



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109219449 B

(45) 授权公告日 2022.08.30

(21) 申请号 201780033618.X

M·巴斯克斯卡斯蒂略

(22) 申请日 2017.03.14

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109219449 A

专利代理人 傅宇昌

(43) 申请公布日 2019.01.15

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

A61K 39/12 (2006.01)

2016-0038 2016.03.31 CU

C07K 14/005 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2018.11.30

CN 1477972 A, 2004.02.25

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 102665687 A, 2012.09.12

PCT/CU2017/050001 2017.03.14

Mamun Al-Mahtab等.Therapeutic

(87) PCT国际申请的公布数据

potential of a combined hepatitis B virus  
surface and core antigen vaccine in  
patients with chronic hepatitis B.  
《Hepatology International》.2013, 第7卷第  
981-989页。

W02017/167317 ES 2017.10.05

Irina Sominskaya等.A VLP Library of  
C-Terminally Truncated Hepatitis B Core  
Proteins: Correlation of RNA  
Encapsidation with a Th1/Th2 Switch in  
the Immune Responses of Mice.《PLoS One》  
.2013, 第8卷(第9期), 第1-13页。 (续)

(73) 专利权人 遗传工程与生物技术中心

审查员 谢庆宁

地址 古巴哈瓦那

权利要求书1页 说明书15页 附图2页

(72) 发明人 J·C·阿吉拉尔鲁维多

预防或免疫治疗的药物中的用途,以及其用于增  
加针对与这些抗原的混合物一起共施用的另外  
抗原的免疫应答的用途。

Y·洛拜纳马托

E·伊格莱西亚斯佩雷斯

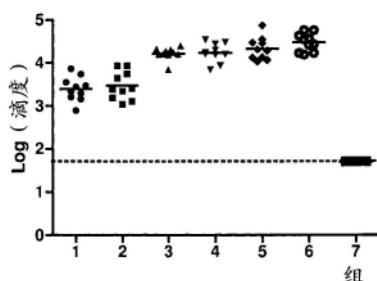
E·彭顿阿里亚斯

G·E·纪廉涅托

J·A·阿吉亚尔圣地亚哥

S·冈萨雷斯布兰科

J·巴尔德斯埃尔南德斯



(54) 发明名称

包含乙型肝炎病毒的表面抗原和核衣壳抗原的药用组合物

B  
CN 109219449  
CN

(57) 摘要

本发明涉及包含乙型肝炎病毒(HBV)的表面抗原(HBsAg)和同样病毒的核衣壳抗原(或核心,HBcAg)的药用组合物。在所述组合物中存在的HBcAg以高于该抗原的核糖核酸(RNA)总量的45%的比例包含信使核糖核酸(mRNA)。由于构成该组合物的抗原的组成的变化,本发明的组合物可用于预防或治疗慢性乙型肝炎。本发明还考虑了该药用组合物在制备用于针对HBV感染的免疫

[接上页]

(56) 对比文件

Yadira Lobaina等.Comparison of the immune response induced in mice by five commercial vaccines based on recombinant HBsAg from different sources, implications on their therapeutic use.《Biotecnología Aplicada》.2008,第25卷(第4期),第325-331页.

Arístides AguilarBetancourt等.Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant hepatitis B surface and core antigens.《International Journal of Infectious Diseases》.2007,第11卷(第5期),第394-401页.

1. 药用组合物,其特征在于,它包含乙型肝炎病毒(HBV)的核心抗原(HBcAg)病毒样颗粒和乙型肝炎病毒的表面抗原(HBsAg)病毒样颗粒,所述HBcAg病毒样颗粒以高于该抗原病毒样颗粒的核糖核酸总量的45%的比例包含信使核糖核酸,并且所述HBsAg病毒样颗粒以高于该抗原病毒样颗粒的磷脂总量的5%的比例包含磷脂酰丝氨酸。
2. 权利要求1的药用组合物,其特征在于,HBsAg病毒样颗粒与HBcAg病毒样颗粒的比例为1:1。
3. 权利要求1的药用组合物,其特征在于,它被配制成为通过肠胃外途径来进行施用。
4. 权利要求1的药用组合物,其特征在于,它被配制成为通过鼻内途径来进行施用。
5. 权利要求1的药用组合物,其特征在于,它另外还包含疫苗佐剂。
6. 权利要求1的药用组合物在制备用于针对乙型肝炎病毒(HBV)感染的免疫预防或免疫治疗的药物中的用途。
7. 权利要求6的用途,其中所述药物被配制成为通过肠胃外途径来进行施用。
8. 权利要求6的用途,其中所述药物被配制成为通过鼻内途径来进行施用。
9. 权利要求6的用途,其中所述药物用于治疗慢性乙型肝炎患者。
10. 权利要求9的用途,其中对慢性乙型肝炎患者的治疗为预防源自HBV感染的肝细胞癌。

## 包含乙型肝炎病毒的表面抗原和核衣壳抗原的药用组合物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及医学领域,特别地涉及疫苗学分枝,尤其涉及具有更大功效的疫苗组合物的开发。这些组合物包含在其化学组成方面具有修饰的乙型肝炎病毒(HBV)的抗原,这出人意料地增加了它们的免疫原性。在其化学组成方面经修饰的HBV的抗原为表面抗原(HBsAg)和核心抗原(HBcAg)。

### 现有技术

[0002] 世界卫生组织(WHO)认为,基于感染的血清学标志物的存在,接近三分之一的世界人口已被HBV感染。已估计,被HBV感染的大约5至10%的成人和直至90%的新生儿发展出了慢性乙型肝炎(CHB)。目前,3.5亿人具有持续或慢性感染。病毒的持续复制(长期的)导致肝脏的炎症过程,其导致被感染人群的25%的死亡,作为肝硬化、肝细胞癌的后果,或者由于其他并发症例如腹水、食管出血和脾肿大。尽管在最近几年期间进行了新生儿和幼儿的普遍疫苗接种,并且随后新的HBV感染的发病率降低,但是CHB在世界范围内仍然是重大的健康问题[Hilleman,M.R.Vaccine (2001),19,1837-48]。

[0003] 用 $\alpha$ 干扰素(IFN- $\alpha$ )、其PEG化变体(PegIFN)以及核苷酸和核昔的类似物(例如替诺福韦、恩替卡韦、拉米夫定、阿德福韦二匹伏酯和替比夫定)进行治疗是治疗CHB的现有技术。通常,关于在治疗后HBV的持续消除,这些药物具有差的效力,并且它们的使用与重大的不利事件(AE)相关联,这是广泛得到认可的[Nash K.Adv Ther (2009),26:155-169;Yang N,Hepatol Int.2015年9月12日.[Epub ahead of print]PubMed PMID:26363922]。

[0004] 作为免疫治疗策略在治疗CHB中使用疫苗制剂是一种令人感兴趣的方法。已将病毒持久性与在抗-HBV细胞免疫的发展中的缺陷相关联。自20世纪80年代初,已开发出了旨在增大和增强CHB患者的弱的T细胞应答的疫苗策略。这些免疫治疗策略最初使用了商业抗-HBV疫苗,目的是诱导针对HBV的特异性CD4+和CD8+应答,和能够控制病毒复制的促炎细胞因子。因此,几乎所有商业的预防性疫苗都是单独地或与常规抗病毒疗法一起进行检验的。在以前的治疗性疫苗接种研究中,将疫苗与或不与其他抗病毒治疗一起进行施用。此外,用商业疫苗的免疫治疗还提出了具有更多接种次数的计划方案,并且探究了备选的肠胃外途径。下面总结了主要的研究。

