(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102727885 A
(43)申请公布日 2012.10.17

(21)申请号 201210223606.2

(22)申请日 2006.11.06

(30)优先权数据
60/734,026 2005.11.04 US
60/735,468 2005.11.11 US

(62)分案原申请数据
200680047609.8 2006.11.06

(71)申请人 诺华疫苗和诊断有限公司
地址 意大利锡耶纳

(72)发明人 R·拉普奥里 D·奥黑根
G·德尔古迪斯

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陶家蓉

(51)Int.Cl.
A61K 39/39(2006.01)
A61K 39/145(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)

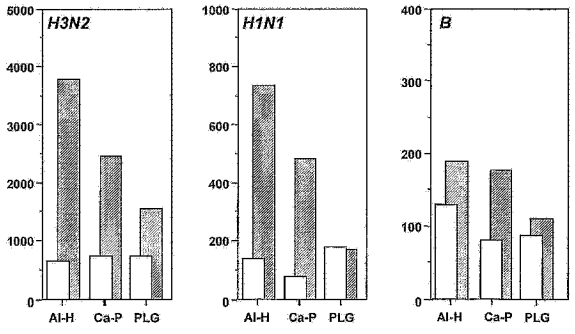
权利要求书 1 页 说明书 26 页 附图 2 页

(54)发明名称

包含颗粒佐剂和免疫增强剂组合的流感疫苗

(57)摘要

发现含有不可溶颗粒佐剂的流感疫苗能引发主要是TH2应答(IgG1)的IgG应答。通过在组合物中加入免疫增强剂可使该应答向TH1应答(IgG2a)转变。因此,本发明提供包含以下组分的免疫原性组合物:(i)流感病毒抗原;(ii)不可溶颗粒佐剂;和(iii)免疫增强剂。



CN 102727885 A

1. 一种免疫原性组合物，其包含：(i) 流感病毒抗原；(ii) 不可溶颗粒佐剂；和 (iii) 免疫增强剂。

2. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述流感病毒抗原是灭活病毒。

3. 如权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述流感病毒抗原包含完整的病毒、裂解病毒或纯化的表面抗原。

4. 以上任一项权利要求所述的组合物，其特征在于，所述流感病毒抗原来自 H1、H2、H3、H5、H7 或 H9 甲型流感病毒亚型。

5. 以上任一项权利要求所述的组合物，其特征在于，从用细胞培养物培养的流感病毒制备所述流感病毒抗原。

6. 以上任一项权利要求所述的组合物，其特征在于，从用卵培养的流感病毒制备所述流感病毒抗原。

7. 如权利要求 1-5 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述组合物不含卵白蛋白、卵类黏蛋白和鸡 DNA。

8. 如权利要求 5 或 7 所述的组合物，其特征在于，所述组合物包含少于 10ng 细胞培养宿主的细胞 DNA。

9. 如权利要求 5 或 7 所述的组合物，其特征在于，所述组合物包含的 100 个核苷酸或更长的 DNA 少于 10ng。

10. 以上任一项权利要求所述的组合物，其特征在于，所述组合物包含 0.1-20μg 血凝素 / 病毒毒株。

11. 以上任一项权利要求所述的组合物，其特征在于，所述不可溶颗粒佐剂选自：铝盐；钙盐；和微粒。

12. 如权利要求 11 所述的组合物，其特征在于，所述不可溶颗粒佐剂包含氢氧化铝。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的组合物，其特征在于，所述不可溶颗粒佐剂包含磷酸铝。

14. 如权利要求 11 所述的组合物，其特征在于，所述不可溶颗粒佐剂包含磷酸钙。

15. 如权利要求 11 所述的组合物，其特征在于，所述不可溶颗粒佐剂包含由聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯) 制成的微粒。

16. 以上任一项权利要求所述的组合物，其特征在于，所述免疫增强剂是人 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 和 / 或 TLR9 中的一种或多种的激动剂。

17. 以上任一项权利要求所述的组合物，其特征在于，所述免疫增强剂是免疫刺激性寡核苷酸。

18. 不可溶颗粒佐剂；和 (iii) 免疫增强剂。

19. 一种制备免疫原性组合物的方法，所述方法包括混合以下组分的步骤：(i) 流感病毒抗原；(ii) 不可溶颗粒佐剂；和 (iii) 免疫增强剂。

20. 一种装有以下组分的试剂盒：(i) 包含流感病毒抗原的第一试剂盒组分；和 (ii) 包含不可溶颗粒佐剂的第二试剂盒组分，其中 (a) 所述第一组分或所述第二组分包含免疫增强剂，或 (b) 所述试剂盒装有包含免疫增强剂的第三试剂盒组分。

包含颗粒佐剂和免疫增强剂组合的流感疫苗

[0001] 本申请是 2006.11.06 提交的 CN200680047609.8，题为“包含颗粒佐剂和免疫增强剂组合的流感疫苗”的分案申请。本文引用的所有文件全文纳入本文作为参考。

技术领域

[0002] 本发明属于用佐剂配制疫苗来提供保护以抵御流感病毒感染的领域。

背景技术

[0003] 除了希龙疫苗公司 (Chiron Vaccines) 的 FLUAD™ 产品利用 MF59 水包油乳液佐剂外 [1]，目前常规使用的流感疫苗不包含佐剂。参考文献 2 的第 17 和 18 章详细描述了这些疫苗。它们基于活病毒或灭活的病毒，灭活疫苗可以基于完整的病毒、“裂解”病毒或纯化的表面抗原 (包括血凝素和神经氨酸酶)。血凝素 (HA) 是灭活流感疫苗的主要免疫原，参考 HA 水平标准化疫苗剂量，疫苗通常含有约 15μgHA/ 毒株。

[0004] 流感爆发期需要大量流感疫苗，但难以增加疫苗供应从而满足巨大的需求。因此，除了生产更多疫苗抗原，有人提出可以使用较低含量的抗原 / 毒株，同时使用佐剂来弥补减少的抗原剂量。还有人提出在流行间期采用相同的方案，从而例如能覆盖更多人群而无需提高生产水平。

[0005] 有人提示可用不可溶的颗粒佐剂 [3]，例如铝盐 [4-7] 或微粒 [8] 改进流感疫苗。虽然这些佐剂配制的疫苗是有用的，但仍有提高的空间。因此，本发明的目的是提供佐剂配制的其它改进流感疫苗 (对于流行期和流行间期使用) 和它们的制备方法。

发明内容

[0006] 现已发现含有不可溶颗粒佐剂的流感疫苗能引发 IgG 应答，主要是 TH2 应答 (IgG1)。通过在组合物中加入免疫增强剂可将该应答改变为 TH1 应答 (IgG2a)。据报道，TH1 型应答 [9] 能提高针对流感病毒的异源亚型 (heterosubtypic) 免疫力。有利的是，还发现免疫增强剂能提高血凝素滴度和抗 - 血凝素 ELISA 滴度。

[0007] 因此，本发明提供包含 (i) 流感病毒抗原 ；(ii) 不可溶的颗粒佐剂 ；和 (iii) 免疫增强剂的免疫原性组合物。

[0008] 本发明还提供制备免疫原性组合物的方法，其包括混合 (i) 流感病毒抗原 ；(ii) 不可溶的颗粒佐剂 ；和 (iii) 免疫增强剂的步骤。

[0009] 本发明提供装有以下组分的试剂盒 ：(i) 包含流感病毒抗原的第一试剂盒组分 ；和 (ii) 包含不可溶颗粒佐剂的第二试剂盒组分，其中 (a) 所述第一和第二组分包含免疫增强剂，或 (b) 所述试剂盒装有包含免疫增强剂的第三试剂盒组分。

[0010] 流感病毒抗原

[0011] 本发明组合物包含流感病毒抗原。通常可从流感病毒颗粒制备这些抗原，或者可在重组宿主 (例如，利用杆状病毒载体的昆虫细胞) 中表达诸如血凝素等抗原并以纯化形式使用 [10、11]。然而，抗原一般来自病毒颗粒。

[0012] 抗原可采用活病毒，或者更优选灭活病毒的形式。灭活病毒的化学方法包括用有效量的一种或多种以下试剂处理：洗涤剂、甲醛、福尔马林、β－丙内酯或紫外光。灭活的其它化学方法包括用亚甲基蓝、补骨脂素、羧基富勒烯 (C60) 或它们任何的组合处理。本领域知道灭活病毒的其它方法，例如二元乙胺 (binary ethylamine)、乙酰基乙烯亚胺或 γ 射线。INFLEXAL™ 产品是完整的病毒颗粒灭活疫苗。

[0013] 如果使用灭活病毒，疫苗可包含完整的病毒、裂解病毒或纯化的表面抗原（包含血凝素，通常还包含神经氨酸酶）。

[0014] 可通过各种方法从含病毒的液体收集病毒颗粒。例如，纯化方法可包括利用线性蔗糖梯度溶液的区带离心，所述蔗糖溶液含有洗涤剂以使病毒颗粒破裂。任选稀释后，可通过渗滤纯化抗原。

[0015] 用洗涤剂（例如，乙醚、聚山梨醇酯 80、脱氧胆酸盐、磷酸三 -N- 丁酯、曲通 X-100、曲通 N101、溴化十六烷基三甲铵、Tergitol NP9，等等）处理病毒颗粒，包括“吐温－醚”裂解方法来产生亚病毒颗粒制品，从而获得了裂解病毒。本领域熟知裂解流感病毒的方法，例如参见参考文献 12-17 等。通常利用破裂浓度 (disrupting concentration) 的裂解剂 (splitting agent) 使感染性或非感染性的完整病毒破裂或破碎来进行病毒的裂解。破裂造成病毒蛋白质完全或部分溶解，从而改变了病毒的完整性。优选的裂解剂是非离子和离子性（例如，阳离子）表面活性剂，例如烷基糖苷、烷基硫苷、酰基糖、磺基甜菜碱、甜菜碱、聚氧乙烯烷基醚、N,N- 二烷基－葡糖酰胺 (Glucamides)、海克麦格 (Hecameg)、烷基苯氧基－聚乙氧基乙醇、季铵化合物、十二烷基肌氨酸钠、CTAB（溴化十六烷基三甲铵）、磷酸三丁酯 (tri-N-butyl-phosphate)、塞太弗伦 (Cetavlon)、肉豆蔻基三甲基铵盐、脂转染试剂、脂转染胺、DOT-MA、辛基－或壬基苯氧基聚氧乙醇（例如，曲通表面活性剂，如曲通 X-100 或曲通 N101）、聚氧乙烯失水山梨糖醇酯（吐温表面活性剂）、聚氧乙烯醚、聚氧乙烯酯等。一种有用的裂解方法利用脱氧胆酸钠和甲醛的连续作用，裂解发生在最初的病毒颗粒纯化期间（例如，在蔗糖密度梯度溶液中）。因此裂解方法可包括使含病毒颗粒的物质澄清（以除去非病毒颗粒物质），浓缩收集的病毒颗粒（例如，采用吸附法，如 $CaHPO_4$ 吸附），分离完整病毒颗粒与非病毒颗粒物质，在密度梯度离心步骤中利用裂解剂裂解病毒颗粒（例如，利用含有裂解剂，如脱氧胆酸钠的蔗糖梯度（溶液）），然后过滤（例如，超滤）以除去不需要的物质。可将裂解的病毒颗粒有用地重悬在磷酸钠缓冲的等渗氯化钠溶液中。BEGRIVAC™、FLUARIX™、FLUZONE™ 和 FLUSHIELD™ 产品是裂解疫苗 (split vaccine)。

[0016] 纯化的表面抗原疫苗包含流感表面抗原血凝素，通常还包含神经氨酸酶。本领域熟知制备纯化形式的这些蛋白质的方法。FLUVIRIN™、AGRIPPAL™ 和 INFLUVAC™ 产品是亚单位疫苗。

[0017] 流感抗原还可以病毒体形式存在 [18]。

[0018] 流感病毒可以是减毒的。流感病毒可以对温度敏感。流感病毒可以是冷适应的。这三种可能性特别适用于活病毒。

[0019] 用于疫苗中的流感病毒毒株每季不同。在目前的流行间期，疫苗通常包含两种甲型流感毒株 (H1N1 和 H3N2) 和一种乙型流感毒株，一般是三价疫苗。本发明还可利用流行毒株（即，对疫苗受者和普通人群而言免疫原初的毒株）的病毒，例如 H2、H5、H7 或 H9 亚型毒株（特别是甲型流感病毒），流行毒株的流感疫苗可以是单价疫苗，或者可以添加了流行

毒株的普通三价疫苗为基础。然而，取决于季节和疫苗所含抗原的性质，本发明可起保护作用以抵御以下一种或多种甲型流感病毒血凝素亚型：H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16。本发明可起保护作用以抵御以下一种或多种甲型流感病毒 NA 亚型：N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8 或 N9。

