



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111344005 A

(43)申请公布日 2020.06.26

(21)申请号 201880059580.8

(22)申请日 2018.10.04

(30)优先权数据

2017-195262 2017.10.05 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2018/037172 2018.10.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/070019 JA 2019.04.11

(71)申请人 东兴药品工业株式会社

地址 日本国大阪府大阪市北区浪花町14番  
25号

申请人 公益财团法人东京都医学综合研究  
所

日本国立感染症研究所

国立大学法人鹿儿岛大学

国立大学法人爱媛大学

(72)发明人 上下泰造 宫崎隆 小原道法  
真田崇弘 日浅阳一 吉田理  
小原恭子 长谷川秀树

(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理  
有限公司 11444

代理人 薛诗文 王刚

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 9/12(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61K 47/32(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

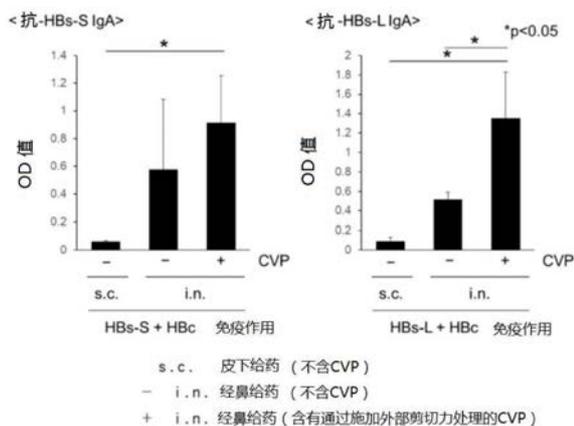
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

经鼻乙型肝炎疫苗组合物及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及用于鼻粘膜喷雾给药以预防和治疗乙型肝炎的乙型肝炎疫苗组合物,其包含乙型肝炎抗原和羧基乙烯基聚合物。



1. 一种用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其包括:(i)乙型肝炎表面抗原(HBs抗原)和/或乙型肝炎核衣壳抗原(HBc抗原),和(ii)包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料,其中,所述凝胶基质材料通过添加外部剪切力进行处理以增加喷雾性能。

2. 根据权利要求1所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其中,(i)所述乙型肝炎疫苗的量为每种抗原0.01-10mg/mL。

3. 根据权利要求1或2所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,所述乙型肝炎疫苗组合物包括0.1w/v%至1.0w/v%的羧基乙烯基聚合物。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其中,所述喷雾性能为控制:(1)喷雾化的组合物的粒径分布、(2)喷雾密度的均匀性、和/或(3)喷雾角度。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,所述乙型肝炎疫苗组合物通过以下方式制备:通过添加外部剪切力来处理包括0.5w/v%至2.0w/v%的羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料,以控制作为喷雾性能的(1)喷雾化的组合物的粒径分布、(2)喷雾密度的均匀性、和/或(3)喷雾角度,从而得到凝胶基质材料,并且

随后在短时间内无应力地将所得的所述凝胶基质材料与包括HBs抗原和/或HBc抗原的病毒原液均匀地混合。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,所述乙型肝炎疫苗组合物由包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料制备,所述凝胶基质材料通过施加外部剪切力进行处理,从而增加喷雾性能,所述喷雾性能为控制:(1)对于喷雾化的组合物的粒径分布,平均粒径在50 $\mu$ m至120 $\mu$ m的范围内,且在10 $\mu$ m至100 $\mu$ m之间的颗粒分布为50%以上,

(2)喷雾密度是均匀的,以形成均匀的实心锥形状,并且

(3)喷雾角度在30°至70°的范围内调节。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,所述乙型肝炎疫苗组合物由包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料制备,所述凝胶基质材料通过施加外部剪切力进行处理从而增加喷雾性能,所述喷雾性能为控制:(1)对于喷雾化的组合物的粒径分布,平均粒径在70 $\mu$ m至100 $\mu$ m的范围内,且10 $\mu$ m至100 $\mu$ m之间的颗粒分布为60%以上,

