

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780037742.X

[43] 公开日 2009 年 9 月 2 日

[11] 公开号 CN 101522211A

[22] 申请日 2007.11.16

[21] 申请号 200780037742.X

[30] 优先权

[32] 2006.11.17 [33] US [31] 60/859,724

[86] 国际申请 PCT/US2007/024051 2007.11.16

[87] 国际公布 WO2008/063555 英 2008.5.29

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.9

[71] 申请人 基因特伦尼克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 雅各布·马蒂森

伊丽莎白·托伦·谢尔勒

鲁内·谢肯 戴尔特墨·拉布塞

林 峰

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 吴贵明 张 英

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称

使用电穿孔辅助疫苗接种和加强免疫来增强
免疫反应的方法

[57] 摘要

本发明披露了增强免疫反应的方法。这样的方法涉及向不同组织给予疫苗组合物以引发增强的免疫反应。该增强的免疫反应由在两个分开的患者组织中接种疫苗以及给予加强的途径所产生，例如，通过首先向皮肤内给予初始免疫，随后向肌肉中给予加强免疫。在每一种情况（初始和加强免疫）下，该疫苗组合物的给予优选使用同时电穿孔辅助递送抗原试剂来实施。

1. 一种增强哺乳动物中的免疫反应的方法,包括在第一时间向所述哺乳动物在第一组织递送部位给予疫苗组合物的第一推注,接着在第二时间向所述哺乳动物在第二组织递送部位给予所述疫苗组合物的加强推注,所述加强递送在所述第一时间之后的2到10天给予所述哺乳动物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述第一推注和加强推注的所述给予包括在给予所述第一推注和/或加强推注的给予之前、同时或之后的至少一个电穿孔电脉冲。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述哺乳动物是人类。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述哺乳动物是动物。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述疫苗组合物包含多肽抗原。
6. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述疫苗组合物包含编码抗原的核酸,所述抗原在所述哺乳动物中能够从所述核酸被表达。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述第一组织递送部位包括选自由皮肤、表皮和皮下组织组成的组中的组织。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述第二组织递送部位包括选自由肌肉、横纹肌和平滑肌组成的组中的组织。

9. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述向第一组织部位给予组合物与所述向第二组织部位给予组合物在时间上间隔 2 天到 30 天。
10. 一种使哺乳动物免疫的方法, 包括向所述哺乳动物在第一时间在所述哺乳动物的第一组织给予部位递送疫苗组合物的至少一个第一推注, 接着向所述哺乳动物在第二时间在所述哺乳动物上的第二组织给予部位递送加强疫苗组合物的至少一个推注。
11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述第一推注和加强推注的所述给药包括在所述第一推注和加强推注的给药之前、同时或之后的至少一个电穿孔电脉冲。
12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 所述哺乳动物是人类。
13. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中, 所述哺乳动物是动物。
14. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述疫苗组合物包含多肽抗原。
15. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述疫苗组合物包含编码抗原的核酸, 所述抗原在所述哺乳动物中能够从所述核酸表达。
16. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述第一组织给予部位包括选自由皮肤、表皮和皮下组织组成的组中的组织。
17. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述第二组织给予部位包括选自由肌肉、横纹肌和平滑肌组成的组中的组织。

-
18. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述向所述第一组织部位给予组合物与所述向所述第二组织部位给予组合物在时间上间隔 3 天到 4 周。

使用电穿孔辅助疫苗接种 和加强免疫来增强免疫反应的方法

技术领域

本发明涉及疫苗以及它们的给药。更具体地，本发明涉及诱导和增强哺乳动物对抗原试剂的免疫反应（免疫应答，immune response），通过向所述哺乳动物在第一免疫反应组织中提供所述抗原试剂的最初给药（primary administration），之后向所述哺乳动物在第二身体组织中提供至少一种加强给药（助推给药，boost administration），其中所述最初和加强给药中的至少一种是通过电穿孔加以辅助的。

背景技术

以下描述包括可以用于理解本发明的信息。并不表示承认任何这样的信息是所要求保护的发明的现有技术、或相关技术，或者任何具体或含蓄参考的出版物是现有技术。

在接种疫苗领域，疫苗的给药通常是通过利用注射器和针头注入到皮下或肌肉（IM）组织。在传统操作中，疫苗的初始给药之后是一次或多次以与第一次相同的注射方式给药的助推注射，仅仅是在后一时间或时间段（通常是初始给药后的 2 到 6 周）。在某些情况下，第二次加强给药是以第二时间间隔递送的，该第二时间间隔经常比第一时间间隔（即，在疫苗的最初或“初始”给药和第一次加强接种疫苗之间的时间）更长。在这样的时间间隔期间，免疫系统通常应答，例如通过产生针对该疫苗的抗原成分的抗体（所谓的

