



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102892409 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201180014386. 6

A61K 31/131(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 03. 31

A61K 31/14(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 33/06(2006. 01)

1005522. 6 2010. 03. 31 GB

A61K 33/08(2006. 01)

1005518. 4 2010. 03. 31 GB

A61K 39/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2012. 09. 17

(56) 对比文件

WO 2005/042029 A2, 2005. 05. 12,

CN 1438874 A, 2003. 08. 27,

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2005/042029 A2, 2005. 05. 12,

PCT/GB2011/000497 2011. 03. 31

审查员 魏秀丽

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/121305 EN 2011. 10. 06

(73) 专利权人 稳定性科技有限公司
地址 英国伦敦

(72) 发明人 杰弗里·德鲁 戴维·伍德华德
阿曼达·科尔泰恩

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240
代理人 张英 王玉桂

(51) Int. Cl.

A61K 9/08(2006. 01)

A61K 9/19(2006. 01)

A61K 31/10(2006. 01)

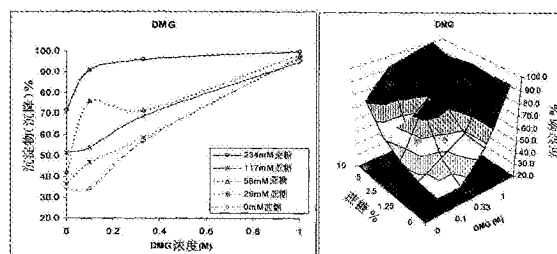
权利要求书2页 说明书36页 附图7页

(54) 发明名称

用于保存铝盐佐剂和铝盐-佐剂化疫苗的方法

(57) 摘要

用于在冷冻或干燥期间保存铝盐佐剂的方法,包括冷冻或干燥含水悬浮液或溶液,所述含水悬浮液或溶液包括:(a) 铝盐佐剂;(b) 式(I)的化合物或其生理用盐或酯或者式(II)的化合物或其生理用盐或酯;以及(c) 可选的一种或多种糖。



1. 一种用于在冷冻或冷冻干燥期间保存铝盐佐剂的方法, 包括冷冻或冷冻干燥含水悬浮液或溶液, 所述含水悬浮液或溶液包括:

(a) 铝盐佐剂;

(b) 0.1M 至 1M 的 N, N- 二甲基甘氨酸、N, N, N- 三甲基甘氨酸、N- 甲基甘氨酸、二甲基砷或 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸、或其生理用盐; 以及

(c) 0.1M 至 1M 的糖, 所述糖是蔗糖或甘露醇。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述含水悬浮液或溶液还包括至少一种抗原。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述含水悬浮液或溶液包括 (b) N, N- 二甲基甘氨酸或其生理用盐。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述铝盐佐剂是磷酸铝或氢氧化铝。

5. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中, 提供的所述或每一种抗原吸收在所述佐剂上。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述糖是蔗糖, 蔗糖的浓度为 0.1 至 0.5M, 并且 N, N- 二甲基甘氨酸、N, N, N- 三甲基甘氨酸、N- 甲基甘氨酸、二甲基砷或 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸、或其生理用盐的列表的浓度为 0.2 至 1M。

7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其中, 蔗糖的浓度为 0.1 至 0.2M。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述糖是甘露醇, 甘露醇的浓度为 0.2 至 0.8M, 并且 N, N- 二甲基甘氨酸、N, N, N- 三甲基甘氨酸、N- 甲基甘氨酸、二甲基砷或 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸、或其生理用盐的浓度为 0.5 至 1M。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述糖是蔗糖, 并且蔗糖的浓度为 0.1 至 0.7M。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述糖是蔗糖, 并且蔗糖的浓度为 0.1 至 0.6M。

11. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述糖是蔗糖, 并且蔗糖的浓度为 0.1 至 0.5M。

12. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中, 所述悬浮液或溶液是冷冻干燥的。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述悬浮液或溶液被冷冻干燥以形成非晶的固体基质。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 形成了经干燥的非晶固体基质, 并且所述固体基质是以密封小瓶、安瓿或注射器中的粉剂形式提供的。

15. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中, 研磨由冷冻干燥所得到的块以形成粉剂, 并且所述粉剂被提供在密封小瓶、安瓿或注射器中。

16. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中, 所述固体基质形成片剂或胶囊剂的一部分。

17. 赋形剂在冷冻或冷冻干燥期间用于保存铝盐佐剂的应用, 所述赋形剂包括 (i) 0.1M 至 1M 的 N, N- 二甲基甘氨酸、N, N, N- 三甲基甘氨酸、N- 甲基甘氨酸、二甲基砷或 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸、或其生理用盐, 以及 (ii) 0.1M 至 1M 的糖, 所述糖是蔗糖或甘露醇。

18. 一种疫苗组合物, 包括:

- 铝盐佐剂;

- 一种或多种抗原;

- 0.1M 至 1M 的 N, N- 二甲基甘氨酸、N, N, N- 三甲基甘氨酸、N- 甲基甘氨酸、二甲基砷

或 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸、或其生理用盐 ; 以及

-0.1M 至 1M 的糖, 所述糖是蔗糖或甘露醇。

19. 一种可由根据权利要求 2 至 16 中任一项限定的方法获得的疫苗组合物。

用于保存铝盐佐剂和铝盐 - 佐剂化疫苗的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于在冷冻或干燥期间保存铝盐佐剂的方法,典型地在冷冻或干燥包含铝盐佐剂和一种或多种疫苗抗原的疫苗制剂期间。

背景技术

[0002] 目前铝盐佐剂是最广泛使用的用于人类和牲畜疫苗的佐剂。铝佐剂化合物包括铝盐,如磷酸铝(AlPO_4)和氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$),其在疫苗佐剂领域中通常称为“明矾(铝盐)”。为了提供充分的免疫原性,认为抗原必须吸附到佐剂的表面上。认为明矾佐剂充当免疫系统刺激物,以及向给予(例如通过注射)的部位提供抗原库,从而提供抗原的逐渐和连续的释放以刺激抗体产生。已知以其天然形式的铝佐剂通常称为凝胶,其为水性介质中的颗粒悬浮液。

[0003] 明矾 - 佐剂化疫苗的储存和运输是有问题的。冷冻干燥(冻干)是一种经常用于改善不同蛋白制剂的长期稳定性的过程(工艺, process)。然而,不能在不对佐剂的结构造成破坏的情况下冷冻干燥包含铝盐佐剂的商用疫苗组合物。冷冻干燥引起佐剂的凝胶结构的崩塌,导致再悬浮于水中时佐剂盐的团聚和沉淀。效果是显著降低了疫苗的免疫原性。

[0004] WO 01/93829 描述了一种制备佐剂化疫苗的方法,包括喷雾干燥或喷雾冷冻干燥水溶液,该水溶液包括:

[0005] (a) 按重量计从 0.1% 至 0.95% 的其中吸附有抗原的铝盐或钙盐佐剂;

[0006] (b) 按重量计从 0.5% 至 6% 的糖类;

[0007] (c) 按重量计从 0.1% 至 2% 的氨基酸或其盐;以及

[0008] (d) 按重量计从 0.02% 至 1% 的胶体物质。

[0009] WO 2008/118691 描述了制备免疫原 - 活性的结合佐剂的经干燥的疫苗组合物的方法,包括(a)使至少一种铝盐佐剂、至少一种缓冲系统、至少一种玻璃形成剂和至少一种抗原相结合,以产生液体疫苗剂型(配方);

[0010] (b) 冷冻液体疫苗剂型以产生冷冻的疫苗剂型;以及(c)冻干已冷冻的疫苗剂型以产生干燥的疫苗组合物。优选玻璃形成剂是海藻糖。

发明内容

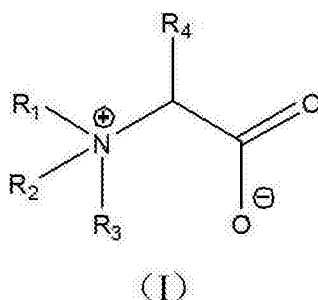
[0011] 出乎意料地,本发明的发明人发现在式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯存在的情况下通过冷冻或干燥,尤其是冷冻干燥佐剂可以降低对铝盐佐剂的结构破坏。额外存在一种或多种糖类可以导致在冷冻或干燥期间进一步降低对佐剂的结构破坏。

[0012] 因此,本发明提供了用于在冷冻或干燥期间保存铝盐佐剂的方法,该方法包括冷冻或干燥含水悬浮液或溶液,其包括:

[0013] (a) 铝盐佐剂;

[0014] (b) 式(I)的化合物或其生理用盐或酯

[0015]



[0016] 其中：

[0017] $-R_1$ 表示氢或 C_{1-6} 烷基；以及

[0018] $-R_4$ 表示氢；或

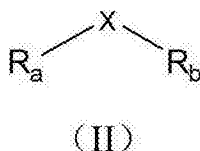
[0019] $-R_1$ 和 R_4 与连接至其的原子一起形成吡咯烷环；

[0020] $-R_2$ 表示氢、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH_2)_{2-5}NHC(O)(CH_2)_{5-15}CH_3$ ；以及

[0021] $-R_3$ 表示 C_{1-6} 烷基；或

[0022] 式(II)的化合物或其生理用盐或酯

[0023]



[0024] 其中：

[0025] $-X$ 表示 $-S(O)_2-$ 或 $-S^+(R_c)-$ ；

[0026] $-R_a$ 和 R_b 独立地表示 C_{1-6} 烷基；以及

[0027] $-R_c$ 表示由羧酸根(羧酸酯,羧酸盐)阴离子和用胺($-NH_2$)部分取代的 C_{1-6} 烷基；以及

[0028] (c)可选地,一种或多种糖类。

[0029] 本发明还提供了：

[0030] $-$ 赋形剂在冷冻或干燥期间用于保存铝盐佐剂的应用,该赋形剂包括(i)本发明的式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯,以及(ii)可选地,一种或多种糖类；

[0031] $-$ 疫苗组合物,包括:铝盐佐剂;一种或多种抗原;本发明的式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯;以及可选地,一种或多种糖类。

[0032] $-$ 由本发明的方法可获得的疫苗组合物;以及

[0033] $-$ 赋形剂作为疫苗组合物的再悬浮剂(重悬剂,resuspension agent)的应用,该赋形剂包括(i)本发明的式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯,以及(ii)可选的一种或多种糖类。

[0034] 冷冻的或干燥的疫苗组合物有利于组合物的适当储存并且使其货架期最大化。组合物可以堆积存放延长的时间段。因而可以保持疫苗的免疫原性、潜能和效能。式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯以及可选的一种或多种糖充当冷冻保护剂(防冻剂),并保护铝盐佐剂免于在冷冻期间遇到的应力,并且也作为冷冻干燥期间的冻干保护剂。

附图说明

[0035] 图1示出了在参考例中,在冷冻氢氧化铝凝胶之后用显微镜分析佐剂的结果。图A

示出了正常的未被破坏的结构的实施例,而图 B 示出了氢氧化铝佐剂冷冻后被破坏的团聚的晶体结构。

[0036] 图 2 示出了在实施例 1 中,在存在各种浓度的蔗糖和二甲基甘氨酸(DMG)的情况下,冷冻氢氧化铝凝胶之后,佐剂凝聚试验的结果。

[0037] 图 3 示出了如使用凝聚试验评估的,在实施例 2 中描述的包含蔗糖和 / 或三甲基甘氨酸(TMG)的剂型中,冻融之后佐剂($\text{Al}(\text{OH})_3$)的恢复率(恢复)。

[0038] 图 4 示出了如通过凝聚试验评估的,在实施例 2 中描述的包含蔗糖和 / 或 S- 甲基-L- 甲硫氨酸(SMM)的剂型中,冻融之后佐剂($\text{Al}(\text{OH})_3$)的恢复率。

[0039] 图 5 示出了在实施例 3 中,在存在各种浓度的蔗糖和二甲基甘氨酸(DMG)、三甲基甘氨酸(TMG)、S- 甲基甲硫氨酸(SMM)或肌氨酸的情况下,冷冻干燥氢氧化铝凝胶之后佐剂凝聚试验的结果。

[0040] 图 6 示出了与对照相比,在实施例 6 中结合至佐剂的 BSA 的百分率。

[0041] 图 7 示出了在实施例 6 中结合至佐剂的 BSA 的浓度。

[0042] 图 8 示出了来自实施例 7 的斑点印迹结果。图 8A 示出了表 19 中给出的储存在 4°C 下的样品的斑点印迹。图 8B 示出了表 19 中给出的储存在 -80°C 下的样品的斑点印迹。

