

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580011627.6

[51] Int. Cl.
G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 4 月 4 日

[11] 公开号 CN 1942766A

[22] 申请日 2005.2.24
[21] 申请号 200580011627.6
[30] 优先权
[32] 2004. 2. 26 [33] DK [31] PA200400310
[32] 2004. 2. 26 [33] US [31] 60/548,454
[32] 2004. 4. 2 [33] US [31] 60/559,095
[86] 国际申请 PCT/DK2005/000123 2005.2.24
[87] 国际公布 WO2005/083385 英 2005.9.9
[85] 进入国家阶段日期 2006.10.17
[71] 申请人 阿尔克 - 阿贝洛有限公司
地址 丹麦赫斯霍尔姆
[72] 发明人 H - H · 伊普森
L · 伦德梅尔克达尔
H · H · 雅各比

[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 陈轶兰

权利要求书 5 页 说明书 28 页 附图 11 页

[54] 发明名称

评价粘膜给药的疫苗的治疗潜力的方法

[57] 摘要

本发明涉及评价疫苗接种程序的治疗潜力的方法，该疫苗接种程序包括含有一种或多种抗原的用于粘膜给药的疫苗和接种方案，该方法包括 a) 使至少一个测试个体接受疫苗接种程序，b) 测量测试个体生物样品中生物标记抗体的水平，该生物标记抗体选自抗原特异性的 IgA, IgG, IgE 和 IgX, 和 c) 使用所获得的测量结果来评价疫苗接种程序的治疗潜力。

1. 评价疫苗接种程序的治疗潜力的方法，该程序包括含有一种或多种抗原的用于粘膜给药的疫苗和疫苗接种方案，该方法包括

- a) 使至少一个测试个体接受疫苗接种程序，
- b) 测量测试个体生物样品中生物标记抗体的水平，该生物标记抗体选自对所述抗原特异性的 IgA, IgG, IgE 和 IgX, 和
- c) 使用所获得的测量结果来评价该疫苗接种程序的治疗潜力。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中通过与参照的时间生物标记抗体水平曲线相比较来进行对所获得测量结果的评价。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中生物标记抗体是 IgE。

4. 根据权利要求 2 或 3 的方法，其中与疫苗接种程序开始时的水平相比较，IgE 水平提高超过 50%，优选超过 100%，更优选超过 200%，更优选超过 300%，和更优选超过 400%。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中 IgE 水平提高在自疫苗接种程序开始十二周内发生，优选十周内，更优选八周内，优选四周内。

6. 根据权利要求 2-5 任一项的方法，其中 IgE 水平具有最大值，然后降低。

7. 根据权利要求 6 的方法，其中 IgE 水平的最大值出现在自疫苗接种方案开始十二周内，优选十周内，更优选八周内，和更优选四周内。

8. 根据权利要求 6 或 7 的方法，其中 IgE 水平降低至低于最大值的 90%的水平，优选低于 80%，更优选低于 70%，更优选低于 60%，和最优选低于 50%。

9. 根据权利要求 8 的方法，其中 IgE 水平降低在自最大值之时起 26 周内发生，优选 20 周内，更优选 16 周内，更优选 12 周内，更优选 8 周内，和最优选 4 周内。

10. 根据之前任一项权利要求的方法，其中生物标记抗体是 IgA。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中与疫苗接种程序开始时的水平

相比较, IgA 水平提高超过 50%, 优选超过 100%, 更优选超过 200%, 更优选超过 300%, 和最优选超过 400%。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其中 IgA 水平提高在从给药开始 20 周内发生, 优选 16 周内, 更优选 12 周内, 和最优选 8 周内。

13. 根据之前任一项权利要求的方法, 其中生物标记抗体是 IgG。

14. 根据权利要求 13 的方法, 其中与疫苗接种程序开始时的水平相比较, IgG 水平提高超过 50%, 优选超过 100%, 更优选超过 200%, 更优选超过 300%, 和最优选超过 400%。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中 IgG 水平提高在从给药开始 20 周内发生, 优选 16 周内, 更优选 12 周内, 和最优选 8 周内。

16. 根据之前任一项权利要求的方法, 其中生物标记抗体是 IgX。

17. 根据权利要求 16 的方法, 其中 IgX 表示为有生物样品中其他成分竞争的免疫测定中所测量的 IgE 水平与无竞争的免疫测定中所测量的 IgE 水平的比例。

18. 根据权利要求 17 的方法, 其中与疫苗接种程序开始时的水平相比较, IgX 水平降低超过 4%, 优选超过 6%, 更优选超过 8%, 更优选超过 10%, 更优选超过 12%, 和最优选超过 14%。

19. 根据权利要求 18 的方法, 其中 IgX 水平降低在从给药开始 24 周内发生, 优选 16 周内, 更优选 12 周内, 和最优选 8 周内。

20. 根据之前任一项权利要求的方法, 其中疫苗接种方案包括每天, 每两天, 每三天或每四天将疫苗给药于测试个体。

21. 根据权利要求 20 的方法, 其中疫苗接种方案包括给药疫苗持续时间段长于 4 周, 优选长于 8 周, 更优选长于 12 周, 更优选长于 16 周, 更优选长于 20 周, 更优选长于 24 周, 更优选长于 30 周, 和最优选长于 36 周。

22. 根据权利要求 21 的方法, 其中给药的时间段是连续的时间段。

23. 根据权利要求 21 的方法, 其中给药的时间段是由一个或多个非给药时间段间断的不连续时间段。

24. 根据权利要求 23 的方法, 其中非给药时间段短于给药时间段。

25. 根据权利要求 20-24 任一项的方法, 其中将疫苗每天一次给药于测试个体。

26. 根据权利要求 20-25 任一项的方法, 其中将疫苗每天两次给药于测试个体。

27. 根据权利要求 20-26 任一项的方法, 其中疫苗是单剂量疫苗。

28. 根据权利要求 1-27 任一项的方法, 其中疫苗选自配制成适于通过口粘膜, 呼吸系统的粘膜, 消化系统的粘膜, 直肠粘膜和生殖器粘膜给药的疫苗。

29. 根据权利要求 28 的方法, 其中将疫苗配制成适于通过口粘膜给药。

30. 根据之前任一项权利要求的方法, 其中疫苗选自配制成溶液, 悬浮液, 快速分散剂型, 滴剂和锭剂的疫苗。

31. 根据权利要求 30 的方法, 其中将疫苗配制成快速分散剂型。

32. 根据之前任一项权利要求的方法, 其中抗原选自呼吸道抗原, 消化道抗原, 微生物抗原和昆虫抗原。

33. 根据权利要求 32 的方法, 其中抗原是呼吸道抗原。

34. 根据权利要求 32 或 33 的方法, 其中抗原是过敏原。

35. 根据权利要求 34 的方法, 其中过敏原是吸入过敏原。

36. 根据之前任一项权利要求的方法, 其中通过 ELISA 来进行生物样品中抗原特异性的生物标记抗体 IgA, IgG 和/或 IgE 水平的测量, 包括步骤 1) 将过敏原包被到 Elisa 板上并洗涤, 2) 加入生物样品, 温育并洗涤, 3) 加入酶和抗生物标记抗体的缀合物, 温育并洗涤, 4) 加入酶底物, 温育并停止反应, 和 5) 测量已反应底物的水平。

37. 根据权利要求 1-35 任一项的方法, 其中通过双位点免疫测定来进行生物样品中抗原特异性 IgA, IgE 和/或 IgG 水平的测量, 包括步骤:

(a) 混合 (i) 生物样品和 (ii) 与固相结合的对检测抗体的类别特异性抗体来形成液相和两种成分固相复合物的混合物,

(b) 将两种成分固相复合物与液相分离并洗涤分离的两种成分固

相复合物来除去非复合物结合的化合物，

(c) 加入 (iii) 抗原、抗体或半抗原形式的配体，和 (iv) 标记化合物，来形成四种成分固相复合物，

(d) 将四种成分固相复合物与液相分离，

(e) 洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物，

(f) 进行对洗涤过的经标记的四种成分复合物的检测/测量。

38. 根据权利要求 37 的方法，其中双位点免疫测定包括对抗体的双位点免疫测定，使用化学发光标记物和生物素结合的配体，所述方法包括步骤 (a) 混合 (i) 生物样品和 (ii) 与顺磁颗粒结合的针对待检测抗体的类别特异性抗体来形成液相和两种成分固相复合物的混合物，(b) 将两种成分固相复合物与液相磁性分离并洗涤分离的两种成分固相复合物来除去非复合物结合的化合物，

(c) 加入 (iii) 结合生物素或其功能衍生物的抗原、抗体或半抗原形式的配体，和 (iv) 结合抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其功能衍生物的化学发光吡啶鎓化合物，来形成四种成分固相复合物，

(d) 将四种成分固相复合物与液相磁性分离，

(e) 洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物，

(f) 引发洗涤过的固相中如果有的化学发光反应，并检测/测量所得到的化学发光，如果有的话。

39. 根据之前任一项权利要求的方法，其中以有生物样品中其他成分竞争的免疫测定中所测量的 IgE 水平与无竞争免疫测定中所测量的 IgE 水平的比例来测定 IgX。

40. 根据权利要求 39 的方法，其中在免疫测定中来测量竞争免疫测定中所测量的 IgE，包括步骤：

(a) 混合生物样品和结合生物素或其功能衍生物的配体抗原、抗体或半抗原，与顺磁颗粒结合的针对待检测抗体的类别特异性抗体，和结合抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其功能衍生物的化学发光吡啶鎓化合物，来形成四种成分固相复合物，

(b) 将四种成分固相与液相磁性分离，

(c) 洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物,

(d) 引发所分离固相中如果有的化学发光反应, 并检测/测量所得到的化学发光, 如果有的话。

41. 根据权利要求 39 或 40 的方法, 其中在免疫测定中来测量无竞争免疫测定中所测量的 IgE, 包括步骤:

(a) 混合 (i) 生物样品和 (ii) 与顺磁颗粒结合的针对待检测抗体的类别特异性抗体来形成液相和两种成分固相复合物的混合物,

(b) 将两种成分固相复合物与液相磁性分离并洗涤分离的两种成分固相复合物来除去非复合物结合的化合物,

(c) 加入结合生物素或其功能衍生物的抗原、抗体或半抗原形式的配体, 和 (iv) 结合抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其功能衍生物的化学发光吖啶鎓化合物, 来形成四种成分固相复合物,

(d) 将四种成分固相复合物与液相磁性分离,

(e) 洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物,

(f) 引发洗涤过的固相中如果有的化学发光反应, 并检测/测量所得到的化学发光, 如果有的话。

42. 根据之前任一项权利要求的方法, 其中生物样品选自血液, 血浆, 血清, 尿液, 唾液和鼻分泌物。

43. 可根据权利要求 1-42 任一项方法获得的疫苗。

44. 评价粘膜特异性变态反应疫苗接种 (SAV) 对个体的效果的方法, 该方法包括:

a) 使个体接受粘膜 SAV,

b) 测量个体生物样品中生物标记抗体的水平, 该生物标记抗体选自抗原特异性的 IgA, IgG, IgE 和 IgX, 和

c) 使用所获得的测量结果来评价 SAV 的效果。

评价粘膜给药的疫苗的治疗潜力的方法

技术领域

本发明涉及评价粘膜给药的疫苗的治疗潜力的方法，该疫苗包含一种或多种抗原。

发明背景

变态反应是适应西方生活方式国家中的主要健康问题。而且，过敏性疾病的发病率在这些国家日益增加。尽管通常不认为变态反应是威胁生命的疾病，但哮喘每年导致相当大数量的死亡。青少年中约30%的异常发病率导致生活质量、工作日和金钱的重大损失，并使其成为西方世界的一类主要健康问题。

变态反应是一种复杂的疾病。许多因素促成了致敏事件。这些中有由尚不充分理解的几个基因之间的相互作用限定的个体易感性。另一个重要的因素是过敏原暴露超过特定阈值。在致敏过程中，几个环境因素可能是重要的，包括污染，孩童时期的感染，寄生虫感染，肠微生物等。一旦个体致敏并建立了过敏免疫应答，只需微量过敏原的存在就能有效地转变成症状。

过敏性疾病的自然病程通常伴随在两个水平上的加重恶化。首先，症状和疾病严重性的进展，以及疾病进展，例如从花粉热变成哮喘。其次，侵犯过敏原的播散时常发生，导致过敏多重反应性。慢性炎症导致粘膜防御机制的全面削弱，导致非特异性的刺激并最终破坏粘膜组织。婴儿可能主要对食物即奶变得敏感，导致湿疹或胃肠道病症；然而，他们常常自发地不再有这些症状。这些婴儿在他们日后的生命中处于发生吸入变态反应的风险中。

在我们呼吸的空气中特定大小的最普遍颗粒中发现了最重要的过敏原来源。这些来源非常普遍并包括草花粉和屋尘螨排泄物颗粒，它

们总共引起了全部变态反应的约 50%。全球重要的还有动物毛发皮屑，即猫和狗的毛发皮屑，其他花粉，如艾蒿花粉，和微真菌，如链格孢属。以地域性为基础，还有其他花粉可能是占优势的，如北欧和中欧的桦树花粉，美国东部和中部的豚草，和日本的日本杉花粉。昆虫即蜜蜂和胡蜂毒液以及食物各自占全部变态反应的约 2%。

变态反应，即 I 型超敏反应，由对外来非致病物质不适当的免疫反应引起。变态反应的重要临床表现包括哮喘，花粉热，湿疹和胃肠道病症。过敏反应是特异性的，理解为特定个体对特定过敏原敏感，而该个体不必定显示出对其他已知导致过敏疾病的物质的过敏反应。过敏表型的特征在于靶器官粘膜的明显炎症和循环中以及肥大细胞和嗜碱细胞表面上 IgE 类过敏原特异性抗体的存在。

当抗体结合肥大细胞和嗜碱细胞表面上的高亲和性 IgE 特异性受体时，外来过敏原和过敏原特异性 IgE 抗体的反应启动过敏性攻击。肥大细胞和嗜碱细胞含有预先形成的介质，即组胺、类胰蛋白酶和其他物质，它们在两个或多个受体结合的 IgE 抗体交联时得到释放。IgE 抗体通过同时结合一个过敏原分子而交联。肥大细胞表面上受体结合的 IgE 的交联还导致信号分子的释放，这些信号分子引起嗜曙红细胞、过敏原特异性的 T 细胞和其他类型的细胞吸引至过敏应答的位点。这些细胞与过敏原、IgE 和效应细胞相互作用，导致遭遇过敏原后 12-24 小时发生的症状的重新闪现（晚期反应）。

