



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105939709 A

(43)申请公布日 2016.09.14

(21)申请号 201480063745.0

(22)申请日 2014.11.05

(30)优先权数据

13191742.9 2013.11.06 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/073762 2014.11.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/067632 EN 2015.05.14

(71)申请人 爱尔兰詹森科学公司

地址 爱尔兰科克郡

(72)发明人 D.M.L.克林格利尔斯 A.H.范迪克

J.门施

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 徐晶 万雪松

(51)Int.Cl.

A61K 9/16(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

A61K 47/36(2006.01)

A61K 47/38(2006.01)

A61K 31/787(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

用于治疗上呼吸道感染的聚肌苷酸-聚胞苷酸(Poly(I:C))制剂

(57)摘要

本发明涉及用于预防和/或治疗上呼吸道的病毒感染或普通感冒的组合物和一种设备,所述组合物包含聚肌苷酸-聚胞苷酸的微粒(Poly(I:C))和选自豌豆淀粉、预胶凝化马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、透明质酸盐或氨基葡萄糖的载体聚合物,所述设备优选为鼻递送系统,包含所述组合物以由有需要的患者使用以预防和/或治疗感染或所述普通感冒。

1. 一种组合物,其包含聚肌苷酸-聚胞苷酸的微粒(Poly(I:C))和选自豌豆淀粉、预胶凝化马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、透明质酸盐或氨基葡萄糖的载体聚合物。
2. 权利要求1的组合物,其中所述载体聚合物为豌豆淀粉。
3. 权利要求1或2的组合物,其中Poly(I:C)-载体-聚合物微粒借助于例如喷雾干燥方法的颗粒形成方法产生。
4. 权利要求1-3中任一项的组合物,其中Poly(I:C)/豌豆淀粉的比率为1/200 (w/w)至1/0.1 (w/w)。
5. 权利要求4的组合物,其中所述Poly(I:C)/豌豆淀粉的比率为1/12 (w/w)至1/9 (w/w)。
6. 权利要求3-5中任一项的组合物,其中所述微粒的D_{v50}的范围为0.1微米-200微米。
7. 权利要求1-6中任一项的组合物,其中所述组合物为包含有机溶剂的液体组合物。
8. 权利要求7的组合物,其中所述有机溶剂基于甘油或乙醇或其组合。
9. 根据权利要求1-8中任一项的组合物,其用于医药中。
10. 根据权利要求1-8中任一项的组合物,其用于治疗和/或预防感染或普通感冒。
11. 根据权利要求1-8中任一项的组合物用于生产用于通过鼻施用预防和/或治疗上呼吸道感染药物的用途。
12. 设备,尤其是鼻递送系统,其包含根据权利要求1-8中任一项的组合物。

用于治疗上呼吸道感染的聚肌苷酸-聚胞苷酸(Poly(I:C)) 制剂

[0001] 本发明涉及用于治疗 and/或预防感染或普通感冒的组合物和一种设备,所述组合物包含聚肌苷酸-聚胞苷酸的微粒(Poly(I:C))和选自豌豆淀粉、预胶凝化马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、透明质酸盐或氨基葡萄糖的载体聚合物,所述设备优选为鼻递送系统,包含所述组合物以由有需要的患者使用以预防和/或治疗感染或普通感冒。

[0002] 普通感冒(也称作鼻咽炎、急性病毒性鼻咽炎、急性鼻炎或感冒)为主要由病毒引起的上呼吸道系统的病毒感染疾病。

[0003] 病毒

普通感冒为上呼吸道的病毒感染。最常涉及的病毒为鼻病毒(30-50%),其是一类具有99种已知血清型的小核糖核酸病毒。其他病毒包括冠状病毒(10-15%)、流感(5-15%)、人类副流感病毒、人类呼吸道合胞体病毒、腺病毒、肠道病毒和变型肺病毒(metapneumovirus)。