[0043] 图 9 示出了来自实施例 7 的更多斑点印迹结果。图 9A 示出了表 20 中给出的储存在 4°C 下的样品的斑点印迹。图 9B 示出了表 20 中给出的储存在 -80°C 下的样品的斑点印迹。

具体实施方式

[0044] 概述

[0045] 本发明涉及当冷冻或干燥,尤其是冷冻干燥时,降低和 / 或防止对铝盐疫苗佐剂的结构破坏。这样的结构破坏是通过在式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯以及可选地(ii)一种或多种糖类存在下,冷冻或干燥佐剂来降低或防止的。

[0046] 使典型地至少一种抗原吸附在其上的铝盐佐剂与式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯在水溶液中接触。冷冻或干燥得到的含水组合物,其中也可以存在一种或多种糖类。当存在抗原时,该方法是制备包含铝盐佐剂和至少一种抗原的疫苗组合物的方法。在冷冻或干燥之后,在向患者给予疫苗制剂之前可以分别解冻或重组包含铝佐剂的疫苗制剂。

[0047] 本发明使得能够在冷冻或干燥步骤期间保存铝佐剂的结构和功能。因此在冷冻或干燥之后可以保持铝佐剂化疫苗的免疫原性。

[0048] 铝盐佐剂

[0049] 在本发明中可以使用适宜用作佐剂的任何类型的铝盐。铝盐可以是氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)、磷酸铝(AlPO_4)、盐酸铝、硫酸铝、铵明矾、钾明矾或硅酸铝。优选地,使用的铝盐佐剂是氢氧化铝或磷酸铝。最优选地,铝盐佐剂是氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)。

[0050] 典型地,铝盐佐剂采用由铝盐制成的水合凝胶的形式,水合凝胶是含水介质中的颗粒悬浮液。本领域的技术人员公知铝盐佐剂的制备。例如,如本领域的技术人员已知的,通常通过将铝离子的水溶液(典型地以硫酸盐或氯化物)暴露在明确的以及控制的化学环

境中的碱性条件下来制备氢氧化铝和磷酸铝佐剂。可以使用这样的方法,例如,以制备氢氧化铝或磷酸铝的水合凝胶。

[0051] 抗原

[0052] 适宜用于本发明的抗原包括疫苗的任何免疫原性组分。因此,抗原可以是蛋白质、细菌特异性蛋白、黏蛋白、糖蛋白、肽、脂蛋白、多糖、肽聚糖、核蛋白或融合蛋白。

[0053] 抗原可以源于微生物(如细菌、病毒或真菌)、原生动物、肿瘤、恶性细胞、植物、动物、人或过敏原。在一个实施方式中,抗原是蛋白质,但是不包括整个病毒或病毒体。

[0054] 抗原可以是合成的,例如,如使用重组 DNA 技术得到的。抗原可以是疾病相关的抗原,如病原体相关的抗原、肿瘤相关的抗原、过敏相关的抗原、神经缺损相关的抗原、心血管疾病抗原、风湿性关节炎相关的抗原。抗原可以是失活的或减活的/去毒的毒素(类毒素)。

[0055] 特别地,来自于疫苗免疫的病原体可以包括人乳头瘤病毒(HPV)、HIV、HSV2/HSV1、流感病毒(A、B 和 C 型)、付流感病毒、脊髓灰质炎病毒、RSV 病毒、鼻病毒、轮状病毒、A 型肝炎病毒、诺瓦克病毒、肠道病毒、星状病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒、非洲淋巴细胞瘤病毒、腺病毒、风疹病毒、人 T 细胞淋巴瘤 I 型病毒(HTLV-I)、B 型乙肝病毒(HBV)、C 型乙肝病毒(HCV)、D 型肝炎病毒、痘病毒、牛痘病毒、沙门氏菌、奈瑟氏菌、伯氏疏螺旋体、衣原体、梭菌(如 *C. difficile* 和 *C. tetani*)、博德特氏菌(如博德特氏百日咳菌)、棒状杆菌(如 *C. diphtheriae*)、变形体、弓形体病毒、肺炎双球菌、脑膜炎球菌、隐球菌、链球菌、霍乱弧菌、葡萄球菌、嗜血杆菌、杆菌(如炭疽杆菌(炭疽))、埃希氏菌、假丝酵母、曲霉、阿米巴、贾第虫和锥虫。

[0056] 疫苗可以进一步用于针对许多牲畜疾病刺激适宜的免疫应答。因此疫苗抗原可以源于口蹄疫病毒(包括血清型 O、A、C、SAT-1、SAT-2、SAT-3 和 Asia-1)、冠状病毒、蓝舌病病毒、猫白血病毒、禽流感病毒、亨德拉和尼帕病毒、诸如牛病毒性腹泻病毒和犬细小病毒的虫媒病毒。

[0057] 肿瘤相关的抗原包括例如,黑色素瘤相关的抗原、乳腺癌相关的抗原、结肠直肠癌相关的抗原或前列腺癌相关的抗原。

[0058] 过敏原相关的抗原包括适宜用于疫苗的任意过敏抗原,以刺激抑制给予疫苗的个体中的过敏反应(例如源于花粉、尘螨、昆虫、食物过敏原、灰尘、毒药、毒素、毒液和寄生虫的抗原)。

[0059] 式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯

[0060] 式(I)和(II)的化合物可以作为其生理用盐或酯存在。

[0061] 典型地,盐是具有生理用酸的盐,因此包括由无机酸(如盐酸或硫酸)或有机酸(如柠檬酸、酒石酸、苹果酸、马来酸、扁桃酸、反丁烯二酸或甲磺酸)形成的那些。优选盐酸盐。

[0062] 典型地,酯是 C_{1-6} 烷基酯,优选 C_{1-4} 烷基酯。因此酯可以是甲基酯、乙基酯、丙基酯、异丙基酯、丁基酯、异丁基酯或叔丁酯。优选乙基酯。

[0063] 如在本文中使用的, C_{1-6} 烷基优选是 C_{1-4} 烷基。优选的烷基选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和叔丁基。特别优选甲基和乙基。

[0064] 为了避免疑惑,式(I)和式(II)的化合物的定义还包括其中羧酸根(羧酸酯,羧酸盐)阴离子是质子化的以给出 $-COOH$ 的化合物,并且铵或铈阳离子与药用阴离子相关。此外,为了避免疑惑,上文定义的化合物可以以任何互变异构体或对映异构体的形式使用。

[0065] 式(I)的化合物

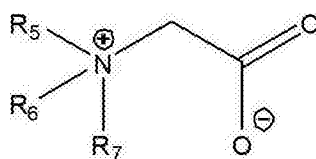
[0066] 典型地, R_1 表示氢或 C_{1-6} 烷基, 并且 R_4 表示氢。典型地, R_2 表示氢或 C_{1-6} 的基。优选地, R_1 表示氢或 C_{1-6} 烷基, R_4 表示氢, 并且 R_2 表示氢或 C_{1-6} 烷基。

[0067] 优选地, 式(I)的化合物是 $N-C_{1-6}$ 烷基-、 N,N -二(C_{1-6} 烷基)-或 N,N,N -三(C_{1-6} 烷基)-甘氨酸或其生理用盐或酯。典型地烷基是 C_{1-4} 烷基。优选的烷基选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基和叔丁基。特别优选甲基和乙基。

[0068] 优选式(I)的化合物是 N -甲基甘氨酸、 N,N -二甲基甘氨酸或 N,N,N -三甲基甘氨酸或其生理用盐或酯。 N -甲基甘氨酸也称为肌氨酸。 N,N -二甲基甘氨酸也称为二甲基甘氨酸(DMG)或 2-(二甲氨基)-乙酸。 N,N,N -三甲基甘氨酸称为三甲基甘氨酸(TMG)。

[0069] 可替换地, 典型地式(I)的化合物是式(IA)的甘氨酸衍生物或其生理用盐或酯:

[0070]

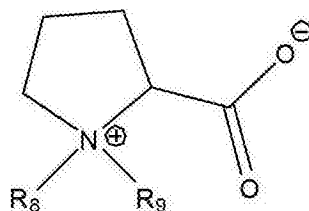


(IA)

[0071] 其中, R_5 和 R_6 独立地表示 C_{1-6} 烷基, 例如 C_{1-4} 烷基如甲基或乙基; 并且 R_7 表示 C_{1-6} 烷基, 例如 C_{1-4} 烷基如甲基或乙基, 或 $-(CH_2)_{2-5}NHC(O)(CH_2)_{5-15}CH_3$ 。优选式(IA)的化合物是三甲基甘氨酸(TMG)和椰油酰胺丙基甜菜碱(CAPB)或其生理用盐或酯。

[0072] 可替换地, 典型地式(I)的化合物是式(IB)的脯氨酸衍生物或生理用盐或酯:

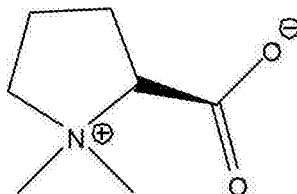
[0073]



(IB)

[0074] 其中, R_8 和 R_9 独立地表示 C_{1-6} 烷基, 例如 C_{1-4} 烷基, 如甲基或乙基。优选地, 式(IB)的化合物是 S -脯氨酸衍生物。优选地, R_8 和 R_9 都表示甲基; 这种化合物称为脯氨酸甜菜碱。特别优选 S -脯氨酸甜菜碱或其生理用盐或酯:

[0075]



[0076] 优选式(IA)的化合物或其生理用盐或酯。

[0077] 最优选地, 式(I)的化合物是 N,N -二甲基甘氨酸或其生理用盐或酯。

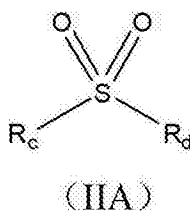
[0078] 式(II)的化合物

[0079] 典型地, R_c 的羧酸根(羧酸酯, 羧酸盐)和胺取代基连接至 R_c 的烷基部分的相同碳

原子。典型地, R_c 是 C_{2-4} 或 C_{2-3} 烷基部分。

[0080] 典型地式(II)的化合物是式(IIA)的砷化合物或其生理用盐或酯:

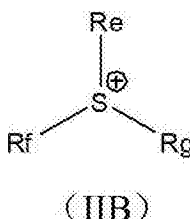
[0081]



[0082] 其中, R_c 和 R_d 独立地表示 C_{1-6} 烷基, 例如 C_{1-4} 烷基, 如甲基或乙基。优选的砷化合物是甲磺酰基甲烷(MSM), 其也称为二甲基砷(DMSO_2)。

[0083] 典型地, 式(II)的化合物是式(IIB)的化合物或其生理用盐或酯:

[0084]



[0085] 其中, R_e 和 R_f 独立地表示 C_{1-6} 烷基, 例如 C_{1-4} 烷基如甲基或乙基, 并且 R_g 表示用羧酸根(羧酸酯, 羧酸盐)阴离子以及用胺($-\text{NH}_2$)部分取代的 C_{1-6} 烷基, 例如 C_{1-4} 烷基如甲基或乙基。优选式(IIB)的化合物是 S-甲基-L-甲硫氨酸(SMM)或其生理用盐或酯。

[0086] 糖类

[0087] 适宜用于本发明的糖类包括还原糖, 如葡萄糖、果糖、甘油醛、乳糖、阿拉伯糖和麦芽糖; 并且优选非还原糖, 如蔗糖和棉子糖。糖可以是单糖、二糖、三糖或其他低聚糖(寡糖)。术语“糖”包括糖醇。

[0088] 设想单糖, 例如半乳糖和甘露糖; 二糖如蔗糖、乳糖和麦芽糖; 三糖如棉子糖以及四糖如水苏糖。海藻糖、伞形糖、毛蕊花糖、异麦芽糖、纤维二糖、麦芽酮糖、松二糖、松三糖和蜜二糖也适宜用于本发明。适宜的糖醇是甘露醇。

[0089] 可以存在两种或多种糖。可以使用两种、三种或四种糖。当在冷冻或冷冻干燥的含水悬浮液中存在一种或多种糖时, 优选存在蔗糖或蔗糖和棉子糖。蔗糖是葡萄糖和果糖的二糖。棉子糖是由半乳糖、果糖和葡萄糖构成的三糖。

[0090] 待冷冻或干燥的含水悬浮液

[0091] 待冷冻或干燥的含水悬浮液可以通过将铝盐佐剂与式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯的水溶液混合制备。特别地, 式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯可以选自二甲基甘氨酸、S-甲基-L-甲硫氨酸、甲磺酰甲烷、肌氨酸和三甲基甘氨酸, 并且例如, 可以是二甲基甘氨酸、S-甲基-L-甲硫氨酸、甲磺酰基甲烷或三甲基甘氨酸。可以使用任何适宜的水溶液。溶液可以是缓冲的。溶液可以是 HEPES、Tris 缓冲的、磷酸盐缓冲的或纯水溶液。

