

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/04

A61K 39/21 A61K 39/002

A61K 47/44 A61K 47/14



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817408.9

[43] 公开日 2005 年 1 月 5 日

[11] 公开号 CN 1561230A

[22] 申请日 2002.7.26 [21] 申请号 02817408.9

[30] 优先权

[32] 2001.7.26 [33] NZ [31] 513169

[86] 国际申请 PCT/NZ2002/000132 2002.7.26

[87] 国际公布 WO2003/009868 英 2003.2.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.5

[71] 申请人 奥塔戈创新公司

地址 新西兰达尼丁

共同申请人 动物健康委员会公司

阿戈里索契有限公司

[72] 发明人 弗兰克·欧内斯特·阿尔德威尔

布赖斯·马尔科姆·巴都

伊恩·乔治·塔克

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有
限责任公司

代理人 梁兴龙 王达佐

权利要求书 5 页 说明书 24 页 附图 7 页

[54] 发明名称 抗原组合物

[57] 摘要

本发明涉及抗原组合物及使用该抗原组合物使动物免疫的方法。该抗原组合物包含通常为固体形式的脂质制剂及至少一种抗原成分。优选的抗原成分为活的有机体。在优选的实施方案中该组合物被配制成口服使用。

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

1. 一种抗原组合物，其包含脂质制剂和至少一种抗原成分，所述抗原成分包含活的有机体。

5

2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中所述的脂质制剂是固体形式。

3. 如权利要求 2 所述的组合物，其中所述的脂质制剂在 10°C 或以上时为固体形式。

10

4. 一种抗原组合物，其包含在 10°C 或以上时为固体形式的脂质制剂和至少一种抗原成分。

5. 如权利要求 4 所述的组合物，其中所述的抗原成分是蛋白质、糖
15 蛋白质、肽、或者具有蛋白质或肽成分的因子或其混合物。

6. 如权利要求 4 所述的组合物，其中所述的抗原成分包含活的有机体。

7. 如权利要求 1 至 3 或 6 中任一项所述的组合物，其中所述的活的
20 有机体选自真菌、原生动物、细菌和病毒。

8. 如权利要求 7 所述的组合物，其中所述的病毒是 HIV 或 SIV。

9. 如权利要求 8 所述的组合物，其中所述的细菌选自布鲁氏菌、炭
25 疽和分支杆菌。

10. 如权利要求 9 所述的组合物，其中所述的细菌是分支杆菌。

30 11. 如权利要求 10 所述的组合物，其中所述的分支杆菌选自结核分

枝杆菌复合体(包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌及田鼠分枝杆菌)、胞内鸟型分枝杆菌复合体(包括胞内分枝杆菌和鸟型分枝杆菌)、副结核杆菌、母牛分支杆菌、耻垢分枝杆菌、龟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、麻风分枝杆菌、海鱼分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、
5 猿分枝杆菌、嗜血分支杆菌、摩尔分支杆菌、石氏分枝杆菌、胃分支杆菌、地分支杆菌复合体和无色分枝杆菌, 包括这些菌株的功能等效变体、天然或基因工程产生的克隆体、变异体和重组体及其抗原成分。

12. 如权利要求 11 所述的组合物, 其中所述的分支杆菌是 *M. bovis*。
10

13. 如权利要求 12 所述的组合物, 其中所述的 *M. bovis* 是卡介苗 (BCG)。

14. 如权利要求 1 至 13 中任一项所述的组合物, 其包含至少两种抗原成分。
15

15. 如权利要求 14 所述的组合物, 其中一种抗原成分是活的有机体, 一种抗原成分是蛋白质或肽。

16. 如权利要求 15 所述的组合物, 其中所述的活的有机体是分支杆菌。
20

17. 如权利要求 16 所述的组合物, 其中所述的分支杆菌是 *M. bovis*。

18. 如权利要求 17 所述的组合物, 其中所述的 *M. bovis* 是 BCG。
25

19. 如权利要求 15 至 18 中任一项所述的组合物, 其中所述的蛋白质是免疫避孕蛋白质。

20. 如权利要求 15 至 18 中任一项所述的组合物, 其中所述的蛋白质
30

或肽是弱免疫原性的。

21. 如权利要求 1 至 20 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂在约 10°C~30°C 下为固体形式。

5

22. 如权利要求 21 所述的组合物，其中所述的脂质制剂在约 20°C~30°C 下为固体形式。

23. 如权利要求 1 至 22 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂在约 30°C 到 37°C 之间发生从固体到液体的转变。

10

24. 如权利要求 1 至 23 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂包含 40%-100%，优选为 60%-100%，优选为 80%-100%，更优选为 90%-100% 的 C₁₆ 和/或 C₁₈ 脂肪酸。

15

25. 如权利要求 1 至 23 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂包含 10%-40%，优选为 20%-35%，更优选为 25%-32% 的 C₁₆ 脂肪酸；及 40%-90%，优选为 50%-80%，更优选为 60%-70% 的 C₁₈ 脂肪酸。

20

26. 如权利要求 1 至 23 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂包含少于 35%，优选少于 25%，更优选少于 10% 的 C₁₄ 或更短的脂肪酸。

27. 如权利要求 1 至 23 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂包含少于 5% 的 C₁₄ 或更短的脂肪酸、25%-32% 的 C₁₆ 脂肪酸及 60%-70% 的 C₁₈ 脂肪酸。

25

28. 如权利要求 1 至 23 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂包含：

20%-60% 的饱和脂肪酸；

30

25%-60% 的单不饱和脂肪酸；及

0.5%-15%的多不饱和脂肪酸。

29. 如权利要求 28 所述的组合物，其中所述的脂质制剂包含：

30%-55%的饱和脂肪酸；

5 30%-60%的单不饱和脂肪酸；及

3%-11%的多不饱和脂肪酸。

30. 如权利要求 29 所述的组合物，其中所述的脂质制剂包含：

40%-50%的饱和脂肪酸；

10 40%-55%的单不饱和脂肪酸；及

5%-9%的多不饱和脂肪酸。

31. 如权利要求 1 至 23 中任一项所述的组合物，其中所述的脂质制剂具有如下的配方：3%的肉豆蔻酸；26%的棕榈酸；15%的硬脂酸；40%
15 的油酸；及 6%的亚油酸。

32. 如权利要求 1 至 31 中任一项所述的组合物，其基本上没有含水成分。

20 33. 如权利要求 1 至 32 中任一项所述的组合物，其被配制成非肠道使用。

34. 如权利要求 32 所述的组合物，其被配制成皮下使用。

25 35. 如权利要求 1 至 32 中任一项所述的组合物，其被配制成口服使用。

36. 如权利要求 1 至 35 中任一项所述的组合物，所述组合物是疫苗。

30 37. 如权利要求 1 至 35 中任一项所述的组合物，所述的组合物是疫

苗佐剂。

38. 一种使动物免疫的方法，所述方法包括对所述的动物使用如权利要求 1 至 37 中任一项所述的组合物。

5

39. 一种刺激动物中粘膜免疫反应的方法，所述方法包括对所述的动物使用如权利要求 1 至 37 中任一项所述的组合物。

40. 如权利要求 38 或 39 所述的方法，其中所述的使用方式是口服使
10 用。

41. 如权利要求 38 或 39 所述的方法，其中所述的使用方式是皮下使用。

抗原组合物

5 技术领域

本发明主要涉及脂质用于制备抗原组合物的用途，特别是制备活的细菌疫苗的用途，及使用该组合物使动物免疫的方法。

背景技术

10 大多数人和动物的病原体，包括那些引起肺结核(TB)的病原体，可通过粘膜表面引发感染。因此，对抗这些病原体的保护性免疫可能需要强粘膜免疫反应的诱导。然而，在非肠道免疫后的粘膜免疫反应一般较弱。尽管对保护粘膜位点的疫苗，特别是TB疫苗有着明显的需要，但当前使用的疫苗是通过皮内或皮下注射使用的。因而人们希望开发更有效的组
15 合物，和/或可选择途径的疫苗给药系统。特别是口服疫苗具有许多优点，包括易于服用，并以粘膜免疫反应为目标。尽管如此，能够对动物和人提供粘膜和/或系统免疫的口服疫苗到目前为止大多是无效的。这种疫苗的功效受到在其通过肠道时疫苗退化的影响。特别是大多数抗原化合物具有肽键，其很容易被肠道中的胃酶和蛋白酶分解。

20 许多疫苗依赖于有机体冻干制剂的使用。例如，目前使用的人TB疫苗以被称为卡介苗(BCG)的活减毒细菌的冻干制剂为基础。然而，已表明冻干过程可导致BCG活性损失30-50%并损害剩余活细菌的恢复(7)。可在使用前使有机体保持较大活性的组合物将极大地提高疫苗的功效。

为改善免疫反应，抗原与许多佐剂混合以刺激免疫原性。这些佐剂
25 主要是明矾和水包油型乳化液。后一类以弗氏(Freund's)矿物油佐剂为代表。然而，在人和脊椎动物疫苗中使用弗氏完全佐剂(FCA)是不可取的，因为已有毒性反应的报道。基于这些理由，弗氏佐剂可能也不适用于口服。

在其它的水包油型乳化液中因为油含量高，所以需要表面活性剂。
30 表面活性剂的清洁性使它们不适用于肠道或口服使用。另外，甚至对于

被批准使用的表面活性剂也有毒性反应的报道。乳化液其它的缺点在于其是一种液体分散于另一种液体中时不能混溶的异质系统，该系统是不稳定的，并且水相随时间发生分离，这对使疫苗保持在稳定的悬浮液中造成困难。此外，防止在油包水型乳化液的水相中截留的抗原免于降解是不可能的。

也研究了脂质体和脂质囊泡在疫苗上的使用，特别是对容易胶囊化的较小抗原成分而言。通常，脂质体和脂质囊泡对于较大抗原如活的微生物的胶囊化是无效的。另外，脂质体和脂质囊泡生产成本高且生产耗时，并且在它们的制备中所用的提取过程可能导致疫苗制剂化学结构或活性改变，因此导致疫苗免疫原性的改变。例如，受热和溶剂可能改变抗原成分如蛋白质的生物学完整性。

因此本发明的目的是提供一种抗原组合物和/或给药系统，其可解决这些需要或至少为公众提供一种有用的选择。

15 发明概述

因此，在第一个方面本发明提供一种抗原组合物，其包含脂质制剂和至少一种抗原成分，该抗原成分包含活的有机体。

优选地，该脂质制剂是固体形式。

在另一个方面本发明提供一种抗原组合物，其包含在 10°C 或以上时为固体形式的脂质制剂和至少一种抗原成分。

优选地，在本发明的组合物中使用的脂质制剂包含长链脂肪酸。

在脂肪酸组分方面，优选的脂质制剂包含 40%-100%，优选为 60%-100%，更优选为 80%-100%，再更优选为 90%-100% 的 C₁₆ 和/或 C₁₈ 脂肪酸。

更优选的组合物含有脂质制剂，该脂质制剂包含少于 35%，优选少于 25%，更优选少于 10% 的 C₁₄ 或更短的脂肪酸。

在一种实施方案中，脂质制剂包含：

20%-60% 的饱和脂肪酸；

25%-60% 的单不饱和脂肪酸；及

30 0.5%-15% 的多不饱和脂肪酸。

在特别优选的组合物中，脂质制剂包含：

35%-50%的饱和脂肪酸；

40%-55%的单不饱和脂肪酸；及

5%-9%的多不饱和脂肪酸。

- 5 在本发明中所用的通常优选的脂质制剂具有以下配方：3%的肉豆蔻酸；26%的棕榈酸；15%的硬脂酸；40%的油酸；及6%的亚油酸。

抗原成分可以是蛋白质、糖蛋白质、肽、或者具有蛋白质或肽成分的因子。

在一种实施方案中，抗原成分包含活的有机体。

- 10 优选地，本发明组合物中的活的有机体是细菌，特别是非病原性细菌，更优选属于分支杆菌属的细菌。本发明中使用的特别优选的分支杆菌是牛型结核菌(*Mycobacterium bovis*)BCG。

- 15 在一种实施方案中，组合物包含至少两种抗原成分。第一种优选为活的有机体，而第二种抗原成分优选取自传染媒介或者是弱免疫原性的蛋白质或肽。

在另一个方面，本发明提供一种制备本发明的抗原组合物的方法，该方法包括将抗原成分与脂质制剂混合。

在另一个方面，本发明还提供一种使动物免疫的方法，该方法包括对所述的动物使用本发明的抗原组合物。

- 20 在另一个方面，本发明提供一种刺激动物中粘膜免疫反应的方法，该方法包括对所述的动物使用本发明的抗原组合物。

在这些方法中该组合物的使用优选通过口服途径。

本发明还涉及脂质制剂在制备本发明的抗原组合物中的用途。

25 附图简要说明

现在将参照附图对本发明的各方面进行描述，其中：

图1，脂质制剂的脂肪酸组分。按照标准方案用气相色谱分析脂质。各脂质的脂肪酸组分以总脂肪酸组分的百分比表示。

- 30 图2，配制且储存在4°C(2a)或室温(10-25°C)(2b)的脂质中后BCG的活性。BCG制剂被加温到37°C并在7H9肉汤中乳化。通过将连续10倍

