(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104984352 A
(43)申请公布日 2015.10.21

(21)申请号 201510239248.8

(22)申请日 2006.11.15

(30)优先权数据
60/597280 2005.11.21 US

(62)分案原申请数据
200680051299.7 2006.11.15

(71)申请人 圣诺菲·帕斯图尔有限公司
地址 加拿大安大略省

(72)发明人 S·奇加里尼

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 孔青 李炳爱

(51)Int.Cl.
A61K 47/18(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)
A61K 47/34(2006.01)
A61K 47/32(2006.01)
A61K 47/36(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
C12N 1/04(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
C12N 7/01(2006.01)
C12N 7/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)

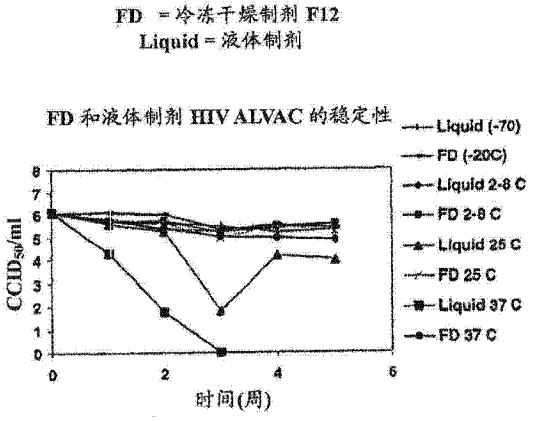
权利要求书3页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

重组病毒的稳定制剂

(57)摘要

本发明涉及用于例如疫苗或其它药物或研究用途的病毒制品，使这种制品稳定的方法和生产这种制品的方法，以及它们的用途，例如作为疫苗或病毒载体。所述制剂包含糖、防腐剂、分散剂、热稳定剂、缓冲剂和最多3种不同类型的氨基酸，这些成分都不会影响冻干产品的结构外观。



CN 104984352 A

1. 一种使病毒保持稳定形式的制剂，所述制剂包含糖、防腐剂、分散剂、热稳定剂、缓冲剂和最多 3 种不同类型的氨基酸。

2. 一种使病毒保持稳定形式的制剂，所述制剂包含糖、防腐剂、分散剂、热稳定剂、缓冲剂和最多 2 种不同类型的氨基酸。

3. 一种使病毒保持稳定形式的制剂，所述制剂包含糖、防腐剂、分散剂、热稳定剂、缓冲剂和单一类型的氨基酸。

4. 权利要求 1-3 中任一项的制剂，其中所述糖是蔗糖或山梨糖醇。

5. 权利要求 1-4 中任一项的制剂，其中所述缓冲剂是三（羟甲基）氨基甲烷。

6. 权利要求 1-5 中任一项的制剂，其中所述分散剂是聚乙烯吡咯烷酮。

7. 权利要求 1-6 中任一项的制剂，其中所述分散剂是聚乙烯吡咯烷酮 40。

8. 权利要求 1-7 中任一项的制剂，其中所述氨基酸选自精氨酸、丝氨酸和甘氨酸。

9. 权利要求 8 的制剂，其中所述氨基酸是精氨酸。

10. 权利要求 8 的制剂，其中所述氨基酸是丝氨酸。

11. 权利要求 8 的制剂，其中所述氨基酸是甘氨酸。

12. 权利要求 8-11 中任一项的制剂，其中所述氨基酸存在于制剂中的浓度约为 100mg/ml 以下。

13. 权利要求 12 的制剂，其中所述氨基酸存在于制剂中的浓度约为 80mg/ml。

14. 权利要求 1-13 中任一项的制剂，所述制剂在 5℃下的溶解时间为 15 秒钟以内。

15. 权利要求 1-13 中任一项的制剂，所述制剂经冻干在约 -20℃下保存约 52 周后原料仍呈光滑的白色药层。

16. 权利要求 1-13 中任一项的制剂，所述制剂在 5℃下的溶解时间为 15 秒钟以内，并且经冻干在约 -20℃下保存约 52 周后原料仍呈光滑的白色药层。

17. 权利要求 1-16 中任一项的制剂，所述制剂还包含重组病毒。

18. 权利要求 17 的制剂，其中所述病毒选自腺病毒、流感病毒、痘病毒和逆转录病毒。

19. 权利要求 18 的制剂，其中所述病毒是痘病毒。

20. 权利要求 19 的制剂，其中所述痘病毒是正痘病毒或禽痘病毒。

21. 权利要求 20 的制剂，其中所述正痘病毒选自痘苗病毒、MVA 和 NYVAC。

22. 权利要求 20 的制剂，其中所述禽痘病毒选自金丝雀痘病毒、家禽痘病毒、TROVAC、ALVAC 和 ALVAC(2)。

23. 权利要求 17-22 中任一项的制剂，其中所述重组病毒在其基因组内含有至少一种编码致病生物或癌症相关抗原的核酸序列。

24. 权利要求 23 的制剂，其中所述致病生物选自芽孢杆菌、博德特氏菌、疏螺旋体、布鲁氏菌、弯曲杆菌、衣原体、梭菌、棒杆菌属、肠杆菌、埃希氏菌、嗜血菌、螺杆菌、克雷伯氏菌、军团菌、李斯特氏菌、分枝杆菌、枝原体、奈瑟氏球菌、诺卡氏菌、巴斯德氏菌、变形菌、立克次氏体、沙门氏菌、志贺氏菌、葡萄球菌、链球菌、弧菌、冠状病毒、CMV、登革热病毒、埃博拉病毒、EBV、肝炎病毒、疱疹病毒、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、乳头瘤病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、RSV、西尼罗病毒、黄热病病毒、曲霉、芽生菌、念珠菌、球孢子菌、隐球菌、组织胞浆菌、球虫、隐孢子虫、内阿米巴、贾第鞭毛虫、利什曼原虫、疟原虫、血吸虫、弓形虫、旋毛虫和锥虫。

25. 权利要求 24 的制剂，其中所述病原体选自炭疽芽孢杆菌、支气管炎博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌、百日咳博德特氏菌、布氏疏螺旋体、沙眼衣原体、肉毒梭菌、白喉杆菌、大肠杆菌、流感嗜血菌、幽门螺杆菌、结核分枝杆菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、淋病奈瑟氏球菌、肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、弗氏志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、霍乱弧菌、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、痘苗病毒、天花病毒、溶组织内阿米巴、兰氏贾第鞭毛虫和鼠弓形虫。

