

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 39/39

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98804685.7

[43]公开日 2000年7月5日

[11]公开号 CN 1259052A

[22]申请日 1998.4.1 [21]申请号 98804685.7

[30]优先权

[32]1997.4.1 [33]US [31]08/831,073

[86]国际申请 PCT/US98/06528 1998.4.1

[87]国际公布 WO98/43670 英 1998.10.8

[85]进入国家阶段日期 1999.10.29

[71]申请人 科里克萨有限公司

地址 美国华盛顿

[72]发明人 R·T·克莱恩

[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

代理人 周中琦

权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 单磷酰基脂质 A 的水性免疫佐剂组合物

[57]摘要

含有减毒的脂质 A 衍生物和表面活性剂的水性佐剂组合物增强恒温动物对蛋白抗原的免疫反应。根据本发明有用的减毒的脂质 A 衍生物包括单磷酰基脂质 A 和 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A。表面活性剂和表面活性剂的混合物溶解于溶剂中。1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱是优选的表面活性剂。将溶解的表面活性剂加入减毒的脂质 A 衍生物中以获得混合物。混合物中减毒的脂质 A 衍生物与表面活性剂的摩尔比约为 4:1。蒸发掉溶剂并将水加到所得的薄膜上。在 60℃ 水浴中对悬浮液超声处理直至变得澄清。给予这种佐剂制剂的动物表现出对所给抗原增强的抗体反应并表现出增强的淋巴细胞增生和细胞毒性 T-淋巴细胞反应。水性佐剂组合物和抗原的鼻内给药刺激血清和粘膜分泌的 IgA 的产生。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种水性佐剂组合物包含减毒的脂质 A 衍生物和一种或多种表面活性剂。

2. 权利要求 1 的水性佐剂组合物，其中所述减毒的脂质 A 衍生物选自单磷酸基脂质 A 或 3-O-脱酰基的单磷酸基脂质 A。

3. 权利要求 1 的水性佐剂组合物，其中所述减毒的脂质 A 衍生物是单磷酸基脂质 A。

4. 权利要求 1 的水性佐剂组合物，其中所述减毒的脂质 A 衍生物是 3-O-脱酰基的单磷酸基脂质 A。

5. 权利要求 1 的水性佐剂组合物，其中所述的表面活性剂选自甘氨酸胆酸盐、脱氧胆酸盐、鞘磷脂、鞘氨醇、卵磷脂、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、L- α -磷脂酰乙醇胺和 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱或它们的混合物。

6. 权利要求 1 的水性佐剂组合物，其中所述的表面活性剂是 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

7. 权利要求 1 的水性佐剂组合物，其中减毒的脂质 A 衍生物与表面活性剂的摩尔比是从约 10:1 到约 10:5。

8. 权利要求 1 的水性佐剂组合物，其中减毒的脂质 A 衍生物与表面活性剂的摩尔比约为 4:1。

9. 制备水性佐剂组合物的方法，包括步骤：

- a. 将一种或多种表面活性剂溶解于溶剂中；
- b. 混合溶解的表面活性剂和减毒的脂质 A 衍生物以获得减毒的脂质 A 衍生物和表面活性剂的混合物；
- c. 从表面活性剂和减毒的脂质 A 衍生物的混合物中蒸发掉溶剂；

d. 将水加入蒸发后的混合物以获得悬浮液；并且

e. 对步骤 d 的悬浮液加热并超声处理直至澄清。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述减毒的脂质 A 衍生物选自单

磷酰基脂质 A 和 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A。

11. 权利要求 9 的方法，其中所述减毒的脂质 A 衍生物是单磷酰基脂质 A。

12. 权利要求 9 的方法，其中所述减毒的脂质 A 衍生物是 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A。

13. 权利要求 9 的方法，其中所述的表面活性剂选自甘氨酸胆酸盐、脱氧胆酸盐、鞘磷脂、鞘氨醇、卵磷脂、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、L- α -磷脂酰乙醇胺和 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱或它们的混合物。

14. 权利要求 9 的方法，其中所述的表面活性剂是 1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

15. 权利要求 9 的方法，其中减毒的脂质 A 衍生物与表面活性剂的摩尔比是从约 10:1 到约 10:5。

16. 权利要求 9 的方法，其中减毒的脂质 A 衍生物与表面活性剂的摩尔比约为 4:1。

17. 权利要求 9 的方法，其中所述的溶剂选自氯仿、醇、二甲基亚砷和二甲基甲酰胺或它们的混合物。

18. 权利要求 9 的方法，其中所述溶剂是乙醇。

19. 权利要求 9 的方法，其中所述悬浮液加热到约 60°-约 80°。

20. 权利要求 9 的方法，其中所述悬浮液加热到约 60℃。

21. 权利要求 9 的方法，其中对所述悬浮液超声处理约 5-60 分钟。

22. 权利要求 9 的方法，其中对所述悬浮液超声处理约 10 分钟。

23. 一种增强恒温动物对能够激发动物免疫应答的蛋白抗原的免疫应答的方法，此方法包括给予该动物一种或多种蛋白抗原和有效量的含有减毒的脂质 A 衍生物和一种或多种表面活性剂的水性佐剂组合物。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述减毒的脂质 A 衍生物选自单磷酰基脂质 A 和 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述水性佐剂组合物是鼻内给药。

26. 一种刺激恒温动物对能够激发动物免疫应答的蛋白抗原的血清和粘膜分泌型 IgA 反应的方法，此方法包括给予动物一种或多种蛋白抗原和有效量的含有减毒的脂质 A 衍生物和一种或多种表面活性剂的水性佐剂组合物。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述减毒的脂质 A 衍生物选自单磷酰基脂质 A 和 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A。

28. 权利要求 26 的方法，其中所述水性佐剂组合物是鼻内给药。

说 明 书

单磷酰基脂质 A 的水性免疫佐剂组合物

相关申请的交叉参考

本申请是 1997 年 4 月 1 日提交的共同未决的专利申请序号 08/831, 073 的继续部分申请。

发明背景

化合物单磷酰基脂质 A (MLA) 和 3-O-脱酰基单磷酰基脂质 A (3D-MLA) 是减毒的细菌脂多糖 (LPS) 的脂质 A 衍生物。LPS 和脂质 A 是在给予这些化合物的病人中诱导体液抗体反应和细胞介导的免疫应答的有力的免疫刺激剂。然而, 脂质 A 和 LPS 也可表现出毒性副作用如引起发热和局部 Shwarzman 反应。MLA 和 3D-MLA 是已得到修饰以减轻 LPS 毒性的脂质 A 样分子。

