(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103209707 A
(43)申请公布日 2013.07.17

(21)申请号 201180052183.6
(22)申请日 2011.10.27
(30)优先权数据
61/408,575 2010.10.30 US
13/279,252 2011.10.22 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2013.04.28
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2011/058184 2011.10.27
(87)PCT申请的公布数据
WO2012/058492 EN 2012.05.03
(71)申请人 乔治·刘
地址 美国宾夕法尼亚州卡里吉维尔布拉辛顿路1029号 19426
(72)发明人 乔治·刘
(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务所(普通合伙) 11350
代理人 汤东凤
(51)Int.Cl.
A61K 39/145(2006.01)
A61K 31/12(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

病毒疫苗以及其制备工艺

(57)摘要

本发明提供了一种针对病毒感染的疫苗。示例性的疫苗包括一个病毒疫苗株的病毒抗原;其中所述病毒抗原来自病毒疫苗株的一种病毒制备;其中所述病毒疫苗株的病毒制备包含一个感染性病毒颗粒的亚群,并且所述感染性病毒颗粒的亚群由其所占所述病毒制备的总的病毒颗粒或病毒抗原总量中的比例来表示;并且其中所述感染性病毒颗粒的亚群在所述病毒制备的总的病毒颗粒或病毒抗原总量中的比例超过一个预定的阈值;因此,该疫苗提供至少部分亚型间(inter-subtypic)或亚型内(intra-subtypic)针对与疫苗株不同的病毒株的交叉免疫应答。

CN 103209707 A

1. 一种疫苗包括：

一个病毒的疫苗株的病毒抗原；

其中所述病毒抗原来自病毒疫苗株的一个病毒制备；

其中所述病毒疫苗株的病毒制备包含一个感染性病毒颗粒亚群，并且所述感染性病毒颗粒亚群表示为在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例；

及其中所述感染性病毒颗粒亚群在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例超过一个预定阈值；

因此，该疫苗提供针对与疫苗株不同的病毒株的至少部分的亚型间（inter-subtypic）或亚型内（intra-subtypic）的交叉免疫应答。

2. 根据权利要求 1 所述疫苗，其特征在于：其中所述病毒能够感染人类和动物。

3. 根据权利要求 2 所述疫苗，其特征在于：其中所述病毒是流感病毒，艾滋病病毒，登革病毒或口蹄疫病毒。

4. 根据权利要求 1 所述疫苗，其特征在于：其中所述病毒抗原是病毒的表面抗原。

5. 根据权利要求 1 所述疫苗，其特征在于：其中所述病毒制备是通过细胞培养或鸡胚卵或允许所述病毒增殖的合适宿主来生产。

6. 根据权利要求 1 所述疫苗，其特征在于：其中所述病毒制备中的感染性病毒颗粒亚群是由病毒感染性的实验包括空斑形成单位实验（PFU），组织培养感染剂量（TCID50），蛋感染剂量（EID50）和致死量（LD50）来确定，并且总病毒颗粒或总病毒抗原是由病毒总体实验包括血凝法，ELISA 法，蛋白质印迹，总蛋白测定来确定。

7. 根据权利要求 1 所述疫苗，其特征在于：其中所述感染性病毒颗粒亚群的比例的预定义的阈值被如此确定：提供一组含有不同感染性病毒颗粒亚群的比例的病毒制备；

制备疫苗，含有从该组的病毒制备获得的病毒抗原；

用所述制备的疫苗免疫一个合适的宿主；

用所述病毒的一个攻毒株攻击所述免疫的宿主，其中所述攻毒株不同于疫苗病毒株；

及分析攻毒结果；

其中所述预定义的阈值定义为提供预期免疫力的病毒制备的比例值。

8. 根据权利要求 1 所述疫苗，其特征在于：其中所述病毒抗原包括纯化的病毒表面抗原，分裂形式的病毒，该病毒的病毒体，或灭活的全病毒。

9. 生产权利要求 1 所述疫苗的方法，其特征在于：所述方法包括：

提供一个病毒疫苗株的一个病毒制备；其中所述病毒疫苗株的病毒制备包含一个感染性病毒颗粒亚群，并且所述感染性病毒颗粒亚群表示为在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例；及其中所述感染性病毒颗粒亚群在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例超过一个预定阈值；

从所述病毒制备获得所述病毒抗原；

使所述病毒抗原与生理上可接受的佐剂混合而制备疫苗；

因此，该疫苗提供针对与疫苗株不同的病毒株的至少部分的亚型间（inter-subtypic）或亚型内（intra-subtypic）的交叉免疫应答。

10. 根据权利要求 9 所述生产疫苗的方法，其特征在于：其中所述病毒能够感染人类和动物。

11. 根据权利要求 10 所述生产疫苗方法，其特征在于：其中所述病毒是流感病毒，艾滋病病毒，登革病毒或口蹄疫病毒。

12. 根据权利要求 9 所述生产疫苗方法，其特征在于：其中所述病毒抗原是病毒的表面抗原。

13. 根据权利要求 9 所述生产疫苗方法，其特征在于：其中所述病毒制备是通过细胞培养或鸡胚卵或允许所述病毒增殖的合适宿主来生产。

14. 根据权利要求 9 所述生产疫苗方法，其特征在于：其中所述病毒制备中的感染性病毒颗粒亚群是由病毒感染性的实验包括空斑形成单位实验（PFU），组织培养感染剂量（TCID50），蛋感染剂量（EID50）和致死量（LD50）来确定，并且总病毒颗粒或总病毒抗原是由病毒总体实验包括血凝法，ELISA 法，蛋白质印迹，总蛋白测定来确定。

