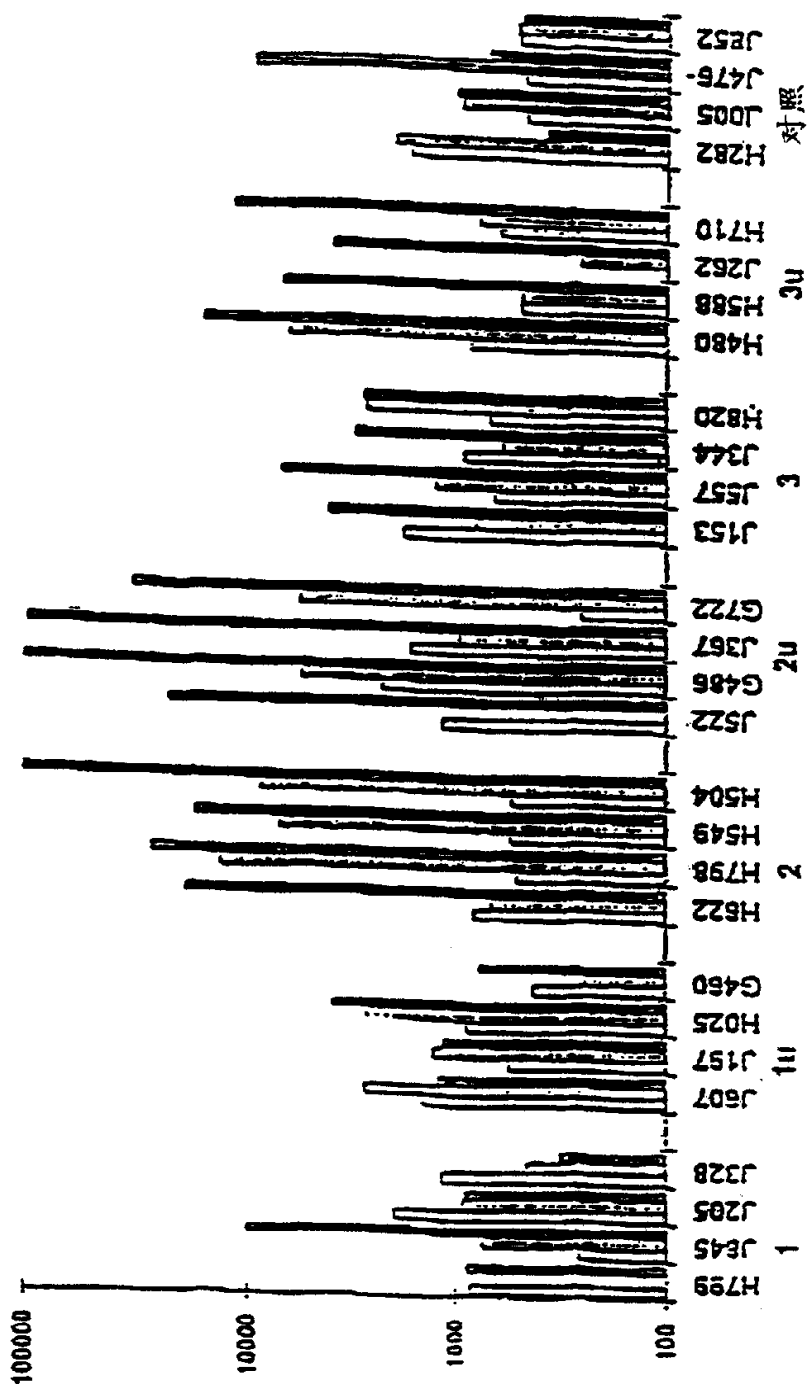