[0092] 可选地, 在与佐剂混合之前, 在水溶液中溶解一种或多种糖。可替换地, 可以在式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯的水溶液中将一种或多种糖与佐剂的悬浮液混合。

[0093] 当存在的情况下, 通常在佐剂与式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯的水溶

液混合之前,使一种或多种抗原吸附在佐剂上。可以以水合凝胶的形式制备佐剂,并且抗原吸附到水合凝胶中。可以使用本领域的技术人员已知的技术进行抗原吸附。例如,对于某些蛋白质抗原,吸附最好可以在佐剂和抗原将具有相反电荷的 pH 间隔内进行,促进静电吸引和吸附。对于特定抗原-佐剂结合的蛋白质吸附,将取决于抗原的性质和化学环境(pH、离子强度、表面活性剂的存在等)。

[0094] 可以通过常规实验来测定待冷冻的水悬浮液或溶液中的式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯以及每一种糖的浓度。因而可以选择最佳的浓度。式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯可以与一种或多种糖协同起作用以改善稳定性。

[0095] 典型地,含水悬浮液或溶液中的式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯的浓度在 0.001M 以上的范围内,优选在 0.01M 以上的范围内,更优选 0.1M 以上,例如,从 0.1M 至 5.0M。采用的特定浓度将取决于几种因素,包括,当存在的情况下,抗原的性质;使用的式(I)或(II)的特定化合物或其生理用盐或酯;是否使用了一种或多种糖,并且如果使用了,一种或多种糖的特性;以及采用的特定冷冻或干燥程序。因此:

[0096] - 式(I)的化合物或式(IA)或式(IB)的化合物(如 TMG)或其生理用盐或酯的浓度优选为 0.01M 至 5M、0.1M 至 5M、0.2M 至 5.0M 或 0.1M 至 1M。

[0097] - 式(II)的化合物(其中 X 表示 $-S(O)_2-$)或式(IIA)的化合物如 MSM 或其生理用盐或酯的浓度优选为 0.01M 至 4M、0.05M 至 2M 或 0.07M 至 1M,或者甚至到 0.53M。

[0098] - 式(II)的化合物(其中 X 表示 $-S^+(R_c)-$)或式(IIB)的化合物,如 S-甲基-L-甲硫氨酸或其生理用盐或酯的浓度优选为 0.01M 至 5M、0.1M 至 5M、0.2M 至 3M 或 0.1M 至 1M。

[0099] - 式(I)的化合物,其为 N,N-二(C₁₋₆烷基)-、N,N,N-三(C₁₋₆烷基)-,或 N-C₁₋₆烷基-甘氨酸,如 N,N-二甲基甘氨酸、N,N,N-三甲基甘氨酸或 N-甲基甘氨酸)或其生理用盐或酯的浓度典型地是 0.01M 以上,优选 0.1M 以上,例如 0.1M 至 5.0M、0.33M 至 5.0M、0.5M 至 4M 或 0.5M 至 3M。

[0100] - 式(I)的化合物(其为 N,N-二甲基甘氨酸(DMG))或其生理用盐或酯的浓度典型地为 0.01M 以上,优选 0.1M 以上,例如 0.1M 至 5.0M、0.33M 至 5.0M、0.5M 至 4M 或 0.5M 至 3M。当存在一种或多种糖时,可以采用较少的 DMG 或 DMG 盐或酯。

[0101] 如果使用一种或多种糖类,在待冷冻或干燥的含水悬浮液或溶液中糖的浓度或糖的总浓度典型地是 1M 以下或 0.7M 以下,例如 0.5M 以下或 0.29M 以下。10%w/v 的蔗糖溶液具有 0.29M 的蔗糖浓度。糖浓度或总浓度可以降低至 0.1mM、至 0.5mM、至 0.073M 或至 0.146M。

[0102] 当式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯是 DMG 或其生理用盐或酯时,如果存在,在用于冷冻或干燥的含水悬浮液或溶液中糖的浓度典型地是 1M 以下或 0.7M 以下,例如 0.5M 以下或 0.29M 以下。10%w/v 的蔗糖溶液具有 0.29M 的蔗糖浓度。优选地,诸如蔗糖或棉子糖的糖的浓度,或者如果存在多于一种的糖,糖的总浓度是 0.5M 以下、0.2M 以下、0.1M 以下或 10mM 以下。如果存在,糖的最小浓度,或如果存在多于一种的糖,糖的最小总浓度可以是 0.01M、0.1M 或 0.2M。糖的浓度,例如蔗糖或棉子糖的浓度,或如果存在多于一种的糖,那么总浓度可以是 0.01M 至 0.7M、0.029M 至 0.5M、0.058M 至 0.3M 或 0.1M 至 0.3M。当糖是蔗糖时,优选蔗糖的浓度为 0.01 至 0.2M,并且优选 DMG 或其盐或酯的浓度为 0.2 至 2M。

[0103] 采用的特定浓度将取决于几个因素,包括抗原的性质、使用的式(I)或(II)的特

定化合物或其生理用盐或酯、以及采用的特定冷冻或干燥程序。糖的浓度或总浓度可以是 0.1mM 至 0.7M、5mM 至 0.7M、0.073M 至 0.5M，或 0.146M 至 0.389M。

[0104] 当糖是甘露醇时，典型地，甘露醇的浓度为 0.2 至 1M 或 0.2 至 0.8M，优选 0.25 至 0.6M 或 0.4 至 0.8M，例如 0.5 至 0.6M。

[0105] 式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯的最有效浓度将取决于使用的化合物的特定类型、是否与糖结合使用以及使用的铝盐佐剂的类型，例如使用的是氢氧化铝还是磷酸铝佐剂。使用式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯与糖的混合物，发明人已经证实，当单独使用每一种组分时，可以使用较低浓度的每一种组分以使获得的佐剂达到相同水平的保护。

[0106] 当向患者注射包含这种高度浓缩的糖类的疫苗制剂时，已知该高度浓缩的糖类溶液给出部位特异性反应。因此，本发明具有以下优势，即当与式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯结合时，可以使用较低浓度的糖类。因此，当重建或解冻这样的疫苗制剂时，糖的浓度降低，并使部位特异性反应的可能性最小化。

[0107] 冷冻 / 干燥

[0108] 冷冻

[0109] 通过任何适宜的方法进行冷冻。因此，可以通过浸入液氮或液氮蒸汽中、置于 -4°C 至 -80°C 温度的制冷器中或者使用干冰和酒精冷冻浴进行冷冻。在大气压力下，可以使用以下温度，如 -4°C 以下、 -10°C 以下、 -15°C 以下、 -20°C 以下、 -25°C 以下。

[0110] 干燥

[0111] 典型地，通过冷冻干燥、真空干燥、喷雾干燥、喷雾冷冻干燥或流化床干燥来实现干燥。优选冷冻干燥。通过减少材料中的水并将材料密封在小瓶中，可以容易地储存、运输材料以及之后重建至其原始形式。可以经由常规实验来适当地优化干燥条件。

[0112] 干燥后，形成并入病毒颗粒的组合物。因而产生了并入病毒颗粒的基质(基质，matrix)。典型地组合物是非晶固体。因而通常形成固体基质，通常为非晶固体基质。“非晶的”是指非结构化的且不具有可观察的有序或重复排列的分子(即非晶的)。例如，通过冷冻干燥可以实现干燥程序以形成非晶块(饼，cake)。

[0113] 冷冻干燥

[0114] 根据标准程序可以进行冷冻干燥。存在三个主要阶段：冷冻、一次干燥和二次干燥。典型地，使用冷冻干燥机进行冷冻。在该步骤中，重要的是，将生物材料冷却至低于其共晶点，即材料的固相和液相可以共存的最低温度。这确保在随后的步骤中将发生升华而不是熔化。可替换地，非晶材料没有共晶点，但是具有临界点，产物必须保持在临界点之下以防止在一次和二次干燥期间回熔或崩塌。

[0115] 在一次干燥期间，通过应用适当水平的真空来控制压力，同时提供足够的热以使得水升华。在这一阶段，材料中至少 50%，典型地 60 至 70% 的水升华。一次干燥可以是慢的，因为太多的热可以降解或改变生物材料的结构。冷的冷凝室和 / 或冷凝板提供水蒸气通过再凝固在其上被捕获的表面。

[0116] 在二次干燥过程中，通过进一步施加热来去除结合水。典型地，也降低压力以促进进一步的干燥。在冷冻干燥过程完成之后，可以在密封之前用诸如氮的惰性气体破坏真空，

或者可以在真空下密封材料。

[0117] 真空干燥

[0118] 在某些实施方式中,在大约 1300Pa 下使用真空干燥进行干燥。然而,真空干燥对于本发明不是必要的,并且在其他实施方式中,与病毒颗粒接触的保存混合物是旋压的(例如旋转干燥)或冷冻干燥的(如在下文中进一步描述)。有利地,本发明的方法进一步包括使含有病毒颗粒的保存混合物经受真空。方便地,在 20,000Pa 以下,优选 10,000Pa 以下的压力下施加真空。有利地,真空施加至少 10 小时的时间,优选 16 小时以上。如本领域的技术人员已知的,真空时间的时间将取决于样品的尺寸、使用的机器和其他参数。

[0119] 喷雾干燥和喷雾冷冻干燥

[0120] 在另一个实施方式中,通过喷雾干燥或喷雾冷冻干燥与本发明的保存混合物混合的病毒颗粒来实现干燥。本领域的技术人员已知这些技术,并且这些技术涉及通过气体干燥液体进料的方法,例如空气、无氧气体或氮气,或者在喷雾冷冻干燥的情况下为液氮。将液体进料雾化成小液滴的喷雾。然后在干燥室中或用液氮与气体接触来干燥小液滴。

[0121] 流化床干燥

[0122] 在进一步的实施方式中,通过流化床干燥与本发明的保存混合物混合的病毒颗粒来实现干燥。本领域的技术人员已知这种技术,并且这种技术典型地涉及在控制粘度的条件下,使气体(例如空气)通过产物层以产生流体化的状态。该技术可以涉及颗粒状产物材料的干燥、冷却、凝聚、粒化和涂覆的阶段。

[0123] 可以通过流化的气体和/或通过浸入流化层中的其他加热表面(例如板或管)来提供热。使用冷的气体 and/或浸入流化层中的冷却表面来实现冷却。本领域的技术人员已知并且可以依赖于要达到的产物性质以各种方式进行凝聚和粒化的步骤。在受控的条件下,可以通过将液体喷雾在流化的颗粒上实现诸如粉剂、颗粒或片剂的颗粒状产物的涂覆。

[0124] 通过冷冻或干燥产生的组合物典型地是具有低残余含水量的固体基质(固体基质)。实现了一定水平的残余含水量,其提供了在高于冷藏温度(例如从 4° C 至 56° C 以上)或低于冷冻温度(例如从 0° C 至 -70° C 以下)的温度下疫苗活性的长期保存。因此,根据本发明产生的组合物可以具有按重量计 5% 以下、2% 以下或 1% 以下的残余含水量。典型地,组合物具有从 0.1% 至 5% 或从 0.5% 至 5% 的残余含水量。

[0125] 可以以干粉的形式获得组合物。由干燥,例如冷冻干燥步骤产生的块可以磨成粉剂的形式。因此,根据本发明的固体组合物可以采用自由流动的颗粒形式。典型地,以密封的小瓶、安瓿或注射器中的粉剂提供固体组合物。如果为了吸入,可以在干粉吸入器中提供粉剂。可替换地,可以以片剂提供固体基质。粉剂可以压制成片剂形式。

[0126] 组合物可以由或基本上由以下组成:铝盐佐剂;一种或多种抗原;式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯;以及可选的一种或多种糖。

[0127] 本发明的组合物的应用

[0128] 在给予患者之前,使冷冻的或干燥的疫苗转化成液体形式(水溶液)。如果有必要,用磷酸缓冲盐水或注射用水解冻并稀释冷冻的组合物。将干燥的组合物重建为水溶液,例如,通过磷酸缓冲盐水或注射用水。然后可以例如通过注射将得到的水溶液给予需要接种疫苗的患者。