稀释的各乳化液接种到 7H11 琼脂平板上确定活的有机体的数目。在培养 2-3 周后确定制剂介质的 CFU/ul 数目。结果表示的是两次试验的结果且用平均数表示。

图 3, 在口服不同剂量的按配方配制的 *M. bovis* BCG 疫苗后的牛 PPD 诱导的 IFN- γ 反应。小鼠在口服按配方配制的 *M. bovis* BCG(圆形)、非按配方配制的 *M. bovis* BCG(三角形)或仅用制剂材料(菱形)后第 8 周处死。脾细胞用牛 PPD 孵育 72 小时, 然后收集上清液并用夹心 ELISA 法进行分析。每个处理组包含 6 只小鼠, 脾被单独地处理。结果以 pg/ml 表示, 并用三次测定的平均值表示。竖条表示标准误差。

图 4, 在 BALB/c 小鼠中对 *M. bovis* BCG 疫苗抗原诱导的脾 IFN- γ 反应。在皮下注射 10^6 CFU 的 *M. bovis* BCG 疫苗(方形)、口服 10^7 CFU 的按配方配制的 *M. bovis* BCG 疫苗(圆形)、非按配方配制的 *M. bovis* BCG(三角形)或仅用制剂材料(菱形)后的第 2、4、6 和 8 周无痛处死小鼠。脾细胞用牛 PPD 孵育 72 小时, 然后收集上清液并用夹心 ELISA 法进行分析。每个处理组包含 5-6 只小鼠, 脾被单独地处理。第 8 周的结果来自 2 个分离的试验, P 值 < 0.05 (Student *t* 检验)。竖条表示标准误差。

图 5, 与非粘附腹膜浆细胞(NPEC)共培养的巨噬细胞对 *M. bovis* 的生长抑制。用 *M. bovis* 以每个巨噬细胞两个细菌的 MOI 感染巨噬细胞, 非粘附的自体同源 NPEC 按每个巨噬细胞 10 NPEC 的比率加入。在感染后 72 小时对 [3 H] 尿嘧啶混合进行分析。不含 *M. bovis* 的细胞培养的平均 [3 H] 尿嘧啶摄入是 460cpm。共培养巨噬细胞和 NPEC 的细胞内细菌的生长用三次的平均值表示。结果代表两个试验。*表示与仅含制剂材料的对照组的平均值有显著差异的平均值; 竖条表示标准误差。

图 6, 负鼠口服接种按配方配制的 BCG 对体外外周血淋巴细胞对 PPD-B 的母细胞化反应 (blastogenic response) 的影响。按配方配制的 BCG ◆---◆; 非按配方配制的 BCG ■---■; 非接种的对照 X---X; 结果以平均刺激指数(SI)表示。*表示与非接种的对照组的平均值有显著差异的平均值。竖条表示 SE。

图 7, 口服接种按配方配制的 BCG 对用 *M. bovis* 进行免疫性实验的负鼠的体重的影响。平均体重变化在从进行免疫性实验到处死的时间

确定。进行免疫性实验前的负鼠的平均体重是 $3.0 \pm 0.07 (\pm SE)$ kg。竖条表示 SE。

图 8, 口服接种按配方配制的 BCG 对用 *M. bovis* 进行免疫性实验的负鼠的肺重量的影响。平均肺重量在处死时确定。为使随体重变化的肺重量差异标准化, 将各动物的肺重量与体重相比并表示为比率。*表示与非接种的对照组的平均值有显著差异的平均值; 竖条表示 SE。

图 9, 负鼠口服接种按配方配制的 BCG 对用 *M. bovis* 进行免疫性实验后的从肺分离的分支杆菌平均数的影响。结果以 CFU(\log_{10})/g 组织的几何平均数表示。*表示与非接种的对照组的平均值有显著差异的平均值; 竖条表示 SE。

图 10, 负鼠口服接种按配方配制的 BCG 对用 *M. bovis* 进行免疫性实验后的从脾分离的分支杆菌平均数的影响。结果以组织的 CFU (\log_{10})/g 的几何平均数表示。*表示与非接种的对照组的平均值有显著差异的平均值; 竖条表示 SE。

图 11, 对四种口服脂质 BCG 制剂或皮下接种的免疫反应的比较。图中显示了接种(第 0 周)和进行免疫性实验(第 8 周)后对负鼠的体外外周血淋巴细胞对 PPD-B 的母细胞化反应的影响。结果表示为平均刺激指数 (SI)。

图 12 为本发明的普通疫苗给药系统的示意图。

详细说明

因此, 在第一个方面, 本发明提供一种抗原组合物, 其包含脂质制剂和至少一种抗原成分, 该抗原成分包含活的有机体。

优选地, 脂质为固体形式。适宜的是在 10°C 或以上为固体形式的脂质。

在另一个方面, 本发明提供一种抗原组合物, 其包含在 10°C 或以上时为固体形式的脂质制剂和至少一种抗原成分。

在上述制剂中采用的脂质优选适于动物或人体食用, 并可以广泛地从天然的(来自于植物或动物)或合成的脂质产品中选取, 包括油、脂和蜡。

最一般的情况是脂质材料在高于约 30°C 的温度下为液体，也就是说应选择在将脂质给药、最通常是将脂质口服给药的动物的生理温度下可达到熔点的脂质。理想地，脂质在大气压下在 10-30°C 下为固体形式，优选在大气压下在 20°C-30°C 时仍为固体。然而脂质的熔化温度不是唯一的，并且包括具有熔化温度范围的油、脂和蜡。

本文优选使用的脂质在约 30°C 和约 37°C 的生理温度之间会发生从固相到液相的转变。从本领域技术中可得到脂相行为的总结，例如参见(10)。因此，有经验的读者能够根据本领域的信息和简单的试验来选择具有所需要特性和熔点的脂质。

适宜的脂质制剂是包括羧酸甘油酯在内的甘油三酸酯、由脂肪链和 -COOH 末端组成的化合物、饱和与不饱和的脂肪酸、及其混合物。

当前优选的脂质主要是含有 C₈-C₂₀ 酰基的甘油三酸酯，例如肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、parinic、月桂酸、亚麻酸、花生四烯酸和二十碳五烯酸或其混合物。

现已确定，对于在本发明中可用的脂质制剂，优选的是较长链的脂肪酸，例如 C₁₆-C₁₈ 脂肪酸。已发现长链脂肪酸对有机体的保护更有效，如给予小鼠和负鼠的疫苗中的 BCG。如此看来，在本发明中优选使用的脂质制剂包含：40%-100%，优选为 60%-100%，优选为 80%-100%，更优选为 90%-100% 的 C₁₆ 和/或 C₁₈ 脂肪酸。

一般 C₁₆ 脂肪酸占总脂肪酸含量的 10%-40%，更优选为 20%-35%，再更优选为 25%-32%，而 C₁₈ 脂肪酸占总脂肪酸含量的 40%-90%，优选为 50%-80%，更优选为 60%-70%。

优选的脂质制剂还包含少于 35%，优选少于 25%，更优选少于 10% 的 C₁₄ 或更短的脂肪酸。

从链长度来看，优选的脂质制剂包含少于 5% 的 C₁₄ 或更短的脂肪酸，25%-32% 的 C₁₆ 脂肪酸和 60%-70% 的 C₁₈ 脂肪酸。

从它们的脂肪酸含量来看，在本发明中使用的脂质制剂包含：20%-60%，优选为 30%-55%，更优选为 40%-50% 的饱和脂肪酸；25%-60%，优选为 30%-60%，更优选为 40%-55% 的单不饱和脂肪酸；及 0.5%-15%，优选为 3%-11%，更优选为 5%-9% 的多不饱和脂肪酸。

在本发明中使用的特别优选的脂质制剂包含 40%-50%的饱和脂肪酸，40%-50%的单不饱和脂肪酸，及 5%-9%的多不饱和脂肪酸。

在本发明中使用的通常优选的脂质制剂按 HPLC 分析测定，具有以下配方：3%的肉豆蔻酸，26%的棕榈酸，15%的硬脂酸，40%的油酸及
5 6%的亚油酸。

通常优选的脂质制剂还包含来自于动物的分馏脂质复合物、一种或多种氢化植物油，特别是橄榄油或椰子油、商用栓剂基本成分、其它的脂质制剂或其混合物。

脂质制剂可用于抗原组合物的制备，及防止组合物中的抗原退化。脂质
10 制剂对于保持活的有机体、尤其是细菌的活性特别有用。脂质制剂起到将有机体保持在活的而不是休眠状态的作用。这一点对于配制成口服使用的包含活的有机体的疫苗特别重要。脂质还可将抗原保持在均匀的悬浮液中。也就是说，在本发明的组合物中抗原成分、特别是活的有机体在整个固体或膏状脂质基质中是均匀分布的。在口服时脂质还可防止抗原受胃肠道分泌物的破坏。
15 在通过其它途径如皮下使用时防止受巨噬细胞的攻击也是可能的。这使得抗原和特别是活的有机体可以通过胃肠道粘膜吸收，并随后可以在宿主中复制。活的有机体在宿主中的复制刺激了保护性免疫反应，这一点通过用剧毒细菌进行免疫性实验后疾病严重程度的降低得到了确定。

适用于多种给药途径的制剂还可以包括添加剂，如填充剂、增量剂、粘
20 结剂、润湿剂、乳化剂、抛光剂、表面活性剂、助悬剂、防腐剂、着色剂、盐、抗氧化剂，包括谷氨酸钠(MSG)、维生素如维生素 E、丁基化羟基茴香醚(BHA)、白蛋白-葡萄糖-过氧化氢酶(ADC)、保护涂层、引诱剂、芳香剂、及有助于包含在脂质中的有机体存活的试剂，但并不局限于此。

保护涂层或肠衣可以从例如包括明胶在内的凝胶、石蜡及塑胶中选择。
25 当选择口服途径时涂层还有助于防止暴露于胃酸和酶。

当用于口服使用时，制剂还可以包括例如改善口味的添加剂，如调味剂(包括茴香油、巧克力和薄荷油)和甜味剂(包括葡萄糖、果糖或任何其它食糖或人造甜味剂)。

抗原成分可以是蛋白质、糖蛋白质、肽、或者具有蛋白质或肽成分的
30 的因子或其混合物。这种成分可以来自可被用于在动物中产生免疫反应的试剂。

最通常地，抗原至少带有一个抗原决定基，其存在于对处理的动物是病原性的有机体上。也可以使用本领域公知的其它抗原结构，例如与载体结合的多糖、糖脂和半抗原。

优选地，抗原成分是活的有机体。

- 5 组合物中的活的有机体可以选自真菌、原生动物、细菌和病毒。例如，HIV、SIV、布鲁氏菌和炭疽。优选地，有机体是细菌，优选在配制成口服或皮下给药的组合物中使用通常选自非病原性细菌的有机体，优选的细菌是选自分支杆菌属的非病原性菌株，包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)复合体(包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、非洲分枝杆菌(*M. Africanum*)及田鼠分枝杆菌(*M. microtii*))、胞内鸟型分枝杆菌(*M. avium-intracellulare*)复合体(包括胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)和鸟型分枝杆菌(*M. avium*))、副结核杆菌(*M. paratuberculosis*)、母牛分支杆菌(*M. vaccae*)、耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)、龟分枝杆菌(*M. chelonae*)、偶发分枝杆菌(*M. fortuityum*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、麻风分枝杆菌(*M. leprae*)、海鱼分枝杆菌(*M. Marinum*)、溃疡分枝杆菌(*M. ulcerans*)、猿分枝杆菌(*M. simiane*)、嗜血分支杆菌(*M. haemophilum*)、摩尔分支杆菌(*M. malmoense*)、石氏分枝杆菌(*M. shimoidei*)、胃分支杆菌(*M. gastri*)、地分支杆菌复合体(*M. terrae complex*)和无色分枝杆菌(*M. nonchromogenicum*)。在特别优选实施方式中该试剂为
- 10 卡介苗(BCG)，其是 *M. bovis* 的减毒株，包括下列菌株：83/6235, Pasteur 1173P2, Glaxo 1077, Japanese 172, Prague, Russian, Brazilian, Danish 1331, Copenhagen, Connaught，并包括这些菌株的功能等效变体和其它的 *M. bovis* 减毒株、克隆体、变异体和重组体，或者天然重组体或者通过多种
- 15 基因工程技术产生的重组体，及其抗原成分。

