

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780017932.5

[51] Int. Cl.

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

C07K 14/11 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 6 月 3 日

[11] 公开号 CN 101448523 A

[22] 申请日 2007.3.23

[21] 申请号 200780017932.5

[30] 优先权

[32] 2006.3.24 [33] EP [31] 06251602.6

[86] 国际申请 PCT/IB2007/001149 2007.3.23

[87] 国际公布 WO2007/110776 英 2007.10.4

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.17

[71] 申请人 诺华疫苗和诊断有限两合公司

地址 德国马尔堡

[72] 发明人 H·舍弗兹克

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陶家蓉

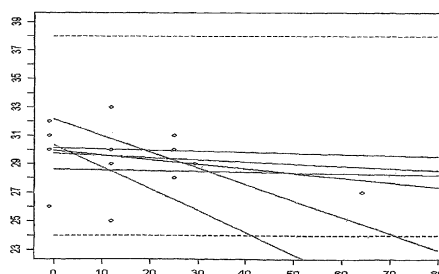
权利要求书 3 页 说明书 43 页 附图 4 页

[54] 发明名称

无需冷藏储存流感疫苗

[57] 摘要

来自个体流感病毒株的抗原在组合以制造多价流感病毒疫苗之前无需冷藏。此外，流感疫苗在包装和给药之间无需冷藏。因此，对冷藏的需求被最小化，且在疫苗制造和给药之间无需维持冷链。



1. 一种储存水性流感疫苗的方法，包括将疫苗在 10℃ 以上储存超过 10 周 的步骤。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述疫苗是原料疫苗。
3. 如权利要求 2 所述的方法，还包括从原料中提取单位剂量疫苗并将该单 位剂量置入容器内的步骤。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述疫苗是包装的疫苗。
5. 一种销售多份包装的水性流感疫苗的方法，包括在非冷藏条件下将疫苗 从第一地点运输到第二地点的步骤。
6. 一种销售原料水性流感疫苗的方法，包括在非冷藏条件下将疫苗从第一 地点移动到第二地点的步骤。
7. 如权利要求 6 所述的方法，还包括从原料中提取单位剂量疫苗并将该单 位剂量置于容器内的步骤。
8. 如权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于，所述原料是单价原料。
9. 如权利要求 6 或 7 所述的方法，其特征在于，所述原料是多价原料。
10. 如上述任意一项权利要求所述的方法，其特征在于，所述第一和第二 地点相隔 1 公里以上。
11. 一种销售多份包装的水性流感疫苗的方法，包括将疫苗从第一地点运 输到第二地点的步骤，且其中所述疫苗在非冷藏条件下在所述第二地点储存至 少 100 小时。
12. 一种从疫苗原料制备包装的水性疫苗的方法，包括在非冷藏条件下从 原料中取出单位剂量的疫苗并置于容器内的步骤。
13. 一种稀释浓缩的流感抗原原料的方法，包括在非冷藏条件下用水性介 质稀释浓缩原料的步骤。
14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述原料是单价原料。
15. 如权利要求 14 所述的方法，还包括将所述稀释的抗原与一种或多种其 他流感病毒株的抗原混合的步骤，从而提供多价组合物。
16. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述原料是多价原料。

17. 一种制备多价流感疫苗的方法, 包括在非冷藏条件下将包含第一流感病毒株抗原的水性制剂与包含第二流感病毒株抗原的水性制剂混合的步骤。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其特征在于, 将三种毒株的抗原混合以得到三价流感疫苗。

19. 一种将包含流感病毒的组合物灭活的方法, 其特征在于, 该方法包括在非冷藏条件下将所述组合物与灭活剂混合的步骤。

20. 一种制备含佐剂的流感病毒疫苗的方法, 包括在非冷藏条件下将流感病毒抗原与佐剂混合的步骤。

21. 一种通过上述任一权利要求所述方法可获得的或者获得的疫苗。

22. 一种药盒, 其中装有: (a) 含有至少一种流感病毒株的血凝素的水性疫苗, 和(b)标明该疫苗可以(i)在非冷藏条件下储存和/或(ii)在室温储存的书面材料。

23. 一种已经在非冷藏条件下储存至少 100 小时的水性流感病毒疫苗, 前提是, 该疫苗不是(i)包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Yamanashi/166/98 的三价疫苗; (ii)包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Guangdong/120/00 的三价疫苗; 或(iii)包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Shangdong/7/97 的三价疫苗。

24. 一种已经在非冷藏条件下储存至少 100 小时的水性流感病毒疫苗, 其特征在于, 所述疫苗是从生长在细胞培养物中的流感病毒制备的。

25. 一种已经在非冷藏条件下储存至少 100 小时的水性流感病毒疫苗, 其特征在于, 所述疫苗不含鸡 DNA、卵清蛋白和卵类黏蛋白。

26. 一种已经在非冷藏条件下储存至少 100 小时的水性流感病毒疫苗, 其特征在于, 所述疫苗不含汞。

27. 一种已经在非冷藏条件下储存至少 100 小时的水性流感病毒疫苗, 其特征在于, 所述疫苗是裂解病毒颗粒疫苗、完整的病毒颗粒疫苗、活病毒疫苗或病毒体疫苗。

28. 一种含有至少一种流感病毒株的血凝素的水性疫苗, 其特征在于, 当

所述疫苗在 25℃ 储存时，血凝素的降解速率低于 33%/年/毒株。

29. 流感病毒抗原在制造由执业医师给予患者的药物中的应用，其特征在于，所述药物在药物制造和被执业医师收到之间无需冷藏。

30. 流感病毒抗原在制造由执业医师给予患者的药物中的应用，其特征在于，所述药物在被执业医师收到和给予患者之间无需冷藏。

31. 一种将流感病毒疫苗给予患者的方法，其特征在于，在给药前 24 小时内，该疫苗已在非冷藏条件下储存至少 12 小时。

32. 一种将流感病毒疫苗给予患者的方法，其特征在于，该疫苗在非冷藏条件下储存至少 12 小时后再给予患者。

33. 如上述任一权利要求所述的方法、疫苗或应用，其特征在于，所述疫苗从生长在细胞培养物中的病毒制备。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其特征在于，所述细胞培养物在选自下组的细胞系上：MDCK；CHO；293T；BHK；Vero；MRC-5；PER.C6；或 WI-38。

35. 如上述任一权利要求所述的方法、疫苗或应用，其特征在于，所述疫苗包含去污剂。

36. 如上述任一权利要求所述的方法、疫苗或应用，其特征在于，所述疫苗从灭活病毒制备。

37. 如权利要求 36 所述的方法、疫苗或应用，其特征在于，所述疫苗从裂解病毒制备。

38. 如权利要求 36 所述的方法、疫苗或应用，其特征在于，所述疫苗是纯化的表面糖蛋白疫苗。

39. 如上述任一权利要求所述的方法、疫苗或应用，其特征在于，所述疫苗能抵抗 HA 亚型 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 中的一种或多种。

40. 如上述任一权利要求所述的方法、疫苗或应用，其特征在于，所述疫苗包含佐剂。

无需冷藏储存流感疫苗

文中引用的所有文献全文纳入本文作为参考。

技术领域

本发明涉及防止流感病毒感染的疫苗，具体涉及无需冷藏即保留功效的疫苗。

背景技术

目前可获得各种形式的流感病毒疫苗(例如，参见参考文献1的第17和18章)。疫苗通常基于活病毒或灭活病毒。灭活疫苗可能基于完整病毒颗粒，‘裂解’病毒颗粒，或者基于纯化的表面抗原。

典型流感疫苗要求保存期为52周。为满足这一要求，目前流感疫苗的共有特征是，直到给药之前它们是保存在冷藏条件下的。这些条件能维持包括血凝素(HA)在内的保护性抗原的稳定性。

参考文献2包括各种疫苗制品中HA降解的分析，并报道称，如果在5℃保存则HA含量可维持在允许限度内达78周，但储存温度升至25℃(即室温)会时降解速率提高至少6倍(观察到的最坏情况是升至24倍)。尽管当在5℃储存时一种待测疫苗的预期保存期为104周，而当在25℃储存时降至16周，但预计这种疫苗在25℃放置5.3周以上将是不稳定的。

由于这种温度敏感性，目前的流感疫苗制造、包装和销售系统要求维持冷链。

为避免这种对冷链的需求，已经提出了许多替代免疫策略。例如，参考文献3和4报道了干粉状流感疫苗制剂。还提出过用DNA疫苗代替基于蛋白质的疫苗。

本发明的目的是提供进一步改进的流感疫苗，以及它们的制造方法，该方法避免了对于维持冷链的需求，尤其避免了销售过程中和/或达到最终健康护理提供者之前对于冷链的需求。

发明内容

根据本发明，流感疫苗在包装和给药之间无需冷藏。尽管现有技术称，即

便在室温储存至少 6 个月，流感疫苗的 HA 含量仍可维持在允许限度内。

本发明还能够免除病毒生长之后原料抗原制造期间(例如，抗原纯化期间)的冷藏条件，但是，为了无需改变现有制造方法，这些步骤仍旧可在冷藏条件下进行，而仅将原料制成之后的步骤(例如，将不同毒株的抗原混合、填装剂量、储存、销售)在没有冷藏的条件下进行。本发明的一个重要益处是允许销售商和/或医师等在非冷藏条件下储存包装的疫苗。此外，本发明能提高患者的舒适度，因为疫苗是在接近体温的温度下给予的。

因此，本发明提供了一种销售多份包装的水性流感疫苗的方法，包括在非冷藏条件下将疫苗从第一地点运输到第二地点的步骤。所述第一和第二地点优选相隔至少 1 公里。

本发明还提供了一种销售原料水性流感疫苗的方法，包括在非冷藏条件下将疫苗从第一地点移动到第二地点的步骤。所述第一和第二地点优选相隔至少 1 公里。所述原料可以是单价或多价原料。该方法可包括从原料中提取单位剂量疫苗并将该单位剂量置于容器内的进一步的步骤。

因此，本发明提供了一种销售多份包装的水性流感疫苗的方法，包括将疫苗从第一地点运输到第二地点的步骤，且其中所述疫苗在非冷藏条件下在所述第二地点储存至少 h 小时。h 的值选自 12、18、24、36、48、60、72、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、5000 或更大。第二地点优选是给予疫苗的地点，如诊所、手术室等。

本发明还提供了一种销售流感疫苗的方法，其中，所述疫苗在非冷藏条件下从第一地点移动到第二地点，其中所述第二地点是可以(优选就是)给患者接种疫苗的地点。所述第二地点可以是，例如，诊所、健康护理中心、大卖场、患者家中、患者工作场所，等等。

本发明还提供了一种储存水性流感疫苗的方法，包括将疫苗在 10℃ 以上储存超过 10 周的步骤。所述储存的疫苗可以是原料疫苗(单价或多价)或包装的疫苗。当所述疫苗是原料疫苗时，该方法可包括从原料中提取单位剂量疫苗并将该单位剂量置于容器内的进一步的步骤。当所述原料是单价原料时，该方法可包括将单价原料(在任何相关稀释处理之前、期间或之后)与单独的单价原料混合的进一步的步骤。当所述疫苗是包装的疫苗时，它优选不是(i)包含毒株

A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株(reass.)和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Yamanashi/166/98 的三价疫苗; (ii)包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Guangdong/120/00 的三价疫苗; 或(iii)包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Shangdong/7/97 的三价疫苗。

本发明还提供了一种从疫苗原料制备包装的水性疫苗的方法, 包括在非冷藏条件下从原料中取出单位剂量的疫苗并置于容器内的步骤。

本发明还提供了一种稀释浓缩的流感抗原原料的方法, 包括在非冷藏条件下用水性介质稀释浓缩原料的步骤。该方法得到了具有所需最终浓度的抗原制品。所述原料可包含多种流感病毒的抗原。作为替代, 它也可以是含有一种流感病毒株的抗原的单价原料, 此时, 该方法可包括将稀释的抗原与一种或多种其他流感病毒株的抗原混合的进一步的步骤, 从而得到多价组合物。

本发明还提供了一种制备多价流感疫苗的方法, 包括在非冷藏条件下将包含第一流感病毒株抗原的水性制品与包含第二流感病毒株抗原的水性制品混合的步骤。该方法可用于制备原料疫苗, 或者可用于制备包装的疫苗。优选地, 该方法用于通过混合三种不同流感病毒株的抗原来制备三价流感疫苗。当该方法被用于制备原料疫苗时, 该方法可包括从原料中提取单位剂量疫苗并将该单位剂量置于容器内的进一步的步骤。

本发明还提供了一种将包含流感病毒的组合物灭活的方法, 其中, 该方法包括在非冷藏条件下将所述组合物与灭活剂(例如甲醛, 详见下文)混合的步骤。

本发明还提供了一种制备含佐剂的流感病毒疫苗的方法, 包括在非冷藏条件下将流感病毒抗原与佐剂混合的步骤。该方法可用于提供原料疫苗, 此时, 该方法可包括从原料中提取单位剂量的含佐剂的疫苗并将该单位剂量置于容器内的进一步的步骤。与佐剂混合的流感病毒抗原优选是多价的。

本发明还提供了通过这些方法可获得的或者获得的疫苗。

本发明还提供了在非冷藏条件下已储存至少 h 小时的水性流感病毒疫苗, 其中: (a) h 选自 12、18、24、36、48、60、72、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、5000 或更大; 和(b) 该疫苗不是(i)

包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Yamanashi/166/98 的三价疫苗；(ii) 包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Guangdong/120/00 的三价疫苗；或(iii) 包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Shangdong/7/97 的三价疫苗。

本发明还提供了在非冷藏条件下已储存至少 h 小时的水性流感病毒疫苗，其中：(a) h 选自 12、18、24、36、48、60、72、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、5000 或更大；和(b) 该疫苗是从生长在细胞培养物中的流感病毒制备的。因此，不同于从鸡蛋制备的疫苗，这种疫苗不含鸡 DNA 和鸡蛋蛋白质(如卵清蛋白和卵类黏蛋白)，因此降低了变应原性。

本发明还提供了一种药盒，其中装有：(a) 水性流感疫苗，和(b) 标明该疫苗可以(i)在非冷藏条件下储存和/或(ii)在室温储存的书面材料。

本发明还提供了一种含有至少一种流感病毒株的血凝素的水性疫苗，其中，当所述疫苗在 25℃ 储存时，血凝素的降解速率低于 33%/年/毒株。例如，当抗原浓度为 30μg/ml/毒株时，降解速率低于 10μg/ml/年/毒株。

本发明还提供了一种含有至少一种流感病毒株的神经氨酸酶的水性疫苗，其中，当所述疫苗在 25℃ 储存时，神经氨酸酶的降解速率低于 33%/年/毒株。

本发明还提供了一种含有至少一种流感病毒株的血凝素和神经氨酸酶的水性疫苗，其中，当所述疫苗在 25℃ 储存时，血凝素和神经氨酸酶的降解速率都低于 33%/年/毒株。

本发明还提供了流感病毒抗原在制造由执业医师给予患者的药物中的应用，其中，所述药物在药物制造和被执业医师收到之间无需冷藏。

本发明还提供了流感病毒抗原在制造由执业医师给予患者的药物中的应用，其中，所述药物在被执业医师收到和给予患者之间无需冷藏。

本发明还提供了一种将流感病毒疫苗给予患者的方法，其中，在给药前 24 小时内(例如，注射前)，该疫苗已在非冷藏条件下储存至少 12 小时(优选至少 18 小时，更优选至少 23 小时，例如，在之前的所有 24 小时)。

本发明还提供了一种将流感病毒疫苗给予患者的方法，其中，该疫苗在非冷藏条件下储存至少 h 小时后再给予患者，其中，h 选自 12、18、24、36、48、60、72、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、5000 或更大。

用于本发明方法、应用和疫苗的抗原优选是从生长在细胞培养物中的病毒而不是从生长在鸡蛋中的病毒制备的，这是由于发现这些抗原特别稳定。不希望局限于理论，发明人目前认为，相对于鸡蛋培养的抗原稳定性提高可能有两个原因：(a) 残留的鸡蛋衍生组分(例如酶类，如蛋白酶和/或糖苷酶)可能会造成现有疫苗的 HA 降解；因此避免将鸡蛋作为病毒生长基质能提供具有更佳热稳定性的疫苗；和/或(b) 在细胞培养物，尤其是哺乳动物细胞培养物中获得的流感病毒糖蛋白的糖型较之在鸡蛋中获得的糖型更加稳定。

