

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96109319

※ 申請日期：96.3.19

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

病毒顆粒的鼻內或吸入給藥

INTRANASAL OR INHALATIONAL ADMINISTRATION OF VIROSOMES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

亞培生物股份有限公司 / ABBOTT BIOLOGICALS B.V.

代表人：(中文/英文)

維哈吉 M. / VERHAGE, M.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

荷蘭威斯普·豪登拉安 36 號

C.J. van Houtenlaan 36, 1381 CP Weesp, The Netherlands

國籍：(中文/英文)

荷蘭 / The Netherlands

三、發明人：(共 5 人)

姓名：(中文/英文)

1. 克斯頓 亞歷山大 J. / KERSTEN, ALEXANDER J.

2. 葛茲 利沙 / GEREZ, LISYA

3. 史丘恩 彼得 J. / SCHOEN, PIETER J.

4. 烙塔 喬瑟夫 J. P. / NAUTA, JOZEF J. P.

5. 凡英克利蘇斯 多林 H. / VAN RHEINECK LEYSSIUS, DORINE H.

國籍：(中文/英文)

1.-5. 荷蘭 / The Netherlands

四、聲明事項：

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

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、 2006/03/22、 60/784,462
2. EPO、 2006/03/22、 06111534.1

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供了流感病毒顆粒的組合物，所述病毒顆粒包含所述病毒的重構外殼，其中，所述病毒外殼完全從流感病毒粒獲得，其中，沒有從外界來源向重構病毒顆粒加入脂類，其中，病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物，其中，沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑，以及其中，所述組合物作為鼻內或吸入給藥配方製劑來設計，所述組合物特徵在於，所述配方製劑向人類的單次鼻內或吸入給藥足以誘導抵抗所述流感抗原的全身性免疫應答和/或局部免疫應答和/或細胞毒性淋巴細胞誘導，所述全身性應答能符合針對流感疫苗的CHMP標準，以及其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於30 μg 。本發明還提供了重構的流感病毒顆粒用於製造所述組合物的用途，以及由此製造的疫苗配方製劑。

六、英文發明摘要：

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.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明涉及，例如，用於滅活流感疫苗的組合物以及
5 給藥方式，其中，單次鼻內或吸入給藥獲得了與臨床保護
正相關的全身性免疫應答。

【先前技術】

發明背景

用於通過鼻內或口咽途徑，以及使用滅活流感抗原針
10 對流感進行免疫的多種觀念已作為皮下或肌肉內免疫的非
注射(無針頭needle-less)替代途徑被研究。已在動物模型中
產生了支持非注射手段的實驗數據。得到動物數據支持的、
使用滅活流感抗原(例如化學方式滅活的完整病毒粒子
15 (virus particles)，或者被進一步加工的病毒組分，例如被切
開的病毒，或者經純化的表面抗原血球凝集素(HA)和/或神
經氨酸酶(NA))以通過鼻內途徑進行免疫的思路包括：使用
佐劑或免疫刺激劑(immune stimulator)與滅活流感抗原組
合，或者需要多次免疫。佐劑是能增強與其混合的抗原的
20 免疫原性的任何物質。在人類中，通過鼻內途徑抵抗流感
的成功疫苗接種僅報導過：(a)活的(經冷改造的毒株)流感
疫苗(FluMistTM，MedImmune Vaccines Inc)(參考文獻1、2、
3)，(b)病毒顆粒型流感疫苗，其佐有大腸桿菌(E. coli)的熱
不穩定毒素(heat labile toxin)(NasalFlu，Berna Biotech
Ltd)(參考文獻4)或(c)使用高劑量抗原和重複疫苗接種(參

考文獻5、10、11)。雖然活疫苗能誘導滿意的免疫應答，但其能變成活病毒的特定性質導致了額外的安全顧慮，由於需要在上呼吸道附近的病毒複製，這可能會誘導出副作用。此外，所需的貯藏條件也限制了這些產品的商業化。

- 5 使用用大腸桿菌HLT作為佐劑的鼻內流感疫苗與面癱(Bell's Palsy)之間的強烈相關性導致佐有HLT的病毒顆粒疫苗從市場撤出(參考文獻6)。

流感疫苗在給定人群中的療效可通過下述方法來評估：評定接種後產生的抗流感抗體的數量相關的免疫原性參數。這些免疫原性參數通常被稱為CHMP標準，其用於對滅活流感疫苗進行每年重新許可認證(參考文獻7)。至今為止，通過使用滅活疫苗的一次單次鼻內施予，不加佐劑(其是疫苗中的附加成分，其不來自將用疫苗來預防的感染性試劑，並且是為增強對抗原的免疫應答的目的被加入到疫苗配方製劑中)，就達到這些免疫學要求或者CHMP標準(參考文獻7)的、對人類抵抗流感的成功免疫尚未有記載。因此，人們認識到，在本領域中仍有對下述滅活流感疫苗組合物的需求，所述組合物能在單次鼻內給藥之後誘導滿意的全身性免疫反應，並且不含佐劑，且通過所述單次給藥能達到CHMP標準(參考文獻7)。

所述“CHMP標準”按照下文所述被定義。在CHMP(Committee for Medicinal Products for Human Use)的Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines中，定義了下述血清學參數，以評定滅活

流感疫苗的免疫原性：

- 血清保護率，其中血清保護被定義為紅血球凝聚抑制(Haemagglutination Inhibition, HI)效價 ≥ 40 ，
- 血清轉化率，其中血清轉化被定義為接種前HI效價 < 10 ，接種後HI效價 ≥ 40 ，或者，接種前HI效價 ≥ 10 以及HI效價至少4倍的增加，
- 平均倍數增加值，這是對個體內增加的幾何平均值(即，接種後HI效價/接種前HI效價)。