(2)喷雾密度是均匀的,以形成均匀的实心锥形状,并且

(3)喷雾角度在40°至60°的范围内调节。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,所述乙型肝炎疫苗组合物包括用于喷雾给药的、包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料,所述凝胶基质材料通过添加外部剪切力进行处理,从而控制(1)喷雾化的组合物的粒径分布、(2)喷雾密度的均匀性和(3)喷雾角度,以使得无泵送功能的可喷雾装置能够进行喷雾给药。

9. 一种预防和/或治疗乙型肝炎的方法,所述方法包括:使用能够从鼻孔向鼻粘膜喷雾粘性制剂的装置将根据权利要求1至8中任一项所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物给药于有需要的受试者。

10. 一种根据权利要求1至8中任一项所述的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合

物在治疗和/或预防乙型肝炎中的用途。

## 经鼻乙型肝炎疫苗组合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于鼻粘膜喷雾给药以预防和治疗乙型肝炎的乙型肝炎疫苗组合物及其工艺。

### 背景技术

[0002] 乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染引起的肝炎,该病毒通过血液或体液感染。HBV持续感染肝细胞会引起慢性肝炎、肝硬化、肝细胞癌。

[0003] 现在主要通过使用干扰素制剂 (IFN) 或核苷类似物制剂 (NA) 作为第一线治疗来进行慢性乙型肝炎 (CHB) 的治疗。在IFN疗法中,已经报道了一些有效的实例,其增加免疫力以有效地维持对病毒的生长抑制,但是总的来说,IFN疗法具有低HBV清除率和强副作用,这是一个大问题。另一方面,NA疗法具有约95%的高HBV清除率,但是治疗效果是暂时的并且不能带来完全的治愈。因此,有必要终身接受该给药。相应地,NA疗法也存在依从性和医学经济性的大问题,并且已经报道了长期使用后出现耐药性病毒。因此,需要一种用于CHB的新疗法。

[0004] 关于日本的HBV感染的预防,具有高感染风险的人群(例如HBV携带者的家庭成员、医护人员)会接受疫苗接种,在主要减少HBV携带者方面取得了良好的效果。对于CHB的治疗,过去也尝试了用HBV疫苗的免疫疗法,但是在治疗中还没有足够成功。

[0005] 为了尝试免疫疗法,本发明人注意到在HBV中存在多种抗原的事实,并且已经关注了能够诱导中和抗体的多种HBV抗原中的HBs抗原(乙型肝炎表面抗原)。另外,随着技术研究的最新发展,很明显,针对HBc抗原(乙型肝炎核衣壳抗原)获得的免疫性可能有助于抑制HBV的生长和HBV的排除。

后来,古巴国家药品、设备和医疗器械控制中心(CECMED)开发了一种用于治疗乙型肝炎的经鼻疫苗,其中包含两种抗原,即,HBs抗原和HBc抗原,在孟加拉国进行临床测试后,该疫苗被成功地产品商品化,商品名:HeberNasvac™(非专利文献1)。然而,在其给药方法中,需要与皮下接种结合使用以获得充分的免疫反应,即,其是两轮疫苗接种(two-cycle vaccination),不是用于鼻粘膜给药的完整疫苗。

[0006] 如上所述地,作为下一代乙型肝炎疫苗,期望有一种用途广泛的经鼻疫苗制剂,作为用于治疗 and 预防的HBV疫苗,但目前仍未完全成功。

现有技术

专利文献

[0007] 专利文献1:W02007/123193

非专利文献

[0008] 非专利文献1:HeberNasvac package insert

### 发明内容

[0009] (技术问题)

本发明的目的之一是提供一种用于鼻粘膜喷雾给药的易于使用的乙型肝炎疫苗组合物及其工艺,以及用于治疗 and 预防乙型肝炎的方法,该乙型肝炎疫苗组合物不需要任何平行的给药,例如皮下给药,并且不包含任何具有毒性问题的辅助成分,诸如佐剂。

[0010] (问题的解决方案)

本发明人对上述问题进行了广泛的研究,发现(i)用于鼻粘膜喷雾给药的、包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质(材料)和(ii)HBs抗原和HBc抗原这2种抗原的组合可以在无佐剂的情况下仅通过经鼻给药增强对人体的免疫诱导作用,其中,凝胶基质通过添加外部剪切力进行处理以增加喷雾性能。基于该新发现,完成了本发明。本发明可以提供以下实施方式。