[0004] 总体超过200种血清学上不同的病毒类型导致感冒。在成人感冒中特别涉及到冠状病毒。在超过30种冠状病毒之中,3或4种冠状病毒造成人类感染,但它们难以在实验室中生长且因此其有效度尚未被充分了解。由于许多不同类型的病毒及其连续突变的趋势,不可能获得对普通感冒的完全免疫。

[0005] 临床体征和症状

上呼吸道病毒的第一适应症常为喉咙溃疡或刺痛。其他常见症状为流鼻涕、充血和打喷嚏。这些有时伴随着结膜炎(红眼)、肌肉痛、疲劳、不适、头痛、虚弱或食欲不振。咳嗽和发烧通常以约80%的阳性前兆值指示流感病毒,而不是上呼吸道病毒。症状在婴儿和幼童中可能更严重,且在这些情况下,其可包括发烧和荨麻疹。上呼吸道病毒在吸烟者中也可能更严重。

[0006] 病毒复制在初次接触之后2-6小时开始。症状通常在初始感染之后2-5天开始,但有时仅仅10小时就出现。症状在症状发作之后2-3天达到峰值,而流感症状发作是经常且快速的。目前并没有缩短持续时间的已知治疗;然而,症状通常在7-10天自发地消散,一些症状可能持续长达三周。在儿童中,35-40%的病例咳嗽持续大于10天且10%的病例咳嗽持续大于25天。普通感冒是人类最频发的感染性疾病,成人平均每年感染2-4次且年龄6-12岁的儿童平均每年感染若干次。在美国,感冒的发病率在秋季(秋天)和冬季较高,大多数感染在9月至4月发生。季节效应可归因于学年的开始或人们在户内花费的时间更多(彼此较接近),从而增加了病毒传播的机会。

[0007] 传染期

普通感冒在症状的前两天到前三天期间最易传染,然而,在症状发作之前的几天也会传染并且直至症状完全消散仍然会稍微传染。

[0008] 人类鼻病毒

人类鼻病毒为小核糖核酸病毒科中的肠病毒属的成员。HRV粒子由27-30nm的由4种多肽(VP1、VP2、VP3和VP4)组成的无包膜的衣壳构成。病毒衣壳含有约7200个碱基的单链RNA基因组。病毒编码的蛋白(VPg)共价连接到RNA基因组的5'端。已经充分表征了人类鼻病毒

(HRV)感染的临床过程。HRVs可感染上下气管、鼻粘膜、窦和中耳,且感染产生“普通感冒”的症状(参见上文)。感染是自限性的且通常局限于上气管。外周白血球计数在感染的最初2-3天期间可能会升高。

[0009] HRV感染还可导致下气管感染、中耳炎(特别是在幼童中)和鼻窦炎。来自鼻病毒感染的严重并发症(例如肺炎)是罕见的且已经报道在婴儿和幼童中、特别是在具有例如支气管肺发育不良、先天性心脏病、早熟和神经病症的潜在病症的那些婴儿和幼童中以及在免疫抑制(骨髓移植接受者)成人中出现。虽然小核糖核酸病毒科的其他成员可感染中枢神经系统(即脊髓灰质炎病毒、肠病毒),但尚未报道由HRVs引起的人类中枢神经系统感染。

[0010] 治疗

尚不存在用于治疗鼻病毒感染或预防普通感冒的市售抗病毒剂。由鼻病毒引起的上呼吸道感染的治疗基于通常使用非处方药抗组胺剂、阿司匹林、咳嗽抑制剂和鼻减充血剂控制症状(打喷嚏、鼻塞、鼻溢、眼睛刺激、喉咙痛、咳嗽、头痛、发烧、寒战)。HRVs感染的更严重并发症(例如肺炎)使用医学上适当的护理标准控制。

[0011] 成本和医学需求

根据世界卫生组织的资料,去年美国报道了大于10亿例普通感冒。在美国,普通感冒每年引起 7.5×10^7 - 1×10^8 次医生出诊,每年保守的费用估计77亿美元。为了缓减症状,美国在非处方药上花费29亿美元,而在处方药上又花费4亿美元。每年估计有 2.2×10^7 - 1.89×10^8 天缺课归因于感冒。结果,父母请假 1.26×10^8 天以待在家中照看他们的孩子。当加上患感冒的职工请假 1.5×10^8 天时,感冒有关的工作损失的总经济影响每年超过200亿美元。这占工作时间损失的40%。