图 4



5

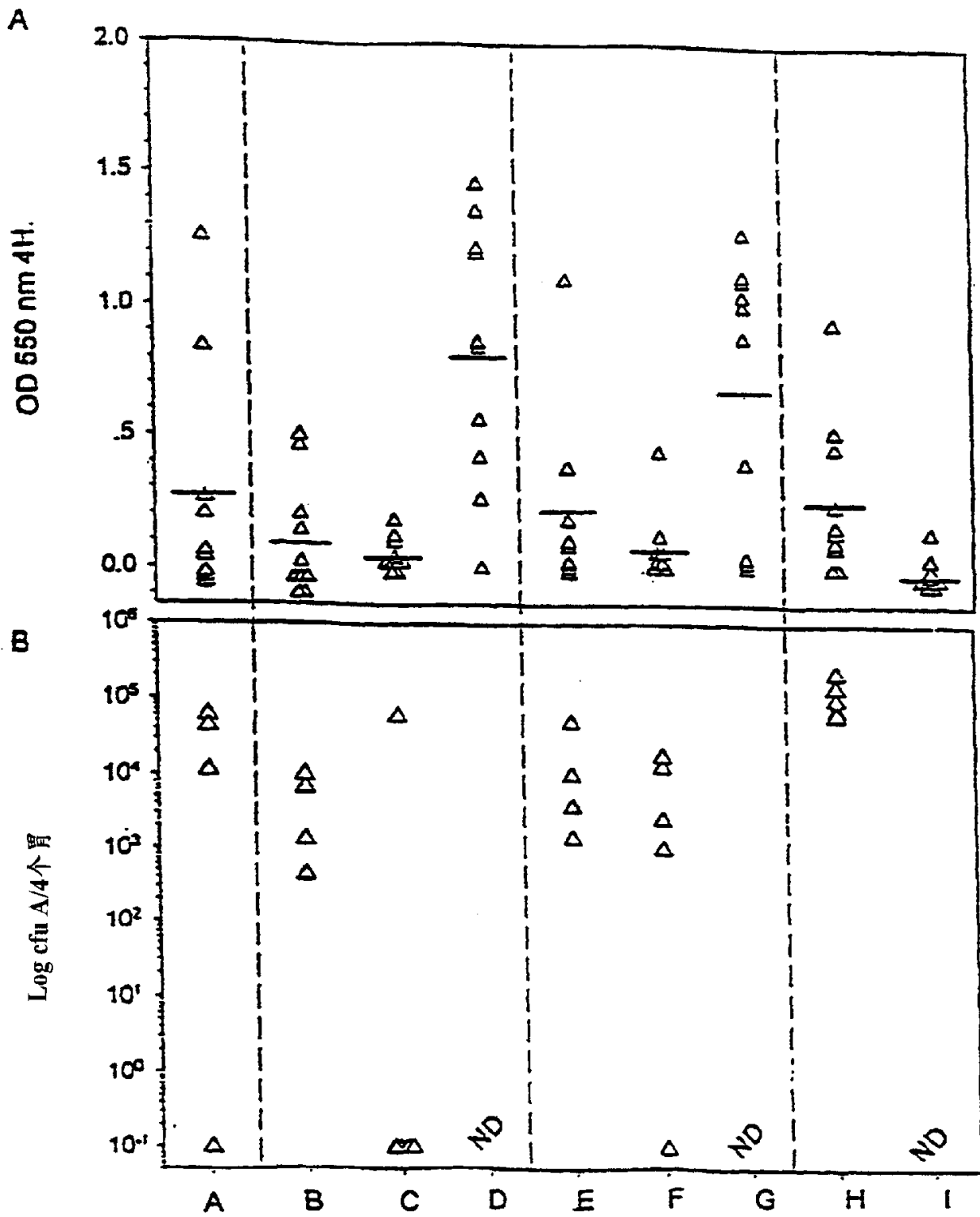
