



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102307590 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 04

(21) 申请号 201080007887. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 02. 10

A61K 39/145 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/295 (2006. 01)

61/207, 385 2009. 02. 10 US

A61P 31/16 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2010/000312 2010. 02. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02010/092479 EN 2010. 08. 19

(71) 申请人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 M·肯托尼 D·奥黑根 N·格罗斯

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

权利要求书 2 页 说明书 19 页

(54) 发明名称

具有减少量的角鲨烯的流感疫苗

(57) 摘要

流感疫苗包含来自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素。所述流感疫苗还含有具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂，其含有角鲨烯。在一些实施方式中，血凝素浓度为每株 $> 12 \mu\text{g/ml}$ 。在一些实施方式中，角鲨烯浓度为 $< 19\text{mg/ml}$ 。在一些实施方式中，疫苗不含汞。在一些实施方式中，疫苗的单位剂量体积为 0.2-0.3ml。在一些实施方式中，角鲨烯的浓度为 9.75mg/ml 或 4.88mg/ml。在一些实施方式中，疫苗含有来自两种甲型流感病毒株和两种乙型流感病毒株的抗原。

1. 一种流感病毒疫苗,含有:(i) 获自至少两种甲型流感病毒株和至少两种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 $< 19\text{mg/ml}$ 。

2. 一种流感病毒疫苗,含有:(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素,其中,所述血凝素的浓度为每株 $> 12\mu\text{g/ml}$;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 $< 19\text{mg/ml}$ 。

3. 一种无汞流感病毒疫苗,含有:(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 $< 19\text{mg/ml}$ 。

4. 一种流感病毒疫苗,含有:(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 9.75mg/ml 或 4.88mg/ml 。

5. 前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于,具有 0.5mL 的单位剂量体积。

6. 一种流感病毒疫苗,具有 $0.2\text{--}0.3\text{mL}$ 的单位剂量体积,该疫苗含有(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 $< 19\text{mg/ml}$ 。

7. 一种流感病毒疫苗,具有 $0.2\text{--}0.3\text{mL}$ 的单位剂量体积,该疫苗含有(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 19.5mg/ml 、 9.75mg/ml 或 4.88mg/ml 。

8. 前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于,所述血凝素为裂解病毒粒子或纯化表面抗原的形式。

9. 前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于,含有获自以下毒株的血凝素:(i) H1N1 甲型流感病毒株;(ii) H3N2 甲型流感病毒株;(iii) B/Victoria/2/87- 样乙型流感病毒株;以及(iv) B/Yamagata/16/88- 样乙型流感病毒株。

10. 前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于,每毒株的血凝素的浓度为至少 $25\mu\text{g/ml}$ 。

11. 前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于,角鲨烯的浓度为 $< 10\text{mg/ml}$ 。

12. 前述任一项权利要求所述的疫苗,其特征在于,本发明组合中角鲨烯与血凝素的重量比在 20 到 180 的范围内。

13. 如权利要求 4-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株和 B 毒株的三价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30\mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 19.5mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.25ml 的单位剂量体积。

14. 如权利要求 2-5 或 8-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株和 B 毒株的三价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30\mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 9.75mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.5ml 的单位剂量体积。

15. 如权利要求 1 或 5 或 7-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株、B/Yamagata 谱系的乙型流感病毒株和 B/Victoria 谱系的乙型流感病毒株的四价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30\mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 19.5mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.25ml 的单位剂量体积。

16. 如权利要求 1-5 或 8-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株、B/Yamagata 谱系的乙型流感病毒株和 B/Victoria 谱系的乙型流感病毒株的四价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30 \mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 9.75mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.5ml 的单位剂量体积。

17. 如权利要求 2-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株和 B 毒株的三价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30 \mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 9.75mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.25ml 的单位剂量体积。

18. 如权利要求 2-5 或 8-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株和 B 毒株的三价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30 \mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 4.88mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.5ml 的单位剂量体积。

19. 如权利要求 1-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株、B/Yamagata 谱系的乙型流感病毒株和 B/Victoria 谱系的乙型流感病毒株的四价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30 \mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 9.75mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.25ml 的单位剂量体积。

20. 如权利要求 1-5 或 8-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株、B/Yamagata 谱系的乙型流感病毒株和 B/Victoria 谱系的乙型流感病毒株的四价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30 \mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 4.88mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.5ml 的单位剂量体积。

21. 如权利要求 2-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株和 B 毒株的三价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30 \mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 4.88mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.25ml 的单位剂量体积。

22. 如权利要求 1-12 中任一项所述的疫苗,其特征在于,所述疫苗是具有 A/H1N1 毒株、A/H3N2 毒株、B/Yamagata 谱系的乙型流感病毒株和 B/Victoria 谱系的乙型流感病毒株的四价灭活流感疫苗,所述疫苗具有每株约 $30 \mu\text{g/ml}$ 的血凝素浓度,约 4.88mg/ml 的角鲨烯浓度,和约 0.25ml 的单位剂量体积。

23. 一种在患者中引起免疫应答的方法,该方法包括给予该患者前述任一项权利要求所述的疫苗的步骤。

具有减少量的角鲨烯的流感疫苗

[0001] 本专利申请要求 2009 年 2 月 10 日提交的美国临时专利申请 61/207385 作为优先权,其全部内容以引入的方式纳入本文。

技术领域

[0002] 本发明属于保护不受流感病毒感染的疫苗领域,尤其是所含角鲨烯含量相对于市售疫苗减少的疫苗领域。

背景技术

[0003] 除 PREPANDRIX™ 产品(格兰素史克公司(GlaxoSmithKline)) 和 FLUAD™ 产品(诺华疫苗公司)外,流感疫苗通常不含有佐剂。

[0004] 大流行前季节性单价 PREPANDRIX™ 疫苗中的佐剂是一种水包油乳液。其抗原和乳液佐剂提供于分开的 10 剂小瓶中,在使用时以 1 : 1 的体积比混合。该产品的数据表显示每一剂的体积为 0.5mL,含有 3.75 μ g HA 以及 10.68mg 角鲨烯和 4.85mg 聚山梨醇酯 80。

[0005] 三价季节性 FLUAD™ 疫苗中的佐剂是一种水包油乳液。其抗原和乳液佐剂以预混合的形式提供于预填充的注射器中。该产品的数据表显示每剂的体积为 0.5mL,含有 15 μ g 血凝素(HA)/每株,以及 9.75mg 角鲨烯和 1.175mg 聚山梨醇酯 80。如参考文献 1 所揭示,通过混合体积比为 1 : 1 的 2X 乳液和 2X 抗原溶液、以获得乳液和抗原都为 1X 浓度的最终溶液而制备该疫苗。该 1 : 1 混合比例在参考文献 75 的第 10 章中有进一步的解释。参考文献 2 揭示了这种混合的改动形式。

[0006] 与 FLUAD™ 产品相比,参考文献 3 公开了具有较低量的 HA(3 \times 5 μ g HA/剂)和较低量的角鲨烯(5.35mg/剂)的三价流感疫苗。该疫苗含有硫柳汞防腐剂,并以 0.5mL 剂量给予人。

[0007] 本发明的一个目的是提供进一步改进的佐剂化的流感疫苗制剂,尤其是季节性流感疫苗。

发明内容

[0008] 在一个实施方式中,本发明提供一种流感病毒疫苗,含有:(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素,其中,所述血凝素的浓度为每株 $\geq 12 \mu$ g/ml;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 ≤ 19 mg/ml。

[0009] 在另一实施方式中,本发明提供一种无汞的流感病毒疫苗,含有:(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 ≤ 19 mg/ml。

[0010] 在另一实施方式中,本发明提供一种流感病毒疫苗,该疫苗具有 0.2-0.3mL 的单位剂量体积,该疫苗含有(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为

≤ 19mg/ml。

[0011] 在另一实施方式中,本发明提供一种流感病毒疫苗,该疫苗含有:(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 9.75mg/ml 或 4.88mg/ml。

[0012] 在另一实施方式中,本发明提供一种流感病毒疫苗,该疫苗具有 0.2-0.3mL 的单位剂量体积,该疫苗含有(i) 获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 19.5mg/ml、9.75mg/ml 或 4.88mg/ml。

[0013] 在另一实施方式中,本发明提供一种流感病毒疫苗,含有:(i) 获自至少两种甲型流感病毒株和至少两种乙型流感病毒株的血凝素;和(ii) 具有亚微米油滴的水包油乳液佐剂,其含有角鲨烯,其中,角鲨烯浓度为 ≤ 19mg/ml。

[0014] 疫苗制备

[0015] 目前可获得各种形式的流感病毒,疫苗通常基于活病毒或灭活病毒。灭活病毒可以基于完整的病毒、裂解的病毒粒子或纯化的表面抗原。流感抗原还可以病毒体的形式提供。本发明可使用任何这些类型的疫苗,但通常使用灭活疫苗。

