

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：96141996

※申請日期：96.11.7

※IPC 分類：

A61K 9/19 (2006.01,

A61K 38/38 (2006.01,

C07K 14/765 (2006.01,

A61K 39/12 (2006.01,

一、發明名稱：(中文/英文)

以凍乾法穩定疫苗/STABILIZATION OF VACCINES BY LYOPHILIZATION

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

艾坎伯斯公司/ACAMBIS INC.

代表人：(中文/英文) 葛雷格 瓦多皮斯/GREG WADOOVPS

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國麻州 02139 坎伯里雪黎街 38 號

國 籍：(中文/英文) 美國/U.S.A

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 丹尼爾 C. 威倫/VELLOM, DANIEL C.

2. 詹姆斯 E. 沃斯威羅/WOISZWILLO, JAMES E.

3. 保羅 迪喬治/DEGEORGE, PAUL

4. 彼德 西亞彌塔羅/CIARAMETARO, PETER

國 籍：(中文/英文)

1.~4. 美國/U.S.A

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： 年 月 日。

☒ 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、2006/11/07、60/857,424

☐ 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：

本發明提供醫藥組成物，例如疫苗，以及製造與使用該等組成物的方法。

六、英文發明摘要：

This invention provides pharmaceutical compositions, such as vaccines, and methods of making and using such compositions.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(9)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

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】

本發明關於醫藥組成物，例如疫苗，以及製造與使用該等組成物的方法。

【先前技術】

疫苗為醫學上最重要成就之一，且已與數以千萬計的人類分享消滅疾病的效果。在疫苗廣泛使用之前，感染性疾病每年單單在美國就造成數以千計的兒童及成人的死亡，且在全世界造成更多死亡。疫苗廣泛使用於預防與治療由細菌、病毒與其他病原所引起的感染，同時亦使用於預防與治療癌症的方針。數種不同的方針使用於疫苗，包含已死病原、活的減毒化病原與去活性化病原次單元的投藥。在病毒感染的狀況中，已發現活病毒賦予最強有力與持久保護的免疫反應。

活的減毒化疫苗已開發於對抗黃病毒，其為小的、經封套、正股 RNA 病毒且通常由經感染的蚊子及蜱蟲所傳染。黃病毒科家族的黃病毒屬包含將近 70 種病毒，其中之多者，例如黃熱(YF)病毒、登革熱(DEN)病毒、日本腦炎(JE)病毒、與蜱媒腦炎(TBE)病毒，為基準要的人類病原(參照 Burke and Monath, Fields Virology, 4th Ed., 1043-1126, 2001)。

於抗黃病毒疫苗的開發上已使用不同方針。於黃熱病毒的情況中，例如，藉由系列繼代(serial passage)已開發兩種疫苗(黃熱 17D 與法國神經因性疫苗(French

neurotropic vaccine)) (Monath, "Yellow Fever," In Plotkin and Orenstein, *Vaccines*, 3rd ed., Saunders, Philadelphia, pp. 815-879, 1999)。使用於疫苗的黃病毒減毒的另一方針包括嵌合性黃病毒的構築，其包括兩種(或多種)不同黃病毒的成分。了解該等嵌合體需解析黃病毒基因體的結構。

黃病毒蛋白質由單一、長的開放讀架(open reading frame)的轉譯產生聚蛋白質，其後該聚蛋白質借由宿主與病毒蛋白酶進行複雜系列的後轉譯蛋白質分解而產生成熟的病毒蛋白質(Amberg 等人 *J. Virol.* 73:8083-8094, 1999; Rice, "Flaviviridae," In *Virology*, Fields (ed.), Raven-Lippincott, New York, 1995, Volume I, p. 937)。病毒結構蛋白質以次序 C-prM-E 經安排於該聚蛋白質中，其中「C」為外殼蛋白質(capsid)，「prM」為病毒封套-結合 M 蛋白質的前驅物，以及「E」為封套蛋白質。該等蛋白質在於該聚蛋白質的 N-終端區域，而非結構蛋白質(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 與 NS5)位於該聚蛋白質的 C-終端區域。

已製造的嵌合性黃病毒包含來自不同黃病毒的結構性與非結構性蛋白質。例如，稱為 ChimeriVaxTM 技術應用黃熱 17D 病毒外殼蛋白質與非結構性蛋白質傳遞其他黃病毒的封套蛋白質(prM and E)(參照例如，Chambers 等人 *J. Virol.* 73:3095-3101, 1999)。此技術已使用於開發對抗登革熱病毒、日本腦炎(JE)病毒、西奈(WN)病毒與聖路易

腦炎(SLE)病毒的疫苗候選者(參照例如，Pugachev 等人 in New Generation Vaccines, 3rd ed., Levine 等人 eds., Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 559-571, 2004; Chambers 等人 J. Virol. 73:3095-3101, 1999; Guirakhoo 等人 Virology 257:363-372, 1999; Monath 等人 Vaccine 17:1869-1882, 1999; Guirakhoo 等人 J. Virol. 74:5477-5485, 2000; Arroyo 等人 Trends Mol. Med. 7:350-354, 2001; Guirakhoo 等人 J. Virol. 78:4761-4775, 2004; Guirakhoo 等人 J. Virol. 78:9998-10008, 2004; Monath 等人 J. Infect. Dis. 188:1213-1230, 2003; Arroyo 等人 J. Virol. 78:12497-12507, 2004;及 Pugachev 等人 Am. J. Trop. Med. Hyg. 71:639-645, 2004)。

疫苗的成功使用與商業化的中心為其所處理與配方的方法，使疫苗在使用前的運輸與儲存的狀態中確保藥效的穩定性與維持性。凍乾(Lyophilization)為相關於某些疫苗產物的製造的方針，且為重要的冷凍-乾燥製法，其係於低壓條件，經由昇華移除水，且遺留的產物為具小量濕氣的乾燥餅。此製法對包括上述嵌合性黃病毒疫苗為有利的，此乃因該等疫苗於低濕氣環境中傾向更穩定。凍乾亦可提升產物的儲存溫度而使其更易於運送。影響凍乾製法的藥效的重要因素為疫苗的配方。例如，除了移除水外，期望配方增強產物穩定性。典型地，疫苗配方將含有下述成分：填充劑(例如糖)、穩定劑(例如糖或蛋白質)及緩衝

劑。因而，有效率與有藥效的製造方法與配方的開發，為臨床上有用與商業化成功的疫苗（包含上述所討論的黃病毒疫苗）開發的大重點。

【發明內容】

本發明提供之組成物包括一種或複數種活的、減毒的黃病毒疫苗，一種或複數種穩定劑，一種或複數種填充劑，與一種或複數種緩衝劑成分。於一實例中，該穩定劑為人類血清白蛋白(HSA)(例如非重組人類血清白蛋白(HSA)或重組人類血清白蛋白(rHSA)(例如，約 0.05 至 2.0% 或 0.1%)。本發明組成物之填充劑可為乳糖(例如，約 2 至 10% 或 4%)及/或甘露糖醇(例如，約 2 至 10% 或 5%)，本發明組成物之緩衝劑成分可為組胺酸(例如，約 1 至 20mM 或 10mM)及/或麩胺酸鉀(例如約 20 至 80mM 或 50mM)。於冷凍乾燥之前，該組成物可為冷凍-乾燥形式或為液體形式。進一步地，該組成物的 pH 可為例如 6 至 10、7 至 9、7.5 至 8.5 或 7.9 至 8.1。

包含於本發明組成物之活的、減毒的黃病毒疫苗，可為例如嵌合性黃病毒，例如包含第一黃病毒的結構性蛋白質，以及第二不同之黃病毒的非結構性蛋白質的嵌合性黃病毒。於一實例中，該嵌合性黃病毒包含第一黃病毒的預膜(pre-membrane)/膜蛋白質與封套蛋白質，以及該第二不同之黃病毒的外殼蛋白質與非結構性蛋白質。

該第一黃病毒與第二黃病毒獨立地選自下述群組：黃熱病毒(例如 YF17D)、日本腦炎(Japanese encephalitis)

病毒、登革熱(dengue)-1 病毒、登革熱-2 病毒、登革熱-3 病毒、登革熱-4 病毒、墨壘山谷腦炎(Murray Valley encephalitis)病毒、聖路易腦炎(St. Louis encephalitis)病毒、西奈(West Nile)病毒、康寧(Kunjin)病毒、羅西奧腦炎(Rocio encephalitis)病毒、以赫斯(Ilheus)病毒、中歐腦炎(Central European encephalitis)病毒、西伯利亞腦炎(Siberian encephalitis)病毒、俄羅斯春夏腦炎(Russian Spring-Summer encephalitis)病毒、科薩努爾森林疾病(Kyasanur Forest Disease)、阿爾谷瑪(Alkhurma)病毒、鄂木斯克出血熱(Omsk Hemorrhagic fever)病毒、跳躍病(Louping ill)病毒、波瓦森(Powassan)病毒、根岸(Negishi)病毒、亞伯斯特羅(Absettarov)病毒、漢撒洛瓦(Hansalova)病毒、阿波一(Apoi)病毒與海普爾(Hypr)病毒。於一具體例中，該第一黃病毒為日本腦炎病毒或西奈病毒，以及該第二病毒為黃熱病毒(例如 YF17D)。

亦包含於本發明者為組成物，該組成物包含一種或複數種蛋白質為基準及/或病毒為基準的醫藥產物、人類血清白蛋白(例如非重組人類血清白蛋白(HSA)或重組人類血清白蛋白(rHSA)(例如約 0.05 至 2.0%或 0.1%)、麩胺酸鹼金屬鹽(類)(例如麩胺酸鉀)(例如約 20 至 80mM 或 50mM)、一種或複數種其他胺基酸(例如組胺酸(例如約 1 至 20mM 或 10mM))、與一種或複數種糖或糖醇(例如乳糖及/或甘露糖醇)(例如約 2 至 10%、4%或 5%)。於冷凍乾燥之前，該組成物可為冷凍乾燥形式或為液體形式。進一步地，該組成物

的 pH 可為例如 6 至 10、7 至 9、7.5 至 8.5 或 7.9 至 8.1。

於一實例中，該病毒為基準的醫藥產物包含天花疫苗（例如痘疫苗或經減毒痘疫苗，例如，ACAM1000、ACAM2000 或經改質之痘安卡拉 (Modified Vaccinia Ankara; MVA)）。於另一實例中，該蛋白質為基準的醫藥產物包括 B 型肝炎病毒核心蛋白融合物（例如進一步包含一種或複數種流感 M2e 肽的 B 型肝炎病毒核心蛋白融合物）。進一步地，於另一實例中，該蛋白質為基準的醫藥產物包含芽孢桿菌 (*Clostridium difficile*) 的毒素或類毒素。

製備醫藥組成物的方法亦包含於本發明，其包括將上文所述之組成物進行冷凍-乾燥步驟。此步驟可包括下述步驟：冷凍、主要乾燥與次要乾燥。於一實例中，該冷凍步驟包括於約 -50°C 冷凍約 120 分鐘。該主要乾燥步驟可包括設定溫變步驟 (ramp steps)，包括設定溫變於約 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至約 -40°C 的棚架溫度，維持約 500 分鐘；設定溫變於約 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至約 -35°C 的棚架溫度，維持約 500 分鐘；設定溫變於約 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至約 -30°C 的棚架溫度，維持約 500 分鐘；與設定溫變於約 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至約 -25°C 的棚架溫度，維持約 800 分鐘。於此實例中，該次要乾燥步驟可包括設定溫變步驟，包括設定溫變於約 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至約 $+20^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持約 800 分鐘。

於另一實施例中，冷凍步驟可包括於約 -40°C 冷凍約 60 分鐘。主要乾燥步驟可包括設定溫變步驟，包括設定溫變於約 $+0.5^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至約 -5°C 的棚架溫度，維持約 300 分

鐘；以及設定溫變於約 -0.5°C /分鐘至約 -0°C 的棚架溫度，維持約 300 分鐘。次要乾燥步驟可包括設定溫變步驟，包括設定溫變於約 $+0.2^{\circ}\text{C}$ /分鐘至約 $+30^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持約 600 分鐘；以及設定溫變於約 -1.0°C /分鐘至約 $+5^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持約 9999 分鐘。

本發明亦包括於個體預防或治療一種或複數種疾病或狀況的方法，該方法包括投藥上文及本文他處所述之本發明的一種或複數種組成物。於該等方法之具體例中，該個體處於發展或患有黃病毒(例如日本腦炎病毒、西奈病毒、登革熱病毒或黃熱病毒感染)、天花、流感病毒或芽孢桿菌的風險。進一步地，本發明亦包括本文所述組成物與製劑，於本文所述的疾病與狀況的預防及治療的用途，以及使用於該等目的之醫藥品的製備。一般而言，若個體未患有疾病，該方法實用於「預防」該個體之疾病、狀況或感染。若個體患有該疾病、狀況或感染，則該方法實用於「治療」該個體之疾病、狀況或感染。以降低未投藥時所獲得的效果，或去除該等效果而完成預防及/或治療。