象脂质 A, MLA 和 3D-MLA 分子具有一个上面带有长链脂肪酸的糖主链。主链包括糖甙键连接的两个六碳糖环。MLA 和 3D-MLA 在 4 位磷酸化。5-8 个长链脂肪酸(12-14 碳)结合在糖主链上使 MLA 和 3D-MLA 成为强疏水分子, 不易溶于水。

减毒的脂质 A 衍生物 (ALD) MLA 和 3D-MLA 用作感染性疾病的预防疫苗和治疗癌性肿瘤和慢性感染的治疗性疫苗中的免疫佐剂。大多数疫苗中所含的抗原制品经常是水溶性蛋白的复杂的混合物使得不溶于水的佐剂难以配制在水性疫苗制剂中。因此, 在加入抗原制品水前, MLA 和 3D-MLA 必须先与溶剂混合。然而, 溶剂的存在可能使疫苗制剂进一步复杂化, 并且, 在某些情况下降低其成分的有效性。另外, 溶剂可能刺激粘膜表面或者在注射位点引起炎症。含有非干扰性的共同溶剂的 MLA 或 3D-MLA 的简单制剂可获得来自疫苗组合物中的佐剂和抗原的最大好处, 本发明满足了这一需要。

发明概述

本发明涉及减毒的脂质 A 衍生物 (ALD) 和表面活性剂的水性制

剂及其制备方法。根据本发明，有用的减毒脂质 A 的衍生物包括单磷酸酯基脂质 A (MLA) 和 3-O-脱酯基的单磷酸酯基脂质 A (3D-MLA)。MLA 的水性制剂 (MLA/AF) 或 3D-MLA 的水性制剂 (3D-MLA/AF)，改变了对用于疫苗制备的不良溶剂或共同溶剂系统的需要。本发明提供 ALD 和表面活性剂的稳定水性组合物，当与抗原一起施用于小鼠时，加强动物对该抗原的细胞和体液免疫应答。令人吃惊地，当鼻内给药时，本发明的水性制剂诱发免疫动物中高水平的血清和粘膜分泌的 IgA。要求专利保护的水性组合物的实施方案包括约 4:1 的 MLA 或 3D-MLA 与表面活性剂的摩尔比并具有约 50-70nm 的颗粒大小。1, 2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC) 是优选的表面活性剂。

本发明公开了制备水性组合物的方法。在一种实施方案中，溶解 ALD 和表面活性剂并在乙醇中均匀地混合。乙醇挥发后留下一层薄膜。将水加到薄膜上。通过超声处理使 ALD 和表面活性剂悬浮于水中。超声处理悬浮液直至澄清。给予要求专利保护的组合物和抗原的动物表现出对此抗原的加强的体液和细胞免疫应答。本发明还公开和要求专利保护应用组合物增强这些应答的方法。

附图简述

图 1a-d 表示给予 3-O-脱酯基单磷酸酯基脂质 A 的水性配方 (3D-MLA/AF) 中的破伤风类毒素 (TT) 抗原★或盐水中破伤风类毒素抗原◆的小鼠的抗体效价。图 1a 表示给予破伤风类毒素抗原的小鼠的总 IgG 抗体效价。图 1b 表示给予破伤风类毒素抗原的小鼠的 IgG2a 抗体效价。图 1c 表示给予破伤风类毒素抗原的小鼠的 IgG2b 的抗体效价，图 1d 表示动物的 IgG1 抗体效价。

图 2 表示用纯化的蛋白衍生物免疫的小鼠的 T-细胞增殖反应。表示了初次接种后 14 天给予 3D-MLA/AF 中的破伤风类毒素小鼠和正常对照组小鼠的增殖反应。

发明详述

本发明涉及减毒的脂质 A 衍生物 (ALD) 的水性佐剂制剂。将 ALD 和表面活性剂以约 4:1 的摩尔比悬浮于水中并且通过超声处理使悬浮中

颗粒大小约为 50 - 70nm.

根据本发明, 减毒的脂质 A 衍生物可配制成水性复合物以提供有力的佐剂。减毒的脂质 A 衍生物是表现脂质 A 有利的免疫刺激性质但较少表现出该化合物的不良副作用的脂质 A 样化合物。例如, 单磷酰基脂质 A (MLA) 和 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A (3D-MLA) 是强力的免疫刺激物但比脂质 A 毒性小得多的 ALD. MLA 和 3D-MLA 可用于本发明的组合物中, 这是已知的并不需在此详细描述。见例如, 于 1984 年 3 月 13 日授予的转让给 Ribl ImmunoChem Research, Inc. 的美国专利序号 4, 436, 727 公开了单磷酰基脂质 A 及其制备。也是转让给 Ribl ImmunoChem Research, Inc. 的美国专利号 4, 912, 094 和 Myers 等的再审查证书 B14,912,094 包括 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A 及其制备。涉及 MLA 和 3D-MLA 的每一这些专利的公开内容在此引入作为参考。

不探究引入作为参考的以前专利的细节, 在此所用的单磷酰基脂质 A (MLA) 来源于脂质 A, 大肠杆菌脂多糖的一种成分, 是强力但高度毒性的免疫系统调节剂。Edgar Ribl 和他的同事实现了起初称为精制去毒内毒素的单磷酰基脂质 A (MLA) 的生产。通过在中等强度无机酸溶液 (如 0.1 HCl) 中回流从革兰氏阴性细菌无庚糖突变体获得的内毒素提取物 (LPS 或脂质 A) 约 30 分钟来生产 MLA。这种处理导致还原末端葡萄糖胺的位置 1 处磷酸部分的丢失。

同时, 这种处理中, 从非还原葡萄糖胺的位置 6 去除核心糖。结果产物 (MLA) 表现出明显减轻的正常与内毒素起始物质相关的内毒素活性如热原性、局部 Shwarzman 反应性和如鸡胚 50% 致死量分析 (CELD₅₀) 中测定的毒性。然而, 出于预料地保留了脂质 A 和 LPS 作为免疫调节剂的功能。