10 針對流感疫苗免疫原性的CHMP要求是：對於疫苗中三種病毒毒株中的每種而言，達到下述標準中的至少一項：

標準	成年人	老年人
血清保護率	$> 70\%$	$> 60\%$
血清轉化率	$> 40\%$	$> 30\%$
平均倍數增加值	> 2.5	> 2.0

本發明還應用於兒童，從他們顯示出，他們以與成年人相當的方式作出免疫應答(參考文獻8)。本發明還應用於老年個體。老年人為超過60歲的。

15 【發明內容】

發明描述

令人吃驚地，以及與臨床前齧齒類數據和關於人類臨床經歷的文獻相反地，我們發現，對於18-60歲年齡組而言，用包含重構流感病毒外殼的滅活流感疫苗進行單次鼻內接種後，人類的免疫應答達到了針對流感疫苗療效的全部三個CHMP標準。一次單次鼻內施予是：為達到針對滅活流感疫苗免疫原性的上述CHMP標準，通過一個或兩個

鼻孔進行疫苗配方製劑的接種，而無需重複施予疫苗配方製劑。一次單次疫苗施予(通過鼻、吸入、口服、皮下或肌內途徑)通常是下述接種安排，其不包括：在本領域作為初次(priming)和強化(boosting)而已知的、以數天或數周的時間間隔對疫苗的多次施予。被設計為鼻內或吸入給藥配方製劑的配方製劑包含一種或多種活性組分和賦形劑的混合物，是按照允許鼻內或吸入給藥的方式製備的。本發明提供了一種方法，用於誘導達到CHMP標準的全身性免疫應答(循環的免疫球蛋白或產生抗體的B細胞)，有利地，所述方法用對病毒顆粒流感疫苗的單次鼻內或吸入給藥來進行。本發明還提供了一種方法，用於誘導局部或粘膜免疫應答，所述應答包括粘膜膜表面上作為IgA已知的分泌免疫球蛋白的增加，有利地，所述方法用對病毒顆粒流感疫苗的單次鼻內或吸入給藥來進行。鼻內施予之後對特異性IgG和IgA應答的誘導涉及鼻腔中淋巴組織的活性(參考文獻12)。此類組織作為鼻相關淋巴組織(NALT)已知，其還被顯示為用於細胞免疫應答的粘膜誘導位點(參考文獻13)。因為已知病毒顆粒具有誘導細胞內免疫應答的可能性(參考文獻14、15)，因此本發明還提供了誘導特異性細胞毒性淋巴細胞(CTL)的方法。

病毒顆粒(virosome)是含有病毒糖蛋白的脂質雙層。通常通過用去垢劑從帶包膜病毒提取膜蛋白和脂類，接著通過除去所述去垢劑來重構特徵性雙層來生產病毒顆粒。本發明還提供了流感病毒顆粒的組合物，其包含重構的流感

病毒外膜(具體而言，不再加脂類，並且不加免疫刺激劑(通常稱為佐劑)的免疫調節劑而重構)，用於通過氣溶膠進行接種，所述氣溶膠通過一個或兩個鼻孔施予鼻咽或口咽的粘5
膜，以獲得抵抗流感的全身性和局部免疫性。通過吸入進行的單次施予也是可行的。單次口服粘膜施予也是可行的。

可從滅活病毒來製備重構流感病毒顆粒，可以用不可透析的去垢劑對滅活病毒加以溶解，通過吸附到疏水珠粒上來除去所述去垢劑。製備物可包含一種或多種流感抗原的經過純化的懸浮液，所述流感抗原選自血球凝集素10 (HA)、神經氨酸酶(NA)、血球凝集素的衍生物和神經氨酸酶的衍生物。可以在病毒脂類(含有低水平的內毒素和卵清蛋白)構成的膜中，對病毒膜蛋白血球凝集素和神經氨酸酶進行重構(見參考文獻9)。血清凝集素和/或神經氨酸酶的衍生物是具有經修飾的氨基酸序列和/或結構的血球凝集素15 和/或神經氨酸酶分子。氨基酸可例如被刪除、替換或添加到序列中。此外，糖基化方式可被改變。衍生物保留有導入宿主時誘導免疫應答的能力。

可在例如含有胚胎的雞蛋中，或在附著的細胞或懸浮液中的細胞的細胞培養物中培養用於製備重構病毒顆粒的20 流感病毒。病毒例如可以是野生型的或重配的(reassortant)或經過遺傳修飾的毒株。病毒類型可例如是任何流感A或B亞型，包括流行性的毒株。

本發明還提供疫苗。術語疫苗應被理解為具有免疫活性的藥物製備物。在某些實施方式中，疫苗可包含病原性

微生物的無害變體或衍生物，例如，刺激免疫系統產生針對真實病原體的抵抗。在某些實施方式中，疫苗施予宿主時例如能誘導適應性免疫。疫苗可含有病原體或病原體組分的已死亡或削弱形式，例如病原體的抗原性組分。疫苗製備物可還含有藥物載體，可針對疫苗將由其被施予的特定模式對載體加以設計，例如針對鼻內或吸入給藥設計的藥物載體。流感疫苗可包含一種或多種未變性流感抗原，其一種或多種能誘導對流感特異的免疫應答。

本發明提供了含流感病毒顆粒的組合物，所述流感病毒顆粒包含所述病毒的重構外殼，其中所述組合物被設計為鼻內或吸入給藥配方製劑。本發明還提供了其中病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物的所述組合物。本發明還提供了其中病毒外殼完全從病毒粒子獲得的所述組合物。本發明還提供了其中沒有脂類從外界來源向重構病毒顆粒加入的所述組合物。本發明還提供了其中沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑的所述組合物。本發明還提供了其中向個體的單次鼻內或吸入給藥能誘導全身性免疫應答的所述組合物。本發明還提供了其中向個體的單次鼻內或吸入給藥還能誘導局部免疫應答的所述組合物。本發明還提供了向個體的單次鼻內或吸入給藥還能誘導細胞毒性淋巴細胞應答的所述組合物。本發明還提供了其中誘導全身性免疫應答和/或局部免疫應答和/或細胞毒性淋巴細胞應答的能力在人類中顯示的所述組合物。本發明還提供了其中免疫應答包含針對

