



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201417820 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：102135548

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 10 月 01 日

(51)Int. Cl.：

A61K35/76 (2006.01)

A61K47/32 (2006.01)

A61K47/26 (2006.01)

A61K47/18 (2006.01)

(30)優先權：2012/10/02

歐洲專利局

12306198.8

(71)申請人：傳斯堅公司 (法國) TRANSGENE S.A. (FR)

法國

(72)發明人：西尼 克勞迪 SENE, CLAUDE (FR)；恰斯理 美琳娜 CHASLE, MELINA (FR)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：1 共 73 頁

(54)名稱

含病毒的調配物及其使用

VIRUS-CONTAINING FORMULATION AND USE THEREOF

(57)摘要

本發明有關於調配物，其包含(i)至少一種以病毒為基礎的材料，(ii)至少一種選自於聚乙基吡咯烷酮及其衍生物之群組中的聚合物，(iii)至少一種糖，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，且任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。此一調配物係特別適合於冷凍乾燥。本發明亦有關於對應的乾燥產物，以及其之製備製程。本發明亦有關於一包含該乾燥產物的復原材料，其可以投藥至需要它之患者。此種調配物及復原材料做為疫苗係有用的，較佳地用於治療及/或預防癌症、感染性疾病及/或自體免疫性病症。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201417820 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：102135548

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 10 月 01 日

(51)Int. Cl.：

A61K35/76 (2006.01)

A61K47/32 (2006.01)

A61K47/26 (2006.01)

A61K47/18 (2006.01)

(30)優先權：2012/10/02

歐洲專利局

12306198.8

(71)申請人：傳斯堅公司 (法國) TRANSGENE S.A. (FR)

法國

(72)發明人：西尼 克勞迪 SENE, CLAUDE (FR)；恰斯理 美琳娜 CHASLE, MELINA (FR)

(74)代理人：憚軼群；陳文郎

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：23 項 圖式數：1 共 73 頁

(54)名稱

含病毒的調配物及其使用

VIRUS-CONTAINING FORMULATION AND USE THEREOF

(57)摘要

本發明有關於調配物，其包含(i)至少一種以病毒為基礎的材料，(ii)至少一種選自於聚乙炔基吡咯烷酮及其衍生物之群組中的聚合物，(iii)至少一種糖，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，且任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。此一調配物係特別適合於冷凍乾燥。本發明亦有關於對應的乾燥產物，以及其之製備製程。本發明亦有關於一包含該乾燥產物的復原材料，其可以投藥至需要它之患者。此種調配物及復原材料做為疫苗係有用的，較佳地用於治療及/或預防癌症、感染性疾病及/或自體免疫性病症。

發明摘要

※ 申請案號：| 0 2 1 3 5 5 4 8

※ 申請日：102. 10. 01

※ I P^oC 分類：

A61K 35/56 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/56 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

含病毒的調配物及其使用

VIRUS-CONTAINING FORMULATION AND USE THEREOF

【中文】

本發明有關於調配物，其包含(i)至少一種以病毒為基礎的材料，(ii)至少一種選自於聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物之群組中的聚合物，(iii)至少一種糖，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，且任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。此一調配物係特別適合於冷凍乾燥。本發明亦有關於對應的乾燥產物，以及其之製備製程。本發明亦有關於一包含該乾燥產物的復原材料，其可以投藥至需要它之患者。此種調配物及復原材料做為疫苗係有用的，較佳地用於治療及/或預防癌症、感染性疾病及/或自體免疫性病。

【英文】

The present invention relates to formulation comprising (i) at least one virus-based material, (ii) at least one polymer selected in the group of polyvinylpyrrolidone and derivatives thereof, (iii) at least one sugar, (iv) at least two different amino acids, (v) at least two pharmaceutical acceptable salts, wherein at least one of said salts is a phosphate salt and, optionally (vi) a pharmaceutical acceptable buffer. Such a formulation is particularly suitable for freeze-drying. The present invention also relates to the corresponding dry product, as well as its preparation process. The present invention also relates to a reconstituted material comprising said dry product, which can be administered to a patient in need thereof. Such formulation and reconstituted material are useful as vaccines, preferably for the treatment and/or the prevention of cancers, infectious diseases and/or autoimmune disorders.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第()圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

含病毒的調配物及其使用

VIRUS-CONTAINING FORMULATION AND USE
THEREOF

【技術領域】

發明領域

[0001]本發明屬於生物活性物質調配物之領域，諸如病毒為基礎的材料(例如，病毒、病毒顆粒、病毒疫苗.....)，或更精確地屬於適合其等之儲存的調配物。其亦有關於此種調配物之製備。更精確地，本發明考量一種調配物，該者包含(i)一種以病毒為基礎的材料，(ii)在聚乙炔基吡咯烷酮及其衍生物之該群組中選擇的至少一種聚合物，(iii)至少一種糖，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，及，任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。更特別地，本發明之調配物係適合於乾燥製程，更特別地，冷凍乾燥製程。本發明進一步考量該所獲得的乾燥產物，且更特別地，該所獲得的冷凍乾燥產物。根據本發明之該等調配物與乾燥產物作為用於預防及/或治療病症的疫苗係為有用的，諸如癌症、自體免疫性病症及感染性疾病。

【先前技術】

發明背景

[0002]生物活性物質，舉例而言，在製藥工業中所使

用者，之儲存及運送係有問題的，因為這些物質係容易降解的，尤其是熱降解。這在諸如疫苗之生物活性物質事例中係特別真實的，該者可以分佈到世界各地，且因此可能取決於分佈的國家而遞交至不同的溫度，或在運輸期間中遞交至溫度變化。這樣進一步限制了生物材料至發展中國家的分佈，由於有限的基礎設施。

[0003]病毒為基礎之材料，包括病毒、病毒顆粒、病毒疫苗，的醫療活性要求在儲存及/或運送期間維持其結構的完整性，以為了為具感染及/或生物活性。

[0004]基於病毒之材料的這種結構完整性在該調配製程中經常會損害的，從而阻礙其醫療用途。該醫療活性進一步要求的是，該病毒效價損失，特別是感染性效價損失係為有限的。

[0005]開發新的方法或調配物，以為了安定化用於工業應用，諸如疫苗，的生物活性物質，以改善這些生物材料之儲存與運送能力因此係為製藥業的一持續目標。

[0006]該等建議溶液之一者係已於特定溫度範圍內維持該生物活性物質，更特別地於低溫下，意即低於 0°C 下，更特別地，直至 -30°C ，且還更佳地，直至 -80°C 。此種超低溫儲存不僅非常昂貴，還創造儲存、運輸及臨床使用的重大不便。因此，其係有必要開發可以儲存在冷藏條件下的調配物。

[0007]根據一替代方案，因此，已提出了伴隨動物或人類起源之添加劑，諸如白蛋白、蛋白腴、明膠或血液代

用劑(haemaccel)，調配該生物活性物質。然而，使用此種組份係受限的，由於安全議題，諸如過敏反應的風險或感染原(例如，BSE(牛隻海綿樣腦病變))污染或傳染的風險。此外，此溶液一般係昂貴的，且因此不相容於工業發展。

[0008]再者，其係假設的是當儲存在冷藏條件下，在一液體形式中達一延長時間段時，以病毒為基礎之材料將無法維持其感染性。所以，其係沒有記載的研究於冷藏條件下在一液體形式中調配及儲存病毒。因此，對於病毒製備品的長期儲存安定調配物仍然有一需求。

[0009]另一種替代方法係為在乾燥形式中保存該生物活性物質，尤其是病毒為基礎之材料。在乾燥生物材料現有的技術之中，冷凍乾燥(亦稱為凍乾)象徵用於製造諸如疫苗之生物藥學的一關鍵步驟。冷凍乾燥導致於約4°C至8°C下安定的乾燥生物產物，且在某些事例中，直至約25°C。凍乾作用已經廣泛地使用以改善各種病毒疫苗與重組蛋白產物的安定性。

[0010]冷凍乾燥製程涉及生物材料之冷凍溶液或懸浮液的連續步驟，繼之初級及次級乾燥步驟(為了回顧，參閱Adams於"2007, Methods Mol. Biol. 368, 15-38")。基本上，此技術係基於在真空下於零度以下的溫度昇華水，而沒有溶液熔融。然而，從冰凍生物材料的水蒸汽擴散速率係非常低的，且因此該過程為耗時的。此外，冷凍與乾燥階段兩者皆引入應力(例如，鹽濃度、沈澱/結晶、剪切應力、極端 pH、經過冷凍乾燥製程剩餘的殘留水

分、.....)，該等應力可以強迫該生物材料進行顯著的化學及物理變化，且對諸如以病毒為基礎之材料的一些生物材料為非常損傷的。因此，其係有必要具有適當的調配物以允許在乾燥製程期間，且有利地進一步在儲存/運送步驟期間保存該生物活性物質。

[0011] 先前技藝提供使用於冷凍乾燥生物材料之調配物的例子，更精確地基於病毒之材料。

[0012] 為了限制小兒麻痺病毒製備品之感染效價損失，WO89/06542已提出在由10%海藻糖作為僅有保護劑所構成之一安定溶液存在下於37°C乾燥病毒原種溶液。然而，在感染效價中之下降依舊為大的，而且大於對非乾燥疫苗所觀察到的。

[0013] EP 0 872 249描述重組病毒載體製備品，該者包含麩胺酸或其鈉鹽與葡萄糖之一組合。

[0014] WO 95/10601揭露一種水性重組病毒溶液，該者包含醣類、高分子量結構添加劑、胺基酸、緩衝液及水。

[0015] WO 03/053463揭露牛痘病毒調配物，該者包含蔗糖、葡聚醣、麩胺酸及一無磷酸鹽的緩衝液。

[0016] WO 2005/066333描述一病毒組成物，該者包含尿素、糖、鹽、緩衝液、分散劑、及必需與非必需胺基酸之一混合物。

[0017] WO 2007/056847揭露一含病毒調配物，該者包含蔗糖、山梨糖醇、聚乙基吡咯烷酮、尿素、TRIS緩衝

液、麩胺酸鈉及其它胺基酸，諸如精胺酸、丙胺酸、絲胺酸或甘胺酸。

[0018] WO2008/114021 及 WO2011/121306 描述病毒組成物其包含聚乙烯亞胺化合物，任選地與一種或多種糖(等)組合。

[0019] 不過，對於新調配物其允許生物材料之安定化作用，特別是病毒為基礎的材料，允許工業應用、儲存而不影響該產物之生物活性，且更特別地避免病毒效價損失，依舊有一需求。

[0020] 本發明提供含有病毒為基礎之材料的調配物，更特別地水性調配物，適合用於冷凍乾燥。根據較佳實施例，本發明之該調配物在下文界定之長期安定性試驗期間為安定的，且更具體地，在儲存於溫度 0°C 以上之期間，特別是約 4°C 及約 30°C 之間，較佳地約 4°C 及約 25°C 之間，更佳地約 2°C 及約 8°C 之間，且還更佳地約 4°C 及約 5°C 之間(例如冷藏溫度)。

【發明內容】

[0021] 依據本發明之一實施例，係特地提出一種調配物，其包含(i)至少一種以病毒為基礎的材料、(ii)至少一種選自於聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物之群組中的聚合物、(iii)至少一種糖、(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，以及任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

【圖式簡單說明】

[0022] 圖1例示一MVA載體(TG4001)之感染性效價的累計損失，該等係於磷酸鹽缺席下(黑色長條)或在提高濃度磷酸鹽存在下(淡灰至深灰)配製，並儲存於5°C(圖1A)或45°C(圖1B)達該所表示的一段時間。淺灰色長條代表組成物I，中灰色長條代表組成物II，深灰色長條代表組成物III，而黑色長條代表下文描述的對照樣品RS1。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

調配物

[0023] 根據一第一實施例，本發明考量一種調配物，該者包含(i)至少一種以病毒為基礎的材料，(ii)在聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物之該群組中選擇的至少一種聚合物，(iii)至少一種糖，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，及，任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0024] 除非另有明確陳述者，下列術語貫穿整個申請案使用時具有以下涵義。

[0025] 於此，「及/或」包括「及」、「或」與「由該術語所連接之元素的所有或任何其它組合」。

[0026] 「包含」及「包含有」係意欲意謂該等材料、產物、調配物、組成物及方法包括所述之組份或步驟，但不排除它者。「實質上由...所組成」或「組成實質上為...」，當使用於界定產物、組成物及方法時，應意謂排除其它任何實質顯著的組份或步驟。因此，舉例而言，實質上由所

列舉的組份所組成之一組成物將不排除微量污染物與藥學上可接受的載劑。「由...組成」或「由...所組成」應意謂排除大於微量元素之其它組份或步驟者。

[0027]如於此所使用，「約」或「約略」意謂一給定數值或範圍之10%內，且更佳地5%內。根據此定義之一特別實施例，「約為x」亦包括x。

[0028]根據較佳實施例，本發明之調配物係為一種水性調配物。此一調配物係適合儲存於冷藏溫度下，或儲存在非冷藏的溫度(例如環境溫度)，尤其是依靠冷凍乾燥。

[0029]根據本發明，「以病毒為基礎的材料或產物」意謂病毒、病毒顆粒、病毒載體及病毒疫苗。這些術語係為同義且可以互換的。這一術語包括野生型病毒、殺死、滅毒活、去活化及重組病毒。該者進一步包括以病毒為基礎的產物，諸如病毒載體、病毒顆粒，諸如似病毒顆粒(VLPs)或核殼體。