另外一种可能用于本发明实施的减毒脂质 A 衍生物称为 3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A (3D-MLA)。已知 3D-MLA 如美国专利序号 4,912,094, 再审查证书 B1 4, 912, 094 ('094 专利) 中所述的, 并且与 MLA 不同, 因为它是在不对其它基团造成不利影响的条件下, 从 MLA 分子选择性去除在位置 3 与还原末端葡萄糖胺相连的酯的 β -

羟基肉豆蔻基酰基残基。3-O-脱酰基的单磷酰基脂质 A 可从 RiBi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana 59840 获得。

MLA 和 3D-MLA 分子是多种带有不同脂肪酸链长度的脂肪酸取代形式即十七碳酰基、十六碳酰基和十五碳酰基等的复合物或混合物。因此，本发明包括 MLA 和 3D-MLA 的多种形式。而且本发明包括合成或半合成方法产生的化合物的混合物形式和单独化合物。——094 专利中描述的脂质 A 的主链与从明尼苏达沙门氏菌 R595 通过十七碳酰基脂质 A3-脱酰基作用获得的产物相一致。此公开内容中包括其它脂肪酸取代类型；基本特征是该物质是 3-O-脱酰基的。

用于本发明的修饰的 3D-MLA 的制备是通过在导致脂质 A 主链的位置 3 单个脂肪酸丢失的条件下将 MLA 进行碱水解。在碱性介质中，位置 3 的 β -羟基肉豆蔻基脂肪酸异常地不稳定。仅需温和的碱处理就可使脂质 A 完全达到 3-脱酰基。其它脂质 A 的酯键需要在水解发生前某种更强烈的条件以致于在不明显影响分子的其它部分的情况下选择性地使位置 3 的部分脱酰基。目前不清楚位置 3 的酯连接的 β -羟基肉豆蔻基脂肪酸对碱性介质的异常敏感性的原因。

尽管已知碱性水解方法，选择除了水解在位置 3 的 β -羟基肉豆蔻基的酯键以外不引起进一步水解的条件是重要的。通常水解可在水性或有机介质中进行。后一种情况下，溶剂包括甲醇（乙醇）、二甲基亚砷（DMSO）。二甲基甲酰胺（DMF）、氯仿、二氯甲烷等以及它们的混合物。也可联合应用水和一种或多种上而提取的有机溶剂。

碱性基质可选自多种氢氧化物、碳酸盐、磷酸盐和胺。举例的碱包括无机碱如氢氧化钠、氢氧化钾、碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠、碳酸氢钾等，有机碱如烷基胺，并且包括但不局限于二乙胺、三乙胺等。

在水性介质中 pH 值典型地在约 10-14 之间，pH 值约 12-13.5 是优选的范围。典型地，水解反应在约 20°C - 80°C 的温度下进行，优选在约 50-60°C 下反应约 10-30 分钟。例如，水解可在室温（22°C - 25°C）下 3% 三乙胺水溶液中进行 48 小时。选择水解温度和时间的唯一要求是使脱酰基作用发生以便仅在位置 3 去除 β -羟基肉豆蔻基。

实践中，已发现特别有利的水解方法，包括将脂质 A 或单磷酰基

脂质 A 溶解于氯仿: 甲醇 2:1 (v/v) 中, 用含有 0.5M Na_2CO_3 的水性缓冲液在 pH10.5 饱和此溶液, 然后在 45°C - 50°C 真空机或吸气器 (约 100mHg) 下迅速蒸发溶剂。得到的物质在位置 3 选择性地脱酰基。这一过程也可用上面所列的任一种无机碱进行。在某些情况下, 在水性缓冲液饱和之前向有机溶液中加入相转移催化剂如四丁基溴化铵是可取的。

制备本发明的组合物中, 一般地, 将减毒的脂质 A 衍生物 (ALD) 与每种溶解于溶剂中的表面活性剂相混合。溶剂挥发后留下一薄膜。在薄膜上加水并且在加热得到的悬浮液的同时进行超声处理直至澄清。最终悬浮液具有约 40 - 150nm 并且优选地约 50 - 70nm 的颗粒大小。

ALD 与表面活性剂以约 10 份 ALD 比约 1 到 5 份表面活性剂的摩尔比相混合。优选地, 成分以约 4 份 ALD 比 1 份表面活性剂的摩尔比相混合。根据本发明有用的表面活性剂包括但不限于胆汁盐、天然磷脂和鞘脂。在要求专利保护的组合物中胆汁盐如甘氨酸胆酸盐和脱氧胆酸盐可用作表面活性剂。其它合适的表面活性剂包括鞘脂如鞘磷脂和鞘氨醇及磷脂如卵磷脂、1, 2 - 二棕榈酰基 - sn - 甘油 - 3 - 磷酸乙醇胺、L - α - 磷脂酰乙醇胺和 1, 2 - 二棕榈酰基 - sn - 甘油 - 3 - 磷酸胆碱或它们的混合物。优选的实施方案中, 磷脂 1, 2 - 二棕榈酰基 - sn - 甘油 - 3 - 磷酸胆碱 (DPPC) 是表面活性剂。DPPC 用于人是可接受的并且当制剂是鼻内给药时尤其有效。

将 ALD 和表面活性剂溶解于溶剂是并彻底混合。根据本发明有用的水性或有机溶剂包括氯仿、醇 (如乙醇)、二甲基亚砷 (DMSO)、二甲基甲酰胺 (DMF) 等及它们的混合物。

将溶剂从 ALD 和表面活性剂的混合物蒸发掉并留下一层薄膜。将水加到薄膜上并在加热得到的悬浮液的同时进行超声处理直至澄清。优选在水浴超声波仪中对悬浮液进行超声处理。水浴温度可为 40°C - 80°C, 优选地约 60°C。悬浮液可超声处理 5 分钟至约 1 小时直至澄清。超声处理的时间可随悬浮液的体积和浓度不同而不同但可由本领域技术人员容易地确定。最终悬浮液中颗粒大小约 40 - 150nm 并优

选地约 50 - 70nm.

