



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1468256 B

(45) 授权公告日 2010.10.27

(21) 申请号 01816998.8

A61K 39/29(2006.01)

(22) 申请日 2001.08.07

C07K 1/36(2006.01)

A61P 1/16(2006.01)

(30) 优先权数据

0019728.5 2000.08.10 GB

0101334.1 2001.01.18 GB

(56) 对比文件

Sesardic-D. Non-pertussis components of combination vaccines: Problems with potency testing. Biologicals-27 2. 1999, 27(2), 177-181.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2003.04.07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2001/009100 2001.08.07

审查员 陆纯

(87) PCT申请的公布数据

W002/12287 EN 2002.02.14

(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 K·德海德 P·舒 M·赛兰托尼
O·范奥普斯特尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘玥

(51) Int. Cl.

C07K 14/02(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于疫苗中的 HBV 抗原的纯化

(57) 摘要

本发明涉及生产适用于疫苗的乙型肝炎抗原的一种方法,所述方法包括在半胱氨酸存在下纯化所述抗原,涉及包含这类抗原的疫苗。

1. 一种用于生产乙型肝炎疫苗的方法,所述疫苗含有纯化的乙型肝炎表面抗原和药学上可接受的赋形剂,所述抗原每 20 μ g 蛋白含有少于 0.025 μ g 的汞,其中所述抗原是在具有游离 -SH 基团的还原剂存在下纯化的。

2. 一种依照权利要求 1 的方法,其中所述疫苗不含防腐剂。

3. 一种依照权利要求 2 的方法,其中所述防腐剂是硫柳汞。

4. 一种依照权利要求 1 至权利要求 3 中任一项的方法,其中所述乙型肝炎表面抗原吸附在氢氧化铝上。

5. 一种依照权利要求 1-3 任一项的方法,其中纯化乙型肝炎表面抗原的方法包括:

(a) 凝胶渗透层析;

(b) 离子交换层析;和

(c) 加入具有游离 -SH 基团的还原剂。

6. 一种依照权利要求 1-3 任一项的方法,其中所述还原剂是半胱氨酸、谷胱甘肽、二硫苏糖醇或 β -巯基乙醇。

7. 一种依照权利要求 6 的方法,其中所述还原剂是半胱氨酸。

8. 一种依照权利要求 7 的方法,其中所述半胱氨酸加入至终浓度在 1-10mM 之间。

9. 一种依照权利要求 8 的方法,其中所述半胱氨酸加入至终浓度 2mM。

10. 一种依照权利要求 1-3 和 7-9 任一项的方法,其中所述抗原是在用所述还原剂处理之前在硫柳汞存在下纯化的。

11. 一种依照权利要求 1-3 和 7-9 任一项的方法,其中所述疫苗包含佐剂。

12. 一种依照权利要求 11 的方法,其中所述佐剂是铝盐。

13. 一种依照权利要求 12 的方法,其中所述铝盐是氢氧化铝。

14. 一种权利要求 11 所要求保护的方法,其中所述佐剂包含 TH-1 诱导佐剂。

15. 一种依照权利要求 14 的方法,其中所述 TH1 诱导佐剂选自:3-DMPL、QS21、3-DMPL 和 QS21 以及 CpG 寡核苷酸。

16. 一种依照权利要求 11 的方法,其中所述疫苗还含有选自以下的一种或多种抗原:白喉类毒素、破伤风类毒素、无细胞百日咳抗原、灭活脊髓灰质炎病毒、流感嗜血菌抗原、甲型肝炎抗原、单纯疱疹病毒、衣原体、GSB、HPV、肺炎链球菌和奈瑟氏菌抗原。

17. 一种用来生产适用于疫苗的乙型肝炎表面抗原的方法,所述方法包括在具有游离 -SH 基团的还原剂存在下纯化所述抗原,其中所述抗原是在用所述还原剂处理之前在硫柳汞存在下纯化,并且其中所述纯化抗原制品每 20 μ g 蛋白含有少于 0.025 μ g 的汞。

18. 一种依照权利要求 17 的生产乙型肝炎表面抗原的方法,其中纯化乙型肝炎表面抗原的方法包括:

(a) 凝胶渗透层析;

(b) 离子交换层析;和

(c) 加入具有游离 -SH 基团的还原剂。

19. 一种依照权利要求 17 或权利要求 18 的生产乙型肝炎表面抗原的方法,其中所述还原剂是半胱氨酸、谷胱甘肽、二硫苏糖醇或 β -巯基乙醇。

20. 一种包含乙型肝炎表面抗原及半胱氨酸溶液的疫苗组合物,其中所述疫苗完全不含硫柳汞。

21. 一种包含用权利要求 1 所述方法获得的乙型肝炎表面抗原、佐剂及灭活的脊髓灰质炎病毒的疫苗制剂,其中所述疫苗完全不含硫柳汞。

用于疫苗中的 HBV 抗原的纯化

[0001] 本发明涉及生产用于治疗或预防乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的乙型肝炎疫苗的一种新方法。它还涉及通过本发明所述新方法可获得的 HBV 疫苗。

[0002] 由于目前对慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的治疗有限, 因此它构成了一个巨大的全球公众健康问题。估计在世界范围内数量超过 3 亿的慢性 HBV 携带者有发展成为慢性活动型肝炎、肝硬化和原发性肝癌的危险。

[0003] 目前存在的许多疫苗需要加入防腐剂以防止变质。常用的防腐剂是硫柳汞, 它是一种含汞的化合物。虽然评论员强调含硫柳汞疫苗的潜在危害不应该被夸大, 但已经出现了对于在疫苗中使用汞的担心 (Offit ;P. A. JAMA 第 283 卷 ;第 16 期)。不过发现新的和可能更安全的制备疫苗方法来替代在所述生产方法中使用硫柳汞应该是有利的。因而需要开发不含硫柳汞的疫苗, 尤其是乙型肝炎疫苗。

[0004] 第一方面, 本发明提供了一种生产适用于疫苗中的乙型肝炎抗原的方法, 所述方法包括在含有游离 -SH 基的还原剂存在下纯化所述抗原。

[0005] 本发明优选提供一种生产稳定的无硫柳汞痕迹的乙型肝炎抗原的方法, 所述方法包括在含有游离 -SH 基的还原剂存在下纯化所述抗原。

[0006] 如本文所述, 当利用汞吸收分光光度测定法在纯化抗原制品中检测不到硫柳汞时, 所述抗原制剂通常是无硫柳汞痕迹的。

[0007] 在通过吸收分光光度测定法适当地测量时, 所述肝炎抗原制剂优选包含每 20 μ g 蛋白少于 0.025 μ g 的汞。

[0008] 优选所述纯化是在不存在硫柳汞下进行的, 并且所述纯化抗原完全不含硫柳汞。

[0009] 优选所述抗原是稳定的, 如在这里举例的实施例 1 中所描述的, 适宜基本上与在硫柳汞存在下纯化后的肝炎抗原一样稳定。

[0010] 优选所述肝炎抗原是具有免疫原性的。

[0011] 优选所述还原剂是在所述抗原纯化工序中加入, 优选是在表达所述抗原的细胞生长后加入。

[0012] 优选所述还原剂是半胱氨酸、二硫苏糖醇、 β -巯基乙醇或谷胱甘肽, 半胱氨酸是最优选的。

[0013] 因此本发明优选提供一种生产无硫柳汞痕迹的稳定的免疫原性乙型肝炎抗原的方法, 所述方法包括在半胱氨酸存在下纯化所述抗原。

[0014] 优选所述纯化在半胱氨酸溶液存在下进行。

[0015] 优选溶液中或粉末状的半胱氨酸在所述工序中加入至终浓度在 1mM 至 10mM 之间, 优选是 1mM 至 5mM, 更优选所述半胱氨酸加入至终浓度约 2mM。

[0016] 优选所述半胱氨酸是 L- 半胱氨酸。

[0017] 本发明还提供一种生产不含硫柳汞的稳定乙型肝炎抗原的方法, 其中所述粗制抗原经过凝胶渗透层析, 经过离子交换层析, 然后与含有游离 -SH 基的还原剂混合。

[0018] 优选所述离子交换层析是阴离子交换层析。

[0019] 本发明还提供一种通过本发明制备方法可获得的不含硫柳汞的乙型肝炎抗原, 其

中所述抗原至少与在硫柳汞存在下制备的乙型肝炎抗原具有一样的免疫原性和抗原性。

[0020] 本发明还提供一种免疫原性乙型肝炎抗原,所述抗原的平均 ELISA 蛋白比率超过 1.5,并且其 RF1 含量的 IC50 值至少降低至在存在硫柳汞情况下制备的乙型肝炎表面抗原的三分之一。

