202309276

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202309276 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：111118644 (22)申請日： 中華民國 106 (2017) 年 08 月 02 日

(51)Int. Cl.： *C12N7/04 (2006.01)* *A61K39/12 (2006.01)*
A61K47/02 (2006.01) *A61K47/18 (2006.01)*
A61K47/20 (2006.01) *A61K47/26 (2006.01)*
A61K47/42 (2017.01)

(30)優先權：2016/08/03 美國 62/370,611

(71)申請人：美商武田疫苗股份有限公司 (美國) TAKEDA VACCINES, INC. (US)
美國

(72)發明人：厄伯 史蒂芬 M. ERB, STEVEN MICHAEL (US)；利文葛德 吉爾 A. LIVENGOOD, JILL ANN (US)；斯傳吉 琳達 M. STRANGE, LINDA MARIE (US)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：15 共 108 頁

(54)名稱

用於與經改良之調配物一起穩定黃病毒的組成物及方法

(57)摘要

本案的具體例關於用於穩定黃病毒的組成物和方法。在某些具體例中，本案揭示的組成物和方法涉及穩定活、減毒或未減毒(譬如活的完整)黃病毒。其他具體例關於用於減少活、減毒或未減毒黃病毒之降解的組成物和方法。其他具體例關於用於在製造、儲存、加速儲存和運輸期間延長活的減毒或未減毒黃病毒之穩定性的經改良調配物。又其他具體例關於本案揭示的組成物在用於可運輸應用和方法之套組的用途。

Embodiments herein relate to compositions and methods for stabilizing Flaviviruses. In certain embodiments, compositions and methods disclosed herein concern stabilizing live, attenuated or unattenuated (e.g. live whole) flaviviruses. Other embodiments relate to compositions and methods for reducing degradation of live, attenuated or unattenuated flaviviruses. Other embodiments relate to improved formulations for prolonging stabilization of live attenuated or unattenuated Flaviviruses during manufacturing, storage, accelerated storage and transport. Yet other embodiments relate to uses of compositions disclosed herein in kits for transportable applications and methods.

20230927
20230927

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於與經改良之調配物一起穩定黃病毒的組成物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR STABILIZING FLAVIVIRUSES WITH IMPROVED FORMULATIONS

【中文】

本案的具體例關於用於穩定黃病毒的組成物和方法。在某些具體例中，本案揭示的組成物和方法涉及穩定活、減毒或未減毒(譬如活的完整)黃病毒。其他具體例關於用於減少活、減毒或未減毒黃病毒之降解的組成物和方法。其他具體例關於用於在製造、儲存、加速儲存和運輸期間延長活的減毒或未減毒黃病毒之穩定性的經改良調配物。又其他具體例關於本案揭示的組成物在用於可運輸應用和方法之套組的用途。

【英文】

Embodiments herein relate to compositions and methods for stabilizing Flaviviruses. In certain embodiments, compositions and methods disclosed herein concern stabilizing live, attenuated or unattenuated (*e.g.* live whole) flaviviruses. Other embodiments relate to compositions and methods for reducing degradation of live, attenuated or unattenuated flaviviruses. Other embodiments relate to improved formulations for prolonging stabilization of live attenuated or unattenuated Flaviviruses during manufacturing, storage, accelerated storage and transport. Yet other embodiments relate to uses of compositions disclosed herein in kits for transportable applications and methods.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於與經改良之調配物一起穩定黃病毒的組成物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR STABILIZING FLAVIVIRUSES WITH IMPROVED FORMULATIONS

【技術領域】

【0001】優先權

本PCT申請案係依照35 USC § 119(e)主張2016年8月03日提申的臨時美國申請號62/370,611的權益，其整體內容係以參照方式併入本案以用於所有目的。

【0002】領域

本案的具體例關於用於穩定黃病毒的組成物和方法。在某些具體例中，本案揭示的組成物和方法涉及穩定活、減毒或未減毒(譬如活的完整)黃病毒。其他具體例關於用於減少活、減毒或未減毒黃病毒之降解的組成物和方法。其他具體例關於用於在製造、儲存、加速儲存和運輸期間延長活的減毒或未減毒黃病毒之穩定性的經改良調配物。又其他具體例關於本案揭示的組成物在用於可運輸應用和方法之套組的用途。

【先前技術】

【0003】背景

已經顯示疫苗和疫苗調配物對於保護人類和動物免

受廣泛眾多疾病，例如由病毒導致的疾病的有害影響是重要的。就病毒疫苗而言的最成功的預防技術之一是以病毒的弱化或減毒株(「活、減毒病毒」)免疫動物或人類。作為免疫性組成物一部分的適當減毒病毒株在免疫後展現出有限的複製，因此不會引起疾病。然而，該減毒病毒的有限病毒複製係足以表現完整的病毒抗原庫，並產生對病毒的強效且持久的免疫回應。於是，隨後暴露於該病毒的致病株時，經免疫的個體發展出疾病的機會就降低了。該等活、減毒病毒疫苗係列為公共衛生中使用的最成功疫苗之一。

【0004】為了使活、減毒病毒疫苗有效，它們必須能夠在免疫後複製，並且在投予一個體之前的製備還有運輸期間，病毒本身必須被保護免於降解，以確保，舉例來說，正確的劑量濃度遞送到該個體。一些疫苗對極端溫度敏感；過熱或意外凍結可能使疫苗失活。在開發中國家，在分發全程維持此「冷鏈(cold chain)」尤為困難。因此，仍然需要改善現有和新開發之活、減毒病毒和活病毒的穩定性，以改善疫苗的製造，以及調配物的運輸和遞送。

【發明內容】

【0005】概要

本案的具體例關於用於穩定黃病毒的組成物和方法。在某些具體例中，本案揭示的組成物和方法涉及穩定活、減毒或未減毒的完整黃病毒。其他具體例關於用於減少活、減毒或未減毒黃病毒之降解的組成物和方法。其他

具體例關於用於在製造(譬如疫苗或抗病毒治療)、儲存和運輸期間延長活的減毒或未減毒黃病毒之穩定性的經改良調配物。又其他具體例關於本案揭示的組成物在用於可運輸應用和方法之套組的用途。

【0006】本案的具體例關於用於穩定活病毒的調配物，其可包括一或多種活黃病毒、一或多種碳水化合物劑、以及一或多種胺基酸或其鹽、酯或醯胺衍生物。根據該等具體例，本案使用的調配物係穩定活黃病毒。在其他具體例中，本案使用的調配物係穩定用於商業用途的活黃病毒。

【0007】在一些具體例中，本案揭示的調配物可包括，但不限於，用於穩定黃病毒的調配物。黃病毒可包括，但不限於，登革熱病毒、西尼羅河病毒(West Nile virus)、蜱傳腦炎病毒、黃熱病病毒、日本腦炎病毒、昆津病毒(Kunjin virus)、聖路易斯腦炎病毒(St. Louis encephalitis virus)、墨萊溪谷腦炎病毒(Murray Valley encephalitis virus)、茲卡病毒(Zika virus)、或其任何相關病毒。