本发明的疫苗可包含去污剂，如聚氧乙烯失水山梨糖醇酯表面活性剂(称为‘吐温’)，辛苯聚醇(如辛苯聚醇-9(Triton X-100)或叔-辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)，溴化十六烷基三甲铵(‘CTAB’)，去氧胆酸钠，尤其是对于裂解或表面抗原疫苗而言。吐温 80 的含量可相对于 HA 过量(即大于 $1\mu\text{g}/\mu\text{g}$ HA)，如 $5\text{-}25\mu\text{g}/\mu\text{g}$ HA，例如 $10\text{-}15\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 。CTAB 的含量为 $0.5\text{-}2.5\mu\text{g}/\mu\text{g}$ HA，例如 $1.0\text{-}1.5\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 。吐温 80 和 CTAB 也可同时存在。去污剂可以稳定流感病毒抗原(如 HA)并防止它们热降解。存在吐温 80(聚山梨酯 80)尤其可解释在下面的实施例中观察到的热稳定性。

抗原组分

本发明采用流感病毒抗原。所述抗原通常从流感病毒颗粒制备，但作为替代，抗原也可由重组宿主表达并以纯化形式使用。例如，重组血凝素已被用作抗原，例如使用杆状病毒载体在昆虫细胞系中表达[5,6]，重组神经氨酸酶亦是如此[7]。然而，抗原通常来自病毒颗粒。

抗原的形式可以是活病毒，或者更优选是灭活病毒。灭活病毒的化学方法包括用有效量的以下一种或多种物质处理：去污剂、甲醛(例如以福尔马林的形式)、 β -丙内酯或 UV 光。其他化学灭活方法包括用亚甲蓝、补骨脂素、羧基富勒烯(C60)或其任意组合处理。本领域已知其他病毒灭活方法，例如二乙胺、乙酰氮丙啶或 γ 射线辐射。INFLEXAL™产品是全病毒颗粒灭活疫苗。

可通过各种方法从含有病毒的液体收获病毒颗粒。例如，纯化方法可涉及采用线性蔗糖梯度溶液的区带离心，其中包含去污剂以破裂病毒颗粒。然后可通过透析纯化抗原，纯化前可任选进行稀释。

获得裂解病毒颗粒的过程包括：用去污剂(如乙醚、聚山梨酯 80、脱氧胆酸盐、三正丁基磷酸盐、Triton X-100、Triton N101、溴化十六烷基三甲铵、Tergitol NP9 等)处理纯化的病毒颗粒以产生亚病毒颗粒制剂，包括'吐温-醚'裂解方法。裂解流感病毒的方法是本领域熟知的，例如参见参考文献 8-13 等。一般使用破坏性浓度的裂解剂通过破坏或片段化完整病毒来裂解病毒，无论该病毒有无感染性。这种破坏导致病毒蛋白的完全或部分溶解，改变病毒的完整性。优选的裂解剂是非离子型和离子型(例如阳离子型)表面活性剂，如烷基糖苷、烷基硫苷、酰基糖、磺基甜菜碱、甜菜碱、聚氧乙烯烷基醚、N,N-二烷基-葡糖酰胺、Hecameg、烷基苯氧基-聚乙氧基乙醇、季铵化合物、肌氨酰、CTAB(溴化十六烷基三甲铵)、三正丁基磷酸酯、塞塔隆(Cetavlon)、十四烷基三甲铵盐、脂质转染试剂、脂转染胺、和 DOTMA、辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(如 Triton 表面活性剂，如 Triton X-100 或 Triton N101)、聚氧乙烯失水山梨糖醇酯(吐温表面活性剂)、聚氧乙烯醚、聚氧乙烯酯等。一种有用的裂解方法使用脱氧胆酸钠和甲醛连续作用，在最初病毒颗粒纯化过程中(例如在蔗糖密度梯度溶液中)发生裂解。可将裂解的病毒颗粒重悬于磷酸钠缓冲的等渗氯化钠溶液中。BEGRIVAC™、FLUARIX™、FLUZONE™和 FLUSHIELD™产品是裂解疫苗。

纯化的表面抗原疫苗包含流感表面抗原血凝素，一般还包含神经氨酸酶。制备纯化形式的这些蛋白质的方法是本领域熟知的。FLUVIRIN™、AGRIPPAL™和 INFLUVAC™产品是亚单位疫苗。

流感抗原也可以病毒体(无核酸的病毒样脂质体颗粒)的形式存在[14]，例如 INFLEXAL V™和 INVAVAC™产品，但本发明优选不使用病毒体。因此，在一些实施方式中，流感抗原不是病毒体的形式。

可使流感病毒减毒。流感病毒可以是温度敏感型。流感病毒可以是冷适应性病毒。使用活病毒作为抗原时这三种特征特别有用。

疫苗中使用的流感病毒毒株随季节而变。在目前的大流行间期，疫苗一般

包含两种甲型流感毒株(H1N1 和 H3N2)和一种乙型流感毒株,一般是三价疫苗。本发明也可使用来自大流行毒株(即疫苗接受者和普通人群未曾免疫接触的毒株)的 HA,如 H2、H5、H7 或 H9 亚型毒株(尤其是甲型流感病毒毒株),大流行毒株的流感疫苗可以是单价疫苗,或者可基于补充有大流行毒株的正常三价疫苗。然而,根据季节和疫苗中包含的抗原特性,本发明可保护免受甲型流感病毒 HA 亚型 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16 中一种或多种的感染。采用 H1 抗原时,与参考文献 2 相比,观察到 HA 降解速率大幅下降。采用 H3 抗原也观察到降解速率降低,采用乙型流感病毒抗原亦是如此。

本发明可保护免受甲型流感病毒 NA 亚型 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8 或 N9 中一种或多种的感染。

除了适合免疫对抗大流行间期毒株,本发明组合物也特别适用于免疫对抗大流行毒株。可能引起大流行爆发的流感毒株的特征是:(a)与目前流通的人毒株中的血凝素相比,它含有新的血凝素,即数十年没有在人群中发现的血凝素(如 H2),或者从未在人群中发现的血凝素(如 H5、H6 或 H9,通常只出现在鸟群体中),和/或与目前流通的人毒株中的神经氨酸酶相比,它含有新的神经氨酸酶,以至于人群未曾免疫接触过该毒株的血凝素和/或神经氨酸酶;(b)它能够在人群中水平传播;和(c)它使人致病。含有 H5 血凝素类型的病毒优选用于获得对大流行流感,如 H5N1 毒株的免疫。其它可能的毒株包括 H5N3、H9N2、H2N2、H7N1 和 H7N7,以及任何其它可能出现的大流行毒株。在 H5 亚型内,病毒可能属于 HA 进化枝 1、HA 进化枝 1'、HA 进化枝 2 或 HA 进化枝 3[15],进化枝 1 和 3 特别相关。

其抗原可有用地包含在本发明组合物中的其它毒株是抗病毒治疗有抗性(例如对奥塞米韦[16]和/或扎那米韦有抗性)的毒株,包括抗性大流行毒株[17]。

本发明组合物可包含一种或多种(如 1、2、3、4 或更多种)流感病毒毒株,包括甲型流感病毒和/或乙型流感病毒的抗原。可制备单价疫苗,也可制备 2-价、3-价、4-价疫苗,等等。当疫苗包含一种以上流感毒株时,一般单独培养不同毒株,收获病毒后将它们混合在一起,然后制备抗原。因此,本发明方法

可包括混合一种以上流感毒株的抗原的步骤，且该步骤可在非冷藏条件下进行。优选三价疫苗，其包含来自两种甲型流感病毒毒株和一种乙型流感病毒毒株的抗原。

在本发明的一些实施方式中，该组合物可包含来自一种甲型流感毒株的抗原。在一些实施方式中，该组合物可包含来自两种甲型流感毒株的抗原，前提是这两种毒株不是 H1N1 和 H3N2。在一些实施方式中，该组合物可包含来自两种以上甲型流感毒株的抗原。

流感病毒可能是再造毒株，可通过逆向遗传学技术获得该病毒。逆向遗传学技术[如 18-22]能够用质粒在体外制备含有所需基因组区段的流感病毒。该技术一般包括例如(a)由 polII 启动子表达编码所需病毒 RNA 分子的 DNA 分子，和(b)由 polIII 启动子表达编码病毒蛋白的 DNA 分子，这两种类型的 DNA 在细胞中的表达导致组装成完整的感染性病毒颗粒。该 DNA 优选提供病毒的所有 RNA 和蛋白质，但也可能使用辅助病毒来提供一些 RNA 和蛋白质。优选采用不同质粒产生各病毒 RNA 的基于质粒的方法[23-25]，这些方法也包括使用质粒来表达所有或一些病毒蛋白(例如，仅 PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白)，在一些方法中使用 12 种质粒。为了减少所需的质粒数量，近期方法[26]将多个 RNA 聚合酶 I 转录盒(用于合成病毒 RNA)合并到同一质粒上(如编码 1、2、3、4、5、6、7 或所有 8 种甲型流感 vRNA 区段的序列)，并且将多个蛋白编码区与 RNA 聚合酶 II 启动子合并到另一个质粒上(如编码 1、2、3、4、5、6、7 或所有 8 种甲型流感 mRNA 转录物的序列)。参考文献 26 方法的优选方面包括：(a) PB1、PB2 和 PA mRNA 编码区在同一质粒上；和(b)所有 8 个 vRNA 编码区段在同一质粒上。一个质粒上包含 NA 和 HA 区段而另外六个区段位于另一质粒上也可能是有利的。

作为使用 polII 启动子来编码病毒 RNA 区段的替换方式，可使用噬菌体聚合酶启动子[27]。例如，可方便地使用 SP6、T3 或 T7 聚合酶的启动子。由于 polII 启动子的物种特异性，噬菌体聚合酶启动子可能较适合许多细胞类型(如 MDCK)，但也必须用编码外源性聚合酶的质粒转染细胞。

在其它技术中，可使用 polII 和 polIII 双启动子由一个模板同时编码病毒 RNA 和可表达的 mRNA[28,29]。

因此,病毒,特别是甲型流感病毒可包含来自 A/PR/8/34 病毒的一个或多个 RNA 区段(一般 6 个区段来自 A/PR/8/34, HA 和 N 区段来自疫苗毒株,即 6:2 再造毒株)。也可包含来自 A/WSN/33 病毒,或用于产生疫苗制剂的再造病毒的任何其它毒株的一个或多个 RNA 区段。本发明一般保护免受能够在人与人之间传播的毒株的感染,因此该毒株的基因组通常包含起源于哺乳动物(如人)流感病毒的至少一个 RNA 区段。它可包含起源于禽流感病毒的 NS 区段。

通常在细胞培养物上培养用作抗原来源的病毒,但在一些实施方式中,可以在鸡蛋上培养它们。目前标准的流感病毒培养方法采用无特定病原(SPF)含胚鸡蛋,由鸡蛋内容物(尿囊液)纯化病毒。如果使用基于鸡蛋的病毒培养,则可将一种或多种氨基酸与病毒一起引入鸡蛋尿囊液中[12]。

细胞基底层一般是哺乳动物来源的细胞系。合适的哺乳动物细胞来源包括但不限于:仓鼠、牛、灵长动物(包括人和猴)和犬细胞。可采用各种细胞类型,例如肾细胞、成纤维细胞、视网膜细胞、肺细胞等。合适的仓鼠细胞的例子是称为 BHK21 或 HKCC 的细胞系。合适的猴细胞是(例如)非洲绿猴细胞,例如肾细胞,如 Vero 细胞系。合适的犬细胞是(例如)肾细胞,例如 MDCK 细胞系。因此,合适的细胞系包括但不限于:MDCK、CHO、293T、BHK、Vero、MRC-5、PER.C6、WI-38 等。使用哺乳动物细胞意味着疫苗可不含鸡 DNA,以及不含鸡蛋蛋白质(如卵清蛋白和卵类黏蛋白),从而降低变应原性。

用于培养流感病毒的哺乳动物细胞系优选包括: Madin Darby 犬肾来源的 MDCK 细胞[30-33]; 非洲绿猴(*Cercopithecus aethiops*)肾来源的 Vero 细胞[34-36]; 或人胚视网膜母细胞来源的 PER.C6 细胞[37]。这些细胞系可由各种来源获得,例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)[38]、Coriell 细胞库[39]或欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)。例如,ATCC 供应各种不同 Vero 细胞,目录号为 CCL-81、CCL-81.2、CRL-1586 和 CRL-1587,还供应 MDCK 细胞,目录号为 CCL-34。PER.C6 可获自 ECACC,保藏号 96022940。作为哺乳动物细胞系的代替,可在禽细胞系[如参考文献 40-42],包括禽胚胎干细胞[40,43]和鸭(如鸭视网膜)或母鸡来源的细胞系上培养病毒。合适的禽胚胎干细胞包括衍生自鸡胚胎干细胞的 Ebx 细胞系、EB45、EB14 和 EB14-074[44]。也可使用鸡胚成纤维细胞(CEF),等等。

用于培养流感病毒的最优选的细胞系是 MDCK 细胞系。原始 MDCK 细胞系可购自 ATCC(CCL-34)，但也可利用该细胞系的衍生细胞系。例如，参考文献 45 公开了适合悬浮培养的 MDCK 细胞系('MDCK 33016'，保藏号 DSM ACC 2219)。类似地，参考文献 45 公开了在无血清培养基中悬浮培养的 MDCK 衍生细胞系('B-702'，保藏号 FERM BP-7449)。参考文献 46 公开了非致瘤性 MDCK 细胞，包括'MDCK-S'(ATCC PTA-6500)、'MDCK-SF101'(ATCC PTA-6501)、'MDCK-SF102'(ATCC PTA-6502)和'MDCK-SF103'(PTA-6503)。参考文献 47 公开了非常易于感染的 MDCK 细胞系，包括'MDCK.5F1'细胞(ATCC CRL-12042)。可使用任何这些 MDCK 细胞系。

细胞生长培养物，以及用于启动培养的病毒接种物优选不含(即经测试且得到阴性污染结果)单纯疱疹病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒 3、SARS 冠状病毒、腺病毒、鼻病毒、呼肠孤病毒、多瘤病毒、双 RNA 病毒、环病毒和/或细小病毒[48]。特别优选不存在单纯疱疹病毒。

可以在悬浮[30,49,50]或贴壁培养的细胞中培养病毒。在一个实施方式中，细胞可能适合悬浮培养。一种适合悬浮培养的 MDCK 细胞系是 MDCK33016(保藏号 DSM ACC 2219)。或者，可采用微载体培养。

优选在无血清培养基和/或无蛋白培养基中培养支持流感病毒复制的细胞系。在本发明中，如果培养基中没有人或动物来源的血清添加剂，则称为无血清培养基。无蛋白应理解为在不含蛋白质、生长因子、其它蛋白添加剂和非血清蛋白质的情况下发生细胞增殖的培养物，但可任选包含诸如胰蛋白酶和其它蛋白酶等可能是病毒生长所必需的蛋白质。在这类培养物中培养的细胞在天然情况下本身含有蛋白质。

在病毒复制过程中，支持流感病毒复制的细胞系优选在 37°C 以下[51](如 30-36°C)培养。

在培养细胞中增殖病毒的方法通常包括以下步骤：用待培养的毒株接种培养的细胞，将感染细胞培养所需时间以使病毒增殖，例如通过病毒效价或抗原表达来确定所需时间(如接种后 24-168 小时)，然后收获增殖的病毒。用 1:500-1:1，优选 1:100-1:5，更优选 1:50-1:10 的病毒(由 PFU 或 TCID₅₀ 测定)：细胞比接种培养的细胞。将病毒加入细胞悬液中，或施加于细胞单层，在 25-40

℃, 优选 28-37℃下, 使病毒吸附于细胞至少 60 分钟, 但通常小于 300 分钟, 优选 90-240 分钟。可通过冻融或酶作用去除感染的细胞培养物(如单层), 以提高收获的细胞上清液的病毒含量。然后, 可灭活或冷冻储存收获的液体。可以约 0.0001-10、优选 0.002-5、更优选 0.001-2 的感染复数("m.o.i.")感染培养的细胞。更优选地, 以约 0.01 的 m.o.i.感染细胞。可以在感染后 30-60 小时收获感染的细胞。优选在感染后 34-48 小时收获细胞。更优选在感染后 38-40 小时收获细胞。通常在细胞培养期间加入蛋白酶(一般是胰蛋白酶), 以使病毒释放, 可以在培养的任何合适的阶段加入蛋白酶。

