



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102580077 A

(43) 申请公布日 2012.07.18

(21) 申请号 201210049536.3

代理人 李程达

(22) 申请日 2007.03.21

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

06111534.1 2006.03.22 EP

A61K 39/145(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

(62) 分案原申请数据

200780010217.9 2007.03.21

(71) 申请人 索尔瓦生物学有限公司

地址 荷兰韦斯普

(72) 发明人 A·J·克斯坦 L·杰勒兹

P·J·舍恩 J·J·P·璘塔

D·H·范蕾内科莱希思

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书 1 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

基于病毒颗粒的鼻内流感疫苗

(57) 摘要

本发明提供了流感病毒颗粒的组合物,所述病毒颗粒包含所述病毒的重构包膜,其中所述病毒包膜完全从流感病毒粒获得,其中没有从外源向重构病毒颗粒加入脂类,其中病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和/或神经氨酸酶或其衍生物,其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和/或免疫刺激剂,并且其中所述组合物作为鼻内或吸入给药制剂来设计,所述组合物特征在于所述制剂向人类的单次鼻内或吸入给药足以诱导抵抗所述流感抗原的全身性免疫应答和/或局部免疫应答和/或细胞毒性淋巴细胞应答,所述全身性应答能符合针对流感疫苗的 CHMP 标准,并且其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂量等于或低于 30 μ g。本发明还提供了重构的流感病毒颗粒用于制备所述组合物的用途,以及由此制备的疫苗制剂。

1. 用于向人类的单次鼻内或吸入给药以及能诱导抵抗流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶的全身和 / 或局部免疫应答的组合物, 所述组合物包含由所述病毒的重构包膜形成的流感病毒颗粒, 其中:

- 所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得,
- 没有从外源向所述重构病毒颗粒加入脂类,
- 所述病毒颗粒包含流感血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶,
- 每单次鼻内或吸入给药的每种病毒株的血细胞凝集素的剂量为 $5\mu\text{g}$ 至 $30\mu\text{g}$,

其特征在于没有向组合物中加入附加的佐剂和 / 或免疫刺激剂, 并且其中所述制剂的单次鼻内或吸入给药还能诱导细胞毒性淋巴细胞应答。

2. 根据权利要求 1 的组合物, 其中所述免疫应答符合针对流感疫苗的 CHMP 标准。

3. 根据权利要求 1 或 2 的组合物, 其中所述免疫应答提供了下述中一种或多种: 对于成年人 $> 70\%$ 和 / 或对于老年人 $> 60\%$ 的血清保护率, 对于成年人 $> 40\%$ 和 / 或对于老年人 $> 30\%$ 的血清转化率, 和对于成年人 > 2.5 和 / 或对于老年人 > 2.0 的平均倍数增加。

4. 由所述病毒的重构包膜形成的流感病毒颗粒在制备用于向人类的单次鼻内或吸入给药并且能诱导抵抗流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶的全身和 / 或局部免疫应答的组合物的用途, 所述组合物包含由所述病毒的重构包膜形成的流感病毒颗粒, 其中:

- 所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得,
- 没有从外源向所述重构病毒颗粒加入脂类,
- 所述病毒颗粒包含流感血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶,
- 每单次鼻内或吸入给药的每种病毒株的血细胞凝集素的剂量为 $5\mu\text{g}$ 至 $30\mu\text{g}$,

其特征在于没有向组合物中加入附加的佐剂和 / 或免疫刺激剂, 并且其中所述制剂的单次鼻内或吸入给药还能诱导细胞毒性淋巴细胞应答。

5. 根据权利要求 4 的用途, 其中所述免疫应答符合针对流感疫苗的 CHMP 标准。

6. 根据权利要求 4 或 5 的用途, 其中所述免疫应答提供了下述中一种或多种: 对于成年人 $> 70\%$ 和 / 或对于老年人 $> 60\%$ 的血清保护率, 对于成年人 $> 40\%$ 和 / 或对于老年人 $> 30\%$ 的血清转化率, 和对于成年人 > 2.5 和 / 或对于老年人 > 2.0 的平均倍数增加。

7. 根据权利要求 4 至 6 中任意一项的用途, 其中所述制备的组合物是疫苗制剂。

8. 包含根据权利要求 1 至 3 中任意一项的组合物的疫苗制剂。

9. 用于鼻内或吸入给药的包含根据权利要求 8 的所述疫苗制剂以及用于所述疫苗雾化的机制的装置。

10. 根据权利要求 9 的装置, 其中所述装置包含一定量用于单次鼻内或吸入给药的疫苗制剂。

11. 根据权利要求 9 或 10 的装置, 其中所述装置是一次性的。

基于病毒颗粒的鼻内流感疫苗

[0001] 本申请是申请日为 2007 年 3 月 21 日、申请号为 200780010217.9、发明名称为“基于病毒颗粒的鼻内流感疫苗”的中国专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及,例如,用于灭活流感疫苗的组合物以及给药方式,其中,单次鼻内或吸入给药获得了与临床保护正相关的全身性免疫应答。

[0003] 发明背景

[0004] 通过鼻内或口咽途径及使用灭活流感抗原针对流感进行免疫的多种设想已作为皮下或肌肉内免疫的非注射(无针头 needle-less)替代途径被研究。已在动物模型中产生了支持非注射手段的实验数据。得到动物数据支持的、使用灭活流感抗原(例如化学方式灭活的完整病毒粒子,或者被进一步加工的病毒组分,例如被切开的病毒,或者经纯化的表面抗原血细胞凝集素(HA)和/或神经氨酸酶(NA))经鼻内途径进行免疫的思路包括:使用佐剂或免疫刺激剂(immune stimulator)与灭活流感抗原组合,或者需要多次免疫。佐剂是能增强与其混合的抗原的免疫原性的任何物质。在人类中,通过鼻内途径抵抗流感的成功疫苗接种仅报道过:(a)活的(冷适应性的株)流感疫苗(FluMist™, MedImmune Vaccines Inc)(参考文献 1、2、3), (b)病毒颗粒型流感疫苗,其佐有大肠杆菌(E. coli)的热不稳定毒素(NasalFlu, Berna Biotech Ltd)(参考文献 4)或(c)使用高剂量抗原并且重复疫苗接种(参考文献 5、10、11)。虽然活疫苗能诱导满意的免疫应答,但其能变成活病毒的特定性质带来了额外的安全顾虑,而且由于需要在上呼吸道附近的病毒复制,因此有可能会诱导出副作用。此外,所需的贮藏条件也限制了这些产品的商业化。使用大肠杆菌 HLT 作为佐剂的鼻内流感疫苗与面瘫(Bell's Palsy)之间的强烈相关性导致佐有 HLT 的病毒颗粒疫苗从市场撤出(参考文献 6)。

[0005] 流感疫苗在给定人群中的疗效可通过下述方法来评估:评定与接种后产生的抗流感抗体的数量相关的免疫原性参数。这些免疫原性参数通常被称为 CHMP 标准,其用于对灭活流感疫苗进行每年重新许可认证(参考文献 7)。至今为止,通过使用灭活疫苗的一次单次鼻内施予,不加佐剂(其是疫苗中的附加成分,其不来自将用疫苗来预防的感染性试剂,并且是为了增强对抗原的免疫应答的目的被加入到疫苗制剂中),就符合这些免疫学要求或者 CHMP 标准(参考文献 7)的、对人类抵抗流感的成功免疫尚未有记载。因此,人们认识到,在本领域中仍有对下述灭活流感疫苗组合物的需求,所述组合物能在单次鼻内给药之后诱导满意的全身性免疫反应,并且不含佐剂,且通过所述单次给药能符合 CHMP 标准(参考文献 7)。