过敏性疾病控制包括诊断和治疗，包括预防性治疗。变态反应的诊断涉及过敏原特异性 IgE 的证实和过敏原来源的鉴定。许多情况中，仔细的既往病史可足以用于变态反应的诊断和对侵犯过敏原来源物质的鉴定。然而，常见的是，通过客观测量来支持诊断，如皮肤单刺试验（skin prick test），验血或激发试验。

治疗选择落入三个主要的种类。第一种机会是避免过敏原或减少暴露。尽管避免过敏原是显而易见的，例如在食物过敏原的情况中，但这可能是困难的或昂贵的，如对于屋尘螨过敏原，或可能是不可能的，如对于花粉过敏原。第二种和最广泛使用的治疗选择是开处经典

症状药物，如抗组胺药和类固醇。症状药物是安全而有效的；然而，它们不改变疾病的自然病因，也不控制疾病播散。第三种治疗可替换方案是特异性的变态反应疫苗接种，其在大多数情况中减轻或缓解了由问题过敏原引起的变态反应症状。

常规特异性变态反应疫苗接种是对过敏疾病的病因治疗。其干预基础免疫学机制，导致患者免疫状态持久改善。因此，与症状药物治疗相比，特异性变态反应疫苗接种的保护性效果延长超过治疗阶段。一些接受治疗的患者得以治愈，此外，大部分患者会有疾病严重程度和所经历症状的缓解，或至少疾病恶化的停止。因此，特异性变态反应疫苗接种具有预防性效果，降低了花粉热发展成哮喘的风险，并降低了产生新敏感性的风险。

成功的变态反应疫苗接种潜在的免疫学机制具体不得而知。特异性免疫应答，如对抗特定病原体抗体的产生，称为适应性免疫应答。这种应答可区别于先天性免疫应答，后者是针对病原体的非特异性反应。变态反应疫苗旨在致力于适应性免疫应答，其包括具有抗原特异性的细胞和分子，如 T-细胞和产生抗体的 B-细胞。没有相应特异性 T 细胞的帮助，B 细胞不能成熟为产生抗体的细胞。参与过敏性免疫应答刺激的 T 细胞主要是 Th2 型。已经提出 Th1 和 Th2 细胞之间新平衡的建立对于特异性变态反应疫苗接种的免疫学机制是有益的和重要的。这是由 Th2 细胞减少，Th2 至 Th1 细胞的转换，或是 Th1 细胞上调而引起的是有争议的。最近，已经提出调控 T-细胞对于变态反应疫苗接种的机制是重要的。根据该模式，调控 T-细胞，即 Th3 或 Tr1 细胞，下调相应抗原特异性的 Th1 和 Th2 细胞。尽管这些不明确性，通常认为活性疫苗必须具有刺激过敏原特异性 T-细胞的能力。

尽管其功效，特异性变态反应疫苗接种没有广泛使用，主要是因为两个原因。一个原因是与传统接种疫苗程序相关的不方便性，包括重复接种，特别是在几个月内重复注射。另一个原因更重要，是过敏性副反应的风险。对抗感染因子的普通接种使用单个或几个高剂量免疫来有效进行。然而，该策略不能用于变态反应疫苗接种，因为病理

性免疫应答已在进行中。

因此使用在延长的时间段内应用的多次皮下免疫来进行常规特异性变态反应疫苗接种。该过程分成两个阶段，上调给药剂量和维持阶段。在上调给药剂量阶段中，应用提高的剂量，通常历经 16 周的时间，开始于微量。当达到推荐的维持剂量时，对于维持阶段应用该剂量，通常每六周进行注射。每次注射后，由于过敏副反应的风险，患者必须处于医疗监护之下 30 分钟，尽管其原则上极为罕见但仍可危及生命。此外，必须将诊所装备起来以支持紧急治疗。毫无疑问的是基于不同给药途径的疫苗将消除或减少目前基于皮下疫苗固有的过敏副反应的风险，以及将促进更广泛的使用，甚至可能能在家里自己接种疫苗。

改善特异性变态反应疫苗接种的努力已经进行了超过 30 年，并包括各种各样的方法。几种方法通过对 IgE 反应性的改变致力于过敏原自身。其他方法致力于制剂和疫苗的给药途径。

新过敏原、过敏原制剂和治疗方案的测试是艰巨且费时费力的，因为需要动物和/或人的体内测试，包括临床试验。尤其是，测试新疫苗或治疗方案的治疗效用的临床试验是费时费力的，因为按照惯例其要包括大量患者，长期的治疗阶段（例如对于花粉过敏，要包括花粉季和花粉季之前的阶段），以及大范围的剂量。此外，临床试验需要政府对待进行临床研究的批准和招募合适的测试人员。此外，疫苗例如变态反应疫苗的临床试验依赖于临床症状的监测和评价，这是高度主观性的参数，因此这样的测试结果包含一定程度的不确定性。

本发明的目的是提供评价接种疫苗的方案或用于粘膜给药的疫苗的治疗潜力的改良方法，例如用于口粘膜（oromucosal）特别是舌下给药的疫苗。

发明概述

通过本发明实现了该目的，其特别包括以下方面：

评价疫苗接种程序的治疗潜力的方法，该疫苗接种程序包括用于

粘膜给药的包含一种或多种抗原的疫苗和接种疫苗方案，该方法包括

- a) 使至少一个测试个体接受疫苗接种程序，
- b) 测量测试个体生物样品中生物标记抗体的水平，该生物标记抗体选自对所述抗原特异性的 IgA, IgG, IgE 和 IgX, 和
- c) 使用所获得的测量值来评价疫苗接种程序的治疗潜力。

可根据权利要求 1-35 任一项的方法获得的疫苗。

评价粘膜特异性变态反应疫苗接种 (SAV) 对个体的效果的方法，该方法包括

- a) 使个体接受粘膜 SAV,
- b) 测量测试个体生物样品中生物标记抗体的水平，该生物标记抗体选自抗原特异性的 IgA, IgG, IgE 和 IgX, 和
- c) 使用所获得的测量值来评价 SAV 的效果。

本发明是基于令人惊讶的实验发现：变态反应疫苗粘膜给药后对所关注过敏原特异性的 IgE, IgG, IgA 和 IgX 血液流体浓度明显的和可靠的提高，而对于免疫系统应答的多种其他可测量标记，疫苗的粘膜给药不引起任何改变。实验结果表明抗原特异性 IgE, IgG, IgA 和 IgX 的体液浓度对于疫苗的治疗效果是强有效的标记。因此本发明通过体外测试来自测试动物或个体的生物样品，提供了测试新过敏原候选物、新疫苗制剂以及新接种方案的可能性。例如在临床试验之前通过进行这样的体外测试，可以在开始临床试验之前排除无效的接种方案、疫苗和剂量，并因此缩小临床试验的范围，从而使得新疫苗的研发变得更可行。

此外，本发明已经提供了评价疫苗或接种方案治疗潜力的新的另外的参数，该参数容易测量和定量，且因此非常可靠。特别地，该方法可以结合临床试验使用来获得另外的信息或获得可替换其他参数如临床症状的信息，并因此使得临床试验更可靠。

从以上可明显看出，该方法可以用于疫苗研发的任何阶段，从新过敏原候选物例如重组和重组修饰的过敏原的筛选，至为获得疫苗上市许可对疫苗的临床试验。

附图简述

图 1 显示了用安慰剂治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgE 水平。

图 2 显示了用 2500 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgE 水平。

图 3 显示了用 25000 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgE 水平。

图 4 显示了用 75000 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgE 水平。

图 5 显示了用安慰剂治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgA 水平。

图 6 显示了用 2500 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgA 水平。

图 7 显示了用 25000 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgA 水平。

图 8 显示了用 75000 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgA 水平。

图 9 显示了用安慰剂治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgG 水平。

图 10 显示了用 2500 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgG 水平。

图 11 显示了用 25000 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgG 水平。

图 12 显示了用 75000 SQ 剂量治疗的患者组在给药阶段的四个时间点的 IgG 水平。

图 13 显示了用安慰剂治疗的患者组在治疗阶段开始时和治疗阶段后 1-2 周时的 IgE 水平。

图 14 显示了用 1000000 SQ 剂量治疗的患者组在治疗阶段开始时和治疗阶段后 1-2 周时的 IgE 水平。

图 15 显示了治疗组 1-4 意向治疗 (Intention-To-Treat) (ITT) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgE 水平。

图 16 显示了治疗组 1, 5 和 6 意向治疗 (ITT) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgE 水平。

图 17 显示了治疗组 1-4 按照方案 (Per-Protocol) (PP) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgE 水平。

图 18 显示了治疗组 1, 5 和 6 按照方案 (PP) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgE 水平。

图 19 显示了治疗组 1-4 意向治疗 (ITT) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgX 水平。

图 20 显示了治疗组 1, 5 和 6 意向治疗 (ITT) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgX 水平。

图 21 显示了治疗组 1-4 按照方案 (PP) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgX 水平。

图 22 显示了治疗组 1, 5 和 6 按照方案 (PP) 群在治疗阶段过程中三个时间点的 IgX 水平。

发明详述

疫苗接种程序治疗潜力的评价

疫苗接种程序治疗潜力的评价可以基于 1) IgE, IgA, IgG 或 IgX 单独的测量, 2) 四种生物标记抗体中两种的测量, 3) 四种生物标记抗体中三种的测量, 或 4) 全部四种生物标记抗体的测量。

通过与参照时间生物标记抗体水平曲线相比较来进行对所获得测量结果的评价, 例如, 通过制备生物标记抗体水平对时间的曲线图来产生时间曲线。将所获得的测量值用于评价给定的待测试疫苗接种方

案的治疗潜力。疫苗接种程序具有两个主要组成部分，即疫苗接种方案和疫苗，每个具有多个参数，其可以是本发明方法中的测试主体。疫苗接种方案包括这样的参数，例如筛选和选择用于研究的人员，发生疫苗给药的情况，给药途径，所用抗原的剂量，给药频率和持续时间等。疫苗包括的参数有一种或多种抗原，佐剂（如果存在），和疫苗的配制，即制剂的赋形剂。

本发明的方法可以用于评价以下各项的治疗潜力：1）使用常规疫苗的疫苗接种方案，2）使用常规疫苗接种方案的疫苗，或3）疫苗接种方案和疫苗的组合。

本发明方法的一实施方案中，生物标记抗体是 IgE。与疫苗接种程序开始时的水平相比较，优选 IgE 水平提高超过 50%，优选超过 100%，更优选超过 200%，更优选超过 300%，更优选超过 400%。进一步优选的是，IgE 水平的提高在从疫苗接种程序开始十二周内发生，优选十周内，更优选八周内，更优选六周内，最优选四周内。

本发明的特定实施方案中，IgE 水平具有一个最大值，接着是降低。优选 IgE 水平的最大值出现在从疫苗接种程序开始十二周内，优选十周内，更优选八周内，更优选六周内，和更优选四周内。优选 IgE 水平降低至低于最大值的 90% 的水平，优选低于最大值的 80%，更优选低于 70%，更优选低于 60%，和最优选低于 50%。优选 IgE 水平降低在从最大值之时起 26 周内发生，优选 20 周内，更优选 16 周内，更优选 12 周内，更优选 8 周内，和最优选 4 周内。

本发明的另一实施方案中，一旦达到最佳值，IgE 水平将保持在大约最佳值。

本发明进一步的优选实施方案中，生物标记抗体是 IgA。与疫苗接种程序开始时的水平相比较，优选 IgA 水平提高超过 50%，优选超过 100%，更优选超过 200%，更优选超过 300%，且最优选超过 400%。优选 IgA 水平的提高在从给药开始 20 周内发生，优选 16 周内，更优选 12 周内，且最优选 8 周内。

本发明的再一优选实施方案中，生物标记抗体是 IgG。与疫苗接

种程序开始时的水平相比较, 优选 IgG 水平提高超过 50%, 优选超过 100%, 更优选超过 200%, 更优选超过 300%, 和最优选超过 400%。优选 IgG 水平的提高在从给药开始 20 周内发生, 优选 16 周内, 更优选 12 周内, 和最优选 8 周内。

本发明进一步优选的实施方案中, 生物标记抗体是 IgX。本发明优选的实施方案中, 将 IgX 表示为有生物样品中其他成分竞争的免疫测定中所测量的 IgE 水平与无竞争免疫测定中所测量的 IgE 水平的比例。本发明的这个实施方案中, 与疫苗接种程序开始时的水平相比较, 优选 IgX 的水平降低超过 4%, 优选超过 6%, 更优选超过 8%, 更优选超过 10%, 更优选超过 12%, 和最优选超过 14%。进一步优选的是 IgX 水平的降低在从给药开始 24 周内发生, 优选 16 周内, 更优选 12 周内, 和最优选 8 周内。

以上所用的表述“IgE 水平”, “IgA 水平”, “IgG 水平”和“IgX 水平”可指单个测试个体的水平, 或者, 当一组个体接受疫苗接种程序时, 指该组或组的一部分的加权水平, 如其平均水平。通常 IgA, IgE, IgG 和 IgX 的水平在一个个体与另一个个体之间是不同的, 因此优选使用两个或多个个体的组, 优选五个或更多, 更优选十个或更多个体, 用于测试疫苗接种程序。

疫苗接种方案

本发明的一实施方案中, 疫苗接种方案包括将疫苗每日施用于测试个体。本发明的另一实施方案中, 疫苗接种方案包括每两天, 每三天或每四天施用疫苗。例如, 疫苗接种方案包括疫苗施用长于 4 周, 优选长于 8 周, 更优选长于 12 周, 更优选长于 16 周, 更优选长于 20 周, 更优选长于 24 周, 更优选长于 30 周, 和最优选长于 36 周。

给药阶段可以是连续阶段。或者, 给药阶段是由一个或多个非给药阶段间断的不连续阶段。优选, 非给药的(总)阶段短于给药的(总)阶段。

本发明进一步的实施方案中, 将疫苗一天一次给药于测试个体。

或者,将疫苗一天两次给药于测试个体。疫苗可以是单剂量(uni-dose)疫苗。

IgE、IgA、IgG 和 IgX 的测量

本发明的一实施方案中,通过 ELISA 来进行生物样品中抗原特异性的 IgA, IgE 和/或 IgG 水平的测量,包括步骤 1) 将过敏原包被到 Elisa 板上并洗涤, 2) 加入生物样品, 温育并洗涤, 3) 加入酶和抗-IgA/IgG/IgE 抗体的缀合物, 温育并洗涤, 4) 加入酶底物, 温育并停止反应, 和 5) 测量反应过的底物的水平。

本发明的另一实施方案中,通过双位点免疫测定(竞争免疫测定)来进行生物样品中抗原特异性的 IgA, IgE 和/或 IgG 水平的测量,包括步骤

(a) 提供液相和四种成分固相复合物的混合物,这四种成分固相复合物由以下组成: (i) 样品的抗体, (ii) 与固相结合的对检测抗体的类别特异性抗体, (iii) 抗原、抗体或半抗原形式的配体, 和 (iv) 标记化合物, 来形成四种成分固相复合物。