本發明提供數種優勢。例如，如上所討論，對於包括蛋白質及/或病毒組成分的醫藥組成物的有效使用而言，例如疫苗，於運送與儲存的變化條件下該等組成物仍維持穩定為重要的。如下文所進一步討論，本發明提供配方及處理步驟以使組成物的製劑具有增強的穩定性。本發明的其他特徵與優勢將由下文詳細說明、圖式與申請專利範圍明顯可知。

【實施方式】

本發明提供組成物與方法，其可使用於病毒為基準及/或蛋白質為基準的醫藥產品的製備，包括活病毒疫苗，如下文進一步所討論者。本發明之組成物包括如下文所述組成份(例如特定穩定劑、填充劑及緩衝劑)，本發明人們已發現於疫苗製備為有利的，而本發明方法包括凍乾之步驟亦提供優勢。本發明亦提供應用本發明組成的預防與治療的方法。本發明之組成物與方法進一步如下文所述。

本發明之組成物包括一種或複數種蛋白質為基準及/或病毒為基準的治療劑，以及一種或複數種穩定劑，及/或緩衝劑組成份。本發明組成物之實施例進一步如下文所述，且包括嵌合性黃病毒疫苗、作為穩定劑的人類血清白蛋白(0.1%)、作為填充劑的甘露糖醇(5%)以及乳糖(4%)、與作為緩衝劑組成份的組胺酸(10mM)與麩胺酸鉀(50mM)。除了此具體例，本發明亦包括如其中之組成分的種類於性質及/或量如下文所述的有所變化的組成物。

可存在於本發明之組成物的穩定劑包括人類血清白蛋白。較佳的血清白蛋白為人類血清白蛋白(HSA)，無論為非重組型式或重組型式。可包含於本發明之組成物的血清白蛋白的其他例為牛血清白蛋白。除了血清白蛋白之外，可包含於本發明之組成物的其他穩定劑為明膠，例如人類明膠(例如重組人類明膠，其可為野生型或經基因工程改造)與豬明膠、酪蛋白、PVP與本文所述(或此項技術領域已知)之任何穩定劑的組合。於人類血清白蛋白的情況中，此組

成分的量可為例如約 0.05 至 2.0%、0.075 至 1.0% 或 0.1%。

可存在於本發明組成物之填充劑包括糖類，例如乳糖、蔗糖及果糖，及/或糖醇類，例如甘露糖醇與山梨糖醇。如下文進一步所討論者，於本發明之組成物中包含甘露糖醇，其可較佳為此組成分為非晶型而非結晶型。進一步地，於某些實例中，較佳用於本發明之組成物之填充劑包括糖類及/或糖醇類的組合。於一實施例中，其進一步如下文所討論者，本發明之組成物可包括乳糖與甘露糖醇的組合，後者較佳為非晶型。於一實例中，乳糖存在於約 1 至 10%、2 至 8% 或 4 至 6% (例如 4%)，而甘露糖存在於 1 至 10%、2 至 8% 或 4 至 6% (例如 5%)。

如上所注意者，除了穩定劑與填充劑之外，本發明之組成物可包括緩衝劑組成份，例如胺基酸類，其可作為對例如特定 pH 濃度或範圍及/或產物穩定性之維持有貢獻。可包含於本發明組成物之緩衝劑組成份之一實例為組胺酸，其可以約 1 至 20、5 至 15 或 10mM 的濃度存在於組成物中。緩衝劑組成份之另一實例為麩胺酸鹼金屬鹽類，例如麩胺酸鈉或麩胺酸鉀，其可以約 10 至 100、25 至 75 或 50mM 的濃度存在於組成物中。進一步地，一般而言，組成物的 pH 為 6 至 10、7 至 9、7.5 至 8.5 或 7.9 至 8.1。

本發明之組成物更可包括一種或複數種活性、治療性組成份，其可為胜肽為基準或蛋白質為基準的治療劑，與病毒，例如活的、減毒的病毒疫苗。後組治療劑(活的、減毒的病毒疫苗)型之一實例為黃病毒疫苗，例如黃熱病毒疫

苗。該黃熱病毒疫苗之具體例為 YF17D 疫苗株 (Smithburn 等人 “Yellow Fever Vaccination,” World Health Org., p. 238, 1956; Freestone, in Plotkin 等人 (eds.), Vaccines, 2nd edition, W. B. Saunders, Philadelphia, 1995)。其他黃熱病毒株，例如 YF17DD (GenBank 讀取編號 U 17066) 及 YF17D-213 (GenBank 讀取編號 U17067) (dos Santos 等人 Virus Res. 35:35-41, 1995)、YF17D-204 France (X15067, X15062)、YF17D-204、234 US (Rice 等人 Science 229:726-733, 1985; Rice 等人 New Biologist 1:285-296, 1989; C 03700, K 02749) 及由 Galler 等人所描述之黃熱病毒株 Vaccine 16 (9/10):1024-1028, 1998，亦可存在於本發明之組成物中。

可存在於本發明之組成物之其他黃病毒包括其他蚊媒傳播黃病毒，例如日本 (例如 SA14-14-2) 腦炎病毒、登革熱病毒 (血清型 1 至 4)、墨壘山谷腦炎 (Murray Valley encephalitis) 病毒、聖路易腦炎 (St. Louis encephalitis) 病毒、西奈 (West Nile) 病毒、康寧 (Kunjin) 病毒、羅西奧腦炎 (Rocio encephalitis) 病毒及以赫斯 (Ilheus) 病毒；以及蜱媒傳播黃病毒，例如中歐腦炎 (Central European encephalitis) 病毒、西伯利亞腦炎 (Siberian encephalitis) 病毒、俄羅斯春夏腦炎 (Russian Spring-Summer encephalitis) 病毒、科薩努爾森林疾病 (Kyasanur Forest Disease)、阿爾谷瑪 (Alkhurma) 病毒、鄂木斯克出血熱 (Omsk Hemorrhagic fever) 病毒、跳躍病

(Louping ill) 病毒、波瓦森 (Powassan) 病毒、根岸 (Negishi) 病毒、亞伯斯特羅 (Absettarov) 病毒、漢撒洛瓦 (Hansalova) 病毒、阿波一 (Apoi) 病毒與海普爾 (Hypr) 病毒；以及來自肝炎病毒屬的病毒(例如 C 型肝炎病毒)。

除了上文所列舉的病毒以及其他黃病毒之外，嵌合性黃病毒亦可包含於本發明之組成物中。嵌合體(chimera)可由其中之結構蛋白質(群)已由第二個病毒(亦即，測試或預先決定的病毒，參照例如美國專利第 6,696,281 號；美國專利第 6,184,024 號；美國專利第 6,676,936 號；及美國專利第 6,497,884 號)的相對應結構蛋白質(群)所置換之黃病毒(例如骨架黃病毒)所組成。例如，該嵌合體可由黃病毒中之膜蛋白與封套蛋白已由第二、測試病毒(例如西奈病毒、登革熱病毒(血清型 1、2、3 或 4)、日本腦炎病毒、或另一例如本文所述及之任一者病毒)的膜及封套所置換的骨架黃病毒所組成。嵌合性病毒可由病毒之任意組合所製造，但典型地尋求抗免疫性的病毒為插入結構蛋白質(群)的來源。

可包括於本發明之組成物之嵌合性病毒型示的具體實例為黃熱人類病毒疫苗 YF17D，其中的膜蛋白與封套蛋白已由另一黃病毒，例如西奈病毒、登革熱病毒(血清型 1、2、3 或 4)、日本腦炎病毒、聖路易腦炎病毒、墨壘山谷腦炎病毒、或例如所列舉之一者的任何其他黃病毒的膜蛋白及封套蛋白所置換。使用此方法製造之嵌合性黃病毒已指名為 "ChimeriVax" 病毒。下述嵌合性黃病毒，其係使用

ChimeriVax™技術製造且寄存於美國菌種收集保存中心(ATCC)於 Manassas, Virginia, U.S.A.，根據布達佩斯條約且獲得寄存日為 1998 年 1 月 6 日，可使用於製造本發明之病毒：嵌合性黃熱病毒 17D/日本腦炎病毒 SA 14-14-2 病毒(YF/JE A1.3; ATCC 讀取編號 ATCC VR-2594)。

可使用於本發明之製造嵌合性病毒之詳細敘述係提供於例如下述文獻：WO 98/37911; WO 01/39802; Chambers 等人， J. Virol. 73:3095-3101, 1999; WO 03/103571; WO 2004/045529; 美國專利第 6,696,281 號；美國專利第 6,184,024 號；美國專利第 6,676,936 號；及美國專利第 6,497,884 號。可存在於本發明之組成物的嵌合性黃病毒之其他具體實例，且可包括特定減毒的突變，係敘述於例如 WO 02/072835、WO 02/102828、WO 03/103571、WO 2004/045529、WO 2005/082020、WO 2006/044857、WO 2006/116182 及美國專利第 6,589,531 號。

可存在於本發明之組成物之其他病毒疫苗包括天花疫苗(例如痘病毒為基準的疫苗，包括 ACAM1000、ACAM2000、經改質痘安卡拉(MVA)、及 Lister 株，以及猴天花為基準的疫苗)，以及疱疹病毒及疫苗(例如 HSV-1 及其重組物與 HSV-2 及其重組物)(參照例如美國專利第 7,115,270 號)。

除了病毒之外，本發明之組成物亦可包括治療性或疫苗胜肽或蛋白質，例如 B 型肝炎病毒芯蛋白質融合結構物(例如，B 型肝炎病毒芯蛋白質融合一種或複數種流感胜肽，例如 M2e；參照例如 WO2005/055957)與芽孢桿菌類毒

素疫苗類(包括，例如類毒素 A 及/或 B)。

如上文或本文其他處所述及的組成物可為冷凍-乾燥型式，或液體型式，例如冷凍-乾燥步驟之前或之後。如本文進一步所討論者，本發明之組成物特別有利於活性組成分之穩定性，其大部份起因於配方物及製備產物的方法包括凍乾(lyophilization)。一般而言，此方法包括下述步驟；冷凍、主要乾燥、次要乾燥及注塞(stoppering)。此方法進一步敘述於下文，於試驗實例中，但此方法之一實例係如下述者。

於冷凍步驟中，凍乾棚架預冷至 -50°C 。一旦所有盤皆裝載後，棚架維持於 -50°C 、120 分鐘。於主要乾燥步驟中，真空設定於 25mT，且進行下述設定溫變步驟：設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ /分鐘至 -40°C 的棚架溫度，維持約 500 分鐘；設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ /分鐘至 -35°C 的棚架溫度，維持約 500 分鐘；設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ /分鐘至 -30°C 的棚架溫度，維持約 500 分鐘，以及設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ /分鐘至 -25°C 的棚架溫度，維持約 800 分鐘。於次要乾燥步驟中，真空設定於 25mT，且進行設定溫變步驟例如設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ /分鐘至 $+20^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持約 800 分鐘。必要時，於注塞前(stoppering)，產物可維持於 $+20^{\circ}\text{C}$ 、25mT 至額外的 24 小時。於注塞步驟中，使用 $0.22\mu\text{m}$ 過濾之乾燥氮氣釋氣(outgas)於室，真空設定於 800mbar(稍微真空)，且將塞子推入小瓶。可使用於本發明之替代的凍乾循環係總結於下表。

表 1-替代凍乾循環

步驟	棚架溫度	維持時間
冷凍循環		
預冷凍乾棚架	5°C	未實施
裝載盤，維持	5°C	≥30 分鐘
設定溫變於-2.0°C/分鐘	-5°C	15 分鐘
設定溫變於-1.0°C/分鐘	-40°C	60 分鐘
主要乾燥		
真空於 25 mT		
設定溫變於+0.5°C/分鐘	+5°C	300 分鐘
設定溫變於-0.5°C/分鐘	0°C	300 分鐘
次要乾燥		
真空於 25 mT		
設定溫變於+0.2°C/分鐘	+30°C	600 分鐘
設定溫變於-1.0°C/分鐘	+5°C	9999 分鐘
注塞		
使用 0.22 μm 過濾之乾燥氮氣釋氣於室	+20°C	未實施
設定真空至 800 mbar (稍微真空)	+20°C	未實施
將塞子推入小瓶	+20°C	未實施
使用 0.22 μm 過濾之乾燥氮氣釋氣於室至大氣壓	+20°C	未實施

因此，本發明之方法可包括冷凍於或冷凍至約例如 -70°C 至 -30°C (例如 -60°C 至 -40°C 或 -50°C)。該冷凍可進行約 30 至 240 分鐘(例如 60 至 120 分鐘)或更久。之後該物質可進行一種或複數種乾燥步驟，如本文所述。於該等步驟中，可應用真空(例如 25mT)以及溫度可逐漸改變(例如 0.1 至 1.0°C /分鐘或 0.5°C 分鐘)於一段時間歷程(如 100 至 1000 分鐘，例如 200 至 600 或 300 至 500 分鐘)。於主要乾燥步驟中，溫度可提升至約例如 -30°C 至 +10°C，例如

