

[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 200410048963.5

[51] Int. Cl.

*A61K 39/12 (2006.01)*  
*A61K 39/295 (2006.01)*  
*A61K 31/29 (2006.01)*  
*A61K 39/25 (2006.01)*  
*A61P 31/12 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1325117C

[22] 申请日 2000.9.7

[21] 申请号 200410048963.5

分案原申请号 00815424.4

[30] 优先权

[32] 1999.9.7 [33] GB [31] 9921146.8

[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 M·M·斯劳伊

[56] 参考文献

CN 1138298 A 1996.12.18

US 5855891 A 1999.1.5

Assessment of the serological relatedness of genital humanpapillomaviruses by hemagglutination inhibition. Roden R. B. S. et al, Journal of Virology, Vol. 70 No. 5 1996

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 8 页

[54] 发明名称

联合疫苗组合物

[57] 摘要

提供了新的联合疫苗组合物, 所述组合物包括一种单纯疱疹病毒(HSV)抗原和一种 HPV 抗原, 且可任意选择地另外包括下面抗原的一种或更多种: EBV 抗原、甲型肝炎抗原或灭活的减毒病毒、乙型肝炎病毒抗原、VZV 抗原、HCMV 抗原、鼠弓形体抗原。用一种佐剂配制所述的疫苗组合物, 所述佐剂是 TH1 细胞应答的优先刺激物, 例如 3D - MPL 和 QS21。

1. 一种疫苗, 所述疫苗包含人乳头瘤病毒 16 L1 病毒样颗粒, 人乳头瘤病毒 18 L1 病毒样颗粒, 氢氧化铝和 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A。
2. 权利要求 1 的疫苗, 其中病毒样颗粒采用预先吸附在氢氧化铝上的抗原或 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 整体式材料配制。
3. 权利要求 1 或 2 的疫苗, 其中, 人乳头瘤病毒 16 L1 病毒样颗粒和人乳头瘤病毒 18 L1 病毒样颗粒纯化材料被加到氢氧化铝上, 以获得 2 $\mu$ g 病毒样颗粒/10 $\mu$ g 氢氧化铝的比例。
4. 一种疫苗, 由人乳头瘤病毒 16 L1 病毒样颗粒, 人乳头瘤病毒 18 L1 病毒样颗粒, 氢氧化铝和 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 组成。
5. 一种人乳头瘤病毒 16 L1 病毒样颗粒, 采用预先吸附在氢氧化铝或  $\text{AlPO}_4$  上的抗原或 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 的整体式材料与明矾/3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 配制。
6. 一种人乳头瘤病毒 18 L1 病毒样颗粒, 采用预先吸附在氢氧化铝或  $\text{AlPO}_4$  上的抗原或 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 的整体式材料与明矾/3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 配制。

## 联合疫苗组合物

本申请为 2000 年 9 月 7 日提交的，申请号为 00815424.4 的、发明名称与本申请相同的申请的分案申请。

本发明涉及新的疫苗制剂、制备它们的方法及所述疫苗制剂在治疗中的应用。具体地说，本发明涉及适合于给予青少年的联合疫苗。

乳头瘤病毒是高度种特异性的小 DNA 肿瘤病毒。迄今已描述了超过 70 种独特的人乳头瘤病毒(HPV)基因型。HPV 通常对皮肤(例如 HPV-1 和 HPV-2)或者对粘膜表面(例如 HPV-6 和 HPV-11)是特异性的，且常常引起持续达几个月或几年的良性肿瘤(疣)。对有关的个人，这样的良性肿瘤可能是令人苦恼的，但不会是威胁生命的，不过有些是例外。

某些 HPV 也与癌症有关。HPV 和人类癌症之间的最强的正相关是存在于 HPV-16 及 HPV-18 与宫颈癌之间的关系。在发展中国家里，宫颈癌是最常见的恶性肿瘤；世界上每年大约有 500,000 个新病例出现。现在，在技术上可行的是：用疫苗主动地和原发性 HPV-16 感染作斗争、以及甚至与确认的包含 HPV-16 的癌作斗争。有关于防备 HPV-16 的预防性接种和治疗性接种之前景的综述，参见：Cason J., Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293-306 和 Hagenessee M. E., Infections in Medicine 1997 14 (7) 555-556, 559-564。

特别关注的其它的人乳头瘤病毒是血清型 31、33 和 45 乳头瘤病毒。

今天，已分离出不同类型的 HPV，且借助于细菌中的克隆系统及新近通过 PCR 的扩增，已鉴定了它们的特征。在与充分表征的牛 1 型乳头瘤病毒(BPV1)之基因组的分子组构进行比较的基础上，确定了所述 HPV 基因组的分子组构。

虽然发生较少的变异，但是，所描述的所有 HPV 基因组至少有 7 种早期基因即 E1 至 E7，以及至少有两种晚期基因 L1 和 L2。另外，一个上游的调节区包含着似乎控制所述 HPV 基因组的大多数转录事件的

调节序列。

E1 和 E2 基因分别涉及病毒复制和转录控制；且 E1 和 E2 基因往往会由于病毒的整合而被破坏。E6 和 E7 涉及病毒转化，近来证据暗示 E5 也涉及病毒转化。

就与宫颈癌有关的 HPV 例如 HPV-16 及 HPV-18 而言，在病毒 DNA 整合后，开始致癌过程。所述的整合导致编码衣壳蛋白 L1 和 L2 的基因失活，并导致建立起两种早期蛋白 E6 和 E7 的连续超量表达，所述的超量表达将导致正常的细胞分化的逐步丧失及癌的形成。

宫颈癌在妇女中是常见的，且通过癌变前的中间阶段发展到常常导致死亡的侵袭性癌。该病的所述中间阶段被称为宫颈上皮内瘤；且根据严重程度的增加，将所述中间阶段分成 I 至 III 级。

临床上，女性肛生殖道的 HPV 感染表现为宫颈扁平湿疣，宫颈扁平湿疣的标志是主要影响宫颈鳞状上皮的表层细胞和中间细胞的中空细胞病。

作为病毒的致细胞病变效应结果的中空细胞表现为具有一个核周透明晕的多核细胞。异常角质化使上皮变厚，造成病变的疣状外观。

如果这类扁平湿疣是 HPV 16 血清型或 HPV 18 血清型阳性的，则由于扁平湿疣朝着本身被认为是侵袭性宫颈癌癌前病变的宫颈上皮内瘤 (CIN) 和原位癌 (CIS) 发展，因而是高度危险的因素。

WO 96/19496 公开了人乳头瘤病毒 E6 蛋白和 E7 蛋白的变体，尤其是在 E6 蛋白和 E7 蛋白中都有一个缺失的 E6/E7 融合蛋白。据说这些缺失的融合蛋白是免疫原性的。

在 WO94/00152、WO94/20137、WO93/02184 和 WO94/05792 中公开了基于 HPV L1 的疫苗。这样的一种疫苗可包含作为单体的所述 L1 抗原、一种衣壳粒或一种病毒样颗粒。这样的粒子可另外包含 L2 蛋白。例如在 WO93/00436 中描述了基于 L2 的疫苗。其它的 HPV 疫苗基于早期蛋白，例如 E7、或例如 L2-E7 的融合蛋白。

HSV-2 是生殖器疱疹的主要病原体。HSV-2 和 HSV-1 (唇疱疹的病

原体)的特征在于其主要在神经元之神经节细胞中既诱发急性疾病、又建立潜伏感染的能力。

仅在美国,估计大约 500 万人发生生殖器疱疹,每年记录有 50 万临床病例(原发性感染和复发性感染)。原发性感染一般发生在青春期之后,其特征为局部出现有持续 2 至 3 周的疼痛性皮肤病变。在原发性感染之后的接下来的六个月内,50%的患者将经历该病的一次复发。大约 25%的患者每年可经历 10-15 次该病的复发性发作。在免疫妥协的患者中,高频复发的发生率在统计学上高于正常患者群体中的发生率。

HSV-1 和 HSV-2 病毒都有许多位于病毒表面的糖蛋白组分。这些组分称为 gB、gC、gD 和 gE 等等。

需要有效的联合疫苗以预防青少年特别易患的疾病。

本发明提供一种疫苗组合物,所述组合物包含与一种佐剂结合的:

(a) 一种单纯疱疹病毒(HSV)抗原;及

(b) 一种人乳头瘤病毒(HPV)抗原;

该佐剂为 TH1 细胞应答的优先刺激物。

本发明疫苗组合物给予青少年是非常有益的,青少年可能尤其有 HSV 和/或 HPV 感染的危险。

本发明的疫苗组合物可任意选择地另外包括下文描述的许多其它抗原中的一种或更多种。

已发现,根据本发明的疫苗组合物出人意外地没显示出干扰;也就是说,针对本发明组合物中每种抗原的免疫应答,与通过结合作为 TH1 细胞应答优先刺激物的佐剂单独给予每种抗原而获得的免疫应答基本上一样。

用于预防乙型肝炎感染、包含一种或更多种乙型肝炎抗原的疫苗是众所周知的。例如,运用 SmithKline Beecham Biologicals 的疫苗 Engerix-B (商标)预防乙型肝炎。这种疫苗包含乙型肝炎表面抗原(具体为在 Harford 等, Postgraduate Medical Journal, 1987, 63 (增刊 2), 第 65-70 页中描述的 226 个氨基酸的 S-抗原);且用氢氧化铝作为佐剂配制这种疫苗。

同样得自 SmithKline Beecham Biologicals 的疫苗 Havrix (商标)是可以用来预防甲型肝炎感染的疫苗的一个实例。用氢氧化铝作为佐剂来配制它。这种疫苗包括一种用甲醛溶液(甲醛)灭活的甲型肝炎病毒 HM-175 的减毒株; 参见 Andre 等的论文(Prog. med. Virol., 第 37 卷, 第 1-24 页)。