[0005] 一项使用Genhevac**B**<sup>®</sup>(Aventis Pasteur,France,在哺乳动物细胞CHO中产生的)在具有CHB的患者中进行疫苗接种的试探性研究证明了大约50%的慢性携带者的HBV复制的减少[Pol S等人,C R Acad Sci III (1993),316:688-91]。另一项安慰剂-控制的、多中心的研究也评价了疫苗Genhevac**B**<sup>®</sup>、疫苗**Recombivax**<sup>®</sup>(Merck Sharp Dohme-Chibret,France,在酵母中产生的)。在该研究中,在第六个月观察到在分别用安慰剂、**Genhevac**<sup>®</sup>和**Recombivax**<sup>®</sup>进行接种的组之间的显著差异(3%、20%和22%)。然而,在第12个月,差异消失[Pol S,J Hepatol (2001),34:917-21]。总之,不可能观察到清晰的临床益处,并且在疫苗**Genhevac**<sup>®</sup>中存在的抗原pre-S2看起来不具有任何额外的效应。

[0006] 其中就治疗目的评价了疫苗**Genhevac®**的其他研究[Yalcin K等人, Infection (2003), 31:221-225; Dikici B等人, J Gastroenterol Hepatol (2003), 18 (2) :218-22]仅显示出与治疗相关联的非常轻微的益处。

[0007] 疫苗**Hepagene®** (Medeva Ltd., UK, 在CHO中产生的) 包括HBsAg的三种变体(L、S和M), 并且其在健康志愿者和无应答者中的结果显示出高水平的免疫原性[Page M等人, Intervirology (2001), 44:88-97; Yap I等人,, Ann Acad Med Singapore (1996), 25:120-122; Zuckerman JN等人, BMJ (1997), 314:329; Jones CD等人, Vaccine (1999), 17 (20-21) : 2528-37]。考虑到这一点, 进行了一项其中评价其治疗潜力的研究。施用了8个剂量的20 $\mu$ g的该疫苗, 以两轮的4次接种(相互之间相隔5个月) [Carman WF等人, J Hepatol (2001), 34: 917-921]。在计划方案结束时, 完成了该计划方案的22名患者中的8名具有HBV的持续去除应答, 和7名患者消除了HBeAg。在该非受控的有限试验之后接着是具有更多的患者数目的受控试验。在用103名HBeAg阳性的慢性患者的该第二个临床试验中, 以一个月的间隔施用4个剂量的疫苗或安慰剂, 并且在8个月之后, 所有受试者以一个月的间隔接受8个额外的剂量。在治疗结束时, 未观察到显著的临床益处 [Medeva PLC. <http://www.investigate.co.uk/article.aspx?id=200001171532169093D> (2015年10月20日查询)]。

[0008] 为了促成抗病毒免疫应答的发展, 已使用了将治疗性疫苗接种与常规抗病毒疗法相组合的治疗。该策略考虑了与拉米夫定的效应(其增加外周血中HBV特异性T细胞的频次, 作为抑制病毒复制的结果) 相关的发现[Bertoletti A等人, Expert Rev Gastroenterol Hepatol (2009), 3 (5) :561-9]。

[0009] 组合型抗病毒疫苗接种的策略应当有利于更大的对于HBV的T细胞应答的反应性, 但是也可以被认为是更安全的, 因为应当避免大的肝损害, 作为激活免疫系统的后果。然而, 还不存在有任何这样的实验, 其显示在CHB患者中通过该疫苗激活特异性免疫应答引起暴发型肝炎。

[0010] 2002年发表的一项研究在CHB患者中评价了疫苗Engerix-B® (GlaxoSmithKline) 与拉米夫定的真皮内(ID) 施用[Dahmen A等人, J Med Virol 2002, 66:452-60]。施用了六个剂量的Engerix-B®, 每月一次, 与拉米夫定的每日施用相组合地。另外一个组接受与白介素2(IL-2) 的每日皮下(SC) 施用一起的相同治疗。一旦该疗法结束, 第一组的9名患者中的7名, 和第二组的5名患者中的2名, 已将其病毒载量降低至不可检测的水平。四名应答者消除了病毒并且使转氨酶正常化。在另一项临床研究中, 评价了通过ID途径的治疗性疫苗接种(用在氧化铝中包含HBsAg的疫苗) 与拉米夫定的每日施用的组合一年[Horiike N等人, J Clin Virol (2005), 32:156-161]。这些研究证明了该组合疗法对于CHB患者是有效的并且具有很少的并发症。然而, 在这两种情况下均采用了ID途径, 这是可能有利于疫苗的免疫原性的方面。

[0011] 在强有力的佐剂中配制的相同的表面抗原在与拉米夫定的组合疗法中不是有效的, 这暗示不应当忽视免疫接种途径的影响, 并且这可能是对于疫苗接种的未来来说至关重要的因素。

[0012] 结束了疫苗候选物的长期临床评价(关于病毒载量的压制条件)的研究是Vandepapeliere等人的报告[Vandepapeliere P等人,Vaccine (2007) 12月12日,25 (51) : 8585-97]。该研究呈现了基于经吸附的HBsAg的制剂的疫苗候选物的临床评价的结果,所述疫苗候选物与油性佐剂和与强有力的免疫调节剂(例如单磷脂酰胆碱A和皂昔QS21)一起以100 $\mu$ g HBsAg的剂量通过肌内(IM)途径进行注射。在减少的病毒载量的条件下的十次施用未显示出相比于仅用抗病毒药进行治疗的对照组而言的在病毒学应答方面的优点。

[0013] 关于宿主免疫应答的特征的积累的知识和产生自常规疫苗的治疗性使用的知识暗示,旨在诱导针对HBV抗原的强烈且持续的T细胞反应性的策略是可行的,并且代表了关于CHB患者的令人满意的治疗的希望。

[0014] 针对核衣壳抗原的免疫刺激的不存在可能是基于HBsAg的治疗性疫苗接种失败的主要免疫学标志。事实上,在CHB中治疗性疫苗接种的目的是触发与在自动调控的急性乙型肝炎期间或在经历血清转变的CHB中盛行的那些相同的天然免疫机制。如果免疫治疗在刺激这些免疫应答方面失败,那么在诱导血清转变方面也可能会失败。

[0015] 在抗原选择和疫苗接种策略方面的制剂的改善可能是用于克服所提及的困难的一条途径。包膜的蛋白质具有这样的特征,其证明将它包括在治疗性疫苗中是正确的。实际上,包膜的蛋白质包含许多B和T细胞表位[Penna A等人,J Virol (1992),66 (2) :1193-6; Nayersina R等人,J Immunol (1993),150:4659-71],并且据估计抗包膜抗体通过从循环中去除游离的病毒颗粒并防止易感细胞的再感染而在病毒压制中发挥着关键作用。另一方面,高水平的HBsAg在CHB患者的血清中循环,该事实可能通过耗尽T细胞和压制抗-HBs抗体的产生而在维持免疫耐受性中发挥作用[Nagaraju K等人,J Viral Hepat (1997),4:221-30]。

[0016] 从这个方向上,已暗示了HBcAg为待被包括在用于CHB的治疗性疫苗中的主要抗原候选物。在自消退性急性肝炎期间,T细胞的表位应答强烈地得到支持,并且在自发的或由治疗诱导的CHB中的血清转变期间是占优势的[Ferrari C等人,J Clin Invest (1991),88: 214-22;Marinos G等人,Hepatology (1995),22:1040-9;Tsai SL等人,Clin Invest (1992),89:87-96]。

[0017] 迄今为止,没有任何商业的抗乙型肝炎疫苗显示出足够水平的临床结果,其使得它们能够与目前的治疗相竞争,或保证其被引入到医学实践中。然而,这些疫苗在治疗领域中已产生了很大的期待,不仅在抗乙型肝炎免疫治疗的情景下,而且对于其他病理学状况例如人免疫缺陷病毒(HIV)感染和癌症,在其他慢性疾病(可传染的或不可传染的)中。如此,该策略要求新的疫苗概念的临床评价和所有相关因素的优化。在这个意义上,除了HBsAg外还包括HBcAg的治疗性疫苗候选物是开发此类免疫治疗策略的结果。

