(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113301917 B
(45)授权公告日 2025.04.29

(21)申请号 201980078668.9
(22)申请日 2019.11.28
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113301917 A
(43)申请公布日 2021.08.24
(30)优先权数据
62/772823 2018.11.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.05.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/082940 2019.11.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/109485 EN 2020.06.04
(73)专利权人 康特伦英国斯温顿捷迪斯有限公司
地址 英国格拉斯哥
(72)发明人 黄毓腾 C·斯马顿 K·希尔哈尼 M·阿马克 S·弗罗伊里 A·J·H·斯特曼
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 林毅斌
(51)Int.Cl.
A61K 39/12(2006.01)
A61P 31/18(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2008042789 A1,2008.04.10
EP 2624815 A1,2013.08.14
审查员 陈慧敏

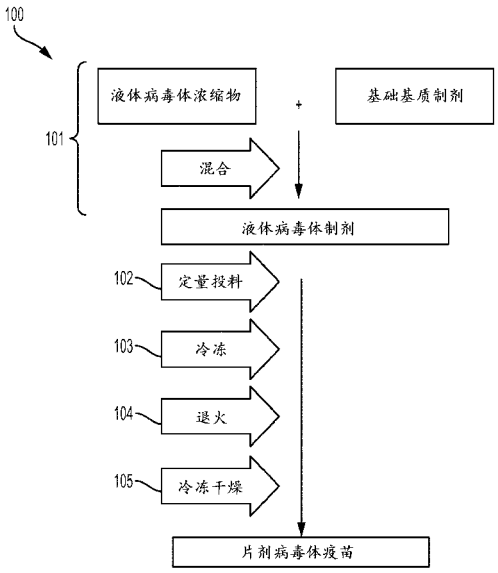
权利要求书1页 说明书29页 附图7页

(54)发明名称

包含病毒体的可经口分散疫苗

(57)摘要

本公开内容涉及经口疫苗剂型和用于生产经口疫苗剂型的方法。剂型包括基于脂质的囊泡(例如病毒体、脂质体),其具有免疫原性量的至少一种疫苗靶分子,连同或不连同佐剂。具体地,申请人发现了液体病毒体浓缩物的组合物、用于固体剂型制剂的基础基质的组合物(排除病毒体浓缩物)、以及用于剂型的制造条件的组合,所述剂型可以产生具有物理稳固性、颗粒和抗原完整性和稳定性的冷冻干燥的舌下剂型。



CN 113301917 B

1.一种冷冻干燥的经口固体疫苗剂型,其包含:

(1)衍生自流感病毒的病毒体,所述病毒体冷冻干燥自液体病毒体制剂,所述液体病毒体制剂包含25-50重量%的含有悬浮于缓冲系统中的病毒体的液体病毒体浓缩物,所述缓冲系统包含130-150mM NaCl和40-60mM HEPES;

(2)10-15重量%的海藻糖;

(3)33-37重量%的鱼明胶;和

(4)45-50重量%的甘露糖醇。

2.权利要求1的剂型,其中所述鱼明胶是高分子量鱼明胶。

3.权利要求1的剂型,其中所述病毒体包含佐剂。

4.权利要求1-3中任一项的剂型,其中所述剂型促进至少一种靶分子的口腔摄取。

5.权利要求4的剂型,其中所述剂型在置于口腔中之后180秒内崩解。

6.权利要求5的剂型,其中所述剂型在置于口腔中之后90秒内崩解。

7.权利要求6的剂型,其中所述剂型在置于口腔中之后60秒内崩解。

8.权利要求7的剂型,其中所述剂型在置于口腔中之后30秒内崩解。

9.权利要求4的剂型,其中当通过置于口腔中而施用于患者时,诱导免疫应答。

10.权利要求9的剂型,其中置于口腔中是置于舌上或舌下或者颊或咽区域中。

11.权利要求1-10中任一项的剂型在制备用于在患者中诱导免疫应答的疫苗中的用途,其中将所述疫苗置于需要免疫应答的个人的口腔中。

12.权利要求11的用途,其中置于口腔中是置于舌上或舌下或者颊或咽区域中。

13.一种形成经口固体疫苗剂型的方法,所述方法包括:

将液体病毒体制剂定量投料到预成型模具内,其中所述病毒体制剂包含:

(1)25-50重量%的含有悬浮于缓冲系统中的衍生自流感病毒的病毒体的病毒体浓缩物,所述缓冲系统包含130-150mM NaCl和40-60mM HEPES;

(2)1-5重量%的海藻糖;

(3)4-8重量%的鱼明胶;和

(4)5-10重量%的甘露糖醇;

使定量投料的病毒体制剂在-60℃至-90℃的温度下冷冻;

通过使所述冷冻的病毒体制剂在低于-15℃的温度下保持3-9小时,使之退火;和

使退火的病毒体制剂冷冻干燥,以形成剂型。

14.权利要求13的方法,其中使所述定量投料的病毒体制剂在-60℃至-90℃的温度下冷冻1-5分钟的持续时间。

15.权利要求13的方法,其中使所述退火的病毒体制剂冷冻干燥包括:(1)使所述退火的病毒体制剂在-10℃至-20℃的温度下保持20-28小时,以及(2)使所述退火的病毒体制剂在-5℃至-15℃的温度下保持14-22小时。

16.权利要求13-15中任一项的方法,其中所述冷冻干燥在小于600毫巴的压力下发生。

17.权利要求13-15中任一项的方法,其中所述病毒体制剂具有6.5-8的pH。

18.权利要求17的方法,其中所述鱼明胶是高分子量鱼明胶。

19.权利要求13-15中任一项的方法,其中所述病毒体包含佐剂。

包含病毒体的可经口分散疫苗

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求于2018年11月29日提交的美国临时申请号:62/772,823的权益,所述美国临时申请的整体内容引入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本公开内容涉及诱导粘膜免疫的经口剂型。更具体而言,本公开内容涉及含有病毒体的冷冻干燥的可经口分散疫苗。导致本申请的项目已从欧盟的地平线2020研究和创新项目(*European Union's Horizon 2020 research and innovation programme*)根据资助协议号646122获得资金。

背景技术

[0004] 疫苗在传统上通过肌内、皮内或皮下注射来递送。这些注射可以产生强烈的全身免疫应答,而用于触发粘膜免疫应答的功效是可变的,且经常是微弱或无法检测的,特别是对于亚单位疫苗。从已处理注射疫苗的引流淋巴结中,抗原特异性的细胞毒性T细胞(CTL)以及由B细胞产生的抗体可以迁移到体内的不同器官,但由于归巢粘膜受体和趋化性不足,其对各种粘膜组织(例如生殖的、肠的、呼吸的)的迁移经常是有限的或不可能的。然而,也被视为肠胃外免疫途径的鼻内途径,可以在共享一些相互联系的呼吸道、生殖道和肠道中触发良好的粘膜免疫应答,如果疫苗在粘膜部位处递送,则其更容易获得。因此,此类肠胃外疫苗可以在一些情况下提供针对粘膜病原体的保护。

[0005] 因为大多数病原体通过粘膜组织(口、呼吸道、生殖道和肠道)进入机体,并且其中许多仅在粘膜组织中复制,所以通过在局部和远处粘膜部位处诱导先天性(例如NK细胞)和适应性(T和B细胞)免疫应答两者,粘膜疫苗接种可以最佳地诱导一线防御。

[0006] 借助常驻的粘膜防御,保护可以是立即的,而无来自外周的细胞募集的延迟,其允许在病原体扩散以及在一些情况下储库建立之前,更有效地干扰非常早期的传播事件和感染事件。

[0007] 粘膜组织和淋巴结含有多于90%的免疫细胞。此外,粘膜抗体代表约80%的身体总抗体生产。因此,通过粘膜抗体的局部免疫应答可以充当针对粘膜感染(例如HIV-1、疱疹病毒、轮状病毒等),以及跨越粘膜组织进入以到达其它器官(例如HIV-1、乙型肝炎、肺结核)的一线防御。相比之下,一旦病原体已越过粘膜防御,血液抗体就可以充当后备防御,或者与粘膜抗体和粘液环境协同作用。血液抗体主要充当有效的一线防御,用于应对在蚊虫叮咬后直接进入血流内的病原体(例如疟疾、基孔肯雅热、登革热、塞卡病毒、西尼罗河病毒、黄热病等)、或意外的皮肤/粘膜损伤(例如,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))。

[0008] 作为诱导局部和远处抗体免疫应答以及全身免疫应答的手段,粘膜疫苗递送(经由颊、舌下、鼻、经口或阴道粘膜)已受到越来越多的关注。另外,通过固体剂型(例如颊/舌下片剂、经口片剂或胶囊、阴道插入剂)的粘膜疫苗递送可以提供几个优点,例如用于大规

模免疫的潜力、患者依从性、易于使用、产品贮存期限稳定性、冷链不依赖性能力。此外，粘膜疫苗递送可以适合于具有针头注射恐惧症的患者，并且患者可以在充分解释的情况下自施用疫苗。颊/舌下途径多年以来已用于将药物和小分子递送到血流，但其作为用于疫苗的粘膜递送手段的应用受到很少关注。

发明内容

[0009] 基于脂质的囊泡可以用作药物、疫苗或佐剂递送系统、及其组合。基于脂质的囊泡可以由以下组成：形成基础结构(颗粒)的一种或几种天然和/或合成脂质、以及另外的任选组分(肽、蛋白质、碳水化合物、核酸、小分子)。基于脂质的囊泡的范围可以从纳米颗粒(大约20-200 nm)到亚微米(大约200-800 nm)到微米(大约800 nm - 10 μm)规模。

[0010] 病毒体和脂质体属于基于脂质的囊泡系统。病毒体是单层的，而脂质体可以是单层、双层或多层的。病毒体是一类亚单位疫苗，其可以含有任何包膜病毒衍生的蛋白质，所述蛋白质用作用于形成基于脂质的病毒体颗粒的原材料。这些病毒体可以缺乏遗传材料，是非复制性和非传染性的，这使得它们对于肠和肠胃外免疫是合适且安全的，条件是它们可以以稳定化形式进行配制。病毒体可能含有处于肽、蛋白质和/或碳水化合物形式下的另外分子，例如同源(相同病原体起源)或异源靶分子(衍生自不同于起始病毒材料的病原体)，核酸，佐剂，特异性脂质和/或小分子(药物)。与病毒体相似，脂质体也可以用作用于药学药物、疫苗和佐剂施用的媒介物，但脂质膜不含任何天然病毒蛋白质。在一些实施方案中，本文使用的脂质体可以是脂蛋白体(即，具有蛋白质的脂质体)。

[0011] 理想地，稳定化或允许不依赖于冷链的疫苗贮存，或允许疫苗支持在建议的冷链条件之外的高温和低温偏移，而不损害产品的生物活性。

[0012] 申请人已开发了含有病毒体的冷冻干燥的可经口分散疫苗，以及制备此类疫苗的方法，所述方法可以保存病毒体的稳定性(对于颗粒结构在物理上的稳定性和对于靶分子在化学上的稳定性两者)。产品稳定性可以在环境温度(例如，约25℃)下的贮存期间得到维持，而不依赖于冷链贮存条件，并且还可以支持意外的冷冻条件(例如，约4℃至约-17℃)以及暴露于温暖国家中存在的高温(例如35℃至45℃)。本文公开的含有病毒体疫苗的冷冻干燥的舌下剂型可以诱导粘膜免疫，并且还可以引发全身免疫应答。具体地，液体病毒体浓缩物及其缓冲液的组合物、用于固体剂型的液体基础基质的组合物(排除病毒体浓缩物)、以及用于生成处于冷冻干燥的舌下片剂的固体剂型的制造条件的组合，可以生成对于舌下片剂具有适当的物理属性的固体疫苗形式，伴随保存的病毒体和靶分子完整性，具有在不同环境条件下的贮存期间的稳定性。施用稳定的病毒体固体剂型可以适合于舌下粘膜免疫。

[0013] 病毒体属于包膜病毒样颗粒(“VLP”)家族，因为它们具有含有衍生自起始纯化病毒的病毒膜蛋白的脂质膜。作为VLP，病毒体可以紧密地模拟病毒颗粒体系结构、组成、抗原膜表面呈递，具有或不具有天然病毒包膜的功能活性。病毒体可能包含一般通过以下获得的重构的病毒膜：用增溶剂从包膜病毒中纯化增溶的膜蛋白和脂质，随后加入天然或合成的脂质和抗原，连同或不连同佐剂，并且从混合物中去除所述增溶剂，导致具有蛋白质从其中突出的脂质双层形成。抗原可以是天然蛋白质，以及重组或合成的蛋白质或肽。病毒体也可以首先形成，然后通过其膜的共价或非共价修饰进行修饰，以含有佐剂和其它分子。病毒体的特有特征在于它们可以紧密地模拟天然病毒包膜的组成、表面体系结构和功能活性。

在一些情况下,当CD8+ T细胞的诱导是疫苗策略的一部分时,所述病毒体的特别重要的特性是血凝素(HA)受体结合及其融合膜活性的保持。如果疫苗策略集中于抗原特异性抗体的诱导,则HA融合活性并非绝对必需的,但HA作为赋形剂的存在仍是重要的,因为它可以提供T细胞辅助,特别是对于可能缺乏此类性质的小抗原和肽。尽管在本公开内容中提到了具体疫苗,但使用病毒体作为递送平台的所有疫苗都由本公开内容涵盖。含有HIV抗原(P1和rgp41)和TLR 7/8佐剂的流感病毒体,可以用作本文公开的疫苗的模型病毒体浓缩物。具有HIV抗原rgp41的流感病毒体已显示在各种动物研究和1期临床研究中,经由鼻内和肌内途径能够引发免疫应答。在此类研究中,病毒体制剂处于通过针或鼻腔液体喷雾剂施用的液体形式下,由于活性药物成分("API")的化学修饰,其易于显示在4℃下有限的贮存期限稳定性。为了预防或降低在水性环境中经常存在的此类API化学修饰,开发具有低水分含量的固体疫苗形式被鉴定为有希望的方法。

[0014] 申请人能够克服在生产作为本文公开的冷冻干燥的可经口分散疫苗的固体疫苗形式中的各种问题。具体地,含有携带抗原的病毒体和佐剂的基于流感的病毒体浓缩物,可以作为在缓冲盐溶液中的悬浮液供应。为了生产冷冻干燥的疫苗剂型,在片剂内稳固且多孔的结构应该在制造过程中产生,并且在后续贮存期间维持。在病毒体浓缩物中的缓冲盐的存在可能在制造这种此类稳固且多孔的结构中提出了挑战。因此,申请人发现了适当量的赋形剂与制造条件结合,以使得能够形成在冷冻干燥过程期间并不塌陷(collapse)或部分塌陷的稳固剂型。

[0015] 另外,冷冻、退火和冷冻干燥过程也可能损害病毒体颗粒的完整性。对病毒体的这种损害应该降到最低,使得足够的病毒体颗粒保留在冷冻干燥的产物中,使得足够量的病毒体颗粒可以越过舌下粘膜,用于被免疫细胞处理,以诱导粘膜免疫应答,其也可能通过全身免疫应答得到支持。因此,申请人能够平衡赋形剂使用和冷冻干燥过程,以维持病毒体的免疫原性(例如,具有有限的簇存在的完整病毒体)和良好的剂型性质(例如,经口崩解的舌下片剂)两者。