[0016] 在使用灭活病毒时,疫苗可含有完整的病毒粒子,裂解的病毒粒子,或纯化的表面抗原(包括血凝素,通常还包括神经氨酸酶)。灭活病毒的化学方法包括用有效量的一种或多种以下试剂处理:去污剂、甲醛、β-丙内酯、亚甲基蓝、补骨脂素、羧基富勒烯(C60)、二元乙胺(binary ethylamine)、乙酰基乙亚胺或它们的组合。灭活病毒的非化学方法是本领域已知的,例如 UV 光或 γ 照射。

[0017] 可通过各种方法从含病毒的液体中收集病毒粒子。例如,纯化方法可包括利用线性蔗糖梯度溶液的区带离心,所述蔗糖溶液含有去污剂以使病毒粒子破裂。任选稀释后,可通过渗滤纯化抗原。

[0018] 用去污剂(例如,乙醚、聚山梨醇酯 80、脱氧胆酸盐、磷酸三-N-丁酯、曲通 X-100、曲通 N101、溴化十六烷基三甲铵、Tergitol NP9,等等)处理纯化的病毒粒子,包括“吐温-醚”裂解方法来产生亚病毒粒子制品,从而获得了裂解的病毒粒子。本领域熟知裂解流感病毒的方法,例如参见参考文献 4-9 等。通常利用破裂浓度(disrupting concentration)的裂解剂(splitting agent)使感染性或非感染性的完整病毒破裂或破碎来进行病毒的裂解。破裂造成病毒蛋白质完全或部分溶解,改变病毒的完整性。优选的裂解剂是非离子和离子性(例如,阳离子)表面活性剂,例如烷基糖苷、烷基硫代糖苷、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(Glucamides)、海克麦格(Hecameg)、烷基苯氧基-聚乙氧基乙醇、季铵化合物、十二烷基肌氨酸钠(sarcosyl)、CTAB(溴化十六烷基三甲铵)、磷酸三-N-丁酯、塞太弗伦(Cetavlon)、肉豆蔻基三甲基铵盐、脂转染试剂(lipofectin)、脂转染胺(lipofectamine)、和 DOT-MA、辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(例如,曲通表面活性剂,如曲通 X-100 或曲通 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利用脱氧胆酸钠和甲醛的连续作用,裂解可发生在最初的病毒粒子纯化期间(例如,在蔗糖密度梯度溶液中)。因此裂解方法可包括使含病毒粒子的物质澄清(以除去非病毒粒子物质),浓缩收集的病毒粒子(例如,采用吸附法,如 CaHPO₄ 吸附),分离完整病毒粒子与非病毒粒子物质,在

密度梯度离心步骤中利用裂解剂裂解病毒粒子（例如，利用含有裂解剂（如脱氧胆酸钠）的蔗糖梯度），然后过滤（例如，超滤）以除去不需要的物质。可将裂解的病毒粒子有用地重悬在磷酸钠缓冲的等渗氯化钠溶液中。PREPANDRIX™、BEGRIVAC™、FLUARIX™、FLUZONE™和 FLUSHIELD™ 产品是裂解疫苗。

[0019] 纯化的表面抗原疫苗包含流感表面抗原血凝素，通常还包含神经氨酸酶。本领域熟知制备纯化形式的这些蛋白质的方法。FLUVIRIN™、FLUAD™、AGRIPPAL™ 和 INFLUVAC™ 产品是这些疫苗的例子。

[0020] 灭活的流感抗原的另一种形式是病毒体 [10]（不含核酸的病毒样脂质体颗粒），如 INFLEXAL V™ 和 INVAVAC™ 产品中的形式。可使用去污剂溶解流感病毒、接着除去核壳体和重构含有病毒糖蛋白的膜而制备病毒体。制备病毒体的另一种方法涉及将病毒的膜糖蛋白加到过量的磷脂中，以产生其膜中具有病毒蛋白的脂质体。

[0021] 毒株选择

[0022] 本发明的疫苗包括获自至少一种甲型流感病毒株和至少一种乙型流感病毒株的血凝素。通常使不同株分开生长，然后在收集病毒和制备抗原后混合。因此，本发明的方法可包括混合来自一种以上流感株的抗原的步骤。

[0023] 本发明使用的毒株可具有野生型病毒中发现的天然 HA，或改性 HA。例如，已知可改变 HA，以除去使病毒对禽类高度致病的决定簇（如 HA1/HA2 裂解位点附近的超碱性区域）。用于本发明的乙型流感病毒的血凝素优选在氨基酸 197 具有 Asn，以提供糖基化位点 [11]。

[0024] 本发明使用的流感病毒可以是重配毒株，并可通过反向遗传学技术获得。反向遗传学技术 [例如，12-16] 能利用质粒或其它人工载体在体外制备含所需基因组区段的流感病毒。该技术通常涉及表达 (a) 例如能从 poII 启动子或噬菌体 RNA 聚合酶启动子编码所需病毒 RNA 分子的 DNA 分子，和 (b) 例如能从 poIII 启动子编码病毒蛋白质的 DNA 分子，从而使得在细胞中表达两种类型的 DNA 能装配完整的感染性病毒粒子。DNA 优选能提供所有病毒 RNA 和蛋白质，但也可利用辅助病毒提供所述 RNA 和蛋白质中的一些。可使用利用单独的质粒制备各病毒 RNA 的基于质粒的方法 [17-19]，且这些方法也将涉及使用质粒来表达所有或一些（如仅仅 PB1、PB2、PA 和 NP 蛋白）病毒蛋白，一些方法利用高达 12 种质粒。为减少所需的质粒数，一种方法 [20] 在同一质粒上组合了多个 RNA 聚合酶 I 转录盒（用于病毒 RNA 合成）（例如，编码 1、2、3、4、5、6、7 或所有 8 个甲型流感 vRNA 区段的序列），在另一质粒上组合了含 RNA 聚合酶 II 启动子的多个蛋白质编码区（例如，编码 1、2、3、4、5、6、7 或所有 8 个甲型流感 mRNA 转录物的序列）。参考文献 20 所述方法的优选方面包括：(a) 一个质粒上的 PB1、PB2 和 PA mRNA 编码区；和 (b) 一个质粒上的所有 8 个 vRNA 编码区段。在一个质粒上包含 NA 和 HA 区段和在另一质粒上包含 6 个其它区段也是有利的。

[0025] 作为使用 poII 启动子编码病毒 RNA 区段的替代方式，还可能用细菌噬菌体聚合酶启动子 [21]。例如，可方便地使用 SP6、T3 或 T7 聚合酶的启动子。由于 poII 启动子的种属特异性，噬菌体聚合酶启动子对于许多细胞类型（例如，MDCK）更方便，虽然还必须用编码外源性聚合酶的质粒转染细胞。

[0026] 在其它技术中，可采用双重 poII 和 poIII 启动子来同时编码来自一个模板的病毒 RNA 和可表达的 mRNA [22, 23]。

[0027] 因此,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(通常是 A/PR/8/34 的 6 个区段,其中 HA 和 N 区段来自疫苗毒株,即 6:2 重配株)。还可包含 A/WSN/33 病毒或用于生产疫苗制备用重配病毒的任何其它病毒毒株的一个或多个 RNA 区段。甲型流感病毒可包括少于 6 个(即 0、1、2、3、4 或 5 个)来自 AA/6/60 流感病毒的病毒区段(A/Ann Arbor/6/60)。乙型流感病毒可包括少于 6 个(即 0、1、2、3、4 或 5 个)来自 AA/1/66 流感病毒的病毒区段(B/Ann Arbor/1/66)。通常,本发明抵御能人向人传播的毒株,因此该毒株的基因组一般包含源自哺乳动物(例如人)流感病毒的至少一个 RNA 区段。其可包含源自禽流感病毒的 NS 区段。

[0028] 其抗原可包含在组合物中的毒株可对抗病毒治疗具有耐受性(如耐奥司他韦 [24] 和 / 或耐扎那米韦),包括耐药性流行性毒株 [25]。

[0029] 特别有用的毒株是那些从分离自患者开始到在细胞培养系统中复制这一过程中的任何阶段(包括分离和在细胞培养系统中复制)都未通过鸡蛋传代的毒株。可在分离到病毒复制过程中的所有步骤中都只用 MDCK 细胞。

[0030] 在一些实施方式中,本发明使用的毒株的血凝素相对于具有 Sia(α 2,3)Gal 末端二糖的寡糖而言对具有 Sia(α 2,6)Gal 末端二糖的寡糖具有结合偏好。人流感病毒结合具有 Sia(α 2,6)Gal(唾液酸以 α 2,6 方式连接于半乳糖)末端二糖的受体寡糖,而鸡蛋和 Vero 细胞的受体寡糖具有 Sia(α 2,3)Gal 末端二糖。人流感病毒在细胞如 MDCK 中的生长提供了针对血凝素的选择压力,以维持天然的 Sia(α 2,6)Gal 结合,这与鸡蛋传代不同。

