[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680009034.0

[43] 公开日 2008 年 3 月 19 日

[11] 公开号 CN 101146551A

[22] 申请日 2006.2.16
[21] 申请号 200680009034.0
[30] 优先权
[32] 2005. 2.16 [33] US [31] 60/653,741
[86] 国际申请 PCT/GB2006/000557 2006.2.16
[87] 国际公布 WO2006/087563 英 2006.8.24
[85] 进入国家阶段日期 2007.9.20
[71] 申请人 诺华疫苗和诊断公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 D·欧哈根
[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 陶家蓉
权利要求书 3 页 说明书 16 页

[54] 发明名称

含有磷酸铝和 3D－MPL 的佐剂组合物

[57] 摘要

一种含有(i)抗原；(ii)磷酸铝佐剂和(iii)3－O－脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂的免疫原性组合物。组分(ii)和(iii)也可单独用作佐剂系统。 公开了这些组合物的各种特征，包括至少 50％的所述 3－O－脱酰基单磷酰脂质 A 吸附到所述磷酸铝佐剂上。所述佐剂混合物特别可用于乙肝病毒表面抗原。

1. 一种佐剂组合物，其含有：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于，至少 50%的所述 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 吸附到所述磷酸铝佐剂上。

2. 如权利要求 1 所述的佐剂组合物，其特征在于，所述组合物中未吸附的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 少于 5 μg/ml。

3. 如以上任一项权利要求所述的佐剂组合物，其特征在于，至少 95%的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 吸附到所述磷酸铝佐剂上。

4. 如以上任一项权利要求所述的佐剂组合物，其特征在于，所述 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂包含酰化二糖混合物，其中各种二糖：(a) 具有两个 β-1',6-连接的 2-脱氧-2-氨基葡萄糖单糖亚单元；(b) 4'位磷酸化；(c) 1、3 和 6'位未取代；(d) 3'位 O-酰化；和(e) 2 和 2'位 N-酰化；其中以重量计所述酰化二糖混合物所含至少 10%的组分中 2、2'和 3'位各酰基自身的脂肪族碳原子有 O-酰基取代。

5. 如以上任一项权利要求所述的佐剂组合物，其特征在于，还含有三乙铵离子。

6. 如以上任一项权利要求所述的佐剂组合物，其特征在于，所述组合物的重量克分子渗透压浓度在 200-400 mOsm/kg 之间。

7. 如以上任一项权利要求所述的佐剂组合物，其特征在于，所述组合物的 pH 在 5-7.5 之间。

8. 一种免疫原性组合物，其含有：(i) 磷酸铝佐剂；(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂；和(iii) 抗原，其特征在于，至少 50%的所述 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 吸附到所述磷酸铝佐剂上。

9. 如以上任一项权利要求所述的佐剂组合物，其特征在于，所述磷酸铝佐剂是不定形的。

10. 如权利要求 9 所述的组合物，其特征在于，所述抗原是乙肝病毒表面抗原(HBsAg)。

11. 如权利要求 10 所述的组合物，其特征在于，至少 50%，优选至少 90%的所述 HBsAg 吸附到所述磷酸铝佐剂上。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的组合物，其特征在于，所述抗原是酵母菌表达的基本上球形颗粒形式的 HBsAg，其包含含有磷脂的脂质基质。

13. 如权利要求 12 所述的组合物，其特征在于，所述酵母菌是酿酒酵母。

14. 如权利要求 10-13 中任一项所述的组合物，其特征在于，0.5 ml 剂量的该组合物含有约 50 μg 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A；约 0.5 mg 磷酸铝 (按照 Al^{3+}表示)；和约 20 μg/ml HBsAg。

15. 如权利要求 8 或 9 所示的组合物，其特征在于，所述抗原是酵母菌表达的混合颗粒(RTS,S)，其含有：(a) RTS，其是所含的基本上全部镰状疟原虫 CS 蛋白的 C-末端部分通过 HBV 表面抗原的前 S2 部分四个氨基酸与 HBsAg 相连的杂交蛋白；和(b) 作为乙肝病毒表面抗原的 S。

16. 如权利要求 8-15 中任一项所述的组合物，其特征在于，将其包装入注射器中。

17. 如权利要求 16 所述的组合物，其特征在于，所述注射器用硼硅玻璃制成，配有丁基橡胶制成的盖帽。

18. 一种制备如权利要求 8-15 中任一项所述组合物的方法，包括以下步骤：(a) 混合所述抗原与所述磷酸铝佐剂；然后(b) 混合所述 3-O 脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂与该抗原/磷酸铝混合物。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，步骤(a)中将所述抗原吸附到所述磷酸铝佐剂上。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的方法，其特征在于，还包括在步骤(b)后抽取 0.5 ml 混合物样品并注入容器中的步骤。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述容器是玻璃注射器。

22. (i)抗原；(ii) 磷酸铝佐剂；和(iii)3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂在制备给予患者的疫苗中的应用，其中至少 50%的所述 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 吸附到所述磷酸铝佐剂上。

23. 如权利要求 22 所述的应用，其特征在于，所述疫苗用于肌肉内注射。

24. 如权利要求 22 或 23 所述的应用，其特征在于，所述抗原是 HBsAg。

25. 如权利要求 24 所述的应用，其特征在于，采用第 0、1、2 和 6 个月给药的免疫方案来给予所述组合物，其中 0 时是首次给药的时间。

26. 如权利要求 24 或 25 所述的应用，其特征在于，所述患者是血液透析的成人。

含有磷酸铝和 3D-MPL 的佐剂组合物

本文引用的所有文件千万纳入本文作为参考。

技术领域

本发明涉及疫苗佐剂领域。

背景技术

铝盐(常称为“明矾”)是经典的疫苗佐剂。各种其它佐剂已有描述，详情可见参考文献 1 和 2 等教材。这些佐剂之一是 3'脱酰基单磷酰脂质 A (或“3D-MPL”)。

