



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101926993 B

(45) 授权公告日 2013.12.04

(21) 申请号 200910173165.8

A61K 39/145(2006.01)

(22) 申请日 1999.10.08

A61P 31/14(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 31/16(2006.01)

9822712.7 1998.10.16 GB

A61P 31/00(2006.01)

9822709.3 1998.10.16 GB

9822703.6 1998.10.16 GB

(续)

(62) 分案原申请数据

99814341.3 1999.10.08

(56) 对比文件

WO 96/26741 A1, 1996.09.06, 全文.

WO 97/00697 A1, 1997.01.09, 全文.

EP 0812593 A1, 1997.12.17, 全文.

US 5723130, 1998.03.03, 全文.

CN 1176604 A, 1998.03.18, 全文.

WO 98/43670 A2, 1998.10.08, 全文.

(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

G S Hui et al.. Synthetic low-toxicity muramyl dipeptide and monophosphoryl lipid A replace Freund complete adjuvant in inducing growth-inhibitory antibodies to the Plasmodium falciparum major merozoite surface protein, gp195. 《infection and immunity》. 1991, 第 59 卷 (第 5 期), 1585-1591.

LELAND S. RICKMAN et al.. Use of adjuvant containing mycobacterial cell-wall skeleton, monophosphoryl lipid A, and squalane in malaria circumsporozoite protein vaccine. 《THE LANCET》. 1991, 第 337 卷 (第 8478 期), 998-1001.

柳钟勋. 新型免疫佐剂在疫苗中的应用. 《中华微生物学和免疫学杂志》. 1997, 第 17 卷 (第 5 期), 337-341.

(72) 发明人 N·加康

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 赵苏林 韦欣华

审查员 李洋

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

A61K 39/25(2006.01)

A61K 39/245(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/095(2006.01)

A61K 39/112(2006.01)

A61K 39/118(2006.01)

A61K 39/36(2006.01)

A61K 39/015(2006.01)

A61K 39/125(2006.01)

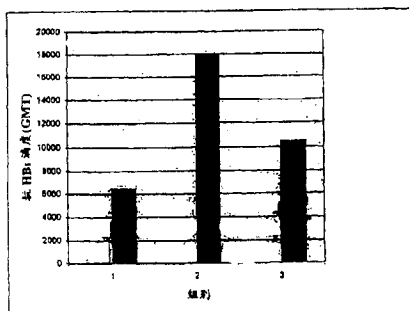
权利要求书1页 说明书13页 附图5页

(54) 发明名称

佐剂系统及疫苗

(57) 摘要

佐剂系统及疫苗。本发明提供疫苗以及包含免疫刺激剂和金属盐的佐剂制剂。所述免疫刺激剂吸附于金属盐颗粒上,得到的颗粒基本不含抗原。



组别	ELISA 滴度(GMT)
1	6495
2	18006
3	10496

[转续页]

CN 101926993 B

[接上页]

(51) Int. Cl.

A61P 31/20 (2006. 01)

A61P 31/22 (2006. 01)

A61P 31/04 (2006. 01)

A61P 33/06 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 37/08 (2006. 01)

1. 包含两组主要复合物的疫苗组合物：

(a) 第一组复合物包含吸附于氢氧化铝或磷酸铝颗粒上的 3- 脱氧酰化单磷酰脂质 A，其特征在于能够吸附于所述氢氧化铝或磷酸铝颗粒的总物质中不多于 20 质量%是抗原；并且

(b) 第二组复合物包含吸附于氢氧化铝或磷酸铝颗粒上的抗原，所述抗原是乙型肝炎表面抗原或 HPV L1 颗粒或壳粒，特征在于能够吸附于所述氢氧化铝或磷酸铝颗粒的总物质中不多于 20 质量%是免疫刺激剂，并且其中在所述第一组复合物和所述第二组复合物中存在的铝盐是相同的。

2. 权利要求 1 要求保护的疫苗组合物，其中所述第二组复合物包含多种亚复合物，每种亚复合物包含吸附于氢氧化铝或磷酸铝颗粒上的不同抗原。

3. 权利要求 1 或 2 要求保护的疫苗组合物，其中所述抗原是 HPV L1 颗粒或壳粒。

4. 权利要求 3 要求保护的疫苗组合物，其中所述 HPV L1 颗粒或壳粒来源于 HPV6、11、16 或 18。

5. 权利要求 4 要求保护的疫苗组合物，其中所述 HPV L1 颗粒或壳粒来源于 HPV16 或 18。

6. 权利要求 1 或 2 要求保护的疫苗组合物，其中所述抗原是乙型肝炎表面抗原。

7. 制备疫苗组合物的方法，所述方法包括：

(a) 吸附抗原于第一种氢氧化铝或磷酸铝颗粒上，所述抗原是乙型肝炎表面抗原或 HPV L1 颗粒或壳粒；

(b) 吸附 3- 脱氧酰化单磷酰脂质 A 于第二种氢氧化铝或磷酸铝颗粒上；和

(c) 混合步骤 (a) 和步骤 (b) 的产物，

其中在所述第一种颗粒和所述第二种颗粒中存在的铝盐是相同的。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中所述抗原是 HPV L1 颗粒或壳粒。

9. 根据权利要求 7 的方法，其中所述抗原是乙型肝炎表面抗原。

10. 可由权利要求 7-9 中任一项的方法获得的疫苗组合物。

11. 权利要求 1-6 或 10 中任一项要求保护的疫苗组合物在制备药物中的用途。

佐剂系统及疫苗

[0001] 本申请是申请日为 1999 年 10 月 8 日,申请号为 99814341.3 的发明名称为“佐剂系统及疫苗”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及改进的疫苗、佐剂系统以及制备这样的疫苗和佐剂系统的方法。具体地说,本发明的疫苗和佐剂系统包括金属盐以及其它免疫刺激剂如单磷酸脂质 A 或其衍生物、Quil A 或其衍生物、或免疫刺激性寡核苷酸如 CpG。

[0003] 在本领域内,众所周知铝盐提供了具有佐剂活性的安全赋形剂。据认为这些佐剂的作用机制包括形成抗原储存库 (antigen depot) 以致抗原可以在给予后滞留在注射位点长达 3 周,以及形成更易被抗原呈递细胞摄入的抗原 / 金属盐复合物。除铝外,已经使用其它金属盐来吸附抗原,包括锌盐、钙盐、铈盐、铬盐、铁盐以及铍盐。铝的氢氧化物和磷酸盐是最常用的。

[0004] 包含铝盐、抗原以及其它免疫刺激剂的疫苗制剂是本领域内已知的。比起由铝盐和抗原单独刺激的免疫反应,这样的制剂引起更强烈的免疫反应。这些疫苗制备物的配制以前涉及特殊的生产过程,因为据认为要发生最佳的免疫反应,必须使抗原吸附于免疫刺激剂所吸附的同一铝盐颗粒上。这样,当抗原呈递细胞摄入抗原时,共吸附的免疫刺激剂直接对同一抗原呈递细胞施加其刺激作用。

[0005] 在 EP 0 576 478 B1、EP 0 689 454 B1 和 EP 0 633 784 B1 中描述了基于铝的疫苗制剂,其中抗原和免疫刺激剂 3-脱氧酰化单磷酸脂质 A (3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A) (3D-MPL) 吸附于同一颗粒。在这些情况下,首先使抗原吸附到铝盐上,随后使免疫刺激剂 3D-MPL 吸附于同一铝盐颗粒。这样的过程首先涉及在水浴中通过超声处理而悬浮 3D-MPL,直到颗粒达到 80 到 500nm 之间的大小。一般在室温下,在搅拌的同时使抗原吸附在铝盐上一小时。然后将所述 3D-MPL 悬浮物加入已吸附的抗原,并将所述制剂在室温下温育 1 小时,随后在 4°C 保存备用。

[0006] 从免疫的观点上看,所述在先技术的配制方法提供了有效的疫苗,但是,它们也包含一些商业缺陷。为使得疫苗适于给予人类,所述方法必须保持一致并服从生产质量管理规范 (GMP) 控制以及质量控制 (QC)。在一些情况下,所述在先技术的方法提供了其中一种抗原或多种抗原全部吸附到同一金属盐颗粒上的疫苗。然后 3D-MPL 要吸附于同一金属颗粒的要求也使得该方法复杂化。在包含多种抗原的联合疫苗的情况下,可能是特别成问题的 (多种抗原的吸附依赖于每种抗原在特定 pH 下对特定金属盐的亲合力)。根据存在何种抗原,所述在先技术的方法可能在重复生产能力和疫苗 QC 上存在问题。此外,如果在一种特定抗原的 QC 中发生任何事故或可能导致疫苗污染的事件,这有可能导致所有各个成分的浪费,而不仅仅是出现问题的特定抗原的浪费。另外,在一些情况下,联合疫苗可能要求顺序加入抗原,这样一个过程是极其耗时并且昂贵的。因此,所述在先技术的方法复杂、不易控制并且昂贵。

