

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03133237.4

[51] Int. Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1313152C

[22] 申请日 1993.5.22 [21] 申请号 03133237.4

分案原申请号 93107319.7

[30] 优先权

[32] 1992. 5. 23 [33] GB [31] 9211081.6

[32] 1992. 6. 23 [33] GB [31] 9213308.1

[73] 专利权人 史密丝克莱恩比彻姆生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

[72] 发明人 J·佩特里 P·豪泽

[56] 参考文献

EP0339667A 1989.11.2

Polyvalent antigen vaccine for human use Research Disclosure, No. 329 1991

Simultaneous administration of diphtheria - tetanus - ertussis - polioand . . . . . Coursaget P. et al, Infect. Immun. , Vol. 51 No. 3 1986

审查员 吴文英

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 22 页

[54] 发明名称

疫苗

[57] 摘要

本申请说明书描述了含 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的稳定有效的多效疫苗组合物, 其中 HBsAg 组分在 37℃ 可稳定一星期, 并且如将其疫苗接种到幼儿时, 则是高度致免疫的。该组合物典型地含吸附在磷酸铝上的 HBsAg 和其他抗原, 尤其是适于在儿科疫苗中使用, 吸附到磷酸铝或氢氧化铝上的那些抗原。还叙述了制备疫苗的方法和在多效疫苗配方中应用磷酸铝稳定 HBsAg 的方法。

1. 一种多效疫苗，其包含吸附在磷酸铝上的 HBsAg，以及其他抗原，所述疫苗选自以下各组：

白喉、破伤风、百日咳、HBsAg；

白喉、破伤风、HBsAg；

白喉、破伤风、百日咳、HBsAg、失活的脊髓灰质炎疫苗(IPV)；

白喉、破伤风、百日咳、失活的脊髓灰质炎疫苗、HBsAg、嗜血杆菌流行性感冒 b；

白喉、破伤风、百日咳、嗜血杆菌流行性感冒 b、HBsAg；

其中其他抗原被吸附在氢氧化铝或磷酸铝上。

2. 权利要求 1 的包含 HBsAg 的多效疫苗，其中其他抗原包括提供针对白喉、破伤风和百日咳的免疫性的抗原。

3. 权利要求 2 的包含 HBsAg 的多效疫苗，其中提供针对百日咳的免疫性的抗原是含有纯化的抗原的全细胞百日咳疫苗或无细胞百日咳疫苗。

4. 权利要求 1-3 中任一权利要求的包含 HBsAg 的多效疫苗，其中至少一种所述其他抗原被吸附在磷酸铝上。

5. 权利要求 1-3 中任一权利要求的包含 HBsAg 的多效疫苗，其中至少一种所述的其他抗原被吸附在氢氧化铝上。

6. 权利要求 1-3 中任一权利要求的包含 HBsAg 的多效疫苗，其中所有其他抗原被吸附在氢氧化铝上。

7. 权利要求 1-3 中任一权利要求的包含 HBsAg 的多效疫苗，其还包含提供针对选自下列病原体中的一种或几种的免疫性的其他抗原：脑膜炎 A、脑膜炎 B、脑膜炎 C 和中耳炎。

8. 权利要求 1-3 中任一权利要求的包含 HBsAg 的多效疫苗，其还包含提供针对 A 型肝炎的免疫性的抗原。

9. 权利要求 3 的包含 HBsAg 的多效疫苗，其中所述无细胞百日咳疫苗包含 pertactin。

10. HBsAg 在制备用于预防 B 型肝炎病毒感染的权利要求 1-9 中任一权利要求的多效疫苗中的用途。

11. 制备权利要求 1-8 中任一权利要求的多效疫苗的方法，该方法包括将磷酸铝吸附的 HBsAg 与氢氧化铝或磷酸铝吸附的其他抗原中的一种或几种混合。

12. 一种制备含有 HBsAg 的多效疫苗的方法，该方法包括将 HBsAg 吸附到磷酸铝上，将白喉-破伤风、白喉-破伤风-全细胞百日咳或白喉-破伤风-无细胞百日咳吸附到氢氧化铝或磷酸铝上，在达到完全和稳定吸附相应组分的允许时间后，将被吸附的产物合并。

## 疫苗

本申请是申请日为 1993 年 5 月 22 日，申请号为 93107319.7，发明名称为“疫苗”的发明专利申请的分案申请。

本发明涉及新的疫苗配方、制备该疫苗配方的方法及其在治疗中的应用。更具体地，本发明涉及新的复合疫苗配方，包括治疗 B 型肝炎感染的 B 型肝炎疫苗。

B 型肝炎 (HB) 病毒感染是一个普遍存在的问题，但是已用于大众免疫的疫苗现在可购到，例如产品 ‘Engerix - B’ (Smithkline Beechamplc)。Engerix B 有 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 作为 B 型肝炎抗原组分，而 B 型肝炎表面抗原是用基因工程技术制备得到的。