[0031] 为了测定病毒是否相对于具有 Sia(α 2,3)Gal 末端二糖的寡糖对具有 Sia(α 2,6)Gal 末端二糖的寡糖具有结合偏好,可进行各种检测。例如,参考文献 26 描述了一种检测流感病毒受体-结合活性的固相酶联检测,该检测提供敏感和定量的亲和常数测量值。参考文献 27 使用固相检测,其评估了病毒对两种不同的唾液酸基糖蛋白的结合(卵类粘蛋白,具有 Sia(α 2,3)Gal 决定簇;和猪 α 2-巨球蛋白,具有 Sia(α 2,3)Gal 决定簇),该文献还描述了评估病毒对两种受体类似物:游离唾液酸(Neu5Ac)和 3'-唾液酸基乳糖(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc)的结合的检测。参考文献 28 报道了一种使用能清楚区分针对 α 2,3 或 α 2,6 连接的受体偏好的聚糖阵列的检测。参考文献 29 报道了一种基于人红血球的凝集的检测,该人红血球经酶学修饰成含有 Sia(α 2,6)Gal 或 Sia(α 2,3)Gal。依赖于检测的类型,检测可直接使用病毒自身,或可间接使用由病毒纯化得到的血凝素。

[0032] 在一些实施方式中,本发明使用的流感毒株具有其糖基化模式不同于鸡蛋衍生的病毒的糖基化模式的糖蛋白(包括血凝素)。因此,糖蛋白将包括在鸡蛋中未发现的糖形。

[0033] 甲型流感病毒目前具有 16 种 HA 亚型:H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 和 H16。本发明可抵御一种或多种这些亚型。本发明可抵御甲型流感病毒 NA 亚型 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8 和 N9 中的一种或多种。本文的疫苗包括来自至少一种甲型流感病毒株的抗原,且通常将包括来自至少两种甲型流感病毒株(如 2 或 3 种甲型流感病毒株)的抗原。当包括两种甲型流感病毒株时,这些病毒株通常将是 H1 株和 H3 株。当包括三种甲型流感病毒株时,这些病毒株将是 H1 株、H3 株和大流行相关的毒株。在一些实施方式中,H3 毒株与 A/Moscow/10/99 交叉反应;在其它实施方式中,H3 毒株与 A/Fujian/411/2002 交叉反应。参考文献 30 公开了含有 A/H1N1、A/H3N2、A/H5N1 和 B 抗原的疫苗。

[0034] 大流行相关流感毒株的特征如下：(a) 具有与目前常见人毒株的血凝素相比新的血凝素，即在过去 10 年以上的时间内在人群中未出现过（例如，H2），或者以前在人群中从未发现（例如，通常只在鸟类中发现的 H5、H6 或 H9），因此，疫苗受体和普通人群对该毒株的血凝素没有免疫力；(b) 能够在人群中水平传播；以及 (c) 对人致病。用于本发明的大流行相关的毒株通常具有 H2、H5、H7 或 H9 亚型，如 H5N1、H5N3、H9N2、H2N2、H7N1 或 H7N7 株。优选 H5N1 毒株。大流行毒株可具有 H1 亚型（如 H1N1），例如，HA 可以与 A/California/04/09 毒株具有免疫学交叉反应性。

[0035] 目前未发现乙型流感病毒具有不同的 HA 亚型，但是乙型流感病毒株确实可分为两个不同的谱系。这两谱系在上世纪 80 年代末期出现，含有抗原性和 / 或遗传性彼此不同的 HA [31]。目前的乙型流感病毒株是 B/Victoria/2/87- 样的或者是 B/Yamagata/16/88- 样的。这些毒株通常具有不同的抗原性，但是也已经公开根据氨基酸序列差异来区分这两个谱系，例如，B/Yamagata/16/88- 样毒株的 HA 蛋白通常（但不总是）在 164 位氨基酸残基上缺失，这是以 ‘Lee40’ HA 序列为基准的编号 [32]。

[0036] 在一些实施方式中，本发明的组合物包含来自单种乙型流感病毒株的抗原，且该毒株可以是 B/Victoria/2/87- 样的或者是 B/Yamagata/16/88- 样的。但在其它实施方式中，本发明的组合物包含来自两种乙型流感病毒株的抗原，且这两种毒株通常包括 B/Victoria/2/87- 样毒株和 B/Yamagata/16/88- 样毒株。

[0037] 本发明的优选疫苗含有来自两种甲型流感病毒株的抗原和来自两种乙型流感病毒株的抗体（“ABBA”疫苗）。因此，本发明优选的 ABBA 疫苗含有来自 (i) H1N1 毒株；(ii) H3N2 毒株；(iii) B/Victoria/2/87- 样毒株；以及 (iv) B/Yamagata/16/88- 样毒株的血凝素。

[0038] 在一些 ABBA 实施方式中，至少两株乙型流感病毒株可具有不同的血凝素但是具有相关的神经氨酸酶。例如，两者可都包含 B/Victoria/2/87- 样神经氨酸酶 [33]，或者两者都包含 B/Yamagata/16/88- 样神经氨酸酶。例如，两种 B/Victoria/2/87- 样神经氨酸酶可以都包含一个或多个如下序列特征：(1) 27 位残基不是丝氨酸，优选代之以亮氨酸；(2) 44 位残基不是谷氨酸，优选代之以赖氨酸；(3) 46 位残基不是苏氨酸，优选代之以异亮氨酸；(4) 51 位残基不是脯氨酸，优选代之以丝氨酸；(5) 65 位残基不是精氨酸，优选代之以组氨酸；(6) 70 位残基不是甘氨酸，优选代之以谷氨酸；(7) 73 位残基不是亮氨酸，优选代之以苯丙氨酸；和 / 或 (8) 88 位残基不是脯氨酸，优选代之以谷氨酰胺。同样，在某些实施方式中，神经氨酸酶可在 43 位残基上缺失，或可以是苏氨酸；有报道称，NA 基因上的三核苷酸缺失造成的 43 位残基的缺失是 B/Victoria/2/87- 样毒株的特征，但最近的毒株又恢复了 Thr-43 [33]。相反，两种 B/Yamagata/16/88- 样神经氨酸酶当然也可共有上述相反的特征，例如，S27、E44、T46、P51、R65、G70、L73 和 / 或 P88。这些氨基酸的编号以 ‘Lee40’ 神经氨酸酶序列为基准 [34]。因此，ABBA 疫苗可使用两株 HA 抗原性不同（一株 B/Yamagata/16/88- 样毒株，一株 B/Victoria/2/87- 样毒株）、但 NA 相关（两种 B/Yamagata/16/88- 样 NA，或两种 B/Victoria/2/87- 样 NA）的乙型流感病毒。

[0039] 本发明并不局限于三价和四价疫苗，还包括五价、六价、七价等疫苗。举例来说，五价疫苗可包含三株甲型流感病毒（例如，一株 H1 和两株 H3，如上所述）加上两株乙型流感病毒。例如，A-A-A-B-B 疫苗可包含来自于以下毒株的血凝素：(i) H1N1 毒株；

(ii)A/Moscow/10/99- 样 H3N2 毒株 ;(iii)A/Fujian/411/2002- 样 H3N2 毒株 ;(iv)B/Victoria/2/87- 样毒株 ;以及 (v)B/Yamagata/16/88- 样毒株。另一种 A-A-A-B-B 疫苗可包含来自于如下毒株的血凝素 : (i)H1N1 毒株 ;(ii)H3N2 毒株 ;(iii)H5 甲型流感毒株, 如 H5N1 毒株 ;(iv)B/Victoria/2/87- 样毒株 ;以及 (v)B/Yamagata/16/88- 样毒株。A-A-A-A-B 疫苗可包含来自于如下毒株的血凝素 : (i)H1N1 毒株 ;(ii)A/Moscow/10/99- 样 H3N2 毒株 ;(iii)A/Fujian/411/2002- 样 H3N2 毒株 ;(iv)H5 甲型流感毒株, 如 H5N1 毒株 ;以及 (v) 乙型流感毒株。A-A-A-A-B-B 疫苗可包含来自于如下毒株的血凝素 : (i)H1N1 毒株 ;(ii)A/Moscow/10/99- 样 H3N2 毒株 ;(iii)A/Fujian/411/2002- 样 H3N2 毒株 ;(iv)H5 甲型流感毒株, 如 H5N1 毒株 ;(v)B/Victoria/2/87- 样毒株 ;以及 (vi)B/Yamagata/16/88- 样毒株。

[0040] 血凝素剂量

[0041] 血凝素 (HA) 是目前灭活流感疫苗的主要免疫原, 通过参照一般由 SRID 测量的 HA 水平来标准化疫苗剂量。现有疫苗通常在 0.5mL 的剂量中含有约 15 μ g HA/ 毒株, 虽然例如对儿童 (通常为 0.25mL 的剂量, HA 浓度相同)、或在大流行情况下、或在使用佐剂时可使用较低的剂量。已使用分剂量, 例如 1/2 (即 7.5 μ g HA/ 毒株)、1/4 和 1/8, 以及较高剂量 (如 3x 或 9x 剂量 [35, 36])。

