



(21)申請案號：109143764

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K39/29 (2006.01)

A61K31/7028(2006.01)

A61K31/7084(2006.01)

A61K31/7088(2006.01)

A61P31/20 (2006.01)

(30)優先權：2019/12/13 中國大陸

201911279536.0

(71)申請人：大陸商遠大賽威信生命科學（南京）有限公司（中國大陸）GRAND THERAVAC LIFE SCIENCE (NANJING) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：李建強 (CN)；葛君 (CN)；孫嬌嬌 (CN)；周童 (CN)；任蘇林 (CN)；譚昌耀 (CN)；顧月 (CN)；黃紅穎 (CN)；王世偉 (CN)；陳曉曉 (CN)；黃精俸 (CN)；王曉東 (CN)；陳悅 (CN)

(74)代理人：陳展俊

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：14 共 50 頁

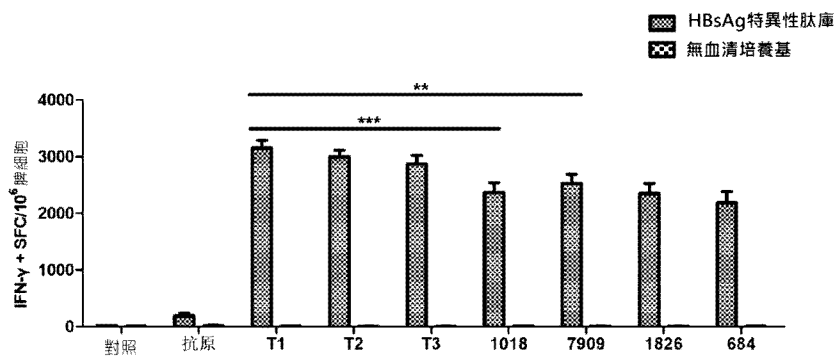
(54)名稱

醫藥組合物及其用途

(57)摘要

本發明屬於生物製藥領域，具體涉及一種醫藥組合物。所述醫藥組合物包含 B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎核心抗原和免疫刺激組合物，其中，所述免疫刺激組合物包含皂苷和 CpG 寡聚去氧核苷酸，或者所述免疫刺激組合物由包含皂苷的佐劑和 CpG 寡聚去氧核苷酸組成。

指定代表圖：



【圖3】



202128217

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 醫藥組合物及其用途

【英文發明名稱】 PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE THEREOF

【中文】

本發明屬於生物製藥領域，具體涉及一種醫藥組合物。所述醫藥組合物包含B型肝炎表面抗原、B型肝炎核心抗原和免疫刺激組合物，其中，所述免疫刺激組合物包含皂苷和CpG寡聚去氧核苷酸，或者所述免疫刺激組合物由包含皂苷的佐劑和CpG寡聚去氧核苷酸組成。

【指定代表圖】 圖3

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 醫藥組合物及其用途

【英文發明名稱】 PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE

THEREOF

### 【技術領域】

【0001】 本發明屬於生物製藥領域。具體地，本發明涉及一種醫藥組合物，其包含 B 型肝炎表面抗原、B 型肝炎核心抗原和免疫刺激組合物。其中，該免疫刺激組合物包含皂苷和 CpG 寡聚去氧核苷酸，或者該免疫刺激組合物由包含皂苷的佐劑和 CpG 寡聚去氧核苷酸組成，其中該 CpG 寡聚去氧核苷酸序列中具有兩個或兩個以上拷貝的 5'-TTCGTT-3' 基序或 5'-TCGTCGTCG-3' 基序。本發明還涉及該醫藥組合物用於治療 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病的用途。

### 【先前技術】

【0002】 B 型肝炎病毒(HBV)感染是世界範圍的嚴重公共衛生問題之一。HBV 感染是導致慢性 B 型肝炎、肝硬化和肝細胞癌的重要原因(Fattovich G. J. Hepatol. 2008 ; 48 : 335-352)。臨床治療慢性 HBV 感染的常用藥物主要有核苷類似物和干擾素。核苷類似物無法完全清除肝細胞內的 cccDNA，且長期使用易導致耐藥突變株的出現以及停藥後反彈(Kwon H，Lok AS. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011 ; 8 : 275-284)。干擾素不適合用於無症狀的 HBV 攜帶者，在慢性 HBV 患者中，使用半年後 HBeAg 血清學轉換發生率僅為 33%，而且干擾素副作用較大也限制其應用(Tang SX，Yu GL. Lancet 1990 ; 335(8684) : 302)。

【0003】 目前廣泛應用的 B 型肝炎蛋白疫苗藉由誘導體液免疫，產生保護性中和抗體，達到預防的目的。大量的研究發現中和抗體僅能夠消除胞外病毒顆粒，而胞內感染的病毒則主要依賴特異性的細胞免疫反應，輔助性 T 細胞、CD4+T 細胞產生的 IFN- $\gamma$  等 Th1 型細胞因子，尤其是病毒特異性的殺傷性 T 淋巴細胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)來清除(ChinR, Lacamini S. Rev Med Virol. 2003 : 13(4) : 255-72)。細胞免疫反應的強弱直接決定著 B 型肝炎的預後。因此，理想的治療性 B 型肝炎疫苗需要同時誘導特異性的體液免疫和細胞免疫，突破 B 型肝炎的免疫耐受。例如，中國專利 CN104043120B 提供了一種治療性 B 型肝炎疫苗，其包括 B 型肝炎表面抗原(HBsAg)、B 型肝炎核心抗原(HBcAg)、寡聚去氧核苷酸(CpG)，可以突破 B 型肝炎的免疫耐受，用於病毒性 B 型肝炎，尤其是慢性 B 型肝炎的治療。

【0004】 發明人對現有技術進行了深入研究，發現佐劑對治療性 B 型肝炎疫苗的治療作用發揮重要作用。常用佐劑寡聚去氧核苷酸(CpG)作為一種免疫刺激組合物，其化學本質為含有胞嘧啶鳥嘌呤二核苷酸的寡去氧核苷酸，具有與天然 CpG 模式識別受體相似的免疫反應，能與細胞膜上的 Toll 樣受體結合，藉由 TLR9 信號通路有效引發哺乳動物免疫反應。皂苷佐劑是一類苷元為三萜或螺旋甾烷類化合物的糖苷，屬植物來源佐劑。其中，皂樹皂苷(QS)是從皂樹中提取得到的皂苷，在 QS 系列中 QS-21 是目前報導最廣泛的一類佐劑，但 QS-21 可誘導細胞溶血，有一定系統和局部的毒副作用。Alving 等(ALVING CR, MATYAS G, BECK Z, et al. Revue Roumaine de Chimie, 2016, 61(8): 631-635.)研究發現，以 ALF 脂質體結合 MPLA 和 QS-21 作為佐劑對抗 HIVgp140 蛋白可有效增加血清中抗體滴度。Ng 等(NG H, FERNANDO G J P, DE-PELSENAIRE A C I, et al. Scientific Reports, 2016, 6(1): 228-230.)使用一種皮下傳遞技術-奈米貼片，與 QS-21 構成佐劑複合物。結果表明，奈米貼片與傳統肌

內注射相比，可顯著減少抗原和 QS-21的使用劑量以及誘導更高的 IgG 滴度(韓子怡，曾忠良，現代農業科技，2019(14)：220-221.)。

**【0005】** 現有技術(WO2001051083A3)曾報導關於包含皂苷與 CpG 寡聚去氧核苷酸的免疫刺激組合物，其中，CpG 佐劑涉及 CpG1826和 CpG7909。然而，由於 CpG 寡聚去氧核苷酸具備結構多樣性，不同序列的 CpG 佐劑間的效果差異巨大。

**【0006】** 因此，當前對免疫效果更強的佐劑以及 B 型肝炎治療劑存在需求。

#### **【發明內容】**

**【0007】** 針對現有技術的不足，發明人在進行了大量研究後，出乎意料地發現了免疫效果更強的免疫刺激組合物，以及包含該免疫刺激組合物的醫藥組合物。本發明提供的醫藥組合物包含雙佐劑，並且其中皂苷和 CpG 寡聚去氧核苷酸之間表現出高效的協同作用，可以介導更強烈的免疫應答。本發明還提供了該醫藥組合物用於治療 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病的用途。

**【0008】** 本發明的目的是藉由以下技術方案實現的：

**【0009】** 一方面，本發明提供一種醫藥組合物，其包含：

i)B 型肝炎表面抗原、該抗原的活性片段、該抗原的變體，或者其中至少兩種的混成物，

ii)B 型肝炎核心抗原、該抗原的活性片段、該抗原的變體，或者其中至少兩種的混成物，

iii)免疫刺激組合物，該免疫刺激組合物包含皂苷和 CpG 寡聚去氧核苷酸，或者該免疫刺激組合物由包含皂苷的佐劑和 CpG 寡聚去氧核苷酸組成；其

中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸序列具有兩個或兩個以上拷貝的5'-TTCGTT-3'基序或5'-TCGTCGTCG-3'基序。

【0010】 根據本發明該的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸的序列選自以下中的任一種：

CpG T1：TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT(SEQ ID NO: 6)、CpG T2：TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT CGT T(SEQ ID NO: 7)和 CpG T3：TCG TCG TCG TCG TCG TCG(SEQ ID NO: 8)；

【0011】 較佳地，該 CpG 寡聚去氧核苷酸的序列為 CpG T1：TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT(SEQ ID NO: 6)。

【0012】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該皂苷可以選自皂樹皂苷、人參皂苷、桔梗皂苷、黃芪皂苷、三七皂苷、甘草皂苷、合歡皮皂苷、麥冬皂苷、柴胡皂苷或竹節參皂苷中的一種或多種。較佳地，該皂苷為皂樹皂苷、人參皂苷、桔梗皂苷或黃芪甲苷；更佳地，該皂樹皂苷為 QS-7、QS-17、QS-18或 QS-21；進一步較佳地，該皂樹皂苷為 QS-21；該人參皂苷可以為人參皂苷 Rg1、人參皂苷 Rg3、人參皂苷 Rb1或人參皂苷 Re；該桔梗皂苷可以為桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D2或其兩者的混合物；該黃芪皂苷可以為黃芪甲苷(黃芪皂苷 IV)、黃芪皂苷 I、黃芪皂苷 II 等單體或其中兩個或兩個以上皂苷單體的混合物；該三七皂苷可以為三七皂苷 R1；該麥冬皂苷可以為麥冬皂苷 D 等；該柴胡皂苷可以為柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 或其兩者的混合物；該成歡皮皂苷可以為合歡皮總皂苷等；該甘草皂苷可以為甘草總皂苷；該竹節參皂苷可以為竹節參總皂苷。

【0013】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該包含皂苷的佐劑為免疫刺激複合物佐劑(Iscom 佐劑)。

【0014】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸

可以包含硫代磷酸酯連接；較佳地，該 CpG 寡聚去氧核苷酸為硫代寡聚去氧核苷酸，更佳地為全硫代寡聚去氧核苷酸。

【0015】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸與皂苷的重量比為1~40：0.1~2，較佳為2~40：0.1~2。