参考文献 3-10 报道了使用称为“AS04”的佐剂系统在无反应肝炎患者中获得成功，据称该佐剂系统含有 3D-MPL 和明矾[11-14]。本发明的目的之一是改进和提高该佐剂系统。

发明内容

本发明组合物包含磷酸铝佐剂和 3D-MPL 佐剂。该双佐剂组合已在参考文献 12-14 的通用术语中得到描述，但本发明公开了对该组合的许多如下改进：

(a) 该组合物的重量克分子渗透压浓度在 200-400 mOsm/kg 之间。

(b) 该组合物的 pH 应在 5-7.5 之间。

(c) 该组合物应含缓冲液。

(d) 疫苗中至少 50%的 3D-MPL 应吸附于磷酸铝。

(e) 疫苗中的 3D-MPL 应采取直径小于 150 nm 的胶束结构形式。

(f) 疫苗中的 3D-MPL 应是不同酰化形式的混合物，优选至少 10%是 6-酰基-链形式。

(g) 该组合物可含有一种或多种以下组分：聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯；山梨醇；三乙醇胺；三乙铵离子(triethylammonium ion)；乳糖；蔗糖；海藻糖；甘露糖。

这些改进可单独使用或联用。

因此，本发明提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于该组合物的重量克分子渗透压浓度在 200-400 mOsm/kg 之间。

本发明也提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于该组合物的 pH 在 5-7.5 之间。

本发明也提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于该组合物含缓冲液，例如其 pH 在 5-7.5 之间。

本发明也提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于至少 50%的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 吸附于磷酸铝。

本发明也提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于该组合物中未吸附的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 小于 50 μg/ml。

本发明也提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 采取直径小于 150 nm 的颗粒形式。

本发明也提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 包含酰化二糖混合物的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其中各种二糖：(a) 具有两个 β-1',6-连接的 2-脱氧-2-氨基葡萄糖单糖亚单元；(b) 4'位磷酸化；(c) 1、3 和 6'位未取代；(d) 3'位 O 酰化；和(e) 2 和 2'位 N-酰化；其中酰化二糖混合物所含至少 10%(以重量计)的组分中 2、2'和 3'位各酰基自身的脂肪族碳原子上有 O-酰基取代。

本发明也提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂；和至少一种选自山梨醇、三乙醇胺、三乙铵离子、乳糖、蔗糖、海藻糖和甘露糖的物质。

以上各种特征可组合使用。因此，本发明提供含有以下组分的佐剂组合物：(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其特征在于该组合物具有以下一种或多种特性：

(1) 重量克分子渗透压浓度在 200-400 mOsm/kg 之间；

(2) pH 在 5-7.5 之间。

(3) 含有缓冲液；

(4) 至少 50%的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 吸附于磷酸铝；

(5) 其中未吸附的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 小于 50 μg/ml；

(6) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂采取直径小于 150 nm 的颗粒形式；

(7) 所述 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂包含酰化二糖混合物，其中各二糖：(a) 具有两个 β-1',6-连接的 2-脱氧-2-氨基葡萄糖单糖亚单元；(b) 4'位磷酸化；(c) 1、3 和 6'位未取代；(d) 3'位 O 酰化；和(e) 2 和 2'位 N-酰化；其中酰化二糖的混合物所含至少 10%(以重量计)的组分中 2、2'和 3'位各酰基自身的脂肪族碳原子上有 O-酰基取代；和/或

(8) 含有至少一种选自山梨醇、三乙醇胺、三乙铵离子、乳糖、蔗糖、海藻糖和甘露糖的物质。

本发明也提供包含本发明佐剂组合物，还包含(iii)一种抗原的免疫原性组合物。

磷酸铝佐剂

本发明组合物包含磷酸铝佐剂和 3D-MPL 佐剂。

术语“磷酸铝”是该领域惯常的，但未精确描述其代表的实际化学化合物[例如，参见参考文献 2 的第 9 章]。本发明可用常规用作佐剂的任何“磷酸铝”佐剂，一般是羟基磷酸铝，这些佐剂也常含有少量硫酸根(即，羟基磷酸硫酸铝)。可通过沉淀获得这些佐剂，沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取得该盐羟基的程度。羟基磷酸盐中 PO_4/Al 摩尔比通常在 0.3-1.2 之间。羟基磷酸盐因存在羟基而有别于严格的 $AlPO_4$。例如，3164cm^{-1} 的 IR 光谱带(例如，当加热至 200℃时)表明存在结构性羟基[参考文献 2 的第 9 章]。

铝盐可采取任何合适的物理形式，但通常是无定形的。

磷酸铝佐剂的 PO_4/Al^{3+}摩尔比通常在 0.3-1.2 之间，优选在 0.8-1.2 之间，更优选 0.95 ± 0.1。磷酸铝通常是无定形的，特别是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 PO_4/Al^{3+} 摩尔比在 0.84-0.92 之间，含 0.6 mg Al^{3+}/ml 的无定形羟基磷酸铝。磷酸铝通常是颗粒状的。这些颗粒在吸附任何抗原和/或 3D-MPL 后的典型直径是 0.5-20 μm(例如，约 5-10 μm)。

磷酸铝的 PZC 与磷酸根取代羟基的程度逆相关，该取代程度依据沉淀制备该

盐所用的反应条件和反应物浓度而不同。也可通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(磷酸根越多 = PZC 酸性越高)或通过添加组氨酸缓冲液(使得 PZC 更具碱性)等缓冲液来改变 PZC。本发明所用磷酸铝的 PZC 通常在 4.0-7.0 之间，更优选在 5.0-6.5 之间，例如约 5.7。

