

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2015 年 1 月 29 日 (29.01.2015)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2015/010450 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 45/00 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/000717
- (22) 国际申请日: 2014 年 7 月 28 日 (28.07.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310322617.0 2013 年 7 月 26 日 (26.07.2013) CN
- (71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN];
中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。
- (72) 发明人: 王宾 (WANG, Bin); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。 王宪政 (WANG, Xianzheng); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。 张继明 (ZHANG, Jiming); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。
- (74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城宣武门西大街甲 129 号金隅大厦 602 室, Beijing 100031 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则 48.2(h))。

(54) Title: VIRAL IMMUNOTHERAPY DRUG COMPLEX AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 一种病毒免疫治疗药物复合物及其用途

(57) Abstract: The present invention involves a new viral immunotherapy drug complex, and in particular, a viral immunotherapy drug complex for persistent hepatitis B infection. The present drug consists of antiviral drugs, immunoregulating drugs and a recombinant hepatitis B vaccine, for use in treating hepatitis B and in particular chronic hepatitis B infections. Antiviral drugs of the described drug complex are selected among α -IFN and nucleosides; the immunoregulating drugs are selected from among GM-CSF and similar.

(57) 摘要: 本发明涉及一种新的病毒免疫治疗药物复合物, 尤其涉及一种用于乙肝持续性病毒感染的病毒免疫治疗药物复合物。本发明的药物复合物由抗病毒药物, 免疫调节药物和重组乙肝疫苗组成, 用于治疗乙肝, 尤其是慢性乙型肝炎。所述的药物复合物中, 抗病毒药物选自 α -IFN, 核苷类等; 免疫调节药物选自 GM-CSF 等。



WO 2015/010450 A1

一种病毒免疫治疗药物复合物及其用途

技术领域

- 5 本发明属生物医药领域，涉及一种新的病毒免疫治疗药物复合物。尤其涉及一种用于乙肝持续性病毒感染的病毒免疫治疗药物复合物。

背景技术

- 现有技术公开了乙型病毒性肝炎是由乙肝病毒(HBV)引起的、通过血液与体液传播的、以肝脏损害为主的传染病，是一个严重的公共卫生问题，该疾患对人类健康的威胁很大。研究显示，感染乙型肝炎后，部分患者将发展成为慢性持续性感染状态，其中有可能演变为肝硬化或原发性肝细胞癌。我国是乙型肝炎病毒感染高流行区，每年约有35万人死于与乙肝相关的疾病（如：肝硬化、肝癌等），其中，人群感染率为60%，乙型肝炎表面抗原(HBsAg)人群携带率为10%。目前，据估计，全世界共有3亿HBsAg携带者，而我国占其中的三分之一，乙型肝炎传播已成为影响我国人口素质的重要问题。

- 实践显示，乙肝疫苗的接种是控制或预防乙型肝炎最有效的措施。进入80年代，乙型肝炎基因重组疫苗的发展非常迅速，自1981年起，默克公司成功研制出乙型肝炎基因S蛋白在酵母中表达后与铝佐剂配伍的基因重组疫苗并商品化后，对全球乙型肝炎的预防和控制起到了重要作用。现有上市的乙肝疫苗主要是基于乙肝病毒S抗原与铝佐剂配伍的形式。

- 对于慢性乙型肝炎患者，HBV在肝脏细胞内长期持续复制，会导致机体内病毒特异性效应T细胞的耗竭以及病毒的免疫逃逸，使患者处于一种免疫耐受的状态，病毒特异性的CTL反应变得非常弱。有研究提示，机体针对HBV的特异性T细胞应答低下可能是HBV持续性感染的重要原因之一，其具体分子机制尚未完全明了，分析认为可能与病毒抗原的量、天然免疫的诱导效率、抗原提呈细胞的类型、辅助性T细胞与调节性T细胞的数量与功能及共刺激分子的调控等有关。

- 根据中华医学会肝病学分会和感染病学分会组织国内有关专家制定的《慢性乙型肝炎防治指南》，对于属于抗病毒的适应症范围内的HBV患者，应给予抗病毒治疗。目前的治疗乙肝的抗病毒药物包括 α -IFN、核苷（酸）类似物，如拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定、替诺福韦酯等；这些药物能抑制适应症范围内患者的HBV DNA拷贝数，但长期服用，易产生耐药性；此外，核苷（酸）类似物停用后可出现复发，甚至病情恶化；而干扰素有骨髓抑制作用，长期服用有较大的副作用；甘草酸制剂、水飞蓟素制剂、多不饱和卵磷脂制剂以及双环醇等，均有不同程度的抗炎、抗氧化、保护肝细胞膜及细胞器等作用，临床应用结果显示可改善肝脏生化学指标，但不能取代抗病毒治疗。

研究者认为，目前，乙肝有效的免疫治疗手段应是基于激发病毒携带者体内的免疫系统。已知粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）是一种具有多项

潜能的造血细胞重要生长因子，对各种原因引起的白细胞减少症有明显的疗效。GM-CSF主要由活化的T细胞、B细胞、单核巨噬细胞、肥大细胞、内皮细胞和成纤维细胞产生，它不仅能够促进造血前体细胞的增殖、分化和成熟，而且对其他细胞，如抗原递呈细胞（APC）、成纤维细胞、角质细胞、皮肤黏膜细胞等均有不同程度的刺激作用。1993年，Dranoff等首次将GM-CSF作为免疫佐剂，增强了抗肿瘤疫苗的免疫反应。GM-CSF的免疫增强作用可能与其增强APC细胞的抗原递呈能力有关。GM-CSF作用于树突状细胞（DC），增强其递呈抗原的能力[1]；增加IL-2的产生，活化CD4⁺T细胞，使其分泌抗体的能力增强，同时亦可增强CD8⁺T细胞的功能[2]。近年来的研究发现，GM-CSF可激活T细胞、内皮细胞，增强APC的功能，增加细胞MHC，协同刺激分子，参与机体免疫调节，增强抗病毒药物的疗效。但Hasan等通过在给正常人注射重组乙肝疫苗之前立即肌肉注射GM-CSF，发现此种情况下GM-CSF不能提供显著的佐剂活性，即不能有效地提高初级免疫反应[3]。V. Bronte等人发现全身性高水的GM-CSF能诱导暂时性抑制T细胞反应[4]。S. J. Simmons等人在一个前列腺癌疫苗的II期临床试验中，利用GM-CSF作为全身性佐剂，结果却无法检测到DC-多肽注射后的临床反应增强，或检测到显著提高的免疫反应。此外，部分患者还发生了一些剂量不良反应，例如局部反应、疲劳、骨痛、肌痛和发热[5]。这些结果与其他许多GM-CSF作为佐剂一同免疫能显著改善抗原特异性免疫反应的报道不同，这说明可能是由于GM-CSF的剂量、给药的持续时间以及免疫剂量与临床免疫结果息息相关，然而对于GM-CSF免疫疗法的剂量、持续时间的研究还并不透彻，亟待通过系统的研究优化出较优的GM-CSF作为免疫疗法药物的用途。

有研究报道，单独使用干扰素治疗HBV，大约只有25%-40%具有治疗效果。拉米夫定因其相对安全和价格低廉，至今仍是很多地区治疗HBV感染的首要选择，但其快速形成的耐药性是其中存在的主要缺陷[6]。随着阿德福韦使用量增加，针对这种药物的耐药性也成为了主要问题，这说明部分病人对这种单一治疗是无反应的，或易产生耐药性。鉴于在针对HIV感染方面的联合治疗法取得成功，以及单一药物治疗HBV仍存在各种问题，很多研究者对联合治疗法治疗HBV进行研究[7]。Guptan等通过联合干扰素和GM-CSF，观察到60%干扰素单一治疗无反应的HBV患者在最初治疗结束后HBeAg和HBV-DNA降低，但随后患者中出现了病毒复发情况[8]。而Heintges等则使用 α -IFN和乙肝疫苗联合治疗六个月后，发现50%(8/19)的干扰素单一治疗无反应者已无法检测出HBV-DNA，但治疗后的持续反应率在该临床实验中没有报道。也有研究报道了病毒携带者直接接种HBsAg疫苗进行治疗，28.6%的患者病毒复制减少，21.4%的患者HBV-DNA呈阴性。但Dikici等人却发现慢性HBV感染的免疫耐受儿童乙肝疫苗接种治疗组和未接种组无明显区别。

中国公开号“CN 1990043A”，“重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子在制备治疗或预防乙型肝炎药物中的用途”公开了同时给予重组人GM-CSF和基因工

程乙型肝炎疫苗可以促进机体的体液免疫；提前给予重组人GM-CSF，再给予基因工程乙型肝炎疫苗，可以刺激动物产生细胞免疫，加快T细胞转化，可刺激Th1细胞分泌IFN- γ 等细胞因子，促进IgG2a型抗体的产生，增加细胞毒T细胞（CTL）的功能，从而达到治疗治疗HBV的效果。近几年，不同的细胞因子、趋化因子已经被用于动物模型和人类疫苗研究的免疫佐剂，促进抗原识别和T细胞的扩增。有研究报道，GM-CSF是目前在增加抗肿瘤疫苗免疫原性方面使用最多的细胞因子佐剂。GM-CSF即可以通过基因转导至肿瘤细胞或周边正常的细胞释放该细胞因子，也可以以重组蛋白形式全身性或局部地用于动物或病人的不同疫苗接种。但GM-CSF用于人类抗病毒疫苗的免疫佐剂仍存在争议。Hasan等通过在给正常人注射重组乙肝疫苗之前立即肌肉注射GM-CSF，发现此种情况下GM-CSF不能提供显著的佐剂活性，即不能有效地提高初级免疫反应[3]。同样以GM-CSF为免疫佐剂，却得到不同的结果，可能与GM-CSF实际应用时的剂量、免疫部位和免疫方式有关。