15. 根据权利要求 9 所述生产疫苗方法，其特征在于：其中所述感染性病毒颗粒亚群的比例的预定义的阈值被如此确定：

提供一组含有不同感染性病毒颗粒亚群的比例的病毒制备；

制备疫苗，含有从该组的病毒制备获得的病毒抗原；

用所述制备的疫苗免疫一个合适的宿主；

用所述病毒的一个攻毒株攻击所述免疫的宿主，其中所述攻毒株不同于疫苗病毒株；

及分析攻毒结果；

其中所述预定义的阈值定义为提供预期免疫力的病毒制备的比例值。

16. 根据权利要求 9 所述生产疫苗方法，其特征在于：其中所述病毒抗原包括纯化的病毒表面抗原，分裂形式的病毒，该病毒的病毒体，或灭活的全病毒。

17. 根据权利要求 1 所述疫苗的用途为免疫一个主体，其中所述疫苗预防或治疗病毒感染。

18. 根据权利要求 17 所述用途，其中所述主体是一个人或动物。

病毒疫苗以及其制备工艺

技术领域

[0001] 本发明涉及包括一种从含有富集的感染性颗粒亚群的病毒制备而获得的病毒抗原的病毒疫苗，并进一步涉及其制备工艺。

背景技术

[0002] 可怕的感染性病毒，如人类免疫缺陷病毒(HIV)，流感病毒，登革热病毒(DENV)，和口蹄疫病毒(FMDV)，仍然对人类和动物引起严重后果。疫苗被认为是用于预防和治疗病毒感染的最有效和经济的手段。不幸的是，病毒如 HIV，流感病毒，DENV，FMDV，包含许多血清型(即亚型)，并进行快速的抗原变化；这些使得生产具有亚型间(inter-subtypic)和/或亚型内(intra-subtypic)交叉保护的有效疫苗成为严峻挑战。

[0003] 甲型流感病毒造成上个世纪流感大流行，并且是引起每年暴发的流感疫情的病原体。据世界卫生组织估计，流感疫情每年影响约 5-15％的全球人口，每年造成 3-5 百万重症病人和 50 万人死亡。世卫组织流感情况表 211。世界卫生组织，日内瓦，瑞士(2003 年)。

[0004] 甲型流感病毒是正粘病毒家族的成员，具有广泛的宿主范围，包括人，马，狗，鸟和猪。它是一种有包膜的，负链 RNA 病毒，由一组 8 个 RNA 片段(缩写为 PB2，PBL，PA，HA，NP，NA，M 和 NS)组成，编码至少 10 个病毒蛋白。HA 片段编码血凝素蛋白(HA)。NA 片段编码神经氨酸酶(NA)。根据血清学分类，迄今已经确定 16 个 HA 亚型(标记为 HI-HI6)和 9 个 NA 亚型(标记为 N1-N9)。目前全球在人群中传播的甲型流感的亚型包括 H1N1，H1N2，和 H3N2 病毒；H5N1 和 H9N2 在鸟类如鸡中传播；H1N1 和 H3N2 病毒在猪群中传播。

[0005] 目前流感灭活疫苗是三价的，含 15 微克来自两个甲型流感(H1N1 和 H3N2)亚型和一个 B 型流感毒株的 HA。从他们在 20 世纪 40 年代引入临床应用，疫苗生产的基本技术和原则仍然是基本相同的。传统的智慧都集中在优化生产过程，以生产含有最大量 HA 蛋白的常规病毒制备。另外，流感疫苗的标准化完全基于 HA 含量。随着同一亚型内的传播病毒和为疫苗选择的病毒之间的抗原关联变得更遥远，疫苗的功效下降。对流感疫苗而言，世卫组织每年两次选育用于每年的季节性流感疫苗的三种病毒株。虽然选定的毒株通常与流行株抗原性相近，但是在一些年里，他们的抗原性不相近。因此，有必要生产能产生广谱保护免疫力的疫苗。对于 HIV-1，目前已经有 3 千 3 百万感染者，每一个藏有很大阵列的 HIV-1 准种，这将导致在一个在人群中同时接种并传播的巨大数字的变种。

[0006] 针对这个庞大阵列的潜在感染株来提供保护，是一个在疫苗研制方面的前所未有的挑战。令人惊讶的是，传统的化学灭活或活减毒的疫苗方法没有产生广谱的保护或安全的 HIV-1 疫苗。

[0007] FMDV 感染用于食品生产的动物，如牛，绵羊，山羊，和猪。FMDV 是一个非包膜病毒，二十面体对称，直径约 30nm，在体外极其不稳定。病毒灭活疫苗的功效高度依赖于病毒的完整性。140S 定量蔗糖密度梯度分析是量化病毒抗原的推荐方法，并在此基础上，制定疫苗。然而，完全基于 140S 量制定的口蹄疫病毒疫苗在生产中经常失败。登革热病毒(DENV)有四个血清型，引起登革热。它是一个单一的正链 RNA 病毒，属于黄病毒科。其基因组约 11000

