



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101522217 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 200780037461. 4

A61K 39/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 08. 15

A61K 39/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/13 (2006. 01)

0616306. 7 2006. 08. 16 GB

A61K 39/29 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2009. 04. 07

W0 9819702 A1, 1998. 05. 14, 摘要、权利要求 1, 2、实施例 1, 2.

(86) PCT国际申请的申请数据

P. Laroche, et al.. The Immunogenicity and Safety of a New Combined

PCT/IB2007/003255 2007. 08. 15

Diphtheria, Tetanus and Poliomyelitis

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/020328 EN 2008. 02. 21

Booster Vaccine (Td-eIPV). 《Infection》. 1999, 第 27 卷 49-56.

(73) 专利权人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

审查员 李影

地址 比利时里克森萨特

(72) 发明人 K·德·海德 C·阿托伊斯  
C·范德凯瑟瑞

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 李慧惠 权陆军

(51) Int. Cl.

A61K 39/295 (2006. 01)

A61K 39/05 (2006. 01)

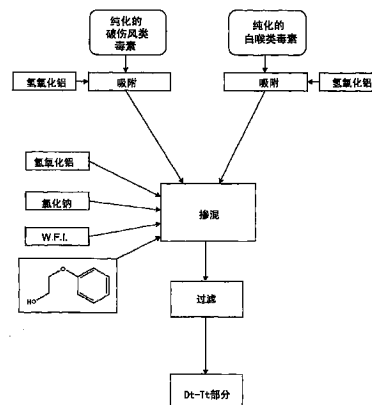
权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

抗原剂量降低的加强免疫疫苗的制造

(57) 摘要

一种制造疫苗的方法, 其中所述疫苗包含白喉类毒素和破伤风类毒素, 所述方法包括以下步骤: 将 (i) 含有白喉类毒素和破伤风类毒素的第一部分与 (ii) 含有破伤风类毒素而没有包含类毒素的第二部分混合。这种安排有利于由相同部分制造婴幼儿和青少年疫苗: 第一部分可具有适合婴幼儿疫苗的白喉: 破伤风比率, 第二部分用于降低白喉类毒素的相对量, 如青少年疫苗中那样。



1. 一种制造疫苗的方法,其中所述疫苗包含白喉类毒素和破伤风类毒素,所述方法包括以下步骤:将(i)含有白喉类毒素和破伤风类毒素的第一部分与(ii)含有破伤风类毒素的第二部分混合,其中(i)中白喉:破伤风Lf单位之比为2:1到3:1,且其中所述第二部分不含其它抗原,无佐剂也没有防腐剂。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述疫苗还包含一种或多种无细胞百日咳抗原。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述疫苗包括灭活的百日咳毒素、丝状血细胞凝集素和百日咳杆菌粘附素。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述灭活的百日咳毒素、丝状血细胞凝集素和百日咳杆菌粘附素的重量比为8:8:3。

5. 如前述权利要求任一项所述的方法,其特征在于,所述疫苗还包含灭活的脊髓灰质炎病毒(IPV)抗原。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述疫苗包含分别来自1型脊髓灰质炎病毒株、2型脊髓灰质炎病毒株和3型脊髓灰质炎病毒株的IPV抗原。

7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述IPV抗原中1型:2型:3型的DU比为5:1:4。

8. 如前述权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述疫苗包含一种或多种铝盐佐剂。

9. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述疫苗包含一种或多种铝盐佐剂。

10. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述疫苗包含氢氧化铝佐剂。

11. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述疫苗包含氢氧化铝佐剂。

12. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述疫苗还包含磷酸铝佐剂。

13. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述疫苗还包含磷酸铝佐剂。

14. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述疫苗不含磷酸铝佐剂。

15. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述疫苗不含磷酸铝佐剂。

16. 如前述权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一部分中的白喉和破伤风类毒素被吸附在氢氧化铝佐剂上。

17. 如前述权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一部分不含汞防腐剂。

18. 如前述权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一部分包含防腐剂。

19. 如权利要求18所述的方法,其特征在于,所述第一部分包含1-羟基-2-苯氧乙烷。

20. 如权利要求19所述的方法,其特征在于,所述第一部分包含5g/l的1-羟基-2-苯氧乙烷。

21. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一部分不含防腐剂。

22. 如前述权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述白喉类毒素和破伤风类毒素以白喉:破伤风Lf单位之比2.5:1存在。

23. 如前述权利要求1-4中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一部分中每100Lf的白喉类毒素包含5-6mg的氯化钠。

24. 如前述权利要求 1 — 4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一部分不含聚山梨酯 80。

25. 如前述权利要求 1 — 4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二部分不含聚山梨酯 80。

26. 如前述权利要求 1 — 4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述疫苗  $Al^{3+}$  含量为 0.25-1.5mg/ml。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其特征在于,所述疫苗  $Al^{3+}$  含量为 0.6mg/ml。

28. 如前述权利要求 1 — 4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括将疫苗包装到容器中的步骤。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其特征在于,所述容器是药瓶。

30. 如权利要求 28 所述的方法,其特征在于,所述容器是针筒。

31. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,每毫升所述疫苗包含以下成分:5Lf 白喉类毒素,10Lf 破伤风类毒素,16  $\mu$ g 灭活的百日咳毒素,16  $\mu$ g 丝状血细胞凝集素,5  $\mu$ g 百日咳杆菌粘附素。

32. 如权利要求 5 所述的方法,其特征在于,每毫升所述疫苗包含以下成分:5Lf 白喉类毒素,10Lf 破伤风类毒素,16  $\mu$ g 灭活的百日咳毒素,16  $\mu$ g 丝状血细胞凝集素,5  $\mu$ g 百日咳杆菌粘附素,80DUMahoney 脊髓灰质炎病毒株,16DUMEF1 脊髓灰质炎病毒株和 64DUSaukett 脊髓灰质炎病毒株。