[0021] 另一方面,本发明涉及一种生产适用于疫苗的肝炎抗原的方法,所述方法包括在硫柳汞存在下纯化所述抗原和随后在含有游离 -SH 基的还原剂存在下处理抗原。

[0022] 适宜在纯化步骤后进行所述处理例如透析以除去硫柳汞。

[0023] 优选所述还原剂是半胱氨酸、DTT、谷胱甘肽或 2- 巯基乙醇。

[0024] 本发明的所述乙型肝炎抗原可以用于治疗或预防乙型肝炎感染,特别是治疗或预防例如慢性乙型肝炎感染。

[0025] 本发明还提供一种包含与佐剂结合的本发明乙型肝炎抗原的疫苗制剂。优选所述佐剂是铝盐或 TH1 细胞反应的优先刺激物。

[0026] 优选所述抗原是乙型肝炎表面抗原。

[0027] 乙型肝炎表面抗原的制备已有详细的纪录。参见例如,Harford 等 Develop. Biol. Standard 54, 第 125 页 (1983)、Gregg 等, Biotechnology, 5, 第 479 页 (1987)、EP-A-0226846、EP-A-0299108 和其中的参考文献。

[0028] 此中用到的“乙型肝炎表面抗原”或“HBsAg”表述包括任何 HBsAg 抗原或呈现出 HBV 表面抗原抗原性的其片段。人们会理解,除了 HBsAgS 抗原的 226 个氨基酸的序列(参见 Tiollais 等, Nature, 317, 489 (1985) 和其中的参考文献)之外,如果需要,此中所描述的 HBsAg 还可以含有在上面参考文献中和 EP-A-0 278 940 中描述的全部或部分的前 -S 序列。这里描述的 HBsAg 也可以指变体,例如在 WO 91/14703 中描述的“逃避突变体”。

[0029] HBsAg 也可以指在 EP 0 198 474 或 EP 0 304 578 中所描述的多肽。

[0030] 通常所述 HBsAg 是颗粒状的。在一个尤其优选实施方案中,所述 HBsAg 基本上由上面所提到的 HBsAg S- 抗原组成。

[0031] 所述疫苗可以有利地包含一种药学上可接受的赋形剂,例如合适的佐剂。合适的佐剂是市场上有售的,例如弗氏不完全佐剂和完全佐剂 (Difco Laboratories, Detroit, MI); Merck 佐剂 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); 铝盐,例如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝; 钙盐、铁盐或锌盐; 酰化酪氨酸的不溶性悬浮液; 酰化糖; 阳离子衍生多糖或阴离子衍生多糖; 聚磷腈; 生物可降解微球; 单磷酸脂质 A 和 quil A。细胞因子,例如 GM-CSF 或白介素 -2、白介素 -7 或白介素 -12 也可以用作佐剂。

[0032] 在本发明所述制剂中,优选所述佐剂组合物诱导主要是 TH1 型的免疫应答。高水平的 Th1 型细胞因子(例如 IFN- γ 、TNF α 、IL-2 和 IL-12)往往有利于诱导针对所给予抗原的细胞介导免疫应答。在一个优选实施方案中,其中的应答主要是 Th1 型, Th1 型细胞因子的水平会比 Th2 型细胞因子的水平增大到一个更大的范围。这些细胞因子的水平可以很容易地利用标准测定法确定。对于细胞因子家族的综述,参见 Mosmann 和 Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989。

[0033] 因此,用于引起主要为 Th1 型应答的合适佐剂包括,例如单磷酸脂质 A, 优选 3- 脱氧 - 酰化单磷酸脂质 A (3D-MPL) 与铝盐的组合。其他已知的优先诱发 TH1 型免疫应答的

佐剂包括含有 CpG 的寡核苷酸。所述寡核苷酸的特征在于,所述 CpG 二核苷酸是未甲基化的。这类寡核苷酸是熟知的,描述于例如 WO 96/02555 中。同样描述了免疫刺激性 DNA 序列例如, Sato 等, Science 273 :352,1996。另一种优选佐剂是皂苷,优选是 QS21(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA),它可以单独使用或与其他佐剂联合使用。例如,一个增强的系统包括单磷酸脂质 A 和皂苷衍生物的组合,例如在 WO 94/00153 中所描述的 QS21 和 3D-MPL 的组合,或者在 WO 96/33739 中所描述的其中 QS21 被胆固醇猝灭的反应原性较低的组合物。其他优选的制剂包括水包油乳剂和生育酚。包含 QS21、3D-MPL 和生育酚的水包油乳剂的尤其有效佐剂制剂描述于 WO 95/17210 中。

[0034] 包含 QS21、3D-MPL 和生育酚的水包油乳剂的尤其有效佐剂制剂描述于 WO 95/17210 中,它是一种优选的制剂。

[0035] 因此,在本发明的一个实施方案中,提供一种包含本发明乙型肝炎表面抗原的疫苗,它另外还包含 TH-1 诱导佐剂。一个优选实施方案是一种疫苗,其中所述 TH-1 诱导佐剂选自由下列组成的佐剂组:3D-MPL、QS21、QS21 和胆固醇的混合物和 CpG 寡核苷酸。另外一个优选实施方案是含有由单磷酸脂质 A 或其衍生物、QS21 和生育酚的水包油乳剂的作为佐剂的乙型肝炎表面抗原的一种疫苗。

[0036] 优选所述疫苗另外还包含皂苷,更优选是 QS21。包括 CpG 和皂苷的另一种尤其合适的佐剂制剂描述于 WO 00/09159 中,它是一种优选制剂。最优选在那种特定制剂中所述皂苷是 QS21。优选所述制剂另外还包含水包油乳剂和生育酚。

[0037] 本发明此外还提供一种疫苗制剂,所述疫苗制剂包含与佐剂结合的本发明乙型肝炎表面抗原,另外还包含选自以下的一种或多种抗原:白喉类毒素(D)、破伤风类毒素(T)、无细胞百日咳抗原(Pa)、灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)、流感嗜血菌抗原(Hib)、甲型肝炎抗原、单纯疱疹病毒(HSV)、衣原体、GSB、HPV、肺炎链球菌和奈瑟氏菌抗原。提供针对其他疾病的保护作用的抗原也可以联合到本发明的所述疫苗制剂中。

[0038] 在一个具体实施方案中,所述疫苗制剂包含通过本发明制备方法可获得并与佐剂和灭活脊髓灰质炎病毒结合的乙型肝炎表面抗原。

[0039] 本发明同样也提供一种治疗和/或预防乙型肝炎病毒感染的方法,所述方法包括给予患有或易感乙型肝炎病毒感染的人或动物受治疗者安全和有效量的本发明疫苗,以用于预防和/或治疗乙型肝炎病毒感染。

[0040] 本发明还提供本发明的乙型肝炎表面抗原在用于乙型肝炎病毒感染、例如慢性乙型肝炎病毒感染患者的治疗药物的制备中的应用。

[0041] 本发明所述疫苗含有免疫保护量的所述抗原,并可以通过常规技术制备。

[0042] 疫苗制备方法通常描述于 Pharmaceutical Biotechnology, 61 卷 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, Powell 和 Newman 编辑, Plenum Press, 1995 和 New Trends and Developments in Vaccines, Voller 等编辑, University Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A. 1978。例如,在脂质体内包封描述于例如 Fullerton 的美国专利 4,235,877 中。蛋白与大分子的缀合例如在 Likhite 的美国专利 4,372,945 和 Armor 等的美国专利 4,474,757 中公开。Quil A 的应用由 Dalgaard 等在 Acta Vet Scand, 18:349(1977) 中公开。3D-MPL 可得自 Ribi immunochem, USA, 并在英国专利申请第 2220211 号和美国专利 4912094 中公开。QS21 在美国专利第 5057540 号中公开。

[0043] 本发明通过下列实施例说明,但并不限于下列实施例,其中:

[0044] 图 1 图解说明所述 Engerix B™ 的无硫柳汞生产方法。

[0045] 图 2 图解说明主体抗原 (bulk antigen) 批料的 SDS-PAGE 分析;和

[0046] 图 3 图解说明通过无硫柳汞方法生产的主体抗原批料中的残留酵母蛋白。

[0047] 实施例 1:

[0048] 硫柳汞存在下乙型肝炎表面抗原的生产方法

[0049] SB Biologicals 乙型肝炎单价疫苗 (Engerix B™) 的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 是在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中作为重组蛋白表达的 (参见 Harford 等,在上述引文中)。所述 24kD 蛋白在胞内产生并在重组酵母细胞中积聚。在发酵结束时收获所述酵母细胞,然后在温和表面活性剂例如 Tween 20 存在下破碎细胞以释放所需蛋白。随后含有所述可溶性表面抗原颗粒的细胞匀浆经过一系列沉淀得到预纯化,然后通过超滤浓缩。