[0030]根據本發明，「病毒」較佳地有關於在疫苗中使用的那些者，且更佳地DNA病毒，諸如腺病毒、疱疹病毒及痘病毒。

[0031]根據更佳實施例，「病毒」意欲指定一痘病毒載體。根據本發明，痘病毒更佳地意指脊索痘病毒(Chordopoxviruses)(脊椎動物痘病毒)。脊索痘病毒包括但不限於：正痘病毒(Orthopoxviruses)、副痘病毒(Parapoxviruses)、禽痘病毒(Avipoxviruses)、羊痘病毒(Capripoxviruses)、野兔痘病毒(Leporipoxviruses)、豬痘病

毒(Suipoxviruses)、軟體動物痘病毒(Molluscipoxviruses)或亞塔痘病毒(Yatapoxviruses)。根據本發明，較佳之脊索痘病毒為正痘病毒。根據另一較佳實施例，該者係選自由牛痘病毒所組成之該群組中，適合的牛痘病毒包括但不限於哥本哈根(Copenhagen)株(Goebel等人於”1990, Virol. 179, 247-266 and 517-563”；Johnson等人於”1993, Virol. 196, 381-401”)、惠氏(Wyeth)株、Elstree、Western Reserve(WR)、IHDJ、及衍自於其等之高度減毒病毒，包括MVA、NYVAC(參閱WO 92/15672 – Tartaglia等人於”1992, Virology, 188, 217-232”)。載體亦可能從痘病毒科的任何其它成員獲得，特別是禽痘(例如TROVAC，參閱Paoletti等人於”1995, Dev Biol Stand., 84, 159-163”)；金絲雀痘(例如ALVAC，WO 95/27780，Paoletti等人於”1995, Dev Biol Stand., 84, 159- 163”)；鴿痘；豬痘及之類。

[0032]根據一實施例，該病毒載體係為一種能夠感染哺乳動物細胞之複製勝任的載體，特別是分裂的細胞(意即溶瘤載體)，且更具體的為選自由牛痘病毒株哥本哈根或WR所組成之該群組的複製勝任痘病毒載體(參閱舉例而言，WO2009/065547、WO2009/065546或WO9531105)。

[0033]根據另一實施例，該病毒載體係為一種減毒的痘病毒，其特徵為在人類細胞品系中喪失繁殖複製的能力。

[0034]根據一較佳實施例，本發明以病毒為基礎的材料係為病毒或病毒顆粒其選自由牛痘病毒(VV)及經修飾安

卡拉牛痘病毒(MVA)所組成之該群組。

[0035]較佳的VV可能為如專利申請案WO2009/065546、WO2009/065547或WO95/31105中所描述的VV，該等描述即為VV其武裝以一免疫刺激細胞激素者，該者係為GM-CSF或具一自殺基因。

[0036]本發明較佳地係以經修飾的安卡拉牛痘病毒(MVA)(Sutter等人於”1994, Vaccine, 12, 1032-40”)實行。一典型的MVA株係為MVA 575，該者已以存托號ECACC V00120707存托於European Collection of Animal Cell Cultures。根據本發明可以使用的MVA株之其它例子係為在N° I-721號碼下存託於CNCM的MVA株，在V00083008號碼下存託於ECACC的MVA-BN。在存託號V94012707下存託於ECACC的MVA II/85、MVA-572，或任何此種病毒的衍生物。

[0037]如先前所界定，根據本發明之一病毒可能為野生型、經減毒或重組病毒，更佳地一重組痘病毒。

[0038]該術語「重組」病毒意指一病毒，更特別地一痘病毒，該者包含插入其基因組中之一外源性序列。如於此所使用，一外源性序列意指在該親代病毒中非天然存在的核酸。

[0039]此種重組體病毒之一例子為JX-594/TG6006，該者係為胸苷激酶去活化牛痘病毒(惠氏株)，其表現一種顆粒球巨噬細胞群落刺激因子，意即GM-CSF之免疫刺激細胞激素(參閱WO95/31105、WO2007/030668及

WO2008/113078)。另一例子係為胸苷激酶(TK-)與核苷酸還原酶(I4L-)雙重去活化牛痘病毒TG6002(哥本哈根株)，該者表現自殺基因諸如FCU1自殺基因(參閱WO2009/065546)。

[0040]該外源性序列可能在一標靶細胞中代替一缺陷基因的功能。包含人類在內的哺乳類動物有數千種遺傳性基因疾病，該等係由缺陷基因造成，諸如舉例而言，包括囊狀纖維化症、裘馨氏肌肉萎縮症、鐮刀狀細胞症等疾病。許多類型之癌症亦由缺陷基因造成，尤其是原癌基因及已進行突變的腫瘤抑制基因，諸如舉例而言，原癌基因ras、src、bcl等等。腫瘤抑制基因之例子為p53與Rb。

[0041]根據另一可能性，該外源性序列可以編碼一腫瘤相關抗原(Tumor Associated Antigen, TAA)。TAA意指一分子，較諸於在相同組織類型的非腫瘤細胞中，該分子於腫瘤細胞中係於一更高頻率或密度偵測到。TAA之例子包括但不限於CEA、MART1、MAGE1、MAGE3、GP-100、MUC1、MUC-2，諸如於此併入以做為參考的WO 92/07000、WO 95/09241中所描述者，更佳地MUC1。

[0042]該外源性基因可能進一步編碼一抗原。較佳地該抗原係衍自諸如下列之一病毒：舉例而言，HIV-1(諸如gp 120或gp 160)、任一種貓免疫缺陷病毒、人類或動物疱疹病毒，諸如gD或其衍生物或立即早期蛋白，諸如源自HSV1或HSV2的ICP27、細胞巨大型病毒(諸如gB或其衍生物)、水痘帶狀疱疹病毒(諸如gpI、II或III)，或源自一肝炎

病毒，諸如B型肝炎病毒(HBV)，舉例而言，B型肝炎表面抗原或其衍生物(參閱WO2011/015656及WO2013/007772)、A型肝炎病毒(HAV)、C型肝炎病毒(HCV；參閱WO 04/111082；較佳地為源自基因型1b株的非結構HCV蛋白質)及E型肝炎病毒，或源自其它病毒病原體者，諸如呼吸融合病毒、人類乳突瘤病毒(HPV；參閱WO 90/10459、WO 95/09241、WO 98/04705、WO 99/03885及WO 07/121894；較佳地為源自HPV16株的E6與E7蛋白質；亦參閱Liu等人於"Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5；101 Suppl 2:14567-71")，或流感病毒，或衍自細菌病原體，諸如沙門氏菌、奈瑟氏菌、疏螺旋體(舉例而言，OspA或OspB或其衍生物)、或衣原體或博德氏菌，舉例而言，P. 69、PT與FHA、或衍自寄生蟲，諸如瘧原蟲或弓形蟲。根據本發明，該抗原更佳地係選自HCV或HPV。就此觀點，根據本發明在一調配物中使用的此種較佳重組病毒係為MVA-HCV(參閱WO 04/111082)，亦稱為TG4040，該者係為表現HCV NS3、NS4及NS5B抗原之一MVA(NS3與NS4係以一融合蛋白表現而NS5B獨立表現地)。

[0043]該重組病毒可以包含一種以上之外源性序列，且每一外源性序列可以編碼一種以上的分子。舉例而言，其可能為有用的是在同一重組病毒中關聯編碼例如一TAA(如先前所描述)或一抗原(如先前所述)之一外源性序列與一外源性序列其編碼一細胞激素(例如白細胞介素(IL

譬如IL2)；腫瘤壞死因子(TNF)；干擾素-(IFN)；群落刺激因子(CSF))。

[0044]就此觀點，根據本發明所使用的較佳重組病毒為：

- MVA-[MUC1-IL2]該者係為表現MUC-1抗原與IL-2之一MVA(參閱WO 92/07000與WO 95/09241)，亦稱為TG4010；及

- MVA-[HPV-IL2]，該者係為表現HPV-16非致癌基因E6與E7抗原及IL-2之一MVA(參閱WO 90/10459、WO 95/09241、WO 98/04705、WO 99/03885及WO 07/121894)，亦稱為TG4001。

[0045]根據一較佳實施例，本發明以病毒為基礎之材料係為一種痘病毒為基礎的產物，更特別地，一種以VV為基礎的產物，諸如所謂的JX-594/TG6006及TG6002，或以MVA為基礎的產物，諸如所謂的TG4040、TG4010及TG4001。

[0046]根據本發明在該調配物中含有的痘病毒可以為一天然發生的痘病毒、一減毒痘病毒或一重組痘病毒。

[0047]用於製造及純化病毒為基礎之材料的方法，特別是根據本發明所使用之病毒載體及/或病毒，係為熟習該項技藝者所知悉的。更具體地，考量痘病毒，可用的生產方法包含在一細胞品系(例如HelaS3或鴨細胞品系)中、含胚卵(embryonated eggs)中或雞胚胎成纖維細胞(CEF)中複製病毒。CEF細胞更特別地係專用於生產基於MVA的產

物。它們可以在熟習該項技藝者所知悉之條件下培育。根據WO 07/147528，自CEF或細胞品系上清液產生之病毒可以藉由深度過濾、微過濾及濾洗法而純化。

[0048] WO 2010/130753描述一種方法，該者使用核酸酶生產痘病毒，且進一步使用陰離子交換吸附劑純化該病毒。

[0049] 不過，以本發明該調配物所觀察到的結果係無關於在該調配物中的病毒是一未純化、純化或部分純化的病毒而獲得的。純化或部分純化的病毒為較佳的。如於此所使用的，「純化」意指相較於該粗病毒製備品之蛋白質含量至少90%的蛋白質含量降低，而「部分純化」意謂相對於該粗病毒製備品之蛋白質含量一顯著的降低(例如，至少20%)。

[0050] 根據本發明之一實施例，該調配物包含至少一種以病毒為基礎的材料，該材料係為一病毒且該調配物中之病毒效價係含括在 1.10^6 Pfu/mL及 1.10^{10} Pfu/mL之間，更佳地在 1.10^7 Pfu/mL及 1.10^9 Pfu/mL之間，更佳地 1.10^7 Pfu/mL及 5.10^8 Pfu/mL之間，且更佳地 1.10^8 Pfu/mL及 5.10^8 Pfu/mL之間。

[0051] 本發明之該調配物進一步包含(ii)至少一種聚合物，該聚合物係選自於由聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物所組成之該群組，以及其等之混合物。

[0052] 如於此所使用，該術語「聚乙烯基吡咯烷酮」意指從單體N-乙基吡咯烷酮製成的一水溶性聚合物。

PVP、普維酮(povidone)、plasdone、聚維酮(polyvidone)、交聯普維酮、kollidon該等術語及縮寫係同義使用。

[0053]如於此所使用，該術語「PVP衍生物」及其變型，係意欲意謂包含聚乙烷基吡咯烷酮(PVP)及其取代款式的物質，包括但不限於：共聚維酮(舉例而言，plasdone S-630及kollidon VA-64；及交聯PVP(舉例而言，交聯普維酮亦稱為聚乙基聚吡咯烷酮或PVPP)。

[0054]根據本發明，PVP及其衍生物具有一分子量，在5 kDa至400 kDa該範圍中，更佳地在5 kDa至70 kDa之一範圍中。根據有利實施例，PVP及其衍生物具有一低分子量，意即不超過55 kDa之一分子量，較佳地含括在10 kDa及40 kDa之間，較佳地15 kDa及30 kDa之間，且更佳地25 kDa。在注射期間，低分子量PVP聚合物較諸高MW將較不產生免疫且更好耐受地。

[0055]根據較佳實施例，本發明之調配物包含5 g/L及80 g/L之間的PVP或衍生物或其混合物，較佳地在10 g/L及50 g/L之間，更佳地在15 g/L及40 g/L之間，且更佳地20 g/L及35 g/L之間的PVP或如上文界定之衍生物。根據一具體實施例，本發明之調配物包含33.25 g/L的PVP，且更具體地，具有25 kDa分子量的PVP。

[0056]本發明之調配物進一步包含(iii)至少一種糖。

[0057]該糖更佳地係擇自單醣、雙醣、三醣、四醣及其衍生物之間。

[0058]根據本發明，諸如葡萄糖、半乳糖及甘露糖之

單糖係較佳擇取地。

[0059]根據本發明之雙醣較佳地係擇自蔗糖(亦稱為蔗糖)、乳酮糖、乳糖、麥芽糖、海藻糖、纖維雙糖、異麥芽糖及麥芽酮糖之間。

[0060]根據本發明，諸如棉籽糖之三醣係較佳擇取地。

[0061]根據本發明，諸如水蘇糖之四醣亦為設想的。

[0062]根據一較佳實施例，本發明之一調配物包含至少一種雙醣。根據還更佳實施例，該雙醣係選自由蔗糖、乳酮糖、乳糖、麥芽糖、海藻糖、纖維雙糖、異麥芽糖及麥芽酮糖所組成之該群組中，且有利地係為蔗糖。