【0016】 較佳地，該 CpG 寡聚去氧核苷酸與皂苷的重量比為1：0.1、1：1、1：2、2：0.1、2：1、40：0.1、40：1或20：1，較佳為1：1、2：1、40：0.1、40：1或20：1，進一步較佳為2：1。

【0017】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該 B 型肝炎表面抗原包含如 SEQ ID NO: 1所示的序列或由其組成。

【0018】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該 B 型肝炎核心抗原包含如 SEQ ID NO: 2所示的序列或由其組成；較佳地，該 B 型肝炎核心抗原的活性片段包含 SEQ ID NO: 2中的第1位~第 X 位的連續胺基酸或由其組成，其中，X 可以為149至183之間的整數；進一步較佳地，X 為152至183之間的整數。

【0019】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該醫藥組合物的組分 i)、ii)和 iii)之間的重量的比為4：2：1.1~42，較佳為4：2：2.1~42。

【0020】 進一步較佳地，該醫藥組合物的組分 i)、ii)和 iii)之間的重量的比為4：2：1.1、4：2：2、4：2：3、4：2：2.1、4：2：40.1、4：2：41或4：2：42，較佳為4：2：2、4：2：3、4：2：40.1、4：2：41或4：2：42，進一步較佳為4：2：3。

【0021】 根據本發明所述的醫藥組合物，其中，該醫藥組合物還包含：iv)可藥用載體。

【0022】 另一方面，本發明提供了一種 B 型肝炎預防性疫苗或 B 型肝炎治療性疫苗，其包含該醫藥組合物；較佳地，該疫苗為 B 型肝炎治療性疫苗。

【0023】 再一方面，本發明提供了該醫藥組合物在製備用於預防和/或治

療 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病的藥物中的用途；較佳地，該 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病選自 B 型肝炎、肝硬化和肝癌。

【0024】 再一方面，本發明提供了該醫藥組合物在製備用於在物件中產生針對 B 型肝炎病毒的體液免疫和/或細胞免疫應答的藥物中的用途。

【0025】 再一方面，本發明提供了該醫藥組合物在製備用於使物件中 B 型肝炎核心抗體發生亞型轉變的藥物中的用途。

【0026】 再一方面，本發明提供了該醫藥組合物在製備用於在對象中突破 B 型肝炎病毒免疫耐受的藥物中的用途。

【0027】 再一方面，本發明提供了一種預防和/或治療 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病的方法，該方法包括給予有需要的受試者預防和/或治療有效量的醫藥組合物；較佳地，該 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病選自 B 型肝炎、肝硬化和肝癌。

【0028】 另一方面，本發明提供了一種在物件中產生針對 B 型肝炎病毒的體液免疫和/或細胞免疫應答的方法，該方法包括給予有需要的受試者有效量的醫藥組合物。

【0029】 另一方面，本發明提供了一種使物件中 B 型肝炎核心抗體發生亞型轉變的方法，該方法包括給予有需要的受試者有效量的醫藥組合物。

【0030】 另一方面，本發明提供了一種在物件中突破 B 型肝炎病毒免疫耐受的方法，該方法包括給予有需要的受試者有效量的醫藥組合物。

【0031】 本發明的醫藥組合物中包含兩種佐劑，具有出乎意料的技術效果，可介導更強的免疫應答。單獨使用 CpG T1、CpG T2和 CpG T3的免疫刺激作用弱於 CpG1018、CpG7909和 CpG1826等，但與 QS21聯合應用後，該佐劑表現出出人意料的協同作用，免疫效果顯著增強。含有該免疫刺激組合物的 B



型肝炎治療性疫苗可以突破基因轉殖小鼠的免疫耐受，產生高滴度的抗 HBsAg 抗體、抗 HBcAg 抗體、中和抗體。各項檢測結果均顯示，該疫苗藉由多次免疫可以顯著清除基因轉殖小鼠體內的 B 型肝炎病毒，在免疫過程結束後，HBsAb 水準接近飽和，可以保持穩定長效的免疫效果，HBsAg 平均下降率維持在92%左右。同時含有該免疫刺激物的 B 型肝炎疫苗可誘導產生較強的 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  水準，免疫效果顯著優於單獨佐劑，顯著優於其他 CPG 佐劑和 QS21的組合。

### 【圖式簡單說明】

【0032】 以下，結合附圖來詳細說明本發明的實施方案，其中：

圖1顯示了不同的 CPG 寡聚去氧核苷酸對 HBsAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖2顯示了不同的 CPG 寡聚去氧核苷酸對 HBcAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖3顯示了根據本發明的不同的免疫刺激組合物對 HBsAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖4顯示了根據本發明的不同的免疫刺激組合物對 HBcAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖5顯示了根據本發明的不同劑量的免疫刺激組合物對 HBsAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖6顯示了根據本發明的不同劑量的免疫刺激組合物對 HBcAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖7顯示了含有本發明所述的免疫刺激組合物的 B 型肝炎疫苗對血清中 HBsAg 水準的影響；

圖8顯示了含有本發明所述的免疫刺激組合物的 B 型肝炎疫苗對血清中 HBsAb 水準的影響；

圖9顯示了含有本發明所述的免疫刺激組合物的 B 型肝炎疫苗對 HBsAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖10顯示了含有本發明所述的免疫刺激組合物的 B 型肝炎疫苗對 HBcAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖11顯示了含有本發明所述的免疫刺激組合物的 B 型肝炎疫苗對小鼠血清中 HBsAg 抗原特異性 IgG 抗體及其亞型水準的影響；

其中，A 圖：各組小鼠血清的 HBsAb IgG 水準；B 圖：各組小鼠血清的 HBsAb IgG1 水準；C 圖：各組小鼠血清的 HBsAb IgG2a 水準；D 圖：各組小鼠血清的 HBsAb IgG2a 與 IgG1 的比值；

圖12顯示了含有本發明所述的免疫刺激組合物的 B 型肝炎疫苗對小鼠血清中 HBcAg 抗原特異性 IgG 抗體及其亞型水準的影響；

其中，A 圖：各組小鼠血清的 HBcAb IgG 水準；B 圖：各組小鼠血清的 HBcAb IgG1 水準；C 圖：各組小鼠血清的 HBcAb IgG2a 水準；D 圖：各組小鼠血清的 HBcAb IgG2a 與 IgG1 的比值；

圖13顯示了含有不同皂苷的免疫刺激組合物對 HBsAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響；

圖14顯示了含有不同皂苷的免疫刺激組合物對 HBcAg 抗原特異性 IFN- $\gamma$  分泌水準的影響。

## 【實施方式】

### 【0033】 定義

除非另有定義，本文使用的所有科技術語具有本領域普通技術人員所理解

的相同含義。關於本領域的定義及術語，專業人員具體可參考 *Current Protocols in Molecular Biology*(Ausubel)。胺基酸殘基的縮寫是本領域中所用的指代20個常用 L-胺基酸之一的標準3字母和/或1字母代碼。

**【0034】** 儘管本發明以廣義範圍顯示數位範圍和參數近似值，但是具體實施例中所示的數值盡可能準確的進行記載。然而，任何數值本來就必然含有一定的誤差，其是由它們各自的測量中存在的標準差所致。另外，本文公開的所有範圍應理解為涵蓋其中包含的任何和所有子範圍。例如記載的“1.1至42”的範圍應認為包含最小值1.1和最大值42之間(包含端點)的任何和所有子範圍；也就是說，所有以最小值1.1或更大起始的子範圍，例如1.1至6.1，以及以最大值42或更小終止的子範圍，例如5.5至42。另外，任何稱為“併入本文”的參考文獻應理解為以其整體併入。

**【0035】** 另外應注意，如本說明書中所使用的，單數形式包括其所指物件的複數形式，除非清楚且明確的限於一個所指物件。術語“或”可與術語“和/或”互換使用，除非上下文另有清楚指明。

**【0036】** 本文使用的術語“醫藥組合物”、“組成藥物”和“藥物組成”可互換地使用，其表示組成在一起以實現某種特定目的的至少一種藥物以及任選的可藥用賦形劑或輔料的組合。在某些實施方案中，該醫藥組合物包括在時間和/或空間上分開的組合，只要其能夠共同作用以實現本發明的目的。例如，該醫藥組合物中所含的成分(例如 HBsAg、HBcAg、QS-21、CpG 寡聚去氧核苷酸)可以以整體施用於物件，或者分開施用於物件。當該醫藥組合物中所含的成分分開地施用於物件時，該成分可以同時或依次施用於物件。

**【0037】** 本文使用的術語“CpG 寡聚去氧核苷酸”或 CpG-ODN”是指短的單鏈成 DNA 分子，其含有一個或更多個“CpG”單元，其中 C 表示胞嘧啶，G 表示鳥嘌呤，p 表示磷酸二酯鍵。特別地，該 CpG 寡聚去氧核苷酸是非甲基化

的。在一些實施方案中，該 CpG-ODN 包含硫代磷酸酯連接或硫代磷酸酯骨架。也就是說，在一些實施方案中，該 CpG-ODN 為硫代磷酸酯寡聚去氧核苷酸(即硫代寡聚去氧核苷酸)。較佳地，該 CpG-ODN 中所有核苷酸間連接均為硫代磷酸酯連接，即該 CpG-ODN 為全硫代寡聚去氧核苷酸。在另一些實施方案中，該 CpG-ODN 包含兩個或兩個以上拷貝的5'-TTCGTT-3'基序或5'-TCGTCGTCG-3'基序。特別地，該 CpG-ODN 具有選自下列的序列：TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT(SEQ ID NO: 6)、TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT CGT T(SEQ ID NO: 7)或 TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG(SEQ ID NO: 8)，較佳地為 TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT(SEQ ID NO: 6)。

**【0038】** 本文使用的“人參皂苷、桔梗皂苷、黃芪皂苷、三七皂苷、甘草皂苷、合歡皮皂苷、麥冬皂苷、柴胡皂苷或竹節參皂苷”是指是存在於對應植物中的活性成分，例如人參皂苷是一種固醇類化合物，主要存在於人參屬藥材中，是人參中的活性成分。在一些實施方案中，該人參皂苷較佳為人參皂苷 Rg1、人參皂苷 Rg3、人參皂苷 Rb1、人參皂苷 Re 等單體或其中兩個或兩個以上皂苷單體的混合物；桔梗皂苷較佳為桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D2或其兩者的混合物；黃芪皂苷較佳為黃芪甲苷(黃芪皂苷 IV)、黃芪皂苷 I、黃芪皂苷 II 等單體或其中兩個或兩個以上皂苷單體的混合物；三七皂苷較佳為三七皂苷 R1 等；麥冬皂苷較佳為麥冬皂苷 D 等；柴胡皂苷較佳為柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 或其兩者的混合物；合歡皮皂苷較佳為合歡皮總皂苷等；甘草皂苷較佳為甘草總皂苷等；竹節參皂苷較佳為竹節參總皂苷等。