基于上述研究，本申请的发明人拟提供一种新的病毒免疫治疗药物复合物，尤其涉及一种用于乙肝持续性病毒感染的病毒免疫治疗药物复合物。

与本发明相关的现有技术有：

1. van de Laar L, Coffey P, Woltman A: Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 2012, 119(15):3383-3393.
2. Wanjalla C, Goldstein E, Wirblich C, Schnell M: A role for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the regulation of CD8(+) T cell responses to rabies virus. *Virology* 2012, 426(2):120-133.
3. Cruciani M, Mengoli C, Serpelloni G, Mazzi R, Bosco O, Malena M: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as an adjuvant for hepatitis B vaccination: a meta-analysis. *Vaccine* 2007, 25(4):709-718.
4. Cytokines as natural adjuvants for vaccines.pdf.
5. GM-CSF as a Systemic Adjuvant in a Phase II Prostate Cancer Vaccine Trial.pdf.
6. Morrey J, Bailey K, Korba B, Sidwell R: Utilization of transgenic mice replicating high levels of hepatitis B virus for antiviral evaluation of lamivudine. *Antiviral research* 1999, 42(2):97-108.
7. Paul N, Han S-H: Combination Therapy for Chronic Hepatitis B: Current Indications. *Current hepatitis reports* 2011, 10(2):98-105.
8. Rajkumar CG, Varsha T, Seyed NK, Shiv KS: Efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or lamivudine combination with recombinant interferon in non-responders to interferon in hepatitis B virus-related chronic liver disease patients. *Journal of*

Gastroenterology and Hepatology 2002, 17.

发明公开

5 本发明的目的是提供一种新的病毒免疫治疗药物复合物，尤其涉及一种用于乙肝持续性病毒感染的病毒免疫治疗药物复合物。本发明的药物复合物可为治疗乙肝提供新的免疫治疗药物。

本发明的药物复合物由抗病毒药物，免疫调节药物和重组乙肝疫苗组成。

10 本发明的药物复合物用于治疗乙肝，尤其适合治疗慢性乙型肝炎，所述的药物复合物中，利用 α -IFN、核苷类等抗病毒药物降低机体内的病毒载量；再为机体给以GM-CSF为佐剂的乙肝疫苗，使机体建立有效的免疫记忆保护反应，产生强力的抗体保护和细胞免疫，防止病毒复发，甚至达到清除病毒的目的，以及预防HBV再次感染。

15 本发明中，所述的抗病毒药物选自干扰素或核酸类药物，例如：普通IFN- α 3~5 MU，聚乙二醇IFN- α 2a，聚乙二醇IFN- α 2b，拉米夫定(lamivudine, LAM)，阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)，恩替卡韦(entecavir, ETV)，替比夫定(telbivudine, LdT)，替诺福韦酯((tenofovир disoproxil fumarate, TDF)；

所述的免疫调节药物选自重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子，如GM-CSF；

所述的重组乙肝疫苗为基因工程乙肝疫苗，如亚单位蛋白质疫苗；

20 本发明采用下述技术实施方，通过基因工程技术将干扰素基因在大肠杆菌或酵母系统中进行表达出蛋白质，提取纯化后与辅料配伍制成抗病毒药物IFN- α （一型干扰素），通过基因工程技术将人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子基因酵母系统中进行表达出蛋白质，提取纯化后与辅料配伍制成免疫调节药物为rhGM-CSF（重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子），通过基因工程技术将人乙肝抗原基因在酵母系统中进行表达出蛋白质，提取纯化后与佐剂配伍制成重组
25 乙肝表面抗原疫苗。

本发明的药物复合物中的 α -IFN、核苷类等抗病毒药物均为已上市的常用抗病毒药。

30 本发明的药物复合物中，抗病毒药物的用量采用临床常规用药剂量（可参照《慢性乙型肝炎防治指南》）；基因工程乙型肝炎疫苗与重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的质量配比为1：1~30。

本发明中，抗病毒药物用量和用法参照了《慢性乙型肝炎防治指南》，例如，

1. 普通IFN- α 3~5 MU（可根据患者的耐受情况适当调整剂量），每周3次或隔日1次，皮下注射，一般疗程为6个月。
- 35 2. 聚乙二醇IFN- α 2a 180 μ g，每周1次，皮下注射，疗程1年。
3. 聚乙二醇IFN- α 2b 1.0~1.5 μ g/kg，每周1次，皮下注射，疗程1年。
4. 拉米夫定(lamivudine, LAM)，每日1次口服100 mg拉米夫定。

5. 阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV), 阿德福韦酯10 mg, 每日1次口服。

6. 恩替卡韦(entecavir, ETV): 恩替卡韦0.5 mg, 每日1次口服。

7. 替比夫定(telbivudine, LdT): 替比夫定600 mg, 每日1次口服。

5 8. 替诺福韦酯((tenоfovir disoproxil fumarate, TDF): TDF与阿德福韦酯结构相似, 但肾毒性较小, 治疗剂量为每日300mg(本药在我国尚未被批准上市)。

10 本发明的药物复合物中的抗病毒药物, 免疫调节药物和重组乙肝疫苗采用混合物形式给药, 或分别给予的方式给药, 其给药方式采用皮下或肌肉注射的方式; 或分别口服加注射的形式给药, 或给予不同时间的先后次序形式给药, 如, 采用抗病毒药物给药在基因工程乙肝疫苗给药前; 或采用重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子给药在基因工程乙肝疫苗给药前。

具体地, 另一方面, 本发明公开了:

15 抗病毒药物(干扰素、核酸类药物等)和免疫调节药物(重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)、重组乙肝疫苗在制备治疗乙型肝炎药物中的用途; 尤其在制备治疗慢性乙型肝炎药物中的用途;

所述的用途中, 抗病毒药物在基因工程乙肝疫苗给药前给药;

20 所述的用途中, 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子在基因工程乙肝疫苗给药前给药;

抗病毒用药剂量参照《慢性乙型肝炎防治指南》; 基因工程乙型肝炎疫苗与重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的质量配比为1: 1~30。

25 本发明的药物复合物进行了抗病毒免疫实验, 结果表明, 用于治疗乙肝持续性病毒感染, 其中的 α -IFN、核苷(酸)类药物降低机体内的病毒载量; GM-CSF等具有免疫增强作用的细胞因子为佐剂的乙肝疫苗, 使机体建立有效的免疫记忆保护反应, 能产生强力的抗体保护和细胞免疫, 清除病毒以及防止感染。在本发明的一个实施例中, 采用重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和基因工程乙型肝炎疫苗不同的联合免疫方式进行了大量实验, 结果显示, 注射乙肝疫苗30 前3天原位注射重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(2~30ug/只/天)后, 再进行基因工程乙肝疫苗免疫(1ug/只)能有效促进动物树突细胞成熟, 显著增强动物的细胞免疫水平, 提高抗体水平, 促进TH1型细胞因子, 促进IgG2a类抗体产生, 增强T细胞增殖能力和细胞毒T细胞(CTL)功能。

35 在本发明的另一个实施例中, 在慢性乙肝转移基因小鼠动物模型中, 注射乙肝疫苗前3天原位注射重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(2~30ug/只/天)后, 再进行基因工程乙肝疫苗免疫(1ug/只)能有效打破小鼠的免疫耐受, 产生较高的抗乙肝病毒抗体水平, 增强了细胞免疫能力, 有效的清除了小鼠表达

乙肝抗原的肝脏细胞。而同时注射注射重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（2~30ug/只）与基因工程乙肝疫苗（1ug/只），不能较好的打破小鼠对乙肝抗原的免疫耐受。

在本发明的另一个实施例中，将抗病毒药物（重组人一型干扰素）与重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、重组乙肝疫苗配伍联合使用，在乙肝疫苗注射前（4~0天）注射抗病毒药物，乙肝疫苗前3天原位注射重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（2~30ug/只/天）后，再进行基因工程乙肝疫苗免疫（1ug/只）同样可以诱导较高的细胞免疫反应，促进T细胞的增殖能力。

本发明还提供一种用于治疗已经被乙肝和艾滋病病毒感染的病人的乙肝和艾滋病的疫苗复合物，该疫苗复合物包含有抗病毒药物、免疫调节剂和乙肝疫苗。

附图说明

图1. 显示实施例1中，通过定量ELISA法，A，检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫的总IgG，及检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫的IgG亚型比例， B，显示实施例1中重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫增强免疫反应的T淋巴细胞扩增的检测结果， C，显示实施例1中流式细胞仪检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫增强免疫反应后的体内CTL反应。

图2. 显示实施例1中流式细胞仪检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫增强乙肝疫苗免疫反应的IFN- γ 、IL-4在CD4 T细胞中，和IFN- γ 在CD8 T细胞中表达结果。

图3. 显示实施例2中检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫打破乙肝表面抗原转基因小鼠免疫耐受后乙肝表面抗原抗体的变化情况以及转基因小鼠体内乙肝表面抗原下降情况。

图4. A, 显示实施例2中流式细胞仪检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫打破乙肝表面抗原转基因小鼠免疫耐受后IL-10、IFN- γ 在CD4和CD8T细胞中的表达情况；B，显示实施例2中在乙肝表面抗原转基因小鼠总进行重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫后增强乙肝疫苗免疫反应DTH的检测结果。

图5. 显示实施例2中流式细胞仪检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫打破乙肝表面抗原转基因小鼠免疫耐受后，清除乙肝抗原转基因小鼠肝脏表面的乙肝表面抗原的组化染色情况，以及经过治疗后转基因小鼠肝脏内表达乙肝抗原的肝细胞的平均光密度值。

图6. A, 显示ELISA方法检测实施例3中抗病毒药物IFN-a2a了、重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫增强乙肝疫苗免疫反应检测重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫的总IgG；B，显示实施例3中抗病毒药物IFN-a2a了、重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫增