优选采用加有 3D-MPL(和任选的抗原)的水溶液形式的磷酸铝(注意：虽然正常将水性磷酸铝称为“溶液”，但从严格的物理化学观点上讲，该盐不可溶并形成混悬液)。优选先将磷酸铝稀释至所需浓度并确保溶液均匀，再加入 3D-MPL 和/或抗原。

3D-MPL 和/或抗原加入前 Al^{3+}的浓度通常在 0-10 mg/ml 之间。优选的浓度是在 0.5-3 mg/ml 之间。

用于制备本发明组合物的磷酸铝溶液可含有缓冲液(例如，磷酸或组氨酸或 Tris 缓冲液)，但不一定。磷酸铝溶液优选无菌、无热原。磷酸铝溶液可含有游离的水性磷酸根离子，例如浓度在 1.0-20 mM 之间、优选在 5-15 mM 之间、更优选约 10 mM。磷酸铝溶液也可含有氯化钠。氯化钠浓度优选为 0.1-100 mg/ml(例如，0.5-50 mg/ml、1-20 mg/ml、2-10 mg/ml)，更优选约 3 ± 1 mg/ml。存在氯化钠有助于先正确检测 pH 再吸附其它组分，也能影响重量克分子渗透压浓度。

3D-MPL 佐剂

本发明组合物包含磷酸铝佐剂和 3D-MPL 佐剂。

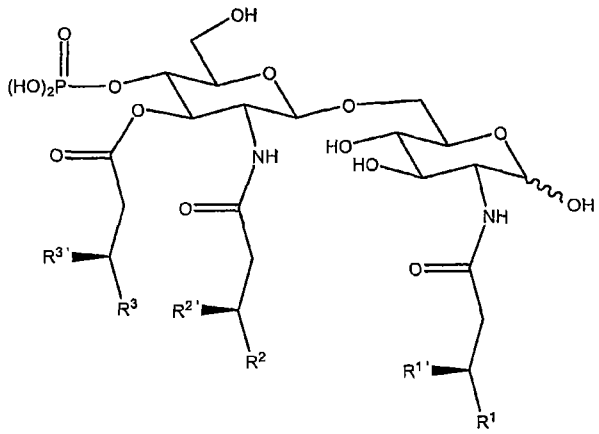
3-O-脱酰基单磷酰脂质 A(3D-MPL)也称为 3-脱-O-酰基单磷酰脂质 A 或 3-O-脱酰基-4'-单磷酰脂质 A。该名称表明单磷酰脂质 A 中还原端葡糖胺的 3 位脱酰基。其由明尼苏达沙门菌(*Salmonella minnesota*)的无庚糖(heptoseless)突变体制备，化学结构类似于脂质 A 但缺乏酸不稳定的磷酰基和碱不稳定的酰基。它能激活单核细胞/巨噬细胞谱系细胞，刺激释放几种细胞因子，包括 IL-1、IL-2、TNF-α和 GM-CSF。制备 3D-MPL 最初描述于参考文献 15，该产品由 Corixa Corporation 生产并以商品名 MPL™ 出售。其它细节见参考文献 16-19。

典型组合物包含浓度在 25 μg/ml-200 μg/ml 之间，例如 50-150 μg/ml、75-125 μg/ml、90-110 μg/ml 或约 100 μg/ml 的 3D-MPL，通常每剂量给予 25-75 μg 之间的 3D-MPL，例如每剂量 45-55 μg 之间，或约 50 μg 的 3D-MPL。

优选将 3D-MPL 吸附到磷酸铝上。优选吸附至少 50%(以重量计)的 3D-MPL，

例如≥60%、≥70%、≥80%、≥90%、≥95%、≥98%或更高。可用与抗原相同的方法(见下文)检测吸附的百分数。在 3D-MPL 总浓度为 100 μg/ml 的组合物中，未吸附的 3D-MPL 的浓度应低于 50 μg/ml，例如≤40 μg/ml、≤35 μg/ml、≤30 μg/ml、≤25 μg/ml、≤20 μg/ml、≤15 μg/ml、≤10 μg/ml、≤5 μg/ml、≤2 μg/ml、≤l μg/ml 等。

3D-MPL 可采取酰化程度不同(例如，含有 3、4、5 或 6 条长度不同的酰基链)的相关分子混合物。两个葡糖胺(也称为 2-脱氧-2-氨基-葡萄糖)单糖的 2-位碳(即，2 和 2'位)有 N-酰基，3'位也有 O-酰基。与碳 2 相连的基团如式-NH-CO-CH_2-$CR^1R^{1'}$所示。与碳 2'相连的基团如式-NH-CO-CH_2-$CR^2R^{2'}$所示。与碳 3'相连的基团如式-O-CO-CH_2-$CR^3R^{3'}$所示。代表性的结构是：