[0020] 可有用地包含在组合物中的其它毒株是耐受抗病毒治疗的毒株（例如，耐受奥塞米韦 [19] 和 / 或扎那米韦）的毒株，包括耐药性流行毒株 [20]。

[0021] 本发明的佐剂配制的组合物特别可用于免疫接种以抵御流行毒株。能导致流行病爆发的流感毒株的特征在于：(a) 与目前流行的人毒株中的血凝素相比，其含有新的血凝素，即，未在人群中出现超过 10 年的毒株（例如，H2），或者以前根本未在人群中见到的毒株（例如，通常只在鸟群中发现的 H5、H6 或 H9），从而使得人群对该毒株的血凝素而言在免疫学上是原初的；(b) 其能在人群中水平转移；和 (c) 其对人具有致病性。对于免疫接种抵御流行性流感，优选具有 H5 血凝素类型的毒株，例如 H5N1 毒株。其它可能的毒株包括 H5N3、H9N2、H2N2、H7N1 和 H7N7，及任何其它可能出现的流行毒株。在 H5 亚型内，病毒可能属于 HA 进化枝 1、HA 进化枝 1’、HA 进化枝 2 或 HA 进化枝 3[21]，其中进化枝 1 和 3 特别相关。

[0022] 本发明组合物可包含一种或多种（例如，1、2、3、4 或更多种）流感病毒毒株，包括甲型流感病毒和 / 或乙型流感病毒的抗原。如果疫苗包含多种流感毒株，通常分别培养不同的毒株，收集病毒后混合来制备抗原。因此，本发明方法可包括混合多种流感毒株的抗原的步骤。

[0023] 流感病毒可以是重配毒株，可通过反向遗传学技术获得。反向遗传学技术 [例如，22-26] 能利用质粒在体外制备含所需基因组区段的流感病毒。该技术通常涉及表达 (a) 例如能从 polI 启动子编码所需病毒 RNA 分子的 DNA 分子，和 (b) 例如能从 polII 启动子编码病毒蛋白质的 DNA 分子，从而使得在细胞中表达两种类型的 DNA 能装配完整的感染性病毒颗粒。DNA 优选能提供所有病毒 RNA 和蛋白质，但也可能利用辅助病毒提供所述 RNA 和蛋白质中的一些。优选质粒方法，从而能用不同质粒产生各病毒 RNA[27-29]，这些方法还包括利用质粒来表达所有病毒蛋白质或其中一些（例如，PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白质），一些方法利用了 12 种质粒。

[0024] 为减少所需的质粒数，最近的方法 [30] 在同一质粒上组合了多个 RNA 聚合酶 I 转录盒（对于病毒 RNA 合成）（例如，编码 1、2、3、4、5、6、7 或所有 8 个甲型流感 vRNA 区段的序列），在另一质粒上组合了含 RNA 聚合酶 II 启动子的多个蛋白质编码区（例如，编码 1、2、3、4、5、6、7 或所有 8 个甲型流感 mRNA 转录物的序列）。参考文献 30 所述方法的优选方面包括：(a) 一个质粒上的 PB1、PB2 和 PA mRNA 编码区；和 (b) 一个质粒上的所有 8 个 vRNA 编码区段。包含一个质粒上的 NA 和 HA 区段和另一质粒上的 6 个其它区段也是有利的。

[0025] 除了用 polI 启动子编码病毒 RNA 区段，还可能用细菌噬菌体聚合酶启动子 [31]。例如，可方便地使用 SP6、T3 或 T7 聚合酶的启动子。由于 polI 启动子的种类特异性，细菌噬菌体聚合酶启动子对于许多细胞类型（例如，MDCK）更方便，虽然还必须用编码外源性聚合酶的质粒转染细胞。

[0026] 其它技术可能采用双重 polI 和 polIII 启动子来同时编码一个模板的病毒 RNA 和可表达的 mRNA[32、33]。

[0027] 因此，甲型流感病毒可包含 A/PR/8/34 病毒的一个或多个 RNA 区段（通常是 A/

PR/8/34 的 6 个区段，其中 HA 和 N 区段来自疫苗毒株，即 6:2 重配株），特别是用卵培养病毒时。还可包含用于生产疫苗制备用重配病毒的 A/WSN/33 病毒或任何其它病毒毒株的一个或多个 RNA 区段。通常，本发明保护抵御能人向人传播的毒株，因此毒株的基因组一般包含源自哺乳动物（例如人）流感病毒的至少一个 RNA 区段。其可包含源自禽流感病毒的 NS 区段。

[0028] 可用卵（通常是 SPF 卵）或细胞培养物培养用作抗原来源的病毒。目前培养流感病毒的标准方法利用含胚的鸡蛋以及从鸡蛋内含物（尿囊液）中纯化病毒。然而，近年来用动物细胞培养物培养病毒，出于速度和患者变态反应的原因，优选该培养方法。如果采用鸡蛋培养病毒，则可将病毒与一种或多种氨基酸一起引入鸡蛋的尿囊液中 [15]。

[0029] 细胞物质通常是哺乳动物细胞系。合适的哺乳动物细胞来源包括但不限于 ：仓鼠、牛、灵长类（包括人和猴）和犬细胞。可利用各种细胞类型，例如肾细胞、成纤维细胞、视网膜细胞、肺细胞等。合适的仓鼠细胞的例子是名为 BHK21 或 HKCC 的细胞系。合适的猴细胞是，例如非洲绿猴细胞，例如 Vero 细胞系中的肾细胞。合适的犬细胞是，例如 MDCK 细胞系中的肾细胞。因此，合适的细胞系包括但不限于 ：MDCK ；CHO ；293T ；BHK ；Vero ；MRC-5 ；PER.C6 ；WI-38 ；等等。用于培养流感病毒的优选哺乳动物细胞系包括 ：源自马 - 达二氏犬肾的 MDCK 细胞 [34-37] ；源自非洲绿猴 (Cercopithecus aethiops) 肾脏的 Vero 细胞 [38-40] ；或源自人胚胎成视网膜细胞的 PER.C6 细胞 [41]。这些细胞系可广泛购自，例如美国模式培养物保藏所 (ATCC)[42]、寇里尔细胞保藏中心 (Coriell Cell Repositories)[43] 或欧洲细胞培养物保藏所 (ECACC)。例如，ATCC 提供目录号为 CCL-81、CCL-81.2、CRL-1586 和 CRL-1587 的各种不同 Vero 细胞，目录号为 CCL-34 的 MDCK 细胞。PER.C6 可以保藏号 96022940 购自 ECACC。作为哺乳动物细胞系的次选替代，可用禽细胞系培养病毒 [例如，参考文献 44-46]，包括源自鸭（例如，鸭视网膜）或母鸡的细胞系，例如鸡胚胎干细胞 (CEF)，等等。离子包括禽胚胎干细胞 [44、47]，包括源自鸡胚胎干细胞的 EBx 细胞系、EB45、EB14 和 EB14-074[48]。

[0030] 如果利用哺乳动物细胞系培养病毒，则组合物优选不含卵蛋白质（例如，卵白蛋白和卵类黏蛋白）和鸡 DNA，从而能降低变应原性。

[0031] 培养流感病毒的最优选细胞系是 MDCK 细胞系。原始 MDCK 细胞系可以 CCL-34 购自 ATCC，但也可使用该细胞系的衍生物。例如，参考文献 34 披露了适应于在悬浮培养基中生长的 MDCK 细胞系（“MDCK 33016”，以 DSMACC2219 保藏）。类似地，参考文献 49 披露了生长在无血清培养悬液中的 MDCK 衍生细胞系（“B-702”，以 FERM BP-7449 保藏）。参考文献 50 披露了非致瘤性 MDCK 细胞，包括“MDCK-S”(ATCC PTA-6500)、“MDCK-SF101”(ATCC PTA-6501)、“MDCK-SF102”(ATCC PTA-6502) 和“MDCK-SF103”(PTA-6503)。参考文献 51 披露了对感染高度敏感的 MDCK 细胞系，包括“MDCK.5F1”细胞 (ATCC CRL-12042)。可使用任何这些 MDCK 细胞系。

[0032] 如果用细胞系培养病毒，则生长培养基以及用于启动培养的病毒接种物优选不含（即，经测试得到污染的阴性结果）单纯疱疹病毒、呼吸道合胞体病毒、副流感病毒 3、SARS 冠状病毒、腺病毒、鼻病毒、呼肠病毒、多瘤病毒、双 RNA 病毒、环病毒和 / 或细小病毒 [52]。特别优选不含单纯疱疹病毒。

[0033] 如果用细胞系培养病毒，则每剂组合物优选含有少于 10ng（优选少于 1ng，更优选少于 100pg) 的残留宿主细胞 DNA，虽然可以存在痕量的宿主细胞 DNA。总之，本发明组合物

中的宿主细胞 DNA 不能长于 100bp。

[0034] 现在，检测残留的宿主细胞 DNA 是生物制品的常规要求，属于技术人员的普通能力。用于检测 DNA 的试验通常是确认试验 [53、54]。可利用数学和可定量的术语描述确认试验的性能特征，已鉴定了其可能的误差来源。已总体上检验了该试验的诸如准确度、精密度、特异性等特征。一旦校验（例如，用已知标准量的宿主细胞 DNA）及检验好某试验，可常规进行定量 DNA 检测。可采用三种主要的 DNA 定量技术：杂交方法，例如 Sourthern 印迹或槽印迹 [55]；免疫测定方法，例如 Threshold™ 系统 [56]；和定量 PCR[57]。技术人员熟知这些方法，虽然各方法的精确特征取决于所研究的宿主细胞，例如杂交探针的选择，扩增用引物和 / 或探针的选择，等等。分子装置公司 (Molecular Devices) 的 Threshold™ 系统是用于皮克水平总 DNA 的定量试验，其已用于监测生物药品中的污染 DNA 水平 [56]。典型的试验包括在生物素化的 ssDNA 结合蛋白、脲酶偶联的抗 -ssDNA 抗体和 DNA 之间非序列特异性地形成反应复合物。所有试验组分均装入购自生产商的完整的总 DNA 测定试剂盒 (Total DNA Assay Kit) 中。各种商品化生产商提供检测残留宿主细胞 DNA 的定量 PCR 试验，例如 AppTec™ 实验室服务公司 (AppTec™ Laboratory Services)、BioReliance™、亚瑟技术公司 (Althea Technologies)，等等。检测人病毒疫苗中宿主细胞 DNA 污染的化学发光杂交试验和总 DNA Threshold™ 系统的比较见参考文献 58。

[0035] 可采用标准纯化方法，例如层析等在疫苗制备期间除去污染性 DNA。通过核酸酶处理，例如用 DNA 酶可促进除去残留的宿主细胞 DNA。参考文献 59 和 60 披露了减少宿主细胞 DNA 污染的便利方法，其涉及两步处理，首先可在病毒培养期间使用 DNA 酶（例如，Benzonase），然后可在病毒颗粒破裂期间使用阳离子洗涤剂（例如，CTAB）。用烷化剂，例如 β - 丙内酯处理也可用于除去宿主细胞 DNA，该方法还可优选用于灭活病毒颗粒 [61]。

[0036] 优选在每 15μg 血凝素中含有 <10ng（例如，<1ng、<100pg）宿主细胞 DNA 的疫苗，例如每 0.25ml 体积含有 <10ng（例如，<1ng、<100pg）宿主细胞 DNA 的疫苗。更优选在每 50μg 血凝素中含有 <10ng（例如，<1ng、<100pg）宿主细胞 DNA 的疫苗，例如每 0.5ml 体积含有 <10ng（例如，<1ng、<100pg）宿主细胞 DNA 的疫苗。

[0037] 优选任何残留宿主细胞 DNA 的平均长度短于 500bp，例如短于 400bp、短于 300bp、短于 200bp、短于 100bp，等等。

[0038] 对于用细胞系，例如 MDCK 细胞培养，可用悬液培养 [34、62、63] 或贴壁培养的细胞来培养病毒。用于悬液培养的一种合适的 MDCK 细胞系是 MDCK 33016（保藏号为 DSM ACC 2219）。或者，可采用微载体培养。

[0039] 优选用无血清的培养基和 / 或无蛋白质的培养基培养支持流感病毒复制的细胞系。本发明将其中不含人或动物来源的血清添加剂的培养基称为无血清培养基。无蛋白质应理解为表示发生细胞增殖的培养基中不含蛋白质、生长因子、其它蛋白质添加剂和非血清蛋白质，但可包含病毒生长所需的蛋白质，例如胰蛋白酶或其它蛋白酶。在这种培养基中生长的细胞自身可天然含有蛋白质。

[0040] 支持流感病毒复制的细胞系优选在 37℃以下生长 [64]（例如，30-36℃，或约 30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃），例如在病毒复制期间。

[0041] 在培养的细胞中繁殖病毒的方法通常包括以下步骤：给培养的细胞接种待培养的毒株，将受感染的细胞培养病毒繁殖所需的时间，例如通过病毒滴度或抗原表达测定

的（如，接种后 24-168 小时），收集繁殖的病毒。以病毒和细胞之比为 1:500-1:1，优选 1:100-1:5，更优选 1:50-1:10（通过 PFU 或 $TCID_{50}$ 检测）接种培养的细胞。可将病毒加入细胞悬液中，或施加于细胞单层，病毒于 25-40℃，优选 28-37℃，在细胞上吸附至少 60 分钟，但通常少于 300 分钟，优选在 90-240 分钟之间。可通过冻融或酶促作用除去感染的细胞培养物（例如，单层），从而增加了收集的培养上清液中的病毒含量。然后使收集的液体灭活或冷冻保存。以约 0.0001 - 10，优选 0.002 - 5，更优选 0.001-2 的感染复数（“m.o.i.”）感染培养的细胞。更优选以约 0.01 的 m.o.i. 感染细胞。感染后 30-60 小时收集感染的细胞。优选在感染后 34-48 小时收集细胞。更优选在感染后 38-40 小时收集细胞。通常在细胞培养期间加入蛋白酶（通常是胰蛋白酶）以释放病毒，可在培养期间的任何合适阶段加入蛋白酶。