然而，常常必需或者希望与其他疫苗同时使用 B 型肝炎疫苗，这样可能要多次注射。多次注射带来的问题包括更复杂的用药程序和注射的总体积很大。

因此，需要一种稳定的复合疫苗，这种疫苗含有与其他抗原复合的 B 型肝炎抗原。其他抗原尤其是在疫苗配方中能预防 A 型肝炎 (HA)、白喉 (D)、破伤风 (T)、全细胞百日咳 (Pw)、无细胞百日咳 (Pa)、嗜血杆菌流行性感冒 b (Hib) 和脊髓灰质炎 (P) 的那些抗原。

在疫苗配方中广泛使用氢氧化铝 (AH) 作为佐剂。例如，Engerix B 使用吸附到氢氧化铝上的 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg)。在 A 型肝炎疫苗的配方中和复合疫苗 DT、DTPw 和 DTPa 中我们也成功地使用过 AH。但是，在复合配方中，当将 AH 吸附的

HBsAg 与其他疫苗配合使用时，明显降低对 HBsAg 的免疫应答。因此在接种后导致血清保护附低或不充分。此外复合疫苗中 HBsAg 组分稳定性不好。

在市场上可购到的由 Korean Cheil Sugar Co Ltd 生产的单效疫苗 (HEPPACINE) 曾使用磷酸铝 (AP) 吸附的 HBsAg。我们发现了，AH 吸附的 HBsAg 单效疫苗 (Enterix B) 与 AP 吸附的 HBsAg 单效疫苗在致免疫特性方面没有很大的差别。

欧洲专利申请公开号 0339667 公开了一种双效疫苗，该疫苗含 HBsAg 和 A 型肝炎抗原，其中使用氢氧化铝或磷酸铝作佐剂。但是这表明在含 HBsAg 的多效疫苗中并不一定需要避免氢氧化铝作佐剂。此外，在该文件或其他文件中似乎没有公开双效或多效 B 型肝炎疫苗，在该疫苗中，除 HBsAg 外的至少一种抗原被吸附在氢氧化铝上，而 HBsAg 被吸附在磷酸铝上。

的确，似乎在以前没有公开过含 HBsAg 等的稳定有效的多效的疫苗。

一方面，本发明提供含 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 和一些 (n) 其他抗原，并配有佐剂的复合疫苗组合物，佐剂含一种或一种以上的铝盐，n 值是 1 或大于 1，用于吸附 HBsAg 的佐剂不是氢氧化铝，但当 n 是 1 时，其他抗原不是抗 A 型肝炎的抗原。

最好 n 是 2、3、4、5 或 6。

本发明的优点在于，在复合疫苗配方中 HBsAg 免疫原性没有显著降低。在该疫苗配方中，避免使用 AH 吸附 HBsAg 组分，还导致产生特别好的稳定性。本发明另一个优点是，克服或至少已减缓了上述与多次注射相关的问题，并且提供了稳定高效免疫复合配方。本发明组合物特别适合儿童使用。

最好，将 HBsAg 吸附在 AP 上。特别是，在人的临床研究中

我们曾发现，在复合疫苗中，当 AP—吸附的 HBsAg 与一种或多种 AH—吸附或 AP—吸附的抗原复合时，免疫原性没有显著降低。在该配方中 AP—吸附的 HBsAg 稳定性也大于 AH—吸附的 HBsAg。

因此，在本发明的另一方面，提供一种本发明疫苗组合物，该组合物中至少一种除 HBsAg 外的抗原被吸附在磷酸铝上。

更好地，至少一种除 HBsAg 外的抗原被吸附在 AH 上。

此外，本发明提供含吸附到 AP 上的 B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) 和吸附到 AP 或吸附到 AH 上的抗原的复合疫苗，所述抗原选自于抗下述一种或多种致病菌的抗原：白喉 (D)、破伤风 (T)、百日咳 (P)、已失活的脊髓灰质炎 (IPV)、嗜血杆菌流行性感冒 b (Hib) 和 A 型肝炎 (HA)。

