



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101755044 B

(45) 授权公告日 2014.06.11

(21) 申请号 200880025155.3

(22) 申请日 2008.05.06

(30) 优先权数据

60/930,746 2007.05.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.01.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/005840 2008.05.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/143782 EN 2008.11.27

(73) 专利权人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 R·韦林 Y·奥

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

C12N 5/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 20030219475 A1, 2003.11.27,

US 20030219475 A1, 2003.11.27,

US 6423252 B1, 2002.07.23,

WO 2003087335 A, 2003.10.23,

WO 2003040280 A, 2004.07.15,

审查员 于娜

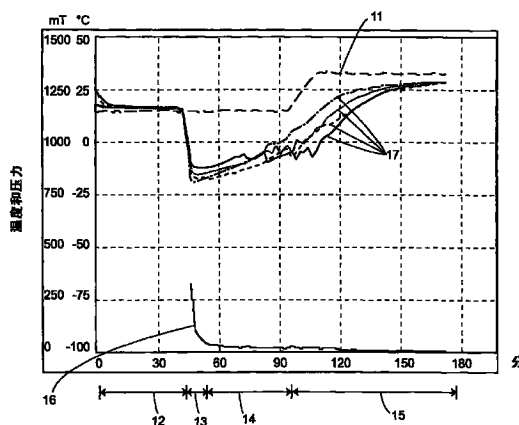
权利要求书2页 说明书32页 附图14页

(54) 发明名称

通过冻干泡沫保存生物活性材料

(57) 摘要

本发明提供在干燥泡沫基质中保存生物活性材料的方法、系统和组合物。方法在接近膜的相变温度的温度下以非沸腾方式产生泡沫并且渗透保存剂。在采用低温二次干燥的冷冻泡沫方法中,可保存生物活性材料的高初始活力。



1. 一种制备稳定干燥泡沫组合物的方法,所述组合物包含生物活性材料,所述方法包括:

制备在溶剂中包含所述生物活性材料和多元醇或聚合物的制剂;

使所述制剂膨胀成泡沫;

冷冻所述泡沫;

通过在 0°C 或更低的泡沫温度下升华,对冷冻的泡沫进行初次干燥;和

在温度为 25°C 或更低的环境中二次干燥所述泡沫达足够时间,以将所述泡沫的残留含水量降低至 10% 或更低。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述生物活性材料包括病毒或细菌。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述生物活性材料包括利斯特菌或流感毒株。

4. 如权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括将所述制剂的温度保持在所述病毒或细菌的膜相变温度的 2°C 范围内。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述泡沫的厚度为 2mm 或更低。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,将所述泡沫干燥足够时间,以便将所述泡沫的残留含水量降低至 5% 或更低。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,二次干燥温度保持在所述泡沫的玻璃化转变温度以下。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法还包括将所述干燥泡沫研磨成平均粒度为 0.1 μ m 至 100 μ m 的粉末。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述初次干燥或二次干燥包括在 100Torr 或更低的压力下冻干。

10. 一种制备稳定干燥泡沫组合物的方法,所述组合物包含生物活性材料,所述方法包括:

制备在溶剂中包含所述生物活性材料和多元醇或聚合物的制剂;

使所述制剂膨胀成泡沫;

冷冻所述泡沫;

在使所述泡沫冻结或保持低于所述泡沫的玻璃化转变温度的温度下升华,以便对所述泡沫进行初步干燥;和

在温度为 25°C 或更低的环境中二次干燥所述泡沫达足够时间,以将所述泡沫的残留含水量降低至 10% 或更低。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述生物活性材料包括病毒或细菌。

12. 如权利要求 11 所述的方法,还包括将所述制剂的温度保持在所述生物活性材料的膜转变温度的 2°C 范围内 2 分钟或更长时间,然后使所述泡沫膨胀。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述生物活性材料包括利斯特菌或流感毒株。

14. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述泡沫的厚度为 2mm 或更低。

15. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,将所述泡沫干燥足够时间,以便将所述泡沫的残留含水量降低至 5% 或更低。

16. 一种环境控制隔室,所述环境控制隔室包含内部温度和内部压力的控制器和隔室内的泡沫,所述泡沫包含溶剂中的生物活性材料和多元醇或聚合物;

其中,所述泡沫的厚度为 2mm 或更低,或者长宽比为 10 或更高;和

由此,泡沫可以在 25°C 或更低的温度下、在 2 天或更短的时间内,干燥至残留含水量为 10% 或更低。

17. 如权利要求 16 所述的环境控制隔室,其特征在于,所述生物活性材料包括病毒或细菌。

18. 如权利要求 16 所述的环境控制隔室,其特征在于,所述生物活性材料包括利斯特菌或流感毒株。

19. 如权利要求 16 所述的环境控制隔室,其特征在于,所述泡沫的厚度为 1mm 或更低,长宽比为 100 或更高。

通过冻干泡沫保存生物活性材料

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 5 月 18 日提交的 Reinhard Vehring 等的美国临时专利申请 60/930,746,“通过冻干泡沫保存生物活性材料”(Preservation of Bioactive Materials by Freeze Dried Foam) 的权益和优先权。本申请涉及 2003 年 4 月 10 日提交的 Vu Truong-Le 的在先美国实用申请 10/412,630(目前为美国专利 7,135,180),“通过冻干泡沫保存生物活性材料”(Preservation of Bioactive Materials by Freeze Dried Foam) 和 2002 年 4 月 11 日提交的 Vu Truong-Le 的在先美国临时申请号 60/372,236,“制剂和制备方法”(Formulations and Methods for Preparation)。通过引用将这些现有申请的全部公开内容纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明属于在储存过程中保存生物材料的领域。具体说,本发明涉及,例如,通过在保护性干燥泡沫中玻璃化而保存生物活性分子和活生物体。这种方法和系统能够很好地恢复病毒和细菌活力。

[0004] 发明背景

[0005] 储存于培养基或其它溶液中时,生物材料,如蛋白质、真核细胞、细菌和病毒通常是不稳定的。例如,在冰箱温度,即约 4°C 储存少于 2-3 周后,包膜病毒,例如由鸡蛋尿囊液生产的活流感病毒的强度对数值降低 1,定义为组织培养感染剂量 (TCID₅₀)。在室温条件(约 25°C)和更温暖的条件(如 37°C)下,该病毒的强度分别在数天至数小时内降低这么多。通常利用冻干过程稳定这些生物材料,冻干过程包括冻结水性体系(aqueous formulas),然后通过升华干燥。去除水并用保护性分子如糖取代可防止化学降解、变性和微生物污染物生长,从而提高稳定性。

[0006] 在冻干(冷冻干燥)中,通常将生物材料与保护剂混合成溶液或悬液,冷冻,然后通过升华和二次干燥脱水。冷冻和升华干燥的低温可减缓降解反应的动力学。然而,所涉及的低温和低表面体积比可能需要长时间干燥。常规冻干过程中缓慢的冷冻速率和生物活性材料保持冷冻状态的时间长度常引起重要结构损伤。这种损伤可能包括变性、聚集和其它不良物理应力,它们是由冰核凝结和增长步骤中形成的冰晶结构造成。因此,具有细胞壁或脂膜的生物材料对于保存较大和较复杂的实体如病毒、细菌和细胞的生物活性是极难的。

[0007] 此外,即使在最佳冻干条件下,二次干燥步骤中仍然可能发生损伤。近年来的研究提示,冻干诱导的损伤主要在去除最后剩余水的二次脱水步骤中发生(Webb, S. D. 重组人干扰素- γ 的退火冻干和喷雾冻干配制的作用 (Effects of annealing lyophilized and spray-lyophilized formulations of recombinant human interferon-gamma). J Pharm Sci 2003 年 4 月 ;92(4) :715-29)。因此,有足够的证据证明,冻干和二次干燥过程可迫使蛋白质或细胞(例如)发生显著的化学改变和物理改变。这种改变可导致蛋白质活性由于盐浓度、沉淀/结晶、剪切应力、极端 pH 和冻干后残留水分的作用而丧失。

[0008] 保护剂是加入制剂以便在冷冻期间保护细胞和分子,并且在储存期间提高稳定性

的化学物质。例如,用于活病毒疫苗的的稳定剂通常包括高浓度的糖,如蔗糖、甘露醇或山梨糖醇,以提高冻干和储存期间的病毒稳定性。然而,对于有包膜的病毒和其它生物物质,这种保护剂可能无法充分穿透膜来保护膜包封体积内的活性分子。因此,仍然迫切需要开发优化的干燥方法和制剂,使不稳定生物物质获得足够稳定性。

[0009] 通过某些干燥泡沫保存方法克服了冻干过程伴随的一些问题。在 Bronshtein 的美国专利 5,766,520,“通过形成泡沫保存”(Preservation by Foam Formation),例如,首先通过在中等真空条件下干燥使溶剂配制的生物溶液或悬液增稠,然后施加强真空使其余溶剂气泡沸腾,形成干燥稳定的泡沫。通常,由于在泡沫泡表面上可能发生氧化和变性,所以在生物材料的加工中应避免这种沸腾。此外,即使在真空下沸腾,也需要输入热量,这可能危及生物活性材料的稳定性。Bronshtein 通过在溶液或悬液中引入保护剂,如糖和表面活性剂来减轻这些问题。由于在沸腾期间的液体对流和泡沫泡表面的表面积增加,这种类型的干燥泡沫保存方法具有快速干燥的优点。然而,二次热干燥至低含水量可能使细胞和病毒活力降低 90% 以上。由于存在亲水性保护剂和大泡沫表面积,所以可以快速重建这类干燥泡沫。可将干燥泡沫研磨成细粉以便进一步改进重建次数,或通过吸入给予所述生物材料。

[0010] 上述干燥泡沫保存方法保护各种生物材料的灵活性有限。例如,该方法排除了冷冻步骤(例如,参见 Bronstein, 第 1 栏,第 41 行 - “冻干方法的冷冻和其它步骤对许多敏感的生物材料十分有害”([f]reezing and other steps of the freeze-drying process are very damaging to many sensitive biological materials))和随后的冰升华(去除泡沫中水分的方式)。由于 Bronshtein 避免了冷冻,所以必须在起泡和干燥前增稠该制剂,以便不损失大量水以及潜热,以冷冻该泡沫。与常规冻干或喷雾冻干工艺循环相比,避免冷冻需要该方法在更低的真空水平(7-24Torr)下进行。Bronshtein 中的沸腾需要输入大量,可能是失稳量的热量,以提供必需的泡沫喷发。

[0011] Bronshtein 干燥泡沫方法不是十分适合保存具有脂膜的生物材料。例如,该方法不是十分适合保存生物物质,如脂质体、病毒或活细胞。脂膜常常能防止该保护剂渗入其包封体积内,或阻止包封体积内水分的充分去除。如果保护剂不能充分渗入,那么酶促过程,例如蛋白水解以及化学过程,例如氧化和自由基攻击可能破坏生物材料的活性或活力。在膜包封体积内保持低渗液体可促进生物材料的不稳定。二次热干燥可杀死细胞。

[0012] 仍然需要在储存期间,特别是在冻结温度以上保存生物物质,例如蛋白质、病毒颗粒和细胞的方法。优选在不接触高温的条件下提供足够干燥的制备干燥泡沫保存基质的方法。可以在储存过程中保护生物物质的组合物将为医学和科学研究带来益处。阅读以下内容后可以看出本发明提供的这些和其它特征。

发明内容

[0013] 本发明包括在储存过程中保存生物活性材料,如肽、蛋白质、核酸、抗体、疫苗、细菌、病毒、脂质体、血小板和 / 或细胞悬液的方法、系统和组合物。该方法通常提供,例如将生物活性材料和多元醇的制剂膨胀成泡沫、冷冻所述泡沫和将所述泡沫干燥成稳定的干燥泡沫组合物的过程。该方法可包括例如,在干燥前冷冻所述泡沫,将发泡剂掺入制剂中,将该制剂保持在脂膜的相变温度以提高保护剂的渗透性,在约 200Torr 至 25mTorr 的压力下

膨胀该制剂,二次干燥所述泡沫形成薄层形式和 / 或在较低温度,例如室温或更低温度下干燥所述泡沫。

[0014] 本发明方法一般包括在包含多元醇的剂型中提供生物活性材料如肽、蛋白质、核酸、抗体、疫苗、细菌、病毒、脂质体、血小板和 / 或细胞悬液,使该制剂膨胀成泡沫,冷冻该泡沫,通过冻干干燥和在低温下去除残留水分。例如,一种制备生物活性材料的稳定干燥泡沫组合物的方法可包括以下步骤:制备在溶剂(如水)中包含生物活性材料和多元醇或聚合物的制剂;使所述制剂膨胀成泡沫;冷冻所述泡沫;在泡沫温度为 0°C 或更低时通过蒸发或升华初次干燥所述泡沫;在温度为 25°C 或更低的环境下二次干燥所述泡沫足够的时间,从而将所述泡沫的残留含水量降低至 10% 或更低。在所述方法的任选变化形式中,制备在溶剂中包含生物活性材料和多元醇或聚合物的制剂;将所述制剂膨胀成泡沫;冷冻所述泡沫;在冻结泡沫且保持在该泡沫玻璃化转变温度以下蒸发或升华以干燥所述泡沫;和,在 25°C 以下的环境下二次干燥所述泡沫足够的时间,从而将所述泡沫的残留含水量降低至 10% 以下。对于脂膜包封体积中的生物活性材料而言,可能优选将该制剂或泡沫的温度保持在该生物活性材料的膜转变温度附近 2°C 范围内 2 分钟或更长时间,然后膨胀该泡沫。

[0015] 在低温干燥方法的优选实施方式中,该生物活性材料包括肽、蛋白质、核酸、抗体、疫苗、细菌、病毒、脂质体、血小板和 / 或细胞悬液。在一个实施方式中,所述生物活性材料包括病毒或细菌,例如利斯特菌 (*Listeria*) 或流感菌株 (*Influenza*)。在一个实施方式中,所述利斯特菌是单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)。在另一实施方式中,使用单核细胞增生利斯特菌的减毒毒株。在另一实施方式中,使用重组改造为表达抗原性肽的疫苗的一株单核细胞增生利斯特菌。基于利斯特菌的疫苗,包括附加序列的构建详见分别于 2003 年 12 月 24 日、2004 年 8 月 18 日、2004 年 10 月 1 日和 2004 年 10 月 7 日提交的题为“EphA2 疫苗”(EphA2 Vaccines) 的美国临时专利申请号 60/532,696、60/602,588、60/615,548 和 60/617,564,分别于 2004 年 3 月 26 日、2004 年 10 月 1 日和 2004 年 10 月 7 日提交的题为“基于利斯特菌的 EphA2 疫苗”(Listeria-based EphA2 Vaccines) 的美国临时申请号 60/556,631、60/615,470 和 60/617,544,以及国际公开号 WO 2005/067460 和 WO 2005/037233,各自通过引用全文纳入本文。在又一实施方式中,流感毒株是甲型和乙型流感病毒。在另一实施方式中,将流感毒株减毒,以使用作活疫苗。

[0016] 在优选方法中,该泡沫的厚度为 2mm 以下,以加速低温,如 25°C 以下、20°C 以下、15°C 以下的二次干燥。就最终产品的稳定性而言,优选使该泡沫干燥足够时间,以使泡沫的残留含水量降低至 10% 以下、5% 以下、3% 以下或 1% 以下。常常优选将二次干燥温度保持在泡沫多元醇基质的玻璃化转变温度以下。初次干燥和 / 或二次干燥常常优选包括在 100Torr 以下、50Torr 以下、10Torr 以下、1Torr、100mTorr、10mTorr 或更低压力下去除溶剂,以便在低温下加速去除泡沫中的水分。

[0017] 干燥泡沫可以是片层或大颗粒形式。任选地,可将干燥泡沫研磨成平均粒度为(例如)约 0.1 μ m 至 100 μ m 的粉末,以便储存或吸入给药。任选地,可将泡沫作为重建液体,通过例如注射给予哺乳动物。

[0018] 本发明包括有效实施制备稳定干燥泡沫组合物的方法的系统。例如,能够在较低温度,如 20°C 以下快速进行二次干燥的系统,可以使泡沫以薄片形式开放地 (openly) 暴露于高真空。制备生物活性材料的稳定干燥泡沫组合物的系统可包括用于控制内部温度和内

部压力的环境控制隔室；该隔室内在溶剂中包含生物活性材料和多元醇或聚合物的泡沫。可通过提供厚度为 2mm 以下和 / 或高宽比（宽度或长度与厚度之比）为 10 以上的泡沫；或者厚度为 1mm 以下和 / 或高宽比为 100 以上的泡沫，以加速干燥。优选在 25℃ 以下、用 2 天或更短的时间使泡沫干燥至残留含水量为 10% 以下。

[0019] 如同所述方法那样，该系统所用的生物活性材料可以是任何生物活性材料。然而，已知所述系统对病毒或细菌，如利斯特菌或流感毒株的活力特别有利。在一个实施方式中，所述利斯特菌是单核细胞增生利斯特菌。在另一实施方式中，使用单核细胞增生利斯特菌的减毒菌株。在另一实施方式中，使用重组改造为表达抗原性肽的疫苗的一株单核细胞增生利斯特菌。在又一实施方式中，流感毒株是甲型和乙型流感病毒。在另一实施方式中，将流感毒株减毒，以便用作活疫苗。

[0020] 本发明包括稳定干燥泡沫组合物。例如，该组合物可在干燥泡沫基质中包含：肽、蛋白质、核酸、抗体、疫苗、细菌、病毒、脂质体、血小板和 / 或细胞悬液，所述干燥泡沫基质的残留含水量为 10% 以下，其中所述基质包含多元醇和 / 或聚合物，所述干燥泡沫是由生物活性材料的液体制剂制备的，其活力损失小于 $0.5 \log_{10}$ 。如本文所述不难获得这种保留的活力，即使将该泡沫干燥至含水量为 5% 以下。在一个实施方式中，病毒或细菌的生物活性材料可包括例如，利斯特菌或流感毒株。在一个实施方式中，所述利斯特菌是单核细胞增生利斯特菌。在另一实施方式中，使用单核细胞增生利斯特菌的减毒菌株。在另一实施方式中，使用重组改造为表达抗原性肽的疫苗的一株单核细胞增生利斯特菌，例如该肽不是天然利斯特菌肽。在又一实施方式中，流感毒株是甲型和乙型流感病毒。在另一实施方式中，将流感毒株减毒，以便用作活疫苗。病毒或细菌可包括例如，利斯特菌或流感毒株。在优选实施方式中，例如，使用本发明方法和 / 或系统获得的过程活力损失小于 $0.5 \log_{10}$ 、小于 $0.3 \log_{10}$ 、小于 $0.1 \log_{10}$ 。

[0021] 定义

[0022] 应理解，本发明不限于特定的系统或方法，它们当然可以改变。应当理解本文所使用的术语仅为了描述特定的实施方式而不是限制性的。在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”，“一种”和“该”包括多个指示物，除非上下文中有明显的表示。因此，例如，提到“一个表面”时包括两个或多个表面的组合；提到“细菌”时包括细菌的混合物等。