[0042] 血凝素 (HA) 是灭活流感疫苗中的主要免疫原，参考 HA 水平使疫苗剂量标准化，一般通过单向辐射状免疫扩散 (SRID) 试验检测。疫苗通常含有约 15μgHA/ 毒株，虽然在例如儿童，或流行情况下还可使用较低的剂量。与较高剂量（例如，3× 或 9× 剂量 [65、66]）一样，已使用了部分剂量，例如 $^1/_2$（即，7.5μg HA/ 毒株）、$^1/_4$ 和 $^1/_8$[6、7]。因此，疫苗可包含 0.1-150μg HA/ 流感毒株，优选 0.1-50μg，例如 0.1-20μg、0.1-15μg、0.1-10μg、0.1-7.5μg、0.5-5μg，等等。具体的剂量包括，例如约 45、约 30、约 15、约 10、约 7.5、约 5、约 3.8、约 1.9、约 1.5，等等。与本发明一样，当疫苗中存在佐剂时，这些较低的剂量最有用。

[0043] 对于活疫苗，通过中值组织培养感染剂量 ($TCID_{50}$) 而不是 HA 含量来检测给药，每种毒株的 $TCID_{50}$ 一般在 10^6-10^8 之间（优选 $10^{6.5}$-$10^{7.5}$）。

[0044] 本发明所用的 HA 可以是病毒中发现的天然 HA，或者可经修饰。例如，已知可修饰 HA 以除去致使病毒在禽类中高度致病的决定簇（例如，围绕 HA1 和 HA2 之间的切割位点的超碱性区域 (hyper-basic region)），否则这些决定簇可阻止病毒在卵中生长。

[0045] 本发明试剂盒的抗原组分可包含洗涤剂，例如聚氧乙烯失水失水山梨糖醇酯表面活性剂（称为“吐温”），辛苯聚醇（例如，辛苯聚醇 -9（曲通 X-100）或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇），溴化十六烷基三甲铵 (CTAB)，或脱氧胆酸钠，特别是对于裂解或表面抗原疫苗。可以只存在痕量的洗涤剂。因此，疫苗中所含的辛苯聚醇 -10、α - 生育酚半琥珀酸酯 (α -tocopheryl hydrogen succinate) 和聚山梨醇酯 80 各自低于 1mg/ml。其它痕量的残留组分可以是抗生素（例如，新霉素、卡那霉素、多粘菌素 B）。

[0046] 灭活但非全细胞的疫苗（例如，裂解病毒疫苗或纯化的表面抗原疫苗）可包含基质蛋白，从而受益于位于该抗原内的其它 T 细胞表位。因此，包含血凝素和神经氨酸酶的非全细胞疫苗（特别是裂解疫苗）还可包含 M1 和 / 或 M2 基质蛋白。如果存在基质蛋白，优选包含可检测水平的 M2 基质蛋白。还可存在核蛋白。

[0047] 不可溶的颗粒佐剂

[0048] 本发明的组合物和试剂盒包含不可溶的颗粒佐剂。本发明所用的合适不可溶颗粒佐剂的离子包括但不限于 :铝盐、钙盐和微粒。

[0049] 不可溶的颗粒佐剂的功能通常是作为吸附剂，从而能在混合抗原和佐剂时将抗原（例如，血凝素）能吸附到佐剂上。然而对于微粒，作为将抗原吸附到颗粒表面的替代方法（或者除了将抗原吸附到颗粒表面），还可能将抗原包裹在颗粒的内部。

[0050] 铝盐

[0051] 合适的铝盐包括称为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是惯常的，但只是为方便而使用，并未精确描述所存在的实际化学构成［例如，见参考文献 67 的第 9 章］。本发明可用常规用作佐剂的任何“氢氧化物”或“磷酸盐”佐剂。

[0052] 称为“氢氧化铝”的佐剂一般是羟基氧化铝盐，其通常至少部分结晶。羟基氧化铝以分子式 AlO(OH) 表示，其与其它铝化合物，例如氢氧化铝 $Al(OH)_3$ 的区别在于红外 (IR) 光谱，特别是在 1070cm^{-1} 处存在吸收带和在 3090-3100cm^{-1} 处存在强烈的肩峰［参考文献 67 的第 9 章］。半峰高处衍射带的宽度 (WHH) 反映了氢氧化铝佐剂的结晶程度，结晶不佳的颗粒因晶体尺寸较小而显示更强的谱线增宽。表面积随 WHH 的增加而增加，WHH 值较大的佐剂显示吸附抗原的能力较强。氢氧化铝佐剂呈典型的纤维形态（例如，电子透射显微照片所见的）。氢氧化铝佐剂的 pI 通常约 11，即在生理 pH 下佐剂本身具有表面正电荷。据报道，pH7.4 时，氢氧化铝佐剂的吸附能力在每 mg Al^{+++} 1.8-2.6mg 蛋白质之间。

[0053] 称为“磷酸铝”的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代该盐中羟基的程度。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 67 的第 9 章］。

[0054] 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 0.6mg Al^{3+}/ml 的无定形羟基磷酸铝。磷酸铝通常是颗粒状的（例如，电子透射显微照片中所见的平板样形态）。这些颗粒在吸附任何抗原后的典型直径是 0.5-20μm（例如，约 5-10μm）。据报道，pH7.4 时，磷酸铝佐剂的吸附能力在每 mg Al^{+++} 0.7-1.5mg 蛋白质之间。

[0055] 磷酸铝的零电荷点 (PZC) 与磷酸根取代羟基的程度成反比，而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）或通过添加例如组氨酸缓冲液（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。

[0056] 本发明所用的铝盐悬液可含有缓冲液（例如，磷酸或组氨酸或 Tris 缓冲液），但不一定。这些悬液优选无菌、无热原。悬液可含有游离的水性磷酸根离子，例如浓度在 1.0-20mM 之间、优选在 5-15mM 之间、更优选约 10mM。这些悬液也可含有氯化钠。

[0057] 在本发明的一个实施方式中，佐剂包含氢氧化铝和磷酸铝的混合物 [6]。在这种情况中，磷酸铝可能多于氢氧化铝，例如重量比至少为 2:1，例如≥ 5:1、≥ 6:1、≥ 7:1、≥ 8:1、≥ 9:1，等等。

[0058] 给予患者的组合物中 Al^{+++} 的浓度优选低于 10mg/ml，例如≤ 5mg/ml、≤ 4mg/ml、≤ 3mg/ml、≤ 2mg/ml、≤ 1mg/ml，等等。优选的范围在 0.3-1mg/ml 之间。优选最大 <0.85mg/ 剂。

[0059] 钙盐

[0060] 在各种钙盐中，通常只用磷酸钙作为佐剂。现已报道了磷酸钙的各种佐剂形式，本发明可用任何这些形式。

[0061] 水合磷酸钙凝胶佐剂可购自丹麦瓦德贝克市的斯由普夫公司 (Superfos, Vedbaek, Denmark)。

[0062] 1995 年,参考文献 67 的第 8 章总结了磷酸钙佐剂。可通过在有抗原存在下原位沉淀该盐,或通过吸附至预形成的盐上而将抗原吸附到磷酸钙上。述及了预形成的磷酸钙凝胶的商品化来源。详细给出了沉淀条件对佐剂的物理化学特征,包括吸附能力的影响。

[0063] 参考文献 68 报道了各种磷酸钙佐剂的结构和吸附特性。据报道,这些佐剂是式 $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ 所示的非化学计量羟基磷灰石,而不是严格的 $Ca_3(PO_4)_2$,其表面电荷取决于 pH,零电荷点 (PZC) 为 5.5。佐剂可以形成尺寸约 10nm×150nm 的针状颗粒以及直径约 20-30nm 的不规则形状的片。

[0064] 参考文献 69 披露了含有反应活性空位 (reactive vacant site) 的反应活性无定形磷酸钙,通过使碳酸化的无定形磷酸钙的碳酸盐预组分 (pre-component) 热分解成气态或汽化副产物来除去所述预组分而获得这些反应活性位点。

[0065] 参考文献 70 和 71 披露了颗粒磷酸钙佐剂 (“CAP”),其中所述颗粒的直径为 300-4000nm(纳米颗粒),形状为球形,表面平滑。参考文献 72 披露这些颗粒可用于粘膜免疫。

[0066] 参考文献还披露了了粘膜免疫,其中疫苗接种哺乳动物以产生 IgA 抗体应答的方法利用大小适于经上皮转运的颗粒羟基化磷酸钙。

[0067] 参考文献 74 披露了在体内可溶的复合颗粒,其包含聚合物颗粒,所述颗粒表面包被有 Ca/P 之比约 1.0-2.0 的磷酸钙化合物。

[0068] 参考文献 75 披露了用于吸附疫苗的可注射水性磷酸钙凝胶,其中钙离子和磷酸根离子的组合比例使得重量比 Ca/P 为 1.62-1.85,从而在 20℃当每升含 0.07 个 Ca 原子时该凝胶的沉淀时间为 10 分钟内沉降 1-20mm。

[0069] 磷酸钙佐剂的 Ca 与 P 摩尔比可以不同,例如在 1.35-1.83 之间 [见参考文献 67 的第 8 章]。现已发现佐剂的吸附特性依据沉淀期间所用的条件而有所不同,例如缓慢混合所得佐剂的吸附性能低于快速混合形成的佐剂。

[0070] 本发明疫苗中以 Ca^{++} 检测的磷酸钙含量可以在 0.1mg/ml 和 10mg/ml 之间,例如在 0.5-5mg/ml 之间,优选 0.75-3mg/ml、0.9-1.5mg/ml 之间或约 1mg/ml。

[0071] 磷酸钙佐剂能吸附抗原。对于某给定的抗原,以抗原的总重量计,吸附了至少 80%(例如,≥ 85%、≥ 90%、≥ 92.5%、≥ 95%、≥ 97.5%、≥ 97.5%、≥ 98%、≥ 99%、≥ 99.5%,等等)。由于磷酸钙佐剂不可溶,采用以下方法可方便地检测吸附程度,所述方法包括离心然后测定固体或可溶物质之一(或二者)中的抗原含量。离心后,未吸附的抗原维持在溶液中。例如,参考文献 76 采用该方法检测了磷酸钙佐剂的吸附能力。当 (a) 白喉类毒素水平升高到 100Lf 以上和 (b) 破伤风类毒素水平升高到 25Lf 以上时,将白喉和破伤风类毒素吸附到 1mg Ca^{++} 上是不完全的。

[0072] 对于吸附,优选利用加入了一种或多种流感抗原的水性悬液形式磷酸钙佐剂。可先将钙盐稀释至所需浓度再加入抗原。

[0073] 微粒

[0074] 将微粒用作佐剂已见描述,例如见参考文献 77 和 78。

[0075] 优选的微粒由生物可降解和无毒聚合物制成。例如,可用选自下组的聚合物制成 :

聚（α-羟酸）、聚羟基丁酸、聚己酸内酯、聚原酸酯、聚酐和聚氰基丙烯酸酯。还可利用这些聚合物的共聚物，例如或者 D,L- 丙交酯和己内酯的共聚物。

[0076] 优选的聚合物是聚（α-羟酸），更优选选自下组的那些：聚 (L- 丙交酯）、聚 (D,L- 丙交酯）和聚 (D,L- 丙交酯 - 共 - 乙交酯）。最优选的聚合物是称为“PLG”的聚 (D,L- 丙交酯 - 共 - 乙交酯）聚合物。优选的聚 (D,L- 丙交酯 - 共 - 乙交酯）聚合物是丙交酯 / 乙交酯摩尔比为 25:75-75:25，更优选 40:60-60:40，例如约 50:50 的那些。含有 50%D,L- 丙交酯和 50% 乙交酯的 50:50PLG 聚合物是快速吸附的聚合物，而因为丙交酯分量增加，75:25PLG 降解较慢，85:15 和 90:10 甚至降解更慢。

[0077] 可获得各种分子量的这些聚合物，本领域技术人员不难测定某给定抗原的合适分子量。对于聚交酯，例如合适的分子量是约 2000-5000 级别的。对于 PLG，合适的分子量通常是约 10,000- 约 200,000，优选约 15,000- 约 150,000，最优选约 50,000- 约 100,000。有用的范围是 30,000 道尔顿 -70,000 道尔顿。

[0078] 微粒的直径为约 100nm- 约 150nm，更优选直径约 200nm- 约 30μm，最优选直径约 500nm- 约 10μm。一般它们基本上是球形的。