[0011] [1]一种用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其包括:(i)乙型肝炎表面抗原(HBs抗原)和/或乙型肝炎核衣壳抗原(HBc抗原),和(ii)包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料,该凝胶基质材料通过添加外部剪切力进行处理以增加喷雾性能。

[0012] [2]根据[1]的鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其中,(i)乙型肝炎疫苗的量 of 每种抗原0.01-10mg/mL。

[0013] [3]根据[1]或[2]的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其包括0.1w/v%至1.0w/v%的羧基乙烯基聚合物。

[0014] [4]根据[1]至[3]中任一项的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其中,喷雾性能为控制:(1)喷雾化的组合物的粒径分布、(2)喷雾密度的均匀性、和/或(3)喷雾角度。

[0015] [5]根据[1]至[4]中任一项的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其中,乙型肝炎疫苗组合物通过以下方式制备:通过添加外部剪切力来处理包括0.5w/v%至2.0w/v%的羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料,以控制作为喷雾性能的(1)喷雾化的组合物的粒径分布、(2)喷雾密度的均匀性、和/或(3)喷雾角度,从而得到凝胶基质材料,并且

随后在短时间内无应力地将所得的所述凝胶基质材料与包括HBs抗原和/或HBc抗原的病毒原液均匀混合

[0016] [6]根据[1]至[5]中任一项的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,乙型肝炎疫苗组合物由包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料制备,该凝胶基质材料通过施加外部剪切力进行处理,从而增加喷雾性能,该喷雾性能为控制:(1)对于喷雾化的组合物的粒径分布,平均粒径在50 $\mu$ m至120 $\mu$ m的范围内,且在10 $\mu$ m至100 $\mu$ m之间的颗粒分布为50%以上,

(2)喷雾密度均匀,从而形成均匀的实心锥形状(full-cone shape),并且

(3)喷雾角度在30°至70°的范围内调节。

[0017] [7]根据[1]至[5]中任一项的用于鼻腔粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,该乙型肝炎疫苗组合物由包含羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料制备,该凝胶基质材料通过施加外部剪切力进行处理从而增加喷雾性能,该喷雾性能为控制:(1)对于喷雾化的组合物的粒径分布,平均粒径在70 $\mu$ m至100 $\mu$ m的范围内,且在10 $\mu$ m至100 $\mu$ m之间的颗粒分布为60%以上,

(2)喷雾密度均匀,从而形成均匀的实心锥形状,并且

(3)喷雾角度在40°至60°的范围内调节。

[0018] [8]根据[1]至[7]中任一项的用于鼻腔粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,该

乙型肝炎疫苗组合物包含用于喷雾给药的包含羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料,该凝胶基质材料通过添加外部剪切力进行处理,从而控制(1)喷雾化的组合物的粒径分布、(2)喷雾密度的均匀性和(3)喷雾角度,以使得无泵送功能的可喷雾装置能够进行喷雾给药。

[0019] [9]一种预防和/或治疗乙型肝炎的方法,该方法包括:使用能从鼻孔向鼻粘膜喷雾粘性制剂的装置将根据[1]至[8]中任一项的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物给药于有需要的受试者。

[0020] [10]一种[1]至[8]中任一项的用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物在治疗和/或预防乙型肝炎中的用途。

[0021] (发明的效果)

本发明可以用包括作为有效成分的HBs抗原和HBc抗原的疫苗组合物中的少量抗原诱导有效的免疫应答,从而本发明可以提供用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其不需要任何平行给药(例如皮下施用)并且不需要任何佐剂。另外,本发明可以通过易于使用的方法给药,副作用低,并且可以产生足够的免疫应答,因此本发明不仅可以用于预防乙型肝炎,还可以用于治疗乙型肝炎,特别是,通过连续施用具有这种有效活性的疫苗组合物希望能够完全治疗CHB。

## 附图说明

[0022] 图1显示了免疫应答的结果,即,中和抗体效价的结果,该结果在最后接种的最后一周测得。在图表中,s.c.表示皮下接种,i.n.表示经鼻接种。基质材料显示出通过施加外部剪切力而处理的CVP,其中,(-)表示不包含CVP的基质材料,且(+)表示包含CVP的基质材料。