-20 至 +5°C 或 -15°C 至 0°C，而於次要乾燥步驟中，溫度可改變為例如 +5°C 至 +35°C，例如 10°C 至 30°C 或 15°C 至 20°C。如此項技術領域中具有通常知識者所知，該等參數（例如溫度、維持時間、設定溫變速率及真空程度）可根據例如所獲得的結果而加以變化。

於配方之前，可包括於本發明之組成物之病毒（包括嵌合體）可使用此項技術領域的標準方法製造。例如，對應於病毒基因體之 RNA 分子可導入至原代細胞、雞胚胎細胞或二倍體細胞株，而後由該等（或該等之上清液）可純化子代病毒（progeny virus）。可使用於製造病毒之另一方法係應用異倍體（heteroploid）細胞，例如 Vero 細胞（Yasumura 等人 Nihon Rinsho 21:1201-1215, 1963）。於此方法中，對應於病毒基因體之核酸分子（例如 RNA 分子）係經導入至該異倍體細胞，由細胞已被收集之培養基收集病毒，所收集的病毒使用核酸酶（例如降解 DNA 與 RNA 兩者的核酸內切酶，例如 Benzonase™；美國專利第 5,173,41 號）處理，濃縮經核酸酶處理的病毒（例如使用具有分子量切分（例如 500kDa）的過濾器之超過濾的使用），以及經濃縮的病毒經配方用於疫苗目的。此方法之詳細內容係提供於 WO 03/060088 A2，其合併於本文作為參考文獻。

本發明之疫苗組成物可作為初段預防劑投藥至處於感染風險者，或可使用於治療已感染患者的第二段藥劑。由於某些該等組成物中之病毒為經減毒的，其特別適合用於對”處於風險個體”投藥，例如老年人、兒童或 HIV 感染

患者。該疫苗亦可使用於獸醫學情況，例如用於馬對抗西奈病毒感染的接種，或用於鳥類（例如有價值、瀕臨絕種或馴養的鳥類，分別例如紅鶴、禿鷹及鵝類）接種。進一步地，本發明之疫苗可包括病毒，例如嵌合性病毒，該病毒包括特定突變，與缺乏該等突變之病毒之混合物中。

本發明之疫苗可使用此項技術領域已知的方法投藥，以及投藥該等疫苗的合適量可由此項技術領域中具有通常知識者容易地決定。決定對投藥者之病毒之合適量，可藉由考慮例如要投藥病毒之個體之大小與一般健康狀況的因素而決定。例如，本發明之病毒可配方為無菌水溶液於 0.1 至 1.0ml 之劑量容積中含有界於 10^2 與 10^8 ，例如 10^3 至 10^7 ，感染單位（例如溶菌斑形成單位 (plaque-forming units) 或組織培養感染劑量），藉由例如肌肉內、皮下或真皮內的途徑投藥。此外，黃病毒能經由黏膜途徑，例如經口途徑 (Gresikova 等人 "Tick-borne Encephalitis," In *The Arboviruses, Ecology and Epidemiology*, Monath (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988, Volume IV, 177-203) 感染人類宿主，本發明之黃病毒為基準的疫苗可藉由黏膜途徑等投藥。進一步地，本發明之疫苗可以單一劑量投藥，或視需要地投藥可包括投藥的初始劑量 (priming dose) 接著為加強劑量 (booster dose)，例如 2 至 6 個月後，可由此項技術領域中具有通常知識者加以合適地決定。

【實施例】

試驗如下文所述於用於兩疫苗的配方物與凍乾的開發進程中進行，該兩疫苗為 ChimeriVax™-WN(嵌合性黃病毒包括黃熱病毒之外殼蛋白與非結構性蛋白質以及西奈病毒之預膜/膜蛋白與封套蛋白)與 ChimeriVax™-JE(嵌合性黃病毒包括黃熱病毒之外殼蛋白與非結構性蛋白質以及日本腦炎病毒之預膜/膜蛋白與封套蛋白)，但該等方向包括於本發明中，以含有其他蛋白質/胜肽及/或病毒之治療性產物等之配方物與方法的觀點，如上述所討論者。

因此，於一實例中，本發明之配方物包括 10mM 組胺酸(胺基酸)、50mM 麩胺酸(胺基酸)鉀、0.1%HSA(人類血清白蛋白，USP)、5%甘露糖醇與 4%乳酸，pH7.9 至 8.1。於本發明之方法之一實例中，凍乾如下述進行。凍乾棚架預冷至 -50°C，且一旦所有盤皆裝載後，棚架維持於 -50°C、120 分鐘。於主要乾燥步驟中，真空設定於 25mT，且步驟包括：設定溫變於 +0.1°C / 分鐘至 -40°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘；設定溫變於 +0.1°C / 分鐘至 -35°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘；設定溫變於 +0.1°C / 分鐘至 -30°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘；及設定溫變於 +0.1°C / 分鐘至 -25°C 的棚架溫度，維持 800 分鐘。於次要乾燥步驟中，真空保持於 25mT，且設定溫變於 +0.1°C / 分鐘至 +20°C 的棚架溫度，維持 800 分鐘。必要時，於注塞前，產物可維持於 +20°C、25mT，多至 24 小時。於注塞步驟中，使用 0.22 μ m 過濾之乾燥氮氣釋氣(outgas)於室，真空設定於 800mbar(稍微真空)，且將塞子推入小瓶。此實例之基礎，以及包括於本發明 配方物

與方法係部分提供於下文。

實例 I-使用甘露糖醇/乳酸配方物之西奈病毒凍乾研究 (WNPd-045)試驗

於此實例所敘述之試驗中，研究使用 5%甘露糖醇、4%乳酸與 10mM 組胺酸為基準之西奈病毒的配方物。完整的配方物顯示於表 2，與相關的玻璃移轉溫度。

表 2: WNPd-045 配方物與玻璃移轉溫度

	基礎	其他組成份	Tg
1	5% 甘露糖醇、4% 乳酸、 10 mM 組胺酸	0.1% HSA, 50 mM 麩胺酸 鉀	-42.4
2	5% 甘露糖醇、4% 乳酸、 10 mM 組胺酸	0.1% rHG-272, 50 mM 麩 胺酸鉀	-42.1
3	5% 甘露糖醇、4% 乳酸 10 mM 組胺酸	0.1% HSA	-40.1
4	5% 甘露糖醇、4% 乳酸、 10 mM 組胺酸	0.1% rHG-272	-39.8

病毒藉由實施 WNPd-001 Clarified Bulk 之 1:100 稀釋至配方緩衝液。配方完成於 BSC。凍乾係於下述條件進行：設定溫變於 0.5°C / 分鐘至 -55°C 的棚架溫度且維持 120 分鐘；當產物溫度接近 -50°C 時，維持 15 分鐘；於 150mT 的反應室(chamber)與於 100mT 的前置管線(foreline)乾燥；設定溫變於 0.2°C / 分鐘至 -20°C 的棚架溫度維持 1034 分鐘於 50mT；以及設定溫變於 0.53°C / 分鐘至 20°C 的棚架溫度於 50mT 且維持大約 862 分鐘。此凍乾循環於約 38 小時完成。

加速的穩定性研究係於經凍乾物質進行。數個凍乾小瓶於 37°C 培養。於第 7 與 14 日，移出小瓶，加標識且置

於-80°C 儲存。所有使用麩胺酸鉀的配方物於 37°C 第 7 日後經歷重大的餅損耗(shrinkage)。WNPD-049 與 WNPD-051 進行 PFU 分析以測定於該等配方物中病毒之穩定性。所有樣品使用 WFI 重新組合。

結果

於凍乾後所有配方物顯現非常類似。餅為完整且未顯現遭受顯著的容積損失。某些餅由小瓶壁脫離但此顯現於配方物中為隨機。表 3 顯示相較於使用於配方物之 Clarified Bulk 物質之冷凍收率與經過凍乾之收率。

表 3: WNPD-045 凍乾與冷凍收率

於 37°C 的 WNPD-045 穩定性	分析	冷凍 (-80°C) 力價	於 -80°C 日數	冷凍收率	第 0 日力價	凍乾 收率
WNPD-045、5% 甘露糖醇、4% 乳酸、10 mM 組胺酸、0.1% HSA、50 mM 麩胺酸鉀	WNPD-049	1.67E+05	7	103%	1.29E+05	80%
	WNPD-051	1.80E+05	14	79%	1.55E+05	68%
WNPD-045、5% 甘露糖醇、4% 乳酸、10 mM 組胺酸、0.1% rHG-272、50 mM 麩胺酸鉀	WNPD-049	5.40E+04	7	34%	7.80E+04	48%
	WNPD-051	5.80E+04	14	26%	1.57E+05	69%
WNPD-045、5% 甘露糖醇、4% 乳酸、10 mM 組胺酸、0.1% HSA	WNPD-049	1.55E+05	7	96%	1.45E+05	90%
	WNPD-051	1.46E+05	14	64%	1.23E+05	54%
WNPD-045、5% 甘露糖醇、4% 乳酸、10 mM 組胺酸、0.1% rHG-272	WNPD-049	2.18E+05	7	135%	3.10E+04	19%
	WNPD-051	3.30E+04	14	15%	7.90E+04	35%

表 4： 於 37°C 的 WNPД-045 穩定性

於 37°C 的 WNPД-045 穩定性	分析	第 0 日之 力價	第 7 日之 力價	第 7 日之 對數損失	第 14 日之 力價	第 14 日之 對數損失
WNPД-045、5% 甘露糖 醇、4% 乳酸、10 mM 組 胺酸、0.1% HSA、50 mM 麩胺酸鉀	WNPД-049	1.29E+05	5.99E+04	0.33		
	WNPД-051	1.55E+05	8.21E+04	0.27	7.64E+04	0.31
WNPД-045、5% 甘露糖 醇、4% 乳酸、10 mM 組 胺酸、0.1% rHG-272、 50 mM 麩胺酸鉀	WNPД-049	7.80E+04	1.51E+04	0.71		
	WNPД-051	1.57E+05	1.05E+04	1.17	3.40E+03	1.66
WNPД-045、5% 甘露糖 醇、4% 乳酸、10 mM 組 胺酸、0.1% HSA	WNPД-049	1.45E+05	6.39E+04	0.36		
	WNPД-051	1.23E+05	5.61E+04	0.34	3.83E+04	0.51
WNPД-045、5% 甘露糖 醇、4% 乳酸、10 mM 組 胺酸、0.1% rHG-272	WNPД-049	3.10E+04	4.50E+03	0.84		
	WNPД-051	7.90E+04	3.20E+03	1.39	3.70E+03	1.33

結 論

使用 HSA 的配方物表現非常好，且具有截至我們目前的最佳結果。於 -80°C 儲存並無顯著損失。該等配方物亦顯示具有平均產率 73% 之非常好的凍乾產率。應注意為該等樣品的餅外觀與目前為止的任何其他配方物更為一致。HSA 配方物的穩定性為非常令人激賞的。於 37°C 第 14 日後，兩配方物顯示 <0.5 對數損失。其顯示含有麩胺酸鉀對配方物有利。

具有重組人類明膠，rHG-272，之配方物未產生如同 HSA 一樣好的結果，但增加 0.1% 濃度時可改善。該等配方物冷凍於 -80°C 時顯示低產率。此支持於 WNPД-033 所見之數據（參照下文），於 rHG-272 配方物冷凍後具有低回復率。具有重組明膠的配方物於 37°C、14 日後的穩定性研

究，亦顯示低損失(>1 對數)。

試驗 II-用於 ChimeriVax™-WN 及 ChimeriVax™-JE 產物之 經凍乾疫苗之開發

此樣品敘述適合用於 ChimeriVax™-WN 及 ChimeriVax™-JE 疫苗之配方物之開發與特徵化，以及用於該等疫苗之凍乾循環之開發與最適化。

試驗過程與結果

過程

配方物

對用於凍乾試驗之配方物大容量(formulation Bulks)，濃縮的 ChimeriVax™-WN 及 ChimeriVax™-JE 之 1:100 稀釋係實施於配方物緩衝劑。配方物緩衝劑組成物根據試驗計劃而變化。配方物大容量之樣品係於凍乾前取樣且儲存於-80℃作為” pre-lyo”樣品。

凍乾

對於達至 WNPD-070 及至 JEPD-144 之試驗，凍乾使用 FTS DuraStop MP 系統進行。由 JEPD-145 開始，使用 Kinetics LyoStar II 系統。凍乾參數根據試驗計劃而變化。3mL 小瓶使用於所有試驗。一般來說，使用 0.5mL 過濾容積，然而，若可以，則使用 0.3mL 過濾容積且加註明。

ChimeriVax™-WN 溶菌斑分析

使用溶菌斑分析估計凍乾方法與穩定性研究之病毒回復率。經凍乾之 ChimeriVax™-WN 樣品使用注射用水(WFI)或用於注射之 0.9%氯化鈉重新組合。重新組合之樣品稀釋