[0063]根據較佳實施例，本發明之調配物包含10 g/L及100 g/L之間的糖，較佳地20 g/L及80 g/L之間，更佳地在30 g/L及70 g/L之間，且還更佳地40 g/L及60 g/L。根據本發明之一更佳實施例，該調配物包含50 g/L的糖，有利地50 g/L的蔗糖。

[0064]根據一較佳實施例，本發明之一調配物之糖相對於PVP的重量比(糖/PVP(w/w))至少為1，更佳地在1及5之間，更佳地在1及2之間，且較佳地為1.5。

[0065]本發明之調配物進一步包含(iv)至少兩種不同的胺基酸。

[0066]更佳地，該胺基酸係擇自丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺酸、天冬胺酸鹽、半胱胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸鹽、甘胺酸、組胺酸、異亮胺酸、亮胺酸、離胺酸、甲硫

胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、吡咯離胺酸、硒半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸與纈胺酸及其衍生物，包括兩種立體異構物。

[0067] 麩胺酸鹽意指該麩胺酸藥學上可接受的鹽類形式，較佳地其係為一單價鹽，更佳地麩胺酸之一單鈉鹽，意即麩胺酸鈉(MSG)。

[0068] 根據一較佳實施例，本發明之一調配物包含至少一胺基酸其選自於L-立體異構物所組成之該群組中者，例如L-精胺酸。

[0069] 根據一較佳實施例，本發明之一調配物包含至少一胺基酸其選自於由精胺酸、組胺酸及離胺酸所組成之該群組中者。

[0070] 根據另一較佳實施例，本發明之一調配物包含至少一胺基酸其選自於由天冬胺酸鹽及麩胺酸鹽所組成之該群組中者。

[0071] 根據一較佳實施例，本發明之一調配物包含精胺酸及麩胺酸鹽。

[0072] 根據一較佳實施例，本發明之一調配物包含胺基酸總數量其含括在10 g/L及200 g/L之間，更佳地在10 g/L及 150 g/L之間，且更佳地10 g/L及100 g/L之間。

[0073] 根據另一較佳實施例，本發明之調配物包含5 g/L及100 g/L之間的精胺酸，且更佳地5 g/L及80 g/L之間。對具高病毒效價(例如約 1.10^8 PFU/mL或更大)的病毒調配物，5 g/L 至20 g/L的精胺酸濃度係更適合的，而對

具有較低病毒效價(例如小於 1.10^8 PFU/mL)之病毒調配物一較高濃度的精胺酸。

[0074]根據一較佳實施例，本發明之一調配物包含1 g/L及50 g/L之間的麩胺酸鹽，更佳地1 g/L及20 g/L之間，更佳地1 g/L及10 g/L之間，且更佳地1 g/L及5 g/L之間。根據本發明之一更佳實施例，該調配物包含2.49 g/L的麩胺酸鹽。

[0075]根據本發明之一具體實施例，該調配物包含2.49 g/L的麩胺酸鹽及8.43 g/L的精胺酸。

[0076]根據本發明之一更佳實施例，該調配物包含2.49 g/L的麩胺酸鹽及42.13 g/L的精胺酸。

[0077]根據本發明之一更佳實施例，該調配物包含2.49 g/L的麩胺酸鹽及56.04 g/L的精胺酸。

[0078]本發明之該調配物進一步包含(v)至少兩種藥學上可接受鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽。

[0079]磷酸鹽已知會造成pH的漂移，且它們在調配物中之使用已視為有問題的(參閱舉例而言:” Freeze Drying of Pharmaceuticals & Biologicals Conference, August 6 – 9, 2008, Great Divide Lodge Breckenridge, Colorado”)。類似地，EP1418942指出在含有基於病毒，尤其是痘病毒，之材料的調配物中，磷酸鹽的存在誘發病毒聚集及沈澱，尤其是在乾燥加工期間。令人驚訝地，本發明之發明人已經在本發明之上下文中顯示的是，該磷酸鹽緩衝液參與該主張調配物的安定性質。

[0080]根據一實施例，本發明該藥學上可接受鹽類中至少一者係選自由鈉與鉀鹽所組成之該群組中，以及其等之組合。

[0081]根據較佳實施例，該調配物之藥學上可接受鹽類中至少一者為一磷酸鹽，且係選自由單鹼磷酸鹽、二鹼磷酸鹽及三鹼磷酸鹽所組成之該群組中。

[0082]根據一實施例，該調配物之藥學上可接受鹽類中至少一者為一磷酸鹽，且係選自由磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)及磷酸二氫鉀(KH_2PO_4)所組成之該群組中。

[0083]根據另一實施例，該調配物之藥學上可接受鹽類中至少一者為一磷酸鹽，且係選自由磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)及磷酸氫二鉀(K_2HPO_4)所組成之該群組中。

[0084]根據另一實施例，該調配物之藥學上可接受鹽類中至少一者為一磷酸鹽，且係選自由磷酸三鉀(K_3PO_4)及磷酸三鈉(Na_3PO_4)所組成之該群組中。

[0085]根據本發明之一較佳實施例，該調配物之藥學上可接受鹽類中至少一者為一磷酸氫二鈉 Na_2HPO_4 。

[0086]根據另一實施例，根據本發明之一調配物包含(v)形成一磷酸鹽緩衝液之至少兩種磷酸鹽。該磷酸鹽緩衝液更佳地為包含至少一種單鹼磷酸鹽與至少一種二鹼磷酸鹽之一混合物。該磷酸鹽緩衝液更佳地為包含磷酸氫二鉀(KH_2PO_4)與磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)之一混合物。因此，根據一較佳實施例，本發明之該調配物包含(v)磷酸氫二鉀(KH_2PO_4)與磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)。

[0087]根據一具體實施例，本發明之調配物分別包含(v)在約1:5比率中的磷酸氫二鉀(KH_2PO_4)與磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)

[0088]根據另一較佳實施例，本發明之調配物包含至少0.1 g/L的磷酸鹽，更佳地0.1 g/L及10 g/L之間，且還更佳地0.1 g/L及5 g/L之間。

[0089]根據本發明之一具體實施例，該調配物包含至少0.1 g/L的磷酸鹽，較佳地0.19 g/L。

[0090]根據另一較佳實施例，本發明之調配物包含至少0.1 g/L的 Na_2HPO_4 ，且較佳地0.1 g/L及5 g/L之間的 Na_2HPO_4 。

[0091]根據本發明之一具體實施例，該調配物包含包含0.19 g/L的磷酸鹽，且還更具體地0.19 g/L的 Na_2HPO_4 。

[0092]根據另一較佳實施例，本發明之調配物包含至少0.1 g/L的 KH_2PO_4 ，較佳地0.1 g/L及5 g/L之間的 KH_2PO_4 ，還較佳地0.1 g/L及1 g/L之間的 KH_2PO_4 ，且更佳地0.1 g/L及0.6 g/L之間的 KH_2PO_4 。

[0093]根據本發明之另一具體實施例，該調配物包含0.94 g/L的磷酸鹽，且還更具體地0.79 g/L的 Na_2HPO_4 及0.15 g/L的 KH_2PO_4 。

[0094]根據本發明之另一具體實施例，該調配物包含1.88 g/L的磷酸鹽，且還更具體地1.59 g/L的 Na_2HPO_4 及0.29 g/L的 KH_2PO_4 。

[0095]根據本發明之另一具體實施例，該調配物包含

3.75 g/L的磷酸鹽，且還更具體地3.17 g/L的 Na_2HPO_4 及0.58 g/L的 KH_2PO_4 。

[0096]在本發明之上下文中，其係較佳的是，該調配物包含至少1 g/L的磷酸鹽緩衝液(例如，至少1.2、1.5、1.6、1.7或1.8 g/L)。一較佳調配物包含如上文界定之磷酸鹽緩衝液(例如，1.59 g/L的 Na_2HPO_4 及0.29 g/L的 KH_2PO_4 或3.17 g/L的 Na_2HPO_4 及0.58 g/L的 KH_2PO_4)及上文界定的精胺酸(例如，約8.43 g/L或更多)兩者。

[0097]根據另一具體實施例，本發明之調配物包含(v)至少一種額外的藥學上可接受鹽類，該者不是磷酸鹽。

[0098]根據一實施例，該額外的藥學上可接受鹽類為一單價鹽。根據一較佳實施例該額外的藥學上可接受鹽類係選自由NaCl與KCl所組成之該群組中，且較佳地為NaCl。

[0099]根據一實施例，本發明之該調配物包含1 g/L及10 g/L之間的該額外的藥學上可接受鹽類，較佳地不多於5 g/L，且更佳地在1 g/L及5 g/L之間。

[0100]根據本發明之一具體實施例，該調配物包含3.89 g/L的NaCl。

[0101]根據本發明之一具體實施例，該調配物包含1.94 g/L的NaCl。

[0102]本發明之調配物可能進一步包含(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0103]根據一實施例，本發明之調配物進一步包含一

藥學上可接受的緩衝液。

[0104]根據一實施例，根據本發明之一調配物的pH係含括在約7及約8.5之間，較佳地為 7.5 ± 0.5 ，且更佳地為7.5。該pH可以以各自數量的磷酸鹽類校準的，更佳地 KH_2PO_4 與 Na_2HPO_4 ，根據熟習該項技藝者所廣為知悉的方法，諸如於“Sörensen in Hayat, 1986”。

[0105]該藥學上可接受之緩衝液可以在由下列所組成之該群組中選擇：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽。根據一較佳實施例，該緩衝液為TRIS或HEPES，且還更佳地為TRIS。

[0106]根據一較佳實施例，本發明之調配物包含約1 mM及約100 mM之間的該藥學上可接受緩衝液，且更佳地約1 mM及約50 mM之間。

[0107]根據本發明之一具體實施例，該調配物包含約10 mM的TRIS，更具體地，1.61 g/L的TRIS。

[0108]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含：(i)至少一種以病毒為基礎的材料，(ii)在聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物之該群組中選擇的至少一種聚合物，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，且其中該磷酸鹽係為一磷酸氫二鈉鹽，且任選的，(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者更佳地擇自TRIS或HEPES之間。

[0109]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該

者包含：(i)至少一種以病毒為基礎的材料，(ii)在聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物之該群組中選擇的至少一種聚合物，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀鹽之一混合物，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者更佳地擇自TRIS或HEPES之間。

[0110]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含：(i)至少一種以病毒為基礎的材料，(ii)在聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物之該群組中選擇的至少一種聚合物，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)磷酸氫二鈉鹽、磷酸二氫鉀鹽與NaCl之一混合物，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者更佳地擇自TRIS或HEPES之間。

[0111]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少兩種藥學上可接受鹽類，其中該等鹽類中至少一者係為一磷酸鹽，且任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0112]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一一價磷酸鹽及/或至少一種二價磷酸鹽的混合物，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0113]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀鹽之一混合物，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0114]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一種磷酸鹽及至少一種單價鹽，較佳地的NaCl，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0115]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一種一價磷酸鹽及/或至少一種二價磷酸鹽及至少一種單價鹽，較佳地的NaCl，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0116]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽及至少一種單價鹽，較佳地NaCl，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0117]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀之一混合物及至少一種單價鹽，較佳地NaCl，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0118]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少兩種藥學上可接受鹽類，其中該等鹽類中至少一者為一磷酸鹽，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0119]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配

物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一種一價磷酸鹽及/或至少一種二價磷酸鹽之一混合物，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0120]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀鹽之一混合物，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0121]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一種磷酸鹽及一單價鹽，較佳地NaCl，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0122]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽及至少一種單價鹽，較佳地NaCl，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0123]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀之一混合物及至少一種單價鹽，較佳地NaCl，及任選的(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0124]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀之一混合物，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0125]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一種磷酸鹽及一單價鹽，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0126]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽及至少一種單價鹽，較佳地NaCl，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0127]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀之一混合物及至少一

種單價鹽，較佳地NaCl，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0128]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀之一混合物及NaCl，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0129]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少兩種藥學上可接受鹽類，其中該等鹽類中至少一者係為一磷酸鹽，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0130]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一種一價磷酸鹽及/或至少一種二價磷酸鹽之一混合物，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所

組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0131]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀鹽之一混合物，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0132]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)至少一種磷酸鹽及一種單價鹽，較佳地NaCl，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0133]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽及至少一種單價鹽，較佳地NaCl，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：

TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0134]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀之一混合物及至少一種單價鹽，較佳地NaCl，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0135]根據有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)磷酸氫二鈉鹽與磷酸二氫鉀之一混合物及NaCl，及(vi)一藥學上可接受的緩衝液，該者選自由下列所組成之該群組中：TRIS、BES、TES、DIPSO、MOBS、TAPSO、HEPPSO、POPSO、MOPS、HEPES及碳酸氫鹽，較佳地TRIS緩衝液。

[0136]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)約0.1 g/L至約1 g/L的磷酸氫二鈉鹽，及約1 g/L至約10 g/L的單價鹽，較佳地從約1 g/L至5 g/L，較佳地NaCl。

[0137]根據另一有利實施例，本發明有關於一調配物，該者包含(i)一痘病毒其選自由MVA與VV所組成之該群組，(ii)PVP，(iii)蔗糖，(iv)精胺酸及麩胺酸鹽，(v)約0.1 g/L至約1 g/L的磷酸氫二鈉鹽，及約1 g/L至約10 g/L的單價鹽，較佳地從約1 g/L至5 g/L，較佳地NaCl，及(vi)從約1 g/L至約10 g/L的TRIS緩衝液，更佳地從約1 g/L至約5 g/L。