在儿科疫苗中，还可以包括其他相容的抗原，例如抗脑膜炎 B、脑膜炎 A 和 C，以及中耳炎的已知有效抗原。

这里术语“双效”是指含总共两个抗原结合的疫苗。术语、“多效”应用于含两种以上抗原，例如三、四、五或六种抗原的疫苗组合物。

这里使用的术语“磷酸铝”和“氢氧化铝”意思包括适合于辅佐疫苗的各种形式氢氧化铝或磷酸铝。

例如，磷酸铝可以是不溶磷酸铝沉淀（无定形的、半结晶的或结晶的），该沉淀可任选方法制备，但不排除由可溶性铝盐与磷酸盐混合进行制备。“氢氧化铝”可以是不溶的（无定形的、半结晶或结晶的）氢氧化铝，该氢氧化铝可任选方法制备，但不排除由中和铝盐溶液进行制备。特别适合的是市场上购到的各种形态的氢氧化铝和磷酸铝凝胶，例如 Alhydrogel（氢氧化铝，3% 悬浮水溶液）和 Adju-fos（磷酸铝，2% 悬浮盐溶液），这些

商品由 Superfos 提供 (Vedbac 2950 Denmark)。

将会看到，我们第一次能够提供稳定、有效的多效疫苗组合物，其中含 HBsAg。

因此，本发明还在于提供旨在预防两种以上疾病的稳定有效的复合疫苗组合物，其中含 HBsAg 和至少两种其他抗原。

当 HBsAg 吸附在 AP 上，并且至少一种除 HBsAg 之外的其他抗原吸附在 AH 上时，得到的结果最好。

本发明较可取的复合疫苗是

白喉—破伤风—百日咳—B 型肝炎 (DTP—HB)

白喉—破伤风—B 型肝炎 (DT—HB)

DTP—IPV (失活的脊髓灰质炎疫苗)—B 型肝炎

Hib—B 型肝炎

DTP—BHib—B 型肝炎

IPV—DTP—Hib—B 型肝炎

将会知道，对于含 Hib 组分的疫苗来说，其 Hib 抗原在使用前临时配入疫苗便可使用。

本发明范围内特别优选的疫苗是：

白喉—破伤风—百日咳 (DTP 吸附在 AH 或 AP 上)—B 型肝炎 (HBsAg 吸附在 AP 上)。

白喉—破伤风 (DT 吸附在 AP 或 AH 上)—B 型肝炎 (HBsAg 吸附在 AP 上)。

这里使用“稳定的”描述本发明的疫苗，意思是疫苗可保存在 37℃ 下达一星期，而 HBsAg 组分免疫原性没有任何显著损失。

这里使用“有效的”意思是，疫苗组合物的特征在于复合疫苗中 HBsAg 免疫原性是在按照适当接种计划每隔一个月接

种疫苗时,在幼儿上发现几何平均效价为至少 200mIU/ml,最好为 300mIU/ml 或 300mIU/ml 以上。

本发明还提供含 HBsAg 和稳定佐剂的多效疫苗组合物,其稳定的佐剂是这样选择的,该疫苗可在 37℃ 保持 1 星期,而 HBsAg 组分的免疫原性无任何明显损失。最好,多效疫苗组合物另一个特征在于,当按照适当的接种计划每隔一个月接种疫苗时,得到幼儿的几何平均效价为至少 200mIU/ml (第三次剂量后的一个月),最好为 300mIU/ml 或 300mIU/ml 以上。

这里使用的术语“适当的接种计划”是指本发明领域的技术人员熟知的使用疫苗剂量过程的计划,尤其是儿科用量的计划。例如可使用 3、4 和 5 个月的计划。例如,对于含本发明疫苗的 DTP—HBsAg 来说,这是特别合适的。

一方面,HBsAg 可吸附到除氢氧化铝之外的铝盐上。最好吸附在 AP 上。正如下述实施例所表明的,多效疫苗配方中其他抗原吸附在 AH 上是有利的。

有利地,本发明疫苗配方含有百日咳疫苗,

百日咳组分适宜地是含部分纯化或高度纯化了的抗原的全细胞百日咳疫苗或无细胞百日咳疫苗。

上述复合物可以随意含一种能保护人们免患 A 型肝炎的组分,即 HAV 抗原。

较有利地, B 型肝炎复合疫苗是儿科疫苗

抗原的制备和佐剂的吸附方法在本技术领域都是人们熟知的,如参见下文。

B 型肝炎表面抗原(HBsAg)的制备方法有许多文献记载过。例如参见 Harford 等人(1983), Develop. Biol. Standard 54 第 125 页; Gregg 等人(1987) Biotechnology 5 第 479 页, EP—A—