- 25 从前面的说明中可以理解，抗原成分是蛋白质或肽等的复合物。

在一种实施方案中，组合物包含至少两种选自上述的抗原成分，且可能包括亚单位抗原的多种组合。三种或更多的抗原成分也是可行的。

- 组合物中抗原成分的浓度可以按照公知的技术方案变化，只要它的量在给动物使用后能有效地刺激免疫反应，特别是在与小肠的淋巴组织
- 30 相关的消化道中的免疫反应。在分支杆菌的情况下，在 1×10^5 到 1×10^{10} 菌落形成单位(CFU)/ml 的范围内是适宜的。优选该浓度为 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$

CFU/ml。对于蛋白质和肽型抗原，在 10-1000 μ g/g 范围内的制剂是适宜的。对于病毒型抗原， 1×10^3 - 1×10^{10} ，优选 1×10^5 - 1×10^8 空斑形成单位 (PFU)/ml 的范围是适宜的。免疫反应可以是体液或细胞介导的，包括粘膜免疫反应。

- 5 因此，在另一个方面，本发明涉及一种通过给动物使用本发明的抗原组合物而刺激动物中粘膜免疫反应的方法。

该组合物可以使用本领域中已知的技术进行制备。通常如果需要可将脂质制剂加热至液化，再加入如上所述的抗原成分和其它组分(如果使用)。抗原组合物的分散可以通过混合、振荡或其它对抗原成分活性没有不良影响的技术实现。

10 在本发明中使用的更优选的组合物也基本上没有包括水在内的含水成分。在此使用的术语“基本上没有”意指该组合物含有少于 10%的含水成分，优选少于 5%的含水成分。如上所述，含水成分特别是水溶剂的出现降低了脂质制剂的保护效应，特别是在肠道中。

- 15 在一种实施方案中，抗原组合物是疫苗。

在一种变化的实施方案中，抗原组合物是与疫苗一起使用以增强疫苗功效的佐剂。特别优选含分支杆菌和含 BCG 的抗原组合物用作佐剂。

本发明的抗原组合物也可被用于对第二种或更多的如上所述用作抗原成分的抗原分子产生反应，特别是对那些具有弱免疫原性的抗原成分。这可以通过将抗原分子与组合物的抗原成分结合而使本发明抗原组合物中的第二种或更多的抗原分子共同给药来实现。结合可以使用标准的技术来实现(9)，特别地，相关抗原可以与抗原载体或佐剂通过不干扰体内抗体生成的连接基团结合。抗原载体或佐剂可以是任何包含上述有机体的抗原成分，但优选是分支杆菌，更优选是 BCG。适用的连接基团包括甘露糖受体结合蛋白，如卵白蛋白和与 Fc 受体结合的蛋白。第二种或更多的抗原分子优选为蛋白质或肽。特别优选的蛋白质是免疫避孕 (immunocontraceptive) 蛋白质。脂质再次用作给药基质，在图 12 中给出了这种疫苗给药系统的例子。当使用该组合物时，可导致对结合的分

20 子或共同给药分子增强的免疫反应。

25

在本发明的另一方面中还提供了一种使动物免疫的方法，该方法包括对所述的动物使用本发明的抗原组合物。

在此使用的术语“动物”指的是温血动物，特别是哺乳动物。人、狗、猫、鸟、牛、绵羊、鹿、山羊、大鼠、小鼠、兔、负鼠、獾、豚鼠、鼬、猪和水牛是在该术语含义范围内的动物的例子。单胃动物和反刍动物特别符合该术语。

本发明的组合物可以通过各种不同的途径使用，包括非肠道(皮下、皮内、肌肉内)、粘膜、气雾剂和口服使用，但不局限于此。在一种实施方案中，口服使用是优选的。组合物可以以药丸、片剂、胶囊、锭剂或其它适宜剂型的形式使用。由于避免了使用针和注射器，口服用药被众多使用者接受，并且对于野生动物来说是经济和实用的接种方法。因此在一种实施方案中申请人提供了用于口服使用的新型活疫苗。

在变化的实施方案中，组合物可以被配制成为通过注射进行的非肠道给药。这种给药形式还可以包括与身体组织相容的可注射的和皮下储存制剂。由储存制剂导致的延时释放吸收可以单独使用脂质制剂或与另外的生物降解聚合物一起使用而获得。储存制剂使得抗原成分的持续释放以一种更近似于感染过程的方式进行，从而促进在使用该组合物的动物体内免疫反应的进行。脂质保护效应也与这些给药形式同时发生。

组合物可以以单剂量使用，特别是对于非肠道使用，或者随时间以重复剂量使用，例如，按分段间隔的初始剂量和加强剂量。使用剂量是由抗原成分的释放率及其抗原性确定的。一般需考虑诸如动物的重量、年龄、性别、同时治疗(如果有)等因素，要处理的抗原的特性也可能要顾及。口服疫苗的一般剂量范围正如上面给出的，即每剂量是 1×10^5 到 1×10^{10} ，优选 1×10^7 到 1×10^9 CFU/千克。对于肽和蛋白质型抗原，剂量范围是 1-10,000 μ g，优选为 10-1000 μ g。对于病毒型抗原，剂量范围是 1×10^3 - 1×10^{10} ，优选为 1×10^5 - 1×10^8 PFU/ml。不管采用哪种给药方式，当在疫苗制剂中使用活的有机体时，都预期它们可在宿主体内繁殖以促进免疫反应。

组合物也可以被配制成为用于群体接种计划的单剂量制剂或多剂量制剂。

直到需要使用前，本发明的组合物可以在一定的时间内储存在室温下，或者优选储存在约 4°C 的普通冷冻条件下。在 4°C 时，脂质制剂有助于处于休眠而不是活跃状态的有机体的储存和维持而不被破坏。对于非肠道给药，该组合物被加热到 30-40°C 以在使用前液化。对于口服使用，
5 该组合物为固体或膏状。

应该理解，上述说明只是以实施例的方式进行说明，本领域所属技术人员可预料到所用材料和技术两个方面的变化。

现在提供用以阐明本发明的非限制性实施例。

10 实施例

材料与amp;方法

细菌。 *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2(巴斯德研究所，巴黎)用作疫苗菌株。用于巨噬细胞感染研究和负鼠免疫性实验的 *M. bovis* 菌株是最初从刷尾(brushtail)负鼠的结核性伤口中分离出来并且先前已被用于巨噬细胞和负鼠接种研究(1,4)的 *M. bovis* 83/6235(AgResearch, Wallaceville, 新西兰)。对于 BCG 制剂和巨噬细胞感染，细菌在含有补充了白蛋白葡萄糖-过氧化氢酶(ADC; BBL, Becton Dickinson, Maryland, USA)的 Middlebrook 7H9 培养基(Difco, Detroit, Mich.)的 175ml 培养瓶(Falcon)中生长到中对数生长期(mid log phase)。通过离心收集细菌并在储存于-70°C 之前
15 之前在磷酸缓冲液(PBS)中清洗两次。为进行负鼠免疫性实验，*M. bovis* 在含有补充了 0.006% v/v 碱性油酸、0.5% w/v 白蛋白片段 V 和 0.25% w/v 葡萄糖的 Dubos 肉汤培养基(Difco 实验室, Detroit, USA)的 tween 白蛋白肉汤(TAB)中生长到中对数生长期，并且通过混浊度估计细菌的数量。在 TAB 中进行稀释以对负鼠接种。BCG 或 *M. bovis* 的菌落形成单位(CFU)
20 的数目按前面所描述的进行测试(5)。

制剂成分。根据融化温度和将 BCG 保持在均匀的悬浮状态的能力选择三种脂质产品以配制 BCG。选择在 37°C 为液体而在 30°C 以下变成固体的脂质以在 BCG 活性研究中进行测试。在活性测试后，选择下面的三个制剂在小鼠和负鼠的口服疫苗试验中进行测试：

制剂 C-来自于动物的分馏复合物脂质；制剂 K-由纯化的氢化椰子油的甘油三酸酯组成；制剂 N-Novarta B，一种商品栓剂基本成分。这三种制剂通过气相色谱进行分析以确定脂肪酸的百分率。

BCG 制剂。颗粒状的 BCG 被再次悬浮在被加热到 37°C 的制剂介质中。BCG 按 1×10^7 CFU/ml 的浓度再次悬浮以用作小鼠的疫苗，或者按 1×10^8 CFU/ml 的浓度再次悬浮以用作负鼠的疫苗。为增加对负鼠的吸引力和可口性，每毫升制剂中加入 10mg 的葡萄糖和 10 μ l 的茴香油 (Pharmacare, Auckland NZ)。对于小鼠的口服疫苗，每毫升制剂中加入 10mg 的葡萄糖，1mg 的谷氨酸单钠(Sigma)和 10% v/v 的 ADC。这些添加剂分散于制剂脂质中，并先前已证明对 BCG 的活性没有影响。BCG 制剂被转移到 15ml 试管(falcon)中并允许在 4°C 轻轻混合以凝固。从试管中移出制剂并在无菌条件下按照活性测试和接种研究的需要分割成 1g 的小球。按如下所述的通过将小球在 7H11 琼脂板上培养和计数 CFU 以测试 BCG 的分散。

BCG 活性。储存于 4°C 或室温(10-25°C)后按前述(4)测定制剂中的 CFU 数目。通过将三个 BCG 制剂的 100mg 等分试样加热到 37°C 并持续 15 分钟，并在 7H9 肉汤中进行连续的 10 倍稀释以收集培养的样品。通过将 100 μ l 的每种乳化液接种在补充了油酸-ADC(OADC; Becton Dickinson)和 0.5% 甘油的 Middlebrook 7H11 琼脂板上(Difco)来测定活的有机体数目。使用玻璃涂布器分散乳化液。用石蜡密封培养板并在 5% CO₂ 中 37°C 孵育。菌落的数目在培养 2-3 周后计数。结果以 BCG 制剂的 CFU/ μ g 表示。

小鼠的接种。特定的无病原体雌性 BALB/c 小鼠(6-8 周龄)从 Dunedin 的 Otago 大学动物实验科学系获得。小鼠试验经 Otago 大学动物伦理委员会批准进行(批准号：51/2000)。将小鼠分到单独的笼中并在口服接种前断食 12 小时。非配制的对照由 Craig's 不含防腐剂的草莓酱(Heinz-Watties Ltd., Hastings, New Zealand)中的 *M. Bovis* 组成。先前的研究表明在 24 小时间隔内将 *M. Bovis* BCG 混在果酱中对 *M. Bovis* BCG 活性没有影响(数据未显示)。非接种的对照只包含脂质制剂。对于剂量反应和时间过程试验，在 24 小时的间隔内给予小鼠两次单独剂量的疫苗。对于气雾剂免疫

性试验, 给予小鼠一次口服剂量(5×10^7 CFU)或者皮下接种 1×10^6 CFU。在颗粒和果酱的消耗期间在不同的时间间隔观察小鼠以确保它们吃了完全剂量。在接种后的不同时间点, 通过吸入 CO_2 将小鼠处死, 并在无菌条件下摘除脾。

- 5 脾细胞增殖测试。用细胞过滤器(70 μm 网孔; Beckton Dickinson)通过过滤细胞获得脾细胞悬浮液。在 0.83%的 NH_4Cl (pH 7.2)中溶解红细胞。在 PBS 中清洗细胞两次并按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 再次悬浮在包含 10%小牛血清(FCS)、20 mM HEPES 100U/ml 的青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的链霉素、 $5.5 \times 10^{-5}\text{M}$ 的 2-巯基乙醇的 Dulbeccos's 改良 Eagles 培养液(DMEM)(DMEM-10%
10 FCS, 全部来自 Gibco-BRL, USA)中。细胞在加入 10%小牛血清(FCS)的 RPMI(Gibco)中按 $10^7/\text{ml}$ 的浓度再次悬浮。脾细胞(每孔 5×10^5)被涂布在 96 孔板(Nunc)的三重孔中。细胞用最终浓度为 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的来自 *M. bovis*(bovine PPD; CSL, Melbourne, Australia)的纯化蛋白质衍生物或仅用培养基培养。4 天后收集细胞, 在用 1 μCi 的 [^3H]胸腺嘧啶(Amersham,
15 Buckinghamshire, England)脉冲 18 小时后, 如前所述测定混入的胸腺嘧啶(5)。通过将用牛 PPD 孵育的三重培养物的每分钟平均计数(cpm)除以仅用培养基培养的脾细胞的平均 cpm 获得刺激指数(SI)。