[0138]一適於冷凍乾燥之含病毒的典型調配物包含(ii)33.25 g/L的25 kDa PVP，(iii)50 g/L的蔗糖，(iv)2.49 g/L的麩胺酸鹽與8.43 g/L的精胺酸，(v)0.79 g/L的 Na_2HPO_4 及0.15 g/L的 KH_2PO_4 。

[0139]根據本發明另一具體實施例，該調配物包含1.88 g/L的磷酸鹽，且還更具體地，1.59 g/L的 Na_2HPO_4 及0.29 g/L的 KH_2PO_4 。

[0140]根據本發明另一具體實施例，該調配物包含3.75 g/L的磷酸鹽，且還更具體地，3.17 g/L的 Na_2HPO_4 及0.58 g/L的 KH_2PO_4 。

[0141]根據本發明另一具體實施例，該調配物包含3.89g/L的NaCl。

[0142]根據本發明另一具體實施例，該調配物包含1.94g/L的NaCl。

[0143]根據本發明另一具體實施例，該調配物包含3.89g/L的NaCl及1.61 mM的TRIS。

[0144]根據本發明另一具體實施例，該調配物包含

1.94g/L的NaCl及1.61 g/L的TRIS。

乾燥產物

[0145]本發明進一步考量一種安定的含病毒為基礎之材料的疫苗，其包含如上文所揭露之調配物，該者係在乾燥，較佳地冷凍乾燥形式中。

[0146]該術語「乾燥」表明展現小於產物3%重量份之一殘留含水量的調配物、組成物、產物、疫苗及之類，較佳地小於2%，且更佳地為1%或更小。根據特定實施例，該經乾燥材料(包括乾燥調配物、乾燥組成物、乾燥產物、乾燥疫苗、含有病毒為基礎之材料的乾燥疫苗)於5℃、室溫且直至約45℃下為結晶或非晶形式兩者任一的固體。

[0147]根據一具體實施例，該殘留含水量係藉由卡爾費雪(Karl Fisher)法測定。

[0148]根據本發明中，「乾燥材料」(包括乾燥調配物、乾燥組成物、乾燥產物、乾燥疫苗、含有病毒為基礎之材料的乾燥疫苗)具有如上文界定之一殘留水分。

[0149]根據一實施例，該乾燥材料可以藉由冷凍乾燥如上文揭露之一調配物而獲得，較佳地水性調配物。因此，根據較佳實施例，一乾燥材料(特別是本發明之乾燥調配物或含有以病毒為基礎之材料的乾燥疫苗)意指一「冷凍乾燥」或「凍乾」的材料(特別是「冷凍乾燥」或「凍乾」調配物，或含有本發明病毒為基礎之材料的「冷凍乾燥」或「凍乾」的疫苗)。

[0150]該等術語「冷凍乾燥」與「凍乾」係為相等的，以及該等術語「凍乾作用」與「冷凍乾燥作用」。

[0151]根據較佳實施例，凍乾作用後在病毒效價中的損失，意即歸因於冷凍乾燥製程之損失不超過0.3 log，較佳地不超過0.2 log，且更佳地不超過0.1 log。

[0152]更進一步地，「乾燥材料」係有利地安定(參閱下文)，意即其在病毒效價中之累計損失為有限的。

[0153]更進一步地，其係必須注意的是，鑒於在文獻中已知磷酸鹽，諸如磷酸氫二鈉十二水合物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)，於低溫下沈澱，從而可能劇烈地降低該產物的pH(Croyle 等人於 "Factors that influence stability of recombinant adenoviral preparations for human gene therapy, Pharmaceutical development and technology , 3(3), 373-383, 1998")，根據本發明該調配物之pH在冷凍期間於所有溫度係意外地維持。

[0154]其係進一步希望的是，根據本發明的「乾燥材料」具有一低的殘留含水(RM)量，由於熟習該項技藝者已知它為安定性之一指標，因為在儲存期間暴露於水分可以使一產物不安定，且從而允許一較低的保存期限。RM係為在一冷凍乾燥產物中殘餘的結合水數量。該廣為知悉用於測試殘留水分的卡爾費雪比色技術可以使用，以藉由容量滴定確定水含量(Jennings, T.A. 於 "Lyophilization, Introduction and Basic Principles", Interpharm Press, Denver, CO, US, 1999, ISBN 1-57491-081-7, pages 415-418")。此係

相較於該乾燥產物之總重量測量為殘餘水的重量百分比。
歐洲藥典(第V版)建議低於產物3%重量分之一RM。

[0155]更特別地，在根據本發明之「乾燥材料」中，RM係小於產物3%重量分，更佳地小於2%，且更佳地產物1%重量分或以下。

[0156]其亦為預期的是，根據本發明之「乾燥材料」顯示一合宜的外觀。實際上，適合的乾燥組成物呈現一光滑、白層或「餅狀物」，該者在凍乾後不從小玻璃瓶兩側縮回。較不適合的「乾燥材料」看似「熔融」、「沸騰」或其它畸形，並儲存後從小玻璃瓶兩側縮回。

[0157]「乾燥材料」可以在乾燥粉末形式中獲得。例如從冷凍乾燥所得到的餅狀物可以研磨成粉末形式。根據本發明之一固體「乾燥材料」因此可能採取自由流動顆粒形式。該固體組成物典型地係於一密封的小玻璃瓶、安瓿或注射器中以粉末提供。該固體基質可以替代地提供為一貼劑(patch)。粉末可能壓製成錠劑形式。

冷凍乾燥製程

[0158]如上文提及，本發明之調配物，較佳地水性調配物，係適用於乾燥，較佳地冷凍乾燥。較佳地，含括在該經受冷凍乾燥調配物中之該以病毒為基礎的材料，係如上文界定為純化或至少部分純化的。

[0159]根據一具體實施例，本發明有關於一種用於製備「乾燥材料」的方法，其中該方法包含冷凍乾燥一水性調配物之步驟，該調配物包含：(i)至少一以病毒為基礎之

材料，(ii)在聚乙烯基吡咯烷酮及其衍生物之該群組中選擇的至少一種聚合物，(iii)至少一種糖，(iv)至少兩種不同的胺基酸，(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，且，任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。

[0160]冷凍乾燥方法為熟習該項技藝者所普遍知悉地 (Day, J.及McLellan, M.於"Methods in Molecular Biology, Humana Press, (1995) vol. 38")。

[0161]冷凍乾燥法通常有三個主要階段，稱之為冷凍、初級乾燥及次級乾燥。冷凍典型地係使用一冷凍乾燥機執行。在此步驟中，重要的是將生物材料冷卻至其共晶點(T_{eu})以下，在簡單結晶產物之事例中，或其玻璃轉化溫度(T_g')以下，在非晶形產物之事例中，意即於該材料固相及液相可以共存的最低溫度以下。這確保了在繼之的初級乾燥階段中昇華而非熔化將會發生。

[0162]在初級乾燥期間，壓力係藉由施用適當程度的真空而控制，而足夠的熱量係供給，以使得水昇華。在此階段，在該材料中的水至少50%昇華，典型地60%至70%。初級乾燥可能為緩慢的，因為太多的熱量可以降解或改變該生物材料的結構。一冷凝室及/或冷凝板提供一表面，在該表面上水蒸汽係藉由再凝固截住的。

[0163]在該次級乾燥製程中，水合水係藉由進一步施用熱量而移除。典型地，壓力亦下降以鼓勵進一步乾燥。在完成該冷凍乾燥製程後，可以在密封前以諸如氮氣之一

惰性氣體打破真空，或者該材料可以在真空下密封。

[0164]在本發明之上下文中，已經驚訝地發現，高溫，意即高達 50°C 可以施用到次級乾燥步驟，以爲了加快該冷凍乾燥製程而不削弱病毒。

[0165]因此，本發明更佳地有關於一冷凍乾燥製程，該者包含乾燥根據本發明之一液體組成物，且其中該次級乾燥步驟係於高至 $50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 之一不定溫度下執行，更佳地介於 30°C 及 45°C 之間，且較佳地介於 $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

[0166]更進一步地，其係注意的是，具有相同效價參數之一乾燥產物可以在一降低的體積中產生，舉例而言，填充體積的三分之一，從而允許提高該三分之一的濃度且進一步減少凍乾週期的持續時間，相較於在該技藝中對諸如痘病毒之病毒普遍知悉者而言。

復原材料

[0167]本發明進一步考量復原材料。「復原材料」(包括復原調配物、復原組成物、復原產物、復原疫苗、含病毒爲基礎之材料的復原疫苗)對應於「乾燥材料」(包括乾燥調配物、乾燥組成物、乾燥產物、乾燥疫苗、含病毒爲基礎之材料的乾燥疫苗)，前者已藉由加入適量的藥學上可接受溶劑而復原。根據特定實施例，該藥學上可接受溶劑係選自由注射用水(WFI)、生理血清或諸如NaCl溶液之生理食鹽水所組成之該群組中。

[0168]當根據本發明之調配物含有額外的鹽類時，更佳地諸如NaCl之單價鹽，係更特定地專用於校準該復原材

料的滲透壓，假若必要的話。更精確地說，根據本發明之一復原材料的滲透壓應相容於注射用途，意即應含括在280 mOsm/kg與900 mOsm/kg之間，更特別地280 mOsm/kg與600 mOsm/kg之間，更佳地280 mOsm/kg與350 mOsm/kg之間。

病毒效價

[0169]乾燥製程，且更具體地冷凍乾燥製程，的主要缺點之一為它們可以是不安定的，導致病毒中整體病毒效價的損失，該損失在儲存期間可以提高的。

[0170]本發明之一目的係為提供一調配物，較佳地水性調配物，該者係為安定的。本發明進一步有關於乾燥，較佳地冷凍乾燥如上文揭露之一安定調配物。更特別地，該安定性意謂在本發明該調配物(包括水性或乾燥形式)中含有之該以病毒為基礎的材料或產物係生物活化並保留其生物活性的(意即以病毒為基礎的材料，舉例而言，痘病毒，依舊具感染性)，當根據本發明調配時。配製時，根據本發明的。根據本發明，該病毒為基礎之材料保留其生物活性，當根據本發明調配時，假若該以病毒為基礎的材料於一給定時間的生物活性係在該調配物製備時所展現的生物活性約10%之內的話(在檢測誤差之內)。在病毒之事例中，生物活性可以視為保留的，當該調配物之病毒效價係在該初始效價之一個log之內。根據特定實施例，本發明該含有以病毒為基礎材料的調配物係為安定的，當該病毒效價之整體損失在 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 之一培育溫度下於至少60天

期間(例如，90天或甚至更多，諸如數月或數年)為小於0.7 logs時，較佳地小於0.5 logs，更佳地小於0.4 logs，且還更佳地小於0.3 logs。

[0171]根據本發明該「病毒效價之整體損失」係界定為在乾燥步驟後所測量及在該乾燥調配物儲存期間所測量(在該材料復原成水後執行的測量)的病毒效價累計損失。

[0172]「乾燥步驟後的病毒效價損失」對應於在該調配物製備與乾燥步驟後該時間之間的病毒效價損失，意即，因此其係為歸因於乾燥製程的病毒效價損失。在下列實驗中，該者對應於在第0天與第-1天所測量的病毒效價損失(參閱例子部分)。

[0173]「乾燥步驟之後的病毒效價損失」係獨立於溫度的，且較佳地小於0.3 log，更佳地小於0.2 log。

[0174]該乾燥調配物之「儲存期間的病毒效價損失」對應於在乾燥步驟後且於一確定儲存溫度下在一確定的“n”天儲存期期間的病毒效價損失。

[0175]「儲存期間的病毒效價損失」較佳地於+5°C +/-3°C 下達至少60天時小於0.4 log，更佳地於+5°C +/-3°C 下達至少60天時(例如90天或甚至更多)小於0.3 log。

[0176]或者，其係可能縮短根據本發明之一調配物的安定性評估，藉由於一升高溫度下執行加速安定性研究。實際上，此種加速安定性研究允許預測於較低溫度的結果，而無需等待實時的安定性數據，意即於+5°C +/-3°C 一般為1-3年(相對於在37+/-5°C 下約1週，在45+/-5°C 下約3-5

天)。爲了這個目的，不同的數學模型係於該技藝之現況中描述，且可以使用以爲了於較低溫度下外推結果。這些模型之一係爲廣爲知悉的階係以阿瑞尼斯原則爲基礎的多變量模型(Arrhenius principle-based multivariate model)，該者標明如下：

$$\ln\left(\ln\left(\frac{C_0}{C}\right)\right) = \beta_0 + \beta_1 * \frac{1}{T} + \beta_2 * \ln(t)$$

其中C₀係爲該初始效價，單位PFU/mL，T係爲溫度，單位開氏(Kelvin)溫度，t係爲時間，單位天數，C係爲於該對應時間t時的效價，單位PFU/mL，而β₀、β₁及β₂係爲該模型的參數(該等參數取決於模型的具體數據可以有所不同)。