(b) 将四种成分固相复合物与液相分离,

(c) 洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物,

(d) 进行对洗涤过的标记的四种成分复合物的检测/测量。

可以以多种不同的程序来进行双位点免疫测定。任选地,可在混合试剂 (i) 和 (ii) 之后加入试剂 (iii) 和 (iv) 之前和/或在混合试剂 (i)、(ii) 和 (iii) 之后,进行洗涤步骤。固相可以是例如颗粒载体,如顺磁颗粒。标记化合物可以是例如化学发光化合物,如吖啶鎓(acridinium)酯。配体可以结合生物素或其功能衍生物,且标记化合物可以是共价结合抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其功能衍生物的化学发光化合物,在该情况中,通过引发复合物中的化学发光反应并检测/测量所得到的化学发光(如果有的话)来进行对洗涤过的标记的四种成分复合物的检测/测量。例如可以使用 ADVIA Centaur (Bayer) 来进行免疫测定。

双位点免疫测定的特定实施方案（非竞争免疫测定）包括步骤：

（a）混合（i）生物样品和（ii）与固相结合的对检测抗体的类别特异性抗体来形成液相和两种成分固相复合物的混合物，

（b）将两种成分固相复合物与液相分离并洗涤分离的两种成分固相复合物来除去非复合物结合的化合物，

（c）加入（iii）抗原、抗体或半抗原形式的配体，和（iv）标记化合物，来形成四种成分固相复合物，

（d）将四种成分固相复合物与液相分离，

（e）洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物，

（f）进行对洗涤过的标记的四种成分复合物的检测/测量。

双位点免疫测定的另一特定实施方案（竞争免疫测定）包括对于抗体的双位点免疫测定，使用化学发光标记和结合生物素的配体，所述方法包括步骤

（a）将生物样品与结合生物素或其功能衍生物的配体抗原、抗体或半抗原，与顺磁颗粒结合的对检测抗体的类别特异性抗体和结合抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其功能衍生物的化学发光吖啶钼化合物混合，来形成四种成分固相复合物，

（b）将四种成分固相与液相磁性分离，

（c）洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物，

（d）引发分离的固相中的化学发光反应（如果有的话），并检测/测量所得到的化学发光（如果有的话）。

双位点免疫测定进一步的特定实施方案（非竞争免疫测定）包括步骤

（a）混合（i）生物样品和（ii）与顺磁颗粒结合的对检测抗体的类别特异性抗体，来形成液相和两种成分固相复合物的混合物，

（b）将两种成分固相复合物与液相磁性分离，并洗涤分离的两种成分固相复合物来除去非复合物结合的化合物，

（c）加入（iii）结合生物素或其功能衍生物的抗原、抗体或半抗原形式的配体，和（iv）结合抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或

其功能衍生物的化学发光吡啶鎓化合物,来形成四种成分固相复合物,

(d) 将四种成分固相复合物与液相磁性分离,

(e) 洗涤分离的四种成分固相来除去非复合物结合的化合物,

(f) 引发洗涤过的固相中的化学发光反应(如果有的话),并检测/测量所得到的化学发光(如果有的话)。

优选,将 IgX 表示为有生物样品中其他成分竞争的免疫测定中所测量的 IgE 水平与无竞争免疫测定中所测量的 IgE 水平的比例。这种情况下,无竞争免疫测定可以是如上所述的双位点非竞争免疫测定实施方案之一,其中在生物样品和与固相结合的对检测抗体的类别特异性抗体混合后进行洗涤步骤,即在加入过敏原之前进行洗涤,以避免生物样品中非 IgE 抗体竞争样品 IgE 抗体与过敏原的结合。竞争免疫测定可以是上述双位点竞争免疫测定实施方案之一。

优选,生物样品选自血液,血浆,血清,尿液,唾液和鼻分泌物。

疫苗制剂和给药途径

本发明的优选实施方案中,疫苗选自配制成适于通过口粘膜,呼吸系统的粘膜,消化系统的粘膜,直肠粘膜和生殖器粘膜给药的疫苗。优选将疫苗配制成适于通过口粘膜(oromucosa)给药。

本发明特定的实施方案中,疫苗选自配制成溶液,悬浮液,分散体,乳液,快速分散剂型,滴剂,锭剂,喷雾,气溶胶,片剂,咀嚼片,颗粒,粉末,凝胶,糊剂,糖浆,霜剂,膏剂,棒剂,植入物,阴道栓剂(vagitory),栓剂或子宫栓剂(uteritory)的疫苗。优选将疫苗配制成快速分散剂型。制剂可以是适于粘膜给药的任何常规制剂,尤其是制剂可包含常规赋形剂和佐剂。

抗原

根据本发明方法评价的疫苗的抗原可以是暴露于个体时引发免疫应答的任何抗原。本发明的优选实施方案中,抗原选自呼吸道抗原,消化道抗原,微生物抗原和昆虫抗原。本发明的特定实施方案中,抗

原是呼吸道抗原。

特定实施方案中，抗原是过敏原，例如吸入过敏原或昆虫过敏原。抗原的其他实例是类变应原 (allergoid)，肽，半抗原，碳水化合物，肽核酸 (PNA，一种合成的遗传模拟物)，和感染性抗原如病毒或细菌物质，及其类似物或衍生物。营养物的实例是维生素，酶，微量元素和微量矿物质及其类似物或衍生物。药物的实例是抗体，抗生素，肽，盐，激素，溶血剂，止血剂，酶，酶抑制剂，psycopharmica，阿片制剂和巴比妥酸盐，及其类似物或衍生物。

过敏原

本发明的优选实施方案中，过敏原是已经报道的重复暴露于个体时能诱导过敏性即 IgE 介导的反应的任何天然存在的蛋白质。天然存在的过敏原的实例包括花粉过敏原 (树-，草药-，杂草-和草-花粉过敏原)，昆虫过敏原 (吸入物，唾液和毒液过敏原，例如螨过敏原，蟑螂和蠨过敏原，hymenoptera 毒液过敏原)，动物毛发和皮屑过敏原 (来自例如狗，猫，马，大鼠，小鼠等) 和食物过敏原。来自树，草和草药的重要花粉过敏原是来自分类学目山毛榉目，Oleales，松目和悬铃木科，包括，特别是，桦树 (桦属)，桤木 (桤木属)，榛树 (榛属)，鹅耳枥 (鹅耳枥属) 和橄榄树 (齐墩果属)，雪松 (柳杉属和桧属)，悬铃木 (悬铃木属)，Poales 目，包括特别是黑麦草属，梯牧草属，早熟禾属，狗牙根属，Dactylis，绒毛草属，Phalaris，黑麦属和高粱属的草，Asterales 和 Urticales 目，包括特别是豚草属，蒿属和 Parietaria 属的草药。其他重要的吸入过敏原是来自表皮螨属和 Euroglyphus 属的屋尘螨，存储螨，例如 Lepidoglyphys，甜食螨属和食酪螨属，来自蟑螂、蠨和跳蚤的那些，例如小蠨属，大蠨属，摇蚊和 Ctenocephalides，和来自哺乳动物如猫、狗和马的那些，毒液过敏原包括源自有针刺的昆虫或叮咬昆虫，如来自分类学膜翅目的那些，包括蜜蜂 (超家族蜜蜂科)，黄蜂 (超家族胡蜂科) 和蚂蚁 (超家族蚁总科)。来自真菌的重要吸入过敏原特别是源自链格孢属

和枝孢菌属的这些。

本发明更优选的实施方案中，过敏原是 Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1 和 Car b 1, Que a 1, Cry j 1, Cry j 2, Cup a 1, Cup s 1, Jun a 1, Jun a 2, jun a 3, Ole e 1, Lig v 1, Pla l 1, Pla a 2, Amb a 1, Amb a 2, Amb t 5, Art v 1, Art v 2, Par j 1, Par j 2, Par j 3, Sal k 1, Ave e 1, Cyn d 1, Cyn d 7, Dac g 1, Fes p 1, Hol l 1, Lol p 1 和 5, Pha a 1, Pas n 1, Phl p 1, Phl p 5, Phl p 6, Poa p 1, Poa p 5, Sec c 1, Sec c 5, Sor h 1, Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Der p 7, Der m 1, Eur m 2, Gly d 1, Lep d 2, Blo t 1, Tyr p 2, Bla g 1, Bla g 2, Per a 1, Fel d 1, Can f 1, Can f 2, Bos d 2, Equ c 1, Equ c 2, Equ c 3, Mus m 1, Rat n 1, Apis m 1, Api m 2, Ves v 1, Ves v 2, Ves v 5, Dol m 1, Dil m 2, Dol m 5, Pol a 1, Pol a 2, Pol a 5, Sol i 1, Sol i 2, Sol i 3 和 Sol i 4, Alt a 1, Cla h 1, Asp f 1, Bos d 4, Mal d 1, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 4, Ara h 5 或这些中任何过敏原分子育种的改组杂交体。

本发明的最优选实施方案中，过敏原是草花粉过敏原或尘螨过敏原或豚草过敏原或雪松花粉或猫过敏原或桦树过敏原。

本发明的另一实施方案中，快速分散固体剂型包含至少两种不同类型的过敏原，源自相同过敏性来源或源自不同的过敏原来源，例如分别来自不同螨虫和草物种的草组 1 和草组 5 过敏原或螨组 1 和组 2 过敏原，杂草抗原如短和巨大豚草过敏原，不同的真菌过敏原如链格孢属和枝孢菌属，树过敏原如桦树，榛树，鹅耳枥，橡树和桤木过敏原，食物过敏原如花生，大豆和奶过敏原。

掺入快速分散固体剂型的过敏原可以是提取物，纯化的过敏原，修饰的过敏原，重组过敏原或重组过敏原突变体的形式。过敏原提取物可以天然含有相同过敏原的一种或多种异构体，而重组过敏原通常只表示过敏原的一种异构体。优选实施方案中，过敏原是提取物的形式。另一优选实施方案中，过敏原是重组过敏原。进一步优选的实施

方案中，过敏原是天然存在的低 IgE 结合突变体或重组低 IgE 结合突变体。

过敏原可以以等摩尔量存在或过敏原存在的比例可以变化优选高至 1:20。

本发明进一步的实施方案中，低 IgE 结合过敏原是根据 W099/47680，W002/40676 或 W003/096869 的过敏原。

感染性抗原

本发明的优选实施方案中，微生物剂是病毒，细菌，真菌，寄生虫或其任何部分。

微生物剂的实例是弧菌属的菌种，沙门氏菌属的菌种，博尔德氏杆菌属的菌种，嗜血菌属的菌种，弓形虫，巨细胞病毒，衣原体属的物种，链球菌属的菌种，诺沃克病毒，大肠杆菌，幽门螺杆菌，猫螺旋杆菌，轮状病毒，淋病奈瑟氏球菌，脑膜炎奈瑟氏球菌，腺病毒，EB 病毒，日本脑炎病毒，卡氏肺孢子虫，单纯疱疹，梭菌菌种，呼吸道合胞体病毒，克雷伯氏菌属菌种，志贺氏菌属菌种，铜绿假单胞菌，细小病毒，空肠弯曲杆菌属菌种，立克次氏体属物种，水痘带状疱疹，耶尔森氏菌属菌种，罗斯河病毒，J.C. 病毒，马红球菌，粘膜莫拉氏菌，布氏疏螺旋体，溶血巴斯德氏菌，脊髓灰质炎病毒，流感病毒，霍乱弧菌和肠沙门氏菌伤寒血清型。

微生物剂的更多实例是防止或减轻以下疾病的症状的那些：流感，结核病，脑膜炎，肝炎，百日咳，脊髓灰质炎，破伤风，白喉，疟疾，霍乱，疱疹，伤寒，HIV，AIDS，麻疹，莱姆病，旅行者腹泻，甲肝，乙肝和丙肝，中耳炎，登革热，狂犬病，副流感，风疹，黄热病，痢疾，军团病，弓形体病，Q-热，出血热，阿根廷出血热，龋齿，查格斯病，由大肠杆菌引起的尿道感染，肺炎球菌病，腮腺炎和切昆贡亚热。

评价 SAV 对个体效果的方法

本发明进一步涉及评价特异性变态反应疫苗接种(SAV)对个体效果的方法,该方法包括

- a)使个体接受 SAV,
- b)测量个体生物样品中生物标记抗体的水平,该生物标记抗体选自抗原特异性的 IgA, IgG, IgE 和 IgX, 和
- c)使用获得的测量值来评价 SAV 的效果。

以有关评价疫苗接种程序治疗潜力的方法所述的相同方式来进行 SAV 效果的评价。

定义

结合本发明,使用以下的表述:

“生物样品”意思是任何体液,如血液,血浆,血清,尿液和唾液,其是生物有机体内排泄的,分泌的或转运的。

表述“变态反应/过敏”意思是针对抗原的任何 1, 2, 3 或 4 型超敏变态反应。

表述“消化道抗原(digestive antigen)”意思是接触消化系统粘膜的任何抗原剂,尤其是口腔,咽,喉,胃和肠的粘膜。

表述“呼吸道抗原(respiratory antigen)”意思是接触呼吸系统粘膜的任何抗原剂,尤其是鼻,口腔,咽,喉,气管和肺的粘膜。

表述“抗原”意思是个体可能暴露于的任何抗原,并表示已经报道或可显示当暴露于个体时能诱导免疫应答的任何天然存在的或合成的化合物或物质,或其部分或片段。

表述“过敏原”是个体可能暴露于的任何过敏原,并表示已经报道当重复暴露于个体时能诱导过敏性即 IgE 介导的反應的任何天然存在的蛋白质或蛋白质混合物。所评价的过敏原可以是过敏原提取物,纯化的过敏原,修饰的过敏原,重组过敏原,重组突变过敏原,超过 10 个氨基酸的任何过敏原片段或其任意组合的形式。

表述“快速分散剂型”指的是在口腔中在少于约 90 秒内崩解的剂型,优选少于 60 秒,优选少于 30 秒,更优选少于 20 秒,甚至更优选

少于 10 秒，甚至更优选放入口腔中少于 5 秒，最优选少于约 2 秒内崩解。

术语“口粘膜”意思是患者口腔和咽的粘膜。

表述“呼吸系统的粘膜”意思是鼻，口腔，咽，喉，气管和肺的粘膜。

表述“消化系统的粘膜”意思是口腔，咽，喉，胃和肠的粘膜。

表述“生殖器粘膜”意思是阴道和尿道（urinal）粘膜。

术语“治疗潜力”意思是能够部分或完全预防或治疗抗原介导的免疫疾病，或能够部分或全部缓解抗原介导的免疫疾病的症状或抑制其症状成因。

术语“IgX”意指直接或间接表示生物样品中存在的过敏原特异性非 IgE 抗体如 IgG4 水平的参数，该抗体可以与 IgE 竞争过敏原的结合。IgX 可以是例如绝对的 IgX 水平或有生物样品中其他成分竞争（干扰）的免疫测定中所测量的 IgE 与无竞争免疫测定中所测量的 IgE 水平的比例。