[0042] 通常, 每剂 HA 的量可以在 0.1-150 μ g/ 毒株的范围内, 优选 0.1-50 μ g, 例如 0.1-20 μ g、0.1-15 μ g、0.1-10 μ g、0.1-7/5 μ g、0.5-5 μ g 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 1.5 μ g/ 毒株等。在本发明的一些实施方式中, 组合物中每毒株 HA 的浓度至少为 12 μ g/ml (即在 0.5 毫升的体积中每株至少 6 μ g, 这高于参考文献 3 使用的浓度)。通常, 该浓度将为 \geq 15 μ g/ml, 例如, \geq 20 μ g/ml、 \geq 25 μ g/ml、 \geq 30 μ g/ml 或更高。通常为每株 15 μ g/ml 或 30 μ g/ml 的浓度。

[0043] 通常, 组合物中每株的 HA 浓度是相同的。但在一些实施方式中, 该浓度将是最低浓度的整数倍。例如, 某具体毒株的最低 HA 浓度是 15 μ g/ml, 那么组合物中其它 HA 浓度将是 15 μ g/ml、30 μ g/ml、45 μ g/ml 或 60 μ g/ml。

[0044] 如上所述, 本发明通常使用灭活疫苗。但在一些实施方式中, 可使用活疫苗。与基于 HA 含量进行标准化不同, 活疫苗剂量通过中值组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 测定。通常使用每株 10⁶ 到 10⁸ (优选 10^{6.5}-10^{7.5}) 的 TCID₅₀。流感病毒可被减毒。流感病毒可以是温度敏感的。流感病毒可以是冷适应性的。

[0045] 细胞系

[0046] 用于本发明的疫苗的制备可使用 SPF 鸡蛋作为底物进行病毒生长, 其中从感染的母鸡鸡蛋的尿囊液收集病毒。但是, 可使用支持流感病毒复制的细胞系取代鸡蛋。细胞系通常是哺乳动物来源的。合适的哺乳动物来源细胞包括但不限于: 仓鼠、牛、灵长类 (包括人和猴) 和犬细胞, 但灵长类动物细胞不是优选的。可利用各种细胞类型, 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名为 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 [37-39]。合适的犬细胞是, 例如肾细胞, 如 CLDK 和 MDCK 细胞系。

[0047] 因此, 合适的细胞系包括但不限于: MDCK ; CHO ; CLDK ; HKCC ; 293T ; BHK ; Vero ; MRC-5 ; PER. C6 [40] ; FRhL2 ; WI-38 ; 等等。这些细胞系可广泛获自, 例如美国模式培养物保

藏所 (ATCC) [41]、寇里尔细胞保藏中心 (Coriell Cell Repositories) [42] 或欧洲细胞培养物保藏所 (ECACC)。例如, ATCC 提供目录号为 CCL-81、CCL-81.2、CRL-1586 和 CRL-1587 的各种不同 Vero 细胞, 目录号为 CCL-34 的 MDCK 细胞。PER.C6 可以保藏号 96022940 获自 ECACC。

[0048] 最优选的细胞系是具有哺乳动物型糖基化的那些细胞系。作为哺乳动物细胞系的次优替代, 也可以用禽细胞系培养病毒 [例如, 参考文献 43-45], 这包括鸭细胞系 (例如, 鸭的视网膜) 或鸡细胞系。禽细胞系的例子包括禽胚胎干细胞 [43, 46] 和鸭视网膜细胞 [44]。合适的禽胚胎干细胞包括来源于鸡胚胎干细胞的 EBx 细胞系 EB45、EB14 和 EB14-074 [47]。也可以使用鸡胚胎成纤维细胞 (CEF)。但是, 与使用禽细胞不同, 使用哺乳动物细胞意味着疫苗将不含禽类 DNA 和鸡蛋蛋白 (例如卵清蛋白和卵类粘蛋白), 由此可以降低过敏性。

[0049] 培养流感病毒最优选的细胞系是 MDCK 细胞系 [48-51], 该细胞系源于马-达二氏 (Madin-Darby) 犬肾。原始的 MDCK 细胞系可从 ATCC 获得, 编号为 CCL-34, 但也可以使用这个细胞系的衍生物和其它 MDCK 细胞系。例如, 参考文献 48 公开了一种适化后能在悬浮培养物中生长的 MDCK 细胞系 (“MDCK 33016”, 保藏编号为 DSM ACC 2219)。同样, 参考文献 52 公开了一种能在无血清培养物中悬浮生长的 MDCK 衍生的细胞系 (“B-702”, 保藏编号为 FERM BP-7449)。参考文献 53 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 54 公开了对感染高度易感的 MDCK 细胞系, 包括 “MDCK. 5F1” 细胞 (ATCC CRL-12042)。这些 MDCK 细胞系都可以使用。

[0050] 病毒可以在贴壁培养或悬浮培养的细胞中生长。也可以采用微载体培养。在一些实施方式中, 可改造细胞使其适应悬浮生长。

[0051] 优选将细胞系培养在无血清培养基和 / 或不含蛋白的培养基中。在本发明中称某培养基为无血清培养基表示, 该培养基中不含来源于人或动物血清的添加物。在这种培养物中生长的细胞天然地包含其自身的蛋白质, 但是不含蛋白的培养基应当被理解为这样的培养基: 在没有蛋白质、生长因子、其他蛋白添加物和非血清蛋白的情况下细胞能够在其中繁殖 (如, 在感染前), 但是可选地包含如胰蛋白酶或可能为病毒生长所需的其他蛋白酶之类的蛋白。

[0052] 在病毒复制期间, 支持病毒复制的细胞系以在 37°C 以下培养为佳 [55] (例如 30-36°C, 或约 30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C)。

[0053] 在培养的细胞内扩增流感病毒的方法通常包括: 用待生长的毒株接种物接种细胞培养物, 将被感染的细胞培养一段所需时间来扩增病毒, 例如根据病毒滴度或抗原表达情况确定培养时间 (例如接种后 24 到 168 小时), 以及收集扩增的病毒。以 1 : 500 到 1 : 1 的病毒 (根据 PFU 或 TCID₅₀ 测定): 细胞比接种培养的细胞, 优选 1 : 100 到 1 : 5, 更优选 1 : 50 到 1 : 10。将病毒加到细胞悬液中或细胞单层上, 在 25°C 到 40°C、优选 28°C 到 37°C, 让病毒吸附到细胞上, 历时至少 60 分钟, 但是一般不超过 300 分钟, 优选 90 到 240 分钟。可通过冻融或通过酶作用分离感染的细胞培养物 (例如细胞单层), 以增加获得的培养物上清中的病毒含量。然后对获得的液体进行灭活或冻存。培养细胞按约 0.0001 到 10 的感染复数 (“m. o. i.”) 感染, 优选约 0.002 到 5, 更优选 0.001 到 2。更优选的是, 细胞按约 0.01 的 m. o. i. 感染。可在感染后 30 到 60 小时收获被感染的细胞。优选在感染后 34

到 48 小时收获细胞。更优选在感染后 38 到 40 小时收获细胞。通常在细胞培养期间添加蛋白酶（一般是胰蛋白酶）以使病毒释放。可在培养期间任何合适的阶段添加蛋白酶，例如，在接种前，在接种的同时或接种后 [55]。

[0054] 在一些实施方式中，特别是采用 MDCK 细胞的实施方式中，细胞系从主工作细胞库传代的群体倍增水平不超过 40。

[0055] 病毒接种物和病毒培养物最好不含（即，已检测污染且污染检测结果呈阴性）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、双核糖核酸病毒、环状构象病毒和 / 或细小病毒 [56]。特别好的是不含单纯疱疹病毒。

[0056] 宿主细胞 DNA

[0057] 如病毒已在细胞系上生长，那么尽可能减少最后疫苗内残存细胞系 DNA 就是标准操作，这是为了尽可能消除该 DNA 的致癌性。

[0058] 因此，根据本发明制备的疫苗组合物优选每个剂量包含 10ng 以下（优选 1ng 以下，更优选 100pg 以下）的残存宿主细胞 DNA，但仍可能存在痕量的宿主细胞 DNA。

[0059] 优选的是包含 < 10ng（例如，< 1ng，< 100pg）宿主细胞 DNA/15 μ g 血凝素的疫苗，以及包含 < 10ng（例如，< 1ng，< 100pg）宿主细胞 DNA/0.25ml 体积的疫苗。更好的是包含 < 10ng（例如，< 1ng，< 100pg）宿主细胞 DNA/50 μ g 血凝素的疫苗，以及包含 < 10ng（例如，< 1ng，< 100pg）宿主细胞 DNA/0.5ml 体积的疫苗。

[0060] 较好的是，任何残存宿主细胞 DNA 的平均长度小于 500bp，例如，小于 400bp、小于 300bp、小于 200bp、小于 100bp 等。

[0061] 污染性 DNA 可在疫苗制备过程中通过标准纯化方法去除，例如，色谱法等。核酸酶处理，例如 DNA 酶处理，可提高残存宿主细胞 DNA 的清除率。降低宿主细胞 DNA 污染的合适方法可见参考文献 57 和 58，包括两步处理，第一步使用 DNA 酶（例如，Benzonase），可在病毒生长期使用，然后用阳离子去污剂（例如，CTAB），可在病毒粒子裂解过程中使用。也可以采用 β -丙内酯处理进行去除。