【0008】在一些具體例中，本案揭示的調配物可進一步包括一緩衝劑。根據該等具體例，該緩衝液可包括，但不限於，磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。根據該等具體例，該緩衝液可包括以下至少一鹽：氯化鈉(NaCl)、磷酸一鈉及/或磷酸二鈉(Na_2HPO_4)、氯化鉀(KCl)、和磷酸鉀(KH_2PO_4)。在一些具體例中，本案揭示的調配物緩衝液

可包括具有約10.0 mM至約200.0 mM之濃度的氯化鈉。在其他具體例中，用於穩定活或活、減毒黃病毒的調配物不含氯化鎂($MgCl_2$)。

【0009】在某些具體例中，本案揭示的調配物可進一步包括一或多種蛋白質劑。根據該等具體例，該一或多種蛋白質劑可包括，但不限於，白蛋白、明膠及/或葡聚醣。舉例來說，該白蛋白可包括，但不限於，重組白蛋白、天然白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)或白蛋白樣劑(albumin-like agent)。在其他具體例中，該組成物中的該一或多種蛋白質劑可包括，但不限於，任何血清白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、任何相仿的哺乳動物血清、明膠、葡聚醣、多元醇聚合物、或其等之組合。

【0010】在一些具體例中，本案揭示的調配物中的一或多種蛋白質劑可包括白蛋白，例如具有約0.01%至約2.0% (w/v)之濃度的人類血清白蛋白或重組白蛋白。根據該等具體例，本案揭示的調配物可包括具有約0.01%至約2.0% (w/v)之濃度的人類血清白蛋白(HSA)。

【0011】在其他具體例中，本案揭示的調配物的該一或多種碳水化合物劑可包括，但不限於，海藻糖(譬如D-海藻糖脫水物)、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、幾丁聚醣、甘露醇或其等之組合。根據該等具體例，該一或多種碳水化合物劑濃度可為自約0.5%至約15.0% (w/v)。在某些具體例中，該組成物中的該一或多種碳水化合物劑可包

括海藻糖及/或蔗糖。在其他具體例中，該組成物中的該一或多種碳水化合物劑可包括甘露醇結合海藻糖和蔗糖的至少一者。在其他具體例中，該組成物中的該一或多種碳水化合物劑可包括甘露醇結合海藻糖和蔗糖兩者。在某些具體例中，本案揭示的調配物不包括山梨醇。在其他具體例中，本案揭示的調配物不含泊洛沙姆407 (poloxamer 407)或其他泊洛沙姆。

【0012】在一些具體例中，舉例來說，根據段落[0004]-[00010]任一者的那些具體例，調配物中的該一種或多種胺基酸可包括，但不限於，丙胺酸、精胺酸、甲硫胺酸或其等之組合。在某些具體例中，一種或多種胺基酸可包括胺基酸衍生物或其鹽。在又其他具體例中，一胺基酸衍生物可包括麩胺酸單鈉(MSG)或麩胺酸鉀。在某些具體例中，該一或多種胺基酸係以約0.5 mM至約150.0 mM的濃度存在於調配物中。

【0013】在一些具體例中，例如根據段落[0004]-[00011]任一者的那些具體例，本案揭示的調配物可包括一或多種滲透劑。根據該等具體例，一或多種滲透劑可包括尿素(舉例來說，脲)或其他可取代之劑，舉例來說，己內醯胺、PEG 400或PEG 600。根據該等具體例，該一或多種滲透劑濃度可為約0.01%至約0.5% (w/v)。

【0014】在某些具體例中，例如根據段落[0004]-[00012]任一者的那些具體例，本案揭示的調配物可進一步包括蔗糖或海藻糖、一或多種胺基酸和尿素。根

據該等具體例，該等調配物可進一步包括甘露醇、MSG和尿素的至少一者。在某些具體例中，一調配物可包含溶於緩衝液中的海藻糖和甘露醇。根據該等具體例，該緩衝液可包括PBS、NaCl和白蛋白(譬如HSA)。在某些具體例中，該一或多種胺基酸可包括丙胺酸和甲硫胺酸。在其他具體例中，一調配物可包括蔗糖或海藻糖和尿素。

【0015】在一些具體例中，例如根據段落[0004]-[00013]任一者的那些具體例，一調配物可包括呈任何組合的基底緩衝液、蔗糖、白蛋白、甘露醇、丙胺酸、甲硫胺酸、MSG及/或尿素。根據該等具體例，某些調配物可包括具有約0.01%至約2.0% (w/v)之濃度的重組HSA、具有約1.0%至約15.0% (w/v)之濃度的蔗糖濃度、具有約0.1%至約15.0% (w/v)之濃度的甘露醇濃度、具有約0.5 mM至約100 mM之濃度的丙胺酸、具有約1.0 mM至5.0 mM之濃度的甲硫胺酸濃度、具有約5.0 mM至約100.0 mM之濃度的MSG濃度、以及具有約0.05%至約1.0% (w/v)之濃度的尿素濃度。

【0016】在一些具體例中，本案設想到的調配物可包括重組白蛋白或HSA、海藻糖、甘露醇、丙胺酸、甲硫胺酸、MSG和尿素。

【0017】在一些具體例中，例如根據段落[0004]-[00015]任一者的那些具體例，重組HSA濃度可為約0.01%至約2.0% (w/v)，海藻糖濃度可為約1.0%至約10.0% (w/v)，甘露醇濃度可為約0.1%至約15.0%

(w/v)，丙胺酸可為約0.5 mM至約100 mM，甲硫胺酸濃度可為約1.0 mM至5.0 mM，MSG濃度可約為5.0 mM至約100.0 mM，以及尿素濃度可為約0.05%至約1.0% (w/v)。

【0018】在一些具體例中，例如根據段落[0004]-[00016]任一者的那些具體例，調配物可包括重組HSA、蔗糖、丙胺酸和尿素。在其他具體例中，重組HSA濃度可為約0.01%至約0.2%，蔗糖可為一可為約1.0%至約10.0% (w/v)的濃度，丙胺酸可為約0.5 mM至約100 mM，以及尿素濃度可為約0.05%至約1.0% (w/v)。

【0019】在一些具體例中，相較於不含該等劑之一或多者的組成物，穩定一或多種活黃病毒可包括減少該一或多種活黃病毒在冷凍、冷凍乾燥、於冷藏溫度、於室溫和於約25°C的損失或降解。在一些具體例中，如本案所設想到的穩定一或多種活黃病毒可包括獲得減少10%、20%、30%、40%或50%或更多之活的或活、減毒黃病毒的損失。