33. 如前述权利要求 1 — 4 中任一项所述的方法,其特征在于,每毫升所述疫苗中内毒素含量小于 1 个单位。

## 抗原剂量降低的加强免疫疫苗的制造

[0001] 将本文引用的所有文献以全文纳入本文作参考。

### 技术领域

[0002] 本申请属于组合疫苗,即含有来自一种以上病原体的混合免疫原的疫苗的制造领域,使得疫苗的给予可使对象同时免疫对抗一种以上的病原体。

### 背景技术

[0003] 在 2005 年,两种青少年加强免疫疫苗在美国注册为 BOOSTRIX™ 和 ADACEL™[1]。两种疫苗含有白喉类毒素、破伤风类毒素和无细胞百日咳抗原。这两种疫苗的共同特征是,相对于婴幼儿疫苗,它们的抗原剂量较低,例如 BOOSTRIX™ 白喉类毒素含量比 INFANRIX™ 产品低 10 倍,ADACEL™ 比 DAPTACEL™ 低 7.5 倍。而且,抗原组分的比例也不同。具体说,INFANRIX™ 产品中白喉类毒素与破伤风类毒素的比例为 2.5 : 1,而 BOOSTRIX™ 产品中为 1 : 2,DAPTACEL™ 中为 3 : 1 而 ADACEL™ 产品中为 1 : 2.5。

[0004] 因此,这些加强免疫疫苗中白喉类毒素剂量显著降低,包括绝对量和相对于破伤风类毒素含量的相对量。

[0005] 本发明的目的是提供制造这种类型的疫苗组合物的改良方法。

[0006] 发明详述

[0007] 不是将单独部分的白喉和破伤风抗原混合的方法来制造加强免疫疫苗组合物,本发明采用 (i) 包含白喉类毒素和破伤风类毒素的第一部分,和 (ii) 包含破伤风类毒素而没有白喉类毒素的第二部分。这种安排有利于由相同部分制造婴幼儿和青少年疫苗:第一部分可具有适合婴幼儿疫苗的白喉:破伤风比率,第二部分用于降低白喉类毒素的相对量,如青少年疫苗中那样。

[0008] 因此,单一部分将满足疫苗制造商的两种功能,从而简化了制造过程。例如,可制备混合的白喉/破伤风部分并检测其临床释放参数(无菌度、效能、抗原含量等),然后保存备用。如果需要婴幼儿疫苗,则该部分无需进一步调节白喉/破伤风比率即可使用,但是如果需要青少年疫苗则不再需要制备白喉材料。不需要制备或测试或储存单价白喉类毒素部分,从而简化了制造过程。储存混合的白喉/破伤风部分,制造商不难制备婴幼儿疫苗;通过额外储存单价破伤风类毒素部分以补充白喉/类毒素部分,制造商不难在婴幼儿和青少年制剂间进行交换而无需单独的单价白喉类毒素部分,例如取决于健康护理提供者的要求的改变。

[0009] 因此,本发明提供了制造疫苗的方法,其中所述疫苗包含白喉类毒素和破伤风类毒素,所述方法包括以下步骤:将 (i) 含有白喉类毒素和破伤风类毒素的第一部分与 (ii) 含有破伤风类毒素而没有白喉类毒素的第二部分混合。

[0010] 疫苗还可包含抗原,例如无细胞百日咳抗原、灭活的脊髓灰质炎病毒抗原等。这些抗原可以在制造过程中以独立部分的形式使用,和/或它们可以在制造过程开始时掺入第一和/或第二部分中。

[0011] 疫苗可包含佐剂,例如包含一种或多种铝盐(例如氢氧化铝)的佐剂。佐剂可以在制造过程中以独立部分的形式使用,和/或它们可以在制造过程开始之前掺入第一和/或第二部分中。

[0012] 第一水性部分

[0013] 本发明方法中使用的第一部分包含白喉类毒素和破伤风类毒素。

[0014] 第一部分中的白喉和破伤风类毒素优选吸附(更优选完全吸附)在氢氧化铝佐剂上。吸附可通过单独制备类毒素,使它们分别吸附到氢氧化铝佐剂上来实现,然后将这两种吸附的类毒素(任选地与另外的佐剂和任何其他所需组分)进行混合以得到第一部分。

[0015] 第一部分可包含防腐剂,例如 1-羟基-2-苯氧乙烷(也称为“2-羟乙基苯基醚”、“2-苯氧乙醇”、“乙二醇苯基醚”等)。然而,优选该部分不含防腐剂,尤其不含 1-羟基-2-苯氧乙烷。然而,如果第一部分包含 1-羟基-2-苯氧乙烷,其浓度优选为(a)每 100Lf-白喉类毒素 2.5-3.5mg(例如约 3mg),和/或(b)每 100Lf 破伤风类毒素 7-8mg(例如约 7.5mg)。第一部分中可采用 1-羟基-2-苯氧乙烷浓度 3-8g/l(例如 4-6g/l,或约 5g/l)。第一部分不含汞防腐剂(例如柳硫汞)。

[0016] 第一组分中白喉类毒素与破伤风类毒素的比率(以 Lf 单位表示)宜在 2:1 到 3:1 之间,优选约为 2.5:1。

[0017] 第一部分中白喉类毒素与破伤风类毒素的浓度如下,以每毫升表示( $\pm 10\%$ ): 167Lf 白喉类毒素,和 67Lf 破伤风类毒素。作为一种替代方式,类毒素的浓度可以是这些值的分数,前提是相对比例(比率)保持一致,例如简单稀释所得结果。

[0018] 第一部分可包含除类毒素、佐剂和任选的防腐剂之外的其他化合物。具体说,第一部分可包含氯化钠和/或残留的甲醛。氯化钠浓度为每 100Lf 白喉类毒素 5-6mg 氯化钠,优选 8-9mg/ml(例如约 8.5mg/ml)。