[0177]通常，加速安定性測試係於37+/-5℃下約1週期間執行，(世界衛生組織推薦)。在本事例中，此種加速研究已於45+/-5℃下在不同時間段執行(參閱例子部分)。

[0178]「室溫」(RT)在本說明書中使用時對應於一溫度其包括約20℃及約25℃之間。

[0179]使用以確定痘病毒效價，舉例而言，之該檢測係爲溶菌斑檢測技術(參閱，舉例而言，Kaufmann及Kabelitz 於“02, Methods in Microbiology Vol.32: Immunology of Infection. Academic Press. ISBN 0125215320”)。從該檢測的效價係紀錄爲每毫升溶菌斑形成單位(PFU/mL)。確定該病毒效價，及從而該病毒效價之整體損失，之一詳細實驗計畫係於例子部分中給定。然

而，任何替代實驗計畫亦可以使用於確定病毒效價。

[0180]根據本發明包含該以病毒為基礎之材料或該復原材料的該調配物，可能投藥至需要其之一患者或動物，更特別地做為用於醫療或預防疾病用途之一疫苗。

[0181]根據另一實施例，本發明考量針對使用作為一疫苗的調配物，該者包含如先前所界定該以病毒為基礎之材料或一復原材料。該調配物可能藉由不同途徑投藥，該等途徑可能為譬如靜脈內、腫瘤內、肌內、皮內、皮下或腹膜內途徑。此一調配物，尤其是含有痘病毒的水性調配物，如何適當地投藥係在醫生的技能範圍之內。該投藥可能以單一劑量進行或在某個時間間隔之後重複一或數次。適宜的投藥途徑及劑量以各種參數之一函數而變化，舉例而言，個體、欲治療的疾病、或欲轉殖之感興趣基因。

[0182]本發明亦有關於一種方法，用於投藥包含如先前所界定該以病毒為基礎的材料或一復原材料之一調配物到需要其之一宿主，其特徵在於一乾燥產物係於一生理上可接受的溶劑中復原，較佳地擇自於PPI、WFI、生理血清或諸如NaCl溶液之生理食鹽水溶液之中，然後投藥至需要其之宿主。

[0183]本發明亦有關於一調配物其包含如先前所界定該以病毒為基礎的材料或一復原材料者，用於治療及/或預防疾病，且更佳地，擇自癌症、感染性疾病及/或自體免疫性病症之間的疾病狀況。

[0184]如於此所使用，「癌症」意指但不限於肺癌(例

如，小細胞肺惡性腫瘤與非小細胞肺惡性腫瘤)、支氣管癌、食道癌、咽癌，頭頸部癌症(例如，喉癌、唇癌、鼻腔與鼻竇癌、及咽喉癌)、口腔癌(例如舌癌)、胃的癌(例如胃癌)、腸癌、胃腸癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、肛門癌、肝癌、胰腺癌、泌尿道癌、膀胱癌、甲狀腺癌、腎癌、惡性腫瘤、腺惡性腫瘤、肝惡性腫瘤、肝細胞惡性腫瘤(HCC)或轉移性結直腸癌(mCRC)、皮膚癌(例如黑色素瘤)、眼癌(例如視網膜母細胞瘤)、腦癌(例如神經膠質、髓母細胞瘤與腦星形細胞瘤)、中樞神經系統癌、淋巴瘤(例如，皮膚B細胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、何杰金氏綜合症及非何杰金氏淋巴瘤)、骨癌、白血病、乳癌、生殖道癌、子宮頸癌(例如，子宮頸上皮內贅瘤)、子宮癌(例如，子宮內膜癌)、卵巢癌、陰道癌、外陰癌、前列腺癌、睪丸癌。「癌症」亦意指病毒誘發的腫瘤，包括但並不限於乳突瘤病毒誘發的惡性腫瘤、疱疹病毒誘發的腫瘤、EBV誘發的B細胞淋巴瘤、B型肝炎誘發的腫瘤、HTLV-1誘發的淋巴瘤及HTLV-2誘發的淋巴瘤。

[0185]在癌症之事例中，根據本發明之一組成物的此種投藥可能進一步關聯一第一線化療。

[0186]如於此所使用，「感染性疾病」意指由一感染性生物造成的任何疾病。感染性生物包括但並不限於，病毒(例如，單股RNA病毒、單股DNA病毒、人類免疫缺陷病毒(HIV)、A、B及C型肝炎病毒、單純疱疹病毒(HSV)、巨

細胞病毒(CMV)、呼吸道融合病毒(RSV)、伊士坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、人類乳突瘤病毒(HPV))；寄生蟲(例如原生動物及後生動物病原體，諸如瘧原蟲物種、利什曼原蟲物種、住血吸蟲物種或錐蟲物種)；細菌(例如分枝桿菌尤其是結核分枝桿菌、沙門氏菌、鏈球菌、大腸桿菌、葡萄球菌)；真菌(例如念珠菌物種或曲黴菌物種)；卡氏肺囊蟲及普里昂蛋白。

[0187]如於此所使用，「自體免疫病症」意指兩種一般類型：「全身性自體免疫疾病」(意即損傷多種器官或組織之病症)，及「局部性自體免疫疾病」(意即僅損傷單一器官或組織之病症)。然而，「局部性自體免疫疾病」之影響藉由間接影響其它身體器官及系統可以為全身性的。「全身性自體免疫疾病」包括但不限於：類風濕性關節炎，其可影響關節，且可能影響肺及皮膚；狼瘡，包括全身性紅斑狼瘡(SLE)，其可影響皮膚、關節、腎臟、心臟、腦、紅血球細胞、以及其它組織及器官；硬皮症，其可影響皮膚、腸、及肺；斯耶格倫症候群(Sjogren's syndrome)，其可影響唾液腺、淚腺、及關節；古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)，其可影響肺及腎臟；韋格納肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)，其可影響靜脈竇、肺、及腎臟；風濕性多肌痛，其可影響大肌群；及顱動脈炎/巨細胞動脈炎，其可影響頭部與頸部動脈。「局部性自體免疫疾病」包括但不限於第1型糖尿病，其影響胰島；橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)及格雷夫氏疾病

(Graves' disease)，其影響甲狀腺；乳糜瀉、克羅恩氏疾病(Crohn's disease)、及潰瘍性結腸炎，其影響胃腸道；多發性硬化症(MS)及格林-巴利症候群(Guillain-Barre syndrome)，其影響中樞神經系統；愛迪生氏疾病(Addison's disease)，其影響腎上腺；原發性膽道硬化、硬化性膽管炎、及自體免疫性肝炎，其影響肝臟；及雷諾現象(Raynaud's phenomenon)，其可影響手指、腳趾、鼻子、耳朵。

[0188]因此，本發明進一步有關於一種用於治療或預防上述提及之疾病狀況的方法，該方法使用包含如先前界定該以病毒為基礎之材料或一復原材料的一調配物。此一方法更佳地包含復原一如上文所界定的凍乾產物，並投藥該對應的復原材料至需要它們之一宿主。

[0189]然後，本發明之另一實施例考量以包含如先前所界定該以病毒為基礎之一材料或一復原材料的調配物，疫苗接種需要它們之一動物，包括人類，的一種方法。

[0190]假若必要的話，本發明之組成物可能進一步以熟習該項技藝者所廣為知悉的常規疫苗載具調配。

[0191]本發明已於一例示性方式中說明的，但是其應為不言而明的是該等已使用的術語係意欲在性質上說明詞語而非限制。顯然地，鑒於上文教示，本發明之許多修正及變異係為可能的。所以，其係為不言而明的是，在所附該等請求項之發明範圍之內，本發明可能在不同於在此具體描述之一方式中實行的。

[0192]上文所引用的所有專利、公開案及資料庫條目之揭露內容皆以其整體特意地併入於此以作為參考，以相同的程度宛若每一個別的專利、公開案及條目係特定且個別地指出以併入做為參考。

[0193]除非另有指明，為了實現下列例子所使用的所有材料係為市場上可獲得的。

例子

材料

- L-精胺酸鹽酸鹽粉末(J.T BACKER – SIGMA)；
- SVF (PAA)
- TRIS = 三 羥 甲 基 胺 基 甲 氨 基 甲 烷 粉 末 (J.T BACKER)；
- 鹽酸(HCl) 1M (MERCK)；
- 氫氧化鈉(NaOH) 1N (VWR)；
- 蔗糖粉末 (MERCK)；
- 氯化鈉(NaCl)粉末(MERCK)；
- PVP25粉末(MERCK)；
- L-麩胺酸單鈉鹽(MERCK)；
- 磷酸氫二鈉，無水粉末(MERCK)；
- 磷酸二氫鉀無水粉末(MERCK)；
- 注射用水(COOPER)；
- 小玻璃瓶 =TopLyo®小玻璃瓶 (SCHOTT)；塞子 (STELMI)；
- DAB = 3,3'-二胺基聯苯胺(SIGMA) ；

- 宿主細胞BHK-21(ATCC, CCL10)；
- 抗疫苗抗體(Meridian Life science)；
- 結合過氧化酶之抗兔子抗體(DAKO)；
- MilliQ水(Millipore)；
- PBS(DULBECCO SIGMA)；
- Triton X-100 (SIGMA)；
- DMEM (GIBCO)
- Cations 100X (10 g/L醋酸鎂四水合物MERCK及10 g/L氯化鈣二水合物JT BAKER)；

[0194]其應注意的是，在下列表格中，當「-」係表示時，其意謂的是該對應的成分不存在於該對應的組成物中。

方法

[0195]爲了評估根據本發明該調配物在凍乾期間及在儲存期間隨著時間的安定性，病毒滴定法係於下文中詳述的。

[0196]一些乾燥樣品在凍乾之後係立即復原及滴定，以評估凍乾製程在病毒安定性上的影響(意即在下列例子中於第0天的病毒效價損失)。

[0197]其它乾燥樣品係於凍乾之後儲存於不同溫度(譬如於5°C及45°C)，直至復原用於滴定以評估儲存期間之病毒效價損失，包括歸因於凍乾製程中的病毒效價損失(意即在下列例子中於第4天、7天、28天、60天及/或90天的病毒效價損失)。

[0198]如先前所指出，本發明之目的係為獲得乾燥產物，該者於於0°C以上溫度隨著時間的整體病毒效價損失係有限的，更佳地於4°C及25°C之間，且更佳地於約4°C或5°C。由於等待實時安定性數據係為耗時的(在2-8°C下1-2年)，安定性測試典型地於一升高溫度下執行，諸如45°C下約3-5天，且其結果使用該阿瑞尼斯方程式對應於在較低溫度下可以預期者。

[0199]使用於凍乾之前調配物及復原組成物的病毒滴定實驗計畫已經使用溶菌斑檢測技術於BHK-21細胞上執行。在此種方法中，在一樣品中的溶菌斑形成單位(pfu/mL)係確定的。當病毒感染細胞時，一病毒溶菌斑係於該固定的細胞單層內形成(Kaufmann與Kabelitz於"2002, Methods in Microbiology Vol.32: Immunology of Infection. Academic Press. ISBN 0125215320")。對下列根據本發明之示範性調配物每一者所執行的具體步驟係於下文的“例子”部分中詳述。

例子1:製備被冷凍乾燥之含有痘病毒的液體調配物

[0200]在下文所述的液體調配物I至V已按下列步驟製備。這些調配物包含基於MVA的產物。更精確地說，調配物I至III包含TG4001，而調配物IV及V包含TG4040。

[0201]a)TG4001與TG4040最初分別於A1溶液與A2溶液中維持在冷凍狀態。A1(包含TG4001)與A2(包含TG4040)每一溶液之內容物係於下列表1中詳細說明。

表1

	溶液A1 (用於製備調配物I至III)	溶液A2 (用於製備調配物IV與V)
病毒效價(Pfu/mL)	2.40E+08	3.20E+08
蔗糖(%)	5	5
麩胺酸鈉	10mM	10mM
NaCl	50mM	50mM
TRIS	-	10mM
Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	10mM	-
pH	7.5±0.5	7.5±0.5

溶液A1及A2係解凍的。

[0202] 假若必要的話，溶液A1與A2可以根據熟習該項技藝者所廣為知悉的方法進一步稀釋。譬如，溶液A1係不進一步稀釋，且係就這樣使用以爲了製備調配物I至III。考量溶液A2，該者已經用對應於上文描述溶液A2(不包括TG4040)之一溶液A'2稀釋，以爲了得到6.70E+07 pfu/mL之一最終的病毒效價。

[0203] 該所獲得的病毒懸浮液然後係藉由短暫攪拌均質化。

[0204] b) 然後，170μl的下列溶液B係分別加入至如在步驟a)獲得的340μL的病毒溶液A1及A2。

更精確地說：

- 170μl的溶液B1至B3係加入至步驟a)包含TG4001的340μL病毒溶液A1，以爲了製備調配物I至III，且
- 170μl的溶液B4與B5係加入至步驟a)包含TG4040的340μL病毒溶液A'2，以爲了製備調配物IV至V。