【0020】在一些具體例中，本案揭示的方法可包括將包括該活黃病毒的調配物部分地或全部地脫水。在其他具體例中，方法可包括在作為免疫性組成物(譬如疫苗組成物)的一部分投予一個體之前，先將包括該活的或活、減毒黃病毒的調配物部分地或全部地復水。在又其他具體例中，方法可包括冷凍本案揭示的活的或活、減毒黃病毒

組成物。

【0021】其他具體例關於用於穩定活的或活、減毒黃病毒的套組。根據該等具體例，套組可包括本案揭示的任何組成物或調配物以及至少一容器。

【0022】本案揭示的某些具體例涉及活、減毒黃病毒組成物和方法，其係指涉製造能夠減少或預防由本案所設想到的黃病毒的一或多者導致的一醫學病況，例如感染或疾病的發作的免疫性組成物(譬如疫苗)。在某些具體例中，一或多種活、減毒黃病毒可為藥學組成物的一部分，該組成物可包括藥學上可接受的賦形劑或載劑。根據該等具體例，可將該藥學組成物投予一個體，以在投予一個體、及/或製備供投予一個體時，減少由一黃病毒感染導致的病況的發作。個體可為哺乳動物，舉例來說，馴養動物、寵物、家畜、其他動物或人類個體(譬如成人、青少年或兒童)。

【0023】在一些具體例中，本案揭示的組成物可包括重組HSA或HSA、蔗糖、甲硫胺酸和尿素。根據該等具體例，重組HSA可具有介於自約0.01%至約1.0% (w/v)之範圍的濃度，蔗糖可具有介於自約0.5%至約10.0% (w/v)之範圍的濃度，甲硫胺酸可具有介於自約1.0 mM至約5.0 mM之範圍的濃度，以及尿素可具有介於自約0.05%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度。在其他具體例中，具有重組HSA或HSA、蔗糖、甲硫胺酸和尿素的調配物可進一步包括以下一或多者：約5.0 mM至約25.0 mM的

丙胺酸、約1.0%至約15% (w/v)的甘露醇和約1.0 mM至約20.0 mM的麩胺酸單鈉(MSG)。在某些具體例中，此段落[00022]的組成物可於本案揭示的蔗糖基底緩衝液中。

【0024】在其他具體例中，一組成物可包括重組HSA、蔗糖及/或海藻糖、精胺酸和尿素。根據該等具體例，重組HSA或HSA可具有介於自約0.05%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度，蔗糖及/或海藻糖可具有介於自約0.5%至約10.0% (w/v)之範圍的濃度，精胺酸可具有介於自約1.0 mM至約50.0 mM之範圍的濃度，以及尿素可具有介於自約0.01%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度。

【0025】在一些具體例中，一組成物可包括重組HSA、蔗糖及/或海藻糖、MSG (麩胺酸單鈉)和尿素。根據該等具體例，重組HSA或HSA可具有介於自約0.05%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度，蔗糖及/或海藻糖可具有介於自約0.5%至約10.0% (w/v)之範圍的濃度，MSG可具有介於自約1.0 mM至約20.0 mM之範圍的濃度，以及尿素可具有介於自約0.01%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度。

【0026】在一些具體例中，本案揭示的組成物和方法可包括使一或多種活的或活的減毒黃病毒與包括一或多種碳水化合物劑和一或多種胺基酸或其鹽、酯或醯胺衍生物的調配物合併。根據該等方法，本案揭示的調配物可穩定一或多種活的或活、減毒黃病毒免於降解。本案揭示的調配物能夠穩定，舉例來說，黃病毒的任何血清型或病毒

株。在某些具體例中，黃病毒包括包膜病毒，舉例來說，登革熱病毒(譬如血清型1-4)、黃熱病病毒、西尼羅河病毒和茲卡病毒。

【圖式簡單說明】

【0027】下列圖式形成本說明書的一部分，並且被包括以進一步演示本案揭示的一些具體例的某些態樣。藉由參照該等圖示之一或多者結合本案呈現的詳細說明，可更佳地理解某些具體例。

【0028】**圖1**根據本案揭示的一些具體例代表例示在分析各種調配物中的活黃病毒穩定性時進行的實驗獲得的數據的例示性直方圖。

【0029】**圖2**根據本案揭示的一些具體例代表例示在凍乾前、凍乾後以及凍乾並在25°C儲存約5週後分析各種調配物中的活黃病毒穩定性時進行的實驗獲得的數據的例示性長條圖。

【0030】**圖3A**與**3B**在本案揭示的一個具體例代表來自使用各種調配物測試在凍乾後暴露於25°C達5週後的活黃病毒穩定性、於50%散裝藥品物質(BDS藥量)(實心三角形)與當前藥量(CTM藥量)(實心方塊)的log損失(3A)與總log損失(3B)的實驗的數據的示意圖。

【0031】**圖4A**與**4B**在本案揭示的一個具體例代表來自使用各種調配物測試在凍乾後暴露於25°C達5週後的活黃病毒穩定性、於50% BDS (實心三角形)與 CTM (實心方塊)的log損失(4A)與總log損失(4B)的實驗的數據的示

意圖。

【0032】**圖5A**與**5B**在本案揭示的一個具體例代表來自使用各種調配物測試在凍乾後暴露於25°C達5週後的活黃病毒穩定性、於50% BDS (實心三角形)與 CTM (實心方塊)的log損失(5A)與總log損失(5B)的實驗的數據的示意圖。

【0033】**圖6A**與**6B**在本案揭示的一個具體例代表來自使用各種調配物測試在凍乾後暴露於25°C達5週後的活黃病毒穩定性、於50% BDS (實心三角形)與 CTM (實心方塊)的log損失(6A)與總log損失(6B)的實驗的數據的示意圖。

【0034】**圖7A-7D**在本案揭示的一個具體例代表例示單一賦形劑(在含海藻糖的基底緩衝液中)關於液體和凍乾形式的黃病毒病毒效力的效應的示意圖。

【0035】**圖8A-8B**在本案揭示的一個具體例代表例示單一賦形劑(在含蔗糖的基底緩衝液中)關於液體和凍乾形式的黃病毒病毒效力、穩定性損失(**8A**)和凍乾的log損失(**8B**)的示意圖。

【0036】**圖9A-9B**在本案揭示的一個具體例代表例示單一賦形劑(在含蔗糖的基底緩衝液中)關於液體和凍乾形式的黃病毒病毒效力、凍乾的log損失(**9A**)和穩定性損失(**9B**)的示意圖。

【0037】**圖10A-10B**在本案揭示的一個具體例代表來自篩選不同劑、糖(海藻糖或蔗糖)與甘露醇(於基底緩

衝液中)對於病毒穩定性與log損失的效應的數據示意圖。

【0038】**圖11A-11B**在本案揭示的一個具體例是對於黃病毒效力損失的賦形劑篩選數據集的例示性摘要。

【0039】**圖12A-12C**在本案揭示的一個具體例是例示實驗的限定性篩選設計(definitive screening design)(DSD)設計為效價調配的黃病毒調配物在運輸樣本(儲存於25°C的凍乾調配物)的液體、凍乾(儲存於-80°C)與整體穩定性(**12A**)與穩定性趨勢(**12B**)以及各種測試條件下的log下降(**12C**)的例示性長條圖。