於 WN PFU 培養基。稀釋物以每孔 $100\ \mu\text{l}$ 平敷於經接種每孔 2×10^5 個細胞的 O-Vero 培養盤。培養盤於 37°C 及 $5\%\text{CO}_2$ 中培養 1 小時，之後使用甲基纖維素貼面材 (methyl cellulose overlay) 加以貼面。培養盤於 37°C 與 $5\%\text{CO}_2$ 中培養 96 ± 12 小時，之後使用含 1% 結晶紫之 70% 甲醇染色。清洗經染色之培養盤後計數。可接受之稀釋物具有每孔 10 至 120 個溶菌斑且對各稀釋物之所有孔計數具有 $<40\%$ 的相關標準差。

ChimeriVax™-JE 溶菌斑分析

使用溶菌斑分析估計凍乾方法與穩定性研究之病毒回復率。經凍乾之 *ChimeriVax™-JE* 樣品使用注射用水 (WFI) 或用於注射之 0.9% 氯化鈉重新組合。重新組合之樣品稀釋於 WN PFU 培養基。稀釋物以每孔 $100\ \mu\text{l}$ 平敷於經接種每孔 3×10^5 個細胞的 O-Vero 培養盤。培養盤於 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 中培養 1 小時，之後使用甲基纖維素貼面材 (methyl cellulose overlay) 加以貼面。培養盤於 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 中培養 96 ± 12 小時後，使用含 1% 結晶紫之 70% 甲醇染色。清洗經染色之培養盤後計數。可接受之稀釋物具有每孔 10 至 120 個溶菌斑且對各稀釋物之所有孔計數具有 $<40\%$ 的相關標準差。

穩定性研究

穩定性研究於數個溫度進行。加速的穩定性研究於 37°C 培養箱中完成。樣品亦維持於環境溫度 (15 至 30°C)、 25°C 、 2 至 8°C 及 -20°C 。時間帶 (time zone) 樣品儲存於

-80°C。於某些例子中，樣品於特定日數由提升的溫度拉出且儲存於-80°C以於日後分析。

殘餘濕度分析

殘餘濕度分析使用直接樣品注射至 Coulometric Karl Fischer 進行。此測試係根據 US02-FRM-158-02 經由麻省 Canton 之 Acambis' Quality Control group 完成。

示差掃描熱量計 (*Differential Scanning Calorimetry*)

視差掃描熱量計使用 TA Instruments Q1000 進行。液體樣品冷卻至-70°C 之後設定溫變至 20°C。當需要較高解析度時，使用經調整之方法。該方法所產生的玻璃移轉溫度用於配方物緩衝劑候選者。固體樣品設定溫變由 0°C 至 120°C。使用此方法評估經凍乾物質之玻璃移轉溫度且決定儲存條件。

結果

配方物開發總論

配方物根據下述基準評估：

- Tg' - 經冷凍物質之玻璃移轉溫度
- 經凍乾餅之外觀
- 凍乾回復率
- 經凍乾物質於 37°C 之穩定性
- 經凍乾物質之殘餘濕度
- Tg-經凍乾物質之玻璃移轉溫度

於早期配方物試驗中評估大量數目之賦形劑。起始篩選之組成分包括：山梨糖醇、甘露糖醇、蔗糖、右旋糖、

乳糖、甘胺酸、澱粉代用血漿(hetastarch)、膠體液(pentastarch)、PEG3350、PVP 40K、氯化鈉、氯化鉀、Tween-80、組胺酸、丙胺酸、HEPES、TRIS、麩胺酸鉀、三聚磷酸與磷酸鉀。某些配方物於凍乾後無法產生可接受的餅且具有非常低的病毒回復率(少於 30%)。使用於配方物添加 HSA 作為穩定劑使病毒回復率開始改善。

HSA 試驗

於試驗 WNPDP-021 中，HSA 首先使用作為穩定劑。不同濃度的 HSA 添加至兩基礎配方物。此兩配方物為：

- 1%澱粉代用血漿、1%蔗糖與 50mM 麩胺酸鉀
- 4%乳酸、2%山梨糖醇、10mM 組胺酸、10mM 丙胺酸與 50mM 麩胺酸鉀，以及添加 0%、0.2%、1%與 2%濃度的 HSA。

溶菌斑分析顯示使用 WFI 重新組合為下述產率。

表 5： WNPDP-021 凍乾產率

配方物	收率
WNPDP-021 澱粉代用血漿、0.2% HSA	40.10%
WNPDP-021 澱粉代用血漿、2% HSA	28.06%
WNPDP-021 乳糖/山梨糖醇、0.2% HSA	41.33%
WNPDP-021 乳糖/山梨糖醇、2% HSA	39.80%

試驗 JEPD-018 進一步顯示 HSA 於經凍乾配方物中作為穩定劑的效果。此試驗使用 4%乳酸、2%山梨糖醇、10mM 組胺酸、10mM 丙胺酸與 50mM 麩胺酸鉀之配方物，且檢驗 0%、0.05%、0.1%、1%與 2%的 HSA 濃度。於凍乾後，樣品儲存於 37°C 於加速的穩定性研究。表 6 顯示 HSA 的存在大幅地改善凍乾後病毒回收率。於 37°C 第 5、12 及 19 日後的樣

品力價顯示顯著的回收(第 1 圖)。使用 HSA 濃度高於 0.1% 者，為顯示任何顯著的改進，因此決定專注於使用 0.1% HSA 的配方物。

表 6: JEPD-018 的凍乾產率與由 37°C 之加速的穩定性數

配方物	pre-lyo	第 0 日	凍乾 產率	於 37°C 第 5 日	第 5 日 對數損失	於 37°C 第 12 日	第 12 日 對數損失	於 37°C 第 19 日	第 19 日對 數損失
2% HSA	2.93E+04	2.31E+04	79%	7.70E+03	0.48	6.19E+03	0.57		
1% HSA	2.35E+04	2.52E+04	107%			9.41E+03	0.43	4.60E+03	0.74
0.2% HSA	2.33E+04	2.62E+04	112%	1.01E+04	0.41	9.98E+03	0.42	6.40E+03	0.61
0.1% HSA	2.42E+04	2.06E+04	85%	9.38E+03	0.34	8.70E+03	0.37		
0.05% HSA	2.06E+04	2.00E+04	97%	3.15E+03	0.80	8.93E+03	0.35		
0% HSA	5.17E+03	1.30E+03	25%	7.04E+02	0.27				

亦評估重組穩定劑以了解去除 HSA 的可能性。試驗 JEPD-080 檢驗 Delta Biologics' Recombinant HSA 與 Fibrogen' s recombinant Human Gelatin (2 株-野生型與經基因工程者)之使用。重組人類明膠(rHG)產物使用 0.5%與 1%的濃度。所有穩定劑使用 5%甘露醇、4%乳酸、2%山梨糖醇、10mM 組胺酸、10mM 丙胺酸與 50mM 麩胺酸鉀之基準配方物，然而，一般而言，明膠產物具有不佳的凍乾回復率，且於 37°C 的研究中表現不佳的穩定性。

表 7: JEDP-080 的凍乾收率與由 37°C 之加速的穩定性數據

配方物	-80°C 產率	凍乾 產率	於 37°C 第 9 日的產 率	於 37°C 第 12 日 的產率	於 37°C 第 12 日的對 數損失	於 37°C 第 12 日的力 價
0.2% HSA	-	89%	41%	28%	0.55	3.43E+05
0.2% 重組 HSA	81%	95%	32%	28%	0.56	2.92E+05
0.5% 豬明膠	81%	38%	15%	3%	1.56	1.15E+04
1.0% 豬明膠	93%	93%	11%	1%	2.16	8.10E+03

0.5% rHG (經基因工程者)	88%	101%	3%	2%	1.64	2.82E+04
1.0% rHG (經基因工程者)	70%	48%	7%	3%	1.53	1.33E+04
0.5% rHG (野生型)	74%	41%	14%	5%	1.30	2.08E+04
1.0% rHG (野生型)	63%	35%	15%	3%	1.48	9.90E+03

選擇緩衝劑組成份

組胺酸因其具有 pK 值接近 ChimeriVax™ 產物之最適 pH 範圍而選擇作為緩衝劑組成份。目標的 pH 範圍為 7.9 至 8.1 以及組胺酸具有 8.97 的 pK_3' 。試驗 WNPd-033 測試 5% 蔗糖、0.1% HSA 與 50mM 麩胺酸鉀，以及有或無 10mM 組胺酸之配方物。該等配方物經凍乾且於 37°C 進行加速的穩定性研究。此經凍乾之二配方物於重新組合時具有非常類似的產率（無組胺酸為 74%，有組胺酸為 87%），且於 37°C 顯示類似的穩定性曲線（第 2 圖）。雖然有及無組胺酸為類似曲線，但由於其餘目標 pH 範圍的緩衝能力而選擇其作為配方物組成份。

試驗 WNPd-045 檢測 5% 甘露糖醇、4% 乳酸、0.1% HSA 與 10mM 組胺酸，以及有或無 50mM 麩胺酸鉀之配方物。該二配方物經凍乾且於 37°C 培養 28 日。於 37°C 培養中，以 7 日間隔採取樣品以製造示於第 3 圖之穩定性曲線。二配方物於凍乾後具有相當的產率（高於 80%）。具有 50mM 麩胺酸鉀之配方物相較於無麩胺酸鉀者顯示較佳的 37°C 穩定性。於 28 日後，具有麩胺酸鉀之配方物於力價有 0.26 對數損失。無麩胺酸鉀者有 0.56 對數損失。基於該等數據，決定包括 50mM 麩胺酸鉀於配方物中。

選擇填充劑

乳糖首先於 WNPД-021 中研究作為配方物成份。此試驗產生令人激賞的凍乾產率，如表 5 所示，以及乳糖在進一步於 JEPD-018 中研究且於加速的穩定性研究中顯示非常確信的結果(表 6 及第 1 圖)

試驗 WNPД-029 詳細敘述令人激賞的結果。此試驗使用 4%乳糖、2%山梨糖醇、10mM 組胺酸、10mM 丙胺酸與 50mM 麩胺酸鉀之基準配方物。顯示於獻文之數據強化使用 HSA 作為穩定劑組成分之優點。

表 8: WNPД-029 的凍乾收率與由 37°C 之加速的穩定性數據

WNPД-029 穩定性研究	容積	平均 PFU/mL	總 PFU	步驟收率	對數 損失
Clarified Bulk (來自 WNPД-029)	0.1	4.83E+07	4.83E+06		
WNPД-029 乳糖/山梨糖醇，第 0 日	10	1.40E+04	1.40E+05	2.90%	1.54
WNPД-029 乳糖/山梨糖醇，7 日於 37°C 下	10	1.90E+03	1.90E+04	13.57%	0.87
WNPД-029 乳糖/山梨糖醇，14 日於 37°C 下	10	3.00E+02	3.00E+03	2.14%	1.67
WNPД-029 乳糖/山梨糖醇，0.1% HSA，第 0 日	10	3.42E+05	3.42E+06	70.81%	0.15
WNPД-029 乳糖/山梨糖醇，0.1% HSA，7 日於 37°C 下	10	3.48E+05	3.48E+06	101.84%	-0.01
WNPД-029 乳糖/山梨糖醇，0.1% HSA，14 日於 37°C 下	10	1.28E+05	1.28E+06	37.37%	0.43

於試驗 JEPD-145 中，變化乳糖濃度。濃度 2%乳糖、3%乳糖與 4%乳糖經凍乾後與 5%甘露糖醇、0.1%乳糖、10mM 組胺酸與 50mM 麩胺酸鉀。此試驗顯示 3%及 4%乳糖模式類似，但 2%乳糖於加速的穩定性研究中顯示較不佳(第 4 圖)。由於使用 3%乳糖無明顯的優勢，研究持續使用 4%作為乳糖濃度。

試驗 WNPД-036 以下述三配方物比較：

- 4%乳糖、2%山梨糖醇、10mM 組胺酸、10mM 丙胺酸、50mM 麩胺酸鉀、0.1%HSA
- 4%乳糖、3%蔗糖、10mM 組胺酸、50mM 麩胺酸鉀、0.1%HSA
- 4%乳糖、3%甘露糖醇、10mM 組胺酸、0.1%HSA

表 9：WNPd-036 的凍乾收率與由 37°C 之加速的穩定性數據

WNPd-036 穩定性研究 (來自 WNPd-042)	平均 PFU/mL	步驟收率	對數損失
WNPd-036 4%乳糖、2%山梨糖醇、pre-lyo	2.65E+05		
WNPd-036 4%乳糖、2%山梨糖醇、0 日	1.40E+05	52.93%	
WNPd-036 4%乳糖、2%山梨糖醇、6 日於 37°C 下	8.76E+04	62.57%	0.20
WNPd-036 4%乳糖、2%山梨糖醇、14 日於 37°C 下	5.31E+04	37.93%	0.42
WNPd-036 4%乳糖、3%蔗糖、pre-lyo	1.71E+05		
WNPd-036 4%乳糖、3%蔗糖、0 日	1.41E+05	82.16%	
WNPd-036 4%乳糖、3%蔗糖、6 日於 37°C 下	5.10E+04	36.30%	0.44
WNPd-036 4%乳糖、3%蔗糖、14 日於 37°C 下	1.42E+04	10.11%	1.00
WNPd-036 4%乳糖、3%甘露糖醇、10 mM 組胺酸、pre-lyo	1.59E+05		
WNPd-036 4%乳糖、3%甘露糖醇、10 mM 組胺酸、0 日	1.95E+05	122.64%	
WNPd-036 4%乳糖、3%甘露糖醇、10 mM 組胺酸、6 日於 37°C 下	4.11E+04	21.08%	0.68
WNPd-036 4%乳糖、3%甘露糖醇、10 mM 組胺酸、14 日於 37°C 下	1.39E+05	71.31%	0.15