目前参照一般由 SRID 测定的 HA 水平来标准化流感疫苗。现有疫苗一般含有约 15μg HA/毒株, 但较低剂量也可使用(例如, 当用作佐剂时)。采用了分数剂量如 $\frac{1}{2}$ (即 7.5μg HA/毒株)、 $\frac{1}{4}$ 和 $\frac{1}{8}$ [65,66], 以及较高剂量(如 3x 或 9x 剂量[52,53])。因此, 疫苗可包含 0.1-150 μg HA/流感毒株, 优选 0.1-50 μg, 例如 0.1-20μg、0.1-15μg、0.1-10μg、0.1-7.5μg、0.5-5μg 等。具体剂量包括例如, 约 45、约 30、约 15、约 10、约 7.5、约 5、约 3.8、约 1.9、约 1.5μg/毒株等。可对本发明所述疫苗、药盒和方法的组分(例如, 它们的体积和浓度)进行选择以在最终产品中提供这些抗原剂量。从浓缩的原料稀释成最终所需的 HA 浓度可在非冷藏条件下进行。

在活疫苗中, 利用组织培养感染剂量中值(TCID₅₀)而非 HA 含量来测定剂量, TCID₅₀一般为 10⁶-10⁸(优选为 10^{6.5}-10^{7.5})/毒株。

本发明所用 HA 可以是天然 HA, 如病毒中发现的天然 HA, 或者可以是经修饰的 HA。例如, 已知修饰 HA 以去除导致病毒在禽类动物中具有高度致病性的决定簇(如 HA1 和 HA2 之间切割位点周围的超碱性区域(hyper-basic region)), 因为这些决定簇可导致病毒不能在鸡蛋中生长。

除了包含血凝素, 本发明的组合物和包含其他流感病毒蛋白。例如, 它们通常包含神经氨酸酶糖蛋白。它们还可包含基质蛋白, 如 M1 和/或 M2(或其片段), 和/或核蛋白。

在一些实施方式中, 尤其当(a)抗原是从鸡蛋培养的疫苗制备的, (b)疫苗是灭活的表面抗原疫苗, 和/或(c)疫苗包含硫柳汞时, 本发明不涉及参考文献 2 中披露的以下三种疫苗: (i)包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和

A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Yamanashi/166/98 的三价疫苗；(ii) 包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17 再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116 再造株和 B/Guangdong/120/00 的三价疫苗；或(iii)包含毒株 A/Panama/2007/99 RESVIR-17再造株和 A/New Caledonia/20/99 IVR-116再造株和 B/Shangdong/7/97 的三价疫苗。

宿主细胞 DNA

用细胞系培养病毒时，标准实践是最大程度减少最终疫苗中残留的细胞系 DNA 的含量，以尽可能降低这些 DNA 的致癌活性。因此，本发明组合物优选含有小于 10 ng(优选小于 1 ng, 更优选小于 100 pg)残留的宿主细胞 DNA/剂量，但可能存在痕量宿主细胞 DNA。通常，需要从本发明组合物中排除的宿主细胞 DNA 是长度大于 100 bp 的 DNA。

现在，残留宿主细胞 DNA 的测定是生物制品的常规管理要求，并且在普通技术人员的能力范围内。用于测定 DNA 的实验一般是验证实验[54,55]。可通过数学和可以量化的条件来描述验证实验的性能特征，并鉴定可能的误差来源。通常测试该实验的某些特征，如精确性、准确性、特异性。一旦校正(例如用已知标准量的宿主细胞 DNA 校正)并检验了某个实验，则可按常规进行定量 DNA 测定。可采用三种 DNA 定量的基本技术：杂交方法，如 Southern 印迹或狭线印迹[56]；免疫测定法，如 Threshold™系统[57]；和定量 PCR[58]。本领域技术人员熟悉这些方法，但各方法的准确特征，例如杂交探针的选择、引物的选择和/或用于扩增的引物等可能取决于所研究的宿主细胞。来自分子设备公司(Molecular Devices)的 Threshold™系统是皮克水平的总 DNA 的定量实验，已用于监测生物药品中污染 DNA 的水平[57]。典型实验包括生物素化 ssDNA 结合蛋白、脲酶偶联的抗 ssDNA 抗体和 DNA 之间以非序列特异性方式形成反应复合物。购自生产商的总 DNA 测定试剂盒(Total DNA Assay Kit)中包含所有实验组分。多个商业生产商均提供了用于检测残留宿主细胞 DNA 的定量 PCR 实验，例如 AppTec™实验室服务公司(AppTec™ Laboratory Services)、BioReliance™公司奥西科技公司(Althea Technologies)等。用于测定人病毒疫苗的宿主细胞 DNA 污染的化学发光杂交实验和总 DNA Threshold™系统的比较参见参考文献 59。

在疫苗制备过程中可采用标准纯化方法,如层析法等去除污染的 DNA。可通过核酸酶处理,例如 DNA 酶处理来改进对残留宿主细胞 DNA 的清除效果。参考文献 60 和 61 公开了一种减少宿主细胞 DNA 污染的方便方法,该方法包括两步处理,第一步是在病毒生长期间使用 DNA 酶(如 Benzonase)处理,然后是在病毒颗粒破裂期间使用阳离子去污剂(如 CTAB)进行处理。也可利用烷化剂如 β -丙内酯处理来去除宿主细胞 DNA,该方法也宜用于灭活病毒颗粒 [62]。

优选每 15 μ g 血凝素中宿主细胞 DNA 含量<10 ng(如<1 ng、<100pg)的疫苗,以及每 0.25 ml 体积中宿主细胞 DNA 含量<10 ng(如<1 ng、<100pg)的疫苗。更优选每 50 μ g 血凝素中宿主细胞 DNA 含量<10 ng(如<1 ng、<100pg)的疫苗,以及每 0.5ml 体积中宿主细胞 DNA 含量<10 ng(如<1 ng、<100pg)的疫苗。

储存条件和运输

当提及疫苗或抗原组合物无需冷藏(或类似描述)时,是指无需在平衡时温度 $\leq 8^{\circ}\text{C}$ 的条件下储存。因此,暂时放置在冰箱中,而没有放置足够长的时间以至其整体温度降至 8°C 或更低的组合物未经冷藏。然而,在优选实施方式中,本发明允许根本不接触冷藏条件,即便是暂时的。

当本发明涉及在两个地点之间运输时,两个地点之间优选相隔 n 公里以上,其中 n 选自 1、2、3、4、5、10、20、25、30、40、50、100 或更多。

当组合物在 10°C 以上储存时,它可在 $\geq 11^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 12^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 13^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 14^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 16^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 17^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 18^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 19^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 20^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 21^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 22^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 23^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 24^{\circ}\text{C}$ 储存。通常,它将被储存于 40°C 以下,例如 $\leq 39^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 38^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 37^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 36^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 35^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 34^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 33^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 32^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 31^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 29^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 28^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 27^{\circ}\text{C}$ 、 $\leq 26^{\circ}\text{C}$ 。典型的储存温度将是室温,例如在 18°C 和 23°C 之间,如 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

当组合物在非冷藏条件下储存 10 周以上时,它可被储存 ≥ 11 周、 ≥ 12 周、 ≥ 13 周、 ≥ 14 周、 ≥ 15 周、 ≥ 16 周、 ≥ 17 周、 ≥ 18 周、 ≥ 19 周、 ≥ 20 周、 ≥ 25 周、 ≥ 26 周、 ≥ 30 周、 ≥ 35 周、 ≥ 40 周。通常储存 1 年以下。

疫苗可储存在直射光线外,例如避光储存。

当疫苗的血凝素降解速率低于 33%/年/毒株时,优选 $\leq 32\%$ 、 $\leq 31\%$ 、 $\leq 30\%$ 、 $\leq 29\%$ 、 $\leq 28\%$ 、 $\leq 27\%$ 、 $\leq 26\%$ 、 $\leq 25\%$ 、 $\leq 24\%$ 、 $\leq 23\%$ 、 $\leq 22\%$ 、 $\leq 21\%$ 、 $\leq 20\%$ 、

≤19%、≤18%、≤17%、≤16%、≤15%、≤14%、≤13%、≤12%、≤11%、≤10%、≤9%、≤8%、≤7%、≤6%、≤5%或更低。优选按照题为“新药和产品的稳定性检测(Stability Testing of New Drug Substances and Products)”的 ICH(国际人类用药登记技术要求协调会议(International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use))准则 Q1A(R2)测定降解, 并进行有关统计学分析。

佐剂

本发明组合物宜包含佐剂, 佐剂可用于在接受该组合物的患者中提高所引发的免疫应答反应(体液或细胞免疫应答)。曾经描述过将佐剂与流感疫苗一起使用。参考文献 63 和 64 中使用了氢氧化铝, 参考文献 65 中使用了氢氧化铝和磷酸铝的混合物。参考文献 66 也描述了铝盐佐剂的应用。希龙疫苗公司(Chiron Vaccines)的 FLUAD™产品包含水包油乳液。

可用于本发明的佐剂包括但不限于:

包含钙盐和铝盐(或其混合物)的含矿物质组合物。钙盐包括磷酸钙(如参考文献 67 公开的“CAP”颗粒)。铝盐包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等, 所述盐取任何合适的形式(如凝胶、晶体、无定形态等)。优选吸附于这些盐。也可将含有矿物质的组合物制成金属盐的颗粒[68]。下面开始更详细地描述铝盐佐剂。

细胞因子诱导剂(详述见下)

皂苷[参考文献 104 第 22 章], 皂苷是在许多种类的植物的树皮、叶、茎干、根甚至花中发现的甾醇糖苷和三萜糖苷的异质群体。已广泛研究了作为佐剂的来自皂树(*Quillaia saponaria*)Molina 树皮的皂苷。皂苷也可购自丽花菝葜(*Smilax ornata*)(墨西哥菝葜)、满天星(*Gypsophilla paniculata*)(婚纱花)和肥皂草(*Saponaria officianalis*)(皂根)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂如 QS21 以及脂质制剂如 ISCOM。QS21 以商标 Stimulon™出售。已采用 HPLC 和 RP-HPLC 来纯化皂苷组合物。已鉴定了用这些技术纯化的特定组分, 包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。皂苷优选 QS21。制备 QS21 的方法参见参考文献 69。也可将 Quil A 的组分 A 与至少一种其他佐剂一起使用[70]。皂苷制剂也可包含甾醇, 如胆固醇[71]。皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合物(ISCOM)的独特颗粒[参考文献 104 的第 23 章]。ISCOM 通常也含有磷

脂如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。ISCOM 中可采用任何已知的皂苷。ISCOM 优选包含 QuilA、QHA 和 QHC 中的一种或多种。参考文献 71-73 中进一步描述了 ISCOM。任选地, ISCOM 可不含其它去污剂[74]。也可使用至少两种 ISCOM 复合物的混合物, 各种复合物基本上包含一种皂苷组分, 此时的复合物是 ISCOM 复合物或 ISCOM 基质复合物[75]。开发基于皂苷的佐剂的综述可参见参考文献 76 和 77。

脂肪佐剂(详述见下)。

细菌 ADP-核糖基化毒素(如大肠杆菌(*E. coli*)不耐热肠毒素"LT"、霍乱毒素"CT"或百日咳毒素"PT")及其脱毒衍生物, 如称为 LT-K63 和 LT-R72 的突变毒素[78]。参考文献 79 中描述了将脱毒的 ADP-核糖基化毒素用作粘膜佐剂, 参考文献 80 中描述了将其用作胃肠道外佐剂。

生物粘附剂和粘膜粘附剂, 如酯化透明质酸微球[81]或壳聚糖及其衍生物[82]。

由可生物降解和无毒材料(例如聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚正酯、聚酐、聚己酸内酯等), 优选丙交酯-乙交酯共聚物形成的微粒(即直径约 100nm-150 μ m, 更优选约 200nm-30 μ m, 最优选约 500nm-10 μ m 的颗粒), 任选处理以具有带负电表面(如用 SDS 处理)或带正电表面(例如用阳离子去污剂如 CTAB 处理)。

脂质体(参考文献 104 第 13 和 14 章)。适合用作佐剂的脂质体制剂的例子见参考文献 83-85 所述。

水包油乳液(详述见下)

聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂[86]。这种制剂还包括聚氧乙烯失水山梨糖醇酯表面活性剂和辛苯聚醇[87]以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂和至少一种其它非离子表面活性剂如辛苯聚醇[88]的混合物。优选的聚氧乙烯醚选自: 聚氧乙烯-9-月桂醚(laureth 9)、聚氧乙烯-9-固醇醚(stearyl ether)、聚氧乙烯-8-固醇醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。

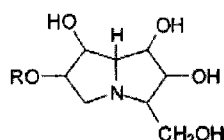
胞壁酰肽, 例如 N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(去甲 MDP)、N-乙酰葡萄糖胺酰-N-乙酰胞壁酰-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰丙酰胺("DTP-DPP" 或

"Theramide™")N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺(MTP-PE)。

由第一种革兰阴性菌制备的外膜蛋白蛋白酶体制剂与第二种革兰阴性菌产生的脂多糖制剂的组合,其中所述外膜蛋白蛋白酶体和脂多糖制剂形成稳定的非共价佐剂复合物。这类复合物包括"IVX-908",它是由脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)外膜蛋白和脂多糖组成的复合物。已将它们用作流感疫苗佐剂[89]。

甲基肌苷 5'-单磷酸酯("MIMP")[90]。

多聚羟化吡咯双烷类化合物[91],如下式化合物:



式中 R 选自:氢,直链或支链、未取代或取代、饱和或不饱和的酰基、烷基(如环烷基)、烯基、炔基和芳基,或这些化合物药学上可接受的盐或衍生物。例子包括但不限于:木麻黄(casuarine)、木麻黄-6- α -D-吡喃葡萄糖、3-表-木麻黄、7-表-木麻黄、3,7-二表-木麻黄等。

γ 菊糖[92]或其衍生物,如 algammaulin。

CD1d 配体,如 α -糖基神经酰胺,例如 α -半乳糖基神经酰胺。

参考文献 104 和 105 中更详细地讨论了这些和其它佐剂活性物质。

组合物可包含两种或多种所述佐剂。例如,它们宜同时包含水包油乳液和细胞因子诱导剂,因为这种组合提高了流感疫苗引发的细胞因子应答,如干扰素- γ 应答,与该乳液或药剂单用时相比,它们联用时引发的应答高得多。组合物中的抗原和佐剂一般形成混合物。

组合物中的抗原和佐剂通常是混合在一起的。

当疫苗包含佐剂时,它可在递送时当场制备。因此,本发明提供了包含各种易混的抗原和佐剂组分的药盒。该药盒可将佐剂和抗原单独保存,直到使用。在药盒中各组分在物理上互相分离,可通过各种方式实现这种分离。例如,这两种组分可以装在两个不同的容器,如药瓶中。可通过(例如)取出一个药瓶的内容物并将其加入另一个药瓶,或者分别取出两个药瓶的内容物并在第三个容器中将它们混合在一起,来混合两个药瓶的内容物。在优选的安排中,药盒的

一种组分在注射器中，另一种组分在容器如药瓶中。可使用该注射器(例如装有针头的注射器)将其内容物注入第二个容器中混合，然后将该混合物抽回注射器中。然后，一般通过新的无菌针头将该注射器中的混合成分给予患者。将一种组分包装到注射器中使得不需要另外准备注射器进行给药。在另一优选的安排中，这两种药盒组分在同一注射器，例如双室注射器(如参考文献 93-100等所述)中分开保存。当注射器致动时(例如给予患者时)，则这两室中的内容物混合。这种安排避免了使用时的单独混合步骤。

水包油乳液佐剂

发现水包油乳液特别适用于含佐剂的流感病毒疫苗。多种这类乳液是已知的，它们一般包含至少一种油和至少一种表面活性剂，油与表面活性剂是可生物降解(可代谢)和生物相容性的。乳液中油滴的直径通常小于 $5\mu\text{m}$ ，甚至可以是亚微米级，用微流化床实现这种小尺寸以提供稳定的乳液。优选小于 220 nm 的液滴，因为它们可进行过滤除菌。