- 脾细胞的细胞因子产率的体外测试。按如上所述的脾细胞增殖测试制备脾细胞悬浮液。1ml 的细胞悬浮液被分散到 24 孔培养板(Costar)中,
20 并将 100 μl 的 PBS 或者牛 PPD(60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的终浓度)加入到孔中。培养物在 5% CO_2 中 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 72 小时, 之后收集 200 μl 的培养上清液并在 70 $^\circ\text{C}$ 冷冻以作细胞因子分析。按照生产商指示使用商用试剂盒(R&D Systems, Duoset, City, Country)进行白介素-2(IL-2)和干扰素- γ (IFN- γ)的捕获 ELISAs。培养上清液中的细胞因子水平通过标准曲线的外插法确定。两个 ELISAs 的最小灵敏度被确定为对于 IFN- γ 是 50pg/ml, 对于 IL-2 是
25 35pg/ml。

- M. bovis* 抑制试验。来自腹膜的巨噬细胞在与或不与自体同源淋巴细胞共培养后测试对 *M. bovis* 的细胞内生长的抑制。按照前述方案的改良方法进行试验。腹膜分泌细胞(PEC)通过从雌性 BALB/c 小鼠洗胃获得。
30 细胞被收集在补充了 1% BSA 和 20U/ml 的肝磷脂的 PBS 中, 清洗一次,

并按 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 再次悬浮在含有 10% 小牛血清和 100U/ml 青霉素的 DMEM 培养液(经补充的 DMEM)中。100 μl 的细胞悬浮液被分散到 96 孔平板(Nunc)中。在 5% CO_2 中 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 小时后除去不贴壁的细胞,清洗并按 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度再次悬浮在经补充的 DMEM 中。通过在 25ml 培养瓶(falcon)中孵育而在其余的贴壁细胞群中选择性耗竭不贴壁的细胞。不贴壁的 PEC(NPEC)在 May-Grunwald/Giemsa 染色后被确定包含 >90% 的淋巴细胞。热的经补充的 DMEM 被加入估计包含 5×10^4 细胞/孔的贴壁单层中。该细胞群对非特异性酯酶染色试剂(目录号 181-B; Sigma, St. Louis, Mo, USA)具有 98% 的阳性,此后称作巨噬细胞。如前所述(2)用 *M. bovis* 以 2 个细菌/巨噬细胞的 MOI 感染巨噬细胞。非吞噬的细菌通过温和清洗除去。100 μl (包含 5×10^5 细胞)的自体同源 NPEC 加入到包含感染的巨噬细胞的各孔中,且在 5% CO_2 中 37 $^\circ\text{C}$ 下再次孵育培养物。选择得到的 NPEC 对巨噬细胞的比为 10:1 的比率以模拟在外周血单核细胞中发现的比率。对照孔由单独的 *M. bovis* 感染的巨噬细胞或非感染的 NPEC 和巨噬细胞组成。72 小时后,用 1.0 μCi [^3H]尿嘧啶脉冲 18 小时。用 0.1% 皂甙溶解细胞,且在用自动细胞收集器(Cambridge Technology, USA)将细胞收集到玻璃纤维过滤器(Whatman Inc, Finland)上之前在 80-90 $^\circ\text{C}$ 加热 20 分钟杀死细菌。混入的 [^3H]尿嘧啶的量用液体 β 型闪烁计数器(Wallac, Country)确定。

用 *M. bovis* 对小鼠进行气雾剂免疫性实验。每个疫苗组 6 只小鼠,在接种第 8 周用剧毒的 *M. bovis* 气雾剂进行免疫性实验,用 Grover 等在 1967 年公开的改良方法制备 *M. bovis* 83/6235 的单独细胞悬浮液并储存在 -70 $^\circ\text{C}$ 。为制备这些悬浮液,细菌细胞通过声处理分散 30 秒,并通过 8 μm 薄膜过滤器过滤。小鼠使用气雾剂室通过呼吸途径感染,气雾剂室可产生大小适合于进入肺泡空间的微滴核。雾状液体中活的 *M. bovis* 的浓度按经验调节以使每个小鼠的肺吸入并保持 5-20 个活的有机体(B. Buddle and G. de Lisle, 未公布资料)。相似的过程已证明得到对豚鼠肺的可重复均匀的感染。气雾剂感染和随后的保持及感染小鼠的处理是在生物危害性设备的严格隔离条件下进行的。

M. bovis 的分离。在进行气雾剂免疫性实验后的 37-40 天处死小鼠。为分离分支杆菌每个小鼠的肺和脾被单独地处理。器官在 Ten-Broeck 研

磨器中匀浆化,且样品在 3500g 离心 20 分钟。沉淀物再次悬浮在 1ml 的蒸馏水中,在 TAB 中制得适量的稀释液,且 0.1ml 稀释或未稀释的样品被接种在改良的分支杆菌 7H11 琼脂上(1)。对各稀释液重复制备两个。培养条件和分离物的鉴别方法按如前所述的进行(1)。

- 5 数据的分析。平均细胞因子水平的差异和对疫苗组的脾细胞增殖反应转化成 \log_{10} 的统计分析使用 Student t 检验确定。从肺和脾的细菌计数被转化成 \log_{10} 并用方差分析进行分析。为进行统计,当没有从组织中培养细菌时,采用最小可检测数的一半(% CFU/器官)。

10 负鼠的接种和免疫性实验。如前所述捕捉负鼠并笼养(4)。用 BCG 喂饲两组负鼠(5 只/组)。1g 的颗粒状配制的 BCG (1×10^8 CPU)被给予一组中的每个负鼠,第二组被给予果酱中的 BCG (1×10^8 CPU)以与配制过程中的对照。预先证明果酱不抑制 BCG 活性(数据未显示)。第三组(6 只/组)被给予只包含制剂介质的颗粒并作为非接种的对照。在颗粒消耗期间观察负鼠以确认吃入全部颗粒。第二天重复接种(总 BCG 剂量 2×10^8 CFU/负鼠)。
15 所有负鼠在接种后 41 天通过气雾剂途径进行免疫性实验。

在第二个试验中,四种口服脂质 BCG 制剂与皮下接种比较。每个疫苗组的 6 只负鼠在接种 8 周后通过用剧毒的 *M. bovis* 通过气雾剂进行免疫性实验。脂质 C, K, N 和 F(包含 10%小牛血清的一种改良的 K)。

20 用 *M. bovis* 对负鼠进行气雾剂免疫性实验。负鼠用 *M. bovis* 83/6235 进行免疫性实验,其最初是从 Taumarunui, New Zealand 负鼠的淋巴结分离的(5)。分离物的单独的细胞悬浮液使用 Grover 等在 1967 所公开的改良方法制备并储存在 -70°C 。为制备这些悬浮液,细菌细胞通过声处理分散 30 秒,并通过 $8\mu\text{m}$ 薄膜过滤器过滤。通过肌肉注射盐酸氯胺酮(30mg/kg; Parnell Laboratories, Auckland, New Zealand)麻醉负鼠,使用气雾剂室通过
25 呼吸途径感染,气雾剂室可产生大小适合于进入肺泡空间的微滴核。雾状液体中活的 *M. bovis* 的浓度按经验调节以使每个负鼠的肺吸入并保持 10-20 个活的有机体(B. Buddle and G. de Lisle, 未公布)。这种免疫性实验的剂量已预先从在感染后 4 周的非接种负鼠的肺中可大致观察到的初期结节的数目估测。相似的过程已证明得到对豚鼠肺的可重复均匀的感染

(Wiegeshaus et al., 1970; Smith et al., 1970)。气雾剂感染和随后的保持及感染小鼠的处理是在生物危害性设备的严格隔离条件下进行的。

负鼠的尸检。所有负鼠在进行免疫性实验后的 56~57 天处死，并进行广泛的总尸检。肺与周围组织分离并称重。

- 5 从负鼠组织分离 *M. bovis*。对于每个动物，肺和脾的样品各称取约 1g，样品从肉眼可见的损伤处获取，如果没有损伤，样品从器官的预定部分获取，并为分离分支杆菌而进行单独处理。称重样品，在 Ten-Broeck 研磨器中匀浆并在 0.75% 的氯化十六烷基吡啶鎓中净化 1 小时。样品在 3500g 离心 20 分钟，且沉淀物再次悬浮在 1ml 的蒸馏水中。在 TAB 中制得适量的稀释液，且 0.1ml 稀释或未稀释的样品被接种在改性的分支杆菌 7H11 琼脂板上。对各稀释液重复制备两个。培养条件和分离物的鉴别方法按如前所述的进行(1)。

- 15 负鼠外周血淋巴细胞增殖试验。用排除了红血细胞的全血测定对 PPD-B 和 PPD-A(CSL Limited, Parkville, Australia)的增殖反应。对 Con A 的反应也被测试。简言之，1ml 的肝素化血与 pH 7.2 的 50ml 0.17M Tris-0.16M NH_4Cl 在 37°C 混合 10 分钟，在 20°C 的 PBS 中清洗两次，并在补充了 2mM 谷酰胺和 2% 正常负鼠血清的 DMEM 组织培养基中调到 3ml。细胞(200 μl)被涂布在于 PBS 中含有 50 μl PPD-B、PPD-A 或 Con A 或单独 PBS 的平底 96 孔板中，以得到 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PPD 或 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A 的终浓度。平板被放在 5% CO_2 的空气孵育器中 72 小时，用 1 $\mu\text{Ci}/\text{孔}$ 的 ^3H -胸腺嘧啶(Amersham, UK)脉冲，再 18 小时后收集，并在 Micro Beta Trilux(Wallac, Finland)中进行 ^3H 计数。通过将用 PPD 刺激的三重培养物的每分钟计数(cpm)除以用培养基和 PBS 培养的三重培养物的 cpm 计算刺激指数(SI)。

- 25 数据的分析。小鼠细胞因子分泌物的统计显著差异使用 Student t 检验确定(GraphPad, San Diego, Calif.)。将这些研究进行两次而具有相似的结果。对于负鼠淋巴细胞增殖反应，>3.5 的刺激指数被记为阳性反应，因为这表示在背景平均值(接种之前 PPD-B 的平均 SI)之上的至少三个标准差的反应。不同处理组负鼠的体重改变、肺重量、淋巴细胞增殖反应和细菌计数通过单次方差分析进行初始比较。然后用 Duncan's 多重检验
- 30

比较各组的平均值。淋巴细胞增殖反应和从肺和脾得到的细菌计数在分析之前转化成 Log_{10} 。为进行统计，当没有从组织中培养细菌时，采用最小可检测数的一半(% CFU/器官)。

5 结果

A. 脂质制剂的脂肪酸成分。选择用于配制口服 BCG 的脂质进行气相色谱分析。图 1 显示了在小鼠和负鼠接种试验中使用的 3 种脂质的脂肪酸成分。

在三种脂质制剂中脂肪酸的相对百分比如图 1 所示。通过 HPLC 对脂质的化学分析表明三种制剂包含下述的脂肪酸混合物：

制剂 C

89%总脂质(48.5%中性, 40.5%极性-包括 3%肉豆蔻酸, 26%棕榈酸, 15%硬脂酸, 40%油酸和 6%亚油酸)。

制剂 K

47%月桂酸, 20%肉豆蔻酸, 12%棕榈酸, 12%硬脂酸和 3%油酸。

制剂 N

Novarta B 是一种商用栓剂基本成分, 由酯化、氢化的分馏植物油和甘油三酸酯的混合物组成, 包括: 44%月桂酸, 20%肉豆蔻酸, 16%棕榈酸, 19%硬脂酸。

B. 配制后的 BCG 活性。配制的 BCG 在储存于 4°C 后的活性如图 2a 所示。在 16 周后, 制剂 C 和 K 保持高水平的 BCG 活性, 其中制剂 C 与制剂 K(52%)相比显示较高的活性维持率(98%)。相比而言, 制剂 N 显示 BCG 活性逐渐丧失, 导致 16 周后超过 97%的活的有机体损失。这些结果表明与制剂 N 相比, 制剂 C 和 K 更适于在 4°C 保持 BCG 活性。

配制的 BCG 在储存于室温($10-25^{\circ}\text{C}$)后的活性如图 2b 所示。制剂 C 和 K 保持高水平的 BCG 活性, 其中在 40 天时的制剂 C 与在 22 天时的制剂 K(平均 $\log_{10}\text{CFU}/\mu\text{g}=10$)相比显示持久的活性维持率(平均 $\log_{10}\text{CFU}/\mu\text{g}=10$)。相比而言, 在 12 天时的制剂 N 显示 BCG 活性快速地损失(平均 $\log_{10}\text{CFU}/\mu\text{g}=10$)。这些结果表明与制剂 N 相比, 制剂 C 和 K 更适于在室温下保持 BCG 活性。