[0019] 第一部分优选不含聚山梨酯 80。

[0020] 第二水性部分

[0021] 本发明方法中使用的第二部分包含破伤风类毒素,但没有白喉类毒素。

[0022] 第二部分中的破伤风类毒素吸附在氢氧化铝佐剂上。然而,优选地,破伤风类毒素不含佐剂,尤其是不含铝盐。如果第二部分中的破伤风类毒素吸附在氢氧化铝佐剂上,则本发明方法可包括以下初始步骤:将不含铝的破伤风制剂与氢氧化铝佐剂混合的步骤。在本发明方法中使用之前,混合的佐剂和类毒素静置一段时间以实现吸附。

[0023] 第二部分可包含防腐剂,例如 1-羟基-2-苯氧乙烷。然而,优选该部分不含防腐剂,尤其不含 1-羟基-2-苯氧乙烷。第二部分不含汞防腐剂(例如柳硫汞)。

[0024] 第二部分优选不含聚山梨酯 80。

[0025] 白喉类毒素

[0026] 白喉是由白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*),一种或多革兰氏阳性无孢子需氧菌产生的。该生物体表达原噬菌体编码的 ADP 核糖基化外毒素(“白喉毒素”),(例如用甲醛)处理后得到无毒但保留抗原性的类毒素,能够在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。参考文献 2 的第 13 章更详细地公开了白喉类毒素。优选的白喉类毒素是经过甲醛处理的毒素。用可以补充牛提取物的生长培养基(如 Fenton 培养基,或 Linggoud 和 Fenton 培养基)培养白喉棒杆菌(*C. diphtheriae*),接着进行甲醛处理、超滤和沉淀,从

而获得白喉类毒素。通过包括无菌过滤和 / 或透析的方法处理此类毒素化物质。

[0027] 可用国际单位 (IU) 表示白喉类毒素的量。例如, NIBSC 提供了“吸附的白喉类毒素的第三国际标准 1999”[4,5], 其含有 160IU/ 安瓿。作为 IU 系统的替代形式, “Lf”单位 (“絮凝单位”、“边界絮凝剂量”或“絮凝限值”) 定义为与一个国际单位的抗毒素混合时, 产生最优絮凝混合物的类毒素量 [5]。例如, NIBSC 提供了“白喉类毒素, Plain”[6], 其含有 300Lf/ 安瓿, 也提供了“用于絮凝试验的白喉类毒素的第一国际参比试剂”[7], 其含有 900Lf/ 安瓿。IU 与 Lf 系统间的转换取决于特定的类毒素制剂。

[0028] 白喉棒状杆菌的培养过程中采用牛材料时, 它们应获自未患牛海绵状脑病 (BSE) 或其他传染性海绵状脑病 (TSE) 的来源。

[0029] 破伤风类毒素

[0030] 破伤风是由破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*), 一种革兰氏阳性有芽孢杆菌产生的。该生物体表达内肽酶 (“破伤风毒素”), 经处理后得到无毒但保留抗原性的类毒素, 能够在注射后刺激特异性抗毒素抗体的产生。参考文献 2 的第 27 章更详细地公开了破伤风类毒素。优选的破伤风类毒素是经过甲醛处理的毒素。用生长培养基 (如衍生自牛酪蛋白的 Latham 培养基) 培养破伤风梭菌 (*C. tetani*), 然后进行甲醛处理、超滤和沉淀, 从而获得破伤风类毒素。然后通过包括无菌过滤和 / 或透析的方法处理此物质。

[0031] 可用国际单位 (IU) 表示破伤风类毒素的量。例如, NIBSC 提供了“吸附的破伤风类毒素的第三国际标准 2000”[9,10], 其含有 469IU/ 安瓿。作为 IU 系统的替代形式, “Lf”单位定义为与一个国际单位的抗毒素混合时, 产生最优絮凝混合物的类毒素量 [11]。例如, NIBSC 提供了“用于絮凝试验的破伤风类毒素的第一国际参比试剂”[12], 其含有 1000Lf/ 安瓿。IU 与 Lf 系统间的转换取决于特定的类毒素制剂。

[0032] 破伤风梭菌的培养过程中采用牛材料时, 它们应获自未患牛海绵状脑病 (BSE) 或其他传染性海绵状脑病 (TSE) 的来源。

[0033] 无细胞百日咳抗原

[0034] 百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*) 是一种可引起哮喘的革兰氏阴性无孢子需氧菌。如参考文献 2 的第 21 章中详细记录的那样, 抗百日咳博德特菌的疫苗已存在许多年, 分为细胞和无细胞两类。细胞疫苗包含完整百日咳博德特菌细胞, 经杀死和灭活 (例如通过用福尔马林和 / 或加热处理), 而无细胞疫苗包含特异性纯化的百日咳博德特菌, 从天然杆菌纯化或在重组宿主中表达后纯化。

[0035] 本发明的方法可涉及利用无细胞百日咳抗原来提供包含白喉类毒素、破伤风类毒素和无细胞百日咳抗原的疫苗。

[0036] 通常本发明在单一疫苗中利用一种以上的无细胞百日咳 (aP) 抗原, 例如两种或三种以下公知且很好表征的百日咳博德特菌抗原: (1) 解毒的百日咳毒素 (百日咳类毒素或“PT”); (2) 丝状血细胞凝集素 (“FHA”); (3) 百日咳杆菌粘附素 (pertactin) (也称为“69 千道尔顿外膜蛋白”)。最优选使用所有三种抗原。优选从改良的 Stainer Scholte 液体培养基培养的百日咳博德特菌培养物中分离制备这三种抗原。可从发酵肉汤中 (如通过吸附于羟基磷灰石凝胶) 分离 PT 和 FHA, 但可通过加热处理和絮凝 (如采用氯化钡) 从细胞中提取百日咳杆菌粘附素。可用连续的色谱和 / 或沉淀步骤纯化抗原。可通过疏水性层析、亲和层析和大小排阻层析纯化 PT 和 FHA。可通过离子交换层析、疏水性层析和大小排阻

层析纯化百日咳杆菌粘附素。

[0037] 在用于本发明之前,可用甲醛处理 FHA 和百日咳杆菌粘附素。优选通过甲醛和/或戊二醛处理使 PT 脱毒。作为这种化学脱毒方法的替代形式,PT 可以通过诱变降低了酶活性的突变 PT[14],但优选用化学处理脱毒。