[0129] 式(I)或(II)的化合物或其生理用盐或酯以及可选的一种或多种糖,典型地充当

疫苗组合物的再悬浮剂,例如当在给予患者之前将其转化成液体形式(水溶液)时。

[0130] 针对冷冻或干燥的不良影响的保护

[0131] 以其天然形式的铝盐佐剂通常为水性介质中的颗粒悬浮液的凝胶形式。冷冻或干燥经常引起结构改变,以增加的程度和相应增加的沉降速率以及沉降的固体化合物更紧密的堆积为代表。然而,使用本发明可以降低冷冻或冷冻干燥导致的以下形式的破坏:增加的程度、增加的沉降速率和/或沉降的固体更紧密的堆积。

[0132] 使用在实施例1中描述的佐剂凝聚试验,可以评估以下形式的结构破坏:增加的程度和相应增加的沉降速率以及沉降的固体化合物更紧密的堆积。在冷冻或冷冻干燥前后还可以使用用于评估铝佐剂的生理化学特性的其它分析方法。例如,使用激光衍射分析、X-射线衍射或红外光谱可以获得铝凝胶颗粒的粒度分布。显微镜也可以用于也能用于示出结构变化。

[0133] 下列实施例示出了本发明。还提供了参考例。

[0134] 参考例

[0135] 佐剂

[0136] 从Sigma(A8222)获得氢氧化铝凝胶($\text{Al}(\text{OH})_3$)作为13mg/ml的溶液(具有6.8的pH)。

[0137] 冷冻佐剂

[0138] 通过置于在 -20°C 下保留过夜的实验室制冷器中冷冻佐剂。然后使得其在室温(约 20°C)下解冻并平衡至室温。

[0139] 微观分析

[0140] 用显微镜在100x的放大率下检测佐剂。在图1中示出了氢氧化铝冷冻后正常的未被破坏的非晶结构和被破坏的凝聚的晶体结构的实例。与示出了典型的冷冻破坏的佐剂形成的大的凝聚平坦晶体结构的照片B相比,照片A示出了未被破坏的佐剂的均匀分布的颗粒状悬浮液。

[0141] 实施例1

[0142] 方法

[0143] 从Sigma(A8222)获得氢氧化铝佐剂,作为pH 6.8的13mg/ml的溶液。最初,在96孔平底微量板的孔中,将 $50\mu\text{l}$ 体积的氢氧化铝加入在杜尔贝科磷酸盐缓冲液(PBS)中稀释的 $100\mu\text{l}$ 体积的蔗糖和/或另外的赋形剂中。另外的赋形剂是DMG。冷冻前DMG和蔗糖的最终浓度的列表可以参见下表1。

[0144] 在 -20°C 下冷冻佐剂。在大约18小时之后解冻包含 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 的样品,并且如描述的,使用下文描述的佐剂凝聚试验评估沉降水平。

[0145] 表1

[0146]

赋形剂	赋形剂浓度(M)	蔗糖浓度(mM)
DMG	1	234
DMG	0.33	234

DMG	0.1	234
DMG	0	234
DMG	1	117
DMG	0.33	117
DMG	0.1	117
DMG	0	117
DMG	1	58
DMG	0.33	58
DMG	0.1	58
DMG	0	58
DMG	1	29
DMG	0.33	29
DMG	0.1	29
DMG	0	29
DMG	1	0
DMG	0.33	0
DMG	0.1	0
DMG	0	0

[0147] 佐剂凝聚试验

[0148] 通过将样品从每一个孔中吸取至 100 μ l 微量移液管中,使得在室温下发生重新稳定 1 小时,然后测定经沉降的凝胶的高度,作为在移液管中溶液的总高度的百分比,从而评估凝聚的量。经沉降的凝胶的高度作为移液管中溶液总高度的百分比,表示为 % 凝胶体积。凝胶体积越大,佐剂的结构越完整。

[0149] 结果和讨论

[0150] 在图 2 中以两种形式示出了来自这些研究的结果。首先示出了简单的 XY 散布图,并且这通过 3D 平面图表示。

[0151] 当不存在任何 DMG 或蔗糖时,测得佐剂仅有 30% 的恢复率,表明在冻融期间佐剂结构发生了非常显著的损失(约 70% 损失)。增加制剂中蔗糖的浓度使佐剂的恢复率增加至在

测试的最高浓度(234mM, 约 8%w/v) 下的约 70% 的最大值。

[0152] 单独增加 DMG 的浓度增加了佐剂的恢复率。观察到了良好的剂量依赖反应, 并且单独用 DMG 达到约 100% 的恢复率是可能的。

[0153] 具有 DMG 和蔗糖两者的佐剂的联合制剂(复合制剂, Coformulation) 显著降低了达到约 100% 恢复率需要的 DMG 的量。

[0154] 实施例 2

[0155] 方法

[0156] 从 Sigma(A8222) 获得氢氧化铝佐剂, 作为 pH 6.8 的 13mg/ml 的溶液。最初, 在 96 孔平底微量板的孔中, 将 50 μ l 体积的氢氧化铝佐剂加入在杜尔贝科磷酸盐缓冲液(PBS) 中稀释的 100 μ l 体积的蔗糖和 / 或另外的赋形剂中。另外的赋形剂是 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸、MSM 和 TMG。在 -20° C 下冷冻佐剂。在冷冻之前蔗糖和另外的赋形剂的最终浓度的列表可以参见下表 2。

[0157] 在大约 18 小时之后解冻包含 Al(OH)₃ 的样品, 并且如描述的, 使用实施例 1 中描述的佐剂凝聚试验评估沉降水平。

[0158] 表 2

[0159]

另外的赋形剂	另外的赋形剂的 浓度 (M)	蔗糖浓度 (mM)
S-甲基-L-甲硫氨酸	1	234
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.33	234
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.1	234
S-甲基-L-甲硫氨酸	0	234
S-甲基-L-甲硫氨酸	1	117
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.33	117
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.1	117
S-甲基-L-甲硫氨酸	0	117
S-甲基-L-甲硫氨酸	1	58
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.33	58
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.1	58
S-甲基-L-甲硫氨酸	0	58
S-甲基-L-甲硫氨酸	1	29
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.33	29

[0160]

S-甲基-L-甲硫氨酸	0.1	29
S-甲基-L-甲硫氨酸	0	29
S-甲基-L-甲硫氨酸	1	0
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.33	0
S-甲基-L-甲硫氨酸	0.1	0
S-甲基-L-甲硫氨酸	0	0
MSM	0.53	234
MSM	0.26	234
MSM	0.13	234
MSM	0.07	234
MSM	0	234
MSM	0.53	117
MSM	0.26	117
MSM	0.13	117
MSM	0.07	117
MSM	0	117
MSM	0.53	58
MSM	0.26	58
MSM	0.13	58
MSM	0.07	58
MSM	0	58
MSM	0.53	29
MSM	0.26	29
MSM	0.13	29
MSM	0.07	29
MSM	0	29
MSM	0.53	0
MSM	0.26	0
MSM	0.13	0
MSM	0.07	0
MSM	0	0
TMG	1	234
TMG	0.33	234
TMG	0.1	234
TMG	0	234
TMG	1	117
TMG	0.33	117
TMG	0.1	117
TMG	0	117
TMG	1	58

[0161]	TMG	0.33	58
	TMG	0.1	58
	TMG	0	58
	TMG	1	29
	TMG	0.33	29
	TMG	0.1	29
	TMG	0	29
	TMG	1	0
	TMG	0.33	0
	TMG	0.1	0
	TMG	0	0
	TMG	0	0

[0162] 结果和讨论

[0163] 在图 3 和 4 中以两种形式示出了来自这些研究的结果。首先示出了简单的 XY 散布图,并且这通过 3D 平面图表示。

[0164] 当蔗糖或另外的赋形剂都不存在时,测得佐剂仅有 30% 的恢复率,表明在冻融期间佐剂结构发生了非常显著的损失(约 70% 损失)。增加制剂中蔗糖的浓度使佐剂的恢复率增加至在测试的最高浓度(234mM, 约 8%w/v) 下的约 70% 的最大值。

[0165] 单独增加另外的赋形剂的浓度(TMG 和 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸)增加了佐剂的恢复率。在这些情况的每一个中,观察到了良好的剂量依赖反应,并且单独用另外的赋形剂达到约 100% 的恢复率是可能的。

[0166] 佐剂与蔗糖和另外的赋形剂(TMG 或 S- 甲基 -L- 甲硫氨酸)中的一种的联合制剂显著降低了达到约 100% 恢复率需要的另外的赋形剂的量。

[0167] 实施例 3

[0168] 方法

[0169] 从 Sigma (A8222) 获得氢氧化铝佐剂,作为 pH6.8 的 13mg/ml 的溶液。将一定体积的佐剂离心以形成颗粒,随后在 pH7.9 的 40mM HEPES+25mM NaCl 中洗涤颗粒(两次),并再悬浮在一半的原始体积中,得到约 26mg/ml 的溶液。向每一个小瓶中加入 75 μ l 的 26mg/ml 佐剂溶液和 225 μ l 的相应赋形剂(浓度已调节至占据加入的佐剂体积)至等于适当的浓度,每一个小瓶中包含 6.5mg/ml 的最终佐剂浓度。在下表 4 中给出了赋形剂的最终浓度列表。

[0170] 通过 VirTis Advantage 冷冻干燥机,使用在下表 3 中示出的干燥循环冷冻干燥样品,持续约 3 天。在用 Thermo Savant VLP 泵(Thermofisher, UK)施加初始为 300 毫托的真空之前,在 -40° C 下冷冻样品 2 小时。在整个过程中调节搁板温度和真空,并且冷凝器保持在 -80° C。在释放真空之前,持续步骤 11 直至塞住样品。

[0171] 在一次干燥阶段中,搁板温度降低至 -45° C。包括一系列保持步骤的二次干燥阶段增加温度可达 30° C 直至完成干燥。探测记录的搁板温度和冷凝器温度。

[0172] 表 3

[0173]

步骤	搁板温度 (°C)	时间(分钟)	坡度/保持	真空(毫托)
1	-45	15	H	-
2	-34	30	R	300
3	-34	1200	H	300
4	-20	120	H	300
5	-10	120	H	300
6	0	120	H	300
7	10	120	H	80
8	20	120	H	80
9	30	1255	H	80
10	30	905	H	80
11	4	1255	H	80

[0174] 佐剂凝聚化验

[0175] 将包含经冷冻干燥的佐剂的小瓶重建到 300 μ l 的纯净水中并涡旋。通过将样品从每一个孔中吸取到 100 μ l 微量移液管中,使得在室温下发生重新稳定 90 分钟,然后测量经沉降的凝胶的高度,作为在移液管中溶液的总高度的百分比,从而评估凝聚的量。经沉降的凝胶的高度作为移液管中溶液总高度的百分比,表示为 % 凝胶体积。凝胶体积越大,佐剂的结构越完整。

[0176] 表 4

[0177]

另外的赋形剂	另外的赋形剂的浓度 (mM)	蔗糖的浓度 (mM)	凝胶体 积%
无	0	500	100
无	0	334	93.2

[0178]

无	0	167	47.3
无	0	84.2	32.3
无	0	1	14.7
无	0	0	16.7
DMG	1	500	99.6
DMG	1	1	12.4
DMG	500	1	99.7
DMG	1	334	96.2
DMG	167	334	100
DMG	1	167	37.2
DMG	167	167	99.7
DMG	334	167	100
DMG	167	1	79.82
DMG	334	1	99.5
DMG	84	334	99.6
DMG	84	84	50.4
DMG	334	84	59.5
DMG	1	500	99.6
DMG	1	1	18.1
DMG	500	1	100
DMG	167	167	100
TMG	1	500	99.6
TMG	1	1	13.5
TMG	500	1	99.3
TMG	1	334	93.0
TMG	167	334	100
TMG	1	167	39.8
TMG	167	167	99.6
TMG	334	167	100
TMG	167	1	60.9
TMG	334	1	84.7
TMG	84	334	90.4
TMG	84	84	51.2
TMG	334	84	94.1
TMG	1	500	100
TMG	1	1	14.1
TMG	500	1	99.5
TMG	167	167	100
SMM	1	500	100
SMM	1	1	13.7
SMM	500	1	100

[0179]