当用于本文时, 术语甲型肝炎病毒(HAV)抗原用来表示来源于甲型肝炎病毒的一种蛋白或 HAV 的一种减毒株, 该减毒株可任意选择地是例如用甲醛灭活的减毒株。如果所述 HAV 抗原是一种来源于甲型肝炎病毒的蛋白, 则它可以任选地作为一种重组蛋白。

疫苗 Twinrix (商标)是重组的乙型肝炎抗原和前面提到的灭活的减毒甲型肝炎病毒的组合。可以用该疫苗来同时防御甲型肝炎与乙型肝炎。

欧洲专利 0 339 667 (Chemo Sero)描述了使一种甲型肝炎抗原和一种乙型肝炎抗原混合而制造一种联合疫苗的一般概念。在该说明书中, 据说所使用的佐剂不是关键性的: 它应当仅能够增强免疫活性至所需程度而不引起任何副作用。认为可以使用铝凝胶, 特别是氢氧化铝凝胶和磷酸铝凝胶。

按照本发明的疫苗组合物可包括一种 HAV 抗原或一种 HBV 抗原, 或者可更优选包括一种 HAV 抗原和一种 HBV 抗原两者的组合, 还可包含所述的 HPV 抗原和 HSV 抗原。

这样的疫苗给予青少年是非常有益的, 青少年可能尤其有 HSV 和/或 HPV 感染、和/或 HAV 感染、和/或 HBV 感染的危险。

免疫应答可以大致分成两个极端类型: 体液免疫应答或细胞介导的免疫应答(传统上分别根据保护作用的抗体机制和细胞效应物机制来加以鉴定)。已把这些类型的应答称为 TH1 型应答(细胞介导的应答)和 TH2 型免疫应答(体液应答)。

可根据抗原特异性的单倍型限制的细胞毒性 T 淋巴细胞的产生以及天然杀伤性细胞的应答, 来鉴定极端的 TH1 型免疫应答。就小鼠而论, 通常根据 IgG2a 亚型抗体的产生来鉴定 TH1 型应答; 而就人类而言, 这

些对应于 IgG1 型抗体。TH2 型免疫应答的特征在于产生一系列免疫球蛋白的同种型，在小鼠中包括 IgG1。

可以认为，这两种类型免疫应答发生的推动力是细胞因子。高水平的 TH1 型细胞因子往往会有助于诱导细胞介导的、对特定抗原的免疫应答；而高水平的 TH2 型细胞因子往往会有助于诱导针对所述抗原的体液免疫应答。

TH1 型免疫应答和 TH2 型免疫应答的区别不是绝对的。事实上，个体将支持被称作主要是 TH1 或主要是 TH2 的免疫应答。无论如何，根据由 Mosmann 和 Coffman (*Mosmann, T.R. 和 Coffman, R.L. (1989) TH1 和 TH2 细胞: 不同的淋巴因子分泌型式导致不同的功能特性。Annual Review of Immunology, 7, 第 145-173 页*)就鼠 CD4 +ve T 细胞克隆描述的内容，考察细胞因子家族通常是方便的。传统上，TH1 型应答与由 T-淋巴细胞产生细胞因子干扰素- $\gamma$  有关。通常与诱导 TH1 型免疫应答直接相关的其它细胞因子不是由 T-细胞产生的；所述细胞因子例如 IL-12。比较起来，TH2 型应答与 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) 的分泌有关。

已知某些疫苗佐剂特别适合于激发 TH1 型细胞因子应答或 TH2 型细胞因子应答。传统上，接种或感染之后免疫应答的 TH1: TH2 平衡的最佳指标包括：在用抗原再刺激后，由 T 淋巴细胞在体外产生 TH1 细胞因子或 TH2 细胞因子的直接测量结果；和/或抗原特异性抗体应答的 IgG1: IgG2a 之比率的测量结果(至少就小鼠而论)。

因此，TH1 型佐剂是这样一种物质，当在体外用抗原再刺激后，该物质刺激分离的 T-淋巴细胞群体产生高水平的 TH1 型细胞因子，并且诱发与 TH1 型同种型有关的抗原特异性免疫球蛋白应答。

在国际专利申请第 WO 94/00153 号和第 WO 95/17209 号中描述了能够优先刺激 TH1 细胞应答的佐剂。

3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A (monophosphoryl lipid A)(3D-MPL)就是一种这样的佐剂。可从 GB 2220211 (Ribi)了解这种佐剂。在化学上，它

是一种具有 4、5 或 6 条酰化链的 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 的混合物，由 Ribi Immunochem Montana 制造。在欧洲专利 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) 中公开了 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A 的一种优选形式。

3D-MPL 的微粒最好是小到足以通过一张 0.22 微米的膜而被过滤除菌(如在欧洲专利第 0 689 454 号中所述)。3D-MPL 将以每剂 10 $\mu$ g - 100 $\mu$ g、且优选 25 $\mu$ g - 50 $\mu$ g 的范围存在，其中所述抗原一般将以每剂 2-50 $\mu$ g 的范围存在。

另一种优选的佐剂包含一种来源于皂树 *Quillaja Saponaria Molina* 树皮、经 Hplc 纯化的无毒级分 QS21。可任意选择地将这种 QS21 与 3 脱-O-酰化单磷酸基脂质 A (3D-MPL) 和任选的一种载体混合。

在美国专利第 5,057,540 号中公开了 QS21 的生产方法。

先前已描述了包含 QS21 的非反应原性佐剂制剂(WO 96/33739)。已经证明：当与一种抗原一起配制这样的包含 QS21 和胆固醇的制剂时，这样的制剂是成功的 TH1 激发佐剂。因此，构成本发明一部分的疫苗组合物可包括 QS21 和胆固醇的组合。

作为 TH1 细胞应答优先刺激物的另外的佐剂包括免疫调节寡核苷酸，例如在 WO 96/02555 中公开的未甲基化的 CpG 序列。

当提供一种作为 TH1 细胞应答之优先刺激物的佐剂的时候，也考虑了不同的 TH1 激发佐剂(例如在上文提到的那些佐剂)的组合。例如，QS21 可以与 3D-MPL 一起配制。QS21:3D-MPL 的比率一般将约为 1:10 至 10:1，优选 1:5 至 5:1，且通常大体上为 1:1。适合于最适协同作用的优选范围是 2.5:1 至 1:1 的 3D-MPL:QS21。

在根据本发明的疫苗组合物中最好也存在一种载体。所述载体可以是一种水包油乳状液，或是一种诸如磷酸铝或氢氧化铝之类的铝盐。

一种优选的水包油乳状液包含一种可代谢的油，例如角鲨烯、 $\alpha$ -生育酚和吐温 80。另外，所述水包油乳状液可包含 span 85 和/或卵磷脂和/或甘油三辛酸酯。



在一个特别优选的方面，将根据本发明的疫苗组合物中的抗原与3D-MPL及明矾混合。

通常，对于给予人类，QS21和3D-MPL将以每剂1 $\mu$ g - 200 $\mu$ g的范围存在于疫苗中；例如它们将以每剂10-100 $\mu$ g且优选每剂10-50 $\mu$ g的范围存在于疫苗中。通常，所述的水包油将包含2-10%的角鲨烯、2-10%的 $\alpha$ -生育酚和0.3-3%的吐温80。角鲨烯: $\alpha$ -生育酚的优选比率等于1或小于1，因为这提供更稳定的乳状液。span 85也可以以1%的水平存在。在某些情况下，本发明的疫苗还包含一种稳定剂可能是有益的。

无毒的水包油乳状液最好包含在水性载体中的一种例如角鲨烯或角鲨烷的无毒油、一种例如吐温80的乳化剂。该水性载体可以例如是磷酸缓冲盐溶液。

在WO 95/17210中描述了在一种水包油乳状液中包含QS21、3D-MPL和生育酚的一种特别有效的佐剂制剂。

本发明组合物中的所述HPV抗原最好来源于：HPV 16和/或HPV 18、或者HPV 6和/或HPV 11、或者HPV 31、HPV 33或HPV 45。

在一个优选的实施方案中，按照本发明的疫苗组合物中的所述HPV抗原包含HPV的主要衣壳蛋白L1，且可任选地包含L2蛋白，特别是来自HPV 16和/或HPV 18的上述蛋白。在这个实施方案中，L1蛋白的优选形式是截短的L1蛋白。该L1（可任选地在L1-L2融合体中）最好是呈病毒样颗粒(VLP)的形式。可以将所述L1蛋白融合到另一种HPV蛋白上，尤其是融合到E7上，从而形成L1-E7融合体。特别优选包括L1-E或L1-L2-E的嵌合病毒样颗粒。

在另一个优选的实施方案中，本发明组合物中的所述HPV抗原来源于E6蛋白或E7蛋白，特别是来源于连接到一种具有T细胞表位的免疫融合配偶体上的E6或E7。

在本发明这个实施方案的一种优选形式中，所述免疫融合配偶体来源于流感嗜血菌B (*Haemophilus influenzae* B)的蛋白D。所述蛋白D的衍生物最好包含该蛋白大约前1/3，尤其是包含N-末端的约前100-110个氨

基酸。

在本发明这个实施方案中的优选融合蛋白包括：蛋白 D-来自 HPV 16 的 E6、蛋白 D-来自 HPV 16 的 E7、蛋白 D-来自 HPV 18 的 E7 和蛋白 D-来自 HPV 18 的 E6。所述蛋白 D 部分最好包含蛋白 D 的前 1/3。