[0018] 遗传工程与生物技术中心(CIGB)产生了HBsAg,其作为在作为宿主的巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中获得的重组蛋白质。自上个世纪90年代初已将该抗原包括在预防性疫苗Heberbiovac**HB**<sup>®</sup>中[Muzio V等人,Biotecnología Aplicada (2001) 18,103-104;ul-Haq N等人,Vaccine (2003) 21:3179-85]。

[0019] 另外,CIGB还开发出了其中增大了抗乙型肝炎免疫应答的制剂,所述制剂包含HBsAg和HBcAg作为主要组分,所述抗原通过粘膜途径来进行施用,以产生全身和粘膜应答[欧洲专利号:EP 1136077]。在该同一个中心的另一个专利文献中,描述了形成颗粒的聚集

型抗原结构的产生。该文献揭示了，聚集、脱脂质或氧化，以及30-500nm的颗粒的选择，和适当地得到辅佐的这些聚集体的制剂，有利于所得的抗原制备物的免疫原性[欧洲专利号：EP 1346727]。结合在这两个专利文献中所提出的策略，CIGB开发出了称为NASVAC的治疗性疫苗候选物[Lobaina Y等人，Mol Immunol (2015), 63:320-327]，其通过免疫途径的组合来进行施用。该疫苗制剂的临床结果是非常吸引人的；然而，应当使用更加强有力的免疫原来增加该产品的功效。

[0020] 包括HBV的主要抗原(例如HBsAg和HBcAg)的疫苗策略已导致了具有一定的抗病毒功效的制剂。然而，要求对其进行改善以增加具有持续抗病毒应答的患者的数目，以及达到从HBsAg至抗-HBsAg的血清转变的患者的数目。

[0021] 发明描述

[0022] 本发明通过提供药用组合物而帮助解决了上面提及的问题，所述药用组合物的特征在于，它包含1) HBV的HBcAg抗原，其以高于该抗原的核糖核酸(RNA)总量的45%的比例包含信使核糖核酸(mRNA)，和2) HBV的HBsAg抗原。在本发明的一个实施方案中，所述药用组合物包含HBsAg，所述HBsAg以高于该抗原所具有的磷脂总量的5%的比例包含磷脂酰丝氨酸。

[0023] 包括以该特别的方式在其化学组成方面经修饰的HBsAg和HBcAg抗原有利于用于免疫治疗的该组合物的免疫学和抗病毒特性。然而，所提及的修饰不影响本发明的HBsAg和HBcAg抗原的蛋白质组成，因为其一级、二级和三级结构相比于其未修饰的变体而言保持相同。尽管如此，所述修饰导致所述抗原的出人意料的特征，其导致更加强有力的免疫原。同样地，所述经修饰的抗原的组合导致用于治疗CHB的具有更高的抗病毒和治疗功效的制剂。

[0024] 在本发明中，以超过45%的mRNA水平获得HBcAg。在一个特别的情况下，该经修饰的抗原是由于其发酵过程的参数的变化的组合而获得的。在该情况下，化学成分确定的培养基的使用和低的比生长速率导致获得HBcAg的变体，其中相比于在其中存在的其余RNA而言mRNA的比例增加。

[0025] 虽然以前已描述了在大肠杆菌(Escherichia coli)中获得的HBcAg的高免疫原性，以及核酸组分参与完整颗粒抗原(具有183个氨基酸)的免疫原性，但直至本发明还不知道关于对于HBcAg的最终免疫原性的特殊贡献，每种RNA变体的相对作用。令人惊讶地发现，具有超过45%的mRNA水平的HBcAg是更具有免疫原性的，并且发展出了相比于未修饰的HBcAg而言更强的Th1应答。

[0026] 所检测的mRNA的比例的变化不影响相对于蛋白质含量而言的在颗粒中存在的总RNA的含量。出人意料地发现，在总RNA之中包含超过45%的mRNA水平的HBcAg具有相对于在其mRNA含量方面没有修饰而获得的HBcAg而言更高的免疫原性。所述在免疫原性方面的增加包括在对转基因小鼠和CHB患者进行免疫接种后Th1细胞因子的显著增加和更大的消除循环HBsAg的能力。

[0027] 另一方面，在本发明中评价了以高于在该脂蛋白抗原中存在的磷脂总量的5%的百分比包含磷脂酰丝氨酸的HBsAg。特别地，在参数变化(例如，在发酵培养基中钙和镁浓度的增加、低的比生长速率和低的pH)之后，显现出大于磷脂总量的5%的磷脂酰丝氨酸比例的增加。然而，本发明并不限于在这些条件下获得的HBsAg。大于5%的磷脂酰丝氨酸比例的增加与所得的抗原的免疫原性的增加相关，相比于具有更低的所述磷脂的含量的HBsAg而言。在用包含大于5%的磷脂酰丝氨酸(相对于总磷脂的%而言)的HBsAg对转基因小鼠和

CHB患者进行免疫接种后,还观察到Th1细胞因子的显著增加和更大的消除循环HBsAg的能力。

[0028] 在本发明中,已基于相比于其中使用未修饰的抗原的制剂而言更大的免疫应答和抗病毒强度选择出了以特别方式进行修饰的HBsAg和HBcAg抗原。此外,包含这两种抗原的制剂能够在更多数目的个体中产生从HBsAg至抗-HBsAg的血清转变,如果将其与分开放用的抗原相比较,这证明了在构成本发明的目标组合物的一部分的抗原中所检测到的修饰的重要性和功能性,以及相比于独个的抗原而言所述组合制剂的优势。

[0029] 本发明体现了关于对新制剂的需要对于在现有技术中盛行的问题的新的解决方案,所述新制剂允许增强抗-HBsAg和抗-HBcAg免疫应答,以取得用于控制慢性HBV感染的更有效的抗病毒治疗。本发明所涉及的事项不会被技术人员认为是显而易见的或源自现有技术,因为它是鉴定出在所描述的抗原中的新特征的结果。虽然此类经修饰的抗原保持其蛋白质组成完整,但是关于与它们相联合的其他分子的化学组成,它们却是不同的。

[0030] 为了本发明的目的,经修饰的HBcAg被考虑是以高于该抗原的RNA总量的45%的比例包含mRNA的HBcAg制备物。同样地,经修饰的HBsAg被认为是以高于该抗原的磷脂总量的5%的比例包含磷脂酰丝氨酸的HBsAg制备物。

[0031] 在本发明的一个实施方案中,该包含HBV的HBcAg抗原(其以高于该抗原的RNA总量的45%的比例包含mRNA)和HBV的HBsAg抗原的组合物的特征在于,它被配制成用于通过肠胃外和粘膜途径来进行施用。为了通过粘膜途径,和特别地通过鼻途径来施用本发明的组合物,可以使用已经为了通过该途径施用药用制剂而开发和/或销售的附件。

[0032] 在一个特别的实施方案中,所述组合物的特征在于,它另外还包含疫苗佐剂。可以在存在于本发明的组合物中的疫苗佐剂之中,包括例如本领域技术人员所熟知的那些,例如铝盐、为了在人中使用而开发的油包水乳状液、免疫系统的刺激剂等。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了HBcAg抗原和HBsAg抗原在制备用于针对HBV感染的免疫预防或免疫治疗的药物中的用途,所述HBcAg抗原以高于该抗原的RNA总量的45%的比例包含mRNA。在本发明的一个实施方案中,构成所述药物的一部分的HBsAg以高于该抗原的磷脂总量的5%的比例包含磷脂酰丝氨酸。在一个特别的实施方案中,所述药物被配制成用于通过肠胃外和粘膜途径来进行施用。在一个优选的实施方案中,该包含HBcAg(其以高于该抗原的RNA总量的45%的比例包含mRNA)和HBsAg抗原的药物用于治疗CHB患者或具有其中感染性病毒之一为HBV的共感染的患者。另外,在用所述药物治疗CHB患者时,该药物用于预防源自HBV感染的肝细胞癌。