26. 权利要求 23 的制剂，其中所述癌症选自结肠癌、直肠癌、乳腺癌、皮肤癌、肺癌、脑癌和血癌。

27. 权利要求 23 的制剂，其中所述核酸序列编码肿瘤抗原。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述肿瘤抗原选自 gp100、MART-1/Melan A、gp75(TRP-1)、酪氨酸酶、黑素瘤蛋白聚糖、MAGE 家族抗原、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-12、BAGE 家族抗原、GAGE 家族抗原、GAGE-1、GAGE-2、RAGE 家族抗原、RAGE-1、N- 乙酰葡糖胺转移酶 -V、p15、β - 联蛋白、MUM-1、细胞周期蛋白依赖性激酶 -4、p21-ras、BCR-abl、p53、p185HER2/neu、表皮生长因子受体、癌胚抗原 (CEA)、癌相关突变型黏蛋白、MUC-1 基因产物、EB 病毒 EBNA 基因产物、乳头瘤病毒 E7、乳头瘤病毒 E6、前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、独特型抗原、KSA、驱动蛋白 2、HIP-55、TGF β -1 抗凋亡因子、肿瘤蛋白 D52、H1FT、NY-BR-1、NY-BR-62、NY-BR-75、NY-BR-85、NY-BR-87、NY-BR-96、BCY1、BFA4、BCY3、BCZ4、其片段及其衍生物。

29. 一种免疫制剂，所述制剂包含权利要求 17-28 中任一项的制剂。

30. 权利要求 29 的免疫制剂，所述制剂还包含佐剂。

31. 一种人用或动物用疫苗，所述疫苗包含权利要求 17-28 中任一项的制剂。

32. 权利要求 31 的疫苗，所述疫苗还包含佐剂。

33. 权利要求 17-32 中任一项的制剂，其中所述制剂是冷冻干燥或冻干的。

34. 一种治疗或预防疾病的方法，该方法包括用药学上可接受的缓冲液复原权利要求 17-33 中任一项的冻干制剂，然后将所述制剂给予宿主。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述疾病是癌症或是由致病生物所引起的。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述致病生物种类选自芽孢杆菌、博德特氏菌、疏螺旋体、布鲁氏菌、弯曲杆菌、衣原体、梭菌、棒杆菌属、肠杆菌、埃希氏菌、嗜血菌、螺杆菌、克雷伯氏菌、军团菌、李斯特氏菌、分枝杆菌、枝原体、奈瑟氏球菌、诺卡氏菌、巴斯德氏菌、变形菌、立克次氏体、沙门氏菌、志贺氏菌、葡萄球菌、链球菌、弧菌、冠状病毒、CMV、登革热病毒、埃博拉病毒、EBV、肝炎病毒、疱疹病毒、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、乳头瘤病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、RSV、西尼罗病毒、黄热病病毒、曲霉、芽生菌、念珠菌、球孢子菌、隐球菌、组织胞浆菌、球虫、隐孢子虫、内阿米巴、贾第鞭毛虫、利什曼原虫、疟原虫、血吸虫、弓形虫、旋毛虫和锥虫。

37. 权利要求 37 的方法，其中所述病原体选自炭疽芽孢杆菌、支气管炎博德特氏菌、副百日咳博德特氏菌、百日咳博德特氏菌、布氏疏螺旋体、沙眼衣原体、肉毒梭菌、白喉杆菌、大肠杆菌、流感嗜血菌、幽门螺杆菌、结核分枝杆菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、淋病奈瑟氏球菌、肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、弗氏志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、霍乱弧菌、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、痘苗病毒、天花

病毒、溶组织内阿米巴、兰氏贾第鞭毛虫和鼠弓形虫。

38. 权利要求 35 的方法，其中所述癌症选自结肠癌、直肠癌、乳腺癌、皮肤癌、肺癌、脑癌和血癌。

39. 权利要求 35 的方法，其中所述重组病毒在其基因组内含有肿瘤抗原编码核酸。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述肿瘤抗原选自 gp100、MART-1/Melan A、gp75(TRP-1)、酪氨酸酶、黑素瘤蛋白聚糖、MAGE 家族抗原、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6、MAGE-12、BAGE 家族抗原、GAGE 家族抗原、GAGE-1、GAGE-2、RAGE 家族抗原、RAGE-1、N- 乙酰葡糖胺转移酶 -V、p15、β - 联蛋白、MUM-1、细胞周期蛋白依赖性激酶 -4、p21-ras、BCR-abl、p53、p185HER2/neu、表皮生长因子受体、癌胚抗原 (CEA)、癌相关突变型黏蛋白、MUC-1 基因产物、EB 病毒 EBNA 基因产物、乳头瘤病毒 E7、乳头瘤病毒 E6、前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、独特型抗原、KSA、驱动蛋白 2、HIP-55、TGF β -1 抗凋亡因子、肿瘤蛋白 D52、H1FT、NY-BR-1、NY-BR-62、NY-BR-75、NY-BR-85、NY-BR-87、NY-BR-96、BCY1、BFA4、BCY3、BCZ4、其片段及其衍生物。

重组病毒的稳定制剂

本申请为分案申请，原申请的申请日为2006年11月15日，申请号为200680051299.7，发明名称为“重组病毒的稳定制剂”。

发明领域

[0001] 本发明涉及用于例如疫苗或其它药物或研究用途的病毒制品，使这种制品稳定的方法和生产这些制品的方法，以及它们的用途，例如作为疫苗或病毒载体。

发明背景

[0002] 已经知道生产用于疫苗和其它目的的活病毒制品的多种方法。而且还知道为了保持活性而用于实验室或疫苗用途的冷冻、冻干或其它保存活病毒制品的制剂和方法。

[0003] 通常，重组病毒以冷冻干燥小糖丸（freeze-dried pellet）保存，其中含有蔗糖、酪蛋白和/或胶原水解产物的磷酸缓冲生理盐水（PBS）。然后这些小糖丸在药学上可接受的溶液（例如0.4-0.9％ NaCl）中再水化。然而，却存在与这种制剂有关的重大缺点并且为本领域所知。在这些缺点中包括使用了动物源性物质、不完全确定的成分、复杂的制备方法、高成本和不能保持某些所需的病毒特性。

[0004] 本领域需要适于制备稳定的病毒制品以用于免疫制剂和疫苗的制剂。需要提供保持病毒所需特性（包括病毒存活力和感染力）的稳定制剂（stabilizing formulation），即免疫制剂或疫苗。另外，出于对有关动物传播疾病的考虑，本领域需要不是由动物类型产品得到的稳定制剂，还需要提供滴度高、体积小、适于快速冷冻干燥处理的制剂。本申请提供了这样的制剂及其使用方法。