在本发明的再一个实施方案中，所述 HPV 抗原呈 L2-E7 融合体的形式，特别是来自 HPV 6 和/或 HPV 11 的 L2-E7 融合体。

优选在大肠杆菌中表达本发明的蛋白。在一个优选的实施方案中，表达具有组氨酸尾的所述蛋白，所述组氨酸尾包含 5-9 个组氨酸残基，优选包含 6 个组氨酸残基。这些组氨酸残基在帮助纯化方面是有益的。在同时待审的 GB 9717953.5 号英国专利申请中，全面描述了这样蛋白的制造说明。

可以使所述疫苗组合物中的 HPV 抗原吸附到  $Al(OH)_3$  上。

本发明组合物中的 HSV 抗原最好来源于 HSV-2，通常为糖蛋白 D。糖蛋白 D 位于该病毒的膜上，也可见于受感染细胞的细胞质中(Eisenberg R.J. 等, J of Virol 1980, 35, 428-435)。它由 393 个氨基酸组成，包括一段信号肽，分子量大约为 60 kD。在所有的 HSV 被膜糖蛋白中，这种糖蛋白大概是表征得最为清楚的(Cohen 等, J. of Virology 60, 157-166)。在体内，已知糖蛋白 D 在病毒附着到细胞膜方面起重要作用。此外，已表明糖蛋白 D 能够在体内激发中和抗体(Eing 等, J. Med. Virology 127: 59-65)。然而，尽管在所述患者的血清中存在高水平的中和抗体，但潜伏的 HSV-2 病毒仍可被再激活并诱导该病复发。

在本发明的一个优选实施方案中，所述 HSV 抗原是一种截短的、308 个氨基酸的 HSV-2 糖蛋白 D，所述糖蛋白 D 包括天然存在的糖蛋白的 1 至 306 号氨基酸，并且在缺乏其膜锚区的该截短蛋白之 C 末端添加天冬酰胺及谷氨酰胺。所述蛋白的这种形式包括信号肽；切去该信号肽，则产生一种 283 个氨基酸的成熟蛋白。在 Genentech 的欧洲专利 EP-B-139 417 里描述了在中国仓鼠卵巢细胞中产生一种这样的蛋白。

在本发明的疫苗制剂中，优选使用重组的成熟 HSV-2 糖蛋白 D 的

截短物，且将其称为 rgD2t。

在 WO 92/16231 中描述了与佐剂 3D-MPL 联合的这种 HSV-2 抗原的组合。

如果在本发明的组合物中包括一种乙型肝炎病毒(HBV)抗原，则这抗原一般是乙型肝炎表面抗原。

已有大量的文献资料记载了乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的制备。参见：例如，Harford 等，*Develop. Biol. Standard* 54，第 125 页(1983)；Gregg 等，*Biotechnology* 5，第 479 页(1987)；EP-A-0 226 846；EP-A-0 299 108 以及在其中的参考文献。

当用于本文时，在本文缩写成 ‘HBsAg’ 或 ‘HBS’ 的表述 ‘乙型肝炎表面抗原’，包括任一 HBsAg 抗原或显示 HBV 表面抗原之抗原性的其片段。人们会明白：除了 226 个氨基酸序列的 HBsAg S 抗原(参见：Tiollais 等，*Nature*, 317, 489 (1985)以及在其中的参考文献)外，如果需要，本文描述的 HBsAg 可包含在上面参考文献中和在 EP-A-0 278 940 中描述的完整的或部分的前-S 序列。本文描述的 HBsAg 也可指变异体，例如在 WO 91/14703 中描述的 ‘逃逸(escape)突变体’。在另一个方面，所述 HBsAg 可包含一种在欧洲专利申请第 0 414 374 号中描述为 L\* 的蛋白，亦即这样一种蛋白，其氨基酸序列由乙型肝炎病毒大(L)蛋白(ad 亚型或 ay 亚型)氨基酸序列的多个部分组成，其特征在于该蛋白的氨基酸序列由以下任一个组成：

(a) 所述 L 蛋白的残基 12-52，后接残基 133-145，再后接残基 175-400；

(b) 所述 L 蛋白的残基 12，后接残基 14-52，后接残基 133-145，再后接残基 175-400。

HBsAg 也可指在 EP 0 198 474 或 EP 0 304 578 中描述的多肽。

所述 HBsAg 通常呈颗粒状态。它可以只包含 S 蛋白，或者可作为复合颗粒，例如(L\*,S)，其中 L\*是如同上文释义的且 S 表示乙型肝炎表面抗原之 S-蛋白。

可以如 WO 93/24148 中描述的, 使该 HBsAg 吸附于磷酸铝。

用于本发明制剂中的乙型肝炎(HBV)抗原最好是用于商品 Engerix-B (商标; SmithKline Beecham Biologicals)中的 HBsAg S-抗原。

在欧洲专利申请 0 633 784 中描述了一种包含与 3D-MPL 结合的乙型肝炎表面抗原的疫苗。

现在描述来自另外病原体的、可被包含在按照本发明之组合物中的抗原的实例。

作为疱疹病毒群中一员的 EB 病毒(EBV)在人类中引起作为原发性疾病的传染性单核细胞增多症。它主要影响儿童或年轻人。普通成人人口的 90%以上被 EBV 感染, EBV 终身存留在外周 B-淋巴细胞中。该病毒终身在腮腺中产生, 且主要通过来自排出该病毒个体的唾液交换而传播。感染 EBV 的儿童大部分是无症状的或有很轻微的症状, 而被感染的青少年和成人则产生典型的传染性单核细胞增多症, 其特征为发热、咽炎以及腺病。已被感染的人在他们的生命的剩余时间里保持抗-EBV 的抗体, 因此对进一步的感染是免疫的。

除了 EBV 的传染特性外, 已证明 EBV 使淋巴细胞转变成快速分裂的细胞, 因此与包括非洲伯基特淋巴瘤(BL)在内的几种不同的淋巴瘤有关。EBV 也可参与引起鼻咽癌(NPC)。在世界范围内, 估计有 80,000 鼻咽癌病例发生, 且鼻咽癌在人种学的中国人种群中是更普遍的。传染性单核细胞增多症是 EBV 原发性感染的结果。如果不存在另外的危险因素, 则传染性单核细胞增多症不是威胁生命的疾病。

已描述了构成 EBV 病毒被膜的、所谓膜抗原复合物的四种蛋白。通常将它们称为 gp 220/350 或 gp 250/350 或者简称为 gp 250 或 gp 350 (参见 EP-A-151079)。有令人信服的证据表明, gp 350 和 gp 250 诱导中和抗体的产生, 且针对 gp 350 和 gp 250 的抗体具有中和能力。因此, 这些蛋白是可能的 EBV 疫苗的候选物。有关 gp 250/350 在预防和治疗与 EBV 相关疾病方面之应用的进一步资料, 参见 EP 0 173 254。

主要的 EBV 表面糖蛋白 gp350/220 通过与细胞膜蛋白 CD21 相互作

用而感染人的靶细胞。在人体中，gp350/220 是 EBV 中和抗体的主要靶，且已表明 gp350/220 的某些形式保护人类抵抗 EBV 相关疾病。虽然可使用其它的保护性抗原，但按照本发明的疫苗组合物最好包含 EBV 的 gp350。

在一个优选的方面，本发明疫苗组合物另外包括一种水痘带状疱疹病毒抗原(VZV 抗原)。适合于在所述疫苗组合物中包含的 VZV 的抗原包括由 Longnecker 等描述的 gpI-V (Longnecker 等, Prog Natl Acad Sci USA 84, 4303-4307 (1987))。

在一个优选的实施方案中，使用 gpI (参见 Ellis 等，美国专利 4,769,239)。也参见 0 405 867 B1 号欧洲专利。

在另一个优选方面，本发明的疫苗组合物另外包括人巨细胞病毒(HCMV)抗原。HCMV 是一种属于疱疹病毒科的、人 DNA 病毒。在世界的大多数地方，HCMV 是地方病的病毒。在两种群体之中，HCMV 导致严重的医学疾病。HCMV 是新生儿中先天缺陷的一个主要原因。有危险的第二个群体是免疫妥协患者，例如受到 HIV 感染的那些患者和经受移植的那些患者。临床上该病引起各种各样的症状，包括发热、肝炎、肺炎和传染性单核细胞增多症。可供针对 HCMV 的疫苗用的一种优选抗原是 WO 95/31555 中描述的 gB685\*\*。在 WO 94/00150 (City of Hope)中描述的一种 HCMV 基质蛋白 pp65 也提供可供 HCMV 疫苗用的免疫原。

在一个优选的方面，本发明的疫苗组合物另外包含一种 VZV 抗原和一种 HCMV 抗原两者，特别是上面描述的那些抗原。

在另一个优选的方面，本发明的疫苗组合物另外包含一种鼠弓形体(*Toxoplasma gondii*)抗原。鼠弓形体是一种在包括人类在内的温血动物中引起弓形体病的专性细胞内原生动植物寄生物。虽然它在健康个体中通常是无临床症状的；但在怀孕妇女和免疫妥协患者中，弓形体病可以引起严重的并发症。用于针对鼠弓形体的疫苗的一种优选抗原是在 WO96/02654 中描述的 SAG1 (也称为 P30)或是在 WO92/11366 中描述的 Tg34。