[0023] 除非另有限定，在此使用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域技术人员的通常理解一致。虽然也可采用与本文所述相似或等同的任何方法和材料实施本发明而无须过多实验，但本文描述了优选的方法和材料。在说明和要求保护本发明的过程中，将依据以下定义使用以下术语。

[0024] “环境”温度或条件是在给定环境中任何给定时间的温度或条件。一般地，环境室温是 22℃，环境大气压和环境湿度不难测定，它们将根据每年中的时间、天气条件、海拔高度等而有所不同。

[0025] “沸腾”指，例如，在液体温度超过其沸点时发生的液体至气体的快速相转变。沸点是本领域技术人员熟知的，它是液体的蒸气压等于所施加压力时的温度。对处于沸点的液体进行加热时，沸腾可能特别剧烈。

[0026] “缓冲液”指通过其酸 - 碱共轭组分的作用抵抗 pH 改变的缓冲溶液。通常选择能稳定所选活性材料的缓冲液 pH，本领域技术人员可以确定该 pH。通常，该 pH 在生理 pH 范

围内,但一些蛋白质可能在较宽的 pH 范围,例如酸性 pH 上稳定。因此,优选的 pH 范围是约 1 至 10,特别优选约 3-8;更优选约 6.0-8.0;更优选约 7.0-7.4;最优选约 7.0-7.2。合适的缓冲液包括 pH 7.2 磷酸盐缓冲液和 pH 7.0 柠檬酸盐缓冲液。本领域技术人员应理解,可使用大量合适的缓冲液。合适的缓冲剂包括但不限于:磷酸钾、磷酸钠、乙酸钠、组氨酸、咪唑、柠檬酸钠、琥珀酸钠、碳酸氢铵和碳酸铵。通常,所用缓冲剂的摩尔浓度为约 1mM-2M,优选约 2mM-1M,特别优选约 10mM-0.5M,特别优选 25-50mM。

[0027] “脱气”指气体分压高于所施加的压力时,从液体溶液中释放气体。如果水在一个大气压(约 760Torr)下接触氮气,水中氮气的分压与气相压力平衡,如果气体压力降低则氮气可从水中起泡溢出。这不是沸腾,压力高于使溶剂沸腾的压力时常会发生。例如,打开瓶盖降低压力时,CO₂ 气体分压较高的瓶装碳酸软饮料快速起泡(但不沸腾)。

[0028] “分散性”指粉末组合物可分散(即悬浮)到空气流中的程度,以便使分散的颗粒可被对象呼吸或吸入肺中。因此,可分散性仅为 20%的粉末指只有 20%质量的颗粒可悬浮以供吸入肺中。

[0029] 在干燥泡沫组合物中,“干燥”指残留含水量小于约 10%。通常将干燥的泡沫组合物干燥至残留含水量为 5%以下、或约 3%至 0.1%。“干燥泡沫”可以是残留含水量低于 10%的稳定泡沫、经过初次干燥的泡沫和/或经过二次干燥的泡沫。提到吸入颗粒时,“干燥”指该组合物的含水量使得颗粒容易分散到吸入装置中形成气溶胶。在本文所述的方法中,初次干燥指从初次冷冻泡沫时到二次干燥开始时的干燥过程。通常,初次干燥主要通过冻结温度下升华进行。提到本文所述方法时,二次干燥指在高于冻结温度(如 0°C 或冷冻制剂的凝点)的温度下进行干燥。在典型的冷冻泡沫干燥方法中,二次干燥步骤使泡沫的残留含水量从约 25%降低至 10%以下。

[0030] “赋形剂”或“保护剂”(包括冷冻保护剂和冻干保护剂(lyoprotectant))通常指加入以保证或提高喷雾冻干过程中和随后治疗剂的稳定性、长期稳定性和粉末产品的流动性的化合物或材料。合适的赋形剂通常是与水接触后不变稠或聚合、患者吸入时基本无害且不与治疗剂发生明显的相互作用而改变其生物学活性的相对自由的流动颗粒固体。合适的赋形剂如下所述,包括但不限于:蛋白质如人和牛血清白蛋白、明胶、免疫球蛋白、糖包括单糖(半乳糖、D-甘露糖、山梨糖等)、二糖(乳糖、海藻糖、蔗糖等)、环糊精和多糖(棉子糖、麦芽糊精、右旋糖苷等);氨基酸如谷氨酸单钠、甘氨酸、丙氨酸、精氨酸或组氨酸以及疏水性氨基酸(色氨酸、酪氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸等);甲胺如甜菜碱;赋形剂盐如硫酸镁;多元醇如三元或更多元糖醇,如甘油、赤藓醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇;丙二醇;聚乙二醇;普罗流尼;表面活性剂;和它们的组合。

[0031] “玻璃”或“玻璃态”或“玻璃基质”指失去流动能力的液体,即粘度非常高的液体,其中粘度范围为 10¹⁰-10¹⁴ 帕斯卡-秒。它可被视作亚稳态无定形体系,其中分子有振动动作,但转动和平移分量非常缓慢(几乎检测不到)。作为亚稳态体系,储存温度大大低于玻璃化转变温度时,它能够长时间保持稳定。由于玻璃不是热力学平衡状态,所以在玻璃化转变温度或其附近储存的玻璃松弛至平衡,并丧失其高粘度。得到的类似橡胶或糖浆的流动液体常常是化学和结构失稳的。虽然可通过许多不同途径获得玻璃,但不管采取的是何种途径,在微观水平上它们是物理性质和结构相同的材料。然而应注意,本发明冷冻泡沫包括例如,在现有技术冻干材料中未发现的起泡的开放隔室和/或封闭隔室宏观结构。获得用

于本发明目的的玻璃基质的方法通常是溶剂升华和 / 或蒸发技术。

[0032] “玻璃化转变温度”由符号 T_g 表示,它是组合物从玻璃态或玻璃状态转变为类似糖浆或橡胶的状态的温度。通常用差示扫描量热法 (DSC) 确定 T_g , 定义为扫过转变时组合物热容 (C_p) 开始改变的温度。 T_g 的定义总是任意的, 目前没有国际惯例。 T_g 可定义为转变的起点、中点或终点; 出于本发明目的, 使用 DSC 时我们使用 C_p 开始改变的定义。参见 C. A. Angell 撰写的题为“由液体和生物聚合物形成玻璃 (Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers)”的文章: Science, 267, 1924-1935 (1995 年 3 月 31 日) 和 Jan P. Wolanczyk 撰写的题为“玻璃转变的差示扫描量热法分析” (Differential Scanning Calorimetry Analysis of Glass Transitions): Cryo-Letters, 10, 73-76 (1989)。详细的数学处理可参见 Gibbs 和 DiMarzio 的“玻璃转变和玻璃态的本质” (Nature of the Glass Transition and the Glassy State): Journal of Chemical Physics, 28, 第 3 期, 373-383 (1958 年 3 月)。这些文章通过引用纳入本文。

[0033] “渗透增强剂”是促进药物通过粘膜或衬里渗透的表面活性化合物, 通常可用于需要渗透特征的情况, 如鼻内、直肠内和阴道内给药。

[0034] “药学上可接受的”赋形剂 (运载体、添加剂) 是可合理地给予哺乳动物对象以提供有效剂量的所用活性成分的物质。优选地, 它们是联邦药品管理局 (FDA) 迄今为止称为 ‘总体评价安全’ (GRAS) 的赋形剂。

[0035] “药物组合物”指使得活性成分的生物学活性明确有效, 并且不含对给予该组合物的对象有毒的其它组分的制剂形式。

[0036] “多元醇”是具有多个羟基的有机物, 包括例如糖 (还原糖和非还原糖)、糖醇和糖酸。本文优选的多元醇的分子量小于约 600kDa (例如在约 120-400kDa 的范围)。“还原糖”是含有半缩醛基团的多元醇, 该基团可还原金属离子或与蛋白质中的赖氨酸和其它氨基发生共价反应。“非还原糖”是不具有还原糖的这些特性的糖。还原糖的例子是果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。非还原糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖和棉子糖。甘露醇、木糖醇、赤藓醇、苏糖醇、山梨糖醇和甘油是糖醇的例子。糖酸包括 L- 葡糖酸和其金属盐。

[0037] “粉末”是由精细分散的固体颗粒构成的组合物, 它能够相对自由地流动, 并且能够容易地分散到吸入装置中以便随后被患者吸入, 这些颗粒适合经过上呼吸道, 包括鼻粘膜的鼻内或经肺给药。

[0038] 组合物的“推荐储存温度”是储存粉末化药物组合物时能在该组合物的保存期限内维持药品的稳定性, 以保证递送剂量一致的温度 (T_s)。此种温度最初由组合物生产商确定, 并经过负责批准该组合物上市的政府管理机构 (如美国的食品药品监督管理局) 批准。每种批准的药品的这种温度有所差异, 这取决于该产品中活性药物和其它材料的温度敏感性。推荐储存温度为约 0°C -40°C, 但通常是环境温度, 即约 25°C。药品通常保存在等于或低于推荐储存温度的温度下。

[0039] 如果经 (例如) 结合实验中测定, 生物活性材料, 如酶在给定时间的生物学活性在药物组合物制备时生物学活性的约 10% (在试验误差内) 内, 则认为药物组合物中的生物活性材料“保持其生物学活性”。在活病毒或细菌的情况下, 当组合物的病毒效价或菌落计数在初始效价或计数的 1 个对数值以内时, 则认为保持了生物学活性。对活细胞而言, 当组

合物活细胞计数在初始计数的 50% 以内时,则认为保持了生物学活性。用于测定活流感病毒效价的试验是荧光聚焦试验 (FFA 试验)。该试验的效价报告为每毫升中荧光聚焦单位的对数 (\log_{10} FFU/ml)。1 \log_{10} FFU/ml 约等于 1 \log_{10} 组织培养感染剂量 / 毫升 (\log_{10} TCID₅₀/ml)。其它“生物学活性”测定的详述见下。

[0040] 如果在给定时间的化学稳定性使人们认为该生物活性材料保持本文所定义的生物学活性,则称药物组合物中的该生物活性材料“保持其化学稳定性”。可通过检测和定量测定生物活性材料的化学改变形式来评价其化学稳定性。化学改变可包括大小修饰(例如剪切蛋白质),这可通过,例如大小排阻色谱、SDS-PAGE 和 / 或衬质辅助激光解吸与电离 / 飞行时间质谱 (MALDI/TOF MS) 进行评估。其它类型的化学改变包括电荷改变(如脱酰胺所致),可通过,例如离子交换色谱进行评估。

[0041] 如果通过视觉观察颜色和 / 或澄清度,或通过 UV 光散射或大小排阻色谱测定,显示聚集、沉淀和 / 或变性没有显著提高,则认为药物组合物中的生物活性材料“保持其物理稳定性”。

[0042] “稳定”制剂或组合物是储存后其中的生物活性材料基本保持其物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物学活性的制剂或组合物。本领域有测定稳定性的各种分析技术可用,综述参见例如《肽和蛋白质药物递送》(Peptide and Protein Drug Delivery), 247-301, Vincent Lee 编, MC 公司 (Marcel Dekker, Inc.), 纽约州纽约出版 (1991) 和 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10 :29-90 (1993)。可以在所选温度下储存所选时间,以测定稳定性。可在材料实际储存至预计保存期限之前,利用趋势分析来估计预计保存期限。就活流感病毒而言,稳定性定义为降低 1 \log_{10} FFU/ml 或 1 \log_{10} TCID₅₀/ml 所经过的时间。优选地,该组合物在室温 (~ 25°C) 下稳定至少 3 个月、或在 40°C 稳定至少 1 个月和 / 或在约 2-8°C 稳定至少 1 年。而且,该组合物优选在冷冻 (如 -70°C) 和融化后仍然稳定。

[0043] 从药理学意义上来说,生物活性材料的“治疗有效量”指有效预防或治疗疾病的用量,其中“疾病”是可从该生物活性材料的治疗中获益的任何病症。这些疾病包括慢性和急性疾病或失调,包括使哺乳动物倾向于发生所提及疾病的病理状况。

[0044] “治疗”既指治疗性措施,又指预防性方法。需要治疗的那些患者包括已经患病的人以及那些需要预防疾病发生的人。

[0045] “单位剂量”指含有治疗有效量的本发明组合物的接受体 (receptacle)。

[0046] 提到细菌时,“活力”指在适合该细菌生长的营养培养基上形成菌落的能力。提到病毒时,活力指在合适的宿主细胞中感染和繁殖,例如导致在宿主细胞平板上形成空斑的能力。

[0047] 附图简要说明

[0048] 图 1 是在示范性泡沫干燥过程中温度和压力与时间的图表。

[0049] 图 2A-2D 是玻璃瓶中进行的制剂冷冻泡沫干燥的照片。

[0050] 图 3 显示利用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 测定的 FluMist™ A/Sydney 流感病毒疫苗的相变。

[0051] 图 4 显示经过在 10°C、15°C 和 20°C 进行干燥的冻干起泡方法后, B/Harbin 流感病毒疫苗的过程活性 (病毒效价) 损失。

[0052] 图 5 显示经过在 10°C、15°C 和 20°C 初次干燥的冻干起泡方法处理的 B/Harbin 流

感病毒疫苗的稳定性趋势。

[0053] 图 6 显示 37°C 和 50°C 储存的泡沫干燥的 B/Ann Arbor 流感病毒效价的稳定性趋势。

[0054] 图 7 显示在制剂 AVS53 中泡沫干燥的三株不同的流感病毒疫苗的稳定性趋势。

[0055] 图 8 显示 X 射线衍射数据和电镜照片,证明本发明泡沫组合物的无定形性质。

[0056] 图 9 显示以 33°C 二次干燥步骤结束的冷冻泡沫方法的过程温度和累积活力损失的图表。

[0057] 图 10 显示随着冷冻泡沫方法中水的去除利斯特菌活力的图表。在较低温度下进行二次干燥的残留含水量低于 5% 的干燥泡沫的活力相当于在较高温度进行二次干燥的相同材料的 10 倍。

[0058] 图 11 是低温冷冻泡沫干燥的示范性系统的示意图。

[0059] 图 12A 和 B 是显示与中等温度干燥相比,低温二次干燥给微生物活力带来的益处的图表。

[0060] 图 13 是显示与非步进过程相比,步进二次干燥温度如何在提高活力的同时降低最终含水量的图表。

[0061] 图 14 是证明微生物冷冻泡沫干燥中活力基本不受泡沫基质是否经历非玻璃条件的影响的证据图表。

[0062] 发明详述

[0063] 本发明的方法和组合物可以干燥泡沫的玻璃基质形式延长生物活性材料,如肽、蛋白质、核酸、抗体、疫苗、细菌、病毒、脂质体、血小板和 / 或细胞悬液的储存时间。本发明方法提供通过以下方法制备的干燥泡沫保存剂组合物,所述方法是例如,制备在溶剂中包含生物活性材料和多元醇或聚合物(含有或不含发泡剂)的制剂,降低压力以便使所述制剂膨胀成泡沫(通过脱气、沸腾和 / 或膨胀引入的气泡),然后通过蒸发或升华所述泡沫中的溶剂(冷冻或不冷冻所述泡沫)稳定所述泡沫。在特别适合保存包含脂膜的生物活性材料的方法中,可将生物活性材料配制成含有保护剂的悬液,预冷,保持在接近膜相变温度的温度下以使保存剂渗透所述膜,然后使所述制剂膨胀成泡沫,干燥成泡沫薄层,在极低压力下干燥,并且在较低的二次干燥温度,例如接近室温的温度下干燥。

[0064] 在泡沫干燥过程中损失微生物活力可归因于以下数种因素的组合:高剪切力、沸腾汽蚀、氧化应激和发泡的其它表面微环境应激,冷冻和冻融应激、温度和脱水应激。在令人惊讶的结果中,特别是对一些病毒和细菌而言,我们发现温度应激,特别是在二次干燥步骤中的温度应激可能是 log 死亡的主要原因。即使是相同的干燥温度,这也不如标准非泡沫冻干过程有害。因此,我们设计了通过冷冻泡沫冻干方法保持活力的独特系统和方法。

[0065] 制备稳定的干燥泡沫的方法

[0066] 制备用以保存生物活性材料的稳定干燥泡沫的方法通常包括,例如,制备在溶液或悬液中合并了生物活性材料和多元醇和 / 或聚合物的制剂,降低施加于所述制剂的压力以引发发泡,冷冻所述泡沫,通过冻干初步干燥所述泡沫,在约 25°C 以下的温度下二次干燥所述泡沫直至残留含水量为 10% 以下。

[0067] 在保存活病毒和 / 或微生物,如细菌的优选实施方式中,泡沫干燥方法包括例如,将微生物和多元醇的制剂温度保持在所述微生物膜相变温度附近。将所述制剂冷却至冻结

的 10°C 以内,然后将大气压降低至环境压力条件以下以便使所述制剂膨胀成泡沫。失去潜热和 / 或环境冷却以冷冻所述泡沫。该泡沫通过冻干初步干燥至约 60% 或 75% 或更多固体。在高于冻结温度的环境中进行二次干燥。在全部或大部分二次干燥阶段,可能优选使泡沫保持冻结和 / 或低于该泡沫的玻璃化转变温度 (T_g)。通常,当残留含水量降低至约 10% 以下,优选约 5% 时,二次干燥完成。

[0068] 例如,在一个实施方式中,溶剂中的生物活性材料、多元醇和 / 或聚合物的制剂在约 200Torr-25Torr 的压力下膨胀成泡沫,然后稳定和干燥所述泡沫。这一实施方式与上述现有技术的区别在于,例如,不需要强真空 (压力 24Torr 以下) 来获得足够的泡沫膨胀。在此实施方式中,可以在较高压力下充分发泡,因为本发明方法提供通过,例如脱去制剂中的饱和气体、煮沸制剂中的高蒸气压溶剂、气体形成化学方法和 / 或扩大注入或截留在制剂中的气泡来提供泡沫膨胀。这种实施方式的制剂可以,例如预冷和 / 或在泡沫膨胀或干燥期间失去大量潜热,以便 (例如) 任选导致冻结和 / 或冻干所述泡沫。完成初次干燥阶段后,可将稳定的干燥泡沫保持在 (例如) 二次干燥温度和低于 50mTorr 的压力下,以完成所述制剂的干燥。

[0069] 在另一实施方式中,所述制剂中存在发泡剂,以便 (例如) 利用沸腾或不利用沸腾提供泡沫膨胀和 / 或控制。例如,可对含有发泡剂、生物活性材料和多元醇和 / 或聚合物的制剂减压,其中将所述制剂膨胀成泡沫 (通过发泡剂的作用)、稳定和干燥。发泡剂可以是,例如制剂溶液中的气体、高蒸气压 (挥发性) 溶剂、碳酸盐、活泼金属、直流电流、小气泡悬液等等,如下文“制剂发泡”章节所述。

