



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105214083 A

(43) 申请公布日 2016.01.06

(21) 申请号 201410294142.3

(22) 申请日 2014.06.26

(71) 申请人 长春华普生物技术有限公司

地址 130021 吉林省长春市高新开发区硅谷大街 1198 号 1002

(72) 发明人 王立公 钱大鹏

(74) 专利代理机构 北京金思港知识产权代理有限公司 11349

代理人 邵毓琴 李晶

(51) Int. Cl.

A61K 39/39(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

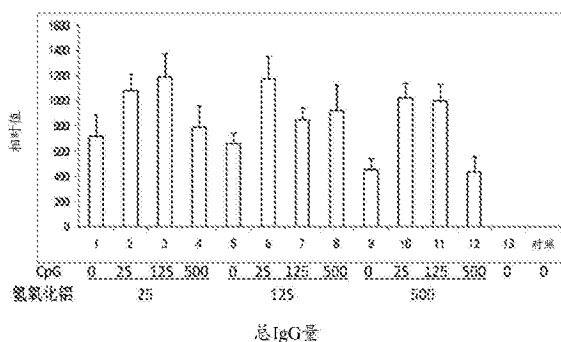
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

含有 CpG 寡核苷酸的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供一种用于诱导受治者体内的免疫反应的药物组合物,其包含:(a)1 μ g/ml-100 μ g/ml 抗原,(b)25 μ g/ml-500 μ g/ml 含有序列 5'-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3' 的 CpG 寡核苷酸,和 (c)25 μ g/ml-500 μ g/ml 铝佐剂。该药物组合物可诱导或增强受治者体内针对抗原的免疫反应。



1. 一种用于诱导受治者体内的免疫反应的药物组合物,其包含:
 - (a) $1\mu\text{g/ml}$ – $100\mu\text{g/ml}$ 抗原,
 - (b) $25\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 含有序列 $5'\text{-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3'}$ 的 CpG 寡核苷酸,和
 - (c) $25\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 铝佐剂。
2. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述 CpG 寡核苷酸的序列为 $5'\text{-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3'}$ 。
3. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述铝佐剂包括氢氧化铝。
4. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述抗原为与病毒相关的抗原。
5. 如权利要求 4 所述的药物组合物,其中,所述病毒选自:重组人乙型肝炎病毒。
6. 如权利要求 4 所述的药物组合物,其中,所述抗原为乙肝表面抗原。
7. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述铝佐剂的浓度为: $25\mu\text{g/ml}$ – $125\mu\text{g/ml}$, 或 $125\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$, 或 $125\mu\text{g/ml}$ – $400\mu\text{g/ml}$, 或 $125\mu\text{g/ml}$ – $300\mu\text{g/ml}$, 或 $250\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$, 或 $300\mu\text{g/ml}$ – $400\mu\text{g/ml}$, 或 $400\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$, 或 $300\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 。
8. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述含有序列 $5'\text{-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3'}$ 的 CpG 寡核苷酸的浓度为: $125\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$, 或 $25\mu\text{g/ml}$ – $125\mu\text{g/ml}$, 或 $125\mu\text{g/ml}$ – $250\mu\text{g/ml}$, 或 $250\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 。
9. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述抗原的浓度为: $20\mu\text{g/mL}$ 。
10. 如权利要求 1 所述的药物组合物,其中,所述抗原浓度为 $20\mu\text{g/mL}$,所述 CpG 寡核苷酸的浓度为 $500\mu\text{g/ml}$,所述铝佐剂的浓度为 $25\mu\text{g/ml}$;或者
所述抗原的浓度为 $20\mu\text{g/ml}$,所述铝佐剂的浓度为 $25\mu\text{g/ml}$,所述 CpG-ODN 的浓度为 $125\mu\text{g/ml}$;或者
所述抗原的浓度为 $20\mu\text{g/ml}$,所述铝佐剂的浓度为 $125\mu\text{g/ml}$,所述 CpG-ODN 的浓度为 $25\mu\text{g/ml}$;或者
所述抗原的浓度为 $20\mu\text{g/ml}$,所述铝佐剂的浓度为 $300\mu\text{g/ml}$,所述 CpG-ODN 的浓度为 $125\mu\text{g/ml}$;或者
所述抗原的浓度为 $20\mu\text{g/ml}$,所述铝佐剂的浓度为 $400\mu\text{g/ml}$,所述 CpG-ODN 的浓度为 $125\mu\text{g/ml}$;或者
所述抗原的浓度为 $20\mu\text{g/ml}$,所述铝佐剂的浓度为 $125\mu\text{g/ml}$,所述 CpG-ODN 的浓度为 $500\mu\text{g/ml}$ 。
11. 如权利要求 1 至 10 任一项所述的药物组合物,其还包含药学上可接受的赋形剂。
12. 权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物在制备用于诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的药物中的应用。
13. 如权利要求 12 所述的应用,其中,所述药物为乙肝疫苗或丙肝疫苗。
14. 如权利要求 12 所述的应用,其中,所述药物为基因工程乙肝疫苗。
15. 如权利要求 14 所述的应用,其中,所述基因工程乙肝疫苗包括重组酵母乙肝疫苗和重组 CHO 乙肝疫苗。
16. 如权利要求 12 所述的应用,其中,所述药物被配制为用于肠胃外给药的剂型、用于

口服给药的剂型或用于透皮给药的剂型。

17. 如权利要求 14 所述的应用,其中,所述用于肠胃外给药的剂型为注射剂型。

18. 如权利要求 14 所述的应用,其中,所述用于口服给药的剂型为片剂、药丸、胶囊、凝胶、糖浆、浆状物和悬浮液。

19. 一种诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的方法,所述方法包括:将有效量的权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物给药于所述受治者。

20. 如权利要求 17 所述的方法,其中,所述方法还包括将有效量的权利要求 1 至 11 任一项所述的药物组合物再次给药于所述受治者。

21. 如权利要求 18 所述的方法,其中,所述再次给药的时间间隔为 2 周至 12 周。

22. 如权利要求 19 所述的方法,其中,所述再次给药的时间间隔为 4 周。

含有 CpG 寡核苷酸的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及一种含有 CpG 寡核苷酸的药物组合物,具体而言,本发明涉及基于 CpG 寡核苷酸与铝佐剂的协同作用的用于加强针对抗原的免疫反应的药物组合物。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒 (HBV) 是危害公众健康的全球性重大问题,使用疫苗能有效预防 HBV 感染,降低慢性肝炎携带率,控制乙肝流行。据 WHO 报道,自 1982 年以来,全世界已经使用了 10 亿剂量的乙型肝炎病毒疫苗,对预防和控制乙型肝炎病毒的传播起到了非常重要的作用。由于 HBV 采用的是易出错的基于 RNA 的复制,从而导致乙肝表面抗原 (HBsAg) 改变的 HBV 抗性逃避突变株的出现。目前市场上预防用乙型肝炎疫苗均用氢氧化铝 ($\text{Al}(\text{OH})_3$) 作为佐剂,其能够增强 Th2 类免疫应答和体液免疫,可以诱导机体产生和分泌保护性抗体 IgG1,氢氧化铝起贮藏作用且推迟抗原清除的时间,延长抗原暴露于免疫系统的时间;同时活化补体,提高淋巴结诱捕能力和淋巴细胞的滞留时间;吸附抗原并转运抗原至淋巴结,产生免疫应答;包裹抗原并缓慢地释放,起到抗原仓库的作用。但近年随着疫苗学及免疫学的发展,已发现其局限性:氢氧化铝主要刺激 Th2 相关抗体的产生(包括 IgE),但不能诱导产生 Th1 细胞免疫反应,不能刺激 Th1 活性,也不能加强细胞免疫 (CTL),阻断 CD8+CTL 的激活。这种抗体虽能中和掉细胞外的病毒,但不能彻底清除掉潜伏在感染细胞中的乙型肝炎病毒,往往导致患者体内乙型肝炎病毒的藏匿。而且人群中 10% 左右的人对该疫苗反应力低下或无反应。如何提高现有乙型肝炎病毒疫苗的免疫活性或研制出能有效激发清除藏匿于细胞中的乙型肝炎病毒的疫苗尤为重要。

发明内容

[0003] 本发明的目的之一在于提供一种用于诱导受治者体内的免疫反应的药物组合物,其包含:(a) $1\mu\text{g/ml}$ – $100\mu\text{g/ml}$ 抗原,(b) $25\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 含有序列 $5' - \text{tcgacgttcgtcgttcgtcgttc} - 3'$ 的 CpG 寡核苷酸,和 (c) $25\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 铝佐剂。

[0004] 在本发明的一种实施方式中,所述 CpG 寡核苷酸的序列为 $5' - \text{tcgacgttcgtcgttcgtcgttc} - 3'$,所述铝佐剂为氢氧化铝,所述抗原为与病毒相关的抗原;优选地,所述病毒选自:肝炎病毒,例如,重组人乙型肝炎病毒,所述抗原为乙肝表面抗原。