本发明可使用的油诸如动物油(如鱼油)或植物油。植物油的来源包括坚果、种籽和谷粒。坚果油中最常见的是花生油、大豆油、可可油和橄榄油。也可使用获自(例如)霍霍巴豆的霍霍巴油。种籽油包括红花油、棉花籽油、葵花籽油、芝麻油等。在谷粒油中，最常见的是玉米油，但也可采用其它谷类如小麦、燕麦、裸麦、稻、画眉草、黑小麦等的油。可从坚果和种籽油开始，通过水解、分离和酯化合适的物质来制备 6-10 碳脂肪酸甘油酯和 1,2-丙二醇，虽然这些物质不是种籽油中天然产生的。来自哺乳动物乳汁的脂肪和油是可代谢的，因此可用于实施本发明。由动物来源获得纯油的过程中必需的分离、纯化、皂化和其它步骤是本领域众所周知的。大多数鱼类含有容易回收的可代谢油。例如，鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和鲸油如鲸蜡代表了可用于本发明的几种鱼油的例子。通过生化途径用 5-碳异戊二烯单元合成许多支链油，它们总称为萜类。鲨鱼肝油含有支链不饱和类萜，称为鲨烯 2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯，本文特别优选此类萜。鲨烯的饱和类似物鲨烷也是优选的油。鱼油，包括鲨烯和鲨烷，易于从商业来源购得，或可通过本领域已知方法获得。其它优选油是生育酚(见下)。可采用油的混合物。

可根据'HLB' (亲水/亲脂平衡值)对表面活性剂进行分类。本发明优选的表

面活性剂的 HLB 至少为 10, 优选至少 15, 更优选至少 16。可用于本发明的表面活性剂包括但不限于: 聚氧乙烯失水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温), 特别是聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80; 以商品名 DOWF AX™出售的环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)和/或环氧丁烷(BO)的共聚物, 如直链 EP/PO 嵌段共聚物; 重复的乙氧基(氧-1,2-乙二基)基团数量不同的辛苯聚醇, 特别感兴趣的是辛苯聚醇 9(Triton X-100, 或叔-辛基苯氧基聚乙氧基乙醇); (辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40); 磷脂如磷脂酰胆碱(卵磷脂); 衍生自十二烷醇、十六烷醇、十八烷醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为苜泽表面活性剂), 如三乙二醇单月桂基醚(苜泽 30); 以及失水山梨糖醇酯(通常称为司盘), 如失水山梨糖醇三油酸酯(司盘 85)和失水山梨糖醇单月桂酸酯。包含在乳液中的优选表面活性剂是吐温 80(聚氧乙烯失水山梨糖醇酯)、司盘 85(失水山梨糖醇三油酸酯)、卵磷脂和 Triton X-100。如上所述, 去污剂如吐温 80 也可提高热稳定性, 从下面的实施例可见。

可使用表面活性剂的混合物, 如吐温 80/司盘 85 混合物。也适合采用聚氧乙烯失水山梨糖醇酯如聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯(吐温 80)和辛苯聚醇如叔-辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(Triton X-100)的混合物。另一种有用的混合物包含聚乙二醇单月桂醚 9 和聚氧乙烯失水山梨糖醇酯和/或辛苯聚醇。

表面活性剂的含量(重量%)优选为: 聚氧乙烯失水山梨糖醇酯(如吐温 80) 0.01-1%, 具体为约 0.1%; 辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(如 Triton X-100, 或 Triton 系列的其它去污剂) 0.001-0.1 %, 具体为 0.005-0.02%; 聚氧乙烯醚(如聚乙二醇单月桂醚 9) 0.1-20 %, 优选 0.1-10 %, 具体是 0.1-1 %或约 0.5%。

本发明所用的具体水包油乳液佐剂包括但不限于:

鲨烯、吐温 80 和司盘 85 的亚微米乳液。该乳液的体积组成可以是约 5% 鲨烯、约 0.5% 聚山梨酯 80 和约 0.5% 司盘 85。以重量计, 这些比例变为 4.3% 鲨烯、0.5% 聚山梨酯 80 和 0.48% 司盘 85。此佐剂称为'MF59' [101-103], 如参考文献 104 的第 10 章和参考文献 105 的第 12 章所详述。MF59 乳液宜包含柠檬酸根离子, 如 10 mM 柠檬酸钠缓冲液。

鲨烯、生育酚和吐温 80 的乳液。该乳液可包含磷酸盐缓冲盐水。它也可含有 Span 85(如 1%)和/或卵磷脂。这些乳液可含有 2-10% 鲨烯、2-10% 生育酚

和 0.3-3%吐温 80, 鲨烯:生育酚的重量比优选 ≤ 1 , 因为这能使乳液更稳定。鲨烯和吐温 80 的体积比可以约为 5:2。可通过下述方法制备一种这样的乳液: 将吐温 80 溶解于 PBS 得到 2%溶液, 然后将 90ml 该溶液与 5g DL- α -生育酚和 5ml 鲨烯的混合物混合, 然后使该混合物微流体化。得到的乳液可含有, 例如, 平均直径为 100-250nm, 优选约 180nm 的亚微米油滴。

鲨烯、生育酚和 Triton 去污剂(如 Triton X-100)的乳液。该乳液也可包含 3d-MPL(见下)。该乳液可含有磷酸盐缓冲液。

含有聚山梨酯(如聚山梨酯 80)、Triton 去污剂(如 Triton X-100)和生育酚(如琥珀酸 α -生育酚)的乳液。该乳液可包含这三种组分, 其质量比约为 75:11:10 (如 750 μ g/ml 聚山梨酯 80, 110 μ g/ml Triton X-100 和 100 μ g/ml 琥珀酸 α -生育酚), 这些浓度应包括抗原中这些组分的贡献。该乳液还可包含鲨烯。该乳液也可包含 3d-MPL(见下)。水相可含有磷酸盐缓冲液。

鲨烯、聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 401("™ L121")的乳液。可以用磷酸盐缓冲盐水, pH 7.4 配制该乳液。该乳液是一种有用的胞壁酰二肽递送载体, 已知与用"SAF-I"佐剂(0.05-1% Thr-MDP、5%鲨烯、2.5% Pluronic L121 和 0.2%聚山梨酸酯 80)配的苏氨酸基-MDP 一起使用[106]。也可不与 Thr-MDP 一起使用, 例如用"AF"佐剂(5%鲨烯、1.25% Pluronic L121 和 0.2%聚山梨酸酯 80)[107]。优选微流体化。

含有 0.5-50%油、0.1-10%磷脂和 0.05-5%非离子型表面活性剂的乳液。如参考文献 108 所述, 优选的磷脂组分是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、鞘磷脂和心磷脂。优选亚微米液滴大小。

不可代谢油(如轻质矿物油)和至少一种表面活性剂(如卵磷脂、吐温 80 或司盘 80)的亚微米水包油乳液。可包含添加剂, 例如 QuilA 皂苷、胆固醇、皂苷-亲脂体偶联物(如通过葡糖醛酸的羧基将脂族胺加到脱酰基皂苷上而产生的 GPI-0100, 参见参考文献 109)、二甲基二-十八烷基溴化铵和/或 N,N-二-十八烷基-N,N-双(2-羟乙基)丙二胺。

含有矿物油、非离子型亲脂乙氧基化脂肪醇和非离子型亲水表面活性剂(如乙氧基化脂肪醇和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物)的乳液[110]。

含有矿物油、非离子型亲水乙氧基化脂肪醇和非离子型亲脂表面活性剂(如乙氧基化脂肪醇和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物)的乳液[110]。

皂苷(如 QuilA 或 QS21)和固醇(如胆固醇)结合成螺旋胶束的乳液[111]。

可以在递送时将该乳液与抗原临时混合。因此,在包装或出售的疫苗中该佐剂和抗原可分开保存,使用时配制成最终制剂。抗原通常是水性形式,以便最终通过混合两种液体制备疫苗。混合的两种液体的体积比可变(例如 5:1-1:5),但通常约为 1:1。

将抗原与佐剂混合之后,血凝素抗原通常保留在水溶液中,但其本身可分布于油/水界面附近。通常,血凝素很少(如果有)会进入该乳液的油相。

当组合物包含生育酚时,可使用 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 或 ξ 生育酚中任何一种,但优选 α -生育酚。生育酚可采取不同形式,例如不同的盐和/或异构体。盐包括有机盐,例如琥珀酸盐、乙酸盐、烟酸盐等。D- α -生育酚和 DL- α -生育酚均可使用。用于老年患者(如年龄大于 60 岁或更大的患者)的疫苗中宜包含生育酚,因为据报道维生素 E 在此患者群体中对免疫应答有正面作用[112]。它们也具有抗氧化特性,这种特性有助于稳定该乳液[113]。优选的 α -生育酚是 DL- α -生育酚,这种生育酚的优选盐是琥珀酸盐。发现琥珀酸盐在体内能与 TNF 相关配体协作。而且,已知琥珀酸 α -生育酚与流感疫苗相容,并且是有用的替代含汞化合物的防腐剂[11]。

细胞因子诱导剂

给予患者时包含在本发明组合物中的细胞因子诱导剂能够引发免疫应答,以释放细胞因子,包括干扰素和白细胞介素。已知细胞因子应答参与针对流感病毒感染的宿主防御的早期和决定阶段[114]。优选药剂可引发以下一种或多种物质的释放:干扰素 γ ; 白细胞介素-1; 白细胞介素-2; 白细胞介素-12; TNF- α ; TNF- β ; 和 GM-CSF。优选的药剂引发与 Th1 型免疫应答有关的细胞因子释放,如干扰素 γ 、TNF- α 、白介素-2。优选刺激干扰素- γ 和白细胞介素-2。

因此,接受本发明组合物的结果是,用流感抗原刺激时,患者的 T 细胞以抗原特异性方式释放所需细胞因子。例如,由血液纯化的 T 细胞在体外接触流感病毒血凝素时释放 γ 干扰素。本领域已知测定外周血单核细胞的这类应答的方法,包括 ELISA、ELISPOT、流式细胞术和实时 PCR。例如,参考文献 115

报道了监测针对破伤风类毒素的抗原特异性 T 细胞介导的免疫应答,特别是 γ 干扰素应答的一项研究,发现 ELISPOT 是区分抗原特异性 TT 诱导的应答与自发性应答的最灵敏的方法,但通过流式细胞术检测胞浆内细胞因子则是检测再刺激作用的最有效方法。

合适的细胞因子诱导剂包括但不限于:

免疫刺激性寡核苷酸,例如含有 CpG 基序的寡核苷酸(含有通过磷酸键连接于鸟嘌呤的未甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)、或双链 RNA、或含有回文序列的寡核苷酸、或含有聚(dG)序列的寡核苷酸。

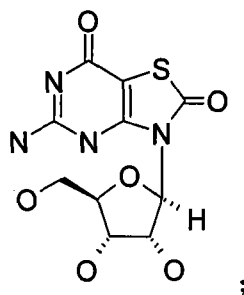
3-O-脱酰化单磷酸脂质 A ('3dMPL', 也称为'MPL™') [116-119]。

咪唑喹啉化合物,如咪唑莫特("R-837") [120,121]、瑞喹莫德("R-848") [122]、和它们的类似物;以及它们的盐(如盐酸盐)。有关免疫刺激性咪唑喹啉的其它细节可参见参考文献 123-127。

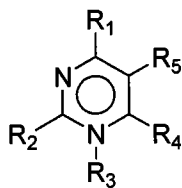
缩氨基硫脲化合物,如参考文献 128 所述的化合物。参考文献 129 中也描述了配制、制备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF- α 方面特别有效。

色胺酮化合物,如参考文献 129 所述的化合物。参考文献 129 中也描述了配制、制备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF- α 方面特别有效。

核苷类似物,如(a)艾沙托立宾(Isatorabine)(ANA-245; 7-硫杂-8-氧代鸟苷)及其前药:



(b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) 参考文献 130-132 所述的化合物; (f) 具有下式的化合物:

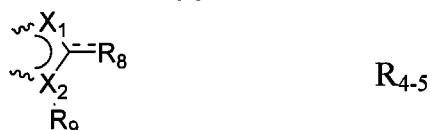


式中:

R₁ 和 R₂ 各自独立地是氢、卤素、-NR_aR_b、-OH、C₁₋₆ 烷氧基、取代的 C₁₋₆ 烷氧基、杂环基、取代的杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、取代的 C₆₋₁₀ 芳基、C₁₋₆ 烷基、或取代的 C₁₋₆ 烷基;

R₃ 不存在, 或者是 H、C₁₋₆ 烷基、取代的 C₁₋₆ 烷基、C₆₋₁₀ 芳基、取代的 C₆₋₁₀ 芳基、杂环基、或取代的杂环基;

R₄ 和 R₅ 各自独立地是氢、卤素、杂环基、取代的杂环基、-C(O)-R_d、C₁₋₆ 烷基、取代的 C₁₋₆ 烷基、或结合在一起形成 5 元环, 如 R₄₋₅:



在 ~~~ 所示的化学键处实现结合,

X₁ 和 X₂ 各自独立地是 N、C、O 或 S;

R₈ 是氢、卤素、-OH、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、-OH、-NR_aR_b、-(CH₂)_n-O-R_c、-O-(C₁₋₆ 烷基)、-S(O)_pR_e、或 -C(O)-R_d;

R₉ 是氢、C₁₋₆ 烷基、取代的 C₁₋₆ 烷基、杂环基、取代的杂环基或 R_{9a}, 其中 R_{9a} 是:



在 ~~~ 所示的化学键处实现结合,

R₁₀ 和 R₁₁ 各自独立地是氢、卤素、C₁₋₆ 烷氧基、取代的 C₁₋₆ 烷氧基、-NR_aR_b、或 -OH;

R_a 和 R_b 各自独立地是氢、C₁₋₆ 烷基、取代的 C₁₋₆ 烷基、-C(O)-R_d、C₆₋₁₀ 芳基;

R_c 各自独立地是氢、磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、C₁₋₆ 烷基、或取代的 C₁₋₆ 烷基;

R_d 各自独立地是氢、卤素、C₁₋₆ 烷基、取代的 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、取代的 C₁₋₆ 烷氧基、-NH₂、-NH(C₁₋₆ 烷基)、-NH(取代的 C₁₋₆ 烷基)、-N(C₁₋₆ 烷基)₂、

-N(取代的 C₁₋₆ 烷基)₂、C₆₋₁₀ 芳基、或杂环基；

R_e 各自独立地是氢、C₁₋₆ 烷基、取代的 C₁₋₆ 烷基、C₆₋₁₀ 芳基、取代的 C₆₋₁₀ 芳基、杂环基、或取代的杂环基；

R_f 各自独立地是氢、C₁₋₆ 烷基、取代的 C₁₋₆ 烷基、-C(O)-R_d、磷酸酯、二磷酸酯、或三磷酸酯基；

n 各自独立地是 0、1、2 或 3；

p 各自独立地是 0、1 或 2；或

或者(g)(a)-(f)中任一项的药学上可接受的盐，(a)-(f)中任一项的互变异构体，或互变异构体的药学上可接受的盐。

洛索立宾(7-烯丙基-8-氧代鸟苷)[133]。

参考文献 134 所述化合物，包括：酰基哌嗪化合物、吡啶二酮化合物、四氢异喹啉(THIQ)化合物、苯并环二酮化合物、氨基氮杂乙烯基化合物、氨基苯并咪唑喹啉酮(ABIQ)化合物[135,136]、水合酞酰胺(hydraphtalamide)化合物、苯并苯基酮化合物、异噁唑化合物、固醇化合物、喹啉酮(quinazolinone)化合物、吡咯化合物[137]、蒽醌化合物、喹啉化合物、三嗪化合物、吡唑并嘧啶化合物、和吡啶化合物[138]。

聚氧鎓(polyoxidonium)聚合物[139,140]或其他 N-氧化的聚乙烯-哌嗪衍生物。

参考文献 141 所述化合物。

氨烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物，如 RC-529[142,143]。

CD1d 配体，如 α-糖基神经酰胺[144-151](例如 α-半乳糖基神经酰胺)、含植物鞘氨醇的 α-糖基神经酰胺、OCH、KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-吡喃乳糖基)-2-(N-二十六烷基氨基)-1,3,4-十八烷三醇]、CRONY-101、3"-O-硫代-半乳糖基神经酰胺，等等。

磷腈，如参考文献 152 和 153 中所述的聚[二(羧酸苯氧基)磷腈](poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene]，"PCPP")。

