

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97113719

※ 申請日期：97.4.15

※IPC 分類：A61K 39/45 (2006.01)
~~A61K, C07K~~

一、發明名稱：(中文/英文)

疫苗

VACCINE

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

比利時商葛蘭素史密斯克藍生物品公司

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A.

代表人：(中文/英文)

亞瑟 威廉 羅素 泰若

TYRRELL, ARTHUR WILLIAM RUSSELL

住居所或營業所地址：(中文/英文)

比利時羅克桑薩爾市研究院路89號

RUE DE L'INSTITUT 89, B-1330 RIXENSART BELGIUM

國 籍：(中文/英文)

比利時 BELGIUM

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 威廉 瑞普利 巴羅
BALLOU, WILLIAM RIPLEY
2. 艾曼紐 茱里斯 漢諾
HANON, EMMANUEL JULES

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 比利時 BELGIUM

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 英國；2007年04月20日；0707697.9
2. 英國；2007年06月12日；0711357.4
3. 英國；2007年06月21日；0712062.9
4. 專利合作條約；2007年10月10日；PCT/EP2007/060743
5. 英國；2007年12月18日；0724651.5

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於對人類進行免疫以抵抗流感疾病之流感免疫原性組合物及疫苗接種方案，其在醫藥中之用途，尤其為其在增加對各種抗原之免疫反應中之用途，且係關於製備方法。詳言之，本發明係關於流感疫苗，其包含流感病毒抗原或抗原性製劑以及水包油乳液佐劑，其中該水包油乳液佐劑包含可代謝油及乳化劑，及視情況之母育酚及/或固醇。

【先前技術】

流感病毒為世界上最普遍存在之病毒之一，其影響人類及家畜。流感導致顯著之經濟負擔、發病率及甚至死亡率。

流感病毒為具有直徑約125 nm之粒度的RNA包膜病毒。其係基本上由藉由具有脂質雙層結構及外醣蛋白之病毒包膜所包圍之與核蛋白相關聯的核糖核酸(RNA)之內部核鞘或核心組成。該病毒包膜之內層係主要由基質蛋白組成且外層通常由宿主衍生之脂質物質組成。流感病毒包含兩種表面抗原，即醣蛋白神經胺糖酸酶(NA)及血球凝集素(HA)，其在粒子表面處呈現為10至12 nm長之刺突。該等表面蛋白(詳言之為血球凝集素)決定流感亞型之抗原特異性。病毒病毒株根據宿主物種起源、地理位置及分離年份、序列號，且對於流感A而言，藉由HA及NA亞型之血清學特性來分類。已識別流感A病毒之16種HA亞型(H1-

H16)及9種NA亞型(N1-N9)[Webster RG等人, Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992;56:152-179; Fouchier RA等人, Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 2005;79:2814-2822)。已自水鳥回收所有HA及NA亞型之病毒,但自1918年起,僅3種HA亞型(H1、H2及H3)及2種NA亞型(N1及N2)在人群中建立穩定譜系。僅識別流感B病毒之一種HA亞型及一種NA。

流感A病毒進化且經歷連續抗原可變性[Wiley D, Skehel J. The structure and the function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* 1987;56:365-394]。缺乏藉由病毒RNA聚合酶之有效校對引起高速率之轉錄誤差,其可造成表面醣蛋白中之胺基酸取代。此稱為"抗原漂移"。區段化病毒基因組允許第二類型之抗原變異。若2種流感病毒同時感染宿主細胞,則稱為"抗原轉移"之遺傳重分配可產生具有新表面或內部蛋白之新穎病毒。該等抗原改變,即'漂移'及'轉移'均為不可預知的,且自免疫學觀點而言具有顯著影響,因為其最終導致新流感病毒株之出現且使得病毒能逃避免疫系統,引起幾乎每年發生之熟知流行病。該等遺傳修飾已引起導致在人類中之大流行的新病毒變異體。

流感B病毒抗原漂移比在A病毒株中之抗原漂移頻率更小,且抗原轉移係未知的。儘管流感B之抗原性相異譜系

(通常為2個，例如B/山形及B/維多利亞)可偶而以各年之間及各國家之間變化之比例共流行，但流感疫苗通常僅含有一種流感B病毒株。

HA為界定不同流感病毒株之血清特異性的最重要抗原。該75-80 kD之蛋白含有許多抗原決定子，其中若干處於經歷不同病毒株之序列改變的區域中(病毒株特異性決定子)且其他抗原決定子處於為許多HA分子所共有之區域中(共有決定子)。

流感病毒幾乎每個冬季均引起流行病，對於A或B型病毒而言，感染速率經6週時期高達40%。流感感染產生自亞臨床感染至輕度上呼吸道感染直至嚴重病毒性肺炎之各種疾病病況。典型流感流行病引起肺炎及下呼吸道疾病之發生率增加，如住院治療或死亡率之增加率所見證。疾病之嚴重程度主要由宿主年齡、其免疫狀況及感染位點來決定。

65歲及以上之老年人尤其易受影響，其在發達國家中在所有流感相關死亡中之佔有率達80%-90%。具有潛伏慢性疾病或具有受損免疫反應之個體亦極可能經歷該等併發症。幼小嬰兒亦可遭受嚴重疾病。該等群體因此尤其需要受保護。除該等'冒風險'群體以外，衛生當局亦推薦對保健提供者進行疫苗接種。

在控制每年之流感流行病中，疫苗接種起關鍵作用。當前可用之流感疫苗為失活或活的減毒流感疫苗。失活流感疫苗包含三種可能形式之抗原製劑：失活完整病毒；亞病

毒粒子，其中純化病毒粒子經清潔劑或其他試劑破壞以溶解脂質包膜(所謂"裂解"疫苗)；或純化HA及NA(亞單位疫苗)。該等失活疫苗係經肌肉內(i.m.)、皮下(s.c)或鼻內(i.n.)給予。

所有種類用於大流行病間期用途之流感疫苗通常為三價疫苗。其通常含有衍生自兩種流感A病毒病毒株及一種流感B病毒株之抗原。如由單向輻射免疫擴散法(single radial immunodiffusion, SRD)所量測，標準0.5 ml可注射劑量在大多數狀況下含有(至少)15 µg來自各病毒株之血球凝集素抗原組份(J.M. Wood等人：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等人，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)。亦已報導四價疫苗，其含有除三種經典病毒株以外之額外B病毒株(*Commun Dis Intell* 2006, 30, 350-357)或額外H3N2病毒株(*Vaccine* 1992, 10, 506-511)。

各季欲併入流感疫苗中之大流行病間期流感病毒病毒株係由與國家衛生當局及疫苗製造商合作之世界衛生組織(World Health Organisation)來確定。當前可用之大流行病間期流感疫苗在所有年齡群體中均視為安全的(De Donato

等人，1999, *Vaccine*, 17, 3094-3101)。

然而，疫苗功效係因受者之年齡及免疫狀況及疫苗與流行流感病毒株之間的匹配而受影響。幾乎無跡象表明當前之流感疫苗在2歲以下小孩中起作用。此外，預防典型確認流感疾病之經報導疫苗功效率對於老年人而言為23%-72%，其顯著低於對於年輕成年人所報導之60%-90%功效率 (Govaert, 1994, *J. Am. Med. Assoc.*, 21, 166-1665 ; Gross, 1995, *Ann Intern. Med.* 123, 523-527)。已展示流感疫苗之有效性與血球凝集抑制(HI)抗體對病毒病毒株之血清效價有關，且若干研究已發現老年成年人在流感免疫後顯示比年輕成年人較低之HI效價 (Murasko, 2002, *Experimental gerontology*, 37, 427-439)。

作為背景而言，在大流行病間期，流行之流感病毒係與來自先前流行病之彼等流感病毒有關。該等病毒在生命早期以不同感染免疫性水平在人群之間傳播。該流行通常歷經2-3年時期而促使新病毒株之選擇，該等新病毒株已發生足夠改變以在普通群體中再次引起流行病；該過程係稱為'抗原漂移'。儘管歷經若干年，'漂移變異體'之總體影響常係類似的，但其在任何一年內在不同社區、地區、國家或洲中可具有不同影響。典型流感流行病引起肺炎及下呼吸道疾病之發生率增加，其如由住院率或死亡率之增加率所見證。老年人或具有潛伏慢性疾病之彼等人最有可能經歷該等併發症，但幼小嬰兒亦可遭受嚴重疾病。

每隔一段不可預知之時間，新穎流感病毒伴隨完全不同

於前一季流行之病毒株之亞型的關鍵表面抗原(血球凝集素)而出現。此時，所得抗原可自先前在人類中流行之病毒株的相應蛋白變化20%至50%。稱為"抗原轉移"之該現象可產生逃避'族群免疫'之病毒且造成大流行病。換言之，當人群對其不具有免疫性之新流感病毒出現時，發生流感大流行病。據認為，至少過去之大流行病在當來自不同物種之流感病毒(諸如禽類或豬流感病毒)已跨越物種障壁時發生。若該等病毒具有在人與人之間傳播之潛能，則其可在幾個月至一年內傳播至全世界範圍，導致大流行病。舉例而言，在1957年(亞洲型流感大流行(Asian Flu pandemic))，H2N2亞型病毒替代H1N1病毒，該H1N1病毒已至少自1918年該病毒首次分離以來即在人群中流行。H2 HA及N2 NA在1957年與1968年間經歷抗原漂移，直至1968年(香港型流感大流行(Hong-Kong Flu pandemic))因出現H3N2流感亞型而替代HA，其後N2 NA繼續與H3 HA一起漂移(Nakajima等人，1991, *Epidemiol. Infect.* 106, 383-395)。

已執行若干臨床研究以評估在未經預致敏群體中之安全性及免疫原性，其中單價候選疫苗含有大流行病毒株，諸如非流行性H2N2或H9N2病毒株。研究已調查在具有或不具有羆佐劑化之情況下，各種HA濃度(每劑量1.9、3.8、7.5或15 μg HA)之裂解或完整病毒調配物。H2N2亞型流感病毒自1957年流行直至1968年，此時其經'香港型大流行病'期間之H3N2病毒株而置換。當今，1968後出生之個體對

H2N2病毒株係天然免疫性的。該等疫苗候選者已展示為免疫原性及良好耐受的。結果報導於Hehme, N等人2002, *Med. Microbiol. Immunol.* 191, 203-208；Hehme N.等人2004, *Virus Research* 103, 163-171中；且，兩項研究以H5N1進行報導 (Bresson JL等人 *The Lancet.* 2006:367 (9523):1657-1664；Treanor JJ等人 *N Engl J Med.* 2006;354:1343-1351)。其他研究已報導經MF59佐劑化之流感疫苗的結果。一項研究已報導，兩劑量之經MF59佐劑化之H5N3流感疫苗在經預致敏群體中加強對流感H5N1之免疫性 (Stephenson等人, *Vaccine* 2003, 21, 1687-1693)，且另一項研究已報導在三劑量之經MF59佐劑化之流感H5N3疫苗後所獲得之交叉反應性抗體對H5N1病毒的反應 (Stephenson等人, *J. Infect. Diseases* 2005, 191, 1210-1215)。

在流感大流行狀況下存在風險之人可由於季節性流感而不同於對併發症而言之確定風險群體。根據WHO，50%之人類病例係由在20歲以下人體中出現之禽流感病毒株H5N1引起，90%發生在年齡小於40歲之彼等人體中。(WHO, weekly epidemiological record, 2006年6月30日)。

在大流行病期間，抗病毒藥物可能不足夠符合或不有效符合需求，且存在流感風險之個體數量將大於大流行病間期，因此有必要研發具有大量產生潛能且具有有效分布及投藥潛能之合適疫苗。一種方式為快速釋放用於產生大流行流感疫苗之一些生產能力。然而，因為大量疫苗接種將

僅在大流行病發作之後開始，所以無論如何，其均將產生因識別病毒株及產生第一批量所需之時間而導致之重要延遲。此外，疫苗製造商每週存在固定及因此有限之輸出量。此意謂，當前方法將幾乎必然在大流行病來襲時在全世界範圍內留下大部分未受保護之群體。可用疫苗對於大部分群體而言將太遲，且死亡率預期較高，估計全世界1.8-3.6億人死亡。

一種解決該當前困境之方式為，在大流行之前產生大流行病疫苗，且設計具有"最佳候選大流行病病毒株"之單價疫苗替代三價疫苗，以試圖降低疫苗體積，主要因為可能必要兩劑量之疫苗以達到在天然免疫受者中之保護性抗體水平(Wood JM等人*Med Microbiol Immunol.* 2002;191:197-201, Wood JM等人*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001;356:1953-1960)。該疫苗隨後可用於儲存或在大流行病間期用於預致敏人群。

不幸地，因為當前生產設施完全因用於北半球及南半球之每年疫苗接種之季節性三價疫苗的產生而整年消耗，所以上述兩種方法均係不可行的，因為不存在產生彼"最佳候選大流行病病毒株"之額外生產能力。另外，應注意，急需尋找對付大流行病間期流感疫苗短缺之解決方案，該短缺在每年流感季節期間經常性地遇到。一種解決方案可為建立額外生產能力，然而其將需要若干年之建構，其無論如何均不足以作為應付下一年大流行病來襲之方法。

目前，快速獲得額外能力之解決方式將為縮短用於每年

三價疫苗之生產時間。在大多數國家，每一季節均發生流感疫苗之週期性短缺，其排除對於發展嚴重流感疾病及併發症而言視為高風險之群體的最佳保護。因為抗原產生為流感疫苗生產中之限速因素，所以必需探究替代性抗原節省策略。

一些方法依賴於佐劑化，其目的在於增加疫苗之免疫原性以能夠降低抗原含量(抗原節省)且因此增加可用疫苗劑量之數量。佐劑之使用亦可克服天然群體中抗原之潛在弱免疫原性。已公開若干方法。已使用經鋁鹽佐劑化之完整失活H2N2或H9N2病毒(N. Hehme等人Virus Research 2004, 103, 163-171)或使用普通亞病毒粒子H5N1疫苗或經氫氧化鋁佐劑化之裂解病毒H5N1疫苗(Bresson JL等人The Lancet. 2006;367 (9523):1657-1664；Treanor JJ等人N Engl J Med. 2006;354:1343-1351)展示實例。該後者試驗之結果指示，普通及經佐劑化H5N1病毒疫苗在至多90 µg之抗原劑量下係安全的(僅作為普通亞病毒粒子疫苗進行測試)。然而，使用該高劑量之抗原與在大流行病狀況下必需賦予之抗原節省策略不可相容。呈水包油乳液形式之經佐劑MF59佐劑化之亞單位流感疫苗為市售的以用於老年人及風險群體，且已證明其誘導比以未經佐劑化亞單位疫苗所獲得之效價更高之抗體效價的能力(De Donato等人1999, Vaccine, 17, 3094-3101)。然而，在近期公開案中，相同疫苗未證明其與未經佐劑化裂解疫苗相比之改良概況(Puig-Barbera等人，2004, Vaccine 23, 283-289)。

因此仍需要有效且同時解決抗原節省考慮因素之新疫苗。該等新疫苗將具有尤其抵抗弱或非免疫原性大流行病病毒株，或用於諸如老年人群體之免疫受損個體之可接受(若非改良)免疫原性。該等新疫苗亦將理想地具有交叉保護潛能，以便其可用作大流行病前之疫苗或儲存疫苗，以預致敏天然免疫群體而在宣布大流行病之前或之後抵抗大流行病病毒株。

【發明內容】

本發明者已發現，為改良流感疫苗之供應，可研發含有佐劑之新穎有效免疫原性流感調配物，因此使得可使用較低量之流感抗原。在此提供新穎佐劑化組合物，其使得抗原節省調配物就細胞介導之免疫反應及/或體液反應而言可提供對所有年齡群體之充分保護。

本發明者尤其已發現可依賴於免疫原性流感組合物，該等組合物之特徵在於，免疫原性組合物中之佐劑的每一或所有個別組份均具有與先前認為適用者相比更低之含量。其具有維持抵抗抗原之免疫原性水平同時降低宿主受者體內之反應原性的優點。

因此，在本發明之第一態樣中，提供呈適於人類用途之劑量體積之免疫原性流感組合物，詳言之為疫苗，其包含流感病毒抗原或抗原性製劑以及水包油乳液佐劑，其中該水包油乳液佐劑包含可代謝油及乳化劑，及視情況之母育酚及/或固醇，且其中該可代謝油係以低於11 mg之含量存在於該人類劑量中，且該乳化劑係以低於5 mg之含量存在

於該人類劑量中。當存在時，該母育酚及/或固醇係以低於12 mg之含量存在於該人類劑量中。合適地，每劑量每病毒株之流感抗原的量為15 μg HA或諸如小於15 μg HA之低量。

在另一態樣中，本發明提供一種疫苗套組，其包含流感病毒抗原組份或流感病毒抗原性製劑組份、視情況之低量抗原組份，且另外包含用於伴隨或連續投藥之如本文中所述定義之佐劑。

在第三態樣中，本發明提供一種生產用於大流行病情形、大流行病前之情形或大流行病間期(季節性)情形之流感免疫原性組合物的方法，該方法包含將流感病毒抗原或其抗原性製劑與如本文中所述定義之水包油乳液佐劑混合。詳言之，本發明提供一種生產流感疫苗之方法，該方法包含將佐劑化免疫原性物與醫藥學上可接受之賦形劑混合，且提供每劑量含有至多15 μg 流感血球凝集素抗原之疫苗單位的步驟。流感病毒可為卵衍生、植物衍生、細胞培養物衍生的，或可為重組產生的。合適地，流感病毒抗原為卵衍生或細胞培養物衍生的。

在第四態樣中，提供一種如本文中所述定義之免疫原性組合物或疫苗，其適用於治療或預防藉由流感感染引起之疾病。在相關態樣中，本發明提供流感病毒抗原或其抗原性製劑及如本文中所述定義之水包油乳液在製造用於保護以抵抗藉由流感病毒引起之感染或疾病之免疫原性組合物(例如疫苗)中的用途。

在又一態樣中，提供(a)如本文中所定義之低量來自流感病毒株的流感病毒抗原或其抗原性製劑及(b)如本文中所定義之水包油乳液佐劑在製造免疫原性組合物或套組中之用途，該免疫原性組合物或套組與由未經佐劑化組合物所獲得之反應相比，在人類中誘導抵抗該病毒抗原或抗原性組合物之以下反應中的至少一者：i)改良之CD4 T細胞免疫反應，ii)改良之B細胞記憶反應，iii)改良之體液反應。

在另一態樣，提供一種如上文所定義之用於保護以抵抗藉由流感病毒引起之感染或疾病的方法或用途，該流感病毒為免疫原性組合物中之抗原衍生自其之病毒的變異體。在另一實施例中，提供一種如上文所定義之用於保護以抵抗藉由病原體引起之流感感染或疾病的方法或用途，該病原體包含作為免疫原性組合物中之彼抗原之變異體的抗原。

本發明亦係關於一種疫苗接種之方法，其包含傳遞抗原及如本文中所定義之水包油乳液佐劑。

本發明之其他態樣及優點在其較佳實施例之以下實施方式中進一步描述。

【實施方式】

本發明者已發現佐劑組合物(其包含可代謝油及乳化劑，及視情況之母育酚及/或固醇，其中各組份係以每人類疫苗劑量比先前所用更低之含量存在)可改良對流感製劑之免疫反應，而同時比其中每人類劑量中佐劑組份以較高含量(合適地，高出2倍或2倍以上)存在之某些先前技術

調配物具有更低之反應原性。

本發明者另外已發現流感調配物(其包含流感病毒或其抗原性製劑以及如本文中所述之佐劑，且視情況另外連同諸如脂質A衍生物(諸如3D-MPL)之免疫刺激劑)能夠i)與以未經佐劑化之病毒或其抗原性製劑所獲得者相比，改良抵抗該抗原或抗原性組合物之CD4 T細胞免疫反應及/或體液免疫反應，及/或ii)產生可與以經其中各組份以較高(合適地，高出2倍或2倍以上)含量存在之佐劑佐劑化之組合物所獲得者相當的抵抗該抗原或抗原性組合物之CD4 T細胞免疫反應及/或體液免疫反應。經佐劑佐劑化之調配物有利地用以誘導能夠偵測藉由MHC II類分子呈現之流感抗原決定基之抗流感CD4-T細胞反應。本申請者已發現，其有效靶向細胞介導之免疫系統以增加抵抗同源及漂移流感病毒株(疫苗接種及感染後)之反應性。

本發明之特定實施例為，適用於本發明之組合物能夠在人類中提供以下之一或兩者：(i)與未經佐劑化之組合物相比，在再疫苗接種後抵抗流感之更佳血清保護，及(ii)與其中各組份以較高含量存在之經佐劑化組合物相比，在再疫苗接種後抵抗流感之相當血清保護，其係如藉由滿足保護之任何、若干或所有流感關聯物(亦即血清轉化率、轉化因子、保護率)之人類受檢者的數目來評估。此外，另一特定實施例為，適用於本發明之組合物亦將能夠誘導以下之一或兩者：(i)與未經佐劑化之組合物相比，在人類受檢者首次疫苗接種後更高之B細胞記憶反應，及在再疫苗

接種後更高之體液反應，及(ii)與其中各組份以較高(合適地，高出2倍或2倍以上)含量存在之經佐劑化組合物相比，在人類受檢者首次疫苗接種後相當之B細胞記憶反應，及在再疫苗接種後相當之體液反應。

根據本發明之經佐劑化流感組合物具有若干優點。該等優點可藉由與等效未經佐劑化組合物相比，或藉由與其中各佐劑組份以較高含量存在之經佐劑化組合物相比來評估：

- 1) 與未經佐劑化組合物相比經改良之免疫原性，藉此允許任何或所有以下各者：i) 將對於較少免疫原性流感病毒株之弱免疫反應改良至與由未經佐劑化調配物所獲得者相比更高之水平；ii) 將諸如老年人(50歲以上，通常為65歲以上)之特定群體中的弱免疫反應恢復至在年輕人中所見之水平(抗體及/或T細胞反應)；
- 2) 使用佐劑可克服天然群體或幼小嬰兒(6個月至4歲之間，尤其為1歲以下兒童)中之抗原的潛在弱免疫原性，且誘導預致敏及保護作用；
- 3) 除提供與經典疫苗(例如市售裂解疫苗)相比至少等效之抵抗疫苗病毒株的保護以外，其可藉由產生允許建立交叉預致敏策略之改良交叉保護概況：增加之交叉反應性、抵抗變異體(漂移)流感病毒株之交叉保護作用而賦予抵抗漂移病毒株之額外保護層；其受到特殊關注，其中其可用作大流行病前之疫苗，進一步使得增強抵抗(流行)大流行病病毒株之保護僅需要一劑量

之大流行病疫苗；其亦受關注係因為其可解決傾向於比在其他大流行病間期A病毒株H1N1中更快出現之H3N2漂移的問題；

- 4) 與由其中各組份以較高(合適地，高出2倍或2倍以上)含量存在之組合物所獲得之彼概況相比，經佐劑化組合物之降低反應原性概況，同時維持令人滿意之免疫原性潛能。

藉由進一步以降低之抗原劑量(通常低於15 μg /病毒株/劑量)及降低之佐劑劑量達到任何或所有該等優點，此將確保在緊急狀況下或用於大流行病情形(在大流行病情形下之抗原節省)之製備性的增加之能力，且在大流行病疫苗接種季節間期提供更高數量之群體可用疫苗劑量的可能性。

藉由依賴於降低之抗原劑量及/或降低之佐劑劑量的組合，其將使得可研發諸如四價疫苗之更複雜流感組合物，該四價疫苗包含第四病毒株，其可為待添加至標準三價疫苗中之第二流感B病毒株或大流行病流感病毒株。

在本發明之另一態樣中，如本文中所定義之經佐劑化免疫原性組合物證明關於流感特異性(視情況為交叉反應性)CD4之抗體產生及疫苗接種後頻率兩者的免疫原性結果，其係大於或等於分別以未經佐劑化疫苗或以經其中佐劑組份以較高含量存在之佐劑佐劑化之疫苗所產生的彼等結果。該效應在兒科群體或老年人群體中尤其重要，其允許比當前商用疫苗更高之功效，同時與接收其中佐劑組份

具有更高(合適地，高出2倍)量之經佐劑化疫苗的群體相比，展示更低或更少之反應原性症狀。

水包油乳液佐劑

根據本發明之佐劑為乳液，詳言之為水包油乳液，且可視情況包含其他免疫刺激劑。詳言之，乳液系統之油相包含可代謝油。術語可代謝油之含義在此項技術中為熟知的。可代謝可定義為"能夠藉由新陳代謝轉變"(Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 第25版(1974))。油可為任何植物油、魚油、動物油或合成油，其對受者而言不具毒性且能夠藉由新陳代謝轉變。堅果、種子及穀物為植物油之普通來源。合成油亦為本發明之部分，且可包括市售油，諸如NEOBEE®及其他者。尤其合適之可代謝油為角鯊烯。角鯊烯(2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳己烯)為不飽和油，其可大量存在於鯊魚肝油中，而在橄欖油、麥胚芽油、米糠油及酵母中之量較少，且其為適用於本發明之油。角鯊烯由於其係膽固醇生物合成中之中間物而為可代謝油(Merck索引，第10版，登記號8619)。

水包油乳液本身在此項技術中為熟知的，且已建議適用作佐劑組合物(EP399843B)；亦已將水包油乳液與其他活性劑之組合描述為用於疫苗之佐劑：WO 95/17210；WO 98/56414；WO 99/12565；WO 99/11241；WO 2006/100109；WO 2006/100110；WO 2006/100111，其揭示以角鯊烯、 α -生育酚及TWEEN 80為主，視情況經免疫刺激劑

QS21及/或3D-MPL調配之乳液佐劑。已描述其他基於水包油乳液之佐劑，諸如揭示於WO 90/14837；WO 00/50006；WO 2007/080308；WO 2007/006939中之彼等佐劑，其全部形成油乳液系統(尤其當以角鯊烯為主時)以形成本發明之替代性佐劑及組合物。

在特定實施例中，水包油乳液包含可代謝、無毒油，諸如角鯊烷或角鯊烯；視情況之母育酚，諸如生育酚，詳言之為 α 生育酚(且視情況為角鯊烯與 α 生育酚)；及乳化劑(或界面活性劑)，諸如非離子性界面活性劑TWEEN 80™或聚山梨醇酯80。在特定實施例中，油乳液另外包含諸如膽固醇之固醇。

母育酚(例如維生素E)亦常用於油乳液佐劑中(EP0382271B1；US 5667784；WO95/17210)。用於本發明之油乳液(視情況為水包油乳液)之母育酚可如EP0382271B1中所述來調配，原因在於母育酚可為直徑視情況小於1微米之母育酚小液滴(視情況包含乳化劑)之分散液。或者，母育酚可與另一種油組合使用，以形成油乳液之油相。可與母育酚組合使用之油乳液的實例係描述於本文中，諸如上文所述之可代謝油。

產生水包油乳液之方法對於熟習此項技術者而言為熟知的。通常，該方法包含將油相與諸如PBS/TWEEN80™溶液之界面活性劑混合，接著使用均質器均質化，對於熟習此項技術者而言明顯的係，包含使混合物兩次通過注射器針頭之方法將適合於均質化小體積之液體。同樣地，在微流

化器(M110S微流化機器，在6巴之最大壓力輸入(出口壓力約850巴)下，最多通過50次，歷時2分鐘之時期)中之乳化方法可由熟習此項技術者修改以產生較小或較大體積之乳液。修改可藉由包含量測所得乳液直至以所需直徑之油小液滴實現製備的常規實驗來實現。

在水包油乳液中，油及乳化劑應處於水性載劑中。水性載劑可為(例如)磷酸鹽緩衝生理食鹽水。

如藉由光子相關光譜法所量測，穩定水包油乳液中所見之油小液滴之尺寸視情況小於1微米，可在大體上30-600 nm之範圍內，視情況直徑大體上為30-500 nm左右，且視情況直徑大體上為150-500 nm，且直徑尤其為約150 nm。就此而言，以數量計80%之油小液滴應在該等範圍內，以數量計視情況大於90%且視情況大於95%之油小液滴在所定義之尺寸範圍內。

本發明之關鍵態樣為，存在於免疫原性組合物之佐劑中的組份具有比先前認為適用者更低之量，合適地，每人類劑量之免疫原性組合物，低於11 mg之可代謝油(諸如角鯊烯)，例如在0.5-11 mg、0.5-10 mg或0.5-9 mg之間，及低於5 mg之乳化劑(合適地，諸如聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯)，例如在0.1-5 mg之間。存在時，合適母育酚(例如 α -生育酚)係為低於12 mg，例如在0.5-12 mg之間。本發明之佐劑組合物包含水包油乳液佐劑，合適地，該乳液包含0.5-10 mg之間量的可代謝油，及0.4-4 mg之間量的乳化劑，及視情況0.5-11 mg之間量的母育酚。合適地，該

乳液具有油小液滴，以強度計，該等油小液滴之至少70%，合適地為至少80%具有小於1 μm 之直徑。

本發明因此提供人類劑量之經佐劑化免疫原性組合物，其中該佐劑包含水包油乳液佐劑，其包含每人類劑量低於11 mg含量之可代謝油，合適地為角鯊烯，合適地，每人類劑量包含0.5-11、0.5-10、0.5-9、1-10、1-11、2-10、4-8或4.5-5.5(例如2-3、5-6或9-10 mg)之間的可代謝油。在另一實施例中，本發明提供人類劑量之經佐劑化免疫原性組合物，其中該佐劑包含水包油乳液佐劑，其包含每人類劑量低於5 mg含量之乳化劑，合適地為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯(諸如Tween 80或聚山梨醇酯80™)，合適地，每人類劑量包含0.1-5、0.2-5、0.3-5、0.4-5、0.5-4、1-2或2-3 mg(例如0.4-1.2、2-3或4-5 mg)之間的乳化劑。在又一實施例中，本發明提供人類劑量之經佐劑化免疫原性組合物，其中該佐劑另外包含每人類劑量低於12 mg含量之母育酚，合適地為 α -生育酚，合適地，每人類劑量包含0.5-12、10-11、1-11、2-10、4-9、5-7 mg(例如10-11、5-6、2.5-3.5、1-2或1-3 mg)之間之母育酚。

合適地，根據本發明之人類劑量之佐劑免疫原性組合物為其中水包油乳液佐劑包含以下各者之組合物：4.5-5.5或5-6 mg可代謝油(合適地為角鯊烯)、5-7 mg母育酚(合適地為 α -生育酚)及2-3 mg乳化劑，該乳化劑可為非離子性界面活性劑(合適地為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯，諸如Tween 80™或聚山梨醇酯80™)。根據另一合適實施例，

根據本發明之人類劑量之佐劑免疫原性組合物為其中水包油乳液佐劑包含以下各者之組合物：2-3 mg可代謝油(合適地為角鯊烯)、2.5-3.5 mg母育酚(合適地為 α -生育酚)及1-1.5 mg乳化劑(合適地為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯，諸如 Tween 80™或聚山梨醇酯 80™)。在又一實施例中，根據本發明之人類劑量之佐劑免疫原性組合物為其中水包油乳液佐劑包含以下各者之組合物：0.5-1.5 mg可代謝油(合適地為角鯊烯)、0.5-1.5 mg母育酚(合適地為 α -生育酚)及0.25-0.75 mg乳化劑(合適地為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯，諸如 Tween 80™或聚山梨醇酯 80™)。在一些狀況下，有利的可為，本發明之疫苗將另外含有穩定劑。

術語"人類劑量"意謂流感組合物劑量(在將佐劑及抗原組份混合之後)，其係以適於人類用途之體積傳遞。通常，其在0.25與1.5 ml之間。在一實施例中，人類劑量為約0.5 ml。在另一實施例中，人類劑量高於0.5 ml，例如為約0.6、0.7、0.8、0.9或約1 ml。在另一實施例中，人類劑量在1 ml與1.5 ml之間。在另一實施例中，尤其當免疫原性組合物用於兒科群體時，人類劑量可小於0.5 ml，例如在0.25與0.5 ml之間，或精確地為0.1 ml、0.2 ml、0.25 ml、0.3 ml或0.4 ml。本發明之特徵在於，免疫原性組合物內之佐劑之每一或所有個別組份均處於比先前認為適用更低之含量且通常如上文所述。詳言之，合適組合物在人類劑量之最終體積(合適地為約0.5 ml或約0.7 ml)中包含以下量

之以下水包油(o/w)佐劑組份(表1)：

表1A-根據本發明之特定以o/w乳液為主之佐劑

	佐劑A	佐劑B	佐劑E	佐劑F	佐劑C	佐劑H	佐劑G	佐劑D
o/w乳液*	125 µl	100 µl	83.33 µl	62.5 µl	50 µl	41.67 µl	31.25 µl	25 µl
組份：								
生育酚(mg)	5.94 (5.6-6.2)	4.75 (4.5-5.0)	3.96 (3.8-4.2)	2.97 (2.8-3.1)	2.38 (2.3-2.5)	1.98 (1.9-2.1)	1.49 (1.4-1.6)	1.19 (1.1-1.25)
角鯊烯(mg)	5.35 (5.1-5.6)	4.28 (4.1-4.5)	3.57 (3.4-3.75)	2.68 (2.5-2.8)	2.14 (2.0-2.25)	1.78 (1.7-1.9)	1.34 (1.3-1.4)	1.07 (1.0-1.1)
聚山梨醇酯 80 或 Tween 80(mg)	2.43 (2.3-2.6)	1.94 (1.8-2.0)	1.62 (1.5-1.7)	1.21 (1.1-1.3)	0.97 (0.9-1.0)	0.81 (0.8-0.9)	0.61 (0.58-0.64)	0.49 (0.47-0.51)

*給出合適o/w體積用於說明但並非限制

()括號之間者為上述值周圍之合適範圍(+/-5%)

表1B-根據本發明之特定以o/w乳液為主之佐劑

	佐劑I	佐劑J	佐劑K	佐劑L	佐劑M	佐劑N	佐劑O	佐劑P
組份：								
Span 85(mg)	0.59 (0.56-0.62)	0.47 (0.45-0.49)	0.39 (0.37-0.41)	0.29 (0.28-0.3)	0.24 (0.23-0.25)	0.2 (0.19-0.21)	0.15 (0.14-0.16)	0.12 (0.11-0.13)
角鯊烯(mg)	4.88 (4.6-5.1)	3.9 (3.7-4.1)	3.25 (3.1-3.4)	2.44 (2.3-2.6)	1.95 (1.85-2.05)	1.63 (1.55-1.7)	1.22 (1.2-1.3)	0.98 (0.9-1.1)
聚山梨醇酯 80 或 Tween 80(mg)	0.59 (0.56-0.62)	0.47 (0.45-0.49)	0.39 (0.37-0.41)	0.29 (0.28-0.3)	0.24 (0.23-0.25)	0.2 (0.19-0.21)	0.15 (0.14-0.16)	0.12 (0.11-0.13)

	佐劑Q	佐劑R	佐劑S	佐劑T	佐劑U	佐劑V	佐劑W	佐劑X
組份：								
Span 85(mg)	0.84 (0.8-0.9)	0.67 (0.64-0.7)	0.56 (0.53-0.6)	0.42 (0.4-0.44)	0.34 (0.32-0.36)	0.28 (0.27-0.3)	0.21 (0.2-0.22)	0.17 (0.16-0.18)
角鯊烯(mg)	4.88 (4.6-5.1)	3.9 (3.7-4.1)	3.25 (3.1-3.4)	2.44 (2.3-2.6)	1.95 (1.85-2.05)	1.63 (1.55-1.7)	1.22 (1.2-1.3)	0.98 (0.9-1.1)
聚山梨醇酯 80 或 Tween 80(mg)	0.84 (0.8-0.9)	0.67 (0.64-0.7)	0.56 (0.53-0.6)	0.42 (0.4-0.44)	0.34 (0.32-0.36)	0.28 (0.27-0.3)	0.21 (0.2-0.22)	0.17 (0.16-0.18)

()括號之間者為上述值(+/-5%)周圍之合適範圍(+/-5%)

包括表1中彼等數值之所有給定數值(例如以%或以mg計)應理解為允許5%變化，亦即，4.88 mg角鯊烯應理解為意謂在4.64-5.12 mg之間。

可執行各組份(o/w乳液及抗原)之預稀釋以產生傳遞所

需HA量及所需佐劑組份量之經佐劑化疫苗。

在本發明之一態樣中，本發明之經佐劑化疫苗之o/w乳液(無論預稀釋與否)均可以不超過或合適地低於總劑量體積一半之體積來添加。藉由說明，給出表1A中說明之調配物A-H之乳液組份的合適體積(例如在125 μ l至25 μ l之範圍變化)。因此，在本發明之一態樣中，提供一種製造經佐劑化流感疫苗之方法，其包含將第一體積之水包油乳液及第二體積之包含流感病毒或其抗原性製劑之水性懸浮液混合的步驟，其中第二體積大於第一體積。合適地，第一體積之o/w乳液係在濃縮乳液之稀釋後獲得。

或者，將大體上相等體積(無論在預稀釋後與否)之o/w乳液及抗原懸浮液混合，以產生本發明之經佐劑化疫苗組合物。各組份之各別體積通常將隨後具有其他組份之彼體積之最大10%過量(亦即佐劑乳液:抗原懸浮液比率為1:1.1至1.1:1)，合適地具有最大5%過量(亦即o/w乳液:抗原懸浮液比率為1:1.05至1.05:1)，合適地具有最大2.5%過量(亦即佐劑乳液:抗原懸浮液比率為1:1.025至1.025:1)。因此，在本發明之另一態樣中，提供一種製造經佐劑化流感疫苗之方法，其包含將大體上相等體積之水包油乳液及包含流感病毒或其抗原性製劑之水性懸浮液混合的步驟。合適地，第一體積之o/w乳液係在濃縮乳液之稀釋後獲得。

又在另一實施例中，本發明之經佐劑化疫苗之o/w乳液佐劑係以超過總劑量體積一半之體積來添加。因此，在本發明之另一態樣中，提供一種製造經佐劑化流感疫苗之方

法，其包含將第一體積之水包油乳液與第二體積之包含流感病毒或其抗原性製劑之水性懸浮液混合的步驟，其中第一體積大於第二體積。合適地，第一體積之o/w乳液係在濃縮乳液之稀釋後獲得。

在所有三種方法中，最終人類劑量體積之乳液組份及視情況HA之量比先前認為適用者更低且如本文中所主張。合適地，其具有如本文中所主張之特定量。

疫苗內之各個別組份之量可表示為總疫苗組合物之百分比，亦即以% (v/v)或以% (w/v)計。以下轉化數字將為熟習此項技術者所已知且可應用：角鯊烯0.855 g/ml、 α -生育酚0.949 g/ml、聚山梨醇酯80 1.080 g/ml及Span 85 0.94 g/ml。

因此，可代謝油(合適地為角鯊烯)係以總疫苗體積之0.5%至2%，合適地為0.25-2或0.25-1.75，或0.5-1.65，或0.6-1.5，或0.8-1.4或1-1.25 % (w/v)油之量存在於疫苗組合物中。在另一特定實施例中，可代謝油(合適地為角鯊烯)係以疫苗組合物總體積之約1.25%或約0.6% (w/v)的最終量存在。在另一特定實施例中，可代謝油係以總疫苗體積之0.25% (w/v)的最終量存在。

母育酚之量亦可表示為總疫苗組合物體積之百分比。合適地，母育酚係以免疫原性組合物總體積之0.25%至2% (w/v)的量存在於疫苗組合物中，例如總疫苗體積之0.25-2，包含0.25-2或0.25-1.75，或0.5-1.65或0.6-1.5，或0.8-1.4或1-1.25 % (w/v)母育酚。在本發明之一實施例中，母

育酚係以疫苗組合物總體積之0.2%與2% (v/v)之間的量存在，或在0.5 ml疫苗劑量體積中具有1.25% (v/v)之量。在一特定實施例中，母育酚係以免疫原性組合物總體積之約1.25%的最終量存在。在另一特定實施例中，母育酚係以總疫苗體積之0.25% (v/v)之最終量存在或在0.5 ml疫苗劑量體積中為1.25% (v/v)或在0.7 ml疫苗劑量體積中為0.9% (v/v)，或在0.5 ml疫苗劑量中為0.5% (v/v)或在0.7 ml疫苗劑量中為0.35-0.37%或0.36%。

在本發明之一實施例中，乳化劑係以每人類劑量0.1-5、0.2-5、0.3-5、0.4-5、0.4-1.2、0.5-4、1-2、2-3或4-5 mg之量存在。當存在一種以上乳化劑時，諸如當存在Tween 80及Span 85兩者時，所主張之量應理解為乳化劑之總量。乳化劑之量可表示為總疫苗組合物體積之百分比。合適地，乳化劑係以免疫原性組合物總體積之0.125-0.8% (w/v)的量存在於疫苗組合物中，諸如為總疫苗體積之0.08-0.5或0.1-0.7，或0.2-0.6，或0.25-0.55，或0.3-0.52或0.4-0.5% (w/v)。在特定實施例中，乳化劑係以總疫苗組合物體積之1%、0.5%或0.2% (w/v)之量存在。

在特定實施例中，0.5 ml疫苗劑量體積含有0.5% (w/w)Tween 80，且0.7 ml疫苗劑量體積含有0.35% (w/w)Tween 80。在另一特定實施例中，0.5 ml疫苗劑量含有0.2% (w/w)乳化劑，且0.7 ml疫苗劑量含有0.14% (w/w)乳化劑。Span 85(脫水山梨糖醇三油酸酯)亦可以0.1至1%之含量存在於用於本發明之乳液中，合適地為約0.5%或

0.5%以下。在特定實施例中，當存在時，Span 85係以與聚山梨醇酯80百分比相同之百分比添加至組合物中。

在一些狀況下，有利的可為，本發明之免疫原性組合物及疫苗將另外含有穩定劑，例如其他乳化劑/界面活性劑，包括辛酸(merck索引第10版，登記號1739)，例如三辛精(Tricaprylin)。

本發明另外提供一種佐劑組合物，其包含如上文中所定義且如上文所定義之量的個別組份，(例如)但並非如表1中所說明係排他的。通常，該佐劑組合物將具有人類劑量合適體積。在佐劑呈欲與液體形式抗原性組合物組合之液體形式時，佐劑組合物將具有人類劑量合適體積，其為人類劑量之預期最終體積之部分，諸如人類劑量之預期最終體積的大致一半，例如，對於0.7 ml之預期人類劑量而言為360 μ l體積，或對於0.5 ml之預期人類劑量而言為250 μ l體積。若人類疫苗劑量增加，則預期佐劑組份之量(以mg計)因該劑量體積之增加(簡單而言為變得更稀)而保持不變。當將佐劑組合物與抗原組合物組合時，視需要將其其稀釋以提供疫苗之最終人類劑量。當然，該劑量之最終體積將視佐劑組合物之初始體積及添加至佐劑組合物中之抗原組合物的體積而變化。

在替代性實施例中，液體佐劑係用以復水經凍乾之抗原組合物。在該實施例中，佐劑組合物之人類劑量合適體積大致等於人類劑量之最終體積。將液體佐劑組合物添加至含有經凍乾抗原組合物之小瓶中。最終人類劑量可在0.5

與 1.5 ml 之間變化。在特定實施例中，人類劑量為約 0.5 ml 或約 0.7 ml，在該實施例中，本發明之疫苗組合物每 0.5 ml 人類劑量將包含小於 11 mg 或上文定義量，例如合適地為 0.5-11、1-11、2-10、4-8 或 5-6 mg 之間(例如 2-3、5-6 或 9-10 mg)的可代謝油含量，此外在該實施例中，視佐劑組合物是否預期分別與液體或經凍乾抗原組合物組合而定，本發明之佐劑組合物每 250 μ l 佐劑組合物或每 500 μ l 佐劑組合物將包含小於 11 mg 或上文定義量之可代謝油含量，例如合適地為包含 0.5-11、1-11、2-10、4-8 或 5-6 mg 之間(例如 2-3、5-6 或 9-10 mg)的可代謝油。同樣地，在其中人類劑量為 0.5 ml 之特定實施例中，在該實施例中，本發明之疫苗組合物每人類劑量將包含低於 5 mg 含量之乳化劑(合適地為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯(諸如 Tween 80™ 或聚山梨醇酯 80™))含量，合適地為每 0.5 ml 人類劑量包含 0.1-5、0.2-5、0.3-5、0.4-5、0.5-4 或 2-3 mg(例如 0.4-1.2、2-3 或 4-5 mg)之間的乳化劑，此外在該實施例中，本發明之佐劑組合物每人類劑量將包含低於 5 mg 含量之乳化劑(合適地為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯(諸如 Tween 80™ 或聚山梨醇酯 80™))含量，合適地為視佐劑組合物是否預期分別與液體或經凍乾抗原組合物組合而定，每 250 μ l 佐劑組合物或每 500 μ l 佐劑組合物包含 0.1-5、0.2-5、0.3-5、0.4-5、0.5-4 或 2-3 mg(例如 0.4-1.2、2-3 或 4-5 mg)之間的乳化劑。類似地，在其中人類劑量為 0.5 ml 之特定實施例中，在該實施例中，本發明之疫苗組合物每人類

劑量將包含低於12 mg含量之母育酚(合適地為 α -生育酚)含量，合適地為每0.5 ml人類劑量包含0.5-12、1-11、2-10、4-9、5-7 mg(例如10-11、5-6、2.5-3.5或1-3 mg)之間之母育酚，此外在該實施例中，本發明之佐劑組合物每人類劑量將包含低於12 mg含量之母育酚(合適地為 α -生育酚)含量，合適地為視佐劑組合物是否預期分別與液體或經凍乾抗原組合物組合而定，每250 μ l佐劑組合物或每500 μ l佐劑組合物包含0.5-12、1-11、2-10、4-9、5-7 mg(例如10-11、5-6、2.5-3.5或1-3 mg)之間之母育酚。

視情況地，油(例如角鯊烯):母育酚(例如 α -生育酚)之比率等於或小於1，因為其提供更穩定之乳液。

在一些狀況下，有利的可為，本發明之疫苗將另外含有穩定劑。

在免疫原性組合物中操作之佐劑的組份劑量合適地為能夠增強人類中對於抗原之免疫反應。詳言之，可代謝油、母育酚及聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯之合適量為與未經佐劑化組合物相比改良組合物之免疫學潛能的量，或為在標靶人群中產生與經包含另一(更高)量之該等組份之佐劑佐劑化的組合物所獲得之免疫學潛能類似的免疫學潛能，同時就反應原性概況而言為可接受的量。

可選免疫刺激劑

在根據本發明之特定實施例中，佐劑為水包油乳液佐劑，其包含上文定義量之可代謝油(諸如角鯊烯)、母育酚(諸如 α -生育酚)及界面活性劑(諸如聚山梨醇酯80)，且不

含有任何額外之免疫刺激劑，詳言之其不含有無毒脂質A衍生物(諸如3D-MPL)或皂素(諸如QS21)。

在本發明之另一實施例中，提供一種疫苗組合物，其包含抗原或抗原組合物及佐劑組合物，該佐劑組合物包含水包油乳液及視情況之一或多種其他免疫刺激劑，其中該水包油乳液包含0.5-10 mg可代謝油(合適地為角鯊烯)、0.5-11 mg母育酚(合適地為 α -生育酚)及0.4-4 mg乳化劑。

在特定實施例中，水包油乳液佐劑視情況包含一或多種不同於QS21及/或MPL之額外佐劑或免疫刺激劑。

在另一特定實施例中，水包油乳液佐劑及免疫原性組合物另外包含額外免疫刺激劑，其為脂多醣，合適地為脂質A之無毒衍生物，尤其為單磷醯基脂質A或更尤其為3-去醯化單磷醯基脂質A(3D-MPL)。3D-MPL係由GlaxoSmithKline Biologicals N.A.以名稱MPL出售且在整個文件中稱為MPL或3D-MPL。參見(例如)美國專利第4,436,727號、第4,877,611號、第4,866,034號及第4,912,094號。3D-MPL主要促進具有IFN-g(Th1)表型之CD4+ T細胞反應。3D-MPL可根據GB2220211 A中所揭示之方法而產生。化學上，其為3-去醯化單磷醯基脂質A與3、4、5或6個醯化鏈之混合物。在本發明之組合物中，可使用小粒子3D-MPL。小粒子3D-MPL具有某一粒度以便其可經由0.22 μm 過濾器經無菌過濾。該等製劑係描述於WO94/21292中。

諸如3D-MPL之該脂多醣可以每人類劑量免疫原性組合物1與50 μg 之間的量來使用。該3D-MPL可以約25 μg ，例

如在20-30 μg 之間，合適地在21-29 μg 之間或在22與28 μg 之間或在23與27 μg 之間或在24與26 μg 之間或25 μg 的含量來使用。在另一實施例中，人類劑量之免疫原性組合物包含約10 μg ，例如在5與15 μg 之間，合適地在6與14 μg 之間，例如在7與13 μg 之間或在8與12 μg 之間或在9與11 μg 之間或10 μg 含量之3D-MPL。在另一實施例中，人類劑量之免疫原性組合物包含約5 μg ，例如在1與9 μg 之間或在2與8 μg 之間，或合適地在3與7 μg 之間或4與6 μg 之間或5 μg 含量之3D-MPL。

在另一實施例中，脂質A之合成衍生物係用作可選之額外免疫刺激劑，一些描述為TLR-4促效劑且包括(但不限於)：

OM174(2-去氧-6-鄰-[2-去氧-2-[(R)-3-十二醯氧基十四醯胺基]-4-鄰-膦酸基- β -D-葡萄糖吡喃糖基]-2-[(R)-3-羥基十四醯胺基]- α -D-葡萄糖吡喃糖基二氫磷酸酯)，(WO 95/14026)

OM 294DP (3S,9R)-3-[(R)-十二醯氧基十四醯胺基]-4-側氧基-5-氮雜-9(R)-[(R)-3-羥基十四醯胺基]癸-1,10-二醇,1,10-雙(二氫磷酸酯)(WO 99/64301及WO 00/0462)

OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-十二醯氧基十四醯胺基]-4-側氧基-5-氮雜-9-[(R)-3-羥基十四醯胺基]癸-1,10-二醇,1-二氫磷酸酯10-(6-胺基己酸酯)(WO 01/46127)

可使用之其他TLR4配位體為烷基葡萄糖胺糖磷酸酯(AGP)，諸如WO 9850399或US 6303347中揭示之彼等配位

體(亦揭示AGP之製備方法)，合適地為如US 6764840中所揭示之RC527或RC529，或AGP之醫藥學上可接受之鹽。一些AGP為TLR4促效劑，且一些為TLR4拮抗劑。認為兩者均適於用作佐劑。

能夠經由TLR-4引起信號轉導反應(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)之其他合適TLR-4配位體為(例如)來自革蘭氏陰性細菌(gram-negative bacteria)之脂多醣及其衍生物，或其片段，詳言之為LPS之無毒衍生物(諸如3D-MPL)。其他合適TLR促效劑為：熱休克蛋白(heat shock protein，HSP)10、60、65、70、75或90；界面活性劑蛋白A、玻尿酸寡醣、硫酸乙醯肝素片段、纖維結合蛋白片段、血纖維蛋白原肽及b-防禦素-2、胞壁醯基二肽(MDP)或呼吸合成病毒之F蛋白。在一實施例中，TLR促效劑為HSP 60、70或90。其他合適TLR-4配位體係如WO 2003/011223及WO 2003/099195中所述，諸如WO 2003/011223之第4-5頁上或WO 2003/099195之第3-4頁上所揭示之化合物I、化合物II及化合物III，且尤其為WO 2003/011223中所揭示之彼等化合物，諸如ER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680及ER804764。合適地，該TLR-4配位體為ER804057。

Toll樣受體(TLR)為I型跨膜受體，其演化性地保存於昆蟲與人類之間。迄今為止已確立十種TLR(TLR 1-10)(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。TLR家族之成員具有類似之細胞外域及細胞內域；已展示其細胞外域具有白

胺酸富集之重複序列，且其細胞內域類似於介白素-1受體(IL-1R)之細胞內區域。TLR細胞在免疫細胞及其他細胞(包括血管上皮細胞、脂肪細胞、心肌細胞及腸上皮細胞)之間經差異性地表現。TLR之細胞內域可與接附蛋白Myd88相互作用，該接附蛋白Myd88在其細胞質區域中亦具有IL-1R域，引起細胞激素之NF-KB活化；該Myd88路徑為藉由TLR活化實現細胞激素釋放的一種方式。TLR之主要表現係在諸如抗原呈現細胞(例如樹突狀細胞、巨噬細胞等)之細胞類型中。

樹突狀細胞藉由經TLR刺激之活化引起樹突狀細胞之成熟，且產生諸如IL-12之發炎細胞激素。迄今為止進行之研究已發現TLR識別不同類型之促效劑，儘管一些促效劑為若干TLR所共有。TLR促效劑主要源自細菌或病毒，且包括諸如鞭毛蛋白或細菌脂多醣(LPS)之分子。"TLR促效劑"意謂能夠作為直接配位體或間接經由產生內源或外源配位體而經由TLR信號轉導路徑引起信號轉導反應之組份(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。

在另一實施例中，TLR分子之其他天然或合成促效劑係用作可選之額外免疫刺激劑。該等促效劑可包括(但不限於)TLR2、TLR3、TLR7、TLR8及TLR9之促效劑。

因此，在一實施例中，佐劑及免疫原性組合物另外包含選自由以下各者組成之群的額外免疫刺激劑：TLR-1促效劑、TLR-2促效劑、TLR-3促效劑、TLR-4促效劑、TLR-5促效劑、TLR-6促效劑、TLR-7促效劑、TLR-8促效劑、

TLR-9促效劑或其組合。

在本發明之一實施例中，使用能夠經由TLR-1引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。合適地，能夠經由TLR-1引起信號轉導反應之TLR促效劑係選自：三醯化脂肽(LP)；苯酚-可溶性調節蛋白；結核分枝桿菌LP(*Mycobacterium tuberculosis* LP)；S-(2,3-雙(十六醯氧基)-(2-RS)-丙基)-N-十六醯基-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH，三鹽酸鹽(Pam₃Cys)LP，其模擬細菌脂蛋白之乙醯化胺基末端；及來自伯氏疏螺旋菌(*Borrelia burgdorferi*)之OspA LP。

在替代性實施例中，使用能夠經由TLR-2引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。合適地，能夠經由TLR-2引起信號轉導反應之TLR促效劑為以下之一或多者：來自結核分枝桿菌、伯氏疏螺旋菌、梅毒螺旋體(*T pallidum*)之脂蛋白、肽聚糖、細菌脂肽；來自包括金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之物種的肽聚糖；脂胞壁酸、甘露糖醛酸、奈瑟菌屬孔洞蛋白(*Neisseria porin*)、細菌纖毛(*bacterial fimbriae*)、耶爾森氏菌屬毒性因子(*Yersina virulence factor*)、CMV病毒粒子、麻疹血球凝集素及來自酵母之酵母聚糖。

在替代性實施例中，使用能夠經由TLR-3引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。合適地，能夠經由TLR-3引起信號轉導反應之TLR促效劑為雙鏈RNA(dsRNA)，或聚肌苷酸-聚胞嘧啶核苷酸(Poly

IC，一種與病毒感染相關聯之分子核酸類型)。

在替代性實施例中，使用能夠經由TLR-5引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。合適地，能夠經由TLR-5引起信號轉導反應之TLR促效劑為細菌鞭毛蛋白。