实施例

实施例 1：用快速分散的非压缩舌下片剂来治疗草花粉过敏患者背景

已知使用梯牧草（*Phleum pratense*）提取物作为过敏原活性物质的对抗草花粉变态反应的疫苗在皮下给药的制剂中是有效的，其中将过敏原和作为佐剂的氢氧化铝凝胶一起配制。

目的

为了测试用于舌下给药的快速分散非压缩冻干片剂形式的梯牧草提取物新制剂的治疗潜力（效力），片剂不含有佐剂。片剂含有鱼胶作为基质成形剂。效力研究构成临床 I 期研究的一部分，后者还包括安全性研究。

疫苗接种方案

测试人员

48 名在草花粉季节患有中度至严重过敏性鼻炎且在季节外没有症状的 18 至 65 岁的成人测试人员。入选标准是 1) 测试人员的临床病史, 2) 阳性皮肤单刺试验 (>3mm Soluprick© SQ-U HEP 梯牧草), 和 3) 对抗梯牧草的特异性 IgE 阳性 (CAP 类别 2 或更高)。

剂量和给药程序

将 48 名测试者分成四组 A, B, C 和 D, 每组包括 12 名人员。组 A (2,500 SQ-U) 用一片含有 2,500 SQ-U 的片剂和两片安慰剂来治疗。组 B (25,000 SQ-U) 用一片含有 25,000 SQ-U 的片剂和两片安慰剂来治疗。组 C (75,000 SQ-U) 用三片含有 25,000 SQ-U 的片剂来治疗。组 D 用三片安慰剂来治疗。三片片剂每天一次给药, 给药 8 周。8 周治疗后的 10 周没有治疗, 然后将在最初 8 周中进行的相同治疗继续 15 周。

在效力测试之前, 45 名人员参与了安全性研究, 其中对 30 名人员给予了 2500 至 1,125,000 SQ-U 的递增剂量, 对 15 名人员给予了安慰剂。

测量

在 8 周治疗阶段的 0, 3-5 和 7-8 周后以及在 15 周治疗阶段结束后 2 周时获得血清样品。使用以下列出的测定来测量 IgE, IgA 和 IgG 的水平。

测量 IgE 的测定程序

在 ADVIA Centaur (Bayer) 上使用双位点免疫测定来测量 IgE, 使用以下的程序:

(a) 将液体样品与针对待检测抗体的与顺磁颗粒结合的类别特异性抗体混合来形成第一固相复合物,

- (b) 洗涤,
- (c) 加入结合生物素的梯牧草过敏原来形成第二固相复合物,
- (d) 加入结合链霉抗生物素蛋白的化学发光吖啶镧化合物来形成第三固相复合物,
- (e) 将固相与液相磁性分离,
- (f) 洗涤,
- (g) 引发所分离固相中的化学发光反应 (如果有的话), 和
- (h) 测量发射的化学发光, 其表明样品中所述抗体存在。

测量 IgA 和 IgG 的测定程序

1. 包被。将 100 μ l Phl p (10 μ g/ml) 提取物加入 ELISA 板 (NUNC Maxisorp 439454) 的孔中。将平板在 2-8 $^{\circ}$ C 静置直至第二天。
2. 洗涤。用缓冲液洗涤经包被的平板。
3. 封闭。将 200 μ l 2% 酪蛋白缓冲液加入每个孔中并在摇床上室温温育一小时。温育后, 除去酪蛋白缓冲液。
4. 血清。稀释血清样品, 并将 100 μ l 稀释的样品加入平板的孔中并在摇床上室温温育两小时。
5. 洗涤。
6. 缀合物。将 100 μ l 以 1:1000 稀释于 0.5% 酪蛋白缓冲液中的 HRP 小鼠抗人 IgG/IgA 加入每个孔中并在摇床上室温放置一小时。
7. 洗涤。
8. 底物: 100 μ l TMP (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺, Kem-En-Tec TMB ONE) 加入每个孔中并温育 20 分钟。
9. 停止。将 100 μ l 的 0.5M H_2SO_4 加入每个孔中来停止反应。
10. 测量。将所得到的反应混合物接受 450nm 终点的分光光度测量 (Bio Kinetics Reader EL-340)。

结果

结果显示于图 1-12 中, 其中图 1-4 各自显示了组 A, B, C 和 D

的 IgE 水平, 图 5-8 各自显示了组 A, B, C 和 D 的 IgA 水平, 图 9-12 各自显示了组 A, B, C 和 D 的 IgG 水平, 且其中每幅图表示四个测量时间点 (0 周, 4 周 (3-5 周获得的样品), 8 周 (7-8 周获得的样品) 和结束 (15 周治疗阶段结束后两周)) 的抗体水平 (对于 IgE 为 kU/L, 对于 IgA 和 IgG 为与过敏患者的参照血清相比较的相对滴度)。抗体水平是治疗组的平均值。

由图 1-4 可见: 在治疗组 A (安慰剂) 中在整个给药阶段没有记录到 IgE 水平提高。对于治疗组 B (2500 SQ), 在整个阶段内记录到 IgE 水平从 29 至 58 的连续提高。对于治疗组 C (25000 SQ), 观察到从 31 至 94 的连续提高。最后, 对于治疗组 D (75000 SQ), IgE 水平从 0 周的 34 急剧地升高至 4 周的最大值 168, 然后在 8 周跌至 159 并进一步在结束时跌至 86。认为组 D 的时间曲线代表了理想的曲线, 其意味着有效的特异性变态反应疫苗接种。

图 5-8 显示出对于治疗组 A 和 B 没有记录到 IgA 水平提高。对于治疗组 C 和 D, IgA 水平在给药阶段内稳定提高。

图 9-12 显示出对于治疗组 A 和 B 没有记录到 IgG 水平提高。对于治疗组 C 和 D, IgG 水平在给药阶段内稳定提高。

图 1-12 中所示的结果进一步列于表 1 中。

表 1

Ab	N	剂量	0 周	4 周	8 周	结束
IgE	10	安慰剂	25.5	18.8	22.4	17.5
IgE	12	2.500 SQ-U	28.9	32.6	45.2	57.8
IgE	12	25.000 SQ-U	31.1	58.9	74.9	93.6
IgE	11	75.000 SQ-U	33.8	167.6	159.2	86.2
IgA		安慰剂	0.373	0.228	0.356	0.308
IgA		2.500 SQ-U	0.545	0.339	0.613	0.435
IgA		25.000 SQ-U	0.500	0.526	0.773	2.155
IgA		75.000 SQ-U	0.586	1.078	2.108	2.380
IgG		安慰剂	0.0432	0.049	0.0404	0.0356
IgG		2.500 SQ-U	0.05117	0.0523	0.05558	0.07763
IgG		25.000 SQ-U	0.036	0.04827	0.06833	0.1364
IgG		75.000 SQ-U	0.0615	0.1041	0.2124	0.2996

实施例 2: 用快速分散的非压缩舌下片剂来治疗草花粉过敏患者背景

已知使用梯牧草提取物作为过敏原活性物质的对抗草花粉变态反应的疫苗在皮下给药的制剂中是有效的，其中将过敏原和作为佐剂的氢氧化铝凝胶一起配制。

目的

为了测试用于舌下给药的快速分散非压缩冻干片剂形式的梯牧草提取物新制剂的治疗潜力（效力），片剂不含有佐剂。片剂含有鱼胶作为基质成形剂。效力研究构成临床 I 期研究的一部分，后者还包括安全性研究。

疫苗接种方案

测试人员

9 名在草花粉季节患有中度至严重过敏性鼻炎且在季节外没有症状的 18 至 65 岁的成人测试人员。入选标准是 1) 测试人员的临床病史，2) 阳性皮肤单刺试验 (>3mm Soluprick© SQ-U HEP 梯牧草)，和 3) 对抗梯牧草的特异性 IgE 阳性 (CAP 类别 2 或更高)。

剂量和给药程序

用对应于 1.000.000 SQ-U 日剂量的多个片剂来治疗 6 名测试人员，持续 28 天，用安慰剂治疗 3 名人员相同的时间段。

测量

在治疗开始时和治疗最后一天后 1-2 周时获得生物样品。使用实施例 1 中所述的测定来测量 IgE 水平。

结果

结果显示于图 13-14 中，其中图 13 显示了用安慰剂治疗的患者组

在治疗开始时和治疗阶段后 1-2 周时的 IgE 水平,其中图 14 显示了用 1000000 SQ 剂量治疗的患者组在治疗阶段开始时和治疗阶段后 1-2 周时的 IgE 水平。

由图 13 可见,对于安慰剂组,在治疗阶段过程中 IgE 水平没有改变,而(对于治疗组) IgE 水平从约 0.31 提高至约 1.79。

实施例 3: 用快速分解的非压缩舌下片剂来治疗草花粉过敏患者背景

已知使用梯牧草提取物作为过敏原活性物质的对抗草花粉变态反应的疫苗在皮下给药的制剂中是有效的,其中将过敏原和作为佐剂的氢氧化铝凝胶一起配制。

目的

为了测试用于舌下给药的快速分散非压缩冻干片剂形式的梯牧草提取物新制剂的治疗潜力(效力),片剂不含有佐剂。片剂含有鱼胶作为基质成形剂。效力研究构成临床 IIb-III 期研究的一部分。

疫苗接种方案

测试人员

855 名在草花粉季节患有中度至严重过敏性鼻炎且在季节外没有症状的 18 至 65 岁的成人测试人员。入选标准是 1) 测试人员的临床病史, 2) 阳性皮肤单刺试验(>3mm Soluprick© SQ-U HEP 梯牧草), 和 3) 对抗梯牧草的特异性 IgE 阳性(CAP 类别 2 或更高)。测试人员生活在丹麦, 德国, 瑞典, 挪威, 比利时, 奥地利, 英格兰, 瑞士和加拿大。

剂量和给药程序

将 855 名测试人员分成六组 1, 2, 3, 4, 5 和 6, 各自包括 136, 136, 139, 141, 150 和 153 人。

组 1 用安慰剂和活性抗组胺药来治疗。

组 2 用 2500 SQ 的过敏原剂量和活性抗组胺药来治疗。

组 3 用 25000 SQ 的过敏原剂量和活性抗组胺药来治疗。

组 4 用 75000 SQ 的过敏原剂量和活性抗组胺药来治疗。

组 5 用安慰剂和安慰剂抗组胺药来治疗。

组 6 用 75000 SQ 的过敏原剂量和安慰剂抗组胺药来治疗。

在预期的梯牧草花粉季开始之前（预治疗阶段），整个花粉季节和花粉季节后 1 周（后治疗阶段），每日进行治疗，持续约 8 周。花粉季的持续时间变化，从在 Trondheim（挪威）为 12 天，到在卡尔斯鲁厄（Karlsruhe）（德国）为 86 天。

测量

在预治疗阶段开始时（图 15-22 中的预治疗），花粉季开始时（图 15-22 中的治疗），和后治疗阶段结束时（图 15-22 中的后治疗），采取血样。使用实施例 1 中所述的测定来测量 IgE 水平。以 IgE 水平（竞争）/IgE 水平（非竞争）来测定 IgX 参数。使用实施例 1 中所述的测定来测量 IgE 水平（非竞争）。使用以下的测定程序来测量 IgE 水平（竞争）：

（a）将液体样品与针对待检测抗体的与顺磁颗粒结合的类别特异性抗体混合来形成第一固相复合物，

（b）加入结合生物素的梯牧草过敏原来形成第二固相复合物，

（c）加入结合链霉抗生物素蛋白的化学发光吖啶镧化合物来形成第三固相复合物，

（d）将固相与液相磁性分离，

（e）洗涤，

（f）引发所分离固相中的化学发光反应（如果有的话），和

（h）测量所发射的化学发光，其表明样品中所述抗体存在。

结果

IgE 结果显示于图 15-18 以及表 2 和 3 中,其中图 15 显示了组 1-4 对于 ITT-群的 IgE 水平,图 16 显示了组 1, 5 和 6 对于 ITT-群的 IgE 水平,图 17 显示了组 1-4 对于 PP-群的 IgE 水平,和图 18 显示了组 1, 5 和 6 对于 PP-群的 IgE 水平。ITT 意思是意向治疗并包括研究开始时的所有人员,PP 意思是按照方案并包括根据所计划的方案治疗的所有人员。表 2 包含图 15 和 16 的所有值,表 3 包括图 17 和 18 的所有值。

从图 15-18 以及表 2 和 3 可以看出,对于组 1 和 5,没有记录到从预处理至治疗 IgE 水平提高,记录到 IgE 水平从治疗至后治疗有少许提高。对于组 2,记录到 IgE 水平适度的稳定提高。对于组 3, 4 和 6,记录到 IgE 水平从预处理至治疗急剧提高,接着是从治疗至后治疗的平台阶段。对于组 4, IgE 水平在平台阶段中略微降低。认为组 3, 4 和 6 特别是组 4 的时间曲线代表了理想的曲线,其表明有效的特异性变态反应疫苗接种。

IgX 结果显示于图 19-22 以及表 4 和 5 中,其中图 19 显示了组 1-4 对于 ITT 群的 IgX 水平,图 20 显示了组 1, 5 和 6 对于 ITT-群的 IgX 水平,图 21 显示了组 1-4 对于 PP-群的 IgX 水平,和图 22 显示了组 1, 5 和 6 对于 PP-群的 IgX 水平。ITT 意思是意向治疗并包括研究开始时的所有人员,PP 意思是按照方案并包括根据所计划的方案治疗的所有人员。表 4 包含图 19 和 20 的所有值,表 5 包括图 21 和 22 的所有值。

从图 19-22 以及表 4 和 5 可以看出,对于组 1 和 5,没有记录到从预处理至治疗 IgX 水平降低,记录到 IgX 水平从治疗至后治疗有少许降低。对于组 2 和 3,记录到 IgX 水平适度的稳定降低。对于组 4 和 6,记录到 IgX 水平从预处理至治疗急剧降低,接着是从治疗至后治疗不那么强的降低。对于组 4,大部分 IgX 水平降低发生在预处理至治疗的阶段中。认为组 4 和 6 特别是组 4 的时间曲线代表了理想的曲线,其表示有效的特异性变态反应疫苗接种。

表 2. 对于 ITT 群的草特异性 IgE (kU/L)