图2示出了免疫应答的结果,即,在最后接种后的一周测量的IgA抗体效价的结果。在图表中,s.c.表示皮下接种,i.n.表示经鼻接种。基质材料显示出通过施加外部剪切力而处理的CVP,其中,(-)表示不包含CVP的基质材料,(+)表示包含CVP的基质材料。

## 具体实施方式

[0023] 本发明提供了一种用于鼻粘膜喷雾给药的乙型肝炎疫苗组合物,其包括含有羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料以及乙型肝炎抗原,凝胶基质材料通过添加外部剪切力进行处理以增加喷雾性能。

[0024] 在此使用的“包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料,凝胶基质材料通过施加外部剪切力进行处理以增加喷雾性能”是指,例如,W02007/123193中公开的“包括皮肤/粘膜粘剂的凝胶基质材料”,其为包括羧基乙烯基聚合物并可选地包括结冷胶的基质材料,其粘度通过施加外部剪切力来调节。W0 2007/123193中公开的实际de外部剪切力不是简单的搅拌或摇动,即,在此提供剪切力的操作可以通过本领域技术人员已知的装置进行,例如,高速回转型乳化装置、胶体磨型乳化装置、高压乳化装置、辊磨型乳化装置、超声型乳化装置和膜式乳化装置可用作提供剪切力的装置。尤其,优选的是均质混合器型、梳子型、以及间歇喷射流生成型、高速回转型乳化装置。该基质材料的特征在于,可以通过施加外部剪切力来将其粘度调节为各种粘度,并且可以控制喷雾容器的喷雾散布角和喷雾密度以满足目的。

[0025] 喷雾给药中使用的装置不应受限制,只要是通常使用的经鼻喷雾装置即可,也可

以包括不具有泵送功能的可喷雾装置。例如,在WO2007/123193(参见图1和2)和WO 2007/123207(参见图1-11)中公开的作为多剂量喷雾容器的上泄压无气型喷雾容器可以用于该用途,因为该喷雾容器可以设置为以任何角度或任何角度范围进行喷雾,并且可以用完而不会有残留在容器中,这适合在发展中国家给许多人进行接种。并且,作为仅用于为一个人接种的一次性装置,可以使用WO 2015/199130(参见图1-4)中公开的经鼻喷雾喷嘴。在本发明中,通过喷雾给药装置给药的乙型肝炎抗原可以长时间在鼻粘膜广泛散布,从而可以提高疫苗的免疫原性。

[0026] 羧基乙烯基聚合物作为本发明的凝胶基质材料的材料成分是通过使作为主要成分的丙烯酸聚合而制备的亲水性聚合物。可以向凝胶基质材料中添加任何成分,这些成分可以不受限制地选自通常用于制备水性凝胶剂的药物添加剂。

通过添加外部剪切力以增加喷雾性能而被处理的包括羧基乙烯基聚合物的凝胶基质材料的含量为0.1-1.0w/v%,优选为0.3-0.7w/v%,即羧基乙烯基聚合物的含量。

[0027] 本发明的疫苗的特征在于包含作为抗原的乙型肝炎抗原表面型和/或核心型(分别为HBs抗原、HBc抗原)。在此使用的乙型肝炎抗原是指通过重组DNA技术在酵母中制备的乙型肝炎表面抗原和乙型肝炎核衣壳抗原。

作为上述乙型肝炎抗原,在此使用其病毒原液,将其纯化或浓缩以与凝胶基质材料混合以用于鼻粘膜喷雾给药。关于本发明的疫苗,每种乙型肝炎病毒抗原的浓度优选为0.01-10mg/mL,更优选0.05-5mg/mL。

乙型肝炎表面抗原(HBsAg)为颗粒形式(直径:约50-60nm),其中脂质膜上有很多抗原蛋白。抗原蛋白最初由三个结构域(S、Pre-S1、Pre-S2)组成。抗原蛋白的区别如下:具有全部三个结构域的抗原是HBsAgL-蛋白,缺少Pre-S1的抗原是HBsAg M-蛋白,缺少Pre-S1和Pre-S2的抗原是HBsAg S-蛋白。通过使用重组酵母可以制备所有抗原。