[0005] 在本发明的药物组合物中,所述铝佐剂的浓度为: $25\mu\text{g/ml}$ – $125\mu\text{g/ml}$,或 $125\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$,或 $125\mu\text{g/ml}$ – $400\mu\text{g/ml}$,或 $125\mu\text{g/ml}$ – $300\mu\text{g/ml}$,或 $250\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$,或 $300\mu\text{g/ml}$ – $400\mu\text{g/ml}$,或 $400\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$,或 $300\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 。所述含有序列 $5' - \text{tcgacgttcgtcgttcgtcgttc} - 3'$ 的 CpG 寡核苷酸 (CpG-ODN) 的浓度为: $125\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$,或 $25\mu\text{g/ml}$ – $125\mu\text{g/ml}$,或 $125\mu\text{g/ml}$ – $250\mu\text{g/ml}$,或 $250\mu\text{g/ml}$ – $500\mu\text{g/ml}$ 。所述抗原的浓度为: $20\mu\text{g/ml}$ 。

[0006] 根据本发明的优选实施方式,本发明的药物组合物中,所述抗原的浓度为: $20\mu\text{g/}$

ml,所述铝佐剂的浓度为:250 μ g/ml-500 μ g/ml 或 300 μ g/ml-500 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为:125 μ g/ml-500 μ g/ml。

[0007] 在本发明更为优选的实施方式中,所述抗原的浓度为:20 μ g/ml,所述铝佐剂的浓度为:125 μ g/ml、250 μ g/ml、300 μ g/ml、400 μ g/ml 或 00 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为:125 μ g/ml、250 μ g/ml 或 500 μ g/ml。

[0008] 在本发明尤为优选的实施方式中,所述抗原的浓度为 20 μ g/ml,所述铝佐剂的浓度为 25 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为 500 μ g/ml;或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml,所述铝佐剂的浓度为 25 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml;或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml,所述铝佐剂的浓度为 125 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为 25 μ g/ml;或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml,所述铝佐剂的浓度为 300 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml;或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml,所述铝佐剂的浓度为 400 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml;或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml,所述铝佐剂的浓度为 125 μ g/ml,所述 CpG-ODN 的浓度为 500 μ g/ml。

[0009] 本发明的药物组合物还包含药学上可接受的赋形剂,所述赋形剂选自:溶剂、分散介质、包被剂、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗菌剂、抗真菌剂),等渗剂、延迟吸收剂、盐、药物稳定剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、颜料,以及它们的组合或类似物。

[0010] 本发明的另一目的在于提供本发明的药物组合物在制备用于诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的药物中的应用。通过使用药物领域常用的赋形剂可将本发明的药物组合物配制为用于肠胃外给药的剂型,例如,注射剂型;用于口服给药的剂型,例如,片剂、药丸、胶囊、凝胶、糖浆、浆状物和悬浮液,或用于透皮给药的剂型,或者其他本领域常用的剂型。在本发明的一种实施方式中,通过本发明的药物组合物配制的用于诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的药物可为乙肝疫苗或丙肝疫苗,可选地,通过本发明的药物组合物配制的用于诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的药物为基因工程乙肝疫苗,包括重组酵母乙肝疫苗和重组 CHO 乙肝疫苗。

[0011] 本发明的又一目的在于提供一种诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的方法,所述方法包括:将有效量的本发明的药物组合物给药于所述受治者。所述方法还可包括将有效量的本发明的药物组合物再次给药于所述受治者。其中,所述再次给药的时间间隔为 2 周至 12 周。在本发明的一种实施方式中,所述再次给药的时间间隔为 4 周。通过向受治者给药两次本发明的药物组合物即可诱导受治者体内针对抗原的免疫反应,产生保护性抗体应答水平,这相对于目前给药三次来诱导免疫反应的方法而言,减少了给药次数,缩短了诱导受治者体内的免疫反应的全程免疫时间。

附图说明

[0012] 图 1 表示联合使用不同浓度的 CpG 和不同浓度的铝佐剂诱导 HBsAg 产生 IgG 的总量的变化;

[0013] 图 2 表示使用不同浓度的 CpG 和不同浓度的铝佐剂联合诱导 HBsAg 产生 IgG2a 亚型的量的变化;

[0014] 图 3 表示使用不同浓度的 CpG 和不同浓度的铝佐剂联合诱导 HBsAg 产生 IgG2a 与

IgG1 的比值的变化；

[0015] 图 4 表示使用不同浓度的 CpG 和不同浓度的铝佐剂联合在小鼠体内诱导 HBsAg 产生抗-HBs 抗体滴度的变化；

[0016] 图 5 表示使用不同浓度的 CpG 和不同浓度的铝佐剂联合在小鼠体内诱导 IFN- γ 产生的量的变化。

具体实施方式

[0017] 以下将结合实施例对本发明涉及的多个方面进行详细说明,这些实施例仅用于举例说明。本领域普通技术人员可理解的是,本发明不受实施例中所描述的具体操作步骤的限制。

[0018] 除非另有说明,本文使用的所有技术术语和科学术语通常具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0019] 术语释义

[0020] 免疫佐剂

[0021] 本发明的免疫佐剂是本领域普通技术人员熟知的免疫佐剂,其一般分为如下四类:(1) 微生物及其产物,常用的微生物有分枝杆菌、短小棒状杆菌、百日咳杆菌以及革兰氏阴性杆菌的提取物脂多糖,分枝杆菌的提取物胞壁酰二肽等;(2) 多聚核苷酸,例如,多聚肌苷酸:胞苷酸 (poly1 :C),多聚腺苷酸 (poly1 :A : μ) 等;(3) 弗氏佐剂,(4) 无机物,例如明矾,等。免疫佐剂主要通过以下机制起效:(1) 刺激单核-吞噬细胞系统,增强其对抗原的处理和提呈能力;(2) 延长抗原在体内的存留期,增加与免疫细胞接触的机会;(3) 诱发抗原注射部位及其局部淋巴结的炎症反应,有利于刺激免疫细胞的增殖作用。

[0022] CpG 寡核苷酸

[0023] 本发明中所述的 CpG 寡核苷酸属于新型免疫佐剂,其是由磷酸二酯键连接成的非甲基化的二核苷酸,具有免疫刺激作用。CpG-ODN 能促进 B 细胞增殖分化并分泌 IL-6,从而诱导抗体的分泌;激活单核细胞,巨噬细胞,树突状细胞等抗原提呈细胞分泌多种细胞因子(例如,IL-12, IL-6, TNF- α , IFN- α 和 IFN- β 等)。通过细胞因子间接促进杀伤性 T 细胞(CTL)和天然杀伤细胞(NK 细胞)的活性,诱导细胞内病原体产生细胞免疫,并诱导 NK 细胞和 T 细胞分泌 IFN- γ 。除了诱导天然免疫反应之外,CpG-ODN 还可以增强抗原特异性反应,这是由于(1)通过 B 细胞抗原受体引发的信号传导途径和通过 CpG 引发的 B 细胞信号传导途径之间存在强烈的协同作用;(2)能够增加抗原特异性的 T 辅助的 Th1 样细胞因子,从而增强了 B 细胞和 T 细胞的抗原特异型反应,以及(3)细胞反应需要有共刺激分子的正调控。

[0024] 早在 19 世纪 90 年代,人们就发现给癌症患者注射细菌提取物能明显减轻病情,后来研究表明,细菌 DNA 具有直接的免疫刺激作用和抗肿瘤作用。通过合成的寡聚脱氧核苷酸进行实验研究,发现细菌 DNA 的免疫刺激作用和其中的非甲基化 CpG 二核苷酸有关。

[0025] 具有免疫刺激活性的 CpG-ODN 的基本结构特点如下:

[0026] a. CpG 基序是 CpG-ODN 产生免疫刺激作用的基本结构,其由 CpG 二核苷酸及其 5' 端和 3' 端的各两个碱基构成。

[0027] b. CpG 两侧的嘌呤和嘧啶以及 CpG 的间隔都会影响 CpG-ODN 的免疫刺激活性及其作用特点。

[0028] c. ODN 所含 CpG 基序的数目,通常含有 2-4 个 CpG 基序是最佳的, CpG 基序间的间隔,通常至少要间隔两个碱基,而且最好是胸腺嘧啶。

[0029] d. 含有 poly-G 序列 (3 个或以上鸟嘌呤组成) 的 CpG-ODN 具有较强的刺激浆细胞样树突细胞 (pDC) 产生干扰素- α 的作用;全部硫代修饰的 CpG-ODN 最稳定,且对 B 细胞的刺激作用最佳,但全部硫代修饰的 CpG-ODN 刺激 pDC 产生 IFN- α 的作用却不及部分硫代修饰的 CpG-ODN。

[0030] 基于功能特征, CpG-ODN 可分为三种类型 (Tomoki Ito, et al., Blood, 2006, Vol11 07, Num6:2423-2431) :

[0031] (1)A 型 CpG-ODN,通过嵌合骨架合成,其中骨架的 5' 和 3' 末端是硫代磷酸酯,中间 CpG 区域是磷酸二酯,这些 ODN 能很好地激活天然杀伤细胞 (NK 细胞) 和浆细胞样树突细胞 (pDC 细胞) 使其大量产生 IFN- α ,但只能有限地激活 B 细胞;

[0032] (2)B 型 CpG-ODN,通过可抵抗核酸酶的硫代磷酸酯骨架合成,很好地激活 B 细胞和 pDC 细胞,使其产生 IL-12 并诱导抗体分泌,但是只能有限地激活 NK 细胞,通常 B 型 CpG-ODN 可有效作为疫苗佐剂;以及