**【0039】** 本文使用的“Iscom 佐劑”為免疫刺激複合物佐劑，具體地為不包含抗原的 Iscom 基質(ISCOM MATRIX)，是由磷脂、皂苷、膽固醇組成的籠狀結構的佐劑。

**【0040】** 本文使用的“治療有效量”或“有效量”是指足以顯示其對於所施

用物件益處的劑量。施用的實際量，以及施用的速率和時間過程會取決於所治療者的自身情況和嚴重程度。治療的處方(例如對劑量的決定等)最終是全科醫生及其它醫生的責任並依賴其做決定，通常考慮所治療的疾病、患者個體的情況、遞送部位、施用方法以及對於醫生來說已知的其它因素。

**【0041】** 本文所使用的術語“哺乳動物”是指人類，也可以是其它動物，如野生動物(如蒼鷺、鸛、鶴等)，家畜(如鴨、鵝等)或實驗動物(如猩猩、猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠、土撥鼠、地松鼠等)。

**【0042】** 在另一些實施方案中，本發明組合物還可包含另外的添加劑，如可藥用載體或添加劑，尤其是當它以藥物製劑形式存在時。

**【0043】** 較佳的藥物載體尤其是水，緩衝水溶液，較佳等滲鹽溶液如PBS(磷酸鹽緩衝液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、纖維素、碳酸鎂、0.3%甘油、透明質酸、乙醇或聚亞烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用藥物載體的類型尤其依賴於根據本發明的組合物是否配製為用於口服、鼻、皮內、皮下、肌內或靜脈施用。根據本發明的組合物可包含潤濕劑、乳化劑或緩衝液物質作為添加劑。

**【0044】** 根據本發明的醫藥組合物、疫苗或者藥物製劑可藉由任何適宜的途徑施用，例如可口服、鼻、皮內、皮下、肌內或靜脈內施用。

**【0045】** 以下結合附圖藉由具體實施方式的描述對本發明作進一步說明，但這並非是對本發明的限制，本領域技術人員根據本發明的基本思想，可以作出各種修改或改進，但是只要不脫離本發明的基本思想，均在本發明的範圍之內。

**【0046】** 實施發明的最佳實施方式

**【0047】** 以下參照具體的實施例來說明本發明。本領域技術人員能夠理

解，這些實施例僅用於說明本發明，其不以任何方式限制本發明的範圍。

【0048】 下述實施例中的實驗方法，如無特殊說明，均為常規方法。下述實施例中所用的原料、試劑材料等，如無特殊說明，均為市售購買產品。

【0049】 實施例1 免疫刺激組合物的篩選實驗準備

【0050】 1、HBsAg 原液：HBsAg 蛋白的胺基酸序列如 SEQ ID NO: 1所示。

【0051】 HBsAg 蛋白由 HBsAg 基因重組酵母細胞製備，酵母細胞種類包括漢遜酵母、釀酒酵母和畢赤酵母，較佳為漢遜酵母。具體製備步驟參考中國專利申請 CN108330145A，HBsAg 基因重組漢遜酵母細胞經發酵培養，收穫菌體。經破菌處理和矽膠吸附、柱層析和 TFF 等步驟純化。

【0052】 2、HBcAg 原液：HBcAg 蛋白的胺基酸序列如 SEQ ID NO: 2所示。

【0053】 HBcAg 蛋白由 HBcAg 基因重組酵母細胞製備，酵母細胞種類包括漢遜酵母、釀酒酵母和畢赤酵母，較佳漢遜酵母。具體製備步驟參考中國專利申請 CN108047316A，HBcAg 基因重組漢遜酵母細胞經發酵培養，收穫菌體。經破菌處理和硫酸銨、柱層析和 TFF 等步驟純化，製備 HBcAg 原液。

【0054】 3、QS-21：購自 BRENNTAG 公司，CAS.NO.A010-023。

【0055】 4、CPG 寡聚去氧核苷酸原料的製備方法：

【0056】 寡聚去氧核苷酸是合成製備的寡聚去氧核苷酸序列片段，其含有一個或多個 CpG 基序，本實施例使用的 CPG 序列見表1：

表1 CPG 寡聚去氧核苷酸的具體序列

CPG 寡聚去氧核苷酸的分型	CPG 寡聚去氧核苷酸	序列
B 型	CpG 1018	TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA(SEQ ID NO: 3)
	CpG 7909	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT(SEQ ID NO: 4)
	CpG 1826	TCCATGACGTTCCCTGACGTT(SEQ ID NO: 5)
	CpG T1	TCGTTCGTTTCGTTTCGTTTCGTT(SEQ ID NO: 6)
	CpG T2	TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT CGT T(SEQ ID NO: 7)
	CpG T3	TCG TCG TCG TCG TCG TCG TCG(SEQ ID NO: 8)
	CpG 684	TCGACGTTTCGTCGTTTCGTCGTTTC(SEQ ID NO: 9)
	CpG 1668	TCC ATG ACG TTC CTG ATGCT(SEQ ID NO: 10)
	CpG D2	TGTCGTCGTCGTTTGTCGTTTGTCGTT(SEQ ID NO: 11)
A 型	CpG 2216	GGGGGACGATCGTCGGGGGG(SEQ ID NO: 12)
	ODN 2336	GGGGACGACGTCGTGGGGGGG(SEQ ID NO: 13)
C 型	ODN 2395	TCGTCGTTTCGCGCGCGCCG(SEQ ID NO: 14)
	ODN M362	TCGTCGTTTCGTTTCGTCGAACGACGTTTGAT(SEQ ID NO: 15)

**【0057】** 具體製備方法：使用常規固相亞磷醯胺三酯法化學合成方法製備，由3'端開始，1)脫保護基：先用三氯乙酸脫去連接在 CpG 上的核苷酸的保護基團 DMT(二甲氧基三苯甲基)，獲得游離的5'羥基，以供下一步縮合反應使用；2)活化：將亞磷醯胺保護的核苷酸單體與四氫唑活化劑混合並進入合成

柱，形成亞磷醯胺四唑活性中間體，此中間體與 CpG 上已脫保護基的核苷酸發生縮合反應；3)連接：亞磷醯胺四唑活性中間體遇到 CpG 上已脫保護基的核苷酸時，將與其5'羥基發生親和反應，縮合並脫去四唑，此時寡核苷酸鏈向前延長一個城基；4)氧化：縮合反應時核苷酸單體是藉由亞磷酯鍵與連在 CpG 上的寡核苷酸連接，而亞磷酯鍵不穩定，易被酸或碱水解，此時使用硫代試劑將亞磷醯胺氧化為硫磷雙鍵的磷酸三酯，從而得到穩定的寡核苷酸；5)封閉：縮合反應後為了防止連在 CpG 上的未參與反應的5'羥基在隨後的迴圈反應中被延伸，常藉由乙醯化來封閉此端羥基；經過以上五個步驟後，一個去氧核苷酸就連到 CpG 的核苷酸上；重複以上的脫保護基、活化、連接、氧化、封閉過程即可得到一個 DNA 片段粗品；最後對其進行切割、脫保護基、純化、定量等合成後處理即可。

**【0058】** 使用 PBS 溶液(購自 Hyclone 公司)將 HBsAg 原液和 HBcAg 原液分別稀釋至200 $\mu$ g/ml 和100 $\mu$ g/ml；使用 PBS 溶液將各 CPG 原料分別溶解並稀釋至100 $\mu$ g/ml，供下一步使用。

### **【0059】 實施例2 CPG 寡聚去氧核苷酸的篩選實驗**

**【0060】** 1、實驗動物：C57BL/6(N)小鼠，雄性，4 週齡，135 隻，上海靈暢實驗動物技術有限公司。

**【0061】** 2、實驗分組：見表 2，每次注射量為 100 $\mu$ L/隻。其中 A 組為陰性對照，PBS 溶液 100 $\mu$ L/隻。



表2 實驗動物分組

組別	數量 (隻)	組分(μg/隻小鼠)														
		HBs Ag	HBc Ag	CpG T1	CpG T2	CpG T3	CpG 1018	CpG 7909	CpG 1826	CpG 684	CpG 1668	CPG D2	CpG 2216	ODN 2336	ODN 2395	ODN M362
對照	9															
抗原	9	20	10													
T1	9	20	10	10												
T2	9	20	10		10											
T3	9	20	10			10										
1018	9	20	10				10									
7909	9	20	10					10								
1826	9	20	10						10							
684	9	20	10							10						
1668	9	20	10								10					
D2	9	20	10									10				
2216	9	20	10										10			
2336	9	20	10											10		
2395	9	20	10												10	
M362	9	20	10													10

**【0062】** 3、實驗步驟：小鼠免疫後第 7 天取脾，按常規方法製備脾淋巴細胞，具體如下：無菌操作取脾臟：用無菌鑷子及剪刀剪取脾臟，放於 70μm 細胞濾網中，置於含有 2ml 預冷處理的 2%FBS(購自 GIBCO 公司)-PBS 的平皿中；用研磨棒研磨脾臟，脾臟細胞藉由篩目進入平皿中，得到細胞懸液，用巴氏吸管將懸液放入經 40μm 細胞濾網過濾(購自 BD 公司)的 50ml 無菌離心管；500×g，4°C 離心 5 分鐘；棄去上清，加入 2ml 1×破紅劑(購自 BD 公司)重懸細胞，4°C 避光靜置 5 分鐘，以破碎紅細胞；加入 10ml 2% FBS-PBS 終止破紅反應；500×g，4°C 離心 5 分鐘；棄去上清，加入 5ml 2% FBS-PBS 重懸細胞備用。分別使用刺激物 HBsAg 特異性肽庫 PS4 和 HBcAg 特異性肽庫 PCP 刺激脾細胞；按照試劑盒說明書，使用 ELISPOT 試劑盒(BD 公司)檢測 HBsAg 和 HBcAg 抗原特異性 IFN-γ 分泌水準；使用 ImmunoSPOT Series 3 酶聯斑點分析儀讀取

ELISPOT 試劑盒測出的斑點數(具體操作步驟參考中國專利 CN104043120B 的實施例 7)。

【0063】 其中，HBsAg 特異性肽庫序列參考中國專利 CN104043120B 的實施例 7；HBcAg 特異性肽庫序列見 SEQ ID NO: 16~30。

【0064】 4、實驗結果：ELISPOT 斑點結果見圖 1 和圖 2，結果顯示，不同序列的 B 型 CpG 佐劑具有不同的免疫效果，其中，CpG T1~T3、CpG1018、CpG7909、CpG 1826 和 CpG 684 整體優於 A 型 CpG 佐劑和 C 型 CpG 佐劑，而 CpG1618 和 CPG D2 的免疫效果較差，誘導產生 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  水平均低於 A 型 CpG 佐劑和 C 型 CpG 佐劑。