【0040】**圖13A-13C**在本案揭示的一個具體例代表關於調配物設計、塊狀物外觀和病毒效價損失的黃病毒血清型(在四價免疫性組成物)的例示性數據。

【0041】**圖14A-14D**在本案揭示的一個具體例代表不同候選四價TDV凍乾疫苗調配物儲存在4°C達39週的例示性直線圖。

【0042】**圖15A-15B**在本案揭示的一個具體例代表來自篩選各種賦形劑組合對於黃病毒效力、凍乾的log損失(**15A**)與穩定性log損失(**15B**)的效應的數據的例示性長條圖。

【實施方式】

例示具體例的說明

定義

【0043】如本案所用，「一(a)」或「一(an)」可意指一個或不止一個物品。

【0044】如本案所用，「約」可意指至多並包括正負百分之五，舉例來說，約100 mM可意指95 mM和至多105 mM。

【0045】如本案所用，「TDV」是指例示性登革熱病毒(譬如活、減毒的登革熱病毒血清型，TDV-1)、登革熱-登革熱嵌合體(dengue-dengue chimeras)、帶有登革熱-2骨架的登革熱嵌合體(dengue chimera with a dengue-2 backbone) (譬如PDK-53或與PDK-53帶有至少95%同源性的其修飾版本等等)。

【0046】如本案所用，「DMEM」可意指杜氏(Dulbecco)修飾的最小基本培養基。

【0047】如本案所用，「PBS」可意指磷酸鹽緩衝鹽水。

【0048】如本案所用，「FBS」可意指胎牛血清。

【0049】如本案所用，「HSA」可意指人類血清白蛋白。

【0050】如本案所用，取決於參考架構，「Lyo」可意指凍乾的或脫水的。

【0051】如本案說明書所用，「個體(subject)」或「多個個體(subjects)」可包括，但不限於，哺乳動物，例如人類(譬如成人、青少年、兒童或嬰兒)或馴養或野生的哺乳動物，舉例來說，狗、貓、其他家養寵物(譬如倉鼠、豚鼠、小鼠、大鼠)、雪貂、兔子、豬、馬、牛、其他牲畜、草原犬、野生嚙齒動物、或動物園動物。

【0052】如本案所用，術語「病毒嵌合體」、「嵌合病毒」、「黃病毒嵌合體」和「嵌合黃病毒」可意指黃病毒嵌合體的構築體。黃病毒嵌合體的例子可包括，但不限於，登革熱病毒、西尼羅河病毒(West Nile virus)、日本腦炎病毒、聖路易斯腦炎病毒(St. Louis encephalitis virus)、蜱傳腦炎病毒、黃熱病病毒、茲卡病毒(Zika virus)及其任何組合。舉例來說，設想到的是登革熱-登革熱嵌合體或黃熱病/登革熱嵌合體。

【0053】如本案所用，術語「登革熱-登革熱嵌合體」可意指至少兩個不同的登革熱病毒血清型構成了該登革熱-登革熱嵌合體。

【0054】如本案所用，「核酸嵌合體」可意指本揭示內容的構築體，包括來自至少兩個不同病毒的核酸序列，舉例來說，本案揭示的嵌合黃病毒或登革熱-登革熱嵌合體可為核酸嵌合體。

【0055】如本案所用，「活黃病毒」可意指野生型活黃病毒(譬如供吾人製造活、減毒黃病毒)。「活、減毒黃病毒」可意指具有突變的活黃病毒、黃病毒嵌合體或為性狀選擇的其他病毒，其中該病毒已經減少到不具感染性和降低的擴增性或無法從一個宿主傳播到另一個宿主，並用於製造免疫性組成物，其中其他性狀可包括降低的致病力(virulence)、安全性、效力或經改良的生長等等。

【0056】詳細說明

在下節中，說明了各種例示性組成物和方法，以詳

述各種具體例。對熟習相關領域技術者極明顯的是，實行各種實施例不需要運用本案概述的所有或甚至一些特定細節，而是可經由常規實驗來修改濃度、時間和其他特定細節。在一些具體例中，熟知的方法或組分未包括在本說明中。

【0057】在某些具體例中，用於免疫性或疫苗調配物的活黃病毒的穩定性已在本案揭示的各種調配物中研究。在某些具體例中，已經證明了增加黃病毒穩定性以減少液體、冷凍、凍乾、部分凍乾和復水的活黃病毒調配物之效價損失的調配物。

【0058】在一些具體例中，本案揭示的調配物可包括，但不限於，用於穩定黃病毒的調配物。黃病毒可包括，但不限於，登革熱病毒、西尼羅河病毒、蜱傳腦炎病毒、黃熱病病毒、日本腦炎病毒、昆津病毒、聖路易斯腦炎病毒、墨萊溪谷腦炎病毒、茲卡病毒、或其任何相關病毒。

【0059】在一些具體例中，本案揭示的調配物可進一步包含一緩衝劑。根據該等具體例，該緩衝液可包括，但不限於，磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。根據該等具體例，該緩衝液可包括以下至少一鹽：氯化鈉(NaCl)、磷酸一鈉及/或磷酸二鈉(Na_2HPO_4)、氯化鉀(KCl)、和磷酸鉀(KH_2PO_4)。在一些具體例中，本案揭示的調配物的緩衝液可包括具有以下濃度的氯化鈉：約10.0 mM至約200.0 mM；或約10 mM至約150 mM；或約15 mM至約75 mM

或約15 mM至約50 mM。在其他具體例中，用於穩定活黃病毒的調配物不含氯化鎂($MgCl_2$)。

【0060】在某些具體例中，本案揭示的調配物可進一步包括一或多種蛋白質劑。根據該等具體例，該一或多種蛋白質劑可包括，但不限於，白蛋白、明膠及/或葡聚醣。舉例來說，該白蛋白可包括，但不限於，重組白蛋白、天然白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)或白蛋白樣試劑。在其他具體例中，該組成物中的該一或多種蛋白質劑可包括，但不限於，任何血清白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、任何相仿的哺乳動物血清、明膠、葡聚醣、多元醇聚合物、或其等之組合。

【0061】在一些具體例中，本案揭示的調配物中的一或多種蛋白質劑可包括具有約0.01%至約2.0% (w/v)；或約0.05%至約1.0% (w/v)；或0.05%至約0.5% (w/v)；或0.075%至0.2% (w/v)；或0.1%至0.3% (w/v)之濃度的白蛋白，例如人類血清白蛋白或重組白蛋白。根據該等具體例，本案揭示的調配物可包括具有約0.01%至約2%之濃度的人類血清白蛋白(HSA)。