流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物的免疫應答的所述組合物。在一種優選的實施方式中，本發明還提供了其中免疫應答達到用於流感疫苗的CHMP標準的所述組合物。本發明還提供了其中免疫應答提供下述中的一種或多種的所述組合物：對成年人而言>70%和/或對老年人而言>60%的血清保護率，針對成年人>40%和/或針對老年人>30%的血清轉化率，以及針對成年人>2.5和/或針對老年人>2.0的平均倍數增加值。在一種特別優選的實施方式中，本發明還提供了其中每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於30 μ g的所述組合物。最後，本發明還提供了其中組合物是包含用於鼻內或吸入給藥的藥物載體的疫苗配方製劑的所述組合物。

本發明還提供了包含病毒的重構外殼的流感病毒顆粒用於製造用於鼻內或吸入給藥的組合物的用途。本發明還提供了這樣的所述用途：其中，流感病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物。本發明還提供了這樣的所述用途：其中，病毒外殼完全從流感病毒粒子獲得。本發明還提供了這樣的所述用途：其中，沒有脂類從外界來源向重構病毒顆粒加入。本發明還提供了這樣的所述用途：其中，沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑。本發明還提供了這樣的所述用途：其中，向個體的單次鼻內或吸入給藥足以誘導全身性免疫應答。本發明還提供了這樣的所述用途：其中，向個體的單次鼻內或吸入給藥還誘導局部免疫應答。本發明還提供了這樣的

所述用途：其中，向個體的單次鼻內或吸入給藥還誘導細胞毒性淋巴細胞應答。本發明還提供了這樣的所述用途：其中，接受給藥的個體是人類。本發明還提供了這樣的所述用途：誘導的免疫應答包含針對流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物的免疫應答。在一種優選的實施方式中，本發明還提供了這樣的所述用途，其中，組合物誘導達到針對流感疫苗的CHMP標準的免疫應答。本發明還提供了這樣的所述用途，其中，免疫應答提供下述中的一種或多種的所述組合物：對成年人而言>70%和/或對老年人而言>60%的血清保護率，針對成年人>40%和/或針對老年人>30%的血清轉化率，以及針對成年人>2.5和/或針對老年人>2.0的平均倍數增加值。在一種特別優選的實施方式中，本發明還提供了這樣的所述用途，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素被施予劑量等於或低於30 μ g。最後，本發明還提供了其中製造的組合物是疫苗配方製劑的所述用途。

因此，在一種實施方式中，本發明提供了包含病毒的重構外殼的流感病毒顆粒的組合物，其中，所述病毒外殼完全從流感病毒粒子獲得，其中，沒有從外界來源向重構病毒顆粒加入脂類，其中，病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物，其中，沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑，以及其中，所述組合物作為鼻內或吸入給藥配方製劑來設計，所述組合物特徵在於，所述配方製劑向人類的單次鼻內或吸入給藥能誘導

抵抗所述流感抗原的全身性免疫應答和/或局部免疫應答，所述全身性應答能符合用於流感疫苗的CHMP標準，以及其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於 $30\mu\text{g}$ 。

- 5 根據另一種實施方式，本發明提供了包含病毒的重構外殼的流感病毒顆粒用於製造用於鼻內或吸入給藥的組合物的用途，其中，所述病毒外殼完全從流感病毒粒子獲得，其中，沒有從外界來源向重構病毒顆粒加入脂類，其中，病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物，其中，沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑，所述流感病毒顆粒用於製造用於鼻內或吸入給藥的組合物的用途的特徵在於，所述組合物向人類的單次鼻內或吸入給藥足以誘導抵抗所述流感抗原的全身性免疫應答和/或局部免疫應答，所述應答能達到針對流感疫苗的
- 10 CHMP標準，以及其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於 $30\mu\text{g}$ 。
- 15

- 根據另一種實施方式，本發明提供了一種包含流感病毒顆粒的組合物的疫苗配方製劑，所述病毒顆粒包含所述病毒的重構外殼，其中，所述病毒外殼完全從流感病毒粒子獲得，其中，沒有從外界來源向重構病毒顆粒加入脂類，其中，病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物，其中，沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑，其中，疫苗特徵在於，針對向人類的單次鼻內或吸入給藥來設計疫苗，並且，其中，每種病毒毒株
- 20

每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於 $30\ \mu\text{g}$ 。有利地，所述配方製劑的所述單次鼻內或吸入給藥能在所述人類中誘導全身性和/或局部免疫應答。根據本發明還提供了包含一定量的用於單次鼻內或吸入給藥的所述疫苗
5 配方製劑的設備。

每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的根據本發明的應用劑量還可以低於或等於 $25\ \mu\text{g}$ 、 $20\ \mu\text{g}$ 、 $15\ \mu\text{g}$ 、 $10\ \mu\text{g}$ 或 $5\ \mu\text{g}$ 。

引用的文獻

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

(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

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

20 (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

(5) Samdal HH, Bakke H, Oftung 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

5 (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

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

(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
15 months to 4 years. BJCP 1997 March, 51(2): 87-90

(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
20 1987, 6(9): 2651-2659

(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): 2 54-62

(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): 4 367-74

(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

(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

(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

(15) Glück R, Burri KG, Metcalfe I, Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes. *Curr. Drug Deliv.* 2005 2:395-400

20 **【實施方式】**

實施例1

在8周齡的BALB/C小鼠中的LPP病毒顆粒疫苗；次優HA劑量水平上，對多種HA/LPP比例的鼻內比較

流感血清陰性雌性Balb/c小鼠組成的組(每組10只)通

過鼻內施予獲得LPP(脂肽)-病毒顆粒疫苗，其HA/LPP比例為1:1.5、1:0.7、1:0.4、1:0(即沒有LPP)，並且每份劑量具有2 μ g的HA。此外，10只雌性小鼠的對照組獲得0 μ g HA/劑量(載體的鼻內施予)。