[0034] 当在通过免疫治疗来治疗CHB患者中使用该包含HBcAg(其以高于该抗原的RNA总量的45%的比例包含mRNA)和HBsAg抗原的药物时,这可以以主动形式(通过用所述药物对患者进行免疫接种)或被动形式(通过细胞刺激)来进行。由于其组分,本发明的药用制剂可以用于刺激自体或异体细胞。因此,本发明成为这样的方法:用所述制剂进行细胞刺激,和随后对CHB患者进行被动免疫接种,基于自体或异体细胞(包括树突细胞、B细胞和巨噬细胞)的体内或体外最大刺激。

[0035] 在另一个方面,本发明揭示了用于针对HBV感染的免疫预防或免疫治疗方法,其特征在于,向有此需要的个体施用有效量的包含HBV的HBcAg抗原和HBV的HBsAg抗原的药用组合物,所述HBV的HBcAg抗原以高于该抗原的RNA总量的45%的比例包含mRNA。在本发明的

一个实施方案中,所述HBsAg以高于该抗原的磷脂总量的5%的比例包含磷脂酰丝氨酸。在本发明的一个实施方案中,所述药用组合物通过肠胃外和粘膜途径来进行施用。在一个优选的实施方案中,接受免疫治疗的个体为CHB患者。在这种情况下,将本发明的方法应用于CHB患者的免疫治疗导致源自HBV感染的肝细胞癌的预防。

[0036] HBcAg抗原和HBsAg抗原用于增加针对与这些抗原的混合物一起共施用的另外抗原的免疫应答的用途也是本发明的目标,所述HBcAg抗原以高于该抗原的RNA总量的45%的比例包含mRNA。在本发明的一个实施方案中,构成该抗原混合物的一部分的HBsAg以高于该抗原的磷脂总量的5%的比例包含磷脂酰丝氨酸。

[0037] 所提及的抗原混合物可以用于增强针对CHB的免疫应答(在治疗的情景下)或用于预防性疫苗接种策略,其中该疫苗是多价的。这是因为,除了以特别方式进行修饰的HBsAg和HBcAg抗原的免疫原性的增加外,还可能证实它们能够诱导增强异种抗原的免疫原性的效应。实验评价的结果显示,在多价制剂中存在的这些抗原对于预防性或治疗性用途来说可以是有用的。

[0038] 虽然关于在本发明中的制剂,可以避免使用佐剂、稳定剂、防腐剂或其他添加剂,但是这并不限制引入不降低该制剂或所得的最终产品的免疫原性或者所施用的制剂的抗病毒效力的添加剂、赋形剂、稀释剂。

[0039] 用本发明的药用组合物和用于免疫预防或免疫治疗的方法,取得了持续的抗病毒应答,并且增加了达到从HBsAg至抗-HBsAg的血清转变的患者的数目,相对于该技术领域中已知的组合物和方法而言。

[0040] 附图简述

[0041] 图1.在施用两个剂量后抗-HBcAg IgG抗体的应答。

[0042] 图2.抗-CR3 IgG抗体。

[0043] 图3.CR3 (HIV-1) -特异性CD8+ T细胞的增殖应答。

[0044] 实施方案的详细描述/实施例

[0045] 实施例1.具有各种不同的RNA变体比例的HBcAg蛋白的获得

[0046] HBcAg从用携带编码该抗原的基因的质粒进行遗传转化的大肠杆菌菌株开始来获得[Aguilar JC等人, Immunol Cell Biol (2004) 82:539-46]。

[0047] 在表征从在各种不同时间段期间进行的发酵过程产生的HBcAg颗粒时,观察到在用更长的发酵期产生的HBcAg制备物中所掺入的mRNA的比例增加。在发酵20小时时,在该抗原中的mRNA的水平增加多于20%,相比于在直至14小时的过程中所获得的HBcAg而言,如在表1中所观察到的。未检测到在所述颗粒中RNA总量的显著变化,因为未发现在总RNA水平方面以及在RNA含量/蛋白质含量比例方面的显著差异。然而,当与其他变体,尤其是核糖体RNA(rRNA)(它的存在随着mRNA的增加而成比例地降低)相比较时,具有mRNA水平的显著增加。在通过质谱法或者其他化学和物理研究来进行检定时,未发现在与HBcAg相联合的次要组分方面或在特定污染物方面的其他相关变化。

[0048] 表1.按照发酵过程的持续时间,在HBcAg中的RNA的主要类型的相对百分比的变化。

变体	tRNA (%)	rRNA (%)	mRNA (%)
1(10小时)	0.1	76.3	23.6

2(12小时)	0.1	60.0	39.9
3(14小时)	0.09	54.9	45.0
4(16小时)	0.09	40.0	59.1 (*)
5(18小时)	0.1	34.5	65.5 (*)
6(20小时)	0.1	32.8	67.1 (*)

[0050] 结果显示了五次测定的平均值。在“变体”这一栏中，在括号中指出了发酵的持续时间。tRNA:转移RNA; rRNA:核糖体RNA; 和mRNA:信使RNA。(\*) :显著的差异 ( $p < 0.05$ )。

[0051] 在Balb/c小鼠中评价掺入有各种不同百分比的mRNA的HBcAg变体的免疫原性

[0052] 一旦获得了在颗粒内部掺入有各种不同百分比的mRNA的不同的HBcAg变体(表1)，就在Balb/c小鼠中进行这些制备物的免疫学评价。对于该研究，使用8至12周龄的雌性小鼠，其在第0天和第15天通过SC途径接受两次免疫接种，以在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的1 $\mu$ g HBcAg的剂量，其中施用100 $\mu$ L的最终体积。该计划方案的详细描述显示在表2中。

[0053] 表2.用于评价在HBcAg颗粒中所掺入的mRNA的百分比对于该抗原的免疫原性的影响的免疫接种计划方案的设计。

[0054]

组	治疗	动物数目
1	1 $\mu$ g HBcAg (23% mRNA)	10
2	1 $\mu$ g HBcAg (39% mRNA)	10
3	1 $\mu$ g HBcAg (45% mRNA)	10
4	1 $\mu$ g HBcAg (60% mRNA)	10
5	1 $\mu$ g HBcAg (65% mRNA)	10
6	1 $\mu$ g HBcAg (67% mRNA)	10
7	1X PBS	10

[0055] 在施用第二个剂量化后10天进行血液抽取，以评价产生自该免疫接种的特异性抗体应答。抗-HBcAg抗体应答的测量通过ELISA技术来进行。

[0056] 如在图1(其显示了对于每个研究组所获得的抗-HBcAg IgG抗体的滴度)中所观察到的，所产生的抗-HBcAg IgG应答对于接受以大于45%掺入有mRNA的HBcAg的组(表2的组3至6)来说是显著地更高的。在组3、4、5和6之间未检测到显著差异，虽然观察到轻微的与所掺入的mRNA的百分比的增加相关联的IgG应答增加的趋势。结果表明，以大于相对于所掺入的总RNA而言45%的水平掺入到HBcAg颗粒内部的mRNA的比例的增加赋予该蛋白质以更大的体液免疫原性。IgG亚类模式的初步分析暗示了与细胞类型的免疫应答的水平类似的行为。