[0038] 可使用的其他无细胞百日咳抗原可包含菌毛(如凝集原 2 和 3)。

[0039] aP 抗原可以未吸附状态使用,但优选它们在使用之前吸附在一种或多种铝盐佐剂。aP 抗原优选吸附在氢氧化铝佐剂上。

[0040] 可将 aP 抗原加入第一和/或第二部分中,或者它们可以是独立的部分添加。如果使用一种以上的 aP 抗原,可将每种 aP 抗原以其单独部分添加,或者可以在使用之前将 aP 抗原可组合成同一部分。

[0041] 优选地,aP 组分基本上不含 1- 羟基-2- 苯氧乙烷。

[0042] 优选地,aP 组分基本上不含汞防腐剂(例如柳硫汞)。

[0043] aP 组分可包括聚山梨酯 80。百日咳组分中聚山梨酯 80 的含量使得该组分任意稀释后能够确保百日咳抗原在最终疫苗产品中处于所需的浓度,聚山梨酯 80 浓度小于 200 微克/毫升,优选小于 100 微克/毫升。通常最终疫苗产品中聚山梨酯浓度约为 70-90 微克/毫升,例如约 80 微克/毫升。

[0044] 在本发明方法中使用之前 aP 组分中聚山梨酯 80 的含量上限优选小于 40 微克/10 微克 FHA。

[0045] 无细胞百日咳抗原的量一般用微克表示。对于 PT、FHA 和百日咳杆菌粘附的组合,优选选择每种抗原的含量使得最终疫苗中 PT : FHA : 百日咳杆菌粘附的比率为 8 : 8 : 2.5。

[0046] 灭活的脊髓灰质炎病毒抗原

[0047] 脊髓灰质炎可能由三种类型的脊髓灰质炎病毒之一引起。这三种类型相似,并且引起相同的症状,但它们的抗原性差异很大,被一种类型感染后并不能保护其免受其它类型的感染。如参考文献 2 第 24 章所述,本发明方法优选采用三种脊髓灰质炎病毒抗原:1 型脊髓灰质炎病毒(如 Mahoney 毒株)、2 型脊髓灰质炎病毒(如 MEF-1 毒株)和 3 型脊髓灰质炎病毒(如 Saukett 毒株)。

[0048] 本发明的方法可涉及利用灭活的脊髓灰质炎病毒(IPV)抗原来提供包含白喉类毒素、破伤风类毒素和灭活的脊髓灰质炎病毒抗原的疫苗。

[0049] 脊髓灰质炎病毒可以在细胞培养物中培养。优选的培养物是 Vero 细胞系,它是从猴肾分离得到的连续细胞系。Vero 细胞可方便地培养成小载体。病毒感染之前和感染期间的 Vero 细胞的培养可涉及使用来自牛的材料,例如小牛血清,使用乳球蛋白水解产物(例如由乳球蛋白酶降解得到的产物)。这些来自牛的材料应从不患有 BSE 或其他 TSE 的来源获取。培养后,可用诸如超滤、渗滤和层析纯化病毒颗粒。给予患者之前,脊髓灰质炎病毒必须被灭活,这可通过在本发明方法中使用该病毒之前用甲醛处理来实现。

[0050] 三种脊髓灰质炎病毒优选单独培养、纯化和灭活,然后合并形成本发明方法中使用的整体混合物。合并的脊髓灰质炎病毒优选在本发明方法中使用之前不吸附在任何佐剂上,但在添加后它们可吸附到疫苗组合物中已经存在的铝佐剂上。

[0051] 可将 IPV 抗原加入第一和/或第二部分中,或者它们可以是独立的部分添加。

[0052] 优选地, IPV 组分基本上不含 1- 羟基 -2- 苯氧乙烷。

[0053] 优选地, IPV 组分基本上不含汞防腐剂 ( 例如柳硫汞 ) 。

[0054] 优选地, IPV 抗原基本上不含聚山梨酯 80, 例如聚山梨酯 80 的含量小于 0.1 微克 / 毫升, 优选不含可检测含量的聚山梨酯 80。然而, 在 IPV 组分的制备过程中已经使用了聚山梨酯 80。

[0055] IPV 抗原可包含痕量的新霉素和 / 或多粘菌素。

[0056] 一般用“DU”单位 ( “D- 抗原单位” [15]) 表示 IPV 抗原的量。优选选择每种单独毒株中的抗原含量, 使得最终疫苗中 1 型 : 2 型 : 3 型 DU 比率为 5 : 1 : 4。

[0057] 其它任选的抗原

[0058] 优选利用本发明来制备三价白喉 - 破伤风 - 百日咳疫苗或制备四价白喉 - 破伤风 - 百日咳 - 脊髓灰质炎病毒疫苗。然而, 除了白喉、破伤风、百日咳和 IPV 抗原之外, 本发明疫苗还可包含一种或多种其他抗原, 例如来自乙型肝炎病毒、来自乙型流感嗜血杆菌、来自肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟氏菌、甲型肝炎病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、轮状病毒、流感病毒等的抗原。

[0059] 佐剂

[0060] 如本文所述, 在本发明方法中使用之前, 抗原可吸附到铝佐剂上 ( 它们是“预先吸附”的 ) 。

[0061] 目前使用的铝佐剂通常称为“氢氧化铝”或“磷酸铝”佐剂。这些名称方便使用, 但它们都不是所代表的实际化合物的准确描述 [ 例如参见参考文献 15 的第 9 章 ]。本发明可采用通常用作佐剂的任何“氢氧化物”或“磷酸盐”佐剂。