	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
	安慰剂 +活性物质 (N=136)	2500SQ +活性物质 (N=136)	25000SQ +活性物质 (N=139)	75000SQ +活性物质 (N=141)	安慰剂 +安慰剂 (N=150)	75000SQ +安慰剂 (N=153)
全部						
就诊 (visit)	(N=136)	(N=136)	(N=139)	(N=141)	(N=150)	(N=855)
预防治疗						
N	136	135	139	139	148	850
平均 (SD)	25.7 (34.4)	3.8 (47.2)	27.2 (34.6)	27.1 (45.8)	18.8 (28.0)	26.9 (39.8)
中值	12.4	14.0	12.7	12.4	10.1	12.0
P5%-P95%	1.3-109.0	1.6-120.9	0.8-115.4	1.1-97.2	0.5-71.4	0.8-107.4
最小-最大	0.3-201.5	0.2-271.8	0.4-207.1	0.4-360.6	0.1-185.6	0.1-360.6
治疗						
N	130	131	130	131	142	809
平均 (SD)	22.7 (29.5)	57.1 (87.5)	88.3 (104.6)	103.0 (126.1)	17.5 (28.3)	65.8 (101.4)
中值	11.2	24.9	46.4	63.4	9.3	26.6
P5%-P95%	0.9-92.8	1.6-173.1	1.9-326.8	3.0-355.5	0.4-63.5	1.2-258.8
最小-最大	0.2-148.8	0.2-702.1	0.5-563.3	1.1-705.6	0.0-233.4	0.0-901.7
后治疗						
N	130	131	130	133	142	812
平均 (SD)	40.7 (53.1)	74.8 (96.1)	94.1 (107.5)	99.5 (129.4)	30.2 (46.7)	75.2 (105.6)
中值	18.9	38.6	53.7	58.3	15.4	36.1
P5%-P95%	1.5-154.1	2.8-250.2	2.8-360.0	3.3-350.6	1.0-101.6	1.9-290.1
最小-最大	0.3-286.8	0.3-675.5	1.6-554.9	1.5-715.7	0.0-278.9	0.0-928.8

表 3. 对于 PP-群的草特异性 IgE (kU/L)

	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6	
	安慰剂	2500SQ	25000SQ	75000SQ	安慰剂	75000SQ	
	+活性物质	+活性物质	+活性物质	+活性物质	+安慰剂	+安慰剂	全部
就 诊	(N=122)	(N=122)	(N=125)	(N=124)	(N=128)	(N=127)	(N=748)
预治疗							
N	122	121	125	122	127	127	744
平均 (SD)	25.3 (35.0)	34.7 (48.6)	25.7 (34.5)	27.7 (48.1)	19.4 (28.7)	26.4 (40.3)	26.5 (39.9)
中值	12.1	14.1	11.0	11.9	11.1	10.5	11.6
P5%-P95%	1.3-109.0	1.6-120.9	0.8-103.1	1.5-97.2	0.4-71.4	0.6-107.1	0.8-109.0
最小-最大	0.3-201.5	0.2-271.8	0.4-207.1	0.4-360.6	0.1-185.6	0.2-219.0	0.1-360.6
治 疗							
N	122	121	123	123	127	127	743
平均 (SD)	22.3 (29.2)	58.9 (90.2)	85.7 (102.5)	102.4 (127.9)	17.6 (28.9)	104.1 (133.2)	65.2 (101.4)
中值	11.2	25.0	44.9	63.3	9.3	57.0	26.7
P5%-P95%	0.9-92.8	1.7-173.1	1.9-280.4	3.4-355.5	0.4-63.5	2.7-327.4	1.3-251.3
最小-最大	0.2-148.8	0.2-702.1	0.5-563.3	1.1-705.6	0.0-233.4	0.5-901.7	0.0-901.7
后治疗							
N	122	121	121	123	127	126	740
平均 (SD)	40.9 (54.3)	77.8 (98.8)	92.2 (105.7)	98.4 (131.2)	29.2 (44.4)	107.7 (136.5)	74.3 (105.3)
中值	18.5	38.6	53.2	57.8	15.7	53.2	34.9
P5%-P95%	1.5-154.1	3.2-250.2	2.8-324.7	3.3-350.6	0.7-94.0	3.1-356.0	2.0-288.4
最小-最大	0.3-286.8	0.5-675.5	1.6-554.9	1.5-715.7	0.0-278.9	1.1-928.8	0.0-928.8

表 4. 对于 ITT-群的草特异性 IgX

	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
	安慰剂	2, 500SQ	25, 000SQ	75, 000SQ	安慰剂	75, 000SQ
	+活性物质	+活性物质	+活性物质	+活性物质	+安慰剂	+安慰剂
就诊	(N=136)	(N=136)	(N=139)	(N=141)	(N=150)	(N=153)
						全部 (N=855)
预防治疗						
N	136	135	139	139	148	153
平均 (SD)	1.097(0.15)	1.101(0.15)	1.111(0.16)	1.075(0.13)	1.101(0.21)	1.091(0.18)
中值	1.08	1.08	1.09	1.07	1.07	1.08
P5%-P95%	0.88-1.37	0.90-1.37	0.90-1.42	0.87-1.30	0.87-1.44	0.85-1.39
最小-最大	0.80-1.75	0.81-1.64	0.66-1.78	0.79-1.44	0.67-2.68	0.57-1.69
						0.57-2.68
治疗						
N	130	131	130	131	142	145
平均 (SD)	1.107(0.16)	1.082(0.14)	1.060(0.17)	0.988(0.13)	1.113(0.25)	0.990(0.16)
中值	1.09	1.06	1.02	1.00	1.07	0.97
P5%-P95%	0.88-1.41	0.90-1.35	0.88-1.46	0.80-1.20	0.86-1.46	0.77-1.25
最小-最大	0.77-1.76	0.83-1.53	0.64-1.76	0.55-1.39	0.79-3.19	0.47-1.48
						0.47-3.19
后治疗						
N	130	131	130	133	142	146
平均 (SD)	1.087(0.16)	1.058(0.14)	1.015(0.16)	0.964(0.16)	1.110(0.27)	0.934(0.17)
中值	1.07	1.03	0.99	0.95	1.07	0.95
P5%-P95%	0.87-1.35	0.88-1.33	0.81-1.38	0.71-1.20	0.87-1.44	0.67-1.19
最小-最大	0.76-1.65	0.70-1.62	0.56-1.64	0.53-1.65	0.80-3.48	0.29-1.24
						0.29-3.48

表 5. 对于 PP-群的草特异性 IgX

	组 1	组 2	组 3	组 4	组 5	组 6
	安慰剂 +活性物质 (N=122)	2,500SQ +活性物质 (N=122)	25,000SQ +活性物质 (N=125)	75,000SQ +活性物质 (N=124)	安慰剂 +安慰剂 (N=128)	75,000SQ +安慰剂 (N=127) 全部 (N=748)
就诊						
预防治疗						
N	122	121	125	122	127	127
平均 (SD)	1.103 (0.15)	1.103 (0.15)	1.114 (0.17)	1.070 (0.12)	1.103 (0.22)	1.088 (0.18)
中值	1.08	1.10	1.09	1.07	1.07	1.07
P5%-P95%	0.89-1.37	0.90-1.37	0.91-1.42	0.88-1.29	0.87-1.44	0.84-1.40
最小-最大	0.80-1.75	0.81-1.64	0.66-1.78	0.79-1.44	0.67-2.68	0.57-2.68
治疗						
N	122	121	123	123	127	127
平均 (SD)	1.110 (0.16)	1.086 (0.13)	1.060 (0.17)	0.985 (0.13)	1.117 (0.25)	0.989 (0.16)
中值	1.09	1.06	1.02	1.00	1.07	0.97
P5%-P95%	0.88-1.41	0.90-1.35	0.88-1.46	0.80-1.20	0.86-1.40	0.77-1.25
最小-最大	0.77-1.76	0.83-1.53	0.64-1.76	0.55-1.39	0.81-3.19	0.47-3.19
后治疗						
N	122	121	121	123	127	126
平均 (SD)	1.090 (0.16)	1.057 (0.13)	1.014 (0.17)	0.960 (0.16)	1.113 (0.28)	0.929 (0.17)
中值	1.07	1.04	0.99	0.94	1.07	0.95
P5%-P95%	0.88-1.35	0.88-1.32	0.81-1.38	0.71-1.20	0.87-1.44	0.65-1.19
最小-最大	0.76-1.65	0.70-1.62	0.56-1.64	0.53-1.65	0.80-3.48	0.29-3.48