[0006] 所述“CHMP 标准”按照下文所述被定义。在 CHMP(Committee for Medicinal Products for Human Use)的 Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines 中,定义了下述血清学参数,以评定灭活流感疫苗的免疫原性:

[0007] - 血清保护率,其中血清保护被定义为红血球凝聚抑制(Haemagglutination Inhibition, HI)效价 ≥ 40 ,

[0008] - 血清转化率, 其中血清转化被定义为接种前 HI 效价 < 10 , 接种后 HI 效价 ≥ 40 , 或者, 接种前 HI 效价 ≥ 10 以及 HI 效价至少 4 倍的增加,

[0009] - 平均倍数增加值, 这是对受试者内增加的几何平均值 (即, 接种后 HI 效价 / 接种前 HI 效价)。

[0010] 针对流感疫苗免疫原性的 CHMP 要求是: 对于疫苗中三种病毒株中的每种而言, 符合下述标准中的至少一项:

[0011]

标准	成年人	老年人
血清保护率	$> 70\%$	$> 60\%$
血清转化率	$> 40\%$	$> 30\%$
平均倍数增加值	> 2.5	> 2.0

[0012] 本发明还适用于儿童, 从他们显示出, 他们以与成年人相当的方式作出免疫应答 (参考文献 8)。本发明还适用于老年受试者。老年人为超过 60 岁的。

[0013] 发明描述

[0014] 本发明涉及:

[0015] 1. 包含流感病毒颗粒的组合物, 所述病毒颗粒包含所述病毒的重构包膜, 其中所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得, 其中没有从外源向所述重构病毒颗粒加入脂类, 其中所述病毒颗粒包含所述流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物, 其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和 / 或免疫刺激剂, 并且其中所述组合物作为鼻内或吸入给药制剂来设计, 所述组合物特征在于所述制剂向人类的单次鼻内或吸入给药能诱导抵抗所述流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物的全身性免疫应答和 / 或局部免疫应答。

[0016] 2. 如项目 1 所述的组合物, 其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂量低于或等于 $30 \mu\text{g}$ 。

[0017] 3. 如项目 1 或 2 中任意一项所述的组合物, 其中所述制剂的单次鼻内或吸入给药还能诱导细胞毒性淋巴细胞应答。

[0018] 4. 如项目 1 至 3 中任意一项所述的组合物, 其中所述免疫应答符合针对流感疫苗的 CHMP 标准。

[0019] 5. 如项目 4 所述的组合物, 其中所述免疫应答提供下述中的一种或多种: 对成年人而言 $> 70\%$ 和 / 或对老年人而言 $> 60\%$ 的血清保护率, 针对成年人 $> 40\%$ 和 / 或针对老年人 $> 30\%$ 的血清转化率, 以及针对成年人 > 2.5 和 / 或针对老年人 > 2.0 的平均倍数增加。

[0020] 6. 如项目 2 至 5 中任意一项所述的组合物, 其中, 每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $25 \mu\text{g}$ 。

[0021] 7. 如项目 2 至 5 中任意一项所述的组合物, 其中, 每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $20 \mu\text{g}$ 。

[0022] 8. 如项目 2 至 5 中任意一项所述的组合物, 其中, 每种病毒株每次鼻内或吸入给药

的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $15\mu\text{g}$ 。

[0023] 9. 如项目 2 至 5 中任意一项所述的组合物, 其中, 每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $10\mu\text{g}$ 。

[0024] 10. 如项目 2 至 5 中任意一项所述的组合物, 其中, 每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $5\mu\text{g}$ 。

[0025] 11. 如项目 1 至 10 中任意一项所述的组合物, 其中, 所述组合物是包含用于鼻内或吸入给药的药物载体的疫苗制剂。

[0026] 12. 包含所述病毒的重构包膜的流感病毒颗粒用于制备用于鼻内或吸入给药的组合物的用途, 其中所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得, 其中没有从外源向所述重构病毒颗粒加入脂类, 其中所述病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物, 其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和 / 或免疫刺激剂, 所述组合物特征在于所述组合物向人类的单次鼻内或吸入给药足以诱导抵抗所述流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物的全身性免疫应答和 / 或局部免疫应答。

[0027] 13. 如项目 12 所述的用途, 其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂量等于或低于 $30\mu\text{g}$ 。

[0028] 14. 如项目 12 或 13 中任意一项所述的用途, 其中所述制剂的单次鼻内或吸入给药还诱导细胞毒性淋巴细胞应答。

[0029] 15. 如项目 12 至 14 中任意一项所述的用途, 其中所述免疫应答符合针对流感疫苗的 CHMP 标准。

[0030] 16. 如项目 15 所述的用途, 其中所述免疫应答提供下述中的一种或多种: 对成年人而言 $> 70\%$ 和 / 或对老年人而言 $> 60\%$ 的血清保护率, 针对成年人 $> 40\%$ 和 / 或针对老年人 $> 30\%$ 的血清转化率, 以及针对成年人 > 2.5 和 / 或针对老年人 > 2.0 的平均倍数增加。

[0031] 17. 如项目 13 至 16 中任意一项所述的用途, 其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $25\mu\text{g}$ 。

[0032] 18. 如项目 13 至 16 中任意一项所述的用途, 其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $20\mu\text{g}$ 。

[0033] 19. 如项目 13 至 16 中任意一项所述的用途, 其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $15\mu\text{g}$ 。

[0034] 20. 如项目 13 至 16 中任意一项所述的用途, 其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $10\mu\text{g}$ 。

[0035] 21. 如项目 13 至 16 中任意一项所述的用途, 其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 $5\mu\text{g}$ 。

[0036] 22. 如项目 12 至 21 中任意一项所述的用途, 其中制备的组合物是疫苗制剂。

[0037] 23. 包含流感病毒颗粒的组合物的疫苗制剂, 所述病毒颗粒包含所述病毒的重构包膜, 其中所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得, 其中没有从外源向重构病毒颗粒加入脂类, 其中病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物, 其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和 / 或免疫刺激剂, 该疫苗特征在于针对向人类的单次鼻内或吸入给药来设计所述疫苗, 并且其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂

量等于或低于 30 μg 。

[0038] 24. 如项目 23 所述的疫苗制剂,其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 25 μg 。

[0039] 25. 如项目 23 所述的疫苗制剂,其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 20 μg 。

[0040] 26. 如项目 23 所述的疫苗制剂,其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 15 μg 。

[0041] 27. 如项目 23 所述的疫苗制剂,其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 10 μg 。

[0042] 28. 如项目 23 所述的疫苗制剂,其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的剂量低于或等于 5 μg 。

[0043] 29. 如项目 23 至 28 中任意一项所述的疫苗制剂,其中所述制剂的单次鼻内或吸入给药能在所述人类中诱导免疫应答,所述免疫应答包括:抵抗流感抗原血细胞凝集素和/或神经氨酸酶或其衍生物的全身性免疫应答,抵抗流感抗原血细胞凝集素和/或神经氨酸酶或其衍生物的局部免疫应答,以及细胞毒性淋巴细胞介导的免疫应答中的一项或多项。

[0044] 30. 如项目 29 所述的疫苗制剂,其中所述免疫应答符合针对流感疫苗的 CHMP 标准。

[0045] 31. 如项目 30 所述的疫苗制剂,其中,所述免疫应答提供下述中的一种或多种:对成年人而言 > 70% 和/或对老年人而言 > 60% 的血清保护率,针对成年人 > 40% 和/或对老年人 > 30% 的血清转化率,以及针对成年人 > 2.5 和/或对老年人 > 2.0 的平均倍数增加。