[0033] (3)C 型 CpG-ODN,通过硫代磷酸酯骨架合成,具有介于 A 型和 B 型 CpG-ODN 之间的刺激活性,例如,很好地激活 B 细胞,也能很好地激活 NK 细胞和 pDC 细胞。

[0034] 本发明使用的 CpG-ODN 含有序列 5'-tcgacgttcgtcgttcgttc-3' (SEQ ID NO. :1);在本发明的一种优选的实施方式中,本发明使用的 CpG-ODN 的核苷酸序列为 5'-tcgacgttcgtcgttcgttcgttc-3' (SEQ ID NO. :1)。所述 CpG-ODN 的浓度为:125 μ g/ml-500 μ g/ml,或 25 μ g/ml-125 μ g/ml,或 125 μ g/ml-250 μ g/ml,或 250 μ g/ml-500 μ g/ml。

[0035] 本发明的 CpG-ODN 中的碱基可为未修饰的,或部分修饰的,或全部修饰的。所述修饰可包括多种化学修饰,例如,使用硫代磷酸酯部分修饰或全部修饰本发明的 CpG-ODN 中的碱基。所述修饰可在寡核苷酸的合成过程中进行或者在合成之后进行,并且所述修饰可发生在核苷之间的磷酸二酯桥键上、核糖单元上和 / 或天然核苷碱基 (腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶) 上。当在合成寡核苷酸的过程中进行修饰时,被修饰的碱基可被并入寡核苷酸内部或位于寡核苷酸末端。当在合成寡核苷酸之后进行修饰时,所述修饰可通过使用活性基团进行,例如,通过氨基修饰成分进行,通过 3' 或 5' 羟基进行,或通过磷酸酯基团进行。

[0036] 本发明所述的化学修饰可包括对本发明的 CpG-ODN 的骨架进行修饰,包括但不限于,用硫代磷酸酯对骨架进行修饰,得到硫代磷酸酯骨架,这种骨架是一种稳定的核酸分子的糖磷酸酯骨架,在该骨架中,至少一个核苷酸之间的键上,硫取代了未桥接的磷酸酯的氧,或者,在每个或每隔一个核苷酸之间的键上,硫取代了未桥接的磷酸酯的氧。还可对寡核苷酸骨架进行其他修饰,例如,使用非离子型 DNA 类似物,例如,烷基磷酸酯和芳基磷酸酯,对骨架进行修饰,其中,由烷基或芳基取代带电荷的磷酸酯中的氧,或者使用磷酸二酯和烷基磷酸三酯对骨架进行修饰,其中,将带电荷的氧烷基化。

[0037] 铝佐剂

[0038] 本发明中所述的铝佐剂是本领域所公知的且常用的免疫佐剂,其能从溶液中强烈吸附蛋白质抗原,形成沉淀。当将其接种到机体内后可形成一个“抗原库”,缓慢释放出抗原,充分延长了抗原的作用时间。同时还能促进局部 (注射部位) 巨噬细胞的应答。本发

明的铝佐剂可选自：氢氧化铝，磷酸铝和硫酸铝。

[0039] 在本发明优选的实施方式中，所述铝佐剂为氢氧化铝 ($\text{Al}(\text{OH})_3$)。所述铝佐剂的浓度为： $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $125\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $125\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $125\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $125\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

[0040] 抗原

[0041] 本发明中所述的抗原是指能够诱导机体的免疫系统发生免疫应答，并能与免疫应答的产物（抗体和 / 或效应细胞）在体内或体外结合，发生特异性反应的物质，其可包括蛋白质、脂质、糖类、核酸、化合物，等等，其中，作为抗原的蛋白质包括被修饰或未被修饰的蛋白质，所述修饰例如糖基化或甲基化，例如，所述蛋白质被环化或连接至脂质。与感染原或疾病有关的抗原包括作为感染原的一部分的抗原，例如，包膜蛋白、衣壳蛋白、表面蛋白、毒素、细胞壁、抗原脂质，等等。其他合适的抗原可包括宿主的抗原，其包括被诱导、修饰或过表达为感染或疾病的标志物的那些抗原。从感染原、感染、病症或疾病衍生得到的所有这些抗原或者与感染原、感染、病症或疾病有关的所有这些抗原适用于本发明。

[0042] 在本发明的一些实施方式中，所述抗原为与病毒相关的抗原，所述病毒包括但不限于：肝炎病毒，例如，乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒。

[0043] 乙肝表面抗原 (HBsAg)

[0044] 本发明中所述的乙肝表面抗原 (HBsAg) 由 226 个氨基酸残基组成，包括三种蛋白成份：小分子 S 蛋白、中分子 M 蛋白和大分子 L 蛋白，它们拥有共同的 C 端。S 区又分为 S 基因、preS1 基因和 preS2 基因 3 段，它们读码框相位相同，连续串连排列，分别编码 S 蛋白、preS1 蛋白和 preS2 蛋白。S 基因区所编码的产物除了在病毒及亚病毒颗粒的装配中作为主要成分外，还刺激机体产生中和性抗体或称为保护性抗体。以前认为只有 S 蛋白可以刺激机体产生中和性抗体，现有的研究表明 preS1 和 preS2 多肽的免疫原性都很强，含有多个优势抗原决定簇，由 preS 抗原引起的 T 细胞免疫反应，可以帮助克服某些个体对 S 蛋白的免疫无反应状态或同时对 S 和 preS2 蛋白的双重无反应状态。乙肝表面抗原 (HBsAg) 共有 14 个半胱氨酸残基 (Cys)，并以 Cys 的二硫键形成复杂的空间结构。HBsAg 按血清学分为 4 个主要的亚型：adr、adw、ayr 和 ayw。a 抗原共同决定簇位于 S 蛋白的 124–147 位氨基酸残基段，形成亲水性的双环状结构，此构型与 a 决定簇的抗原性密切相关，也与免疫原性有重要关系。乙肝表面抗原 (HBsAg)，是一种乙肝病毒外衣壳蛋白，其并非完整病毒。这种表面抗原不含有病毒遗传物质，不具备感染性和致病性，但保留了免疫原性，即刺激机体产生保护性抗体的能力。先前，从乙肝病毒携带者的血液中提取乙肝表面抗原，经纯化灭活等严格工序制备血源性乙肝疫苗，但是该疫苗由于安全、来源和成本等原因已被淘汰（如，有引起血源性疾病的嫌疑和浪费大量的血浆）。

[0045] 在本发明的优选实施方式中，所述抗原为乙肝表面抗原。所述抗原的浓度为： $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $90\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $80\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $70\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，或 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ – $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

[0046] 浓度

[0047] 本发明的药物组合物中各个成分的浓度为足以诱导机体的免疫系统发生免疫应答的量。本发明的药物组合物中各个成分的浓度取决于所使用的特定免疫佐剂和抗原的活性、给药途径、联合使用的其他成分、所治疗或预防的特定疾病的严重性和给药形式，等等。本发明的药物组合物中各个成分的浓度是使安全性和疗效最佳的浓度。典型地，来自体外和 / 或体内原始试验的剂量 - 效果关系可对组合物中各个成分的浓度的确定提供指导作用。

[0048] 根据本发明优选的实施方式，本发明提供的药物组合物中，所述抗原的浓度为：20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 250 μ g/ml-500 μ g/ml 或 300 μ g/ml-500 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为：125 μ g/ml-500 μ g/ml。更优选地，所述抗原的浓度为：20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 125 μ g/ml、250 μ g/ml、300 μ g/ml、400 μ g/ml 或 500 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为：125 μ g/ml、250 μ g/ml 或 500 μ g/ml。

[0049] 根据本发明尤为优选的实施方式，本发明提供的药物组合物中，所述抗原的浓度为 20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 25 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为 500 μ g/ml；或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 25 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml；或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 125 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为 25 μ g/ml；或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 300 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml；或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 400 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml；或者所述抗原的浓度为 20 μ g/ml，所述铝佐剂的浓度为 125 μ g/ml，所述 CpG-ODN 的浓度为 500 μ g/ml。

[0050] 药学上可接受的赋形剂

[0051] 本发明的药物组合物除了包含抗原，含有序列 5'-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3' 的 CpG 寡核苷酸和铝佐剂之外，还可包含药学上可接受的赋形剂。本发明所述的“药学上可接受的赋形剂”包括溶剂、分散介质、包被剂、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂（例如，抗菌剂、抗真菌剂），等渗剂、延迟吸收剂、盐、药物稳定剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、颜料，以及它们的组合或类似物，上述药学上可接受的赋形剂是本领域普通技术人员所熟知的（参见，例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版，Mack Printing Company, 1990, 第 1289-1329 页，该参考文献通过引用并入本文）。

[0052] 举例而言，填充剂的实例为乳糖一水合物、无水乳糖和各种淀粉。粘合剂的实例为各种纤维素和交联聚乙烯吡咯烷酮、微晶纤维素以及硅化微晶纤维素。合适的润滑剂的实例，包括作用于被压缩粉末的流动性的药剂，例如，胶态二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸钙和硅胶。增甜剂的实例是天然或人造增甜剂，例如蔗糖、木糖醇、糖精钠、甜蜜素和天冬甜素。防腐剂的实例为山梨酸钾、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、苯甲酸及其盐、诸如对羟基苯甲酸丁酯之类的对羟基苯甲酸的酯、诸如乙醇或苯甲醇之类的醇、诸如苯酚之类的酚化合物，或者四元化合物，例如，苯扎氯铵。合适的稀释剂的实例包括药物可接受的惰性填料，例如，微晶纤维素、乳糖、磷酸氢钙和糖类。稀释剂的实例包括微晶纤维素，诸如乳糖一水合物和无水乳糖之类的乳糖，磷酸氢钙，甘露糖醇，淀粉，山梨糖醇，蔗糖和葡萄糖。合适的崩解剂包括轻度交联聚乙烯吡咯烷酮、玉米淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉和改性淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮、羟基乙酸淀粉钠及其混合物。