[0016] 在一些实施方案中,经口固体疫苗剂型包括基于脂质的囊泡,其包含免疫原性量的至少一种靶分子;5-20重量%的至少一种冷冻-冻干保护剂;25-40重量%的基质形成剂;和40-55重量%的结构形成剂。在一些实施方案中,基于脂质的囊泡是病毒体或脂蛋白体。在一些实施方案中,剂型包含10-15重量%的至少一种冷冻-冻干保护剂。在一些实施方案中,至少一种冷冻-冻干保护剂包含海藻糖。在一些实施方案中,剂型包含33-37重量%的基质形成剂。在一些实施方案中,基质形成剂包含明胶。在一些实施方案中,明胶包含鱼明胶。在一些实施方案中,鱼明胶是高分子量鱼明胶。在一些实施方案中,剂型包含45-50重量%的结构形成剂。在一些实施方案中,结构形成剂包含甘露糖醇。在一些实施方案中,病毒体衍生自流感病毒膜或其它包膜病毒。在一些实施方案中,至少一种靶分子存在于病毒体上。在一些实施方案中,至少一种靶分子包含HIV-1包膜衍生的抗原。在一些实施方案中,HIV-1包膜衍生的抗原包含HIV-1 PI肽和/或HIV-1重组gp41。在一些实施方案中,病毒体包含佐剂。在一些实施方案中,剂型促进至少一种靶分子的口腔摄取。在一些实施方案中,剂型在置于口腔中之后180秒内崩解。在一些实施方案中,剂型在置于口腔中之后90秒内崩解。在一些实施方案中,剂型在置于口腔中之后60秒内崩解。在一些实施方案中,剂型在置于口腔中之后30秒内崩解。在一些实施方案中,当通过置于口腔中而施用于患者时,诱导免疫应答。在一些实

施方案中,置于口腔中是置于舌上或舌下或者颊或咽区域中。

[0017] 在一些实施方案中,在患者中诱导免疫应答的方法包括将上述任何剂型置于需要免疫应答的个人的口腔中。在一些实施方案中,置于口腔中是置于舌上或舌下或者颊或咽区域中。

[0018] 在一些实施方案中,形成经口固体疫苗剂型的方法包括将液体病毒体制剂定量投料(dose)到预成型模具内,其中所述病毒体制剂包含:基于脂质的囊泡,其包含免疫原性量的至少一种靶分子,1-5重量%的冷冻-冻干保护剂,4-8重量%的基质形成剂和5-10重量%的结构形成剂;使定量投料的病毒体制剂在-60℃至-90℃的温度下冷冻;通过使冷冻的病毒体制剂在低于-15℃的温度下保持3-9小时,使之退火;并且使退火的病毒体制剂冷冻干燥,以形成剂型。在一些实施方案中,使定量投料的病毒体制剂在-60℃至-90℃的温度下冷冻约1-5分钟的持续时间。在一些实施方案中,使退火的病毒体制剂冷冻干燥包括:使所述退火的病毒体制剂在-10℃至-20℃的温度下保持20-28小时的第一步,以及使所述退火的病毒体制剂在-5℃至约-15℃的温度下保持14-22小时的第二步。在一些实施方案中,冷冻干燥在小于600毫巴的压力下发生。在一些实施方案中,病毒体制剂具有约6.5-8的pH。在一些实施方案中,冷冻-冻干保护剂包含海藻糖。在一些实施方案中,基质形成剂包含明胶。在一些实施方案中,明胶包含鱼明胶。在一些实施方案中,鱼明胶是高分子量鱼明胶。在一些实施方案中,结构形成剂包含甘露糖醇。在一些实施方案中,基于脂质的囊泡衍生自流感病毒或呼吸道合胞病毒。在一些实施方案中,至少一种靶分子包含HIV-1包膜衍生的抗原。在一些实施方案中,HIV-1包膜衍生的抗原包含HIV-1 PI肽或HIV-1重组gp41。在一些实施方案中,基于脂质的囊泡包含佐剂。

[0019] 在一些实施方案中,形成经口固体疫苗剂型的方法包括:将液体病毒体制剂定量投料到预成型模具内,其中所述病毒体制剂包含:(1) 20-50重量%的病毒体浓缩物,其中所述病毒体浓缩物包含:包含免疫原性量的至少一种靶分子的病毒体;2-10重量%的冷冻-冻干保护剂;和60-200 mM的缓冲系统;(2) 4-8重量%的基质形成剂;和(3) 5-10重量%的结构形成剂;使定量投料的病毒体制剂在-60℃至-90℃的温度下冷冻;通过使冷冻的病毒体制剂在低于-15℃的温度下保持3-9小时,使之退火;使退火的病毒体制剂冷冻干燥,以形成剂型。在一些实施方案中,缓冲系统包含HEPES-氯化钠。

[0020] 另外的优点根据下述详细描述对于本领域技术人员将是显而易见的。本文的实例和描述本质上应被认为是说明性的而不是限制性的。

[0021] 本申请中提及的所有出版物,包括专利文件、科学论文和数据库,整体引入作为参考用于所有目的,其程度与每个个别出版物个别地引入作为参考相同。如果本文阐述的定义与引入本文作为参考的专利、申请、公开的申请和其它出版物中阐述的定义相反或不一致,则本文阐述的定义优于引入本文作为参考的定义。

附图说明

[0022] 示例性实施方案参考附图进行描述,在所述附图中:

[0023] 图1示出了用于生产本文公开的疫苗剂型的流程图概述。

[0024] 图2示出了用于生产本文公开的疫苗剂型,从基质制剂到最终舌下片剂的流程图。

[0025] 图3A是具有完全润湿的片剂的图片的示意图。

[0026] 图3B是具有含硬块的片剂的图片的示意图。

[0027] 图3C是具有片剂的图片的示意图,所述片剂具有在冷冻干燥的片剂的表面处形成的塌陷制剂基质的膜(结皮)。

[0028] 图4是免疫印迹的照片,其显示了抗P1和抗rgp41特异性抗体与来自重构的Zydis®舌下片剂的病毒体P1和病毒体rgp41的结合,所述片剂在5℃、25℃和40℃下贮存1个月和3个月(本文公开的实施例2的分析)。

[0029] 图5示出了随着时间过去,液体病毒体浓缩物和含有病毒体的冷冻干燥的舌下片剂的P1和rgp41抗原的免疫原性,两者均贮存于4℃和40℃下。

具体实施方式

[0030] 本文公开的是基于脂质的囊泡(例如病毒体或VLP)的药物组合物,以及制备这些药物组合物的方法。具体地,本公开内容涉及冷冻干燥的可经口分散或崩解的剂型,其可以保存VLP的稳定性(即,结构完整性和抗原化学稳定性),可以不依赖于冷链贮存条件而贮存,并且还可以支持意外的冷冻条件以及对温暖国家中存在的高温的暴露。这些剂型还可以保留VLP的物理和化学属性,使得其适合于舌下递送以诱导粘膜免疫。

[0031] 申请人能够配制且优化基质形成剂和结构形成剂的量,以具有可以应对含有缓冲系统和冷冻-冻干保护剂的病毒体浓缩物的高载量使用的制剂。与赋形剂调整结合,对剂型的制造参数进行优化。具体地,对退火时间进行优化以使甘露糖醇结晶达到最大,其对剂型赋予稳固性并且使病毒体损害降到最低。另外,对冷冻干燥条件进行优化,以使对病毒体颗粒的损害降到最低以及使在冷冻干燥期间的结构塌陷降到最低。

[0032] 基于脂质的囊泡系统

[0033] 基于脂质的囊泡可以用作药物、疫苗或佐剂递送系统、及其组合。基于脂质的囊泡系统可以由以下组成:形成囊泡膜(颗粒)的一种或几种天然和/或合成脂质(例如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、胆固醇、鞘脂及其衍生物)、以及另外的任选组分(肽、蛋白质、碳水化合物、小分子)。基于脂质的囊泡的范围从纳米颗粒(约20-200 nm)到亚微米(约200-800 nm)到微米(约800 nm - 10 μm)规模。

[0034] 基于脂质的囊泡/颗粒可以包含单层、双层或多层脂质双层囊泡。在一些实施方案中,基于脂质的囊泡/颗粒可以包括脂质双层,其包含选自天然和/或合成脂质的脂质。此类脂质可以用于更好地模拟病原体膜和脂筏微结构域,以便改善抗原膜锚定、抗原呈递和/或折叠,用于最佳的表位暴露。基于脂质的囊泡/颗粒可以具有暴露于颗粒的表面处或指向颗粒内部或具有随机取向的膜锚定抗原和/或佐剂。抗原和/或佐剂也可以被封装在基于脂质的囊泡/颗粒的腔内。

[0035] 病毒体是以无细胞系统的方式在体外组装的基于脂质的囊泡,形成属于亚单位疫苗范畴的包膜VLP。作为载体的病毒脂质膜可以衍生自任何包膜病毒,并且因而至少含有来自起始病毒的天然病毒膜蛋白。这些病毒体缺乏遗传病毒材料,不能复制且是非传染性的,这使得它们对于全身和粘膜免疫是合适且安全的。另外,病毒体可能含有另外的分子,例如抗原(例如肽、蛋白质、碳水化合物、核酸)、佐剂、特异性脂质和/或小分子(药物),其可以锚定在病毒体表面处和/或截留在病毒体腔内。

[0036] 脂质体也是基于脂质的囊泡,形成一类亚单位疫苗,其可以作为具有至少一个脂

质双层的囊泡形成,其不含衍生自包膜病毒的天然病毒膜的蛋白质。也在体外组装的此类基于脂质的颗粒缺乏遗传材料,并且可以适合于全身和粘膜应用。另外,脂质体可能含有另外的分子,例如抗原(肽、蛋白质和/或碳水化合物、核酸)、佐剂、特异性脂质和/或小分子(药物),其可以锚定在脂质体表面处和/或截留在脂质体腔内。在一些实施方案中,本文使用的脂质体可以是脂蛋白体(即,具有蛋白质的脂质体)。

[0037] 本文所述剂型中使用的脂质可以属于阳离子脂质、糖脂、磷脂、甘油磷脂、半乳糖神经酰胺、鞘脂、胆固醇及其衍生物。磷脂可以包括但不限于具有不同的脂肪酰基组成的磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酸、心磷脂和磷脂酰肌醇。

[0038] 另外,脂质可以选自DOTMA (N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)、DOTAP (N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵、DODAC (N,N-二油基-N,N,-二甲基氯化铵)、DDAB (双十二烷基二甲基溴化铵)和硬脂胺或其它脂肪族胺等等。

[0039] 病毒体制剂

[0040] 病毒体浓缩物

[0041] 图1示出了关于生产本文公开的疫苗剂型的方法100的流程图。在步骤101中,可以将液体病毒体浓缩物与基础基质制剂的预混合物混合,以形成适合于冷冻干燥的液体病毒体制剂。申请人已发现,当将病毒体浓缩物的组合物与基础基质制剂的特定组合物组合,并且与一组制造条件结合进行制备时,疫苗的生物活性可以得到维持,所述制造条件进行优化以保存具有所需颗粒特性的足够病毒体。病毒体颗粒的生物活性可以取决于颗粒的构象完整性,以及与其单层磷脂膜结合的抗原分子的质量。

[0042] 在一些实施方案中,病毒体浓缩物可以是液体病毒体浓缩物。病毒体浓缩物包括至少一个病毒体群体。病毒体群体可以是含有给定药物的病毒体,或具有疫苗抗原和病毒衍生蛋白(例如,如果病毒体衍生自流感病毒,则为HA)、充当疫苗递送媒介物的病毒体。

[0043] 在一些实施方案中,病毒体可以衍生自流感病毒,用于生成作为包膜VLP的流感病毒体,所述包膜VLP充当异源疫苗抗原(例如锚定于流感衍生的病毒体上的HIV抗原)的载体,或衍生自另一种包膜病毒如呼吸道合胞体病毒(“RSV”)。在一些实施方案中,包膜病毒如RSV、仙台病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、水疱性口炎病毒(VSV)或辛德毕斯(Sindbis),可以用于生成相应的RSV-病毒体、仙台-病毒体、SFV-病毒体、VSV-病毒体或辛德毕斯-病毒体,用于展示的同源疫苗抗原(例如,衍生自RSV的病毒体上的天然RSV抗原)。在一些实施方案中,基于病毒的病毒体可以衍生自任何包膜病毒。在一些实施方案中,基于病毒的病毒体可以衍生自DNA病毒,包括但不限于疱疹病毒、痘病毒(Poxyviruse)和嗜肝性DNA病毒。在一些实施方案中,基于病毒的病毒体可以衍生自RNA病毒,包括但不限于黄病毒、披膜病毒、冠状病毒、丁型肝炎、正粘病毒、副粘病毒、弹状病毒、布尼亚病毒和丝状病毒。在一些实施方案中,基于病毒的病毒体可以衍生自逆转录病毒。

[0044] 在一些实施方案中,可以根据以下中所述的不同方法形成基于流感病毒的病毒体:*Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system*;Moser C.等人,Expert review,779-791 (2013);WO2004110486;WO2004071492;WO2007099446;WO2016039619;EP2058002;以及WO2016039620,所述参考文献在此整体引入本文作为参考。另外,在先前引用的参考文献中列出的各种专利和其它出版物也整体引入本文作为参考。

因此,本申请并不限于用于病毒体制备的具体方法。因此,上述参考文献仅仅是病毒体制备的实例。本申请适用于所有基于脂质的颗粒,例如但不限于病毒体、VLP和纳米颗粒制剂,包括具有抗原的脂质体。

[0045] 尽管这个节段描述了液体病毒体浓缩物,但病毒体可以由脂质体替换,以形成液体脂质体浓缩物。因此,病毒体浓缩物中的组分(除了病毒体本身之外)可以同样地应用于脂质体浓缩物。

[0046] 病毒体(例如流感衍生的病毒体)可以具有在其表面上的病毒蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质可以是血凝素("HA")和/或神经氨酸酶("NA")。在一些实施方案中,液体病毒体浓缩物包括以通过现有技术分析测定法可检测的浓度存在的病毒膜蛋白(例如HA)。在一些实施方案中,当使用流感病毒体作为异源疫苗抗原的载体时,病毒膜蛋白为约10-300 μg/mL或约5-150 μg/mL的液体病毒体浓缩物。对于设计用于诱导CTL应答的流感病毒体,HA浓度范围可以为约150-800 μg/mL或约75-400 μg/mL。在一些实施方案中,病毒膜蛋白的浓度可以大于上文列出的示例浓度。

[0047] 病毒体浓缩物还可以包括脂质。病毒体浓缩物中使用的脂质可以属于阳离子脂质、糖脂、磷脂、甘油磷脂、半乳糖神经酰胺、鞘脂、胆固醇及其衍生物。磷脂可以特别包括具有不同的脂肪酰基组成的磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酸、心磷脂和磷脂酰肌醇。另外,脂质可以选自DOTMA (N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵)、DOTAP (N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵、DODAC (N,N-二油基-N,N,-二甲基氯化铵)、DDAB (双十二烷基二甲基溴化铵)和硬脂胺或其它脂肪族胺等等。在一些实施方案中,浓缩物可以包括约0.1-10 mg/mL、约0.3-8 mg/mL或约0.5-5 mg/mL的脂质。

[0048] 病毒体可以含有靶分子(例如,疫苗抗原),连同或不连同佐剂。抗原可以溶解并截留在病毒体腔内,或者共价或非共价锚定到病毒体上,所述抗原可以是肽、蛋白质、多糖、细菌细胞的完整或部分片段或提取物、病毒颗粒或核酸,或者可以衍生自引起疾病的寄生虫,例如原生动物或蠕虫或其组合,或者衍生自任何植物、动物或人细胞或细胞系。本领域已知的任何抗原都可以适合于与病毒体一起使用,所述抗原包括商购可得的抗原,或者通过纯化病原体或癌细胞或非转化细胞(天然蛋白)的制剂来制备、重组表达或通过标准制造合成产生的抗原。用于生成用于掺入病毒体内的合适抗原的方法是本领域已知的,并且可以如本文公开的使用任何已知方法。