[0070] 本发明的另一实施方式提供例如,制备用于保存生物活性材料的冻干泡沫组合物的方法。例如,可以在减压条件下将含有生物活性材料和多元醇和 / 或聚合物的制剂膨胀成泡沫,冷冻和升华以提供冻干的干燥泡沫组合物。在此实施方式中,冷冻可以通过,例如从制剂中带走热量和 / 或由于溶剂蒸发或升华失去潜热来实现。

[0071] 本发明包括例如,保存具有脂膜组分的生物材料的方法。保存含有脂膜的生物活性材料的方法可包括例如,在含有约 2% -40% 多元醇保护剂的溶液中将生物材料制剂冷却至约 45°C 至 0°C 的膜相变温度约 30 分钟。(所述保护剂可以,例如穿过相变中的膜,以稳定封闭体积内的生物分子。膜相变温度是脂膜由液相 (高流动性) 向更为刚性的液晶相转变的温度。假设因为在脂质双层的特征性相变温度下脂膜倾向于接受外部环境的被动扩散,所以将稳定剂 / 保护剂加载于细胞、细菌或病毒的一种方式是在这种相变温度下预孵育。) 然后,可降低压力,以 (例如) 煮沸所述制剂和形成泡沫。水和潜热可以从所述制剂中快速流失,导致 (例如) 所述泡沫冻结。水分通过几分钟的升华过程继续损失,以提供基本干燥的泡沫组合物。可使温度升高,例如,以驱除掉残留的水分和水合水,从而提高所述干燥泡沫的物理和 / 或化学稳定性。

[0072] 图 1 显示本发明的示范性冷冻泡沫干燥方法。叠加在真空隔室温度和压力与时间的曲线图上的是包含有包膜病毒的制剂在不同干燥阶段的照片。真空隔室温度曲线 11 说明在冷冻发泡过程中真空隔室的温度。从渗透阶段 12、发泡阶段 13 到初始 (最初) 干燥阶段 14,将真空隔室温度保持在病毒的相变温度附近或约 15°C。在二次干燥阶段 15 期间,将真空隔室温度逐步提高至约 33°C 的干燥温度。在渗透阶段隔室压力曲线 16 保持在大气压以上,在发泡阶段其降低至约 2500mTorr,在初始干燥阶段降低至约 250mTorr,在二次干燥

阶段降低至约 50mTorr。小瓶温度曲线 17 代表在所述过程中放入代表性小瓶的制剂中的热电偶测得的温度。该小瓶在渗透阶段保持膜相变温度,但在发泡阶段随压力降低而迅速冷却(由于制剂中水的蒸发和升华带走潜热)。随着二次干燥阶段中残留水分丧失速率逐渐降低,小瓶温度逐步上升到接近隔室干燥温度。

[0073] 图 2A-2D 显示代表性的制剂小瓶在冷冻泡沫干燥阶段的照片。在图 2A 中,随着隔室内压力开始降低,瓶底的液体制剂开始沸腾。在图 2B 中,随着水分的损失和温度的降低泡沫状基质变厚,并开始稳定。在图 2C 中,该泡沫被冻结并且损失了大部分初始干燥阶段的水。图 2D 显示已进入二次干燥阶段的干燥的泡沫玻璃基质。

[0074] 例如,在所述方法的一个实施方式中,该制剂在 40%蔗糖、5%明胶、0.02%普罗流尼 F68 和 pH 7.2 磷酸盐缓冲液的溶液中包含活减毒流感病毒生物活性材料。将该制剂等分到无菌的 10ml 硅化玻璃瓶中,预冷至 15°C(近似病毒包膜的相变温度,参见图 3)约 30 分钟。将压力快速降低至约 50mTorr 约半小时产生泡沫,同时产生冰核且冰遍及各处。初始发泡和冷冻后,经过冰的升华和蒸发产生物理稳定的泡沫。(当制剂含有发泡剂时,这种泡沫可以在约 400Torr-7.7Torr 以下,或 2.5Torr-50mTorr 的真空下产生)。在二次干燥步骤中将温度提高至约 33°C持续约 2 天,以将该组合物的残留含水量降低至所需水平。将该小瓶无菌密封,以防止污染物和水分侵入,从而保证储存稳定性。

[0075] 制备制剂

[0076] 本发明制剂可包含例如,配制成溶液或悬液的生物活性材料,所述溶液或悬液含有多元醇、聚合物、发泡剂、表面活性剂和/或缓冲剂。可使用本领域技术人员理解的适合各组分的技术按顺序混合所述制剂成分。例如,可一边搅拌一边将聚合物和/或高浓度的多元醇溶解到加热的水溶液中,然后冷却,并与生物活性材料混合。生物活性材料,如病毒或细菌可通过离心或过滤从生长培养基浓缩和分离,然后重悬于所述制剂。

[0077] 所述生物活性材料可以是,例如提供任何生物活性,例如酶活性、储存遗传信息、亲和相互作用、诱导免疫应答、细胞增殖、感染、抑制细胞生长、刺激细胞生长、治疗效果、药理学效果、抗微生物效果等的感兴趣材料。例如,生物活性材料可以是酶、抗体、激素、核酸、细菌、病毒、脂质体、血小板、其它细胞等。生物活性材料可以是,例如,活细胞和/或活病毒。生物活性材料可以是,如用作疫苗或治疗剂递送载体的死细胞或脂质体。本发明病毒生物活性材料可以是,例如活病毒和活减毒病毒,如流感病毒、副流感病毒、AAV、腺病毒、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、SARS 病毒、冠状病毒科成员、人肺炎后病毒、EB 病毒等等。

[0078] 所述方法的保护剂可包括,例如任何多元醇。例如,多元醇如蔗糖可以在物理上围绕生物活性材料,以促进在整个干燥过程中保留分子结构,并赋予干燥状态的玻璃基质以结构刚性。多元醇的其它功能可包括,例如保护生物活性材料免于接触损伤性的光照、氧气、水分等。例如,多元醇如蔗糖可以在物理上围绕和保护生物活性材料,使其免于接触损伤性光照、氧气、水分等。多元醇可以(例如)替代干燥期间损失的水合水,以防止该材料的生物分子变性。在本发明方法中,多元醇可提供,例如具有粘性(tenacity)的增稠剂,以促进构成保存剂组合物干燥泡沫结构的气泡的形成和稳定。虽然本发明不局限于任何特定的多元醇,但所述制剂和泡沫组合物可包含例如,蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖、山梨糖醇、水苏糖、棉子糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、

甘露醇、木糖醇、赤藓醇、苏糖醇、山梨糖醇、甘油、L- 葡糖酸等等。大多数多元醇容易以（例如）约 1 重量% - 约 45 重量%、约 2 重量% - 约 40 重量%或约 5 重量% - 约 20 重量%的含量溶解混入制剂中。

[0079] 所述方法的制剂中可包含聚合物，以（例如）提供保护作用和 / 或泡沫结构稳定性。如同多元醇那样，聚合物可为生物活性材料提供（例如）物理和化学保护作用。与简单的多元醇相比，根据与制剂的重量比，聚合物常可为制剂提供（例如）更稠的粘度。聚合物的直链或支链可提高本发明干燥泡沫组合物的结构强度。许多聚合物的水溶性很高，因此它们基本不阻碍干燥泡沫的重建。在本发明方法中，聚合物保护剂可包括例如，水解明胶、未水解明胶、水溶性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮、卵清蛋白、胶原、硫酸软骨素、唾液酸化多糖、肌动蛋白、肌球蛋白、微管、动力蛋白、激动素、人血清白蛋白等。

[0080] 发泡剂可以是例如，压力降低时能够导致制剂膨胀成泡沫的制剂组分。发泡剂可以是例如，可以在减压时膨胀的悬浮于该制剂的小气泡和 / 或能够在制剂中产生气泡的组分。发泡剂可以是例如，溶液中的气体、形成气体的化学物质、容易沸腾的溶剂、截留或悬浮的气泡、注入的气泡等等。

[0081] 所述方法的制剂中可包含表面活性剂，以便例如，提高其他制剂组分的溶解度、保护其免于在发泡期间发生表面张力诱导的某些生物分子的变性、稳定气泡、加快重建等。表面活性剂可以是例如，合适的离子或非离子去污剂、吐温表面活性剂、普罗流尼表面活性剂等。

[0082] 所述方法的制剂中可加入缓冲剂，以便为所述方法的制剂和本发明组合物提供合适、稳定的 pH。本发明缓冲剂一般包括例如，磷酸钾、磷酸钠、乙酸钠、组氨酸、咪唑、柠檬酸钠、琥珀酸钠、碳酸氢氨和 / 或碳酸盐。可以将缓冲液调整成合适的酸和盐形式，以（例如）使 pH 稳定在大约 pH 4 至 pH 10 的范围。对许多组合物而言，优选接近中性的 pH，例如 pH 7.2。

[0083] 所述制剂中可包含其他赋形剂。例如，氨基酸，如精氨酸和甲硫氨酸可以成为所述制剂和组合物的组分。例如，氨基酸可用作两性离子，以封闭加工表面和存储容器上的带电基团，从而防止生物活性材料的非特异性结合。例如，氨基酸可通过清除氧化剂、清除脱酰胺剂和稳定蛋白质构象而提高组合物的稳定性。在另一实例中，例如，本发明制剂中可包含甘油，用作干燥泡沫组合物中的多元醇和 / 或增塑剂。例如，所述组合物中可包含 EDTA，以清除可能引发破坏性的自由基化学反应的金属离子。

[0084] 制剂的冷却

[0085] 可以先冷却本发明制剂，再进行泡沫膨胀、泡沫稳定、冷冻和 / 或干燥，以便提供以下益处，例如稳定生物活性、增稠制剂、提高制剂组分的跨膜渗透和 / 或在冻干前冷冻该制剂。

[0086] 冷却可通过本领域已知的任何合适技术进行。例如，冷却可通过以下方法进行：接触冷藏设备或由冷藏设备进行、接触冷流体流、失去潜热等。通常，将制剂保持在温度受控的处理隔室内金属支架上的玻璃容器中，从而使其平衡至控制温度。该隔室可包括例如，压力控制能力，以便通过蒸发或升华制剂溶剂失去潜热，从而驱动冷却。

[0087] 例如，可将本发明制剂预冷至与脂膜相关的生物材料的相变温度，以提高保护剂的渗透。生物膜的脂质双层和一些脂质体的单层在高于主相变温度 (T_m) 的温度下可以呈

流体相,在低于 T_m 的温度下可以呈晶相。流体相脂膜和晶相脂膜可能是亲水性分子渗透的连续疏水屏障。不受任何具体理论限制,相信在接近 T_m 的温度下,脂膜上流体相和晶相区域的边界上可能存在跨膜缺陷。这种跨膜缺陷可提高亲水性分子,例如许多本发明保护剂的渗透性。而且,因为所述制剂具有高固体含量,所以产生化学梯度,这进一步驱动溶质如保护剂进入膜内。随后去除制剂中的水分时,所述保护剂可以保留在膜封闭体积内且保持稳定水平。图 4 和 5 分别显示在膜相变温度下接触保护剂的病毒的加工稳定性和储存稳定性提高(见图 3)。

[0088] 许多脂膜的 T_m 高于本发明制剂的冻结温度和玻璃化转变温度 (T_g)。这使得接近 T_m 时保护剂容易通过脂膜扩散到液态溶液中。例如,在 15°C 的典型膜 T_m 下,40%蔗糖溶液保持液态以便有效渗入细胞。液体溶液中的保护剂通过相变中的膜的渗透性提高可保护膜封闭体积内的生物分子。

[0089] 可通过例如傅立叶变换红外光 (FTIR) 显微术、抗弯刚度法、离子渗透性研究等确定膜的 T_m 。在本发明方法中,具有脂膜的生物活性材料的制剂可保持在(例如)约 0°C -70°C、约 2°C -45°C、约 12°C -16°C 或约 15°C 的温度下。发现与 10°C 和 20°C 干燥的泡沫(见图 5)相比,在推定相变温度 15°C 干燥的活流感病毒泡沫(见图 3)对于方法相关性效价损失的抵抗性较高(见图 4),且室温下长期稳定性明显较高。可将制剂保持在 T_m ,以便使保护剂充分渗透。例如,可将制剂保持在脂膜 T_m 下约 10-60 分钟,或约 30 分钟。

[0090] 制剂的发泡

[0091] 可通过例如,截留制剂释放的气体和 / 或膨胀悬液中的现有气泡实现发泡。例如,随着制剂上方的气压降低,溶剂组分的沸点可降低到制剂温度以下,导致溶剂快速蒸发或沸腾。压力降低至溶剂中溶解的气体分压以下时,制剂中也可能发生明显起泡现象,由脱气产生气泡。气泡形成可能是化学诱导的。或者,起泡可能是通过容器底部,例如通过多孔玻璃引入气体物理诱导的。

[0092] 可通过,例如降低施加的压力在制剂内膨胀气泡,以便使制剂膨胀成泡沫。气泡可以是例如,先前存在的、注入的和 / 或原位产生的。气泡可以(例如)在膨胀前悬浮在制剂中,在膨胀前或膨胀期间注入制剂中,或者通过沸腾、脱气或形成气体的化学反应产生的。例如,包含入以促进制剂膨胀成泡沫的制剂组分可以是本发明发泡剂。

[0093] 可通过(例如)煮沸制剂膨胀该制剂。沸腾可以发生在,例如溶剂沸点,或者在制剂溶剂的蒸气压超过环境压力时。可通过(例如)调节制剂的温度(较高温度导致较高的蒸气压)和 / 或调节施加的压力控制沸腾。通常,本发明制剂可以在减压条件(真空或低于大气压的压力)下沸腾,以降低沸点,更有利于生物活性材料的稳定。包含低沸点(或高蒸气压)溶剂的制剂可以在较低温度下沸腾。例如,包含某些醇、醚、碳氟化合物等可降低本发明制剂的沸点。

[0094] 例如,可通过脱气将制剂膨胀成泡沫。气体可扩散和溶解到液体溶剂中,直到液体中该气体的分压与周围气压之间建立平衡。例如,如果周围气压突然降低,那么气体可以气泡形式从液体中快速溢出。例如,与大气压气体建立平衡的水溶液暴露于较低气压时,可以在容器壁上形成气泡,或者可以“嘶嘶”地从溶液中喷出。这不是沸腾,而是溶液释放溶解的气体,或脱气。如果压力进一步降低,可基本上除去溶液中的气体。最终,根据溶液的溶剂、温度和压力,溶液的溶剂开始沸腾。本发明制剂可在减压条件下通过脱气膨胀成泡沫。

可使制剂暴露于合适压力,例如约 1 大气压(在海平面上约 760Torr)至约 500 大气压的气体,以驱使气体进入制剂。当气体在高压(大于 1 大气压)下与制剂建立平衡时,产生膨胀作用的低压不必是真空(小于 1 大气压)。气体与制剂在环境压力或更低压力下建立平衡时,引发气泡膨胀的低压可以是,例如,真空。可用作本发明发泡剂的气体可以是本领域已知的任何气体,例如空气、一氧化氮、氮气、氧气、低分子量烃、惰性气体、二氧化碳等。

[0095] 例如,产气化学反应可使制剂膨胀成泡沫。本发明发泡剂可以是,例如本领域技术人员熟知的参与产气化学反应的化学物质。例如,制剂中的碳酸盐可与酸发生反应产生 CO₂ 气体。在其他反应中,例如,活泼金属如钠和锂可在水存在下发生反应产生氢气。例如,可使用直流电进行电解反应,以便在电极上提供氢气和 / 或氧气。例如,制剂内产生的气体可在绝热或常压条件下膨胀,以使制剂膨胀成泡沫。任选地,可通过降低施加的压力膨胀制剂内化学产生的气体,以使制剂膨胀成泡沫。

[0096] 可通过,例如机械过程将气泡掺入制剂中。可通过,例如将气泡强力掺入制剂和 / 或在减压条件下膨胀注入的小气泡,以使制剂膨胀成泡沫。例如,可通过搅拌、搅打、均质化、吹、喷射、振荡、超声处理、涡旋、掺混等操作将气泡掺入制剂。例如,引入本发明粘稠制剂后,气泡可长时间保持悬浮于基质结构。例如,悬浮的气泡可通过施加低压膨胀和 / 或通过干燥或冷却制剂而稳定。在一个实施方式中,可通过加压气体的作用力经滤膜将小气泡(例如,直径 0.01-0.1-1mm)引入制剂。

[0097] 可通过降低制剂上方的压力引发发泡或膨胀泡沫。可通过,例如,使制剂脱气,膨胀掺入的小气泡和 / 或溶剂沸腾实现发泡。可通过,例如该制剂中的粘性保护剂和 / 或表面活性剂截留逃逸的气体。发泡步骤可导致,例如制剂的初次干燥、增稠和结构稳定和 / 或冷冻泡沫。

[0098] 包含脂膜的生物活性材料的保存方法包括例如,组合使用预冷至相变温度和导致制剂冷冻的真空条件。由于冻结是冻干过程中蛋白质(和膜)损伤的主要原因,所以现有技术教导使用较高的压力(如~100Torr 以上)、浓溶液和 / 或较高的起始温度来防止冻结。使用含有各种冷冻保护剂的制剂和本发明工艺参数可低温保护应该在该工艺的泡沫膨胀、泡沫稳定或干燥阶段冻结的生物活性蛋白质和 / 或膜免于冻结。

[0099] 蒸发制剂中的溶剂可加速该制剂在真空下的初次干燥。溶剂沸腾会通过,例如将溶剂快速移出制剂、制剂的对流周转和提高表面积而加速该制剂的初次干燥。在许多情况下,优选不煮沸制剂,因为起泡可能太大或者制剂可能因溢出容器。

[0100] 随着蒸发的进行,可稳定泡沫结构。随着溶剂被驱除出制剂,溶液中的保护剂可变得浓稠。溶剂蒸发和失去潜热可冷却该制剂。在一些点上,冷却和浓缩的保护剂可达到其玻璃化转变温度并停止作为液体的流动。失去潜热可导致制剂冻结。通常,可通过与冷却表面和 / 或冷却气氛接触除去热量,从而导致冻结。玻璃状和 / 或冻结制剂可保持稳定的泡沫结构。可通过例如,给盛放容器提供蚀刻玻璃底以促进该容器底部形成气泡,从而提供遍在的开放蜂窝泡沫结构。通过增稠制剂向上升起的气泡可以形成开放蜂窝泡沫的互联空间。还可通过快速干燥和增稠防止无泡沫制剂的沉降或在制剂上方形成密封表皮,从而促使形成开放蜂窝泡沫。开放蜂窝泡沫可缩短二次干燥的时间和重建时间。

[0101] 可通过,例如制剂组分的类型和浓度、制剂温度、施加的压力水平、压力改变速率等条件影响发泡。例如,表面活性剂或增稠剂的存在可稳定低密集度泡沫的气泡。在另一