[0053] 剂型

[0054] 本发明的上述药物组合物可为水溶液形式、盐水溶液形式、颗粒、气溶胶、粉末、片剂、糖衣片剂、微胶囊、栓剂、糖浆、乳液、悬浮剂、霜剂、滴剂或其他适于多种药物递送系统的形式。

[0055] 本发明的药物组合物可通过如下方式给药：口服给药、肠胃外给药、舌下给药、跨粘膜给药、透皮给药、直肠给药、腹腔内注射给药、皮下给药、肌肉内给药、静脉内给药、动脉内给药、鞘内给药、局部给药（以粉末、软膏、凝胶、滴剂或透皮贴剂的形式局部给药）、含服给药、通过导管给药、通过植入物给药，等等。在任何给药形式的情况下，本发明的药物组合物必须是无菌的且在生产和存储条件下为稳定的，并且不会受到细菌或微生物污染。

[0056] 本发明的药物组合物还可被配制为通过注射（例如，快速注射或连续输注）方式肠胃外给药的剂型。可以单位剂量形式提供用于注射给药的剂型，例如，以安瓶或多剂量容器的形式提供。本发明的药物组合物可采用诸如油性载体或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液之类的形式并且可含有诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂之类的调节剂，并且可加入例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐（例如，海藻酸钠）。

[0057] 本发明的药物组合物的悬浮液可制备成合适的油性注射悬浮液或水性注射悬浮液，其中，合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油（例如，芝麻油）或合成的脂肪酸酯（例如，油酸乙酯或甘油三酯）或脂质体；水性注射悬浮液可包含能够增加悬浮液的粘度的物质，例如，羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地，悬浮液还可含有合适的能够增加化合物的溶解度的稳定剂或试剂，从而可制备高度浓缩的溶液。对于注射而言，本发明的药物组合物可被配制成水性溶液，优选地配制成生理相容性缓冲液（例如，Hanks 溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液）。

[0058] 优选地，本发明的药物组合物可为使用前溶解于合适的载体中的粉末形式，所述合适的载体例如，无菌无热原水。

[0059] 对于透过粘膜给药而言，在该剂型中使用适于待穿透的屏障的渗透剂。这些渗透剂通常为本领域已知的。

[0060] 对于口腔给药而言，本发明的药物组合物可以通过常规方式配制的片剂或含片的形式给药。

[0061] 对于吸入给药而言，本发明的药物组合物可被配制成便于通过使用合适的推进剂（例如，二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体）以由加压包或喷雾器提供的喷雾的形式递送。在使用加压喷雾的情况下，剂量单位可通过提供递送计量的量的阀来确定。在吸入器或吹入器中使用的胶囊和药筒（例如，明胶胶囊和药筒）可被配制为含有本发明的药物组合物和合适的粉末基体（例如，乳糖或淀粉）的粉末混合物的剂型。

[0062] 本发明的药物组合物还可包含合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。这些载体或赋形剂的实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖类、淀粉、纤维素衍生物、明胶和诸如聚乙二醇之类的聚合物。

[0063] 疫苗

[0064] 本发明所述的“疫苗”是指设计为诱导针对抗原的免疫反应的制剂。疫苗可为治疗性的，在治疗过程中给予疫苗以加强免疫反应或驱动特定方向的反应，或者疫苗可为预防性的，在患上疾病之前或刚刚患上疾病不久给予疫苗。在治疗已产生的疾病和预防将来会

复发的疾病方面,疫苗可同时既为治疗性的也为预防性的。疫苗可通过本领域常用的给药方法给药于受治者。本文使用的术语“给药”包括向患者提供物质的所有合适的方式。常见途径包括口服给药、舌下给药、跨粘膜给药、透皮给药、直肠给药、阴道给药、皮下给药、肌肉内给药、静脉内给药、动脉内给药、鞘内给药、通过导管给药、通过植入物给药,等等。

[0065] 本发明的药物组合物可用于制备用于诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的药物。在一种实施方式中,本发明的药物组合物可用于制备乙肝疫苗或丙肝疫苗。在本发明的优选实施方式中,本发明的药物组合物可用于制备基因工程乙肝疫苗,例如,重组酵母乙肝疫苗,重组 CHO 乙肝疫苗。所述基因工程乙肝疫苗利用 DNA 重组技术把乙型肝炎病毒表面抗原基因构建到表达载体上,转入宿主酵母细胞或哺乳动物细胞中表达,在体外培养增殖过程中组装或分泌出 HBsAg,随后与本发明的铝佐剂和 CpG 结合,通过分离、纯化技术制备得到。根据转染的宿主细胞的不同,得到不同的基因工程乙肝疫苗,例如,宿主细胞为酵母细胞(例如,啤酒酵母菌或者汉逊酵母)时,得到重组酵母乙肝疫苗,宿主细胞为中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)时,得到重组 CHO 乙肝疫苗。

[0066] 医疗用途

[0067] 本发明的药物组合物可用于诱导受治者体内的针对抗原的免疫反应,包括,将有效量的本发明的药物组合物给药于受治者,并且还可包括将有效量的本发明的药物组合物再次给药于受治者,其中,再次给药的时间间隔为 2 周,3 周,4 周,5 周,6 周,7 周,8 周,9 周,10 周,11 周或 12 周,并且再次给药可通过相同或不同的给药途径以相同或不同的量给药。向受治者给药两次本发明的药物组合物即可诱导受治者体内针对抗原的免疫反应,产生保护性抗体应答水平,这相对于目前给药三次来诱导免疫反应的方法而言,减少了给药次数,缩短了诱导受治者体内的免疫反应的全程免疫时间。

[0068] 在本发明的一种优选实施方式中,通过在 0 时间点将有效量的本发明的药物组合物给药于受治者,随后在第 4 周的时间点以与 0 时间点的给药方式相同的方式将有效量的本发明的药物组合物给药于受治者,从而诱导受治者体内针对抗原的免疫反应。本发明的药物组合物可与药学上可接受的载体一同给药于受治者,例如,以溶于无菌无热原的盐水中的溶液形式或悬浮于无菌无热原的盐水中的悬浮液的形式给药于受治者。所述药学上可接受的载体是指一种或一种以上适用于将本发明的药物组合物给药于受治者的固体或液体填充物、稀释剂或包封物质。所述载体可为有机物、无机物、天然产物或合成的物质。所述载体包括任何以及所有溶液、稀释液、溶剂、分散介质、脂质体、乳液、包被剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延迟吸收剂以及任何其他适用于将本发明的药物组合物给药于受治者的载体。所述药学上可接受的载体基于特定的给药方式来选择。肠胃外剂型通常包括可注射的液体,其包括药学上和生理学上可接受的液体,例如,水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等等。对于固体组合物(例如,粉末、药丸、片剂或胶囊)而言,所述组合物可包含微量无毒佐剂,例如,润湿剂或乳化剂,防腐剂和 pH 缓冲剂,等等。

[0069] 本发明所述的有效量是指足以诱导受治者体内针对抗原的免疫反应的本发明的药物组合物的有效剂量。该有效剂量可由本领域普通技术人员根据本领域的公知常识来确定,例如,该有效剂量可由本领域普通技术人员根据受治者的年龄、性别、体重、给药方式、待诱导的免疫反应的类型等多种因素来确定,并且,所述有效剂量还可通过动物模型来确定,例如,通过确定在小鼠之类的动物模型中实现有效诱导针对抗原的免疫反应的剂量,从

而调节用于人类受治者的有效剂量。所述有效剂量还可通过表现出类似活性的已知药物组合物的人体数据来确定。例如,通过注射方式给药本发明的药物组合物时,所述有效剂量通常可为约 0.01mg/kg/ 人至 150mg/kg/ 人。

[0070] 受治者

[0071] 本发明使用的术语“受治者”是指动物,包括,但不限于,灵长类动物(例如,人类),牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔子、大鼠、小鼠、鱼、鸟,等等。优选地,所述动物为哺乳动物。在优选的实施方式中,所述受治者为人类。

[0072] 免疫细胞

[0073] 本发明中的免疫细胞是指所有参与免疫应答及与免疫应答有关的细胞及其前体细胞,免疫细胞包括 T 细胞(例如,CD4⁺ 细胞,CD8⁺ 细胞和各种其他 T 细胞亚类),B 细胞,自然杀伤细胞(NK 细胞),巨噬细胞,单核细胞,树突细胞和嗜中性粒细胞。