C. 小鼠中配制的 BCG 的免疫原性。

在小鼠中口服配制的 *M. bovis* BCG 诱导免疫反应。为了确定口服 *M. bovis* BCG 后测量系统免疫反应的适合方法，我们比较了口服 10^7 CFU 脂质制剂的 *M. bovis* BCG 或果酱中的 *M. bovis* BCG(非配制的 *M. bovis* BCG) 后第 8 周牛 PPD 诱导的脾细胞增殖(LTA)，及脾的 IL-2 和 INF- γ 反应。表 1 表明尽管 LTA 和 INF- γ 测试显示在配制和非配制的口服 *M. bovis* BCG 组之间具有显著差异，但 IL-2 测试的差异不显著。由于 INF- γ 在对抗肺结核中的重要性，INF- γ 测试被用于进一步的试验中以监测系统免疫反应。

为确定口服后 *M. bovis* BCG 剂量的效果，我们比较了用不同剂量的配制或非配制的 *M. bovis* BCG 接种后小鼠 8 周内对牛 PPD 的脾 INF- γ 反应。图 2 表明在用 10^6 CFU 的 *M. bovis* BCG 口服免疫后在配制组中检测到低水平的 INF- γ (<200pg/ml)，但在疫苗组之间没有显著差异。当剂量增加到 10^7 CFU 时，非配制组的 INF- γ 反应保持低水平，而对配制的 *M. bovis* BCG 的反应显著增加($P<0.05$)。在使用 10^8 CFU 的 *M. bovis* BCG 时也可看到类似的差异。当疫苗剂量增加到 BCG 为 10^9 CFU 时，在非配制组也可看到 INF- γ 水平的增加，同时配制组保持高水平。在 *M. bovis* BCG 剂量为 10^7 - 10^9 CFU 时，在配制的 *M. bovis* BCG 组中 INF- γ 反应显著大于非配制的 *M. bovis* BCG 组。在高剂量非配制组中看到的 INF- γ 反应的增加表明为获得免疫反应的诱导，与配制的 *M. bovis* BCG 相比，需要相当高口服剂量的 *M. bovis* BCG。为确定口服 *M. bovis* BCG 的免疫反应时间过程，我们比较了在口服或皮下接种 *M. bovis* BCG 后按 2 周时间的间隔脾的 INF- γ 反应。图 3 显示 INF- γ 反应在皮下接种后第 4 周达峰值，并在第 6 和 8 周逐渐降低。相反，INF- γ 反应在口服接种配制的 *M. bovis* BCG 后第 6 周开始增加，并在接种后第 8 周保持高水平。对非配制的 *M. bovis* BCG 或仅含制剂材料的 INF- γ 反应在 2-8 周之间保持低水平。这些结果表明口服接种配制的 *M. bovis* BCG 后与皮下接种相比免疫反应被延迟，但至少持续 8 周。

来自用配制的 *M. bovis* 口服接种的小鼠腹膜的淋巴细胞抑制自体同源巨噬细胞中 *M. bovis* 的生长。NPEC 加入到来自用 *M. bovis* BCG 制剂口服接种的小鼠的 *M. bovis* 感染的巨噬细胞中以确定是否淋巴细胞介导

的效应器可以抑制 *M. bovis* 的细胞内生长。巨噬细胞内 *M. bovis* 的生长通过 [³H]尿嘧啶摄入确定。仅在巨噬细胞内或与来自口服接种小鼠的 NPEC 共培养时 *M. bovis* 的生长如图 4 所示。从用配制或非配制的 *M. bovis* BCG 口服接种的小鼠或只给予制剂材料的小鼠得来的巨噬细胞它们在控制 *M. bovis* 生长的能力上没有差异。当来自用配制的 *M. bovis* BCG 接种的小鼠的 NPEC 与自体同源的 *M. bovis* 感染的巨噬细胞共培养时，与来自用非配制的 *M. bovis* BCG 或仅用制剂材料接种的小鼠的 NPEC 共培养相比，⁵ [³H]尿嘧啶计数显著降低($P<0.05$)。这些结果证实来自用配制的 *M. bovis* BCG 口服接种的小鼠的淋巴细胞可激活巨噬细胞以抑制 *M. bovis* 的细胞内生长。体外 *M. bovis* 细胞内生长的对照能够反映体内可导致宿主内 *M. bovis* 的散布降低的生长抑制。¹⁰

口服接种配制的 *M. bovis* BCG 可防止剧毒 *M. bovis* 的气雾剂感染。为确定配制的口服 *M. bovis* BCG 的保护功效，对小鼠口服接种 5×10^7 CFU 的配制的 *M. bovis* BCG 或皮下接种 1×10^6 CFU 的 *M. bovis* BCG。非¹⁵ 接种小鼠作为对照。在接种后第 8 周通过气雾剂途径对小鼠用剧毒 *M. bovis* 进行免疫性实验，并在进行免疫性实验后 37-40 天处死。表 2 表明皮下 *M. bovis* BCG 接种可降低肺细胞计数约 2.34 个 log，降低脾细菌计数约 1.90 个 log。相比而言，配制的口服 *M. bovis* BCG 降低肺细菌计数约 1.0 个 log，降低脾细菌计数约 1.48 个 log。表 2 中的结果表明口服配制的 *M. bovis* BCG 和皮下使用 *M. bovis* BCG 对剧毒 *M. bovis* 的气雾剂感染可产生有效保护，尽管皮下使用 *M. bovis* BCG 在肺中的保护功效大于口服配制的 *M. bovis* BCG 组。²⁰

D. 负鼠的免疫反应和病理学。

淋巴细胞增殖反应。口服接种配制的 BCG 对全血淋巴细胞对牛 PPD 增殖反应的效果如图 5 和表 3 所示。在接种后第 6 周，配制的 BCG 组对 PPD-B 的平均刺激指数(SIs)明显高于非配制的 BCG 组和非接种对照组 ($P<0.05$)。在用 *M. bovis* 进行免疫性实验后第 4 周，所有组对 PPD-B 的平均 SI 均 >20 。这些结果显示，与非配制的 BCG 相比口服使用配制的 BCG 在负鼠中引发强烈的对 PPD-B 的免疫反应。²⁵

进一步的试验比较了四种口服脂质 BCG 制剂和皮下接种的免疫反应(图 11)。皮下接种的负鼠显示出强烈的 LTA 反应,在接种后第 4 周达峰值(平均 SI 为 42.5),并到第 8 周逐渐降低到 SI=30。相比而言,脂质 N 配制的口服 BCG 在 8 周的接种期内不能引发 LTA 反应,在脂质 C、K 和 F 中配制的口服 BCG 在接种后第 4 周诱导 LTA 反应较弱(SI=1-7),但逐步增加并维持到接种后第 8 周(SI=15-22)。这些结果显示,与皮下接种相比,口服接种的系统免疫反应被延迟,但它们持续更久。制剂 N 不诱导在非接种负鼠上看到的 LTA 反应,也不防止 *M. bovis* 的气雾剂感染(见表 4),这表明用于配制的口服 BCG 的脂质类型对于防止肺结核是重要的。

临床结果。在免疫性实验和尸检之间不同组体重变化如图 6 所示。用配制的 BCG 接种的负鼠平均体重在免疫性实验和尸检之间增加 0.02kg。相比而言,非配制的 BCG 和非接种对照组的平均体重在此期间分别降低 0.35kg 和 0.23kg。但是这些差异不具有统计显著性。

在进一步的试验中(表 4),比较了四种口服脂质 BCG 制剂和皮下接种,与非接种组(0.147kg)相比,在免疫性实验和尸检之间的平均体重变化对于皮下接种组(平均体重降低 0.012kg)和口服脂质 BCG 组之一(F 组)(0.035kg)而言明显降低。相比而言,其它口服 BCG 组平均体重降低 0.060kg(脂质 C)、0.067kg(脂质 K)及 0.122kg(脂质 N)。对接种未显示免疫反应的负鼠(即非接种和脂质 N 组)与有反应的各组相比显示较大的体重下降。

病理学。在所有的免疫性实验动物的肺中观察到肉眼可见的损伤。结核型肺炎的程度可以通过肺重量估测(图 7)。较高的肺重量与广泛的结核型肺炎相联系(3)(4)。为标准化肺重量随体重变化的差异,将各动物的肺重量与体重相比,并表示为比率。用配制的 BCG 接种的动物的平均肺重量与体重的比率是 1.62。相比而言,非配制的 BCG 和非接种对照组的平均肺重量与体重的比率分别是 2.86 和 3.0。用配制的 BCG 接种负鼠的肺重量与体重的比率明显与非配制的 BCG 组和非接种对照组不同($P<0.05$)。通常,肺损伤是小的结合区或与在损伤中间的黄色坏死区结合的肺叶。肿胀的支气管淋巴结可在具有极大肺损伤的动物中观察到。

在第二个试验中(表 4), 比较了四种口服脂质 BCG 制剂和皮下接种, 在接种组之间平均肺重量与体重的比率没有明显差异。然而, 对接种未显示免疫反应的负鼠(即非接种和脂质 N 组)与有反应的动物相比具有较高的平均肺重量。

5 细菌学

从 *M. bovis* 感染的负鼠的肺和脾分离牛型结核菌。从不同组的肺和脾分离的 *M. bovis* 的平均数目如图 8 和 9 所示。非配制和配制的 BCG 组的平均肺细菌计数明显低于非接种对照组($P < 0.05$)。配制的 BCG 组的平均脾细菌计数是非配制的 BCG 组的约十分之一, 是非接种对照组的约四十分之一。配制的 BCG 组的平均脾细菌计数明显低于非配制的 BCG 组和非接种对照组($P < 0.05$)。

在第二个试验中, 比较了四种口服脂质 BCG 制剂和皮下接种(表 4), 三个口服接种组和皮下接种组的脾细菌计数明显低于非接种组($P < 0.05$)。其它口服脂质 BCG 组(脂质 N)未显示出脾细菌计数的明显下降。当与肺细菌计数相比时在各组之间未发现显著差异。一般地, 对接种未显示免疫反应的负鼠(即非接种和脂质 N 组)与有反应的动物相比具有较高的平均脾细菌计数和肺细菌计数。

表 1. 用不同脂质制剂^a口服接种 8 周后小鼠中牛 PPD 刺激的脾细胞反应

免疫	IL-2(pg/ml)	INF- γ (pg/ml)	LTA(SI)
仅含制剂材料	110.62(+/-14.06)	51.44(+/-14.38)	1.67(+/-0.49)
非配制的 BCG	153.51(+/-25.22)	65.10(+/-20.05)	1.83(+/-0.51)
制剂 C BCG	430.43*(+/-66.44)	2160.95*(+/-273.40)	16.26*(+/-1.20)
制剂 K BCG	230.23(+/-54.13)	1268.30*(+/-76.80)	7.26*(+/-0.83)
制剂 N BCG	130.23(+/-54.70)	75.50(+/-16.80)	2.76(+/-0.33)

*表示与非接种(仅含制剂材料)的对照组的平均值有差异显著的平均值。P 值 < 0.05 (Student *t* 检验)

表 2. 接种对防止小鼠受牛型结核菌气雾剂感染的效果

疫苗组	肺细菌计数 [†]	Log ₁₀ 抵抗力 [#]	脾细菌计数	Log ₁₀ 抵抗力 [#]
非接种	5.837 ^a (± 0.362)	NA	4.565 ^a (± 0.189)	NA
配制的口服 BCG	4.774 ^b (± 0.270)	1.06	3.084 ^b (± 0.176)	1.48
皮下 BCG	3.498 ^c (± 0.237)	2.34	2.660 ^b (± 0.181)	1.90

[†]值是来自免疫性实验 37-40 后每组 6 只动物的肺和脾的 *M. bovis* 的 CFU \pm 标准误差的 log₁₀ 值。

[#]数据表示为 log₁₀ 抵抗力水平, 是通过从非接种动物器官中细菌的 log₁₀ 平均值减去从接种动物器官中细菌的 log₁₀ 平均值而计算得到的。

NA-不适用。

带有相同上标的栏中数字没有显著差别($P > 0.05$)。

表 3. 口服疫苗后的淋巴细胞增殖分析中对牛 PPD 发生响应的负鼠的数目

BCG 制剂		接种后周数		
组大小	0	4	6	
配制的 BCG	5	0*	2	5
非配制的 BCG	5	0	0	1
对照(无 BCG)	6	0	0	0

*刺激指数>3.5 的动物的数目

表 4. 用 *M. bovis* 进行免疫性实验的接种负鼠的病理学和微生物学结果

疫苗组	体重/免疫性实验体重的变化 ^a	肺重量/PM 体重 ^b	肺细菌计数 ^c	脾细菌计数 ^c
脂质 C	-0.060 (±0.033)	22.54 (±2.63)	5.634 (±0.385)	1.301* (±0.373)
脂质 K	-0.067 (±0.030)	15.49 (±2.12)	5.481 (±0.428)	1.321* (±0.289)
脂质 N	-0.122 (±0.037)	23.47 (±2.85)	6.038 (±0.273)	2.200 (±0.498)
脂质 F	-0.035* (±0.031)	16.28 (±4.11)	5.342 (±0.290)	0.934* (±0.230)
皮下 BCG	-0.012* (±0.055)	20.07 (±3.86)	5.384 (±0.427)	1.270* (±0.309)
非接种	-0.147 (±0.048)	24.10 (±3.50)	6.048 (±0.166)	2.553 (±0.465)