### 【0065】 實施例3 免疫刺激組合物的篩選實驗

【0066】 1、實驗動物：C57BL/6(N)小鼠，雄性，4週齡，81隻，上海靈暢實驗動物技術有限公司，

【0067】 2、實驗分組：見表3，每次注射量為100 $\mu$ L/隻。其中 A 組為陰性對照，PBS 溶液100 $\mu$ L/隻。

表3 實驗動物分組

組別	數量 (隻)	組分( $\mu$ g/隻小鼠)									
		HBsAg	HBcAg	CpG T1	CpG T2	CpG T3	CpG 1018	CpG 7909	CpG 1826	CpG 684	QS21
對照	9										
抗原	9	20	10								
T1	9	20	10	10							5
T2	9	20	10		10						5
T3	9	20	10			10					5
1018	9	20	10				10				5
7909	9	20	10					10			5
1826	9	20	10						10		5
684	9	20	10							10	5

【0068】 3、實驗步驟：同實施例2。

【0069】 4、實驗結果：ELISPOT 斑點結果見圖3和圖4，結果顯示，CpG T1~T3與 QS21聯合應用後產生了高效的協同作用，誘導產生 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  水準顯著高於 CpG1018、CpG7909等其他幾種 CpG 佐劑，具有出人意料的免疫效果。

【0070】 實施例4 不同含量佐劑對醫藥組合物免疫效果的影響

1、實驗動物：C57BL/6(N)小鼠，雄性，4週齡，60隻，上海靈暢實驗動物技術有限公司。

2、試劑材料：

1)HBsAg 蛋白、HBcAg 蛋白和 CpG T1均由實施例1製得；

2)QS-21(CAS.NO.A010-023，購自 BRENNTAG 公司)

3)使用 PBS 溶液(購自 Hyclone 公司)將 HBsAg 原液、HBcAg 原液分別稀釋至200 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml，將 QS21分別稀釋至5 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml，使用 PBS 溶液將 CpG T1溶解並分別稀釋至50 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml、2mg/ml，使用 PBS 溶液將 CPG7909溶解並稀釋至100 $\mu$ g/ml，供下一步使用。

3、實驗分組：見表4，每次注射量為100 $\mu$ L/隻。其中 A 組為陰性對照，PBS 溶液100 $\mu$ L/隻。

4、實驗步驟：同實施例2。

5、實驗結果：ELISPOT 斑點結果見圖5和圖6，結果顯示，CpG T1與 QS21的劑量變化對疫苗組合物均有顯著性影響，高於劑量5的免疫刺激組合物，誘導產生 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  水準顯著高於 CPG7909組，但由於種屬差異性，佐劑劑量進一步增加誘導效果並無顯著性增加，推測原因為小

鼠無法準確反映佐劑的免疫強度。

劑量1、2、4與 CPG7909組的免疫刺激效果相當，但是使用的佐劑劑量低於同等 CPG7909組，因此也具有一定優勢。

表4 實驗動物分組

組別	數量(隻)	組分(μg/隻小鼠)				
		HBsAg	HBcAg	CpG T1	QS21	CPG7909
對照	5					
抗原	5	20	10			
劑量1	5	20	10	5	0.5	
劑量2	5	20	10	5	5	
劑量3	5	20	10	5	10	
劑量4	5	20	10	10	0.5	
劑量5	5	20	10	10	5	
劑量6	5	20	10	10	10	
劑量7	5	20	10	200	0.5	
劑量8	5	20	10	200	5	
劑量9	5	20	10	200	10	
CPG7909	5	20	10		5	10

### 【0071】 實施例5 B 型肝炎疫苗的實驗組設置及免疫流程

#### 1、實驗動物及模型建立：

C57BL/6(N)小鼠，雄性，4週齡，81隻，上海靈暢實驗動物技術有限公司，rAAV8-HBV 腺病毒，購自北京五加和分子醫學研究所有限公司。在 C57BL/6(N)小鼠上尾靜脈注射 rAAV8-HBV 腺病毒，建立 rAAV8-HBV 持續感

染 C57BL/6(N)的小鼠模型。

2、試劑材料：

1) HBsAg 蛋白：實施例1製得。

2) HBcAg 蛋白：實施例1製得。

3) 使用 PBS 溶液(購自 Hyclone 公司)將 HBsAg 原液、HBcAg 原液和 QS-21 分別稀釋至200 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml，使用 PBS 溶液將 CpG 溶解並稀釋至100 $\mu$ g/ml，供下一步使用。

3、實驗分組：見表5，每隻小鼠每次注射量為100 $\mu$ L/隻，其中 A 組為陰性對照，注射 PBS 溶液100 $\mu$ L/隻。

表5 實驗動物分組及每組注射量

組別	數量 (隻)	組分( $\mu$ g/隻小鼠)				
		HBsAg	HBcAg	CpG T1	CpG 7909	QS-21
A	9					
B	9			10		
C	9					5
D	9			10		5
E	9	20	10			
F	9	20	10	10		
G	9	20	10			5
H	9	20	10	10		5
I	9	20	10		10	5

4、動物免疫：所有組別每2週進行1次肌肉注射，接種部位為右側後大腿，共給藥6次，分別於尾靜脈注射 rAAV8-HBV 病毒後第4週、第6週、第8

週、第10週、第12週、第14週給藥。給藥開始後每2週採1次血，採血時間分別為第4週、第6週、第8週、第10週、第12週、第14週、第16週、第18週、第20週、第22週。第22週將所有小鼠處死。

### 【0072】 實施例6 B 型肝炎疫苗對血清中 HBsAg 水準的影響

1、血清 HBsAg 的檢測步驟：委託南京鼓樓醫院檢測。

使用兩步免疫測定法，首先檢測樣本和包被 B 型肝炎表面抗體的順磁微粒結合，經過洗滌，加入吡啶酯標記的 B 型肝炎表面抗體結合物，再經過洗滌，加入預激發液和激發液到反應混合物中，測定檢測樣本的相對發光值 (RLU)，樣本中的 HBsAg 含量與 RLU 之間成正相關性，藉由產生的 ARCH-TITECT HBsAg 標準曲線測定小鼠血清樣本中 HBsAg 濃度，最終小鼠血清樣本中 HBsAg 濃度為測定值的50~200倍。

2、結果分析(圖7)：含有本發明該免疫刺激物的 H 組疫苗，對應的 HBsAg 水準呈明顯下降趨勢，在免疫過程結束後(第14週起)，保持穩定長效的免疫效果，相比單獨的 CpG 組(F 組)和 QS-21組(G 組)，具有顯著性優勢。H 組 HBsAg 水準從起始>6350 IU/ml 降低到50 IU/ml 左右，該組在第二次免疫(第6週)後 HBsAg 水準即下降30%以上，在第三次免疫(第8週)後 HBsAg 水準下降70%以上，且在第14週免疫結束後平均下降率維持在92%左右。具有優越的免疫效果。與雙佐劑對照(I 組)相比，H 在第14週免疫結束後依舊維持穩定的免疫效果，免疫水準顯著優於 I 組。

### 【0073】 實施例7 B 型肝炎疫苗的體液免疫效果評價

1、血清 HBsAb 的檢測步驟：委託南京鼓樓醫院檢測。

使用兩步免疫測定法，即首先檢測樣本和重組 HBsAg(rHBsAg)包被順磁微

粒子混合，經過洗滌，加入吡啶酯標記的 rHBsAg 結合物，再經過洗滌，加入預激發液和激發液到反應混合物中，測定檢測樣本的相對發光值(RLU)，樣本中的 HBsAb 含量與 RLU 之間成正相關性，藉由產生的 ARCHITECT HBsAb 校準曲線測定小鼠血清樣本中 HBsAb 濃度，最終小鼠血清樣本中 HBsAb 濃度為測定值的50~200倍。

2、結果分析(圖8)：含有該免疫刺激物的 H 組疫苗在第二次免疫(第6週)後開始產生 HBsAb(>10mIU/ml)，且隨著免疫次數的增加，HBsAb 水準呈現不斷增長的趨勢，且增長趨勢顯著優於單獨的 CpG 組(F 組)和 QS-21組(G 組)。免疫結束後兩週(第十六週)之後 HBsAb 水準接近飽和，可達4.0個對數值即 10000mIU/ml 左右的 HBsAb 水準，與雙佐劑對照(I 組)相比，產生的抗體水準也具有顯著性優勢。

#### 【0074】 實施例8 B 型肝炎疫苗的細胞免疫效果評價

1、檢測步驟：同實施例2；實驗分組見表6。

2、評價指標：若對照孔斑點數 $\leq 5$  SCF，樣品孔斑點數 $\geq 10$  SCF，判定為陽性；若 $5 \text{ SFC} < \text{對照孔斑點數} \leq 10 \text{ SCF}$ ，樣品孔斑點數/對照孔斑點數 $\geq 2$ ，判定為陽性；若對照孔斑點數 $> 10 \text{ SFC}$ ，樣品孔斑點數/對照孔斑點數 $\geq 3$ ，判定為陽性。

3、實驗結果：

表6 脾細胞分泌的 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  的轉陽率

組別	數量(隻)	陽轉率(%)	
		HBsAg	HBcAg
A	9	11.1	11.1
B	9	0	11.1
C	8	0	0
D	8	12.5	12.5
E	9	37.5	12.5
F	9	100	100
G	8	100	100
H	8	100	100
I	8	100	100

細胞免疫水準檢測結果：ELISPOT 斑點結果見圖9和10，分析結果顯示，F組-I組的 HBsAg 特異性 IFN- $\gamma$  陽轉率均為100%，HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  陽轉率均為100%。含有該免疫刺激物的 H 組疫苗可誘導產生較高的 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  水準，分別大於2350 SFC/ $10^6$ 脾細胞和大於1250 SFC/ $10^6$ 脾細胞，與單獨的 CpG 組(F 組)和 QS-21組(G 組)相比，具有顯著性差異。H 組與雙佐劑對照(I 組)相比，後者誘導產生的 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN- $\gamma$  水準約為1630 SFC/ $10^6$ 脾細胞和750 SFC/ $10^6$ 脾細胞左右，顯著低於 H 組。

### 【0075】 實施例9 醫藥組合物在血清中 HBsAg 和 HBcAg 特異性抗體檢測

1、檢測步驟：用純化的 HBsAg 和 HBcAg 包被96孔酶標板，形成固相抗原，經過封閉處理後，將待測血清以一定的起始稀釋度作倍比稀釋，設多個稀



釋度，在96孔酶標板中加入倍比稀釋後的血清樣本，再與 HRP 標記的抗 IgG/IgG1/IgG2a 抗體結合，形成抗原-抗體(血清)-酶標抗體複合物，最後加入底物 TMB 顯色，並用酶標儀測定450nm 波長下的吸光度(OD 值)，顯色顏色的深淺與檢測樣本中的 HBsAg 和 HBcAg 特異性抗體 IgG/IgG1/IgG2a 水準呈正相關，藉由擬合“吸光度 OD 值-血清樣本稀釋倍數(Log)”的關係曲線，進行抗體滴度的判定。