[0028] 佐剂是具有例如增强和抑制免疫应答的调节活性的物质的通用术语,并且被用作待添加到疫苗中以增强抗原的免疫原性的免疫增强剂。迄今为止,已经研究了许多佐剂。佐剂的使用增强了疫苗的免疫效果,但是它具有诸如炎症的副作用的缺点。可以选择一些佐剂作为用于经鼻给药的疫苗中的候选,但是由于不存在具有普遍安全性的佐剂,因此目前还没有任何获得批准的包含佐剂的经鼻给药疫苗。

[0029] 在将凝胶基质材料与病毒原液混合的步骤中所使用的“无应力”是指在没有热、压力等且没有高速搅拌的情况下进行混合。

[0030] 本发明人已经发现,当针对上述乙型肝炎疫苗使用具有例如对鼻粘膜的高粘附性的上述有用的喷雾性能的凝胶基质材料时,尽管没有佐剂且抗原水平较低,但仍可以制备具有高效和低副作用的疫苗,无需与诸如皮下接种的另一给药方式结合使用。另外,本发明人还发现,使用能够喷雾甚至具有高粘度的凝胶基质材料的装置,可以将乙肝疫苗组合物喷雾到鼻粘膜,其中,喷雾化的组合物的平均粒径在50 $\mu$ m至120 $\mu$ m的适当的范围内(优选70 $\mu$ m至100 $\mu$ m的范围)。10 $\mu$ m与100 $\mu$ m之间的粒径分布为50%以上(优选为60%以上),装置的喷雾角度被设定在30°至70°的范围内(优选在40°至60°的范围内),以便可以将组合物给药至鼻腔中的所要求达到的部位,并且喷雾密度均匀以形成均匀的实心锥形状。此外,本发明人还发现了其工艺和使用该组合物预防和治疗乙型肝炎的方法。基于这些新发现,完成了本发明。

[0031] 用于表示无偏且均匀的喷雾密度的“实心锥形状”是喷雾形状图案之一,并且实心锥形状是指均匀的整个圆。反义词是具有环形的“空心锥”。

[0032] 本发明的疫苗除乙型肝炎病毒抗原和用于鼻粘膜喷雾给药的凝胶基质材料外,还可包含另外的药学上可接受的载体。在此使用的载体可以是通常用于制备疫苗或鼻腔给药制剂中的载体,其包括例如生理盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、等渗水性缓冲溶液和它们的组合。并且,本发明的疫苗可选地包含防腐剂(例如乙基汞硫代水杨酸钠)、等渗剂、pH调节剂、表面活性剂、稳定剂(例如乙二胺四乙酸二钠水合物)和灭活剂(例如福尔马林)。

[0033] 疫苗的剂量应根据受试者的年龄、性别和体重来决定,通常可以每一种抗原0.1-100 $\mu$ g、优选0.5-10 $\mu$ g的剂量,一次、两次或更多次给药。优选地,疫苗按复数给药。在这种情况下,给药间隔优选为1至4周。

#### 实施例

[0034] 在下文中,基于实施例举例说明本发明,但是本发明不限于此。

[0035] 根据以下所示的方法,制备凝胶基质材料和乙型肝炎病毒原液,并如下所示将每种凝胶基质材料和每种病毒原液混合以制备乙型肝炎疫苗组合物。

#### <凝胶基质材料的制备>

##### 凝胶基质材料的实施例(1)

成分	量	制备工艺
羧基乙烯基聚合物	11.0 mg	左栏中所示的每种成分按照对应于此处所示的每种重量的比例混合,并搅拌以变得均匀。随后,使用间歇喷射流产生型高速回转型乳化装置通过高速旋转对混合物施加外部剪切力。通过外部剪切力适当调节粘度后,所得基质材料在 90℃下加热 20 分钟,以得到凝胶基质材料。 性状: 透明无色的凝胶基质材料, 几乎无味。 pH: 7.29 粘度: 3800 mPa·s
L-精氨酸	24.0 mg	
浓缩甘油	20.0 mg	
纯水	q.s.	
总计	1.0 mL	