SMM	1	334	95.4
SMM	167	334	98.1
SMM	1	167	40.0
SMM	167	167	100
SMM	334	167	100
SMM	167	1	98.0
SMM	334	1	100
SMM	84	334	100
SMM	84	84	99.6
SMM	334	84	99.2
SMM	1	500	98.2
SMM	1	1	14.9
SMM	500	1	100
SMM	167	167	100
肌氨酸	1	500	98.1
肌氨酸	1	1	13.8
肌氨酸	500	1	100
肌氨酸	1	334	91.3
肌氨酸	167	334	98.2
肌氨酸	1	167	40.6
肌氨酸	167	167	98.5
肌氨酸	334	167	100
肌氨酸	167	1	50.7
肌氨酸	334	1	100
肌氨酸	84	334	97.2
肌氨酸	84	84	65.9
肌氨酸	334	84	100
肌氨酸	1	500	98.1
肌氨酸	1	1	14.1
肌氨酸	500	1	100
肌氨酸	167	167	98.4

[0180] 结果和讨论

[0181] 结果在以上表 4 中给出并绘制在图 5 中。这些证实了在一系列浓度的(i) DMG、TMG、S- 甲基甲硫氨酸或肌氨酸以及(ii) 蔗糖存在下,在冷冻干燥佐剂溶液后可以保持佐剂的结构。通常,较低浓度的另外的赋形剂和较高浓度的蔗糖的块质量较好。

[0182] 实施例 4[0183] 材料和设备

[0184]

甘露醇	Sigma	批号: 077K0166
DMG	Sigma	批号 077K0166
TMG	Sigma	批号 049K1529
SMM	Sigma	批号 001425374
肌氨酸	Sigma	批号 078K3727
氢氧化铝凝胶	Sigma	批号 018K0761
Virtis Advantage Plus 冷冻干燥器:	Virtis	EQP # 084
纯净水	Sigma	批号 RNBB2958
微量移液管 (毛细管)	Blaubrand	批号 7091 44
冷冻干燥小瓶:	Adelphi	2 ml VCDIN2R
塞子:	Adelphi	FDW13 13 mM

[0185] 方法

[0186] 考虑到每 300 μ l 冷冻干燥小瓶中加入 75 μ l 佐剂(1/4 体积, 从而 25% 以上浓缩的), 以 10ml 的主混合液(master mixes) 产生在 HEPES 缓冲液中的以下赋形剂混合液。

[0187] 表 5

[0188]

	甘露醇[M]				
	0.548	0.274	0.137	0.069	0%
赋形剂[mM]	500				
	250				
	125				
	62.5				
	31.25				
	15.63				
	0				

[0189] 向每一个小瓶中加入 75 μ l 的 26mg/ml 的氢氧化铝佐剂(通过将 13mg/ml 氢氧化铝凝胶离心, 并且使颗粒再悬浮在一半的原始体积中制备) 以及 225 μ l 适当的赋形剂混合液, 如在以上列出的。然后在置于使用下表 6 中示出的干燥循环的 VirTis Advantage 冷冻干燥机中之前塞住小瓶。

[0190] 表 6

[0191]

步骤	温度 (° C)	时间 (分钟)	真空 (毫托)
1	-40	45	500
2	-36	600	200
3	-20	120	300

4	-10	120	300
5	0	120	300
6	10	120	80
7	20	120	80
8	30	1255	80
9	4	1255	80

[0192] 在冷冻干燥之后,在真空下塞住小瓶,盖上瓶盖并拍照。如在实施例 3 中阐述的,评估了佐剂的凝聚。

[0193] 结果和讨论

[0194] 结果在下面的表 7 至 10 中给出。

[0195] 表 7A

[0196]

甘露醇 [M]	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548
DMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	100	100	98	97	98.5

[0197] 表 7B

[0198]

甘露醇 [M]	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274
DMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	100	98	77.5	96	50

[0199] 表 7C

[0200]

甘露醇 [M]	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137
DMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0

[0201]

凝胶高度 %	98	100	96	73.3	43.75	46.2	32.5
-----------	----	-----	----	------	-------	------	------

[0202] 表 7D

[0203]

甘露醇 [M]	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069
DMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	90	28.6	26.2	21.2	16.7

[0204] 表 7E

[0205]

甘露醇 [M]	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041
DMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	99	99	90	42.5	27.0	18.8	12.5

[0206] 表 7F

[0207]

甘露醇 [M]	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206
DMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	99	98	95	41.5	25.0	14.0	12.5

[0208] 表 7G

[0209]

甘露醇 M	0	0	0	0	0	0	0
DMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	97	80	31.6	18.6	13.6	11.8

[0210] 表 8A

[0211]

甘露醇 M	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548
TMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0

[0212]

凝胶高度 %	100	100	100	100	97	94	92
-----------	-----	-----	-----	-----	----	----	----

[0213] 表 8B

[0214]

甘露醇 M	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274
TMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	100	100	88.9	80	45

[0215] 表 8C

[0216]

甘露醇 M	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137
TMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	98	87.5	50	50	38.6	35.7

[0217] 表 8D

[0218]

甘露醇 M	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069
TMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	99	98	90	50	25	15.8	11.6

[0219] 表 8E

[0220]

甘露醇 M	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041
TMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	98	50	25.0	15.8	11.6

[0221] 表 8F

[0222]

甘露醇 M	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206
TMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	98	96	80	44.0	20.0	16.6	13.5

[0223] 表 8G

[0224]

甘露醇 M	0	0	0	0	0	0	0
TMG [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	98	90	50	27.7	15.5	10.7	9.9

[0225] 表 9A

[0226]

甘露醇 M	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548
SMM [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	100	98	95	100	95.0

[0227] 表 9B

[0228]

甘露醇 M	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274
SMM [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	100	100	100	90	48

[0229] 表 9C

[0230]

甘露醇 M	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137
SMM [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	98	100	98	98	62.5	50	31.9

[0231] 表 9D

[0232]

甘露醇 M	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069
SMM [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	97	100	88.2	27.5	23.4	18.75

[0233] 表 9E

[0234]

甘露醇 M	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041
SMM [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	97	97	78.6	24.7	15.7

[0235] 表 9F

[0236]

甘露醇 M	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206
SMM [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	98	98	90	98	45	23.8	12.5

[0237] 表 9G

[0238]

甘露醇 M	0	0	0	0	0	0	0
SMM [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	100	96	34.4	26.2	11.1

[0239] 表 10A

[0240]

甘露醇 M	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548	0.548
肌氨酸 [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	97	88	97	88	89

[0241] 表 10B

[0242]

甘露醇 M	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274	0.274
肌氨酸 [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	100	98	87.5	88.9	39.8

[0243] 表 10C

[0244]

甘露醇 M	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137
肌氨酸 [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	98	100	61.2	40	35.7	33.7	30.8

[0245] 表 10D

[0246]

甘露醇 M	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069	0.069
肌氨酸 [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	98	34.1	22.7	21.9	20.4

[0247] 表 10E

[0248]

甘露醇 M	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041
肌氨酸 [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	98	28.6	20	14.8	13.1

[0249] 表 10F

[0250]

甘露醇 M	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206	0.0206
肌氨酸 [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	97	97	80	38	20	13.5	12.6

[0251] 表 10G

[0252]

甘露醇 M	0	0	0	0	0	0	0
肌氨酸 [mM]	500	250	125	62.5	31.25	15.625	0
凝胶高度 %	100	100	90	37.5	17.7	12.8	11.1

[0253] 这些结果示出 DMG、TMG、SMM、和肌氨酸的存在使得糖类的浓度降低而不降低佐剂保护。这证实了赋形剂在佐剂稳定中的明显作用。

[0254] 实施例 5

[0255] 材料和设备

[0256]

甘露醇:	Sigma	批号: 077K0166
DMG:	Sigma	批号 077K0166
TMG	Sigma	批号 049K1529
SMM	Sigma	批号 001425374
肌氨酸	Sigma	批号 078K3727
氢氧化铝凝胶	Sigma	批号 018K0761
Virtis Advantage Plus 冷冻干燥器:	Virtis	EQP # 084
纯净水:	Sigma	批号 RNBB2958
微量移液管 (毛细管):	Blaubrand	批号 7091 44
冷冻干燥小瓶:	Adelphi 2 ml VCDIN2R	
塞子:	Adelphi FDW13 13 mM	

[0257] 方法

[0258] 考虑每 300 μ l 冷冻干燥小瓶中加入 75 μ l 佐剂 (1/4 体积, 从而 25% 以上浓缩的), 以 10ml 的主混合液 (master mixes) 产生在 HEPES 缓冲液中的以下赋形剂混合液。

[0259] 表 11

	甘露醇[M]					
	0.767	0.657	0.548	0.438	0.329	0
[0260] 赋形剂[M]	1.4					
	1.2					
	1.0					
	0.8					
	0.6					
	0					

[0261] 向每一个小瓶中加入 75 μ l 的 26mg/ml 的氢氧化铝佐剂 (通过将 13mg/ml 氢氧化铝凝胶离心, 并且使颗粒再悬浮在一半的原始体积中制备) 以及 225 μ l 适当的赋形剂混合液, 如在以上列出的。然后在置于冷冻干燥机中之前塞住小瓶, 并运行在表 12 中示出的循环。

[0262] 表 12

[0263]

步骤	温度 (° C)	时间 (分钟)	真空 (毫托)
1	-40	45	
2	-36	600	200

3	-20	120	300
4	-10	120	300
5	0	120	300
6	10	120	80
7	20	120	80
8	30	1255	80
9	4	1255	80

[0264] 在冷冻干燥之后,在真空下塞住小瓶,盖上瓶盖并拍照。如在实施例 3 中阐述的,评估了佐剂的凝聚。

[0265] 结果和讨论

[0266] 结果在下面的表 13 和 14 中给出。

[0267] 表 13

[0268]

甘露醇[M]	赋形剂类型/浓度[mM]	保护%
0.767	DMG 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100
	0.8 M	100
	0.6 M	100
	0 M	86
0.657	DMG 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100
	0.8 M	100
	0.6 M	100
	0 M	75
0.548	DMG 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100

[0269]

		0.8 M	100
		0.6 M	100
		0 M	63
	0.438	DMG 1.4 M	100
		1.2 M	100
		1.0 M	96
		0.8 M	100
		0.6 M	100
		0 M	50
	0.329	DMG 1.4 M	100
		1.2 M	100
		1.0 M	100
		0.8 M	96
		0.6 M	100
		0 M	23
	0	DMG 1.4 M	100
		1.2 M	100
		1.0 M	100
		0.8 M	96
		0.6 M	96
		0 M	11
	0.767	TMG 1.4 M	100
		1.2 M	100
		1.0 M	100
		0.8 M	100
		0.6 M	100
		0 M	90
	0.657	TMG 1.4 M	100
		1.2 M	100
		1.0 M	100
		0.8 M	98
		0.6 M	100
		0 M	80
	0.548	TMG 1.4 M	100
		1.2 M	100
		1.0 M	100
		0.8 M	100
		0.6 M	100
		0 M	70
	0.438	TMG 1.4 M	100
		1.2 M	100

[0270]

	1.0 M	100
	0.8 M	100
	0.6 M	100
	0 M	50
0.329	TMG 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100
	0.8 M	96
	0.6 M	100
	0 M	50
0	TMG 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100
	0.8 M	100
	0.6 M	96
	0 M	14

[0271] 表 14

[0272]

甘露醇[M]	赋形剂类型/浓度[mM]	保护%
0.767	SMM 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	98
	0.8 M	98
	0.6 M	98
	0 M	82
0.657	SMM 1.4 M	100
	1.2 M	98
	1.0 M	98
	0.8 M	98
	0.6 M	100
	0 M	75
0.548	SMM 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100
	0.8 M	100
	0.6 M	100
	0 M	68
0.438	SMM 1.4 M	100
	1.2 M	100

[0273]

0.329	1.0 M	100
	0.8 M	100
	0.6 M	98
	0 M	52
	SMM 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100
	0.8 M	98
	0.6 M	100
	0 M	46
	SMM 1.4 M	100
	1.2 M	100
	1.0 M	100
0	0.8 M	100
	0.6 M	95
	0 M	12

[0274] 这些结果示出 DMG、TMG 和 SMM 的存在使得糖类的浓度降低而不降低佐剂的保护。这证实了赋形剂在佐剂稳定中的明显作用。

[0275] 实施例 6

[0276] 介绍

[0277] 牛血清白蛋白 (BSA) 通常用作实验中的模型, 其中例如测量在佐剂上的蛋白质吸附。

[0278] 材料和设备

[0279]

BSA:	Sigma P5369	批号 058K6061
Alhydrogel: 2%	Brenntag	批号 4420
甘露醇:	Sigma	批号: 077K0166
DMG:	Sigma	批号 077K0166
TMG:	Sigma	批号 049K1529
SMM:	Sigma	批号 001425374
DPBS:	Sigma	RNBB1286
Virtis Advantage Plus 冷冻干燥器:	Virtis	EQP # 084
纯净水:	Sigma	批号 RNBB2958