[0049] 靶分子以一定量包括在液体病毒体浓缩物的病毒体和本文公开的后续剂型中,当在剂型中提供时,所述量足以致使其免疫原性。"免疫原性量"定义为诱发所需免疫应答适当的量。尤其是基于免疫途径、剂型待施用于其的患者的年龄和重量,本领域技术人员可以容易地确定用于给定疾病或感染的免疫原性量。

[0050] 在一些实施方案中,液体病毒体浓缩物可以包括约1-2000 μg/mL的靶分子。靶分子可以是肽、蛋白质、碳水化合物、核酸或小分子、或其组合。靶分子可以充当抗原(例如疫苗抗原)、药物、诊断分子、分析传感器或其组合。在一些实施方案中,液体病毒体浓缩物可以包括约1-1000 μg/mL的一种靶分子和约1-1000 μg/mL的第二靶分子。在下游处理成固体剂型后,每个片剂可以含有约0.01至250 μg的每种靶分子。

[0051] 在更优选的实施方案中,液体病毒体浓缩物可以包括约25-500、约50-500 μg/mL、

约25-225 μg/mL、约25-200 μg/mL、约50-450 μg/mL、约50-400、约100-400 μg/mL、约100-400 μg/mL、约100-200 μg/mL、或约200-400 μg/mL的至少一种靶分子(例如抗原)。在一些实施方案中,液体病毒体浓缩物可以包括约1-500 μg/mL、约25-500 μg/mL、约50-450 μg/mL、约50-400 μg/mL、约25-250 μg/mL、约25-200 μg/mL、约50-250 μg/mL、约75-225 μg/mL、或约100-200 μg/mL的一种靶分子,以及约50-450 μg/mL、约50-400 μg/mL、约25-225 μg/mL、约25-200 μg/mL、约100-500 μg/mL、约150-450 μg/mL、约175-425 μg/mL、或约200-400 μg/mL的第二种靶分子。

[0052] 本文公开的剂型可以用于递送治疗或预防性疫苗,以在取决于病毒体制剂的B细胞(抗体)和/或有关的T细胞亚群(例如,Th1、Th2、Th16、Thf、Tc1、Tc2、Tc3、Treg等)诱导后,防止或减轻与过敏或感染有关的症状、肿瘤发展和扩散、病原体传播、细胞感染、病原体载量。为此,靶分子可以提供针对下述代表性疾病列表的防护,所述列表并非穷举性的:流感、结核、脑膜炎、肝炎、百日咳、小儿麻痹症、破伤风、白喉、疟疾、霍乱、疱疹、伤寒、HIV/AIDS、麻疹、莱姆病、旅行者腹泻、甲型肝炎、乙型肝炎和丙型肝炎、中耳炎、登革热、狂犬病、副流感、风疹、黄热病、痢疾、军团菌病、弓形虫病、q热、出血热、阿根廷出血热、龋齿、南美锥虫病、由大肠杆菌引起的尿道感染、肺炎球菌病、腮腺炎、基孔肯雅热、癌症、过敏及其组合。另外,靶分子可以提供针对由下述非穷举性致病生物体列表引起的疾病的防护:弧菌属(*Vibrio*)物种、沙门氏菌属(*Salmonella*)物种、博德特氏菌属(*Bordetella*)物种、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)物种、刚地弓形虫(*Toxoplasmosis gondii*)、巨细胞病毒、衣原体属(*Chlamydia*)物种、链球菌属(Streptococcal)物种、诺瓦克病毒、大肠埃希氏菌(*Escherischia coli*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、轮状病毒、淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhae*)、脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningiditis*)、腺病毒、EB病毒、日本脑炎病毒、卡氏肺囊虫(Pneumocystis carini)、单纯疱疹、梭菌属(Clostridia)物种、呼吸道合胞病毒、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)物种、志贺氏菌属(*Shigella*)物种、铜绿假单胞菌、细小病毒、弯曲菌属(*Camylobacter*)物种、立克次体属(*Rickettsia*)物种、水痘带状疱疹、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)物种、罗斯河病毒、J.C.病毒、马红球菌(*Rhodococcus equi*)、卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、溶血巴斯德菌(*Pasteurella haemolytica*)及其组合。另外或可替代地,靶分子可以提供针对过敏(即,含有过敏原的病毒体)、癌症(例如,肿瘤抗原、抗体、抗癌药、核酸)和其它类型的状况的防护或治疗。

[0053] 还考虑了本公开内容的兽医学应用。相应地,靶分子可以提供针对下述非穷举性兽医学疾病列表的防护:球虫病、新城疫、地方性肺炎、猫白血病、萎缩性鼻炎、丹毒、口蹄疫、猪肺炎、以及影响伴侣动物和农场动物的其它疾病状况及其它感染、以及其组合。

[0054] 在一些实施方案中,除存在于重构的膜中的病毒蛋白质之外,病毒体还含有至少一种疫苗抗原。在一些实施方案中,疫苗抗原可以是HIV-1 P1肽和/或HIV-1重组gp41。

[0055] 如上文所述,液体病毒体浓缩物的病毒体也可以含有佐剂或与佐剂混合。病毒体和其它亚单位疫苗可能需要佐剂用于改善免疫应答,导致抗体和T细胞的加速和增强产生,同时还维持免疫记忆。为了有效,优选具有与记忆应答的生成相关的免疫应答,所述记忆应答提供了免于特异性疾病的长效保护。佐剂还可以允许降低抗原剂量(剂量节省)并增加所需免疫应答的宽度。一旦暴露于抗原,免疫系统就可以“记住”它,并且在再次暴露期间,免

疫应答快速得多。佐剂增强免疫应答的有效性可以不依赖于它与之组合的抗原,因为单独的佐剂可以触发非特异性免疫应答,并且如果在不存在抗原的情况下实现强细胞活化,则可能导致自身免疫性副作用。然而,当抗原和佐剂在物理上联系在一起时,它们都可以在注射后共迁移到同一位点,其有利于抗原特异性免疫活化,伴随较低的非特异性炎症应答。合适的佐剂包括但不限于:Toll样受体(TLR)激动剂、炎性小体激动剂、核苷酸结合和寡聚化结构域(NOD)样受体(NLR)激动剂,更具体而言,无毒的细菌片段、霍乱毒素(及其脱毒形式和级分)、壳聚糖、大肠杆菌的不耐热毒素(及其脱毒形式和级分)、丙交酯/乙交酯均聚物和共聚物(PLA/GA)、聚酐例如偏苯三甲酰亚胺(trimellitylimido)-L-酪氨酸、DEAE-右旋糖酐、与膜蛋白抗原复合的皂苷(免疫刺激复合物-ISCOMS)、细菌产物如脂多糖(LPS)和胞壁酰二肽(MDP)、脂质体、脂质卷(cochleate)、类蛋白、细胞因子(白细胞介素、干扰素)、遗传改造的活微生物载体、非传染性百日咳突变毒素、神经酰胺酶/半乳糖氧化酶、以及衍生自突变株的减毒细菌和病毒毒素及其组合。佐剂的合适量可以通过本领域普通技术人员容易地确定。

[0056] 在一些实施方案中,病毒体可以具有佐剂3M-052 (通过3M供应的TLR7/8激动剂)。在一些实施方案中,液体病毒体浓缩物可以含有在约8-140 μg/mL、约4-70 μg/mL、约1- 60 μg/mL和0.01至16 μg/片剂范围内的3M-052佐剂。

[0057] 在一些实施方案中,液体病毒体浓缩物可以包括至少两个不同的病毒体群体,每个群体都具有至少一种抗原,连同或不连同佐剂。在一些实施方案中,这两个不同的病毒体群体可以具有不同的抗原,但具有相同的佐剂(例如,与病毒体-rgp41/3M-052混合的病毒体-P1/3M-052)。在一些实施方案中,这两个不同的病毒体群体可以具有不同的抗原,但具有不同的佐剂(例如,与病毒体-rgp41/佐剂B混合的病毒体-P1/佐剂A)。

[0058] 在一些实施方案中,病毒体浓缩物可以包括至少两种不同的抗原/病毒体,连同或不连同佐剂(例如,具有P1和rgp41抗原两者的病毒体,连同或不连同佐剂)。

[0059] 液体病毒体浓缩物还可以包括缓冲系统。在一些实施方案中,病毒体可以悬浮于缓冲系统中。缓冲系统可以维持病毒体浓缩物中病毒体的物理完整性和化学稳定性。在一些实施方案中,病毒体悬浮于缓冲系统中,以维持约6-9、约6.5-8、约7-8、约7.2-7.6、约7.3-7.5或约7.4的目标pH。另外,当病毒体在约2-8℃的贮存温度下处于液体形式时,缓冲系统可以稳定病毒体。

[0060] 合适的缓冲系统包括但不限于HEPES-氯化钠(HN)缓冲液、HEPES-氯化钠-EDTA(HNE)缓冲液、磷酸盐缓冲系统(PBS)或其组合。在一些实施方案中,病毒体浓缩物中的缓冲系统可以为约5 -1000 mM、约60-200 mM、约100-300 mM、约125-275 mM、约150-250 mM、约175-225 mM、约180-210 mM、约185-200 mM、约185-195 mM、或约190-195 mM。如果病毒体浓缩物中的缓冲系统是HEPES-氯化钠,则病毒体浓缩物中的氯化钠可以为约5-1000 mM、约50-150 mM、约125-175 mM、约130-160 mM、约130-150 mM、约135-145 mM、或约140-145 mM。如果病毒体浓缩物中的缓冲系统是HEPES-氯化钠,则病毒体浓缩物中的HEPES可以为约1-200 mM、约10-75mM、约10-50 mM、约25-75 mM、约30-70 mM、约40-60 mM、约45-55 mM、或约48-52 mM。

[0061] 液体病毒体浓缩物还可以包括至少一种冷冻-冻干保护剂。在生产本文公开的剂型的冷冻和/或冷冻干燥步骤期间,病毒体可能被损害。因此,可以将冷冻-冻干保护剂包括

在病毒体浓缩物中,以改善在冷冻和/或冷冻干燥步骤期间的病毒体保存。冷冻-冻干保护剂的实例包括但不限于多元醇例如海藻糖、糖例如蔗糖和氨基酸例如赖氨酸、寡糖例如菊粉(中链寡糖)或其组合。所使用的冷冻-冻干保护剂可以是惰性的,以适合于疫苗制剂。液体病毒体浓缩物可以包括约1-20% w/w、约1.5-10% w/w、约2-10% w/w、约4-10% w/w、约2-9% w/w、约2-5% w/w、约3-8% w/w、约3.5-8% w/w、约3.5-7% w/w、约4-8% w/w、或约5-7% w/w的冷冻-冻干保护剂。

[0062] 病毒体浓缩物可以为约1-75% w/w、约10-65% w/w、约15-60% w/w、约20-55% w/w、约20-50% w/w、或约25-50% w/w的病毒体制剂。在一些实施方案中,病毒体浓缩物可以为约15-35% w/w、约20-30% w/w、约23-27% w/w、或约25% w/w的病毒体制剂。

[0063] 基础基质制剂

[0064] 基础基质制剂帮助提供最终剂型的结构。因此,基础基质制剂可以包括基质形成剂。基质形成剂可以提供剂型的网络结构,其在处理过程中赋予强度和弹力。合适的基质形成剂可以包括但不限于明胶、淀粉或其组合。另外的基质形成剂可以在整体引入本文作为参考的EP 2624815 B1中找到。明胶可以是鱼明胶、牛明胶、猪明胶或其组合。每种明胶可以具有不同的胶凝特性。明胶溶液形成凝胶的程度可以取决于明胶的浓度和明胶溶液的温度。牛明胶溶液在低于18℃的温度下趋于胶凝,并且因此可以被视为胶凝明胶。相比之下,鱼明胶可以在低至10℃的温度下保留在溶液中,并且因此可以被视为非胶凝明胶。在一些实施方案中,明胶可以是低内毒素明胶,例如根据临时申请号62/640,394中公开的方法来源的或生产的明胶,所述临时申请在此整体引入作为参考。在一些实施方案中,病毒体制剂中的基质形成剂的量可以为约1-15% w/w、约2-12、约3-10% w/w、约4-8% w/w、约4-6%、约5-7% w/w、或约6% w/w。

[0065] 病毒体制剂定量投料的温度可以低至10-18℃。因此,使用单独的牛明胶的制剂可能无法在这些低温下定量投料。然而,可以使用牛明胶和另一类明胶(例如鱼明胶)的组合。申请人发现鱼明胶可以提供具有稳固的基质结构和约30-180或30-60秒崩解时间的冷冻干燥片剂,所述崩解时间是影响与口腔粘膜的充分接触时间所期望的。另外,鱼明胶可以为制剂组合物提供具有良好物理属性的冷冻干燥剂型,所述制剂组合物含有高载量的可溶性组分如缓冲盐,例如本文公开的量。

[0066] 在一些实施方案中,鱼明胶可以是高分子量鱼明胶、标准分子量鱼明胶或其组合。高分子量鱼明胶定义为其中多于50%的分子量分布大于30,000道尔顿的鱼明胶。标准分子量鱼明胶定义为其中多于50%的分子量分布低于30,000道尔顿的鱼明胶。

[0067] 在一些实施方案中,基质形成剂还可以充当抗原的稳定剂以及粘膜粘附剂。另外,淀粉也可以充当免疫刺激性赋形剂。

[0068] 基础基质制剂还可以包括结构形成剂。合适的结构形成剂可以包括糖,其包括但不限于甘露糖醇、右旋糖、乳糖、半乳糖、环糊精或其组合。结构形成剂可以在冷冻干燥中用作填充剂,因为它结晶以对冷冻干燥的产物提供结构稳固性。病毒体制剂中的可溶性赋形剂例如缓冲盐和海藻糖可以抑制其结晶。通常使用延长的退火时间以允许结晶。然而,这些可溶性赋形剂的存在也可以引起在退火过程中冷冻产物的融化。因此,申请人发现了结构形成剂、缓冲盐和冷冻-冻干保护剂的量与退火条件(即,温度和时间)之间的平衡。在一些实施方案中,病毒体制剂中的结构形成剂的量可以为约1-20% w/w、约3-15% w/w、约4.5-

10% w/w、约4.5-8% w/w、约5-10% w/w、约6-10% w/w、约7-9% w/w、或约8% w/w。申请人发现了,在低于4.5% w/w结构形成剂的值下,在冷冻干燥期间可能发生一些微结构塌陷,导致冷冻干燥剂型的弱分散/崩解。因此,发现较高量的结构形成剂使微结构塌陷降到最低或得到消除,而不显著影响病毒体。

[0069] 另外,基础基质制剂还可以包括冷冻-冻干保护剂。冷冻-冻干保护剂的实例包括但不限于多元醇例如海藻糖、糖例如蔗糖和氨基酸例如赖氨酸、寡糖例如菊粉(中链寡糖)或其组合。冷冻-冻干保护剂可以用于保护病毒体免于在后续的冷冻和冷冻干燥期间的损害。然而,冷冻-冻干保护剂的添加可以在冷冻干燥期间诱导剂型基质的微结构塌陷。因此,应该取得平衡以使微结构塌陷降到最低,并且同时保存足够数目的病毒体,以维持用于诱导免疫应答的病毒体质量。基础基质制剂中的冷冻-冻干保护剂的量可以为约0.01-2% w/w、约0.1-1.5% w/w、约0.2-1% w/w、或约0.25-0.75% w/w。因此,在病毒体制剂(即,液体病毒体浓缩物加上基础基质制剂)中的冷冻-冻干保护剂的净量(下文“(净)”)可以为约0.5-6% w/w、约0.5-5 % w/w、约0.5-4.5% w/w、约1-4.5% w/w、约1.5-4.5% w/w、约1.5-3 % w/w、约1.5-2.5、约2-3% w/w、约2.5 % w/w、或约2% w/w。申请人发现了,在这些水平下,冷冻/冻干保护剂可以提供足够的冷冻-冻干保护,而不导致在冷冻干燥期间无法接受的微结构塌陷。

