



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I624474 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：103110044 (22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 17 日
(51)Int. Cl. : C07K14/33 (2006.01) A61K39/08 (2006.01)
(30)優先權：2013/03/15 美國 61/790,423
(71)申請人：賽諾菲巴斯德有限公司 (美國) SANOFI PASTEUR, INC. (US)
美國
(72)發明人：豪瑟 史蒂芬 HAUSER, STEVEN (US)
(74)代理人：陳長文
(56)參考文獻：
WO 1999020304A1 WO 2009035707A1
審查人員：劉建宏
申請專利範圍項數：18 項 圖式數：3 共 39 頁

(54)名稱

類毒素、組合物及相關方法

TOXOIDS, COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

(57)摘要

本發明大體上係關於毒素失活之領域。更特定言之，其係關於梭菌毒素、使此等毒素失活之方法及包含類毒素(例如藉由此等方法產生之類毒素)之組合物(例如疫苗)。提供產生困難梭菌類毒素之方法，該方法包含用甲醛使困難梭菌毒素失活。藉由此等方法製備之類毒素在高溫(例如 37°C)下穩定，且在最少殘餘甲醛下保持非細胞毒性。

The disclosure relates to generally to the field of toxin inactivation. More specifically, it relates to clostridial toxins, methods of inactivating these toxins and compositions (e.g., vaccines) comprising toxoids (e.g., produced by these methods). Provided are methods of producing a *C. difficile* toxoid comprising inactivating a *C. difficile* toxin with formaldehyde. Toxoids prepared by these methods are stable at high temperature (e.g., 37°C) and remain non-cytotoxic with minimal residual formaldehyde.

指定代表圖：

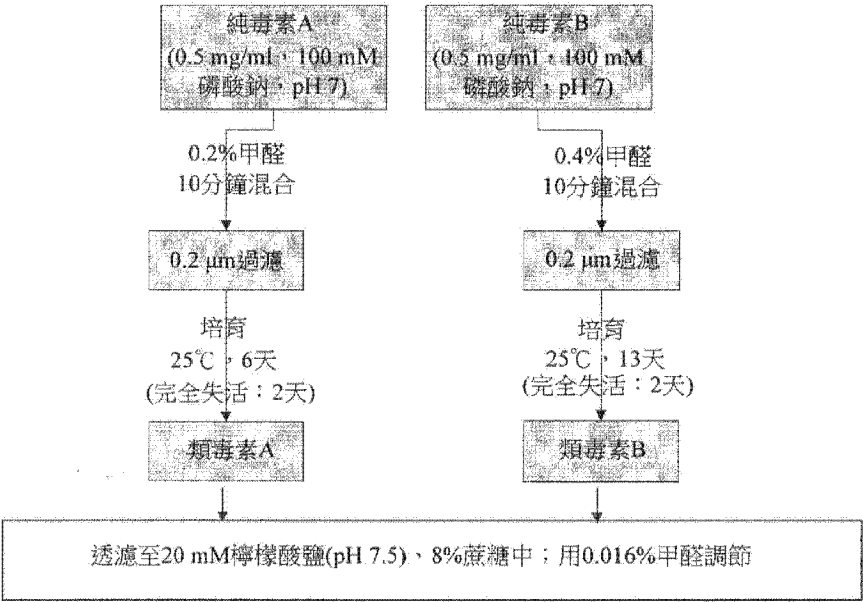


圖2

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】

類毒素、組合物及相關方法

TOXOIDS, COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

相關申請案

本申請案主張2013年3月15日申請之美國第61/790,423號之優先權，其藉此以全文併入本申請案中。

【技術領域】

本發明大體上係關於毒素失活之領域。更特定言之，其係關於梭菌毒素、使此等毒素失活之方法、及包含所得類毒素之組合物(例如疫苗)。

【先前技術】

可使用熟習此項技術者熟知之化學劑(諸如甲醛、戊二醛或 β -丙內酯)來使細菌毒素失活。失活毒素(亦稱為類毒素)在某些情況下可反轉或重獲細胞毒性。

一種困難梭菌(*C. difficile*)疫苗為經福馬林失活之疫苗，該疫苗含有自困難梭菌菌株ATCC 43255之厭氧培養物純化的類毒素A及B。該等毒素可單獨經純化、失活(類毒素化)、且以靶向類毒素A:類毒素B比率(例如3:2)混合。毒素A及B的福馬林介導之類毒素化藉由防止細胞毒性來在界定及控制藥品之許多產品特徵及質量屬性中及最重要的是在疫苗之安全性中起主要作用。

已公開用於用甲醛使困難梭菌毒素A及B失活之方法。舉例而言，美國專利第6,669,520號描述與4.25% mg/ml甲醛一起在4°C下培育

18天的經部分純化之困難梭菌毒素A及B之混合物。所得類毒素混合物用於製備含有或不含甲醛之調配物。在不存在殘餘福馬林之情況下，在較高溫度(28°C-37°C)下發生毒性形式之部分反轉，其中類毒素經數天或數週而重獲可偵測之生物活性。雖然殘餘甲醛可用於防止反轉，但仍需要限制存在於疫苗中之甲醛量(例如以滿足由一些管理機構所設定之需求)。在此項技術中需要在高溫(例如37°C)下保持穩定性且含有最少之殘餘甲醛的類毒素，以尤其滿足由各種藥物管理機構所設定之需求。本文所描述之方法提供在高溫下穩定且僅含有殘餘福馬林之類毒素。本發明提供該等方法及其另外之優點。

【發明內容】

本發明提供用於製備類毒素之方法及試劑，該類毒素在高溫下穩定且僅含有最少之福馬林(例如殘餘甲醛)。例示性方法藉由以下步驟以及其他步驟來產生在高溫(例如37°C)下穩定且含有較低量(例如殘餘量)之甲醛的類毒素組合物：藉由與大致為0.15%至約0.5%中之任何量(例如大致為0.2%至0.8%中之任何量，諸如對類毒素A為約0.2% (例如0.21%)及/或對類毒素B為約0.4% (例如0.42%))的甲醛(w/v)一起在適當溫度(例如大致為17°C至32°C中之任何溫度(例如約25°C))下培育適量時間(例如約2至約30天)來使經純化之毒素A及經純化之毒素B失活(例如使得各別毒素失活為相應類毒素)。類毒素可隨後經組合以產生含有類毒素之免疫組合物及/或疫苗，該組合物及/或疫苗僅含有殘餘量之甲醛(例如大致為0.0001%至0.025%中之任何量，諸如0.004%、0.008%或0.016% (w/v))。類毒素免疫組合物可呈凍乾形式，該形式所含有的用於向宿主投與之甲醛濃度(例如約0.016%甲醛(w/v))可比自其復原之組合物所含有的甲醛濃度(例如大致為0.001%、0.004%或0.008%中之任一者的甲醛(w/v))更高。本發明提供用於產生類毒素及包含該等類毒素之組合物(包括免疫組合物及/或疫苗)以及其中間物

(例如單獨包含類毒素A或類毒素B之組合物)的方法。如對一般技術者而言將為顯而易見的，在本發明中提供其他實施例。

【圖式簡單說明】

圖1為細胞毒性分析之結果的圖形表示。使用來自根據所描述之方法(實例2)經歷滅活之毒素A及毒素B中之每一者的一個物料之樣品來進行使用IMR90細胞之細胞毒性分析。在第0天取得樣品，在添加甲醛以使毒素失活之後，且在多天後評估材料之細胞毒性。y軸識別在毒性物質存在下50%細胞變圓(相較於其正常條紋形態)之最小濃度(MC50)。分析偵測值之下限(LOD)使用虛線來識別。

圖2為一種使困難梭菌毒素A及毒素B失活之例示性方法的示意性圖示。

圖3為來自免疫接種研究之結果的圖形表示。在於倉鼠攻擊模型(使用5組，9隻倉鼠/組)中所進行之研究(描述於實例2中)中，根據所描述之方法製備類毒素A及類毒素B，組合，且調配為凍乾組合物。在疫苗接種之前，使組合物復原且與佐劑混合。向一個倉鼠組投與安慰劑。為其他四個倉鼠組中之每一者製備人類劑量(HD)之組合物(100微克/劑)的四種不同稀釋液。在X軸上識別所投與之組合物(亦即安慰劑或HD稀釋液)。所測定的在投與致死性攻擊劑量之困難梭菌之後的各組之存活率%如圖形所示。

【實施方式】

本發明提供用於製備梭菌類毒素之方法、藉由此等方法製備之梭菌類毒素、及包含此等類毒素之組合物。本文中尤其受關注者為困難梭菌毒素A及/或B及/或其衍生物(例如基因脫毒版本、截斷形式、片段、及其類似物)。出於本發明之目的，毒素A及/或毒素B可包括任何困難梭菌毒素，該困難梭菌毒素可使用此項技術中之標準技術來識別為毒素A及/或毒素B。例示性技術可包括例如免疫分析(諸如

ELISA)、點漬墨法或活體內分析。適用於進行該等識別之試劑可包括例如抗毒素A家兔多株抗血清(例如Abcam[®]產品第ab35021號或Abcam[®]產品第ab93318號)或抗毒素A小鼠單株抗體(例如Abcam[®]產品第ab19953號(mAb PCG4)或第ab82285號(mAb B618M)中之任一者)、抗毒素B家兔多株抗血清(例如Abcam[®]產品第ab83066號)或抗毒素B小鼠單株抗體(例如Abcam[®]產品第ab77583號(mAb B428M)、第ab130855號(mAb B423M)或第ab130858號(mAb B424M)中之任一者)(所有均可購自Abcam[®] (Cambridge, MA))。

