



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103405764 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201310356488. 7

A61P 37/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 12. 12

### (30) 优先权数据

0525321. 6 2005. 12. 13 GB

0609902. 2 2006. 05. 18 GB

0620337. 6 2006. 10. 12 GB

0620336. 8 2006. 10. 12 GB

### (62) 分案原申请数据

200680047139. 5 2006. 12. 12

(71) 申请人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

(72) 发明人 P. 范德帕佩利耶

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 李波 孟慧岚

(51) Int. Cl.

A61K 39/39 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书78页 附图26页

### (54) 发明名称

包含皂苷佐剂的疫苗组合物

### (57) 摘要

本发明涉及包含皂苷佐剂的疫苗组合物。具体地,本发明提供了人类剂量的免疫原性组合物,包含与佐剂组合的抗原或抗原制剂,该佐剂包含以脂质体形式存在的来源于南美皂皮树的树皮的免疫活性皂苷级分和脂多糖,其中所述皂苷级分和所述脂多糖都以低于 30  $\mu$ g 的水平存在于所述人类剂量中。本发明进一步提供了人类剂量合适体积的佐剂组合物,包含 1-30  $\mu$ g 脂多糖和以脂质体形式存在的 1-30  $\mu$ g 免疫活性皂苷级分。

1. 适于人类使用的剂量体积的免疫原性组合物, 包含与佐剂组合的抗原或抗原性制剂, 所述佐剂包含免疫活性皂苷级分和脂多糖, 所述皂苷级分来源于南美皂皮树的树皮并以脂质体形式存在, 其中所述皂苷级分和所述脂多糖都以低于  $30\ \mu\text{g}$  的水平存在于所述人类剂量中。

2. 权利要求 1 的免疫原性组合物, 其中所述佐剂组合物进一步包含甾醇, 其中皂苷 : 甾醇的比是  $1 : 1-1 : 100\text{w/w}$ 。

3. 权利要求 2 的免疫原性组合物, 其中皂苷 : 甾醇的比是  $1 : 1-1 : 10\text{w/w}$ 。

4. 权利要求 2 的免疫原性组合物, 其中皂苷 : 甾醇的比是  $1 : 1-1 : 5\text{w/w}$ 。

5. 权利要求 1-4 的任一项的免疫原性组合物, 其中所述免疫活性皂苷级分是 QS21。

6. 权利要求 2-5 的任一项的免疫原性组合物, 其中所述甾醇是胆固醇。

7. 前述任一项权利要求的免疫原性组合物, 其中所述脂多糖是脂质 A 衍生物。

8. 权利要求 7 的免疫原性组合物, 其中所述脂质 A 衍生物是 3D-MPL。

9. 权利要求 7 或 8 的免疫原性组合物, 其中 QS21 : 3D-MPL 的比是  $1 : 1$ 。

10. 权利要求 1-9 的任一项的免疫原性组合物, 进一步包含载体。

11. 前述任一项权利要求的免疫原性组合物, 其中所述脂多糖以  $1-30\ \mu\text{g}$  的量存在。

12. 权利要求 11 的免疫原性组合物, 其中所述脂多糖以  $25\ \mu\text{g}$  的量存在。

13. 权利要求 11 的免疫原性组合物, 其中所述脂多糖以  $1-15\ \mu\text{g}$  的量存在。

14. 权利要求 13 的免疫原性组合物, 其中所述脂多糖以  $10\ \mu\text{g}$  的量存在。

15. 权利要求 13 的免疫原性组合物, 其中所述脂多糖以  $5\ \mu\text{g}$  的量存在。

16. 权利要求 11-15 的任一项的免疫原性组合物, 其中所述脂多糖是脂质 A 衍生物。

17. 权利要求 16 的免疫原性组合物, 其中所述脂质 A 衍生物是 3D-MPL。

18. 前述任一项权利要求的免疫原性组合物, 其中所述皂苷以  $1-25\ \mu\text{g}$  的量存在。

19. 权利要求 18 的免疫原性组合物, 其中所述皂苷以  $25\ \mu\text{g}$  的量存在。

20. 权利要求 18 的免疫原性组合物, 其中所述皂苷以  $1-10\ \mu\text{g}$  的量存在。

21. 权利要求 20 的免疫原性组合物, 其中所述皂苷以  $10\ \mu\text{g}$  的量存在。

22. 权利要求 20 的免疫原性组合物, 其中所述皂苷以  $5\ \mu\text{g}$  的量存在。

23. 权利要求 18-22 的任一项的免疫原性组合物, 其中所述免疫活性皂苷级分是 QS21。

24. 前述任一项权利要求的免疫原性组合物, 其中所述适于人类使用的剂量体积是  $0.5-1.5\text{ml}$ 。

25. 权利要求 24 的免疫原性组合物, 其中所述剂量体积是  $0.5\text{ml}$ 。

26. 权利要求 24 的免疫原性组合物, 其中所述剂量体积是  $0.7\text{ml}$ 。

27. 权利要求 24 的免疫原性组合物, 其中所述剂量体积是  $1.0\text{ml}$ 。

28. 以适用于人类剂量的免疫原性组合物的体积存在的佐剂组合物, 包含  $1-30\ \mu\text{g}$  脂多糖和  $1-30\ \mu\text{g}$  以脂质体形式存在的免疫活性皂苷级分。

29. 权利要求 28 的佐剂组合物, 其中所述脂多糖是脂质 A 衍生物。

30. 权利要求 29 的佐剂组合物, 其中所述脂质 A 衍生物是 3D-MPL。

31. 权利要求 28-30 的任一项的佐剂组合物, 其中所述免疫活性皂苷级分是 QS21。

32. 权利要求 28-31 的任一项的佐剂组合物, 其中所述脂多糖和所述免疫活性皂苷级分以相同量存在于佐剂组合物中。

33. 权利要求 28-32 的任一项的佐剂组合物,其中所述适用于人类剂量的体积是 250  $\mu$  l。

34. 权利要求 28-32 的任一项的佐剂组合物,其中所述适用于人类剂量的体积是 360  $\mu$  l。

35. 权利要求 28-34 的任一项的佐剂组合物,其中所述脂多糖以 25  $\mu$  g 的量存在。

36. 权利要求 28-34 的任一项的佐剂组合物,其中所述脂多糖以 10  $\mu$  g 的量存在。

37. 权利要求 28-34 的任一项的佐剂组合物,其中所述脂多糖以 5  $\mu$  g 的量存在。

38. 权利要求 28-37 的任一项的佐剂组合物,其中所述免疫活性皂苷以 25  $\mu$  g 的量存在。

39. 权利要求 28-37 的任一项的佐剂组合物,其中所述免疫活性皂苷以 10  $\mu$  g 的量存在。

40. 权利要求 28-37 的任一项的佐剂组合物,其中所述免疫活性皂苷以 5  $\mu$  g 的量存在。

41. 权利要求 1-27 的任一项的免疫原性组合物,其中所述抗原或抗原性制剂来源于水痘-带状疱疹病毒 (VZV)。

42. 权利要求 1-27 的任一项的免疫原性组合物,其中所述抗原或抗原性制剂来源于肺炎链球菌。

43. 权利要求 1-27 的任一项的免疫原性组合物,其中所述抗原或抗原性制剂来源于巨细胞病毒 (CMV)。

44. 权利要求 1-27 的任一项的免疫原性组合物,其中所述抗原或抗原性制剂来源于恶性疟原虫。

45. 权利要求 1-27 的任一项的免疫原性组合物,其中所述抗原或抗原性制剂来源于流感病毒。

46. 权利要求 1-27 的任一项的免疫原性组合物,其中所述抗原或抗原性制剂来源于人乳头瘤病毒 (HPV)。

47. 免疫原性组合物,包含与佐剂组合物组合的流感病毒或其抗原性制剂,所述佐剂组合物包含以脂质体形式存在的免疫活性皂苷。

48. 权利要求 47 的免疫原性组合物,其中所述佐剂进一步包含脂质 A 衍生物。

49. 权利要求 48 的免疫原性组合物,其中所述脂质 A 衍生物是 3D-MPL。

50. (a) 抗原或其抗原性制剂和 (b) 权利要求 1-49 的任一项定义的佐剂在制备免疫原性组合物中的用途,所述免疫原性组合物用于诱导人类的以下至少一种或至少两种或全部应答:(i) 改进的针对所述抗原或其抗原性制剂的 CD4T- 细胞免疫应答,(ii) 改进的针对所述抗原或其抗原性制剂的体液免疫应答,(iii) 改进的针对所述抗原或其抗原性制剂的 B- 记忆细胞应答。

51. 接种方法,包括给有需要的个体或群体送递抗原或抗原性组合物,和权利要求 1-49 的任一项定义的佐剂。

52. 权利要求 50 或 51 的用途或方法,所述用途或方法是用于老年人或免疫受损的人类个体或群体。

53. 权利要求 50-52 的任一项的用途或方法,其中所述免疫原性组合物的施用诱导改进的 CD4T 细胞免疫应答和改进的 B- 记忆细胞应答。

54. 权利要求 50-53 的任一项的用途或方法,其中所述 CD4T- 细胞免疫应答涉及诱导交叉反应性 CD4T 辅助细胞应答。

55. 权利要求 50-54 的任一项的用途或方法,其中所述体液免疫应答涉及诱导交叉反应性体液免疫应答。

56. 权利要求 50-55 的任一项的用途或方法,其中所述目标群体是超过 65 岁的老年人。

57. 权利要求 50-56 的任一项的用途或方法,用于提供抗病原体引起的感染或疾病的保护作用,所述病原体是免疫原性组合物中的抗原所来源的病原体的变体。

58. 权利要求 50-56 的任一项的用途或方法,用于提供抗病原体引起的感染或疾病的保护作用,所述病原体包含抗原,所述抗原是免疫原性组合物中的抗原的变体。

59. 权利要求 57 或 58 的任一项的用途或方法,其中再次接种后的免疫应答是以下任意一种或两种或全部:改进的针对所述抗原或抗原性制剂的 CD4 应答、改进的体液应答或改进的 B 细胞记忆应答。

60. 权利要求 57 或 58 的用途或方法,其中所述保护作用是通过受感染个体或群体的体温而评估的。

61. 权利要求 1-60 的任一项的组合物、用途或方法,其中所述免疫原性组合物包含具有 CD4T 细胞表位的抗原。

62. 权利要求 1-60 的任一项的组合物、用途或方法,其中所述免疫原性组合物包含具有 B 细胞表位的抗原。

63. 一种抗原在制备免疫原性组合物中的用途,所述免疫原性组合物用于再次接种以前用抗原或抗原性组合物或其片段或变体和权利要求 1-49 的任一项所定义的佐剂接种过的个体。

64. 权利要求 63 的用途,其中所述用于再次接种的抗原与用于前一次接种的抗原或抗原性组合物具有共同的 CD4T- 细胞表位。

65. 权利要求 63 或 64 的用途,其中所述用于再次接种的抗原或抗原性组合物是含有佐剂的。

66. 权利要求 65 的用途,其中所述佐剂如权利要求 1-49 的任一项所定义。

67. 权利要求 1-27 的任一项的人类剂量的免疫原性组合物,用于医药。

68. 权利要求 1-67 的任一项的组合物、用途或方法,其中所述抗原或抗原性制剂来源于选自下组的生物:流感病毒、HPV、CMV、VZV、肺炎链球菌、恶性疟原虫、间日疟原虫、呼吸道合胞病毒(RSV)。

69. 权利要求 68 的组合物、用途或方法,其中所述流感抗原选自:分裂流感病毒、纯化的完整流感病毒、亚基流感病毒及其抗原性制剂。

70. 权利要求 69 的组合物、用途或方法,其中所述流感病毒或其抗原性制剂来自至少两种流感病毒株。

71. 权利要求 70 的组合物、用途或方法,其中所述流感病毒或其抗原性制剂来自至少三种流感病毒株。

72. 权利要求 71 的组合物、用途或方法,其中所述流感病毒或其抗原性制剂来自至少四种流感病毒株。

73. 权利要求 69-72 的任一项的组合物、用途或方法,其中所述流感病毒的至少一种株

或其抗原性制剂与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的可能。

74. 权利要求 73 的组合物、用途或方法,其中所述所述流感病毒的至少两种株或其抗原性制剂与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的可能。

75. 权利要求 74 的组合物、用途或方法,其中所述所述流感病毒的至少三种株或其抗原性制剂与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的可能。

76. 权利要求 73-75 的任一项的组合物、用途或方法,其中所述至少一种、至少两种、至少三种大流行流感病毒株选自:H5N1、H9N2、H7N7 和 H2N2。

77. 权利要求 68-76 的任一项的组合物、用途或方法,其中所述流感病毒或其抗原性制剂含有每流感病毒株 1-15  $\mu$ g HA。

78. 权利要求 68-76 的任一项的组合物、用途或方法,其中所述流感病毒或其抗原性制剂含有每流感病毒株少于 15  $\mu$ g HA。

79. 权利要求 77 或 78 的组合物、用途或方法,其中所述流感病毒或其抗原性制剂含有每株 2.5-7.5  $\mu$ g HA。

80. 权利要求 51-53 的任一项的用途或方法,其中所述用于再次接种的流感病毒或其抗原性制剂来自至少两种不同的流感病毒株。

81. 权利要求 80 的用途或方法,其中用于再次接种的流感病毒或其抗原性制剂来自至少三种不同的流感病毒株。

82. 权利要求 57-59 的任一项的用途或方法,其中用于再次接种的流感病毒或其抗原性制剂含有至少一种与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的可能的流感病毒株。

83. 权利要求 82 的用途或方法,其中所述大流行株选自 H5N1、H9N2、H7N7 和 H2N2。

84. 权利要求 57-59 和 80-83 的任一项的用途或方法,其中第一次接种是用含有可能导致大流行爆发的流感病毒株的流感组合物进行的,再次接种是用含有循环大流行株的流感组合物进行的。

85. 权利要求 57-59 和 80-84 的任一项的用途或方法,其中所述流感抗原或其抗原制剂是每剂少于 15  $\mu$ g HA 抗原。

86. 权利要求 68-85 的任一项的用途或方法,其中所述流感抗原或其抗原性制剂来源于卵或来源于细胞培养物。

87. 权利要求 86 的组合物、用途或方法,其中所述 HPV 抗原与癌症或生殖器疣相关。

88. 权利要求 68 的组合物、用途或方法,其中所述癌症相关 HPV 是 16 型 HPV 和 / 或 18 型 HPV。

89. 权利要求 88 的组合物、用途或方法,其中与 HPV16 和 / 或 18 抗原一起使用一种或多种来自致癌 HPV 类型的额外抗原,所述抗原选自以下 HPV 类型:HPV31、45、33、58 和 52。

90. 权利要求 88 或 89 的组合物、用途或方法,其中所述抗原是病毒样颗粒 (VLPs) 的形式。

91. 权利要求 90 的组合物、用途或方法,其中所述 VLPs 是 L1VLPs。

## 包含皂苷佐剂的疫苗组合物

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 12 月 12 日的中国专利申请 200680047139.5 “包含皂苷佐剂的疫苗组合物”的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及改进的疫苗组合物、制备它们的方法,以及它们在医学中的用途。具体地,本发明涉及含佐剂的疫苗组合物,其中所述佐剂是脂质体制剂,包含皂苷和脂多糖。本发明进一步涉及流感疫苗制剂和用于进行抗流感疾病免疫的免疫方案。

### 背景技术

[0003] 总是需要具有改进的免疫原性的新组合物或疫苗。作为一种策略,已经用佐剂尝试和改进针对任何给定抗原产生的免疫应答。

[0004] 脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性细菌外膜的外小叶的主要表面分子,并且只存在于所述外小叶中。LPS 通过血清补体和吞噬细胞阻止细菌破坏,并且参与用于集群的粘附。LPS 是一组结构上相关的复杂分子,大小是大约 10,000 道尔顿,并且由三个共价连接的区域组成:

[0005] (i) 外部区域的 O- 特异性多糖链 (O- 抗原)

[0006] (ii) 核心寡糖中心区

[0007] (iii) 最内部的区域,其作为疏水性锚,包含携带长链脂肪酸的糖胺二糖单元。

[0008] 已经证明 LPS 的生物活性,例如致死毒性、致热性和佐剂性,与脂质 A 部分相关。相反,免疫原性与 O- 特异性多糖成分 (O- 抗原) 相关。长期以来,已知 LPS 和脂质 A 都具有强佐剂作用,但这些分子的高毒性排除了将它们用于疫苗制剂。因此,为了减少 LPS 或脂质 A 的毒性而保持它们的佐剂性,进行了显著努力。

[0009] 1966 年,从亲本 (光滑) 菌株的培养物分离了明尼苏达沙门氏菌突变体 R595 (Luderitz 等,1966Ann. N. Y. Acad. Sci. 133 :349-374)。筛选了选择的菌落对一组噬菌体的裂解的易感性,仅仅选择了展示出窄范围敏感性 (仅仅对一种或两种噬菌体易感) 的那些菌落进行进一步研究。该努力导致分离了深粗糙 (deep rough) 突变菌株,其是 LPS 生物合成缺陷的,并且称作明尼苏达沙门氏菌 R595。

[0010] 与其它 LPS 相比,由突变体明尼苏达沙门氏菌 R595 产生的那些具有相对简单的结构。

[0011] (i) 它们不含 O- 特异性区 - 这是导致从野生型光滑表型转变为突变的粗糙表型并且导致失去毒力的特征

[0012] (ii) 核心区非常短 - 该特征增加菌株对多种化学物质的易感性

[0013] (iii) 脂质 A 部分由最多 7 个脂肪酸进行高度酰化。

[0014] 4' - 单磷酸脂质 A (MPL) 可以通过从革兰氏阴性细菌的深粗糙突变株提取的 LPS 的酸水解获得,其保留 LPS 的佐剂特性,同时证明毒性减少超过 1000 的因数 (由鸡胚卵中的致死剂量测量) (Johnson 等,1987Rev. Infect. Dis. 9Suppl :S512-S516)。LPS 典型地在

中等强度的无机酸溶液（如 0.1M HCl）中回流大约 30 分钟。该过程导致在 1 位的去磷酸化，和在 6' 位的去糖化，产生 MPL。

[0015] 3-O-脱酰基单磷酸脂质 A (3D-MPL) 可以通过 MPL 的温和碱水解获得，其具有进一步减少的毒性，同时也保持佐剂性。参见 US4, 912, 094 (Ribi Immunochemicals)。碱水解典型地在有机溶剂，如氯仿 / 甲醇的混合物中通过用弱碱水溶液，如 pH10.5 的 0.5M 碳酸钠饱和而进行。

[0016] 关于制备 3D-MPL 的进一步信息可以从例如 US4, 912, 094 和 W002/078637 (Corixa Corporation) 获得。

[0017] 皂苷是从皂树 (*Quillaja saponaria*) 的树皮提取的三萜糖苷。粗皂苷已经广泛用作兽医佐剂。Quil-A 是皂苷材料的一种部分纯化的水性提取物。QS21 是 Quil A 的 Hplc 纯化的无毒级分，其制备方法（作为 QA21）公开于美国专利 No. 5, 057, 540。

[0018] 举例说明，已经开发了具有佐剂的流感疫苗和抗人乳头瘤病毒 (HPV) 的疫苗。

[0019] 流感病毒是世界上最普遍存在的病毒之一，既可感染人类，也可感染家畜。流感产生重大的经济负担、发病率乃至死亡率。

[0020] 流感病毒是 RNA 包膜病毒，颗粒的直径大小约为 125nm。流感病毒的基本组成为：内部为与核蛋白缔合的核糖核酸 (RNA) 核衣壳或核心，其包绕着脂质双层结构和外层糖蛋白的病毒包膜。病毒包膜内层主要由基质蛋白组成，而外层主要是宿主来源的脂类物质。流感病毒包含两种表面抗原：糖蛋白神经氨酸酶 (NA) 和血细胞凝集素 (HA)，它们以 10-12nm 长的刺突显露在颗粒表面上。就是这些表面蛋白、尤其是血细胞凝集素，决定了流感亚型的抗原特异性。

[0021] 这些表面抗原渐进地、有时快速地经历某些导致流感病毒抗原性变异的改变。这些抗原性改变称为‘漂移’和‘转换’，是不可预见的，由免疫学观点看可能具有显著的影响，因为它们最终导致出现新流感株，能使病毒逃逸免疫系统，几乎每年都引起众所周知的流行病。

[0022] 每个季节加入到流感疫苗中的流感病毒株由 WHO 协同国家卫生管理局以及疫苗生产商共同确定。

[0023] HA 是确定不同流感株的血清学特异性的最重要的抗原。此 75-80kD 的蛋白包含众多的抗原决定簇，其中几个位于在不同毒株中经历序列改变的区域中（毒株特异性决定簇），其余的位于许多 HA 分子共有的区域中（决定簇所共有的）。

[0024] 流感病毒几乎每年冬天都引起流行，甲型或乙型病毒的感染率在 6 周的时间段内高达 40%。流感感染产生各种疾病状态，由亚临床感染至轻微的上呼吸道感染到严重的病毒性肺炎。典型的流感流行引起肺炎和下呼吸道疾病的发病率增加，证据是住院率或死亡率增加。疾病的严重性主要由宿主的年龄、其免疫状况和感染部位决定。

[0025] 65 岁和以上的老年人尤其易受攻击，占发达国家所有流感相关死亡的 80-90%。患有基础性慢性疾病的个体也非常有可能经历这种并发症。幼儿也可能患严重疾病。因此，这些群体尤其需要受保护。除了这些‘风险’群体以外，卫生当局还推荐对与老年人接触的健康成人接种。

[0026] 接种对控制每年的流感流行起关键作用。目前可用的流感疫苗是灭活的流感疫苗或减毒活流感疫苗。灭活的流感疫苗包括 3 种可能形式的抗原制剂：灭活的全病毒、纯化的

病毒颗粒被去污剂或其它试剂破坏以溶解脂质包膜的亚病毒体（所谓的“分裂 (split) 疫苗”）或纯化的 HA 或 NA（亚单位疫苗）。这些灭活的疫苗肌肉内 (i.m.) 或鼻内 (i.n.) 施用。

[0027] 所有种类的流感疫苗通常都是三价疫苗。一般来说，它们含有的抗原得自两种甲型流感病毒株和一种乙型流感病毒株。据单辐射免疫扩散 (SRD) (J.M. Wood 等: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5(1977) 237-247; J.M. Wood 等, International collaborative study of single radial diffusion and Immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9(1981) 317-330) 的检测, 在大多数情况下, 标准 0.5ml 注射剂量含有每种毒株的 15  $\mu$ g 血细胞凝集素抗原组分。

[0028] 目前可用的流感疫苗被认为在所有年龄组都是安全的 (De Donato 等, 1999, Vaccine, 17, 3094-3101)。但是, 很少有证据表明当前的流感疫苗在 2 岁以下的儿童中有作用。而且, 预防典型的已确认流感疾病的疫苗的报告有效率对老年人为 23-72%, 这显著低于对较年轻成年人所报告的 60-90% 的有效率 (Govaert, 1994, J. Am. Med. Assoc, 271, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med. 123, 523-527)。业已表明, 流感疫苗的有效性与针对病毒株的血凝反应抑制 (HI) 抗体的血清滴度相关, 几个研究已发现较年长的成年人在流感免疫后表现出的 HI 滴度低于较年轻成年人 (Murasko, 2002, Experimental gerontology, 37, 427-439)。

[0029] 因此, 仍需要具有改善的免疫原性的新疫苗。疫苗抗原和有效佐剂的制剂是一种有可能增强对亚病毒体抗原的免疫应答的方法。

[0030] 用水包油乳液形式的佐剂 MF59 作为佐剂的亚单位流感疫苗已商品化, 已证明其诱导高于无佐剂亚单位疫苗所获抗体滴度的抗体滴度的能力 (De Donato 等, 1999, Vaccine, 17, 3094-3101)。但是, 在后来的出版物中, 相同疫苗没有表现出其相比无佐剂分裂疫苗改善的谱 (Puig-Barbera 等, 2004, Vaccine 23, 283-289)。

[0031] 作为背景, 在大流行之间的时间段内, 与之前流行的流感病毒相关的流感病毒传播。病毒以和生命早期感染不同的免疫水平在人与人之间传播。在通常 2-3 年的时间段内, 这种传播促进对已改变得足以在一般群体中再引起流行的新毒株的选择; 此过程称为 ‘抗原性漂移’。‘漂移变体’ 在任一年中在不同的社区、地区、国家或洲都具有不同影响, 尽管在几年内其总体影响经常是相似的。换句话说, 当出现人群对其没有免疫性的新流感病毒时, 发生流感大流行。典型的流感流行引起肺炎和下呼吸道疾病的发病率增加, 证据是住院率或死亡率增加。老年人或患有基础性慢性疾病的人最有可能经历此并发症, 而幼儿也可能患严重疾病。

[0032] 新流感病毒以不可预见的间隔出现, 其具有与之前季节流行的毒株完全不同亚型的关键表面抗原, 即血细胞凝集素。此时, 产生的抗原可以先前在人体中循环的毒株的对应蛋白的 20% 至 50% 变化。这可导致病毒逃逸 ‘群体免疫’, 并建立大流行。此现象叫做 ‘抗原性转变’。一般认为, 至少在过去已发生了大流行, 当时不同物种的流感病毒如禽或猪流感病毒已穿过种间屏障。如果这些病毒具有人与人之间传播的潜力, 它们可在数月至一年内全球扩散, 导致大流行。例如, 在 1957 年 (亚洲流感大流行), H2N2 亚型取代了 H1N1 病

毒, H1N1 病毒至少从首先分离到该病毒的 1918 年开始就在人群中循环。H2HA 和 N2NA 在 1957 年至 1968 年之间经历了抗原漂移, 直至 HA 在 1968 年(香港流感大流行)被出现的 H3N2 流感病毒亚型替代, 此后 N2NA 连同 H3HA 继续漂移(Nakajima 等, 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395)。

[0033] 给予流感病毒株引起大流行爆发潜力的流感病毒株特征是: 与当前循环株中的血细胞凝集素相比其包含新血细胞凝集素, 其可伴有或不伴有神经氨酸酶亚型的改变; 其能够在人群中水平传播; 其对人致病的。新血细胞凝集素可为长时间段内(可能数十年)在人群中还不明显的血细胞凝集素, 例如 H2。或者其可为之前还没有在人群中循环的血细胞凝集素, 例如存在于鸟类中的 H5、H9、H7 或 H6。在任一种情况下, 大部分或至少大比例的乃至整个群体以前都没有遇到抗原, 在免疫学上对抗原是原初态的。

[0034] 乳头瘤病毒是小 DNA 肿瘤病毒, 是高度物种特异性的。迄今为止已描述了 100 多种独立的人乳头瘤病毒(HPV)基因型。一般来说, HPV 对皮肤(例如 HPV-1 和 HPV-2)或粘膜表面(例如 HPV-6 和 HPV-11)是特异性的, 通常引起持续数月或数年的良性肿瘤(疣)。这种良性肿瘤可困扰所涉及的个体, 但趋向于无生命威胁, 有一些例外。

[0035] 一些 HPV 还与癌症相关。HPV 和人类癌症之间最强的正相关是 HPV-16 和 HPV-18 与宫颈癌之间存在的正相关。宫颈癌是发展中国家最常见的恶性肿瘤, 在全世界每年发生约 500,000 例新病例。现在, 使用疫苗主动对抗原发性 HPV-16 感染乃至已确诊的含 HPV-16 的癌症在技术上是可行的。关于抗 HPV-16 的预防性和治疗性接种的前景的综述, 参见 Cason J., Clin. Immunother. 1994 ;1(4) 293-306 和 Hagenessee M. E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556, 559-564。

[0036] 尽管确实存在微小差异, 但所描述的所有 HPV 基因组都具有至少 8 个早期基因, 即 E1 至 E8 和 2 个晚期基因, 即 L1 和 L2。另外, 上游调节区具有调节序列, 该调节序列似乎控制 HPV 基因组的大部分转录事件。

[0037] 基于 HPV L1 的疫苗公开于 W094/00152、W094/20137、W093/02184 和 W094/05792。此疫苗可包含为单体、壳粒或病毒样颗粒的 L1 抗原。制备 VLP 的方法在本领域众所周知, 包括 VLP 分解-再组装法, 以提供增强的均一性, 例如 W09913056 和 US6245568 所述。这种颗粒可另外包含 L2 蛋白。基于 L2 的疫苗描述于例如 W093/00436。其它 HPV 疫苗方法基于早期蛋白, 例如 E7 或诸如 L2-E7 的融合蛋白。

[0038] 仍需要改进的疫苗, 特别是在流感的情况下, 特别是流感大流行, 以及对于老年人群, 或在 HPV 疫苗的情况下。

[0039] 以前已经公开了含有脂多糖和皂苷的组分的佐剂, 例如, 在 EP0671948 中。该专利证明了当脂多糖(3D-MPL)与皂苷(QS21)组合时的强协同作用。目前已经发现在佐剂组合物中采用脂多糖和皂苷的组合作为免疫刺激剂, 可以实现良好的佐剂特性, 甚至当免疫刺激剂在人类剂量中以小量存在时也是如此。

## 发明内容

[0040] 在本发明的第一方面, 提供了免疫原性组合物, 其包含与佐剂组合物组合的抗原或其抗原性制剂, 所述佐剂组合物包含免疫活性的皂苷级分和脂多糖, 所述皂苷级分来源于南美皂皮树(Quillaja Saponaria Molina)的树皮并以脂质体形式存在。

[0041] 在本发明的第二方面,提供了免疫原性组合物,其包含与皂苷佐剂组合的流感病毒或其抗原性制剂,所述皂苷佐剂以脂质体形式存在。在该方面的一种特定实施方案中,所述免疫原性组合物进一步包含脂质 A 衍生物,如 3D-MPL。

[0042] 适当地,本发明的脂质体形式的皂苷佐剂包含来源于南美皂皮树的树皮的皂苷的活性级分,如 QS21 和甾醇,如胆固醇,其中皂苷:甾醇的比是 1 : 1-1 : 100w/w。

[0043] 具体地,所述免疫原性组合物包含具有 CD4T 细胞表位的抗原。或者,所述免疫原性组合物包含具有 B 细胞表位的抗原。

[0044] 本发明也涉及流感病毒或其抗原性制剂和佐剂在制备用于预防流感病毒感染和 / 或疾病的免疫原性组合物中的用途,所述佐剂包含免疫活性的皂苷级分和脂多糖,所述皂苷级分来源于南美皂皮树的树皮并以脂质体形式存在。

[0045] 本发明也涉及人乳头瘤病毒抗原或其抗原性制剂和佐剂在制备用于预防人乳头瘤病毒感染和 / 或疾病的免疫原性组合物中的用途,所述佐剂包含免疫活性的皂苷级分和脂多糖,所述皂苷级分来源于南美皂皮树的树皮并以脂质体形式存在。

[0046] 本发明也涉及巨细胞病毒抗原或其抗原性制剂和佐剂在制备用于预防巨细胞病毒感染和 / 或疾病的免疫原性组合物中的用途,所述佐剂包含免疫活性的皂苷级分和脂多糖,所述皂苷级分来源于南美皂皮树的树皮并以脂质体形式存在。

[0047] 本发明也涉及肺炎链球菌抗原或其抗原性制剂和佐剂在制备用于预防肺炎链球菌感染和 / 或疾病的免疫原性组合物中的用途,所述佐剂包含免疫活性的皂苷级分和脂多糖,所述皂苷级分来源于南美皂皮树的树皮并以脂质体形式存在。

[0048] 本发明也涉及恶性疟原虫抗原或其抗原性制剂和佐剂在制备用于预防恶性疟原虫感染和 / 或疾病的免疫原性组合物中的用途,所述佐剂包含免疫活性的皂苷级分和脂多糖,所述皂苷级分来源于南美皂皮树的树皮并以脂质体形式存在。

[0049] 本发明也涉及水痘 - 带状疱疹病毒抗原或其抗原性制剂和佐剂在制备用于预防水痘 - 带状疱疹病毒感染和 / 或疾病的免疫原性组合物中的用途,所述佐剂包含免疫活性的皂苷级分和脂多糖,所述皂苷级分来源于南美皂皮树的树皮并以脂质体形式存在。

[0050] 另一方面,提供了 (a) 抗原或其抗原性制剂和 (b) 上文定义的佐剂在制备用于在人类中诱导以下至少一种或至少两种或全部效果的免疫原性组合物中的用途:(i) 改进的抗所述抗原或其抗原性制剂的 CD4T- 细胞免疫应答,(ii) 改进的抗所述抗原或其抗原性制剂的体液免疫应答,(iii) 改进的抗所述抗原或其抗原性制剂的 B- 记忆细胞应答。

[0051] 具体地,所述抗原是流感病毒、HPV、巨细胞病毒 (CMV)、水痘 - 带状疱疹病毒 (VZV)、肺炎链球菌或疟疾抗原或其抗原性制剂,并且所述人是免疫受损的个体或群体,例如高危成人、老年人或婴儿。在一种特定实施方案中,提供了本文定义的抗原或其抗原性制剂在制备用于人类,特别是老年人抗病原体接种的免疫原性组合物中的用途,其中免疫组合物中的抗原来源于所述病原体。特别地,所述抗原是流感病毒、人乳头瘤病毒、巨细胞病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、肺炎链球菌、疟原虫寄生虫抗原或其抗原性制剂。

[0052] 也提供了接种方法,包括给有需要的个体或群体送递抗原或抗原性组合物,特别是流感病毒或 HPV、巨细胞病毒、水痘 - 带状疱疹病毒、肺炎链球菌、疟原虫寄生虫或其抗原性制剂和上文定义的佐剂。

[0053] 在一种特定实施方案中,与用不包含佐剂的抗原或抗原性组合物所获得的免疫应

答相比,所述免疫原性组合物能够诱导改进的抗所述抗原或其抗原性制剂的 CD4T- 细胞免疫应答,特别地,进一步能够诱导体液免疫应答或改进的 B- 记忆细胞应答,或这两者。特别地,所述 CD4T- 细胞免疫应答涉及诱导交叉反应性 CD4T 辅助细胞应答。特别地,所述体液免疫应答涉及诱导交叉反应性体液免疫应答。

[0054] 在进一步的实施方案中,提供了上文定义的方法或用途,用于提供抗病原体导致的感染或疾病的保护作用,所述病原体是免疫原性组合物中的抗原所来源的病原体的变体。在另一实施方案中,提供了上文定义的方法或用途,用于提供抗病原体导致的感染或疾病的保护作用,所述病原体包含抗原,所述抗原是免疫原性组合物中的抗原的变体。在一种特定实施方案中,提供了抗原,特别是流感病毒或 HPV 或其免疫原性制剂在制备用于以前用包含抗原的免疫原性组合物接种的人的再次接种的免疫原性组合物中的用途,所述抗原特别是流感病毒或 HPV 或其抗原性制剂,其与本文描述的佐剂组合。

[0055] 在一种特定实施方案中,用于再次接种的组合物可以额外包含佐剂。在另一特定实施方案中,用于再次接种的免疫原性组合物包含抗原,所述抗原与用于前一次接种的抗原或抗原性组合物具有共同的 CD4T- 细胞表位。特别地,用于再次接种的免疫原性组合物包含流感病毒或其抗原性制剂,其与用于第一次接种的流感病毒或其病毒抗原性制剂具有共同的 CD4T- 细胞表位。

[0056] 一方面,对已经在上一季进行了抗流感接种的受试者中进行再次接种。典型地,在第一次接种后至少 6 个月,优选在第一次接种后 8-14 个月,更优选在第一次接种后大约 10-12 个月进行再次接种。另一方面,在已经用包含流感病毒或其抗原性制剂的组合物接种的受试者中进行再次接种,其中至少一种病毒株与大流行爆发相关,或具有与大流行爆发相关的可能。

[0057] 在本发明的进一步的实施方案中,提供了来自第一流感病毒株的流感病毒或其抗原性制剂在制备本文定义的用于提供抗流感感染的保护作用的免疫原性组合物中的用途,所述流感感染由变异的流感病毒株导致。

[0058] 本发明也涉及接种方法,包括送递流感病毒或其抗原性制剂和本文定义的佐剂。

[0059] 另一方面,提供了对免疫受损的人类个体或群体,例如高危成人或老年人进行接种的方法,包括施用包含与本文定义的佐剂组合的流感病毒或其抗原性制剂的流感免疫原性组合物。

[0060] 在另一实施方案中,本发明提供了对以前用流感免疫原性组合物接种过的人进行再次接种的方法,所述组合物包含与本文定义的佐剂组合的、来自至少一种流感病毒株的流感病毒抗原或其抗原性制剂,所述方法包括给所述人施用含有佐剂或不含佐剂的免疫原性组合物,所述组合物包含流感病毒或其抗原性制剂。

[0061] 本发明也涉及用于制备免疫原性组合物的方法,包括将脂质体形式的皂苷佐剂与流感病毒或其抗原性制剂组合,任选与 3D-MPL 组合。

[0062] 在以下优选实施方案的详述中进一步描述本发明的其它方面和优点。

## 附图说明

[0063] 图 1 :MPL 制备的图示。

[0064] 图 2 :在用实验制剂免疫雪貂后抗各种流感病毒株的体液应答 :异源初免 (H1N1A/

斯德哥尔摩 /24/90) 之前和之后,免疫后 (H1N1A/ 新喀里多尼亚 /20/99, H3N2A/ 巴拿马 /2007/99 和 B/ 山东 /7/97) 以及异源攻击后 (H3N2A/ 怀俄明 /3/2003) 的血细胞凝集素抑制测试 (GMT+/-IC95)。

[0065] 图 3:雪貂研究:攻击后(第 42 天)鼻洗液中的病毒滴度。

[0066] 图 4:小鼠研究:用实验制剂免疫小鼠后抗三种流感疫苗株的体液应答:免疫 (H1N1A/ 新喀里多尼亚 /20/99, H3N2A/ 怀俄明 /3/2003 和 B/ 江苏 /10/2003) 后 21 天的血细胞凝集素抑制测试 (GMT+/-IC95)。

[0067] 图 5:小鼠研究:细胞介导的免疫应答:免疫后第 7 天的流感特异性 CD4+T 细胞应答。

[0068] 图 6:小鼠研究:CD4 的 CMI- 合并的病毒株(都加倍)-第 0 天和第 21 天。

[0069] 图 7:第 0 天和 21 天时 HI 抗体的 GMTs。

[0070] 图 8:用含有佐剂的流感病毒制剂免疫后,在 7 天随访阶段期间报道的人局部和全身症状的发生率(总数和第 3 级相关的),比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0071] 图 9:用含佐剂的 HPV 制剂免疫后,小鼠中对 HPV16 和 18L1 的体液应答,比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0072] 图 10:小鼠中的细胞介导的免疫应答:细胞内细胞因子染色-用含佐剂的 HPV 制剂免疫后的 VLP16 和 18CD4+T 细胞,比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0073] 图 11:用含佐剂的 HPV 制剂免疫后产生特异性 B 记忆细胞,比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0074] 图 12:小鼠中含有佐剂的肺炎链球菌疫苗的临床前比较,比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0075] 图 13:用含有佐剂的 Gb 疫苗免疫后的豚鼠抗 -gB ELISA 滴度,比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0076] 图 14:用含有佐剂的 Gb 疫苗免疫后的豚鼠抗 CMV 中和滴度,比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0077] 图 15:用含有佐剂的 gB 疫苗免疫后的小鼠抗 -gB ELISA 滴度。

[0078] 图 16:用含有佐剂的 gB 疫苗免疫后的小鼠抗 CMV 中和滴度。

[0079] 图 17:小鼠研究:细胞介导的免疫-用 gB 肽的合并物再刺激后的 CMV 特异性 CD4+ 和 CD8+ 细胞(第二次免疫后 7 天)。

[0080] 图 18:小鼠研究:细胞介导的免疫-用两种不同剂量的 gB 肽的合并物再刺激后的 CMV 特异性 CD4+ 细胞(第二次免疫后 21 天)。

[0081] 图 19:小鼠研究:细胞介导的免疫-用两种不同剂量的 gB 肽的合并物再刺激后的 CMV 特异性 CD8+ 细胞(第二次免疫后 21 天)。

[0082] 图 20:在小鼠中用含有佐剂的 RTS,S 疫苗免疫后抗子孢子蛋白 CSP 的几何平均抗体滴度 (GMT),比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0083] 图 21:在小鼠中用含有佐剂的 RTS,S 疫苗免疫后抗乙型肝炎表面抗原 (HBs) 的几何平均抗体滴度 (GMT),比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0084] 图 22:用含有佐剂的 RTS,S 免疫原性组合物免疫后,CSP 特异性 CD4 和 CD8T 细胞的 IL-2 和 / 或 IFN  $\gamma$  离体表达,比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0085] 图 23 :用含有佐剂的 RTS, S 免疫原性组合物免疫后, HBs 特异性 CD4 和 CD8T 细胞的 IL-2 和 / 或 IFN  $\gamma$  离体表达, 比较具有两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂。

[0086] 图 24 :用含有佐剂的三价分裂流感疫苗 (A/ 新喀里多尼亚, A/ 怀俄明, B/ 江苏) 免疫后小鼠中的体液应答, 两种不同浓度的免疫刺激剂。

[0087] 图 25 :用含有佐剂的三价流感疫苗 (A/ 新喀里多尼亚, A/ 怀俄明, B/ 江苏) 免疫后小鼠中的细胞介导的免疫应答, 两种不同浓度的免疫刺激剂。

[0088] 图 26 :小鼠中比较以 AS01B 或 AS01E 为佐剂的 VZV gE 疫苗的临床前结果。

[0089] 图 27 :用流感病毒抗原初免和攻击后的鼻洗液病毒滴度 - 在雪貂中用普通的或以包含两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂组合物为佐剂的 A/ 新喀里多尼亚、A/ 怀俄明、B/ 江苏免疫。

[0090] 图 28 :用流感抗原初免和攻击后在雪貂中监测体温。用普通的或以包含两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂组合物为佐剂的 A/ 新喀里多尼亚、A/ 怀俄明、B/ 江苏免疫。

[0091] 图 29 :用流感抗原制剂免疫和攻击后三价疫苗制剂中 A 株的抗 HI 滴度。用普通的或以包含两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂组合物为佐剂的 A/ 新喀里多尼亚、A/ 怀俄明、B/ 江苏免疫。

[0092] 图 30 :用流感抗原制剂免疫和攻击后用于攻击的 B/ 江苏和漂移株的抗 HI 滴度, 用普通的或以包含两种不同浓度的免疫刺激剂的佐剂组合物为佐剂的 A/ 新喀里多尼亚、A/ 怀俄明、B/ 江苏免疫。

### 具体实施方式

[0093] 本发明人发现, 包含以脂质体形式存在的皂苷和脂多糖的佐剂组合物 ( 其中每种免疫刺激剂以 30  $\mu$  g 或低于 30  $\mu$  g / 人类剂量的水平存在 ) 可以改进对抗原性制剂的免疫应答, 而同时比一些现有技术的制剂具有更低的反应原性, 在所述现有技术制剂中, 免疫刺激剂以每个人类剂量更高水平存在。

[0094] 本发明人进一步发现, 包含流感病毒或其抗原性制剂以及佐剂 ( 包含以脂质体形式存在的皂苷 ) 并且任选额外包含脂质 A 衍生物如 3D-MPL 的流感制剂与用不含佐剂的病毒或其抗原性制剂获得的制剂相比, 能够改进抗所述抗原或抗原性组合物的 CD4T- 细胞免疫应答。以脂质体形式的皂苷作为佐剂的制剂有利地用于诱导能够检测 II 类 MHC 分子呈递的流感病毒表位。本申请人发现, 其有效靶定细胞介导的免疫系统, 以便 ( 在接种和感染后 ) 增加针对同源和漂移流感病毒株的反应性。

[0095] 本发明的一种特定实施方案是, 用于本发明的组合物在再次接种后能够在人类中提供更好的抗流感的血清保护作用, 这是通过满足流感相关保护作用的人类受试者数目评估的。此外, 另一特定实施方案是与不含佐剂的组合物相比, 用于本发明的组合物在首次接种人类受试者后也能够诱导更高的 B 细胞记忆应答, 并且在再次接种后能够诱导更高的体液应答。

[0096] 本发明的含有佐剂的组合物具有一些优点 :

[0097] 1) 改进的免疫原性 : 它们使得能够在老年人 ( 超过 50 岁, 典型地超过 65 岁 ) 中的弱免疫应答恢复到年轻人中观察到的水平 ( 抗体和 / 或 T 细胞应答 );

[0098] 2) 改进的交叉保护谱 : 增加的抗变异 ( 漂移 ) 流感病毒株的交叉保护作用 ;

[0099] 3) 它们也允许用减少的抗原剂量来得到相似的应答,从而确保在紧急情况(例如大流行)时增加的能力。

[0100] 在本发明的另一方面,发明人发现,本文定义的佐剂组合物证明了抗体产生和接种后流感特异性 CD4 频率的免疫原性结果等于或有时大于用不含佐剂的疫苗产生的结果。这种作用在老年群体中特别有价值,并且可以用本文定义的含有较低剂量免疫刺激剂的佐剂实现。此外,反应原性症状显示以下趋势:在接受以最高浓度的免疫刺激剂为佐剂的疫苗的组中比接受以较低浓度免疫刺激剂为佐剂的疫苗的组中更高。

[0101] 这些发现可以适用于其它形式的相同抗原和其它抗原。

[0102] 皂苷佐剂

[0103] 本发明的佐剂组合物包含以脂质体形式存在的皂苷佐剂。

[0104] 特别适用于本发明的皂苷是 Quil A 及其衍生物。Quil A 是一种从南美洲的树木-南美皂皮树分离的皂苷制剂,并且在 1974 年由 Dalsgaard 等人首先描述(“Saponin adjuvants”, Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol.44, Springer Verlag, Berlin, p243-254) 具有佐剂活性。已经通过 HPLC 分离了 Quil A 的纯化片段,其保留佐剂活性而没有与 Quil A 相关的毒性 (EP0362278),所述片段例如 QS7 和 QS21(也称作 QA7 和 QA21)。QS-21 是一种来源于南美皂皮树的树皮的天然皂苷,其诱导 CD8+ 毒性 T 细胞 (CTLs)、Th1 细胞和占优势的 IgG2a 抗体应答,并且是本发明的优选皂苷。

[0105] 在本发明的一种合适的形式中,免疫原性组合物中的皂苷佐剂是南美皂皮树 Quil A 的衍生物,优选是 Quil A 的免疫活性级分,例如 QS-17 或 QS-21,合适地是 QS-21。在一种实施方案中,本发明的组合物含有基本纯的形式的免疫活性皂苷级分。优选地,本发明的组合物含有基本纯的形式的 QS21,也就是说, QS21 是至少 90% 纯的,例如,至少 95% 纯或至少 98% 纯。

[0106] 在一种特定实施方案中, QS21 是在其反应原性较低的组合物中提供的,其中用外源甾醇,例如胆固醇对其进行猝灭。存在一些特定形式的反应原性较低的组合物,其中用外源胆固醇猝灭 QS21。在一种特定实施方案中,皂苷/甾醇是脂质体结构的形式 (W096/33739, 实施例 1)。在该实施方案中,脂质体合适地含有中性脂质,例如磷脂酰胆碱,其在室温下合适地是非晶体,所述磷脂酰胆碱例如卵黄磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC) 或二月桂酰磷脂酰胆碱。脂质体也可以含有带电脂质,其增加用于饱和脂质组成的脂质体的脂质体-QS21 结构的稳定性。在这些情况下,带电脂质的量合适地是 1-20% w/w, 优选 5-10%。甾醇与磷脂的比例是 1-50% (mol/mol), 合适地是 20-25%。

[0107] 合适的甾醇包括  $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、麦角甾醇、麦角钙化甾醇和胆固醇。在一种特定实施方案中,佐剂组合物包含胆固醇作为甾醇。这些甾醇是本领域已知的,例如,胆固醇在 Merck Index, 第 11 版, 第 341 页中描述为动物脂肪中存在的天然甾醇。

[0108] 本发明的包含 QS21 和甾醇,特别是胆固醇的佐剂组合物,与不存在甾醇的组合物相比,显示出减少的反应原性,同时保持佐剂作用。可以根据 W096/33739 中公开的方法评估反应原性研究。本发明的甾醇表示外源甾醇,即,并非是抗原性制剂所来源的生物体内源的甾醇,而是加入到抗原制剂中或随后在配制时加入的。典型地,通过利用例如甾醇猝灭形式的皂苷,可以在随后用皂苷佐剂配制抗原制剂过程中加入甾醇。合适地,如 W096/33739 中的描述,外源甾醇与皂苷佐剂缔合。

[0109] 当活性皂苷级分是 QS21 时, QS21 : 甾醇的比例典型地将是 1 : 100-1 : 1(w/w) 的数量级, 合适地是 1 : 10-1 : 1(w/w), 优选是 1 : 5-1 : 1(w/w)。存在合适过量的甾醇, QS21 : 甾醇的比例是至少 1 : 2(w/w)。在一种实施方案中, QS21 : 甾醇的比例是 1 : 5(w/w)。甾醇合适地是胆固醇。

[0110] 其它有用的皂苷来源于植物 - 欧洲七叶树或 *Gyophilla struthium*。描述于文献中的其它皂苷包括七叶素, 其描述于 Merck index(12 版: 条目 3737), 其是存在于七叶树 (拉丁文是 *Aesculus hippocastanum*) 的种子中的皂苷混合物。描述其分离是通过色谱和纯化 (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213(1953)), 以及通过离子交换树脂 (Erbring 等, US3, 238, 190)。已经纯化了七叶素的级分, 并且显示是生物活性的 (Yoshikawa M 等, (*Chem Pharm Bull* (Tokyo) 1996Aug; 44(8) : 1454-1464))。已经针对例如 ISCOM 生产, 描述了来自 *Gypsophilla struthium* 的 Sapoalbin(R. Vochten 等, 1968, *J. Pharm. Belg.*, 42, 213-226)。

[0111] 本发明的关键方面是以下事实: 免疫活性皂苷, 优选 QS21, 可以以比以前认为有用的量更低的量使用, 合适地是低于 30  $\mu$ g, 例如 1-30  $\mu$ g/ 人类剂量的免疫原性组合物。

[0112] 因此, 本发明提供了人类剂量的免疫原性组合物, 其中包含免疫活性皂苷, 优选 QS21, 其水平是 30  $\mu$ g 或更低, 例如 1-30  $\mu$ g。

[0113] 在一种实施方案中, 免疫原性组合物的体积适于人类剂量, 所述人类剂量的免疫组合物包含 QS21, 其水平是大约 25  $\mu$ g, 例如 20-30  $\mu$ g, 合适地是 21-29  $\mu$ g 或 22-28  $\mu$ g 或 23-27  $\mu$ g 或 24-26  $\mu$ g, 或 25  $\mu$ g。在另一实施方案中, 人类剂量的免疫原性组合物包含 QS21, 其水平是大约 10  $\mu$ g, 例如 5-15  $\mu$ g, 合适地是 6-14  $\mu$ g, 例如 7-13  $\mu$ g 或 8-12  $\mu$ g 或 9-11  $\mu$ g, 或 10  $\mu$ g。

[0114] 在进一步的实施方案中, 人类剂量的免疫组合物包含 QS21, 其水平是大约 5  $\mu$ g, 例如 1-9  $\mu$ g, 或 2-8  $\mu$ g, 或合适地是 3-7  $\mu$ g 或 4-6  $\mu$ g, 或 5  $\mu$ g。

[0115] QS21 的合适量是例如以下任一量: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,  $\mu$ g(w/v)/ 人类剂量的免疫原性组合物。

[0116] 术语“人类剂量”表示具有适于人类使用的体积的剂量。通常是 0.3-1.5ml。在一种实施方案中, 人类剂量是 0.5ml。在进一步的实施方案中, 人类剂量是高于 0.5ml, 例如 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 或 1ml。在进一步的实施方案中, 人类剂量是 1ml-1.5ml。本发明的特征在于每个人类剂量含有 30  $\mu$ g 或更少, 例如 1-30  $\mu$ g 的 QS21。