[0280]

冷冻干燥小瓶: Adelphi 2 ml VCDIN2R
 塞子: Adelphi FDW13 13 mm
 -20°C 制冷器: Stabilitech EQP #
 Nunc 96-孔 ELISA 板
 Bradford 试剂: Sigma B6916-500ML 批号 080M4359
 Bio Tek 板读数器: Stabilitech EQP: 027

[0281] 蛋白质吸附

[0282] 将铝水凝胶(以 2% (w/v) 的储备液提供) 加入包含 BSA 的 PBS 中以等于浓度为 0.52% 铝水凝胶和 200 μ g/ml 的最终 10ml 体积。在 +4° C 下放置过夜之前, 在室温下通过轻微摇动孵育蛋白质吸附步骤。

[0283] 以 5ml 的体积制备下列赋形剂混合液:

[0284] -1.315M (24%) 的甘露醇

[0285] -1.315M (24%) +1.6M DMG

[0286] -1.315M (24%) +1.6M TMG

[0287] -1.315M (24%) +1.6M SMM

[0288] -1.096M (20%) 甘露醇 +1.2M DMG

[0289] -1.096M (20%) +1.2M TMG

[0290] -1.096M (20%) +1.2M SMM

[0291] -0.877M (16%) 甘露醇 +0.8M DMG

[0292] -0.877M (16%) +0.8M TMG

[0293] -0.877M (16%) +0.8M SMM

[0294] -PBS

[0295] 佐剂-赋形剂处理

[0296] 以 1:1 的比率(2ml+2ml) 使佐剂与赋形剂浓缩液混合, 以产生一半浓度的以上赋形剂、0.26% 的铝水凝胶和 100 μ g/ml 的 BSA。在分成 300 μ l 体积之前, 在 +4° C 下孵育 12 小时, 其为(a) 冷冻的(-80° C)、(b) 如在下表 15 中给出的冻干的或(c) 在 +4° C 下保持为液体的。

[0297] 如讨论的, 产生并处理等体积的空白, 其中不包含蛋白质, 作为蛋白质试验的对照。

[0298] 表 15

[0299]

步骤	温度(° C)	时间(分钟)	真空(毫托)
1	-40	45	
2	-36	600	200

3	-20	120	300
4	-10	120	300
5	0	120	300
6	10	120	80
7	20	120	80
8	30	1255	80
9	4	1255	80

[0300] 在冷冻干燥之后,在真空下塞住小瓶,盖上瓶盖并拍照,如在实施例 3 中描述的依赖块的质量对块打分。

[0301] 然后将液体、冷冻的和冻干的小瓶置于室温下以平衡 / 解冻,同时在 300 μ l 的纯净水中重建经冻干的小瓶,并涡旋直至观察到完全重建。

[0302] 使 300 μ l 体积中的每一个在微量离心机上脉冲 1 分钟以使佐剂颗粒化,丢弃上清液,并将颗粒再悬浮在等体积的 PBS 中。重复该程序 3 次以从佐剂中完全去除残余的赋形剂。

[0303] 蛋白质试验(Bradford)

[0304] 制备双份的赋形剂组合物中的每一个以及双份的对应空白(即没有蛋白质)。在独立的板上运行液体、冻干的和冷冻的样品。为了标准化蛋白质浓度,每一个板以标准曲线运行,该标准曲线以 200 μ g/ml 的 BSA 开始连续稀释至 6.25 μ g/ml。在加入 125 μ l 的 Brandford 溶液(平衡至室温)之前,将 50 μ l 体积的佐剂样品加入每一个孔中。将板转移至设置在板振荡模式(以保持佐剂悬浮)的板读数器,持续 5 分钟之后在 595nm 的吸光度下读出每一个板。

[0305] 结果

[0306] 对于每一个板产生标准曲线(减去空白)以及这些标准曲线(具有 $y=mx+c$ 等式)用于确定佐剂样品的蛋白质浓度,也减去它们各自的空白。将数据绘制成佐剂样品的总蛋白浓度 /ml 并且也绘制成 PBS 对照的百分比。

[0307] 结果在下面的表 16 至 18 以及图 6 和 7 中给出。

[0308] 表 16

[0309]	赋形剂[M]	0.8M DMG + 0.66M 甘露醇	0.8M TMG + 0.66M 甘露醇	0.8M SMM + 0.66M 甘露醇	0.66M 甘露醇
	BSA (PBS 对照) %	99.49	98.12	96.76	100.00

[0310] 表 17

[0311]

赋形剂[M]	0.6M DMG + 0.548 M 甘露醇	0.6M TMG + 0.548 M 甘露醇	0.6M SMM + 0.548 M 甘露醇
BSA (PBS 对照) %	97.27	101.877	100.68

[0312] 表 18

[0313]

赋形剂[M]	0.4M DMG + 0.438 M 甘露醇	0.4M TMG + 0.438 M 甘露醇	0.4M SMM + 0.438 M 甘露醇
BSA (PBS 对照) %	97.088	94.37	95.39

[0314] 讨论

[0315] 这些甘露醇和 DMG、TMG 和 SMM 浓缩液导致佐剂结构接近完全的结构保存。

[0316] 总蛋白质结果证明了在所有甘露醇 - 赋形剂的范围内吸附至佐剂的 BSA 水平是可比较的, 并且甚至与单独的甘露醇 (0.66M/12%) 和 PBS 是可比较的。这表明, 当向预吸附的铝水凝胶中引入赋形剂时, 没有由赋形剂引起的蛋白质的洗脱。对于 PBS 和甘露醇也是这种情况。液体的保持、冻干以及冻融的事件没有恶化任何洗脱。

[0317] 该实验示出, 在在冻干期间保存佐剂的结构条件下, 蛋白质仍然吸附至佐剂上。

[0318] 实施例 7

[0319] 介绍

[0320] 该实验比较了甘露醇底物与 DMG、TMG 和 SMM 的已经在之前示出保护佐剂结构的水平。其比较了以下两者的抗体结合至明矾的抗原性: 当铝抗体已经保持在 4° C 时以及当其已经被冻融时, 使用斑点印迹以探测两种储存方法中抗体的活性。

[0321] 材料

[0322] 化学药品

[0323]

	供应商	产品代码	批号
PBSx10		-	-
吐温 20	Sigma	P1379	-
脱脂奶粉	Marvel	-	-
铝水凝胶	Brenntag	-	4420
TMB 发色团	Invitrogen	SB02	727643282A
鼠 mAb	Serotec	8437	5208x220610

抗鼠 HRP	Sigma	A0412	077K6008
甘露醇	Sigma	M1902	077K0166
DMG	Sigma	D1156	077K1856U
TMG	Sigma	B2629	049K1529
SMM	Sigma	12209121	0001423374

[0324] 其他

[0325]

	供应商	产品代码	批号
硝化纤维膜	Sigma	N8267	3110
Petri 培养皿	Fisher	FB51504	264541

[0326] 设备

[0327]

	生产商	设备号
摇床	Stuart Scientific	EQP#091
天平	Sartorius	EQP#089
Forma 900 系列 -80° C 制冷器	Thermofisher	EQP#015
扫描仪	Cannon	-

[0328] 方法

[0329] 在各种赋形剂存在下,冻融吸附在铝盐上的鼠抗体并保持在 4° C 下。使用斑点印迹进行试验以明了鼠抗体是否保持了其抗原性。

[0330] 用 PBS 将 2% 的铝水凝胶溶液稀释至 0.52%, 并加入鼠抗体至 200 μ g/ml 的浓度。这使得在室温下搅拌混合 1 小时, 然后放在 4° C 下过夜。然后用赋形剂溶液以 1:1 稀释铝盐抗体溶液以给出如下列举的最终赋形剂浓度:

[0331] -0.657M 甘露醇

[0332] -0.657M 甘露醇 +0.8M DMG

[0333] -0.657M 甘露醇 +0.8M TMG

[0334] -0.657M 甘露醇 +0.8M SMM

[0335] -PBS

[0336] 然后将这些溶液分为两等份。每一种赋形剂中的一个保持在 4° C 下, 另一个储存在 -80° C 下直至需要。

[0337] 保持的鼠抗体活性的斑点印迹

[0338] 将硝基纤维膜切割成需要的尺寸,并且将 $2\mu\text{l}$ 的样品作为点施加。使得其干燥,然后在室温下,在摇床上和在 10ml 的 PBS+0.05% 的吐温 20+5% 牛奶中孵育 1 小时。然后去除该溶液,并在室温下,在摇床上和在 PBS+0.05% 的吐温 20+5% 的牛奶中稀释至 1:5000 的 10ml 的抗鼠 HRP (辣根过氧化物酶)中孵育膜 1 小时。然后膜用 PBS+0.05% 的吐温 20 洗涤膜 3×10 分钟。使膜沾染薄纸以去除过量的缓冲液,然后将 10ml 的 TMB (四甲基联苯胺)放置在膜上持续 5 分钟。然后轻轻擦去 TMB,并扫描印迹颜色。

[0339] 结果

[0340] 图 8 (表 19 示出了图 8 中测试的样品的布局) 示出了在液体(图 8A) 和经冻融的(图 8B)样品中,如预期的,不包含抗体的所有样品是阴性的,并且仅抗体的阳性对照是强阳性的。在液体样品中,所有斑点在相同的稀释下是类似的。冷冻的样品是较少一致的,尤其是在赋形剂中的样品和 PBS 对照样品之间。在 1:500 的稀释下的 PBS 样品比不同赋形剂中的样品是较差的。

[0341] 图 9 (表 20 示出了在图 9 中测试的样品的布局) 示出了与此一致的结果。所有不含抗体的阴性对照是阴性的,包括仅赋形剂的对照,其示出赋形剂不影响试验。当冷冻时 PBS 样品再次比液体样品较差,尤其是当与 1:300 和 1:500 的赋形剂中的样品比较时。

[0342] 表 19- 图 7 中测试的样品的布局(设计)

[0343]

1、仅 0.52%铝盐	2、鼠 mAb 50ug/ml 1:100	3、鼠 mAb 50ug/ml 1:500
4、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.26%的铝盐	5、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.26%的铝盐 1:100	6、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.26%的铝盐 1:500
7、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 DMG-0.26%的铝盐	8、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 DMG-0.26%的铝盐 1:100	9、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 DMG-0.26%的铝盐 1:500
10、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 TMG-0.26%的铝盐	11、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 TMG-0.26%的铝盐 1:100	12、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 TMG-0.26%的铝盐 1:500
13、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 Vit U 0.26%的铝盐	14、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 Vit U 0.26%的铝盐 1:100	15、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 Vit U 0.26%的铝盐 1:500
16、鼠 mAb-PBS-0.26%的铝盐	17、鼠 mAb-PBS-0.26%的铝盐 1:100	18、鼠 mAb-PBS-0.26%的铝盐 1:500

[0344] 表 20- 图 8 中测试的样品的布局

[0345]

1、仅 0.52%的铝盐	2、鼠 mAb 50ug/ml	3、12% 甘露醇-0.8M Vit U 0.26% 铝盐
4、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.26%的铝盐 1:100	5、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.26%的铝盐 1:300	6、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.26%的铝盐 1:500

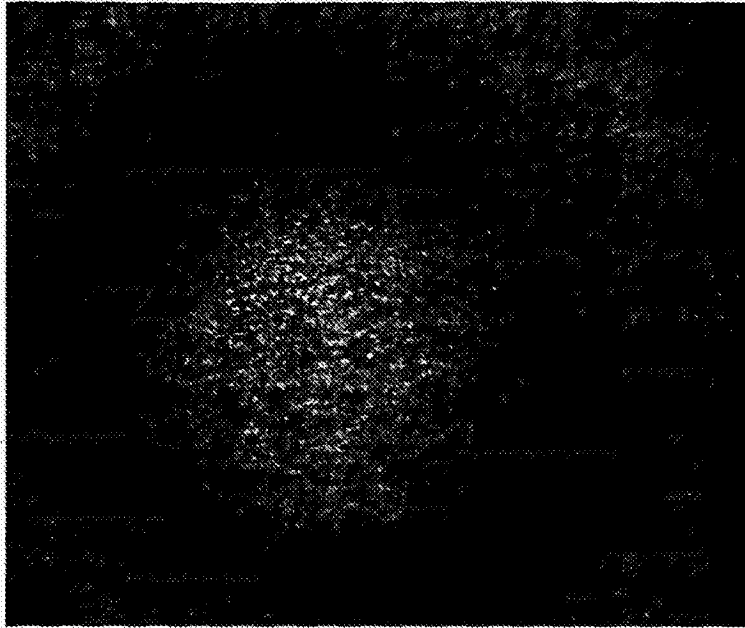
[0346]

