(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 112839673 A
(43)申请公布日 2021.05.25

(21)申请号 201980062008.1

(22)申请日 2019.07.22

(30)优先权数据
2018-138001 2018.07.23 JP
2019-038976 2019.03.04 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/028674 2019.07.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/022272 JA 2020.01.30

(71)申请人 日本国立感染症研究所所长代表之
日本国
地址 日本東京都
申请人 大日本住友制药株式会社

(72)发明人 高桥宜圣 安达悠 阿户学
福岛晃久

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李志强 初明明

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

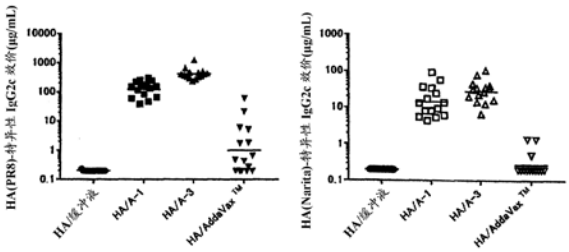
权利要求书3页 说明书28页
序列表2页 附图14页

(54)发明名称

包含流感疫苗的组合物

(57)摘要

本发明提供包含通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合物。



CN 112839673 A

1.组合物,其包含以下(1)和(2);

(1)通用流感疫苗抗原;和

(2)疫苗佐剂。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中所述通用流感疫苗抗原为产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原。

3.根据权利要求2所述的组合物,其中所述流感HA裂解疫苗抗原具有暴露于外部的HA茎区。

4.根据权利要求1所述的组合物,其中所述通用流感疫苗抗原为流感HA裂解疫苗抗原,其中暴露于外部的所述HA茎区增强所述HA茎区的LAH的抗原性,并且所述流感HA裂解疫苗能够产生结合到所述HA茎区的LAH的抗体。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中通过使流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生所述通用流感疫苗抗原。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中通过包括以下的产生方法产生所述通用流感疫苗抗原:使流感HA裂解疫苗经受酸性处理;并随后使所述流感HA裂解疫苗经受福尔马林处理。

7.权利要求1-6中任一项所述的组合物,其中所述疫苗佐剂为增强TLR的生理活性的物质。

8.权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述疫苗佐剂为增强选自TLR7、TLR8和TLR9的一种或多种TLR的生理活性的物质。

9.权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中所述疫苗佐剂为增强至少TLR7的生理活性的物质。

10.权利要求1-9中任一项所述的组合物,其中所述疫苗佐剂为增强至少TLR8的生理活性的物质。

11.权利要求1-10中任一项所述的组合物,其中所述疫苗佐剂为增强至少TLR9的生理活性的物质。

12.根据权利要求8或9所述的组合物,其中所述增强TLR7的生理活性的物质为增强TLR7的生理活性的低分子量化合物,或者是其中增强TLR7的生理活性的低分子量化合物和脂质通过间隔基化学连接的缀合化合物。

13.权利要求12所述的组合物,其中所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物或包含在所述缀合化合物中的所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物的分子量为200-600,并且具有腺嘌呤骨架、嘧啶骨架、咪唑并喹啉骨架、咪唑并吡啶骨架或喹唑啉骨架。

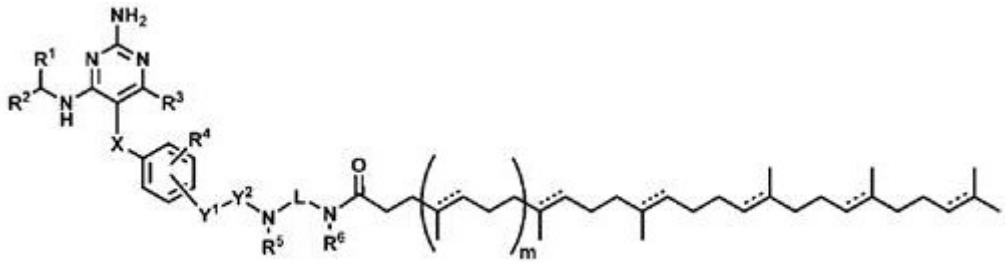
14.权利要求13所述的组合物,其中所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物或包含在所述缀合化合物中的所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物具有嘧啶骨架、腺嘌呤骨架或咪唑并喹啉骨架。

15.权利要求12-14中任一项所述的组合物,其中所述脂质为衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质。

16.根据权利要求12-15中任一项所述的组合物,其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为其中具有腺嘌呤骨架的低分子量化合物和衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过间隔基化学连接的缀合化合物或其药学上可接受的盐。

17.根据权利要求12-15中任一项所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为其中具有嘧啶骨架的低分子量化合物和衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过间隔基化学连接的缀合化合物或其药学上可接受的盐。

18.根据权利要求12-15和17中任一项所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为式(1)表示的化合物或其药学上可接受的盐：



(1)

其中

X表示亚甲基，

R^1表示氢原子或可以被羟基取代的具有1-3个碳原子的烷基，

R^2表示氢原子或具有1-6个碳原子的烷基，

R^3表示具有1-3个碳原子的烷基，

R^4表示氢原子、卤素原子、羟基、具有1-3个碳原子的烷基或具有1-3个碳原子的烷氧基，

Y^1表示单键或亚甲基，

Y^2表示单键或-C(O)-，

L表示具有2个或3个碳原子的直链亚烷基，

R^5和R^6独立地表示氢原子或具有1-3个碳原子的烷基，或者R^5和R^6共同形成取代或未取代的5元至8元含氮饱和杂环，条件是当所述5元至8元含氮饱和杂环被取代时，其被相同或不同的1-4个选自羟基和卤素原子的取代基取代，和

m表示0或1，

------均为双键。

19.根据权利要求12-15、17和18中任一项所述的组合物，其中所述缀合化合物为：

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苄基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苯甲酰基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基](甲基)氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺;或者

其药学上可接受的盐。

20.根据权利要求12-15和17-19中任一项所述的组合物,其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为:

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺;

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺;或者

其药学上可接受的盐。

21.流感疫苗,其包含根据权利要求1-20中任一项所述的组合物。

22.用于预防流感的方法,所述方法包括给予需要其的温血动物预防有效量的根据权利要求1-20中任一项所述的组合物。

23.用于预防流感的方法,所述方法包括给予需要其的温血动物预防有效量的通用流感疫苗抗原和预防有效量的疫苗佐剂。

24.用于预防流感的试剂盒,其包含通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂。

25.用于预防流感的疫苗佐剂,其与通用流感疫苗抗原联用。

26.用于预防流感的通用流感疫苗抗原,其与疫苗佐剂联用。

27.疫苗佐剂在制造包含通用流感疫苗抗原的用于预防流感的组合物中的用途。

28.通用流感疫苗抗原在制造包含疫苗佐剂的用于预防流感的组合物中的用途。

29.根据权利要求22或23所述的方法、根据权利要求24所述的试剂盒、根据权利要求25所述的疫苗佐剂或根据权利要求26所述的抗原,其中所述通用流感疫苗抗原和所述疫苗佐剂同时或分开给予。

30.根据权利要求22或23所述的方法、根据权利要求24所述的试剂盒、根据权利要求25所述的疫苗佐剂或根据权利要求26所述的抗原,其中所述通用流感疫苗抗原在给予所述疫苗佐剂之前、之后或同时给予。

包含流感疫苗的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含疫苗佐剂和通用流感疫苗抗原的组合物。

背景技术

[0002] 包含病毒衍生的蛋白质或其部分肽的组分疫苗比活疫苗或全颗粒灭活的疫苗更安全。然而，组分疫苗倾向于免疫刺激功效低。因此，为了增强表位的免疫原性和改进疫苗的免疫刺激活性，已经研究了组合使用佐剂和抗原的方法。佐剂是增强对抗原的体液和/或细胞免疫应答的添加剂，并且明矾、皂苷等已经用作疫苗佐剂。

[0003] 近来已经发现Toll样受体(TLR)在先天免疫性的激活中起重要的作用，其是活的生物体针对微生物的防御机制之一，并且发现单磷酰基脂质A (MPL)、含有未甲基化的胞苷酰鸟苷酰(CpG)序列的寡脱氧核苷酸(CpG ODN)等通过TLR具有免疫刺激作用。据说在人类中鉴定了13种TLR，五种TLR (TLR 1,2,4,5,6)涉及识别细菌组分，而四种TLR (TLR 3,7,8,9)涉及识别病毒核酸(非专利文献1)。作为TLR7和TLR8的激动剂(激活剂)，已知为天然配体的模仿病毒的单链RNA的小分子。例如，已经报道了合成的化合物，例如嘧啶化合物(专利文献1和2)和咪唑并喹啉化合物(专利文献3)。

[0004] 用其激动剂激活TLR7和/或TLR8通过TLR和髓样分化因子88 (MyD 88)-依赖性信号传导通路激活树突细胞(DC)。结果是，T细胞共刺激分子(CD80、CD86、CD40)的表达增强，并且产生炎性细胞因子，包括I型干扰素(特别是IFNα)、TNFα、IL-6或IL-12。

[0005] 除了激活DC以外，已知TLR7和/或TLR8激动剂(激活剂)激活T细胞和B细胞并进一步刺激NK细胞以促进产生IFNγ，并因此预期具有疫苗佐剂活性。实际上，已经报道了TLR7和/或TLR8激动剂(例如瑞喹莫德和咪喹莫特)的佐剂活性(非专利文献2)。

[0006] TLR7和/或TLR 8激动剂与其它物质的以下复合物是已知的：其中脂肪酸和咪唑并喹啉化合物共价连接的疫苗佐剂(专利文献4、5、6和非专利文献4)、磷脂和腺嘌呤化合物的缀合化合物(专利文献7、8和9)，脂肪酸和腺嘌呤化合物的缀合化合物(非专利文献5)、脂肪酸甘油酯或磷脂和腺嘌呤化合物通过聚乙二醇的缀合化合物(专利文献10)，角鲨烯和腺嘌呤化合物的缀合化合物(专利文献11)以及角鲨烯和嘧啶化合物的缀合化合物(专利文献12)。

[0007] 也称为流感HA裂解疫苗的当前的流感血细胞凝集素(下文缩写为“HA”)疫苗诱导抗HA抗体，从而发挥针对感染的保护作用。抗HA抗体结合到从病毒膜暴露于外部的血细胞凝集素中的称为“头区”的病毒的部分。该区最经常在病毒毒株中经历结构变化。因此，在一些情况下，抗HA抗体可能不能结合到引起抗原性变异并且不同于疫苗毒株的病毒，并且疫苗不能发挥针对感染的保护作用。

[0008] 近来已经揭示结合到不太可能引起抗原性变异(抗茎抗体)的血细胞凝集素中的茎区的抗体包括针对感染的保护抗体(专利文献13)。为了有效诱导抗茎抗体，已经开发具有稳定化的茎部分的HA茎蛋白质，并且已经进行其在人类中的临床试验：最初不稳定的茎部分通过在血细胞凝集素中的人工变异或连接基与血细胞凝集素的结合而变得稳定。然

而,在HA茎蛋白质的实际应用中,在免疫原性的改进和产生方法方面仍存在问题。

[0009] 已经报道抗茎抗体针对感染的保护能力不仅取决于它们的抗原结合性质和抗体水平,而且强烈地取决于诱导的IgG抗体的亚类(非专利文献3)。具体地,已经显示茎IgG2抗体是功能性的且交叉反应的,并且强烈诱导抗茎IgG2抗体的疫苗在针对宽泛的流感感染的保护中是有效的。然而,尚未发现有效增强疫苗诱导抗茎IgG2抗体的能力的方法。

[0010] 现有技术文献

专利文献

专利文献1:WO 00/12487

专利文献2:WO 2009/067081

专利文献3:美国专利申请公开号4689338

专利文献4:WO 2005/001022

专利文献5:WO 2005/018555

专利文献6:WO 2012/024284

专利文献7:WO 2010/048520

专利文献8:WO 2011/017611

专利文献9:WO 2011/139348

专利文献10:WO 2010/093436

专利文献11:WO 2017-061532

专利文献12:WO 2017-056494

专利文献13:JP 2016-516090 A

专利文献14:WO 2016/109792

非专利文献

非专利文献1:Iwasaki, A., Nat. Immunol. 2004, 5, 987

非专利文献2:Vaccine 2011, 29, 3341·M. A. Tomai等人, Exp. Rev. Vaccine, 6, 835

非专利文献3:DiLillo, DJ., Nat. Medicine 2014, 20, 143

非专利文献4:Vaccine. 2011年7月26日;29(33):5434-42

非专利文献5:Bioconjugate Chem. 2009, 20, 1194-1200

非专利文献6:Curr Opin Virol. 2016, 17, 95-103

非专利文献7:Nat Med. 2015, 21, 1065-70

非专利文献8:Science. 2015, 349, 1301-6。

发明内容

[0011] 技术问题

本申请的目标是找到有效产生结合到流感病毒的不太可能经历抗原性变异的HA茎区的抗体的流感HA裂解疫苗,以及提供用于改进疫苗诱导IgG2抗体的能力的方法。

[0012] 解决问题的方案

本发明人已经广泛研究以解决上述问题,并且已经发现通过使当前的流感HA裂解疫苗经受酸性处理,血细胞凝集素的茎区暴露于外部,并且在酸性处理后所述流感HA裂解

疫苗可以产生能够结合到HA茎区中LAH (长α螺旋)的交叉反应性抗体,并从而可以用作通用流感疫苗抗原。此外,本发明人已经发现,通过向在酸性处理后的流感HA裂解疫苗加入增强TLR7的生理活性的化合物,该化合物用作疫苗佐剂,并且疫苗的IgG2抗体诱导能力得到改进,并从而已经实现本发明。

[0013] 具体地,本发明涉及以下。

[0014] [项目1]

组合物,其包含以下(1)和(2);

(1)通用流感疫苗抗原;和

(2)疫苗佐剂。

[0015] [项目2]

根据项目1所述的组合物,其中所述通用流感疫苗抗原为产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原。

[0016] [项目3]

根据项目2所述的组合物,其中所述流感HA裂解疫苗抗原具有暴露于外部的HA茎区。

[0017] [项目4]

根据项目1所述的组合物,其中所述通用流感疫苗抗原为流感HA裂解疫苗抗原,其中暴露于外部的所述HA茎区增强所述HA茎区的LAH的抗原性,并且所述流感HA裂解疫苗能够产生结合到所述HA茎区的LAH的抗体。

[0018] [项目5]

根据项目1-4中任一项所述的组合物,其中通过使流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生所述通用流感疫苗抗原。

[0019] [项目6]

根据项目1-5中任一项所述的组合物,其中通过使尚未经历福尔马林处理的流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生所述通用流感疫苗抗原。

[0020] [项目7]

根据项目1-6中任一项所述的组合物,其中通过包括以下的产生方法而产生所述通用流感疫苗抗原:使流感HA裂解疫苗经受酸性处理;并随后,使所述流感HA裂解疫苗经受福尔马林处理。

[0021] [项目8]

根据项目1-7中任一项所述的组合物,其中通过使单一HA亚型的流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生所述通用流感疫苗抗原。

[0022] [项目9]

根据项目1-7中任一项所述的组合物,其中所述通用流感疫苗抗原为包含两种或更多种流感HA裂解疫苗抗原的疫苗抗原,所述两种或更多种流感HA裂解疫苗抗原各自通过使单一HA亚型的流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生。

[0023] [项目10]

项目1-9中任一项所述的组合物,其中所述疫苗佐剂为增强TLR的生理活性的物质。

[0024] [项目11]

项目1-10中任一项所述的组合物，其中所述疫苗佐剂为增强选自TLR7、TLR8和TLR9的一种或多种TLR的生理活性的物质。

[0025] [项目12]

项目1-11中任一项所述的组合物，其中所述疫苗佐剂为增强至少TLR7的生理活性的物质。

[0026] [项目13]

项目1-12中任一项所述的组合物，其中所述疫苗佐剂为增强至少TLR8的生理活性的物质。

[0027] [项目14]

项目1-13中任一项所述的组合物，其中所述疫苗佐剂为增强至少TLR9的生理活性的物质。

[0028] [项目15]

根据项目11或12所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的物质为增强TLR7的生理活性的低分子量化合物，或者是其中增强TLR7的生理活性的低分子量化合物和脂质通过间隔基化学连接的缀合化合物。

[0029] [项目16]

项目15所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物或包含在所述缀合化合物中的所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物的分子量为200-600，并且具有腺嘌呤骨架、嘧啶骨架、咪唑并喹啉骨架、咪唑并吡啶骨架或喹唑啉骨架。

[0030] [项目17]

项目16所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物或包含在所述缀合化合物中的所述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物具有嘧啶骨架、腺嘌呤骨架或咪唑并喹啉骨架。

[0031] [项目18]

项目15-17中任一项所述的组合物，其中所述脂质为衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质。

[0032] [项目19]

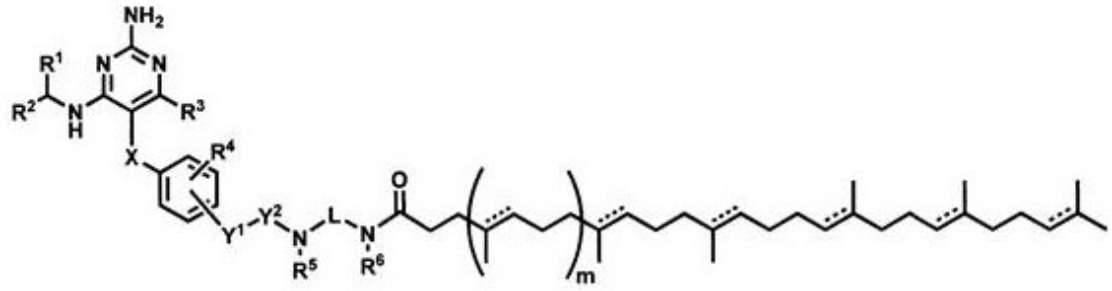
根据项目15-18中任一项所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为其中具有腺嘌呤骨架的低分子量化合物和衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过间隔基化学连接的缀合化合物或其药学上可接受的盐。