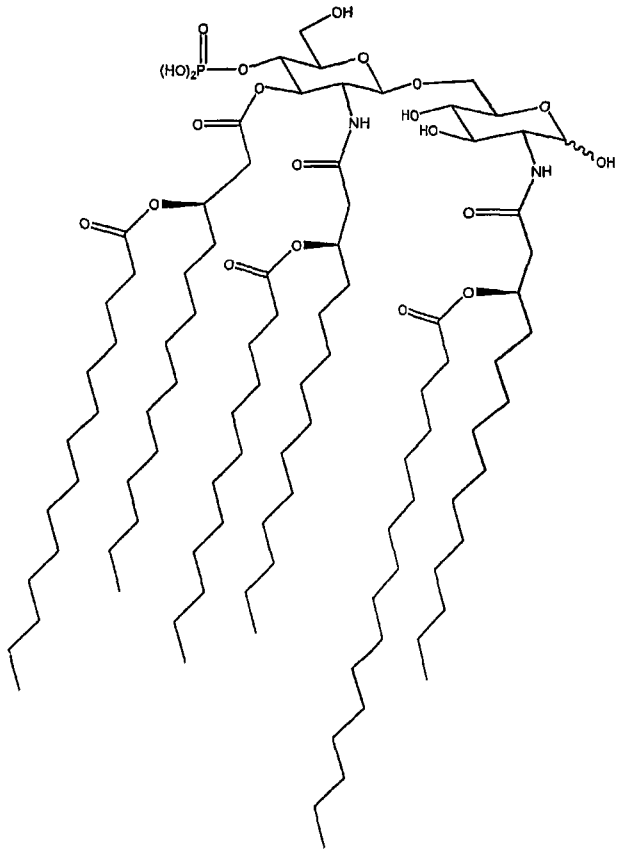


基团 R^1、R^2 和 R^3 各自独立为-$(CH_2)_n$-CH_3。n 值优选在 8-16 之间，更优选在 9-12 之间，最优选 10。

基团 $R^{1'}$、$R^{2'}$和 $R^{3'}$各自独立为：(a) –H；(b) –OH；或(c) -O-CO-R^4，其中 R^4 是-H 或-$(CH_2)_m$-CH_3，其中 m 值优选在 8-16 之间，更优选 10、12 或 14。在 2 位，m 优选 14。在 2'位，m 优选 10。在 3'位，m 优选 12。因此基团 $R^{1'}$、$R^{2'}$和 $R^{3'}$优选十二烷酸、十四烷酸和十六烷酸的-O-酰基。

当 $R^{1'}$、$R^{2'}$和 $R^{3'}$均是-H 时，3D-MPL 只有 3 条酰基链 (2、2'和 3'位上各有一条)。当 $R^{1'}$、$R^{2'}$和 $R^{3'}$中只有两个是-H 时，3D-MPL 可具有 4 条酰基链。当 $R^{1'}$、$R^{2'}$和 $R^{3'}$中只有一个是-H 时，3D-MPL 可具有 5 条酰基链。当 $R^{1'}$、$R^{2'}$和 $R^{3'}$中无一是-H 时，3D-MPL 可具有 6 条酰基链。本发明所用 3D-MPL 佐剂可以是具有 3-6 条酰基链的这些形式的混合物，但优选混合物中包含具有 6 条酰基链的 3D-MPL，特别是要确保 6 酰基链形式至少占总 3D-MPL 的 10%(以重量计)，例如≥20%、≥30%、≥40%、≥50%或更高。发现具有 6 条酰基链的 3D-MPL 是最有活性的佐剂形式。

因此，本发明组合物包含的 3D-MPL 最优选形式是：



当采用混合物形式的 3D-MPL 时，提及本发明组合物中 3D-MPL 的用量或浓度指该混合物中混合的 3D-MPL 诸种类的用量活浓度。

在水性条件下，3D-MPL 可形成大小不同的胶束凝聚物或颗粒，例如直径< 150 nm 或> 500 nm。本发明可使用任一种或二者，可通过常规试验选择较好的颗粒。较小的颗粒因其较佳的活性而优选用于本发明 (例如，足够小从而能得到 3D-MPL 的透明水性混悬液) [20]。优选颗粒的平均直径小于 150 nm，更优选小于 120 nm，平均直径甚至可以小于 100 nm。然而，在大多数情况中，平均直径不会小于 50 nm。

将 3D-MPL 吸附到磷酸铝上可能无法直接测量 3D-MPL 颗粒大小，但可以先测量颗粒大小再进行吸附。

可通过动态光散射的常规技术评估颗粒直径，该技术能揭示平均颗粒直径。当说到颗粒的直径为 x nm 时，通常表示颗粒分布范围在该平均值附近，但以数量计至少 50%(例如，≥60%、≥70%、≥80%、≥90%或更多)的颗粒的直径在 x±+25% 范围内。

任选的抗原

本发明佐剂系统优选与抗原联用以提高给予抗原所致的免疫应答。

与本发明佐剂系统联用的优选抗原是病毒抗原，例如乙肝病毒(HBV)、人乳头瘤病毒(HPV)或单纯疱疹病毒(HSV)抗原。该佐剂系统也适合与寄生虫抗原，例如镰状疟原虫(*Plasmodium falciparum*)联用。

抗原浓度通常在 5 μg/ml-50 μg/ml 之间，例如在 10-30 μg/ml、在 15-25 μg/ml 之间或约 20 μg/ml。每剂量抗原的含量通常也在 5 μg/剂-50 μg/剂之间，例如在 10-30 μg/剂之间、在 15-25 μg/剂之间或约 20 μg/剂。

优选将抗原吸附到磷酸铝佐剂上。组合物中被吸附的具体抗原百分比优选至少 50%(以重量计)，例如≥60%、≥70%、≥80%、≥90%、≥95%、≥98%或更高，例如高达 100%。可将吸附的物质与未吸附的物质分离，例如通过离心，其中吸附于磷酸铝的抗原易于形成沉淀物，而未吸附的抗原仍留在上清液中，从而能方便地检测组合物中被吸附抗原的百分比。从组合物中抗原的总量中扣除上清液中该抗原的含量(例如，通过 ELISA 检测)，然后计算被吸附抗原的百分比。优选完全吸附抗原，即在上清液中检测不到抗原。

乙肝病毒(HBV)是导致病毒性肝炎的已知因子之一。HBV 病毒颗粒由外壳蛋白或衣壳围绕的内部核心组成，所述病毒核心含有病毒 DNA 基因组。衣壳的主要组分是称为 HBV 表面抗原或更常称为“HBsAg”的蛋白质，其是一种 226 个氨基酸的肽，分子量约 24 kDa。现有的乙肝病毒均含有 HBsAg，当将该抗原给予正常的接种疫苗者时，它能刺激产生抵御 HBV 感染保护作用的抗-HBsAg 抗体。