将有效量的本发明组合物与抗原施用于恒温动物以增强动物对该抗原的免疫应答。本发明的组合物加强了动物对抗原的体液免疫应答以及细胞免疫应答。所给予的激发期望的应答的抗原的量可由本领域技术人员容易地确定并且将随所给的抗原类型，给药途径和免疫时间表的不同而不同。两次免疫分别 21 天皮下给小鼠 1 μ g 破伤风类毒素及要求专利保护的组合物激发对该抗原的体液免疫应答。当鼻内给药时，本发明的组合物和抗原刺激细胞毒性 T-淋巴细胞的产生。在 0 天和 21 天鼻内给予要求专利保护的组合物中的乙型肝炎表面抗原 (2.5 μ g) 刺激了免疫的动物体内细胞毒性 T-淋巴细胞的产生。而且，当鼻内给药时，本发明的组合物在激发免疫动物的 IgA 反应中特别有效。给予 0.5 - 12.5 μ g 的 3-O-脱酰基单磷酰基脂质 A 的水性制剂中的破伤风类毒素的小鼠表现出对该抗原增高的 IgA 效价。本发明的组合物的有效量是可刺激或增强免疫应答的量。例如，申请专利的组合物有效量可含有 1 到约 250 μ g 减毒脂质 A 衍生物并且以典型的 70kg 成年病人为基础的给药优选地约 25 - 50 μ g。

提供下面的实施例以进一步说明但不限制本发明的组合物和方法。应理解的是在此提供的小鼠模型是恒温动物的代表并且与其它恒温动物的情况包括人合理地相关。除非另有说明，所有百分比是重量百分比且所有溶剂混合物比例为体积比。

实施例 1 - 减毒的脂质 A 衍生物的水性制剂的制备

根据本发明，注射用水中含有 1000 μ g/ml 来自明尼苏达沙门氏菌 R595 的减毒的脂质 A 形式的 3D-MLA (RiBi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana 59840) 和 118 μ g/ml 的 1, 2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC) 的 3-O-脱酰基单磷酰基脂质 A (3D-MLA/AF) 的水性制剂的制备如下：

将 DPPC 溶解于乙醇使其浓度为 4mg/ml 并旋转使其澄清。将 2.7ml DPPC 溶液加到含有 100mg 冻干的 3D-MLA 的小瓶中并轻轻转动以湿润 3D-MLA。轻轻向小瓶中吹入过滤的氮气以去除乙醇。向小

瓶中加入注射用水(91.7ml), 然后将小瓶塞好, 封口并悬浮于 Labline 9303 水浴超声波仪中。60℃ 超声处理悬浮液 10 分钟直至澄清。用来自 Malvern Instruments 的 PSC 1000 Spectrometer 测定得到的水性制剂中含有 70nm 的颗粒并用 0.2μm 滤器过滤除菌。

实施例 2 - 抗体反应的刺激作用

用本发明水性制剂中的破伤风类毒素 (TT) 免疫的小鼠产生破伤风类毒素特异抗体。免疫之后用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定小鼠血清中 TT 特异的总 IgG 效价和 IgG 同种型 (2a, 2b, 1) 的效价。

用含有 0.1μg 破伤风类毒素 (TT) + 50μg 3D - MLA/AF 或 0.1μg TT 与盐水的一定剂量的疫苗免疫雌性 ICR 小鼠。按实施例 1 制备 3D - MLA/AF。在第 0 天和第 21 天皮下注射疫苗。第二次免疫后第 14 天收集血清并用标准 ELISA 技术测定以报导破伤风类毒素特异性抗体 IgG₁、IgG_{2a} 和 IgG_{2b} 同种型以及总 IgG 的相对量。

图 1 表示由 3D - MLA/AF 产生的破伤风类毒素特异抗体效价。当与破伤风类毒素抗原一起施用, 3D - MLA/AF 刺激免疫动物的 IgG 抗体产生并且尤其活跃地刺激 IgG_{2a} 产生。

实施例 3 - 细胞增殖的刺激作用

当脾细胞用该抗原处理时, 通过用本发明的佐剂组合物和纯化的蛋白衍生物 (PPD) (结核) 菌素免疫诱导的小鼠表现出体外增殖反应。

通过用一定剂量的含有 50μg PPD + 50μg 3D - MLA/AF 的疫苗皮下注射免疫雌性 BALB/c 小鼠。按实施例 1 制备 3D - MLA/AF。免疫后 14 天收集脾细胞并作为增殖测定中淋巴细胞的来源。在微量滴定孔中, 脾细胞以 10⁶ 个细胞/ml 密度在含有 0.1、1 或 10μg PPD/ml 的培养液中培养 96 小时。培养的最后 24 小时向培养物中加入氘标记的胸腺嘧啶。在玻璃纤维滤纸上收集细胞并测定氘的掺入。刺激指数由用 PPD 刺激的细胞的每分钟计数 (CPM) 除以单纯培养液中的培养细胞的 CPM 而定。得到的数据见图 2。

实施例 4 - 细胞毒性 T-淋巴细胞反应的刺激作用

用细胞毒性测定法检测给予本发明的水性佐剂组合物和蛋白抗原之后的细胞毒性 T-淋巴细胞反应的诱导。用配制在 3D-MLA/AF 中的 25 μ g 卵白蛋白 (OVA) 皮下注射 (腹股沟) 给多组 C57/BL/6 小鼠进行首次免疫。如实施例 1 制备 3D-MLA/AF。注射体积为 200 μ l。21 天后每实验组的 3 只小鼠被杀检并且摘取脾脏, 制成单细胞悬浮液并计数。

将来自实验组的脾细胞 (3-4ml 培养液中 75×10^6 个细胞) 置于 25cm² T-培养瓶中。然后, 将 1.0ml 的 5×10^6 /ml 的辐射的 (20,000 拉德) E.G7 (OVA) 细胞加入培养瓶中。使体积达到 10ml。将培养瓶直立于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 天。第 4 天从培养瓶中取出存活细胞, 洗一次, 重悬于 5.0ml 中并且计数。将复原的效应细胞的浓度调节为 5×10^6 活细胞/ml 并且用 100 μ l/孔的培养液作为稀释剂在 96 孔圆底培养板 (Corning 25850) 的孔中将 100 μ l 体积连续稀释三次。然后, 将 1×10^5 细胞/ml 的 100 μ l 体积的 ⁵¹Cr 标记的 (见下面) 靶细胞 [E.G7 (OVA) - 卵白蛋白基因转染的 EL-4 细胞系] 加到孔中。自发释放 (SR) 孔含有 100 μ l 靶细胞和 100 μ l 培养液。最大释放 (MR) 孔含有 100 μ l 靶细胞和 100 μ l 去污剂 (2% Tween 20)。效应细胞/靶细胞 (E/T) 比为 50:1、25:1、12.5:1、6.25:1。400 \times g 离心培养板并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下培养 4 小时。培养之后, 用 Skatron 上清收集系统收集上清液。

$$\text{特定的溶解百分率} = 100 \times \left[\frac{\text{实验孔释放} - \text{自发释放 (SR)}}{\text{最大释放 (MR)} - \text{自发释放 (SR)}} \right]$$