本發明提供用於製備梭菌類毒素之方法、藉由此等方法製備之梭菌類毒素、及包含此等類毒素之組合物。本文中尤其受關注者為困難梭菌毒素A及/或B及/或其衍生物(例如基因脫毒版本、截斷形式、片段、及其類似物)。出於本發明之目的，毒素A及/或毒素B可包括任何困難梭菌毒素，該困難梭菌毒素可使用此項技術中之標準技術來識別為毒素A及/或毒素B。例示性技術可包括例如免疫分析(諸如ELISA)、點漬墨法或活體內分析。適用於進行該等識別之試劑可包括例如抗毒素A家兔多株抗血清(例如Abcam[®]產品第ab35021號或Abcam[®]產品第ab93318號)或抗毒素A小鼠單株抗體(例如Abcam[®]產品第ab19953號(mAb PCG4)或第ab82285號(mAb B618M)中之任一者)、抗毒素B家兔多株抗血清(例如Abcam[®]產品第ab83066號)或抗毒素B小鼠單株抗體(例如Abcam[®]產品第ab77583號(mAb B428M)、第ab130855號(mAb B423M)或第ab130858號(mAb B424M)中之任一者)(所有均可購自Abcam[®] (Cambridge, MA))。

本文提供用於藉由以下步驟中之一或多者來產生在高溫(例如37°C)下穩定且含有較低量甲醛之困難梭菌類毒素組合物的方法：1)提供包含毒素A及毒素B之困難梭菌培養物；2)自該培養物純化毒素A及毒素B，以提供各毒素之單獨組合物；3)藉由與大致為0.15%至約

0.5%中之任何量(例如大致為0.2%至0.8%中之任何量，諸如對類毒素A為約0.2% (例如0.21%)及/或對類毒素B為約0.4% (例如約0.42%))的甲醛(w/v)一起在適當溫度(例如大致為17°C至32°C中之任何溫度(例如約25°C))下培育適量時間(例如約2至約21天)來使經純化之毒素A及經純化之毒素B失活(例如使得各別毒素失活毒素相應類毒素)以分別生成類毒素A及類毒素B組合物；及4)將類毒素組合以產生類毒素免疫組合物及/或疫苗，該組合物及/或疫苗僅含有殘餘量之甲醛(例如大致為0.0001%至0.025%中之任何量，諸如大致為0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01%、0.016%、0.02%或0.025% (w/v)中之任一者(較佳地大致為0.004%或0.008%中之任一者)。雖然通常以組合物之百分比(重量/體積(「w/v」))來提及組合物中所含有之甲醛量，但基於諸如蛋白質濃度之某些因素來調節化學計量可為至關重要的。舉例而言，本文所涵蓋的適合之甲醛濃度為將在個別之毒素A及/或毒素B多肽內提供分子間交聯而不亦使多肽與彼此實質上交聯(例如不產生分子間交聯)的一種甲醛濃度。如實例中所示，包含0.5 mg/ml毒素A之組合物可僅需要0.21% (w/v)甲醛。然而，包含較高濃度之毒素A的組合物可需要較高或較低濃度之甲醛，以在不亦產生大量分子間交聯之情況下產生必需分子內交聯(例如類毒素化)。相同原理可適用於毒素B之類毒素化。適合用於特定組合物之條件可由一般技術者使用本文所描述之技術或如可在此項技術中獲得之技術來確定。舉例而言，特定量之甲醛是否對使組合物中之特定毒素類毒素化有效可使用描述於實例部分中的細胞毒性分析、陰離子交換層析、尺寸排外層析、胺含量分析、抗原性及免疫原性分析中之任何一或多者來測定。亦應理解雖然本文使用甲醛，但如由一般技術者所確定，可用其他類似試劑對其進行取代。舉例而言，在一些實施例中，甲醛可由戊二醛取代。另外，亦應理解雖

然本文使用磷酸鹽緩衝劑中之類毒素化，但如由一般技術者所確定，可用其他類似試劑對其進行取代。舉例而言，在一些實施例中，緩衝劑含有甘胺酸及/或離胺酸。雖然進行該取代可需要不同濃度，但該取代之適合條件可使用本文所描述之技術(例如描述於實例部分中的細胞毒性分析、陰離子交換層析、尺寸排外層析、胺含量分析、抗原性及免疫原性分析中之任何一或多者)來確定。

在某些實施例中，毒素A可與適量甲醛(例如約0.2%甲醛)混合適量時間(例如大致為1至60分鐘中之任何時間，諸如十分鐘)以產生類毒素A，且隨後在適當溫度(例如約25°C)下培育適量時間(例如約2至21天，諸如約6至12天之間的任何時間(例如約6天))。在一些較佳實施例中，如本文實例中所示，可藉由將毒素A在包含約0.21% (w/v) 甲醛之調配物中於約25°C下培育約6至約12天來將毒素A轉化為類毒素A。在某些實施例中，毒素B可與適量甲醛(例如約0.42%)混合適量時間(例如大致為1至60分鐘中之任何時間，諸如十分鐘)，且隨後在適當溫度(例如約25°C)下培育適量時間(例如約2至30天，諸如約13-21天之間的任何時間(例如約21天))以產生類毒素B。在一些較佳實施例中，如本文實例中所示，可藉由將混入包含約0.42% (w/v) 甲醛之調配物中的毒素B在約25°C下培育約13至約20天來將毒素B轉化為類毒素B。甲醛可自37%甲醛儲備溶液以所需量引入(例如無菌地引入)包含毒素A或毒素B之溶液中，繼而培育一段時間(例如五至十分鐘)且在適當溫度及時間下(例如2-8°C持續多天)儲存。在某些實施例中，可組合經純化之毒素A及經純化之毒素B，且隨後與適量甲醛(例如約0.42%)混合適量時間(例如大致為1至60分鐘中之任何時間，諸如10分鐘)，且隨後在適當溫度(例如約25°C)下培育適量時間(例如約2至30天，諸如大致為約13-21天之間的任何時間(例如約21天))以產生類毒素A及B。類毒素可含於適合之緩衝劑(例如大致為20-150 mM中之任何濃度(例如

100 mM)的磷酸鹽，pH 7.0)中。類毒素A及類毒素B組合物可隨後在適合之緩衝劑(例如藉由透濾至適當緩衝劑中，諸如20 mM檸檬酸鹽(pH 7.5)、5%-8%蔗糖(例如8%))中組合以產生類毒素A/B免疫組合物及/或疫苗(例如其在本文中可總體稱為「組合物」)。該等組合物亦可使用標準技術以凍乾形式製備。因此，在一些實施例中，類毒素免疫組合物可呈凍乾形式，該形式所含有之甲醛濃度可例如比自其復原之組合物(例如藥品)所含有的甲醛濃度更高。舉例而言，凍乾組合物可包含約0.016% (w/v)甲醛，但在復原以用於向宿主投與之後，組合物(例如藥品)可包含小於0.016% (w/v) (例如大致為0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01% (w/v)中之任一者)的甲醛。則在一些實施例中，類毒素A/B免疫組合物及/或疫苗(例如「藥品」)可包含大致為0.0001%至0.025%中之任何量(例如大致為0.001%、0.002%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.01%、0.016%、0.02%或0.025% (w/v)中之任一者)的甲醛(w/v) (例如「殘餘甲醛」)。已發現在藥品中摻雜殘餘甲醛為尤其有益的，因為其可減少及/或防止類毒素A及/或類毒素B分別反轉為毒素A或毒素B，其中該組合物維持在較高溫度(例如4°C以上，諸如室溫或37°C)下一段時間(例如約六週)。應注意，在一些情況下，甲醛之量可增加以減少毒素失活時間。最終組合物(例如免疫組合物、疫苗)將僅包括殘餘量之甲醛。如實例中所示，此等過程意外地提供具有有利生物化學及功能特性的含有免疫類毒素A/B之組合物。

在某些實施例中，在本文所描述之方法中的任何時間點處調控可干擾其中甲醛之功能的某些緩衝劑組分之量可為有益的。舉例而言，TRIS具有胺基，該胺基可與蛋白質有效競爭甲醛介導之修飾，藉此降低反應混合物中之有效甲醛濃度。因此，將其中產生毒素及/或類毒素之組合物中的TRIS之量維持為較低量可為有益的。舉例而

言，毒素製劑中之殘餘TRIS值可降低至更適合之量(例如約1至約5 $\mu\text{g/ml}$ 以下(例如1 $\mu\text{g/ml}$ (例如偵測限以下)或5 $\mu\text{g/ml}$)。如實例中所示，藉由使用例如切向流過濾(例如用扁材(flat stock) Millipore PES50K)來將經純化之毒素A及/或經純化之毒素B透濾至25 mM Tris (例如以移除 MgCl_2)，且隨後透濾至磷酸鹽緩衝劑(例如100 mM PO_4 ，pH 7)可意外地使毒素製劑中之殘餘TRIS值降低至更適合之量(例如1 $\mu\text{g/ml}$ 以下)(例如相較於空心纖維或其他類型之膜)。在一些實施例中，所得TRIS之較低濃度可使吾人更有效地調節使類毒素化過程起作用所需的甲醛之量。其他實施例可涉及例如使用不含胺基之緩衝劑(例如MEM、乙酸鹽、檸檬酸鹽)及/或pH值受控之水溶液(例如向其中添加有酸或鹼之鹽水或水)。