[0012] 气管上皮细胞是上呼吸道(URT)感染物如鼻病毒和冠状病毒的主要目标。因为这些病毒的感染在反映受感染细胞的免疫系统廓清(clearance)的症状发作之前发生,所以直接抗病毒治疗干预可能证明并不非常有效。另外,在鼻粘膜中实现并维持直接抗病毒化合物的活性水平由于其高代谢(turnover)而非常困难。另一方面,已经显示在鼻上皮细胞中利用身体本身的防御并诱发抗病毒状态的预防引起抵抗随后病毒攻击(challenge)的显著预防以及降低疾病有关的症状。

[0013] 尽管感冒仅可持续一周或两周,但是严重感冒可持续长达一个月。根据年龄和暴露,成人平均每年感冒2-3次,且儿童每年感冒6-10次。存在数百种不同血清型的感冒病毒,这使得不可能研发出将有效抵抗它们全部的标准疫苗预防方案。

[0014] 症状治疗通常涉及使用诱发睡眠的口服抗组胺剂和/或具有兴奋剂副作用的血管收缩性减充血剂。这只是不明显地有效且这些副作用常像感染本身一样使人衰弱。尽管预防将是理想的解决方案,但是出于上文提到的原因,近期非常不可能有抵抗所有不同血清型的广泛有效的疫苗的机会。因此,由于缺乏隔离措施,人们将定期暴露于这些感染物,特别是在“感冒季”期间,因此广泛有效的方便的无副作用的预防将对公众健康和工作场所的生产率具有重大影响。

[0015] 靶向先天性免疫反应,身体的“早期预警系统”将解决上述问题。存在于鼻上皮细胞中的该系统一旦受到适当刺激就会导致细胞认为它们正被病毒攻击并触发抗病毒防御反应。这一旦发生,细胞就难以控制随后的病毒攻击。尽管在二十世纪八十年代晚期已经进行了一些早期工作,但是考虑到使用例如干扰素的免疫刺激分子来触发先天性免疫反应,

生产是昂贵的且其作用难以控制。

[0016] 当前研究的目的是研发触发分子(Poly(I:C))的制剂,其可以以可测量和可控制的方式(例如每隔几天或甚至每周一次)使用以引发(prime)先天免疫系统并提供抵抗病毒感染的预防。下文概述的方法采用现有试剂Poly(I:C),已经证实了其功效,但是其不切实际,且使用制剂科学使其方便且有效。

[0017] Toll样受体3(TLR3)为在人体中由TLR3基因编码的蛋白质。TLR3为先天免疫系统的模式识别受体的Toll样受体家族的成员,其在先天免疫的病原体识别和活化方面起主要作用。TLRs从果蝇到人类高度保守且共有结构和功能相似性。它们识别在感染物上表达的病原体相关分子模式(PAMPs)并作为有效免疫性的发展所必需的细胞因子的产生的媒介。各种TLRs表现出不同的表达模式。该TLR3受体还由气管上皮细胞表达并限于白细胞的树状亚群。

[0018] TLR3识别双链RNA(dsRNA)。双链RNA为具有可在病毒复制循环期间形成的两个互补链的RNA。在识别时,TLR3诱发转录因子如NF- κ B和干扰素调节因子3(IRF3)的活化以提高向其他细胞发出信号以增加其抗病毒防御的I型干扰素的产生。

[0019] TLR3的结构形成与邻近马蹄接触的大马蹄形状,形成两个马蹄的“二聚体”。大部分TLR3蛋白表面被糖分子覆盖,使其成为糖蛋白,但在一个面(包括在两个马蹄之间的建议界面)上,存在大的无糖表面。该表面还含有富含带正电的氨基酸的两个不同斑块,其可为带负电的双链RNA的结合位点。