【0062】在其他具體例中，本案揭示的調配物的該一或多種碳水化合物劑可包括，但不限於，海藻糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、幾丁聚醣、甘露醇或其等之組合。根據該等具體例，該一或多種碳水化合物劑濃度可自約0.5%至約15.0% (w/v)；或約1.0%至約10%或約5.0%至約8.0%。在某些具體例中，組成物中的一或多種碳水

化合物劑可包括海藻糖及/或蔗糖。在其他具體例中，該組成物中的該一或多種碳水化合物劑可包括甘露醇結合海藻糖和蔗糖的至少一者。在其他具體例中，該組成物中的該一或多種碳水化合物劑可包括甘露醇結合海藻糖和蔗糖兩者。在某些具體例中，本案揭示的調配物的該一或多種碳水化合物劑具有10% (w/v)或更低的碳水化合物濃度。在其他具體例中，本案揭示的調配物的該一或多種碳水化合物劑具有小於10% (w/v)的碳水化合物濃度。在某些具體例中，本案揭示的調配物不包括山梨醇。在其他具體例中，本案揭示的調配物不含泊洛沙姆407或其他泊洛沙姆。

【0063】在一些具體例中，一調配物中的該一或多種胺基酸可包括，但不限於，丙胺酸、精胺酸、甲硫胺酸、或其等之組合。在某些具體例中，一種或多種胺基酸可包括胺基酸衍生物或其鹽。在又其他具體例中，一胺基酸衍生物可包括麩胺酸單鈉(MSG)或麩胺酸鉀。在某些具體例中，該一或多種胺基酸係以約0.5 mM至約150.0 mM；或約0.5 mM至100 mM；或約1 mM至約50 mM或約1.0 mM至約15.0 mM或約2.5 mM至10 mM的濃度存在於調配物中。

【0064】在一些具體例中，例如根據段落[0004]-[00011]任一者的那些具體例，本案揭示的調配物可包括一或多種滲透劑。根據該等具體例，一或多種滲透劑可包括尿素(舉例來說，脲)或其他可取代之劑，舉例來

說，己內醯胺、PEG 400或PEG 600。根據該等具體例，該一或多種滲透劑濃度可為約0.01%至約1.0% (w/v)；或約0.01%至約0.5% (w/v)；或約0.05%至約0.5% (w/v)或約0.075%至約0.4% (w/v)或約0.125% (w/v)。

【0065】在某些具體例中，本案揭示的調配物可進一步包括蔗糖或海藻糖、一或多種胺基酸和尿素。根據該等具體例，該等調配物可進一步包括甘露醇、MSG和尿素的至少一者。在某些具體例中，一調配物可包含溶於緩衝液中的海藻糖和甘露醇。根據該等具體例，該緩衝液可包括PBS、NaCl和白蛋白(譬如HSA)。在某些具體例中，該一種或多種胺基酸可包括丙胺酸和甲硫胺酸。在其他具體例中，一調配物可包括蔗糖和尿素。

【0066】在某些具體例中，黃病毒調配物可包括，但不限於，一或多種活黃病毒、緩衝液、一或多種胺基酸、和一或多種碳水化合物劑。舉例來說，本案揭示的免疫性組成物和疫苗調配物可包括具有以下濃度的緩衝液：約1.0至30.0 mM的磷酸鹽緩衝液、約1.0至30.0的HEPES緩衝液、約1.0至30.0的組胺酸緩衝液、約1.0至30.0的Tris緩衝液，有或無鹽及海藻糖、蔗糖或其等之組合。其他例示性的免疫性組成物和疫苗調配物包括pH約7.2、帶有約10.0至約100 mM氯化鈉之約1.0至30.0 mM磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)，見下表1。

表1：免疫性組成物的例示性調配物

編號	糖	緩衝液	NaCl

1	海藻糖(10%)+0.1%HSA	10 mM 磷酸鹽緩衝液(pH:7.2)	-
2		10 mM 磷酸鹽緩衝液(pH:7.2)	50 mM
3		10 mM HEPES 緩衝液(pH:7.2)	-
4		10 mM HEPES 緩衝液(pH:7.2)	50 mM
5		10 mM 組胺酸緩衝液(pH:7.2)	-
6		10 mM 組胺酸緩衝液(pH:7.2)	50 mM
7		10 mM Tris 緩衝液(pH:7.2)	-
8		10 mM Tris 緩衝液 pH:7.2)	50 mM
9	蔗糖(10%)+0.1% HSA	10 mM 磷酸鹽緩衝液(pH:7.2)	-
10		10 mM 磷酸鹽緩衝液(pH:7.2)	50 mM
11		10 mM HEPES 緩衝液(pH:7.2)	-
12		10 mM HEPES 緩衝液(pH:7.2)	50 mM
13		10 mM 組胺酸緩衝液(pH:7.2)	-
14		10 mM 組胺酸緩衝液(pH:7.2)	50 mM
15		10 mM Tris 緩衝液(pH:7.2)	-
16		10 mM Tris 緩衝液(pH:7.2)	50 mM
17	FTA(15% 海藻糖+0.1%HSA+ % Pluronic F127®)	10 mM 磷酸鹽緩衝液(pH:7.4)	137 mM

【0067】在其他具體例中，一調配物可包括呈任何組合的基底緩衝液、蔗糖、白蛋白、甘露醇、丙胺酸、甲

硫胺酸、MSG及/或尿素。根據該等具體例，某些調配物可包括具有約0.01%至約2.0% (w/v)或約0.05%至約1.0% (w/v)之濃度的重組HSA、具有約1.0 %至約10% (w/v)或小於10% (w/v)之濃度的蔗糖濃度、具有約0.5%至約15.0% (w/v)之濃度的甘露醇濃度、具有約0.5 mM至約100 mM或約5.0 mM至約50 mM之濃度的丙胺酸、具有約1.0 mM至5.0 mM或約1.5 mM至約3.0 mM之濃度的甲硫胺酸濃度、具有約5.0 mM至約100.0 mM之濃度的MSG濃度，以及具有約0.1%至約1.0% (w/v)或約0.1%至約0.5% (w/v)之濃度的尿素濃度。

【0068】在一些具體例中，本案設想到的調配物可包括重組白蛋白或HSA、海藻糖、甘露醇、丙胺酸、甲硫胺酸、MSG和尿素。根據該等具體例，重組HSA濃度可為約0.01%至約2.0% (w/v)或約0.05至約1.0%，海藻糖濃度可為約1.0%至約15.0% (w/v)或約2.5 %至小於10%，甘露醇濃度可為約0.1%至約10.0% (w/v)，丙胺酸可為約1.0 mM至約50 mM或約5 mM至約25 mM，甲硫胺酸濃度可為約1.0 mM至約5 mM，MSG濃度可為約1.0 mM至約20.0 mM，以及尿素濃度可為約0.05%至約0.5% (w/v)。