[0062] 称为“氢氧化铝”的佐剂一般是羟基氧化铝盐 ( 通常至少部分为晶体 )。羟基氧化铝以分子式  $AlO(OH)$  表示, 与其它铝化合物, 例如氢氧化铝  $Al(OH)_3$  的区别在于红外 (IR) 光谱, 特别是在  $1070\text{cm}^{-1}$  处存在吸收带和在  $3090\text{--}3100\text{cm}^{-1}$  处存在强烈的肩峰 [ 参考文献 15 的第 9 章 ]。半峰高处衍射带的宽度 (WHH) 反映了氢氧化铝佐剂的结晶程度, 结晶不佳的颗粒因晶体尺寸较小而显示更强的谱线增宽。表面积随 WHH 的增加而增加, WHH 值较大的佐剂显示吸附抗原的能力较强。氢氧化铝佐剂呈典型的纤维形态 ( 例如, 电子透射显微照片所见的 )。氢氧化铝佐剂的 pI 通常约 11, 即在生理 pH 下佐剂本身具有表面正电荷。据报道, pH 7.4 时, 氢氧化铝佐剂的吸附能力在每  $\text{mg } Al^{+++}$  1.8-2.6mg 蛋白质之间。

[0063] 称为“磷酸铝”的佐剂一般是羟基磷酸铝, 这些佐剂也常含有少量硫酸根。可通过沉淀获得这些佐剂, 沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代该盐中羟基的程度。羟基磷酸盐中  $PO_4/Al$  摩尔比通常在 0.3-1.2 之间。羟基磷酸盐因存在羟基而有别于严格的  $AlPO_4$ 。例如,  $3164\text{cm}^{-1}$  的 IR 光谱带 ( 例如, 当加热至  $200^\circ\text{C}$  时 ) 表明存在结构性羟基 [ 参考文献 16 的第 9 章 ]。

[0064] 磷酸铝佐剂的  $PO_4/Al^{3+}$  摩尔比通常在 0.3-1.2 之间, 优选在 0.8-1.2 之间, 更优选  $0.95 \pm 0.1$ 。磷酸铝通常是无定形的, 特别是羟基磷酸盐。典型的佐剂是  $PO_4/Al^{3+}$  摩尔比在 0.84-0.92 之间, 含  $0.6\text{mg } Al^{3+}/\text{ml}$  的无定形羟基磷酸铝。磷酸铝通常是颗粒状的 ( 例如, 电子透射显微照片中所见的平板样颗粒 )。这些颗粒在吸附任何抗原后的典型直径是  $0.5\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$  ( 例如, 约  $5\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$  )。据报道, pH7.4 时, 磷酸铝佐剂的吸附能力在每  $\text{mg } Al^{+++}$  0.7-1.5mg 蛋白质之间。



[0065] 磷酸铝的零电荷点 (PZC) 与磷酸根取代羟基的程度成反比, 而该取代程度依据沉淀制备该盐所用的反应条件和反应物浓度而不同。也可通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度 (磷酸根越多 = PZC 酸性越高) 或通过添加例如组氨酸缓冲液 (使得 PZC 更具碱性) 等缓冲液来改变 PZC。本发明所用磷酸铝的 PZC 通常在 4.0–7.0 之间, 更优选在 5.0–6.5 之间, 例如约 5.7。

[0066] 本发明疫苗可具有氢氧化铝佐剂, 或者它们可具有组合的氢氧化铝 / 磷酸铝佐剂。如果同时存在氢氧化铝和磷酸铝, 两种铝盐中  $Al^{3+}$  的含量优选为 3 : 2 (例如 0.6mg/ml  $Al^{3+}$  来自氢氧化铝, 0.4mg/ml  $Al^{3+}$  来自磷酸铝)。

[0067] 青少年加强免疫疫苗的  $Al^{3+}$  含量可能是最佳免疫的关键 [17]。本发明产生的疫苗中总的铝含量 (由  $Al^{3+}$  表示) 优选大于 0.25mg/ml, 但优选小于 1.5mg/ml, 例如约 0.6mg/ml。

[0068] 为了得到所需的最终  $Al^{3+}$  含量, 可以在合并之前在各部分中加入合适的  $Al^{3+}$  含量和 / 或以单独部分的形式加入额外的铝盐, 例如组合第一部分、第二部分和第三部分, 其中所述第三部分含有铝佐剂。

[0069] 本发明方法制备的疫苗

[0070] 在典型的应用中, 本发明的方法将用于提供适合包装、然后适合分配和给药的散装组合疫苗。上述浓度通常是最终包装疫苗中的浓度, 因此散装疫苗中的浓度可能较高 (例如, 需要通过稀释以降至最终浓度)。

[0071] 因此, 本发明的方法可包括将疫苗包装在容器中以供使用的额外步骤。容器可装有单剂量疫苗, 或者它们可装有一剂以上疫苗 (“多剂量”容器), 例如, 10 剂。当采用多剂量药瓶时, 各剂量应在严格无菌条件下用无菌针头和针筒取出, 同时要小心避免污染药瓶的内容物。优选单剂量容器。多个单剂量容器可包装在一起, 例如 10 个单剂量药瓶包装在一起。

[0072] 合适的容器包括药瓶和一次性针筒。它们优选是无菌的。尤其优选包装到针筒内, 使得疫苗准备好给予最终使用者。针筒可配有附连的针头, 但也可以没有针头。

[0073] 可在针筒上提供可剥离的印有内容物批号和有效期的标签 (例如, 条形码) 以方便记录保存。针筒可包括彩色 (例如绿色) 条带以便识别其内容物。针筒内的柱塞优选有制动器以防止柱塞在抽吸过程中意外被拉出。针筒可具有乳胶橡皮帽和 / 或柱塞。针筒通常会具有针帽以在附加针头之前密封针尖, 且该针帽优选由丁基橡胶制成。如果针筒和针头是独立包装的, 则优选为针头配备丁基橡胶护罩。优选灰色丁基橡胶。针筒可具有包括闭锁机构的针尖以固定针头, 例如 Tip-Lok™。合适的针筒是以商品名 Tip-Lok™ 或 Hypak™ PRTC 销售的那些。

[0074] 如果将疫苗包装在药瓶中, 药瓶由塑料材料构成, 或者优选由玻璃构成。药瓶在疫苗加入之前优选无菌。为避免乳胶敏感患者的问题, 优选不含乳胶的密封药瓶。