乳糖 / 甘露糖醇配方物表現佳。於凍乾後具有優良回收率，且於 37°C 兩周後於力價僅顯示 0.15 對數損失。選擇其作為進一步研究之候選者。期望甘露糖醇之結晶性質可用於加速凍乾循環。

單一糖配方物

其他試驗展現分別使用該等填充劑。WNPd-030 檢測僅含有甘露糖醇或蔗糖之配方物。乳糖於 WNPd-047 中研究。該等配方物係與來自 WNPd-045 之含有 5%甘露糖醇與 4%乳糖之兩種糖類組合之配方物比較。WNPd-045 配方物(5%甘露糖醇、4%乳糖、0.1%HSA、10mM 組胺酸、50mM 麩胺酸鉀)之穩定性遠超過任一個單一糖類配方物。所有的單一糖類配方物於 37°C 14 日後顯示小瓶力價損失大於 0.9 對數。該甘露糖醇/乳糖配方物於相同時間歷程僅具有 0.46 對數損失。此顯示於第 5 圖。

退火(*Annealing*)

退火嘗試於二凍乾試驗，JEPd-166 與 JEPd-172。於試驗中，小瓶冷凍於 -50°C，以及之後於 0.8°C /分鐘升溫至 -15°C 且維持 180 分鐘以進行退火。其次，於主要乾燥開始前，溫度於 0.8°C /分鐘降低至 -50°C 且維持一額外的 120 分鐘。

兩試驗產生優良的餅。退火使甘露糖醇結晶，以及外觀為典型的結晶甘露糖醇餅。然而，相較於無退火產生餅之所有試驗，經退火物質顯現較差穩定性。經退火樣品於 37°C 儲存兩周後顯示近 1.0 對數損失，而未經退火樣品於相同時間歷程中，典型地經歷損失於 0.3 至 0.5 對數範圍(第 6 圖)。

該等數據，結合來自單一糖類系統的數據，顯示出結論為結晶甘露糖醇對於 ChimeriVax™ 產物之穩定性並無益

處。

示差掃描熱量計確認退火機實質上使所有甘露糖醇結晶。第 7 圖顯示具有 -32.6°C 脂玻璃移轉溫度之 4% 乳糖溶液的熱量圖 (thermalgram)。第 8 圖顯示添加 5% 甘露糖醇至配方物，玻璃移轉溫度降低約 6°C 為 -38°C 。然而，退火使甘露糖醇結晶且回復玻璃移轉溫度至僅有乳酸之熱量圖中所見的範圍。此玻璃移轉降低的消失確認甘露糖醇完全地結晶。

由該等數據可導出另一結論。當凍乾時乳糖經常保留於非晶型狀態。甘露糖醇，於配方物中藉由其本身，將凍乾為結晶物質，然而，當與其他糖類組合時，甘露糖醇可為結晶或非晶型。之前試驗以顯示於下述情況中為不佳穩定性：

- 乳糖單獨 (4%) - 其中乳糖為非晶型
- 甘露糖醇單獨 (5%) - 其中甘露糖醇為結晶
- 乳糖 (4%) 與甘露糖醇 (5%) 經退火 - 其中甘露糖醇為結晶且乳糖為非晶型

良好的穩定性僅包括該二組成分之配方物之一。當乳糖 (4%) 與甘露糖醇 (5%) 晶凍乾而無任何退火步驟時，乳糖與甘露糖醇兩者皆保留於非晶型狀態。因此，非晶型甘露糖醇或非晶型甘露糖醇 / 乳糖組合對經凍乾之 ChimeriVax™ 賦予優異的穩定性。非晶型乳糖單獨已證實無效，同樣地已證實結晶狀態之任何種類的甘露醇無效。

最終配方物之支持數據

如上所列舉，5%甘露糖醇、4%乳糖、0.1%HSA、10mM組胺酸與 50mM 麩胺酸鉀(pH7.9 至 8.1)係經選擇作為 ChimeriVax™疫苗之配方物緩衝劑。完成數個試驗以特徵化該配方物，以及製造且最適化凍乾循環。

液體穩定性

來自 WNPD-052、JEPD-072 與 JEPD-087 之數據可檢測以顯示此配方物於即時的-80℃儲存試驗中提供優異的穩定性。於該等試驗中，於儲存中無統計上顯著的力價損失(第 9 圖)。此配方物對 ChimeriVax™產物於凍乾前儲存於-80℃時應提供充足穩定性。

示差掃描熱量計

使用示差掃描熱量計(DSC)來測定此配方物之玻璃移轉溫度(T_g')。第 10 圖顯示來自 WNPD-045 樣品之熱量圖。使用經調整之 DSC 分析以改善解析度。第 11 圖為來自 JEPD-172 之樣品，其不使用經調整的掃描而顯示足夠的解析度。二樣品顯示於-38 至-40℃之低玻璃移轉溫度(經由中間點溫度)。

濕度分析

當比較於 37℃ 二周後之殘餘濕度量與疫苗穩定性時可見一趨勢。第 12 圖呈現由試驗 JEPD-072、JEPD-087、

JEPD-145、JEPD-147 與 JEPD-151 所收集之數據，且顯示相較於殘餘濕度百分比之力價損失。

凍乾參數

表 10 之試驗顯示凍乾最終配方物之參數。其亦記錄凍乾後的小瓶產率、經凍乾餅之濕度百分比、經凍乾餅之外觀、與第 1 及 2 周之 37°C 加速的穩定性數據、以及來自 37°C 培養之最大時間點。

表 10：使用最終配方物之試驗之凍乾參數

回數	WNPD-045	WNPD-052	JEPD-072	JEPD-087	JEPD-145	JEPD-147	JEPD-151	JEPD-153	JEPD-166	JEPD-172	JEPD-174
冷凍											
設定溫變	0.5	2.5	0.25	0.5	0.5	預冷	預冷	預冷	預冷	預冷	預冷
溫度	-55	-55	-50	-50	-50	-50	-50	-50	-50	-50	-50
維持時間	120	60	30	60	30	180	180	180	2000	120	120
主要乾燥											
設定溫變	0.2	0.2	0.1	0.2	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
mT	50	50	50	50	50	50	25	25	25	25	25
溫度 1	-20	-12	-20	-20	-20	20	-35	-25	-20	-20	-40
維持	1034	2100	1500	1625	1500	1300	300	1000	1250	1000	500
溫度 2							-30				-35
維持							300				500
溫度 3							-25				-30
維持							300				500
溫度 4							-20				-25
維持							300				800
溫度 5											-20
維持											600
次要乾燥											
設定溫變	0.53	0.5	0.2	0.2	0.2		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

mT	50	50	50	50	25		25	25	25	25	25
溫度	20	20	20	20	20		20	20	30	20	20
維持	862	360	630	1000	1000		2300	500	400	600	650
註									於-15 退 火 180 分 鐘	於-15 退 火 180 分 鐘	
結果											
濕度			1.60%	0.87%	0.92%	1.31%	0.55%				
凍乾收率	83%	84%	67%	56%	50%	86%	93%	72%	76%	74%	69%
餅外觀	稍微與 壁分離	由壁分 離	由角落 與壁分 離	由壁非 常分離	餅分層	餅分層	於角落 有某些 收縮	於角落收 縮	優異	優異	某些角 落收縮
7 日於 37C 之對 數損失	0.31	0.13	0.45		0.48	0.26	0.16*	0.18*	0.57	0.65	0.24
14 日於 37C 之 對數損失	0.37	0.25*	0.65	0.45	0.46	0.55	0.26*	0.32	0.96	0.94	0.49*
於 37C 最多日數	28	96	70	126	34	33	23	14	23	16	7
於作多日樹脂 墮數損失	0.26	1.48	0.92	1.45	0.55	1.14	0.49	0.32	1.12	0.94	0.24

* 註記數目為由穩定性曲線推知

根據該等數據，需要建立能移轉至契作製造者之凍乾循環。JEPD-151 於凍乾後具有最高收率，於 37°C 二周後具有最佳穩定性，最低殘餘濕度與產生由美學觀點為最佳的某些餅(第 13 圖)。由此試驗之凍乾循環作為將給予契作製造者之技術說明書的模式。

技術說明書

該等技術說明書係以 JEPD-151 為基準，但維持時間可延長以補償使用不同凍乾積之潛在規模議題。該等說明書移轉至 Walter Reed Army Institute of Research 用於 ChimeriVax™-WN 與 ChimeriVax™-JE Phase I/II 物質之完成。

冷凍循環

- 預冷凍乾棚架至 -50°C 。
- 一旦所有盤皆裝載後，棚架維持於 -50°C 、120 分鐘。

主要乾燥

- 真空設定於 25mT。
- 設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -40°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘。
- 設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -35°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘。
- 設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -30°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘。
- 設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -25°C 的棚架溫度，維持 800 分鐘。

次要乾燥

- 真空設定於 25mT。
- 設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 $+20^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持 800 分鐘。
- 必要時，於注塞前，產物可維持於 $+20^{\circ}\text{C}$ 、25mT，多至 24 小時。

注塞 (Stoppering)

- 使用 $0.22\ \mu\text{m}$ 過濾之乾燥氮氣釋氣(outgas)於反應室。
- 真空設定於 800mbar(稍微真空)。

· 將塞子推入小瓶。

材料與方法

材料

- WN PFU 培養基 - M199 培養基 (Gibco, Catalog # 12340-030) 含有 10% FBS (Hyclone, Catalog # SH30070.03) 與 1x 盤尼西林青黴素 / 鏈黴素 (Sigma, P4333)
- JE PFU 培養基 - EMEM 培養基含有 10% FBS (Hyclone, Catalog # SH30070.03) 與 1x 盤尼西林 / 鏈黴素 (Sigma, P4333), 1x L- 麩胺鹽胺 (2mM) (Gibco, Catalog # 25030-018) 與 20mM HEPES
- 甲基纖維素貼面材 - 甲基纖維素 (製備如各 SOP# 502-066) 含有 5% or 10% FBS (Hyclone, Catalog # SH30070.03), 1x L- 麩胺鹽胺 (Gibco, Catalog # 25030-018), 1x 抗生素 / 抗真菌素 (Gibco, Catalog # 15240-062)

設備

- FTS Durastop MP 凍乾機
- Kinetics Lyostar II 凍乾機
- Orion Karl Fischer Coulometric Titrator model AF7LC
- TA Instruments DSC Q1000 (ID# 8769)
- Heraeus Heracell 240 培養機 (ID# 9055)
- VWR 低溫培養機 Model 2005 (ID#s 8618 and 8617)

- VWR 冷凍機 (ID# 8663)
- Fischer Scientific Isotemp (ID# 9059)
- Revco Ultima II (ID# 9061)

結論 / 討論

次實例中所呈現之數據列舉用於 ChimeriVax™ 產物之凍乾之配方物的選擇與開發。該配方物已經完全特徵化，且顯示於液體形式具有充足穩定性，且於凍乾後具有優異的回收率與穩定性。於凍乾前，配方物疫苗可儲存於 -80°C 而對力價無任何顯著的影響。此實例亦記錄於 3mL 小瓶填入 0.5mL 所使用之凍乾循環的開發與最適化。此循環應產生可接受外觀之餅、病毒之高回復率 ($>70\%$) 與低殘餘濕度 ($<2\%$)。該經凍乾之產物已於升高的溫度呈現優異的穩定性，且當儲存於 $\leq -10^{\circ}\text{C}$ 的條件下無顯著的力價損失。

上文所述及之所有文獻之內皆併入作為參考文獻。其他具體例係於後文申請專利範圍之範疇中。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示於試驗 JEPD-018 中由 37°C 儲存的力價損失圖。

第 2 圖顯示於試驗 WNPD-033 中有與無組胺酸之穩定性圖。

第 3 圖顯示於試驗 WNPD-045 中在 37°C 中有與無麩胺酸鉀之穩定性圖。

第 4 圖顯示於 JEPD-145 中在 37°C 下以不同濃度乳酸

之穩定性圖。

第 5 圖顯示比較單一糖配方物與甘露糖/乳糖合併物於 37°C 的穩定性圖。

第 6 圖顯示於退火樣品中由 37°C 儲存之力價損失圖。

第 7 圖顯示具有 -32.6°C 玻璃移轉的 4% 乳酸之熱量圖。

第 8 圖顯示當添加 5% 甘露糖至配方物時，玻璃轉溫度受到抑制約 6°C 至 -38°C 的熱量圖。

第 9 圖顯示於 -80°C 之最終配方物的即時穩定性圖。

第 10 圖顯示 WNPd-045 樣品使用經調整的 DSC 分析以改善解析度的熱量圖。

第 11 圖為不使用經調整的掃描而顯示足夠解析度的來自 JEPD-172 樣品的熱量圖。

第 12 圖顯示於指示性試驗中經凍乾的 ChimeriVax™ 之穩定性與殘餘濕度之相關圖。

第 13 圖顯示試驗 JEPD-151 之熱偶合溫度圖。

【主要元件符號說明】

無

公告本**十、申請專利範圍：**

1. 一種冷凍乾燥的醫藥組成物，包括一活的減毒黃病毒疫苗，一或複數種穩定劑，一或複數種填充劑，以及一或複數種緩衝劑成分，其中該一或複數種填充劑包括非晶型甘露糖醇。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該穩定劑為人類血清白蛋白(HSA)。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白為非重組之人類血清白蛋白(HSA)。