按下面用 ⁵¹Cr (铬酸钠) 标记靶细胞即 E.G7(OVA)。在 15ml 的圆锥形试管中将总体积为 1.0ml 的 5×10^6 靶细胞和 250 μ Ci⁵¹Cr 混和。细胞悬浮液在 37 $^{\circ}$ C 水浴中培养 90 分钟, 并每隔 15 分钟轻轻混合。培养之后, 通过离心并用 15ml 培养液倾析洗标记的细胞 3 次。第三次离

心之后将细胞重悬于 10ml 新鲜培养液中并将其置于室温中 30 分钟，然后离心。最终细胞重悬于培养液中，密度为 1×10^5 细胞/ml。细胞毒性测定的结果见表 1。

表 1

物质	细胞毒性 (^{51}Cr - 释放)			
	效应细胞: 靶细胞比率			
	50:1	25:1	12.5:1	6.25:1
PBS*	13	10	7	2
3D - MLA/AF	61	60	59	45
非免疫脾细胞	8	4	2	2

*磷酸缓冲盐水

实施例 5 - 水性 ALD 制剂鼻内给药的抗体反应的刺激

鼻内给予 3D - MLA/AF 中的破伤风类毒素 (TT) 的小鼠产生的血清和粪便提取物中都可检测到 IgA 效价。而且，鼻内给予本发明的水性制剂和 TT 产生 IgG 同种型 IgG_{2a} 和 IgG_{2b} 的高效价。

鼻内给多组 ICR 小鼠磷酸缓冲盐水 (PBS) 中的或与 $25\mu\text{g}$ 3D - MLA/AF 混合的 0.5、2.5、10 或 $12.5\mu\text{g}$ 破伤风类毒素。小鼠在 0 天首次接触抗原，在第 10 天取血 ($\text{d}10\text{P}1^\circ$)，在第 14 天加强免疫，第 24 天取血 ($\text{d}10\text{P}2^\circ$)，在第 28 天加强，在第 38 天取血 ($\text{d}10\text{P}3^\circ$)。用 ELISA 测定每次取血的混合血清的 IgG 和 IgA 特异的抗 - 破伤风类毒素抗体。在第 22 天 ($\text{d}7\text{P}2^\circ$) 检查粪便提取液。免疫的小鼠的血清 IgG 和 IgA 效价见于表 2 - 5 中所示。

表 2

疫苗*	血清抗破伤风类毒素效价 ⁻¹						
	给药途径	IgG 特异的			IgA 特异的		
		d10P1°	d10P2°	d10P3°	d10P1°	d10P2°	d10P3°
0.5μg TT+PBS	鼻内	200	400	25,600	<200	<200	<200
2.5μg TT+PBS	鼻内	400	51,200	25,600	<200	<200	<200
12.5μg TT+PBS	鼻内	3,200	51,200	102,400	<200	200	400
0.5μg TT+3D-MLA/AF	鼻内	12,800	>409,600	>409,600	<200	800	6,400
2.5μg TT+3D-MLA/AF	鼻内	51,200	>409,600	>409,600	<200	12,800	25,600
12.5μg TT+3D-MLA/AF	鼻内	102,400	>409,600	>409,600	<200	25,600	102,400
0.5μg TT+PBS	SQ	800	204,800	409,600	<200	<200	<200

*n=4

表 3 表 2 中来自 d10P3°取血的血清 IgG 同种型分析

疫苗	抗破伤风类毒素效价 ⁻¹			
	给药途径	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃
0.5μg TT+PBS	IN	25,600	6,400	25,600
2.5μg TT+PBS	IN	51,200	3,200	25,600
12.5μg TT+PBS	IN	204,800	12,800	51,200
0.5μg TT+3D-MLA/AF	IN	819,200	409,600	819,200
2.5μg TT+3D-MLA/AF	IN	>819,200	819,200	>819,200
12.5μg TT+3D-MLA/AF	IN	>819,200	>819,200	>819,200
0.5μg TT+PBS	SQ	819,200	6,400	25,600
正常小鼠血清	---	<400	<400	<400

表 4

疫苗	血清抗破伤风类毒素效价 ⁻¹						
	给药途径	IgG 特异的		IgA 特异的		粪便提取物	
		d10P2°	d10P3°	d10P2°	d10P3°	IgG	IgA
TT*+3D-MLA/AF/PBS	IN	>102,400	>>102,400	6,400	25,600	<50	1,600
TT+DPPC/PBS	IN	6,400	6,400	100	200	<50	<50
TT+3D-MLA/AF/PBS	SQ	>102,400	>102,400	100	100	<50	<50
正常小鼠血清	—	50	50	100	100	<50	<50

*给予 10 μ g 破伤风类毒素

表 5 表 4 中 d10P3°取血的血清 IgG 同种型分析

疫苗	抗破伤风类毒素效价 ⁻¹			
	给药途径	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}
TT+3D-MLA/AF/PBS	IN	>819,200	102,400	409,600
TT+DPPC/PBS	IN	25,600	1,600	3,200
TT+3D-MLA/AF/PBS	SQ	>819,200	51,200	102,400
正常小鼠血清	---	<400	<400	<400

实施例 6 - 通过水性 ALD 制剂的鼻内给药刺激对乙型肝炎表面抗原的免疫反应

鼻内给予小鼠本发明的组合物中的乙型肝炎表面抗原 (HBSAG) 产生对该抗原的血清 IgG 和 IgA 效价。在阴道洗液中检测分泌的 IgA 并用细胞毒性测定检测细胞毒性 T-淋巴细胞反应的诱导。

鼻内用 20 μ l 的 2.5 μ g HBsAg+10 μ g 3D-MLA/AF 对多组 Balb/C 小鼠进行初次免疫 (1°)。按实施例 1 制备 3D-MLA/AF。21 天后鼻内给小鼠 20 μ l 的 7.5 μ g HBsAg+10 μ g 3D-MLA/AF 进行第二次免疫 (2°)。第二次免疫之后第 28 天用与第二次免疫相同的组合物进行第三次免疫 (3°)。第二次免疫之后 16 天 (d16, 2°之后) 及第三次免疫之后第 8 天 (d8, 3°之后) 进行测定以检测细胞毒性 T-淋巴细胞活性。