因此，在一些較佳實施例中，在類毒素化反應中，參可由另一種緩衝劑(諸如磷酸鹽緩衝劑)替換。舉例而言，如實例中所描述，澄清困難梭菌培養物濾液可加工(例如濃縮及諸如藉由切向流過濾而透濾)至Tris緩衝劑(例如50 mM Tris/ NaCl /0.2 mM EDTA/1 mM DTT，pH 7.5)中。所得溶液可隨後經過濾(例如使用膜過濾器)、將硫酸銨濃度調節至約適量(例如至約0.4 M)，且隨後進行另一個過濾(例如使用膜過濾器)。隨後可使含有困難梭菌毒素A及毒素B之此水溶液經受疏水性相互作用層析，且結合至尺寸排外(例如瓊脂糖)管柱上之毒素可用Tris緩衝劑洗滌。困難梭菌毒素可隨後用含有DTT及IPA之Tris緩衝劑溶離，合併，且使用WFI將導電性調節至約9 mS或9 mS以下。此等困難梭菌毒素(在經合併之溶離液中)可隨後藉由另一種方法(諸如涉及用Tris緩衝劑進行平衡之陰離子交換層析)來進一步純化。可隨後用低鹽Tris緩衝劑溶離毒素A，及用高鹽Tris緩衝劑溶離毒素B。含有經純化之毒素A或經純化之毒素B的溶液可隨後各自經濃縮且透濾至磷酸鹽緩衝劑(諸如100 mM PO_4 ，pH 7)中(其中殘餘TRIS值較佳為約1至約5

μg/ml以下)。已發現較低濃度之磷酸鹽(例如 20 mM)可能為不適當的，且可能導致多聚化(其應儘可能減到最少)增加。因此，較佳的適合之磷酸鹽緩衝劑可包括自約 20 mM 以上直至約 200 mM 的任何濃度之磷酸鹽，諸如大致為 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195 或 200 mM 中之任一者。如本文實例中所示，隨後可藉由將毒素 A 與 100 mM PO_4 (pH 7)中包含約 0.21% (w/v) 甲醛之調配物在約 25°C 下混合約六天來將毒素 A 轉化為類毒素 A。且在一些較佳實施例中，如本文實例中所示，可藉由將毒素 B 與 100 mM PO_4 (pH 7)中約 0.41% (w/v) 甲醛之調配物在約 25°C 下混合約 13 天來將毒素 B 轉化為類毒素 B。如一般技術者將理解的，亦涵蓋其他適合之緩衝劑。

一般技術者可藉由分析特定條件(例如緩衝劑(或其組分)、時間、溫度)來測定其是否適用於製備及/或維持類毒素 A 及/或類毒素 B 組合物，以確定組合物之特徵是否為可接受的。舉例而言，組合物可使用細胞毒性分析(例如使用 IMR-90 細胞系(參見例如實例)或非洲綠猴腎細胞(Vero cell))、陰離子交換高效液相層析(AEX-HPLC)、尺寸排外高效液相層析(SEC-HPLC)、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、使用 280 nm 處之吸光度而量測的濃度、反轉分析(參見例如實例)、及/或活體內效能分析(例如實例中所描述之倉鼠效能分析)來進行測試。在有利條件下製備之組合物通常可展現以下各者中之任何一或多者：對在細胞毒性分析中監測之細胞細胞毒性極小或無細胞毒性；AEX-HPLC 及/或 SEC-HPLC 層析圖顯示類毒素之多聚化極少或沒有(或至少在一種條件下比另一種條件更少，更少者較佳)；ELISA/A280 值較接近 1 (例如與在不利條件下製備之組合物相比，且通常可展現較遠離 1 之 ELISA/A280 值)；在測試時間段期間自類毒素至毒素之反轉極少或不

反轉；及/或在活體內分析期間之免疫原性(例如在倉鼠效能分析中，Log10效價為4.8或更高)。如由一般技術者可測定的，其他方法亦可用於進行此等測定。

本文所描述之方法可適用於來自困難梭菌之幾乎任何菌株的毒素。困難梭菌之較佳菌株為產生毒素A及/或B之菌株，且包括例如(但不限於)0毒素型菌株(例如VPI10463/ATCC43255、630)、III毒素型菌株(例如027/NAP/B1)、V毒素型菌株(例如078)及VIII毒素型菌株(例如017)。方法亦可適用於使用重組型方法產生之困難梭菌毒素。毒素(例如毒素A及/或毒素B)可使用此項技術中已知之方法(例如美國專利第6,669,520號)來自困難梭菌之培養物濾液純化。自困難梭菌之培養物濾液純化毒素的例示性方法描述於本文實例中。毒素之純度較佳大致為75%、80%、85%、90%、95%、99%或99%以上中之任一者。毒素可一起或單獨地失活。舉例而言，經純化之毒素可以所需毒素A:毒素B比率(例如3:1、3:2、5:1、1:5)混合且隨後失活，或可單獨失活。較佳使毒素單獨失活以產生類毒素。本文使用術語「類毒素」來描述已藉由化學處理而部分或完全失活之毒素。如例如藉由活體外細胞毒性分析或藉由活體內分析所量測的，若毒素之毒性比未經處理之毒素少(例如毒性為100%、99%、95%、90%、80%、75%、60%、55%、50%、25%或10%或10%以下)，則將該毒素成為失活的。如本文所揭示，使用甲醛處理來使毒素失活。其他可能之化學手段包括例如戊二醛、過氧化物、 β -丙內酯或氧氣處理。

失活可藉由將毒素與防止類毒素反轉為毒素的一定量之甲醛一起培育來進行。反轉可藉由在包含經純化之毒素A或毒素B之緩衝劑中包括適合量之甲醛來防止。甲醛在緩衝劑中之量可經調節以維持防止反轉的適當濃度之甲醛。為此目的，可在緩衝劑(及/或醫藥組合物)中包括殘餘濃度之甲醛。甲醛之殘餘濃度為防止反轉且/或對投與本

文所描述之組合物的個人呈現較低之副作用風險的濃度。舉例而言，殘餘甲醛濃度可介於大致為0.0001%至0.025%中之任何甲醛濃度(w/v) (例如大致為0.004%、0.008%、0.016%、或約0.01%中之任一者)、約0.001%至約0.020% (w/v)、約0.004%至約0.020% (w/v) (例如約0.016%±0.04%)、或約0.004%至0.010% (w/v) (例如約0.008%)之範圍以及其他範圍內。防止反轉通常見於其中藉由活體外分析(諸如藉由本文所描述之活體外分析)，在於37°C下儲存之後未觀測到可偵測之細胞毒性的情況(參見例如實例中之細胞毒性分析)。「實質上」防止反轉通常意謂藉由描述於實例中之活體外分析，在於37°C下儲存之後，10%或10%以下之類毒素反轉為毒素。適合之活體外細胞毒性分析可為使用例如非洲綠猴腎細胞的基於細胞之螢光分析。另一種適合之活體外細胞毒性分析可使用IMR90細胞(例如ATCC®登錄號CCL-186)來進行。測試物質(例如類毒素)之毒性可測定為50%之細胞與其正常條紋形態相比變圓的最小濃度(例如MC-50)。如本文實例中所描述，包含藉由本文所描述之方法製得之類毒素及0.008%或0.008%以下之甲醛的疫苗組合物顯示，藉由活體外分析，在於37°C下儲存之後，無可偵測之細胞毒性。物理化學分析(例如陰離子交換層析)亦可用於確認反轉，但活體外細胞毒性分析可更具資訊性。類毒素之效能亦可藉由倉鼠活體內效能分析(其量測log10抗毒素A或抗毒素B IgG效價之平均值)來量測。

在一些實施例中，可自37%甲醛溶液向毒素中添加適當量之甲醛。在添加甲醛之前，毒素較佳在適合之緩衝溶液(例如100 mM磷酸鈉緩衝劑，pH 7.0)中。其中毒素濃度可為例如約0.1至約5 mg/mL (例如0.5 mg/mL)。為開始失活過程，可首先使毒素與適合濃度(例如約0.1%至約0.6%)之甲醛混合適合之時間段(例如十分鐘)。舉例而言，可將經純化之毒素A (經純化之毒素A於100 mM磷酸鈉中的0.5 mg/ml

溶液，pH 7.0)在約0.2%甲醛中混合約十分鐘。且可將經純化之毒素B (例如經純化之毒素B於100 mM磷酸鈉中的0.5 mg/ml溶液，pH 7.0)在約0.4%甲醛中混合約十分鐘。隨後可過濾(例如使用0.2 μ m膜過濾器)該等混合物以移除可影響藉由280 nm處吸光度得到之蛋白質濃度的小蛋白質聚集體(例如允許以預定類毒素A:類毒素B比率精確調配醫藥組合物)。失活可隨後藉由將混合物培育約1至約21天(例如約2天、約6天或約13天)來繼續。舉例而言，可將毒素A混合物在適合之溫度(例如約25°C)下培育13天或13天以下(例如約2天、約6天或約13天)。可將毒素B混合物在適合之溫度(例如約25°C)下培育21天或21天以下(例如約2天、約6天、或約13天)。以此方式，可提供類毒素A及/或類毒素B之製劑。該等製劑通常包含至少大致為90%、95%、99%或100%中之任一者的類毒素(例如失活毒素)。