[0079] 可采用各种方法制备微粒。例如，已知有双乳液 / 溶剂蒸发技术，该技术包括形成由聚合物溶液液滴构成的初级乳液，随后与含有颗粒稳定剂 / 表面化学表面活性剂的连续液相混合。更具体地说，如参考文献 79 中所述，可利用水包油包水 (w/o/w) 溶剂蒸发系统形成微粒。在该技术中，将特定的聚合物与有机溶剂，例如乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈、丙酮、氯仿等混合。聚合物在有机溶剂中形成约 2-15%，更优选约 4-10%，最优选 6% 的溶液。利用，例如匀浆器乳化聚合物溶液。然后将乳液与乳液稳定剂，例如聚乙烯醇 (PVA) 或聚乙烯吡咯烷酮的大体积水溶液混合。乳液稳定剂通常形成约 2-15% 的溶液，更常见形成约 4-10% 的溶液。然后匀浆该混合物产生稳定的 w/o/w 双重乳液。随后蒸发有机溶剂。可调节制剂参数以沉淀小的 (<5μm) 和大的 (>30μm) 微粒。例如，慢速搅拌可获得大颗粒，因为增大了内相体积。可通过常规方法测定颗粒大小。

[0080] 除了采用双乳液技术，还可采用单乳液技术。还可采用喷雾干燥和凝聚，或通过空气悬浮包衣技术，例如锅包衣和 Wurster 包衣形成微粒。还可利用离子凝胶。

[0081] 制备后，可按原样保存微粒，或可冻干待用。

[0082] 将抗原悬浮到制备的微粒上的一种方法如下所示。利用可透析的洗涤剂将微粒再水合并分散成基本上单体的微粒悬液。有用的洗涤剂包括但不限于：各种 N- 甲基葡糖酰胺 (methylglucamide)（称为 MEGA），例如庚酰基 -N- 甲基葡糖酰胺 (MEGA-7)、辛酰基 -N 甲基葡糖酰胺 (MEGA-8)、壬酰基 -N- 甲基葡糖酰胺 (MEGA-9) 和癸酰基 -N- 甲基葡糖酰胺 (MEGA-10)；胆酸；胆酸钠；脱氧胆酸；脱氧胆酸钠；牛磺酸；牛磺酸钠；牛磺去氧胆酸 (taurodeoxycholic acid)；牛磺去氧胆酸钠；3[(3- 胆酰胺 (cholamido) 丙基）二甲基铵基 (dimethylammonio)]-1- 丙磺酸酯 (CHAPS)；3-[(3- 胆酰胺丙基）二甲铵]-2- 羟基 -1- 丙磺酸酯 (CHAPSO)；N- 十二烷基 -N,N- 二甲基 -3- 铵基 (ammoniol)- 丙磺酸酯 (ZWITTERGENT3-12)；N,N- 双 -(3-D- 葡糖酰氨基丙基 (gluconeamidopropyl))- 脱氧胆酰胺 (deoxycholamide)(DEOXY-BIGCHAP)；N 辛基葡糖苷；蔗糖单月桂酸酯 (sucrose monolaurate)；甘氨胆酸 / 甘氨胆酸钠；月桂肌氨酸 (laurosarcosine)（钠盐）；葡糖脱氧胆酸 (glycodeoxycholic acid)/ 葡糖脱氧胆酸钠 (sodium glycodeoxycholate)。所用的

洗涤剂与微粒之比 (w:w) 一般约为 0.0156:1，更优选约 0.625:1，甚至更优选约 0.25:1，最优选约 1:1-2:1。

[0083] 然后物理研磨微粒 / 洗涤剂混合物，例如使用陶瓷研钵和研棒，直至形成光滑的浆液。然后加入合适的水性缓冲液，例如磷酸缓冲盐水 (PBS) 或 Tris 缓冲盐水，超声处理或匀浆得到的混合物直至微粒完全悬浮。随后向微粒悬液中加入感兴趣的抗原，整个系统进行透析以除去洗涤剂。聚合物微粒和洗涤剂系统的选择最好使得感兴趣的抗原能吸附到微粒表面同时仍能维持抗原的活性。可以洗去含有表面吸附抗原的所得微粒的未结合抗原，将其作为合适缓冲制剂的悬液保存，或用合适的赋形剂冻干，如下文进一步描述的。

[0084] 可任选处理微粒以获得带负电荷的表面 (例如，用 SDS) 或带正电荷的表面 (例如，用阳离子洗涤剂，如 CTAB)。根据待吸附的抗原，表面特征变化可改变吸附特征。

[0085] 免疫增强剂

[0086] 本发明组合物包含免疫增强剂，发现联用免疫增强剂和不可溶的颗粒佐剂获得了出乎意料有效的免疫原性组合物。

[0087] 优选的免疫增强剂是 Toll 样受体 (TLR) 激动剂。例如，它们可以是人 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 和 / 或 TLR9 蛋白中的一种或多种的激动剂。优选的免疫增强剂是 TLR7 的激动剂 (例如，咪唑并喹啉类) 和 / 或更优选 TLR9 的激动剂 (例如，CpG 寡核苷酸)。这些免疫增强剂可用于活化先天免疫途径。

[0088] 典型的免疫增强剂是有机化合物，通常不是聚合物。它们的分子量可低于 2kDa，例如 <1800Da、<1600Da、<1400Da、<1200Da、<1000Da、<800Da、<600Da、<500Da、<400Da、<300Da 或 <200Da。

[0089] 合适的免疫增强剂包括但不限于 :

[0090] • 免疫刺激性寡核苷酸，例如含 CpG 基序的寡核苷酸 (含有通过磷酯键与鸟嘌呤连接的非甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)，或双链 RNA，或含回文序列的寡核苷酸或含聚 (dG) 序列的寡核苷酸。

[0091] • 3-O- 脱酰基单磷酰脂质 A(“3dMPL”，也称为 “MPL™”)[80-83]。

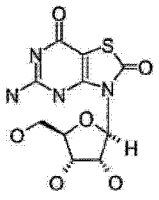
[0092] • 咪唑并喹啉化合物，例如咪喹莫特 (“R837”)[84、85]、瑞喹莫德 (“R-848”)[86] 和它们的类似物 ; 和它们的盐 (例如，盐酸盐)。免疫刺激性咪唑并喹啉的其它细节见参考文献 87-91。

[0093] • 缩氨基硫脲化合物，例如参考文献 92 披露的那些。参考文献 92 还描述了配制、制造和筛选活性化合物的方法。

[0094] • 色胺酮化合物，例如参考文献 93 披露的那些。参考文献 93 还描述了配制、制造和筛选活性化合物的方法。

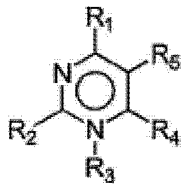
[0095] • 核苷类似物，例如 (a) 艾沙托拉滨 (Isatorabine)(ANA-245 ;7- 硫杂 -8- 氧代鸟苷) 及其前药 :

[0096]



[0097] (b)ANA975；(c)ANA-025-1；(d)ANA380；(e) 参考文献 94-96 所述的化合物；(f) 下式所示化合物：

[0098]



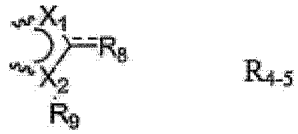
[0099] 式中：

[0100] R_1 和 R_2 各自独立为 H、卤素、$-NR_aR_b$、-OH、C_{1-6} 烷氧基、取代的 C_{1-6} 烷氧基、杂环基、取代的杂环基、C_{6-10} 芳基、取代的 C_{6-10} 芳基、C_{1-6} 烷基或取代的 C_{1-6} 烷基；

[0101] R_3 不存在，或是 H、C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、C_{6-10} 芳基、取代的 C_{6-10} 芳基、杂环基或取代的杂环基；

[0102] R_4 和 R_5 各自独立为 H、卤素、杂环基、取代的杂环基、$-C(O)-R_d$、C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基，或结合在一起形成 5 元环，如 R_{4-5}：

[0103]



R_{4-5}

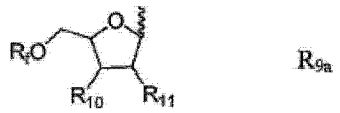
[0104] 在~~~~所示键处实现结合。

[0105] X_1 和 X_2 各自独立为 N、C、O 或 S；

[0106] R_8 是 H、卤素、-OH、C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烯基、C_{2-6} 炔基、-OH、$-NR_aR_b$、$-(CH_2)_n-O-R_c$、$-O-(C_{1-6}$ 烷基）、$-S(O)_pR_e$ 或 $-C(O)-R_d$；

[0107] R_9 是 H、C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、杂环基、取代的杂环基或 R_{9a}，其中 R_{9a} 是：

[0108]



R_{9a}

[0109] 在~~~~所示键处实现结合。

[0110] R_{10} 和 R_{11} 各自独立为 H、卤素、C_{1-6} 烷氧基、取代的 C_{1-6} 烷氧基、$-NR_aR_b$ 或 -OH；

[0111] R_a 和 R_b 各自独立为 H、C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、$-C(O)R_d$、C_{6-10} 芳基；

[0112] R_c 各自独立为 H、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、C_{1-6} 烷基或取代的 C_{1-6} 烷基；

[0113] R_d 各自独立为 H、卤素、C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 烷氧基、取代的 C_{1-6} 烷氧基、$-NH_2$、$-NH(C_{1-6}$ 烷基）、-NH（取代的 C_{1-6} 烷基）、$-N(C_{1-6}$ 烷基 $)_2$、-N（取代的 C_{1-6} 烷基 $)_2$、C_{6-10} 芳基或杂环基；

[0114] R_e 各自独立为 H、C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、C_{6-10} 芳基、取代的 C_{6-10} 芳基、杂环基或取代的杂环基；

[0115] R_f 各自独立地为 H、C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、$-C(O)R_d$、磷酸酯基、二磷酸酯基或三磷酸酯基；

[0116] n 各自独立为 0、1、2 或 3；

[0117] p 各自独立为 0、1 或 2；或者

[0118] (g)(a)-(f)中任一项的药学上可接受的盐，(a)-(f)中任一项的互变异构体，或该互变异构体的药学上可接受的盐。

[0119] • 罗唑利宾(Loxoribine)(7-烯丙基-8-氧代鸟苷)[97]。

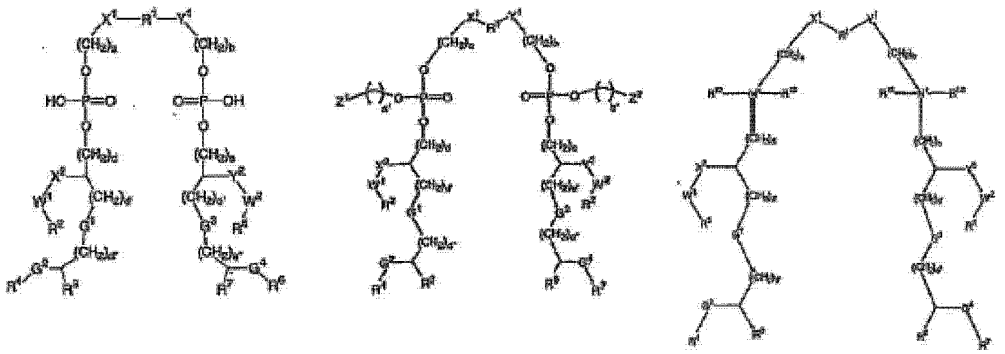
[0120] • polyoxidonium聚合物[98、99]或其它N-氧化的聚乙烯-哌嗪衍生物。

[0121] • 参考文献100披露的化合物。

[0122] • 式I、II或III所示化合物，或它们的盐：

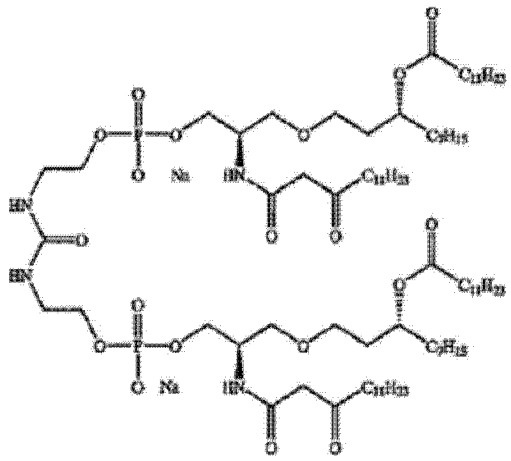
[0123]

I II III



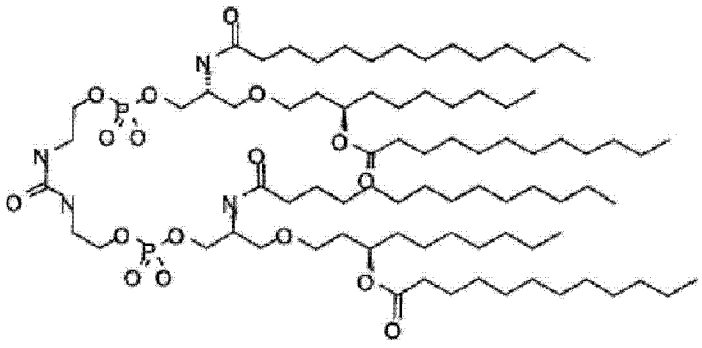
[0124] 如参考文献101所述，如'ER 803058'、'ER 803732'、'ER 804053'、'ER804058'、'ER 804059'、'ER 804442'、'ER 804680'、'ER 804764'、'ER 804057'(结构如下所示)：

[0125]