在替代性實施例中，使用能夠經由TLR-6引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。合適地，能夠經由TLR-6引起信號轉導反應之TLR促效劑為分枝桿菌脂蛋白、二醯化LP及苯酚可溶性調節蛋白。其他TLR6促效劑係描述於WO 2003043572中。

在替代性實施例中，使用能夠經由TLR-7引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。合適地，能夠經由TLR-7引起信號轉導反應之TLR促效劑為單鏈RNA(ssRNA)，洛索立賓(loxoribine，一種在N7及C8位置處之鳥苷類似物)，或咪唑并喹啉化合物或其衍生物。在一實施例中，TLR促效劑為咪喹莫特(imiquimod)。其他TLR7促效劑係描述於WO02085905中。

在替代性實施例中，使用能夠經由TLR-8引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。合適地，能夠經由TLR-8引起信號轉導反應之TLR促效劑為單鏈RNA(ssRNA)，其係一種具有抗病毒活性之咪唑并喹啉分子，例如雷西喹莫特(resiquimod)(R848)；雷西喹莫特亦能夠藉由TLR-7識別。可使用之其他TLR-8促效劑包括WO 2004071459中所述之彼等促效劑。

在替代性實施例中，使用能夠經由TLR-9引起信號轉導反應之TLR促效劑(Sabroe等人，JI 2003第1630-5頁)。在一實施例中，能夠經由TLR-9引起信號轉導反應之TLR促效劑為HSP90。或者，能夠經由TLR-9引起信號轉導反應之TLR促效劑為細菌或病毒DNA、含有未甲基化CpG核苷酸之DNA，詳言之為稱作CpG基元之序列情況。含CpG之寡核苷酸主要誘導Th1反應。該等寡核苷酸為熟知的且描述於(例如)WO 96/02555、WO 99/33488及美國專利第6,008,200號及第5,856,462號中。合適地，CpG核苷酸為CpG寡核苷酸。適用於本發明之免疫原性組合物中之合適寡核苷酸為含有CpG之寡核苷酸，其視情況含有兩個或兩個以上藉由至少3個，合適地至少6個或6個以上核苷酸分離之二核苷酸CpG基元。CpG基元為胞嘧啶核苷酸接著鳥嘌呤核苷酸。本發明之CpG寡核苷酸通常為去氧核苷酸。在特定實施例中，寡核苷酸中之核苷酸間鍵為二硫代磷酸酯，或合適地為硫代磷酸酯鍵，儘管磷酸二酯及其他核苷酸間鍵在本發明之範疇內。本發明之範疇內亦包括具有混合核苷酸間鍵聯之寡核苷酸。產生硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯之方法係描述於US 5,666,153、US 5,278,302及WO 95/26204中。較佳寡核苷酸之實例具有以下序列。該等序列可含有經硫代磷酸酯修飾之核苷酸間鍵聯：

OLIGO 1(SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT
(CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT

(CpG 1758)

OLIGO 3(SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT
GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT
GTC GTT (CpG 2006或7909)

OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT
(CpG 1668)

OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC
GCC G (CpG 5456)

合適地，使用硫代磷酸酯骨架 CpG7909(SEQ ID NO:4)。替代性地，CpG寡核苷酸可包含上文指定之序列，因為其具有對其之不連續缺失或添加。本發明中所用之CpG寡核苷酸可藉由此項技術中已知之任何方法來合成(例如參見EP 468520)。方便地，該等寡核苷酸可利用自動合成器來合成。

在另一實施例中，佐劑及免疫原性組合物另外包含皂素佐劑。適用於本發明之尤其合適皂素為Quil A及其衍生物。Quil A為自南美皂皮樹(South American tree *Quillaja Saponaria Molina*)分離之皂素製劑且由Dalsgaard等人於1974年("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, 第44卷, Springer Verlag, Berlin, 第243-254頁)首次描述為具有佐劑活性。已藉由HPLC分離Quil A之純化片段，該等片段保留佐劑活性，而無與Quil A相關聯之毒性(EP 0 362 278)，例如QS7及QS21(亦稱為QA7及

QA21)。QS-21為源自皂皮樹樹皮之天然皂素，其誘導CD8+細胞毒性T細胞(CTL)、Th1細胞及主要IgG2a抗體反應，且在本發明之情況下為較佳皂素。在本發明之合適形式中，免疫原性組合物內之皂素佐劑為皂皮樹quil A之衍生物，諸如Quil A之免疫活性部分，諸如QS-17或QS-21，合適地為QS-21。在一實施例中，本發明之組合物含有呈大體上純形式之免疫活性皂素部分。在一實施例中，本發明之組合物含有呈大體上純形式之QS21，亦即QS21為至少90%純，例如至少95%純或至少98%純。

其他適用皂素係源自植物歐洲七葉樹(*Aesculus hippocastanum*)或*Gyophilla struthium*。已描述於文獻中之其他皂素包括七葉素(Escin)，其已在Merck索引(第12版：登錄號3737)中描述為歐洲七葉樹(horse chestnut tree，拉丁文為：*Aesculus hippocastanum*)種子中存在之皂素混合物。其分離係藉由層析及純化(Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213 (1953))及藉由離子交換樹脂(Erbring等人，US 3,238,190)來描述。已純化七葉素之部分且展示具有生物學活性(Yoshikawa M, 等人(*Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996年8月；44(8):1454-1464))。亦可選擇來自*Gypsophilla struthium*之皂素(R. Vochten等人，1968, *J. Pharm. Belg.*, 42, 213-226)。

諸如QS21之該免疫活性皂素可以每人類劑量免疫原性組合物1與50 μg 之間的量來使用。有利地，QS21係以約25 μg ，例如在20-30 μg 之間，合適地在21-29 μg 之間或在22-

28 μg 之間或在23-27 μg 之間或在24-26 μg 之間或25 μg 之含量來使用。在另一實施例中，人類劑量之免疫原性組合物包含約10 μg ，例如在5與15 μg 之間，合適地在6-14 μg 之間，例如在7-13 μg 之間或在8-12 μg 之間或在9-11 μg 之間或10 μg 之含量的QS21。在另一實施例中，人類劑量之免疫原性組合物包含約5 μg ，例如在1-9 μg 之間或在2-8 μg 之間，或合適地在3-7 μg 之間或4-6 μg 之間或5 μg 之含量的QS21。

3D-MPL及/或QS21之劑量能夠合適地增強人類中對於抗原之免疫反應。詳言之，合適之3D-MPL及/或QS21量為與未經佐劑化之組合物相比或與經另一3D-MPL或QS21量佐劑化之組合物相比，改良組合物之免疫學潛能，同時就反應原性概況而言為可接受的量。通常對於人類投藥而言，皂素(例如QS21)及/或LPS衍生物(例如3D-MPL)將以每劑量1 μg -200 μg ，諸如10-50 μg 或1 μg -25 μg 之範圍存在於人類劑量之免疫原性組合物中。

在特定實施例中，根據本發明之佐劑及免疫原性組合物包含於上文所述油乳液中之皂素(例如QS21)及/或LPS衍生物(例如3D-MPL)以及固醇(例如膽固醇)。該等固醇在此項技術中為熟知的，例如在Merck索引，第11版，第341頁中膽固醇係經揭示為見於動物脂肪中之天然存在的固醇。另外，油乳液(詳言之為水包油乳液)可含有Span 85及/或卵磷脂及/或三辛精。包含水包油乳液、固醇及皂素之佐劑係描述於WO 99/12565中。其他免疫刺激劑之實例係描述

於本文及 "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, 第6卷, 編者 Powell, M.F.及 Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X 中。

在包括角鯊烯及皂素(視情況為QS21)時, 有益的為調配物亦包括固醇(視情況為膽固醇), 因為其允許降低乳液中之油的總含量。其引起降低製造成本、改良疫苗接種之總體舒適性以及定性及定量改良所得免疫反應, 諸如改良之IFN- γ 產生。因此, 本發明之佐劑系統通常包含200:1至300:1範圍內之可代謝油: 皂素(w/w)比率, 本發明亦可以"低油"形式來使用, 其可選範圍為1:1至200:1, 視情況為20:1至100:1, 或大體上為48:1, 該疫苗保留所有組份之有益佐劑特性, 具有降低更多之反應原性概況。因此, 一些實施例具有1:1至250:1, 或20:1至200:1, 或20:1至100:1範圍內, 或大體上為48:1之角鯊烯: QS21(w/w)比率。視情況地, 亦包括以如本文所述之皂素: 固醇比率存在之固醇(例如膽固醇)。

其中視情況包括額外免疫刺激劑之佐劑尤其適用於嬰兒及/或老年人疫苗調配物。

根據本發明之水包油乳液佐劑可因此視情況另外包含5-60、10-50或20-30 μg (例如5-15、40-50、10、20、30、40或50 μg)脂質A衍生物(例如3D-MPL)。水包油佐劑可視情況含有0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3或0.125-0.25 mg(例如0.2-0.3、0.1-0.15、0.25或0.125 mg)固醇(例

如膽固醇)，1-60、10-50或20-30 μg (例如1-10、5-15、40-50、10、20、30、40或50 μg)脂質A衍生物(例如3D-MPL或脂質A之任何合成衍生物)，及1-60、10-50或20-30 μg (例如1-10、5-15、40-50、10、20、30、40或50 μg)皂素(例如QS21)。

流感病毒病毒株及流感抗原、疫苗接種方案、給藥及功效標準

該流感病毒或其抗原性製劑可為卵衍生或細胞培養物衍生的。舉例而言，根據本發明之流感病毒抗原或其抗原性製劑可藉由使流感病毒在卵中生長且純化所獲尿囊液而源自習知之胚卵方法。卵可在短期內大量積聚。或者，其可使用生長病毒或表現重組流感病毒表面抗原之細胞或細胞培養物而源自任何新穎產生方法。用於使病毒生長之合適細胞受質包括(例如)犬腎細胞，諸如MDCK或來自MDCK純系之細胞、MDCK樣細胞；猴腎細胞，諸如AGMK細胞，包括Vero細胞；合適豬細胞系；或適於產生用於疫苗目的之流感病毒的任何其他哺乳動物細胞類型。合適細胞受質亦包括人類細胞，例如MRC-5細胞或Per.C6細胞系。合適細胞受質不限於細胞系；舉例而言，亦包括初級細胞，諸如雞胚胎纖維母細胞及禽類細胞系，諸如雞或鴨細胞系(例如EBx細胞系，諸如分別源自雞或鴨胚胎幹細胞之EB14或EB24)。合適之昆蟲細胞為Sf9或Hi5。

在一實施例中，根據本發明適用之流感病毒或其抗原性製劑可為裂解流感病毒或其裂解病毒抗原性製劑。在替代

性實施例中，流感製劑可含有另一類型之失活流感抗原，諸如失活完整病毒或純化HA及NA(亞單位疫苗)或流感病毒顆粒。在又一實施例中，流感病毒可為活的減毒流感製劑。

根據本發明適用之裂解流感病毒或其裂解病毒抗原性製劑合適地為失活病毒製劑，其中病毒粒子經清潔劑或其他試劑破壞以溶解脂質包膜。裂解病毒或其裂解病毒抗原性製劑合適地藉由將感染性或失活之完整流感病毒破碎，同時伴隨有機溶劑或清潔劑之溶解濃縮，且隨後移除所有或大多數溶解劑及一些或大多數病毒脂質物質來製備。其裂解病毒抗原性製劑意謂裂解病毒製劑，其與裂解病毒相比可已經歷某種程度之純化，同時保留裂解病毒組份之大多數抗原性特性。舉例而言，當產生於卵中時，裂解病毒可自卵污染蛋白耗盡，或當產生於細胞培養物中時，裂解病毒可自宿主細胞污染物耗盡。裂解病毒抗原性製劑可包含一種以上病毒病毒株之裂解病毒抗原性組份。含有裂解病毒之疫苗(稱為'流感裂解疫苗')或裂解病毒抗原性製劑通常含有殘餘基質蛋白及核蛋白且有時含有脂質，以及膜包膜蛋白。該等裂解病毒疫苗將通常含有大多數或所有病毒結構蛋白，儘管未必呈與其在完整病毒中所存在之相同比例。市售裂解疫苗之實例為(例如)FLUARIX™、FIUSHIELD™或FLUZONE™。

或者，流感病毒可呈完整病毒疫苗之形式。其在大流行病情況下可證明具有優於裂解病毒疫苗之優點，因為其使

得對於新流感病毒病毒株而言可否成功產生裂解病毒疫苗的不確定性得以避免。對於一些病毒株而言，用於產生裂解病毒之習知清潔劑可破壞病毒且使其不可用。儘管總存在使用不同清潔劑且/或研發用於產生裂解疫苗之不同方法的可能性，但其將耗費時間，其在大流行病情況下將不可用。除完整病毒方法之可靠度較高外，疫苗生產能力亦大於裂解病毒，因為在製備合適裂解疫苗所必需之額外純化步驟期間將損失相當大量之抗原。

在另一實施例中，流感病毒製劑係呈純化亞單位流感疫苗形式。亞單位流感疫苗通常含有兩種主要包膜蛋白，HA及NA，且可具有優於完整病毒粒子疫苗之額外優點，因為尤其在年輕受疫苗接種者中其反應原性通常較低。亞單位疫苗可藉由重組或自經破壞病毒粒子純化而產生。市售亞單位疫苗之實例為(例如)AGRIPPAL™或FLUVIRIN™。在特定實施例中，亞單位疫苗係自至少一種主要包膜組份來製備，諸如自血球凝集素(HA)、神經胺糖酸酶(NA)或M2來製備，合適地自HA來製備。合適地，其包含兩種或兩種以上抗原之組合，諸如流感結構蛋白HA、NA、基質1(M1)及M2中之至少兩者的組合，合適地為HA與NA兩者之組合，視情況包含M1。合適地，流感組份係藉由重組DNA技術而產生，亦即自由重組DNA操縱所得之核酸產生或自其表現，該核酸包括活的重組載體(牛痘)或重組亞單位蛋白(桿狀病毒/昆蟲細胞、哺乳動物細胞、禽類細胞、酵母、植物或細菌)。合適之昆蟲細胞為草地夜蛾

(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9) 昆蟲細胞或自粉紋夜蛾 (*Trichoplusia ni*)(Invitrogen)研發之 High Five(Hi5)昆蟲細胞，且合適之桿狀病毒為苜蓿銀紋夜蛾核多角體病病毒 (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) (Baculogold, Becton Dickinson, PharMingen)或所謂穿梭載體系統(Bacmid system)。

在一實施例中，流感病毒製劑係呈病毒顆粒之形式。病毒顆粒為球形、單層囊泡，其在插入病毒顆粒之磷脂雙層膜中之真實構形中保留功能性病毒包膜糖蛋白HA及NA。市售病毒顆粒疫苗之實例為(例如)INFLEXAL V™或 INVAVAC™。

在另一實施例中，亞單位流感組份係以病毒樣粒子(VLP)或衣殼體形式表現，合適地為植物製得或昆蟲細胞製得之VLP。VLP以其天然形式呈現抗原。VLP亞單位技術可完全基於流感蛋白，或可依賴於其他病毒，諸如鼠科動物白血病毒(MLV)，且可因此包含非流感抗原，諸如MLV gag蛋白。合適之VLP包含至少一種，合適地為至少兩種流感蛋白，視情況以及其他流感或非流感蛋白，諸如M1及HA、HA及NA、HA、NA及M1或HA、NA及MLV gag。其可在植物細胞或昆蟲細胞中產生。VLP亦可載有來自一種以上流感病毒株之抗原，諸如自兩種季節性病毒株(例如H1N1及H3N2)製得或(例如)自一種季節性病毒株及一種大流行病病毒株(例如H3N2及H5N1)製得之VLP。

因此，在一實施例中，本發明之免疫原性組合物包含來

自生長於卵或細胞培養物上之流感病毒的流感病毒抗原或其抗原性製劑。在另一實施例中，該流感病毒抗原或其抗原性製劑包含完整病毒、裂解病毒、病毒顆粒或一或多種選自HA、NA、M1、M2之純化抗原。在另一實施例中，該(等)純化抗原係自生長於哺乳動物、禽類或昆蟲細胞中之流感病毒來製備。特定而言，該(等)純化抗原係經重組產生。其可呈病毒樣粒子之形式。

流感病毒抗原或其抗原性製劑可藉由多種商業上可適用方法中之任何方法而產生，例如以引用的方式併入本文之專利第DD 300 833號及第DD 211 444號中所述之裂解流感方法。傳統上，使用溶劑/清潔劑處理，諸如磷酸三正丁酯或乙醚以及TweenTM(稱為"Tween-乙醚"裂解)而產生裂解流感，且該方法仍用於一些生產設施中。現使用之其他裂解劑包括清潔劑或蛋白水解酶或膽汁鹽，例如以引用的方式併入本文之專利第DD 155 875號中所述之去氧膽酸鈉。可用作裂解劑之清潔劑包括陽離子性清潔劑，例如十六烷基三甲基溴化銨(CTAB)；其他離子性清潔劑，例如月桂基硫酸酯、牛黃去氧膽酸酯；或諸如上文所述者之非離子性清潔劑，包括Triton X-100(例如在Lina等人，2000, Biologicals 28, 95-103中所述之方法中)及Triton N-101；或任何兩種或兩種以上清潔劑之組合。

裂解疫苗之製備方法可包括呈各種組合之多種不同過濾及/或其他分離步驟，諸如超速離心、超濾、區帶離心及層析(例如離子交換)步驟，及視情況(例如)用熱、甲醛或

β -丙內酯或U.V.之失活步驟，該失活步驟可在裂解之前或之後進行。裂解方法可以分批、連續或半連續方法來進行。用於裂解免疫原性組合物之較佳裂解及純化方法係描述於WO 02/097072中。

根據本發明之較佳裂解流感疫苗抗原製劑包含自生產方法剩餘之殘餘量的Tween 80及/或Triton X-100，儘管該等物質可在製備裂解抗原之後添加或調整其濃度。在一實施例中，Tween 80及Triton X-100兩者均存在。該等非離子性界面活性劑於疫苗劑量中之最終濃度的較佳範圍(自抗原性製劑產生)為：

Tween 80：0.01至1%，或約0.1% (v/v)

Triton X-100：0.001至0.1(% w/v)，或0.005至0.02% (w/v)。

在特定實施例中，自抗原性製劑產生之Tween 80的最終濃度在0.025%-0.09% w/v之範圍變化。在另一特定實施例中，抗原以2倍濃縮混合物形式來提供，其具有0.025%-0.2% (w/v)範圍內之Tween 80濃度，且必須在經佐劑化之最終調配(或於對照調配物中之緩衝液)後稀釋兩次。

在另一特定實施例中，Triton X-100之最終濃度在0.004%-0.017% w/v之範圍變化。在另一特定實施例中，抗原以2倍濃縮混合物形式來提供，其具有0.005%-0.034% (w/v)範圍內之Triton X-100濃度，且必須在經佐劑化之最終調配(或於對照調配物中之緩衝液)後稀釋兩次。

在一實施例中，流感製劑在低含量之硫柳汞存在下或在

不存在硫柳汞之情況下製備。在另一實施例中，所得流感製劑在不存在有機汞防腐劑之情況下係穩定的，詳言之，該製劑不含殘餘硫柳汞。詳言之，流感病毒製劑包含在不存在硫柳汞之情況下或在低含量硫柳汞(通常5 µg/ml或5 µg/ml以下)下經穩定化之血球凝集素抗原。特定而言，B流感病毒株之穩定化作用係藉由諸如α生育酚丁二酸酯(亦稱為維生素E丁二酸酯，亦即VES)之α生育酚衍生物來執行。該等製劑及製備其之方法係揭示於WO 02/097072中。

較佳組合物含有三種自適當流感季節之WHO推薦病毒株製備的失活裂解病毒粒子抗原。

在一實施例中，根據本發明之流感病毒或其抗原性製劑及佐劑含於同一容器中。其稱為'一瓶式方法(one vial approach)'。在另一實施例中，小瓶為預填充注射器。在替代性實施例中，根據本發明之流感病毒或其抗原性製劑及佐劑含於獨立容器或小瓶中且在投與受檢者體內之前或之後的短時間內混合。其稱為'兩瓶式方法'。合適地，雙組份疫苗係由0.5 ml存在於I型玻璃小瓶(抗原容器)中之濃縮失活裂解病毒粒子抗原及含有0.5 ml佐劑之預填充I型玻璃注射器(佐劑容器)組成。或者，疫苗為雙組份疫苗，其存在於2個小瓶中(一者用於抗原，一者用於佐劑，各為10劑量)，以用於在室溫下，在投與第一患者前24小時內混合，且隨後在4°C下儲存短期時間(例如至多一週)以供後續投藥。在注射時，將含有佐劑之多劑量小瓶或注射器之內含物注射至含有濃縮裂解病毒粒子抗原之小瓶中。混合之

後，將內含物抽取至注射器中且藉由肌肉內針替代此針。一劑量經復水佐劑化之流感候選疫苗相應於0.5 ml。

在一實施例中，如藉由SRID所測定，各人類劑量之免疫原性組合物每劑量每流感病毒株含有15 μg 之HA。其尤其適用於老年人群。

本發明之重要態樣為，流感抗原可以比先前已認為適用者更低之量來使用，合適地以每人類劑量之免疫原性組合物，每病毒株小於15 μg HA之含量，例如每病毒株1與10 μg 之間HA的含量來使用。

因此，在一實施例中，各人類劑量之免疫原性組合物含有低劑量之血球凝集素(HA)，其係定義為如藉由單向輻射免疫擴散法(SRD)所量測，每劑量小於15 μg 之HA，合適地為小於10 μg 之量(J.M. Wood等人：J. Biol. Stand. 5 (1977) 237-247；J. M. Wood等人，J. Biol. Stand. 9 (1981) 317-330)。在特定實施例中，人類劑量之免疫原性組合物每病毒株包含約10 μg ，例如在5與15 μg 之間，合適地在6與14 μg 之間，例如在7與13 μg 之間或在8與12 μg 之間或在9與11 μg 之間或10 μg 之含量的血球凝集素(HA)劑量。在另一實施例中，人類劑量之免疫原性組合物每病毒株包含約5 μg ，例如在1與9 μg 之間或在2與8 μg 之間，或合適地在3與7 μg 之間或4與6 μg 之間或5 μg 之含量的血球凝集素(HA)劑量。合適之量為1.9 μg 、2.5 μg 、3.8 μg 、5.0 μg 、7.5 μg 或10 μg HA，或低於15 μg 之任何適量之HA，其將經測定以便疫苗組合物滿足如本文所定義之功效標準。

有利地，可使用 1 μg 之 HA，或諸如 0.5 μg 之 HA 之甚至更小劑量的 HA 劑量，其將允許滿足表 2 中所定義之調節標準。HA 之合適量為(例如)每人類劑量之免疫原性組合物，每流感病毒株 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 $\mu\text{g(w/v)}$ 之任何量。HA 之該低量可低至實際上可行之量，其限制條件為，其允許調配滿足國際(例如)EU 或 FDA 功效標準之疫苗，如下文所詳述(參見表 2 及如列舉之特定參數)。

合適地，使用 0.5 ml 之疫苗劑量。1 ml 之疫苗劑量(0.5 ml 佐劑加 0.5 ml 抗原製劑)亦為合適的。有利地，根據本發明之疫苗劑量，詳言之為低 HA 量疫苗，可以比習知注射裂解流感疫苗更小之體積來提供，該體積通常為每劑量約 0.5、0.7 或 1 ml。根據本發明之低體積劑量合適地為每劑量低於 500 μl ，通常低於 300 μl 且合適地不大於約 200 μl 或 200 μl 以下。劑量體積之輕微修改將視原始總樣本中之 HA 濃度，或視以藉由鼻內或皮內路徑給藥之較小劑量的傳遞路徑，或視標靶群體(例如嬰兒可接收成年人劑量之一半)而按慣例來進行。

合適地，欲包括在免疫原性或疫苗組合物中之流感病毒病毒株為大流行病間期(季節性)病毒株，或與大流行病爆發相關聯或具有欲與大流行病爆發相關聯之潛能的病毒株，或合適地，呈該等病毒株之多價組合物、混合物形式。

大流行病間期病毒株為(例如)在大流行病間期在全世界

範圍內流行之病毒株，諸如(但不限於)：H1N1、H1N2、H3N2或B。市售流感疫苗為包括一種流感B病毒株及兩種流感A病毒株(H1N1、H3N2)之三價組合。

賦予其引起與大流行病流感病毒株相關聯之流感疾病大流行或爆發的潛能之流感病毒病毒株的特徵在於：其含有與當前流行病毒株中之血球凝集素相比新的血球凝集素，且因此幾乎所有人均天然免疫；其能夠在人群中水平傳播；且其對人類而言為病原性的。新血球凝集素可為在人群中歷時延長時期，可能數十年尚不明顯之血球凝集素，諸如H2。或，其可為之前尚未在人群中流行之血球凝集素，例如H5、H9、H7或H6，其均發現於禽類物種(鳥類)中。在任一狀況下，大多數或至少大部分或甚至整個群體先前均未遇到抗原且對其天然免疫。目前，已由WHO識別為可能可在人類中引起大流行病之流感A病毒為高病原性H5N1禽流感病毒。因此，根據本發明之大流行病疫苗將合適地包含H5N1病毒。適於包括在所主張組合物中之兩種其他合適病毒株為H9N2或H7N1。

某些群體在大流行病情況下通常存在增加之感染流感的風險。老年人、慢性病患者及小孩尤其敏感，但許多幼兒及明顯健康之人亦存在風險。對於H2流感而言，1968年後出生之群體部分具有增加之風險。對於該等群體而言重要的係受到儘可能快且簡單方式之有效保護。

存在增加風險之另一人群為旅行者。當今人們比過去旅行得更多，且其中最新病毒出現之區域，即中國及東南亞

已成為近年來流行之旅行目的地。旅行模式之該改變使新病毒能在數週而非數月或數年內到達整個地球。

因此，對於該等人群而言，尤其需要疫苗接種以在大流行病情況或潛在大流行病情況下保護以抵抗流感。合適之病毒株為(但不限於)：H5N1、H5N8、H5N9、H7N4、H9N2、H7N7、H7N3、H2N2及H7N1。人類中之其他大流行病病毒株為：H7N3(2例報導於加拿大)、H10N7(2例報導於埃及)及H5N2(1例報導於日本)及H7N2。作為大流行病病毒株或易與大流行病相關聯之病毒株的流感病毒株將在本文件中簡稱為"大流行病病毒株"。

本發明之流感藥劑合適地滿足某些國際疫苗標準。標準在國際上應用於量測流感疫苗之功效。對於與流感疫苗之每年批准程序相關之臨床試驗而言，血清學變數係根據用於人類用途之歐洲藥品評價署(European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)標準(CHMP/BWP/214/96，專利醫藥品委員會(Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP)，*Note for harmonization of requirements for influenza vaccines*, 1997. CHMP/BWP/214/96函件N° 96-0666:1-22)來評估(表2)。對成年人群體(18-60歲)及老年群體(>60歲)而言，要求係不同的(表2)。對於大流行病間期流感疫苗而言，疫苗中所包括之所有流感病毒株之評估值(血清轉化因子、血清轉化率、血清保護率)中的至少一者應滿足歐洲要求。等於或大於1:40之效價比例係視為最相關的，因為預期該等效價為保護之最佳關聯數

[Beyer W 等人 1998. Clin Drug Invest.;15:1-12]。

如"大流行病流感疫苗銷售核准應用之檔案結構及內容準則 (Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorisation application)(CHMP/VEG/4717/03, 2004年4月5日, 或更近期, 2007年1月24日標題為'Guidelines on flu vaccines prepared from viruses with a potential to cause a pandemic'之 EMEA/CHMP/VWP/263499/2006, 可在 www.emea.eu.int 得到)中所指定, 在不存在用於源自非流行性病毒株之流感疫苗的特定標準之情況下, 期望大流行病候選疫苗應(至少)能夠在兩劑量疫苗後, 在未經預致敏之成年人或老年人受檢者中引發足夠之免疫學反應以合適地滿足用於現存疫苗之所有3種當前標準設定。EMEA準則描述在大流行病之情形下群體將具天然免疫性的情況, 且因此假定用於季節性疫苗之所有3種CHMP標準將藉由大流行病候選疫苗而得以滿足。在預疫苗接種血清陰性受檢者中, 無需證明其之明確要求。

本發明之組合物合適地滿足用於組合物中所包括之大流行病病毒株的至少一種該標準(一種標準足以獲得批准), 合適地滿足至少兩種或通常至少所有3種如表2A中所列舉之保護標準。

表 2A(CHMP標準)

	18-60歲	>60歲
血清轉化率*	>40%	>30%
轉化因子**	>2.5	>2.0
保護率***	>70%	>60%

*血清轉化率係定義為各群體中具有保護性疫苗接種後效價 $\geq 1:40$ 之受檢者比例。血清轉化率簡單表示為在疫苗接種前具有 $< 1:10$ 之HI效價且在疫苗接種後具有 $\geq 1:40$ 之HI效價的受檢者百分比。然而，若初始效價 $\geq 1:10$ ，則在疫苗接種後，抗體之量需要增加至少4倍。

**轉化因子係定義為對於各疫苗病毒株而言，疫苗接種後之血清HI幾何平均效價(GMT)的增加倍數。

***保護率係定義為在疫苗接種之前為血清陰性且在(保護性)疫苗接種後HI效價 $\geq 1:40$ 或在疫苗接種之前為血清陽性且疫苗接種後效價顯著增加4倍之受檢者的比例；其通常視為指示性保護。

由歐洲健康管理機構(European health regulatory authority)(CHMP-人用藥品委員會(Committee for Medicinal Products for Human Use))定義之70%血清保護率為通常要求滿足每年季節性流感疫苗的3種標準之一，且亦預期該CHMP滿足大流行病候選疫苗。然而，數學模型建立已指示，在群體含量下，抵抗某些漂移病毒株僅30%有效之疫苗亦可有益於幫助降低大流行病之量值，且使用抵抗大流行病病毒株具有30%功效(30%之交叉保護)之(大流行病前)疫苗的大流行病疫苗接種行為可有效地使臨床發病率降低75%，且因此降低群體中之發病率/死亡率(Ferguson等人，Nature 2006)。

FDA已公開對支持大流行病流感疫苗之許可所需之臨床資料(Clinical Data Needed to Support the Licensure of

Pandemic Influenza Vaccines)的指引草案(CBER標準草案)(可得自 the Office of Communication, Training and Manufacturers Assistance (HFM-40), 1401 Rockville Pike, Suite 200N, Rockville, MD 20852-1448, 或藉由呼叫1-800-835-4709 或 301-827-1800 得到, 或可得自網際網路 <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>), 且所建議之標準亦係基於CHMP標準。FDA使用稍有不同之年齡截止點。適當終點類似地包括: 1)達到HI抗體效價 $\geq 1:40$ 之受檢者百分比, 且2)血清轉化率, 其係定義為疫苗接種後HI抗體效價之4倍升高。幾何平均效價(GMT)應包括在結果中, 但資料應不僅包括點估算, 而且包括血清轉化發生率之95%信賴區間的下限, 且HI效價 $\geq 1:40$ 之第42天發生率必須超過目標值。因此, 應提供該等評估之點估算的該等資料及95%信賴區間(CI)。FDA指引草案需要滿足兩種目標。其概括於表2B中。

表 2B(CBER標準草案)

	18 - 64歲	>64歲
血清轉化率*	>40%	>30%
HI效價率 $\geq 1:40$	>70%	>60%

*血清轉化率係定義為: a)對於基線效價 $\geq 1:10$ 之受檢者而言, 4倍或4倍以上升高; 或b)對於基線效價 $< 1:10$ 之受檢者而言, 升高至 $\geq 1:40$ 。

必須在真實值之95% CI的下限處滿足該等標準。

因此, 在本發明之一態樣中, 提供一種如本文中所主張之組合物、方法或用途, 其中藉由投與所涵蓋之流感組合

物誘導之該免疫反應或保護滿足所有三種關於流感疫苗功效之EU管理標準。合適地，對於病毒株或組合物之各病毒株而言，滿足以下標準之至少一種，合適地為兩種或三種：

-在成年人群體(年齡18-60歲)及/或亦合適地在老年人群體(年齡>60歲)中，>50%、>60%、>70%，合適地為>80%或>90%之血清轉化率；

-在成年人群體(年齡18-60歲)及/或亦合適地在老年人群體(年齡>60歲)中，>75%、>80%、>85%，合適地為>90%之保護率；

-在成年人群體(年齡18-60歲)及/或亦合適地在老年人群體(年齡>60歲)中，>4.0、>5.0、>6.0、>7.0、>8.0、>9.0或為10或10以上之轉化因子。

在特定實施例中，根據本發明之組合物將在成年人群體中滿足>60%或>70%或合適地>80%之血清轉化率及>75%，合適地>80%之保護率兩者。在另一特定實施例中，根據本發明之組合物將在成年人群體中滿足>5.0或>7.0或合適地>10.0之轉化因子及>60%或>70%或合適地>80%之血清轉化率兩者。在另一特定實施例中，根據本發明之組合物將在成年人群體中滿足>5.0或>7.0或合適地>10.0之轉化因子及>75%，合適地>80%之保護率兩者。在又一特定實施例中，根據本發明之組合物將滿足10.0或10.0以上之轉化因子、80%或80%以上之血清轉化率，及80%或80%以上之保護率。

在另一實施例中，所主張之疫苗，合適地為含有大流行病病毒株或易與大流行病相關聯之病毒株的大流行病前疫苗，將具有抵抗流行大流行病病毒株之30%功效(30%之交叉保護)。詳言之，所主張之疫苗將滿足抵抗漂移病毒株之至少30%的血清保護率，合適地為抵抗漂移病毒株之至少40%或>50%或>60%之血清保護率。合適地，血清保護率將為抵抗漂移病毒株之>70%，或合適地為>80%。能夠賦予交叉保護之該大流行病前疫苗將能夠使總感染發病率大體上降低至少50%，或合適地為至少75%，且因此降低群體中之發病率/死亡率。

在又一實施例中，所主張之經佐劑化疫苗能夠在至少50%之受檢者，至少60%，合適地至少70%或合適地大於75%之受檢者中誘導抵抗漂移病毒株或來自不同分枝之病毒株的中和抗體。合適地，該效應係以低劑量之抗原，諸如以7.5 μg HA或甚至更低抗原劑量，諸如3.8 μg 或1.9 μg 之HA來實現。

合適地，對於其他群體，諸如兒童及任何免疫受損群體而言，亦滿足任何或所有該等標準。

在本發明之一態樣中，人類劑量之免疫原性組合物含有來自單一流感病毒株之血球凝集素(HA)，且稱為"單價"流感組合物。在本發明之另一態樣中，人類劑量之免疫原性組合物包含來自一種以上流感病毒株之血球凝集素(HA)，且稱為"多價"流感組合物。根據本發明之合適多價組合物為二價組合物(包含來自兩種流感病毒株之血球凝集

素(HA)，該等病毒株諸如(而不排他地)兩種與大流行病相關聯或易與大流行病相關聯之病毒株，例如H5+H2)，三價組合物(包含來自三種流感病毒病毒株，視情況來自兩種A病毒株及一種B病毒株之血球凝集素(HA)，該等病毒株諸如(但不限於)B/山形或B/維多利亞)，四價組合物(包含來自四種流感病毒病毒株之血球凝集素(HA))或五價組合物(包含來自五種流感病毒病毒株之血球凝集素(HA))。合適之四價組合物包含來自兩種A病毒株及兩種來自不同譜系(諸如B/山形或B/維多利亞)之B病毒株的血球凝集素。或者，四價組合物包含來自三種A病毒株(視情況為H1N1、H3N2，及與大流行病相關聯或易與大流行病相關聯之一種A病毒株)及一種B病毒株(諸如B/山形或B/維多利亞)之血球凝集素。另一替代性四價組合物包含來自四種A病毒株之血球凝集素，該等A病毒株係來自與大流行病相關聯或易與大流行病相關聯之病毒株，諸如禽類病毒株，諸如H5+H2+H7+H9。特定而言，諸如大流行病二價(例如H5+H2)或三價或四價(例如H5+H2+H7+H9)組合物之多價經佐劑化大流行病組合物提供抵抗大流行病流感A威脅亞型之預先免疫及抵抗威脅亞型之耐久性預致敏的優點。通常，使用便利時程(例如間隔6-12個月)及視情況週期性加強預見(例如10年)，自6週年齡起給予兩劑量。視情況，該大流行病疫苗可與季節性疫苗組合。

多價組合物亦可包含5種以上流感病毒株，諸如6、7、8、9或10種流感病毒株。

當兩種B病毒株用於多價季節性組合物中時，其可來自兩種不同譜系(視情況來自B/維多利亞及B/山形)。該B病毒株之至少一者，合適地為兩種B病毒株將來自流行譜系。該組合物尤其適用於兒童。合適地，當適用於兒童之多價組合物包括兩種B病毒株時，通常分配至B病毒株之抗原量在兩種B病毒株之間分配。特定言之，經佐劑化四價(H1+H3+兩種B譜系)流感疫苗提供以下優點：以其與未經佐劑化疫苗相比(就同源性及漂移保護，及其抵抗兩種流行B譜系之功效而言)優越之功效用於天然兒童之增強預防作用，及基於年齡之可能全年性免疫。一劑量或兩劑量合適地係早在自6週年齡起或在6至35個月之間年齡時投與。

在特定實施例中，人類劑量之免疫原性組合物為三價免疫原性或疫苗組合物，其包含來自兩種A病毒株(視情況為H1N1、H3N2)及一種B病毒株之血球凝集素(HA)。合適地，每病毒株之HA為低量之HA(視情況每病毒株10 µg HA或10 µg以下)且其係如上文所定義。合適地，每病毒株之HA係約5 µg或5 µg以下，約2.5 µg或2.5 µg以下。佐劑係如本文中所定義且尤其如表1中所定義。合適地，佐劑組合物為每劑量分別包含5-6 mg之間，5-6 mg之間及2-3 mg之間量的角鯊烯、α-生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。或者，佐劑組合物為每劑量分別包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、α-生育酚及聚山梨醇酯80的水包油乳液。該等經佐劑化免疫原性組合物

或疫苗尤其適用於成年人(18-60歲)或年長兒童(3-17歲)群體，且可提供抵抗H3N2漂移變異體及抵抗來自不同譜系之B病毒株的交叉保護。

在另一特定實施例中，人類劑量之免疫原性組合物為四價免疫原性或疫苗組合物，其包含來自兩種A病毒株(視情況為H1N1、H3N2)及兩種B病毒株(視情況來自不同譜系，諸如來自B/維多利亞及B/山形)之血球凝集素(HA)。合適地，每病毒株每劑量之HA係為約15 μg 。合適地，每病毒株之HA為低量之HA(視情況每病毒株每劑量約10 μg HA或10 μg 以下，以便達成每劑量40-45 μg HA之最大值)且係如上文所定義。合適地，每病毒株之HA係為約5 μg 或5 μg 以下，約2.5 μg 或2.5 μg 以下。佐劑係如本文中所定義且尤其如表1中所定義。合適地，佐劑組合物為每劑量分別包含5-6 mg之間，5-6 mg之間及2-3 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。或者，佐劑組合物為每劑量分別包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。包含第二B病毒株之該組合物尤其適用於極幼小兒童，尤其在預先暴露或預致敏係重要之時。佐劑將提供向該群體傳遞增加保護之優點。用於兒童群體之人類劑量的免疫原性組合物合適地為成年人劑量之一半，且將合適地每病毒株包含2.5 μg 之HA及水包油乳液，該水包油乳液每劑量包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80。

或者，合適地具有上文關於四價組合物所定義之特徵及量的該額外B病毒株可以如上文所述之單價組合物至三價組合物形式來添加。使用諸如10 μg 或低於10 μg ，或5 μg 或低於5 μg ，或視情況對於幼小兒童而言，2.5 μg 或低於2.5 μg 的低量HA將具有限制添加流感病毒株對全球疫苗供應之影響的優點。合適地，當兩種B病毒株包括在疫苗組合物中時，通常分配至B病毒株之抗原量在兩種B病毒株之間分配。

在另一特定實施例中，人類劑量之免疫原性組合物為四價免疫原性或疫苗組合物，其包含來自兩種大流行病間期A病毒株(視情況為H1N1、H3N2)，一種B病毒株及一種與大流行病相關聯或易與大流行病相關聯之A病毒株(視情況為H5N1、H9N2、H7N7、H5N8、H5N9、H7N4、H7N3、H2N2、H10N7、H5N2、H7N2及H7N1)的血球凝集素(HA)。合適地，每病毒株之HA為低量之HA(視情況每病毒株10 μg HA或10 μg 以下)且其係如上文所定義。合適地，每病毒株之HA係為約5 μg 或5 μg 以下，約2.5 μg 或2.5 μg 以下。佐劑係如本文中所定義且尤其如表1中所定義。合適地，佐劑組合物為每劑量分別包含5-6 mg之間，5-6 mg之間及2-3 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。或者，佐劑組合物為每劑量分別包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及在1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。

在另一特定實施例中，人類劑量之免疫原性組合物為四

價免疫原性或疫苗組合物，其包含來自三種大流行病間期A病毒株(視情況為H1N1及兩種H3N2病毒株)及一種B病毒株之血球凝集素(HA)。合適地，每病毒株之HA為低量之HA(視情況為每病毒株10 μg HA或10 μg 以下)且其係如上文所定義。合適地，每病毒株之HA係為約5 μg 或5 μg 以下，約2.5 μg 或2.5 μg 以下。佐劑係如本文中所定義且尤其如表1中所定義。合適地，佐劑組合物為每劑量分別包含5-6 mg之間，5-6 mg之間及2-3 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。或者，佐劑組合物為每劑量分別包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。包含第三季節性A病毒株之該組合物尤其適用於極幼小兒童。合適地，三種大流行病間期病毒株中之兩者為H3N2病毒株，第二H3N2病毒株與第一H3N2病毒株相比具有最接近或疏遠分枝。佐劑將提供向該群體傳遞增加保護之優點。用於兒童群體之人類劑量之免疫原性組合物合適地為成年人劑量之一半，且將合適地每病毒株包含2.5 μg 之HA及水包油乳液，該水包油乳液每劑量包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80。

在另一特定實施例中，人類劑量之免疫原性組合物為五價免疫原性或疫苗組合物，其包含來自兩種大流行病間期A病毒株(視情況為H1N1、H3N2)，兩種B病毒株(視情況來自不同譜系，諸如來自B/維多利亞及B/山形)及一種與大

流行病相關聯或易與大流行病相關聯之A病毒株(視情況為H5N1、H9N2、H5N8、H5N9、H7N4、H7N7、H7N3、H2N2、H10N7、H5N2及H7N1)之血球凝集素(HA)。合適地，每病毒株每劑量之HA係約15 μg 。合適地，每病毒株之HA為低量之HA(視情況每病毒株每劑量約10 μg HA或10 μg 以下，以便達成每劑量40-45 μg HA之最大值)且係如上文所定義。合適地，每病毒株之HA係約5 μg 或5 μg 以下，約2.5 μg 或2.5 μg 以下。佐劑係如本文中所定義且尤其如表1中所定義。合適地，佐劑組合物為每劑量分別包含5-6 mg之間，5-6 mg之間及2-3 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。或者，佐劑組合物為每劑量分別包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。

在另一特定實施例中，人類劑量之免疫原性組合物為五價免疫原性或疫苗組合物，其包含來自三大流行病間期A病毒株(視情況為H1N1及兩種H3N2病毒株)及兩種B病毒株(視情況來自不同譜系，諸如來自B/維多利亞及B/山形)之血球凝集素(HA)。合適地，每病毒株之HA為低量之HA(視情況為每病毒株10 μg HA或10 μg 以下)且其係如上文所定義。合適地，每病毒株之HA係約5 μg 或5 μg 以下，約2.5 μg 或2.5 μg 以下。佐劑係如本文中所定義且尤其如表1中所定義。合適地，佐劑組合物為每劑量分別包含5-6 mg之間，5-6 mg之間及2-3 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。或者，佐劑組合物為每劑量分

別包含 2.5-3.5 mg 之間，2-3 mg 之間及 1-2 mg 之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯 80 之水包油乳液。

因此，在特定實施例中，本發明提供一種包含角鯊烯及 HA 之流感免疫原性組合物，其中角鯊烯：HA 總量(所包括之所有流感病毒株)重量比係在約 50-150 或約 150-400 之間(例如約 200-300)之範圍內。該等組合物合適地(但不排他地)用於老年群體且具最佳平衡反應原性及免疫原性。在另一實施例中，本發明提供一種包含角鯊烯及 HA 之流感免疫原性組合物，其中角鯊烯:HA 總量(所包括之所有流感病毒株)重量比係在約 50-400，例如約 50-100、75-150、75-200、75-400、100-200、100-250 或 200-400 之範圍內。對於特定群體而言，至少符合兩種，適當地是三種所有保護標準(表 2)，則該比率將是合適地。TLR 促效劑可包括在內，合適地為 TLR-4(例如選自：3D-MPL、MPL；AGP 分子，諸如 RC527 或 RC529，或 ER804057)或 TLR-9(合適地為 CpG 寡核苷酸，例如 CpG7909)促效劑。合適之角鯊烯:TLR-4 重量比係在約 100-450，例如 50-250、50-150、100-250、200-250、350-450 之間。合適之角鯊烯:TLR-9 重量比係在約 50-1000，例如 50-500、100-1000、100-400、400-600 之間。HA 可來自季節性流感病毒株。該等組合物合適地(但不排他地)用於成年人或小兒科群體且具最佳平衡反應原性及免疫原性。合適地，HA 來自至少三種、至少四種流感病毒株。合適地，存在三種季節性(例如 H1N1、H3N2、B)病毒株。合適地，當存在四種病毒株

時，其來自以下各群：四種季節性病毒株(例如 H1N1、H3N2、兩種 B 病毒株；或 H1N1、B、兩種 H3N2 病毒株)或一種大流行病(例如禽類)病毒株加三種季節性病毒株(例如 H1N1、H3N2、B)之群。

所有主張之經佐劑化免疫原性組合物或疫苗可有利地依賴於佐劑以提供持久免疫反應，歷經超過 6 個月之時期，合適地為疫苗接種後之 12 個月。

合適地，上述反應係在同時進行之初級免疫反應期間投與之一劑量後或通常在兩劑量後獲得。所主張之組合物之特定優點在於，免疫反應係在僅一劑量之經佐劑化組合物或疫苗之後獲得。亦合適的，在同時進行之初級免疫反應期間投與兩劑量，其適用於天然或免疫受損群體或個體。合適地，在兒童中可能需要兩劑量，尤其在低於 6 歲或 9-10 歲之年齡，先前未經疫苗接種時需要。

因此，在本發明之一態樣中提供一種非活大流行病流感病毒抗原製劑，尤其為裂解流感病毒或其抗原性製劑在製造用於抵抗流感之一劑量或兩劑量疫苗接種之疫苗組合物中的用途，其中一劑量或兩劑量疫苗接種產生滿足關於流感疫苗之至少一個，合適地為兩個或三個國際管理要求的免疫反應。在另一特定實施例中，該一劑量疫苗接種亦或另外產生 CD4 T 細胞免疫反應及/或 B 細胞記憶反應，其比用未經佐劑化疫苗所獲得之彼反應更高。在特定實施例中，該免疫反應為交叉反應性抗體反應或交叉反應性 CD4 T 細胞反應或兩者。在特定實施例中，人類患者對疫苗接

種病毒株具天然免疫性(亦即不具有預存在之免疫性)。特定言之，疫苗組合物含有低HA抗原量及具有比先前已認為適用之含量更低含量之組份的水包油乳液佐劑，且該等量係如本文中所定義。特定言之，疫苗組合物係如本文中所定義。詳言之，疫苗組合物之免疫原性特性係如本文中所定義。合適地，疫苗係經肌肉內投與。

用於本發明之疫苗接種(視情況為首次疫苗接種)之免疫原性組合物的免疫原性特性

在本發明中，與用未經佐劑化，亦即不含有任何外源性佐劑之相應組合物(本文中亦稱為"普通組合物")所獲得之CD4+ T細胞免疫反應相比，經佐劑化之免疫原性組合物合適地能夠誘導抵抗或抵抗組份抗原或抗原性組合物中之至少一者的改良CD4+ T細胞免疫反應。在特定實施例中，當免疫原性流感組合物來自若干流感病毒株，其中一者為第二B病毒株或第三大流行病間期A病毒株或大流行病病毒株時，該改良之CD4+ T細胞免疫反應係抵抗該等病毒株中之至少一者。在另一實施例中，經佐劑化之免疫原性組合物，其中佐劑組份具有比先前認為適用者更低之含量且通常如上文所定義，合適地能夠誘導抵抗或抵抗組份抗原或抗原性組合物中之至少一者的CD4+ T細胞免疫反應，其至少可與用經一些先前技術佐劑佐劑化之組合物所獲得之彼反應相當。該特徵在下文中將稱為"相當CD4+ T細胞免疫反應"。

"經改良之CD4+ T細胞免疫反應"意謂在投與如本文所定

義之經佐劑化免疫原性組合物後，在人類患者中獲得比投與不含佐劑之相同組合物後獲得之彼者更高的CD4+反應。舉例而言，與投與包含流感病毒或其抗原性製劑之未經佐劑化免疫原性組合物後誘導之反應相比，在投與包含流感病毒或其抗原性製劑以及水包油乳液佐劑之免疫原性組合物後，在人類患者中獲得更高之CD4+ T細胞反應，該水包油乳液佐劑包含可代謝油(視情況為角鯊烯)、母育酚(視情況為 α 生育酚)及乳化劑(視情況為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯，諸如Tween 80™或聚山梨醇酯80™)。該經佐劑化之調配物將有利地用以誘導抗流感CD4+ T細胞反應，其能夠偵測藉由MHC II類分子呈現之流感抗原決定基。

合適地，藉由適用於本發明之經佐劑化裂解流感組合物誘導之該免疫學反應高於藉由任何其他未經佐劑化之流感習知疫苗(諸如亞單位流感疫苗或完整流感病毒疫苗)所誘導之免疫學反應。

詳言之(但不排他地)，該"經改良之CD4+ T細胞免疫反應"或"相當CD4+ T細胞免疫反應"係在經免疫未預致敏患者，亦即對該流感病毒或抗原為血清陰性之患者中獲得。該血清陰性可為從未面臨該病毒或抗原(所謂'天然'患者)或者一旦遇到時未能對該抗原反應之該患者的結果。合適地，該經改良之CD4+ T細胞免疫反應係在免疫受損受檢者，諸如通常至少50歲，通常65歲或65歲以上之老年人，或小於65歲之具有高風險醫學病狀之成年人('高風險'成年

人)，或2歲以下兒童中獲得。

(經改良之)CD4+ T細胞免疫反應可藉由量測產生以下細胞激素中任何者之細胞數量來評估：

- 產生至少兩種不同細胞激素(CD40L、IL-2、IFN γ 、TNF α)之細胞
- 產生至少CD40L及另一細胞激素(IL-2、TNF α 、IFN γ)之細胞
- 產生至少IL-2及另一細胞激素(CD40L、TNF α 、IFN γ)之細胞
- 產生至少IFN γ 及另一細胞激素(IL-2、TNF α 、CD40L)之細胞
- 產生至少TNF α 及另一細胞激素(IL-2、CD40L、IFN γ)之細胞。

與投與未經佐劑化之組合物相比，當產生任何上述細胞激素之細胞在投與經佐劑化組合物後具有更高量時，存在"經改良之"CD4+ T細胞免疫反應。通常，將滿足上文中所提及之5種條件之至少一者，合適地為兩者。在特定實施例中，與未經佐劑化之群組比較，在經佐劑化之群組中，產生所有四種細胞激素之細胞將以更高量存在。與用經一些先前技術佐劑(亦即，經高含量之相同組份)佐劑化之組合物所獲得之CD4+ T細胞免疫反應相比，當在用經佐劑化之免疫原性組合物獲得之反應中無顯著，視情況無統計學顯著降低時，存在"相當"CD4+ T細胞免疫反應，其中佐劑組份具有比先前認為適用者更低之含量且通常係如本文中

所定義。

在特定實施例中，經改良之CD4 T細胞免疫反應可藉由本發明之經佐劑化流感組合物來賦予，且可理想地在一次單一投藥後獲得。單一劑量方法將(例如)在快速演化爆發情況下具極端相關性。在某些情況下，尤其對於老年人群體而言，或在首次接受疫苗接種以抵抗流感之幼小兒童(9歲以下)之狀況下，或在大流行病之狀況下，投與兩劑量用於彼季節之相同組合物可為有益的。第二劑量之該相同組合物(仍視為'用於首次疫苗接種之組合物')可在進行中之初級免疫反應期間投與且適當間隔。通常，第二劑量之組合物係在首次劑量後數週，或約1個月，例如2週、3週、4週、5週或6週時給予，以有助於在無反應或反應不良之個體中使免疫系統預致敏。在特定態樣中，首次疫苗接種後接著含有異源性流感病毒株之經佐劑化疫苗產物的後續疫苗接種過程。

在特定實施例中，與在以未經佐劑化組合物免疫之個體中誘導之B記憶細胞反應相比，該免疫原性組合物之投藥或者或另外在以經佐劑化免疫原性組合物投藥之患者中誘導經改良之B記憶細胞反應。經改良之B記憶細胞反應意欲意謂如藉由活體外分化作用之刺激所量測(參見實例部分，例如Elispot B細胞記憶之方法)，在遭遇抗原後能夠分化成分泌抗體之血漿細胞的周邊血液B淋巴細胞之增加頻率。在另一實施例中，經佐劑化之免疫原性組合物(其中佐劑組份具有比先前認為適用者更低之含量且通常如上

文所定義)能夠合適地誘導抵抗或抵抗組份抗原或抗原性組合物中至少一者之B記憶細胞反應，其與用經一些先前技術佐劑佐劑化之組合物所獲得之反應相當(亦即無顯著或視情況統計學顯著之劣勢)。該特徵在文中將稱為"相當B記憶細胞反應"。

在又一特定實施例中，用經佐劑化之組合物用於首次疫苗接種之疫苗接種對CD8反應具有不可量測之影響。

合適地，包含用水包油乳液佐劑調配之流感病毒或其抗原性製劑之所主張組合物將有效促進免疫受損或天然免疫人群中之T細胞反應，詳言之該水包油乳液佐劑包含諸如上文所定義之低量的可代謝油(視情況為角鯊烯)、母育酚(視情況為 α -生育酚)及乳化劑(視情況為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯，諸如 Tween 80™或聚山梨醇酯 80™)。合適地，如本發明中所述，如藉由用於流感疫苗之保護關聯數所評估，在抵抗流感之再疫苗接種後，投與單一劑量之經佐劑化免疫原性組合物用於首次疫苗接種將能夠提供比用未經佐劑化流感疫苗之疫苗接種所得者更佳之血清保護。與用未經佐劑化之調配物所獲得者相比，所主張之經佐劑化調配物亦將有利地誘導抵抗流感病毒之經改良CD4 T細胞免疫反應。該特性可與對流感抗原性暴露之疫苗接種或感染後增加之反應性相關聯。此外，其亦可與交叉反應性相關聯，亦即反應以抵抗變異體流感病毒株之更高能力。該定性及/或定量改良之反應可在大流行病之狀況下有益於所有群體，且尤其有益於諸如老年人群體(65歲及