儘管此等類毒素製劑可與緩衝劑直接混合，但較佳將該等製劑濃縮且透濾至適當的緩衝溶液中。濃縮及透濾較佳使用切向流過濾來進行，以在確保移除甲醛且交換至緩衝劑中的同時使蛋白質剪切最小化。緩衝劑較佳包括至少一種或多種醫藥學上可接受之賦形劑，該等賦形劑增加類毒素之穩定性及/或延遲或減少類毒素之聚集。適用之賦形劑包括例如(但不限於)糖(例如蔗糖、海藻糖)或糖醇(例如山梨糖醇)及鹽(氯化鈉、氯化鉀、氯化鎂、乙酸鎂)或其組合。另外，適合之賦形劑可為描述於例如美國專利公開案2011/045025 (第12/667,864號)中之彼等賦形劑中的任一者。在失活之後，失活毒素(亦即類毒素)之溶液可經濃縮及/或超過濾及/或透濾，且儲存在適當之緩衝劑中(諸如(但不限於)約5至約100 mM (例如大致為5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100 mM中之任一者)的pH值為8.0或8.0以下(例如6.5-7.7，諸如大致為6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、

7.9或8.0中之任一者)的檸檬酸鹽、磷酸鹽、甘胺酸、碳酸鹽、碳酸氫鹽或其類似緩衝劑)(例如20 mM檸檬酸鹽, pH 7.5), 該等緩衝劑阻止或實質上阻止類毒素反轉為細胞毒性形式(例如反轉為毒素)。一種例示性緩衝劑可為例如20 mM檸檬酸鹽(pH 7.5)、5%-8%蔗糖, 含有適含量之甲醛(例如0.016% (w/v))。如一般技術者所理解的, 其他緩衝劑及其類似物亦可為適合的。

類毒素可經調配以用作醫藥組合物(例如免疫原性及/或疫苗組合物)。舉例而言, 包含困難梭菌類毒素之組合物可藉由使類毒素懸浮在醫藥學上可接受之稀釋劑(例如生理鹽水)中或藉由使類毒素與醫藥學上可接受之載劑締合來製備以供投藥。該等醫藥調配物可包括此項技術中已知之一或多種賦形劑(例如稀釋劑、增稠劑、緩衝劑、防腐劑、佐劑、清潔劑及/或免疫刺激劑)。適合之賦形劑應與類毒素且與佐劑(在有佐劑之組合物中)相容, 其中其實例為一般技術者已知且可獲得的。組合物可呈液體形式, 或經凍乾(按照標準方法)或泡沫乾燥(如例如在美國專利公開案2009/110699中所描述)。一種例示性凍乾疫苗組合物可包含例如類毒素A及B、20 mM檸檬酸鹽、8%蔗糖、0.016%甲醛, pH 7.5。

為製備用於投藥之疫苗, 可用水溶液(諸如注射用水)或適合之稀釋劑或緩衝溶液來使乾燥組合物復原。在某些實例中, 如本文所描述, 稀釋劑包括甲醛。稀釋劑可包括具有或不具有甲醛之佐劑(例如氫氧化鋁)。例示性稀釋劑可為NaCl及氫氧化鋁之水溶液。該稀釋劑可用於使乾燥組合物復原。醫藥組合物可包含劑量為約10至150 $\mu\text{g/mL}$ (例如約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140或150 $\mu\text{g/mL}$ 中之任一者)的類毒素。注射劑量體積通常為約0.5 mL或1.0 mL。可增加或減少劑量以調節待在個體中誘導之免疫反應。類毒素可在存在或不存在佐劑之情況下, 以可由熟習此項

技術者確定之量投與。所用佐劑包括鋁化合物，諸如氫氧化鋁、磷酸鋁及羥基磷酸鋁。

免疫及/或疫苗組合物可藉由經皮(percutaneous) (例如肌肉內、靜脈內、腹膜內或皮下)、透皮(transdermal)、經黏膜途徑以由熟習此項技術者確定為適當之量及方案向具有症狀性困難梭菌感染或具有出現該感染之風險的個體投與。此等個體群體包括例如已接受廣譜抗生素之個體，諸如住院老年患者、老人安養院居住者、長期生病患者、癌症患者、AIDS患者、特護病房中之患者及接受透析治療之患者。疫苗可投與1、2、3、4或4次以上。當投與多個劑量時，劑量可彼此間隔例如一週、一月或若干月。因此，本發明亦提供誘發針對毒素、類毒素及/或困難梭菌之免疫反應的方法，其藉由向個體投與醫藥組合物來進行。此可藉由向個體投與本文所描述之醫藥組合物(例如免疫原性組合物及/或疫苗)以實現使該個體之免疫系統暴露於類毒素中來達成。因此，免疫原性組合物及/或疫苗可用於預防及/或治療症狀性困難梭菌感染。

組合物可包括於套組(例如疫苗套組)中。舉例而言，套組可包含第一容器，該第一容器含有呈乾燥形式的本文所描述之組合物，及第二容器，該第二容器含有用於使該組合物復原之水溶液。套組可視情況包括用於投與組合物之復原液體形式的裝置(例如皮下注射器、微針陣列)及/或使用說明書。因為已發現如本文所描述之組合物在於適度溫度(例如約2°C-8°C)及較高溫度(例如約15°C、25°C、37°C或37°C以上)下儲存一定時間間隔之後可具有良好穩定性且保持非細胞毒性，所以該等套組為可能的。在某些實例中，如下文中進一步描述，組合物在於37°C下儲存之後保持-細胞毒性(例如無反轉跡象)。

因此，本發明提供用於產生困難梭菌類毒素之方法，其藉由例如與約0.15%-0.5%甲醛(w/v)一起在約17°C-32°C下培育約2至約21天以

使經純化之困難梭菌毒素A及/或經純化之困難梭菌毒素B失活來進行。在一些實施例中，可將毒素A與約0.2%甲醛一起在約25°C下培育約2天以產生類毒素A。在一些實施例中，將毒素B與約0.4%甲醛一起在約25°C下培育約13天以產生類毒素B。亦提供包含藉由該等方法製備之類毒素A及/或類毒素B的組合物。亦提供用於製備包含經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B的免疫原性組合物的方法，其藉由將經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B與包含殘餘量之甲醛(例如大致為0.001%至0.025%中之任何量，諸如大致為0.004%、0.008%或0.016% (w/v)中之任一者)的組合物組合來進行。在一些實施例中，該等方法可提供在37°C下穩定長達約六週的困難梭菌類毒素A及/或經純化之困難梭菌類毒素B之組合物。因此，在一些實施例中，本文所描述之方法亦可包含藉由與約0.15%-0.5%甲醛(w/v)一起在約17°C-32°C下培育約2至約21天來使經純化之困難梭菌毒素A或經純化之困難梭菌毒素B失活；及將困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B與包含殘餘量之甲醛的組合物組合。藉由該等方法製備之困難梭菌類毒素A及B組合物可在37°C下穩定長達約六週。甲醛在該等組合物中之殘餘量可大致為0.001%至0.025%、0.004%、0.008%或0.016% (w/v)中之任一者。組合物亦可包含約20 mM檸檬酸鹽(pH 7.5)、4%至8%蔗糖、及0.016%甲醛。在一些實施例中，組合物可經凍乾。此等方法亦可包含提供包含毒素A及毒素B之困難梭菌培養物，及自該培養物純化毒素A及毒素B。亦提供根據此等方法產生之困難梭菌類毒素A或B。在一些實施例中，該等組合物為疫苗(例如提供針對症狀性困難梭菌感染之保護性、預防性及/或治療性反應的組合物)。組合物(例如疫苗組合物)可以5:1至1:5 (諸如3:1或3:2)之A:B比率包含類毒素A及類毒素B。在一些實施例中，組合物可經凍乾、冷凍乾燥、噴霧乾燥或泡沫乾燥，或呈液體形式。該等組

合物可包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。組合物可包括緩衝劑(諸如檸檬酸鹽、磷酸鹽、甘胺酸、碳酸鹽或碳酸氫鹽緩衝劑)或pH值受控之水溶液、及/或一或多種糖(例如蔗糖、海藻糖)及/或糖醇(山梨糖醇)。其他實施例對一般技術者而言將為顯而易見。

「經純化之」毒素通常意謂該毒素已例如自培養物濾液分離且至少在一定程度上使用此項技術中已知之方法純化。舉例而言，本文描述純化毒素之例示性方法。在一些實施例中，經純化之毒素的純度可大致為75%、80%、85%、90%、95%、99%或99%以上中之任一者。類似地，「經純化之」類毒素可為純度大致為75%、80%、85%、90%、95%、99%或99%以上中之任一者的類毒素。

術語「約」、「大約」及其類似物在數值或範圍之列表之前時獨立地提及列表或範圍中之各個別值，如同該術語緊靠在該列表或範圍中之各個別值之前。該術語意謂其所提及之值為確切、接近或類似該值。舉例而言，術語「約」或「大約」可包括指定值的 $\pm 10\%$ 之值(例如「約 30°C 」可意謂 27°C 至 33°C 之間的任何值，包括(但不限於) 30°C 。