在一个优选的方面，本发明的疫苗组合物另外包括和一种鼠弓形体抗原联合的一种 VZV 抗原或一种 HCMV 抗原，特别是上面描述的那些抗原。

在一个优选方面，本发明疫苗组合物是一种多价疫苗，例如一种四价疫苗或一种五价疫苗。

在诱发保护性免疫方面，甚至用很低剂量的抗原(例如低到 5  $\mu\text{g}$  的 rgD2t)，本发明的制剂也是非常有效的。

它们提供针对原发性感染的极好保护，且有利地既刺激特异性的体液(中和抗体)免疫应答、又刺激效应细胞介导的(DTH)免疫应答。

在另一个方面，本发明提供一种本文描述的、供医学治疗之用的疫苗制剂，特别是提供供治疗或预防人乳头瘤病毒感染及单纯疱疹病毒感染之用的疫苗制剂。

本发明的疫苗将包含免疫保护量的所述抗原，且可以用常规技术来制备本发明的疫苗。

在 *Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61, Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach*, Powell 和 Newman 编辑, Plenum Press, 1995 中，以及在 *New Trends and Developments in Vaccines*, Voller 等编辑, University Park Press, Baltimore, Maryland, 美国, 1978 中，全面地描述了疫苗的制备。例如，Fullerton 的美国专利 4,235,877 描述了在脂质体内的包封。例如，Likhite 的美国专利 4,372,945 和 Armor 等的美国专利 4,474,757 公开了将蛋白结合到大分子上。

每剂疫苗中的蛋白量选择为在典型的疫苗中诱发免疫保护性应答而无显著不良副作用的量。这样的量将根据使用哪一种特定的免疫原而变化。通常，预期每一剂将包含 1-1000 $\mu\text{g}$  的蛋白，优选 2-100 $\mu\text{g}$ ，最优选包含 4-40 $\mu\text{g}$  的蛋白。可通过涉及观测抗体效价及受接种者的其它反应的标准研究，来确定特定疫苗的最适量。在初次接种以后，受接种者可过大约 4 周接受一次加强。

除了为易患 HPV 感染或 HSV 感染的人接种外，可用本发明的药用

组合物来免疫治疗性地治疗受到所述病毒感染的患者。

在本发明的再一个方面，提供一种本文描述的制造方法，其中该方法包括：将一种人乳头瘤病毒抗原及一种单纯疱疹病毒抗原与例如 3D-MPL 的一种 TH1 诱发佐剂混合，且优选与例如明矾的一种载体混合。

如果需要，可以以任何方便的顺序来添加其它的抗原，从而提供本文描述的多价疫苗组合物。

下面的实施例阐明了本发明，但不限制本发明。

### 实施例 1: 用 AS04 配制的单价疫苗或联合疫苗中的 HPV 抗原/HBs/gD 之相当的免疫原性

#### 引言

采用预先吸附于  $\text{Al}(\text{OH})_3$  或  $\text{AlPO}_4$  上的抗原或 3D-MPL 的整体式材料(monobulks)，将以下四种不同的抗原与明矾/3D-MPL (AS04)一起配制：

1. HPV16 L1 病毒样颗粒(VLP-16)，
2. HPV18 L1 病毒样颗粒(VLP-18)，
3. HSV-2 的 gD 抗原，
4. HBsAg，

用所配制的抗原在 Balb/C 小鼠体内进行免疫原性研究。

将 3D-MPL/ $\text{Al}(\text{OH})_3$  制剂称为 AS04D，而将基于 3D-MPL/ $\text{AlPO}_4$  的制剂称为 AS04C。

评价下面的疫苗：

1. VLP16 + VLP18 AS04D，
2. gD AS04D，
3. HBs AS04C；

并评价组合这些疫苗的潜力。

本实验的目的是比较两种不同 AS04 组合的免疫原性；所述组合是用

- 1) VLP16 + VLP18 与 gD、

## 2) VLP16 + VLP18 与 gD 及 HBs Ag

中的任一种制造的。

在材料与方法一节中全面地描述了所述实验方案。

总之，用基于不同抗原的制剂，以3周的间隔为各组小鼠肌肉内免疫两次，每组10只小鼠。在第二次免疫后第14天，通过ELISA，来监测通过接种诱导的针对病毒样颗粒、gD和乙型肝炎表面抗原的抗体应答以及同种型的分布型。在同一时间点，在体外用或者VLP抗原、gD抗原或者HBs抗原再刺激脾细胞后，分析所述细胞因子的产生(干扰素 $\gamma$ /IL5)。

## 材料与方法

### 制剂

#### 制剂组合物

用在铝盐上的3D-MPL配制的VLP16、VLP18、gD及HBs。

#### 所用的成分

成分	浓度	缓冲液
HPV 16 VLP	560 $\mu\text{g/ml}$	Tris 20 mM/NaCl 500 mM
HPV 18 VLP	550 $\mu\text{g/ml}$	NaCl 500 mM/NaPO <sub>4</sub> 20 mM
Al(OH) <sub>3</sub>	10380 $\mu\text{g/ml}$	H <sub>2</sub> O
HBs	1219 $\mu\text{g/ml}$	PO <sub>4</sub> 10 mM/ NaCl 150 mM
gD	443 $\mu\text{g/ml}$	pH 7.4 的 PBS
3D-MPL	1170 $\mu\text{g/ml}$	注射用水
AlPO <sub>4</sub>	5 mg/ml	NaCl 150 mM

### 吸附

#### a) *VLP* 的吸附

将纯化的VLP 16和VLP18材料(bulk)添加到Al(OH)<sub>3</sub>中，从而达到



2  $\mu\text{g}$  VLP/10  $\mu\text{g}$   $\text{Al}(\text{OH})_3$  的比率。把该混合物贮藏在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  之间直到最后的配制为止。

*b) gD 的吸附*

将 2  $\mu\text{g}$  gD 与 10  $\mu\text{g}$   $\text{Al}(\text{OH})_3$  混合。将这种混合物贮藏在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  之间直至最后的配制为止。

*c) HBs 的吸附*

将 2  $\mu\text{g}$  HBs 与 10  $\mu\text{g}$   $\text{AlPO}_4$  混合。将这种混合物贮藏在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  之间直至最后的配制为止。

*d) 3D-MPL 的吸附*

将 5  $\mu\text{g}$  3D-MPL 与 10  $\mu\text{g}$   $\text{Al}(\text{OH})_3$  混合。将这种混合物贮藏在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  之间直至最后的配制为止。

将 5  $\mu\text{g}$  3D-MPL 与 10  $\mu\text{g}$   $\text{AlPO}_4$  混合。将这种混合物贮藏在 2-8 $^{\circ}\text{C}$  之间直至最后的配制为止。

配制

混合水和 NaCl (10x 浓缩的), 在室温下搅拌 10 分钟后, 添加不同的成分: 吸附的抗原、吸附的 3D-MPL 和  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (参见下表)。在室温下将它们摇动 10 分钟并贮藏在 4 $^{\circ}\text{C}$ , 直至注射为止。

组别	抗原		免疫刺激剂		载体	
	类型	μg	类型	μg	类型	μg
A	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP16	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP18	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
B	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP16	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP18	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
	HBs	2			AlPO <sub>4</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
C	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	30
D	VLP16	2	3D-MPL	5	Al(OH) <sub>3</sub>	10
	VLP18	2			Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	20
E	HBs	2	3D-MPL	5	AlPO <sub>4</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	10
					Al(OH) <sub>3</sub>	30

### 小鼠血清学

#### 抗 VLP-16 和抗 VLP-18 的血清学

用 VLP16 503/1 (20/12/99)和 VLP18 504/2 (25/10/99F)作为包被抗原, 通过 ELISA 完成抗 VLP16 抗体和抗 VLP18 抗体的定量。以每孔 50 μl 的量使用抗原溶液和抗体溶液。以 0.5 μg/ml 的终浓度, 用 PBS 稀释所述抗原, 且在 4℃ 使该抗原过夜吸附到 96 孔微量滴定板(Maxisorb

Immuno-plate, Nunc, 丹麦)的各孔中。然后,使所述板与包含1%牛血清白蛋白的PBS在37℃保温1小时。把血清在饱和缓冲液中的2倍稀释液(以1/400的稀释液开始)添加到所述VLP包被板上,并在37℃将其保温1小时30分钟。用PBS 0.1%吐温-20洗涤所述板四次,并往每个孔中添加用饱和缓冲液以1/1500稀释的结合生物素的抗小鼠Ig(Amersham, UK),且在37℃将其保温1小时30分钟。在一个洗涤步骤之后,加入用饱和缓冲液以1/1000稀释的链霉抗生物素蛋白-生物素标记的过氧化物酶复合物(Amersham, UK),并在37℃再保温30分钟。如上所述洗涤所述板,并将其与一种溶液保温20分钟,所述溶液为0.04%的邻苯二胺(Sigma)和0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶于0.1%吐温-20 0.05 M 柠檬酸盐缓冲液pH 4.5中的溶液。用2 N的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止该反应,并在490/630 nm读数。用SoftmaxPro(用一个四参数方程),根据参比来计算ELISA效价,并以EU/ml表示。

#### 抗gD应答:

运用gD(gD 43B318)作为包被抗原,通过ELISA完成抗gD抗体的定量。以每孔50 μl的量使用抗原溶液和抗体溶液。以1 μg/ml的终浓度,用PBS稀释该抗原,且在4℃使该抗原过夜吸附到96孔微量滴定板(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, 丹麦)的各孔中。然后,使所述板与包含1%牛血清白蛋白和0.1%吐温-20的PBS(饱和缓冲液,100 μl/孔)在37℃保温1小时。把血清在饱和缓冲液中的2倍稀释液(以1/100的稀释液开始)添加到gD包被板上,并在37℃将其保温1小时30分钟。用PBS 0.1%吐温-20洗涤所述板四次,并往每个孔中添加用饱和缓冲液以1/1000稀释的结合生物素的抗小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或Ig(Amersham, UK);且在37℃将其保温1小时30分钟。在一个洗涤步骤之后,加入用饱和缓冲液以1/1000稀释的链霉抗生物素蛋白-生物素标记的过氧化物酶复合物(Amersham, UK),并在37℃再保温30分钟。如上所述洗涤所述板,并将其与一种溶液保温20分钟,所述溶液为0.04%的邻苯二胺(Sigma)和0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶于0.1%吐温-20 0.05 M 柠檬酸盐缓冲液pH 4.5中的溶