强免疫反应的T淋巴细胞扩增的检测结果；显示实施例3中流式细胞仪检测抗病毒药物IFN- α 2a了、重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子联合乙肝疫苗免疫增强乙肝疫苗免疫反应的IFN- γ 、IL-17在CD4⁺ T细胞中表达结果。

图7是实施例5的HBsAg水平下降情况，其中纵坐标为HBsAg水平，IU/ml；横坐标为各时间点，2012年5月—2013年3月。

实施发明的最佳方式

下述实施例对本发明做更详细的说明，它们并不构成对本发明的限制。下述实施例中的实验方法，如无特别说明，均为常规方法。下述实施例中的百分含量，如无特别说明，均为质量百分含量。

除非特别说明，本发明实施例中的实验数据均为各组中每只小鼠得到的数值的平均值。

实施例 1：GM-CSF 联合重组乙肝疫苗免疫策略增强 C57BL/6 对重组乙肝亚单位疫苗的免疫反应

材料与仪器：

实验材料：基因工程(CHO)乙型肝炎疫苗[Recombinant Hepatitis B Vaccine (CHO)]，10ug/1.0 mL，注射用重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子[Recombinant Human Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor for Injection]，300ug/支，CHO 表达的基因工程乙肝疫苗原液(HBsAg 原液)均由华北制药集团金坦生物技术有限公司提供。

主要试剂盒仪器：RPMI 1640 培养液(WISENT 公司)；胎牛血清(天津市灏洋生物制品有限公司)；小鼠抗兔 IgG 抗体：购于 Sigma，HRP 标记抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a，购于 Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA。红细胞裂解液：8.29g NH₄Cl，1g KHC0₃，37.2mg Na₂EDTA，加去离子水到 800 mL，调节 PH 值到 7.2-7.4，加去离子水到 1000 mL，过滤除菌，室温保存。玻璃棉柱：将玻璃棉装入一次性的 1mL 注射器中制成分离 T 淋巴细胞用的玻璃棉柱。MTT：将购买的 MTT 粉末溶于 PBS 后(浓度为 5mg/mL 即 0.5%MTT)过滤除菌，-20℃避光保存。ConA：将 ConA 粉末溶解于无血清的 RPMI1640 培养基中，浓度为 60 μ g/mL。荧光标记单克隆抗体：常用的有 FITC、PE、APC 标记的单克隆抗体，购自 BD、eBioscience、BioLegend 公司；封闭抗体：抗 Fc 受体抗体 免疫细胞表面一般表达有 Fc 受体，能和抗体的 Fc 段结合。封闭抗体的作用就是阻断荧光标记的单克隆抗体的 Fc 段与免疫细胞表面 Fc 受体结合所产生的非特异性的结果；固定剂：4%的多聚甲醛 PBS 溶液；破膜剂：1%皂素；乙肝表面抗原 CD8 体外 CTL 刺激多肽由上海吉尔生化公司合成。乙肝表面抗体诊断试剂盒及乙肝表面抗体标准品购自北京金豪制药股份有限公司。离心机：Eppendorf 产品；流式细胞仪：FACScalibur，美国 BD Bioscience 制造。

实验动物及免疫：实验动物及免疫：C57BL/6 小鼠，SPF 级，6-8 周龄雌性，体重 16-18g，购于中国医学科学院实验动物研究所。分 4 组，每组 6 只小鼠，

实验分组见下表。每组疫苗或 GM-CSF 溶解在生理盐水中，每只小鼠注射 100 微升，每只小鼠颈部皮下注射进行免疫，第一次免疫后 14 天加强免疫一次。

实验免疫组别设计

实验分组	疫苗	GM-CSF
1. Naïve	0 g	
2. HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	0 g
3. 3GM-CSF+HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	1 g GM-CSF (-3、-2、-1day)
4. HBV+GM-CSF	1 g HBV vaccine (0 day)	1 g GM-CSF (0day)

小鼠血清收集：灭菌的毛细玻璃针，收集小鼠眼底动脉血样约 200-300 μ L 至无菌微量离心管中，室温静置 30min，置 4℃ 2h，5000rpm，离心 10min，收集上清，-20℃ 保存备用。

ELISA 检测血清中总 IgG 滴度：

- (1) 抗原包被：以 1 μ g/ml 抗原包被 96 孔酶标板，100 μ l/孔，4℃ 过夜；
- (2) 封闭：PBST (0.05% Tween20 溶于 PBS) 洗涤 3 次，每次 5min，5% 脱脂奶粉，100 μ l/孔，37℃ 封闭 1 h；
- (3) 加血清：PBST 洗涤 3 次，每次 5min，将小鼠血清做 2 倍梯度稀释，以未免疫的小鼠血清作对照，100 μ l/孔，37℃ 孵育 1 h；
- (4) 加二抗：PBST 洗涤 3 次，每次 5min，加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1000)，100 μ l/孔，37℃ 孵育 1 h；
- (5) 显色：PBST 洗涤 3 次，每次 5min，加底物 TMB 显色，100 μ l/孔，37℃ 避光显色 15min；
- (6) 终止：加入 0.2M 硫酸终止显色，50 μ l/孔；
- (7) 读数：OD 450nm/620 nm 处测光密度值。实验孔的 OD 值为对照孔的两倍时认为是阳性。

ELISA 检测血清中 IgG1 和 IgG2a 浓度

- (1) 抗原包被：以 2 μ g/ml 兔的 IgG 和 1 μ g/ml VP1 抗原包被 96 孔酶标板，100 μ l/孔，4℃ 过夜；
- (2) 封闭：PBST (0.05% Tween20 溶于 PBS) 洗涤 3 次，每次 5min，3%BSA，100 μ l/孔，37℃ 封闭 1 h。
- (3) 加血清：PBST 洗涤 3 次，每次 5min，将小鼠抗兔 IgG 从 20ng/ml 按 2 倍稀释 10 个梯度，将小鼠血清按 1:100 倍稀释，每个设 3 个重复孔，100 μ l/孔，37℃ 孵育 1 h。
- (4) 加二抗：PBST 洗涤 3 次，每次 5min，加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 1 和 IgG2a (1:1000)，100 μ l/孔，37℃ 孵育 1 h。

(5) 显色: PBST 洗涤 3 次, 每次 5min, 加底物 TMB 显色, 100 μ l/孔, 37°C 避光显色 15min;

(6) 终止: 加入 0.2M 硫酸终止显色, 100 μ l/孔。

(7) 读数: OD 450nm/620 nm 处测光密度值。实验孔的 OD 值为对照孔的两倍时认为是阳性。

(8) 做出标准曲线, 计算出抗体含量。

T 细胞增殖实验:

用MTT 法检测小鼠T 细胞体外增殖活性

- (1) 实验中用到的所有物品均需提前灭菌。
- (2) 脱臼处死小鼠, 用70%乙醇浸泡15 分钟。
- (3) 在提前紫外灯灭菌20 分钟的超净工作台中, 无菌条件下取出小鼠脾脏于提前加有2ml RPMI1640 培养液的细胞培养皿中。
- (4) 将铜网灼烧后降温放入平皿中, 利用无菌注射器将脾脏磨碎, 制成细胞悬浮液, 并过滤到13ml 细胞离心管内。
- (5) 将离心管口用封口膜封好, 离心2000 转, 10 分钟。
- (6) 弃上层培养液, 加2~3ml 红细胞裂解液, 悬浮细胞, 裂解2 分钟后, 加等体积RPMI1640培养基 (或胎牛血清) 中止反应, 将离心管口用封口膜封好, 离心2000 转, 10 分钟。
- (7) 弃上层培养液, 加3~4ml RPMI1640 (含2%胎牛血清) 培养基悬浮细胞。
- (8) 用玻璃棉37°C 慢慢滤过细胞, 保证细胞充分和玻璃棉结合以除去B 细胞。
- (9) 用血球计数板细胞计数。
- (10) 用RPMI1640 (含2%胎牛血清) 培养基调整细胞浓度至 $3\sim 4\times 10^6$ 个/ml。
- (11) 将调整好浓度的细胞加入96 孔板, 每孔100 μ l。
- (12) 将抗原过滤除菌, 稀释一定倍数后每孔加刺激物20 μ l (刺激物终浓度为: ConA 10 μ g/ml, 5 μ g/ml, BSA/OVA 2 μ g/ml, 抗原刺激物可以按不同浓度稀释加样。), 并设有只有细胞不加刺激物的对照孔, 和只有培养基的本底孔。
- (13) 将细胞放入细胞培养箱, 37°C, 5% CO₂ 培养48~72 小时后, 用MTT 法进行显色, (每孔加20 μ lMTT 显色液, 3~4 小时后读数) 实验组OD-培养本底OD
- (14) 然后吸掉上清, 每孔加入150 μ l二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解。用酶标仪 (Magellan, Tecan Austria GmbH) 测定490nm 的OD 值。
- (15)。结果计算: 刺激指数 SI = (各刺激孔的 OD 值 - 培养基 OD 值) / (未刺激孔的 OD 值 - 培养基 OD 值)。

表面及胞内染色实验方法:

(1) 从小鼠分离得到纯的T 细胞, 在10%的培养基中并稀释成 1×10^7 /mL 个

细胞。

(2) 往96 细胞板里加100uL, 同时加入终浓度为10ug/mL 的短肽, 同时可以加入共刺激信号终浓度10ug/mL CD28 的单抗, 混匀后, 37℃, 5%二氧化碳培养。

5 (3) 刺激4-6 小时后加2 ul /孔的monensin 蛋白转运抑制剂。

(4) monensin 拟制2 小时后, 用2mL 的PBS 2000rpm 离心5 分钟, 将细胞重悬于100-200uL的PBS 中, 按照1ug/106 细胞的用量加入纯化的FcII/III 受体的抗体 (CD16/32, 消除非特异性的结合染色, 冰浴上孵育15-20 分钟, 用2mL 的PBS 2000rpm 离心5 分钟。