[0007] 惊人的是,本发明人已经发现不必将抗原和免疫刺激剂吸附于同一颗粒。与本领域内已经接受的观点不同,已经发现当抗原吸附于从免疫刺激剂结合的那些金属盐颗粒分离的特定金属盐颗粒上时,可以产生令人满意的疫苗。

[0008] 所述改进过程包括吸附免疫刺激剂到金属盐颗粒上,接着使抗原吸附于另一金属盐颗粒,随后混合所述分离的金属颗粒以形成疫苗。本发明还为佐剂组合物提供了吸附于金属盐颗粒的免疫刺激剂,其特征在于所述金属盐颗粒基本不含其它抗原。此外,本发明还提供了疫苗,所述疫苗的特征在于免疫刺激剂吸附于基本不含其它抗原的金属盐颗粒,并且吸附抗原的金属盐颗粒基本不含其它免疫刺激剂。

[0009] 因此,本发明提供了包含已经吸附到金属盐颗粒上的免疫刺激剂的佐剂制剂,其特征在于所述组合物基本不含其它抗原。此外,该佐剂制剂是在本发明的生产疫苗的方法中要求的中间体。因此,提供了生产疫苗的方法,所述方法包括将本发明的所述佐剂组合物与抗原混合。所述抗原最好已经预吸附到金属盐上。所述金属盐可以与吸附所述免疫刺激剂的金属盐相同或相似。

[0010] 本发明还提供了疫苗组合物,所述组合物包含吸附于第一种金属盐颗粒的免疫刺激剂以及吸附于金属盐的抗原,其特征在于所述第一种金属盐颗粒和所述第二种金属盐颗粒是不同的。

[0011] 或者,构成本发明的部分的疫苗包括两组主要的复合物,第一组复合物包括(a)吸附于金属盐颗粒的免疫刺激剂,特征在于所述金属盐颗粒基本不含抗原;而第二组复合物包括(b)吸附于金属盐颗粒的抗原。所述疫苗组合物也可包括两组主要的复合物,第一组复合物包括(a)吸附于金属盐颗粒的免疫刺激剂,特征在于所述金属盐颗粒基本不含抗原;第二组复合物包括(b)吸附于金属盐颗粒的抗原,特征在于所述金属盐颗粒基本不含免疫刺激剂。

[0012] 在这两组主要复合物中存在的金属盐可以是相同或不同的。此外,在其中可能存在多种不同抗原的联合疫苗的情况下,所述第二组复合物(上面所述)可以包含吸附于不同金属颗粒上的多种抗原。

[0013] 关于本发明中基本不含其它抗原的定义,是指能够吸附于所述金属盐颗粒的总物质中不多于20%(质量)是另一种抗原,优选不多于10%(质量)是另一种抗原,最优选不多于5%(质量)是另一种抗原。或者,关于本发明中基本不含免疫刺激剂是指能够吸附于所述金属盐颗粒的总物质中不多于20%(质量)是免疫刺激剂,优选不多于10%(质量)是免疫刺激剂,最优选不多于5%(质量)是免疫刺激剂。可以使用对于本领域内技术人员明显的常规检验来确定抗原或免疫刺激剂是否吸附到不同的分离颗粒上,包括但不限于在电场内通过制剂的自由流动而分离疫苗成为不同组份,或者如特别适用于非颗粒性抗原的沉降速率分析等技术,随后分析各组份中的免疫刺激剂或抗原。

[0014] 本发明还提供了试剂盒,所述试剂盒包括一个盛有吸附于金属盐的免疫刺激剂的容器;以及第二个盛有抗原的容器,所述抗原最好吸附于金属盐。

[0015] 当需要商业化规模数量的联合疫苗时,本发明的方法是特别有用的。联合疫苗是含有一种以上病原体的一种以上抗原的单剂疫苗。这样的疫苗可以减少引起对抗多种病原体和疾病的保护所需的接种数量。

[0016] 例如,如果一种疫苗包含 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、3D-MPL以及抗原V、W、X、Y、Z,以前的方法涉及将所述抗原和3D-MPL配制到 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 的同一颗粒上。这样的在先技术方法要求将V、W、X、Y、Z吸附于 $\text{Al}(\text{OH})_3$,随后将游离的3D-MPL加入到每一种预吸附的抗原复合物。

[0017] 与此不同,在本发明的配制方法中,抗原V、W、X、Y、Z各自在分离的容器中吸附到

分离的 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 颗粒上。3D-MPL 也在另一容器吸附到 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 。然后将每一独离容器的材料简单混合,组成疫苗。在这种情况下,结合 3D-MPL 的 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 颗粒可以与结合抗原的 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 颗粒分离。

[0018] 或者,本发明提供了制备包含免疫刺激剂、抗原以及金属盐的疫苗的方法,包括:

[0019] 1. 吸附抗原于第一种金属颗粒,

[0020] 2. 吸附免疫刺激剂于第二种金属颗粒,然后

[0021] 3. 混合上面步骤 1 和步骤 2 的产品。

[0022] 本发明提供了克服在先技术中存在的问题的生产疫苗的方法。各个抗原-金属盐复合物都可以接受 GMP 控制,并且如果特定抗原-金属盐制备物发生任何不凑巧的污染,那么不会危及其它抗原以及免疫刺激性佐剂的完整性。惊人的是,与本领域内已经接受的观点不同,通过本发明的方法产生的疫苗与使用在先技术制备的疫苗一样有效。

[0023] 在本发明的意义内,免疫刺激剂的定义可以描述为具有佐剂活性的天然化合物或合成化合物,所述佐剂活性来源于所述化合物本身对免疫系统细胞的直接或间接刺激效应,而不是通过其它非刺激性效应如储存库效应 (depot effect) 或靶向免疫系统。这样的免疫刺激剂的例子描述于“Vaccine Design—the subunit and adjuvant approach” (Powell, M. F. 和 Newman, M. J. 编辑;1995, Pharmaceutical Biotechnology (Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X) 中由 Powell, M. F. 和 Newman, M. 编写的名为“疫苗佐剂与赋形剂纲要”的一章。在本发明范围内的这些免疫刺激剂包括:得自细菌的化合物,如单磷酰脂质 A 或其衍生物;得自植物的皂苷类或其衍生物,例如 Quil A;或免疫刺激性寡核苷酸如 CpG、嵌段共聚物、霍乱毒素、免疫刺激性细胞因子如 GM-CSF 和 IL-1、polyribo A 和 polyribo U 以及胞壁酰三肽 (MTP)。

[0024] 单磷酰脂质 A 是具有佐剂活性的衍生自细菌的化合物,并且是在本发明的应用中优选的免疫刺激剂。已经改变该毒性化合物以形成毒性更低的衍生物,一种这样的衍生物是 3-脱氧酰化单磷酰脂质 A (称为 3D-MPL 或 d3-MPL,表示还原性末端葡糖胺的 3 位是脱氧酰化)。为制备 3D-MPL,见 GB 2 220 211 A。在化学上它是具有 3、4、5 或 6 个酰化链的 3-脱氧酰化单磷酰脂质 A 的混合物。在本发明的组合物中最好使用小颗粒 MPL。小颗粒 MPL 具有这样的颗粒大小以致其可以通过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜无菌滤过。在国际专利申请第 WO 94/21292 号中描述了这样的制备物。其它改进在公开了包含三酰基和四酰基同族元素的 3D-MPL 的稳定制备物的 GB 9807933.8 中描述。

[0025] GB 2 220 211 A 提到降低了以前使用的肠杆菌脂多糖 (LPS) 的内毒性,同时保留了免疫原性特性。然而 GB 2 220 211 仅在关于细菌 (革兰氏阴性) 系统时引用了这些发现。

[0026] 在本发明的应用中另一种优选的免疫刺激剂是 Quil A 及其衍生物。Quil A 是一种从南美洲的树 *Quilaja Saponaria Molina* 分离得到的皂苷制备物,Dalgaard 等在 1974 年 (“皂苷佐剂”, *Archiv. fur die gesamte Virusforschung*, 第 44 卷, Springer Verlag, Berlin, 第 243-254 页) 首次描述其具有佐剂活性。已经通过 HPLC 分离了保留其佐剂活性并且不具有与 Quil A 相关的毒性的 Quil A 的纯化片段 (EP 0 362 278), 例如 QS7 和 QS21 (也称为 QA7 和 QA21)。已经描述了特别优选的 QS21 的特定制剂,这些制剂还包含固醇 (W096/33739)。