血清中过敏原特异性IgE水平

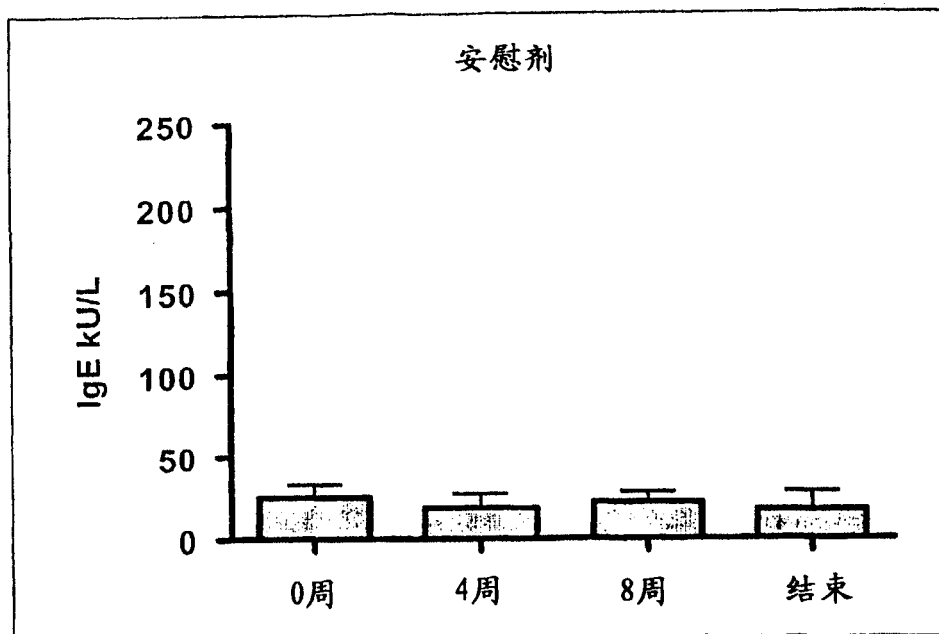


图1

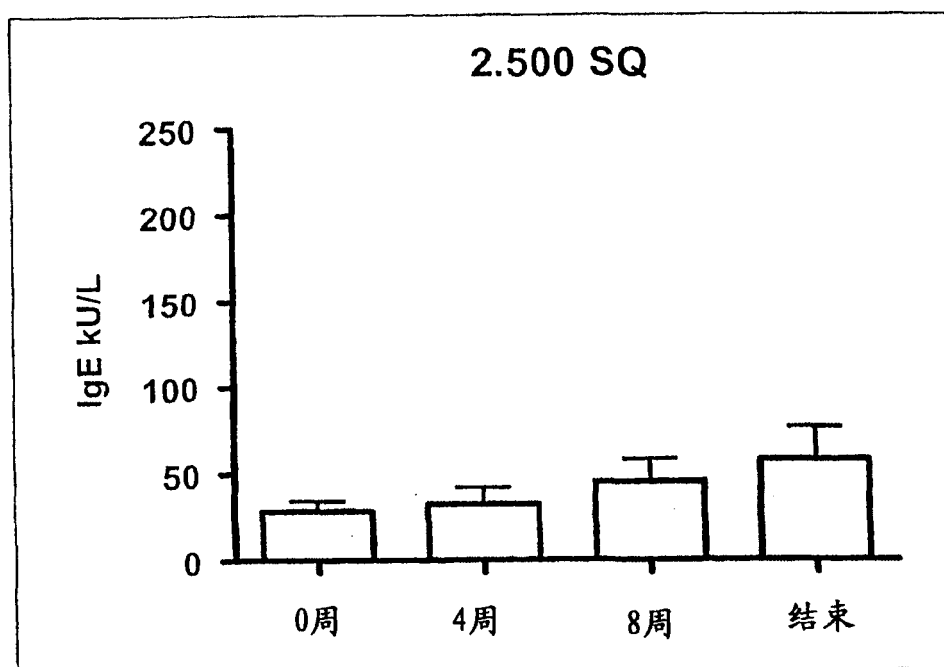


图2

血清中过敏原特异性IgE水平

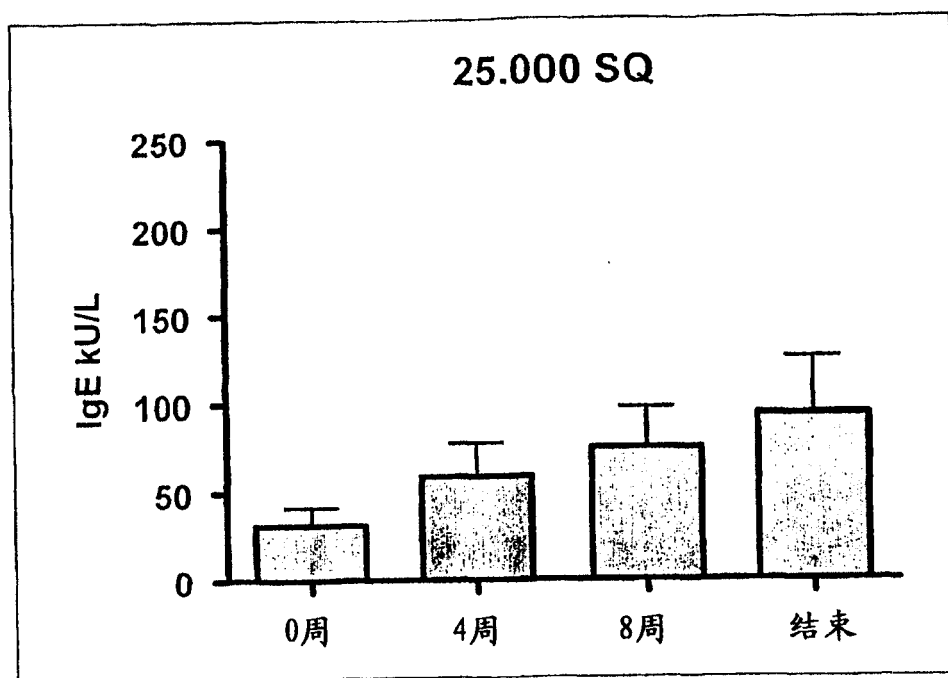


图3

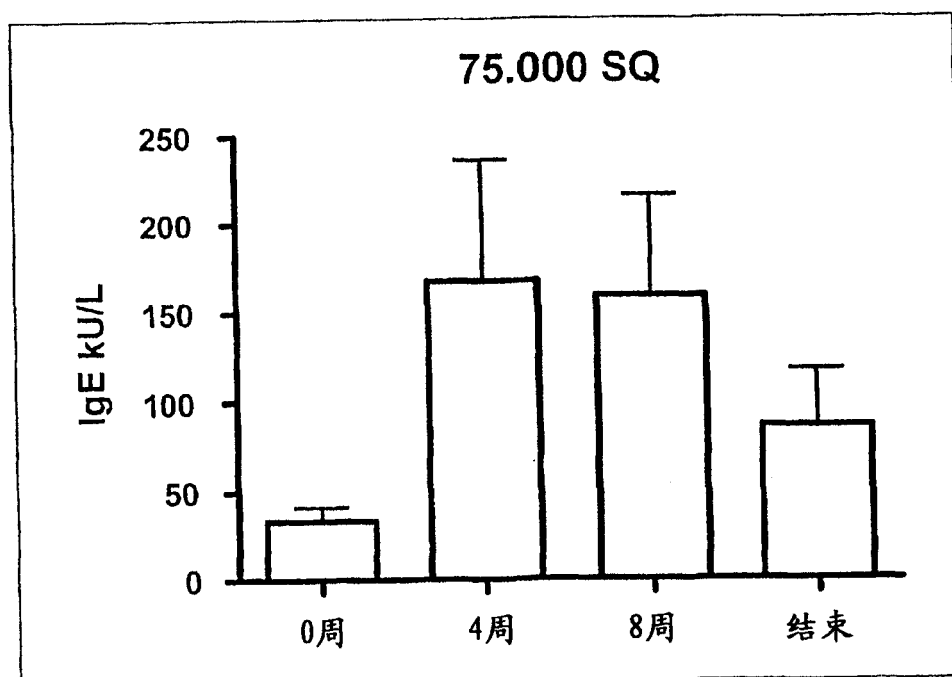


图4

血清中过敏原特异性IgA水平

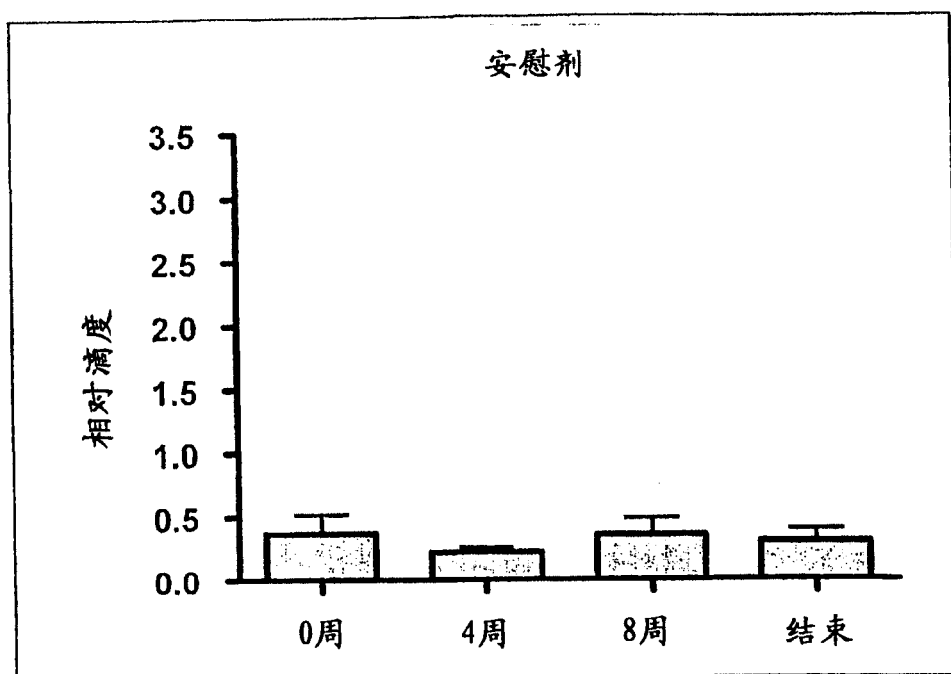


图5

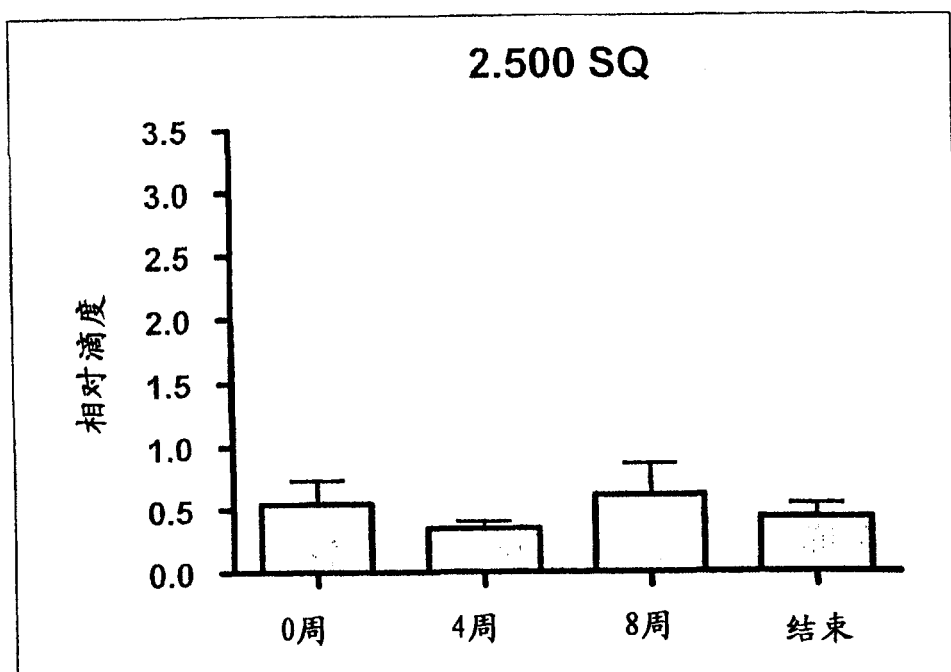


图6

血清中过敏原特异性IgA水平

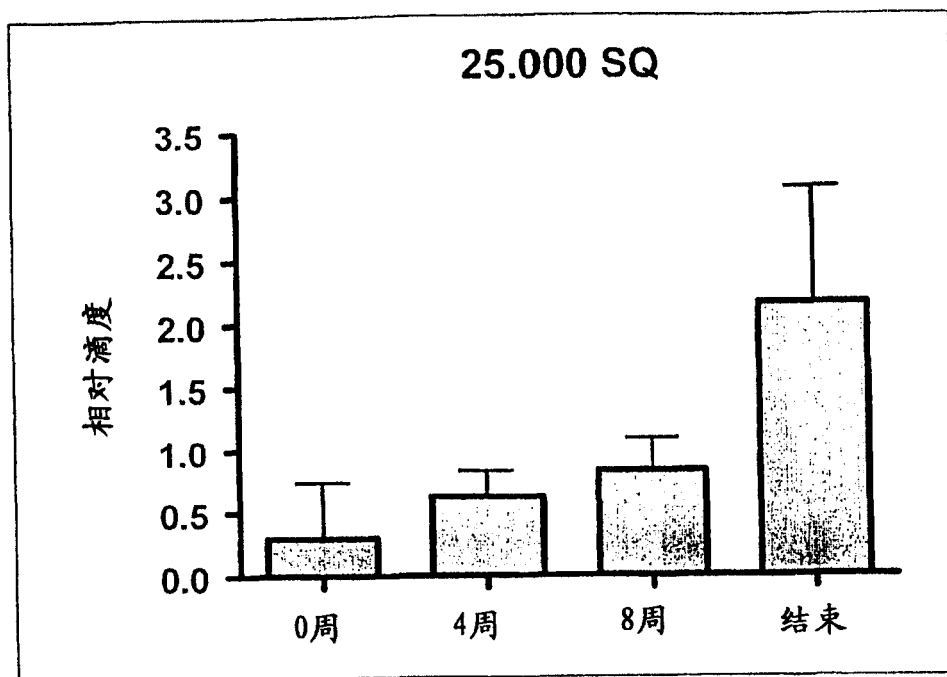


图7

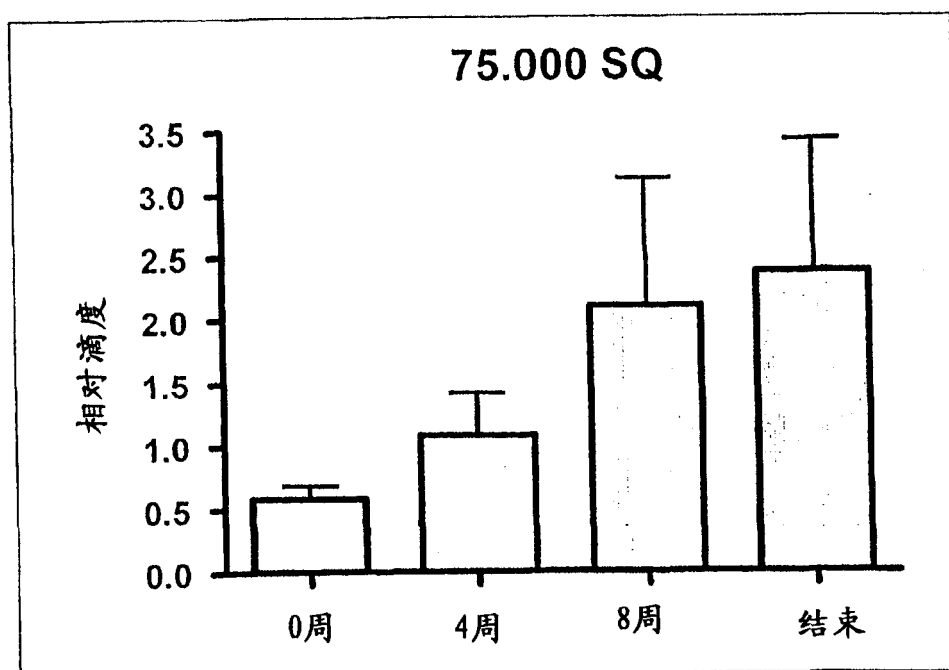


图8

血清中过敏原特异性IgG水平

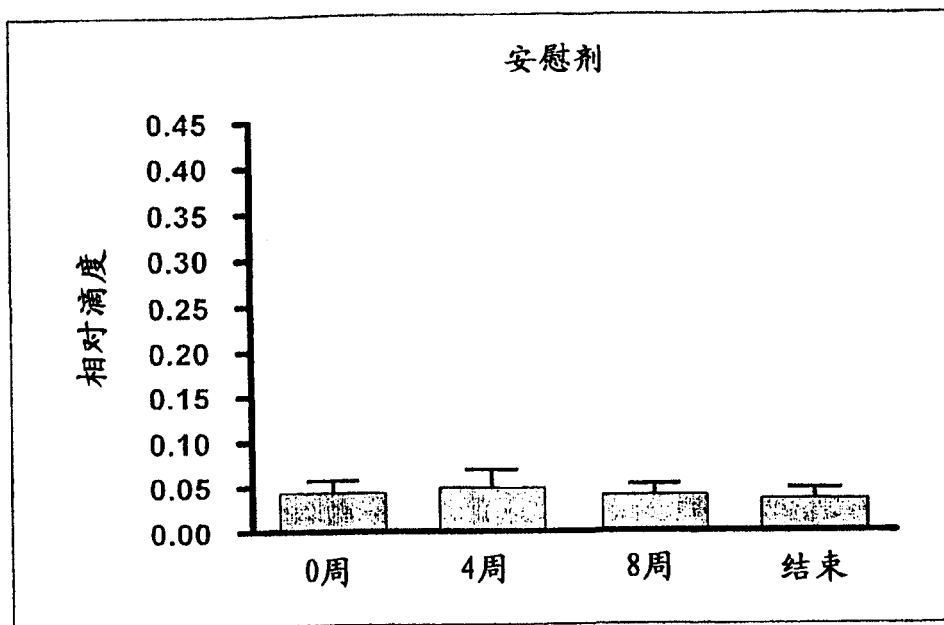


图9

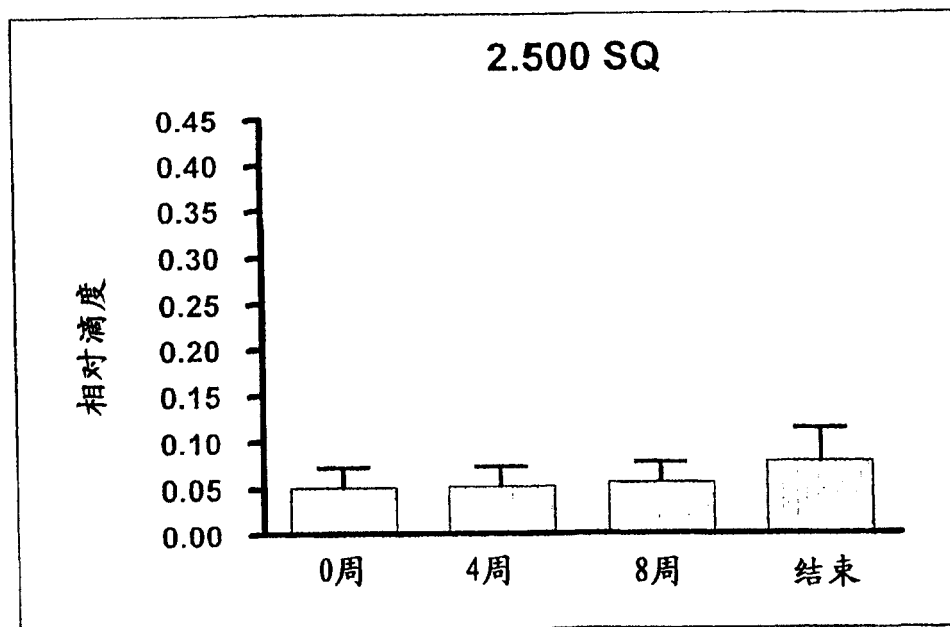


图10

血清中过敏原特异性IgG水平

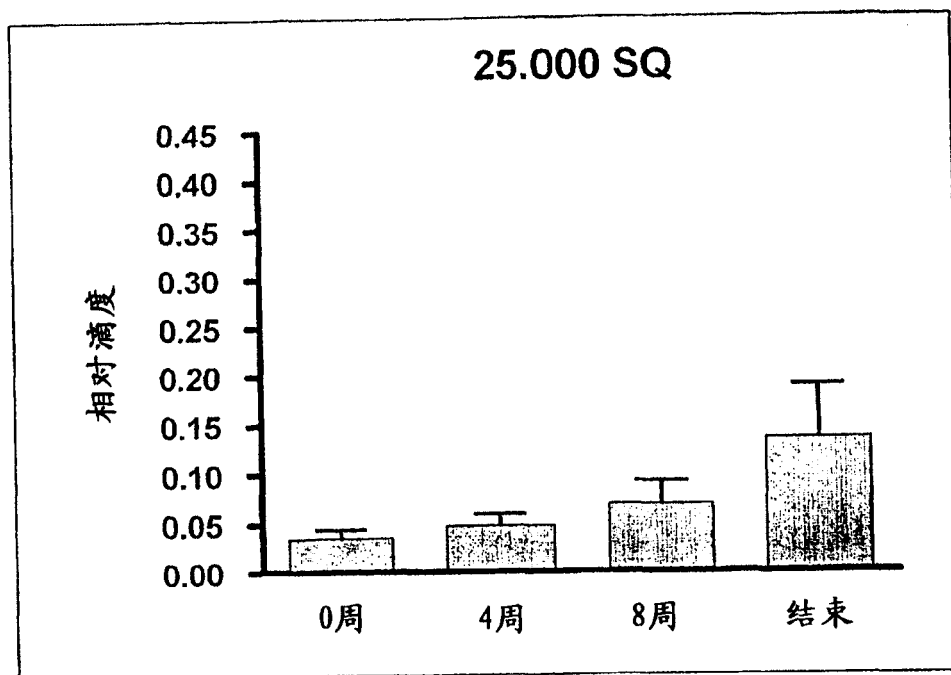


图 11

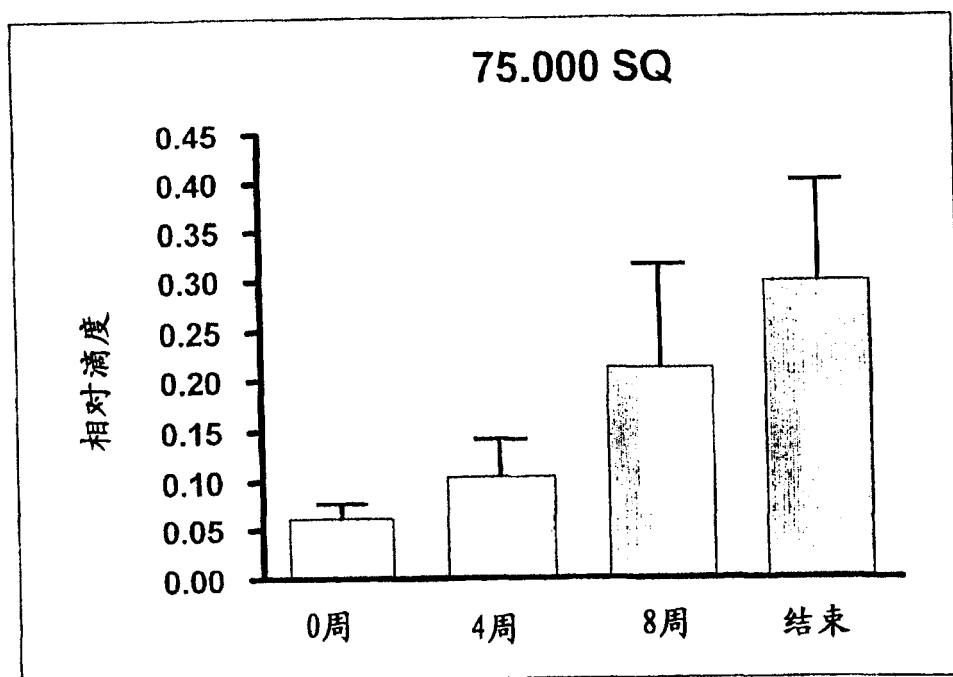


图 12

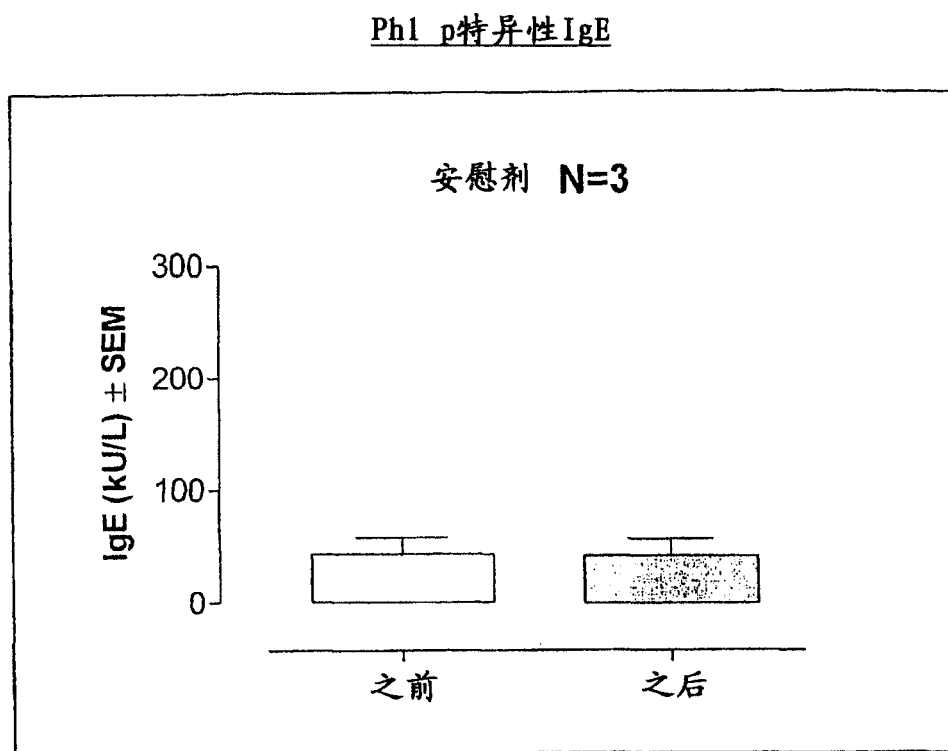


