



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118987191 A

(43) 申请公布日 2024.11.22

(21) 申请号 202410981157.0 *A61P 1/16* (2006.01)
(22) 申请日 2019.11.13 *A61P 31/20* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 39/39* (2006.01)
62/760,439 2018.11.13 US *A61P 37/04* (2006.01)
(62) 分案原申请数据
201980074891.6 2019.11.13
(71) 申请人 变异生物技术公司
地址 加拿大
(72) 发明人 大卫·伊万德·安德森
坦维尔·艾哈迈德
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 陈九洲
(51) Int. Cl.
A61K 39/29 (2006.01)

权利要求书1页 说明书21页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称
用于治疗乙型肝炎的免疫原性组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗乙型肝炎的免疫原性组合物。本公开内容提供了可用于在患有乙型肝炎的对象中诱导The细胞应答的组合物和方法。如本文所述,本公开内容的组合物包含具有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg和磷酸铝佐剂。在一个优选实施方案中,所述免疫原性组合物包含至少20 $\mu\text{g/ml}$ 的HBsAg抗原,并且未吸附抗原的量为至少30%。

1. 免疫原性组合物,其包含:
 - (a) 包含S蛋白、前S1蛋白和前S2蛋白的HBsAg抗原;和
 - (b) 磷酸铝佐剂,其中所述组合物包含至少20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的HBsAg抗原,并且未吸附抗原的量为至少30%。
2. 权利要求1所述的免疫原性组合物,其中铝以500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度存在。
3. 权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述HBsAg抗原以20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度存在。
4. 权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述HBsAg抗原以40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度存在。
5. 权利要求1或2所述的免疫原性组合物,其中所述HBsAg抗原以60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度存在。
6. 权利要求1至5中任一项所述的免疫原性组合物,其用于在哺乳动物中诱导Th1细胞应答。
7. 权利要求1至5中任一项所述的免疫原性组合物用于制备用于在对象中诱导Th1细胞应答的药物的用途。
8. 权利要求7所述的用途,其中所述对象已感染乙型肝炎。
9. 药物组合物,其包含权利要求1至5中任一项所述的免疫原性组合物和可药用赋形剂。
10. 权利要求9所述的药物组合物,其用于治疗患有乙型肝炎的对象。
11. 在哺乳动物中诱导Th1细胞应答的方法,所述方法包括施用权利要求1至5中任一项所述的免疫原性组合物。
12. 在对象中治疗乙型肝炎的方法,所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的权利要求1至5中任一项所述的免疫原性组合物。
13. 权利要求12所述的方法,其中在向所述对象施用所述免疫原性组合物之前、同时或之后,向所述对象施用另外的乙型肝炎治疗。
14. 权利要求13所述的方法,其中所述另外的乙型肝炎治疗是核苷抑制剂或聚乙二醇化干扰素 α 。
15. 权利要求13所述的方法,其中所述另外的乙型肝炎治疗是聚合酶抑制剂、RNase H抑制剂、TLR激动剂、N-糖基化抑制剂、反义寡核苷酸、抗乙型肝炎抗体、衣壳抑制剂、核心蛋白抑制剂、核心组装调节剂、S抗原还原剂或螯合剂、核酸聚合物、ccc DNA抑制剂、干扰素、免疫调节剂或siRNA。

用于治疗乙型肝炎的免疫原性组合物

[0001] 本申请是申请日为2019年11月13日、申请号为201980074891.6、发明名称为“用于治疗乙型肝炎的免疫原性组合物”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2018年11月13日提交的美国临时申请号62/760,439的权益,其内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0004] 本发明属于免疫原性组合物,特别是可用于治疗乙型肝炎感染的免疫原性组合物的领域。

背景技术

[0005] 乙型肝炎是为急性和慢性肝病的病因的病毒感染。它通过接触来自受感染个体的血液或其他体液在人中传播。乙型肝炎感染是普遍而重大的健康问题,其引起每年全世界超过2.5亿人患慢性肝病和近100万人死亡(2017年全球肝炎报告,世界卫生组织)。在感染之后,乙型肝炎引起在大多数人中没有症状的急性期疾病。那些表现出症状的人会经历黄疸、疲劳和腹痛,其中一小部分患者会经历可致命的急性肝衰竭。感染乙型肝炎后,患者的免疫系统可清除病毒而导致治愈,或者患者可发生慢性乙型肝炎感染。慢性乙型肝炎的后果是重大的,因为30%的慢性感染成年人最终发生肝硬化和/或肝癌。发生慢性病的可能性随着年龄而降低,其中婴儿患慢性感染的几率为90%,而健康成年人的几率为仅5%-10%。

[0006] 尽管已经致力于用于乙型肝炎感染的疫苗,但仍需要用于慢性乙型肝炎患者的改进的治疗,尤其是能够引发对象中增强的细胞免疫应答的治疗。

发明内容

[0007] 提供了多个实施方案,其涉及包含含有S、前S1和前S2结构域的HBsAg抗原和磷酸铝佐剂的免疫原性组合物、本公开内容的免疫原性组合物的用途、通过施用本公开内容的免疫原性组合物诱导Th1细胞应答的方法和通过施用本公开内容的免疫原性组合物来治疗乙型肝炎感染的方法。

[0008] 在一些实施方案中,本公开内容提供了包含含有S、前S1和前S2结构域(例如,本文所述的S、前S1和前S2蛋白)的HBsAg包膜抗原和磷酸铝佐剂的免疫原性组合物。在一个优选实施方案中,本公开内容提供了免疫原性组合物,其包含至少约20 μ g/ml(例如,至少约30 μ g/ml、至少约40 μ g/ml、至少约50 μ g/ml或至少约60 μ g/ml)的含有S、前S1和前S2结构域的HBsAg包膜抗原,和磷酸铝佐剂,其中未结合抗原的量为至少30%(例如,至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、或更多)。在一个特别优选的实施方案中,本公开内容提供了疫苗制剂,其包含约20 μ g/ml至60 μ g/ml(例如,约20 μ g/ml、约30 μ g/ml、约40 μ g/ml、约50 μ g/ml或约60 μ g/ml)的含有S、前S1和前S2结构域的HBsAg抗原,和磷酸铝佐剂,其中未结合抗原的量为至少约30%(例如,至少约35%、至少约

40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、或更多)。

[0009] 在一些实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物包含62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂存在的铝。在一个优选实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物包含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂的铝。在一个特别优选的实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物包含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂的铝和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的具有S、前S1和前S2蛋白中所有三种的HBsAg抗原。

[0010] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了用于在对象中引发Th1应答的免疫原性组合物,所述组合物包含含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg包膜抗原和磷酸铝佐剂。在一个优选实施方案中,本公开内容提供了用于在哺乳动物中引发Th1应答的免疫原性组合物,所述组合物包含至少20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg包膜抗原,和磷酸铝佐剂,其中未结合抗原的量为至少30%。在一个特别优选的实施方案中,本公开内容提供了用于在哺乳动物中引发Th1应答的免疫原性组合物,所述组合物包含20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg抗原,和磷酸铝佐剂,其中未结合抗原的量为至少30%。在一些实施方案中,用于在哺乳动物中引发Th1应答的免疫原性组合物包含62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂存在的铝。在一个优选实施方案中,用于在哺乳动物中引发Th1应答的免疫原性组合物包含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂的铝和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg抗原。在一个特别优选的实施方案中,用于在哺乳动物中引发Th1应答的免疫原性组合物包含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂的铝和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg抗原。

[0011] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了用于在有此需要的人对象中治疗乙型肝炎的免疫原性组合物,所述组合物包含含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg包膜抗原和磷酸铝佐剂。在一个优选实施方案中,本公开内容提供了用于在有此需要的人对象中治疗乙型肝炎的免疫原性组合物,所述组合物包含至少20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg包膜抗原、和磷酸铝佐剂,其中未结合抗原的量为至少30%。在一个特别优选的实施方案中,本公开内容提供了用于在有此需要的人对象中治疗乙型肝炎的免疫原性组合物,所述组合物包含20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg抗原、和磷酸铝佐剂,其中未结合抗原的量为至少30%。在一些实施方案中,用于在有此需要的人对象中治疗乙型肝炎的免疫原性组合物包含62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂存在的铝。在一个优选实施方案中,用于在有此需要的人对象中治疗乙型肝炎的免疫原性组合物包含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂的铝和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg抗原。在一个特别优选的实施方案中,用于在有此需要的人对象中治疗乙型肝炎的免疫原性组合物包含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂的铝和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg抗原。