[0027] CpG 是具有已知佐剂特性的免疫刺激性寡肽 (WO 96/02555)。在本发明的范围内优选的 CpG 序列是:(TCC ATG AGC TTC CTG ACG TT, Krieg 1826)、(TCT CCC AGC GTG CGC CAT, Krieg 1758) 以及 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT。

[0028] 本发明涉及所述佐剂的特定配制方法以及特性,并且因此可以与许多种抗原一起使用。本发明的疫苗可以用于初次剂量和加强剂量 (priming and boosting dose),以及用于引起针对多种病原体的免疫反应和引起针对由多种病原体介导的感染的保护。同时本发明提供了引发针对抗原的免疫反应的方法,包括使用包含金属盐、免疫刺激剂和抗原的疫苗,其中所述免疫刺激剂吸附于从吸附所述抗原的那些金属盐颗粒分离的金属盐颗粒上。下面列出了一些病原体和抗原。

[0029] 由甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒和戊型肝炎病毒导致的病毒性肝炎是非常普遍的病毒性疾病。尤其是通过乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒,还引起了许多例肝癌。因此发展有效的疫苗是非常重要的,尽管有值得注意的成功,但这仍是一项正在进行的工作。在 Lancet,1990 年 5 月 12 日第 1142 页及其下 (Prof A. L. W. F. Eddleston) 中可以找到关于现代肝炎疫苗的综述,包括许多重要的参考资料。还可参见“Viral Hepatitis and Liver Disease”(Vyas, B. N., Dienstag, J. L., 和 Hoofnagle, J. H., 编辑, Grune 和 Stratton. Inc. (1984)) 和“Viral Hepatitis and Liver Disease”(Proceedings of the 1990 International Symposium, F. B. Hollinger, S. M. Lemon 和 H. Margolis 编辑, Williams and Wilkins 出版)。

[0030] 本文使用的表述“乙型肝炎抗原”用来指由乙型肝炎病毒衍生的可用于在人体内引起针对所述病毒的免疫的任何抗原性物质。

[0031] 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是一个广泛的问题,但用于群体免疫 (mass immunisation) 的疫苗目前是可以得到的,例如通过遗传工程技术获得的产品“Engerix-B”(SmithKline Beecham plc)。

[0032] 制备乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 已经有许多文献论述。见,例如,Harford 等在 Develop. Biol. Standard 54, 第 125 页 (1983)、Gregg 等在 Biotechnology, 5, 第 479 页 (1987)、EP-A-0 226 846、EP-A-0 299 108 以及其中的参考文献。

[0033] 本文使用的表达方式“乙型肝炎表面抗原”或“HBsAg”包括显示 HBV 表面抗原的抗原性的任何 HBsAg 抗原或其片段。可以知道除 HBsAg S 抗原的 226 氨基酸序列 (见 Tiollais 等, Nature, 317, 489 (1985) 和其中的参考文献) 外,如果需要,如本文所述的 HBsAg 可以包括全部或部分前 S 序列,如上面的参考资料以及 EP-A-0 278 940 所述。尤其是所述 HBsAg 可以包括包含这样的氨基酸序列的多肽:所述氨基酸序列包含残基 12-52,其后是残基 133-145,其后是与 ad 血清型乙型肝炎病毒上的可读框有关的 HBsAg 的 L-蛋白的残基 175-400 (该多肽称为 L*; 见 EP 0 414 374)。在本发明范围内的 HBsAg 也可以包括在 EP 0 198 474 (Endotronics) 中描述的前 S1-前 S2-S 多肽或其类似物,如在 EP 0 304 578 (Mc Cormick and Jones) 中描述的那些类似物。如本文所述的 HBsAg 也可以指突变体,例如在 WO 91/14703 或欧洲专利申请公开号 0 511 855 A1 中描述的“逃逸突变体 (escape mutant)”,特别是其中在 145 位上的氨基酸取代是从甘氨酸到精氨酸的 HBsAg。

[0034] 一般 HBsAg 将是颗粒形式的。所述颗粒可以包括例如单独的 S 蛋白或者可以是复合颗粒,例如 (L*, S), 其中 L* 如上所定义, S 表示 HBsAg 的 S 蛋白。在酵母中表达时,所述

颗粒在形式上是有利的。

[0035] 对甲型肝炎具有保护的成份最好是名为“Havrix”(SmithKline Beecham Biologicals)的产品,“Havrix”是由HAV HM-175株得到的灭活减毒疫苗[见“*Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A*”, F.E. Andre, A. Hepburn 和 E.D. Hondt(1980), *Prog. Med. Virol.* 第37卷,第72-95页以及由SmithKline Beecham Biologicals出版的产品专题文章“Havrix”(1991)。

[0036] 因此,在本发明的一个优选实施方案中,提供了包含HBsAg以及甲型肝炎抗原的联合疫苗。另外,本发明提供了生产甲型肝炎和乙型肝炎联合疫苗的方法,以及由该方法得到的产品。

[0037] 其它联合疫苗可以在市场上获得,包括由SmithKline Beecham Biologicals制造的Infanrix™系列(range)。这样的疫苗基于Diphtheria毒素、破伤风毒素和百日咳博德特氏菌(*B. pertussis*)抗原的“核心”组合。该疫苗包含一种百日咳成份(灭活的完整百日咳博德特氏菌细胞,或一般包括两种抗原PT和FHA、通常69kDa的无细胞百日咳,可选地还有凝集原2或凝集原3中的一种或两种)。这样的疫苗通常称为DTPw(完整细胞)或DTPa(无细胞)。

[0038] 在本发明范围内的特定联合疫苗包括:

[0039] Diphtheria-破伤风-百日咳-乙型肝炎(DTP-HB)

[0040] Diphtheria-破伤风-乙型肝炎(DT-HB)

[0041] Hib-乙型肝炎

[0042] DTP-Hib-乙型肝炎

[0043] IPV(灭活脊髓灰质炎疫苗)-DTP-Hib-乙型肝炎

[0044] 所述百日咳成份合适地是完整细胞的百日咳疫苗或包含部分或高度纯化的抗原的无细胞百日咳疫苗。上面的组合可选地包括保护对抗甲型肝炎的成份。所述甲型肝炎成份最好经过福尔马林灭活的HM-175。最好如下纯化HM-175:用胰蛋白酶处理培养的HM-175,通过渗透层析从小蛋白酶消化的蛋白中分离完整的病毒,然后用福尔马林灭活。最好所述乙型肝炎联合疫苗是一种儿科疫苗。

[0045] 本发明的其它联合疫苗公开于GB 9805105.5(SmithKline Beecham Biologicals s. a.),这样的联合疫苗对用于青少年的疫苗特别有利。优选的组合基于乙型肝炎抗原(Hep B)和单纯疱疹(HSV)抗原的“核心”组合。在这个“核心”中可以选择地加入一种或多种得自下面的抗原:埃-巴二氏病毒(EBV)抗原、甲型肝炎抗原(Hep A)、人乳头瘤病毒(HPV)抗原。这些联合疫苗可以另外包含水痘-带状疱疹病毒(VZV)、人巨细胞病毒(HCMV)或弓形虫抗原。

[0046] 本发明的疫苗制剂最好包含能够引发对抗人类病原体的免疫反应的抗原或抗原组合物,所述抗原或抗原组合物来自HIV-1(如tat、nef、gp120或gp160)、人类疱疹病毒(如gD或其衍生物或立即早期蛋白如来自HSV1或HSV2的ICP27)、巨细胞病毒((特别是人类)(如gB或其衍生物))、轮状病毒(包括活减毒病毒)、埃-巴二氏病毒(如gp350或其衍生物)、水痘-带状疱疹病毒(如gp I、II和IE63),或者所述抗原或抗原组合物来自肝炎病毒如乙型肝炎病毒(例如乙型肝炎表面抗原或其衍生物)、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒,或者所述抗原或抗原组合物来自其它病