“体液”免疫)和/或通过引发涉及细胞毒性 T 淋巴细胞的细胞免疫反应。在抗体产生的环境下,抗体效价的水平通常约 4 至 8 周后加强(免疫)会达到最大效价。

对于许多疾病,加强免疫系统对于将身体保持在准备好对抗感染或某些肿瘤形成的状态来说是必要的。然而,在单个组织类型中的加强免疫不会总是提供最佳免疫反应。许多因素影响免疫反应的质量,例如,一些抗原不诱导强免疫反应,而其他抗原可以引发诱导强免疫反应和炎性或有时调节性免疫反应。对各种抗原试剂的免疫系统反应的差异性在疫苗开发中是一个主要关心的问题。在出现生物恐怖主义和用作生物武器的病原体的高度有毒菌株的可能性、以及由于哺乳动物和鸟类病原体(例如, HIV, SARS, H5N1 等)在相同物种中和不同物种之间的进化和有效快速扩展引起的可能危险的情况下,本领域需要提供以能够在巨大种群中以稳定方式提供快速诱导强大、广谱免疫反应的方式进行疫苗接种种群的方法。

本发明正是以这样的方式,即通过提供用于增强对靶抗原的免疫反应的方法而推动了疫苗接种领域,该方法包括在预选组织中电穿孔辅助给予初始和加强(免疫)组合物。

发明内容

一方面,本发明包括向皮肤和/或肌肉组织中给予疫苗组合物。这方面的一些实施方式中,本发明包括用于给予疫苗组合物的给药方案,其中初始推注给予到一种组织类型(例如肌肉,皮肤,皮下空间,粘膜,鼻内,或吸入到肺中)并且加强给药在不同或第二组织类型中递送。在一个特别优选的实施方式中,开始的初始推注给药到皮肤而加强推注给药到肌肉组织。在一种可替换的实施方式中,初始推注可给药到肌肉而一个或多个加强给药可递送到皮肤组织中。

另一方面，本发明涉及电穿孔（EP）在递送通过两次或更多次给药（每一次间隔多于一天）的疫苗组合物中的应用。电穿孔可通过任何恰当的适于将物质递送到特定类型组织中的细胞内的电穿孔装置来提供。例如，对于将一种物质给药到皮肤组织细胞，电穿孔装置可包括具有利用非侵入性电极经皮或经粘膜地进行电穿孔的能力的任何装置，或者可替换地，具有针状电极的装置，该针状电极可利用直接插入到要电穿孔的组织，如皮肤（皮内或皮下）、粘膜或肌肉中的电极来电穿孔该组织。

本发明的另一个方面涉及给予患者疫苗的电穿孔辅助方法，相比于在没有电穿孔的相同的免疫原量和质量情况下预期观察到的或者在单独一种组织类型中给药之后预期观察到的免疫反应，引起增强的免疫反应。

在又一个方面，本发明涉及疫苗的电穿孔辅助给药，其中该疫苗由以减活或灭活细菌或病毒形式的抗原、蛋白质、多肽或肽构成；或者可替换地，核酸（或多个核酸物种）的电穿孔辅助给药，其中该核酸编码一种或多种抗原，并且尤其是在给予身体组织并由这样的组织中的细胞摄取之后能够指导所编码抗原的表达的核酸。

在又一个方面，本发明提供用于更快、更强并且具有引发体液和/或细胞（即 T 细胞）免疫反应的能力的免疫反应。

这些和其他方面以及实施方式通过参考以下附图、详细描述以及所附权利要求将显而易见。

附图说明

图 1 是曲线图，示出了在兔的所选组织中利用编码人类 IgG 的 DNA 质粒进行注射和 EP 之后所得到的兔抗-人类 IgG 抗体效价。误差棒表示平均值的标准误差。

图 2A 和 2B 是曲线图，示出了在 Balb/c 小鼠的不同同龄组中对乙型肝炎表面抗原的抗体产生的结果。如图所示，在皮肤中的初始接种与 6 天后在肌肉中结合电穿孔的后续加强提供了增强的效价水平。

图 3A 和 3B 是曲线图，示出了对 Balb/c 小鼠的不同同龄组的乙型肝炎表面抗原的抗体产生的结果。如图所示，这些结果证实了在图 2A 和 2B 中获得的那些结果。特别地，甚至在初始接种之后 20 天联合电穿孔在肌肉中的加强（接种）供了增强的抗体效价。