[0033] [项目20]

根据项目15-18中任一项所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为其中具有嘧啶骨架的低分子量化合物和衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过间隔基化学连接的缀合化合物或其药学上可接受的盐。

[0034] [项目21]

根据项目15-18和20中任一项所述的组合物，其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为式(1)表示的化合物或其药学上可接受的盐：



(1)

其中

X表示亚甲基，

R^1表示氢原子或可以被羟基取代的具有1-3个碳原子的烷基，

R^2表示氢原子或具有1-6个碳原子的烷基，

R^3表示具有1-3个碳原子的烷基，

R^4表示氢原子、卤素原子、羟基、具有1-3个碳原子的烷基或具有1-3个碳原子的烷氧基，

Y^1表示单键或亚甲基，

Y^2表示单键或-C(O)-，

L表示具有2个或3个碳原子的直链亚烷基，

R^5和R^6独立地表示氢原子或具有1-3个碳原子的烷基，或者R^5和R^6共同形成取代或未取代的5元至8元含氮饱和杂环，条件是当所述5元至8元含氮饱和杂环被取代时，其被相同或不同的1-4个选自羟基和卤素原子的取代基取代，和

m表示0或1，

------ 均为双键。

[0035] [项目22]

根据项目15-18、20和21中任一项所述的组合物，其中所述缀合化合物为：

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苄基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苯甲酰基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰

基](甲基)氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺;或者

其药学上可接受的盐。

[0036] [项目23]

根据项目15-18和20-22中任一项所述的组合物,其中所述增强TLR7的生理活性的化合物为:

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺;

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺;或者

其药学上可接受的盐。

[0037] [项目24]

流感疫苗,其包含根据项目1-23中任一项所述的组合物。

[0038] [项目25]

用于预防流感的方法,所述方法包括给予需要其的温血动物预防有效量的根据项目1-23中任一项所述的组合物。

[0039] [项目26]

用于预防流感的方法,所述方法包括给予需要其的温血动物预防有效量的通用流感疫苗抗原和预防有效量的疫苗佐剂(例如,增强TLR7的生理活性的物质)。

[0040] [项目27]

用于预防流感的试剂盒,其包含通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂(例如,增强TLR7的生理活性的物质)。

[0041] [项目28]

用于预防流感的疫苗佐剂(例如,增强TLR7的生理活性的物质),其与通用流感疫苗抗原联用。

[0042] [项目29]

用于预防流感的通用流感疫苗抗原,其与疫苗佐剂(例如,增强TLR7的生理活性的物质)联用。

[0043] [项目30]

疫苗佐剂(例如,增强TLR7的生理活性的物质)在制造包含通用流感疫苗抗原的用于预防流感的组合物中的用途。

[0044] [项目31]

通用流感疫苗抗原在制造包含疫苗佐剂(例如,增强TLR7的生理活性的物质)的用于预防流感的组合物中的用途。

[0045] [项目32]

根据项目25或26所述的方法、根据项目27所述的试剂盒、根据项目28所述的疫苗佐剂或根据项目29所述的抗原,其中所述通用流感疫苗抗原和所述疫苗佐剂(例如,增强TLR7的生理活性的物质)同时或分开给予。

[0046] [项目32-1]

根据项目25或26所述的方法、根据项目27所述的试剂盒、根据项目28所述的疫苗佐剂或根据项目29所述的抗原，其中所述通用流感疫苗抗原在给予所述疫苗佐剂(例如，增强TLR7的生理活性的物质)之前、之后或同时给予。

[0047] [项目33]

用于产生包含流感HA裂解疫苗抗原和疫苗佐剂(例如，增强TLR7的生理活性的物质)的组合物的方法，所述方法包括以下步骤：

a)通过使尚未经历福尔马林处理的流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原；和

b)将在步骤a)中获得的所述疫苗抗原与所述疫苗佐剂混合。

[0048] [项目34]

用于产生包含流感HA裂解疫苗抗原和疫苗佐剂(例如，增强TLR7的生理活性的物质)的组合物的方法，所述方法包括以下步骤：

a)使流感HA裂解疫苗经受酸性处理，

b)随后，进行福尔马林处理以获得产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原；和

c)将在步骤b)中获得的所述疫苗抗原与所述疫苗佐剂混合。

[0049] [项目35]

用于产生包含流感HA裂解疫苗抗原和疫苗佐剂(例如，增强TLR7的生理活性的物质)的试剂盒的方法，所述方法包括以下步骤：

a)通过使尚未经历福尔马林处理的流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原；和

b)将在步骤a)中获得的所述疫苗与所述疫苗佐剂组合以形成试剂盒。

[0050] [项目36]

用于产生包含流感HA裂解疫苗抗原和疫苗佐剂(例如，增强TLR7的生理活性的物质)的试剂盒的方法，所述方法包括以下步骤：

a)使流感HA裂解疫苗经受酸性处理，

b)随后，进行福尔马林处理以获得产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原；和

c)将在步骤b)中获得的所述疫苗与所述疫苗佐剂组合以形成试剂盒。

[0051] 发明效果

根据本发明，提供了通用流感疫苗抗原，并且通过加入疫苗佐剂可以进一步改进其疫苗活性。

附图说明

[0052] [图1] 图1是说明流感病毒的示意图。

[0053] [图2] 图2是显示接种膜融合类型H3N2 HA裂解疫苗的小鼠血清中抗LAH抗体效价的增加的图。

[0054] [图3] 图3是显示接种膜融合类型H3N2 HA裂解疫苗的小鼠针对抗原性变体的交

叉保护能力的改进的图。

[0055] [图4] 图4是显示接种膜融合类型H1N1 HA裂解疫苗的小鼠血清中抗LAH抗体效价的增加的图。

[0056] [图5] 图5是显示接种膜融合类型H1N1 HA裂解疫苗的小鼠针对抗原性变体的交叉保护能力的改进的图。

[0057] [图6] 图6显示各自指示LAH结合性单克隆抗体与膜融合类型HA裂解疫苗的结合比与当前的HA裂解疫苗结合更强烈的图。

[0058] [图7] 图7显示各自显示补充有A-1、A-2或CpG的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG2c-诱导活性的图。

[0059] [图8] 图8显示各自显示补充有A-1、A-2或CpG的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG1-诱导活性的图。

[0060] [图9] 图9显示各自显示补充有A-1、A-2或CpG的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG2c/IgG1比率的图。

[0061] [图10] 图10显示各自显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG2c-诱导活性的图。

[0062] [图11] 图11显示各自显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG1-诱导活性的图。

[0063] [图12] 图12显示各自显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG2c/IgG1比率的图。

[0064] [图13] 图13是显示接种补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型H3N2 HA裂解疫苗的小鼠针对抗原性变体的交叉保护能力的图。

[0065] [图14] 图14是显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型H3N2 HA裂解疫苗对由于抗原性变体感染的小鼠重量减轻的抑制作用的图。

[0066] [图15] 图15显示各自指示LAH结合性单克隆抗体强烈结合到在酸性处理后已经经受福尔马林处理的膜融合类型HA裂解疫苗的图。

[0067] [图16] 图16是显示接种膜融合类型H3N2 HA裂解疫苗((前固定)和(后固定))的小鼠血清中抗LAH抗体效价的增加的图。

[0068] [图17] 图17显示各自显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG2c-诱导活性的图。

[0069] [图18] 图18显示各自显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG1-诱导活性的图。

[0070] [图19] 图19显示各自显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型HA裂解疫苗的交叉反应性IgG2c/IgG1比率的图。

[0071] [图20] 图20是显示接种补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型H1N1 HA裂解疫苗的小鼠针对抗原性变体的交叉保护能力的图。

[0072] [图21] 图21是显示补充有A-1、A-3或AddaVax ™的膜融合类型H1N1 HA裂解疫苗对由于抗原性变体感染的小鼠重量减轻的抑制作用的图。

具体实施方式

[0073] 以下将详细描述本发明的实施方案。实施方案旨在促进理解本发明的原理，并且本发明的范围不限于以下实施方案。其中以下实施方案的配置已被本领域技术人员适当替换的其它实施方案也包括在本发明的范围内。

[0074] 如本文所用，术语“疫苗佐剂”是指具有免疫-增强作用的物质或含有所述物质的制剂，其通过加入到抗原中而增强抗原的免疫原性。

[0075] 本文的疫苗佐剂包括明矾、乳液(例如，弗氏佐剂、MF59(注册商标)、AddaVax(TM)、AS03等)、增强NOD受体的生理活性的物质、增强RIG-I受体的生理活性的物质、增强C类型凝集素受体的生理活性的物质、增强胞质DNA受体的生理活性的物质、增强STING的生理活性的物质、增强TLR的生理活性的物质等。

[0076] 本文的疫苗佐剂优选包括增强TLR的生理活性的物质。

[0077] 如本文所用，增强TLR的生理活性的物质是指具有TLR受体激动剂活性的TLR激动剂，并且不特别限制，只要该物质增强一种或多种TLR受体的功能。

[0078] 如本文所用，增强TLR的生理活性的物质的实例包括单磷酰基脂质A及其衍生物、腺嘌呤化合物、嘧啶化合物、咪唑并喹啉化合物、苯并氮杂䓬(benzapine)化合物、咪唑并吡啶化合物、喹唑啉化合物、鸟嘌呤化合物、二氢蝶啶化合物、CpG ODN等。

[0079] 如本文所用，增强TLR的生理活性的物质优选包括增强选自TLR7、TLR8和TLR9的一种或多种TLR的生理活性的物质，并且更优选包括增强至少TLR7的生理活性的物质。

[0080] 如本文所用，增强TLR7的生理活性的物质是指具有TLR7受体激动剂活性的TLR7激动剂，并且不特别限制，只要该物质增强TLR7受体的功能。

[0081] 如本文所用，增强TLR8的生理活性的物质是指具有TLR8受体激动剂活性的TLR8激动剂，并且不特别限制，只要该物质增强TLR8受体的功能。

[0082] 如本文所用，增强TLR9的生理活性的物质是指具有TLR9受体激动剂活性的TLR9激动剂，并且不特别限制，只要该物质增强TLR9受体的功能。

[0083] 本文的增强TLR7的生理活性的物质的实例包括增强TLR7的生理活性的物质或增强TLR7和TLR8的生理活性的物质。

[0084] 如本文所用，增强TLR7的生理活性的物质优选包括TLR7选择性激动剂。如本文所用，术语“TLR7选择性”是指TLR7以外的TLR受体激动剂活性比TLR7受体激动剂活性弱，并且包括例如其中TLR7受体激动剂活性比TLR8受体激动剂活性强的情况(TLR8的内源性配体为单链RNA)，更具体地，其中TLR7受体激动剂活性(EC 50值)是TLR8受体激动剂活性的10倍或更多的情况。

[0085] 本文的增强TLR7的生理活性的物质的实例包括增强TLR7的生理活性的低分子量化合物，和其中增强TLR7的生理活性的一种或多种低分子量化合物和一种或多种脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物。

[0086] 本文的增强TLR7的生理活性的低分子量化合物的具体实例包括分子量为200-600，优选分子量为250-500，并且更优选分子量为300-500的那些。

[0087] 本文的增强TLR7的生理活性的低分子量化合物优选包括具有一个或多个腺嘌呤骨架、一个或多个嘧啶骨架、一个或多个咪唑并喹啉骨架、一个或多个咪唑并吡啶骨架、一个或多个喹唑啉骨架、一个或多个鸟嘌呤骨架或一个或多个二氢蝶啶骨架的化合物，并且

更优选包括具有一个或多个腺嘌呤骨架、一个或多个嘧啶骨架、一个或多个咪唑并喹啉骨架的化合物。

[0088] 具有一个或多个腺嘌呤骨架的化合物的实例包括具有4-氨基-8-氧代-嘌呤(8-氧代腺嘌呤)骨架的化合物，例如具有4-氨基-8-氧代-嘌呤骨架的化合物，其中9-位被烷基(例如，具有1-6个碳原子的直链烷基)取代，所述烷基可以被5-6元芳族碳环、5-6元芳族杂环或4-7元脂族含氮杂环取代。具体实例包括在MedChemComm 2011, 2, 185.中描述的化合物，例如GSK-2245035 [6-氨基-2-{[(1S)-1-甲基丁基]氧基}-9-[5-(1-哌啶基)戊基]-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮]、PF-4171455 [4-氨基-1-苄基-6-三氟甲基-1,3-二氢咪唑并[4,5-c]吡啶-2-酮]等，以及在WO 98/01448、WO 99/28321、WO 02/085905、WO 2008/114008、WO 2008/114819、WO 2008/114817、WO 2008/114006、WO 2010/018131、WO 2010/018134、WO 2008/101867、WO 2010/018133、WO 2009/005687、WO 2012/080730等中描述的化合物。

[0089] 具有一个或多个腺嘌呤骨架的化合物优选包括以下化合物或其药学上可接受的盐：

6-氨基-9-({6-[2-(二甲基氨基)乙氧基]吡啶-3-基}甲基)-2-乙氧基-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮；

6-氨基-2-(丁基氨基)-9-({6-[2-(二甲基氨基)乙氧基]吡啶-3-基}甲基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮；

N-(4-{[6-氨基-2-(丁基氨基)-8-氧代-7,8-二氢-9H-嘌呤-9-基]甲基}苯甲酰基)甘氨酸；

(3-{[[3-(6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7,8-二氢-9H-嘌呤-9-基)丙基](3-吗啉-4-基丙基)氨基]甲基}苯基)乙酸甲酯；或者

(4-{[[3-(6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7,8-二氢-9H-嘌呤-9-基)丙基](3-哌啶-1-基丙基)氨基]甲基}苯基)乙酸甲酯。

[0090] 具有一个或多个嘧啶骨架的化合物的实例包括具有2,4-二氨基嘧啶骨架的化合物，例如2,4-二氨基嘧啶，其中6-位可以任选地被烷基等取代并且5-位被烷基(例如，具有1-6个碳原子的直链烷基)取代，后者烷基可以被5-6元芳族碳环、5-6元芳族杂环或4-7元脂族含氮杂环取代。化合物的更具体的实例包括在WO 00/12487、WO 2010/133885、WO 2013/172479或WO 2012/136834中描述的化合物。

[0091] 具有一个或多个咪唑并喹啉骨架的化合物的实例包括具有4-氨基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉骨架的化合物，例如咪喹莫特、瑞喹莫德或852A [N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]甲磺酰胺]，例如4-氨基-1H [4,5-c]喹啉，其中1-位被C1-6烷基或C1-6烷氧基取代并且2-位被C1-6烷基或C1-6烷氧基取代。化合物的更具体的实例包括在WO 2010/48520、WO 2008/135791、US4689338、US 4698348或WO 2007/030777中描述的化合物。具有一个或多个咪唑并喹啉骨架的化合物的优选实例包括咪喹莫特。

[0092] 具有一个或多个咪唑并吡啶骨架的化合物的实例包括具有4-氨基-1,3-二氢-2H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-酮骨架的化合物，例如具有4-氨基-1,3-二氢-2H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-酮骨架的化合物，其中6-位或7-位被C1-6烷基或C1-6烷氧基(各自可以任选地被卤素原子取代)取代，并且1-位被烷基(例如，具有1-4个碳原子的直链烷基)取代，所述烷基任选地被5-6元芳族碳环、5-6元芳族杂环或4-7元脂族含氮杂环取代。化合物的更具体的实例包

括在WO 2007/93901中描述的化合物和PF-4171455 [4-氨基-1-苄基-6-(三氟甲基)-1,3-二氢-2H-咪唑并[4,5-c]吡啶-2-酮]。

[0093] 具有一个或多个喹唑啉骨架的化合物的实例包括具有2,4-二氨基喹唑啉骨架的衍生物,例如具有2,4-二氨基喹唑啉骨架的化合物,其中4-位被烷基(例如,具有1-8个碳原子的直链或支链烷基)取代,所述烷基任选地被羟基、卤素原子等取代。具体实例包括在WO 2012/156498或WO 2014/76221中描述的化合物。

[0094] 具有一个或多个鸟嘌呤骨架的化合物的实例包括具有2-氨基-6-氧代嘌呤骨架的化合物,并且具体地,洛索立宾。

[0095] 具有一个或多个二氢蝶啶骨架的化合物的实例包括具有4-氨基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮骨架的化合物,具体地vesatolimod [4-氨基-2-丁氧基-8-[[3-[(吡咯烷-1-基)甲基]苯基]甲基]-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮]。

[0096] 为TLR7激动剂的低分子量化合物的其它实例包括艾沙托立宾、ANA-773和在WO 2010/077613中描述的化合物。

[0097] 如本文所用,其中增强TLR7的生理活性的一种或多种低分子量化合物和一种或多种脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物中脂质的实例包括:具有少于100个碳原子的饱和或不饱和脂肪酸;具有10-30个碳原子的饱和或不饱和脂肪酸和甘油的二甘油酯;包括磷脂酸的磷脂,其中磷酸进一步键合到具有10-30个碳原子的饱和或不饱和脂肪酸和甘油的二甘油酯;等。优选地,例示具有18-30个碳原子的饱和或不饱和脂肪酸,并且更优选地,例示衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂肪酸。

[0098] 衍生自角鲨烯的脂肪酸的实例包括(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酸等。衍生自角鲨烷的脂肪酸的实例包括4,8,12,17,21,25-六甲基二十六烷酸等。适当地,衍生自角鲨烯或角鲨烷的化合物可以通过本领域技术人员公知的方法连接到间隔基以提供缀合化合物。

[0099] 如本文所用,在其中增强TLR7的生理活性的一种或多种低分子量化合物和一种或多种脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物中增强TLR7的生理活性的低分子量化合物的部分的实例包括前述增强TLR7的生理活性的低分子量化合物。