个碱基，编码三个结构蛋白，衣壳蛋白C，膜蛋白M，包膜蛋白E；七个非结构蛋白，NS1，NS2A，NS2B，NS3，NS4A，NS4B，NS5。这种病毒的核苷酸替换率达到 $6.5X10^{-4}$ 每核苷酸每年，类似其他RNA病毒的速度。目前没有疫苗可用。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种疫苗，能够针对一种病毒产生至少部分的亚型间（inter-subtypic）或亚型内（intra-subtypic）的交叉免疫力。

[0009] 本发明的一个方面提供了一种疫苗。在一个实施例中，该疫苗包括一个病毒疫苗株的病毒抗原，其中所述病毒抗原来自病毒疫苗株的一个病毒制备，其中所述病毒疫苗株的病毒制备包含一个感染性病毒颗粒亚群，并且所述感染性病毒颗粒亚群表示为在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例；及其中所述感染性病毒颗粒亚群在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例超过一个预定阈值；因此，该疫苗提供针对与疫苗株不同的病毒株的至少部分的亚型间（inter-subtypic）或亚型内（intra-subtypic）的交叉免疫应答。

[0010] 本发明的另一个方面提供用于生产疫苗的方法。在一个实施例中，该方法包括提供一个病毒疫苗株的病毒制备，其中所述病毒疫苗株的病毒制备含有感染性病毒颗粒亚群，并且所述感染性病毒颗粒亚群表示为在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例；及其中所述感染性病毒颗粒亚群在所述病毒制备的总病毒颗粒或总病毒抗原中所占的比例超过一个预定阈值；从所述病毒制备获得一个病毒抗原；和将所述病毒抗原与一种生理上可接受的佐剂混合，制得疫苗，从而该疫苗提供针对与疫苗株不同的病毒株的至少部分的亚型间（inter-subtypic）或亚型内（intra-subtypic）的交叉免疫应答。

[0011] 本发明的另一个方面提供了用于免疫受试者的疫苗使用，其中所述疫苗针对一种病毒产生至少部分的亚型间（inter-subtypic）或亚型内（intra-subtypic）的交叉免疫力，以预防或治疗病毒感染。

具体实施方式

[0012] 可以通过引用以下的本发明的某些实施例的详细描述而更容易地理解本发明。

[0013] 在本申请中，为了更充分地描述本发明所涉及领域状态，当出版物被引用，这些出版物的公开内容的全部经引用而并入本申请。

[0014] 除非另有说明，在本发明的实践将采用分子生物学（包括重组技术），微生物学，细胞生物学，生物化学，核酸化学和免疫学的现有技术，这些是在本领域的技能之内。这些技术在文献中已有完全解释，如分子克隆：实验室说明书，第三版（Sambrook 和 Russel，2001年）；动物细胞培养（RI Freshmey 主编，1987 年版）；分子生物学当代程序（FM Ausubel 等主编，1987 年，包括补充至 2001 年）；免疫学当代程序（JE Coligan 等主编，1991 年）；免疫分析手册“（D.Wild 主编，斯托克顿出版社，纽约，1994 年）；免疫学分析方法（R.Masseyeff，WH Albert 和 NA Staines 等主编，Weinheim：VCH VERLAGS GESELLSCHAFT MBH，1993 年）。

[0015] 病毒在细胞内复制，因此病毒制备可以通过在例如鸡胚，体外组织，和培养细胞中增殖病毒来生产。例如，流感病毒在鸡胚和 Vero 细胞中增殖，用于生产流感疫苗；FMDV 在 BHK-21 细胞中增殖，用于生产 FMDV 疫苗。根据目前疫苗生产的教条，用于疫苗生产的流感

病毒制备在他们血凝分析上 HA 效价的基础上进行了优化，用于疫苗生产的 FMDV 制备在其 $TCID_{50}$ 滴度的基础上进行了优化。HA 滴度表示所有病毒粒子亚群的量，不考虑任何特定亚群的比例；$TCID_{50}$ 滴度仅代表感染性病毒颗粒亚群，而不考虑其在所有病毒粒子亚群中的比例。

[0016] 众所周知，一个病毒制备包含所有病毒颗粒亚群，例如感染性病毒颗粒的亚群和非感染性病毒颗粒亚群。在追求生产具有针对亚型间（Inter-subtypic）或亚型内（Intra-subtypic）毒株的广谱免疫力的病毒疫苗中，本发明的发明者发现，感染性病毒颗粒亚群在一个病毒制备中的比例是至关重要的，用于生产能产生广谱免疫力的疫苗，和进一步发现感染性病毒颗粒亚群在一个病毒制备中的比例可以通过例如优化培养条件来增加。本发明对为什么目前流感和 FMDV 疫苗不诱导亚型内（Intra-subtypic）或亚型间（Inter-subtypic）的交叉免疫力，以及为什么没有 HIV 或登革热疫苗，提供至少部分解释。更重要的是，本发明提供了一条原则，用于生产病毒疫苗，其能够诱导针对任何病毒感染的广谱的亚型内（Intra-subtypic）或亚型间（Inter-subtypic）的的交叉免疫力。