[0075] 将组合物包装到容器中后, 可将容器密封到用于分销的箱子, 如纸板箱中。箱子上该疫苗的详细情况, 例如商品名、疫苗所含抗原的列表 (例如 “破伤风类毒素、减毒的白喉类毒素和无细胞百日咳疫苗, 吸附的” 和 / 或 “Tdap”)、呈递的容器 (例如 “一次性预填充的 Tip-Lok 注射器” 或 “10×0.5 毫升的单剂量药瓶”)、剂量 (如 “各包含单剂量 0.5 毫升”)、“仅用于青少年”)、保质期、生产商名称等。每个箱子含有一个以上的包装疫苗, 例如

5-10 个包装疫苗,例如 5 个针筒或 10 个药瓶。对于视觉效果,箱子一角的背景颜色可以便于箱子的其余部分,例如绿色箱子上的紫色角。

[0076] 可将疫苗与单页宣传品包装在一起(在同一个箱子中),所述单页宣传品包括疫苗的详细情况如给药说明书、疫苗内所含抗原的详情等。说明书也可包含警告,(例如)准备好肾上腺素溶液以应对疫苗接种后发生过敏反应的情况等。

[0077] 本发明的方法尤其适用于制备具有以下组分的疫苗,以每毫升表示:

[0078]

| 抗原           | 每毫升的浓度*    |
|--------------|------------|
| 白喉类毒素        | 5Lf        |
| 破伤风类毒素       | 10Lf       |
| 灭活的百日咳毒素     | 16 $\mu$ g |
| 丝状血细胞凝集素     | 16 $\mu$ g |
| 百日咳杆菌粘附素     | 5 $\mu$ g  |
| 1 型脊髓灰质炎病毒** | 80DU       |
| 2 型脊髓灰质炎病毒** | 16DU       |
| 3 型脊髓灰质炎病毒** | 64DU       |

[0079] \* 这些剂量以  $\pm 10\%$  表示 \*\* 在 4 价 D-T-aP-IPV 疫苗中

[0080] 因而可计算散装疫苗中各种抗原的浓度,散装疫苗中加入抗原之前所需的稀释,以及散装到最终疫苗任何所需的稀释,因此可执行本发明方法以制备每剂量含有这些浓度的抗原的最终组合疫苗。

[0081] 最终的疫苗优选无菌。

[0082] 最终的疫苗优选无热原,例如每剂量含有  $< 1\text{EU}$  (内毒素单位,  $1\text{EU}$  等于  $0.2$  纳克 FDA 参比标准内毒素 EC-2 “RSE”),优选每剂量  $< 0.1\text{EU}$ 。

[0083] 最终的疫苗优选不含谷蛋白。

[0084] 最终疫苗的 pH 优选为 6-8,例如 6.5-7.5。因此,本发明方法可包括在包装前调整混合疫苗 pH 的步骤。

[0085] 包装疫苗优选是混浊的白色悬浮液。

[0086] 包装疫苗优选保存于  $2^{\circ}\text{C}$  -  $8^{\circ}\text{C}$ 。不应被冷冻。

[0087] 为了控制最终疫苗产品的张力,优选包含生理性盐如钠盐。优选氯化钠 ( $\text{NaCl}$ ),例如等张氯化钠。 $\text{NaCl}$  最终浓度为  $9\text{mg/ml}$  通常是合适的。

[0088] 本发明的方法过程中优选不使用防腐剂,尤其是汞防腐剂(例如柳硫汞)。

[0089] 疫苗的给予

[0090] 本发明方法制备的组合疫苗优选通过注射给予患者。优选肌内注射(例如装入上

臂三角肌内)。理想地应在注射之前清洁注射部位的皮肤并用合适的杀菌剂进行制备。通常注射体积为 0.5 毫升,因此本发明的方法可包括将 0.5 毫升散装组合疫苗中的样品提取和包装到容器中的步骤。给予疫苗 BOOSTRIX 的针头大小通常是 22-25 号针头,长度在 1-1.25 英寸之间 (2.5-3.2 厘米)。

[0091] 如果疫苗包含铝盐佐剂,则应在给药之前剧烈震摇以获得均匀、混浊的白色悬浮液。

[0092] 疫苗优选以加强疫苗的形式给予过去已经接种过白喉和破伤风疫苗的患者,优选也能对抗百日咳。可根据对上述疫苗的免疫学记忆应答来分辨这些患者与普通人群。优选患者在接受本发明疫苗之前,最近的接受白喉和 / 或破伤风疫苗已经经历至少 5 年。因此,优选的接受疫苗的患者年龄在 4-65 岁,例如 11-64 岁,10-18 岁等。

[0093] 本发明制备的疫苗可以与其他疫苗基本上同一时间给予患者 (例如,在同一次对医疗保健专业机构或疫苗接种中心的医疗咨询或就诊期间),例如与脑膜炎球菌偶联疫苗 (例如四价血清群 A-C-W135-Y 疫苗) 和 / 或多价肺炎球菌偶联疫苗等基本上同时给予。这些其他疫苗应用单独的针筒给予,并且在不同于本发明疫苗的注射部位给予。类似地疫苗可与破伤风免疫球蛋白基本上同一时间给予。

[0094] 对于任意特定的抗原,疫苗接种规定 (例如 WHO 规定) 推荐或建议最终疫苗中应存在一定量的抗原。该信息 (例如 10 微克 / 剂量) 可与疫苗剂量体积 (例如 0.5 毫升剂量) 组合以计算该抗原在散装疫苗中所需的浓度。

[0095] 本发明的方法尤其适用于制备每 0.5 毫升剂量具有以下组分的疫苗:

[0096]

| 抗原           | 每剂量的浓度* |
|--------------|---------|
| 白喉类毒素        | 2.5Lf   |
| 破伤风类毒素       | 5Lf     |
| 灭活的百日咳毒素     | 8 µg    |
| 丝状血细胞凝集素     | 8 µg    |
| 百日咳杆菌粘附素     | 2.5 µg  |
| 1 型脊髓灰质炎病毒** | 40DU    |
| 2 型脊髓灰质炎病毒** | 8DU     |
| 3 型脊髓灰质炎病毒** | 32DU    |