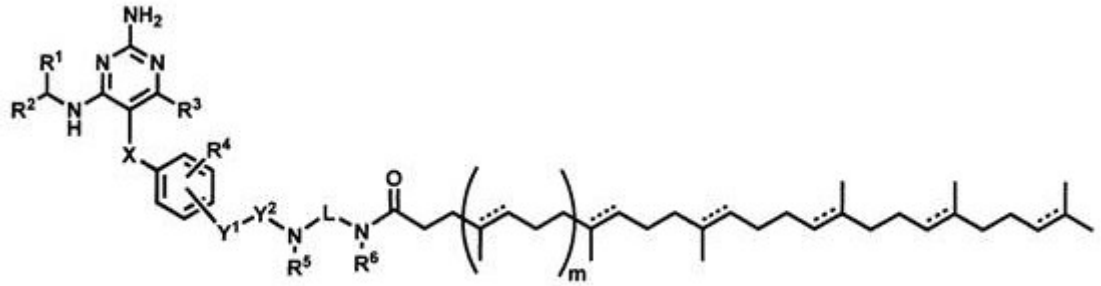
[0100] 如本文所用,其中增强TLR7的生理活性的一种或多种低分子量化合物和一种或多种脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物的实例包括其中一种或多种脂肪酸和一种或多种咪唑并喹啉化合物共价键合的疫苗佐剂(专利文献4、5、6和非专利文献4)、一种或多种磷脂和一种或多种腺嘌呤化合物的缀合化合物(专利文献7、8、9)、一种或多种脂肪酸和一种或多种腺嘌呤化合物的缀合化合物(非专利文献5)、一种或多种脂肪酸甘油酯和一种或多种腺嘌呤化合物通过聚乙二醇的缀合化合物(专利文献10)、一种或多种角鲨烯和一种或多种腺嘌呤化合物的缀合化合物(专利文献11)、一种或多种角鲨烯和一种或多种嘧啶化合物的缀合化合物(专利文献12)等。

[0101] 如本文所用,其中增强TLR7的生理活性的一种或多种低分子量化合物和一种或多种脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物的优选的实例包括其中具有一种或多种腺嘌呤骨架的一种或多种低分子量化合物和一种或多种衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物、其中具有一种或多种嘧啶骨架的一种或多种低分子量化合物和一种或多种衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过一个或多个间隔基

化学连接的缀合化合物，及其药学上可接受的盐。

[0102] 其中具有一种或多种腺嘌呤骨架的一种或多种低分子量化合物和一种或多种衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物的优选的实例包括在专利文献11中描述的化合物。

[0103] 其中具有一种或多种嘧啶骨架的一种或多种低分子量化合物和一种或多种衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物的优选的实例包括在专利文献12中描述的化合物。更优选地，例示式(1)表示的化合物或其药学上可接受的盐。



(1)

[0104] 其中

X表示亚甲基，

R^1表示氢原子或可以被羟基取代的具有1-3个碳原子的烷基，

R^2表示氢原子或具有1-6个碳原子的烷基，

R^3表示具有1-3个碳原子的烷基，

R^4表示氢原子、卤素原子、羟基、具有1-3个碳原子的烷基或具有1-3个碳原子的烷氧基，

Y^1表示单键或亚甲基，

Y^2表示单键或-C(O)-，

L表示具有2个或3个碳原子的直链亚烷基，

R^5和R^6独立地表示氢原子或具有1-3个碳原子的烷基，或者R^5和R^6共同形成取代或未取代的5元至8元含氮饱和杂环，条件是当所述5元至8元含氮饱和杂环被取代时，其被相同或不同的1-4个选自羟基和卤素原子的取代基取代，

m表示0或1，

------均为双键。

[0105] “卤素原子”包括氟原子、氯原子、溴原子和碘原子，并且优选包括氟原子或氯原子。

[0106] “具有2个或3个碳原子的直链亚烷基”的实例包括但不限于亚乙基和正亚丙基。

[0107] 术语“具有1-3个碳原子的烷基”包括具有1-3个碳原子的直链或支链烷基。实例包括但不限于甲基、乙基、丙基和异丙基。

[0108] 术语“具有1-3个碳原子的烷氧基”包括具有1-3个碳原子的直链或支链烷氧基。实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基。

[0109] 术语“5元至8元含氮饱和杂环”包括含有1-3个选自2个或3个氮原子、0个或1个氧

原子和0个或1个硫原子的杂原子的5元至8元含氮饱和杂环，其中环中含有至少两个氮原子。具体实例包括吡咯烷、哌啶、全氢氮杂䓬、咪唑烷、哌嗪、吗啉、硫代吗啉、全氢-1,4-二氮杂䓬等。

[0110] 用于含氮饱和杂环的取代基的实例优选包括甲基、乙基、丙基、羟甲基、羟乙基、羰基、羟基和卤素原子，并且更优选羟基和卤素原子。含氮饱和杂环可以被相同或不同的1-4个所述取代基取代。

[0111] 其中具有一种或多种嘧啶骨架的一种或多种低分子量化合物和一种或多种衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物的更优选的实例包括：

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺(专利文献12，实施例1的化合物，以下式(2))；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苄基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮(专利文献12，实施例2的化合物)；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苯甲酰基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮(专利文献12，实施例3的化合物)；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺(专利文献12，实施例4的化合物，以下式(3))；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基](甲基)氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺(专利文献12，实施例5的化合物)；和

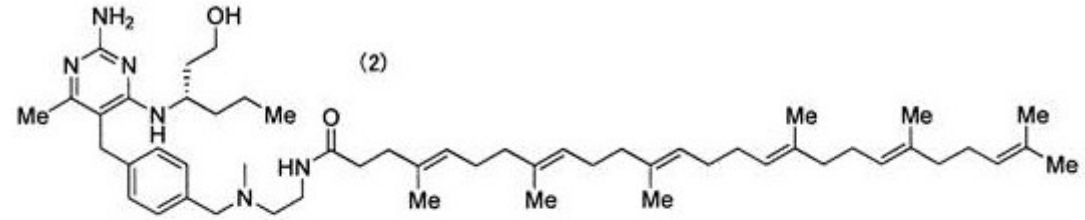
其药学上可接受的盐。

[0112] 其中具有一种或多种嘧啶骨架的一种或多种低分子量化合物和一种或多种衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物的更优选的实例包括

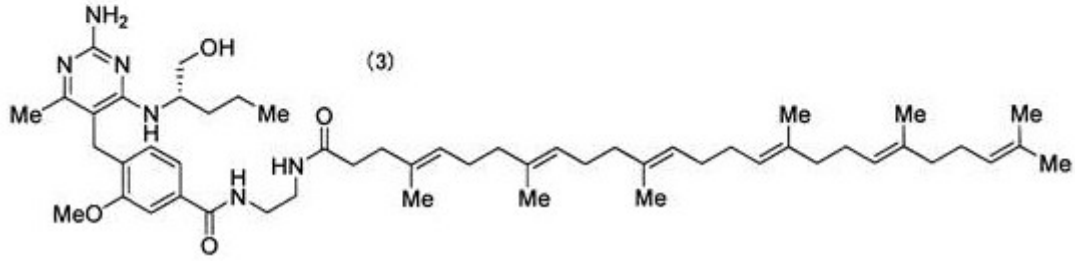
(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺(专利文献12，实施例1的化合物，以下式(2))，

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺(专利文献12，实施例4的化合物，以下式(3))，和

其药学上可接受的盐。



(2)



(3)

[0113] 如本文所用，药学上可接受的盐的实例包括酸加成盐或碱加成盐。酸加成盐的实例包括使用无机酸或有机酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸、三氟乙酸、柠檬酸和马来酸)的酸加成盐。碱加成盐的实例包括碱金属盐(例如钠盐和钾盐)、碱土金属盐(例如钙盐)和铵盐。

[0114] 如本文所用，通用流感疫苗抗原是指诱导抗体的流感疫苗抗原，所述抗体可以宽泛地保护流感，包括变体病毒(例如，交叉保护抗体)。

[0115] 通用流感疫苗抗原包括例如包含在专利文献14中公开的一种或多种流感病毒衍生的蛋白质的颗粒抗原和在非专利文献6、7和8中公开的流感HA抗原。

[0116] 通用流感疫苗抗原的优选实例包括“产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原”。更优选地，例示“流感HA裂解疫苗抗原，其中HA茎区暴露于外部，能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体”（下文称为本发明的流感HA裂解疫苗)，其可以通过以下所述的包括施用酸性处理的步骤的方法来制造。

[0117] 由于本发明的流感HA裂解疫苗诱导结合到不太可能引起抗原性变异的血细胞凝集素的茎区中的LAH的抗体，所以本发明的流感HA裂解疫苗可以有效针对其中位于血细胞凝集素的头区的抗原位点(由常规的流感HA裂解疫苗诱导的抗体与之结合)突变的流感病毒。

[0118] 在优选的实施方案中，本发明的流感HA裂解疫苗比当前的HA裂解疫苗更强烈地结合到LAH结合性单克隆抗体。例如，流感HA裂解疫苗比当前的HA裂解疫苗更强烈地结合到LAH结合性单克隆抗体，是至少1.05倍，优选至少1.1倍，更优选至少1.5倍，并且甚至更优选至少2倍。在此上下文中，“流感HA裂解疫苗比当前的HA裂解疫苗更强烈地结合，是至少1.05倍，至少1.1倍，至少1.5倍，或至少2倍”是指，例如当通过回归确定的吸光度为0.7时，抗体浓度的倒数是当前的HA裂解疫苗的抗体浓度倒数的至少1.05倍，至少1.1倍，至少1.5倍，或至少2倍。在优选的实施方案中，本发明的流感HA裂解疫苗与LAH结合性单克隆抗体的结合能力比当前的HA裂解疫苗的结合能力高。尽管不特别限制上限，但是结合能力可以在例如1.05-200倍，1.1-150倍，1.5-100倍，或2-50倍范围内。或者，与当前的HA裂解疫苗相比，本发明的流感HA裂解疫苗与LAH结合性单克隆抗体的结合能力的范围可以由选自1.05、1.1、1.5、2、3、4和5的下限值和选自200、150、100、50、30和20的上限值的组合来表示。对于流感HA裂解疫苗与LAH结合性单克隆抗体的结合能力的测量，可以使用任何方法而没有特别限

制,并且可以采用本领域技术人员已知的常见方法。例如,结合能力可以通过在本申请的实施例中描述的方法来测量。

[0119] 在本申请中,“LAH结合性单克隆抗体”是指结合到LAH的单克隆抗体。对于单克隆抗体的产生,可以使用任何方法而没有特别限制,并且可以采用本领域技术人员已知的常见方法。在流感HA裂解疫苗与LAH结合性单克隆抗体的结合能力的测量中,假定LAH结合性单克隆抗体能够结合到对应于从中衍生流感HA裂解疫苗的流感病毒的LAH的至少一部分的肽。

[0120] 在本申请中,“当前的HA裂解疫苗”是指从中通过用醚处理全病毒疫苗而去除变为致热源的脂质组分的疫苗,并且可以例如通过在本申请的实施例1中描述的方法产生。与通过包括以下酸性处理的方法制备的本发明的流感HA裂解疫苗相比,当前的HA裂解疫苗也可以是未经受酸性处理而产生的流感HA裂解疫苗。

[0121] 以下描述用于产生本发明的流感HA裂解疫苗的方法的实例。用于产生流感HA裂解疫苗的方法包括使流感HA裂解疫苗经受酸性处理的步骤。

[0122] 通过用醚处理全病毒疫苗以去除变为致热源的脂质组分,制备流感HA裂解疫苗。流感HA裂解疫苗具有HA蛋白质作为主要成分,因为通过密度梯度离心从病毒颗粒的表面收集免疫需要的HA蛋白质来产生流感HA裂解疫苗。

[0123] 称为“纤突蛋白质(spike protein)”的糖蛋白从流感病毒的表面突出(图1)。甲型流感病毒具有两种类型的纤突蛋白质,即,HA和NA (神经氨酸酶),其帮助病毒引起感染。HA结合到待感染的细胞并且帮助病毒进入细胞。HA通常引起抗原性变异。NA从HA解开感染的细胞,并用于从细胞释放复制的病毒。

[0124] 对流感HA裂解疫苗的酸性处理将HA蛋白质的结构改变为称为膜融合类型的结构。在膜融合类型HA蛋白质中,茎区从病毒膜而不是头区暴露于外部,在抗原茎的构象中具有大的结构变化。本发明人已经体内发现当膜融合类型HA蛋白质用作疫苗时,诱导结合到茎区的LAH的抗体,并且该抗体具有针对引起抗原性变异的病毒毒株的保护作用。

[0125] 不特别限制酸性处理,并且可以在例如3.0-6.5,优选4.0-6.0,并且更优选4.4-5.8的pH下进行。不特别限制用于酸性处理的酸,并且可以是例如磷酸、柠檬酸、马来酸或任何其它合适的酸。

[0126] 本发明的流感HA裂解疫苗的产生可以包括进行福尔马林处理。在优选的实施方案中,在福尔马林处理之前进行流感HA裂解疫苗的酸性处理。在制备本发明的流感HA裂解疫苗抗原(能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的流感HA裂解疫苗抗原)中,用于当前的流感HA裂解疫苗的HA级分经受酸性处理,并然后经受福尔马林处理。这使得可以获得流感HA裂解疫苗抗原,其更有效地产生交叉反应性抗体,并因此更优选作为通用流感疫苗抗原。也就是说,在本申请的优选的实施方案中,从中通过用醚或任何其它合适的试剂处理病毒颗粒而去除脂肪溶剂的HA级分经受酸性处理,并然后经受福尔马林处理。

[0127] 在本申请的优选的实施方案中,在酸性处理之前的流感HA裂解疫苗是未经历福尔马林处理的裂解疫苗。

[0128] 可商购获得的流感HA疫苗(商品名)已经经历在病毒通过醚或任何其它合适的试剂分解并且去除脂肪溶剂之后,用甲醛或具有等效作用的物质处理,如在Biological Products Standards (2004年3月30日,Ministerial Notification No. 155 of

Ministry of Health, Labor and Welfare, 2018年11月30日最新版, Ministerial Notification No. 409)中描述的。优选不使用可商购获得的流感HA疫苗(商品名),其为用于产生本发明的流感HA裂解疫苗的流感HA裂解疫苗的一种,因为其已经用甲醛或任何其它合适的试剂处理过了。

[0129] 在酸性处理后,在用于福尔马林处理流感HA裂解疫苗的福尔马林处理溶液中福尔马林的浓度例如为0.0005 v/v%至10 v/v%,优选0.001 v/v%至1 v/v%,更优选0.003 v/v%至0.5 v/v%,并且还更优选0.005 v/v%至0.1 v/v%。优选使用医用级别的福尔马林。

[0130] 基于抗原性的差异,甲型流感病毒的HA分类为18种亚型(H1至H18),并且NA分类为9种亚型(N1至N9)。本发明的流感HA裂解疫苗适用于所有这些亚型。此外,用于产生根据本发明的流感HA裂解疫苗的方法可以产生疫苗,其不仅针对甲型流感病毒有效,而且针对具有HA的乙型流感病毒也有效。因此,用于甲型流感病毒和乙型流感病毒的疫苗在本发明的流感HA裂解疫苗的范围内。

[0131] 本发明的流感HA裂解疫苗的优选的实例包括衍生自H3N2流感病毒和H1N1流感病毒的那些。

[0132] 在本申请中,“单一HA亚型的流感HA裂解疫苗”是指选自甲型流感病毒的18种亚型(H1至H18)或乙型流感病毒的单一HA亚型的流感HA裂解疫苗。只要具有单一HA亚型,NA亚型可以相同或不同。优选的HA亚型包括H1、H3和乙型。

[0133] 为了产生含有两种或更多种HA亚型的混合疫苗,各自为单一HA亚型的流感HA裂解疫苗经受酸性处理,并且可以将这样获得的多种(两种或更多种)流感HA裂解疫苗混合在一起。或者,还可以通过对先前通过混合两种或更多种HA亚型的疫苗制备的流感HA裂解疫苗进行酸性处理来产生混合疫苗。为了接种疫苗作为两种或更多种亚型的疫苗,疫苗优选包括1-3种选自H1、H3和乙型的亚型。

[0134] 根据本发明的流感HA裂解疫苗产生结合到不太可能引起变异的LAH的抗体。因此,疫苗可以针对称为抗原性变体的流感病毒交叉保护,只要病毒具有相同的HA亚型。此外,通过根据本发明的产生方法获得的流感HA裂解疫苗可以在LAH的类似氨基酸序列的HA亚型(例如,H3和H7)之间可交叉反应。

[0135] 通过上述产生方法获得的流感HA裂解疫苗具有针对引起抗原性变异的病毒毒株的保护作用。例如,如果当前的HA裂解疫苗由H3N2流感病毒(A/Fujian/411/02(H3N2))的颗粒制备并且经受酸性处理,疫苗不仅针对A/Fujian/411/02(H3N2)的感染可以具有保护作用,而且例如还针对A/Guizhou/54/89(H3N2)、A/OMS/5389/88(H3N2)、A/Beijing/32/92(H3N2)、A/England/427/88(H3N2)、A/Johannesburg/33/94(H3N2)、A/Leningrad/360/86(H3N2)、A/Mississippi/1/85(H3N2)、A/Philippines/2/82(H3N2)、A/Shangdong/9/93(H3N2)、A/Shanghai/16/89(H3N2)、A/Shanghai/24/90(H3N2)、A/Sichuan/2/87(H3N2)、A/Kitakyushyu/159/93(H3N2)、A/Akita/1/94(H3N2)、A/Panama/2007/99(H3N2)、A/Wyoming/03/03(H3N2)、A/New York/55/2004(H3N2)或A/Hiroshima/52/2005(H3N2)的感染具有保护作用。另外,例如,如果当前的HA裂解疫苗由H1N1流感病毒(A/Puerto Rico/8/34(H1N1))的颗粒制备并且经受酸处理,疫苗不仅针对A/Puerto Rico/8/34(H1N1)的感染还可以具有保护作用,而且例如还针对A/Narita/1/09(H1N1)、A/Beijing/262/95(H1N1)、A/Brazil/11/78 (H1N1)、A/Chile/1/83(H1N1)、A/New Jersey/8/76(H1N1)、A/Taiwan/1/86(H1N1)、A/