4. 如申請專利範圍第 2 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白為重組之人類血清白蛋白(rHSA)。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，包括乳糖作為填充劑。

6. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，包括組胺酸作為緩衝劑成分。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，包括麩胺酸鉀作為緩衝劑成分。

8. 如申請專利範圍第 1 項之組成物，包括組胺酸及麩胺酸鉀作為緩衝劑成分。

9. 如申請專利範圍第 2 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 0.05 至 2.0%(重量/體積%)。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為

0.1%(重量/體積%)。

11. 如申請專利範圍第 5 項所述之組成物，其中該乳糖於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 2 至 10%(重量/體積%)。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述之組成物，其中該乳糖於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 4%(重量/體積%)。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該甘露糖醇於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 2 至 10%(重量/體積%)。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之組成物，其中該甘露糖醇於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 5%(重量/體積%)。

15. 如申請專利範圍第 6 或 8 項所述之組成物，其中該組胺酸於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 1 至 20mM。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之組成物，其中該組胺酸於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 10mM。

17. 如申請專利範圍第 7 或 8 項所述之組成物，其中該麩胺酸鉀於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 20 至 80mM。

18. 如申請專利範圍第 17 項所述之組成物，其中該麩胺酸鉀於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 50mM。

19. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該活的減毒化黃病毒為嵌合性黃病毒。

20. 如申請專利範圍第 19 項所述之組成物，其中該嵌合性黃病毒包括一第一黃病毒的結構性蛋白質，該第一黃病毒中一個或以上的結構性蛋白由一第二個不同的黃病毒蛋白質之相對應結構所置換。

21. 如申請專利範圍第 20 項所述之組成物，其中該第一黃病毒的膜蛋白質與封套蛋白質由該第二個不同的黃病毒的膜蛋白質與封套蛋白質所置換。

22. 如申請專利範圍第 21 項所述之組成物，其中該第一黃病毒與第二黃病毒獨立地擇自下列所組成之族群：黃熱病毒、日本腦炎病毒、登革熱-1 病毒、登革熱-2 病毒、登革熱-3 病毒、登革熱-4 病毒、墨壘山谷腦炎病毒、聖路易腦炎病毒、西奈病毒、康寧病毒、羅西奧腦炎病毒、以赫斯病毒(Illheus viruses)、中歐腦炎病毒、西伯利亞腦炎病毒、俄羅斯春夏腦炎病毒、科薩努爾森林疾病、阿爾谷瑪病毒(Alkhurma viruses)、鄂木斯克出血熱病毒、跳躍病病毒、波瓦森病毒(Powassan viruses)、根岸病毒(Negishi viruses)、亞伯斯特羅病毒(Absettarov viruses)、漢撒洛瓦病毒(Hansalova viruses)、阿波一病毒(Apoi)與海普爾病毒(Hypr viruses)。

23. 如申請專利範圍第 21 項所述之組成物，其中該第一黃病毒為黃熱病毒。

24. 如申請專利範圍第 23 項所述之組成物，其中該黃熱病毒為 YF17D。

25. 如申請專利範圍第 21 項所述之組成物，其中該第

二黃病毒為日本腦炎病毒或西奈病毒。

26. 如申請專利範圍第 1 項所述之組成物，其中該組成物的 pH，在冷凍乾燥前，為 7.9 至 8.1。

27. 一種冷凍乾燥的醫藥組成物，包括一蛋白質或病毒為基礎的醫藥產物、人類血清白蛋白、一麩胺酸鹼金屬鹽、一或複數種其他之胺基酸、以及一或複數種糖或糖醇，其中該一或複數種糖或糖醇包括非晶型甘露糖醇。

28. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白為非重組之人類血清白蛋白。

29. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白為重組之人類血清白蛋白。

30. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該麩胺酸鹼金屬鹽為麩胺酸鉀。

31. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該一或複數種其他之胺基酸為組胺酸。

32. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該一或複數種糖或糖醇包括乳糖。

33. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 0.05 至 2.0%(重量/體積%)。

34. 如申請專利範圍第 33 項所述之組成物，其中該人類血清白蛋白於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 0.1%(重量/體積%)。

35. 如申請專利範圍第 32 項所述之組成物，其中該乳

糖於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 2 至 10%(重量/體積%)。

36. 如申請專利範圍第 35 項所述之組成物，其中該乳糖於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 4%(重量/體積%)。

37. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該甘露糖醇於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 2 至 10%(重量/體積%)。

38. 如申請專利範圍第 37 項所述之組成物，其中該甘露糖醇於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 5%(重量/體積%)。

39. 如申請專利範圍第 31 項所述之組成物，其中該組胺酸於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 1 至 20mM。

40. 如申請專利範圍第 39 項所述之組成物，其中該組胺酸於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 10mM。

41. 如申請專利範圍第 30 項所述之組成物，其中該麩胺酸鉀於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 20 至 80mM。

42. 如申請專利範圍第 41 項所述之組成物，其中該麩胺酸鉀於該組成物中的濃度，在冷凍乾燥前，為 50mM。

43. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該組成物的 pH，在冷凍乾燥前，為 7.9 至 8.1。

44. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該病毒為基礎之醫藥產物包括一天花疫苗。

45. 如申請專利範圍第 44 項所述之組成物，其中該天

花疫苗包括一痘病毒或一減毒的痘病毒。

46. 如申請專利範圍第 45 項所述之組成物，其中該痘病毒或減毒的痘病毒為 ACAM1000、ACAM2000 或經改質痘安卡拉(MVA)。

47. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該蛋白質為基礎之醫藥產物包括一 B 型肝炎病毒核蛋白融合物(core protein fusion)。

48. 如申請專利範圍第 47 項所述之組成物，其中該 B 型肝炎病毒核蛋白融合物更包括一或複數種流感病毒 M2e 胜肽。

49. 如申請專利範圍第 27 項所述之組成物，其中該蛋白質為基礎的醫藥產物包括一芽孢桿菌(*Clostridium difficile*)的毒素或類毒素。

50. 一種製備申請專利範圍第 1 至 26 項任一項之組成物的方法，該方法包括將相對應的液體組成物進行冷凍-乾燥步驟。

51. 一種製備醫藥組成物之方法，該方法包括將申請專利範圍第 27 至 49 項任一項之組合物進行冷凍-乾燥步驟。

52. 如申請專利範圍第 50 項所述之方法，其中該方法包括冷凍步驟、主要乾燥步驟與次要乾燥步驟。

53. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該冷凍步驟包括於 -50°C 冷凍 120 分鐘。

54. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該主要

乾燥步驟包括設定溫變步驟：包括設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -40°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘；設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -35°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘；設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -30°C 的棚架溫度，維持 500 分鐘；以及設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -25°C 的棚架溫度，維持 800 分鐘。

55. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該次要乾燥步驟包括設定溫變步驟：包括設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 $+20^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持 800 分鐘。

56. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該冷凍步驟包括於 -40°C 冷凍 60 分鐘。

57. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該主要乾燥步驟包括設定溫變步驟：包括設定溫變於 $+0.5^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 -5°C 的棚架溫度，維持 300 分鐘；以及設定溫變於 $+0.5^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 0°C 的棚架溫度，維持 300 分鐘。

58. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該次要乾燥步驟包括設定溫變步驟：包括設定溫變於 $+0.2^{\circ}\text{C}$ / 分鐘至 $+30^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持 600 分鐘；以及設定溫變於 -1.0°C / 分鐘至 $+5^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度，維持 9999 分鐘。

59. 一種申請專利範圍第 1 或 26 項所述之組成物用於製備治療或預防因黃病毒感染之疾患或症狀之藥物的用途。

60. 如申請專利範圍第 59 項所述之用途，其中該黃病毒感染為日本腦炎病毒、西奈病毒、登革熱病毒或黃熱病毒的感染。

61. 一種申請專利範圍第 1 或 26 項所述之組成物用於製備治療或預防因天花病毒感染之疾患或症狀之藥物的用途。

62. 一種申請專利範圍第 1 或 26 項所述之組成物用於製備治療或預防因流感病毒感染之疾患或症狀之藥物的用途。

63. 一種申請專利範圍第 1 或 26 項所述之組成物用於製備治療或預防因芽孢桿菌感染之疾患或症狀之藥物的用途。

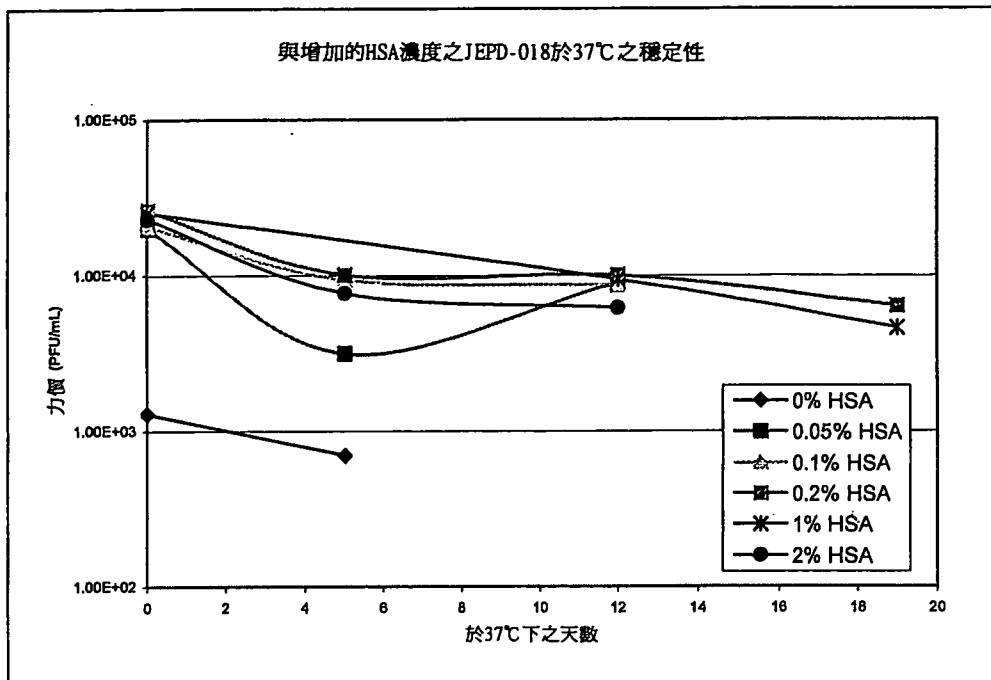
64. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該冷凍步驟包括於 -50°C 冷凍 60 分鐘。

65. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該主要乾燥步驟包括設定溫變至 -25°C 的棚架溫度。

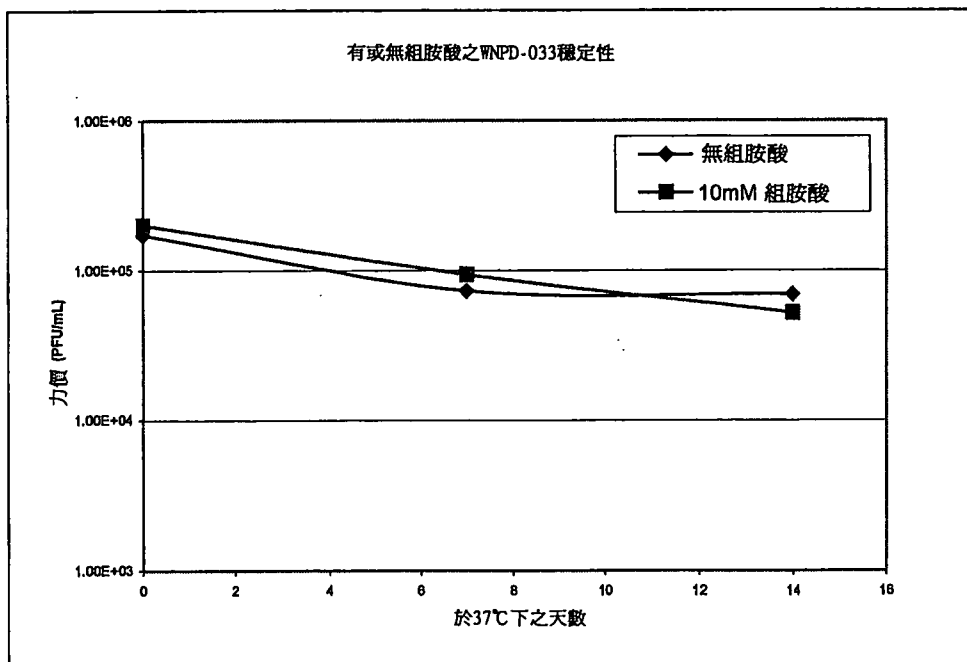
66. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該次要乾燥步驟包括設定溫變於 $+0.1^{\circ}\text{C}/\text{分鐘}$ 至 $+0.5^{\circ}\text{C}/\text{分鐘}$ 至 $+5^{\circ}\text{C}$ 至 $+35^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度。