[0012] 本公开内容还包括本公开内容的至少一种免疫原性组合物在制备预期用于治疗乙型肝炎感染的药物组合物中的用途。

[0013] 本公开内容还提供了包含本公开内容的免疫组合物的药物组合物,其用于施用于有此需要的对象。

[0014] 本公开内容还提供了用于在哺乳动物中诱导Th1应答的方法,其包括施用治疗有效量的本公开内容的组合物。

[0015] 本公开内容还提供了用于治疗乙型肝炎感染,特别是慢性乙型肝炎感染的方法,

其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本公开内容的组合物。

[0016] 在本文描述的任何方面或实施方案中,组合物可包含S蛋白(例如,包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列或由其组成的S蛋白)、前S2蛋白(例如,包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列或由其组成的前S2蛋白)、和前S1蛋白(例如,包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列或由其组成的前S1蛋白)。本文所述的一些实施方案可包括按重量计约75%至90%的S蛋白、按重量计约2%至8%的前S1蛋白和按重量计约5%至15%的前S2蛋白(例如,83+/-3.3%的S蛋白、6+/-3%的前S1蛋白和11+/-3%的前S2蛋白)。

[0017] 从以下具体实施方式中,本公开内容的其他特征、目的和优点是明显的。然而,应理解,具体实施方式尽管示出了本公开内容的一些实施方案,但是仅以举例说明而非限制的方式给出。对于本领域技术人员而言,根据具体实施方式,在本公开内容范围内的多种变化和修改将变得明显。

[0018] 序列表

[0019] 以下是本文引用的序列的列表:

[0020] SEQ ID NO:1是HBsAG氨基酸序列的小蛋白:

	1	11	21	31
	MENITSGFLG	PLLVLQAGFF	LLTRILTIPQ	SLDSWWTSLN
	41	51	61	71
	FLGGSPVCLG	QNSQSPTSNH	SPTSCPPICP	GYRWMCLRRF
	81	91	101	111
[0021]	IIFLFILLLC	LIFLLVLLDY	QGMLPVCPLI	PGSTTTSTGP
	121	131	141	151
	CKTCTTPAQG	NSMFPPSCCT	KPTDGNCTCI	PIPSSWAFAK
	161	171	181	191
	YLWEWGSVRF	SWLSLLVPFV	QWFVGLSPTV	WLSVIWMMWY
	201	211	221	
	WGPNLYNILS	PFIPLLPIFF	CLWVYI	

[0022] SEQ ID NO:2是HBsAG氨基酸序列的中等蛋白:

	1	11	21	31
	MQWNSTAFHQ	ALQHPRVRGL	YFPAGGSSSSG	TVNPAQNIAS
	41	51	61	71
	HISSISSRTG	DPAPNMENT	SGFLGPLLVL	QAGFFLLTRI
	81	91	101	111
	LTIPQSLDSW	WTSLNFLGGS	PVCLGQNSQS	PTSNHSPTSC
	121	131	141	151
[0023]	PPICPGYRWM	CLRRFIIFLF	ILLLCLIFLL	VLLDYQGMLP
	161	171	181	191
	VCPLIPGSTT	TSTGPCKTCT	TPAQNSMFPP	SCCCTKPTDG
	201	211	221	231
	NCTCIPIPSS	WAFAYLWEW	GSVRFSWLSL	LVPFVQWFVG
	241	251	261	271
	LSPTVWLSVI	WMMWYWGPNL	YNILSPFIPL	LPIFFCLWVY
	281			
	I			

[0024] SEQ ID NO:3是HBsAg氨基酸序列的大蛋白:

MGLSWTVPLE WGKNQSTSNP LGFFPDHQLD PAFGANSNNP DWDLNSNKDH
WPQANQVGVG AFGPGFTPPH GLLGWSSQA QGTLHTVPAV PPPASTNRQT
KRQPTISPP LRDSHPQAMQ WNSTAFHQAL QHPRVRGLYF PAGGSSSGTV
NPAQNIASHI SSISSRTGDP APNMENTSG FLGPLLVLQA GFFLLTRILT

[0025]

IPQSLDSWWT SLNFLGGSPV CLGQNSQSPT SNHSPTSCPP ICPGYRWMCL
RRFIIFLIL LLCLIFLLVL LDYQGMLPVC PLIPGSTTTS TGPKCTCTTP
AQGNSMFPSC CCTKPTDGNC TCIPSSWA FAYLWEWGS VRFSWLSLLV
PFVQWFVGLS PTVWLSVIWM MWYWGPNLYN ILSPFIPLLP IFFCLWVYI

具体实施方式

[0026] 本申请的发明人已经制备了改进的治疗性乙型肝炎疫苗,其有效地诱导Th1细胞免疫应答。

[0027] 乙型肝炎病毒是肝脱氧核糖核酸病毒科(Hepadnaviridae)的正肝脱氧核糖核酸病毒属(Orthohepadnavirus)的成员。它是小型的包膜DNA病毒,其包含核衣壳和乙型肝炎表面抗原(Hepatitis B surface antigen,HBsAg)的外包膜。HBsAg抗原由全部均由病毒DNA上的同一开放阅读框(“S ORF”)编码的三种相关包膜蛋白构成。这三种蛋白质具有相同的C末端,但由于存在将S ORF分为三个区域的三个框内ATG起始密码子而在它们的N末端不同。S或“小”包膜蛋白是最丰富的且最小的,有226个氨基酸。M或“中间”表面蛋白包含S蛋白

并且具有由55个氨基酸组成的被称为前S2的额外蛋白质结构域。被称为L或“大”蛋白的蛋白质由S、前S2和具有118个氨基酸的被称为前S1的第三个蛋白质结构域组成。乙型肝炎病毒基因组易于复制错误,结果是存在许多基因型和遗传变体。已经鉴定出至少十种不同的病毒基因型,以及许多突变,其中一些发生在S和前S结构域。因此,这三个蛋白质结构域中的每一个都存在许多序列变异。

[0028] 在一些实施方案中,本文所述的S蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,本文所述的S蛋白包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,本文所述的前S2蛋白包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,本文所述的前S2蛋白包含与SEQ ID NO:2的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,本文所述的前S1蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,本文所述的前S1蛋白包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0029] 尚未发现用于乙型肝炎感染的有效治疗。急性感染进行卧床治疗。慢性感染通常用抗病毒剂,特别是基于核苷的抗病毒剂,例如泰诺福韦(tenofovir)、拉米夫定(lamivudine)或恩替卡韦(entecavir)或者用聚乙二醇化干扰素 α (PEG-IFN α)进行治疗。抗病毒剂可以减慢肝硬化的进程并降低肝癌的发病率,但已证明它们无法实现从患者清除病毒。此外,它们是昂贵的,并且它们必须持续用于患者的生命期中以维持有效性。PEG-IFN α 与副作用相关,并且仅在约30%的患者中引起持续的抗病毒应答。因此,用于慢性乙型肝炎的药物治疗通常仅有效减慢疾病的进程,而并没有成功治愈。为了清除乙型肝炎病毒并且从而避免慢性病症,患者必须产生强效且多样的免疫应答。特别地,强且特异性的T细胞应答对于实现乙型肝炎的病毒清除是必不可少的(Bertoletti和Rivino(2014) *Curr Opin Infect. Dis* 27:528-534)。这种类型的应答几乎仅在具有成熟免疫系统的成年患者中观察到(Bertoletti和Gehring, (2013) *PLOS Path.* 9:1-4)。