Yamagata/32/89(H1N1)、A/New Caledonia/20/99(H1N1)、A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)、A/Brisbane/59/2007(H1N1)或A/Mexico/4108/2009(H1N1)的感染具有保护作用。

[0136] 通过组合增强TLR7的生理活性的化合物,本发明的流感HA裂解疫苗具有增强的能力以诱导抗茎IgG2抗体,并且表现出优异的疫苗活性。

[0137] 本文的通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的一个实施方案包括以下的组合:选自包含在专利文献14中公开的流感病毒衍生的蛋白质的颗粒抗原、在非专利文献6、7和8中公开的流感HA抗原以及膜融合类型流感HA裂解疫苗抗原的一种或多种通用流感疫苗抗原;和选自明矾、乳液(例如,弗氏佐剂、MF59(注册商标)、AddaVax(TM)、AS03等)、增强NOD受体的生理活性的物质、增强RIG-I受体的生理活性的物质、增强C类型凝集素受体的生理活性的物质、增强胞质DNA受体的生理活性的物质、增强STING的生理活性的物质和增强TLR的生理活性的物质的一种或多种疫苗佐剂。

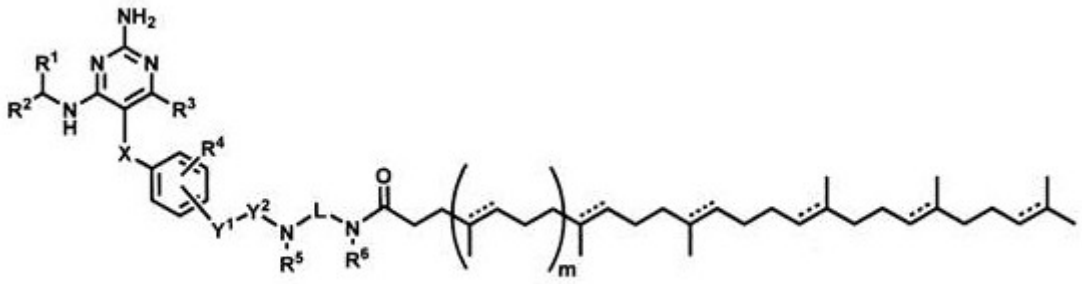
[0138] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括产生结合到HA茎区的LAH的抗体的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原;和增强TLR的生理活性的一种或多种物质的组合。

[0139] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的其中HA茎区暴露于外部的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原;和选自增强TLR7的生理活性的低分子量化合物,和其中增强TLR7的生理活性的一种或多种低分子量化合物和一种或多种脂质通过一个或多个间隔基化学连接的缀合化合物的增强TLR7的生理活性的一种或多种物质的组合。

[0140] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的其中HA茎区暴露于外部的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原;和分子量为200-600,并且具有一种或多种腺嘌呤骨架、一种或多种嘧啶骨架、一种或多种咪唑并喹啉骨架、一种或多种咪唑并吡啶骨架或一种或多种喹唑啉骨架的其中增强TLR7的生理活性的一种或多种低分子量化合物和一种或多种脂质通过一个或多个间隔基化学连接的一种或多种缀合化合物的组合。

[0141] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的其中暴露于外部的HA茎区增强HA茎区的LAH的抗原性的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原;和其中具有一种或多种嘧啶骨架的一种或多种低分子量化合物和一种或多种衍生自角鲨烯或角鲨烷的脂质通过一个或多个间隔基化学连接的一种或多种缀合化合物的组合。

[0142] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的其中暴露于外部的HA茎区增强HA茎区的LAH的抗原性的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原;和式(1)表示的增强TLR7的生理活性的一种或多种化合物或其一种或多种药学上可接受的盐的组合;



(1)

其中

X表示亚甲基，

R^1表示氢原子或可以被羟基取代的具有1-3个碳原子的烷基，

R^2表示氢原子或具有1-6个碳原子的烷基，

R^3表示具有1-3个碳原子的烷基，

R^4表示氢原子、卤素原子、羟基、具有1-3个碳原子的烷基或具有1-3个碳原子的烷氧基，

Y^1表示单键或亚甲基，

Y^2表示单键或-C(O)-，

L表示具有2个或3个碳原子的直链亚烷基，

R^5和R^6独立地表示氢原子或具有1-3个碳原子的烷基，或者R^5和R^6共同形成取代或未取代的5元至8元含氮饱和杂环，条件是当所述5元至8元含氮饱和杂环被取代时，其被相同或不同的1-4个选自羟基和卤素原子的取代基取代，

m表示0或1，

------均为双键。

[0143] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的其中暴露于外部的HA茎区增强HA茎区的LAH的抗原性的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原；和选自以下化合物的增强TLR7的生理活性的一种或多种化合物的组合：

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苄基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；

(4E,8E,12E,16E,20E)-1-(4-{4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-3-甲氧基苯甲酰基}哌嗪-1-基)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯-1-酮；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺；

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基](甲基)氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺;和

其药学上可接受的盐。

[0144] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的其中暴露于外部的HA茎区增强HA茎区的LAH的抗原性的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原;和选自以下化合物的增强TLR7的生理活性的一种或多种化合物的组合:

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺;

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺;和

其药学上可接受的盐。

[0145] 通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂的组合的另一个实施方案包括通过使流感HA裂解疫苗经受酸性处理而产生的能够产生结合到HA茎区的LAH的抗体的一种或多种流感HA裂解疫苗抗原;和选自以下化合物的增强TLR7的生理活性的一种或多种化合物的组合:

(4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺;

4-[(2-氨基-4-{[(2S)-1-羟基戊-2-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]-N-(2-{[(4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰基]氨基}乙基)-3-甲氧基苯甲酰胺;和

其药学上可接受的盐。

[0146] 如本文所用,术语“预防有效量”是赋予预防流感的益处所需的通用流感疫苗抗原和/或疫苗佐剂的量。

[0147] 在本申请中,通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂可以共同包含在一个组合物中并且可以在单独的组合物中配制,但是从降低患者负担的角度,优选通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂包含在一个组合物中,使得在给药时可以同时给予。

[0148] 当通用流感疫苗抗原和疫苗佐剂在单独的组合物中配制时,通用流感疫苗抗原组合物和疫苗佐剂组合物的给药路线可以相同或不同。在本申请中,疫苗抗原和疫苗佐剂可以同时给予或有时间差异地给予,即,疫苗抗原组合物和疫苗佐剂组合物可以同时或分开给予(例如,疫苗佐剂组合物在给予疫苗抗原组合物之前或之后给予)。通用流感疫苗抗原组合物和疫苗佐剂组合物可以作为包含它们的试剂盒提供。

[0149] 如本文所用,包含通用流感疫苗抗原和/或疫苗佐剂的组合物可以通过通用方法来制备,其中加入一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体,例如,呈口服药物形式,例如片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、锭剂、糖浆剂、乳剂、混悬剂等,或肠胃外药物,例如外用药物、栓剂、注射剂、滴眼剂、鼻内剂、经肺剂等。制剂的优选的实例包括可注射的或鼻内溶液剂,

或通过冻干所述溶液剂而制备的冻干的制剂。

[0150] 可注射的溶液剂的实例包括包含水性溶液和油质组合物的乳剂和脂质体，其中通用流感疫苗抗原和/或疫苗佐剂(例如，式(1)表示的化合物或其药学上可接受的盐)溶解或分散在水中的水性溶液剂制剂或水性混悬剂制剂，或其中通用流感疫苗抗原和/或疫苗佐剂(例如，式(1)表示的化合物或其药学上可接受的盐)溶解或分散在油中的油质溶液剂制剂或油质混悬剂制剂。

[0151] 水性溶液剂、水性溶液剂制剂或水性混悬剂制剂的实例包括包含用于注射的蒸馏水并任选包含缓冲液、pH调节剂、稳定剂、等渗剂和/或乳化剂的水性溶液剂或水性混悬剂等。

[0152] 油质组合物、油质溶液剂制剂或油质混悬剂制剂的实例包括含有植物油和脂肪、动物油和脂肪、碳水化合物、脂肪酸酯、磷脂等的组合物，并且更具体地，含有角鲨烯、角鲨烷等的组合物。

[0153] 乳化剂的实例包括亲水性表面活性剂和疏水性表面活性剂。

[0154] 本文的组合物可以包含一种或多种选自蔗糖、三氯半乳蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、甘氨酸、甲硫氨酸、柠檬酸、乳酸、酒石酸、乙酸、三氟乙酸和pH调节剂的药学上可接受的载体。

[0155] 在本申请中，给予组合物、试剂盒等的方法可以根据情况(例如疾病的类型、受试者的情况和靶向位点)来适当地选择。给药方法的实例包括肠胃外给药，具体地，血管内(例如，静脉内)、皮下、皮内、肌内、经鼻和经皮给药。

[0156] 在本申请中，不特别限制疫苗佐剂和疫苗抗原的剂量，并且根据给药方法、受试者、受试者的年龄、剂型、给药路线等适当地选择。

[0157] 例如，当疫苗佐剂为式(1)的化合物或其药学上可接受的盐时，式(1)的化合物或其药学上可接受的盐可以通常在5-5000 mg/m^2身体表面积(即，约0.1 ng/kg至100 mg/kg)范围的单位剂量给予温血动物，其通常提供预防有效剂量。单位剂型(例如注射剂、片剂或胶囊剂)通常含有例如1 ng至250 mg的式(1)的化合物或其药学上可接受的盐，并且优选以在1 ng至50 mg/kg/天范围的剂量使用。然而，日剂量可以根据待治疗的宿主、给药路线和待治疗的疾病的严重性而变化。因此，最优剂量可以由治疗个体患者或温血动物的从业人员确定。如果疫苗佐剂与通用流感疫苗抗原同时给予，疫苗佐剂例如根据以下给予通用流感疫苗抗原的计划给予。即使当疫苗佐剂与通用流感疫苗抗原分开给予时，其也可以例如在考虑以下通用流感疫苗抗原的给予计划而给予。

[0158] 在本申请中，通用流感疫苗抗原(例如，本发明的流感HA裂解疫苗)的剂量、组合物的剂型、剂量的数量、单一给药所需的时间等可以根据情况(例如受试者的年龄和靶向位点)来适当地选择。通用流感疫苗抗原(例如，本发明的流感HA裂解疫苗)可以仅在单一剂量中给予，或者可以在初始剂量和加强剂量中给予，例如，在初始剂量之后在预定的时间段之后给予加强剂量。不特别限制从初始接种疫苗到加强接种疫苗的时间段，但是例如为20天至3年，优选3个月至2年，并且更优选6个月至1年。不特别限制用于初次接种疫苗和加强接种疫苗的通用流感疫苗抗原的量，但是例如为1 μg至200 μg/剂量，优选10 μg至30 μg/剂量，并且更优选15 μg/剂量。例如，一种剂量为0.5 mL。在初次接种疫苗和加强接种疫苗中增强TLR7的生理活性的物质的量通常为0.0001 mg至1000 mg，优选0.001 mg至1000 mg，并

且更优选0.1 mg至10 mg。对于初次接种疫苗和加强接种疫苗，不特别限制给药方法，但是可以是例如鼻、皮下、皮内、经皮、眼内、粘膜或口服给予，优选肌内给药。

[0159] 如本文所用，“温血动物”包括人和非人动物。非人动物包括但不限于例如哺乳动物，例如非人动物灵长类、绵羊、狗、猫、马和牛。在温血动物中，优选人，尤其是需要预防流感的人。

[0160] 本文的用于预防流感的方法的一个实施方案包括一种方法，所述方法包括给予包含上述一种或多种通用流感疫苗抗原和一种或多种疫苗佐剂的组合物。另一个实施方案包括一种方法，所述方法包括给予通用流感疫苗抗原组合物和疫苗佐剂组合物。

实施例

[0161] 下文中，本发明将通过实施例来详细描述，但是本发明不限于此。

[0162] 实施例1：本发明的流感HA裂解疫苗

1．HA裂解疫苗的制备

将吐温80加入到悬浮在磷酸缓冲盐水中的H3N2流感病毒(毒株X31)的颗粒或H1N1流感病毒(A/Puerto Rico/8/34毒株)的颗粒中至最终浓度为0.1 v/v%并悬浮在其中。加入乙醚并悬浮，并让悬浮液静置直至水层和乙醚层完全分离，并然后去除乙醚层。重复该醚萃取之后，在常压下蒸馏除去残留在回收的水层中的乙醚以获得HA裂解疫苗。

[0163] 2．酸性处理

将HA裂解疫苗悬浮在磷酸缓冲盐水中，并然后通过加入0.15 M柠檬酸盐缓冲液(pH 3.5)进行酸性处理，以使pH为5.0。在室温下静置30分钟后，加入1 M Tris缓冲液(pH 8.0)使得pH返回到7.3。随后，进行离心以获得膜融合类型HA裂解疫苗。将福尔马林加入到这样制备的膜融合类型HA裂解疫苗中至最终浓度为0.05 v/v%，并静置几天。

[0164] 除了不提供酸性处理，采用与在上述1中所述相同的方式制备当前的HA裂解疫苗。

[0165] 3．通过ELISA测量抗LAH抗体的效价

3-1．H3N2流感疫苗的接种

将BALB/c小鼠(雌性，6-12周龄)腹膜内接种当前的H3N2 HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗(10 μg的疫苗+10 v/v%的AddaVax佐剂(InvivoGen)，溶解在磷酸缓冲盐水中至液体体积为200 μl)。初始接种后28天，将小鼠腹膜内接种膜融合类型HA疫苗(仅10 μg的疫苗溶解在磷酸缓冲盐水中至液体体积为200 μl)。另外的接种后至少14天，从接种疫苗的小鼠收集血液，从中收集血清。

[0166] 3-2．通过ELISA测量

采用以下方式通过ELISA(酶联免疫吸附测定)测量腹膜内接种当前的H3N2 HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗的BALB/c小鼠的血清中抗LAH抗体的浓度。

[0167] 具体地，将对应于茎部分的一部分(长α螺旋)的合成肽(H3;Ac-RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMNKLFEKTRRQLRENADYKDDDDKC) (SEQ ID NO:1)以10 μg/ml溶解在磷酸缓冲盐水(pH 7.3)中，并加入到96孔板中，每个孔100 μl。在4℃下静置过夜后，每个孔用磷酸缓冲盐水洗涤三次，并加入150 μl含有1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水。在室温下静置2小时后，每个孔用磷酸缓冲盐水洗涤三次。然后，将用含有0.05 v/v%的吐温20和1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液系列稀释的100 μl的小鼠血清和100 μl的已知

浓度的标准单克隆抗体(H3;克隆名称V15-5)加入到每个孔中。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%的吐温20)洗涤三次,并将用含有0.05 v/v%吐温20和1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水稀释的100 μl的过氧化物酶标记的抗小鼠IgG抗体(Southern Biotech)加入到每个孔中。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%的吐温20)洗涤三次。然后,将30 mg的邻苯二胺片剂(Sigma)和24 μl的30%过氧化氢溶液(30% w/w;Sigma)加入到60 ml的柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)作为底物中,并将100 μl的所得物加入到每个孔中。显色后,加入50 μl的1 mol/L硫酸(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)以停止反应,并使用Microplate Reader 450 (Biorad)测量在490 nm下的吸光度值。

[0168] 如在图2中显示的,腹膜内接种膜融合类型HA裂解疫苗的BALB/c小鼠的血清中的抗LAH抗体的效价显著高于腹膜内接种当前的HA裂解疫苗的BALB/c小鼠的血清中的抗LAH抗体的效价。

[0169] 4.针对抗原性变体的交叉保护

在针对被H3N2病毒感染的保护的实验中,将200 μl的从未接种的小鼠收集的血清、200 μl的从接种当前的H3N2 HA裂解疫苗的小鼠收集的血清或200 μl的从接种膜融合类型HA裂解疫苗的小鼠收集的血清腹膜内给予BALB/c小鼠(雌性,6-12周龄)。

[0170] 血清给予后3小时,在麻醉下以5倍小鼠致死剂量50 (50%的小鼠病毒致死量的5倍)鼻内给予具有与疫苗毒株不同抗原性的另一种H3N2流感病毒(A/Guizhou/54/89)。

[0171] 从病毒感染起每日将小鼠称重并观察持续21天,以研究体重和存活率的变化。人道终点设定在25%体重减轻。

[0172] 如在图3中显示的,关于接种膜融合类型HA裂解疫苗的BALB/c小鼠,在用不同抗原性的其它H3N2流感病毒感染后第9天以后显著抑制存活率降低。

[0173] 5.通过ELISA测量抗LAH抗体的效价

5-1.H1N1流感病毒的颗粒

将C57BL/6小鼠(雌性,6-12周龄)腹膜内接种当前的H1N1 HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗(10 μg的疫苗+10 μg的CpG-ODN 1760,悬浮在磷酸缓冲盐水中并与等体积的弗氏不完全佐剂(ROCKLAND)混合至液体体积为200 μl)。初始接种后28天,将小鼠腹膜内接种膜融合类型HA裂解疫苗(10 μg的疫苗+10 μg的CpG-ODN,悬浮在磷酸缓冲盐水中并与等体积的弗氏不完全佐剂(ROCKLAND)混合至液体体积为200 μl,采用与初始接种相同的方式)。另外的接种后至少14天,从接种疫苗的小鼠收集血液,从中收集血清。