65歲以上)及尤其高風險老年人群體之免疫受損人群。其亦可有益於大多數天然嬰兒群體(5歲以下，合適地2歲以下)。當組合物包含至少一種大流行病病毒株時，該經改良之反應就用於預致敏而言係有益的，(例如)在大流行病爆發之前或開始時受益於含有漂移變異體之儲存疫苗。其可導致總發病率及死亡率降低且預防由於肺炎及其他流感類疾病而入院之緊急事件。此外，其允許誘導CD4 T細胞反應，與用未經佐劑化調配物所誘導之反應相比，其在時間上更持久，例如在首次疫苗接種後仍存在一年。所有該等優點可用所主張之佐劑組合物而獲得，同時與具有更高組份量之佐劑相比降低總的反應原性。

合適地，CD4 T細胞免疫反應(諸如在未預致敏受檢者中獲得之"經改良"或"相當"CD4 T細胞免疫反應)涉及交叉反應性CD4 T佐劑化反應之誘導。詳言之，交叉反應性CD4 T細胞之量增加。'交叉反應性'CD4反應意謂CD4 T細胞靶向視情況來自不同分枝或譜系之流感病毒株之間的共用抗原決定基。

通常，可用流感疫苗僅有效抵抗具有擁有類似抗原性特徵之血球凝集素之流感病毒的感染病毒株。當感染(流行)流感病毒已經歷造成表面醣蛋白(詳言之為血球凝集素)中之胺基酸改變(抗原性漂移變異體病毒病毒株)的微小改變(諸如點突變或點突變積聚)時，疫苗仍可提供一些保護，儘管其僅可提供有限保護，因為新產生之變異體可逃避藉由先前流感感染或疫苗接種所誘導之免疫性。抗原性漂移

引起在大流行病間期發生之每年流行病(Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394)。交叉反應性CD4 T細胞之誘導向本發明之組合物提供額外優點，即其亦可提供交叉保護，換言之，抵抗異源性感染之保護，亦即，抵抗藉由作為免疫原性組合物中所含之流感病毒株之變異體(例如漂移變異體)的流行流感病毒株所引起之感染的保護。當流行病毒株難以在卵中增殖或難以在細胞培養物中產生時，此可為有利的，使得漂移病毒株之用途具有研究替代性。當受檢者間隔若干月或一年來接收首次及第二次疫苗接種時，此亦可為有利的，且用於第二次免疫之免疫原性組合物中之流感病毒株為用於首次疫苗接種之組合物中所用病毒株之漂移變異病毒株。

因此，如本文中所述之經佐劑化流感免疫原性組合物在經疫苗接種之老年或年幼兒童受檢者中具有誘導血清保護及交叉反應性CD4 T細胞之較高能力。該特徵可與反應以抵抗存在於免疫原性組合物中之病毒株之變異病毒株的較高能力相關聯。其可經證明為在大流行病情況下之重要優點。舉例而言，包含至少一種大流行病病毒株(視情況為H5、H2、H9、H7或H6病毒株中之任何者)之免疫原性流感組合物可在經該漂移病毒株後續疫苗接種後或在經該漂移病毒株感染後，提供反應以抵抗大流行病變異體(亦即該大流行病病毒株之漂移病毒株)之較高能力。舉例而言，經佐劑化疫苗組合物包含A/印度尼西亞病毒株且能夠產生抵抗一種，合適地為一種以上漂移病毒株，諸如A/香

港、A/土耳其、A/越南及/或A/安徽病毒株之交叉保護性及/或交叉反應性免疫反應。

在用流感疫苗之疫苗接種後偵測交叉反應性CD4 T細胞

在經典三價流感疫苗投藥(3週)後，對應於與疫苗中存在之病毒株製劑(H3N2：A/巴拿馬/2007/99，H1N1：A/喀裏多尼亞/20/99，B：B/山東/7/97)同源之抗原性病毒株製劑(完整病毒或裂解抗原)的周邊血液CD4 T細胞之頻率存在實質上增加(參見實例III)。若周邊血液CD4 T細胞經分類為漂移病毒株之流感病毒株(H3N2：A/悉尼/5/97，H1N1：A/北京/262/95，B：B/山梨/166/98)再刺激，則可見頻率之相當增加。相反，若周邊血液CD4 T細胞由該領域中之專家以分類為轉移病毒株(H2N2：A/新加坡/1/57，H9N2：A/香港/1073/99)之流感病毒株再刺激，則在疫苗接種後不存在可觀測之增加。

能夠識別同源性及漂移流感病毒株之CD4 T細胞已在本文件中命名為"交叉反應性的"。如本文中所述之經佐劑化流感組合物已能夠展示異源亞型交叉反應性，因為存在可觀測之抵抗漂移流感病毒株的交叉反應性。如上文所述，包含至少一種大流行病病毒株之疫苗調配物有效抵抗漂移大流行病病毒株之能力可證明為大流行病狀況下之重要特徵。

與上述觀測一致，已在人類中識別由不同流感病毒株共用之CD4 T細胞抗原決定基(Gelder C等人1998, *Int Immunol.* 10(2):211-22；Gelder CM等人1996 *J Virol.*

70(7):4787-90 ; Gelder CM 等人 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506)。

由於其免疫原性特性，所主張之組合物可能夠建立抵抗人類流感大流行病威脅之主動疫苗接種策略，包括大流行病前疫苗之儲存，以更佳應付大流行病之開始。亦可能夠建立抵抗流行病毒株之主動疫苗接種策略，該流行病毒株可不與疫苗組合物中所存在之病毒株精確匹配。在特定實施例中，經佐劑化之組合物可賦予提供抵抗血球凝集素中之已經歷主要改變(諸如(例如)兩種不同物種之間的基因重組)(抗原性轉移)之流行病毒株的更佳保護，當前可用疫苗不具有抵抗該等流行病毒株之功效。

特定而言，大流行病前疫苗為包含至少一種類似於當前鳥群中流行之病毒株的大流行病病毒株(視情況為H5N1(禽流感))且已(例如)經由使用反向遺傳學而產生之疫苗。以對大流行病前疫苗反應而發展之免疫性可允許免疫系統在準備就緒之情況下經'預致敏'或'培養'，且藉此允許在遇到實際大流行病病毒株後更快速地發展保護性免疫反應，引起對流感之相關大流行病病毒株之敏感性降低。一旦WHO已宣布大流行病，且識別最終大流行病病毒株(其可為漂移病毒株或不可為漂移病毒株)，大流行病前疫苗亦將在當大流行病疫苗變為可用時允許對大流行病疫苗更快速之免疫反應。

再疫苗接種及用於再疫苗接種之組合物(加強組合物)

在本發明之一態樣中，提供以下各者：

- (a)來自第一流感病毒株之流感病毒或其抗原性製劑，及
- (b)如本文中所述定義之水包油乳液佐劑

在製造如本文中所述定義之用於保護以抵抗由作為該第一流感病毒株之變異體之流感病毒株引起的流感感染之免疫原性組合物中的用途。

亦提供一種免疫原性組合物，其包含來自第一流感病毒株之流感病毒或其抗原性製劑，及如本文中所述定義之水包油乳液佐劑，其適用於保護人類或人群抵抗由作為該第一流感病毒株之變異體之流感病毒株引起的流感感染。

本發明之態樣提供流感抗原在製造用於對先前經如本文中所述定義之經佐劑化流感組合物疫苗接種(一或兩劑量)的人類進行再疫苗接種之流感免疫原性組合物中的用途。亦提供一種免疫原性組合物，其包含流感病毒或其抗原性製劑，視情況以及如本文中所述定義之水包油乳液佐劑，其適用於對先前經如本文中所述定義之經佐劑化流感組合物疫苗接種之人類進行再疫苗接種。

在實施例中，用於再疫苗接種之免疫原性組合物含有流感病毒或其抗原性製劑，其與用於首次疫苗接種之流感病毒或其抗原性製劑共用共同之CD4 T細胞抗原決定基。共同之CD4 T細胞抗原決定基意欲意謂來自可由相同CD4細胞識別之不同抗原的肽/序列/抗原決定基(參見以下各者中所述抗原決定基之實例：Gelder C等人1998, *Int Immunol.* 10(2):211-22；Gelder CM等人1996 *J Virol.* 70(7):4787-90；Gelder CM等人1995 *J Virol.* 1995 69(12):7497-506)。

在本發明之一態樣中，提供來自第一流感(視情況為大流行病)病毒株之流感病毒或其抗原性製劑在製造如本文中所定義之用於保護以抵抗由作為該第一流感(視情況為大流行病)病毒株之變異體之流感病毒株引起的流感感染之經佐劑化免疫原性組合物中的用途。亦提供一種經佐劑化免疫原性組合物，其包含來自第一流感(視情況為大流行病)病毒株之流感病毒或其抗原性製劑，及如本文中所定義之佐劑，其適用於保護以抵抗由作為該第一流感(視情況為大流行病)病毒株之變異體之流感病毒株引起的流感感染。

在另一態樣中，本發明提供流感病毒或其抗原性製劑在製造用於對先前經如本文中所主張之經佐劑化流感組合物或經包含變異體流感病毒株之經佐劑化流感組合物(該佐劑如本文中所定義)疫苗接種的人類進行再疫苗接種之流感免疫原性組合物中的用途。亦提供一種流感免疫原性組合物，其包含流感病毒或其抗原性製劑，視情況以及如本文中所定義之水包油乳液佐劑，其適用於對先前經如本文中所主張之經佐劑化流感組合物或經包含變異體流感病毒株之經佐劑化流感組合物(該佐劑如本文中所定義)疫苗接種的人類進行再疫苗接種。

在另一態樣中，本發明提供一種對人群或個體進行疫苗接種以抵抗一種流感病毒病毒株，繼而對該人類或群體進行再疫苗接種以抵抗變異體流感病毒病毒株之方法，該方法包含向該人類投與(i)包含來自第一流感病毒病毒株之流

感病毒或其抗原性製劑及如本文中所定義之佐劑的第一組合物，及(ii)包含該第一流感病毒病毒株之流感病毒病毒株變異體之第二免疫原性組合物。在特定實施例中，該第一病毒株與大流行病相關聯或具有與大流行病爆發相關聯之潛能。在另一特定實施例中，該變異體病毒株與大流行病相關聯或具有與大流行病相關聯之潛能。詳言之，再疫苗接種係由包含至少一種作為流行大流行病病毒株之病毒株的流感組合物來進行。在另一實施例中，該變異體病毒株為漂移變異體，其視情況來自用作第一病毒株之H3N2的鄰近分枝或合適地疏遠分枝。在另一實施例中，該變異體病毒株為不同於第一B病毒株譜系之譜系的B病毒株（諸如B/山形或B/維多利亞，屬於不同譜系）。預致敏組合物及加強組合物兩者均可為單價或合適地多價，亦即可含有至少兩種流感病毒病毒株，諸如二價、三價、四價或五價疫苗。當組合物為多價時，至少一種病毒株係合適地選自由以下各者組成之群：大流行病病毒株、B病毒株（諸如B/山形或B/維多利亞）、H3N2病毒株，且視情況為存在於用於首次疫苗接種之疫苗中之病毒株的漂移變異體。

首次疫苗接種可合適地包含兩劑量，如上文所定義，其在同時進行之免疫反應期間的數週內投與。通常，再疫苗接種係在首次疫苗接種後若干個月內進行，合適地為首次疫苗接種後之至少3個月或4個月，合適地為其後之8至14個月，合適地為其後之約10至12個月或甚至更長。合適地，再疫苗接種係在首次疫苗接種後至少6個月進行。合

適地，再疫苗接種在接近下一流感季節或在下一流感季節時進行，例如在第一免疫原性組合物後大致一年時進行。加強組合物亦可在隨後之每年給予(第三、第四、第五疫苗接種等等)。

因此，在一實施例中，本發明提供一種疫苗接種流程(適用於該流程之組合物)，其包含(i)在一年中之任何時間(亦即流感季節之外)，以給予一或兩劑量(合適地間隔，例如間隔3至6週，或間隔3-4週)的根據本發明之經佐劑化組合物進行之初級疫苗接種，繼而為(ii)在首次疫苗接種後之至少6週至1年時所投與之加強疫苗接種。當在初級疫苗接種時投與兩劑量時，第一劑量可用經佐劑化之三價或四價季節性疫苗，繼而為第二劑量之大流行病(例如單價)經佐劑化疫苗。合適地，在首次疫苗接種後至少6週及在常規免疫處理日程(例如對兒童而言)中之任何時間，或在下一流感季節時投與加強組合物。加強組合物可用任何商業上認可之流感疫苗(例如經典三價未經佐劑化或經佐劑化疫苗，諸如FluAdTM)，或用根據本發明之經佐劑化組合物(例如經佐劑化之三價或四價組合物)。合適地，加強組合物包含用於彼季節之流行季節性病毒株，其可為來自存在於初級疫苗中之病毒株的漂移變異體。該疫苗接種流程適於小兒科群體，該群體可在生命早期(例如在6個月以下或2個月以下)經可用疫苗預致敏，且隨後用包含流行病毒株之組合物加強，該流行病毒株可為來自存在於初級組合物中之病毒株的漂移變異體。

用於再疫苗接種之免疫原性組合物(加強組合物)可含有任何類型之抗原製劑，其為失活或活減毒的。其可含有與用於首次疫苗接種之免疫原性組合物相同類型之抗原製劑，例如裂解流感病毒或其抗原性製劑、完整病毒粒子或純化HA及NA(亞單位)疫苗。加強組合物可含有與用於首次疫苗接種之流感抗原相同亞型的流感抗原。舉例而言，當首次疫苗接種係在宣布大流行病時進行且再疫苗接種在其後進行時，再疫苗接種係用包含具有與用於首次疫苗接種之流感病毒株(例如H5N1越南)相同亞型之流感病毒株(例如H5N1越南)的疫苗來進行。或者，加強組合物可含有與用於首次疫苗接種之流感抗原(例如H5N1印度尼西亞)相同亞型之流感抗原的漂移病毒株。在另一實施例中，用於再疫苗接種之該流感病毒株為轉移病毒株，亦即不同於用於首次疫苗接種之病毒株，例如其具有不同之HA或NA亞型，諸如H5N2(與H5N1相同之HA亞型，但不同NA亞型)或H7N1(不同於H5N1之HA亞型，但相同NA亞型)。舉例而言，用於首次免疫處理之疫苗組合物包含A/印度尼西亞病毒株且加強組合物包含A/香港、A/土耳其、A/越南及/或A/安徽病毒株。

在一實施例中，使用裂解病毒。加強組合物可為經佐劑化或未經佐劑化的。未經佐劑化加強組合物可為經肌肉內給予之Fluarix™/α-Rix®/Influsplit®，其含有三種自適當流感季節之WHO推薦病毒株製備之失活裂解病毒粒子抗原。詳言之，流感病毒病毒株或其抗原性製劑係根據世界衛生

組織(World Health Organisation)發布之參考物質來選擇，以便使其適應於在再疫苗接種當年流行之流感病毒株。經佐劑化之加強組合物可合適地包含如本文中所定義之水包油乳液佐劑，視情況以及諸如TLR-4配位體之額外免疫刺激劑，諸如3D-MPL或皂素。

合適地，與在用未經佐劑化流感病毒或其抗原性製劑進行首次疫苗接種後誘導之等效反應相比，用包含如本文中所定義之佐劑之組合物進行的再疫苗接種誘導以下反應中之任何者，合適地為兩者或所有反應：(i)抵抗流感病毒或其抗原性製劑之經改良CD4+ T細胞免疫反應，或(ii)經改良之B細胞記憶反應或(iii)經改良之體液反應。合適地，與在用經其中各組份以較高含量存在之佐劑佐劑化之流感病毒或其抗原性製劑進行首次疫苗接種後誘導之等效反應相比，用包含如本文中所定義之佐劑之組合物進行的再疫苗接種誘導以下反應中之任何者，合適地為兩者或所有反應：(i)抵抗流感病毒或其抗原性製劑之相當CD4+ T細胞免疫反應，或(ii)相當之B細胞記憶反應或(iii)相當之體液反應。

在根據本發明之一態樣中，用包含流感病毒及水包油乳液佐劑之加強組合物對受檢者進行再疫苗接種將展示比在用未經佐劑化組合物進行首次疫苗接種且用未經佐劑化組合物加強之人群中的相應值更高之抗體效價，該水包油乳液佐劑包含如上文所定義量之可代謝油(視情況為角鯊烯)、母育酚(視情況為 α -生育酚)及乳化劑(視情況為聚氧

化 乙 烯 脫 水 山 梨 糖 醇 單 油 酸 酯) 。 佐 劑 在 增 強 對 再 疫 苗 接 種 之 抗 體 反 應 中 的 效 應 在 老 年 人 群 體 或 年 幼 兒 童 中 尤 其 重 要 ， 該 老 年 人 群 體 或 年 幼 兒 童 已 知 對 流 感 病 毒 之 疫 苗 接 種 或 感 染 具 有 低 反 應 。 詳 言 之 ， 與 經 佐 劑 化 組 合 物 相 關 聯 之 益 處 就 改 良 再 疫 苗 接 種 後 之 CD4 T 細 胞 反 應 而 言 亦 將 係 顯 著 的 。

與 對 照 疫 苗 賦 予 之 保 護 相 比 ， 用 於 再 疫 苗 接 種 之 經 佐 劑 化 組 合 物 將 能 夠 誘 導 抵 抗 漂 移 病 毒 株 (來 自 下 一 流 感 季 節 之 流 感 病 毒 株) 之 更 佳 交 叉 反 應 性 。 與 用 未 經 佐 劑 化 調 配 物 獲 得 之 交 叉 反 應 性 相 比 ， 該 交 叉 反 應 性 已 展 示 更 高 持 久 性 。 佐 劑 在 增 強 抵 抗 漂 移 病 毒 株 之 交 叉 反 應 性 中 之 效 應 在 大 流 行 病 情 況 下 為 重 要 的 。

在 另 一 實 施 例 中 ， 本 發 明 係 關 於 一 種 疫 苗 接 種 方 案 ， 其 中 首 次 疫 苗 接 種 係 用 流 感 組 合 物 ， 合 適 地 為 裂 解 流 感 組 合 物 來 進 行 ， 該 流 感 組 合 物 含 有 可 潛 在 地 引 起 大 流 行 病 之 流 感 病 毒 株 ， 且 再 疫 苗 接 種 係 用 單 價 或 多 價 組 合 物 來 進 行 ， 該 組 合 物 包 含 至 少 一 種 流 行 病 毒 株 ， 其 係 大 流 行 病 病 毒 株 或 經 典 病 毒 株 。

在 特 定 實 施 例 中 ， 用 於 再 疫 苗 接 種 之 人 類 劑 量 之 免 疫 原 性 組 合 物 係 經 水 包 油 乳 液 佐 劑 來 佐 劑 化 。 合 適 地 (但 不 排 他 地) ， 該 佐 劑 包 含 母 育 酚 。 合 適 地 ， 每 病 毒 株 每 劑 量 之 HA 係 約 15 μg 。 在 特 定 實 施 例 中 ， 每 病 毒 株 之 HA 為 低 量 之 HA (視 情 況 每 病 毒 株 每 劑 量 約 10 μg HA 或 10 μg 以 下 ， 以 便 達 成 每 劑 量 40-45 μg HA 之 最 大 值) 且 其 係 如 上 文 所 定 義 。

合適地，每病毒株之HA係約5 μg 或5 μg 以下，約2.5 μg 或2.5 μg 以下。合適地，佐劑組合物為每劑量分別包含5-6 mg之間，5-6 mg之間及2-3 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。或者，佐劑組合物為每劑量分別包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80之水包油乳液。用於再疫苗接種之人類劑量之免疫原性組合物合適地包含水包油乳液佐劑，該水包油乳液佐劑包含存在於用於初級疫苗接種之組合物中之組份的一半；且將合適地包含水包油乳液，該水包油乳液每劑量包含2.5-3.5 mg之間，2-3 mg之間及1-2 mg之間量的角鯊烯、 α -生育酚及聚山梨醇酯80。在特定實施例中，該再疫苗接種劑量在初級疫苗接種後約一年或約兩年時給予。

HA中之CD4抗原決定基

該抗原性漂移主要駐留於病毒表面蛋白血球凝集素(HA)及神經胺糖酸酶(NA)之抗原決定基區域內。已知不同流感病毒株之間的CD4及B細胞抗原決定基中的任何差異均將在流感疫苗接種中起主要作用，該差異係由病毒使用以逃避宿主免疫系統之適應性反應。

由不同流感病毒株共用之CD4 T細胞抗原決定基已在人類中識別(例如參見：Gelder C等人1998, *Int Immunol.* 10(2):211-22；Gelder CM等人1996 *J Virol.* 70(7):4787-90；及Gelder CM等人1995 *J Virol.* 1995 69(12):7497-506)。

在特定實施例中，再疫苗接種係藉由使用加強組合物來進行，該加強組合物含有流感病毒或其抗原性製劑，其與用於首次疫苗接種之流感病毒抗原或其抗原性製劑共用共同之CD4 T細胞抗原決定基。本發明因此係關於包含大流行病流感病毒或其抗原性製劑及如上文所定義之水包油乳液佐劑之免疫原性組合物在製造多劑量疫苗之第一疫苗接種組份中的用途，該多劑量疫苗另外包含作為加強劑量之流感病毒或其抗原性製劑，其與首次疫苗接種時所給予劑量之大流行病流感病毒抗原或其病毒抗原性製劑共用共同之CD4 T-細胞抗原決定基。

疫苗接種方式

本發明之組合物可藉由任何合適傳遞路徑，諸如皮內、經黏膜，例如鼻內、經口、肌肉內或皮下路徑來投與。其他傳遞路徑在此項技術中為熟知的。

肌肉內傳遞路徑尤其適於經佐劑化之流感組合物。根據本發明之組合物可存在於單劑量容器中，或者尤其適於大流行病疫苗之多劑量容器中。在該情況下，通常存在諸如硫柳汞之抗菌防腐劑以在使用期間預防污染。硫柳汞濃度可為25 $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ 劑量(亦即50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。合適地，存在5 $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ 劑量(亦即10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)或10 $\mu\text{g}/0.5\text{ ml}$ 劑量(亦即20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)之硫柳汞濃度。可使用合適之IM傳遞裝置，諸如無針液體噴射注入裝置，例如Biojector 2000(Bioject, Portland, OR)。或者，可使用諸如用於腎上腺素之家用傳遞的筆式注射裝置以允許疫苗之自身投藥。該等傳遞裝置

之使用可尤其適於諸如將在大流行病期間需要之大規模免疫行為。

皮內傳遞為另一合適路徑。任何合適裝置均可用於皮內傳遞，例如短針裝置。皮內疫苗亦可藉由限制針進入皮膚之有效穿透長度的裝置來投與，諸如 WO99/34850 及 EP1092444 中所述之彼等裝置以及其功能等效物，該等參考案以引用的方式併入本文中。亦合適者為經由液體射流器或經由刺入角質層且產生達至真皮之噴射的針將液體疫苗傳遞至真皮的射流裝置。亦合適者為使用壓縮氣體來促使呈粉末形式之疫苗穿過皮膚外層達到真皮之彈道粉末/粒子傳遞裝置。另外，習知之注射器可用於皮內投藥之經典孟陀式(mantoux)方法中。

另一合適投藥路徑為皮下路徑。任何合適裝置均可用於皮下傳遞，例如經典的針。合適地，使用無針射流器機構(service)。合適地，該裝置經液體疫苗調配物預填充。

或者，經鼻內投與疫苗。通常，將疫苗局部投與至鼻咽區域，合適地不經吸入肺中。希望使用將疫苗調配物傳遞至鼻咽區域而不或大體上不使其進入肺中之鼻內傳遞裝置。

用於根據本發明疫苗之鼻內投藥的合適裝置為噴霧裝置。合適之市售鼻噴霧裝置包括 Accuspray™(Becton Dickinson)。噴霧器產生可易於吸入肺中之極精細噴霧，且因此並未有效達至鼻黏膜。因此，噴霧器並非較佳。

用於鼻內用途之合適噴霧裝置為裝置效能並非取決於使

用者施加之壓力的裝置。已知該等裝置為壓力臨限裝置。僅當施加臨限壓力時，自噴嘴釋放液體。該等裝置使其更易於達成具有規則液滴尺寸之噴霧。適於供本發明使用之壓力臨限裝置在此項技術中為已知的且描述於(例如)WO 91/13281及EP 311863B及EP 516636中，該等專利以引用的方式併入本文中。該等裝置可購自Pfeiffer GmbH且亦描述於Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, 1999年9月中。

合適之鼻內裝置產生1至200 μm ，合適地10至120 μm 範圍內之小液滴(使用水作為液體來量測)。低於10 μm 時，存在吸入風險，因此希望具有至多約5%之小液滴低於10 μm 。120 μm 以上之小液滴以及稍小之小液滴不傳播，因此希望具有至多約5%之小液滴超過120 μm 。

雙劑量傳遞為供根據本發明之疫苗使用之鼻內傳遞系統的另一合適特徵。雙劑量裝置含有兩亞劑量之單一疫苗劑量，一亞劑量用於投藥至每一鼻孔。通常，兩亞劑量存在於單一腔室中且裝置之建構允許一次性有效傳遞單一亞劑量。或者，單劑量裝置可用於投與根據本發明之疫苗。

或者，表皮或經皮疫苗接種路徑亦涵蓋於本發明中。

在本發明之一態樣中，用於首次投藥之經佐劑化免疫原性組合物可經肌肉內給予，且經佐劑化或未經佐劑化之加強組合物可經由不同路徑，例如經皮內、皮下或鼻內投與。在特定實施例中，用於首次投藥之組合物含有用於大流行病流感病毒株之小於15 μg 的HA量，且加強組合物可

含有 15 μg 之標準量或合適地低量之 HA，亦即 15 μg 以下，視投藥路徑而定，其可以更小體積來給予。

儘管本發明之疫苗可作為單一劑量投與，但其組份亦可同時一起共同投與或在不同時間投與(例如流感抗原可單獨投與，合適地與佐劑之投藥同時投與)。除單一投藥路徑之外，當投與兩次注射時，可使用兩種不同的投藥路徑。舉例而言，經佐劑化流感抗原之首次投藥(例如預致敏劑量)可經 IM(或 ID)投與，且第二次投藥(例如加強劑量)可經 IN(或 ID)投與。另外，本發明之疫苗對於預致敏劑量而言可經 IM 投與且對於加強劑量而言可經 IN 投與。

疫苗中流感抗原之含量通常將在每流感病毒株 0.1-15 μg HA 之範圍內，合適地為 1-10 μg ，最通常在 1-8 μg 範圍內。流感抗原之合適含量將小於或精確地為每包括於疫苗中之流感病毒株 5 μg HA。初始疫苗接種之後，受檢者可接受一次加強免疫或若干次適當間隔之加強免疫。

疫苗接種之群體

疫苗接種之目標群體為整個人群，例如健康年輕成年人(例如年齡為 18-50 歲或 18-60 歲)、老年人(通常年齡在 60 歲以上)或嬰兒/兒童。目標群體可尤其為免疫受損的。免疫受損人類通常與健康成年人相比，較差能夠對抗原作出良好反應，尤其對流感抗原作出反應。

在根據本發明之一態樣中，目標群體為針對流感未經預致敏之群體，其為天然的(諸如相對於大流行病病毒株)或先前未能對流感感染或疫苗接種作出反應。合適地，目標

群體為合適地年齡至少60歲，或至少65歲及65歲以上之老年人，諸如在衛生機構中工作之人的年輕高風險成年人(亦即18歲與60歲之間)或具有諸如心血管疾病及肺病或糖尿病之風險因素的彼等年輕成人。另一目標群體為自出生或年齡在2個月及2個月以上，或年齡在6個月及6個月以上的所有兒童，尤其為年齡在6-23個月之經歷相對高之流感相關住院治療率的兒童。另一目標群體為自出生至年齡為6個月之更年幼兒童。

本申請案中之所有參考案(包括專利申請案及許可專利)之教示完全以引用的方式併入本文中。本申請案所主張優先權之任何專利申請案均以本文中對公開案及參考案所述之方式，以全文引用的方式併入本文中。

在每一情形下，為避免疑慮，本文中本發明者所欲指之術語"包含"視情況可經術語"由...組成"取代。本文中關於本發明之"疫苗組合物"之實施例亦適用於關於本發明之"免疫原性組合物"的實施例，且反之亦然。所有數值中之術語"約"(或"大約")允許5%變化，亦即約1.25%之值將意謂在1.19%-1.31%之間。

本發明將另外藉由參考以下非限制性實例來描述：

實例 I 描述用於小鼠、雪貂、豬及人類研究中之免疫學讀出方法。

實例 II 描述用於例示研究中之水包油乳液及佐劑調配物之製備。

實例 III 展示在年齡為18-59歲成年人群體中用含有裂解流

感抗原製劑及兩劑量之AS03佐劑之疫苗的臨床試驗。

實例IV展示在預致敏BALB/c小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解流感疫苗(包含各種劑量之AS03佐劑)的臨床前評估。

實例V展示在預致敏C57B1/6小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解流感疫苗(包含各種劑量之AS03佐劑)的臨床前評估。

實例VI展示在預致敏C57B1/6小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解流感疫苗(包含各種劑量之AS03佐劑及低劑量抗原)的臨床前評估。

實例VII展示在天然C57B1/6小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解H5N1疫苗(包含各種劑量之AS03佐劑及抗原)的臨床前評估。

實例VIII展示在預致敏大白豬中之經佐劑化及未經佐劑化流感疫苗的臨床前評估。

實例IX展示在天然及預致敏C57B1/6小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解TIV及QIV季節性疫苗(包含各種劑量之AS03佐劑及抗原)的臨床前評估。

實例X展示在年齡為18-64歲之成年人群體中用含有裂解流感抗原製劑及各種劑量之AS03佐劑之疫苗的臨床試驗。

實例XI展示在年齡為65歲以上之老年人群體中用含有裂解流感抗原製劑及各種佐劑之疫苗的臨床試驗。

實例I-免疫學讀出方法

I.1. 小鼠方法

I.1.1. 血球凝集抑制測試

測試原理(經典程序)。

使用血球凝集抑制測試(HI)測定三種(季節性)流感病毒病毒株之抗血球凝集素抗體效價。HI測試之原理係基於特定抗流感抗體藉由流感病毒血球凝集素(HA)抑制紅血球(RBC)之血球凝集作用的能力。藉由高嶺土及RBC處理熱失活血清以移除非特異性抑制劑。預處理之後，用4個血球凝集單位之各流感病毒株培育血清之兩倍稀釋液。隨後添加紅血球且對凝集之抑制作用計分。效價表示為完全抑制血球凝集作用之血清之最高稀釋度的倒數。當血清之第一稀釋度為1:20時，將不可偵測之含量計分為等於10之效價。

用於H5N1之修改(使用馬紅血球之HI的特定描述)：

因為用於測定抗HA抗體之經典HI檢定備案為對H5N1病毒株不可充分作用，所以使用利用馬RBC之修改實驗方案。

馬之紅血球用於H5N1大流行病病毒株。於含有0.5 % BSA(牛血清白蛋白，終點濃度)之磷酸鹽緩衝液中之0.5 %(終點濃度)馬紅血球懸浮液。該懸浮液每天藉由用相同磷酸鹽緩衝液洗滌紅血球及隨後之離心步驟(10 min，2000 rpm)來製備。該洗滌步驟必須重複一次。在將馬紅血球添加至血清及病毒懸浮液之反應混合物中之後；由於馬紅血球之低沈降速率，因此必須將培育板在室溫(RT，20°C +/- 2°C)下培育2小時。

統計分析

使用 UNISTAT 對疫苗接種後 HI 效價執行統計分析。用於變異數分析之實驗方案可如下簡要描述：

- ◆ 資料之對數轉換
- ◆ 對各群體(群組)進行 Shapiro-Wilk 測試以驗證群組分布之正態性；
- ◆ 進行 Cochran 測試以驗證不同群體(群組)之間變異數的同質性；
- ◆ 對所選資料之變異數分析。
- ◆ 對雙因素 ANOVA(two-way ANOVA)之相互作用的測試
- ◆ 用於多重比較之 Tukey-HSD 測試

I.1.2. 細胞內細胞激素染色

該技術允許基於細胞激素產生來定量抗原特異性 T 淋巴細胞：效應子 T 細胞及/或效應子記憶 T 細胞產生 IFN- γ 及/或中央記憶 T 細胞產生 IL-2。在免疫後 7 天收穫 PBMC。

在分泌抑制劑(布雷菲特菌素(Brefeldine))存在下，對淋巴樣細胞進行活體外再刺激。隨後，使用螢光抗體(CD4、CD8、IFN- γ 及 IL-2)，藉由習知免疫螢光程序處理該等細胞。結果表示為細胞激素陽性細胞在 CD4/CD8 T 細胞內之頻率。在第二次免疫後 7 天，對 PBMC 執行 T 細胞之細胞激素的細胞內染色。自小鼠收集血液且彙集於肝素化培養基 RPMI+Add 中。對血液而言，將經 RPMI+Add 稀釋之 PBL 懸浮液根據推薦實驗方案(在 2500 rpm 及 R.T 下離心 20 min)層化至淋巴細胞-哺乳動物梯度上。將界面處之單核細胞移

除，在RPMI+Add中洗滌2次，且在RPMI 5%胎牛血清中將PBMC懸浮液調整至 2×10^6 個細胞/毫升。

在 1×10^7 個細胞/毫升(FACS管)之最終濃度下，用完整FI(1 μ g HA/病毒株)進行PBMC之活體外抗原刺激，且隨後在37°C下以添加抗-CD28及抗-CD49d(兩者均為1 μ g/ml)培育2小時。

在抗原再刺激步驟之後，在布雷菲特菌素(1 μ g/ml)存在於37°C下將PBMC在37°C下培育隔夜以抑制細胞激素分泌。

IFN- γ /IL-2/CD4/CD8染色如下執行：洗滌細胞懸浮液，再懸浮於含有2% Fc阻斷試劑(1/50；2.4G2)之50 μ l PBS 1% FCS中。在4°C下培育10 min後，添加50 μ l之抗CD4-PE(2/50)及抗CD8 perCp(3/50)之混合物且在4°C下培育30 min。在PBS 1% FCS中洗滌之後，藉由再懸浮於200 μ l之Cytotfix-Cytoperm(Kit BD)中將細胞滲透化且在4°C下培育20 min。隨後，將細胞用Perm Wash(Kit BD)洗滌，且用稀釋於Perm Wash中之50 μ l之抗IFN- γ APC(1/50)+抗IL-2 FITC(1/50)的混合物將其再懸浮。在4°C下最多培育2 h隔夜後，將細胞用Perm Wash洗滌且再懸浮於PBS 1% FCS+1%三聚甲醛中。藉由FACS執行樣本分析。閘控活細胞(FSC/SSC)且在CD4+ T細胞上執行對約20,000個事件(淋巴細胞)或35,000個事件之獲取。對CD4+及CD8+閘控群體計算IFN- γ +或IL2+之百分比。

I.1.3. 抗H5N1 ELISA。

藉由ELISA，使用裂解H5N1作為塗層執行抗H5N1 Ig、

IgG1及IgG2b抗體效價之定量。以每孔100 μ l來使用病毒及抗體溶液。以於PBS中之1 μ g/ml之最終濃度稀釋裂解病毒H5N1且在4°C下吸附隔夜至96孔微量滴定板(Maxisorb Immunoplate Nunc 439454)之孔中。隨後，在37°C下，用每孔200 μ l含有1% BSA及0.1% Tween 20(飽和緩衝液)之PBS將培育板培育1小時。將12份血清於飽和緩衝液中之兩倍稀釋液添加至經H5N1塗佈之培育板中且在37°C下培育1小時30鐘。用PBS 0.1% Tween 20將培育板洗滌4次。將在PBS 1% BSA 0.1% Tween 20中以1/500稀釋之生物素標記結合抗小鼠Ig(Prozan-E0413)或以1/4000稀釋之生物素標記結合抗小鼠IgG1(Imtech 1070-08)或生物素標記抗小鼠IgG2b (Imtech 1090-08)添加至各孔中且在37°C下培育1小時30鐘；洗滌步驟後，用在PBS 1% BSA Tween 20中以1/10000稀釋之抗生蛋白鏈菌素-生物素-過氧化酶(Streptavidine-Biotine -Preoxidase)結合物(Prozan P0397)將培育板培育30 min。

對比色顯示而言，在22°C下，用鄰苯基二胺(Sigma P4664)0.04% H₂O₂ 0.03%於pH 4.2之0.1 M檸檬酸鹽緩衝液中之溶液將培育板培育20 min。用H₂SO₄ 2N終止反應且在490-630 nm下閱讀微板。

I.2. 雪貂方法

I.2.1. 血球凝集抑制測試(HI)

測試程序

使用血球凝集抑制測試(HI)測定三種流感病毒病毒株之抗血球凝集素抗體效價。HI測試之原理係基於特定抗流感

抗體藉由流感病毒血球凝集素(HA)抑制雞紅血球(RBC)之血球凝集作用的能力。首先用25%神經胺糖酸酶溶液(RDE)處理血清且將其熱失活以移除非特異性抑制劑。預處理之後，用4個血球凝集單位之各流感病毒株培育血清之兩倍稀釋液。隨後添加雞紅血球且對凝集之抑制作用計分。效價表示為完全抑制血球凝集作用之血清之最高稀釋度的倒數。當血清之第一稀釋度為1:10時，將不可偵測之含量計分為等於5之效價。

統計分析

使用UNISTAT對HI效價(第41天，攻毒之前)執行統計分析。用於變異數分析之實驗方案可如下簡要描述：

- 資料之對數轉換。
- 對各群體(群組)進行Shapiro-Wilk測試以驗證群組分布之正態性。
- 進行Cochran測試以驗證不同群體(群組)之間變異數的同質性。
- 對單因素ANOVA之相互作用的測試。
- 用於多重比較之Tuckey-HSD測試。

I.2.2. 體溫監控

在攻毒期間以傳輸器及藉由遙測記錄來監控個體溫度。對所有植入物進行檢查且整修，且在置於腹膜腔內之前藉由DSI(Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, The Netherlands)執行新的校正。在該等量測期間，將所有動物個別地收容於單一籠中。

攻毒前4天，每15分鐘記錄溫度直至攻毒後7天。

I.2.3. 鼻洗滌物

藉由將5 ml PBS投與喚醒動物之兩個鼻孔中來執行鼻洗滌。將接種物收集於皮氏培養皿(Petri dish)中且置於乾冰上之樣本容器中。

鼻洗滌物之病毒滴定

首先將所有鼻樣本經由Spin X過濾器(Costar)無菌過濾以移除任何細菌污染。將鼻洗滌物之50 μ l連續10倍稀釋液轉移至含有50 μ l培養基之微量滴定板(10個孔/稀釋液)。隨後將100 μ l之MDCK細胞(2.4×10^5 個細胞/毫升)添加至各孔中且在35°C下培育5-7天。

培育5-7天後，輕輕移除培養基且添加100 μ l含有1/20 WST-1之培養基，且再培育18小時。

在病毒滴定檢定結束時，WST-1藉由活細胞還原所產生之黃甲臍染料的濃度與孔中所存在之活細胞的數量成比例，且藉由在適當波長(450奈米)下量測各孔之吸光度來定量。將截止值定義為未經感染對照細胞之OD平均值-0.3 OD(0.3 OD相應於未經感染對照細胞之 ± 3 StDev之OD)。當OD<截止值時定義為正計分，且相反，當OD >截止值時定義為負計分。藉由"Reed及Muench"測定病毒排毒效價且將其表示為Log TCID₅₀/ml。

I.3. 豬方法

I.3.1. 血球凝集抑制測試(HI)

測試程序。

使用血球凝集抑制測試(HI)測定三種流感病毒病毒株之抗血球凝集素抗體效價。HI測試之原理係基於特定抗流感抗體藉由流感病毒血球凝集素(HA)抑制雞紅血球(RBC)之血球凝集作用的能力。首先用25%神經胺糖酸酶溶液(RDE)處理血清且將其熱失活以移除非特異性抑制劑。預處理之後，用4個血球凝集單位之各流感病毒株培育血清之兩倍稀釋液。隨後，添加雞紅血球且對凝集之抑制作用計分。效價表示為完全抑制血球凝集作用之血清之最高稀釋度的倒數。當血清之第一稀釋度為1:10時，將不可偵測之含量計分為等於5之效價。

統計分析。

使用UNISTAT對HI效價(第41天，攻毒之前)執行統計分析。用於變異數分析之實驗方案可如下簡要描述：

- 資料之對數轉換。
- 對各群體(群組)進行Shapiro-Wilk測試以驗證群組分布之正態性；
- 進行Cochran測試以驗證不同群體(群組)之間變異數的同質性。
- 對單因素ANOVA之相互作用的測試。
- 用於多重比較之Tuckey-HSD測試。

I.4. 評估人類免疫反應之檢定

I.4.1. 血球凝集抑制檢定

使用WHO Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control, Atlanta, USA(1991)所述之方法，藉由量

測HI抗體來測定免疫反應。

使用4個血球凝集抑制單位(4 HIU)之適當抗原及0.5%家禽紅血球懸浮液，用標準化及綜合驗證之微量法對解凍之冷凍血清樣本進行抗體效價量測。非特異性血清抑制劑藉由熱處理及受體破壞酶來移除。

評估所獲得血清之HI抗體含量。以1:10之初始稀釋度開始，製備連續稀釋液(以2之因子)直至1:20480之終點稀釋度。將滴定終點視為展示完全抑制(100%)血球凝集作用之最高稀釋步驟。所有檢定均重複進行2次。

I.4.2. 神經胺糖酸酶抑制檢定

在經胎球蛋白塗佈之微量滴定板中執行檢定。製備抗血清之2倍連續稀釋液且與標準化量之流感A H3N2、H1N1或流感B病毒混合。該測試係基於神經胺糖酸酶之生物活性，該神經胺糖酸酶自胎球蛋白酶促釋放神經胺糖酸。在末端神經胺糖酸裂解之後，露出 β -D-半乳糖-N-乙醯基-半乳糖。將特異性地結合至半乳糖結構之經辣根過氧化物酶(HRP)標記的花生凝集素(來自落花生(*Arachis hypogaea*))添加至孔中。結合凝集素之量可在與四甲基聯苯胺(TMB)之受質反應中偵測及定量。仍抑制病毒神經胺糖酸酶活性至少50%之最高抗體稀釋度指示為NI效價。

I.4.3. 中和抗體檢定

對解凍之冷凍血清樣本進行中和抗體量測。

在微量中和檢定中測定藉由血清中所含抗體之病毒中和作用。血清在不經其他處理之情況下即用於檢定中。

將各血清重複測試三次。將標準化量之病毒與血清之連續稀釋液混合且培育以使抗體可與病毒結合。隨後，將含有確定量MDCK細胞之細胞懸浮液添加至病毒及抗血清之混合物中，且在33°C下培育。培育期之後，藉由雞紅血球之血球凝集觀測病毒複製。血清之50%中和效價係藉由Reed及Muench之方法來計算。

I.4.4. 藉由細胞激素流式細胞儀(Cytokine Flow Cytometry, CFC)評估細胞介導之免疫性

若用其相應抗原來培育，則周邊血液抗原特異性CD4及CD8 T細胞可經活體外再刺激以產生IL-2、CD40L、TNF- α 及IFN。

因此，在細胞表型之習知免疫螢光標記以及細胞內細胞激素產生之後，可藉由流式細胞儀對抗原特異性CD4及CD8 T細胞進行計數。在本研究中，將流感疫苗抗原以及源自特定流感蛋白之肽用作抗原以再刺激流感特異性T細胞。將結果表示為細胞激素陽性CD4或CD8 T細胞在CD4或CD8 T細胞亞群中之頻率。

I.4.5. 統計方法

I.4.5.1. 初級終點

- 在疫苗接種後7天後繼時期(亦即疫苗接種當天及隨後6天)期間及整個時期，所請求之局部及全身徵象及症狀的百分比、強度及與疫苗接種之關係。
- 在疫苗接種後21天後繼時期(亦即疫苗接種當天及隨後20天)期間及整個時期，未經請求之局部及全身徵象及症狀

的百分比、強度及與疫苗接種之關係。

- 在整個研究期間之嚴重不良事件的發生。

I.4.5.2.二級終點

對體液免疫反應而言：

所觀測之變數：

- 在第0天及第21天：分別抵抗疫苗中所提供之三種流感病毒病毒株(抗H1N1、抗H3N2及抗B-抗體)之每一者所測試的血清血球凝集抑制(HI)及NI抗體效價。

- 在第0天及第21天：分別抵抗疫苗中所提供之三種流感病毒病毒株之每一者所測試的中和抗體效價。

導出變數(95%信賴區間)：

- 疫苗接種前及後具有95%信賴區間(95% CI)之血清HI抗體的幾何平均效價(GMT)
- 第21天具有95% CI之血清轉化率*
- 第21天具有95% CI之轉化因子**
- 第21天具有95% CI之血清保護率***
- 在所有時間點之血清NI抗體GMT(具有95%信賴區間)。

*血清轉化率，其定義為對於各疫苗病毒株而言，與第0天相比，第21天之血清HI效價至少增加4倍之受疫苗接種者的百分比。

**轉化因子，其定義為對於各疫苗病毒株而言，與第0天相比，第21天之血清HI GMT的增加倍數。

***保護率，其定義為在疫苗接種後(對於各疫苗病毒株而言)血清HI效價=40之受疫苗接種者的百分比，通常將其接

受為保護指示。

應瞭解，對於一些臨床試驗而言，反應原性/安全性可為二級終點，且免疫原性可為初級終點。

對細胞介導之免疫(CMI)反應而言

所觀測之變數

在第0天及第21天：在不同測試中，每 10^6 個中細胞激素陽性CD4/CD8細胞之頻率。各測試將CD4/CD8 T細胞之反應定量為：

- 肽流感(pf)抗原(需要給予/解釋該等抗原之準確性質及起源)
- 裂解流感(sf)抗原
- 完整流感(wf)抗原。

導出變數：

- 產生至少兩種不同細胞激素(CD40L、IL-2、IFN γ 、TNF α)之細胞
- 產生至少CD40L及另一細胞激素(IL-2、TNF α 、IFN γ)之細胞
- 產生至少IL-2及另一細胞激素(CD40L、TNF α 、IFN γ)之細胞
- 產生至少IFN γ 及另一細胞激素(IL-2、TNF α 、CD40L)之細胞
- 產生至少TNF α 及另一細胞激素(IL-2、CD40L、IFN γ)之細胞

I.3.5.3. 免疫原性分析

免疫原性分析係基於總疫苗接種組。對各處理群組而言，計算以下參數(95%信賴區間)：

- 第0天及第21天之HI及NI抗體效價之幾何平均效價(GMT)。
- 第0天及第21天之中和抗體效價之幾何平均效價(GMT)。
- 第21天之轉化因子。
- 第21天之血清轉化率(SC)，其定義為與第0天相比，第21天之血清HI效價增加至少4倍的受疫苗接種者之百分比。
- 第21天之保護率，其定義為血清HI效價=1:40之受疫苗接種者的百分比。
- 在各時間點(第0天、第21天)且對於各抗原(肽流感(pf)、裂解流感(sf)及完整流感(wf))而言，對各疫苗接種群組概括(描述性統計學)在反應中分泌之CD4/CD8 T-淋巴細胞之頻率。
- 在各5次不同測試時，對各疫苗接種群組及各抗原(pf、sf及wf)而言，在時間點(Post-Pre)反應之間的個別差異之描述性統計學。
- 非參數測試(Kruskall-Wallis測試)用以比較3個群組之間的位置差異，且在各5次不同測試時，對各抗原而言計算統計學p值。所有顯著性測試均為雙尾的。小於或等於0.05之p值視為統計學顯著的。

實例II-水包油乳液及佐劑調配物之製備

除非另外陳述，否則用於隨後實例中之油/水乳液包含由2種油(α -生育酚及角鯊烯)組成之有機相及含有Tween

80™或聚山梨醇酯 80™作為乳化劑之PBS水相。除非另外陳述，否則製備用於隨後實例中之水包油乳液佐劑調配物，其包含以下水包油乳液組份(給出最終濃度)：2.5%角鯊烯(v/v)、2.5% α -生育酚(v/v)、0.9%聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯(v/v)(Tween 80)，參見WO 95/17210。如下製備在隨後實例中稱為AS03之呈2倍濃縮物形式之該乳液。

II.1. 乳液SB62之製備

該方法用於在臨床及臨床前實例部分報導之研究中。SB62乳液之製備係藉由在強力攪動下將包含疏水性組份(DL- α -生育酚及角鯊烯)之油相及含有水溶性組份(陰離子性清潔劑Tween 80及pH 6.8之PBS mod(經改質))之水相混合來進行。在攪拌同時，將油相(1/10總體積)轉移至水相(9/10總體積)，且在室溫下將混合物攪拌15分鐘。隨後，使所得混合物在微流化床之相互作用腔室中經受剪切、衝擊及空蝕力(15000 PSI-在用於實例III報導之臨床試驗中之佐劑中8次循環或3次循環)，以產生次微米級小液滴(分布於100與200 nm之間)。所得pH在 6.8 ± 0.1 之間。隨後，藉由經由0.22 μm 膜過濾將SB62乳液滅菌，且在2至8°C下，在Cupac容器中冷凍儲存無菌本體乳液。將無菌惰性氣體(氮或氬)沖入死體積之SB62乳液最終本體容器中歷時至少15秒鐘。

SB62乳液之最終組成如下：

Tween 80：1.8 % (v/v) 19.4 mg/ml；角鯊烯：5 % (v/v)

42.8 mg/ml ; α -生育酚 : 5 % (v/v) 47.5 mg/ml ; PBS-mod : NaCl 121 mM、KCl 2.38 mM、Na₂HPO₄ 7.14 mM、KH₂PO₄ 1.3 mM ; pH 6.8 \pm 0.1。

實例 III-在年齡為 18-59 歲成年人群體中用含有裂解流感抗原製劑及兩劑量之 AS03 佐劑 (Flu-LD-004) 之疫苗進行的臨床試驗。

III.1. 介紹

2006 年，在年齡為 18-59 歲之成年人群體中進行 II 期、受控、隨機化、單盲研究，以評估具有兩劑量之 AS03 佐劑之 GlaxoSmithKline Biologicals 低劑量流感候選疫苗 (亦即每病毒株含有 5 μ g HA) 的免疫原性、安全性及反應原性。

在經肌肉內投與一劑量之經 AS03 佐劑化疫苗後 21 天時量測體液免疫反應 (亦即抗血球凝集素)。FluarixTM 用作參考物。

III.2. 研究設計

三群受檢者經肌肉內平行接受以下疫苗：

- 一群 100 個受檢者接受含有 5 μ g HA 之經 AS03 (FluLD1/1) 佐劑化之低劑量裂解病毒流感疫苗的 1 次注射
- 一群 100 個受檢者接受含有 5 μ g HA 之經一半劑量 AS03 (AS03 $\frac{1}{2}$) (FluLD1/2) 佐劑化之低劑量裂解病毒流感疫苗的 1 次注射
- 一群 100 個受檢者接受一劑量之 FluarixTM (Fluarix)

時程：在第 0 天流感疫苗之 1 次 IM 注射，在第 0 天及第 21 天進行研究位點訪問，同時在第 30 天進行血液樣本收集 (HI

抗體測定)及額外電話聯繫(研究結論)。

用於該研究中之標準三價裂解流感疫苗-Fluarix™為來自GlaxoSmithKline Biologicals研發且製造之2006/2007年Northern Hemisphere之商用疫苗。

III.3. 研究目標

III.3.1. 主要目標

-為評估就抗血球凝集素抗體效價而言，藉由研究疫苗誘導之體液免疫反應：

第0天及第21天所觀測之變數：血清血球凝集抑制抗體效價。

導出變數(95%信賴區間)：

-第0天及第21天之血清抗體的幾何平均效價(GMT)

-第21天之血清轉化率*

-第21天之血清轉化因子**

-第0天及第21天之血清保護率***

*血球凝集素抗體反應之血清轉化率，其定義為具有疫苗接種前效價 $<1:10$ 及疫苗接種後效價 $\geq 1:40$ 或疫苗接種前效價 $\geq 1:10$ 且疫苗接種後之效價增加至少4倍之受疫苗接種者的百分比

**血清轉化因子，其定義為與第0天相比，疫苗接種後血清HI GMT之增加倍數；

***血清保護率，其定義為在疫苗接種後血清HI效價 $\geq 1:40$ 之受疫苗接種者的百分比，通常將其接受為保護指示。

III.3.2. 二級目標

為評估就所請求之局部及全身不良事件、未經請求之不良事件及嚴重不良事件而言之研究疫苗的安全性及反應原性：

1. 在各群組中，各疫苗接種後7天後繼時期(亦即疫苗接種當天及隨後6天)期間，所請求之局部及全身徵象及症狀的發生、強度及與疫苗接種之關係。
2. 在各群組中，疫苗接種後30天後繼時期(亦即疫苗接種當天及隨後29天)期間，未經請求之局部及全身徵象及症狀的發生、強度及與疫苗接種之關係。
3. 在各群組中，整個研究時期期間，嚴重不良事件之發生及關係。

III.4. 疫苗組合物及投藥

III.4.1. 疫苗製備

未經佐劑化流感疫苗為三價裂解病毒粒子、失活流感疫苗，其係由三種單價病毒抗原本體(分別自流感病毒株A/H1N1、A/H3N2及B製備)組成。存在於該疫苗中之抗原與經批准之*Fluarix*TM疫苗相同，該*Fluarix*TM疫苗自1992年起在市場上作為*Fluarix*TM(α -Rix®)市售且每劑量含有15 μ g HA/病毒株。FluLD臨床批量中所包括之流感病毒株為對於2006/2007 Northern Hemisphere所選擇之病毒株：

- A/新喀裏多尼亞/20/99(H1N1)類病毒株：A/新喀裏多尼亞/20/99(H1N1)IVR-116
- A/威斯康星/67/2005(H3N2)類病毒株：A/威斯康星/67/2005(H3N2)NYMCX-161

- B/馬來西亞/2506/2004。

抗原係源自卵生長病毒。裂解係在失活步驟之前用去氧膽酸鈉來進行，其經由去氧膽酸鈉與甲醛之隨後作用來執行。

經AS03佐劑化之低劑量流感(FluLD)疫苗(臨床批量)係以市售之*Fluarix*TM疫苗(分別自流感病毒株A/H1N1、A/H3N2及B製備)為主，但具有較低抗原含量且經GSK佐劑系統AS03來佐劑化。AS03係由水包油乳液(SB62)組成，該水包油乳液含有兩種可生物降解油，即角鯊烯及 α -生育酚(維生素E)；及界面活性劑，聚山梨醇酯80(Tween 80)。流感抗原藉由與乳液簡單混合而經併入佐劑系統之水相中。已測試兩種調配物，其不同之處在於在疫苗批量中經Flu抗原所引入之佐劑的量。經佐劑化之疫苗每劑量含有5 μ g血球凝集素(HA)之各流感病毒病毒株，以及全劑量(AS03)或半劑量(AS03 $\frac{1}{2}$)之佐劑系統AS03。賦形劑為以下各者：聚山梨醇酯80(Tween 80)、辛苯昔醇10(octoxynol 10)(Triton X-100)、 α -生育酚氫丁二酸酯、氯化鈉、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鉀、注射用水。

經AS03佐劑化之低劑量流感疫苗(FluLD，全或半劑量之AS03)為不含防腐劑之疫苗。然而，其自製造方法之早期即含有痕量之硫柳汞(每劑量 $<1.25 \mu$ g之Hg)。其均以0.5 ml/劑量之體積，以單劑量疫苗形式存在於玻璃(I型)預填充注射器中。