[0030] 鉴于乙型肝炎感染对健康有重大影响,很多注意力都集中在该疾病的预防上。针对乙型肝炎的预防性疫苗已使用了超过30年,并且在许多国家,对儿童进行了针对乙型肝炎的普遍疫苗接种。第一批针对乙型肝炎的预防性疫苗是在20世纪70年代末使用来自乙型肝炎患者的血浆开发的。改良的乙型肝炎疫苗在20世纪80年代使用,并且是在酵母细胞中使用重组DNA技术表达HBsAg的S结构域而生产的。这些更新型的疫苗迅速取代了第一批疫苗,并且仍然是当今市场上的主要商业疫苗。20世纪90年代开发了更先进的乙型肝炎疫苗,其在哺乳动物细胞中生产,并且包含HBsAg的所有三个结构域,具体地是S、前S1和前S2。前S1和前S2结构域的存在与增强的免疫原性应答有关,并且还抑制病毒结合和感染性有关(US 5,242,812)。多种包膜蛋白的生物学功能以及针对每种组分(S、前S2和前S1)的免疫应答的性质仅有部分了解。然而,已知在急性乙型肝炎感染中,前S1和前S2抗原和抗体在急性感染后早期出现并消失,而针对S结构域的抗体则在数周后出现。这以及使用前S1或前S2结构域抗原的研究表明前S1和前S2抗原可与诱导T细胞帮助产生针对S结构域的抗体有关(Milich et al(1985) *PNAS* 82 8170-8172; Milich et al(1986) *J Immunol* 137 315-

322)。

[0031] 市售的预防性乙型肝炎疫苗已被证明在健康对象中成功诱导针对HBsAg的S蛋白结构域的强抗体应答,特别是那些年轻且其免疫系统无损伤的对象。然而,尝试使用这些疫苗作为慢性乙型肝炎患者的治疗性治疗被证明是不成功的。为测量单独包含HBsAg S结构域以及同时包含前S2和S结构域的乙型肝炎疫苗的治疗作用而进行的临床试验表明,这些疫苗无法实现对乙型肝炎病毒的清除(Pol et al, (2001) *J. Hepatol* 34:917-921)。免疫原性治疗慢性乙型肝炎感染的失败通常归因于“免疫耐受”,即乙型肝炎患者的免疫系统变得对进一步暴露于乙型肝炎抗原、特别是HBsAg无应答的现象。慢性乙型肝炎患者的免疫耐受与该病毒大量产生乙型肝炎抗原有关,这会导致T细胞、特别是乙型肝炎特异性CD8+T细胞的耗竭(Boni, C. et al, (2007) *J. Virol.* 81:4215-4225)。耗竭的乙型肝炎特异性T细胞过表达程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1),其促进抗原特异性T细胞的死亡。在具有高乙型肝炎病毒载量的患者中,抗原特异性T细胞的破坏可导致这些细胞从肝中完全消失。结果是T细胞对乙型肝炎抗原刺激的应答减弱。

[0032] 除了免疫耐受带来的挑战之外,仅含HBsAg S蛋白的乙型肝炎疫苗由于其在大多数对象中通过T细胞应答刺激细胞免疫的能力弱而可能无法实现从慢性患者中清除病毒。为了更有效地刺激T细胞应答,已经在慢性乙型肝炎患者中实施了治疗性疫苗接种研究,其使用包含前S1、前S2和S蛋白结构域中所有三个的乙型肝炎疫苗来进行。这些研究表明,某些患者中具有乙型肝炎特异性T细胞应答。但是,这种效果是短暂的,并没有导致疾病的清除,可能是因为疫苗刺激了Th2应答,但没有刺激CD8+T淋巴细胞应答。(Jung et al, (2002) *Vaccine* 20:3598-3612, Kosinka et al (2015) *Med. Microbiol. Immunol* 204)。以IL-4、IL-5和IL-13细胞因子分泌为特征的Th2细胞促进抗体产生并且通常与变态性应答相关,而针对病毒感染的效果低于以IFN- γ 分泌为特征的Th1细胞。进一步尝试使用DNA疫苗诱导成功的免疫应答也未能实现持续应答(Bertoletti和Gehring (2009) *Exp. Rev. Gastro. Hep.* 3:561-569)。

[0033] 许多研究人员得出结论,彻底治愈乙型肝炎还需要很多年,而且通过使用组合治疗,有可能实现所谓的“功能性治愈”,从而使慢性患者获得乙型肝炎病毒和其他疾病标志物的持续降低以及停止治疗后肝癌发生率降低(Lok et al, (2017) *J. Hep.* 67:847-861)。由于抗病毒治疗和预防性疫苗单独地无法实现功能性治愈,因此一些研究人员得出结论,可能有必要将预防性疫苗与降低病毒载量的乙型肝炎治疗相组合。病毒载量的降低可降低免疫耐受水平,并且从而提高疫苗治疗诱导能够控制感染的免疫应答的能力(Zoulim, F. et al (2018) *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2015) :5:a21501)。例如,已经尝试了预防性疫苗与核苷抑制剂的组合。然而,迄今为止,使用市售的乙型肝炎疫苗的组合治疗尚未成功地实现从慢性乙型肝炎患者中清除病毒(Vandepapeliere et al (2007) *Vaccine* 51:8585-8597)。在一项越南研究中,尝试通过将更新型疫苗Genhevac B(具有氢氧化铝佐剂的前S1、前S2和S蛋白疫苗)与核苷抑制剂(拉米夫定)组合来改善响应性。这种组合在降低患者中病毒DNA水平方面优于单独的各治疗。然而,在中断疫苗治疗后效果并没有持续。因此,这种组合治疗未能募集患者的免疫系统来有效清除病毒(Hoa, (2009) *Antimicrob. Agents and Chemo.* 53:5134-5140)。

[0034] 已经提出了更复杂的三联治疗,其包括阻断PD-1活性的抗体以及核苷抑制剂和预

防性乙型肝炎疫苗。在土拨鼠模型中使用类似于乙型肝炎的病毒对这种三联进行的研究仅在三分之一的动物中有效(Kosinka et al, (2015)同上:103-114;Liu et al, *Virologica*, (2014) 29:10-16)。此外,这种三联的效力尚未在人中得到证实,并且其需要可能无限期地使用昂贵的治疗。因此,即使与其他药物组合,针对治疗目的使用常规预防疫苗尚未被证明能成功地作为用于慢性患者中乙型肝炎的功能性治愈。因此,为了在慢性乙型肝炎患者中获得持续的应答,必须找到改善的方法来增强这些患者引发针对病毒的T细胞应答的能力。

[0035] 出现了利用基因沉默方法来治疗慢性乙型肝炎的更新型策略。这些治疗的一些实例包括使用小干扰RNA (SiRNA) 来干扰病毒基因表达,特别是HBsAg。像核苷抑制剂一样,这些治疗具有降低病毒载量和分泌的HBsAg的水平潜力(Woodell et al, (2015) *Mol. Ther.* 21:973-985),并且已提出其在与诱导免疫应答的治疗组合时可能有用(Ren et al. (2013) *PLoS One* 8(3):e57525)。然而,该组合的有效性尚未确定,并且鉴于早期抗病毒剂研究的失败,有效性可取决于包括能够刺激稳健Th1细胞应答的免疫学药剂的组合。

[0036] 以前曾尝试通过改变疫苗制剂来增强T细胞对乙型肝炎疫苗的应答。大多数市售的乙型肝炎疫苗,包括广泛使用的乙型肝炎疫苗Engerix B[®],以及包含S/前S1和前S2的乙型肝炎疫苗Sci-B-Vac[®],都用氢氧化铝佐剂配制而成。氢氧化铝佐剂是含铝佐剂家族的一种,其有时被非正式地称为“明矾”(但是“明矾”一词更准确地用于描述水合硫酸铝钾(KAl(SO₄)₂·12H₂O),其被用作白喉类毒素的早期佐剂,但由于制造困难而被放弃)。自1932年以来,基于铝的佐剂已用于人疫苗中,尽管它们具有长期的安全记录,但其作用方式并不完全了解。通常认为基于铝的佐剂通过活化树突细胞来增强免疫应答。

[0037] 已经进行研究以更好地了解 and 增强基于铝的佐剂的有效性。两种最常用的基于铝的佐剂被称为“磷酸铝”和“氢氧化铝”,其中氢氧化铝佐剂是商业上使用最广泛的。氢氧化铝佐剂不是Al(OH)₃,而是表面积大于结晶氢氧化铝的结晶羟基氧化铝(AlOOH)。磷酸铝佐剂实际上是无定形的羟基磷酸铝(Al(OH)_x(PO₄)_y),其中氢氧化铝佐剂中的一些羟基被磷酸基团替代。磷酸铝佐剂的表面由Al-OH和Al-OPo₃基团构成。尽管它们在化学上相似,但是这两种佐剂具有不同的化学性质。氢氧化铝佐剂具有晶体结构、大的表面积和在中性pH时带正电荷(+30毫伏)。磷酸铝佐剂是无定形的且在中性pH下带有负电荷(约-20毫伏)。而且,磷酸铝佐剂显示在注射之后更容易溶解。