[0126] 或'ER 803022'(结构如下所示)：

[0127]

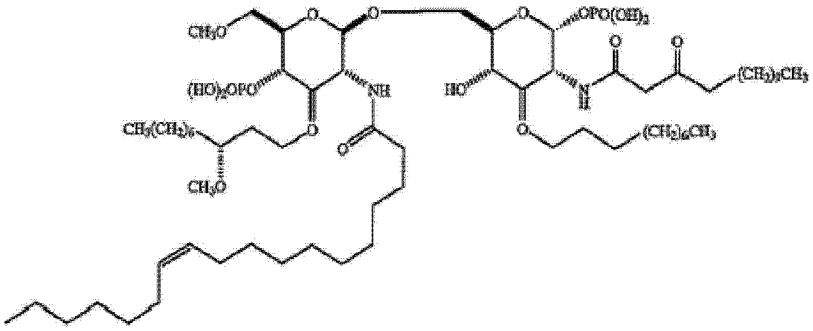


[0128] • 氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸盐衍生物，如 RC-529[102、103]。

[0129] •磷腈，例如参考文献 104 和 105 中描述的聚 [二 (羧基苯氧基) 磷腈](“PCPP”，poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene])。

[0130] • 含有连接于含磷酸无环主链的脂质的化合物，例如 TLR4 拮抗剂 E5564[106、107]：

[0131]



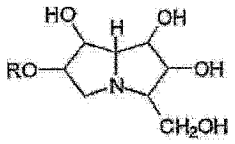
[0132] •胞壁酰肽，例如 N- 乙酰基 - 胞壁酰 -L- 苏氨酰基 -D- 异谷氨酰胺 (“thr-MDP”)、N- 乙酰基 - 去甲胞壁酰 -L- 丙氨酰基 -D- 异谷氨酰胺 (“nor-MDP”)、N- 乙酰基葡糖胺 -N- 乙酰基胞壁酰 -L-Al-D- 异谷 -L-Ala- 二棕榈酰丙酰胺 (N-acetylglucsaminyl-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxy propylamide)(“DTP-DPP”，或“Theramide™”) 或 N- 乙酰基胞壁酰 -L- 丙氨酰基 -D- 异谷氨酰胺 -L- 丙氨酸 -2-(1’-2’- 二棕榈酰基 -sn- 甘油基 -3- 羟基磷酰氧基)- 乙胺 (“MTP-PE”)。

[0133] • 参考文献 108 披露的化合物，包括：酰基哌嗪化合物、吲哚二酮 (Indoledione) 化合物、四氢异喹啉 (THIQ) 化合物、苯并环二酮 (Benzocyclodione) 化合物、氨基氮杂乙烯基 (Aminoazavinyl) 化合物、氨基苯并咪唑喹啉酮 (Aminobenzimidazole quinolinone) (ABIQ) 化合物 [109、110]、羟邻苯二甲酰胺 (Hydrapthalamide) 化合物、二苯甲酮化合物、异噁唑化合物、固醇化合物、喹唑酮 (Quinazilinone) 化合物、吡咯化合物 [111]、蒽醌化合物、喹喔啉化合物、三嗪化合物、吡唑嘧啶 (Pyrazalopyrimidine) 化合物和氮茚 (Benzazole) 化合物 [112]。

[0134] • 甲基肌苷 5’- 单磷酸酯 (“MIMP”)[113]。

[0135] • 多羟基化吡咯双烷 (pyrrolizidine) 化合物 [114] 或其药学上可接受的盐或衍生物，例如下式所示：

[0136]



[0137] 其中 R 选自下组：氢，直链或支链、未取代或取代的、饱和或不饱和的酰基、烷基 (例如，环烷基)、烯基、炔基和芳基。例子包括但不限于：木麻黄素 (casuarine)、木麻黄素 -6- α -D- 吡喃型葡萄糖、3- 表 - 木麻黄素、7- 表 - 木麻黄素、3,7- 二表 - 木麻黄素，等等。

[0138] • 小分子免疫增强剂 (SMIP)，例如：

[0139] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺；

[0140] N2,N2- 二甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0141] N2- 乙基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0142] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0143] 1-(2- 甲基丙基)-N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0144] N2- 丁基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0145] N2- 丁基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0146] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N2- 戊基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0147] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N2- 丙 -2- 烯基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0148] 1-(2- 甲基丙基)-2-[(苯基甲基) 硫]-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺 ;

[0149] 1-(2- 甲基丙基)-2-(丙硫基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -4- 胺 ;

[0150] 2-[[4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2- 基](甲基) 氨基] 乙醇 ;

[0151] 2-[[4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2- 基](甲基) 氨基] 乙基乙酸酯 ;

[0152] 4- 氨基 -1-(2- 甲基丙基)-1,3- 二氢 -2H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2- 酮 ;

[0153] N2- 丁基 -1-(2- 甲基丙基)-N4,N4- 双 (苯基甲基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0154] N2- 丁基 -N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N4,N4- 双 (苯基甲基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0155] N2- 甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N4,N4- 双 (苯基甲基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0156] N2,N2- 二甲基 -1-(2- 甲基丙基)-N4,N4- 双 (苯基甲基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺 ;

[0157] 1-{4- 氨基 -2-[甲基 (丙基) 氨基]-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 基 }-2- 甲基丙 -2- 醇 ;

[0158] 1-[4- 氨基 -2-(丙基氨基)-1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -1- 基]-2- 甲基丙 -2- 醇 ;

[0159] N4,N4- 二苄基 -1-(2- 甲氧基 -2- 甲基丙基)-N2- 丙基 -1H- 咪唑并 [4,5-c] 喹啉 -2,4- 二胺。

[0160] 可在组合物制备期间的各阶段加入免疫增强剂。例如,可将其加入抗原组合物中,然后将该混合物加入不可溶的颗粒佐剂。或者,可将其与不可溶的颗粒佐剂混合,再将该混合物与抗原混合。

[0161] 可将免疫增强剂与不同的药物,例如抗原 (如 CRM197) 偶联。参考文献 115 概述了小分子偶联技术。或者,免疫增强剂可以与其它药物非共价结合,例如借助疏水性或离心性相互作用。

[0162] 两种优选的免疫增强剂是 (a) 免疫刺激性寡核苷酸和 (b)3dMPL。

[0163] 免疫刺激性寡核苷酸

[0164] 免疫刺激性寡核苷酸可包含核苷酸修饰 / 类似物,如硫代磷酸酯修饰,可以是双链或 (除了 dsRNA) 单链。参考文献 116、117 和 118 披露了可能的类似取代,例如用 2'- 脱

氧-7-脱氮鸟苷取代鸟苷。参考文献119-124进一步讨论了CpG寡核苷酸的佐剂作用。CpG序列可涉及TLR9,例如基序GTCGTT或TTCGTT[125]。CpG序列可特异性诱导Th1免疫应答,例如CpG-A ODN(寡聚脱氧核苷酸),或更特异地诱导B细胞应答,例如CpG-B ODN。参考文献126-128讨论了CpG-A和CpG-B ODN。CpG优选CpG-A ODN。优选将CpG寡核苷酸构建为5'端易于为受体识别。任选将两条CpG寡核苷酸序列在它们的3'端相连以形成"免疫聚体"(immunomer)。参见,例如参考文献125和129-131。有用的CpG佐剂是CpG7909,其也称为ProMune™(格雷药物有限公司(Coley Pharmaceutical Group,Inc.))。

[0165] 除使用CpG序列以外,还可使用TpG序列[132]。这些寡核苷酸可不含未甲基化的CpG基序。

[0166] 免疫刺激性寡核苷酸可以富含嘧啶。例如,其可包含多个连续的胸苷核苷酸(例如,参考文献132所述的TTTT),和/或其核苷酸组成可含有>25%的胸苷(例如,>35%、>40%、>50%、>60%、>80%,等等)。例如,其可包含多个连续的胞嘧啶核苷酸(例如,参考文献132所述的CCCC),和/或其核苷酸组成可含有>25%的胞嘧啶(例如,>35%、>40%、>50%、>60%、>80%,等等)。这些寡核苷酸可不含未甲基化的CpG基序。

[0167] 免疫刺激性寡核苷酸通常包含至少20个核苷酸。它们可包含少于100个核苷酸。

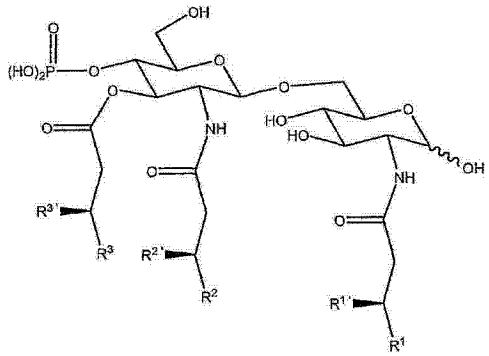
[0168] 3dMPL

[0169] 3dMPL(也称为3脱-O-酰化单磷酰基脂质A或3-O-脱酰基-4'-单磷酰基脂质A)是单磷酰基脂质A中还原端葡糖胺的3位被脱酰化的佐剂。3dMPL从明尼苏达沙门菌(Salmonella minnesota)的无庚糖突变体(heptoseless mutant)制备,其在化学上类似于脂质A但缺乏酸不稳定的磷酰基和碱不稳定的酰基。它活化单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞,刺激几种细胞因子释放。参考文献133最先描述了3dMPL的制备。

[0170] 3dMPL与铝盐的联用是已知的,例如与磷酸铝联用[135],或与氢氧化铝联用[135]。

[0171] 3dMPL可采取酰化程度不同的相关分子混合物的形式(例如,具有长度可能不同的3、4、5或6条酰基链)。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)被N-酰基化,3'位也被O-酰基化。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:

[0172]



[0173] 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。

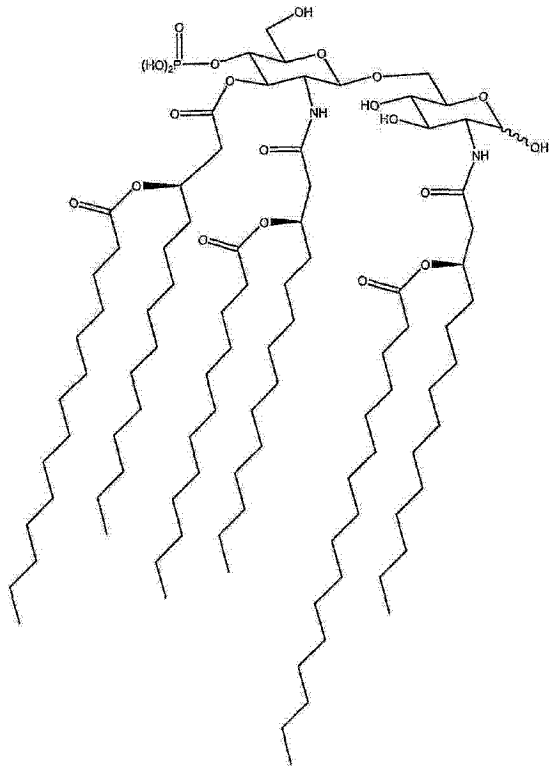
[0174] 基团$R^{1'}$、$R^{2'}$和$R^{3'}$各自独立为:(a)-H;(b)-OH;或(c)-O-CO-R^4,其中R^4是-H

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。

[0175] 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，特别是要确保以重量计 6 酰基链形式至少占总 3d-MPL 的 10%，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。

[0176] 因此，本发明组合物包含的 3d-MPL 最优选形式是：

[0177]



[0178] 当采用混合物形式的 3dMPL 时，提及本发明组合物中 3dMPL 的用量或浓度指该混合物中混合的 3dMPL 诸种类。

[0179] 在水性条件下，3dMPL 可形成大小不同的胶束凝聚物或颗粒，例如直径 <150nm 或 >500nm。本发明可使用任一种或二者，通过常规试验可选择较佳的颗粒。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-PL 的透明水性混悬液)[136]。优选颗粒的平均直径小于 220nm，更优选小于 200nm 或小于 150nm 或小于 120nm，平均直径甚至可以小于 100nm。然而，在大多数情况中，平均直径不会小于 50nm。这些颗粒足够小，从而适于过滤灭菌。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，颗粒分布一般在该平均值附近，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。

[0180] 最好基本上所有 3dMPL 位于乳液的水相中。

[0181] 疫苗中 3dMPL 的常见用量是 10-100μg/ 剂，例如约 25μg 或约 50μg。

[0182] 药物组合物

[0183] 本发明组合物是药学上可接受的。它们通常包含除抗原、佐剂和免疫增强剂以外的组分，例如，它们通常包含一种或多种药物载体和 / 或赋形剂。对这些组分的充分讨论见参考文献 137。

[0184] 组合物可包含一种或多种防腐剂，例如硫柳汞或 2- 苯氧基乙醇。然而，这些疫苗优选基本上不含（即，少于 5μg/ml）汞物质，例如不含硫柳汞 [14、138]。更优选不含汞的疫苗。特别优选不含防腐剂的疫苗。

[0185] 优选包含生理盐，例如钠盐以控制张力。优选 1-20mg/ml 之间的氯化钠 (NaCl)。可存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、脱水磷酸氢二钠 (disodium phosphate dehydrate)、氯化镁、氯化钙等。