毒性病原体,如副粘病毒:呼吸道合胞病毒(如F蛋白和G蛋白及其衍生物)、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒(例如HPV6、11、16和18)、黄病毒(如黄热病毒、登革病毒、蜱传脑炎病毒、日本脑炎病毒)或流感病毒,或者所述抗原或抗原组合物来自细菌病原体,如奈瑟氏菌属(*Neisseria* spp.),包括淋病奈瑟氏菌(*N. gonorrhoea*)和脑膜炎奈瑟氏菌(*N. meningitidis*)(例如荚膜多糖及其偶联物、运铁蛋白结合蛋白、乳铁蛋白结合蛋白、PilC、粘附素);链球菌属(*Streptococcus* spp.),包括肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)(例如荚膜多糖及其偶联物、PsaA、PspA、链球菌溶血素、胆碱结合蛋白)、酿脓链球菌(*S. pyogenes*)(例如M蛋白或其片段、C5A蛋白酶、脂磷壁质)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)、变异链球菌(*S. mutans*);嗜血菌属(*Haemophilus* spp.),包括B型流感嗜血菌(*H. influenzae*)(例如PRP及其偶联物)、未定型(non typeable)流感嗜血菌(例如OMP26、高分子量粘附素、P5、P6、脂蛋白D)、杜氏嗜血菌(*H. ducreyi*);莫拉氏菌属(*Moraxella* spp.),包括粘膜炎莫拉氏菌(*M. catarrhalis*),也称为卡他布兰汉氏菌(*Branhamella catarrhalis*)(例如高分子量粘附素和低分子量粘附素及侵袭素);博德特氏菌属(*Bordetella* spp.),包括百日咳博德特氏菌(*B. pertussis*)(例如pertactin、百日咳毒素或其衍生物、丝状血凝素、腺苷酸环化酶、菌毛)、副百日咳博德特氏菌(*B. parapertussis*)和支气管炎博德特氏菌(*B. bronchiseptica*);分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.),包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)(例如ESAT6、85A抗原、85-B抗原或85-C抗原)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、麻风分枝杆菌(*M. leprae*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、副结核分枝杆菌(*M. paratuberculosis*)、耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*);军团菌属(*Legionella* spp.),包括嗜肺军团菌(*L. pneumophila*);埃希氏菌属(*Escherichia* spp.),包括肠毒性大肠杆菌(*E. coli*)(例如定居因子、热不稳定毒素或其衍生物、热稳定毒素或其衍生物)、肠出血性大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌(例如志贺样毒素或其衍生物);弧菌属(*Vibrio* spp.),包括霍乱弧菌(*V. cholera*)(例如霍乱毒素或其衍生物);志贺氏菌属(*Shigella* spp.),包括宋内氏志贺氏菌(*S. sonnei*)、痢疾志贺氏菌(*S. dysenteriae*)、弗氏志贺氏菌(*S. flexnerii*);耶尔森氏菌属(*Yersinia* spp.),包括小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Y. enterocolitica*)(例如Yop蛋白)、鼠疫耶尔森氏菌(*Y. pestis*)、假结核耶尔森氏菌(*Y. pseudotuberculosis*);弯曲杆菌属(*Campylobacter* spp.),包括空肠弯曲杆菌(*C. jejuni*)(例如毒素、粘附素和侵袭素)和大肠弯曲杆菌(*C. coli*);沙门氏菌属(*Salmonella* spp.),包括伤寒沙门氏菌(*S. typhi*)、副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌(*S. choleraesuis*)、肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*);李斯特氏菌属(*Listeria* spp.),包括单核细胞增生李斯特氏菌(*L. monocytogenes*);螺旋杆菌属(*Helicobacter* spp.),包括幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)(例如脲酶、过氧化氢酶、空泡毒素(vacuolating toxin));假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.),包括铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*);葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.),包括金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*);肠球菌属(*Enterococcus* spp.),包括粪肠球菌(*E. faecalis*)、屎肠球菌(*E. faecium*);梭菌属(*Clostridium* spp.),包括破伤风梭菌(*C. tetani*)(例如破伤风毒素及其衍生物)、肉毒梭菌(*C. botulinum*)(例如肉毒杆菌毒素及其衍生物)、艰难梭菌(*C. difficile*)(例如梭菌毒素A或梭菌毒素B及它们的衍生物);芽孢杆菌属(*Bacillus*),包括炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)(例如肉毒杆菌毒素及其衍生物);棒杆

菌属 (*Corynebacterium* spp.), 包括白喉棒杆菌 (*C. diphtheriae*) (例如白喉毒素及其衍生物); 疏螺旋体属 (*Borrelia* spp.), 包括布氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*) (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、嘎氏疏螺旋体 (*B. garinii*) (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、阿氏疏螺旋体 (*B. afzelii*) (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. andersonii* (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、赫氏婢疏螺旋体 (*B. hermsii*); 埃里希氏体属 (*Ehrlichia* spp.), 包括马埃里希氏体 (*E. equi*) 和人粒细胞增多埃里希病的病原体; 立克次氏体属 (*Rickettsia* spp.), 包括立氏立克次氏体 (*R. Rickettsii*); 衣原体属 (*Chlamydia* spp.), 包括沙眼衣原体 (*C. trachomatis*) (例如 MOMP、肝素结合蛋白)、肺炎衣原体 (*C. pneumoniae*) (例如 MOMP、肝素结合蛋白)、鹦鹉热衣原体 (*C. psittaci*); 钩端螺旋体属 (*Leptospira* spp.), 包括问号钩端螺旋体 (*L. interrogans*); 密螺旋体属 (*Treponema* spp.), 包括苍白密螺旋体 (*T. pallidum*) (例如稀有外膜蛋白)、齿垢密螺旋体 (*T. denticola*)、猪痢疾密螺旋体 (*T. hyodysenteriae*); 或来自寄生虫, 例如疟原虫属 (*Plasmodium* spp.), 包括恶性疟原虫; 弓浆虫属 (*Toxoplasma* spp.), 包括鼠弓浆虫 (*T. gondii*) (例如 SAG2、SAG3、Tg34); 内阿米巴属 (*Entamoeba* spp.), 包括痢疾内变形虫 (*E. histolytica*); 巴贝虫属 (*Babesia* spp.), 包括田鼠巴贝虫 (*B. microti*); 锥虫属 (*Trypanosoma* spp.), 包括克鲁兹锥虫 (*T. cruzi*); 贾第鞭毛虫属 (*Giardia* spp.), 包括吸吮贾第虫 (*G. lamblia*); *Leshmania* 物种, 包括 *L. major*; 肺囊虫属 (*Pneumocystis* spp.), 包括卡氏肺囊虫 (*P. carinii*); 毛滴虫属 (*Trichomonas* spp.), 包括阴道毛滴虫 (*T. vaginalis*); *Schistosoma* 物种, 包括 *S. mansoni*, 或得自酵母, 例如念珠菌属 (*Candida* spp.), 包括白色念珠菌 (*C. albicans*); 隐球酵母属 (*Cryptococcus* spp.), 包括新型隐球菌酵母 (*C. neoformans*)。

[0047] 在一个优选的方面, 本发明的疫苗制剂包含 HIV-1 抗原 gp120, 特别是当在 CHO 细胞中表达时。在另一个优选的实施方案中, 本发明的疫苗制剂包含如上面所定义的 gD2t。

[0048] 在本发明一个优选的实施方案中, 含有要求保护的佐剂的疫苗包括据认为引起生殖器疣的 HPV 病毒 (HPV 6 或 HPV 11 及其它病毒) 以及引起宫颈癌的 HPV 病毒 (HPV 16、HPV 18 及其它病毒)。尤其优选的疫苗形式包含 L1 颗粒或病毒壳粒, 以及包含由以下选出的一种或多种抗原的融合蛋白: HPV 6 和 HPV 11 蛋白 E6、E7、L1 和 L2。最优选的融合蛋白形式是: GB 95 15478.7 中公开的 L2E7 以及 GB 9717953.5 (W099/10375) 中公开的蛋白 D(1/3)-E7。

[0049] 本发明的疫苗还包括由导致疟疾的寄生虫得到的抗原。例如, 优选的来自 *Plasmodia falciparum* 的抗原包括 RTS、S 和 TRAP。RTS 是一种杂种蛋白, 包含通过乙型肝炎表面抗原前 S2 部分的四个氨基酸连接到乙型肝炎病毒表面 (S) 抗原的恶性疟原虫孢子蛋白的基本上全部 C 末端片段。其完整结构公开于要求英国专利申请第 9124390.7 号的优先权的公开号为 W0 93/10152 的国际专利申请第 PCT/EP92/02591 号中。当在酵母中表达时, RTS 作为脂蛋白颗粒产生, 当其与来自 HBV 的 S 抗原共表达时, 它产生名为 RTS, S 的混合颗粒。公开号为 W0 90/01496 的国际专利申请第 PCT/GB89/00895 号中描述了 TRAP 抗原。本发明的优选实施方案是一种疟疾疫苗, 其中所述抗原制备物包含 RTS, S 和 TRAP 抗原的组合。有可能成为多级疟疾疫苗的成份的候选物的其它疟原虫抗原是恶性疟原虫 MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、钳合蛋白、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230 以及它们在疟原虫物种中的类