个实例中,例如,通过加热处理隔室替代失去的潜热可延长溶剂的沸腾时间。在另一个例子中,较低的压力可提供更剧烈或更连续的沸腾和 / 或膨胀。可将压力降低至(例如)低于约 400Torr、约 200Torr 以下、约 100Torr 至 25Torr 以下、25Torr 至 7.7Torr 以下、或 2500mTorr 至约 50mTorr、或约 25mTorr 以下,以在本发明方法中产生和所需的发泡和 / 或冷冻作用。真空可维持约 1 小时或约 2 小时,以完成发泡、泡沫稳定和泡沫的初次干燥。

[0102] 本发明方法中的初次(如初级)干燥可包括,例如冻干。例如,在没有替换热的情况下失去潜热或热量被传导除去时,可达到制剂的冻结温度。由于蒸发、接触传递和 / 或升华失去额外热量,制剂可冻结,(例如)以稳定泡沫结构。随着真空升华去除额外溶剂,初次干燥可继续进行。可通过冷凝或脱水去除泡沫周围气体环境中的溶剂(水分),从而驱动升华和 / 或蒸发。

[0103] 二次干燥

[0104] 结构稳定且经过初次干燥的泡沫的二次干燥可去除,例如截留的溶剂或分子水合水,以提供在环境温度下长时间稳定储存的组合物。二次干燥可包括例如,在强真空中施加冷却到温热的温度数小时至数天。在保护包含生命形式的生物活性材料的优选实施方式中,发现活力极度依赖适宜的温度,例如在二次干燥步骤中处于室温以下。

[0105] 例如,可向初次干燥的泡沫施加热量以驱除残留溶剂。例如,为了缓和泡沫的加热,可谨慎地施加热量来替代蒸发或升华的潜热,而不施以大量额外热量或提高泡沫温度。可通过,例如以 IR 光加热低压气氛进行加热,和 / 或可通过关联设备,如架子、托盘和玻璃瓶对泡沫加热。干燥温度可以(例如)低于剩余组合物的玻璃化转变温度,以防止泡沫结构瓦解。本发明方法产生药学上可接受的玻璃基质,其在无定形玻璃基质内包含至少一种生物活性材料。玻璃基质可以是一种固体材料,其形成中空泡沫气泡室室壁的较大规模泡沫基质结构。优选地,该组合物几乎完全干燥。组合物中可能残留一些水分或其它水性溶剂,但通常残留水分不超过 10 重量%。干燥温度范围可能是约 10°C -70°C、约 25°C -45°C 或约 35°C。对许多生物活性材料而言,二次干燥过程通常可包括例如,将温度提高到约 30°C -35°C 的干燥温度,保持约 0.5 天 -5 天,以提供残留水分为 0.1% -约 10%、或约 3% 的稳定干燥泡沫组合物。在保存微生物和病毒的优选实施方式中,二次干燥的温度低于 30°C、更优选 25°C、20°C 或更低温度。在二次干燥微生物的优选实施方式中,以缓慢和连续的(如以温度梯度)或一系列小步骤由初次干燥条件缓慢提升干燥温度。本文所用术语“干燥”、“干燥的”和“基本干燥的”包括含水量约为 0% 至约 5% 的组合物。经卡尔 - 费休 (Karl Fisher) 法测定,玻璃基质的水分含量优选约为 0.1% -3%。

[0106] 在二次干燥过程中可以提供真空,以提高除去水分的速率和 / 或除去至更低的残留含水量。二次干燥期间的真空可以是,例如,小于 400Torr、小于 100Torr、小于 2.5Torr、小于 500mTorr、小于 100mTorr、小于 50mTorr,或优选约 25mTorr。在保护微生物的优选实施方式中,在二次干燥中使用相对较低的压力,例如,低于 10Torr、低于 1Torr、低于 500mTorr、低于 100mTorr、低于 50mTorr,从而在所用的较低温度下加速干燥。为了保存生命形式,优选以非常低的绝对压力驱动二次干燥和避免长时间使用较高的二次干燥温度。

[0107] 由冷冻泡沫干燥过程得到的产物通常是无定形固体(见图 8),其中玻璃状赋形剂材料,如蔗糖是无定形的玻璃态,并包裹住生物活性材料,因而由于玻璃态组合物中化合物和其它分子的流动性大大降低而防止蛋白质去折叠并显著减缓分子相互作用或交叉反应。

假定这一过程是通过无定形玻璃机械固定蛋白质或通过氢键结合蛋白质上的极性和带电基团,即通过水置换进行,从而防止干燥诱导的变性和抑制进一步降解性相互作用。只要玻璃态固体的温度低于其玻璃化转变温度且赋形剂中的残留含水量较低,不稳定蛋白质和/或含有脂膜的生物活性材料就可以保持相对稳定。应该注意到,获得玻璃态不一定是长期稳定性的先决条件,因为一些活性成分在更偏向结晶的状态稳定性可能更好。虽然公认生物材料通常在干燥至无定形玻璃态时更易于稳定,但在某些情况下这种玻璃态对于长期保存而言既不充分也不必要。重要的是认识到,使生物材料稳定的机理可能依靠多种因素,而限于包裹活性成分的粉末基质的无定形性质。在本文所述方法中稳定可包括许多因素,包括但不限于:由于包裹造成蛋白质侧链的构象活动性和柔性降低和/或自由体积缩小、基质的结构刚性改进、稳定剂的物理渗透、赋形剂与活性成分的相分离降低、通过选择最优氢键形成供体改进水置换程度。后者与赋形剂对所稳定的蛋白质、核酸、糖或脂质表面的亲和力和亲合力有关。通常,只要固体的温度低于其玻璃化转变温度且赋形剂中的残留含水量较低,不稳定蛋白质和/或含有脂膜的生物活性材料就可以保持相对稳定。

[0108] 填充和给药

[0109] 例如,可视需要在发泡和干燥前将制剂填充到容器中,或者等分至单个容器以供使用。例如,可将制剂填充到标准玻璃冻干瓶中,以便加工成稳定的泡沫。该玻璃瓶可以是无菌并具有蚀刻的底部和可密封的塞子。可通过,例如注射重建的溶液或悬液,或吸入经研磨的泡沫粉末颗粒,给予本发明生物活性材料。

[0110] 本文所述的组合物可以是稳定的,即,它们保存了包裹的生物活性材料的生物学活性,并且化学性质和/或物理性质稳定。可通过在升高温度(如 37°C)下进行老化试验并测定该制剂的生物学活性、化学和/或物理稳定性,来检验该组合物的稳定性。作为一个活减毒流感病毒疫苗的例子(FluMist™),这些研究的结果证明用这些制剂中配制的病毒在 50°C 稳定至少 1 个月,在 37°C 稳定三个月以上(见图 6)。稳定性定义为 log 荧光斑点单位/毫升(FFU/ml)效价降低 1 所需的时间。在 25°C,活流感病毒稳定一年以上(见图 7)。即使使用高浓度的生物活性材料,这类制剂也是稳定的。因此,这些制剂的优点是它们可以在室温以上温度长时间运输和储存。

[0111] 可利用本领域已知方法进一步加工干燥后提供的无定形玻璃基质中稳定的生物活性材料组合物(见图 8)。例如,玻璃基质易于通过切割、铣切或其它分割技术进行分割。本领域熟知研磨或粉碎药物的方法。例如,可使用锤式粉碎机、称为因特利特粉碎机的冲压粉碎机、喷射粉碎机、销棒粉碎机、韦利粉碎机或类似的研磨设备。优选粒度为 100um 以下至约 0.1um,优选小于 50um。例如,小于约 10um 的颗粒适合通过吸入经肺给药,而较大的颗粒可能适合给予上呼吸道和鼻部区域。可选择粒度以便获得不同的分散和流动特性。例如,自由流动的粉末可能特别适合鼻内和经肺递送。粉末化的本发明组合物可容易地用水、盐水或其他液体再水化。

[0112] 可用合适的水性缓冲液重建干燥泡沫组合物,以便通过注射或吸入给予。例如,可通过静脉内、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、外用、鼻内或经肺途径递送生物活性材料,以便将本发明组合物给予哺乳动物。泡沫的大表面积和许多保护剂的高溶解度使得能够以低于或高于原始制剂的浓度重建本发明干燥泡沫。在一些情况下,例如,可以高浓度,例如高达约 400mg/ml 的浓度重建生物活性材料,以便通过小体积皮

下注射递送足够剂量。浓缩程度较低的重建溶液可作为气雾剂通过吸入给予。给药途径的选择可取决于,例如,作用位点、药理学考量等。本发明方法中生物活性材料的典型剂量为约 0.01ng/kg 至 15mg/kg。

[0113] 生物活性材料的合适剂量(“治疗有效量”)取决于,例如,所治疗的病症、该病症的严重程度或过程、因预防或治疗目的给予生物活性材料、曾经接受的治疗、患者的临床病史和对生物活性材料的反应、所用生物活性材料的类型和主治医师的判断。生物活性材料可能适合一次性给予患者,或者通过一系列治疗给予患者,也可在诊断后任何时间给予患者。生物活性材料可作为单独的治疗给予,或者与用于治疗所研究病症的其他药物或治疗联用。

[0114] 作为总体建议,无论一次或多次给药,所给予的生物活性材料的治疗有效量范围是约 0.01ng/kg 至 50mg/kg 患者体重,例如,采用的每天给予的蛋白质范围通常约为 0.05ng/kg 至 20mg/kg,更优选约为 0.1ng/kg 至 15mg/kg。然而,也可采用其他剂量方案。可通过常规技术监测这种治疗的进展。

[0115] 在本发明的另一实施方式中,提供一种包含容器的制品,该容器装有本发明药物组合物且任选地提供使用说明书。合适的容器包括例如,大瓶、小瓶和注射器。该容器可由各种材料,如玻璃或塑料制成。示范性的容器是 3-20cc 一次性玻璃瓶。或者,对多剂量制剂而言,容器可以是 3-100cc 玻璃瓶。该容器装有制剂且贴有或附有标签,标签上可记载使用指南。制品还可包括从商业和使用者立场来看可能需要的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、填充剂、针头、注射器和具有使用说明书的插页。

[0116] 本发明组合物

[0117] 本发明组合物包括生物活性材料和多元醇和 / 或聚合物的干燥泡沫组合物。因为通过先冷冻再干燥的方式制备组合物,所以它们在结构和功能上与未经初次冷冻就干燥的泡沫不同。例如,即使在宏观水平也能注意到仅干燥某制剂和冷冻干燥某制剂之间的差异。例如,可通过本发明方法制备本发明组合物。可通过以下方法制备本发明组合物:例如,制备多元醇和具有脂膜的生物活性材料的制剂、将该制剂冷却至约为脂膜相变温度的温度、降低制剂上方的压力以形成泡沫、冷冻该泡沫、升华冷冻泡沫中的水以提供冻干的干燥泡沫组合物。可使用二次干燥条件进一步干燥该泡沫。本发明组合物包含,例如用水性缓冲液重建的干燥泡沫。

[0118] 在一个实施方式中,本发明组合物是活减毒流感病毒的疫苗。例如,按照本发明方法制备该组合物,包括在低于玻璃化转变温度的干燥温度,例如 20°C 至 35°C 二次干燥该泡沫 6 小时至 5 天,以提供残留含水量小于约 5% 的最终组合物。这类组合物在约 25°C 保存 1 年以上可保持稳定。可将制剂中的病毒保持在接近膜相变温度的温度(例如约 15°C;见图 4)和 / 或在较低的温度(如 22°C)下二次干燥,以便显著提高经过该过程的初始活力。

[0119] 对于活生物活性材料,本发明所述方法保持活力的能力超过现有技术中的泡沫干燥法。以下条件的组合对单细胞微生物和病毒特别有利:用多元醇在膜相变温度附近预处理该材料、在低温引发发泡、通过升华初次干燥、在二次干燥期间保持在玻璃化转变温度以下、在二次干燥期间保持低于约 30°C、使用较强真空加速干燥和 / 或二次干燥相对较薄的泡沫。使用这类方法时,组合物可由泡沫状生物活性材料制成,其残留含水量低于 10%,而保持较高的活力水平。例如,可将肠细菌科(Enterobacteriaceae)的细菌与多元醇和 / 或

聚合物配制在一起,暴露于真空产生泡沫,冷冻或冻干,在逐步升高至约 25°C (或更低) 的温度下进行数小时或数天的二次干燥,以产生保持初始液体制剂活菌落计数的 25%、50%、75%、90% 或更高的组合物。

[0120] 图 5 和 6 是显示本发明干燥泡沫中保存且储存于 25°C、37°C 和 50°C 的包膜病毒的稳定性数据的图表。它是效价 (荧光斑点单位 / 毫升 -FFU/mL) 与时间的图表,单个数据时间绘制成圆点或方块。趋势线 51 和 95% 置信区间 52 表明本发明组合物中的病毒在 25°C 储存约 40 个月的预测稳定性 (log 效价损失不超过 1)。

[0121] 在另一实施方式中,本发明组合物包含例如,作为生物活性材料稳定储存在干燥泡沫中的血小板。血小板是可聚集在血管损伤部位防止出血和启动修复的巨核细胞的胞质片段。利用血小板输注校正外伤、疾病或药物诱导性功能障碍造成的患者循环血小板缺陷或功能障碍。例如,患有特发性血小板减少症、镰状细胞贫血和接受消融化疗的患者可通过血小板输注进行治疗。消融化疗在各种恶性肿瘤中的应用逐步增加导致对替代血小板治疗的需求增加。使用分离血小板的主要难题是它们的保存期限较短。食品药品监督管理局 (FDA) 批准在室温下血小板只能以液态储存最多 5 天,在此期间功能特性快速退化。在民用和军用医学中,这造成许多后勤保障问题。

[0122] 可通过将血液采集到合适抗凝剂中,然后通过本领域已知的任何方法获得富含血小板的血浆 (PRP),从而制备保存血小板的组合物。可按照本发明方法加工血小板,产生含有血小板的稳定干燥泡沫。由于与病毒相比血小板较大且结构复杂,所以在其特征性相变温度干燥特别重要。可通过重悬于生理上可接受的缓冲液重建干燥的血小板,再进行输注。对治疗应用而言,该缓冲液是无菌的。该缓冲液可以是 pH 合适的任何缓冲液。优选地,重建缓冲液可包含具有高胶体渗透压的一种或多种物质,包括但不限于:聚乙二醇 (PEG) 和羟基-乙基淀粉 (HES)。优选地,该缓冲液是盐水配制的 1-5% 人血清白蛋白 (HSA)。在优选实施方式中,可如其他微生物推荐的那样处理血小板、脂质体、动物细胞和植物细胞,例如,利用膜相变温度、输注保护剂和使用低温 / 高真空二次干燥。

[0123] 制备干燥泡沫组合物的制剂

[0124] 制备本发明干燥泡沫组合物的制剂可包含例如,聚合物、多元醇、发泡剂、表面活性剂和 / 或缓冲剂。可按照本发明方法加工这类制剂,以提供用于储存和给予生物活性材料的稳定组合物。

[0125] 本发明生物活性材料包括例如,在活体系中具有可检测的生物活性的材料、分析用生物细胞和分子、药用生物细胞和分子、研究用生物细胞和分子等等。例如,本发明组合物的生物活性材料包括肽、蛋白质、激素、核酸、抗体、疫苗、细菌、病毒、脂质体、血小板、细胞悬液等等。

[0126] 组合物中包含脂膜的生物活性材料通常是活的和 / 或减毒的、具生物活性的、活的或死的细胞、病毒、微生物 (如细菌) 和 / 或脂质体。例如,该生物活性物质可包括疫苗、病毒、脂质体、细菌、血小板和 / 或细胞。病毒性生物活性物质可包括例如,流感病毒、副流感病毒、AAV、腺病毒、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒、SARS 病毒、人肺炎后病毒、冠状病毒科成员、巨细胞病毒和 / 或 EB 病毒,它们在本发明制剂中的含量范围可以是约 10^1 TCID₅₀/mL 以上、约 10^3 TCID₅₀/mL 至 10^{12} TCID₅₀/mL 或约 10^6 TCID₅₀/mL 至 10^9 TCID₅₀/mL。以重量计,生物活性材料的含量通常小于约 1%;更优选小于约 0.001%;最优选小于约 0.0001%。

[0127] 制备干燥泡沫组合物的制剂可包括例如,基本上所有固体(减去溶剂,如水的组分)。所有固体的主要部分可包含生物活性材料、多元醇和/或聚合物。例如,多元醇在该制剂中的浓度范围可以是约2重量%-50重量%、约5重量%-45重量%、或约20重量%-40重量%。在另一实例中,聚合物在该制剂中的浓度范围可以是约1重量%-10重量%,或约5重量%。优选地,该制剂在引发发泡之前应具有高固体含量;通常约为5%-70%,或约30%-50%。本发明制剂的粘度通常大于5厘泊(cP);更优选大于10cP。优选制剂的粘度约为12cP。

[0128] 本发明多元醇可包括例如,各种糖、碳水化合物和醇。例如,所述多元醇可包括非还原糖、蔗糖、海藻糖、山梨糖、松三糖和/或棉子糖。所述多元醇可包括例如,甘露糖、麦芽糖、乳糖、阿拉伯糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和葡萄糖、甘露醇、木糖醇、赤藓醇、蔗糖醇、山梨糖醇、甘油或L-葡糖酸。需要该制剂冻融稳定时,多元醇优选是在冷冻温度(如-20℃)不结晶,以便不使该制剂中的生物活性材料去稳定的多元醇。宜包含两种或多种不同的多元醇,以抑制晶体形成。

[0129] 本发明聚合物可包括例如,各种糖、多肽、直链和支链亲水性分子。例如,制剂的聚合物可包括明胶、水解明胶、卵清蛋白、聚乙烯吡咯烷酮、胶原、硫酸软骨素、唾液酸化多糖、肌动蛋白、肌球蛋白、微管、动力蛋白、激动素或人血清白蛋白。这些添加剂不一定能单独稳定生物活性材料免于失活;它们也可能帮助防止冻干材料在冻干过程和随后的固态储存期间发生物理瓦解。也可用作稳定剂的其他明胶替代品包括天然胶原和藻酸盐。

[0130] 优选使用明胶,更优选使用水解明胶。“水解明胶”指发生部分水解的明胶,产生的部分水解明胶的分子量约为1kDa-50kDa,或约3kDa。这种明胶水解产物的氨基酸组成与明胶基本相同。水解明胶的典型氨基酸组成是已知的。部分水解明胶可获自多种商业来源。也可通过蛋白水解酶,如木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶和菠萝蛋白酶水解的方式对明胶进行酶促水解,从而获得部分水解明胶,但也可采用其它已知的水解方式,例如酸水解。优选使用分子量约为1kDa-50kDa的明胶。与全长明胶相比,水解至约3kDa以下的明胶的变应原性可能较低。明胶可源自各种来源,包括猪和牛。可使用人源化胶原以及高度加工的胶原,例如获自宫木化学品工业有限公司(Miyagi Chemical Industrial Co, Ltd.)的一种变应原性降低的药用明胶FreAlagin。再次,该制剂中的明胶用量取决于该制剂的总体组成和预期用途。通常,明胶浓度为约1-7%;更优选约1-5%。优选制剂含有约5%明胶。