[0057] 实施例2.具有各种不同的磷脂酰丝氨酸比例的HBsAg的病毒样颗粒(VLP)的获得

[0058] 重组HBsAg从用编码该抗原的基因进行遗传转化的巴斯德毕赤酵母菌株开始来获得[欧洲专利号:EP 480525]。已知在该酵母物种中表达的HBsAg在其结构脂质中包含磷脂酰丝氨酸[Lobaina Y等人,Biotecnología Aplicada (2008),25:325-331]。然而，直至本发明，未研究过该脂质的存在对于该抗原的免疫原性的影响。

[0059] 为了研究磷脂酰丝氨酸的比例如何影响HBsAg的免疫原性，在各种不同的发酵条件下获得了所述VLP的制备物。在发酵罐中培养重组酵母期间，将培养基中的Mg<sup>(2+)</sup>浓度增加至1.0-2.0%的百分比，这导致与HBsAg的VLP相联合的所述磷脂的增加。这在表征在各种

不同生长条件下获得的HBsAg期间通过使用薄层色谱法来进行检测。

[0060] 磷脂酰丝氨酸与具有公认的脂质性质的HBsAg的VLP相联合。在表3中所收集的结果显示了五次不同重复的平均值。纯化对于所有在各种不同实验条件下产生的HBsAg制备物来说是相似的。如在该表格中所观察到的,当用包含低于1.2%的Mg<sup>(2+)</sup>浓度的培养基进行发酵时,在所获得的样品中没有检测到磷脂酰丝氨酸。在用包含2.0%的Mg<sup>(2+)</sup>的培养基所获得的制备物中所发现的磷脂酰丝氨酸水平显著地高于在用包含1.4%的Mg<sup>(2+)</sup>的培养基所获得的制备物(变体C)中所发现的磷脂酰丝氨酸水平。

[0061] 表3.具有渐增量的磷脂酰丝氨酸的HBsAg变体的获得。

[0062]

变体	Mg <sup>(2+)</sup> 浓度(%)	PS(%)
A	1.0	ND
B	1.2	ND
C	1.4	2.5±0.3
D	1.6	5.0±0.4(*)
E	1.8	6.1±0.4(**)
F	2.0	7.7±0.5(**)

[0063] ND:未检测到。Mg<sup>(2+)</sup>(%) :在培养基的盐水添加剂中存在的Mg离子的浓度(以百分比表示)。PS(%) :在总磷脂中磷脂酰丝氨酸的百分比,其在提取经纯化的HBsAg后测定。(\*) :显著的差异(p<0.05), (\*\*) :非常显著的差异(p<0.01)。

[0064] 在表3中所描绘的HBsAg制备物相比于其原始变体而言在其蛋白质组成方面是相同的,按照为了研究其一级、二级和三级结构所进行的表征。重要的是强调,对于任何处于研究中的变项,脂质浓度/蛋白质浓度比例均未发生变化。用总磷脂与总蛋白质含量的比例取得了同样的发现。作为通过质谱法来分析其组成的结果,在分析HBsAg的杂质或其他次要化合物期间没有其他显著的变化。

[0065] 实施例3.具有各种不同的磷脂酰丝氨酸百分比的HBsAg制备物的免疫学评价

[0066] 为了评价磷脂酰丝氨酸的存在是否影响针对HBsAg的免疫应答,于在血清中表达HBsAg的转基因小鼠中进行免疫原性研究[Castro F0等人, Interferón y Biotecnología (1989) 6:251-257; Pérez A等人, Acta Biotechnol (1993) 13:373-383]。使用了7个组,每组6只小鼠。使用8-12周龄的雌性小鼠,其通过鼻内(IN)途径进行免疫接种。该研究的前六个组每个接受具有弗氏佐剂的5μg的在表3中所描述的各种不同HBsAg变体。第七个组用作对照组,并且接受1X PBS。所有治疗组接受10个剂量的免疫原,其每14天进行施用。血液抽取在最初免疫接种之前和在每个剂量之后10天进行,从所施用的第三个剂量开始。在表4中显示了在转基因小鼠的血清中的HBsAg水平,以及在施用10个剂量后分离的脾细胞的培养物上清液中所诱导的细胞因子(γ IFN(IFN-γ)、肿瘤坏死因子(TNF-α)和IL-2)的水平。所述评价借助于ELISA技术来进行。

[0067] 在以10次连续的免疫接种通过IN途径施用5μg的HBsAg后,在关于HBsAg来说转基因的小鼠的血液中HBsAg浓度显著地降低,当在所述HBsAg中的磷脂酰丝氨酸水平为5%或更高时(表3的变体D、E和F,实施例2)。同样地,具有5%或更高的磷脂酰丝氨酸的HBsAg变体诱导相比于具有低的(变体C)或不可检测的磷脂酰丝氨酸水平的变体而言显著地更高水平的IFN-γ、TNF-α和IL-2,这暗示了剂量依赖性效应。所有这些在表4中可看到。

[0068] 相比于不包含磷脂酰丝氨酸的HBsAg而言,在用包含高于5%的磷脂酰丝氨酸水平的HBsAg变体(表4,变体D至F)对HBsAg转基因小鼠进行免疫接种后,产生Th1细胞因子的显著增加并且发现更大的消除循环HBsAg的能力。对于变体D-F所发现的细胞因子水平显著高于条件A-C的那些。在体外刺激经免疫接种的转基因动物的脾脏细胞后,变体D-F诱导了最强的HBsAg浓度降低,以及最有力的细胞因子分泌。

[0069] 表4.在用具有各种不同的磷脂酰丝氨酸百分比的HBsAg变体对转基因小鼠进行免疫接种后,循环HBsAg和细胞因子水平的评价。

<b>HBsAg 变体</b>	<b>HBsAg 浓度 的降低%</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> 的分泌 ( pg/mL )</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math> 的分泌 ( pg/mL )</b>	<b>IL-2 的分泌 ( pg/mL )</b>
<b>[0070]</b>	<b>A</b>	<b>20±3</b>	<b>50±7</b>	<b>14±6</b>
	<b>B</b>	<b>23±4</b>	<b>65±12</b>	<b>22±4</b>
	<b>C</b>	<b>26±5</b>	<b>149±15</b>	<b>36±7</b>
	<b>D</b>	<b>66±5 (*)</b>	<b>250±20 (*)</b>	<b>570±30 (*)</b>
	<b>E</b>	<b>70±6 (*)</b>	<b>300±27 (*)</b>	<b>660±27 (*)</b>
	<b>F</b>	<b>90±5 (**)</b>	<b>359±31 (**)</b>	<b>77±8 (**)</b>

[0071] A-F:所产生的HBsAg变体,它们在其组成中具有渐增的磷脂酰丝氨酸水平,在表3中所显示的。(\*) :显著的差异 ( $p<0.05$ ) ; (\*\*) :非常显著的差异 ( $p<0.01$ ) 。

[0072] 如所看到的,通过用具有更高磷脂酰丝氨酸含量的HBsAg变体对关于HBsAg来说转基因的小鼠进行免疫接种,具有了Th1细胞因子的显著增加,和更大的消除循环HBsAg的能力,这证明了随着在与由该抗原所形成的VLP相联合的脂质之中该脂质组分的比例增加,该抗原的免疫原性增加。

[0073] 在现有技术中以前已经报道了在HBsAg颗粒中磷脂酰丝氨酸的插入。然而,还没有研究该组分的比例如何影响所述颗粒的免疫原性。虽然在2008年Lobaina等人对于磷脂酰丝氨酸在巴斯德毕赤酵母中产生的HBsAg的更高的免疫原性之中可能具有的作用作出了推测 [Lobaina Y等人,Biotecnología Aplicada (2008), 25:325-331],但是在那篇报道中证明,两种基于在相同宿主中产生的HBsAg的疫苗显示出在免疫原性方面的差异,尽管由于其中产生它的酵母物种而据推测具有相同的磷脂酰丝氨酸水平。