- 5 体重/免疫性实验体重的变化: 脂质 F, BCG<非接种(P<0.05).
脾细菌计数: 脂质 C, 脂质 K, 脂质 F, BCG<非接种; 脂质 F<脂质 N(P<0.05).
^a 在处死后和免疫性实验之间的体重(kg)/免疫性实验时体重(kg)的变化。
^b 肺重量(g)/处死后体重(kg).
^c 细菌计数, CFU log₁₀/g 组织。
- 10 * 对非接种组的显著性差异。

工业实用性

- 抗原组合物包括使抗原保持在稳定基质中的脂质制剂, 由此它们被均匀地分散。这有助于抗原给药剂量一致, 避免了剂量过大和无效的低剂量。申请人还表明脂质制剂可提高其中所含有的活的有机体的储存和活性。脂质制剂还可防止抗原和活的有机体被胃酸和酶降解。在以脂质为基础的制剂中有机体活性损失也明显低于报道的冻干产品中的有机体活性损失。由于制剂的疏水特性, 也可以将制剂储存在湿润或潮湿的条件下而不发生变质。

已证实疫苗制剂中的有机体特别是细菌的活性对于诱导强的和持久的保护性免疫是重要的。这可以使用本发明的组合物达到。该组合物制备也简单，更方便于生产，且可以避免使用针和注射器从而提高了使用者的接受率和安全性。

5 本发明的组合物可以用各种不同的途径使用，包括皮下注射，但是特别适于口服使用。申请人发现，组合物中的脂质制剂可以防止有机体和它们的组成抗原的活性在胃中下降，这使得活的有机体能够通过处理的胃肠粘膜吸收，复制并显示给免疫系统。此外，申请人确定使用的剂量在低于先前预计的口服剂量时是有效的(8)。

10 野生动物如负鼠的免疫需要抗原通过粘膜途径给药，因此食饵疫苗是实用和节省成本的给药选择。人的口服疫苗也是一种更节省成本的免疫方法，且更易于为使用者接受。

当以其它途径如皮下使用时，脂质制剂仍可防止受到例如巨噬细胞的攻击。在皮下使用或注射使用时，储存脂类的制剂也可持续释放以模拟感染过程，并促进免疫反应的进行。

15 可以理解，本发明的组合物与许多高成本的、可注射的疫苗制剂相比具有实质性的优点。

该组合物对于诱导对多种感染性有机体的免疫反应是有效的，感染性有机体包括胃肠道和呼吸道病原体，优选为肺结核菌。

20 本发明的组合物还可以被用作多种抗原、或者抗原分子的共同给药或联合给药的疫苗给药系统，特别是用作那些由于剂量或抗原性的原因而具有弱免疫原性的抗原的疫苗给药系统。本发明的组合物也适于作为疫苗佐剂。

本领域所属技术人员更应该理解，本说明仅是示例性的，本发明的范围不局限于此。

参考文献列表

1. Aldwell, F. E., D. L. Keen, V. C. Stent, A. Thomson, G. F. Yates, G. W. de Lisle, and B. M. Buddle. 1995. Route of BCG administration in possums affects protection against bovine tuberculosis. *New Zealand Veterinary Journal*. 43:356-359.

2. Aldwell, F. E., D. N. Wedlock, and B. M. Buddle. 1996. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M. bovis*. *Immunol Cell Biol.* 74:45-51.
3. Aldwell, F. E., D. N. Wedlock, and B. N. Buddle. 1997. Sequential activation of
5 alveolar macrophages by IFN- γ and LPS is required for enhanced growth inhibition of virulent *Mycobacterium bovis* but not *M. bovis* BCG. *Immunology and Cell Biology.* 75:.
4. Buddle, B. M., F. E. Aldwell, D. L. Keen, N. A. Parlane, G. Yates, and G. W. de Lisle. 1997. Intraduodenal vaccination of brushtail possums with bacille Canette-Guerin
10 enhances immune responses and protection against *Mycobacterium bovis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1:377-83.
5. Buddle, B. M., F. E. Aldwell, A. Pfeffer, and G. W. de Lisle. 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): pathology, haematology and lymphocyte stimulation responses. *Vet Microbiol.*
15 38:241-54.
6. Daugelat, S., C. H. Ladel, and S. H. Kaufmann. 1995. Influence of mouse strain and vaccine viability on T-cell responses induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Infect Immun.* 63:2033-40.
7. Gheorghiu, M., M. Lagranderie, and A. M. Balazuc. 1996. Stabilisation of BCG
20 vaccines. *New Approaches to Stabilisation of Vaccine Potency.* Dev. Biol. Stand. Basel, Karger. 87:251-261.
8. Lagranderie, M., P. Chavarot, A. M. Balazuc, and G. Marchal. 2000. Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine.* 18:1186-95.
- 25 9. Masarova, J., Mislovicova, D., Gemeiner, P and Michalkova, E. 2001 Stability enhancement of *Escherichia coli* penicillin G acylase by glycosylation with yeast mannan. *Biotechnol Appl Biochem* 34:127-33
10. Morrison, I. M. and Hawke, J. C 1979. Influence of elevated levels of linoleic acid on the thermal properties of bovine milk fat *Lipids* 14:391-4.