[0186] 组合物的重量克分子渗透浓度通常在 200mOsm/kg-400mOsm/kg 之间，优选 240-360mOsm/kg 之间，更优选处于 290-310mOsm/kg 范围内。以前有报道说重量克分子渗透浓度对疫苗接种所致的疼痛没有影响 [139]，但最好将重量克分子渗透浓度维持在该范围内。

[0187] 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；组氨酸缓冲液；或柠檬酸缓冲液。所含的缓冲液范围一般是 5-20mM。

[0188] 组合物的 pH 通常在 5.0-8.1 之间，更常见在 6.0-8.0 之间，例如 6.5 和 7.5 之间，或 7.0-7.8 之间。因此，本发明方法可包括先调节散装疫苗的 pH 再包装的步骤。

[0189] 组合物优选无菌。组合物优选无热原，例如每剂量含有 <1EU（内毒素单位，标准量度），优选每剂量 <0.1EU。组合物优选无谷蛋白。

[0190] 组合物可包含一次免疫的物质，或可包含多次免疫的物质（即，“多剂量”试剂盒）。在多剂量配置中，优选包含防腐剂。除了在多剂量组合物中包含防腐剂以外，还可将组合物置于装有用于转移物质的无菌适配器的容器中。

[0191] 一般给予的疫苗剂量体积是约 0.5ml，虽然可将半剂量（即，约 0.25ml）给予儿童。

[0192] 通常混合组合物中的抗原、佐剂和免疫增强剂。本发明组合物通常是水性形式。

[0193] 组合物和试剂盒优选保存在 2℃ -8℃之间。不应冷冻它们。应避免有光直射。

[0194] 本发明的试剂盒

[0195] 如上所述，可以在递送时临时制备本发明组合物。因此，本发明提供装有即时混合的各组分的试剂盒。所述试剂盒将佐剂和抗原分别保存待用。免疫增强剂可以包含在这两种试剂盒组分之一中，或者可以是第三试剂盒组分的一部分。

[0196] 试剂盒内的诸组分彼此物理分离，可采用各种方法实现这种分离。例如，诸组分可处于单独的容器，例如小瓶中。然后可取出一个小瓶的内含物并将其加入另一小瓶，或者分别取出两小瓶的内含物并在第三容器中混合而混合两小瓶的内含物。

[0197] 在优选的配置中，试剂盒诸组分之一存于注射器中，其它组分存于容器，例如小瓶中。可利用注射器（例如，装有针头）将其内含物注入第二容器中进行混合，然后将混合物抽入该注射器中。随后将该注射器中的混合内含物给予患者，通常利用新的无菌针头。将一种组分包装在注射器中无需利用另一注射器来给予患者。

[0198] 在另一优选配置中，将两种试剂盒组分分别保存在同一注射器，例如双室注射器中，如参考文献 140-147 等所披露的。使用该注射器（例如，给予患者期间）之时即混合了该两室中的内含物。该配置在使用时无需单独的混合步骤。

[0199] 试剂盒各组分的内含物通常均可处于水性形式。在一些配置中，某组分（一般是抗原组分而不是佐剂组分）处于干燥形式（例如，冻干的形式），另一组分处于水性形式。可以混合所述两种组分以再活化干组分，从而获得给予患者的水性组合物。冻干组分通常保存于小瓶而不是注射器内。干燥的组分可以包含稳定剂，例如乳糖、蔗糖或甘露醇以及它们的混合物，例如乳糖 / 蔗糖混合物、蔗糖 / 甘露醇混合物等。一种可能的配置将水佐剂组分存于预填充注射器中，而将冻干抗原组分存于小瓶中。

[0200] 包装组合物或试剂盒组分

[0201] 本发明组合物（或试剂盒组分）的合适容器包括小瓶、注射器（例如，一次性注射器）、鼻喷雾器等。这些容器应无菌。

[0202] 如果将组合物 / 组分存于小瓶中，所述小瓶优选由玻璃或塑料材料制成。优选先使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，所有包装材料最好均不含乳胶。小瓶可装有单剂量疫苗，或可装有多剂量（“多剂量”小瓶），例如 10 份剂量。优选用无色玻璃制成小瓶。

[0203] 小瓶可装有盖子（例如，Luer 锁扣），从而可将预填充的注射器插入盖子中，将注射器的内含物推入小瓶中（例如，重建其中的冻干材料），再将小瓶的内含物抽回注射器中。将注射器从小瓶中取出后，装上针头，将组合物给予患者。优选使盖子位于封口或覆盖物内，从而要先除去封口或覆盖物再接触盖子。小瓶可具有盖子，从而能无菌取出其内含物，特别是对于多剂量小瓶。

[0204] 如果要将某组分包装入注射器，注射器可装有针头。如果未装针头，可随注射器提供单独的针头用于装配和使用。这种针头可以是有鞘的。优选安全针头。常见的是 1- 英寸 23- 号、1- 英寸 25- 号和 5/8- 英寸 25- 号针头。注射器可装有可剥离标签，其上打印了批号、流感季节和内含物的有效期，从而有助于记录保管。注射器的柱塞优选具有塞子，从而能防止柱塞在抽吸期间意外掉出。注射器可装有乳胶橡胶盖子和 / 或柱塞。一次性注射器可含有单剂量疫苗。在装上针头之前，注射器一般装有针帽以密封顶端，所述针帽优选由丁基橡胶制成。如果注射器和针头分开包装，则优选给针头装有丁基橡胶罩。优选的注射器是以“Tip-Lok”™ 为商品名投入市场的那些。

[0205] 可给容器做上显示半剂量体积的标记，例如以有助于递送给儿童。例如，含有 0.5ml 剂量的注射器可具有显示 0.25ml 体积的标记。

[0206] 如果使用玻璃容器（例如，注射器或小瓶），则优选使用硼硅酸玻璃而不是钠钙玻璃制成的容器。

[0207] 可随试剂盒或组合物装有（例如，装在同一盒子中）插页，该插页包括疫苗的细节，例如给药的使用说明书，疫苗中抗原的细节等。使用说明书还可包括警告，例如准备肾上腺素溶液以防疫苗接种后的过敏反应，等等。

[0208] 治疗方法和疫苗的施用

[0209] 本发明组合物适合给予人患者，本发明提供在患者体内产生免疫应答的方法，包括将本发明组合物给予患者的步骤。

[0210] 本发明还提供试剂盒，或者用作药物的本发明组合物。

[0211] 本发明还提供 (i) 流感病毒抗原；(ii) 不可溶的颗粒佐剂；和 (iii) 免疫增强剂在制备用于在患者体内产生免疫应答的药物中的应用。

[0212] 这些方法和应用产生的免疫应答通常包括抗体应答，优选保护性抗体应答。本领域熟知评估流感病毒疫苗接种后的抗体应答、中和能力和保护作用的方法。人类研究证明针对人流感病毒血凝素的抗体滴度与保护作用有关（血清样品血凝反应 - 抑制滴度约 30-40 时，对同源病毒感染的保护作用约为 50%）[148]。一般通过血凝反应抑制、微量中和、单辐射免疫扩散 (SRID) 和 / 或单向辐射状溶血 (SRH) 检测抗体应答。本领域熟知这些试验技术。

[0213] 可以各种方法给予本发明组合物。最优选的免疫途径是肌肉内注射（例如，注射入手臂或腿中），但其它可用的途径包括皮下注射、鼻内 [149-151]、口服 [152]、真皮内 [153,154]、透皮、经皮 [155] 等。

[0214] 本发明制备的疫苗可用于治疗儿童和成年人。流感疫苗目前推荐用于儿科和成年人免疫接种，年龄自 6 个月起。因此，患者可以小于 1 岁、1-5 岁、5-15 岁、15-55 岁、或至少 55 岁。接受疫苗的患者优选老年人（例如，≥ 50 岁，≥ 60 岁，优选≥ 65 岁），年轻人（例如，≤ 5 岁），住院患者，卫生保健人员、军队和军事人员，怀孕的妇女，慢性病、免疫缺陷患者，在接受疫苗前 7 天中服用抗病毒化合物（例如，奥塞米韦或扎那米韦化合物；例如磷酸奥塞米韦，参见下文）的患者，和出国的人。然而，这些疫苗不仅适用于这些团体，还可应用于更广泛的人群中。对于流行毒株，优选给予所有的年龄组。

[0215] 治疗可以是单剂量用药法或多剂量用药法。多剂量可以用于初次免疫接种程序表和 / 或加强免疫接种程序表中。在多剂量用药法中，可通过相同或不同的途径给予各种剂量，例如胃肠外致敏和粘膜加强，粘膜致敏和胃肠外加强，等等。给予多次剂量（通常是两剂量）在免疫原初患者，例如对于以前从未接受流感疫苗的人，或对于接种抵御新 HA 亚型的疫苗而言（例如在流行病爆发期间）特别有用。多剂量通常可间隔至少一周（例如，约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 10 周、约 12 周、约 16 周，等等）给予。

[0216] 本发明的优选组合物满足 CPMP 效力标准的第 1、2 或 3 条。在成年人 (18-60 岁）中，这些标准是：(1) ≥ 70% 血清保护作用；(2) ≥ 40% 血清转化；和 / 或 (3)GMT 增加≥ 2.5 倍。在老年人 (>60 岁）中，这些标准是：(1) ≥ 60% 血清保护作用；(2) ≥ 30% 血清转化；和 / 或 (3)GMT 增加≥ 2 倍。这些标准依据至少 50 位患者的标签公开研究 (open label study)。

[0217] 可将本发明疫苗与其它疫苗基本上同时（例如，可在医疗保健专家或疫苗接种中心的同一次用药咨询或就诊期间）给予患者，例如与以下疫苗基本上同时：麻疹疫苗、腮腺炎疫苗、风疹疫苗、MMR 疫苗、水痘疫苗、MMRV 疫苗、白喉疫苗、破伤风疫苗、百日咳疫苗、DTP 疫苗、偶联的乙型流感嗜血杆菌疫苗、灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗、乙肝病毒疫苗、脑膜炎球菌偶联物疫苗（例如，四价 A-C-W135-Y 疫苗）、呼吸道合胞体病毒疫苗、肺炎球菌偶联物疫苗，等等。与肺炎球菌疫苗和 / 或脑膜炎球菌疫苗基本上同时给予在老年患者中特别有用。

[0218] 类似地，可将本发明疫苗与抗病毒化合物，特别是有效抵御疫流感毒的抗病毒化合物（例如，奥塞米韦和 / 或扎那米韦）基本上同时（例如，可在医疗保健专家的同一次

用药咨询或就诊期间）给予患者。这些抗病毒（化合物）包括神经氨酸酶抑制剂，例如(3R,4R,5S)-4- 乙酰基氨基 -5- 氨基 -3(1- 乙基丙氧基)-1- 环己烯 -1- 羧酸或 5-(乙酰基氨基)-4-[(氨基亚氨基甲基)- 氨基]-2,6- 脱水 -3,4,5- 三脱氧 -D- 丙三基 -D- 半乳糖壬 (galactonon)-2- 烯酸 (enonic acid)，包括它们的酯（例如乙酯）和它们的盐（例如磷酸盐）。优选的抗病毒化合物是 (3R,4R,5S)-4- 乙酰基氨基 -5- 氨基 -3(1- 乙基丙氧基)-1- 环己烯 -1- 羧酸、乙酯、磷酸酯 (1:1)，也称为磷酸奥塞米韦 (TAMIFLU™)。

[0219] 概述

[0220] 术语“含有”包括“包含”以及“由…组成”，例如“含有”X 的组合物可仅由 X 组成或可包含其它物质，例如 X+Y。

[0221] 词语“基本上”不排除“完全”，例如“基本上无”Y 的组合物可完全无 Y。该词语“基本上”可视需要从本发明定义中省去。

[0222] 与数值 x 有关的术语“约”表示，例如 x±10%。

[0223] 除非有专门表述，包括混合两种或多种组分的步骤的某方法不要求任何具体混合顺序。因此，可以任何顺序混合诸组分。如果有三种组分，则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。

[0224] 如果利用动物（特别是牛）材料培养细胞，这些材料应从不含可传染海绵样脑病 (TSE)，特别是不含牛海绵样脑病 (BSE) 的来源获得。总体上，优选在完全不含动物来源的材料中培养细胞。

[0225] 如果将化合物作为组合物的一部分给予身体，或可用合适的前药替代该化合物。

[0226] 如果将细胞物质用于重配或反向遗传学方法，优选批准用于人疫苗生产的细胞物质，例如欧洲药典概述章节 5.2.3 中的。

[0227] 附图简述

[0228] 图 1-3 显示了用不同组合物免疫的小鼠的 Log10 血清抗体滴度 (ELISA)。图 1 显示了 H1N1。图 2 显示了 H3N2。图 3 显示了乙型流感。

[0229] 图 4 显示了 HI 滴度。前柱是 1-3 组，后柱是 4-6 组。

[0230] 图 5 显示了 IgG 的 GMT(AU/ml)。各对中左柱显示了 IgG1 ；右柱显示了 IgG2a。

[0231] 本发明实施方式

[0232] 在MDCK细胞上分别培养流感病毒毒株Wyoming H3N2(A)、New-Caledonia H1N1(A)和 Jiangsu(B)。制备三价表面糖蛋白疫苗，用其在第 0 天和第 28 天以 0.1μg HA/ 毒株经肌肉内免疫免疫原初的 Balb/C 小鼠。在第 42 天采集小鼠的血液并用该血进行各种抗体试验 ：HI 滴度 ；通过 ELISA 检测抗 -HA 应答。IgG 应答分类为 IgG1 或 IgG2a。