[0046] 32. 用于鼻内或吸入给药的装置,所述装置包含根据项目 23 至 31 中任意一项所述的疫苗制剂。

[0047] 33. 如项目 32 所述的装置,其中,所述装置包含一定量的用于单次鼻内或吸入给药的疫苗制剂。

[0048] 34. 如项目 32 或 33 所述的装置,其中,所述装置是一次性的。

[0049] 令人吃惊地,与临床前啮齿类数据和关于人类临床经历的文献相反,我们发现,对于 18-60 岁年龄组而言,用包含重构流感病毒包膜的灭活流感疫苗进行单次鼻内接种后,人类的免疫应答符合针对流感疫苗疗效的全部三个 CHMP 标准。一次单次鼻内施予是:为符合针对灭活流感疫苗免疫原性的上述 CHMP 标准,通过一个或两个鼻孔进行疫苗制剂的接种,而无需重复施予疫苗制剂。一次单次疫苗施予(通过鼻、吸入、口服、皮下或肌肉途径)通常是下述接种安排,其不包括:在本领域作为初次(priming)和强化(boosting)而已知的、以数天或数周的时间间隔对疫苗的多次施予。被设计为鼻内或吸入给药制剂的制剂包含一种或多种活性组分和赋形剂的混合物,是按照允许鼻内或吸入给药的方式制备的。本发明提供了一种方法,用于诱导符合 CHMP 标准的全身性免疫应答(循环的免疫球蛋白或产生抗体的 B 细胞),有利地,所述方法用对病毒颗粒流感疫苗的单次鼻内或吸入给药来进行。本发明还提供了一种方法,用于诱导局部或粘膜免疫应答,所述应答包括粘膜膜表面上作为 IgA 已知的分泌免疫球蛋白的增加,有利地,所述方法用对病毒颗粒流感疫苗的单次鼻内或吸入给药来进行。鼻内施予之后对特异性 IgG 和 IgA 应答的诱导涉及鼻腔中淋巴组

织的活性（参考文献 12）。此类组织作为鼻相关淋巴组织（NALT）已知，其还被显示为用于细胞免疫应答的粘膜诱导位点（参考文献 13）。因为已知病毒颗粒具有诱导细胞内免疫应答的可能性（参考文献 14、15），因此本发明还提供了诱导特异性细胞毒性淋巴细胞（CTL）的方法。

[0050] 病毒颗粒（virosome）是含有病毒糖蛋白的脂质双层。通常通过用去垢剂从带包膜病毒提取膜蛋白和脂类，接着通过除去所述去垢剂来重构特征性双层来生产病毒颗粒。本发明还提供了流感病毒颗粒的组合物，其包含重构的流感病毒包膜（具体而言，不再加脂类，并且不加免疫刺激剂（通常称为佐剂）的免疫调节剂而重构），用于通过气溶胶进行接种，所述气溶胶通过一个或两个鼻孔施予鼻咽或口咽的粘膜，以获得抵抗流感的全身性和局部免疫性。通过吸入进行的单次施予也是可行的。单次口服粘膜施予也是可行的。

[0051] 可从灭活病毒来制备重构流感病毒颗粒，可以用不可透析的去垢剂对灭活病毒加以溶解，通过吸附到疏水珠粒上来除去所述去垢剂。制备物可包含一种或多种流感抗原的经过纯化的悬浮液，所述流感抗原选自血细胞凝集素（HA）、神经氨酸酶（NA）、血细胞凝集素的衍生物和神经氨酸酶的衍生物。可以在病毒脂类（含有低水平的内毒素和卵清蛋白）构成的膜中，对病毒膜蛋白血细胞凝集素和神经氨酸酶进行重构（见参考文献 9）。血清凝集素和 / 或神经氨酸酶的衍生物是具有经修饰的氨基酸序列和 / 或结构的血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶分子。氨基酸可例如被删除、替换或添加到序列中。此外，糖基化方式可被改变。衍生物保留有导入宿主时诱导免疫应答的能力。

[0052] 可在例如含有胚胎的鸡蛋中，或在附着的细胞或悬浮液中的细胞的细胞培养物中培养用于制备重构病毒颗粒的流感病毒。病毒例如可以是野生型的或重配的（reassortant）或经过遗传修饰的株。病毒类型可例如是任何流感 A 或 B 亚型，包括流行性的株。

[0053] 本发明还提供疫苗。术语疫苗应被理解为具有免疫活性的药物制备物。在某些实施方式中，疫苗可包含病原性微生物的无害变体或衍生物，例如，刺激免疫系统产生针对真实病原体的抵抗。在某些实施方式中，当疫苗施予宿主时例如能诱导适应性免疫。疫苗可含有病原体或病原体组分的已死亡或削弱形式，例如病原体的抗原性组分。疫苗制备物可还含有药物载体，所述药物载体可针对疫苗将被施予的特定模式加以设计，例如针对鼻内或吸入给药设计的药物载体。流感疫苗可包含一种或多种未变性流感抗原，其一种或多种能诱导流感特异的免疫应答。

[0054] 本发明提供了含流感病毒颗粒的组合物，所述流感病毒颗粒包含所述病毒的重构包膜，其中所述组合物被设计为鼻内或吸入给药制剂。本发明还提供了其中病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物的所述组合物。本发明还提供了其中病毒包膜完全从病毒粒子获得的所述组合物。本发明还提供了其中没有脂类从外源向重构病毒颗粒加入的所述组合物。本发明还提供了其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和 / 或免疫刺激剂的所述组合物。本发明还提供了其中对受试者的单次鼻内或吸入给药能诱导全身性免疫应答的所述组合物。本发明还提供了其中对受试者的单次鼻内或吸入给药还能诱导局部免疫应答的所述组合物。本发明还提供了对受试者的单次鼻内或吸入给药还能诱导细胞毒性淋巴细胞应答的所述组合物。本发明还提供了其中在人类中显示诱导全身性免疫应答和 / 或局部免疫应答和 / 或细胞毒性淋巴细胞应答的能力的所述组合物。本发明还

提供了其中免疫应答包含针对流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物的免疫应答的所述组合物。在一种优选的实施方式中,本发明还提供了其中免疫应答符合用于流感疫苗的 CHMP 标准的所述组合物。本发明还提供了其中免疫应答提供下述中的一种或多种的所述组合物:对成年人而言 > 70% 和 / 或对老年人而言 > 60% 的血清保护率,针对成年人 > 40% 和 / 或针对老年人 > 30% 的血清转化率,以及针对成年人 > 2.5 和 / 或针对老年人 > 2.0 的平均倍数增加。在一种特别优选的实施方式中,本发明还提供了其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂量等于或低于 30 μ g 的所述组合物。最后,本发明还提供了其中组合物是包含用于鼻内或吸入给药的载体疫苗的疫苗制剂的所述组合物。