[0074] 实施例4.包囊有更高比例的mRNA的HBcAg变体在CHB患者中免疫原性增加的证明

[0075] 在实施例1中,在小鼠中证明了在所包囊的总RNA之中mRNA的比例增加的HBcAg的免疫原性增加。考虑到这些结果,表征了包括分别在其mRNA含量和磷脂酰丝氨酸含量方面具有修饰的HBcAg和HBsAg两者的制剂的免疫学和体内抗病毒应答的行为。

[0076] 为此,在患有慢性乙型肝炎的患者中进行随机且双盲的II期临床研究。在该研究开始时选择具有大于10000个拷贝/mL的病毒载量和阳性HBeAg的患者。将患者分成6个组,每个组15名患者,向他们施用在表5中所描述的治疗。施用总共10个剂量,其分为两轮,每轮5个剂量,间隔一个月的休息。前5个剂量仅通过IN途径进行施用,和其余5个剂量通过IN/SC同时共施用。在所述两轮施用中,均以14天的间隔安排剂量。

[0077] 表5.在II期临床研究中的治疗组,其中评价了分别在其mRNA含量和磷脂酰丝氨酸含量方面具有修饰的HBcAg和HBsAg抗原。

[0078]	组	治疗
	1	50μg mHBsAg+50μg mHBcAg
	2	100μg mHBsAg+100μg mHBcAg
	3	1000μg mHBsAg+1000μg mHBcAg
	4	50μg HBsAg+50μg HBcAg
	5	100μg HBsAg+100μg HBcAg
	6	1000μg HBsAg+1000μg HBcAg

[0079] mHBcAg:HBcAg,其以该抗原的RNA总量的50%的比例包含mRNA;

[0080] mHBsAg:HBsAg,其在VLP的脂质组分之中包含7%的磷脂酰丝氨酸。

[0081] 令人惊讶地,在用包含所述两种经修饰的抗原的制剂(即包含具有高于5%的磷脂酰丝氨酸水平的HBsAg和具有大于45%的mRNA的HBcAg的制剂)进行治疗的患者组中发现显著更高的至HBeAg和至HBsAg的血清转变水平,当与用没有这些特征的制剂进行治疗的患者组相比较时(参见表6)。这证明了此类修饰在患者中产生的抗病毒应答的质量增加之中的重要性。

[0082] 在人中,在从50μg/抗原/剂量直至1000μg/抗原/剂量的浓度范围内对所述抗原进行了评价,其中证明了抗病毒应答,在下述方面:至HBsAg和HBeAg的血清转变,病毒学控制,和持续病毒学应答,低于10000个拷贝的HBV DNA/mL,在治疗结束后超过1年时。

[0083] 表6.在用分别在其mRNA含量和磷脂酰丝氨酸含量方面具有修饰的HBcAg和HBsAg进行的II期临床研究中,在治疗结束后1年时具有至HBeAg和至HBsAg的血清转变的患者的频次。

[0084]	治疗组	至HBeAg的血清转变	至HBsAg的血清转变
	1	6/15	2/15
	2	7/15	3/15
	3	12/15	6/15
	4	3/15	0/15
	5	3/15	0/15
	6	4/15	0/15

[0085] 在关于HBsAg来说转基因的小鼠的模型中也发现了相似的结果,其中进行评价与在表5中所描述的那些相似的治疗组的测定法,并且对于接受包含具有上面所描述的修饰的抗原的制剂的组,获得了更大的循环HBsAg的减少,以及更高的且更早出现的抗-HBsAg抗体滴度。

[0086] 令人感兴趣的是,包含经修饰的HBcAg和HBsAg变体的制剂在关于HBV来说转基因的小鼠中和在患者中发展出了更强有力的Th1免疫原性,相比于用包含未修饰的抗原的制剂或者仅包含这些经修饰的抗原之一的制剂所获得的应答而言。

[0087] 实施例5.分别在其mRNA含量和磷脂酰丝氨酸含量方面具有修饰的HBcAg和HBsAg抗原在多价制剂中的佐剂效应

[0088] 在该研究中,通过肠胃外和粘膜途径,比较了分别在其mRNA含量和磷脂酰丝氨酸含量方面具有修饰的重组蛋白质HBcAg和HBsAg的混合物与未修饰的HBcAg和HBsAg的混合物的佐剂(即增加针对共施用的抗原的免疫应答)能力。为此目的,选择了重组嵌合蛋白质

CR3,其是HIV-1的多表位抗原[Iglesias E等人,J Biochem Mol Biol&Biophys (2001) 1: 109-122]。用下列对八个组(八只6-8周龄的雌性Balb/c (H-2<sup>d</sup>) 小鼠) 进行接种:1) PBS (安慰剂),通过SC免疫接种(此后我们称其为安慰剂(SC)) ;2) 乙酸钠缓冲液(NaAc),pH=5.2,通过IN免疫接种(安慰剂(IN)) ;3) HBcAg (C) 和HBsAg (S) 的混合物,通过SC途径(C+S (SC)) ;4) 以该抗原的RNA总量的50%的比例包含mRNA的HBcAg (mC) 和在其脂质组分之中包含7%的磷脂酰丝氨酸的HBsAg (mS) 的混合物,通过SC途径(mC+mS (SC)) ;5) C+S,通过IN途径(C+S (IN)) ;6) mC+mS,通过IN途径(mC+mS (IN)) ;7) CR3与HBcAg (C) 和HBsAg (S) 的混合物,通过SC途径(CR3+C+S (SC)) ;8) CR3+mC+mS (SC) ;9) CR3+C+S (IN) ;和10) CR3+mC+mS (IN) 。所使用的剂量为每种途径5μg的每种抗原,并且在免疫接种计划方案的第0、7和21天施用免疫原。对于SC免疫接种,将蛋白质溶解在PBS中并且吸附在1.4mg/mL的氢氧化铝(Superfos Biosector A/S, Vedbaek, Denmark) 中。对于IN途径,将蛋白质溶解在NaAc,pH=5.2中。将处于仰卧位置的动物通过腹膜内(IP) 施用30μL的氯胺酮(10mg/mL) 来进行麻醉,并且用移液管的尖端将免疫原缓慢分配在50μL(25μL/鼻孔) 中。在免疫接种后十天,收集所有动物的血清,并且在研究结束时处死五只动物(以随机方式),以便获得其脾脏以用于细胞免疫应答的研究。

[0089] 通过间接ELISA来评价血清中的IgG应答,其中将平板用CR3蛋白进行包被。以前已经报道了用于定量在用CR3进行刺激的培养物的上清液中的IFN- γ 分泌的方法[Garcia Diaz D等人, Immunol Lett (2013) 149:77-84]。

[0090] 关于统计学分析,用科尔莫戈罗夫-斯米尔诺夫(Kolmogorov-Smirnov) 检验来评价数据的高斯分布,和用巴特利特(Bartlett) 检验来评价方差一致性。将具有正态分布(或者其中通过高斯分布来推断) 和具有方差一致性的样品用参数检验来进行比较。否则,选择备选的非参数检验。将所有IgG滴度转换成log 10,以取得所述值的正态分布。对于未达到血清转变的动物的血清,指定1:10的任意滴度,以为统计学处理。p<0.05的值被认为是在统计学上显著的。