[0233] 检验了三种不可溶的颗粒佐剂 ：(i) 氢氧化铝，以 1mg/ml 使用并包含 5mM 组氨酸缓冲液 ；(ii) 磷酸钙，以 1mg/ml 使用并包含 5mM 组氨酸缓冲液 ；或 (iii) 由聚 (丙交酯 - 共 - 乙交酯)50:50 共聚组合物形成的微粒，内部粘度 0.4(“PLG”)。

[0234] 检验的两种免疫增强剂是 ：(a) 具有硫代磷酸酯主链的免疫刺激性 CpGODN，10μg/ 剂 ；和 (b)R-848。

[0235] 因此，共 12 组动物 ：

[0236]

	(i)Al-H	(ii)Ca-P	(iii)PLG	无颗粒佐剂
无免疫增强剂 r	1	2	3	10
(a)CpG	4	5	6	11
(b)R-848	7	8	9	12

[0237] 对于 Al-H 制剂，4℃将三价抗原吸附过夜，该体系中含 1mg/ml 氢氧化铝，3μg/ml 抗原，5mM 组氨酸缓冲液，pH6.5 和 9mg/ml 氯化钠。

[0238] 对于 Ca-P 制剂，利用 20-mm 探针以 15,000rpm 匀浆磷酸钙悬液 3 分钟以减小粒度。然后于 4℃将抗原吸附至 5mM 组氨酸缓冲液 pH6.5 配制的匀浆悬液过夜，该悬液中含 1mg/ml Ca-P、3μg/ml 抗原和 9mg/ml 氯化钠。

[0239] 采用溶剂蒸发方法制备 PLG 微粒。简言之，利用 10-mm 探针匀浆 10ml 二氯甲烷配制的 6%w/v 聚合物溶液与 2.5ml 磷酸缓冲盐水 (PBS)，以此制备微粒。然后将如此形成的油包水乳液加入 50ml 含 DSS 的蒸馏水，在冰浴中用 20-mm 探针高速匀浆该混合物 5 分钟。该方法形成了水包油包水乳液，然后于室温以 1000rpm 搅拌该乳液 12 小时。蒸发二氯甲烷。利用粒度分析仪测定所得微粒的大小分布。利用马尔文 ζ 分析仪 (Malvern Zeta analyzer) 检测 ζ 电位。培育含 100mg 空白 PLG 微粒的悬液与 30μg 三价流感抗原，以 0.03%w/w 的加载量吸附抗原。加入浓组氨酸缓冲溶液，终浓度为 10mM，pH6.2，总体积为 10ml。4℃用实验室振荡器 (lab rocker) 混合该悬液过夜。在使用时取出 1ml 来测定吸附效率。将含有 3.6μg 三价抗原的等份试样置于玻璃小瓶中，以 -50℃和 90×10^{-3} 毫巴冻干，含有的甘露醇和蔗糖在重建后终浓度分别是 4.5% 和 1.5%。

[0240] 如下所示测定蛋白质与这三种佐剂的吸附效率：过夜培育步骤后取出 PLG/FCC、Al-H/FCC 或 Ca-P/FCC 的 1ml 等份试样。离心后，通过凝胶过滤层析检测上清液中剩余的未结合蛋白质的量。实际上，用 Waters 2690/432 仪器将 100μl 上清液注射到 TSK3000SWXL 上。建立三价抗原的线性校验曲线，计算上清液中存在的蛋白质含量。然后从最初加入的蛋白质总量中扣除未结合的蛋白质总量，利用差值来计算实际加载效率。

[0241] 为从 Al-H 和 Ca-P 制剂提取抗原，以 5000rpm 离心等份试样 15-20 分钟。取出各样品的上清液，不要弄散沉淀物。为置换出抗原，向各沉淀物中加入解吸缓冲液 (0.25M Na_2HPO_4+0.15M EDTA)，室温下通过轻柔摇动培育 2-3 小时。通过离心分离提取的抗原和递送系统。

[0242] 为从 PLG 微粒提取抗原，在 PBS 中加入 0.05% 辛基 -β- 葡糖苷，室温下通过轻柔摇动培育 1-2 小时。通过离心分离含有提取的 FCC 抗原的上清液和沉淀物。

[0243] 通过 ELISA 测定抗原特异性抗体。最后一次免疫两周后，滴定各血清的 HA- 特异性 IgG。27-30℃，用磷酸缓冲盐水，pH7.4(PBS) 配制的 H1N1、H2N3 或乙型（抗原）以 0.2μg/孔包被 Maxisorp 96- 孔平底板过夜。室温下用 300μl 3%PVP 封闭包被的诸平板 1 小时。用 PBS pH7.4、0.1% BSA 和 0.05% 吐温 -20 清洗平板，拍干并干燥。首先用稀释缓冲液 (PBS pH7.4，1% BSA，0.05% 吐温 -20) 将血清样品和血清标准品作 1:5,000-1:20,000 稀释，然后将其转移入包被并封闭的平板中，其中各样品用同一缓冲液连续稀释三倍。用碱性磷酸酶

偶联的山羊抗-小鼠 IgG 检测抗原特异性 IgG。抗体滴度表示为 ELISA 滴度的对数，得到的光密度 (OD) 高于平均值加免疫前血清所得平均 OD 的五倍标准偏差 (SD)。这些滴度依据平行检测的参比血清标准化。

[0244] 在 V- 形 96- 孔微量滴定板中通过血凝反应抑制试验测定在第一次免疫后 2 周 (1 后）和第二次免疫后 2 周 (2 后）采集的各血清的抗体。简言之，室温下将 25μl 两倍连续稀释的样品与 25μl 毒株特异性流感抗原（完整的病毒，含有 4 个血凝单位）培育 60 分钟。加入从成年公鸡获得的红细胞的 0.5%v/v 悬液，将该混合物再培育 60 分钟。通过目测观察反应：形成红斑点表示阳性反应（抑制），细胞呈弥散的片状表示阴性反应（血凝反应）。滴度定义为发生最后一次完全血凝抑制的血清稀释度。抗体浓度对应于滴度的倒数值。

[0245] 图 1-3 显示了 12 组的抗 -HA ELISA 应答。比较组 1 和 4 显示向氢氧化铝中加入 CpG 提高了 HA 滴度。类似地，将 CpG 加入磷酸钙佐剂（组 2 和 5）和 PLG 佐剂（组 3 和 6）时也提高了 HA 滴度。

[0246] 图 4 显示了组 1-6 的 HI 滴度。加入 CpG 提高了 HI 滴度。

[0247] 为研究免疫应答是 TH1 型还是 TH2 型，将 HA- 特异性 IgG 再分成 IgG1(TH2) 或 IgG2a(TH1)。图 5 显示了该分析的结果。单用颗粒抗原（组 1、2 和 3）显示几乎没有 IgG2a。然而，加入 CpG 时，观察到显著的 IgG2a 应答（组 4、5 和 6），其中 IgG2a 在组 5(CpG+CaP) 中占优势。因此，向不可溶的颗粒佐剂中加入免疫增强剂，例如 CpG 导致了从 TH2- 型应答向 TH1- 型应答的转变。有报道说 TH1- 型应答提高了抵御流感病毒的异源亚型免疫力 [9]，因此加入免疫增强剂可改善含有不可溶颗粒佐剂的已知流感疫苗。

[0248] 应该知道只是借助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中。

[0249] 参考文献（其内容通过引用纳入本文）

[0250] [1]Frey 等 (2003)Vaccine21:4234-7.

[0251] [2]《疫 苗》(Vaccines)，(Plotkin 和 Orenstein 编)， 第 4 版，2004，ISBN:0-7216-9688-0.

[0252] [3]Espuelas 等 (2005)Immonologia24(2):208-23.

[0253] [4]US6,372,223.

[0254] [5]WO00/15251.

[0255] [6]WO01/22992.

[0256] [7]Hehme 等 (2004)Virus Res.103(1-2):163-71.

[0257] [8]Coombes 等 (1998)Biomaterials19(11-12):1073-81.

[0258] [9]Moran 等 (1999)J Infect Dis180:579-85.

[0259] [10]WO96/37624.

[0260] [11]WO98/46262.

[0261] [12]WO02/28422.

[0262] [13]WO02/067983.

[0263] [14]WO02/097072.

[0264] [15]WO2005/113756.

[0265] [16]WO02/074336.

[0266] [17]WO01/21151.

[0267] [18]Huckriede 等 (2003)Methods Enzymol 373:74-91.

[0268] [19]Herlocher 等 .(2004)J Infect Dis190(9):1627-30.

[0269] [20]Le 等 (2005)Nature 437(7062):1108.

[0270] [21] 世界卫生组织 (2005)Emerging Infectious Diseases 11(10):1515-21.

[0271] [22]Hoffmann 等 (2002)Vaccine 20:3165-3170.

[0272] [23]Subbarao 等 (2003)Virology 305:192-200.

[0273] [24]Liu 等 (2003)Virology 314:580-590.

[0274] [25]Ozaki 等 (2004)J.Virol 78:1851-1857.

[0275] [26]Webby 等 (2004)Lancet 363:1099-1103.

[0276] [27]WO00/60050.

[0277] [28]WO01/04333.

[0278] [29]US6649372.

[0279] [30]Neumann 等 (2005)Proc Natl Acad Sci USA 102:16825-9.

[0280] [31]WO2006/067211.

[0281] [32]WO01/83794.

[0282] [33]Hoffmann 等 (2000)Virology 267(2):310-7.

[0283] [34]WO97/37000.

[0284] [35]Brands 等 (1999)Dev Biol Stand 98:93-100.

[0285] [36]Halperin 等 (2002)Vaccine 20:1240-7.

[0286] [37]Tree 等 (2001)Vaccine 19:3444-50.

[0287] [38]Kistner 等 (1998)Vaccine 16:960-8.

[0288] [39]Kistner 等 (1999)Dev Biol Stand 98:101-110.

[0289] [40]Bruhl 等 (2000)Vaccine 19:1149-58.

[0290] [41]Pau 等 (2001)Vaccine 19:2716-21.

[0291] [42]http://www.atcc.org/

[0292] [43]http://locus.umdnj.edu/

[0293] [44]WO03/076601.

[0294] [45]WO2005/042728.

[0295] [46]WO03/043415.

[0296] [47]WO01/85938.

[0297] [48]WO2006/108846.

[0298] [49]EP-A-1260581(WO01/64846).

[0299] [50]WO2006/071563.

[0300] [51]WO2005/113758.

[0301] [52]WO2006/027698.

[0302] [53]Lundblad(2001)Biotechnology and Applied Biochemistry34:195-197.

[0303] [54]“工业指南 :生物分析方法确认”(Guidance for Industry:Bioanalytical Method Validation),美国健康和人服务部食品药品管理中心兽药评估和研究 (CDER) 中心

(CVM)(U.S.Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research(CDER)Center for Veterinary Medicine(CVM)).2001 年 5 月 .

[0304] [55]Ji 等 (2002)Biotechniques.32:1162-7.

[0305] [56]Briggs(1991)J Parenter Sci Technol.45:7-12.

[0306] [57]Lahijani 等 (1998)Hum Gene Ther.9:1173-80.

[0307] [58]Lokteff 等 (2001)Biologicals.29:123-32.

[0308] [59]EP-B-0870508.

[0309] [60]US5948410.

[0310] [61] 名为“残留细胞 DNA 水平低的细胞衍生的病毒疫苗”(CELL-DERIVED VIRAL VACCINES WITH LOW LEVELS OF RESIDUAL CELL DNA) 的国际专利申请,2006 年 11 月 1 日提交,要求 US-60/732786 的优先权。

[0311] [62]WO03/023021

[0312] [63]WO03/023025

[0313] [64]WO97/37001.

[0314] [65]Treanor 等 (1996)J Infect Dis173:1467-70.

[0315] [66]Keitel 等 (1996)Clin Diagn Lab Immunol3:507-10.

[0316] [67]《疫苗设计:亚单位和佐剂方法》(Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach)(Powell 和 Newman 编), 普莱纳姆出版社 (Plenum Press)1995(ISBN0-306-44867-X).

[0317] [68]Jiang 等 (2004)Vaccine23:693-8.

[0318] [69] 美国专利 5,676,976.

[0319] [70]WO00/46147.

[0320] [71] 美国专利 6,355,271.

[0321] [72]WO03/051394.

[0322] [73] 美国专利 5,443,832.

[0323] [74] 美国专利 5,851,670.

[0324] [75] 美国专利 4,016,252.

[0325] [76]Aggerbeck 和 Heron(1995)Vaccine13:1360-5.

[0326] [77]WO98/33487.

[0327] [78]《疫苗佐剂:制备方法和研究方案》(Vaccine Adjuvants:Preparation Methods and Research Protocols)(分子医学丛书第 42 卷).ISBN:1-59259-083-7. O’Hagan 编 .