[0017] 本发明提供病毒疫苗，其包括一个得至于感染性病毒颗粒亚群占一个比例的病毒制备的病毒抗原，其中该比例是高于一个预定的值，每种病毒的比例预定值是特定的。本发明进一步提供用于制造此种疫苗的方法。

[0018] 在病毒的增殖中，同时产生感染性和非感染性的病毒颗粒，其中感染性颗粒指这些颗粒，其可以例如在基于细胞的空斑形成实验中形成空斑（即，空斑形成颗粒）或导致 CPE 或感染宿主时引起临床症状，非感染性颗粒指不能完成感染性颗粒的感染性功能的颗粒。此外，许多病毒片段和可溶性抗原同样在病毒增殖过程中产生。在本发明原则的最简单的应用中，测量病毒制备的两个参数，一个为感染性病毒颗粒亚群（例如表示为空斑形成单位（PFU），TCID50，EID50，LD50），另一个为总病毒颗粒（例如表示为 HA 滴度）或总病毒抗原（例如表示为 ELISA 读数，Western 印迹强度），然后基于这两个参数来计算感染性病毒颗粒亚群在病毒制备中的比例。在实践中，比例可以是任意值，只要当多个病毒制备被比较时，该值可以被用来显示感染性病毒颗粒亚群的比例的差异。这是唯一为了方便起见。如果条件许可，每个参数的绝对值都可以使用。感染性病毒颗粒亚群在病毒备中的比例是受操控的，例如，不同的培养条件，分离和提纯。在一个实施例中，对疫苗株，不同的接种剂量（例如，同样原料的不同稀释度）和不同培养时间段（比如，接种后 24，36，48，72 小时）用于病毒增殖，找出在所得病毒原料中产生最佳（例如，最高）感染性颗粒群的剂量和培养时间段，其中所得到的病毒原料用于制备疫苗或须进一步处理（例如，纯化，部分裂解）。在另一个实施例中，增殖后的病毒原料经物理分离（例如，梯度离心法），以便获得一小部分的病毒，它包含较高的感染性颗粒群。要注意的是，当初步研究已经确定在活病毒的病毒库被分离下含有较高的感染性颗粒群的部分，物理分离可以在病毒灭活后做，以尽量减少生物危害。在另一个实施例中，含有来自最佳增殖的最佳感染性颗粒群的病毒原料经进一步的物理分离，使感染性颗粒群进一步增加或丰富。显然，可以在一定程度上提纯感染性颗粒的任何过程都适合用于本发明。

[0019] 用于本发明的疫苗和药物组合物的病毒抗原中的感染性颗粒的富集增强交叉保护免疫应答的诱导。在不希望被任何特定理论所约束，本发明的理由在于：1）在病毒生产中，病毒颗粒由感染性和非感染性颗粒组成，其中感染性颗粒必须包含具有为了成功感染

的合适的受体结合表位的表面抗原，而非感染性颗粒可能会缺乏这类抗原；尽管在任何用于目前疫苗制造的病毒制备中，没有感染性颗粒的数据可用，我们的实验表明，从普通增殖条件(即高稀释度的接种剂量(100-10000 稀释)和长培养期(48-72 小时))所得到的流感病毒的病毒原料，在总的病毒颗粒中含有低百分比(小于 1％)的感染性颗粒；2)一个特定的病毒的细胞表面受体全然不发生变异或很少发生变异，这意味着，特定病毒例如流感病毒的不同亚型或血清型在其受体结合分子(即，表面抗原)应具有相同或基本相似的受体结合表位或域；表面抗原上的合适受体结合表位，更可能被一个特定病毒之内的不同亚型或血清型的感染性颗粒所共享。因此，目前疫苗的交叉保护的缺乏或无效可能是针对特异受体结合的抗原表位或域的抗体不足，因为存在于总病毒抗原中的小百分比的感染性颗粒上的受体结合表位或域可能被宿主的免疫系统所忽略。此外，如果增加感染性颗粒的百分比，它期望增加在总病毒抗原中合适受体结合决定簇或域的存在；当合适受体结合抗原表位或域的数目达到一个点，诱导足够的针对受体结合抗原表位或域的特异抗体反应，以便与不同的亚型或血清型作用，导致交叉保护。

[0020] 用于增加病毒制备中的感染性颗粒的含量的方法包括任何合适的方法。例如，合适病毒制备的选择可以通过用不同稀释度的种子病毒接种鸡胚或细胞，然后培养不同的时间段，然后测定总病毒抗原(例如，对 A 型流感病毒而言，血凝法或 HA 蛋白质含量)和传染性颗粒(例如，对 A 型流感病毒而言，细胞空斑法)，然后确定条件来生产合适病毒制备。另外，有理由相信感染性颗粒在物理上不同于其他颗粒或者不完整颗粒或可溶性抗原；因此有可能将感染性颗粒与病毒制备的其余部分分离，以获得用于疫苗的含有感染性颗粒较高量的病毒制备。理想的情况是，感染性颗粒可以特异地与病毒制备的其余部分分离。例如，感染颗粒的密度可以是特殊的，所以，可以使用梯度超离心以获得感染性颗粒富集的级分。显而易见的是，可以通过组合两种或两种以上的方法来获得最佳的病毒制备。