似物。

[0050] 所述制剂还可以包含抗肿瘤抗原并可用于治疗癌症的免疫疗法 (immunotherapeutic treatment cancers)。例如,发现所述佐剂制剂对肿瘤排斥抗原 (tumor rejection antigen) 有作用,如前列腺癌、乳癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌或黑素瘤癌 (melanoma cancer) 的肿瘤排斥抗原。典型抗原包括 MAGE 1 和 MAGE 3 或其它用于治疗黑素瘤的 MAGE 抗原、PRAME、BAGE 或 GAGE (Robbins 和 Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunology* 8, 第 628-636 页; Van den Eynde 等, *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (1997 年提交); Correale 等 (1997), *Journal of the National Cancer Institute* 89, 第 293 页。事实上这些抗原在广泛的肿瘤类型中表达,例如黑素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌。其它适于与本发明的佐剂使用的肿瘤特异性抗原包括但不限于前列腺特异性抗原 (PSA) 或 Her-2/neu、KSA (GA733)、MUC-1 和癌胚抗原 (CEA)。已经提出其它抗原作为泛癌治疗抗原 (pan-cancer therapeutic antigen), 其中包括酪氨酸酶和 Survivin。因此,在本发明的一方面,提供了包含依照本发明的一种佐剂组合物以及一种肿瘤排斥抗原的疫苗。

[0051] 预计本发明的组合物将用于配制包含来自疏螺旋体物种的抗原的疫苗。例如,抗原可以包括核酸、病原体衍生的抗原或抗原制备物、重组产生的蛋白或多肽以及嵌合融合蛋白。尤其是所述抗原是 OspA。所述 OspA 可以是借助于宿主细胞 (大肠杆菌) 的脂质化形式的完整成熟蛋白,名为 (Lipo-OspA), 或者是非脂质化的衍生物。这样的非脂质化衍生物包括具有流感病毒非结构蛋白 (NS1) 的头 81 个 N 末端氨基酸以及完整 OspA 蛋白的非脂质化 NS1-OspA 融合蛋白,而另一种非脂质化衍生物 MDP-OspA 是带有 3 个额外 N 末端氨基酸的非脂质化形式 OspA。

[0052] 本发明的疫苗可以用于预防或治疗变态反应。这样的疫苗将包含变态反应原特异性抗原 (例如 Der p1 以及花粉相关抗原) 和变态反应原非特异性抗原 (例如 stanworth 十肽)。

[0053] 在每一疫苗剂量中抗原量是根据在典型受接种者体内引起免疫保护性反应并且没有显著副作用的量而选择。这样的量将根据所使用的是哪一种特定免疫原以及其如何呈递而有所不同。一般来说,预期每剂量将包含 1-1000 μ g 抗原,优选 1-500 μ g, 优选 1-100 μ g, 最优选 1 到 50 μ g。对于特定疫苗的最佳量可以根据涉及观察受实验者体内合适的免疫反应的标准研究而确定。在初次接种 (initial vaccination) 后,受实验者可以以足够间隔接受一次或几次加强免疫 (booster immunisation)。为给予人类,一般免疫刺激剂含量为每剂量 1 μ g-1000 μ g, 优选每剂量 10 μ g-500 μ g, 更优选每剂量 20 μ g-200 μ g, 更优选每剂量 20-100 μ g, 最优选每剂量 10-50 μ g。

[0054] 本发明还提供了本发明的佐剂和疫苗在药中的应用,具体地说是治疗患有病原性感染或癌症或变态反应或对上述状况易感的哺乳动物。还提供了本发明的佐剂及疫苗在生产病毒感染、细菌感染、寄生虫感染、变态反应或癌症的免疫预防药物和免疫治疗药物中的应用。本发明的制剂可以用于预防目的以及治疗目的。

[0055] 疫苗制备物在 "Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach" Powell, M. F. 和 Newman, M. J. 编辑; 1995, *Pharmaceutical Biotechnology* (Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X) 中一般性描述。

[0056] 本发明由下面的实施例举例说明但不限于下面的实施例。

[0057] 实施例 1, 材料与方法

[0058] 血清学

[0059] 使用 HBs (Hep 286) 作为包被抗原, 通过 ELISA 进行抗 HBs 抗体的定量。每孔加入 50 μ l 抗原和抗体溶液。抗原在 PBS 中稀释到 1 μ g/ml 的最终浓度, 并于 4 $^{\circ}$ C 下吸附到 96 孔微量滴定板 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark) 的孔过夜。然后将所述板在 37 $^{\circ}$ C 下用含 1% 牛血清白蛋白和 0.1% TWEEN 20 的 PBS (饱和缓冲液; 100 μ l/孔) 温育 1 小时。在 HBs 包被的板中加入用饱和缓冲液成倍稀释的血清 (从 100 倍稀释度开始), 并在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时 30 分钟。所述板用 PBS 0.1% TWEEN 20 洗四次, 每孔加入在饱和缓冲液中稀释为 1/1000 的生物素偶联抗小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 或 Ig (Amersham, UK), 并在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时 30 分钟。在冲洗步骤后, 加入在饱和缓冲液中稀释为 1/5000 的链霉抗生物素-生物素酰化过氧化物酶复合物 (Amersham, UK), 并继续在 37 $^{\circ}$ C 下温育 30 分钟。如上洗板, 并在邻苯二胺 (Sigma) 0.04% H₂O₂ 0.03% 的 0.1% TWEEN 20, 0.05M 柠檬酸盐缓冲液 pH 4.5 中温育 20 分钟。用 2N H₂SO₄ 终止反应并在 490/630nm 读数。采用 SoftmaxPro (使用四参数方程) 根据对照计算 ELISA 滴度并表示为 EU/ml。

[0060] T 细胞扩增

[0061] 第二次免疫后两周, 处死小鼠, 无菌操作取出脾置于池中。在含有 2mM L-谷氨酰胺, 抗生素, 5x 10⁻⁵M 2-巯基乙醇以及 1% 同系正常小鼠血清的 RPMI 1640 培养基 (GIBCO) 中制备细胞悬浮液。脾细胞在含有不同浓度 (10-0.03 μ g/ml) HBs 抗原的圆底 96 孔板的 200 μ l 中培养到 2x 10⁶ 细胞/ml 的最终浓度。每个测试进行四个平行实验。在 5% CO₂ 下 37 $^{\circ}$ C 培养 96 小时后, 用 ³H-胸苷 (Amersham, UK, 5Ci/mmol) 以 0.5 μ Ci/孔脉冲输送 (pulse) 18 小时, 然后用细胞收集器收集在 Unifilter 板 (Packard) 上。在闪烁计数器 (Topcount, Packard) 中测量结合的放射性。结果以 cpm 表示 (四个复孔的平均 cpm) 或表示为刺激数 (stimulation indice) (带有抗原的细胞培养物的平均 cpm/ 没有抗原的细胞培养物的平均 cpm)。

[0062] 细胞因子产生

[0063] 第二次免疫后两周, 处死小鼠, 无菌操作取出脾置于池中 (每组 3 池)。在含有 2mM L-谷氨酰胺, 抗生素, 5x 10⁻⁵M 2-巯基乙醇以及 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 (GIBCO) 中制备细胞悬浮液。脾细胞在含有不同浓度 (10-0.1 μ g/ml) HBs 抗原的平底 24 孔板的 1ml 中培养到 5x 10⁶ 细胞/ml 的最终浓度。96 小时后收集上清液并冻存, 直到通过 ELISA 测试 IFN γ 和 IL-5 的存在。

[0064] IFN γ 的产生

[0065] 使用 Genzyme 的试剂, 通过 ELISA 进行 IFN γ 的定量。每孔加入 50 μ l 样品和抗体溶液。4 $^{\circ}$ C 下用 50 μ l 在碳酸盐缓冲液 pH 9.5 中稀释为 1.5 μ g/ml 的仓鼠抗小鼠 IFN γ 包被 96 孔微量滴定板 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark) 过夜。然后将所述板在 37 $^{\circ}$ C 下用 100 μ l 含 1% 牛血清白蛋白和 0.1% TWEEN 20 的 PBS (饱和缓冲液) 温育 1 小时。在抗 IFN γ 包被的板中, 加入得自体外刺激的上清液在饱和缓冲液中的两倍稀释液 (开始于 1/2), 并在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时 30 分钟。所述板用 PBS 0.1% TWEEN (洗涤缓冲液) 洗四次, 每个孔中加入在饱和缓冲液中稀释到最终浓度 0.5 μ g/ml 的生物素偶联山羊抗小鼠