10 (5) 将细胞重悬200 ul 的加4%的多聚甲醛PBS 溶液, 室温孵育10-15 分钟, 用2mL 的PBS 2000rpm 离心5 分钟。;

(6) 将细胞重悬200 ul 的加0.1%的皂素, 4℃ 孵育10 分钟, 用2mL 的PBS 2000rpm 离心5 分钟。

(7) 进行表面分子和细胞内细胞因子的染色

15 根据说明书同时加入适量的两种荧光抗体, 冰浴上孵育 20-30 分钟, 用 2mL 的 PBS 2000rpm 离心 5 分钟, 将细胞重悬于 300UL 的 PBS 中, 将细胞悬液用铜网过滤入 FACS 专用管中, 准备进行仪器检测和分析。

体内 CTL 实验方法:

取Naïve 小鼠, 破红细胞后分离得到脾脏淋巴细胞。

20 (1) 将脾细胞等分成二份于两个培养皿中, 一份孵育50 g T 细胞表位的肽段, 一份不孵育肽, 每皿的体积为1-2mL, 37C, 5% CO2 培养4 小时 (此步可以根据实验组的多少适当增加靶细胞数目)。

(2) 4 小时后将细胞转入15mL 的细胞管中, 3000rpm 离心5 分钟。

25 (3) 将没有孵育小肽的靶细胞用低浓度的CFSE (0.5uM) 染色, 孵育小肽靶细胞用高浓度的CFSE (5uM) 染色, 37C 避光轻摇染色15 分钟。

(4) 染色后用等体积的胎牛血清终止反应, 3000rpm 离心5 分钟, 弃上清, 用10mL 的PBS洗3 次。

(5) 将低浓度和高浓度染色的靶细胞等体积的混合, 按每只小鼠 2×10^7 个细胞由尾静脉注射回实验组小鼠体内, 进行体内细胞毒反应。

30 (6) 注射4小时后, 处死实验小鼠, 避光分离得到脾细胞。

(7) 铜网过滤后转入 FACS 专用管中, 准备进行仪器检测和分析。

实验结果用t-检验进统计学分析, $p < 0.05$ 差异显著, $p < 0.01$ 差异极显著。

实验结果:

35 1、为了检测是否 GM-CSF 能够影响 HBV 疫苗的体液反应, GM-CSF 进行提前或同时与 HBV 疫苗注射, 加强免疫后第七天, 检测了血清中抗 HBsAg 总 IgG 抗体, 与只注射了 HBV 的小组相比, 注射了 GM-CSF 的小组总 IgG 水平显著增强 (图 1-A);

在免疫前 3 天注射 GM-CSF 的小组, IgG2a 水平显著提高 ($p < 0.05$); 相反, 若 GM-CSF 与 HBV 同时注射时, IgG1 水平显著提高(图 2-1B); 数据表明 GM-CSF 的预处理可以增强 Th1 反应, 而 GM-CSF 与疫苗同时注射能够增强 Th2 反应。

2、不同时间注射 GM-CSF 对乙型肝炎疫苗 T 细胞水平的影响

5 进一步观察是否 GM-CSF 会影响 T 细胞反应, 在加强免疫后一周, 无菌取小鼠的脾脏细胞, rHBsAg 抗原来刺激 T 细胞增殖, 用 BSA 作为非特异性抗原对照, 用 ConA 作为阳性对照, 用培养基作为阴性对照, 结果表明在预注射 GM-CSF 组中增殖反应显著提高, 而在 GM-CSF, HBV 同时注射的小组中增殖反应水平低下(图 1-B), 表明了 GM-CSF 预处理能够促进抗原特异性 T 细胞反应。

10 3、不同时间注射 GM-CSF 对乙型肝炎疫苗体内 CTL 水平的影响

了解不同时间注射 GM-CSF 对 CTL 反应的影响, 在第二次免后 7 天, 通过流式细胞仪检测 CTL 反应, 如图 1-C 所示, GM-CSF 预处理组对靶细胞特异性的杀伤率为 30.01%, 明显高于单独免疫核酸疫苗组的杀伤率为 10.26%, 而 HBV 与 GM-CSF 同时注射的组的杀伤率为 13.6%, 结果证明 GM-CSF 预处理组能够增强体内 CTL 反应水平, 而 HBV 与 GM-CSF 同时注射组没有明显的变化。

15 4、不同时间注射 GM-CSF 对乙型肝炎疫苗细胞因子水平的影响

细胞因子可以调节细胞分化、增殖和诱导细胞发挥相应功能, 在调节免疫反应中起重要的作用, 本实验通过胞内细胞因子染色的方法检测 CD4⁺ T 细胞中抗原特异 IL-4, IFN- γ 和 CD8⁺ T 细胞中抗原特异 IFN- γ 的表达水平, 如图 2 所示, GM-CSF 20 预处理组比只用 HBV 注射组的 IL-4, IFN- γ (CD4 细胞中) 水平和 IFN- γ (CD8 细胞中) 水平都显著提高, 然而, HBV 与 GM-CSF 同时注射的组中 IFN- γ 表达水平没有增强, 只有 IL-4 水平比对照组有所提高, 这表明 GM-CSF 预处理组能够同时提高 Th-1 和 Th-2 细胞因子的表达水平, 而 GM-CSF 与 HBV 疫苗同时注射只能诱导 Th-2 型细胞因子的表达。

25

实施例 2: GM-CSF 联合重组乙肝疫苗免疫策略打破 HBsAg 转基因小鼠免疫耐受诱导转基因小鼠抗乙肝表面抗原体液免疫应答

材料与仪器:

30 HBsAg 转基因小鼠 (C57BL / 6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri / Jf4J) 购自复旦大学附属上海市公共卫生临床中心。“乙型肝炎表面抗原酶联免疫法诊断试剂盒”及乙肝表面抗原标准品购自北京金豪制药股份有限公司。其他实验材料、主要试剂和仪器同实施例 1。

试验方法:

动物分组及免疫方法:

35 HBsAg 转基因小鼠 (C57BL / 6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri / Jf4J) 35 只 (初始血清 HBsAg 浓度为 5000-10000pg/ml), 随机分为 5 组, 每组 7 只, 实验分组按下表免疫实验组别设计; 每组疫苗或 GM-CSF 溶解在生理盐水中, 每只小鼠注射 100

微升，每只小鼠颈部皮下注射进行免疫，各组小鼠免疫 4 次，前三次每次间隔 14 天，第四次免疫与第三次免疫间隔 8 周，每两周对小鼠进行眼眶采血，并用 ELISA 方法检测转基因小鼠血清中的乙肝表面抗原及抗乙肝表面抗原抗体浓度。

免疫实验组别设计

实验分组	疫苗	GM-CSF
Naïve	0 g	
HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	0 g
3GM-CSF+HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	1 g GM-CSF (-3、-2、-1day)
30GM-CSF+ HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	1 g GM-CSF (0day)
10GM-CSF+ HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	1 g GM-CSF (0day)

5 乙肝表面抗原诊断试剂盒检测 HBVs 抗原转基因小鼠血清 HBVs 抗原：

1. 抗原标准品 (2mg/mL) 稀释：从 10^6 开始做 2 倍梯度稀释。

取 2uL AG 用 PBS 稀释到 20uL (10x)，取 10uL 用 PBS 稀释到 1mL (100x 2ug)，取 500u 用 PBS1 稀释至 1mL (2x 1ug)，继续 2 倍稀释 14 次。取最后 7 次稀释和 PBS 组做 8 点的标准曲线。

10 2. 血清稀释：10x, 50x, 100x 每个样品做 3 个副孔

3. 根据实验要求，选择一定量的反应条，每孔加入稀释好的样本 75uL，留阴性对照，阳性对照，空白各一孔。

4. 用封片纸封好，37℃ 孵育 60min。

5. 取出反应板，死去封片，各孔加入 50uL 酶底物复合物。震荡 10s，封片纸封好 37℃ 孵育 30min

15

6. 取出反应板死去封片纸，洗涤 5 次。拍干。

7. 将显色液 A、B 1:1 配好，每孔加入 100 混匀的显色液，震荡 10s，37℃ 孵育 30min。

8. 每孔加入 50uL 终止液，震荡混匀，用酶标仪度数，波长 450nm，参考波长 630nm。

20

乙肝表面抗体诊断试剂盒检测 HBVs 抗原转基因小鼠血清 HBVs 抗体

1. 抗体标准品 (40mIU) 稀释：从原液开始做 2 倍梯度稀释。稀释 7 次，加 PBS 组做 8 点的标准曲线；

2. 血清稀释：10x, 50x, 100x 每个样品做 3 个副孔；

25

3. 根据实验要求，选择一定量的反应条，每孔加入稀释好的样本 50uL，留阴性对照，阳性对照，空白各一孔。各孔加入 50uL 酶底物复合物。震荡 10s，封片纸封好 37℃ 孵育 30min；

4. 取出反应板死去封片纸，洗涤 5 次。拍干；
5. 将显色液 A、B 1:1 配好，每孔加入 100 混匀的显色液，震荡 10s，37℃ 孵育 30min；
6. 每孔加入 50ul 终止液，震荡混匀，用酶标仪度数，波长 450nm，参考波长 630nm。