III.4.1.1. 經AS03佐劑化流感疫苗之組成

一劑量之FluLD(全或半劑量之AS03)相應於0.5 ml。組成提供於表3中。對於兩種調配物而言，每劑量之HA含量為5 µg，唯一差異為存在於最終容器中之AS03的量。

表3經AS03佐劑化之低劑量流感疫苗(全及半劑量之AS03)的組成

組份	每劑量(0.5 ml)之量
失活裂解病毒粒子	
-A/新喀裏多尼亞/20/99(H1N1)IVR-116	5 µg HA
-A/威斯康星/67/2005(H3N2)NYMCX-161	5 µg HA
-B/馬來西亞/2506/2004	5 µg HA
佐劑(全劑量/半劑量)	
-SB62乳液(總體積)	0.250 mL
• 角鯊烯	10.70 mg/5.35 mg
• DL-α-生育酚	11.88 mg/5.94 mg
• 聚山梨醇酯80(Tween 80)	4.85 mg/2.425 mg
聚山梨醇酯80(Tween 80)	0.122 mg
辛荳昔醇10(Triton X-100)	0.0283 mg
α生育酚氫丁二酸酯	0.01665 mg
氯化鈉	4 mg
磷酸氫二鈉	0.575 mg
磷酸二氫鉀	0.100 mg
氯化鉀	0.101 mg
注射用水	足量至0.50 ml

縮寫：HA=血球凝集素。

當使用AS03全劑量時，聚山梨醇酯80中之總含量相應於每劑量4.972 mg，且當使用AS03半劑量時，相應於每劑量2.547 mg。

III.4.1.2. 裂解失活流感抗原製劑之產生

流感抗原與FluarixTM(流感病毒疫苗)中所包括之彼等抗原相同。單價本體係由純化失活裂解病毒組成，其係自流感病毒之三種病毒株(即A型(H1N1及H3N2)及B型)之研究

種子所製備，該等研究種子個別地生長於含胚雞卵中。該等研究種子係源自由WHO協作中心按照每年WHO推薦所接受之病毒株。對於製備方法而言，經由說明對WO 02/097072給出抗原參考物。三種單價本體之體積係基於調配之前各單價本體中所量測之HA含量及目標製造體積計。

將10倍濃縮磷酸鹽緩衝生理食鹽水(當1倍濃縮時pH為7.4)及Tween 80與 α -生育酚氫丁二酸酯之預混合物稀釋於注射用水中，繼而在室溫下攪拌5-30分鐘期間。

隨後，將三種濃縮單價本體依次稀釋於所得磷酸鹽緩衝生理食鹽水/Tween 80- α -生育酚氫丁二酸酯溶液中以達到以下濃度：

20 μg HA之各A單價本體(H1N1、H3N2)

23.32 μg HA之B單價本體

每mL中間三價本體(5 μg HA之各A單價本體及5.83 μg HA之B/500 μl 三價最終本體)。

在各單價本體之添加之間，在室溫下將混合物攪拌10-30分鐘且在最後單價本體之添加後攪拌15-30分鐘。亦稱為"預池(pre-pool)"之該中間三價本體可保持於+2-+8 $^{\circ}\text{C}$ 下，或另外在當天經處理至最終調配步驟。預池之最終體積為每劑量250 μl 。

III.4.1.3. 具有AS03佐劑之疫苗組合物的製備

經佐劑化之疫苗：LD AS03 1/1(表4)

將10倍濃縮之PBS mod(當1倍濃縮時pH 7.4；137 mM

NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄、1.47 mM KH₂PO₄，pH 7.4) 以及含有 Tween80、Triton X-100 及 VES(量考慮存在於病毒株中之清潔劑)之混合物添加至注射用水中。5至30分鐘攪拌後，添加每ml之各病毒株H1N1及H3N2中20 µg HA及每ml之B病毒株中23.32 µg HA，同時在每次添加之間攪拌10至30分鐘。攪拌15至30分鐘後，丟棄小體積之所謂"中間本體"以用於分析，且儲存於+2與+8°C之間。中間本體係處於1倍濃縮之PBS mod中。目標清潔劑濃度為每ml 488 µg Tween 80、每ml 73.6 µg Triton X-100及每ml 66.6 µg VES。

隨後製備最終調配物：將相等體積之SB62(參見實例II中之製備)添加至各250 µl之預池中間本體中，且在室溫下在30至60分鐘期間混合。檢查pH在6.8與7.5之間之範圍內。用氮沖洗調配物且隨後在填充之前將其儲存於+2與8°C之間。

表4 經AS03佐劑化之低劑量疫苗

組份	濃度	體積(ml)
步驟1：預池		
A/新喀裏多尼亞單價本體	104 µg/ml	302.88
A/威斯康星單價本體	85 µg/ml	370.59
B/馬來西亞單價本體	110 µg/ml	333.90
PBS mod(1)	參見腳註	56.76
Tween 80	48000 µg/ml	5.24
Triton X-100		來自H3N2病毒株之殘餘物
α-生育酚氫丁二酸酯	26480 µg/ml	1.2
過濾水		504.43
總體積=1575(ml) 取回75 ml預池樣本用於測試 剩餘預池體積=1500(ml)		

步驟2：添加至預池中		
乳液		1500
最終本體之總體積=3000(ml)		

(1)：緩衝液最終本體組成為：137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na₂HPO₄、1.47 mM KH₂PO₄，pH 7.4

經佐劑化之疫苗：LD AS03 1/2(表5)

將10倍濃縮之PBS mod物(當1倍濃縮時pH 7.4-參見上文組合物)以及含有Tween 80、Triton X-100及VES(量考慮存在於病毒株中之清潔劑)之混合物添加至注射用水中。5至30分鐘攪拌後，添加每ml之各病毒株H1N1及H3N2中20 µg HA及每ml之B病毒株中23.32 µg HA，同時在每次添加之間攪拌10至30分鐘。攪拌15至30分鐘後，丟棄小體積之所謂"中間本體"以用於分析，且將其儲存於+2與+8°C之間。PBS mod為於中間本體中之1倍濃縮物。目標清潔劑濃度為每ml 488 µg Tween 80、每ml 73.6 µg Triton X-100及每ml 66.6 µg VES。

隨後製備最終調配物：首先用PBS mod緩衝液稀釋SB62且在室溫下攪拌15-30分鐘。隨後將相等體積之該經稀釋SB62添加至各250 µl之中間本體預池中。在室溫下攪拌30至60分鐘後，檢查pH在6.8與7.5之間之範圍內。用氮沖洗調配物且隨後在填充之前將其儲存於+2與8°C之間。

兩種調配物之最終體積均為每劑量500 µl且最終HA濃度均為每ml三價最終本體10 µg之各A單價本體及11.66 µg之B單價本體。最終Tween 80、Triton X-100(來自H3N2單本體製造之殘餘物)及α-生育酚氫丁二酸酯(α-生育酚氫丁二

酸酯為RRR(D異構體)- α -生育酚之酯形式)目標濃度分別為244 $\mu\text{g/ml}$ 、58.6 $\mu\text{g/ml}$ 及33.3 $\mu\text{g/ml}$ 。

表5 經AS03佐劑化之低劑量疫苗(半劑量之佐劑)

組份	濃度	體積(ml)
步驟1：預池		
A/新喀裏多尼亞單價本體	104 $\mu\text{g/ml}$	300.96
A/威斯康星單價本體	85 $\mu\text{g/ml}$	368.24
B/馬來西亞單價本體	110 $\mu\text{g/ml}$	331.78
PBS mod(1)	參見圖例	56.4
Tween 80	48000 $\mu\text{g/ml}$	5.2
Triton X-100		來自H3N2病毒株之殘餘物
α -生育酚氫丁二酸酯	26480 $\mu\text{g/ml}$	1.2
過濾水		501.22
總體積=1565(ml) 取回65 ml預池樣本用於測試 剩餘預池體積=1500(ml)		
步驟2：添加至預池中		
乳液SB62		750
PBS mod(1)	參見圖例	75
過濾水		675
最終本體之總體積=3000(ml)		

(1)：緩衝液最終本體組成為：137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na_2HPO_4 、1.47 mM KH_2PO_4 ，pH 7.4

III.4.2. 疫苗投藥

將疫苗填充至1.25 ml無菌I型(Ph. Eur.)玻璃注射器中。將各注射器填充至0.57 ml之標靶(範圍：0.54-0.60 ml)。在非支配臂之三角肌區域中經肌肉內投與疫苗。所有疫苗均作為預填充之注射器(0.5 ml)存在。為確保疫苗之適當IM注射，使用至少25G且長度至少為2.5 cm之針。

III.5 研究群體結果

總計300個受檢者登記於該研究中：3個群組之每一群組

為100個受檢者。在疫苗接種時之總疫苗接種組的平均年齡為36.7歲，標準偏差為13.67歲。3個疫苗群組之間各受檢者之平均年齡及性別分布係類似的。

III.6 免疫原性結果

對免疫原性之ATP組(297個受檢者)執行免疫原性分析。

體液免疫反應

為評估藉由經AS03佐劑化之低劑量流感候選疫苗誘導之體液免疫反應，對各處理群組計算以下參數(95%信賴區間)：

- 第0天及第21天之HI抗體效價的幾何平均效價(GMT)；
- 第21天之血清轉化率(SC)；
- 第21天之轉化因子；
- 第0天及第21天之保護率。

III.6.1 HI幾何平均效價(GMT)

具有95% CI之HI抗體的GMT展示於表6及圖1中。群組之間的經調整GMT比率展示於表7中。

在3個處理群組中，所有3種疫苗病毒株之HI抗體的疫苗接種前GMT均在相同範圍內。對所有3種病毒株而言，第21天對經佐劑化群組所觀測之GMT傾向於比Fluarix群組高，且對A/威斯康星疫苗病毒株而言在FluLD1/1與Fluarix之間具有統計學差異(95%CI無重疊且經調整之GMT比率不含值1)。對B/馬來西亞疫苗病毒株而言，亦在FluLD1/2與Fluarix之間觀測到統計學差異(經調整之GMT比率不含值1)。

表 6- 第 0 天及 第 21 天之抗 HA 抗體的血清陽性率及幾何平均效價 (GMT)(免疫原性之 ATP 組)

抗體	群組	時間	N	≥ 10 I/DIL				GMT			Min	Max
				n	%	95% CI		I/DL	95% CI			
						LL	UL		LL	UL		
A/新喀裏多尼亞	FluLD1/1	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	31.9	23.5	43.4	<10.0	2560.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	475.4	352.2	641.6	20.0	7240.0
	FluLD1/2	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	36.1	26.9	48.5	<10.0	3620.0
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100	399.0	294.7	540.2	<10.0	7240.0
	Fluarix	PRE	98	85	86.7	78.4	92.7	26.1	20.5	33.2	<10.0	1280.0
		PI(D21)	98	98	100	96.3	100	380.6	274.2	528.4	10.0	7240.0
A/威斯康星	FluLD1/1	PRE	99	61	61.6	51.3	71.2	16.8	13.1	21.5	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	276.2	223.5	341.3	28.0	5120.0
	FluLD1/2	PRE	99	66	66.7	56.5	75.8	19.9	15.2	25.9	<10.0	640.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	241.9	192.9	303.4	20.0	5120.0
	Fluarix	PRE	98	58	59.2	48.8	69.0	14.7	11.6	18.6	<10.0	320.0
		PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	172.3	136.4	217.6	<10.0	5120.0
B/馬來西亞	FluLD1/1	PRE	99	72	72.7	62.9	81.2	20.4	15.9	26.1	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	268.6	221.3	326.0	28.0	2560.0
	FluLD1/2	PRE	99	76	76.8	67.2	84.7	22.2	17.6	27.9	<10.0	320.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	301.5	246.1	369.4	28.0	3620.0
	Fluarix	PRE	98	76	77.6	68.0	85.4	26.5	20.9	33.6	<10.0	320.0
		PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	219.2	171.4	280.2	<10.0	5120.0

FluLD1/1=具有全劑量 AS03 佐劑之低劑量流感疫苗 (5 μg HA/病毒株)

FluLD1/2=具有半劑量 AS03 佐劑之低劑量流感疫苗 (5 μg HA/病毒株)

Fluarix=Fluarix 疫苗

GMT=幾何平均抗體效價

N=具有可用結果之受檢者的數量

n/%=血清陽性受檢者 (HI 效價 ≥ 1:10) 之數量/百分比

95% CI=95% 信賴區間, LL=下限, UL=上限

MIN/MAX=最小值/最大值

PRE=疫苗接種前, 第 0 天

PI (D21)=疫苗接種後, 第 21 天

表 7-對各疫苗病毒株而言, 第 21 天各群組之間的經調整

GMT比率(免疫原性之ATP組)

抗體	群組描述	N	經調整之 GMT	群組描 述	N	經調整之 GMT	經調整之GMT比率			
							比率次序	值	95% CI LL UL	
A/新喀裏多 尼亞 (1/DIL)	FluLD1/1	99	472.4	FluLD1/ 2	99	385.0	FluLD1/1 /FluLD1/2	1.23	0.80	1.88
	FluLD1/1	99	472.3	Fluarix	98	396.9	FluLD1/1 /Fluarix	1.19	0.78	1.82
	FluLD1/2	99	385.0	Fluarix	98	397.0	FluLD1/2 /Fluarix	0.97	0.63	1.49
A/威斯康星 (1/DIL)	FluLD1/1	99	277.3	FluLD1/ 2	99	230.0	FluLD1/1 /FluLD1/2	1.21	0.90	1.62
	FluLD1/1	99	277.5	Fluarix	98	180.8	FluLD1/1 /Fluarix	1.54	1.14	2.06
	FluLD1/2	99	230.0	Fluarix	98	180.6	FluLD1/2 /Fluarix	1.27	0.95	1.71
B/馬來西亞 (1/DIL)	FluLD1/1	99	275.1	FluLD1/ 2	99	303.4	FluLD1/1 /FluLD1/2	0.91	0.68	1.22
	FluLD1/1	99	275.2	Fluarix	98	212.7	FluLD1/1 /Fluarix	1.29	0.96	1.74
	FluLD1/2	99	303.4	Fluarix	98	212.6	FluLD1/2 /Fluarix	1.43	1.06	1.92

FluLD1/1=具有全劑量AS03佐劑之低劑量流感疫苗(5 µg HA/病毒株)

FluLD1/2=具有半劑量AS03佐劑之低劑量流感疫苗(5 µg HA/病毒株)

Fluarix=Fluarix疫苗

經調整之GMT=對基線效價而言經調整之幾何平均抗體效價

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量

95% CI=經調整GMT比率之95%信賴區間(Ancova模型：對2個以上群組之基線效價-合併變異數的調整)；LL=下限、UL=上限

III.6.2抗HI抗體效價之血清轉化因子、血清保護率及血清轉化率(當建立用於人類之流感疫苗時，保護之關聯性)

血清保護率之結果呈現於表8-圖2中，血清轉化率之結果呈現於表9-圖3中且轉化因子之結果呈現於表10-圖4中。

歐洲當局(European Authorities)關於**血清保護率**所要求之臨限(70%)在所有群組中均達到(至少94.9%)。對於各疫苗病毒株而言，對3個群組而言，第21天之血清保護率係在相同範圍內。

歐洲當局關於**血清轉化率**所要求之臨限(40%)在所有群組中均達到(至少65%)。

對A/新喀裏多尼亞疫苗病毒株而言，對3個群組而言，第21天之SCR係在相同範圍內。

對A/威斯康星疫苗病毒株而言，對FluLD1/1群組而言，第21天之SCR與Fluarix群組相比傾向於更高。對FluLD1/2群組而言，第21天之SCR與Fluarix群組相比係在相同範圍內。

對B/馬來西亞疫苗病毒株而言，對FluLD1/2群組而言，第21天之SCR與Fluarix群組相比傾向於更高。對FluLD1/1群組而言，第21天之SCR與Fluarix群組相比係在相同範圍內。

歐洲當局關於**血清轉化因子**所要求之臨限(2.5)在所有群組中均達到(至少6.2)。

對A/新喀裏多尼亞疫苗病毒株而言，對3個群組而言，第21天之SCF似乎在相同範圍內。對FluLD1/2群組所觀測之值低於對Fluarix群組所觀測之值，但可藉由FluLD1/2群組中較高之疫苗接種前血清保護率來解釋。

對A/威斯康星疫苗病毒株而言，對FluLD1/1群組而言，第21天之SCF與Fluarix群組相比傾向於更高。對FluLD1/2群組而言，第21天之SCF與Fluarix群組相比係在相同範圍內。

對B/馬來西亞疫苗病毒株而言，對2個經佐劑化群組而言，第21天之SCF與Fluarix群組相比傾向於更高。

表8-第0天及第21天之HI抗體效價的血清保護率(SPR)(免疫原性之ATP組)

疫苗病毒株	群組	時間	N	SPR			
				n	%	95% CI LL	UL
A/新喀裏多尼亞	FluLD1/1	PRE	99	41	41.4	31.6	51.8
		PI(D21)	99	95	96.0	90.0	98.9
	FluLD1/2	PRE	99	55	55.6	45.2	65.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	35	35.7	26.3	46.0
		PI(D21)	98	93	94.9	88.5	98.3
A/威斯康星	FluLD1/1	PRE	99	32	32.3	23.3	42.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	37	37.4	27.9	47.7
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	25	25.5	17.2	35.3
		PI(D21)	98	93	94.9	88.5	98.3
B/馬來西亞	FluLD1/1	PRE	99	31	31.3	22.4	41.4
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	39	39.4	29.7	49.7
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100
	Fluarix	PRE	98	44	44.9	34.8	55.3
		PI(D21)	98	94	95.9	89.9	98.9

FluLD1/1=具有全劑量AS03佐劑之低劑量流感疫苗(5 µg HA/病毒株)

FluLD1/2=具有半劑量AS03佐劑之低劑量流感疫苗(5 µg HA/病毒株)

Fluarix=Fluarix疫苗

N=具有可用結果之受檢者的數量

n/%=經血清保護受檢者(HI效價 \geq 40 1/DIL)之數量/百分比

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

PRE=疫苗接種前，第0天

PI (D21)=疫苗接種後，第21天

資料來源=附錄表 IIIA

表 9-第 21 天之 HI 抗體效價的血清轉化率 (SCR)(免疫原性之 ATP 組)

疫苗病毒株	群組	N	SCR			
			n	%	95% CI LL	UL
A/新喀裏多尼亞	FluLD1/1	99	69	69.7	59.6	78.5
	FluLD1/2	99	64	64.6	54.4	74.0
	Fluarix	98	66	67.3	57.1	76.5
A/威斯康星	FluLD1/1	99	88	88.9	81.0	94.3
	FluLD1/2	99	79	79.8	70.5	87.2
	Fluarix	98	73	74.5	64.7	82.8
B/馬來西亞	FluLD1/1	99	76	76.8	67.2	84.7
	FluLD1/2	99	82	82.8	73.9	89.7
	Fluarix	98	65	66.3	56.1	75.6

FluLD1/1=具有全劑量 AS03 佐劑之低劑量流感疫苗 (5 μ g HA/病毒株)

FluLD1/2=具有半劑量 AS03 佐劑之低劑量流感疫苗 (5 μ g HA/病毒株)

Fluarix=Fluarix 疫苗

血清轉化定義為：

對最初血清陰性受檢者而言，疫苗接種後之抗體效價 \geq 40 1/DIL

對最初血清陽性受檢者而言，疫苗接種後之抗體效價 ≥ 4 倍疫苗接種前之抗體效價

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量

n/%=經血清轉化受檢者之數量/百分比

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

表 10- 第 21 天之 HI 抗體效價的血清轉化因子 (SCF)(免疫原性之 ATP 組)

疫苗病毒株	群組	N	值	SCF 95% CI	
				LL	UL
A/新喀裏多尼亞	FluLD1/1	99	14.9	10.4	21.3
	FluLD1/2	99	11.0	7.7	15.9
	Fluarix	98	14.6	9.9	21.6
A/威斯康星	FluLD1/1	99	16.5	13.0	20.9
	FluLD1/2	99	12.2	9.2	16.1
	Fluarix	98	11.7	8.8	15.6
B/馬來西亞	FluLD1/1	99	13.2	10.0	17.4
	FluLD1/2	99	13.6	10.2	18.0
	Fluarix	98	8.3	6.2	11.0

FluLD1/1=具有全劑量 AS03 佐劑之低劑量流感疫苗 (5 μ g HA/病毒株)

FluLD1/2=具有半劑量 AS03 佐劑之低劑量流感疫苗 (5 μ g HA/病毒株)

Fluarix=Fluarix 疫苗

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量

SCF=血清轉化因子或幾何平均比率 (平均 $[\log_{10}(\text{PI}(\text{D21})/\text{PRE}))]$)

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

III.7 安全性結論

就經佐劑化疫苗群組中之所請求(局部/全身)及未經請求症狀而言，與Fluarix群組相比之更高反應原性為該研究中所觀測之總體趨勢。經佐劑化疫苗中AS03含量之降低對所有全身及局部3級症狀均具有顯著影響。

與Fluarix群組(35%)相比，未經請求症狀之發生率在經佐劑化疫苗群組中傾向於更高(55%及47%之受檢者)。

自該等結果可推斷，候選疫苗之反應原性及安全性概況係令人滿意且在臨床上可接受的。

III.8. 總結論

III.8.1. 免疫原性結果

該研究之主要目標為評估藉由具有兩種不同濃度之AS03佐劑之低劑量流感疫苗及藉由Fluarix引發之體液免疫反應(抗HI抗體效價)。

第21天，三種疫苗超過歐洲當局關於每年登記之裂解病毒粒子流感疫苗的要求(用於每年病毒株改變之免疫邏輯評估之"Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for influenza Vaccines"-CPMP/BWP/214/96)。與Fluarix群組相比，經佐劑化群組中之GMT傾向於更高，對A/威斯康星(FluLD1/1相對Fluarix)及B/馬來西亞疫苗病毒株(FluLD1/2相對Fluarix)觀測到統計學顯著差異。在所有三個群組中均觀測到類似血清保護率，其係在94.9%至99%之範圍內。在經佐劑化群組中，觀測到血清轉化率及血清轉化因子比Fluarix群組中高。來自該試驗之資料亦揭示，

藉由具有半劑量AS03佐劑之疫苗所誘導之免疫原性相當於用全劑量佐劑所誘導之免疫原性。

III.8.2. 反應原性及安全性結果

在該研究群體中，亦即年齡在18與59歲之間的成年人中，投與經AS03佐劑化之低劑量流感候選疫苗為安全的且在臨床上具良好耐受性。與全劑量佐劑化之疫苗相比，半劑量佐劑化之疫苗展示所請求之局部及全身症狀的發生率顯著降低。

實例IV-在預致敏BALB/c小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解流感疫苗(包含各種劑量之AS03佐劑)的臨床前評估

IV.1. 實驗設計及目標

在經流感預致敏小鼠中執行實驗以評估藉由經該水包油佐劑調配之流感疫苗所誘導之AS03的體液反應之增加。為更接近人類情況(人由於大致每兩年經漂移病毒株反覆感染而為血清陽性的)，使用經異源亞型病毒株預致敏之動物進行該實驗。與用同型病毒株預致敏相比，異源亞型預致敏亦為更嚴格之模型，且為在不同佐劑之間進行辨別之較佳模型。

IV.1.1. 處理/群組(表11)

具有27隻成年雌性BALB/c小鼠之群組在第0天，用三價完整、福馬林(formalin)失活流感病毒(對各病毒株而言，5 µg HA)經鼻內預致敏(體積20 µl)。由彼等病毒株之較早期漂移變異體(5 µg HA完整失活H1N1 A/約翰內斯堡/82/96、H3N2 A/悉尼/5/97、B/哈爾濱/7/94)組成之預致敏病毒株包

括在疫苗中。28天後，用單一劑量之疫苗候選物，以50 μ l之總體積經肌肉內對小鼠進行疫苗接種。用僅含有裂解抗原(三價裂解普通抗原)之調配物或含有經兩劑量AS03(全或1/5)佐劑化之裂解抗原的調配物對小鼠進行免疫。用於免疫之病毒株包括H1N1 A/新喀裏多尼亞/20/99、H3N2 A/巴拿馬/2007/99、B/山東/7/97病毒抗原(1.5 μ g/病毒株、1/10之人類劑量)。

表 11

群組	抗原/調配物	其他處理
1	三價裂解/普通(未經佐劑化)	異源性預致敏D0
2	三價裂解/AS03	異源性預致敏D0
3	三價裂解/AS03 1/5	異源性預致敏D0

IV.1.2. 疫苗調配物之製備

製備 Tween 80、Triton X100及維生素E丁二酸酯(VES)之預混物以使最終濃度達成具有750 μ g/ml之Tween 80、110 μ g/ml之Triton X100及100 μ g/ml之VES的疫苗。用於預混物中之量係考慮已存在於病毒株中之清潔劑及VES之量來計算。

製備1公升之10倍濃縮生理食鹽水緩衝液(PBS pH 7.4)：向0.800 l注射用水中添加NaCl 80 g、KCl 2 g、Na₂HPO₄ 11.44 g、KH₂PO₄ 2 g。溶解後，用注射用水調整至1.0 L。當10倍稀釋時，pH將為7.4。

三價裂解/普通

根據以下次序臨時製備一50 μ l劑量之調配物：注射用水+生理食鹽水緩衝液(10倍濃縮PBS pH 7.4)+預混物，在室

溫下 5 min 磁力攪拌，+1.5 μg HA H1N1 病毒株，在室溫下 10 min 磁力攪拌，+1.5 μg HA H3N2 病毒株，在室溫下 10 min 磁力攪拌，+1.5 μg HA B 病毒株，在室溫下 15 min 磁力攪拌。在其製備結束後之該小時內注射調配物。

三價裂解/AS03

製備 Tween 80、Triton X100 及維生素 E 丁二酸酯 (VES) 之預混物以使最終濃度達成具有 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 Tween 80、110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 Triton X100 及 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 VES 的疫苗。用於預混物中之量係考慮已存在於病毒株中之清潔劑及 VES 之量來計算。

根據以下次序臨時製備一 50 μl 劑量之調配物：注射用水 + 生理食鹽水緩衝液 (10 倍濃縮 PBS pH 7.4) + 預混物，在室溫下 5 min 磁力攪拌，+1.5 μg HA H1N1 病毒株，在室溫下 10 min 磁力攪拌，+1.5 μg HA H3N2 病毒株，在室溫下 10 min 磁力攪拌，+1.5 μg HA B 病毒株，在室溫下 15 min 磁力攪拌，+25 μl SB62 乳液 (對全劑量 AS03 而言) 或 5 μl SB62 乳液 (對 1/5 劑量 AS03 而言)，在室溫下 15 min 磁力攪拌。在其製備結束後之該小時內注射調配物。

IV.1.3. 讀出 (表 12)

在免疫之前 (第 28 天) 及免疫後 14 天 (27 隻小鼠/群組) 量測疫苗接種之體液免疫反應。藉由血球凝集抑制 (HI) 測試來測試血清樣本。

表 12

讀出	時間點	樣本類型	分析方法
體液反應	D28, D42	血清	IHA

IV.2. 結果

IV.2.1. 體液免疫

結果呈現於圖 5 中。在異源亞型預致敏繼而為單一疫苗接種之該小鼠模型中，已展示 AS03 及其稀釋液誘導與普通疫苗相比更高之 HI 效價。對所有流感 A 病毒株而言，觀測到 HI 效價之統計學顯著增加 ($p < 0.05$)。對 H1N1 病毒株而言，亦在 AS03 與 AS03 1/5 之間觀測到 HI 效價之顯著差異 ($p < 0.05$)。與普通疫苗相比，對 B 病毒株而言，降低劑量之 AS03 未能增加 HI 效價。針對 B 病毒株 (B/山東) 觀測到極低反應；其可能歸因於用於預致敏之 B 病毒株與疫苗之間的顯著抗原性漂移。

IV.3. 結果及結論之概要

總之，與普通疫苗相比，當使用經 AS03 佐劑化之疫苗時，在經異源亞型病毒株預致敏之動物中觀測到 HI 效價之增加。對獲得抵抗所有三種流感疫苗病毒株之穩固 HI 效價而言，全劑量之 AS03 為最佳的。

實例 V-在預致敏 C57Bl/6 小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解流感疫苗(包含各種劑量之 AS03 佐劑)的臨床前評估

V.1. 實驗設計及目標

在流感預致敏小鼠中執行實驗，以評估藉由經該水包油佐劑調配之流感疫苗所誘導之 AS03 的體液及細胞反應之增

加。

為模擬人類情況，使用經異源亞型病毒株預致敏之小鼠進行實驗。

V.1.1. 處理/群組(表13)

具有25隻成年雌性C57B1/6小鼠之群組在第0天，用三價完整、福馬林失活流感病毒(對各病毒株而言，5 µg HA)經鼻內預致敏(體積20 µl)。由彼等病毒株之較早期漂移變異體(5 µg HA完整失活H1N1 A/北京/262/95、H3N2 A/巴拿馬/2007/99、B/山東/7/97)組成之預致敏病毒株包括在疫苗中。28天後，用單一劑量之疫苗候選物以100 µl之總體積經肌肉內對小鼠進行疫苗接種。用僅含有裂解抗原(三價裂解普通抗原)之調配物或含有經三劑量AS03(全、1/2或1/5)佐劑化之裂解抗原的調配物對小鼠進行免疫。用於免疫之病毒株包括H1N1 A/新喀裏多尼亞/20/99、H3N2 A/紐約/55/2004、B/江蘇/10/2003病毒抗原(1.5 µg/病毒株、1/10之人類劑量)。

表 13

群組	抗原/調配物	其他處理
1	三價裂解/普通(未經佐劑化)	異源預致敏D0
2	三價裂解/AS03	異源預致敏D0
3	三價裂解/AS03 1/2	異源預致敏D0
4	三價裂解/AS03 1/5	異源預致敏D0
5	PBS	異源預致敏D0

V.1.2. 疫苗調配物之製備

三價裂解/普通

根據以下次序臨時製備100 µl劑量之調配物：注射用水

+生理食鹽水緩衝液(如實例IV中教示所製備之10倍濃縮PBS pH 7.4)+Fluarix Lot DFLUA014(最終劑量中，每病毒株1.5 µg)。

三價裂解/AS03

根據以下次序臨時製備100 µl劑量之調配物：注射用水+生理食鹽水緩衝液(如實例IV中教示所製備之10倍濃縮PBS pH 7.4)+Fluarix Lot DFLUA014(最終劑量中，每病毒株1.5 µg)+25 µl SB62乳液(對全劑量而言)或12.5 µl SB62乳液(對½劑量而言)或5 µl SB62乳液(對1/5劑量而言)。在製備結束後之該小時內注射調配物。

V.1.3. 讀出(表14)

在免疫後21天(10隻小鼠/群組)量測對疫苗接種之體液免疫反應且藉由血球凝集抑制(HI)測試來測試血清樣本。藉由細胞內細胞激素染色(ICS)，在免疫後7天測試細胞免疫反應(每群組15隻小鼠)。

表 14

讀出	時間點	樣本類型	分析方法
體液反應	D49	血清	IHA
細胞反應	D35	PBMC	ICS

V.2. 結果

V.2.1. 體液免疫(10隻小鼠/群組)。

結果呈現於圖6中。在異源亞型預致敏繼而單一疫苗接種之該小鼠模型中，展示AS03及其稀釋液(1/2及1/5)誘導與普通疫苗相比更高之HI效價。對所有三種病毒株而言，在接受經全劑量AS03或降低劑量AS03佐劑化之疫苗的小

鼠之間未觀測到HI效價之差異。

V.2.2. 細胞免疫性(15隻小鼠/群組)。

結果呈現於圖7中。無論AS03之稀釋度如何，與經三價裂解普通疫苗免疫之小鼠相比，在經AS03佐劑化之三價裂解疫苗免疫之小鼠中觀測到更高之CD4+ T細胞反應。與在用經全劑量AS03佐劑化之三價裂解物免疫之小鼠中所誘導之反應相比，當用經更低劑量AS03佐劑化之三價裂解物對小鼠進行免疫時，觀測到更低細胞反應之趨勢。

V.3. 結果及結論之概要

總之，與普通疫苗相比，當使用經AS03佐劑化之疫苗時，在經異源亞型病毒株預致敏之動物中觀察到體液及細胞反應會增加。在經全劑量或部分劑量AS03佐劑免疫的小鼠之間，觀測到類似數值變化之體液反應。然而，佐劑劑量之降低與CD4+ T細胞反應降低幅度的趨勢有關聯。

實例VI-在預致敏C57Bl/6小鼠中藉由經佐劑化及未經佐劑化裂解流感疫苗(包含各種劑量之AS03佐劑及低劑量抗原)所誘導之細胞免疫反應的臨床前評估

VI.1. 實驗設計及目標

在流感預致敏小鼠中執行實驗以評估藉由含有低劑量抗原(0.5 µg/病毒株，1/30之人類劑量)且經該水包油佐劑調配之流感疫苗所誘導之AS03的細胞免疫反應之增加。為模擬人類情況，使用經異源亞型病毒株預致敏之小鼠進行實驗。

VI.1.1. 處理/群組(表15)

具有15隻成年雌性C57B1/6小鼠之群組在第0天，用三價完整、福馬林失活流感病毒(對各病毒株而言，5 µg HA)經鼻內方式預致敏(體積20 µl)。由彼等病毒株之較早期漂移變異體(5 µg HA完整失活H1N1 A/北京/262/95、H3N2 A/巴拿馬/2007/99、B/山東/7/97)組成之預致敏病毒株包括在疫苗中。28天後，用單一劑量之疫苗候選物以50 µl之總體積經肌肉內對小鼠進行疫苗接種。用僅含有裂解抗原(三價裂解普通抗原)之調配物或含有經三劑量AS03(全、1/2或1/5)佐劑化之裂解抗原的調配物對小鼠進行免疫。用於免疫之病毒株包括H1N1 A/新喀裏多尼亞/20/99、H3N2 A/紐約/55/2004、B/江蘇/10/2003病毒抗原(0.5 µg/病毒株、1/30之人類劑量)。

表 15

群組	抗原/調配物	其他處理
1	三價裂解/普通(未經佐劑化)	異源預致敏D0
2	三價裂解/AS03	異源預致敏D0
3	三價裂解/AS03 1/2	異源預致敏D0
4	三價裂解/AS03 1/5	異源預致敏D0
5	PBS	異源預致敏D0

VI.1.2. 疫苗調配物之製備

三價裂解/普通

根據以下次序臨時製備50 µl劑量之調配物：注射用水+生理食鹽水緩衝液(如實例IV中教示所製備之10倍濃縮PBS pH 7.4)+Fluarix Lot DFLUA014(最終劑量中，每病毒株0.5 µg)。

三價裂解/AS03

根據以下次序臨時製備50 µl劑量之調配物：注射用水+生理食鹽水緩衝液(如實例IV中教示所製備之10倍濃縮PBS pH 7.4)+Fluarix Lot DFLUA014(最終劑量中，每病毒株0.5 µg)+25 µl SB62乳液(對全劑量而言)或12.5 µl SB 62乳液(對½劑量而言)或5 µl SB62乳液(對1/5劑量而言)。在製備結束後之該小時內注射調配物。

VI.1.3. 讀出(表16)

藉由細胞內細胞激素染色，在免疫後7天測試細胞免疫反應。

表 16

讀出	時間點	樣本類型	分析方法
細胞反應	D35	PBMC	ICS

VI.2. 結果

VI.2.1. 細胞免疫性

結果呈現於圖8中。與用三價裂解普通疫苗免疫之小鼠相比，在用經AS03(全或1/2劑量)佐劑化之三價裂解疫苗免疫之小鼠中觀測到邊緣性更高之CD4+ T細胞反應。與在用三價裂解普通疫苗或經全劑量或半劑量AS03佐劑化之三價裂解疫苗進行免疫之小鼠中所誘導之反應相比，當用經1/5之AS03劑量佐劑化之三價裂解疫苗對小鼠進行免疫時，觀測到更高之細胞反應。

VI.3. 結果及結論之概要

總之，與普通疫苗相比，當使用經AS03佐劑化之疫苗時，在經異源亞型預致敏之動物中觀測到CD4+ T細胞反應

之最小增加。在該實驗中未觀測到佐劑劑量反應，且的確，1/5之AS03劑量誘導比用更高佐劑劑量所見者更高頻率之抗原特異性CD4+ T細胞。總之，使用每病毒株0.5 µg HA所產生之該等資料不類似於來自使用每病毒株1.5 µg HA所產生之其他臨床前實驗的資料。

實例 VII-在天然 C57Bl/6 小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解 H5N1 疫苗 (包含各種劑量之 AS03 佐劑及抗原) 的臨床前評估

VII.1. 實驗設計及目標

在 H5N1 天然小鼠中執行實驗以評估藉由經該水包油佐劑調配之 H5N1 裂解疫苗所誘導之 AS03 的體液及細胞免疫反應之增加。在大流行病之狀況下，預期整個世界人群將對新流行之大流行病流感病毒株天然免疫。由於該天然免疫狀態，大流行病疫苗將可能需要兩疫苗劑量以保護個體以避免由新流感病毒株所引起之感染及嚴重疾病。為表示該先前暴露之缺乏，研發天然小鼠模型以評估疫苗之免疫原性。

VII.1.1. 處理/群組 (表 17)

具有 15 隻成年雌性天然 C57Bl/6 小鼠之群組在第 0 天及第 21 天，用大流行病 H5N1 疫苗候選物以 50 µl 之總體積經肌肉內進行免疫。用僅含有裂解 H5N1 抗原 (H5N1 裂解普通抗原) 之調配物或含有經不同劑量 AS03 (雙倍、全、1/2 或 1/5) 佐劑化之裂解抗原的調配物對小鼠進行免疫。用於免疫之病毒株包括 H5N1 A/越南/1194/04 病毒抗原 (1.5 或 0.38 µg/

病毒株相應於1/10之人類劑量)。

未用雙倍AS03劑量進行調配，而進行一50 µl H5N1裂解/AS03全劑量+一50 µl劑量AS03之伴隨注射。

表 17

群組	抗原/調配物	抗原劑量
1	H5N1裂解/普通(未經佐劑化)	1.5 µg
2	H5N1裂解/雙倍劑量AS03	1.5 µg
3	H5N1裂解/AS03	1.5 µg
4	H5N1裂解/AS03 1/2	1.5 µg
5	H5N1裂解/AS03 1/5	1.5 µg
6	H5N1裂解/普通(未經佐劑化)	0.38 µg
7	H5N1裂解/雙倍劑量AS03	0.38 µg
8	H5N1裂解/AS03	0.38 µg
9	H5N1裂解/AS03 1/2	0.38 µg
10	H5N1裂解/AS03 1/5	0.38 µg
11	PBS	

VII.1.2. 疫苗調配物之製備

1公升最終本體緩衝液(PBS pH 7.2 ± 0.2)之製備：向0.800 l注射用水中添加NaCl 7.699 g、KCl 0.200 g、MgCl₂×6H₂O 0.100 g、Na₂HPO₄×12 H₂O 2.600 g、KH₂PO₄ 0.373 g。溶解後，用注射用水調整至1.0 L。

H5N1裂解/普通

50 µl劑量之製備：

將硫柳汞(量考慮其在病毒株中之濃度)及Triton X100添加至最終本體緩衝液中。因為調配物中之含量目標係由病毒株之Tween濃度達成，所以不添加Tween 80。在1.5 µg調配物劑量中，硫柳汞之最終濃度為10 µg/ml，Tween 80之最終濃度為368 µg/ml且Triton X100之最終濃度為35 µg/ml。在0.38 µg調配物劑量中，硫柳汞之最終濃度為10

$\mu\text{g/ml}$ ，Tween 80之最終濃度為93 $\mu\text{g/ml}$ 且Triton X100之最終濃度為8.9 $\mu\text{g/ml}$ 。5-30 min磁力攪拌後，添加1.5或0.38 μg 之HA(H5N1病毒株)。將調配物攪拌30-60分鐘。檢查pH。在調配結束後之該小時內進行注射。

H5N1裂解/AS03

50 μl 劑量之製備：

將硫柳汞(量考慮其在病毒株中之濃度)及Triton X100添加至最終本體緩衝液中。因為調配物中之含量目標係由病毒株之Tween濃度達成，所以不添加Tween 80。在1.5 μg 調配物劑量中，硫柳汞之最終濃度為10 $\mu\text{g/ml}$ ，Tween 80之最終濃度為368 $\mu\text{g/ml}$ 且Triton X100之最終濃度為35 $\mu\text{g/ml}$ 。在0.38 μg 調配物劑量中，硫柳汞之最終濃度為10 $\mu\text{g/ml}$ ，Tween 80之最終濃度為93 $\mu\text{g/ml}$ 且Triton X100之最終濃度為8.9 $\mu\text{g/ml}$ 。5-30 min磁力攪拌後，添加1.5或0.38 μg 之HA(H5N1病毒株)。30-60分鐘磁力攪拌後，添加25或12.5或5 μl 之SB62乳液。將調配物攪拌30-60分鐘。檢查pH。在調配結束後之該小時內進行注射。

VII.1.3. 讀出(表18A)

藉由抗Ig、IgG1及IgG2b抗體效價，在免疫後第14天量測體液免疫反應(10隻小鼠/群組)(圖9，A-F)。亦藉由抗H5N1血球凝集抑制檢定，在免疫後第21天量測體液免疫反應(10隻小鼠/群組)(圖10，A-B)。

藉由流式細胞儀所讀數之抗原特異性CD4+ T細胞之細胞內細胞激素染色(ICS)，在免疫後第6天測試細胞免疫反

應(5個池，每群組3隻小鼠)(圖11，A-B)。

表 18A

讀出	時間點	樣本類型	分析方法
體液反應	D42	血清	ELISA、同型及HI效價
細胞反應	D47	PBMC	ICS

VII.2. 結果

VII.2.1. 體液免疫反應：ELISA及同型。

結果呈現於圖9及表18B中。

表 18B

	H5N1 裂解普通	H5N1 裂解 2×AS03	H5N1 裂解 AS03	H5N1 裂解 AS03/2	H5N1 裂解 AS03/5	PBS
Ig反應(ELISA中點效價)						
1.5 µg/小鼠	177	81680	59734	67772	57697	50
0.38 µg/小鼠	120	91319	76144	49162	54566	
IgG1反應(ELISA中點效價)						
1.5 µg/小鼠	124	54683	44965	40558	39854	50
0.38 µg/小鼠	144	62445	44381	31855	39269	
IgG2b反應(ELISA中點效價)						
1.5 µg/小鼠	190	10928	10625	11215	7903	79
0.38 µg/小鼠	60	20993	12617	9352	9565	
比率IgG1/IgG2b						
1.5 µg/小鼠	0.7	5	4.2	3.6	5	0.6
0.38 µg/小鼠	2.4	3	3.5	3.4	4.1	

在H5N1裂解疫苗之各劑量下，與未經佐劑化H5N1裂解疫苗相比，所有經佐劑化群組誘導更高之抗H5N1 Ig、IgG1及IgG2b抗體效價(圖9-A至F)。在H5N1裂解疫苗之各劑量下；抗H5N1 IgG1抗體反應比抗H5N1 IgG2b抗體反應高4-5倍(圖9-C至F)。用1.5 µg HA之H5N1裂解疫苗之劑量且與各劑量之佐劑組合，未觀測到抗H5N1 Ig、IgG1及IgG2b抗體反應之差異(圖9-A、C及E)。

用 0.38 μg HA 之 H5N1 裂解疫苗之劑量時，與藉由經 AS03/2 ($p=0.7315$) 及 AS03 1/5 ($p=0.9744$) 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗誘導之反應相比，在用經 2 \times 全劑量佐劑化之 H5N1 裂解疫苗免疫後，獲得更高抗 H5N1 Ig 效價之趨勢(圖 9-B)。對於抗 H5N1 IgG1 抗體反應而言亦觀測到該趨勢(圖 9-D)。然而，動力(power)不足以觀測到統計學顯著差異(對 1.7 倍差異而言為 25% 動力，或對 2 倍差異而言為 47%)。

VII.2.2. 體液免疫反應：HI 效價。

用 1.5 μg HA/小鼠之劑量時：

在各佐劑劑量下，與在用未經佐劑化 H5N1 裂解疫苗免疫之小鼠中所獲得之反應相比，用 AS03 佐劑化 H5N1 裂解疫苗免疫之所有小鼠誘導更高之 HI 效價(圖 10-A)。當 H5N1 裂解疫苗經一定劑量範圍之 AS03 佐劑化時，未觀測到 HI 效價之統計學顯著差異(圖 10-A)。

用 0.38 μg HA/劑量之劑量時

在各佐劑劑量下，與在用未經佐劑化 H5N1 裂解疫苗免疫之小鼠中所獲得之反應相比，用 AS03 佐劑化 H5N1 裂解疫苗免疫之所有小鼠誘導更高之 HI 效價(圖 10B)。

與用經 AS03/2 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗所獲得之反應相比(對 4 倍差異而言 $p=0.032$)，用經 2 \times 全劑量 AS03 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗觀察到顯著更高之 HI 效價(圖 10B)。

在用經 2 \times 全劑量 AS03 或全劑量 AS03 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗免疫之小鼠中，或在用經 AS03/2 或 AS03/5 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗免疫之小鼠之間，未觀測到 HI 效價之統計

學顯著差異(圖 10B)。

抗原劑量(1.5 μg 或0.38 μg)之間的比較：

除在用經 AS03/5 佐劑化之 1.5 μg HA 裂解 H5N1 免疫之小鼠之間展示比用經 2 \times 全劑量 AS03 佐劑化之 0.38 μg HA 裂解 H5N1 免疫之小鼠顯著更低的 HI 效價 ($p=0.01$) 以外，在用各 HA 劑量之經 AS03、AS03/2 或 AS03/5 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗免疫的小鼠之間未觀測到 HI 效價之統計學顯著差異(圖 10)。

VII.2.3. 細胞免疫反應

為評估由三價季節性流感疫苗誘導之細胞免疫反應，每病毒株 1 μg HA 之裂解抗原用於 CD4 T 細胞之再刺激。為對於單價 H5N1 流感疫苗維持相同再刺激條件，在該實驗中使用 3 μg HA 之單價裂解抗原。對在不同佐劑之間的辨別而言，該濃度亦展示為最佳的。結果呈現於圖 11 中。

在 H5N1 裂解疫苗之各劑量(1.5 或 0.38 μg)下，與用未經佐劑化 H5N1 裂解疫苗進行免疫之小鼠相比，在用經各種劑量之 AS03 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗進行免疫之小鼠中觀測到更高之 CD4+ T 細胞反應。

在 1.5 μg H5N1 裂解疫苗之劑量下，AS03 劑量之降低相應於 CD4+ T 細胞頻率之降低(圖 11A)。然而，在 0.38 μg H5N1 裂解疫苗之劑量下，在用經 AS03 佐劑化之 H5N1 裂解疫苗進行免疫之小鼠中，在不同佐劑劑量之間未觀測到 CD4+ T 細胞反應之差異(圖 11B)。

VII.3. 結果及結論之概要

小鼠中之免疫原性研究展示，經佐劑化之H5N1裂解疫苗誘導比藉由未經佐劑化H5N1裂解疫苗誘導之彼等反應顯著更高之體液(抗H5N1 ELISA及HI效價)及細胞(CD4+ T細胞)反應。

除在VII.2.2部分中所提及之兩個群組外，在用1.5 μg 及0.38 μg 經佐劑化H5N1裂解疫苗進行免疫之小鼠之間，未觀測到體液免疫反應之抗原劑量反應效應，其暗示在佐劑之存在下，該模型中可能需要甚至更低劑量之HA以觀測劑量反應效應。

與普通H5N1疫苗相比，當使用經AS03佐劑化之H5N1大流行病疫苗時，在天然小鼠中觀測到CD4+ T細胞反應之強烈增加。當0.38 μg 劑量之H5N1裂解疫苗用作疫苗候選物時，未觀測到AS03稀釋液之影響，而當1.5 μg H5N1裂解疫苗經降低劑量之AS03佐劑化時，觀測到CD4 T細胞反應之降低。

如先前所觀測，在用經全劑量AS03或經AS03/2佐劑化之H5N1裂解疫苗(在任一抗原劑量下)進行免疫之小鼠之間，未觀測到體液及細胞免疫反應的差異。當2 \times 全劑量AS03用於疫苗調配物中時，偵測到免疫反應之一些增強，且因此當AS03/5用於疫苗調配物中時，偵測到免疫反應之降低。

總之，在此報導之資料證明該新穎佐劑系統於該疫苗調配物中之效能。

實例 VIII-預致敏大白豬中之經佐劑化及未經佐劑化流感

疫苗的臨床前評估

VIII.1. 實驗設計及目標

在流感預致敏豬中執行實驗以評估藉由經該水包油佐劑調配之流感疫苗誘導之AS03的體液反應之增加。

使用豬以在接近於人類之動物模型中評估AS03之劑量範圍。豬展示長系列之確定該動物之生物學類似性，因為生理學上最接近於人類，極個別例外(Douglas R., 1972)。此外，在豬中通常觀測到流感感染之表現。

VIII.1.1. 處理/群組(表19)

具有10隻成年雌性大白豬之群組在第0天，用三價完整、福馬林失活流感病毒(對各病毒株而言25 µg HA)以200 µl之總體積經鼻內預致敏。預致敏病毒株係由與疫苗病毒株同源之病毒株(25 µg HA完整失活H1N1 A/新喀裏多尼亞/20/99、H3N2 A/巴拿馬/2007/99及B/山東/7/97)組成。28天後，用單一劑量之疫苗候選物以500 µl之總體積經肌肉內對豬進行疫苗接種。用僅含有裂解抗原(三價裂解普通抗原)之調配物或含有經一定劑量範圍之AS03(全、1/2或1/5)佐劑化之裂解抗原的調配物對豬進行免疫。用於免疫之病毒株包括H1N1 A/新喀裏多尼亞/20/99、H3N2 A/巴拿馬/2007/99及B/山東/7/97病毒抗原(如在一人類劑量中，15 µg HA之H1N1 A/新喀裏多尼亞/20/99、H3N2 A/巴拿馬/2007/99病毒株及17.5 µg B/山東/7/97病毒株)。

表 19

群組	抗原/調配物	其他處理
1	三價裂解/普通(未經佐劑化)	同源預致敏D0
2	三價裂解/AS03	同源預致敏D0
3	三價裂解/AS03 1/2	同源預致敏D0
4	三價裂解/AS03 1/5	同源預致敏D0

VIII.1.2. 疫苗調配物之製備

三價裂解/普通

製備 Tween 80、Triton X100及維生素E丁二酸酯(VES)之預混物以使最終濃度達成具有750 µg/ml之 Tween 80、110 µg/ml之 Triton X100及100 µg/ml之 VES的疫苗。用於預混物中之量考慮其於病毒株中之含量。

根據以下次序臨時製備一500 µl劑量之調配物：注射用水+生理食鹽水緩衝液(如實例IV中教示所製備之10倍濃縮 PBS pH 7.4)+預混物，在室溫下5 min磁力攪拌，+15 µg HA H1N1病毒株，在室溫下10 min磁力攪拌，+15 µg HA H3N2病毒株，在室溫下10 min磁力攪拌，+17.5 µg HA B病毒株，在室溫下15 min磁力攪拌。在其製備結束後之該小時內注射調配物。

三價裂解/AS03

製備 Tween 80、Triton X100及維生素E丁二酸酯(VES)之預混物以使最終濃度達成具有750 µg/ml之 Tween 80、110 µg/ml之 Triton X100及100 µg/ml之 VES的疫苗。用於預混物中之量考慮其於病毒株中之含量。

根據以下次序臨時製備一500 µl劑量之調配物：注射用水+生理食鹽水緩衝液(如實例IV中教示所製備之10倍濃縮

PBS pH 7.4)+預混物，在室溫下5 min磁力攪拌，+15 µg HA H1N1病毒株，在室溫下10 min磁力攪拌，+15 µg HA H3N2病毒株，在室溫下10 min磁力攪拌，+17.5 µg HA B病毒株，在室溫下15 min磁力攪拌，+250 µl SB62乳液(對全劑量AS03而言)或125 µl SB62乳液(對1/2劑量AS03而言)或50 µl SB62乳液(對1/5劑量AS03而言)，在室溫下15 min磁力攪拌。在其製備結束後之該小時內注射調配物。

VIII.1.3. 讀出(表 20)

在鼻內預致敏之前(第0天)，免疫之前(第28天)及免疫後第14天量測對疫苗接種之體液免疫反應(10隻豬/群組)。血清樣本係藉由血球凝集抑制(HI)測試來測試。

表 20

讀出	時間點	樣本類型	分析方法
體液反應	D0, D28, D42	血清	IHA

VIII.2. 結果及結論

VIII.2.1. 體液免疫

結果呈現於圖 12 中。無論佐劑之稀釋度如何，在同源預致敏之該模型中，經AS03佐劑化之三價裂解調配物比普通三價調配物誘導對所有病毒株而言更強之HI反應，儘管對於所有三種病毒株而言，並非總達到統計顯著性。觀測到佐劑劑量效應在各病毒株之間存在輕微差異。對諸如B/山東之較小免疫原性病毒株而言，僅經全劑量之AS03佐劑化之三價裂解疫苗顯著不同於普通疫苗。與經全劑量之AS03佐劑化之三價裂解疫苗相反，降低劑量之AS03未能使所有

三種病毒株之HI效價增加高於用普通疫苗所見之彼等效價。

實例IX-在天然及預致敏C57B1/6小鼠中之經佐劑化及未經佐劑化裂解三價或四價(含有第二B病毒株)疫苗的臨床前評估

IX.1. 實驗設計及目標

在天然及預致敏小鼠中執行實驗以評估藉由經該水包油乳液佐劑(AS03或AS03半劑量)調配之流感裂解三價或四價(含有第二B病毒株)疫苗所誘導之體液免疫反應的增加。近期分離流感B病毒之HA基因的系統發生分析證明，自20世紀80年代中期起，該基因已進化為兩個抗原性相異的譜系，其係藉由B/維多利亞/2/87類及B/山形/16/88類病毒來表示。該等實驗評估與由三價流感疫苗(TIV)誘導之反應相比，第二B病毒株於四價流感疫苗(QIV)中之存在對體液免疫反應之影響。

IX.1.1. 處理/群組(表21)

藉由使用具有10隻成年雌性C57B1/6天然小鼠或經與疫苗病毒株相比異源之病毒株預致敏的小鼠之群組執行該等實驗。

在第0天及第28天，用三價或四價流感疫苗候選物以1000 μ l之總體積經肌肉內對天然小鼠進行免疫。

在第0天，預致敏小鼠首先接收用三價完整、福馬林失活流感病毒(對各病毒株而言5 μ g HA)之鼻內投藥(20 μ l體積)。由彼等病毒株之漂移變異體(5 μ g HA完整失活H1N1

A/北京/262/95、H3N2 A/惠靈頓/1/04及B/布裏斯班/32/02)組成之預致敏病毒株包括在疫苗中。28天後，用單一劑量之疫苗候選物以100 µl之總體積經肌肉內對小鼠進行疫苗接種。