[0131] 制备本发明组合物的制剂可包含例如,有利于制剂组分的溶解性和稳定性并帮助形成和稳定泡沫的一种或多种表面活性剂。表面活性剂可包括例如,非离子型去污剂,如聚乙二醇去水山梨糖醇单月桂酸酯(吐温20)、聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯(吐温80)、聚乙二醇和聚丙二醇的嵌段共聚物(普流罗尼克)等等。该制剂可包含离子型去污剂。本发明的制剂和组合物可包含表面活性剂,如聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙二醇/聚丙二醇嵌段共聚物、聚乙二醇烷基醚、聚丙二醇烷基醚、聚乙二醇/聚丙二醇醚嵌段共聚物、烷基芳基磺酸盐、苯磺酸盐、烷基硫酸盐、烷基磺酸盐、烷基醚硫酸盐、烷基芳基醚硫酸盐、烷基聚二醇醚磷酸盐、聚芳基苯基醚磷酸盐、烷基磺基丁二酸盐、烯烴磺酸盐、石蜡磺酸盐、石油磺酸盐、牛磺酸盐(tauride)、肌氨酸盐(sarcoside)、脂肪酸、烷基萘磺酸、萘磺酸、木素磺酸、磺化萘与甲醛的缩合物、或磺化萘与甲醛和酚的缩合物、木素-亚硫酸盐废液、烷基磷酸盐、季铵化合物、氧化胺、甜菜碱等等。本发明制剂中表面活性剂的浓度范围可以是约0.001

重量% -2 重量%，或约 0.01 重量% -1 重量%。

[0132] 例如，制备干燥泡沫组合物的制剂中可存在缓冲剂，以控制 pH、提高稳定性、影响组分溶解度、提供给药舒适感等。可将制剂 pH 控制在以下范围内：约 pH 4-pH 10、约 pH 6-pH 8 或约 pH 7.2。优选缓冲剂常常是公认对生物活性材料的特定给药途径而言是安全的缓冲剂阴离子的成对酸和盐形式。用于本发明制剂和组合物的缓冲剂通常包括例如，磷酸钾、磷酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、组氨酸、咪唑、琥珀酸钠、碳酸氢铵、碳酸盐等。

[0133] 在一个实施方式中，该制剂含有上述物质（即生物活性材料、多元醇、表面活性剂和明胶），且基本不含一种或多种保存剂，如苯醇、酚、间甲酚、氯丁醇和苜索氯铵）。在另一实施方式中，该制剂可包含保存剂，特别是在该制剂是多剂量制剂时。

[0134] 一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂，如 Osol, A. 编辑的《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 第 16 版 (1980) 所述的这类物质可以包含在制剂中，只要它们不对该制剂的所需特性造成负面影响。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒，其包括：额外的缓冲剂；共溶剂；成盐抗衡离子如钾和钠；抗氧化剂，如甲硫氨酸、N-乙酰半胱氨酸或抗坏血酸；螯合剂，如 EDTA 或 EGTA。该制剂可包含氨基酸，如精氨酸和甲硫氨酸。该制剂中精氨酸的含量范围可以是约 0.1 重量% -5 重量%。该制剂中甲硫氨酸的浓度范围可以是约 1mM 至 50mM 或约 10mM。甘油在该制剂中的浓度范围可以是，例如约 0.1 重量% -5 重量%，或约 1 重量%。该制剂中 EDTA 的浓度范围可以是，例如约 1mM 至 10mM，或约 5mM。

实施例

[0135] 提供以下实施例，以说明而非限制要求保护的本发明。

[0136] 实施例 1 保存活减毒病毒

[0137] 本实施例记载一种在 37°C 储存 125 天后保持蛋白质完整性和稳定性的组合物。

[0138] 将单价活减毒流感病毒 B/Harbin (批号 CAZ039) 配制成 8.0log FFU/ml 效价溶液（病毒母液的总蛋白质浓度 ~ 10 微克 / 毫升），其中含有 40% 蔗糖、5% 明胶、0.02% 普流罗尼克 F68、25mM 7.2pH KPO₄ 缓冲剂。然后，将此溶液的 1 毫升试样分配到 10mL 玻璃冻干瓶中，用冻干塞部分覆盖，用 VirTis Genesis 25EL 冻干机（获自纽约加德纳的 VT 公司 (VirTis, Gardiner, NY)）按照下述循环条件冻干：

[0139] 1) 将架子预冷至 15°C（冻干机架上有干燥剂，冷凝器设置为 -60°C）；

[0140] 2) 装上小瓶并平衡 30 分钟；

[0141] 3) 将真空设定为 50mTorr；

[0142] 4) 保持 60 分钟；

[0143] 5) 以约 0.7°C / 分钟的速率逐步升温至 33°C；

[0144] 6) 保持 48 小时；和

[0145] 7) 塞住小瓶。

[0146] 所得泡沫的含水量约为 2.2% (w/w)，T_g 约为 43°C。

[0147] 实施例 2 制剂

[0148] 按照本发明方法，用 B/Harbin 流感病毒或安慰剂制备以下制剂。用氢氧化钠或氢氧化钾调节制剂 pH。

[0149]

ID	谷氨酸	多元醇	聚合物添加剂	表面活性剂	其他
AVS1	20%	10%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	2%精氨酸, 5mM EDTA, 10mM 甲硫氨

[0150]

					酸, 50mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS2	20%	10%蔗糖	-	0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 5mM EDTA, 10mM 甲硫氨酸, 7.2KPO4 缓冲剂 50mM,
AVS3	25%	15%蔗糖	--	0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 5mM EDTA, 50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS4	25%	15%蔗糖	--	0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS5	25%	5%蔗糖	--	0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS1 A	20	10%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	2%精氨酸, 5mM EDTA, 10mM 甲硫氨酸, 50mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS2 A	20	10%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 5mM EDTA, 10mM 甲硫氨酸, 50mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS3 A	25	15%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 5mM EDTA, 10mM 甲硫氨酸, 50mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS4 A	25	15%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 50mM 7.2 KPO4 缓冲剂

AVS5 A	25	5%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸,50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS6	20	10%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	2%精氨酸,5mM EDTA,10mM 甲硫氨 酸
AVS7	20	10%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸,5mM EDTA,10mM 甲硫氨 酸,50mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS8	25	15%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸,5mM EDTA,10mM 甲硫氨 酸,50mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS9	25	15%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	5%精氨酸,50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS10	25	5%蔗糖		0.1%普流罗尼克	5%精氨酸,50mM 7.2

[0151]

				F68	KPO4 缓冲剂
AVS11	10%	20%蔗糖 ; 10%棉子 糖		0.2%普流罗尼克 F68	1%精氨酸,50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS12	20	20%棉子 糖		0.2%普流罗尼克 F68	1%精氨酸,50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS13	25	10%蔗糖 ; 2%棉子糖		0.2%普流罗尼克 F68	5%精氨酸,50mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS14	20	10%蔗糖		0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸,50 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS15	20	10%蔗糖	1%明胶	0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸
AVS16	20	10%蔗糖	1%明胶	0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸

AVS17	20	2%棉子糖	1%明胶	0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸,
AVS18	20	10%棉子糖		0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸
AVS19	20	10%蔗糖		0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 100 mM 7.0 柠檬酸缓冲剂
AVS20	20	10%蔗糖	1%明胶	0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 100 mM 7.0 柠檬酸缓冲剂
AVS21	20	10%蔗糖, 2%棉子糖	1%明胶	0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 100 mM 7.0 柠檬酸缓冲剂
AVS22	20	2%棉子糖	1%明胶	0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 100 mM 7.0 柠檬酸缓冲剂
AVS23	20	10%棉子糖		0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 100 mM 7.0 柠檬酸缓冲剂
AVS24	20	10%蔗糖, 5%棉子糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS25	20	15%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS26	20	15%棉子糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS27	20	10%蔗糖, 5%棉子糖		0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS28	20	10%蔗糖, 5%棉子糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	2%卵清蛋白, 10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS29		40%棉子糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS30	10	40%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂

[0152]

AVS31	10	40%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂, 1%甘油
AVS32	20	15%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS33	20	15%蔗糖	1%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS34	20	15%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS35	20	20%蔗糖	5%明胶	0.1%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS36	20	20%蔗糖		0.1%普流罗尼克 F68	2%卵清蛋白, 10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS37	10	20%蔗糖, 10%棉子 糖		0.1%普流罗尼克 F68	1%精氨酸, 10mM 甲 硫氨酸, 25mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS38	20	20%蔗糖	1%明胶	0.2%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS39	20	20%蔗糖	5%明胶	0.005%吐温 20	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS40	20	20%蔗糖		0.005%吐温 20	2%卵清蛋白, 10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2 KPO4 缓冲剂
AVS41	10	40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS42	10	40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂, 1%甘油
AVS43		40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂

AVS44		40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂, 1%甘油
AVS45	10	40%蔗糖	5%明胶		10mM 甲硫氨酸, 1% 甘油
AVS46		50%蔗糖	1%明胶		10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂, 1%甘油
AVS47	10	40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂, 1%甘油
AVS48		40%蔗糖,	5%明胶	0.02%普流罗尼克	10mM 甲硫氨酸, 25

[0153]

		5%海藻糖		F68	mM 7.2KPO4 缓冲剂, 1%甘油
AVS49		40%蔗糖	3%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS50		40%蔗糖	1%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS51		40%蔗糖		0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS52		40%蔗糖	5%明胶		10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS53		40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	25mM 7.2KPO4 缓冲 剂
AVS54		40%蔗糖	5%明胶		25mM 7.2KPO4 缓冲 剂
AVS55		20%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS56		10%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25 mM 7.2KPO4 缓冲剂

AVS57		40%蔗糖		0.02%普流罗尼克 F68	5%卵清蛋白, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS58 A		40%蔗糖	5%明胶 (西格玛公司 (Sigma AD))	0.02%普流罗尼克 F68	25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS58 B		40%蔗糖	5%明胶 西格玛公司 (R)	0.02%普流罗尼克 F68	25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS59		40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS60		40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS61		20%蔗糖	2.5%明胶	0.01%普流罗尼克 F68	5mM 甲硫氨酸, 12.5mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS62		40%蔗糖		0.02%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS63		40%蔗糖		2.5% PEG 1000, 0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS64		40%蔗糖		2.5% PVP 10,000, 0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS65		40%蔗糖		2.5% Ficoll 400K,	10mM 甲硫氨酸, 25

[0154]

				0.02%普流罗尼克 F68	mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS66		20%蔗糖	2%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	10mM 甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS67		40%蔗糖	5%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	1%甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂

AVS68		20%蔗糖	2%明胶	0.02%普流罗尼克 F68	1%甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS69		40%蔗糖		0.02%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 1%甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂
AVS70		20%蔗糖		0.02%普流罗尼克 F68	5%精氨酸, 1%甲硫氨酸, 25mM 7.2KPO4 缓冲剂

[0155] 测定冻干后储存于 37°C 或 50°C 的上述制剂的热稳定性。随着效价损失速率降低 (通过 log FFU/ml 或 TCID₅₀/ml 测定), 可观察到热稳定性提高。以下提供对本发明各种制剂而言, FFU/ml 的对数降低 1 所需的时间。

[0156]

制剂	37°C 的稳定性
AVS43	125 天
AVS41	97 天
AVS44	142 天
AVS30	93 天
AVS31	48 天
AVS42	146 天

[0157] 实施例 3 泡沫干燥条件

[0158] 用以下冻干 / 干燥室条件制备制剂 :

[0159] 循环 1 :

[0160] 1) 将架子预冷至 25°C ;

[0161] 2) 装上小瓶并平衡 ;

[0162] 3) 将真空设定为 50mTorr ;

[0163] 4) 保持 30 分钟 ;

[0164] 5) 逐步升温至 45°C ;

[0165] 6) 保持 1 小时 ;

[0166] 7) 将温度调节至 37°C 并保持 1 小时 ; 和

[0167] 8) 塞住小瓶。

[0168] 循环 2 :

[0169] 1) 将架子预冷至 30°C ;

[0170] 2) 装上小瓶并平衡 ;

- [0171] 3) 将真空设定为 50mTorr ;
- [0172] 4) 保持 2 小时 ;
- [0173] 5) 逐步升温至 37℃ ;
- [0174] 6) 保持 16 小时 ;和
- [0175] 7) 塞住小瓶。
- [0176] 循环 3 :
- [0177] 1) 将架子预冷至 15℃ ;
- [0178] 2) 装上小瓶并平衡 ;
- [0179] 3) 将真空设定为 50mTorr ;
- [0180] 4) 保持 60 分钟 ;
- [0181] 5) 逐步升温至 37℃ ;
- [0182] 6) 保持 20 小时 ;和
- [0183] 7) 塞住小瓶。
- [0184] 循环 4 :
- [0185] 1) 将架子预冷至 12℃ ;
- [0186] 2) 装上小瓶并平衡 ;
- [0187] 3) 将真空设定为 50mTorr ;
- [0188] 4) 保持 25 分钟 ;
- [0189] 5) 逐步升温至 33℃ ;
- [0190] 6) 保持 24 小时 ;和
- [0191] 7) 塞住小瓶。
- [0192] 循环 5 :
- [0193] 1) 将架子预冷至 17℃ ;
- [0194] 2) 装上小瓶并平衡 10 分钟 ;
- [0195] 3) 将真空设定为 50mTorr ;
- [0196] 4) 保持 60 分钟 ;
- [0197] 5) 逐步升温至 37℃ ;
- [0198] 6) 保持 48 小时 ;
- [0199] 7) 逐步升温至 40℃ ;
- [0200] 8) 保持 48 小时 ;和
- [0201] 9) 塞住小瓶。
- [0202] 循环 6 :
- [0203] 1) 将架子预冷至 20℃ ;
- [0204] 2) 装上小瓶并平衡 ;
- [0205] 3) 将真空设定为 50mTorr ;
- [0206] 4) 保持 60 分钟 ;
- [0207] 5) 逐步升温至 33℃ ;
- [0208] 6) 保持 72 小时 ;和
- [0209] 7) 塞住小瓶。

- [0210] 循环 7：
- [0211] 1) 将架子预冷至 15℃；
- [0212] 2) 装上小瓶并平衡；
- [0213] 3) 将真空设定为 50mTorr；
- [0214] 4) 保持 60 分钟；
- [0215] 5) 逐步升温至 25℃；
- [0216] 6) 保持 72 小时；和
- [0217] 7) 塞住小瓶。
- [0218] 循环 8：
- [0219] 1) 将架子预冷至 7℃；
- [0220] 2) 装上小瓶并平衡；
- [0221] 3) 将真空设定为 50mTorr；
- [0222] 4) 保持 120 分钟；
- [0223] 5) 逐步升温至 20℃；
- [0224] 6) 保持 72 小时；和
- [0225] 7) 塞住小瓶。
- [0226] 循环 9：
- [0227] 1) 将架子预冷至 15℃；
- [0228] 2) 装上小瓶并平衡 30 分钟；
- [0229] 3) 将真空设定为 50mTorr；
- [0230] 4) 保持 60 分钟；
- [0231] 5) 逐步升温至 33℃；
- [0232] 6) 保持 48 小时；和
- [0233] 7) 塞住小瓶。
- [0234] 循环 10：
- [0235] 1) 将架子预冷至 15℃；
- [0236] 2) 装上小瓶并平衡 30 分钟；
- [0237] 3) 将真空设定为 50mTorr；
- [0238] 4) 保持 18 小时；
- [0239] 5) 以 0.2℃ / 分钟的速率升温至 25℃；
- [0240] 7) 保持 5 小时；
- [0241] 8) 以 0.2℃ / 分钟的速率升温至 33℃；
- [0242] 9) 保持 19 小时；和
- [0243] 10) 塞住小瓶。
- [0244] 循环 11：
- [0245] 1) 将架子预冷至 7℃；
- [0246] 2) 装上小瓶并平衡；
- [0247] 3) 将真空设定为 50mTorr；
- [0248] 4) 保持 3 小时；

- [0249] 5) 以 0.2℃ / 分钟的速率升温至 15℃ ;
 [0250] 6) 保持 16 小时 ;
 [0251] 7) 以 0.2℃ / 分钟的速率升温至 25℃ ;
 [0252] 8) 保持 2 小时 ;
 [0253] 9) 以 0.2℃ / 分钟的速率升温至 33℃ ;
 [0254] 10) 保持 27 小时 ;和
 [0255] 11) 塞住小瓶。
 [0256] 实施例 4 制剂

[0257] 用实施例 1 所示的干燥循环稳定活 B/Harbin 流感病毒。下表小结了 25℃ 储存 10 个月后观察到的这些制剂的稳定性概况。

[0258]

制剂	KPO4 缓冲剂	蔗糖	明胶	甲硫氨酸	普流罗尼克	25℃	log FFU/ml	过程损失
	pH 7.2 (mM)	(%)	(%)	(mM)	F68	的斜率	降低 1 所需	(Log
					(%)		的时间 (月)	FFU/ml)
AVS068	25	10	0	0	0.02	-0.167	6	0.20
AVS071	25	10	0	10	0	-0.245	4.1	0.13
AVS072	25	10	0	66.7	0.2	-0.047	21.4	0.37
AVS073	25	10	2	0	0.2	-0.089	11.2	0.63
AVS074	25	10	2	10	0.02	-0.056	17.8	1.13
AVS075	25	10	2	66.7	0	-0.154	6.5	0.43
AVS076	25	10	5	0	0	-0.145	6.9	0.67
AVS077	25	10	5	10	0.2	-0.008	121.2	0.47
AVS078	25	10	5	66.7	0.02	-0.050	20.0	0.27
AVS079	25	10	5	66.7	0.2	-0.043	23.1	0.83
AVS080	25	20	0	0	0	-0.132	76	0.50
AVS081	25	20	0	10	0.02	-0.060	16.8	0.53
AVS082	25	20	0	66.7	0.2	-0.045	224	0.07
AVS083	25	20	2	0	0.02	-0.040	24.9	2.27
AVS084	25	20	2	10	0	-0.096	10.4	0.33
AVS085	25	20	2	66.7	0.2	-0.040	250	0.43
AVS086	25	20	5	0	0.2	-0.022	44.6	0.30
AVS087	25	20	5	10	0.2	-0.005	200.4	0.40
AVS088	25	20	5	66.7	0	-0.060	16.7	-0.07
AVS089	25	20	5	66.7	0.02	-0.022	44.5	0.67
AVS090	25	40	0	0	0.2	-1.283	0.8	0.63

AVS091	25	40	0	10	0.2	-1.117	09	0.77
AVS092	25	40	0	66.7	0	-0.120	8.3	0.50
AVS093	25	40	0	66.7	0.02	-0.033	30.2	0.73
AVS094	25	40	2	0	0	-0.116	8.6	0.83
AVS095	25	40	2	10	0.2	-0.016	63.8	0.47
AVS096	25	40	2	66.7	0.02	-0.030	33.2	0.80
AVS097	25	40	2	66.7	0.2	-0.017	58.1	0.27
AVS053s	25	40	5	0	0.02	-0.022	44.6	0.47
AVS098	25	40	5	0	0.2	-0.023	43.4	0.37
AVS052b	25	40	5	10	0	-0.087	11.6	0.67
AVS043c	25	40	5	10	0.02	-0.037	27.2	0.77
AVS099	25	40	5	66.7	0	-0.067	15.0	0.40