液。用 2 N 的  $H_2SO_4$  终止该反应,并在 490/630 nm 读数。用 SoftmaxPro (用一个四参数方程), 根据参比来计算 ELISA 效价, 并以 EU/ml 表示。

### 抗 HBs 血清学

运用 HBs (Hep 286) 作为包被抗原, 通过 ELISA 完成抗 HBs 抗体的定量。以每孔 50  $\mu$ l 的量使用抗原溶液和抗体溶液。以 1  $\mu$ g/ml 的终浓度, 用 PBS 稀释该抗原, 且在 4 $^{\circ}$ C 使该抗原过夜吸附到 96 孔微量滴定板 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, 丹麦) 的各孔中。然后, 使所述板与包含 1% 牛血清白蛋白和 0.1% 吐温-20 的 PBS (饱和缓冲液) 在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。把血清在饱和缓冲液中的 2 倍稀释液 (以 1/100 的稀释开始) 添加到 HBs 包被板上, 并在 37 $^{\circ}$ C 将其保温 1 小时 30 分钟。用含有 0.1% 吐温-20 的 PBS 洗涤所述板四次, 并往每个孔中添加用饱和缓冲液以 1/1500 稀释的结合生物素的抗小鼠 Ig (Amersham, UK), 或添加用饱和缓冲液分别以 1/4000、1/8000、1/4000 稀释的 IgG1、IgG2a、IgG2b (IMTECH, 美国); 且在 37 $^{\circ}$ C 将其保温 1 小时 30 分钟。在一个洗涤步骤之后, 加入用饱和缓冲液以 1/1000 稀释的链霉抗生物素蛋白-生物素标记的过氧化物酶复合物 (Amersham, UK), 并在 37 $^{\circ}$ C 再保温 30 分钟。如上所述洗涤所述板, 并将其与一种溶液保温 20 分钟, 所述溶液为 0.04% 的邻苯二胺 (Sigma) 和 0.03%  $H_2O_2$  溶于 0.1% 吐温-20 0.05 M 柠檬酸盐缓冲液 pH 4.5 中的溶液。用 2 N 的  $H_2SO_4$  终止该反应, 并在 490/630 nm 读数。用 SoftmaxPro (用一个四参数方程), 根据参比来计算 ELISA 效价, 并以 EU/ml 表示。

### 细胞因子的产生

在第二次免疫后两周, 杀死小鼠, 无菌地切取脾脏并将其汇集。用包含 2 mM L-谷氨酰胺、抗生素、 $5 \times 10^{-5}$  M 的 2-巯基乙醇以及 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 (GIBCO), 来制备细胞悬浮液。在具有不同浓度 (10-1  $\mu$ g/ml) 的各种抗原 (VLP 抗原、E7 抗原或 HBs 抗原) 的平底 24 孔板上, 在 1 ml 中, 以  $5 \times 10^6$  个细胞/ml 的终浓度培养细胞。96 小时后收获

上清液；并使其冷冻，直到通过 ELISA 检验干扰素 $\gamma$ 和 IL5 的存在。

### 干扰素 $\gamma$ (Genzyme)

用来自 Genzyme 的试剂，通过 ELISA 进行干扰素 $\gamma$ 的定量测定。以每孔 50  $\mu$ l 的量使用样品溶液和抗体溶液。在 4 $^{\circ}$ C，用 50  $\mu$ l 在 pH 9.5 碳酸盐缓冲液中以 1.5  $\mu$ g/ml 稀释的仓鼠抗小鼠干扰素 $\gamma$ 包被 96 孔微量滴定板(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, 丹麦)过夜。然后，使所述板与 100  $\mu$ l 包含 1%牛血清白蛋白和 0.1%吐温-20 的 PBS (饱和缓冲液)在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。把得自体外刺激的上清液在饱和缓冲液中的 2 倍稀释液(以 1/2 开始)添加到抗-干扰素 $\gamma$ 包被板上，并在 37 $^{\circ}$ C 将其保温 1 小时 30 分钟。用包含 0.1%吐温的 PBS (洗涤缓冲液)洗涤所述板四次，并往每个孔中添加用饱和缓冲液以 0.5  $\mu$ g/ml 之终浓度稀释的结合生物素的山羊抗小鼠干扰素 $\gamma$ ，且在 37 $^{\circ}$ C 将其保温 1 小时。在一个洗涤步骤之后，在 37 $^{\circ}$ C，加入用饱和缓冲液以 1/10000 稀释的 AMDEX 缀合物(Amersham)达 30 分钟。如上所述洗涤所述板，并将其与 50  $\mu$ l TMB (Bioard)保温 10 分钟。用 0.4 N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止该反应，并在 450/630 nm 读数。用 SoftmaxPro (四参数方程)，利用标准曲线(小鼠干扰素 $\gamma$ 标准)来计算浓度，并以 pg/ml 表示。

### IL5 (Pharmingen)

用来自 Pharmingen 的试剂，通过 ELISA 进行 IL5 的定量测定。以每孔 50  $\mu$ l 的量使用样品溶液和抗体溶液。在 4 $^{\circ}$ C，用 50  $\mu$ l 在 pH 9.5 碳酸盐缓冲液中以 1  $\mu$ g/ml 稀释的大鼠抗小鼠 IL5 包被 96 孔微量滴定板(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, 丹麦)过夜。然后，使所述板与 100  $\mu$ l 包含 1%牛血清白蛋白和 0.1%吐温-20 的 PBS (饱和缓冲液)在 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。把得自体外在饱和缓冲液中刺激的上清液的 2 倍稀释液(以 1/2 开始)添加到抗-IL5 包被板上，并在 37 $^{\circ}$ C 将其保温 1 小时 30 分钟。用包含 0.1%吐温的 PBS (洗涤缓冲液)洗涤所述板四次，并往每个孔中添加用饱和缓冲液以 1  $\mu$ g/ml 之终浓度稀释的结合生物素的大鼠抗小鼠 IL5；且在 37

℃将其保温1小时。在一个洗涤步骤之后，在37℃，加入用饱和缓冲液以1/10000稀释的AMDEX缀合物(Amersham)达30分钟。如上所述洗涤所述板，并将其与50 μl TMB (Bioard)保温15分钟。用0.4 N的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止该反应，并在450/630 nm读数。用SoftmaxPro (四参数方程)，利用标准曲线(重组的小鼠IL-5)来计算浓度，并以pg/ml表示。

### 组别

用下面制剂对10只一组的各组Balb/C小鼠进行肌肉免疫。

表1: 组别与制剂

组别	制剂
A	VLP16 2μg /VLP18 2μg /gD 2μg /3D-MPL 5μg /Al(OH) <sub>3</sub> 50μg
B	VLP16 2μg /VLP18 2μg / HBs 2μg / gD 2μg / 3D-MPL 5μg / Al(OH) <sub>3</sub> 40μg / AlPO <sub>4</sub> 10μg
C	gD 2μg / 3D-MPL 5μg / Al(OH) <sub>3</sub> 50μg
D	VL16 2μg / VL18 2μg / 3D-MPL 5μg / Al(OH) <sub>3</sub> 50μg
E	HBs 2μg / 3D-MPL 5μg / AlPO <sub>4</sub> 10μg / Al(OH) <sub>3</sub> 40μg

在上述“材料与方法”中，描述了制剂的详情。

### 结果

#### 1. 血清学

##### a) 抗VLP16应答:

用VLP16 503-1 (20/12/99)作为包被抗原，通过ELISA测定体液应答(Ig)。分析第二次免疫后第14天的血清。

图1显示了在第二次免疫后第14天对个体血清测定的抗VLP16 Ig抗体应答。

用VLP、gD和HBs Ag的组合(组B)进行免疫后所获得的抗VLP16

之效价,比用或者 VLP 和 gD 的组合(组 A)或者单价 VLP 制剂(组 D)而得到的抗 VLP16 之效价略低(GMT 分别为 27578 对 48105 EU/ml 对 44448 EU/ml)。在统计学分析之前,对各群体使用 T-Grubbs 检验以进行数据排除。为了分析,排除在组 A 和组 D 中的两只无反应小鼠。

运用 Student Newman Keuls 检验,表明在所述各组之间观测到的差异在统计学上是不显著的。

#### **b) 抗 VLP18 应答:**

用 VLP18 504-2 (25/10/99)作为包被抗原,通过 ELISA 测定体液应答(Ig)。分析第二次免疫后第 14 天的血清。

图 2 显示了在第二次免疫后第 14 天对个体血清测定的抗 VLP18 Ig 抗体应答。

用 VLP、gD 和 HBs Ag 的组合(组 B)进行免疫后所获得的抗 VLP18 之效价,与用 VLP 和 gD 的组合(组 A)或单价 VLP 制剂(组 D)而得到的效价在同一数量级上(GMT 分别为 56078 对 88786 EU/ml 对 76991 EU/ml)。

在统计学分析之前,对各群体使用 T-Grubbs 检验以进行数据排除。为了分析,排除在组 A 和组 D 中的不响应的两只无反应小鼠。

采用单因素方差分析检验,表明所观测到的差异在统计学上无显著性。

#### **c) 抗 gD 应答:**

使用 gD 作为包被抗原,通过 ELISA 测定体液应答(Ig 和同种型)。分析第二次免疫后第 14 天的血清。

图 3 显示了在第二次免疫后第 14 天对个体血清测定的抗 gD 的抗体应答。

关于抗 gD 应答,与仅用 gD (组 C)或用 VLP/gD 组合(组 A)相比较,观测到用 VLP/gD/HBs 组合(组 B)获得的 GMT 稍微减少(分别与 32675 EU/ml、27058 EU/ml 相比较, GMT 为 18631 EU/ml)。