[0055] 本发明还提供了包含所述病毒的重构包膜的流感病毒颗粒用于制备用于鼻内或吸入给药的组合物的用途。本发明还提供了这样的所述用途:其中,流感病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物。本发明还提供了这样的所述用途:其中病毒包膜完全从流感病毒粒子获得。本发明还提供了这样的所述用途:其中没有脂类从外源加入到重构病毒颗粒。本发明还提供了这样的所述用途:其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和 / 或免疫刺激剂。本发明还提供了这样的所述用途:其中向受试者的单次鼻内或吸入给药足以诱导全身性免疫应答。本发明还提供了这样的所述用途:其中向受试者的单次鼻内或吸入给药还诱导局部免疫应答。本发明还提供了这样的所述用途:其中向受试者的单次鼻内或吸入给药还诱导细胞毒性淋巴细胞应答。本发明还提供了这样的所述用途:其中接受给药的受试者是人类。本发明还提供了这样的所述用途:诱导的免疫应答包含针对流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物的免疫应答。在一种优选的实施方式中,本发明还提供了这样的所述用途,其中组合物诱导符合针对流感疫苗的 CHMP 标准的免疫应答。本发明还提供了这样的所述用途,其中免疫应答提供下述中的一种或多种:对成年人而言 > 70% 和 / 或对老年人而言 > 60% 的血清保护率,针对成年人 > 40% 和 / 或针对老年人 > 30% 的血清转化率,以及针对成年人 > 2.5 和 / 或针对老年人 > 2.0 的平均倍数增加。在一种特别优选的实施方式中,本发明还提供了这样的所述用途,其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的施予剂量等于或低于 30 μ g。最后,本发明还提供了其中制备的组合物是疫苗制剂的所述用途。

[0056] 因此,在一种实施方式中,本发明提供了包含所述病毒的重构包膜的流感病毒颗粒的组合物,其中所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得,其中没有从外源向重构病毒颗粒加入脂类,其中病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物,其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和 / 或免疫刺激剂,以及其中所述组合物作为鼻内或吸入给药制剂来设计,所述组合物特征在于所述制剂向人类的单次鼻内或吸入给药能诱导抵抗所述流感抗原的全身性免疫应答和 / 或局部免疫应答,所述全身性应答能符合用于流感疫苗的 CHMP 标准,以及其中,每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂量等于或低于 30 μ g。

[0057] 根据另一种实施方式,本发明提供了包含所述病毒的重构包膜的流感病毒颗粒用于制备用于鼻内或吸入给药的组合物的用途,其中所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得,其中没有从外源向重构病毒颗粒加入脂类,其中病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和 / 或神经氨酸酶或其衍生物,其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和 / 或免疫刺激剂,

所述流感病毒颗粒用于制备用于鼻内或吸入给药的组合物的用途的特征在于,所述组合物向人类的单次鼻内或吸入给药足以诱导抵抗所述流感抗原的全身性免疫应答和/或局部免疫应答,所述应答能符合针对流感疫苗的 CHMP 标准,以及其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂量等于或低于 $30 \mu\text{g}$ 。

[0058] 根据另一种实施方式,本发明提供了一种包含流感病毒颗粒的组合物的疫苗制剂,所述病毒颗粒包含所述病毒的重构包膜,其中,所述病毒包膜完全从流感病毒粒子获得,其中没有从外源向重构病毒颗粒加入脂类,其中病毒颗粒包含流感抗原血细胞凝集素和/或神经氨酸酶或其衍生物,其中没有向所述组合物加入单独的佐剂和/或免疫刺激剂,其中疫苗特征在于针对向人类的单次鼻内或吸入给药来设计疫苗,并且,其中每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素剂量等于或低于 $30 \mu\text{g}$ 。有利地,所述制剂的所述单次鼻内或吸入给药能在所述人类中诱导全身性和/或局部免疫应答。根据本发明还提供了包含一定量的用于单次鼻内或吸入给药的所述疫苗制剂的装置。

[0059] 每种病毒株每次鼻内或吸入给药的血细胞凝集素的根据本发明的应用剂量还可以低于或等于 $25 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $15 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ 或 $5 \mu\text{g}$ 。

[0060] 引用的文献

[0061] (1)Maassab HF. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25°C , Nature 213, 612-14 (1967)

[0062] (2)Maassab HF. Bryant ML. The development of live attenuated cold-adapted influenza virus vaccine for humans. Rev. Med. Virol. 1999 Oct-Dec ;9(4) :237-44

[0063] (3)Keitel W, Piedra PA. Live cold-adapted, reassortant in influenza vaccines(USA). In: Textbook of Influenza. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (Ed), Blackwell Science Oxford, UK, 373-390 (1998)

[0064] (4)Gluck U, Gebbers JO, Gluck R, Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli heat-labile toxin in adult volunteers. J Virol. 1999 Sep ;73(9) :7780-6

[0065] (5)Samdal HH, Bakke H, Of tung F, Holst J, Haugen IL, Korsvold GE, Kristoffersen AC, Krogh G, Nord K, Rappuoli R, Berstad AKH, Haneberg B, Anon-Living Nasal Influenza Vaccine Can Induce Major Humoral and Cellular Immune Responses in Humans without the Need for Adjuvants. Human Vaccines 1 : 2, 85-90 ;March/April 2005

[0066] (6)Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Spyr C, Steffen R. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. N Engl J Med, 2004 Feb 26 ;350(9) :896-903

[0067] (7)Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines. EMEA/CpMP/BWP/214/96

[0068] (8)Daubeney, P., Taylor, C. J., McGaw, J., Brown, Brown, E. M., Ghosal, S., Keeton, B. R., Palache, B., Kerstens, R. Immunogenicity and tolerability of a trivalent influenza subunit vaccine(InfluvacR) in high-risk children aged 6 months to 4 years. BJCP 1997 March, 51(2) :87-90

- [0069] (9) Stegmann, T., Morselt, H. W. M., Booy, F. P., Van Breemen, J. F. L., Scherphof, G., Wilschut, J. Functional reconstitution of influenza virus envelopes. *EMBO Journal* 1987, 6(9) :2651-2659
- [0070] (10) Treanor J, Nolan C, O'Brien D, Burt D, Lowell G, Linden J, Fries L. Intranasal administration of a proteosome-influenza vaccine is well-tolerated and induces serum and nasal secretion influenza antibodies in healthy human subjects. *Vaccine* 2006 ;24(3) :254-62
- [0071] (11) Read R. C., Naylor S. C. Potter C. W., Bond J., Jabbal-Gill I., Fisher A., Illum L., Jennings R. Effective nasal influenza vaccine delivery using chitosan. *Vaccine* 2005 ;23(35) :4367-74
- [0072] (12) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DM, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestein AM, van Breda Vriesman PJ, Sminia T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 1992;13 :219-24
- [0073] (13) Zuercher AW, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ. Nasal-associated lymphoid tissue is mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *J. Immunol.* 2002 168 : 1796-803
- [0074] (14) Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM, Wilschut J. The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine* 2005 23(Suppl 1) :S26-38
- [0075] (15) Glück R, Burri KG, Metcalfe I, Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes. *Curr. Drug Deliv.* 2005;2 :395-400

实施例

[0076] 实施例 1 在 8 周龄的 BALB/C 小鼠中的 LPP 病毒颗粒疫苗 ; 次优 HA 剂量水平上, 对多种 HA/LPP 比例的鼻内比较

[0077] 流感血清阴性雌性 Balb/c 小鼠组成的组 (每组 10 只) 通过鼻内施予获得 LPP (脂肽) - 病毒颗粒疫苗, 其 HA/LPP 比例为 1 : 1.5、1 : 0.7、1 : 0.4、1 : 0 (即没有 LPP), 并且每份剂量具有 2 μ g 的 HA。此外, 10 只雌性小鼠的对照组接受 0 μ g HA/ 剂量 (载体的鼻内施予)。