[0259] 实施例 5 提供高活力的方法

[0260] 在以前的实验中,我们注意到与标准冻干过程相比,冷冻泡沫干燥过程中相同制剂的病毒和细菌加工活力损失通常较高。我们预计这种差异是由这种方法的主要差异造成的:与标准冻干方法相比,泡沫冷冻方法中冷冻前有发泡和沸腾的干燥前步骤。进行实验以研究和表征过程活力损失与加工步骤、时间、温度和干燥度的关系。

[0261] 在基于蔗糖的制剂中,通过泡沫冻干顺序加工单核细胞增生利斯特菌并在关键点取出样品以供分析。图 9 显示整个过程中小瓶温度与蔗糖质量分数(干燥水平)的关系图。将利斯特菌制剂的小瓶放入压力和温度受控的隔室内。该过程开始时 80,利斯特菌在约 30%蔗糖制剂中,15°C。使该制剂膨胀,以便在发泡步骤 81 中产生泡沫。然后,冷冻泡沫 82,通过蒸发和升华在架温 15°C 的初次干燥步骤中去除水分 83。就我们的标准非发泡冻干方法而言,保留约 25%水分时,将隔室温度快速提升至约 33°C,从而加速二次干燥步骤 84。继续进行二次干燥,直到残留含水量为约 3% 85。在利斯特菌菌落计数过程中的不同时间点取出样品。

[0262] 令我们惊讶的是,由于所述冷冻泡沫方法独有的初次发泡和冷冻步骤,所述泡沫冷冻方法的活力损失非常小。因此,出人意料地发现它们不是泡沫和非泡沫冻干方法之间活力差异的主要原因。由于与工业上的许多冻干二次干燥步骤相比所用的干燥温度较低,并且在冷冻泡沫方法中与标准冻干方法中相同,所以我们预计干燥过程不是方法之间活力差异的主要原因。再次令我们惊讶的是冷冻泡沫的主要活力损失与二次干燥过程有关(大约 $-1.5 \log_{10}$)。我们认为,这种损失是由于随时间的热应激和脱水应激的组合;但这些温度在标准冻干过程中不会造成问题。

[0263] 重复该实验,这一次使初次干燥 15°C 的架温延伸至二次干燥步骤持续足够时间,以便将残留含水量降低至 10% 以下。这里,需要在 15°C 持续约 4-5 小时才能达到 10% 的残留含水量。总之,在 15°C 进行初次和二次干燥,持续约 16 小时,以达到约 7% 的残留含水量。然后,最终干燥步骤包括将温度逐步提高至 33°C。如图 10 所示,与冷冻泡沫干燥有关的活力损失主要是由于直到 10% 残留含水量的二次干燥温度的选择。发现在冷冻泡沫干燥

过程中加工时间和最终的干燥水平对活力影响较小。

[0264] 冷冻泡沫干燥和标准冻干过程之间的主要差异是冷冻之前进行的发泡和对流沸腾干燥,以及涉及冷冻泡沫过程的延长的二次干燥时间。这些实验提供令人惊讶的结果,即这些因素不是在比较冷冻发泡法和标准冻干过程时观察到的活力损失的主要原因。这一实验从许多因素中鉴定到一种对活力后果产生主要影响的因素。通过降低冷冻泡沫干燥的二次干燥温度,我们发现可获得与标准冻干过程相当的活力。

[0265] 实施例 6 快速低温二次干燥的系统

[0266] 如上所述,冷冻泡沫保存方法可获益于在二次干燥步骤中提供较低温度。然而,这可导致加工时间延长,进而影响制造生产率。以下实施例鉴定了可加速本发明某些冷冻泡沫干燥过程所用的低温二次干燥的系统要素。

[0267] 与许多冻干或喷雾干燥过程相比,冷冻泡沫干燥材料的表面积体积比可能较低。在基本封闭的容器,例如冻干小瓶中干燥较深或较厚的冷冻泡沫时,这一缺点特别成问题。我们认为,可以在实用时间尺度上,在较低的二次干燥温度下完成二次干燥,通过(例如)降低容器对干燥的干扰和/或缩短水离开泡沫所必须经过的距离使得病毒和微生物活力高。

[0268] 可设计这样的系统,能够加速冷冻泡沫的低温干燥。例如,如图 11 所示,系统可包括环境控制室 110,以便控制内部温度和压力。在该隔室内可以装有用于发泡和冷冻的生物活性材料制剂 111(溶液和/或悬液)。该制剂可安置在表面 112 上。虽然该表面可以是容器的内表面,但为了较快干燥它优选不是容器的内表面。可降低该隔室的内部压力,以使该制剂膨胀成泡沫 113。例如,可通过暴露于冷却的内部气氛、蒸发冷却和/或冷却表面 112 来冷冻泡沫。在优选实施方式中,冷冻泡沫的厚度 114 为小于约 10mm、小于 5mm、小于 2mm、约 1mm 以下。直接暴露于内部隔室环境而不受容器干扰的薄泡沫可通过二次干燥快速进展至残留含水量 10% 以下。

[0269] 在本发明系统中,可以分批或连续方式,在(例如)大容器、平板、带或滚筒 115 表面上冻干和二次干燥冷冻泡沫。在所示的连续加工系统中,可通过在滚筒表面上喷涂一层施加制剂。该层可通过内部真空膨胀成泡沫层。可将该泡沫冷冻到表面上,可通过冻干进行初次干燥。该滚筒可旋转,并且按需旋转的不同点上通过(例如)接触热交换器、温度控制气流、红外光、热电装置等而将热量传递给该层或从该层移除热量。例如,可沿滚筒表面在发泡完成之点冷却滚筒表面,以冷冻该泡沫。接着,可在沿滚筒旋转方向的下一个点上略微加热该表面,以替代升华所致的热量损失。在沿滚筒旋转方向的第二干燥点上,可向表面施加额外热量,以便维持(例如)约 25℃,从而除去残留水分。最后,通过,例如刮除从滚筒上收获经冷冻泡沫干燥的生物活性材料产物。

[0270] 或者,可以在分批顺序方法中,在整个加工表面上进行涂布、发泡、冷冻、初次干燥、二次干燥和收获。例如,可将制剂倾倒或散布到平板上或大开口容器底部,形成薄层。然后将该片层放入环境控制隔室中,通过降低压力使制剂膨胀成薄泡沫(如 1mm-10mm)。通过失去潜热和热量传导出泡沫的组合来冷冻该泡沫。可通过升华进行初次干燥,潜热被温度控制隔室环境气氛中的热量置换。二次干燥可包括使泡沫暴露于 15-25℃ 的气氛足够长时间,以便获得 5% 相对湿度。可通过将泡沫片层破碎成颗粒来收集泡沫,并将它们倒入常规容器储存。

[0271] 实施例 7 延长的低温干燥

[0272] 将低温真空干燥延伸至二次干燥中或贯穿二次干燥以提高利斯特菌活力。

[0273] 如图 12A 所示,在隔室温度为 15°C 的初次和二次干燥中,单核细胞增生利斯特菌的活力保持相对稳定。然而,最终在 33°C 进行二次干燥时活力损失加速。

[0274] 如图 12B 所示,简单地将 15°C 干燥温度延伸至干燥结束时,能保持高水平活力,即使直至残留含水量约为 5%。

[0275] 实施例 8 步进式二次干燥

[0276] 延长低温真空二次干燥,用步进式温度提升完成干燥,以提高利斯特菌的活力。

[0277] 如图 13 所示,可通过在 7°C 进行初次干燥和早期二次干燥,然后在 15°C 进一步进行二次干燥来保存利斯特菌。这种逐步干燥法通过在实用加工时间提供约 7% 残留含水量提供高活力。与 33°C 干燥相比,在约 25°C 以及最后在约 33°C 进一步进行二次干燥不会显著降低活力,如图 12A 所示。以此方式,可以在保持高活力的同时干燥至残留含水量低于 5%,即使最后采用 33°C 的干燥步骤。

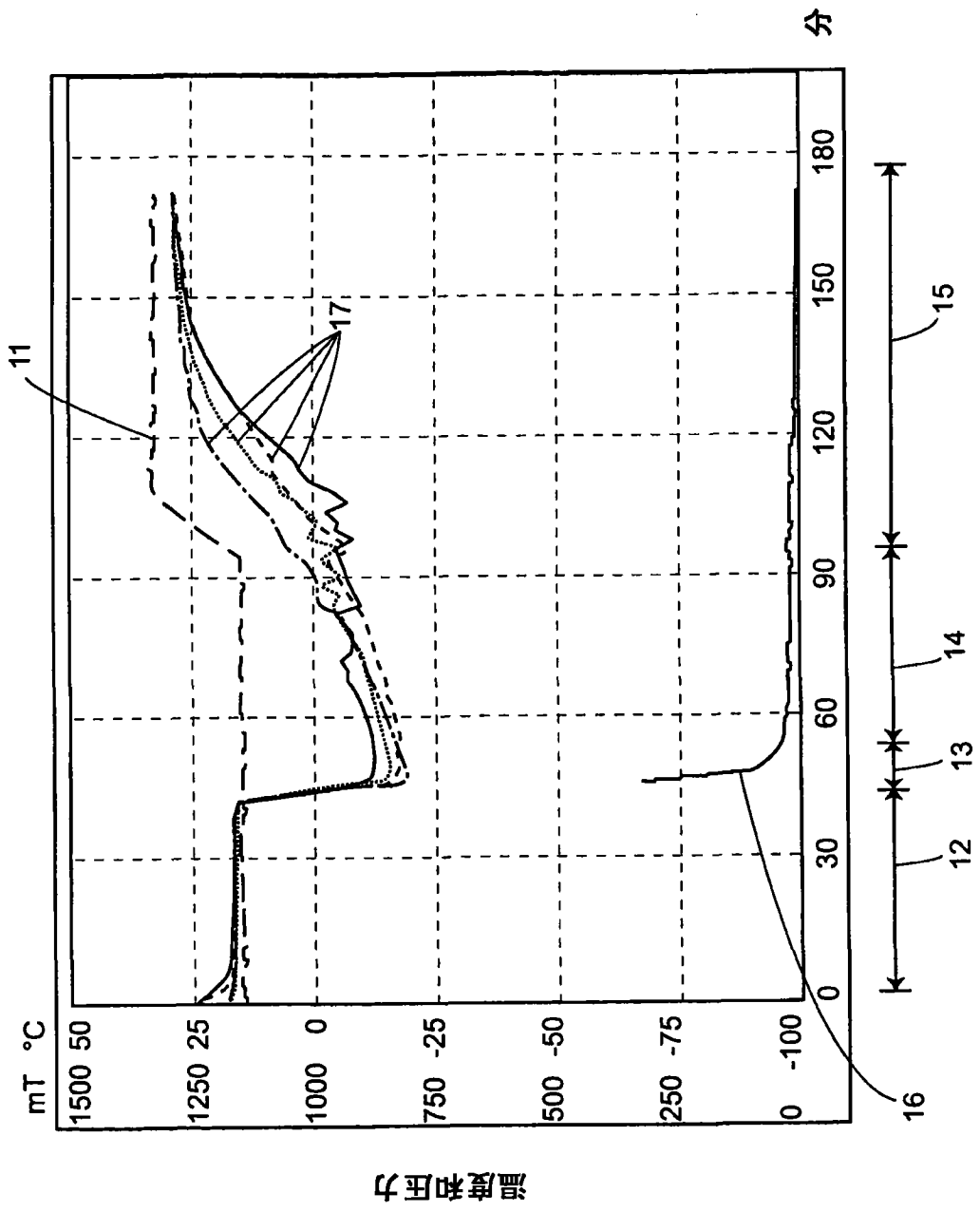
[0278] 实施例 9 非玻璃基质对活力的影响

[0279] 在基质 T_g 以下或以上干燥的多元醇基质中保存利斯特菌,不显著改变该微生物的活力。

[0280] 在蔗糖制剂(纯 T_g 34.5°C)和海藻糖制剂(纯 T_g 53.9)中冷冻泡沫干燥利斯特菌。在高于蔗糖制剂 T_g、但保持低于海藻糖制剂 T_g 的温度下,在小瓶中干燥制剂。如图 14 的图表所示,经过加工步骤并且在最终干燥产物中的利斯特菌的活力基本不受干燥过程中基质是否保持玻璃态的影响。

[0281] 应理解,本文所述的实施例和实施方式只是为了说明,本领域技术人员应了解据此作出的各种修饰或改变,它们包括在本申请的构思和范围以及所附权利要求书的范围内。

[0282] 尽管已经出于清楚和理解的目的在一些细节中描述了本发明,但是本领域技术人员通过阅读该说明书可以很清楚地了解,可以在不背离本发明真实范围的情况下进行各种形式和细节的变化。例如,上述制剂、技术和设备均可以组合使用。本申请中提到的所有公开出版物、专利、专利申请和 / 或文献都通过引用全文纳入本文中,相当于所述各单独的公开出版物、专利、专利申请和 / 或文献都独立地通过引用纳入本文用于所有目的。