[0070] 在一些实施方案中,基础基质制剂还可以包括粘膜粘附剂例如树胶。合适的树胶包括但不限于阿拉伯胶、瓜尔胶、琼脂、黄原胶、结冷胶、角叉菜胶、凝胶多糖、魔芋胶、刺槐豆胶、威兰胶、黄蓍树胶、阿拉伯树胶、刺梧桐胶、茄替胶、果胶、右旋糖酐、葡甘露聚糖和海藻酸盐或其组合。

[0071] 基础基质制剂还可以含有另外的药学上可接受的试剂或赋形剂。此类另外的药学上可接受的试剂或赋形剂包括但不限于糖例如甘露糖醇、右旋糖和乳糖、无机盐例如氯化钠和硅酸铝、哺乳动物起源的明胶、鱼明胶、改性淀粉、防腐剂、抗氧化剂、表面活性剂、粘度增强剂、渗透性增强剂、着色剂、调味剂、pH调节剂、甜味剂、掩味剂及其组合。合适的着色剂可以包括红色、黑色和黄色氧化铁,以及FD&C染料例如FD&C蓝色2号和FD&C红色40号及其组合。合适的调味剂可以包括薄荷、覆盆子、甘草、橙、柠檬、葡萄柚、焦糖、香草、樱桃和葡萄调味料以及这些的组合。合适的pH调节剂可以包括柠檬酸、酒石酸、磷酸、盐酸、马来酸、氢氧化钠((例如3% w/w的氢氧化钠溶液)及其组合。在一些实施方案中,基础基质制剂和/或病毒体制剂具有一定量的pH调节剂,以维持约6-9、约7-8、约7.2-7.6、约7.3-7.5或约7.4的目标pH。合适的甜味剂可以包括阿斯巴甜、乙酰磺胺酸钾和索马甜及其组合。需要时,本领域普通技术人员可以容易地确定这些各种另外的赋形剂的合适量。

[0072] 基础基质制剂还可以包括溶剂。在一些实施方案中,溶剂可以是水(例如,纯净水)。在一些实施方案中,基础基质制剂和/或病毒体制剂的剩余量为溶剂。

[0073] 基础基质制剂可以为约25-99% w/w、约35-90% w/w、约40-85% w/w、约45-80% w/w、或约50-75% w/w的病毒体制剂。在一些实施方案中,基础基质制剂可以为约65-85% w/w、约70-80% w/w、约73-77% w/w、或约75% w/w的病毒体制剂。

[0074] 制备包含病毒体制剂的剂型

[0075] 如上文所述,在步骤101中,将液体病毒体浓缩物与基础基质制剂混合,以形成适合于冷冻干燥方法的病毒体制剂。图2提供了形成本文公开的疫苗剂型的方法的更详细描

述。在一些实施方案中,可以通过将基质形成剂和结构形成剂溶解于溶剂中,以形成预混物,来制备基础基质制剂。例如,可以将明胶和甘露糖醇溶解于水中,如图2的步骤201中所示。可以将预混物加热至约40-80℃、约50-70℃、约55-65℃或约60℃,并且维持约45-75分钟、约55-65分钟或约60分钟。如步骤202中所示,可以将预混物加热至60℃并维持1小时。然后可以将预混物冷却至约30-50℃、约35-45℃或约40℃,并且筛分,然后进一步冷却至约10-20℃或约15℃,并且在方法的剩余部分自始至终维持在此温度下。如步骤203中所示,可以将预混物冷却至40℃并筛分。接下来,如步骤204中所示,可以将预混物冷却至15℃。

[0076] 接下来,可以将冷冻-冻干保护剂加入预混物中。例如,如步骤205中所示,可以将海藻糖加入预混物中。随后,可以使用pH调节剂,将pH调整至约6-9、约7-8、约7.2-7.6、约7.3-7.5或约7.4。例如,如步骤206中所示,可以使用氢氧化钠溶液将pH调整至7.4。在调整pH后,可以添加液体病毒体浓缩物。在添加液体病毒体浓缩物后,可以重新检查pH (步骤207),并且需要时,使用另外的pH调节剂,将pH调整至约6.0-8.5、约7-8、约7.2-7.6、约7.3-7.5或约7.4。这种混合物可以用溶剂(即,病毒体制剂)补足至所需的分批大小。例如,如步骤208中所示,可以将所需量的水加入混合物中。

[0077] 在图1的步骤102中,可以将液体病毒体制剂定量投料到预成型模具内。如本文使用的,“定量投料(dose)”指溶液或悬浮液的预定等分试样的置放。如本文使用的,“预成型模具”指任何合适的容器或区室,水溶液或悬浮液可以置放到其内,并且随后在其内冷冻干燥。在本公开内容的某些实施方案中,预成型模具是具有一个或多个泡罩袋的泡罩包装。可以将其量为约150-1000 mg或约500 mg湿填充定量投料重量(也称为定量投料填充重量)的病毒体制剂的预定等分试样,计量到预成型模具内。在一些实施方案中,病毒体制剂可以在约10-20℃或约15℃下定量投料。例如,如步骤209中所示,病毒体制剂可以在15℃下用500 mg的定量投料填充重量定量投料。

[0078] 在图1的步骤103中,然后可以使定量投料的病毒体制剂在预成型模具中冷冻。可以通过本领域中已知的任何手段,使预成型模具中的定量投料病毒体制剂冷冻。例如,可以使制剂通过低温室(例如液氮隧道)。在冷冻过程中的温度可以为约-50至-100℃、约-60至-90℃、约-60至-80℃、约-65至-75℃或约-70℃。冷冻持续时间的范围可以为约1.5-5分钟、约2-4.5分钟、约2.5-4分钟、约3-4分钟、约3-3.5分钟或约3.25分钟。例如,如步骤210中所示,可以使定量投料的病毒体制剂在-70℃下冷冻3分钟15秒。

[0079] 在图1的步骤104中,可以收集在预成型模具中的冷冻单元,并且置于在低于约-25℃、约-20℃、约-15℃、约-10℃、约-5℃的温度下的冷冻机中,且退火(即冷冻保持)一段时间,以使结构形成剂结晶。结构形成剂结晶可以为冷冻单元提供结构强度,以防止冷冻单元在冷冻干燥期间的塌陷。这对于病毒体完整性可能是关键的。退火时间的范围可以为约3-9小时、约4-8小时、约5-7小时或约6小时。例如,如步骤211中所示,可以使冷冻单元在低于-15℃下退火约3-9小时。

[0080] 在退火后,可以在步骤105中使退火的冷冻单元冷冻干燥,以形成剂型。在冷冻干燥过程期间,水从冷冻单元升华。在一些实施方案中,可以将冷冻单元装载到冷冻干燥机的架子上。在一些实施方案中,可以将冷冻干燥机预冷却至约-15至-35℃、约-20至-30℃或约-25℃。一旦退火的冷冻单元处于冷冻干燥机中,就可以启动冷冻干燥循环。在一些实施方案中,一旦启动冷冻干燥循环,就可以抽真空并升高架温度。冷冻干燥机可以在低压(即

真空)下运行。在一些实施方案中,冷冻干燥机可以在约小于或等于1000毫巴、约900毫巴、约800毫巴、约700毫巴、约600毫巴、约500毫巴、或约400毫巴的压力下运行。

[0081] 申请人开发了两步冷冻干燥循环(步骤212),其可以实现剂型的结构稳固性以及最小程度地损害剂型中的病毒体。两步冷冻干燥循环可以包括使冷冻单元在约-5℃至-25℃、约-10℃至-20℃、约-13℃至-17℃或约-15℃下保持约12-36小时、约18-30小时、约20-28小时或约24小时的第一步。另外,两步冷冻干燥循环可以包括在第一步之后的第二步。第二步可以包括使冷冻单元在约0℃至-20℃、约-5℃至约-15℃、约-8℃至约-12℃或约-10℃下保持约6-30小时、约12-24小时、约14-22小时或约18小时。在两步冷冻干燥循环结束时,可以将冷冻干燥机的温度升高至约环境温度(即约20-25℃或约23℃)。

[0082] 在一些实施方案中,两阶段冷冻干燥方法可以包括将冷冻干燥机预冷却至约-25℃,使冷冻干燥机经2小时升温至-15℃,使冷冻干燥机在-15℃下保持24小时,使冷冻干燥机经2小时升温至-10℃,在-10℃下保持18小时,经15分钟升温至0℃,然后按该次序经15分钟升温至23℃。

[0083] 在步骤213中,可以从冷冻干燥机中取出冷冻干燥的剂型,并检查任何缺陷(如下所述的质量检查)。然后可以将剂型置于小于约35% RH的大气湿度下的贮存柜中,然后可以将剂型在其预成型模具中密封。密封过程(步骤214)可以将盖箔置于预成型模具上,并且提供冷冻干燥的剂型的泡罩。

[0084] 冷冻干燥的剂型中的水可以在冷冻干燥期间经由升华去除。相应地,冷冻干燥的剂型中排除冷冻-冻干保护剂的病毒体浓缩物的剩余部分(即,冷冻干燥的病毒体浓缩物中存在的病毒体、抗原、佐剂和缓冲系统)可以为剂型的约1-5重量%、约2-4重量%、约2.5-3.5重量%、约2.6-3.4重量%、约2.7-3.3重量%、约2.8-3.2重量%、约2.9-3.1重量%、或约3-3.1重量%。

[0085] 如上所述,靶分子以一定量包括在本文公开的剂型中,当在剂型中提供时,所述量足以致使其免疫原性。尤其是基于施用途径、剂型待施用于其的患者的年龄和重量,本领域技术人员可以容易地确定用于给定疾病或感染的免疫原性量。在一些实施方案中,固体剂型可以含有0.01-250 μg的每种靶分子(例如,HIV-1P1肽和/或rgp41)。

[0086] 在一些实施方案中,冷冻干燥剂型中的至少一种冷冻-冻干保护剂可以为剂型的约5-20重量%、约8-18重量%、约10-15重量%、约11-15重量%、或约12-15重量%。在一些实施方案中,冷冻干燥的剂型中的至少一种冷冻-冻干保护剂可以为剂型的约1-5重量%、约1-4重量%、或约2-4重量%。

[0087] 在一些实施方案中,剂型中的基质形成剂的量可以为约20-50重量%、约25-45重量%、约25-40重量%、约30-40重量%、约33-37重量%、或约35-37重量%。在一些实施方案中,剂型中的结构形成剂的量可以为约27-65重量%、约27-60重量%、约40-55重量%、或约45-50重量%。在一些实施方案中,冷冻干燥剂型中pH调节剂的剩余部分(例如氢氧化钠)可以为约0.01-0.08重量%。

[0088] 本公开内容的剂型是溶解剂型,并且相应地具有更快速的崩解时间的明显优点。施用途径可以是经口、阴道或鼻腔,尽管优选经口(即,舌下和/或颊)。一旦置于口腔中并与唾液接触,剂型就可以在约1至约180秒、约1至约120秒、约1至约60秒内,优选在约1至约30秒,更优选在约1至约10秒内,且最优选在少于约5秒内崩解。

[0089] 制剂、测试方法和实例

[0090] 对于实例,使用由流感病毒制备的液体病毒体浓缩物。病毒体含有流感HA以及添加的抗原和佐剂。制备了两种病毒体制剂,各自含有衍生自HIV包膜糖蛋白的单一抗原。液体病毒体浓缩物是两种病毒体制剂的混合物。两种HIV-gp41衍生的抗原是代表最后35个C末端细胞外结构域残基的P1肽,以及缺乏簇I和最后21个C末端细胞外结构域残基的截短的rgp41。佐剂3M-052在任一种病毒体制剂中存在或不存在。将病毒体悬浮于在pH 7.4下,含有142.5 mM氯化钠和50 mM HEPES的HEPES-氯化钠缓冲液中。另外,测试了在0-10% w/w液体病毒体浓缩物的范围内的海藻糖(冷冻-冻干保护剂)。下表1概括了对于我们的一些实验使用的HIV-1液体病毒体浓缩物的靶组合物,在所述实验期间,将500mg(定量投料填充重量)水性病毒体制剂的等分试样计量到预成型泡罩的袋内,随后为冷冻和冷冻干燥。定量投料填充重量范围可以为150 mg至1000 mg,并且可以调整HIV-1液体病毒体浓缩物的组合物,以满足所需的靶剂量。请注意,下述靶范围可以取决于目的和进一步用途,例如用于动物研究或人研究。因此,其它靶浓度可以用于其它目的。

[0091] 表1

[0092]

用于 500mg 定量投料填充重量 Zydis® 病毒体制剂的基于脂质的颗粒浓缩物的实例	基于脂质的颗粒浓缩物中的示例靶分子和赋形剂
HIV 疫苗 MYM-V202 (用于 Zydis®病毒体制剂中 25%载量的液体病毒体的 4x 浓缩物)	- 靶分子(P1 抗原): 50-450 μg/mL - 靶分子(rgp41 抗原): 50-400 μg/mL - HA 赋形剂: 10-160 μg/mL - 佐剂(例如 3M-052): 8-140μg/ml - 磷脂: 0.5 至 5 mg/mL - 氯化钠: 50-150 mM - HEPES 10-50 mM - 海藻糖: 4 - 10% w/w - pH 6.5 至 8.0
HIV 疫苗 MYM-V202 (用于 Zydis®病毒体制剂中 50%载量的液体病毒体的 2x 浓缩物)	- 靶分子(P1 抗原): 25-225 μg/mL - 靶分子(rgp41 抗原): 25-200 μg/mL - HA 赋形剂: 5-80 μg/mL - 佐剂(例如 3M-052): 4-70 μg/ml - 磷脂: 0.5 至 5 mg/mL - 氯化钠: 50-150 mM - HEPES 10-50 mM - 海藻糖: 2 - 5% w/w - pH 6.5 至 8.0
安慰剂疫苗 VP02 (用于最终 Zydis®病毒体制剂中 25%载量的液体病毒体的 4x 浓缩物)	- HA 赋形剂: 10-160 μg/mL - 佐剂(例如 3M-052): 8-140μg/ml - 磷脂: 0.5 至 5 mg/mL - 氯化钠: 50-150 mM - HEPES 10-50 mM - 海藻糖: 4 - 10% w/w - pH 6.5 至 8.0

[0093] 在我们的一些实验中,关于每个片剂的HA和HIV-1抗原的靶剂量分别为20 μg HA、25 μg P1和50 μg rgp41。为了达到这些剂量,需要与高湿填充剂量重量组合的高有效载荷的液体病毒体浓缩物。表2显示了液体病毒体浓缩物载量(范围为25-50% w/w)与湿填充定量投料重量(范围为250至1000 mg)的各种组合。湿填充定量投料重量是在冷冻干燥之前对于每个剂量计量的病毒体制剂的等分试样的量。

[0094] 表2

[0095]

液体病毒体浓缩物 HA 和抗原含量	基础基质制剂中的液体病毒体浓缩物%载量	定量投料填充重量	每个片剂 HA/P1/rpg41 的病毒体疫苗靶剂量
HA 80 μg/ml (连同佐剂 3M -052) P1 100 μg/ml rgp41 200 μg/ml	25% w/w	1000 mg	20μg/25μg/50μg
	50% w/w	500 mg	20μg/25μg/50μg
HA 160 μg/ml (连同佐剂 3M -052) P1 200 μg/ml rgp41 400 μg/ml	25% w/w	500 mg	20μg/25μg/50μg
	50% w/w	250 mg	20μg/25μg/50μg