[0050] 所述重组抗原的进一步纯化是在随后的层析分离中进行的。第一步,所述粗抗原浓缩液在 Sepharose 4B 介质上进行凝胶渗透层析。在所述 4B 凝胶渗透层析步骤中,在洗脱缓冲液中存在硫柳汞。所述洗脱缓冲液的组成如下:10mM Tris,5%乙二醇,pH 7.0,50mg/L 硫柳汞。硫柳汞包含在这个缓冲液中来控制生物负荷。大部分的硫柳汞在随后的纯化步骤包括离子交换层析、超速离心和脱盐(凝胶渗透)中被清除,这样通过所述原先的方法制备的纯化主体抗原制剂每 20 μ g 蛋白含有约 1.2 μ g 硫柳汞并少于 2 μ g 硫柳汞。

[0051] 用 DEAE- 基质进行离子交换层析,然后将这种混合液在预先制备的不同氯化铯浓度的 4 个液层上进行铯-梯度超速离心。所述抗原颗粒在所述梯度中根据它们的密度与污染细胞组分分离开来,并在所述离心工序结束时洗脱。然后通过在 Sepharose 凝胶上进行第二次凝胶渗透,从这种混合液中清除氯化铯。

[0052] 当通过在所述 4B 凝胶渗透缓冲液中含有硫柳汞的方法制备 HBsAg 时,浓度超过 30mg/ml 的蛋白回收到来自 CsCl 梯度的混合的含 HBsAg 级分中,通过来自 Abbott Laboratories 的 AUSZYME 试剂盒来测定,相当于相等浓度的 HBsAg。

[0053] 所述 CsCl 超速离心步骤通常从所述 HBsAg 制剂中清除残余的脂类、DNA 和少量蛋白污染物。它是通过在 Beckman Instruments,Fullerton,California 的 Ti 15 转子中以转速 30,000rpm 区带离心进行约 40-60 小时。待纯化的样品加入到终浓度为 0.75M、1.5M、2.5M 和 3.25M CsCl 的多层 CsCl 溶液上。在离心结束时将所述梯度被洗脱成多个级分。含有 HBsAg 的级分可以通过在 280nm 的 UV 吸收或者通过 AUSZYME 试剂盒检测所述级分的稀释液来鉴别。所述 HBsAg 带是在密度 1.17 至 1.23g/cm³ 之间。

[0054] 所述含有纯化 HBsAg 的溶液在被用于制备疫苗制剂之前除菌过滤。

[0055] 从所述酵母细胞裂解物中纯化如同所述抗原在胞内生产一样复杂,设计用于清除不同类型(酵母)污染物的一系列分离技术对于获得纯净的主体抗原是必要的。所述纯化步骤是重要的,因为待纯化的制品是包含多拷贝表面抗原多肽的脂蛋白颗粒,而且这个结构必须在整个纯化工序中得到保持。这个工序的特点是它生产出的表面抗原颗粒具有完整的免疫原性,而不需要另外的化学处理来加强免疫原性(对照 EP0135435)。

[0056] 所述生产方法的细节进一步描述于欧洲专利 0199698 中。

[0057] 实施例 2:

[0058] 用无硫柳汞方法生产酵母来源 HBsAg 以及所述 HBsAg 的表征

[0059] 1. 酵母来源 HBsAg 的生产和纯化

[0060] 1.1 生产工序概述

[0061] 乙型肝炎表面抗原可以通过酿酒酵母的一个适当菌株的发酵来生产,例如 Harford 等(在上述引文中)所描述的。

[0062] 在所述重组酵母菌株大规模发酵结束时,收获细胞,并在温和表面活性剂例如 Tween 20 存在下破碎细胞。然后所述表面抗原通过多步骤的提取和纯化程序分离,所述程序严格按照上面实施例 1 中直到在 Sepharose 4B 上进行的第一次凝胶渗透步骤所描述的。

[0063] 1.2 无硫柳汞纯化工序

[0064] 与实施例 1 中所描述的所述工序相比较,在无硫柳汞方法中引入了下列两个变化。

[0065] 1.4B 凝胶渗透层析步骤中的洗脱缓冲液不再含有硫柳汞。

[0066] 2. 加入半胱氨酸(终浓度 2mM)到得自所述阴离子交换层析步骤的洗出混合液中。

[0067] 已经发现从所述 4B 凝胶渗透缓冲液中去除硫柳汞会导致所述 HBsAg 颗粒在所述 CsCl 密度梯度离心步骤期间沉淀,从而造成制品损失和所回收抗原的聚合和凝集。

[0068] 向得自前面的阴离子交换层析步骤的洗出混合液中加入终浓度为 2mM 的半胱氨酸,防止抗原在 CsCl 密度离心过程中沉淀和损失。

[0069] 半胱氨酸是用于这种处理的优选物质,因为它是天然存在的氨基酸,而且可以在利用 Sepharose 4BCLFF 作为柱基质,在随后的凝胶渗透柱上进行的脱盐步骤中清除。

[0070] 与实施例 1 中所描述的方法相比,在所述生产方法中没有其他的变化。

[0071] 所述无硫柳汞方法生产具有与来自于实施例 1 中所述方法的抗原相当的纯度和特性的主体抗原。

[0072] 1.2a

[0073] 以 50 μ g/ml 加入到所述 4B 缓冲液中的所述硫柳汞被认为分解了,所形成的乙基汞可以共价连接到所述蛋白的半胱氨酸残基的游离巯基上。所述蛋白包含 14 个半胱氨酸残基,其中有 7 个位于 101 位和 150 位之间。

[0074] 所述蛋白的这个区域相信位于所述颗粒的表面,包含 HBsAg 的主要抗原性区域,包括免疫显性 a 区域和 RF1 单克隆抗体的识别位点(Waters J 等,Postgrad. Med. J., 1987: 63(Suppl. 2):51-56. 和 Ashton-Rickardt 和 Murray J. Med. Virology, 1989:29:196)。利用存在于所述 4B 凝胶渗透缓冲液中的硫柳汞纯化的抗原,在所述纯化工序结束时含有约 0.5-0.6 μ g 汞。这些汞通过简单的透析不能够完全去除。

[0075] 在一个实验中,在主体抗原制剂中测量到 0.56 μ g 汞/20 μ g 蛋白。将这种制剂在室温下 150mM NaCl、10mM NaPO₄ pH 6.9 缓冲液中透析 16 个小时。在透析结束时,测量的浓度为 0.33 μ g Hg/20 μ g 蛋白。

[0076] 相反,在还原剂例如 0.1-5.0mg/ml 的 L-半胱氨酸、50mM 的 DTT 或 0.5M 的 2-巯基乙醇存在下透析,然后进行第二次透析以去除所述还原剂,导致所述抗原制剂中汞的含量减少到不到 0.025 μ g 汞/20 μ g 蛋白。这是所述方法的检测最低限度。

[0077] 通过吸收分光光度法测量所述汞含量。将所述抗原稀释于含有 0.01% w/v 重铬酸钾(K₂Cr₂O₇)和 5% v/v 硝酸的溶液中。标准溶液利用硫柳汞作为汞源制备。在蒸汽发生器

中汽化后,利用汞特异性阴极在 253.7nm 处测量样品和标准溶液的原子吸收。所述稀释液体的原子吸收作为空白测量。所述样品的汞含量通过从所述标准溶液中获得的校准曲线来计算。结果以 μg 汞 / $20\mu\text{g}$ 蛋白表示。

[0078] 1.3 无硫柳汞主体抗原的生产

[0079] 纯化主体抗原的工艺步骤显示于图 1 中。

[0080] 1.4 不用硫柳汞制备的疫苗的组成

[0081] 在表 1 中提供了不含防腐剂并由所述无硫柳汞方法制备的抗原配制得来的乙型肝炎疫苗的标准定量组成。

[0082] 表 1:

[0083] 组分	用量/ml
[0084] 活性组分-蛋白质, 其中至少95%是HBsAg	$20\mu\text{g}$
[0085] 氢氧化铝(吸附剂)(以 Al_2O_3 表示)	0.95mg
[0086] 氯化钠	9.0mg(最大值)
[0087] 二水合磷酸氢二钠	0.98mg
[0088] 二水合磷酸二氢钠	0.71mg
[0089] 注射用水q. s. ad	1.0ml

[0090] 所述组分可以通过加入 3D-MPL 和 / 或其他佐剂而有所变化。

[0091] 2. 通过无硫柳汞方法生产的主体抗原和疫苗的表征

[0092] 2.1 纯化主体抗原的试验和测定

[0093] 2.1.1 比较基础

[0094] 通过依照这个实施例(实施例 1.2)的无硫柳汞方法制备 3 批主体抗原,并标记为 HEF001、HEF002 和 HEF003。将这些主体抗原与通过先前的方法(实施例 1 中所描述的)在硫柳汞存在下制备的 1 批主体抗原(HEP2055)进行比较。