[0117] 本发明进一步提供了包含 30  $\mu$ g 或更少, 例如 1-30  $\mu$ g 的 QS21 的佐剂组合物。典型地, 所述佐剂组合物将是人类剂量合适的体积。当佐剂是要与液体形式的抗原组合物进行组合的液体形式时, 佐剂组合物将是人类剂量合适的体积, 其大约是人类剂量的目标终体积的大约一半, 例如, 对于 0.7ml 的目标人类剂量, 其是 360  $\mu$ l 体积, 对于 0.5ml 的目标人类剂量, 其是 250  $\mu$ l 体积。当与抗原组合物组合时, 佐剂组合物是稀释的, 以提供最终人类剂量的疫苗。所述剂量的终体积当然根据佐剂组合物的初始体积和加入佐剂组合物中的抗原组合物的体积而改变。在一种替代的实施方案中, 用液体佐剂重配冻干的抗原组合物。在该实施方案中, 佐剂组合物的人类剂量合适的体积大约等于人类剂量的终体积。在含有冻干的抗原组合物的管形瓶中加入液体佐剂组合物。最终的人类剂量可以是 0.5-1.5ml。在一种特定实施方案中, 人类剂量是 0.5ml。在该实施方案中, 本发明的疫苗组合物将包含

QS21,其水平是 30  $\mu$ g 或低于 30  $\mu$ g,例如 1-30  $\mu$ g/0.5ml 人类剂量。此外,在该实施方案中,本发明的佐剂组合物将包含 QS21,其水平是 30  $\mu$ g 或低于 30  $\mu$ g,例如 1-30  $\mu$ g/250  $\mu$ l 佐剂组合物或 /500  $\mu$ l 佐剂组合物,这取决于佐剂组合物是要与液体还是冻干的抗原组合物进行组合。

[0118] 特别地,当与流感抗原组合时,可以使用的 QS21 的量可以是例如 1-100  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量,优选是 10-50  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量。QS21 的合适的量是例如以下任一量:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49 或 50  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量。更优选地, QS21 的量是 25-75  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量。通常,组合物剂量是约 0.5ml-约 1ml。典型的疫苗剂量是 0.5ml,0.6ml,0.7ml,0.8ml,0.9ml 或 1ml。在一种优选实施方案中,每 ml 疫苗组合物中包含终浓度为 50  $\mu$ g 的 QS21,或 25  $\mu$ g/0.5ml 疫苗剂量。在另一种优选实施方案中,每 ml 疫苗组合物中包含终浓度为 35.7  $\mu$ g 或 71.4  $\mu$ g 的 QS21。特别地,0.5ml 疫苗剂量体积包含 25  $\mu$ g 或 50  $\mu$ g 的 QS21/剂量。

[0119] QS21 的剂量合适地能够增强人类中对抗原的免疫应答。具体地,合适的 QS21 的量是相对于不含佐剂的组合物或相对于以另一 QS21 量为佐剂的组合物,改进组合物的免疫潜能同时仍然是反应原性谱能够接受的量。

[0120] 3D-MPL 佐剂

[0121] 组合物进一步包含额外的佐剂,其是脂多糖,合适地是脂质 A 的无毒衍生物,特别是单磷酸脂质 A 或更特别是 3-脱酰基单磷酸脂质 A(3D-MPL)。

[0122] 3D-MPL 由 GlaxoSmithKline Biologicals N.A. 以 MPL 的名称出售,并且在文件中称作 MPL 或 3D-MPL。参见例如美国专利 Nos. 4,436,727;4,877,611;4,866,034 和 4,912,094。3D-MPL 主要促进具有 IFN- $\gamma$ (Th1) 表型的 CD4+T 细胞应答。根据 GB2220211A 公开的方法可以生产 3D-MPL。化学上,它是具有 3、4、5 或 6 个酰化链的 3-脱酰基单磷酸脂质 A 的混合物。优选地,本发明的组合物中采用小颗粒 3D-MPL。小颗粒 3D-MPL 具有的粒度使得它能够通过 0.22  $\mu$ m 滤器进行灭菌过滤。所述制剂描述于 W094/21292 中。

[0123] 本发明的关键方面是以下事实:脂多糖,优选 3D-MPL,可以以比以前认为有用的量更低的量使用,合适地 30  $\mu$ g 或更低的水平,例如 1-30  $\mu$ g/人类剂量的免疫原性组合物。

[0124] 因此,本发明提供了人类剂量的免疫原性组合物,其中包含脂多糖,优选 3D-MPL,其水平是 30  $\mu$ g 或更低,例如 1-30  $\mu$ g。

[0125] 在一种实施方案中,人类剂量的免疫组合物包含 3D-MPL,其水平是大约 25  $\mu$ g,例如 20-30  $\mu$ g,合适地是 21-29  $\mu$ g 或 22-28  $\mu$ g 或 23-27  $\mu$ g 或 24-26  $\mu$ g,或 25  $\mu$ g。

[0126] 在另一实施方案中,人类剂量的免疫原性组合物包含 3D-MPL,其水平是大约 10  $\mu$ g,例如 5-15  $\mu$ g,合适地是 6-14  $\mu$ g,例如 7-13  $\mu$ g 或 8-12  $\mu$ g 或 9-11  $\mu$ g,或 10  $\mu$ g。

[0127] 在进一步的实施方案中,人类剂量的免疫组合物包含 3D-MPL,其水平是大约 5  $\mu$ g,例如 1-9  $\mu$ g,或 2-8  $\mu$ g,或合适地是 3-7  $\mu$ g 或 4-6  $\mu$ g,或 5  $\mu$ g。

[0128] 3D-MPL 的合适量是例如以下任一量:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,  $\mu$ g(w/v)/人类剂量的免疫原性组合物。

[0129] 在一种实施方案中,人类剂量的体积是 0.5ml。在进一步的实施方案中,免疫原性

组合物的体积是适于人类剂量的体积,所述体积是高于 0.5ml,例如 0.6,0.7,0.8,0.9 或 1ml。在进一步的实施方案中,人类剂量是 1ml-1.5ml。本发明的特征在于每个人类剂量含有 30  $\mu$ g 或更少,例如 1-30  $\mu$ g 的 3D-MPL。

[0130] 本发明进一步提供了包含 30  $\mu$ g 或更少,例如 1-30  $\mu$ g 的 3D-MPL 的佐剂组合物。典型地,所述佐剂组合物将是人类剂量合适的体积。当佐剂是要与液体形式的抗原组合物进行组合的液体形式时,佐剂组合物将是人类剂量合适的体积,其大约是人类剂量的目标终体积的大约一半,例如,对于 0.7ml 的目标人类剂量,其是 360  $\mu$ l 体积,对于 0.5ml 的目标人类剂量,其是 250  $\mu$ l 体积。当与抗原组合物组合时,佐剂组合物是稀释的,以提供最终人类剂量的疫苗。所述剂量的终体积当然根据佐剂组合物的初始体积和加入佐剂组合物中的抗原组合物的体积而改变。在一种替代的实施方案中,用液体佐剂重配冻干的抗原组合物。在该实施方案中,佐剂组合物的人类剂量合适的体积大约等于人类剂量的终体积。在含有冻干的抗原组合物的管形瓶中加入液体佐剂组合物。最终的人类剂量可以是 0.5-1.5ml。在一种特定实施方案中,人类剂量是 0.5ml。在该实施方案中,本发明的疫苗组合物将包含 3D-MPL,其水平是 30  $\mu$ g 或低于 30  $\mu$ g,例如 1-30  $\mu$ g/0.5ml 人类剂量。此外,在该实施方案中,本发明的佐剂组合物将包含 3D-MPL,其水平是 30  $\mu$ g 或低于 30  $\mu$ g,例如 1-30  $\mu$ g/250  $\mu$ l 佐剂组合物或 /500  $\mu$ l 佐剂组合物,这取决于佐剂组合物是要与液体还是冻干的抗原组合物进行组合。

[0131] 当免疫原性组合物含有流感病毒或其抗原性制剂时,包含脂质体形式的皂苷的佐剂组合物任选额外包含脂质 A 衍生物,特别是单磷酸脂质 A 或更特别是 3D-MPL。在该实施方案中,可以使用的 3D-MPL 的量可以是例如 1-100  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量,优选是 10-50  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量。3D-MPL 的合适的量是例如以下任一量:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49 或 50  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量。更优选地,3D-MPL 的量是 25-75  $\mu$ g(w/v)/组合物剂量。通常,组合物剂量是约 0.5ml-约 1ml。典型的疫苗剂量是 0.5ml,0.6ml,0.7ml,0.8ml,0.9ml 或 1ml。在一种优选实施方案中,每 ml 疫苗组合物中包含终浓度为 50  $\mu$ g 的 3D-MPL,或 25  $\mu$ g/0.5ml 疫苗剂量。在另一种优选实施方案中,每 ml 疫苗组合物中包含终浓度为 35.7  $\mu$ g 或 71.4  $\mu$ g 的 3D-MPL。特别地,0.5ml 疫苗剂量体积包含 25  $\mu$ g 或 50  $\mu$ g 的 3D-MPL/剂量。

[0132] 3D-MPL 的剂量合适地能够增强人类中对抗原的免疫应答。具体地,合适的 3D-MPL 的量是相对于不含佐剂的组合物或相对于以另一 MPL 量为佐剂的组合物,改进组合物的免疫潜能同时仍然是反应原性谱能够接受的量。

[0133] 本发明的合适组合物是这样的:其中最初在没有 MPL 的条件下制备脂质体(如 W096/33739 中的描述),然后加入 MPL,合适地作为小于 100nm 的小颗粒或容易通过 0.22  $\mu$ m 膜进行灭菌过滤的颗粒。因此,MPL 不包含在囊泡膜中(称作 MPL 在外)。MPL 包含在囊泡膜内(称作 MPL 在内)的组合物也形成本发明的一方面。抗原可以包含在囊泡膜内或包含在囊泡膜外。合适地,可溶性抗原在外,疏水或脂化抗原包含在膜内或膜外。

[0134] 在一种实施方案中,本发明的佐剂组合物包含脂多糖和免疫活性皂苷这两者。在本发明的一种特定实施方案中,脂多糖是 3D-MPL,并且免疫活性皂苷是 QS21。在本发明的进一步的实施方案中,佐剂组合物基本由脂多糖和脂质体制剂中的免疫活性皂苷组成。合

适地,在这种实施方案的一种形式中,佐剂组合物基本由 3D-MPL 和 QS21 组成,任选含有甾醇,其优选是胆固醇。

[0135] 在本发明的进一步的实施方案中,佐剂组合物在脂质体制剂中包含脂多糖和免疫活性皂苷,它们与一种或多种其它的免疫刺激剂或佐剂组合。合适地,在这种实施方案的一种形式中,脂多糖是 3D-MPL,并且免疫活性皂苷是 QS21。

[0136] 在一种特定实施方案中, QS21 和 3D-MPL 以相同终浓度 / 人类剂量的免疫组合物存在。在该实施方案的一个方面,人类剂量的免疫原性组合物包含最终水平为 25  $\mu$ g 的 3D-MPL 和 25  $\mu$ g 的 QS21。在进一步的实施方案中,人类剂量的免疫原性组合物包含最终水平为 10  $\mu$ g 的 MPL 和 10  $\mu$ g 的 QS21。在进一步的实施方案中,提供了体积为 250  $\mu$ l 的佐剂组合物,其中包含水平为 25  $\mu$ g 的 MPL 和 25  $\mu$ g 的 QS21,或 MPL 和 QS21 各 10  $\mu$ g。

[0137] 可以与本发明的佐剂组合物一起使用的抗原包括病毒、寄生虫、细菌或肿瘤相关抗原,例如:

[0138] 按照本发明使用的流感病毒或其抗原性制剂可为分裂流感病毒或其分裂病毒抗原性制剂。在一个替代性实施方案中,流感病毒制剂可包含另一类型的灭活流感抗原,例如灭活的全病毒或纯化的 HA 和 NA (亚单位疫苗),或流感病毒体。在再另一个实施方案中,流感病毒可为减毒活流感病毒制剂。

[0139] 合适地,按照本发明使用的分裂流感病毒或其分裂病毒抗原性制剂为灭活病毒制剂,其中病毒颗粒用溶解脂质包膜的去污剂或其它试剂破坏。合适地,分裂病毒或其分裂病毒抗原性制剂如下制备:用溶解浓度的有机溶剂或去污剂使感染性或灭活的完整流感病毒片段化,随后去除全部或大部分溶解剂和某些或大部分病毒脂质物质。所述其分裂病毒抗原性制剂是指相比于分裂病毒可能已经受了一定程度的纯化而保留了分裂病毒组分的大部分抗原特性的分裂病毒制剂。例如,当在卵中产生时,可以从分裂病毒去除了卵污染蛋白,或者在细胞培养物中产生时,可以从分裂病毒去除了宿主细胞杂质。分裂病毒抗原性制剂可包含一种以上病毒株的分裂病毒抗原性组分。含分裂病毒的疫苗(叫做‘分裂流感疫苗’)或含分裂病毒抗原性制剂的疫苗一般包含残余的基质蛋白和核蛋白,有时包含脂质以及膜包膜蛋白。这种分裂病毒疫苗通常包含大部分或全部病毒结构蛋白,但不一定和它们在全病毒中存在的比例相同。

[0140] 或者,流感病毒可为全病毒疫苗形式。对于大流行情况来说,其可表现出超过分裂病毒疫苗的优势,因为其避免了有关针对新流感病毒株是否可成功地产生分裂病毒疫苗的不确定性。对于某些病毒株来说,用于生产分裂病毒的常规去污剂可损伤病毒,并使其无用。尽管经常有可能使用不同的去污剂和 / 或开发不同的分裂疫苗生产方法,但这会耗时,在大流行情况下可能不可用。全病毒法除了较大程度的确定性以外,还有比分裂病毒大的疫苗生产能力,因为在制备适宜的分​​裂疫苗必需的额外纯化步骤中有相当大量的抗原损失。

[0141] 在另一个实施方案中,流感病毒制剂为纯化的亚单位流感疫苗形式。亚单位流感疫苗一般包含两种主要的包膜蛋白 HA 和 NA,可能具有超过全病毒体疫苗的额外优势,因为它们一般无反应原性,尤其是在年轻的接种者中。亚单位疫苗可重组生产,或者可由破裂的病毒颗粒纯化。

[0142] 在另一个实施方案中,流感病毒制剂为病毒体形式。病毒体是球形的单层囊泡,其

保留了真实构象的功能性病毒包膜糖蛋白 HA 和 NA, 嵌入病毒体的磷脂双层膜中。

[0143] 所述流感病毒或其抗原性制剂来源于卵或来源于细胞培养物。

[0144] 例如, 本发明的流感病毒抗原或其抗原性制剂可来源于常规的含胚卵法, 该方法在卵中培养流感病毒, 并纯化收集的尿囊液。卵可在短时间内大量累积。或者, 它们可来源于任一种使用细胞或细胞培养物的新生产方法, 以培养病毒或表达重组流感病毒表面抗原。适于培养病毒的细胞基质包括例如狗肾细胞, 例如 MDCK 或来自 MDCK 克隆的细胞、MDCK 样细胞, 猴肾细胞, 例如 AGMK 细胞, 包括 Vero 细胞, 合适的猪细胞系, 或适于生产疫苗用途的流感病毒的任意其它哺乳动物细胞类型。合适的细胞基质还包括人细胞, 例如 MRC-5 细胞。合适的细胞基质不限于细胞系; 例如原代细胞, 如鸡胚成纤维细胞, 还包括禽细胞系。

[0145] 流感病毒抗原或其抗原性制剂可通过众多工业用方法中的任一种生产, 例如在专利号 DD300833 和 DD211444 (引入本文作为参考) 中描述的分裂流感病毒法。分裂流感病毒传统上使用溶剂 / 去污剂处理产生, 例如磷酸三正丁酯, 或者二乙醚与 Tween™ 的组合 (称作 “Tween- 醚” 分裂), 该方法仍在某些生产厂家中使用。目前使用的其它分裂剂包括去污剂或蛋白水解酶或胆盐, 例如在专利号 DD155875 (引入本文作为参考) 中描述的脱氧胆酸钠。可用作分裂剂的去污剂包括阳离子去污剂, 例如溴化鲸蜡基三甲铵 (CTAB); 其它离子去污剂, 例如十二烷基硫酸盐、牛磺脱氧胆酸盐; 或非离子去污剂, 如上述的一种, 包括 Triton X-100 (例如在 Lina 等, 2000, Biologicals 28, 95-103 描述的方法中) 和 Triton N-101; 或者任何两种或多种去污剂的组合。

[0146] 分裂疫苗的制备方法可包括众多不同的过滤和 / 或其它分离步骤, 如各种组合的超离心、超滤、区带离心和层析 (例如离子交换) 步骤, 以及任选的例如采用热、甲醛或  $\beta$ -丙醇酸内酯或紫外线的灭活步骤, 其可在分裂前或后进行。分裂过程可以分批、连续或半连续过程进行。用于分裂免疫原性组合物的优选分裂和纯化方法描述于 W002/097072。

[0147] 本发明的优选分裂流感疫苗抗原制剂包含生产过程剩余的残余量的 Tween80 和 / 或 Triton X-100, 但这些物质可在分裂抗原制备后加入或调整其浓度。优选地, Tween80 和 Triton X-100 都存在。疫苗剂量中这些非离子型表面活性剂的终浓度的优选范围为:

[0148] Tween80 : 0.01-1%, 更优选为约 0.1% (体积 / 体积)

[0149] Triton X-100 : 0.001-0.1% (重量 / 体积), 更优选为 0.005-0.02% (重量 / 体积)。

[0150] 在一个特定实施方案中, Tween80 的终浓度在 0.045% -0.09% (重量 / 体积) 的范围内。在另一个特定实施方案中, 抗原作为 2 倍浓缩的混合物提供, 其具有的 Tween80 浓度在 0.045% -0.2% (重量 / 体积) 的范围内, 在最终配制时必须用佐剂 (或在对照制剂中用缓冲液) 稀释 2 倍。

[0151] 在另一个特定实施方案中, Triton X-100 的终浓度在 0.005% -0.017% (重量 / 体积) 的范围内。在另一个特定实施方案中, 抗原作为 2 倍浓缩的混合物提供, 其具有的 Triton X-100 浓度在 0.005% -0.034% (重量 / 体积) 的范围内, 在最终配制时必须用佐剂 (或在对照制剂中用缓冲液) 稀释 2 倍。

[0152] 优选地, 流感病毒制剂在低水平硫柳汞存在下制备, 或优选地在没有硫柳汞的情况下制备。优选地, 获得的流感制剂在没有有机汞防腐剂的情况下是稳定的, 具体地说, 所述制剂不含残余硫柳汞。具体地说, 流感病毒制剂包含在没有硫柳汞的情况下或在低水平

硫柳汞（一般来说为  $5\mu\text{g/ml}$  或以下）的情况下稳定的血细胞凝集素抗原。具体地说，乙型流感毒株的稳定利用  $\alpha$  生育酚衍生物如  $\alpha$  生育酚琥珀酸酯（也称为维生素 E 琥珀酸酯，即 VES）来实施。这种制剂及其制备方法公开于 W002/097072。

[0153] 优选的组合物含 3 种灭活的分裂病毒体抗原，它们由 WHO 推荐的适宜流感季的病毒株制备。

[0154] 优选地，流感病毒或其抗原性制剂和本发明的佐剂包含在同一容器中。这被称为‘单管形瓶法’。优选地，所述管形瓶为预填充注射器。在一个替代实施方案中，流感病毒或其抗原性制剂和本发明的佐剂包含在分开的容器或管形瓶中，并在给予受试者之前不久或给予受试者时混合。这被称为‘双管形瓶法’。作为实例，当疫苗为  $0.7\text{ml}$  总剂量体积的 2 组分疫苗时，浓缩抗原（例如浓缩三价灭活分裂病毒体抗原）存在于 1 个管形瓶（ $335\mu\text{l}$ ）（抗原容器）中，预填充注射器含佐剂（ $360\mu\text{l}$ ）（佐剂容器）。在注射时，使用含佐剂的注射器将含浓缩的三价灭活分裂病毒体抗原的管形瓶中的内容物由管形瓶中取出，接着轻柔混合注射器。在注射前，使用的针头用肌内针头替换，体积调整到  $530\mu\text{l}$ 。在该实例中，一个剂量的重配的含有佐剂的流感疫苗候选物相当于  $530\mu\text{l}$ 。

[0155] 根据本发明，在本文定义的多价免疫原性组合物中的至少一种流感病毒株与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的潜力。这种病毒株在下文还可称为‘大流行株’。具体地说，当疫苗为多价疫苗如二价或三价或四价疫苗时，至少一种病毒株与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的潜力。适宜的病毒株是但不限于：H5N1、H9N2、H7N7、H2N2 和 H1N1。

[0156] 所述流感病毒或其抗原性制剂合适地为多价的，例如二价或三价或四价。优选地，流感病毒或其抗原性制剂为三价的或四价的，具有得自 3 种不同流感株的抗原，至少一种病毒株与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的潜力。

[0157] 给予流感病毒株引起大流行爆发潜力的流感病毒株特征是：与当前循环株中的血细胞凝集素相比其包含新血细胞凝集素；其能够在人群中水平传播；其对人是致病的。新血细胞凝集素可为长时间段内（可能数十年）在人群中还不明显的血细胞凝集素，例如 H2。或者其可为之前还没有在人群中循环的血细胞凝集素，例如存在于鸟中的 H5、H9、H7 或 H6。在任一种情况下，大部分或至少大比例的乃至整个群体以前都没有遇到抗原，在免疫学上对抗原是原初态的。

[0158] 一般来说，在大流行环境下，某些群体被流感感染的风险增加。老年人、慢性疾病患者和小孩尤其易感，但许多年轻人和表面上健康的人也有风险。对于 H2 流感，1968 年后出生的部分群体承受的风险增加。对这些群体重要的是尽快地和以简单的方式有效地被保护。

[0159] 承受增加的风险的另一个人群是旅行者。今天，人们比以往任何时候都更常旅行，出现最多新病毒的地区中国和东南亚在近些年已成为受欢迎的旅行目的地。旅游模式的这种改变能使新病毒在约数周内而不是数月或数年内到达全球。

[0160] 因此，对于这些人群来说，在大流行情况下或潜在大流行的情况下特别需要接种保护来对抗流感。适宜的病毒株是但不限于：H5N1、H9N2、H7N7、H2N2 和 H1N1。

[0161] 任选地，所述组合物可包含 3 价以上，例如 3 种非大流行毒株加一种大流行毒株。或者，所述组合物可包含 3 种大流行毒株。优选地，所述组合物包含 3 种大流行毒株。

[0162] 用于本发明的免疫原性组合物的抗原的另一实例是链球菌抗原,例如来自 A 族链球菌或 B 族链球菌,但最优选来自肺炎链球菌。最优选使用至少一种蛋白和 / 或至少一种糖抗原。至少一种肺炎链球菌蛋白抗原最优选选自:肺炎球菌溶血素、PspA 或其跨膜缺失变体、PspC 或其跨膜缺失变体、PsaA 或其跨膜缺失变体、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、CbpA 或其跨膜缺失变体、PhtA、PhtD、PhtB、PhtE、SpsA、LytB、LytC、LytA、Sp125、Sp101、Sp128、Sp130 和 Sp133,或其免疫功能等同物(例如,上述蛋白的结构域的融合体,例如 W001/98334 和 W003/54007 中描述的 PhtDE 融合体)。

[0163] 某些组合物描述于 W000/56359 和 W002/22167 和 W002/22168(在此引入作为参考)。

[0164] 所述抗原可包含荚膜糖类抗原(优选缀合至载体蛋白),其中所述糖类(最优选多糖)来源于至少四种肺炎球菌血清型。优选地,所述四种血清型包括 6B、14、19F 和 23F。在进一步的实施方案中,所述组合物中包含至少 7 种血清型,例如来源于血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 的那些。在进一步的实施方案中,所述组合物中包含至少 10 种血清型,例如在一个实施方案中,所述组合物包含来源于血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 的荚膜糖类(优选缀合至载体蛋白)。在另一实施方案中,免疫原性组合物包含来源于血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 的荚膜糖类(优选缀合至载体蛋白)。在本发明的一种优选实施方案中,包括至少 13 种糖类抗原(优选缀合至载体蛋白),但本发明还包括另外的糖类抗原,例如 23 价体(如血清型 1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F)。

[0165] 尽管上述糖类有利地为其全长天然多糖形式,但应该理解,如果在偶联至蛋白载体时有需要,那么也可以使用大小减少但仍然具备免疫原性的多糖(参见例如 EP497524 和 497525)。

[0166] 为了预防 / 缓解老年(55 岁以上)群体的肺炎和婴儿(最大至 18 个月)以及幼儿(通常是 18 个月到 5 岁)的中耳炎,本发明的优选实施方案将本文描述的多价肺炎链球菌糖类与优选选自以上列出蛋白的肺炎链球菌蛋白组合在一起。肺炎链球菌蛋白的组合还可有利地如下文所述使用。

[0167] 肺炎球菌蛋白

[0168] 肺炎链球菌抗原优选选自:来自多组氨酸三联体家族(Pht)的蛋白、来自 Lyt 家族的蛋白、胆碱结合蛋白、具有 LPXTG 基序的蛋白(其中 X 是任意氨基酸)、具有 II 型信号序列基序 LXXC 的蛋白(其中 X 是任意氨基酸)和具有 I 型信号序列基序的蛋白。这些种类(或基序)中的优选实例是以下蛋白(或其截短物或免疫功能等同物):

[0169] Pht(聚组氨酸三联体)家族包含蛋白 phtA、PhtB、PhtD 和 PhtE。该家族具有以下特征:脂化序列、由脯氨酸富集区和几个组氨酸三联体分隔开的两个结构域(可能涉及金属或核苷结合或酶活性)、(3-5) 卷曲螺旋区、保守的 N 末端和异源的 C 末端。它存在于已检验的所有肺炎球菌菌株中。同源蛋白还可见于其它链球菌和奈瑟氏球菌。该家族优选的成员包括 PhtA、PhtB 和 PhtD。更优选地,其包括 PhtA 或 PhtD。但是,要理解的是,术语 PhtA、B、D 和 E 指具有在下文引用文献中公开的序列的蛋白,以及其具有序列同源性的天然(和人工制备的)变体,所述变体与参比蛋白至少 90% 相同。优选地,至少 95% 相同,最优选 97% 相同。

[0170] 对于 Pht 蛋白而言, PhtA 公开于 W098/18930, 还可称作 Sp36。如上所述, 其是一种多组氨酸三联体家族的蛋白, 且具有 II 型信号基序 LXXC。

[0171] PhtD 公开于 W000/37105, 也可称作 Sp036D。如上所述, 它也是多组氨酸三联体家族的一种蛋白, 也具有 II 型 LXXC 信号基序。PhtB 公开于 W000/37105, 也称作 Sp036B。PhtB 家族的另一成员是降解 C3 的多肽, 公开于 W000/17370。该蛋白也来自多组氨酸三联体家族, 也具有 II 型 LXXC 信号基序。优选的免疫功能等同物是公开于 W098/18930 的蛋白 Sp42。PhtB 截短物 (约 79kD) 公开于 W099/15675, 它也被认为是 PhtX 家族成员。

[0172] PhtE 公开于 W000/30299, 称作 BVH-3。

[0173] SpsA 是胆碱结合蛋白 (Cbp), 公开于 W098/39450。

[0174] Lyt 家族是膜结合蛋白, 与细胞裂解有关。N 末端结构域包含胆碱结合结构域, 但 Lyt 家族不具有以下所示的见于胆碱结合蛋白家族 (Cbp) 的所有特征, 因此, 对本发明而言, Lyt 家族被认为不同于 Cbp 家族。与 Cbp 家族相反, C 末端结构域包含 Lyt 蛋白家族的催化结构域。该家族包括 LytA、B 和 C。对于 Lyt 家族而言, LytA 公开于 Ronda 等, Eur J Biochem, 164 :621-624(1987)。LytB 公开于 W098/18930, 也称作 Sp46。LytC 也公开于 W098/18930, 也称作 Sp91。该家族的优选成员是 LytC。

[0175] 另一个优选实施方案是 Lyt 家族 (具体地说是 LytA) 截短物, 其中“Lyt”如上定义, “截短物”指缺失胆碱结合区的 50% 或更多的蛋白。优选地, 这类蛋白缺失整个胆碱结合区。

[0176] Sp125 是具有细胞壁锚定基序 LPXTG (其中 X 是任意氨基酸) 的肺炎球菌表面抗原的实例。业已发现, 在该类具有此基序的肺炎球菌表面蛋白中的任意蛋白在本发明范围内都是有用的, 因此被看作是本发明的又一种蛋白。Sp125 自身公开于 W098/18930, 也称为 ZmpB 一锌金属蛋白酶。

[0177] Sp101 公开于 W098/06734 (其中, 其具有参考号 #y85993)。其特征还在于 I 型信号序列。

[0178] Sp133 公开于 W098/06734 (其中, 其具有参考号 #y85992)。其特征还在于 I 型信号序列。

[0179] Sp128 和 Sp130 公开于 W000/765400。

[0180] 本发明所使用的蛋白优选选自 : PhtD、PhtA 和 PhtE, 或者是这些蛋白中的 2 种或全部 3 种的组合 (即 PhtA+D、A+E、D+E 或 A+D+E)。

[0181] 可包括的其它肺炎球菌蛋白抗原为来自以下的一种或多种 : 肺炎球菌溶血素 (也称为 Ply ; 优选通过化学处理或突变而去毒) [W096/05859, W090/06951, W099/03884]、PsaA 及其跨膜缺失变体 (Berry 和 Paton, Infect Immun 1996 年 12 月 ; 64(12) : 5255-62)、PspA 及其跨膜缺失变体 (US5804193、W092/14488、W099/53940)、PspC 及其跨膜缺失变体 (W097/09994、W099/53940)、胆碱结合蛋白 (Cbp) 家族成员 [例如 CbpA 及其跨膜缺失变体 (W097/41151 ; W099/51266)]、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (Infect, Immun. 1996 64 : 3544)、HSP70 (W096/40928)、PcpA (Sanchez-Beato 等, FEMS Microbiol Lett 1998, 164 : 207-14)、M 样蛋白 (SB 专利申请号 EP0837130) 和粘附素 18627 (SB 专利申请号 EP0834568)。本发明还包含这种蛋白的免疫功能等同物或截短物 (如上定义)。

[0182] 关于胆碱结合蛋白家族, 该家族的成员最初被鉴定为可通过胆碱亲和层析纯化的

肺炎球菌蛋白。所有胆碱结合蛋白都非共价结合于细胞壁磷壁酸和膜结合型脂磷壁酸的磷酸胆碱部分。在结构上,它们有数个在整个家族中共有的区域,但这些蛋白的确切特性(氨基酸序列,长度等)可变。一般来说,胆碱结合蛋白包含 N 末端区(N)、保守重复区(R1 和/或 R2)、脯氨酸富集区(P)和保守的胆碱结合区(C),这些区域由多个重复序列组成,占该蛋白的约一半。正如本申请中所用的,术语“胆碱结合蛋白家族(Cbp)”选自在 W097/41151 中鉴定的胆碱结合蛋白、PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD 和 CbpG。CbpA 公开于 W097/41151。CbpD 和 CbpG 公开于 W000/29434。PspC 公开于 W097/09994。PbcA 公开于 W098/21337。优选地,胆碱结合蛋白选自:CbpA、PbcA、SpsA 和 PspC。

[0183] 如果 Cbp 是所用的另一种蛋白,那么它可以是 Cbp 截短物,其中“Cbp”如上定义,“截短物”指缺失胆碱结合区(C)的 50%或更多的蛋白。优选这类蛋白缺失整个胆碱结合区。更优选地,这类蛋白截短物缺失(i)胆碱结合区和(ii)该蛋白的 N 末端一半的一部分,但仍保留至少一个重复区(R1 或 R2)。再更优选地,所述截短物具有 2 个重复区(R1 和 R2)。这类优选实施方案的实例是描述于 W099/51266 或 W099/51188 的 NR1xR2、R1xR2、NR1xR2P 和 R1xR2P,但缺失类似胆碱结合区的其它胆碱结合蛋白也包括在本发明的范围内。

[0184] Cbp 截短物-Lyt 截短物嵌合蛋白(或融合体)也可用于本发明的组合物。优选地,其包括 Cbp 的 NR1xR2(或 R1xR2 或 NR1xR2P 或 R1xR2P)和 Lyt 的 C 末端区(Cterm,即缺失胆碱结合域)(例如 LytCCterm 或 Sp91Cterm)。更优选地,Cbp 选自 CbpA、PbcA、SpsA 或 PspC。再更优选地,其是 CbpA。优选地,Lyt 是 LytC(也可称作 Sp91)。

[0185] 也可应用缺失了胆碱结合域(C)并表达为与 Lyt 的融合蛋白的 PspA 或 PsaA 截短物。优选地,Lyt 是 LytC。

[0186] 在一种肺炎球菌组合物中,可能组合本发明的不同肺炎球菌蛋白。优选本发明的蛋白组合选自 2 种或多种(3 或 4 种)不同种类,如具有 II 型信号序列基序 LXXC 的蛋白(其中 X 是任何氨基酸,例如多组氨酸三联体家族(Pht))、胆碱结合蛋白家族(Cbp)、具有 I 型信号序列基序的蛋白(例如 Sp101)、具有 LPXTG 基序的蛋白(其中 X 是任意氨基酸,例如 Sp128、Sp130)、毒素(例如 Ply)等等。在这些种类(或基序)中的优选实例是以上所提到的蛋白或其免疫功能等同物。毒素+Pht、毒素+Cbp、Pht+Cbp 和毒素+Pht+Cbp 是优选的种类组合。

[0187] 优选的有益组合包括但不限于 PhtD+NR1xR2、PhtD+NR1xR2-Sp91Cterm 嵌合或融合蛋白、PhtD+Ply、PhtD+Sp128、PhtD+PsaA、PhtD+PspA、PhtA+NR1xR2、PhtA+NR1xR2-Sp91Cterm 嵌合或融合蛋白、PhtA+Ply、PhtA+Sp128、PhtA+PsaA、PhtA+PspA、NR1xR2+LytC、NR1xR2P+PspA、NR1xR2+PspA、NR1xR2+Sp128、R1xR2+LytC、R1xR2+PspA、R1xR2+PsaA、R1xR2+Sp128、R1xR2+PhtD、R1xR2+PhtA。优选地,NR1xR2(或 R1xR2)来自 CbpA 或 PspC。更优选它来自 CbpA。

[0188] 特别优选的肺炎球菌蛋白组合包括 Ply(或其截短物或免疫功能等同物)+PhtD(或其截短物或免疫功能等同物)以及任选包括 NR1xR2(或 R1xR2 或 NR1xR2P 或 R1xR2P)。优选地,NR1xR2(或 R1xR2 或 NR1xR2P 或 R1xR2P)来自 CbpA 或 PspC。更优选它来自 CbpA。

[0189] 所述抗原可为含多糖抗原的肺炎球菌糖类缀合物,所述多糖抗原来自至少 4 种血清型,优选至少 7 种血清型,更优选至少 10 种血清型,包括至少一种但优选 2、3 或 4 种优选

选自上述蛋白组的肺炎链球菌蛋白。优选所述蛋白中的一种蛋白是 PhtD (或其免疫功能等同物) 和 / 或 Ply (或其免疫功能等同物)。

[0190] 与多糖接种方法有关的问题是多糖本身为弱免疫原这一事实。为克服此问题,可将多糖与蛋白载体缀合,所述载体可提供旁观 T 细胞辅助作用。因此,优选本发明所用的糖类连接至这种蛋白载体。目前常用于产生糖类免疫原的这类载体的实例包括白喉类毒素和破伤风类毒素 (分别为 DT、DT CRM197 和 TT)、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、来自脑膜炎奈瑟氏球菌的 OMPC 以及结核菌素的纯化蛋白衍生物 (PPD)。

[0191] 基于肺炎球菌糖类的免疫原性组合物 (或疫苗) 的优选载体是来自流感嗜血杆菌的 D 蛋白 (EP594610-B) 或其片段。适合使用的片段包括含 T 辅助表位的片段。具体地说, D 蛋白片段优选包含所述蛋白的 N 末端 1/3。D 蛋白载体可作为载体用在其中缀合了多种肺炎球菌糖类抗原的组合物中。组合中的一种或多种肺炎球菌糖类可有利地缀合到 D 蛋白上。

[0192] 用于肺炎球菌糖类的另一种优选载体是肺炎球菌蛋白本身 (如上在“本发明的肺炎球菌蛋白”章节中定义)。

[0193] 所述糖类可通过任何已知方法 (例如 Likhite 的美国专利 4,372,945 和 Armor 等的美国专利 4,474,757 的方法) 与载体蛋白连接。优选地,可进行 CDAP 缀合 (W095/08348)。

[0194] 优选地,所述缀合物的蛋白:糖类 (重量:重量) 比例是 0.3 : 1 到 1 : 1,更优选 0.6 : 1 到 0.8 : 1,最优选约 0.7 : 1。

[0195] 本发明的特别优选的组合物包含一种或多种缀合的肺炎球菌糖类,以及本发明的一种或多种肺炎球菌蛋白。另外,肺炎球菌糖类和蛋白可作为吸附在磷酸铝上的原液组分以液体形式稳定储存。

[0196] 在本发明的另一方面,疫苗组合物可以包含人巨细胞病毒 (HCMV) 抗原。HCMV 是一种属于疱疹病毒家族的人 DNA 病毒,并且是新生儿先天缺陷的主要原因,并且也导致免疫受损患者的严重医学状况。临床疾病导致多种症状,包括发热、肝炎、肺炎和传染性单核细胞增多症。

[0197] 在一种实施方案中, HCMV 抗原是嵌合融合蛋白或其免疫原性衍生物,其包含与 HSV 糖蛋白的一部分融合的 HCMV 糖蛋白的一部分。HCMV 糖蛋白典型地是 gB, 并且 HSV 糖蛋白典型地是 gD, 特别是 HSV2 型 gD (gD2)。融合体典型地位于 HCMV gB 蛋白的一部分的 N 末端部分的氨基酸与 HCMV gD 蛋白的一部分的 C 末端的氨基酸之间。融合蛋白的 HCMV gB 蛋白和 HSV gD 蛋白组分都可以缺乏膜锚区。

[0198] HCMV gB 蛋白的部分可以包含 HCMV gB 的不可切割形式。合适地,这是通过改变位于蛋白的切割位点的一个或多个氨基酸,例如通过分别将 Arg458 和 Arg459 分别交换为 Glu 和 Thr 而实现的。HSV 蛋白的部分可以包含 gD2 的信号序列 (氨基酸 1-25), 并且任选包含 gD2 的氨基酸 26-52, 和 / 或来自 gD2 的序列 PEDSALLEDPED 或其功能等同物,其可以更短或更长。来自 HSV gD 的其它序列可以加入融合蛋白,例如 HCMV gB 蛋白的 C 末端。

[0199] 在一种实施方案中,融合蛋白包含与 HCMV gB 蛋白的残基 28-685 融合的 HSV gD2 蛋白的氨基酸 1-52。所述融合蛋白称作 HCMVgB685\*。在进一步的实施方案中,来源于内部 gD2 序列的氨基酸序列 PEDSALLEDPED 可以包括在蛋白 HCMV gB685\* 的 C 末端,以产生命名为 HCMV gB685\*\* 的蛋白。这些特定融合蛋白更详细描述于 W095/31555。

[0200] 适于用作 HCMV 疫苗的另一种免疫原是 pp65,它是一种描述于 W094/00150 (City of Hope) 的 HCMV 基质。

[0201] 在进一步的实施方案中,免疫原性组合物包含来源于认为与生殖器疣有关的人乳头瘤病毒 (HPV) (HPV6 或 HPV11 以及其它 HPV 病毒) 和 / 或与宫颈癌有关的 HPV 病毒 (HPV16、HPV18 以及其它 HPV 病毒) 的抗原。

[0202] 在一种实施方案中,生殖器疣预防或治疗组合物的形式包含 L1 颗粒或病毒壳粒和融合蛋白,该融合蛋白包含一种或多种选自 HPV 蛋白 E1、E2、E5、E6、E7、L1 和 L2 的抗原。

[0203] 在一种实施方案中,融合蛋白的形式为:W096/26277 公开的 L2E7 和 GB9717953.5 (PCT/EP98/05285) 公开的蛋白 D(1/3)-E7。

[0204] 优选 HPV 宫颈感染或宫颈癌的预防或治疗疫苗组合物可包含 HPV16 或 18 抗原。例如 L1 或 L2 抗原单体、或以病毒样颗粒 (VLP) 一起存在的 L1 或 L2 抗原或者以 VLP 或壳粒结构单独存在的 L1 蛋白。这类抗原、病毒样颗粒和病毒壳粒本身是已知的。参见例如 W094/00152、W094/20137、W094/05792 和 W093/02184。

[0205] 可包含其它单独或作为融合蛋白的早期蛋白,例如 E7、E2 或优选 E5;这样特别优选的实施方案包括含 L1E7 融合蛋白的 VLP (W096/11272)。

[0206] 在一种实施方案中,HPV16 抗原包含与蛋白 D 载体融合的早期蛋白 E6 或 E7,以形成蛋白 D-HPV16 的 E6 或 E7 融合体,或其组合;或者 E6 或 E7 与 L2 的组合 (W096/26277)。

[0207] 或者,HPV16 或 18 早期蛋白 E6 和 E7 可以以单个分子、优选蛋白 D-E6/E7 融合蛋白存在。这种组合物可任选包含 HPV18 的 E6 和 E7 之一或二者,优选为蛋白 D-E6 或蛋白 D-E7 融合蛋白或蛋白 D E6/E7 融合蛋白形式。

[0208] 本发明的组合物还可额外包含来自其它 HPV 类型、优选 HPV31 或 33 的抗原。

[0209] 致癌 HPV 类型包括 HPV31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 和 68。因此,除 HPV16 和 / 或 PV18 之外,本发明的组合物可以包含来自一种或多种所述 HPV 类型的抗原。

[0210] 用于本发明的 HPV L1VLPs 或病毒壳粒可以包含全长 L1 或 L1 的免疫原性片段,或由全长 L1 或 L1 的免疫原性片段组成。当 VLP 或病毒壳粒包含 L1 的免疫原性片段或由 L1 的免疫原性片段组成时,HPV L1 的合适免疫原性片段包括 L1 的截短、缺失、取代或插入突变体。合适地,所述免疫原性片段能够引起免疫应答,所述免疫应答能够识别 L1 蛋白,例如得到 L1 蛋白的 HPV 类型的病毒样颗粒。

[0211] 合适的免疫原性 L1 片段包括截短的 L1 蛋白。一方面,截短除去了核定位信号。另一方面,截短是 C 末端截短。另一方面,C 末端截短除去了少于 50 个氨基酸,如少于 40 个氨基酸。当 L1 来自 HPV16 时,则另一方面,C 末端截短从 HPV16L1 除去了 34 个氨基酸。当 L1 来自 HPV18 时,则另一方面,C 末端截短从 HPV18L1 除去了 35 个氨基酸。

[0212] 合适的截短的 HPV16 和 18L1 序列公开于 W006/114312。

[0213] HPV16 序列也可以为公开于 W09405792 或 US6649167 中的那些,例如,合适地被截短。合适的截短为在上述序列的等同位置截短,如通过序列比较来评价。

[0214] 另一种 HPV18 序列在 W09629413 中公开,其可合适地被截短。合适的截短为在上述序列的等同位置截短,如通过序列比较来评价。

[0215] 其它的 HPV16 和 HPV18 序列是本领域已知的,可适用于本发明。

[0216] 当存在来自另一种 HPV 类型的 L1 蛋白时,则可以使用相应于对 HPV16 和 HPV18 进

行的 C 末端截短的那些截短,这是基于 DNA 或蛋白序列比对。HPV31 和 45L1 蛋白的合适截短公开于 W006/114312。

[0217] 例如,也可以进行 HPV31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 和 68 的合适的截短,在一方面,除去与上文描述的那些等同的 L1 蛋白 C 末端部分,如通过序列比对所评价的。

[0218] 本发明的 L1 蛋白或其免疫原性片段可以任选是融合蛋白形式,例如 L1 蛋白与 L2 或早期蛋白的融合体。

[0219] HPV L1 蛋白合适地是病毒壳粒或病毒样颗粒 (VLP) 的形式。一方面,HPV VLPs 可以用于本发明。HPV VLPs 和生产 VLPs 的方法是本领域公知的。VLPs 典型地是从病毒的 L1 结构蛋白,任选从 L2 结构蛋白构建的,参见例如 W09420137, US5985610, W09611272, US6599508B1, US6361778B1, EP595935。任何合适的 HPV VLP 都可以用于本发明,其提供交叉保护,如 L1 或 L1+L2VLP。

[0220] 合适地,VLP 是仅仅含有 L1 的 VLP。

[0221] 本发明的组合物可以含有 HPV16L1VLPs 和 HPV18L1VLPs 的组合,或来自 HPV16,18,31 和 45 的 HPV L1VLPs 的组合,或更大的组合,并且包括 HPV16 和 18 或 HPV16,18,31 和 45L1VLPs,或更大的组合,其中 L1 按照上文的描述任选截短。

[0222] 在本发明的特定实施方案中,一种或多种来自致癌 HPV 类型的额外抗原与 HPV16 和 / 或 18 抗原一起使用,所述抗原选自以下 HPV 类型:HPV31,45,33,58 和 52。如本文的描述,每种情况下抗原可以是 L1,例如 L1VLPs 或病毒壳粒形式。因此,用于本文描述的组合物、方法和用途中的 HPV 抗原可以包含来自 HPV16,18,31,45,33,58 和 52 的 L1VLPs 或病毒壳粒或由所述 VLPs 或病毒壳粒组成。L1VLPs 可以是仅仅含 L1 的 VLPs,或与另一种抗原如 L2 在 L1+L2VLPs 中组合。L1 蛋白可以合适地按照本文的描述截短。

[0223] 可以通过标准技术,例如电子显微术和动态激光散射来评估 VLP 制剂。

[0224] VLP 可以包含全长 L1 蛋白。一方面,用于形成 VLP 的 L1 蛋白是上文描述的截短的 L1 蛋白。

[0225] 可以在任何合适的细胞基质,如酵母细胞或昆虫细胞,如在杆状病毒表达系统中制备 VLPs,并且,用于制备 VLPs 的技术是本领域公知的,如 W09913056, US6416945B1, US6261765B1 和 US6245568 及其中的参考文献,在此引入其完整内容作为参考。

[0226] 可以通过解组装和重新组装技术来制备 VLP,其可提供更稳定和 / 或更均质的乳头瘤病毒 VLP。例如 McCarthy 等,1998 " Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type11Virus like Particles in Vitro" J.Virology72(1): 33-41,其中描述了从昆虫细胞纯化的重组 L1HPV11VLP 的解组装和重新组装以获得 VLP 的均质制剂。W09913056 和 US6245568 也描述了制备 HPV VLP 的解组装和重新组装方法。

[0227] 一方面,本发明的 HPV VLPs 可如 W09913056 或 US6245568 中的描述制备。

[0228] 本发明的组合物可以包含来自引起疟疾的寄生虫如恶性疟原虫或间日疟原虫的抗原或其抗原性制剂。例如,可能的来自恶性疟原虫的抗原包括孢子蛋白 (CS 蛋白)、RTS, S MSP1、MSP3、LSA1、LSA3、AMA1 和 TRAP。RTS 是一种杂合蛋白,包含恶性疟原虫的孢子 (CS) 蛋白的基本上所有 C- 末端部分,其通过乙型肝炎表面抗原的 preS2 部分的四个氨基酸与乙型肝炎病毒的表面 (S) 抗原连接。它的完整结构在国际专利申请 NO. PCT/EP92/02591 中公开,所述专利申请的公开号是 W093/10152,要求英国专利申请

No. 9124390.7 的优先权。当在酵母中表达时,RTS 作为脂蛋白颗粒产生,当与来自 HBV 的 S 抗原共表达时,产生称为 RTS, S 的混合颗粒。TRAP 抗原在以 W090/01496 公开的国际专利申请 NO. PCT/GB89/00895 中公开。本发明的一种优选实施方案是疟疾疫苗,其中抗原性制剂包含 RTS, S 和 TRAP 抗原的组合。其他很可能作为多阶段疟疾疫苗的组分候选物的疟原虫抗原是恶性疟原虫 MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、锚合蛋白、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfs25、Pfs28、PFS27/25、Pfs16、Pfs48/45、Pfs230 和它们在疟原虫物种中的类似物。本发明的一个实施方案是包含 RTS, S 或 C 蛋白或其片段,如 RTS, S 的 CS 部分的组合物,所述 RTS, S 或 C 蛋白或其片段与可以选自例如 MSP1、MSP3、AMA1、LSA1 或 LSA3 的一种或多种其它疟疾抗原组合。来自间日疟原虫的可能抗原包括孢子蛋白(CS 蛋白)和 Duffy 抗原结合蛋白及其片段,如 PvRII(参见例如 W002/12292)。

[0229] 可以用于本发明的免疫原性组合物的其它可能的抗原包括:

[0230] 链球菌抗原,如来自 A 族链球菌或 B 族链球菌、合适地来源于以下病原体的抗原: HIV-1, (如 F4 抗原或其片段或 gag 或其片段,诸如 p24、tat、nef、gp120 或 gp160 或任何这些抗原的片段);人类疱疹病毒,如 gD 或其衍生物或立即早期蛋白,如来自 HSV1 或 HSV2 的 ICP27;巨细胞病毒((尤其是人类))(如 gB 或其衍生物);轮状病毒(包括减毒活病毒);EB 病毒(如 gp350 或其衍生物);水痘-带状疱疹病毒(如 gpI、II 和 IE63);或来自肝炎病毒,如乙型肝炎病毒(例如乙型肝炎表面抗原或其衍生物)、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒,或来自其它病毒病原体,如副粘病毒:呼吸道合胞体病毒(如 F、N 和 G 蛋白或其衍生物)、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人乳头瘤病毒(例如 HPV6、11、16、18)、黄病毒(如黄热病毒、登革热病毒、蜱传播脑炎病毒、日本脑炎病毒)或流感病毒(全活病毒或灭活病毒、在卵中或 MDCK 细胞中培养的分裂流感病毒或完整流感病毒体(如 R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920 所述)或其纯化蛋白或重组蛋白,如 HA、NP、NA 或 M 蛋白或其组合);或来源于细菌病原体,如奈瑟氏球菌(*Neisseria* spp),包括淋病奈瑟氏球菌(*N. gonorrhea*)和脑膜炎奈瑟氏球菌(*N. meningitidis*)(例如荚膜糖类及其缀合物、运铁蛋白结合蛋白、乳铁蛋白结合蛋白、PilC、粘附素);化脓链球菌(*S. pyogenes*)(如 M 蛋白或其片段, C5A 蛋白酶、脂磷壁酸)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)、变异链球菌(*S. mutans*);杜氏嗜血菌(*H. ducreyi*);莫拉氏菌(*Moraxella* spp),包括粘膜炎莫拉氏菌(*M. catarrhalis*),也称为粘膜炎布兰汉氏球菌(*Branhamella catarrhalis*)(例如高分子量和低分子量的粘附素和侵袭素);博德特氏菌(*Bordetella* spp),包括百日咳博德特氏菌(*B. pertussis*)(例如百日咳外膜蛋白(pertactin)、百日咳毒素或其衍生物、丝状血凝素、腺苷酸环化酶、菌毛)、副百日咳博德特氏菌(*B. parapertussis*)和支气管炎博德特氏菌(*B. bronchiseptica*);分枝杆菌(*Mycobacterium* spp.),包括结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)(例如 ESAT6、抗原 85A、-B 或 -C)、牛分枝杆菌(*M. bovis*)、麻风分枝杆菌(*M. leprae*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、副结核分枝杆菌(*M. paratuberculosis*)、耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*);军团菌(*Legionella* spp),包括侵肺军团菌(*L. pneumophila*);埃希氏菌(*Escherichia* spp),包括肠产毒性大肠杆菌(enterotoxigenic *E. coli*)(例如定居因子、热不稳定毒素或其衍生物、热稳定毒素或其衍生物)、肠出血性大肠杆菌、肠致病性大肠杆菌(例如志贺毒素样毒素或其衍生物);弧菌(*Vibrio* spp),包括霍乱弧菌(*V. cholera*)(例如霍乱毒素或其衍生物);志贺氏菌(*Shigella* spp),包括索氏志