在第二次免疫之后第 22 天 (d22, 2°之后) 和第三次免疫之后第 21 天 (d21, 3°之后) 评估血清和粘膜抗体效价。所有的测定按本领域标准方法进行并且在前面实施例 2 和 4 中有描述。此实验的结果见表 6-8。

表 6

物质	% 细胞毒性 (⁵¹ Cr - 释放)				
	效应细胞: 靶细胞比率				
	天	50:1	25:1	12.5:1	6.25:1
3D-MLA/AF	2°之后第 16 天	38	22	15	9
载体		3	2	0	0
非免疫脾细胞		3	3	0	0
3D-MLA/AF	3°之后第 8 天	82	65	49	36
载体		5	2	1	1
非免疫脾细胞		7	5	3	3

表 7

物质	抗 HBsAg 效价 ⁻¹			
	天	IgG ₁	IgG _{2a}	IgA
3D-MLA/AF	2°之后第 22 天	256,000	64,000	1,600
载体		<2,000	<2,000	<200
3D-MLA/AF	3°之后第 21 天	1,000,000	1,000,000	25,600
载体		<2,000	<2,000	<200

用 2.5μg HBsAg+10μg 3D - MLA/AF 鼻内免疫多组 Balb/C 小鼠并在 21 天后用 7.5μg HBsAg+10μg 3D - MLA/AF 鼻内给药加强免疫。加强免疫之后第 10 天收集阴道样品。

表 8

物质	阴道洗液 抗 HBSAG 效价	
	IgG	IgA
3D - MLA/AF	100	6400
载体	<50	<50

本发明组合物中的 HBsAg 的鼻内给药刺激对该抗原的体液和细胞免疫应答。用配制在 3D - MLA/AF 的抗原鼻内免疫诱导细胞毒性 T - 淋巴细胞反应和抗原特异性体液和粘膜免疫应答。

实施例 7 - 通过水性 ALD 制剂的鼻内给药产生对流感的保护性免疫反应。

用含有配制在本发明组合物中的血凝素抗原的 FLUSHIELD 流感疫苗鼻内免疫小鼠产生在阴道洗液中重新发现的 IgG 和 IgA。免疫的小鼠也 100% 得到保护免受以后的流感攻击。

鼻内用含有 0.3 μ g 血凝素抗原 (HA) + 10 μ g 3D - MLA/AF 的 FLUSHIELD 流感疫苗 (Wyeth-Lederle) 以 21 天的时间间隔免疫 ICR 小鼠 3 次。按实施例 1 制备 3D - MLA/AF。在最后一次免疫之后 14 天收集阴道洗液。最后一次免疫之后第 35 天用 10LD₅₀ (半数致死量) 的传染性流感 A/HK/68 攻击小鼠并监测死亡率。

表 9

分组	IgA 阴道洗液	IgG 阴道洗液	% 保护作用
未免疫的	<20	<20	0
载体	160	80	60
3D - MLA/AF	2560	1280	100

实施例 8-单磷酰基脂质 A 的组合物

单磷酰基脂质 A 可配制成本发明的水性组合物中并可以与实施例 1-7 中相同的量给药以产生相似的结果。

应理解前面所述的实施例仅仅是本发明的说明。可对组合物和/或所用的方法进行某些修饰并且仍可达到本发明的目的。这些修饰可包括在要求专利保护的本发明范围之内。

说明书附图

图 1(A)