[0062] 测定残存宿主细胞 DNA 现在是生物制品的常规法定要求，也是本领域技术人员常规技术之一。用于测定 DNA 的方法通常是经验证的实验 [59,60]。一项经验证的实验其性能特征可以数学和定量术语来描述，其可能的误差原因应是已知的。这样的实验通常已就诸如精度、准度、特异性等特征经过了测试。待一项实验经过校准（例如，用已知标准量的宿主细胞 DNA 校准）并测试后，就可进行常规的定量 DNA 测定。有三种主要的 DNA 定量测定技术可以使用：杂交方法，如 DNA 印迹 (Southern Blots) 或狭缝印迹 (Slot Blots) [61]；免疫测定方法，如 Threshold™ 系统 [62]；以及定量 PCR [63]。这些方法都是本领域技术人员熟知的，但每一种方法的精准度可能与待测的宿主细胞有关，例如，杂交探针的选择、扩增用的引物和 / 或探针的选择等。Molecular Devices 的 Threshold™ 系统是一种可测定 pg 级总 DNA 的定量分析方法，已被用于检测生物药物的污染 DNA 水平 [62]。典型的实验包括生物素化的 ssDNA 结合蛋白、尿素酶结合的抗 ssDNA 抗体和 DNA 之间非序列特异性地形成反应复合物。所有检测组分都包括在厂家生产的完整总 DNA 分析试剂盒内。许多商业制造商都提供用于检测残存宿主细胞 DNA 的定量 PCR 实验，例如 AppTec™ 实验室服务公司 (AppTec™ Laboratory Services)、BR 公司 (BioReliance™)、阿尔泰技术公司 (Althea

Technologies) 等。参考文献 64 对用于测定人病毒疫苗内宿主细胞 DNA 污染的化学发光杂交分析和总 DNA Threshold™ 系统进行了比较。

[0063] 药用组合物

[0064] 本发明使用的疫苗通常除流感病毒外还包含其它组分, 如它们通常包含一种或多种药用载体和 / 或赋形剂。有关这些组分的全面讨论可参见参考文献 65。在许多实施方式中, 还可包含佐剂。

[0065] 组合物在给药时通常为水溶液形式。

[0066] 组合物可包含防腐剂, 如硫柳汞或 2- 苯氧乙醇。但在一些实施方式中, 与 PREPANDRIX™ 产品不同, 疫苗应基本上不含含汞物质, 例如不含硫柳汞 [8, 66]。不含汞的疫苗是更优选的。不含防腐剂的疫苗是特别优选的。α - 生育酚琥珀酸盐可作为汞化合物的替代物 [8]。特别优选的是不含防腐剂的疫苗。

[0067] 为了控制渗透压 (tonicity), 优选包含生理盐, 如钠盐。优选氯化钠 (NaCl), 其浓度可为 1 到 20mg/ml。其他可以使用的盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和 / 或氯化镁等。在佐剂与抗原分开存在于不同容器时, 氯化钠可存在于两个容器中。

[0068] 组合物的渗透压通常为 200mOsm/kg 到 400mOsm/kg, 优选 240-360mOsm/kg, 更优选 290-310mOsm/kg。

[0069] 本发明组合物可包含一种或多种缓冲剂。典型的缓冲剂包括: 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 (特别是与氢氧化铝佐剂一起); 或者柠檬酸盐缓冲剂。缓冲剂的使用浓度一般为 5-20mM。

[0070] 组合物的 pH 一般在 5.0 到 8.1 之间, 更常见的是在 6.0 到 8.0 之间, 例如 6.5-7.5 或 7.0-7.8。

[0071] 组合物最好是无菌的。组合物最好是无热原的, 例如, 每剂 EU (内毒素单位, 标准计量) < 1, 每剂 EU 优选 < 0.1。组合物优选不含谷蛋白。

[0072] 本发明的组合物, 特别是裂解疫苗或表面抗原疫苗, 可包含去污剂, 例如, 聚氧乙烯脱水山梨酯表面活性剂 (被称为“吐温”)、辛苯聚醇 (如辛苯聚醇 -9 (曲通 X-100) 或叔辛基苯氧聚乙氧基乙醇)、溴化十六烷基三甲胺 (“CTAB”) 或脱氧胆酸钠。去污剂可以只以痕量存在。因此, 疫苗可包含含量各低于 1mg/ml 的辛苯聚醇 -10 和聚山梨醇酯 80。其它痕量存在的残留组分可以是抗生素 (例如, 新霉素、卡那霉素、多粘菌素 B)。在佐剂与抗原分开保存在不同容器时, 去污剂通常存在于含有抗原的容器中 (如抗原与聚山梨醇酯 80 和辛苯聚醇 -10 在一起)。

[0073] 组合物可包含用于单次免疫的材料, 或者包含用于多次免疫的材料 (即, “多剂量” 药盒)。多剂量组合物中优选包含防腐剂。作为多剂量组合物包含防腐剂的替代手段, 或者在包含防腐剂以外, 可以将组合物装在带有用于取用材料的无菌接配器的容器内。

[0074] 人流感病毒疫苗通常以约 0.5mL 的单位剂量体积通过肌肉内注射给药。但在本发明的一些实施方式中, 可使用该体积一半的单位剂量 (即, 约 0.25ml)。此减少的剂量体积特别可给予儿童。还可使用更低的剂量 (如 0.1ml 或 0.2ml), 例如用于皮内注射。

[0075] 优选将疫苗存放在 2°C 到 8°C。它们不应被冷冻。理想的是避免光线直接照射。

[0076] 可以各种合适的容器提供疫苗, 疫苗可被配制成立即可用的, 或者为给药前临时混合的试剂盒的一部分, 如分开的抗原和佐剂组分 (如 PREPANDRIX™ 产品中的那样)。合

适的容器包括小瓶、注射器（如一次性注射器）、鼻喷雾器等。这些容器应无菌。如果将组合物 / 组分存于小瓶中，所述小瓶优选由玻璃或塑料材料制成。优选先将小瓶灭菌再加入组合物。为避免患者对乳胶过敏的问题，优选用无乳胶的塞子密封小瓶，优选所有包装材料均不含乳胶。小瓶可装有单剂量疫苗，或可装有一剂量以上（“多剂量”小瓶），例如 10 剂量。优选用无色玻璃制成小瓶。小瓶可装有盖子（例如，Luer 锁扣），该盖子适于将注射器插入其中。小瓶，尤其是多剂量小瓶，可具有允许无菌取出其内容物的盖子。如果组分包装在注射器中，注射器可装有针头。如果未装针头，可随注射器提供单独的针头用于装配和使用。这种针头可以是有鞘的。优选安全针头。常见的是 1 英寸 23 号、1 英寸 25 号和 5/8 英寸 25 号针头。注射器可装有可剥离标签，其上打印了批号、流感季节和内含物的有效期，从而有助于记录保管。注射器的柱塞优选具有限位器，从而能防止柱塞在抽吸期间意外掉出。注射器可装有乳胶橡胶盖子和 / 或柱塞。一次性注射器含有单剂量疫苗。在装上针头之前，注射器一般装有针帽以密封顶端，所述针帽优选由丁基橡胶制成。

[0077] 可给容器做上显示半剂量体积的标记，例如以有助于递送给儿童。例如，含有 0.5ml 剂量的注射器可具有显示 0.25ml 体积的标记。因此，可以 0.5ml 的单位剂量体积包装疫苗，但疫苗可以 0.25ml 的定量剂量体积给予，容器上的标记有助于这种半剂量给药。

[0078] 如果使用玻璃容器（例如，注射器或小瓶），则优选使用硼硅酸盐玻璃而不是钠钙玻璃制成的容器。

[0079] 可随容器装有（例如，装在同一盒子中）插页，该插页包括疫苗的细节，例如给药的说明书，疫苗中抗原的细节等。说明书还可包括警告，例如准备肾上腺素溶液以防疫苗接种后的过敏反应，等等。

[0080] 佐剂

[0081] 在使用时，本发明疫苗宜包含佐剂，佐剂的作用是增强在接受该组合物的患者中引起的免疫应答（体液免疫和 / 或细胞免疫）。水包油乳液佐剂（尤其是含有角鲨烯的佐剂）的存在被证明可增强季节性 [67] 和大流行 [68,69] 流感疫苗的免疫应答的毒株交叉反应性。

[0082] 本发明所用的水包油乳液通常包含至少一种油和至少一种表面活性剂，所述油和表面活性剂是生物可降解（可代谢）和生物相容的。乳液中的油滴直径通常小于 5 μ m，甚至可具有亚微米直径，通过微流化床实现这种小尺寸以提供稳定乳液。优选小于 220nm 的液滴，因为它们可进行过滤除菌。