具体实施方式

本发明总体上涉及用于电穿孔辅助递送针对病原体、传染原以及其他疾病状态（例如癌症）的疫苗的方法，该疫苗组合物通过一段时间的两次或多次给予。然而，该所述的本发明目前的方法基于以下创造性认识：初始推注递送到第一组织例如皮肤组织，接着加强（助推，boosting）到第二、不同组织例如肌肉组织，同时采用电穿孔以直接将所述疫苗组合物递送到所述组织中的至少一个并且优选每一个的细胞内，在哺乳动物中提供了增强的免疫反应。事实上，在一些优选实施方式中，起初的或初始给药包括将用于治疗特定疾病或病症的抗原试剂用电穿孔辅助递送至皮肤组织，而一个或多个后续“加强”给药递送至已被同时电穿孔（即，在递送抗原（或编码抗原的核酸以增强抗原的吸收）（或核酸）之前、同时或之后被电穿孔）的肌肉组织。在其他优选实施方式中，初始是选择

性地通过同时 EP 和初始推注给予肌肉以及在皮肤组织中的后续加强而实施的。

在 EP 辅助疫苗递送的情况下，疫苗可以使用包括各种类型电极的电穿孔装置而被递送至组织。例如，对于皮肤组织（如角质层、表皮组织和皮下组织）的电穿孔，电穿孔装置可采用非侵入性电极如美国专利 No. 6,009,345、5,968,006 和 6,972,013 中所描述的曲流电极（meander electrode）和环形电极。另外，也可采用如在 PCT 申请 WO02/072781 中描述的非侵入性点电极，以及如在美国专利号 5,439,440 中描述的卡钳电极。在一个相关的优选实施方式中，疫苗可以通过局部施加至皮肤表面而递送，以便采用电穿孔脉冲或脉冲序列以携带抗原通过角质层的表面并通过“经皮电穿孔”而进入到较深的皮肤组织，而在其他优选实施方式中，疫苗使用针头和注射器、无针头快速注射装置如 Biojector、皮肤贴递送系统（skin patch delivery system）或任何其他合适方式，同时使用任何合适电极结构例如曲流电极、环形电极或点电极，联合向该皮肤组织提供电穿孔脉冲或脉冲序列而给药到皮肤组织（例如表皮或皮下）内。

皮肤组织中的疫苗接种也可使用侵入性电极如针状电极、微电极或通过从快速注射装置喷射的导电流体射流形成的电极来实施。在一些这样的实施方式中，针状电极也可包括可用于将抗原物质递送到身体组织内的空心针。对于皮肤给药，疫苗组合物可被例如皮下地，如通过单独的皮下注射器针头、喷射注射器、或者通过电极本身注入到皮肤组织内，接着利用一个或多个电穿孔脉冲来脉冲这些电极。

关于疫苗组合物给药至肌肉组织，通常针头型电极（可选地能够递送疫苗）与通过针头和注射器或喷射注射而将疫苗递送至肌肉同时（经常是在其后）进行脉冲。

在本发明方法中使用的针头电极可包括任何适于预计目的的针头电极，包括在上述专利中描述的或在美国专利 No. 5,273,525、6,110,161、6,261,281、6,958,060、PCT 申请 WO01/85202 以及 WO2007/095140 中的任何一个所描述的那些电极，将其全部以其各自的整体并入本文供参考。

如将理解的，本发明提供用于由于初始疫苗接种到第一组织（例如皮肤组织）中接着在第二组织（例如肌肉组织）中一次或多次加强导致的增强的免疫反应。事实上，在涉及多次加强给药的实施方式中，第二或后续加强可以给药至仍不同于给予第一次加强给药的其他组织类型。不希望受特定理论束缚，认为增强的免疫反应至少部分地是通过包括皮肤组织中的初始免疫和肌肉中的加强免疫的方法引起的，因为将疫苗接种到皮肤中提供相对较高浓度的树突细胞（其能够影响所递送的抗原试剂的免疫加工），而肌肉内的加强免疫提供该抗原在肌肉隔室中的相对较长期存在，使得该抗原在提供细胞应答的细胞中被加工。因此，编码一种或多种肽或多肽抗原物种的一种或多种核酸物种的递送增强该肽或多肽抗原的长期表达，从而允许所表达的抗原相对较长期暴露于免疫系统的细胞和体液臂（humoral arm）。