[0096] 可以将25%载量的液体病毒体浓缩物加入基础基质制剂中。定量投料填充剂量重量可以是500 mg。表3显示了评估的HA和抗原含量的范围。

[0097] 表3

[0098]

组分	液体浓缩物中的靶组合物	供应用于评估的组合物	25%载量制剂中的组合物
用抗原和佐剂加上标签的病毒体	HA: 10 -160 μg/ml P1: 50-450 μg/ml rgp41: 50-400 μg/ml 3M-052: 8-140 μg/ml	HA: 70-160 μg/ml P1: 40-100 μg/ml rgp41: 70-230 μg/ml 3M-052: 16-65 μg/ml	HA: 18-40 μg/ml P1: 10-25 μg/ml rgp41: 17.5-57.5 μg/ml 3M-052: 4-16.3 μg/ml
氯化钠	50-150mM	142.5 mM	35.625 mM
HEPES	10-50 mM	50 mM	12.5 mM
海藻糖	4 - 10% w/w	3.5 - 7% w/w	0.9 – 1.75% w/w

[0099] 水性组合物中缓冲剂的存在可以降低凝固点,因此使得难以冷冻制剂组合物并维持其冷冻状态。另外,由于缓冲盐可以降低在退火过程期间甘露糖醇的结晶,因此片剂基质结构的塌陷也可能在冷冻干燥期间发生。需要甘露糖醇的结晶,以对片剂基质提供强度和结构以防止结构塌陷。然而,甘露糖醇的结晶可以在冷冻、退火和冷冻干燥期间损害病毒体颗粒。液体病毒体浓缩物的较低百分比载量(例如25%载量)导致降低这种影响。也可以考虑液体病毒体浓缩物的较低百分比的载量和较大的定量投料填充重量的组合。

[0100] 与具有高缓冲剂含量的制剂组合物组合的病毒体制剂的高湿填充定量投料重量,还可能使得更难以冷冻并且维持结构,以使在冷冻干燥期间的塌陷降到最低。然而,较大的片剂(例如1000 mg定量投料填充重量)可以覆盖更大的表面积,并且可以潜在地改善病毒体通过。当需要高湿填充定量投料重量时,优选具有低缓冲剂含量的制剂组合物。

[0101] 表4 (制剂1)概括了病毒体制剂的水性组合物和本文评估的片剂病毒体的相应组合物。根据图2中显示且描述的步骤制备下述制剂和片剂。另外,使冷冻的制剂经受伴随500

毫巴真空、具有下述的两步冷冻干燥过程：(a) -25℃预冷却；(b) 经2小时升温至-15℃；(c)在-15℃下保持24小时；(d) 经2小时升温至-10℃；(e)在-10℃下保持18小时；(f) 经15分钟升温至0℃；(g) 经15分钟升温至23℃。接下来，释放真空，并使冷冻干燥机恢复到大气压。

[0102] 每种成分的浓度(% w/w)是在通过冻干期间的升华去除液体病毒体浓缩物中存在的水、氢氧化钠溶液和用于制备的水之前的量。另外，下表包括每种成分可能的量范围。

[0103] 表4

[0104]

成分	评估的% w/w 范围	% w/w 制剂 1/2	对于 500 mg 湿定量投料填充重量以 mg 计的量	冷冻干燥后以 mg 计的量
液体病毒体浓缩物	25 -50%	25%	125 mg	~2.5-2.6 mg*
海藻糖	0.5%– 4.5%	2%** (净)	10 mg	10 mg** (净)
鱼明胶	4 – 6%	6%	30 mg	30 mg
甘露糖醇	4.5 – 8%	4.5%/8%	40 mg	40 mg
氢氧化钠溶液(例如 3% w/w)	适量 pH 7.4	适量 pH 7.4	~1.3 mg (适量 pH 7.4)	~ 0.04 mg (通过升华去除的水)
水(用于制备水性基质混合物)	适量 100%	适量 100%	~293.7 mg	去除的水
冷冻干燥的疫苗片剂的总重量	N/A	N/A	N/A	~82.64 mg

[0105] *如上文所述，液体病毒体浓缩物包括悬浮于具有5% w/w海藻糖的142.5mM NaCl和50 mM HEPES的缓冲系统中的病毒体。对于500 mg定量投料填充重量中25%载量的病毒体制剂(即125 mg液体病毒体浓缩物)，伴随水从病毒体、抗原、佐剂、NaCl和HEPES(排除海藻糖)中升华，估计干物质为约2.5-2.6 mg。

[0106] **这是病毒体制剂和剂型中的海藻糖的净量。因此，该量包括来自液体病毒体浓缩物的海藻糖以及由基础基质制剂添加的海藻糖。

[0107] 冷冻干燥的剂型的性质：

[0108] 冷冻干燥的剂型在物理属性和病毒体质量(粒度特征和抗原含量)方面可以是稳定的，并且可以不依赖于冷链贮存条件而贮存。另外，冷冻干燥的剂型可以允许病毒体在贮存或运输期间对意外暴露于零下贮存条件是抗性的。

[0109] 剂型物理特性：

[0110] 产生具有可接受的物理特性的冷冻干燥片剂。片剂的物理属性包括外观、分散特性、崩解时间和水分含量。

[0111] 测试了十个冻干片剂的片剂外观。从泡罩包装中取出每个片剂。就片剂表面和基质上的表面缺陷执行关于每个片剂的目视检查。标准是冷冻干燥的片剂应该具有良好的外观，不具有表面缺陷。另外，对于其从泡罩袋中的可取出性，片剂应该具有足够的稳固性而

不破裂。

[0112] 分散特性(体外测试):测试最少5个片剂。首先,准备含有大约200 mL、在20℃±0.5℃下的纯净水的烧杯。然后将每个片剂从泡罩包装中取出,并且将片剂基质朝下置于水的表面上。所花费的时间是每个片剂完全润湿或解离所花费的时间。润湿持续单元完全润湿所花费的时间。片剂的润湿可以以小片的形式发生,最终合并在一起,使得整个单元变湿。当单元的中心是润湿团块时,分散测试被视为完成。因此,润湿时间是单元的中心已充分润湿时所花费的时间,因为这是最厚的单元部分。对于五个片剂各自记录润湿时间。每次测试的最长时间为60秒。比此更长的时间可以简单地写作大于60秒。解离=单元分解所花费的时间。当单元开始在边缘处散开时,可以采取此时间。对于五个片剂各自记录解离时间。每次测试的最长时间为60秒。比此更长的时间可以写作大于60秒。偶然地,在该时间限制内,单元并未完全润湿或完全地解离。有的时候,单元可能在其中具有硬块;其它时候,它可能根本没有在表面上润湿。另外,整个单元可能被硬皮覆盖。如果发生这种情况,则在描述中注明这点,适当地引用“硬块(hard lumps)”或“残留结皮(skin remains)”。“硬块(hard lumps)”和/或“结皮(skin)”的形成可以指示在冷冻干燥期间的微结构塌陷。图3A-C显示了三种可能的非分散状态的简化表示,以及当它们在水中出现时单元的侧视图和俯视图。图3A-C中的照片显示了相同范畴的一些代表性单元。分散特性测试的标准是,5个片剂是否可以在60秒或更短的时间内完全润湿和/或解离成可触知的团块,而无硬块和结皮的存在。在一些实施方案中,本文公开的剂型可以在60秒或更短的时间内完全润湿和/或解离成可触知的团块,而无硬块和/或结皮的存在。

[0113] 崩解时间(体外测试):六个片剂用于该测试。将六个烧杯装满纯净水,并且置于控制在37℃±0.5℃下的水浴中。然后将每个片剂从泡罩包装中取出。小心地将线夹放在六个片剂的每个上。确保夹子可以夹住片剂而不造成损害。接下来,如药典中描述的执行测试。此类测试的实例是美国药典(United State Pharmacopeia) (701)崩解。对于每个片剂记录最大崩解时间。崩解时间测试的标准是,对于六个片剂中的每个,崩解时间不应多于60秒。在一些实施方案中,本文公开的剂型可以具有少于60秒的崩解时间。

[0114] 水分含量:具有744 Oven Sample Processor的Methron 831 Karl Fischer Coulometer (Metrohm,Herisau,瑞士)用于确定片剂的水分含量。准确地称重片剂并将其置于玻璃小瓶中。立即将小瓶压接关闭,以确保没有水分进入。然后将样品小瓶置于744 Oven Sample Processor中,并且将温度设定为102℃。使用Hydranal Coulometric AG Oven试剂滴定蒸发的水分,以定量释放的水量。测试一式三份执行,并且记录平均值。水分含量的标准是,冷冻干燥的剂型是否具有小于约8%,优选小于6%,且更优选小于4%的水分含量。在一些实施方案中,本文公开的剂型可以具有小于约8%,优选小于6%,且更优选小于4%的水分含量。

[0115] 病毒体特性:

[0116] 在来自起始液体病毒体群体的完整病毒体的比例、其粒度以及对于病毒体的免疫原性和免疫学益处所需的表面抗原含量方面,含有病毒体的冷冻干燥剂型可以得到充分保存。病毒体结构可以通过用于产生剂型的冷冻干燥方法被破坏。因此,从重构的冷冻干燥片剂的溶液评价病毒体颗粒特性。病毒体可以作为完整的个别颗粒和不同大小的簇存在,这些都是免疫原性的,但具有不同的抗原/表位暴露,并具有穿过舌下屏障的不同能力。病毒

体可以根据(a)平均粒度和(b)病毒体保存(完整病毒体)的比例来表征。

[0117] 使用NTA技术:纳米颗粒跟踪分析(Nanoparticle Tracking Analysis) (NTA;使用NanoSight NS300仪器)的病毒体粒度和颗粒浓度(病毒体颗粒的计数/mL)评价是灵敏的方法,其可以鉴定溶液中存在的30-1000 nm范围内的不同粒度。样品溶液中的颗粒可以通过直接观察个别地进行跟踪且同时分析。由于围绕其的水分子的随机运动,纳米颗粒在布朗运动下移动。小颗粒比更大的颗粒移动得更快。经由视频实时跟踪每个颗粒的布朗运动,并且NTA分析布朗运动以确定粒度。可以通过跟踪每个颗粒的移动来计算扩散系数,然后通过应用Stokes-Einstein方程来计算粒度。这种逐个颗粒的方法产生用于粒度分布和浓度(即,已知体积的液体中的颗粒数目)的高分辨率结果。下表5中概括了用于仪器检测的最佳检测的目标值。

[0118] 表5

[0119]

质量指标	目标	原理
PPF (颗粒/帧)	50-100	颗粒计数影响可实现的分辨率和生成的曲线的统计准确度
有效轨迹数目	>5000	对于多分散样品生成的曲线的统计准确度
S:N (信噪比)	高	小颗粒或微弱颗粒的改善检测
SD (标准差)	低	可变数据越少给出结果的置信度越高
曲线外观	良好:非高斯峰,在峰顶上的最小肩峰	数据中出现的噪声更少,明确的粒度群体

[0120] 测试样品必须为液体形式。对于这项工作,病毒体疫苗以液体形式供应。对于来自本文公开的疫苗制剂的测试样品,混合物以液体形式提供,在测试之前将冷冻单元解冻为液体形式,并且将冷冻干燥的剂型用水缓冲液重构为液体形式。测试样品不应太浓缩。液体测试样品可以适当地用HN缓冲液进一步稀释,以优化检测。稀释缓冲液可以是高纯度的,并且可以在使用之前,至少通过0.22 μm过滤器进行过滤。下表6中概括了用于NTA分析的实验参数集。

[0121] 表6

[0122]

参数	设置
样品稀释度	取决于含量(取决于稀释的测试样品中病毒体计数的浓度,其范围可以为1:100至1:8000)
捕获数目	5
捕获持续时间	60秒
温度控制	25℃
粘度	0.9Cp

[0123] 如本领域已知的通过NTA测量样品。在一些实施方案中,本文公开的病毒体颗粒范围包括片段和簇可以为约50-500 nm。在一些实施方案中,其为完整病毒体的病毒体颗粒可以在约70-400 nm或约70-200 nm(主峰)的范围内。在一些实施方案中,病毒体颗粒的平均直径可以为约70-200 nm、约100-175 nm、约125-155 nm。为了检测的目的,样品中病毒体群体的颗粒浓度可以为至少10^{10}个计数/mL。

[0124] 使用流式细胞术的病毒体保存评价的比例:流式细胞术用于该评价。首先,通过将

亲脂性染料Dil (长链二烷基羰花青(long-chain diallylcarbocyanin))插入到病毒体的脂质双层内,标记起始液体病毒体颗粒(代表100%原材料的参考样品)。(用Dil标记对粒度没有可测量的作用)。其次,将冷冻干燥的片剂重构,并且用Dil (测试样品)标记冷冻干燥的片剂中的病毒体。然后使用AMNIS成像流式细胞仪分析样品,并且比较在参考样品(在冷冻干燥前的液体病毒体)和测试样品(冷冻干燥的病毒体)之间的事件,以根据以下方面评估在冷冻干燥之后的病毒体保存比例:(a)病毒体回收的百分比和(b)病毒体簇的百分比。在一些实施方案中,作为单个颗粒的病毒体的回收百分比可以为原材料的约20-50%、约30-50%或约40-50%。在一些实施方案中,病毒体簇(双联体、三联体或更高数目的形式)的百分比可以为约小于50%、约25%、约10%或约5%。

[0125] 病毒体血凝素(HA)、HIV-1抗原P1、HIV-1抗原和佐剂的含量

[0126] 病毒体的流感HA、HIV-1抗原和佐剂含量可以通过各种方法进行定量。这些在下表7中进行制表。

[0127] 表7

[0128]

待定量的含量	方法
流感 HA	免疫印迹测定法 SRID 测定法 ELISA HPLC 测定法
HIV-1 抗原	免疫印迹测定法 HPLC 测定法 ELISA
佐剂	UV 光谱测定法 HPLC 测定法

[0129] 用于HA、P1和rgp41的免疫印迹测定方法:在该分析中,可以将制剂(液体病毒体浓缩物或含有病毒体的重构冷冻干燥的剂型)吸收到硝酸纤维素膜上,并且由于不存在加热程序、变性剂或还原剂,抗原维持在其天然状态下。该测定法检测特异性抗体可接近的所有抗原,并且指示主要的抗原降解或变性,其破坏或阻碍了对特异性表位的接近。它还指示特异性赋形剂是否可以阻止抗体与其抗原结合。为了制备用于分析的冷冻干燥的剂型(测试样品),将每个片剂溶解于0.5 mL水中(即,将冷冻干燥的片剂重构回为冷冻干燥之前的病毒体制剂的组合物)。为了制备阳性对照,将液体病毒体浓缩物的样品用超纯水稀释(稀释度为4倍)。理想地,液体病毒体浓缩物是与用于制备剂型测试样品相同的批次。准备所有测试样品和阳性对照的连续2倍稀释物。也可以使用另外的阳性对照,如纯化的HA和rgp41、以及合成的P1。将1.5 μL的每个样品和阳性对照点样到干硝酸纤维素膜上(从左到右稀释度渐增-未稀释、$^{1}/_{2}$、$^{1}/_{4}$、$^{1}/_{8}$、$^{1}/_{16}$、$^{1}/_{32}$、$^{1}/_{64}$、$^{1}/_{128}$)。将干膜用1% (w/v)酪蛋白封闭,并且与特异性抗体溶液 - 对于HIV-1 P1抗原特异性的人单克隆抗体(mab) 2F5和对于HIV-1 rgp41抗原的兔抗rgp41血清 - 一起温育。在温育后,洗涤硝酸纤维素膜。然后,使用远红荧光扫描仪检测与荧光标记的二抗(抗人抗体或抗兔抗体)结合的特异性抗体,所述扫描仪允许同时检