图13

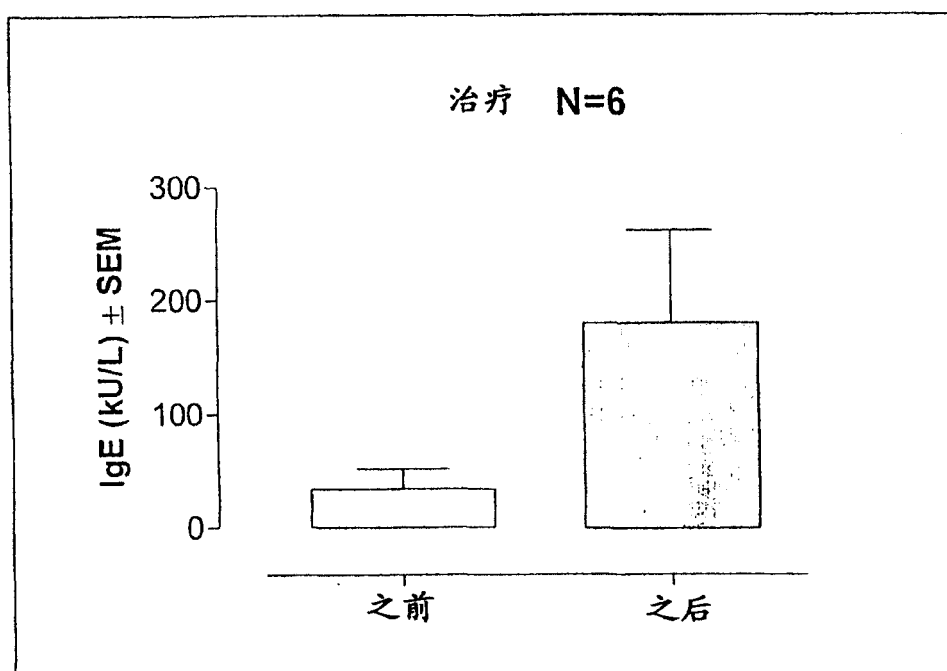


图14

对于ITT-群的平均IgE

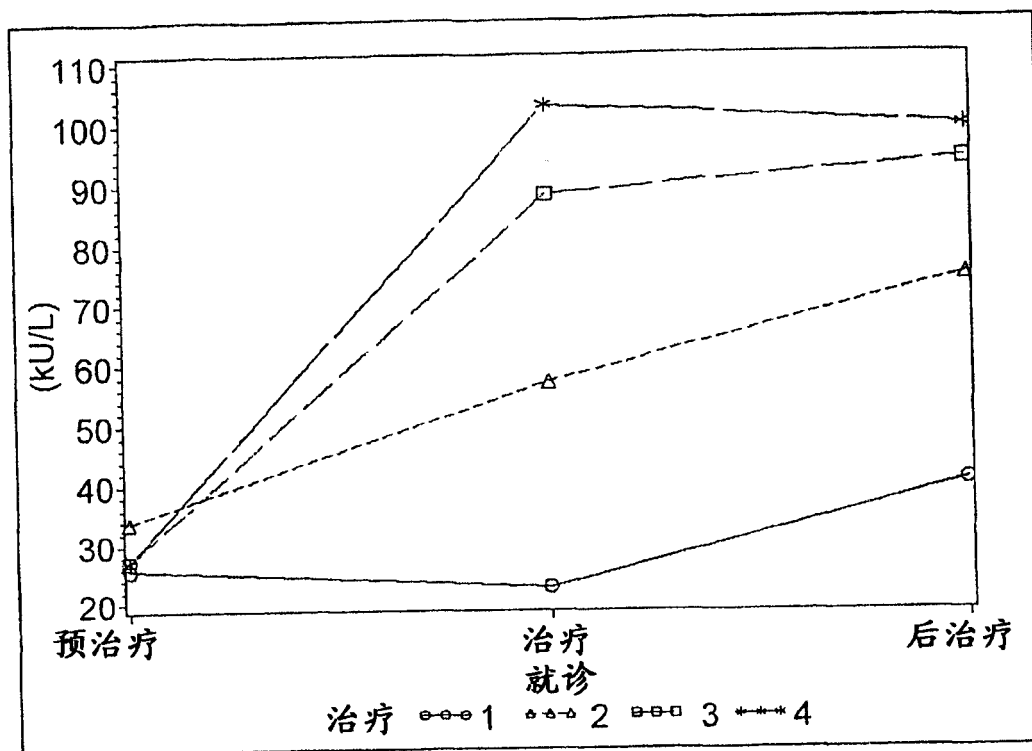


图 15

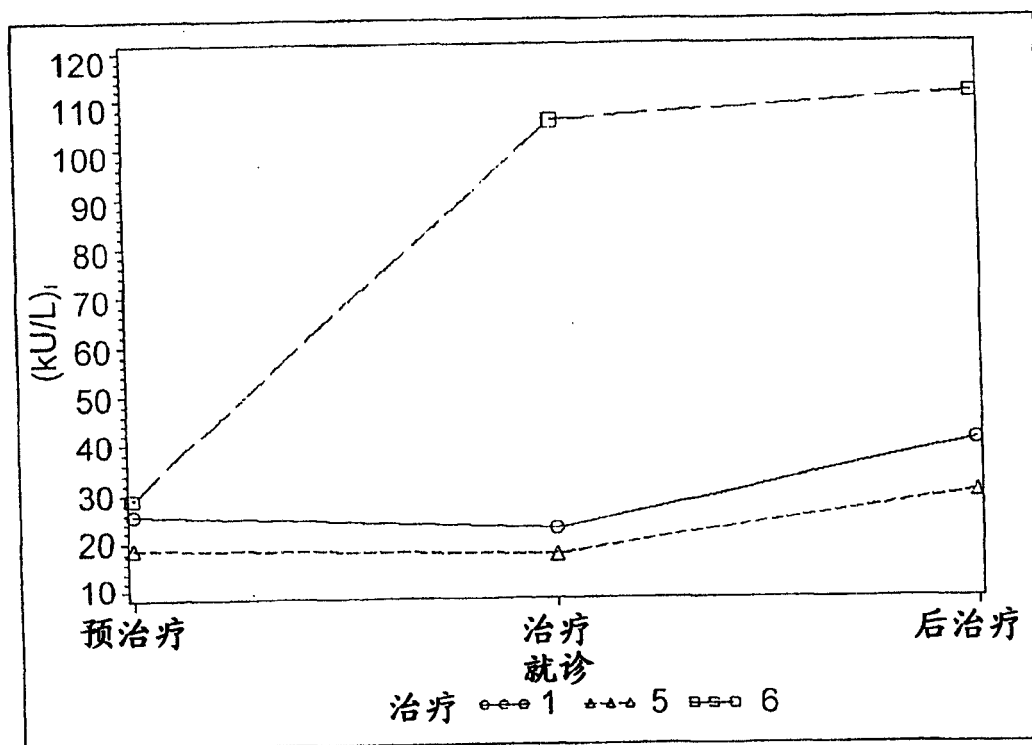


图 16

对于PP-群的平均IgE

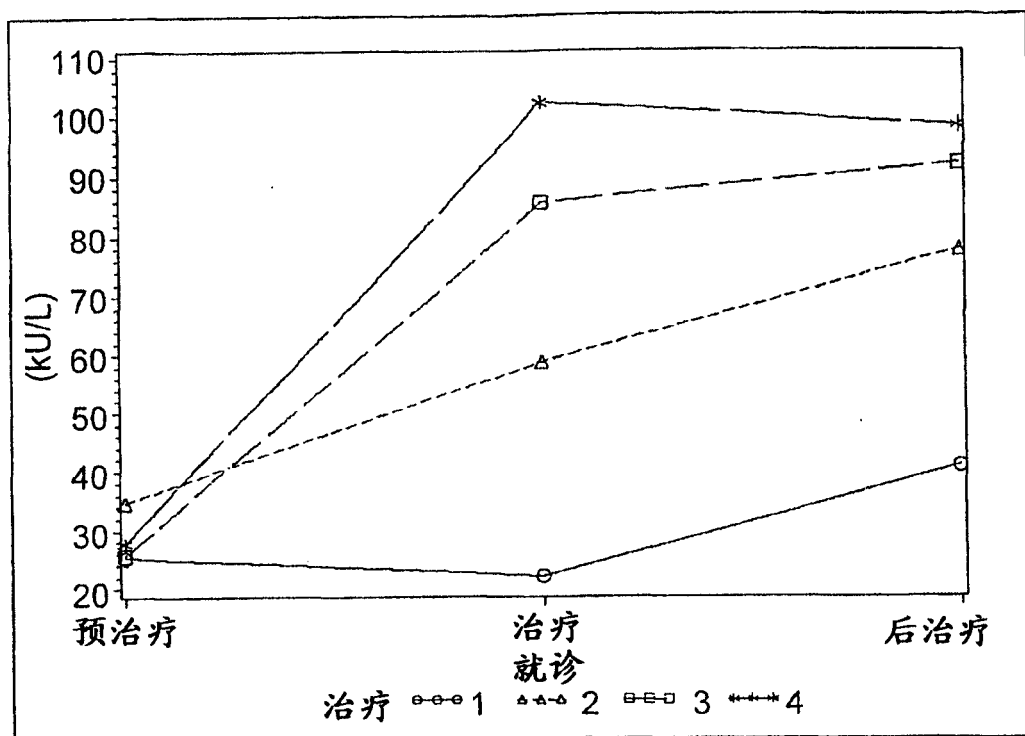


图 17

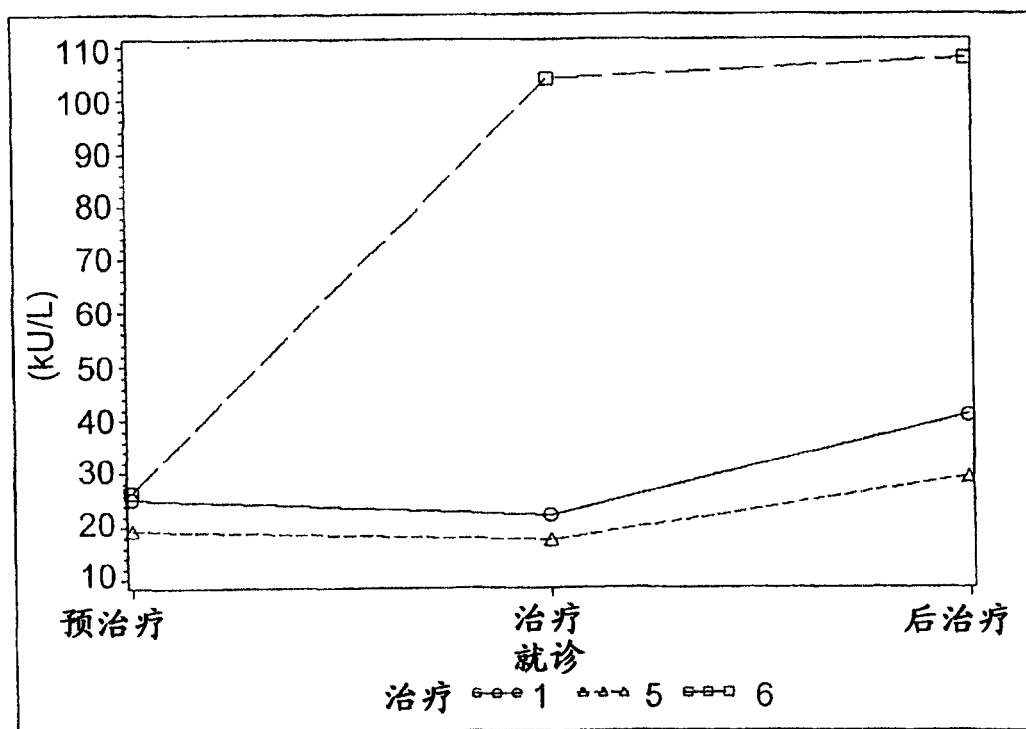


图 18

ITT-群的平均IgX

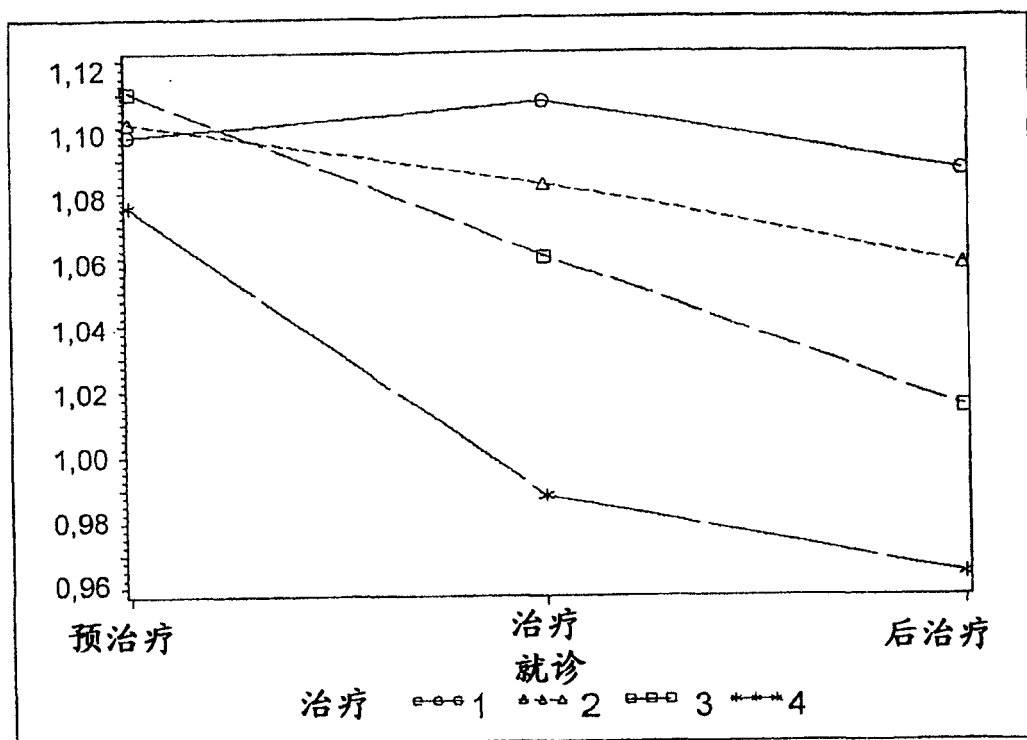


图19

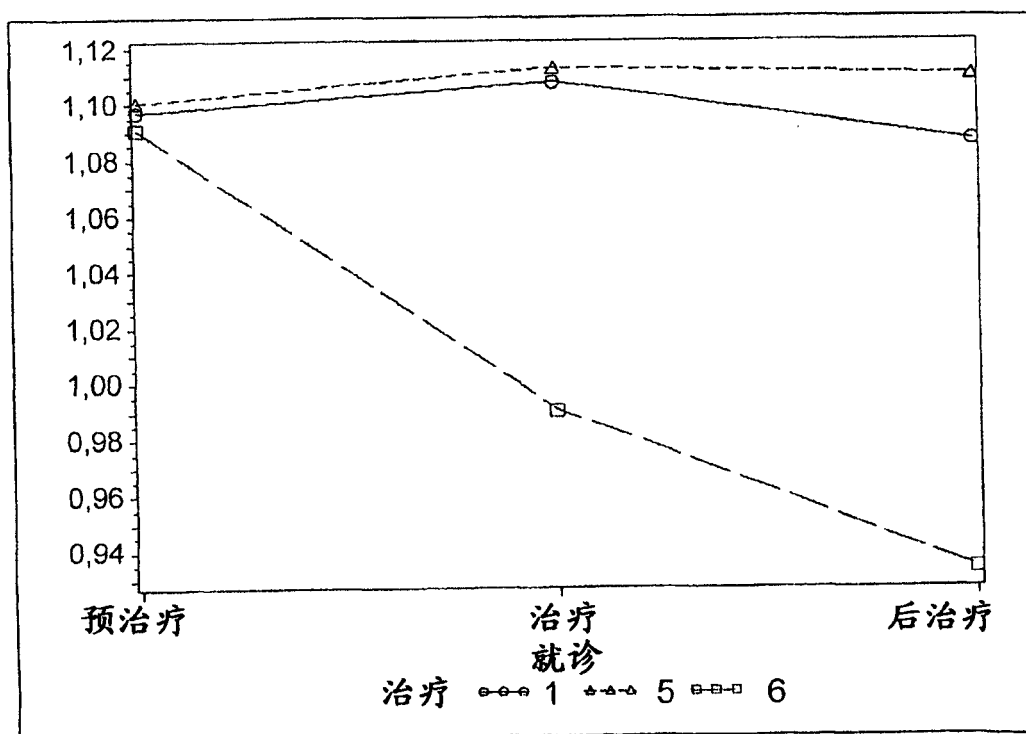


图20

PP-群的平均IgX

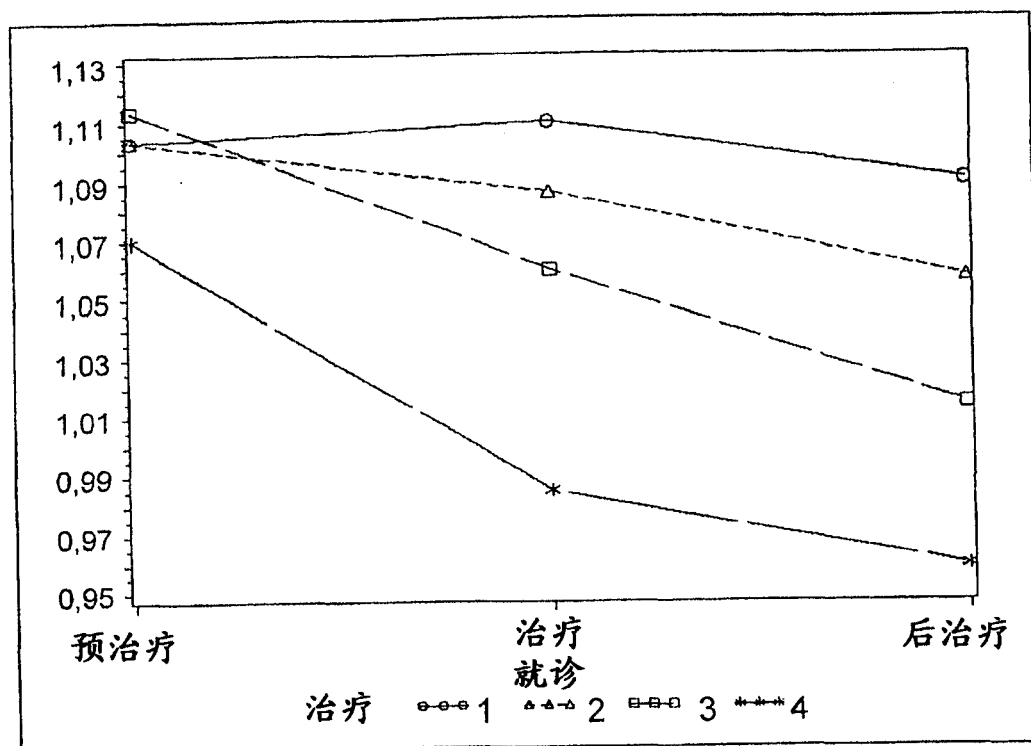


图 21

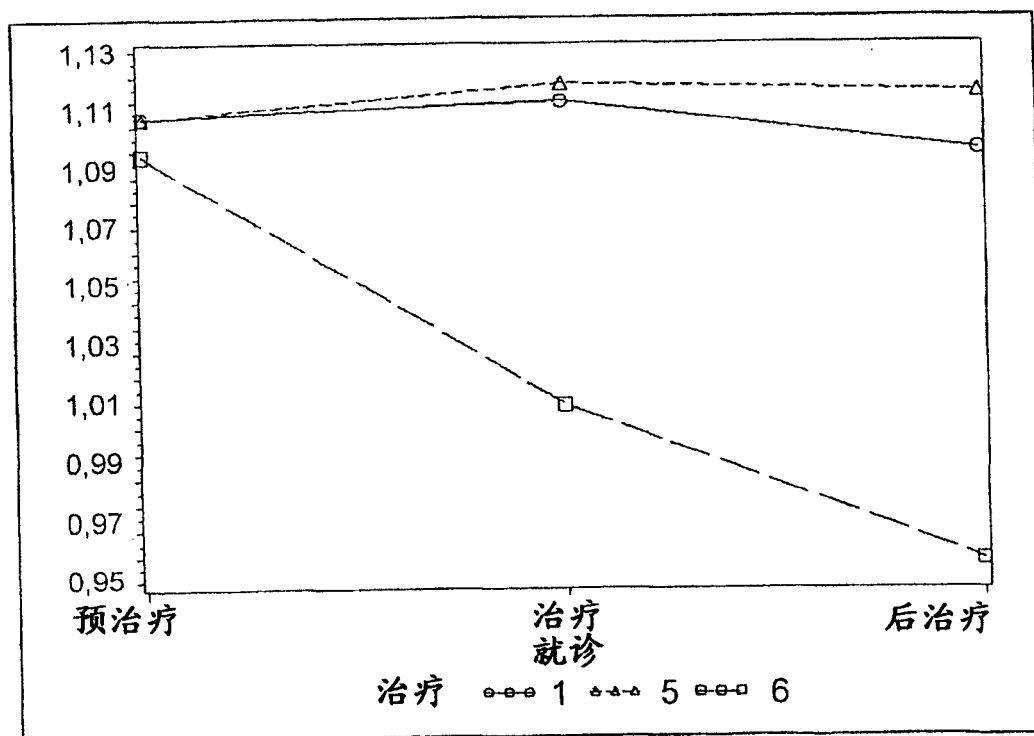


图 22

专利名称(译)	评价粘膜给药的疫苗的治疗潜力的方法		
公开(公告)号	CN1942766A	公开(公告)日	2007-04-04
申请号	CN200580011627.6	申请日	