- 5 製備含有LPP的病毒顆粒的四種製備物。簡言之，通過離心對30-40%蔗糖溶液中的滅活流感病毒進行沈澱。重新懸浮病毒，溶解於含有去垢劑八聚乙二醇單十二烷基醚(OEG)的緩衝液中。隨後，通過超離心除去病毒核殼體。將含有OEG的上清液分為4等分體積，加入不同量的含OEG緩衝液中的脂肽P3CSK4(P3CSK4：N-棕櫚醯-S-[2,3-雙(棕櫚醯氧)-(2RS)-丙基]-[R]-半胱氨酸-[S]-絲氨酸-[S]-賴氨酸-[S]-賴氨酸-[S]-賴氨酸-[S]-賴氨酸)。用含OEG的緩衝液調節體積。通過吸附到疏水樹脂上除去OEG。這導致了含LPP的病毒顆粒的形成，在它們膜中含有HA和NA以及(可選地)重構的病毒泡囊在它們膜中含有LPP。OEG去除之後，將病毒顆粒濾經孔徑為0.22 μ m的PVDF膜。

- 20 起始原料為20 mg的HA，其來自甲型流感/Wyoming/3/2003 X-147(類A/Fujian/411/200(H3N2)毒株)，含有252 I.U.內毒素/100 μ g HA。溶解後，按照表1所概述的製備4批。

表1 病毒顆粒的製備

批次	作為起始原料的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

載體由5 mM Hepes、145 mM NaCl、1 mM EDTA(pH 7.4)構成。對組E(見表2)來說，將載體濾經孔徑為0.22 μ m的PVDF膜。按照表2所述，針對鼻內免疫，將製備的4批病毒顆粒稀釋至200 μ g/ml的濃度，針對肌內免疫，稀釋至67 μ g/ml的濃度，分裝進1 ml的小瓶(每組2瓶)。按照表4所概述的來使用這些疫苗組。

表2 疫苗的製備

組號	製備
A	VIR-2004-11
B	VIR-2004-12
C	VIR-2004-13
D	VIR-2004-14
E	載體*

*載體：濾經孔徑為0.22 μ m的PVDF膜的5 mM Hepes、145 mM NaCl、1 mM EDTA(pH 7.4)。

10

對配方製劑的分析

針對表3所示的若干種變數來分析用於本研究的配方製劑。

表3 對於用於製備疫苗的病毒顆粒的分析數據

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

15 ^aLowry試驗，原理：用堊式硫酸銅和Folin-ciocalteu酚試劑處理之後，蛋白質形成藍色。使用白蛋白BSA標準作為參考，從750 nm處的吸光度來測定蛋白質含量。

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

Oostr, GM, NS Mathewson, and GN Catrivas. Anal. Biochem. 89: 31. 1978.

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

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

^bPhEur：專題文章2053和2.7.1節

^c原理：每個磷脂含有單個磷原子，其可用於對磷脂進行定量。通過高氯酸來破壞磷脂，通過鉬酸鹽配合產生的磷酸鹽/酯，鉬酸鹽被抗壞血酸還原產生藍色的產物。用分光光度計在812 nm處測定顏色。通過包括磷酸校準物來對樣品中磷脂的量加以定量。

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

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

^dPh. Eur. 2.6.14

^e卵清蛋白ELISA是直接的三明治式酶免疫方法，其中使用用於捕捉的被固定的多克隆抗卵清蛋白抗體以及抗卵清蛋白-HRP結合物作為檢測系統。對結合物和樣品進行同時培養。通過洗滌步驟去除未結合的組分。將底物(TMB和H₂O₂)加入到孔中。通過藍色的顯色來指示孔中特異性結合的結合物的存在。向底物中加入硫酸來終止反應，其導致產物中顏色變化為黃色。在450 nm讀取吸光度(OD)。為獲得最優結果，使用620 nm處的參照濾光器。從試驗中包括的卵清蛋白標準(0.3-20.0 ng/ml)的應答來製造標準曲線。未知樣品的濃度從標準曲線內插來讀取。

^f根據專題文章0869和2053：通過聚丙烯醯胺凝膠電泳來檢查單價合併的(monovalent pooled)收集物的純度。電泳：按照Ph.Eur 2.2.31來進行。

測試系統

5 測試動物

使用七組動物，每組十隻雌性 Balb/c 小鼠 (BALB/cAnNCrl)。

在處理的一開始，小鼠為8-9周齡，重量為17-19 g。

10 在第0天和第14天用單價LPP病毒顆粒流感疫苗 (A/Wyoming)對動物進行鼻內接種，在第二次接種後21天進行屍體檢查。

鼻內：測試物質被鼻內接種(10 μ l，分成兩個鼻孔上進行)，這用在背部輕度異氟烷/O₂/N₂O麻醉的動物進行。

表4 處理安排

組號	施予途徑	疫苗配方製劑	雌性編號	動物編號
A	鼻內	2 μ g HA, HA、LPP比例為1:1.5	10	01-10
B	鼻內	2 μ g HA, HA、LPP比例為1:0.7	10	11-20
C	鼻內	2 μ g HA, HA、LPP比例為1:0.4	10	21-30
D	鼻內	2 μ g HA, HA、LPP比例為1:0	10	31-40
E	鼻內	2 μ g HA, HA、LPP比例為0:0	10	41-50

15

在第一次接種之前以及第一次接種14天之後，在異氟烷/O₂/N₂O麻醉下收集眼窩血樣。第35天，處死動物，收集血樣(在O₂/CO₂麻醉下通過腹部大動脈或心臟穿刺放血)。收集來自全部樣品的血清，深度冷凍，於低於-10°C貯存在聚
20 丙烯管中直到進行處理。

流感病毒使紅血球細胞(RBCs)凝集，在存在足夠的病

毒特異性抗體時這會被阻止。該現象提供了血細胞凝集抑制(HI)試驗的基礎，該試驗被用於探測和定量血清中的特異性抗病毒抗體。將血清加入到流感病毒和火雞RBCs中。對若干稀釋液加以測試(效價分析)。HI效價被定義為仍能抑制血細胞凝集的最高稀釋度的倒數。按下文所述來計算幾何平均值效價(GMT)：