[0078] 制备含有 LPP 的病毒颗粒的四种制备物。简言之, 通过离心对 30-40% 蔗糖溶液中的灭活流感病毒进行沉淀。重新悬浮病毒, 溶解于含有去垢剂八聚乙二醇单十二烷基醚 (Octaethylene glycol monododecyl ether) (OEG) 的缓冲液中。随后, 通过超离心除去病毒核壳体。将含有 OEG 的上清液分为 4 等分体积, 加入不同量的含 OEG 缓冲液中的脂肽 P3CSK4 (P3CSK4 : N-棕榈酰-S-[2,3-双 (棕榈酰氧)-(2RS)-丙基]-[R]-半胱氨酰-[S]-丝氨酰-[S]-赖氨酰-[S]-赖氨酰-[S]-赖氨酰-[S]-赖氨酸)。用含 OEG 的缓冲液调节体积。通过吸附到疏水树脂上除去 OEG。这导致了含 LPP 的病毒颗粒的形成, 一种在它们膜中含有 HA 和 NA 以及 (可选地) 在它们膜中含有 LPP 的重构的病毒小泡。OEG 去除之后, 将病毒颗粒经孔径为 0.22 μ m 的 PVDF 膜过滤。

[0079] 起始原料为 20mg 的 HA, 其来自甲型流感 /Wyoming/3/2003X-147(类 A/Fujian/411/200(H3N2) 株), 含有 252I. U. 内毒素 /100 μ g HA。溶解后, 按照表 1 所概述的制备 4 批。

[0080] 表 1 病毒颗粒的制备

[0081]

批次	作为起始原料的 HA 的量 (mg)	加入的 P3CSK4 的量 (mg)	HA/LPP 比例
VIR-2004-11	5	7.5	1:1.5
VIR-2004-12	5	3.5	1:0.7
VIR-2004-13	5	2.0	1:0.4
VIR-2004-14	5	0	1:0

[0082] 载体由 5mM Hepes、145mM NaCl、1mM EDTA(pH 7.4) 构成。对组 E(见表 2) 来说, 将载体经孔径为 0.22 μ m 的 PVDF 膜过滤。按照表 2 所述, 针对鼻内免疫, 将制备的 4 批病毒颗粒稀释至 200 μ g/ml 的浓度, 针对肌肉免疫, 稀释至 67 μ g/ml 的浓度, 分装进 1ml 的小瓶(每组 2 瓶)。按照表 4 所概述的来使用这些疫苗组。

[0083] 表 2 疫苗的制备

[0084]

组号	制备
A	VIR-2004-11
B	VIR-2004-12
C	VIR-2004-13
D	VIR-2004-14
E	载体*

[0085] *载体: 经孔径为 0.22 μ m 的 PVDF 膜的 5mM Hepes、145mM NaCl、1mM EDTA(pH 7.4) 过滤。

[0086] 对制剂的分析

[0087] 针对表 3 所示的若干种变量来分析用于本研究的制剂。

[0088] 表 3 对于用于制备疫苗的病毒颗粒的分析数据

[0089]

待分析物	VIR-2004-11	VIR-2004-12	VIR-2004-13	VIR-2004-14
蛋白质 (mg/ml) ^a	1.7	1.6	1.5	1.4
HA (μg/ml) ^b	776	759	697	757
磷脂 (mmol/l) ^c	0.658	0.692	0.658	0.682
内毒素 (每 100 μg HA 的 I.U.) ^d	3.1	1.5	1.9	1.0
卵清蛋白 (每 100 μg HA 的 μg) ^e	0.047	0.050	0.055	0.050
纯度 ^f	主要是 HA	主要是 HA	主要是 HA	主要是 HA

[0090] ^aLowry 试验,原理:用碱式硫酸铜和 Folin-ciocalteu 酚试剂处理之后,蛋白质形成蓝色。使用白蛋白 BSA 标准作为参考,从 750nm 处的吸光度来测定蛋白质含量。

[0091] Lowry, OH, NJ Rosebrough, AL Farr, and RJ Randall. J. Biol. Chem. 193 : 265. 1951.

[0092] Oostra, GM, NS Mathewson, and GN Catravas. Anal. Biochem. 89 :31. 1978.

[0093] Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. Methods in Enzymology 182 : 50-69 (1990).

[0094] Hartree, EF. Anal Biochem 48 :422-427 (1972).

[0095] ^bPhEur :专题文章 2053 和 2.7.1 节

[0096] ^c原理:每个磷脂含有单个磷原子,其可用于对磷脂进行定量。通过高氯酸来破坏磷脂,通过钼酸盐络合产生的磷酸盐/酯,钼酸盐被抗坏血酸还原产生蓝色的产物。用分光光度计在 812nm 处测定颜色。通过包括磷酸校准物来对样品中磷脂的量加以定量。

[0097] Ames BN. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Meth. Enzymol. 1966 ;8 :115-118

[0098] **Böttcher** CJF, van Gent CM & Pries C. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. Anal. Chim. Acta 1961 ;24 :203-204

[0099] ^dPh. Eur. 2.6.14

[0100] ^e卵清蛋白 ELISA 是直接的三明治式酶免疫方法,其中使用用于捕捉的固定的多克隆抗卵清蛋白抗体以及抗卵清蛋白-HRP 结合物作为检测系统。对结合物和样品进行同时培养。通过洗涤步骤去除未结合的组分。将底物 (TMB 和 H₂O₂) 加入到孔中。通过蓝色的显色来指示孔中特异性结合的结合物的存在。向底物中加入硫酸来终止反应,其导致产物中颜色变化为黄色。在 450nm 读取吸光度 (OD)。为获得最优结果,在 620nm 处使用参照滤光器。从试验中包括的卵清蛋白标准 (0.3-20.0ng/ml) 的应答来建立标准曲线。未知样品的浓度从标准曲线内插来读取。

[0101] ^f根据专题文章 0869 和 2053:通过聚丙烯酰胺凝胶电泳来检查单价合并的 (monovalent pooled) 收集物的纯度。电泳:按照 Ph. Eur 2.2.31 来进行。

[0102] 测试系统

[0103] 测试动物

[0104] 使用七组动物, 每组十只雌性 Balb/c 小鼠 (BALB/cAnNCr1)。

[0105] 在处理的一开始, 小鼠为 8-9 周龄, 重量为 17-19g。

[0106] 在第 0 天和第 14 天用单价 LPP 病毒颗粒流感疫苗 (A/Wyoming) 对动物进行鼻内接种, 在第二次接种后 21 天进行尸体检查。

[0107] 鼻内: 在背部轻度异氟烷 /O₂/N₂O 麻醉的动物中鼻内接种测试物质 (10 μ l, 分成两个鼻孔上进行)。

[0108] 表 4 处理安排

[0109]

组号	施予途径	疫苗制剂	雌性编号	动物编号
A	鼻内	2 μ g HA, HA/LPP 比例为 1 : 1.5	10	01-10
B	鼻内	2 μ g HA, HA/LPP 比例为 1 : 0.7	10	11-20
C	鼻内	2 μ g HA, HA/LPP 比例为 1 : 0.4	10	21-30
D	鼻内	2 μ g HA, HA/LPP 比例为 1 : 0	10	31-40
E	鼻内	2 μ g HA, HA/LPP 比例为 0 : 0	10	41-50

[0110] 在第一次接种之前以及第一次接种 14 天之后, 在异氟烷 /O₂/N₂O 麻醉下收集眼窝血样。第 35 天, 处死动物, 收集血样 (在 O₂/CO₂ 麻醉下通过腹部大动脉或心脏穿刺放血)。收集来自全部样品的血清, 深度冷冻, 于低于 -10°C 贮存在聚丙烯管中直到进行处理。