[0021] 如本文所用，“疫苗”指抗原制备，用于在个体中诱导免疫应答。疫苗可以有一个以上的抗原性成分。

[0022] 如本文所用，“非蛋白载体”指不是蛋白质的载体，并且可以用于实现流感矩阵和/或核蛋白的多聚体显示。

[0023] “佐剂”是指一种物质，其当添加到如抗原的免疫性试剂中，在接触到此混合物的个体中非特异性地增强或加强对免疫性试剂的免疫反应。

[0024] 术语“微载体”指的是颗粒组合物，不溶于水，并具有小于约 150，120 或 100 微米的大小，更常用的是小于约 50-60 微米，并且可以小于约 10 微米或甚至小于约 5 微米。微载体包括“纳米载体”，这是具有的尺寸小于约 1 微米的，优选小于约 500nm 的，微载体。微载体包括固相颗粒如从生物相容性的天然聚合物，合成聚合物或合成的共聚物形成的颗粒，虽然琼脂糖或交联琼脂糖形成的微载体可以被包括在或排除出此处微载体的定义，以及其他领域中已知的生物降解材料。

[0025] “个体”或“受试者”指脊椎动物，如禽类，优选为哺乳动物，如人类。哺乳动物包括，但不限于，人类，非人类灵长类动物，农场动物，运动动物，实验动物，啮齿动物(例如，小鼠和大鼠)和宠物。

[0026] 一种物质的“有效量”或“足量”指一个量，足以实现所希望的生物学效应，如有益的结果，包括临床结果，因此，“有效量”取决于物质被应用的环境。在本发明的范围中，包含

期望抗原的组合物的有效量的一个例子，是足够在个体诱导免疫应答的量。有效量可以给予一次或多次。“刺激”免疫应答，如体液或细胞免疫应答，指应答的增加，可能来自引发和/或增强应答。

[0027] 如本文所用，以及在本领域中所熟知，“治疗”是一种方法，用于获得有益的或预期的结果，包括临床结果。对于本发明的目的，有益的或预期的临床效果包括，但不限于，改善或缓解一种或多种症状，缩小感染程度，稳定（即，不恶化）感染状态，减轻或改善感染状态，并消失（部分或全部），是否检测或检测不到。“治疗”也可以意味着延长存活，相比于如果不接受治疗的预期生存期。

[0028] 根据本发明，疫苗组合物的“剂量”，指疫苗组合物在一个特定的时间点给药的量。“剂量”也可以是疫苗组合物的量，通过使用的缓释制剂和/或装置逐渐给药给动物。在本发明的某些实施例中，两个或更多个疫苗组合物的剂量在不同的时间点给予动物。

[0029] 根据本发明，流感病毒（例如，灭活流感病毒）的“免疫有效量”是流感病毒的量（通常在血细胞凝集单位或“HA 单元”表示），这将在处理过的动物中诱导针对后续的禽流感病毒的毒力株的攻击的完全或部分免疫力。完全或部分免疫力，可以通过观察评估，定量或定性，在禽流感病毒的毒力株的攻击后比较在接种疫苗的和未接种疫苗的动物上流感病毒感染的临床症状。当接种疫苗的动物遭受攻击后，与在未接种疫苗的动物遭受类似或相同的攻击后相比，观察到的流感病毒感染的临床症状被减少，减轻或消除，给予免疫动物的流感病毒的量被视为“免疫有效量”。

[0030] “交叉保护免疫应答”指防止毒株感染，其与用来引起的应答的毒株是不相同的；“交叉保护免疫应答”可能是亚型间（inter-subtypic）或亚型内（intra-subtypic）。

[0031] 除非另有定义，本文所用的所有技术和科学术语具有的含义，与本技术领域的普通技术人员所通常理解的含义相同。

[0032] 确定 HA 单位方法在本领域中是已知的。如本文所用，单位被定义为含流感病毒样品与红细胞结合时，导致可见血凝的最高稀释度的倒数。病毒包括，但不限于，流感病毒，HIVs，FDMV，登革热病毒，丙肝病毒，埃博拉病毒，麻疹病毒，副流感病毒，呼吸道合胞病毒，或任何病毒，其抗原表位在循环流行株中持续改变。这类病毒可包括，但不限于，副粘病毒（仙台病毒，副流感病毒，腮腺炎，新城疫病毒），麻疹病毒属（麻疹病毒，犬瘟热病毒，牛瘟病毒）；肺病毒（呼吸道合胞病毒，牛呼吸道病毒）；rhabdo 病毒（水泡性口炎病毒和狂犬病病毒）。

[0033] 流感病毒在细胞培养物的制造方法在本领域中是已知的。病毒可在哺乳动物，鸟类，或人源细胞中生长，如 Madin Darby 犬肾（MDCK），Vero 细胞，MDBK，CLDK，EBX 或 PERC6 细胞。对于口蹄疫病毒，BHK-21 细胞是合适的。

[0034] 病毒抗原的剂量在 0.1 和 60 微克之间，优选地在 3 和 30 微克之间，和最优选地在 5 和 15 微克之间。病毒抗原的形式可以是灭活病毒颗粒，分裂病毒抗原，病毒体或纯化的抗原。