[0091] 在图2中所看到的抗-CR3 (HIV-1) IgG抗体的测定结果证明了在通过SC和IN途径进行施用后,分别地在用CR3+mC+mS的混合物进行免疫接种的动物组(组8和10) 中相对于在用CR3+C+S的混合物进行免疫接种的动物组(组7和9) 中而言更高的应答(p<0.05)。与前面的结果相一致,在来自相同组的小鼠的培养物上清液中还观察到更大的IFN- γ 分泌,如在表7中所观察到的。对于该分析,在最后一次免疫接种后10天(第31天),培养来自五只小鼠/组的脾细胞。对于安慰剂组,制备独个动物的脾细胞的悬浮液。用2.5μg/mL的CR3蛋白离体刺激五天。在上清液体中,用“夹心”型ELISA来对CR3-特异性IFN- γ 进行定量。检测极限为0.80ng/mL。

[0092] 表7.在培养物上清液体中所测量的IFN- γ 分泌。

组	接种物	重复 (小鼠)	IFN- $\gamma$ (ng/mL)
1	安慰剂 (SC)	汇集物	< 0.80
2	安慰剂 (IN)	汇集物	< 0.80
		1	< 0.80
		2	< 0.80
3	C+S (SC)	3	< 0.80
		4	< 0.80
		5	< 0.80
		1	< 0.80
		2	< 0.80
4	mC+mS (SC)	3	< 0.80
		4	< 0.80
		5	< 0.80
		1	< 0.80
		2	< 0.80
5	C+S (IN)	3	< 0.80
[0093]		4	< 0.80
		5	< 0.80
		1	< 0.80
		2	< 0.80
6	mC+mS (IN)	3	< 0.80
		4	< 0.80
		5	< 0.80
		1	6.35
		2	7.86
7	CR3+C+S (SC)	3	3.32
		4	4.45
		5	3.54
		1	10.35
		2	9.86
8	CR3+mC+mS (SC)	3	8.62
		4	9.05
		5	11.24

		1	<b>&lt; 0.80</b>
		2	<b>2.03</b>
9	<b>CR3+C+S ( IN )</b>	3	<b>1.68</b>
		4	<b>0.97</b>
		<b>5</b>	<b>2.25</b>
<hr/>			
[0094]		1	<b>4.55</b>
		2	<b>5.36</b>
10	<b>CR3+mC+mS ( IN )</b>	3	<b>3.87</b>
		4	<b>2.54</b>
		<b>5</b>	<b>3.98</b>

---

[0095] 最后,在通过SC途径进行免疫接种的组中,比较了在离体刺激后对于CR3 (HIV-1)来说特异性的CD8+细胞的频次。在以CR3+mC+mS (SC) 进行刺激的组中获得相对于在以CR3+C+S (SC) 进行刺激的组中而言更高的CD8+细胞的频次 ( $p<0.05$ ) ,这是在图3中所观察到的。

[0096] 这些结果一起证明,通过肠胃外和粘膜途径,具有大于45%的mRNA的HBcAg (mC) 和具有高于5%的磷脂酰丝氨酸水平的HBsAg (mS) 的混合物具有更高的Th1佐剂效应。特别地,对于针对HIV的疫苗接种,该结果具有最大的重要性,因为Th1抗病毒应答与针对感染和至AIDS的进展的保护作用相关。

[0097] 虽然该实验的目标不是测量针对HBsAg和HBcAg抗原(在该实施例中缩写为C和S)的体液应答,但是在用经修饰的HBsAg和HBcAg抗原的混合物 (mC+mS) 进行免疫接种的小鼠组中观察到相比于未修饰的HBsAg和HBcAg的混合物 (C+S, 数据未显示) 而言更高的抗-HBcAg和抗-HBsAg IgG应答,具有统计学显著性。这确证了先前获得的结果。

[0098] 实施例6.通过将来自用分别在其mRNA含量和磷脂酰丝氨酸含量方面具有修饰的HBcAg和HBsAg抗原的制剂进行免疫接种的Balb/c小鼠的细胞过继转移至表达HBsAg的转基因Balb/c小鼠来进行被动免疫接种

[0099] 在本发明中,希望从用包含分别在其磷脂酰丝氨酸含量和mRNA含量方面含有修饰的HBsAg和HBcAg抗原的制剂对个体进行主动免疫接种开始来增强供者中的抗-HBsAg和抗-HBcAg免疫应答,并且另外还在转移之前在体外激活待转移的细胞,从而使得当将所述细胞接种到受者生物体中时,针对这些抗原的应答是最大的。如此,人为地获得了在人中不存在的应答类型,这使得能够将供者的界限扩大至具有相似单元型的人,而不依赖于他们是否已被HBV感染。

[0100] 在本实施例中,通过细胞的过继转移评价了通过用分别在其磷脂酰丝氨酸含量和mRNA含量方面具有修饰的HBsAg和HBcAg抗原组成的制剂(其通过IN/肠胃外途径进行应用,在表达HBsAg的转基因小鼠 (HBV的持续感染的模型) 的背景下) 进行疫苗接种而产生的免疫应答的效应。该研究的目标之一是评价转移的免疫应答对于在转基因小鼠血清中的HBsAg浓度(抗原血症) 的效应。此外,还比较了由用于施用HBsAg和HBcAg抗原的制剂的IN/肠胃外途径的组合所诱导的应答的效应,相对于通过转移在体内和在体外仅用HBsAg进行刺激的细胞而产生的效应而言。另外,在关于该抗原来说明转基因的小鼠的背景下,研究了转移的抗-HBsAg抗体应答的动力学。使用了Balb/c小鼠和HBsAg (+) 转基因小鼠 (Balb/c遗传

背景,在CIGB获得)。

[0101] 在Balb/c小鼠中抗-HBsAg免疫性的产生

[0102] 在8至12周龄的雌性Balb/c小鼠中进行免疫接种计划方案。用包含经修饰的抗原HBsAg(具有高于5%的磷脂酰丝氨酸含量)和HBcAg(具有高于45%的mRNA含量)的疫苗制备物同时通过IN和胃肠外途径对小鼠进行免疫接种。在胃肠外途径之中,在该情况下检定了IM、SC和ID途径。在第0和14天时施用所述剂量(以100μL的体积),并且在第100天时,在转移之前,施用一个加强剂量。在第-2、10和25天时通过眶后丛来进行血液抽取。在表8中反映了免疫接种计划方案的设计,包括每个组所接受的治疗。

[0103] 表8. 非转基因Balb/c小鼠中的免疫方案。

组	治疗	途径	动物数目
1	<b>mHBsAg + mHBcAg + 氧化铝/ mHBsAg + mHBcAg</b>	IM / IN	13
2	<b>mHBsAg + mHBcAg + 氧化铝/ mHBsAg + mHBcAg</b>	SC / IN	13
3	<b>mHBsAg + mHBcAg + 氧化铝/ mHBsAg + mHBcAg</b>	ID / IN	13
4	<b>mHBsAg + mHBcAg / mHBsAg + mHBcAg</b>	IM / IN	13
5	<b>mHBsAg + mHBcAg / mHBsAg + mHBcAg</b>	SC / IN	13
6	<b>mHBsAg + mHBcAg / mHBsAg + mHBcAg</b>	ID / IN	13
7	<b>氧化铝/ PBS</b>	IM / IN	9

[0104] [0105] mHBcAg:HBcAg,其以该抗原的RNA总量的50%的比例包含mRNA;

[0106] mHBsAg:HBsAg,其在VLP的脂质组分之中包含7%的磷脂酰丝氨酸。

[0107] 通过使用ELISA技术在每次接种后测量IgG应答和抗-HBsAg IgG亚类来进行由这些治疗所产生的体液免疫应答的评价。为了评价细胞免疫应答,在首次施用后10天,进行ELISPOT类型测定法,以测量由来自脾脏的CD8+淋巴细胞进行的针对HBsAg的特异性IFN-γ分泌。这些评价的结果表明,第5组产生了最大的细胞应答和与其余所研究的组没有差别的体液应答。基于此,选择该组的两只动物作为脾细胞的供者以用于过继转移。以1:1(HBsAg:HBcAg)的比例来进行免疫原的选择。