IFN γ , 并在 37°C 下温育 1 小时。在洗涤步骤后, 加入在饱和缓冲液中稀释为 1/10000 的 AMDEX 偶联物 (Amersham), 在 37°C 下温育 30 分钟。如上洗板, 并用 50 μ l TMB (Biorad) 温育 10 分钟。用 0. 4N H₂SO₄ 终止反应并在 450/630nm 读数。使用标准曲线 (小鼠 IFN γ 标准) 通过 SoftmaxPro (四参数方程) 计算浓度并表示为 pg/ml。

[0066] IL-5 的产生

[0067] 使用 Pharmingen 的试剂, 通过 ELISA 进行 IL-5 的定量。每孔加入 50 μ l 样品和抗体溶液。4°C 下用 50 μ l 在碳酸盐缓冲液 pH 9.5 中稀释为 1 μ g/ml 的大鼠抗小鼠 IL-5 包被 96 孔微量滴定板 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark) 过夜。然后将所述板在 37°C 下用 100 μ l 含 1% 牛血清白蛋白和 0. 1% TWEEN 20 的 PBS (饱和缓冲液) 温育 1 小时。在抗 IFN γ 包被的板中, 加入得自体外刺激的上清液在饱和缓冲液中的两倍稀释液 (开始于 1/2), 并在 37°C 下温育 1 小时 30 分钟。所述板用 PBS TWEEN 0. 1% (洗涤缓冲液) 洗四次, 每个孔中加入在饱和缓冲液中稀释到最终浓度 1 μ g/ml 的生物素偶联大鼠抗小鼠 IL-5, 并在 37°C 下温育 1 小时。在洗涤步骤后, 加入在饱和缓冲液中稀释为 1/10000 的 AMDEX 偶联物 (Amersham), 在 37°C 下温育 30 分钟。如上洗板, 并用 50 μ l TMB (Biorad) 温育 15 分钟。用 0. 4N H₂SO₄ 终止反应并在 450/630nm 读数。使用标准曲线 (重组小鼠 IL-5 标准) 通过 SoftmaxPro (四参数方程) 计算浓度并表示为 pg/ml。

[0068] 实施例 2, 小鼠中的免疫原性研究

[0069] 为测试 MPL 在不含抗原的固体颗粒载体上的作用原理 (concept), 使用 HABMPL 疫苗的不同配制顺序在 Balb/C 小鼠中进行免疫原性研究:

[0070] 表 1, 疫苗组方

[0071]

组别	组方
1	(HB-A1PO ₄)-3D-MPL+(HA-A1(OH) ₃)
2	(3D-MPL-A1(OH) ₃)+(HA-A1(OH) ₃)+(HB-A1PO ₄)
3	(3D-MPL-A1PO ₄)+(HA-A1(OH) ₃)+(HB-A1PO ₄)

[0072] 配制方法描述:

[0073] 组 1, 在先技术的配制方法。抗原首先吸附于金属盐上, 随后加入游离 3D-MPL, 导致 3D-MPL 吸附于抗原所吸附的同一金属盐颗粒。

[0074] 组 2 和组 3, 本发明的配制方法。3D-MPL 吸附于一种金属盐颗粒上, 抗原吸附于分离的金属盐颗粒, 随后将预吸附的复合物混合。

[0075] 免疫计划

[0076] 用基于 HAB 的制剂 (1/10 人类剂量, 即 HAV 72ELU, HBs 2 μ g, MPL 5 μ g) 以 4 周间隔皮下免疫各组二次, 每组 10 只小鼠。在第二次免疫后 14 天, 用 HBs 和 HAV 体外再刺激脾细胞后, 分析淋巴组织增生反应以及细胞因子产生 (IL5/IFN γ)。在第 35 天从眶后窦 (retroorbital sinus) 取血, 通过 ELISA 监测对 HBs 和 HAV 的抗体反应以及同种型分布型诱导 (isotypic profile induced) (仅 HBs)。

[0077] 结果

[0078] 通过 ELISA 测定体液反应 (Ig 和同种型), 使用 HBs 作为包被抗原测量针对 HBV 的体液反应, 使用 Behring 试剂盒测量针对 HAV 的体液反应。仅分析第二次免疫后 14 天的取血。

[0079] 图 1 显示了在个体血清上测量的抗 HBs Ig 抗体反应并表示为 GMT。

[0080] 图 2 显示了由对汇集的血清分析计算出的同种型重新分布 (IgG1、IgG2a 和 IgG2b)。

[0081] 在组 1 和新型制剂 (组 2 和组 3) 之间没有观察到在抗体滴度上的差异。此外, 新型制剂 (组 2 和组 3) 刺激的 IgG1 和 IgG2a/b 同种型比例与由在先技术的制剂 (组 1) 刺激的 IgG1 和 IgG2a/b 同种型比例相似。

[0082] 细胞介导的免疫反应

[0083] 在第二次免疫后 14 天, 在用 HBs 或 HA 抗原体外再刺激脾细胞后, 测定细胞介导的免疫反应 (淋巴组织增生和 IFN γ /IL-5 产生)。对于每组小鼠, 处死 5 只动物并收集脾以用于体外测试。

[0084] 图 3 显示了在用 HBs 再刺激的脾细胞中监测到的淋巴组织增生。

[0085] 图 4 显示了在用 HBs 再刺激的脾细胞中监测到的细胞因子产生。

[0086] 在各制剂之间未能观察到淋巴组织增生反应的差异。

[0087] 此外, 在所有组中观察到强烈的 IFN- γ (+/-1000pg/ml) 反应, 在各组间未观察到 IL-5 产生的差异 (低于 60pg/ml)。

[0088] 结论

[0089] 在各 HABMPL 配制顺序之间未观察到对 HBsAg 的体液免疫反应及细胞介导的免疫反应的显著差异。

[0090] 实施例 3, 豚鼠的 HSV 接种

[0091] 前面的实施例证实了新型制剂及方法关于肝炎抗原的功效。本实施例研究经典方法与本发明的方法相比, 用明矾和 3D-MPL 配制的单纯疱疹病毒 gD 疫苗的免疫原性及保护功效。用 HSV 豚鼠阴道内保护模型比较这两种疫苗。

[0092]

组别	组方
4	gD2t(20 μ g) + 3D-MPL(50 μ g) + Al(OH) ₃ (500 μ g)
5	gD2t(20 μ g) + Al(OH) ₃ (400 μ g) 3D-MPL(50 μ g) + Al(OH) ₃ (100 μ g)
6	未处理

[0093] 实验方法

[0094] 在第 0 天和第 28 天两次免疫各组, 每组 12 只雌性 Hartley 豚鼠。在第 57 天, 阴道内用 105pfu HSV2MS 株 (100 μ l) 攻击动物。攻击之后, 从第 4 天到第 12 天每日监测动物初次疾病 (primary disease) 的临床征兆。第二次免疫后, 在第 14 天和第 28 天从眶后窦取血, 并通过 ELISA 监测抗 gD 抗体反应 (IgG)。

[0095] 配制方法

[0096] 依照 WO 92/16231 中描述的技术产生来自 HSV2 的 gD2t。3D-MPL 购自 Ribi ImmunoChem Inc., Montana, USA。Al(OH)₃ 购自 Superfos。在第一次注射前 15 天制备制剂。所有温育在室温及搅拌的条件下完成。

[0097] 组 4 基于 Al(OH)₃ 的制剂 (250 μ l/ 剂量) : 经典途径

[0098] 在加入 MPL(12.5 μ g) 之前, 使 gD2t(5 μ g) 吸附于 125 μ g Al(OH)₃ 上 15 分钟。三十分钟后, 用 10 倍浓缩的 PBS pH 7.4 溶液缓冲所述制剂。15 分钟后, 加入 500 μ g/ml 苯氧基乙醇作为防腐剂。

[0099] H₂O+Al(OH)₃+Ag-15 分钟 -MPL-30 分钟 -10xPBSpH7.4-15 分钟 -2 苯氧基

[0100] 组 5 基于 Al(OH)₃ 的制剂 (250 μ l/ 剂量) : 新途径

[0101] 使 gD2t(5 μ g) 吸附 100 μ g Al(OH)₃ 15 分钟, 并作为浓缩的单批 (monobulk) 贮存起来。在另一方面, 将 MPL(12.5 μ g) 吸附到 25 μ g Al(OH)₃ 上 30 分钟, 并作为另一浓缩单批贮存起来。为进行最后的配制, 将吸附的 gD2t 稀释于 H₂O 以及 10 倍浓缩的 PBS pH 7.4。十五分钟后, 在加入苯氧基乙醇作为防腐剂前, 加入吸附的 MPL。