贺氏菌 (*S. sonnei*)、痢疾志贺氏菌 (*S. dysenteriae*)、弗氏志贺氏菌 (*S. flexnerii*) ; 耶尔森氏菌 (*Yersinia* spp), 包括小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Y. enterocolitica*) (例如 Yop 蛋白)、鼠疫耶尔森氏菌 (*Y. pestis*)、假结核耶尔森氏菌 (*Y. pseudotuberculosis*) ; 弯曲杆菌 (*Campylobacter* spp), 包括空肠弯曲杆菌 (*C. jejuna*) (例如毒素、粘附素和侵袭素) 和大肠弯曲杆菌 (*C. coli*) ; 沙门氏菌 (*Salmonella* spp), 包括伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*)、副伤寒沙门氏菌 (*S. paratyphi*)、猪霍乱沙门氏菌 (*S. choleraesuis*)、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) ; 利斯特氏菌 (*Listeria* spp), 包括单核细胞增生利斯特氏菌 (*L. monocytogenes*) ; 螺杆菌 (*Helicobacter* spp), 包括幽门螺杆菌 (*H. pylori*) (例如脲酶、过氧化氢酶、空泡毒素) ; 假单胞菌 (*Pseudomonas* spp), 包括铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) ; 葡萄球菌 (*Staphylococcus* spp), 包括金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、表皮葡萄球菌 (*S. epidermidis*) ; 肠球菌 (*Enterococcus* spp), 包括粪肠球菌 (*E. faecalis*)、尿肠球菌 (*E. faecium*) ; 梭菌 (*Clostridium* spp.), 包括破伤风梭菌 (*C. tetani*) (例如破伤风毒素和其衍生物)、肉毒梭菌 (*C. botulinum*) (例如肉毒杆菌毒素和其衍生物)、艰难梭菌 (*C. difficile*) (例如梭菌毒素 A 或 B 和其衍生物) ; 芽孢杆菌 (*Bacillus* spp), 包括炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*) (例如肉毒杆菌毒素和其衍生物) ; 棒杆菌 (*Corynebacterium* spp), 包括白喉棒杆菌 (*C. diphtheriae*) (例如白喉毒素和其衍生物) ; 疏螺旋体 (*Borrelia* spp.), 包括布氏疏螺旋体 (*B. burgdorferi*) (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、格氏疏螺旋体 (*B. garinii*) (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、阿氏疏螺旋体 (*B. afzelii*) (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、*B. andersonii* (例如 OspA、OspC、DbpA、DbpB)、赫氏蜱疏螺旋体 (*B. hermsii*) ; 埃里希氏体 (*Ehrlichia* spp), 包括马埃里希氏体 (*E. equi*) 和人粒细胞埃里希氏体病 (*Ehrlichiosis*) 因子 ; 立克次氏体 (*Rickettsia* spp), 包括立氏立克次氏体 (*R. rickettsii*) ; 衣原体 (*Chlamydia* spp.), 包括砂眼衣原体 (*C. trachomatis*) (例如 MOMP、肝素结合蛋白)、肺炎衣原体 (*C. pneumomae*) (例如 MOMP、肝素结合蛋白)、鹦鹉热衣原体 (*C. psittaci*) ; 钩端螺旋体 (*Leptospira* spp.), 包括问号钩端螺旋体 (*L. interrogans*) ; 密螺旋体 (*Treponema* spp.), 包括苍白密螺旋体 (*T. pallidum*) (例如稀有外膜蛋白)、齿垢密螺旋体 (*T. denticola*)、猪痢疾密螺旋体 (*T. hyodysenteriae*) ; 或来源于寄生物, 如疟虫 (*plasmodium* spp.), 包括恶性疟虫 (*P. falciparum*) ; 弓形虫 (*Toxoplasma* spp.), 包括鼠弓形虫 (*T. gondii*) (例如 SAG2、SAG3、Tg34) ; 内变形虫 (*Entamoeba* spp.), 包括痢疾内变形虫 (*E. histolytica*) ; 巴贝虫 (*Babesia* spp.), 包括果氏巴贝虫 (*B. microti*) ; 锥虫 (*Trypanosoma* spp.), 包括克香氏锥虫 (*T. cruzi*) ; 贾第虫 (*Giardia* spp.), 包括表吮贾第虫 (*G. lamblia*) ; 利什曼虫 (*Leishmania* spp.), 包括硕大利什曼虫 (*L. major*) ; 肺囊虫 (*pneumocystis* spp.), 包括卡氏肺囊虫 (*P. carinii*) ; 毛滴虫 (*Trichomonas* spp.), 包括阴道毛滴虫 (*T. vaginalis*) ; 血吸虫 (*Schistosoma* spp.), 包括曼氏血吸虫 (*S. mansoni*), 或来源于酵母, 如假丝酵母 (*Candida* spp.), 包括白色假丝酵母 (*C. albicans*) ; 隐球酵母 (*Cryptococcus* spp.), 包括新型隐球酵母 (*C. neoformans*)。

[0231] 结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 的其它优选特异性抗原是例如 Tb Ra12、Tb H9、Tb Ra35、Tb38-1、Erd14、DPV、MTI、MSL、mTTC2 和 hTCC1 (W099/51748), Mtb72F 和 M72。结核分枝杆菌的蛋白还包括融合蛋白和其变体, 其中结核分枝杆菌的至少两个, 优选三个多肽融合成一个更大的蛋白。优选的融合体包括 Ra12-TbH9-Ra35、Erd14-DPV-MTI、

DPV-MTI-MSL、Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2、Erd14-DPV-MTI-MSL、DPV-MTI-MSL-mTCC2、Tbh9-DPV-MTI (W099/51748)。可以提到的特定 Ra12-Tbh9-Ra35 序列是 W02006/117240 中定义为 SEQ ID No6 的序列以及其变体（其中该序列的 Ser704 突变为丝氨酸以外的氨基酸，如 Ala）和衍生物，所述衍生物中掺入了合适长度的 N 末端 His 标记（如 W02006/117240 的 SEQ ID No2 或 4）。

[0232] 衣原体如沙眼衣原体的示例性抗原选自 CT858, CT089, CT875, MOMPCT622, PmpD, PmpG 及其片段, SWIB 和其任一免疫原性片段（如 PmpDpd 和 PmpGpd）及其组合。抗原的优选组合包括 CT858, CT089 和 CT875。可以采用的特定序列和组合描述于 W02006/104890。优选的细菌组合物包含源自嗜血菌 (*Haemophilus* spp) 的抗原, 包括 B 型流感嗜血菌（例如 PRP 及其缀合物）、不可分型的流感嗜血菌, 例如 OMP26、高分子量粘附素、P5、P6、D 蛋白和脂蛋白 D, 以及丝束蛋白和丝束蛋白衍生的肽 (US5, 843, 464) 或多重拷贝变体或其融合蛋白。

[0233] 乙型肝炎表面抗原的衍生物是本领域熟知的, 且尤其包括, 在欧洲专利申请 EP-A-414374、EP-A-0304578 和 EP198-474 中所列出的 PreS1、PreS2S 抗原。在一个优选方面, 本发明的疫苗制剂包含 HIV-1 抗原、gp120, 尤其是在 CHO 细胞中表达时。在另一个实施方案中, 本发明的组合物包含如上文所述的 gD2t。

[0234] 组合物还可包含抗肿瘤抗原, 并用于癌症的免疫治疗性治疗。例如, 所述抗原可为肿瘤排斥抗原, 例如针对前列腺癌、乳癌、结直肠癌、肺癌、胰腺癌、肾癌或黑素瘤的抗原。示例性的抗原包括 MAGE1、MAGE3 和 MAGE4 或例如公开于 W099/40188 中的其它 MAGE 抗原、PRAME、BAGE、Lage（也称为 NY Eos1）、SAGE 和 HAGE (W099/53061) 或 GAGE (Robbins 和 Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunology* 8, 628-636 页; Van den Eynde 等, *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (1997 年提交); Correale 等 (1997), *Journal of the National Cancer Institute* 89, 293 页)。实际上, 这些抗原在广泛的肿瘤类型中表达, 如黑素瘤、肺癌、肉瘤和膀胱癌。

[0235] 用于本发明的 MAGE 抗原可与表达增强子或免疫融合配偶体一起作为融合蛋白表达。具体地说, Mage 蛋白可融合至 B 型流感嗜血菌的 D 蛋白或其脂质化衍生物。具体地说, 融合配偶体可包含 D 蛋白的前 1/3。此结构公开于 W099/40188。

[0236] 其它肿瘤特异性抗原包括但不限于 KSA (GA733) 肿瘤特异性神经节苷脂, 例如 GM2 和 GM3 或其与运载蛋白的缀合物; 或者所述抗原可以是自身肽激素, 如全长促性腺激素释放激素 (GnRH, W095/20600), 其是 10 个氨基酸长的短肽, 用于治疗许多癌症, 或用于免疫去势。

[0237] 在一个优选实施方案中, 利用前列腺抗原, 例如前列腺特异性抗原 (PSA)、PAP、PSCA (PNAS95 (4) 1735-17401998)、PSMA 或称为 Prostase 的抗原。

[0238] Prostase 是前列腺特异性丝氨酸蛋白酶（胰蛋白酶样）, 254 个氨基酸长, 具有保守的丝氨酸蛋白酶催化三联体 H-D-S 和氨基末端前 - 肽原序列, 显示潜在的分泌功能 (P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinas, L. Hood & K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96, 3114-3119)。已经描述了推定的糖基化位点。预测的结构非常类似于其它已知的丝氨酸蛋白酶, 表明成熟

多肽折叠成单个结构域。成熟蛋白为 224 个氨基酸长,具有一个显示被天然加工的 A2 表位。

[0239] Prostase 核苷酸序列和推定的多肽序列和同源物公开于 Ferguson 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA1999, 96, 3114-3119) 和国际专利申请号 W098/12302 (以及相应的授权专利 US5, 955, 306)、W098/20117 (以及相应的授权专利 US5, 840, 871 和 US5, 786, 148) (前列腺特异性激肽释放酶) 和 W000/04149 (P703P)。本发明提供含基于 Prostase 蛋白及其片段和同源物 (“衍生物”) 的含 Prostase 蛋白融合体的组合物。这种衍生物适用于适合治疗前列腺肿瘤的治疗性疫苗制剂。典型地,所述片段将含如在以上引用的专利和专利申请中公开的至少 20 个、优选 50 个、更优选 100 个连续氨基酸。

[0240] 再优选的前列腺抗原称为 P501S,即 W098/37814 的序列标识号 113。免疫原性片及其部分含如以上引用的专利申请中公开的至少 20 个、优选 50 个、更优选 100 个连续氨基酸。参见例如 PS108 (W098/50567)。

[0241] 其它前列腺特异性抗原可从 W098/37418 和 W0/004149 得知。另一个是 STEAP (PN AS9614523145287-121999)。

[0242] 在本发明范围中有用的其它肿瘤相关抗原包括:Plu-1 (J Biol. Chem274 (22) 15633-15645, 1999)、HASH-1、HasH-2、Cripto (Salomon 等, Bioessays199, 2161-70, 美国专利 5654140)、Criptin (美国专利 5981215)。另外,与癌症治疗特别相关的抗原还包括酪氨酸酶和存活蛋白。

[0243] 粘蛋白衍生的肽如 Muc1 参见例如 US5744, 144、US5827, 666、W08805054、US4, 963, 484。特别考虑的是 Muc1 衍生肽,其包含 Muc1 肽的至少一个重复单元,优选至少两个这种重复单元,其可被 SM3 抗体识别 (US6054438)。其它粘蛋白衍生肽包括来自 Muc5 的肽。

[0244] 本发明抗原可为乳癌抗原,如 Her-2/Neu、乳腺珠蛋白 (美国专利 5668267) 或在 W000/52165、W099/33869、W099/19479、W098/45328 中公开的抗原。Her2neu 抗原特别地公开于美国专利 5, 801, 005。优选地,Her2neu 包含完整胞外结构域 (包含大约氨基酸 1-645) 或其片段,以及大约 C 末端 580 个氨基酸的至少免疫原性部分或完整胞内结构域。具体地说,胞内部分应包含磷酸化结构域或其片段。这种构建体公开于 W000/44899。一种特别优选的构建体被称为 ECD PD,第二种被称为 ECD PD。参见 W000/44899。在此使用的 Her-2neu 可来源于大鼠、小鼠或人类。

[0245] 所述组合物可包含与肿瘤支持机制 (例如血管生成、肿瘤侵入) 相关的抗原,例如 tie2、VEGF。

[0246] 可预见的是,本发明的组合物可使用来源于博氏疏螺旋体 (*Borrelia* sp.) 的抗原。例如,抗原可包括核酸、病原体衍生的抗原或抗原制备物、重组生产的蛋白或肽以及嵌合融合蛋白。具体地说,所述抗原是 OspA。OspA 可为借助于宿主细胞 (大肠杆菌) 的脂质化形式的完整成熟蛋白,称为 (Lipo-OspA),或者可为非脂质化的衍生物。此非脂质化衍生物包括具有流感病毒非结构蛋白 (NS1) 的前 81 个 N-末端氨基酸的非脂质化 NS1-OspA 融合蛋白、完整 OspA 蛋白以及另一个 MDP-OspA,MDP-OspA 是携带 3 个额外的 N-末端氨基酸的 OspA 的非脂质化形式。

[0247] 本发明的组合物可用于变态反应的预防或治疗。这种疫苗应包含变应原特异性抗原 (例如 Der p1) 和变应原非特异性抗原 (例如来源于人 IgE 的肽,包括但不限于

stanworth 十肽 (EP0477231B1))。

[0248] 本发明的组合物还可用于变态反应、癌症或感染性疾病之外的慢性疾病的预防或治疗。这种慢性疾病是诸如动脉硬化和阿尔茨海默病的疾病。

[0249] 本发明的组合物特别适合于诸如慢性病症和癌症的疾病的免疫治疗性治疗,而且适合于持续感染的治疗。因此,本发明的组合物特别适合于感染性疾病的免疫治疗,所述感染性疾病例如为结核病 (TB)、AIDS 和乙型肝炎 (HepB) 病毒感染。

[0250] 另外,在 AIDS 背景下,提供一种治疗易感或患有 AIDS 的个体的方法。该方法包括给予所述个体本发明的疫苗,由此降低由随后的 HIV 感染引起的 CD4+T 细胞减少量,或者减慢或阻止已感染 HIV 的个体中的 CD4+T- 细胞减少。

[0251] 除了上述肺炎球菌抗原以外 (包括或不包括肺炎球菌抗原),其它抗原包括细菌 (优选荚膜) 糖类。多糖抗原吸附到磷酸铝上,便利地储存于原液中 - 因此通过将所述原液与本发明的含油乳液即时混合直接产生本发明的疫苗组合物。优选地,所述其它细菌糖类选自:脑膜炎奈瑟氏球菌血清型 A 荚膜糖类 (MenA)、脑膜炎奈瑟氏球菌血清型 C 荚膜糖类 (MenC)、脑膜炎奈瑟氏球菌血清型 Y 荚膜糖类 (MenY)、脑膜炎奈瑟氏球菌血清型 W-135 荚膜糖类 (MenW)、B 族链球菌 I 组荚膜糖类、B 族链球菌 II 组荚膜糖类、B 族链球菌 III 组荚膜糖类、B 族链球菌 IV 组荚膜糖类、B 族链球菌 V 组荚膜糖类、金黄色葡萄球菌 5 型荚膜糖类、金黄色葡萄球菌 8 型荚膜糖类、得自伤寒沙门氏菌的 Vi 糖类、脑膜炎奈瑟氏球菌 LPS、卡他莫拉菌 LPS 和流感嗜血菌 LPS。所述 LPS 是指天然脂多糖 (或脂寡糖) 或其中脂质 A 部分已通过众多已知方法中的任一种解毒的脂多糖 (参见例如 W097/18837 或 W098/33923), 或任何包含来源于所述 LPS 的 O- 多糖的分子。所述脑膜炎奈瑟氏球菌 LPS 是指 12 种已知免疫型 (L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11 或 L12) 中的 1 种或多种。

[0252] 特别优选的组合是含以下组分的组合物:1) 缀合的 Hib、缀合的 MenA 和缀合的 MenC;2) 缀合的 Hib、缀合的 MenY 和缀合的 MenC;3) 缀合的 Hib 和缀合的 MenC;和 4) 缀合的 MenA、缀合的 MenC、缀合的 MenY 和缀合的 MenW-135。在每种上述缀合物中的 PS 量可为每 0.5mL 人剂量各 5 或 10  $\mu$ g。优选地, Hib、MenA、MenC、MenW-135 和 MenY 是 TT 缀合物。

[0253] 与多糖接种方法有关的问题是多糖本身为弱免疫原这一事实。为克服此问题,可将本发明的糖类与蛋白载体缀合,所述载体可提供旁观 T 细胞辅助作用。因此,优选本发明所用的糖类连接至这种蛋白载体。目前常用于产生糖类免疫原的这类载体的实例包括白喉类毒素和破伤风类毒素 (分别为 DT、DT CRM197 和 TT)、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、来自流感嗜血杆菌的 D 蛋白 (EP594610-B)、来自脑膜炎奈瑟氏球菌的 OMPC 以及结核菌素的纯化蛋白衍生物 (PPD)。

[0254] 所述糖类可通过任何已知方法 (例如 Likhite 的美国专利 4,372,945 和 Armor 等的美国专利 4,474,757 中的方法) 连接至载体蛋白。优选地,可进行 CDAP 缀合 (W095/08348)。

[0255] 优选地,所述缀合物的蛋白:糖类 (重量:重量) 比例是 0.3 : 1-1 : 1,更优选 0.6 : 1-0.8 : 1,最优选约 0.7 : 1。

[0256] 本发明包括提供抗肺炎球菌和不同病原体的保护作用的抗原组合。目前许多儿科疫苗以联合疫苗形式给予,以减少儿童必须接受的注射次数。因此,对于儿科疫苗来说,来自其它病原体的其它抗原可以与本发明的肺炎球菌疫苗一起配制。例如,本发明的疫苗

可以用公知的‘三价’联合疫苗配制（或同一时间分别给予），该联合疫苗包含白喉类毒素（DT）、破伤风类毒素（TT）和百日咳成分[通常是去毒的百日咳类毒素（PT）和丝状血细胞凝集素（FHA），以及任选的百日咳外膜蛋白（pertactin, PRN）和/或凝集素 1+2]，例如市售疫苗 INFANRIX-DTPa (SmithKlineBeecham Biologicals)，其包含 DT、TT、PT、FHA 和 PRN 抗原，或带有完整细胞百日咳组分，例如 SmithKlineBeecham Biologicals s.a. 销售的 Tritanrix™。联合疫苗还可以包含其它抗原，如乙型肝炎表面抗原（HBsAg）、脊髓灰质炎病毒抗原（例如灭活的三价脊髓灰质炎病毒-IPV）、卡他莫拉菌外膜蛋白、不可分型的流感嗜血菌蛋白、脑膜炎奈瑟氏球菌 B 外膜蛋白。

[0257] 可包含在联合疫苗中（特别是用于预防中耳炎）的优选卡他莫拉菌蛋白抗原的实例为：OMP106[W097/41731(Antex) 和 W096/34960(PMC)]；OMP21；LbpA 和/或 LbpB[W098/55606(PMC)]；TbpA 和/或 TbpB[W097/13785 和 W097/32980(PMC)]；CopB[Helminen ME 等，(1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]；UspA1 和/或 UspA2[w093/03761(德克萨斯大学)]；OmpCD；HasR(PCT/EP99/03824)；PilQ(PCT/EP99/03823)；OMP85(PCT/EP00/01468)；lipo06(GB9917977.2)；lipo10(GB9918208.1)；lipo11(GB9918302.2)；lipo18(GB9918038.2)；P6(PCT/EP99/03038)；D15(PCT/EP99/03822)；Omp1A1(PCT/EP99/06781)；Hly3(PCT/EP99/03257) 和 OmpE。可包含在联合疫苗（特别是用于预防中耳炎）中的不可分型的流感嗜血菌抗原的实例包括：丝束蛋白[(US5766608-俄亥俄州研究基金会)]和含来自该蛋白的肽的融合体[例如 LB1(f) 肽融合体；US5843464(OSU) 或 W099/64067]；OMP26[W097/01638(Cortecs)]；P6[EP281673(纽约州立大学)]；TbpA 和/或 TbpB；Hia；Hsf；Hin47；Hif；Hmw1；Hmw2；Hmw3；Hmw4；Hap；D15(W094/12641)；D 蛋白(EP594610)；P2 和 P5(W094/26304)。

[0258] 考虑的其它组合是本发明的肺炎链球菌糖类和蛋白与病毒抗原的组合，所述病毒抗原例如来自流感病毒（减毒的、裂解的或亚单位的）[例如表面糖蛋白神经氨酸酶（NA）和血细胞凝集素（HA）]。参见例如：Chaloupka I. 等，Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127]；RSV（例如 F 和 G 抗原或 F/G 融合体，参见例如：Schmidt A. C. 等，J. Viral, 2001 年 5 月，4594-4603 页）；PIV3（例如 HN 和 F 蛋白，参见 Schmidt 等，出处同上）；水痘病毒（例如减毒的、糖蛋白 I-V 等）以及 MMR（麻疹、流行性腮腺炎、风疹）的任意（或全部）组分。

[0259] 本发明意欲用于整体治疗或预防中耳炎的优选儿科联合疫苗包含：一种或多种肺炎链球菌糖类抗原（优选缀合至 D 蛋白）、一种或多种肺炎球菌蛋白（优选上述肺炎球菌蛋白）和一种或多种来自卡他莫拉菌和/或非典型流感嗜血菌的表面暴露抗原。D 蛋白可有利地用作肺炎球菌糖类（如上所述）的蛋白载体，因为其自身为能够产生 B 细胞介导的抗非典型流感嗜血菌（ntHi）保护作用的免疫原。卡他莫拉菌或非典型流感嗜血菌抗原可包含在亚单位形式的疫苗中，或者可作为存在于由细菌制备的外膜囊泡（疱）表面上的抗原被加入。

[0260] 用于本发明接种的免疫原性组合物的免疫原性特性

[0261] 在本发明中，相比于用不含佐剂，即不含任何外源佐剂的对应组合物（本文也称为‘普通组合物’）获得的 CD4T<sup>+</sup> 细胞免疫应答，免疫原性组合物优选能够诱导抗至少一种组分抗原或抗原性组合物的改进的 CD4T<sup>+</sup> 细胞免疫应答。在一种特定实施方案中，当免疫

原性组合物是流感组合物,并且当流感疫苗制剂是来自几种流感病毒株(其中之一是大流行株)时,所述改进的 CD4T- 细胞免疫应答是针对大流行流感病毒株。

[0262] 所述“改进的 CD4T- 细胞免疫应答”是指在给予含有佐剂的免疫原性组合物之后在哺乳动物中获得的 CD4 应答高于在给予不含佐剂的相同组合物后获得的 CD4 应答。例如,与给予包含流感病毒或其抗原性制剂并且不含佐剂的免疫原性组合物之后诱导的应答相比,在给予包含流感病毒或其抗原性制剂以及佐剂的免疫原性组合物后在人类患者中获得更高的 CD4T- 细胞应答。这种制剂将有利地用于诱导抗流感病毒的 CD4-T 细胞应答,该应答能够检测由 MHC II 类分子呈递的流感表位。

[0263] 具体地但非排它性地,所述‘改进的 CD4T- 细胞免疫应答’在免疫学上未初免的患者(即对所述抗原为血清阴性的患者)中获得。此血清阴性可能是从未面对这种病毒或抗原的所述患者(所谓的‘原初’患者)的结果,或者是在遭遇时不能对所述抗原应答的所述患者的结果。在一个特定方面,在免疫受损的受试者,如老年人,典型是 65 岁或年龄更大,或具有高危医学状况的小于 65 岁的成人(“高危”成人)或 2 岁以下幼儿中获得所述 CD4T- 细胞免疫应答。

[0264] 改进的 CD4T- 细胞免疫应答可通过检测产生任何以下细胞因子的细胞数来评价:

[0265] • 产生至少两种不同细胞因子(CD40L、IL-2、IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ )的细胞

[0266] • 产生至少 CD40L 和另一种细胞因子(IL-2、TNF  $\alpha$ 、IFN  $\gamma$ )的细胞

[0267] • 产生至少 IL-2 和另一种细胞因子(CD40L、TNF  $\alpha$ 、IFN  $\gamma$ )的细胞

[0268] • 产生至少 IFN  $\gamma$  和另一种细胞因子(IL-2、TNF  $\alpha$ 、CD40L)的细胞

[0269] • 产生至少 TNF  $\alpha$  和另一种细胞因子(IL-2、CD40L、IFN  $\gamma$ )的细胞

[0270] 当与给予不含佐剂的组合物相比在给予含有佐剂的组合物后产生任何以上细胞因子的细胞的量较高时,将存在改进的 CD4T- 细胞免疫应答。通常,上文提及的 5 种状况中的至少一种、优选两种将被实现。在一个具体实施方案中,与无佐剂组相比,含有佐剂的组中生产全部 4 种细胞因子的细胞将以更高量存在。

[0271] 由本发明的含有佐剂的流感组合物赋予的改进的 CD4T- 细胞免疫应答理想地可在单次给予后获得。例如在快速发展的爆发情况下单剂方法将有极为重大的意义。在某些情况下,尤其是对于老年人群,或者对于首次进行抗流感接种的小孩(9 岁以下)或在大流行的情况下,给予两剂相同的用于该季的组合物可能是有益的。第二剂所述相同组合物(仍被看作是‘用于首次接种的组合物’)可在初次免疫应答正在发展的过程中给予,并有足够的时间间隔。通常,第二剂组合物在首剂后数周或约 1 个月(例如首剂后 2 周、3 周、4 周、5 周或 6 周)给予,以帮助激发无应答或低应答个体的免疫系统。

[0272] 在另一实施方案中,与用不含佐剂的组合物免疫的个体中诱导的 B 记忆细胞应答相比,给予所述免疫原性组合物在给予含有佐剂的免疫原性组合物的患者中诱导改进的 B- 记忆细胞应答。改进的 B- 记忆细胞应答意指在遭遇抗原时能够分化为分泌抗体的浆细胞的外周血 B 淋巴细胞的频率增加,这通过体外分化刺激进行检测。

[0273] 在另一实施方案中,与用不含佐剂的组合物免疫的个体中诱导的体液应答相比,给予所述免疫原性组合物在给予含有佐剂的免疫原性组合物的患者中诱导改进的体液应答。所述体液免疫应答可以根据实施例 1,特别是 I.1(I.1.1)、I.2(I.2.1)和 I.3(I.3.5.2)部分详细描述的任何程序进行测量。当免疫原性组合物是流感病毒组合物时,特别地,所述

体液应答是针对同源或异源病毒株获得的。具体地,所述异源体液免疫应答表示流感病毒株之间的体液应答,并且称作“交叉反应性”体液免疫应答。所述“交叉反应性”体液免疫应答涉及诱导抗一种流感病毒株的应答,所述流感病毒株是用于接种的流感病毒株的变体(漂移)。所述应答的一个实例在实施例 III. 3. 1 和图 2 中举例说明。

[0274] 在一种特定实施方案中,给予所述含有佐剂的免疫原性组合诱导以下应答中的至少两种:与用不含佐剂,即不含任何外源佐剂的相应组合物(本文也称作“普通组合物”)相比,(i) 改进的 CD4T<sup>+</sup> 细胞免疫应答,(ii) 改进的 B<sup>+</sup> 记忆细胞应答,(iii) 改进的针对至少一种组分抗原或抗原性组合物的体液应答。

[0275] 在进一步的特定实施方案中,采用用于第一次接种的含佐剂的组合物进行接种,对 CD8 应答没有可测量的影响。

[0276] 本发明的一个特定实施方案是用以脂质体形式存在的皂苷佐剂,特别是胆固醇猝灭形式的 QS21 皂苷配制包含流感病毒或其抗原性制剂的组合物,能够在免疫受损的人群中有效促进 T 细胞应答。在一种实施方案中,所述佐剂进一步包含 3D-MPL。具体地,通过流感疫苗保护的关联性评价,与用不含佐剂的流感疫苗接种相比,给予单剂如本发明所述的用于首次接种的免疫原性组合物,在对老年人群进行抗流感接种后能够提供更好的血清保护作用。相比于用不含佐剂的制剂获得的免疫应答,要求保护的含有佐剂的制剂还能够诱导抗流感病毒的改进的 CD4T<sup>+</sup> 细胞免疫应答。该观察结果可能与接种或由于流感抗原暴露导致的感染时增加的应答性相关。而且,其还可能与交叉反应性相关,即对变体流感株应答的能力较高。这种改进的应答可能在免疫受损的人群如老年人群(65 岁和以上)以及尤其是高危老年人群中特别有益。这可导致降低整体的发病率和死亡率,并防止肺炎和其它流感类疾病的紧急入院。这还可对婴儿群体(5 岁以下,优选 2 岁以下)有益。而且,与用不含佐剂的制剂诱导的应答相比,其允许诱导时间更持久的 CD4T 细胞应答,例如在首次接种后 1 年仍存在。

[0277] 在一个特定方面,CD4T<sup>+</sup> 细胞免疫应答,例如在未初免受试者中获得的改进的 CD4T<sup>+</sup> 细胞免疫应答,包括诱导交叉反应性 CD4T 辅助细胞应答。具体地说,增加交叉反应性 CD4T 细胞的量。所述‘交叉反应性’CD4 应答指 CD4T<sup>+</sup> 细胞靶向流感株之间的共有表位。

[0278] 通常,可用的流感疫苗通常仅有效对抗具有相似抗原性特征的血细胞凝集素的流感病毒感染株。当感染(循环)性流感病毒已经历了表面糖蛋白(具体地说是血细胞凝集素)的微小变化(例如点突变或点突变的累积,导致例如氨基酸改变)时(抗原漂移变体病毒株),疫苗仍可提供一些保护作用,但其可能仅提供有限的保护作用,因为新产生的变体可能逃脱先前流感感染或接种诱导的免疫性。抗原漂移是两次大流行期间发生的年度流行的原因(Wiley&Skehel,1987,Ann. Rev. Biochem. 56,365-394)。交叉反应性 CD4T 细胞的诱导为本发明组合物提供了额外的优势,因为其还可提供交叉保护作用,换句话说就是抗异源感染的保护作用,所述异源感染即由为免疫原性组合物中包含的流感病毒株的变体(例如漂移变体)的循环流感病毒株引起的感染。这在循环毒株难以在卵中繁殖或难以在组织培养物中生产时可能是有利的,使漂移株用作备选工作株。这在受试者以几个月或一年间隔接受第一次和第二次接种时也可能有利,用于第二次免疫的免疫原性组合物中的流感株是用于首次接种的组合物中使用的毒株的漂移变体株。

[0279] 因此,本文定义的含有佐剂的流感免疫原性组合物具有更高的诱导接种的老年受

试者中的血清保护和交叉反应性 CD4T 细胞的能力。这种特征可能与针对免疫原性组合中存在的病毒株的变异株的更高应答能力相关。可以证实这是大流行情况下的重要优点。例如,包含 H5、H2、H9、H7 或 H6 株中的任一或几个株的多价流感免疫原性组合在接种后或受到大流行变体,即所述大流行株的漂移株感染后,可以提供更高的针对所述漂移株的应答。

[0280] 用流感疫苗接种后交叉反应性 CD4T- 细胞的检测

[0281] 能够识别同源和漂移的流感株两者的 CD4T- 细胞在本文件中已命名为“交叉反应性”。如本文所述的含有佐剂的流感组合已能够显示出异亚型的交叉反应性,因为存在可观测的抗漂移流感株的交叉反应性。如上所述,大流行疫苗制剂有效对抗漂移大流行株的能力在大流行情况下可证明是重要的特征。

[0282] 与以上观测结果相一致,已在人中鉴别出不同流感株共有的 CD4T- 细胞表位 (Gelder C 等,1998, Int Immunol. 10 (2) :211-22 ;Gelder CM 等,1996J Virol. 70 (7) : 4787-90 ;Gelder CM 等,1995J Virol. 199569 (12) :7497-506)。

[0283] 在一个特定实施方案中,含有佐剂的组合可提供额外益处,该益处提供了抗循环株的更好的保护作用,所述循环株经历了血细胞凝集素的大改变 (例如基因重组,例如两个不同物种之间的基因重组) (抗原转变),目前可用疫苗对其无效。

[0284] 再次接种和用于再次接种的组合 (加强组合)

[0285] 在一种实施方案中,本发明提供流感病毒或其抗原性制剂在制备免疫原性组合中的用途,所述免疫原性组合用于再次接种先前用本文要求保护的免疫原性组合接种过的人。

[0286] 在本发明的一个方面,提供了来自第一次大流行的流感病毒株的流感病毒或其抗原性制剂在制备本文定义的含有佐剂的免疫原性组合中的用途,所述免疫原性组合用于提供抗流感病毒株导致的流感感染的保护作用,所述病毒株是所述第一次流感病毒株的变体。

[0287] 另一方面,本发明提供流感病毒或其抗原性制剂在制备流感免疫原性组合中的用途,所述免疫原性组合用于再次接种先前用本文要求保护的含佐剂的流感组合或用含变异流感病毒株的含佐剂的流感组合接种过的人,所述佐剂是本文定义的佐剂。

[0288] 另一方面,本发明提供了对人群或个体进行抗一种流感病毒株的接种,然后对所述人或人群进行抗变异流感病毒株的再次接种的方法,所述方法包括给所述人施用 (i) 第一组合,其包含来自第一流感病毒株的流感病毒或其抗原性制剂和本文定义的佐剂,和 (ii) 第二免疫原性组合,其包含所述第一流感病毒株的流感病毒株变体。在一种特定实施方案中,所述第一病毒株与大流行爆发相关,或具有与大流行爆发相关的可能。在另一特定实施方案中,所述变异株与大流行爆发相关,或具有与大流行爆发相关的可能。具体地,再次接种是用包含作为循环大流行株的至少一种病毒株的流感组合进行的。初免组合和加强组合都可以是多价的,即可以含有至少两种流感病毒株。当组合是多价时,至少一种病毒株与大流行爆发相关,或具有与大流行爆发相关的可能。

[0289] 通常,再次接种于首次接种后至少 6 个月进行,优选于首次接种后 8-14 个月进行,更优选于首次接种后约 10-12 个月进行。

[0290] 用于再次接种的免疫原性组合 (加强组合) 可包含任意类型的抗原制

剂,其是灭活的或者是减毒的活病毒。其可包含相同类型的抗原制剂,即分裂流感病毒或其分裂流感病毒抗原性制剂、全病毒体、纯化的 HA 和 NA(亚单位)疫苗或病毒颗粒,作为首次接种用的免疫原性组合物。或者,加强组合物可包含首次接种所使用流感抗原类型之外的另一种类型的流感病毒抗原,即分裂流感病毒或其分裂流感病毒抗原性制剂、全病毒体、纯化的 HA 和 NA(亚单位)疫苗或病毒颗粒。优选地,使用分裂病毒或全病毒体疫苗。加强组合物可有佐剂或无佐剂。无佐剂的加强组合物可为肌肉给予的 Fluarix / $\alpha$ -Rix®/Influsplit®。所述制剂包含 3 种由 WHO 推荐的合适流感季毒株制备的灭活分裂病毒体抗原。

[0291] 加强组合物可含有佐剂或不含佐剂。在一个特定实施方案中,加强组合物包含本文定义的皂苷佐剂。

[0292] 在一个特定实施方案中,用于再次接种的免疫原性组合物(下文也称为‘加强组合物’)包含流感病毒或其抗原性制剂,它们与用于首次接种的流感病毒或其抗原性制剂共有共同的 CD4T<sup>+</sup> 细胞表位。共同的 CD4T<sup>+</sup> 细胞表位意指可由相同 CD4 细胞识别的不同抗原的肽/序列/表位(参见例如以下文献描述的表位:Gelder C 等,1998, Int Immunol. 10(2):211-22;Gelder CM 等,1996 J Virol. 70(7):4787-90;Gelder CM 等,1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506)。

[0293] 在本发明的一个实施方案中,加强组合物为一种单价流感组合物,其包含与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的可能的流感株。具体地,加强组合物中的所述病毒株是循环大流行株。合适的病毒株是但不限于:H5N1、H9N2、H7N7 和 H2N2。所述病毒株可与存在于首次接种用组合物中的病毒株相同,或与其中一种病毒株相同。在一个替代实施方案中,所述病毒株可为首次接种用组合物中存在的病毒株的变体株,即漂移株。

[0294] 在另一个具体实施方案中,加强组合物为多价流感疫苗。具体地说,当加强组合物为多价疫苗如二价、三价或四价疫苗时,至少一种病毒株与大流行爆发相关或具有与大流行爆发相关的可能。在一个具体实施方案中,加强组合物中的两种或多种病毒株是大流行株。在另一个具体实施方案中,加强组合物中的至少一种大流行株与首次接种用组合物中存在的病毒株相同,或与其中一种病毒株相同。在一个备选实施方案中,至少一种病毒株可为首次接种用组合物中存在的至少一种大流行株的变体株,即漂移株。具体地,加强组合物中的至少一种病毒株是循环大流行株。加强组合物可以含佐剂或不含佐剂。

[0295] 通常,加强组合物在使用时于下一个流感季给予,例如在第一个免疫原性组合物之后约 1 年给予。加强组合物还可随后每年给予(第三次、第四次、第五次接种等)。加强组合物可与用于首次接种的组合物相同。合适地,加强组合物包含流感病毒或其抗原性制剂,其为用于首次接种的流感病毒的变异株。具体地说,流感病毒株或其抗原性制剂按照世界卫生组织发布的参考材料选择,使得它们适合于在再次接种年循环的流感株。

[0296] 用于再次接种的流感抗原或抗原性组合物优选合适地包含上文描述的佐剂。所述佐剂可为如上文所述的以脂质体形式存在的皂苷,优选任选地包含额外的佐剂,如 3D-MPL。

[0297] 一方面,相比于用无佐剂的流感病毒或其抗原性制剂第一次接种后诱导的等同应答,再次接种诱导以下的任一种、优选两种或全部:(i) 抗流感病毒或其抗原性制剂的改进的 CD4 应答,或(ii) 改进的 B 细胞记忆应答或(iii) 改进的体液应答。优选地,用本文定义的含有佐剂的流感病毒或其抗原性制剂再次接种后诱导的免疫应答高于用不含佐剂的

组合物再次接种后诱导的对应应答。优选地,在用含有佐剂的、优选分裂的流感病毒组合物首次接种的人群中,用无佐剂的、优选分裂的流感病毒再次接种后诱导的免疫应答高于在用无佐剂的、优选分裂的流感病毒组合物首次接种的人群中的对应应答。

[0298] 在一个特定实施方案中,用含流感病毒和本文定义的脂质体形式的皂苷佐剂的加强组合物再次接种受试者显示出的抗体滴度高于用不含佐剂的组合物首次接种并用不含佐剂的组合物加强的人群中的对应值。佐剂增强针对再次接种的抗体应答的效力在已知对流感病毒接种或感染具有低应答的老年人中尤其重要。就改善再次接种后的 CD4T<sup>+</sup> 细胞应答而言,含有佐剂的组合物相关的益处也是显著的。

[0299] 具体地,相比于对照疫苗赋予的保护作用,本发明的含有佐剂的组合物能够诱导抗漂移株(下一流感季的流感株)的更好的交叉反应性。所述交叉反应性表现出的持久性比用无佐剂制剂获得的持久性高。所述佐剂增强抗漂移株的交叉反应性的作用对于大流行情况很重要。

[0300] 在再一个实施方案中,本发明涉及一种接种方案,其中首次接种用含至少一种流感病毒株的流感组合物、优选分裂流感组合物进行,其中所述流感病毒株可能引起大流行爆发,再次接种用为大流行株或经典株的循环病毒株进行。

[0301] HA 中的 CD4 表位

[0302] 此抗原漂移主要存在于病毒表面蛋白血细胞凝集素(HA)和神经氨酸酶(NA)的表位区。已知被病毒用于逃避宿主免疫系统的适应性应答的不同流感株之间 CD4 和 B 细胞表位的任意差异都将在流感接种中起重要作用,并确实如此。

[0303] 已在人中鉴别出不同流感株共有的 CD4T<sup>+</sup> 细胞表位(参见例如:Gelder C 等,1998,Int Immunol. 10(2):211-22;Gelder CM 等,1996J Virol. 70(7):4787-90;和 Gelder CM 等,1995J Virol. 199569(12):7497-506)。

[0304] 在一个具体的实施方案中,再次接种使用含流感病毒或其抗原性制剂的加强组合物进行,所述流感病毒或其抗原性制剂与用于第一次接种的流感病毒抗原或其病毒抗原性制剂共有共同的 CD4T<sup>+</sup> 细胞表位。因此,本发明涉及含大流行流感病毒或其抗原性制剂和脂质体形式的皂苷,特别是胆固醇去毒形式的 QS21,以及任选 3D-MPL 的免疫原性组合物在制备多剂疫苗的首次接种组分中的用途,所述多剂疫苗还包含作为加强剂量的流感病毒或其抗原性制剂,它们与第一次接种时所给予剂量的大流行流感病毒抗原或其病毒抗原性制剂共有共同的 CD4T<sup>+</sup> 细胞表位。

[0305] 接种方法

[0306] 本发明的免疫原性组合物可通过任意合适的传递途径施用,例如皮内、粘膜如鼻内、口服、肌内或皮下。其它送递途径在本领域众所周知。

[0307] 肌内送递途径对含有佐剂的免疫原性组合物是优选的。

[0308] 皮内送递是另一个适宜的途径。任意合适的装置都可用于皮内传递,例如在 US4,886,499、US5,190,521、US5,328,483、US5,527,288、US4,270,537、US5,015,235、US5,141,496、US5,417,662 中描述的短针装置。皮内疫苗还可通过限制针头进入皮肤的有效穿透长度的装置施用,例如描述于 W099/34850 和 EP1092444 的装置及其功能等同物,这两个文献通过引用结合到本文中。射流喷射装置也是适宜的,其经液体射流喷射器或经刺穿角质层并产生到达真皮的射流的针头传递液体疫苗至真皮。射流喷射装置描述于例

如 US5, 480, 381、US5, 599, 302、US5, 334, 144、US5, 993, 412、US5, 649, 912、US5, 569, 189、US5, 704, 911、US5, 383, 851、US5, 893, 397、US5, 466, 220、US5, 339, 163、US5, 312, 335、US5, 503, 627、US5, 064, 413、US5, 520, 639、US4, 596, 556、US4, 790, 824、US4, 941, 880、US4, 940, 460、W097/37705 和 W097/13537。喷射粉末 / 颗粒送递装置也是适宜的, 其使用压缩气体加速粉末形式的疫苗通过皮肤外层至真皮。另外, 常规注射器可用于皮内施用的经典结核菌素皮内试验法。

[0309] 另一个合适的施用途径是皮下途径。任意合适的装置都可用于皮下送递, 例如经典的针。优选地, 使用例如在 W001/05453、W001/05452、W001/05451、W001/32243、W001/41840、W001/41839、W001/47585、W001/56637、W001/58512、W001/64269、W001/78810、W001/91835、W001/97884、W002/09796、W002/34317 中公开的无针射流喷射器装置。更优选地, 所述装置用液体疫苗制剂预填充。

[0310] 或者, 疫苗鼻内施用。典型地, 疫苗局部施用于鼻咽部, 优选没有吸入到肺中。理想的是使用将疫苗制剂送递入鼻咽部而没有或基本没有使其进入肺中的鼻内送递装置。

[0311] 本发明疫苗的优选鼻内施用装置是喷雾装置。适宜的商用鼻喷雾装置包括 Accuspray™ (Becton Dickinson)。雾化器产生非常细小的雾滴, 其可被轻易地吸入到肺中, 因此不能有效到达鼻粘膜。因此不优选雾化器。

[0312] 用于鼻内用途的优选喷雾装置的性能与使用者提供的压力无关。这些装置称为压力阈装置。只有在提供阈压力时才由喷嘴释放液体。这些装置更容易获得液滴大小规则的喷雾。适用于本发明的压力阈装置在本领域是已知的, 描述于例如 W091/13281 和 EP311863B 和 EP516636, 这些文献通过引用结合到本文中。这种装置可由 Pfeiffer GmbH 购买, 还描述于 Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, 1999 年 9 月。

[0313] 优选的鼻内装置产生的液滴 (使用水作为液体检测) 范围为 1–200  $\mu\text{m}$ , 优选 10–120  $\mu\text{m}$ 。小于 10  $\mu\text{m}$  存在吸入风险, 因此理想的是 10  $\mu\text{m}$  以下的液滴不超过约 5%。120  $\mu\text{m}$  以上的液滴扩散得不如较小的液滴好, 所以理想的是 120  $\mu\text{m}$  以上的液滴不超过约 5%。

[0314] 双剂量送递是用于本发明疫苗的鼻内送递系统的更优选特征。双剂量装置包含单剂疫苗的两个亚剂量, 每个鼻孔施用一个亚剂量。一般来说, 两个亚剂量存在于一个容器中, 装置的构造允许每次有效送递单个亚剂量。或者, 可使用单剂量装置施用本发明疫苗。

[0315] 或者, 本发明还设想了表皮或透皮接种途径。

[0316] 在本发明的一个具体实施方案中, 首次施用的含有佐剂的免疫原性组合物可肌肉施用, 含有佐剂的或不含佐剂的加强组合物可通过不同途径施用, 例如皮内、皮下或鼻内。在另一个具体实施方案中, 首次施用的组合物可包含每个流感病毒株 15  $\mu\text{g}$  的标准 HA 含量, 加强组合物可包含低剂量的 HA, 即低于 15  $\mu\text{g}$ , 并根据施用途径可以较小体积施用。

[0317] 接种群体

[0318] 接种的目标群体可为免疫受损的人。和健康成人相比, 免疫受损的人一般不能很好地对抗原、尤其是流感抗原应答。

[0319] 优选地, 目标群体是未进行抗流感初免的群体, 他们或者是原初态的 (例如相对于大流行病毒株), 或者先前不能对流感感染或接种应答。优选地, 目标群体是老年人, 合适地为 65 岁和以上, 较年轻的高危成人 (即 18–64 岁), 例如在健康机构工作的人, 或者具有

高危因素如心血管病和肺病或糖尿病的年轻成人。另一个目标群体是所有 6 个月和以上的儿童,尤其是 6-23 个月龄的儿童,他们经历了相对高的流感相关住院率。优选地,目标群体是 65 岁以上的老年人。

[0320] 接种方案、给药和附加的效力标准

[0321] 合适地,本发明的免疫原性组合物在大部分情况下为标准 0.5ml 注射剂量,根据单辐射免疫扩散 (SRD) (J. M. Wood 等 :J. Biol. Stand. 5(1977) 237-247 ;J. M. Wood 等, J. Biol. Stand. 9(1981) 317-330) 检测,含各个流感株的 15  $\mu$ g 血细胞凝集素抗原组分。合适地,疫苗剂量体积在 0.5ml 至 1ml 之间,具体地说是标准 0.5ml 或 0.7ml 疫苗剂量体积。根据原液样品中的 HA 浓度,可常规地轻微调整剂量体积。

[0322] 合适地,所述免疫原性组合物含低剂量的 HA 抗原-例如每流感病毒株 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14  $\mu$ gHA 中的任一个剂量。

[0323] 有利地,本发明的疫苗剂量,尤其是低剂量疫苗,可以以比一般为每剂约 0.5、0.7 或 1ml 的常规注射分裂流感疫苗小的体积提供。本发明的小体积剂量优选每剂不到 500  $\mu$ l,更优选每剂不到 300  $\mu$ l,最优选每剂不超过约 200  $\mu$ l 或以下。

[0324] 因此,按照本发明一个方面的优选小体积疫苗剂量是在小体积中具有低抗原剂量的剂量,例如在约 200  $\mu$ l 体积中有约 15  $\mu$ g 或约 7.5  $\mu$ g HA 或约 3.0  $\mu$ g HA (每病毒株)。

[0325] 本发明的流感药物优选满足疫苗的某些国际标准。

[0326] 国际上应用了检测流感疫苗效力的标准。在下表 1 中显示了有效抗流感疫苗的欧盟官方标准。理论上,为满足欧盟要求,对疫苗中包含的所有流感株来说,流感疫苗仅需满足表中的一项标准。本发明的组合物合适地满足这些标准中的至少一项。

[0327] 然而,在实践中,所有病病毒株必须满足所述标准中的至少两项或全部三项,特别是对于新型疫苗(例如经不同途径送递的新型疫苗)而言。在某些情况下,两项标准可能足够了。例如,可以接受所有病病毒株满足三项标准中的两项,而部分但不是全部病病毒株满足第三项标准(例如三种病病毒株中的两种)。对成年人群体(18-60 岁)和老年人群体(大于 60 岁)的要求是不同的。

[0328] 表 1

[0329]

|         | 18-60 岁 | > 60 岁 |
|---------|---------|--------|
| 血清阳转率 * | > 40%   | > 30%  |
| 转变因子 ** | > 2.5   | > 2.0  |
| 保护率 *** | > 70%   | > 60%  |

[0330] \* 血清阳转率定义为接种后针对每种疫苗株的血清血细胞凝集素抑制 (HI) 滴度增加达至少 4 倍的接种者的百分率。

[0331] \*\* 转变因子定义为接种后针对每种疫苗株的血清 HI 几何平均滴度 (GMT) 的增加倍数。

[0332] \*\*\* 保护率定义为接种后(针对每种疫苗株的)血清 HI 滴度等于或高于 1 : 40 的接种者的百分率,通常可被看作指示保护作用。

[0333] 再一方面,本发明提供一种设计用于已知要通过 CD4+T 细胞活化治愈或治疗的疾病的疫苗的方法,包括“

[0334] 1) 选择含 CD4+ 表位的抗原,和

[0335] 2) 组合所述抗原和上文定义的脂质体形式的皂苷佐剂,其中所述疫苗在所述哺乳动物中施用后能够在所述哺乳动物中诱导增强的 CD4T 细胞应答。

[0336] 本申请的所有参考文献(包括专利申请和已授予专利)的教导都完整地通过引用结合到本文中。

[0337] 为避免疑惑,本发明人的意图为本文的术语“包含”、“含有”和“包括”在每种情况下都任选地可以被术语“由……组成”替代。

[0338] 本发明将参考以下的非限制性实施例进一步描述:

[0339] 实施例 I 描述了在小鼠、雪貂和人研究中使用的免疫读出方法。

[0340] 实施例 II 描述了 MPL/QS21 脂质体佐剂的制备。

[0341] 实施例 III 描述了含有佐剂的不含佐剂的流感疫苗在雪貂中的临床前评价。

[0342] 实施例 IV 显示了含有佐剂的不含佐剂的流感疫苗在原初和初免的 C57BI/6 小鼠中的临床前评价。

[0343] 实施例 V 描述了以两种不同浓度的 3D-MPL 为佐剂的流感疫苗在小鼠中的比较。

[0344] 实施例 VI 描述了以两种不同浓度的 3D-MPL 为佐剂的流感疫苗在老年人中的比较。

[0345] 实施例 VII 描述了含有佐剂的 HPV 疫苗在小鼠中临床前评价。

[0346] 实施例 VIII 描述了含有佐剂的不含佐剂的巨细胞免疫组合物的临床前评价。

[0347] 实施例 IX 描述了以两种不同浓度的 3D-MPL 为佐剂的 RTS, S 疫苗的临床前评价。

[0348] 实施例 X 描述了以两种不同浓度的 3D-MPL 为佐剂的 RTS, S 疫苗的临床评价。

[0349] 实施例 I- 免疫读出方法

[0350] I. 1. 小鼠法

[0351] I. 1. 1. 血凝反应抑制测试

[0352] 测试程序

[0353] 使用血凝反应抑制测试(HI)测定针对3种流感病毒株的抗血细胞凝集素抗体滴度。HI测试的原理基于特异性抗流感抗体通过流感病毒血细胞凝集素(HA)抑制鸡红细胞(RBC)血凝反应的能力。热灭活血清预先用高岭土和鸡RBC处理,以去除非特异性抑制剂。在预处理后,将2倍稀释度的血清与4个血凝单位的每种流感株温育。然后加入鸡红细胞,并记录凝集抑制。滴度表示为完全抑制血凝反应的血清最高稀释度的倒数。由于血清的第一个稀释度是1:20,所以不可检测水平记录为等于10的滴度。

[0354] 统计学分析

[0355] 使用 UNISTAT 对接种后的 HI 滴度进行统计学分析。用于分析方差的方法可如下简述:

[0356] ■数据的对数转换

[0357] ■对各个群体(组)进行的 Shapiro-Wilk 检验,以便验证组分布的正态性

[0358] ■ Cochran 检验,以便确定不同群体(组)之间的方差均一性

[0359] ■对各组进行的双因素方差分析

[0360] ■用于多重比较的 Tukey HSD 检验

[0361] I. 1. 2. 胞内细胞因子染色

[0362] 该技术允许根据细胞因子产量定量抗原特异性 T 淋巴细胞：效应子 T 细胞和 / 或生产 IFN- $\gamma$  的效应子 - 记忆 T 细胞和 / 或生产 IL-2 的中枢记忆性 T 细胞。在免疫后 7 天收集 PBMC。

[0363] 在分泌性抑制剂 (Brefeldine) 存在下体外再刺激淋巴样细胞。

[0364] 然后使用荧光抗体 (CD4、CD8、IFN- $\gamma$  和 IL-2) 通过常规免疫荧光法处理这些细胞。结果表示为 CD4/CD8T 细胞中细胞因子阳性的细胞的频率。在第二次免疫后 7 天对 PBMC 进行 T 细胞的胞内细胞因子染色。由小鼠收集血液, 并合并肝素化培养基 RPMI+ 添加物中。对于血液, RPMI+ 添加物稀释的 PBL 悬浮液按照推荐的方法 (于室温以 2500rpm 离心 20 分钟) 在 Lympholyte-Mammal 梯度上分层。去除界面处的单核细胞, 用 RPMI+ 添加物清洗 2 次, 用 RPMI5% 胎牛血清将 PBMC 悬浮液调整至  $2 \times 10^6$  个细胞 /ml。

[0365] 用  $\mu$  beads 上的流感三价分裂病毒 (5  $\mu$  gHA/ 珠) 或完整流感疫苗 (1  $\mu$  gHA/ 病毒株) 以  $1 \times 10^6$  个细胞 /ml (管式 FACS) 的终浓度对 PBMC 进行体外抗原刺激, 然后在加入抗 -CD28 和抗 -CD49d (均为 1  $\mu$  g/ml) 的情况下于 37°C 温育 2 小时。

[0366] 加入两种抗体后, 活化的 T 和 NK 细胞的增殖和细胞因子产生增加, 并且可以提供 CTL 诱导的共刺激信号。

[0367] 此外, 也用流感三价分裂疫苗 (30  $\mu$  g HA/ 株) - 或完整流感疫苗 (5  $\mu$  g HA/ 病毒株) - 脉冲的 BMDCs ( $1 \times 10^5$  个细胞 /ml) 刺激 PBMCs 过夜, 所述脉冲的 BMDCs 是通过 37°C 下用三价分裂疫苗 (60  $\mu$  gHA/ 株) 或完整流感三价疫苗 (10  $\mu$  gHA/ 病毒株) 脉冲 BMDCs 6 小时而制备的。抗原刺激步骤后, 37°C 下在布雷菲德菌素 (1  $\mu$  g/ml) 存在下温育 PBMC 过夜, 以抑制细胞因子分泌。

[0368] IFN- $\gamma$  /IL-2/CD4/CD8 染色如下进行: 清洗细胞悬浮液, 重悬浮在含 2% Fc 封闭试剂 (1/50 ; 2. 4G2) 的 50  $\mu$  l PBS1% FCS 中。于 4°C 温育 10 分钟后, 加入抗 -CD4-PE (2/50) 和抗 -CD8perCp (3/50) 的 50  $\mu$  l 混合物, 于 4°C 温育 30 分钟。在 PBS1% FCS 中清洗后, 通过重悬浮在 200  $\mu$  l Cytofix-Cytoperm (Kit BD) 中并于 4°C 温育 20 分钟使细胞透化。然后用 Perm Wash (Kit BD) 清洗细胞, 并用以 Perm Wash 稀释的抗 -IFN- $\gamma$  APC (1/50) + 抗 -IL-2FITC (1/50) 的 50  $\mu$  l 混合物重悬浮。于 4°C 温育最少 2 小时最长过夜后, 用 Perm Wash 清洗细胞并重悬浮在 PBS1% FCS+1% 低聚甲醛中。通过 FACS 进行样品分析。门控 (FSC/SSC) 活细胞, 对 CD4+T 细胞上的约 50,000 个事件 (淋巴细胞) 或 35,000 个事件进行探测。针对 CD4+ 和 CD8+ 门控的群体计算 IFN- $\gamma$  + 或 IL2+ 的百分率。

[0369] I. 2. 雪貂法

[0370] I. 2. 1. 血凝反应抑制测试 (HI)

[0371] 测试程序

[0372] 使用血凝反应抑制测试 (HI) 测定针对 3 种流感病毒株的抗血细胞凝集素抗体滴度。HI 测试的原理基于特异性抗流感抗体通过流感病毒血细胞凝集素 (HA) 抑制鸡红细胞 (RBC) 血凝反应的能力。血清首先用 25% 神经氨酸酶溶液 (RDE) 处理, 并热灭活, 以去除非特异性抑制剂。在预处理后, 将 2 倍稀释度的血清与 4 个血凝单位的每种流感株温育。然后加入鸡红细胞, 并记录凝集抑制。滴度表示为完全抑制血凝反应的血清最高稀释度的

倒数。由于血清的第一个稀释度是 1 : 10, 所以不可检测水平记录为等于 5 的滴度。

[0373] 统计学分析

[0374] 使用 UNISTAT 对 HI 滴度 (41 天, 攻击前) 进行统计学分析。用于分析方差的方法可如下简述:

[0375] ■数据的对数转换

[0376] ■对各个群体 (组) 进行的 Shapiro-Wilk 检验, 以便验证组分布的正态性

[0377] ■ Cochran 检验, 以便确定不同群体 (组) 之间的方差均一性

[0378] ■对单因素 ANOVA 的相互作用的检验

[0379] ■用于多重比较的 Tukey HSD 检验

[0380] I. 2. 3. 鼻清洗

[0381] 通过在清醒动物的两个鼻孔中给予 5ml PBS 进行鼻清洗。将接种物收集在培养皿中, 并置于干冰上的样品容器中。

[0382] 鼻清洗液的病毒滴定

[0383] 所有鼻样品都首先通过 Spin X 滤器 (Costar) 除菌过滤, 以去除任何细菌污染物。将 50  $\mu$ l 连续 10 倍稀释的鼻清洗液转移至含 50  $\mu$ l 培养基 (10 孔 / 稀释度) 的微量滴定板中。然后将 100  $\mu$ l MDCK 细胞 ( $2.4 \times 10^5$  个细胞 / ml) 加入每个孔, 并于 35°C 温育 5-7 天。在 6-7 天温育后, 小心地取出培养基, 加入 100  $\mu$ l 含 1/20 WST-1 的培养基, 再温育 18 小时。

[0384] 在存活细胞还原 WST-1 时产生的黄色甲腊染料的强度与病毒滴定实验结束时存在于孔中的存活细胞数成比例, 并通过在合适波长 (450nm) 检测各孔的吸光度定量。截止值定义为未感染对照细胞的 OD 平均值 -0.30D (0.30D 相当于未感染对照细胞 OD  $\pm$  3 个标准差)。OD < 截止值时定义为阳性得分, 相反, OD > 截止值时定义为阴性得分。病毒脱落滴度通过 “Reed and Muench” 测定, 并表示为 Log TCID<sub>50</sub>/ml。

[0385] I. 3. 评价人体中免疫应答的测定

[0386] I. 3. 1. 血凝反应抑制测定

[0387] 使用 WHO 流感合作中心, 疾病控制中心, Atlanta, USA (1991) 描述的方法通过检测 HI 抗体测定免疫应答。

[0388] 使用 4 个血凝反应抑制单位 (4HIU) 的适宜抗原和 0.5% 禽红细胞悬浮液, 用标准的和综合验证过的微量法对融化的冷冻血清样品进行抗体滴度检测。通过热处理和受体破坏酶去除非特异性血清抑制剂。

[0389] 评价所获血清的 HI 抗体水平。以 1 : 10 起始稀释度开始制备稀释系列 (乘以因数 2), 直至最终稀释度 1 : 20480。把显示完全抑制 (100%) 血凝反应的最高稀释度步骤视为滴定终点。所有实验都以双份进行。

[0390] I. 3. 2. 神经氨酸酶抑制测定

[0391] 在包被胎球蛋白的微量滴定板中进行测定。制备 2 倍连续稀释的抗血清, 与标准化量的甲型流感 H3N2、H1N1 或乙型流感病毒混合。测试基于由胎球蛋白酶解释放神经氨酸的神经氨酸酶生物活性。在切下末端神经氨酸后,  $\beta$ -D- 半乳糖 -N- 乙酰基 - 氨基半乳糖暴露出来。向各孔加入来自落花生的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的花生凝集素, 其特异性结合半乳糖结构。可在含四甲基联苯胺 (TMB) 的底物反应中检测和定量结合凝集素的量。表明仍抑制病毒神经氨酸酶活性达至少 50% 的最高抗体稀释度为 NI 滴度。

[0392] I. 3. 3. 中和抗体测定

[0393] 对融化的冷冻血清样品进行中和抗体检测。包含在血清中的抗体的病毒中和以微量中和实验来测定。血清在实验中无需进一步处理即可使用。各个血清以三重测定进行测试。将标准化量的病毒与连续稀释的血清混合并温育,以使抗体结合病毒。然后将含确定量的 MDCK 细胞的细胞悬浮液加入病毒和抗血清的混合物中,于 33℃温育。在温育期后,通过鸡红细胞的凝集反应显现病毒复制。利用 Reed and Muench 的方法计算血清的 50%中和滴度。

[0394] I. 3. 4. 通过细胞因子流式细胞术 (CFC) 评价细胞介导的免疫性

[0395] 如果与对应抗原温育,外周血抗原特异性 CD4 和 CD8T 细胞可在体外被再刺激,以产生 IL-2、CD40L、TNF- $\alpha$  和 IFN。因此,抗原特异性 CD4 和 CD8T 细胞可在常规免疫荧光标记细胞表型以及胞内细胞因子生产后通过流式细胞术计数。在本研究中,流感疫苗抗原以及来源于特定流感蛋白的肽用作再刺激流感特异性 T 细胞的抗原。结果表示为 CD4 或 CD8T 细胞亚群中细胞因子阳性 CD4 或 CD8T 细胞的频率。

[0396] I. 3. 5. 统计方法

[0397] I. 3. 5. 1. 主要终点

[0398] • 在接种后的 7 天随访期(即接种日和随后 6 天)以及整个过程中主诉的局部和全身体征和症状的百分率、强度以及同接种的关联。

[0399] • 在接种后的 21 天随访期(即接种日和随后 20 天)以及整个过程中主诉的局部和全身体征和症状的百分率、强度以及同与接种的关联。

[0400] • 整个研究过程中严重不良事件的发生。

[0401] I. 3. 5. 2. 次要终点

[0402] 对于体液免疫应答:

[0403] 观测变量:

[0404] • 在 0 天和 21 天:血清血凝反应抑制(HI)和 NI 抗体滴度,分别对疫苗中提供的 3 种流感病毒株的每一种测试(抗-H1N1、抗-H3N2 和抗-B-抗体)。

[0405] • 在 0 天和 21 天:中和抗体滴度,分别对疫苗中提供的 3 种流感病毒株的每一种测试。

[0406] 衍生变量(具有 95%置信区间):

[0407] • 接种前和接种后具有 95%置信区间(95% CI)的血清 HI 抗体的几何平均滴度(GMT)

[0408] 21 天时具有 95% CI 的血清阳转率 \*

[0409] 21 天时具有 95% CI 的转变因子 \*\*

[0410] 21 天时具有 95% CI 的血清保护率 \*\*\*

[0411] • 在所有时间点的血清 NI 抗体 GMT(具有 95%置信区间)

[0412] \* 血清阳转率定义为相比于第 0 天在第 21 天时针对每种疫苗株的血清 HI 滴度时增加达至少 4 倍的接种者百分率。

[0413] \*\* 转变因子定义为相比于第 0 天在第 21 天时针对每种疫苗株的血清 HI GMT 的增加倍数。

[0414] \*\*\* 保护率定义为接种后(针对每种疫苗株的)血清 HI 滴度等于 40 的接种者百

分率,通常将该百分率看作指示保护作用。

[0415] 对于细胞介导的免疫 (CMI) 应答

[0416] 观测变量

[0417] 在第 0 天和 21 天:不同测试中每  $10^6$  当中细胞因子阳性 CD4/CD8 细胞的频率。每个测试都定量 CD4/CD8T 细胞针对以下物质的应答:

[0418] • 肽流感 (pf) 抗原 (这些抗原的精确性质和来源必须给出 / 解释)

[0419] • 分裂流感 (sf) 抗原

[0420] • 完整流感 (wf) 抗原

[0421] 衍生变量:

[0422] • 产生至少两种不同细胞因子 (CD40L、IL-2、IFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$ ) 的细胞

[0423] • 产生至少 CD40L 和另一种细胞因子 (IL-2、TNF  $\alpha$ 、IFN  $\gamma$ ) 的细胞

[0424] • 产生至少 IL-2 和另一种细胞因子 (CD40L、TNF  $\alpha$ 、IFN  $\gamma$ ) 的细胞

[0425] • 产生至少 IFN  $\gamma$  和另一种细胞因子 (IL-2、TNF  $\alpha$ 、CD40L) 的细胞

[0426] • 产生至少 TNF  $\alpha$  和另一种细胞因子 (IL-2、CD40L、IFN  $\gamma$ ) 的细胞

[0427] I. 3. 5. 3. 免疫原性分析

[0428] 免疫原性分析基于总接种群体。对于每个治疗组,计算以下参数 (具有 95% 置信区间):

[0429] • 在第 0 天和 21 天时 HI 和 NI 抗体滴度的几何平均滴度 (GMT)

[0430] 在第 0 天和 21 天时中和抗体滴度的几何平均滴度 (GMT)

[0431] 21 天时的转变因子

[0432] 21 天时的血清阳转率 (SC),定义为相比于第 0 天在第 21 天时血清 HI 滴度增加达至少 4 倍的接种者百分率。

[0433] 21 天时的保护率定义为血清 HI 滴度 = 1 : 40 的接种者百分率。

[0434] • 在各个时间点 (第 0 天、第 21 天) 针对每个接种组和针对每种抗原 (肽流感 (pf) 抗原、分裂流感 (sf) 抗原和完整流感 (wf) 抗原) 总结 CD4/CD8T- 淋巴细胞分泌应答的频率 (描述统计)。

[0435] • 在各 5 种不同测试中对于每个接种组和每种抗原 (pf、sf 和 wf),在时间点 (接种后 - 接种前) 之间个体应答差异的描述统计。

[0436] • 使用非参数检验 (Kruskal-Wallis 检验) 比较 3 组之间的局部差异,以各 5 种不同测试计算每种抗原的统计学 p- 值。所有显著性检验都是双尾的。低于或等于 0.05 的 P- 值被看作是统计学显著的。

[0437] 实施例 II- 制备 MPL/QS21 脂质体佐剂

[0438] II. 3MPL 液体悬浮液的制备

[0439] MPL (在整个文件中使用,其是 3D-MPL 即 3-O- 脱酰基单磷酸脂质 A 的缩写) 原液由 3D-MPL 冻干粉制备。MPL 原液是稳定的原料浓缩 (约 1mg/ml) 水分散体,其随时可用于疫苗或佐剂配制。制备过程的示意图在图 1 中给出。

[0440] 对于最大批量 12g, MPL 原液制品储存在无菌玻璃容器中。MPL 的分散由以下步骤组成:

[0441] - 将 MPL 粉末悬浮在注射用水中

[0442] - 通过加热解聚任意大的聚集物（热处理）

[0443] - 通过微流化将粒度缩小至 100nm 至 200nm

[0444] - 用 Sartoclean 预过滤装置 0.8/0.65  $\mu\text{m}$  预过滤制品

[0445] - 于室温除菌过滤制品（Sartobran P 装置, 0.22  $\mu\text{m}$ ）

[0446] MPL 粉末通过微流化冻干, 产生稳定的胶体水性分散体 (MPL 粒度小于 200nm)。MPL 冻干粉末分散在注射用水中, 以便获得粗制的 10mg/ml 悬浮液。然后在搅拌下对悬浮液进行热处理。冷却至室温后, 开始微流化处理, 以便降低粒度。使用微流控装置 M110EH, 以限定压力通过微流化相互作用腔连续循环分散液达最小通过量 (循环次数:  $n_{\min}$ ) 进行微流化。代表循环次数的微流化持续时间基于检测的流速和分散体积计算。对于给定压力下的给定设备, 获得的流速可在一个至另一个相互作用腔之间以及特定相互作用腔的整个活动周期中有所变化。在本实施例中, 使用的相互作用腔是 F20Y 型微流控器。由于微流化效力与压力-流速对相关, 所以处理时间可在一批至另一批之间变化。1 次循环需要的时间基于流速计算。所认定的流速是就在将 MPL 导入装置前用注射用水检测的流速。1 次循环被定义为 MPL 总体积通过装置 1 次所需要的时间 (以分钟表示)。如下计算获得 n 次循环需要的时间:

[0447]  $n \times \frac{\text{要处理的 MPL 的量 (ml)}}{\text{流速 (ml/分钟)}}$

[0448] 由此相应地修改循环次数。描述了对所用的优选设备和相互作用腔要实施的最小循环量 ( $n_{\min}$ )。根据  $n_{\min}$  循环后进行的粒度检测结果确定要实施的总循环量。基于历史数据确定粒度限制 ( $d_{\lim}$ )。检测通过光子相关光谱法 (PCS) 技术实现,  $d_{\lim}$  表示为单峰结果 (Z 均值)。在该限度之下, 可在  $n_{\min}$  循环后终止微流化。在该限度之上, 继续微流化, 直至获得满意的粒度减小, 最多再进行 50 个循环。

[0449] 如果在微流化后不立即开始过滤, 则将分散的 MPL 储存在 +2 至 +8°C, 等待转移至过滤区域。

[0450] 在微流化后, 用注射用水稀释分散液, 通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤器在层流下除菌过滤。最终的 MPL 浓度是 1mg/ml (0.80-1.20mg/ml)。

[0451] II.2 制备 MPL/QS21 脂质体佐剂

[0452] 该佐剂命名为 AS01, 其包含胆固醇猝灭形式的 3D-MPL 和 QS21, 并且按照引入作为参考的 W096/33739 中的描述制备。具体地, 基本按照 W096/33739 的实施例 1.1 的描述制备 AS01 佐剂。AS01B 佐剂包含: 脂质体, 其包含二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、胆固醇和 3D MPL [其量为 1000  $\mu\text{g}$  DOPC, 250  $\mu\text{g}$  胆固醇和 50  $\mu\text{g}$  3D-MPL, 每个值都是以每疫苗剂量中大约的量给出的], QS21 [50  $\mu\text{g}$ /剂], 磷酸盐 NaCl 缓冲液和水, 到 0.5ml 的体积。

[0453] AS01E 包含与 AS01B 相同的成分, 但浓度较低, 其量是 500  $\mu\text{g}$  DOPC, 125  $\mu\text{g}$  胆固醇, 25  $\mu\text{g}$  3D-MPL 和 25  $\mu\text{g}$  QS21, 磷酸盐 NaCl 缓冲液和水, 到 0.5ml 的体积。

[0454] 在制备含有 MPL 的脂质体的过程中, 将 DOPC (二油酰磷脂酰胆碱)、胆固醇和 MPL 溶解于乙醇。通过真空下蒸发溶剂, 形成脂质膜。加入 pH6.1 的磷酸缓冲液 (9mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 41mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100mM NaCl), 使混合物进行预先匀化, 然后在 15,000psi 压力下进行高压匀化 (约 15-20 个循环)。这导致产生脂质体, 所述脂质体在无菌 (100 型) 区域中通过 0.22  $\mu\text{m}$  膜灭菌过滤。然后在无菌玻璃容器中分布无菌产物, 并且在冷室中保存 (+2-+8°C)。

[0455] 以此方式, 产生的脂质体在膜中含有 MPL (W096/33739 的“MPL 在内”实施方案)。

[0456] QS21 在水溶液中添加到需要的浓度。

[0457] 实施例 III- 含有佐剂的不含佐剂的流感疫苗在雪貂中的临床前评价

[0458] III. 1. 原理和目的

[0459] 就对感染的敏感性和临床应答这二者而言,雪貂模型中的流感感染酷似人流感。

[0460] 在先前未适应流感病毒株的情况下,雪貂对甲型流感和乙型流感这二者的感染极为敏感。因此,其为研究由施用的流感疫苗赋予的保护作用提供了极佳的模型系统。

[0461] 该研究调查了含有佐剂的或不含佐剂的各种 3 价分裂疫苗减轻疾病症状(体温)和用同源病毒株攻击的雪貂鼻分泌物中病毒脱落的效力。

[0462] 该实验的目标是表明含有佐剂的流感疫苗相比于普通(不含佐剂的)疫苗的效力。

[0463] 终点是:

[0464] 1) 主要终点:减少同源攻击后鼻清洗液中的病毒脱落;

[0465] 2) 次要终点:通过 HI 滴度分型体液应答

[0466] III. 2. 实验设计

[0467] III. 2. 1. 治疗/组别(表 1)

[0468] 由 MISAY Consultancy(Hampshire, UK) 获得 14-20 周龄的雌性雪貂(地中海雪貂(*Mustela putorius furo*))。雪貂在第 0 天用异亚型病毒株 H1N1A/ 斯德哥尔摩/24/90(4Log TCID<sub>50</sub>/ml) 初免。在第 21 天,用全人剂量(500 μg 疫苗剂量,15 μg HA/病毒株)的 H1N1A/ 新喀里多尼亚/20/99、H3N2A/ 巴拿马/2007/99 和 B/ 山东/7/97 的组合肌肉内注射雪貂。然后在第 42 天通过鼻内途径用异亚型病毒株 H3N2A/ 怀俄明/3/2003(4.5Log TCID<sub>50</sub>/ml) 攻击雪貂。

[0469] 表 1

[0470]

| 组 | 抗原 + 剂量            | 制剂 + 剂量            | 注释(方案/途径/攻击) | In/Po | 其它处理                         |
|---|--------------------|--------------------|--------------|-------|------------------------------|
| 1 | 三价普通疫苗             | 全人剂量: 15 μg HA/病毒株 | IM; 第 21 天   | 单个    | 第 0 天 H1N1 (A/斯德哥尔摩/24/90)初免 |
| 2 | 三价/ 脂质体中的 MPL-QS21 | 全人剂量: 15 μg HA/病毒株 | IM; 第 21 天   | 单个    | 第 0 天 H1N1 (A/斯德哥尔摩/24/90)初免 |

[0471] 6 只雪貂/组。In/Po = 单个/合并物

[0472] III. 2. 2. 疫苗制剂的制备

[0473] 制剂 1:三价普通(不含佐剂的)分裂制剂:

[0474] 将 PBS10 倍浓缩液(1 倍浓缩时为 pH7.4)以及含 Tween80、Triton X-100 和 VES 的混合物(量计入病毒株中存在的去污剂)加入注射用水中。搅拌 5 分钟后,按顺序加入病毒株 H1N1、H3N2 各 15 μg 和 17.5 μg 乙型病毒株,每次加入之间搅拌 10 分钟。制剂于室

温搅拌 15 分钟,如果不立即施用,则储存于 4℃。

[0475] 制剂 2:以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价分裂流感疫苗:

[0476] 将 PBS10 倍浓缩液 (1 倍浓缩时为 pH7.4) 以及含 Tween80、Triton X-100 和 VES 的混合物 (量计入病毒株中存在的去污剂) 加入注射用水中。搅拌 5 分钟后,按顺序加入病毒株 H1N1、H3N2 各 15 μg 和 17.5 μg 乙型病毒株,每次加入之间搅拌 10 分钟。制剂于室温搅拌 15 分钟。在制剂中加入称作“DQS21-MPLin”的预混合物,然后最少搅拌 15 分钟。DQS21-MPLin 预混合物是脂质体 (由 DOPC40mg/ml、胆固醇 10mg/ml, MPL2mg/ml 制备) 和免疫刺激剂 QS21 的混合物。将该预混合物温育最少 15 分钟,然后加入三价分裂混合物。最终制剂中 MPL 和 QS21 的浓度是 50 μg/500 μl。如果不立即施用,则将该制剂储存于 4℃。

[0477] 备注:在每种制剂中,加入 PBS10 倍浓缩液至等渗,在最终体积中为 1 倍浓缩液。计算 H<sub>2</sub>O 体积以达到目标体积。

[0478] 表 2:制剂 1 和 2 (用分裂株制备的制剂中的最终组成 (对于 500 μl))

[0479]

| 制剂 | 抗原                                   | Tween<br>80 | Triton<br>X-100 | VES  | DOPC | 胆固醇   | MPL  | QS21 |
|----|--------------------------------------|-------------|-----------------|------|------|-------|------|------|
| 1  | H1N1:15μg<br>H3N2: 15μg<br>B: 17.5μg | 375μg       | 55μg            | 50μg | -    | -     | -    | -    |
| 2  | H1N1:15μg<br>H3N2: 15μg<br>B: 17.5μg | 375μg       | 55μg            | 50μg | 1mg  | 250μg | 50μg | 50μg |

[0480] III. 2. 3. 读出结果 (表 3)

[0481] 表 3

| 读出结果            | 时间点               | 样品类型 | 分析方法       |
|-----------------|-------------------|------|------------|
| 病毒脱落            | 攻击后 D + 1 至 D + 7 | 鼻清洗液 | 滴定         |
| 抗-HI 抗体 (HI 滴度) | 初免前、初免后、免疫后、攻击后   | 血清   | 血细胞凝集素抑制测试 |

[0483] III. 3. 结果

[0484] 结果的示意图示于图 1 和 2。

[0485] III. 3. 1. 体液免疫 (图 1)

[0486] 在鼻内异源初免后 17 天和免疫后 21 天以及攻击后 13 天,检测来自每组 6 只动物的血清中抗 H3N2 疫苗株 (疫苗株 A/ 巴拿马 /2007/99 和攻击株 A/ 怀俄明 /3/2003) 的血凝反应抑制活性。

[0487] 用实施例 I. 2. 1 详述的血凝反应抑制测试 (HI) 确定针对三种流感病毒株的抗血细胞凝集素抗体滴度。结论如下:

[0488] ➤对于两种 A/H3N2 株和所有组,免疫后在所有接种组中观察到了 HI 滴度的加强。

[0489] ➤用 A/ 巴拿马 /2007/99 免疫后,与三价普通分裂疫苗相比,以脂质体中的 MPL/QS21 为三价分裂疫苗的佐剂时,观察到了统计学显著更高的抗 -A/ 巴拿马 /2007/99HI 滴度。

[0490] ➤用 A/ 巴拿马 /2007/99 免疫后,只有以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价分裂疫苗能够显著增加针对异源株 A/ 怀俄明 /3/2003 的 HI 滴度(在用该漂移株攻击前的交叉反应性)

[0491] ➤用 A/ 怀俄明 3/2003 攻击后,对于三价普通分裂疫苗和以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价分裂疫苗,都观察到了抗 -A/ 怀俄明 /3/2003HI 滴度的显著增加。

[0492] ➤对于 A/ 新喀里多尼亚 /20/99 和 B/ 山东 /7/97 株,与三价普通分裂疫苗相比,以脂质体中的 MPL/QS21 为三价分裂疫苗的佐剂时,观察到了统计学显著更高的 HI 滴度。

[0493] III. 3. 2. 病毒脱落(图 3).

[0494] 按照实施例 I. 2. 3 的详细描述,对每组 6 只动物进行鼻清洗液的病毒滴定。通过在清醒动物的两个鼻孔中施用 5ml PBS 进行鼻清洗。将接种物收集在培养皿中,并置于 -80℃(干冰)的样品容器中。

[0495] ➤攻击后 2 天,与三价普通分裂疫苗相比,用以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价分裂疫苗观察到了统计学显著更低的病毒脱落。

[0496] ➤第 49 天(攻击后 7 天),在鼻清洗液中没有检测到病毒。

[0497] III. 3. 3. 实验结论

[0498] 对于所有 4 种病毒株,与三价普通分裂疫苗相比,用以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价分裂疫苗观察到了更高的体液应答(HI 滴度)。

[0499] 用 A/ 巴拿马 /2007/99 免疫后,只有以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价分裂疫苗能够显著增加针对异源株 A/ 怀俄明 /3/2003 的 HI 滴度(在用该病毒株攻击前的交叉反应性)

[0500] 脂质体制剂中的 MPL/QS21 在雪貂中的保护效力方面显示了增加的益处(异源攻击后更低的病毒脱落)。用脂质体中的三价分裂 MPL/QS21 进行抗用于攻击的漂移株的免疫后观察到的交叉反应似乎与在这些雪貂中观察到的保护作用相关。

[0501] 实施例 IV 含有佐剂的和不含佐剂的流感疫苗在 C57B1/6 初免小鼠中的临床前评价

[0502] IV. 1. 实验设计和目的

[0503] 将异源病毒株初免的 C57B1/6 小鼠用于本实验。

[0504] 目的是比较由 GlaxoSmithKline 公司的商业化三价分裂疫苗(Fluarix™)与三价亚单位疫苗(Chiron 公司的疫苗 Agrippal™)诱导的体液(HI 滴度)和 CMI(ICS,细胞内细胞因子染色)免疫应答以及由以含有单独的 3D-MPL 的脂质体、单独的 DQS21(脂质体中的 QS21,即去毒的 QS21)或脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的这些疫苗获得的 CMI 应答。在下文实施例中,从分裂的单批量(monobulks)开始制备制剂,达到与 Fluarix 疫苗相同组成而与商购 Fluarix 剂量不同。获得的制剂称作“Fluarix 样”。

[0505] IV. 1. 1. 处理 / 组

[0506] 从荷兰的 Harlan Horst 获得 6-8 周龄的雌性 C57B1/6 小鼠。在第 0 天用异亚型

病毒株对小鼠进行初免 (5  $\mu$ g HA 完整灭活 H1N1A/ 北京 /262/95, H3N2A/ 巴拿马 /2007/99, B/ 山东 /7/97)。第 28 天, 给小鼠肌肉注射 1, 5  $\mu$ g HA 三价分裂 (A/ 新喀里多尼亚 /20/99, A/ 怀俄明 /3/2003, B/ 江苏 /10/2003) 普通疫苗或含有佐剂的疫苗 (参见下文表 4-6 的分组)。

[0507] 表 4

[0508]

| 组 | 抗原 / 制剂                         | 其它处理    |
|---|---------------------------------|---------|
| 1 | 三价分裂 * / 普通 (不含佐剂的) = Fluarix 样 | 异源初免 D0 |
| 2 | 三价分裂 * / 含 3D-MPL 的脂质体          | 异源初免 D0 |
| 3 | 三价分裂 * / DQS21                  | 异源初免 D0 |
| 4 | 三价分裂 * / 脂质体中的 MPL/QS21         | 异源初免 D0 |

[0509]

|   |                                 |         |
|---|---------------------------------|---------|
| 5 | Aggripal™ (亚基)                  | 异源初免 D0 |
| 6 | Aggripal™ (亚基) / 含 3D-MPL 的脂质体  | 异源初免 D0 |
| 7 | Aggripal™ (亚基) / DQS21          | 异源初免 D0 |
| 8 | Aggripal™ (亚基) / 脂质体中的 MPL/QS21 | 异源初免 D0 |
| 9 | PBS                             | 异源初免 D0 |

[0510] \*Fluarix 样. 16 只小鼠 / 组

[0511] IV. 1. 2. 制备疫苗制剂

[0512] IV. 1. 2. 制备疫苗制剂

[0513] 第 1 组的制剂:

[0514] 将 PBS10 倍浓缩液 (1 倍浓缩时为 pH7.4) 以及含 Tween80、Triton X-100 和 VES 的混合物 (量计入病毒株中存在的去污剂) 加入注射用水中。搅拌 5 分钟后, 按顺序加入病毒株 H1N1、H3N2 各 15  $\mu$ g 和 15  $\mu$ g 乙型病毒株, 每次加入之间搅拌 10 分钟。制剂于室温搅拌 15 分钟, 如果不立即施用, 则储存于 4°C。

[0515] 第 2 组的制剂:

[0516] 将 PBS10 倍浓缩液 (1 倍浓缩时为 pH7.4) 以及含 Tween80、Triton X-100 和 VES 的混合物 (量计入病毒株中存在的去污剂) 加入注射用水中。搅拌 5 分钟后, 按顺序加入病毒株 H1N1、H3N2 各 15  $\mu$ g 和 15  $\mu$ g 乙型病毒株, 每次加入之间搅拌 10 分钟。将制剂搅拌 15 分钟。加入含有 3D-MPL 的浓缩脂质体 (由 DOPC40mg/ml、胆固醇 10mg/ml, 3D-MPL2mg/ml 制备) 达到每剂 50  $\mu$ g 的最终 MPL 浓度。然后将该制剂搅拌最少 15 分钟, 如果不立即施用, 则将该制剂储存于 4°C。

[0517] 第 3 组的制剂:

[0518] 将 PBS10 倍浓缩液 (1 倍浓缩时为 pH7.4) 以及含 Tween80、Triton X-100 和 VES 的混合物 (量计入病毒株中存在的去污剂) 加入注射用水中。搅拌 5 分钟后,按顺序加入病毒株 H1N1、H3N2 各 15  $\mu$ g 和 15  $\mu$ g 乙型病毒株,每次加入之间搅拌 10 分钟。将制剂搅拌 15 分钟。然后加入由脂质体 (由 DOPC40mg/ml、胆固醇 10mg/ml 制备) 和称作“DQS21”的 QS21 制备的预混合物,达到每剂 50  $\mu$ g 的 QS21 浓度。在加入三价分裂混合物之前,该预混合物至少温育了 15 分钟。将该制剂搅拌最少 15 分钟,如果不立即施用,则将该制剂储存于 4℃。

[0519] 第 4 组的制剂:

[0520] 将 PBS10 倍浓缩液 (1 倍浓缩时为 pH7.4) 以及含 Tween80、Triton X-100 和 VES 的混合物 (量计入病毒株中存在的去污剂) 加入注射用水中。搅拌 5 分钟后,按顺序加入病毒株 H1N1、H3N2 各 15  $\mu$ g 和 15  $\mu$ g 乙型病毒株,每次加入之间搅拌 10 分钟。将制剂搅拌 15 分钟。然后加入由含 3D-MPL 的脂质体 (由 DOPC40mg/ml、胆固醇 10mg/ml, 3D-MPL2mg/ml 制备) 和 QS21 制备的混合物,达到每剂 50  $\mu$ g 的 QS21 和 MPL 浓度。在加入三价分裂混合物之前,该预混合物至少温育了 15 分钟。将所称的“三价分裂脂质体中的 MPL/QS21”制剂最少 15 分钟,如果不立即施用,则将该制剂储存于 4℃。

[0521] 备注:在 1-4 组,加入 PBS10 倍浓缩液达到等渗,在终体积中是 1 倍浓缩。计算 H<sub>2</sub>O 体积,达到目标体积。

[0522] 第 5 组的制剂:

[0523] 将一剂 Aggripal™ 与等体积 PBS pH7.4。将该制剂搅拌最少 15 分钟,如果不立即施用,则将该制剂储存于 4℃。

[0524] 第 6 组的制剂:

[0525] 混合 PBS pH7.4 和一剂 Aggripal™。然后在搅拌下加入含 3D-MPL 的脂质体 (由 DOPC40mg/ml、胆固醇 10mg/ml, 3D-MPL2mg/ml 制备),达到相当于每剂 50  $\mu$ g MPL。将该制剂搅拌最少 15 分钟,如果不立即施用,则将该制剂储存于 4℃。

[0526] 备注:加入 PBS,在终体积达到等渗。Aggripal 是制剂体积的一半。

[0527] 第 7 组的制剂:

[0528] 混合 PBS pH7.4 和一剂 Aggripal™。然后在搅拌下加入脂质体 (由 DOPC40mg/ml、胆固醇 10mg/ml 制备) 和称作“DQS21”的 QS21 的预混合物,达到相当于 50  $\mu$ g QS21。在加入之前,该预混合物至少温育了 15 分钟。将该制剂搅拌最少 15 分钟,如果不立即施用,则将该制剂储存于 4℃。

[0529] 备注:加入 PBS,在终体积达到等渗。Aggripal™ 是制剂体积的一半。

[0530] 第 8 组的制剂:

[0531] 混合 PBS pH7.4 和一剂 Aggripal™。搅拌下在制剂中加入所谓的“DQS21-MPLin”的预混合物。DQS21-MPLin 预混合物是脂质体 (由 DOPC40mg/ml、胆固醇 10mg/ml, MPL2mg/ml 制备) 和免疫刺激剂 QS21 的混合物。在加入 Aggripal/PBS 混合物之前,该预混合物至少温育了 15 分钟。MPL 和 QS21 在制剂中的量是各 50  $\mu$ g。将该制剂搅拌最少 15 分钟,如果不立即施用,则将该制剂储存于 4℃。

[0532] 备注:加入 PBS,在终体积达到等渗。Aggripal 是制剂体积的一半。

[0533] 表 5:用分裂病毒株制备的制剂 1-4 的最终组成 (对于 1ml)

[0534]

| 组 | 抗原                                    | Tween 80 | Triton<br>X-100 | VES   | DOPC | 胆固醇   | MPL  | QS21 |
|---|---------------------------------------|----------|-----------------|-------|------|-------|------|------|
| 1 | H1N1: 15μg<br>H3N2: 15μg<br>B: 17.5μg | 750μg    | 110μg           | 100μg | —    | —     | —    | —    |
| 2 | 与第 1 组相同                              | 与第 1 组相同 | 110μg           | 100μg | 1mg  | 250μg | 50μg | -    |
| 3 | 与第 1 组相同                              | 与第 1 组相同 | 110μg           | 100μg | 1mg  | 250μg | -    | 50μg |
| 4 | 与第 1 组相同                              | 与第 1 组相同 | 110μg           | 100μg | 1mg  | 250μg | 50μg | 50μg |

[0535] 表 6 :用 Aggripal™ 疫苗制备的制剂 5-8 的最终组成 (1ml)

[0536]

| 组 | 抗原              | DOPC | 胆固醇     | MPL    | QS21   |
|---|-----------------|------|---------|--------|--------|
| 5 | 1 剂 Aggripal 疫苗 | —    | —       | —      | —      |
| 6 | 与第 5 组相同        | 1mg  | 250 μ g | 50 μ g | —      |
| 7 | 与第 5 组相同        | 1mg  | 250 μ g | —      | 50 μ g |
| 8 | 与第 5 组相同        | 1mg  | 250 μ g | 50 μ g | 50 μ g |

[0537] IV. 1. 3. 读出结果 (表 7)

[0538] 表 7

[0539]

| 读出结果                            | 时间点                   | 样品类型 | In/Po | 分析方法            |
|---------------------------------|-----------------------|------|-------|-----------------|
| 抗-HI抗体<br>(HI滴度)                | 免疫后第 21<br>天 (第 49 天) | 血清   | 单个    | 血凝反应抑制测试        |
| CD4, CD8, IL-2,<br>IFN-γ (FACS) | 免疫后第 7 天<br>(第 35 天)  | PBLs | 合并物   | 细胞内细胞因子染色 (ICS) |

[0540]  $In = \text{单个} / Po = \text{合并物}$ 

[0541] IV. 2. 结果

[0542] IV. 2. 1. 体液应答 (免疫后 21 天的 HI 滴度).

[0543] HI 滴度表示的体液应答 - 图 4。

[0544] 免疫后 21 天,检测来自每组 8 只动物的血清中抗三种疫苗株 (A/ 新喀里多尼亚 /20/99, A/ 怀俄明 /3/2003, B/ 江苏 /10/2003) 的血凝反应抑制活性。

[0545] ➤与 PBS 免疫的小鼠相比,对于所有三种病毒株 (三价分裂或三价亚单位疫苗),用测试的所有流感疫苗候选物免疫后,观察到了 HI 滴度的增加。

[0546] ➤对于三种病毒株,与三价分裂流感普通疫苗或以含有单独的 3D-MPL 的脂质体为佐剂的疫苗免疫的小鼠相比,用以单独的 DQS21 或脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价分裂疫苗免疫的小鼠中观察到了统计学显著更高的 HI 滴度。体液应答的排序如下:(脂质体中的 MPL/QS21 = 单独的 DQS21) > (含有单独的 3D-MPL 的脂质体 = 普通) > PBS。

[0547] ➤对于三种病毒株,与用三价分裂普通疫苗免疫的小鼠相比,在用以单独的 DQS21、含有单独的 3D-MPL 的脂质体或脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价亚单位疫苗免疫的小鼠中观察到了统计学显著更高的 HI 滴度。体液应答的排序如下:(脂质体中的 MPL/QS21 = 单独的 DQ21 = 含单独的 3D-MPL 的脂质体) > 普通 > PBS。

[0548] ➤当制剂不含佐剂或以单独的 DQ21 或脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂时,三价分裂和三价亚单位疫苗诱导相似的 HI 滴度。

[0549] IV. 2. 2. 细胞介导的免疫应答(免疫后第 7 天的 ICS)。

[0550] CD4T 细胞应答 - 图 5

[0551] 在免疫后第 7 天收获来自每组 8 只小鼠的 PBMCs,并且在每组 2 只小鼠的 4 个合并物中测试。

[0552] 在流感全病毒特异性总 CD4+T 细胞(表达 IL-2、IFN- $\gamma$  和这两种细胞因子)方面:

[0553] ➤无论是何种制剂,在三价分裂和三价亚单位疫苗之间观察到了相同的 CD4+T 细胞应答。

[0554] ➤与普通或以含单独的 3D-MPL 的脂质体或单独的 DQ21 为佐剂的三价制剂(分裂或亚单位)相比,以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价制剂(分裂或亚单位)观察到了更高的 CD4+T 细胞应答。

[0555] ➤对于三价制剂(分裂或亚单位)诱导的细胞应答,与单独的 DQ21 或含单独的 3D-MPL 的脂质体相比,含有 3D-MPL+DQS21 的脂质体存在协同作用。

[0556] ➤细胞应答的排序如下:脂质体中的 MPL/QS21 > (含单独的 3D-MPL 的脂质体 = 单独的 DQ21 = 普通 = PBS)。

[0557] IV. 3. 结果概括和结论

[0558] ➤对于所有三种病毒株,与用普通三价制剂(分裂或亚单位)免疫的小鼠相比,用以单独的 DQ21 或脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价制剂(分裂或亚单位)免疫的小鼠中观察到了统计学显著更高的 HI 滴度。含单独的 3D-MPL 的脂质体当与三价亚单位疫苗一起配制时,似乎比与三价分裂疫苗一起配制诱导更高的体液应答。

[0559] ➤无论是何种制剂,对三价分裂(Fluarix)和三价亚单位疫苗(Agrippal)获得了相似的 CD4+T 细胞应答。

[0560] ➤与普通或以含单独的 3D-MPL 的脂质体或脂质体中单独的 DQ21(DQS21)为佐剂的三价制剂(分裂或亚单位)相比,以脂质体中的 MPL/QS21 为佐剂的三价制剂(分裂或亚单位)诱导了更高的 CD4+T 细胞应答。

[0561] 实施例 V 以脂质体制剂中的 3D-MPL/QS21 为佐剂的含分裂流感抗原的疫苗的临床前比较(两种不同浓度的 3D-MPL)

[0562] V. 1 小鼠

[0563] V. 1. 1 实验设计和目的

[0564] 本实验采用异源病毒株初免的 C57B1/6 小鼠。目的是分析不含佐剂的 GlaxoSmithKline 商业化三价分裂疫苗 (Fluarix™) 和当以含有两种不同浓度的 3D-MPL 和 QS21 的脂质体为佐剂时诱导的体液 (HI 滴度) 和 CMI (ICS, 细胞内细胞因子染色) 免疫应答。

[0565] V. 1. 2 处理 / 组

[0566] 从荷兰的 Harlan Horst 获得 8 周龄的雌性 C57B1/6 小鼠。在第 0 天用异亚型病毒株对小鼠进行鼻内初免 (完整灭活 A/ 北京 /262/95, H3N2A/ 巴拿马 /2007/99, B/ 山东 /7/97)。第 28 天, 给小鼠肌肉注射三价分裂 (A/ 新喀里多尼亚 /20/99, A/ 怀俄明, B/ 江苏) 普通疫苗或以两种不同浓度的脂质体中的免疫刺激剂为佐剂的疫苗 (参见下文表 8 的分组)。

[0567] 表 8

[0568]

| 组 | 抗原 + 剂量                    | 制剂 + 剂量                     | 其它处理                     |
|---|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1 | 三价分裂流感<br>1.5 µg/病毒株/50 µl | 普通                          | 鼻内异源初免D0<br>完整灭活5µg/20µl |
| 2 | 三价分裂流感<br>1.5 µg/病毒株/50 µl | 含3D-MPL的脂质体<br>每0.5ml剂量50µg | 鼻内异源初免D0<br>完整灭活5µg/20µl |
| 3 | 三价分裂流感<br>1.5 µg/病毒株/50 µl | DQS21<br>每0.5ml剂量50µg       | 鼻内异源初免D0<br>完整灭活5µg/20µl |
| 4 | 三价分裂流感<br>1.5 µg/病毒株/50 µl | MPL和QS21<br>每0.5ml剂量25µg    | 鼻内异源初免D0<br>完整灭活5µg/20µl |
| 5 | 三价分裂流感<br>1.5 µg/病毒株/50 µl | MPL和 QS21<br>每0.5ml剂量50µg   | 鼻内异源初免D0<br>完整灭活5µg/20µl |
| 6 | PBS                        | 无                           | 鼻内异源初免D0<br>完整灭活5µg/20µl |

[0569] 按照实施例 IV 制备制剂。

[0570] V. 1. 3 结果

[0571] HI 滴度表示的体液应答 - 图 24。

[0572] 免疫后 21 天, 检测来自每组 9 只动物的血清中抗三种疫苗株的血凝反应抑制活性。

[0573] ➤与 PBS 免疫的小鼠相比, 对于所有三种病毒株, 用测试的所有流感疫苗候选物免疫后, 观察到了 HI 滴度的增加。

[0574] ➤对于所有三种病毒株, 与用三价流感分裂普通疫苗免疫的小鼠相比, 用以 MPL 和 QS21 为佐剂的三价分裂疫苗免疫的小鼠中观察到了统计学显著更高的 HI 滴度 (最大 p 值 = 0.03)。

[0575] 多个以脂质体为佐剂的组之间没有观察到统计学显著差异。

[0576] 细胞介导的免疫应答（免疫后 7 天的 ICS）- 图 25

[0577] 在免疫后第 7 天收获来自每组 8 只小鼠的 PBMCs, 并且在每组 3 只小鼠的 3 个合并物中测试。在完整流感病毒特异性 CD4+T 细胞（表达 IL-2、IFN- $\gamma$  或这两种细胞因子）方面：

[0578] 从图 25 可以看出, 用以最高浓度的免疫刺激剂为佐剂的三价分裂疫苗免疫后, 获得了最高的 IFN- $\gamma$  CD4+T 细胞特异性应答。但是, 两种浓度的免疫刺激剂之间, IL2 和 IL2+IFN- $\gamma$  T 细胞应答是相似的。

[0579] 实施例 VI- 以脂质体制剂中的 3D-MPL/QS21 为佐剂的含分裂流感抗原制剂的疫苗在年龄超过 65 岁的老年人群中的临床试验（两种不同浓度的 3D-MPL）

[0580] VI. 1. 研究设计和目的

[0581] 开放的随机 I/II 期研究, 证明在老年人群（年龄 65 岁和以上）中施用的含各种佐剂的 GlaxoSmithKline Biologicals 公司的流感候选疫苗在细胞介导的免疫应答方面与在成人（18-40 岁）中施用的 Fluarix<sup>TM</sup>（在比利时称作  $\alpha$ -Rix<sup>TM</sup>）相比, 效果并不差。

[0582] 分为 4 个平行组：

[0583] ● - 个对照组中的 75 个成人（18-40 岁）接受一剂 Fluarix<sup>TM</sup>（Fluarix 组）

[0584] ● 200 个老年受试者（年龄 65 岁和以上）以 3 : 3 : 2 随机分为 3 组：

[0585] - 一组 75 个受试者, 接受以 AS01B 为佐剂的流感疫苗

[0586] - 一组 75 个受试者, 接受以 AS01E 为佐剂的流感疫苗

[0587] - 具有 50 个受试者的参照流感疫苗组, 接受一剂 Fluarix<sup>TM</sup>

[0588] 第一目的

[0589] 第一目的是证明在接种后 21 天, 与在成人（18-40 岁）中施用的 Fluarix<sup>TM</sup> 相比, 在老年受试者（年龄 65 岁和以上）中施用的含佐剂的流感疫苗在产生至少两种不同细胞因子（CD40L, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ）的流感特异性 CD4T- 淋巴细胞频率方面, 效果并不差。

[0590] 第二目的

[0591] 第二目的是：

[0592] 1) 在老年受试者（年龄 65 岁和以上）中肌肉施用疫苗后的 21 天期间, 评价用含有佐剂的候选流感疫苗接种的安全性和反应原性。Fluarix<sup>TM</sup> 用作参照。

[0593] 2) 评价用含有佐剂的流感候选疫苗接种后 21、90 和 180 天的体液免疫应答（抗血细胞凝集素滴度）。Fluarix<sup>TM</sup> 用作参照。

[0594] 第三目的

[0595] 第三目的是评价含有佐剂的流感疫苗接种后 21、90 和 180 天的细胞介导的免疫应答（IFN- $\gamma$ , IL-2, CD40L 和 TNF- $\alpha$  的产生以及记忆 B- 细胞应答）。Fluarix<sup>TM</sup> 用作参照。

[0596] VI. 2. 疫苗组成和施用

[0597] 采用两种不同的佐剂：

[0598] 1. AS01B, 含有 50  $\mu$ g MPL 和 QS21 的基于脂质体的佐剂

[0599] 2. AS01E, AS01B 的两倍稀释制剂

[0600] 对照：通过 IM 施用全剂量的 Fluarix<sup>TM</sup>。

[0601] 所有疫苗都意欲肌肉施用。用于 5 种疫苗中的病毒株是 WHO 推荐的 2005-2006 北

半球流感季的那些,即 A/ 新喀里多尼亚 /20/99 (H1N1), A/ 纽约 /7/2004 (H3N2) 和 B/ 江苏 /10/2003。

[0602] 用于含有佐剂的流感候选疫苗制剂中的三种灭活分裂病毒体抗原(单价批量)与用于商购 Fluarix™/α-Rix™-GSK Bio 的分裂病毒体灭活流感疫苗制剂中使用的活性成分完全相同。它们来源于卵生长的病毒。流感病毒株是商购 Fluarix™/α-Rix™2005/2006 的制剂中使用的 2005/2006 季推荐的那些。

[0603] 用于三种疫苗中的病毒株是 WHO 推荐的 2005-2006 北半球流感季的那些,即

[0604] ● A/ 新喀里多尼亚 /20/99 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) IVR-116

[0605] ● A/ 纽约 /55/2004 (H3N2) NYMC X-157

[0606] ● B/ 江苏 /10/2003

[0607] 同 Fluarix™/α-Rix™类似,含有佐剂的疫苗每剂含有每种流感病毒株的 15 μg 血细胞凝集素 (HA)。

[0608] VI. 2. 1. 以 AS01B 为佐剂的疫苗批次的说明

[0609] 以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗是一种两组分疫苗,由玻璃管形瓶中的浓缩三价灭活分裂病毒体抗原和含有 AS01B 佐剂的玻璃管形瓶组成。注射时,取出佐剂管形瓶的内容物,并且注射到含有浓缩三价灭活分裂病毒体抗原的管形瓶中。混合后,将内容物抽入注射器,针头用肌内针头替换。采用的针头用肌内针头替换,体积校正到 1ml。一剂重配的以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗相应于 1mL。

[0610] 以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗是不含防腐剂的疫苗。

[0611] VI. 2. 2. 以 AS01B 为佐剂的临床批次的组成

[0612] 一剂重配的以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗相应于 1mL。其组成如表 8 所示。如同注册的 Fluarix™/α-Rix®疫苗,它含有 15 μg 每种流感病毒株的 HA。