[0020] 聚肌苷酸-聚胞苷酸(Poly(I:C))为具有高达例如3,600,000道尔顿的MW分布的双链RNA分子。Poly(I:C)为模拟病毒RNA的Toll样受体3(TLR3)配体且为先天性免疫反应的已知兴奋剂。当经鼻施用,其诱发抗病毒蛋白质如干扰素 α 和 β 在鼻上皮组织中的表达。已经证实其降低鼻病毒感染的数目和严重性。

[0021] Poly(I:C)在正常水溶液中通常是不稳定的分子。当前,为了实现有效的治疗或预防作用,Poly(I:C)必须在使用之前快速再溶解并每2小时施用一次。为了改进患者顺应性并降低配药频率,已经研发出稳定且显示增强的功效的新制剂。

[0022] Poly(I:C)用可延长在鼻上皮组织上的停留时间并提供先天免疫系统的更有效且可控制的刺激的多种生物粘附聚合物配制。

[0023] 本发明提供可在室温下几乎无限期地储存并保持其先天免疫系统刺激活性的独特制剂的鉴定。

[0024] 本发明制剂含有水溶性载体且具有低粘度特性的优势。

[0025] 当在包含Poly(I:C)的组合物的制剂中使用豌豆淀粉时,与用于相同目的的任何其他淀粉相比较,当这种小瓶、管或设备必须用本发明的组合物填充时,这种组合物意料不到地显示出对所述小瓶、管或设备(如喷雾器)的内部的较差的粘附行为。该技术优势在于,更确切地说,可将所述Poly(I:C)的剂量施用到有需要的患者,因为较少的组合物将相应地粘到鼻喷雾设备的内侧。另外,所述制剂增强Poly(I:C)的功效并在甚至更大的TLR3刺激活性下容许频率少得多的配药。

[0026] 本发明因此涉及包含聚肌苷酸-聚胞苷酸的微粒(Poly(I:C))和选自豌豆淀粉、预胶凝化马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、透明质酸盐或氨基葡萄糖的载体聚合物的组合物。出于本发明的目的,对于透明质酸盐,优选其钠盐,而对于氨基葡萄糖,优选N-乙酰基-D-氨

基葡萄糖形式。微粒为具有0.1 μ m-100 μ m的平均粒径的颗粒。优选所述载体聚合物为从植物山黧豆属(genus Lathyrus)、更具体地从豌豆得到的淀粉。

[0027] 在所述组合物中包含的Poly(I:C)-载体-聚合物微球或同样所谓的微粒借助于例如喷雾干燥方法的颗粒形成方法产生。

[0028] 根据本发明的Poly(I:C)/豌豆淀粉的比率的范围为1/200 (w/w)至1/0.1 (w/w)，但优选为1/100 (w/w)至1/1 (w/w)且甚至更优选为1/100 (w/w)至1/5 (w/w)，而1/12至1/9 (w/w)的Poly(I:C)/豌豆淀粉的比率为最优选的。相同的范围和比率应用于根据本发明提到的其他载体。

[0029] 在根据本发明的组合物中的微粒的D_v50 (=颗粒基于体积的50%筛下累积)的范围为0.1微米-200微米，优选为1微米-50微米，更优选为2微米-40微米，甚至更优选为2微米-20微米且最优选为10微米-20微米。

[0030] 本发明的组合物还可为包含有机溶剂的液体组合物，其中所述有机溶剂基于甘油或乙醇或其组合。

[0031] 本发明的组合物可用于优选用于预防和/或治疗人类上呼吸道感染(例如称为“普通感冒”)的人类和/或动物医药中。对于动物使用，根据本发明的组合物可在例如畜栏、谷仓、鸡群等中作为气雾制剂使用。

[0032] 本发明的组合物可由患有哮喘和/或COPD (慢性阻塞性肺病, Chronic Obstructive Pulmonary Disease)的患者使用以潜在地预防和/或治疗即将出现的普通感冒症状。