[0102] Al(OH)₃+Ag

[0103] Al(OH)₃+MPL

[0104] H₂O+10xPBS pH 7.4+ 加入 gD2t-15 分钟 - 加入 MPL-15 分钟 -2 苯氧基

[0105] 样品定量

[0106] 使用 gD 43B318 作为包被抗原, 通过 ELISA 进行抗 gD 抗体的定量。每孔加入 50 μ l 抗原和抗体溶液。抗原在 PBS 中稀释到 1 μ g/ml 的最终浓度, 并于 4°C 下吸附到 96 孔微量滴定板 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark) 的孔过夜。然后将所述板在 37°C 下用含 1% 牛血清白蛋白和 0.1% TWEEN 20 的 PBS (饱和缓冲液) 温育 1 小时。在 gD 包被的板中加入血清在饱和缓冲液中的两倍稀释液, 并在 37°C 下温育 1 小时 30 分钟。所述板用 PBS 0.1% TWEEN 20 洗四次, 每孔加入在饱和缓冲液中稀释为 1/10000 的生物素偶联抗豚鼠 IgG (Amersham, UK), 并在 37°C 下温育 1 小时 30 分钟。在冲洗步骤后, 加入在饱和缓冲液中稀释为 1/1000 的链霉抗生物素 - 生物素酰化过氧化物酶复合物 (Amersham, UK), 并继续在 37°C 下温育 30 分钟。如上洗板, 并在邻苯二胺 (Sigma) 0.04% H₂O₂ 0.03% 的 0.1% TWEEN 20 0.05M 柠檬酸盐缓冲液 pH 4.5 中温育 20 分钟。用 2N H₂SO₄ 终止反应, 并在 490/630nm 读数。由参考通过 SoftmaxPro (使用四参数方程) 计算 ELISA 滴度并表示为 EU/ml。

[0107] 统计分析

[0108] 使用 UNISTAT 对血清学数据进行统计分析:

[0109] 适用于单因素方差分析的方法可以简要描述如下:

[0110] 1) 对数据进行对数转化。

[0111] 2) 对每个群体 (组) 进行 Kolmogorov Smirnov 检验以检验其正态性 (normality)。

[0112] 3) 进行 Hartley 和 Cochran 检验以检验不同群体 (组) 间方差齐性。

[0113] 4) 选定数据的方差分析: 第二次免疫后 14 天或第二次免疫后 28 天的数据。

[0114] 结果

[0115] 血清学

[0116] 图 5,显示了在第二次免疫后对各个血清测量的抗 gD IgG 抗体反应。

[0117] 在第二次免疫后 14 天 (17090-18508EU/ml GMT) 或第二次免疫后 28 天 (10227-11965EU/ml GMT),在两组制剂间没有观察到抗体滴度的显著差异。由数据的对数转化后的两个时间点,分别对两种疫苗制剂引起的抗 gD IgG 滴度进行单向因素方差分析。在两种制剂间没有检测到统计学上的显著差异 (对于第二次免疫后 14 天和第二次免疫后 28 天的数据, p 值分别等于 0.7397 和 0.5078)。

[0118] 防护疾病

[0119] 在攻击后 4 到 12 天,通过比较在已接种和未处理的动物中的几个参数,评估对初次疾病的防护:

[0120] ●有和没有病变 (阴道或外部) 动物的百分率。

[0121] ●如下计算每组的初次感染指数 (PI):

[0122] Σ (计数最大值 x 以%表示的发生率)。

[0123] ●表达为中值的病变计数总数 (第 4 天到第 12 天) 以及具有病变的动物数目 (N)。

[0124] ●在第 4 天和第 12 天之间,对每组计算的平均累积数计算。

[0125] 表 2 病变参数的总结

[0126]

组	无病变的动物 (%)	阴道病变 (%)	外部病变 (%)	初次感染指数*	病变严重程度 (n)**
4	66.7	25	8.3	29.2 -97%	1 (4)
5	83.3	16.7	0	8.3 -99%	0.5 (2)
6	11.1	0	88.9	844.4	28.3 (8)

[0127] *注射后第 4 天到第 12 天病变计数的总数 (未考虑没有病变的动物)。病变计数: 无病变 (0), 阴道病变 (0.5 或 1), 外部皮肤水泡 (2、4、8 或 16)。

[0128] **初次感染指数 = (最大计数 I) x (发生率%); 其中 I = 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 或 16。

[0129] 图 6 显示了 HSV 攻击后的累积损伤 (lesion) 计数曲线。

[0130] 高百分率的免疫后动物没有出现任何病变 (66%到 83%) 或阴道病变。与此相比, 89%的对照组动物显示有外部病变。

[0131] 在免疫的动物观察到初次感染指数的强烈降低 (97%到 99%)。这伴随着与未处理组相比 (中值 = 28), 记录到接种组的病变程度非常轻 (中值 = 0.5 或 1)。