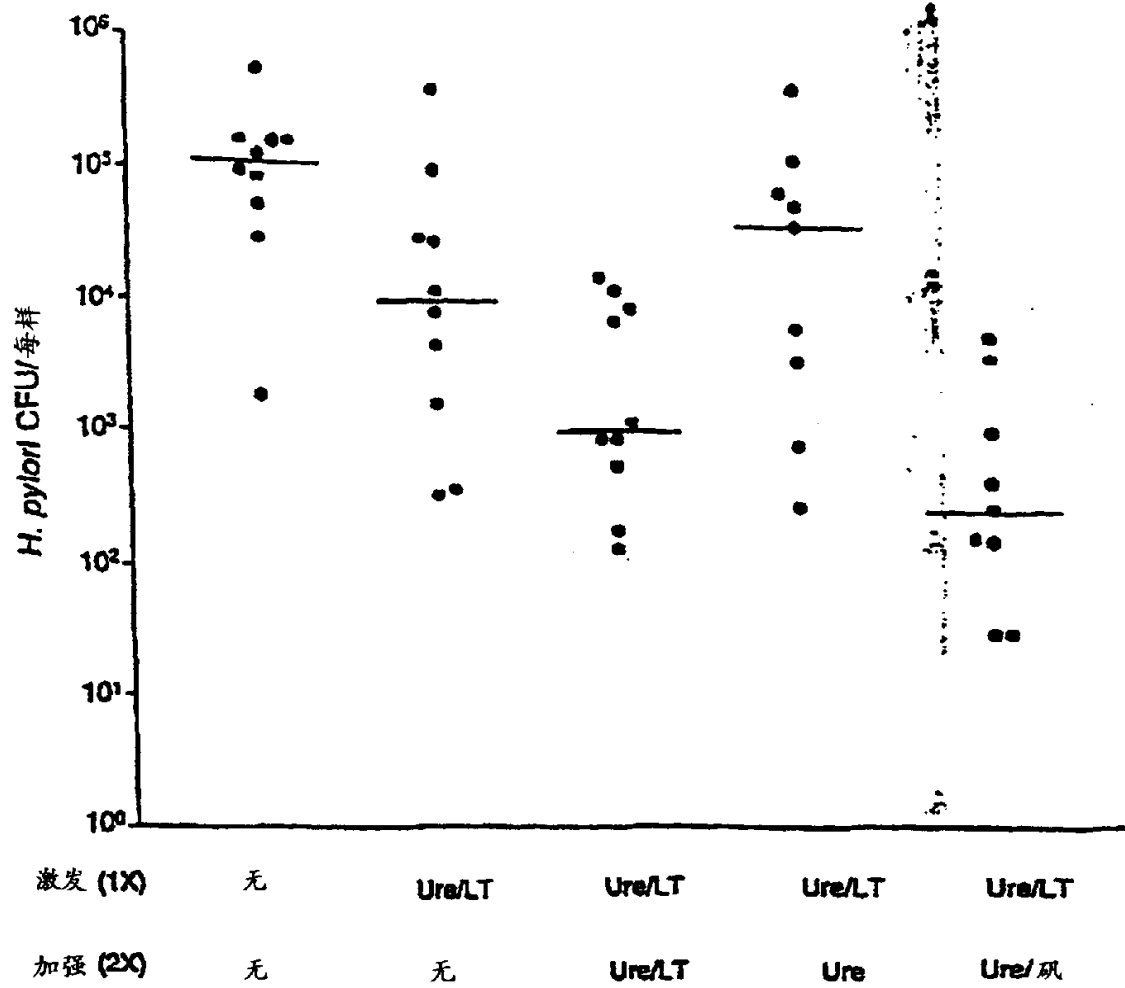