0226846、EP—A—0299108 和其中的参考文献。

这里使用的词语“B型肝炎表面抗原”即“HBsAg”包括显示 HBV 表面抗原的抗原性的任何 HBsAg 抗原或它们的片段。应理解，除 HBsAg 抗原的 226 氨基酸序列外（参见 Tiollais 等人，*Nature*, 317, 489 (1985) 以及其中的文献），这里叙述的 HBsAg，如果希望的话，可以含如在上面参考文献中和 EP—A—0278940 中叙述的全部或部分 pre—S 顺序。特别是，HBsAg 可以含有一种多肽，该多肽含有氨基酸序列，该序列含有与血清型的 B 型肝炎病毒上的开放解读密码相关的 HBsAg 蛋白质的残基 12—52，其后是残基 133—145，再后是残基 175—400（这种多肽称之为 L\*，参见 EP0414374）。本发明范围的 HBsAg 还可以包括在 EP0198474 (Endotronics) 中叙述的 preS1—preS2—S 多肽，或者如在 EP0304578 (Mc Cormick 和 Jones) 中叙述的 preS1—preS2—S 多肽类似物。这里所述的 HBsAg 也可指突变体，例如，WO91/14703 或欧洲专利申请公开号 0511855A 中叙述的“脱逸突变体”，尤其是在第 145 位氨基酸取代是由精氨酸到甘氨酸的 HBsAg。

通常 HBsAg 应是微粒状的。其微粒可含如仅含 S 蛋白质或可以是复合微粒，例如 (L\*, S)，其中 L\* 如上面所定义，S 表示 HBsAg 的 S—蛋白质。所说的微粒以在酵母中被表达的形式较有利。

本发明疫苗中使用的适宜抗原已可从市场上采购到，详细情况可由世界卫生组织获得。例如，IPV 成分可以是索尔克失活脊髓灰质炎疫苗。百日咳疫苗可以含全细胞产物、无细胞产物或复合法生产的产物。尤其是，百日咳组分可以是 PT（百日咳毒素）或其亚部分，FHA（丝状血细胞凝集素抗原）、凝集原的

(菌毛的)和外膜蛋白质,包括 69kDa 蛋白质 (pertactin, 非菌毛凝集原)。参考文献: Robinson, A. Irons, L. I. & Ashworth, A. E. *Vaccines*, 3 1985, 11—22; 和 Brennan, H. J., Li, S. M., Cowell, J. L. Bishen, M. E. Steven, A. C. Novotny., P. Manclarck, C. R., *Infection and Immunity*, 56, 1988, 3189—3195。

试图保护人们免患 A 型肝炎的组分最好是称之“Havrix”的产品 (Smith Kline Beecham Biologicals), 该产品是一种来自于 HAV 的 HM—175 菌株的死的减毒疫苗 [参见 F. E. Andre, A. Hepburn 和 E. D'Hondt (1980), *Prog. Med. Virol. Vol37* 第 72—95 页 “Inactivated Candidate Vaccine for Hepatitis A”, 和 Smith Kline Beecham Biologicals (1991) 出版的该产品的专题文章 “Havrix.”]

Flehmig 等人 (loc cit., 第 56—71 页) 对 A 型肝炎在临床方面、病毒学、免疫学和流行病学方面作过评述, 还讨论了抗这种常见病毒感染疫苗的研制方法。

这里使用的术语“HAV 抗原”是指任何能刺激人 HAV 失效抗体的抗原。HAV 抗原最好含失活的减毒病毒疫苗微粒, 或者例如可以是 HAV 壳体或 HAV 病毒蛋白质, 这通常用重组 DNA 技术获得。

疫苗制备在“疫苗的新趋势与发展 (1978)”一书 (由 Voller 等人, University Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A 出版) 中有一般描述。

应根据使接种过疫苗者有免疫保护反应但没有显著不利副反应这样的量选择每一种疫苗剂量中抗原的量。其量将根据使用的特定免疫原来改变。一般地, 希望每种剂量含 1—1000 $\mu$ g 总免疫原, 可取为 2—100 $\mu$ g, 更可取为 1—40 $\mu$ g, 最可取为 1—5 $\mu$ g。通过涉及抗体效价的观测和接受治疗者的其他反应的标准研

究,可以确定特定疫苗的最佳量。第一次接种过程可以包括2或3疫苗剂量,遵照WHO对DTP免疫作用的建议相隔一到二个月接种。

在本发明的另一方面,提供本发明的疫苗组合物的供药品中使用。

在本发明的另一方面,应用HBsAg生产本发明复合疫苗供预防B型肝炎病毒感染。

另外,本发明规定使用AP,目的在于在本发明多效疫苗中作为HBsAg稳定剂和/或保持HBsAg效果的作用。

特别地,本发明规定使用磷酸铝,目的在于制备一种含HBsAg和至少一种其他抗原的稳定复合疫苗,因此,HBsAg组分的稳定性和/或免疫原性比HBsAg组分吸附到AH上的复合疫苗中的要大。