因此，优选的 HBV 抗原是 HBsAg。可用参考文献 21 所述的方法将 HBsAg 吸附到磷酸铝上。吸附到磷酸铝上与熟知的 ENGERIX-B™ 产品(其中 HBsAg 吸附到氢氧化铝上)不同，但与 HEPACCINE™ 和 RECOMBIVAX™ 产品相同。如参考文献 22 所述，对于 HBsAg，磷酸铝是优于氢氧化铝的佐剂。

对于疫苗生产，可用两种方法制备 HBsAg。第一种方法包括从慢性乙肝病毒携带者的血浆纯化获得颗粒形式的抗原，因为在 HBV 感染期间，肝脏合成大量 HBsAg 并释放入血流。第二种方法包括通过重组 DNA 方法表达该蛋白质。可用任一种方法制备本发明所用的 HBsAg，但优选用重组表达的 HBsAg。具体地说，优选用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表达来制备 HBsAg。与天然 HBsAg(即，血浆纯化的产物)不同，酵母菌表达的 HBsAg 通常是非糖基化的，这是本发明所用 HBsAg 的最优选形式，因为其免疫原性高并且制备时不会有血液产品污染的危险。

酵母菌表达的 HBsAg 优选基本为球形颗粒(平均直径约 20 nm)形式，其包含含有磷脂的脂质基质。

纯化后，可透析 HBsAg(例如，用半胱氨酸)除去任何含汞的防腐剂，例如 HBsAg 制备期间可能已使用的硫柳汞[23]。

除了“S”序列，表面抗原可包含全部或部分前-S 序列，例如全部或部分前-S1 和/或前-S2 序列。

本发明所用的优选 HPV 抗原是 L1 衣壳蛋白，其能组装形成称为病毒样颗粒(VLP)的结构。也可用酵母细胞(例如酿酒酵母)或昆虫细胞(例如蛾(*Spodoptera*)细胞，如草地贪夜蛾(*S.frugiperda*)或果蝇(*Drosophila*)细胞)生产 VLP。对于酵母细胞，质粒载体可携带 L1 基因；对于昆虫细胞，杆状病毒载体可携带 L1 基因。更优选该组合物包含 HPV-16 和 HPV-18 菌株(产生)的 L1 VLP。该双价组合已显示高度有效[24]。除了 HPV-16 和 HPV-18 菌株，也可包含 HPV 6 和 HPV-11 菌株(产生)的 L1 VLP。也可利用致癌 HPV 菌株。疫苗可包含 20-60 μg/ml 之间 (例如，约 40 μg/ml)每种 HPV 菌株的 L1。

本发明所用的优选 HSV 抗原是膜糖蛋白 gD。优选用 HSV-2 菌株(产生)的 gD(“gD2”抗原)。该组合物可用 C-末端膜锚定区缺失的 gD 形式[25]，例如包含该天然蛋白质的氨基酸 1-306 和在 C-末端加入天冬酰胺和谷氨酰胺的截短 gD。该蛋白质的这种形式包含信号肽，切除信号肽后得到 283 个氨基酸的成熟蛋白质。锚定区缺失可使制备的蛋白质成为可溶形式。

本发明所用的优选镰状疟原虫抗原以环子孢子(CS)蛋白为基础。该蛋白可采取重组蛋白形式，其中 CS 蛋白部分与 HBsSAg 融合，称为“RTS,S”或 TRAP。RTS 所含的基本上全部 CS 的 C-末端部分通过 HBV 表面抗原的前 S2 部分四个氨基酸与 HBsAg 相连的杂交蛋白 [26]。当用酵母菌(特别是酿酒酵母)表达时，产生的 RTS 是脂蛋白颗粒(特别是包含磷脂)，当其与 HBV 的 S 抗原共表达时，产生称为 RTS,S 的混合颗粒。所用的 RTS: S 比例约为 1: 4。参考文献 27 描述了 TRAP 抗原。

药物组合物

除了佐剂和抗原组分，本发明组合物还可包含其它组分。这些组分可有各种来源。例如，它们可以是生产期间所用的抗原或佐剂组分之一，或者可与抗原性组

分分开加入。

优选的本发明组合物包含一种或多种药学载体和/或赋形剂。

为控制张力，优选包含生理盐，例如矿物盐，如钠盐。优选氯化钠(NaCl)，其浓度在 1-20 mg/ml 之间。在混合佐剂和混合抗原与佐剂期间可存在盐。

组合物通常具有 200 mOsm/kg-400 mOsm/kg 之间的重量克分子渗透压浓度，优选 240-360 mOsm/kg，更优选 290-300 mOsm/kg。以前曾报道重量克分子渗透压浓度对疫苗接种所致疼痛没有影响[28]，但仍优选将重量克分子渗透压浓度维持在此范围内。

本发明组合物可包含一种或多种缓冲液。典型的缓冲液包括：磷酸缓冲液；Tris 缓冲液；硼酸缓冲液；琥珀酸缓冲液；组胺缓冲液或柠檬酸缓冲液。为避免缓冲液中与 3D-MPL 磷酸基团之间的竞争，优选除磷酸缓冲液以外的缓冲液。缓冲液的含量通常是 5-20 mM。

本发明组合物的 pH 通常在 5.0-7.5 之间，就稳定性最佳而言更典型的 pH 在 5.0- 6.0 之间，或在 6.0-7.0 之间。

由于抗原的吸附性质，最终的疫苗产品可能是混浊状外观的混悬液。该外观意味着不易观察微生物污染，因此疫苗最好含有抗微生物剂。当将疫苗包装在多剂量容器中时尤其重要。优选的抗微生物剂是 2-苯氧乙醇和硫柳汞。然而，优选在本发明方法中不用含汞防腐剂(例如，硫柳汞)。但是如果在制备本发明组合物前用这种防腐剂处理抗原，则难以避免存在痕量防腐剂。但为安全起见，优选最终组合物含有的汞低于约 25 ng/ml。最优选最终组合物检测不到硫柳汞。一般可通过先除去抗原制品中的含汞防腐剂再将抗原加入本发明方法中或避免在制备该组合物所用组分期间使用硫柳汞来实现该目的。