在本发明的又一个实施方式中，给药的方法包括将加强接种与初始接种的时间间隔开恰当的天数。当然，在初始和加强接种之间（以及考虑或需要在两个或更多个加强给药的后续加强接种之间）的特定时间间隔可易于确定，并且将取决于这样的因素，如待引发的期望的免疫反应、递送的抗原、初始和加强组合物要递送到其中的组织类型、递送的组合物的类型（例如在每一种情况下为包含肽的组合物，在每一种情况下为编码抗原的核酸、在一种情况（例如初始）下为肽和在另一情况（例如加强）下为编码肽的核酸），是否联合初始免疫、加强免疫、或初始和加强免疫使用了 EP、给予

该组合物的患者的年龄和症状等。如附图 1 所示出的，相比于将在初始和加强之间的时间间隔开一个足够期间以允许免疫系统可以对皮肤中的最初接种起反应来说，同时对皮肤和肌肉给药效果要差一些。在一个优选实施方式中，疫苗初始推注的给药与加强推注在时间上间隔开一天到大约 4-7 周。在一个特别优选的实施方式中，初始和加强推注之间的时间间隔可以为一天至 7、14、20、30、35、40、45、50 和 54 天。在特别优选的实施方式中，该时间间隔可以为 2 天、6 天或 20 天。当给予多次加强给药时，后续加强免疫之间的时间间隔可以相同或不同。一些优选的加强免疫之间的间隔包括 1 周，2-4 周，1-3 个月，4、5、6、8 和 10 个月，以及 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15 和 20 年。

如已经描述的，本发明的疫苗可以包括，除了其他物质以外，编码一种或多种抗原肽、蛋白质或多肽（其表达通过启动子，优选可诱导性的或组织特异性启动子调节或控制）的基因基疫苗。在一些优选的这种实施方式中，以预定时间间隔推注递送至皮肤和肌肉组织分别用于最初免疫和加强免疫。然而，本发明还设想了同时给予初始和加强接种，其中初始的推注给药优选到皮肤中而加强接种被递送到肌肉内。在这类的一个特别优选实施方式中，递送至肌肉的疫苗组合物包括在诱导性启动子（其可通过暴露于诱导剂或与诱导剂可操作相关联而被诱导）调节下编码抗原的核酸。因此，在一个所选时间，例如在同时的初始和加强免疫之后的 1 至 14 天之间，由递送至肌肉组织的核酸编码的基因的表达可被诱导以表达感兴趣的抗原，并诱导或增强对该特定抗原的免疫应答。在其他可替换的实施方式，用于初始免疫的疫苗组合物可以包括编码抗原肽的可表达核酸，而加强组合物可以包括包含抗原本身的肽或多肽。即，在这样的一个实施方式中，一种或多种疫苗组合物（其是用于初始或加强的组合物）可以包括不同形式的相同抗原；例如，组合物之一可以包括单个抗原肽、蛋白、或多肽物种，而组合物的另一个可

以包含能够指导该相同抗原肽、蛋白或多肽物种的表达的核酸。更进一步地，初始和/或加强组合物可包含任何合适的基因递送载体（例如，DNA 或 RNA 病毒，病毒基因组，“裸露”DNA 载体，质粒或不打算整合到将其引入的细胞的基因组中的其他遗传元件，用于整合（通过同源性重组、随机插入或其他方式）的载体或其部分，肽，蛋白质或多肽物种，和/或设计用于任何特定指征（其中期望免疫反应）的有机分子混合物。

现在转到本发明的特定代表性、非限制性实施例，描述了涉及给予皮肤组织疫苗组合物随后在肌肉中加强（在两种情况下都使用电穿孔）的实验，以提供增强的免疫反应。

实施例 1

白色新西兰兔的三个同龄组（n=4）用编码完全人类 IgG 蛋白的 DNA 接种。该接种对于同龄组 1-3 给药如下：

- 1) 第 0 天：仅肌肉注射；
- 2) 第 0 天：皮肤接种；第 7 天：肌肉注射，每一种情况利用电穿孔；
- 3) 第 0 天：皮肤和肌肉都接种。

电穿孔使用具有能够在肌肉组织中注射和电穿孔的两个相同注射/电极的 Elgen 1000 (Inovio AS, Oslo, Norway) 装置以及具有用于皮肤电穿孔的卡铂电极 (9 mm x 9 mm) 的 BTX ECM 820 来实施。对于皮肤和肌肉的给药，在皮内或肌肉注射疫苗溶液后分别施加电场。对于皮肤，接种包括使用 28G 针头以在兔背部皮肤中注射 30 µg/30 µl 的编码 IgG 的 DNA 溶液。对于肌肉，接种包括在兔四头肌中使用 200 µl DNA/针=400 µl/注射部位或者 20 µg/400 µl hIgG 的肌肉注射 (i.m.)。