更特别地,本发明规定这样使用,从而其疫苗可保持在37℃达1星期,而HBsAg的免疫原性无显著损失。

还规定这样使用,从而按照适当的接种计划在每隔一个月对幼儿实施第三次接种之后一个月测定的几何平均效价高于200mIU/ml,最好高于300mIU/ml。

本发明的另外一个方面,提供一种有效预防B型肝炎感染的复合疫苗的生产方法,其方法包括本文定义的AP—吸附的HBsAg与一种或一种以上其他抗原(其中至少一种抗原吸附在AP或AH上)混合起来。

在一个较可取的方面,除HBsAg之外的其他抗原都吸附在AH上。例如可以这种方法制备非常有效的DTPa—B型肝炎疫苗。

复合疫苗可按如下方式制备。将不同的DT、DTPw、DTPa

或 HA 组分吸附在 AH 或 AP 上；将 HBsAg 吸附在 AP 上。在达到完全和稳定吸附相应组分的允许时间之后，将不同组分合并。在添加吸附了 HBsAg 组分之前可分别将 DT、DTPw 和 DTPa 组分合并。含另外或补加的抗原的多效疫苗可以按类似方式制备。因此，提供一种制备本发明复合疫苗组合物的方法，其方法包括将磷酸铝吸附的 HBsAg 与一种或一种以上氢氧化铝或磷酸铝吸附的抗原混合起来。

下述实施例说明本发明。

#### 实施例 1—5

##### 配方

按下述制备本发明的具体配方。

##### 实施例 1

##### HBsAg 吸附在 $AlPO_4$ 以浓缩物作复合疫苗配方

将等渗盐水中含 0.03—0.3 克铝（以磷酸铝计）的磷酸铝悬浮液与含 10mg HBsAg 蛋白质的 HBsAg 浓缩物混合，最后体积达到 10—100ml。在 pH 调整到 5—6.5 后，其混合物于室温下搅拌 10—24 小时。然后随意加防腐剂（即硫柳汞 1：20000 至 1：10000 或 2—苯氧基乙醇 3—6mg/ml）。

##### 实施例 2

##### 复合白喉—破伤风—B 型肝炎疫苗配方

制备吸附到 0.35 克铝（以氢氧化铝或磷酸铝计）上的含 25000Lf 白喉类毒素的和 10000Lf 破伤风类毒素的浓缩物，最终体积达到 0.15 升等渗盐水，并将其 pH 到 pH6—7，正如由 WHO 对 DT 和 DTP 疫苗所规定的。该浓缩物与 0.05 升实施例 1B 型肝炎浓缩物合并。

这种混合物用等渗盐水调到最终体积为 0.5 升，以随意添

加防腐剂 (c. c 硫柳汞 1 : 20000 至 0 : 10000, 或 2-苯氧基乙醇, 3—6mg/ml)。按照 WHO 对 DT 和 DTP 疫苗作的规定, 最终 PH 是 6—7。

一份 0.5ml 这种疫苗以活性成分计含:

D 类毒素:	25Lf
T 类毒素:	10Lf
HBsAg:	10 $\mu$ g 蛋白质

可以随意修改该方法以便使用较高或较低量的活性成分。

### 实施例 3

复合白喉—破伤风—百日咳(全细胞疫苗)—B 型肝炎疫苗的配方

制备一种吸附到 0.45mg Al (以氢氧化铝和磷酸铝计) 上的有 7500Lf 白喉类毒素、3250Lf 破伤风类毒素和 15000 容量单位 B. 百日咳抗原的浓缩物 ex Behringwerke, 最终体积为 0.4 升等渗盐水, 并按照 WHO 对 DTP 疫苗作的规定, 将其浓缩物调整的 pH6—7。将该浓缩物与实施例 1 的 0.05 升 B 型肝炎浓缩物合并。

这种混合物用等渗盐水调整到最终体积为 0.5 升。可以随意添加防腐剂 (c. c. 硫柳汞 1 : 20000 到 0 : 10000 或 2-苯氧基乙醇, 3—6mg/ml)。按照 WHO 对 DT 疫苗的规定, 最终 pH 是 6—7。

一份 0.5ml 这种疫苗按活性成分计含:

D 类毒素:	7.5Lf
T 类毒素:	3.25Lf
Pw 抗原:	150U
HBsAg:	10 $\mu$ g 蛋白质

可以随意修改本方法以便使用更高或更低量的活性成分。

#### 实施例 4 白喉—破伤风—百日咳（无细胞组分）疫苗的配方

制备吸附剂 0.35g Al（以氢氧化铝或磷酸铝凝胶）上含 25000Lf 白喉类毒素和 10000Lf 破伤风类毒素的浓缩物，最终体积为 0.15 升等渗盐水，并按照 WHO 对 DTP 疫苗所规定的，将其浓缩物调整到 pH6—7。添加 25mg 失活的百日咳类毒素（DT-Pa）、25mg 丝状血细胞凝集素（FHA）和随意加 8mg 69kDa 外膜蛋白质（pertactin），每种与 0.05 克 Al（以氢氧化铝或磷酸铝计）合并。

如本技术领域里已知方法所描述的，例如欧洲专利申请 427462、PCT 申请 WO91/12020，或其他方法所描述的，可以制备 B. 百日咳抗原 PT、FHA 和 pertactin，得到在生理学上可接受和有效的 B. 百日咳抗原。

用等渗盐水将该混合物调到最终体积为 0.5 升。可以随意添加防腐剂（c. c. 硫柳汞 1：20000 到 0：10000 或 2—苯氧基乙醇，3—6mg/ml）。按照 WHO 对 DT 和 DTP 疫苗所规定的，最终 pH 是 6—7。

一份 0.5ml 这种疫苗以有效成分计含：

D 类毒素：	25Lf
T 类毒素：	10Lf
PT 类毒素：	25 $\mu$ g
FHA（甲醛处理）	25 $\mu$ g
69kDa OMP（甲醛处理）	8 $\mu$ g（随意的）

可随意修改该法，以便使用更高或更低量的活性成分。

### 实施例 5 复合白喉—破伤风—百日咳（无细胞组分）—B 型肝炎疫苗的配方

除了另外 50ml 由实施例 1 制备的 HBsAg 吸附浓缩物加到最终混合物之外，其他则采用实施例 4 的方法。

用等渗盐水将得到的混合物调到最终体积为 0.5 升。可以随意添加防腐剂（c. c. 硫柳汞 1：20000 至 0：10000 或 2—苯氧基乙醇 3—6mg/ml），按 WHO 对 DT 和 DTP 疫苗所规定的，最终 pH 是 6—7。

一份 0.5ml 这种疫苗以有效成分计含：

D 类毒素：	25Lf
T 类毒素：	10Lf
PTd 类毒素：	25 $\mu$ g
FHA 类毒素：	25 $\mu$ g
69kDaOMP：	8 $\mu$ g（随意）

可随意修改该方法以便使用较高或较低量的活性成分。

### 实施例 6—10

动物和人体的试验研究

### 实施例 6 复合 A 型肝炎—B 型肝炎疫苗配方

失活的 A 型肝炎病毒浓缩物（460000 Elisa 单位）吸附到 0.02—0.2 克，最好 0.04—0.1 克铝（以氢氧化铝计）上，最终体积约 125ml，将其浓缩物与 50ml 含如实施例 1 描述的吸附在磷酸铝上的 10mg HBsAg 的浓缩物合并。

得到的混合物补加等渗盐水和氨基酸浓缩物（Travasol, Baxter—Travenol Inc.），以得到最终体积为 0.5 升，含 1.5 克氨基酸。得到的 pH 是 6—7。

此 1ml 疫苗以活性成分计含：

A 型肝炎病毒抗原： 800Elisa 单位

HBsAg 20 $\mu$ g 蛋白质

可随意修改该方法，以便使用更高或更低量的活性成分。

结果：

氢氧化铝 (AH) 和磷酸铝 (AP) 吸附 HBsAg (单效疫苗) 对比的临床研究

以每隔一个月 3 次接种 20 $\mu$ g HBsAg 蛋白质使开始血清反应阴性的健康成熟志愿者免疫。在二次和三次后一个月得到的血清中，用 Ausab (Abbott) 试验测定抗体水平。把反应规定受试者的效价大大高于背景。效价以 mIU/ml 表示。

以几何平均效价 (mIU/ml) 表示的结果。

HBsAg Lot	佐剂	受试 者数	在 2 次后， 第 2 个月		在 3 次后， 第 3 个月	
			GMT	% 反应者	GMT	% 反应者
100	AH	43	32	86	141	100
101	AH	45	26	93	198	98
102	AH	46	30	84	147	93
105/P	AP	7	43	83	380	100



HBsAg Lot	佐剂	受试 者数	在 2 次后, 第 2 个月		在 3 次后, 第 3 个月	
			GMT	% 反应者	GMT	% 反应者
102	AH	51	14	82	126	98
103	AH	50	15	83	110	98
102	AH	54	17	83	133	96
104/P	AP	54	18	96	270	98
105/P	AP	51	14	90	156	96