[0613] 表 8- 重配的以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗的组成(流感病毒和佐剂组分)

|        | • 组分                                | • 每剂的量   | • 分析参考        |
|--------|-------------------------------------|----------|---------------|
|        | • 活性成分                              |          |               |
| [0614] | 灭活的分裂病毒体                            |          |               |
|        | - A/新喀里多尼亚/20/99 (H1N1)<br>IVR-116  | 15 µg HA | Ph. Eur. 158  |
|        | - A/纽约/55/2004 (H3N2) NYMC<br>X-157 | 15 µg HA | Ph. Eur. 158  |
|        | - B/江苏/10/2003                      | 15 µg HA | Ph. Eur. 158  |
|        | • AS01B 佐剂                          |          |               |
|        | - 脂质体                               |          |               |
|        | • 二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)                    | 1000 µg  | GSK Bio 3217  |
|        | • 胆固醇                               | 250 µg   | Ph. Eur. 0993 |
|        | • MPL                               | 50 µg    | GSK Bio 2972  |
|        | - QS21                              | 50 µg    | GSK Bio 3034  |

[0615] VI. 2. 3. 以 AS01B 为佐剂的疫苗批次的生产方法

[0616] 以 AS01B 为佐剂的流感疫苗的制备由以下三个主要步骤组成：

[0617] ● 配制不含佐剂的三价最终批量（2 倍浓缩）并且装入抗原容器

[0618] ● 制备 AS01B 佐剂

[0619] ● 以 AS01B 为佐剂的分裂病毒疫苗的临时重配。

[0620] 配制不含佐剂的三价最终批量并且装入抗原容器

[0621] 三个单价批量的体积是基于在配制之前每个单价批量中测量的 HA 含量并且基于 1320ml 的目标体积。

[0622] 将浓缩的磷酸缓冲液  $\text{PO}_4\text{Na}/\text{K}_2$  ( $80 \mu\text{l}/\text{剂}$ ) 以及 Tween80、Triton X-100 和  $\alpha$ -生育酚氢琥珀酸酯的预混合物稀释在注射用水中。然后将 3 种浓缩的单价批量 (A/ 新喀里多尼亚 /20/99IVR-116, A/ 纽约 /55/2004NYMC X-157, B/ 江苏 /10/2003) 连续稀释入获得的磷酸缓冲盐水 /Tween80-Triton X-100- $\alpha$ -生育酚氢琥珀酸酯溶液 (pH7.8, 81mM NaCl, 1.56mM KCl, 4.79mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.87mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7.2mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 72.8mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tween80, 110  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Triton X-100 和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -生育酚氢琥珀酸酯) 中, 以便具有终浓度 30  $\mu\text{g}$  A 病毒株 (H1N1、H3N2) 的 HA/ml 三价最终批量 (15  $\mu\text{g}$  HA/A 病毒株 /500  $\mu\text{l}$  三价最终批量) 和 35  $\mu\text{g}$  B 病毒株的 HA (17.5  $\mu\text{g}$  HA/B 病毒株 /500  $\mu\text{l}$  三价最终批量)。在加入每种单价批量之间, 于室温搅拌混合物 10-30 分钟。在加入最后一种单价批量后, 搅拌 15-30 分钟, 检查 pH, 并用 HCl 或 NaOH 将 pH 调节至  $7.65 \pm 0.25$ 。

[0623] 抗原的三价最终批量无菌分装入 3-ml 无菌 I 型 (欧洲药典) 玻璃瓶中。每瓶含 600  $\mu\text{l}$  体积 (500  $\mu\text{l}$  + 90  $\mu\text{l}$  过充)。

[0624] 制备 AS01B 佐剂批量并且装入佐剂容器

[0625] 通过混合两种组分 :QS21 和含有 MPL 的脂质体,制备佐剂 AS01B。这些组分的每一种组分的制备概括如下 :

[0626] QS21 是一种三萜烯糖苷,获自皂树的树皮,由 Aquila Worchester, MA, USA (现在是 Antigenics) 生产。

[0627] QS21 是作为冻干粉末提供给 GSK Biologicals 公司的。GSK Biologicals 公司对 QS21 的制备由以下步骤组成 :以大约 5mg/mL 的浓度将 QS21 粉末悬浮于注射用水中, pH 调节到  $\text{pH}6.0 \pm 0.2$ , 并且进行灭菌过滤。将液体批量 QS21 于  $-20^{\circ}\text{C}$  下储存于聚乙烯容器中。

[0628] MPL 是通过来自明尼苏达沙门氏菌的 Re595 株的脂多糖的顺序酸和碱水解获得的 3-O-脱酰基-4'-单磷酸脂质 A。它由 GSK Biologicals, Hamilton, Montana 生产。批量 MPL 是作为三乙胺 (TEA) 的冻干盐提供的。

[0629] 在制备含 MPL 的脂质体过程中,将 DOPC (二油酰磷脂酰胆碱)、胆固醇和 MPL 溶解于乙醇中。通过真空下蒸发溶剂,形成脂质膜。加入  $\text{pH}6.1$  的磷酸缓冲液 (9mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 41mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100mM NaCl 组成),使混合物进行预先匀化,然后在 15,000psi 压力下进行高压匀化 (+/-20 个循环)。这导致产生脂质体,所述脂质体在无菌 (100 型) 区域中通过  $0.22 \mu\text{m}$  膜灭菌过滤。然后在无菌玻璃容器中分装无菌产物,并且在冷室中保存 ( $+2$ – $+8^{\circ}\text{C}$ )。

[0630] 将脂质体的无菌批量制品与无菌 QS21 批量溶液混合。搅拌 30 分钟后,将混合物加入注射用水和稀释 10 倍的磷酸盐 500mM, NaCl1M  $\text{pH}6.1$  的混合物。计算稀释 10 倍时的磷酸盐 500mM, NaCl1M  $\text{pH}6.1$  的量,达到在最终体积中等渗。检查 pH。然后对佐剂进行灭菌过滤 ( $0.22 \mu\text{m}$ ),并且无菌分装到管形瓶中。管形瓶在  $+2$ – $+8^{\circ}\text{C}$  下保存。

[0631] AS01B 稀释液是乳白色液体,不含外来颗粒,装在无菌 1 型玻璃管形瓶中。每个管形瓶的目标填充量是 0.7ml,以满足规定 ( $\geq 0.5\text{ml}$ )。

[0632] 以 AS01B 为佐剂的分裂病毒疫苗的临时重配

[0633] 注射时,取出含佐剂的管形瓶的内容物,并且注射到含有浓缩三价灭活分裂病毒体抗原的管形瓶中。混合后,将内容物抽入注射器,采用的针头用肌肉针头替换,体积校正到 1ml。一剂重配的以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗相应于 1mL。

[0634] VI. 2. 4. 以 AS01E 为佐剂的疫苗批次的说明

[0635] 以 AS01E 为佐剂的流感候选疫苗是一种 3 组分疫苗,由玻璃管形瓶中的浓缩三价灭活分裂病毒体抗原、含有 AS01B 佐剂的玻璃管形瓶和含有稀释剂 (注射用氯化钠溶液) 的管形瓶组成,所述稀释剂用于对 AS01B 进行两倍稀释。

[0636] 为了制备 AS01E 佐剂,用注射器抽出稀释剂管形瓶的内容物,注射到含有 AS01B 佐剂的管形瓶中,然后混合。注射时,用注射器从 AS01E 管形瓶抽出  $600 \mu\text{L}$  AS01E 佐剂,注射到含有浓缩三价灭活分裂病毒体抗原的管形瓶中。混合后,将内容物抽入注射器,针头用肌肉针头替换。一剂重配的以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗相应于 1mL。

[0637] 以 AS01E 为佐剂的流感候选疫苗是不含防腐剂的疫苗。

[0638] VI. 2. 5. 以 AS01E 为佐剂的临床批次的组成

[0639] 一剂重配的以 AS01E 为佐剂的流感候选疫苗相应于 1mL。其组成如表 9 所示。如同注册的 **Fluarix<sup>TM</sup>/α-Rix<sup>®</sup>** 疫苗,它含有  $15 \mu\text{g}$  每种流感病毒株的 HA。

[0640] 1. 表 9- 重配的以 AS01E 为佐剂的流感候选疫苗的组成 (流感病毒和佐剂组分)

|        | • 组分                                           | • 每剂的量                        | • 分析参考                                            |
|--------|------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|
|        | • 活性成分                                         |                               |                                                   |
| [0641] | 灭活的分裂病毒体<br>- A/新喀里多尼亚/20/99 (H1N1)<br>IVR-116 | 15 µg HA                      | Ph. Eur. 158                                      |
|        | - A/纽约/55/2004 (H3N2) NYMC<br>X-157            | 15 µg HA                      | Ph. Eur. 158                                      |
|        | - B/江苏/10/2003                                 | 15 µg HA                      | Ph. Eur. 158                                      |
|        | • AS01B 佐剂                                     |                               |                                                   |
|        | - 脂质体<br>• 二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)<br>• 胆固醇<br>• MPL    | 500 µg<br><br>125 µg<br>25 µg | GSK Bio 3217<br><br>Ph. Eur. 0993<br>GSK Bio 2972 |
|        | - QS21                                         | 25 µg                         | GSK Bio 3034                                      |

[0642] VI. 2. 6. 以 AS01E 为佐剂的疫苗批次的生产方法

[0643] 以 AS01B 为佐剂的流感疫苗的制备由以下三个主要步骤组成：

[0644] ● 配制不含佐剂的三价最终批量（2 倍浓缩）并且装入抗原容器

[0645] ● 制备 AS01B 佐剂

[0646] ● 制备以 AS01E 为佐剂的流感疫苗，然后是以 AS01E 为佐剂的分裂病毒疫苗的临时重配。

[0647] 配制不含佐剂的三价最终批量并且装入抗原容器

[0648] 参照 V. 2. 3 部分对以 AS01B 为佐剂的流感疫苗的描述。

[0649] 制备 AS01B 佐剂批量并且装入佐剂容器

[0650] 参照 V. 2. 3 部分对以 AS01B 为佐剂的流感疫苗的描述。

[0651] 以 AS01E 为佐剂的分裂病毒疫苗的临时重配

[0652] 为了制备 AS01E 佐剂，用注射器抽出稀释剂管形瓶的内容物，注射到含有 AS01B 佐剂的管形瓶中，然后混合。注射时，用注射器从 AS01E 管形瓶抽出 600 µl AS01E 佐剂，注射到含有浓缩三价灭活分裂病毒体抗原的管形瓶中。混合后，将内容物抽入注射器，针头用肌肉内针头替换。一剂重配的以 AS01B 为佐剂的流感候选疫苗相应于 1mL。

[0653] 每名受试者进行 4 次预定随访：于 0、21、90 和 180 天的每次随访时收集血样，以评价免疫原性。

[0654] 接种程序：在第 0 天进行 1 次流感疫苗注射。

[0655] VI. 2. 7 免疫测定

[0656] 血凝反应抑制测定

[0657] 使用 WHO 流感合作中心, 疾病控制中心, 亚特兰大, 美国 (1991) 描述的方法通过检测血凝反应抑制 (HI) 抗体测定免疫应答。使用 4 个血凝反应抑制单位 (4HIU) 的适宜抗原和 0.5% 禽红细胞悬浮液, 用标准的和综合验证过的微量法对解冻的冷冻血清样品进行抗体滴度检测。通过热处理和受体破坏酶去除非特异性血清抑制剂。评价所获血清的 HI 抗体水平。以 1 : 10 起始稀释度开始制备连续稀释度 (乘以因数 2), 直至最终稀释度 1 : 20480。把显示完全抑制 (100%) 血凝反应的最高稀释度步骤视为滴定终点。所有实验都以双份进行。

[0658] 通过细胞因子流式细胞术 (CFC) 评价细胞因子的频率 - 阳性 CD4 或 CD8T 淋巴细胞

[0659] 如果与对应抗原温育, 外周血抗原特异性 CD4 和 CD8T 细胞可在体外被再刺激, 以产生 CD40L、IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ 。因此, 抗原特异性 CD4 和 CD8T 细胞可在常规免疫荧光标记细胞表型以及胞内细胞因子生产后通过流式细胞术计数。在本研究中, 流感疫苗抗原以及来源于特定流感蛋白的肽用作再刺激流感特异性 T 细胞的抗原。结果表示为 CD4 或 CD8T 细胞亚群中细胞因子阳性 CD4 或 CD8T 细胞的频率。

[0660] 用 ELISPOT 评价记忆 B- 细胞的频率

[0661] B 细胞 Elispot 技术使得能够进行特定抗原的特异性记忆 B 细胞的定量。用 CpG 培养 5 天后, 记忆 B 细胞可以在体外诱导分化成浆细胞。因此, 可以用 B- 细胞 elispot 测定计数体外产生的抗原特异性浆细胞。简言之, 在抗原包被的培养板中温育体外产生的浆细胞。抗原特异性浆细胞将形成抗体 / 抗原斑点, 其可以通过常规免疫 - 酶程序检测。在本研究中, 用流感疫苗株或抗人免疫球蛋白包被培养板, 以分别计数抗流感或分泌 IgG 的浆细胞。结果表示为一百万个产生 IgG 的浆细胞中的抗原特异性浆细胞的频率。

[0662] PBMCs 的解释性表征

[0663] 可以进行选择的表面活性剂 / 激活标记物 (即 CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD28, CD27 或一些 KIR) 的表达。通过分析细胞因子 (T 辅助细胞 1 或 T 辅助细胞 2 细胞因子) 的归巢标记物 (即 CCR7、CXCR5), 或通过分析与诸如 Foxp3、CTLA-4 或 TGF  $\beta$  的调节功能相关的因子的表达, 可以解决疫苗诱导的 T 淋巴细胞的功能。具体地, 可以通过对疫苗抗原的体液、B 和 T 细胞应答, 分析 CD8+CD28- 群体或其它调节性 T 细胞群体。

[0664] VI. 3. 免疫原性结果

[0665] VI. 3. 1. CMI 终点知结果

[0666] 为了表征用含有佐剂的流感疫苗接种后的 CMI 应答, 用来自三种疫苗株的抗原 (单独或合并使用) 的抗原体外再刺激 CD4 和 CD8T- 淋巴细胞。流感特异性 CD4/CD8T 细胞在常规免疫荧光标记胞内细胞因子 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 CD40L) 生产后通过流式细胞术计数。

[0667] 主要终点的评价

[0668] 第 21 天 : 所有受试者中在产生至少两种不同细胞因子 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  和 CD40L) 的测试中每  $10^6$  个细胞中流感特异性 CD4T- 淋巴细胞频率方面的 CMI 应答。

[0669] 对于 CMI 应答的评价, 如下分析流感特异性 CD4 的频率 :

[0670] 采用同等方法, 当几何平均值 (GM) 比 (Fluarix™ (18-40 岁) 组和含有佐剂的流感候选疫苗 ( $\geq 65$  岁组) 之间在第 21 天时产生至少两种细胞因子的流感特异性 CD4T- 细胞

的频率方面) 的两侧 98.75% 置信区间的上限低于 2.0 时, 与 Fluarix™ (施用于 18-40 岁的成人 - 称作“年轻人流感”或“Flu YNG”的组), 至少一种含有佐剂的流感候选疫苗 (施用于 ≥ 65 岁的老年人 - 称作“老年人流感”或“Flu ELD”的组) 并没有表现出更差。

[0671]

$$UL_{98.75\%CI} \left( \frac{GM_{Fluarix \text{ 成人}}}{GM_{\text{含有佐剂的流感疫苗}}} \right) < 2$$

[0672] 用协变量分析 (ANCPVA) 模型, 对频率的 log10 转换结果计算接种后 21 天的 GM 比的 98.75% CI。ANCOVA 模型包括作为固定效果的疫苗组 (Fluarix™ (18-40 岁) 组与含有佐剂的流感候选疫苗 (≥ 65 岁)) 和作为回归量的接种前频率。GM 比及其 98.75% CI 来源于模型中相反的对对应组的指数转换。调整的 GM 的 98.75% CI 通过以上 ANCOVA 模型的组最小平方方法的 98.75% CI 的指数转换获得。

[0673] 结果 - 推理分析 (表 10)

[0674] 在用“合并的抗原 II”体外再刺激后于第 21 天产生至少两种细胞因子 (IL-2、IFN-γ、TNF-α 和 CD40L) 的流感特异性 CD4T- 淋巴细胞的调整的 GM 和 GM 比示于表 10。对于每种含佐剂的流感疫苗, GM 比的双侧 98.75% CI 的上限远低于 2.0 的临床限度。这表明与施用于 18-40 岁的成人的 Fluarix™ 疫苗相比, 施用于老年受试者的两种含有佐剂的流感疫苗在流感特异性 CD40 的接种后频率方面没有表现出更差。

[0675] 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 表 10 用合并的疫苗抗原再刺激后第 21 天产生至少两种细胞因子的流感特异性 CD4 的调整的 GM 比 (免疫原性的 ATP 队列)

|         |        |       |        | GM 比(Flu YNG / AS01B ) |          |      |
|---------|--------|-------|--------|------------------------|----------|------|
| Flu YNG |        | AS01B |        |                        | 98.8% CI |      |
| N       | GM     | N     | GM     | 值                      | LL       | UL   |
| 74      | 2844.8 | 71    | 2725.6 | 1.04                   | 0.79     | 1.38 |

|         |        |       |        | GM 比(Flu YNG / AS01E ) |          |      |
|---------|--------|-------|--------|------------------------|----------|------|
| Flu YNG |        | AS01E |        |                        | 98.8% CI |      |
| N       | GM     | N     | GM     | 值                      | LL       | UL   |
| 74      | 2879.6 | 74    | 2697.0 | 1.07                   | 0.79     | 1.44 |

[0678] 调整的 GM = 根据基线滴度调整的几何平均抗体 ; N = 接种前和接种后结果可用的受试者数目 ; 98.8% CI = 调整的 GM 比的 98.8% 置信区间 (Ancova 模型 : 对基线调整) ; LL = 上限 ; UL = 下限。数据来源 = 附表 IIIA

[0679] 结果 - 描述性分析 (图 6)

[0680] 主要发现是 :

[0681] 1) 接种前 CMI 应答在年轻人中比在老年人中高

[0682] 2) 接种后 :

[0683] - 流感疫苗对年轻成人 (18-40 岁) 中的 CMI 应答有加强作用

[0684] - 在已接受含有佐剂的流感疫苗的老年人中的 CMI 应答与年轻成人中的 CMI 应答

相当。

[0685] 对于所有测试,与 Fluarix™ 相比,接种前和接种后针对所研究的所有细胞因子 (IL-2、CD40L、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ) 的 CD4T 淋巴细胞应答的差异在采用含有佐剂的疫苗时都显著较高。

[0686] 分析第三目的

[0687] 为了评价第三终点,在第 0、21、90 和 180 天检测流感特异性 CD4/CD8T- 淋巴细胞和记忆 B 细胞的频率。

[0688] ●总结了对于每种抗原、每个接种组在第 0 和 21 天的流感特异性细胞因子阳性 CD4/CD8T- 淋巴细胞的频率 (描述性统计)。

[0689] ●非参数检验 (Wilcoxon 检验) 用于对比两个组之间的差异定位 (含有佐剂的流感疫苗与 Fluarix™), 计算在各个测试中针对每种抗原的统计学 p- 值。

[0690] ●在各个不同的测试中针对每个接种组和每种抗原进行 21 天 /0 天 (接种后 / 接种前) 应答之间的个体差异的描述性统计。

[0691] ●非参数检验 (Wilcoxon 检验) 用于对比个体差异 (接种后 / 接种前接种), 计算每个不同检验中每种抗原的统计学 p- 值。

[0692] 用于对比流感特异性 CD4T- 淋巴细胞频率差异的 Wilcoxon 检验的 p- 值示于表 11。

[0693] 结果 - 评价第三终点 (表 11)

[0694] 主要结论是:

[0695] ●流感特异性 CD4 的接种前 GM 频率在所有老年受试者组中都是相似的,但在 18-40 岁的成人中较优。

[0696] ●与 Fluarix™ 相比,在用含有佐剂的疫苗接种后,流感特异性 CD4T 淋巴细胞的接种后 (第 21 天) 频率显著较高。

[0697] ●与接种 Fluarix™ 的 18-40 岁成人相比,接种以 AS01B 或 AS01E 为佐剂的疫苗的老年受试者接种后的流感特异性 CD4T 淋巴细胞的接种后频率保持较低。

[0698] ●流感特异性 CD8T 细胞的接种前和接种后 GM 频率在所有组中都基本相似。

[0699] 表 11 推论性统计:由 Kruskal-Wallis 检验获得的 CD4T 细胞在各个时间点的 p- 值 (免疫原性的 ATP 队列)

| 测试描述                | P-值               |        |                   |        |
|---------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|
|                     | AS01B vs. Flu YNG |        | AS01E vs. Flu YNG |        |
|                     | 第 0 天             | 第 21 天 | 第 0 天             | 第 21 天 |
| 所有双重                | <0.0001           | 0.0070 | <0.0001           | 0.0025 |
| CD4OL               | <0.0001           | 0.0056 | <0.0001           | 0.0015 |
| IFN $\gamma$        | <0.0001           | 0.0009 | <0.0001           | 0.0006 |
| IL2                 | <0.0001           | 0.0029 | <0.0001           | 0.0021 |
| [0700] TFN $\alpha$ | <0.0001           | 0.0295 | <0.0001           | 0.0378 |
|                     | AS01B vs. Flu ELD |        | AS01E vs. Flu ELD |        |
|                     | 第 0 天             | 第 21 天 | 第 0 天             | 第 21 天 |
| 所有双重                | 0.6165            | 0.0004 | 0.8744            | 0.0018 |
| CD4OL               | 0.7560            | 0.0005 | 0.9504            | 0.0021 |
| IFN $\gamma$        | 0.9936            | 0.0008 | 0.9835            | 0.0029 |
| IL2                 | 0.6702            | 0.0011 | 0.7855            | 0.0023 |
| TFN $\alpha$        | 0.5450            | 0.0022 | 0.6688            | 0.0040 |

[0701] 结果 – 评价体液免疫应答终点

[0702] 观测变量：

[0703] 在第 0、21、90 和 180 天：血清血凝反应抑制 (HI) 抗体滴度，针对疫苗中提供的 3 种流感病毒株的每一种单独测试（抗 -H1N1、抗 -H3N2 和抗 -B 抗体）。

[0704] 抗所有疫苗抗原的 HI 抗体的截止值在分析前由实验室确定（等于 1 : 10）。血清阴性受试者是抗体滴度低于截止值的受试者。血清阳性受试者是抗体滴度大于或等于截止值的受试者。低于测定截止值的抗体滴度以截止值一半的任意值给出。

[0705] 基于 HI 抗体滴度，计算以下参数：

[0706] ● 在第 0 天和 21 天的 HI 抗体的几何平均滴度 (GMTs)，采用对数滴度转换平均值的反对数计算。

[0707] ● 第 21 天时的血清转变因子 (SF)，定义为相比于第 0 天在第 21 天时血清 HI GMTs 的增加倍数。

[0708] ● 第 21 天时的血清阳转率 (SC)，定义为接种前 HI 滴度 < 1 : 10 且接种后滴度  $\geq$  1 : 40 的接种者百分率，或接种前滴度  $\geq$  1 : 10 且接种后滴度有最少达 4 倍增加的接种者百分率。

[0709] ● 第 21 天时的血清保护率 (SPR)，定义为血清 HI 滴度  $\geq$  1 : 40 的接种者的百分率。

[0710] 分别获得每个组的 GM 的 95% CI。首先获得对数转换滴度平均值的 95% CI，假定对数转换滴度以未知方差正态分布。然后通过通过对数转换滴度平均值的 95% CI 的指数转换获得 GM 的 95% CI。

[0711] 具体抗体检测的缺失的血清学结果不被替换。因此,在给定时间点无血清学结果的受试者不影响该时间点的测定分析。

[0712] 体液免疫应答结果(图7和表12)

[0713] 全部3种疫苗株的HI抗体的接种前GMTs在4个治疗组中都处于相同范围内。在接种后,相比于相同群体中的标准Fluarix,增加老年人中的体液应答的2种佐剂有明显的作用(图7,以线性刻度示出,如果以对数刻度显示,明显是相同影响)。

[0714] GMTs是

[0715] • 对于AS01E,针对H1N1的GMT显著较高,

[0716] • 对于两种佐剂,针对H3N2的GMT显著较高。

[0717] • 在接受含有佐剂的两组受试者之间,没有观察到接种后GMTs方面的显著差异。

[0718] 接种后21天,Fluarix(18-40岁)的受试者对新喀里多尼亚和B/江苏株的HI应答较高。

[0719] 如表12所示,在60岁以上的受试者中,含有佐剂的流感疫苗超出了欧洲官方对每年注册的分裂病毒体流感疫苗的要求[“关于用于免疫学评价年度病毒株变化的协调流感疫苗要求的指引说明”(CPMP/BWP/214/96)]。

[0720] 在接种后,就HI抗体的血清保护率而言,Fluarix( $\geq 65$ 岁)组和以下组具有统计学差异:

[0721] • 对于A/新喀里多尼亚株的Flu/AS01B和Flu/AS01E

[0722] 对于各个疫苗株,2种含有佐剂的流感疫苗组的血清保护率相比于Fluarix(18-40岁)组处于相同范围内。

[0723] 对于各个疫苗株,2种含有佐剂的流感疫苗组的血清阳转率相比于Fluarix(18-40岁)组处于相同范围内,新喀里多尼亚株除外。

[0724] 表12在第21天的血清保护率、血清阳转率和转变因子(免疫原性的ATP队列)

[0725]

| 病毒株            | 组        | N  | 血清保护率<br>(HI滴度 $\geq 40$ )<br>% | 血清阳转率<br>( $\geq 4$ 倍增加)<br>[95% CI]<br>% | 转变因子<br>[95% CI]<br>% |
|----------------|----------|----|---------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| 欧洲标准(>60岁)     |          |    | >60%                            | >30%                                      | >2.0                  |
| 欧洲标准(<60岁)     |          |    | >70%                            | >40%                                      | >2.5                  |
| A/新喀里多尼亚(H1N1) | Flu Yng  | 75 | 100 [95.20-100]                 | 77.3 [66.2-86.2]                          | 35.1 ^21.9-56.4]      |
|                | Flu Eld  | 49 | 71.4 [56.74-83.42]              | 30.6 [18.3-45.4]                          | 3.7 [2.4-5.7]         |
|                | FluAS01B | 75 | 97.3 [90.70-99.68]              | 48.0 [36.5-59.8]                          | 4.5 [3.3-6.1]         |
|                | FluAS01E | 75 | 93.3 [85.12-97.80]              | 52.0 [40.2-63.7]                          | 5.0 [3.6-6.9]         |
| A/纽约           | Flu Yng  | 75 | 93.3 [85.12-97.80]              | 76.0 [64.7-85.1]                          | 9.2 [7.1-11.8]        |

[0726]

|          |          |    |                    |                  |                  |
|----------|----------|----|--------------------|------------------|------------------|
| (H3N2)   | Flu Eld  | 49 | 81.6 [67.98-91.24] | 69.4 [54.6-81.7] | 8.2 [5.7-11.8]   |
|          | FluAS01B | 75 | 96.0 [88.75-99.17] | 85.3 [75.3-92.4] | 13.1 [10.0-17.1] |
|          | FluAS01E | 75 | 93.3 [85.12-97.80] | 80.0 [69.2-88.4] | 14.5 [10.4-20.2] |
| B/江苏 (B) | Flu Yng  | 75 | 100 [95.20-100]    | 81.3 [70.7-89.5] | 13.9 [10.1-19.1] |
|          | Flu Eld  | 49 | 93.9 [83.13-98.72] | 44.9 [30.7-59.8] | 4.3 [3.0-6.1]    |
|          | FluAS01B | 75 | 100 [95.20-100]    | 65.3 [53.5-76.0] | 5.2 [4.2-6.5]    |
|          | FluAS01E | 75 | 97.3 [90.70-99.68] | 70.7 [59.0-80.6] | 6.7 [5.1-8.9]    |

[0727] N = 受试者总数 ; % = 在 21 天时滴度处于特定范围内的受试者百分率 ; CI = 置信区间

#### [0728] VI. 3. 2. 免疫原性结论

[0729] ● 相比于 18-40 岁的成人, 老年人中的流感特异性 CD4 的接种前频率明显较差。在用 Fluarix™ 接种后, 相比于年轻人, 老年人中的接种后频率 (第 21 天) 仍较差。相反, 相比于在 18-40 岁成人中用 Fluarix™ 接种, 在用含有佐剂的疫苗接种老年受试者后表现出的流感特异性 CD4 的接种后频率并不差。

[0730] ● 关于 HI 抗体滴度方面的体液免疫应答, 所有流感疫苗都满足欧洲官方对每年注册的流感灭活疫苗的要求 [“关于用于免疫学评价年度病毒株变化的协调流感疫苗要求的指引说明” (CPMP/BWP/214/96)]。在老年人中, 含有佐剂的疫苗介导至少一种趋势: 针对流感血细胞凝集素的体液免疫应答比 Fluarix™ 高。表 13 总结了相比于 Fluarix™ 在老年受试者中由含有佐剂的疫苗介导的针对每种疫苗株的体液免疫应答之间的显著差异。相比于用 Fluarix™ 接种的 18-40 岁成人, 用含有佐剂的疫苗接种的老年受试者显示出一种趋势: 在第 21 天时抗 A/ 纽约株的接种后 GMTs 和血清转变因子较高。

[0731] 表 13 在相同群体中, 与 Fluarix 相比, 在接种不同的含有佐剂的疫苗的老年受试者中观察到显著更高的体液免疫应答 (基于非重叠的 95% CI) 的流感病毒株

[0732]

|          | 接种后 GMT  | 血清转变因子 | 血清保护率    | 血清阳转率 |
|----------|----------|--------|----------|-------|
| FluAS01B | A/纽约     |        | A/新喀里多尼亚 |       |
| FluAS01E | A/新喀里多尼亚 |        | A/新喀里多尼亚 |       |
|          | A/纽约     |        |          |       |

[0733] 接种后 GMT = 接种后的几何平均滴度

#### [0734] VI. 4 反应原性结论

##### [0735] VI. 4. 1. 不良事件的记录 (AE)

[0736] 记录在 7 天随访期 (接种日和随后的 6 天) 当中出现的主诉症状 (参见表 14)。还记录了在 21 天随访期 (接种日和随后的 20+3 天) 当中出现的主诉症状。如在表 15 中所述, 评价以下 AE 的强度。

[0737] 表 14 主诉的局部 / 全身不良事件

[0738]

| 主诉的局部 AE | 主诉的全身 AE |
|----------|----------|
| 注射部位疼痛   | 疲劳       |
| 注射部位发红   | 发热       |
| 注射部位肿胀   | 头疼       |
| 血肿       | 肌肉疼      |
|          | 寒颤       |
|          | 注射臂关节痛   |
|          | 其它部位关节痛  |

[0739] 注意 :体温在晚上记录。在一天中的其它时间应另外进行体温检测,记录最高体温。

[0740] 表 15 成人中主诉症状的强度等级

[0741]

| 不良事件         | 强度等级 | 参数             |
|--------------|------|----------------|
| 注射部位疼痛       | 0    | 无              |
|              | 1    | 触摸时            |
|              | 2    | 移动肢体时          |
|              | 3    | 妨碍正常活动         |
| 注射部位发红       |      | 以 mm 记录最大的表面直径 |
| 注射部位肿胀       |      | 以 mm 记录最大的表面直径 |
| 注射部位血肿       |      | 以 mm 记录最大的表面直径 |
| 发热*          |      | 以 °C/°F 记录温度   |
| 头疼           | 0    | 没有             |
|              | 1    | 容易耐受           |
|              | 2    | 干扰正常活动         |
|              | 3    | 妨碍正常活动         |
| 疲劳           | 0    | 没有             |
|              | 1    | 容易耐受           |
|              | 2    | 干扰正常活动         |
|              | 3    | 妨碍正常活动         |
| 注射部位和其它部位关节痛 | 0    | 没有             |
|              | 1    | 容易耐受           |
|              | 2    | 干扰正常活动         |
|              | 3    | 妨碍正常活动         |
| 肌肉痛          | 0    | 没有             |
|              | 1    | 容易耐受           |
|              | 2    | 干扰正常活动         |
|              | 3    | 妨碍正常活动         |
| 寒颤           | 0    | 没有             |
|              | 1    | 容易耐受           |
|              | 2    | 干扰正常活动         |
|              | 3    | 妨碍正常活动         |

[0742] \* 发热定义为腋下体温  $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$  ( $99.5^{\circ}\text{F}$ )

[0743] 局部注射部位发红 / 肿胀的最大强度如下记录：

[0744] 0 是 0mm ;1 是  $> 0$  至  $\leq 20\text{mm}$  ;2 是  $> 20$  至  $\leq 50\text{mm}$  ;3 是  $> 50\text{mm}$ 。

[0745] 如下记录发热的最大强度：

[0746] 1 是  $> 37.5$  至  $\leq 38.0^{\circ}\text{C}$  ;2 是  $> 38.0$  至  $\leq 39.0^{\circ}\text{C}$  ;3 是  $> 39.0^{\circ}\text{C}$ 。

[0747] 研究者针对所有其它 AE 进行强度判断,其它 AE 即主诉的症状,包括在研究当中报告的 SAE。评价基于研究者的临床判断。记录的每种 AE 的强度指定为以下的一种类别：

[0748] 1(轻微) = 受试者容易耐受的 AE,引起最低的不适,且干扰每天的活动；

[0749] 2(中等) = 不适足以干扰每日正常活动的 AE；

[0750] 3(严重) = 阻碍每日正常活动的 AE(在成人 / 青少年中,这种 AE 例如会阻碍上班 / 上学,应必须给予正确的治疗)。

#### [0751] VI. 4. 2. 记录不良事件 (AE)

[0752] 在老年人中,就局部和全身症状这二者来说,发现采用含有佐剂的疫苗观察到的反应原性比用 Fluarix<sup>TM</sup> 观察到的高。症状的发病率和强度在用含有佐剂的疫苗接种后都增加(图 8)。3 级症状表现出一种趋势:与接受以较低浓度的免疫刺激剂为佐剂的疫苗的组相比,在接受以最高浓度的免疫刺激剂(MPL, QS21)为佐剂的疫苗的组中较高。但是,在所有情况下,症状都快速消退。

[0753] 实施例 VII:含有佐剂的 HPV 疫苗在小鼠中的临床前评价

[0754] 该研究采用来自人乳头瘤病毒(HPV)的二价抗原性组合物,其组合了从 HPV16 的 L1 和 HPV18 的 L1 形成的病毒样颗粒(VLPs)作为抗原。研究的目的是比较当与 AS01B 和 AS01B 的 1/5 稀释液一起配制时,这种抗原性制剂的效力,所述稀释液是以 GSK 的宫颈癌疫苗中的佐剂 AS04(明矾上的 MPL)为基准的。

#### [0755] VII. 1- 接种

[0756] 在第 0 和 28 天,用疫苗制剂注射小鼠( $n$  = 每组 12 只),所述疫苗制剂包含来源于 Hi-580/80L 方法,并且用 1/10 和 1/50 人剂量的 AS04(用明矾配制的  $50\mu\text{g}$  MPL)或 AS01B(0.5ml 中的  $50\mu\text{g}$  QS21- $50\mu\text{g}$  MPL)配制的 HPV16/18L1(各  $2\mu\text{g}$  或  $0.5\mu\text{g}$ )。由于实验是在小鼠中进行的,1/10 人剂量可以等同于 AS01B 人制剂,即,0.5ml 中的  $50\mu\text{g}$  QS21 和  $50\mu\text{g}$  MPL,并且 1/50 可以认为是 AS01B 人制剂的 1/5 稀释液,即 0.5ml 中的  $10\mu\text{g}$  QS21 和  $10\mu\text{g}$  MPL。在第 II 剂后 14 和 45 天采取血样,以测定个体血清中总的抗 L1 型特异性抗体。在第 II 剂后 7 天和 14 天对 PBMC 测量细胞因子染色,在第 II 剂后 45 天用脾细胞进行。在第 II 剂后 45 天用脾细胞测量 VLPs 特异性记忆 B 细胞的频率。

#### [0757] VII. 2- 抗 -HPV16/18L1ELISA

[0758] 用 VLP-16 和 VLP-18 作为包被抗原,通过 ELISA 完成抗 VLP-16 抗体和抗 VLP-18 抗体的定量。以  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$  的终浓度,用 PBS 稀释所述抗原,且在  $4^{\circ}\text{C}$  使该抗原过夜吸附到 96 孔微量滴定板(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, 丹麦)的各孔中。然后,使所述板与包含 1% 牛血清白蛋白的 PBS(饱和缓冲液)在  $37^{\circ}\text{C}$  温育 1 小时。将稀释于含有 PBS+0.1% Tween20+1% BSA 的缓冲液中的血清加入 HPV L1 包被的板中, $37^{\circ}\text{C}$  下温育 1 小时 30 分钟。用 PBS0.1% Tween20 洗涤所述板四次,并往每个孔中添加用饱和缓冲液以 1/1000 稀释的生物素缀合的抗小鼠 Ig(Dako, UK),且在  $37^{\circ}\text{C}$  将其温育 1 小时 30 分钟。在一个洗涤步骤之后,加入用饱和缓冲液以 1/3000 稀释的链霉抗生物素-辣根过氧化物酶复合物(Dako, UK),并在  $37^{\circ}\text{C}$  再温育 30 分钟。如上所述洗涤所述板,并将其与一种溶液室温下 20 分钟,所述

溶液为 0.04% 的邻苯二胺 (Sigma) 和 0.03%  $H_2O_2$  溶于 0.1% Tween200.05M 柠檬酸缓冲液 pH4.5 中的溶液。用 2N 的  $H_2SO_4$  终止该反应,并在 492/620nm 读数。用 SoftmaxPro (用一个四参数方程),从参照来计算 ELISA 效价,并以 EU/ml 表示。

#### [0759] VII. 3- 细胞内细胞因子染色 (ICS)

[0760] 在第 II 剂后 7 天和 14 天对 PBL 进行 T 细胞的细胞内细胞因子染色,并且在第二次免疫后 45 天进行对脾细胞进行上述染色。从小鼠采集 PBMCs (1 个合并物 / 组) 或脾细胞 (每组 3 个器官的 4 个合并物)。用 VLP16 或 18, (5  $\mu$ g/ml) + CD49d CD28 抗体 (1  $\mu$ g/ml), 以  $5 \times 10^6$  个细胞 /ml (96 孔微量滴定板) 的终浓度进行脾细胞的体外抗原刺激,然后 37°C 下温育 3 小时。抗原再刺激步骤后,37°C 下在布雷菲德菌素 (1  $\mu$ g/ml) 存在下将细胞温育过夜,以抑制细胞因子分泌。如下进行细胞染色:洗涤细胞悬浮液,重悬于 50  $\mu$ l 含有 2% Fc 阻断试剂 (1/50 ; 2.4G2) 的 PBS1% FCS 中。4°C 下温育 10 分钟后,加入 50  $\mu$ l 抗 -CD4-APC (1/50) 和抗 -CD8perCp (1/50) 的混合物,4°C 下温育 30 分钟。在 PBS1% FCS 中洗涤后,通过重悬于 200  $\mu$ l Cytofix-Cytoperm (Kit BD) 中使细胞透化,4°C 下温育 20 分钟。然后用 Perm Wash (Kit BD) 洗涤细胞,重悬于 50  $\mu$ l 稀释于 PermWash 中的抗 -IF  $\gamma$  APC (1/50) + 抗 -IL-2FITC (1/50)。4°C 下温育 2 小时后,用 Perm Wash 洗涤细胞,重悬于 PBS1% FCS + 1% 低聚甲醛中。通过 FACS 进行样品分析。门控 (FSC/SSC) 活细胞,对约 20,000 个事件 (淋巴细胞) 进行采集。针对 CD4+ 和 CD8+ 门控的群体计算 IFN-  $\gamma$  + 或 IL2+ 的百分率。

#### [0761] VII. 4-B 记忆细胞

[0762] 第二次免疫后 45 天,处死小鼠,通过 lymphoprep 梯度 (Cedarlane) 分离脾细胞。然后将 B 细胞重悬于含有添加剂 (丙酮酸钠 1mM、MEM 非必须氨基酸、青霉素 / 链霉素、谷氨酰胺和  $\beta$ -2 巯基乙醇)、5% 胎牛血清、50U/ml rhIL-2 (eBioscience) 和 3  $\mu$ g/ml CpG 的 RPMI1640 培养基 (Gibco)。在每个平底 6 孔的 5ml 中以  $10^6$  个细胞 /ml 的终浓度培养细胞 5 天。乙醇活化步骤后,用 10  $\mu$ g/ml VLPs 或用 1/200 稀释于 PBS 中的山羊抗小鼠 Ig (GAM; Sigma) 包被硝酸纤维素板 (Multiscreen-IP; Millipore)。用完全培养基进行饱和的步骤后,将 100  $\mu$ l  $12 \times 10^6$  个细胞 /ml 加入 VLPs 包被的板,并且将 100  $\mu$ l  $10^6$  和  $5 \times 10^5$  个细胞 /ml 加入 GAM 板。37°C 下温育 2 小时的时间后,4°C 下将平板保存过夜。用 PBS0.1% Tween20 将板洗涤 4 次,将 1/200 稀释于 PBS1% BSA5% FCS (稀释缓冲液) 中的抗小鼠 Ig Biot 分布到板上,37°C 下温育 2 小时。洗涤步骤后,加入 1/550 稀释于稀释缓冲液中的 Extravidin HRP (Sigma),37°C 下持续额外的 1 小时。按照上文洗涤平板,室温下用 AEC 溶液 (Sigma) 温育 10 分钟。通过用自来水轻柔冲洗平板,终止反应。当平板干燥后,用 KS400 读数。

#### [0763] VII. 5- 统计分析

[0764] 用单因素方差分析 (ANOVA1) 比较配制方法。为了标准化目的,对 log10 转换数据进行分析。当检测到处理平均值之间的显著差异时 ( $p$ - 值  $\leq 0.05$ ),以 0.5 的显著性水平进行平均值之间的逐对比较 (Student-Newman-Keuls 多重比较检验)。

#### [0765] VII. 6 结果

[0766] 按照上文 VII. 1 免疫小鼠。采用以下组:

[0767]

| 组 | 抗原                       | 佐剂    | 佐剂稀释                                    |
|---|--------------------------|-------|-----------------------------------------|
| 1 | HPV 16-18 L1 2 $\mu$ g   | AS04  | 1/10 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 50 $\mu$ g MPL) |
| 2 | HPV 16-18 L1 0.5 $\mu$ g | AS04  | 1/50 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 10 $\mu$ g MPL) |
| 3 | HPV 16-18 L1 2 $\mu$ g   | AS04  | 1/10 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 50 $\mu$ g MPL) |
| 4 | HPV 16-18 L1 0.5 $\mu$ g | AS04  | 1/50 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 10 $\mu$ g MPL) |
| 5 | HPV 16-18 L1 2 $\mu$ g   | AS01B | 1/10 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 50 $\mu$ g MPL) |
| 6 | HPV 16-18 L1 0.5 $\mu$ g | AS01B | 1/50 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 10 $\mu$ g MPL) |
| 7 | HPV 16-18 L1 2 $\mu$ g   | AS01B | 1/10 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 50 $\mu$ g MPL) |
| 8 | HPV 16-18 L1 0.5 $\mu$ g | AS01B | 1/50 人剂量 (等同于每 0.5ml HD 10 $\mu$ g MPL) |

#### [0768] VII. 6. 体液应答

[0769] 对于抗 HPV16-L1 抗体滴度或抗 HPV18-L1 抗体滴度, 采用任一种佐剂稀释液, 对于两种测试的抗原剂量, 没有观察到显著剂量范围 (图 9)。

[0770] 对于抗 HPV16-L1 抗体滴度, 无论抗原剂量如何, 对于每种佐剂测试的两种剂量, 没有观察到显著剂量范围。

[0771] 当观察抗 HPV18-L1 抗体滴度时, 在第二剂后 14 天测量, 与 AS01B(1/50HD) 相比, 对 AS01B(1/10HD) 观察到了滴度的略微增加 (2.5 倍剂量范围,  $p$  值 = 0.0035), 但是仅仅对 2  $\mu$ g 抗原观察到了该范围, 对 0.5  $\mu$ g 抗原没有观察到该范围 ( $P$  值 = 0.0867)。到第 II 剂后 45 天, 无论抗原剂量如何, 对于每种佐剂测试的两种剂量, 没有观察到显著剂量范围。

#### [0772] VII. 6. 2 细胞应答

##### [0773] 细胞内细胞因子染色

[0774] 无论 HPV18-L1 的佐剂剂量如何, 对测试的两种抗原剂量, 没有观察到抗原的剂量范围效果。用含有不同剂量佐剂的两种测试抗原剂量获得了相似频率的 VLP16 特异性 CD4+T 细胞 (图 10)。

[0775] 与 AS01B(1/50HD) 相比, 对 AS01B(1/10HD) 观察到了轻微的剂量效果 (对于 HPV18-L1 是 2.6 倍,  $p$  值 = 0.0009, 对于 HPV16-L1 是 2 倍,  $P$  值 = 0.0187), 但是仅仅对 2  $\mu$ g 抗原观察到了该范围, 对 0.5  $\mu$ g 抗原没有观察到该范围。

##### [0776] 特异性 B 记忆细胞

[0777] 无论 HPV16 或 18L1 的佐剂的剂量如何, 对两种测试的抗原剂量没有观察到抗原的剂量范围效果 (图 11)。

[0778] 无论 HPV17 或 1811 的佐剂的剂量如何, 对两种测试的抗原剂量没有观察到抗原的剂量范围效果。

[0779] 从上述结果可以看出, AS01B 的 1/5 稀释液产生了在免疫组合物中与 AS01B 自身具有等效效力的制剂。

#### [0780] 实施例 VIII: 含有佐剂的肺炎链球菌疫苗在小鼠中的临床前评价

[0781] 用于本研究中的肺炎球菌疫苗是 11 价的含有佐剂的肺炎球菌缀合物疫苗 (11PCV/AS), 其由以 AS01B 或 AS01E 为佐剂的 11 种肺炎球菌多糖缀合物的混合物组成。缀合物由肺炎链球菌血清型 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 和 23F 的纯化多糖组成, 其各自

缀合于载体蛋白,所述载体蛋白是白喉类毒素(DT)、破伤风类毒素(TT)或流感嗜血杆菌的蛋白D(PD)。疫苗作为冻干粉末存在,将要用液体佐剂之一重配。

[0782] 如下生产 11PCV/AS:

[0783] 活化和偶联条件对于每种多糖是特异性的。这些条件如下表所示。将一定大小的多糖(除 PS5、6B 和 23F 外)溶解于 NaCl 2M 中或注射用水(WFI)中。对于所有血清型,评价最佳多糖浓度。将除血清型 18C 外的所有血清型直接与载体蛋白缀合,如下文的详细描述。

[0784] 从乙腈或乙腈/水 50%/50%溶液中的 100mg/ml 原液,将 CDAP(CDAP/PS 比: 0.75mg/mg PS)加入多糖溶液。1.5 分钟后,加入 0.2M-0.3M NaOH,获得特定活化 pH。25℃下在 3 分钟的时间中在此 pH 下进行多糖的活化。在活化的多糖中加入纯化的蛋白(蛋白 D 或 DT)(其量取决于最初 PS/载体蛋白比),在 pH 调节下,于特定 pH 进行偶联反应,最长达 2 小时(取决于血清型)。为了猝灭未反应的氰酸酯的酯基团,随后将 2M 甘氨酸溶液加入混合物中。将 pH 调节至猝灭 pH(pH9.0)。25℃下将该溶液搅拌 30 分钟,然后 2-8℃下连续缓慢搅拌过夜。

[0785] 18C 的制备:

[0786] 通过接头,即己二酸二酰肼(ADH)将 18C 连接于载体蛋白。

[0787] 缀合前,对多糖血清型 18C 进行微流化。

[0788] 用 EDAC 衍生破伤风类毒素

[0789] 为了衍生破伤风类毒素,以 25mg/ml 将纯化的 TT 稀释于 0.2M NaCl 中,加入 ADH 间隔物,以便达到 0.2M 的终浓度。当间隔物完全溶解时,将 pH 调节到 6.2。然后加入 EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基-氨基丙基)碳二亚胺),达到 0.02M 的终浓度, pH 调节下将混合物搅拌 1 小时。通过在 25℃下将 pH 增加到最多 9.0 至少 30 分钟,终止缩合反应。然后,渗滤(10kDa CO 膜)衍生的 TT,以便除去残留的 ADH 和试剂。

[0790] 最后对 TT<sub>AH</sub> 批量进行灭菌过滤,直到偶联步骤,并且在 -70℃下保存。

[0791] TT<sub>AH</sub> 与 PS18C 的化学偶联

[0792] 缀合参数的细节可以见表 1。

[0793] 以确定的浓度将 2 克微流化的 PS 稀释于水中,通过添加 NaCl 粉末,调节到 2M NaCl。

[0794] 加入 CDAP 溶液(100mg/ml,在 50/50v/v 乙腈/WFI 中新制备),达到合适的 CDAP/PS 比。

[0795] 通过加入 0.3M NaOH,使 pH 升高到活化 pH9.0,在此 pH 稳定,直到加入 TT<sub>AH</sub>。

[0796] 3 分钟后,加入衍生的 TT<sub>AH</sub>(20mg/ml,溶于 0.2M NaCl),达到 TT<sub>AH</sub>/PS 比为 2;调节 pH,达到偶联 pH9.0。静止溶液 1 小时,直到 pH 调节。

[0797] 为了猝灭,在混合物 PS/TT<sub>AH</sub>/CDAP 中加入 2M 甘氨酸溶液。

[0798] 将 pH 调节到猝灭 pH(pH9.0)。

[0799] 25℃下将溶液搅拌 30 分钟,然后 2-8℃下连续缓慢搅拌过夜。

[0800] 缀合物的纯化:

[0801] 采用 0.15M NaCl 平衡的 Sephacryl500HR 凝胶过滤柱(对于 18C 是 S500HR),通过凝胶过滤纯化缀合物,以除去小分子(包括 DMAP)和未缀合的 PS 和蛋白。基于反应组分的

不同分子大小,首先洗脱 PS-PD、PS-TT 或 PS-DT,然后是游离 PS,然后是游离 PD 或游离 DT,最后是 DMAP 和其它盐 (NaCl, 甘氨酸)。

[0802] 通过  $UV_{280nm}$  检测含缀合物的级分。根据 Kd 合并级分,灭菌过滤 ( $0.22 \mu m$ ),在  $+2-8^{\circ}C$  下保存。确定缀合物制剂中的 PS/ 蛋白比。

[0803] PS 肺炎链球菌 - 蛋白 D/TT/DT 缀合物的特异性活化 / 偶联 / 猝灭条件

[0804]

| 血清型                   | 1<br>微流体    | 3<br>(微流体)  | 4<br>微流体    | 5           | 6B          | 7F<br>微流体   |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PS 浓度(mg/ml)          | 2.5         | 3.0         | 2.5         | 7.1         | 5.0         | 5.0         |
| PS 溶解                 | WFI         | NaCl 2M     | WFI         | WFI         | NaCl 2M     | NaCl 2M     |
| PD 浓度<br>(mg/ml)      | 10.0        | 5.0         | 10.0        | 5.0         | 5.0         | 10.0        |
| 初始 PS/PD 比<br>(w/w)   | 1.5/1       | 1/1         | 1.5/1       | 1/1         | 1.1/1       | 1.2/1       |
| CDAP 浓度<br>(mg/mg PS) | 0.50        | 0.75        | 0.50        | 0.79        | 0.83        | 0.75        |
| $pH_a=pH_c=pH_q$      | 9.0/9.0/9.0 | 9.0/9.0/9.0 | 9.5/9.5/9.0 | 9.0/9.0/9.0 | 9.5/9.5/9.0 | 9.5/9.5/9.5 |