## 2、結果分析：

### 1) 血清中 HBsAb IgG 抗體及亞型檢測結果：

各組不同時間用 ELISA 方法檢測小鼠血清中 HBsAb IgG 抗體及亞型水準如圖11所示。含有該免疫刺激物的 H 組疫苗產生較高滴度的抗 HBsAg 特異性 IgG/IgG1/IgG2a 抗體，且隨著免疫次數的增加，抗體水準不斷增長，在第六次免疫(第14週)時抗體水準接近飽和，特異性抗體滴度可達5.4個對數值以上；A 組-D 組未檢測到特異性抗體，E 組-G 組雖然產生一定的 HBsAg 特異性 IgG/IgG1/IgG2a 抗體水準，但抗體水準顯著低於 H 組，雙佐劑對照(I 組)產生的抗 HBsAg 特異性 IgG 抗體和 IgG2a 抗體水準顯著低於 H 組。

### 2) 血清中 HBcAb IgG 抗體及亞型檢測結果：

各組不同時間用 ELISA 方法檢測小鼠血清中 HBcAb IgG 抗體及亞型水準如圖12所示。含有該免疫刺激物的 H 組疫苗產生較高滴度的抗 HBcAg 特異性 IgG/IgG1/IgG2a 抗體，且隨著免疫次數的增加，抗體水準不斷增長，在第六次免疫(第14週)時抗體水準接近飽和，特異性抗體滴度可達4.8個對數值以上；A 組-D 組未檢測到特異性抗體，E 組-G 組雖然產生一定的 HBcAg 特異性 IgG/IgG1/IgG2a 抗體水準，但抗體水準顯著低於 H 組。且 H 組更偏向於 Th1 通路，D 圖可見特異性抗體 IgG2a 呈顯著上升趨勢，反映出 H 組疫苗可以促進抗 HBcAg 抗體亞型轉變，且轉變效率顯著高於雙佐劑對照(I 組)。

**【0076】 實施例10 不同皂苷對醫藥組合物免疫效果的影響**

1、實驗動物：C57BL/6(N)小鼠，雄性，4週齡，40隻，上海靈暢實驗動物技術有限公司。

2、試劑材料：

1) HBsAg 蛋白、HBcAg 蛋白和 CpG T1均由實施例1製得；

2) QS-21(CAS.NO.A010-023，購自 BRENNTAG 公司)；人參皂苷 Rg1(CAS: 22427-39-0，購自南京春秋生物工程有限有限公司)、黃芪甲苷(CAS: 84687-43-4，購自南京春秋生物工程有限有限公司)、桔梗皂苷 D(CAS: 58479-68-8，購自湖北雲鎂科技有限有限公司)，Iscom 佐劑(購自上海熹垣生物科技有限有限公司)。

3) 使用 PBS 溶液(購自 Hyclone 公司)將 HBsAg 原液、HBcAg 原液分別稀釋至200 µg/ml、100 µg/ml，將各皂苷分別稀釋至50 µg/ml，使用 PBS 溶液將 CpG T1溶解並稀釋至100 µg/ml，供下一步使用。

3、實驗分組：見表7，每次注射量為100µL/隻。其中 A 組為陰性對照，PBS 溶液100µL/隻。

4、實驗步驟：同實施例2。

5、實驗結果：ELISPOT 斑點結果見圖13和圖14，結果顯示，CpG T1與各皂苷聯合應用後均產生了高效的協同作用，誘導產生 HBsAg 和 HBcAg 特異性 IFN-γ 水準顯著高於其他 CpG 和皂苷的組合物，其中，QS21的效果最佳。

表7 實驗動物分組

組別	數量 (隻)	組分(μg/隻小鼠)								
		HBs Ag	HBcA g	CpG T1	QS- 21	人參皂 苷 Rg1	桔梗皂 苷 D	黃芪 甲苷	Iscom 佐劑	CpG 7909
對照	5									
抗原	5	20	10							
QS-21	5	20	10	10	5					
人參皂苷 Rg1	5	20	10	10		5				
桔梗皂苷 D	5	20	10	10			5			
黃芪甲苷	5	20	10	10				5		
Iscom 佐劑	5	20	10	10					5	
7909	5	20	20		5					10

【0077】 綜上所述，本發明所述的醫藥組合物應用雙佐劑組合，相比單一佐劑、其他 CPG 佐劑和 QS21的組合，本發明的 CpG T1~T3與各種佐劑尤其是 QS-21表現出高效的協同作用，可以介導更強烈的免疫應答。含有該免疫刺激組合物的醫藥組合物具有顯著性優勢，表現出高效的免疫治療作用，具有很高的臨床應用價值和廣闊的市場前景。

【0078】 儘管以上已經對本發明作了詳細描述，但是本領域技術人員理解，在不偏離本發明的精神和範圍的前提下可以對本發明進行各種修改和改變。本發明的權利範圍並不限於上文所作的詳細描述，該修改和改變應歸屬於申請專利範圍的範圍。雖然以上僅描述了本發明的具體實施方式的範例，但本領域的技術人員應當理解，以上這些僅為舉例說明，本發明的保護範圍是由所附申請專利範圍限定的。本領域的技術人員在不背離本發明的原理和實質的前提下，可以對這些實施方式做出多種變更或修改，但這些變更或修改均應落入

本發明的保護範圍。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

## 【序列表】

<110> 南京遠大賽威信生物醫藥有限公司  
(JIANGSU THERAVAC BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

<120> 醫藥組合物及其用途

<130> EIC20310011TW

<150> 2019112795360

<151> 2019-12-13

<160> 30

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln

1                        5                        10                        15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu

                      20                        25                        30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys

                      35                        40                        45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser

                      50                        55                        60

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe

65                        70                        75                        80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val  
 85 90 95  
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly  
 100 105 110  
 Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala  
 115 120 125  
 Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp  
 130 135 140  
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu  
 165 170 175  
 Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu  
 180 185 190  
 Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile  
 195 200 205  
 Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val  
 210 215 220  
 Tyr Ile  
 225

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 2

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp  
                   20                    25                    30  
 Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys  
                   35                    40                    45  
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu  
                   50                    55                    60  
 Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys  
                   85                    90                    95  
 Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg  
                   100                    105                    110  
 Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr  
                   115                    120                    125  
 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro  
                   130                    135                    140  
 Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr  
 145                    150                    155                    160  
 Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser  
                   165                    170                    175  
 Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

tgactgtgaa cgttcgagat ga 22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

tcgctgTTTT gtcgTTTTgt cgTT 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

tccatgacgt tccTgacgtt 20



<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

tcgttcgttc gttcgttcgt t 21

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

tcgttcgttc gttcgttcgt tcggt 25

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

tcgtcgtcgt cgtcgctcgc g 21

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

tcgacgttcg tcgttcgctc ttc 23

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

tgctgctgctc gtttgctgctt tgctgctt 27

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

gggggacgat cgtcgggggg 20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

tcgtcgtttc ggcgcgccc 20

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

tcgctcgttcg ttcgctcgaac gacgtttgat 30

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly

1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp

1                    5                    10                    15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 19

Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn

1                    5                    10                    15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro

1                    5                    10                    15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 21

Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu

1                    5                    10                    15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 22

Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val Val Ser

1                    5                    10                    15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 23

Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val  
1                    5                    10                    15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 24

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu  
1                    5                    10                    15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 25

Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln  
1                    5                    10                    15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 26

Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe

1                    5                    10                    15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 27

Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys

1                    5                    10                    15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 28

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly

1                    5                    10                    15

<210> 29

<211> 15



<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 29

Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val

1                    5                    10                    15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 30

Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu

1                    5                    10                    15

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種醫藥組合物，該醫藥組合物包含：

i) B型肝炎表面抗原、該抗原的活性片段、該抗原的變體，或者其中至少兩種的混成物，

ii) B型肝炎核心抗原、該抗原的活性片段、該抗原的變體，或者其中至少兩種的混合物，

iii) 免疫刺激組合物，其包含皂苷和 CpG 寡聚去氧核苷酸，或者其由包含皂苷的佐劑和 CpG 寡聚去氧核苷酸組成，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸序列具有兩個或兩個以上拷貝的5'-TTCGTT-3'基序或5'-TCGTCGTCG-3'基序。

【請求項2】 如請求項1所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸的序列選自以下中的任一種：

CpG T1：TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT(SEQ ID NO: 6)、CpG T2：TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT CGT T(SEQ ID NO: 7)和 CpG T3：TCG TCG TCG TCG TCG TCG(SEQ ID NO: 8)；

較佳地，該 CpG 寡聚去氧核苷酸的序列為 CpG T1：TCG TTC GTT CGT TCG TTC GTT(SEQ ID NO: 6)。

【請求項3】 如請求項1或2所述的醫藥組合物，其中，該皂苷選自皂樹皂苷、人參皂苷、桔梗皂苷、黃芪皂苷、三七皂苷、甘草皂苷、合歡皮皂苷、麥冬皂苷、柴胡皂苷或竹節參皂苷中的一種或多種。

【請求項4】 如請求項3所述的醫藥組合物，其中，該皂樹皂苷為 QS-7、QS-17、QS-18或 QS-21，較佳地，該皂樹皂苷為 QS-21；該人參皂苷為人參皂苷 Rg1、人參皂苷 Rg3、人參皂苷 Rb1或人參皂苷 Re；該桔梗皂苷為桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D2或其兩者的混合物；該黃芪皂苷為黃芪甲苷、黃芪皂

昔 I、黃芪皂昔 II 或其中兩種或兩種以上皂昔單體的混合物；該三七皂昔為三七皂昔 R1；該麥冬皂昔為麥冬皂昔 D；該柴胡皂昔為柴胡皂昔 a、柴胡皂昔 d 或其兩者的混合物；該成歡皮皂昔為合歡皮總皂昔；該甘草皂昔為甘草總皂昔；該竹節參皂昔為竹節參總皂昔。

- 【請求項5】 如請求項1至4中任一項所述的醫藥組合物，其中，該包含皂昔的佐劑為 Iscom 佐劑。
- 【請求項6】 如請求項1至5中任一項所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸包含硫代磷酸酯連接。
- 【請求項7】 如請求項1至6中任一項所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸為硫代寡聚去氧核苷酸。
- 【請求項8】 如請求項1至7中任一項所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸為全硫代寡聚去氧核苷酸。
- 【請求項9】 如請求項1至8中任一項所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸與皂昔的重量比為1~40：0.1~2，較佳為2~40：0.1~2。
- 【請求項10】 如請求項1至9中任一項所述的醫藥組合物，其中，該 CpG 寡聚去氧核苷酸與皂昔的重量比為2：1。
- 【請求項11】 如請求項1至10中任一項所述的醫藥組合物，其中，該 B 型肝炎表面抗原包含如 SEQ ID NO: 1所示的序列或由其組成；該 B 型肝炎核心抗原包含如 SEQ ID NO: 2所示的序列或由其組成。
- 【請求項12】 如請求項1至11中任一項所述的醫藥組合物，其中，該 B 型肝炎核心抗原的活性片段包含 SEQ ID NO: 2中的第1位~第 X 位連續胺基酸或由其組成，其中，X 為149至183之間的整數。
- 【請求項13】 如請求項12所述的醫藥組合物，其中，該 B 型肝炎核心抗原的