[0074] 表达特异性抗原受体的特异性 T 淋巴细胞和特异性 B 淋巴细胞参与介导获得性免疫应答。其中 B 淋巴细胞接受抗原特异性刺激后可活化增殖并分化为浆细胞,产生特异性抗体,介导体液免疫应答;T 淋巴细胞受到抗原特异性刺激后可活化增殖并分化为效应 T 细胞,介导细胞免疫应答,并辅助体液免疫应答。另外,在获得性免疫应答启动阶段,树突状细胞、单核巨噬细胞等专职 APC 参与进来,提呈抗原激活 T 细胞;在获得性免疫应答的效应阶段,单核巨噬细胞、NK 细胞等参与进来,协同 T 细胞、抗体等发挥清除抗原的作用。

[0075] 参与固有性免疫应答的细胞主要有单核巨噬细胞、粒细胞、树突状细胞、NK 细胞、内皮细胞、肥大细胞、红细胞、血小板等以及少数 T、B 淋巴细胞亚群。其中,NK 细胞是第三类淋巴细胞,具有非特异性细胞毒活性,在固有免疫应答抗病毒感染和抗肿瘤方面发挥重要作用。单核巨噬细胞、粒细胞等具有较强的吞噬杀伤功能,并通过释放大量的活性产物参与炎症反应。

[0076] 本发明的药物组合物通过铝佐剂与 CpG- 寡核苷酸的协同作用,同时诱导体液免疫应答和细胞免疫应答,加强 Th1 型 T 细胞免疫功能,大大增强 T 细胞免疫反应。

[0077] 实施例

[0078] 实施例 1:包含乙肝表面抗原(HBsAg)与氢氧化铝以及 CpG 寡核苷酸的药物组合物

[0079] 本实施例提供包含乙肝表面抗原(HBsAg)、氢氧化铝以及 CpG 寡核苷酸的药物组合物,该药物组合物中的 HBsAg、Al(OH)₃ 和 CpG-ODN 的浓度参见下表 1。

[0080] 表 1

[0081]

样品编号 #	HBsAg(μg/ml)	Al(OH) ₃ (μg/ml)	CpG(μg/ml)
1#	20	25	0
2#	20	25	25
3#	20	25	125
4#	20	25	500

5#	20	125	0
6#	20	125	25
7#	20	125	125
8#	20	125	500
9#	20	500	0
10#	20	500	25
11#	20	500	125
12#	20	500	500
13#	PBS	PBS	PBS

[0082]

[0083] 根据如下所述的实验方法检测本实施例中的包含上表 1 所列的不同浓度的 HBsAg、Al(OH)₃ 和 CpG-ODN 的药物组合物在诱导 IgG、IgG2a 以及 IgG1 产生方面的作用。

[0084] 1.1 试剂：

[0085] (1) 乙肝表面抗原 (HBsAg, 不含铝佐剂, 北京生物制品研究所)；

[0086] (2) 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG2a 和 IgG1 (Serotec 公司)；

[0087] (3) PBS 溶液：用 800ml 超纯水充分溶解 8g NaCl (北京化工厂)、0.2g KCl (北京化工厂)、2.9g Na₂HPO₄·12H₂O (北京化工厂)、0.2g KH₂PO₄ (北京化工厂)，随后用 HCl 或 NaOH 调节 pH 为 7.2-7.4 配制；

[0088] (4) 包被液：用 80ml PBS 配制；

[0089] (5) 洗涤液：用 400ml PBS 和 0.5ml Tween20 (北京化工厂) 配制；

[0090] (6) 封闭液：用 80ml PBS 和 1g 牛血清白蛋白 (BSA, 北京鼎国生物技术有限公司) 配制；

[0091] (7) 样品稀释液：用 800ml 超纯水溶解 2.42g Tris (北京化工厂) 和 8.77g NaCl (北京化工厂)，随后用 HCl 调节 pH 至 7.1；然后加入 1g BSA, 0.5ml Tween20 配制；

[0092] (8) 底物液：将 19.2g 柠檬酸 (北京化工厂) 的水溶液与 71.7g Na₂HPO₄·12H₂O (北京化工厂) 的水溶液混合，随后用 0.22 μm 滤膜滤过除菌配制；

[0093] (9) 终止液：用稀硫酸溶液配制；

[0094] (10) CpG-ODN (5'-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3', SEQ ID NO. 1, 由北京迪纳兴科生物科技公司合成) 溶液：用无菌生理盐水作为溶剂，溶解不同量的 CpG-ODN 制备成不同浓度的 CpG ODN 溶液；

[0095] (11) Al(OH)₃ (北京化工厂) 溶液：用无菌生理盐水作为溶剂，溶解不同量的 Al(OH)₃ 制备成不同浓度的 Al(OH)₃ 溶液。

[0096] 1.2 方法：

[0097] 将 100 μ l HBsAg(5 μ g/ml) 加至 10ml 包被液中进行稀释,随后将稀释过的 HBsAg 加入酶标板的每个孔中,4℃下静置过夜。第二天,取出酶标板,将每个孔中的液体吸干,再加入 300 μ l 洗涤液,室温放置 3 分钟,重复三次。然后,向每个孔中加入 300 μ l 封闭液,室温放置 1 小时。随后进行洗涤。然后在每个孔中加入不同浓度的 Al(OH)₃ 溶液和 CpG-ODN 溶液(Al(OH)₃ 和 CpG-ODN 的浓度参见下表 1)。随后加入用样品稀释液稀释过(稀释比 1:100000)的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG2a 和 IgG1,室温避光条件下放置 1 小时。然后,在每个孔中加入 100 μ l 底物液,室温避光孵育 10-20 分钟,随后加入 50 μ l 终止液。在加入终止液 5 分钟内,采用酶标仪测量 450nm 的吸光度。

[0098] 1.3 结果:

[0099] 如图 1 所示(其中对照为空白样品),在氢氧化铝的浓度分别为 25 μ g/ml、125 μ g/ml 和 500 μ g/ml 的条件下,CpG-ODN 在 25-500 μ g/ml 的浓度范围内可显著诱导 IgG 产生。在氢氧化铝的浓度为 25 μ g/ml, CpG-ODN 为 125 μ g/ml 时以及在氢氧化铝的浓度为 125 μ g/ml, CpG-ODN 为 25 μ g/ml 时,氢氧化铝和 CpG-ODN 联合使用诱导产生的 IgG 的量最多。并且, CpG-ODN 和氢氧化铝联合使用产生的 IgG 的量均高于单独使用氢氧化铝产生的 IgG 的量,并且低浓度至中等浓度的(25-125 μ g/ml) CpG-ODN 与氢氧化铝联合使用所产生的 IgG 的量略高于高浓度(高于 125 μ g/ml)的 CpG-ODN 与氢氧化铝联合使用产生的 IgG 的量。

[0100] 如图 2 所示(其中对照为空白样品),在氢氧化铝的浓度分别为 25 μ g/ml、125 μ g/ml 和 500 μ g/ml 的条件下, CpG-ODN 在 25-500 μ g/ml 的浓度范围内均都能显著提高 IgG2a 抗体含量,并且在氢氧化铝浓度为 25 μ g/ml 且 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml 的条件下, IgG2a 抗体含量最高,其次是氢氧化铝浓度为 25 μ g/ml 且 CpG-ODN 的浓度为 500 μ g/ml 和氢氧化铝浓度为 125 μ g/ml 且 CpG-ODN 的浓度为 25 μ g/ml 以及氢氧化铝浓度为 500 μ g/ml 且 CpG-ODN 的浓度为 125 μ g/ml 的条件。图 2 的结果说明 CpG-ODN 和氢氧化铝的联合使用能显著提高 IgG2a 抗体含量,并且经方差分析表明,CpG-ODN 与氢氧化铝联合使用产生的 IgG2a 的量相对于单独使用氢氧化铝产生的 IgG2a 抗体的量具有显著性差异(P<0.05)。这说明 CpG-ODN 和氢氧化铝的联合使用可以大大促进 IgG2a 抗体生成,同时,促进 T 细胞反应。

[0101] 如图 3 所示(其中对照为空白样品),在氢氧化铝的浓度分别为 25 μ g/ml、125 μ g/ml 和 500 μ g/ml 的条件下,CpG ODN 在 25-500 μ g/ml 的浓度范围内均都能显著提高 IgG2a/IgG1 比值。在氢氧化铝浓度为 25 μ g/ml 且 CpG-ODN 的浓度为 500 μ g/ml 的条件下 IgG2a/IgG1 比值最大,其次是氢氧化铝浓度为 125 μ g/ml 且 CpG-ODN 的浓度为 500 μ g/ml 的条件。这进一步说明 CpG-ODN 可促进 IgG2a 抗体的产生,抑制 IgG1 抗体的产生,CpG-ODN 与氢氧化铝的联合使用可加强 T 细胞免疫反应。

[0102] 通过图 1 至图 3 可以看出,在 CpG ODN 的浓度为 25-500 μ g/ml 的条件下,降低氢氧化铝用量没有导致总 IgG 水平下降。在氢氧化铝的浓度为 25 μ g/ml 的条件下,Th1 型 T 细胞免疫功能(用 IgG2a/IgG1 的比值作为指标)并未下降,这说明对 Th1 的影响主要来自于 CpG-ODN,Th1 型 T 细胞免疫功能与 CpG-ODN 具有浓度依赖关系。

[0103] 实施例 2:包含乙肝表面抗原与氢氧化铝佐剂以及 CpG 寡核苷酸的药物组合物诱导抗体产生免疫应答

[0104] 本实施例提供包含乙肝表面抗原 (HBsAg)、氢氧化铝以及 CpG 寡核苷酸的药物组合物, 该药物组合物中的 HBsAg、Al (OH)₃ 和 CpG-ODN 的浓度参见下表 2。