[0205] 該混合物然後係藉由短暫攪拌均質化。

[0206] 溶液B1至B5的詳細組成物係於下列表2中給定。

表2

	溶液B1用於 調配物I	溶液B2用於 調配物II	溶液B3用於 調配物III	溶液B4用於 調配物IV	溶液B5用於 調配物V
PVP 25 (%)	10	10	10	10	10
蔗糖(%)	5	5	5	5	5
L-精胺酸	120mM	120mM	120mM	600mM	800mM
麩胺酸鈉	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
NaCl	100mM	100mM	100mM	100mM	-
TRIS	-	-	-	20mM	20mM
Na ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	-	20mM	60mM	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	4mM	4mM
pH	7.5±0.5	7.5±0.5	7.5±0.5	7.5±0.5	7.5±0.5

[0207] c) 該所獲得凍乾之前之液體組成物I至V(510 μ L)
係於下方表3中詳述。

表3

組份	液體 調配物I	液體 調配物II	液體 調配物III	液體 調配物IV	液體 調配物V
病毒載體 (PFU/mL)	TG4001 2.55E+08	TG4001 1.64E+08	TG4001 1.55E+08	TG4040 4.25E+07	TG4040 3.75E+07
PVP(25MW) (g/L)	33.25	33.25	33.25	33.25	33.25
蔗糖(g/L)	50	50	50	50	50
麩胺酸鈉 (g/L)	2.49	2.49	2.49	2.49	2.49
L-精胺酸 (g/L)	8.43	8.43	8.43	42.13	56.04
NaCl (g/L)	3.89	3.89	3.89	3.89	1.94
TRIS (g/L)	-	-	-	1.61	1.61
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	0.79	1.59	3.17	0.19	0.19
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.15	0.29	0.58	-	-
pH	7.5±0.5	7.5±0.5	7.5±0.5	7.5±0.5	7.5±0.5

上文描述之該等液體調配物I至V亦為本發明之一部份。

例子2:對應的冷凍乾燥調配物I至V之製備

[0208]在下列例子中，所有凍乾作用係於一凍乾器 TELSTAR LYOBETA 25中執行。

[0209]該凍乾作用實驗計畫係為下列。

a)製備乾燥產物I至III

TopLyo®小玻璃瓶(SCHOTT)係充填以如先前在例子1中所獲得的液體調配物I至III，且該凍乾製程係如下列般實行：

冷凍步驟

描述	壓力 (mbar)	溫度 (°C)	斜線上升 (h:min)	安定作用 (h:min)
裝載	AP (大氣壓力)	RT		
冷凍	AP	-45	2:00	0:30

初級乾燥步驟

描述	壓力 (mbar)	溫度 (°C)	斜線上升 (h:min)	安定作用 (h:min)
初級1	0.1	-10	0:15	
初級2	0.1	-35	5:00	8:00

次級乾燥步驟

描述	壓力 (mbar)	溫度 (°C)	斜線上升 (h:min)	安定作用 (h:min)
次級乾燥1	0.0047mbar	40	0:15	8:00
次級乾燥2	0.0047mbar	20	0:30	

b)製備乾燥產物IV與V

TopLyo®小玻璃瓶(SCHOTT)係充填以如先前在例子1中所獲得的液體調配物IV與V，且該凍乾製程係如下列般實行。該實驗計畫係類似於調配物I至III所實行者，但在

此事例中，一進一步真空步驟係執行的。

冷凍

描述	壓力 (mbar)	溫度 (°C)	斜線上升 (h : min)	安定作用 (h : min)
裝載	Atm. P.	室溫		
冷凍	Atm. P.	-50	2:00	0 : 30

初級乾燥

描述	壓力 (mbar)	溫度 (°C)	斜線上升 (h : min)	安定作用 (h : min)
初級1	0.150	-35	0 :15	18:00
初級2	0.150	-10	1 : 00	0

次級乾燥

描述	壓力 (mbar)	溫度 (°C)	斜線上升 (h : min)	安定作用 (h : min)
次級乾燥1	最小	40	2 :00	8 :00
次級乾燥1	最小	20	1 :00	
次級乾燥2	最小	10	0 : 02	3:00

[0210]該所獲得之乾燥產物I至V形成一適合外觀的餅狀物，意即一光滑、白色的“餅狀物”該者在凍乾後係不從小玻璃瓶的側面縮回。

[0211]該等產物I至V在冷凍乾燥後分別的病毒效價係於下列表4中詳述。

表4

組份	乾燥產物I	乾燥產物 II	乾燥產物 III	乾燥產物 IV	乾燥產物 V
病毒載體 (PFU/mL)	TG4001 1.44E+08	TG4001 1.21E+08	TG4001 1.27E+08	TG4040 2.07E+07	TG4040 2.18E+07

乾燥產物I至V亦為本發明之一部份。

[0212]該餅狀物係研磨，且然後該所獲得的粉末係復

原，以爲了根據先前所描述的病毒滴定法確定病毒效價。

例子3:安定性研究：總體病毒效價損失之評估，意即隨著時間在儲存期間，包括歸因於凍乾製程之損失

3.a)乾燥產物I至V之復原

[0213]在剛凍乾後以WFI製備最終體積爲680 μ L的復原材料(復原組成物)I至V係於下列表5中詳述的(意即無儲存期爲t0)。

表5

組份	復原組成物I	復原組成物II	復原組成物III	復原組成物IV	復原組成物V
病毒載體(PFU/mL)	TG4001 1.44E+08	TG4001 1.21E+08	TG4001 1.27E+08	TG4040 2.07E+07	TG4040 2.18E+07
PVP 25 (g/L)	25	25	25	25	25
蔗糖(g/L)	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
麩胺酸(g/L)	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
L-精胺酸(g/L)	6.3	6.3	6.3	31.6	42.1
NaCl (g/L)	2.9	2.9	2.9	2.9	1.5
TRIS (g/L)	-	-	-	1.2	1.2
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	0.60	1.19	2.39	0.14	0.14
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.11	0.22	0.44	-	-
pH	7.5 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.5

[0214]爲了評估乾燥產物I至V於5 $^{\circ}$ C或45 $^{\circ}$ C兩者任一儲存達該指定的一段時間後的病毒效價，該等乾燥產物I至V首先需要復原。在下列例子中，它們係以WFI復原在終體積680 μ L中，且分別的病毒效價係根據先前詳述的溶菌斑檢測技術評估。

[0215]復原材料I至V亦爲本發明之一部份。

3.b)評估乾燥組成物I至V於5°C下的病毒效價損失

[0216]如先前所指出，每一乾燥產物的累計病毒效價損失(意即在儲存期間隨著時間過去的損失，包括歸因於凍乾製程的損失)係於BHK-21細胞上使用溶菌斑檢測技術評估。

[0217]就此而言，組成物I至V每一者所執行的步驟係於下文詳述。

1. 細胞貼附

[0218]宿主細胞BHK-21係在DMEM中單層生長的。於融合時，該等細胞係以10 mL的PBS洗滌，且然後解離。在移除胰蛋白酶之後，細胞係於37°C下以具10%SFV之10mL DMEM重新懸浮。

[0219]然後，將細胞懸浮液均質化，並分佈在多孔盤(該盤子之6個孔每一者中2 mL)。然後，該等盤子係於37°C、5%CO₂中培養。

2. 細胞感染

[0220]在細胞貼附後約1天，病毒懸浮液的等分試樣係加入步驟1包含該BHK-21細胞的每一孔中。假若有必要的話，該懸浮液首先係序列稀釋於PBS、Cations 100X及1%的SVF中，根據熟習該項技藝者所廣為知悉的方法。取決於該事例，加入步驟1之BHK-21細胞的病毒懸浮液為冷凍乾燥之前的含病毒液體組成物，或復原的含病毒組成物(意即凍乾後，於不同時間段及溫度者)兩者任一。

[0221]培養基然後係移除，且在於室溫攪拌60分鐘期

間之後，2 mL的感染培養基(DMEM+5%SVF)係分佈在每一孔中。盤子然後係於37°C、5%CO₂中培養。

3. 細胞固定。

[0222]在移除培養基後，細胞係以PBS洗滌(每孔約1mL)。然後，1mL的甲醇/丙酮溶液(50/50)係加入，且該所得到的混合物係於室溫中輕輕攪拌。

[0223]然後將這些平盤於室溫乾燥。

4. 偵測及效價測定

[0224]病毒效價測定係根據廣為知悉的過氧化酶反應執行，該者使用抗疫苗抗體及結合過氧化酶的抗兔子抗體。更精確地說，在反應前抗疫苗抗體係於PBS+2% SVF中稀釋100倍。然後，500μL的該抗體係加入至每一孔中，並在37°C下培養約30分鐘期間，然後以1mL PBS + 1% Triton X-100洗滌3次。

[0225]結合過氧化酶之抗兔子抗體的反應係在相同方式中實行，除了在反應之前，該抗體係於PBS + 2% SVF中稀釋200倍。

[0226]DAB溶液係藉由溶解一商業用DAB錠在15mL的TRIS 0.05M中而製備。然後，該所獲得的溶液係於一2μm的NALGENE過濾單元上過濾，且該所得到的過濾溶液係加至15μL的30% H₂O₂水性溶液。一旦製備，1 mL的DAB溶液係加入至每一孔中，且直到棕色出現。該著色的溶液隨後係移除且結果係目視解釋。

[0227]然後，該感染性效價係使用下列公式計算，單

位為PFU/mL：

$[\text{病毒溶菌斑數平均值} \times 4] \times \text{稀釋因數} = \text{數目PFU/mL}$

結果

[0228]於5℃下的安定性研究結果係呈現於下列表6中，其中：

- SD =標準差。

-第-1天之病毒效價對應於液體組成物I至V凍乾前的病毒效價。

-第0天之病毒效價對應於乾燥組成物I至V剛凍乾後的病毒效價。該者與液體組成物I至V凍乾前之病毒效價的比較允許確定凍乾作用期間的病毒效價損失。

-第28、60及90天的病毒效價對應於乾燥組成物I至V分別在28、60及90天儲存期後的病毒效價。該者與復原組成物I至V剛凍乾後(意即在第0天)之病毒效價的比較允許確定於5℃下在儲存期間的病毒效價損失。

表6 (於+5℃)

	天數	滴定平均值 (3樣品) PFU/mL	Log (平均值)	累計損失	SD
組成物I	-1	2.55E+08	8.28*	0.00	0,09
	0	1.44E+08	8.16	-0.12	0,07
	28	1.15E+08	8.06	-0.22	0,04
	60	1.08E+08	8.03	-0.25	0,05
	90	9.85E+07	7.99	-0.29	0.06
組成物II	-1	1.64E+08	8.09*	0.00	0,04
	0	1.21E+08	8.08	-0.01	0,10
	28	1.34E+08	8.13	0.04	0,04

	天數	滴定平均值 (3樣品) PFU/mL	Log (平均值)	累計損失	SD
	60	1.16E+08	8.07	-0.03	0,00
	90	9.70E+07	7.99	-0.10	0,01
組成物III	-1	1.55E+08	8.07*	0.00	0,06
	0	1.27E+08	8.10	0.04	0,11
	28	1.09E+08	8.04	-0.03	0,15
	60	1.09E+08	8.04	-0.03	0,07
	90	9.60E+07	7.98	-0.08	0.02
組成物IV	-1	4.25E+07	7.50*	0.00	0,07
	0	2.07E+07	7.32	-0.19	0,06
	28	1.71E+07	7.23	-0.27	0,05
	60	1.58E+07	7.20	-0.31	0,01
	90	2.40E+07	7.38	-0.12	0.08
組成物V	-1	3.75E+07	7.45*	0.00	0,09
	0	2.18E+07	7.34	-0.11	0,06
	28	1.50E+07	7.18	-0.27	0,03
	60	1.58E+07	7.20	-0.25	0,05
	90	2.39E+07	7.38	-0.07	0.16

*意謂著該log平均值已經調整為體積680 μ L(=log(滴定平均值 x 0.510/0.680))

[0229] 如所預期，乾燥產物I至V在5°C下係安定的。實際上，其等在5°C下至少90儲存天數之後的累計病毒效價損失不超過0.6 log。

3.c) 評估乾燥產物I至V於45°C下的病毒效價損失

[0230] 爲了進一步估定乾燥產物I至V的安定性，安定性研究已經於45°C下執行。如先前所解釋，這種升高的溫度允許在一加速方式中預測病毒的降解。

[0231] 乾燥產物I至V每一者係於45℃下儲存達4、28、60及90天。

[0232] 每一乾燥產物的累計病毒效價損失(意即在儲存期間隨著時間過去的損失，包括歸因於凍乾製程的損失)係如先前所描述使用滴定法評估(於BHK-21細胞上溶菌斑檢測技術)。

結果

[0233] 45℃之加速安定性研究的結果係呈現於下列表7中，其中：

- SD、-1天之病毒效價及第0天之病毒效價與先前表6中具有相同的含義。

-第4、7、28及60天的病毒效價對應於乾燥組成物I至V分別在4、7、28及60天儲存期後的病毒效價。該者與復原組成物I至V剛凍乾後(意即在第0天)之病毒效價的比較允許確定於45℃下在儲存期間的病毒效價損失。

表7 (於+45℃)

	天數	滴定平均值 (3樣品) PFU/mL	Log (平均值)	累計損失	SD
組成物I	-1	2.55E+08	8.28*	0.00	0.09
	0	1.44E+08	8.16	-0.12	0.07
	4	7.60E+07	7.88	-0.40	0.09
	28	5.87E+06	6.77	-1.51	0.08
	60	7.55E+05	5.88	-2.40	0.03
組成物II	-1	1.64E+08	8.09*	0.00	0.04
	0	1.21E+08	8.08	-0.01	0.10
	4	5.88E+07	7.77	-0.32	0.10