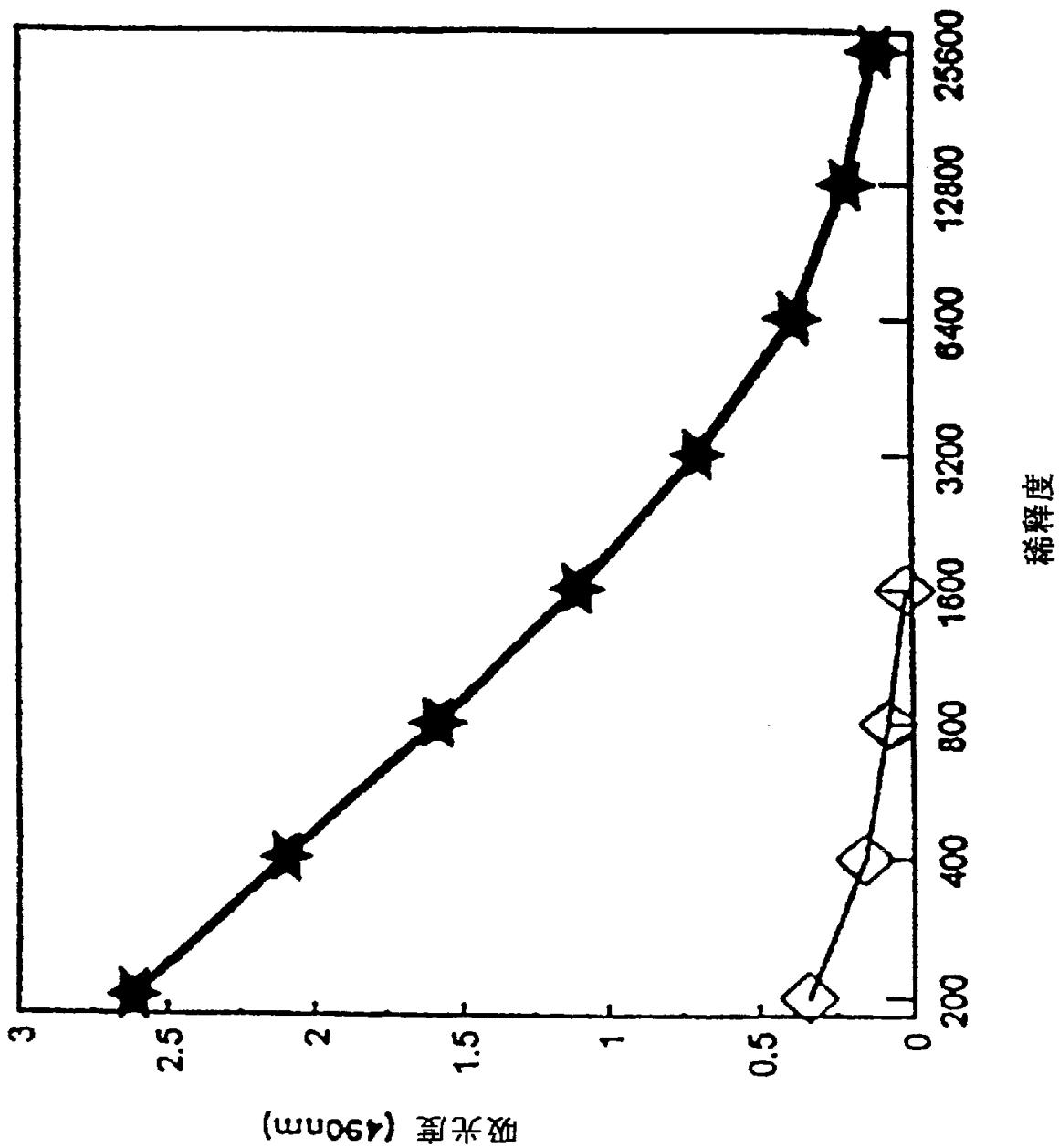


图 1(B)

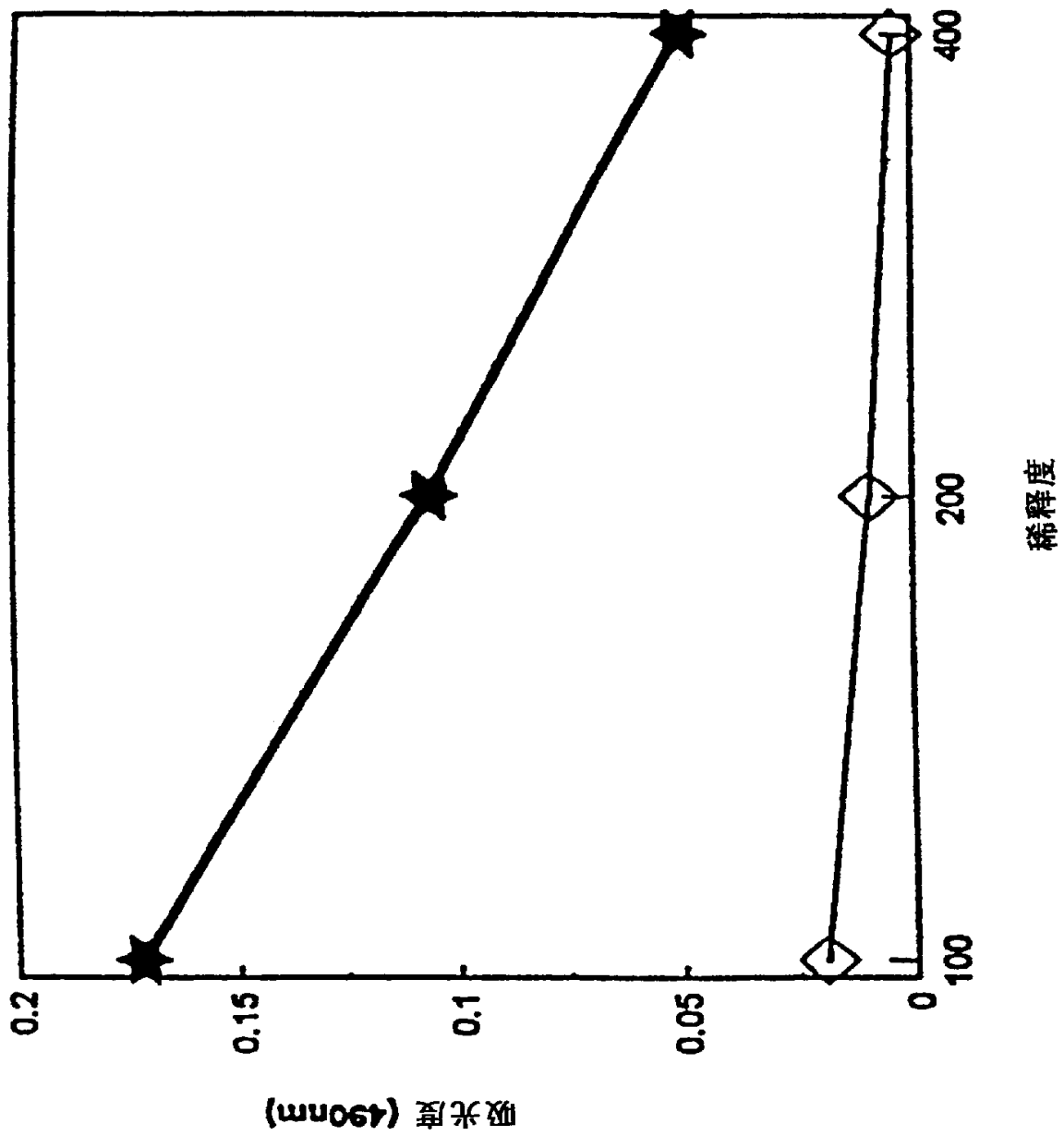


图 1 (C)