制备期间，通常用 WFI(注射用水)稀释各组分以得到所需的终浓度。

按照 Al^{3+}表示，本发明组合物中磷酸铝的浓度优选低于 5 mg/ml，例如≤4 mg/ml、≤3 mg/ml、≤2 mg/ml、≤1 mg/ml 等。

本发明组合物中 3D-MPL 的浓度优选低于 200 μg/ml，例如≤150 μg/ml、≤125 μg/ml、≤110 μg/ml、≤100 μg/ml 等。

本发明组合物中各抗原的浓度优选低于 60 μg/ml，例如≤55 μg/ml、≤50 μg/ml、≤45 μg/ml、≤40 μg/ml 等。

优选给予患者 0.5 ml 剂量的本发明组合物。提及 0.5 ml 剂量应理解为包括正常差异，例如 0.5 ml ± 0.1 ml、0.5 ml ± 0.05 ml 等。

优选的组合物每剂量含有约 50 μg 3D-MPL 和约 0.5 mg 铝佐剂。

本发明能提供适合包装成单位剂量的散装材料，然后分发给予患者。以上提及的浓度通常是最终包装剂量中的浓度，因此，散装疫苗的浓度可以更高(例如，通过稀释降低终浓度)。

本发明组合物通常是水性形式。

本发明组合物中存在的其它组分可包括：已用于防止 3D-MPL 凝聚的聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯(“吐温 80”)[20]；已用于防止 3D-MPL 凝聚的山梨醇；已用于溶解 3D-MPL 的三乙醇胺；用于溶解 3D-MPL 的三乙铵离子；乳糖；蔗糖；海藻糖和/或甘露糖。

本发明方法

本发明提供生产本发明佐剂组合物的方法，包括混合(i) 磷酸铝佐剂；和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂的步骤。

本发明也提供生产本发明组合物的方法，包括混合(i) 抗原；(ii) 磷酸铝佐剂；和(iii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂的步骤。可以任何顺序混合组分(i)、(ii)和(iii)，但优选先混合抗原和磷酸铝，然后将 3D-MPL 加入抗原/磷酸铝混合物。或者，可先混合 3D-MPL 和磷酸铝，再将抗原加入该佐剂混合物。

本发明提供生产本发明组合物的方法，包括以下步骤：(a) 在重组宿主中表达抗原；(b) 纯化抗原；和(c) 混合纯化抗原与(i)磷酸铝佐剂和(ii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂。如上所述，可以任何顺序混合步骤(c)中混合的三种组分。优选的重组宿主是上述酵母菌和昆虫细胞。

本发明提供生产本发明组合物的方法，包括以下步骤：(a) 混合抗原、磷酸铝佐剂和 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂；(b) 检测该组合物的重量克分子渗透压浓度；和，如果重量克分子渗透压浓度超出 200-400 mOsm/kg 的范围外，(c) 将重量克分子渗透压浓度调节至 200-400 mOsm/kg 的范围内。调节可包括加入生理盐，例如钠盐，如氯化钠。

本发明提供生产本发明组合物的方法，包括以下步骤：(a) 混合抗原、磷酸铝佐剂和 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂；(b) 检测该组合物的 pH；和，如果 pH 超

出 5.0-7.5 的范围，(c) 将 pH 调节至 5.0-7.5 的范围内。调节可包括加入酸或碱。

本发明提供生产本发明组合物的方法，包括混合以下物质：(i) 抗原，(ii) 磷酸铝佐剂和(iii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂，其中组分(iii)的 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂是直径小于 150 nm 的颗粒形式。可以任何顺序混合组分(i)、(ii)和(iii)。组分(iii)还可包含聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯和/或山梨醇。

混合抗原和佐剂后，本发明方法可包括提取和将 0.5 ml 混合物样品包装入容器的步骤。对于多剂量情况，可提取多剂量用量一起包装入一个容器中。

本发明方法可包括将疫苗包装入所用容器的其它步骤。合适的容器包括小小瓶和一次性注射器(优选无菌的)。

包装本发明组合物

要将本发明组合物包装入小瓶时，这些小瓶优选用玻璃或塑料材料制成。优选先将小瓶灭菌再加入组合物。为避免患者对乳胶过敏的问题，优选用无乳胶的塞子密封小瓶。小瓶可装有单剂量疫苗，或者可装有多剂量(“多剂量”瓶)，例如 10 份剂量。当使用多剂量瓶时，应在严格无菌条件下用灭菌针头和注射器抽取各份剂量，应小心以免污染小瓶内含物。优选用无色玻璃制成小瓶。

在将组合物包装入注射器的情况中，所述注射器通常不具有与之相连的针头，虽然可分开提供注射器和针头，使用时再装配。优选用安全针头(safety needle)。典型的针头是 1-英寸 23-号、1-英寸 25-号和 5/8-英寸 25-号。注射器上可贴有可剥离标签，标签印有内含物的批号和有效期已有助于保存记录(record keeping)。注射器的柱塞优选装有塞子以防止抽吸过程中柱塞意外脱落。注射器可装有乳胶盖和/或柱塞。一次性注射器可装有单剂量疫苗。注射器通常装有盖帽(tip cap)以在装上针头前密封顶端，所述盖帽优选用丁基橡胶制成。如果分别包装注射器和针头，优选给针头装上丁基橡胶罩。优选灰色丁基橡胶。优选的注射器是以商品名 Tip-Lok™ 投放市场的那些注射器。

优选(将疫苗)包装入注射器，因而医师或患者接收的所预装填注射器。

使用玻璃容器(例如，注射器或小瓶)时，优选用硼硅玻璃而不是钠钙玻璃。

组合物包装入容器后，可将容器封装在分发用的盒子中，例如装在纸板盒中，所述盒子可以标注有疫苗详情，例如其商品名、疫苗中抗原的清单(如“重组乙肝病毒”等)、包装容器 (如“一次性预装填 Tip-Lok 注射器”或“10 × 0.5 ml 单剂