	天數	滴定平均值 (3樣品) PFU/mL	Log (平均值)	累計損失	SD
	28	8.63E+06	6.94	-1.15	0.03
	60	6.00E+05	5.78	-2.31	0.11
組成物III	-1	1.55E+08	8.07*	0.00	0.06
	0	1.27E+08	8.10	0.04	0.11
	4	6.53E+07	7.82	-0.25	0.12
	28	7.53E+06	6.88	-1.19	0.14
	60	1.22E+06	6.09	-1.98	0.07
組成物IV	-1	4.25E+07	7.50*	0.00	0.07
	0	2.07E+07	7.32	-0.19	0.06
	3	8.68E+06	6.94	-0.57	NA
	3.5	8.14E+06	6.91	-0.59	NA
	4	7.67E+06	6.88	-0.62	NA
	7	5.80E+06	6.76	-0.74	0.07
	28	1.67E+06	6.22	-1.28	0.04
	60	6.85E+05	5.84	-1.67	0.05
組成物V	-1	3.75E+07	7.45*	0.00	0.09
	0	2.18E+07	7.34	-0.11	0.06
	3	6.97E+06	6.84	-0.61	NA
	3.5	6.46E+06	6.81	-0.64	NA
	4	6.03E+06	6.78	-0.67	NA
	7	4.33E+06	6.64	-0.81	0.08
	28	1.23E+06	6.09	-1.36	0.17
	60	4.33E+05	5.64	-1.81	0.16

*意謂著該log平均值已經調整為體積680μL(=log(滴定平均值 x 0.510/0.680))

NA =不適用

[0234]其係注意的是，在上文表7中，組成物IV及V在45℃下於天數3、3.5及4所指出的結果已根據如下文描述

之統計分析估計的，意即使用軟體SAS 9.2及1階阿瑞尼斯原則為基礎的多變量模型，該者係以下列公式界定：

$$\ln\left(\ln\left(\frac{C_0}{C}\right)\right) = \beta_0 + \beta_1 * \frac{1}{T} + \beta_2 * \ln(t)$$

其中：

- C_0 係為初始效價，單位pfu/mL(凍乾之後)，
- T 係為溫度，單位開氏度
- t 為時間，單位天數，
- C 為於該對應時間 t 的效價，單位pfu/mL。

[0235]由於在本例子中僅使用一個溫度，意即45°C，該方程可以簡化為：

$$\ln\left(\ln\left(\frac{C_0}{C}\right)\right) = \beta_0 + \beta_2 * \ln(t)$$

[0236]當該模型之參數係估計時，在給定時間點的效價可以藉由下式估計：

$$\hat{C} = \frac{C_0}{\exp\left(\exp(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_2 * \ln(t))\right)}$$

其中：

- C_0 係為初始效價(凍乾之後)，單位pfu/mL，
- t 為時間，單位天數，
- $\hat{C}$ 為於該對應時間 t 的效價，單位pfu/mL，
- $\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_2$ 係為模型的估計參數。

[0237]而該損失估計然後係藉由下式估計：

$$\hat{L} = \log(\hat{C}) - \log(C_{-1} * 0.51/0.68)$$

其中：

- $\bar{c}$ 係為該估計的效價，單位 pfu/mL，
- c_{-1} 係為凍乾前一天的效價，單位 pfu/mL，
- L 係為估計的損失。

[0238] 考量組成物 IV，經校準的 R^2 ，等於 0.995，意謂該模型正確地符合數據。

[0239] 考量組成物 IV，經校準的 R^2 ，等於 0.999，意謂該模型正確地符合數據。

[0240] 因此，上述結果顯示的是該等液體調配物 I 至 V 允許繼之在凍乾製程中發生的熱挑戰後保存病毒的安定性，且顯示進一步病毒安定性在長期安定性試驗期間係進一步保存的。

[0241] 總結，在根據本發明之調配物中，病毒對熱壓力造成之損傷係受到保護的，無論是在凍乾製程期間(意即歸因於冷凍、冷凍乾燥及解凍步驟)期間及儲存於 0°C 以上溫度期間，更特別地於約 5°C。

例子 4: 不具磷酸鹽的病毒製備品調配物

[0242] 三種對照樣品(RS2至RS4)係從TG4040之一純化批次產生的，而一種(RS1)係從純化的TG4001病毒批次產生。該等對照樣品處理係一起處理以在例子1至3中描述的該等組成物I至V，除了該等RS樣品係調配不具磷酸鹽的。Arg及NaCl之濃度亦根據樣品變化的。

[0243] 如上文描述，340 μ L的病毒溶液係混合至170 μ L的安定溶液。每一對照產物S1至S4之安定溶液的詳細組成

物係於下方表8中給定的。

表8

	對照樣品 RS1之安定 化溶液	對照樣品 RS2之安定 化溶液	對照樣品 RS3之安定 化溶液	對照樣品 RS4之安定 化溶液
PVP 25kDa (%)	10%	10%	10%	10%
蔗糖(%)	5%	5%	5%	5%
麩胺酸鈉(g/L)	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
L-精胺酸 (g/L)	120 mM	120 mM	600 mM	800 mM
NaCl (g/L)	100 mM	100 mM	100 mM	-
Tris (g/L)	20 mM	20 mM	20mM	20mM
Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ P0 ₄ (g/L)	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	-	-	-	-
pH	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5

[0244]該所獲得的凍乾前液體對照產物RS1至RS4係於下方表9中詳述。

表9

	對照樣品 RS1	對照樣品 RS2	對照樣品 RS3	對照樣品 RS4
病毒載體 (PFU/mL)	TG4001 2.95 ^E +08	TG4040 3,28E+07	TG4040 3,83E+07	TG4040 3,97E+07
PVP 25kDa (g/L)	33.25	33.25	33.25	33.25
蔗糖(g/L)	50	50	50	50
麩胺酸鈉 (g/L)	2.49	2.49	2.49	2.49
L-精胺酸 (g/L)	8.43	8.43	42.13	56.04
NaCl (g/L)	3.89	3.89	3.89	1.94
Tris (g/L)	1.61	1.61	1.61	1.61
Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ P0 ₄ (g/L)	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	-	-	-	-
pH	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5

[0245]該等對照產物RS1-RS4然後係如上文凍乾，並以WFI復原在680 μ L之終體積中。

[0246]在剛凍乾製程後(意即無儲存期)製備的該等經復原對照產物RS1至RS4之詳細組成物係於下方表10中詳述的。

表10

	對照樣品 RS1	對照樣品 RS2	對照樣品 RS3	對照樣品 RS4
病毒載體(於凍乾後 t_0 之PFU/mL)	TG4001 1.66E+08	TG4040 2,20E+07	TG4040 1,96E+07	TG4040 2,45E+07
PVP 25KDa (g/L)	25	25	25	25
蔗糖(g/L)	37.5	37.5	37.5	37.5
麩胺酸鈉 (g/L)	1.9	1.9	1.9	1.9
L-精胺酸 (g/L)	6.3	6.3	61.6	42.1
NaCl (g/L)	2.9	2.9	2.9	1.5
Tris (g/L)	1.2	1.2	1.2	1.2
Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ P0 ₄ (g/L)	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ (g/L)	-	-	-	-
pH	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5	7.5 +/- 0.5

[0247]安定性研究係如例子3中所描述於5°C及45°C下執行。爲了這個目的，每一乾燥對照樣品RS1至RS4係儲存在5°C或45°C下達一段時間，且該累計病毒效價損失(意即隨著時間過去在儲存期間的損失，包括歸因於凍乾製程的損失)係使用先前描述的滴定法於各種時間點評估。

[0248]TG4001與TG4040調配物在5°C下之安定性結果係於下方表11中給定。

表11

+5℃	天數	滴定平均值 (3樣品) PFU/mL	Log (平均值)	累計損失	SD log
對照樣品 RS1 TG4001	-1	2.95E+08	8.34	0.00	0.05
	0	1.66E+08	8.22	-0.12	0.10
	28	1.97E+08	8.29	-0.05	0.10
	60	1.24E+08	8.09	-0.25	0.06
	90	1.18E+08	8.07	-0.27	0.03
對照樣品 RS2	-1	3.28E+07	7.39	0.00	0.04
	0	2.20E+07	7.34	-0.05	0.12
	28	1.43E+07	7.16	-0.24	0.06
	60	1.64E+07	7.22	-0.18	0.04
	90	1.60E+07	7.20	-0.19	0.06
對照樣品 RS3	-1	3.83E+07	7.46	0.00	0.03
	0	1.96E+07	7.29	-0.17	0.07
	28	1.72E+07	7.24	-0.22	0.03
	60	1.85E+07	7.27	-0.19	0.02
	90	2.24E+07	7.35	-0.11	0.21
對照樣品 RS4	-1	3.97E+07	7.47	0.00	0.07
	0	2.45E+07	7.39	-0.08	0.11
	28	1.85E+07	7.27	-0.21	0.07
	60	1.64E+07	7.22	-0.26	0.02
	90	1.99E+07	7.30	-0.17	0.12

[0249] TG4001及TG4040調配物於45℃下的安定性結果係於下方表12中給定。

表12

+45℃	天數	滴定平均值 (3樣品) PFU/mL	Log (平均 值)	累計損失	SD
對照樣品 TG4001 (RS1)	-1	2.95E+08	8.34	0.00	0.05
	0	1.66E+08	8.22	-0.12	0.10
	4	5.87E+07	7.77	-0.58	0.08
	28	3.96E+06	6.60	-1.75	0.19
	60	1.28E+05	5.11	-3.24	0.05
對照樣品 TG4040 (RS2)	-1	3.28E+07	7.39	0.00	0.04
	0	2.20E+07	7.34	-0.05	0.12
	4	5.35E+06	6.73	0.66	NA
	28	1.17E+05	5.07	-2.32	0.04
	60	1.54E+03	3.19	-4.20	0.12
對照樣品 (RS3)	-1	3.83E+07	7.46	0.00	0.03
	0	1.96E+07	7.29	-0.17	0.07
	4	5.62E+06	6.75	-0.71	NA
	28	1.76E+06	6.25	-1.21	0.02
	60	7.40E+05	5.87	-1.59	0.12
對照樣品 RS4	-1	3.97E+07	7.47	0.00	0.07
	0	2.45E+07	7.39	-0.08	0.11
	4	6.74E+06	6.83	-0.64	NA
	28	6.33E+05	5.80	-1.67	0.12
	60	2.48E+05	5.40	-2.08	0.23

[0250]如圖1及表6與表11中所例示，磷酸鹽的存在對病毒製備品之安定性係為有益的。事實上，感染性TG4001效價後於5℃下在28、60或90天後的累計損失在磷

酸鹽緩衝液存在下係降低的，當相較於其缺席的情況下(參閱圖1A)。舉例而言，於5°C下經過60天後，對包含0.94g/L磷酸鹽緩衝液的組成物I之累計損失為-0.25，對包含1.88g/L及3.75g/L磷酸鹽緩衝液的組成物II及III為-0.03 log，當相較於在缺乏磷酸鹽下調配的對照樣品RS1為-0.25 log時。由包含磷酸鹽緩衝液之調配物所提供的提高安定性在加速安定性研究中亦觀察到；引致在磷酸鹽存在下於45°C經過60天後約-2 log的累計效價損失數(對組成物I、II及III分別為-2.40 log、-2.31 log及-1.98 log)，相對於缺乏磷酸鹽下超過-3 log(RS1為-3.24 log)。

[0251]在TG4040調配物觀察到相同的趨勢。舉例而言，對RS4樣品於5°C下在90天後所測量的累計損失較諸以調配物V所偵測到者為更重要的(分別為-0.17 log及-0.07 log)。這種效果是於45°C下在60天後亦觀察到(分別為-2.08 log及-1.81 log)。

例子5: 長期安定性

[0252]TG4040病毒製備品係如上文描述般配製。更具體地，兩種不同的濃度係測試的；分別是高劑量(約 1.70×10^8 pfu/mL)及低劑量(約 7.00×10^7 pfu)，且該等病毒製備品係調配於調配物其含有1mM之 Na_2HPO_4 及10mM之Tris；10mM麩胺酸鈉、3.75%蔗糖、NaCl 50mM、2.5%之PVP 25kDa及30mm之Arg。具有150mM Arg之一調配物亦與低劑量TG4040製備品測試的。

[0253]該三種TG4040調配物係如上文描述般處理並所

根據一半工業製程(IDT)凍乾。該冷凍乾燥產物係復原的且病毒安定性係於5°C 估定達一年之一段時間(病毒損失係於5°C 在凍乾前、剛復原後(t_0)、並於第28、90、180、270及365天時估定)。

[0254] 對每一TG4040調配物於5°C 下一年後觀察到次於-0.60 log之一病毒損失(分別為-0.33 log對在30mM Arg中之高劑量調配物；-0.42 log對在30mM Arg中之低劑量調配物及-0.24 log對在150mM Arg中之低劑量調配物)。