【0069】在某些具體例中，本案揭示的調配物可包括重組HSA、蔗糖、丙胺酸和尿素。在其他具體例中，重組HSA濃度可為約0.01%至約2.0% (w/v)或約0.05%至約0.5% (w/v)，蔗糖可為約1.0%至約10%或約5%的濃

度，丙胺酸濃度可為約1.0 mM至約50 mM，以及尿素濃度可為約0.05%至約0.5% (w/v)。

【0070】在一些具體例中，相較於不含該等劑之一或多者的組成物，穩定一或多種活黃病毒可包括減少該一或多種活黃病毒在冷凍、冷凍乾燥、於冷藏溫度、於室溫和於約25°C的損失或降解。在一些具體例中，在藉由本案揭示的組成物和方法調配時，如本案所設想到的穩定一或多種活黃病毒可包括獲得減少10%、20%、30%、40%或50%或更多之活的或活、減毒黃病毒的損失。

【0071】在一些具體例中，本案揭示的方法可包括將包括該活黃病毒的調配物部分地或全部地脫水。在其他具體例中，方法可包括在作為免疫性組成物(譬如疫苗組成物)的一部分投予一個體之前，先將包括該活的或活、減毒黃病毒的調配物部分地或全部地復水。在又其他具體例中，方法可包括冷凍本案揭示的活的或活、減毒黃病毒組成物。

【0072】本案揭示的某些具體例涉及活、減毒黃病毒組成物和方法，其係指涉製造能夠減少或預防由本案所設想到的黃病毒的一或多者導致的醫學病況，例如感染或疾病的發作的免疫性組成物(譬如疫苗)。在某些具體例中，一或多種活、減毒黃病毒可為藥學組成物的一部分，該組成物可包括藥學上可接受的賦形劑或載劑。根據該等具體例，可將該藥學組成物投予一個體，以在投予一個體、及/或製備供投予一個體時，減少由一黃病毒感染導

致的病況的發作。個體可為哺乳動物，舉例來說，馴養動物、寵物、家畜、其他動物或人類個體(譬如成人、青少年或兒童)。

【0073】在一些具體例中，本案揭示的組成物可包括重組HSA或HSA、蔗糖、甲硫胺酸和尿素。根據該等具體例，重組HSA可具有介於自約0.05%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度，蔗糖可具有介於自約0.5%至約10.0% (w/v)之範圍的濃度，甲硫胺酸可具有介於自約1.0 mM至約5.0 mM之範圍的濃度，以及尿素可具有介於自約0.05%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度。在其他具體例中，具有重組HSA或HSA、蔗糖、甲硫胺酸和尿素的調配物可進一步包括以下一或多者：約5.0 mM至約25.0 mM的丙胺酸、約1.0%至約15% (w/v)的甘露醇和約1.0 mM至約20.0 mM的麩胺酸單鈉(MSG)。在某些具體例中，此段落[00072]的組成物可於本案揭示的蔗糖基底緩衝液中。

【0074】在其他具體例中，一組成物可包括重組HSA、蔗糖及/或海藻糖、精胺酸和尿素。根據該等具體例，重組HSA或HSA可具有介於自約0.05%至約1.0% (w/v)之範圍的濃度，蔗糖及/或海藻糖可具有介於自約0.5%至約10.0% (w/v)之範圍的濃度，精胺酸可具有介於自約1.0 mM至約50.0 mM之範圍的濃度，以及尿素可具有介於自約0.01%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度。

【0075】在一些具體例中，一組成物可包括重組HSA、蔗糖及/或海藻糖、MSG(麩胺酸單鈉)和尿素。根

據該等具體例，重組HSA或HSA可具有介於自約0.05%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度，蔗糖及/或海藻糖可具有介於自約0.5%至約10.0% (w/v)之範圍的濃度，MSG可具有介於自約1.0 mM至約20.0 mM之範圍的濃度以及尿素可具有介於自約0.01%至約0.5% (w/v)之範圍的濃度。

【0076】在一些具體例中，本案揭示的組成物和方法可包括使一或多種活的或活、減毒黃病毒與包括一或多種碳水化合物劑和一或多種胺基酸或其鹽、酯或醯胺衍生物的調配物合併。根據該等方法，本案揭示的調配物可穩定一或多種活的或活、減毒黃病毒免於降解。本案揭示的調配物能夠穩定，舉例來說，黃病毒的任何血清型或病毒株。在某些具體例中，黃病毒包括包膜病毒，舉例來說，登革熱病毒(譬如血清型1-4)、黃熱病病毒、西尼羅河病毒和茲卡病毒。

【0077】在其他具體例中，本案揭示的組成物可包括置於緩衝液中的黃病毒、尿素和一或多種胺基酸，其可包括，但不限於，丙胺酸、精胺酸、甲硫胺酸或其等之組合，以及一或多種碳水化合物劑，其可包括，但不限於，蔗糖、海藻糖及/或甘露醇的至少一者。本案揭示的某些組成物亦可包括鹽或鹽溶液。根據該等具體例，該等黃病毒調配物可用於在約-80°C至約40°C或以上的活的黃病毒或活的減毒黃病毒的液體、冷凍或凍乾儲存，而不會顯著損失該組成物的病毒效價。舉例來說，可使用本案揭示的調配物實現在4°C和25°C的長期儲存。在某些具體例中，

本案設想到的組成物可部分地或全部地脫水及/或水合。

【0078】在一些具體例中，本案所設想到受益於本揭示內容的組成物和調配物的活、黃病毒可包括，但不限於，登革熱病毒、西尼羅河病毒、蜱傳腦炎病毒、黃熱病病毒、日本腦炎病毒、昆津病毒、聖路易斯腦炎病毒、墨萊溪谷腦炎病毒、茲卡病毒、或其任何相關病毒。根據該等具體例，用於疫苗的活的、黃病毒或活、減毒黃病毒可在各種溫度下儲存，其中本案揭示的調配物藉由，舉例來說，減少該調配物中黃病毒之降解，例如效價損失來增加該調配物的穩定性。

【0079】本案揭示的一些具體例涉及用於在一組成物中保存黃病毒效價的組成物、方法和用途，以更精確地遞送活黃病毒或活、減毒的黃病毒免疫性組成物。

【0080】在某些具體例中，本案揭示的組成物可用於製備用於投予一對其有需要之個體的疫苗組成物的方法。在某些具體例中，提供了針對黃病毒感染或其併發症的免疫性組成物。舉例來說，本案揭示的組成物可用以製造疫苗或免疫性組成物，其中尋求經改良的儲存條件和減少的黃病毒降解。在其他具體例中，可將一或多種或所有登革熱病毒血清型製成本案揭示的免疫性組成物，以減少黃病毒的降解或保留病毒效價，以更準確地遞送已知量的黃病毒至一個體。在某些具體例中，當合併時，免疫性組成物可包括多價疫苗組成物(譬如二價、三價和四價)，以更準確地賦予被多於一個黃病毒物種或病毒株感染的同時