量小瓶”)、其剂量 (如“各含一份 0.5 ml 剂量”)、注意事项 (如“只用于成人”)、有效期等。各盒可装有一个以上的包装疫苗，例如 5-10 个包装疫苗(特别是对于小瓶)。如果疫苗包装在注射器中，则包装(材料)上可显示注射器的图样。

可将疫苗与含疫苗详情(例如给药使用说明书、疫苗中抗原的详情等)的插页包装在一起(例如，同一盒中)。使用说明书也可包括注意事项，例如准备好肾上腺素溶液以防疫苗接种后发生过敏反应等。

包装的疫苗物质优选无菌。

包装的疫苗物质优选无热原，例如每份剂量含有<1 EU (内毒素单位，标准测量)，优选 <0.1 EU。

包装的疫苗物质优选不含谷蛋白。

任何包装的水性疫苗物质的 pH 优选在 5-8 之间，例如 5.5-6.5 之间。因此，本发明方法可包括先调节散装疫苗 pH 再包装的步骤。

优选将包装的疫苗保存在 2℃-8℃之间。不应冷冻。

治疗和给予疫苗的方法

本发明组合物适合给予人患者，本发明提供引发患者免疫应答的方法，包括给予患者本发明组合物的步骤。

本发明也提供用于医学的本发明组合物。

本发明也提供(i) 抗原；(ii)磷酸铝佐剂；和(iii) 3-O-脱酰基单磷酰脂质 A 佐剂在生产给予患者的药物中的应用。

本发明方法和应用特别适合于在给予患者后引发免疫应答以抵御和/或治疗以下疾病：HBV 感染；HSV 感染；HSV 导致的生殖道疱疹；HPV 感染；HPV 导致的生殖道疣；HPV 导致的子宫颈癌和/或疟疾。

本发明免疫原性组合物优选疫苗以用于防止和/或治疗感染。

为获得完全的疗效，典型的免疫接种方案可包括给予多次剂量。例如，可以在第 0 和第 6 个月给药(0 时是首次给药时间)；在第 0、1、2 和 6 个月给药；在第 0 天、第 21 天给药，然后在第 6-12 个月之间给予第三剂量；或者在第 0、1、2、6 和 12 个月给药。

本发明组合物可通过，例如手臂或腿的肌肉内注射给予。

由于本发明组合物含有铝佐剂，保存期间可能发生组分沉淀。因此，在给予

患者前应振荡该组合物。经振荡的组合物将是混浊的白色混悬液。

其它抗原性组分

除了包含 HBsAg、HPV L1、HSV gD 和/或疟疾抗原外，本发明组合物可含有一种或多种其它抗原。例如，可含有一种或多种以下抗原：甲肝病毒抗原；白喉类毒素；破伤风类毒素；灭活的脊髓灰质炎病毒抗原；细胞百日咳抗原；细胞百日咳抗原，包括解毒的百日咳毒素、丝状血凝素和任选的 69 kDa 抗原；偶联的乙型流感嗜血杆菌荚膜糖，通常包含破伤风类毒素作为载体蛋白；偶联的血清群 A 脑膜炎奈瑟球菌荚膜糖；偶联的血清群 C 脑膜炎奈瑟球菌荚膜糖；偶联的血清群 Y 脑膜炎奈瑟球菌荚膜糖；偶联的血清群 W135 脑膜炎奈瑟球菌；偶联的肺炎链球菌(*S.pneumoniae*)荚膜糖。

磷酸铝的替代物

对于一些应用，可用氢氧化铝佐剂替代磷酸铝佐剂，或者可联用氢氧化铝和磷酸铝佐剂。例如，在 HPV 和 HSV 疫苗中，氢氧化铝优于磷酸铝。因此，可据此修正本发明的以上定义。

术语“氢氧化铝”是该领域惯常的，但未精确描述其代表的实际化学化合物[例如，参见参考文献 2 的第 9 章]。本发明可用常规用作佐剂的任何“氢氧化铝”佐剂，一般是羟基氢氧化铝，这些佐剂通常至少部分是结晶(partially crystalline)的。化学式 AlO(OH)所表示的羟基氢氧化铝与其它铝化合物，例如氢氧化铝 $Al(OH)_3$ 的区别在于红外(IR)光谱，特别是在 1070 cm^{-1} 存在吸收带和 3090-3100 cm^{-1} 存在强肩峰[参考文献 2 的第 9 章]。氢氧化铝佐剂的结晶程度反映在半高衍射带(diffraction band at half height)的宽度(WHH)，结晶不佳的颗粒因晶体较小而显示谱线增宽(line broadening)较大。表面积随 WHH 增加而增大，已发现 WHH 值较高的佐剂具有较大的抗原吸附容量。氢氧化铝佐剂的典型形态是纤维状(例如，用电子透射显微照片观察到的)。氢氧化铝的 pI 通常约 11，即在生理 pH 下佐剂自身表面带正电荷。据报道，pH7.4 时氢氧化铝佐剂的吸附容量每 $mgAl^{+++}$ 在 1.8-2.6 mg 蛋白之间。

通用术语

术语“含有”包括“包含”以及“由……构成”，例如“含有”X 的组合物可仅由 X 构成或可包含其它物质，例如 X+Y。

词语“基本上”不排除“完全”，例如“基本上不含”Y 的组合物可完全不

含 Y。“基本上”如需要可从本发明定义中删去。

与数值 x 相关的术语“约”表示，例如 $x\pm10\%$。

除非有专门表述，包括混合两种或多种组分的步骤的方法不要求任何特定的混合顺序。因此，可以任何顺序混合诸组分。当有三种组分时，可先将两种组分彼此混合，再将该混合物与第三种组分混合，等等。