实验结果用 t-检验进行统计学分析， $p < 0.05$ 差异显著， $p < 0.01$ 差异极显著。

实验结果：

1. 检测是否 GM-CSF 联合重组乙肝疫苗免疫策略能打破 HBsAg 转基因小鼠免疫耐并受诱导转基因小鼠抗乙肝表面抗原体液免疫应答，GM-CSF 进行提前或同时与 HBV 疫苗注射，每隔两周，检测小鼠血清中 HBsAg 浓度及抗 HBsAg 总 IgG 抗体，和只注射了 HBV 的小组相比，3GM-CSF+HBV 的小组总 IgG 水平显著增强(如图 3 所示)，在第四次免疫后六周，前 3 天注射 GM-CSF 的小组（3GM-CSF+HBV），乙肝病毒表面抗原水平显著下降（ $p < 0.05$ ），结果说明 3GM-CSF+HBV 组即前 3 天注射 GM-CSF 的小组可以打破转基因小鼠免疫耐并受诱导转基因小鼠抗乙肝表面抗原体液免疫应答，进而使乙肝病毒表面抗原水平保持较低状态，。而单纯注射 HBV 疫苗组以及 GM-CSF 与 HBV 疫苗同时注射组都没有促进抗乙肝表面抗原抗体显著升高。

实施例 3：GM-CSF 联合重组乙肝疫苗免疫策略打破 HBsAg 转基因小鼠免疫耐并受诱导转基因小鼠抗乙肝病毒表面抗原细胞免疫应答并清除肝脏中乙肝病毒表面抗原

材料与仪器：

HBsAg 转基因小鼠（C57BL / 6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri / Jf4J）购自复旦大学附属上海市公共卫生临床中心。乙肝表面 S 抗原免疫组化一抗、二抗购自上海长岛生物技术有限公司。其他实验材料、主要试剂和仪器同实施例 1。

动物分组及免疫方法：

HBsAg 转基因小鼠（C57BL / 6J-Tg (Alb1HBV) 44Bri / Jf4J）35 只（初始血清 HBsAg 浓度为 5000-10000pg/ml），随机分为 5 组，每组 5 只，实验分组见下表。每组疫苗或 GM-CSF 溶解在生理盐水中，每只小鼠注射 100 微升，每只小鼠颈部皮下注射进行免疫，各组小鼠免疫 3 次，每次间隔 14 天，第三次免疫后 12 天，进行迟发型超敏反应检测，第三次免疫后 15 天处死小鼠，分离脾细胞检测并取肝脏进行免疫组化实验。

免疫实验组别设计

实验分组	疫苗	GM-CSF
Naïve	0 g	
HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	0 g

GM-CSF	0 g	~ 1 g GM-CSF (0day)
3xGM-CSF+HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	~ 1 g GM-CSF (-3、-2、-1day)
30GM-CSF+ HBV	1 g HBV vaccine (0 day)	~ g GM-CSF (0day)

迟发型超敏反应检测:

在第三次免疫后12天,所有的实验组和对照组均被右脚垫注射rHBsAg抗原(2 μ g),左脚垫注射生理盐水。24小时,48小时,72小时分别采用游标卡尺检测脚垫厚度,按如下公式计算:肿胀厚度(mm)=右脚厚度(mm)-左脚厚度(mm),肿胀厚度的高低代表迟发型超敏反应水平(DTH)的高低。

流式细胞仪检测细胞因子表达水平:同实施例1。

组织学检测:

在最后一次免疫后14天将HBsAg转基因小鼠麻醉处理,制作肝脏组织固定、包埋和切片,分别进行H&E染色和免疫组织化学实验,免疫组织化学实验中采用的抗体为有抗HBsAg的抗体。

制备组织切片:

(1) 取样:麻醉处死转基因小鼠后,取出小鼠的肝脏组织;
(2) 固定:将肝脏组织块迅速放入配制好的Bouin 固定液中;
(3) 脱水、透明:用由低到高浓度的酒精,脱去组织中的水分;
(4) 浸蜡:
蜡 I 56°C-58°C 用时约1hrs; 蜡 II 56°C-58°C 用时约1hrs; 蜡 III 56°C-58°C 用时约1-2hrs;

(5) 包埋:将组织块放入预先叠好的小纸盒中,加入蜡;
(6) 修理蜡块:将蜡块修理成梯形,有利于蜡带的形成;
(7) 切片:切片厚度约8-10 μ m;
(8) 展片:将蜡带放入水浴展片机,调整温度为38度,待蜡带已经展开的时候,用载玻片将蜡带捞上来,在显微镜下观察,已确定选取组织形态;
(9) 烤片:展片后尽快放入大于41°C不高于50°C 温箱烘烤至少4个小时,使组织块与玻片牢固粘合。

组织切片的免疫组化:

(1) 将组织形态比较好的组织切片进行梯度酒精复水,用PBS (0.01 M; pH 7.4) 浸泡三次,每次5 分钟;
(2) 抗原修复:切片放入盛有柠檬酸缓冲液的容器中,置微波炉内高火加热5min $\times$ 3,如液体损失,需补入热蒸馏水;
(3) 用封闭用血清或BSA 在37°C的烘箱内封闭至少1 小时 ;
(4) 倾去血清,勿洗,切片上覆盖适当比例稀释的一抗;27°C封闭1 小时

或4℃过夜；

(5) PBS 冲洗3 次，每次5min；

(6) 滴加适当比例稀释的生物素标记二抗（1%BSA-PBS 稀释），27℃孵育30～40min；

5 (7) PBS 冲洗3 次，每次5min；

(8) 滴加适当比例稀释的三抗，27℃孵育30min；

(9) 碱性磷酸酶显色；显色需要在避光条件下进行；AP 显色结果阳性应为特异性的红色；

(10) 自来水冲洗；

10 (11) 复染：染色流程为苏木精染色1～3min，弱酸液（可在蒸馏水中滴加1～2 滴1M 的盐酸即可）进行返蓝处理1min，自来水冲洗3min 即可。伊红染色直接进行，染色1min 即可完成；

(12) 脱水封片，通风橱中干燥后观察组织形态；

15 将切片存放到切片盒中，观察与照相注意合适的比例尺，色泽的调整以及适当阳性结果的选择。

实验结果用t-检验进行统计学分析， $p < 0.05$ 差异显著， $p < 0.01$ 差异极显著。

实验结果：

1, GM-CSF联合重组乙肝疫苗免疫增强了乙肝表面抗原转基因小鼠迟发型超敏反应水平：迟发型超敏反应是主要由T 细胞介导的一种免疫反应，为了进一步确
20 GM-CSF联合重组乙肝疫苗免疫策略在体内诱导了强烈的细胞免疫水平，利用迟发型超敏反应水平来作为体内指标，根据实验分组进行免疫，三次免疫HBsAg转基因小鼠（C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri / Jf4J ）后12 天，所有的实验组和对照组均被右脚垫注射rHBsAg 抗原，左脚垫注射生理盐水，24 小时，48 小时，72 小时分别检测脚垫厚度，图4-B 中可以看出只免疫乙肝疫苗组的DTH 水平比对照组较高，而
25 GM-CSF联合重组乙肝疫苗免疫策略组（3*GM-CSF+HBV和30ug GM-CSF+HBV组）的DTH 水平比单独注射HBV疫苗要显著增强，说明GM-CSF联合重组乙肝疫苗免疫策略组（3*GM-CSF+HBV和30ug GM-CSF+HBV组）在体内诱导了强烈的细胞免疫水平。

2, GM-CSF联合重组乙肝疫苗免疫策略增强了CD8+ T 细胞介导的DTH，可能会提高杀伤性CD8+ T 细胞的活性，分泌IFN- γ 的CD8+ T 细胞（Tc1）和分泌IL-17 的
30 CD8+ T 细胞（Tc17）是两群关键的杀伤性CD8+ T 细胞，本实验进一步检测了免疫后小鼠CD8+ T 细胞的IFN- γ 和IL-17 表达情况，三次免疫后15 天，无菌取出脾脏，制备单细胞悬液，进行体外的乙肝表面抗原CD8+ T 细胞表位多肽的孵育，培养6 小时后，进行胞内细胞因子染色，流式细胞仪分析细胞亚群的变化，图4-A中可以看出GM-CSF联合重组乙肝疫苗免疫策略能够促进CD4+T细胞、CD8+T 细胞分泌IFN- γ
35 和IL-17 的水平，而3*GM-CSF+HBV免疫策略更多的是诱导Th1、Tc1的免疫反应，30ug GM-CSF混合HBV免疫策略更多是诱导Th17、Tc17的免疫反应。

3, 在最后一次免疫后14 天麻醉处理HBsAg 转基因小鼠, 进行肝脏组织固定、包埋和切片, 分别进行H&E染色和免疫组织化学实验, 图5为乙肝病毒表面抗原转基因小鼠肝脏的乙肝病毒表面原免疫组化照片及图片光密度统计图, 可以看出3*GM-CSF+HBV免疫策略下的转基因小鼠的肝脏中的乙肝表面抗原得到了非常显著的清除, 而30ug GM-CSF混合HBV免疫策略组虽然肝脏中乙肝病毒表面抗原有所下降, 但没有3*GM-CSF+HBV免疫策略清除显著, 结果显示, 由于GM-CSF+HBV免疫打破了乙肝病毒表面抗原转基因小鼠的免疫耐受, 诱导乙肝病毒表面抗原转基因小鼠产生了强烈的体液免疫及细胞免疫反应, 有效的清除了血清中及肝脏中乙肝病毒表面抗原。

10

实施例 4: 不同时间注射一型干扰素对 GM-CSF 联合重组乙肝疫苗免疫策略的影响

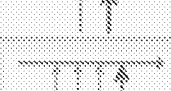
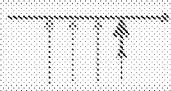
材料与仪器: 重组人干扰素 α 1b 注射液购自北京三元基因工程有限公司, 50ug/1ml/支。其他实验材料、主要试剂和仪器同实施例 1、2、3。