1)對各個log(效價)進行計算，得到兩次重複的算術平均值：

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

2)計算各個log(效價)的算術平均值

$$3)\text{GMT}_{(\text{組})} = 10 \text{ EXP}(\text{組平均值} \log(\text{效價}))$$

統計學分析

通過接種組和天數，使用幾何平均值效價來概括HI效價。通過線性回歸來分析經log轉化的第35天組的HI效價，以研究疫苗中LPP的量與GMT之間的劑量應答關係。

結果

HI效價分析

GMT示於表5中。

表5 幾何平均值效價

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

第0天，在小鼠中不能探測到HA特異性抗體(即，所有

HI效價 <10)。

第14天，在通過鼻內途徑(i.n.)接種的小鼠中的大多數中不能探測到HA特異性抗體。所有效價 ≤ 10 ，除了組A中的一隻小鼠(HI效價：80)、組C中的一隻小鼠(HI效價：35)和組D中的一隻小鼠(HI效價：160)之外。

第35天，觀察到了HA特異性抗體產生中的劑量應答，即，向疫苗中加入更多的LPP導致更高的抗體效價。

通過線性回歸在組間比較(經log轉換的)第35天的HI效價。適合的回歸斜率高度顯著($P < 0.0001$)。因此，觀察到的疫苗中的LPP含量與GMT之間的劑量應答關係在統計上是顯著的。

結論：

用無佐劑的重構流感病毒顆粒對小鼠進行重複鼻內接種不誘導可被測量到的全身性免疫應答。以同樣HA劑量水平($2 \mu\text{g HA/劑量}$)，採用上升的LPP劑量，用佐以LPP的重構流感病毒顆粒進行的重複鼻內接種顯示出了LPP劑量依賴型免疫應答。與本發明完全相反(見下面的實施例2)，這些數據之前被認為支持本領域的公認結論，即，使用免疫刺激劑(在這種情況下LPP)對於用滅活流感疫苗進行鼻內接種是必要的，即使流感抗原(HA)存在於重構病毒顆粒中。

實施例2

雙盲、隨機、平行的組研究，以研究脂肽佐劑的安全性及其對於病毒顆粒亞基流感疫苗療效的效果(在年齡 ≥ 18 和 ≤ 40 的健康年輕成年人中鼻內運送之後)

用含有每毒株150 mcg HA/mL和315 mcg LPP/mL的、佐有LPP(脂肽)的重構流感病毒顆粒以0.2 ml的劑量體積(每個鼻孔0.1 ml)對健康人類志願者進行鼻內接種。用含有每毒株150 mcg HA/mL的、沒有LPP的重構流感病毒顆粒以

5 0.2 ml的劑量體積(每個鼻孔0.1 ml)對類似的組進行鼻內接種。研究目的是在男人中驗證小鼠中展示的觀點，即，為在用滅活流感疫苗進行鼻內接種後獲得滿意的全身性免疫應答，需要使用佐劑(例如LPP)。

研究設計：

10 這是在年齡 ≥ 18 和 ≤ 40 的健康年輕個體中進行的雙盲、隨機平行組研究。該研究在一個研究中心進行：Swiss Pharma Contract Ltd., 瑞士巴塞爾。原理的研究者是M. Seiberling博士。研究具有兩個部分。在部分I中，在12個個體中評定佐有LPP的病毒顆粒亞基流感疫苗的安全性。用

15 LPP-RVM(LPP重構的病毒膜；流感疫苗-表面抗原，滅活的，病毒顆粒-佐有LPP)接種九個個體，用RVM(流感疫苗-表面抗原，滅活的，病毒顆粒-)來接種三個個體。在研究的部分II中，在一百個個體中(每組50個)評定LPP-RVM的療效和安全性。

20 研究在健康個體中進行。此外，在研究開始前三年，參與研究的部分II的個體都沒有針對流感進行接種。這通過儘量減小具有預先存在的針對流感的抗體的個體的數目，增加了部分II中研究人群的同質性。

部分I：

在接種前14天(第1次訪問)，在個體已經給出贊成意見後，針對包括和排除標準對他或她加以篩選，並對他或她進行身體檢查。在該次訪問中，採集鼻上皮細胞的樣品用於細胞學分析，用糖精試驗來測量基線纖毛(cilia)活性。

- 5 在第2次訪問(第1天)，取4-6 mL血樣，用於標準血液學分析，取6-10 mL血樣用於標準生物化學分析，並評定生命體征。經過隨機化後，用兩種疫苗配方製劑之一來接種個體，在接種之後個體就地停留第一個24小時，以監測立即產生的局部和全身性反應以及不利的事件。在接種後第四
- 10 和二十四小時評定生命體征。此外，24小時後，取兩份血樣用於標準血液學(4-6 mL)和生物化學(6-10 mL)分析；接種後，採集鼻上皮細胞的樣品用於細胞學分析，用糖精試驗進行接種後纖毛活性分析。向個體發放調查問卷(調查問卷I)，讓他們帶回家，評定下一天(第3天)的局部和全身性
- 15 反應。

- 個體必須在他們被釋放回家後兩周回到研究點：第3次訪問(第4天)。在該次就診中，評定局部和全身性反應，記錄前次和本次就診之間發生的任何自發不利事件。此外取兩份血樣用於標準血液學(4-6 mL)和生物化學(6-10 mL)
- 20 分析，並評定生命體征。

在第一次接種後兩周，在第15天，個體回到研究點(第4次訪問)。在該次就診中，收集鼻上皮細胞的樣品用於細胞學分析，用糖精試驗測量纖毛活性，記錄第3次訪問和第4次訪問間發生的不利事件。

部分II：

在第一次採血和鼻洗出物(wash)採樣前14天(第1次訪問)，在個體已經給出贊成意見後，針對包括和排除標準對他或她加以篩選，通過身體檢查來檢測他或她的健康。

5 在第2次訪問(-1天；該就診可以與第1次就診合併進行)，取6-10 mL血樣用於基線血細胞凝集抑制(HI)效價測定，並且取血樣進行標準血液學(4-6 mL)和標準生物化學(6-10 mL)分析。收集鼻洗出物樣品用於測定基線鼻IgA抗體效價。