67. 如申請專利範圍第 66 項所述之方法，其中該次要乾燥步驟包括設定溫變至 $+30^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度。

68. 如申請專利範圍第 66 項所述之方法，其中該 $+5^{\circ}\text{C}$ 至 $+35^{\circ}\text{C}$ 的棚架溫度維持 400 分鐘。

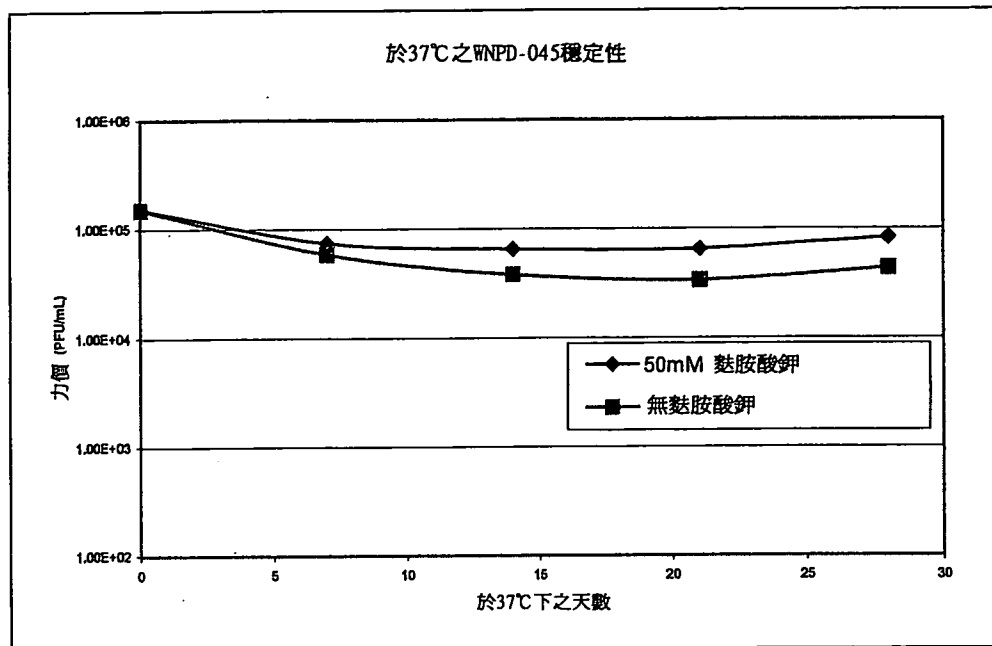
JEPD-018 於 37°C 儲存之力價損失

第1圖

WNPD-033 於 37°C 儲存時有或無組胺酸之力價損失

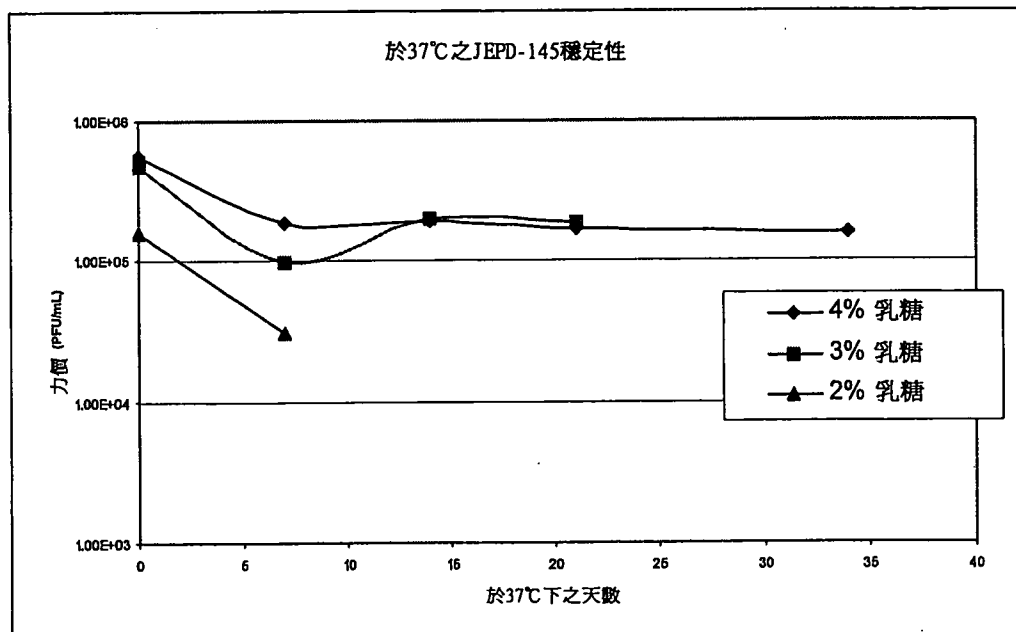
第2圖

WNPD-045 於 37°C 儲存時有或無麩胺酸鉀之力價損失



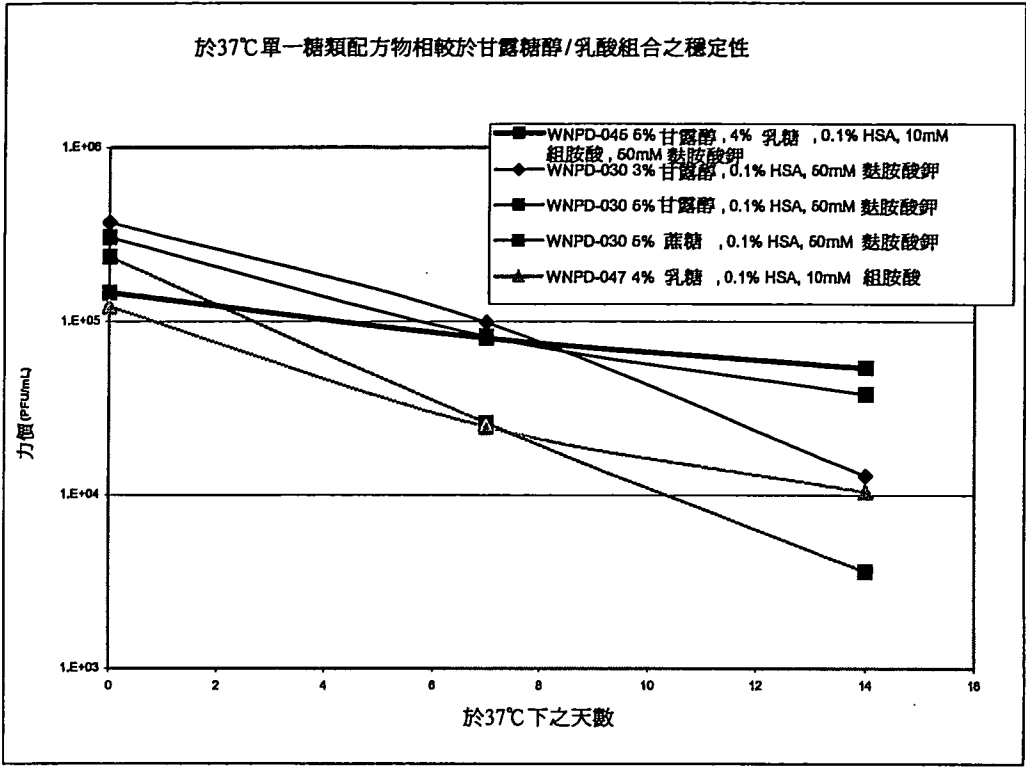
第3圖

JEPD-145 於 37°C 儲存時有不同乳糖濃度力價損失



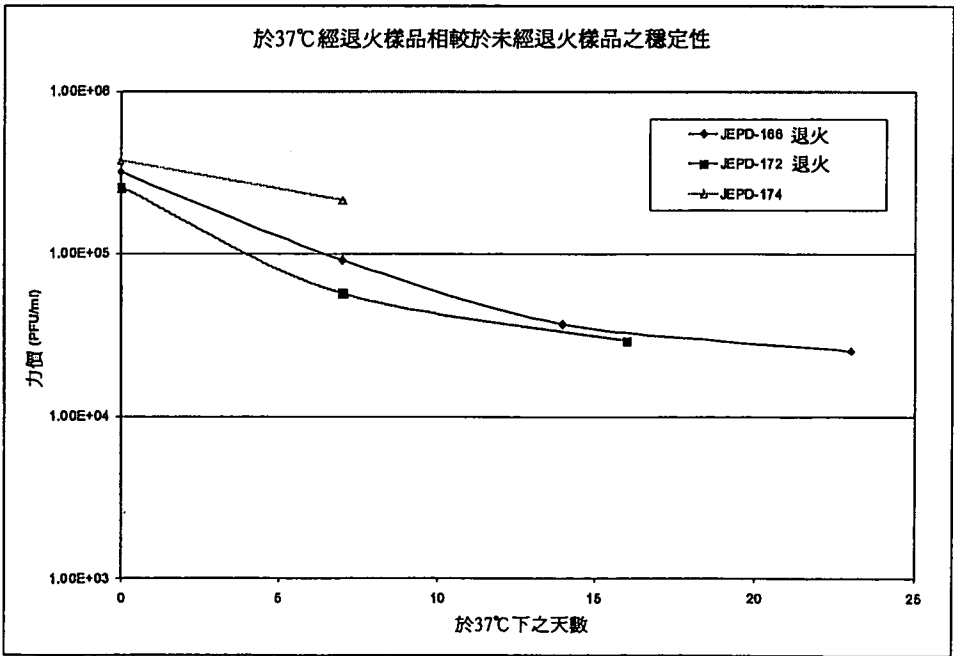
第4圖

單一糖類配方物中於37°C 儲存時之力價損失



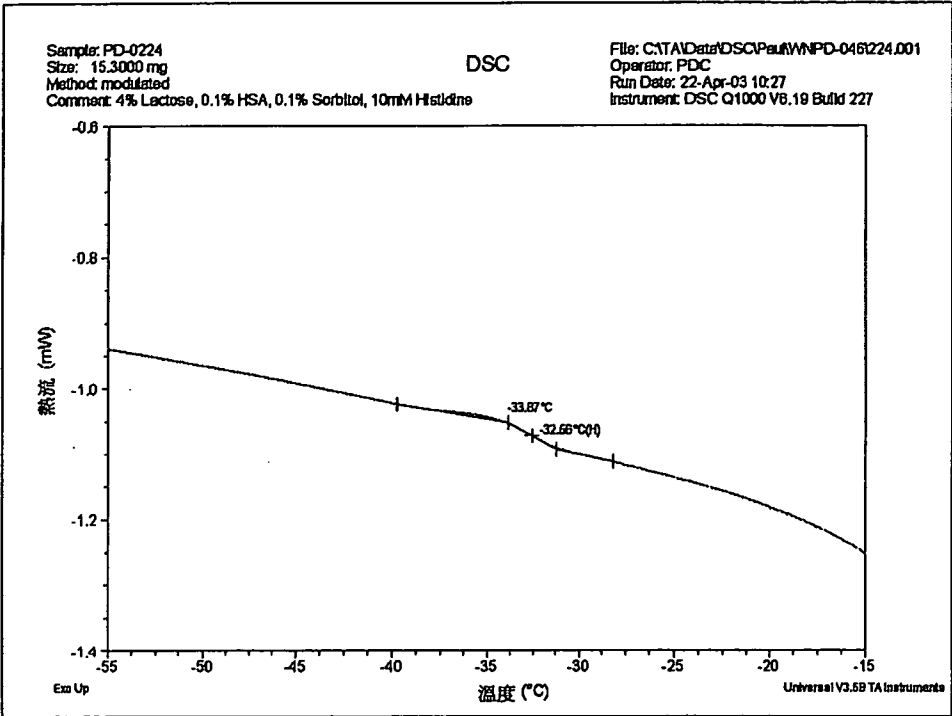