[0097] \* 这些剂量以 ±10% 表示 \*\* 在 4- 价 D-T-aP-IPV 疫苗中

[0098] 概述

[0099] 术语“含有”包括“包含”以及“由... 组成”,例如“含有”X 的组合物可仅由 X 组成或可包含其它物质,例如 X+Y。

[0100] 词语“基本上”不排除“完全”，例如“基本上无”Y 的组合物可完全无 Y。该词语“基本上”可视需要从本发明定义中省去。

[0101] 与数值 x 有关的术语“约”表示，例如  $x \pm 10\%$ 。

[0102] 如果使用玻璃容器，相比钠钙玻璃更优选硼硅玻璃。

[0103] 如果组分描述为“吸附”在佐剂上，优选至少 50%（重量%）的抗原被吸附，例如 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或更多。如果组分被完全吸附，则离心后组合物上清液中应不存在可检测的含量。

[0104] 附图简要说明

[0105] 图 1 显示了吸附的白喉和破伤风类毒素的混合疫苗的制备。

[0106] 实施例

[0107] 实施例 1/ 用于青少年加强疫苗的 D-T-aP 疫苗

[0108] 第一部分抗原组分的制备如图 1 所示。它具有以下组成：

[0109]

| 组分             | 每毫升的浓度* |
|----------------|---------|
| 白喉类毒素          | 167Lf   |
| 破伤风类毒素         | 67Lf    |
| 氢氧化铝佐剂         | 6.91mg  |
| 1- 羟基 -2- 苯氧乙烷 | 5mg     |
| 氯化钠            | 8.5mg   |
| pH             | 6.0-6.3 |

[0110] \* 这些剂量以  $\pm 10\%$  表示

[0111] 白喉和破伤风类毒素都完全吸附在佐剂上，该部分样品离心后上清液中不存在可检测的含量。

[0112] 该部分可用于制备婴幼儿 D-T-aP 疫苗，例如每剂量含有 25Lf 白喉类毒素和 10Lf 破伤风类毒素。对于与白喉类似地相比，需要更多破伤风类毒素（以 Lf 单位衡量）的青少年加强免疫剂量，则不能使用该部分。如果该部分稀释至白喉类毒素所需的最终剂量 2.5Lf，则稀释的破伤风类毒素剂量仅为 1Lf，比所需剂量低 5 倍。稀释的  $Al^{3+}$  剂量（ $< 0.1mg$ ）也将低于参考文献 17 所述的最低有效剂量。因此必须调节白喉：破伤风比率和  $Al^{3+}$  剂量。

[0113] 为了调节白喉：破伤风比率，制备包含浓缩的破伤风类毒素（在 3000Lf/ml 到 3000Lf/ml 之间；氯化钠在 8mg/ml 到 9mg/ml 之间；pH 为 7.0-7.8）的第二部分。第二部分不含其他抗原，无佐剂也没有防腐剂。

[0114] 将这两部分抗原与包含额外的铝佐剂（氢氧化铝和磷酸铝）、吸附在氢氧化铝佐剂上的无细胞百日咳抗原和氯化钠合并并稀释，得到具有所需最终浓度和组分比率的散装组合疫苗。该方法可用于制备具有以下组成的疫苗，以每毫升表示：

[0115]

| 组分               | 每毫升的量*                             |
|------------------|------------------------------------|
| 白喉类毒素            | 5Lf                                |
| 破伤风类毒素           | 10Lf                               |
| 灭活的百日咳毒素         | 16 $\mu$ g                         |
| 丝状血细胞凝集素         | 16 $\mu$ g                         |
| 百日咳杆菌粘附素         | 5 $\mu$ g                          |
| Al <sup>3+</sup> | 1mg<br>0.6mg 来自氢氧化铝<br>0.4mg 来自磷酸铝 |

[0116] 将该部分以 0.5 毫升的剂量包装到 Tip-Lok™ 针筒中。疫苗可用于过去已经接受 D-T-P 疫苗的青少年的加强免疫。

[0117] 因此,第一部分可用作婴幼儿和青少年 D-T-P 疫苗的基础。

[0118] 实施例 2/ 不含防腐剂的减毒的铝 D-T-aP 疫苗

[0119] 为了消除实施例 1 制备的疫苗中的防腐剂,采用另一种第一部分。混合步骤期间不加入 1- 羟基-2- 苯氧乙烷。

[0120] 为了降低铝含量,不加入磷酸铝佐剂。

[0121] 包装后,每个不含防腐剂的 0.5 毫升剂量具有以下组成:

[0122]

| 组分               | 每剂量的量*      |
|------------------|-------------|
| 白喉类毒素            | 2.5Lf       |
| 破伤风类毒素           | 5Lf         |
| 灭活的百日咳毒素         | 8 $\mu$ g   |
| 丝状血细胞凝集素         | 8 $\mu$ g   |
| 百日咳杆菌粘附素         | 2.5 $\mu$ g |
| 氯化钠              | 4.5mg       |
| Al <sup>3+</sup> | 0.3mg       |

[0123]

[0124] \* 这些剂量以  $\pm 10\%$  表示

[0125] 实施例 3/D-T-aP-IPV 疫苗

[0126] 为制备 4- 价 D-T-aP-IPV 疫苗,将散装混合的 IPV 加入实施例 1 的方法中,得到具有以下内容物的最终疫苗,以每 0.5 毫升剂量表示:

[0127]

| 组分                   | 每剂量的量*                               |
|----------------------|--------------------------------------|
| 白喉类毒素                | 2.5Lf                                |
| 破伤风类毒素               | 5Lf                                  |
| 灭活的百日咳毒素             | 8 $\mu$ g                            |
| 丝状血细胞凝集素             | 8 $\mu$ g                            |
| 百日咳杆菌粘附素             | 2.5 $\mu$ g                          |
| 1 型脊髓灰质炎病毒 (Mahoney) | 40DU                                 |
| 2 型脊髓灰质炎病毒 (MEF1)    | 8DU                                  |
| 3 型脊髓灰质炎病毒 (Saukett) | 32DU                                 |
| Al <sup>3+</sup>     | 0.5mg<br>0.3mg 来自氢氧化铝<br>0.2mg 来自磷酸铝 |