如本文所用，個體或宿主意謂個別者。個體可包括馴養動物(諸如貓及狗)、家畜(例如牛、馬、豬、綿羊及山羊)、實驗室動物(例如小鼠、家兔、大鼠、天竺鼠)及鳥類。在一個態樣中，個體為哺乳動物，諸如靈長類或人類。

術語「培育」、「混合」及「儲存」(或其同義語及/或衍生物)可互換使用。舉例而言，毒素可與包含甲醛之溶液一起培育。該培育可視情況意謂例如組合物藉由運動(例如使用類似混合棒)主動組合，或維持為基本上停滯之狀態。

視情況選用(optional)或視情況(optionally)意謂隨後描述之事件或情形可能或不能發生，且該描述包括其中該事件或情形發生之情況及

其中該事件或情形不發生之情況。舉例而言，片語組合物視情況可包含組合意謂組合物可包含不同分子之組合或可不包括組合，以使得描述包括組合及組合(亦即組合之個別成員)不存在兩者。

範圍在本文中可表示為自約一個特定值及/或至約另一個特定值。當表示該範圍時，另一個態樣包括自一個特定值及/或至另一個特定值。類似地，當藉由使用前置約或大約來將值表示為近似值時，應理解特定值形成另一個態樣。進一步應理解範圍中之每一者的端點在相對於其他端點及獨立於其他端點時均為重要的。範圍(例如90-100%)意欲包括範圍本身以及該範圍內之各獨立值，如同單獨列出各值。

當本文中與對給定病狀之給定治療結合使用術語預防(prevent/preventing/prevention)(例如預防症狀性感染)時，其意謂表達待治療之個體完全未出現臨床上可觀測之量的病狀，或病狀出現比未進行治療者更緩慢及/或程度更低。此等術語不僅限於其中個體不經歷任何病狀之態樣的情況。舉例而言，若在將個體暴露於已預期將產生給定病狀表現之刺激中期間進行治療，且導致個體比其它方式之預期經歷更少及/或更輕病狀症狀，則將該治療稱為預防該病狀。治療可藉由使個體僅呈現溫和之明顯感染症狀來「預防」症狀性感染；其不暗示此處必須已無困難梭菌微生物存在。

類似地，如本文中與使用給定治療之感染風險結合使用的降低(reduce/reducing/reduction)(例如降低症狀性困難梭菌感染之風險)通常係指與在不存在治療(例如使用所揭示之類毒素的投藥或疫苗接種)之情況下出現感染之對照或基本水準相比，個體出現感染更緩慢或程度更低。症狀性感染之風險降低可使個體僅呈現溫和之明顯感染症狀或延遲感染症狀；其不暗示此處必須已無困難梭菌微生物存在。

本發明內所引用之所有參考均以全文引用之方式併入本文中。

在以下實例中進一步描述某些實施例。此等實施例僅作為實例提供，而並不意欲以任何方式限制申請專利範圍之範疇。

實例

僅出於說明之目的提供以下實例，而不意欲限制本發明之範疇。涵蓋形式變化及等效物取代以作為可表明或賦予有利條件之情況。儘管本文已採用特定術語，但該等術語意欲為描述含義而非出於限制之目的。所用但未明確描述於本發明及此等實例中之分子遺傳、蛋白質生物化學及免疫學方法在科學文獻中得以充分報告且充分處於熟習此項技術者之能力內。

實例1

使用困難梭菌工作菌種(菌株VPI10463/ATCC43255)來接種包含大豆蛋白胨、酵母提取物、磷酸鹽緩衝劑及碳酸氫鈉(pH 6.35-7.45)的經預處理之培養基(SYS培養基)，且按比例自4 mL工作細胞庫(WCB)小瓶擴增為160 L培養物。在達到所需密度及10-12小時培育期時候，加工全部160 L培養物以進行澄清及0.2 μm 過濾。收集來自另一個產生醱酵器之培養物，且使之經受膜過濾(例如使用Meisner膜過濾器)以移除困難梭菌細胞及細胞碎片雜質。濃縮所得澄清培養物濾液，且藉由切向流過濾使之透濾至50 mM Tris/NaCl/0.2 mM EDTA/1 mM DTT(pH 7.5)中。使用膜過濾器來過濾所得溶液，增加硫酸銨之濃度(例如至約0.4 M)，且隨後進行另一次過濾(例如使用膜過濾器)。此水溶液含有困難梭菌毒素A及毒素B。使水溶液經受疏水性相互作用層析。將困難梭菌毒素結合至瓊脂糖凝膠管柱。用Tris緩衝劑洗滌管柱，且用含有DTT及IPA之三緩衝劑溶離兩個溶離份之困難梭菌毒素。合併自HIC溶離之兩個毒素溶離份，且使用WFI將導電性調節至9 mS或9 mS以下。藉由陰離子交換層析來進一步純化困難梭菌毒素(在經合併之溶離液中)。使經溶離之水溶液穿過陰離子交換管柱，以使

毒素結合至管柱上。用Tris緩衝劑來使管柱平衡，且用低鹽Tris緩衝劑溶離毒素A且用高鹽Tris緩衝劑溶離毒素B。將經純化之毒素A及經純化之毒素B各自濃縮，且透濾至100 mM PO₄ (pH 7)中。蛋白質濃度為約0.5 mg/mL，且各毒素之純度為90%或90%以上。

向毒素A透濾液及毒素B透濾液中之每一者中無菌添加37%甲醛溶液，以獲得0.42%之最終濃度。混合溶液，且隨後在2°C-8°C下儲存18-22天。在失活之後，將毒素透濾液透析至調配物緩衝劑(20 mM檸檬酸鹽/5%蔗糖，pH 7.5)中。視需要藉由添加37%甲醛溶液來調節甲醛濃度。以3:2 (A:B)之重量比率組合類毒素A及B，且凍乾。凍乾產品包含類毒素A (0.24 mg/mL)、類毒素B (0.16 mg/mL)、20 mM檸檬酸鈉、5% (w/v)蔗糖及指定濃度之甲醛。

進行反轉分析以觀測在37°C下經6週時間之可能反轉。將包含類毒素A及類毒素B之組合物與不同量之殘餘甲醛(0%、0.008%及0.016% (w/v))調配在一起，在37°C或4°C下儲存，且每週藉助於細胞毒性分析來測試，持續6週。來自此等研究之資料陳述在表1中。在4°C下，即使未添加有殘餘甲醛，產物亦通過反轉分析。然而，在37°C下，需要0.016%殘餘甲醛以通過反轉測試。

表1

儲存在37°C下之藥品的反轉分析

4°C	第7天	第14天	第21天	第28天	第35天	第42天
0%	-	-	-	-	-	-
0.008%	-	-	-	-	-	-
0.016%	-	-	-	-	-	-
37°C	第7天	第14天	第21天	第28天	第35天	第42天
0%	+	+	+	+	+	+
0.008%	-	+	+	-	-	-
0.016%	-	-	-	-	-	-

* - =未偵測到細胞毒性；+ =細胞毒性

實例2

進行本文所描述之實驗以識別將提供在37°C下穩定之類毒素的類毒素化方法。使用困難梭菌工作菌種(菌株VPI10463/ATCC43255)來接種無菌拋棄式袋中的經預處理之培養基(包含大豆蛋白腴、酵母提取物、磷酸鹽緩衝劑及D-山梨糖醇，pH 7.1-7.3)且在35°C-39°C下培育培養物直至達成目標OD。使用30 L菌種1培養物來接種250 L無菌拋棄式培養袋中之培養基，且在35°C-39°C下培育培養物直至達成目標OD。使用菌種2培養物來接種1000L無菌拋棄式培養袋，且在35°C-39°C下培育培養物直至達成目標OD。收集來自另一個產生醱酵器之培養物，且使之經受深度過濾(例如使用Pall Depth 700 p/80 p/0.2µm 0.02msq/L)以移除困難梭菌細胞及細胞碎片雜質，且同時使之冷卻(例如約37°C-19°C)以限制蛋白酶活性。濃縮所得澄清培養濾液，且使用扁材Millipore及在約4°C之溫度(用於降低蛋白酶活性)下藉由切向流過濾使之透濾至25 mM Tris/50 mM NaCl/0.2 mM EDTA (pH 7.5-8.0且未添加有DTT)。使用膜過濾器來過濾所得溶液，增加硫酸銨之濃度(例如至約0.9 M)，且隨後進行另一次過濾(例如使用膜過濾器)。此水溶液含有困難梭菌毒素A及毒素B。使水溶液經受疏水性相互作用層析。將困難梭菌毒素結合至丁基瓊脂糖樹脂(諸如GE丁基S FF瓊脂糖)上。用0.9 mM硫酸銨25 mM Tris (pH 8.0)洗滌管柱，且用25 mM Tris(pH 8.0)溶離困難梭菌毒素且使用WFI將導電性調節至7 mS或7 mS以下。藉由陰離子交換層析來進一步純化困難梭菌毒素(在溶離液中)。使經溶離之水溶液穿過陰離子交換管柱(例如Tosoh Q 650 M)以是毒素結合至管柱上。用25 mM Tris (pH 7.5)來使管柱平衡，且用MgCl₂於25 mM Tris中的27 mM溶液(pH 8.0)溶離毒素A且用MgCl₂於25 mM Tris中的135 mM溶液(pH 8.0)溶離毒素B。將經純化之毒素A及經純化之毒素B各自濃縮，且首先透濾至25 mM Tris中(例如以移除MgCl₂)，且隨後透濾至100 mM PO₄ (pH 7)。毒素A之平均產量為約