图 6A和6B



免疫

图 7

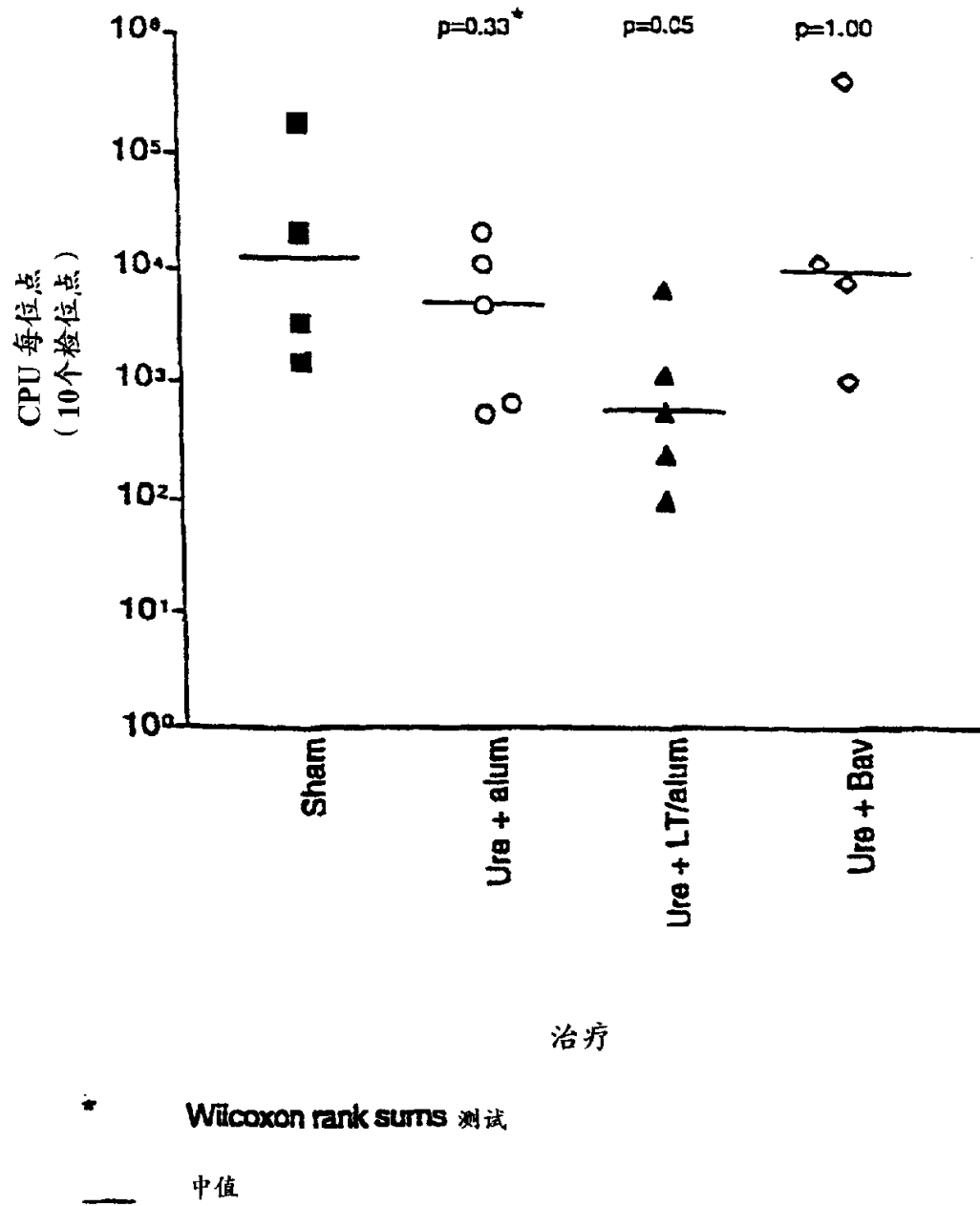


图 8