[0035] 合适佐剂的非限制性例子包括角鲨烷和角鲨烯（或其他动物来源的油）；嵌段共聚物；洗涤剂如 Tween-80；奎尔甲，矿物油如 DRAKEOL 或用 Marcol，植物油如花生油；棒杆菌来源的佐剂，如棒状杆菌；丙酸 dznved 佐剂如痤疮丙酸杆菌，牛分枝杆菌（卡介苗或 BCG），白细胞介素如白细胞介素 2 和白介素 12，单核因子如白细胞介素 1，肿瘤坏死因子，干扰素

如作为 γ-干扰素；表面活性物质如十六烷基胺，十八烷基胺，十八烷基氨基酸酯，溶血卵磷脂，二甲基二甲基溴化铵，N，IV-dicoctadecyl 基 -N'，N'-双）2-羟基乙基-丙二胺），methoxyhexadecylglycerol，和普鲁兰尼克多元醇；多胺如吡喃，葡聚糖，聚 IC 的卡波普；肽，如胞壁酰二肽及其衍生物，二甲基甘氨酸，促吞噬素（tuftsin），油乳剂；及矿物凝胶，如磷酸铝，氢氧化铝或明矾；如皂苷-铝的氢氧化物或奎尔-甲铝的组合氢氧化脂质体；分枝杆菌细胞壁提取物，合成糖肽类，如胞壁酰二肽或其他衍生工具 Avridine；脂质 A 衍生物，葡聚糖硫酸酯；DEAE-葡聚糖或磷酸铝；如 CarbopoPEMA 羧基聚亚甲基丙烯酸共聚物的乳液如 Neocryl A640；牛痘或动物的的痘病毒蛋白质；子病毒粒子佐剂如霍乱毒素，或它们的混合物。

[0036] 单糖或双糖的衍生物，具有至少一个但不超过 N-1 个脂肪酸酯基团，选择地一个但不超过 N-1 个硫酸酯基团，其中 N 是得到该衍生物的单糖或双糖的羟基数目。蔗糖脂肪酸硫酸酯并入亚微米级的角鲨烷的水包油乳液。蔗糖脂肪酸硫酸酯的剂量是在 0.1 和 40 毫克之间。优选地，蔗糖脂肪酸硫酸酯的剂量是在 0.5 至 10 毫克之间。最优选地，脂肪酸蔗糖硫酸酯的剂量是在 0.5 和 4 毫克之间。角鲨烷的剂量是在 0.4 和 160 毫克之间。优选地，角鲨烷的剂量是在 1 和 40 毫克之间。最优选地，角鲨烷的剂量是在 2 和 16 毫克之间。

[0037] 本发明的治疗组合物可以配制在被治疗的对象可以容忍的赋形剂。此类赋形剂的例子包括水，盐水，林格氏（Ringer's）溶液，葡萄糖溶液，Hank 氏溶液，和其它含水生理平衡盐溶液。赋形剂也可以含有少量的添加剂，如增强等渗性和化学或生物稳定性的物质。缓冲液的例子包括磷酸盐缓冲液，碳酸氢盐缓冲液和 Tris 缓冲液，稳定剂的例子包括：A1/A2 稳定剂，来自钻石动物健康，得梅因，爱荷华州。

[0038] 在本申请的范围内，个体指鸟类和 / 或哺乳动物如，但不限于，猿，黑猩猩，猩猩，人类，猴子或驯养动物（宠物）如狗，猫，豚鼠，仓鼠，兔子，雪貂，牛，马，山羊和绵羊。禽类或鸟类。这里定义为类鸟类的任何温血脊椎动物成员，通常具有前肢改装成的翅膀，鳞片状的腿，喙和在硬壳鸡蛋中孵化后代。为了本发明的目的，优选地鸟类都是家养的鸡，火鸡，鸵鸟，鸭，鹅，天鹅，和康沃尔游戏母鸡。更优选地是家养的鸡和火鸡。以有效方式给予治疗性组合物的可接受方案包括个体剂量的大小，剂量的数量，剂量给药的频率，及管理模式。此类方案的决定可通过本领域技术人员完成，并且例子在此公开。管理或管理被定义为引入一种物质到个体的身体，包括口，鼻，眼，直肠，阴道和肠胃外的途径。组合物可单独或与其他药物组合可以通过任何给药途径给药，包括，但并不限于，皮下（SQ），肌肉内（IM），静脉（IV），腹腔内（IP），皮内（ID），通过鼻，眼或口腔粘膜（IN）或口服。

[0039] 在本发明的范围内，给予患者的剂量应该是在一个适当的时期内，足以在患者体内引起有益的应答。给予试剂的数量可能取决于受处理者，包括年龄，性别，体重和一般健康状况，其因素将取决于从业者的判断。本发明的免疫治疗组合物可用于预防性或治疗性地免疫动物如人类。然而，其他动物也在考虑之列，最好是脊椎动物，包括家养动物，如牲畜和伴侣动物。

[0040] 该疫苗可与其他的组合共同使用，例如，用减毒疫苗初免，接着用灭活疫苗加强。

[0041] 本发明涵盖所有含有抗原，佐剂，和药物上可接受的载体的药物组合物。

[0042] 在本发明中优选使用的药学上可接受的载体可包括无菌水溶液，非水溶液，悬浮液，和乳剂。非水溶剂的例子是丙二醇，聚乙二醇，植物油，如橄榄油，和可注射的有机酯，如