0.021公克純毒素/公升醱酵物(UV280)，且如由SDS Page評估純度為平均約97.2%。毒素B之平均產量為約0.011公克純毒素/公升醱酵物(UV280)，且如由SDS Page評估純度為平均約93.9%。自此過程生成之毒素展現90%或90%以上之純度且亦顯示自先前過程步驟留下之基質殘餘(例如參(羥甲基)胺基甲烷(TRIS))減少。在來自實質上如實例1中所描述之過程的毒素基質中的殘餘TRIS值在約100-800 $\mu\text{g/ml}$ 之間變化，而在來自描述於此實例中之純化過程的毒素基質中的殘餘TRIS值在1 $\mu\text{g/ml}$ 以下(亦即在偵測限以下)。關於使用甲醛之類毒素化反應，TRIS具有可與用於甲醛介導之修飾的蛋白質有效競爭的胺基，藉此降低反應混合物中之有效甲醛濃度。相應地，資料表明，與藉由描述於實例1中之過程製備的類毒素的動力學相比，藉由此過程製得之類毒素的類毒素化動力學更快。

對類毒素化過程進行關於溫度及甲醛濃度之研究，且分析其隨類毒素化培育期之變化。目標為發展穩健類毒素化過程，該類毒素化過程提供在維持相同量之免疫原性的同時比使用早先過程(如實例1中所描述)生成之類毒素更好的安全型態及更好的反轉特徵。需要獲得在37°C下用最少量殘餘甲醛通過反轉分析之藥品的類毒素化條件。在此等實驗中，將毒素濃度固定在0.5 mg/ml 下，且所有反應在100 mM磷酸鈉緩衝劑(pH 7.0)中進行。對類毒素化反應中之每一者評估的溫度為4°C、15°C及25°C。甲醛濃度對類毒素A反應在0.21% (「0.2%」)或0.42% (「0.4%」)之間變化，而對類毒素B反應在0.42% (「0.4%」)及0.84% (「0.8%」)之間變化。對反應條件中之每一者而言，將毒素濃度調節至0.5 mg/ml ，且在100 ml規模下進行。隨後添加百分之三十七(37%)甲醛以使個別反應中之每一者達到目標濃度。溫和地攪拌反應5-10分鐘，且放置在目標溫度下之培育箱中(在1小時培育內達成目標溫度)。每日監測個別反應中之每一者，持續長達21天之時間段。

取出樣品，且藉由細胞毒性分析、AEX-HPLC、SEC-HPLC、SDS-PAGE及TNBS分析來進行分析。在視類毒素化條件而定之某些時間間隔處，取出樣品，調配，且進行動物研究、反轉分析及ELISA測試。

動力學細胞毒性分析

在類毒素化反應之後進行細胞毒性分析，且相應地，每日直接自反應混合物取出樣品且供用於同一天之分析。在類毒素化過程之後對IMR90細胞進行細胞毒性，且類毒素化之動力學為單相的，其中毒素A細胞毒性中和需要平均 5 ± 1 天，而毒素B需要接近 13 ± 2 天(對全部反應均下降至3倍安全界限以下)。使用一批物料而獲得之資料顯示在圖1中。y軸含有MC50值，其反映材料之毒性且表示在毒性材料存在下其中50%之細胞變圓(而非其正常條紋形態)的最小濃度。兩種毒素之MC 50值存在1000倍之差異；B更具細胞毒性，其MC50值在較低pg/ml範圍中。類毒素之絕對MC50值未知，因為在此等實驗中當在200 μ g/ml之最高濃度下測試時不存在細胞毒性。失活過程之總時間段為18-21天。

來自對毒素A及毒素B之類毒素化反應的細胞毒性分析的資料顯示在表2中。其描繪對甲醛與毒素之各別反應中的每一者而言，顯示細胞毒性損失所需要之時間量(以天為單位)。自毒素A及毒素B之類毒素化反應的資料，幾種一般傾向顯而易見。隨著甲醛濃度增加，使毒素失活所需之時間減少。另外，隨著反應溫度增加，使毒素失活所需之時間亦減少。資料表明，溫度或甲醛濃度中之任一增加使類毒素化速率加速。自動力學細胞毒性分析識別許多潛在條件，且資料表明，3x安全性界限可藉由將細胞毒性之初始損失外推三倍來獲得。舉例而言，毒素A用0.2%甲醛在25°C下於兩天時脫毒，因此應用適當安全性界限將最低限度地涉及使反應持續六天。基於細胞毒性損失之驗收標準(基於動力學分析)，多種類毒素化反應條件滿足期望，且使用其他

分析之進一步評估將縮小條件之範圍。

表2

動力學研究之細胞毒性結果*

	第0天	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第7天	第9天
類毒素A， 0.2%，4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
類毒素A， 0.2%，15℃	+	+	+	-	-	-	-	-	-
類毒素A， 0.2%，25℃	+	+	-	-	-	-	-	-	N.D.
類毒素A， 0.4%，4℃	+	+	+	-	-	-	-	-	-
類毒素A， 0.4%，15℃	+	-	-	-	-	-	-	-	-
類毒素A， 0.4%，25℃	+	-	-	-	-	-	-	-	N.D.
類毒素B， 0.8%，4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	-
類毒素B， 0.8%，15℃	+	+	-	-	-	-	-	-	-
類毒素B， 0.8%，25℃	+	-	-	-	-	-	-	-	-
類毒素B， 0.4%，4℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
類毒素B， 0.4%，15℃	+	+	+	+	+	-	-	-	-
類毒素B， 0.4%，25℃	+	+	-	-	-	-	-	-	-

* +：細胞毒性；-：未偵測到細胞毒性；N.D.：未測定

DoE反應之動力學AEX-HPLC分析

使用AEX-HPLC (擴展梯度法)作為進一步評估不同類毒素化參數之工具。AEX型態可為縮小適合類毒素化條件之範圍的有價值工具。在AEX層析圖中觀測兩個亞群之類毒素A及類毒素B兩者，其滯留時間均比毒素更長。峰值群體隨著反應進展而偏移，表明對毒素之進一步修飾。潛在地，此反映甲醛與毒素上之胺基的反應使蛋白質上之電荷特徵變得正性較少，藉此增加與管柱樹脂(四級銨樹脂)之結合親和

性。溫度及甲醛濃度可影響峰值群體型態隨時間之變化及使之「偏移」，該變化表明甲醛蛋白質修飾更多；對毒素A及毒素B類毒素化反應兩者而言，在溫度及甲醛濃度增加時觀測到向第二峰值群體之更快偏移。自評估觀點而言，更需要在第二峰值位置處具有單分散型態以確保更多蛋白質修飾。對類毒素A，與0.21%甲醛一起在25°C下> 6天或與0.42%甲醛一起在15°C下> 6天之條件得到所需單分散第2峰值型態。對類毒素B，與0.4%或0.8%甲醛一起在15°C下持續> 10天；或與0.4%甲醛一起在25°C下持續>5天產生所需單分散第2峰值型態。重要的是應注意，具有最高甲醛濃度及溫度之反應開始隨時間產生更多類毒素群體，表明更廣泛之蛋白質修飾(尤其在於0.4%甲醛，25°C下使毒素A失活之情況下)。

動力學SEC-HPLC分析

SEC型態可為縮小適合類毒素化條件之範圍的有價值工具。層析圖可洞悉可因甲醛誘導之分子間交聯而發生之多聚化的程度。需要使類毒素之多聚化量最小化，及達成類似於實例1中產生之產物型態的型態。藉由SEC-MALS每日監測個別反應，且定性分析多聚化之出現。所分析的類毒素B反應之所有條件均不顯示多聚化。對類毒素A，主要在使用最高甲醛濃度之條件下觀測到過度多聚化。因此，SEC-MALS資料不振對溫度、時間或甲醛濃度區別類毒素B條件。然而，資料表明較高溫度及甲醛濃度一起可導致類毒素A之多聚化。

動力學胺含量(TNBS)分析

福馬林介導之類毒素化經由形成基於甲醛之部分的反應而導致蛋白質上之自由胺含量(例如離胺酸之 ϵ -胺基)降低。嘗試對早先材料使用三硝基苯磺酸(TNBS)分析來監測修飾程度，且反應結束時之修飾程度對類毒素A及B分別顯示為約35%及65%(殘餘自由胺含量之倒數)。為此研究，亦使用TNBS分析來監測自由胺含量。條件顯示隨著

溫度及時間增加，自由胺含量%更快速地接近漸近線。因此胺修飾之程度可最大限度地估計為毒素A約40%及毒素B約75%(殘餘自由胺含量之倒數)。儘管胺含量與細胞毒性之損失的相關性極小，但其可用於追蹤與甲醛及毒素之反應的程度。舉例而言，在25°C下，關於A之胺修飾似乎在6天內完全，而關於B之胺修飾似乎在約10天內完全。若反應在較低溫度下進行，則達成相同程度之胺修飾所需的時間增加。因此，資料表明較高溫度將在更短時間量中導致更完全反應。