附图简述

[0005] 图1.在不同温度下，对液体制剂与本发明一个实施方案的新的冻干制剂F12(FD)进行的重组病毒制品稳定性比较。在规定时间测定每种病毒制剂的感染滴度（$CCID_{50}$）。

发明概述

[0006] 本发明提供用于保存病毒（例如病毒载体）并且具有各种用途的稳定制剂，包括免疫制剂和疫苗。在一个实施方案中，本发明制剂包含糖、防腐剂、分散剂、热稳定剂、缓冲剂和最多3种不同类型的氨基酸（即1、2或3种不同类型的氨基酸）。在一个实施方案中，本发明制剂包含3种不同类型的氨基酸。在另一个实施方案中，本发明制剂包含2种不同类型的氨基酸。在另一个实施方案中，本发明制剂仅包含一种类型的氨基酸。优选的氨基酸是精氨酸、丙氨酸、丝氨酸或甘氨酸。另外优选的氨基酸是精氨酸、丝氨酸或甘氨酸。将病毒加到稳定制剂中，在所需时间内保持可测量的具体特性（例如存活力、感染力）。优选的制剂在病毒存在的特定条件下保持某些所需的可测量特性，例如有利的外观和溶解时间，下面将予以描述。本发明的其它实施方案从所附说明书、实施例和权利要求书来讲是显而易见的。

发明详述

[0007] 通常，重组病毒（例如禽痘病毒ALVAC）作为冷冻干燥小糖丸保存，其中含有蔗糖、酪蛋白和/或胶原水解产物的磷酸缓冲生理盐水（PBS）。然后这些小糖丸在药学上可接受

的溶液（例如 0.4-0.9% NaCl）中再水化。然而，却存在与这种制剂有关的重大缺点，而且是本领域已知的难以克服的困难。因此，本发明所提供的是如下所述的新的稳定制剂。

[0008] 本发明提供用于稳定地贮藏和保存病毒的制剂，包括用作表达载体的重组病毒、免疫制剂和 / 或疫苗。所述制剂可用于制备、保存和使用这些病毒的方法中，与现有的制剂相比，制备、保存和使用起来较为容易，成本较低而且病毒活性没有显著降低。这些制剂可称为“稳定制剂”，通常包括糖（例如蔗糖或山梨糖醇、海藻糖、蔗糖、甘露醇、乳糖）、防腐剂（可以是糖、氨基酸、其它组分）、分散剂（例如聚乙烯吡咯烷酮 40、葡聚糖、PEG）、热稳定剂（例如尿素）、缓冲剂（例如三（羟甲基）氨基甲烷 (Tris)、磷酸缓冲盐溶液 (PBS)、磷酸钠、乙酸盐、硼酸盐、Hepes、MOPS、PEG) 和一种或多种氨基酸。

[0009] 本发明制剂中优选包括不超过 1、2、3 或 4 种氨基酸。本领域技术人员应当理解的是，在描述组成时提及的氨基酸不包括在制备后加到制剂中的病毒、佐剂或其它组分内的氨基酸或者从病毒、佐剂或其它组分内中释放出的氨基酸。因此，作为制剂组成部分的所述氨基酸在向制剂中加入病毒或佐剂之前就已存在。

[0010] 在最优选的实施方案中，本发明制剂中包括单种氨基酸。在优选的实施方案中，本发明制剂包括精氨酸、丝氨酸或甘氨酸中的至少一种。在更优选的实施方案中，本发明制剂包含单种氨基酸，该氨基酸是精氨酸、丝氨酸或甘氨酸。优选本发明制剂中氨基酸的含量约为 100mg/ml 以下。更优选本发明制剂中氨基酸的含量为约 90-95mg/ml、约 85-90mg/ml、约 80-85mg/ml 或约 80mg/ml。本领域技术人员可得到各种大量的氨基酸。

[0011] 稳定制剂优选作为液体、冷冻干燥制品 (freeze-dried preparation)、冻干制品 (lyophilized preparation) 或其它形式而用于保存病毒。对于液体，优选液体制剂是药物制剂。冻冷干燥制品或冻干制品通常使用液体（例如药学上可接受的载体）复原而被转化为液体形式。药学上可接受的载体可以是例如含有缓冲剂和盐的液体载体（即 PBS）。合适的缓冲剂和盐的实例以及其它类型的药学上可接受的载体是本领域众所周知的。

[0012] 在评价用于保存病毒制品具体制剂的适宜性时，本发明制剂的视觉外观已被确定为适宜性的重要指标。例如，最合适的制剂呈光滑的白色药层或“块”，在冻干并保存在约 -20℃下约 52 周后不会从小瓶的边缘皱缩。较不合适的制剂呈“熔融”、“起泡”或其它畸形形状，并且在贮存后从小瓶边缘皱缩。如以下实验结果所示，光滑的白色药层与较快的溶解时间有关，这是本文所述制剂的另一个所需特性。光滑的白色层块与用于稳定地保存病毒的制剂紧密相关。

[0013] 如上所述，溶解时间是合适制剂的非常重要的特性。优选在病毒制品冻干后，在约 5℃下保存约 52 周后，本发明制剂在药学上可接受的载体（例如 PBS) 中的溶解时间约为 20-25 秒钟、约 15-20 秒钟或优选约 15 秒钟以内。这就为技术人员提供了现场可快速使用的制剂。

[0014] 使病毒在稳定制剂中维持不变的温度是适于保存一段时间后（例如长达约 52 周）维持病毒 / 制剂所需状态（例如通过观察外观、溶解时间、滴度或制品其它特性而确定）的任何温度。制剂通常并最便于保持在约 10℃以下（例如约 5℃）的温度下。在某些情况下，本发明制剂应保持在 -20℃下。

[0015] 对于制剂复原后合适的 pH 是在保存一段时间（例如长达约 52 周）后维持病毒所需状态（例如存活力、感染滴度、溶解时间）的任何 pH。例如，液体制剂理想的 pH 约为 6-9、

6-8.5、6.5-8.5、7-8.5、7.5-8.5、6-8、6.5-8、7-8、7.5-8 或 7-7.5。优选制剂的 pH 约为 7.5。可将液体制剂放置（例如保持或保存）在任何合适的容器中。通常，容器包括玻璃或塑料小瓶或其它贮存容器的形式，或基本上由玻璃或塑料小瓶或其它贮存容器的形式组成，或由玻璃或塑料小瓶或其它贮存容器的形式组成。