[0038] 抗原“吸附”到基于铝的佐剂上,这意味着它们粘附到佐剂在表面上形成层。抗原通过静电相互作用、范德华力和配体(主要是磷酸根)交换吸附到基于铝的佐剂的表面上。配体交换是最强的吸附力,并且可甚至在静电斥力存在时发生。HBsAg主要由磷脂构成,其含有通过抗原中磷酸基团与基于铝的佐剂中表面羟基之间的配体交换而强烈吸附在佐剂的羟基化矿物表面上的磷酸基团。静电吸引不是HBsAg的主要吸附力(Iver et al, (2004) *Vaccine*, 22:1475-1479)。

[0039] 传统上,有意地使抗原对基于铝的佐剂的吸附最大化,因为通常认为吸附对免疫刺激作用很重要,因为抗原保留在注射部位,产生“贮库(depot)”效应,延长抗原向免疫系统的释放。此外,抗原的完全吸附导致疫苗制剂在长期储存期间有更大的长期稳定性。Engerix B[®]包含10μg HBsAg每250μg来自氢氧化铝佐剂的铝。该0.04μg HBsAg/μg铝的比例确保了完全吸附。然而,最近,抗体与T细胞免疫力、效力和吸附之间的关系变得不那么清

楚。关于HBsAg与氢氧化铝结合的紧密性对经免疫接种小鼠中抗体产生的影响的研究表明,抗原在佐剂上吸附最紧密的疫苗制剂产生的抗体应答最低。(Clapp et al (2011) J.Pharm Sci 100 (2) 388-401)。使用HBsAg S抗原结构域的一项研究表明,具有较高磷酸含量的基于铝的佐剂显示吸附降低、抗原结合更弱且抗体应答更大(Egan et al, (2009) Vaccine 27: 3175-3180)。类似地,含有磷酸铝佐剂的单抗原乙型肝炎疫苗比用氢氧化铝佐剂配制的类似疫苗引发更大的抗体应答并且在更低的佐剂浓度下有效(Fazeli et al, (2008) DARU 3: 143-148)。至少一项研究表明,针对佐剂增强抗体应答并不需要基于铝的佐剂吸附抗原,从而得出炎症而不是吸附与免疫原性相关的结论(Noe et al, (2010) Vaccine 28:3588-3594)。对改变铝组合物和量影响Th2和Th1 T细胞免疫的程度所知甚少,但是有研究报告,本领域技术人员认为更高的抗体应答促进增强的Th2应答而非Th1应答。

[0040] 尽管众所周知基于铝的佐剂改善免疫原性,但也众所周知它们主要起增强抗体产生的作用并且因此在靶向通过与抗体相互作用而杀伤或抑制的病原体方面是最有效的。通常认为它们不能有效地引发Th1应答,而是通过改善抗原呈递细胞(APC)对抗原的吸引和摄取来诱导炎性Th2应答。因此,基于铝的佐剂尚未被用于寻找更好的Th1细胞免疫刺激剂。

[0041] 为了改善细胞或“固有”免疫应答,已向乙型肝炎疫苗添加了更新型的佐剂。一种这样的新型佐剂是内毒素,单磷酸脂质A(monophosphoryl lipid A,MPL),一种细菌脂多糖。WO 93/19780公开了HBsAg疫苗与佐剂组合刺激T细胞应答。用吸附在氢氧化铝上的HBsAg免疫接种之后在Balb/c小鼠中未观察到T细胞应答(如通过IL-2、IFN- γ 和IL-4测量的)。然而,当将3-de-O-酰化单磷酸脂质A(3D-MPL)添加到制剂时,观察到Th1细胞应答(如通过IL-2和IFN- γ 测量的)。随后由同一研究小组申请的专利US 5,972,346公开了在HBsAg/3D MPL疫苗制剂中使用磷酸铝代替氢氧化铝时改善的体液免疫原性。该发现导致以**Fendrix[®]**商品名销售的商业疫苗的开发。随后的研究表明Fendrix引发Th1细胞免疫应答。然而,Fendrix是昂贵的产品,并且其在欧洲仅被批准用于15岁以上患有肾缺陷的患者。此外,在另一些研究中,已表明3D-MPL佐剂的效果是短暂的,并且主要限于注射部位和局部淋巴结(De Pasquale et al., Vaccine 2015)。

[0042] 最近,US20160136264公开了由乙型肝炎抗原片段和佐剂组成的乙型肝炎疫苗,所述佐剂由包含CpG基序的免疫调节性DNA序列组成,其能够介导小鼠中的Th1应答。然而,提出了对乙型肝炎疫苗中使用基于CpG的佐剂的安全性问题,并且尚未在所有司法管辖区获得销售许可。

[0043] 本申请的发明人已发现,包含所有三种HBsAg蛋白(S、前S1和前S-2)和磷酸铝佐剂的免疫原性组合物在该组合物具有显著量未结合抗原时在哺乳动物中有效地刺激Th1细胞应答。对本公开内容的组合物的物理化学分析显示,佐剂与HBsAg抗原的结合较弱。如本文实施例中进一步证明的,该结合显著弱于在用氢氧化铝佐剂配制的乙型肝炎疫苗中所见的。它也显著弱于在包含HBsAg抗原和磷酸铝佐剂的具有较低的HBsAg抗原与磷酸铝佐剂之比的制剂中所见的。

[0044] 令人惊讶地,本公开内容的组合物在不存在已知刺激细胞免疫的另外的更新型佐剂(例如MPL或CpG)的情况下,在哺乳动物中诱导了增强的Th1细胞应答。这些Th1细胞应答使用不同的免疫学标志物、特别是抗原特异性IFN- γ 应答和IgG2a/IgG1比进行了实验证明。鉴于之前的研究这是令人惊讶的,之前的研究显示用单独基于铝的佐剂配制的常规乙

型肝炎疫苗没有Th1应答。

[0045] 甚至更令人惊讶的是,与市售的预防性疫苗相比,本公开内容的免疫原性组合物相对于组合物中抗原量使用显著降低的磷酸铝佐剂浓度时有效地增强Th1细胞应答。特别地,与最广泛使用的市售的预防性疫苗相比,本公开内容的组合物在磷酸铝佐剂与抗原之比降低50%时有效地增强Th1应答。

[0046] 本公开内容的疫苗包含HBsAg,所述HBsAg包含S、前S1和前S2蛋白中的所有三种。HBsAg可源自乙型肝炎的任何基因型、毒株或分离株。此外,HBsAg可源自天然HBsAg或经修饰的HBsAg。HBsAg抗原可分离自乙型肝炎病毒的自然来源,例如从受感染的对象中收集的生物样品(例如血液、血浆、血清、精液、唾液、组织切片、活检试样等)、培养的细胞或组织培养物。HBsAg也可在细胞中使用重组技术产生。在一些实施方案中,HBsAg在哺乳动物细胞系中表达。在一些实施方案中,HBsAg在中国仓鼠卵巢细胞系中表达。包含S、前S1和前S2结构域的HBsAg抗原可使用US 5,242,812中公开的方法产生。编码不同HBsAg的核苷酸序列可在例如Genbank的数据库和已发表的文献中找到(例如,Fukimori et al (1990) 18Nuc. Acid Res 4587;Vaudin et al (1988) 69J. Gen Virol. 1383-1389)。HBsAg的大蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO.1中。在一个优选实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物包含20 μ g/ml或更多的具有S、前S1和前S2蛋白中所有三种的HBsAg抗原。在另一个优选实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物包含20 μ g/ml至60 μ g/ml的具有S、前S1和前S2蛋白中所有三种的HBsAg抗原。

[0047] 本公开内容的疫苗制剂还包含磷酸铝佐剂。适用于本公开内容的磷酸铝佐剂的一个实例是Adju-Phos[®],其是由Brenntag制造的磷酸铝湿凝胶悬浮液。