[0033] 预防和/或治疗上呼吸道感染的优选方式通过鼻施用进行。

[0034] 包含聚肌苷酸-聚胞苷酸的微粒(Poly(I:C))和选自豌豆淀粉、预胶凝化马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、透明质酸盐或氨基葡萄糖的载体聚合物的本发明的组合物可用于治疗和/或预防(病毒)感染或普通感冒，其中所述组合物通过鼻应用以1天至1个月范围、更优选每隔几天或甚至每周一次的时间间隔施用。

[0035] 上述组合物可用于治疗和/或预防(病毒)感染或普通感冒，其中所述Poly(I:C)/豌豆淀粉的比率的范围为1/200 (w/w)至1/0.1 (w/w)，但优选为1/100 (w/w)至1/1 (w/w)，且甚至更优选为1/100 (w/w)至1/5 (w/w)，而最优选1/12至1/9 (w/w)的Poly(I:C)/豌豆淀粉的比率，并且在所述组合物中的微粒尺寸的范围为0.1微米-200微米，优选为1微米-50微米，更优选为2微米-40微米，甚至更优选为2微米-20微米且最优选为10微米-20微米，其中所述组合物通过鼻应用以1天至1个月范围、更优选每隔几天或甚至每周一次的时间间隔施用。

[0036] 本发明的部分还为一种设备，尤其是鼻递送系统，包含根据本发明的组合物。

[0037] 根据本发明，Poly(I:C)作为干粉配制以便鼻施用。为了改进稳定性，Poly(I:C)自含有豌豆淀粉和Poly(I:C)的水性混合物喷雾干燥。

[0038] 认为淀粉具有双重功能：(1) 在鼻中充当生物-粘附剂，和(2) 用作使Poly(I:C)稳定化的保护性基质。淀粉，特别是豌豆淀粉，为用于鼻应用的优选赋形剂，因为积聚通过经淀粉酶降解而防止。

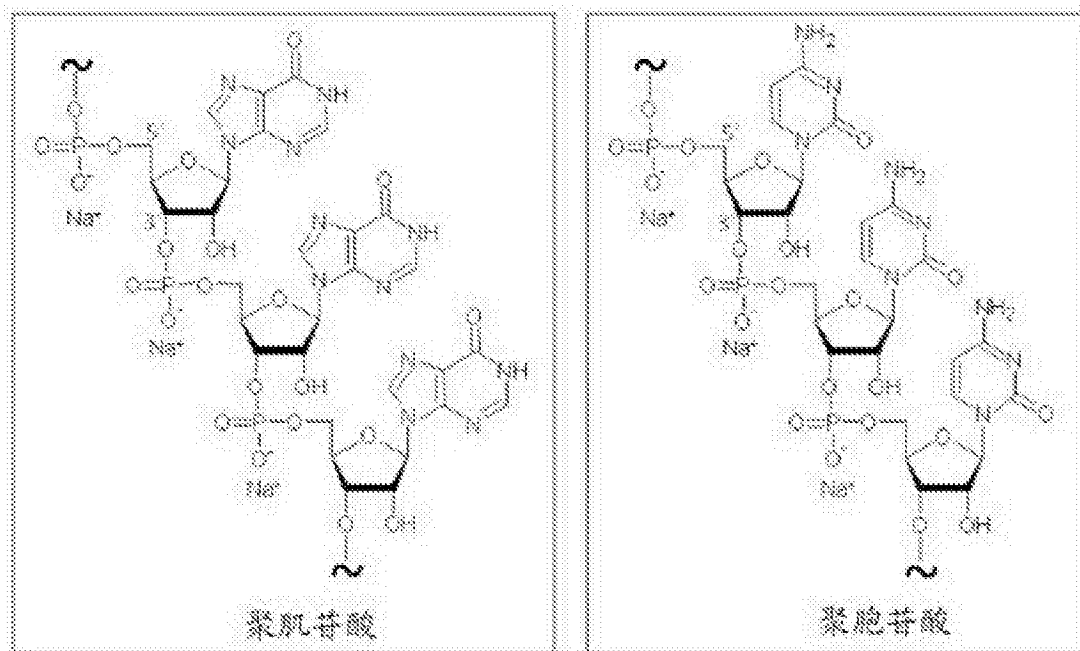
[0039] 具有高支链淀粉含量或具有化学改性淀粉的淀粉表现出良好的粘膜-粘附性。具体地讲，将预胶凝化糯质玉米淀粉(高支链淀粉)和羟丙基预胶凝化豌豆淀粉(化学改性)用