7、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 DMG-0.26% 的铝盐 1:100	8、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 DMG-0.26% 的铝盐 1:300	9、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 DMG-0.26%的铝盐 1:500
10、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 TMG-0.26% 的铝盐 1:100	11、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 TMG-0.26% 的铝盐 1:300	12、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 TMG-0.26%的铝盐 1:500
13、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 Vit U 0.26% 的铝盐 1:100	14、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 Vit U 0.26% 的铝盐 1:100	15、鼠 mAb-12%的甘露醇-0.8M 的 Vit U 0.26%的铝盐 1:500
16、鼠 mAb-PBS-0.26% 的铝盐 1:100	17、鼠 mAb-PBS-0.26% 的铝盐 1:300	18、鼠 mAb-PBS-0.26%的铝盐 1:500
19、12%的甘露醇-0.26% 的铝盐	20、12%的甘露醇-0.8M 的 DMG-0.26%的铝盐	21、12%的甘露醇-0.8M 的 TMG-0.26% 的铝盐

[0347] 结论

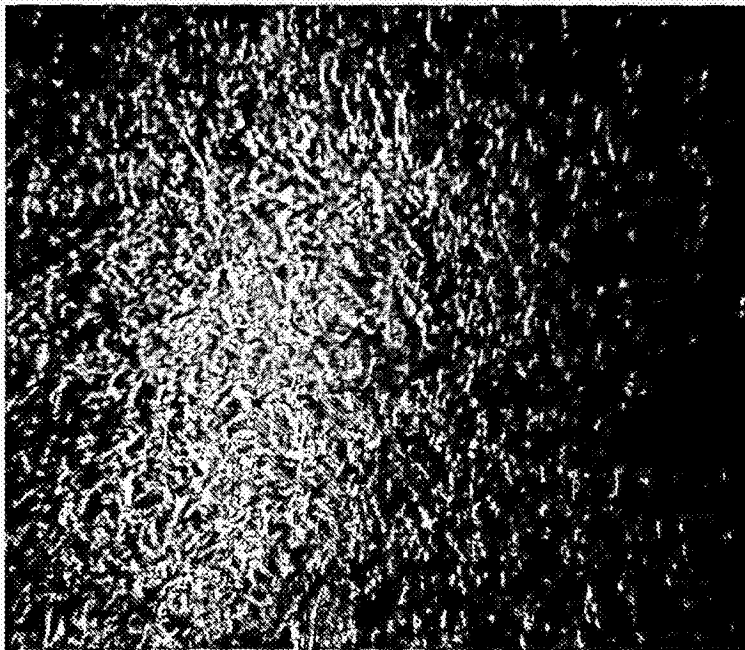
[0348] 两系列的结果示出,当冷冻时,与包含赋形剂的样品相比,仅 PBS 的样品较差的阳性结果。这表明当样品冻融时,当与仅抗体和铝盐比较时,赋形剂对抗体和铝盐提供保护,因为抗体更有效地保留了其抗原性。