在统计学分析之前，对数据排斥的各群体使用 T-Grubbs 试验。为了分析，排除在组 A 中无反应的两只小鼠。

在将第二次免疫后的数据进行对数变换后，对所述抗 gD 的效价进行单因素方差分析检验。在所述三种制剂之间，没观测到统计学显著性差异。

用所汇集的血清分析出的同种型再划分如下：

	同种型再划分(%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
组 A	96	3	2
组 B	96	3	2
组 C	97	1	1

在由所述三种制剂诱导的同种型分布型方面，没观测到差异，如下面表中的报道，在所述 3 个组中主要诱导 IgG1 反应(96-97%的 IgG1)。

#### d) HBs 应答

用 HBsAg (Hep286)作为包被抗原，通过 ELISA 测定体液应答(Ig 和同种型)。在第二次免疫后的第 14 天分析血清。

图 4 显示了在第二次免疫后的第 14 天对个体血清测定的抗 HBs 抗体应答。

与只有 HBs (组 E) 相比，在包含 VLP、gD 及 HBs 抗原的组合组 B 中，观测到微弱的抗 HBs 抗体应答(GMT 为 20536 EU/ml 对 28996 EU/ml)。

在将第二次免疫后的数据进行对数变换后，对所述抗 HBs 的效价进行单因素方差分析检验。使用 Student Newman Keuls 检验，在组 B (VLP/gD/HBs)与组 E (HBs AS04)之间，没观测到统计学显著性差异。

用所汇集的血清分析出的同种型再划分如下，且显示出在 2 个组之



间，没有差异，在所述联合疫苗组中保持一定比例的 IgG2a。

	同种型再划分(%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
组 B	54	24	21
组 E	56	23	21

## 2. 细胞介导的免疫应答

在体外或用 VLP 抗原、gD 抗原或用 HBs 抗原再刺激脾细胞后，在第二次免疫后的第 14 天，评价细胞介导的免疫应答(干扰素 $\gamma$  / IL5 的产生)。对于小鼠的每个组，建立 5 个器官的汇集物。

在上面的“材料与方法”中，全面地描述了这个实验的步骤。

## 3. 细胞因子的产生

### a) 体外用 VLP16 和 VLP18 再刺激

图 5 显示了在体外用 VLP16 再刺激 96 小时后于脾细胞中监测到的细胞因子的产生。

图 6 显示了在体外用 VLP18 再刺激 96 小时后于脾细胞中监测到的细胞因子的产生。

对于用任一种 VLP 抗原的再刺激，采用 10  $\mu\text{g}$  的剂量和 1  $\mu\text{g}$  剂量，没有观测到对两者的细胞因子产生的明确的剂量范围效应。

用所有制剂都观测到明确的 TH1 分布型。

表 2: 在体外用 VLP16 和 VLP18 再刺激后的干扰素- $\gamma$ /IL-5 之比率

干扰素/IL-5 之比率	组 A	组 B	组 D
VLP16 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5.2	8.9	11.8
VLP16 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	15.1	14.3	16.5

干扰素/IL-5 之比率	组 A	组 B	组 D
VLP18 10 $\mu\text{g/ml}$	19.6	11.1	16.1
VLP18 1 $\mu\text{g/ml}$	23.2	14.3	18.2

### b) 体外用 gD 再刺激

图 7 显示了在体外用 gD 抗原再刺激 96 小时后于脾细胞中监测到的细胞因子的产生。

当比较用于再刺激的 10  $\mu\text{g}$  剂量和 1  $\mu\text{g}$  剂量时，没观测到明确的剂量范围效应。

在所有评价的组(单价对联合)中，与指示明确的 TH1 免疫应答分布型的 IL-5 (表 3)相比，以高得多的浓度产生干扰素- $\gamma$ 。

表 3: 在体外用 gD 再刺激后的干扰素- $\gamma$ /IL-5 之比率

干扰素/IL-5 之比率	组 A	组 B	组 C
gD 10 $\mu\text{g/ml}$	6.2	7.2	3.1
gD 1 $\mu\text{g/ml}$	6.2	11.2	2.3

### c) 体外用 HBs 再刺激

图 8 显示了在体外用 HBs 再刺激 96 小时后于脾细胞中监测到的细胞因子的产生。

对于组 B，观测到显著水平的干扰素- $\gamma$ 而非 IL5 的产生。正如在表 2 中所显示的，与组 B 相比，在组 E 中观测到较高水平的干扰素- $\gamma$ 的产生。然而，在未用抗原再刺激、用于对照的组 E (HBs 的单价的)中，观测到干扰素- $\gamma$ 的高本底值。用单价疫苗，则观测到非常高的干扰素- $\gamma$  / IL5 的比率；表明诱发了强 TH1 应答。类似地，用联合疫苗，测定出高的干扰素- $\gamma$  / IL5 之比率；证实了这种制剂同样诱导 TH1 应答的能力。