电穿孔条件:

肌肉: 250 mA, 20 ms, 2 脉冲, 100 ms 间隔 (10 Hz), 2-针阵列, 21 G 针头, 两个针头电极之间 2 mm 距离, 200 μ l/针, 1 cm 总插入深度, 0.7 cm 注射深度;

皮肤: 100 V/mm, 10ms, 5 脉冲, 1 s 间隔, 30 μ l/部位。

如图 1 所示, 相对于单独在肌肉中或者仅作为初始接种在皮肤和肌肉中实施的接种, 当初始和加强接种分别在皮肤和肌肉中实施时, 针对兔中的人类 IgG 的抗体效价惊人地且显著地更高。因此, 这个实验表明, 抗原试剂在时间上间隔开地给予到不同组织能够增强对这样的抗原试剂的免疫反应。这样的方法提供更快和更多地出现针对所述试剂的循环抗体。

实施例 2

在这个实施例中, 使用 (BALB/c) 小鼠免疫模型, 表明了皮肤中的初始免疫和在第二组织如肌肉中的加强免疫并结合电穿孔的附加优点的惊人优势, 其中如通过 ELISA 检测的研究了抗原特异性抗-IgG1 和抗-IgG2a 抗体的效价。这里抗-IgG1 和抗-IgG2a 抗体的使用提供了这样的证实, 即依照本发明的免疫方案增强了与炎性细胞介导的免疫相关的反应 (也称为 TH1 反应) 以及与调节性体液免疫相关的反应 (也称为 TH2 反应)。

在一个第一实验中, Balb/c 小鼠的 5 个同龄组 (n=7) 在小鼠四头肌的皮肤 (表皮) 或肌肉组织中用 30 μ g/30 μ l 的编码乙型肝炎表面抗原 (g-Wiz-HBsAg) (Aldevron LLC, Fargo, ND, USA) 的质粒 DNA (pDNA) 接种, 接着电穿孔。在肌肉中使用 Elgen 1000 装

置 (Inovio Biomedical Corp, San Diego) 而在皮肤中使用 BTX ECM 820 实施电穿孔。

对于肌肉处理, 电穿孔使用 50V 且在 250 mA 的电流限值, 5 个脉冲, 20 ms 脉冲长度, 100 ms 间隔来实施。对于皮肤 (表皮) 组织, 电穿孔使用卡铂电极实施, 其参数为: 3 个脉冲, 10 ms 脉冲长度, 150 V/mm, 脉冲之间为 1 s 的间隔。

第 1 同龄组仅在第 0 天在皮肤 (皮内) 组织接受初始接种 (S0)。

第 2 同龄组在第 0 天在肌肉中接受初始接种 (M0)。

第 3 同龄组在第 0 天在皮肤 (皮内) 和肌肉中接受初始接种 (S0M0)。

第 4 同龄组在第 0 天在皮肤 (皮内) 中接受初始接种然后在第 2 天在肌肉中进行加强 (S0M2)。

第 5 同龄组在第 0 天在皮肤 (皮内) 中接受初始接种然后在第 6 天在肌肉中进行加强 (S0M6)。

血清抗-HB 特异性免疫反应通过 ELISA 进行检测。(A) 几何平均抗-HB IgG1 抗体终点效价 ($\pm$ 标准误差) 在不同时间点 (在第一次免疫之后的第 14、21、28 和 42 天) 进行确定。注意到在第 42 天的统计学显著性差异, $*p<0.05$ 。(B) 几何平均抗-HB IgG2a 终点效价 ($\pm$ 标准误差) 在不同时间点进行确定。也注意到在第 42 天的统计学显著性差异, $*p<0.05$ 。

以上方案的结果在图 2A 和 2B 中示出。如清楚示出的, 这种接种疫苗方案提供了针对疾病靶抗原例如乙型肝炎抗原的增强效价。治疗方案增强了体液反应以及细胞反应。例如, 图 2A 示出了抗-HB IgG1 抗体硝基 (体液的), 而图 2B 示出了抗-HB IgG2a 的免疫反应 (细胞的)。令人惊异地, 与包括使用电穿孔的在皮肤中的

初始以及之后在肌肉中的加强的接种方案相比，相同时间在两个不同组织中、或者可替换地仅在一种组织类型或者另一组织类型例如皮肤和肌肉、或者皮肤或肌肉中的接种会使效价更低。还令人惊异的是，在初始和加强接种之间小到两天的时间间隔的情况下观察到增强的效果。