15

实验动物及免疫: 实验动物及免疫: C57BL/6 小鼠, SPF 级, 6-8 周龄雌性, 体重 16-18g, 购于中国医学科学院实验动物研究所, 分 8 组, 每组 6 只小鼠, 实验分组如表 1 所示; 每组疫苗或 GM-CSF 溶解在生理盐水中, 每只小鼠注射 100 微升, 每只小鼠颈部皮下注射进行免疫, 第一次免疫后 14 天加强免疫一次, 按照实验分组干扰素每只颈部皮下注射 5×10^4 U;

20

表 1 实验免疫组别设计

	GROUPS	GMCSF	IFN- α	HBV vaccine	Mouse
A	NAIVE	-	-	-	6
B	HBV	-	-	1ug	6
C		10ug/d X3d	5×10^4 U	1ug	6
D		30ug/d X1d	5×10^4 U	1ug	6
E		-	5×10^4 U	1ug	6
F		10ug/d X3d	-	1ug	6
G		30ugX1d	-	1ug	6
H		30ug/d X1d	5×10^4 U	1ug	6

 IFN- α
 GMCSF
 HBV vaccine

乙肝表面抗原 ELISA 抗体检测、T 细胞增殖实验、T 细胞细胞因子流式细胞仪检测方法均参照实施例 1。

CFSE 法测 T 细胞增殖：

1. 常规处理小鼠，在 75%乙醇中浸泡 5-10min；
- 5 2. 取小鼠脾脏，加 600ul PBS 或 1640 培养基，磨碎，铜网过滤大块组织，1500rpm 离心 3min，弃上清；
3. RBC 裂解红细胞：每管加入 700ul RBC 裂解细胞 2min（严格控制裂解时间），加入 700ul FBS 终止裂解，1500rpm 离心 3min 弃上清，用 1ml 1640 或 PBS 重悬细胞；
- 10 4. 细胞计数，调整细胞浓度为 1×10^7 /ml；
5. 取 500ul 重悬的细胞，取 500ul PBS 加入 1ul 1mM 的 CFSE，将 CFSE 溶液加入细胞中，充分混匀，颠倒十次；摇床 37℃ 避光染色 10min，加入 500ul FBS 终止染色，2000rpm 离心 3min，加入 15% FBS 血清的 1640 或 PBS 洗 3 次；
- 15 6. 细胞计数，用完全培养基调整细胞浓度为 1×10^7 /ml，充分混匀细胞；
7. 将细胞分在 96 孔板中，每孔 50ul 细胞（ 5×10^5 细胞/孔）每组 3 个平行；
8. 加入刺激物：用完全培养基将刺激物配成浓度为终浓度 2 倍的培养基溶液，（50ul 里含有 0.1ul PMA=0.2ug/ml, 0.1ul 离子霉素=2ug/ml）（antiCD3 终浓度为 2ug/ml antiCD28 终浓度为 0.1ug/ml），抗原刺激物为 10ug/ml；
- 20 9. 37℃ 培养 72 小时，流式检测，可以在检测前染 CD8 抗体。

实验结果用 t-检验进行统计学分析， $p < 0.05$ 差异显著， $p < 0.01$ 差异极显著；

实验结果显示：

1. 第二次免疫后 14 天通过乙肝表面抗体 ELISA 检测发现（见图 6-A），在 HBV 疫苗注射前一天注射 IFN- α 1b 与对照组相比可显著降低抗乙肝病毒表面抗原抗体水平，特别是 IFN- α 1b 与乙肝疫苗混合注射组体液免疫水平得到了显著抑制，说明在乙肝疫苗注射前一天或混合乙肝疫苗注射一型干扰素，会影响乙肝疫苗的体液免疫水平。
- 25 2. 通过 CFSE 法体细胞增殖实验（图 6-B）以及 CD4+T 细胞 IFN- γ 、IL-17 胞内染色流式细胞仪检测（图 6-C），发现干扰素对 GM-CSF 联合重组乙肝疫苗免疫诱导

30 的 CD8 细胞的免疫反应影响不显著。

实施例 5：抗病毒药物、干扰素、GM-CSF 联合乙肝疫苗免疫策略对慢性乙肝病人的临床治疗效果评估

- 患者，男，56 岁，2004 年 5 月确诊为 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎，其母亲 HBsAg 阳性；从 2009 年 5 月开始使用恩替卡韦治疗，2 年后发生 HBeAg 血清转换，2012 年 5 月给予本发明药物复合物干预，包括聚乙二醇干扰素 α -2a 皮下注射，180ug/
- 35

- 周，同时联合粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和乙肝疫苗免疫干预，GM-CSF 每天 1 次肌肉注射 75ug，连续注射 3 天，第 4 天在同一部位注射 1 次乙肝疫苗 20ug，此免疫干预程序分别在干扰素治疗的第 1、2、3、6、9、12 个月使用 1 次，GM-CSF 在干扰素注射后 2-3 天使用，在使用干扰素治疗 3 个月后，
- 5 停用恩替卡韦，图 7 结果显示：经过上述干预后 7 个月后，患者 HBsAg 转阴，抗 HBs 水平有升高趋势。

工业应用

本发明的优点有：

1. 相比于现有技术，本发明的药物复合物用抗病毒药物暂时抑制病毒复制，再利用免疫调节剂加疫苗的方式进行免疫，可有效地增强乙肝疫苗的免疫反应，避免使用单一抗病毒药物耐药性产生无反应性和，为慢性 HBV 感染的治疗研究提供了新的研究方向；
2. 由实施例 1-3 可知，本发明的抗病毒药物免疫联合，相比于现有的抗病毒疗法，能更有效地激活机体的体液和细胞免疫水平，显著增强了免疫效果；
- 15 3. 本发明的药物复合物，使用方便，成本低，副作用小，易于推广；
4. 本发明的药物复合物，不仅能打破免疫耐受激起抗体反应，更高的激活机体的 CD4 以及 CD8 T 细胞反应，包括 Th1、Th2、Th17、Tc1 和 Tc17 的激活，有效通过免疫反应清除病毒，还能预防愈后再次感染。

权利要求

1、一种病毒免疫治疗药物复合物，其特征在于，由抗病毒药物，免疫调节药物和重组乙肝疫苗组成。

5 2、按权利要求 1 所述的病毒免疫治疗药物复合物，其特征在于，所述的抗病毒药物选自干扰素或核酸类药物；所述的免疫调节药物选自重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子；所述的重组乙肝疫苗为基因工程乙肝疫苗；其中，抗病毒药物的用量采用常规用药剂量，基因工程乙型肝炎疫苗与重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的质量配比为 1：1~30。

10 3、按权利要求 1 所述的病毒免疫治疗药物复合物，其特征在于，所述的抗病毒药物选自：普通 IFN- α ，聚乙二醇 IFN- α 2a，聚乙二醇 IFN- α 2b，拉米夫定，阿德福韦酯，恩替卡韦，替比夫定或替诺福韦酯；所述的免疫调节药物选自 GM-CSF；所述的重组乙肝疫苗为亚单位蛋白质疫苗。

15 4、按权利要求 1 所述的病毒免疫治疗药物复合物，其特征在于，所述的药物复合物中的抗病毒药物，免疫调节药物和重组乙肝疫苗采用混合物形式给药，或分别给予的方式给药，其给药方式采用皮下或肌肉注射的方式；或分别口服加注射的形式给药，或给予不同时间的先后次序形式给药。

20 5、按权利要求 4 所述的病毒免疫治疗药物复合物，其特征在于，所述的药物复合物中的抗病毒药物，免疫调节药物和重组乙肝疫苗的给药次序为：抗病毒药物给药在基因工程乙肝疫苗给药前；或重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子给药在基因工程乙肝疫苗给药前。

6、权利要求 1 所述的病毒免疫治疗药物复合物在制备治疗乙型肝炎药物中的用途。

7、按权利要求 6 的用途，其特征在于，所述的乙型肝炎为慢性乙型肝炎。

25 8、按权利要求 6 的用途，其特征在于，所述的药物复合物其给药方式采用皮下或肌肉注射的方式，或以混合物形式给药，或分别口服加注射的形式给药，或给予不同时间的先后次序形式给药。

9、按权利要求 8 所述的用途，其特征在于，所述的给药方式中，所述的抗病毒药物给药在基因工程乙肝疫苗给药前。

30 10、按权利要求 8 所述的用途，其特征在于，所述的给药方式中，所述的重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子给药在基因工程乙肝疫苗给药前。