用僅含有TIV或QIV(普通疫苗)之調配物或含有經不同劑量之AS03(全或半(1/2))佐劑化之TIV或QIV的調配物對小鼠進行免疫。用於免疫之病毒株包括H1N1 A/新喀裏多尼亞/20/99、H3N2 A/威斯康星/52/05及B/山東/7/97(包括於TIV及QIV中之B/維多利亞譜系)且對QIV疫苗而言亦包括B/江蘇/10/03(僅包括於QIV中之B/山形譜系)(1.5 µg/病毒株相應於1/10之人類劑量)。

表 21

群組	抗原/調配物	抗原劑量
1	TIV 普通(未經佐劑化)	1.5 µg
2	TIV AS03	1.5 µg
3	TIV AS03/2	1.5 µg
4	QIV 普通(未經佐劑化)	1.5 µg
5	QIV AS03	1.5 µg
6	QIV AS03/2	1.5 µg
7	PBS	

IX.1.2. 疫苗調配物之製備

TIV 普通(未經佐劑化)

100 µl劑量之製備：

將10倍濃縮之PBS及Tween 80、Triton X-100與VES之預混物(量考慮存在於病毒株中之清潔劑)添加至注射用水中。在調配物中，Tween 80之最終濃度為354 µg/ml，Triton X-100之最終濃度為52 µg/ml、VES之最終濃度為

47.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。5 min磁力攪拌後，添加1.5 μg 之各病毒株(H1N1、H3N2、B病毒株)，在各次添加之間伴隨10 min磁力攪拌。隨後，將調配物攪拌15 min。檢查pH。在調配結束後之該小時內進行注射。

TIV AS03或AS03 1/2

100 μl 劑量之製備：

將10倍濃縮之PBS及Tween 80、Triton X-100與VES之預混物(量考慮存在於病毒株中之清潔劑)添加至注射用水中。在調配物中，Tween 80之最終濃度為354 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，Triton X-100之最終濃度為52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、VES之最終濃度為47.37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。5 min磁力攪拌後，添加1.5 μg 之各病毒株(H1N1、H3N2、B病毒株)，在各次添加之間伴隨10 min磁力攪拌。15 min磁力攪拌後，添加25 μl 或12.5 μl 之SB62乳液。隨後將調配物攪拌15 min。檢查pH。在調配結束後之該小時內進行注射。

QIV普通(未經佐劑化)

100 μl 劑量之製備：

將10倍濃縮之PBS及Tween 80、Triton X-100與VES之預混物(量考慮存在於病毒株中之清潔劑)添加至注射用水中。在調配物中，Tween 80之最終濃度為472 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，Triton X-100之最終濃度為69.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、VES之最終濃度為63.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。5 min磁力攪拌後，添加1.5 μg 之各病毒株(H1N1、H3N2、兩種B病毒株)，在各次添加之間伴隨10 min磁力攪拌。隨後將調配物攪拌15 min。檢查pH。在調

配結束後之該小時內進行注射。

QIV AS03或AS03 1/2

100 µl劑量之製備：

將10倍濃縮之PBS及Tween 80、Triton X-100與VES之預混物(量考慮存在於病毒株中之清潔劑)添加至注射用水中。在調配物中，Tween 80之最終濃度為472 µg/ml，Triton X-100之最終濃度為69.44 µg/ml、VES之最終濃度為63.16 µg/ml。5 min磁力攪拌後，添加1.5 µg之各病毒株(H1N1、H3N2、兩種B病毒株)，在各次添加之間伴隨10 min磁力攪拌。15 min磁力攪拌後，添加25 µl或12.5 µl之SB62乳液。隨後將調配物攪拌15 min。檢查pH。在調配結束後之該小時內進行注射。

IX.1.3. 讀出(表22)

在天然小鼠中，在每群組之10隻小鼠中藉由血球凝集抑制檢定在第一免疫後28天(D28 Post-I)及第二免疫後21天(D21 Post-II)量測體液免疫反應(圖13)。

在預致敏小鼠中，在每群組之10隻小鼠中藉由血球凝集抑制檢定在預致敏後28天(第28天 Post-Prim)及單一免疫後21天(D21 Post-Imm)量測體液免疫反應(圖14)。

為簡化且集中於該實驗之目標，僅描述抵抗B病毒株所誘導之體液免疫反應。

表 22

讀出	時間點	樣本類型	分析方法
體液反應	第28天及第49天	血清	HI效價

IX.2. 結果

IX.2.1. 天然小鼠中之體液免疫反應：HI效價。

與在用未經佐劑化流感裂解疫苗進行免疫之小鼠中所獲得的反應相比，用經佐劑化流感裂解疫苗進行免疫之天然小鼠誘導更高之HI效價(圖 13，A及B)。

無論佐劑為何種佐劑(AS03或AS03/2)，用經佐劑化TIV或經佐劑化QIV進行免疫之天然小鼠均誘導抵抗B/山東/7/97(包括於TIV及QIV兩者中之B/維多利亞類病毒)之類似HI效價(圖 13；A)。

無論佐劑為何種佐劑(AS03或AS03/2)，與在用經佐劑化TIV進行免疫之天然小鼠中所觀測之缺少HI效價相比，用經佐劑化QIV進行免疫之天然小鼠均誘導抵抗B/江蘇/10/03(僅包括於QIV中之B/山形類病毒)之更高HI效價(圖 13；B)。

IX.2.2. 預致敏小鼠中之體液免疫反應：HI效價。

與在用未經佐劑化流感裂解疫苗進行免疫之小鼠中所獲得的反應相比，用B/維多利亞類病毒預致敏且用經佐劑化流感裂解疫苗進行免疫之小鼠誘導更高之HI效價(圖 14，A及B)。

無論佐劑為何種佐劑(AS03或AS03/2)，用維多利亞類病毒預致敏且用經佐劑化TIV或經佐劑化QIV進行免疫之小鼠均誘導抵抗B/山東/7/97病毒(包括於TIV及QIV兩者中之B/維多利亞類病毒)之類似HI效價(圖 14；B)。

無論佐劑為何種佐劑(AS03或AS03/2)，與在用經佐劑化

TIV進行免疫之天然小鼠中所觀測之缺少HI效價相比，用維多利亞類病毒預致敏且用經佐劑化QIV進行免疫之小鼠均誘導抵抗B/江蘇/10/03(僅包括於QIV中之B/山形類病毒)之更高HI效價(圖14；B)。

IX.3. 結果及結論之概要

天然小鼠或用B/維多利亞類病毒預致敏且用經佐劑化(AS03或AS03/2)TIV或QIV疫苗進行免疫之小鼠展示抵抗疫苗中所包括之同型B/維多利亞類病毒或屬於相同B/維多利亞譜系之異源亞型病毒的交叉反應性。天然小鼠或用B/維多利亞類病毒預致敏且用經佐劑化(AS03或AS03/2)TIV疫苗進行免疫之小鼠與疫苗中所包括之B病毒相比，不展示抵抗屬於另一譜系之異源亞型病毒(該實例中之B/山形類病毒)的任何交叉反應性。

該等實驗證明，需要第二B病毒株及佐劑(AS03或AS03/2)以誘導抵抗屬於B/維多利亞譜系及B/山形譜系之B病毒的交叉反應。

實例X-在年齡為18-64歲之群體中用含有裂解流感抗原製劑及各種劑量之AS03佐劑(Flu-LD-012)之疫苗的臨床試驗。

X.1. 介紹

在2007年，在年齡為18-64歲之成年人群體中進行II期、受控、隨機化、單盲研究，以評估與用作參考之Fluarix™(GlaxoSmithKline Biologicals)相比，經肌肉內投與之具有各種劑量AS03佐劑之GlaxoSmithKline Biologicals低

劑量流感候選疫苗(亦即每病毒株含有5 µg HA)的免疫原性、安全性及反應原性。

X.2. 研究設計

5個受檢者群組(每群組200人)經IM平行接收以下疫苗：

-FluLD1/1：5 µg HA/病毒株之經1/1劑量AS03佐劑化的流感疫苗

-FluLD1/2：5 µg HA/病毒株之經1/2劑量AS03佐劑化的流感疫苗

-FluLD1/4：5 µg HA/病毒株之經1/4劑量AS03佐劑化的流感疫苗

-FluLD1/8：5 µg HA/病毒株之經1/8劑量AS03佐劑化的流感疫苗

-一個200個受檢者之群組接首一次全劑量之Fluarix™ 15 µg HA/病毒株

時程：在第0天，流感疫苗之一次IM注射，在疫苗接種後第0天、第21天及第180天進行血液樣本收集。

用於該研究中之標準三價裂解流感疫苗-Fluarix™為來自GlaxoSmithKline Biologicals研發且製造之2007/2008年Northern Hemisphere的商用疫苗。

X.2. 研究目標

X.2.1. 主要目標：免疫原性

為證明在所有受檢者中，在疫苗接種後21天，經AS03(1/1、1/2、1/4、1/8劑量之AS03)佐劑化之低劑量流感疫苗相對於Fluarix的免疫學非次等性(GMT)。

所觀測之變數：

- 第0天及第21天：在所有受檢者中，抵抗三種疫苗病毒株之每一者的血清血球凝集抑制(HI)抗體效價。

導出變數：

- 第0天及第21天之HI抗體效價的幾何平均效價(GMT)。

X.2.2.二級目標

- 為評估在所有受檢者中，在疫苗接種後21天，就藉由經AS03(1/1、1/2、1/4、1/8劑量之AS03)佐劑化之低劑量流感疫苗及藉由Fluarix所引發之抗血球凝集素(HI)抗體效價而言的體液免疫反應。
- 為評估在所有受檢者中，在疫苗接種後180天，經AS03(1/1、1/2、1/4、1/8劑量之AS03)佐劑化之低劑量流感疫苗及藉由Fluarix之HI抗體的持續性。
- 為評估在受檢者之子集中，在第0天、第21天及第180天，就流感特異性CD4/CD8 T淋巴細胞之頻率而言，藉由經AS03(1/1、1/2、1/4、1/8劑量之AS03)佐劑化之低劑量流感疫苗及Fluarix所誘導之細胞介導免疫反應。
- 為評估在受檢者之子集中，在第0天、第21天及第180天，就藉由經AS03(1/1、1/2、1/4、1/8劑量之AS03)佐劑化之低劑量流感疫苗及Fluarix所誘導之中和抗體效價而言的體液免疫反應。
- 為評估所有受檢者中，在整個研究時期期間，經AS03(1/1、1/2、1/4、1/8劑量之AS03)佐劑化之低劑量流感疫苗及Fluarix的安全性及反應原性(在7天期間伴隨之所

請求症狀，在21天期間伴隨之未經請求症狀，在6個月期間伴隨之嚴重不良事件及醫學顯著病狀)。

關於體液反應所觀測之變數：

- 第0天、第21天及第180天：在所有受檢者中，抵抗三種疫苗病毒株之每一者的血清血球凝集抑制(HI)抗體效價。
- 第0天、第21天及第180天：在受檢者之子集中，對獨立抵抗疫苗中所存在之三種流感病毒病毒株之每一者所測試之中和抗體效價。

導出變數：

- 第0天、第21天及第180天之HI抗體效價的幾何平均效價(GMT)。
- 第21天之血清轉化率*
- 第21天之血清轉化因子**
- 第0天及第21天之血清保護率***

*血清轉化率，其定義為具有疫苗接種前效價 $<1:10$ 及疫苗接種後效價 $\geq 1:40$ 或疫苗接種前效價 $\geq 1:10$ 及疫苗接種後效價增加至少4倍之受疫苗接種者的百分比。

**血清轉化因子，其定義為與第0天相比，疫苗接種後血清HI GMT之增加倍數；

***血清保護速率，其定義為具有血清HI效價 $\geq 1:40$ 之受疫苗接種者的百分比，其通常接受為保護指示。

關於CMI反應所觀測之變數(在受檢者之子集中)：

- 第0天、第21天及第180天：
 - 在測試中產生至少兩種不同信號分子(IL-2、IFN- γ 、TFN-

α 及CD40L)之每 10^6 個細胞激素陽性CD4/CD8細胞的頻率。

-在測試中產生至少CD40L及另一信號分子(IL-2、IFN- γ 、TFN- α)之每 10^6 個細胞激素陽性CD4/CD8細胞的頻率。

-在測試中產生至少IL-2及另一信號分子(CD40L、IFN- γ 、TFN- α)之每 10^6 個細胞激素陽性CD4/CD8細胞的頻率。

-在測試中產生至少TFN- α 及另一信號分子(IL-2、IFN- γ 、CD40L)之每 10^6 個細胞激素陽性CD4/CD8細胞的頻率。

-在測試中產生至少IFN- γ 及另一信號分子(CD40L、IL-2、TFN- α)之每 10^6 個細胞激素陽性CD4/CD8細胞的頻率。

導出變數

•對各測試而言，在第0天、第21天、第180天，特異性流感CD4/CD8 T淋巴細胞的幾何平均值(GM)。

X.2.3. 其他目標：

•為評估在受檢者之子集中，在第0天、第21天及第180天時，就疫苗異源性HI效價(抵抗漂移病毒株之血清血球凝集抑制(HI)抗體效價)而言之體液免疫反應。

•為評估在受檢者之子集中，在第0天、第21天及第180天時，就疫苗異源性中和抗體效價(交叉反應性流感特異性病毒病毒株(漂移病毒株))而言之體液免疫反應。

•為評估在受檢者之子集中，在第0天、第21天及第180天時，就交叉反應性流感特異性CD4/CD8 T淋巴細胞(異源性病毒株)(漂移病毒株或經保存流感抗原決定基)而言之CMI反應。

•導出變數及標準(血清保護、血清轉化率及血清轉化因子)

係如上文所述。

X.3. 疫苗組合物及投藥

X.3.1. 疫苗製備

用於該研究中之經AS03佐劑化低劑量流感疫苗為相等量(亦即 $3 \times 5 \mu\text{g}$ HA)之三種經AS03佐劑化之不同裂解失活流感抗原的液體混合物。其以0.5 ml/劑量之體積以單劑量疫苗形式存在於玻璃(I型)預填充注射器中。經AS03佐劑化之低劑量流感候選調配物含有以下病毒株：

- A/所羅門群島/3/2006(H1N1)類病毒株：A/所羅門群島/03/2006(IVR-145)，
- A/威斯康星/67/2005(H3N2)類病毒株：A/威斯康星/67/2005(NYMCX)-161B，
- B/馬來西亞/2506/2004類病毒株：B/馬來西亞/2506/2004。

疫苗每劑量含有5 μg 血球凝集素(HA)之各流感病毒病毒株，以及全劑量、半劑量、1/4劑量或1/8劑量之佐劑系統AS03。流感抗原藉由與乳液簡單混合而併入佐劑系統之水相中。

疫苗含有源自藥物物質製造方法之以下殘餘物：硫柳汞、卵白蛋白、蔗糖、甲醛及去氧膽酸鈉，及來自製造方法早期階段之殘餘含量的硫柳汞(每劑量 $<1 \mu\text{g}$)。按照商用FluarixTM疫苗之製造方法，執行失活裂解病毒粒子抗原之三種單價本體之生產。其如III.4.1.2部分中所解釋來進行。在失活步驟之前，用去氧膽酸鈉進行裂解，其係用甲

醛來執行。

X.3.2. 疫苗組合物

一劑量之FluLD(全、半劑量、1/4劑量或1/8劑量之AS03)相應於0.5 ml。組成提供於表23中。對所有調配物而言，每劑量之HA含量為約5 µg，唯一差異在於存在於最終容器中之AS03的量。

表23經AS03佐劑化之低劑量流感疫苗的組成

組份	每劑量(0.5 ml)之量							
失活裂解病毒粒子	5.0 µg HA							
-A/所羅門群島/03/2006 (IVR-145)					5.0 µg HA			
-A/威斯康星/67/2005(H3N2)NYMCX-161B								
-B/馬來西亞/2506/2004	5.0 µg HA							
佐劑	全劑量	半劑量	1/4劑量	1/8劑量				
-SB62乳液(總體積)	0.250 mL	0.125 mL	0.0625 mL	0.031 mL				
•角鯊烯	10.70 mg	5.35 mg	2.675 mg	1.337 mg				
•DL- α -生育酚	11.88 mg	5.94 mg	2.97 mg	1.5 mg				
•聚山梨醇酯80 (Tween 80)	4.85 mg	2.425 mg	1.21 mg	0.6 mg				
PBS mod	足量至0.250 mL							
賦形劑(目標值)								
聚山梨醇酯80 (Tween-80)	0.40 mg							
辛苯昔醇10 (Triton® X-100)	0.05 mg							
α -生育酚氫丁二酸酯	0.05 mg							
氯化鈉	4 mg							
氯化鎂	0.03 mg							
磷酸氫二鈉	1.30 mg							
磷酸二氫鉀	0.19 mg							
氯化鉀	0.10 mg							
注射用水	足量至0.50 mL							

縮寫：HA=血球凝集素；當使用AS03全劑量時，聚山梨醇酯80中之總含量相應於每劑量4.972 mg，且當使用AS03半劑量時，相應於每劑量2.547 mg。

X.3.3. 具有AS03佐劑之疫苗組合物的製備

抗原製劑("中間本體")：將 Tween 80、Triton X-100及 VES以一定量添加至 PBS mod Na/K(132.7 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.1 mM MgCl₂、7.26 mM Na₂HPO₄、2.72 mM KH₂PO₄，pH 7.2)中以使得在中間本體中之最終濃度分別為 952.5 µg/mL、130.9 µg/ml及 119.1 µg/mL。15至45分鐘攪拌後，添加每 ml 35.71 µg HA之各病毒株 H1N1、36.90 µg/mL 病毒株 H3N2及每 ml 39.29 µg HA之 B病毒株。

經佐劑化之疫苗：將 PBS mod Na/K(132.7 mM NaCl、2.7 mM KCl、1.1 mM MgCl₂、7.26 mM Na₂HPO₄、2.72 mM KH₂PO₄，pH 7.2)添加至注射用水中，以達成每人類劑量 0.5 mL 之最終體積。15至45 min攪拌後，添加一定體積之所謂"中間本體"且混合 15-45 min。隨後，添加 PBS mod 20×濃縮物(2.74 M NaCl、54 mM KCl、142.8 mM Na₂HPO₄、26 mM KH₂PO₄，pH 6.8)且混合 15至45 min。該 PBS mod 20×濃縮物具有與 AS03乳液相同之組成且添加量為 AS03劑量之函數，且經計算以保持疫苗之離子組成恆定同時降低乳液含量。最終，添加其所需之乳液(31.25或 62.5或 125或 250 µl/劑量)且混合 15至45 min以達成表 23中說明之最終目標值。

X.4. 免疫原性結果-體液免疫反應

X.4.1 HI幾何平均效價(GMT)

具有 95% CI之 HI抗體的 GMT展示於表 24及圖 15中。每年齡群組(18-49歲及 50-64歲)95%之 HI抗體的 GMT展示於表 25中。

表 24-第 0 天及第 21 天之 HI 抗體效價的血清陽性率及 GMT
(免疫原性之 ATP 組)

抗體	群組	時間	N	≥10 1/DIL				GMT				
				n	%	95% CI		值	95% CI		Min	Max
						LL	UL		LL	UL		
A/所羅門	FluLD11	PRE	187	94	50.3	42.9	57.6	13.0	10.9	15.5	<10.0	905.0
		PI(D21)	187	187	100	98.0	100	203.2	171.7	240.3	10.0	5120.0
	FluLD12	PRE	189	83	43.9	36.7	51.3	12.3	10.2	14.8	<10.0	1280.0
		PI(D21)	189	185	97.9	94.7	99.4	155.8	128.2	189.4	<10.0	2560.0
	FluLD14	PRE	190	84	44.2	37.0	51.6	12.9	10.6	15.8	<10.0	1280.0
		PI(D21)	190	186	97.9	94.7	99.4	164.9	137.6	197.8	<10.0	2560.0
	FluLD18	PRE	192	100	52.1	44.8	59.3	14.9	12.3	18.2	<10.0	640.0
		PI(D21)	192	187	97.4	94.0	99.1	151.1	124.7	183.1	<10.0	3620.0
Fluarix	PRE	185	106	57.3	49.8	64.5	15.1	12.5	18.2	<10.0	640.0	
	PI(D21)	185	183	98.9	96.1	99.9	191.0	158.5	230.2	<10.0	3620.0	
A/威斯康星	FluLD11	PRE	187	142	75.9	69.2	81.9	29.4	23.8	36.4	<10.0	1280.0
		PI(D21)	187	187	100	98.0	100	380.1	321.3	449.8	14.0	5120.0
	FluLD12	PRE	189	141	74.6	67.8	80.6	30.0	24.3	37.2	<10.0	1280.0
		PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100	326.4	275.6	386.7	<10.0	5120.0
	FluLD14	PRE	190	141	74.2	67.4	80.3	29.9	24.5	36.5	<10.0	640.0
		PI(D21)	190	188	98.9	96.2	99.9	319.9	270.0	379.1	<10.0	20480.0
	FluLD18	PRE	192	149	77.6	71.0	83.3	27.2	22.6	32.8	<10.0	905.0
		PI(D21)	192	191	99.5	97.1	100	273.9	232.0	323.3	<10.0	5120.0
Fluarix	PRE	185	155	83.8	77.7	88.8	37.4	30.2	46.4	<10.0	1280.0	
	PI(D21)	185	185	100	98.0	100	335.3	286.2	392.7	20.0	5120.0	
B/馬來西亞	FluLD11	PRE	187	142	75.9	69.2	81.9	25.8	21.3	31.3	<10.0	2560.0
		PI(D21)	187	187	100	98.0	100	225.8	195.3	261.1	20.0	2560.0
	FluLD12	PRE	189	145	76.7	70.0	82.5	27.3	22.6	32.9	<10.0	3620.0
		PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100	246.1	210.9	287.2	<10.0	3620.0
	FluLD14	PRE	190	138	72.6	65.7	78.8	22.6	18.8	27.1	<10.0	1280.0
		PI(D21)	190	188	98.9	96.2	99.9	195.5	165.1	231.4	<10.0	2560.0
	FluLD18	PRE	192	142	74.0	67.1	80.0	23.2	19.5	27.8	<10.0	1280.0
		PI(D21)	192	188	97.9	94.8	99.4	171.2	144.2	203.2	<10.0	5120.0
Fluarix	PRE	185	139	75.1	68.3	81.2	27.0	22.2	32.7	<10.0	1280.0	
	PI(D21)	185	183	98.9	96.1	99.9	217.8	184.3	257.4	<10.0	3620.0	

FluLD11=具有 1/1 劑量 AS03 之 5 μg HA/病毒株；FluLD12=具有 1/2 劑量 AS03 之 5 μg HA/病毒株；FluLD14=具有 1/4 劑量 AS03 之 5 μg HA/病毒株；FluLD18=具有 1/8 劑量 AS03 之 5 μg HA/病毒株；Fluarix=Fluarix(15 μg HA/病毒株)

N=具有可用結果之受檢者的數量

n/%=血清陽性受檢者(HI效價 ≥ 1:10)之數量/百分比

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

GMT=幾何平均抗體效價；PRE=疫苗接種前第 0 天；

MIN/MAX=最小值/最大值

PI(D21)=疫苗接種後第21天

表 25-在 d0 及 d21，按年齡分類之 HI 抗體效價的血清陽性率及 GMT

抗體	亞群	群組	時間	N	≥10 1/DIL				GMT						
					n	%	95% CI		值	95% CI		Min	Max		
							LL	UL		LL	UL				
A/所羅門	18-49歲	FluLD11	PRE	129	68	52.7	43.7	61.6	14.7	11.7	18.5	<10.0	905.0		
			PI(D21)	129	129	100	97.2	100	271.6	224.5	328.5	10.0	5120.0		
		FluLD12	PRE	128	58	45.3	36.5	54.3	14.1	11.0	18.0	<10.0	1280.0		
			PI(D21)	128	125	97.7	93.3	99.5	195.4	153.3	249.0	<10.0	2560.0		
		FluLD14	PRE	130	62	47.7	38.9	56.6	15.3	11.7	20.0	<10.0	1280.0		
			PI(D21)	130	128	98.5	94.6	99.8	205.5	167.0	252.8	<10.0	2560.0		
		FluLD18	PRE	132	73	55.3	46.4	64.0	17.2	13.4	22.0	<10.0	640.0		
			PI(D21)	132	130	98.5	94.6	99.8	195.7	156.2	245.1	<10.0	3620.0		
		Fluarix	PRE	130	70	53.8	44.9	62.6	15.1	12.0	19.2	<10.0	640.0		
			PI(D21)	130	128	98.5	94.6	99.8	247.6	197.7	310.0	<10.0	3620.0		
		A/威斯康星	50-64歲	FluLD11	PRE	58	26	44.8	31.7	58.5	9.9	7.8	12.5	<10.0	113.0
					PI(D21)	58	58	100	93.8	100	106.5	80.5	141.0	10.0	905.0
				FluLD12	PRE	61	25	41.0	28.6	54.3	9.3	7.4	11.8	<10.0	80.0
					PI(D21)	61	60	98.4	91.2	100	96.9	71.9	130.8	<10.0	1810.0
FluLD14	PRE			60	22	36.7	24.6	50.1	9.0	7.1	11.4	<10.0	160.0		
	PI(D21)			60	58	96.7	88.5	99.6	102.5	73.2	143.4	<10.0	1280.0		
FluLD18	PRE			60	27	45.0	32.1	58.4	11.0	8.1	14.8	<10.0	453.0		
	PI(D21)			60	57	95.0	86.1	99.0	85.6	61.7	118.8	<10.0	1280.0		
Fluarix	PRE			55	36	65.5	51.4	77.8	14.9	11.2	19.9	<10.0	226.0		
	PI(D21)			55	55	100	93.5	100	103.5	77.9	137.3	20.0	2560.0		
A/威斯康星	18-49歲			FluLD11	PRE	129	98	76.0	67.7	83.1	28.7	22.2	37.1	<10.0	1280.0
					PI(D21)	129	129	100	97.2	100	360.1	294.7	440.1	14.0	5120.0
				FluLD12	PRE	128	95	74.2	65.7	81.5	31.2	23.9	40.6	<10.0	1280.0
					PI(D21)	128	127	99.2	95.7	100	335.0	271.4	413.4	<10.0	5120.0
		FluLD14	PRE	130	99	76.2	67.9	83.2	32.1	25.2	41.0	<10.0	640.0		
			PI(D21)	130	130	100	97.2	100	334.8	276.0	406.1	10.0	20480.0		
		FluLD18	PRE	132	105	79.5	71.7	86.1	27.7	22.2	34.5	<10.0	905.0		
			PI(D21)	132	131	99.2	95.9	100	273.2	223.8	333.6	<10.0	3620.0		
		Fluarix	PRE	130	106	81.5	73.8	87.8	34.0	26.6	43.4	<10.0	1280.0		
			PI(D21)	130	130	100	97.2	100	360.7	299.2	434.8	20.0	5120.0		
		50-64歲	FluLD11	PRE	58	44	75.9	62.8	86.1	31.1	20.9	46.4	<10.0	1280.0	
				PI(D21)	58	58	100	93.8	100	428.8	312.7	587.9	20.0	2560.0	
			FluLD12	PRE	61	46	75.4	62.7	85.5	27.8	19.2	40.2	<10.0	640.0	
				PI(第21天)	61	61	100	94.1	100	309.2	231.0	413.9	20.0	5120.0	
FluLD14	PRE		60	42	70.0	56.8	81.2	25.6	17.9	36.6	<10.0	640.0			
	PI(D21)		60	58	96.7	88.5	99.6	290.0	205.5	409.1	<10.0	2560.0			

抗體	亞群	群組	時間	N	≥10 I/DIL				GMT				
					n	%	95% CI		值	95% CI		Min	Max
							LL	UL		LL	UL		
B/馬來西亞	18-49歲	FluLD18	PRE	60	44	73.3	60.3	83.9	26.2	18.3	37.6	<10.0	640.0
			PI(D21)	60	60	100	94.0	100	275.3	202.4	374.4	10.0	5120.0
		Fluarix	PRE	55	49	89.1	77.8	95.9	47.1	30.4	72.9	<10.0	1280.0
			PI(D21)	55	55	100	93.5	100	282.0	208.9	380.6	40.0	2560.0
		FluLD11	PRE	129	101	78.3	70.2	85.1	26.3	20.8	33.4	<10.0	2560.0
			PI(D21)	129	129	100	97.2	100	281.2	237.9	332.4	40.0	2560.0
		FluLD12	PRE	128	98	76.6	68.3	83.6	27.2	21.5	34.4	<10.0	3620.0
			PI(D21)	128	128	100	97.2	100	335.9	283.3	398.3	28.0	3620.0
		FluLD14	PRE	130	94	72.3	63.8	79.8	22.7	18.2	28.2	<10.0	640.0
			PI(D21)	130	128	98.5	94.6	99.8	219.1	179.8	266.9	<10.0	2560.0
		FluLD18	PRE	132	95	72.0	63.5	79.4	23.9	19.1	30.0	<10.0	1280.0
			PI(D21)	132	130	98.5	94.6	99.8	203.5	166.7	248.5	<10.0	5120.0
		Fluarix	PRE	130	98	75.4	67.1	82.5	27.4	21.7	34.4	<10.0	453.0
			PI(D21)	130	129	99.2	95.8	100	250.9	206.9	304.3	<10.0	2560.0
	50-64歲	FluLD11	PRE	58	41	70.7	57.3	81.9	24.8	17.7	34.7	<10.0	320.0
			PI(D21)	58	58	100	93.8	100	138.6	108.1	177.6	20.0	1280.0
		FluLD12	PRE	61	47	77.0	64.5	86.8	27.5	19.9	37.8	<10.0	640.0
			PI(D21)	61	60	98.4	91.2	100	128.1	99.3	165.1	<10.0	1280.0
		FluLD14	PRE	60	44	73.3	60.3	83.9	22.4	15.9	31.6	<10.0	1280.0
			PI(D21)	60	60	100	94.0	100	152.7	110.9	210.3	10.0	2560.0
		FluLD18	PRE	60	47	78.3	65.8	87.9	21.8	16.2	29.2	<10.0	453.0
			PI(D21)	60	58	96.7	88.5	99.6	117.0	85.4	160.3	<10.0	1810.0
		Fluarix	PRE	55	41	74.5	61.0	85.3	26.0	18.0	37.6	<10.0	1280.0
			PI(D21)	55	54	98.2	90.3	100	155.9	113.0	215.0	<10.0	3620.0

中間結論

對A/所羅門群島(H1N1)而言，所有研究群組之GMT係在相同範圍內。對所有病毒株及所有年齡分類而言，所有經佐劑化群組非次於Fluarix群組。對A/威斯康星(H3N2)而言，展示免疫反應隨AS03濃度降低而降低之趨勢，不具有統計學顯著差異。對B/馬來西亞而言，亦展示免疫反應隨AS03濃度降低而降低之趨勢，但對該病毒株而言，僅在經FluLD1/2與FluLD1/8誘導之GMT之間展示統計學顯著差異(參見圖15)。

當藉由年齡群組分析資料時，可見類似結果。然而對B/

馬來西亞而言，在較年輕年齡群組(18-49歲)中，經FluLD1/2誘導之GMT比經FluLD1/4誘導之GMT在統計學上顯著更高。

X.4.2 抗HI抗體效價之血清轉化因子、血清保護率及血清轉化率(當建立用於人類之流感疫苗時，保護之關聯性)

血清保護率之結果呈現於表26及27-圖16中，血清轉化率之結果呈現於表28及29-圖17A及17B中，且轉化因子之結果呈現於表30及31-圖17。

表26-在D0及D21之HI抗體效價的血清保護率(SPR)

疫苗病毒株	群組	時間	N	SPR			
				n	%	95% CI	
						LL	UL
A/所羅門	FluLD11	PRE	187	45	24.1	18.1	30.8
		PI(第21天)	187	177	94.7	90.4	97.4
	FluLD12	PRE	189	46	24.3	18.4	31.1
		PI(第21天)	189	170	89.9	84.7	93.8
	FluLD14	PRE	190	43	22.6	16.9	29.2
		PI(第21天)	190	169	88.9	83.6	93.0
	FluLD18	PRE	192	52	27.1	20.9	34.0
		PI(第21天)	192	166	86.5	80.8	91.0
Fluarix	PRE	185	50	27.0	20.8	34.0	
	PI(第21天)	185	172	93.0	88.3	96.2	
A/威斯康星	FluLD11	PRE	187	90	48.1	40.8	55.5
		PI(第21天)	187	183	97.9	94.6	99.4
	FluLD12	PRE	189	90	47.6	40.3	55.0
		PI(第21天)	189	186	98.4	95.4	99.7
	FluLD14	PRE	190	96	50.5	43.2	57.8
		PI(第21天)	190	185	97.4	94.0	99.1
	FluLD18	PRE	192	91	47.4	40.2	54.7
		PI(第21天)	192	184	95.8	92.0	98.2
Fluarix	PRE	185	95	51.4	43.9	58.8	
	PI(第21天)	185	183	98.9	96.1	99.9	
B/馬來西亞	FluLD11	PRE	187	80	42.8	35.6	50.2
		PI(第21天)	187	183	97.9	94.6	99.4
	FluLD12	PRE	189	88	46.6	39.3	53.9
		PI(第21天)	189	186	98.4	95.4	99.7
FluLD14	PRE	190	81	42.6	35.5	50.0	

				SPR			
				95% CI			
疫苗病毒株	群組	時間	N	n	%	LL	UL
	FluLD18	PI(第21天)	190	180	94.7	90.5	97.4
		PRE	192	86	44.8	37.6	52.1
		PI(第21天)	192	180	93.8	89.3	96.7
	Fluarix	PRE	185	88	47.6	40.2	55.0
		PI(第21天)	185	178	96.2	92.4	98.5

FluLD11=具有 1/1 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；

FluLD12=具有 1/2 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；

FluLD14=具有 1/4 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；

FluLD18=具有 1/8 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；

Fluarix=Fluarix(15 µg HA/病毒株)

血清保護率定義為具有血清 HI 效價 $\geq 1:40$ 之受疫苗接種者的百分比

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量

n/%=經血清保護受檢者之數量/百分比

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

PRE=疫苗接種前，第 0 天；PI(第 21 天)=疫苗接種後，第 21 天

表 27-在 D0 及 D21，按年齡分類之 HI 抗體效價的血清保護率 (SPR)

					SPR			
					95% CI			
疫苗病毒株	亞群	群組	時間	N	n	%	LL	UL
A/所羅門	18-49歲	FluLD11	PRE	129	36	27.9	20.4	36.5
			PI(第21天)	129	127	98.4	94.5	99.8
		FluLD12	PRE	128	35	27.3	19.8	35.9
			PI(第21天)	128	117	91.4	85.1	95.6
		FluLD14	PRE	130	35	26.9	19.5	35.4
			PI(第21天)	130	119	91.5	85.4	95.7
		FluLD18	PRE	132	43	32.6	24.7	41.3
			PI(第21天)	132	119	90.2	83.7	94.7

					SPR				
					95% CI				
疫苗病毒株	亞群	群組	時間	N	n	%	LL	UL	
A/威斯康星	50-64歲	Fluarix	PRE	130	34	26.2	18.8	34.6	
			PI(第21天)	130	124	95.4	90.2	98.3	
		FluLD11	PRE	58	9	15.5	7.3	27.4	
			PI(第21天)	58	50	86.2	74.6	93.9	
		FluLD12	PRE	61	11	18.0	9.4	30.0	
			PI(第21天)	61	53	86.9	75.8	94.2	
		FluLD14	PRE	60	8	13.3	5.9	24.6	
			PI(第21天)	60	50	83.3	71.5	91.7	
		FluLD18	PRE	60	9	15.0	7.1	26.6	
			PI(第21天)	60	47	78.3	65.8	87.9	
	Fluarix	PRE	55	16	29.1	17.6	42.9		
		PI(第21天)	55	48	87.3	75.5	94.7		
	18-49歲	FluLD11	PRE	129	62	48.1	39.2	57.0	
			PI(第21天)	129	127	98.4	94.5	99.8	
		FluLD12	PRE	128	62	48.4	39.5	57.4	
			PI(第21天)	128	126	98.4	94.5	99.8	
		FluLD14	PRE	130	68	52.3	43.4	61.1	
			PI(第21天)	130	128	98.5	94.6	99.8	
		FluLD18	PRE	132	62	47.0	38.2	55.8	
			PI(第21天)	132	127	96.2	91.4	98.8	
		Fluarix	PRE	130	66	50.8	41.9	59.6	
			PI(第21天)	130	128	98.5	94.6	99.8	
	B/馬來西亞	50-64歲	FluLD11	PRE	58	28	48.3	35.0	61.8
				PI(第21天)	58	56	96.6	88.1	99.6
FluLD12			PRE	61	28	45.9	33.1	59.2	
			PI(第21天)	61	60	98.4	91.2	100	
FluLD14			PRE	60	28	46.7	33.7	60.0	
			PI(第21天)	60	57	95.0	86.1	99.0	
FluLD18			PRE	60	29	48.3	35.2	61.6	
			PI(第21天)	60	57	95.0	86.1	99.0	
Fluarix			PRE	55	29	52.7	38.8	66.3	
			PI(第21天)	55	55	100	93.5	100	
18-49歲		FluLD11	PRE	129	53	41.1	32.5	50.1	
			PI(第21天)	129	129	100	97.2	100	
		FluLD12	PRE	128	59	46.1	37.2	55.1	
			PI(第21天)	128	127	99.2	95.7	100	
		FluLD14	PRE	130	57	43.8	35.2	52.8	
			PI(第21天)	130	125	96.2	91.3	98.7	
		FluLD18	PRE	132	61	46.2	37.5	55.1	
			PI(第21天)	132	128	97.0	92.4	99.2	
		Fluarix	PRE	130	61	46.9	38.1	55.9	
			PI(第21天)	130	126	96.9	92.3	99.2	
50-64歲		FluLD11	PRE	58	27	46.6	33.3	60.1	
			PI(第21天)	58	54	93.1	83.3	98.1	

疫苗病毒株	亞群	群組	時間	N	SPR			
					n	%	95% CI	
							LL	UL
		FluLD12	PRE	61	29	47.5	34.6	60.7
			PI(第21天)	61	59	96.7	88.7	99.6
		FluLD14	PRE	60	24	40.0	27.6	53.5
			PI(第21天)	60	55	91.7	81.6	97.2
		FluLD18	PRE	60	25	41.7	29.1	55.1
			PI(第21天)	60	52	86.7	75.4	94.1
Fluarix	PRE	55	27	49.1	35.4	62.9		
	PI(第21天)	55	52	94.5	84.9	98.9		

與表 24 中相同之圖例

中間結論

對所有群組及所有三種病毒株而言，SPR 滿足 CHMP (平均值 >70) 及 FDA 標準 (具有 95% CI 之 LL >70)。展示所有群組之 SPR 係在相同範圍內。

表 28-在 PI(第 21 天)之 HI 抗體效價的血清轉化率 (SCR)

疫苗病毒株	群組	時間	N	SCR			
				n	%	95% CI	
						LL	UL
A/所羅門	FluLD11	PI(第21天)	187	154	82.4	76.1	87.5
	FluLD12	PI(第21天)	189	141	74.6	67.8	80.6
	FluLD14	PI(第21天)	190	133	70.0	62.9	76.4
	FluLD18	PI(第21天)	192	119	62.0	54.7	68.9
	Fluarix	PI(第21天)	185	131	70.8	63.7	77.2
A/威斯康星	FluLD11	PI(第21天)	187	150	80.2	73.8	85.7
	FluLD12	PI(第21天)	189	147	77.8	71.2	83.5
	FluLD14	PI(第21天)	190	142	74.7	67.9	80.7
	FluLD18	PI(第21天)	192	142	74.0	67.1	80.0
	Fluarix	PI(第21天)	185	118	63.8	56.4	70.7
B/馬來西亞	FluLD11	PI(第21天)	187	136	72.7	65.7	79.0
	FluLD12	PI(第21天)	189	127	67.2	60.0	73.8
	FluLD14	PI(第21天)	190	128	67.4	60.2	74.0
	FluLD18	PI(第21天)	192	127	66.1	59.0	72.8
	Fluarix	PI(第21天)	185	125	67.6	60.3	74.3

FluLD11=具有 1/1 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；FluLD12=具有 1/2 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；FluLD14=具有 1/4 劑

量 AS03 之 5 μg HA/病毒株；FluLD18=具有 1/8 劑量 AS03 之 5 μg HA/病毒株；Fluarix=Fluarix(15 μg HA/病毒株)

血清轉化定義為：

對最初血清陰性受檢者而言，疫苗接種後抗體效價 ≥ 40 1/DIL

對最初血清陽性受檢者而言，疫苗接種後之抗體效價 ≥ 4 倍疫苗接種前之抗體效價

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量

n/%=經血清轉化受檢者之數量/百分比

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

PI(第 21 天)=疫苗接種後，第 21 天

表 29-在 PI(第 21 天)，按年齡分類之 HI 抗體效價的血清轉化率 (SCR)

					SCR			
					n	%	95% CI	
疫苗病毒株	亞群	群組	時間	N	n	%	LL	UL
A/所羅門	18-49歲	FluLD11	PI(第21天)	129	113	87.6	80.6	92.7
		FluLD12	PI(第21天)	128	96	75.0	66.6	82.2
		FluLD14	PI(第21天)	130	91	70.0	61.3	77.7
		FluLD18	PI(第21天)	132	84	63.6	54.8	71.8
		Fluarix	PI(第21天)	130	101	77.7	69.6	84.5
	50-64歲	FluLD11	PI(第21天)	58	41	70.7	57.3	81.9
		FluLD12	PI(第21天)	61	45	73.8	60.9	84.2
		FluLD14	PI(第21天)	60	42	70.0	56.8	81.2
		FluLD18	PI(第21天)	60	35	58.3	44.9	70.9
		Fluarix	PI(第21天)	55	30	54.5	40.6	68.0
A/威斯康星	18-49歲	FluLD11	PI(第21天)	129	104	80.6	72.7	87.0
		FluLD12	PI(第21天)	128	101	78.9	70.8	85.6
		FluLD14	PI(第21天)	130	97	74.6	66.2	81.8
		FluLD18	PI(第21天)	132	96	72.7	64.3	80.1
		Fluarix	PI(第21天)	130	89	68.5	59.7	76.3
	50-64歲	FluLD11	PI(第21天)	58	46	79.3	66.6	88.8
		FluLD12	PI(第21天)	61	46	75.4	62.7	85.5

					SCR			
					95% CI			
疫苗病毒株	亞群	群組	時間	N	n	%	LL	UL
		FluLD14	PI(第21天)	60	45	75.0	62.1	85.3
		FluLD18	PI(第21天)	60	46	76.7	64.0	86.6
		Fluarix	PI(第21天)	55	29	52.7	38.8	66.3
B/馬來西亞	18-49歲	FluLD11	PI(第21天)	129	102	79.1	71.0	85.7
		FluLD12	PI(第21天)	128	96	75.0	66.6	82.2
		FluLD14	PI(第21天)	130	93	71.5	63.0	79.1
		FluLD18	PI(第21天)	132	96	72.7	64.3	80.1
		Fluarix	PI(第21天)	130	94	72.3	63.8	79.8
	50-64歲	FluLD11	PI(第21天)	58	34	58.6	44.9	71.4
		FluLD12	PI(第21天)	61	31	50.8	37.7	63.9
		FluLD14	PI(第21天)	60	35	58.3	44.9	70.9
		FluLD18	PI(第21天)	60	31	51.7	38.4	64.8
		Fluarix	PI(第21天)	55	31	56.4	42.3	69.7

與表 26 相同之圖例

中間結論

對所有研究疫苗及所有三種病毒株而言，SCR 滿足 CHMP 標準 (平均值 >40) 及 FDA 標準 (具有 95% CI 之 LL >40)。除 B/馬來西亞外，展示 SCR 隨 AS03 含量降低而降低之趨勢 (其中展示所有結果係在相同範圍內)。對 A/所羅門群島而言，與 FluLD1/8 相比，FluLD1/1 誘導統計學上顯著更高之 SCR。對所有群組而言，FluLD1/2 及 FluLD1/4 誘導之 SCR 係在相同範圍內。

表 30-在 D21 之 HI 抗體效價的血清轉化因子 (SCF)

				SCF		
				95% CI		
疫苗病毒株	群組	時間	N	值	LL	UL
A/所羅門(1/DIL)	FluLD11	PI(第21天)	187	15.6	12.7	19.2
	FluLD12	PI(第21天)	189	12.7	10.2	15.8
	FluLD14	PI(第21天)	190	12.8	10.1	16.1
	FluLD18	PI(第21天)	192	10.1	8.0	12.8
	Fluarix	PI(第21天)	185	12.7	9.9	16.2
A/威斯康星(1/DIL)	FluLD11	PI(第21天)	187	12.9	10.5	16.0
	FluLD12	PI(第21天)	189	10.9	8.9	13.3

疫苗病毒株	群組	時間	N	SCF		
				值	95% CI	
				LL	UL	
	FluLD14	PI(第21天)	190	10.7	8.6	13.2
	FluLD18	PI(第21天)	192	10.1	8.2	12.3
	Fluarix	PI(第21天)	185	9.0	7.2	11.2
B/馬來西亞(1/DIL)	FluLD11	PI(第21天)	187	8.7	7.2	10.6
	FluLD12	PI(第21天)	189	9.0	7.3	11.2
	FluLD14	PI(第21天)	190	8.7	7.0	10.8
	FluLD18	PI(第21天)	192	7.4	6.1	8.9
	Fluarix	PI(第21天)	185	8.1	6.6	9.9

FluLD11=具有 1/1 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；FluLD12=具有 1/2 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；FluLD14=具有 1/4 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；FluLD18=具有 1/8 劑量 AS03 之 5 µg HA/病毒株；Fluarix=Fluarix(15 µg HA/病毒株)

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量

SCF=血清轉化因子或幾何平均比率(平均 [log₁₀(POST/PRE)])

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

PI(第21天)=疫苗接種後，第21天

表 31-在 D21，藉由年齡分類之 HI 抗體效價的血清轉化因子 (SCF)

疫苗病毒株	亞群	群組	時間	N	SCF		
					值	LL	UL
A/所羅門(1/DIL)	18-49歲	FluLD11	PI(第21天)	129	18.5	14.3	23.8
		FluLD12	PI(第21天)	128	13.9	10.5	18.4
		FluLD14	PI(第21天)	130	13.4	10.1	17.8
		FluLD18	PI(第21天)	132	11.4	8.4	15.4
		Fluarix	PI(第21天)	130	16.3	12.1	22.1
	50-64歲	FluLD11	PI(第21天)	58	10.8	7.7	15.1
		FluLD12	PI(第21天)	61	10.4	7.4	14.6
		FluLD14	PI(第21天)	60	11.4	7.7	17.1
		FluLD18	PI(第21天)	60	7.8	5.5	11.2
		Fluarix	PI(第21天)	55	6.9	4.6	10.4

疫苗病毒株	亞群	群組	時間	N	SCF		
					值	LL	UL
A/ 威斯康星 (1/IL)	18-49歲	FluLD11	PI(第21天)	129	12.5	9.8	16.0
		FluLD12	PI(第21天)	128	10.7	8.5	13.7
		FluLD14	PI(第21天)	130	10.4	8.0	13.5
		FluLD18	PI(第21天)	132	9.9	7.8	12.5
		Fluarix	PI(第21天)	130	10.6	8.2	13.8
	50-64歲	FluLD11	PI(第21天)	58	13.8	9.0	21.2
		FluLD12	PI(第21天)	61	11.1	7.5	16.4
		FluLD14	PI(第21天)	60	11.3	7.7	16.7
		FluLD18	PI(第21天)	60	10.5	7.0	15.7
		Fluarix	PI(第21天)	55	6.0	4.0	8.9
B/ 馬來西亞 (1/DIL)	18-49歲	FluLD11	PI(第21天)	129	10.7	8.4	13.5
		FluLD12	PI(第21天)	128	12.4	9.5	16.1
		FluLD14	PI(第21天)	130	9.7	7.4	12.6
		FluLD18	PI(第21天)	132	8.5	6.8	10.7
		Fluarix	PI(第21天)	130	9.2	7.2	11.7
	50-64歲	FluLD11	PI(第21天)	58	5.6	4.0	7.7
		FluLD12	PI(第21天)	61	4.7	3.4	6.5
		FluLD14	PI(第21天)	60	6.8	4.6	10.0
		FluLD18	PI(第21天)	60	5.4	3.8	7.5
		Fluarix	PI(第21天)	55	6.0	4.1	8.8

與表 28 中相同之圖例

中間結論

對所有研究疫苗而言，所有三種病毒株之 SCF 遠高於 CHMP 標準 (>2)。對所有研究疫苗而言，SCF 係在相同範圍內。

X.4.3 佐劑化低劑量疫苗相對於 Fluarix(GMT) 之非次等性

就第 21 天時三種病毒之 GMT 比率而言，經佐劑化低劑量疫苗相對於 Fluarix 之非次等性展示於表 32 中。

表 32-就 D21 時 3 種病毒病毒株之 GMT 比率而言，經佐劑化低劑量疫苗相對於 Fluarix 之非次等性

AS03 劑量 (μ L)	劑量 比例	抗體	流感低劑量 95% CI				Fluarix 95% CI			
			N	GMT	LL	UL	N	GMT	LL	UL
250	1/1	A/H1N1	187	202.3	168.3	243.2	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	187	378.6	320.0	447.8	185	335.3	286.5	392.3
		B	187	236.0	206.1	270.4	185	217.8	184.5	257.2
125	1/2	A/H1N1	189	160.5	135.7	189.9	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	189	336.0	288.2	391.8	185	335.3	286.5	392.3
		B	189	226.2	204.8	249.7	185	217.8	184.5	257.2
62.5	1/4	A/H1N1	190	155.5	139.2	173.7	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	190	302.0	272.9	334.1	185	335.3	286.5	392.3
		B	190	205.7	181.9	232.6	185	217.8	184.5	257.2
31.2	1/8	A/H1N1	192	156.3	132.8	183.8	185	191.0	158.7	229.9
		A/H3N2	192	282.9	244.0	328.1	185	335.3	286.5	392.3
		B	192	169.4	145.1	197.7	185	217.8	184.5	257.2

AS03 劑量 (μ L)	劑量 比例	抗體	LD/Fluarix		
			比率	90% CI	LL
250	1/1	A/H1N1	1.06	0.85	1.32
		A/H3N2	1.13	0.93	1.37
		B	1.08	0.91	1.30
125	1/2	A/H1N1	0.84	0.68	1.04
		A/H3N2	1.00	0.83	1.20
		B	1.04	0.88	1.22
62.5	1/4	A/H1N1	0.81	0.68	0.98
		A/H3N2	0.90	0.77	1.05
		B	0.94	0.79	1.12
31.2	1/8	A/H1N1	0.82	0.67	1.01
		A/H3N2	0.84	0.70	1.01
		B	0.78	0.64	0.94

N=具有可用結果之受檢者的數量

95% CI=95%信賴區間，90% CI=90%信賴區間，LL=下限，UL=上限

GMT=幾何平均抗體效價

中間結論

就所有三種病毒株之GMT比率而言，展示FluLD1/1、1/2、1/4並非次於Fluarix。對於H1N1及H3N2病毒株而非

對於B而言，展示FluLD 1/8並非次於Fluarix。

X.5. 結論

X.5.1 安全結論

與用市售Fluarix疫苗所展示之反應原性相比，用經佐劑化疫苗展示更高之反應原性。對經佐劑化疫苗而言，展示反應原性隨AS03之量降低而降低之趨勢。總之，用FluDL1/4及FluDL1/8獲得類似反應原性概況。

所有疫苗群組之未經請求症狀係相同的。

X.5.2 免疫原性結論

該研究之主要目標為，評估D21時LD疫苗調配物相對於Fluarix之非次等性(GMT)。

在用一劑量經佐劑化疫苗FluDL1/1、FluDL1/2及FluDL1/4進行疫苗接種後第21天，展示所有三種病毒株之GMT比率並非次於用Fluarix獲得之彼等比率。在彼研究中，對於H1N1及H3N2病毒株而非對於B病毒株而言，展示用疫苗FluDL1/8獲得之GMT比率並非次於Fluarix。

不管免疫反應所展示之隨佐劑之量降低而降低之趨勢，所有疫苗均展示滿足用於所有病毒株之所有三種關於監控認可的CHMP標準。

實例 XI-在年齡為65歲以上之老年人群體中用含有裂解流感抗原製劑及各種佐劑之疫苗的臨床試驗。

XI.1. 介紹

諸如FluarixTM之經典裂解流感疫苗在老年成年人中之功效比在成年人或青年人群中顯著更低。表明免疫系統之老

化(亦即免疫衰老)係老年成年人中所見之功效相對缺乏的根本原因，因此為藉由刺激更強免疫反應而改良疫苗留有餘地。因此，在2007年，在年齡為65歲以上之老年人群體中進行II期、受控、隨機化、單盲研究以評估與用作參考之Fluarix™(GlaxoSmithKline Biologicals)相比，具有八種不同佐劑調配物之流感候選疫苗在經肌肉內投與時之免疫原性、安全性及反應原性。

已測試包含水包油乳液且每劑量包含25 µg 3D-MPL之經佐劑化流感疫苗且證明其有效性(WO 2006/100111)。在彼研究中，各組份之量固定為250 µl之水包油乳液及25 µg之MPL。本研究旨在測定最佳疫苗調配物，使所觀測反應原性/安全性概況之可接受性與免疫原性概況之可接受性相平衡。

XI.2. 研究設計及目標

十群組受檢者(除年齡為18-40歲之群組Fluarix YNG外，每群組年齡≥65歲之200個受檢者)經肌肉內(i.m.)平行接收以下流感疫苗：

- FluAS03 1/1：經全劑量 o/w乳液(AS03 1/1)佐劑化之疫苗
- FluAS03 1/2：經1/2劑量 o/w乳液(AS03 1/2)佐劑化之疫苗
- FluAS03 1/4：經1/4劑量 o/w乳液(AS03 1/4)佐劑化之疫苗
- FluAS25 1/1：經25 µg MPL+全劑量 o/w乳液(AS25A)佐劑化之疫苗
- FluAS25 1/2：經25 µg MPL+1/2劑量 o/w乳液(AS25B)佐劑化之疫苗

- FluAS25 1/4：經 25 µg MPL+1/4劑量 o/w乳液 (AS25C)佐劑化之疫苗
- FluAS50 1/2：經 50 µg MPL+1/2劑量 o/w乳液 (AS25E)佐劑化之疫苗
- FluAS50 1/4：經 50 µg MPL+1/4劑量 o/w乳液 (AS25F)佐劑化之疫苗
- Fluarix ELD(≥65歲)：Fluarix™
- Fluarix YNG(18-40歲)：Fluarix™

時程：在第0天，流感疫苗之一次IM注射，疫苗接種後第0天、第21天及第180天進行血液樣本收集。用於該研究之標準三價裂解流感疫苗-Fluarix™與實例X中所用之彼流感疫苗相同。

疫苗調配物描述於表31-32中。

XI.2.1. 主要目標：免疫原性

為基於疫苗接種後21天對於三種疫苗病毒株之免疫原性(GMT)，識別與Fluarix相比，在年齡≥65歲之受檢者中經肌肉內給予之經佐劑化流感疫苗的最佳調配物(一劑量o/w乳液與一劑量MPL之組合)。變數係如實例X.2.1中且用於年齡為65歲以上之受檢者的變數(第21天之HI抗體效價及HI抗體效價之GMT)。