活性片段包含 SEQ ID NO: 2 中的第1位~第 X 位連續胺基酸或由其組成，其中，X 為152至183之間的整數。

【請求項14】 如請求項1至13中任一項所述的醫藥組合物，其中，該醫藥組合物的組分 i)、ii)和 iii)之間的重量比為4：2：1.1~42，較佳為4：2：

2.1~42。

【請求項15】 如請求項1至14中任一項所述的醫藥組合物，其中，該醫藥組合物的組分 i)、ii)和 iii)之間的重量比為4：2：3。

【請求項16】 如請求項1至15中任一項所述的醫藥組合物，其中，該醫藥組合物還包含：

iv)可藥用載體。

【請求項17】 一種 B 型肝炎預防性疫苗或 B 型肝炎治療性疫苗，其包含如請求項1至16中任一項所述的醫藥組合物。

【請求項18】 一種請求項1至16中任一項所述的醫藥組合物在製備用於預防和/或治療 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病的藥物中的用途。

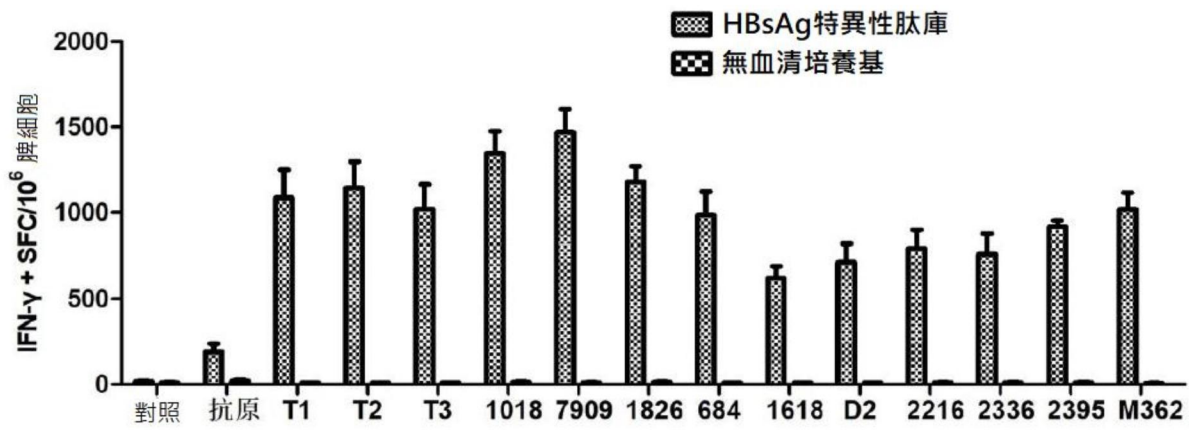
【請求項19】 如請求項18所述的用途，其中，該 B 型肝炎病毒感染和/或 B 型肝炎病毒介導的疾病選自 B 型肝炎、肝硬化和肝癌。

【請求項20】 一種請求項1至16中任一項所述的醫藥組合物在製備用於在物件中產生針對 B 型肝炎病毒的體液免疫和/或細胞免疫應答的藥物中的用途。

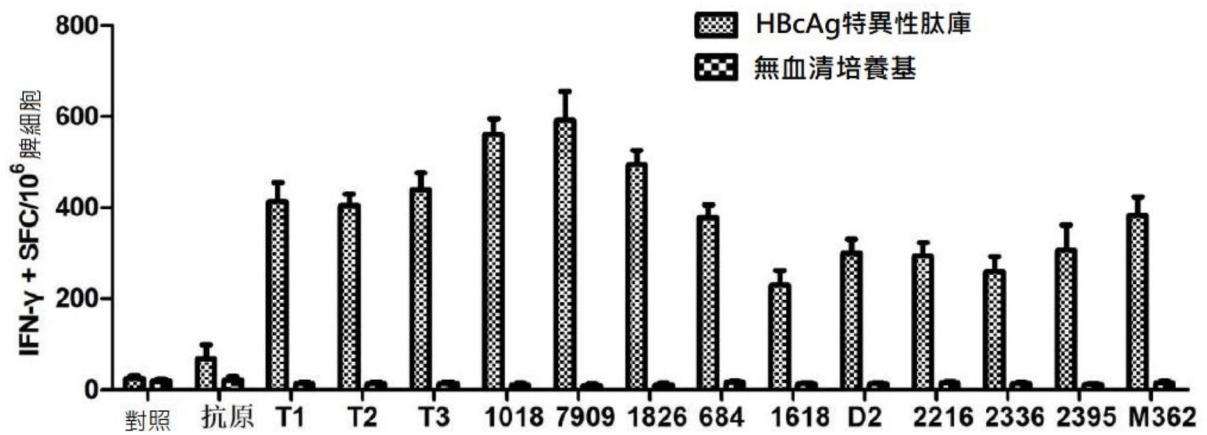
【請求項21】 一種請求項1至16中任一項所述的醫藥組合物在製備用於使物件中 BB 型肝炎核心抗體發生亞型轉變的藥物中的用途。