[0805]

| 血清型                   | 9V<br>微流体   | 14<br>微流体   | 18C<br>微流体  | 19F<br>微流体  | 23F         |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| PS 浓度(mg/ml)          | 5.0         | 5.0         | 4.5         | 9.0         | 2.38        |
| PS 溶解                 | NaCl 2M     | NaCl 2M     | NaCl 2M     | NaCl 2M     | NaCl 2M     |
| 载体蛋白浓度<br>(mg/ml)     | 10.0        | 10.0        | 20.0 (TT)   | 20.0 (DT)   | 5.0         |
| 初始载体蛋白<br>/PS 比 (w/w) | 1.2/1       | 1.2/1       | 2/1         | 1.5/1       | 1/1         |
| CDAP 浓度<br>(mg/mg PS) | 0.50        | 0.75        | 0.75        | 1.5         | 0.79        |
| $pH_a=pH_c=pH_q$      | 9.5/9.5/9.0 | 9.5/9.5/9.0 | 9.0/9.0/9.0 | 9.0/9.0/9.0 | 9.5/9.5/9.0 |

[0806] 然后将 11 种缀合物混合在一起,在免疫前将最终的抗原性制剂与合适的佐剂混合。

[0807] 在第 0、14 和 28 天用 AS01B 或 AS01E 配制的  $0.1 \mu g/11$  价 PS 缀合物肌肉免疫各组的 40 只雌性 4 周龄 Balb/c 小鼠。通过对第 42 天采集的血清进行 ELISA,测量抗-PS IgG

抗体。

[0808] 如图 12 所示,与除 PS14(其中用 AS01B 观察到了更高的应答)和 PS19F(其中用 AS01E 观察到了更高的应答)之外的 AS01B 制剂相比,在稀释的 AS01E 制剂中观察到了相似的应答。

[0809] 实施例 IX:含有佐剂的不含佐剂的巨细胞病毒免疫原性组合物的临床前评价

[0810] IX.1:豚鼠

[0811] IX.1.1Elisa 抗-gB

[0812] 采用 gB 作为包被抗原,通过 Elisa 进行抗-gB 抗体的定量。以 4  $\mu$ g/ml 的最终浓度在 PBS 中稀释抗原,4℃下在 96 孔微量滴定板中将 100  $\mu$ l 温育过夜。然后 37℃下用 200  $\mu$ l 含 1%牛血清白蛋白的 PBS 使平板饱和 1 小时。加入血清的两倍系列稀释液(100  $\mu$ l/孔),37℃下温育 1 小时 30 分钟。用 PBS0.1% Tween20 洗涤平板 4 次,在每孔中加入 100  $\mu$ l 辣根过氧化物酶抗豚鼠 IgG(Dako, UK),37℃下温育 1 小时 30 分钟。用 PBS0.1% Tween20 洗涤平板 4 次,用水洗涤 1 次。然后 22℃下用 0.1M 柠檬酸缓冲液 pH4.2 中的 100  $\mu$ l 邻苯二胺(Sigma)溶液温育 20 分钟。用 100  $\mu$ l  $H_2SO_4$ 2N 终止反应,在 490/620nm 下读数。通过 SoftMaxPro,从参照样品种内推 OD 值,确定 Elisa 滴度。滴度以 EU/ml 表示。

[0813] 用 UNISTAT 对第二次免疫后 14 天的 Elisa 数据进行统计分析。用于方差分析的方案可以简要描述如下:

[0814] 1) 数据的对数转换

[0815] 2) 为了证实正态性,对每个群体(组)进行 Shapiro-Wilk 检验。

[0816] 3) 为了证实不同群体(组)之间变量的均质性,进行 Cochran 检验。

[0817] 4) 对选定的数据进行方差分析(单因素)

[0818] 5) 用于多重比较的 Tuckey-HSD 检验。

[0819] IX.1.2 中和测定

[0820] 测定前,在 96 孔微量滴定板中分布 MRC5 细胞(10000 个细胞/200  $\mu$ l MEM 培养基),37℃下用  $CO_2$  温育 3 天。实现灭活(56℃下 30 分钟)血清的两倍稀释,37℃下用 100  $\mu$ l 病毒溶液(800/ml)温育 1 小时。温育后,将 100  $\mu$ l 血清/病毒混合物接种在含有 MRC5 单层的 96 孔微量滴定板中。35℃下在 2000RPM 将平板离心 1 小时。37℃下温育过夜后,用 80%丙酮溶液固定平板(-20℃下 20 分钟)。弃去丙酮溶液,37℃下用特异性单克隆抗立即早期抗原检测 CMV 阳性细胞 1 小时。用 PBS 洗涤平板三次,在每个孔中加入生物素缀合的抗小鼠 IgG,37℃下温育 1 小时。洗涤步骤后,37℃下加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶额外的 30 分钟。洗涤平板 4 次,用 True-blue 溶液温育 10 分钟。通过显微镜检查,记录特异性有色信号。中和滴度表示为与病毒对照(不含血清的 CMV+ 细胞)相比,导致 CMV 阳性细胞减少 50%的血清最高稀释度的倒数。

[0821] IX.1.3 免疫方案

[0822] 免疫了 4 组。每组含有 8 只 5-8 周龄的雌性 Hartley Cr1:(ha) 豚鼠,但是对照组(第 4 组)仅有 4 个受试者。第 0 和 28 天对受试者进行肌肉免疫。第一次免疫后 28 天和第二次免疫后 14 天采集血清样品。按照上文所述,对第一次免疫后 28 天和第二次免疫后 14 天的血清进行 Elisa。按照上文的描述,在第二次免疫后 14 天进行中和测定。各组如下:

[0823]

| 组 | 抗原   | 佐剂    |
|---|------|-------|
| 1 | gB   | NaCl  |
| 2 | gB   | AS01B |
| 3 | gB   | AS01E |
| 4 | NaCl | NaCl  |

[0824] 如下制备抗原：疫苗抗原在中国仓鼠卵巢（CHO）细胞中表达为 gB\*\*，即一种截短的嵌合体，其 N 和 C- 末端含有来自单纯疱疹病毒 2 (HSV2) 的糖蛋白 gD 的肽序列的截短嵌合体。gB\*\* 在其含有膜锚定序列的 C- 末端结构域截短，因此分泌到培养物上清液中。

[0825] 对于前三组，肌肉注射在 500  $\mu$ l PBS、AS01B 或 AS01E（按照上文实施例 II.2 制备）中制备的 15  $\mu$ g gB\*\*。在第 4 组，肌肉施用单独的 PBS。

[0826] IX. 1.4 结果

[0827] 如图 13 所示，与 gB 普通疫苗相比，两个含有佐剂的组观察到了显著更高的抗 gB ELISA 滴度（gB/AS01B 以及 gb/AS01E 分别高 8 和 5.5 倍）。与 gB/AS01E 组相比，第 II 剂后的抗体滴度在 gB/AS01B 组中非常微小地更高（1.5 倍）。

[0828] 多重比较：Tuckey-HSD

[0829]

| 组     | 病例 | 平均值    | 普通 | AS01E | AS01B |
|-------|----|--------|----|-------|-------|
| 普通    | 8  | 4.7917 |    | **    | **    |
| AS01E | 8  | 5.5293 | ** |       |       |
| AS01B | 8  | 5.6942 | ** |       |       |

[0830] 普通 &lt; AS01E = AS01B

[0831] 在中和滴度方面（图 14）：

[0832] ●在 gB 普通组中没有观察到特异性中和抗体

[0833] ●在两个含有佐剂的组中都检测到了特异性中和抗体

[0834] ●在两个含有佐剂的组中观察到了相似水平的中和抗体。

[0835] IX. 2 小鼠

[0836] IX. 2.1 ELISA 抗 gB

[0837] 采用 gB 作为包被抗原，通过 ELISA 进行抗 -gB 抗体的定量。以 1  $\mu$ g/ml 的最终浓度在 PBS 中稀释抗原，4℃ 下在 96 孔微量滴定板中将 100  $\mu$ l 温育过夜。然后 37℃ 下用 200  $\mu$ l 含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 使平板饱和 1 小时。加入血清的两倍系列稀释液（100  $\mu$ l/孔），37℃ 下温育 1 小时 30 分钟。用 PBS0.1% Tween20 洗涤平板 4 次，在每孔中加入 100  $\mu$ l 辣根过氧化物酶，37℃ 下温育额外的 30 分钟。用 PBS0.1% Tween20 洗涤平板 4 次，用水洗涤 1 次。然后 22℃ 下用 0.1M 柠檬酸缓冲液 pH5.8 中的 100  $\mu$ l 四甲基联苯胺 75% 温育 20 分钟。用 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.4N 终止反应，在 450/620nm 下读数。通过 SoftMaxPro，从参照样品种内推 OD 值，确定 ELISA 滴度。滴度以 EU/ml 表示。

[0838] 用 UNISTAT 对第二次免疫后 14 天的 ELISA 数据进行统计分析。用于方差分析的

方案可以简要描述如下：

[0839] 数据的对数转换

[0840] 2) 为了证实正态性,对每个群体(组)进行 Shapiro-Wilk 检验。

[0841] 3) 为了证实不同群体(组)之间变量的均质性,进行 Cochran 检验。

[0842] 4) 对选定的数据进行方差分析(单因素)

[0843] 5) 用于多重比较的 Tuckey-HSD 检验。

[0844] IX. 2. 2 中和测定

[0845] 测定前,在 96 孔微量滴定板中分布 MRC5 细胞(10000 个细胞/200  $\mu$ l MEM 培养基),37℃下用 CO<sub>2</sub> 温育 3 天。将灭活(56℃下 30 分钟)血清的两倍稀释液(60  $\mu$ l)37℃下用 60  $\mu$ l 病毒溶液(800IPU/ml)温育 1 小时。温育后,将 100  $\mu$ l 血清/病毒混合物接种在含有 MRC5 细胞的 96 孔微量滴定板中。35℃下在 2000RPM 将平板离心 1 小时。37℃下温育过夜后,用 80%丙酮溶液固定平板(-20℃下 20 分钟)。弃去丙酮溶液,37℃下用特异性单克隆抗立即早期 I(IE-1)抗原检测 CMV 阳性细胞 1 小时。用 PBS 洗涤平板三次,在每个孔中加入生物素缀合的抗小鼠 IgG,37℃下温育 1 小时。洗涤步骤后,37℃下加入链霉亲和素-辣根过氧化物酶额外的 30 分钟。洗涤平板 4 次,用 True-blue 溶液温育 10 分钟。通过显微镜检查,记录特异性有色信号。中和滴度表示为与病毒对照(不含血清的 CMV+ 细胞)相比,导致 CMV 阳性细胞减少 50%的血清最高稀释度的倒数。

[0846] IX. 2. 3 细胞内细胞因子染色

[0847] 在第二次免疫后 7 天和 21 天对 PBLs 进行 T 细胞的细胞内细胞因子检测。从小鼠采集 PBLs(1 个合并物/组)。用覆盖 CMV 序列的肽合并物或 gB 蛋白进行淋巴细胞(10 $\times$ 7 个细胞/ml 的终浓度)的体外抗原刺激。PBLs/抗原混合物在 37℃下温育 2 小时。然后 37℃下在布雷菲德菌素(1  $\mu$ g/ml)存在下将细胞温育过夜,以抑制细胞因子分泌。

[0848] 如下进行细胞染色:洗涤细胞悬浮液,重悬于 50  $\mu$ l 含有 2% Fc 阻断试剂的 PBS1% FCS 中。4℃下温育 10 分钟后,加入 50  $\mu$ l 抗-CD4-PE 和抗-CD8perCp 的混合物,4℃下温育 30 分钟。在 PBS1% FCS 中洗涤后,通过重悬于 200  $\mu$ l Cytofix-Cytoperm(kit Beckton Dickinson)中使细胞透化,4℃下温育 20 分钟。然后用 Perm Wash(Kit BD)洗涤细胞,重悬于 50  $\mu$ l 稀释于 PermWash 中的抗-IFN- $\gamma$  APC+ 抗-IL-2FITC。4℃下温育 2 小时后,将细胞重悬于 PBS1% FCS+1%低聚甲醛中。

[0849] 通过 FACS 进行样品分析。门控活细胞,对 +/-20,000 个事件进行采集。针对 CD4+ 和 CD8+ 门控的群体计算 IFN- $\gamma$  + 或 IL2+ 的百分率。

[0850] IX. 2. 4 免疫方案

[0851] 免疫了 4 组。每组含有 12 只 4-10 周龄的雌性 C57B1/6 小鼠。

[0852]

| 组 | 抗原   | 佐剂    |
|---|------|-------|
| 1 | gB   | PBS   |
| 2 | gB   | AS01B |
| 3 | gB   | AS01E |
| 4 | NaCl | NaCl  |

[0853] 如下制备抗原：疫苗抗原在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表达为 gB\*\*，即一种截短的嵌合体，其 N 和 C- 末端含有来自单纯疱疹病毒 2 (HSV2) 的糖蛋白 gD 的肽序列的截短嵌合体。gB\*\* 在其含有膜锚定序列的 C- 末端结构域截短，因此分泌到培养物上清液中。

[0854] 对于每组，在 625  $\mu$ l PBS 或佐剂 AS01B 或 AS01E (按照上文实施例 II.2 制备，分别具有 100  $\mu$ l 免疫刺激剂 /ml 或 50  $\mu$ l 免疫刺激剂 /ml 的浓度) 中制备浓度为 1.5  $\mu$ g/剂的 gB\*。肌肉注射 50  $\mu$ l (即 0.5ml 的人剂量的 1/10)。一个对照组的小鼠注射盐水。第 0 和 28 天进行注射。第二次注射后 14 天采集血清样品进行 ELISA 和中和测定。在第二次注射后 7 天和 21 天采集 PBLs，进行 ICS。

[0855] IX. 2.5 结果

[0856] 抗 -gB ELISA 滴度 (图 15)

[0857] 在不含佐剂的 gB 组中观察到了非常弱至不可检测水平的抗 -gB 抗体。但是，在两个佐剂组，即分别是 AS01B 和 AS01E 中观察到了高抗体应答 (高 65 和 66 倍)。在 AS01B 和 AS01E 组之间没有显著统计学差异。

[0858] 多重比较 :Tuckey-HSD

[0859]

| 组     | 病例 | 平均值    | 普通 | AS01E | AS01B |
|-------|----|--------|----|-------|-------|
| 普通    | 12 | 2.1132 |    | **    | **    |
| AS01E | 12 | 3.9317 | ** |       |       |
| AS01B | 12 | 3.9375 | ** |       |       |

[0860] 普通 < AS01E = AS01B

[0861] 抗 -CMV 中和滴度 (图 16)

[0862] 与 gB 普通组相比，在两个含有佐剂的组中观察到了显著更高的抗 gB 中和滴度。在 AS01B 和 AS01E 制剂之间没有观察到中和抗体滴度的显著差异。

[0863] 细胞介导的免疫

[0864] 由于在第二剂后 7 天样品的再刺激后观察到非常低水平的应答，组间无法分辨，对 CD4 和 CD8 刺激没有观察到确实的应答 (图 17)。这些低至不能检测的应答可能是由于样品制备过程中的技术问题。但是，在第二次注射后 21 天，可以观察到应答。gB (5  $\mu$ g/ml) 或肽 (2  $\mu$ g/ml 或 4  $\mu$ g/ml) 再刺激后的 CD4 数据没有显示出差异 (图 18)。对 AS01E 和 AS01B 观察到了相似细胞因子谱。对于 CD8 刺激，没有观察到确实的应答 (图 19)。

[0865] 这些实验显示，对于另一种抗原性组合物和在两种不同生物中，具有较低水平免疫刺激剂的佐剂与具有较高水平的免疫刺激剂的该佐剂在免疫学上同样有效。

[0866] X：含有佐剂的 RTS, S 疫苗的临床前评价

[0867] X. 1- 制剂

[0868] 在啤酒糖酵母中制备抗原性组合物 RTS, S，所述组合物由两种蛋白，即 RTS 和 S 组成，它们在肌肉和皮下组装成混合的聚合颗粒结构，所述结构估计每个含有平均 100 个多肽。RTS 是 424 个氨基酸的 51KDa 的杂合多肽链，所述多肽链由融合于乙型肝炎病毒 S 蛋白的氨基末端的、来自疟疾寄生虫 - 恶性疟原虫 NF53 株的子孢子表面抗原的 189aa (CSP 抗原，氨基酸 207-395) 组成。S 是一种 24KDa 的多肽 (长度为 226 个氨基酸)，相应于乙型肝炎

炎病毒表面抗原。冻干的抗原团块含有大约 50  $\mu$ g (当设计与 AS01B 配制在 0.5ml 中时) 或 25  $\mu$ g (当设计与 AS01E 配制在 0.5ml 中时) 抗原。

[0869] 通过在罐中混合各种组分 (PBS、脂质体、MPL 和 QS21) 并且在无菌条件下搅拌, 制备 AS01B 和 AS01E。然后灭菌过滤产物, 装入管形瓶或注射器。使用前, 液体佐剂在 +2°C - +8°C 下保存, 用于重配冻干的抗原团块。

#### [0870] X.2 小鼠实验

[0871] 在小鼠中进行了两个实验, 目标在于比较由 RTS, S/AS01B 诱导的对 RTS, S 特异的免疫应答与用 AS01E 配制的 RTS, S 诱导的免疫应答。在每个实验中, 用 10、5 或 2.5  $\mu$ g AS01B 或 AS01E 佐剂配制的 RTS, S 对 C57B1/6 小鼠 (10 只小鼠 / 组) 进行肌肉免疫三次, 每次间隔 2 周。作为对照, 两组用单独的 AS01B 或 AS01E 免疫。第三次免疫后 15 天, 通过 ELISA 评估每只小鼠的 HBs 和 CS 特异性抗体应答。在两个实验中, 对所有接受相同处理的小鼠计算几何平均抗体滴度和它们的 95% 置信区间。对来自两个实验的合并数据进行评估佐剂效果和抗原剂量效果的统计学分析。第二次和第三次免疫后 7 天, 通过对来自每组 5 只小鼠的血细胞合并物的流式细胞术, 测量 CD4 和 CD8 特异性 T 细胞应答。因此, 在每个实验中, 从每组得到 2 个值。

#### [0872] 体液免疫应答

[0873] 如图 20 和 21 所示, AS01B 和 AS01E 佐剂都诱导抗 CSP 和 HBs 的相似的强抗体应答。

[0874] 抗 -CSP GMTs 的三因素 ANOVA 显示, 对于 5 或 2.5  $\mu$ g 剂量的 RTS, S, AS01B 和 AS01E 之间没有显著差异。

[0875] 对于 10  $\mu$ g 剂量, 发现 AS01B 佐剂比 AS01E 诱导更高的抗 CS 滴度, GMT 定量“AS01B 组 / AS01E 组”是 1.93 (95% CI : 1.33-2.79 ; p = 0.001)。

#### [0876] 细胞介导的特异性免疫应答

[0877] 图 22 和 23 显示 CSP 和 HBs 特异性的、表达 IL-2 和 / 或 IFN  $\gamma$  的 CD4 和 CD8T 细胞。

[0878] 三次免疫后, 与 AS01E 相比, 用 AS01B 时 CSP 特异性 CD4 应答倾向于更高, 而用 AS01E 时 CD8T 细胞应答与用 AS01B 时等同或更好。

[0879] 三次免疫后, 与 AS01E 相比, 用 AS01B 时 HBs 特异性 CD4 应答倾向于更高, 较低剂量 RTS, S 时除外, 此时 CD4T 细胞水平在两种佐剂之间相似。用 AS01E 配制的 RTS, S 诱导的 HBs 特异性 CD8T 细胞应答等同于或好于 AS01B 配制的 RTS, S 诱导的应答。

[0880] 这些差异认为是在细胞免疫应答的预期可变性范围之内。

[0881] 小鼠中的 RTS, S/AS01E 疫苗临床前研究发现与 RTS, S/AS01B 相似的可接受的安全性谱。

#### [0882] XI : RTS, S/AS01E 的临床评价

[0883] 按照上述实施例 X 制备制剂。蔗糖用作冻干抗原团块中的赋形剂。如同实施例 X, 用液体佐剂重配冻干的抗原。按照实施例 II.2 的描述制备 AS01E, 并且在 +2-+8°C 下保存直到重配时需要。

[0884] 以 AS01E 为佐剂的 RTS, S 的安全性和免疫原性的 II 期随机双盲研究目前正在加蓬的 18 个月 -4 岁儿童中进行。接种方案是 0、1、2 个月的接种方案。当给生活在疟疾流行

地区的 18 个月 -4 岁儿童中以 0、1、2 个月方案肌内施用 3 次时,RTS,S/AS01E 的目标如下:

[0885] 第一

[0886] - 评估安全性,直到第三剂后 1 个月。

[0887] - 证明在第三剂后 1 个月在抗 -CS 抗体应答方面不比以水包油乳液为佐剂的 RTS,S 疫苗差。

[0888] 第二

[0889] - 评估反应原性,直到第三剂后 1 个月。

[0890] - 证明在第三剂后 1 个月在抗 -HBs 抗体应答方面不比以水包油乳液为佐剂的 RTS,S 疫苗差。

[0891] - 描述抗乙型肝炎血清保护,直到第三剂后 1 个月。

[0892] - 描述抗 CS 应答,直到第三剂后 1 个月。

[0893] 第三

[0894] - 第三剂后 1 个月到第三剂后 12 个月的安全性。

[0895] - 第三剂后 12 个月时对 CS 抗原的体液免疫应答。

[0896] - 第三剂后 12 个月时对 HBs 抗原的体液免疫应答。

[0897] 解释性

[0898] - 评价对 CS 抗原的 T- 细胞介导的免疫应答,直到第三剂后 12 个月。

[0899] - 评价对 CS 抗原的 B- 细胞记忆免疫应答,直到第三剂后 12 个月。

[0900] - 根据筛选时记录的 HBV 免疫状态,描述抗 CS 应答,直到第三剂后 1 个月。

[0901] 入选了 180 个受试者,90 个给予以以前验证的水包油乳液为佐剂的疫苗(在下表中称作“对照”),90 个给予以 AS01E 为佐剂的疫苗。筛选年龄为 18 个月 -4 岁的健康男孩和女孩。通过肌内途径在左侧三角肌施用疫苗。

[0902] 在每剂和总体之后,接种后 7 天阶段(第 0-6 天)中报道的症状(主诉和非主诉)的发生率和性质(总接种队列)

[0903]

|        |      | 任何症状   |     |      |      |      | 全身症状   |     |      |      |      | 局部症状   |     |      |      |      |
|--------|------|--------|-----|------|------|------|--------|-----|------|------|------|--------|-----|------|------|------|
|        |      | 95% CI |     |      |      |      | 95% CI |     |      |      |      | 95% CI |     |      |      |      |
|        | 组    | N      | n   | %    | LL   | UL   | N      | n   | %    | LL   | UL   | N      | n   | %    | LL   | UL   |
| 第 1 剂  | Gr 1 | 90     | 40  | 44.4 | 34.0 | 55.3 | 90     | 23  | 25.6 | 16.9 | 35.8 | 90     | 20  | 22.2 | 14.1 | 32.2 |
|        | Gr 2 | 90     | 47  | 52.2 | 41.4 | 62.9 | 90     | 26  | 28.9 | 19.8 | 39.4 | 90     | 32  | 35.6 | 25.7 | 46.3 |
| 第 2 剂  | Gr 1 | 88     | 50  | 56.8 | 45.8 | 67.3 | 88     | 36  | 40.9 | 30.5 | 51.9 | 88     | 35  | 39.8 | 29.5 | 50.8 |
|        | Gr 2 | 87     | 53  | 60.9 | 49.9 | 71.2 | 87     | 39  | 44.8 | 34.1 | 55.9 | 87     | 34  | 39.1 | 28.8 | 50.1 |
| 第 3 剂  | Gr 1 | 83     | 78  | 94.0 | 86.5 | 98.0 | 83     | 34  | 41.0 | 30.3 | 52.3 | 83     | 76  | 91.6 | 83.4 | 96.5 |
|        | Gr 2 | 85     | 82  | 96.5 | 90.0 | 99.3 | 85     | 50  | 58.8 | 47.6 | 69.4 | 85     | 79  | 92.9 | 85.3 | 97.4 |
| 总体/剂   | Gr 1 | 261    | 168 | 64.4 | 58.2 | 70.2 | 261    | 93  | 35.6 | 29.8 | 41.8 | 261    | 131 | 50.2 | 44.0 | 56.4 |
|        | Gr 2 | 262    | 182 | 69.5 | 63.5 | 75.0 | 262    | 115 | 43.9 | 37.8 | 50.1 | 262    | 145 | 55.3 | 49.1 | 61.5 |
| 总体/受试者 | Gr 1 | 90     | 87  | 96.7 | 90.6 | 99.3 | 90     | 60  | 66.7 | 55.9 | 76.3 | 90     | 83  | 92.2 | 84.6 | 96.8 |
|        | Gr 2 | 90     | 85  | 94.4 | 87.5 | 98.2 | 90     | 70  | 77.8 | 67.8 | 85.9 | 90     | 84  | 93.3 | 86.1 | 97.5 |

[0904] Gr. 1 = RTS, S. AS01E

[0905] Gr. 2 = 对照

[0906] LL = 下限

[0907] UL = 上限

[0908] 对于每个剂量和总体 / 受试者：

[0909] N = 施用至少 1 剂的受试者的数目

[0910] n/% = 存在至少一类症状的受试者的

[0911] 对于总体 / 剂

[0912] N = 施用的剂数

[0913] n/% = 无论施用的研究疫苗是什么, 施用后产生至少一类症状的剂数 / 百分比

[0914] 95% CI = 准确 95% 置信区间, LL = 下限, UL = 上限

[0915] 这些数据证明, 当与对照制剂比较时, 以 AS01E 为佐剂的 RTS, S 疫苗在儿科群体中产生了可接受的反应原性。

[0916] 通过评估对 HBs 和 CSP 重复 (抗 R32LR) 的抗体应答, 测量血清反应。在筛选时、第 60 天和第 90 天 (第二次接种和第三次接种时), 收集用于测定抗体的血清。根据实验室的 SOPs, 采用吸附 R32LR 抗原的平板, 通过标准 ELISA 方法测量抗 CS 的抗体水平, 用标准参照抗体作为对照。结果以 EU/mL 报道。

[0917] 根据测定说明, 用商购 ELISA 免疫测定 (来自 Abbott 的 AUSAB EIA 测试试剂盒) 或等同方案测量针对乙型肝炎表面抗原的抗体。结果以 EU/mL 报道。

[0918] 抗 -CS 抗体的血清阳性率和 GMCs (总接种队列)

[0919]

|      |      |           |    | ≥ 0.5 ELU/ML |     |        |     | GMC   |        |       |      |        |
|------|------|-----------|----|--------------|-----|--------|-----|-------|--------|-------|------|--------|
|      |      |           |    |              |     | 95% CI |     |       | 95% CI |       |      |        |
| 抗体   | 组    | 时间        | N  | n            | %   | LL     | UL  | 值     | LL     | UL    | Min  | Max    |
| 抗-CS | Gr 1 | 筛选时       | 89 | 0            | 0.0 | 0.0    | 4.1 | 0.3   | 0.3    | 0.3   | <0.5 | <0.5   |
|      |      | PII(D60)  | 78 | 78           | 100 | 95.4   | 100 | 81.9  | 64.9   | 103.2 | 4.6  | 568.6  |
|      |      | PIII(D90) | 75 | 75           | 100 | 95.2   | 100 | 215.6 | 178.8  | 259.9 | 14.3 | 1922.3 |
|      | Gr 2 | 筛选时       | 90 | 1            | 1.1 | 0.0    | 6.0 | 0.3   | 0.2    | 0.3   | <0.5 | 0.5    |
|      |      | PII(D60)  | 78 | 78           | 100 | 95.4   | 100 | 56.9  | 45.7   | 70.9  | 3.6  | 2380.9 |
|      |      | PIII(D90) | 80 | 80           | 100 | 95.5   | 100 | 164.8 | 134.1  | 202.6 | 6.3  | 2093.6 |

[0920] Gr. 1 = RTS, S. AS01E

[0921] Gr. 2 = 对照

[0922] GMC = 对所有受试者计算的几何平均抗体浓度

[0923] N = 具有可获得的结果的受试者数目

[0924] n/% = 具有落在指定范围内的浓度的受试者数目 / 百分比

[0925] 95% CI = 95% 置信区间 ;LL = 下限, UL = 上限

[0926] MIN/MAX = 最小 / 最大

[0927] 抗-HBs 抗体的血清阳性率和 GMCs (总接种队列)

[0928]

|       |      |           |    | ≥ 10 MIU/ML |      |        |      | GMC     |         |         |       |         |
|-------|------|-----------|----|-------------|------|--------|------|---------|---------|---------|-------|---------|
|       |      |           |    |             |      | 95% CI |      |         | 95% CI  |         |       |         |
| 抗体    | 组    | 时间        | N  | n           | %    | LL     | UL   | 值       | LL      | UL      | Min   | Max     |
| 抗-HBs | Gr 1 | 筛选时       | 89 | 43          | 48.3 | 37.6   | 59.2 | 40.8    | 23.3    | 71.4    | <10.0 | 46421.6 |
|       |      | PII(D60)  | 78 | 77          | 98.7 | 93.1   | 100  | 8936.4  | 4684.2  | 17048.7 | <10.0 | 1615367 |
|       |      | PIII(D90) | 75 | 75          | 100  | 95.2   | 100  | 24527.7 | 15316.5 | 39278.5 | 21.1  | 1694306 |
|       | Gr 2 | 筛选时       | 90 | 37          | 41.1 | 30.8   | 52.0 | 20.0    | 12.8    | 31.0    | <10.0 | 30796.4 |
|       |      | PII(D60)  | 78 | 77          | 98.7 | 93.1   | 100  | 3640.0  | 1963.1  | 6749.3  | <10.0 | 1508114 |
|       |      | PIII(D90) | 80 | 80          | 100  | 95.5   | 100  | 19485.0 | 13511.3 | 28099.9 | 178.6 | 1103974 |

[0929] Gr. 1 = RTS, S. AS01E

[0930] Gr. 2 = 对照

[0931] GMC = 对所有受试者计算的几何平均抗体浓度

[0932] N = 具有可获得的结果的受试者数目

[0933] n/% = 具有落在指定范围内的浓度的受试者数目 / 百分比

[0934] 95% CI = 95% 置信区间 ;LL = 下限, UL = 上限

[0935] MIN/MAX = 最小 / 最大

[0936] 这些数据证明,当与验证的对照比较时,以 AS01E 为佐剂的 RTS,S 疫苗在儿科群体中产生了可接受的体液免疫应答。

[0937] 实施例 XII:与 AS01E 相比,以 AS01B 为佐剂的水痘-带状疱疹病毒的临床前评价

[0938] 候选疫苗包含 CHO 细胞中产生的截短的 VZV 包膜蛋白,即 gE。

[0939] 为此研究,用皮下施用的一个人类剂量 (HD) 的 Varilrix(约 4log pfu/剂)对 C57BL/6 小鼠 (n = 48) 进行初免。用 Varilrix 初免后 5 周,将小鼠分为 5 组,每组 12 只,在第 0 天和第 28 天肌肉注射 (胫骨肌) 5  $\mu$ g 单独的 gE、5  $\mu$ g gE+AS01E\*(1/10HD) 或 5  $\mu$ g gE+AS01B(1/10HD)。用盐水 (0.9% NaCl) 注射对照组小鼠 (仅仅是初免)。在第二次接种后 14 和 / 或 30 天,评价免疫应答。评价 gE 特异性总抗体水平和产生细胞因子 (IL2/IFN  $\gamma$ ) 的 CD4 和 CD8T 细胞的频率。

[0940] gE 特异性抗体应答:

[0941] 开发 ELISA,用于检测和定量小鼠血清中的 gE 特异性抗体,其中采用 gE 蛋白作为包被蛋白。ELISA 滴度定义为血清稀释度的倒数,其产生等于最大吸光值的 50% 的吸光度 (光密度) 测量值。通过回归分析计算 ELISA 滴度。

[0942] 数据证明, gE AS01E 和 gE AS01B 诱导相似水平的 gE 特异性抗体 (p 值 > 0.05)。与单独的 gE 抗原相比,两种制剂在第二次接种后 14 和 30 天都诱导显著更高的应答 (10-13 倍, p 值 > 0.05) (图 26)。

[0943]

| 第 II 次接种后 14 天 |                |       |        | 第 II 次接种后 30 天 |       |       |
|----------------|----------------|-------|--------|----------------|-------|-------|
| 95% CI         |                |       |        | 95% CI         |       |       |
| 组              | GMT<br>(EU/ml) | LL    | UL     | GMT<br>(EU/ml) | LL    | UL    |
| gE             | 12067          | 5960  | 24433  | 3832           | 911   | 16115 |
| gE/AS01E       | 125934         | 95504 | 166059 | 50439          | 38071 | 66825 |
| gE/AS01B       | 131728         | 88112 | 196934 | 47589          | 36158 | 62635 |
| Varilrix       | 34             | 11    | 105    | 33             | 10    | 102   |

[0944] gE 特异性 CD4 和 CD8 应答

[0945] 用细胞内细胞因子染色技术评价了 CD4 和 CD8T 细胞的细胞因子产生。在第二次免疫后 30 天,从每组 12 只小鼠分离脾细胞,并且合并为 4 组,每组 3 个脾。在跨完整 gE 蛋白 (20 个氨基酸的肽 / 10 个氨基酸重叠) 的 gE 肽 (63 个肽) 存在下将脾细胞 ( $1 \times 10^6$ ) 温育 2 小时,然后在布雷菲德菌素存在下温育过夜。随后,用细胞表面 CD4/CD8 特异性荧光 mAb 和随后的细胞内细胞因子 IL-2 和 IFN  $\gamma$  透化对细胞染色。

[0946] 如图 26 所示,尽管用 gE AS01B 和 gE AS01E 制剂都诱导了相似的细胞因子谱 (IL2/IFN  $\gamma$ ), AS01B 制剂诱导了更高数量级的产生 CD4 和 CD8 细胞因子的细胞 (对于 CD4 是 2 倍, p > 0.05, 对于 CD8 是 3.6 倍, p > 0.05)。由于 T 细胞应答的出乎意料高的可变性,检测佐剂剂量之间的显著差异的能力非常有限 (< 50%)。重要的是,与单独的 gE 相比,以 AS01B 或 AS01E 为佐剂的制剂能够诱导显著更高数量级的产生 CD4 的 T 细胞 (13.3 倍, p

$< 0.05$ )。与单独的 gE 相比,通过 AS01B 或 AS01E 配制 gE,也诱导了更高水平的 CD8 细胞 (3.8 倍,  $p > 0.05$ )。

[0947] 实施例 XIII :AS01B 与 AS01E 在流感雪貂模型中的临床前评价

[0948] 材料和方法

[0949] 由 MISAY Consultancy(Hampshire, UK) 获得 4-6 月龄的雌性雪貂 (*Mustela putorius furo*)。雪貂在第 0 天用鼻内施用的 250  $\mu$ l 异亚型病毒株 H1N1A/ 斯德哥尔摩 /24/90(4Log TCID<sub>50</sub>/ml) 初免。在第 21 天,用全人剂量 (1000  $\mu$ l 疫苗剂量,15  $\mu$ g HA/A 病毒株,17.5  $\mu$ g B 病毒株) 的 H1N1A/ 新喀里多尼亚 /20/99(15  $\mu$ g/ml)、H3N2A/ 怀俄明 /3/2003(15  $\mu$ g/ml) 和 B/ 江苏 /10/2003(17.5  $\mu$ g/ml) 的组合肌肉注射雪貂。然后在第 42 天通过鼻内途径用 250  $\mu$ l 异亚型病毒株 wh. A/NY/55/04(4.51Log TCID<sub>50</sub>/ml) 攻击雪貂。

[0950] 第 21 天的接种是用普通三价制剂(下表中的“普通”)或用以 AS01B(下表中的“AS01B”)或 AS01E(下表中的“AS01E”)为佐剂的三价制剂进行的。按照上文实施例 3 所述制备制剂。

[0951] 体温监测

[0952] 在攻击期间监测个体的体温,并且采用记录每个动物体温的遥测植入物评估的,所述记录是在攻击前和攻击后每 15 分钟进行一次。检查和整修所有植入物,在放入腹腔之前通过 DSI 进行新校准。在这些检测期间所有动物都独立地饲养在单独的笼中。

[0953] 从初免前 6 天直到初免后 4 天,以及攻击前 3 天直到攻击后 7 天,每 15 分钟记录一次体温。

[0954] 血凝反应抑制测试 (HI)

[0955] 测试程序

[0956] 使用血凝反应抑制测试 (HI) 测定针对 3 种流感病毒株的抗血细胞凝集素抗体滴度。HI 测试的原理基于特异性抗流感抗体通过流感病毒血细胞凝集素 (HA) 抑制鸡红细胞 (RBC) 血凝反应的能力。血清首先用 25% 神经氨酸酶溶液 (RDE) 处理,并热灭活,以去除非特异性抑制剂。在预处理后,将 2 倍稀释度的血清与 4 个血凝单位的每种流感株温育。然后加入鸡红细胞,并记录凝集抑制。滴度表示为完全抑制血凝反应的血清最高稀释度的倒数。由于血清的第一个稀释度是 1:10,所以不可检测水平记录为等于 5 的滴度。

[0957] 用 UNISTAT 对 HI 滴度进行统计分析。用于方差分析的方案可以简要描述如下:

[0958] ●数据的对数转换。

[0959] ●为了证实组分布的正态性,对每个群体(组)进行 Shapiro-Wilk 检验。

[0960] ●为了证实不同群体(组)之间变量的均质性,进行 Cochran 检验。

[0961] ●对各组进行单因素方差分析。

[0962] ●用于多重比较的 Tuckey-HSD 检验。

[0963] 鼻清洗液的病毒滴定

[0964] 所有鼻样品都首先通过 Spin X 过滤器 (Costar) 除菌过滤,以去除任何细菌污染物。将 50  $\mu$ l 连续 10 倍稀释的鼻清洗液转移至含 50  $\mu$ l 培养基 (10 孔 / 稀释度) 的微量滴定板中。然后将 100  $\mu$ l MDCK 细胞 ( $2.4 \times 10^5$  个细胞 /ml) 加入每个孔,并于 35°C 温育 6-7 天。在 6-7 天温育后,小心地取出培养基,加入 100  $\mu$ l 含 1/20 WST-1 的培养基,再温育 18 小时。在存活细胞还原 WST-1 时产生的黄色甲臞染料的强度与病毒滴定实验结束时存在于

孔中的存活细胞数成比例,并通过在合适波长(450nm)检测各孔的吸光度定量。截止值定义为未感染对照细胞的OD平均值-0.3OD(0.3OD相当于未感染对照细胞OD $\pm$ 3个标准差)。OD <截止值时定义为阳性得分,相反,OD >截止值时定义为阴性得分。病毒脱落滴度通过“Reed and Muench”测定,并表示为Log TCID<sub>50</sub>/ml。

[0965] 淋巴细胞增殖测定

[0966] 通过在Ficoll Cedarlane哺乳动物淋巴细胞溶液上的密度梯度离心(2500rpm下20分钟,4℃),收集PBMC。将PBMC重悬于5ml培养基(RPMI/4℃下添加)和10%正常雪貂血清中。添加剂由100mM丙酮酸钠、非必须氨基酸MEM、青霉素/链霉素、谷氨酰胺和1000 $\times$ 浓缩 $\beta$ 2-巯基乙醇组成。立即将新分离的PBMC用于体外增殖测定。以 $2 \times 10^5$ 个细胞/孔将细胞置于96孔平底组织培养板中,用不同浓度的抗原(完整灭活病毒的0.1-1 $\mu$ g HA)培养44-96小时,然后用0.5 $\mu$ Ci的 $[^3\text{H}]$ 胸苷脉冲标记。4-16小时后通过 $\beta$ -发射光谱评估放射性标记的掺入。

[0967] 结果

[0968] 攻击后鼻清洗液中的病毒负荷

[0969] 在初免(初免=第0天)前2天、初免后1、2和7天,以及攻击(攻击=第42天)前4天和攻击后7天的时间段中收集鼻清洗液。

[0970]

| 组     | -2   | 0 | +1   | +2   | +7   | 39   | 42 | 43   | 44   | 45   | 47    | 49   |
|-------|------|---|------|------|------|------|----|------|------|------|-------|------|
| 普通    | 0.82 |   | 1.84 | 5.35 | 1.85 | 0.8  |    | 1.82 | 5.77 | 4.44 | 1.97  | 0.9  |
| AS01E | 0.82 |   | 2.11 | 5.83 | 1.65 | 0.8  |    | 1.62 | 4.93 | 4.15 | 2.4   | 0.85 |
| AS01B | 0.81 |   | 2.26 | 5.38 | 1.91 | 0.82 |    | 1.74 | 2.25 | 1.89 | 1.350 | 0.9  |

[0971] 参见图27中的结果。

[0972] 初免后的病毒脱落

[0973] 在初免后2天,在所有雪貂中观察到了病毒脱落的峰值。

[0974] 初免后7天,在所有组中仅仅观察到残留的病毒负荷。

[0975] 攻击后的病毒脱落

[0976] 攻击后24小时,观察到了病毒脱落的峰值。

[0977] 攻击后3天的病毒滴定显示三价分裂普通疫苗免疫的雪貂中的高病毒滴度(无保护)。与用以AS01B为佐剂的三价分裂疫苗相比,用三价分裂AS01E疫苗观察到了较低的病毒脱落减少。

[0978] 体温监测:

[0979] 从初免(初免=第0天)前6天到初免后4天以及从攻击(攻击=第42天)前3天到攻击后7天监测体温。每15分钟进行一次测量,对每组在每日中间计算平均值。结果可以参见图28。

[0980] 初免后

[0981] 在初免之前、期间和之后监测体温,所有组中没有显示体温的增加。

[0982] 攻击后

[0983] 体温监测的解释是困难的。用三价分裂普通疫苗和三价分裂 AS01E 免疫的雪貂在攻击后观察到了体温的略微增加,而三价分裂 AS01B 疫苗则没有观察到增加。通过体温增加  $> 0.4^{\circ}\text{C}$  的雪貂数目,获得以下评分。

[0984] 攻击后的体温增加。

[0985] 三价普通 :5/8 (+0.4, +0.4, +0.5, +0.7, +0.8)

[0986] 三价 AS01B0/8

[0987] 三价 AS01E6/8 (+0.4, +0.4, +0.5, +0.5, +0.9, +1.6)

[0988] 该读出结果没有雪貂中的其它读出结果强。

[0989] 血凝反应抑制测试 (HI)

[0990] 在初免前 4 天、初免后 17 天、免疫后 21 天和攻击后 13 天采集血清样品。结果可以参见图 29 和 30。对于所有三个疫苗株,与三价分裂普通疫苗相比,用 AS01B 或 AS01E 为佐剂的三价分裂疫苗免疫的雪貂中观察到了统计学显著更高的 HI 滴度。两个含有佐剂的组之间没有观察到差异。与其它组相比,用以 AS01B 为佐剂的三价分裂疫苗免疫雪貂后,观察到了对 A/ 纽约 H3N2 (攻击株) 的统计学显著更高的交叉反应性 HI 滴度。



图 1

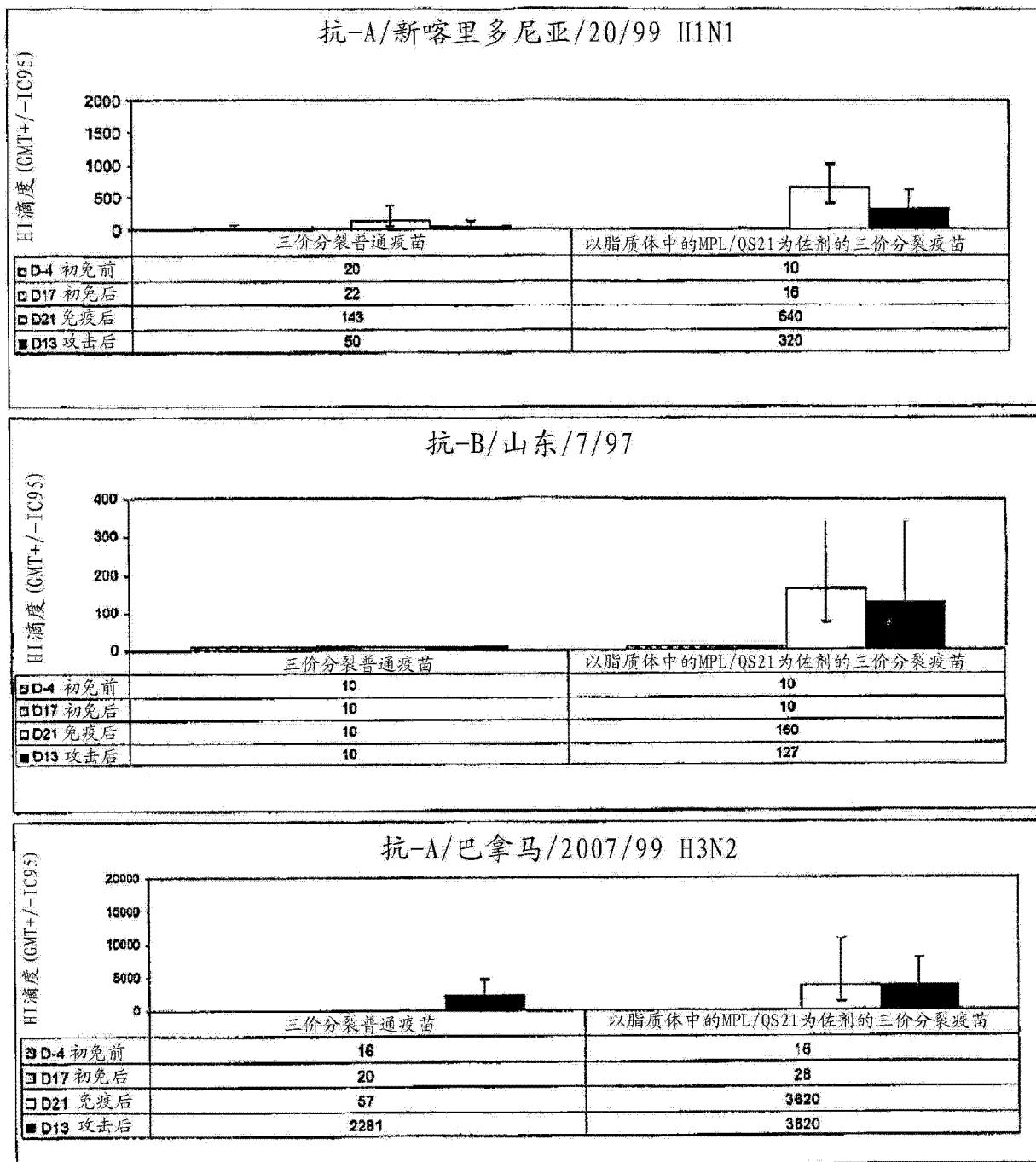


图 2-1

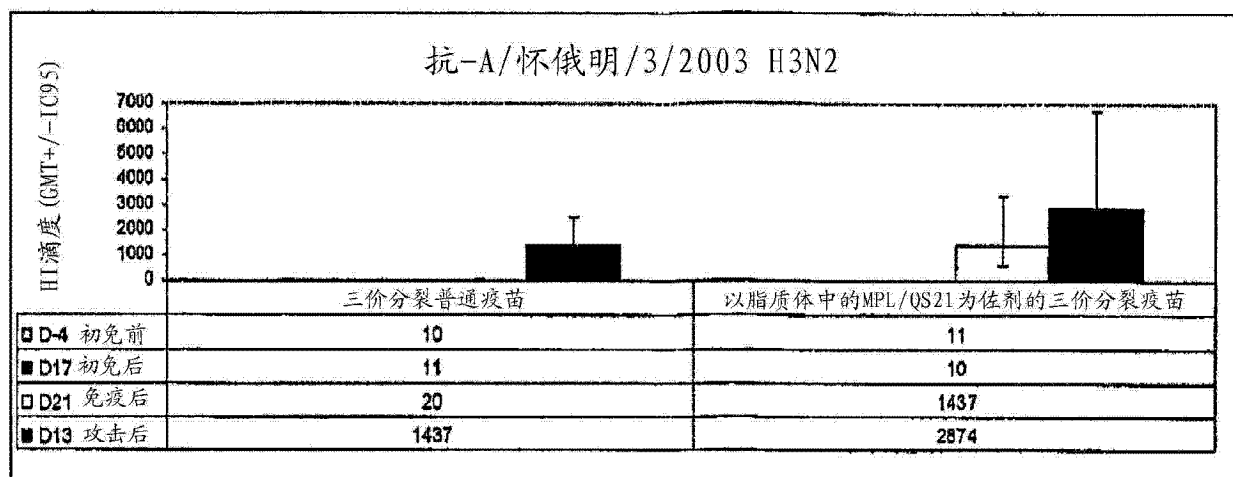


图 2-2

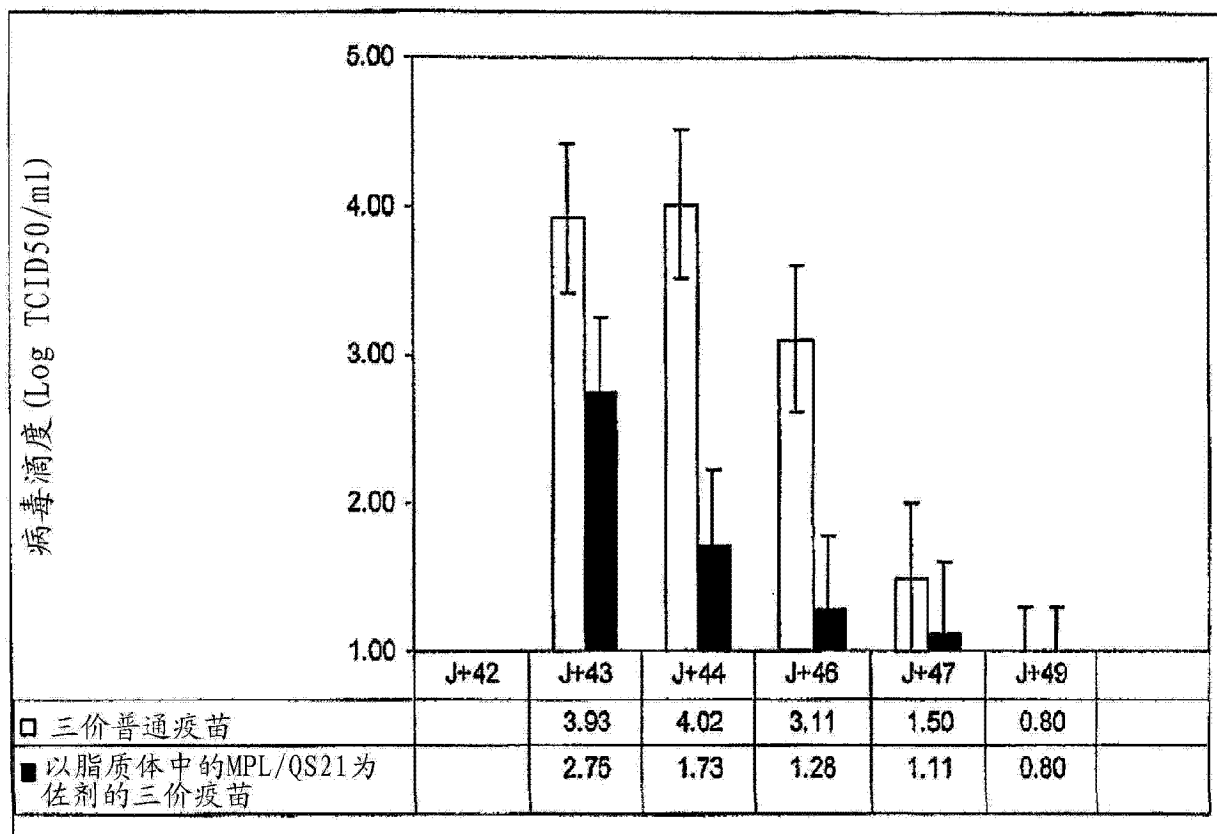


图 3

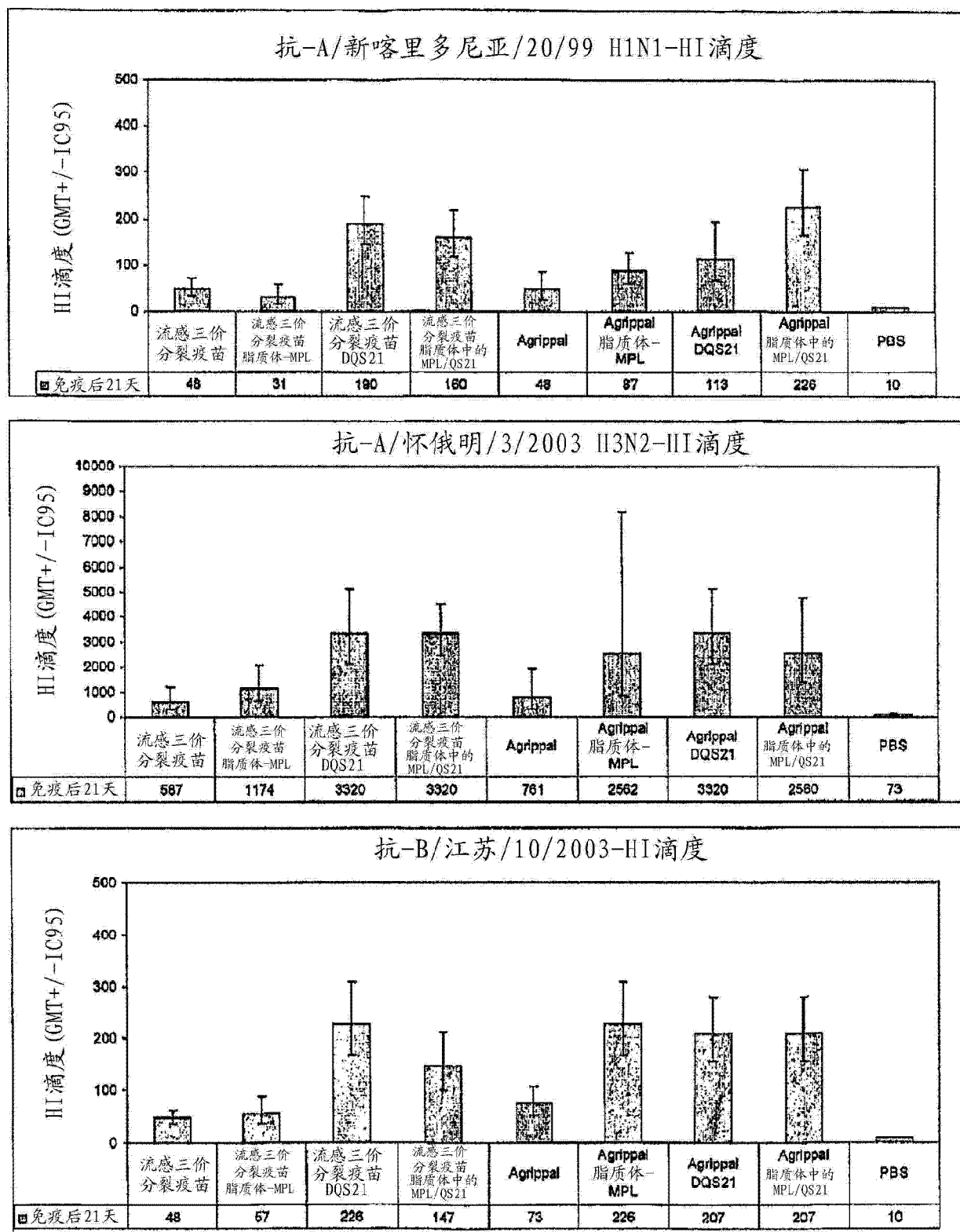


图 4

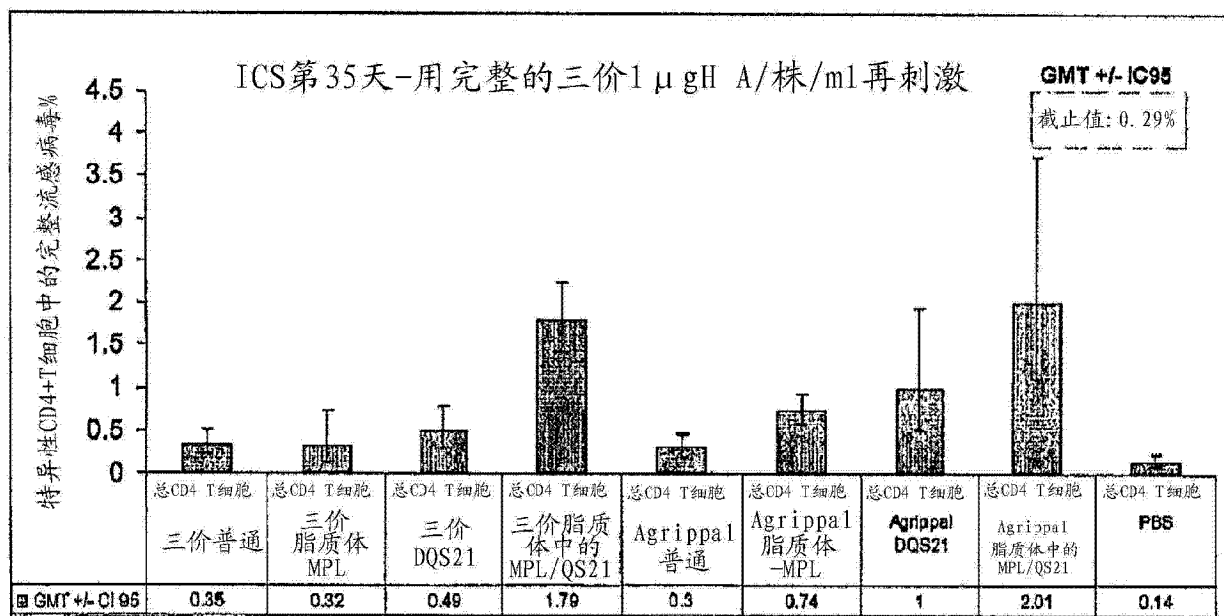
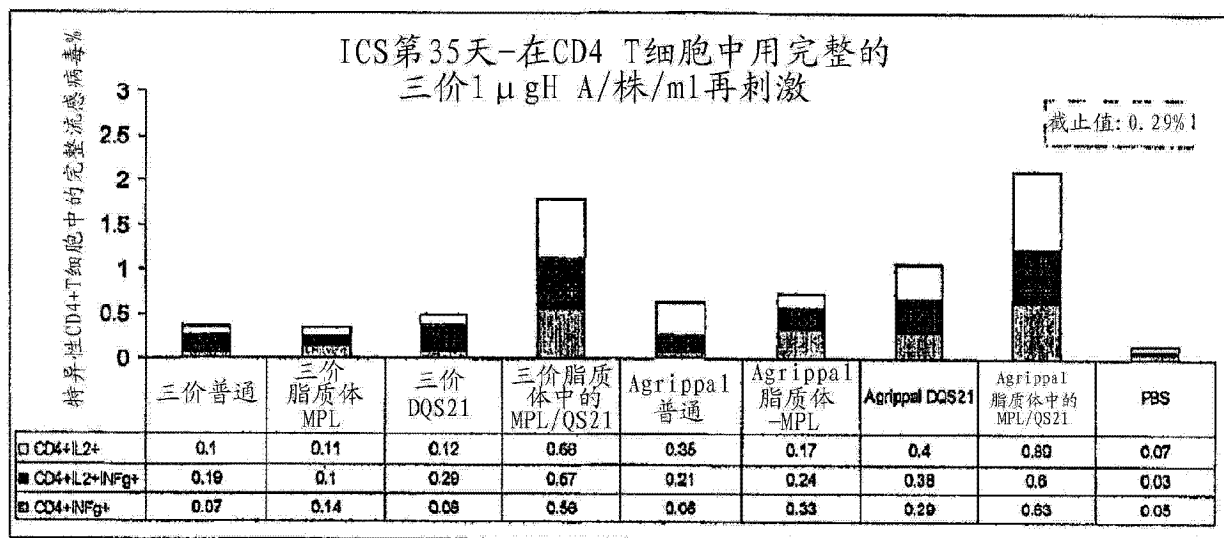