抗原性分析

亦可使用酶聯免疫吸附分析(ELISA)作為進一步評估不同類毒素化參數之工具。產物之ELISA型態可用於縮小適合類毒素化條件之範圍。藉助於針對自早先材料生成之抗體的ELISA來量測所生成之類毒素，且分析隨類毒素化時間之變化。此處，使用ELISA來偵測毒素量，且針對使用280 nm處之吸光度而量測的濃度進行比較。隨著抗原在類毒素化反應中發展，ELISA值可下降，表明與使用實例1類毒素觀測到之反應的變化(潛在地表明多聚化)。儘管在分析中注意到變化，但資料表明較高溫度及較高甲醛濃度導致較低ELISA反應。舉例而言，在25°C下使用0.4%甲醛導致ELISA值比在25°C下使用0.2%甲醛下降更快。類似地，與0.4%甲醛一起在25°C下之條件導致ELISA值比在0.4%甲醛及4°C下之彼等ELISA值下降更快。作為評估工具，需要保持ELISA反應在70%以上；識別大量條件。

免疫原性分析

倉鼠效能分析來量測免疫原性可用於評估類毒素化條件。為類毒素A及類毒素B選擇IgG效價反應不小於4.8平均Log10 IgG效價反應。根據彼等規範評估自此等研究生成之類毒素，且進一步詳細檢查為不具有比來源於早先條件之類毒素明顯更低之反應。另外，因為不可能評估所有可能之滲透(相對於時間、溫度及甲醛濃度)，所以基於

本文所描述之動力學細胞毒性分析(3×安全性界限)以及生物化學特徵來選擇類毒素。將類毒素調配為用於倉鼠效能分析之二價材料(非凍乾)，去分析血清之IgG反應。所有類毒素化條件不僅通過效能規範(亦即平均IgG效價反應4.8 Log10)，且亦具有在統計學上與早先(實例1)材料等效之效價反應(未注意到顯著差異)。另外，所有血清使用活體外攻擊分析來進行測試，且發現其具有中和抗體活性。作為關鍵質量屬性，資料表明任何此等類毒素化條件可為可接受的。

藥品(「DP」)之反轉分析

使用用評估中之類毒素化條件製備的類毒素A及B來調配藥品(包含類毒素A及B之組合物)。調配物包括0%、0.004%及(在一些情況下)0.008% (w/v)之一的殘餘甲醛。藉由自類毒素A或B組合物移除所有(或基本上所有)甲醛，且隨後向經清除之組合物中加入指定量之甲醛來製備調配物。使藥品經受在37°C下進行之反轉分析。來自藥品反轉分析之資料描繪於表3中。對細胞毒性測試為陰性之藥品標註為(-)。

多個藥品調配物通過反轉分析(亦即在於37°C下儲存之後不具有可偵測之細胞毒性)。兩種藥品(具有0.004%或具有0.008%甲醛(「殘餘甲醛」))在於37°C下儲存之後不具有可偵測之細胞毒性：(i)包含藉由0.2%甲醛15°C培育13天而失活之類毒素A及藉由0.8%甲醛15°C培育13天而失活之類毒素B的藥品(表3，測試13及14之參數)；及(ii)包含藉由0.2%甲醛25°C培育6天而失活之類毒素A、0.4%甲醛在25°C下持續13天而失活之類毒素B的藥品(表3，測試22及23之參數)。具有0.008%甲醛之若干其他藥品亦在於37°C下儲存之後不具有可偵測之細胞毒性，包括例如包含藉由0.4%甲醛4°C培育持續13天而失活之類毒素A及0.8%甲醛4°C持續21天而失活之類毒素B的藥品，及包含0.4%甲醛4°C持續13天而失活之類毒素A及0.8%甲醛及4°C持續21天而失活之類毒素B的藥品。自此分析識別之最佳類毒素化條件為毒素A之類毒素化：0.5 mg/ml毒素A，

0.21%甲醛，25℃，在100 mM NaPO₄ (pH 7)中持續6天；及毒素B之類毒素化：0.5 mg/ml毒素B，0.42%甲醛，25℃，在100 mM NaPO₄ (pH 7)中持續13天(表3，測試22之參數)。此等條件在藉由其他生物化學分析來量測時亦具有所需型態。在給定時間點處，AEX對各類毒素顯示均勻峰值群體，SEC MALS顯示最少多聚化，且TNBS顯示各反應達成最大胺修飾。另外，維持ELISA (A280)反應。

表3

反轉分析(37℃)

測試	類毒素A	類毒素B	37℃	第1週	第2週	第3週	第4週	第5週	第6週
			樣品						
1	6天， 0.4%，4℃	21天， 0.8%，4℃	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	13天， 0.4%，4℃	21天， 0.8%，4℃	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+
4			DP+0.004% Form.	+	+	-	-	-	-
5			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-
6	6天， 0.2%，15℃	13天， 0.8%，15℃	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+
7			DP+0.004% Form.	+	+	-	-	-	-
8	6天， 0.2%，15℃	13天， 0.4%，15℃	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10	6天， 0.2%，15℃	18天， 0.4%，15℃	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	13天， 0.2%，15℃	13天， 0.8%，15℃	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+
13			DP+0.004% Form.	-	-	-	-	-	-
14			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-
15	13天， 0.2%，15℃	13天， 0.4%，15℃	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
16			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	13天， 0.2%，15℃	18天， 0.4%，15℃	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	6天， 0.2%，25℃	6天， 0.4%，25℃	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20			DP+0.004% Form.	-	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
21	6天， 0.2%，25℃	13天， 0.4%，25℃	DP+0% Form.	-	+	+	+	+	+
22			DP+0.004% Form.	-	-	-	-	-	-
23			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-
第23週DP									
24	6天， 0.4%，4℃	21天， 0.8%，4℃	DP+0% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
25			DP+0.004% Form.	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
26	13天， 0.4%，4℃	21天， 0.8%，4℃	DP+0% Form.	+	+	+	+	+	+
27			DP+0.004% Form.	+	+	+	+	-	-
28			DP+0.008% Form.	-	-	-	-	-	-

DP=藥品；Form.=甲醛；+：細胞毒性；-：未偵測到細胞毒性；

N.D.：未測定

表1及3指示參數22對自毒素A及B製備類毒素為最佳的。此等條件為：

製備類毒素A：0.5 mg/ml毒素A，0.21%甲醛，25℃，在100 mM NaPO₄ (pH 7)中，持續六天；及

製備類毒素B：0.5 mg/ml毒素B，0.42%甲醛，25℃，在100 mM NaPO₄ (pH 7)中，持續13天。

此等程序在6天(類毒素A)或13天(類毒素B)培育之前亦包括十分鐘混合步驟，繼而為0.2 μm過濾。在於37℃下對反轉進行測試之前，將類毒素A及類毒素B透濾至20 mM檸檬酸鹽(pH 7.5)、0.004%甲醛中。此程序展示於圖2中。亦注意到甲醛於檸檬酸鹽緩衝劑中之0.008%溶液亦通常提供37℃下之良好穩定性。

此資料藉由出人意料之免疫資料(倉鼠中之IgG反應)進一步確認，該免疫資料顯示較長培育時間使得類毒素A之ELISA值較低，表明甲醛誘導之毒素修飾增加(第6天之ELISA/A280 = 0.94；第12天= 0.64)。相反，較長培育時間使得類毒素B之ELISA值較高(第13天之ELISA/A280 = 0.53；第20天= 0.73)。所需ELISA/A280值為較接近1.0之彼等值。一般技術者應理解，對於使毒素A類毒素化，12天培育期可為適當的，而對於使毒素B類毒素化，20天培育期可為適當的。然而，即使鑒於此資料，如上文所述，13天培育時間仍視為對使毒素B類毒素化最佳的。

規模分析

使用所識別之最佳類毒素化條件以更大規模(1/10起動規模(200 L 醱酵))來產生類毒素；亦即使用以下條件使毒素A及毒素B失活：A之類毒素化：0.5 mg/mL毒素A，0.21% (w/v)甲醛，25℃，在100 mM

NaPO₄ (pH 7)中，持續6天；及B之類毒素化：0.5 mg/mL毒素B，0.42% (w/v)甲醛，25℃，在100 mM NaPO₄ (pH 7)中，持續13天。使用在反應期間各時間段處取得之類毒素樣品來評估類毒素化反應之動力學。與以小規模產生之類毒素相比，該等以更大規模產生之類毒素具有相同的動力學細胞毒性型態，其中在反應第2天觀測到細胞毒性之損失。另外，該等類毒素具有與以小規模產生之類毒素類似的AEX型態及類似的胺修飾(如由TNBS分析所量測)。亦藉由倉鼠效能分析來評估自1/10規模類毒素化反應生成之類毒素的免疫原性。如同以小規模產生之類毒素，該等以更大規模產生之類毒素得到平均IgG效價反應4.8 Log或更高，且提供在統計學上與根據如實例1中所陳述過程製備之類毒素的效價反應相當的效價反應。對來源於1/10規模類毒素之藥品進行反轉分析，且與以小規模來源於相同類毒素化條件之藥品相比。以1/10規模來源於類毒素之藥品具有與以小規模來源之彼等藥品相同的反轉特徵，且甚至在0.004%甲醛下仍通過反轉測試。用以更大規模(例如使用1000 L及2000 L醱酵培養物)產生之類毒素獲得類似結果。來自此等研究之資料顯示類毒素化方法可縮放。以大規模產生之類毒素具有與以小規模產生之彼等類毒素相同的動力學細胞毒性型態、倉鼠效能及反轉特徵。關於再現性，使用於毒素A及毒素B之類毒素化過程再現超過6次，且分析顯示批次間特徵類似。