X.2.2. 二級目標為評估以下各者：

- 在用流感疫苗進行疫苗接種之所有受檢者中的安全性及反應原性
- 疫苗接種後21天，在所有受檢者中，流感疫苗之免疫原

性(GMT、SCF、SCR及SPR)。

- 首次疫苗接種後180天，所有受檢者中之HI抗體的持續性。
- 在第0天、第21天及第180天，就產生至少兩種不同細胞激素(IFN- γ 、IL-2、CD40L或TNF- α)之流感特異性CD4/CD8 T淋巴細胞的頻率而言，藉由流感疫苗誘導之細胞介導免疫(CMI)反應(僅對受檢者之子集而言)。

所觀測及導出之變數(及定義)係如實例X中所述。

XI.3. 疫苗組合物及投藥

經佐劑化流感疫苗係以市售Fluarix疫苗為主，其自1992年起由GSK Bio銷售。候選調配物由三價裂解病毒粒子、失活流感抗原(其包含三種單價病毒抗原本體(分別自經推薦用於2007/2008 Northern Hemisphere之流感病毒株A/H1N1、A/H3N2及B製備，參見實例X))以及以MPL及/或水包油(o/w)乳液為主之佐劑系統組成。

將在彼試驗中測試兩個家族之GSK Bio專利佐劑系統：

- 藉由每人類劑量經佐劑化疫苗之乳液量分類(1/1- $\frac{1}{2}$ - \dots)的AS03家族；
- 經MPL補充且藉由每人類劑量經佐劑化疫苗之各組份的量分類(A、B、 \dots)的水包油乳液之AS25家族。

XI.3.1. 疫苗組合物

已描述產生自個別生長於含胚雞卵中之三種流感病毒病毒株(即A型(H1N1及H3N2)及B型)之研究種子製備的裂解失活病毒粒子抗原之三種單本體(參見實例X)。臨床批量

每劑量含有15 µg血球凝集素(HA)之各流感病毒病毒株。流感抗原係經3-O-去醯基-4'-單磷醯基脂質A(MPL)及/或水包油(o/w)乳液AS03佐劑化。AS之八種不同調配物欲與裂解病毒粒子流感抗原組合。佐劑之製備方法係自WO 2006/100111之實例II中所述彼方法改編，其中個別組份之量係根據表31及32中所給之資訊改編。賦形劑為以下各者：聚山梨醇酯80(Tween-80)、辛苯昔醇10(Triton® X-100)、 α -生育酚氫丁二酸酯、氯化鈉、氯化鎂、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鉀、氯化鉀及注射用水。經佐劑化流感疫苗之不同調配物為不含防腐劑之調配物。然而，其含有來自藥物物質製造方法之早期階段的痕量硫柳汞(每劑量<1.25 µg之Hg)，在該製造方法中添加硫柳汞以降低生物負荷。

經佐劑化之流感疫苗為經佐劑化裂解純化流感病毒之注射用無菌微白色乳液。其以雙組份疫苗形式存在，該雙組份疫苗由含有抗原(懸浮液)之I型玻璃小瓶及含有佐劑(乳液)之預填充I型玻璃注射器(PFS)組成。將疫苗儲存於2至8°C下。在注射時，將抗原預填充注射器之內含物注射至含有濃縮三價失活裂解病毒粒子抗原之小瓶中。混合後，將内含物抽取至注射器中且以肌肉內針來替換針。一劑量之復水經佐劑化流感候選疫苗相應於0.7 mL(表33及34)。

表33疫苗調配物

佐劑系統	o/w乳液之體積	MPL之量	抗原流感NH 2007/2008
AS25A (AS25_1_1)	250 µl	25 µg	A/所羅門群島/3/2006(H1N1)IVR-145 A/威斯康星/67/2005(H3N2)NYMCX-161B
AS25B (AS25_1_2)	125 µl	25 µg	
AS25C (AS25_1_4)	62.5 µl	25 µg	
AS03 1/1 (AS03_1_1)	250 µl	0 µg	

AS03 1/2 (AS03_1_2)	125 µl	0 µg	B/馬來西亞/2506/2004
AS03 1/4 (AS03_1_4)	62.5 µl	0 µg	
AS25E -AS50 1/2 (AS50_1_2)	125 µl	50 µg	
AS25F -AS50 1/4 (AS50_1_4)	62.5 µl	50 µg	

表 34 經佐劑化流感疫苗之組成

組份	每劑量(0.7 ml)之量							
活性成份								
失活裂解病毒粒子								
-H1N1	15 µg HA							
-H3N2	15 µg HA							
-B	15 µg HA							
佐劑	AS25A	AS25B	AS25C	AS031/1	AS031/2	AS031/4	AS25E	AS25F
-乳液(µL)	250	125	62.5	250	125	62.5	125	62.5
•角鯊烯(mg)	10.69	5.34	2.67	10.69	5.34	2.67	5.34	2.67
•DL-α-生育酚(mg)	11.86	5.93	2.97	11.86	5.93	2.97	5.93	2.97
•聚山梨醇酯80(Tween-80)(mg)	4.86	2.43	1.22	4.86	2.43	1.22	2.43	1.22
-MPL	25 µg	25 µg	25 µg	/	/	/	50 µg	50 µg

賦形劑(目標值)	
聚山梨醇酯80 (Tween-80)	0.40 mg
辛荳昔醇10(Triton® X-100)	0.05 mg
α-生育酚氫丁二酸酯	0.05 mg
氯化鈉	3.92 mg
氯化鎂	0.03 mg
磷酸氫二鈉	0.54 mg
磷酸二氫鉀	0.16 mg
氯化鉀	0.10 mg
注射用水	足量至0.70 mL

XI.3.2. 疫苗製備

AS03調配物係藉由用注射用水稀釋磷酸鹽緩衝液(Na/K 191.4 mM PO_4^{3-} 、2.74 mM NaCl、54 mM KCL, pH 6.8, 足量至9.57 mM PO_4^{3-})(在RT下攪拌15-45 min直至均質)來製備。隨後添加適當量之水包油乳液本體。在室溫下,將混合物攪拌15-45分鐘,且量測pH。隨後,藉由經由0.2 µm膜過濾將混合物滅菌。執行無菌惰性氣體(氮)沖洗,以在最小1分鐘期間在經填充容器中產生惰性頂部空間。將無

菌 AS03 佐劑儲存於 +2-8°C 下直至無菌填充至 1.25 ml 無菌 I 型 (Ph. Eur.) 玻璃注射器中。各注射器含有 60 µl 之體積過量 (280 µl + 60 µl 過滿)。

AS25 調配物係藉由用注射用水稀釋磷酸鹽緩衝液來製備 (在室溫下攪拌 15-45 min 直至均質)。隨後添加適當量之 SB62 本體及 MPL 液體本體。剩餘程序如上所述。

一劑量之復水經佐劑化流感疫苗相應於 0.7 mL。最終 HA 濃度為每 mL 三價最終本體 21.4 µg 之各單價本體。將抗原 (Ag) 之最終本體填充於 3 ml 玻璃小瓶中，一劑量之三價流感抗原相應於 0.42 ml 之體積。將佐劑最終本體填充於 1.25 ml 玻璃 PFS 中，一劑量相應於 0.28 ml 之體積。復水後之最終疫苗劑量將為 0.7 ml。

為允許復水後標稱體積 (0.7 mL) 之注射，用 0.51 ml 之目標體積填充各 Ag 小瓶且用 0.34 ml 之目標體積填充各 AS 注射器。

XI.4. 免疫原性結果-體液免疫反應

XI.4.1 HI 幾何平均效價 (GMT)

具有 95% CI 之 HI 抗體的 GMT 展示於表 35 及圖 19 中。

表 35- 第 0 天及第 21 天之 HI 抗體效價的血清陽性率及 GMT (免疫原性 HI 之 ATP 組)

抗體	群組	時間	N	≥10 1/DIL				GMT				
				n	%	LL	UL	值	95% CI	Min	Max	
A/所羅門群島	AS03_1_4	PRE	191	97	50.8	43.5	58.1	10.6	9.3	12.2	<10.0	453.0
		PI(D21)	191	184	96.3	92.6	98.5	82.3	69.7	97.1	<10.0	2560.0
	AS03_1_2	PRE	191	91	47.6	40.4	55.0	10.8	9.4	12.4	<10.0	226.0
		PI(D21)	192	188	97.9	94.8	99.4	102.2	87.0	119.9	<10.0	1280.0
	AS03_1_1	PRE	189	86	45.5	38.3	52.9	10.1	8.8	11.5	<10.0	320.0
		PI(D21)	189	185	97.9	94.7	99.4	98.2	84.3	114.3	<10.0	3620.0

抗體	群組	時間	N	≥10 1/DIL				GMT				Min	Max
				n	%	95% CI		值	95% CI				
						LL	UL		LL	UL			
	AS25_1_4	PRE	194	97	50.0	42.8	57.2	10.6	9.3	12.1	<10.0	226.0	
		PI(D21)	194	189	97.4	94.1	99.2	91.7	76.9	109.3	<10.0	1810.0	
	AS25_1_2	PRE	192	97	50.5	43.2	57.8	12.0	10.3	14.0	<10.0	320.0	
		PI(D21)	192	190	99.0	96.3	99.9	113.2	96.0	133.6	<10.0	2560.0	
	AS25_1_1	PRE	193	88	45.6	38.4	52.9	9.9	8.6	11.3	<10.0	320.0	
		PI(D21)	193	188	97.4	94.1	99.2	114.4	97.1	134.8	<10.0	1810.0	
	AS50_1_4	PRE	192	87	45.3	38.1	52.6	10.2	8.9	11.7	<10.0	160.0	
		PI(D21)	192	183	95.3	91.3	97.8	78.5	65.9	93.5	<10.0	1280.0	
	AS50_1_2	PRE	189	91	48.1	40.8	55.5	10.3	9.0	11.9	<10.0	640.0	
		PI(D21)	189	183	96.8	93.2	98.8	111.8	93.3	134.0	<10.0	1280.0	
	Flu_ELD	PRE	187	88	47.1	39.7	54.5	10.7	9.2	12.4	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	188	177	94.1	89.8	97.0	59.6	49.6	71.7	<10.0	3620.0	
	Flu_YNG	PRE	197	122	61.9	54.8	68.7	21.3	17.1	26.5	<10.0	1810.0	
		PI(D21)	197	195	99.0	96.4	99.9	271.6	224.6	328.4	<10.0	5120.0	
A/威斯康星	AS03_1_4	PRE	191	176	92.1	87.4	95.5	59.9	49.5	72.4	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	191	190	99.5	97.1	100	276.2	238.8	319.6	<10.0	5120.0	
	AS03_1_2	PRE	191	168	88.0	82.5	92.2	51.2	41.9	62.4	<10.0	905.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	350.2	298.0	411.4	14.0	14480.0	
	AS03_1_1	PRE	189	168	88.9	83.5	93.0	44.4	36.5	54.0	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	189	189	100	98.1	100	351.3	304.8	404.8	28.0	5120.0	
	AS25_1_4	PRE	194	175	90.2	85.1	94.0	65.7	53.7	80.4	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	194	194	100	98.1	100	309.2	264.9	361.0	10.0	5120.0	
	AS25_1_2	PRE	192	174	90.6	85.6	94.3	61.1	50.6	73.8	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	331.1	289.6	378.6	40.0	5120.0	
	AS25_1_1	PRE	193	173	89.6	84.4	93.6	55.8	46.2	67.4	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	193	192	99.5	97.1	100	438.1	379.7	505.4	<10.0	3620.0	
	AS50_1_4	PRE	192	168	87.5	82.0	91.8	54.6	44.5	67.0	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	192	191	99.5	97.1	100	263.3	225.3	307.7	<10.0	5120.0	
	AS50_1_2	PRE	189	166	87.8	82.3	92.1	57.8	47.1	70.9	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100	347.5	296.4	407.3	<10.0	2560.0	
	Flu_ELD	PRE	187	169	90.4	85.2	94.2	61.0	49.8	74.7	<10.0	1810.0	
		PI(D21)	188	188	100	98.1	100	186.7	158.0	220.7	10.0	2560.0	
	Flu_YNG	PRE	197	166	84.3	78.4	89.1	47.8	39.2	58.4	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	197	197	100	98.1	100	380.2	331.6	435.9	40.0	5120.0	
B/馬來西亞	AS03_1_4	PRE	191	178	93.2	88.6	96.3	58.6	49.8	68.9	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	191	190	99.5	97.1	100	147.1	129.1	167.6	<10.0	2560.0	
	AS03_1_2	PRE	191	180	94.2	89.9	97.1	53.7	45.7	63.2	<10.0	640.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	163.1	142.5	186.6	14.0	2560.0	
	AS03_1_1	PRE	189	177	93.7	89.2	96.7	57.0	48.2	67.5	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	189	189	100	98.1	100	172.1	149.9	197.6	14.0	2560.0	
	AS25_1_4	PRE	194	183	94.3	90.1	97.1	62.6	53.3	73.4	<10.0	1810.0	
		PI(D21)	194	194	100	98.1	100	152.4	134.4	172.7	20.0	2560.0	
	AS25_1_2	PRE	192	184	95.8	92.0	98.2	77.8	66.0	91.7	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	181.4	158.9	207.1	10.0	2560.0	
	AS25_1_1	PRE	193	186	96.4	92.7	98.5	62.9	53.9	73.4	<10.0	2560.0	
		PI(D21)	193	193	100	98.1	100	202.0	179.7	227.1	20.0	3620.0	
	AS50_1_4	PRE	192	179	93.2	88.7	96.3	58.2	49.0	69.1	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100	155.7	134.8	179.8	20.0	5120.0	
	AS50_1_2	PRE	189	176	93.1	88.5	96.3	62.6	53.0	74.0	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	189	189	100	98.1	100	174.6	152.0	200.7	10.0	2560.0	
	Flu_ELD	PRE	187	179	95.7	91.7	98.1	66.5	56.5	78.3	<10.0	905.0	
		PI(D21)	188	188	100	98.1	100	153.0	135.2	173.1	20.0	1280.0	
	Flu_YNG	PRE	197	135	68.5	61.5	74.9	23.4	19.1	28.7	<10.0	1280.0	
		PI(D21)	197	197	100	98.1	100	281.9	241.7	328.7	20.0	5120.0	

Flu_ELD=Fluarix, 老年人(年齡≥65歲);

Flu_YNG=Fluarix，年輕人(年齡18-40歲)

GMT=對所有受檢者計算之幾何平均抗體效價

N=具有可用結果之受檢者的數量

n/%=具有特定範圍內之效價之受檢者的數量/百分比

95% CI=95%信賴區間；LL=下限，UL=上限；MIN/MAX=最小值/最大值

PRE=疫苗接種前劑量1(第0天)；PI(D21)=疫苗接種後劑量1(第21天)；

中間結論

在年齡 ≥ 65 歲之受檢者中，與Fluarix相比，經一全劑量之AS03及25 μg 之MPL(AS25_1_1)佐劑化之流感疫苗對B/馬來西亞病毒株引發統計學上顯著更高之HI反應。在該研究中，在年齡 ≥ 65 歲之受檢者中，與Fluarix相比，對其他兩種病毒株而言，除具有四分之一劑量之AS03的疫苗之外，所有經佐劑化疫苗結果均良好。

XI.4.2 抗HI抗體效價之血清轉化因子、血清保護率及血清轉化率(當建立用於人類之流感疫苗時，保護之關聯性)

血清保護率之結果呈現於表36-圖20(每病毒株1個)中，血清轉化率之結果呈現於表37-圖21中，且血清轉化因子之結果呈現於表38-圖22中。

表36-D0及D21之HI抗體效價的SPR(HI之ATP組)

				SPR			
				95% CI			
疫苗病毒株	群組	時間	N	n	%	LL	UL
A/所羅門群島	AS03_1_4	PRE	191	27	14.1	9.5	19.9
		PI(D21)	191	160	83.8	77.8	88.7

疫苗病毒株	群組	時間	N	SPR			
				n	%	95% CI	
						LL	UL
	AS03_1_2	PRE	191	31	16.2	11.3	22.2
		PI(D21)	192	168	87.5	82.0	91.8
	AS03_1_1	PRE	189	25	13.2	8.7	18.9
		PI(D21)	189	171	90.5	85.4	94.3
	AS25_1_4	PRE	194	33	17.0	12.0	23.1
		PI(D21)	194	158	81.4	75.2	86.7
	AS25_1_2	PRE	192	44	22.9	17.2	29.5
		PI(D21)	192	169	88.0	82.6	92.3
	AS25_1_1	PRE	193	23	11.9	7.7	17.3
		PI(D21)	193	172	89.1	83.8	93.1
	AS50_1_4	PRE	192	22	11.5	7.3	16.8
		PI(D21)	192	153	79.7	73.3	85.1
	AS50_1_2	PRE	189	26	13.8	9.2	19.5
		PI(D21)	189	163	86.2	80.5	90.8
	Flu_ELD	PRE	187	31	16.6	11.6	22.7
		PI(D21)	188	132	70.2	63.1	76.6
	Flu_YNG	PRE	197	69	35.0	28.4	42.1
		PI(D21)	197	182	92.4	87.8	95.7
A/威斯康星	AS03_1_4	PRE	191	133	69.6	62.6	76.1
		PI(D21)	191	188	98.4	95.5	99.7
	AS03_1_2	PRE	191	124	64.9	57.7	71.7
		PI(D21)	192	189	98.4	95.5	99.7
	AS03_1_1	PRE	189	113	59.8	52.4	66.8
		PI(D21)	189	188	99.5	97.1	100
	AS25_1_4	PRE	194	139	71.6	64.8	77.9
		PI(D21)	194	190	97.9	94.8	99.4
	AS25_1_2	PRE	192	131	68.2	61.1	74.7
		PI(D21)	192	192	100	98.1	100
	AS25_1_1	PRE	193	139	72.0	65.1	78.2
		PI(D21)	193	191	99.0	96.3	99.9
	AS50_1_4	PRE	192	130	67.7	60.6	74.3
		PI(D21)	192	187	97.4	94.0	99.1
	AS50_1_2	PRE	189	134	70.9	63.9	77.3
		PI(D21)	189	185	97.9	94.7	99.4
	Flu_ELD	PRE	187	132	70.6	63.5	77.0
		PI(D21)	188	179	95.2	91.1	97.8
Flu_YNG	PRE	197	122	61.9	54.8	68.7	
	PI(D21)	197	197	100	98.1	100	
B/馬來西亞	AS03_1_4	PRE	191	138	72.3	65.3	78.5
		PI(D21)	191	183	95.8	91.9	98.2
	AS03_1_2	PRE	191	140	73.3	66.4	79.4
		PI(D21)	192	183	95.3	91.3	97.8
	AS03_1_1	PRE	189	138	73.0	66.1	79.2
		PI(D21)	189	184	97.4	93.9	99.1
	AS25_1_4	PRE	194	148	76.3	69.7	82.1
		PI(D21)	194	187	96.4	92.7	98.5
	AS25_1_2	PRE	192	156	81.3	75.0	86.5

				SPR				
				95% CI				
疫苗病毒株	群組	時間	N	n	%	LL	UL	
	AS25_1_1	PI(D21)	192	186	96.9	93.3	98.8	
		PRE	193	149	77.2	70.6	82.9	
	AS50_1_4	PI(D21)	193	192	99.5	97.1	100	
		PRE	192	139	72.4	65.5	78.6	
	AS50_1_2	PI(D21)	192	182	94.8	90.6	97.5	
		PRE	189	145	76.7	70.0	82.5	
	Flu_ELD	PI(D21)	189	184	97.4	93.9	99.1	
		PRE	187	144	77.0	70.3	82.8	
	Flu_YNG	PI(D21)	188	183	97.3	93.9	99.1	
		PRE	197	77	39.1	32.2	46.3	
			PI(D21)	197	195	99.0	96.4	99.9

表 37- 第 21 天之 HI 抗體效價的 SCR (免疫原性 HI 之 ATP 組)

			SCR			
			95% CI			
疫苗病毒株	群組	N	n	%	LL	UL
A/所羅門群島	AS03_1_4	191	133	69.6	62.6	76.1
	AS03_1_2	191	138	72.3	65.3	78.5
	AS03_1_1	189	154	81.5	75.2	86.7
	AS25_1_4	194	130	67.0	59.9	73.6
	AS25_1_2	192	142	74.0	67.1	80.0
	AS25_1_1	193	151	78.2	71.7	83.8
	AS50_1_4	192	129	67.2	60.1	73.8
	AS50_1_2	189	146	77.2	70.6	83.0
	Flu_ELD	187	99	52.9	45.5	60.3
	Flu_YNG	197	135	68.5	61.5	74.9
A/威斯康星	AS03_1_4	191	108	56.5	49.2	63.7
	AS03_1_2	191	124	64.9	57.7	71.7
	AS03_1_1	189	141	74.6	67.8	80.6
	AS25_1_4	194	104	53.6	46.3	60.8
	AS25_1_2	192	124	64.6	57.4	71.3
	AS25_1_1	193	142	73.6	66.8	79.6
	AS50_1_4	192	110	57.3	50.0	64.4
	AS50_1_2	189	131	69.3	62.2	75.8
	Flu_ELD	187	69	36.9	30.0	44.2
	Flu_YNG	197	130	66.0	58.9	72.6
B/馬來西亞	AS03_1_4	191	47	24.6	18.7	31.3
	AS03_1_2	191	73	38.2	31.3	45.5
	AS03_1_1	189	65	34.4	27.6	41.6
	AS25_1_4	194	44	22.7	17.0	29.2
	AS25_1_2	192	45	23.4	17.6	30.1
	AS25_1_1	193	79	40.9	33.9	48.2
	AS50_1_4	192	50	26.0	20.0	32.9
	AS50_1_2	189	55	29.1	22.7	36.1
	Flu_ELD	187	47	25.1	19.1	32.0
	Flu_YNG	197	147	74.6	67.9	80.5

血清轉化定義為：

對最初血清陰性受檢者而言，疫苗接種後抗體效價 ≥ 40
1/DIL

對最初血清陽性受檢者而言，疫苗接種後之抗體效價 ≥ 4
倍疫苗接種前之抗體效價

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量

n/=經血清轉化受檢者之數量/百分比

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

表 38- 第 21 天之 HI 抗體效價的 SCF (免疫原性 HI 之 ATP 組)

疫苗病毒株	群組	N	SCF		
			值	95% CI	
				LL	UL
A/所羅門群島	AS03_1_4	191	7.7	6.5	9.2
	AS03_1_2	191	9.4	7.8	11.3
	AS03_1_1	189	9.8	8.3	11.5
	AS25_1_4	194	8.6	7.2	10.4
	AS25_1_2	192	9.4	8.0	11.1
	AS25_1_1	193	11.6	9.7	13.9
	AS50_1_4	192	7.7	6.5	9.2
	AS50_1_2	189	10.8	9.0	13.0
	Flu_ELD	187	5.6	4.7	6.8
	Flu_YNG	197	12.8	10.0	16.3
A/威斯康星	AS03_1_4	191	4.6	3.9	5.4
	AS03_1_2	191	6.8	5.6	8.1
	AS03_1_1	189	7.9	6.6	9.5
	AS25_1_4	194	4.7	4.0	5.5
	AS25_1_2	192	5.4	4.6	6.3
	AS25_1_1	193	7.8	6.5	9.5
	AS50_1_4	192	4.8	4.1	5.7
	AS50_1_2	189	6.0	5.1	7.1
	Flu_ELD	187	3.1	2.6	3.6
	Flu_YNG	197	7.9	6.4	9.8
B/馬來西亞	AS03_1_4	191	2.5	2.2	2.8
	AS03_1_2	191	3.0	2.6	3.5
	AS03_1_1	189	3.0	2.6	3.5
	AS25_1_4	194	2.4	2.2	2.8
	AS25_1_2	192	2.3	2.1	2.6
	AS25_1_1	193	3.2	2.8	3.7
	AS50_1_4	192	2.7	2.3	3.1

			SCF		
			95% CI		
疫苗病毒株	群組	N	值	LL	UL
	AS50_1_2	189	2.8	2.4	3.2
	Flu_ELD	187	2.3	2.0	2.6
	Flu_YNG	197	12.0	9.7	15.0

N=具有疫苗接種前及疫苗接種後可用結果之受檢者的數量
 SCF=血清轉化因子或幾何平均比率(平均 $[\log_{10}(\text{POST}/\text{PRE})]$)

95% CI=95%信賴區間，LL=下限，UL=上限

資料來源=附錄表 IIIA

體液免疫反應之中間結論

AS03(水包油乳液)之明顯劑量效應可見於HI資料中。

與 Flu_ELD 群組相比，對 A/所羅門群島病毒株(除 AS03_1_4 及 AS50_1_4 外)及 A/威斯康星病毒株而言，經佐劑化流感疫苗群組中之 GMT 在統計學上顯著更高。對 B/馬來西亞病毒株而言，與 Flu_ELD 群組相比，在 AS25_1_1 群組中，GMT 在統計學上顯著更高。對 H3N2 病毒株(A/威斯康星)而言，除在其中使用 ¼ 劑量乳液之群組中以外，所有經佐劑化流感疫苗群組之體液反應均增加至年輕成年人中所見之水平。

與 Flu_ELD 群組相比，對 A/所羅門群島病毒株(除 AS25_1_4 及 AS50_1_4 外)及 A/威斯康星病毒株而言，經佐劑化流感疫苗群組中之 SCR 在統計學上顯著更高。對 B/馬來西亞病毒株而言，與 Flu_ELD 群組相比，AS25_1_1 群組中之 SCR 在統計學上顯著更高。

XI.5. 細胞介導免疫反應之分析

對用經彙集疫苗病毒株再刺激之細胞而言，在第0天及第21天產生至少兩種細胞激素(全部加倍)之流感特異性CD4 T細胞的頻率呈現於表39及圖23中。

表39-在第0天及第21天，經彙集病毒株之細胞激素陽性CD4 T細胞頻率(每百萬CD4 T細胞)(免疫原性CMI之ATP組)

測試描述	群組	時間	N	Nmiss	GM	SD	Min	Q1	中值	Q3	Max
CD4- 全部加倍	AS03_1_4	PRE	42	1	1013.57	679.94	1.00	819.00	1202.00	1790.00	2841.00
		PI(D21)	43	0	2038.17	1508.79	422.00	1479.00	2156.00	3215.00	6834.00
	AS03_1_2	PRE	38	1	1085.68	912.10	1.00	939.00	1382.50	1921.00	3502.00
		PI(D21)	39	0	2780.75	1529.68	426.00	2023.00	2851.00	4126.00	8108.00
	AS03_1_1	PRE	48	1	870.96	1342.41	1.00	685.00	1035.50	1534.50	6956.00
		PI(D21)	49	0	2563.84	1840.16	280.00	1907.00	2826.00	3636.00	8830.00
	AS25_1_4	PRE	47	0	1089.72	853.67	139.00	664.00	1177.00	1933.00	3321.00
		PI(D21)	47	0	2186.84	1776.15	506.00	1447.00	2155.00	3234.00	9385.00
	AS25_1_2	PRE	41	2	1124.53	1071.90	384.00	674.00	1194.00	1717.00	4917.00
		PI(D21)	43	0	2153.42	1871.41	348.00	1383.00	1978.00	3751.00	8426.00
	AS25_1_1	PRE	44	0	1106.74	3071.01	140.00	669.00	1140.50	1731.00	20615.00
		PI(D21)	44	0	2771.86	2784.80	526.00	1742.00	2773.50	4855.00	15247.00
	AS50_1_4	PRE	41	2	867.17	666.69	77.00	559.00	835.00	1364.00	2671.00
		PI(D21)	43	0	2067.82	1008.33	303.00	1560.00	2142.00	2949.00	5044.00
	AS50_1_2	PRE	41	6	1067.79	1038.58	169.00	794.00	1192.00	1512.00	6122.00
		PI(D21)	47	0	2421.78	6581.38	202.00	1447.00	2389.00	4010.00	46387.00
	Flu_ELD	PRE	42	3	960.35	998.67	189.00	561.00	863.50	1706.00	4356.00
		PI(D21)	45	0	1509.05	2074.14	211.00	897.00	1452.00	2818.00	11117.00
	Flu_YNG	PRE	40	6	1681.05	1196.39	225.00	1144.00	1907.50	2611.00	5110.00
		PI(D21)	46	0	2687.64	2151.90	830.00	1900.00	2459.50	4241.00	11758.00
CD4-CD40L	AS03_1_4	PRE	42	1	967.13	664.97	1.00	842.00	1186.50	1742.00	2748.00
		PI(D21)	43	0	1916.56	1502.81	168.00	1353.00	2102.00	3122.00	6538.00
	AS03_1_2	PRE	38	1	1060.88	878.50	1.00	891.00	1384.00	1921.00	3398.00
		PI(D21)	39	0	2714.74	1519.80	486.00	1957.00	2829.00	4076.00	8038.00
	AS03_1_1	PRE	48	1	762.13	1329.02	1.00	645.00	1022.50	1541.00	6797.00
		PI(D21)	49	0	2428.54	1856.48	210.00	1862.00	2733.00	3589.00	8809.00
	AS25_1_4	PRE	47	0	994.17	865.71	35.00	579.00	1076.00	1912.00	3340.00
		PI(D21)	47	0	1982.33	1801.26	73.00	1293.00	2055.00	3159.00	9312.00
	AS25_1_2	PRE	41	2	1039.63	1062.10	116.00	596.00	1152.00	1715.00	4899.00
		PI(D21)	43	0	1998.69	1842.77	309.00	1396.00	1946.00	3459.00	8149.00
	AS25_1_1	PRE	44	0	1048.77	1485.48	145.00	674.00	1108.50	1632.50	8844.00
		PI(D21)	44	0	2529.59	2189.87	102.00	1599.50	2763.00	4419.50	9999.00
	AS50_1_4	PRE	41	2	847.56	663.49	95.00	549.00	842.00	1350.00	2588.00
		PI(D21)	43	0	1673.39	1043.51	1.00	1413.00	2062.00	2880.00	4884.00
	AS50_1_2	PRE	41	6	1037.41	982.61	171.00	799.00	1168.00	1492.00	5650.00
		PI(D21)	47	0	2268.52	6584.73	117.00	1447.00	2245.00	3739.00	46410.00
	Flu_ELD	PRE	42	3	923.98	976.85	110.00	607.00	816.50	1597.00	4296.00
		PI(D21)	45	0	1299.05	2034.85	1.00	896.00	1545.00	2818.00	10836.00
	Flu_YNG	PRE	40	6	1636.72	1186.79	233.00	1068.00	1878.50	2418.00	5088.00
		PI(D21)	46	0	2575.50	2169.43	456.00	1862.00	2331.50	4178.00	11718.00

測試描述	群組	時間	N	Nmiss	GM	SD	Min	Q1	中值	Q3	Max
CD4-IFN γ	AS03_1_4	PRE	42	1	721.19	483.64	114.00	475.00	772.00	1142.00	2052.00
		PI(D21)	43	0	1394.52	1096.51	347.00	898.00	1305.00	2261.00	5075.00
	AS03_1_2	PRE	38	1	712.34	598.18	1.00	566.00	936.50	1412.00	2422.00
		PI(D21)	39	0	1894.63	1156.37	581.00	1297.00	2083.00	3016.00	6342.00
	AS03_1_1	PRE	48	1	527.46	1053.96	1.00	395.00	544.00	985.50	6583.00
		PI(D21)	49	0	1623.21	1383.09	104.00	1208.00	1652.00	2380.00	6983.00
	AS25_1_4	PRE	47	0	741.88	643.41	36.00	430.00	770.00	1401.00	2602.00
		PI(D21)	47	0	1433.90	1206.49	246.00	861.00	1374.00	2301.00	5754.00
	AS25_1_2	PRE	41	2	670.69	656.68	218.00	380.00	596.00	1151.00	3664.00
		PI(D21)	43	0	1279.87	1279.29	173.00	617.00	1330.00	2402.00	5385.00
	AS25_1_1	PRE	44	0	597.78	2794.11	1.00	372.50	652.50	1226.00	18946.00
		PI(D21)	44	0	1802.95	2189.25	258.00	1133.50	1970.00	3238.00	13164.00
	AS50_1_4	PRE	41	2	571.79	448.58	134.00	335.00	597.00	945.00	1901.00
		PI(D21)	43	0	1325.52	769.76	188.00	936.00	1428.00	1959.00	3841.00
	AS50_1_2	PRE	41	6	601.27	513.44	32.00	485.00	743.00	1025.00	2283.00
		PI(D21)	47	0	1550.79	6051.21	41.00	1016.00	1624.00	2710.00	42697.00
	Flu_ELD	PRE	42	3	584.91	588.62	77.00	396.00	598.00	955.00	2680.00
		PI(D21)	45	0	980.97	1396.79	137.00	614.00	876.00	1662.00	6633.00
	Flu_YNG	PRE	40	6	1156.67	945.24	126.00	731.50	1248.00	2152.50	3774.00
		PI(D21)	46	0	1811.65	1618.60	411.00	1162.00	1813.00	2524.00	8432.00
CD4-IL2	AS03_1_4	PRE	42	1	805.41	572.67	1.00	683.00	971.50	1429.00	2562.00
		PI(D21)	43	0	1563.40	1203.93	296.00	1116.00	1509.00	2516.00	5786.00
	AS03_1_2	PRE	38	1	881.32	713.88	1.00	727.00	1191.50	1605.00	2791.00
		PI(D21)	39	0	2057.58	1251.53	205.00	1522.00	2184.00	3140.00	7019.00
	AS03_1_1	PRE	48	1	640.10	1098.72	1.00	513.50	813.50	1240.50	6391.00
		PI(D21)	49	0	1955.75	1528.09	232.00	1407.00	2088.00	2874.00	7173.00
	AS25_1_4	PRE	47	0	864.60	696.78	117.00	557.00	896.00	1612.00	2771.00
		PI(D21)	47	0	1629.80	1344.02	330.00	1080.00	1595.00	2504.00	6819.00
	AS25_1_2	PRE	41	2	887.73	863.40	275.00	554.00	924.00	1431.00	4256.00
		PI(D21)	43	0	1656.36	1486.45	316.00	1128.00	1617.00	2760.00	6311.00
	AS25_1_1	PRE	44	0	834.27	755.62	131.00	537.00	877.00	1457.50	4105.00
		PI(D21)	44	0	2028.18	1595.73	325.00	1334.00	2044.50	3624.00	7175.00
	AS50_1_4	PRE	41	2	690.38	574.37	35.00	466.00	730.00	1132.00	2423.00
		PI(D21)	43	0	1533.43	780.68	194.00	1145.00	1477.00	2269.00	3752.00
	AS50_1_2	PRE	41	6	831.91	720.68	102.00	620.00	879.00	1221.00	3918.00
		PI(D21)	47	0	1862.37	5848.13	158.00	1154.00	1852.00	3278.00	41253.00
	Flu_ELD	PRE	42	3	729.05	856.17	177.00	369.00	716.00	1299.00	3514.00
		PI(D21)	45	0	1191.28	1688.15	145.00	620.00	1301.00	2414.00	9166.00
	Flu_YNG	PRE	40	6	1210.88	920.74	138.00	747.00	1308.50	1909.50	3925.00
		PI(D21)	46	0	2033.00	1700.20	684.00	1429.00	1940.50	3296.00	9375.00
CD4-TNF α	AS03_1_4	PRE	42	1	652.51	499.99	1.00	538.00	778.00	1141.00	2037.00
		PI(D21)	43	0	1147.97	942.25	126.00	677.00	1251.00	2054.00	4142.00
	AS03_1_2	PRE	38	1	755.02	646.69	1.00	607.00	985.00	1429.00	2844.00
		PI(D21)	39	0	1596.30	975.22	295.00	1113.00	1695.00	2577.00	4927.00
	AS03_1_1	PRE	48	1	550.23	1016.73	1.00	343.50	605.50	1001.00	5709.00
		PI(D21)	49	0	1445.35	1172.61	132.00	989.00	1578.00	2128.00	5107.00
	AS25_1_4	PRE	47	0	673.18	622.76	91.00	352.00	673.00	1460.00	2299.00
		PI(D21)	47	0	1172.10	1122.07	193.00	722.00	1122.00	1987.00	6086.00
	AS25_1_2	PRE	41	2	708.33	761.85	191.00	447.00	730.00	1004.00	3592.00
		PI(D21)	43	0	1228.68	1330.12	171.00	671.00	1224.00	2452.00	6334.00
	AS25_1_1	PRE	44	0	693.62	2910.36	116.00	358.00	615.00	1077.00	19515.00
		PI(D21)	44	0	1435.67	2242.66	13.00	908.50	1490.00	3017.00	13332.00
	AS50_1_4	PRE	41	2	538.80	433.49	37.00	331.00	655.00	935.00	1648.00
		PI(D21)	43	0	1204.59	698.67	364.00	814.00	1295.00	1934.00	3219.00
	AS50_1_2	PRE	41	6	658.48	764.82	75.00	440.00	810.00	1078.00	4501.00

測試描述	群組	時間	N	Nmiss	GM	SD	Min	Q1	中值	Q3	Max
	Flu_ELD	PI(D21)	47	0	1349.54	4822.50	39.00	895.00	1297.00	2514.00	33798.00
		PRE	42	3	558.80	704.36	40.00	326.00	627.00	1189.00	2767.00
	Flu_YNG	PI(D21)	45	0	819.29	1407.45	1.00	543.00	969.00	1694.00	7960.00
		PRE	40	6	1056.84	852.19	221.00	633.00	1129.50	1724.50	3947.00
		PI(D21)	46	0	1426.37	1615.23	385.00	852.00	1505.00	2355.00	9378.00

N=具有可用結果之受檢者的數量

Nmiss=具有丟失結果之受檢者的數量

GM=幾何平均

SD=標準偏差

Q1,Q3=第一及第三四分位數

Min/Max=最小值/最大值

細胞介導免疫反應之中間結論

在年齡 ≥ 65 歲之受檢者中，對所有細胞激素組合，就個別差異(D21-D0)而言，與*Fluarix*相比，五種經佐劑化疫苗(AS03_1_1、AS03_1_2、AS25_1_1、AS50_1_2及AS50_1_4)對經彙集病毒株誘導顯著更高之CMI反應。在較年輕成年人中，對所有細胞激素組合，就個別差異(第21天-第0天)而言，與*Fluarix*相比，三種該等經佐劑化疫苗(AS03_1_1、AS03_1_2及AS25_1_1)亦對經彙集病毒株誘導顯著更高之CMI反應。

XI.6. 反應原性

局部症狀

已使用用於可定量症狀之EMEA及FDA分級來評估在疫苗接種後之7天時期期間，報導所請求局部症狀(任何級別/3級)之受檢者的百分比。

EMEA分級：淤斑(任何級別 [>0 mm]及3級 [>50 mm])；

疼痛(任何級別)；3級疼痛；充血(任何級別 [>0 mm]及3級 [>50 mm])及腫脹(任何級別 [>0 mm])；3級腫脹(>50 mm)。

FDA分級：淤斑(任何級別 [≥ 25 mm]及3級 [>100 mm])、3級充血(>100 mm)；3級腫脹(>100 mm)，充血(任何級別 [≥ 25 mm])；腫脹(任何級別 [≥ 25 mm])。

全身症狀

EMEA分級：發熱($\geq 37.5^{\circ}\text{C}$)、3級發熱($>39.0^{\circ}\text{C}$)。**FDA分級**：發熱($\geq 38^{\circ}\text{C}$)及3級發熱($>40^{\circ}\text{C}$)。

在疫苗接種後之7天(第0-6天)時期期間，所報導之任何級別及3級請求及未經請求症狀的總發生率及性質呈現於圖24中。

結論

與Flu_ELD群組相比，在經佐劑化流感疫苗群組中，報導至少一種全身症狀之受檢者的百分比在統計學上顯著更高，但對Flu_YNG群組(除AS03_1_4以外)而言係在相同範圍內。

對所有群組而言，報導至少一種3級全身症狀之受檢者的百分比係在相同範圍內。

與Flu_ELD群組相比在經佐劑化流感疫苗群組中，且與Flu_YNG群組相比在AS25_1_1群組中，報導至少一種局部症狀之受檢者的百分比在統計學上顯著更高。

與Flu_ELD及Flu_YNG群組相比，在AS03_1_1、AS25_1_2、AS25_1_1及AS50_1_2群組中，報導至少一種3級局部症狀之受檢者的百分比在統計學上顯著更高。

XI.7.一般結論

該等資料對適當平衡人群中之免疫反應/不良效應而言係重要的。

就HI免疫原性而言，對所有佐劑劑量而言，尤其因H1N1及H3N2之顯著增加而證明明顯之佐劑效應。對B病毒株而言，主要用AS25 1/1，而且用AS03 1/1、AS03 1/2及AS50 ½獲得顯著增加。佐劑之水包油乳液組份展示劑量效應，且對佐劑之MPL組份而言亦如此，儘管後者較為不明顯。

就細胞介導之免疫反應而言，在老年人中，對AS03 1/1、AS03 ½、AS25 1/1及AS50 ½之經彙集病毒株(頻率，所有量度)而言，與Fluarix相比，亦證明具有顯著差異之佐劑效應。用AS25 1/1、AS03 1/1及AS03 1/2獲得最高反應。

就反應原性而言，經佐劑化疫苗比Fluarix更具反應原性，其與疫苗之水包油乳液組份相關聯；儘管較不顯著，但亦存在MPL之劑量效應。AS03 1/2比AS03 1/1具更小反應原性，同時在該老年人群體中顯示令人滿意之免疫原性概況。

【圖式簡單說明】

圖1臨床試驗：抗HA抗體在不同時間點之幾何平均效價(GMT)(免疫原性之ATP組)。

圖2臨床試驗：在第0天及第21天，具有95%信賴區間之HI抗體效價的血清保護率(SCR)(免疫原性之ATP組)。

圖 3 臨床試驗：在第 21 天，具有 95% 信賴區間之 HI 抗體效價的血清轉化率 (SCR) (免疫原性之 ATP 組)。

圖 4 臨床試驗：在第 21 天，具有 95% 信賴區間之 HI 抗體效價的血清轉化因子 (SCF) (免疫原性之 ATP 組)。

圖 5 小鼠研究：在經異源亞型病毒株 (劑量範圍 AS03) 預致敏之 BALB/c 小鼠中之血球凝集素抑制測試 (GMT +/- IC95)。圖 5A：抗 A/新喀裏多尼亞 (Caledonia)/20/99 HI 效價；圖 5B：抗 A/巴拿馬 (Panama)/2007/99 HI 效價。圖 5C：抗 B/山東/7/97 HI 效價。

圖 6 小鼠研究：在經異源亞型病毒株 (劑量範圍 AS03) 預致敏之 C57B1/6 小鼠中之血球凝集素抑制測試 (GMT +/- IC95)。

圖 7 小鼠研究：在來自經異源亞型病毒株 (劑量範圍 AS03) 預致敏之 C57B1/6 小鼠之 PBMC 中的細胞免疫反應 (CD4+ T 細胞)。

圖 8 小鼠研究：在來自經異源亞型病毒株預致敏且經以劑量範圍 AS03 佐劑化之低劑量抗原 (0.5 μg) 免疫之 C57B1/6 小鼠的 PBMC 中之細胞免疫反應 (CD4+ T 細胞)。

圖 9 小鼠研究：在免疫 (GMT +/- IC95) 後第 14 天，對於兩種不同抗原劑量：1.5 μg (A、C 及 E) 或 0.38 μg (B、D 及 F) 之 H5N1 特異性血清 Ig ELISA 效價 (A 及 B) 及抗 H5N1 IgG1 (C 及 D) 及 IgG2b (E 及 F) 同型反應。

圖 10 小鼠研究：在免疫 (GMT +/- IC95) 後第 21 天，對於兩種不同抗原劑量：1.5 μg (A) 或 0.38 μg (B) 之血球凝集抑

制測試(GMT +/- IC95)。

圖 11小鼠研究：在經不同劑量之以劑量範圍AS03佐劑化之H5N1疫苗(1.5或0.38 μg)：(A)1.5 μg HA Ag(抗原)或(B)0.38 μg HA Ag(抗原)免疫之天然C57B1/6小鼠中的細胞免疫反應(CD4+ T細胞)。

圖 12豬研究。在經同源病毒株(劑量範圍AS03)預致敏之豬中的血球凝集素抑制測試(GMT +/- IC95)。

圖 13在經普通或以AS03或AS03/2佐劑化之TIV或QIV免疫之C57B1/6天然小鼠中的血球凝集素抑制測試(GMT +/- IC95)。

圖 14在經B/維多利亞類(Victoria-like)病毒預致敏且經普通或以AS03或AS03/2佐劑化之TIV或QIV免疫之C57B1/6小鼠中的血球凝集素抑制測試(GMT +/- IC95)。

圖 15人類臨床試驗(佐劑劑量範圍)：在d0及d21時之HI抗體效價的GMT。

圖 16人類臨床試驗(成人中之佐劑劑量範圍)：在D0及D21時之HI抗體效價的血清保護率(SCR)。

圖 17人類臨床試驗(成人中之佐劑劑量範圍)：圖 17A：在PI(第21天)時之HI抗體效價的血清轉化率(SCR)；圖 17B：每一年齡分類。

圖 18人類臨床試驗(成人中之佐劑劑量範圍)：圖 18A：在PI(第21天)時之HI抗體效價的血清轉化因子(SCF)；圖 18B：每一年齡分類。

圖 19人類臨床試驗(老年人中之佐劑劑量範圍)：在d0及

d21時之HI抗體效價的GMT。

圖 20人類臨床試驗(老年人中之佐劑劑量範圍)：在第0天及第21天，具有95%信賴區間之HI抗體效價的血清保護率(SCR)。

圖 21人類臨床試驗(老年人中之佐劑劑量範圍)：在PI(第21天)時之HI抗體效價的血清轉化率(SCR)。

圖 22人類臨床試驗(老年人中之佐劑劑量範圍)：在第21天時具有95% CI之HI抗體效價的SCF(免疫原性HI之ATP組)。

圖 23人類臨床試驗(老年人中之佐劑劑量範圍)：在D0及D21時之經彙集病毒株的細胞激素陽性CD4 T細胞(CMI之ATP組)。

圖 24人類臨床試驗(老年人中之佐劑劑量範圍)：在疫苗接種期後之7天期間(第0-6天)，報導相關請求及未經請求症狀(所有級別/3級)之受檢者的百分比(總疫苗接種組)。

序列表

<110> 比利時商葛蘭素史密斯克藍生物物品公司	
<120> 疫苗	
<130> VB62342	
<140> 097113719	
<141> 2008-04-15	
<150> 0707697.9 ; 0711357.4 ; 0712062.9 ; PCT/EP2007/060743 ; 0724651.5	
<151> 2007-04-20 ; 2007-06-12 ; 2007-06-21 ; 2007-10-10 ; 2007-12-18	
<160> 6	
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
<210> 1	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成序列，含未經甲基化CG之序列	
<400> 1	
tccatgacgt tcctgacgtt	20
<210> 2	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成序列，含未經甲基化CG之序列	
<400> 2	
tctcccagcg tgcgccat	18
<210> 3	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成序列，含未經甲基化CG之序列	
<400> 3	
accgatgacg tcgcccgtga cggcaccacg	30
<210> 4	
<211> 24	

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列，含未經甲基化CG之序列

<400> 4

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列，含未經甲基化CG之序列

<400> 5

tccatgacgt tcctgatgct

20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列，含未經甲基化CG之序列

<400> 6

tcgacgtttt cggcgcgcgc cg

22

五、中文發明摘要：

本發明提供一種適於人類用途之劑量體積的免疫原性流感組合物，其包含流感病毒抗原或其抗原性製劑及包含水包油乳液之佐劑組合物，其中該水包油乳液包含含量低於11 mg之可代謝油及含量低於5 mg之乳化劑及視情況含量低於12 mg之母育酚(tocol)或固醇。合適地，流感抗原每劑量每病毒株之含量為15 μ g HA或諸如小於15 μ g HA之低量。

六、英文發明摘要：

The present invention provides an immunogenic influenza composition in a dose volume suitable for human use, comprising an influenza virus antigen or antigenic preparation thereof and an adjuvant composition comprising an oil-in-water emulsion, wherein said oil-in-water emulsion comprises a metabolisable oil at a level of below 11 mg and an emulsifying agent at a level of below 5 mg and optionally a tocol or a sterol at a level of below 12 mg. Suitably the amount of influenza antigen per strain per dose is 15 μ g HA or a low amount such as less than 15 μ g HA.