图 5

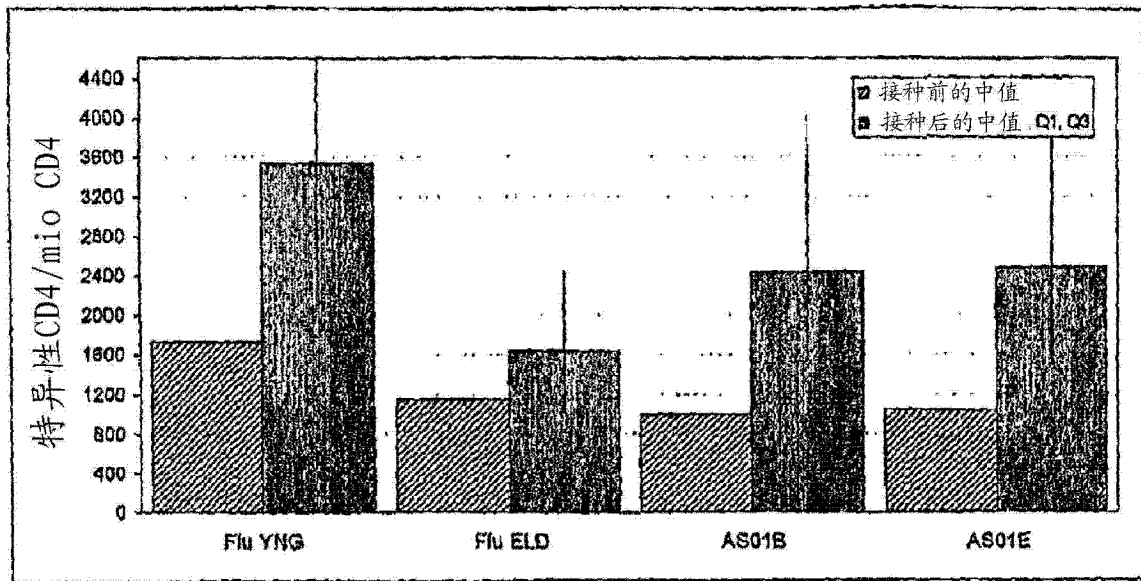


图 6

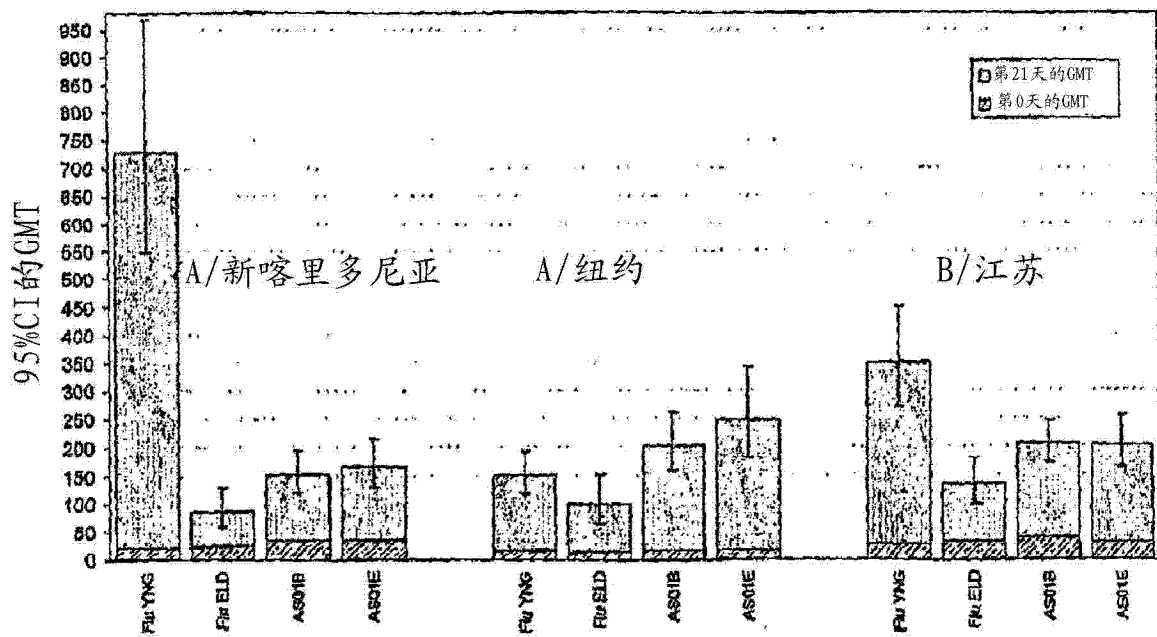


图 7

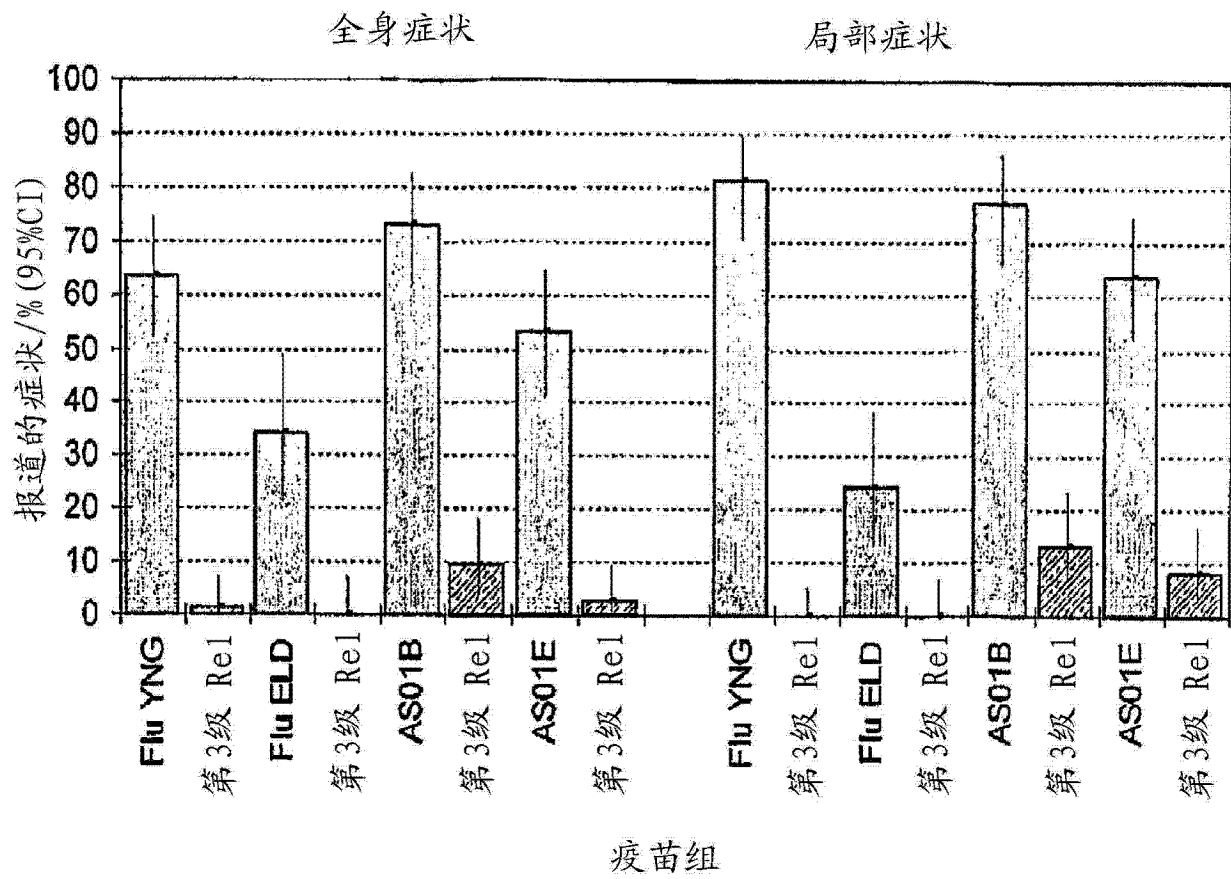


图 8

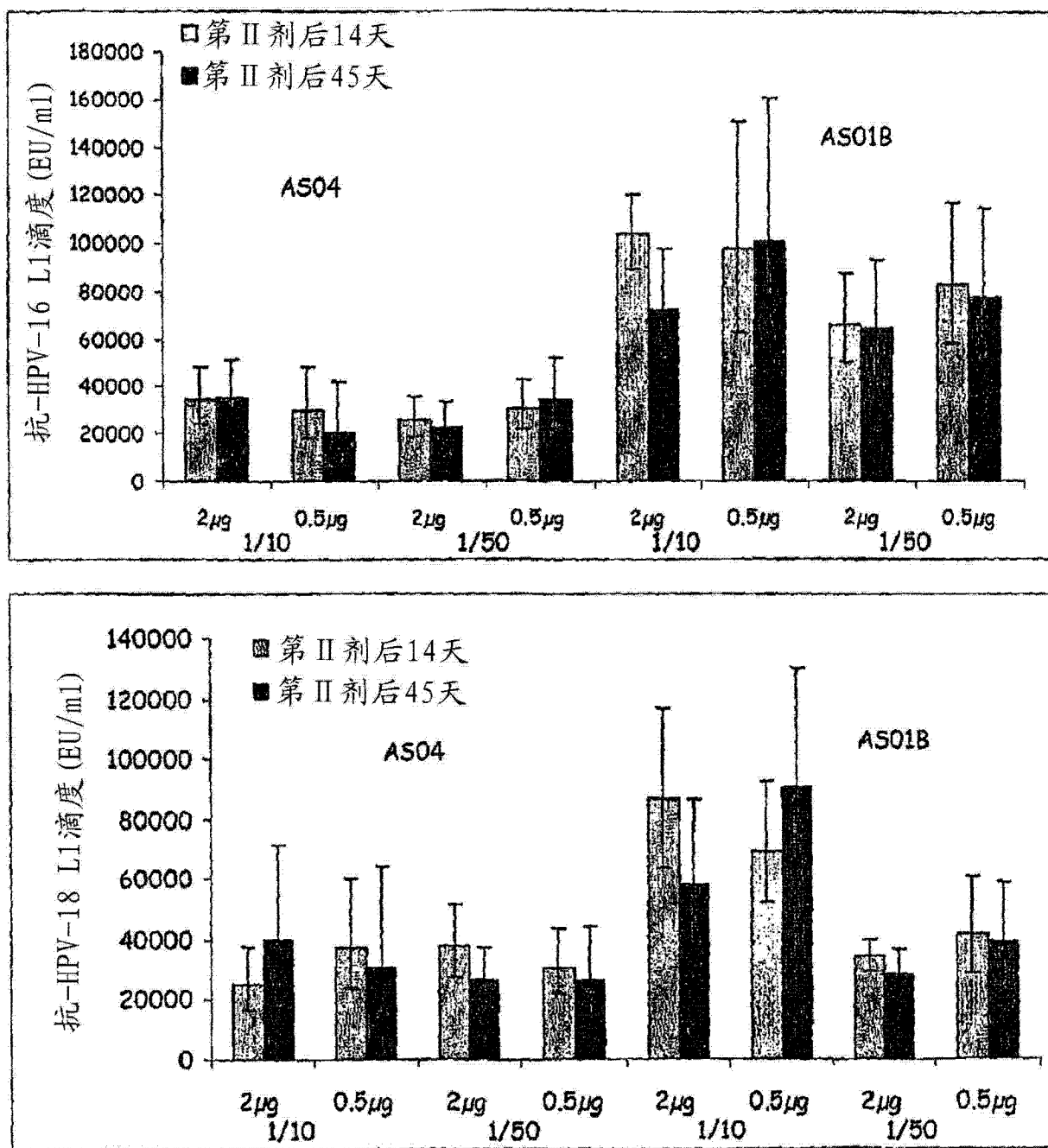


图 9

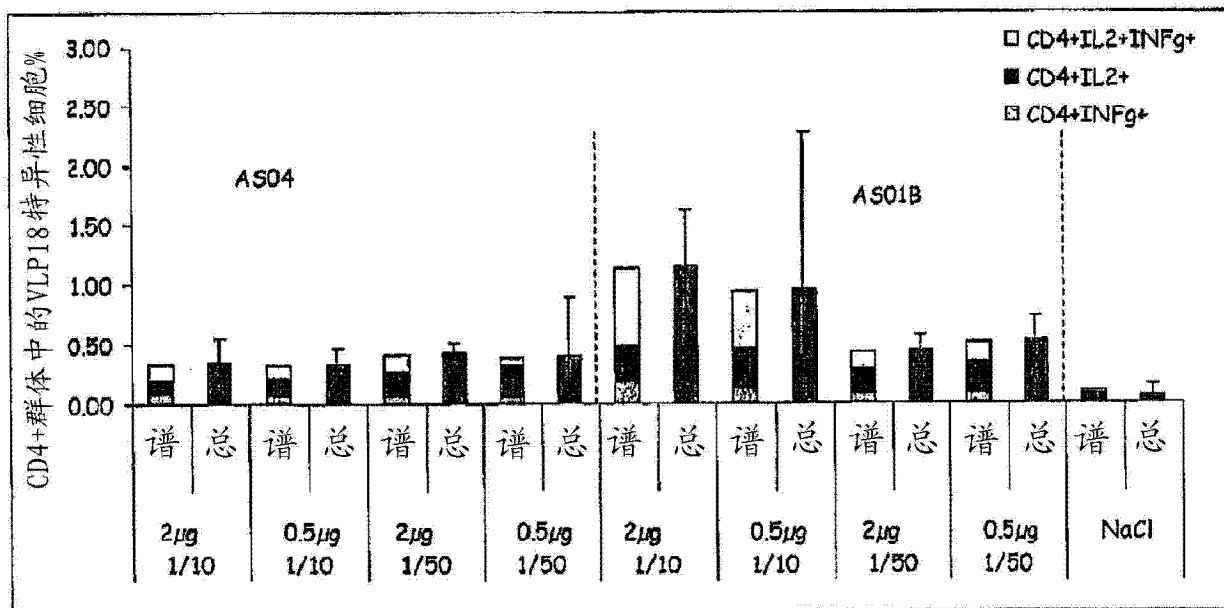
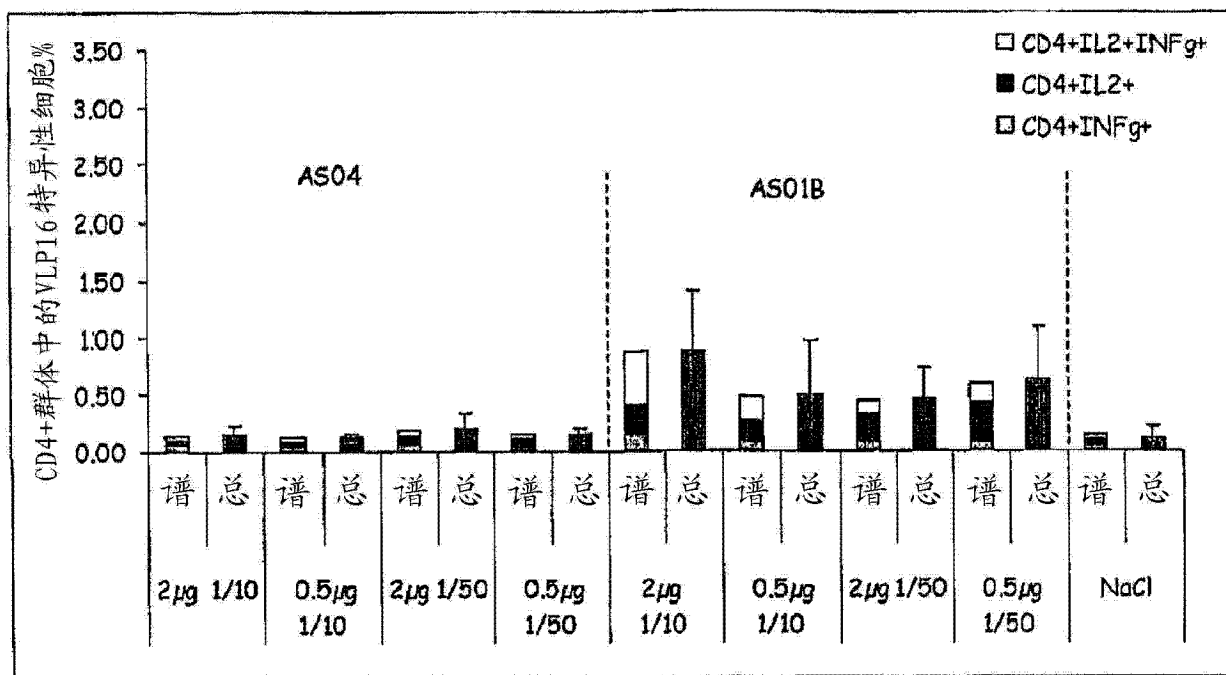


图 10

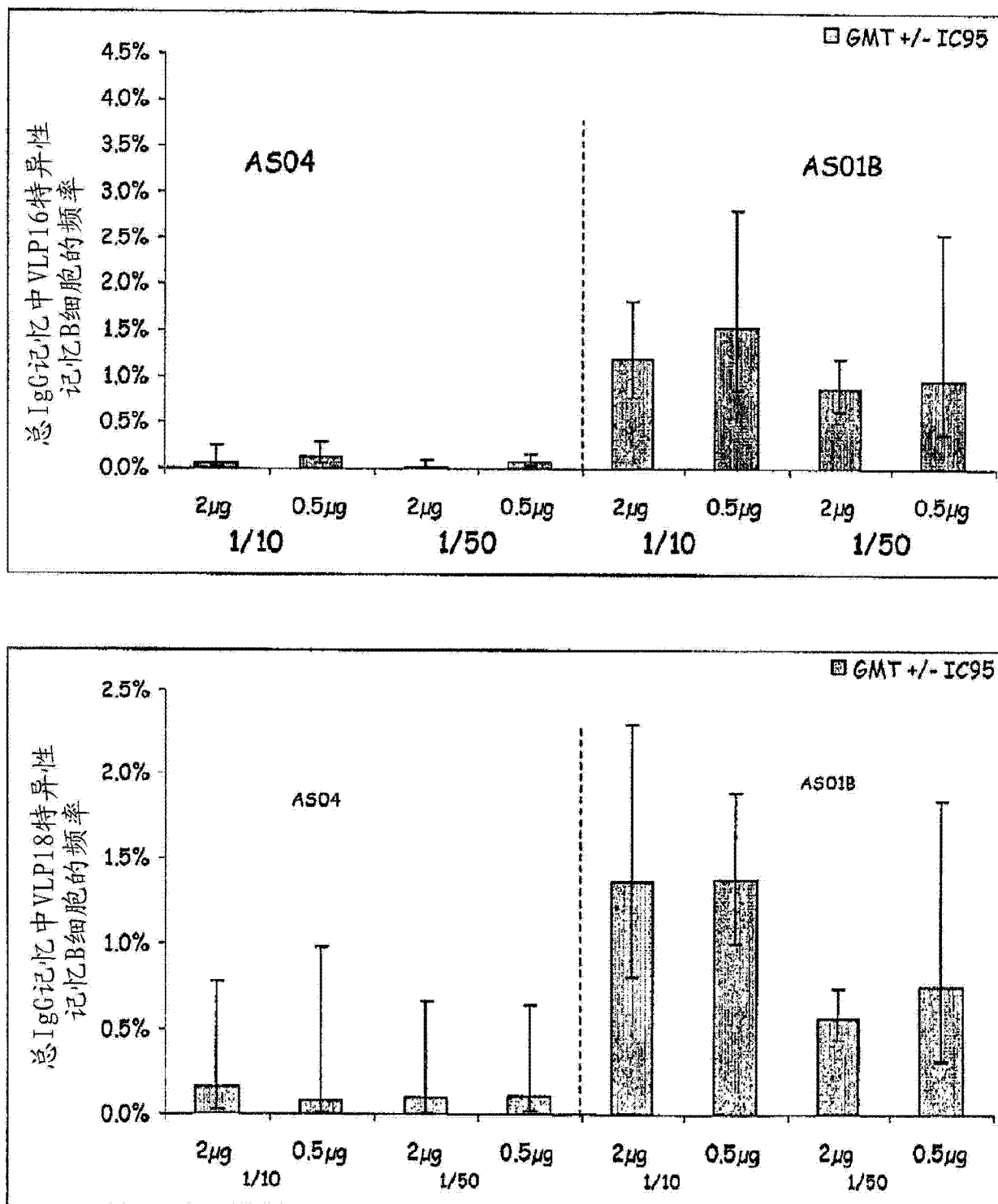


图 11

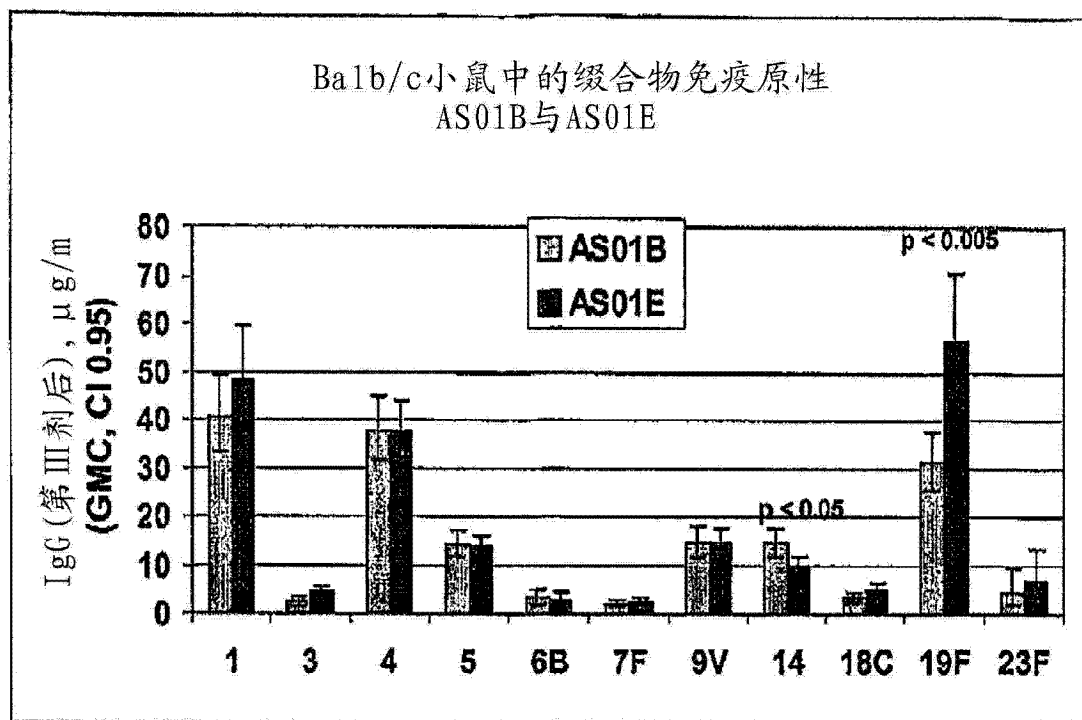


图 12

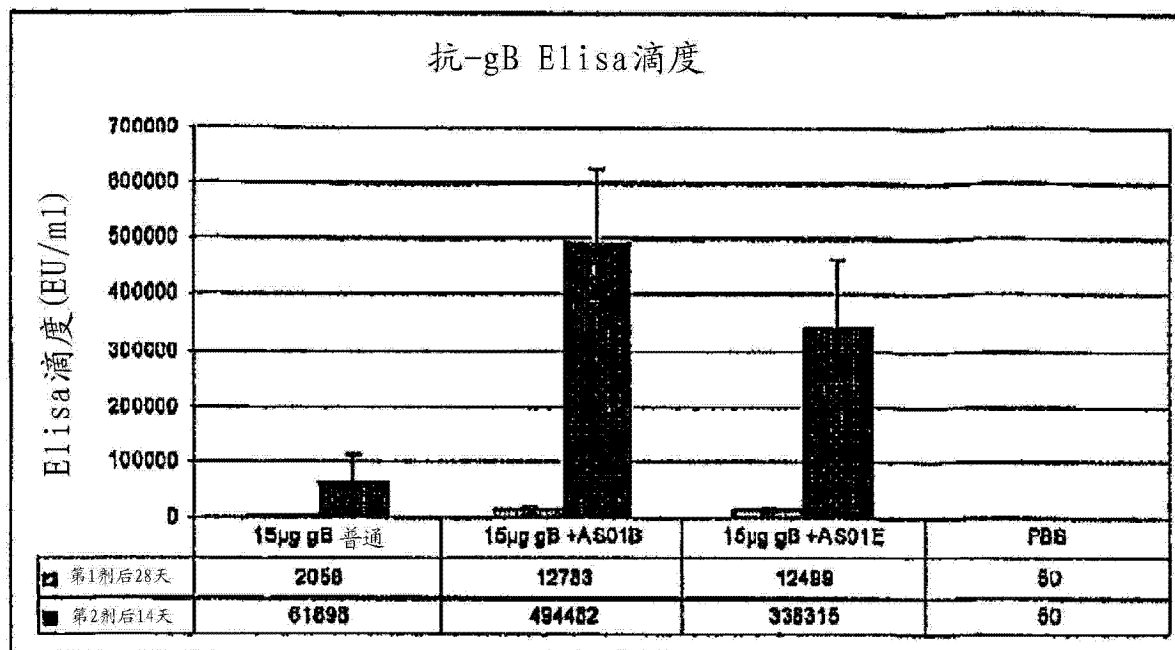


图 13

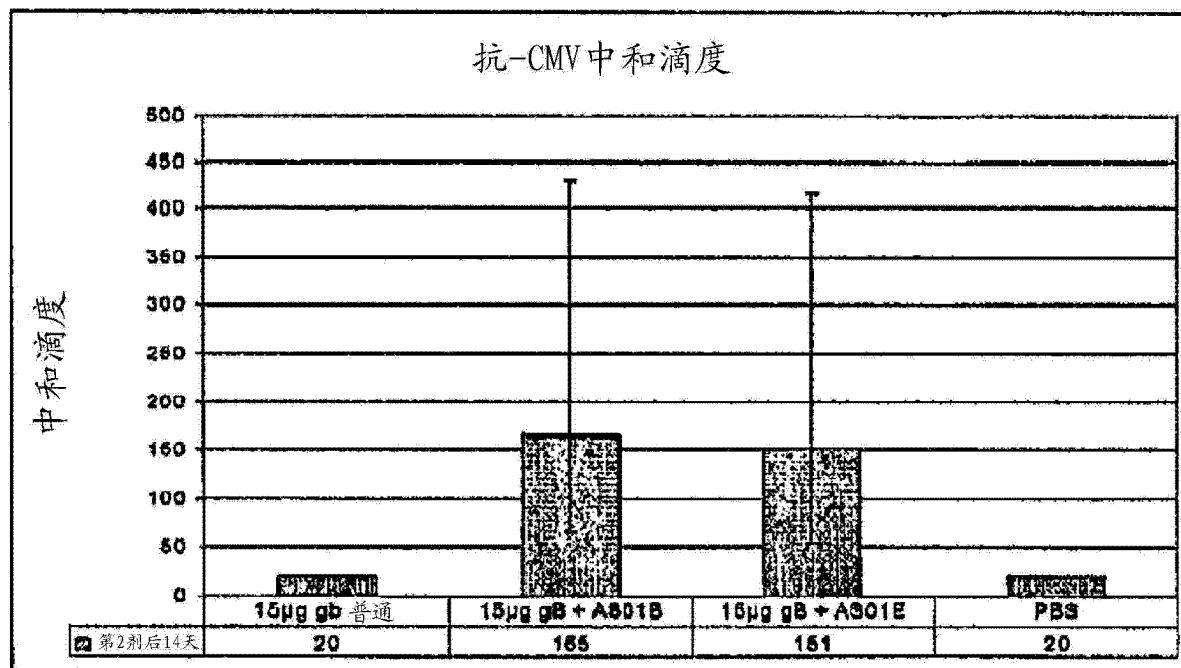


图 14

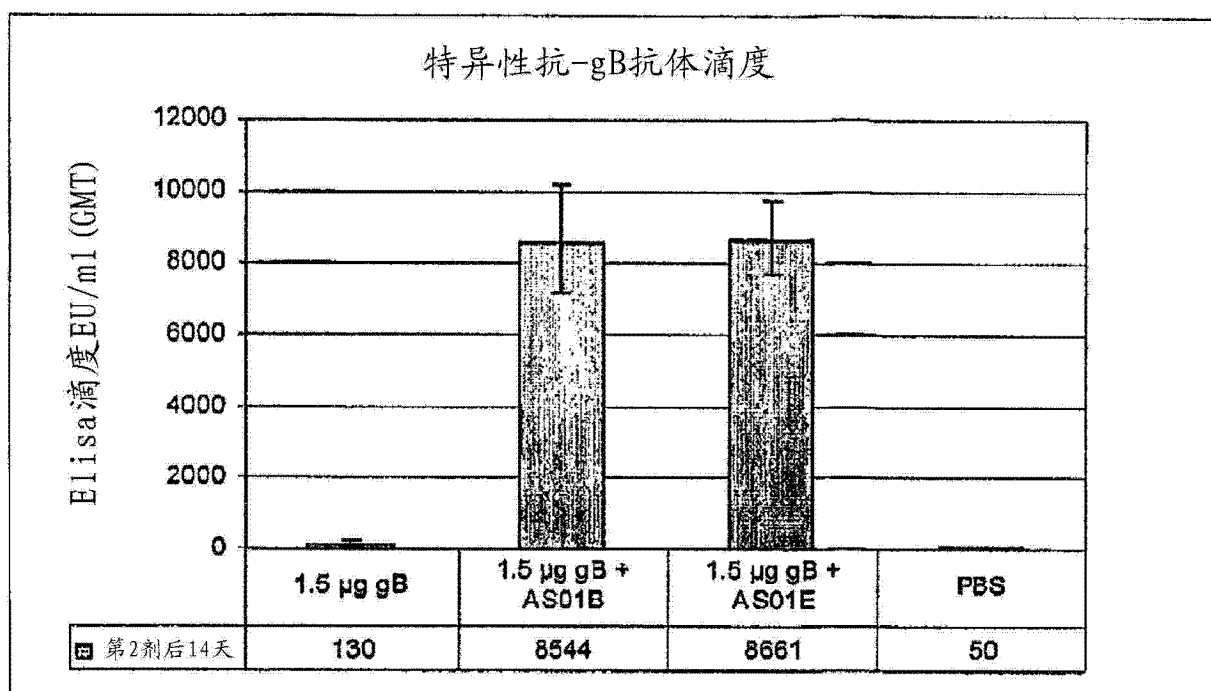


图 15

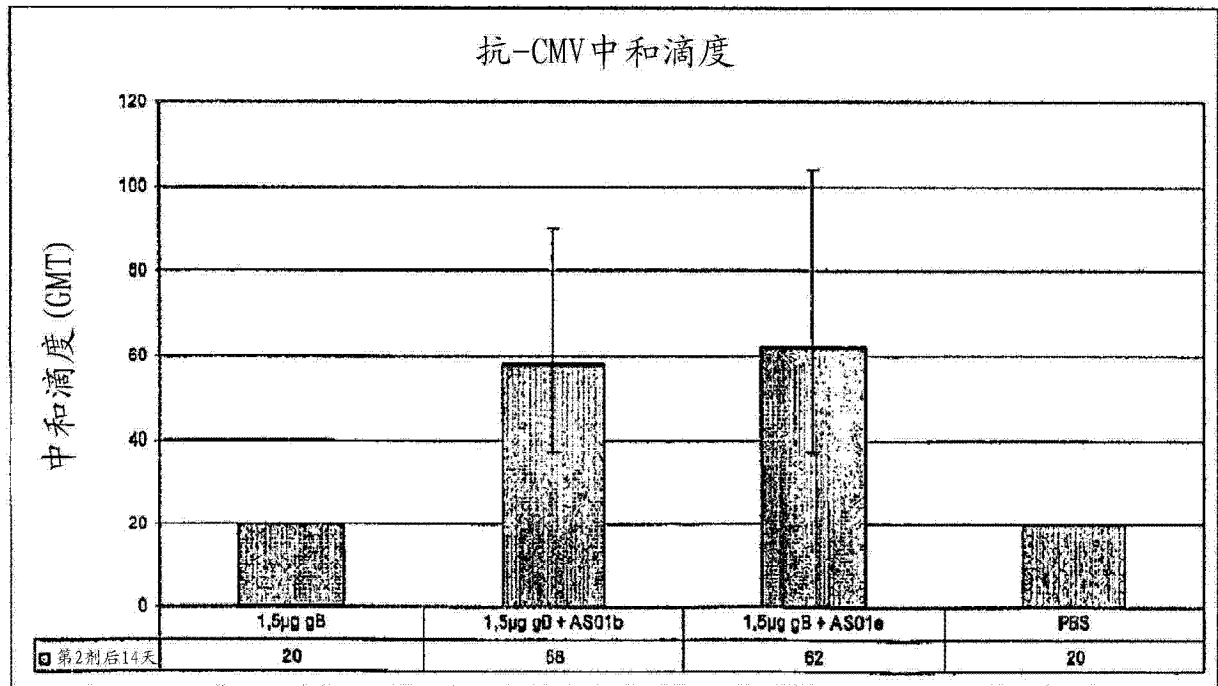


图 16

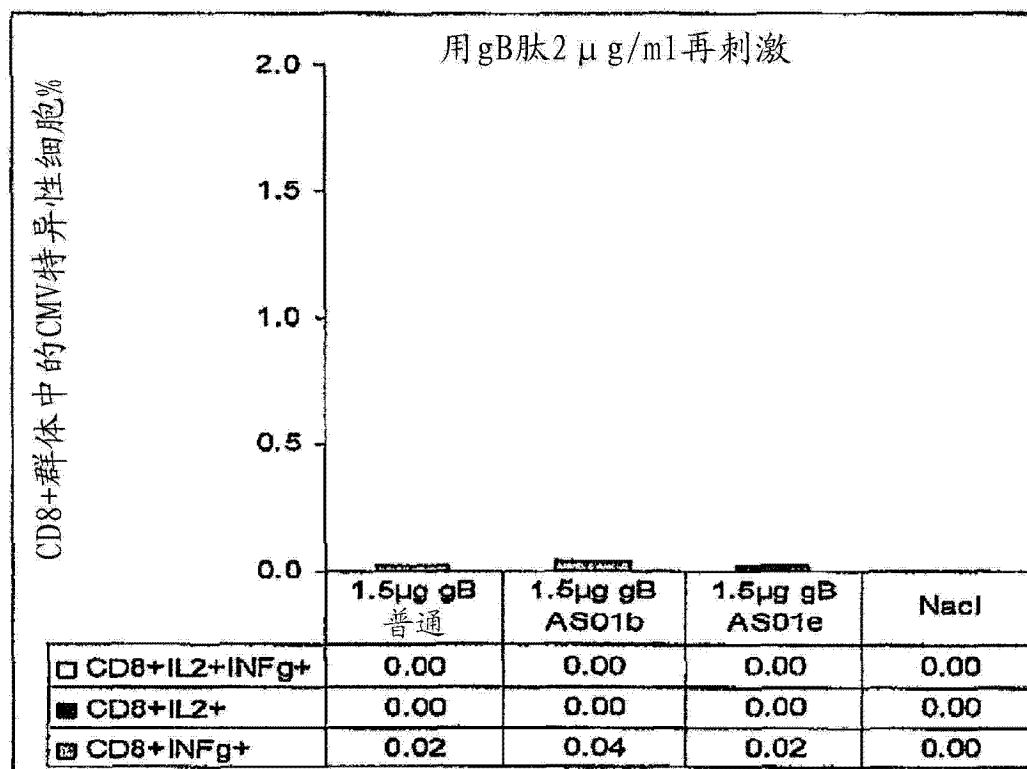
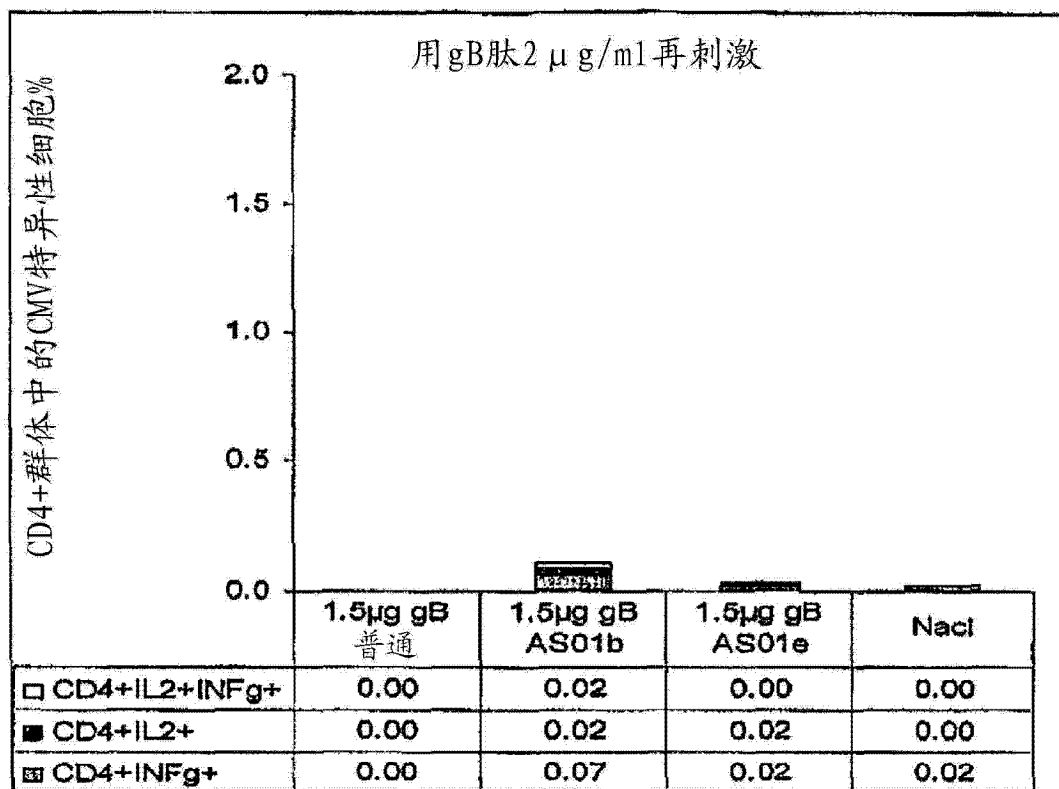


图 17

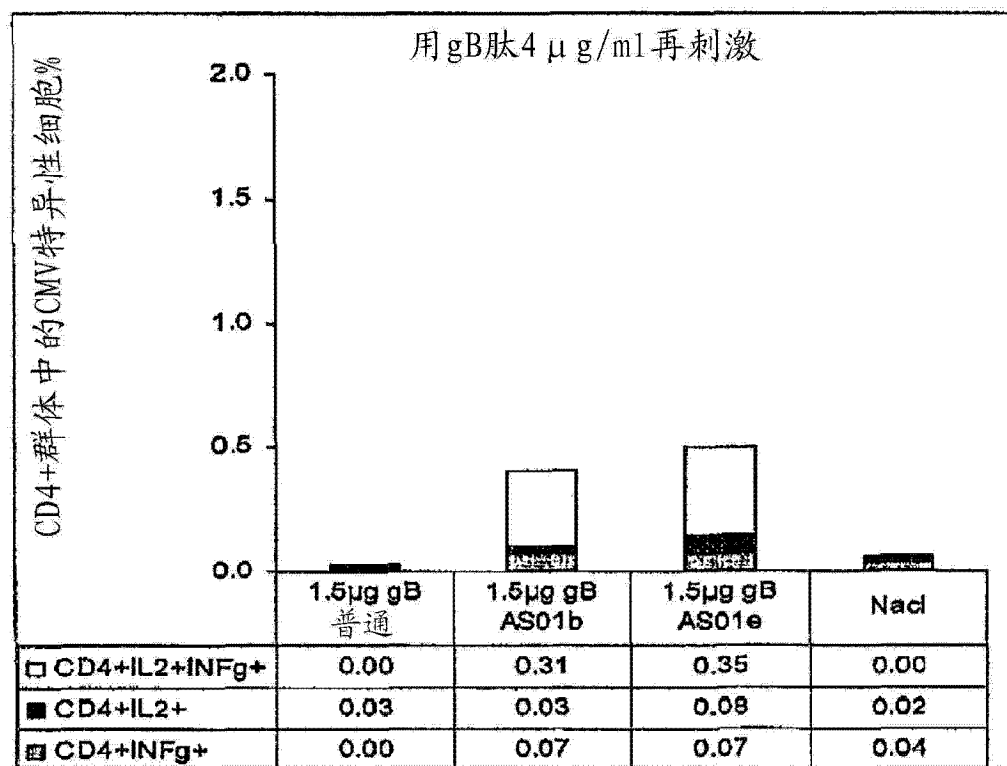
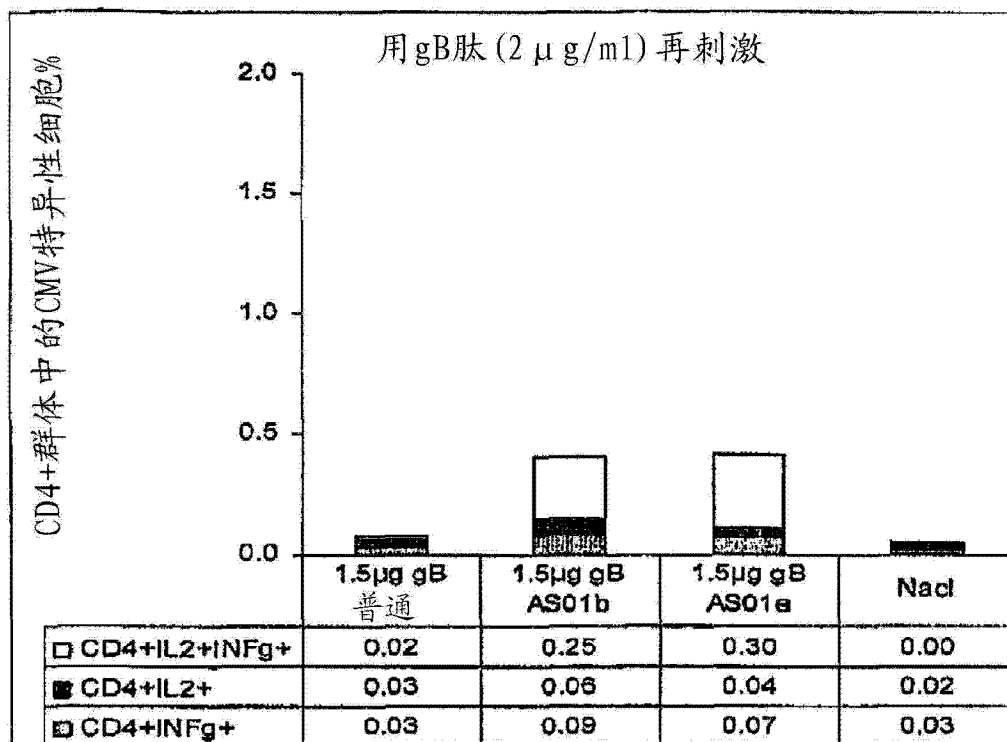