[0328] [79]O’Hagan 等 .(1993)Vaccine11:965-9.

[0329] [80]Myers 等 (1990)《内毒素反应的细胞和分子方面》(Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions),第 145-156 页 .

[0330] [81]Ulrich(2000) 参考文献 78 的第 16 章 (第 273-282 页).

[0331] [82]Johnson 等 (1999)J Med Chem42:4640-9.

[0332] [83]Baldrick 等 (2002)Regulatory Toxicol Pharmacol35:398-413.

[0333] [84]US4,680,338.

[0334] [85]US4,988,815.

[0335] [86]WO92/15582.

[0336] [87]Stanley(2002)Clin Exp Dermatol 27:571-577.

[0337] [88]Wu 等 (2004)Antiviral Res.64(2):79-83.

[0338] [89]Vasilakos 等 (2000)Cell Immunol.204(1):64-74.

[0339] [90] 美国专利 4689338,4929624,5238944,5266575,5268376,5346905,5352784,5389640,5395937,5482936,5494916,5525612,6083505,6440992,6627640,6656938,6660735,6660747,6664260,6664264,6664265,6667312,6670372,6677347,6677348,6677349,6683088,6703402,6743920,6800624,6809203,6888000 和 6924293.

[0340] [91]Jones(2003)Curr Opin Investig Drugs 4:214-218.

[0341] [92]WO2004/060308.

[0342] [93]WO2004/064759.

[0343] [94]US 6,924,271.

[0344] [95]US2005/0070556.

[0345] [96]US 5,658,731.

[0346] [97]US 5,011,828.

[0347] [98]Dyakonova 等 (2004)Int Immunopharmacol 4(13):1615-23.

[0348] [99]FR-2859633.

[0349] [100]PCT/US2005/022769.

[0350] [101]WO03/011223.

[0351] [102]Johnson 等 (1999)Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278.

[0352] [103]Evans 等 (2003)Expert Rev Vaccines 2:219-229.

[0353] [104]Andrianov 等 (1998)Biomaterials 19:109-115.

[0354] [105]Payne 等 (1998)Adv Drug Delivery Review 31:185-196.

[0355] [106]Wong 等 (2003)J Clin Pharmacol 43(7):735-42.

[0356] [107]US2005/0215517.

[0357] [108]WO2004/87153.

[0358] [109]US 6,605,617.

[0359] [110]WO02/18383.

[0360] [111]WO2004/018455.

[0361] [112]WO03/082272.

[0362] [113]Signorelli 和 Hadden(2003)Int Immunopharmacol 3(8):1177-86.

[0363] [114]WO2004/064715.

[0364] [115]Thompson 等 (2003)Methods in Molecular Medicine 94:255-266.

[0365] [116]Kandimalla 等 (2003)Nucleic Acids Research 31:2393-2400.

[0366] [117]WO02/26757.

[0367] [118]WO99/62923.

[0368] [119]Krieg(2003)Nature Medicine 9:831-835.

[0369] [120]McClus kie 等 (2002)FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185.

[0370] [121]WO98/40100.

[0371] [122]US 6,207,646.

[0372] [123]US 6,239,116.

[0373] [124]US 6,429,199.

[0374] [125]Kandimalla 等 (2003)Biochemical Society Transactions 31(部 分 3):654-658.

[0375] [126]Blackwell 等 (2003)J Immunol 170:4061-4068.

[0376] [127]Krieg(2002)Trends Immunol 23:64-65.

[0377] [128]WO01/95935.

[0378] [129]Kandimalla 等 (2003)BBRC 306:948-953.

[0379] [130]Bhagat 等 (2003)BBRC 300:853-861.

[0380] [131]WO03/035836.

[0381] [132]WO01/22972.

[0382] [133] 英国专利申请 GB-A-2220211.

[0383] [134]WO96/26741.

[0384] [135]WO93/19780.

[0385] [136]WO 94/21292.

[0386] [137]Gennaro(2000) 《雷明顿 :药学科学和实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),第 20 版,ISBN:0683306472.

[0387] [138]Banzhoff(2000)Immunology Letters 71:91-96.

[0388] [139]Nony 等 (2001)Vaccine 27:3645-51.

[0389] [140]WO2005/089837.

[0390] [141]US6,692,468.

[0391] [142]WO00/07647.

[0392] [143]WO99/17820.

[0393] [144]US5,971,953.

[0394] [145]US4,060,082.

[0395] [146]EP-A-0520618.

[0396] [147]WO98/01174.

[0397] [148]Potter 和 Oxford(1979)Br Med Bull35:69-75.

[0398] [149]Greenbaum 等 (2004)Vaccine22:2566-77.

[0399] [150]Zurbriggen 等 (2003)Expert Rev Vaccines2:295-304.

[0400] [151]Piascik(2003)J Am Pharm Assoc(华盛顿,哥伦比亚特区).43:728-30.

[0401] [152]Mann 等 (2004)Vaccine22:2425-9.

[0402] [153]Halperin 等 (1979)Am J Public Health 69:1247-50.

[0403] [154]Herbert 等 (1979)J Infect Dis 140:234-8.

[0404] [155]Chen 等 (2003)Vaccine 21:2830-6.

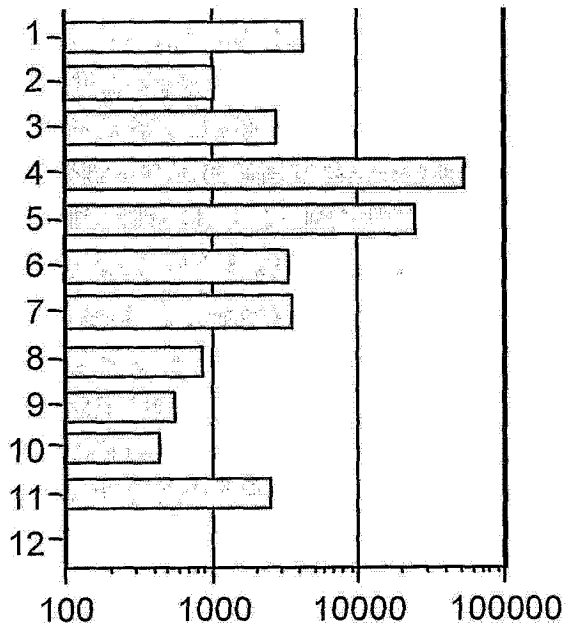

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
100
1000
10000
100000

图 1

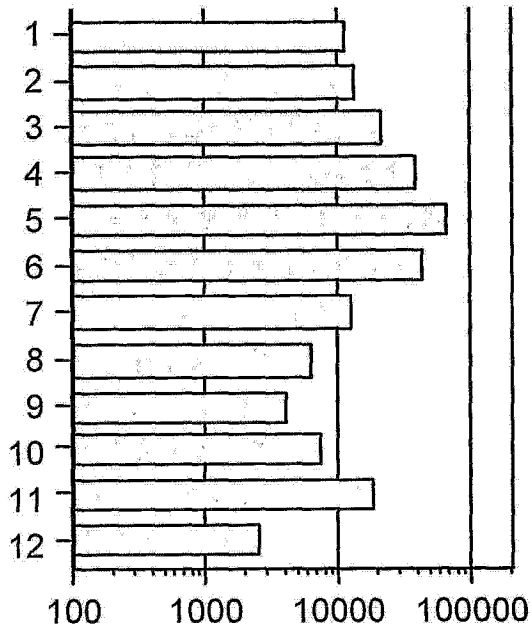

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
100
1000
10000
100000

图 2

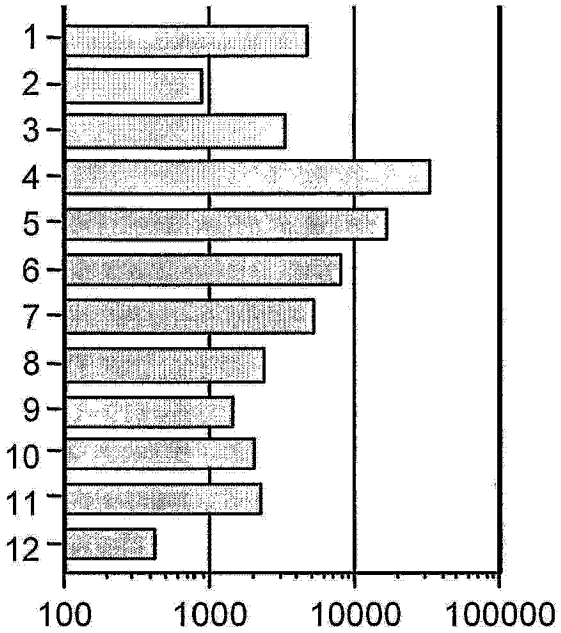

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
100
1000
10000
100000

图 3

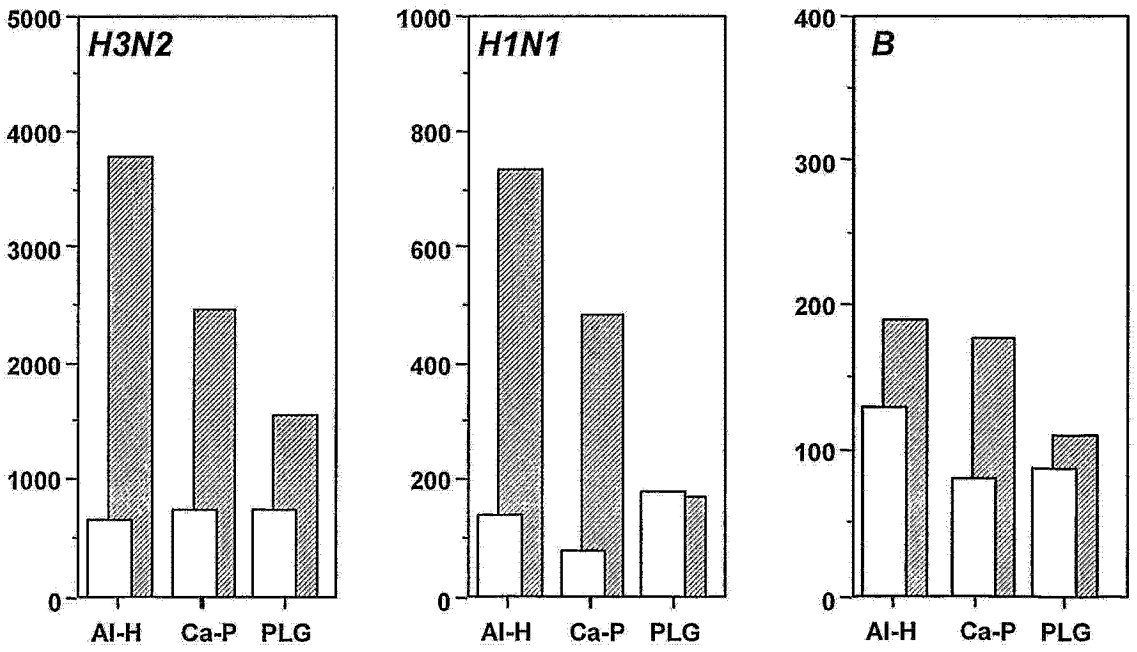

H3N2
5000
4000
3000
2000
1000
0
Al-H
Ca-P
PLG
H1N1
1000
800
600
400
200
0
Al-H
Ca-P
PLG
B
400
300
200
100
0
Al-H
Ca-P
PLG

图 4

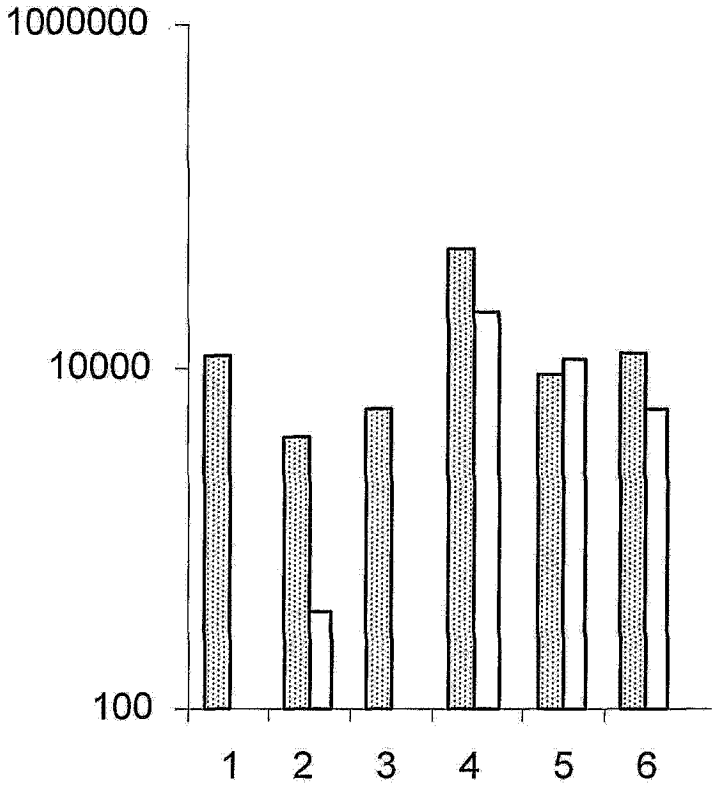

1000000
10000
100
1
2
3
4
5
6

图 5