[0016] 实施本发明时可使用许多不同的病毒。合适的病毒包括例如腺病毒、虫媒病毒、星状病毒、噬菌体、肠道病毒、胃肠炎病毒、汉坦病毒、柯萨奇病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、疱疹病毒（例如 EB 病毒 (EBV)、巨细胞病毒 (CMV) 和单纯疱疹病毒 (HSV))、流感病毒、诺沃克病毒、脊髓灰质炎病毒、脊椎动物痘病毒科 (Chordopoxviridae)（例如正痘病毒属、痘苗病毒、MVA、NYVAC、禽痘病毒、金丝雀痘病毒、ALVAC、ALVAC(2)、家禽痘病毒 (fowlpox))、弹状病毒、呼肠孤病毒、鼻病毒、轮状病毒、逆转录病毒、杆状病毒科 (Baculoviridae)、杯状病毒科 (Caliciviridae)、花椰菜花叶病毒科 (Caulimoviridae)、冠状病毒科 (Coronaviridae)、丝状病毒科 (Filoviridae)、黄病毒科 (Flaviviridae)、肝 DNA 病毒科 (Hepadnaviridae)、罗达病毒科 (Nodaviridae)、正黏病毒科 (Orthomyxoviridae)、副黏病毒科 (Paramyxoviridae)、乳头多瘤空泡病毒科 (Papovaviridae)、细小病毒科 (Parvoviridae)、藻类 DNA 病毒科 (Phycodnaviridae)、小核糖核酸病毒科 (Picomaviridae) 和披膜病毒科 (Togaviridae) 以及起源于、基于或基本类似于上述病毒或其它合适病毒的经修饰的病毒。用于实施本发明优选的病毒是痘病毒，特别是 ALVAC。本领域已知的其它合适的病毒参见例如 Fields 等，Virology（第 34 版，Lippincott Williams&Wilkins(2001))。

[0017] 在某些实施方案中，重组病毒在其基因组内含有编码抗原或免疫原的核酸序列，因此该病毒可用于免疫制剂或疫苗。术语“重组病毒，，是指不是病毒基因组天然部分的异源基因插入到病毒基因组的任何病毒。免疫制剂是这样一种制剂，即在给予宿主时，产生针对由病毒编码的抗原或免疫原或者对由病毒编码的抗原或免疫原起反应的免疫应答。这种免疫应答对宿主可能有或者没有保护作用，或者可能或不能为宿主提供免疫力。疫苗是引起宿主产生针对由宿主编码的抗原或免疫原或者对由宿主编码的抗原或免疫原起反应的保护性免疫应答的制剂。可用本领域技术人员可采用的多种技术中的任一种来测定免疫应答，这些技术包括但不限于 ELISA、BIACORE、DOT-BLOT、免疫扩散技术。

[0018] 在某些情况下，重组病毒可编码一种或多种肿瘤抗原（“TA”）。肿瘤抗原包括肿瘤相关抗原 (TAA) 和肿瘤特异性抗原 (TSA)，其中癌细胞是抗原的来源。肿瘤相关抗原是在肿瘤细胞表面上表达的量比正常细胞中所观察的量高的抗原，或者是胎儿发育期间在正常细胞中表达的抗原。TSA 是肿瘤细胞独特的抗原，不在正常细胞中表达。肿瘤抗原还包括 TAA 或 TSA、其抗原片段和保持其抗原性的修饰形式。肿瘤抗原通常根据肿瘤抗原的表达模式、功能或遗传来源分为以下五类：肿瘤 / 睾丸 (CT) 抗原（例如 MAGE、NY-ESO-1）；黑素细胞分化抗原（例如 Melan A/MART-1、酪氨酸酶，gp100）；突变抗原（例如 MUM-1、p53、CDK-4）；过量表达的“自身”抗原（例如 HER-2/neu、p53）；和病毒抗原（例如 HPV、EBV)。为了实施本发明，合适的肿瘤抗原是在给予肿瘤抗原的宿主中诱导或提高抗肿瘤免疫应答的任何肿瘤抗原。合适的肿瘤抗原包括例如 gp100(Cox 等，Science，264：716-719(1994))、MART-1/Melan A(Kawakami 等，J.Exp.Med.，180：347-352(1994))、gp75(TRP-1)(Wang 等，J.Exp.Med.，186：1131-1140(1996))、酪氨酸酶 (Wolfel 等，Eur.J.Immunol.，24：759-764(1994)；