[0174] 5-2.通过ELISA测量

采用以下方式通过ELISA测量腹膜内接种当前的H1N1 HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠的血清中抗LAH抗体的浓度。

[0175] 采用与上述相同的方式进行测量,不同之处在于使用对应于茎部分的一部分(长α螺旋)的合成肽(H1;Ac-RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQLKNNAD YKDDDDKC) (SEQ ID NO:2)并且使用已知浓度的标准单克隆抗体(H1;克隆名称F2)。

[0176] 如在图4中显示的,腹膜内接种膜融合类型HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠的血清中的抗LAH抗体的效价显著高于腹膜内接种当前的HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠的血清中的抗LAH抗体的效价。

[0177] 6．针对抗原性变体的交叉保护

在针对被H1N1病毒感染的保护的实验中，将200 μl的从未接种的小鼠收集的血清、200 μl的从接种当前的H1N1 HA裂解疫苗的小鼠收集的血清或200 μl的从接种膜融合类型HA裂解疫苗的小鼠收集的血清腹膜内给予C57BL/6小鼠(雌性，6-12周龄)。

[0178] 血清给予后3小时，在麻醉下以5倍小鼠致死剂量50 (50%的小鼠病毒致死量的5倍)鼻内给予具有与疫苗毒株不同抗原性的另一种H1N1流感病毒(A/Narita/1/09)。

[0179] 从病毒感染起每日观察小鼠持续20天，以研究存活率。如在图5中显示的，关于接种膜融合类型HA裂解疫苗的C57BL/6小鼠，在用不同抗原性的其它H1N1流感病毒感染后第9天以后显著抑制存活率降低。

[0180] 7．抗体与LAH表位的结合能力

通过ELISA(酶联免疫吸附测定)测量由被毒株X31感染的鼠外周血或人外周血制备的抗LAH单克隆抗体(图6中的#1至#5)与当前的HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗的结合。将H3N2流感病毒(毒株X31)的当前的HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗溶解在磷酸缓冲盐水(pH 7.3)中，并加入到96孔板中，每个孔50 μl。在4℃下静置过夜后，每个孔用磷酸缓冲盐水洗涤三次，并加入150 μl含有1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水。在室温下静置2小时后，每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%的吐温20)洗涤三次，并加入50 μl的用含有1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液系列稀释的LAH结合性单克隆抗体。在4℃下静置过夜后，每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%的吐温20)洗涤三次，并且将用含有0.05 v/v%吐温20和1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水稀释的100 μl的过氧化物酶标记的抗小鼠IgG抗体(Southern Biotech)加入到每个孔中。在室温下静置2小时后，每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%的吐温20)洗涤三次。然后，将30 mg的邻苯二胺片剂(Sigma)和24 μl的30%过氧化氢溶液(30% w/w;Sigma)加入到60 ml柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中作为底物，并将50 μl的所得物加入到每个孔中。显色后，加入25 μL的1 mol/L硫酸(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)以停止反应，并且使用Microplate Reader 450(Biorad)测量在490 nm下的吸光度值。从关于当前的HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗测量的吸光度值计算结合能力的变化。

[0181] 如在图6中显示的，LAH结合性单克隆抗体与膜融合类型HA裂解疫苗的结合能力比与当前的HA裂解疫苗的结合能力大，为1.05-21倍。结果显示HA裂解疫苗的酸性处理增强抗体与LAH表位的结合能力。

[0182] 实施例2:包含TLR激动剂和本发明的流感HA裂解疫苗的组合物

1．含有增强TLR7的生理活性的化合物的佐剂组合物的制备

A-1的制备方法

各自称重2.96克(2.96 g)的二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱(DMPC)、2.04 g蛋黄磷脂酰甘油(EPG)和0.5 g的TLR7激动剂((4E,8E,12E,16E,20E)-N-{2-[{4-[(2-氨基-4-{[(3S)-1-羟基己-3-基]氨基}-6-甲基嘧啶-5-基)甲基]苄基}(甲基)氨基]乙基}-4,8,12,17,21,25-六甲基二十六碳-4,8,12,16,20,24-六烯酰胺) (下文称为化合物A)，并将20 g环己烷和0.4 g乙醇加入到其中使得它们溶解。使用0.2 μm膜过滤器过滤后，将滤液冻干。将所得固体分散在9 v/v%蔗糖水溶液中。混合物经受挤出机以提供脂质体液体。将通过0.22 μm过滤器的脂质体液体冻干。在使用时将用于注射的蒸馏水加入到所得固体中。

[0183] A-2的制备方法

将4毫克(4 mg)的TLR7激动剂((4-{[[3-(6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7,8-二氢-9H-嘌呤-9-基)丙基](3-哌啶-1-基丙基)氨基]甲基}苯基)乙酸甲酯盐酸盐) (下文称为化合物B)称重,并悬浮在1 mL的含有0.1 v/v%吐温80的0.6 v/v%磷酸缓冲盐水(pH 6)中。

[0184] A-3的制备方法

将TLR7激动剂(化合物A)溶解在油性组分(角鲨烷、三油酸脱水山梨糖醇酯和α-生育酚)中,使得化合物A、角鲨烷、三油酸脱水山梨糖醇酯、α-生育酚的重量比为1:225:25:25。将水性组分(蔗糖、聚山梨醇酯80和抗坏血酸钠)溶解在用于注射的水中。将所得混合物和上述油质组合物初步混合。在该混合物中,化合物A、抗坏血酸钠、聚山梨醇酯80、蔗糖的重量比为1:10:25:500。使用超高压乳化分散器使混合物乳化和分散。通过0.2 μm无菌过滤器过滤后,玻璃小瓶填充1 mL的混合物,随后冻干。在使用时将用于注射的蒸馏水加入到所得固体中。

[0185] 2. 给予包含流感HA裂解疫苗和增强TLR7的生理活性的化合物的本发明的组合物

将衍生自毒株X31的膜融合类型HA裂解疫苗(10μg)与:磷酸缓冲盐水;含有50 μg的TLR7激动剂 (化合物A)的A-1;含有200 μg的TLR7激动剂(化合物B)的A-2;含有10 μg的TLR7激动剂(化合物A)的A-3;其体积等于衍生自毒株X31的膜融合类型HA裂解疫苗的液体的AddaVax佐剂(InvivoGen);或者悬浮在磷酸缓冲盐水中的10 μg的CpG-ODN1760和等体积的弗氏不完全佐剂(ROCKLAND)的混合物混合,以得到每种组合物。C57BL/6小鼠(雌性,6-12周龄)在大腿中皮内接种或在大腿中肌内接种(在每个大腿中50 μl,共计100 μl)上述组合物。3周后,相同的小鼠用相同的抗原并在相同的条件下加强。加强后2周,取血,从中收集血清。

[0186] 3. 通过ELISA测量

采用以下方式通过ELISA测量小鼠血清中抗HA抗体的浓度。

[0187] 将重组HA蛋白质(H3N2流感病毒的毒株X31或A/Uruguay/716/2007)以10 μg/ml溶解在磷酸缓冲盐水(pH 7.3)中,并加入到96孔板中,每个孔100 μl。在4℃下静置过夜后,每个孔用磷酸缓冲盐水洗涤三次,并加入150 μl含有1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水洗涤三次。然后,将用含有0.05 v/v%吐温20和1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液系列稀释的100 μl的小鼠血清,并将100 μl的已知浓度的标准单克隆抗体(H3;克隆名称V15-5)加入到每个孔中。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%吐温20)洗涤三次,并将用含有0.05 v/v%吐温20和1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水稀释的100 μl的过氧化物酶标记的抗小鼠IgG1抗体或IgG2c抗体(Southern Biotech)加入到每个孔中。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%吐温20)洗涤三次。然后,将30 mg的邻苯二胺片剂(Sigma)和24 μl的30%过氧化氢溶液(30% w/w;Sigma)加入到60 ml的柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中作为底物,并将100 μl的所得物加入到每个孔中。显色后,加入50 μl的1 mol/L硫酸(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)以停止反应,并使用Microplate Reader 450 (Biorad)测量在490 nm下的吸光度值。

[0188] 如在图7中显示的,接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有组针对衍生自毒株X31的HA的IgG2c效价显著高于接种不含佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的组。A-1-给予

组的针对衍生自毒株X31的HA的IgG2c效价高于给予CpG-ODN1760/弗氏不完全佐剂(CpG/IFA)的组。在各组中,A-1-给予组诱导针对衍生自毒株X31的HA的最高IgG2c效价。此外,对于衍生自Urg的HA,观察到类似的反应性结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性IgG2抗体,其在针对感染的保护中高度有效。

[0189] 如在图8中显示的,接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有组针对衍生自毒株X31的HA的IgG1效价显著高于接种不含佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的组。在各组中,给予CpG-ODN1760/弗氏不完全佐剂(CpG/IFA)的组诱导针对衍生自毒株X31的HA的最高IgG1效价。此外,对于衍生自Urg的HA,观察到反应性精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性抗体。

[0190] 如在图9中显示的,A-1-给予组的抗衍生自毒株X31的HA IgG2c/IgG1抗体比率高于给予CpG-ODN1760/弗氏不完全佐剂(CpG/IFA)的组。此外,对于衍生自Urg的HA,观察到抗HA IgG2c/IgG1抗体比率精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性抗体,其在针对感染的保护中高度有效。

[0191] 如在图10中显示的,接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有组针对衍生自毒株X31的HA的IgG2c效价显著高于接种不含佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的组。A-1-给予组和A-3-给予组的针对衍生自毒株X31的HA的IgG2c效价高于AddaVax佐剂-给予组。此外,对于衍生自Urg的HA,观察到反应性精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性IgG2抗体,其在针对感染的保护中高度有效。

[0192] 如在图11中显示的,接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有组针对衍生自毒株X31的HA的IgG1效价显著高于接种不含佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的组。在各组中,A-3-给予组和AddaVax-给予组诱导针对衍生自毒株X31的HA的最高IgG1效价。此外,对于衍生自Urg的HA,观察到反应性精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性抗体。

[0193] 如在图12中显示的,A-1-给予组和A-3-给予组的抗衍生自毒株X31的HA IgG2c/IgG1抗体比率高于AddaVax佐剂-给予组。此外,对于衍生自Urg的HA,观察到抗HA IgG2c/IgG1抗体比率精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性抗体,其在针对感染的保护中高度有效。

[0194] 4.针对抗原性变体的交叉保护

在加强后3周,在麻醉下以5倍小鼠致死剂量50 (50%的小鼠病毒致死量的5倍)鼻内给予具有与疫苗毒株不同抗原性的另一种H3N2流感病毒(A/Guizhou/54/89)。从病毒感染起每日将小鼠称重并观察持续14天,以研究体重和存活率的变化。人道终点设定在25%体重减轻。

[0195] 如在图13中显示的,关于接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有小鼠组,在用不同抗原性的其它H3N2流感病毒感染后7天以后显著抑制存活率降低。其中,A-1-给予组和A-3-给予组显示100%存活率和针对感染的保护的最高作用。

[0196] 如在图14中显示的,关于接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有小鼠组,抑制由于用不同抗原性的其它H3N2流感病毒感染的体重减轻。在各组中,A-3-给予组显示比AddaVax佐剂-给予组更高的抑制体重减轻的作用。

[0197] 5.给予包含流感HA裂解疫苗和增强TLR7的生理活性的化合物的本发明的组合物

衍生自H1N1流感病毒的毒株PR8的膜融合类型HA裂解疫苗(10μg)与:磷酸缓冲盐水;含有50 μg的TLR7激动剂(化合物A)的A-1;含有10 μg的TLR7激动剂(化合物A)的A-3;或者其体积等于衍生自毒株PR8的膜融合类型HA裂解疫苗的液体的AddaVax佐剂(InvivoGen)混合,以得到每种组合物。C57BL/6小鼠(雌性,6-12周龄)在大腿中皮内接种或在大腿中肌内接种(在每个大腿中50 μl,共计100 μl)上述组合物。3周后,相同的小鼠用相同的抗原并在相同的条件下加强。加强后2周,取血,从中收集血清。

[0198] 6.通过ELISA测量

采用以下方式通过ELISA测量小鼠血清中抗HA抗体的浓度。重组HA蛋白质(H1N1流感病毒的毒株PR8或A/Narita/1/09)以10 μg/ml溶解在磷酸缓冲盐水(pH 7.3)中,并加入到96孔板中,每个孔100 μl。在4℃下静置过夜后,每个孔用磷酸缓冲盐水洗涤三次,并加入150 μl含有1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水洗涤三次。然后,将用含有0.05 v/v%的吐温20和1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液系列稀释的100 μl的小鼠血清和100 μl的已知浓度的标准单克隆抗体(H1;克隆名称F2)加入到每个孔中。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%的吐温20)洗涤三次,并将用含有0.05 v/v%吐温20和1 v/v%牛血清白蛋白的磷酸缓冲盐水稀释的100 μl的过氧化物酶标记的抗小鼠IgG1抗体或IgG2c抗体(Southern Biotech)加入到每个孔中。在室温下静置2小时后,每个孔用磷酸缓冲盐水(含有0.05 v/v%的吐温20)洗涤三次。然后,将30 mg的邻苯二胺片剂(Sigma)和24 μl的30%过氧化氢溶液(30% w/w;Sigma)加入到60 ml的柠檬酸盐缓冲液(pH 5.0)中作为底物,并将100 μl的所得物加入到每个孔中。显色后,加入50 μl的1 mol/L硫酸(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)以停止反应,并使用Microplate Reader 450 (Biorad)测量在490 nm下的吸光度值。

[0199] 如在图17中显示的,接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有组针对衍生自毒株PR8的HA的IgG2c效价显著高于接种不含佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的组。A-1-给予组的针对衍生自毒株PR8的HA的IgG2c效价高于AddaVax佐剂-给予组。在各组中,A-3-给予组诱导针对衍生自毒株PR8的HA的最高IgG2c效价。此外,对于衍生自A/Narita/1/09的HA,观察到反应性精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性IgG2抗体,其在针对感染的保护中高度有效。

[0200] 如在图18中显示的,接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有组针对衍生自毒株PR8的HA的IgG1效价显著高于接种不含佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的组。在各组中,A-3-给予组诱导针对衍生自毒株PR8的HA的最高IgG1效价。此外,对于衍生自A/Narita/1/09的HA,观察到反应性精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性抗体。

[0201] 如在图19中显示的,A-1-给予组的和A-3-给予组的抗衍生自毒株PR8的HA IgG2c/IgG1抗体比率高于AddaVax佐剂-给予组。此外,对于衍生自A/Narita/1/09的HA,观察到抗HA IgG2c/IgG1抗体比率精确类似的结果。因此,这些结果显示通过接种本申请的组合物诱导交叉反应性抗体,其在针对感染的保护中高度有效。

[0202] 7.针对抗原性变体的交叉保护

在加强后4周,在麻醉下以5倍小鼠致死剂量50 (50%的小鼠病毒致死量的5倍)鼻内给予具有与疫苗毒株不同抗原性的另一种H1N1流感病毒(A/Narita/1/09)。从病毒感染

起每日将小鼠称重并观察持续14天,以研究体重和存活率的变化。人道终点设定在25%体重减轻。

[0203] 如在图20中显示的,关于接种具有A-1佐剂或A-3佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的小鼠组,在用不同抗原性的其它H1N1流感病毒感染后7天以后显著抑制存活率降低,这显示强感染保护作用。

[0204] 如在图21中显示的,关于接种具有佐剂的膜融合类型HA裂解疫苗的所有小鼠组,抑制由于用不同抗原性的其它H1N1流感病毒感染的体重减轻。在各组中,A-1-给予组和A-3-给予组显示比AddaVax佐剂-给予组更高的抑制体重减轻作用。

[0205] 实施例3:福尔马林处理的顺序对抗体的结合能力和抗体诱导性的影响

1. 福尔马林-预处理的HA裂解疫苗的制备

向悬浮在磷酸缓冲盐水中的H3N2流感病毒(毒株X31)的颗粒中加入吐温80,并以0.1 v/v%的最终浓度悬浮。加入乙醚并悬浮,并让悬浮液静置直至水层和乙醚层完全分离,并然后去除乙醚层。

[0206] 重复该醚萃取之后,在常压下蒸馏除去残留在回收的水层中的乙醚。此外,以0.05 v/v%的最终浓度加入福尔马林,并将混合物静置几天以获得福尔马林-预处理的HA裂解疫苗。

[0207] 2. 福尔马林-预处理的HA裂解疫苗的酸性处理

将福尔马林-预处理的HA裂解疫苗悬浮在磷酸缓冲盐水中,并然后通过加入0.15 M柠檬酸盐缓冲液(pH 3.5)进行酸性处理,以使pH为5.0。在室温下静置30分钟后,加入1 M Tris缓冲液(pH 8.0)使得pH返回到7.3。随后,进行离心。

[0208] 3. 抗体与LAH表位的结合能力

采用与在实施例1中所述的相同的方式测量抗体与LAH表位的结合能力,并且计算结合能力的变化。此处,作为示于图6的#2、#4和#5的相同的抗体用作单克隆抗体,并且结合到HA头区的单克隆抗体#6用作对照。

[0209] 4. 通过ELISA测量抗LAH抗体的效价

4-1. H3N2流感疫苗的接种

将BALB/c小鼠(雌性,6-12周龄)腹膜内接种当前的H3N2 HA裂解疫苗或膜融合类型HA裂解疫苗(10 μg疫苗+10 v/v% AddaVax佐剂(InvivoGen),溶解在磷酸缓冲盐水中至液体体积为200 μl)。接种后至少12天,从接种疫苗的小鼠收集血液,从中收集血清。