表 4: 体外用 HBs 再刺激后的干扰素- $\gamma$ /IL-5 的比率

干扰素/IL-5 比率	组 B	组 E
HBs 10 $\mu$ g/ml	15.8	65.3
HBs 1 $\mu$ g/ml	7.6	67.6

### 结论

评价了用 AS04 配制的 VLP/gD 抗原组合或 VLP/gD/HBs 抗原组合在 Balb/C 小鼠体内对免疫原性的影响。

关于血清学分析, 在抗 VLP、抗 gD 和抗 HBs 的血清学中, 没观测到所述抗原组合的干扰。

VLP 与 gD 抗原组合或 VLP、gD 与 HBs 的抗原组合, 不影响由所述 gD 与 HBs 单价疫苗显示的抗体应答的同种型分布型。

在细胞因子评价方面, 用各个联合疫苗组, 则确证了用各种单价疫苗观测到的 TH1 分布型(干扰素- $\gamma$ /IL-5 的比率)。

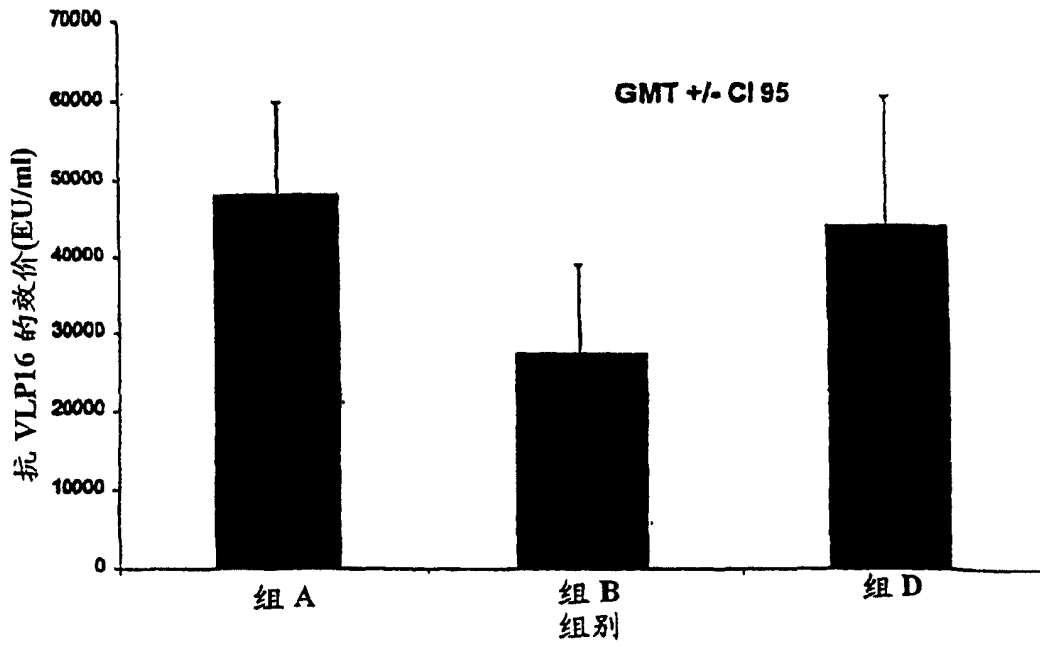


图 1

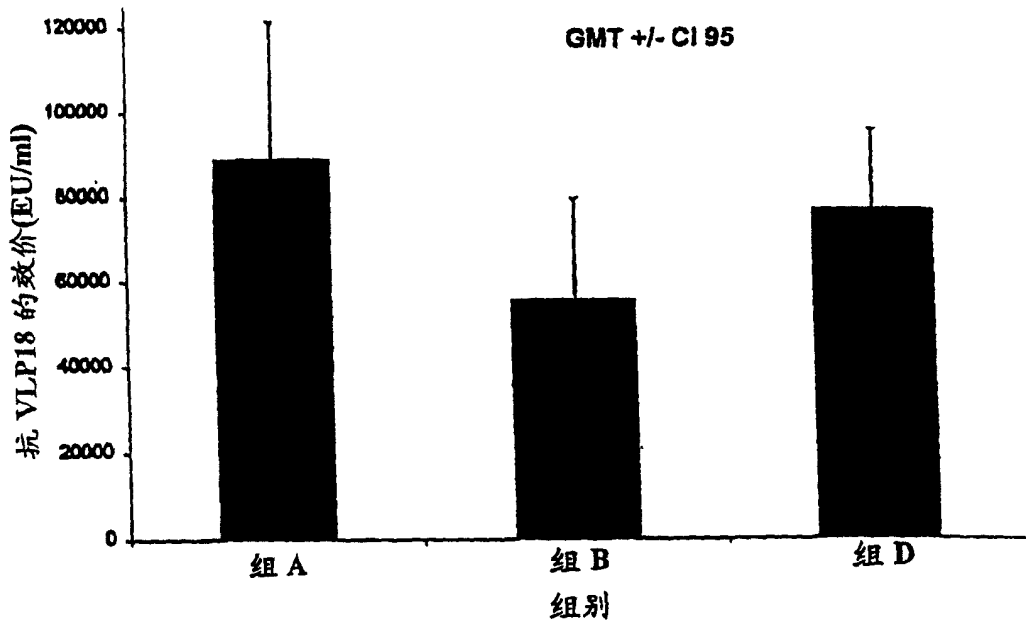


图 2

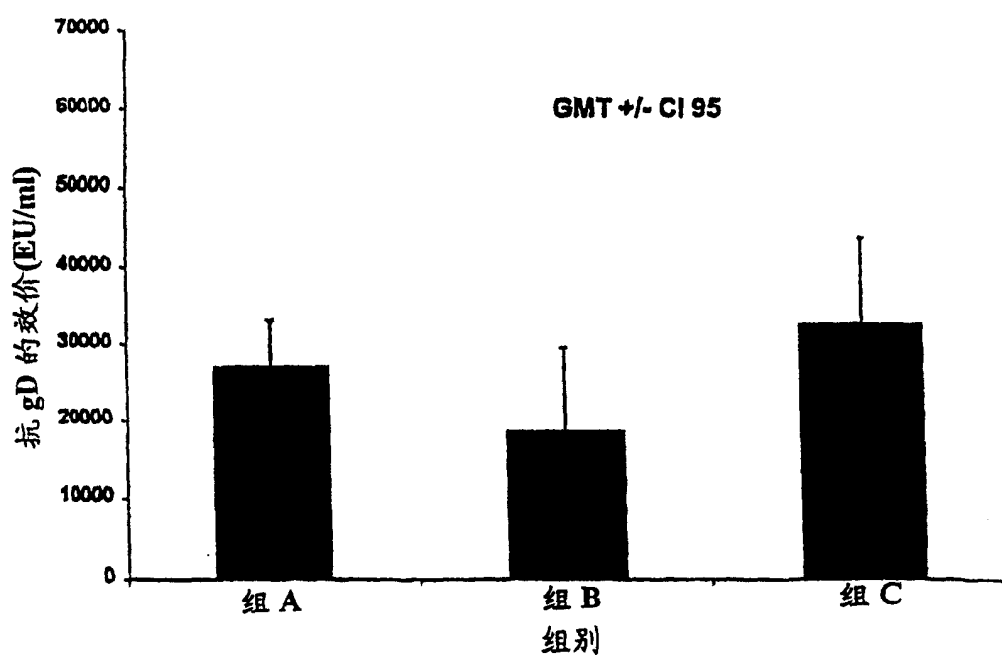


图 3

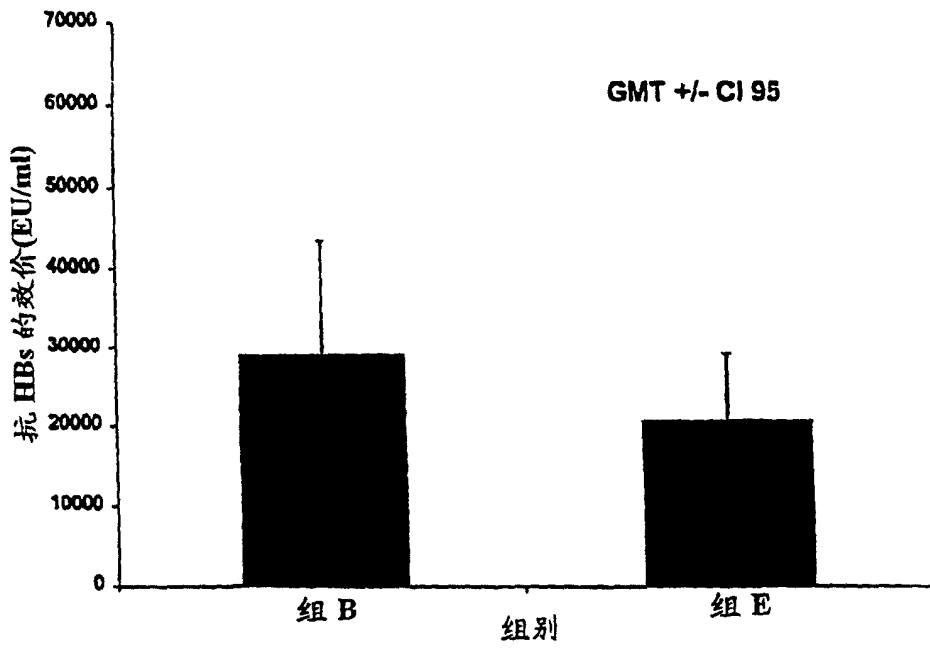
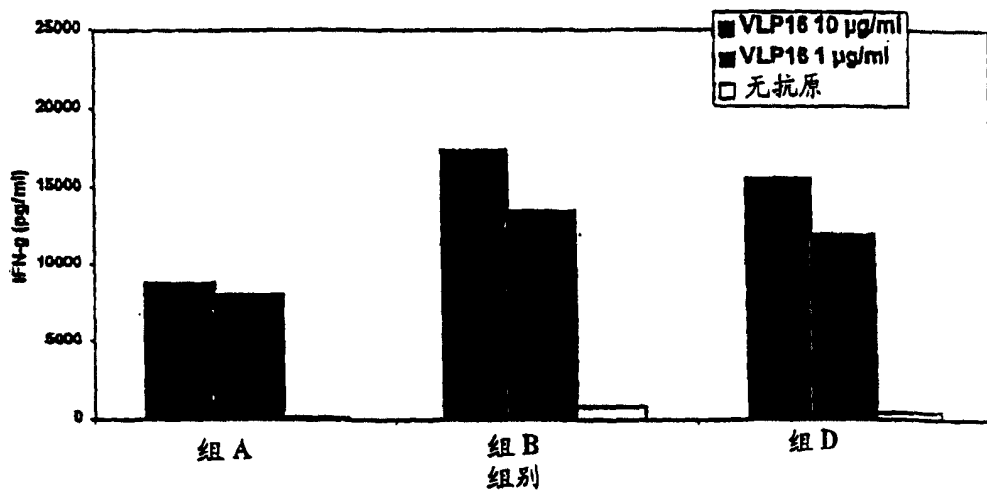


图 4

在体外用 VLP16 刺激后的 IFN-g 的产生



在体外用 VLP16 刺激后的 IL-5 的产生

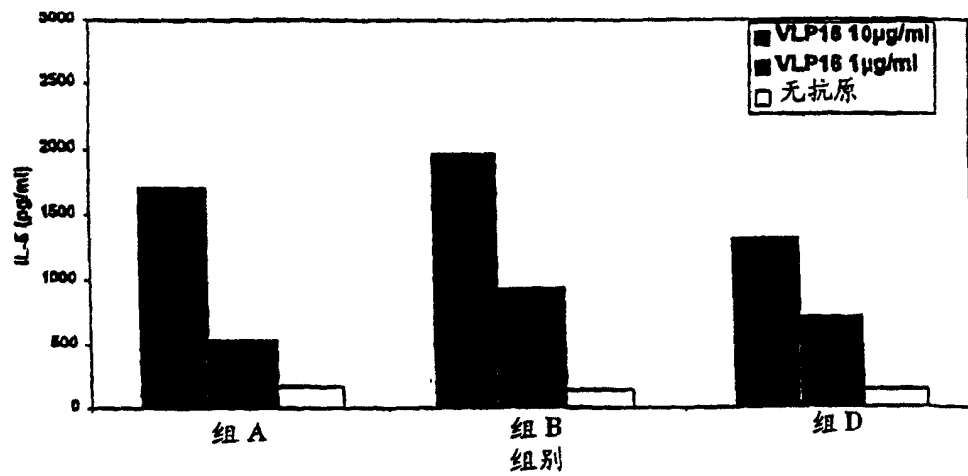
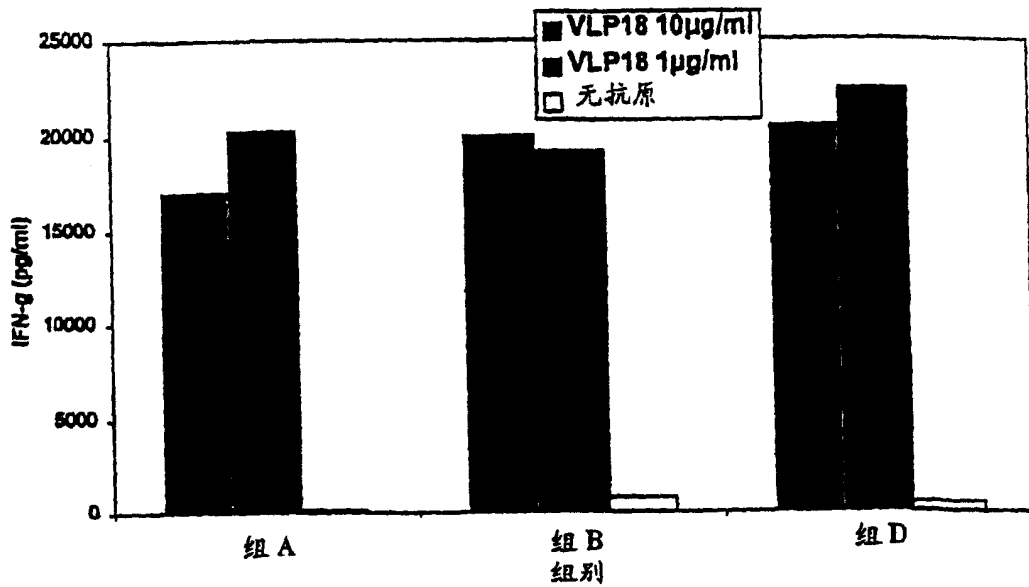