10 下一天，在第3次訪問(第1天)，在對生命體征的評定之後，對個體進行隨機化，用鼻流感疫苗的兩種配方製劑之一的單一劑量進行接種。在接種後的第一個小時中，就地監測任何立即的局部反應、全身性反應和不利事件。之後，重新評定生命體征，個體獲得調查問卷帶回家，在接種後
15 的第一個七天，記錄每天的局部和全身性反應。

兩周後(第4次訪問；第15天)，取6-10 mL血樣用於HI效價測定，取兩份額外血樣用於標準血液學(4-6 mL)和生物化學(6-10 mL)分析，取鼻洗出物樣品用於鼻IgA抗體效價分析。

20 效果評定

為評定效果，在第1天(基線)和第15天收集血樣和鼻洗出物樣品。

血樣

收集6-10 mL血，以測定血細胞凝集抑制(HI)抗體效

價。¹血液收集和凝固之後(室溫下至少30分鐘),分離血清,並保持冷凍(-20°C),直到進行效價分析。以雙份重複進行抗體效價分析。樣品的效價是兩次測定的幾何平均值。接種前和接種後的血清被同時進行效價分析。

5 鼻洗出物樣品

為收集鼻洗出物樣品,於一個鼻孔,在鼻鏡檢查控制下,應用6 mL預熱的鹽水(37°C)。個體被要求將頭傾60°角,使得洗液可以流動。收集的洗液應用於第二個鼻孔,其在相同的條件下被洗滌。向樣品中加入防腐溶液(樣品體積的1/100)。防腐溶液含有10 mg/ml溶解於100 mM Tris HCl緩衝液中的牛血清白蛋白, pH 8。通過低速離心(800 x g, 10分鐘)來直接澄清樣品,將其分為小份(以避免今後對樣品的重複解凍),將其放置在乾冰上,直到轉移進-80°C。

通過ELISA來測定鼻洗滌樣品中的IgA水平,用Wilcoxon試驗來進行統計分析。流感疫苗在96孔板中被用作塗敷抗原。通過與封閉緩衝液一起溫育來封閉非特異性結合位點。將鼻洗出物以封閉緩衝液兩倍稀釋(每份樣品12份稀釋液),用於將流感特異性抗體吸附到96孔板的抗原上。在與酶結合的抗人抗體(結合有馬辣根過氧化物酶或鹼性磷酸酶)一起溫育之前對96孔板加以洗滌。通過洗滌除去未結合的抗人抗體,通過在加入用於酶反應的底物之後測量光密度來測定流感毒株特異性抗體的量。

疫苗配方製劑

兩種不同的流感疫苗配方製劑用於本項研究。兩種配

方製劑都含有WHO為2005年南半球推薦的病毒抗原²，其劑量水平為每0.2 ml的劑量每毒株30 mcg。

- A/New Caledonia/20/99/(H1N1)樣毒株

- A/Wellington/1/2004(H3N2)樣毒株

5 - B/Shanghai/361/2002樣毒株

簡言之，通過離心對30-40%蔗糖溶液中的滅活流感病毒進行沈澱。重新懸浮病毒，溶解於含有去垢劑，八聚乙二醇單十二烷基醚(OEG)的緩衝液中。隨後，通過超離心除去病毒核殼體。用含OEG緩衝液中的脂肽P3CSK4來調節含
 10 OEG的上清液，或者在不含LPP的重構病毒膜的情況下，僅用含OEG的緩衝液來調節(P3CSK4：N-棕櫚醯-S-[2,3-雙(棕櫚醯氧)-(2RS)-丙基]-[R]-半胱氨酸-[S]-絲氨酸-[S]-賴氨酸-[S]-賴氨酸-[S]-賴氨酸-[S]-賴氨酸)。通過吸附到疏水樹脂上除去OEG。這導致了含LPP或不含LPP的病毒膜(在膜中含有
 15 有HA和NA以及可選地在膜中含有LPP的重構病毒泡囊)的形成。OEG去除之後，將病毒顆粒濾經孔徑為0.22 μ m的PVDF膜。

對於病毒的每種毒株而言，製備具有或不具有LPP的單獨的製備物(表6)。加入的LPP的量相應於1:0.7(w/w)的
 20 HA/LPP比例。

表6 病毒顆粒的製備

批次	LPP	病毒毒株
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 reassortant
VIR-2005-13	存在	甲型流感/Wellington/1/2004 IVR-139 reassortant
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/20/1999 IVR-116 reassortant
VIR-2005-14	不存在	甲型流感/Wellington/1/2004 IVR-139 reassortant

表7 對配方製劑的分析

待分析物	VIR-2005-09	VIR-2005-10	VIR-2005-11	VIR-2005-12	VIR-2005-13	VIR-2005-14
蛋白質 (mg/ml) ^a	1.51	1.54	1.86	1.83	1.37	1.18
HA (μ g/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
內毒素(每100 μ g HA 的I.U.) ^d	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.5
卵清蛋白(每100 μ g HA 的 μ g) ^e	0.068	0.088	0.037	0.036	0.132	0.126
純度 ^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

- 5 ^aLowry試驗，原理：用堊式硫酸銅和Folin-ciocalteu酚試劑處理之後，蛋白質形成藍色。使用白蛋白BSA標準作為參考，從750 nm處的吸光度來測定蛋白質含量。

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

- 10 Oostra, GM, NS Mathewson, and GN Catrivas. Anal. Biochem. 89: 31. 1978.