[0095] 2.1.2 主体抗原的试验和测定

[0096] 检验通过无硫柳汞方法生产的所述 3 批主体抗原,所述结果总结于表 2 中。

[0097] 通过 Lowry 等(J. Biol. Chem. 1951:193:265)的方法测量蛋白含量。

[0098] 利用来自 Cape Cod Associates, 704 Main St., Falmouth, MA 02540, USA 的市售试剂盒,通过鲎胶凝技术测量内毒素含量。将所述试剂根据 US Pharm. Endotoxin Reference Standard 标准化。

[0099] 通过 Huddleston 和 Allred(J. Amer. Oil Chemist Soc., 1965:42:983)的方法测量 Tween 20。

[0100] 利用来自 Abbott Laboratories, One Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, USA 的市售 AusZYME 试剂盒测量 HBsAg 含量。使用所述制备厂商的测定程序 B。通过含有硫柳汞的方法纯化的一批主体抗原用作建立剂量反应曲线的标准。

[0101] 通过 Dubois 等(Anal. Chem. 1956:28:350)的方法测量多糖。

[0102] 利用来自 E. Merck, B. P. 4119, Darmstadt D-6100, Germany 的市售试剂盒(Merkotest Total Lipids 3321)测量脂类。

[0103] 利用来自 Molecular Devices Corp., Gutenbergstraße 10, Ismaning, Munich, Germany 的仪器和试剂,通过 Threshold 方法测量 DNA 含量。

[0104] 在所述试验和测定中的实测值,除了通过 ELISA 检测的抗原活性外,都在利用琼

脂糖 4B 凝胶渗透步骤的含硫柳汞洗脱缓冲液生产的主体抗原批料的观测范围之内。所述三批 HEF 制剂的这种测量值 (1.63-2.25) 高于主体抗原批料 HEP2055 的测量值, 后者的 ELISA/ 蛋白比率为 1.13。通过 AUSZYME 试剂盒测量的含有硫柳汞的主体抗原批料的 ELISA/ 蛋白比率通常为约 1.0, 并在 0.8-1.2 的范围之内, 很少超过 1.4。

[0105] 2.1.3 SDS-PAGE 凝胶分析

[0106] 通过在还原条件下的 SDS-PAGE 分析和考马斯蓝染色, 分析所述主体抗原制剂。所有样品都显示出一条 24K 的主带以及痕量的二聚体蛋白。根据不存在污染蛋白的可见条带来评价, 判定所述样品是高纯度的 (纯度 > 99%)。

[0107] 通过在还原和非还原条件下的 SDS-PAGE 分析和银染, 测定所述主体抗原制剂的样品 (1 μ g) (图 2)。在还原条件下, 所述样品显示出迁移到 24K 的一条强带以及痕量的二聚体和多聚体形式。所述凝胶带型与作为对照品的 HEP2055 相比无法区分。所述样品同样在非还原条件下进行分离。在这些条件下很少物质迁移至 24K 处, 而迁移到二聚体和多聚体位置上的多肽量增加了。与对照品 HEP2055 批料相比, 所述各批无硫柳汞主体抗原显示出略高程度的聚合作用。

[0108] 通过利用针对血浆 HBsAg 产生的兔多克隆抗体的蛋白质印迹分析证实了由考马斯蓝染色或银染所揭示的 24K 多肽的身份。所述主体抗原制剂显示出一条 24K 的主带以及二聚体和多聚体形式。所述技术显示出很少量的所述表面抗原蛋白的分解产物。在通过无硫柳汞方法制备的主体抗原和所述 HEP2055 批料之间没有差异。

[0109] 通过在还原条件下的 SDS-PAGE 分析和利用针对酵母蛋白产生的兔多克隆抗血清的蛋白质印迹分析, 测定残留酵母蛋白的存在 (图 3)。所述技术是定性的, 而不能对所述杂质定量。

[0110] 在用无硫柳汞方法制备的所述 3 批主体抗原和 HEP2055 批料上显示出恒定的带型, 但有一条带例外。

[0111] 在 HEP2055 主体抗原的 $\pm$ 23K 处出现的一条强染色带实际上在所述 3 批 HEF 制剂中不存在。蛋白质印迹分析显示, 所述无硫柳汞纯化方法产生更纯的抗原制品。

[0112] 表 2: 纯化无硫柳汞主体抗原的检验和测定结果

[0113]

检验	结果			
	HEF001	HEF002	HEF003	HEP2055
pH	6.8	6.8	6.8	6.8
Lowry 法测量的蛋白含量	1312 μ g/ml	888 μ g/ml	913 μ g/ml	995 μ g/ml
内毒素含量	< 0.25EU	< 0.25EU	< 0.25EU	< 0.25EU
Tween 20 含量	7.1 μ g	6.6 μ g	7.4 μ g	5.8 μ g
ELISA 测量的抗原活性	2957 μ g/ml	1505 μ g/ml	1486 μ g/ml	1128 μ g/ml
ELISA/蛋白比率	2.25	1.69	1.63	1.13
多糖含量	0.33 μ g	0.35 μ g	0.33 μ g	0.34 μ g
脂类含量	13.7 μ g	12.8 μ g	12.9 μ g	11.8 μ g
Threshold 法测量的 DNA 含量	< 1pg	< 1pg	< 1pg	< 1pg

[0114] 2.1.4 其他生化检验和测定

[0115] 2.1.4.1 DNA 含量

[0116] 通过 Threshold 法 (Molecular Devices Corp) 测量所述 3 批主体抗原的 DNA 含量。测量的量小于 10pg DNA/20 μ g 蛋白 (表 2); 这与通过目前已被批准的方法生产的主体抗原的 DNA 含量是同一水平。

[0117] 2.1.4.2 氨基酸组成

[0118] 在用 6N HCl 酸水解后通过在离子交换柱氨基酸层析和柱后茚三酮检测, 测定所述 3 批 HEF 主体抗原的氨基酸组成。没有测定脯氨酸和色氨酸。所述结果在表 3 中给出。

[0119] 所测定的组成与在 HEP2055 中测定的组成和来自 DNA 序列的预测组成很好吻合。虽然测量 HEP2055 得到的甘氨酸残基数量接近于所述预测组成, 但更通常测量到主体抗原制剂的值为 16 至 17 个残基。实测的半胱氨酸残基的平均数是预测的 14, 这表明在 CsCl 梯度步骤中的处理没有造成额外的半胱氨酸结合到所述颗粒上。

[0120] 2.1.4.3 游离半胱氨酸的定量

[0121] 利用过甲酸氧化所述颗粒而不用先前的酸水解, 来测量依照所述方法获得的主体抗原制剂中存在的游离半胱氨酸的数量。在离子交换柱上分离氧化的游离半胱氨酸, 并且柱后用茚三酮检测。通过这个方法测定半胱氨酸的极限是 1 μ g/ml。

[0122] 当以在表 2 中给出的原始蛋白浓度进行测定时, 在所述 3 批 HEF 抗原制剂中测量不到游离半胱氨酸。

[0123] 所述技术测量存在于所述缓冲液中的游离半胱氨酸残基和通过二硫键结合到 HBsAg 蛋白上但不构成所述多肽序列一部分的半胱氨酸残基。

[0124] 2.1.4.4 N-末端序列分析

[0125] 通过所述改良方法生产的 3 批主体抗原中的可能蛋白污染物和降解产物的存在, 通过以 Edman 降解为基础的 N-末端序列分析来评价。检测到所述 HBsAg 蛋白的 N-末端序列 MENITS, 而没有其他序列的干扰。正如在通过常规方法生产的 HBsAg 多肽中所观测到的

一样,也证实了所述 N- 末端甲硫氨酸有 60-75% 通过乙酰化被封闭。

[0126] 表 3 :HBsAg 的氨基酸组成

氨基酸	HEF001	HEF002	HEF003	平均组成	HEP2055	预测组成
Asp	11.3	11.3	11.3	11.3	11.5	10
Thr	17.5	17.4	17.2	17.4	17.8	17
Ser	21.4	21.6	21.4	21.5	20.9	23
Glu	11	11	11	11.0	10.5	9
Pro	nd	nd	nd		nd	24
Gly	17.1	16.8	16.7	16.9	14.6	14
Ala	7.5	7.4	7.4	7.4	7.2	6
Cys	12.3	14.95	14.9	14.1	13.2	14
Val	10.9	11	10.9	10.9	10.7	11
Met	6.8	6.7	7.1	6.9	7.1	6
Ile	12.3	12.4	12.5	12.4	12.2	16
Leu	26.3	26.6	26.2	26.4	26.7	33
Tyr	6.8	6.8	6.8	6.8	7	6
Phe	13.8	13.9	13.8	13.8	13.9	15
His	3	2.8	3.3	3.0	3.3	1
Lys	4	4	3.9	4.0	4.2	3
Arg	5.7	5.8	5.7	5.7	6.1	5
Trp	nd	nd	nd		nd	13