[0083] 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、种籽和谷物。最常见花生油、大豆油、椰子油和橄榄油是坚果油的代表例子。也可使用获自（例如）霍霍巴豆（jojoba bean）的霍霍巴油。种籽油包括红花油、棉花籽油、葵花籽油、芝麻籽油等。在谷物油中，最常见的是玉米油，但也可以使用来自其它谷类，如小麦、燕麦、黑麦、稻、画眉草（teff）、黑小麦（triticale）等的油。可从坚果和种籽油开始，通过水解、分离和酯化合适物质制备甘油和 1,2-丙二醇的 6-10 碳脂肪酸酯（不是种籽油中天然产生的）。来自哺乳动物乳汁的脂肪和油类是可代谢的，因此可以用于实施本发明。由动物来源获得纯油的过程中必需的分选、纯化、皂化和其它方法的步骤是本领域众所周知的。

[0084] 大多数鱼类含有容易回收的可代谢油。例如，鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和如鲸蜡的鲸油是可以用于本发明的几种鱼油的代表例子。通过生化途径用 5-碳异戊二烯单位合成许多

支链油,它们总称为萜类化合物。鲨鱼肝油含有称为角鲨烯的支链不饱和萜类化合物,即2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯。也可采用角鲨烯的饱和类似物角鲨烷(squalane)。鱼油,包括角鲨烯和角鲨烷,易于从商业来源获得,或可以通过本领域已知的方法获得。优选角鲨烯。

[0085] 含有角鲨烯的乳液已包含在FLUAND™和PREPANDRIX™产品中。在FLUAND™疫苗中,HA的总量是45 μg(3×15 μg),角鲨烯的总量是9.75mg,剂量体积为0.5ml(即,19.5mg/ml角鲨烯)。在PREPANDRIX™疫苗中,HA的总量是3.75 μg(单价),角鲨烯的总量是10.68mg,剂量体积为0.5ml(即,21.4mg/ml角鲨烯)。在本发明的许多实施方式中,角鲨烯浓度低于19mg/ml,其同时仍然维持佐剂作用,且其浓度可以是≤10mg/ml,如≤5mg/ml、≤2.5mg/ml。可使用每剂0.5mg角鲨烯的最小量(如,见参考文献3)。每剂的量的例子包括5.3mg、4.9mg、2.7mg、2.4mg和1.2mg等。

[0086] 其他有用的油是生育酚,它宜包含在针对老年患者(如年龄大于60岁或更大的患者)的疫苗中,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[70]。它们也具有抗氧化特性,这种特性有助于稳定该乳液[71]。存在各种生育酚(α、β、γ、δ、ε或ξ),但通常使用α-生育酚。优选的α-生育酚是DL-α-生育酚。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[8]。

[0087] 可使用油的混合物,例如,角鲨烯和α-生育酚的混合物。油含量通常为2-20%(体积)。

[0088] 可通过'HLB'(亲水/亲脂平衡)对表面活性剂分类。本发明优选的表面活性剂的HLB为至少10,优选至少15,更优选至少16。可以与本发明一起使用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),特别是聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80;以商品名DOWFAX™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;乙氧基(氧-1,2-乙二基)重复数量不同的辛苯聚醇,特别感兴趣的是辛苯聚醇9(曲通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);壬酚乙醇酯,如Tergitol™ NP系列;衍生自月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为芊泽(Brij)表面活性剂),如三甘醇单月桂基醚(芊泽30);以及失水山梨糖醇酯(通常称为司盘(SPAN)),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。优选非离子型表面活性剂。用于乳液的最优选的表面活性剂是聚山梨醇酯80(聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯;吐温80)。

[0089] 可使用表面活性剂的混合物,如吐温80/司盘85混合物。聚氧乙烯失水山梨糖醇酯和辛苯聚醇的组合也适用。另一种有用的组合包含月桂醇聚醚9和聚氧乙烯失水山梨糖醇酯和/或辛苯聚醇。

[0090] 优选的表面活性剂的用量(重量%)为:聚氧乙烯失水山梨糖醇酯(如吐温80)0.01-1%,特别是约0.1%;辛基-或壬基-苯氧基聚氧乙醇(如曲通X-100或曲通系列的其它去污剂)0.001-0.1%,特别是0.005-0.02%;聚氧乙烯醚(如月桂醇聚醚9)0.1-20%,优选0.1-10%,特别是0.1-1%或约0.5%。

[0091] 优选含角鲨烯的水包油乳液,特别是含有聚山梨醇酯80的那些乳液。角鲨烯:聚山梨醇酯80之间的重量比可以是1到10,例如2到9,如约2.2或约8.3。本发明所用的具

体水包油乳液佐剂包括但不限于：

[0092] • 角鲨烯、聚山梨醇酯 80 和失水山梨糖醇三油酸酯的亚微米乳液。该乳液的体积组成可以是约 5% 角鲨烯、约 0.5% 聚山梨醇酯 80 和约 0.5% 司盘 85。以重量计, 这些比例为 4.3% 角鲨烯、0.5% 聚山梨醇酯 80 和 0.48% 司盘 85。这种佐剂称为 ‘MF59’ [72-74], 参考文献 75 的第 10 章和参考文献 76 的第 12 章更详细地描述了该佐剂。MF59 乳液宜包含柠檬酸根离子, 如 10mM 柠檬酸钠缓冲液。

[0093] • 角鲨烯、生育酚和聚山梨醇酯 80 的亚微米乳液。这些乳液可含有 2-10% 角鲨烯、2-10% 生育酚和 0.3-3% 聚山梨醇酯 80, 角鲨烯：生育酚的重量比优选 ≤ 1 (例如 0.90), 因为这能提供更稳定的乳液。角鲨烯和聚山梨醇酯 80 的体积比可以约为 5 : 2, 或者重量比约为 11 : 5。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 角鲨烯的混合物混合, 然后使该混合物微流体化。得到的乳液含有平均直径为如 100-250nm, 优选约 180nm 的亚微米油滴。该乳液也可含有 3-脱-O-酰化单磷酸脂质 A (3d-MPL)。此种类型的另一种有用乳液可包含 (每个人用剂量) 0.5-10mg 角鲨烯、0.5-11mg 生育酚和 0.1-4mg 聚山梨醇酯 80 [3]。

[0094] • 角鲨烯、生育酚和曲通去污剂 (如曲通 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剂。

[0095] • 含有聚山梨醇酯 (如聚山梨醇酯 80)、曲通去污剂 (如曲通 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 聚山梨醇酯 80, 110 μ g/ml 曲通 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。该乳液还可包含角鲨烯。该乳液也可包含 3d-MPL。水相可含有磷酸盐缓冲剂。

[0096] • 角鲨烯、聚山梨醇酯 80 和泊洛沙姆 401 (“普流罗尼克 (Pluronic)TM 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的递送载体, 已在 “SAF-1” 佐剂 (0.05-1% Thr-MDP、5% 角鲨烯、2.5% 普流罗尼克 L121 和 0.2% 聚山梨醇酯 80) [77] 中与苏氨酸-MDP 一起使用。也可不与 Thr-MDP 一起使用, 例如 “AF” 佐剂 (5% 角鲨烯、1.25% 普流罗尼克 L121 和 0.2% 聚山梨醇酯 80) [78]。优选微流体化。

[0097] • 含有角鲨烯、水性溶剂、聚氧乙烯烷基醚亲水性非离子型表面活性剂 (如聚氧乙烯 (12) 十六烷基-十八烷基醚) 和疏水性非离子型表面活性剂 (如失水山梨糖醇酯或二缩甘露醇酯, 如失水山梨糖醇单油酸酯或 ‘司盘 80’) 的乳液。该乳液优选为热可逆的和/或其中至少 90% 油滴 (以体积计) 的尺寸小于 200nm [79]。该乳液也可含有以下一种或多种物质：醛醇；低温保护剂 (例如, 糖, 如十二烷基麦芽苷和/或蔗糖)；和/或烷基聚糖苷 (alkylpolyglycoside)。该乳液可包含 TLR4 激动剂 [80]。这类乳液可以被冻干。

[0098] • 角鲨烯、泊洛沙姆 105 和 Abil-Care 的乳液 [81]。含佐剂疫苗中这些组分的终浓度 (重量) 是 5% 角鲨烯、4% 泊洛沙姆 105 (普流罗尼克多元醇) 和 2% Abil-Care 85 (双-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 二甲硅油；辛酸/癸酸甘油三酯)。

[0099] • 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 82 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。优选亚微米液滴尺寸。

[0100] • 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 83)、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。

[0101] • 皂苷 (如 Quila 或 QS21) 和固醇 (如胆固醇) 结合成螺旋胶束的乳液 [84]。

[0102] • 包含矿物油、非离子亲脂性乙氧基化脂肪醇和非离子亲水性表面活性剂 (例如, 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 [85]。

[0103] • 包含矿物油、非离子亲水性乙氧基化脂肪醇和非离子亲脂性表面活性剂 (例如, 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 [85]。

[0104] 可在疫苗制备过程中将乳液与抗原混合, 或者可以独立的组分提供, 以在递送时与独立的含抗原组分临时混合 (如 PREPANDRIX™ 产品那样)。这两种组分是液体时, 混合两种液体的体积比可变 (例如 5 : 1-1 : 5), 但通常约为 1 : 1。