免疫接種研究

實質上根據上述方法(例如表3中之參數22)來製備經純化之困難梭菌類毒素A及困難梭菌類毒素B，且調配為疫苗組合物。以3:2之重量比組合類毒素A及B，與包含蔗糖(4.0%至6.0% w/v)及甲醛(0.012%至0.020% w/v)之檸檬酸鹽緩衝劑一起調配，且凍乾。如下所述用稀釋劑使各組合物復原，且與氫氧化鋁佐劑混合，隨後用作疫苗。敘利亞金倉鼠提供用於困難梭菌疫苗發育之嚴格模型。在用單一腹膜內

(IP)劑量之克林達黴素抗生素預處理之後，且在接受胃內(IG)接種產毒困難梭菌生物體之後，倉鼠快速出現突發腹瀉及出血性盲腸炎，且在兩至四天內死亡(例如未進行疫苗接種)。用稀釋劑(包含0.57%氯化鈉及800 $\mu\text{g/mL}$ 鋁)使疫苗復原。復原疫苗含有100微克/劑量類毒素、0.008%甲醛及400微克/劑量鋁。藉由用不同劑量之困難梭菌疫苗(人類劑量(100微克/劑量)(HD)之4倍稀釋液)的三次肌肉內免疫接種(在第0天、第14天及第27天)對倉鼠(9隻倉鼠/組)接種疫苗，或用安慰劑(AIOH)注射。在第41天，藉由IP途徑用化學形式之克林達黴素-2-磷酸鹽抗生素以10 mg/kg預處理倉鼠。在第42天，在用抗生素預處理28小時之後，藉由IG途徑用致死性劑量的來源於困難梭菌ATCC43255菌株之孢子製劑攻擊倉鼠。藉由量測與困難梭菌感染相關之症狀的出現期動力學及致死率來評估保護性療效。結果展示，疫苗以劑量依賴性方式保護倉鼠不受困難梭菌產毒細菌之致死性攻擊的影響，其中藉由用劑量HD/20 (在100 $\mu\text{g/mL}$ AIOH存在下之5 μg 類毒素A+B)之疫苗接種誘導100%保護(圖3)。保護經免疫之動物不受死亡及疾病(體重減輕及腹瀉)影響。此研究之結果為若干活體內研究之代表。相應地，藉由本文所描述之方法製備的類毒素提供針對困難梭菌疾病(症狀性困難梭菌感染)之保護免疫性。

雖然已以較佳實施例形式描述於中某些實施例，但應理解熟習此項技術者將意識到變化及修飾。因此，希望所附申請專利範圍覆蓋出現在以下申請專利範圍之範疇內的所有該等等效變化。

【符號說明】

無

發明摘要

※ 申請案號：103110044

※ 申請日：103/03/17

※IPC 分類：C07K 14/33 (2006.01)
A61K 39/08 (2006.01)

【發明名稱】

類毒素、組合物及相關方法

TOXOIDS, COMPOSITIONS AND RELATED METHODS

【中文】

本發明大體上係關於毒素失活之領域。更特定言之，其係關於梭菌毒素、使此等毒素失活之方法及包含類毒素(例如藉由此等方法產生之類毒素)之組合物(例如疫苗)。提供產生困難梭菌類毒素之方法，該方法包含用甲醛使困難梭菌毒素失活。藉由此等方法製備之類毒素在高溫(例如37°C)下穩定，且在最少殘餘甲醛下保持非細胞毒性。

【英文】

The disclosure relates to generally to the field of toxin inactivation. More specifically, it relates to clostridial toxins, methods of inactivating these toxins and compositions (e.g., vaccines) comprising toxoids (e.g., produced by these methods). Provided are methods of producing a *C. difficile* toxoid comprising inactivating a *C. difficile* toxin with formaldehyde. Toxoids prepared by these methods are stable at high temperature (e.g., 37°C) and remain non-cytotoxic with minimal residual formaldehyde.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（2）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）

申請專利範圍

1. 一種產生困難梭菌(*C. difficile*)類毒素之方法，該方法包含藉由與0.15%-0.8%甲醛(w/v)一起在15-32℃下培育2至21天來使經純化之困難梭菌毒素A或經純化之困難梭菌毒素B失活，其中該經純化之困難梭菌毒素A或經純化之困難梭菌毒素B具有75%或更高之純度。
2. 如請求項1之方法，其中：
 - (a) 該培育係與0.15%-0.5%甲醛(w/v)一起；及/或
 - (b) 該培育係在17-32℃。
3. 如請求項1或2之方法，其中：
 - (a) 將毒素A與0.2%甲醛一起在25℃下培育2或6天以產生類毒素A；及/或
 - (b) 將毒素B與0.4%甲醛一起在25℃下培育13天以產生類毒素B。
4. 如請求項1或2之方法，其中：
 - (a) 藉由將毒素A與0.21%(w/v)甲醛一起在25℃下培育6至13天，困難梭菌毒素A轉化為類毒素(類毒素A)；或
 - (b) 藉由將毒素B與0.42%(w/v)甲醛一起在25℃下培育13至20天，困難梭菌毒素B轉化為類毒素(類毒素B)。
5. 如請求項4之方法，其中困難梭菌毒素A係藉由將該毒素於0.21%(w/v)甲醛/100 mM PO₄、pH 7中培育而轉化為類毒素(類毒素A)。
6. 如請求項4之方法，其中困難梭菌毒素B係藉由將該毒素於0.42%(w/v)甲醛/100 mM PO₄、pH 7中培育而轉化為類毒素(類毒素B)。

7. 一種用於製備組合物之方法，其中：

(a) 該組合物為包含經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B之免疫原性組合物，其中該組合物係藉由將經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B與包含殘餘量之甲醛的組合物組合而製得，

其中該經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B在37°C下穩定長達六週，且

其中甲醛之該殘餘量為0.001%-0.008% (w/v)；

(b) 該組合物為包含經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B之免疫原性組合物，其中該方法包含：

(i) 藉由與0.15%-0.8%甲醛(w/v)一起在15-32°C下培育2至21天來使經純化之困難梭菌毒素A及經純化之困難梭菌毒素B失活；及

(ii) 將經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素B與包含殘餘量之甲醛的組合物組合；或

(c) 該組合物為類毒素組合物，且該方法包含：

(i) 藉由與0.15%-0.8%甲醛(w/v)一起在15至32°C下培育2至21天來使經純化之困難梭菌毒素A及經純化之困難梭菌毒素B失活；及

(ii) 將該等類毒素組合以產生僅含有殘餘量之甲醛的含類毒素免疫組合物及/或疫苗；且

其中該經純化之困難梭菌類毒素A及經純化之困難梭菌類毒素以及該經純化之困難梭菌毒素A及經純化之困難梭菌毒素B具有75%或更高之純度。

8. 如請求項7之方法，其中：

(a) 該培育係與0.15%-0.8%甲醛(w/v)一起；及/或

(b) 該培育係在15-32℃。

9. 如請求項7或8之方法，其中：

(a) 該困難梭菌類毒素A及困難梭菌類毒素B在37℃下穩定長達六週；

(b) 甲醛之該殘餘量為0.001%、0.004%、0.008%或0.016% (w/v)；

(c) 該組合物包含20 mM檸檬酸鹽、pH 7.5、8%蔗糖及0.016% 甲醛；

(d) 該組合物經凍乾；及/或

(e) 該方法進一步包含提供包含毒素A及毒素B之困難梭菌培養物，且自該培養物純化該毒素A及毒素B。

10. 一種組合物，其中：

(a) 該組合物為由如請求項1-6中任一項之方法製備之包含類毒素A及/或類毒素B之組合物；或

(b) 該組合物由使用如請求項7-9中任一項之方法製備。

11. 一種困難梭菌類毒素A或B，其根據如請求項1至9中任一項之方法產生。

12. 一種疫苗組合物，其包含困難梭菌類毒素A及困難梭菌類毒素B，其中該困難梭菌類毒素A及類毒素B係根據如請求項1至9中任一項之方法產生。

13. 如請求項12之疫苗組合物，其中該疫苗組合物包含：

(a) 0.001%至0.020%甲醛；

(b) 0.004%甲醛；

(c) 0.008%甲醛；或

(d) 0.016%甲醛。

14. 如請求項12或13之疫苗組合物，其中該類毒素A與該類毒素B在

該組合物中以5:1至1:5之A:B比率或以3:1或3:2之A:B比率存在。

15. 如請求項12至14中任一項之疫苗組合物，其中該疫苗組合物：
 - (a) 經冷凍乾燥、噴霧乾燥、泡沫乾燥或呈液體形式；及或
 - (b) 進一步包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。
16. 如請求項10之組合物或如請求項12至15中任一項之疫苗組合物，其包含檸檬酸鹽、磷酸鹽、甘胺酸、碳酸鹽或碳酸氫鹽緩衝劑、或pH值受控之水溶液。
17. 如請求項16之組合物，其進一步包含糖或糖醇。
18. 如請求項17之組合物，其包含蔗糖及檸檬酸鹽。