图 18

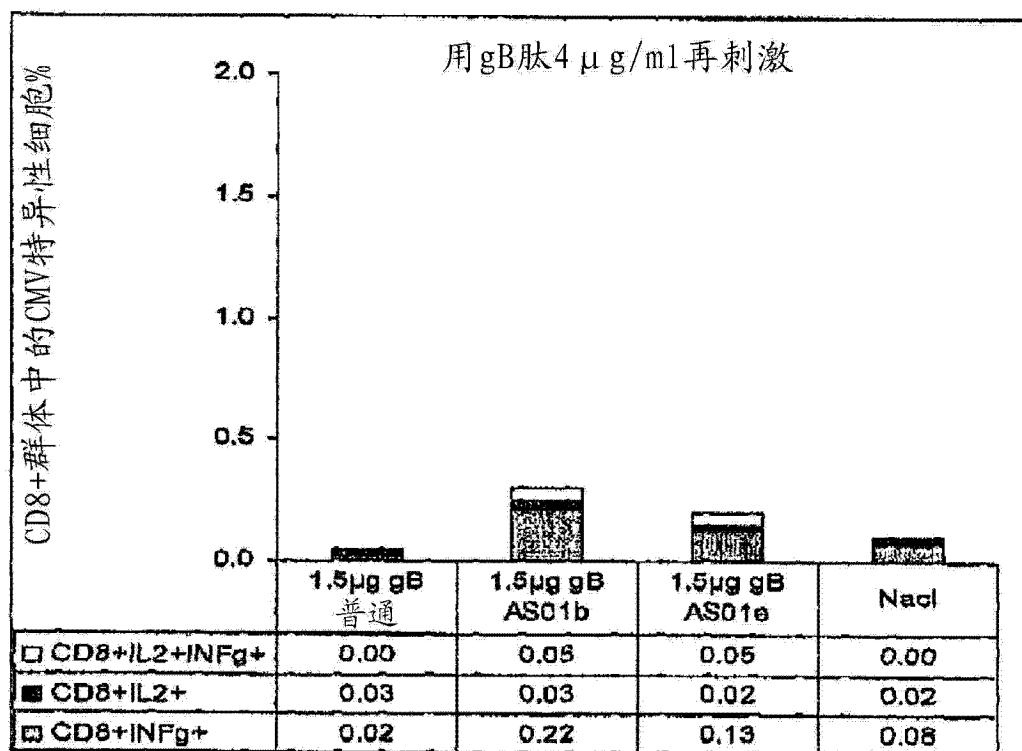
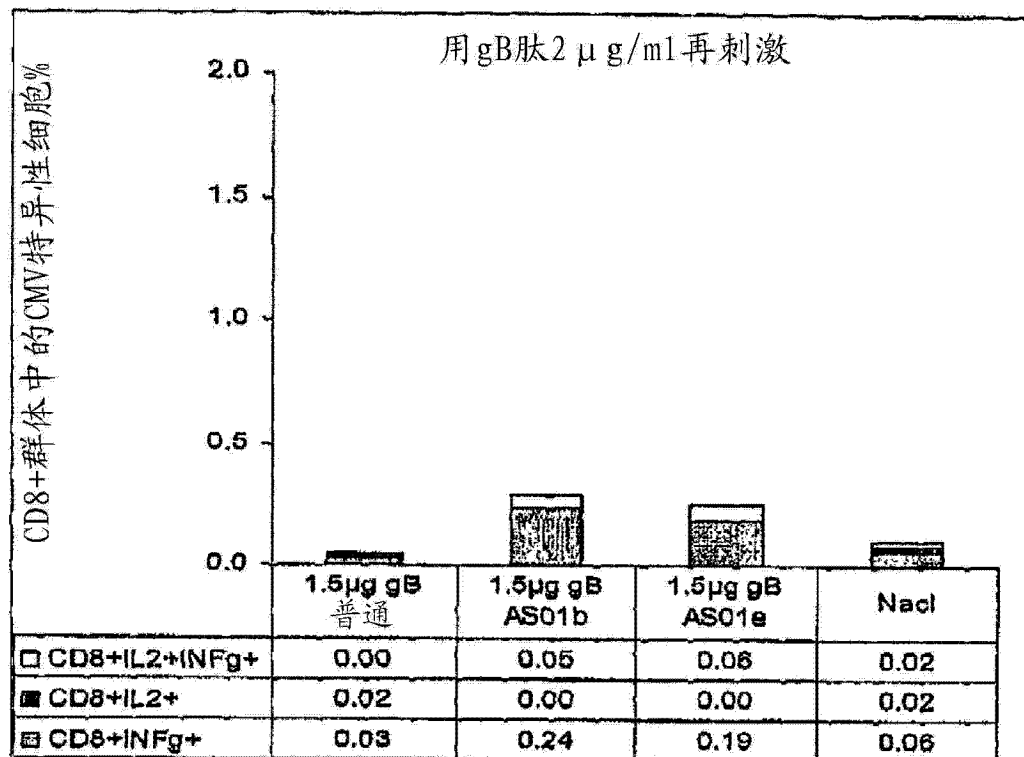


图 19

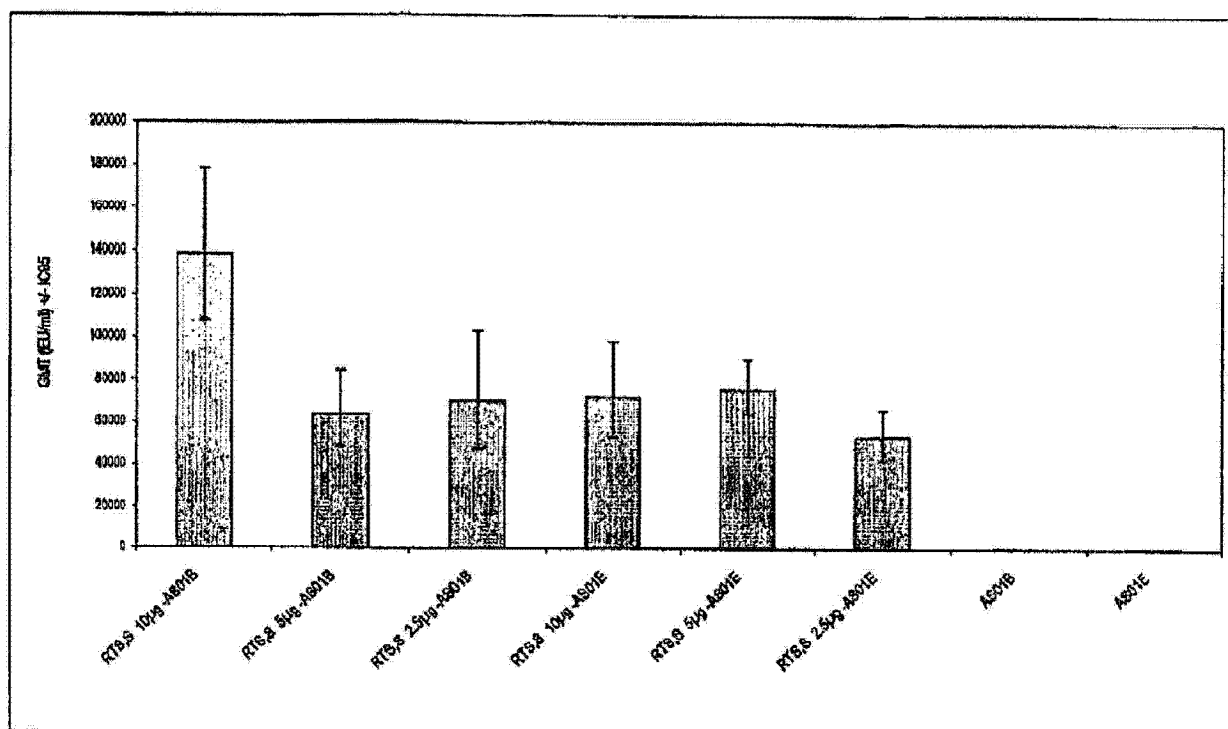


图 20

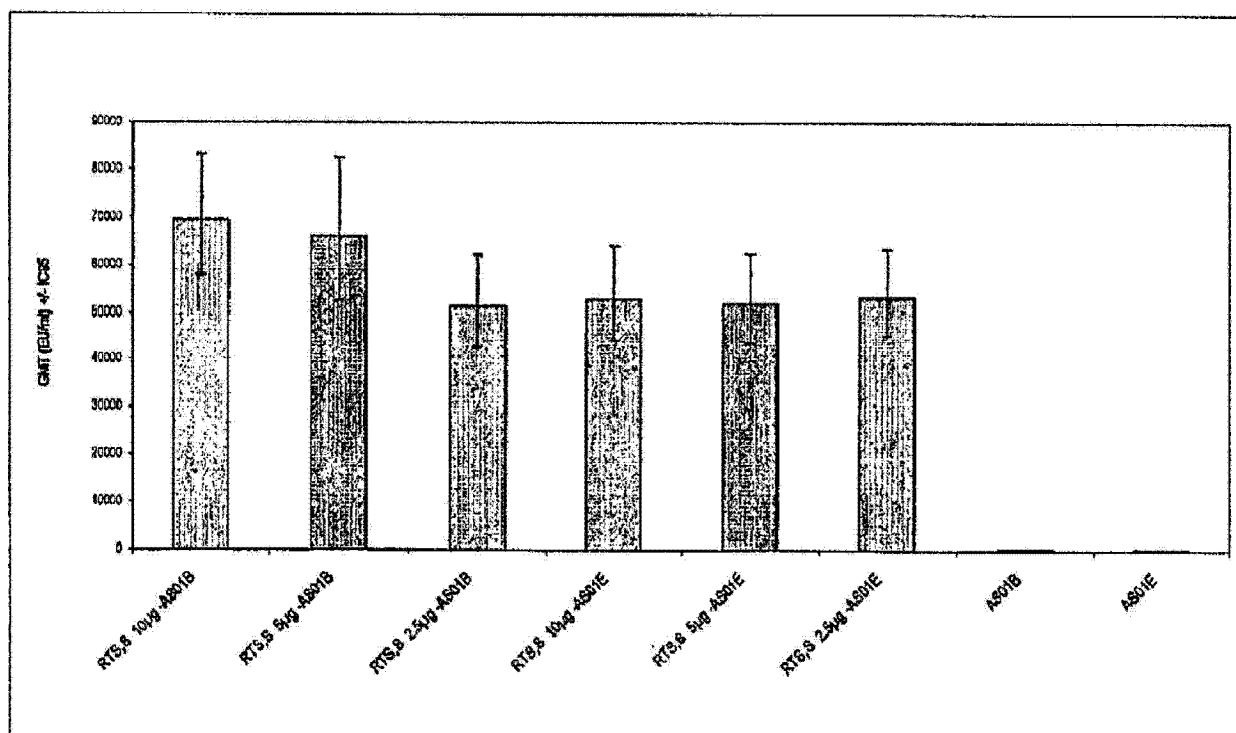


图 21

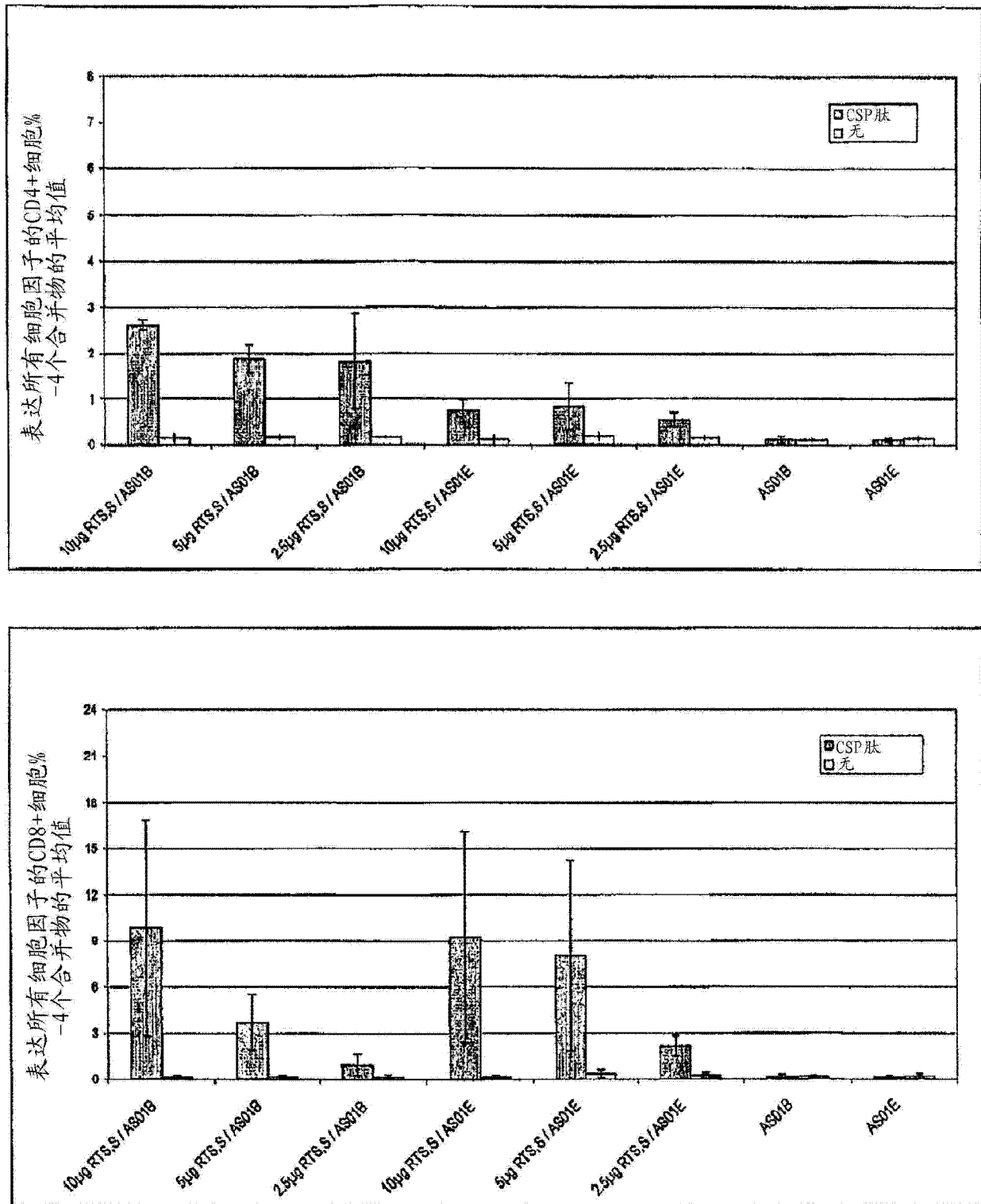


图 22

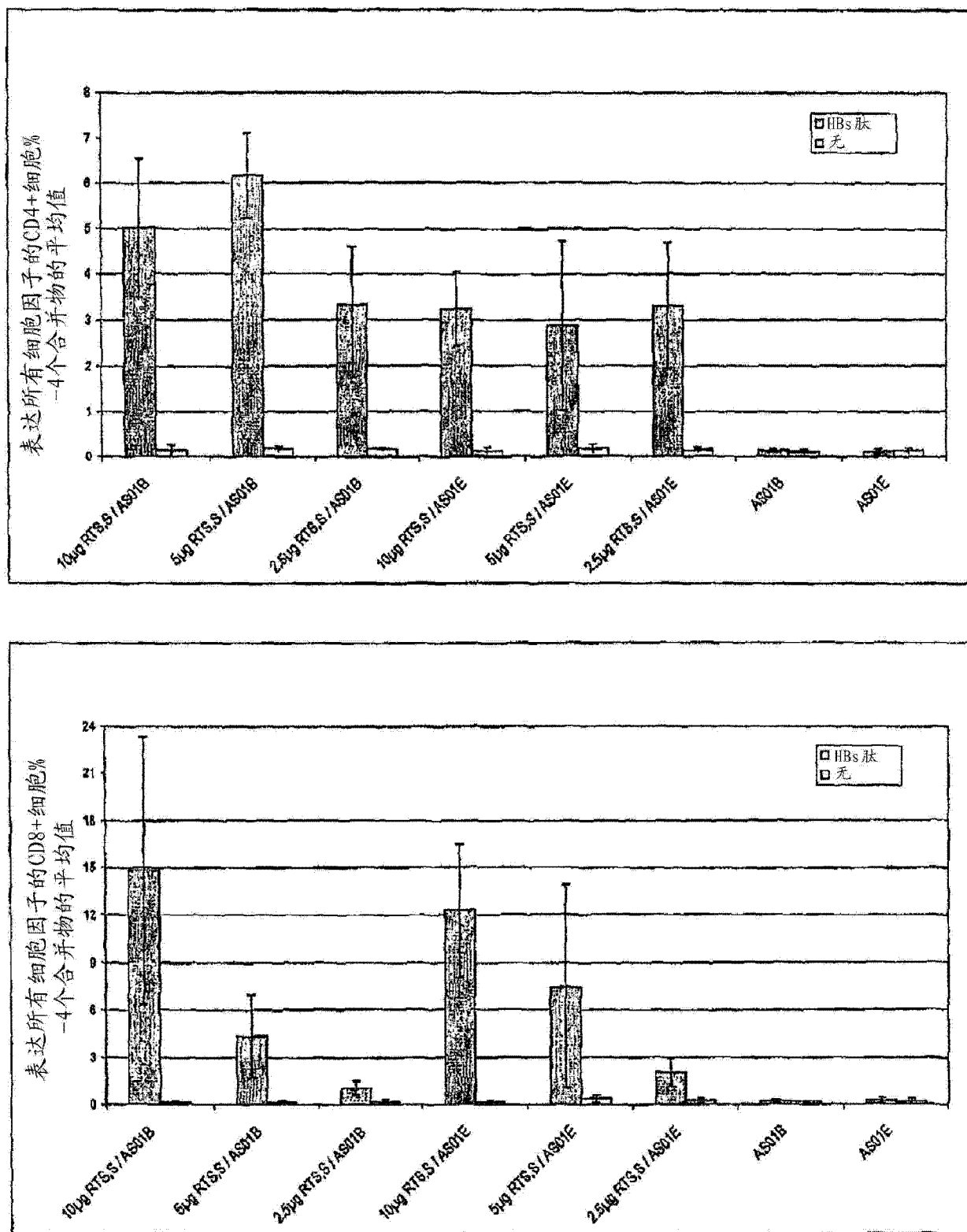


图 23

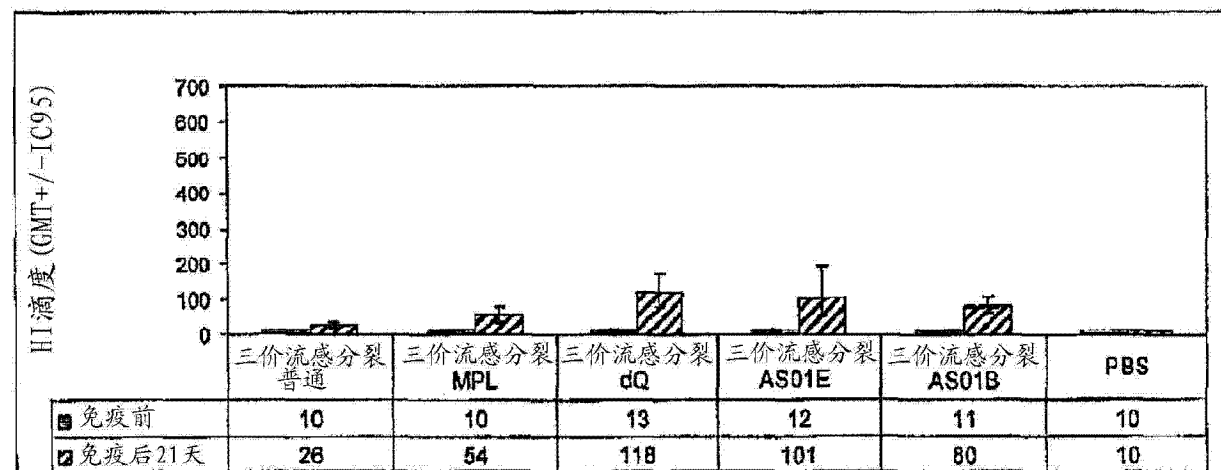
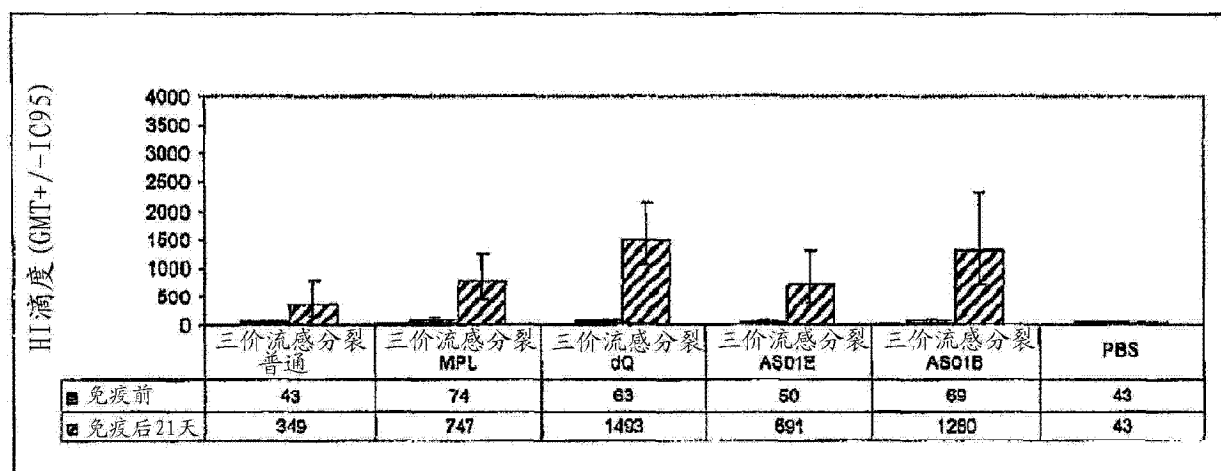
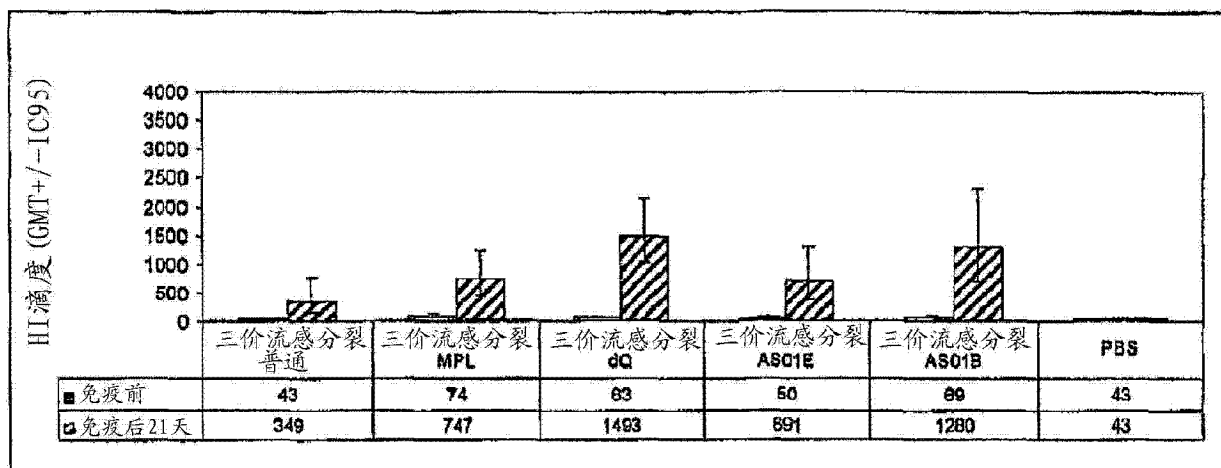


图 24

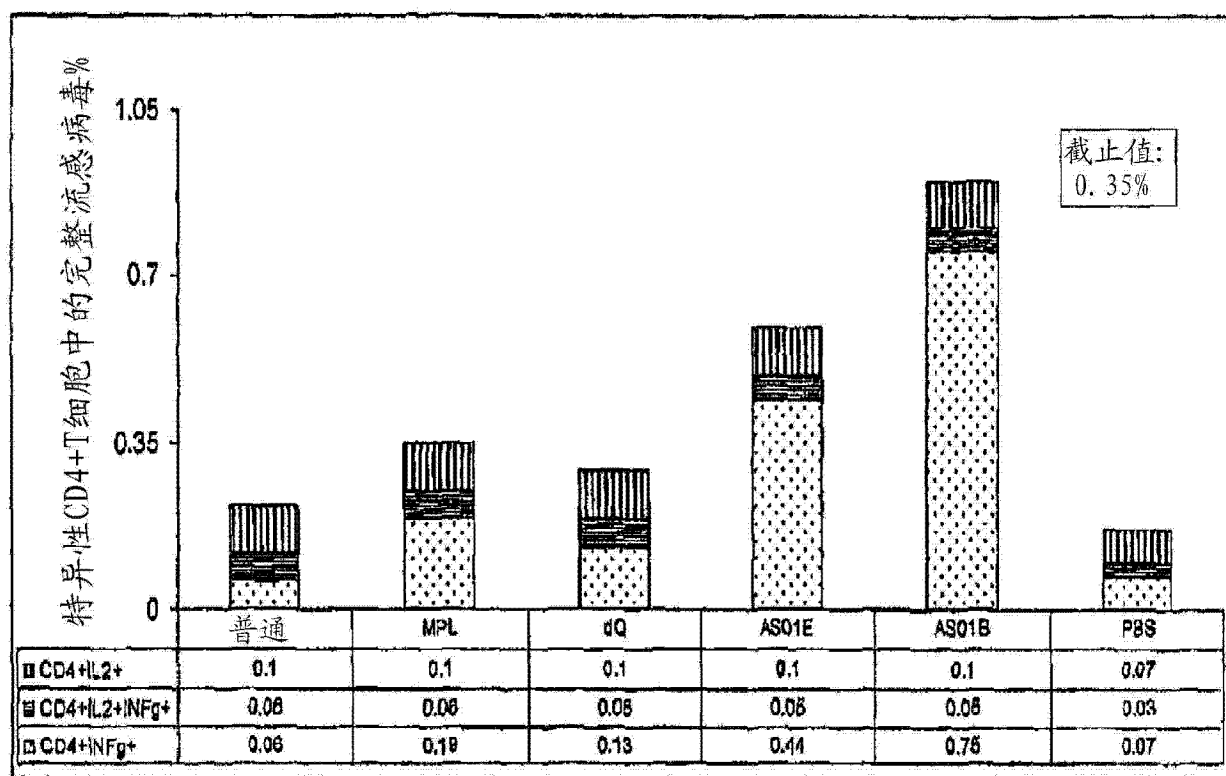


图 25

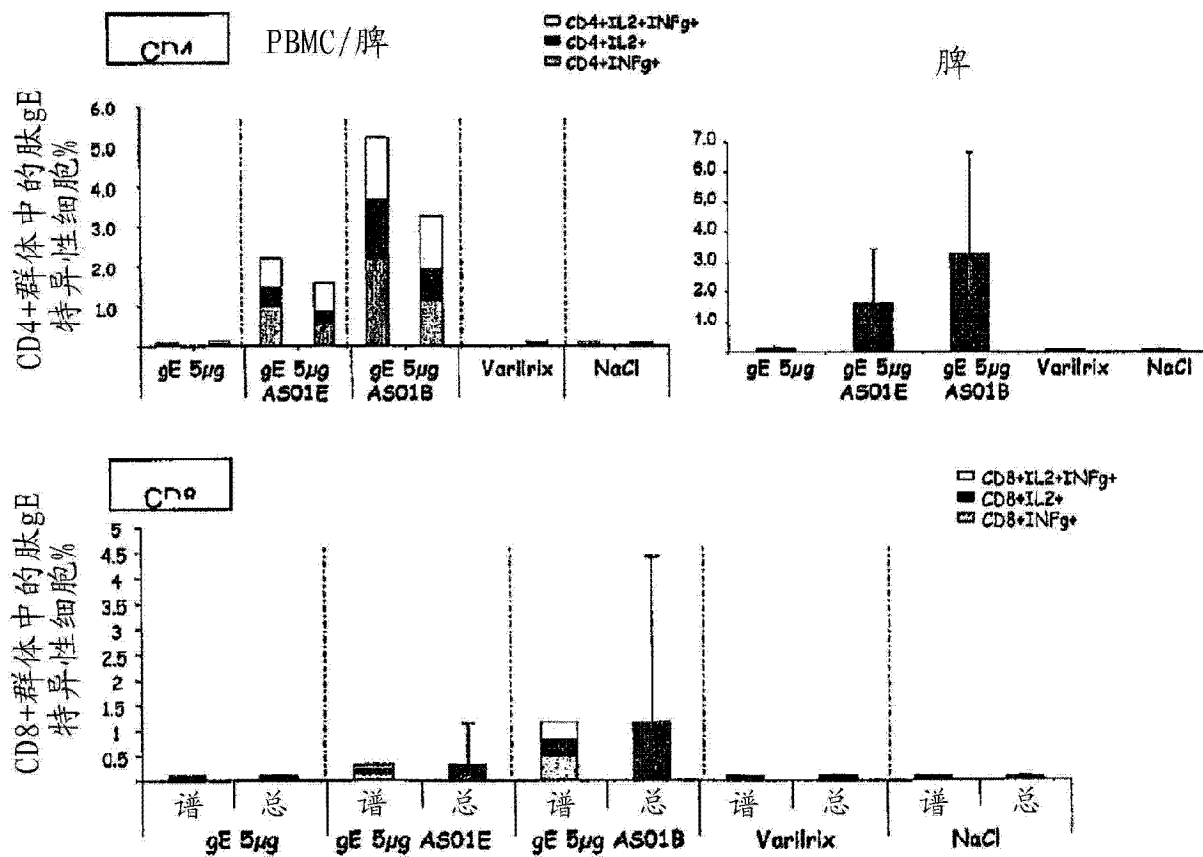
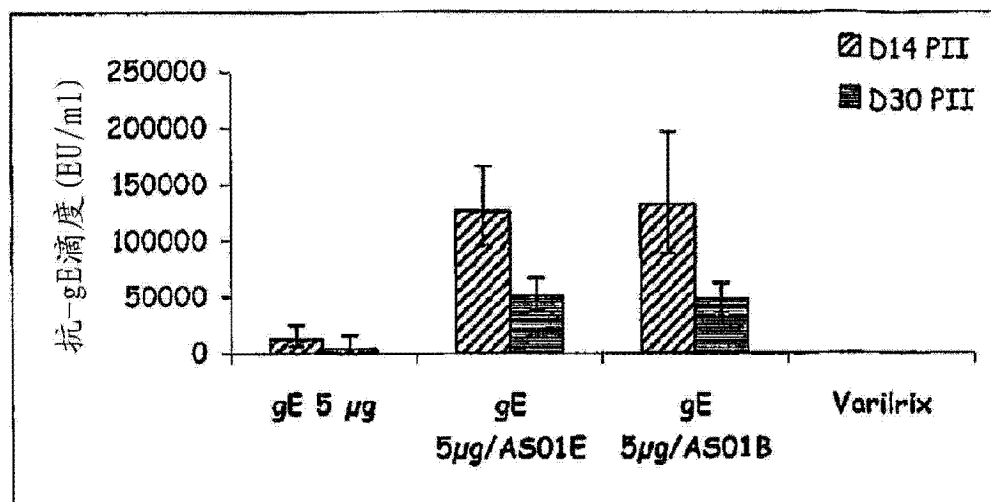
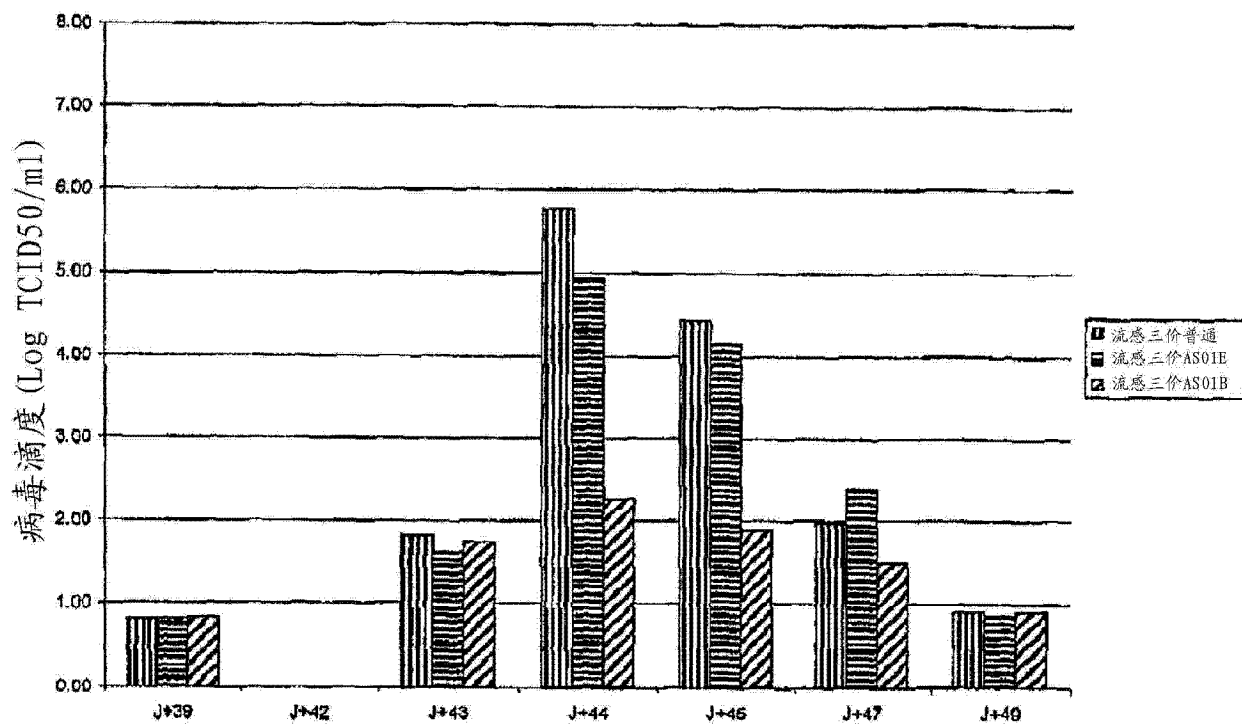


图 26

## 攻击



## 初免

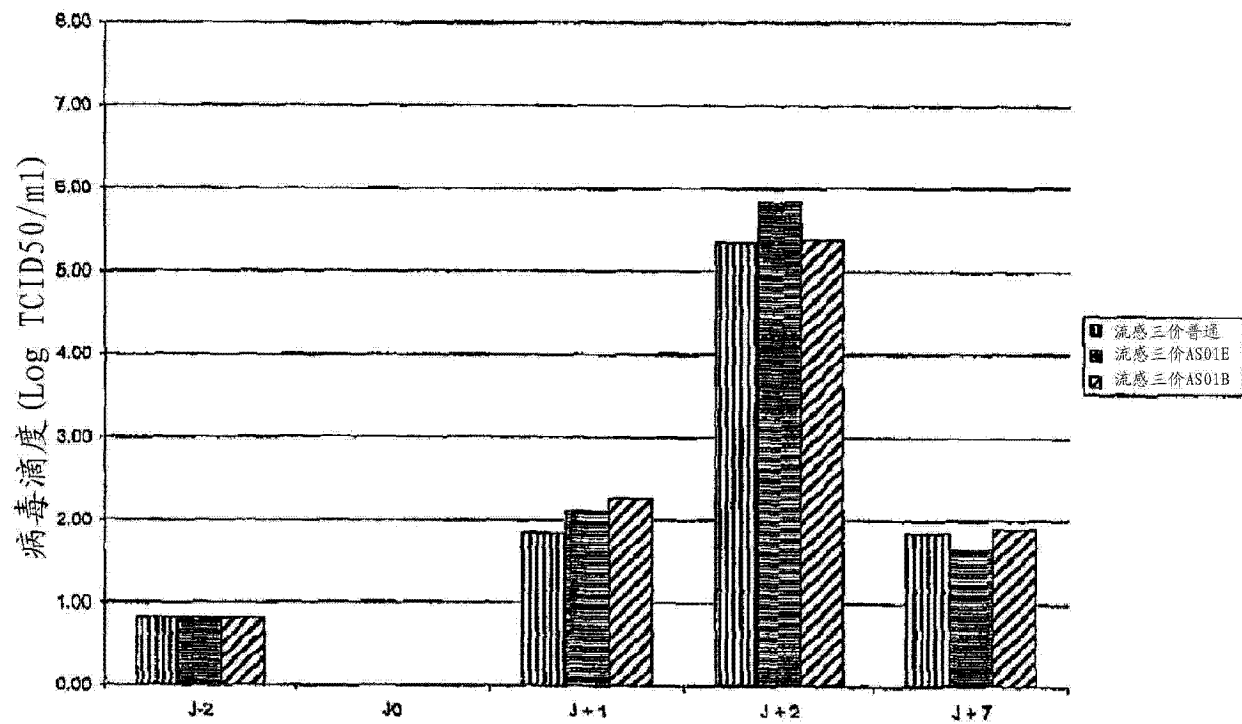
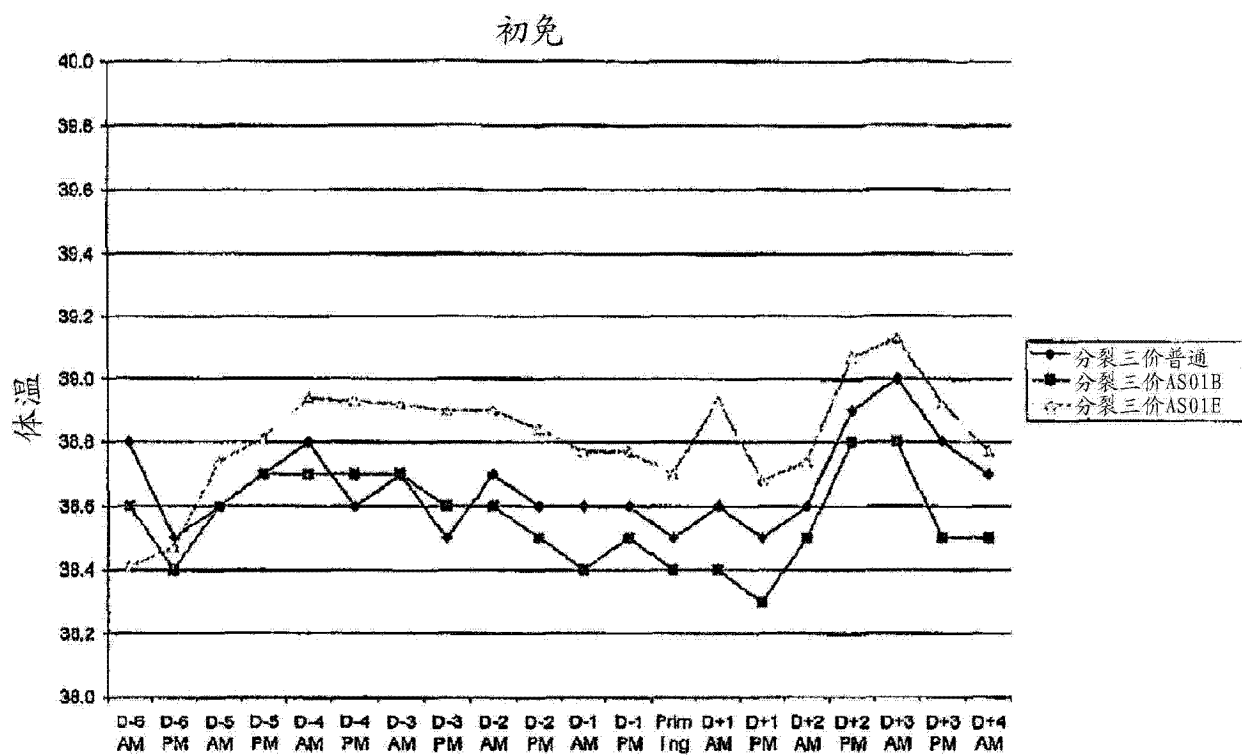


图 27



从攻击前1天直到攻击后7天的体温监测

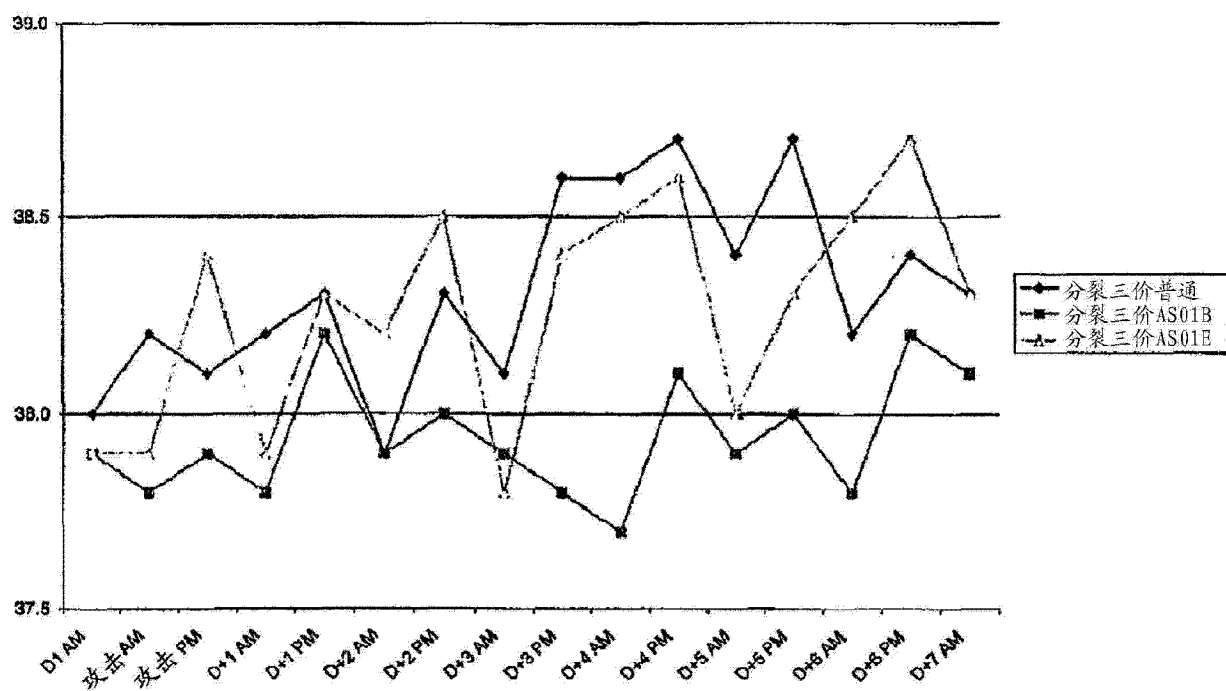
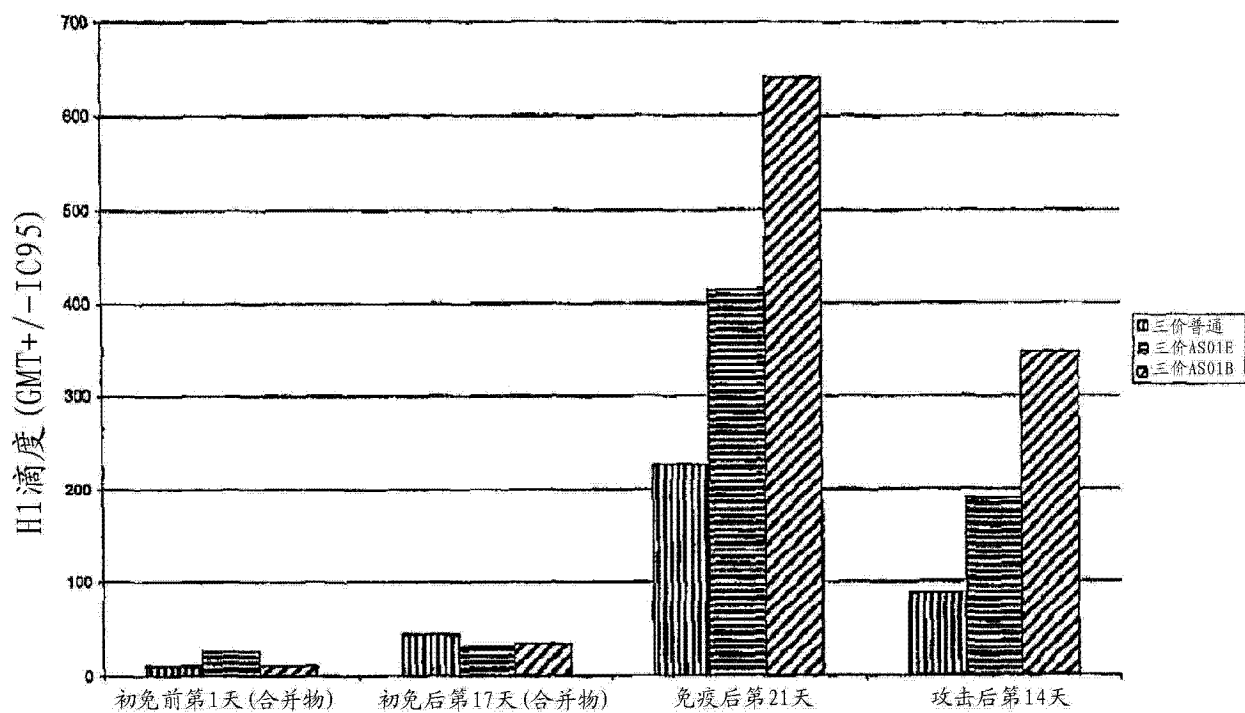


图 28

## 抗-A/新喀里多尼亚/20/99 H1N1-H1滴度



## 抗-A/怀俄明/3/2003 H3N2-H1滴度

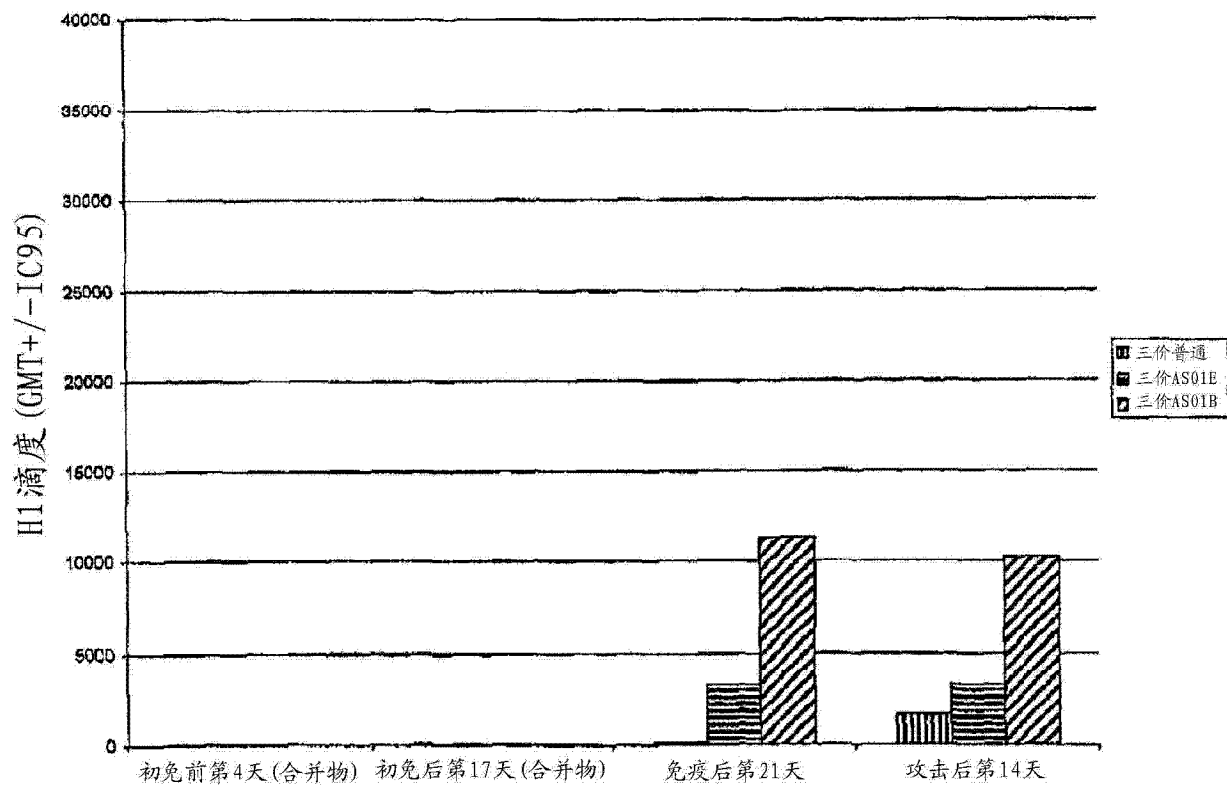
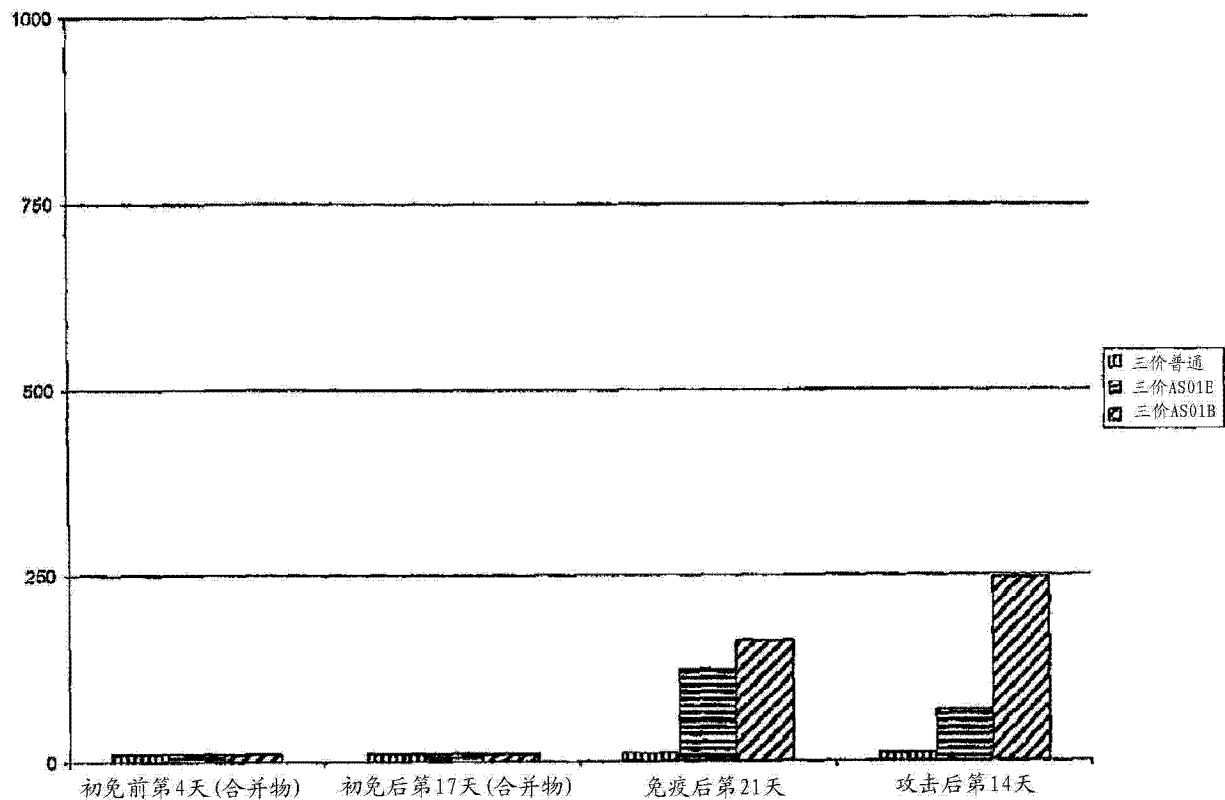


图 29

抗-B/江苏/10/2003-H1滴度



抗-A/纽约/55/2004 H3N2-H滴度

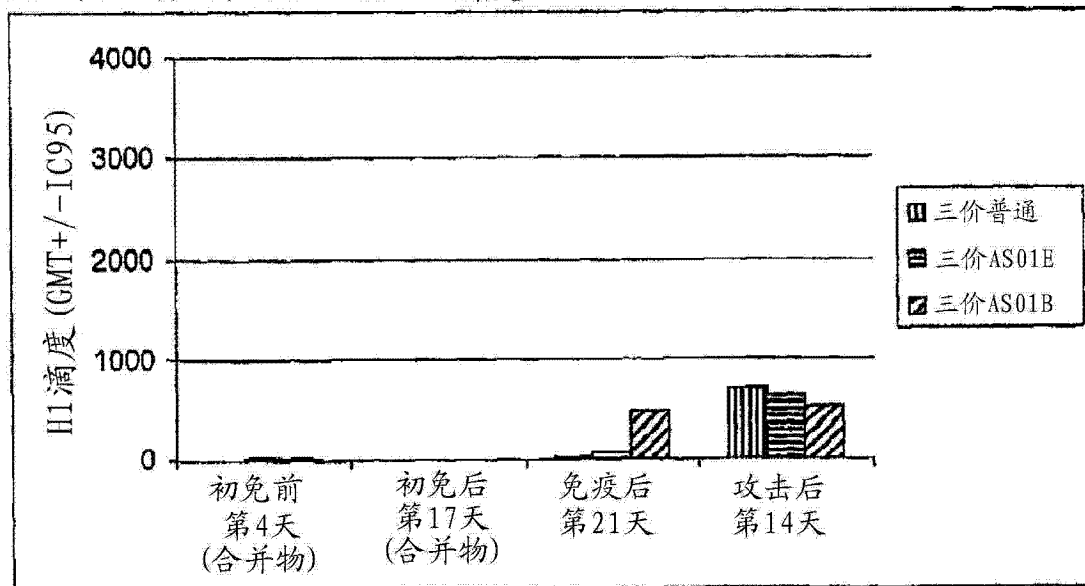


图 30