[0128] 2.1.4.5 激光散射分析

[0129] 通过激光散射,比较利用所述改良方法生产的所述 HBsAg 颗粒和 HEP2055 参照批料之间的粒径大小(表 4)。

[0130] 测定的平均分子量显示所述制剂之间良好的一致性。

[0131] 表 4 :通过激光散射测定的 HBsAg 颗粒分子量

[0132] 抗原批号 MW(道尔顿)

[0133] HEF001 3.07×10^6

[0134] HEF002 2.76×10^6

[0135] HEF003 2.76×10^6

[0136] HEP2055 3.34×10^6

[0137] 2.1.4.6 电镜检查

[0138] 在固定和用醋酸双氧铀染色后,通过电子显微镜检查所述主体抗原制剂。

[0139] 在所有所述样品中观察到的颗粒是相似的,并符合 HBsAg 典型的 $\pm 20\text{nm}$ 近球形或鹅卵石样的颗粒。在所述 3 批 HEF 中观察到的颗粒与在 HEP2055 中观察到的无法区分。

[0140] 2.1.5 免疫分析

[0141] 2.1.5.1 对 RF1 单克隆抗体的反应性

[0142] 通过 ELISA 抑制测定法,测试所述 3 批主体抗原制剂对 RF1 单克隆抗体的反应性。已经表明,RF1 单克隆抗体保护黑猩猩免受 HBV 的攻击,并认为它识别 HBsAg 颗粒上的保护性构象表位 (Iwarson S 等,1985, J. Med. Virol., 16 :89-96)。

[0143] RF1 杂交瘤可以在 BalbC 小鼠的腹膜腔内或在组织培养中繁殖。

[0144] 以 1/50000 稀释于饱和缓冲液 (含有 1% BSA 和 0.1% Tween 20 的 PBS) 中的腹水与待测 HBsAg 样品于 PBS 中的各种稀释液 (终浓度的范围在 100 μ g 和 0.05 μ g/ml 之间) 以 1 : 1 混合。

[0145] 混合物在 Nunc Immunoplates (96U) 上 37°C 保温 1hr, 然后转移到标准 HBsAg 制剂包被的板上 37°C 保温 1hr。所述标准 HBsAg 制剂是一批通过含硫柳汞方法纯化的主体抗原 (Hep 286)。用含有 0.1% Tween20 的 PBS 洗涤后, 加入以 1/1000 稀释到饱和缓冲液中的生物素缀合绵羊抗小鼠 IgG, 然后在 37°C 保温 1hr。洗涤后, 在相同的孔中加入以 1/1000 稀释到饱和缓冲液中的链霉抗生物素蛋白-生物素酰化过氧化物酶复合物, 然后在 37°C 保温 30 分钟。洗板后, 与在 0.1M 柠檬酸缓冲液 pH 4.5 中含有 OPDA 0.04%、 H_2O_2 0.03% 的溶液一起在室温下保温 20 分钟。用 2N H_2SO_4 终止所述反应, 在 490/630nm 处测量光密度 (O.D.), 然后作图。

[0146] IC50 定义为抑制 50% 所述抗体结合到包被的 HBsAg 上的抗原浓度 (抑制剂浓度), 利用 4 参数方程计算 IC50 并以 ng/ml 表示。

[0147] 也测试包括 HEP2055 的一系列 HEP 抗原批料, 并以单纯疱疹 gD 抗原作为阴性对照。所述测定法测量每一种试验抗原抑制 RF1 与已结合到微量滴定板上的标准抗原制剂 (HEP286) 结合的能力。

[0148] 表 5 给出了抑制 50% 的 RF1 结合所述固定抗原的每种抗原浓度。

[0149] 表 5 : RF1 单克隆抗体结合 HBsAg 的抑制

[0150] 主体抗原	IC50 (ng/ml)*
[0151] HEP286	3834
[0152] HEP673	3437
[0153] HEP720	3150
[0154] HEP2055	2384
[0155] HEF001	468
[0156] HEF002	574
[0157] HEF003	540

[0158] *IC50 = 抑制 50% RF1 结合所述固定抗原的抗原浓度 (ng/ml)

[0159] 所述结果显示, 抑制 RF1 结合所需的 HEF 抗原减至四分之一至七分之一 (表 5)。这表明通过所述改良方法制备的所述抗原与 HEP 主体抗原相比增加了所述 RF1 表位的呈递。

[0160] 利用来自 Engerix B™ 疫苗接种者的人血清替代所述 RF1mAb 进行同类型的抑制测定, 在所述各批 HEP 抗原和所述 HEF 抗原之间没有显示出差异。

[0161] 2.1.5.2 结合单克隆 RF1 的亲合力

[0162] 利用来自 Amersham Pharmacia Biotech, Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, UK 的 Biacore 2000 仪器, 通过表面等离子体激元共振来测量 RF1 单克隆抗体结合

所述 3 批 HEF 抗原和 HEP2055 的动力学参数。

[0163] 测量的动力学参数是：

[0164] k_a : 缔合速率常数 ($M^{-1}S^{-1}$)

[0165] k_d : 解离速率常数 (S^{-1})

[0166] K_a : 平衡常数或亲合常数 (M^{-1})

[0167] 其中 $K_a = \frac{k_a}{k_d}$

[0168] 得出的值在表 6 中给出。

[0169] 表 6 : RF1 结合 HBsAg 的亲合常数

	主体抗原	k_a	k_d	K_a
		($\times 10^{-3}$)	($\times 10^5$)	($\times 10^{-7}$)
[0170]	HEF001	6.81	3.21	21.97
	HEF002	6.89	3.73	18.83
	HEF003	7.39	4.67	15.80
	HEP2055	3.31	6.30	5.31

[0171] 所述 3 批 HEF 抗原具有相似的缔合 / 解离常数和结合亲和力值。相反, HEP2055 具有更弱的结合 RF1 的亲和力。

[0172] 这与显示出通过无硫柳汞方法制备的抗原增加了所述 RF1 表位的呈现的 ELISA 抑制测定的结果相一致。

[0173] 2.2. 用通过所述改良方法生产的抗原配制的疫苗的检验和测定

[0174] 将所述 3 批 HEF 抗原吸附到氢氧化铝上, 然后按照表 1 中显示的组成配制成为疫苗。所述表述是小瓶中的成人剂量 (1ml 中含有 $20 \mu g$ 抗原蛋白)。所述批号确定为 DENS001A4、DENS002A4 和 DENS003A4。

[0175] 利用 Abbott Laboratories AUSZYME ELISA 试剂盒并以利用 $50 \mu g/ml$ 硫柳汞配制的一批传统疫苗作为标准, 通过体外抗原含量测定法测量疫苗效力。利用在 PharmaEuropa Special Issue Bio97-2 (December 1997) 中所描述的方法 B 测量抗原效力。所述 3 批 HEF 有高的抗原含量值, 接近于规定含量 $20 \mu g$ 抗原蛋白的两倍。

[0176] 2.2.1 DENS 疫苗对 RF1 单克隆抗体的反应性

[0177] 利用 RF1 单克隆抗体在抑制测定中进一步测试所述吸附疫苗的抗原性。所述测定法测量所述疫苗样品抑制 RF1 结合固定主体抗原 (HEP286) 的能力。

[0178] 以 1/50000 稀释于饱和缓冲液 (含有 1% BSA 和 0.1% Tween 20 的 PBS) 中的腹水与待测疫苗样品在 PBS 的各种稀释液 (浓度范围在 $20 \mu g$ 和 $0.05 \mu g/ml$ 之间) 以 1 : 1 混合。

[0179] 混合物在 Nunc Immunoplates (96U) 上 $37^\circ C$ 振荡保温 2hr, 然后转移到 HBsAg 包被的板上。用于包被的所述 HBsAg 制剂是通过含硫柳汞方法纯化的一批主体抗原 (Hep286)。然后这些板在 $37^\circ C$ 振荡保温 2hr。用含有 0.1% Tween 20 的 PBS 洗涤后, 加入以 1/1000 稀释到饱和缓冲液中的生物素缀合绵羊抗小鼠 IgG, 然后在 $37^\circ C$ 保温 1hr。洗涤后, 在所述各孔中加入以 1/1000 稀释到饱和缓冲液中的链霉抗生物素蛋白 - 生物素酰化过氧化物酶复合

物,然后在 37℃ 保温 30 分钟。洗板后,与在 0.1M 柠檬酸缓冲液 pH 4.5 中含有 OPDA 0.04%、 H_2O_2 0.03% 的溶液一起在室温下保温 20 分钟。用 2N H_2SO_4 终止所述反应,在 490/630nm 处测量光密度 (O.D.),然后作图。

[0180] IC50 定义为抑制 50% 所述抗体结合到包被的 HBsAg 上的抗原浓度 (抑制剂浓度),利用 4 参数方程计算 IC50 并以 ng/ml 表示。