[0210] 4-2. 通过ELISA测量

采用与在上述实施例1中的3-2所述的相同的方式测量抗LAH抗体的效价。

[0211] 如在图15中显示的,LAH结合性单克隆抗体与在制备膜融合类型HA裂解疫苗的过程中在酸性处理后已经经历福尔马林处理的疫苗(后固定)比与在酸性处理之前已经经历福尔马林处理的疫苗(前固定)更强烈地结合。结果指示,何时进行福尔马林处理对通过HA裂解疫苗的酸性处理获得的抗体与LAH表位的结合能力的增强具有影响,并且期望地在酸性处理后进行福尔马林处理。在图15和图16中,采用与在实施例3中所述的相同的方式在福尔马林处理之后通过使HA裂解疫苗经受酸性处理获得的疫苗称为“膜融合类型裂解疫苗(前固定)”。此外,根据实施例1的程序,采用与在实施例1中所述的相同的方式在酸性处理之后通过使HA裂解疫苗经受福尔马林处理获得的疫苗称为“膜融合类型裂解疫苗(后固

定)”。

[0212] 如在图16中显示的,腹膜内接种膜融合类型HA裂解疫苗的BALB/c小鼠的血清中的抗LAH抗体的效价高于腹膜内接种当前的HA裂解疫苗的BALB/c小鼠的血清中的抗LAH抗体的效价。此外,膜融合类型HA裂解疫苗(后固定)表现出比膜融合类型裂解疫苗(前固定)更高的抗LAH抗体的效价。

[0213] 工业适用性

本发明可以用于开发或产生流感疫苗的领域。

[0214] 序列表自由文本

SEQ ID NO:1、2:合成肽。

<110> Japan Health Sciences Foundation
Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.
<120> 包含流感疫苗的组合物
<130> 675048
<150> JP 2018-138001
<151> 2018-07-23
<150> JP 2019-038976
<151> 2019-03-04
<160> 2
<170> PatentIn版本3.5
<210> 1
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化
<400> 1

Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu
1 5 10 15
Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu Asn Gln His Thr
20 25 30
Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe Glu Lys Thr Arg
35 40 45
Arg Gln Leu Arg Glu Asn Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
50 55 60

<210> 2
<211> 64
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<400> 2

Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Leu Asp Ile
1 5 10 15

Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu Arg Thr
20 25 30

Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys Val Arg
35 40 45

Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
50 55 60

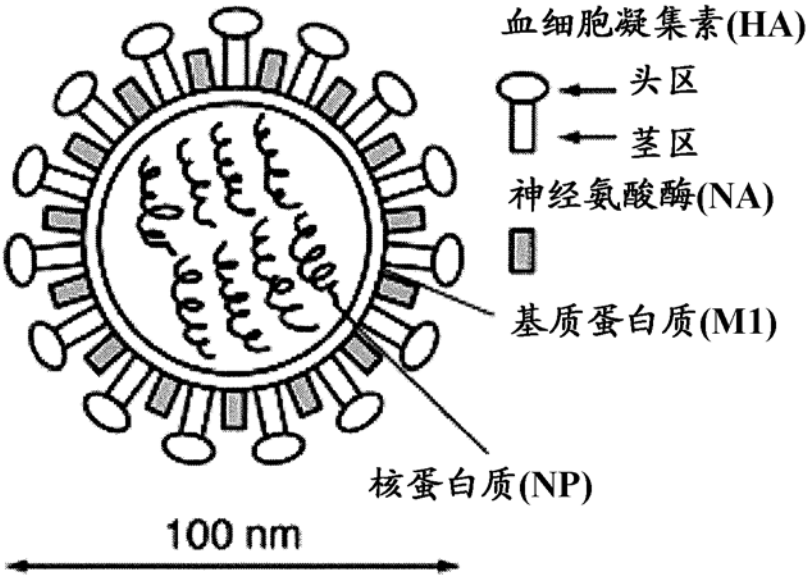


图 1

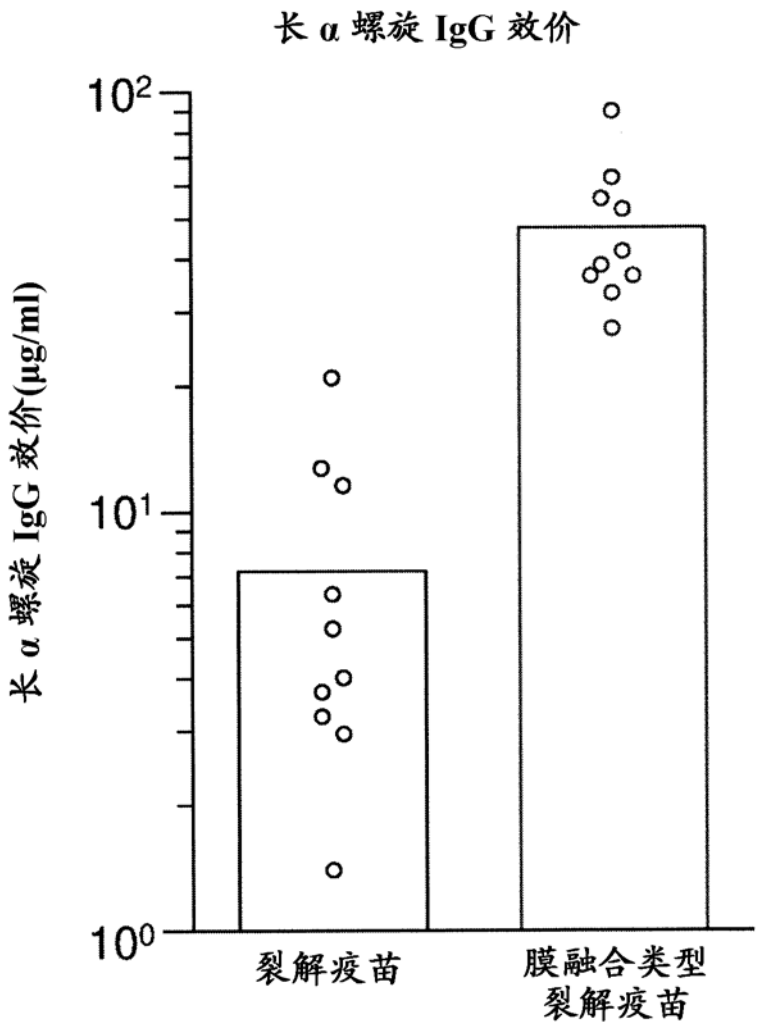


图 2

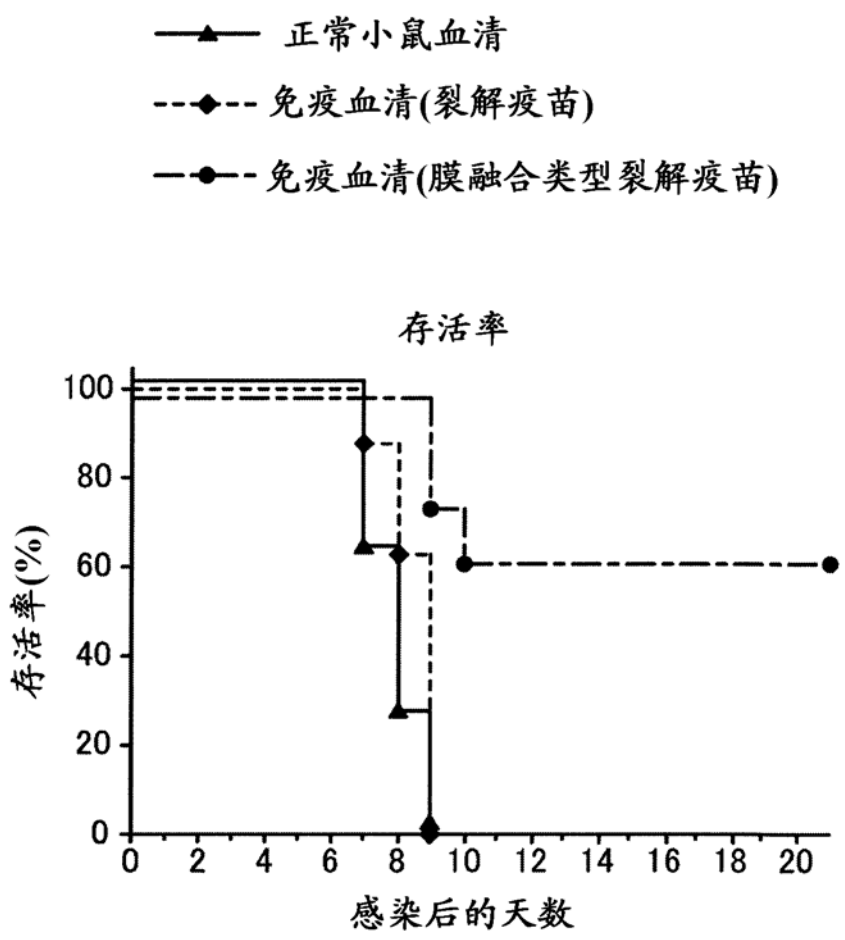

正常小鼠血清
免疫血清(裂解疫苗)
免疫血清(膜融合类型裂解疫苗)
存活率
存活率(%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
感染后的天数

图 3

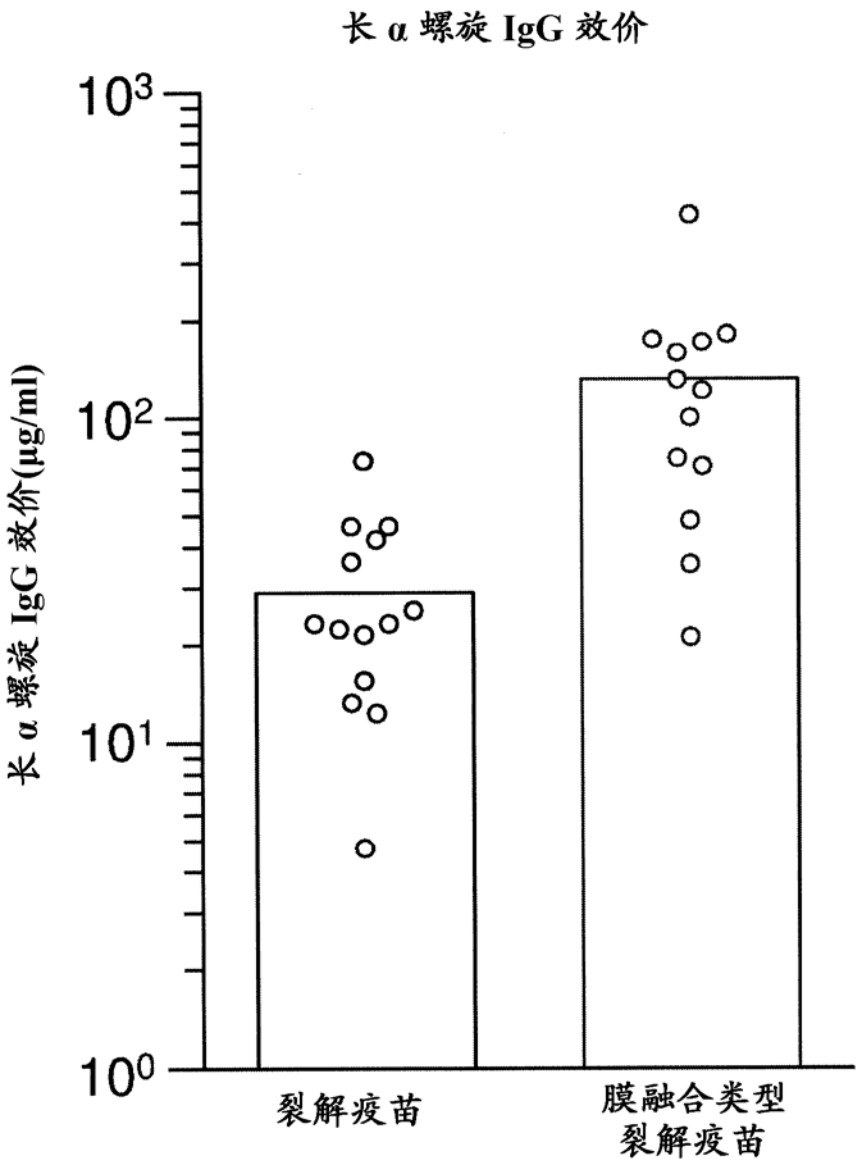


图 4

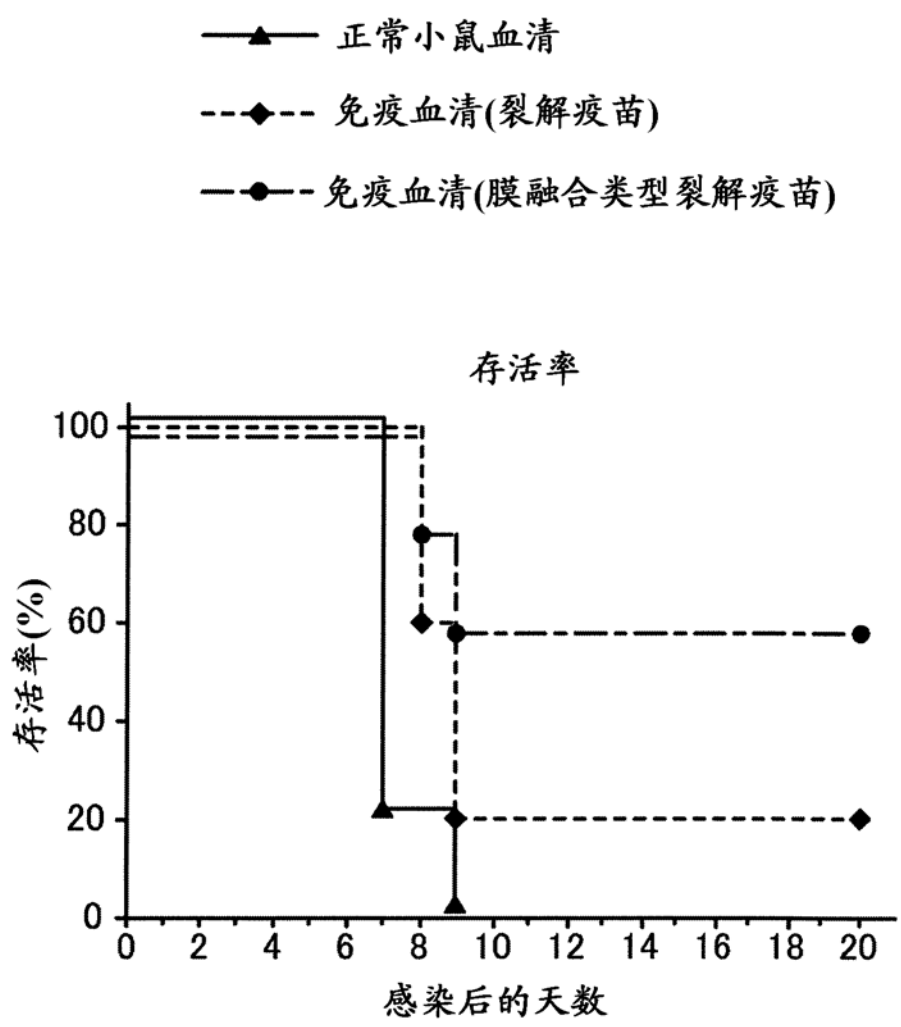

正常小鼠血清
免疫血清(裂解疫苗)
免疫血清(膜融合类型裂解疫苗)
存活率
存活率(%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
感染后的天数

图 5

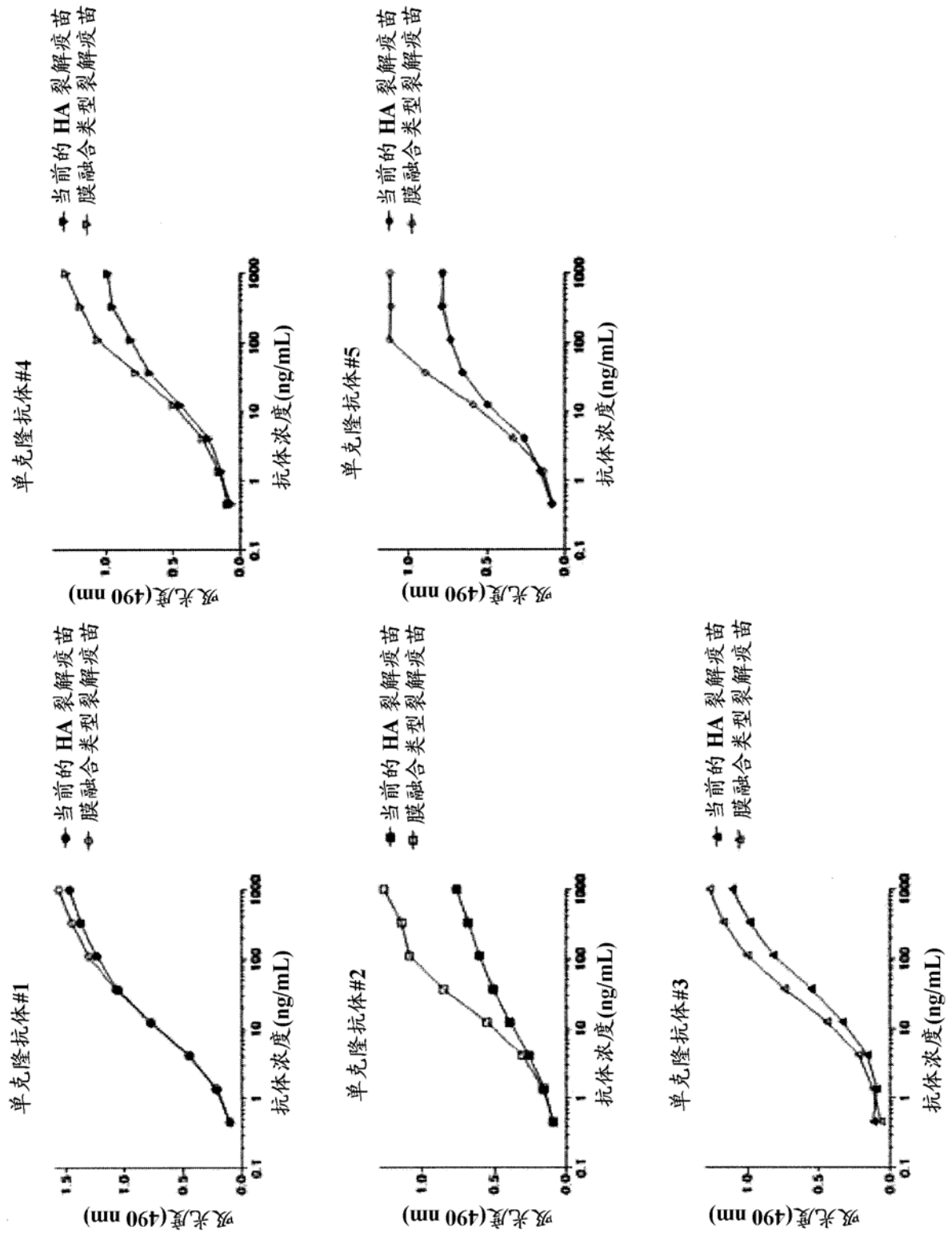

单克隆抗体#1
单克隆抗体#2
单克隆抗体#3
单克隆抗体#4
单克隆抗体#5
当前的 HA 裂解疫苗
膜融合类型裂解疫苗
抗体浓度(ng/mL)
0.1
1
10
100
1000
0.0
0.5
1.0
1.5