于本发明中,因为这些淀粉为冷水溶胀的且含有冷水可溶组分,当在低剪切下与Poly(I:C)混合时产生均质的分散体。所得淀粉分散体具有低至中等的粘度,其允许喷雾干燥成均质粉末。

[0040] 鼻施用优选使用单剂量鼻粉末设备(由Aptar Pharma Germany供应的单位剂量设备)实现。所述单位剂量设备为主动递送系统,是指患者不必吸入且进行是患者独立的。配药通过启动进行,其通过超压控制。每喷烟的剂量由在喷雾干燥粉末中Poly(I:C)的浓度和放出的粉末重量决定。所述粉末将使用用于每喷烟的新设备施用到各鼻孔中。

[0041] 如上所提,Poly(I:C)为由肌苷酸和胞苷酸钠盐的反平行聚核苷酸链构成的合成双链RNA。所述链通过在肌苷和胞嘧啶碱基之间形成的氢键非共价结合。

[0042] Poly(I:C)的平均链长为300–6,000个碱基对,这对应于约180,000–约3,600,000道尔顿。分子式为 $(C_{10}H_{10}N_4NaO_7P)_x \cdot (C_9H_{11}NaN_3O_7P)_x$ 。



[0043] 上述Poly(I:C)可以购得,但任选也可使用例如以下程序室内制造。

[0044] 复式产物Poly(I:C)由单种均聚物聚肌苷(I)和聚胞啶(C)生产。Poly I和Poly C通过多核苷酸磷酸化酶(PNPase)存在下单独聚合核苷二磷酸肌苷和胞啶来合成。各核苷二磷酸通过PNPase单独聚合20–24小时以控制所得核糖核酸聚合物的长度。随后加入酶蛋白激酶以终止聚合反应。使所得均聚物(即单链RNA分子)水解以将各聚合物产物的分子量范围控制在特定范围内。水解产物用乙醇处理以使单链RNA分子(ssRNA)从溶液中沉淀。将沉淀物从上清液中分离并溶解于水中。随后将ssRNA的溶液过滤以除去颗粒,超滤以除去低分子量污染物且随后冻干。单独试验冻干的ssRNA产物的纯度、分子量及其他质量特性,以确保产物在规定内。

[0045] 将单种单链均聚物(Poly I和Poly C)单独溶解于0.015M氯化钠中且随后合并以使形成双链复式产物(Poly I:Poly C)的链退火。在混合之后,过滤所得溶液。将滤液超滤以除去低分子量污染物。随后将超滤的产物冻干。将所得复式产物在–20℃下储存。试验冻干的dsRNA产物的纯度、分子量及其他质量特性,以确保产物在规定内。

[0046] 材料和方法

用载体聚合物喷雾干燥Poly(I:C)

用选自豌豆淀粉、预胶凝化马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、透明质酸盐或氨基葡萄糖的根据本发明的载体的喷雾干燥方法在Buchi B290 Mini喷雾干燥器(Buchi, Flawil, Switzerland)上进行。脱矿物水使用0.2微米醋酸纤维素过滤器(Whatman FP30/0.2 CA-S)过滤并加到玻璃烧瓶中。在使用磁力搅拌器搅拌的同时,加入赋形剂。当完全溶解时,将Poly(I:C)加到所述溶液中。应用0.5% (w/w)的总固体浓度和1/9(w/w)的Poly(I:C)/赋形剂比率。