测在700 nm和800 nm处的2种不同的荧光标记。将每个样品斑点的荧光原始数据信号(从最低到最高)与阳性对照斑点的各自稀释度(以阳性对照的%计)进行比较。计算样品百分比的算术平均值。

[0130] 3M-052的UV光谱测定法:佐剂分子3M-052具有几个UV吸收峰。其中一些峰与脂质和蛋白质的吸收重叠。通过UV光谱法在320 nm处完成测定。

[0131] 用于P1和rgp41的HPLC测定法:HIV抗原P1和rgp41通过反相高压液相层析在C18层析柱上使用水至乙腈梯度进行分离。通过在280 nm处的UV光谱法完成测定,并且通过HPLC系统软件对峰面积进行定量。

[0132] ELISA终点抗体滴度:Maxisorp 96孔板(Nunc平底)和Polysorp板分别在4℃下,用0.1 mL在PBS pH7.4中制备的rgp41或P1肽(2 μg/mL)包被16小时。将板用具有0.05% v/v) Tween 20的PBS (PBST)洗涤3次,然后将在PBST中制备的封闭溶液1% BSA加入每个孔中,并且在室温(RT)下温育2小时。将板用PBST洗涤3次,然后添加0.1 mL/孔的以1/1000稀释的免疫前血清、或在0.1% BSA的PBST溶液中制备的免疫血清系列稀释物(从1/1000到1/64,000),并且在RT下温育2小时。将板用PBST洗涤3次,并且与在0.1% BSA的PBST溶液中1:4000稀释的山羊抗大鼠IgG-HRP一起在RT下温育2小时。再次洗涤板,然后加入0.1 mL比色底物邻苯二胺(OPD),并用2M H_2SO_4终止反应,随后为在492 nm处的板读取。

[0133] 实施例1:高甘露糖醇水平(8% w/w)与低温冷冻干燥循环结合使用,以降低在冷冻干燥期间的微结构塌陷,而不损害病毒体的完整性。

[0134] 甘露糖醇用于剂型中,以增加结构稳固性。由于高水平缓冲剂的存在和海藻糖的添加以保护病毒体颗粒,因此在冷冻干燥期间,以4.5% w/w典型水平的甘露糖醇使用不能提供足够的结构支持。因此,发生了微结构塌陷。

[0135] 然而,申请人发现了,通过使用更高水平的甘露糖醇和低温冷冻干燥循环的组合,可以实现结构上更稳固的冷冻干燥片剂。该实施例显示了将含有4.5% w/w甘露糖醇的制剂与含有8% w/w甘露糖醇的制剂进行比较的数据。在这两种制剂中,在病毒体制剂中使用由Mymetics供应的25% w/w载量的液体病毒体浓缩物MYM-201批次160125-1,其含有在HN缓冲液pH 7.4 (50 mM HEPES、142.5 mM NaCl)中的HA 70-80 μg/ml、P1 40-50 μg/ml、rgp41 70-80 μg/ml (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)。鱼明胶和净海藻糖水平分别保持在6% w/w和2% w/w的病毒体制剂下。如图2中所示,在15℃下,将制剂用500 mg定量投料填充重量等分试样定量投料到铝托盘的泡罩袋内。通过使铝托盘通过设定在-70℃下的冷冻室中3分钟15秒的持续时间,使含有定量投料的水性疫苗混合物的托盘冷冻。收集含有冷冻产物的铝托盘,并且置于在<-15℃的温度下的冷冻机中,并且在冻干之前保持冷冻退火6小时。然后使用两步FD循环,其使用-15℃的24小时,随后为在-10℃下的18小时。将冷冻干燥片剂的泡罩密封在小袋中,并贮存于环境条件下。

[0136] 根据上文说明的测试,评价冻干片剂的物理特性(外观和分散时间)。另外,根据上文说明的测试,对冻干片剂中的病毒体粒度进行表征。结果概括于下表8中。

[0137] 表8

[0138]

甘露糖醇 4.5% (制剂 1)	甘露糖醇 8% (制剂 2)
外观: 良好(n=182) 分散时间(n=8) • 润湿: > 60s (2 个单元-结皮, 5 个单元-硬块 • 解离: > 60s (并未完全分散) NTA 分析 • 冷冻干燥的片剂: 136 nm (主峰) • %病毒体颗粒(< 200 nm): >50%	外观: 良好(n=184) 分散时间(n=8) • 润湿: < 28s • 解离: <36s NTA 分析 • 冷冻干燥的片剂: 140 nm (主峰) • %病毒体颗粒(< 200 nm): >50%

[0139] 所有片剂都具有良好的外观。4.5% w/w甘露糖醇制剂由于微结构塌陷而具有弱分散行为,具有在片剂中可见的结皮和/或硬块。将制剂增加至8% w/w(其促进甘露糖醇的结晶)改善了冷冻干燥片剂的结构。具有8% w/w甘露糖醇的制剂具有良好的分散行为,并且给出柔软且可触及的团块。与低温冷冻干燥循环组合,冷冻干燥的片剂中的病毒体颗粒不受影响。冷冻干燥的片剂中的病毒体粒度在制剂之间总体上是可比较的。

[0140] 实施例2:在ICH条件下贮存3个月的冷冻干燥的疫苗剂型(制剂1)的稳定性数据。

[0141] 液体病毒体浓缩物在2-8℃下一般是稳定的,但由于抗原上发生的重要化学修饰,液体HIV病毒体疫苗具有几个月的有限贮存期限,而不存在聚集。对于具有低水分含量的固体疫苗形式,此类修饰预计减慢速度并随着时间过去降到最低,将贮存期限延长至> 1年。在该实施例中示出了以冷冻干燥的片剂制剂1形式的病毒体疫苗的稳定性。由Mymetics供应的液体病毒体浓缩物批次MYM V202批号170130-1 (其包含在具有7% w/w海藻糖的HN缓冲液pH 7.4 (50 mM HEPES、142.5mM NaCl)中的大约100 μg/ml HIV-1 P1、230 μg/ml HIV-1 rgp41、130 μg/ml HA (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、65 μg/ml佐剂3M-052),供应用于制造冻干的疫苗片剂(批次Z33787A101)。

[0142] 为了制备疫苗片剂,首先制备液体病毒体制剂混合物。它含有25% w/w的液体病毒体浓缩物批次MYM V202批号170130-1、6% w/w鱼明胶、4.5% w/w甘露糖醇、2% w/w(净)海藻糖、至pH 7.4的氢氧化钠溶液(适量)以及至100% w/w的纯净水(适量)。

[0143] 在15℃下,将液体病毒体制剂混合物用500 mg定量投料填充重量等分试样定量投料到铝托盘的泡罩袋内。通过使托盘通过设定在-70℃下的冷冻室中3分钟15秒的持续时间,使含有定量投料的水性疫苗混合物的托盘冷冻。收集含有冷冻产物的铝托盘,并且置于在<-15℃的温度下的冷冻机中。然后使用两步FD循环,其使用-15℃的24小时,随后为在-10℃下的18小时。

[0144] 将冷冻干燥片剂的泡罩密封在小袋中,并且置于在5℃、25℃/60%相对湿度和40℃/75相对湿度下的3个月贮存。在初始测试和3个月测试下的结果概括于下表9中。

[0145] 表9

[0146]

测试	初始	5℃ /3个月	25℃ @ 60%RH /3个月	40℃ @ 75%RH /3个月
外观	良好	良好	良好	良好
水分含量(% w/w)	5.22	5.20	5.76	4.83
崩解时间(秒)	<13	<23	<41	<25
NTA: 主峰(nm)	101	120	124	124
NTA: % 病毒体颗粒(<200nm):	>50%	>50%	>50%	>50%

[0147] 稳定性数据显示了片剂外观是良好的并且在批次之间是一致的。水分含量为5-6% w/w,经过3个月的贮存期,在不同稳定性条件之间具有很小的差异。由于该制剂含有4.5% w/w甘露糖醇,因此如崩解时间的变化性所指示的,在冷冻干燥期间存在一些微结构塌陷。就病毒体粒度而言,DLS和NTA数据显示了,在各种稳定性条件下贮存的片剂之间的病毒体粒度中没有可区别的差异。起始液体病毒体浓缩物具有> 50%的< 200 nm颗粒。结果显示了,来自重构单元的< 200 nm的病毒体基本上保存至相似的数量级。

[0148] 使用半定量免疫印迹分析,经过3个月监测抗原HIV-1抗原P1和rgp41的降解。所有样品都预稀释2倍。对于P1特异性的人mAb 2F5和兔抗rgp41血清用于此目的。将用于生产疫苗批次的液体病毒体浓缩物批次MYM-V202批号170130-1稀释8倍,并且用作阳性对照。图4显示了免疫印迹分析的照片。对于样品Z33787A101,与初始样品(t=0)相比,在5℃下贮存的片剂在贮存1个月和3个月后,没有显示rgp41抗原信号的减少或仅显示最低限度的减少。类似地,对于rgp41抗原,在25℃下贮存的单元仅存在信号强度的最低限度差异,而对于P1抗原略微减少。关于40℃单元的差异是更明显的,尽管这可能仍在10-20%的测定法准确度内。

[0149] 分别在表10和表11中呈现了关于rgp41和P1的荧光数据的定量评估。每个表的上部显示了关于指示的稳定性样品的每个斑点的荧光原始数据信号(从最低稀释度到最高稀释度)。每个表的下部显示了每个样品斑点与阳性对照斑点的分别稀释度相比的值(以阳性对照的%计)。底部行显示了所有样品百分比的算术平均值。从平均计算中排除了测量的明显离群值。

[0150] 表10

[0151]

rgp41	Z33787A101						
	t= 0	1个月			3个月		
MYM-V202	5°C	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
7702462	9058972	8032375	9201721	7801344	6321957	10300125	8521558
4339215	5472388	4683281	4902260	4771430	4016424	4072924	3454675
5371152	4467722	3785349	3403051	4176710	3596774	2556036	3084636
3319677	3265426	2311220	3464764	3194101	3263683	3054427	2615003
2259183	2179005	2166937	2708839	2159053	2482939	2704366	2043011
1704534	1689938	1182171	1769144	1533427	1448772	1594263	1077611
1339732	1048682	751850	1056018	675617	785497	976990	621839
679095	632167	517094	514737	455636	490586	451385	417028
对照的%	117.6	104.3	119.5	101.3	82.1	133.7	110.6
对照的%	126.1	107.9	113.0	110.0	92.6	93.9	79.6
对照的%	83.2	70.5	63.4	77.8	67.0	47.6	57.4
对照的%	98.4	69.6	104.4	96.2	98.3	92.0	78.8
对照的%	96.5	95.9	119.9	95.6	109.9	119.7	90.4
对照的%	99.1	69.4	103.8	90.0	85.0	93.5	63.2
对照的%	78.3	56.1	78.8	50.4	58.6	72.9	46.4
对照的%	93.1	76.1	75.8	67.1	72.2	66.5	61.4
%(均值)	**99.0**	**81.2**	**97.3**	**86.0**	**74.0**	**80.0**	**65.3**

[0152] 表11

[0153]

P1	Z33787A101						
	t= 0	1个月			3个月		
MYM-V202	5°C	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
2764625	1461965	1245932	1471586	1238537	1516476	1351413	1572627
1208918	1606470	723609	1235559	1338350	547105	470287	508107
845363	997068	578732	617270	997966	619197	352482	610820
453354	904843	566560	879843	1200198	1211985	882260	490097
249520	317945	287210	840751	673118	324793	339128	261055
149361	269482	142741	311659	342849	146881	159835	115068
86167	110800	63348	127920	163997	124010	91144	49784
28407	42578	19915	18230	19079	24436	27082	27289
对照的%	52.9	45.1	53.2	44.8	54.9	48.9	56.9
对照的%	132.9	59.9	102.2	110.7	45.3	38.9	42.0
对照的%	117.9	68.5	73.0	118.1	73.2	41.7	72.3
对照的%	199.6	125.0	194.1	264.7	267.3	194.6	108.1
对照的%	127.4	115.1	336.9	269.8	190.2	135.9	104.6
对照的%	180.4	95.6	208.7	229.5	98.3	107.0	77.0
对照的%	128.6	73.5	148.5	190.3	143.9	105.8	57.8
对照的%	149.9	70.1	64.2	67.2	86.0	95.3	96.1
%(均值)	**136.2**	**81.6**	**147.6**	**161.9**	**112.4**	**96.0**	**76.8**

[0154] 对于Z33787A101的疫苗片剂,与初始样品(t=0)相比,在5℃下贮存的片剂在贮存1个月和3个月后,没有显示rgp41和P1抗原信号的减少或仅显示最低限度的减少。类似地,对于rgp41抗原,在25℃下贮存的单元仅存在信号强度的最低限度差异,而对于P1抗原略微减少。关于40℃单元的差异对于两种抗原P1和rpg41是更明显的,尽管这可能仍在测定法的准确度内,尤其是因为变动再次在系列稀释样品中可见。

[0155] 对于经过3个月贮存于不同温度下的所有疫苗片剂,通过UV光谱法在320 nm处完成3M-052的测定。值在下表12中呈现。

[0156] 表12

[0157]

时间点	贮存条件	OD (320 nm)
0	5℃	0.116
1个月	5℃	0.114
1个月	25℃/60% RH	0.112
1个月	40℃/75% RH	0.110

[0158] 在这些样品之间没有观察到可区别的差异,并且因此,在该测定法的准确度内,认为3M-052浓度在所有样品中保持稳定。总体上,HA、P1、rpg41和3M-052在不同贮存条件下贮

存的冷冻干燥的片剂中是稳定的,随着时间过去具有微小变动,如下表13中所示。

[0159] 表13

[0160]

在稳定性研究过程中的抗原和佐剂检测	液体病毒体浓缩物	冷冻干燥的片剂
在5℃下经过3个月rgp41的变化(预计无降解=参考)	不显著	不显著
与5℃相比,在25℃下经过3个月rgp41的变化(降解)	未完成	最低限度减少
与5℃相比,在37-40℃下经过3个月rgp41的变化(降解)	未完成	最低限度减少
在5℃下经过3个月P1的变化(预计无降解=参考)	不显著	不显著
与5℃相比,在25℃下经过3个月P1的变化(降解)	未完成	最低限度减少
与5℃相比,在37-40℃下经过3个月 P1的变化(降解)	未完成	最低限度减少
在5℃下经过3个月3M-052的变化(预计无降解=参考)	不显著	不显著
与5℃相比,在37-40℃下经过3个月 3M-052的变化(降解)	不显著	不显著

[0161] 实施例3:在ICH条件下贮存的冷冻干燥的疫苗剂型(制剂2)的稳定性数据。

[0162] 在该实施例中示出了关于制剂2以冷冻干燥的片剂形式的病毒体疫苗的稳定性。由Mymetics供应的液体病毒体浓缩物批次MYM V202批号17MYM002/F17255 (其包含在具有7% w/w海藻糖的HN缓冲液pH 7.4 (50 mM HEPES、142.5mM NaCl)中的大约121 μg/ml HIV-1 P1、67 μg/ml HIV-1 rgp41、41 μg/ml HA (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、39 μg/ml佐剂3M-052),用于制造冻干的疫苗片剂(批次MYM-212批号1690747)。

[0163] 为了制备疫苗片剂,首先制备液体病毒体制剂混合物。它含有25% w/w的液体病毒体浓缩物批次MYM V202批号17MYM002/F17255、6% w/w鱼明胶、8% w/w甘露糖醇、2% w/w(净)海藻糖、至pH 7.4的氢氧化钠溶液(适量)以及至100% w/w的纯净水(适量)。