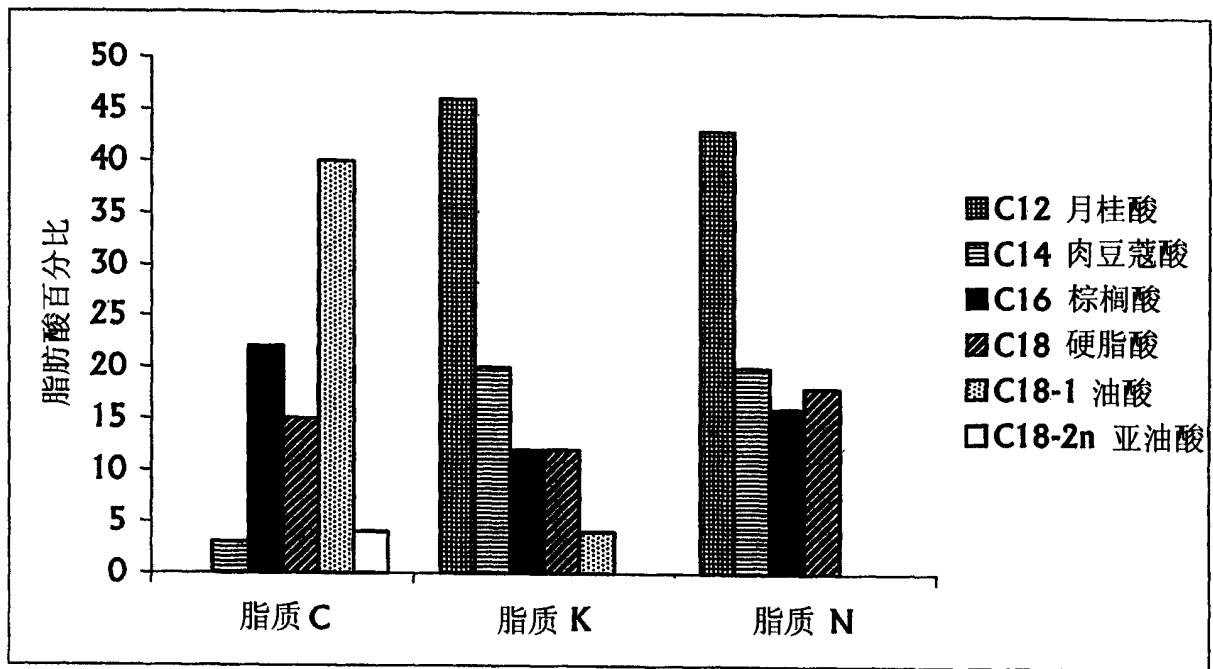


图 1

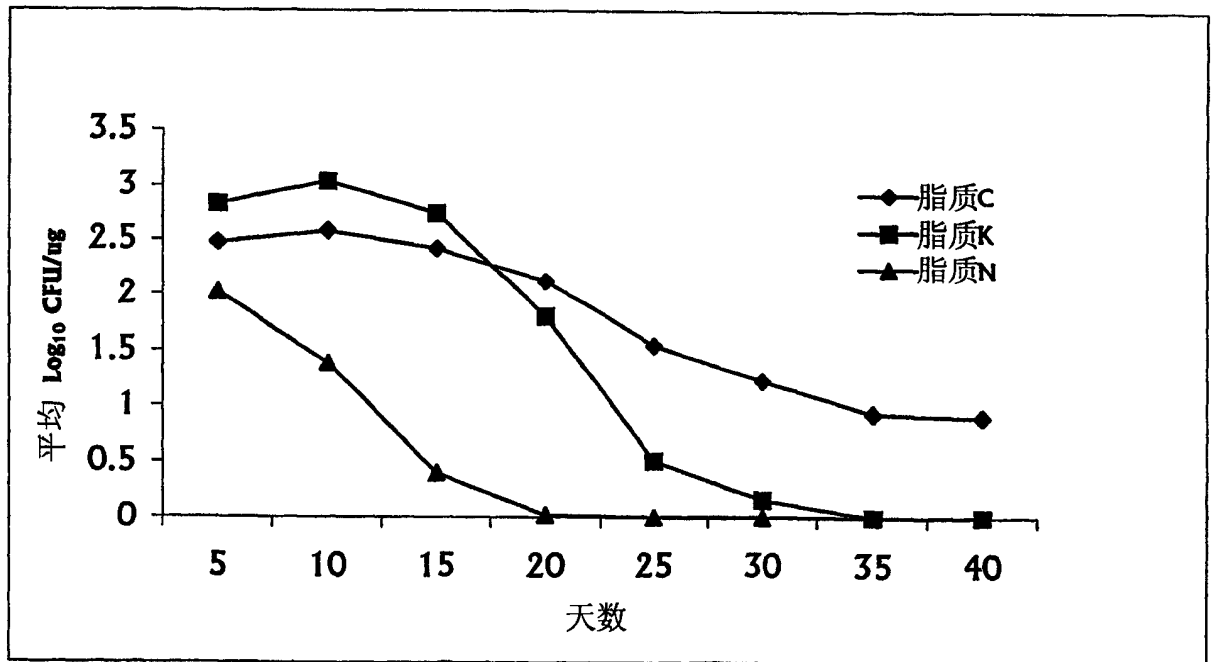


图 2a

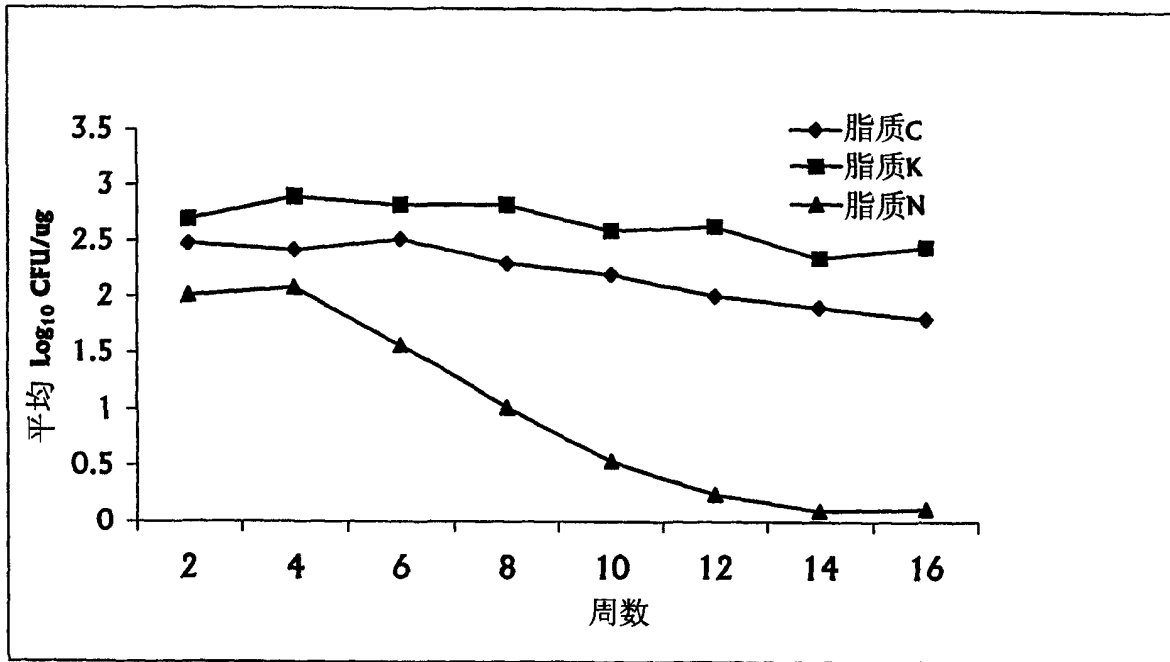


图 2b

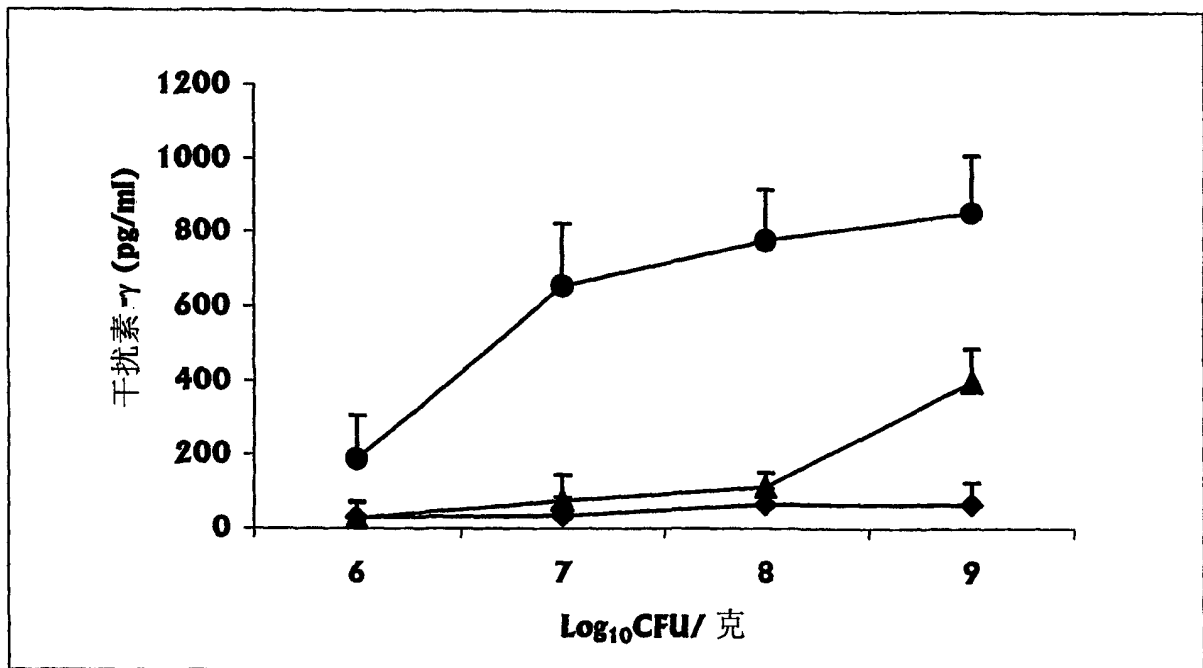


图 3

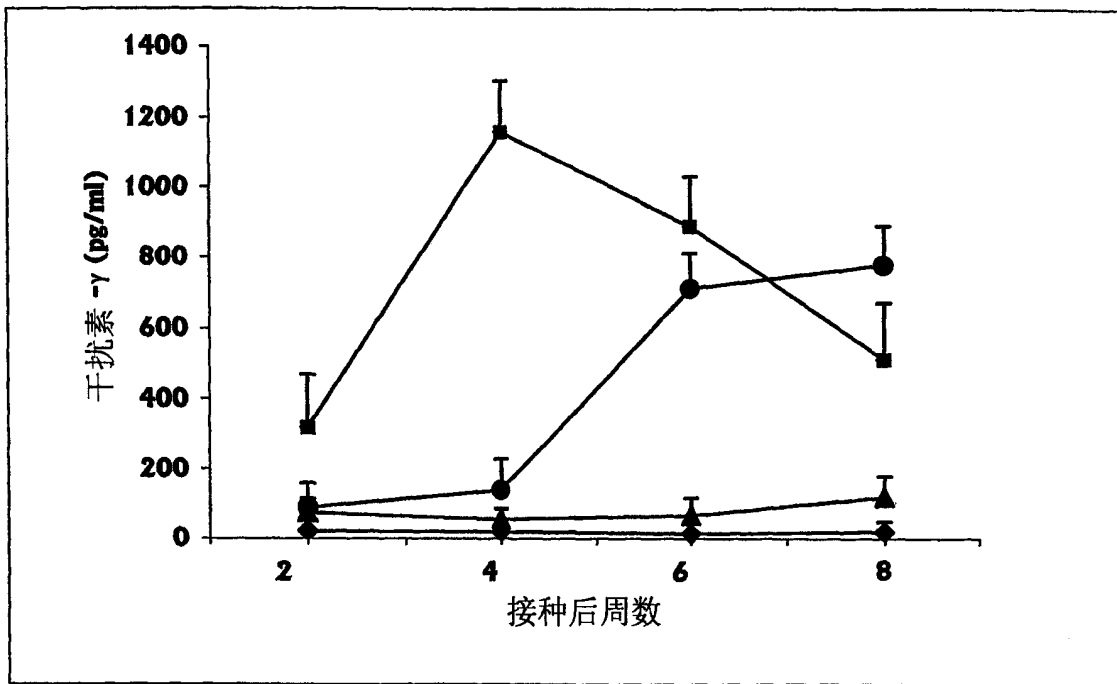


图 4

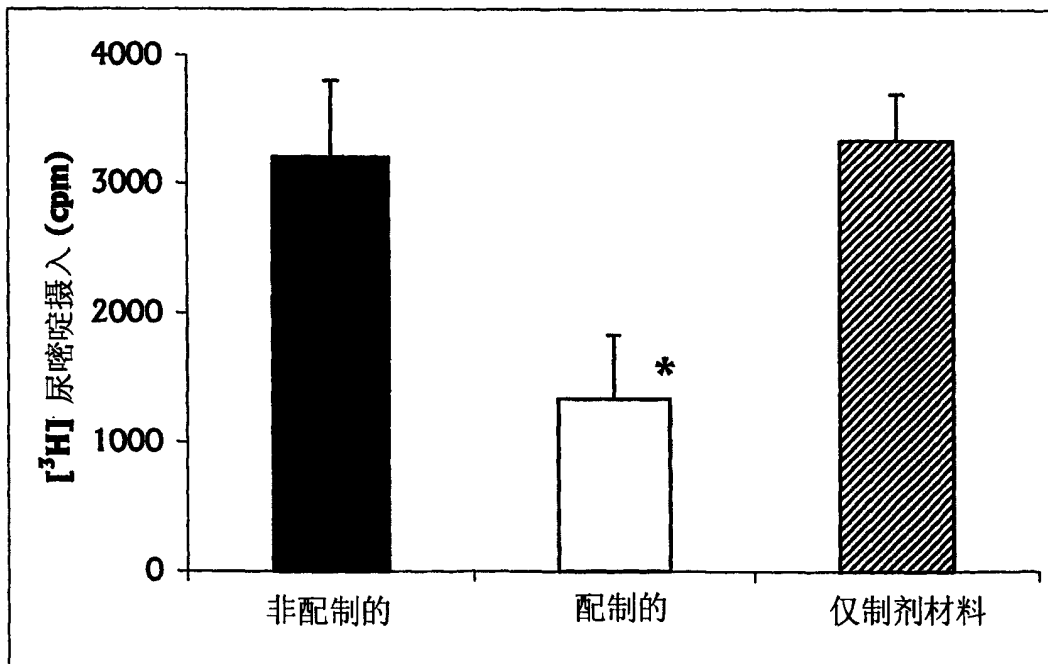


图 5

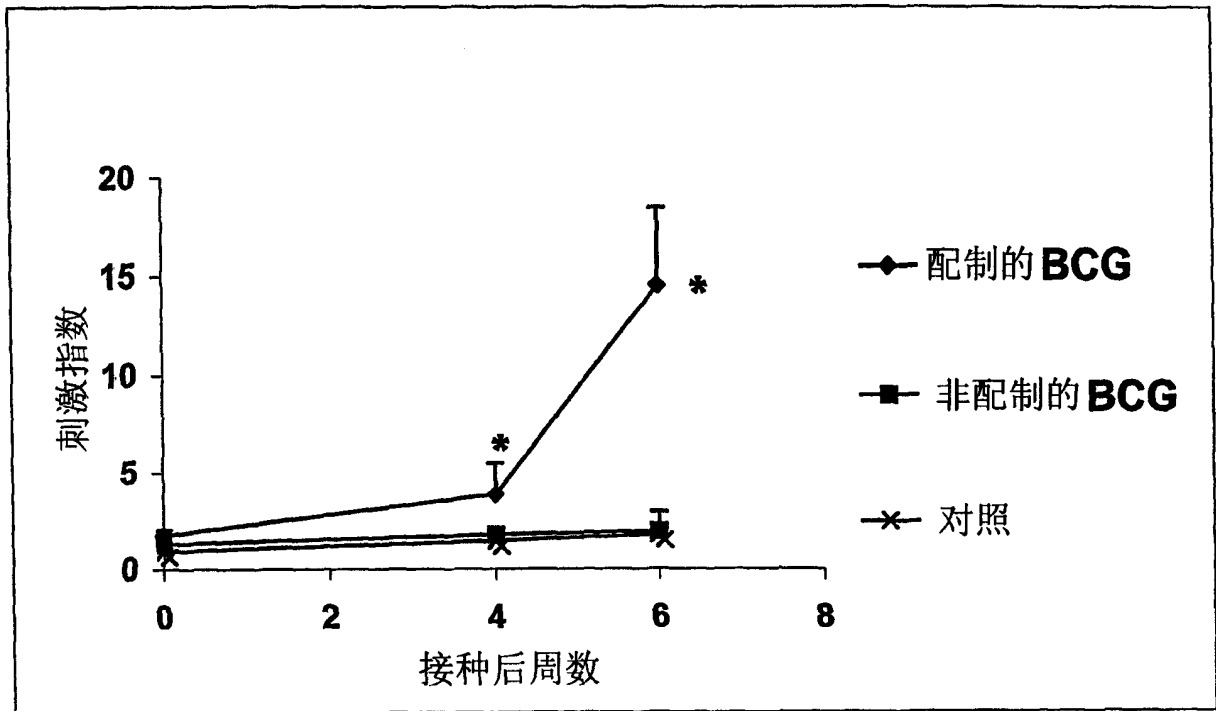