保護。在某些具體例中，黃病毒可包括活黃病毒及/或活、減毒黃病毒。在其他具體例中，黃病毒或不同黃病毒或嵌合體的多於一個血清型或病毒株可在免疫性組成物中合併。根據該等具體例，本案揭示的組成物可提供穩定化調配物，以更準確地遞送針對黃病毒的免疫性組成物，其中活病毒的運輸和儲存存活率係經改善。在某些組成物中，活、減毒黃病毒可包括編碼來自2或更多種不同黃病毒，例如嵌合體的一或多種蛋白質的核酸。在其他具體例中，本案揭示的免疫性組成物和調配物可包括一或多種登革熱血清型，稱作TDV-1 (譬如登革熱血清型1)、TDV-2 (譬如登革熱血清型2)、TDV-3 (譬如登革熱血清型3)、和TDV-4 (譬如登革熱血清型4)、及其等之組合。任何登革病毒構築體或活的減毒登革熱病毒可藉由本案揭示的調配物穩定。

【0081】在一些具體例中，本案提供的活、減毒登革熱病毒嵌合體可含有一種登革熱病毒(譬如登革熱-2病毒)的非結構蛋白質基因、或其等效物，以及至少一第二黃病毒的該結構蛋白質基因或其免疫性部分的一或多者。舉例來說，某些具體例將登革熱-登革熱嵌合體視為單-、二-、三-或四價調配物。

【0082】在其他具體例中，活、減毒黃病毒可包括登革熱嵌合體或任何黃病毒嵌合體，舉例來說，登革熱-茲卡病毒嵌合體或登革熱-黃熱病嵌合體或任何其他黃病毒嵌合體。

【0083】在某些具體例中，本案所設想到的活、減毒黃病毒或黃病毒嵌合體可調配成一藥學組成物，其中該藥學組成物可單獨投予或與其他免疫劑合併投予，及/或可用於製備欲投予至一個體的疫苗組成物。在某些具體例中，可使用本案揭示的組成物將二價、三價或四價登革熱病毒組成物調配成一藥學組成物，以減少該調配物降解，舉例來說，在運輸期間。根據該等具體例，黃病毒可凍乾在本案揭示的任何調配物中，並在室溫下運輸，而不會顯著損失效價(參見實施例的一些例示性方法)。

【0084】本案的具體例涉及減少或預防活、減毒黃病毒之降解及/或失活的方法和組成物。根據該等具體例，某些組成物可包括減少活黃病毒及/或活、減毒黃病毒之降解及/或失活的組分的組合。本案的其他具體例涉及能夠增強該等黃病毒穩定性的劑的組合。本案的又其他組成物和方法係指涉降低對較低溫度的需求(譬如冷藏或冷凍儲存)，同時增加水性及/或重構的活黃病毒或活、減毒黃病毒的保質期。

【0085】根據該等具體例，一或多種活的或活、減毒黃病毒可與一或多種胺基酸和一或多種碳水化合物合併。在某些具體例中，本案揭示的黃病毒調配物包括至少三個組分：以PBS為基底的緩衝液或其他緩衝液和尿素。在其他具體例中，可將一鹽劑加至該等組成物，以增強該調配物的緩衝能力或其他性質。

【0086】一些具體例涉及用於減少活黃病毒或活、

減毒黃病毒失活的方法，該方法包括，但不限於，使一或多種黃病毒與能夠減少本案揭示的黃病毒失活的組成物合併，其中該組成物減少了黃病毒的失活。根據該等具體例，該活黃病毒可包括特定的黃病毒，例如該等具有與包膜黃病毒類似之特徵者，例如登革熱病毒血清型，具有類似於黃病毒之遺傳構成、結構和非結構蛋白質佈局及/或二級結構或等等的其他黃病毒，例如登革熱病毒、茲卡病毒和黃熱病病毒。舉例來說，該等調配物能夠在諸如包殼(encapsidation)、製造、運輸和投予該調配的免疫性組成物至一個體等等的特定過程期間減少黃病毒的降解。黃病毒共享幾個共同特徵，例如共同的大小(40-65 nm)、對稱性(包膜，二十面體核鞘)、核酸(約10,000-11,000個鹼基的正義、單股RNA)。設想的到任何黃病毒或RNA包膜病毒可藉由本案揭示的組成物來穩定。

【0087】在某些具體例中，設想到用於本案組成物的碳水化合物劑可包括，但不限於，蔗糖、果糖、半乳糖、海藻糖、甘露醇或其他類似的碳水化合物。在其他具體例中，設想到用於本案揭示的組成物和調配物的胺基酸或其衍生物包括，但不限於，丙胺酸、精胺酸、甲硫胺酸、麩胺酸鹽、麩胺酸單鈉(MSG)或其鹽、酯或醯胺衍生物。在再其他具體例中，用於本案揭示的組成物和調配物的蛋白質劑包括，但不限於，血清白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)、白蛋白的重組形式、牛血清白蛋白(BSA)、胎牛血清(FBS)、明膠、葡聚醣、多元醇聚合物、或其等

之組合。在一些具體例中，該蛋白質劑包含濃度為特定免疫性組成物之自約0.1%至約2.0%的白蛋白。

【0088】在某些具體例中，本案揭示的調配物和組成物可包括磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)基底緩衝液，連同氯化鈉(NaCl)、磷酸一鈉及/或磷酸二鈉(Na_2HPO_4)的至少一者。在一些具體例中，該基底緩衝液亦可包括氯化鉀(KCl)及/或磷酸鉀(KH_2PO_4)。在其他具體例中，緩衝液，舉例來說，基底緩衝液可包括濃度為約10.0 mM至約200.0 mM的氯化鈉。

【0089】在某些具體例中，本案揭示的組成物可用於將活的或活、減毒黃病毒凍乾及/或復水；運輸處於冷凍至室溫之各種溫度及其他儲存特徵下的黃病毒，並具改良之穩定性。本案所設想到的組成物可在各種儲存溫度下、在加工和純化期間、在運輸和遞送期間及在凍融循環期間增加活的或活、減毒黃病毒之穩定性及/或減少活的或活、減毒黃病毒之失活及/或降解。

【0090】在某些具體例中，本案揭示的組成物可部分地或全部地脫水或水合。再者，本案揭示的組成物可在活的黃病毒或活、減毒黃病毒組成物的凍乾期間和之後使用(參見下表2)。根據該等具體例，組成物可為20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、或95%或更多地脫水。本案所述組成物能夠增加水性或復水黃病毒的保質期。根據該等具體例，本案揭示的組成物可在廣大範