其他数据表明，在第二组织如肌肉中的加强可从第一次接种时延迟，这里，至多 20 天，并且仍然对包括在皮肤（表皮）组织中的初始和在肌肉组织中的加强（二者均通过电穿孔）的免疫方案表现出增强的免疫效果。特别地，Balb/c 小鼠的 5 个同龄组（每个同龄组 $n=7$ ）在该小鼠四头肌的皮肤（表皮）或肌肉组织中用 $30\mu\text{g}/30\mu\text{l}$ 的质粒 g-Wiz-HBsAg（Aldevron LLC, Fargo, ND）接种，接着进行电穿孔。对于肌肉治疗，电穿孔使用 Elgen 1000 两个相同的注射器（Inovio Biomedical Corp, San Diego）实施，其中脉冲参数设定为 50V 和在 250 mA 的电流极限，5 个脉冲，20 ms 脉冲长度，脉冲之间为 100 ms 间隔。对于皮肤/表皮组织治疗，电穿孔使用卡铂电极来实施，并且脉冲参数包括 3 个脉冲，10 ms 脉冲长度，150 V/mm，1s 间隔。

第 1 同龄组在第 0 天在皮肤（皮内）组织接受接种（S0）。

第 2 同龄组在第 0 天在皮肤（皮内）中接受接种，然后在第 20 天在皮肤中再次进行加强（S0S20）。

第 3 同龄组在第 0 天在肌肉中接受接种，然后在第 20 天在肌肉中再次进行加强（M0M20）。

第 4 同龄组在第 0 天在皮肤（皮内）中接受接种，然后在第 20 天在肌肉中进行加强（S0M20）。

第 5 同龄组在第 0 天在肌肉中接受接种并在第 20 天在皮肤（皮内）中进行加强（M0S20）。

来自这个实验的结果示于图 3A 和 3B。特别地，血清抗-HB 特异性免疫反应通过 ELISA 检测。在图 3A 中，几何平均抗-HB IgG1 抗体（体液反应）终点效价（ $\pm$ 标准误差）在第一次疫苗接种后第 28 天和第 42 天出现。示出的在第 42 天的统计学显著性差异为 $*p<0.05$ 。在图 3B 中，示出了几何平均抗-HB IgG2a 反应（细胞的），终点效价 $\pm$ 标准误差。注意到在第 42 天的统计学显著性差异（ $*p<0.05$ ）。根据这些结果，很明显，在一种组织类型中利用疫苗初始免疫一个患者并在第二组织类型中进行加强免疫有明显的优点。在一个特别优选的方面，在皮肤/表皮组织中经由电穿孔的初始免疫以及在肌肉中经由电穿孔的加强免疫中实现了一个优点。而且，在第一次接种之后，在时间上延迟至少 2 天，优选 6 和/或 7 天，并且可替换地优选在 7 天之后如在第 20 天，进行加强免疫可以看到一定的好处。

本文所披露和要求保护的所有组合物以及方法可根据本披露内容无需过度实验而完成和实施。虽然本发明的组合物和方法已经依照优选的实施方式进行了描述，但是对于本领域技术人员来说，明显的是，在不背离本发明的精神和范围的情况下，对于本文所描述的组合物和方法，以及所述方法的步骤或步骤的顺序可以有各种变化。更具体地，所描述的实施方式在所有方面仅认为是举例说明性的而不是限制性的。对于本领域技术人员显而易见的所有类似替代和修改认为是在所附权利要求限定的本发明的精神和范围内。

本说明书中提到的所有专利、专利申请和出版物指示本发明所述领域的普通技术人员的水平。所有专利、专利申请和出版物（包括其所要求的优先权或另一种权益的那些）在本文中通过引用将其如同每一个单个出版物具体和单个地指定通过引用并入的相同程度并入到本文中。

本文中举例说明性地描述的本发明合适地可以在没有本文中没有具体披露的任何元件的情况下实施。因此，例如，在本文的每一种情况下，术语“包括”、“基本还是由...组成”以及“由...组成”中任一个可以用其他两个术语代替。已经采用的术语和表达用作描述的术语而不用于限制，并且并不意图使用这样的术语和表达暗示排除在其整体或其部分总所示和所述的特征的任何等同物，但是应当认识到，在所要求的本发明的范围内可以进行各种修改。因此，应当理解，尽管本发明已经通过优选实施方式和可选的特征具体进行了披露，但是本领域技术人员可以进行本文披露的构思的修改和变形，并且这样的修改和变形认为是在由所附权利要求所限定的本发明的范围内。