[0105] 表 2

[0106]

样品编号 #	HbsAg (μg/ml)	Al (OH) ₃ (μg/ml)	CpG (μg/ml)
1#	20	300	125
2#	20	300	250
3#	20	300	500
4#	20	400	125
5#	20	400	250
6#	20	400	500
7#	20	500	125
8#	20	500	250
9#	20	500	500
10#	20	500	PBS

[0107]

[0108] 根据如下所述的实验方法检测本实施例中的包含上表 2 所列的不同浓度的 HBsAg、Al (OH)₃ 和 CpG-ODN 的药物组合物在诱导抗体产生免疫应答方面的作用。

[0109] 2.1 材料和试剂:

[0110] 实验动物: 清洁级 BALB/C 雌性小鼠, 4-6 周龄 (北京维通利华实验动物有限公司), 体重 15-25g。

[0111] HBsAg 原液 (不含铝佐剂, 北京生物制品研究所): 用 1ml PBS 溶解 1mg HBsAg 蛋白冻干粉配制待用。

[0112] CpG-ODN (5'-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3', SEQ ID NO. 1, 由北京迪纳兴科生物科技公司合成) 溶液: 用无菌生理盐水作为溶剂, 溶解不同量的 CpG-ODN 制备成不同浓度的 CpG ODN 溶液 (CpG-ODN 浓度参见下表 2)。使用前一天配置, 4℃ 过夜放置待用。

[0113] Al (OH)₃ (北京化工厂) 溶液: 用无菌生理盐水作为溶剂, 溶解不同量的 Al (OH)₃ 制备成不同浓度的 Al (OH)₃ 溶液 (Al (OH)₃ 浓度参见下表 2)。

[0114] 2.2 方法:

[0115] 取 50 μl 含有不同浓度的 CpG-ODN 溶液、氢氧化铝溶液及 HBsAg 溶液的混合溶液, 冰上放置 10 分钟, 然后稀释, 分别将 100 μl 稀释的样品 (含 1 μg 乙肝表面抗原) 注射给 4-5 周龄的雌性 BALB/C 小鼠 (每组 8 只) 的左前肢肌肉。在第 0 周和第 4 周进行两次免

疫。分别于第 2 周、第 4 周、第 6 周和第 8 周和第 10 周从尾静脉采血,第 12 周处死小鼠采全血,基础血清在免疫前 5 天获得。用乙肝表面抗体试剂盒检测免疫前及免疫后第 2 周、第 4 周、第 6 周、第 8 周和第 10 周的小鼠血清中的抗-HBs 抗体水平。

[0116] 2.3 结果:

[0117] 如图 4 所示,抗体检测结果表明包含作为佐剂的 CpG-ODN 和氢氧化铝的乙型肝炎疫苗均能在免疫后 6-8 周诱导高滴度抗-HBs 产生,抗体效价随时间延长而增加,至第 10 周上升速度趋于平缓;这说明包含作为佐剂的 CpG-ODN 和氢氧化铝的疫苗组较之对照组(10#, 仅含 $Al(OH)_3$ 单佐剂)的疫苗具有较好的免疫原性,可较快的刺激保护性抗体的产生,且随着时间的延长抗体维持较高的水平。

[0118] CpG-ODN 与氢氧化铝协同起效,这两者联合应用可以提高疫苗诱导抗-HBsAg 抗体应答水平,与含单佐剂氢氧化铝的乙肝疫苗相比体现出了双佐剂疫苗系统的优势。

[0119] 在诱导机体免疫应答中, CpG-ODN 及 $Al(OH)_3$ 佐剂浓度与血清抗体滴度呈相关性,这两者在刺激体液免疫方面具有协同作用。

[0120] 实施例 3:不同浓度的氢氧化铝和 CpG 寡核苷酸的协同作用

[0121] 本实施例提供包含乙肝表面抗原(HBsAg)、氢氧化铝以及 CpG 寡核苷酸的药物组合物,该药物组合物中的 HBsAg、 $Al(OH)_3$ 和 CpG-ODN 的浓度参见下表 3。

[0122] 表 3

[0123]

样品编号 #	HBsAg ($\mu g/ml$)	$Al(OH)_3$ ($\mu g/ml$)	CpG ($\mu g/ml$)
1#	20	300	125
2#	20	300	250
3#	20	300	500
4#	20	400	125
5#	20	400	250
6#	20	400	500
7#	20	500	125
8#	20	500	250
9#	20	500	500
10#	20	500	PBS

[0124]

[0125] 根据如下所述的实验方法检测本实施例中的包含上表 3 所列的不同浓度的 HBsAg、 $Al(OH)_3$ 和 CpG-ODN 的药物组合物中双佐剂的协同作用。

[0126] 3.1 材料和试剂:

[0127] 实验动物:清洁级 BALB/C 雌性小鼠,4-6 周龄(北京维通利华实验动物有限公司),体重 15-25g。

[0128] HBsAg 原液(不含铝佐剂,北京生物制品研究所):用 1ml PBS 溶解 1mg HBsAg 蛋白冻干粉配制待用。

[0129] CpG-ODN(5'-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3', SEQ ID NO. 1,由北京迪纳兴科生物科技公司合成)溶液:用无菌生理盐水作为溶剂,溶解不同量的 CpG-ODN 制备成不同浓度的 CpG ODN 溶液(CpG-ODN 浓度参见下表 3)。使用前一天配置,4℃ 过夜放置待用。

[0130] Al(OH)₃ 溶液:用无菌生理盐水作为溶剂,溶解不同量的 Al(OH)₃ 制备成不同浓度的 Al(OH)₃ 溶液(Al(OH)₃ 浓度参见下表 3)。

[0131] 3.2 方法:

[0132] 取 50 μl 含有不同浓度的 CpG-ODN 溶液、不同浓度的氢氧化铝溶液以及不同浓度的 HBsAg 溶液混匀,冰上放置 10 分钟,然后按照表 4 中的比例连续稀释,将下表 4 中所列的每个稀释度的 CpG-ODN、氢氧化铝以及 HBsAg 混合物溶液接种至 4-6 周龄的体重为 14g 至 16g 的 BALB/c 雌性小鼠(10 只),每只腹腔注射 1.0ml 混合溶液。饲养 4 至 6 周后,从小鼠眼球处取血约 1ml,将抽取的小鼠血液放置于室温 1 小时以上,随后在 8000rpm/分钟的速度下离心 2 分钟,制备得到免疫血清。使用乙肝表面抗体试剂盒,根据厂商的规程,如下测定抗-HBs:

[0133] 设置空白对照 1 份、阴性对照 5 份、阳性对照 2 份,分别向每孔加入 50 μl 待检测的免疫血清及阴阳对照血清;除空白对照孔外,每孔加酶结合物 50 μl,小心混匀,封板,37℃ 孵育 30 分钟。洗板后弃去孔内液体,加入 350 μl 洗涤液,洗板 5 次。最后一次洗板之后,小心拍干,每孔依次加入显色剂各 50 μl,小心混匀,封板,37℃ 孵育显色液 15 分钟。然后,每孔加入终止液 50 μl,混匀。使用酶标仪检测 450nm(参比波长 630nm)的吸光度值(终止反应后 10min 内读数),用空白对照孔校零。计算阴性对照平均吸光度值 NCX,临界值=阴性对照的平均吸光度值 NCX×2.1(阴性对照吸光度值低于 0.05 时按照 0.05 计算,高于 0.05 按实际吸光度计算)。将每个孔的吸光度值与临界值比较,不小于该临界值的样品判定为阳性。根据每个稀释度的阳性数和阴性数,计算抗体阳转率进一步计算 ED₅₀ 值(半数有效量)。

[0134] $ED_{50} \text{ 值} = 10^{\text{50\%阳转率终点对数}}$

[0135] 其中,50%阳转率终点对数=高于 50%阳转率稀释度(含量)对数+距离比×稀释系列对数

[0136]

$$\text{距离比} = \frac{\text{高于50\%阳转率}-50\%}{\text{高于50\%阳转率}-\text{低于50\%阳转率}}$$

[0137] 3.3 结果:

[0138] 下表 4 提供本实施例的包含不同浓度的 HBsAg、Al(OH)₃ 和 CpG-ODN 的药物组合物激活体液免疫应答的效果以及诱导抗-HBs 阳转比例的结果。

[0139] 表 4

[0140]

样品编号#	制剂配比浓 (μg/ml)			阳转比例 (%)				
	Al(OH) ₃	CpG	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	ED50
1#		125	100	100	87.5	50	-----	0.170
2#	300	250	100	100	100	37.5	-----	0.179
3#		500	100	100	87.5	50	-----	0.170
4#		125	-----	100	100	75	0	0.124
5#	400	250	-----	100	100	50	0	0.156
6#		500	-----	100	87.5	87.5	0	0.122

[0141]

7#		125	-----	87.5	100	37.5	12.5	0.178
8#	500	250	-----	100	87.5	37.5	0	0.191
9#		500	-----	100	100	75	0	0.124
10#	500	0	-----	100	75	12.5	0	0.235