图 6

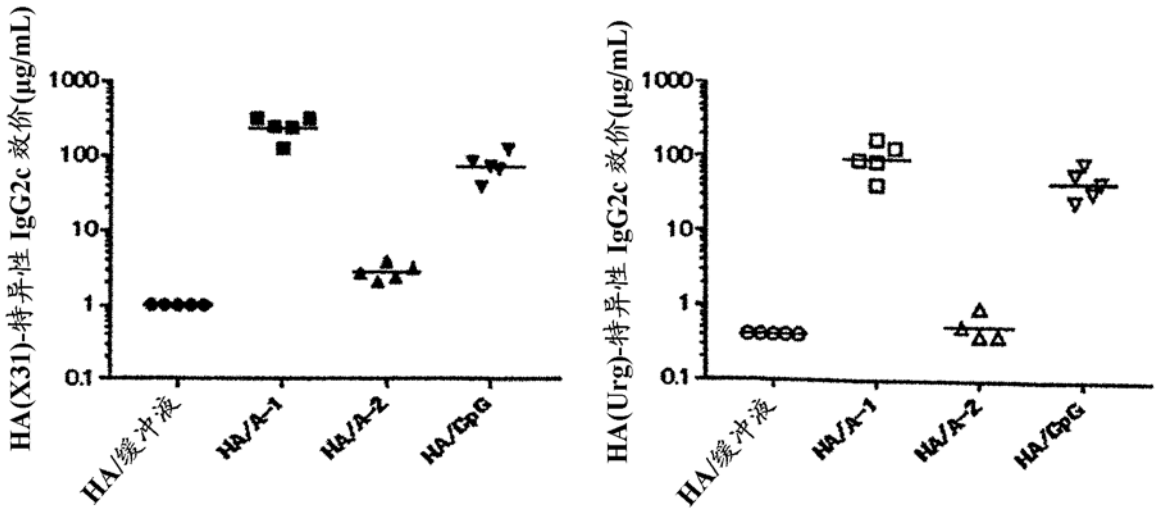

HA(X31)-特异性 IgG2c 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-2
HA/CpG
HA(Urg)-特异性 IgG2c 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-2
HA/CpG

图 7

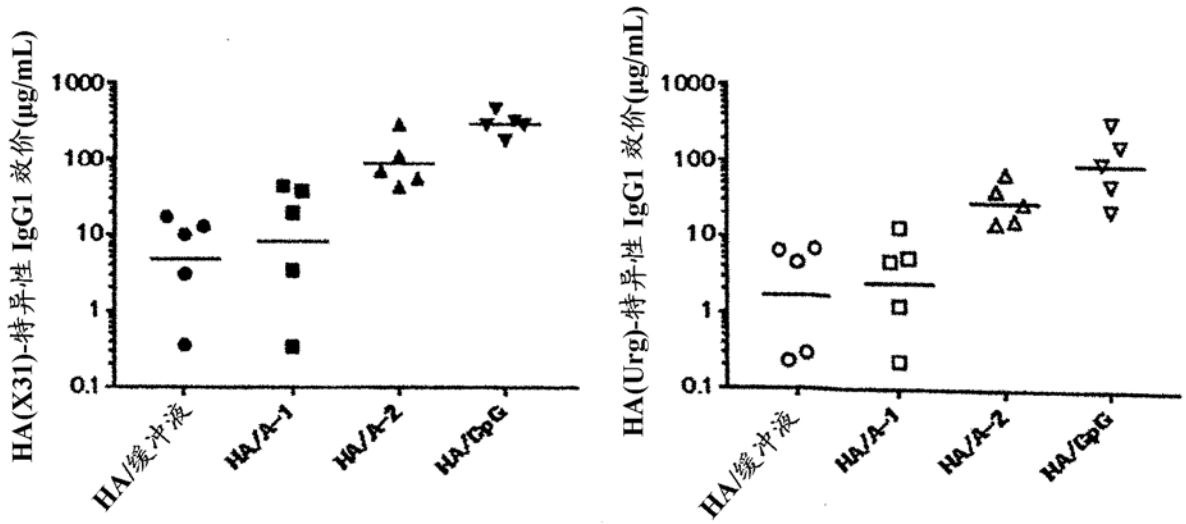

HA(X31)-特异性 IgG1 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-2
HA/CpG
HA(Urg)-特异性 IgG1 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-2
HA/CpG

图 8

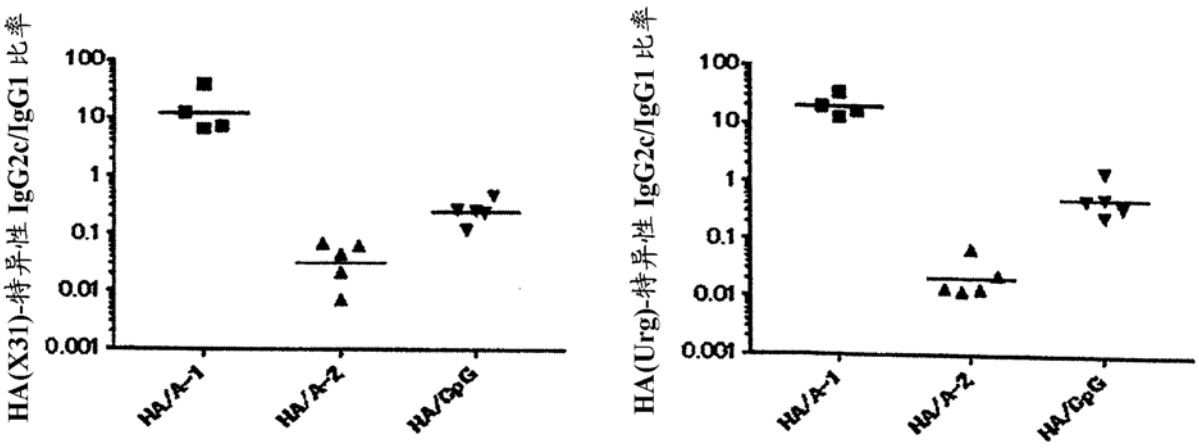

HA(X31)-特异性 IgG2c/IgG1 比率
100
10
1
0.1
0.01
0.001
HA/A-1
HA/A-2
HA/CpG
HA(Urg)-特异性 IgG2c/IgG1 比率
100
10
1
0.1
0.01
0.001
HA/A-1
HA/A-2
HA/CpG

图 9

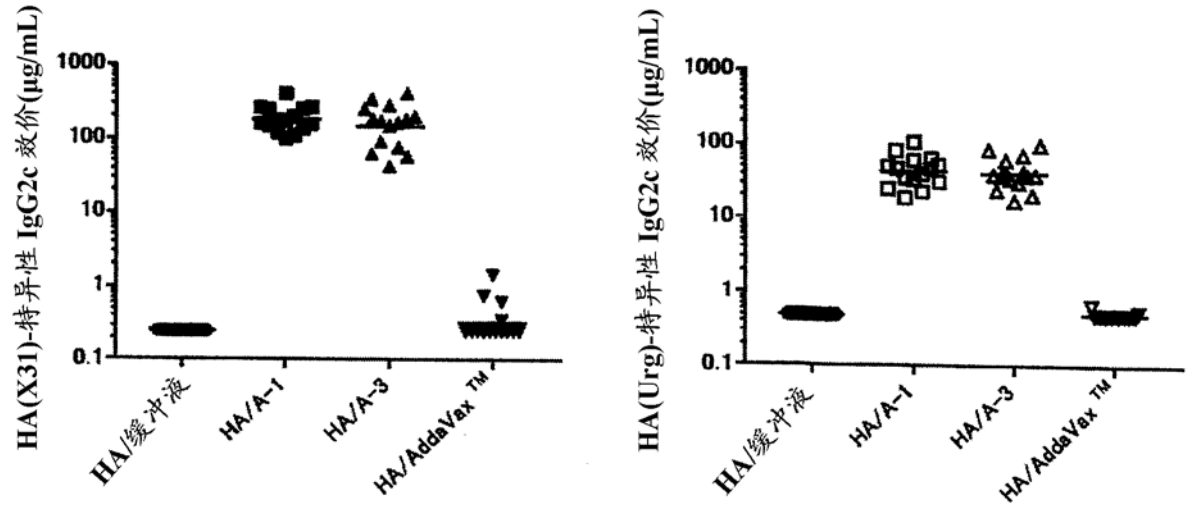

HA(X31)-特异性 IgG2c 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax™
HA(Urg)-特异性 IgG2c 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax™

图 10

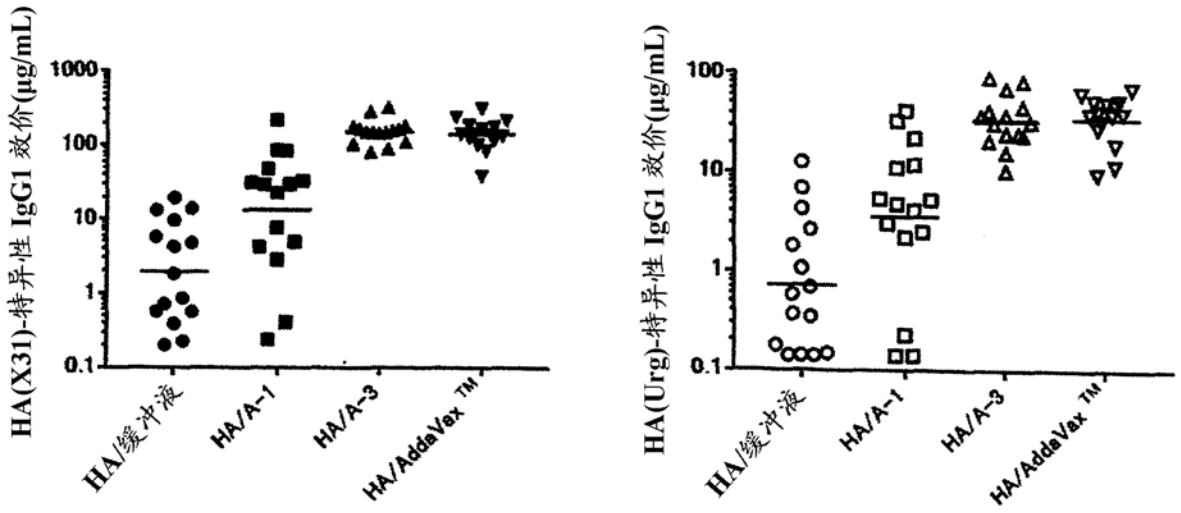

HA(X31)-特异性 IgG1 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™
HA(Urg)-特异性 IgG1 效价(μg/mL)
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™

图 11

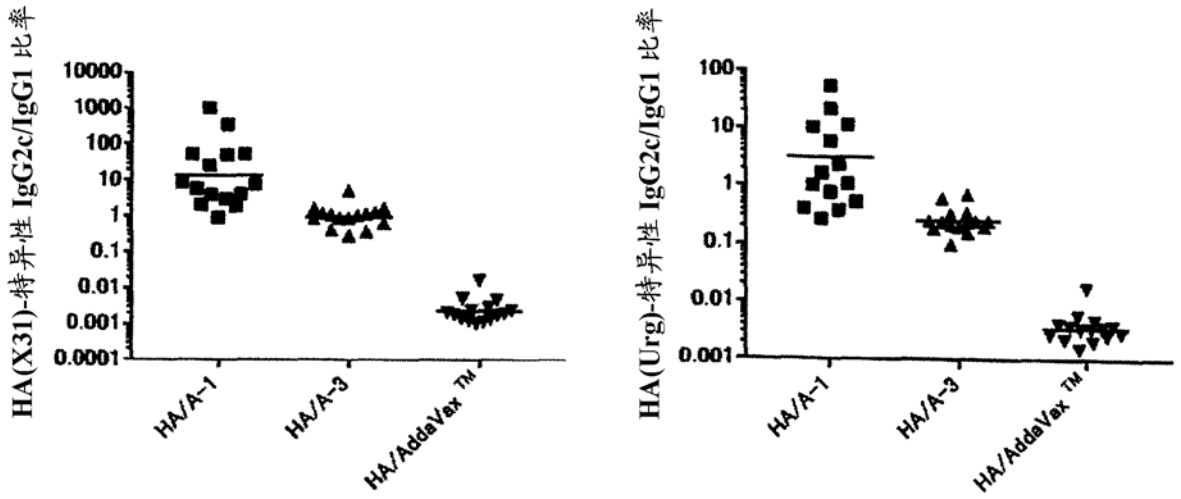

HA(X31)-特异性 IgG2c/IgG1 比率
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™
HA(Urg)-特异性 IgG2c/IgG1 比率
100
10
1
0.1
0.01
0.001
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™

图 12

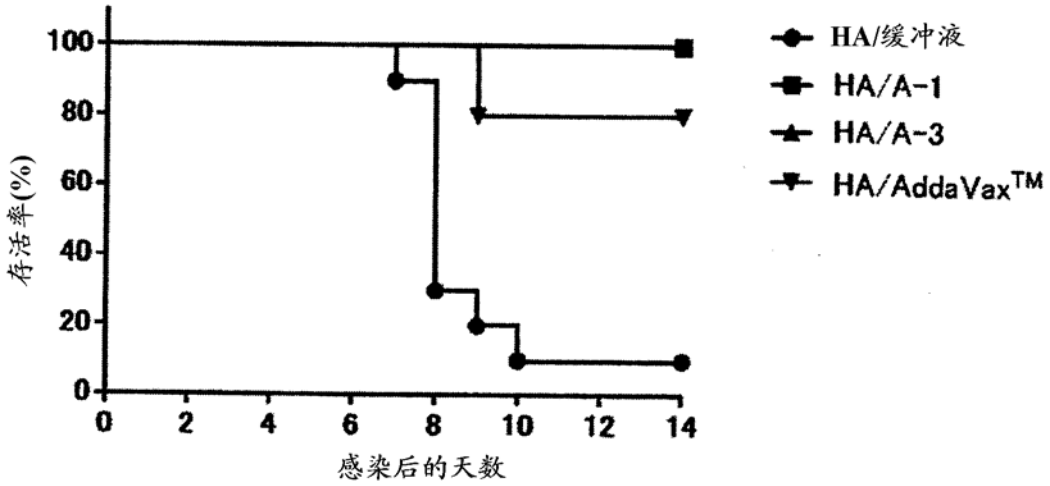

100
80
60
40
20
0
存活率(%)
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后的天数
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax™

图 13

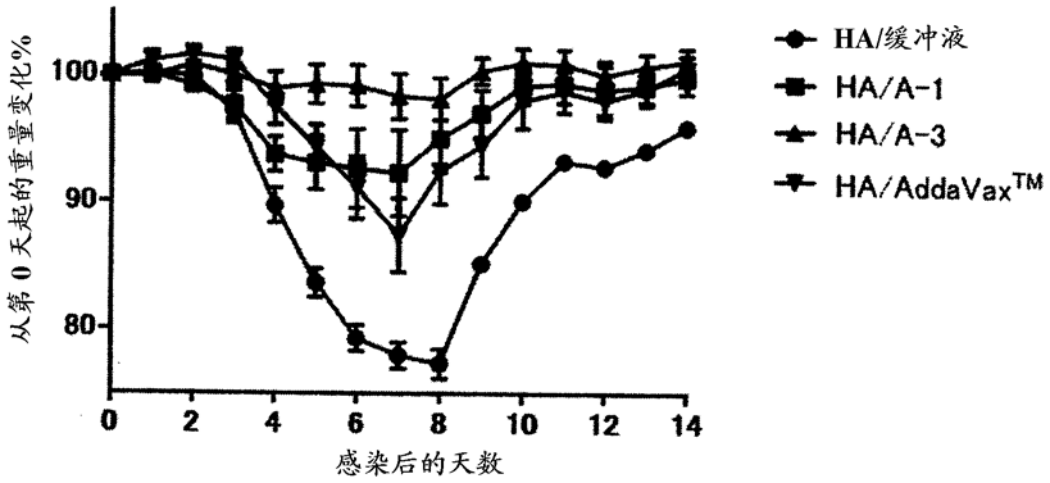

100
90
80
从第 0 天起的重量变化%
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后的天数
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax™