[0048] 如实施例2中所示,使用氢氧化铝佐剂的HBsAg疫苗制剂(包括市售的包含S、前S1和前S2抗原中所有三种的预防性疫苗制剂,与Sci-B-Vac商标关联销售)包含少于5%的未吸附抗原。如表3所示,包含与预防性疫苗中使用的相同抗原量、10 μ g/ml具有S、前S1和Pre-2结构域中所有三种的HBsAg抗原与磷酸铝佐剂而不是氢氧化铝的制剂之未吸附抗原的量没有增加,并且实际上,如表3所示,该制剂中没有未吸附抗原。这是令人惊讶的,因为已知与氢氧化铝佐剂相比,磷酸铝佐剂与HBsAg抗原的结合更弱。然而,在HBsAg抗原浓度为10 μ g/ml时,使用磷酸铝佐剂和氢氧化铝佐剂都可以观察到相似的吸附水平。

[0049] 然而,令人惊讶的是,具有提高浓度的(含有S、前S1和前S2蛋白)的HBsAg抗原和相同浓度磷酸铝佐剂的制剂显示未吸附抗原的含量大幅提高。来自磷酸铝佐剂的500 μ g/ml的铝含量相当于2.27mg/ml的磷酸铝佐剂。在HBsAg浓度为20 μ g/ml和500 μ g/ml作为磷酸铝佐剂存在的铝下,未吸附抗原的量为54.8%。在HBsAg浓度为40 μ g/ml和500 μ g/ml作为磷酸铝佐剂的铝下,未吸附抗原的量为35.8%。在HBsAg浓度为60 μ g/ml和500 μ g/ml作为磷酸铝佐剂的铝下,未吸附抗原的量为47.4%。在含有相同HBsAg抗原浓度与氢氧化铝佐剂的制剂中未观察到降低的抗原吸附。实际上,当使用氢氧化铝佐剂时,即使抗原浓度加倍至20 μ g/ml,未吸附抗原的量仍低于5%(参见表3)。因此,在提高HBsAg浓度下使用磷酸铝佐剂导致未吸附抗原显著且令人惊讶地增加。

[0050] 因此,在本公开内容的一个优选实施方案中,免疫原性组合物包含62.5 μ g/ml至500 μ g/ml的作为磷酸铝佐剂的铝。在一个特别优选的实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物包含500 μ g/ml的作为磷酸铝佐剂的铝和20 μ g/ml至60 μ g/ml的具有S、前S1和前S2蛋

白中所有三种的HBsAg抗原。在一个特别优选的实施方案中,本公开内容的免疫原性组合物包含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为磷酸铝佐剂的铝和20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的具有S、前S1和前S2蛋白中所有三种的HBsAg抗原。

[0051] 通过使用小鼠中的体内研究,本公开内容的发明人已经证明,本公开内容的免疫原性组合物有效地增强小鼠中Th1应答。这种效果是出乎意料的,因为在使用氢氧化铝佐剂的HBsAg组合物中,即使抗原浓度显著提高,也未观察到Th1应答增强。特别地,如实施例3中所示,与市售的预防性疫苗(其具有10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的相同抗原和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的作为氢氧化铝佐剂的铝)相比,在500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为氢氧化铝佐剂的铝下更高的20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HBsAg抗原(包含S、前S1和前S2蛋白)浓度不会增强小鼠中的Th1 T细胞免疫。然而,如在实施例4和5中进一步描述的,当与预防性疫苗制剂(其具有10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的相同抗原和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 来自氢氧化铝佐剂的铝)头对头比较时,由20 μg 抗原与500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 来自磷酸铝佐剂的铝配制的本公开内容的一种优选免疫原性组合物引发显著更高的Th1细胞应答。此外,如实施例6中所述,当与预防性疫苗制剂(其具有10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的相同抗原和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 来自氢氧化铝佐剂的铝)头对头比较时,由20 μg 、40 μg 和60 μg 抗原与500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 来自磷酸铝佐剂的铝配制的本公开内容的免疫原性组合物全部均引发更高的Th1细胞应答。这些结果表明,在本公开内容的一些优选免疫原性组合物中简单地改变佐剂:抗原比不足以增强Th1 T细胞免疫。相反,需要改变抗原浓度和佐剂类型(磷酸铝佐剂而不是氢氧化铝佐剂)二者来增强Th1 T细胞免疫。仅在未吸附抗原量提高的组合物中才能观察到Th1免疫增强。

[0052] 本公开内容还提供了本公开内容的免疫原性组合物用于制备用于在患者中诱导或增强针对乙型肝炎感染的Th1细胞免疫应答的药物组合物的用途。本公开内容还提供了本公开内容的免疫原性组合物用于制备用于在患者中治疗乙型肝炎感染、特别是慢性乙型肝炎感染的药物的用途。

[0053] 本公开内容还提供了可用于患有慢性乙型肝炎感染的个体中治疗应用的药物组合物。

[0054] 在某些实施方案中,可以将提供的药物组合物配制成用于肠胃外,例如通过注射来递送。在这样的一些实施方案中,制剂可适合于肌肉注射。

[0055] 在一些实施方案中,药物组合物以适合于注射的液体剂型提供。在一些实施方案中,药物组合物以粉末(例如冻干和/或灭菌的)提供,任选地在真空下提供,其在注射前用水性稀释剂(例如水、缓冲剂、盐溶液等)重构。在一些实施方案中,将药物组合物在水、凝胶、氯化钠溶液、乙酸钠溶液、苄醇溶液、磷酸缓冲盐水等中稀释和/或重构。在一些实施方案中,粉末应与水性稀释剂轻轻混合(例如,不要摇晃)。

[0056] 在一些实施方案中,提供的药物组合物包含一种或更多种可药用赋形剂(例如,防腐剂、惰性稀释剂、分散剂、表面活性剂和/或乳化剂、缓冲剂等)。合适的赋形剂包括例如水、盐水、右旋糖、蔗糖、海藻糖、甘油、乙醇、或类似物,及其组合。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) 公开了用于配制药组合物的多种赋形剂及其制备的已知技术。除非任何常规的赋形剂介质与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不期望的生物学效果或在其他情况下以有害的方式与药物组合物的任何其他成分相互作用,否则预期其使用在本公开内容的范围内。在一些实施方案中,药物组合物包含一种或更

多种防腐剂。在一些实施方案中,药物组合物不包含防腐剂。

[0057] 根据本公开内容的药物组合物可作为单个单位剂量和/或作为多个的单个单位剂量整批制备、包装和/或出售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将施用于对象的剂量和/或这样的剂量的合适分数,例如这样的剂量的一半或三分之一。

[0058] 本文所述的药物组合物通常以例如在对象中诱导或增强Th1免疫应答所需或足够的量和时间施用。给药方案可由在一段时间内的单剂量或多个剂量组成。待施用的组合物的确切量可因对象而异,并且可取决于数个因素。因此,应当理解,通常,所使用的精确剂量将由处方医生确定,并且不仅取决于对象的体重和施用途径,而且还取决于对象的年龄和症状的严重程度。在某些实施方案中,特定量的疫苗组合物以单剂量施用。在某些实施方案中,特定量的组合物以多于一个剂量施用。

[0059] 本公开内容还提供了在哺乳动物中诱导或增强针对乙型肝炎感染的T细胞免疫应答的方法,其包括向所述哺乳动物施用本公开内容的组合物。所述免疫应答优选地是针对乙型肝炎抗原的Th1应答。施用可通过经由任何方式进行注射,例如通过肌肉注射来进行。可用常规的注射器和针、或本领域中可获得的任何其他合适的装置来进行注射。

[0060] 本公开内容还提供了在有此需要的对象中治疗乙型肝炎感染,特别是慢性乙型肝炎感染的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本公开内容的组合物。施用可通过经由任何方式进行注射,例如通过肌肉注射来进行。可用常规的注射器和针、或本领域中可获得的任何其他合适的装置来进行注射。