[0111] 流感病毒使红血球细胞 (RBCs) 凝集, 在存在足够的病毒特异性抗体时这会被阻止。该现象提供了血细胞凝集抑制 (HI) 试验的基础, 该试验被用于探测和定量血清中的特异性抗病毒抗体。将血清加入到流感病毒和火鸡 RBCs 中。对若干稀释液加以测试 (效价分析)。HI 效价被定义为仍能抑制血细胞凝集的最高稀释度的倒数。按下文所述来计算几何平均值效价 (GMT) :

[0112] 1) 对各个 $\log(\text{效价})$ 进行计算, 得到两次重复的算术平均值 :

[0113] $[\log(\text{效价}_1) + \log(\text{效价}_2)] / 2$

[0114] 2) 计算各个 $\log(\text{效价})$ 的算术平均值

[0115] 3) $\text{GMT}_{(\text{组})} = 10^{\text{EXP}(\text{组平均值 } \log(\text{效价}))}$

[0116] 统计学分析

[0117] 通过接种组和天数, 使用几何平均值效价来概括 HI 效价。通过线性回归来分析经 $\log$ 转化的第 35 天组的 HI 效价, 以研究疫苗中 LPP 的量与 GMT 之间的剂量应答关系。

[0118] 结果

[0119] HI 效价分析

[0120] GMT 示于表 5 中。

[0121] 表 5 几何平均值效价

[0122]

组	施予途径	HA/LPP 比例	第 0 天	第 14 天	第 35 天
A	鼻内	1: 1.5	5	8	415
B	鼻内	1: 0.7	5	6	161
C	鼻内	1: 0.4	5	7	97
D	鼻内	1: 0	5	7	12
E	鼻内	0: 0	5	5	5

[0123] 第 0 天, 在小鼠中不能探测到 HA 特异性抗体 (即, 所有 HI 效价 < 10)。

[0124] 第 14 天, 在通过鼻内途径 (i. n.) 接种的小鼠中的大多数中不能探测到 HA 特异性抗体。所有效价 ≤ 10 , 除了组 A 中的一只小鼠 (HI 效价 :80)、组 C 中的一只小鼠 (HI 效价 :35) 和组 D 中的一只小鼠 (HI 效价 :160) 之外。

[0125] 第 35 天, 观察到了 HA 特异性抗体产生中的剂量应答, 即, 向疫苗中加入更多的 LPP 导致更高的抗体效价。

[0126] 通过线性回归在组间比较 (经 log 转换的) 第 35 天的 HI 效价。拟合的回归斜率有高度显著差异 ($P < 0.0001$)。因此, 观察到的疫苗中的 LPP 含量与 GMT 之间的剂量应答关系在统计上是显著的。

[0127] 结论:

[0128] 用无佐剂的重构流感病毒颗粒对小鼠进行重复鼻内接种不诱导可被测量到的全身性免疫应答。以同样 HA 剂量水平 ($2 \mu\text{g HA/剂量}$), 采用上升的 LPP 剂量, 用佐以 LPP 的重构流感病毒颗粒进行的重复鼻内接种显示出了 LPP 剂量依赖型免疫应答。与本发明完全相反 (见下面的实施例 2), 这些数据之前被认为支持本领域的公认结论, 即, 使用免疫刺激剂 (在这种情况下 LPP) 对于用灭活流感疫苗进行鼻内接种是必要的, 即使流感抗原 (HA) 存在于重构病毒颗粒中。

[0129] 实施例 2 双盲、随机、平行的组研究, 以研究脂肽佐剂的安全性及其对于病毒颗粒亚基流感疫苗疗效的效果 (在年龄 ≥ 18 和 ≤ 40 的健康年轻成年人中鼻内运送之后)

[0130] 用含有每株 150mcg HA/mL 和 315mcg LPP/mL 的、佐有 LPP (脂肽) 的重构流感病毒颗粒以 0.2ml 的剂量体积 (每个鼻孔 0.1ml) 对健康人类志愿者进行鼻内接种。用含有每株 150mcg HA/mL 的、没有 LPP 的重构流感病毒颗粒以 0.2ml 的剂量体积 (每个鼻孔 0.1ml) 对类似的组进行鼻内接种。研究目的是在男人中验证小鼠中展示的观点, 即, 为在用灭活流感疫苗进行鼻内接种后获得满意的全身性免疫应答, 需要使用佐剂 (例如 LPP)。

[0131] 研究设计:

[0132] 这是在年龄 ≥ 18 和 ≤ 40 的健康年轻受试者中进行的双盲、随机平行组研究。该研究在一个研究中心进行: Swiss Pharma Contract Ltd., 瑞士巴塞尔。主要的研究者是 M. Seiberling 博士。研究具有两个部分。在部分 I 中, 在 12 名受试者中评定佐有 LPP 的病毒颗粒亚基流感疫苗的安全性。用 LPP-RVM (LPP 重构的病毒膜; 流感疫苗 - 表面抗原, 灭活的, 病毒颗粒 - 佐有 LPP) 接种九名受试者, 用 RVM (流感疫苗 - 表面抗原, 灭活的, 病

毒颗粒-)来接种三名受试者。在研究的部分 II 中,在一百名受试者中(每组 50 名)评定 LPP-RVM 的疗效和安全性。

[0133] 研究在健康受试者中进行。此外,在研究开始前三年期间,参与研究的部分 II 的受试者都没有针对流感进行接种。这通过尽量减小具有预先存在的针对流感的抗体的受试者的数目,增加了部分 II 中研究人群的均一性。

[0134] 部分 I:

[0135] 在接种前 14 天(第 1 次访问),在所述受试者已经给出知情同意后,针对包括和排除标准对他或她加以筛选,并对他或她进行身体检查。在该次就诊中,采集鼻上皮细胞的样品用于细胞学分析,用糖精试验来测量基线纤毛(cilia)活性。

[0136] 在第 2 次就诊(第 1 天),取 4-6mL 血样,用于标准血液学分析,取 6-10mL 血样用于标准生物化学分析,并评定生命体征。经过随机化后,用两种疫苗制剂之一来接种受试者,在接种之后受试者就地停留第一个 24 小时,以监测立即产生的局部和全身性反应以及不良事件。在接种后第四和二十四小时评定生命体征。此外,24 小时后,取两份血样用于标准血液学(4-6mL)和生物化学(6-10mL)分析;接种后,采集鼻上皮细胞的样品用于细胞学分析,用糖精试验进行接种后纤毛活性分析。向受试者发放调查问卷(调查问卷 I),让他们带回家,评定下一天(第 3 天)的局部和全身性反应。

[0137] 受试者必须在他们被释放回家后两周回到研究点;第 3 次就诊(第 4 天)。在该次就诊中,评定局部和全身性反应,记录前次和本次就诊之间发生的任何自发不良事件。此外取两份血样用于标准血液学(4-6mL)和生物化学(6-10mL)分析,并评定生命体征。

[0138] 在第一次接种后两周,在第 15 天,所述受试者回到研究点(第 4 次访问)。在该次就诊中,收集鼻上皮细胞的样品用于细胞学分析,用糖精试验测量纤毛活性,记录第 3 次就诊和第 4 次就诊间发生的不良事件。

[0139] 部分 II:

[0140] 在第一次采血和鼻洗出物(wash)采样前 14 天(第 1 次访问),在所述受试者已经给出知情同意后,针对包括和排除标准对他或她加以筛选,通过身体检查来检测他或她的健康。