[0036] <包括乙型肝炎病毒抗原的病毒原液的制备>

##### 病毒原液的实施例(1)

成分	量
HBsAg S-蛋白质	0.2mg
HBcAg	0.2mg
氯化钠	8.0mg
氯化钾	0.2mg
磷酸氢二钠(无水)	1.15mg
磷酸二氢钠(无水)	0.2mg
纯水	总计1mL

[0037] 病毒原液实施例(2)

成分	量
HBsAg L-蛋白质	0.2mg
HBcAg	0.2mg

氯化钠	8.0mg
绿化钾	0.2mg
磷酸氢二钠(无水)	1.15mg
磷酸二氢钠(无水)	0.2mg
纯水	总计1mL

## [0038] &lt;凝胶基质材料与病毒原液的混合物&gt;

在搅拌下以1:1的比例将上述病毒原液的实施例(1)或病毒原液的实施例(2)与凝胶基质材料的实施例(1)混合,得到均匀的经鼻乙型肝炎疫苗组合物(实施例1或实施例2)。搅拌下混合可以在短时间内轻柔地完成,而不会给乙型肝炎疫苗抗原带来诸如热量和压力之类的应力。下面还示出了所得乙型肝炎疫苗组合物中每种成分的量、物理性质以及通过用合适的装置将组合物雾化获得的喷雾性能。

## [0039] 实施例1

成分	量	物理性能/喷雾性能
HBsAg L-蛋白质	0.10 mg	pH: 7.16 粘度: 505 mPa·s
HBcAg	0.10 mg	
羧基乙烯基聚合物	5.50 mg	

L-精氨酸	12.00 mg	使用无泵送功能的喷雾装置对250 $\mu$ L溶液进行喷雾过程中的喷雾性能: ·喷雾化的制剂的平均粒径: 88.2 $\mu$ m ·10 $\mu$ m 和 100 $\mu$ m 之间粒径的比例: 66.3 % ·装置的喷雾角度: 55° ·喷雾密度: 实心锥均匀圆形
浓缩甘油	10.00 mg	
氯化钠	4.00 mg	
绿化钾	0.10 mg	
磷酸氢二钠(无水)	5.75 mg	
磷酸二氢钠(无水)	0.10 mg	
纯水	q.s.	
总计	1.0 mL	

## [0040] 实施例2

成分	量	物理性能/喷雾性能
HBsAg S-protein	0.10 mg	pH: 7.16 粘度: 503 mPa·s 使用无泵送功能的喷雾装置对250 $\mu$ L溶液进行喷雾过程中的喷雾性能:
HBcAg	0.10 mg	
羧基乙烯基聚合物	5.50 mg	
L-精氨酸	12.00 mg	·喷雾化制剂的平均粒径: 84.5 $\mu$ m ·10 $\mu$ m 和 100 $\mu$ m 之间粒径的比例: 65.9 % ·装置的喷雾角度: 53° ·喷雾密度: 实心锥均匀圆形
浓缩甘油	10.00 mg	
氯化钠	4.00 mg	
绿化钾	0.10 mg	
磷酸氢二钠(无水)	5.75 mg	
磷酸二氢钠(无水)	0.10 mg	
纯水	q.s.	
总计	1.0 mL	

[0041] 根据下表所示制备不包含凝胶基质材料的经鼻乙型肝炎疫苗组合物。

对比例1

成分	量
HBsAg L-蛋白质	0.10mg
HBcAg	0.10mg
氯化钠	8.0mg
氯化钾	0.2mg
磷酸氢二钠(无水)	1.15mg
磷酸二氢钠(无水)	0.2mg
纯水	q.s.
总计	1.0mL

[0001] 对比例2

成分	量
HBsAg S-蛋白质	0.10mg
HBcAg	0.10mg
氯化钠	8.0mg
氯化钾	0.2mg
磷酸氢二钠(无水)	1.15mg
磷酸二氢钠(无水)	0.2mg
纯水	q.s.
总计	1.0mL