[0061] 如果期望的话,本公开内容的方法或用途可与用于乙型肝炎感染和/或乙型肝炎介导的疾病的一种或更多种常规治疗性治疗组合进行。本公开内容的组合物的施用可在本公开内容组合物的施用之前、与其伴随地或在其之后进行。可在本公开内容的免疫原性组合物的施用之前或与其伴随地施用可与本公开内容的组合物组合的治疗性治疗以用于降低乙型肝炎病毒载量的目的。可与本公开内容的组合物组合的乙型肝炎治疗的代表性实例包括但不限于聚合酶抑制剂、RNase H抑制剂、核苷类似物、核苷酸类似物、TLR激动剂、N-糖基化抑制剂、siRNA、反义寡核苷酸、抗乙型肝炎抗体、衣壳抑制剂、核心蛋白抑制剂、核心组装调节剂、包含核酸聚合物的S抗原还原剂或螯合剂、ccc DNA抑制剂、干扰素和免疫调节剂。尽管这样的护理标准可因患者而异,最常见的乙型肝炎治疗包括有或没有细胞因子(例如IFN α 、聚乙二醇化IFN α 2a和聚乙二醇化IFN α 2b)的核苷酸或核苷类似物(如拉米夫定、恩替卡韦、替比夫定(telbivudine)、阿德福韦(adefovir)、阿德福韦酯(dipivoxil)或泰诺福韦)。然而,用于降低血浆或血清中存在的乙型肝炎病毒载量和/或分泌的HBsAg水平的更新型的治疗,例如siRNA或S抗原螯合剂(例如REP-2139,由Replicor Inc.生产的一种核酸聚合物药物候选物),可有效地与本公开内容的组合物组合。乙型肝炎治疗可按照标准方案、剂量和计划在数小时、数天、数周和/或数月内以单剂量或作为替代地,以多个剂量提供。

[0062] 本公开内容的组合物还可包含另外的佐剂。

[0063] 已经以举例说明的方式描述了本发明,并且根据以上教导,本发明的多个修改方案和变化方案是可能的。因此,应当理解,在权利要求书的范围内,可以以与本文具体描述的方式不同的方式来实施本发明。

[0064] 以上引用的专利、出版物和数据库条目的公开内容全部明确地通过引用整体并入

本文,与每个此类单独的专利、出版物或条目被明确地且单独地指示通过引用并入的程度相同。

[0065] 实施例

[0066] 以下实施例描述了制备和实践本文所述某些组合物的一些示例性模式。应当理解,这些实施例仅用于举例说明目的,并不意味着限制本文所述的组合物和方法的范围。

[0067] 实施例1:疫苗制剂的制备

[0068] 根据US 5,242,812中描述的方法,在CHO细胞中制备了由S、前S1和前S2蛋白中所有三种组成的乙型肝炎表面抗原。

[0069] 如下制备包含氢氧化铝佐剂的疫苗制剂。简而言之,在室温下,将使用含铝量为500mcg/ml的氢氧化铝佐剂(**Alhydrogel[®]**)的两种不同浓度的HBsAg (10mcg/ml和20mcg/ml) 搅拌 16 ± 4 小时的时间。更具体地,将磷酸蔗糖缓冲剂和HBsAg添加至无菌玻璃小瓶,并用移液管轻轻混合。向一个单独的无菌玻璃小瓶添加一个小的搅拌棒,然后添加0.9%的盐水和Alhydrogel佐剂,同时以 100 ± 50 rpm搅拌。在搅拌0.9%盐水和Alhydrogel的同时,使用20 μ l至200 μ l大小的移液管缓慢添加PBS与HBsAg的混合物(见下表1)。将塞子或防漏盖添加到每个小瓶并牢固密封。将Alhydrogel佐剂瓶留在室温(15°C至25°C)下以 100 ± 50 rpm搅拌 16 ± 4 小时。一旦搅拌完成,将疫苗制剂保存在2°C至8°C直至分析或免疫接种。

[0070] 表1:含有氢氧化铝佐剂的免疫原性组合物

	制剂体积				最终受试品目标说明		
	HBsAg终浓度(μ g/mL)	无菌PBS的体积(μ L)	10 μ g/ml HBsAg的体积(μ L)	0.9% (154mM) 氯化钠的体积(μ L)	2% Alhydrogel (10 mg/mL Al+++)的体积(μ L)	终体积(μ L)	铝的终浓度(μ g/mL Al+++)
[0071]	20	219	181	3400	200	4000	500
	10	309	91	3400	200	4000	500

[0072] 如下制备包含磷酸铝佐剂(**Adjuphos[®]**)的疫苗制剂。简而言之,在室温下,将使用500 μ g/ml作为磷酸铝佐剂的铝(Adjuphos)的两种不同浓度的HBsAg (10 μ g/ml和20mcg/ml) 以8rpm至12rpm旋转60分钟。更具体地,将Adjuphos佐剂添加至无菌容器,然后添加10mM磷酸盐8%蔗糖缓冲剂。将HBsAg添加到同一容器,并通过吸液管缓慢混合(见下表2)。将容器密封并用铝箔覆盖,然后在室温下以8rpm至12rpm旋转60分钟。一旦搅拌完成,将疫苗制剂保存在2°C至8°C直至分析或免疫接种。

[0073] 表2:含有磷酸铝佐剂的免疫原性制剂

HBsAg终浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	10 mM磷酸 盐缓冲剂, 8%蔗糖的体积 (μL)	HBsAg 的体积 (μL)	2% AdjuPhos (5 mg/mL Al+++) 的体积 (μL)	终体积 (μL)	铝的终浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
60	0	9000*	3000	30000	500
40	3000	6000*	3000	30000	500
20	3619	181**	200	4000	500
10	3709	91**	200	4000	500

[0075] *HBsAg (浓度 = 200 $\mu\text{g/mL}$; 批号 B-061-6 已稀释), **HBsAg (浓度 = 441 $\mu\text{g/mL}$; 批号 B-054-3),

[0076] 实施例2: 佐剂对抗原吸附的评价

[0077] 如下测量乙型肝炎表面抗原与氢氧化铝佐剂和磷酸铝佐剂的结合。简而言之, 在无菌生物安全柜中, 将500 μL 每种疫苗制剂无菌转移至无菌聚丙烯离心管中, 这在转移前通过移液混合10次至20次之后进行, 以确保溶液均匀。然后将所有等分试样以14,000g离心120分钟。使用20 μL 至200 μL 移液管小心地将上清液(450 μL)从装有免疫原性制剂的离心管中移出, 并转移到新的无菌聚丙烯离心管中。通过添加等于移出的体积的缓冲剂(450 μL)将含有免疫原性制剂沉淀的离心管重悬。适当标记管(经离心的免疫原性制剂的上清液与重悬沉淀)。将经稀释的沉淀(含有结合的HBsAg)和上清液(含有游离的HBsAg)在2 $^{\circ}\text{C}$ 至8 $^{\circ}\text{C}$ 下保存在冰箱中。下表3示出了HBsAg抗原浓度、铝佐剂选择和佐剂剂量对未结合/游离HBsAg量的影响。

[0078] 表3: 受试HBsAg组合物的未吸附抗原含量

受试品	目标 HBsAg ($\mu\text{g/mL}$)	目标铝 $\mu\text{g/mL}$ [Al+++]	总蛋白 ($\mu\text{g/mL}$)			未吸附 HBsAg
			原始的	上清液 (游离的)	沉淀 (结合的)	
1	40	62.5 Alhydrogel	31.9	0.8	32.1	2.8%
2	40	125 Alhydrogel	33.2	未检出	35.8	0%
3	40	250 Alhydrogel	41.6	1.1	39.6	2.7%
4	40	500 Alhydrogel	44.8	1.2	47.6	2.5%

[0080]

5	20	500 Alhydrogel	39.8	未检出	36.6	0%
6	10	500 Alhydrogel	32.5	未检出	34.3	0%
7	40	62.5 Adjuphos	10.2	5.9	4.9	54.6%
8	40	125 Adjuphos	10.1	5.1	4.2	54.8%
9	40	250 Adjuphos	10.5	4.5	5.2	46.4%
10	40	500 Adjuphos	12.2	3.8	6.8	35.8%
11	20	500 Adjuphos	10.0	3.4	2.8	54.8%
12	10	500 Adjuphos	3.5	未检出	3.1	0%
13	60	500 Adjuphos	11.84	7.6	8.43	47.4%

[0081] 受试品6 (TA6) 是市售的预防性Sci-B-Vac疫苗,并且在上清液中未能检测到可检出的未吸附(游离)HBsAg。通过将抗原浓度提高4倍(TA4)来改变抗原与佐剂之比基本上未改变未吸附抗原的量(2.5%)。类似地,通过降低氢氧化铝佐剂(Alhydrogel)的量来改变抗原与佐剂之比未使未吸附抗原的量提高超过5%(TA1至TA3)。