WO 200175117 ;WO 200175016 ;WO 200175007)、NY-ESO-1(WO 98/14464 ;WO 99/18206)、黑素瘤蛋白聚糖 (Hellstrom 等, J. Immunol. ,130 :1467-1472(1983))、MAGE 家族抗原 (例如 MAGE-1、2、3、4、6 和 12 ;Van der Bruggen 等, Science,254 :1643-1647(1991) ;美国专利第 6,235,525 号)、BAGE 家族抗原 (Boel 等, Immunity,2 :167-175(1995))、GAGE 家族抗原 (例如 GAGE-1、GAGE-2 ;Van den Eynde 等, J. Exp. Med. ,182 :689-698(1995) ;美国专利第 6,013,765 号)、RAGE 家族抗原 (例如 RAGE-1 ;Gaugler 等, Immunogenetics,44 :323-330(1996) ;美国专利第 5,939,526 号)、N- 乙酰葡糖胺转移酶 -V(Guilloux 等, J. Exp. Med. ,183 :1173-1183(1996))、p15(Robbins 等, J. Immunol. 154 :5944-5950(1995))、β - 联蛋 白 (Robbins 等, J. Exp. Med. ,183 :1185-1192(1996))、MUM-1(Coulie 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,92 :7976-7980(1995))、细胞周期蛋白依赖性激酶 -4(CDK4)(Wolfel 等, Science,269 :1281-1284(1995))、p21-ras(Fossum 等, Int. J. Cancer,56 :40-45(1994))、BCR-abl(Bocchia 等, Blood,85 :2680-2684(1995))、p53(Theobald 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,92 :11993-11997(1995))、p185 HER2/neu(erb-B1 ;Fisk 等, J. Exp. Med. ,181 :2109-2117(1995))、表皮生长因子受体 (EGFR)(Harris 等, Breast Cancer Res. Treat,29 :1-2(1994))、癌胚抗原 (CEA)(Kwong 等, J. Natl. Cancer Inst. ,85 :982-990(1995)、美国专利号 5,756,103、5,274,087、5,571,710、6,071,716、5,698,530、6,045,802、EP 263933、EP 346710 和 EP 784483) ;癌相关突变型黏蛋白 (carcinoma-associated mutated mucin, 例如 MUC-1 基因产物 ;Jerome 等, J. Immunol. ,151 :1654-1662(1993)) ;EBV 的 EBNA 基因产物 (例如 EBNA-1 ;Rickinson 等, Cancer Surveys,13 :53-80(1992)) ;人乳头瘤病毒的 E7、E6 蛋白 (Ressing 等, J. Immunol. ,154 :5934-5943(1995)) ;前列腺特异性抗原 (PSA ;Xue 等, The Prostate,30 :73-78(1997)) ;前列腺特异性膜抗原 (PSMA ;Israeli 等, Cancer Res. ,54 :1807-1811(1994)) ;独特型表位 (idiotypic epitope) 或独特型抗原, 例如免疫球蛋白独特型或 T 细胞受体独特型 (Chen 等, J. Immunol. ,153 :4775-4787(1994)) ;KSA(美国专利第 5,348,887 号)、驱动蛋白 2(Dietz 等, Biochem Biophys Res Commun 2000 年 9 月 7 日 ;275(3) :731-8)、HIP-55、TCF β -1 抗凋亡因子 (Toomey 等, Br J Biomed Sci 2001 ;58(3) :177-83)、肿瘤蛋白 D52(Bryne J. A. 等, Genomics,35 :523-532(1996))、HlFT、NY-BR-1(WO 01/47959)、NY-BR-62、NY-BR-75、NY-BR-85、NY-BR-87, NY-BR-96(Scanlan, M. Serologic and Bioinformatic Approaches to the Identification of Human Tumor Antigens(鉴定人类肿瘤抗原的血清学和生物信息学方法), 载于 Cancer Vaccines 2000, Cancer Research Institute, New York, NY)、BCY1、BFA4、BCA4 和 BFY3, 包括“野生型”(即由天然存在的基因组正常编码的抗原)、修饰形式、突变形式以及其它片段及其衍生物。这些肿瘤抗原的任一种都可单独使用或者与一种或多种其它肿瘤抗原共免疫方案联用。

[0019] 在其它情况下, 重组病毒可编码源自致病生物的抗原或免疫原。示例性的传染病病原体包括细菌、病毒、真菌、寄生物等。具体示例性的病原体包括芽孢杆菌 (Bacillus spp.)(例如炭疽芽孢杆菌 (B. anthracis))、博德特氏菌 (Bordetella spp.)(例如支气管炎博德特氏菌 (B. brochiseptica)、副百日咳博德特氏菌 (B. parapertussis)、百日咳博德特氏菌 (B. pertussis))、疏螺旋体属 (Borellia)(例如布氏疏螺旋体 (B. burgdorferi))、布鲁氏菌 (Brucella spp.)、弯曲杆菌 (Campylobacter spp.)、衣原体 (Chlamydia spp.)(例如沙眼衣原体 (C. trachomatis))、梭菌 (Clostridium spp.)(例

如肉毒梭菌 (Clostridium botulinum))、棒杆菌属 (Corynebacterium)(例如白喉棒杆菌 (C.diphtheria))、肠杆菌 (Enterobacter spp.)、埃希氏菌 (Escherichia spp.)(例如大肠杆菌 (E.coli))、嗜血菌 (Haemophilus spp.)(例如流感嗜血菌 (H.influenzae))、螺杆菌 (Helicobacter spp.)(例如幽门螺杆菌 (H.pylori))、克雷伯氏菌 (Klebsiella spp.)、军团菌 (Legionella spp.)、李斯特氏菌 (Listeria spp.)、分枝杆菌 (Mycobacterium spp.)(例如结核分枝杆菌 (M.tubercolosis))、枝原体 (Mycoplasma spp.)、奈瑟氏球菌 (Neisseria spp.)(例如脑膜炎奈瑟氏球菌 (N.meningitidis)、淋病奈瑟氏球菌 (N.gonnorhoeae))、诺卡氏菌 (Nocardia spp.)、巴斯德氏菌 (Pasteurella spp.)、变形菌 (Proteus spp.)、立克次氏体 (Rickettsia spp.)、沙门氏菌 (Salmonella spp.)(例如肠炎沙门氏菌 (S.entiriditis)、伤寒沙门氏菌 (S.typhi))、志贺氏菌 (Shigella spp.)(例如弗氏志贺氏菌 (Shigella flexneri))、葡萄球菌 (Staphylococcus spp.)(例如金黄色葡萄球菌 (S.aureus))、链球菌 (Streptococcus spp.)(例如肺炎链球菌 (S.pneumoniae))、弧菌 (Vibrio spp.)(例如霍乱弧菌 (V.cholerea))、冠状病毒、CMV、登革热病毒、埃博拉病毒、EBV、肝炎病毒(例如甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎)、疱疹病毒、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、乳头瘤病毒(人)、痘病毒(例如痘苗病毒、天花病毒)、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、RSV、西尼罗病毒、黄热病病毒、曲霉 (Aspergillus spp.)、芽生菌 (Blastomyces spp.)、念珠菌 (Candida spp.)、球孢子菌 (Coccidioides spp.)、隐球菌 (Cryptococcus spp.)、组织胞浆菌 (Histoplasma spp.)、球虫 (Coccidia spp.)、隐孢子虫 (Cryptosporidum spp.)、内阿米巴 (Entamoeba spp.)(例如溶组织内阿米巴 (E.histolytica))、贾第鞭毛虫 (Giardia spp.)(例如兰氏贾第鞭毛虫 (Giardia lamblia))、利什曼原虫 (Leshmania spp.)、疟原虫 (Plasmodium spp.)、血吸虫 (Schistosoma spp.)、弓形虫 (Toxoplasma spp.)(例如鼠弓形虫 (Toxoplasma gondii))、旋毛虫 (Trichinella spp.) 和锥虫 (Trypanosoma spp.) 等等。

[0020] 在某些实施方案中,本发明的免疫原性制剂或疫苗可与一种或多种佐剂联合给予以加强免疫应答。示例性的佐剂见下表 1 :