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

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

^bPhEur：專題文章2053和2.7.1節

^c原理：每個磷脂含有單個磷原子，其可用於對磷脂進行定量。通過高氯酸來破壞磷脂，通過鉬酸鹽配合產生的磷酸鹽/酯，鉬酸鹽被抗壞血酸還原產生藍色的產物。用分光光度計在812 nm處測定顏色。通過包括磷酸校準物來對樣品中磷脂的量加以定量。

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

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

^dPh. Eur. 2.6.14 ,

^e卵清蛋白ELISA是直接的三明治式酶免疫方法，其中使用用於捕捉的被固定的多克隆抗卵清蛋白抗體以及抗卵清蛋白-HRP結合物作為檢測系統。對結合物和樣品進行同時培養。通過洗滌步驟去除未結合的組分。將底物(TMB和H₂O₂)加入到孔中。通過藍色的顯色來指示孔中特異性結合的結合物的存在。向底物中加入硫酸來終止反應，其導致產物中顏色變化為黃色。在450 nm讀取吸光度(OD)。為獲得最優結果，使用620 nm處的參照濾光器。從試驗中包括的卵清蛋白標準(0.3-20.0 ng/ml)的應答來製造標準曲線。未知樣品的濃度從標準曲線內插來讀取。

^f根據專題文章0869和2053：通過聚丙烯醯胺凝膠電泳來檢查單價合併的收集物的純度。電泳：按照Ph.Eur 2.2.31

來進行。

效果

5 通過 Wilcoxon's 排名總和試驗以 0.05 的兩側顯著水平，在兩個接種組之間對第 15 天每種病毒毒株的經 log 轉化的 HI 抗體效價與第 15 天的鼻 IgA 抗體效價加以比較。

還通過對每種病毒毒株和每個接種組計算下述三個參數來分析第 15 天的 HI 抗體效價。

- 血清保護率，其中血清保護被定義為紅血球凝聚抑制 (HI) 效價 ≥ 40 ，

10 - 血清轉化率，其中血清轉化被定義為接種前 HI 效價 < 10 ，接種後 HI 效價 ≥ 40 ，或者，接種前 HI 效價 ≥ 10 以及 HI 效價至少 4 倍的增加，

- 平均倍數增加值，即，HI 效價倍數增加的幾何平均值。

15 根據預方案 (pre-protocol) 和治療意向 (intent-to-treat) 的原理對效果數據加以分析。但是，鑒於這是所謂的原理驗證型研究，預方案分析被認為是基本的一種。治療意向的樣品由被接種個體的一些接種後效果數據組成。預方案樣品由完成了方案並且沒有發生主要的方案偏差的被接種個體組成。主要的偏差包括 (不限於)：包含或排除標準的偏差，禁藥使用等。此外，實驗室驗證的並發流感感染的個體以及失去了基本效果數據的個體也被從預方案樣品中排除。無論從方案樣品中排除的個體是否是之前決定的，研究數據庫都不是盲的。

20

結果

表8用病毒顆粒流感疫苗(RVM)進行鼻內接種後對體
液免疫應答的CHMP評估

血清保護率							
統計學	A(H3N2)樣			A(H1N1)樣		B樣	
	LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)		LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)	LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)
接種後(第15天)							
血清保護							
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%)
總數	N	48	43	48	43	48	43

- 5 RVM：病毒顆粒流感疫苗
LPP-RVM：佐有脂肽的病毒顆粒流感疫苗

表8用病毒顆粒流感疫苗(RVM)進行鼻內接種後對體
液免疫應答的CHMP評估(續)

血清轉化率							
統計學	A(H3N2)樣			A(H1N1)樣		B樣	
	LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)		LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)	LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)
接種後(第15天)							
血清轉化							
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%)
總數	N	48	43	48	43	48	43

- 10 RVM：病毒顆粒流感疫苗
LPP-RVM：佐有脂肽的病毒顆粒流感疫苗

表8用病毒顆粒流感疫苗(RVM)進行鼻內接種後對體液免疫應答的CHMP評估(續)

HI抗體效價的平均倍數增加值						
統計學	A(H3N2)樣		A(H1N1)樣		B樣	
	LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)	LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)	LPP-RVM (N=48)	RVM (N=43)
接種後(第15天)						
平均值增加倍數						
N	48	43	48	43	48	43
平均值*	12.14	8.52	4.78	10.07	3.64	4.51
注：*幾何平均值						

RVM：病毒顆粒流感疫苗

LPP-RVM：佐有脂肽的病毒顆粒流感疫苗

5

表9 鼻洗出物IgA效價(GMT)

	H3N2		H1N1		B	
	LPP-RVM N=48	RVM N=43	LPP-RVM N=48	RVM N=43	LPP-RVM N=48	RVM 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

結論

出人意料地，以及與用同樣的疫苗批次獲得的臨床前數據(實施例1)和WO 04/110486以及臨床數據(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)相反地，在用無佐劑的重構病毒顆粒流感疫苗僅進行一次接種的人類群體中，觀察到了令人滿意的、達到針對流感疫苗的CHMP標準的全身性免疫應答。

【圖式簡單說明】

(無)

【主要元件符號說明】

(無)

十、申請專利範圍：

1. 一種包含流感病毒顆粒(influenza virosomes)的組合物，所述病毒顆粒包含所述病毒的重構外殼(envelopes)，其中，所述病毒外殼完全從流感病毒粒子獲得，其中，沒有從外界來源向所述重構病毒顆粒加入脂類，其中，所述病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶(neuraminidase)或其衍生物，其中，沒有向所述組合物加入單獨的(separate)佐劑和/或免疫刺激劑，以及其中，所述組合物作為鼻內或吸入給藥配方製劑來設計，所述組合物特徵在於，所述配方製劑向人類的單次鼻內或吸入給藥能誘導抵抗所述流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物的全身性免疫應答和/或局部免疫應答。
2. 如申請專利範圍第1項所述的組合物，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於 $30\mu\text{g}$ 。
3. 如申請專利範圍第1項所述的組合物，其中，所述配方製劑的單次鼻內或吸入給藥還誘導細胞毒性淋巴細胞應答。
4. 如申請專利範圍第2項所述的組合物，其中，所述配方製劑的單次鼻內或吸入給藥還誘導細胞毒性淋巴細胞應答。
5. 如申請專利範圍第1至4項中任意一項所述的組合物，其中，所述免疫應答符合針對流感疫苗的CHMP標準。