[0105] 抗原和佐剂混合后, 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, 如果有, 也是很少的血凝素会进入该乳液的油相。

[0106] 本发明组合中角鲨烯与血凝素 (总量) 的重量比可以为 20-180, 如 25-30、50-60、105-115。

[0107] 治疗方法和疫苗的给药途径

[0108] 本发明的组合物适用于人患者, 本发明提供了在患者体内诱导免疫反应的方法, 该方法包括给予患者本发明组合物的步骤。

[0109] 本发明还提供了可作为药品使用的本发明组合物。

[0110] 本发明还提供了至少一种甲型流感病毒抗原、至少一种乙型流感病毒抗原和角鲨烯 (如, 以水包油乳液形式) 在制备用于主动免疫以抵抗流感疾病的组合物中的应用, 其中, 所述组合物是具有上文所述特征的疫苗。

[0111] 这些方法和用途通常用于诱导抗体应答, 优选保护性抗体应答。分析流感病毒疫苗免疫后的抗体应答、中和能力和保护作用的方法是本领域熟知的。人体实验结果表明, 抗人流感病毒血凝素的抗体滴度与保护作用呈正相关关系 (血清样本内血凝素抑制滴度达到约 30-40 时所产生的保护作用可抑制约 50% 的同源病毒感染) [86]。抗体反应一般用血凝素抑制、微量中和法、单辐射免疫扩散 (SRID) 和 / 或单辐射溶血分析 (SRH) 来测得。这些分析就是都是本领域熟知的。

[0112] 本发明的组合物可以多种途径给药。最优选的免疫途径是肌肉注射 (例如, 注射到胳膊或大腿内), 但是其他可用的途径还有皮下注射、真皮内注射 [87, 88]、鼻内给药 [89-91]、经口给药 [92]、含服 (buccal)、舌下、经皮、透皮给药 [93] 等。

[0113] 按照本发明的方法制备的疫苗可用于治疗儿童和成人。目前推荐将流感疫苗用于儿科和成人免疫接种, 从 6 个月大开始。因此, 患者可以是 1 岁以下、6- < 36 月、1-5 岁、5-15 岁、15-55 岁或 55 岁以上。优选的疫苗接种者有高龄的 (例如 ≥ 50 岁、 ≥ 60 岁, 优选 ≥ 65 岁)、低龄的 (例如, ≤ 5 岁)、住院患者、医疗保健人员、军队服务人员和军事人员、孕妇、慢性病患者、免疫缺陷患者、接种疫苗前 7 天内服用过抗病毒化合物 (例如, 奥司他韦或扎那米韦; 见下文) 的患者、对鸡蛋过敏的人以及到国外旅行的人。疫苗不仅适用于这些人群, 还可用于更多其他人群。

[0114] 本发明的优选组合物可满足疗效 CPMP 标准的 1、2 或 3 条。对于成人来说 (18-60

岁),这些标准是:(1) $\geq 70\%$ 的血清保护;(2) $\geq 40\%$ 的血清转化;和/或(3) GMT 升高 ≥ 2.5 倍。对于高龄患者来说(> 60 岁),这些标准是:(1) $\geq 60\%$ 的血清保护;(2) $\geq 30\%$ 的血清转化;和/或(3) GMT 升高 ≥ 2 倍。这些标准是根据至少包括 50 个患者的开放性研究(Open Label Study)制定的。

[0115] 治疗可采用单剂量方案或多剂量方案。多剂量方案可用于初次免疫和/或加强免疫。在多剂量方案中,不同的剂量可通过相同的或不同的途径给药,例如,胃肠外途径初次免疫加粘膜途径加强免疫,粘膜途径初次免疫加胃肠外途径加强免疫等。一次以上剂量给药(一般两次)特别适用于没有免疫力的患者,例如,以前从未接种过流感疫苗的人群,或用于包含新 HA 亚型的疫苗。多剂量通常至少间隔 1 周给药(例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 12 周、约 16 周等)。

[0116] 本发明生产的疫苗可与其他疫苗一起基本同时(例如,在同一次医疗咨询或或访问健康护理专业人员或疫苗接种中心期间)给药,如基本上同时与下述疫苗给予: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、灭活脊髓灰质炎疫苗、乙肝疫苗、脑膜炎球菌偶联疫苗(如三价 A-C-W135-Y 疫苗)、呼吸道合胞病毒疫苗、肺炎球菌偶联疫苗等。对于高龄患者来说优选与肺炎球菌疫苗和/或脑膜炎球菌疫苗基本上同时给药。

[0117] 同样,本发明的疫苗可与抗病毒化合物基本上同时给药(例如,在同一次医疗咨询或看医生期间),特别是抗流感病毒的抗病毒化合物(例如,奥司他韦和/或扎那米韦)。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-[(氨基亚胺甲基)-氨基]-2,6-无水-3,4,5-三脱氧-D-甘油-D-半乳糖酮-2-烯酸(galactonon-2-enonic acid),包括其酯(例如,乙酯)和其盐(例如,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、其乙酯和磷酸盐(1:1),也被称为磷酸奥司他韦(oseltamivir phosphate)(达菲(TAMIFLU™))。

[0118] 概述

[0119] 术语“含有”包括“包含”以及“由...组成”,例如“含有”X 的组合物可仅由 X 组成或可包含其它物质,例如 X+Y。

[0120] 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”。

[0121] 与数值 x 相关的术语“约”是任选的,其表示(例如) $x \pm 10\%$ 。

[0122] 除非另有说明,包括混合两种或更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。

[0123] 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。

[0124] 当某化合物作为组合物的一部分给予人体时,该化合物可被合适的前药所替换。

[0125] 当细胞底物用于重配或反向遗传学方法时,或用于培养病毒时,优选批准用于人类疫苗生产的细胞底物,例如 Ph Eur 总纲 5.2.3 所述的细胞底物。

[0126] 实施本发明的方式

[0127] 595 位患者（男孩和女孩，6 到 < 36 月）分成 17 组，每组 35 人。每组接受三价（A/H1N1、A/H3N2、B）或四价（A/H1N1、A/H3N2、B/Victoria、B/Yamagata）流感疫苗。疫苗以 0.5ml (15 μ g/剂/株；总共为 45 μ g 或 60 μ g) 或 0.25ml (7.5 μ g/剂/株；总共为 22.5 μ g 或 30 μ g) 的体积给予。一组接受儿科剂量的目前销售的三价灭活疫苗。肌肉内注射给予疫苗，以预填充的注射器形式或小瓶形式提供疫苗。测试了三种不同的佐剂用量（通过稀释获得）。

[0128] 三价疫苗含有推荐用于北半球 2008-2009 流感季的流感毒株：A/Brisbane/59/2007- 样、A/Brisbane/10/2007- 样病毒和 B/Florida/4/2006- 样。B/Florida/4/2006- 样属于 B/Yamagata 谱系，因此，所述四价疫苗额外含有来自 B/Malaysia/2506/2004- 样病毒的抗原，该病毒属于 B/Victoria 谱系。

[0129] 对象在第 1 天和第 29 天接受两剂疫苗（2 组除外，这 2 组在第 1 天接受一剂疫苗），通过分析基线（接种前）、第 28 天和第 50 天采集的血液来评估流感特异性免疫应答。通过针对流感毒株 A/H1N1、A/H3N2 和 B（包括同源的和异源变异毒株）的毒株特异性血凝素抑制（HI）实验来评估血清样品。

[0130] 因此，所述 17 组如下所示：

[0131]

组别	H1N1 (μ g)	H3N2 (μ g)	B/Yam (μ g)	B/Vic (μ g)	角鲨烯 (mg)	给药次数	剂量 (mL)
A	7.5	7.5	7.5	-	-	2	0.25
B	15	15	15	-	-	2	0.5
C	7.5	7.5	7.5	7.5	-	2	0.25
D	15	15	15	15	-	2	0.5
E	7.5	7.5	7.5	-	1.22	2	0.25
F	7.5	7.5	7.5	7.5	1.22	2	0.25
G	7.5	7.5	7.5	-	2.44	2	0.25
H	15	15	15	-	2.44	2	0.5
I	7.5	7.5	7.5	7.5	2.44	2	0.25
J	15	15	15	15	2.44	2	0.5
K	7.5	7.5	7.5	-	4.88	2	0.25
L	15	15	15	-	4.88	2	0.5
M	7.5	7.5	7.5	7.5	4.88	2	0.25
N	15	15	15	15	4.88	2	0.5
O	15	15	15	-	9.75	1	0.5
P	15	15	15	15	9.75	1	0.5
Q	7.5	7.5	7.5	-	-	2	0.25

[0132] 在进一步的研究中，357 位患者（男性和女性，> 65 岁）被分成 8 组。每组肌肉内注射（0.5mL）有或不含有水包角鲨烯乳液的三价流感疫苗（A/H1N1、A/H3N2、B）。疫苗以预填充的注射器形式提供。测试了三种不同的佐剂用量（通过稀释获得）。