[0021] 表 1- 免疫佐剂的类型

佐剂类型	一般实例	具体实例/参考文献
1. 凝胶型	氢氧化铝/磷酸铝(“铝佐剂”)	(Aggerbeck 和 Heron,1995)
	磷酸钙	(Relyveld, 1986)
2. 微生物	胞壁酰二肽(MDP)	(Chedid 等，1986)
	细菌外毒素	霍乱毒素(CT)、大肠杆菌不稳定毒素(LT) (Freytag 和 Clements, 1999)
	基于内毒素的佐剂	单磷酰脂质 A (MPL) (Ulrich 和 Myers, 1995)
	其它细菌	CpG 寡核苷酸(Corral 和 Petray, 2000)、BCG 序列(Krieg 等，*Nature*, 374:576))、破伤风类毒素(Rice 等，*J. Immunol.*, 2001, 167: 1558-1565)
3. 颗粒	生物可降解聚合物微球	(Gupta 等，1998)
	免疫刺激性复合物(ISCOM)	(Morein 和 Bengtsson,1999)
	脂质体	(Wassef 等，1994)
4. 油乳化佐剂和基于表面活性剂的佐剂	弗氏不完全佐剂(Freund’s incomplete aduvant)	(Jensen 等，1998)
	微流化乳剂	MF59 (Ott 等，1995)
		SAF (Allison 和 Byars, 1992) (Allison, 1999)
	皂苷	QS-21 (Kensil, 1996)
5. 合成	胞壁酰二肽衍生物	莫拉丁酯(Lederer, 1986) 苏氨酰-MDP (Allison, 1997)
	非离子型嵌段共聚物	L121 (Allison, 1999)
	聚磷腈(PCPP)	(Payne 等，1995)
	合成多核苷酸	Poly A:U、Poly I:C (Johnson, 1994)

[0022] 在下面的实施例中对本发明作进一步的描述。实施例仅用于说明本发明，并不以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0023] 病毒稳定制剂－材料

[0024] 下述实验将使用下列化学试剂、滤膜和小瓶：尿素（批号 101K0040 Sigma）；L-丙氨酸粉（批号 042K0900 Sigma）；MSG（批号 91K0096 Sigma）；L-精氨酸粉（批号 42K0183 Sigma）；EAA（批号 3065605 Gibco）；甘氨酸粉（批号 32K2502 Sigma）；Tris（批号 73378B BioRad）；L-丝氨酸粉（批号 111K0883 Sigma）；D-甘露醇（批号 22K0111 Sigma）；NEAA（批号 3065603 Gibco）；NaCl（BDH批号 12833/M089160）；浓 HCl（批号 299102 BDH）；蔗糖（批号 51K0026）；蔗糖（批号 022K0065 Sigma、批号 K27819853/0076535B Merck kGAA）；PVP_{40}（批

号 120K0117、批号 71K0064 Sigma)；山梨糖醇（批号 51K0005 Sigma、批号 042K01351 Sigma)；谷氨酸（批号 91K0096 Sigma)；小瓶 (BV0030,3ml 白色管形玻璃小瓶)；塞子 (3101820,13mm V-324432/50Gray Butyl Serum 塞子，不含乳胶)；封铅 (CS0001,13mm 一条铝封)；滤膜 0.2μm(批号 476291 Nalgene® AC，批号 M2MN00586 ZapCap®)。编码 HIV 抗原 gp120 的 ALVAC 病毒 vCP307(批号 PX-0246 与批号 PX-0230) 用于下述实验的示例性病毒。

[0025] 方法 -pH

[0026] 由于冷冻干燥和保存等操作可能改变 pH，测定 ALVAC 冷冻干燥制剂的 pH 对于衡量稳定性十分重要。pH 计 (VWR 科技产品 SB301，Symphony) 用标准 pH 缓冲液 (Orion 应用溶液，pH 缓冲剂 7.00、10.01 和 4.01) 校正，它包括了预期的 pH 样品范围。将部分新鲜样品放入试管中，将电极浸入试管中。当数字显示器显出恒定读数时，就记录读数至两位小数。

[0027] 摩尔渗透压浓度

[0028] 摩尔渗透压浓度是水溶液的总溶质浓度。渗透压计测量的是不考虑分子量或离子电荷的溶质颗粒数。本项研究采用依赖于冰点降低以测量摩尔渗透压浓度的 Advanced Micro-Osmometer 3300 型微渗透压计。渗透压计按照生产说明书用 50mOsm/kg 和 850mOsm/kg 标准曲线校正。通过运行 Clinitrol 290 参比溶液来检验标准曲线。将 20μl 样品加到柱塞中，并插入渗透压计样品口以进行测量。当数字显示器显示恒定读数时，记录读数。

[0029] 残留水分

[0030] 残留水分 (RM) 是在最初干燥后保留在冷冻干燥产品中结合水的含量。本项研究所使用的用于测试残留水分的卡尔•费歇尔技术 (Karl Fisher Technique)，通过容量滴定来测定含水量。所测量的是残留水分占干产品总重量的重量百分比。残留水分是稳定性指标，因为保存期间暴露在湿气中会使产品不稳定。欧洲药典（第 V 版）推荐的残留水分为 3％以下。这样的残留水分有助于避免微生物生长并防止化学降解和物理降解。卡尔•费歇尔库仑法 (Karl Fisher Coulometric Method) 与设计用来用电流测定法测定终点的 CA-06 型自动滴定系统 (Mitsubishi 公司）联用的试验方法一起使用。在相对湿度保持在 15％以下的干燥箱内用五氧化二磷进行操作，干风恒流～ 5ml/ 分钟，温度范围 20-25℃。用置于干燥箱内的 Sartorius 天平称重。

[0031] 感染滴度 ($CCID_{50}$)

[0032] $CCID_{50}$ 是用于测定病毒滴度（感染力）的技术，在本研究的情况下，是测定冷冻干燥 ALVAC 制剂溶解后的滴度。滴度用感染 50％给定批次接种的细胞培养物所需要的病毒稀释量表示。该测定法依赖于细胞致死病毒颗粒（能够引起致细胞病变效应 (CPE) 的病毒）的存在和检出。通常在 96 孔板中，使宿主细胞生长至汇合的健康单层培养物，向其中加入等量的病毒稀释液。孵育时，病毒进行复制，释放出子代病毒体，这些病毒体反过来再感染健康细胞。在一段时间内发生致细胞病变效应，记录各孔是否存在 CPE。随着每次稀释孔数目的增加，该方法变得更加准确。本项试验对测定保存期间减毒 ALVAC 病毒活性的损失是至关重要的。

[0033] 按照标准化操作规程 (SOP) 编号 22 PD-039 v.1.0，在 96 孔板上连续滴定 ALVAC 病毒冷冻干燥产品的样品。将 QT35（鹌鹑）细胞悬液加到各 96 孔板中。在 36℃ ±1℃下孵育 6 天后，统计出现致细胞病变效应 (CPE) 的孔。用最小二乘方法计算产品中病毒的浓