油酸乙酯。含水载体包括水，酒精 / 水溶液，乳剂或悬浮液，包括生理盐水和缓冲介质。肠外载体包括氯化钠溶液，林格氏葡萄糖，葡萄糖和氯化钠，乳酸林格氏或固定油。静脉载体包括流体和营养补充剂，电解质补充剂（如基于林格氏葡萄糖“，和类似物）。防腐剂和其它添加剂也可存在诸如，例如，抗微生物剂，抗氧化剂，螯合剂，和惰性气体等。实施例

[0043] 提供下面实施例的唯一目的是显示本发明的原则；它们丝毫没有打算作为本发明的限制。

[0044] I、流感病毒

[0045] 病毒株

[0046] 流感 A/swine/Guangdong/01/2002（H3N2）从中国南方健康猪中分离。在鸡胚胎中的病毒增殖 11 天龄胚卵用于病毒复制。卵被接种 0.2ml 病毒接种液，来自病毒原料的不同稀释度。在适当的温度下将接种的卵孵育标记时间期限。孵育期结束时，将胚胎通过冷却死亡和鸡蛋在 2-8℃贮存 12-60 小时。从冷冻的含胚卵收获尿囊液。

[0047] HA 实验和空斑形成实验

[0048] HA 实验和空斑形成实验在本领域中是公知的。鸡红血细胞被用于 HA 实验。MDCK 细胞被用于空斑形成实验。结果总结于表 1。PFU 被认为作为感染性颗粒的指标，其中 HA 滴度视为总血细胞凝集素蛋白的一个指标。对于计算，一个 HA 单元是等于 $5x10^6$ 的病毒粒子（血细胞凝集粒子（HAP））在当前的流感疫苗中，血凝素的含量是用于确定疫苗剂量的唯一指标。这里 PFU 与 HA 滴度（HAP）的比率被用于选择病毒原料来测试其作为疫苗的有效性。组接种 10^{-6} 稀释度，孵育 36 小时，产出第二最佳比率（但在 24 小时时，即使该比率是最高的，它有非常低的 HA 滴度；总抗原太低而不能在实践中使用），而一组接种 10^{-2} 稀释度，孵育 72 小时，产出最差比率（但它有最高的 HA，那将是最适合于当前的程序来制造流感疫苗），因此这两组被用于进一步的实验。

[0049] 表 1。

[0050]

稀释度	孵育时间	PFU	HA（HAP）	PFU/HAP
10^{-2}	24 小时	$5.73x10^7$	2^8 ($1.28x10^9$)	4.46%
10^{-6}	24 小时	$6.3x10^5$	0.67 ($3.35x10^6$)	18%
10^{-2}	36 小时	$3.12x10^7$	2^8 ($1.28x10^9$)	2.4%
10^{-6}	**36 小时**	**$4.15x10^7$**	**2^6 ($3.2x10^8$)**	**12.9%**
10^{-2}	48 小时	$1.8x10^7$	2^8 ($1.28x10^9$)	1.4%
10^{-6}	48 小时	$8.5x10^7$	2^{10} ($5.12x10^9$)	1.6%
10^{-2}	**72 小时**	**$5.7x10^6$**	**2^{11} ($1.02x10^{10}$)**	**0.05%**
10^{-6}	72 小时	$2.23x10^7$	2^9 ($2.56x10^9$)	0.87%

[0051] 血凝素蛋白或病毒蛋白的定量分析

[0052] SDS PAGE 凝胶被用来量化在病毒制备中的 HA 蛋白。酶联免疫吸附试验使用病毒

特异性血清用于定量。纯化

[0053] 首先澄清收获的尿囊液，中等速度离心（范围：4000-14000g）；然后再用蔗糖密度梯度离心分离；收集 35-55％部分用于疫苗制备。

[0054] 疫苗组合物和制备

[0055] 未处理的尿囊液或纯化的病毒，由 0.1％福尔马林灭活，然后与矿物油混合，以制取乳化疫苗。

[0056] 免疫接种：抗体酶联免疫吸附试验数据，HI 数据

[0057] 10 日龄雏鸡通过皮下途径在颈背部，免疫接种 500 微升乳化疫苗。攻毒前收集血清。

[0058] 对于血凝抑制（HI）实验，病毒悬浮液与连续（2 倍）稀释的血清样品孵育，血清样品预先用 cholerafiltrate(从霍乱弧菌培养获得)。随后，红细胞加入稀释液中，并温育后，显示完全抑制血凝的最大稀释度定义为 HI 抗体滴度。

[0059] 攻毒

[0060] 免疫后 20 天，接种疫苗的鸡被 H5N1 病毒株（$30LD_{50}$）攻击；攻击后 5 天，计算各组幸存的鸡。用 10^{-2} 稀释（72 小时）且纯化的和 10^{-6} 稀释（36 小时）且无纯化的病毒免疫接种的组对 H5N1 攻击表现为部分保护（分别为 5 或 7 的幸存者），但用 10^{-2} 稀释液（72 小时）且无纯化的病毒免疫接种的组对 H5N1 攻击没有表现出保护（0 幸存者）。