[0142] 从上述结果可见,10#样品免疫的小鼠的ED₅₀值为0.235,而1#样品至9#样品免疫的小鼠的ED₅₀值均小于0.2,与10#样品免疫的小鼠相比具有显著性差异(P<0.05),这说明氢氧化铝和CpG-ODN双佐剂配制的疫苗免疫小鼠抗体阳转率明显升高,证明了CpG-ODN佐剂与氢氧化铝有协同作用,二者联合使用能提高疫苗的保护效果。

[0143] 实施例4:不同浓度Al(OH)₃与不同浓度CpG-ODN联合诱导特异性细胞免疫应答

[0144] 使用实施例3中提供的包含不同浓度的乙肝表面抗原(HBsAg)、氢氧化铝以及CpG寡核苷酸的药物组合物,通过如下所述的实验方法检测该药物组合物在诱导特异性细胞免疫应答方面的作用。

[0145] 4.1 材料和试剂:

[0146] 实验动物:清洁级BALB/C雌性小鼠,4-6周龄(北京维通利华实验动物有限公司),体重15-25g,每组8只。

[0147] HBsAg原液(不含铝佐剂,北京生物制品研究所):用1ml PBS溶解1mg HBsAg蛋白冻干粉配制待用。

[0148] CpG-ODN(5'-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3', SEQ ID NO.1,由北京迪纳兴科生物科技公司合成)溶液:用无菌生理盐水作为溶剂,溶解不同量的CpG-ODN制备成不同浓度的CpG ODN溶液。使用前一天配置,4℃过夜放置待用。

[0149] Al(OH)₃溶液:用无菌生理盐水作为溶剂,溶解不同量的Al(OH)₃制备成不同浓度的Al(OH)₃溶液。

[0150] 4.2 方法:

[0151] 取50μl含有不同浓度的CpG-ODN溶液、氢氧化铝溶液以及HBsAg溶液混匀,冰上放置10分钟,然后稀释,分别将100μl稀释的样品(含1μg乙肝表面抗原)注射给4-5周

龄的雌性 BALB/C 小鼠（每组 8 只）的左前肢肌肉。在第 0 周和第 4 周进行两次免疫。第 5 周处死小鼠。取脾，制备脾细胞。以抗 IFN- γ 抗体包被 PVDF 膜 96-孔板，制备小鼠脾淋巴细胞并计数，封闭后孵育细胞，洗板显色，将 ELISPOT 板放置于 CTL 免疫斑点影像分析仪自动读板仪内，调节参数采集图像，进行计数。

[0152] 4.3 结果：

[0153] 如图 5 所示，在氢氧化铝为 300 μ g/ml 且 CpG-ODN 为 125 μ g/ml 条件下，采集到的图像中斑点最密集，即抗原抗体结合最多，其次是氢氧化铝为 400 μ g/ml 且 CpG-ODN 为 125 μ g/ml 的条件，再次为氢氧化铝为 300 μ g/ml 且 CpG-ODN 为 250 μ g/ml 的条件。而在不含 CpG-ODN 的条件下，采集到的图像中几乎没有斑点，即，抗原抗体几乎没有结合。这说明，在诱导 IFN- γ 分泌方面，仅含有氢氧化铝的 10# 样品疫苗诱导产生 IFN- γ 表达水平较之含有氢氧化铝和 CpG-ODN 双佐剂的 1# 至 9# 样品疫苗低，氢氧化铝单佐剂疫苗能刺激 Th2 类免疫应答，但诱导产生 Th1 细胞免疫反应并不理想。含有氢氧化铝和 CpG-ODN 双佐剂的 1# 至 9# 样品疫苗诱导产生 IFN- γ 的水平明显高于 10# 样品疫苗，而体液免疫应答研究结果也显示含氢氧化铝和 CpG-ODN 双佐剂的疫苗刺激产生抗体水平明显高于氢氧化铝单佐剂组，这说明乙型肝炎疫苗中联合使用氢氧化铝和 CpG-ODN 作为双佐剂协同起效，不但能增强体液免疫，还能诱导 IFN- γ 的表达，激活 Th1 细胞免疫应答。这种双佐剂制剂比传统的仅含氢氧化铝的单佐剂乙型肝炎疫苗更具优势。因此，双佐剂疫苗同时具有治疗和预防病毒性疾病的作用。具有实用潜力。

[0154] 结论：

[0155] 本发明提供的包含 (a) 1 μ g/ml–100 μ g/ml 抗原，(b) 25 μ g/ml–500 μ g/ml 含有序列 5'-tcgacgttcgtcgttcgtcgttc-3' 的 CpG 寡核苷酸，和 (c) 25 μ g/ml–500 μ g/ml 铝佐剂的药物组合物能够诱导针对乙肝表面抗原的免疫反应并且增强乙肝疫苗免疫效果。本发明的含有双佐剂的药物组合物可作为疫苗使用，其比传统的仅含氢氧化铝的单佐剂疫苗更具优势，两种佐剂协同起效，不但能增强体液免疫，还能激活 Th1 细胞免疫应答。由本发明的药物组合物制备得到的疫苗不但能中和掉细胞外的病毒，而且还能彻底清除掉潜伏在感染细胞中的病毒。

[0156] 上文对本发明的优选的实施例进行了描述，但是，显然，这些实施例仅仅用于举例说明。本领域技术人员可在不背离本发明的实质的前提下对这些实施例作出多种改变、修改和替换。本发明的范围由所附的权利要求来限定，并且本发明权利要求范围内的组合物及其应用以及它们的等同物也被所附的权利要求涵盖。

序列表

<110>	长春华普生物技术有限公司	
<120>	含有CpG寡核苷酸的药物组合物	
<130>	H15-1P-HT	
<140>	201410294142.3	
<141>	2014-06-26	
<160>	1	
<210>	1	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CpG寡核苷酸	
<400>	1	
	tcgacggttcg tcggttcgtcg ttc	23