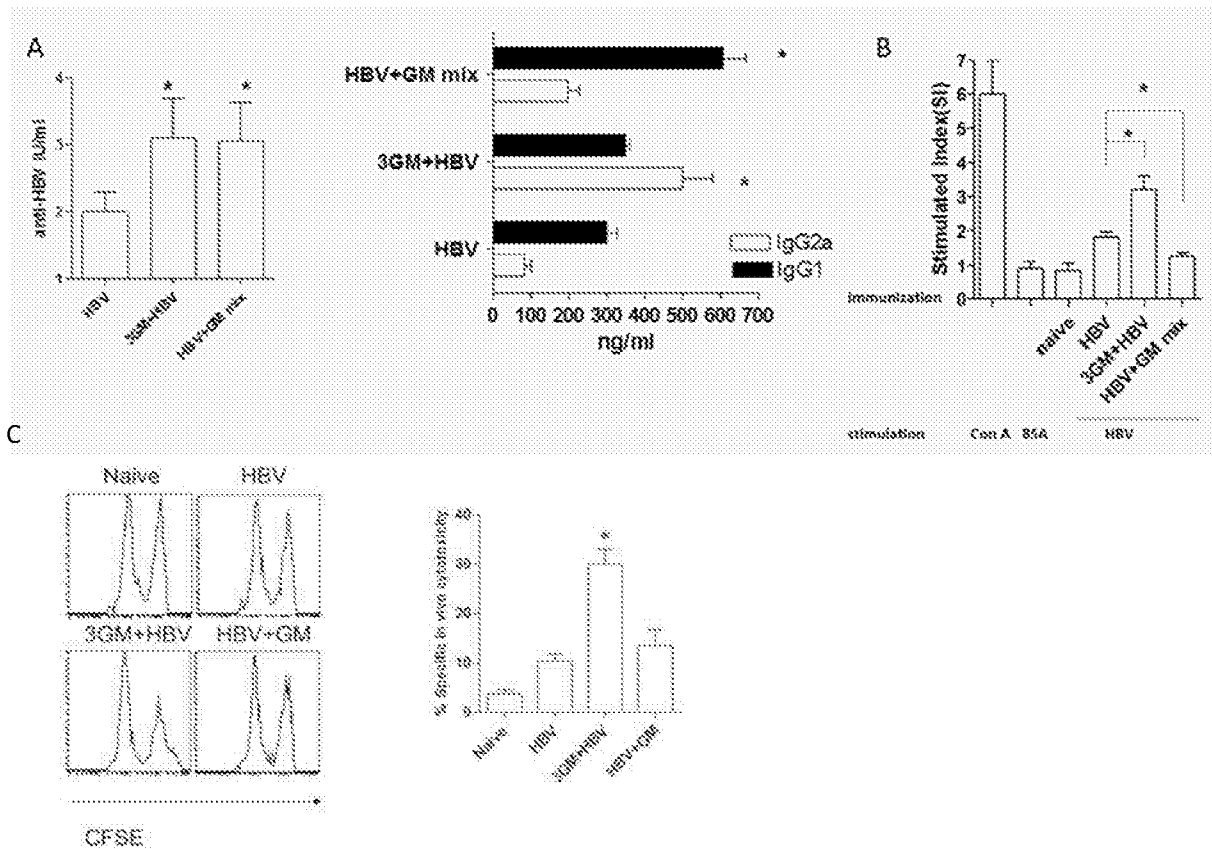


图 1

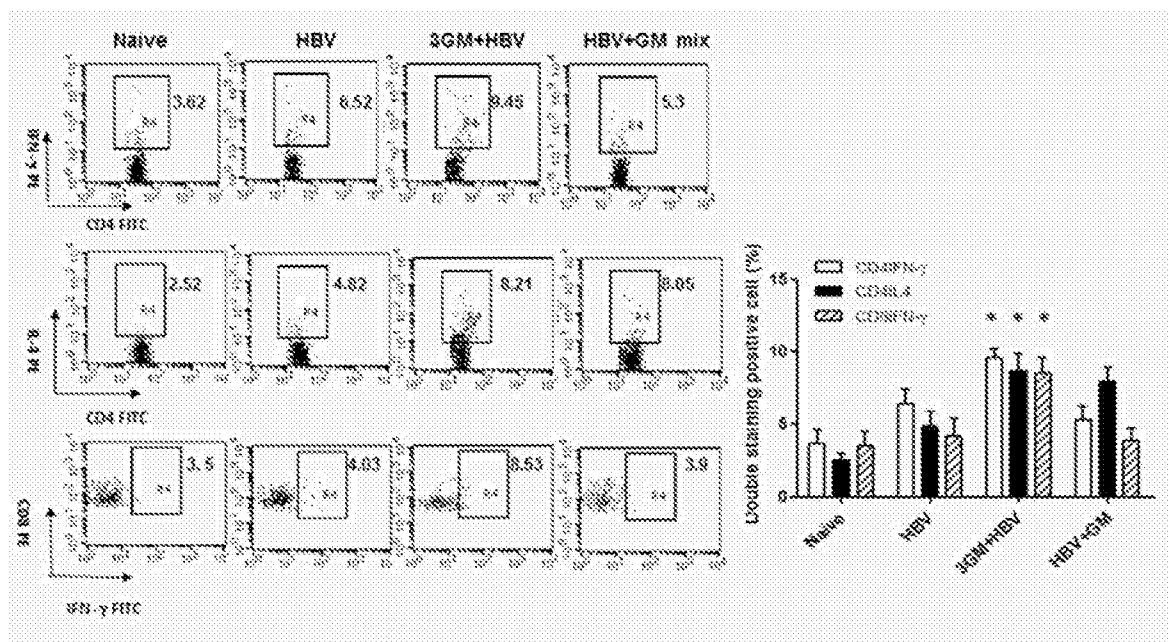


图 2

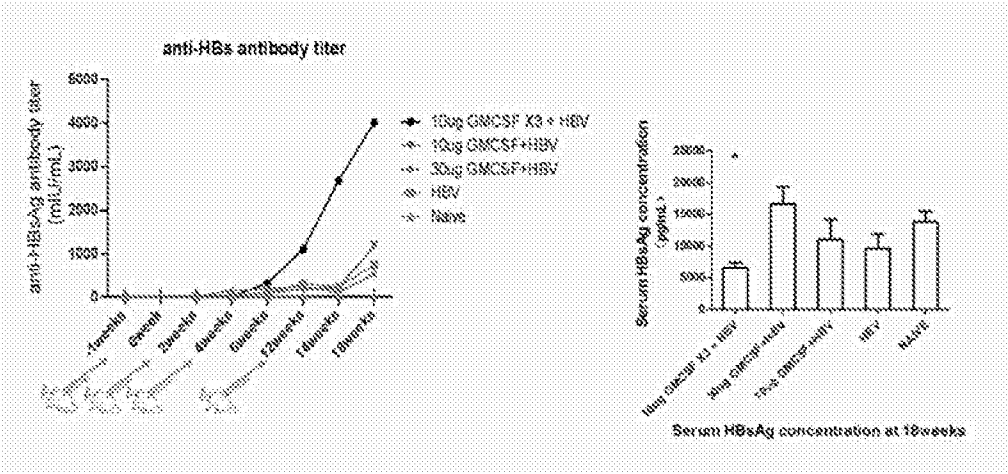


图 3

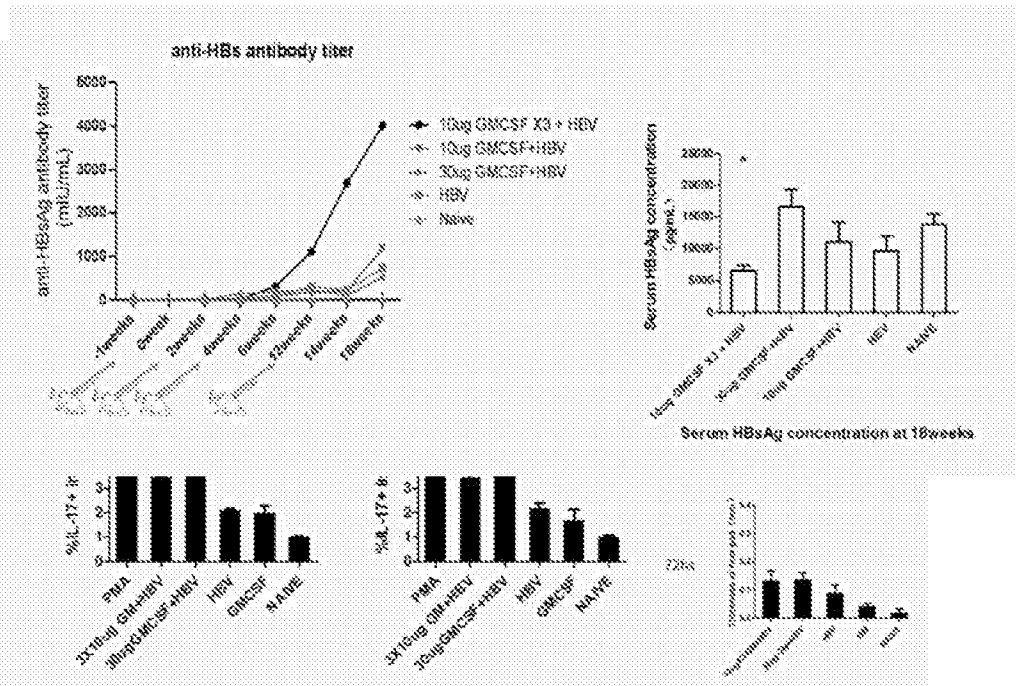


图 4

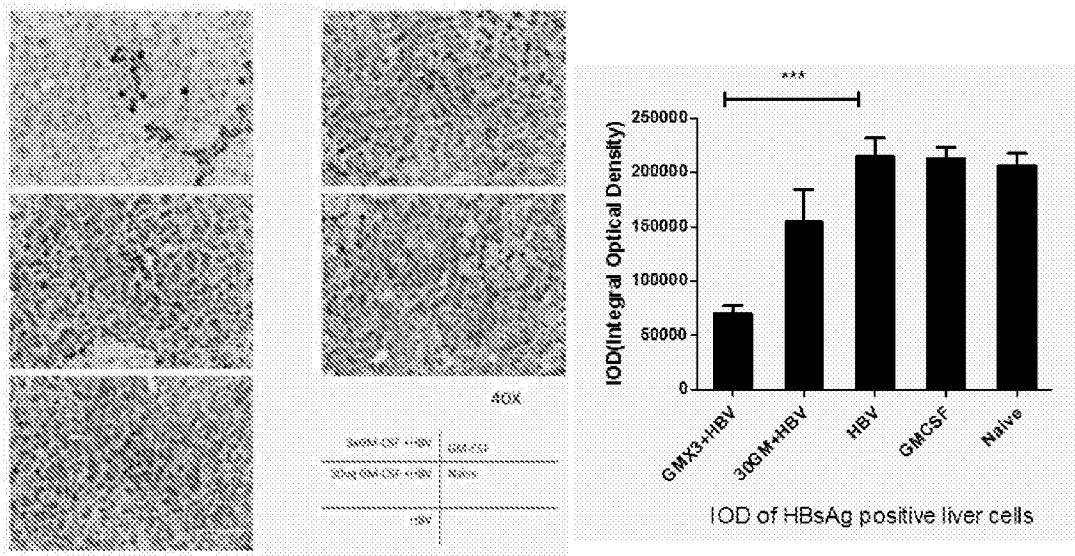


图 5

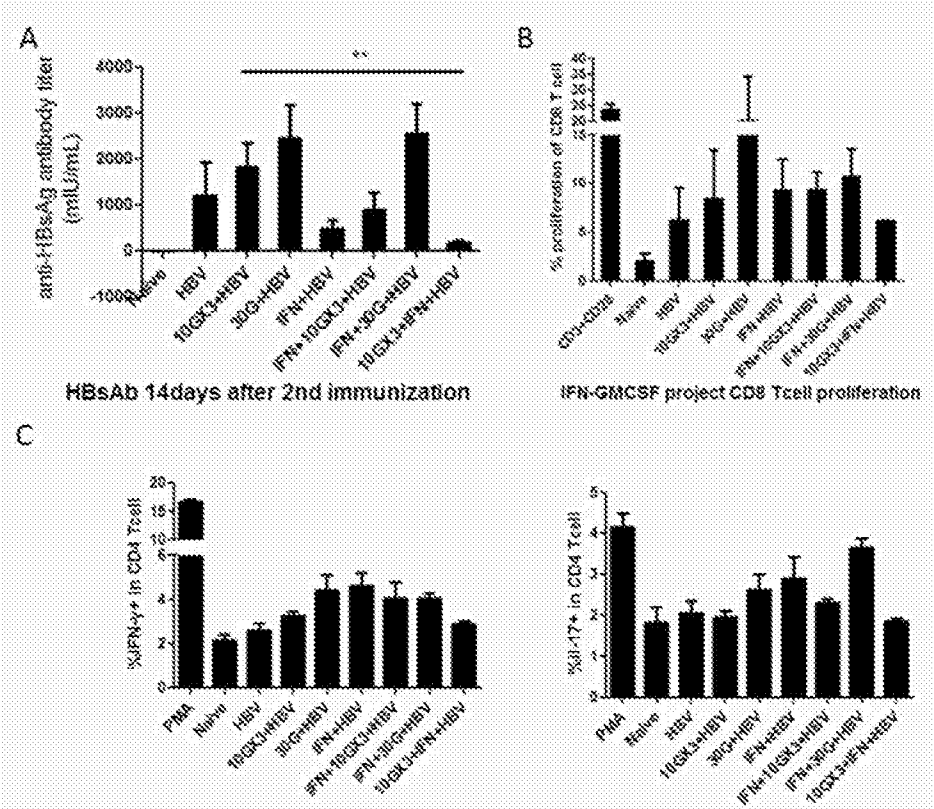


图 6

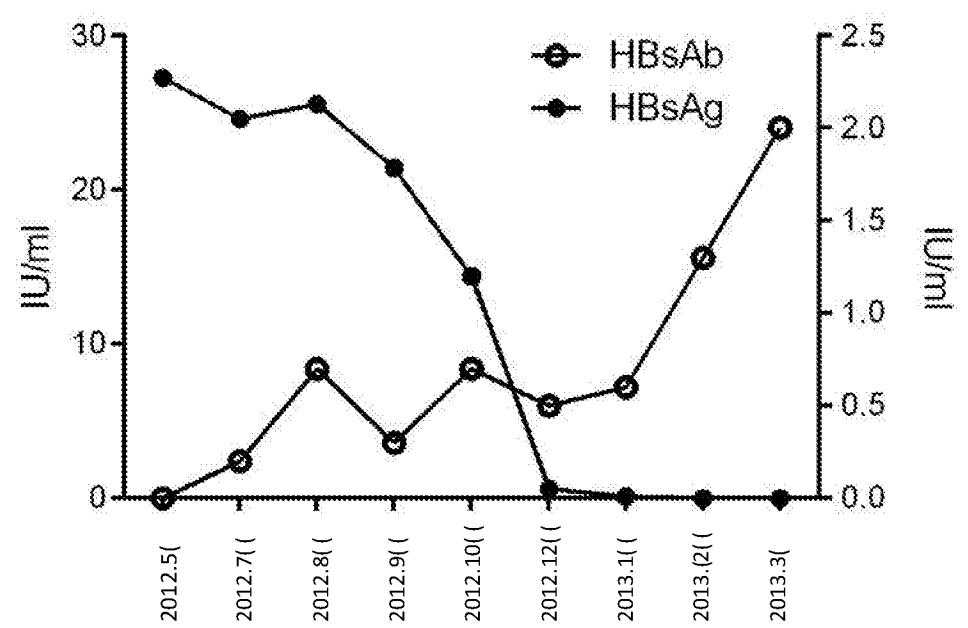


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/000717

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00 (2006.01) i; A61K 39/29 (2006.01) i; A61K 39/39 (2006.01) i; A61P 31/20 (2006.01) i; A61P 1/16 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CNABS, CNKI, Pubmed, Google scholar: immunomodulator, immunomodulatory drug, cytokine, granulocyte macrophage colony stimulating factor, colony stimulating factor, hepatitis b vaccine, antiviral drug, adefovir dipivoxil, entecavir, telbivudine, vaccine, HBsAg, GM-CSF, LAM, lamivudine, IFN, interferon, CSF, hepatitis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG, Yijun; "Comments on Antiviral Treatment of Chronic Hepatitis B", INFECTIOUS DISEASE INFORMATION, vol. 15, no. 03, 30 June 2002 (30.06.2002), ISSN: pages 102-103, sections 2.3 and 2.4	1, 4-10
Y	ZHANG, Yijun; "Comments on Antiviral Treatment of Chronic Hepatitis B", INFECTIOUS DISEASE INFORMATION, vol. 15, no. 03, 30 June 2002 (30.06.2002), ISSN: pages 102-103, sections 2.3 and 2.4	2-3
Y	CN 101509008 A (LI, Junwu), 19 August 2009 (19.08.2009)	2-3
Y	FENG, Li et al., "Progress in the Developments of Hepatitis B Vaccine and its Adjuvants", CHINESE JOURNAL OF NEW DRUGS, vol. 16, no. 20, 31 October 2007 (31.10.2007), ISSN: pages 1660-1665, and page 1663, left column, paragraph 1	2-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 October 2014 (15.10.2014)	Date of mailing of the international search report 10 December 2014 (10.12.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Kangqi Telephone No.: (86-10) 62411034

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/000717**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DING, Fengying; "Clinical Observation on Combination Therapy of Interferon- α 1b and Hepatitis B Gene Vaccine for Chronic Hepatitis B in 40 cases", SHANDONG MEDICAL JOURNAL, vol. 42, no. 30, 31 July 2002 (31.07.2002), ISSN: pages 45-46, paragraph 6	2-3