[0164] 在15℃下,将液体病毒体制剂混合物用500 mg定量投料填充重量等分试样定量投料到铝托盘的泡罩袋内。通过使托盘通过设定在-70℃下的冷冻室中3分钟15秒的持续时间,使含有定量投料的水性疫苗混合物的托盘冷冻。收集含有冷冻产物的铝托盘,并且置于在<-15℃的温度下的冷冻机中。然后使用两步FD循环,其使用-15℃的24小时,随后为在-10℃下的18小时。

[0165] 将冷冻干燥片剂的泡罩密封在小袋中,并且置于在5℃、25℃/60%相对湿度和40℃/75相对湿度下的3个月贮存。在初始测试和6个月测试下的结果概括于下表14中。

[0166] 表14

[0167]

测试	外观	崩解时间	水分含量
初始	良好	22秒	3.6%
在5℃下1个月	良好	8秒	3.8%
在25℃/60% RH下1个月	良好	16秒	3.7%
在40℃/75% RH下1个月	良好	14秒	3.6%
在5℃下3个月	良好	12秒	3.7%
在25℃/60% RH下3个月	良好	10秒	3.7%
在40℃/75% RH下3个月	良好	13秒	3.9%
在5℃下6个月	良好	8秒	3.9%
在25℃/60% RH下6个月	良好	10秒	3.8%
在40℃/75% RH下6个月	良好	13秒	4.0%

[0168] 稳定性数据显示了片剂外观是良好的并且在批次之间是一致的。水分含量为3.6-

4.0% w/w,经过6个月的贮存期,在不同稳定性条件之间具有很小的差异。由于该制剂含有8% w/w甘露糖醇,因此如较短和更一致的崩解时间所指示的,在冷冻干燥期间存在更少的微结构塌陷。

[0169] 使用HPLC测定法,就经过3个月的降解,监测抗原含量(HIV-1抗原P1和rgp41)的稳定性。对于液体疫苗MYM V202 (原材料),发现当在2 - 8°C (冷贮存条件)下贮存1个月和3个月时,P1含量分别降低了4%和7%。对于rgp41,在冷贮存条件下1个月和3个月时,含量分别降低了16%和25%。当液体病毒体在25°C和40°C下贮存时,在1个月和3个月后不再检测到P1和rgp41。

[0170] 对于抗原P1和抗原rgp41,在表15和表16中分别呈现了冻干片剂在贮存下的抗原含量结果。以冻干片剂的形式,P1抗原保持非常稳定,在2-8°C (冷链条件)下3个月后没有观察到含量下降,并且在冷链条件之外的1个月和3个月贮存期间也保持不受影响。对于rgp41抗原,在2-8°C、25°C和40°C下1个月后,分别观察到约5%、10%和20%的下降。在3个月贮存下,下降分别为约13%、15%和19%。考虑到HPLC方法的准确度,所观察到的小于15%的下降浓度差异并不显著。此外,所观察到的逐渐的抗原损失或下降与化学修饰有关,而不是由于具有结构切割的深度降解、氨基酸损失或聚集。同时,给定表位中的化学修饰可能潜在地改变其识别,减少或增加针对该区域的抗体结合,而其它区域仍保持同样良好地识别。

[0171] 在T0时,P1和rgp41抗原具有类似的SDS-PAGE迁移概况,并且在处于舌下片剂下时,仍被特异性单克隆抗体识别,并且针对P1和rgp41的血清抗体针对具有关键表位的各种P1和gp41肽仍是反应性的。这些分析提示了,总体而言,P1和rgp41在制造过程期间已保存了其大多数抗原性和免疫原性(数据未显示)。

[0172] 表15

[0173]

时间点	P1 含量(冻干片剂)		
	μg/ml	μg/单元	%降低/增加
在 2 - 8 °C (均值 5 °C) (冷链条件)下贮存			
初始(T0)	24.7	12.35	不可用
1 个月(T1)	28.6	14.3	+ 15.8 (无损失)
3 个月(T3)	27.6	13.8	+ 11.7 (无损失)
在 25°C/60%RH 下贮存			
1 个月(T1)	27.9	13.95	+ 13.0 (无损失)
3 个月(T3)	27.5	13.75	+ 11.13 (无损失)
在 40°C/75%RH 下贮存			
1 个月(T1)	25.8	12.9	+ 4.5 (无损失)
3 个月(T3)	24.0	12.0	-2.8 (损失)

[0174] 表16

[0175]

时间点	rgp41 含量(冻干片剂)		
	μg/ml	μg/单元	%降低
在 2 - 8 ℃ (均值 5 ℃) (冷链条件)下贮存			
初始(T0)	13.5	6.75	不可用
1 个月(T1)	12.8	6.4	-5.2
3 个月(T3)	11.8	5.9	-12.6
在 25℃/60%RH 下贮存			
1 个月(T1)	12.1	6.05	-10.4
3 个月(T3)	11.5	5.75	-14.8
在 40℃/75%RH 下贮存			
1 个月(T1)	10.8	5.4	-20.0
3 个月(T3)	10.9	5.45	-19.3

[0176] 实施例4:在零下温度的贮存条件下贮存的冻干片剂的稳定性。

[0177] 实施例4中的数据显示了当在零下条件下贮存时,病毒体疫苗片剂和病毒体颗粒的物理特性的稳定性。将液体病毒体制剂混合物用500 mg定量投料填充重量进行定量投料且冷冻干燥,所述混合物含有由Mymetics供应的25% w/w载量的液体病毒体浓缩物MYM-201批号160125-1 (其含有在HN缓冲液pH 7.4 (50 mM HEPES、142.5 mM NaCl)中的HA 70-80 μg/ml、P1 40-50 μg/ml、rgp41 70-80 μg/ml (A/Brisbane/59/2007 (H1N1)、6% w/w鱼明胶、8% w/w甘露糖醇和2% w/w(净)海藻糖。在15℃下,将制剂用500 mg定量投料填充重量等分试样定量投料到铝托盘的泡罩袋内。通过使铝托盘通过设定在-70℃下的冷冻室中3分钟15秒的持续时间,使含有定量投料的水性疫苗混合物的托盘冷冻。收集含有冷冻产物的铝托盘,并且置于在<-15℃的温度下的冷冻机中,并且在冻干之前保持冷冻退火6小时。然后使用两步FD循环,其使用-15℃的24小时,随后为在-10℃下的18小时。将冷冻干燥片剂的泡罩密封在小袋中,并且置于在-15℃下的冷冻机中贮存1周。将相应的一组片剂泡罩密封在小袋中,并且在环境条件下放置相同的持续时间。如根据上文测试方法所述的,评价这些片剂的外观、分散特性(润湿时间和解离时间)和病毒体粒度分布。

[0178] 在两种条件下贮存后,发现所有单元都具有良好的外观。数据显示了,零下贮存对片剂的分散特性(润湿和解离时间) (表17)和病毒体粒度分布(表18)具有很少的影响。

[0179] 表17

[0180]

条件	润湿时间(秒)	解离时间(秒)
环境贮存	<31	<37
零下贮存	<32	<35

[0181] 表18

[0182]

条件	NTA: 主峰粒度(nm)	NTA: %病毒体颗粒(<200nm)
1周环境消化后	130	59.9
1周零下，消化后	132	60.6

[0183] 实施例5:来自重构的冷冻干燥片剂的病毒体颗粒的流式细胞术评价。

[0184] 下文概括了来自工艺开发的冷冻干燥的片剂样品中保存的病毒体比例的估计。表19中提供的值源自AMNIS流式细胞术数据,使用了与病毒体门对应的焦点区域中的事件测量。

[0185] 表19

[0186]

疫苗制剂	从生产结束回收的病毒体百分比	簇(双联体、三联体、更高的形式)的百分比
液体疫苗	100%	<5%
冷冻干燥的片剂(重构	24 - 40%	10-25%

[0187] 数据显示了,冷冻干燥的片剂中保存了24 - 40%的起始病毒体,其中10 -25%的这些病毒体呈簇,大部分为双联体和三联体。

[0188] 实施例6:来自液体病毒体制剂和含有病毒体的重构的冷冻干燥舌下片剂的P1和rgp41抗原的免疫原性评估。

[0189] 关于实施例3的液体病毒体浓缩物(液体疫苗MYM-V202)和含有病毒体的冻干舌下片剂,置于在4℃和40℃下经过三个月时期的贮存,用于免疫原性评价。在贮存1个月后,从贮存柜中取出在40℃下贮存的液体疫苗和舌下片剂的样品,用于免疫原性评价。在贮存3个月后,取出在4℃和40℃下贮存的液体疫苗和舌下片剂的样品,用于免疫原性评价。

[0190] 对于免疫原性评价,使用了每种性别各50%的Wistar大鼠(n=10/组)。在第0天、第28天和第56天,对大鼠进行免疫。液体疫苗含有在0.1 mL中的3.9 μg P1、2.2 μg rgp41和1.3 μg 3M-052 TLR7/8 (佐剂),并且这用于皮下注射。对于舌下片剂,将足够数量的舌下片剂溶解于无菌水中,以达到在0.1 mL中的约3 μg P1、1.7 μg rgp41和1 μg 3M-052 TLR7/8(佐剂),以通过皮下注射施用。在第0天收集免疫前血清,并且在第65天收集免疫血清,用于确定每种动物血清和血清库中的终点抗体滴度。

[0191] 图5显示了来自在不同温度下贮存的液体疫苗和舌下片剂的P1和rgp41的免疫原性。含有P1和rgp41抗原两者的液体佐剂化疫苗制剂MYM-V202是温度敏感的,并且充当参考材料,用于与具有改善热稳定性的舌下片剂疫苗形式的免疫原性比较。(黑线)显示了在4℃下贮存3个月的疫苗;(黑色虚线)显示了在40℃下贮存1个月的疫苗;(灰线)显示了在40℃下贮存3个月的疫苗。数据显示了,冷冻干燥片剂的抗原的免疫原性得到保留。在每个组中,还指示了终点抗体滴度。终点滴度对应于最后一个血清稀释度,生成的OD值是免疫前背景的> 2倍。

[0192] 另外的定义

[0193] 除非另有定义,否则本文使用的所有领域术语、符号以及其它技术和科学术语或

术语学,都预期具有与请求保护的主题所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。在一些情况下,为了清楚起见和/或便于参考,具有通常理解的含义的术语在本文中进行定义,并且此类定义在本文中的包括不应被解释为表示与本领域一般理解的实质差异。

[0194] 本文对“约”值或参数的提及包括(并描述)针对该值或参数本身的变动。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。另外,提及随后为一串值或参数的短语“小于”、“大于”、“至多”、“至少”、“小于或等于”、“大于或等于”或其它类似的短语,意欲将该短语应用于该串值或参数中的每个值或参数。例如,溶液具有至少约10 mM、约15 mM或约20 mM的浓度的陈述,意指该溶液具有至少约10 mM、至少约15 mM或至少约20 mM的浓度。

[0195] 如本文使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”还意欲包括复数形式,除非上下文另有明确指示。还应理解,如本文使用的,术语“和/或”指的是并涵盖一个或多个相关的列出项的任何和所有可能的组合。应进一步理解,当在本文中使用时,术语“包括(includes)”、“包括(including)”、“包含(comprises)”和/或“包含(comprising)”指定所述特征、整数、步骤、操作、要素、组分和/或单元的存在,但并不排除一个或多个其它特征、整数、步骤、操作、要素、组分、单元和/或其组的存在或添加。

[0196] 本申请在正文和附图中公开了若干数值范围。所公开的数值范围固有地支持在所公开的数值范围内的任何范围或值,包括端点,即使在说明书中没有逐字地陈述精确的范围限制,因为本公开内容可以在整个公开的数值范围内进行实践。

[0197] 呈现上文说明书,以致使本领域技术人员能够制备并使用本公开内容,并且在特定应用及其要求的背景下提供。对优选实施方案的各种修改对于本领域技术人员将是显而易见的,并且本文定义的一般原理可以应用于其它实施方案和应用,而不脱离本公开内容的精神和范围。因此,本公开内容并不预期限于所示的实施方案,而应被赋予与本文公开的原理和特征一致的最广泛范围。