度，用 50％感染量 /ml 产品的数值表示。

[0034] 冷冻干燥操作过程

[0035] 冻干法是一种脱水技术，其中通过将湿的物质冷冻后将所得冰在真空下通过升华过程（无需熔融）蒸发，达到干燥状态。这一过程常规分为三个阶段：预冷冻、一级干燥或升华干燥及二级干燥或解吸干燥。基于 ALVAC 表达载体的 24 小时冷冻干燥操作过程按下表 2 概述方法进行：

[0036] 表 2- 冷冻干燥机操作过程

步骤	参数	编程取值
冷冻(3 小时)	加样温度 冷冻结束时的温度	5℃ -40℃
升华干燥(一级干燥) (16 小时，30 分钟)	压力 降至层架温度(shelf temperature)的时间 层架温度 持续时间 升至层架温度的时间	70μBar 1 小时 -17℃ 13 小时 2 小时，30 分钟
解吸干燥(二级干燥) (4 小时)	层架温度 复原有效真空的产品温度	45℃ 25℃
加塞	氮气氛下	氮气氛下

[0037] 对稳定制剂的各种组分，例如氨基酸、糖（蔗糖、山梨糖醇、甘露醇）和聚合物（聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)）对不同稳定制剂的贡献进行了定性和定量评价。组分和浓度见表 3。然后用以下实验评价制剂稳定性：外观、溶解时间、溶解后外观、氢离子浓度负幂指数 (pH)、残留水分和感染力 ($CCID_{50}$)。

[0038] 每种稳定制剂都在层流条件下制备。对于每种制剂，调节各制剂的 pH 至约 7.2 和约 7.4 之间。各制剂经过 0.2μm 聚二氟乙烯 (PVDF) 一次性滤膜过滤、贴标签、指定批号后，在 5℃保存直到冻干。

[0039] 在冷冻干燥前一天，将病毒 ALVAC 粗品（溶于 10mM Tris(pH 9.0) 缓冲溶液）在 30℃ ±2℃水浴中融化。对粗品进行 2 次稀释 (1/2 和 1/6) 以制备 120ml 最终的散装产品 (FBP)。用浓的稳定制剂制备第一稀释液，用稳定制剂与注射用水 (WFI) 按 1 ： 2 稀释制备第二稀释液。

[0040] 准备进行包括许多步骤的冷冻干燥法。首先，用 3ml US 玻璃小瓶在隔离区中装入 0.3ml FBP，每批制剂装 400 个小瓶。第二，将所有小瓶装到 4 个不同层架的托盘中，新配的冷冻干燥稳定制剂 P06 和 P07 用作对照。为了防止挤压，每个盘都位于每个层架的中间，并留有空间以避免层架之间相互接触。将装有温差电偶的小瓶放在冷冻室的前方，以便能够监测产品的温度。最后，进行适当的 24 小时 ALVAC 冻干操作过程（见材料与方法）。

[0041] 运行之后，取出小瓶，盖上 PVC(Poly-Vinyl-Carbon) 塞子并用铝盖 (Alu-Alu cap) 加盖密封。在取出小瓶时，从托盘边缘、中部、前后方观察小瓶冻干块的均匀性。分析

冻干机图表以确保操作过程所进行的每个步骤都没有遇到问题。然后将小瓶保存于 -20℃以备进一步取样和测定。

[0042] 用实时和加速稳定性研究，对制剂对冻干蛋白质稳定性的作用进行了研究。每次实验在不同时间点和不同温度下（-20℃、2-8℃、35-39℃，第 1-6 周、第 8 周、第 12 周、第 26 周和第 52 周）进行，每一批取 5 个样品进行分析。记录每个样品的下列特性：冻干物 (Lyophilizate) 的外观、溶解时间、溶解后的外观、pH 和感染滴度 ($CCID_{50}$)。

[0043] 然后用具有最适特性的制剂进一步进行稳定性研究。每次实验在不同时间点和不同温度下（-20℃、2-8℃、37℃和 45℃，分别在第 0 天、第 3 天、第 7 天、第 11 天、第 14 天、第 21 天、第 25 天、第 28 天、第 35 天、第 56 天、第 84 天、第 182 天和第 364 天）进行，每批取 4-6 个样品进行分析。然后记录每个样品的以下特性：冻干物的外观、溶解时间、溶解后的外观、pH、残留水分和感染滴度 ($CCID_{50}$)。对于对照、F12(n ＝ 6)，在第 45 周时增加额外的观察点。

[0044] 冷冻干燥 ALVAC 制剂 F12 的最终稳定性研究（较早前研究样品的额外时间点），在 23-27℃下，用一套小瓶在第 1 周、第 3 周、第 5 周、第 8 周和第 12 周进行 (n ＝ 6)。然后评价制剂的感染滴度 ($CCID_{50}$)、pH、复原时间、外观和摩尔渗透压浓度。

[0045] 稳定制剂

[0046] 开发出几种新的稳定制剂并进行了试验。每种制剂所包括的组分见表 3。应当理解的是，当将 PVP40 加到制剂中时，要特别注意。搅拌速度在特定时间内应当增加，然后当 PVP40 溶解时应降低。如果速度不增加的话，通常会出现不需要的聚集体。混合的时间和速度取决于所制备的体积，正如本领域技术人员所了解的一样。

[0047] 实验结果

[0048] 冻干物的外观

[0049] 保存于 -20℃和 5℃ 52 周后，对不同制剂冻干物的外观进行评价。第一批实验中制剂 F9、F10、F11 和 F12 冻干块的外观符合所要求的规格（光滑，白色药层，不从小瓶边缘皱缩）。这些所需要的“冻干块”外观规格表明，该制剂能够通过保护病毒和其周围环境避免塌陷或熔融，从而保持病毒的理化完整性。冻干块的塌陷可能由过激的冻干过程或保存条件（例如长期保存或高温）所致。已经确定具有合适冻干块外观的制剂提供适于病毒稳定性的环境。还已经确定的是之前所使用的 20 种必需氨基酸和非必需氨基酸的混合物可用高浓度的 L- 精氨酸、L- 丙氨酸、丝氨酸和 / 或甘氨酸替换而又不影响冻干物的结构外观。