[0255] 這些結果一同強調的是，磷酸鹽的存在對病毒製備品的安定為有益的。Arg亦於病毒安定性中扮演一定的角色，尤其是當凍乾前之病毒濃度低於 10^8 PFU/mL時。含有殘餘蛋白質之產物基質係於相同方式中於低病毒濃度下稀釋；這些蛋白質可以有助於高濃度病毒的安定。在冷凍乾燥操作期間，Arg將取代在該基質中殘留蛋白的安定性角色。

[0256] 在上文說明書中引用的所有文件(例如專利、專利申請案、公開案)係併入於此以作為參考。本發明之各種修飾及變異對熟習該項技藝者將為顯而易見而不背離本發明之發明範圍及精神。雖然本發明已結合具體較佳實施例而說明，其應不言而喻的是，所主張之本發明不應過度受限於此等具體實施例。實際上，對熟習該項技藝者為明顯的是用於實施本發明之所述模式的各種修飾係意欲涵蓋於下列請求項之發明範圍內。

【符號說明】

(無)

申請專利範圍

1. 一種調配物，其包含(i)至少一種以病毒為基礎的材料、(ii)至少一種選自於聚乙烯吡咯烷酮及其衍生物之群組中的聚合物、(iii)至少一種糖、(iv)至少兩種不同的胺基酸、(v)至少兩種藥學上可接受的鹽類，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，以及任選地(vi)一藥學上可接受的緩衝液。
2. 如請求項1之調配物，其中該調配物係為一水性調配物。
3. 如請求項1之調配物，其中該調配物係為一冷凍乾燥調配物。
4. 如請求項1或2之調配物，其中該(ii)至少一種聚合物係選自於下列的群組：聚乙烯吡咯烷酮與其衍生物，及其等之混合物。
5. 如請求項4之調配物，其中該聚乙烯吡咯烷酮或其衍生物具有一含括在10 kDa及40 kDa之間之分子量，較佳地介於15 kDa及30 kDa之間，且更佳地為25 kDa。
6. 如請求項4或5之調配物，其中該調配物包含介於10 g/L及50 g/L之間，較佳地介於15 g/L及40 g/L之間，且更佳地介於20 g/L及35 g/L之間的聚乙烯吡咯烷酮或其衍生物或其等之混合物。
7. 如前述請求項中任一項之調配物，其中該(iii)至少一種糖係擇自於單醣、雙醣、三醣和四醣及其等之衍生物。
8. 如請求項7之調配物，其中該調配物包含至少一種選自

於由下所構成之群組中的雙醣：蔗糖、乳酮糖、乳糖、麥芽糖、海藻糖、纖維雙糖、異麥芽糖及麥芽酮糖。

9. 如請求項7或8之調配物，其中該調配物包含介於20 g/L及80 g/L之間，較佳地介於30 g/L及70 g/L之間，且更佳地介於40 g/L及60 g/L之間的糖。
10. 如請求項9之調配物，其中該調配物包含50 g/L的蔗糖。
11. 如前述請求項中任一項之調配物，其中該(iv)至少兩種不同的胺基酸係擇自於丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺酸、天冬胺酸鹽、半胱胺酸、麩醯胺酸、麩胺酸鹽、甘胺酸、組胺酸、異亮胺酸、亮胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、吡咯離胺酸、硒半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸與纈胺酸及其衍生物，包括兩種立體異構物。
12. 如請求項11之調配物，其中該調配物包含介於5 g/L及100 g/L之間，且較佳地介於5 g/L及80 g/L之間的精胺酸。
13. 如請求項11或12之調配物，其中該調配物包含介於1 g/L及10 g/L之間，且較佳地介於1 g/L及5 g/L之間的麩胺酸鹽。
14. 如前述請求項中任一項之調配物，其中該等鹽類中至少一者為磷酸鹽，且係選自於由下列所構成之群組：鈉鹽及鉀鹽，以及其等之組合。
15. 如請求項14之調配物，其中該磷酸鹽係選自於由下列所構成之群組：單鹼磷酸鹽、二鹼磷酸鹽及三鹼磷酸

鹽。

16. 如請求項14或15之調配物，其中該調配物進一步包含一額外的藥學上可接受的單價鹽。
17. 如請求項16之調配物，其中該額外的藥學上可接受鹽類係選自於由NaCl與KCl所構成之群組，且較佳地為NaCl。
18. 如請求項16或17之調配物，其中該調配物包含介於1 g/L及5 g/L之間的該額外的藥學上可接受鹽類。
19. 如前述請求項中任一項之調配物，其中該(i)以病毒為基礎的材料係為一野生型、減毒或重組病毒或病毒顆粒。
20. 如請求項19之調配物，其中該以病毒為基礎的材料係為一選自於由下列所構成之群組中的病毒或病毒顆粒：牛痘病毒(VV)與經修飾的安卡拉牛痘病毒(MVA)。
21. 如請求項20之調配物，其中該以病毒為基礎的材料係為一選自於由下列所構成之群組中的重組MVA：一表現HCV NS3、NS4及NS5B抗原之MVA；一表現MUC-1抗原及IL-2之MVA；及一表現HPV-16之非致癌E6與E7抗原，及IL-2的MVA。
22. 如請求項20之調配物，其中該以病毒為基礎的材料係為一選自於由下列所構成之群組中的重組牛痘病毒：一表現一免疫刺激細胞激素的胸苷激酶(TK-)去活化的牛痘病毒，其中該免疫刺激細胞激素係為一顆粒球巨噬細胞群落刺激因子；及一表現一自殺基因的胸苷激酶(TK-)

及核糖核苷酸還原酶(I4L-)雙重去活化的牛痘病毒。

23. 如請求項19至22中任一項之調配物，其中該調配物中之病毒效價係含括於 1.10^6 Pfu/mL與 1.10^{10} Pfu/mL之間。

圖式

1/2

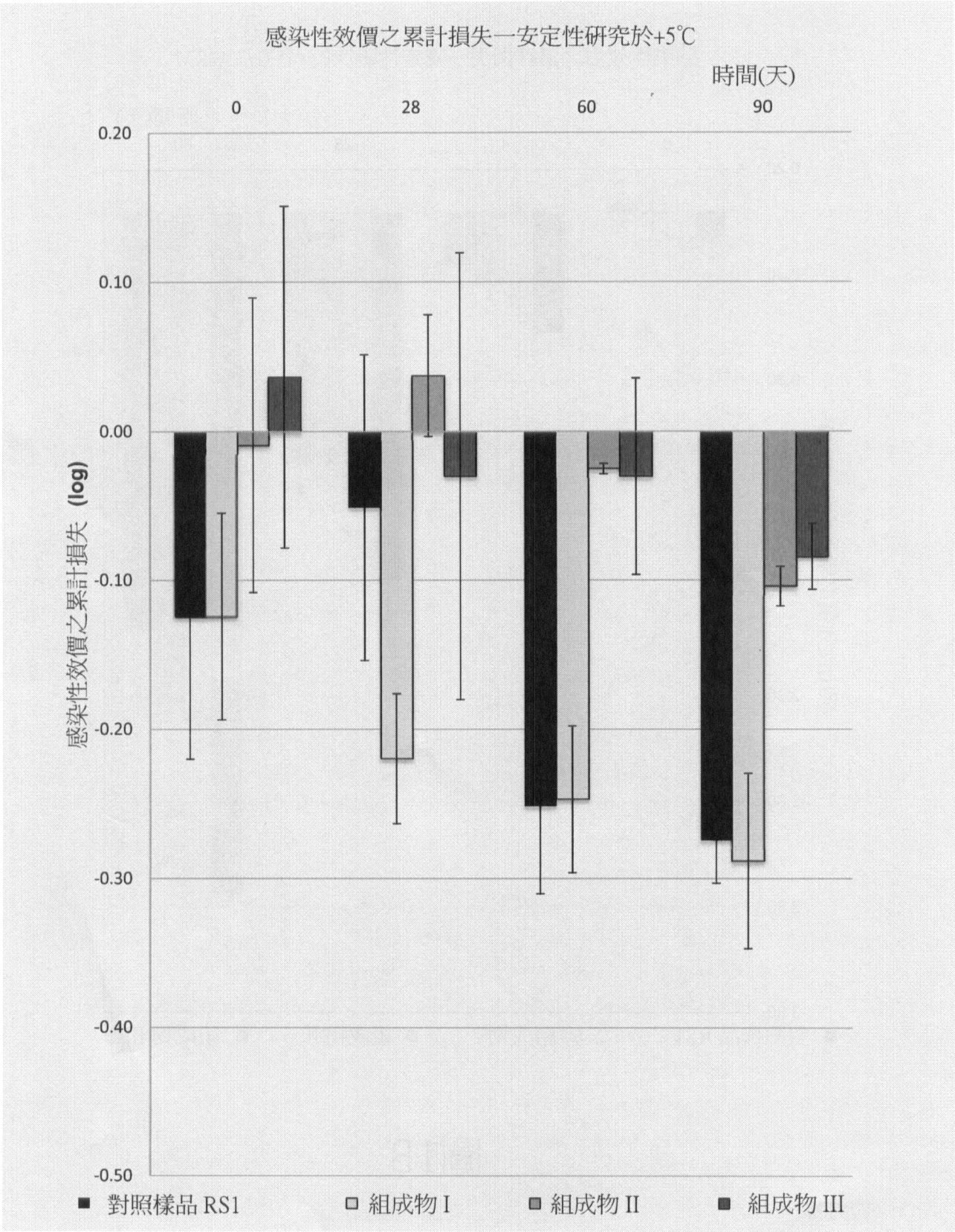


圖1A

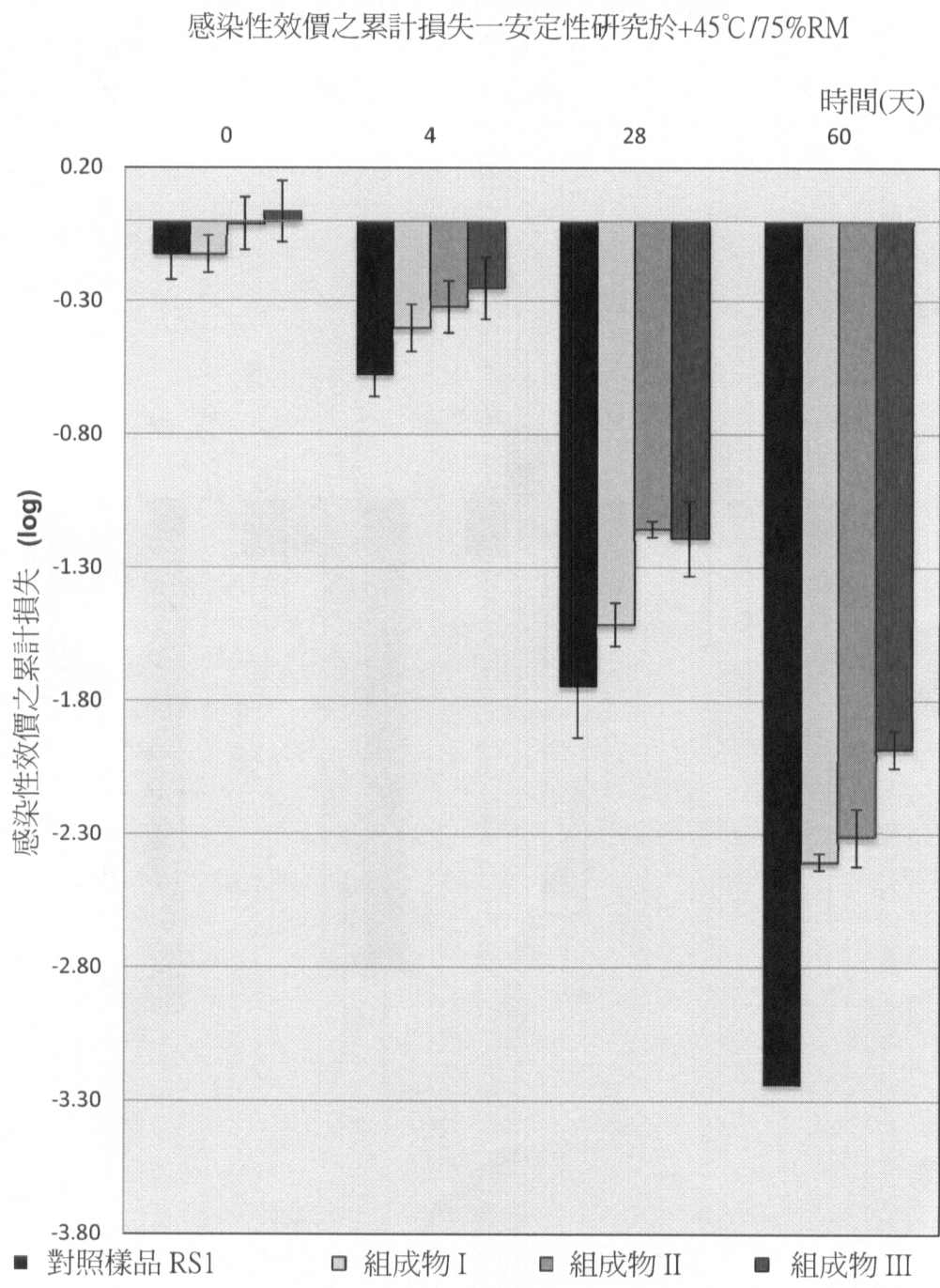


圖1B