[0141] 在第 2 次就诊(-1 天;该就诊可以与第 1 次就诊合并进行),取 6-10mL 血样用于基线血细胞凝集抑制(HI)效价测定,并且取血样进行标准血液学(4-6mL)和标准生物化学(6-10mL)分析。收集鼻洗出物样品用于测定基线鼻 IgA 抗体效价。

[0142] 下一天,在第 3 次就诊(第 1 天),在对生命体征的评定之后,对所述受试者进行随机化,用鼻流感疫苗的两种制剂之一的单一剂量进行接种。在接种后的第一个小时中,就地监测任何立即的局部反应、全身性反应和不良事件。之后,重新评定生命体征,受试者获得调查问卷带回家,在接种后的第一个七天,记录每天的局部和全身性反应。

[0143] 两周后(第 4 次就诊;第 15 天),取 6-10mL 血样用于 HI 效价测定,取两份额外血样用于标准血液学(4-6mL)和生物化学(6-10mL)分析,取鼻洗出物样品用于鼻 IgA 抗体效价分析。

[0144] 效果评定

[0145] 为评定效果,在第 -1 天(基线)和第 15 天收集血样和鼻洗出物样品。

[0146] 血样

[0147] 收集 6-10mL 血,以测定血细胞凝集抑制 (HI) 抗体效价。¹ 血液收集和凝固之后 (室温下至少 30 分钟),分离血清,并保持冷冻 (-20℃),直到进行效价分析。以双份重复进行抗体效价分析。样品的效价是两次测定的几何平均值。接种前和接种后的血清被同时进行效价分析。

[0148] 鼻洗出物样品

[0149] 为收集鼻洗出物样品,于一个鼻孔,在鼻镜检查控制下,应用 6mL 预热的盐水 (37℃)。所述受试者被要求将头倾 60° 角,使得洗液可以流动。收集的洗液应用于第二个鼻孔,其在相同的条件下被洗涤。向样品中加入防腐溶液 (样品体积的 1/100)。防腐溶液含有 10mg/ml 溶解于 100mM Tris HCl 缓冲液中的牛血清白蛋白, pH 8。通过低速离心 (800xg, 10 分钟) 来直接澄清样品,将其分为小份 (以避免今后对样品的重复解冻),将其放置在干冰上,直到转移进 -80℃。

[0150] 通过 ELISA 来测定鼻洗涤样品中的 IgA 水平,用 Wilcoxon 试验来进行统计分析。流感疫苗在 96 孔板中被用作包被抗原。通过与封闭缓冲液一起温育来封闭非特异性结合位点。将鼻洗出物以封闭缓冲液两倍稀释 (每份样品 12 份稀释液),用于将流感特异性抗体吸附到 96 孔板的抗原上。在与酶结合的抗人抗体 (结合有马辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶) 一起温育之前对 96 孔板加以洗涤。通过洗涤除去未结合的抗人抗体,通过在加入用于酶反应的底物之后测量光密度来测定流感株特异性抗体的量。

[0151] 疫苗制剂

[0152] 两种不同的流感疫苗制剂用于本项研究。两种制剂都含有 WHO 为 2005 年南半球推荐的病毒抗原²,其剂量水平为每 0.2ml 的剂量每株 30mcg。

[0153]

[0154] 1 Palmer DF, Dowdle WR, Coleman MT, Schild GC. 血细胞凝集反应抑制实验. 用于流感诊断的先进的实验室技术. U. S. Dept. Hlth. Ed. Welfare, P. H. S. Atlanta; 1975: 25-62

[0155] 2 WHO 推荐的用于 2005 年流感季节的流感病毒疫苗组合物. Weekly Epidem Rec. 2004; 79: 369-376

[0156] -A/New Caledonia/20/99/(H1N1) 样株

[0157] -A/Wellington/1/2004(H3N2) 样株

[0158] -B/Shanghai/361/2002 样株

[0159] 简言之,通过离心对 30-40% 蔗糖溶液中的灭活流感病毒进行沉淀。重新悬浮病毒,溶解于含有去垢剂,八聚乙二醇单十二烷基醚 (OEG) 的缓冲液中。随后,通过超离心除去病毒核壳体。用含 OEG 缓冲液中的脂肽 P3CSK4 来调节含 OEG 的上清液,或者在不含 LPP 的重构病毒膜的情况下,仅用含 OEG 的缓冲液来调节 (P3CSK4 :N- 棕榈酰 -S-[2,3- 双 (棕榈酰氧)-(2RS)- 丙基]-[R]- 半胱氨酰-[S]- 丝氨酰-[S]- 赖氨酰-[S]- 赖氨酰-[S]- 赖氨酰-[S]- 赖氨酸)。通过吸附到疏水树脂上除去 OEG。这导致了含 LPP 或不含 LPP 的病毒膜 (在膜中含有 HA 和 NA 以及可选地在膜中含有 LPP 的重构病毒小泡) 的形成。OEG 去除之后,将病毒颗粒经孔径为 0.22 μm 的 PVDF 膜过滤。

[0160] 对于病毒的每种株而言,制备具有或不具有 LPP 的单独的制备物 (表 6)。加入的 LPP 的量相应于 1 : 0.7 (w/w) 的 HA/LPP 比例。

[0161] 表 6 病毒颗粒的制备

[0162]

批次	LPP	病毒株
VIR-2005-09	存在	乙型流感 /Jiangsu/10/2003
VIR-2005-11	存在	甲型流感 /New Caledonia/20/1999 IVR-116 重配株
VIR-2005-13	存在	甲型流感 /Wellington/1/2004IVR-139 重配株
VIR-2005-10	不存在	乙型流感 /Jiangsu/10/2003
VIR-2005-12	不存在	甲型流感 /New Caledonia/20/1999IVR-116 重配株
VIR-2005-14	不存在	甲型流感 /Wellington/1/2004IVR-139 重配株

[0163] 表 7 对制剂的分析

[0164]

待分析物	VIR- 2005-09	VIR- 2005-10	VIR- 2005-11	VIR- 2005-12	VIR- 2005-13	VIR- 2005-14
蛋白质 (mg/ml) ^a	1.51	1.54	1.86	1.83	1.37	1.18
HA (μg/ml) ^b	805	854	711	784	704	644
磷脂 (mmol/l) ^c	0.494	0.563	0.820	1.03	0.717	0.695
内毒素 (每 100 μg HA 的 I.U.) ^d	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.5
卵清蛋白 (每 100 μg HA 的 μg) ^e	0.068	0.088	0.037	0.036	0.132	0.126
纯度 ^f	主要是 HA	主要是 HA	主要是 HA	主要是 HA	主要是 HA	主要是 HA

[0165] ^aLowry 试验,原理:用碱式硫酸铜和 Folin-ciocalteu 酚试剂处理之后,蛋白质形成蓝色。使用白蛋白 BSA 标准作为参考,从 750nm 处的吸光度来测定蛋白质含量。

[0166] Lowry, OH, NJ Rosebrough, AL Farr, and RJ Randall. J. Biol. Chem. 193 : 265. 1951.

[0167] Oostra, GM, NS Mathewson, and GN Catravas. Anal. Biochem. 89 :31. 1978.

[0168] Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. Methods in Enzymology 182 : 50-69 (1990).

[0169] Hartree, EF. Anal Biochem 48 :422-427 (1972).