[0181] 从通过所述改良方法生产的主体抗原制备得来的疫苗与从传统 HEP 主体抗原配制得来的不用硫柳汞作为防腐剂的 Engerix B™ 疫苗相比较。

[0182] 所述测定以 3 次重复测定进行。

[0183] 所述结果在表 7 中给出,它显示出与不含防腐剂的 Engerix B™ 疫苗相比较,需要大约一半量的 DENS 疫苗即可获得对 RF1 结合 50% 的抑制。这反映出 HEF/DENS 抗原上面所述 RF1 表位的呈递增加了,这与利用 RF1 抗体对所述纯化主体抗原进行的试验是一致的。

[0184] 表 7 配制的疫苗对 RF1 结合的抑制

疫苗批号	IC-50 (ng/ml) ⁽¹⁾			
	实验			平均值
	1	2	3	
DENS001A4	913	662	603	726
DENS002A4	888	715	521	708
DENS003A4	817	685	582	695
ENG5100A2	1606	1514	1481	1534
ENG3199B9	1329	1170	1286	1262
ENG3328A9	1417	1194	1334	1315

[0186] (1) 抑制 50% 的 RF1 抗体结合固定抗原的疫苗浓度

[0187] 2.2.2DENS 疫苗在小鼠中的免疫原性

[0188] 在 Balb/C 小鼠中进行了一项研究,以比较所述三批一致性 DENS (DENS consistency lots) 与依照目前抗原生产方法生产的并用硫柳汞配制的 Engerix B™ 之间的免疫原性。

[0189] 测试下列批料:

[0190] #DENS001A4

[0191] #DENS002A4

[0192] #DENS003A4

[0193] #ENG2953A4/Q 作为参照

[0194] 简要地讲,以对应于成人剂量的 1/10 (2 μg) 或 1/50 (0.4 μg) 的疫苗剂量,以 2 周间隔肌肉免疫 12 只一组的小鼠两次。通过从在第 28 天抽取的血清,监测由接种引起的针对 HBsAg 的抗体应答和同种型分布型。

[0195] 实验设计

[0196] 12 只一组的 Balb/C 小鼠在 0 天和第 15 天双腿肌肉免疫 (2×50 μl),疫苗剂量如

下：

[0197] 表 8 :组别和疫苗剂量

[0198]	组别	疫苗	体积	抗原剂量
	1	DENS001A4	100 μ l	2 μ g
	2	→ 5 × 稀释于 PO ₄ /NaCl 中	100 μ l	0.4 μ g
	3	DENS002A4	100 μ l	2 μ g
	4	→ 5 × 稀释于 PO ₄ /NaCl 中	100 μ l	0.4 μ g
	5	DENS003A4	100 μ l	2 μ g
	6	→ 5 × 稀释于 PO ₄ /NaCl 中	100 μ l	0.4 μ g
	7	ENG2953A4/Q	100 μ l	2 μ g
	8	→ 5 × 稀释于 PO ₄ /NaCl 中	100 μ l	0.4 μ g

[0199] 在第 15 天 (I 后 2 周) 和第 28 天 (II 后 2 周) 从眶后窦取血。

[0200] 对于这个实验的设计 (4 种制剂 × 2 倍剂量, 每组 12 只小鼠), 利用 PASS 统计程序先验性地测量所述效能。所述 PASS (效能和样本大小 (Power and Sample Size)) 统计程序由 NCSS, 329 North 1000 East, Kaysville, Utah 84037 获得。对于所述 2 因素方差分析, 制剂之间具有 5% α 误差的 GMT 的 2.5 倍差异应该以效能 > 90% 检测到。

[0201] 结果

[0202] 血清学：

[0203] 利用 HBsAg (Hep286) 作为包被抗原和用生物素缀合抗小鼠抗体来显示抗 HBs 抗体结合, 通过 ELISA 测定法测量体液应答 (总 Ig 和同种型)。只分析 II 后 2 周的血清。

[0204] 表 9 显示在 II 后 2 周测量各个血清的平均和 GMT 抗 -HBsIg 抗体应答。

[0205] 由 DENS 和传统乙型肝炎制剂诱发相当的抗体应答：在 2 μ g 剂量下, 与 SB Biologicals 乙型肝炎单价疫苗 (Engerix B™) 的 GMT 为 2882 EU/ml 相比, 所述 DENS 各批 GMT 的范围在 2304 和 3976 EU/ml 之间；在 0.4 μ g 剂量下, 与 SB Biologicals 乙型肝炎单价疫苗 (Engerix B™) 的 GMT 为 627 EU/ml 相比, 所述 DENS 各批 GMT 的范围在 696 和 1182 EU/ml 之间。

[0206] ●正如所预期的, 在 2 μ g 和 0.4 μ g 剂量的所有制剂中观察到明显的抗原剂量范围效应, 在 GMTs 上有 3 至 6 倍的差异。

[0207] ●观察到 4 只无应答小鼠 (效价 < 50 EU/ml), 与所述抗原剂量或注射所用的批号没有明显的联系 (1、2、3 和 8 组；每组一只小鼠)。根据统计分析 (Grubbs 测试), 在进一步的分析中放弃这些小鼠。

[0208] 表 9 第 28 天在小鼠中的抗体应答 (第二次接种后 II 后 2 周)

[0209]

组别	疫苗	剂量	数量	ELISA 效价(Ig)	
				平均值	GMT
1	DENS001A4	2 μ g	11	3466	2971
2		0.4 μ g	11	1283	1182
3	DENS002A4	2 μ g	11	2436	2304
4		0.4 μ g	12	984	786
5	DENS003A4	2 μ g	12	4583	3976
6		0.4 μ g	12	997	696
7	ENG2953A4/Q	2 μ g	12	3999	2882
		0.4 μ g	11	737	627

[0210] 统计分析：

[0211] 在对 II 后数据进行对数转换后，利用所述疫苗（4 批）和抗原剂量（2 μ g 和 0.4 μ g）作为因素，对所述抗 HBs 效价进行双因素方差分析。这个分析确认了在所述两个抗原剂量之间观察到了统计学上的显著性差异（p 值 < 0.001），而在所述各批疫苗之间没有显示出任何显著性差异（p 值 = 0.2674）。如前面所提到的，是先验估计所述效能，所述实验设计使得在效能 > 90% 下，可以检测到制剂之间具有 GMT 2.5 倍差异和 5% α 误差。

[0212] 同种型分布

[0213] 表 10 显示了从对 II 后混合血清的分析中计算得来的同种型重新分配（IgG1、IgG2a 和 IgG2b）。

[0214] ●正如所预期的，由这些基于明矾的疫苗诱发了明显的 TH2 反应，因为观察到主要是 IgG1 抗体。

[0215] 没有观察到各批 DENS 或 SB Biologicals 乙型肝炎单价疫苗之间在同种型分布上的任何差异。

[0216] 表 10 在 28 天混合血清中 IgG 同种型的重新分配

	组别	疫苗	剂量	同种型(%)		
				IgG1	IgG2a	IgG2b
[0217]	1	DENS001A4	2 μ g	91	4	5
	2		0.4 μ g	87	8	5
	3	DENS002A4	2 μ g	97	2	1
	4		0.4 μ g	87	6	7
	5	DENS003A4	2 μ g	98	1	1
	6		0.4 μ g	93	4	3
	7	ENG2953A4/Q	2 μ g	88	8	4
			0.4 μ g	88	9	3

[0218] 实施例 3 联合疫苗的配制

[0219] 本发明所述主体抗原尤其适合于配制成为含有 IPV 的联合疫苗。

[0220] 当利用体外免疫测定（通过 ELISA 测量 D- 抗原含量）和体内大鼠效力试验，对联合 DTPa-HBV-IPV 疫苗的初始批次进行的稳定性研究，显示出所述 IPV 组分、详细地讲是 1 型脊髓灰质炎抗原效力下降。对于 3 型没有观察到效力损失。对于 2 型，效力损失在预期的范围之内（保存每一年的损失不超过 10%）。

[0221] 已经开始了研究以确定在所述 DTPa-HBV-IPV 联合疫苗中的这种效力损失的原因。通过观察，SB Biologicals DTPa-IPV 疫苗中 IPV 的稳定性是令人满意地（保存每一年抗原含量损失不超过 10%），结论是所述 HBV 组分可能导致所述 DTPa-HBV-IPV 疫苗中 IPV 的不稳定性。

[0222] 用于所述初始 DTPa-HBV-IPV 制剂中的所述 HBV 组分是同样用于制备 SB Biologicals 乙型肝炎单价疫苗并如实施例 1 中所述制备的所述纯化 r-DNA，酵母来源 HBsAg。