### 实施例 7

老鼠的免疫原性试验，和以氢氧化铝（AH）或磷酸铝（AP）作佐剂含 HBsAg 的复合疫苗的加速稳定性试验结果

在第 0 天和第 14 天 2 次用 2.5 $\mu$ g HBsAg（单组分或复合）皮下使 10 OF1 组老鼠免疫。在第 21 天抽血，并用 Ausab（Abbott）试验滴定 anti-HBsAg。以 mIU/ml 计算抗体效价。有反应的动物数量被规定为抗体水平大大高于背景值的动物数量。还计算出几何平均数价（GMT）。

DT-HB、DTPw-HB、DTPa-HB 的结果表明，根据有反应动物的数量和 GMTs，AP 吸附 HBsAg 进行得比 AH 吸附 HBsAg 要好。复合物中对 AP 吸附 HBsAg 的反应与用单效 HBsAg 得到的反应是可以相比的。

疫苗	7天, 4℃		7天, 37℃		7天, 45℃	
	反应数	GMT	反应数	GMT	反应数	GMT
Engerix B (HB+AH)	7/10	30	9/10	17	6/10	2.7
Engerix B (HB+AH)	9/10	54	8/10	13	5/10	6
HB (AH)	9/10	45	10/10	55	9/10	32
HB (AP)	9/10	54	10/10	50	7/10	6.9
DTPw (AH) HB (AH)	4/10	1.4	nd	nd	nd	nd
DTPw (AH) HB (AP)	9/10	52	8/10	16	8/10	26
DT (AH) HB (AH)	6/10	1.7	nd	nd	nd	nd
DT (AH) HB (AP)	8/10	44	9/10	21	10/10	36
DTPa (AH) HB (AH)	5/10	1.7	nd	nd	nd	nd
DTPa (AH) HB (AP)	10/10	18	8/10	8	9/10	24

nd: 未试验

### 实施例 8

猴子中 HBsAg 与 DTPw 合并的免疫原性

*Cercopithecus aethiops* 猴子在第 0 天和第 30 天接受两次 10 $\mu$ g HBsAg (单一或复合) 感染。在第 30 天和第 57 天抽取血清, 并对 anti-HBsAg 滴定 (Ausab, Abbott)。动物抗体水平大大高于背景的 (预接种血清) 动物被认为有反应。计算出 GMT (mIU/ml)。

结果表明, AP 吸附 HBsAg 进行得比 AH 吸附 HBsAg 要好。其反应与由单效 HBsAg 施用得到的反应是可比较的。

疫苗	在 1 次后, 第 30 天		在 2 次后, 第 57 天	
	反应数	GMT	反应数	GMT
Engerix B (HB) (AH)	4/5	10	5/5	666
DTPw (AH) HB (AH)	4/5	20	5/5	31
DTPw (AH) HB (AP)	5/5	12	5/5	414

### 实施例 9

使用 HBsAg 吸附到氢氧化铝 (AH) 或磷酸铝 (AP) 的各 DT-Pw 疫苗进行的临床研究

对 3、4 和 5 个月的受试验者施用 3 次 0.5ml 含 DTPw 和 10 $\mu$ g HBsAg 蛋白质进行免疫。在 6 个月抽血, 并用 Ausab 试验滴定血清。反应者百分数 (血清转化) 涉及抗体水平大大高于本底的受试验者。保护百分数涉及效价等于或大于 10mIU/ml 的受试验者。GMT 以 mIU/ml 为单位。

DTPw-HB 结果表明, 与 AH 吸附 HBsAg 相反, AP 吸附 HBsAg 产生满意的反应。血清转换率和 GMT 可与用单效 HBsAg 疫苗 (Engerix B) 所见到的代表性数据相比。

疫苗	受试验者数目	抽血时间	% 反应者	% 保护	GMT
DTPw (AH) HB (AH)	32	在 2 次后	nd	nd	nd
		在 3 次后	94	84	38.5
DTPw (AH) HB (AP)	29	在 2 次后	97	97	63
		在 3 次后	100	100	469

### 实施例 10

在 A 型肝炎—B 型肝炎复合疫苗中，吸附在氢氧化铝 (AH) 或磷酸铝 (AP) 上的 HBsAg 的免疫原性和稳定性

在第 0 天和第 14 天二次皮下施用 2.5 $\mu$ g HBsAg (单组分或复合) 使 10 OF1 老鼠组免疫。在第 21 天抽血，并按实施例 7 对 anti-HBsAg 滴定。