小分子免疫增强剂(SMIP)，例如：

N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺

N2,N2-二甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺

N2-乙基-N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N2-丙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
1-(2-甲基丙基)-N2-丙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2-丁基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2-丁基-N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N2-戊基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N2-丙-2-烯基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
1-(2-甲基丙基)-2-[(苯基甲基)硫代]-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺
1-(2-甲基丙基)-2-(丙硫基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺
2-[[4-氨基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-基](甲基)氨基]乙醇
2-[[4-氨基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4-c]喹啉-2-基](甲基)氨基]乙酸乙酯
4-氨基-1-(2-甲基丙基)-1,3-二氢-2H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2-酮
N2-丁基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2-丁基-N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
N2,N2-二甲基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺
1-{4-氨基-2-[甲基(丙基)氨基]-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基}-2-甲基丙-2-醇
1-[4-氨基-2-(丙基氨基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]-2-甲基丙-2-醇
N4,N4-二苄基-1-(2-甲氧基-2-甲基丙基)-N2-丙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-2,4-二胺。

用于本发明的细胞因子诱导剂可以是 Toll 样受体(TLR)的调节剂和/或激动剂。例如，它们可以是人 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 和/或 TLR9 蛋白中一种或多种的激动剂。优选试剂是 TLR7 激动剂(如咪唑并喹啉)和/或 TLR9 激动剂(如 CpG 寡核苷酸)。这些试剂可用于激活先天性免疫途径。

可以在本发明组合物生产过程的各个阶段加入细胞因子诱导剂。例如，可

将其加入抗原组合物中,然后将此混合物加入水包油乳液中。或者,可将其加入水包油乳液中,在这种情况下可以在乳液组分乳化之前加入该试剂,或者可以在乳液乳化后加入该试剂。相似地,该试剂可以凝聚在乳液液滴中。细胞因子诱导剂在最终组合物中的位置和分布将取决于其亲水/亲脂特性,例如该药剂可位于水相、油相和/或油水界面上。

该细胞因子诱导剂可偶联于另一种试剂,如抗原(如 CRM197)。参考文献 154 中提供了有关小分子偶联技术的综述。或者,佐剂可与其它试剂非共价(例如通过疏水作用或离子相互作用)结合。

两种优选的细胞因子诱导剂是(a)免疫刺激性寡核苷酸和(b)3dMPL。

免疫刺激性寡核苷酸可包含核苷酸修饰/类似物,如硫代磷酸酯修饰,可以是双链或(除 RNA 外)单链。参考文献 155、156 和 157 公开了可能的类似取代,例如用 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷代替鸟苷。参考文献 158-163 中进一步讨论了 CpG 寡核苷酸的佐剂作用。CpG 序列可能导向 TLR9,例如基序 GTCGTT 或 TTCGTT[164]。CpG 序列可特异性诱导 Th1 免疫应答,例如 CpG-A ODN(寡脱氧核糖核苷酸),或更特异地诱导 B 细胞应答,例如 CpG-B ODN。参考文献 165-167 中讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。CpG 优选 CpG-A ODN。优选构建 CpG 寡核苷酸时使其 5'端可为受体所识别。任选将两个 CpG 寡核苷酸序列的 3'端相连接形成“免疫聚体”。参见例如,参考文献 164 和 168-170。有用的 CpG 佐剂是 CpG7909,也称为 ProMune™ (科雷制药集团公司(Coley Pharmaceutical Group, Inc.))。

或者,或此外,除使用 CpG 序列外,也可使用 TpG 序列[171]。这些寡核苷酸可以不含未甲基化的 CpG 基序。

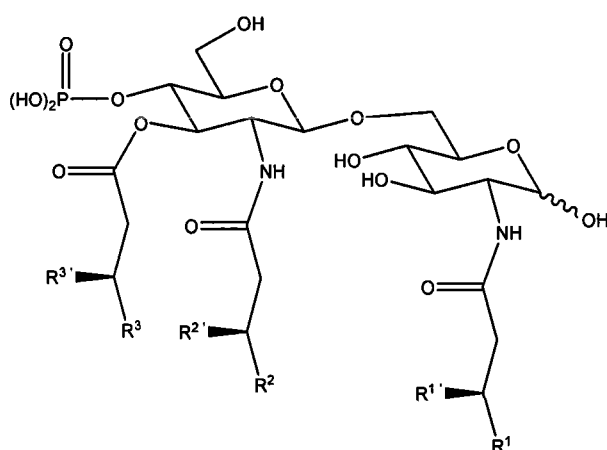
免疫刺激性寡核苷酸可能富含嘧啶。例如,它可能含有一个以上连续的胸腺嘧啶核苷酸(例如,参考文献 171 所公开的 TTTT),和/或它的核苷酸组成中可能含有>25%胸腺嘧啶(例如>35%、>40%、>50%、>60%、>80%等)。例如,它可能含有一个以上连续的胞嘧啶核苷酸(例如,参考文献 171 所公开的 CCCC),和/或它的核苷酸组成中可能含有>25%胞嘧啶(例如>35%、>40%、>50%、>60%、>80%等)。这些寡核苷酸可以不含未甲基化的 CpG 基序。

免疫刺激性寡核苷酸一般含有至少 20 个核苷酸。它们可含有少于 100 个

核苷酸。

3dMPL(也称为 3 脱-O-酰化单磷酸脂质 A 或 3-O-脱酰化-4'-单磷酸脂质 A) 是单磷酸脂质 A 的还原性末端葡萄糖胺的 3 位脱酰化的佐剂。3dMPL 可由明尼苏达沙门菌(*Salmonella minnesota*)的无庚糖突变体制备, 在化学上类似于脂质 A, 但缺少酸-不稳定性磷酸基和碱-不稳定性酰基。它能激活单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞, 并刺激几种细胞因子的释放, 包括 IL-1、IL-12、TNF- α 和 GM-CSF(也参见参考文献 172)。参考文献 173 最先描述了 3dMPL 的制备。

3dMPL 可以采取酰基化不同的相关分子(如具有 3、4、5 或 6 个酰基链, 它们的长度可以不同)的混合物的形式。两个葡萄糖胺(也称为 2-脱氧-2-氨基-葡萄糖)单糖在其 2-位(即 2 和 2'位)碳上 N-酰基化, 3'位上也有 O-酰基化。连接于碳 2 的基团具有下式: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^1\text{R}^{1'}$ 。连接于碳 2'的基团具有下式: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^2\text{R}^{2'}$ 。连接于碳 3'的基团具有下式: $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^3\text{R}^{3'}$ 。代表性结构为:



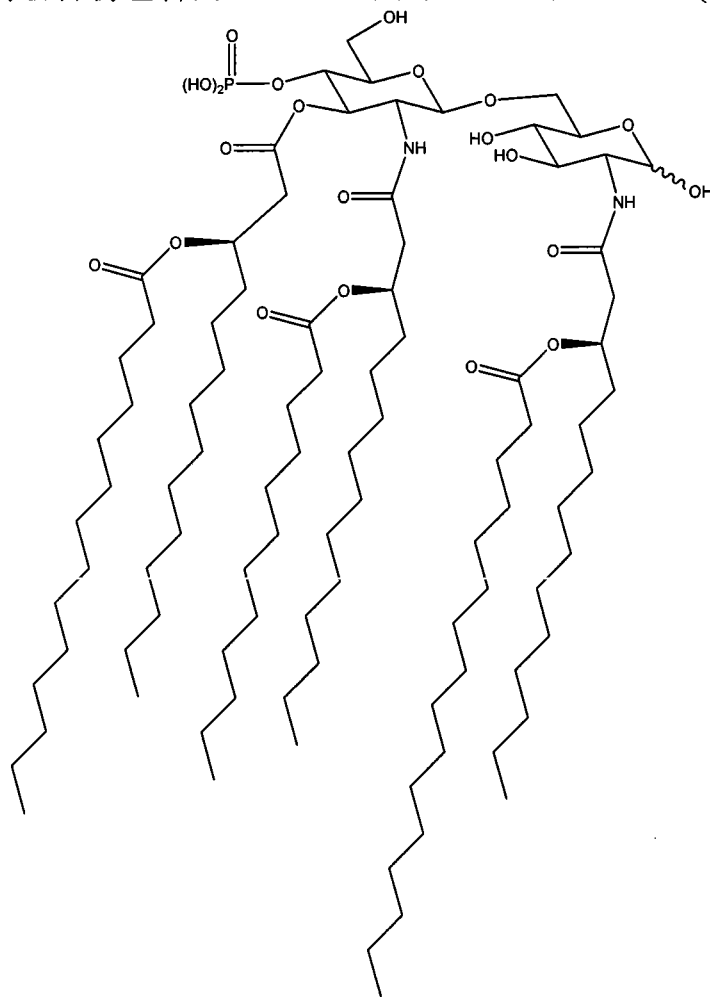
基团 R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地是 $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ 。n 值优选为 8-16, 更优选为 9-12, 最优选为 10。

基团 $\text{R}^{1'}$ 、 $\text{R}^{2'}$ 和 $\text{R}^{3'}$ 各自独立地是: (a)-H; (b)-OH; 或(c)-O-CO- R^4 , 其中 R^4 是-H 或 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, 其中 m 值优选为 8-16, 更优选为 10、12 或 14。在 2 位上, m 优选为 14。在 2'位上, m 优选为 10。在 3'位上, m 优选为 12。基团 $\text{R}^{1'}$ 、 $\text{R}^{2'}$ 和 $\text{R}^{3'}$ 优选为来自十二烷酸、十四烷酸或十六烷酸的-O-酰基。

$\text{R}^{1'}$ 、 $\text{R}^{2'}$ 和 $\text{R}^{3'}$ 均为-H 时, 3dMPL 仅含有 3 条酰基链(2、2'和 3'位置上各有一条)。 $\text{R}^{1'}$ 、 $\text{R}^{2'}$ 和 $\text{R}^{3'}$ 中仅有两个是-H 时, 3dMPL 可含有 4 条酰基链。 $\text{R}^{1'}$ 、 $\text{R}^{2'}$ 和 $\text{R}^{3'}$ 中仅有一个是-H 时, 3dMPL 可含有 5 条酰基链。 $\text{R}^{1'}$ 、 $\text{R}^{2'}$ 和 $\text{R}^{3'}$ 中没有一

个是-H时, 3D-MPL可含有6条酰基链。本发明所用的3dMPL佐剂可以是含有3-6条酰基链的这些形式的混合物, 但混合物中优选包含具有6条酰基链的3dMPL, 具体说, 保证6条酰基链的形式占3dMPL总重的至少10%, 例如 $\geq 20\%$ 、 $\geq 30\%$ 、 $\geq 40\%$ 、 $\geq 50\%$ 或更多。发现具有6条酰基链的3dMPL是佐剂活性最高的形式。

因此, 本发明组合物包含的3dMPL的最优选形式具有下式(IV)。



以混合物的形式使用3dMPL时, 提到3dMPL在本发明组合物中的含量或浓度, 指混合物中的混合3dMPL物质。

在水性条件下, 3dMPL可形成不同大小, 如直径 $<150\text{nm}$ 或 $>500\text{nm}$ 的胶束聚集体或颗粒。其中一种或两者都可用于本发明, 可通过常规实验选择更好的颗粒。本发明优选使用小颗粒(如小到足以产生澄清的3dMPL水悬液), 因为它们活性高[174]。优选颗粒的平均直径小于 220nm , 更优选小于 200nm , 小于 150nm , 或小于 120nm , 它们的直径甚至可以小于 100nm 。然而在大多数

情况下, 平均直径不小于 50nm。这些颗粒足够小, 以便适合过滤除菌。可用揭示平均粒径的常规技术动态光散射评价粒径。据称颗粒的直径为 x nm 时, 粒径通常分布在此平均值附近, 但至少 50 数量%(例如 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 或更多)颗粒的直径在 $x \pm 25\%$ 的范围内。

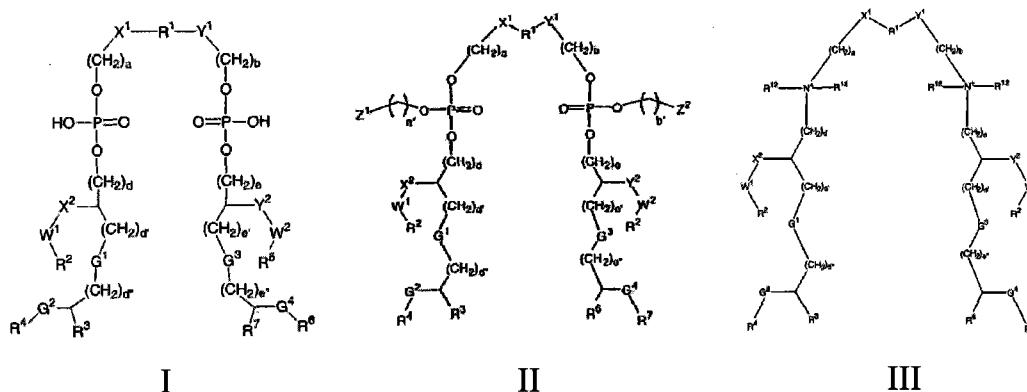
3dMPL 宜与水包油乳液联合使用。基本上所有 3dMPL 均位于该乳液的水相中。

3dMPL 可以独自使用, 或者与一种或多种其它化合物联用。例如, 已知将 3dMP 与以下物质联用: QS21 皂苷[175](包含在水包油乳液中[176])、免疫刺激性寡核苷酸、QS21 和免疫刺激性寡核苷酸、磷酸铝[177]、氢氧化铝[178]或磷酸铝和氢氧化铝。

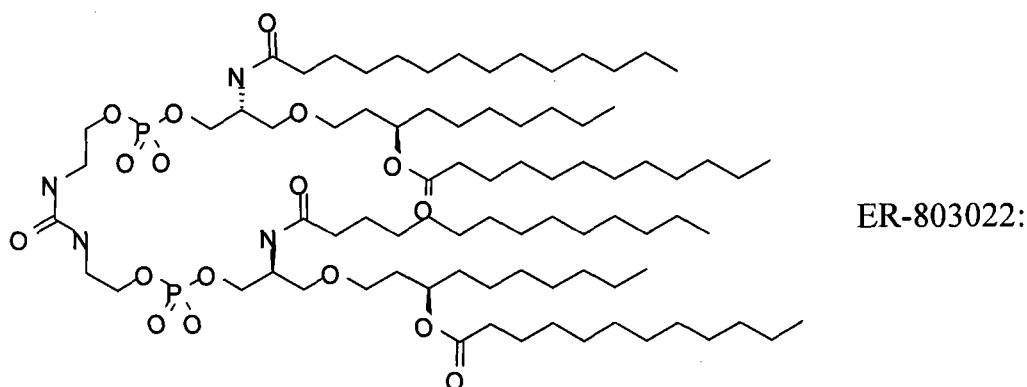
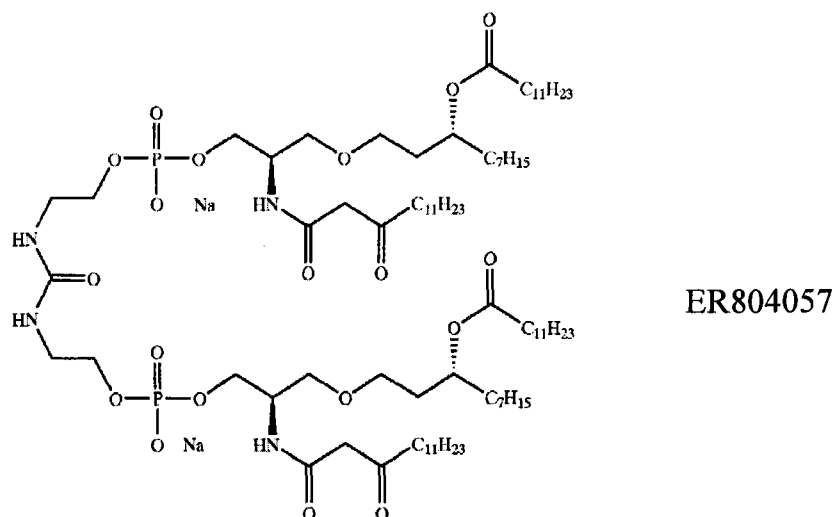
脂肪佐剂

可用于本发明的脂肪佐剂包括上述水包油乳液, 还包括例如:

式 I、II 或 III 的化合物或其盐:



如参考文献 179 所述, 如'ER 803058'、'ER 803732'、'ER 804053'、'ER 804058'、'ER 804059'、'ER 804442'、'ER 804680'、'ER 804764'、'ER 803022'或'ER 804057', 如:

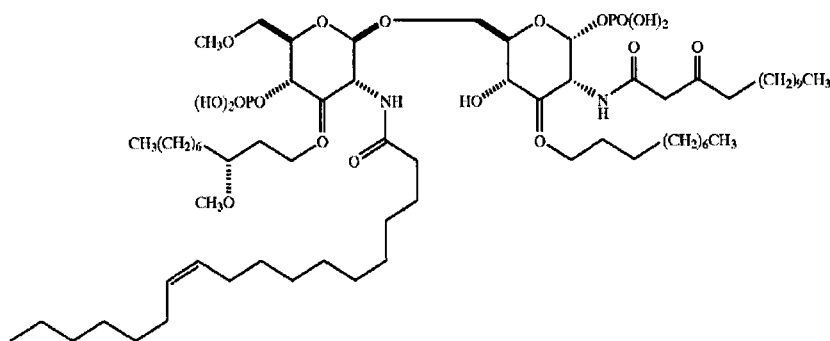


• 大肠杆菌(*Escherichia coli*)的脂质 A 的衍生物如 OM-174(如参考文献 180 和 181 所述)。

• 阳离子脂质与(通常为中性)共脂质(co-lipid)的制剂, 如氨基丙基-二甲基-肉豆蔻烯酰氧基-溴化丙铵-二植酰基磷脂酰-乙醇胺("Vaxfectin™")或氨基丙基-二甲基-双十二烷基氧基-溴化丙铵-二油酰基磷脂酰-乙醇胺("GAP-DLRIE:DOPE")的制剂。优选含有(±)-N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(顺-9-四癸烯氧基)-1-丙铵盐的制剂[182]。

• 3-O-脱酰化单磷酸脂质 A(见上)。

• 含有连接于含磷酸开环主链的脂质的化合物, 如 TLR4 拮抗剂 E5564[183,184]:



铝盐佐剂

可使用称为氢氧化铝和磷酸铝的佐剂。这些名称是常规名称,但仅为方便使用,因为它们都不是所代表的实际化合物的准确描述[例如参见参考文献 104 的第 9 章]。本发明可采用通常用作佐剂的任何"氢氧化物"或"磷酸盐"佐剂。

称为"氢氧化铝"的佐剂一般是羟基氧化铝盐(通常至少部分为晶体)。可采用红外(IR)光谱将式 $\text{AlO}(\text{OH})$ 代表的羟基氧化铝与其它铝化合物,如氢氧化铝 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 区别开,具体区别是 1070cm^{-1} 处存在吸收条带和 $3090\text{-}3100\text{cm}^{-1}$ 处存在强肩峰[参考文献 104 的第 9 章]。半高时衍射条带的宽度(WHH)反映出氢氧化铝佐剂的结晶度,结晶差的颗粒由于结晶较小而谱线增宽较大。随着 WHH 增加,表面积增大,观察到 WHH 值较高的佐剂具有较大的抗原吸附能力。纤维形态(如透射电镜照片中所见)是氢氧化铝佐剂的典型形态。氢氧化铝佐剂的 pI 一般约为 11,即该佐剂本身在生理 pH 下表面带正电荷。据报道, pH 7.4 时氢氧化铝佐剂的吸附容量为 1.8-2.6 毫克蛋白质/毫克 Al^{+++} 。

称为"磷酸铝"的佐剂一般是羟基磷酸铝,也常常含有少量硫酸盐(即羟基磷酸硫酸铝)。它们可通过沉淀获得,沉淀期间的反应条件和浓度都会影响该盐中磷酸取代羟基的程度。羟基磷酸盐的 PO_4/Al 摩尔比通常为 0.3-1.2。可以通过是否存在羟基将羟基磷酸盐与严格的 AlPO_4 区别开。例如, 3164cm^{-1} 处的 IR 谱带(例如加热到 200°C)表明存在结构羟基[参考文献 104 的第 9 章]。

磷酸铝佐剂的 $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$ 摩尔比通常为 0.3-1.2,优选为 0.8-1.2,更优选为 0.95 ± 0.1 。磷酸铝通常是无定形的,尤其是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 PO_4/Al 摩尔比为 0.84-0.92 的无定形的羟基磷酸铝,每毫升包含 0.6mg Al^{3+} 。磷酸铝通常是颗粒(如在透射电子显微镜照片上观察到的板状形态)。抗原吸附后颗粒直径一般是 $0.5\text{-}20\mu\text{m}$ (如约 $5\text{-}10\mu\text{m}$)。据报道, pH 7.4 时磷酸铝佐剂的吸附容量为 0.7-1.5 毫克蛋白质/毫克 Al^{+++} 。

磷酸铝的零电荷点(PZC)与磷酸对羟基的取代程度逆相关,这种取代程度可能取决于用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度。也可通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(更多磷酸根=偏酸性 PZC)或加入缓冲液如组氨酸缓冲液(使 PZC 偏碱性)来改变 PZC。本发明所用的磷酸铝的 PZC 通常为 4.0-7.0,更优选为 5.0-6.5,例如约为 5.7。

用于制备本发明组合物的铝盐悬浮液可以,但不一定含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸或 Tris 缓冲液)。该悬浮液优选无菌且无热原。该悬浮液可含有游离的水性磷酸根离子,如浓度为 1.0-20 mM,优选 5-15 mM,更优选约 10 mM 的磷酸根离子。该悬浮液也可含有氯化钠。

本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝的混合物[65]。在这种情况下,磷酸铝比氢氧化铝多,例如重量比为至少 2:1,例如 $\geq 5:1$ 、 $\geq 6:1$ 、 $\geq 7:1$ 、 $\geq 8:1$ 、 $\geq 9:1$ 等。

给予患者的组合物中 Al^{+++} 的浓度优选小于 10mg/ml,例如 ≤ 5 mg/ml、 ≤ 4 mg/ml、 ≤ 3 mg/ml、 ≤ 2 mg/ml、 ≤ 1 mg/ml 等。优选范围是 0.3-1 mg/ml。最大值优选为 0.85 毫克/剂量。

除包含一种或多种铝盐佐剂外,佐剂组分还可包含一种或多种其它佐剂或免疫刺激剂。其它这类组分包括但不限于:3-O-脱酰化单磷酰脂质 A 佐剂('3d-MPL');和/或水包油乳液。3dMPL 也称为 3 脱-O-酰化单磷酰脂质 A 或 3-O-脱酰化-4'-单磷酰脂质 A。该命名表明单磷酰脂质 A 的还原性末端葡糖胺的 3 位脱酰化。它是由明尼苏达沙门菌(*S. minnesota*)的无庚糖突变体(heptoseless mutant)制备,在化学上类似于脂质 A,但缺少酸-不稳定性磷酰基和碱-不稳定性酰基。它能激活单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞,并刺激释放几种细胞因子,包括 IL-1、IL-12、TNF- α 和 GM-CSF。最初在参考文献 173 中描述了 3d-MPL 的制备,该产品由考科萨公司(Corixa Corporation)生产并以商品名 MPL™出售。其它详情可参见参考文献 116-119。

药物组合物

本发明组合物优选为药学上可接受的组合物。除抗原外,它们通常还包含其它组分,例如它们一般包含一种或多种药物载体和/或赋形剂。对这类组分的充分讨论参见参考文献 185。

该组合物通常是水性形式。

该组合物可含有防腐剂，如硫柳汞或 2-苯氧乙醇。然而，疫苗优选应基本不含(即小于 5 $\mu\text{g/ml}$)汞物质，如不含硫柳汞[11,186]。更优选不含汞的疫苗。特别优选不含防腐剂的疫苗。

为了控制张力，优选包含生理性盐如钠盐。优选氯化钠(NaCl)，它的浓度可以是 1-20 mg/ml 。可以存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、二水合磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。

组合物的渗透压通常为 200-400 mOsm/kg ，优选为 240-360 mOsm/kg ，更优选为 290-310 mOsm/kg 。虽然以前报道过渗透压对疫苗接种引起的疼痛无影响[187]，但优选将渗透压保持在此范围内。

组合物可含有一种或多种缓冲剂。缓冲剂一般包括：磷酸盐缓冲剂；Tris 缓冲剂；硼酸盐缓冲剂；琥珀酸盐缓冲剂；组氨酸缓冲剂；或柠檬酸盐缓冲剂。包含的缓冲剂的浓度一般是 5-20 mM 。缓冲剂可存在于乳剂水相中。

组合物的 pH 通常为 5.0-8.1，更一般为 6.0-8.0，例如 6.5-7.5，或者 7.0-7.8。因此，本发明方法可包括在包装前调整原料疫苗 pH 的步骤。

该组合物优选无菌。该组合物优选无热原，如每剂量含量 $<1\text{EU}$ (内毒素单位，标准量度)，优选每剂量 $<0.1\text{EU}$ 。该组合物优选不含谷蛋白。

疫苗中可包含痕量的残余组分，如抗生素(例如新霉素、卡那霉素、多粘菌素 B)。

该组合物可含有一次免疫的物质，或者可含有多次免疫的物质(即‘多剂量’组合物)。采用多剂量方式时优选含有防腐剂。作为多剂量组合物中包含防腐剂的替代方案(或除此之外)，该组合物可包装具有在用于取出物质的无菌接头的容器中。

流感疫苗的典型给药体积约为 0.5 ml ，但也可将一半剂量(即约 0.25 ml)给予儿童，并相应地选择单位剂量，如将 0.5 ml 的单位剂量给予患者。

组合物或药盒组分的包装

本发明的方法可包括将疫苗置入容器内、尤其是置入销售容器以供医师使用的步骤。装入这种容器之后，该容器无需冷藏。

适用于该疫苗容器包括药瓶、鼻喷雾和一次性注射器等，这些容器应无菌。

组合物/组分位于药瓶中时,该药瓶优选由玻璃或塑料材料制成。在将组合物加入药瓶之前,优选对其进行消毒。为了避免胶乳敏感型患者的问题,优选用无胶乳的塞子密封药瓶,优选所有包装材料中不含胶乳。药瓶可包括单一剂量的疫苗,或者可以包括一个以上剂量('多剂量'药瓶),如 10 个剂量。优选的药瓶由无色玻璃制成。

药瓶可以有适合的帽(如路厄锁),以便将预填装注射器插入该帽,将注射器的内容物推入药瓶(如在其中重建冻干物质),并将药瓶的内容物吸回注射器中。从药瓶中拔出注射器后,可连上针头,并将该组合物给予患者。该帽优选位于封口或盖子内侧,以便在封口或盖子打开后才能接触到该帽。药瓶,特别是多剂量药瓶装瓶帽,以便无菌地取出其内含物。

某组分包装在注射器中时,该注射器可连有针头。如果未连接针头,可随注射器提供单独的针头以便组装和使用。这种针头可装在护罩中。优选安全性针头。一般是 1-英寸 23-号、1-英寸 25-号和 5/8-英寸 25-号针头。可提供有剥离标签的注射器,该标签上可打印上批号、流感季节和过期日期,以帮助记录保存。注射器的活塞优选带有抑止装置,以防止活塞在吸出时偶然脱出。注射器可以有胶乳橡胶帽和/或活塞。一次性注射器含有单一剂量的疫苗。注射器通常带有顶帽,以在连接针头前密封顶端,顶帽优选由丁基橡胶制成。如果注射器和针头分开包装,那么针头优选装有丁基橡胶护罩。优选的注射器是以商品名"Tip-Lok"TM销售的注射器。

容器可标注有半剂量体积,以便递送给儿童。例如,含有 0.5 ml 剂量的注射器可标有 0.25 ml 体积的标记。

采用玻璃容器(如注射器或药瓶)时,优选采用由硼硅酸盐玻璃,而非钠钙玻璃制成的容器。

可将药盒或组合物与单页宣传品包装在一起(在同一个箱子中),所述单页宣传品包括疫苗的详细信息如给药说明书、疫苗内所含抗原的详情等。说明书也可包含警告,(例如)准备好肾上腺素溶液以应对疫苗接种后发生过敏反应的情况等。

治疗方法和疫苗的给药

本发明组合物适合给予人类患者,本发明提供了在患者中产生免疫应答的

方法，该方法包括将本发明组合物给予患者的步骤。

本发明也提供用作药物的本发明药盒或组合物。

这些方法和应用引发的免疫应答通常包括抗体应答，优选保护性抗体应答。评价接种流感病毒疫苗后抗体应答、中和能力和保护作用的方法是本领域众所周知的。人体研究表明，对人流感病毒血凝素的抗体效价与保护作用相关(约 30-40 的血清样品血凝反应-抑制效价对同源病毒感染产生约 50%保护作用)[188]。一般通过血凝反应抑制、微量中和、单径向免疫扩散和/或单径向溶血(SRH)来测定抗体应答。本领域熟知这些测定技术。

可以各种方式给予本发明组合物。最优选的免疫途径是肌肉注射(如注射到上肢或下肢)，但其它可用的途径包括皮下注射、鼻内[189-191]、口服[192]、皮内[193,194]、经皮、透皮[195]等。

可采用按照本发明制备的疫苗来治疗儿童和成年人。目前，推荐将流感疫苗用于年龄>6 个月的儿童和成年人免疫。因此，患者可以小于 1 岁、1-5 岁、5-15 岁、15-55 岁或至少 55 岁。接受该疫苗的优选患者是老年人(例如≥50 岁、≥60 岁，优选≥65 岁)、年轻人(如≤5 岁)、住院患者、健康护理工作人员、军队服务人员和军人、妊娠妇女、慢性疾病患者、免疫缺陷患者、在接受该疫苗前 7 天接受过抗病毒化合物(如奥塞米韦或扎那米韦化合物；见下)的患者、对鸡蛋过敏的人和出国旅行者。然而，该疫苗不只适用于这些人群，还可以在更广泛的人群中使用。就大流行毒株而言，优选给予所有年龄的人。

本发明优选组合物满足 CPMP 的功效标准 1、2 或 3。在成年人(18-60 岁)中，这些标准是：(1)≥70%血清保护；(2)≥40%血清转化；和/或(3)GMT 增加≥2.5 倍。在老年人(>60 岁)中，这些标准是：(1)≥60%血清保护；(2)≥30%血清转化；和/或(3)GMT 增加≥2 倍。这些标准基于至少 50 位患者的标签公开研究。

可以通过单剂量方案或多剂量方案进行治疗。多剂量可用于初免方案和/或加强免疫方案。在多剂量方案中，可通过相同或不同途径给予各种剂量，例如初免采用胃肠外途径而加强免疫采用粘膜途径，等等。给予一个以上剂量(一般是两个剂量)特别可用于免疫未曾免疫接触的患者，例如从未接受过流感疫苗的人，或者用于免疫对抗新的 HA 亚型(如大流行爆发中的亚型)。多剂量的给予一般至少间隔 1 周(例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约

10 周、约 12 周、约 16 周等)。

可将本发明产生的疫苗与其它疫苗基本上同时给予患者(在对健康护理专业人员或疫苗接种中心的同一次用药咨询或访问期间),例如与麻疹疫苗、腮腺炎疫苗、风疹疫苗、MMR 疫苗、水痘疫苗、MMRV 疫苗、白喉疫苗、破伤风疫苗、百日咳疫苗、DTP 疫苗、偶联的乙型流感嗜血杆菌疫苗、脊髓灰质炎病毒灭活疫苗、乙型肝炎病毒疫苗、脑膜炎球菌偶联疫苗(如四价 A-C-W135-Y 疫苗)、呼吸道合胞病毒疫苗、肺炎球菌偶联疫苗等同时给药。

相似地,可将本发明疫苗与抗病毒化合物,具体是对流感病毒有活性的抗病毒化合物(如奥塞米韦和/或扎那米韦)基本上同时给予患者(在对健康护理专业人员的同一次用药咨询或访问期间)。这些抗病毒化合物包括神经氨酸酶抑制剂,如(3R,4R,5S)-4-乙酰基氨基-5-氨基-3(1-乙基丙氧基)-1-环己烯-1-羧酸或 5-(乙酰基氨基)-4-[(氨基亚氨基甲基)-氨基]-2,6-脱水-3,4,5-三脱氧-D-甘油-D-半乳糖壬-2-烯酮酸,包括它们的酯(如乙酯)和盐(如磷酸盐)。优选的抗病毒化合物是(3R,4R,5S)-4-乙酰基氨基-5-氨基-3(1-乙基丙氧基)-1-环己烯-1-羧酸的乙酯和磷酸盐(1:1),也称为磷酸奥塞米韦(TAMIFLU™)。