[0223] 分析所述主体 HBsAg 中硫柳汞的存在，作为确定所述 HBV 组分中哪一种成分对 IPV 有害的第一个尝试。先前已经发现 (Davisson 等, 1956, J. Lab. Clin. Med 47 :8-19)，在 DTP 疫苗中用作防腐剂的硫柳汞在 DTP-IPV 联合疫苗中“对脊髓灰质炎病毒是有害的”。疫苗制备商考虑了这一观测结果，他们已经用其他防腐剂替代硫柳汞来配制他们的含 IPV 疫苗。最近，重新调查硫柳汞在 4℃ 长期保存条件下对 IPV 效力的所述作用。报告了 4-6 个月后的 1 型脊髓灰质炎病毒抗原的效力损失到无法检测的水平 (Sawyer, L. A. 等, 1994, Vaccine 12 :851-856)。

[0224] 利用原子吸收光谱学，在依照实施例 1 的纯化抗原中检测到约 0.5 μ g 汞 (Hg)/20 μ g HBsAg。

[0225] 这个数量的汞（作为硫柳汞、乙基氯化汞和所述硫柳汞降解产物）可以减小到针对于 37℃ 保温 7 天的 IPV 主体浓缩物中 1 型 D- 抗原含量的 ELISA 反应无法检测的水平。

[0226] 建立了一种方法来释放所述主体 HBsAg 中存在的汞。假定汞可以结合到所述 HBsAg 颗粒的巯基上，因而在还原剂存在下可以被释放。用其他还原剂进行实验后，选

择 L-半胱氨酸作为从所述 HBsAg 颗粒中释放汞的试剂。主体 HBsAg 在含有 5.7mM L-半胱氨酸的盐溶液中透析后,在所述保留液中检测不到汞(所述测试方法的检测极限:25ngHg/20 μg HBsAg)。所述透析后抗原与 IPV 批料浓缩物混合,然后通过 37℃ 保温 7 天测量所述 D-抗原含量来评估所述 1 型病毒的稳定性。未混合的 IPV 主体浓缩物与未用半胱氨酸处理的 HBsAg 混合的 IPV 主体浓缩物用作对照。用在 2℃ 至 8℃ 保存 7 天的所述样品获得所述参考 ELISA 效价。

[0227] 所述结果总结于表 11:

[0228] 表 11

样品	D-抗原含量(1 型) ⁽¹⁾		损失
	7 天/4℃	7 天/37℃	
IPV (未混合)	31.6	24.2	23%
IPV+未处理 HBsAg	31.1	18.1	42%
IPV+半胱氨酸处理 HBsAg	31.4	27.6	12%
IPV+硫柳汞(1μg/ml)	30.5	11.0	74%

[0230] (1) 以 D-抗原单位 (DU) 表示

[0231] 从这些实验室制剂中获得的所述数据清楚地证明,如果 HBsAg 在与 IPV 混合之前用半胱氨酸处理以去除残留的汞,可以显著增强 1 型脊髓灰质炎病毒的稳定性。

[0232] 上面所示的数据同样表明,所述参比 IPV 制剂在 37℃ 保温 7 天后 D-抗原含量损失 23%。如先前所报道的,这证实了所述 1 型 Mahoney 脊髓灰质炎病毒的固有不稳定性 (Sawyer, L. A. 等 (1994), Vaccine 12:851-856)。

[0233] 虽然市售批次的 DTPa-HBV-IPV 和 DTPa-HBV-IPV/Hib 疫苗已经利用使用 5.7mM L-半胱氨酸去除残留汞从而保护 IPV 稳定性的透析方法来制备,但所述透析方法不适合于大规模生产,并且它涉及一系列的辅助性步骤来制备不含硫柳汞或汞的 HBsAg。相反,本发明所述不用硫柳汞制备的 HBsAg 可以直接用于联合疫苗的配制,特别是那些含有 IPV 的联合疫苗的配制。

[0234] 4. 总结

[0235] 前面所用的纯化酵母来源表面抗原的方法包括一个凝胶渗透步骤,其中含汞的抗微生物化合物硫柳汞包含在所述洗脱缓冲液中以控制生物负荷量。

[0236] 在所述方法的后续步骤中所述硫柳汞未被完全清除,从而在所述纯化主体抗原中存在约 1.2 μg 硫柳汞 / 20 μg 蛋白。

[0237] 为了生产完全不含硫柳汞(汞)的主体抗原,所述纯化方法在两个步骤上进行了改变。

[0238] ●在所述 4B 凝胶渗透步骤中从所述洗脱缓冲液中去除硫柳汞。

[0239] ●向得自所述阴离子交换层析步骤的所述洗出混合液中加入半胱氨酸(终浓度 2mM)。这防止了在 CsCl 密度梯度离心过程中抗原的沉淀。

[0240] 所述生产方法没有其他的变化。

[0241] 已经对通过所述改良方法生产的主体抗原进行了表征。物理化学试验和测定显示,所述不含硫柳汞抗原在它们的特性上与通过所述先前使用的方法生产的抗原无法区分。所述抗原颗粒具有同样的成分。

[0242] 通过 SDS-PAGE 分析、利用多克隆抗 HBsAg 抗体的蛋白质印迹分析、N-末端序列分析和氨基酸组成判断,所述 HBsAg 多肽的身份和完整性未受所述改良方法的影响。电子显微镜和激光散射分析显示,所述颗粒具有预期的酵母来源 HBsAg 的典型形状和大小。利用抗酵母蛋白血清的蛋白质印迹分析的分析显示,通过所述不含硫柳汞方法生产的所述抗原具有污染酵母蛋白的相似模式。然而,迁移至 23K 处的污染条带的数量在利用所述改良方法生产的所述 3 批 HBsAg 中大大减少了。

[0243] 免疫分析显示,所述不含硫柳汞颗粒具有增强的抗原性。所述颗粒对 Abbott AUSZYME 试剂盒(包含单克隆抗体的混合物)具有更强的反应性,ELISA/蛋白比率为 1.6 至 2.25。利用所述保护性 RF1 单克隆抗体也显示出这种增强的抗原性。抑制 RF1 结合到标准固定抗原所需的不含硫柳汞抗原减至四分之一至七分之一。所述不含硫柳汞抗原和传统抗原的结合抑制曲线属于两个截然不同的曲线类中。利用表面钙等离子体激元共振对 RF1 的结合亲和常数进行的测量,也显示出这种差异。所述不含硫柳汞制剂的结合亲和力是所述比次的标准主体抗原的 3-4 倍。

[0244] 所述主体抗原制剂通过吸附在氢氧化铝上且不用防腐剂配制成疫苗。

[0245] 利用 Abbott AUSZYME ELISA 试剂盒和含硫柳汞 SB Biologicals 乙型肝炎单价疫苗作为标准品进行的体外效力测试显示,获得了高的体外效力值。通过这个试验测量的所述抗原含量接近于所述规定值 20 μ g 蛋白/ml 的两倍。

[0246] 在利用 RF1 单克隆抗体结合固定抗原的抑制测定中,同样见到从不含硫柳汞抗原制备的疫苗的增强反应性。与通过所述先前所用方法纯化并不用防腐剂配制的抗原相比,50%抑制 RF1 结合固定抗原需要约一半量的不含硫柳汞疫苗。

[0247] 所述不含硫柳汞疫苗对于 RF1 的这种增强抗原性与从所述体和在所述主体抗原制剂上进行的外效力试验(抗原含量)和 RF1 抗体试验获得的结果相一致。

[0248] 利用间隔 2 周的激活接种(priming vaccination)和加强接种以及 2 μ g 和 0.4 μ g 抗原的剂量进行小鼠免疫原性试验。在第 28 天、加强接种后 14 天从小鼠取血。分析所述血清的抗体效价和同种型组成。对于所述两个给药剂量观察到明显的抗原剂量效应,但不含硫柳汞疫苗和不含防腐剂疫苗之间在抗体效价(GMT)方面的应答中没有统计学上的显著差异。