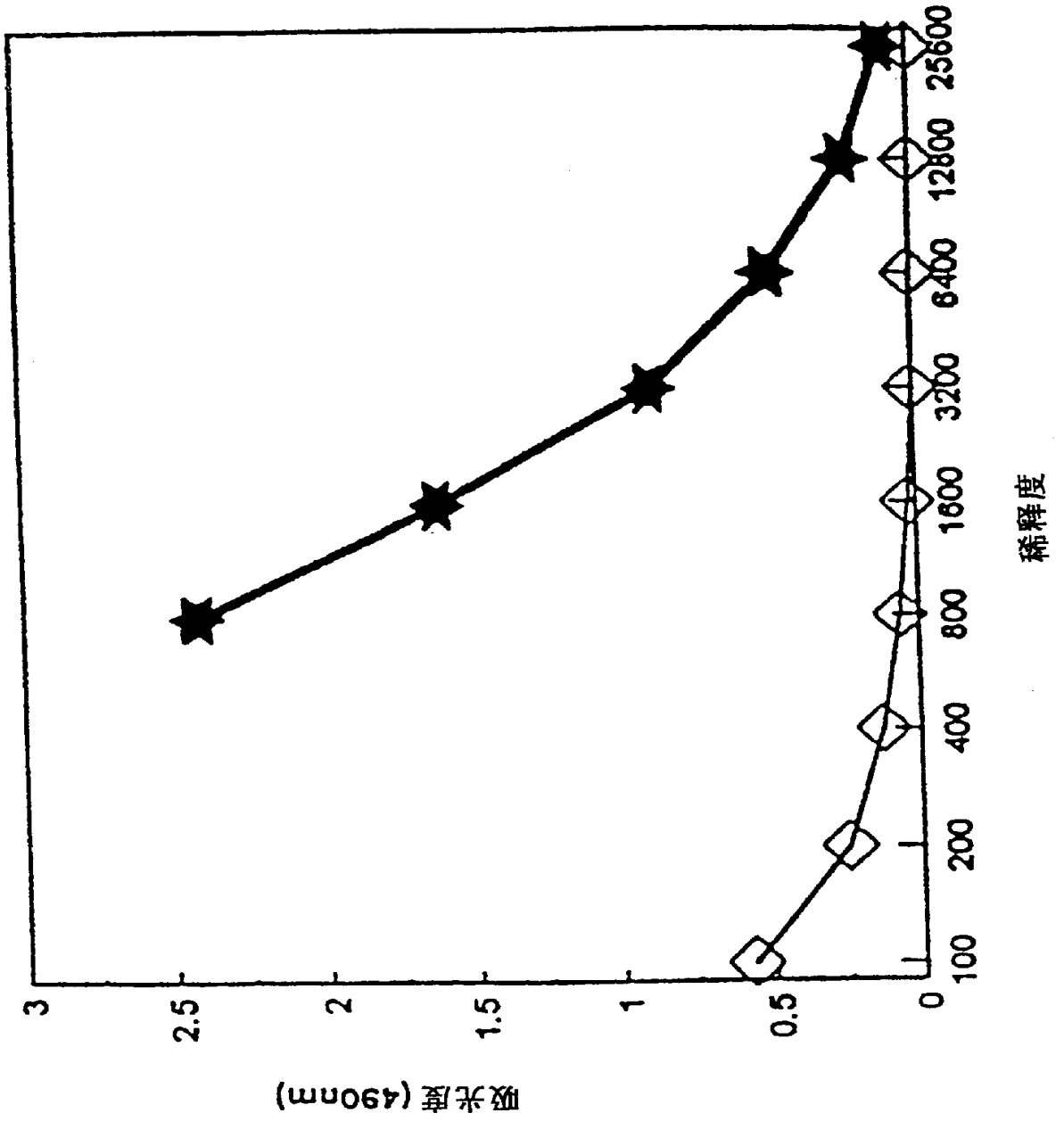


图 1 (D)

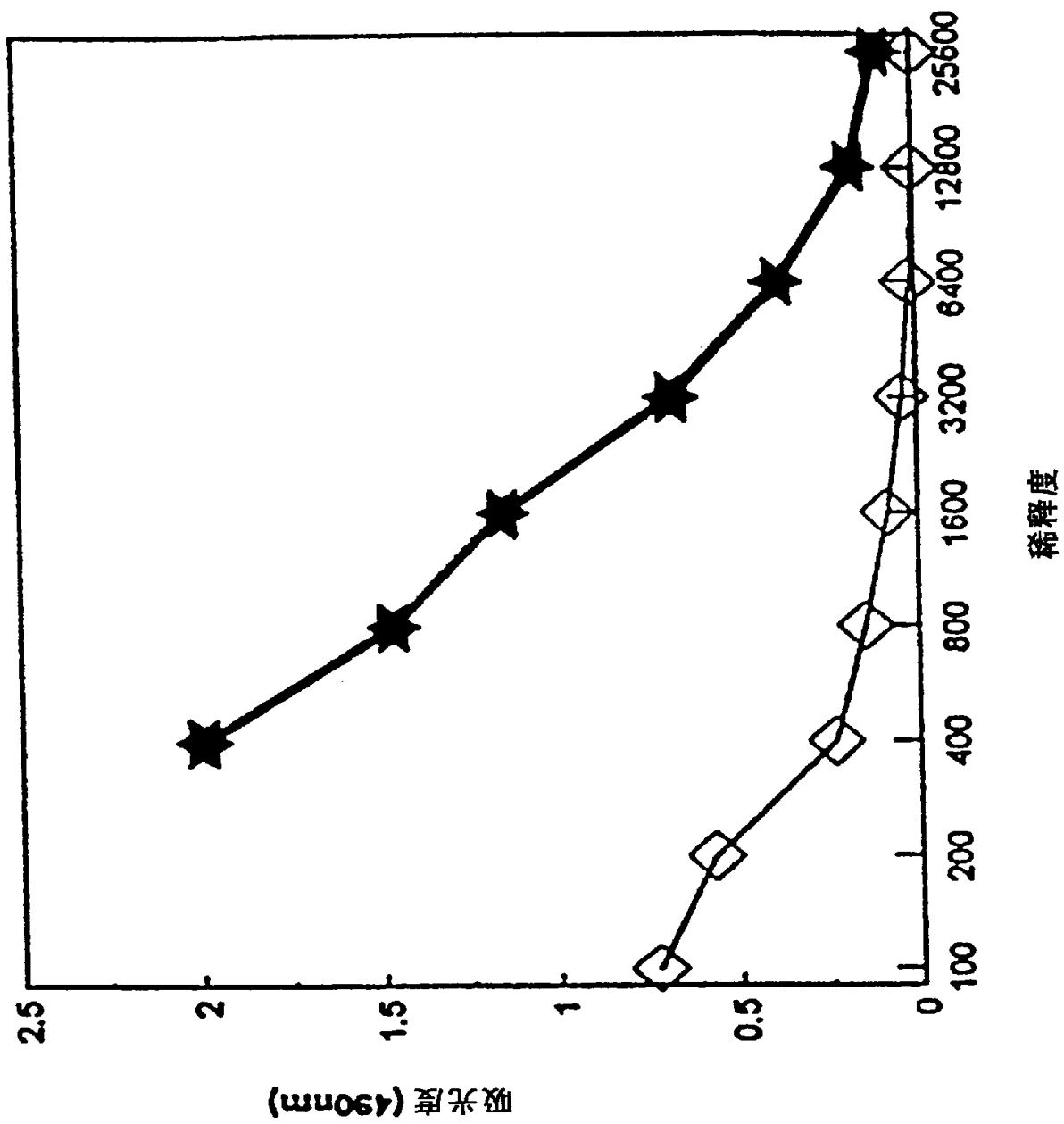


图 2