2005-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔克-阿贝洛有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔克-阿贝洛有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿尔克-阿贝洛有限公司		
[标]发明人	H H伊普森 L伦德梅尔克达尔 HH雅各比		
发明人	H - H·伊普森 L·伦德梅尔克达尔 H·H·雅各比		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/68 A61K39/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/545 G01N33/6854 A61K39/36 A61K2039/542		
优先权	60/559095 2004-04-02 US 60/548454 2004-02-26 US 200400310 2004-02-26 DK		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及评价疫苗接种程序的治疗潜力的方法，该疫苗接种程序包括含有一种或多种抗原的用于粘膜给药的疫苗和接种方案，该方法包括a)使至少一个测试个体接受疫苗接种程序，b)测量测试个体生物样品中生物标记抗体的水平，该生物标记抗体选自抗原特异性的IgA，IgG，IgE和IgX，和c)使用所获得的测量结果来评价疫苗接种程序的治疗潜力。

血清中过敏原特异性IgE水平

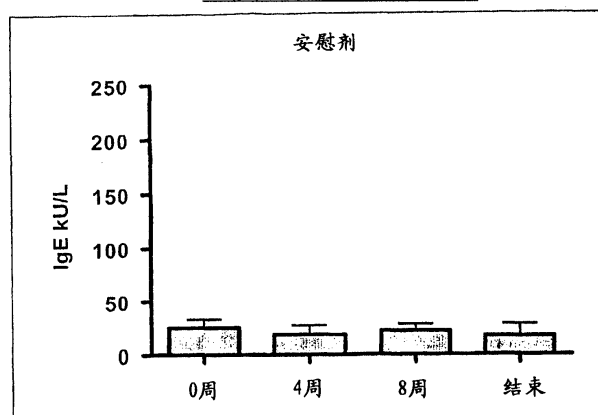


图1