[0128] \* 这些剂量以  $\pm 10\%$  表示

[0129] 应理解,仅以举例的方式描述了本发明,可在本发明的范围和构思内进行修改。

[0130] 参考文献 (其内容被纳入本文作为参考)

[0131] Broder 等, (2006)MMWR Recomm Rep 55(RR 3):1-34。

[0132] 《疫苗》(Vaccines), (Plotkin 和 Orenstein 编), 第 4 版, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0。

[0133] 国立生物标准与控制研究院 (National Institute for Biological Standards and Control); Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk

[0134] Sesardic 等, (2001)Biologicals 29:107-22。

[0135] NIBSC 代码: 98/560。

[0136] WHO 的免疫系列的免疫学基础模块 1 (Module 1 of WHO's The immunological basis for immunization series) (Galazka)。

[0137] NIBSC 代码: 69/017。

[0138] NIBSC 代码: DIFT。

[0139] 国立生物标准与控制研究院 (National Institute for Biological Standards and Control); Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk

[0140] Sesardic 等, (2002)Biologicals 30:49-68。

[0141] NIBSC 代码: 98/552。

- [0142] WHO 的免疫系列的免疫学基础模块 1 (Module 1 of WHO's The immunological basis for immunization series) (Galazka)。
- [0143] NIBSC 代码 :TEFT。
- [0144] Rappuoli 等, (1991) TIBTECH 9 :232-238。
- [0145] WHO 的免疫系列的免疫学基础模块 6 (Module 6 of WHO's The immunological basis for immunization series) (Robertson)
- [0146] 《疫苗设计 :亚单位和佐剂方法》 (Vaccine Design :The Subunit and Adjuvant Approach) (Powell & Newman 编) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)。
- [0147] Theeten 等, (2005) Vaccine 23 :1515-21。

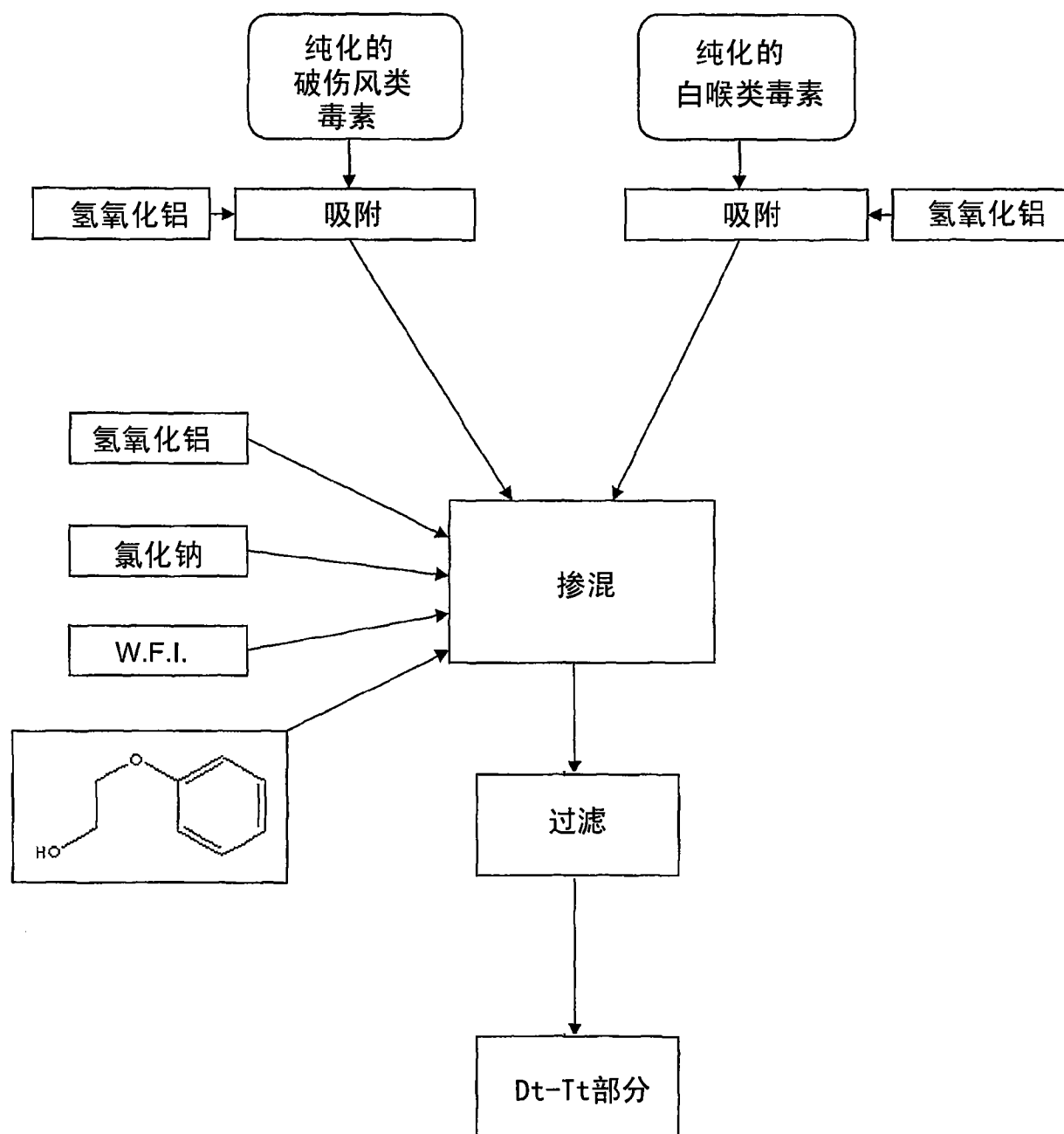


图 1