[0082] 在HBsAg浓度保持在10 μ g/ml时,将免疫原性组合中使用的佐剂从氢氧化铝佐剂(Alhydrogel)(TA6)改为磷酸铝佐剂(Adjuphos)(TA12)类似地未能提高未吸附HBsAg的量(检测到0%)。然而,令人惊奇的是,将抗原浓度提高2倍(TA11)和/或降低磷酸铝佐剂浓度(TA7至TA10)显著地将未吸附HBsAg的量提高到超过30%。特别是,当用500 μ g/ml来自磷酸铝佐剂的铝配制时,20 μ g/ml浓度的抗原显示出非常高的未吸附HBsAg的量。该佐剂浓度,具体地500 μ g/ml,已广泛用于市售的HBsAg疫苗,但是是氢氧化铝佐剂而不是磷酸铝佐剂。

[0083] 总之,在市售的被称为Sci-B-Vac的预防性疫苗(TA6)中没有未吸附HBsAg,但在具有20 μ g/ml的HBsAg和500 μ g/ml的作为磷酸铝佐剂的铝的本公开内容的一个实施方案(TA11)中,未吸附HBsAg大于50%。为了获得大于30%的未吸附抗原的量,必须改变基于铝的佐剂类型和抗原浓度。

[0084] 实施例3:用包含含有S、前S1和前S2的HBsAg和氢氧化铝抗原的两种不同的免疫原性组合物接种疫苗之后小鼠中Th1 T细胞免疫的评价

[0085] 本实施例描述了用两种不同免疫原性制剂免疫接种之后小鼠中T细胞应答的评价,所述制剂包含不同浓度的抗原(包含S、前S1和前S2蛋白的HBsAg)和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 来自氢氧化铝佐剂的铝(表3中的TA5和TA6)。在第0、3、10(或13)周以疫苗制剂人剂量的1/20(即0.5 μg 的TA6抗原和1.0 μg 的TA5抗原)对Ba1b/c小鼠接种疫苗3次。在第三次疫苗接种之后的第6天处死小鼠,如下所述通过酶联免疫斑点测定(“ELISPOT”)使用重叠肽库测量针对前S1、前S2和HBsAg S蛋白的应答。用两种制剂诱导了相当的抗HBsAg抗体应答(数据未显示)。

[0086] 如下进行IFN- γ ELISPOT分析以测量Th1 T细胞应答。将小鼠分成每组8只小鼠的组,用上述两种受试制剂免疫接种,每种受试制剂具有相同浓度的氢氧化铝佐剂但具有不同浓度的HBsAg抗原。每组四只小鼠被处死并移出脾。处理来自单个小鼠的脾以产生单细胞悬液。使用市售的缓冲液(BioLegend)裂解红细胞。然后将脾细胞以 6×10^6 个脾细胞/mL重悬。在收集和处理脾的前一天,用干扰素- γ (IFN- γ) 捕获抗体包被ELISPOT板。没有肽、肌动蛋白肽混合物、前S1肽混合物、前S2肽混合物、HBsAg肽混合物、以及佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯与离子霉素(PMA/iono)被选择作为刺激剂。在收集脾的当天,将刺激剂添加到指定的ELISPOT板孔。将 1.5×10^5 个脾细胞添加到PMA/iono孔,并将 3×10^5 个脾细胞添加到所有其他刺激剂。然后将ELISPOT板置于潮湿的37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 培养箱中40小时至48小时。孵育后,洗涤板以除去脾细胞、刺激剂和培养基,并添加IFN- γ 捕获抗体,然后添加链霉素辣根过氧化物酶(strep-HRP)。最后,使用市售的3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)底物(BD BioSciences)对板进行显色。使用ELISPOT读板器对观察到的斑点进行计数,并且最终数据报告为每1百万个脾细胞的斑点形成细胞(spot forming cell,SFC)。下表4示出了该免疫原性研究的结果。

[0087] 表4:通过ELISPOT测量的Th1活性

免疫原性组合物	前S1 (IFN- γ + SFC/ 10^6 脾细胞)		前S2 (IFN- γ + SFC/ 10^6 脾细胞)		sAg (IFN- γ + SFC/ 10^6 脾细胞)	
	GM	SE	GM	SE	GM	SE
[0088] 10 μg HBsAg制剂, 包含500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [AI+++] (Alhydrogel)	6.048	2.549	124.6	38.31	1056	225.9
20 μg HBsAg制剂, 包含500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [AI+++] (Alhydrogel)	6.328	2.918	112.3	48.17	1094	214.6

[0089] 注意:GM=几何平均值;SE=标准误差

[0090] 表4显示,在含有氢氧化铝作为佐剂的制剂中,更高量的HBsAg抗原未显示出改善的Th1 T细胞应答。该结果与表2中的数据一致,其表明这两种制剂均不具有未吸附抗原。

[0091] 实施例4:用称为Sci-B-Vac的市售预防性疫苗(10 μ g/ml包含S、前S1和前S2的HBsAg和500 μ g/ml作为氢氧化铝佐剂的铝)和本公开内容制剂(包含20 μ g HBsAg和500 μ g/ml作为磷酸铝佐剂的铝)接种疫苗后小鼠中T细胞免疫的比较

[0092] 该实施例描述了用两种不同免疫原性组合物接种疫苗后小鼠中T细胞应答的评价。第一种组合物是被称为Sci-B-Vac的市售的预防性疫苗,其包含10 μ g/ml的包含S、前S1和前S2蛋白的HBsAg和500 μ g/mL作为磷酸铝佐剂的铝(表3中的TA6)。第二种组合物是本公开内容的免疫原性组合物,其包含两倍高浓度的相同HBsAg(20 μ g/ml)和500 μ g/mL作为磷酸铝佐剂的铝(表3中的TA11)。在第0、3、6(或8)周以每种免疫原性组合物的人剂量的1/20(即0.5 μ g的TA6抗原和1.0 μ g的TA11抗原)对Ba1b/c小鼠接种疫苗3次。在第三次疫苗接种之后的第6天处死小鼠,如上所述通过ELISPOT使用重叠肽库测量针对前S1、前S2和HBsAg蛋白的应答。用这两种制剂诱导了相当的抗HBsAg抗体应答。

[0093] 表5:通过ELISPOT测量的Th1活性

免疫原性组合物	前S1 (IFN- γ + SFC/10 ⁶ 脾细胞)		前S2 (IFN- γ + SFC/10 ⁶ 脾细胞)		sAg (IFN- γ + SFC/10 ⁶ 脾细胞)	
	GM	SE	GM	SE	GM	SE
[0094] 10 μ g HBsAg制剂, 包含500 μ g/mL [Al+++] (Alhydrogel)	5.833	0.4951	53.66	7.991	160.3	35.78
20 μ g HBsAg制剂, 包含500 μ g/mL [Al+++] (Adjuphos)	5.439	0.8325	271.7	62.9	333.0	35.51

[0095] 从表5中可以看出,本公开内容的包含20 μ g HBsAg和500 μ g/ml作为磷酸铝佐剂的铝的免疫原性组合物比用远远更低浓度的相同抗原(10 μ g/ml)和氢氧化铝佐剂配制的市售预防性疫苗形式刺激显著更大的针对前S2和S抗原的Th1细胞应答。该结果与表2中的数据一致,其显示,与市售的预防性HBsAg疫苗(TA6)中没有未结合抗原相比,本公开内容的免疫原性组合物(TA11)中有很大大百分比的未结合抗原(54.8%)。对于前S2,应答显示是最大的。

对任一制剂均未检测到针对前S1抗原的应答。

[0096] 实施例5:用称为Sci-B-Vac的市售预防性疫苗(10 μ g/ml包含S、前S1和前S2的HBsAg和500 μ g/ml作为氢氧化铝佐剂的铝)和本公开内容制剂(包含20 μ g HBsAg和500 μ g/ml作为磷酸铝佐剂的铝)接种疫苗后小鼠中个体IgG1/IgG2a比的比较

[0097] 该实施例描述了用两种不同的免疫原性组合物接种疫苗后小鼠中个体IgG1/IgG2a比的比较。第一种组合物是被称为Sci-B-Vac的市售的预防性疫苗,其包含10 μ g/ml的包含S、前S1和前S2蛋白的HBsAg和500 μ g/mL作为氢氧化铝佐剂的铝(表3中的TA6)。第二种组合物是本公开内容的免疫原性组合物,其包含两倍高浓度的相同HBsAg(20 μ g/ml)和500 μ g/mL作为磷酸铝佐剂的铝(表3中的TA11)。在第0、3、6周以每种免疫原性组合物的人剂量的1/20(即0.5 μ g的TA6抗原和1.0 μ g的TA11抗原)对Balb/c小鼠(n=8)接种疫苗3次。在第三次疫苗接种之后的第6天处死小鼠,通过ELISA如下测量抗-HBs IgG1和抗-HB IgG2。