应该知道，可电离基团(例如)取决于 pH 而可以存在本文化学式所示的中性形式，或者荷电形式。因此，磷酸基团可如-P-O-$(OH)_2$所示，该式只代表了中性磷酸基团，本发明包括其它荷电形式。类似地，糖环可存在开放和封闭形式，虽然本文结构式显示封闭形式，但开放形式也属于本发明。

本发明实施方式

纯化重组酿酒酵母菌表达的 HbsAg 的方法包括：回收细胞、沉淀、超滤、凝胶过滤、离子交换、超速离心和脱盐。纯化的抗原是非糖基化的，观察到其基本上是球形颗粒形式(平均直径约 20 nm)。

将抗原维持在磷酸缓冲溶液中，室温搅拌 1 小时使其吸附到不定形磷酸铝佐剂上(浓度在 3-6 mg/ml Al^{+++}之间)。混合物在室温下保存两周，再保存于冰箱中。然后加入 Corixa 的 3D-MPL 佐剂，使之吸附到磷酸铝佐剂上，用注射用水和无菌盐水作必需的任何稀释以获得所需的最终抗原浓度。然后将该散装疫苗分成各剂量包装在一次性注射器中。

首先在健康青少年和成人中检验以此方法生产的疫苗。该疫苗在所有年龄组中引发的免疫应答强于 ENGERIX B™ 产品(血清保护率(seroprotection rate)高达 100%，GMT 值较高)。

当以两剂量方案(0 和 6 个月)给予疫苗时，用磷酸铝/3dMPL 佐剂混合物观察到 98.6%的血清保护率，优于第 0、1 和 6 个月用 ENGERIX B™ 达到的 96.8%。GMT 约 7800(用 ENGERIX B™ 是 3700)。初步检验后，对年龄在 15 岁或以上(平均年龄 58)的血液透析前患者和已进行过血液透析的患者进行检验。这些患者是 HBV 原初的。比较单剂量的该疫苗(20 μg HBsAg)与双剂量的 ENGERIX B™，在第 0、1、2 和 6 个月给药。其血清保护率(%)和抗-HBsAg GMT(mIU/ml)如下所示：

	疫苗中的佐剂	首次给药后的时间(月)					
		2	6	7	12	24	30
SP (%)	AP+3DMPL	49	82	91	86	86	70
	AH	22	66	84	77	77	53

GMT (mIU/ml)	AP+3DMPL	80	250	3560	910	350	180
	AH	60	90	930	320	210	100

因此，这些疫苗在血液透析成年人中产生的免疫应答一致优于市场上主要的ENGERIX B™疫苗。此外，保护作用开始更快(例如，在第3个月时有75%的患者受到血清保护而用ENGERIX B™是52%，$p < 0.005$)，持续更久。

在等待肝脏移植的HBV原初患者中进行的另一试验显示相似结果。在第0天和第21天给予疫苗(加上第7天给予ENGERIX B™)，然后在第6和第12个月之间给予最后一次剂量。

	佐剂	给药后检测	
		第28天	最终剂量
SP (%)	AP+3DMPL	32	60
	AH	21	32
GMT (mIU/ml)	AP+3DMPL	20	480
	AH	40	280

用磷酸铝/3dMPL混合物的血清保护率较高(60%与32%，$p< 0.035$)。

在所有患者中观察到满意的安全性和反应原性。用本发明疫苗的短暂局部不适较多，但很快消退，相比于治疗效益，副作用可以接受。

应该理解，只是用实施例描述了本发明，可以作出改进而仍属于本发明的范围和构思。

参考文献(其内容纳入本文作为参考)

[1] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols(《疫苗佐剂：纸板方法和研究方案》)，(Methods in Molecular Medicine series(《分子医学方法丛书》第42卷))，ISBN: 1-59259-083-7，O'Hagan编。

[2] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach(《疫苗设计：亚单位和佐剂方法》)，(Powell和Newman编)，Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

[3] Desombere等，(2002) Vaccine 20:2597-602。

[4] Levie等，(2002) Scand J Infect Dis 34:610-4.

[5] Kong等，(2003) Abstract from 11th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease(“第11届病毒性肝炎和肝病国际研讨会摘要”)，2003年4月6-10日，悉尼，澳大利亚。

[6] Boland等，(2003) Abstract from 11th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease(“第11届病毒性肝炎和肝病国际研讨会摘要”)，2003

年 4 月 6-10 日，悉尼，澳大利亚。

[7] Starkel 等，(2003) Abstract 61 from 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(“美国肝病研究学会第 55 届年会摘要 61”)，10 月 29 日到 11 月 2 日，波士顿，马萨诸塞州。

[8] Jacques 等，(2002) Vaccine 20:3644-9。

[9] Tong 等，(2005) Kidney International 68:2298-303。

[10] Boland 等，(2004) Vaccine 23:316-20.

[11] WO93/19780.

[12] WO96/26741.

[13] 美国专利 5,972,346.

[14] 美国专利 6,488,934.

[15] 英国专利申请 GB-A-2220211.

[16] Myers 等，(1990)，Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions(《内毒素反应的细胞和分子方面》)，第 145-156 页。

[17] Ulrich，(2000)，参考文献 1 的第 16 章 (第 273-282 页)。

[18] Johnson 等，(1999) J Med Chem 42:4640-9.

[19] Baldrick 等，(2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413。

[20] WO 94/21292.

[21] 美国专利 6013264.

[22] 美国专利 4,624,918.

[23] WO03/066094.

[24] Harper 等，(2004) Lancet 364(9447): 1757-65。

[25] EP-A-0139417.

[26] 美国专利 5928902.

[27] WO 90/01496.

[28] Nony 等，(2001) Vaccine 27:3645-51。