温度和压力

图 1



图 2A



图 2B



图 2C

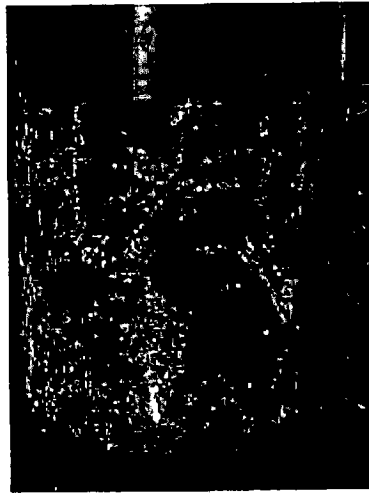


图 2D

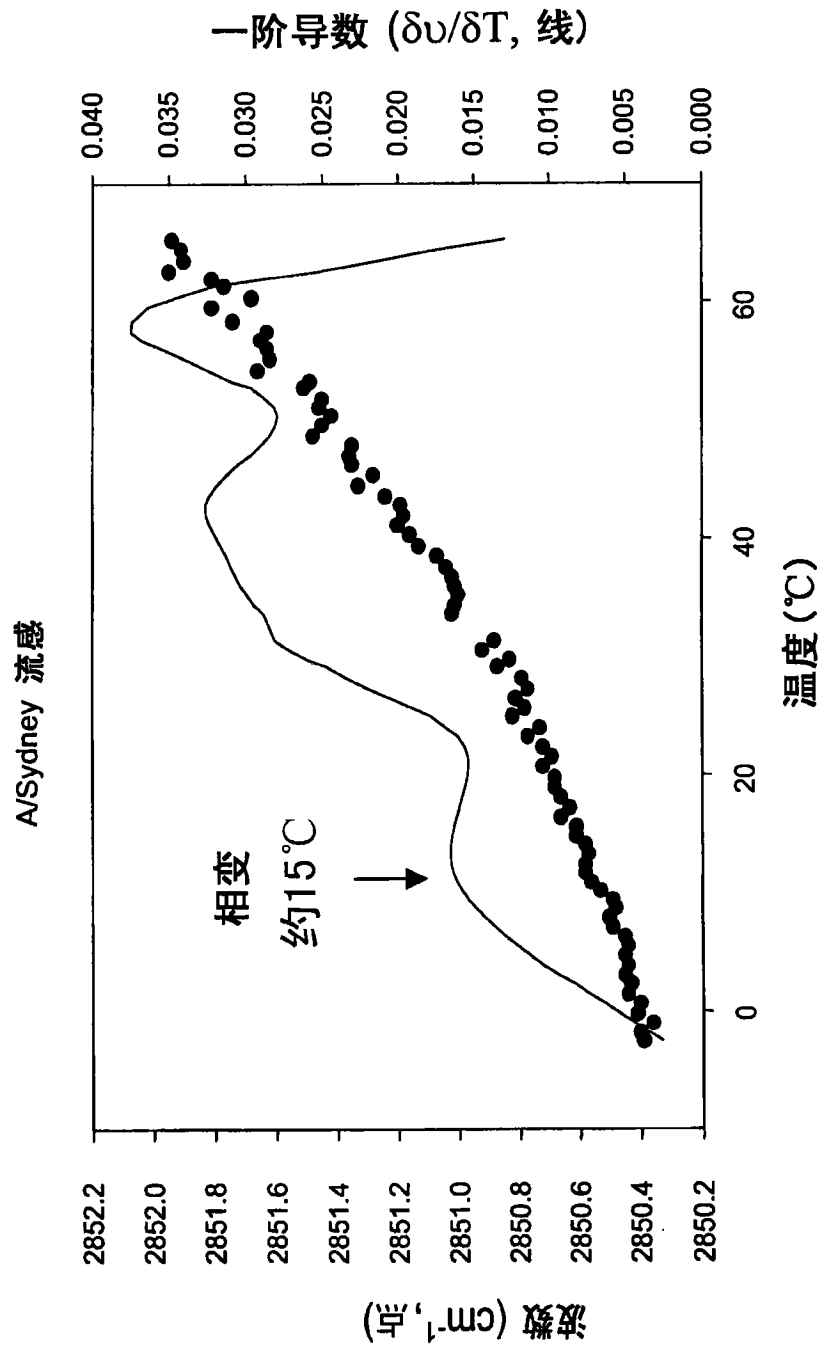


图 3

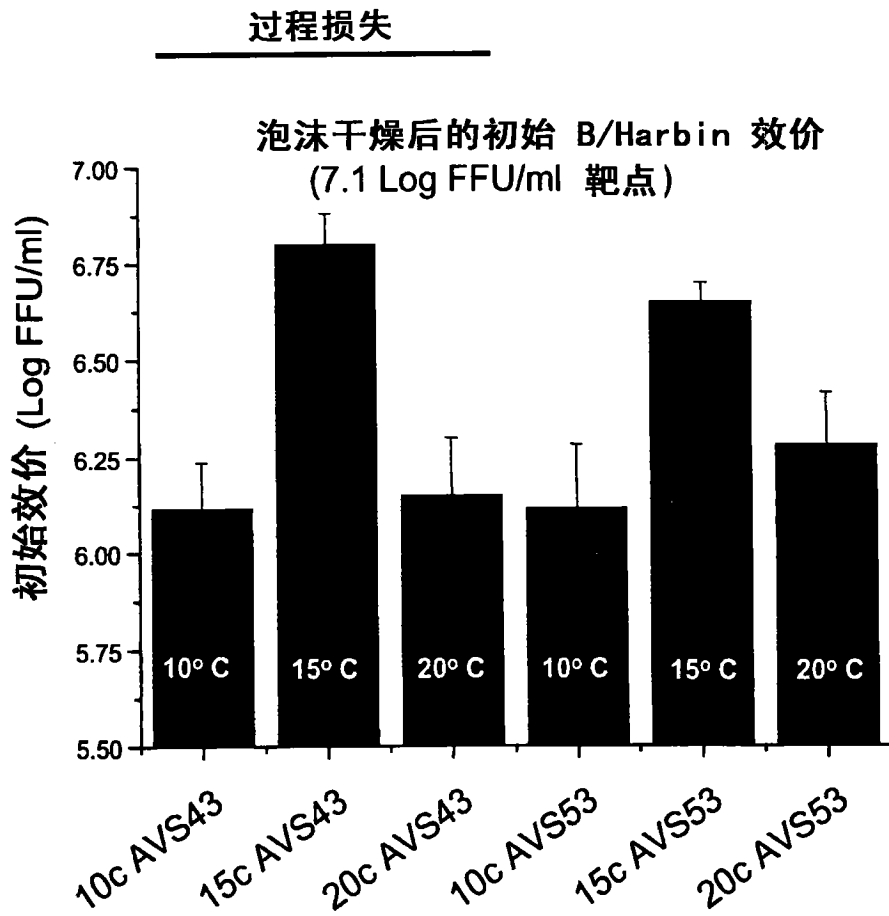


图 4

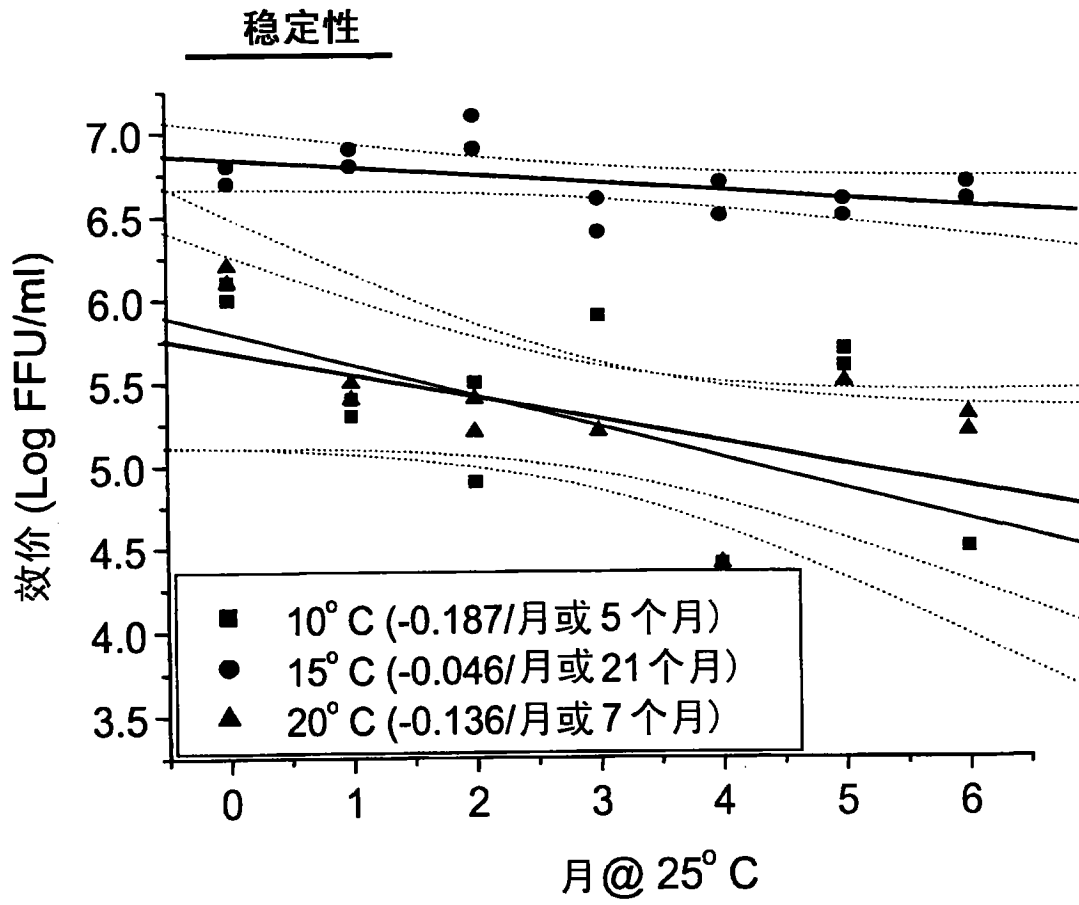


图 5

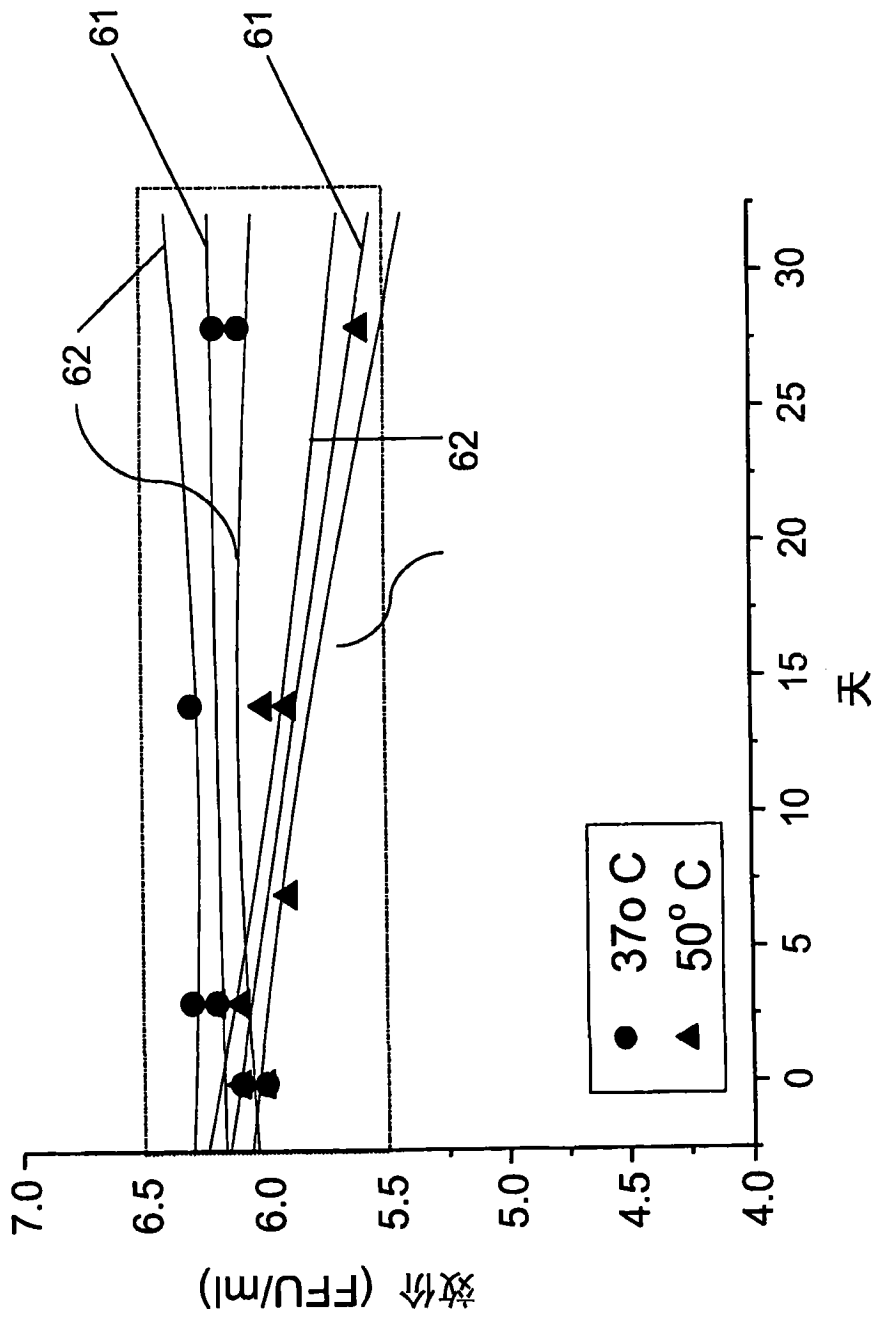


图 6

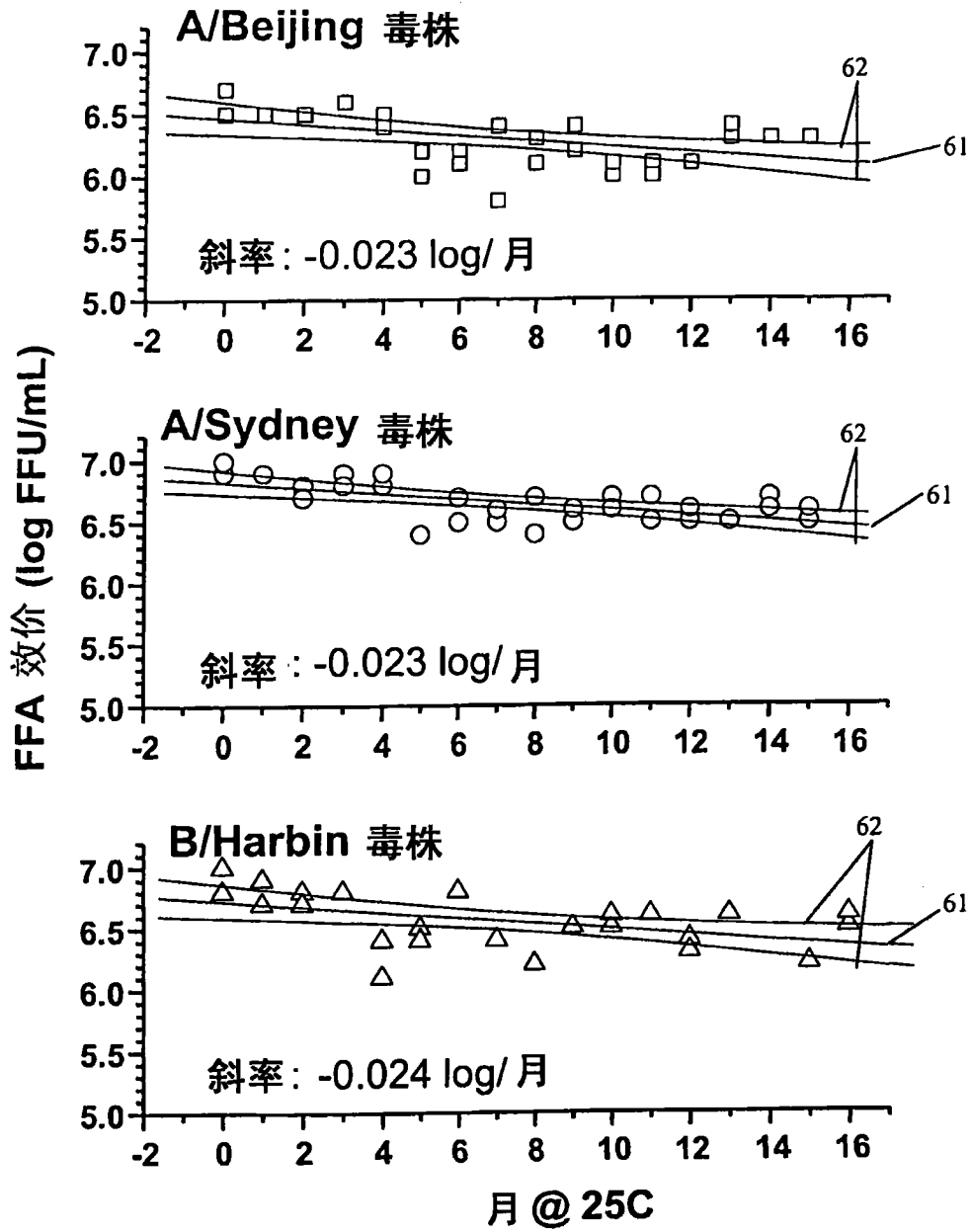


图 7

文件: 10, ID: AVS53
日期: 03/27/02 12: 43 步长: 0.020° 持续时间: 0.600秒
范围: 2.00-40.00(度) 连续扫描速率: 2.00 度/分