HA—HB 复合产品的免疫原性和稳定性结果表明，AP 吸附 HBsAg 产生较高抗体水平和较稳定的形态。

疫苗	暴露	反应者数	GMT
HA (AH) HB (AH)	1 个月, 4 $^{\circ}$ C	9/10	41
	1 个月, 37 $^{\circ}$ C	6/10	5.6
	1 个月, 45 $^{\circ}$ C	5/10	6.4
HA (AH) HB (AP)	1 个月, 4 $^{\circ}$ C	10/10	80
	1 个月, 37 $^{\circ}$ C	9/10	45
	1 个月, 45 $^{\circ}$ C	8/10	18
Engerix B HB (AH)	1 个月, 4 $^{\circ}$ C	8/10	58

### 实施例 11 人体另外的临床结果

#### 1. 幼儿中 DTPw—B 型肝炎免疫原性

##### 实验 A

在斯洛伐克研究：计划：3—4—5 个月。10 $\mu$ g HBsAg；DTPw ex Behringwerke (DT 在 AH 上，Pw 在 AH 和 Ap 混合物上)

**Anti-Hbs 效价**

HBsAg 佐剂	时间	N	GMT	SP (%) <sup>*</sup>
氢氧化物	Post II (5 个月)	44	45	79.5
氢氧化物	Post III (6 个月)	13	34	69.2
磷酸盐	Post II (5 个月)	32	80	97.0
磷酸盐	Post III (6 个月)	32	396	100

\* SP 是血清保护率

在本实施例或其他实施例中，Post II 意指在第二次之后，Post III 意指在第三次之后。

在计划中确定的注射时间之后一个月往往测量 GMT  
抗一白喉、破伤风、B 百日咳效价

Post III 结果	N	GMT	% > 0.1 IU/ml	GMT Post/Pre
抗白喉	38	2.302	100	37.4
抗破伤风	38	3.281	100	38.4
抗百日咳	38	61	—	7.7

**实验 B**

在希腊研究：计划表 2—4—6 个月（疫苗与实验 A 相同）

抗—HBs 效价（暂时结果）

HBsAg 佐剂	时间	N	GMT	SP (%)
氢氧化物	第 7 个月	22	284	90.5
氢氧化物	第 7 个月	17	193	94.4
磷酸盐	第 7 个月	23	1794	92.0

### 实验 C

在斯洛伐克研究：计划表 3—4—5 (HBsAg = 在磷酸铝上 5 $\mu$ g；如实验 (A) 的 DTP ex Behringwerke.

### 抗-HBs 效价

时间	N	GMT	SP (%)
Post II	21	94	90.5
Post III	18	311	100

### 实验 D

在斯洛伐克研究：计划表 3—4—5 个月 (HBsAg = 在磷酸铝上 10 $\mu$ g；如实验 (A) 的 DTPw ex Behringwerke.

## 抗-HBs 效价

时间	N	GMT	SP (%)
Pre	24	0	0
Post II (第 5 个月)	13	259	92.3
Post III (第 6 个月)	10	592	100.0

## 抗白喉抗体

时间选择	N	GMT	SP	GMT Post/Pre
Pre	32	0.054	6.3	1.0
Post II	16	1.094	93.8	20.4
Post III	11	2.314	100.0	43.1

## 抗破伤风抗体

时间选择	N	GMT	SP	GMT Post/Pre
Pre	32	0.083	34.4	1.0
Post II	16	3.146	100.0	37.9
Post III	11	7.989	100.0	96.4

## 抗百日咳抗体

时间选择	N	GMT	GMT Post/Pre
Pre	32	8	1.0
Post II	16	20	2.7
Post III	11	50	6.6

## 2. 幼儿中 DTPa—B 型肝炎疫苗的免疫原性

## 实验 A

在土耳其研究：在 AP 上 HBsAg10 $\mu$ g；在 AH 上 DTP（无细胞），初步结果

## 第 1 组（DTPa—Engerix B 复合）

时间选择	N	S+	%	GMT
Pre	19	0	0	0
Post I	19	4	21.1	24
Post II	19	18	94.7	146
Post III	19	19	100.0	345



## 第 2 组 (DTPa 加 Engerix B, 分开同时注射)

时间选择	N	S+	%	GMT
Pre	8	0	0	0
Post I	8	2	25.0	37
Post II	8	5	62.5	33
Post III	7	6	83.7	385

注：N=被试验者的数目；S<sub>+</sub>=在一定血液采样时间血清阳性试验者数目；%=血清转化率和 GMT=血清转化者的几何平均抗体效价