图 6

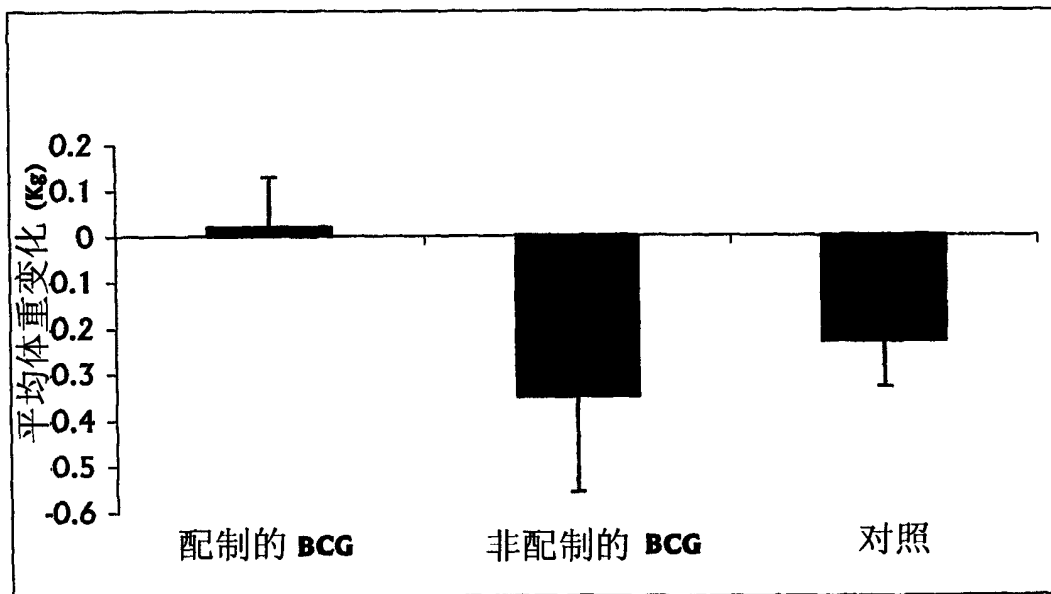


图 7

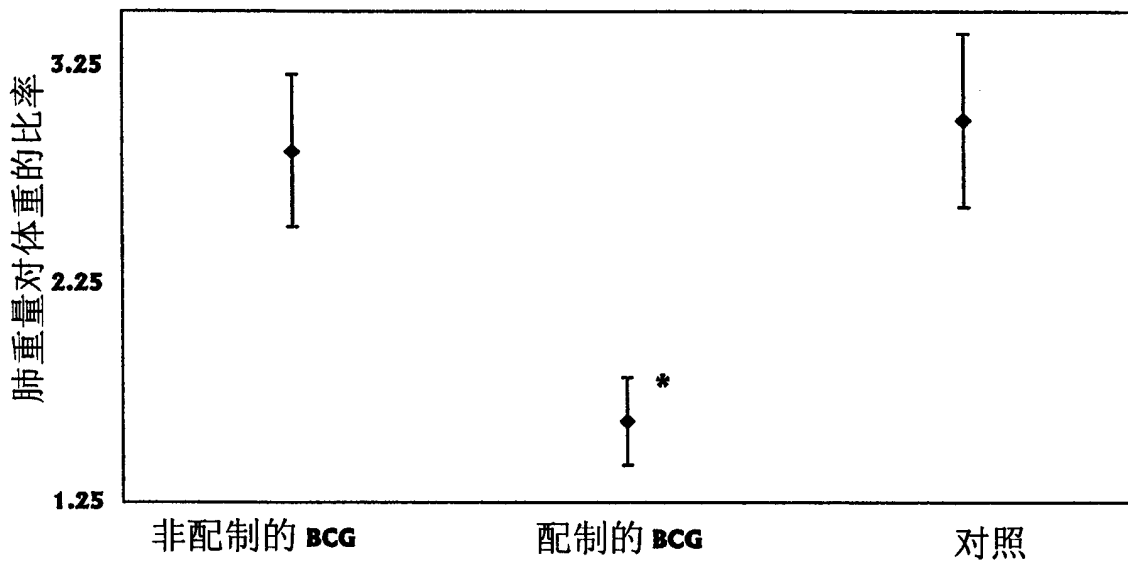


图 8

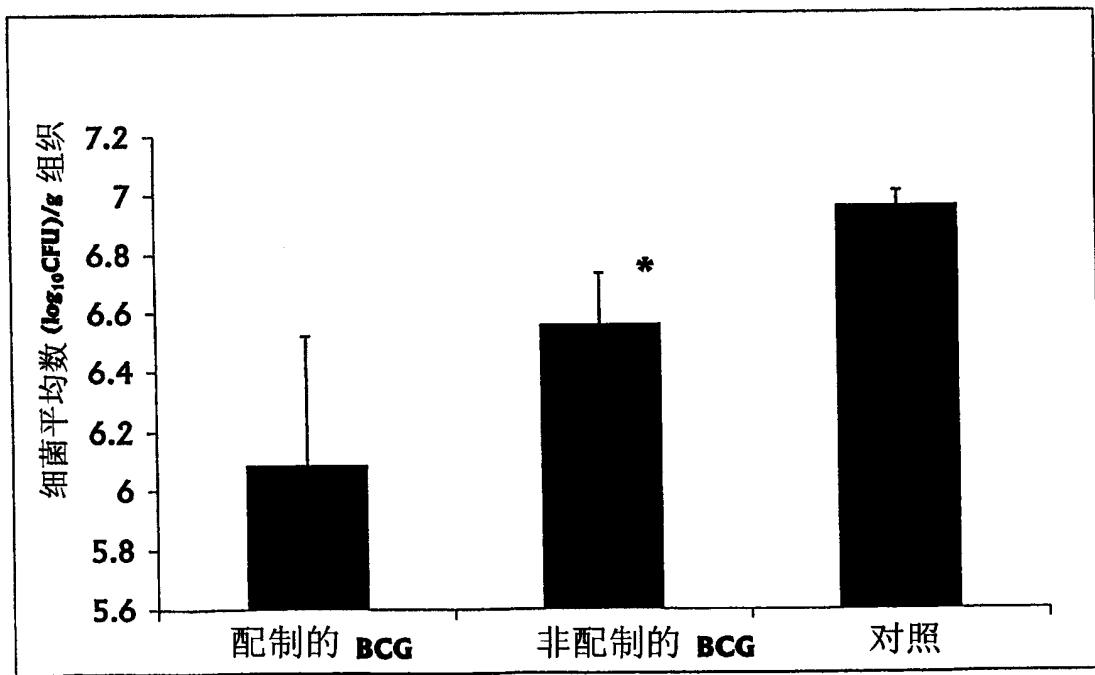


图 9

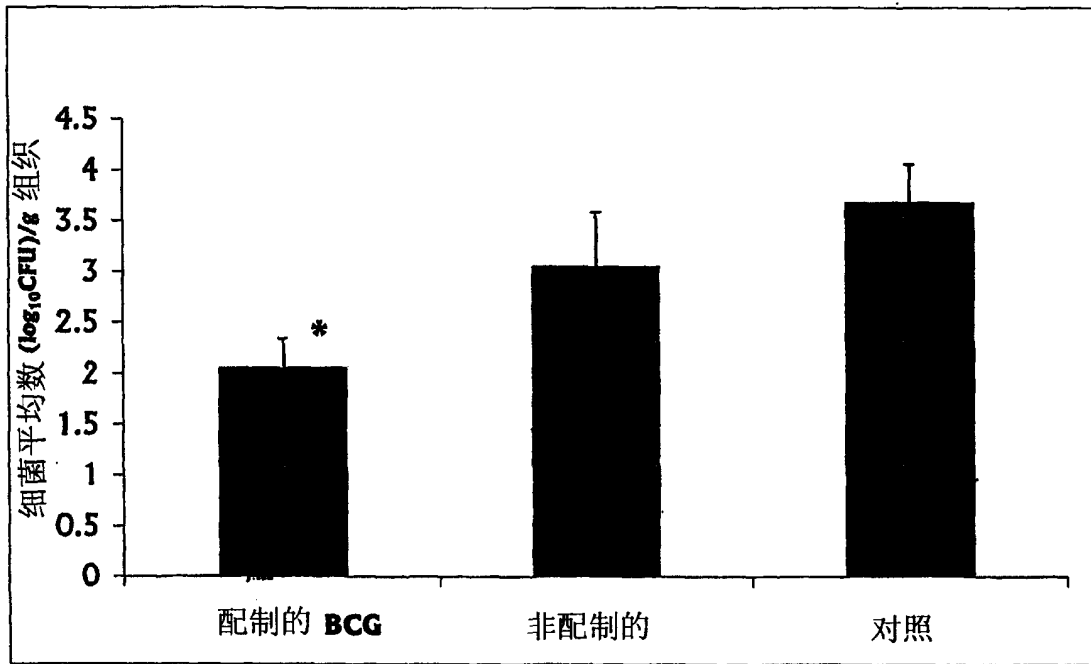


图 10

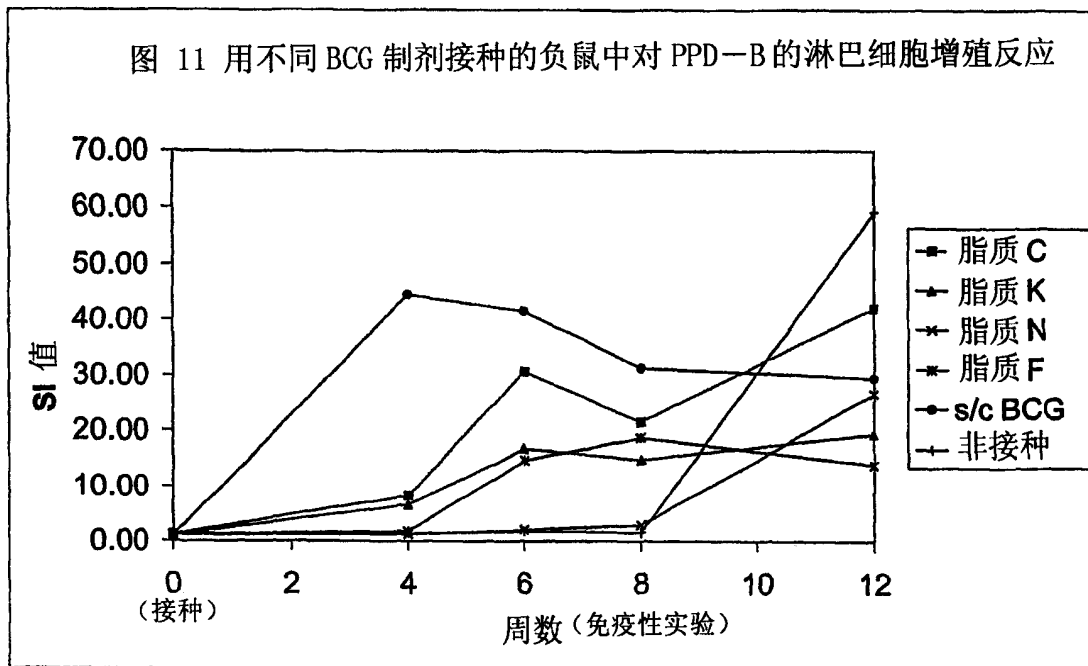


图 11

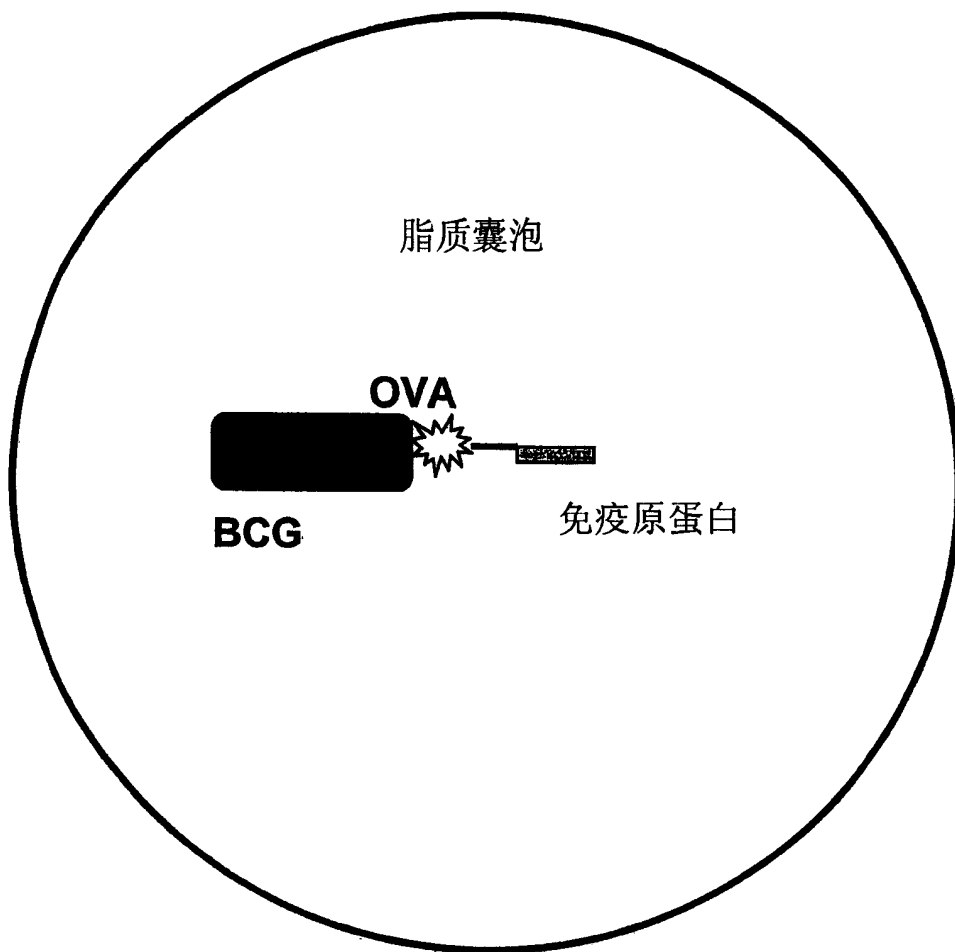


图 12