概述

术语“含有”包括“包含”以及“由.....组成”,例如“含有”X 的组合物排他性地由 X 组成或者可包含其他物质,例如 X+Y。

术语“基本上”不排除“完全”,如“基本上不含”Y 的组合物可能完全不含 Y。必要时,可从本发明定义中删去术语“基本上”。

与数值 x 相关的术语“约”表示,例如 $x \pm 10\%$ 。

除非另有说明,包括混合两种或多种组分的步骤的方法不要求任何特定的混合顺序。因此,可以任何顺序混合这些组分。有三种组分时,两种组分可以相互混合,然后将混合的组分再与第三种组分混合,等等。

将动物(特别是牛)材料用于培养细胞时,它们应获自未患传染性海绵状脑病(TSE),特别是未患牛海绵状脑病(BSE)的来源。总之,优选在完全不含动物来源物质的情况下培养细胞。

当某化合物作为组合物的一部分给予人体时,该化合物可选地由合适的前药所替换。

当使用细胞底物进行病毒再造或逆向遗传学方法时，优选批准用于人类疫苗生产的细胞底物，例如欧洲药典总纲 5.2.3 所述的细胞底物。

优选通过 MPSRCH 程序(牛津分子科技公司(Oxford Molecular))执行的 Smith-Waterman 同源性搜索算法，利用仿射缺口搜索测定多肽序列之间的相同性，其中参数为缺口开放罚分=12、缺口延伸罚分=1。

附图简述

图 1-7 显示了随时间(2-8℃的月数；37℃的天数)测得的以下样品的 HA 水平(μg/mL)：

图	甲型流感		乙型流感		温度 (°C)
	New Caledonia	Panama	Guangdong	Shangdong	
1	X				2-8
2		X			2-8
3			X		37
4	X				37
5	X	X	X		2-8
6	X	X	X		2-8
7	X	X		X	37

图 8 将 23-27℃时 B/Jiangsu 的 HA 含量(μg/ml)外推到 80 周。数据采用独立或均一(homogeneous)模型进行统计学分析，该图显示的回归线采取 95%置信限。将乙型流感病毒的数据与参考文献 2 的数据比较显示，本发明的材料具有较长保存期。

本发明的实施方式

各种流感病毒株在 MDCK 细胞底物上培养[30]：A/Panama (H3N2)；A/New Caledonia (H1N1)；A/Wyoming (H3N2)；A/Wellington (H3N2)；B/Shangdong；B/Guangdong；和 B/Jiangsu。各毒株单独培养，并单独制备单价抗原原料。选择并混合毒株以得到供临床使用的最终的三价产品。最终产品中包含吐温 80(聚山梨酯 80)去污剂(<25 μg/g HA)且不含汞。还存在裂解病毒时残余的 CTAB。

单价原料和最终的三价产品在冷藏条件(2-8℃)或非冷藏条件(23-27℃)下储存，并通过 SRID 测定各时间点的 HA 含量。各单价原料的 HA 浓度是不同的，但在最终的三价材料中，规定的起始 HA 水平(0 时刻)为 15μg/毒株/剂，即 30μg/ml/毒株。

图 1-7 显示了当在不同温度储存时，随时间测得的各种单价或三价材料的 HA 水平的例子。

图 1-7 中的疫苗在 2-8℃ 储存 12 个月以及在 37℃ 储存 4 周显示出极好的稳定性。此外，对于所有批次，包括未显示数据的批次，在各个测量时间点上都能达到稳定性要求，没有批次无法满足稳定性规定。因此，所有单价原料都可在 2-8℃ 储存 12 个月，或在 37℃ 储存 4 周，最终的三价产品亦是如此。但在 2-8℃ 储存时，数据提示储存期为 39 个月。

下表显示了在 23-27℃ 储存最长达 15 个月的各种单价疫苗产品的 HA 水平。不存在 HA 水平低于起始浓度 80% 的情况：

批次	毒株	23-27℃ 的储存时间(月)				
		0	3	6	7	15
522011011	Jiangsu	28	27	n.a.	n.a.	n.a.
522011011	New Caledonia	28	32	n.a.	n.a.	n.a.
522011011	New York	31	26	n.a.	n.a.	n.a.
522008011	Jiangsu	31	33	28	n.a.	n.a.
522008011	New Caledonia	30	26	25	n.a.	n.a.
522008011	New York	31	27	26	n.a.	n.a.
522008012	Jiangsu	32	25	28	n.a.	n.a.
522008012	New Caledonia	29	25	26	n.a.	n.a.
522008012	New York	31	26	28	n.a.	n.a.
522009011	Jiangsu	25	29	n.a.	n.a.	n.a.
522009011	New Caledonia	26	24	n.a.	n.a.	n.a.
522009011	New York	29	27	n.a.	n.a.	n.a.
522007011	Jiangsu	26	30	31	n.a.	27
522007011	New Caledonia	28	31	30	n.a.	27
522007011	Wyoming	32	30	30	n.a.	30
522004011 备用	Jiangsu	30	30	31	29	n.a.
522004011 备用	New Caledonia	30	29	29	25	n.a.
522004011 备用	Wyoming	30	29	24	27	n.a.
522006011 备用	Jiangsu	30	29	30	29	n.a.
522006011 备用	New Caledonia	30	30	29	27	n.a.
522006011 备用	Wyoming	30	29	24	27	n.a.
测试混合物 30505	Jiangsu	29	26	n.a.	n.a.	n.a.
测试混合物 30505	New Caledonia	27	27	n.a.	n.a.	n.a.
测试混合物 30505	Wellington	29	30	n.a.	n.a.	n.a.

基于随时间测得的 HA 水平，可以将 HA 水平外推。这样可得到预计储存期，即 HA 浓度下降至 24µg/ml 以下、或起始量 80% 以下的时间。下表中给出了各种临床三价材料的预计储存期，表示为在 2-8℃ 储存的月数。各种毒株为：

(N) A/New Caledonia; (P) A/Panama; (G) B/Guangdong:

批次 A			批次 B		批次 C		
N	P	G	N	P	N	P	G
≥39	≥30	≥36	≥33	≥24	≥24	≥24	≥24/15

对于所有临床材料，预计储存期至少为 15 个月。预计临床前毒性检测所用材料的储存期也是 15 个月。

将 HA 数据与参考文献 2 的数据进行比较以得到 HA 降解速率和预计储存期。然而，由于流感季节的改变，所有情况下都不可能进行直接的毒株-毒株比较。

图 8 显示了参考文献 2 的研究和本发明之间的统计学比较的一个例子。

当在 23-27℃ 储存时，参考文献 2 的数据显示 HA 的降解率在 11.37 μg/ml/年和 33.71 μg/ml/年之间。相反，测试疫苗显示出的 HA 降解率低得多：在 1.71 μg/ml/年和 4.52 μg/ml/年之间。尤其对于 A/New Caledonia 毒株，参考文献 2 中观察到的速率为 11.37 μg/ml/年，而测试疫苗中观察到的速率为 2.67 μg/ml/年。在 4℃ 储存时疫苗的降解速率也较低。

毒株	2-8℃			23-27℃	
	参考文献 2	批次 D	批次 E	参考文献 2	批次 E
A/New Caledonia	-1.57	-0.65	≥0	-11.37	-2.67
A/Panama	-4.90	-2.93	-	-31.05	-
B/Guangdong	-2.71	≥-0.13	-	-33.71	-
B/Jiangsu	-	-	≥0	-	-1.71
A/Wyoming	-	-	-2.96	-	-4.52

该数据表明，即便在 23-27℃ 储存，三价混合物的储存期也长达 15 个月，远远长于参考文献 2 中建议的储存期。在 4℃ 储存时，储存期可长达 42-45 个月。

即便将三价疫苗储存于 40℃，预计 B/Jiangsu 组分的储存期也约为 6 个月。在较低储存温度(25℃)下，储存期可延长至至少 9 个月，有可能为 18 个月或更长。

与参考文献 2 相比，稳定性提高的可能原因包括：(i)本发明的疫苗是从哺乳动物细胞培养物而不是从鸡蛋制备的，参考文献 2 中看到的降解可能是由于残余的鸡蛋衍生组分(如酶类，例如蛋白酶类和/或糖苷酶类)和/或由于糖基化作用的差异；或(ii)本发明疫苗中存在高水平的吐温 80，它可以稳定 HA。

应理解，仅以举例的方式描述了本发明，可在本发明的范围和构思内进行

修改。

q 参考文献(将其内容纳入本文作参考)

- [1] Vaccines(疫苗), (Plotkin 和 Orenstein 编), 第 4 版, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Coenen 等 (2006) *Vaccine* 24:525-31.
- [3] Huang 等 (2004) *Vaccine* 24:525-801.
- [4] Garmise 等 (2006) *AAPS PharmSciTech* 7(1): 第 19 章. DOI: 10.1208/pt070119.
- [5] WO96/37624.
- [6] .
- [7] .
- [8] .
- [9] WO02/067983.
- [10] WO02/074336.
- [11] WO02/097072.
- [12] WO2005/113756.
- [13] WO01/21151.
- [14] Huckriede 等 (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [15] World Health Organisation (2005) *Emerging Infectious Diseases* 11(10):1515-21.
- [16] Herlocher 等 (2004) *J Infect Dis* 190(9):1627-30.
- [17] Le 等 (2005) *Nature* 437(7062):1108.
- [18] Hoffmann 等 (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
- [19] Subbarao 等 (2003) *Virology* 305:192-200.
- [20] Liu 等 (2003) *Virology* 314:580-590.
- [21] Ozaki 等 (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
- [22] Webby 等 (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
- [23] WO00/60050.
- [24] WO01/04333.
- [25] 美国专利 6649372.
- [26] Neumann 等 (2005) *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16825-9.
- [27] WO2006/067211.
- [28] WO01/83794.
- [29] Hoffmann 等 (2000) *Virology* 267(2):310-7.
- [30] WO97/37000.
- [31] Brands 等 (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [32] Halperin 等 (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [33] Tree 等 (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [34] Kistner 等 (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [35] Kistner 等 (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [36] Bruhl 等 (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [37] Pau 等 (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [38] <http://www.atcc.org/>
- [39] <http://locus.umdj.edu/>
- [40] WO03/076601.
- [41] WO2005/042728.
- [42] WO03/043415.

- [43] WO01/85938
- [44] WO2006/108846
- [45] EP-A-1260581 (WO01/64846).
- [46] WO2006/071563.
- [47] WO2005/113758.
- [48] WO2006/027698.
- [49] WO03/023021
- [50] WO03/023025
- [51] WO97/37001.
- [52] Treanor 等 (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.
- [53] Keitel 等 (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.
- [54] Lundblad (2001) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 34:195-197.
- [55] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.* (生物分析验证方法的工业指南) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM)(美国卫生和人类服务部, 兽药药物评价和研究中心食品药品管理中心(CDER)). 2001 年 5 月.
- [56] Ji 等 (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7.
- [57] Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol*. 45:7-12.
- [58] Lahijani 等 (1998) *Hum Gene Ther*. 9:1173-80.
- [59] Lokteff 等 (2001) *Biologicals*. 29:123-32.
- [60] EP-B-0870508.
- [61] US 5948410.
- [62] PCT/IB2006/003880
- [63] 美国专利 6,372,223.
- [64] WO00/15251.
- [65] WO01/22992.
- [66] Hehme 等 (2004) *Virus Res*. 103(1-2):163-71.
- [67] 美国专利 6355271.
- [68] WO00/23105.
- [69] US 5,057,540.
- [70] WO2005/002620.
- [71] WO96/33739.
- [72] EP-A-0109942.
- [73] WO96/11711.
- [74] WO00/07621.
- [75] WO2004/004762.
- [76] Barr 等 (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [77] Sjolanderet 等 (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [78] Pizza 等 (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [79] WO95/17211.
- [80] WO98/42375.
- [81] Singh 等 (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [82] WO99/27960.
- [83] US 6,090,406
- [84] US 5,916,588
- [85] EP-A-0626169.
- [86] WO99/52549.
- [87] WO01/21207.

- [88] WO01/21152.
[89] WO02/072012.
[90] Signorelli 和 Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
[91] WO2004/064715.
[92] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
[93] WO2005/089837.
[94] 美国专利 6,692,468.
[95] WO00/07647.
[96] WO99/17820.
[97] 美国专利 5,971,953.
[98] 美国专利 4,060,082.
[99] EP-A-0520618.
[100] WO98/01174.
[101] WO90/14837.
[102] Podda 和 Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
[103] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
[104] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach(疫苗设计: 亚基和佐剂方法)*(Powell 和 Newman 编) Plenum Press(普莱努出版社) 1995(ISBN 0-306-44867-X).
[105] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols(疫苗佐剂: 制备方法和研究方案)*(分子医学方法(*Methods in Molecular Medicine*)系列丛书的第 42 卷), ISBN: 1-59259-083-7, O'Hagan 编
[106] Allison 和 Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
[107] Hariharan 等 (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
[108] WO95/11700.
[109] 美国专利 6,080,725.
[110] WO2006/113373.
[111] WO2005/097181.
[112] Han 等(2005) *Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged(维生素 E 对老年人免疫功能和传染病的影响)*, *Nutrition, Immune functions and Health EuroConference(欧洲营养、免疫功能和卫生大会)*, 巴黎, 2005 年 6 月 9-10 日.
[113] US- 6630161.
[114] Hayden 等 (1998) *J Clin Invest* 101(3):643-9.
[115] Tassinon 等 (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.
[116] Myers 等 (1990) *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions(内毒素反应的细胞和分子方面)* 第 145-156 页.
[117] Ulrich (2000) 参考文献 105 的第 16 章(第 273-282 页).
[118] Johnson 等 (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
[119] Baldrick 等 (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
[120] US 4,680,338.
[121] US 4,988,815.
[122] WO92/15582.
[123] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
[124] Wu 等 (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
[125] Vasilakos 等 (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
[126] 美国专利 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747,

6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 和 6924293.

[127] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

[128] WO2004/060308.

[129] WO2004/064759.

[130] US 6,924,271.

[131] US2005/0070556.

[132] US 5,658,731.

[133] 美国专利 5,011,828.

[134] WO2004/87153.

[135] US 6,605,617.

[136] WO02/18383.

[137] WO2004/018455.

[138] WO03/082272.

[139] Dyakonova 等 (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.

[140] FR-2859633.

[141] WO2006/002422.

[142] Johnson 等 (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

[143] Evans 等 (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.

[144] De Libero 等, *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496

[145] 美国专利 5,936,076.

[146] Oki 等, *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640

[147] US2005/0192248

[148] Yang 等, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822

[149] WO2005/102049

[150] Goff 等 *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 13602-13603

[151] WO03/105769

[152] Andrianov 等 (1998) *Biomaterials* 19:109-115.

[153] Payne 等 (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.

[154] Thompson 等 (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.

[155] Kandimalla 等 (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.

[156] WO02/26757.

[157] WO99/62923.

[158] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.

[159] McCluskie 等 (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.

[160] WO98/40100.

[161] 美国专利 6,207,646.

[162] 美国专利 6,239,116.

[163] 美国专利 6,429,199.

[164] Kandimalla 等 (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (第 3 部分):654-658.

[165] Blackwell 等 (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.

[166] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.

[167] WO01/95935.

[168] Kandimalla 等 (2003) *BBRC* 306:948-953.

[169] Bhagat 等 (2003) *BBRC* 300:853-861.

[170] WO03/035836.

[171] WO01/22972.

- [172] Thompson 等 (2005) *J Leukoc Biol* 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells'(LPS、MPL®佐剂和 RC529 的低毒变体是 CD4+ T 细胞的有效佐剂).
- [173] 英国专利申请 GB-A-2220211.
- [174] WO 94/21292.
- [175] WO94/00153.
- [176] WO95/17210.
- [177] WO96/26741.
- [178] WO93/19780.
- [179] WO03/011223.
- [180] Meraldi 等 (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [181] Pajak 等 (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [182] US-6586409.
- [183] Wong 等 (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [184] US2005/0215517.
- [185] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*(雷明顿药物科学和实践). 第 20 版, ISBN:0683306472.
- [186] Banzhoff (2000) *Immunology Letters* 71:91-96.
- [187] Nony 等 (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [188] Potter 和 Oxford (1979) *Br Med Bull* 35: 69-75.
- [189] Greenbaum 等 (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
- [190] Zurbriggen 等 (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
- [191] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
- [192] Mann 等 (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
- [193] Halperin 等 (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
- [194] Herbert 等 (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
- [195] Chen 等 (2003) *Vaccine* 21:2830-6.