图 14

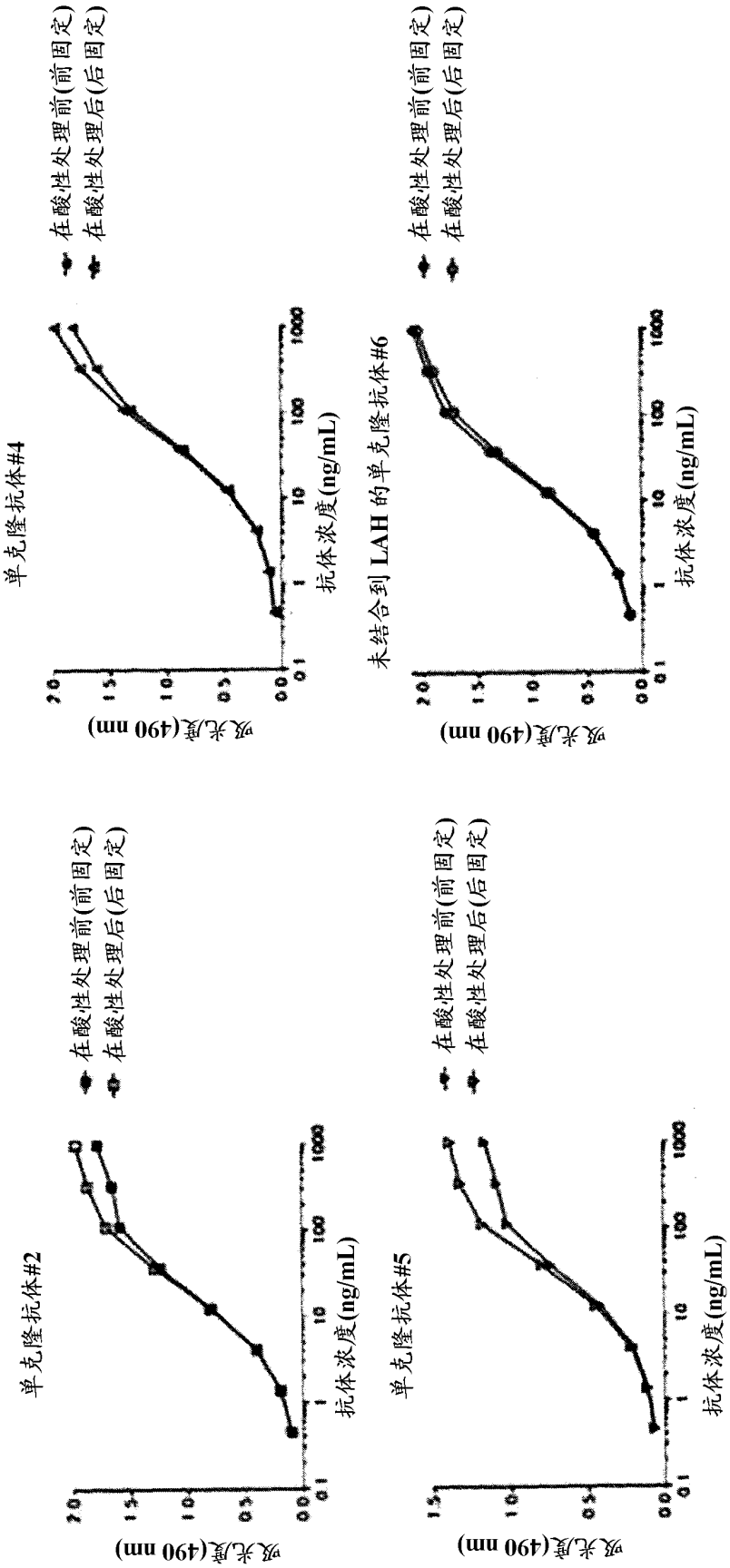

单克隆抗体#4
在酸性处理前(前固定)
在酸性处理后(后固定)
双光度(490 nm)
抗体浓度(ng/mL)
未结合到 LAH 的单克隆抗体#6
在酸性处理前(前固定)
在酸性处理后(后固定)
双光度(490 nm)
抗体浓度(ng/mL)
单克隆抗体#2
在酸性处理前(前固定)
在酸性处理后(后固定)
双光度(490 nm)
抗体浓度(ng/mL)
单克隆抗体#5
在酸性处理前(前固定)
在酸性处理后(后固定)
双光度(490 nm)
抗体浓度(ng/mL)

图 15

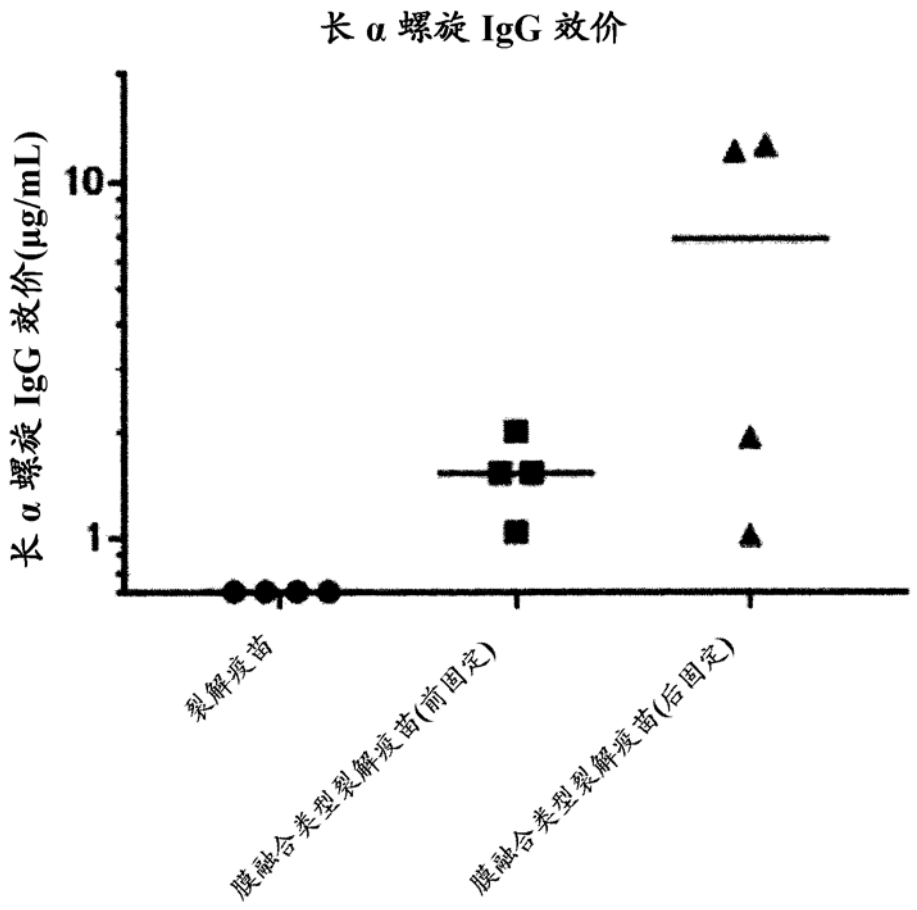

长 α 螺旋 IgG 效价
长 α 螺旋 IgG 效价(μg/mL)
10
1
裂解疫苗
膜融合类型裂解疫苗(前固定)
膜融合类型裂解疫苗(后固定)

图 16

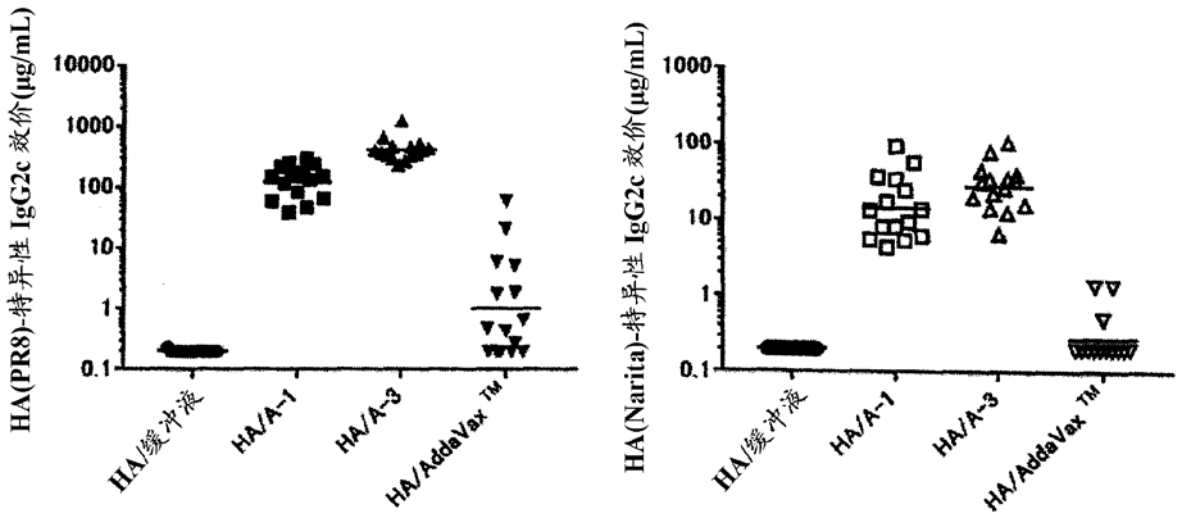

HA(PR8)-特异性 IgG2c 效价(μg/mL)
10000
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™
HA(Narita)-特异性 IgG2c 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™

图 17

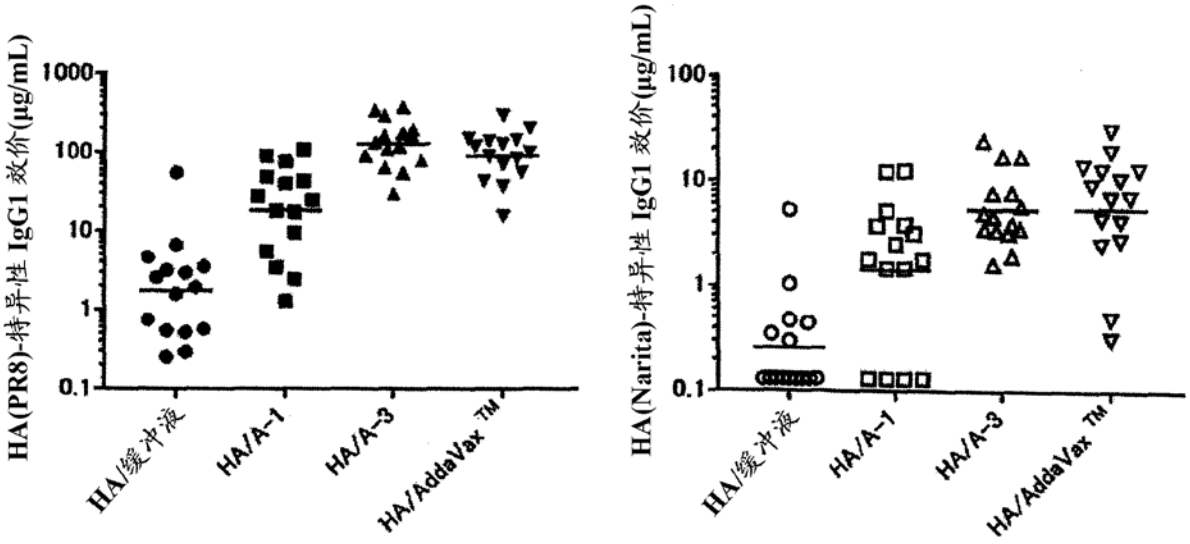

HA(PR8)-特异性 IgG1 效价(μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™
HA(Narita)-特异性 IgG1 效价(μg/mL)
100
10
1
0.1
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™

图 18

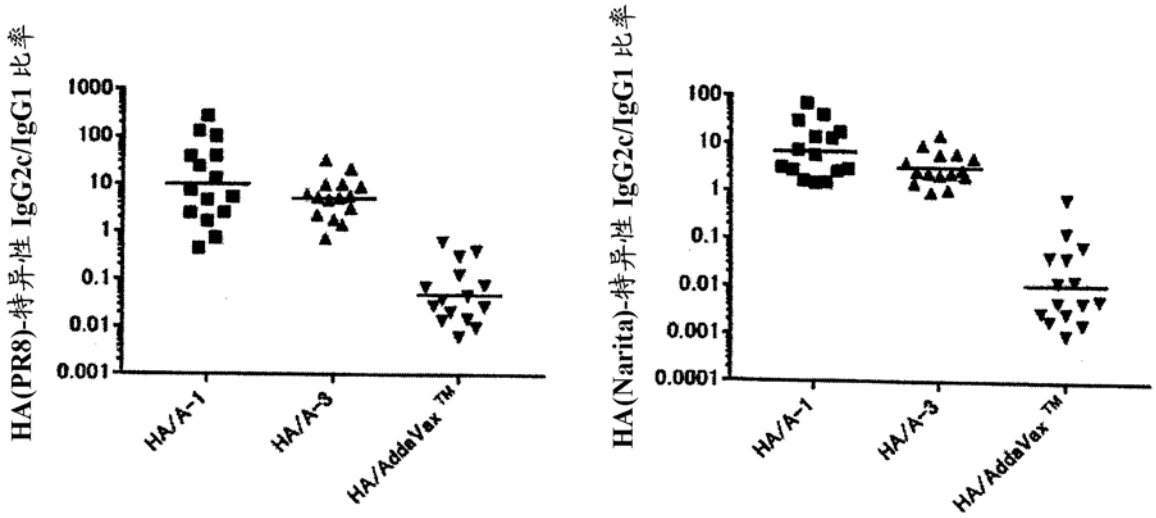

HA(PR8)-特异性 IgG2c/IgG1 比率
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™
HA(Narita)-特异性 IgG2c/IgG1 比率
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax ™

图 19

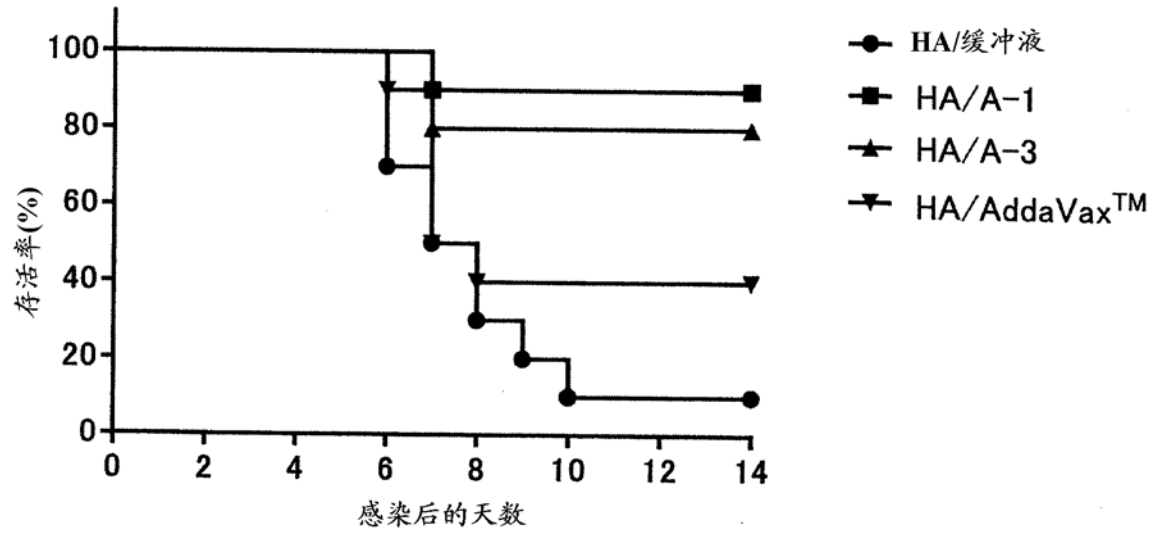

100
80
60
40
20
0
存活率(%)
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后的天数
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax™

图 20

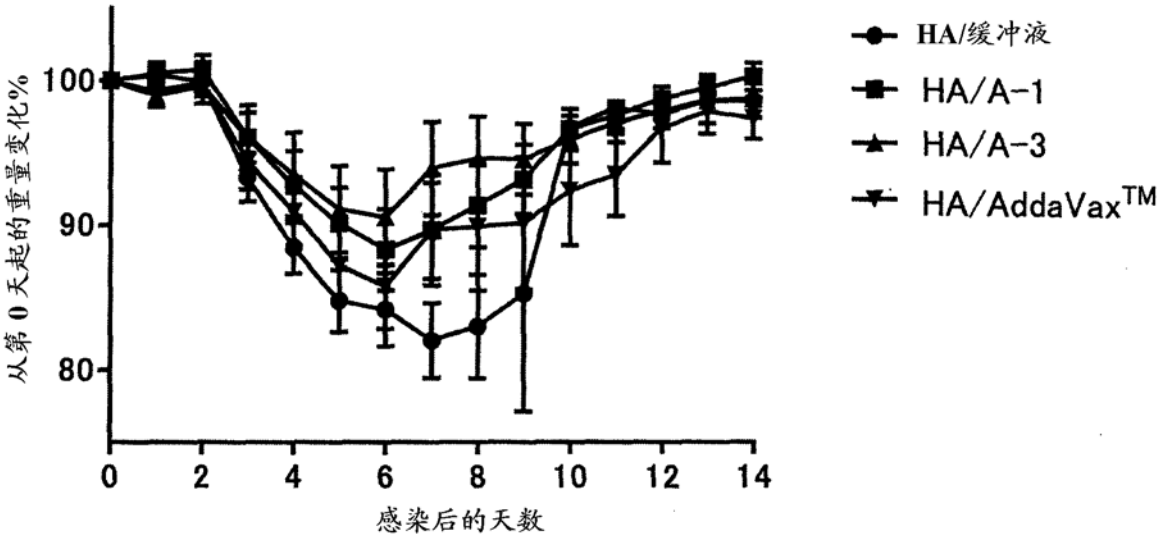

100
90
80
从第 0 天起的重量变化%
0
2
4
6
8
10
12
14
感染后的天数
HA/缓冲液
HA/A-1
HA/A-3
HA/AddaVax™

图 21