十、申請專利範圍：

1. 一種呈適於人類用途之劑量體積之免疫原性流感組合物，其包含併與水包油乳液佐劑組合之流感病毒抗原或抗原性製劑，其中該水包油乳液佐劑包含可代謝油及乳化劑，且其中該可代謝油係以每該人類劑量低於11 mg之含量存在，且該乳化劑係以該人類劑量低於5 mg之含量存在。
2. 如請求項1之免疫原性組合物，其中該可代謝油為角鯊烯。
3. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該可代謝油係以每人類劑量0.5-10、0.5-9、1-10、2-10、4-8、1-2、2-3、4.5-5.5、5-6或9-10 mg之量存在。
4. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該乳化劑為非離子性界面活性劑。
5. 如請求項4之免疫原性組合物，其中該乳化劑為聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯或脫水山梨糖醇三油酸酯或兩者之混合物。
6. 如請求項5之免疫原性組合物，其中該聚氧化乙烯脫水山梨糖醇單油酸酯係選自包含以下各者之群：聚山梨醇酯80或Tween® 80，且脫水山梨糖醇三油酸酯為Span 85。
7. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該乳化劑係以每人類劑量0.1-5、0.2-5、0.3-5、0.4-5、0.4-1.2、0.5-4、1-2、2-3或4-5 mg之量存在。

8. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該佐劑另外包含母育酚、固醇或兩者。
9. 如請求項8之免疫原性組合物，其中該母育酚為 α -生育酚。
10. 如請求項8之免疫原性組合物，其中該母育酚係以每人類劑量0.5-12、1-11、2-10、4-9、5-6、5-7、2.5-3.5、1-2、1-3或10-11 mg之量存在。
11. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該佐劑係選自由以下各者組成之群：(i)每人類劑量包含4.5-5.5或5-6 mg可代謝油、2-3 mg乳化劑，且當存在時5-7 mg母育酚之佐劑；(ii)每人類劑量包含2-3 mg可代謝油、1-1.5 mg乳化劑，且當存在時2.5-3.5 mg母育酚之佐劑；(iii)每人類劑量包含0.5-1.5 mg可代謝油、0.25-0.75 mg乳化劑，且當存在時0.5-1.5 mg母育酚之佐劑。
12. 如請求項8之免疫原性組合物，其中該固醇為膽固醇。
13. 如請求項8之免疫原性組合物，其中該固醇係以每人類劑量0.025-2.5、0.05-1.5、0.075-0.75、0.1-0.3或0.125-0.25 mg(例如0.2-0.3、0.1-0.15、0.25或0.125 mg)之量存在。
14. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該佐劑另外包含選自以下各者之TLR配位體：TLR-1、TLR-2、TLR-3、TLR-4、TLR-7、TLR-8、TLR-9或其組合。
15. 如請求項14之免疫原性組合物，其中該TLR-4配位體係選自：脂質A衍生物、胺基烷基葡萄糖磷酸酯衍生物

(AGP)及選自以下各者之群的化合物：ER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680及ER804764。

16. 如請求項15之免疫原性組合物，其中該脂質A衍生物為3D-MPL或脂質A之任何合成衍生物。
17. 如請求項15之免疫原性組合物，其中該TLR-4配位體係以每人類劑量5-60、40-50、10-50、20-30、5-15、10、20、30、40或50 μg 之量存在。
18. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該佐劑另外包含皂素或其衍生物。
19. 如請求項18之免疫原性組合物，其中該皂素或其衍生物為QS21。
20. 如請求項18之免疫原性組合物，其中該皂素係以每人類劑量5-60、40-50、10-50、20-30、5-15、10、20、30、40或50 μg 之量存在。
21. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該病毒抗原或抗原性製劑每流感病毒株每人類劑量為15 μg 或低於15 μg HA。
22. 如請求項21之免疫原性組合物，其中該病毒抗原或抗原性製劑每流感病毒株每人類劑量係低於10 μg ，或低於8 μg ，或低於4 μg ，或低於2 μg HA，或低於1 μg HA，或低於0.5，或低於0.1 μg HA。
23. 如請求項21之免疫原性組合物，其中該病毒抗原或抗原

性製劑每流感病毒株每人類劑量係介於2-7.5 μg 或1-5 μg 之間的HA。

24. 如請求項21之免疫原性組合物，其中該病毒抗原或抗原性製劑每流感病毒株每人類劑量係低於或精確地為5 μg HA，或低於或精確地為2.5 μg ，或低於或精確地為1 μg 。
25. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該組合物為單價組合物，其包含來自至少一種與大流行病爆發相關聯或具有與大流行病爆發相關聯之潛能之流感病毒株的病毒抗原或抗原性製劑。
26. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該組合物為多價組合物，其包含來自至少兩種、至少三種、至少四種或至少五種流感病毒株之病毒抗原或抗原性製劑。
27. 如請求項26之免疫原性組合物，其中該組合物包含來自至少三種流感季節性(大流行病間期)病毒株之病毒抗原或抗原性製劑，且視情況包含來自至少一種與大流行病爆發相關聯或具有與大流行病爆發相關聯之潛能之流感病毒株的病毒抗原或抗原性製劑。
28. 如請求項26之免疫原性組合物，其中該多價組合物包含選自由以下各者組成之群之病毒抗原或抗原性製劑：(i) 兩種選自以下各者之群之大流行病間期A病毒株：H1N1及H3N2，及兩種選自以下各者之群之B病毒株：B/山形(yamagata)及B/維多利亞(Victoria)；(ii)三種選自以下各者之群之大流行病間期A病毒株：H1N1及H3N2，及一種

選自以下各者之群之B病毒株：B/山形及B/維多利亞；
(iii)兩種選自以下各者之群之大流行病間期A病毒株：
H1N1及H3N2，一種大流行病A病毒株，其中該病毒株為
H5N1，及一種選自以下各者之群之B病毒株：B/山形及
B/維多利亞。

29. 如請求項25之免疫原性組合物，其中該大流行病流感病毒病毒株係選自由以下各者組成之群：H5N1、H9N2、H5N8、H5N9、H7N4、H7N7、H2N2、H10N7、H5N2、H7N2、H7N1及H7N3。
30. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該流感病毒抗原或其抗原性製劑係來自生長在卵或細胞培養物上之流感病毒。
31. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該流感病毒抗原或其抗原性製劑包含完整病毒、裂解病毒、病毒顆粒或一或多種選自以下各者之純化抗原：HA、NA、M1、M2。
32. 如請求項31之免疫原性組合物，其中該或該等純化抗原係自生長在哺乳動物、禽類或昆蟲細胞中之流感病毒而製備。
33. 如請求項31之免疫原性組合物，其中該或該等純化抗原係經以重組方式產生。
34. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其中該人類劑量係選自：等於或低於0.5 ml、介於0.5與1.5 ml之間、介於0.2與1.2 ml之間、介於0.2與0.7 ml之間，及低於或精確地

為 0.25 或 0.5 或 0.7 或 1 ml。

35. 一種製備如請求項 1 至 34 中任一項之經佐劑化流感疫苗之方法，其包含將第一體積之水包油乳液與第二體積之包含流感病毒或其抗原性製劑之水性懸浮液混合之步驟，其中該第一體積係大於該第二體積。
36. 一種製備如請求項 1 至 34 中任一項之經佐劑化流感疫苗之方法，其包含將大體上相等體積之水包油乳液與包含流感病毒或其抗原性製劑之水性懸浮液混合之步驟。
37. 一種製備如請求項 1 至 34 中任一項之經佐劑化流感疫苗之方法，其包含將第一體積之水包油乳液與第二體積之包含流感病毒或其抗原性製劑之水性懸浮液混合之步驟，其中該第二體積係大於該第二體積。
38. 如請求項 35 至 37 中任一項之方法，其包含稀釋該水包油乳液，之後將該所得稀釋乳液與該流感水性懸浮液混合之步驟。
39. 一種疫苗套組，其包含如請求項 21 至 34 中任一項所定義之流感病毒抗原組份或流感病毒抗原性製劑組份，且另外包含用於伴隨或連續投藥之如請求項 1 至 20 中任一項所定義之佐劑。
40. 一種疫苗，其包含如請求項 1 至 34 中任一項之免疫原性組合物及醫藥學上可接受之賦形劑。
41. 一種製造如請求項 40 之疫苗之方法，其包含將如請求項 1 至 34 中任一項之免疫原性組合物與醫藥學上可接受之賦形劑混合之步驟。

42. 一種如請求項1至34中任一項之免疫原性組合物或如請求項40之疫苗之用途，其係用於製造用以對人類宿主進行免疫以抵抗由流感感染引起之疾病的藥劑。
43. 如請求項42之用途，其中該人類宿主為年齡18-50歲之成年人、年齡18-65歲之成年人、年齡65歲或65歲以上之老年人或年齡0-18歲之兒童，且該疾病為季節性 or 大流行病流感感染之任一或兩者。
44. 如請求項42或43之用途，其中該人類宿主為老年人，且該疾病為季節性 or 大流行病流感感染之任一或兩者。
45. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其係用於醫藥中。
46. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其係用於治療或預防由流感感染引起之疾病。
47. 如請求項40之疫苗，其係用於醫藥中。
48. 如請求項40之疫苗，其係用於治療或預防由流感感染引起之疾病。
49. 如請求項46之供使用組合物，其中該組合物能夠在人類中誘導以下反應中之至少一者或至少兩者或所有：(i)與未經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之經改良CD4 T細胞免疫反應，(ii)與未經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之經改良體液免疫反應，(iii)與未經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之經改良B記憶細胞反應。
50. 如請求項46之供使用組合物，其中該組合物能夠在人類

中誘導以下反應中之至少一者或至少兩者或所有：(i)與其中存在更高量該等佐劑組份之經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之相當CD4 T細胞免疫反應，(ii)與其中存在更高量該等佐劑組份之經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之相當體液免疫反應，(iii)與其中存在更高量該等佐劑組份之經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之相當B記憶細胞反應。

51. 如請求項49或50之供使用組合物，其中該CD4 T細胞免疫反應與誘導交叉反應性CD4 T佐劑化子反應有關。
52. 如請求項49或50之供使用組合物，其中該體液免疫反應與誘導交叉反應性體液免疫反應有關。
53. 一種如請求項1至20中任一項所定義之(a)流感病毒抗原或其抗原性製劑及(b)水包油乳液之用途，其係用於製造用以治療或預防由流感感染引起之疾病的免疫原性組合物。
54. 如請求項53之用途，其中該組合物能夠在人類中誘導以下反應中之至少一者或至少兩者或所有：(i)與未經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之經改良CD4 T細胞免疫反應，(ii)與未經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之經改良體液免疫反應，(iii)與未經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性

製劑之經改良B記憶細胞反應。

55. 如請求項53之用途，其中該組合物能夠在人類中誘導以下反應中之至少一者或至少兩者或所有：(i)與其中存在更高量該等佐劑組份之經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之相當CD4 T細胞免疫反應，(ii)與其中存在更高量該等佐劑組份之經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之相當體液免疫反應，(iii)與其中存在更高量該等佐劑組份之經佐劑化組合物所獲得之反應相比，可誘導抵抗該抗原或其抗原性製劑之相當B記憶細胞反應。
56. 如請求項54或55之用途，其中該CD4 T細胞免疫反應與誘導交叉反應性CD4 T佐劑化子反應有關。
57. 如請求項54或55之用途，其中該體液免疫反應與誘導交叉反應性體液免疫反應有關。
58. 如請求項1或2之免疫原性組合物，其適用於治療或預防由流感病原體引起之疾病，該流感病原體為衍生自該免疫原性組合物中抗原之該病原體的變異體。
59. 如請求項40之疫苗，其適用於治療或預防由流感病原體引起之疾病，該流感病原體為衍生自該免疫原性組合物中抗原之該病原體的變異體。
60. 一種如請求項1至20中任一項所定義之(a)流感病毒抗原或其抗原性製劑及(b)水包油乳液之用途，其係用於製造用以治療或預防由流感病原體引起之疾病的免疫原性組

合物，該流感病原體為衍生自該免疫原性組合物中抗原之該病原體的變異體。

61. 如請求項54或55之用途，其係用於保護以抵抗由包含抗原之病原體引起之感染或疾病，該抗原為該免疫原性組合物中彼抗原之變異體。
62. 如請求項49或50之供使用組合物，其係用於保護以抵抗由包含抗原之病原體引起之感染或疾病，該抗原為該免疫原性組合物中彼抗原之變異體。
63. 一種免疫原性流感組合物，其係用於對先前經如請求項1-34之免疫原性組合物或如請求項40之疫苗進行疫苗接種之個體進行再疫苗接種。
64. 一種抗原之用途，其係用於製造用以對先前經如請求項1-34之免疫原性組合物或如請求項40之疫苗進行疫苗接種之個體進行再疫苗接種的免疫原性組合物。
65. 如請求項64之用途，其中該用於進行再疫苗接種之組合物包含與用於先前疫苗接種之該組合物之抗原共用共同之CD4 T細胞抗原決定基的流感抗原。
66. 如請求項63之供使用組合物，其中該用於進行再疫苗接種之組合物包含與用於先前疫苗接種之該組合物之抗原共用共同之CD4 T細胞抗原決定基的流感抗原。
67. 如請求項64或65之用途，其中該用於進行再疫苗接種之抗原或抗原性組合物係經佐劑化的。
68. 如請求項67之用途，其中該佐劑為如請求項1至20中任一項所定義之水包油乳液佐劑。

69. 如請求項 53 至 57、60 及 61 中任一項之用途，其中該疾病為選自由以下各者組成之群之人類宿主或人群的季節性
或大流行病流感感染其中一者或兩者：年齡為 65 歲或 65 歲以上之老年人類、年齡為 18-50 歲或 18-65 歲之成年人、年齡為 0-18 歲之兒童。

十一、圖式：

不同時間點時之抗HA抗體的幾何平均效價 (GMT)
(免疫原性之ATP組)

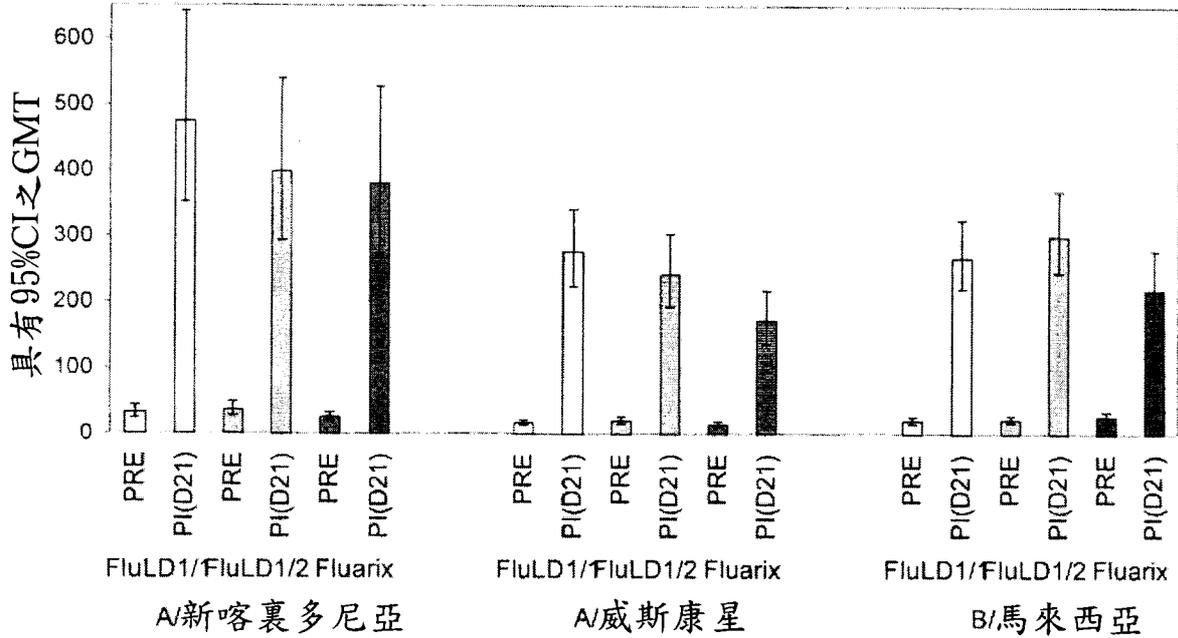


圖1

在第0天及第21天，具有95%信賴區間之HI抗體效價的SPR
(免疫原性之ATP組)

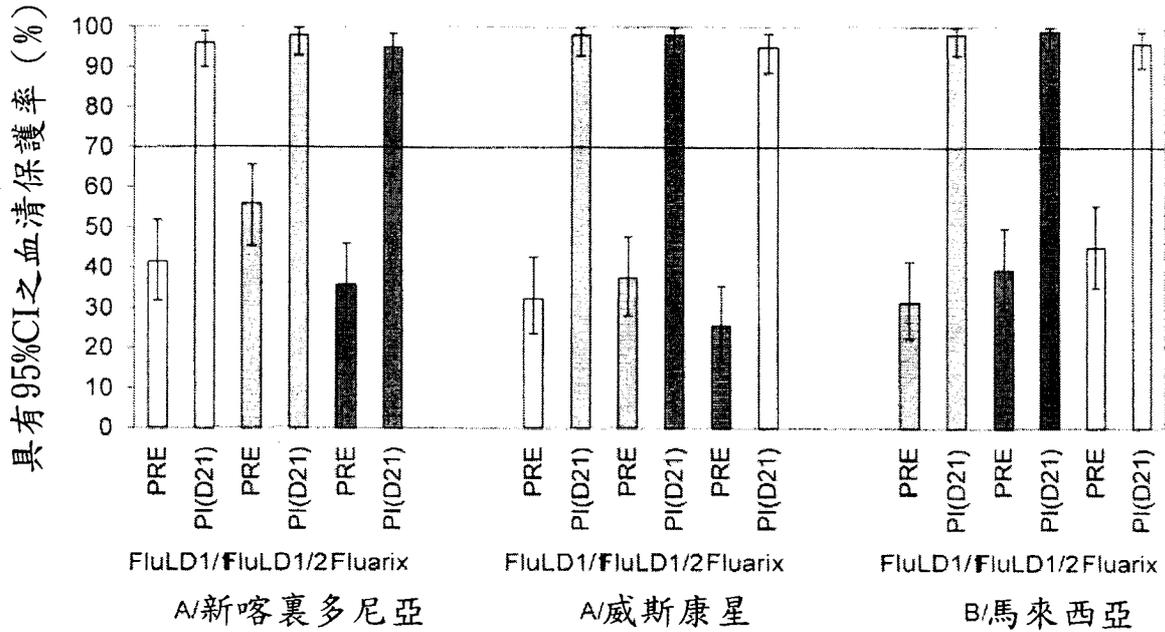


圖2

在第21天，具有95%信賴區間之HI抗體效價的SCR
(免疫原性之ATP組)

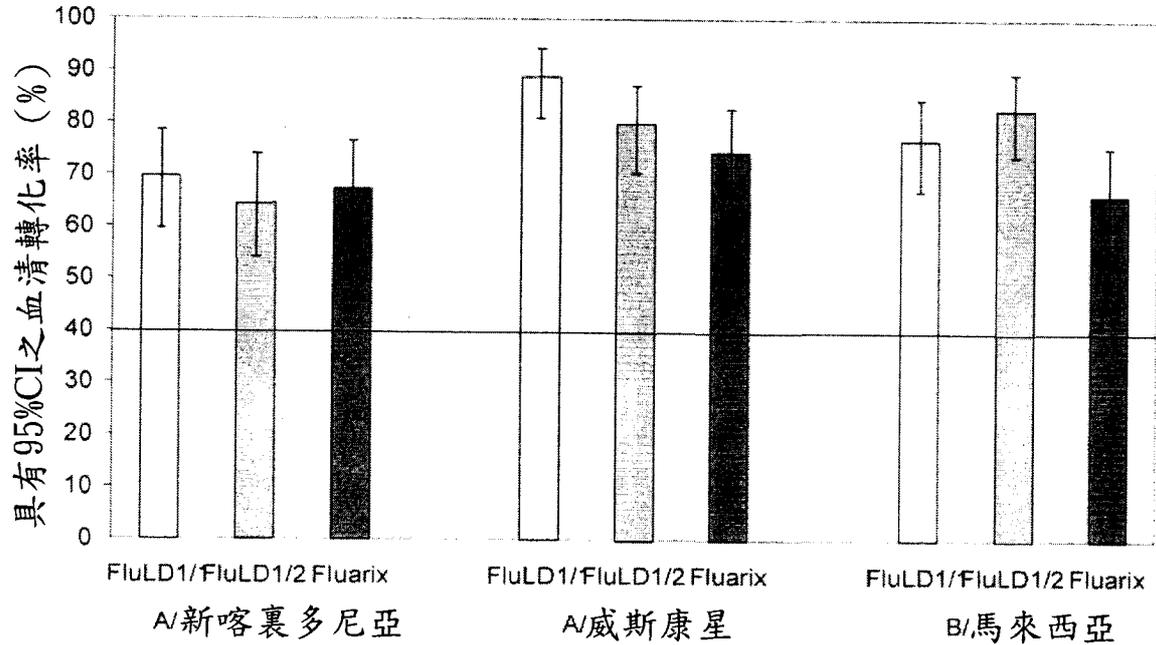


圖3

在第21天，具有95%信賴區間之HI抗體效價的SCF
(免疫原性之ATP組)

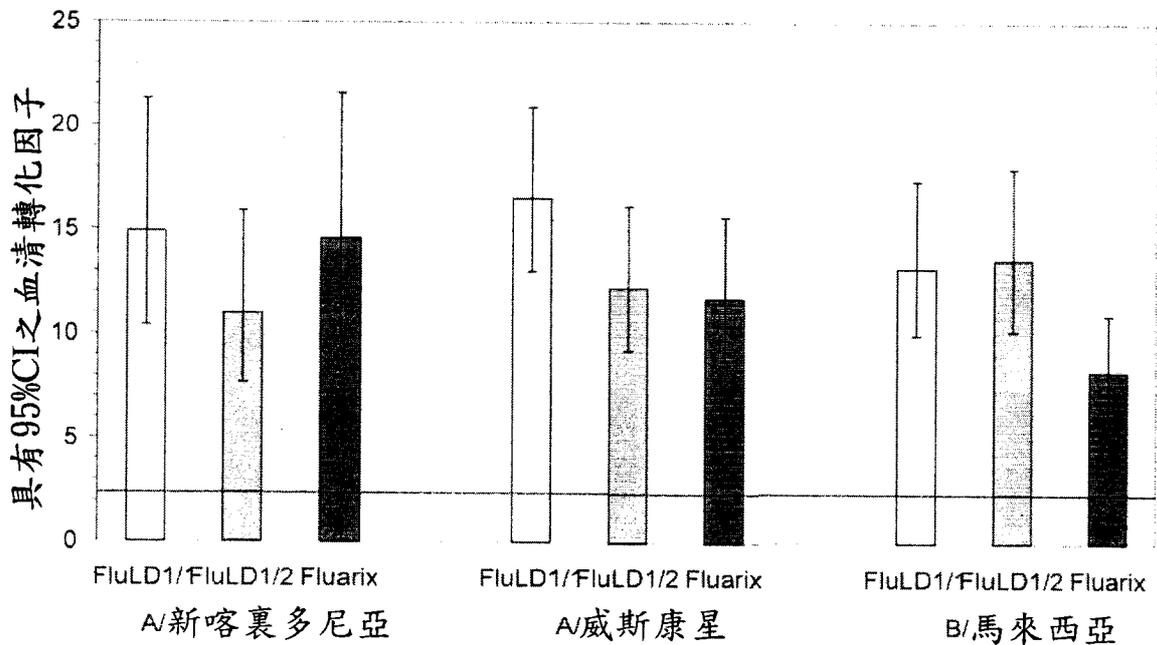


圖4

在經異源亞型病毒株(劑量範圍 AS03)預致敏之
BALB/c 小鼠中之血球凝集素抑制測試
(GMT +/- IC95)

抗A / 新喀裏多尼亞/20/99 HI效價

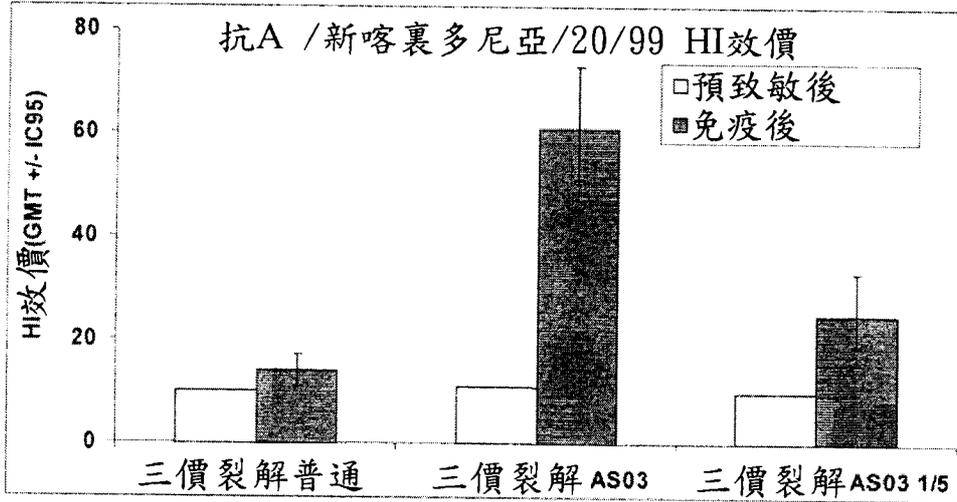


圖 5A

抗A / 巴拿馬 2007/99 HI效價

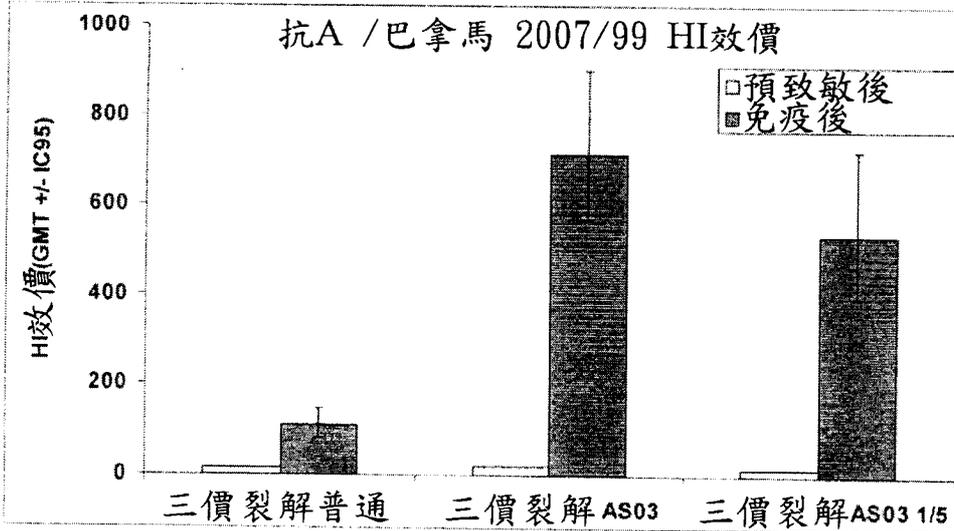


圖 5B

抗B/山東/7/97 HI效價

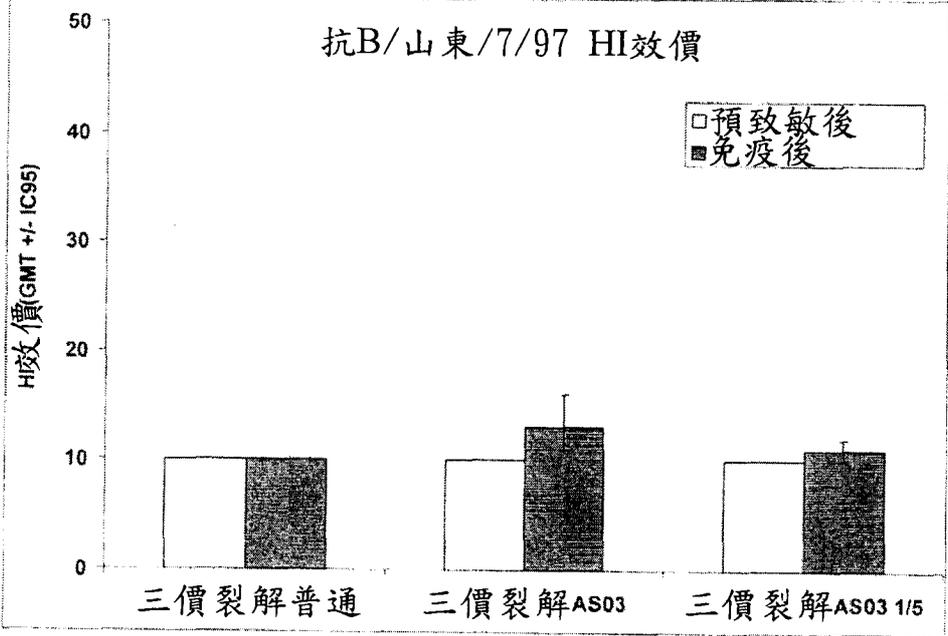


圖5C

在經異源亞型病毒株(劑量範圍 AS03)預致敏之 C57Bl/6 小鼠中之血
球凝集素抑制測試(GMT +/-IC95)

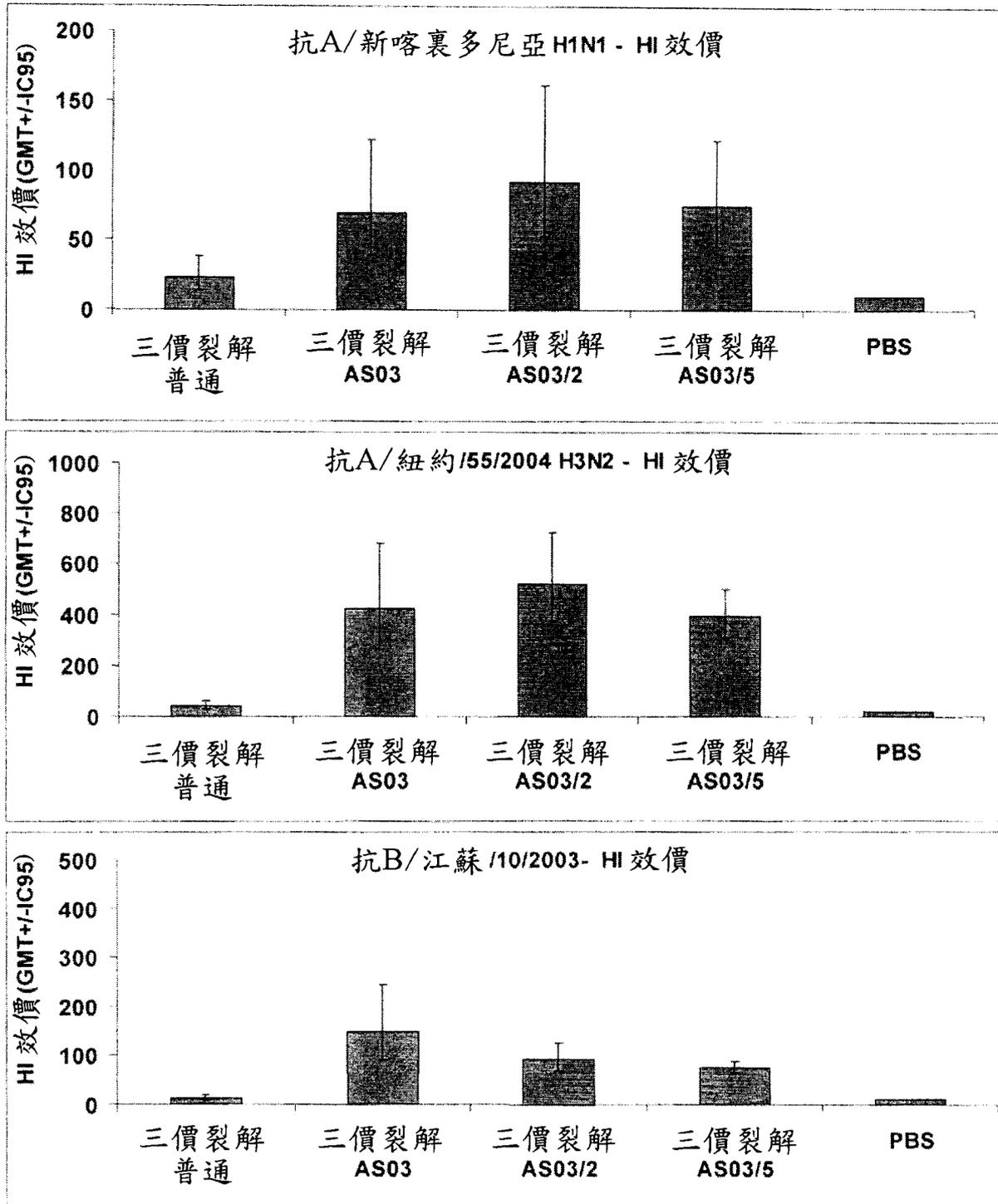


圖6

在來自經異源亞型病毒株(劑量範圍 AS03)預致敏之 C57Bl/6 小鼠之 PBMC 中的細胞免疫反應(CD4+ T 細胞)

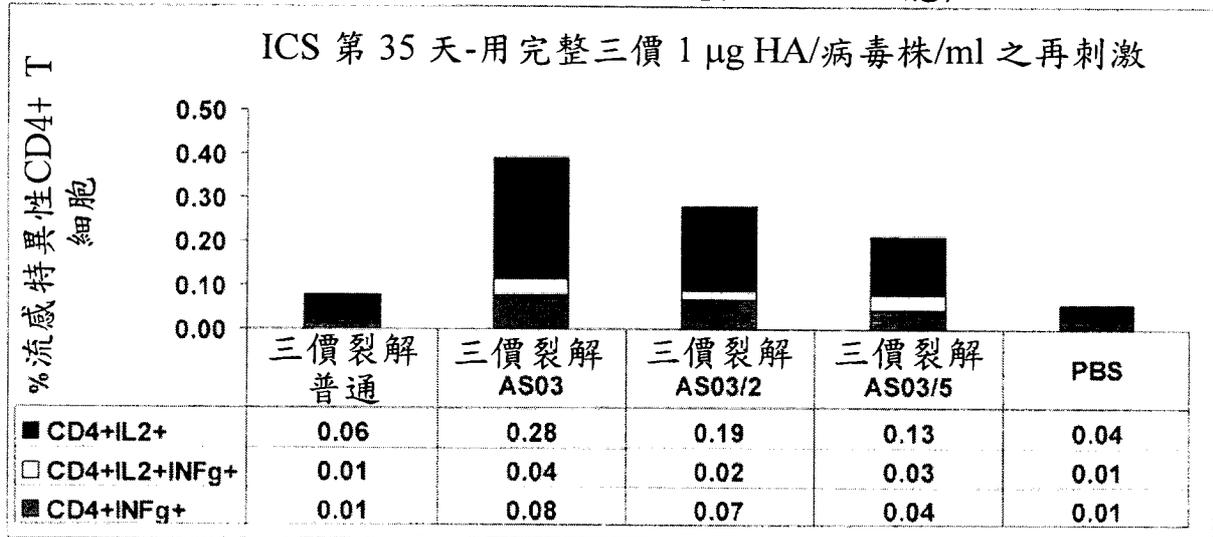


圖 7

在來自經異源亞型病毒株預致敏且經以劑量範圍 AS03 佐劑化之低劑量抗原(0.5 μg)進行免疫之 C57B/6 小鼠的 PBMC 中之細胞免疫反應 (CD4+ T 細胞)

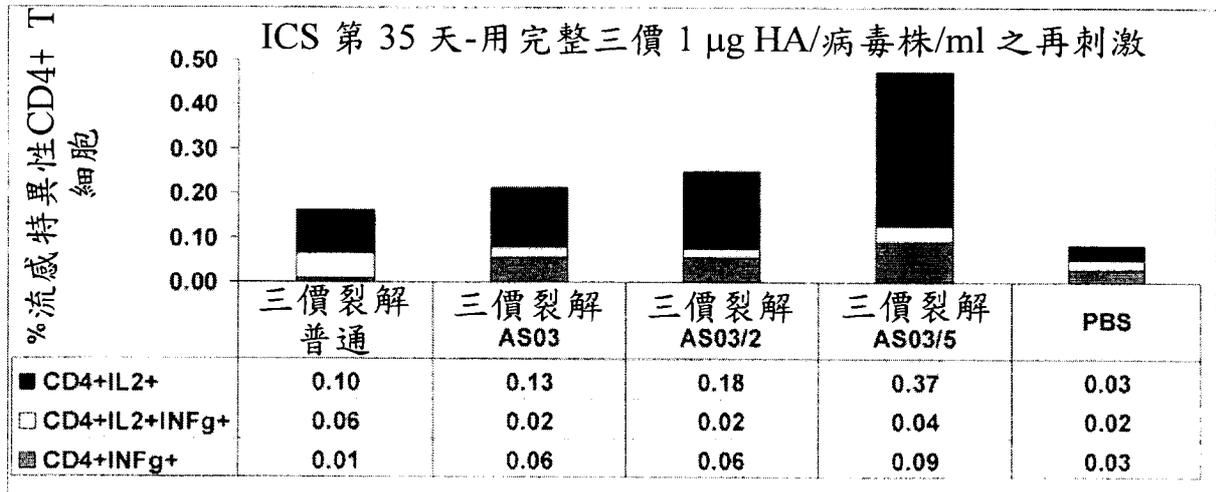


圖 8

在免疫 (GMT + / - IC95) 後第14天，對兩種不同
 抗原劑量：1.5 μg (A、C及E) 或0.38 μg (B、D及F)
 而言之H5N1特異性血清Ig ELISA效價 (A及B) 及抗
 H5N1 IgG1 (C及D) 及IgG2b (E及F) 同型反應

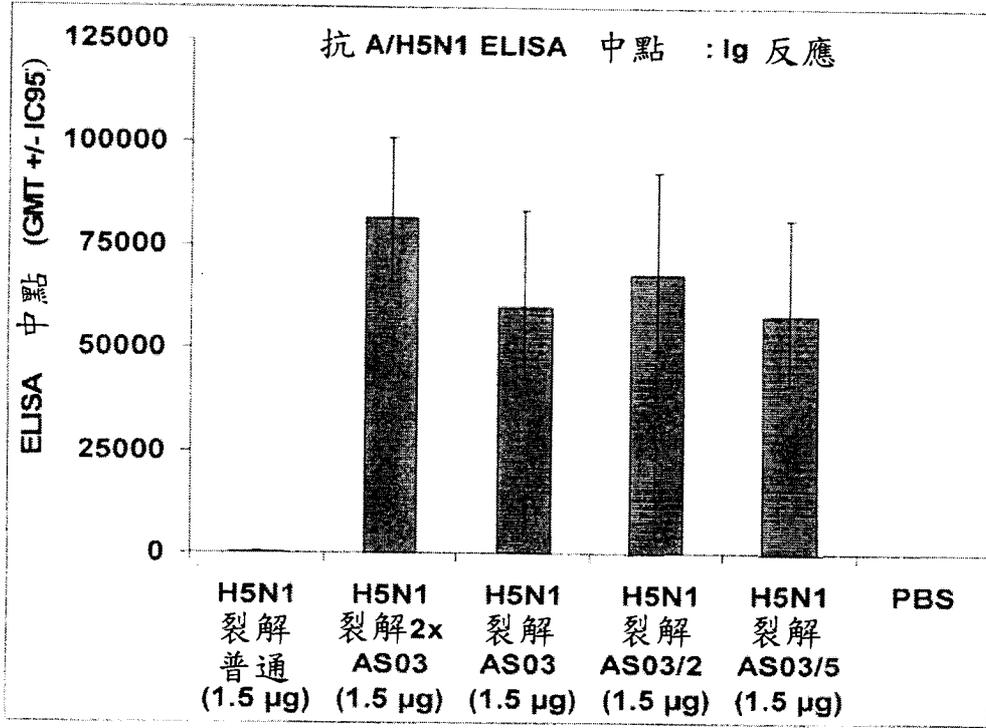


圖9A

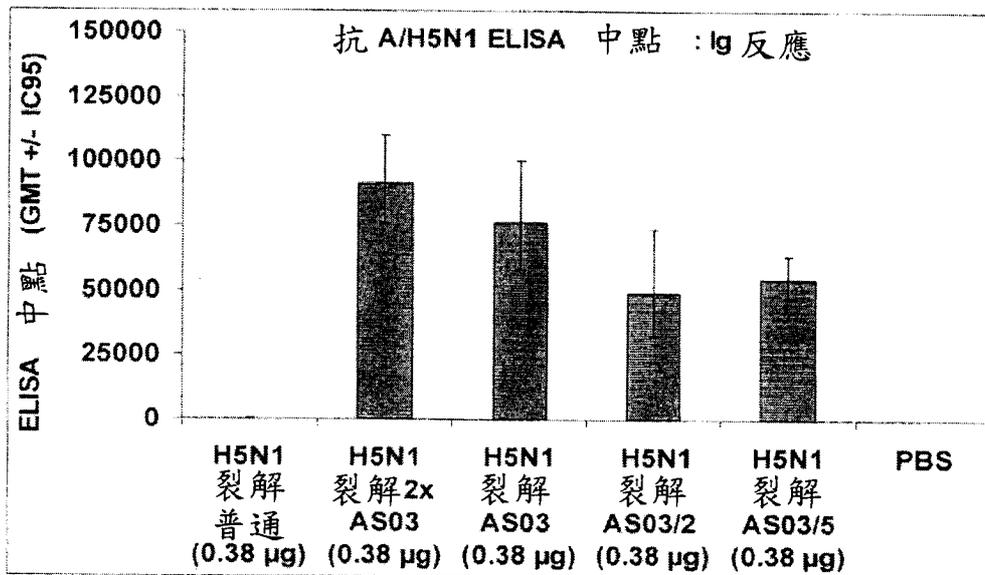


圖9B

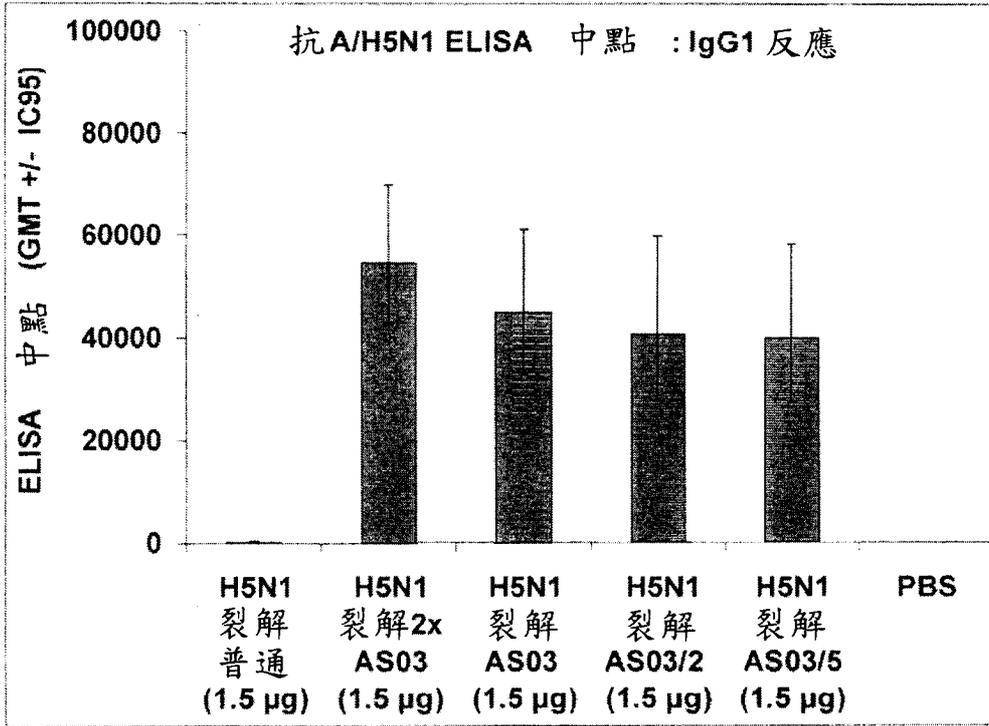


圖9C

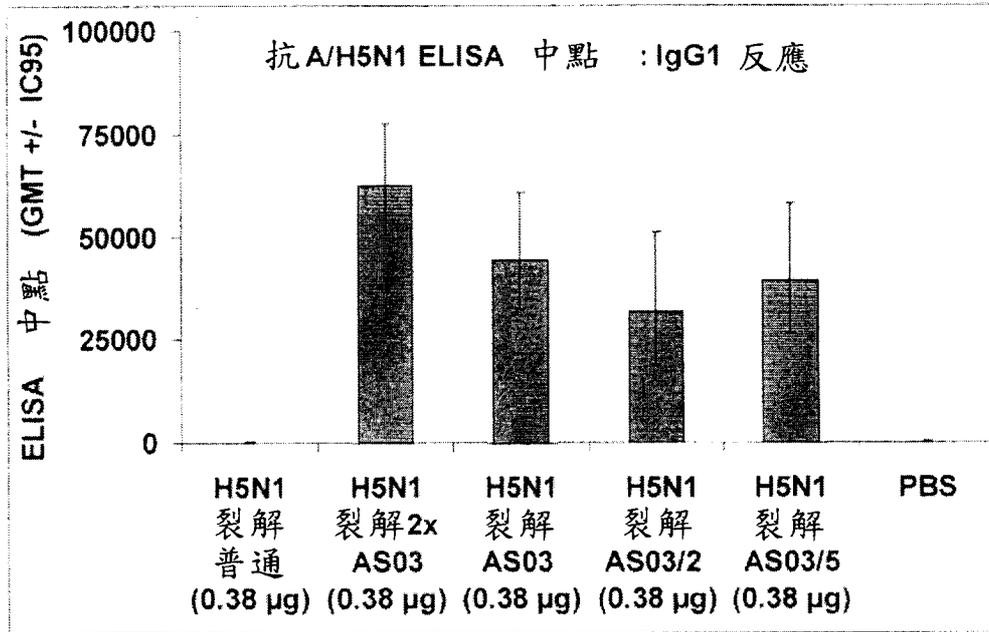


圖9D

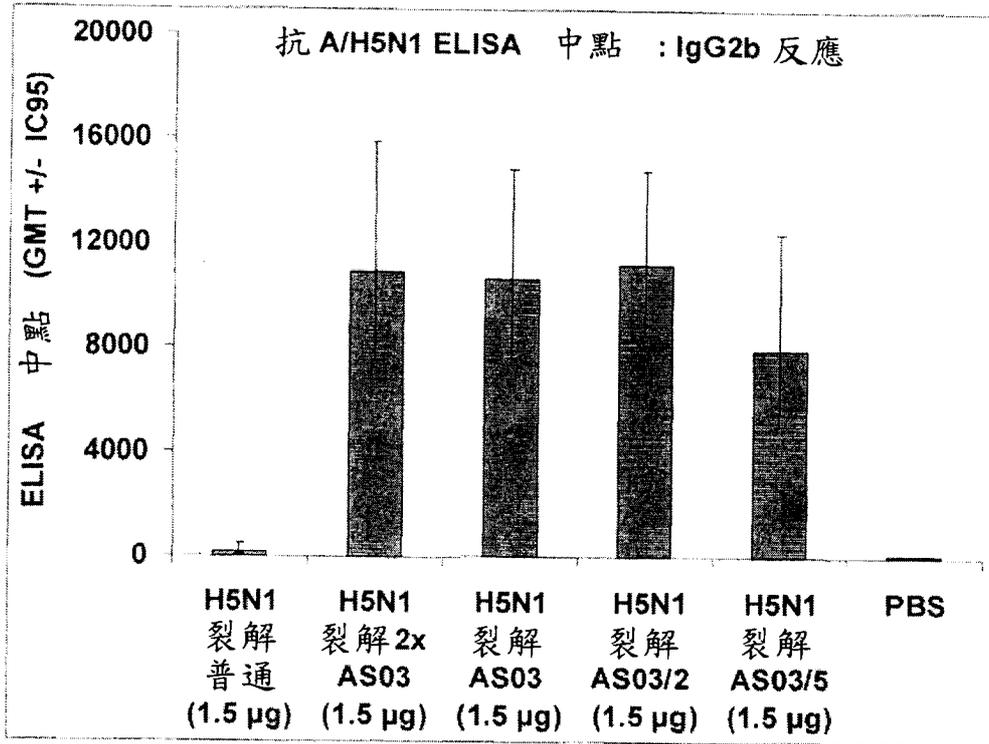


圖 9E

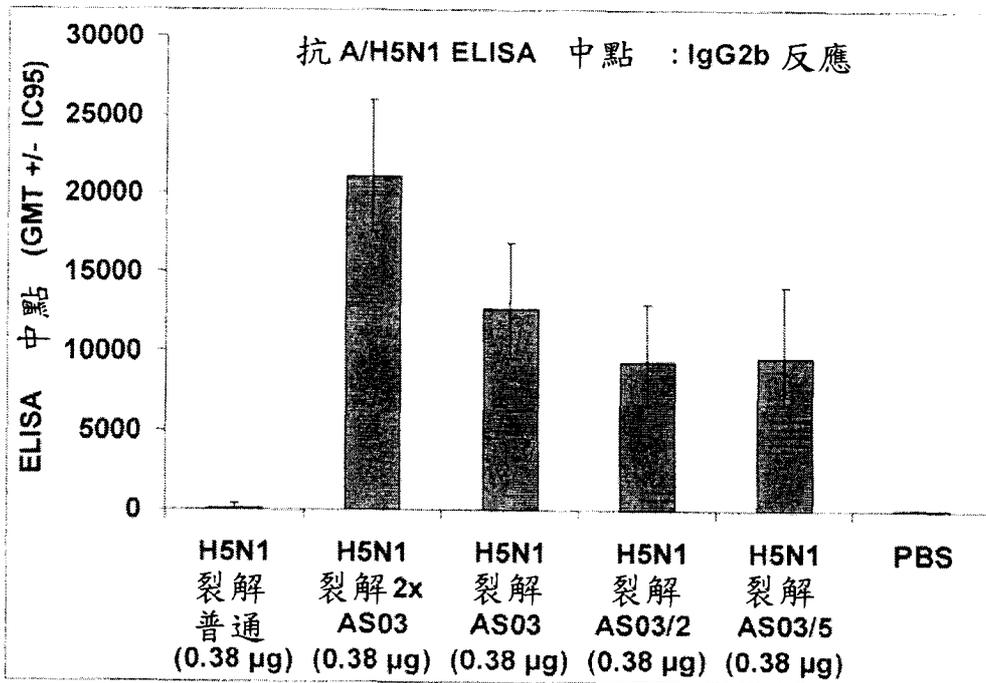


圖 9F

在免疫 (GMT + / - IC95) 後第21天，對兩種不同抗原劑量：1.5 μ g (A) 或0.38 μ g (B) 而言之血球凝集抑制測試 (GMT + / - IC95)

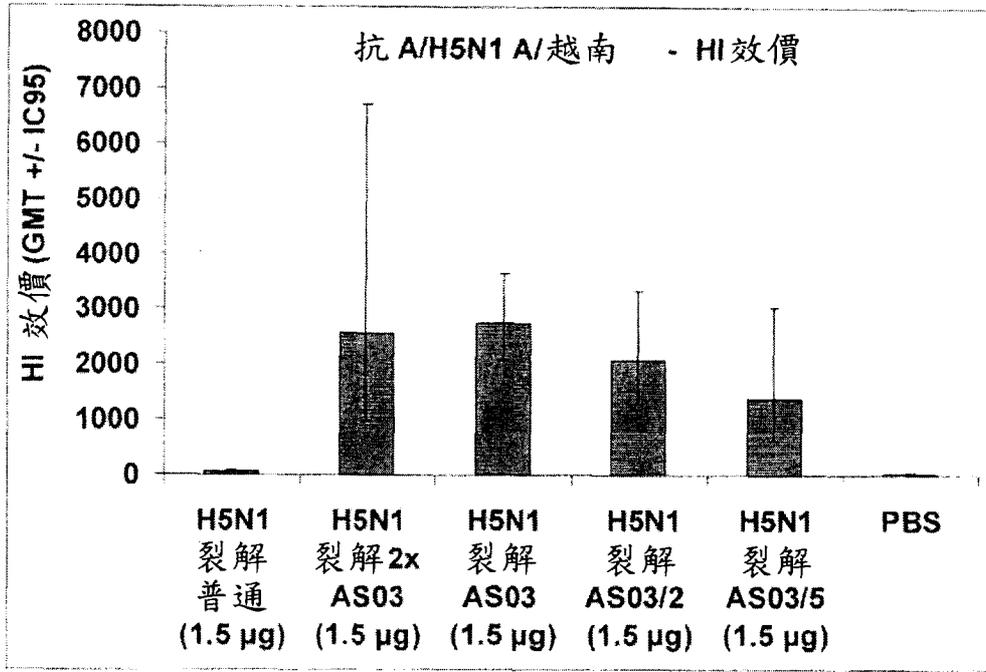


圖 10A

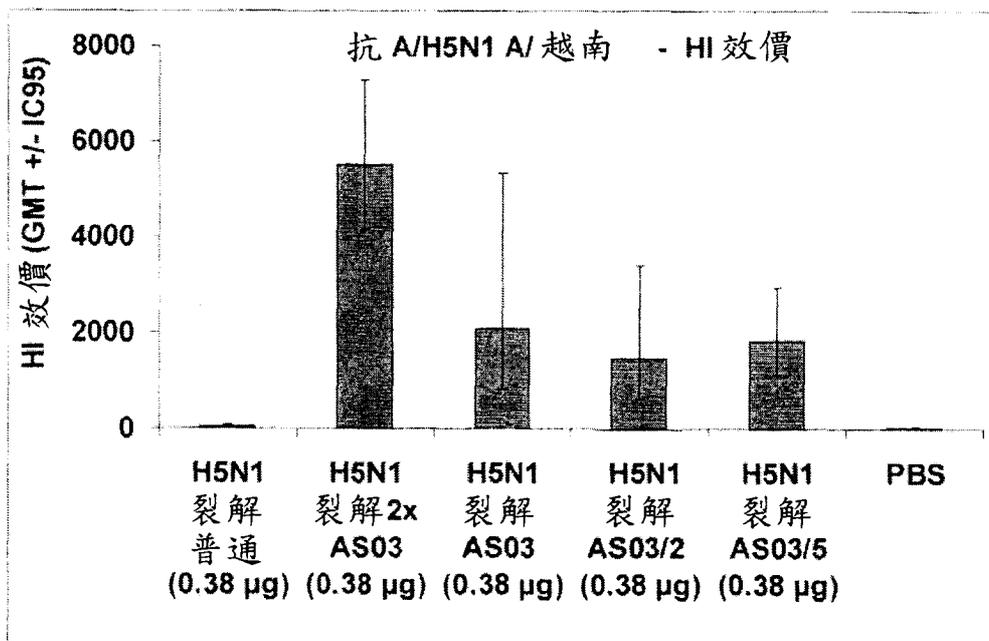


圖 10B

在經不同劑量之以劑量範圍 AS03 佐劑化之 H5N1 疫苗(1.5 或 0.38 μg):(A)1.5 μg Ag 或(B)0.38 μg Ag 進行免疫之天然 C57Bl/6 小鼠中的細胞免疫反應(CD4+ T 細胞)

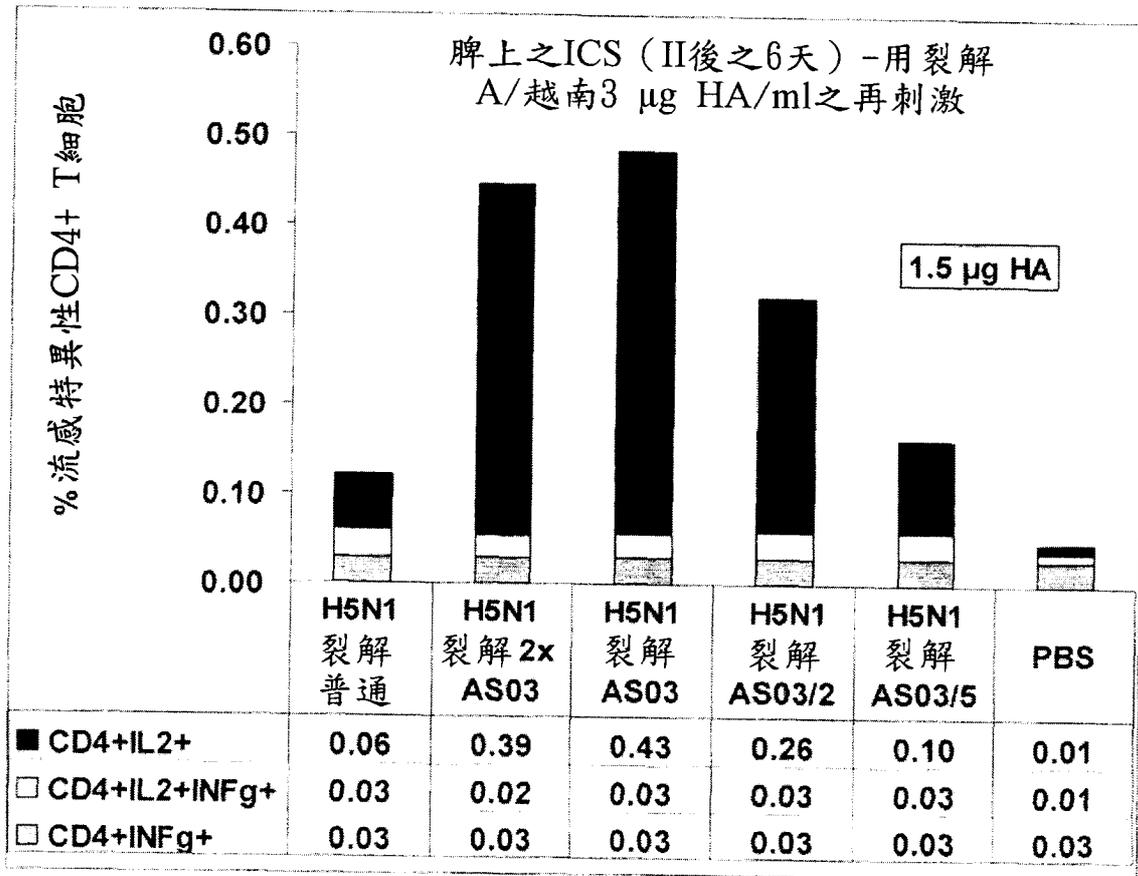


圖 11A

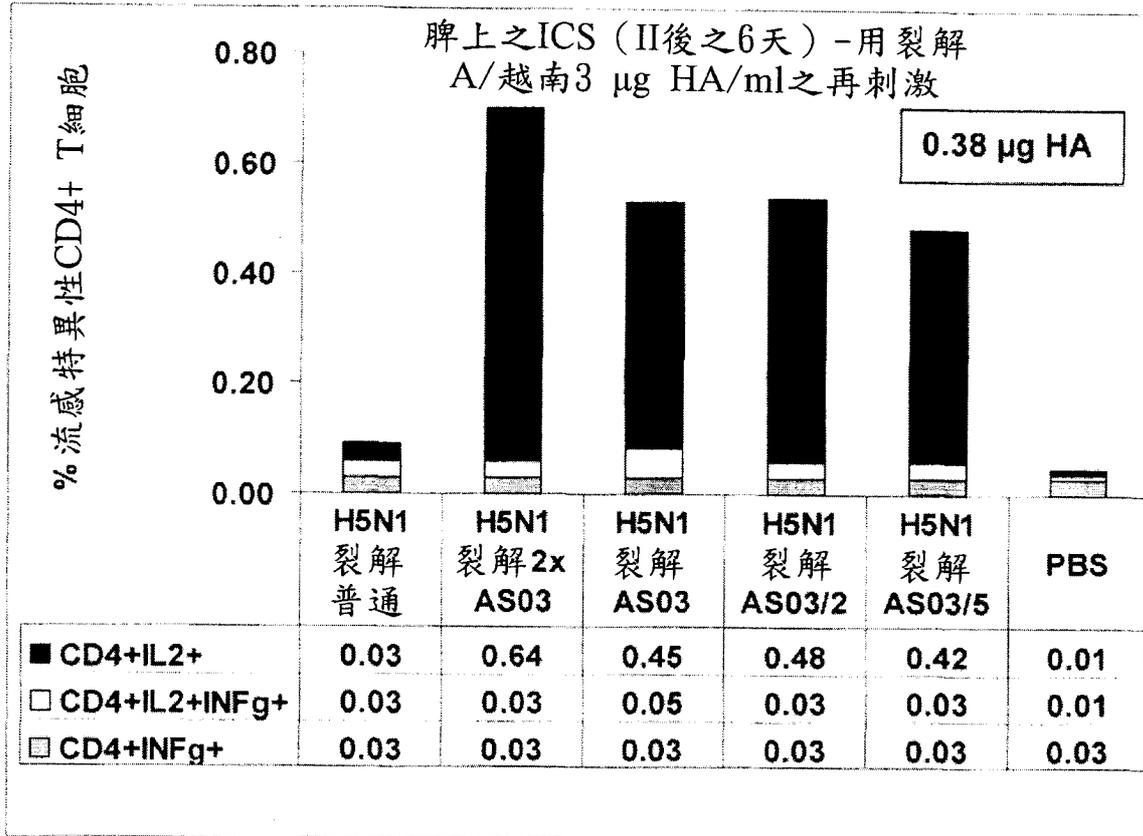
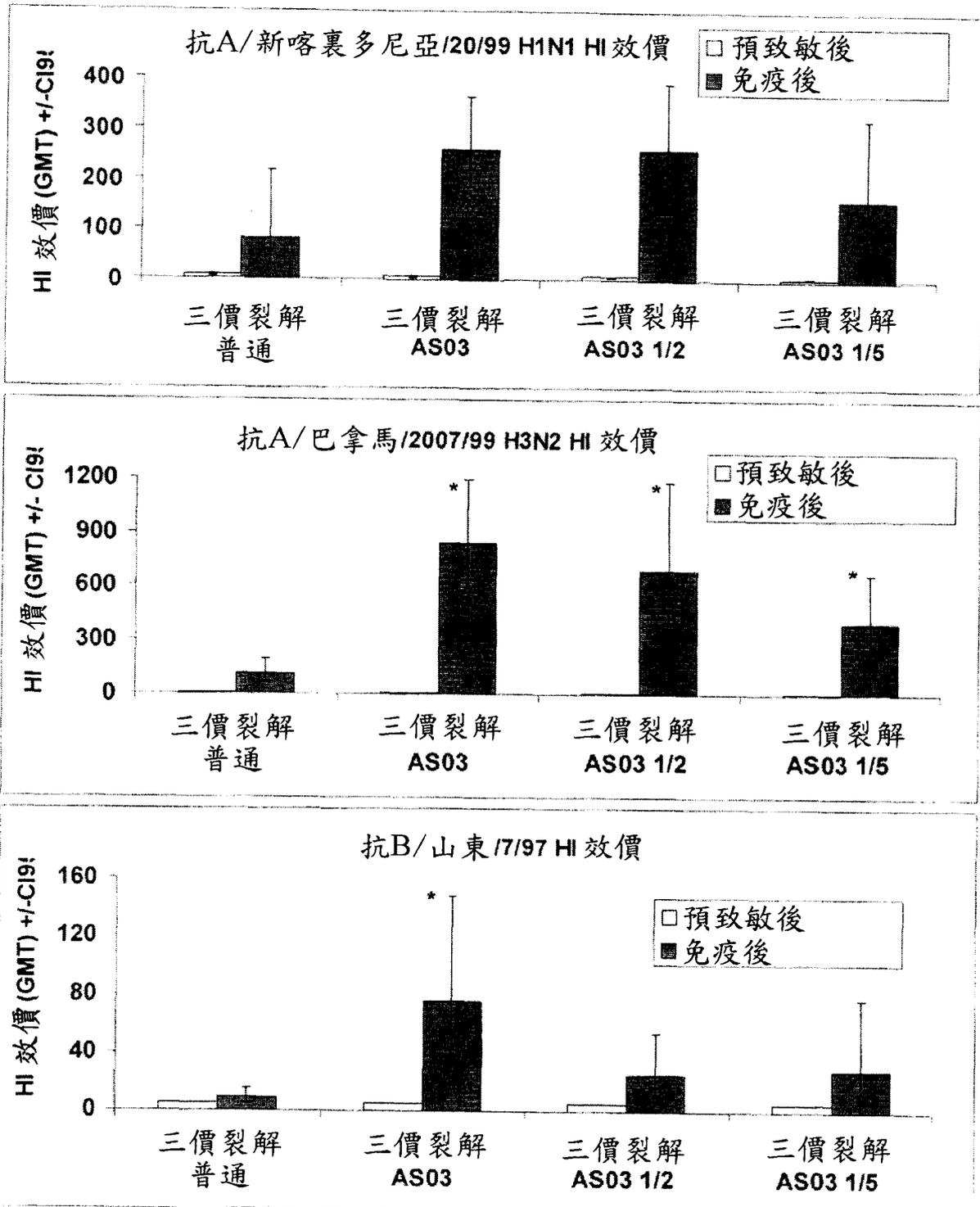