[0098] 抗-HBs IgG1:将96孔板在4 $^{\circ}$ C下用重组乙型肝炎表面抗原蛋白(Abcam)(DPBS中0.25 μ g/mL)包被过夜。第二天,将板在37 $^{\circ}$ C下用在ELISA洗涤缓冲液(PBS中0.05% Tween-20)中的10%山羊血清封闭1小时。用洗涤缓冲液洗涤板,然后添加2倍稀释的个体小鼠血清,从1:10,000开始到1:1280,000。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时,然后洗涤板并添加二抗。添加在ELISA洗涤缓冲液中10%山羊血清中以1:10,000稀释的山羊抗小鼠IgG1(Bethyl),并将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时。将TMB一组分微孔底物(TMB One component Microwell substrate)添加到板,在室温下孵育10分钟,然后添加终止液。使用MAXline读板器在450nm处读取吸光度。

[0099] 抗-HBs IgG2a:将96孔板在4 $^{\circ}$ C下用重组乙型肝炎表面抗原蛋白(Abcam)(DPBS中0.25 μ g/ml)包被过夜。第二天,将板在37 $^{\circ}$ C下用在ELISA洗涤缓冲液中10%山羊血清封闭1小时。用洗涤缓冲液洗涤板,然后添加2倍稀释的个体小鼠血清,从1:5,000开始到1:640,000。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时,然后洗涤板并添加二抗。添加在ELISA洗涤缓冲液中的10%山羊血清中以1:10,000稀释的山羊抗小鼠IgG2a(Bethyl),并将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1.5小时。将TMB一组分微孔底物添加到板,并在室温下孵育10分钟,然后添加终止液。使用MAXline读板器在450nm处读取吸光度。

[0100] 结果示于下表6中。

[0101] 表6:个体IgG1/IgG2比

个体小鼠编号	IgG1/IgG2a比 10 µg HBsAg制剂, 包含500 µg/mL [Al+++] (Alhydrogel)	IgG1/IgG2a比 20 µg HBsAg制剂, 包含500 µg/mL [Al+++] (Adjuphos)
1	5.3	2.5

[0102]

2	36.5	3.6
3	118.3	5.6
4	19.9	0.1
5	35.9	6.9
6	2.0	4.6
7	20.5	0.9
8	N/A	9.4

[0103] 从表6中可以看出,含有20µg HBsAg和500µg/ml作为磷酸铝佐剂的铝的本公开内容的免疫原性组合物刺激了显著更低的IgG1与IgG2a之比。由于IgG2a刺激是Th1活性的标志物,这种变化的比例表明,包含20µg HBsAg和500µg/ml作为磷酸铝佐剂的铝的组合物比包含20µg HBsAg和500µg/ml作为磷酸铝佐剂的铝的组合物引发更强的Th1应答。

[0104] 实施例6:用称为Sci-B-Vac的市售预防性疫苗(10µg/ml包含S、前S1和前S2的HBsAg和500µg/ml作为氢氧化铝佐剂的铝)和三种不同剂量的本公开内容组合物(包含20µg、40µg和60µg HBsAg以及500µg/ml作为磷酸铝佐剂的铝)接种疫苗之后小鼠中的剂量范围研究

[0105] 该实施例描述了剂量范围研究,其检测了用称为Sci-B-Vac的市售预防性疫苗(其包含10µg/ml包含S、前S1和前S2蛋白的HBsAg和500µg/mL作为氢氧化铝佐剂的铝)(表3中的TA6)和本公开内容免疫原性组合物(其包含三种不同剂量的相同HBsAg以及500µg/ml作为磷酸铝佐剂的铝)接种疫苗后小鼠中的Th1活性。三种不同剂量如下:HBsAg(20µg/ml)(表3中的TA11);HBsAg(40µg/ml)(表3中的TA10)和HBsAg(60µg/ml)(表3中的TA13)。

[0106] 简而言之,将Balb/c小鼠(n=8/组)用每种组合物的小鼠剂量肌内接种疫苗3次,间隔3周,具体地为3µg、2µg和1µg。第三次疫苗接种之后7天从小鼠中收获脾细胞,并用对前

S1、前S2和HBsAg具有特异性的重叠肽库刺激。培养48小时后,通过ELISPOT如下评价IFN- γ 分泌T细胞应答。在收集和处理脾的前一天,用浓度为15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的100 μl 干扰素- γ (IFN- γ) 捕获抗体 (Mabtech) 包被ELISpot板 (Millipore),并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。

[0107] 在收集和处理脾的当天,将包被的ELISpot板用200 μl 无菌PBS洗涤5次,并用100 μl 的R10培养基封闭1小时至2小时。一旦脾细胞被分离并计数,移出R10封闭培养基,并将50 μl 脾细胞 (300,000个细胞) 和50 μl 刺激剂平板接种到ELISpot测定板上。用以下刺激剂一式两份地刺激每只小鼠的脾细胞:前S1 (最终刺激浓度=13.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、前S2 (最终刺激浓度=5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和HBsAg (最终刺激浓度=27 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、作为阴性对照的R10,和佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯与离子霉素 (PMA (20 ng/ml)/离子霉素 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作为阳性对照。然后将ELISpot板置于潮湿的37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 培养箱中40小时至48小时。孵育后,将板用200 μl 的PBS-Tween洗涤5次以除去脾细胞、刺激剂和培养基,并随后向每孔添加100 μl 浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IFN- γ 捕获抗体 (Mabtech)。孵育2小时后,将ELISpot板用PBS-Tween洗涤5次,并且向每孔添加100 μl 稀释1:1000的链霉素辣根过氧化物酶 (strep-HRP)。然后将板进一步孵育1小时,之后在室温下通过添加100 μL 的3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC) 底物 (BD BioSciences) 显色30分钟。通过ZellNet Consulting对观察到的斑点进行计数,并且最终数据报告为每1百万个脾细胞的斑点形成单位 (SFC)。表7示出了通过ELISPOT测量的不同组合物的Th1活性。

[0108] 表7:通过ELISPOT测得的Th1活性

免疫原性组合物	前S1 (IFN- γ + SFC/10 ⁶ 脾细胞)		前S2 (IFN- γ + SFC/10 ⁶ 脾细胞)		sAg (IFN- γ + SFC/10 ⁶ 脾细胞)	
	M	SE	M	SE	M	SE
20 μ g HBsAg制剂, 包含500 μ g/mL [Al+++] (Adjuphos)	1.665	1.044	261.2	62.43	498.0	125.4
40 μ g HBsAg	0.9514	0.4951	222.6	69.20	649.6	109.1

[0109]

制剂, 包含500 μ g/mL [Al+++] (Adjuphos)						
60 μ g HBsAg制剂, 包含500 μ g/mL [Al+++] (Adjuphos)	0.7136	0.7136	148.9	31.01	422.0	102.0
10 μ g HBsAg制剂, 包含500 μ g/mL [Al+++] (Alhydrogel)	0.0	0.0	108.4	36.95	226.4	28.54

[0110] 从表7可以看出,通过ELISPOT,与10 μ g/ml包含S、前S1和前S2蛋白的HBsAg和500 μ g/mL作为氢氧化铝佐剂的铝(表3中的TA6)相比,20 μ g和40 μ g和60 μ g剂量包含含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg和500 μ g/mL作为磷酸铝佐剂的铝的组合物能够引发更大数量的前S2和HBsAg特异性IFN- γ 分泌T细胞。因此,与包含10 μ g/ml含有S、前S1和前S2蛋白的HBsAg和500 μ g/mL作为氢氧化铝佐剂的铝的组合物相比,本公开内容的免疫原性组合物的三种剂量中

的每一种都诱导更高的T细胞应答。

[0111] 其他实施方案

[0112] 考虑到本文公开内容的说明或实践,本公开内容的其他实施方案对本领域技术人员而言将是明显的。本说明书和实施例旨在仅被认为是示例性的,本公开内容的真实范围由所附权利要求书指示。本文所引用的任何参考文献的内容在此通过引用整体并入。