[0061] [0072]II、FMDV

[0062] 病毒

[0063] 选择一个口蹄疫病毒株的疫苗株（VS），因其快速增长和稳定性；两个口蹄疫病毒株被选定为攻毒株（CS1 和 CS2）。VS 与 CS1 的同源性为 97.3％，与 CS2 的同源性为 77.3％。所有病毒用常规条件和程序在 BHK-21 细胞中增殖。2、VS 根据不同的稀释和收获时间的 $TCID_{50}$，PFU 和 ELISA 结果 [0076]VS 工作种毒按照常规条件和程序在 BHK-21 细胞中制备，-80[度] 保存。VS 工作种毒稀释 100，1000，10，000，和 100，000 倍，感染 BHK-21 细胞，其中 CPE 在感染后的时间为 10，12，14，16，18，20 和 22 小时被记录，用于计算 $TCID_{50}$；每个样品冻融三次用于 PFU 滴度和 ELISA 实验。CPE，PFU 和酶联免疫吸附试验在本领域中是公知的。结果总结在下面的表 2 和表 3 中。$TCID_{50}$ 和 PFU 值代表感染病毒颗粒亚群，ELISA 效价代表总病毒颗粒或总病毒抗原；从而感染性病毒颗粒亚群与总病毒抗原的比例可以表达为 $TCID_{50}$ 或 PFU 与 ELISA 读数的比值。这里要注意的是，这个比例值是任意的，但它是非常有用的，在揭示哪一个病毒制备包含更大的感染性病毒颗粒亚群。如果这个任意的方法被恒定使用，感染性病毒颗粒亚群的比例的一个预定义的值可以用来选择条件，用于制备用于疫苗生产的病毒制备。另外，病毒制备中的总病毒抗原可以通过其他方法来确定，例如，纯化总的病毒抗原，病毒抗原的浓度可以通过任何已知的方法来确定。

[0064] 表 2、VS 的 $TCDD_{50}$ 和 ELISA 滴度

[0065]

接种后时间 (h)	VS 工作种毒接种的不同稀释度														
	10x			100x			1,000x			10,000			100,000		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
10	7.6	0.31	24	7	0.13		6.6	0.04	165	4.5	nd		4	nd	
12	7.5	nd		7.3	nd		6.6	nd		6	nd		4.5	nd	
14	6.6	0.35	18	7.6	0.24	31	7.5	0.1	75	6.5	0.03	210	4.5	nd	
16	7.5	0.44	17	8.5	0.27	31	8	nd		6.6	nd		5.3	nd	
18	8	0.40	20	8	0.32	25	8.5	0.22	38	8.3	0.11	75	5.6	nd	
20	7.5	0.42	17	7.5	0.35	21	7.6	nd		7.3	nd		6.6	nd	
22	7.3	0.43	16	7.5	0.35	21	7.5	0.28	26	7.6	0.17	44	6.3	0.05	126
注释：A 代表 $TCID_{50}$ 结果 (10^x/ml)；B 代表 ELISA 滴度 (OD450 读数减去对照读数)；C 代表 $TCID_{50}$ 值 与 ELISA 读数的比例.															

[0066] 表 3VS 的 PFU 和 ELISA 抗体滴度

[0067]

接种后时间 (h)	VS 工作种毒接种的不同稀释度														
	10x			100x			1,000x			10,000			100,000		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
10	3.5	0.31	11	4	0.13	30	2,5	0.04	62	0	nd		0	nd	
12	nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
14	5	0.35	14	3	0.24	12	2	0.1	20	0.35	0.03	116	0	nd	
16	nd	0.44		nd	0.27		nd	nd		nd	nd		nd	nd	

[0068]

18	6.5	0.40	16	8.5	0.32	26	8.5	0.22	38	1.5	0.11	13	0.05	nd	
20	nd	0.42		nd	0.35		nd	nd		nd	nd		nd	nd	
22	3	0.43	7	3.5	0.35	10	5	0.28	17	4	0.17	23	4.5	0.05	90
注释：A 代表 PFU 结果 (10^7/ml)；B 代表 ELISA 滴度(OD450 读数减去对照读数)；C 代表 PFU 值与 ELISA 读数的比例.															

[0069] 疫苗的制备，免疫和攻毒

[0070] 从表 2 和 3，选择了两个条件用于制造疫苗生产的病毒制备：稀释 10 倍和 1000 倍稀释；孵育 18 小时后收获。一些更稀的条件下产生高得多的比例值，这是事实，但过低的总病毒抗原（ELISA 读数为代表）。在实践中，在总病毒抗原的一个合理的产率和所希望的比例值之间需要平衡；如果产率太低，变得不经济。疫苗口蹄疫阴性猪免疫两次，间隔两个星期。第二次免疫接种后四个星期，CS1 或 CS2 攻毒，并观察 18 天。所有的实验遵循标准程序。结果总结如下。

[0071] 表 4、疫苗保护结果。

[0072]

疫苗	CS1 攻毒后保护	CS2 攻毒后保护
VS10x 稀释	100%	60%
VS1000x 稀释	100%	100%
阴性对照	0%	0%

[0073] 从表 4，在疫苗中的感染性病毒颗粒亚群的比例的增加，提供了针对更少的同源性病毒的更好的保护。

[0074] 尽管本发明参照特定的实施方式来描述，但是将被理解的是，实施例是说明性的，本发明的范围并不局限于此。本发明的替代实施例对本发明涉及的领域的普通技术人员将变得显而易见。这样的替代实施例都被认为是包含在本发明的精神和范围之内。因此，本发明的范围由所附的权利要求被描述，由前面的描述所支持。