第5圖

於經退火樣品中於 37°C 儲存時力價損失



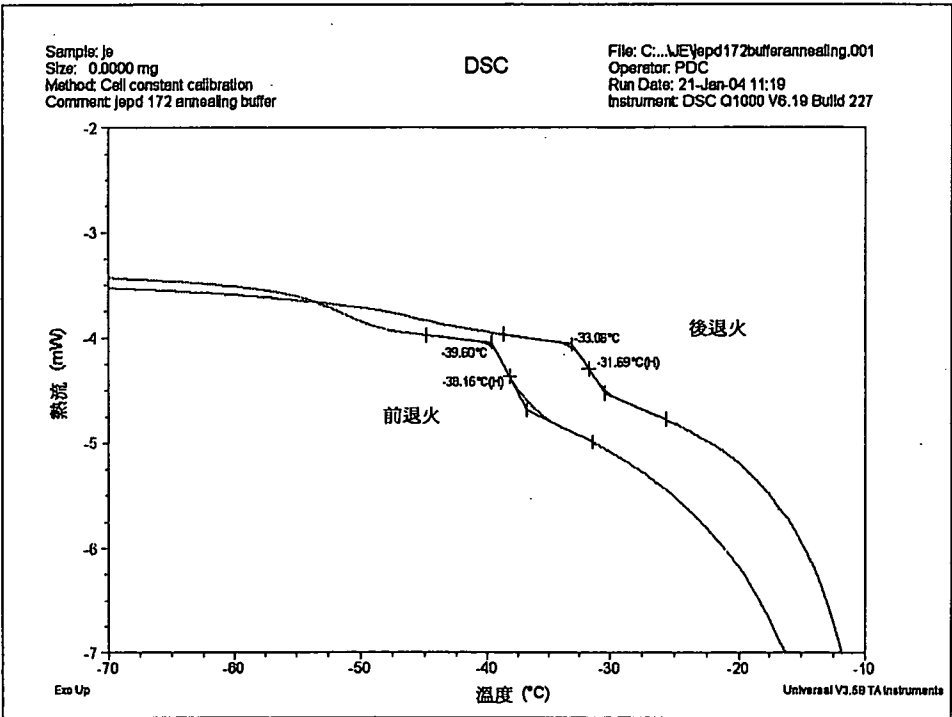
第6圖

4% 乳酸配方物之DSC 熱量圖



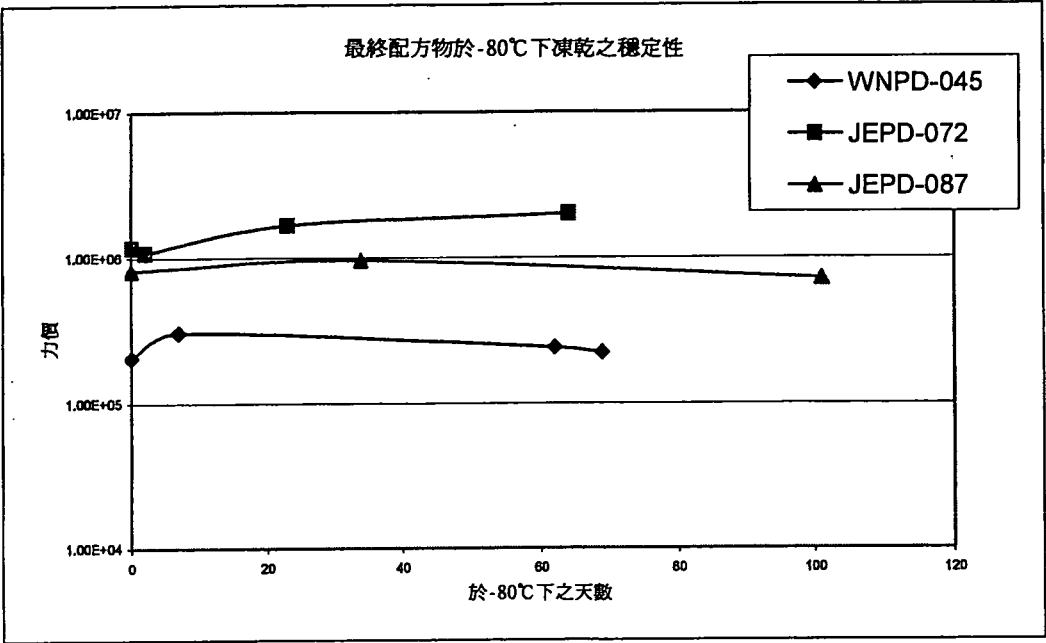
第7圖

5% 甘露糖醇, 4% 乳酸配方物之退火 DSC 熱量圖



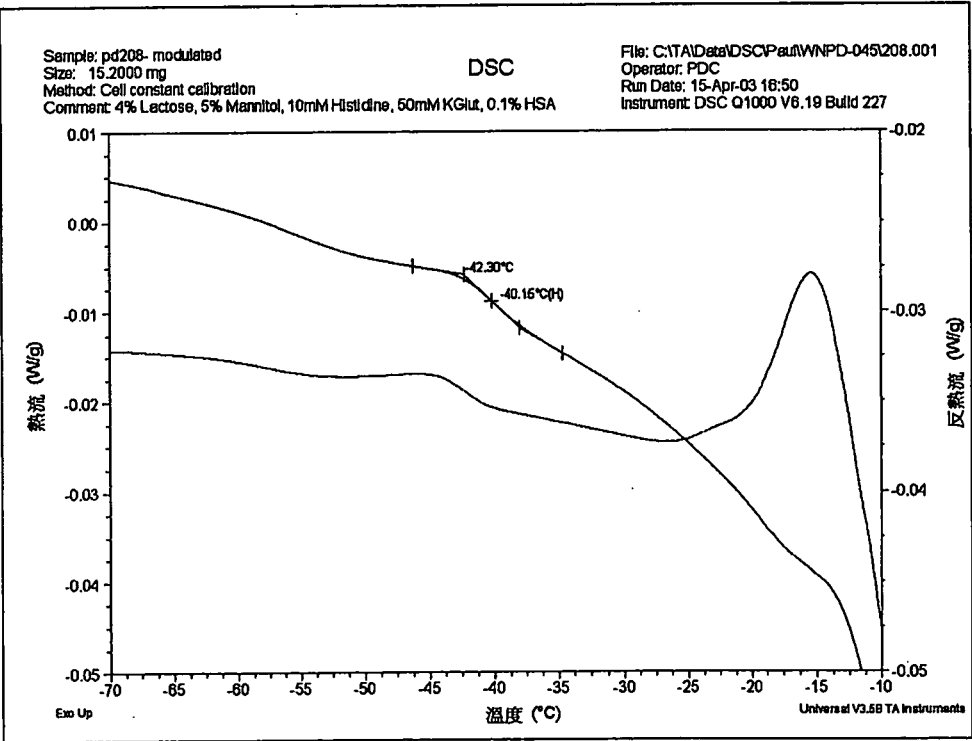
第8圖

最終配方物於 -80°C 之即時穩定性



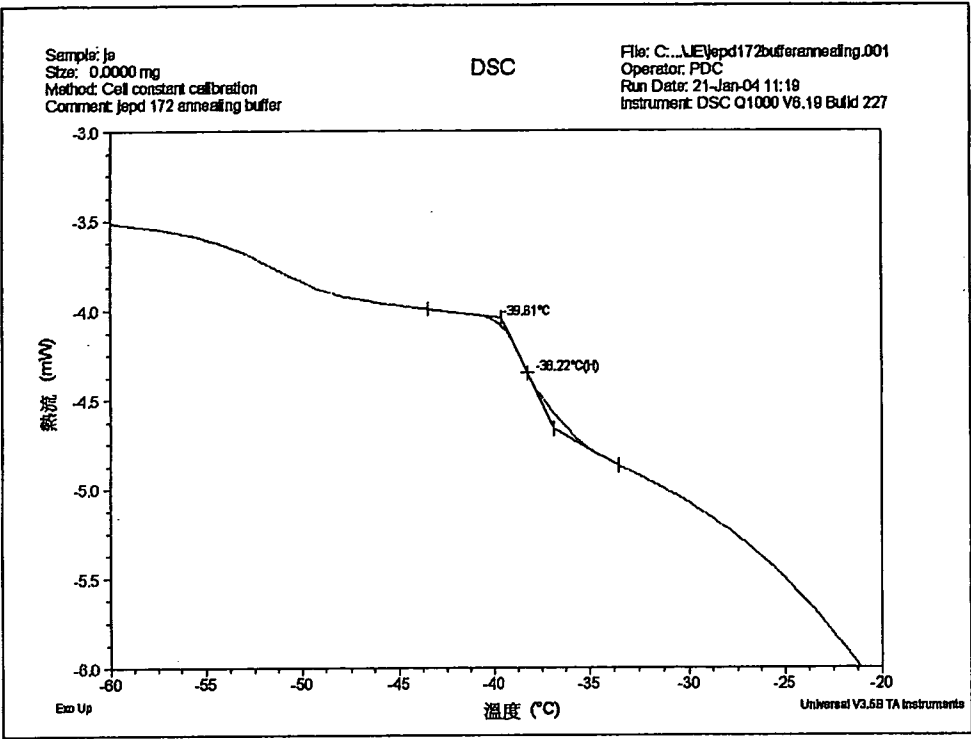
第9圖

最終配方物之 DSC 熱量圖(經調整)



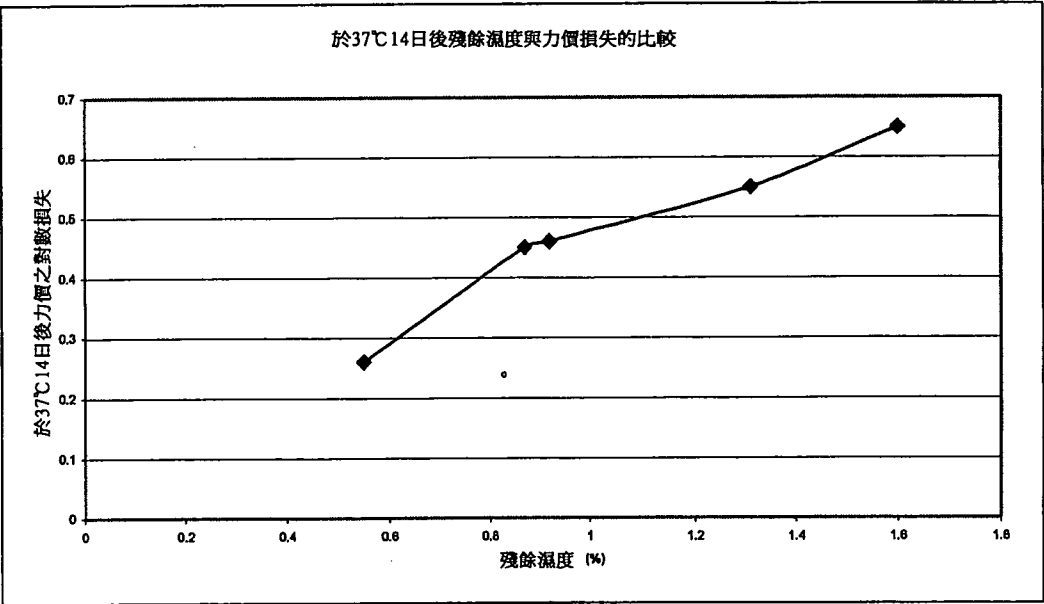
第10圖

最終配方物之 DSC 熱量圖



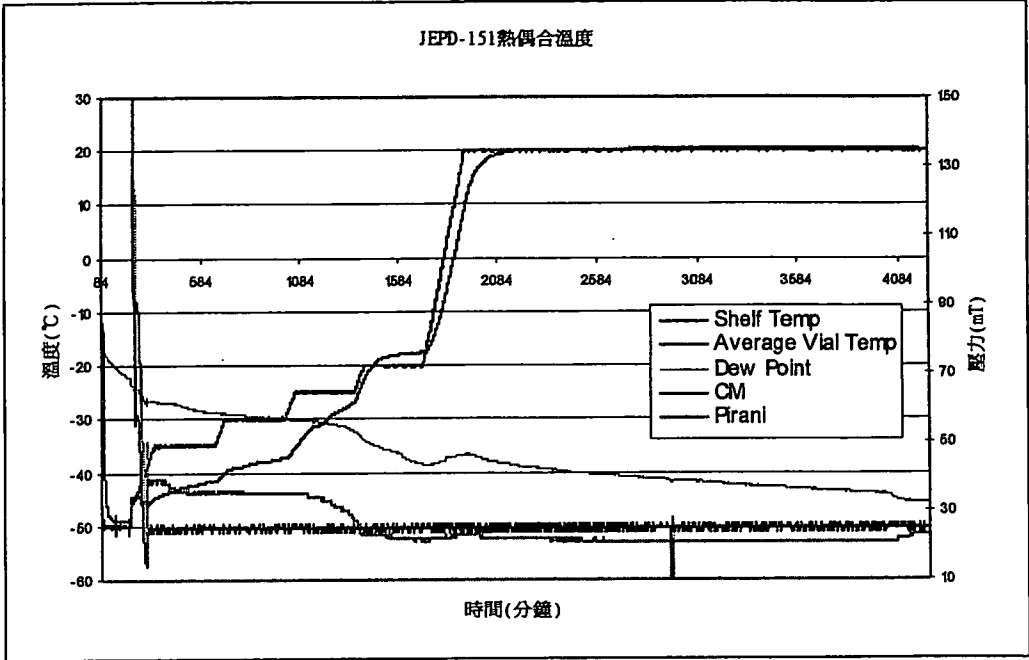
第11圖

經凍乾 ChimeriVax (試驗 JEPD-072, JEPD-087, JEPD-145, JEPD-147, JEPD-151) 之穩定性對殘餘濕度之相關性



第12圖

JEPD-151凍乾數據



第13圖