【請求項22】 一種請求項1至16中任一項所述的醫藥組合物在製備用於在對象中突破 B 型肝炎病毒免疫耐受的藥物中的用途。

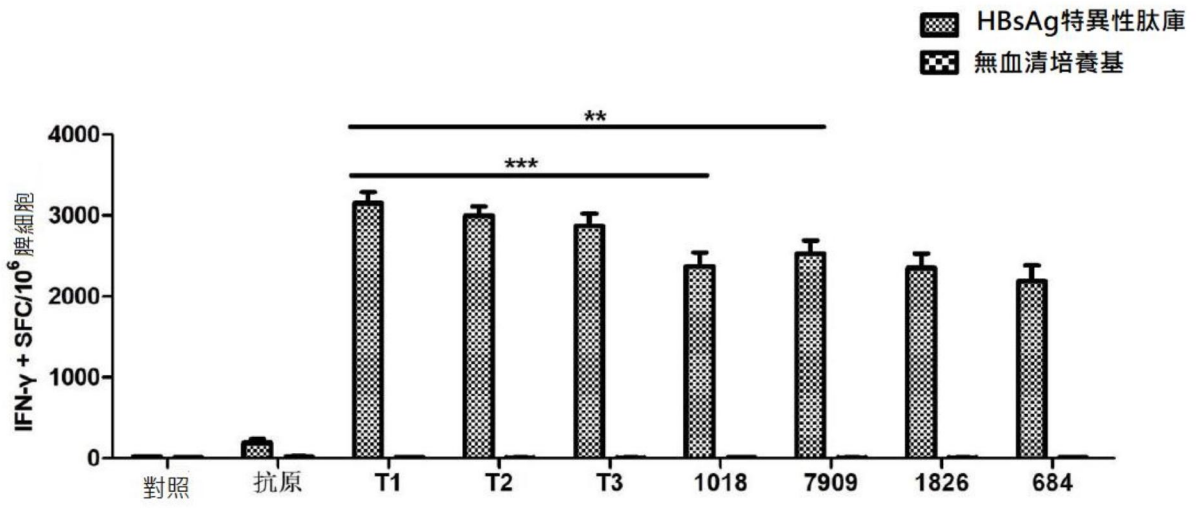
【發明圖式】



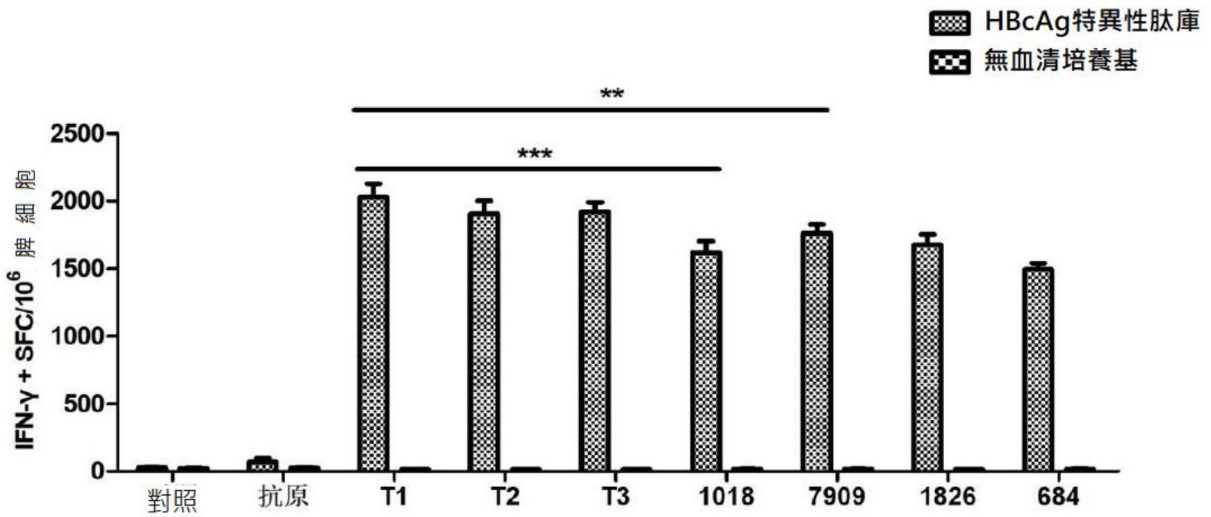
【圖1】



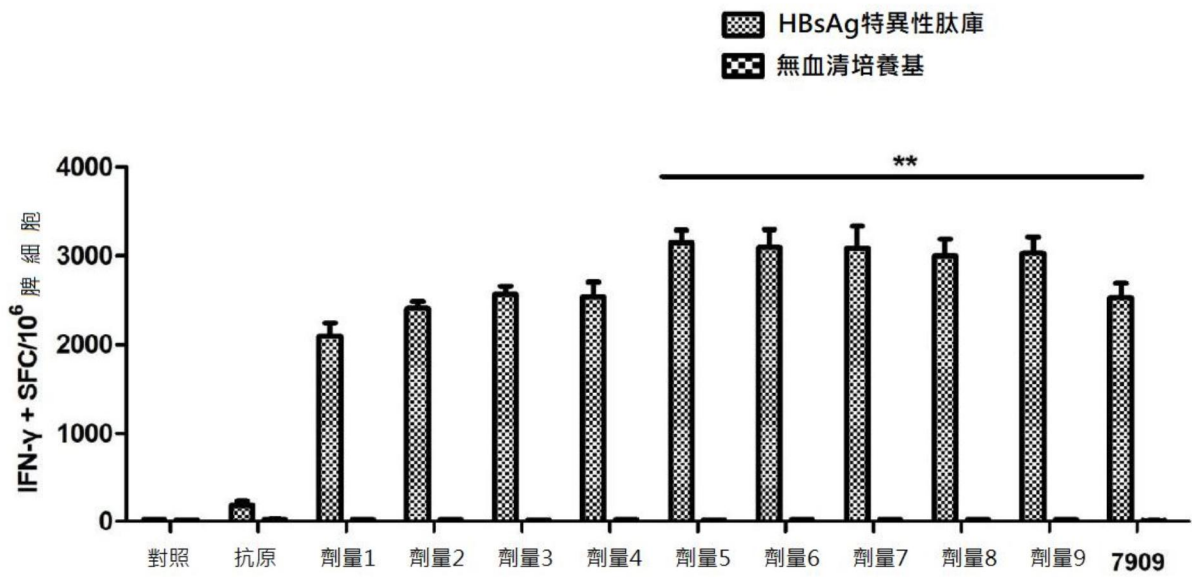
【圖2】



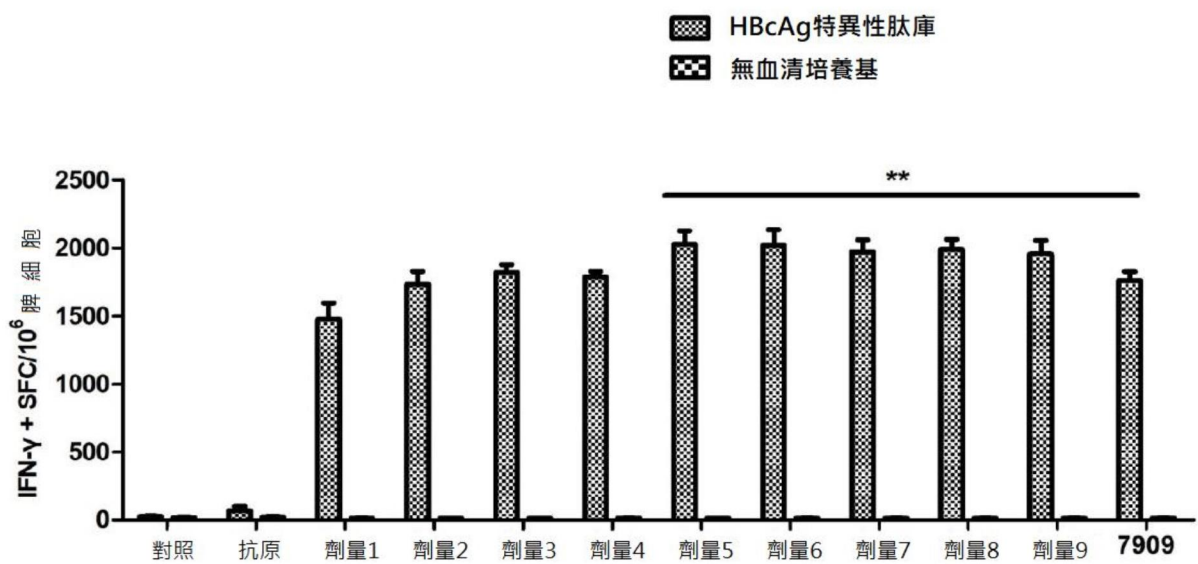
【圖3】



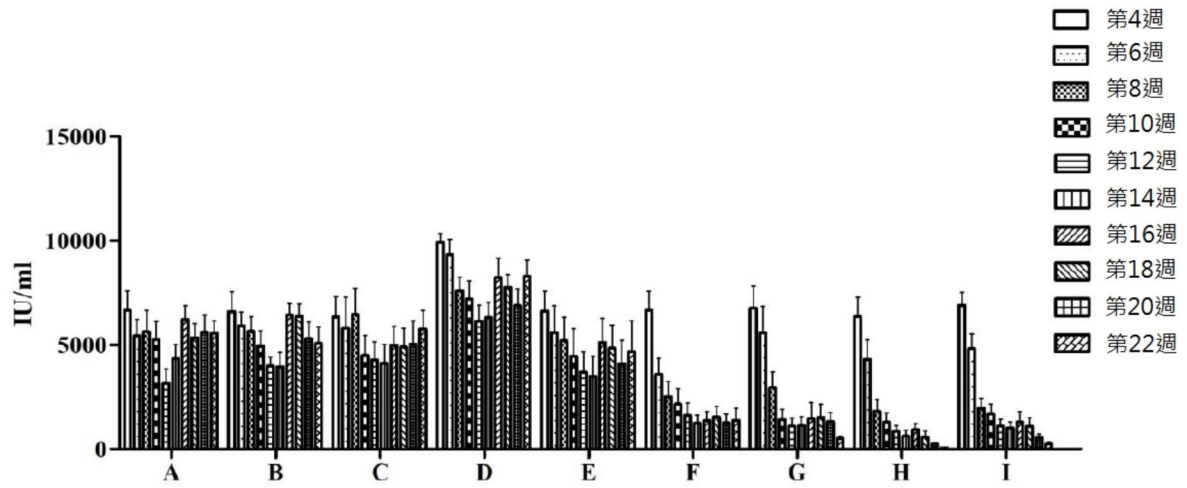
【圖4】



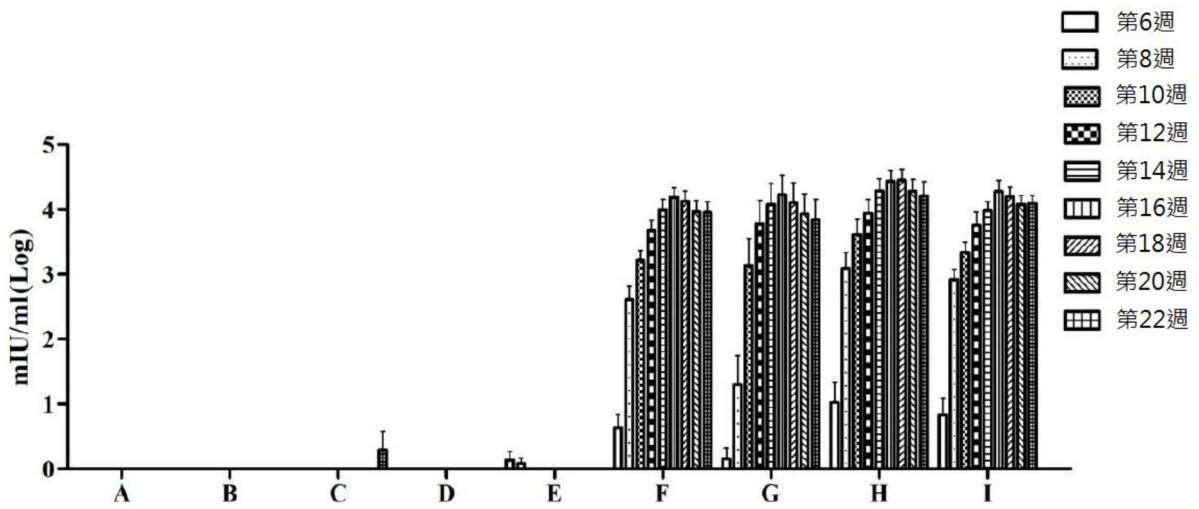