6. 如申請專利範圍第5項所述的組合物，其中，所述免疫應答提供下述中的一種或多種：對成年人而言 $>70\%$ 和/或對老年人而言 $>60\%$ 的血清保護率，針對成年人 $>40\%$ 和/或針對老年人 $>30\%$ 的血清轉化率，以及針對成年人 >2.5 和/或針對老年人 >2.0 的平均值增加倍數。
7. 如申請專利範圍第2項所述的組合物，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $25\mu\text{g}$ 。
8. 如申請專利範圍第2項所述的組合物，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $20\mu\text{g}$ 。
9. 如申請專利範圍第2項所述的組合物，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $15\mu\text{g}$ 。
10. 如申請專利範圍第2項所述的組合物，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $10\mu\text{g}$ 。
11. 如申請專利範圍第2項所述的組合物，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $5\mu\text{g}$ 。
12. 如申請專利範圍第1至4項中任意一項所述的組合物，其中，所述組合物是包含用於鼻內或吸入給藥的藥物載體的疫苗配方製劑。
13. 如申請專利範圍第5項所述的組合物，其中，所述組合

- 物是包含用於鼻內或吸入給藥的藥物載體的疫苗配方製劑。
14. 如申請專利範圍第6項所述的組合物，其中，所述組合物是包含用於鼻內或吸入給藥的藥物載體的疫苗配方製劑。
 15. 一種包含所述病毒的重構外殼的流感病毒顆粒用於製造用於鼻內或吸入給藥的組合物的用途，其中，所述病毒外殼完全從流感病毒粒子獲得，其中，沒有從外界來源向所述重構病毒顆粒加入脂類，其中，所述病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物，其中，沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑，所述組合物特徵在於，所述組合物向人類的單次鼻內或吸入給藥足以誘導抵抗所述流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物的全身性免疫應答和/或局部免疫應答。
 16. 如申請專利範圍第15項所述的用途，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於 30 μ g。
 17. 如申請專利範圍第15項所述的用途，其中，所述組合物的單次鼻內或吸入給藥還誘導細胞毒性淋巴細胞應答。
 18. 如申請專利範圍第16項所述的用途，其中，所述組合物的單次鼻內或吸入給藥還誘導細胞毒性淋巴細胞應答。
 19. 如申請專利範圍第15至18項中任意一項所述的用途，其中，所述免疫應答符合針對流感疫苗的CHMP標準。

20. 如申請專利範圍第19項所述的用途，其中，所述免疫應答提供下述中的一種或多種：對成年人而言>70%和/或對老年人而言>60%的血清保護率，針對成年人>40%和/或針對老年人>30%的血清轉化率，以及針對成年人>2.5和/或針對老年人>2.0的平均值增加倍數。
21. 如申請專利範圍第16項所述的用途，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於25 μg 。
22. 如申請專利範圍第16項所述的用途，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於20 μg 。
23. 如申請專利範圍第16項所述的用途，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於15 μg 。
24. 如申請專利範圍第16項所述的用途，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於10 μg 。
25. 如申請專利範圍第16項所述的用途，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於5 μg 。
26. 如申請專利範圍第15至18項中任意一項所述的用途，其中，製造的組合物是疫苗配方製劑。
27. 如申請專利範圍第19項所述的用途，其中，製造的組合物是疫苗配方製劑。

28. 如申請專利範圍第20項所述的用途，其中，製造的組合物是疫苗配方製劑。
29. 一種包含流感病毒顆粒的組合物的疫苗配方製劑，所述病毒顆粒包含所述病毒的重構外殼，其中，所述病毒外殼完全從流感病毒粒子獲得，其中，沒有從外界來源向重構病毒顆粒加入脂類，其中，病毒顆粒包含流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物，其中，沒有向所述組合物加入單獨的佐劑和/或免疫刺激劑，其中，疫苗特徵在於，針對向人類的單次鼻內或吸入給藥來設計所述疫苗，並且，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素劑量等於或低於 $30\ \mu\text{g}$ ，並且，其中，所述組合物向人類的單次鼻內或吸入給藥能誘導抵抗所述流感抗原血球凝集素和/或神經氨酸酶或其衍生物的全身性免疫應答和/或局部免疫應答。
30. 如申請專利範圍第29項所述的疫苗配方製劑，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $25\ \mu\text{g}$ 。
31. 如申請專利範圍第29項所述的疫苗配方製劑，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $20\ \mu\text{g}$ 。
32. 如申請專利範圍第29項所述的疫苗配方製劑，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $15\ \mu\text{g}$ 。
33. 如申請專利範圍第29項所述的疫苗配方製劑，其中，每

- 種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $10\mu\text{g}$ 。
34. 如申請專利範圍第29項所述的疫苗配方製劑，其中，每種病毒毒株每次鼻內或吸入給藥的血球凝集素的劑量低於或等於 $5\mu\text{g}$ 。
35. 如申請專利範圍第29至34項中任意一項所述的疫苗配方製劑，其中，所述組合物向人類的單次鼻內或吸入給藥還能誘導細胞毒性淋巴細胞介導的免疫應答。
36. 如申請專利範圍第35項所述的疫苗配方製劑，其中，所述免疫應答符合針對流感疫苗的CHMP標準。
37. 如申請專利範圍第36項所述的疫苗配方製劑，其中，所述免疫應答提供下述中的一種或多種：對成年人而言 $>70\%$ 和/或對老年人而言 $>60\%$ 的血清保護率，針對成年人 $>40\%$ 和/或針對老年人 $>30\%$ 的血清轉化率，以及針對成年人 >2.5 和/或針對老年人 >2.0 的平均值增加倍數。
38. 一種用於鼻內或吸入給藥的設備，所述設備包含如申請專利範圍第29至37項中任意一項所述的疫苗配方製劑以及用於將所述疫苗氣溶膠化的機構。
39. 如申請專利範圍第38項所述的設備，其中，所述設備包含一定量的用於單次鼻內或吸入給藥的疫苗配方製劑。
40. 如申請專利範圍第38或39項所述的設備，其中，所述設備是一次性的(disposable)。