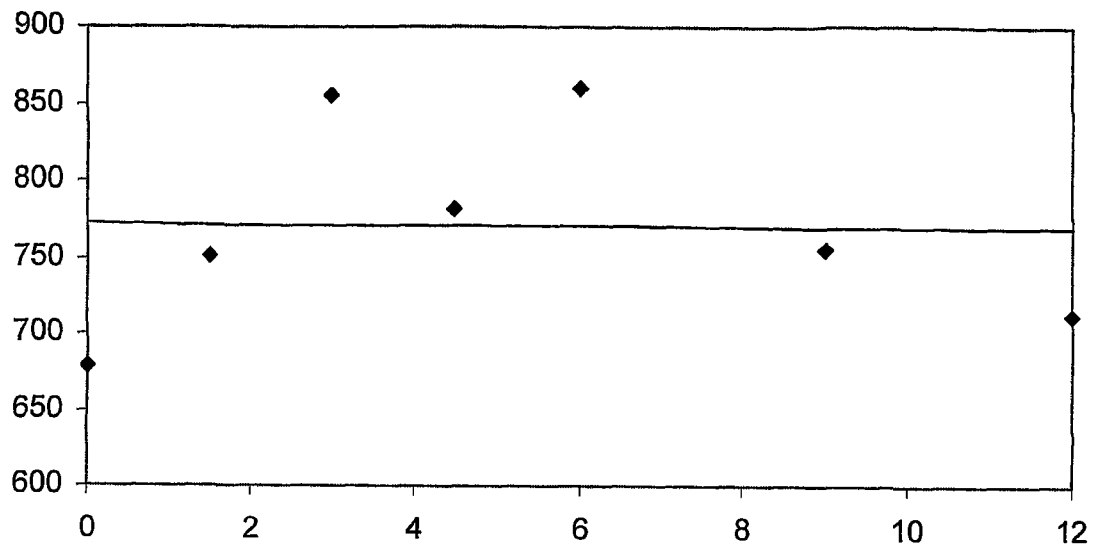


图 1

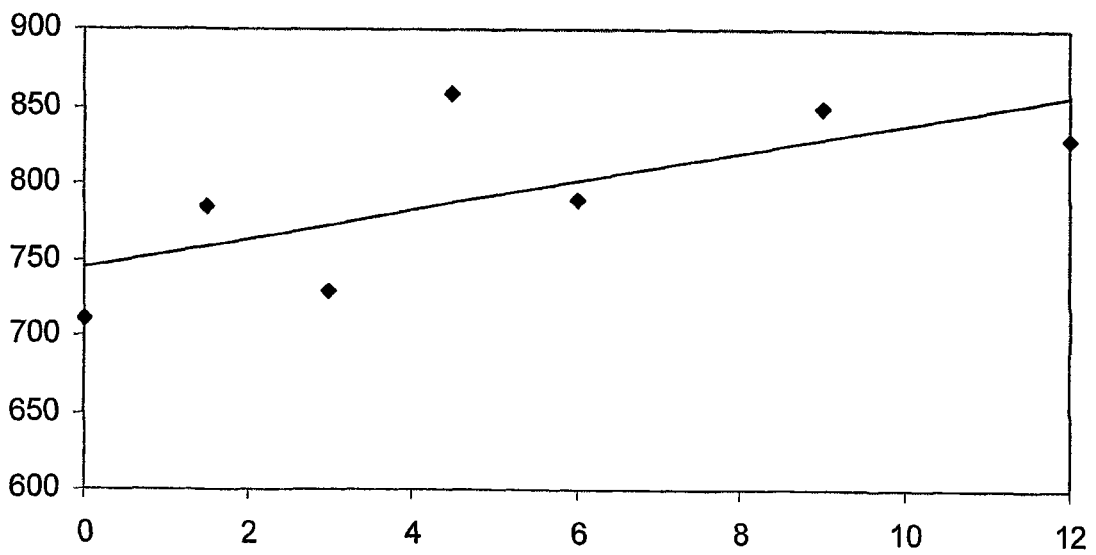


图 2

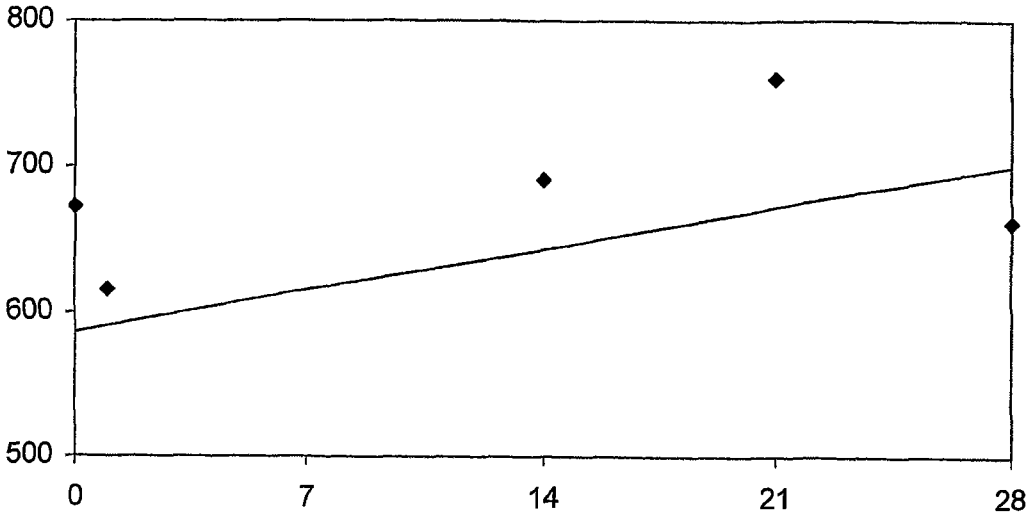


图 3

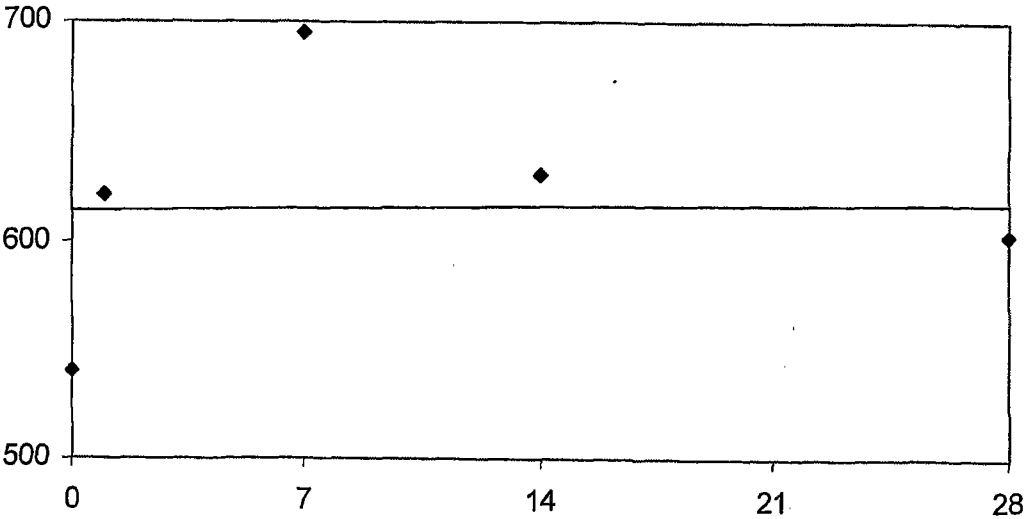


图 4

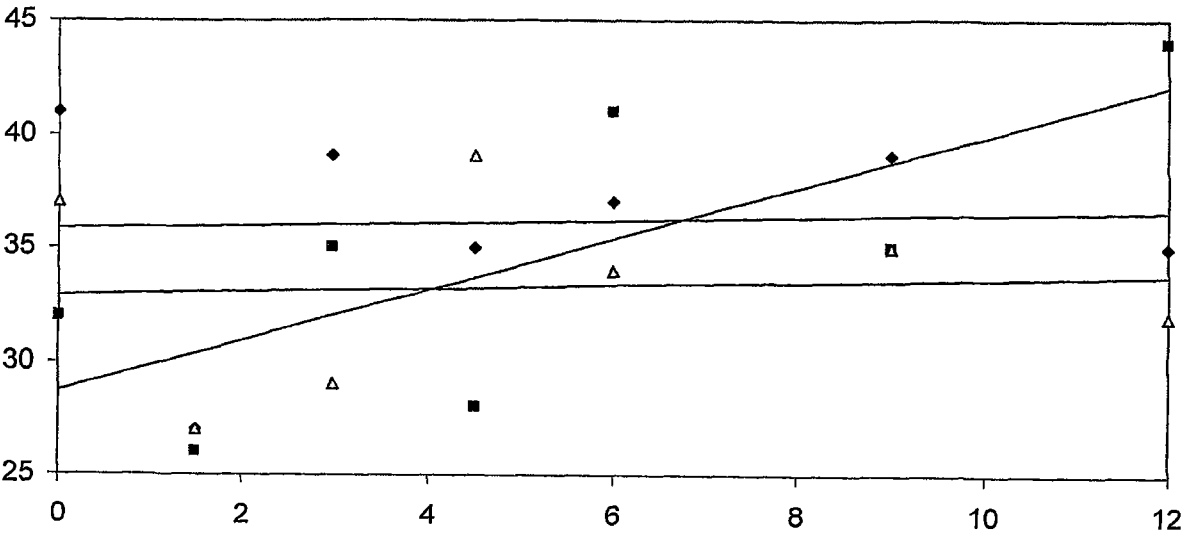


图 5

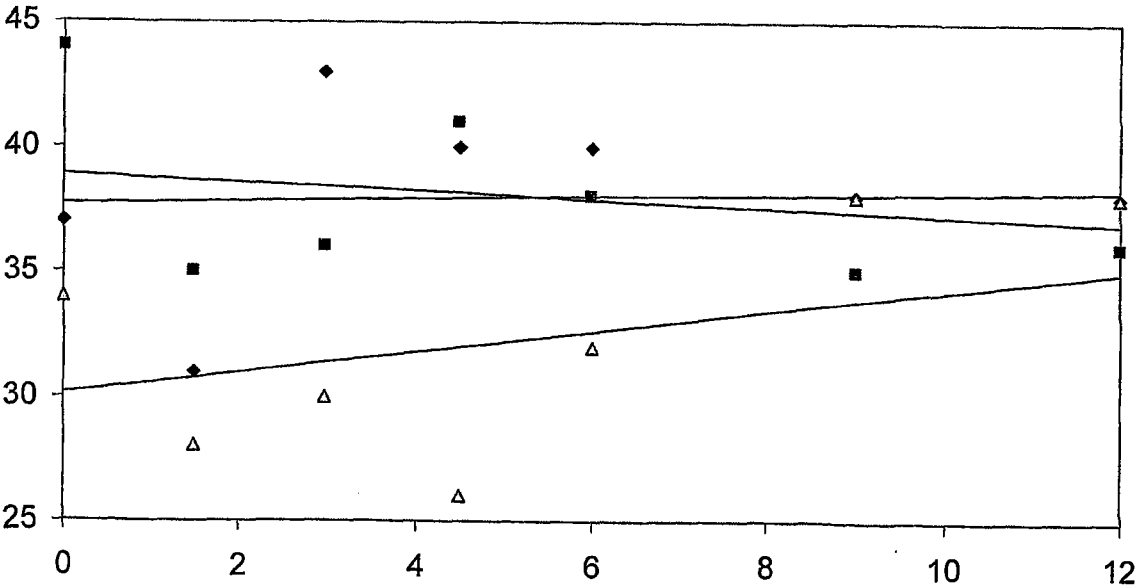


图 6

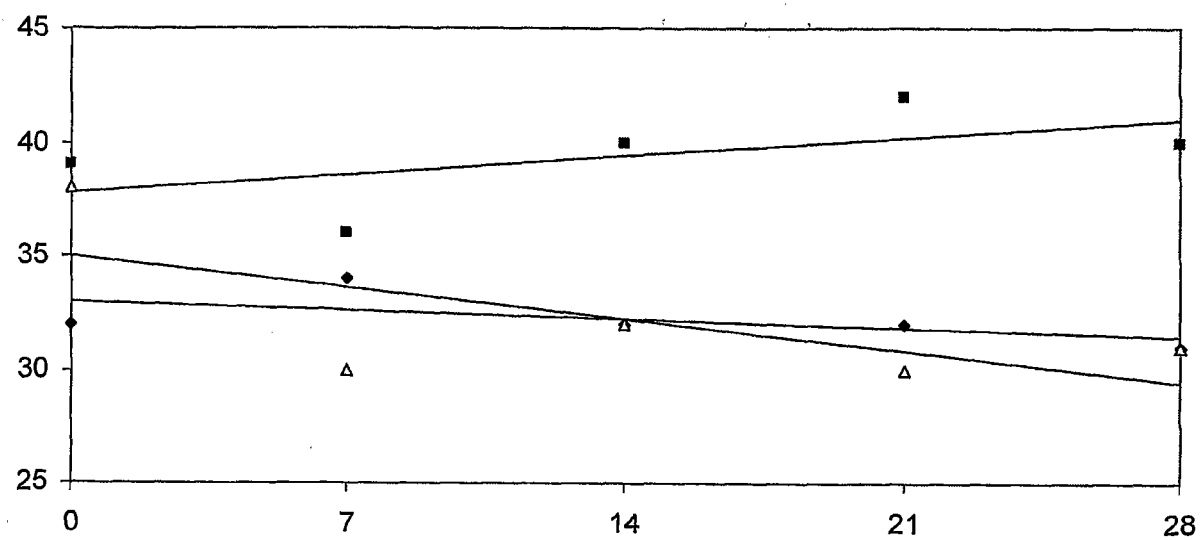


图 7

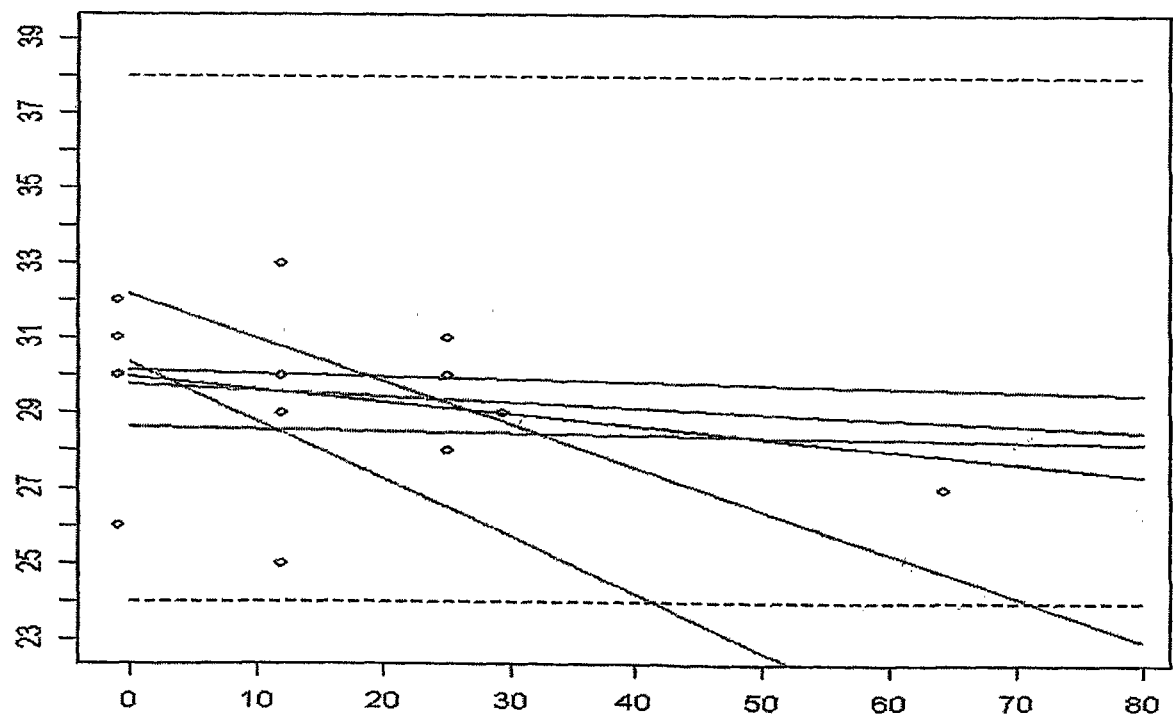


图 8