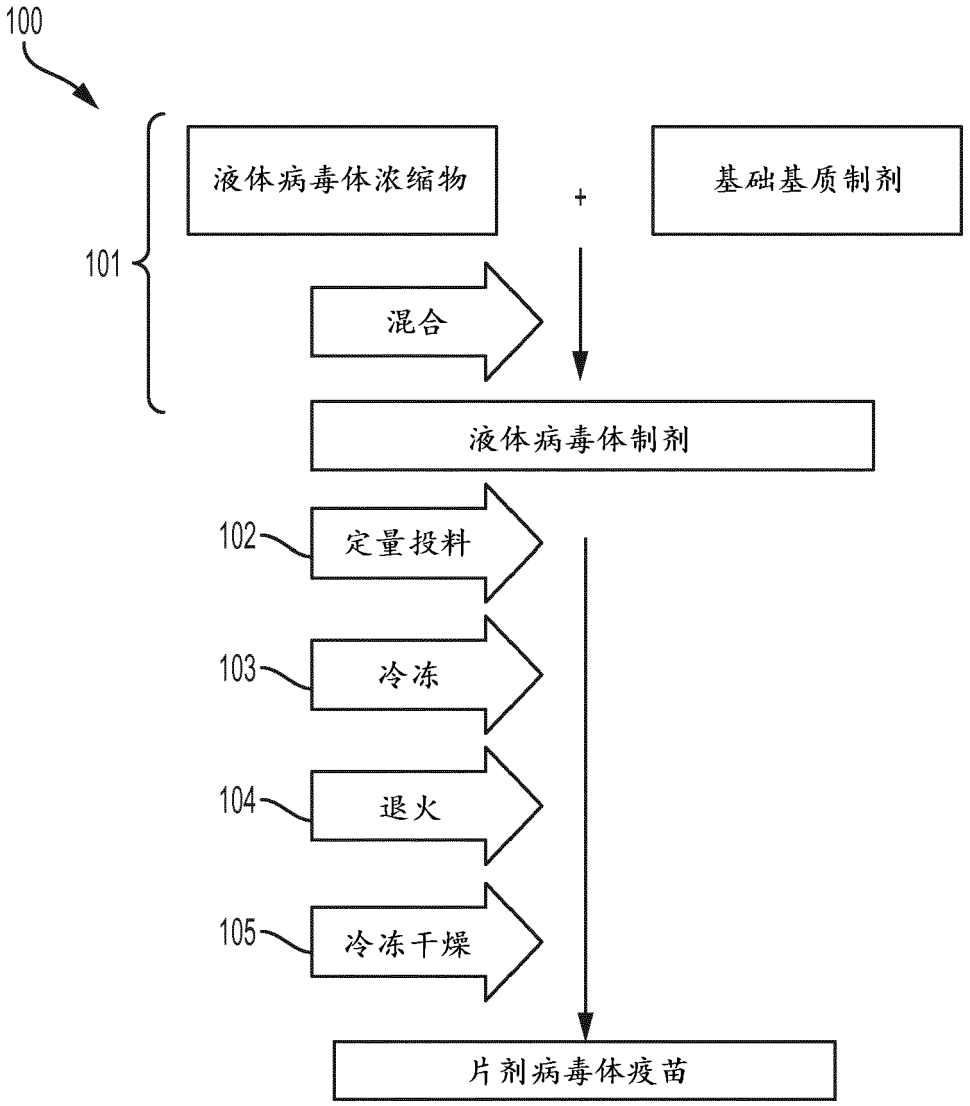

100
液体病毒体浓缩物
+
基础基质制剂
101
混合
液体病毒体制剂
102
定量投料
103
冷冻
104
退火
105
冷冻干燥
片剂病毒体疫苗

图 1

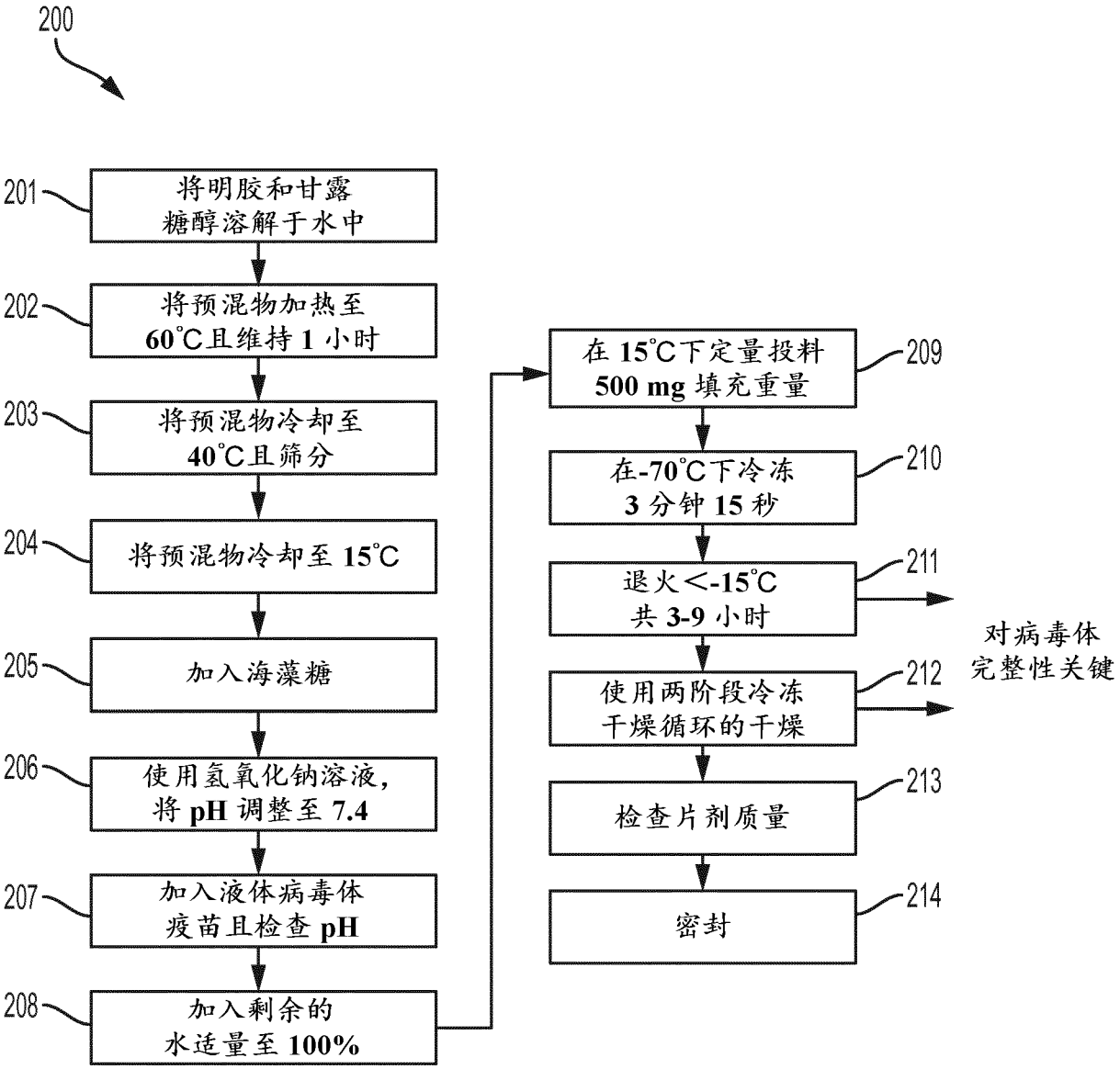
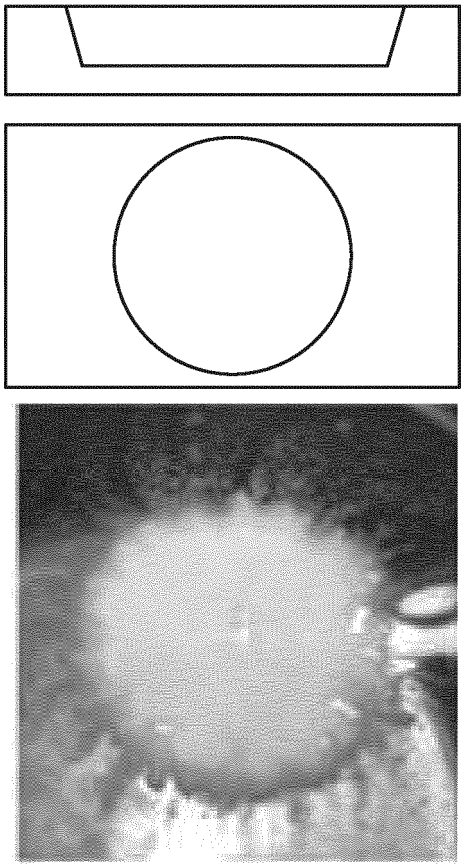
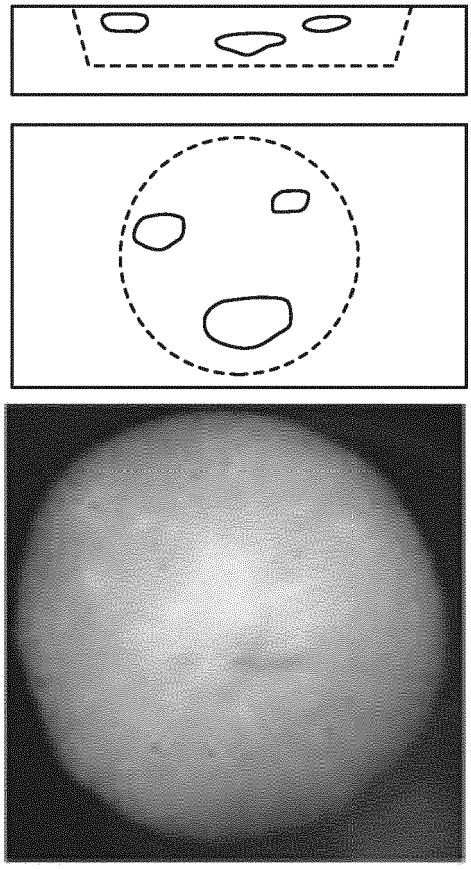

200
201
将明胶和甘露糖醇溶解于水中
202
将预混物加热至60℃且维持1小时
203
将预混物冷却至40℃且筛分
204
将预混物冷却至15℃
205
加入海藻糖
206
使用氢氧化钠溶液，将pH调整至7.4
207
加入液体病毒体疫苗且检查pH
208
加入剩余的水适量至100%
209
在15℃下定量投料500 mg填充重量
210
在-70℃下冷冻3分钟15秒
211
退火<-15℃共3-9小时
212
使用两阶段冷冻干燥循环的干燥
213
检查片剂质量
214
密封
对病毒体完整性关键

图 2



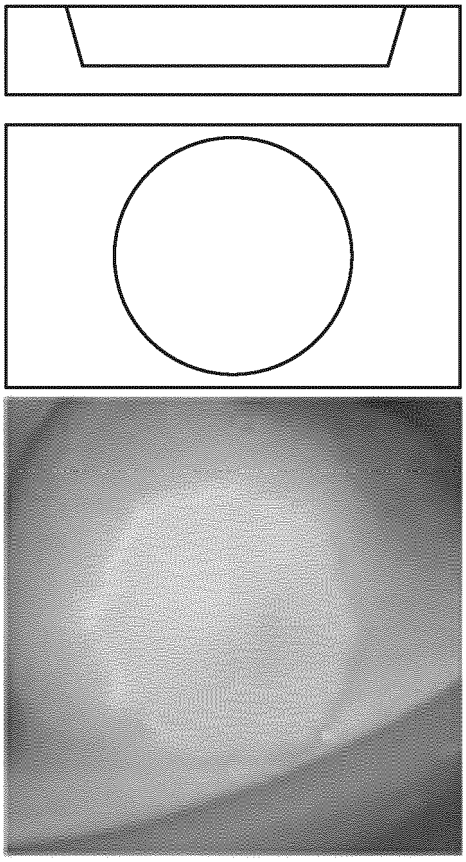
完全润湿

图 3A



块

图 3B



残留结皮

图 3C

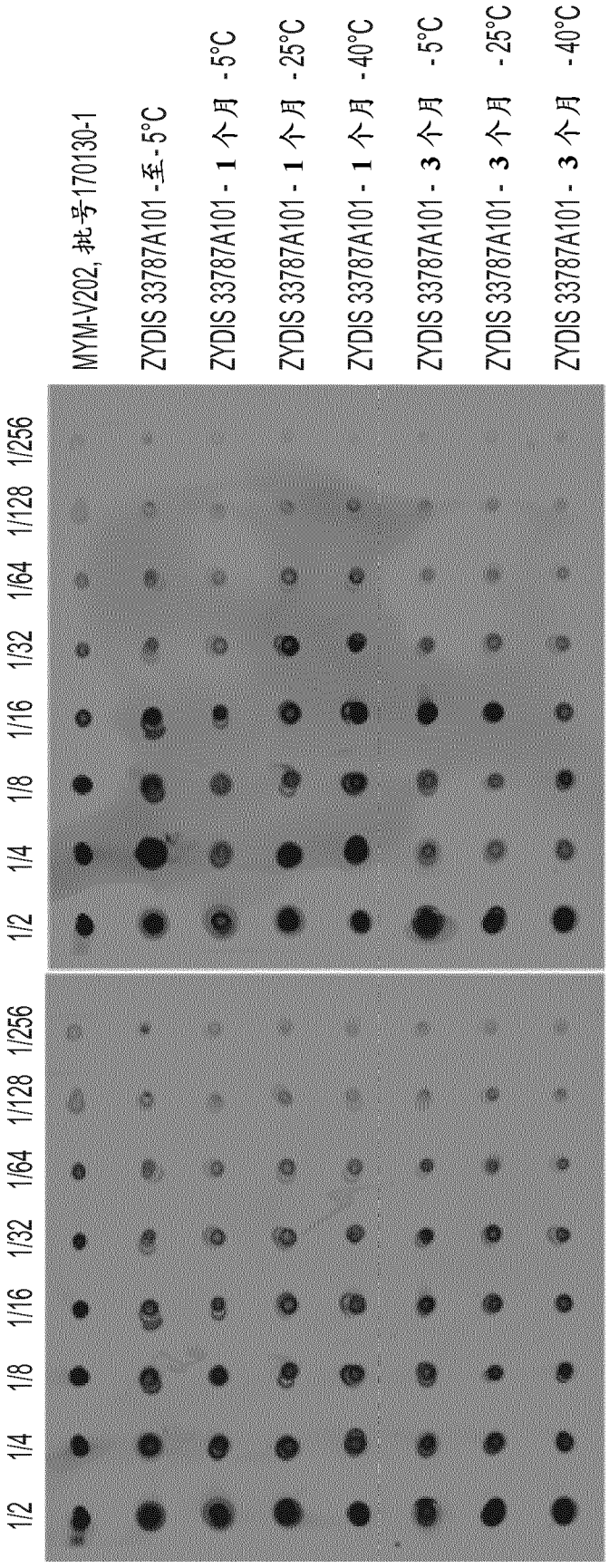
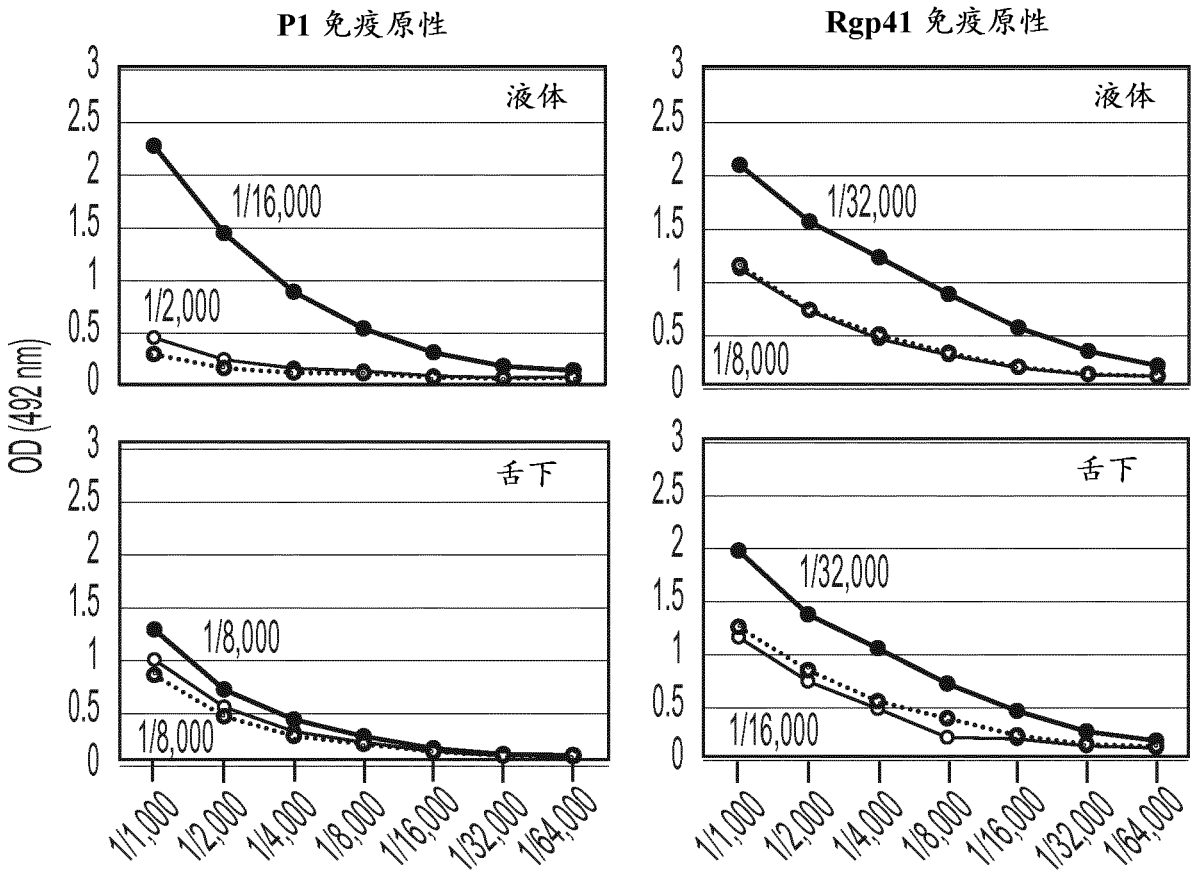

1/2
1/4
1/8
1/16
1/32
1/64
1/128
1/256
rgp41 (兔血清)
+IRDye 680RD 山羊抗兔 IgG
P1 (mAb 2F5)
+IRDye 800CW 山羊抗人 IgG
MYM-V202, 批号170130-1
ZYDIS 3378TA101-至-5°C
ZYDIS 3378TA101 - 1 个月 -5°C
ZYDIS 3378TA101 - 1 个月 -25°C
ZYDIS 3378TA101 - 1 个月 -40°C
ZYDIS 3378TA101 - 3 个月 -5°C
ZYDIS 3378TA101 - 3 个月 -25°C
ZYDIS 3378TA101 - 3 个月 -40°C

图 4



在 4℃下贮存 3 个月的疫苗

在 40℃下贮存 1 个月的疫苗

在 40℃下贮存 3 个月的疫苗

在每个组中，指示了终点抗体滴度。终点滴度对应于生成的 OD 值是免疫前背景＞2 倍的最后一个血清稀释度。

图 5