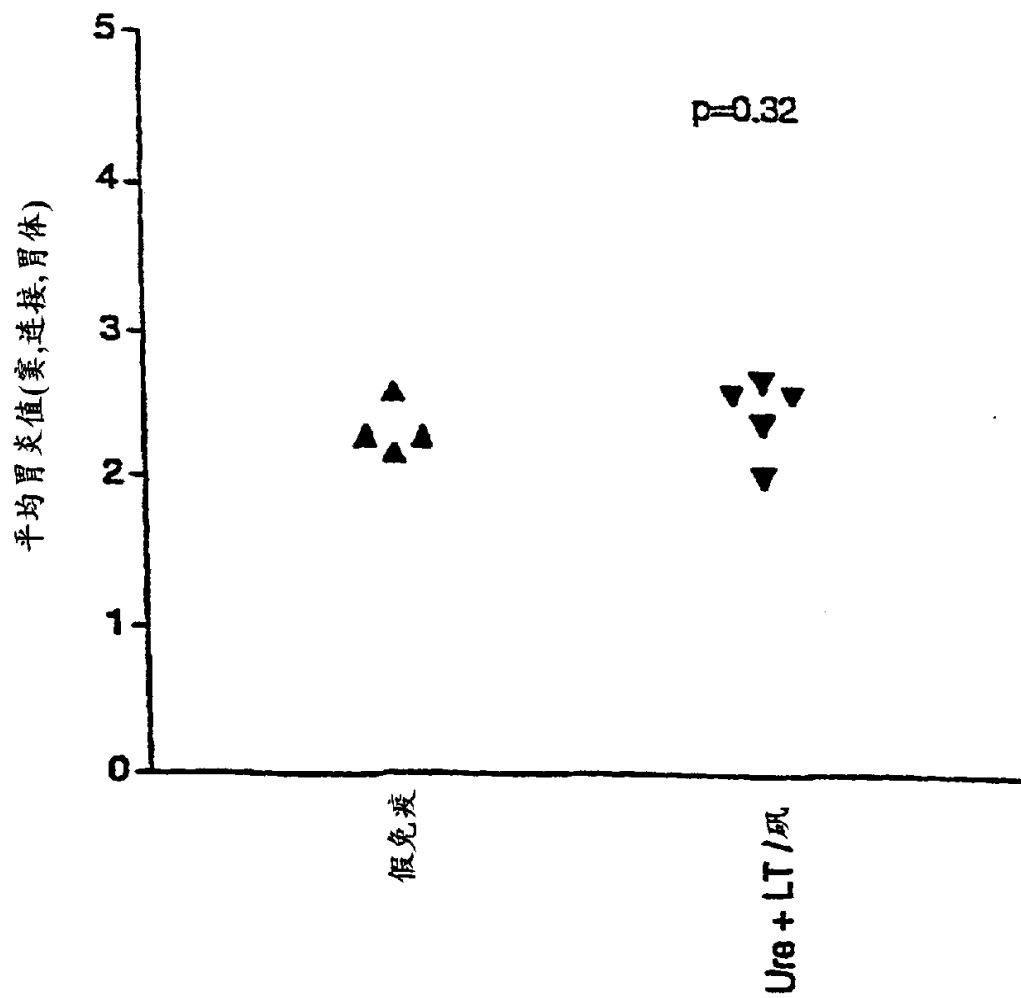


图 9

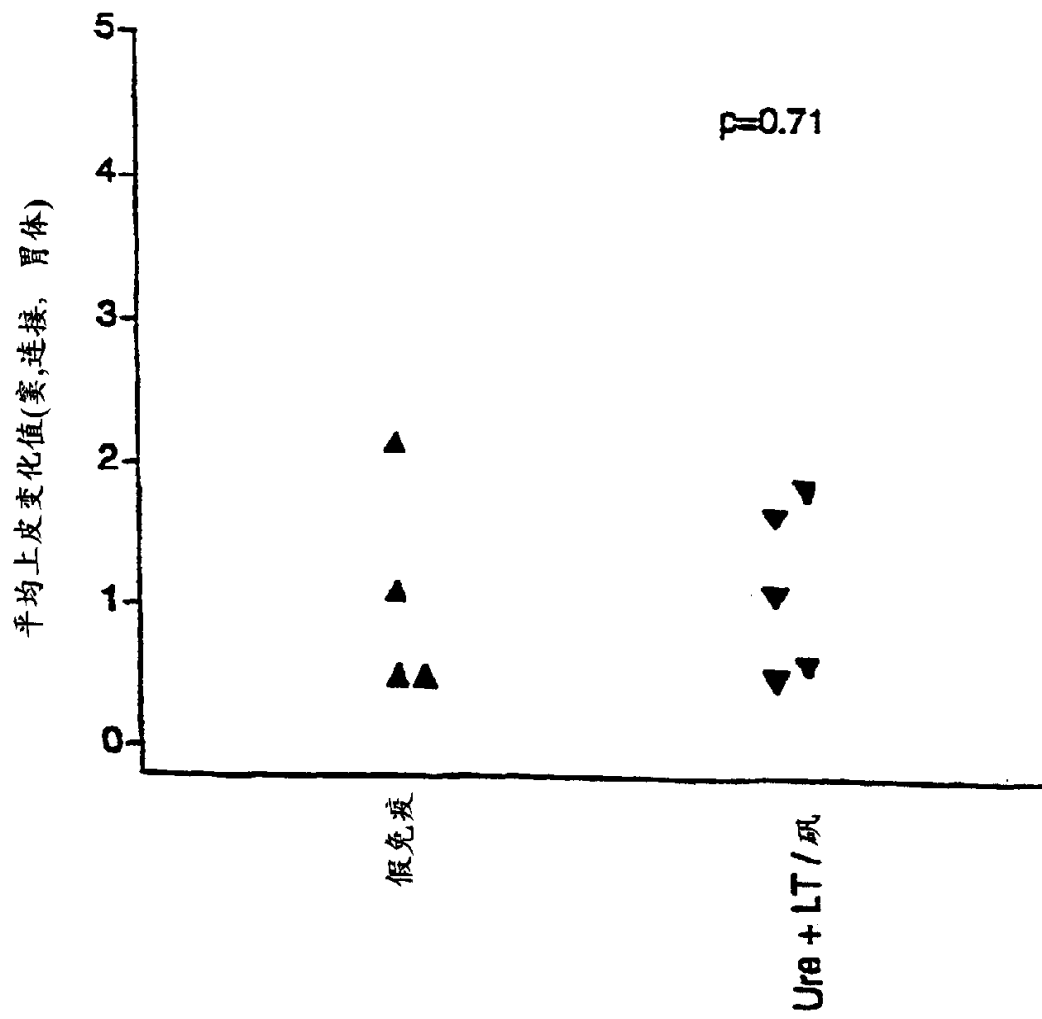


图 10