[0043] 免疫应答的研究

关于在实施例1和2以及对比例1和2中制备的经鼻乙型肝炎疫苗组合物,用实验动物树鼯评价每种抗体诱导性,如下所示。

(对抗体的抗体诱导)

将用作实验动物的树鼯(*Tupaia belangeri*,购自昆明动物学研究所)随机分为4组(每组4只动物的2组,每组3只动物的两组)。每组4只动物的2组用实施例1和2通过经鼻给药进行抗体诱导,每组3只动物的两组用对比例1和2通过经鼻给药进行抗体诱导。通过高压注射器和液体喷雾装置从鼻孔进行经鼻喷雾给药。将疫苗组合物接种到每个树鼯中,一个鼻孔的量为0.05mL(对于两个鼻孔,每种抗原总计10 $\mu$ g)。初次接种后,每2周进行接种,共接种5次。随后在4周的间隔后,再接种一次。在每次接种时和最后一次接种后一周收集血液,并用每次收集的血液评估中和抗体效价。

单独设置新的两组,每组3只树鼯,将对比例1和2以0.1mL的量(每种抗原10 $\mu$ g)皮下接种到每个树鼯的背部。然后,与上述经鼻给药试验相同的方式处理树鼯(包括连续给药、采血和评估)。

[0044] (中和抗体效价和血清IgA抗体的测定)

通过用乙型肝炎病毒基因型C(C<sub>JPNAT</sub>)感染人原代肝细胞(PXB细胞,PhoenixBio公司制造)然后对其进行培养来制备用于测量中和抗体效价的病毒液。用HepG2-NTCP30细胞进行中和试验,并以常规方式测量中和抗体的效价。

另外,通过ELISA测量针对每种抗原的血清IgA抗体。

[0045] (结果)

最后接种后的1周,测定中和抗体效价和IgA抗体效价,结果示于表1、图1和图2。结果表明,经鼻接种的抗体诱导性高于皮下接种,并且还表明,与不包含CVP的比较例1和2相比,包括通过添加外部剪切力处理的羧基乙烯基聚合物(CVP)的实施例1和2可带来显着更高的抗体诱导性。

[表1]

		血清中和抗体效价		血清 IgA 抗体效价 (OD 值)	
		HBs-S + HBc	HBs-L + HBc	抗-HBs-S IgA	抗-HBs-L IgA
皮下	不含 CVP	320	1280	0.062	0.133
		640	640	0.052	0.061
		80	160	0.067	0.082
经鼻	不含 CVP	2560	640	1.145	0.590
		1280	1280	0.169	0.435
		2560	640	0.417	0.515
	包含 CVP 并经添加外部剪切力处理	5120	10240	1.171	1.430
		2560	5120	0.499	1.785
		10240	10240	1.208	0.676
		5120	10240	0.782	1.519