[0050] 其它几种制剂出现起泡 / 熔融，从小瓶边缘皱缩，而且呈不均匀的外观（即不是光滑的白色药层）；就这一点而言，这些因为不符合外观标准而不予采用。如下所述，这种外观与溶解时间不需要的增加有关。这些不被采用制剂的每一种都缺少分散剂（即聚乙烯吡咯烷酮 (PVP40)、山梨糖醇），因此表明这些组分对冻干块结构的重大影响。对于这些出现松散或从小瓶边缘皱缩的制剂，冻干块根据外观标准也不予采用。

[0051] 溶解时间、溶解后的外观、pH 和摩尔渗透压浓度

[0052] 在 -20℃和 5℃下保存 52 周后，与其它在 15 秒钟以内溶解的稳定制剂 (F10-12) 相比，制剂 F9 的溶解时间略有增加。每支小瓶用 1ml NaCl 0.4％复原，手工混合直到整个冻干块溶解。结果表明加入 PVP40 对最终产品的溶解时间有着积极作用。对于保存在胁迫条件 (35-37℃) 下的那些样品，所有制剂的溶解时间都有相当的增加，从 15 秒钟至超过 1

分钟不等。此外，如果冻干块外观出现熔融，则产品粘在小瓶上，使冻干物复原变得困难。

[0053] 对于所有试验条件下的所有制剂，pH 在 7.5±0.5 单位之间时保持稳定。

[0054] 对于制剂 F12，摩尔渗透压浓度范围为 350±100mOsm/kg。

[0055] 残留水分 (RM)

[0056] 制剂 F12 的残留水分结果＜ 3%，符合欧洲药典（第 V 版）的建议。未对其它制剂进行实验。

[0057] 表 4- 残留水分 - 制剂 F12

制剂	样品	水		
		第一轮 CA-03-031	第二轮 CA-03-044	第三轮 CA-03-059
F12	1	1.47	1.19	0.99
	2	1.34	1.20	1.08
	3	1.48	1.25	1.02

[0058] 感染滴度

[0059] 活性下降超过约 10-20%时被视为病毒活性显著下降。所有制剂似乎都在 -20℃和 2-8℃保存 52 周后保持感染滴度不变，同时未观察到明显损失。所有被测制剂与对照相似，证实了该方法的精确性（±0.3log 10$CCID_{50}$/ml）。在胁迫条件下，在 35-37℃下保存整整 8 周时，对照和被测制剂的感染滴度均保持不变。

[0060] 液体制剂与冷冻干燥制剂的稳定性

[0061] 根据上述结果，选择 F12（冷冻干燥）与液体制剂 (ALVAC 的 10mM Tris-HCl 溶液、0.9% NaCl，pH9.0) 进行比较。将这些制剂与“实时”(2-8℃）和在胁迫或加速条件 (23-25℃和 35-39℃）下的制剂进行滴度稳定性比较，并且与对照条件 (-70℃和 -20℃）进行比较。这两种制剂都用相同体积和相同含量的 ALVAC 经澄清的收获物制备。用 $CCID_{50}$ 测定法测定滴度。如图 1 所示，在 2-8℃（以及对照温度 -20℃和 -70℃）下冷冻干燥的 F12 显示与液体制剂相似的滴度，在 25℃和 37℃下，冷冻干燥制剂 F12 的滴度优于液体制剂的滴度。已知事实是 F12 是冷冻干燥制剂，是一种本领域技术人员优选的制剂形式，因此可以得出结论，F12 优于以前可获得的液体制剂。

[0062] 本文所述研究中，分散剂（例如 PVP40 和 / 或山梨糖醇）是保持冷冻干燥制剂外观（即“冻干块”）必不可少的，是所需溶解性质的功能上可预测的成分。另外，显而易见的是以前所使用的 20 种必需氨基酸和非必需氨基酸的混合物可用高浓度的 L- 精氨酸、L- 丙氨酸、丝氨酸和 / 或甘氨酸替换，在维持感染滴度不变化的情况下不会影响冻干物的结构外观。这是尤其重要的，因为简化了制剂制备过程并降低了随之而发生的费用。基于感染滴度数据的结果并不表示各种制剂之间的任何显著差异。所有制剂都能够在 2-8℃ 52 周维持感染滴度不变。

[0063] 虽然按照优选的实施方案对本发明进行了描述，但是要理解的是本领域技术人员可加以改变和修改。因此，所附权利要求书涵盖了所有落入本发明要求保护范围内的这些等同变化。

表 3

定性和定量制剂

制剂	EAA	NEAA	蔗糖	山梨糖醇	MSG	PVP40	Tris	尿素	甘露醇	L-Arg	L-Ala	L-Ser	Gly	5℃下 52 周的溶解时间	外观 -20℃	外观 5℃
对照	40	40	10	10	1	2	1.452	1	0	0	0	0	0	5-12	白色药层光滑冻干块	皱缩或白色药层光滑冻干块
F9	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	0	80	0	0	29	白色药层光滑冻干块	白色药层光滑冻干块
F10	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	80	0	0	0	15	白色药层光滑冻干块	白色药层光滑冻干块
F11	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	0	0	80	0	15	白色药层光滑冻干块	皱缩
F12	0	0	10	10	1	2	1.452	1	0	0	0	0	80	15	白色药层光滑冻干块	白色药层光滑冻干块

FD = 冷冻干燥制剂 F12
Liquid = 液体制剂

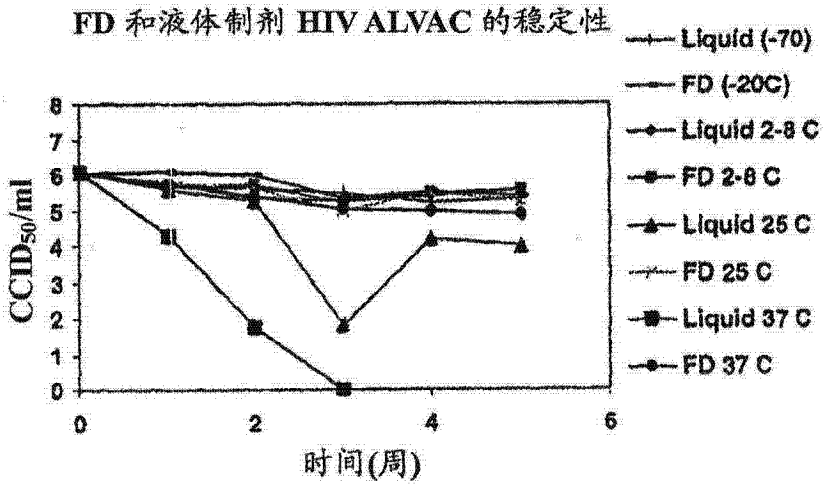


图 1