[0133] 流感毒株为推荐用于北半球 2008-2009 流感季的流感毒株：A/Brisbane/59/2007- 样、A/Brisbane/10/2007- 样病毒和 B/Florida/4/2006- 样。

[0134] 对象接受单剂，通过分析基线（接种前）、接种后 7 天（第 8 天）和 21 天（第 22 天）采集的血液而评估流感特异性免疫应答。通过针对流感毒株 A/H1N1、A/H3N2 和 B 的毒

株特异性血凝素抑制 (HI) 实验来评估血清样品。也进行了细胞介导的免疫检测。

[0135] 因此,所述 8 组如下所示:

[0136]

组别	H1N1 (μ g)	H3N2 (μ g)	B (μ g)	角鲨烯 (mg)	剂量 (mL)
A	15	15	15	-	0.5
B	15	30	15	-	0.5
C	15	15	15	2.44	0.5
D	15	30	15	2.44	0.5
E	15	15	15	4.88	0.5
F	15	30	15	4.88	0.5
G	15	15	15	9.75	0.5
H	15	30	14	9.75	0.5

[0137] 对于两种甲型流感毒株,在 C-H 组患者中(即含有佐剂的疫苗)所有三个 CHMP 标准都能满足。

[0138] 对于乙型流感毒株,接受 4.88mg 角鲨烯或 9.75mg 角鲨烯的组中满足了所有三个 CHMP 标准。在接受不含佐剂的疫苗的组中,仅满足一个 CHMP 标准,但在接受 2.44mg 角鲨烯的组中,三个 CHMP 标准中满足了两个。

[0139] 因此,即使是疫苗中的角鲨烯的剂量低,也能增加抵御甲型流感毒株和乙型流感毒株的免疫保护。

[0140] 应理解,仅以实施例的方式描述了本发明,在维持本发明的范围和精神的情况下可做出任何改动。

[0141] 参考文献

[0142] [1]Minutello 等,(1999)Vaccine 17 :99-104.

[0143] [2]W02007/052155.

[0144] [3]W02008/043774.

[0145] [4]W002/28422.

[0146] [5]W002/067983.

[0147] [6]W002/074336.

[0148] [7]W001/21151.

[0149] [8]W002/097072.

[0150] [9]W02005/113756.

[0151] [10]Huckriede 等,(2003)Methods Enzymol 373 :74-91.

[0152] [11]Saito 等,(2004)J Med Virol 74(2) :336-43.

- [0153] [12]Hoffmann 等, (2002)Vaccine 20 :3165-3170.
- [0154] [13]Subbarao 等, (2003)Virology 305 :192-200.
- [0155] [14]Liu 等, (2003)Virology 314 :580-590.
- [0156] [15]Ozaki 等, (2004)J. Virol 78 :1851-1857.
- [0157] [16]Webby 等, (2004)Lancet 363 :1099-1103.
- [0158] [17]W000/60050.
- [0159] [18]W001/04333.
- [0160] [19]US 专利 6649372.
- [0161] [20]Neumann 等, (2005)Proc Natl Acad Sci USA 102 :16825-9.
- [0162] [21]W02006/067211.
- [0163] [22]W001/83794.
- [0164] [23]Hoffmann 等, (2000)Virology 267(2) :310-7.
- [0165] [24]Herlocher 等, (2004)J Infect Dis 190(9) :1627-30.
- [0166] [25]Le 等, (2005)Nature 437(7062) :1108.
- [0167] [26]Gambaryan 和 Matrosovich(1992)J Virol Methods 39(1-2) :111-23.
- [0168] [27]Mastrosovich 等, (1999)J Virol 73 :1146-55.
- [0169] [28]Stevens 等, (2006)J Mol Biol 355 :1143-55.
- [0170] [29]Couceiro 和 Baum(1994)Mem Inst Oswaldo Cruz 89(4) :587-91.
- [0171] [30]W02008/068631.
- [0172] [31]Rota 等, (1992)J Gen Virol 73 :2737-42.
- [0173] [32]GenBank 序列 GI :325176.
- [0174] [33]McCullers 等, (1999)J Virol 73 :7343-8.
- [0175] [34]GenBank 序列 GI :325237.
- [0176] [35]Treanor 等 (1996)J Infect Dis 173 :1467-70.
- [0177] [36]Keitel 等, (1996)Clin Diagn Lab Immunol 3 :507-10.
- [0178] [37]Kistner 等, (1998)Vaccine 16 :960-8.
- [0179] [38]Kistner 等, (1999)Dev Biol Stand 98 :101-110.
- [0180] [39]Bruhl 等, (2000)Vaccine 19 :1149-58.
- [0181] [40]Pau 等, (2001)Vaccine 19 :2716-21.
- [0182] [41]<http://www.atcc.org/>
- [0183] [42]<http://locus.umdj.edu/>
- [0184] [43]W003/076601.
- [0185] [44]W02005/042728.
- [0186] [45]W003/043415.
- [0187] [46]W001/85938.
- [0188] [47]W02006/108846.
- [0189] [48]W097/37000.
- [0190] [49]Brands 等, (1999)Dev Biol Stand 98 :93-100.
- [0191] [50]Halperin 等, (2002)Vaccine 20 :1240-7.

- [0192] [51]Tree 等, (2001)Vaccine 19 :3444-50.
- [0193] [52]EP-A-1260581 (W001/64846).
- [0194] [53]W02006/071563.
- [0195] [54]W02005/113758.
- [0196] [55]W097/37001.
- [0197] [56]W02006/027698.
- [0198] [57]EP-B-0870508.
- [0199] [58]US 5948410.
- [0200] [59]Lundblad(2001)Biotechnology and Applied Biochemistry 34 :195-197.
- [0201] [60] 工业指南 :生物分析方法有效性 (Guidance for Industry :Bioanalytical Method Validation), 美国健康和人服务部食品药品监督管理局兽医 (CVM) 药物评估和研究 (CDER) 中心 (U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research(CDER)Center for Veterinary Medicine(CVM))2001 年 5 月.
- [0202] [61]Ji 等, (2002)Biotechniques. 32 :1162-7.
- [0203] [62]Briggs(1991)J Parenter Sci Technol. 45 :7-12.
- [0204] [63]Lahijani 等, (199S)Hum Gene Ther. 9 :1173-80.
- [0205] [64]Lokteff 等, (2001)Biologicals. 29 :123-32.
- [0206] [65]Gennaro(2000)《雷明顿 :药剂科学和实践》(Remington :The Science and Practice of Pharmacy). 第 20 版, ISBN :0683306472.
- [0207] [66]Banzhoff(2000)Immunology Letters 71 :91-96.
- [0208] [67]O' Hagan(2001)Expert Rev Vaccines. 6(5) :699-710.
- [0209] [68]Bernstein 等, (2008)J Infect Dis. 197(5) :667-75.
- [0210] [69]Stephenson 等, (2005)J Infect Dis. 191(8) :1210-5.
- [0211] [70]Han 等, (2005) 从营养、免疫功能和健康角度看维生素 E 对年老者免疫功能和感染疾病的影响 (Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health), 欧洲会议 (EuroConference), 巴黎, 2005 年 6 月 9-10 日.
- [0212] [71]US-6630161.
- [0213] [72]W090/14837.
- [0214] [73]Podda 和 Del Giudice(2003)Expert Rev Vaccines 2 :197-203.
- [0215] [74]Podda(2001)Vaccine 19 :2673-2680.
- [0216] [75] 疫苗设计 :亚单位和佐剂方法 (Vaccine Design :The Subunit and Adjuvant Approach) (Powell 和 Newman 编辑), 普莱努出版社 (Plenum), 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [0217] [76] 疫苗佐剂 :制备方法和研究手段 (《分子医学方法》丛书第 42 卷) (Vaccine Adjuvants :Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series)), ISBN :1-59259-083-7. O' Hagan 编.
- [0218] [77]Allison 和 Byars(1992)Res Immunol 143 :519-25.
- [0219] [78]Hariharan 等, (1995)Cancer Res 55 :3486-9.

- [0220] [79]US-2007/0014805.
- [0221] [80]US-2007/0191314.
- [0222] [81]Suli 等, (2004)Vaccine 22(25-26) :3464-9.
- [0223] [82]W095/11700.
- [0224] [83]US 专利 6, 080, 725.
- [0225] [84]W02005/097181.
- [0226] [85]W02006/113373.
- [0227] [86]Potter 和 Oxford(1979)Br Med Bull 35 :69-75.
- [0228] [87]Halperin 等, (1979)Am J Public Health 69 :1247-50.
- [0229] [88]Herbert 等, (1979)J Infect Dis 140 :234-8.
- [0230] [89]Greenbaum 等, (2004)Vaccine 22 :2566-77.
- [0231] [90]Zurbriggen 等, (2003)Expert Rev Vaccines 2 :295-304.
- [0232] [91]Piasecik(2003)J Am Pharm Assoc(Wash DC). 43 :728-30.
- [0233] [92]Mann 等, (2004)Vaccine 22 :2425-9.
- [0234] [93]Chen 等, (2003)21 :2830-6。