本发明涉及可专利的过程和方法。根据本发明的“可专利”过程或方法，如同任何可专利机器、制造的制品、物质的组合物一样，意味着该主题满足对于在进行可专利性分析时的所有法定要求。例如，对于新颖性、创造性等，如果后续审查表明，所附权利要求中的一个或多个涵盖否定新颖性、创造性等的一个或多个实施方式，则通过限定限制至“可专利”实施方式的权利要求，特别排除不可专利的实施方式。而且，本发明所附权利要求应解释为提供最宽的合理范围，以及保持它们的有效性。此外，如果对于可专利性的一个或多个法定要求被修改或者如果对于评价对于可专利性的特定法定要求从该申请提交时是否满足的标准发生变化，或者所附权利要求中的一个或多个的有效性在授予专利时被质疑，则权利要求应以在该情况下（1）保持它们的有效性和（2）提供最宽的合理解释的方式进行解释。

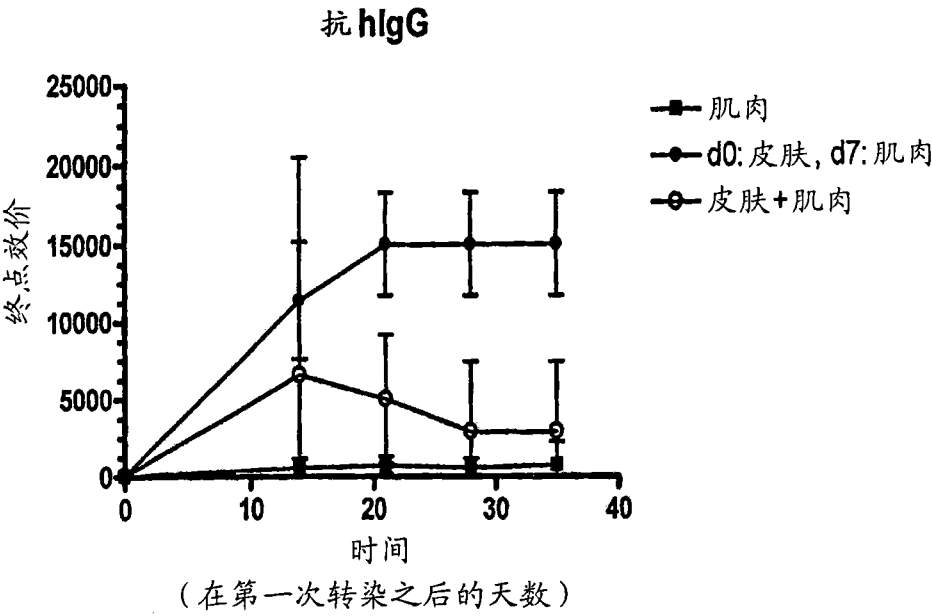


图 1

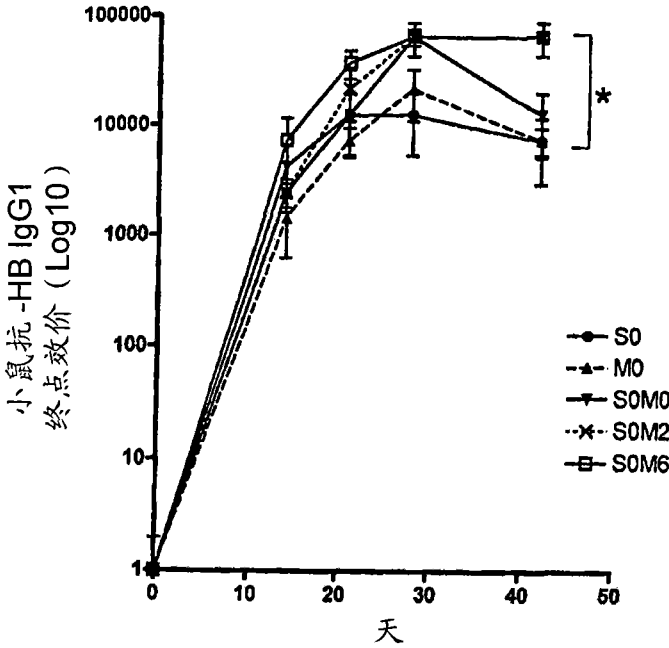


图 2A

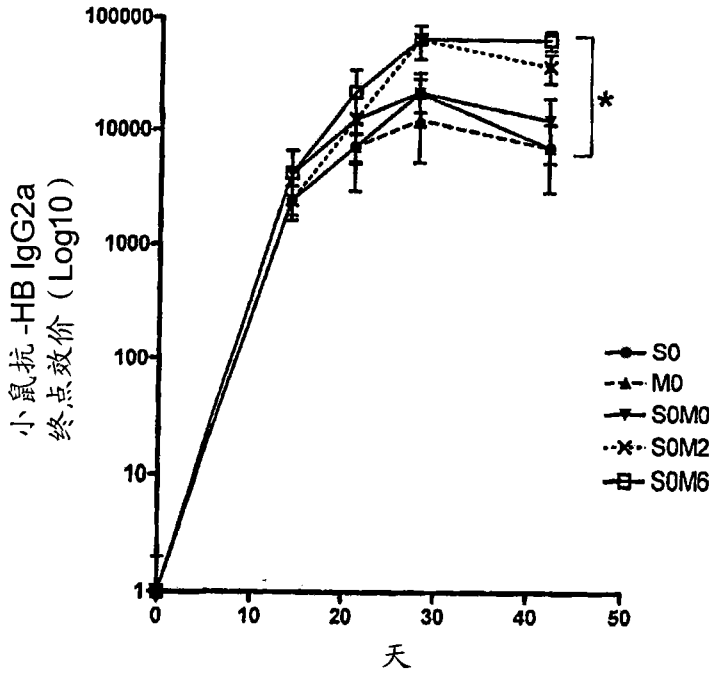


图 2B

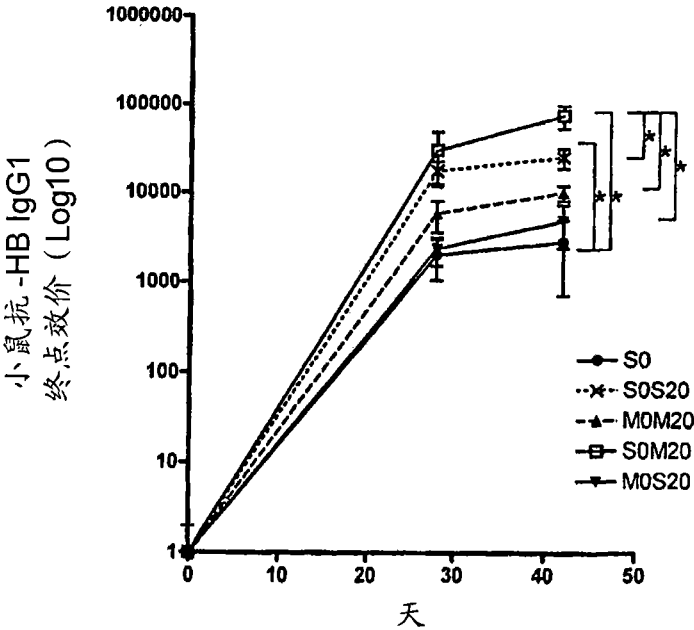


图 3A

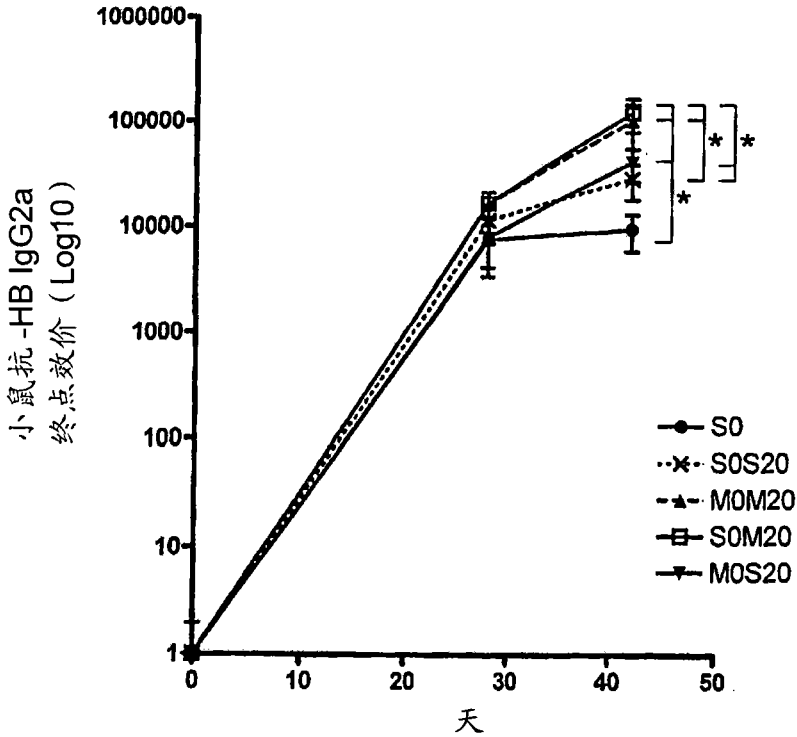


图 3B