[0249] 在所述同种型分布上没有观察到实质性差异。

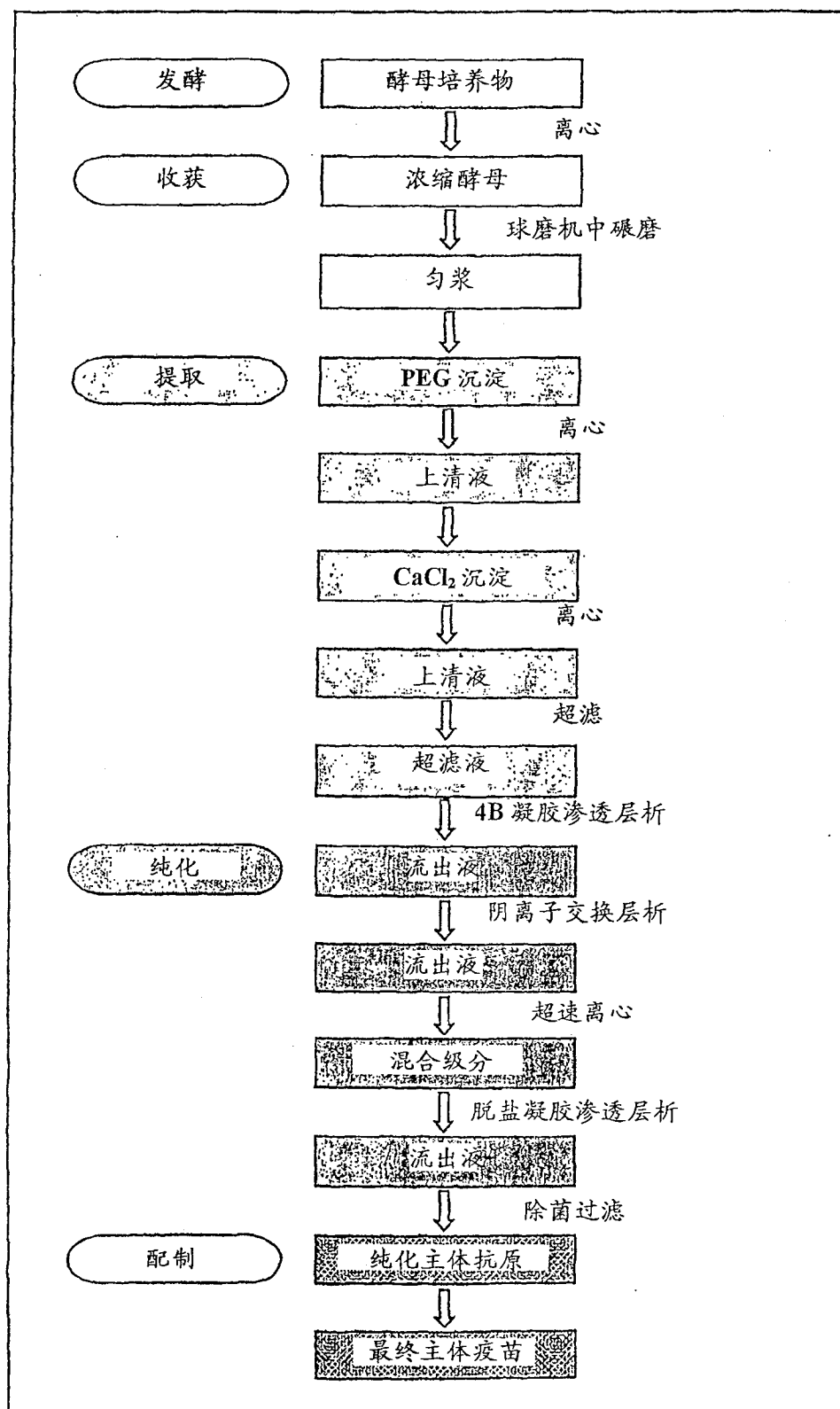


图1:Engereix BTM 不含硫柳汞生产方法的流程图

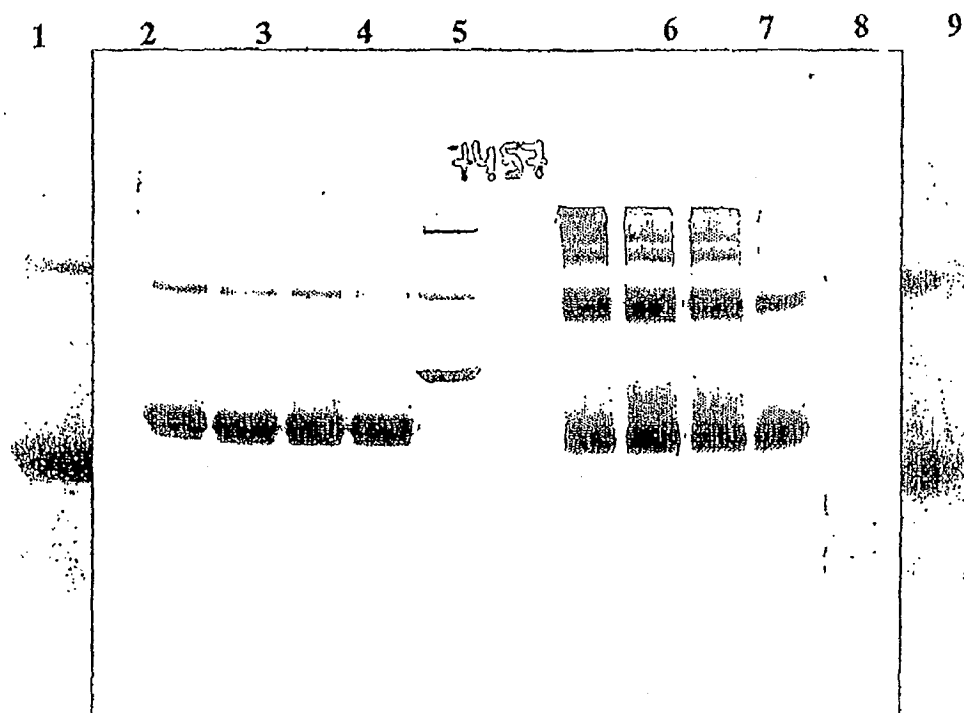


图 2 :主体抗原批料的 SDS-PAGE 分析 :银染 :1 μ g 蛋白 / 样品

泳道 1 :HEF001, 还原条件

泳道 2 :HEF002, 还原条件

泳道 3 :HEF003, 还原条件

泳道 4 :HEP2055, 还原条件

泳道 5 :分子量标记

泳道 6 :HEF001, 非还原

泳道 7 :HEF002, 非还原

泳道 8 :HEF003, 非还原

泳道 9 :HEP2055, 非还原

黑色斑点指示所述分子量标记的位置 :92500、66200、45000、31000、21500、14400。

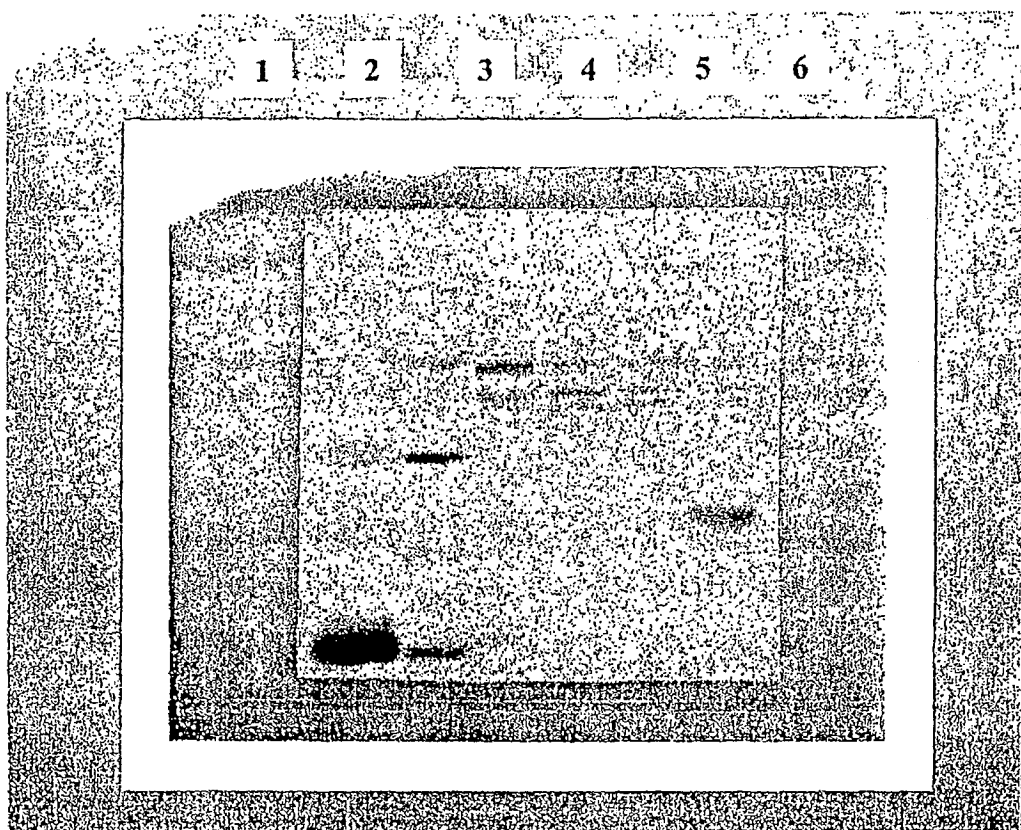


图3:通过不含硫柳汞方法生产的主体抗原批料中的残留酵母蛋白:利用兔抗-酵母蛋白血清的蛋白质印迹分析

泳道1:分子量标记(预染)

泳道2:低分子量标记(生物素酰化)

泳道3:HEF001,20mcg 蛋白

泳道4:HEF002,20mcg 蛋白

泳道5:HEF003,20mcg 蛋白

泳道6:HEP2055,20mcg 蛋白

黑色斑点指示所述低分子量标记的位置:92500、66200、45000、31000、21500、14400。