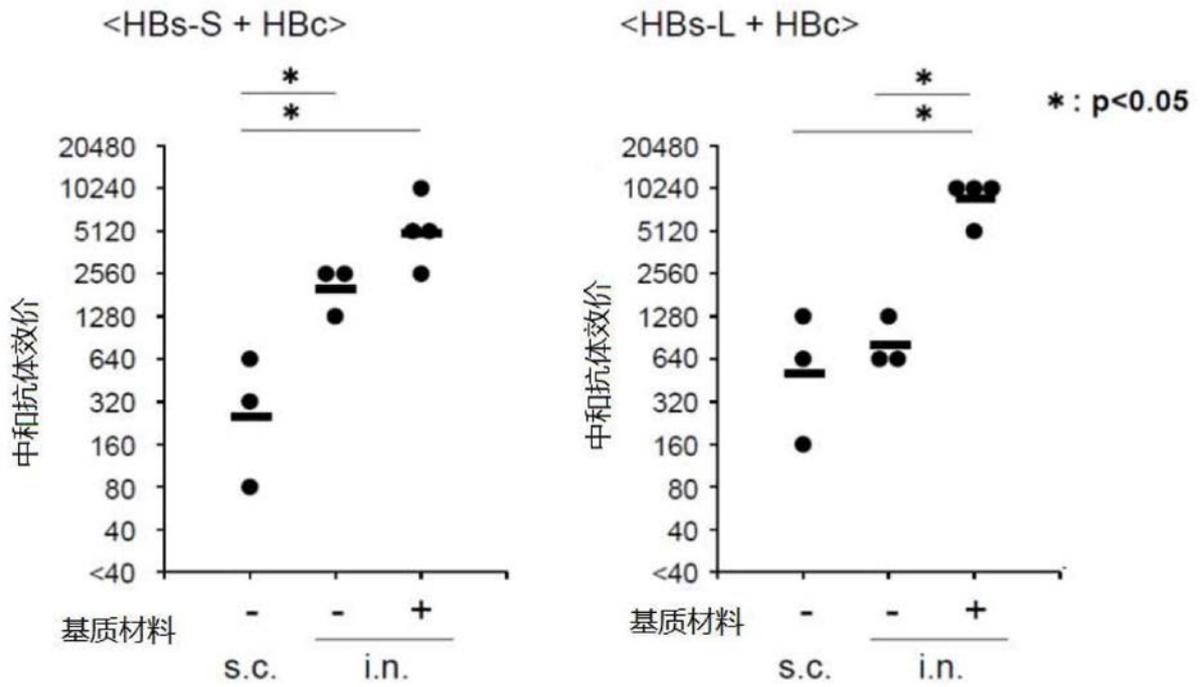
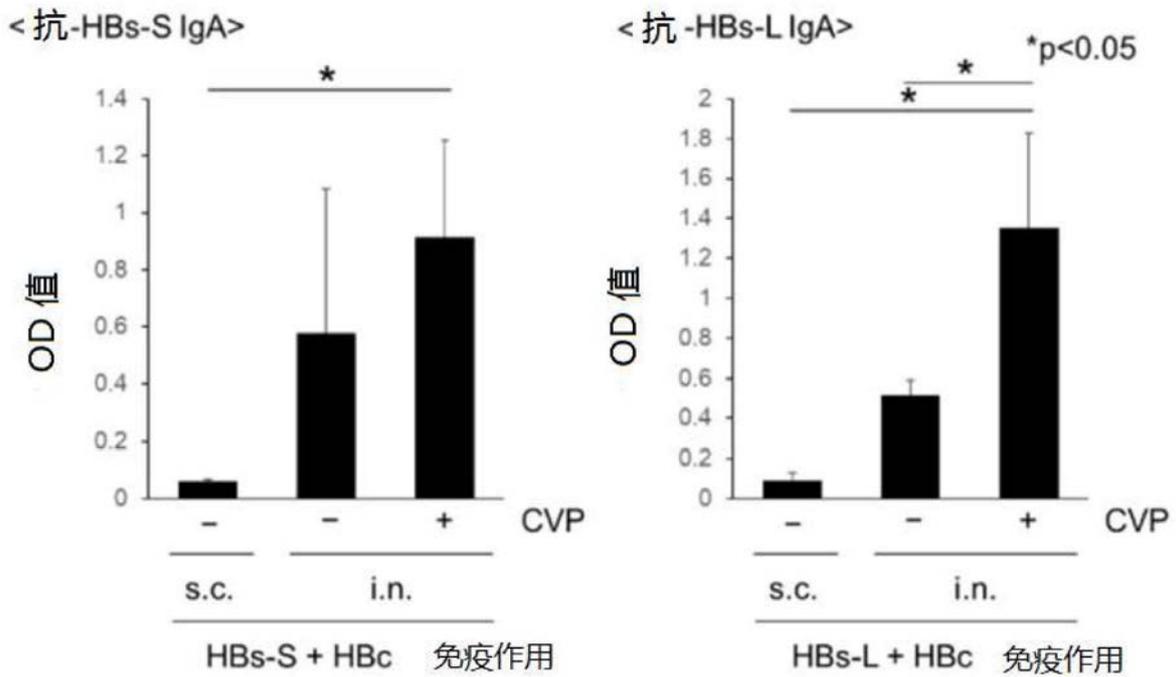


图1



s.c. 皮下给药 (不含CVP)  
 - i.n. 经鼻给药 (不含CVP)  
 + i.n. 经鼻给药 (含有通过施加外部剪切力处理的CVP)

图2