[0132] 如累积计数曲线显示, 两个组 (4 和 5) 都获得非常好并且相当水平的对初次疾病的防护。

[0133] 结论

[0134] 比较了用于疫苗 HSV 疫苗制剂的旧方法和新方法。在 IgG 滴度或在对初次疾病的防护上, 在两种方法之间没有观察到统计学上的显著差异。

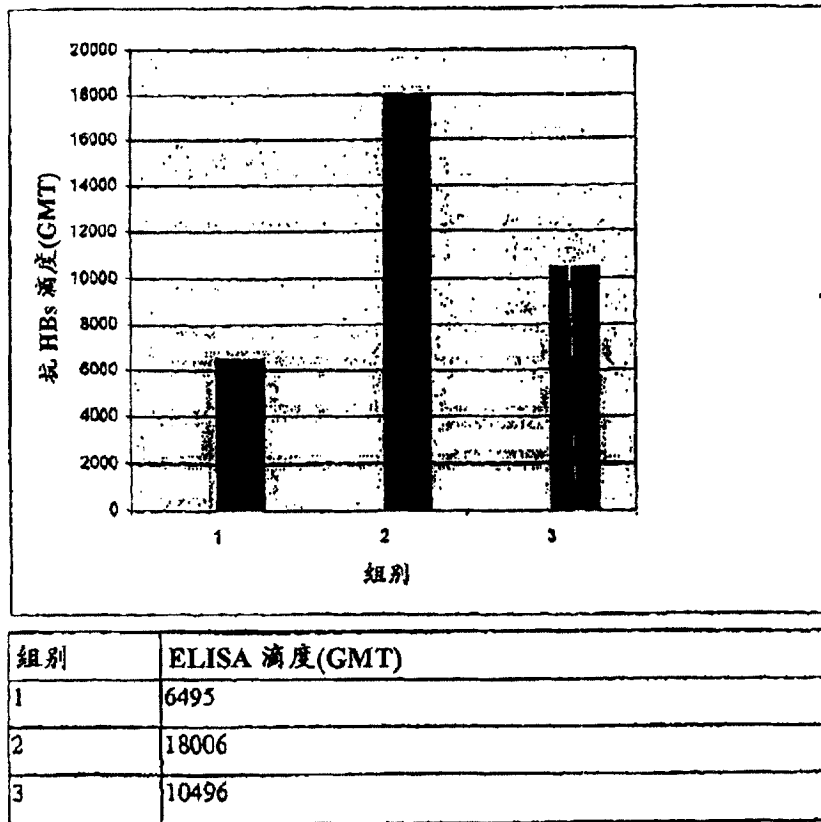


图 1

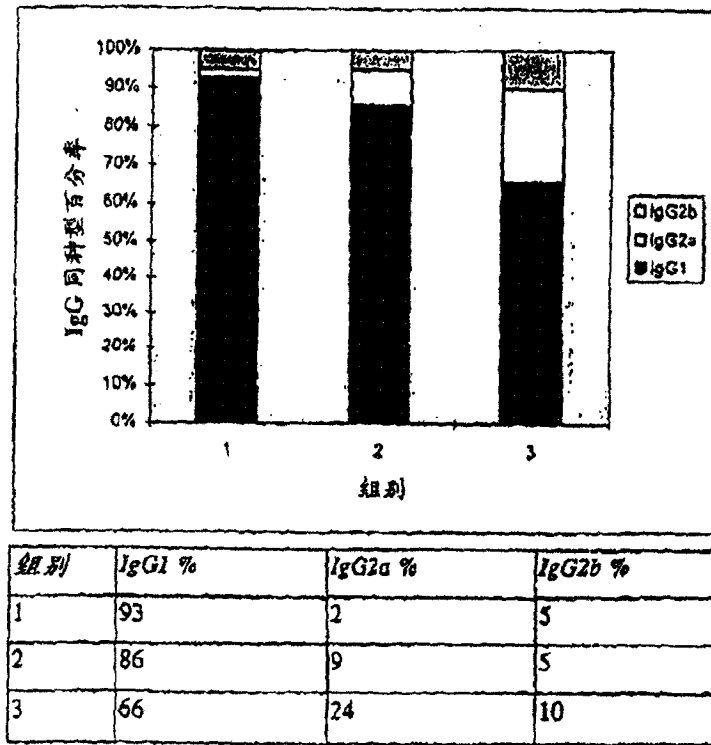


图 2

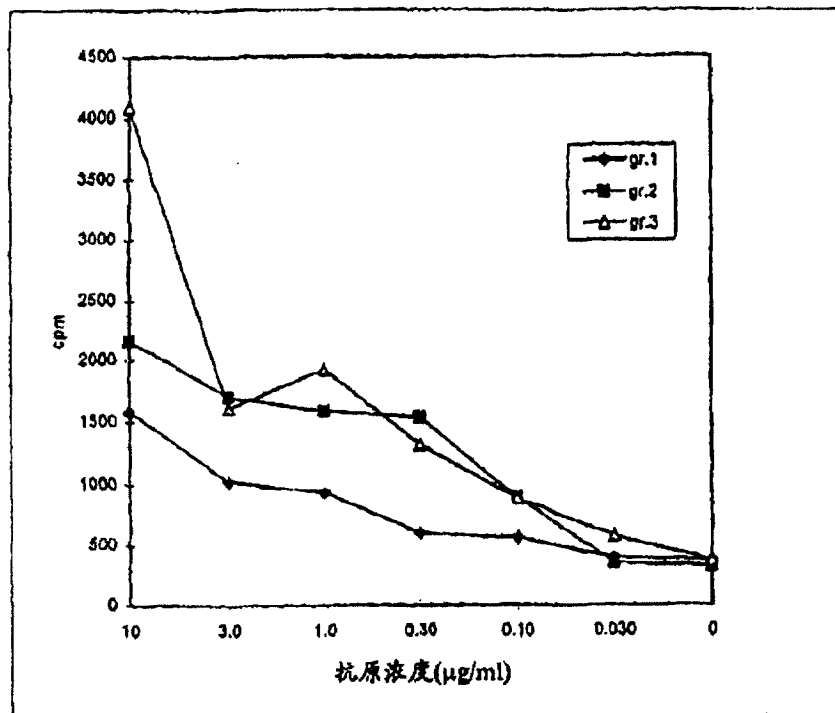
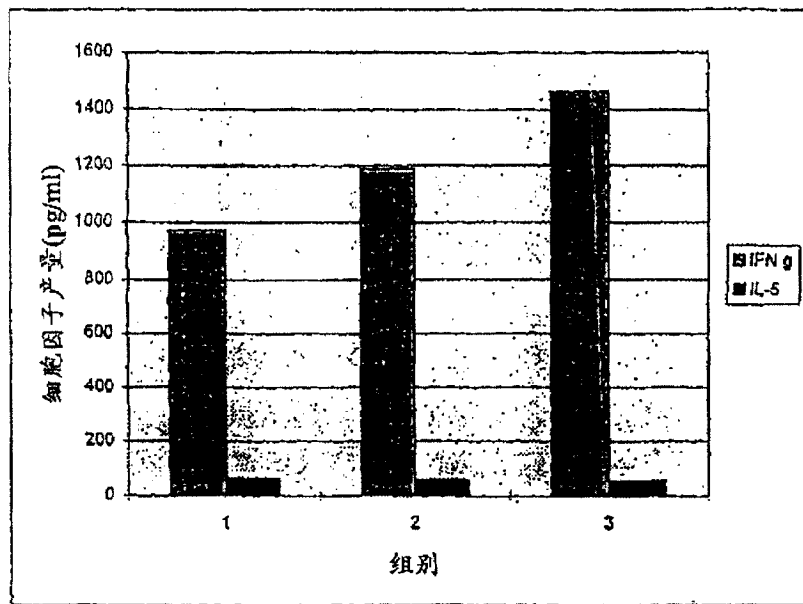


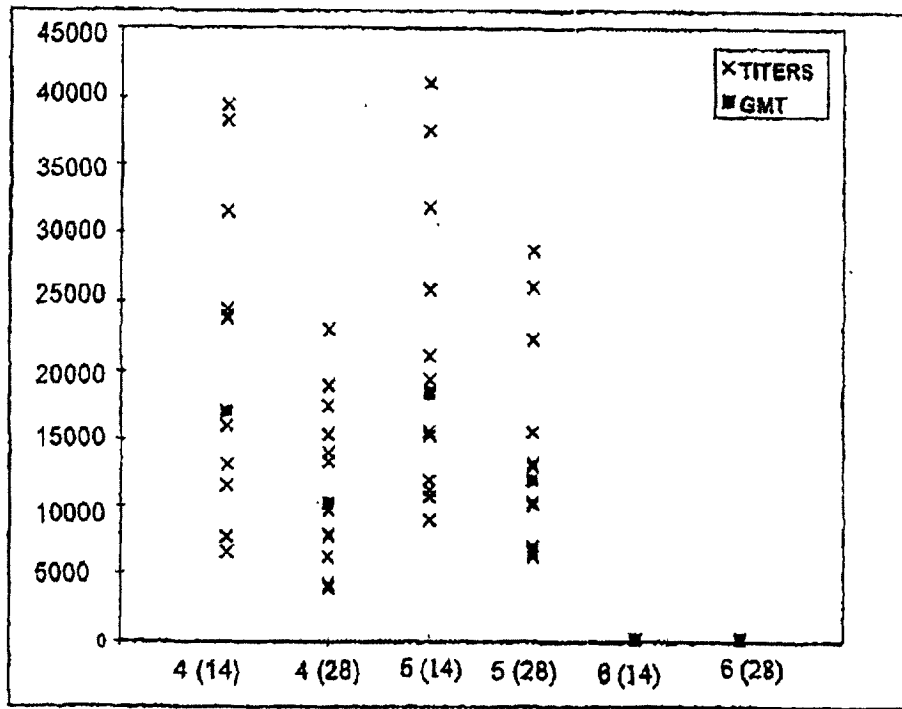
图 3



细胞因子(pg/ml)		Gp 1	Gp 2	Gp 3
IFN g	HBsAg 10 μ g/ml	975	1187	1465
	空白	157*	173*	173*
IL-5	HBsAg 10 μ g/ml	64*	59*	59*
	空白	64*	59*	59*
IFNg/IL-5 比例		15:2	20:1	24:8

* = 定量极限

图 4



组别(取血计划)	ELISA 滴度	
	GMT	平均值
4 (第二次免疫后 14 天)	17090	20336
4 (第二次免疫后 28 天)	10227	11825
5 (第二次免疫后 14 天)	18508	20903
5 (第二次免疫后 28 天)	11965	13796
6 (第二次免疫后 14 天)	200	200
6 (第二次免疫后 28 天)	200	200

图 5

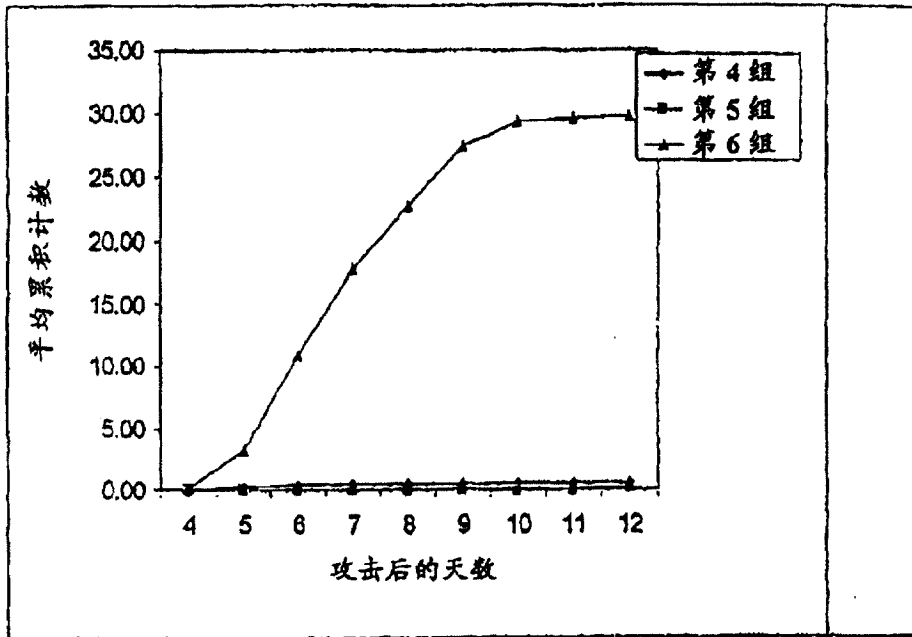


图 6