[0047] 另外的Poly(I:C)-豌豆淀粉的喷雾干燥

喷雾干燥方法在Buchi B290 Mini喷雾干燥器(Buchi, Flawil, Switzerland)上进行。将无核酸酶的水加到玻璃烧杯中并在使用Ultra Turax T25 (Janke & Kunkel)混合的同时加入豌豆淀粉,直至淀粉完全分散。将Poly(I:C)溶解于无核酸酶的水中并在磁力搅拌器上搅拌直至Poly(I:C)完全溶解。将溶解的Poly(I:C)加到分散的豌豆淀粉中并在室温下搅拌,正好在喷雾干燥之前制备Poly(I:C)溶液。应用4.5%(w/w)、10%(w/w)或20%(w/w)的总固体浓度和1/12 (w/w)的Poly(I:C)/豌豆淀粉比率。

[0048] 溶液借助于蠕动泵进料到喷雾干燥器的顶部的两液喷嘴(直径:0.7mm)中。喷雾干燥器以并流氮流模式操作。喷雾干燥的颗粒在连接到旋风分离器(cyclone)的储集器中收集。在收集颗粒之后,将玻璃圆筒和旋风分离器冷却到室温。将收集的粉末转移到棕色玻璃瓶且将该瓶置于铝蒸气封袋中。将小瓶在室温下储存。

[0049] 将相同的上述方法用于喷雾干燥根据本发明的其他载体,其中应用1/9的Poly(I:C)/载体比率。

[0050] 扫描电子显微镜法

将样品用具有直径 $\pm 30-50\text{nm}$ 的金色颗粒溅射。图像使用具有Everhart Thornley检测器的FEI扫描电子显微镜-Quanta 200F型产生。

[0051] 水含量-费歇尔滴定法(Karl Fischer titration)

方案的水含量借助于直接体积费歇尔滴定法测定。使用KF TITRATOR V30 (Mettler Toledo, US)。将粉末(50-100mg)转移到含有Hydranal® Methanol Dry (Sigma Aldrich)的滴定容器并搅拌300秒。滴定使用5ml滴定管用浓度为2mg/ml的Hydranal® Composite 2 (Sigma Aldrich)进行。为了终止,应用15 $\mu\text{g}/\text{min}$ 的停止漂移(stop drift)。一式三份地分析样品。

[0052] 粒径的测定

存在仅基于目标产物的体积分布评价粒径分布数据的倾向。由此,常将所述评价限于 D_{v10} 、 D_{v50} 和 D_{v90} 筛下累积的比较。

[0053] 然而,比较 d_{vx} 筛下累积未必始终是简单的,这归因于不同技术和仪器易于产生不同结果的事实。

[0054] 另外,通过从对于数据的不同观点来看(即使用其他参数),可从粒径(或形状)分布数据得到更多信息。

[0055] 为了测定粒径分布,使用激光衍射试验方法。

[0056] 分析在装备有Hydro2000S湿润分散模块(或等效系统)的Malvern Mastersizer 2000激光衍射仪上进行。所述仪器以蓝光ON检测模式在20nm-2mm的尺寸范围下使用。

[0057] 制剂在流感小鼠模型中的体内试验

所有动物研究都经过伦理委员会支持并根据国家和国际准则进行。使用8-12周龄的雌性瑞士小鼠(Janvier)。所有鼻内治疗都在异氟烷麻醉下进行。为了施用一定量的液体,将液滴直接应用在鼻孔的顶部且通过闭上嘴,让液滴经鼻孔进入鼻腔。正好在各实验之前新鲜地制备喷雾干燥的Poly(I:C)-载体粉末并在15 μ l液体中施用。未配制的Poly(I:C)在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中以1mg/ml的浓度施用。预处理通常在攻击前2天或3天进行。小鼠在第0天用10 $\times$ LD₉₀小鼠适应的H1N1 PR (FLU PR 1600517)以25 μ l攻击(高体积攻击)或用1 $\times$ LD₉₀以15 μ l攻击(低体积攻击)。在攻击之后,通过测量体重和行为每日监测小鼠历时14天,当与攻击日相比失重>20%时或在其行为显示出严重的疾病迹象时将小鼠安乐死。