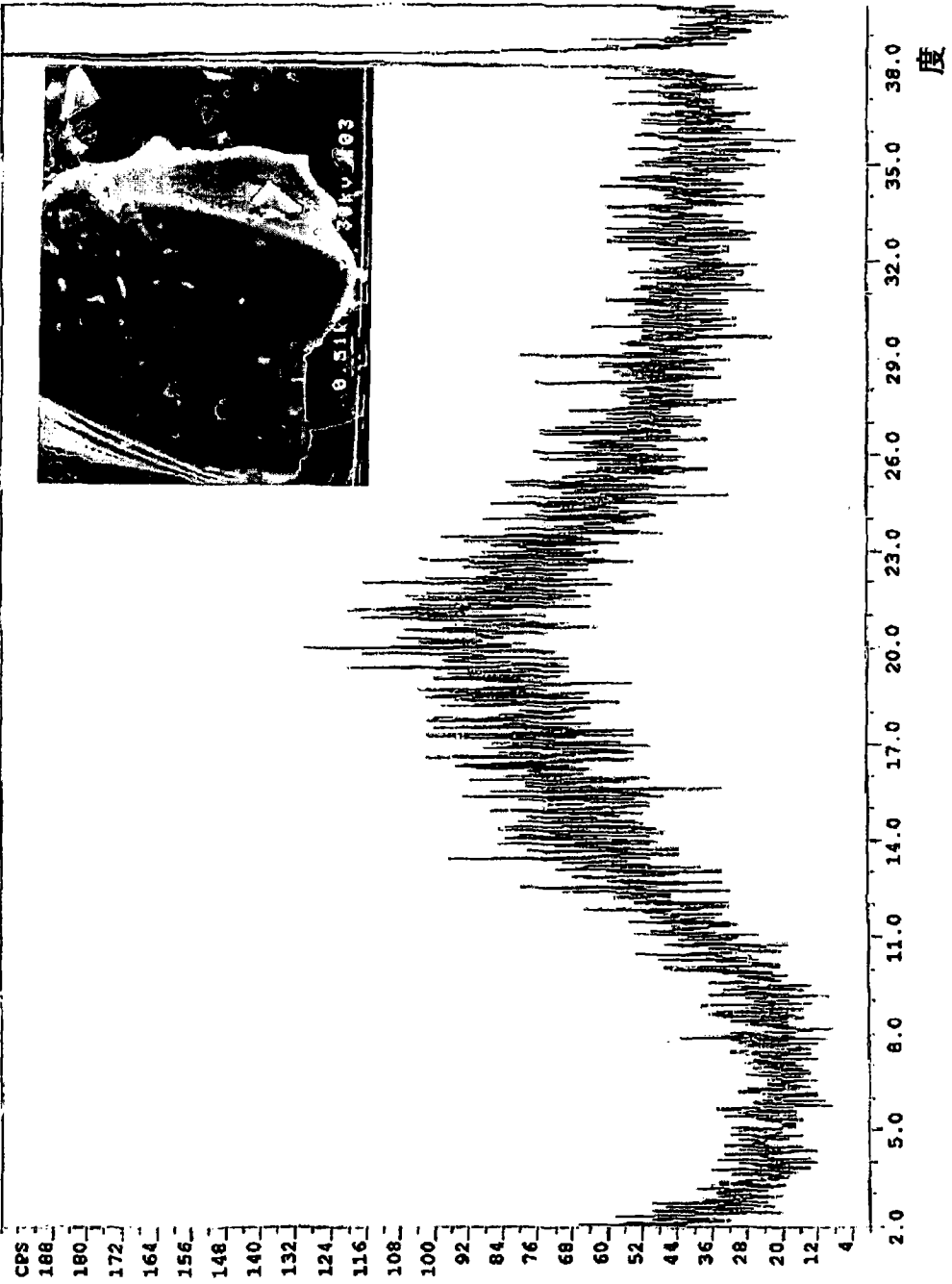


图 8

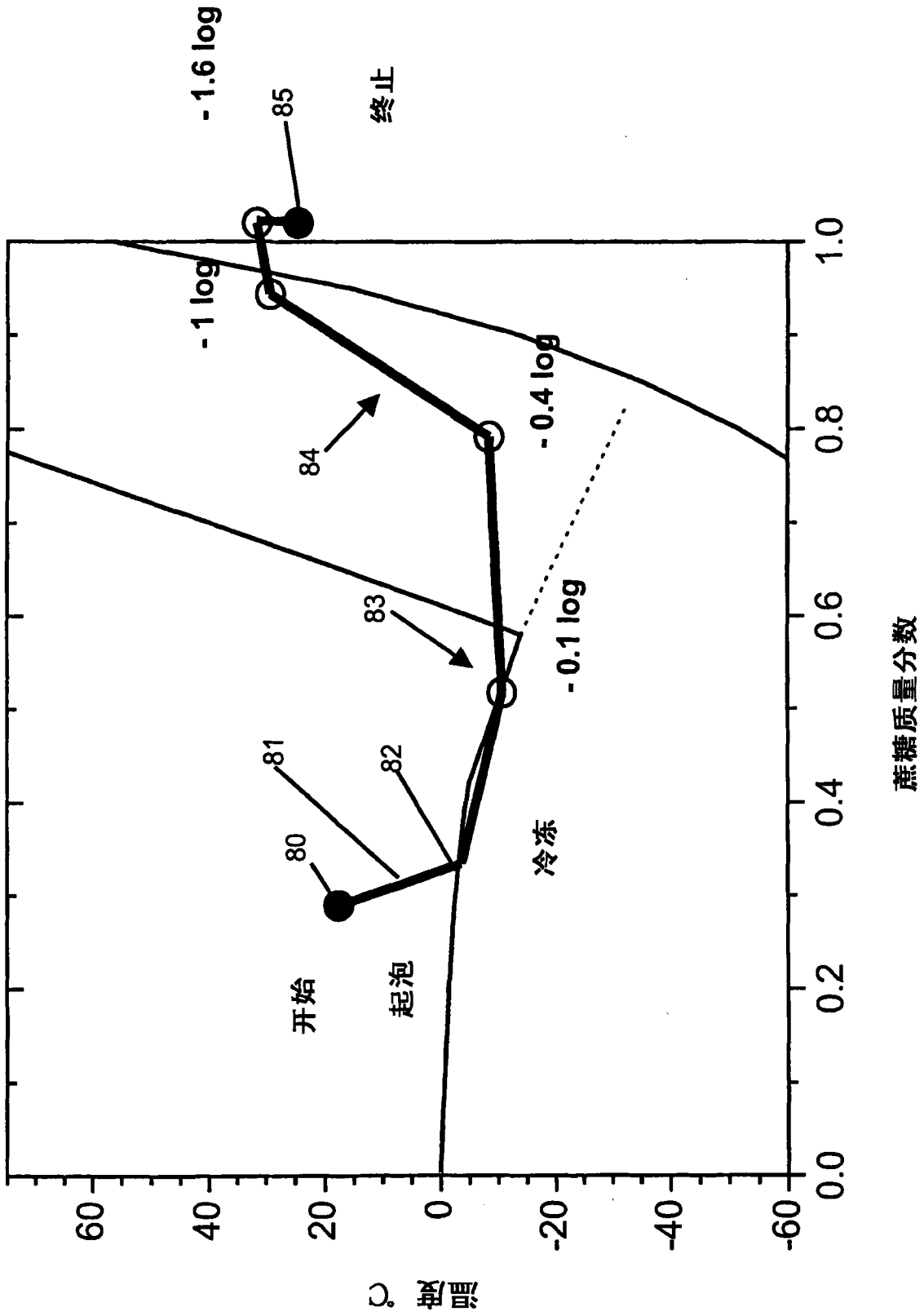


图 9

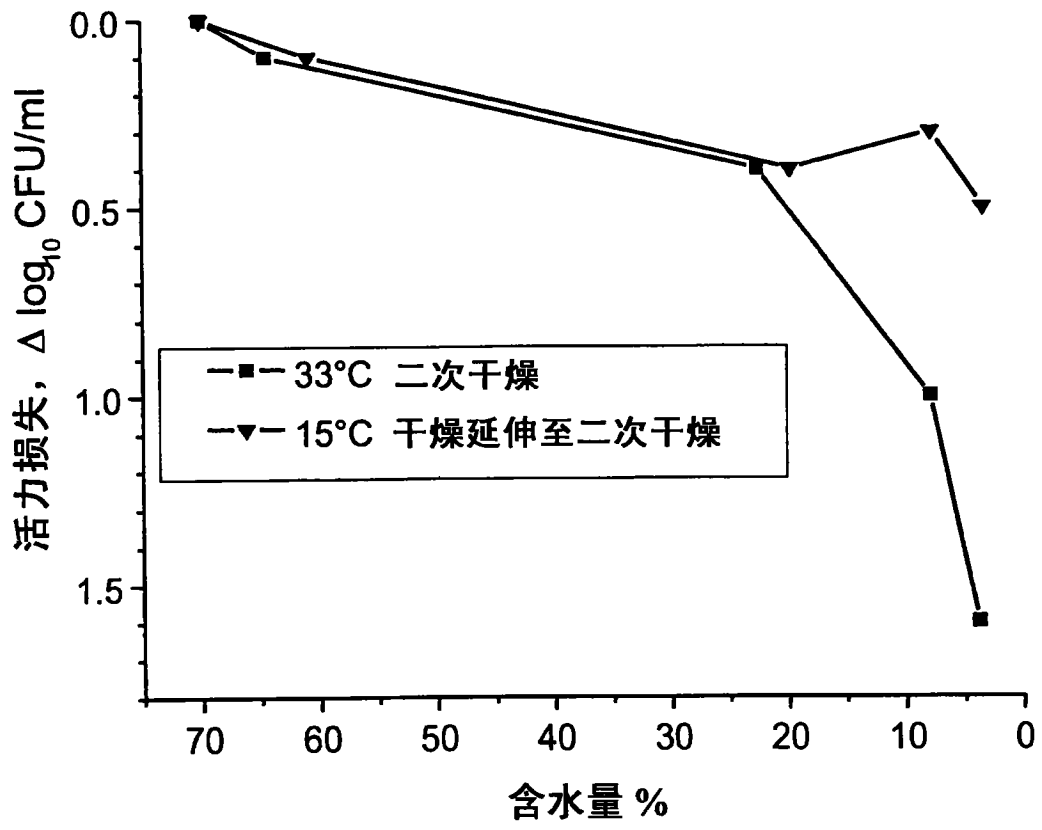


图 10

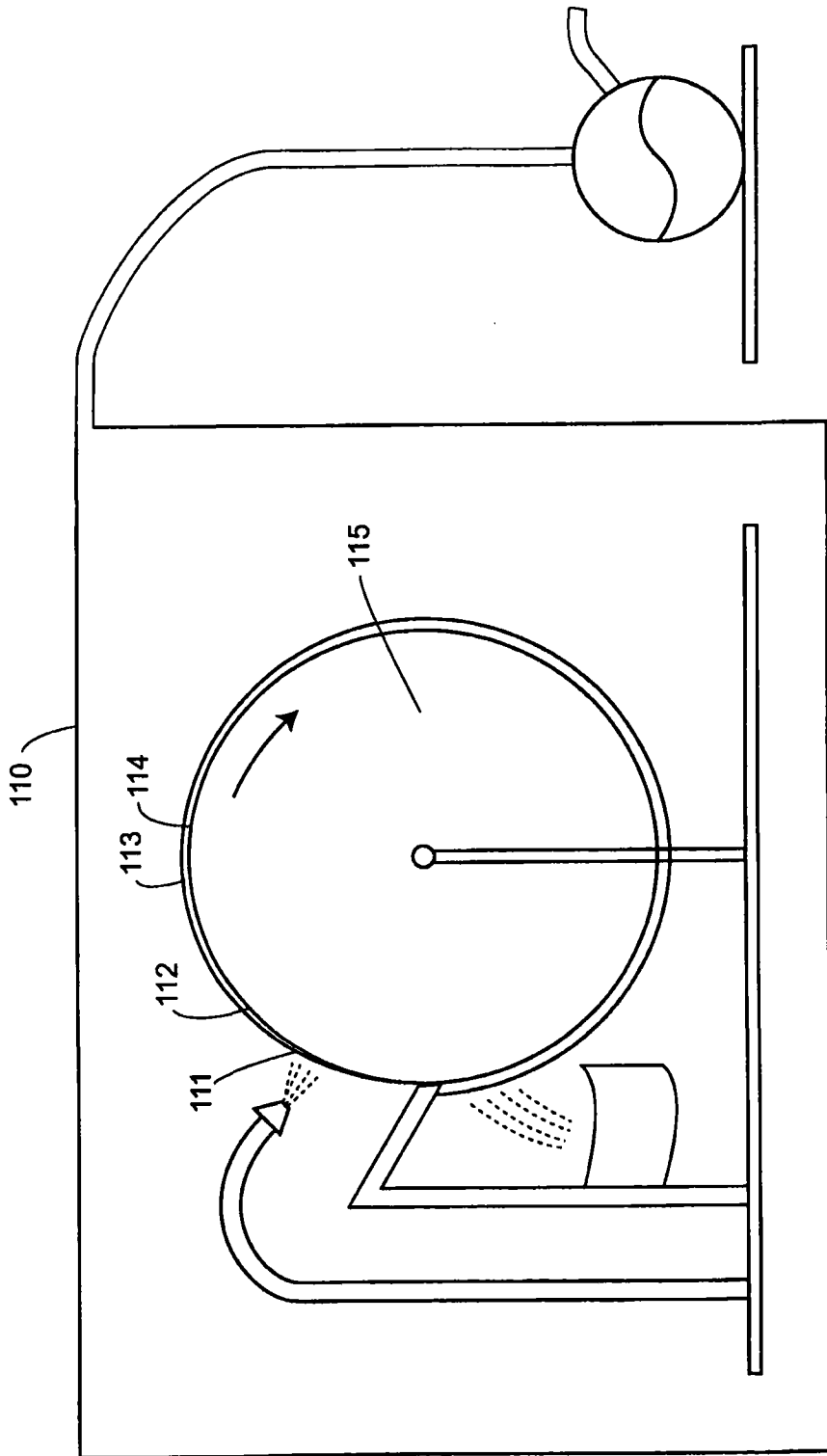


图 11

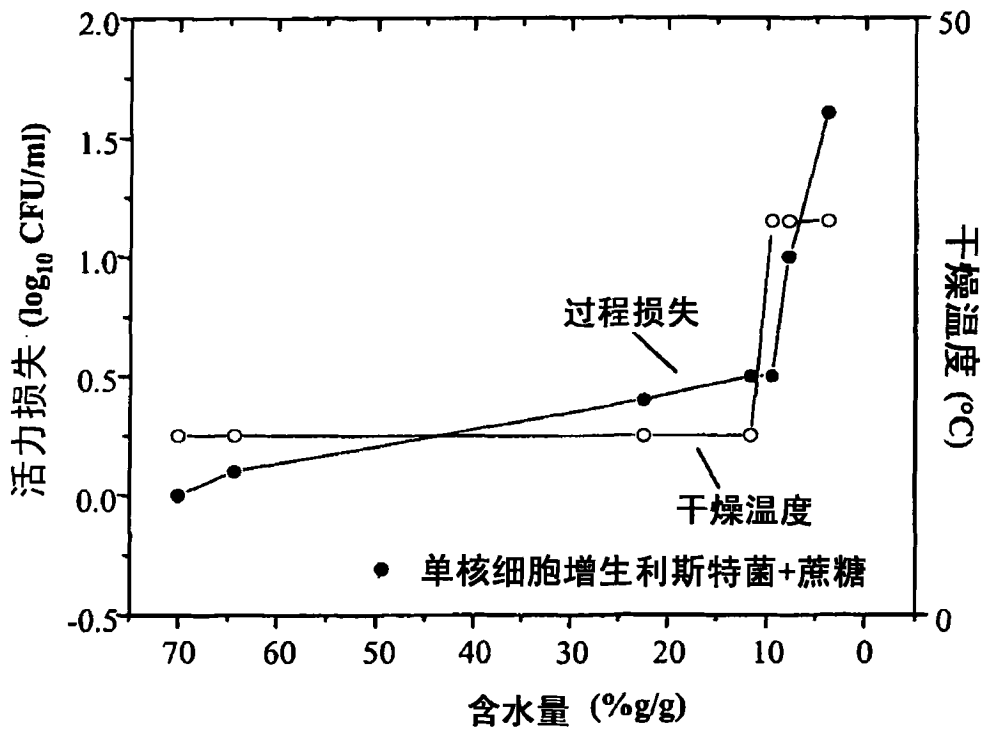


图 12A

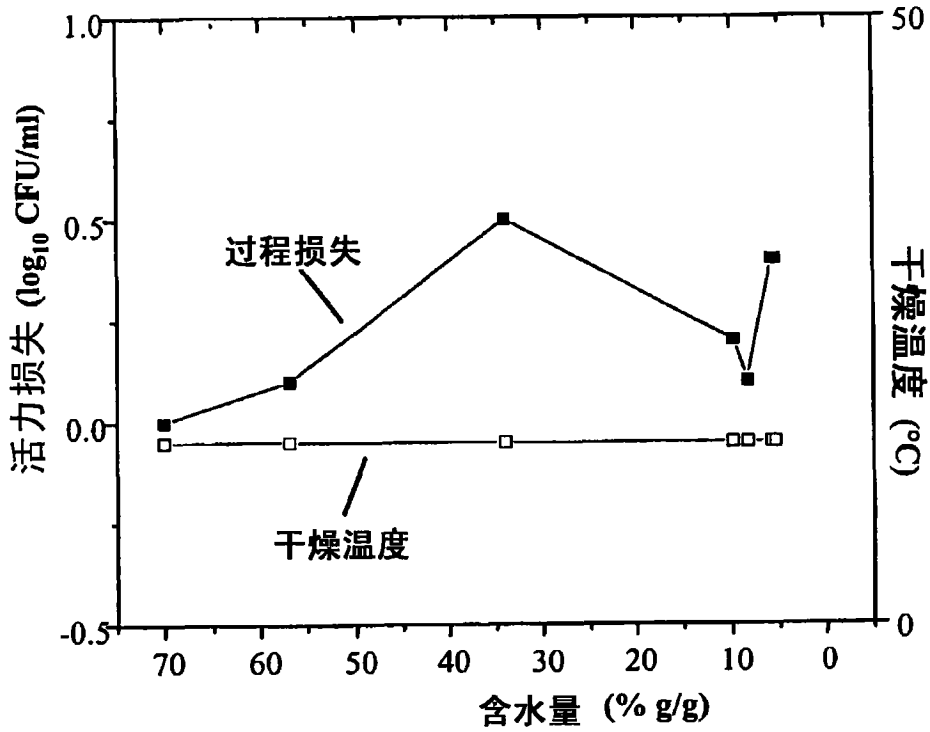


图 12B

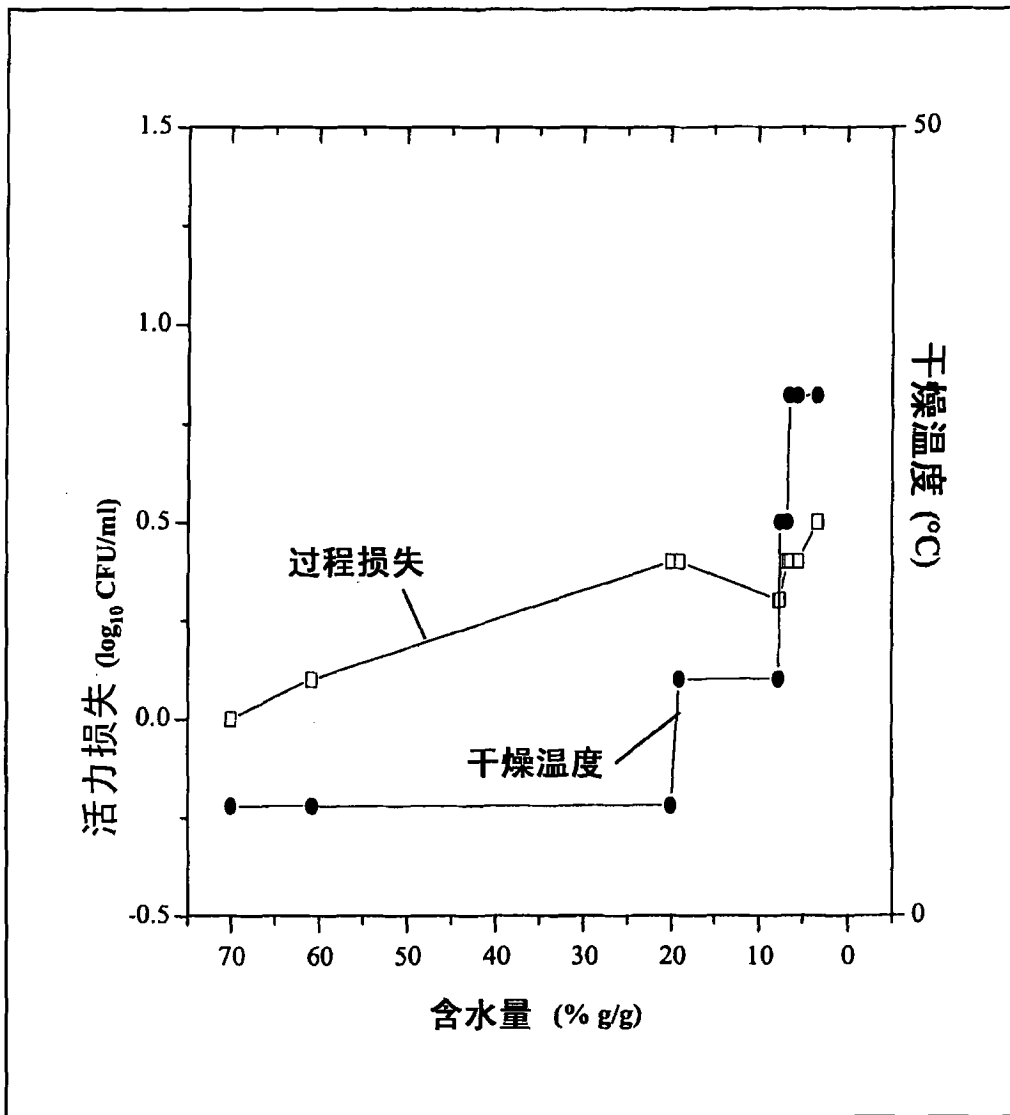


图 13

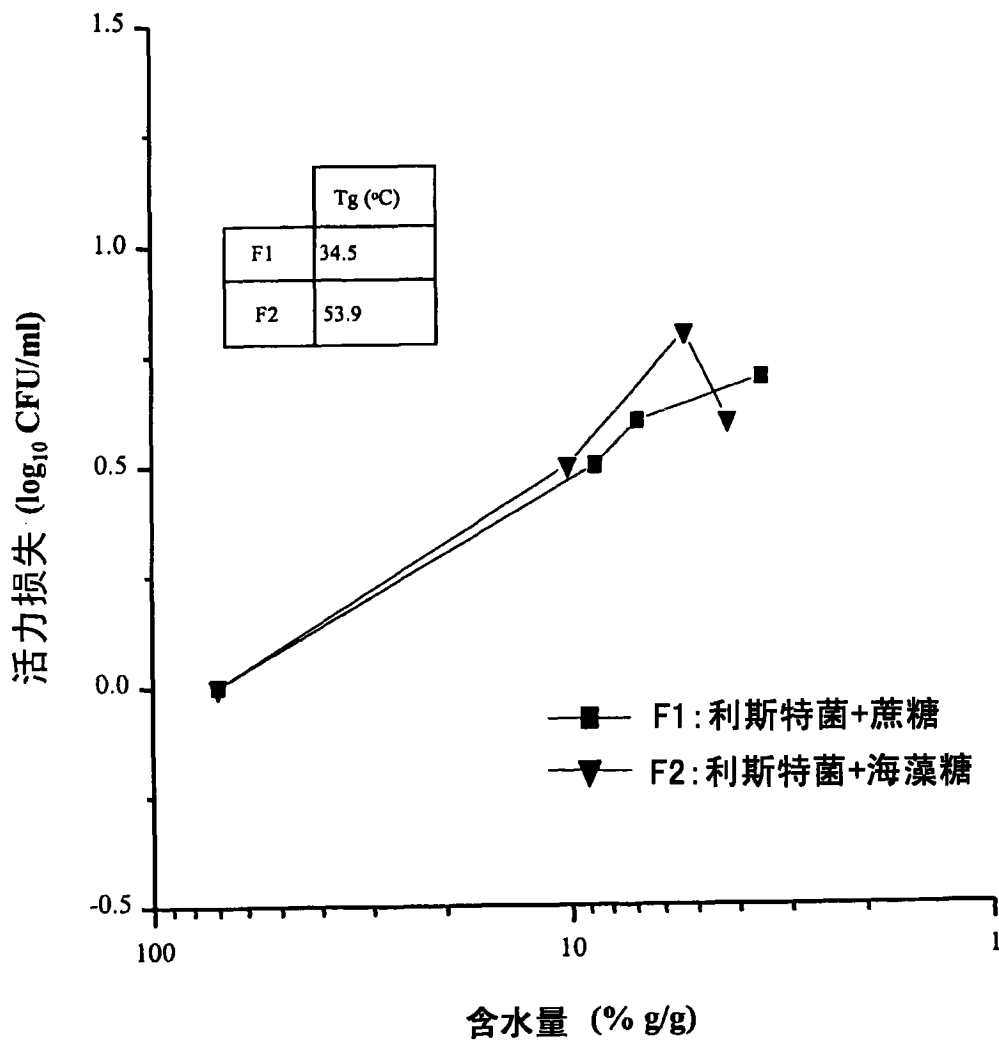


图 14