【圖5】



【圖6】

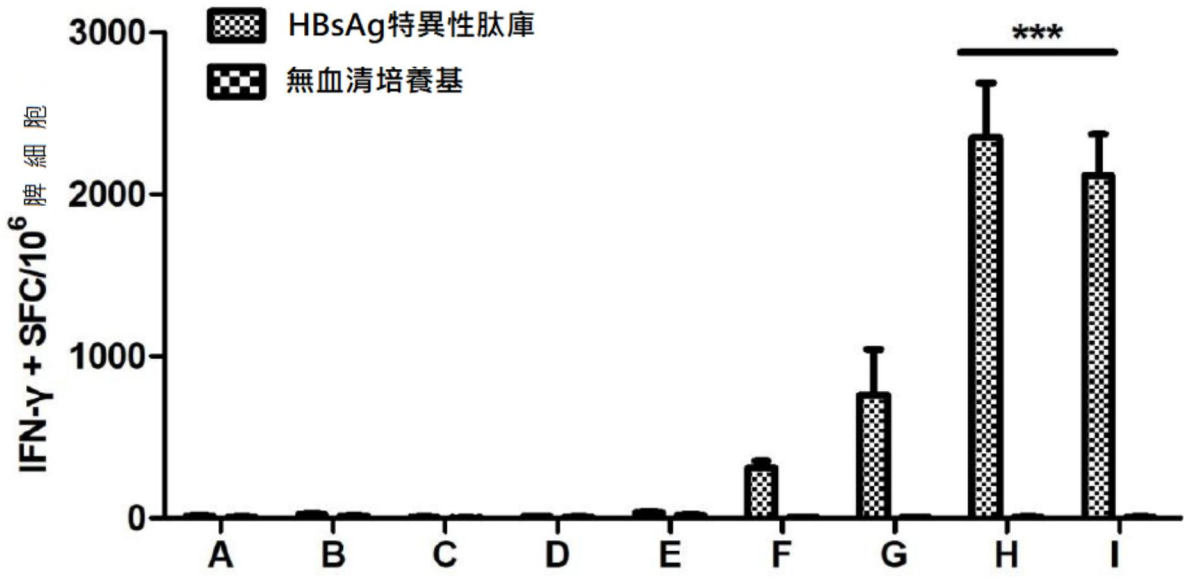


【圖7】

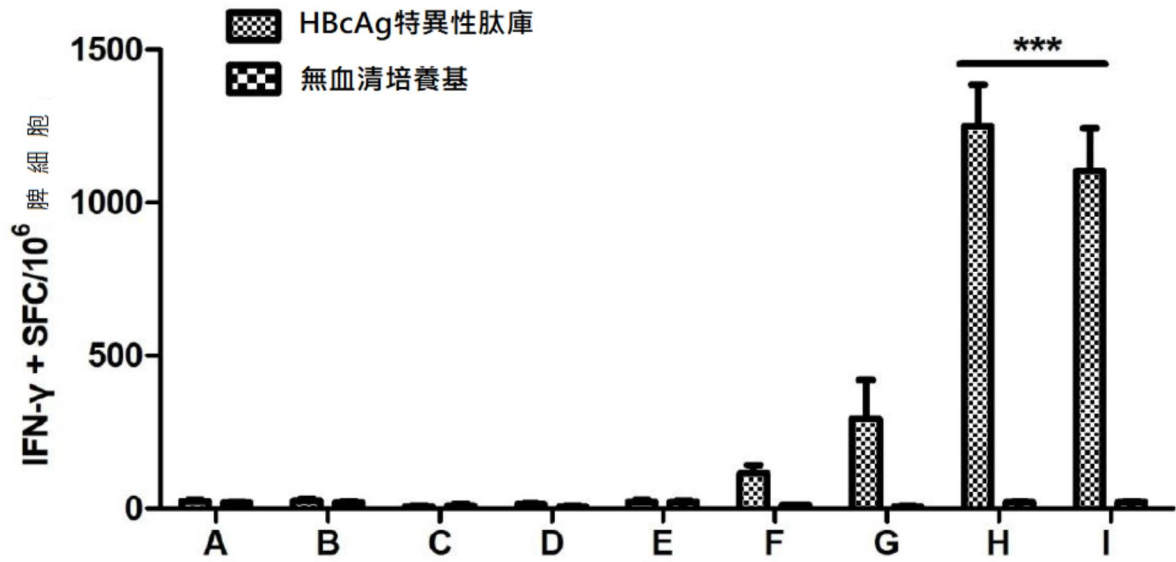


【圖8】

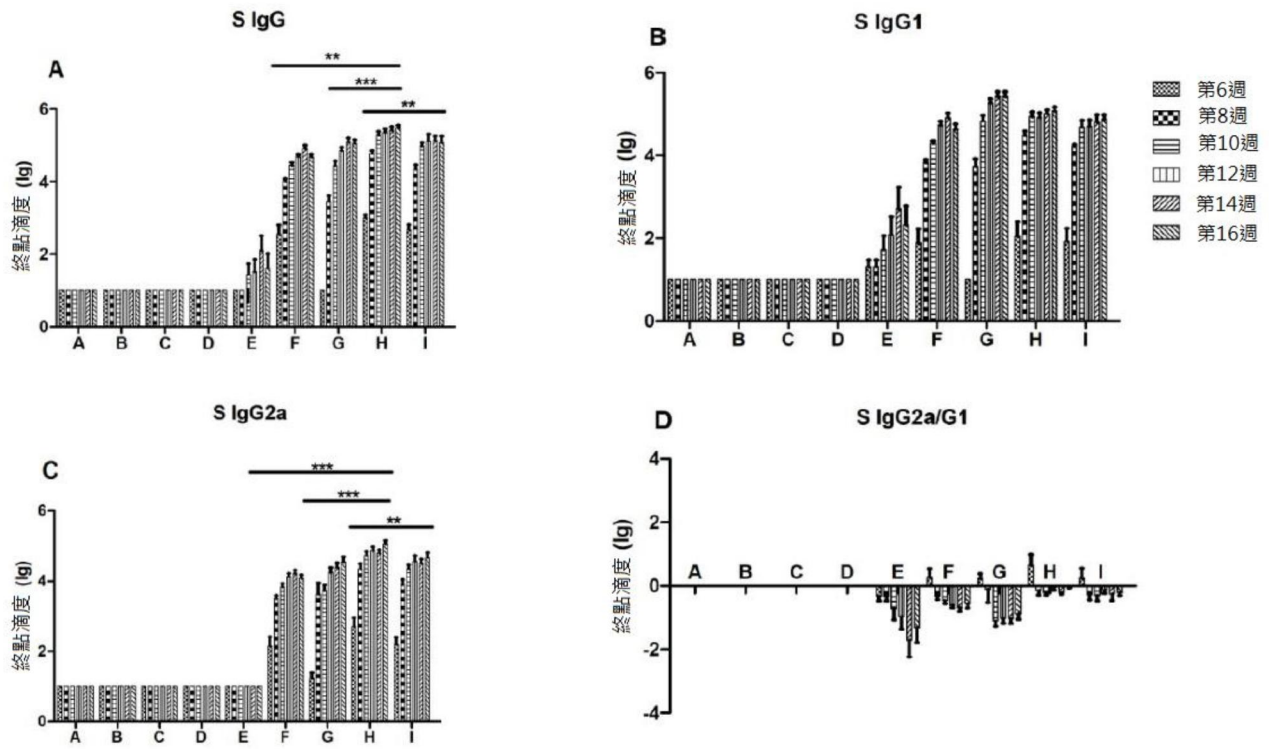




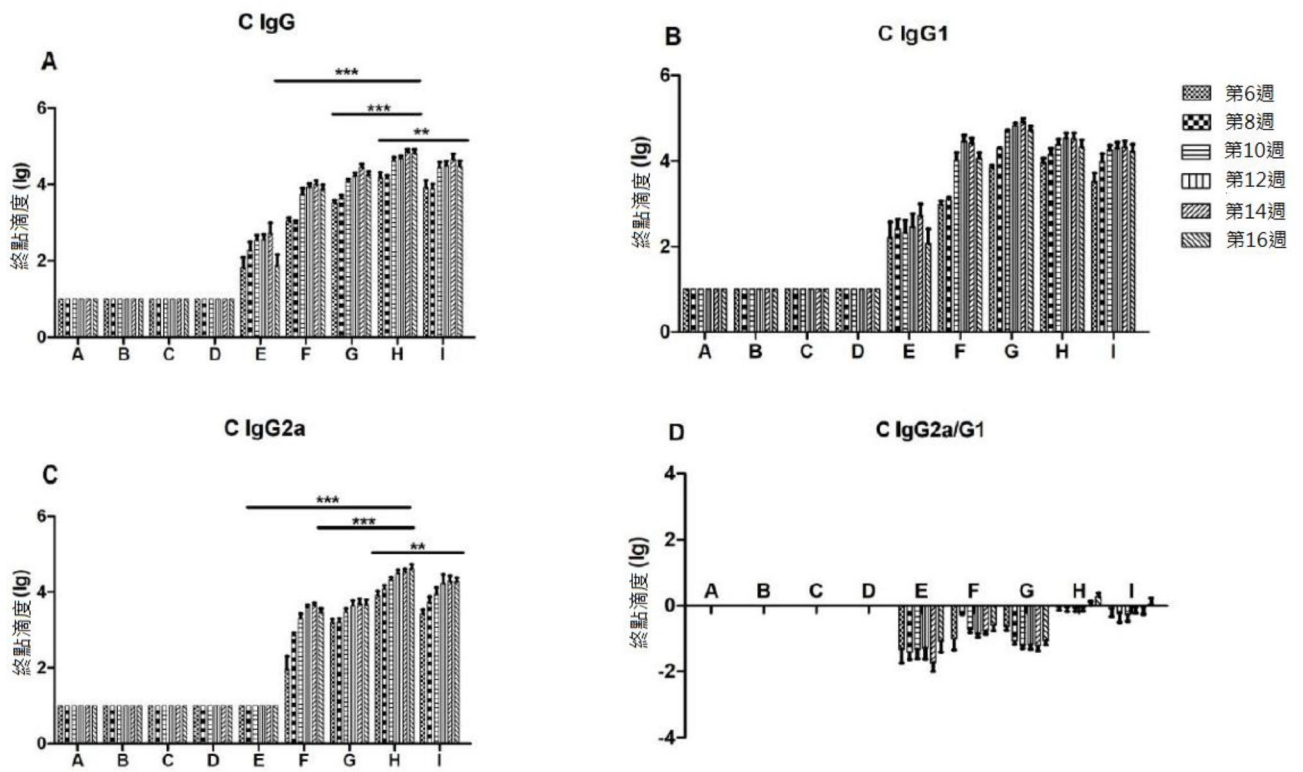
【圖9】



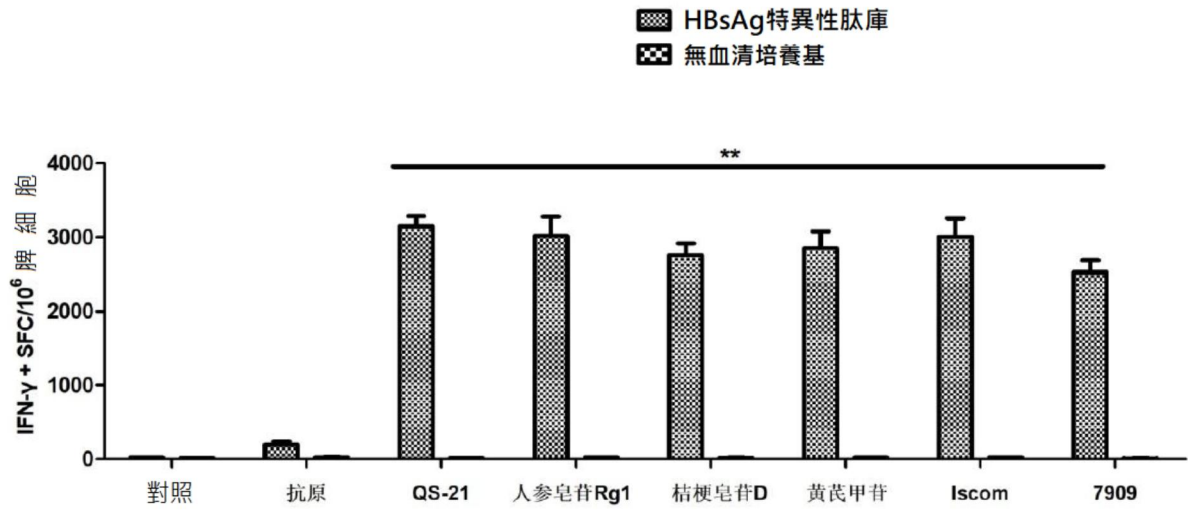
【圖10】



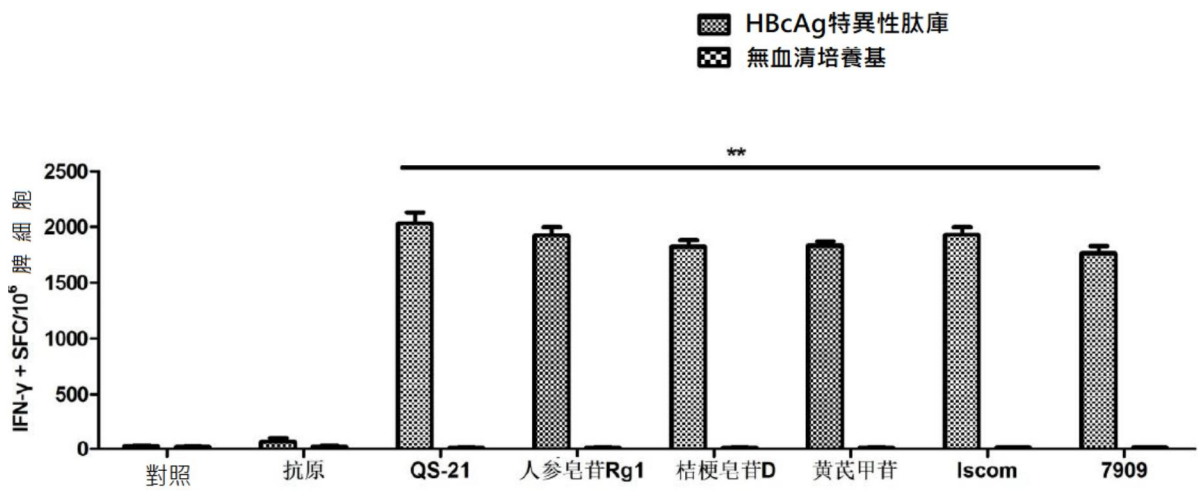
【圖11】



【圖12】



【圖13】



【圖14】