[0108] 免疫脾细胞的获得

[0109] 在接受加强剂量后15天,处死第5组的两只小鼠和第7组(安慰剂)的三只小鼠,并取出脾脏。将第5组的脾脏和第7组的脾脏分别进行分组。处理脾脏直至获得脾细胞。将它们分开为在100μL 1X PBS中的具有 $30 \times 10^6$ 个细胞的等分试样,以用于将它们转移至受者小鼠。

[0110] 免疫性的过继转移

[0111] 作为受者,使用16-20周龄的和两种性别的表达HBsAg的转基因小鼠。将它们分派至各种不同的治疗组,如在表9中所显示的那样。在转移脾细胞之前,进行部分血液抽取,以检查在血清中的HBsAg水平。然后,接种(通过IP途径)在100 $\mu$ L 1X PBS的体积中的 $30 \times 10^6$ 个脾细胞。为了评价免疫性的过继转移的效应,每周通过眶后丛来进行血液抽取,共5周。在转移后第8周,给动物放血并处死动物。

[0112] 表9. 免疫性的过继转移的实验设计。

组	治疗	动物数目
1	来自对 HBsAg 和 HBcAg 具有应答的 Balb/c 小鼠的脾细胞*的转移	3
2	来自安慰剂 Balb/c 小鼠的脾细胞的转移	3
3	1x PBS	3

[0113] [0114] 在关于HBsAg来说转基因的小鼠的血清中的HBsAg的定量

[0115] 通过ELISA来测定在血清中的HBsAg水平。将平板用称为Hep4的抗-HBsAg单克隆抗体(由CIGB生产)进行包被。从在转移后那一周的评价中,所有接受具有先前的对HBsAg的免疫性的细胞的小鼠都显示出在血清中的HBsAg的显著减少,在零时刻与第2和第3周之间存在显著差异( $p < 0.05$ )。从第四周(第35天)开始,观察到在血清中的HBsAg浓度开始增加,这表明由所转移的免疫性对抗原血症的控制正在消失。从该点开始,和直至第8周(第63天),在抗原血症方面与对于该测定法的零时刻所报告的没有差异。

[0116] 在接受具有针对HBsAg的特异性免疫性的脾细胞的转移的小鼠的情况下,检测到在血清中的HBsAg的显著减少,这在第7天和第28天之间是更显著的。然而,对于接受安慰剂脾细胞转移或PBS的小鼠,虽然检测到在血清中的HBsAg浓度的波动,但是这从未达到显著不同于零时刻,并且也从未检测到低于5 $\mu$ g/ml的值。

[0117] 这些结果表明,可能的是,通过由细胞介导的免疫性的过继转移来有效地降低在关于该蛋白质来说转基因的动物的血清中的循环HBsAg的水平。在该情况下,由所转移的免疫应答对抗原血症所建立的控制是有效的,并且在单次细胞转移后持续大约3周。

[0118] 在血清中的抗-HBsAg IgG应答

[0119] 对于所有接受具有先前的对该抗原的免疫性的脾细胞的转移的小鼠,检测针对HBsAg的特异性IgG抗体应答。这与所获得的抗原血症的结果一致。在具有抗-HBsAg应答的动物的情况下,所检测到的滴度是高的(滴度 $> 10^4$ )并且从第三周开始降低,这可能与在大约第4周(第35天)时对于这些动物所观察到的抗原血症的增加相关。接受安慰剂细胞转移或PBS的组不具有特异性抗体滴度。

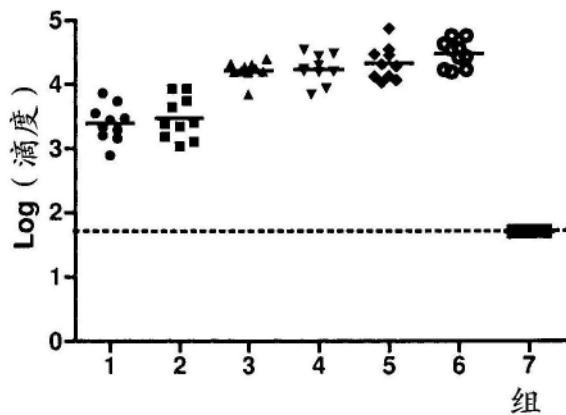


图1

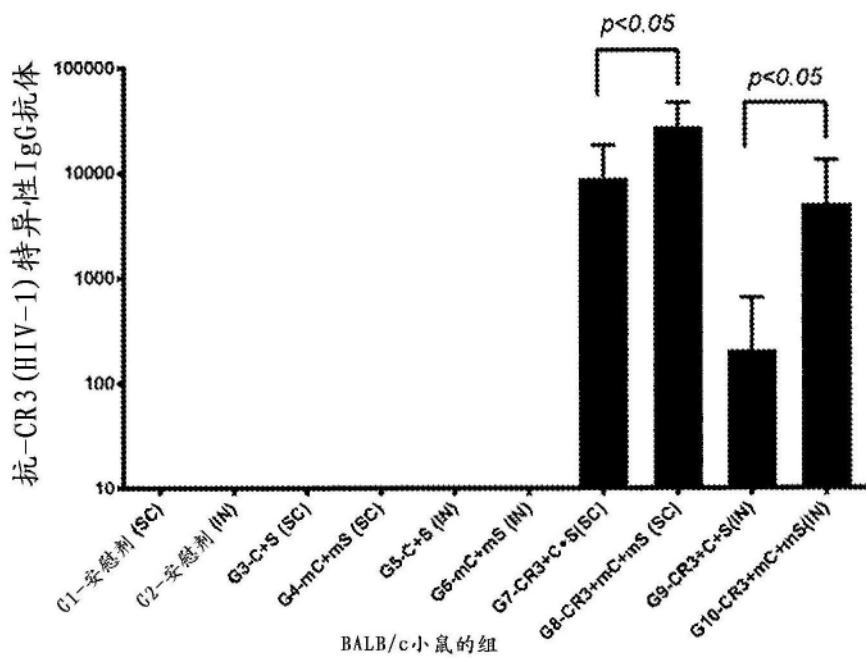


图2

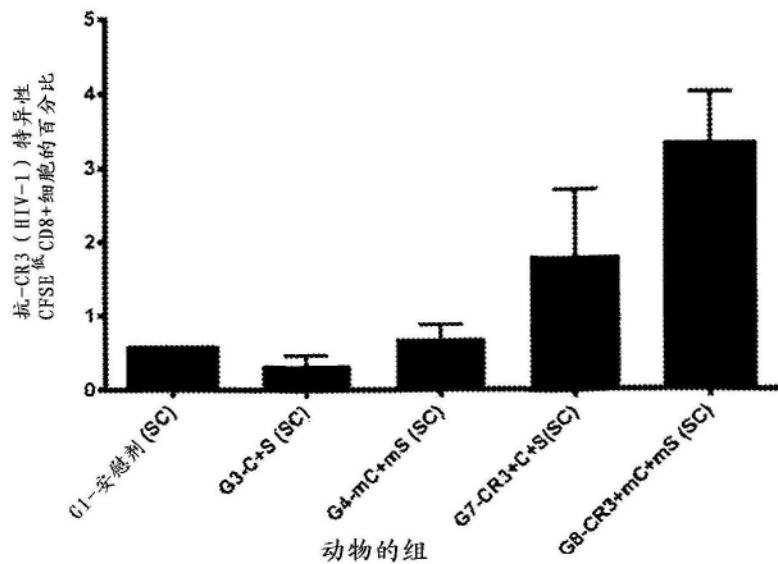


图3