A



正常佐剂

B



冷冻破坏

图 1

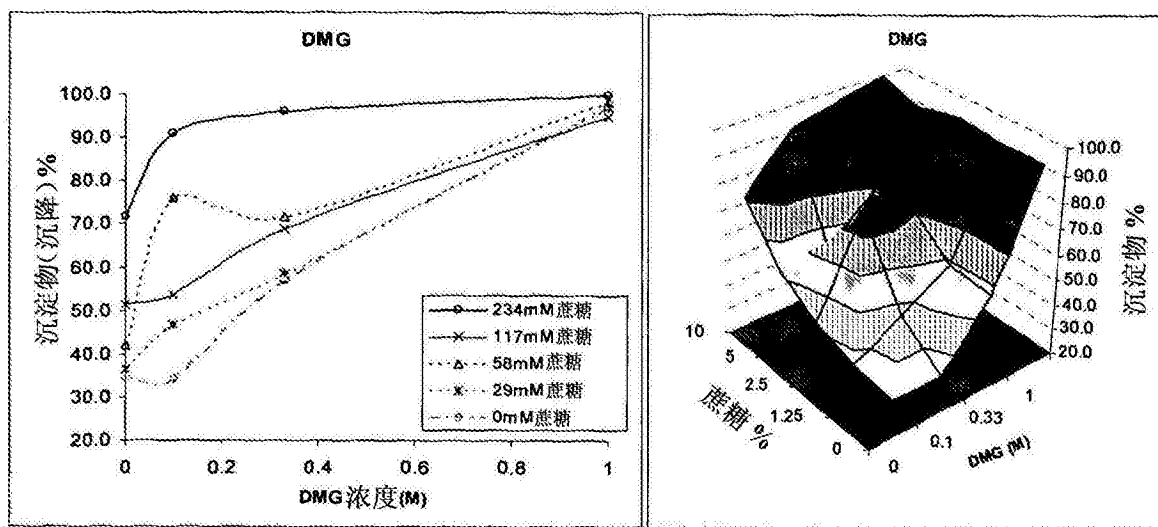


图 2

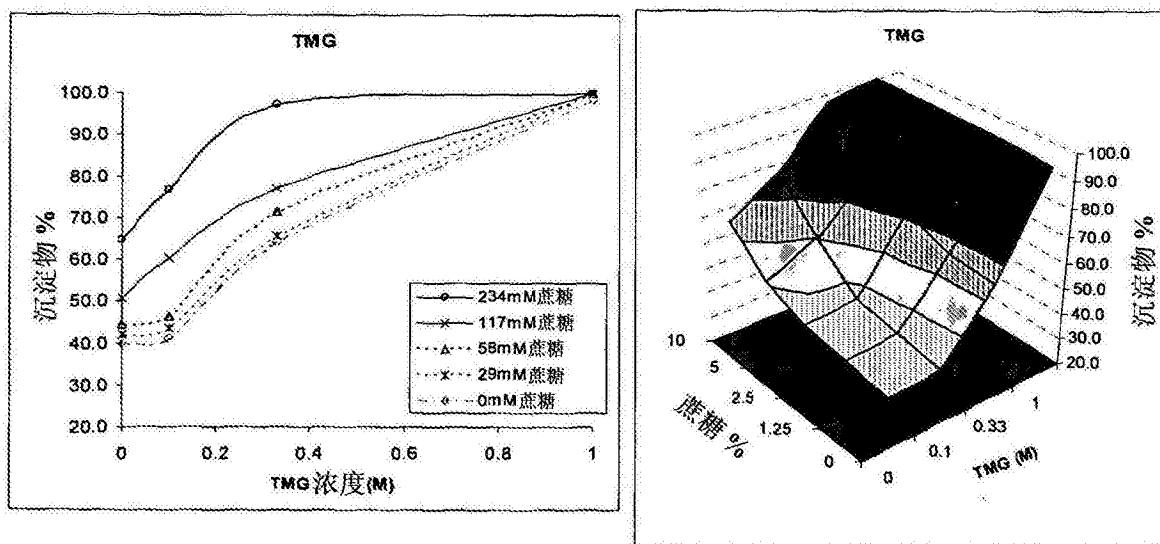


图 3

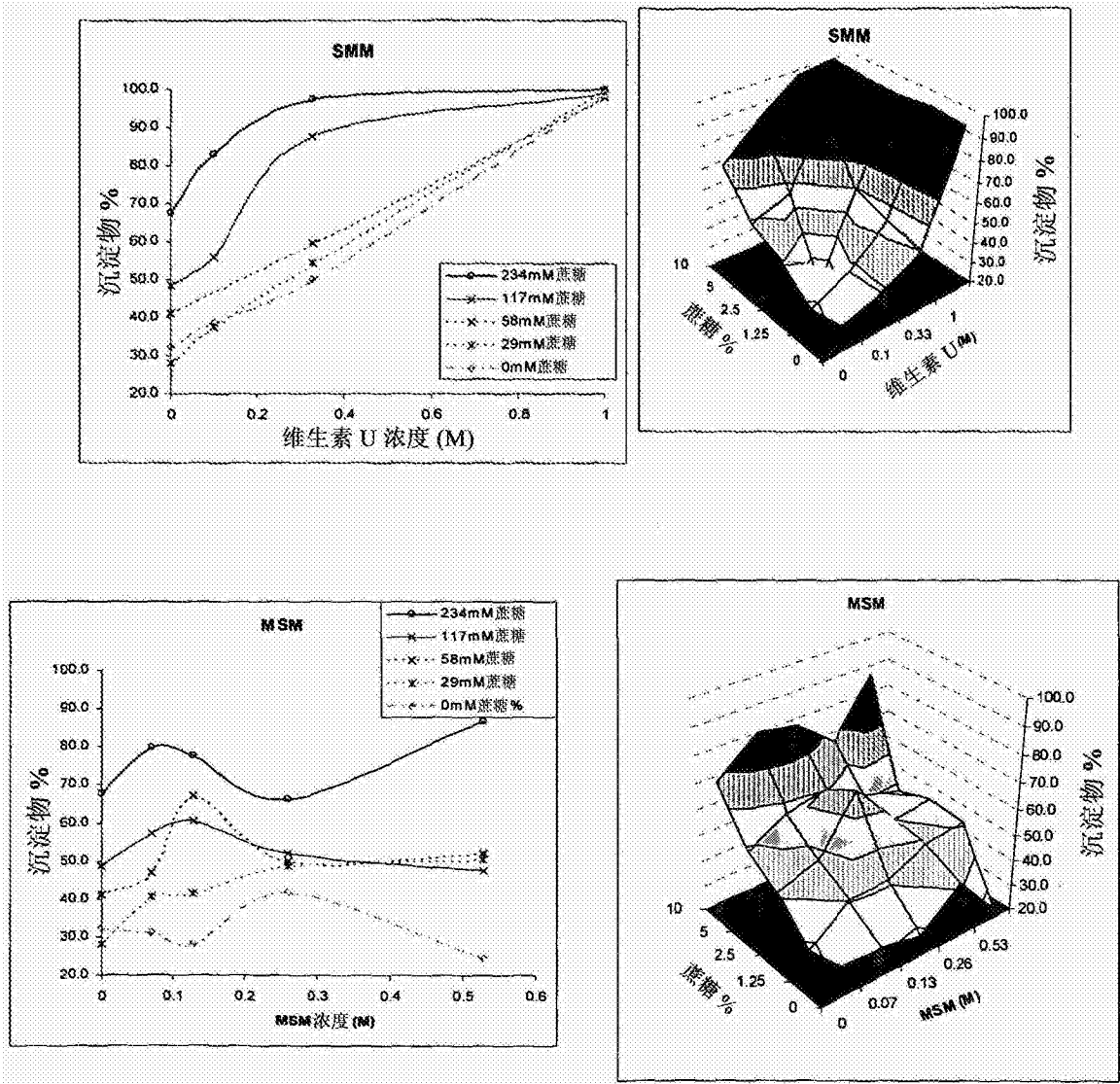


图 4

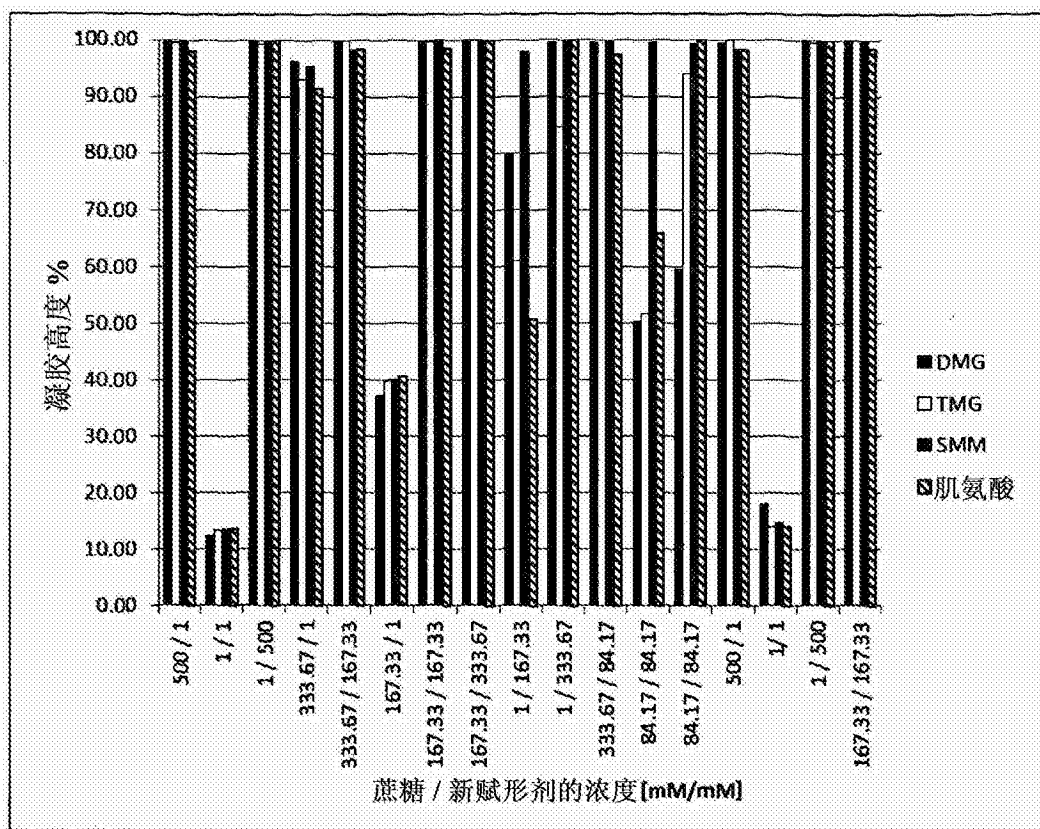


图 5

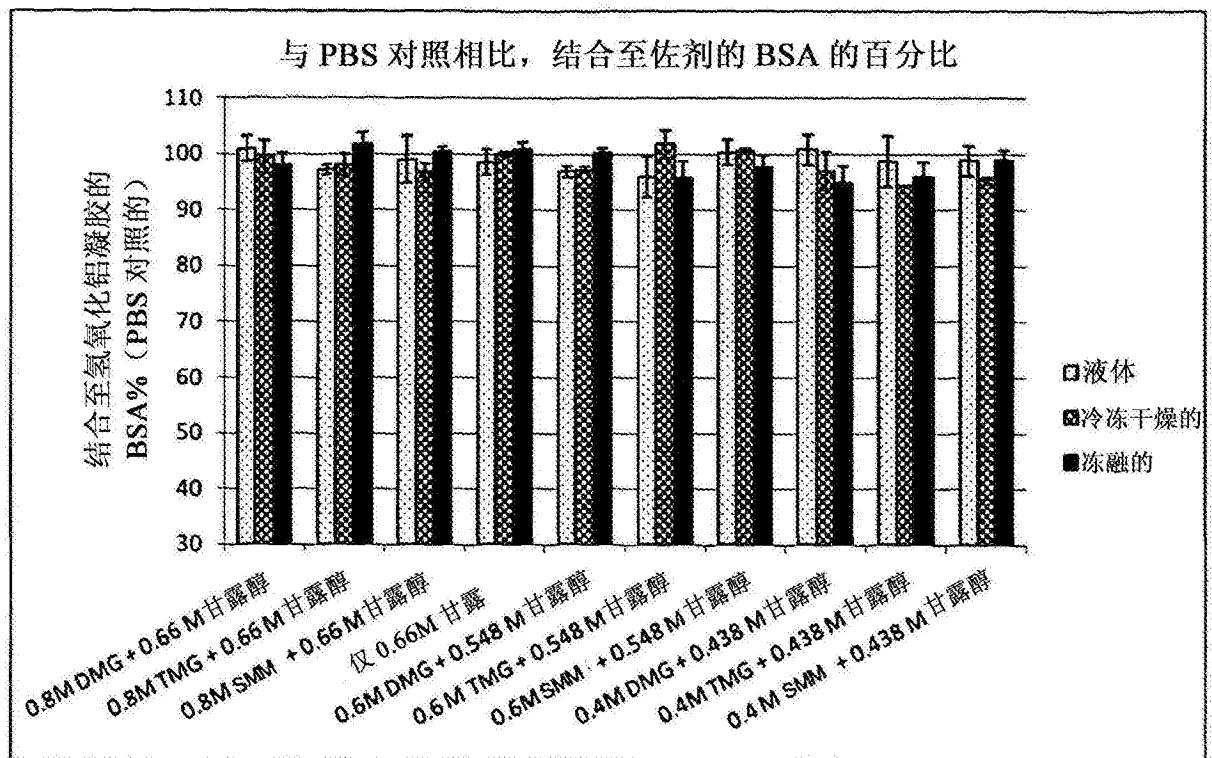


图 6

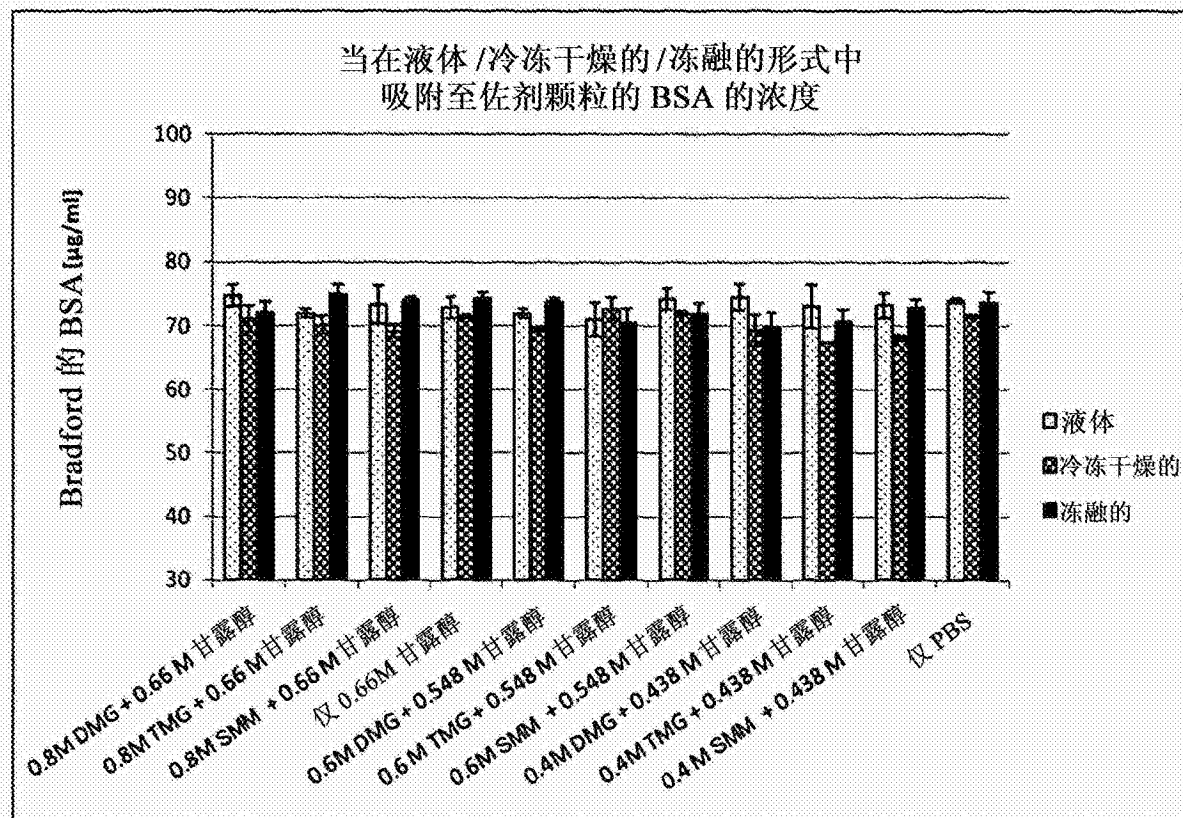


图 7

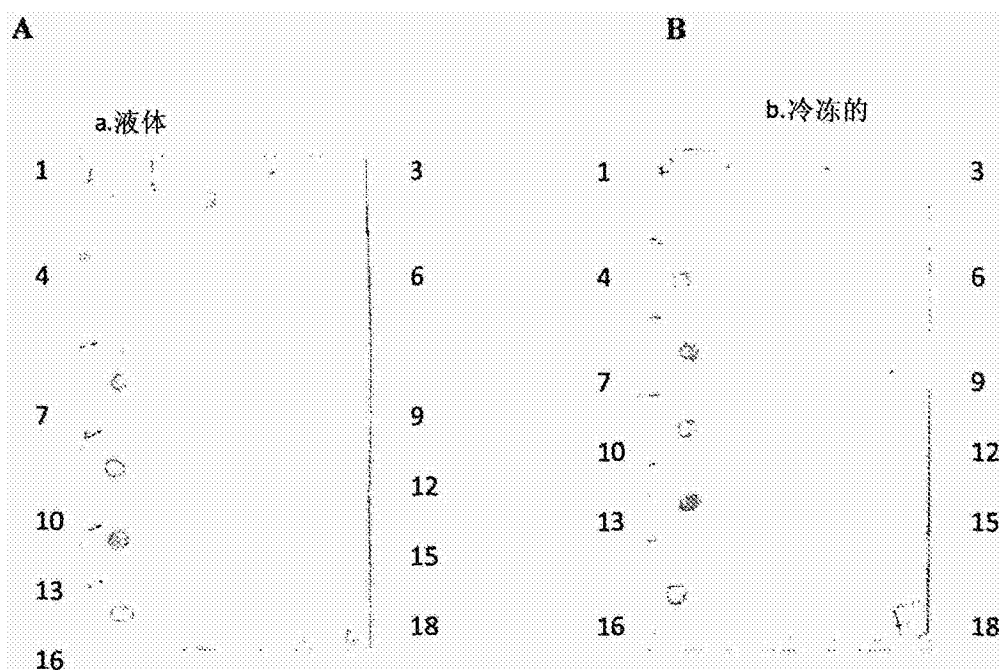


图 8

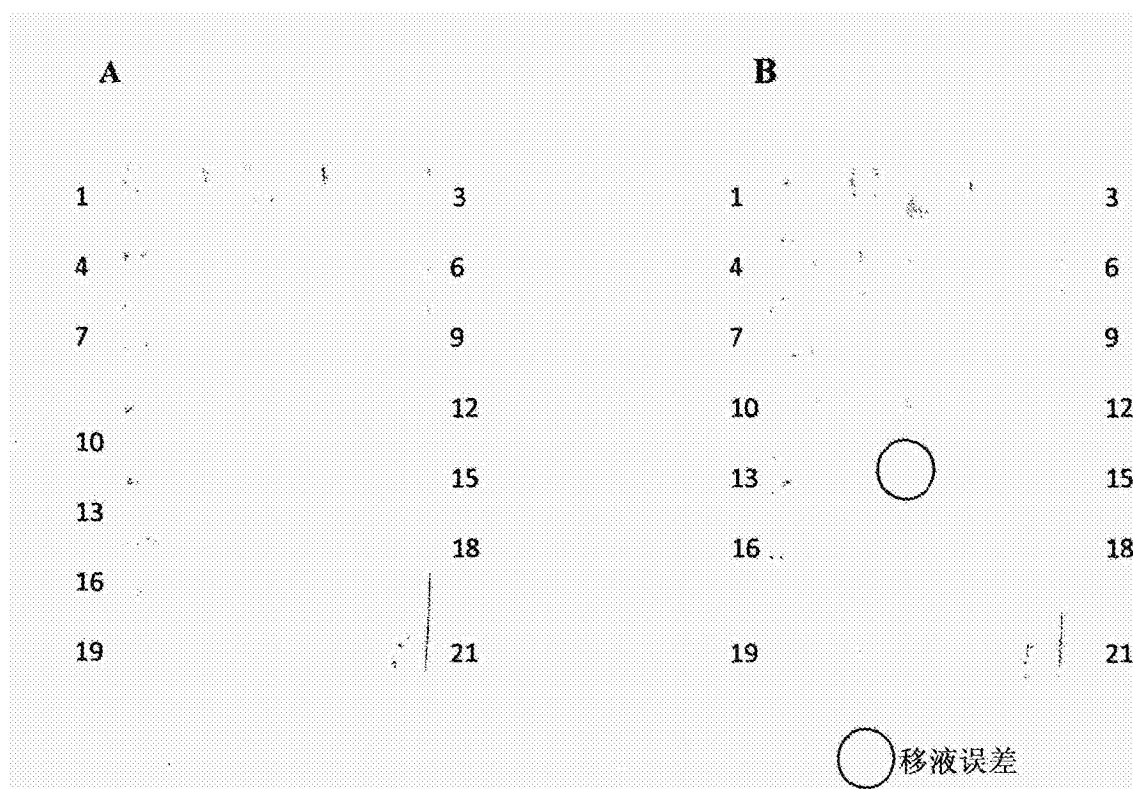


图 9