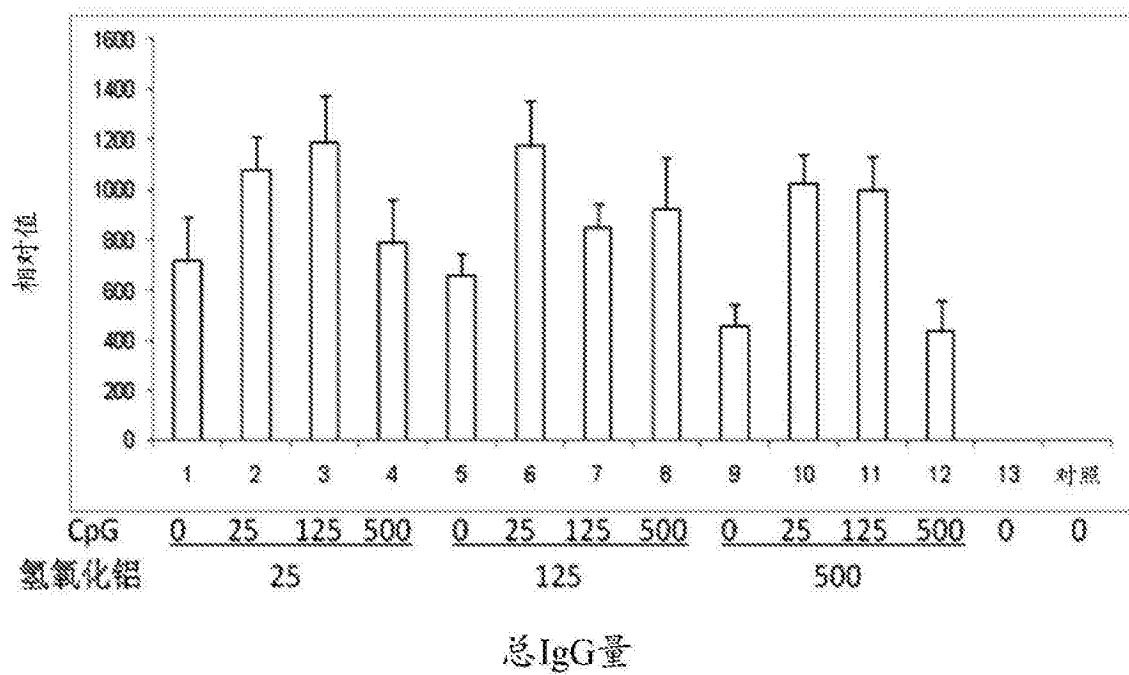


图 1

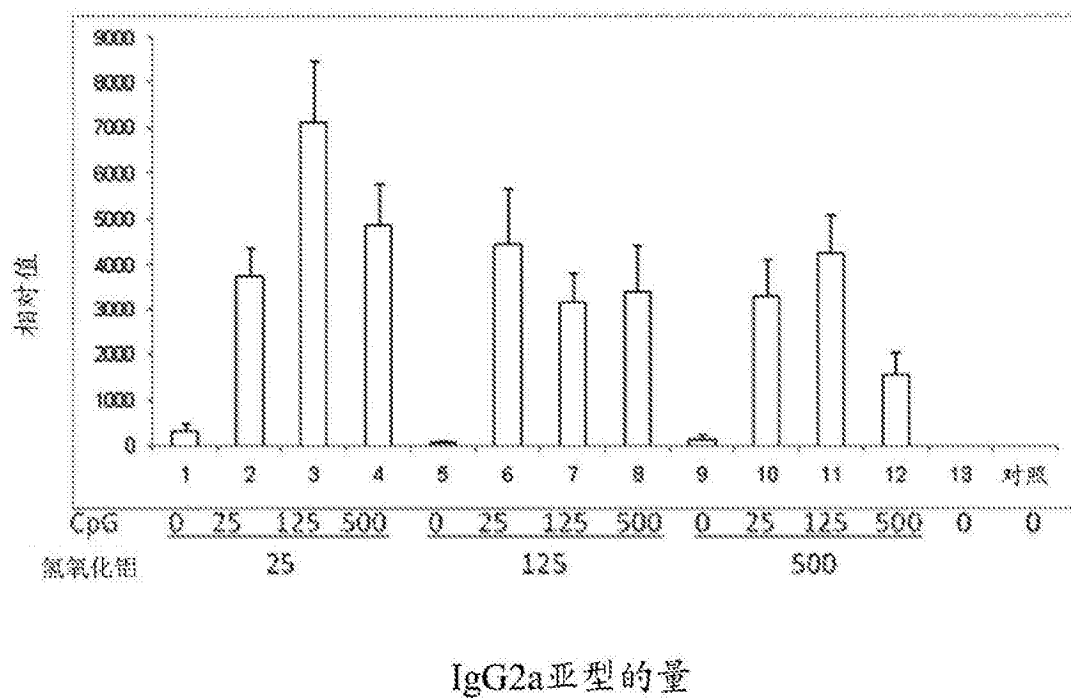


图 2

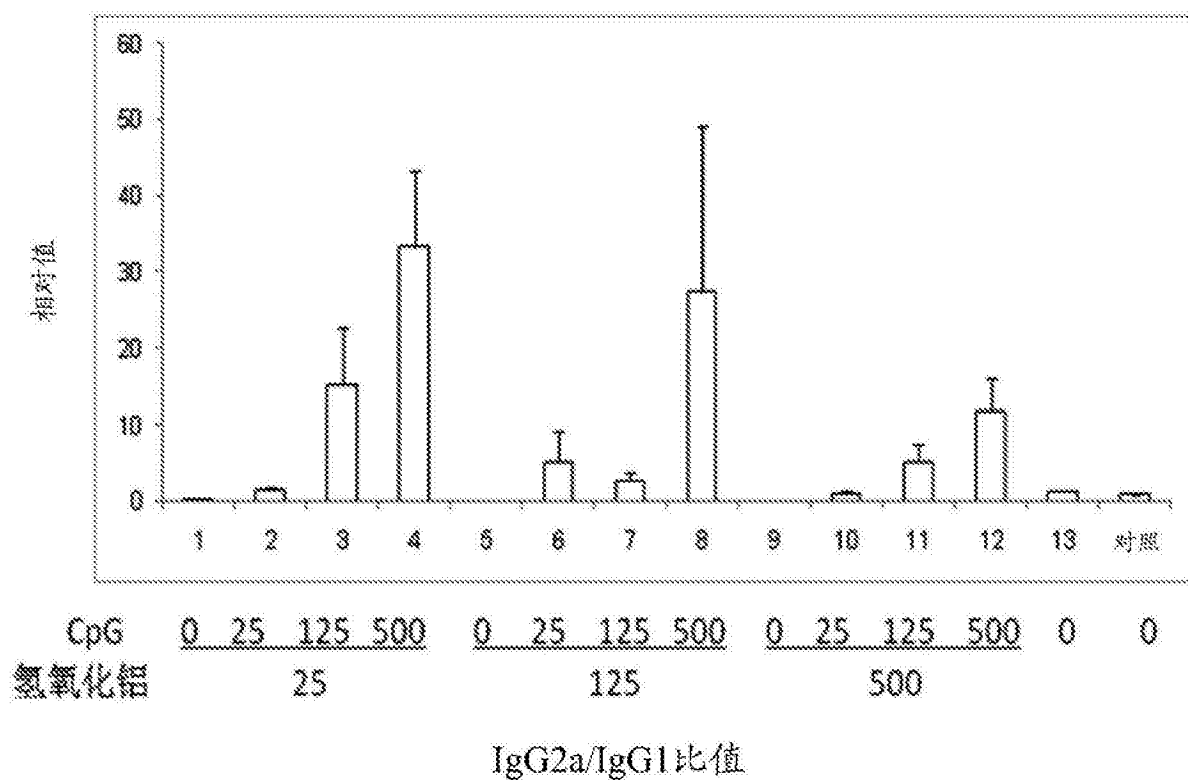


图 3

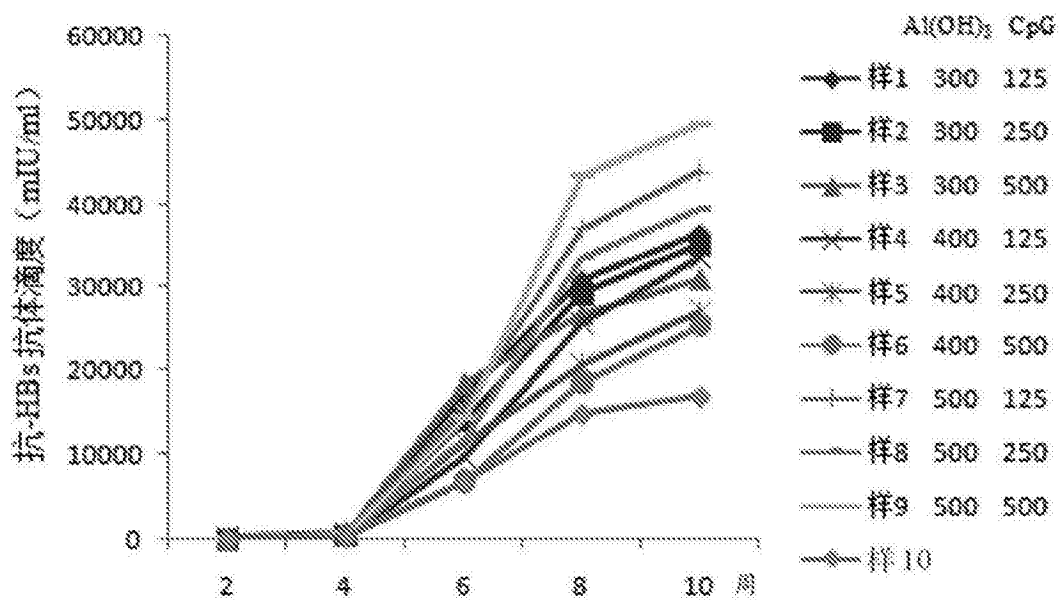


图 4

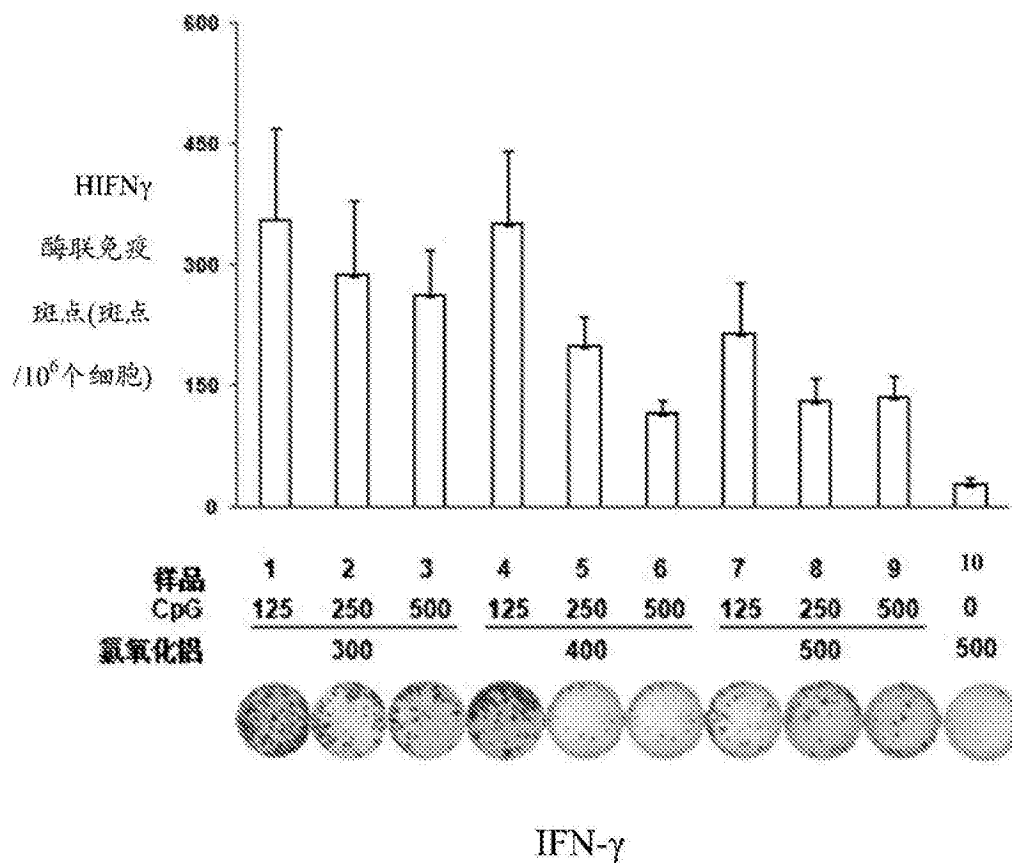


图 5