图 5



在体外用 VLP18 刺激后的 IFN-g 的产生



在体外用 VLP18 刺激后的 IL-5 的产生

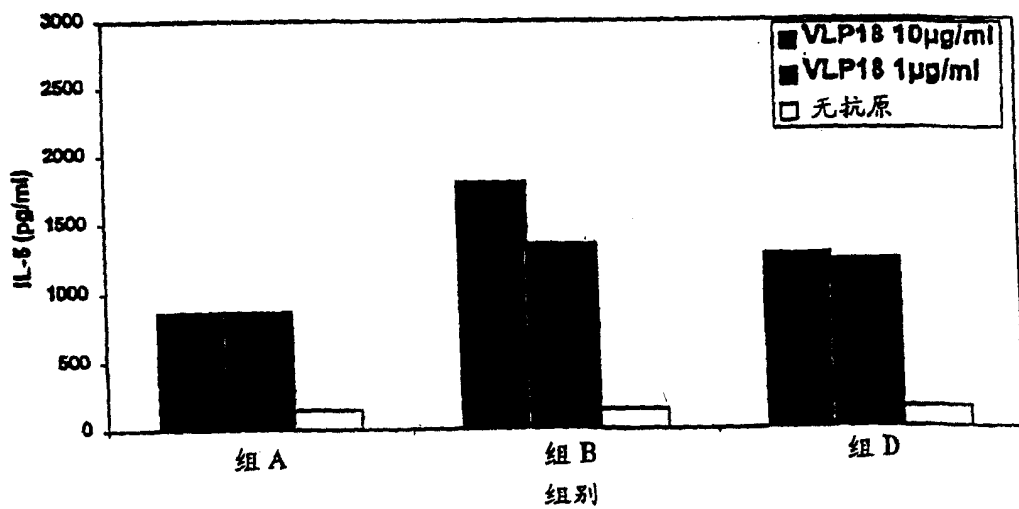
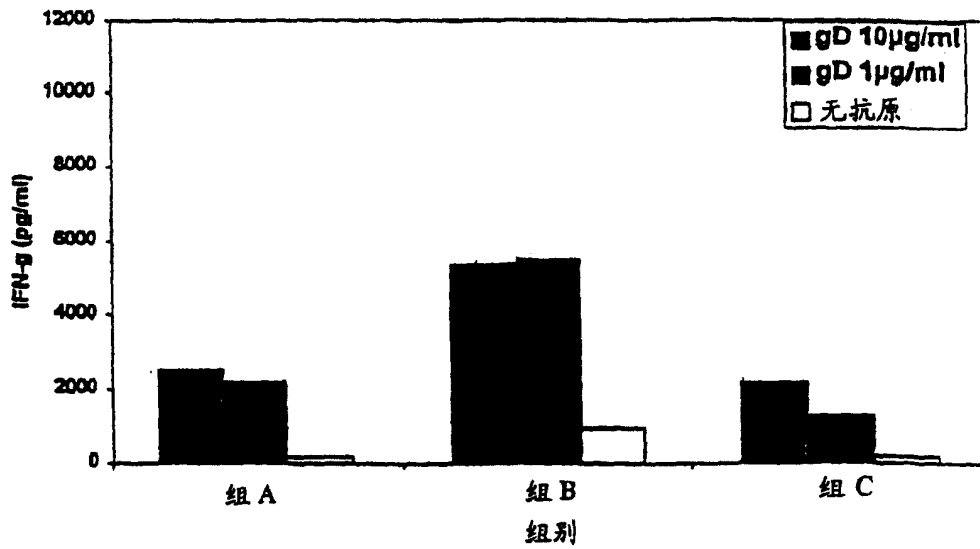


图 6

在体外用 gD 刺激后的 IFN-g 的产生



在体外用 gD 刺激后的 IL-5 的产生

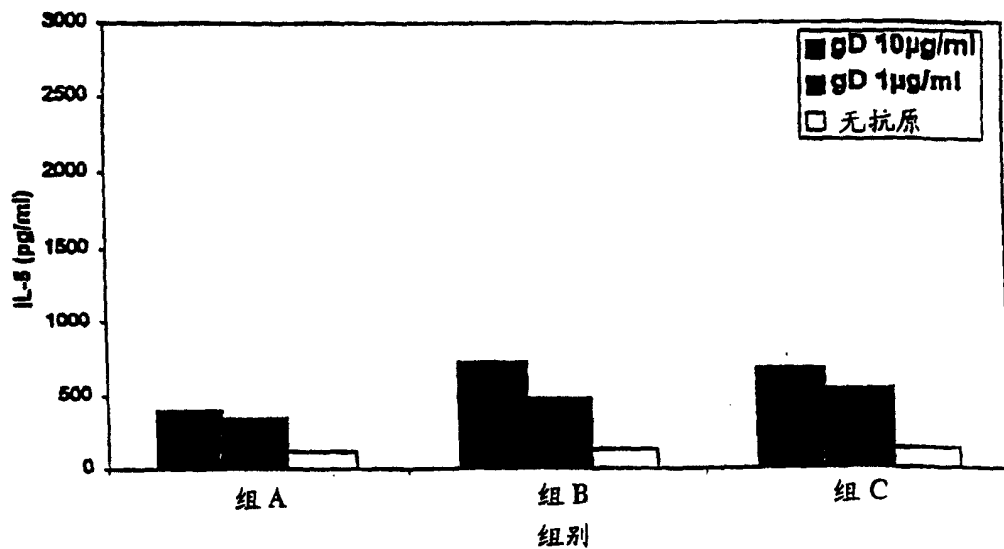
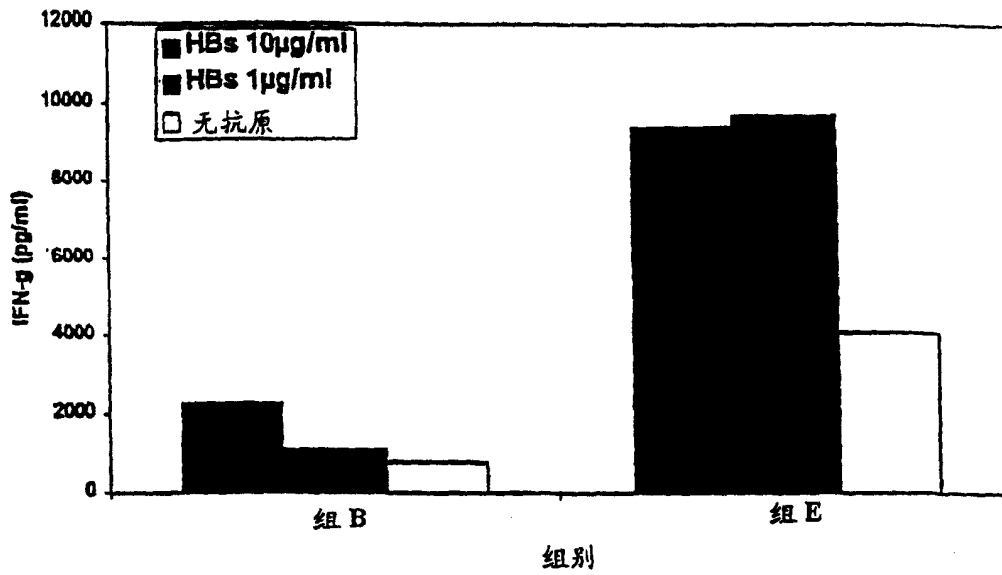


图 7

在体外用 HBs 刺激后的 IFN-g 的产生



在体外用 HBs 刺激后的 IL-5 的产生

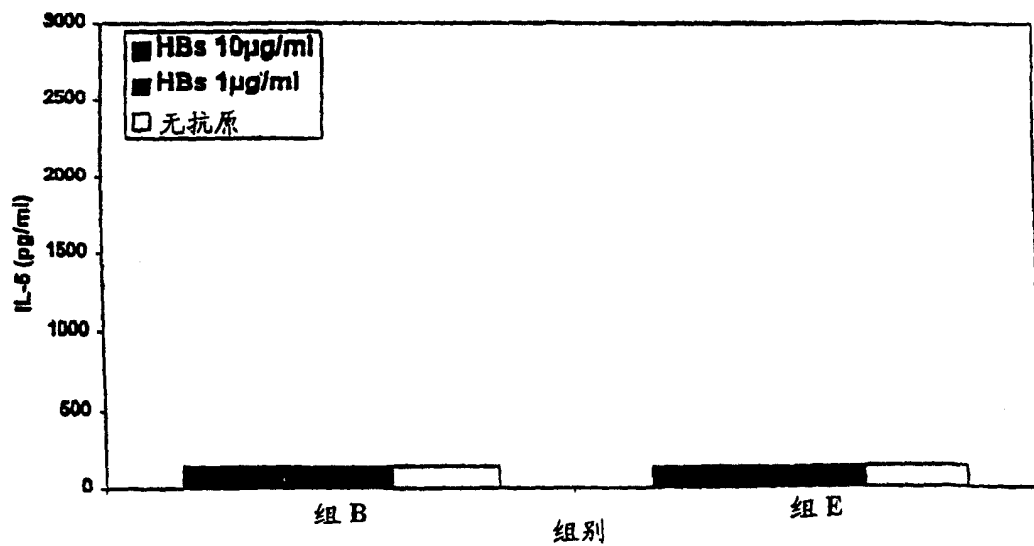


图 8