圖 11B

在經同源病毒株(劑量範圍 AS03)預致敏之豬中的血球凝集素抑制測試 (GMT +/- IC95)



* 與普通相比，具有統計學顯著差異之群組

圖12

在經普通 TIV 或 QIV 或以 AS03 或 AS03 / 2 佐劑化之 TIV 或 QIV 進行免疫之 C57Bl/6 天然小鼠中的血球凝集素抑制測試(GMT +/- IC95)

抗B/山東/7/97 (B/維多利亞類病毒) HI 效價

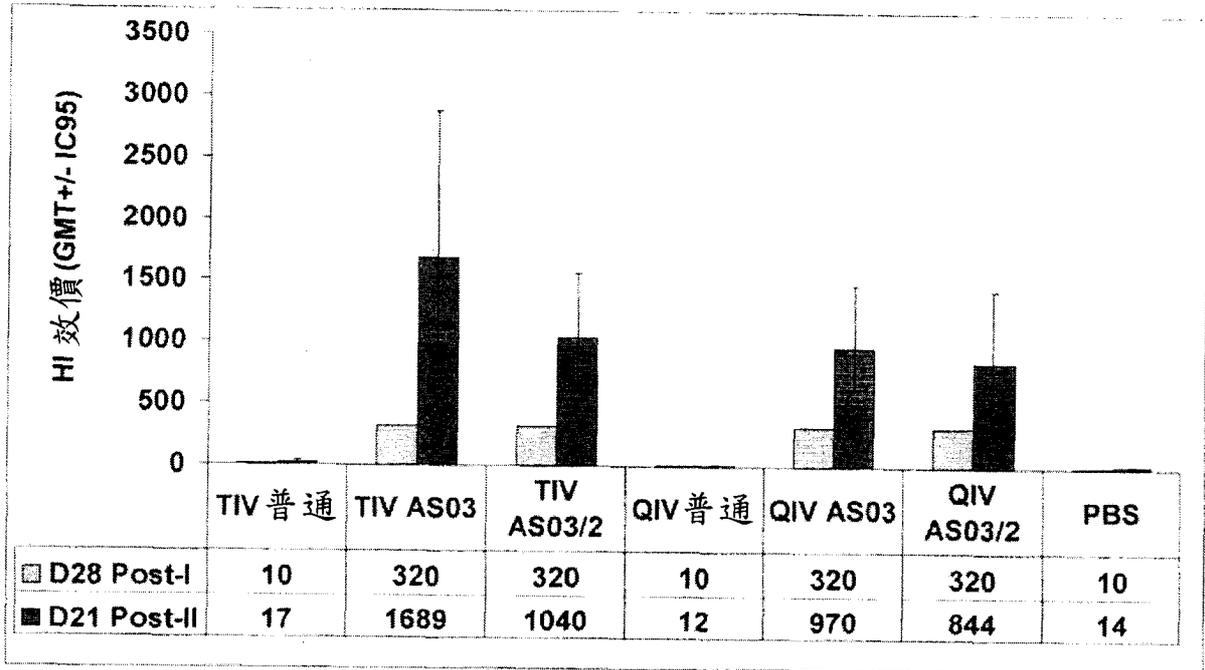


圖13A

抗B/江蘇/10/03 (B/山形類病毒) HI 效價

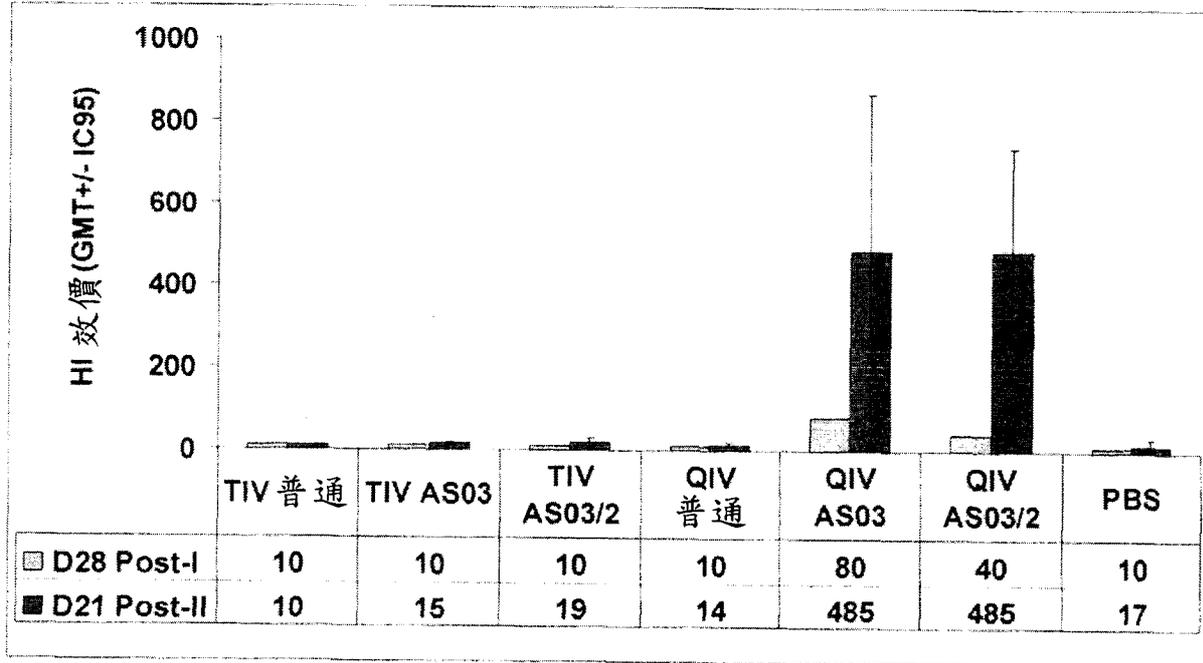


圖13B

在經B/維多利亞類病毒預致敏且經普通TIV或QIV或以AS03或AS03 / 2
輔助之TIV或QIV進行免疫之C57B1 / 6小鼠中的血球凝集素抑制測試
(GMT + / - IC95)

抗B/山東/7/97 (B/維多利亞類病毒) HI效價

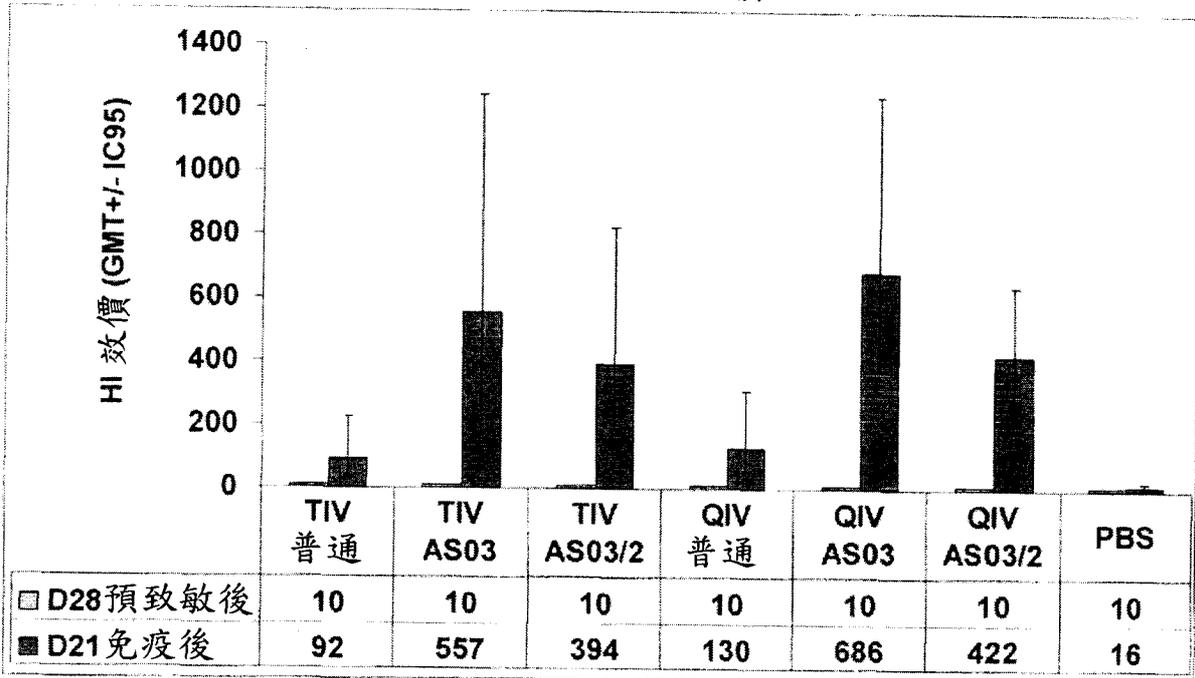


圖14A

抗B/江蘇/10/03 (B/山形類病毒) HI效價

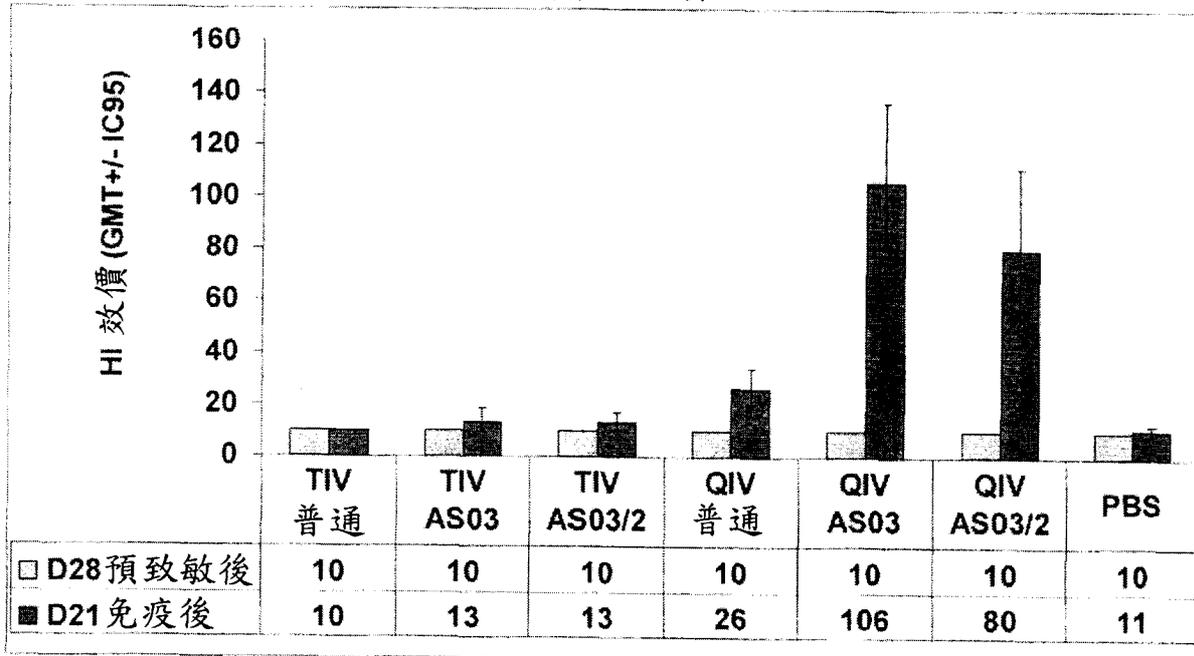


圖14B

在d0及d21時之HI抗體效價的GMT

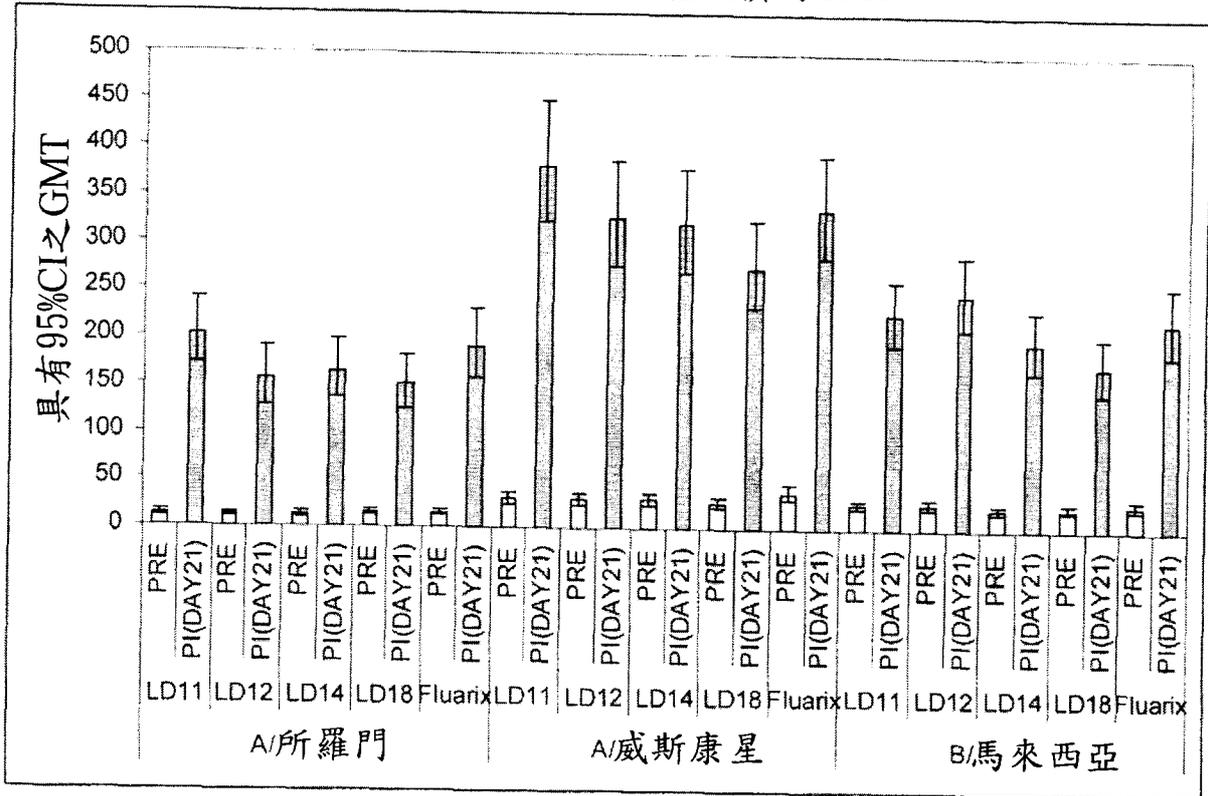


圖 15

在D0及D21時之HI抗體效價的血清保護率 (SPR)

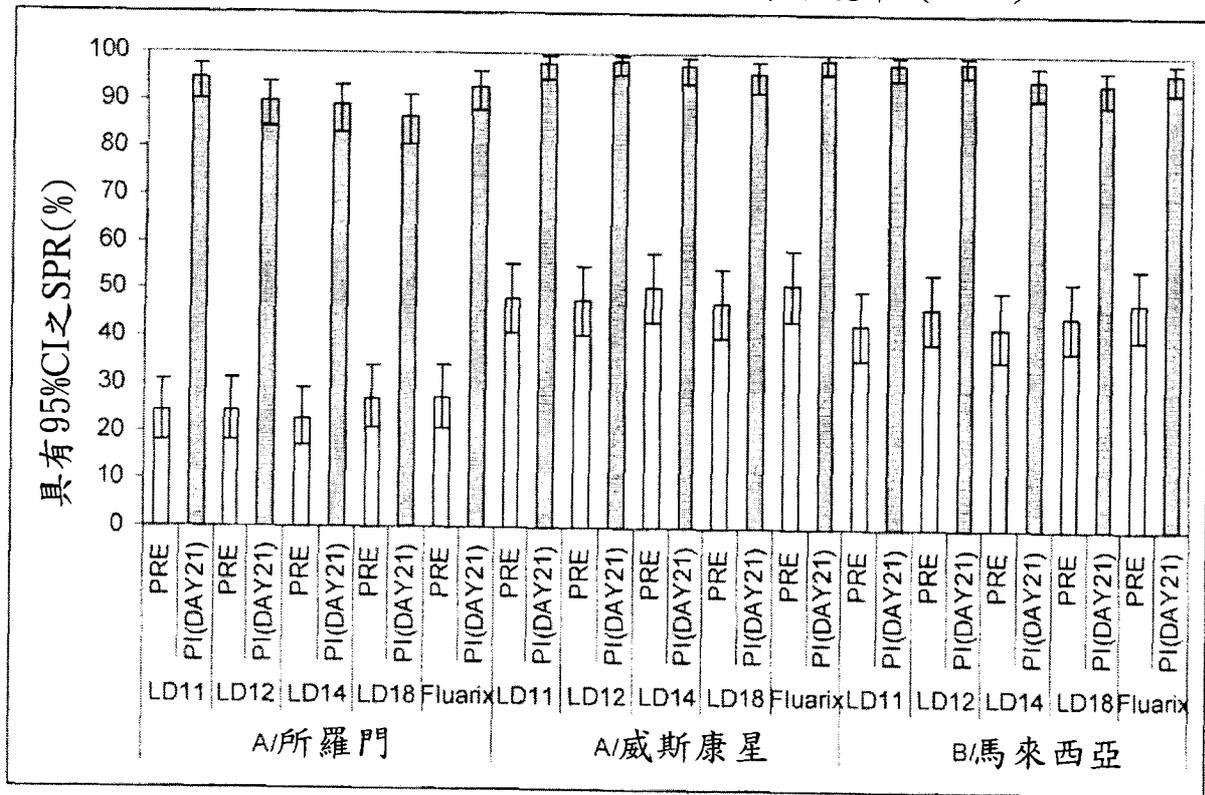


圖 16

在PI (第21天) 時之HI抗體效價的血清轉化率 (SCR)

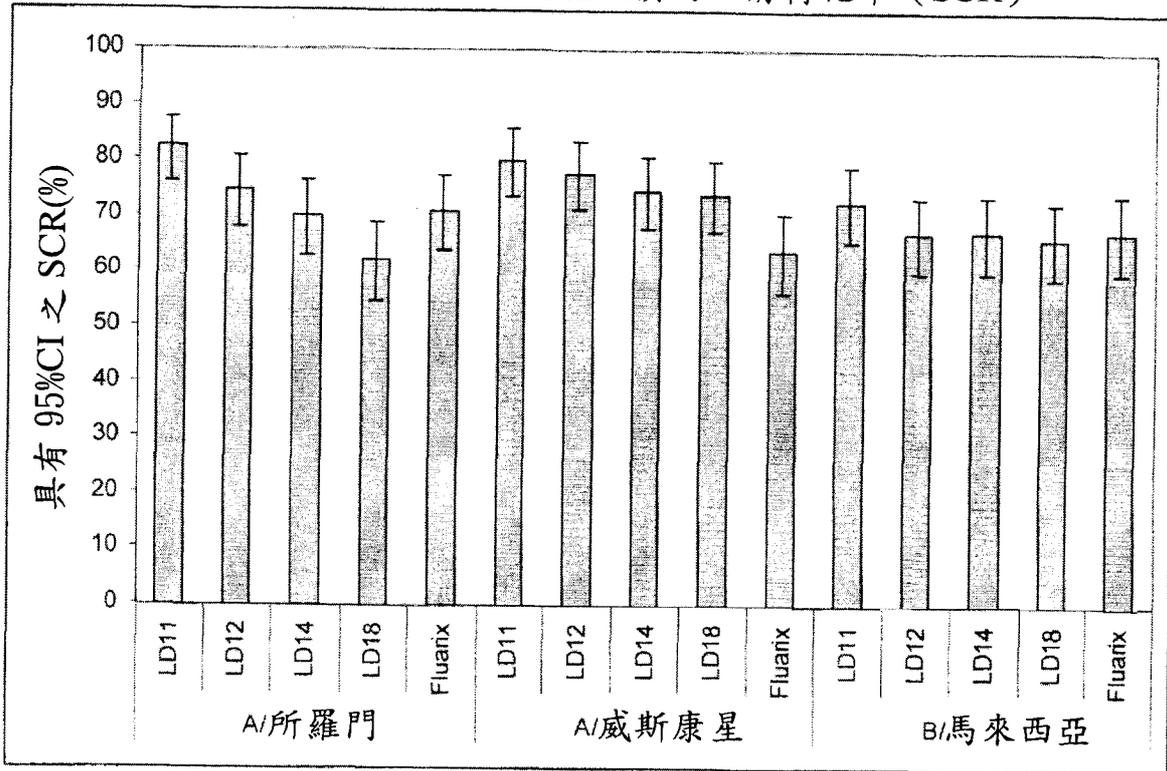


圖17A

在PI (第21天) 時按年齡分類之HI抗體效價的SCR

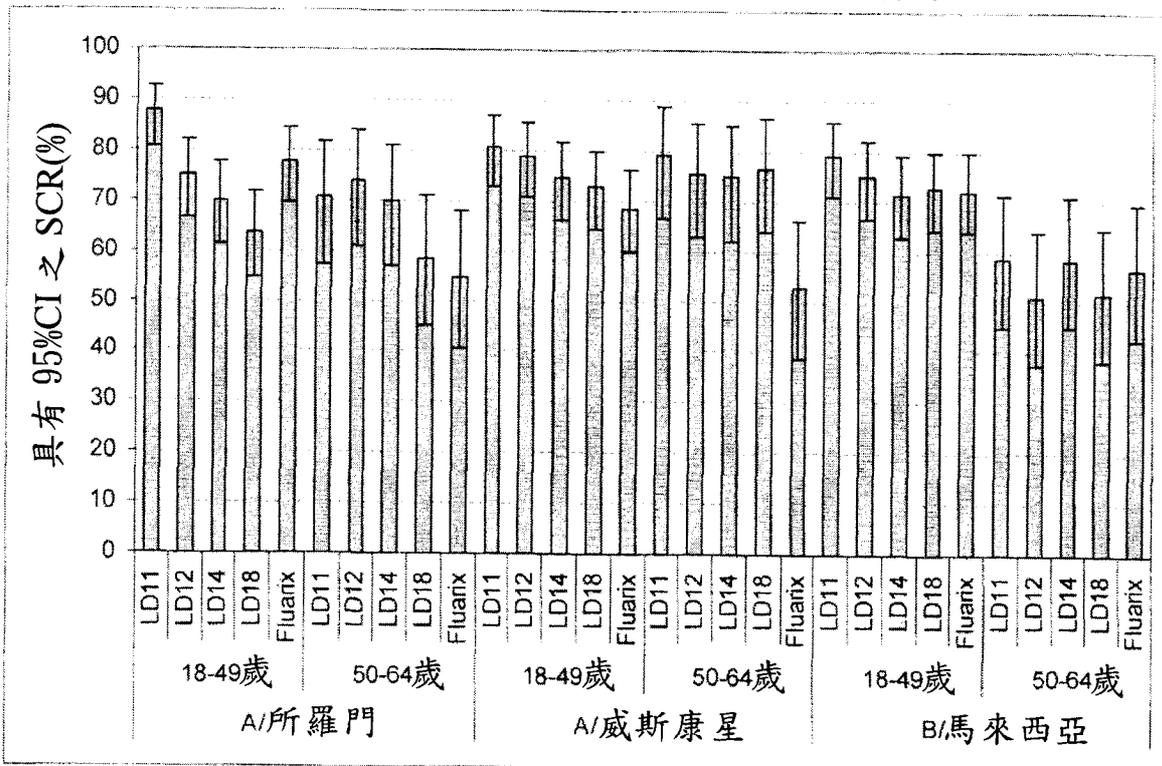


圖17B

在PI (第21天) 時之HI抗體效價之血清轉化因子 (SCF)

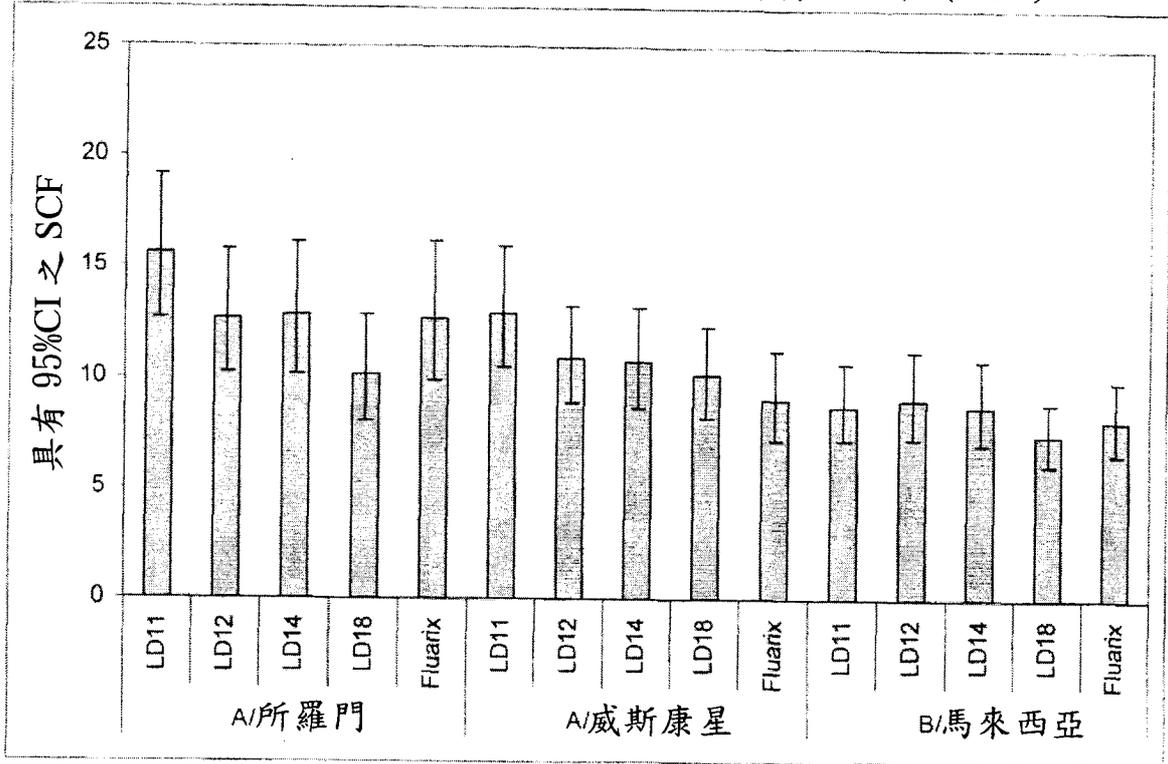


圖18A

在PI (第21天) 時按年齡分類之HI抗體效價的SCF

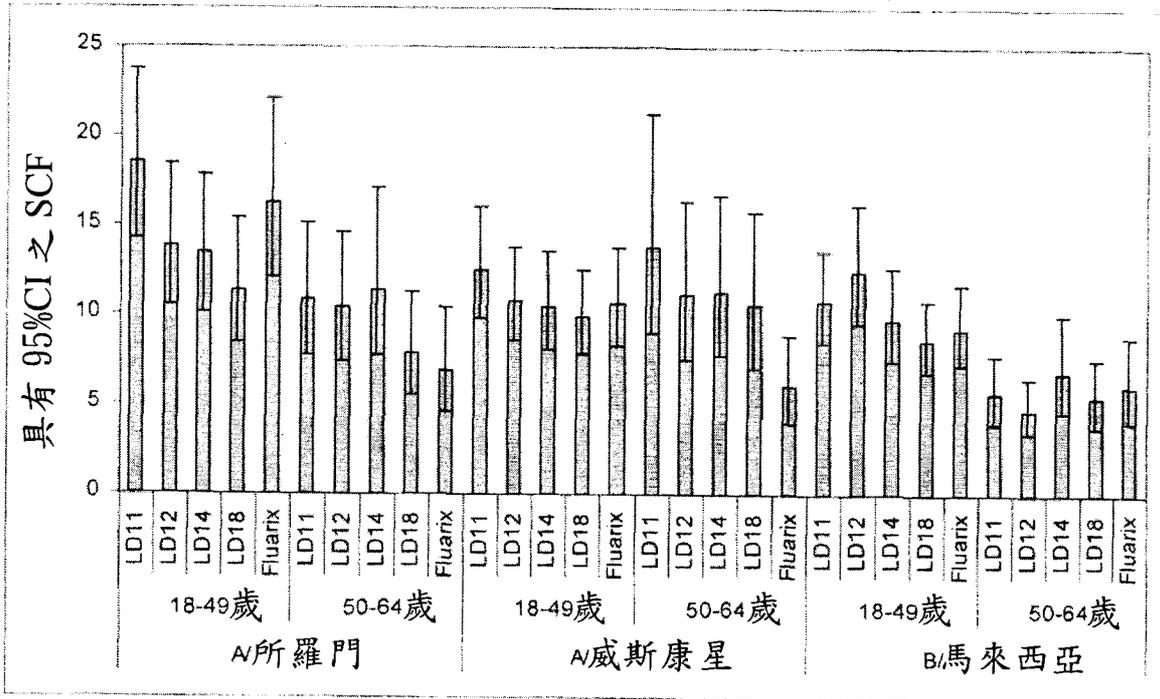


圖18B

在d0及d21時之HI抗體效價的GMT

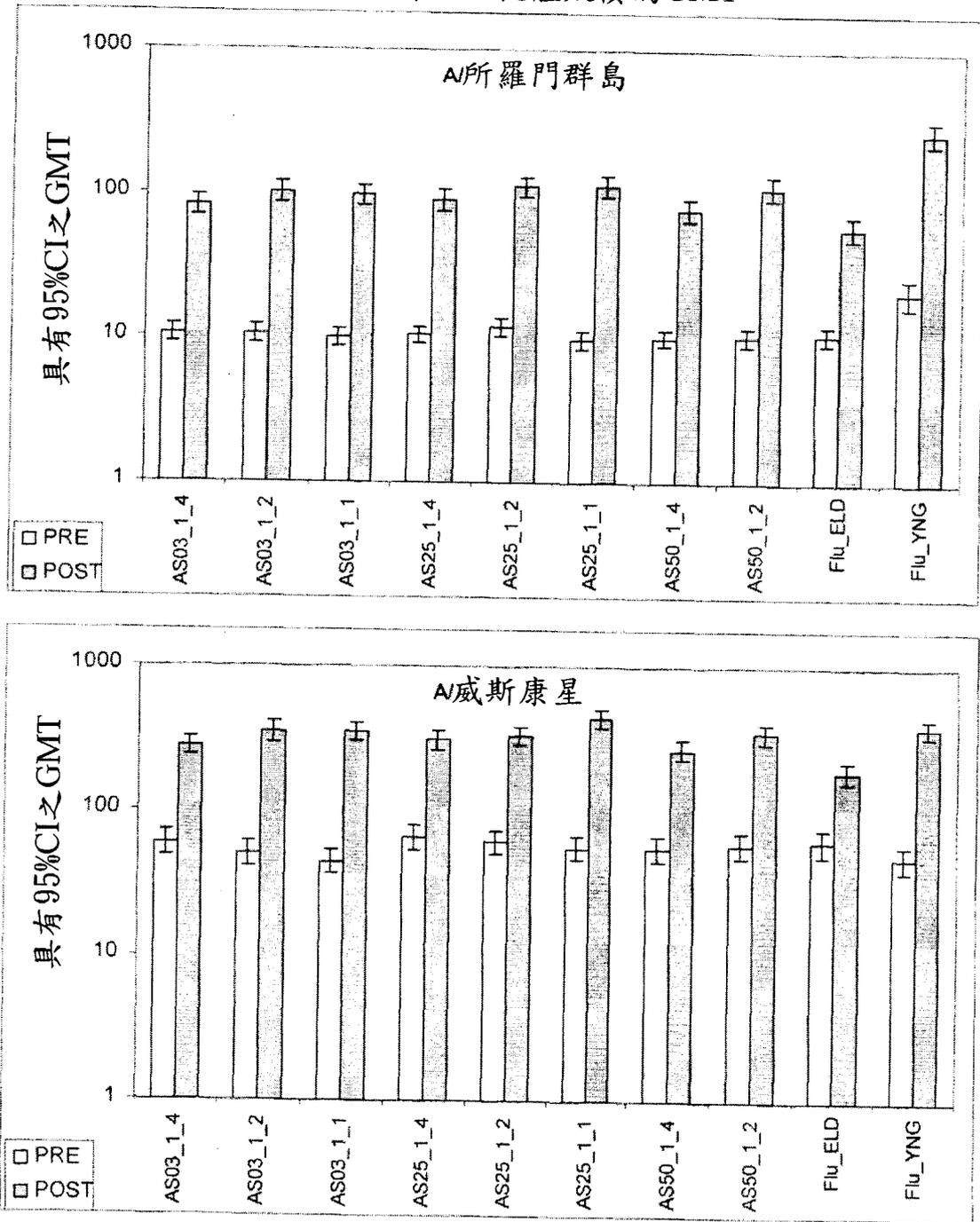


圖 19

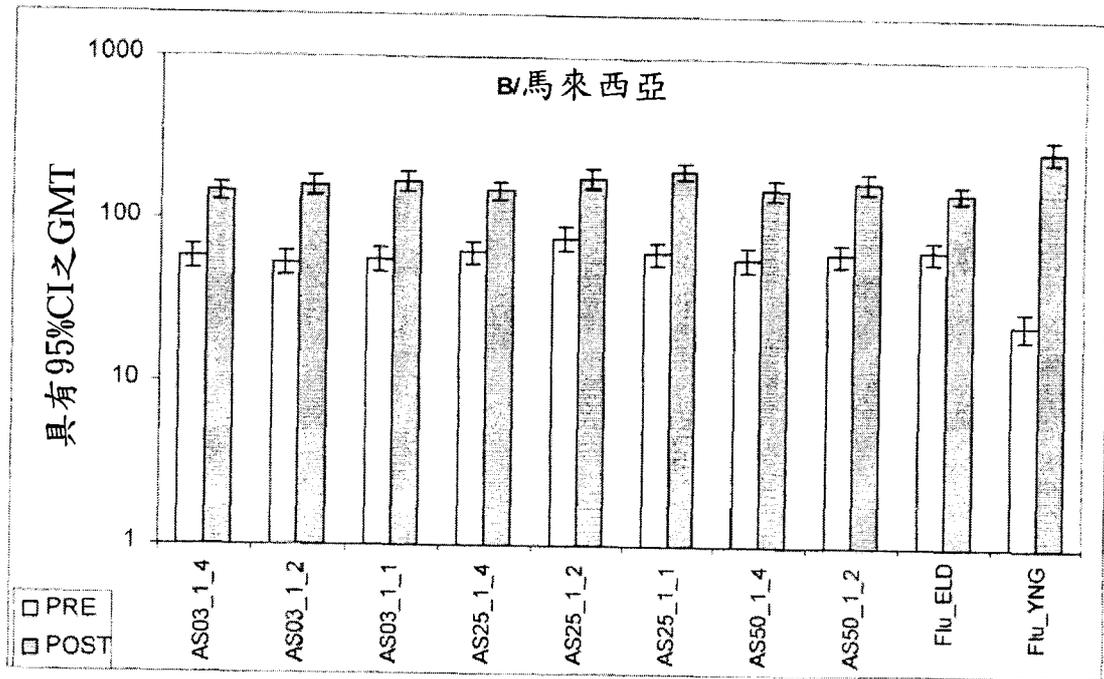


圖 19(續)

在第0天及第21天，具有95%信賴區間之HI抗體效價的SPR
 (免疫原性HI之ATP組)

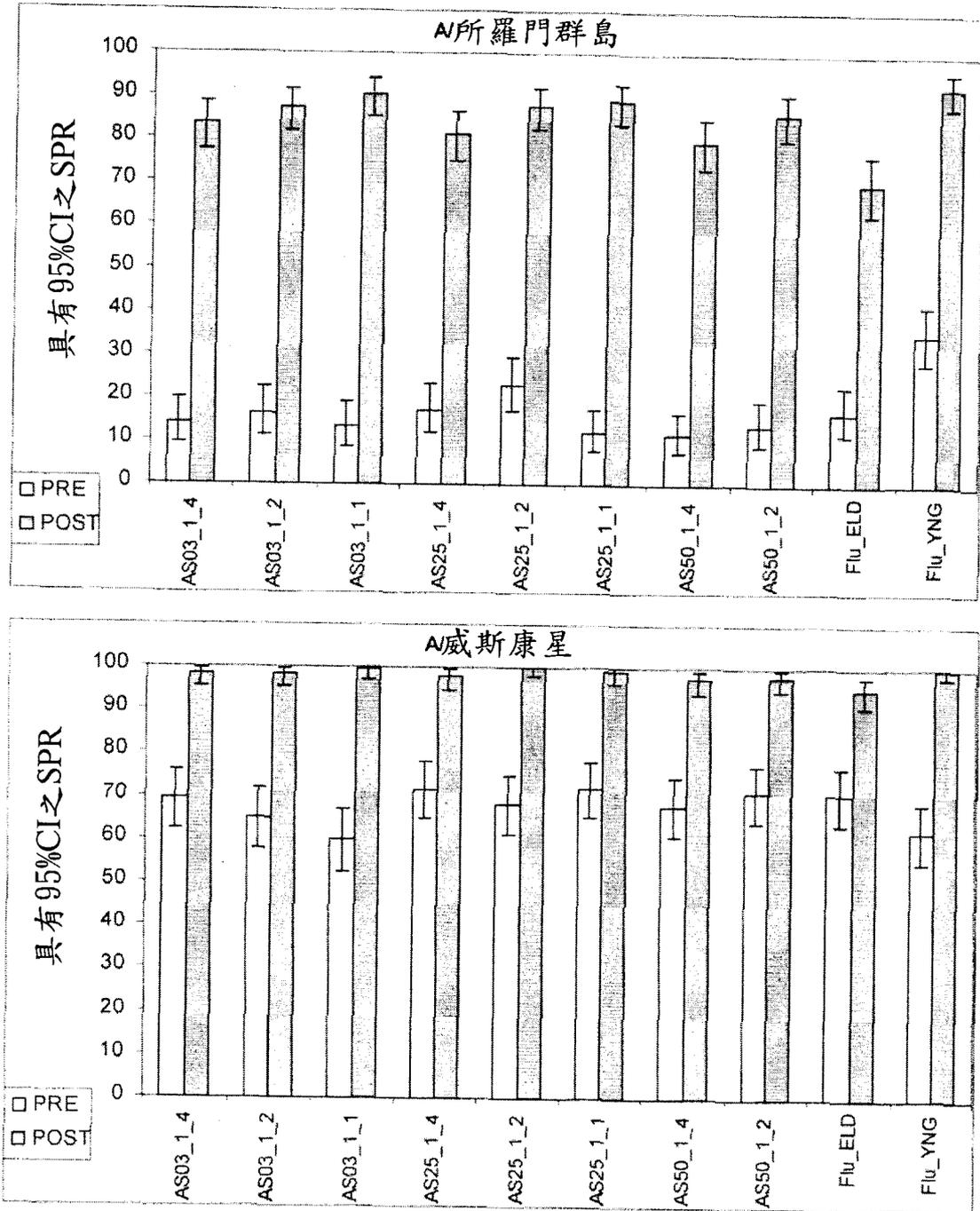


圖 20

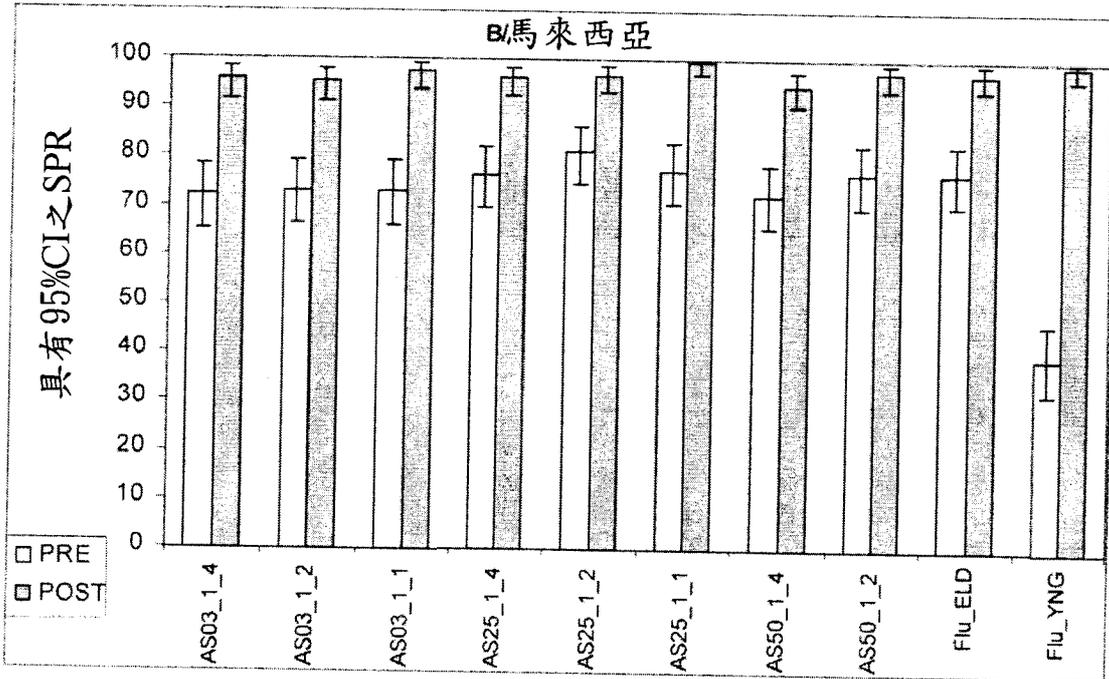


圖 20(續)

在PI (第21天) 時之HI抗體效價的血清轉化率 (SCR)

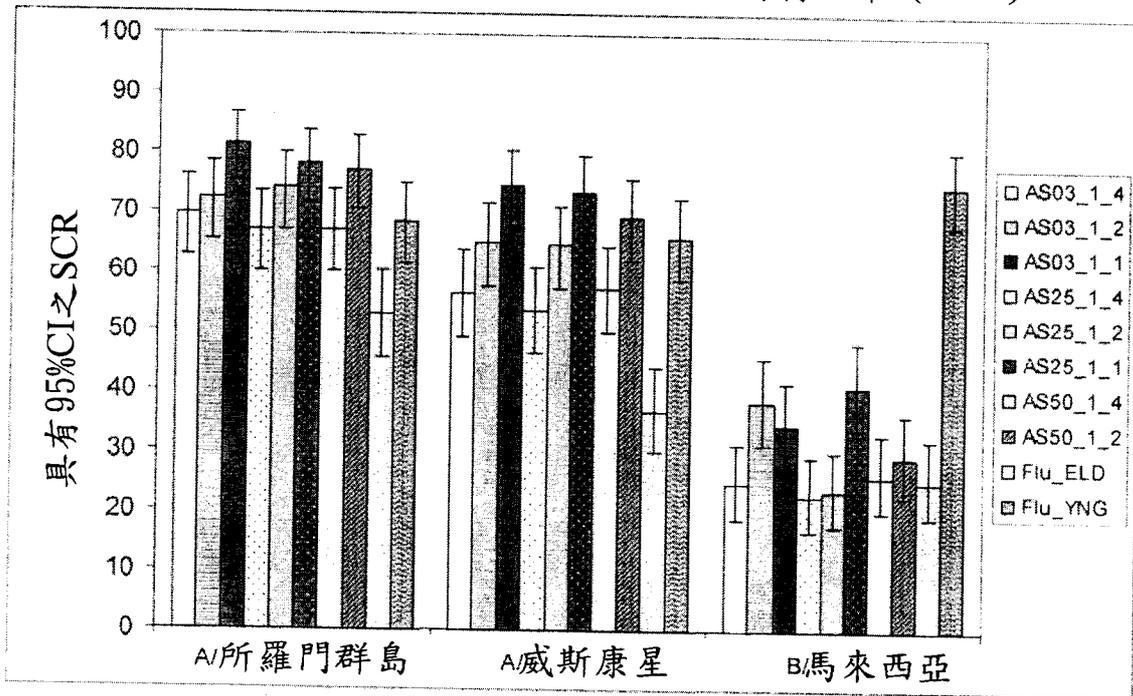


圖 21

在第21天時具有95% CI之HI抗體效價的SCF
(免疫原性HI之ATP組)

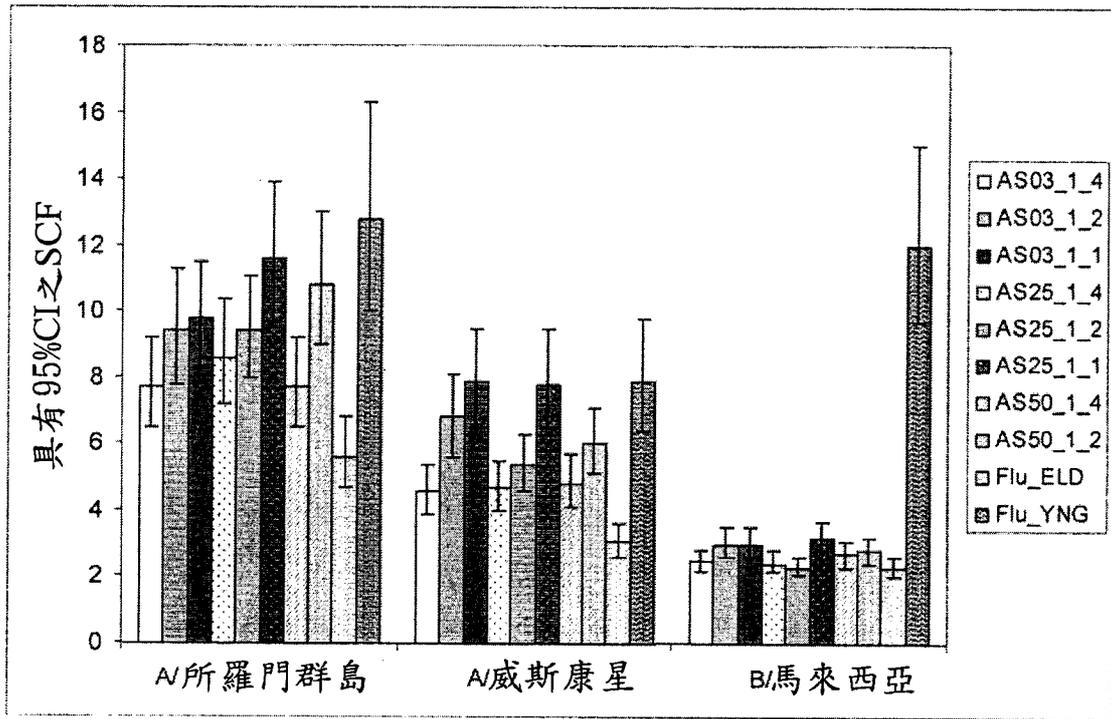


圖22

在 D0 及 D21 時之經彙集病毒株之細胞激
素陽性 CD4 T 細胞(CMI 之 ATP 組)

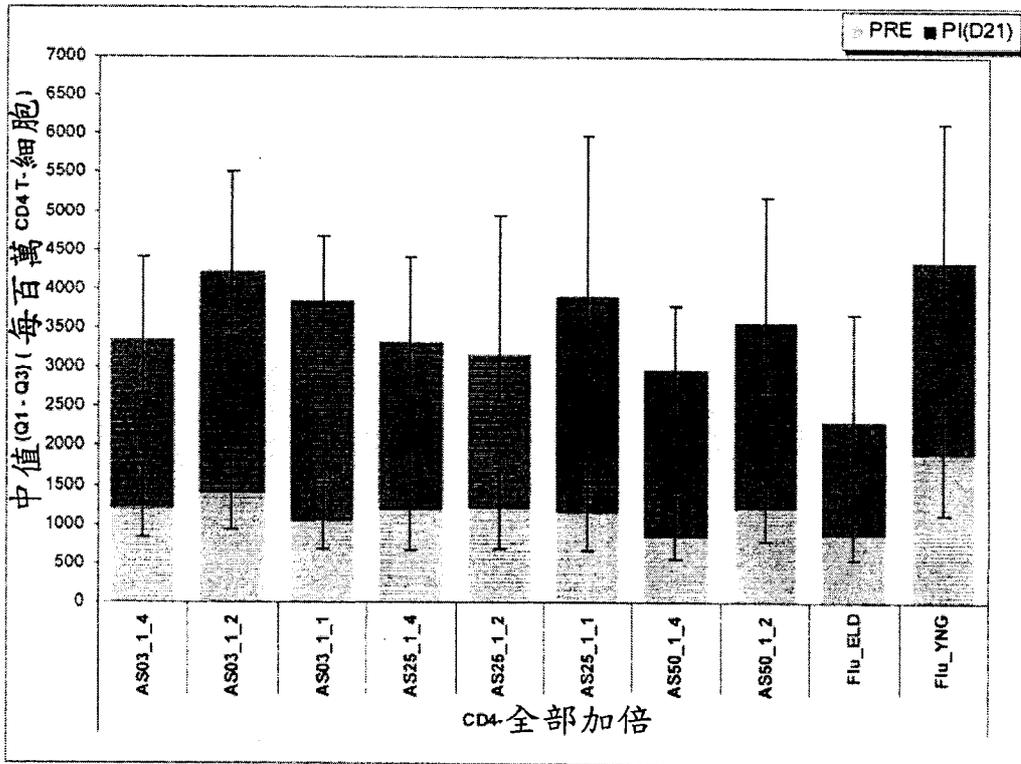


圖23

在疫苗接種後7天時期期間（第0 - 6天），報導相關請求及未經請求
 症狀（所有級別/ 3級）之受檢者的百分比（總疫苗接種組）

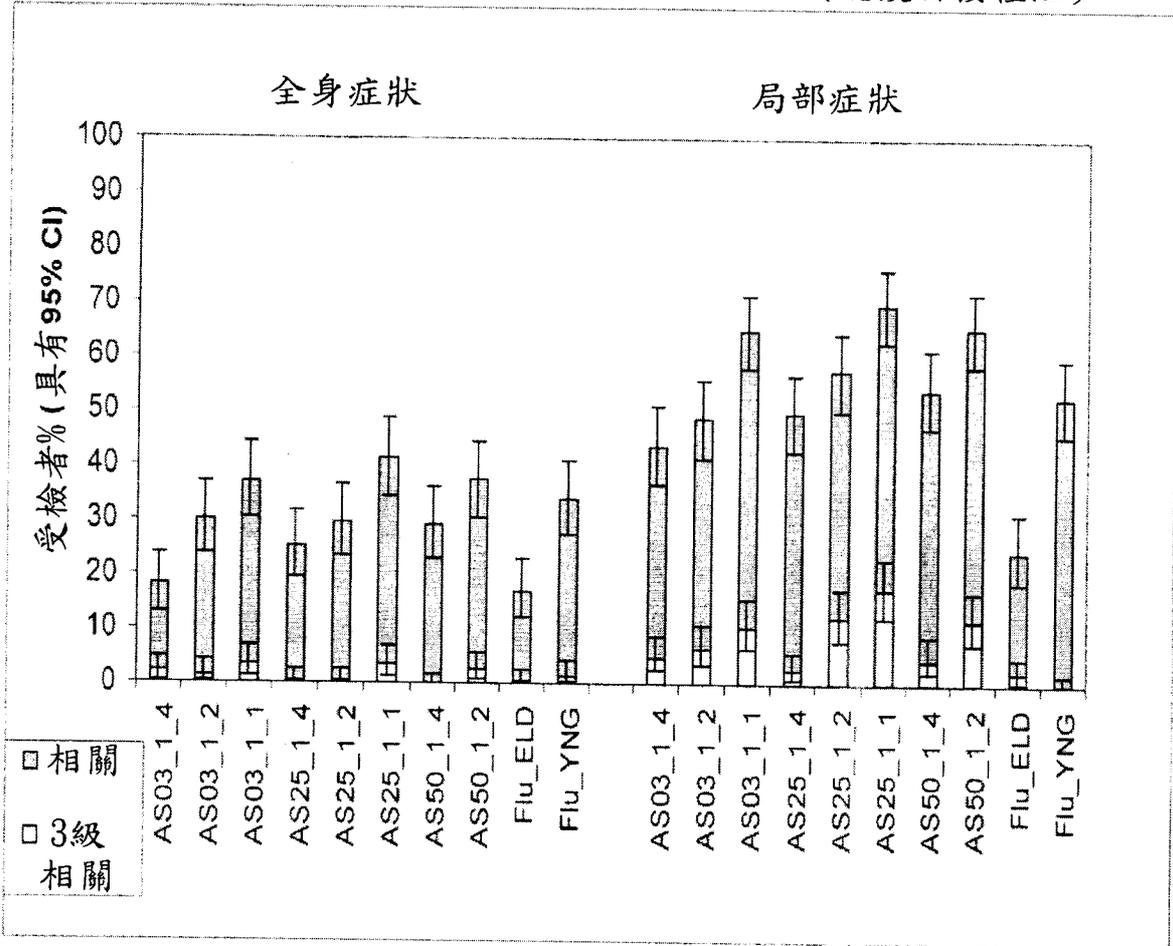


圖24

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)