Y	ZHANG, Junxin et al., "Combination Therapy of Lamivudine and Hepatitis B Vaccine for Chronic Hepatitis B: an Analysis of 39 Cases", WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY, vol. 17, no. 06, 28 February 2009 (28.02.2009), ISSN: pages 614-617, and page 617, left column, paragraph 2	2-3
Y	WU, Xiuying et al., "Curative Effect Observation on Combination Therapy of Lamivudine and Hepatitis B Vaccine for Chronic Hepatitis B", THE MEDICAL JOURNAL OF INDUSTRIAL ENTERPRISE, vol. 17, no. 05, 31 October 2004 (31.10.2004), ISSN: pages 17-18, section 3	2-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/000717

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101509008 A	19 August 2009	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/000717

A. 主题的分类

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 39/29(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

DWPI, SIPOABS, CNABS, CNKI, Pubmed, Google scholar: 免疫调节剂, 免疫调节药物, 细胞因子, 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子, 集落刺激因子, 乙肝疫苗, 抗病毒药物, 干扰素, 拉米夫定, 阿德福韦酯, 恩替卡韦, 替比夫定, 替诺夫韦酯, vaccine, HBsAg, GM-CSF, LAM, lamivudine, IFN, interferon, CSF, hepatitis

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	张宜俊. "慢性乙型肝炎抗病毒治疗的浅见" 传染病信息, 第15卷卷, 第03期期, 2002年 6月 30日 (2002 - 06 - 30), ISSN: 第102-103页, 第2.3节, 2.4节	1, 4-10
Y	张宜俊. "慢性乙型肝炎抗病毒治疗的浅见" 传染病信息, 第15卷卷, 第03期期, 2002年 6月 30日 (2002 - 06 - 30), ISSN: 第102-103页, 第2.3节, 2.4节	2-3
Y	CN 101509008 A (李君武) 2009年 8月 19日 (2009 - 08 - 19)	2-3
Y	冯利等. "乙型肝炎疫苗及其佐剂的研究进展" 中国新药杂志, 第16卷卷, 第20期期, 2007年 10月 31日 (2007 - 10 - 31), ISSN: 第1660-1665页, 第1663页左栏第1段	2-3

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2014年 10月 15日

国际检索报告邮寄日期

2014年 12月 10日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

李康琦

电话号码 (86-10)62411034

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	丁凤英. "干扰素- α 1b联合乙肝基因疫苗治疗慢性乙型肝炎40例临床观察" 山东医药, 第第42卷卷, 第第30期期, 2002年 7月 31日 (2002 - 07 - 31), ISSN: 第45-46页, 第6段	2-3
Y	张俊新等. "拉米夫定联合乙肝疫苗治疗慢性乙型肝炎39例" 世界华人消化杂志, 第第17卷卷, 第第06期期, 2009年 2月 28日 (2009 - 02 - 28), ISSN: 第614-617页, 第617页左栏第2段	2-3
Y	吴修英等. "拉米夫定联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎的疗效观察" 工企医刊, 第第17卷卷, 第第05期期, 2004年 10月 31日 (2004 - 10 - 31), ISSN: 第17-18页, 第3节	2-3

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/000717

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 101509008 A	2009年 8月 19日	无	