[0170] ^bPhEur :专题文章 2053 和 2.7.1 节

[0171] ^c原理:每个磷脂含有单个磷原子,其可用于对磷脂进行定量。通过高氯酸来破坏磷脂,通过钼酸盐络合产生的磷酸盐/酯,钼酸盐被抗坏血酸还原产生蓝色的产物。用分光光度计在 812nm 处测定颜色。通过包括磷酸校准物来对样品中磷脂的量加以定量。

[0172] Ames BN. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Meth. Enzymol. 1966 ;8 :115-118

[0173] **Böttcher** CJF, van Gent CM & Pries C. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. Anal. Chim. Acta 1961 ;24 :203-204

[0174] ^dPh. Eur. 2. 6. 14,

[0175] ^e卵清蛋白 ELISA 是直接的三明治式酶免疫方法,其中使用用于捕捉的固定的多克隆抗卵清蛋白抗体以及抗卵清蛋白-HRP 结合物作为检测系统。对结合物和样品进行同时培养。通过洗涤步骤去除未结合的组分。将底物 (TMB 和 H₂O₂) 加入到孔中。通过蓝色的显色来指示孔中特异性结合的结合物的存在。向底物中加入硫酸来终止反应,其导致产物中颜色变化为黄色。在 450nm 读取吸光度 (OD)。为获得最优结果,使用 620nm 处的参照滤光器。从试验中包括的卵清蛋白标准 (0.3-20.0ng/ml) 的应答来制备标准曲线。未知样品的浓度从标准曲线内插来读取。

[0176] ^f根据专题文章 0869 和 2053 :通过聚丙烯酰胺凝胶电泳来检查单价合并的收集物的纯度。电泳 :按照 Ph. Eur 2. 2. 31 来进行。

[0177] 效果

[0178] 通过 Wilcoxon' s 排名总和试验以 0.05 的双侧显著水平,在两个接种组之间对第 15 天每种病毒株的经 log 转化的 HI 抗体效价与第 15 天的鼻 IgA 抗体效价加以比较。

[0179] 还通过对每种病毒株和每个接种组计算下述三个参数来分析第 15 天的 HI 抗体效价。

[0180] - 血清保护率,其中血清保护被定义为红血球凝聚抑制 (HI) 效价 ≥ 40 ,

[0181] - 血清转化率,其中血清转化被定义为接种前 HI 效价 < 10 ,接种后 HI 效价 ≥ 40 ,或者,接种前 HI 效价 ≥ 10 以及 HI 效价至少 4 倍的增加,

[0182] - 平均倍数增加,即所述 HI 效价倍数增加的几何平均值。

[0183] 根据 per-protocol 和意向治疗 (intent-to-treat) 的原理对效果数据加以分析。但是,鉴于这是所谓的原理验证型研究,per-protocol 分析被认为是基本的一种。意向治疗的样本由被接种受试者的一些接种后效果数据组成。per-protocol 样本由完成了方案并且没有发生主要的方案偏差的被接种受试者组成。主要的偏差包括 (不限于):包含或排除标准的偏差,禁药使用等。此外,实验室验证的并发流感感染的受试者以及失去了基本效果数据的受试者也被从 per-protocol 样品中排除。在研究数据库非盲之前,决定是否将受试者从 per-protocol 中排除。

[0184] 结果

[0185] 表 8 决定是否将受试者从 per-protocol 中排除。用病毒颗粒流感疫苗 (RVM) 进行鼻内接种后对体液免疫应答的 CHMP 评估

[0186]

血清保护率							
统计学		A (H3N2) 样		A (H1N1) 样		B 样	
		LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM
		(N=48)	(N=43)	(N=48)	(N=43)	(N=48)	(N=43)
接种后 (第 15 天)							
血清保护							
是	n (%)	48 (100%)	42 (97.7%)	41 (85.4%)	38 (88.4%)	35 (72.9%)	35 (81.4%)
否	n (%)	0	1 (2.3%)	7 (14.6%)	5 (11.6%)	13 (27.1%)	8 (18.6%)
总数	n	48	43	48	43	48	43

[0187] RVM:病毒颗粒流感疫苗

[0188] LPP-RVM:佐有脂肽的病毒颗粒流感疫苗

[0189] 表 8 用病毒颗粒流感疫苗 (RVM) 进行鼻内接种后对体液免疫应答的 CHMP 评估
(续)

[0190]

血清转化率							
统计学		A (H3N2) 样		A (H1N1) 样		B 样	
		LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM
		(N=48)	(N=43)	(N=48)	(N=43)	(N=48)	(N=43)
接种后 (第 15 天)							
血清转化							
是	n (%)	37 (77.1%)	25 (58.1%)	25 (52.1%)	33 (76.7%)	24 (50.0%)	22 (51.2%)
否	n (%)	11 (22.9%)	18 (41.9%)	23 (47.9%)	10 (23.3%)	24 (50.0%)	21 (48.8%)
总数	n	48	43	48	43	48	43

[0191] RVM:病毒颗粒流感疫苗

[0192] LPP-RVM:佐有脂肽的病毒颗粒流感疫苗

[0193] 表 8 用病毒颗粒流感疫苗 (RVM) 进行鼻内接种后对体液免疫应答的 CHMP 评估
(续)

[0194]

HI 抗体效价的平均倍数增加值						
统计学	A (H3N2) 样		A (H1N1) 样		B 样	
	LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM
	(N=48)	(N=43)	(N=48)	(N=43)	(N=48)	(N=43)
接种后 (第 15 天)						
平均倍数增加						
n	48	43	48	43	48	43
平均值*	12.14	8.52	4.78	10.07	3.64	4.51
注: *几何平均值						

[0195] RVM:病毒颗粒流感疫苗

[0196] LPP-RVM:佐有脂肽的病毒颗粒流感疫苗

[0197] 表 9 鼻洗出物 IgA 效价 (GMT)

[0198]

	H3N2		H1N1		B	
	LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM	LPP-RVM	RVM
	N=48	N=43	N=48	N=43	N=48	N=43
第 1 天	93.88	96.45	80.93	85.97	65.84	55.21
第 15 天	104.51	126.96	89.16	96.94	87.93	102.10

[0199] 结论

[0200] 出人意料地并与用同样的疫苗批次的得的临床前数据 (实施例 1) 以及 WO 04/110486 和临床数据所描述的 (Gluck U, Gebbers JO, Gluck R, Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli heat-labile toxin in adult volunteers. J Virol. 1999 Sep;73(9):7780-6) 相反, 在用无佐剂的重构病毒颗粒流感疫苗仅进行一次接种的人类群体中, 观察到了令人满意的、符合针对流感疫苗的 CHMP 标准的全身性免疫应答。

(54) Title: INTRANASAL INFLUENZA VACCINE BASED ON VIROSOMES

(57) Abstract: The present invention provides a composition of influenza virosomes comprising reconstituted envelopes of said virus, wherein the viral envelopes are entirely derived from influenza viral particles, wherein no lipid is added from an external source to the reconstituted virosomes, wherein the virosomes comprise the influenza antigens haemagglutinin and/or neuraminidase or derivatives thereof, wherein no separate adjuvant and/or immune stimulator is added to the composition, and wherein the composition is for intranasal or inhalational administration, which composition is characterized in that a single intranasal or inhalational administration to a human being is sufficient for the induction of a systemic immune response and/or a local immune response and/or a cytotoxic lymphocytes response against said influenza antigens, which systemic response is in accordance with the CHMP criteria for influenza vaccine, and wherein the dose of haemagglutinin per viral strain per intranasal or inhalational administration is lower than or equal to 30 µg. The invention also provides the use of reconstituted influenza virosomes for the manufacture of said composition, and accordingly manufactured vaccine formulations.