圍的溫度，例如室溫、零下溫度、高溫(譬如自-80°C至40°C及以上)，在凍乾或液體/冷凍條件下增加活的黃病毒或活、減毒黃病毒的穩定性。在其他具體例中，比起未在由基底緩衝液(譬如以PBS為基底的緩衝液)、一或多種碳水化合物劑、和一或多種胺基酸構成之至少一組成物中調配的活、減毒黃病毒組成物，本案揭示的組成物可增加活的黃病毒或活、減毒黃病毒2倍、4倍、10倍或更多的穩定性。

表2：例示性凍乾參數。

	冷凍			初次/二次乾燥		最終
步驟	1	2	3	1	2	1
保質溫度(°C)	-45	-45	-45	-37	+25	4
斜率(°C/min)	-	1.7	-	0.1	0.1	1.0
時間(min)	-	120	120	2400	360	保持
真空(mT)	-	-	50	50	50	50

【0091】在某些具體例中，本案所設想到的組成物可在各種溫度(譬如，約20°C至約25°C或甚至高達40°C)或冷藏溫度(譬如，約0°至約10°C或至多20°C)減少水合活黃病毒的失活及/或降解，超過24小時。在一些具體例中，本案揭示的組成物可保持90%或更高的黃病毒的穩定性達24小時或更久。此外，本案所設想到的調配物和組成物可在至少2、至少3、至少4、至少5、至少6和更多的凍融循環期間減少水合黃病毒的失活。其他組成物和方法涉及能夠在冷藏溫度(譬如約0°C至約10°C)減少水合活黃病毒或活、減毒黃病毒的失活，達約24小時至約26週或更久的調配物和組成物。

【0092】又其他方法涉及使用調配物和組成物讓黃病毒效價損失減少50%或更多，舉例來說，在凍乾後及/或在一定時間後及/或在暴露於一定溫度後。在某些具體例中，本案揭示的方法提供了能夠在凍乾後5、或6或更多週的時間和暴露於25°C溫度下，減少黃病毒效價的損失，相較於無本案揭示之該等組成物的組成物或調配物。

【0093】在某些態樣中，調配物可包括水解明膠，代替血清白蛋白作為蛋白質劑。然而，在某些調配物中，可由於各種原因排除明膠，包括它是動物產物的事實。其他考量在於明膠可能在免疫化兒童和成人導致過敏反應，並且可能是疫苗相關不良事件的原因。此外，明膠可能源自牛或豬的骨頭和脊髓材料。該等來源可能包括外來物，並引起安全問題。此外，白蛋白可從人體中收集，這也帶來引進不安全外來物的潛在風險。因此，某些組成物涉及使用對活的減毒或未減毒黃病毒具有同等穩定效應的動物副產物以外之劑。

【0094】相較於先前技術的那些調配物和組成物，本案的具體例揭示了增強活、減毒病毒組成物的穩定性及/或降低變質或減少過敏反應機會的調配物和組成物。本案揭示的某些組成物提供在40°C或約40°C下高達1天、高達2天、高達4天和大於6週的水性病毒穩定性。本案揭示的某些調配物和組成物在室溫或約室溫(譬如，25°C)穩定黃病毒高達1天至約12週或更久。本案揭示的組成物可提供活黃病毒從，舉例來說，冷凍及/或解凍、及/或高

溫的增多之保護。在某些具體例中，本案揭示的組成物可在室溫條件(譬如，約25°C)穩定脫水活、減毒病毒產物，減少其變質及/或防止其失活。在其他具體例中，本案所設想到的調配物和組成物可在約25°C或高達40°C或約40°C穩定水性活、減毒病毒產物，減少其變質及/或防止其失活。本案揭示的組成物和方法可促進在已開發和未開發地區的病毒疫苗的儲存、分佈、遞送和投予。

【0095】熟習本領域技術者將認知到，本案的組成物或調配物關於未減毒或藉由任何方法減毒的病毒，包括，但不限於，細胞培養物繼代、重配、在感染性選殖體中併入突變、反向遺傳學、插入、缺失、其他重組DNA或RNA操縱。此外，熟習本領域技術者將認知到，其他具體例關於經工程化以表現任何其他蛋白質或黃病毒RNA的病毒，包括，但不限於，重組黃病毒。此類病毒可用作感染性疾病的疫苗、治療腫瘤病況的疫苗、或引入表現蛋白質或RNA (譬如，基因療法、反義療法、核酶療法或小型抑制性RNA療法)以治療病症的病毒。

藥學組成物

【0096】本案的一些具體例關於呈水性或凍乾形式的活、減毒黃病毒的藥學組成物。熟習本領域技術者將基於本揭示內容認知到，改善本案揭示之藥學組成物的熱病毒穩定性並防止凍融失活的調配物可改良液體、粉末狀、冷凍乾燥或凍乾的產品，並且可藉由本領域已知方法製備。在重構後，此類經穩定的疫苗調配物和免疫性組成物

可藉由各種途徑投予，包括，但不限於，皮內投藥、皮下投藥、肌內投藥、鼻內投藥、肺部投藥或口服投藥。在其他具體例中，設想的到用以投予本案揭示的任何藥學組成物的遞送裝置。根據該等具體例，用於疫苗遞送的各種裝置在本領域是已知的，包括，但不限於，注射器和針頭注射、分叉針管投藥、藉由皮內貼劑或幫浦的投藥、皮內無針噴射遞送(皮內等等)、皮內顆粒遞送、或氣溶膠粉末遞送。

【0097】在某些具體例中，組成物可被描述為通常包括生理上可接受的緩衝液。熟習本領域技術者認知到，發現以PBS為基底的緩衝液和緩衝液系統對本案揭示的黃病毒調配物和組成物具有意想不到的穩定效應。此外，熟習本領域技術者認知到，將鹽濃度調至接近生理位準(譬如，生理鹽水或0.15 M總鹽份)對於組成物的腸胃外投藥可能是最佳的，以防止注射部位的細胞損傷及/或疼痛。熟習本領域技術者還將認知到，隨著碳水化合物濃度增加，可降低鹽濃度，以維持調配物的等效滲透壓和滲透壓。在某些具體例中，預想的到pH大於6.0至約pH 10的緩衝介質。在其他具體例中，預想的到pH大於6.8至約8.0的緩衝介質。

【0098】本案的具體例提供了將免疫性組成物和疫苗調配物以一適用於體內投藥的生物相容形式投予一個體。「適用於體內投予的生物相容形式」是指欲投予的活性劑的一形式(譬如，活、減毒黃病毒組成物)，其中任何

毒性效應被該活性劑的治療效果所超過。投予一治療活性量的治療組成物係定義為有效實現所欲結果所需的劑量達一段時間的量。舉例來說，一化合物的一治療活性量可根據諸如該個體的疾病狀態、年齡、性別、和體重之因素、以及調配物在該個體引發所欲回應的能力而變化。可調整劑量方案以提供最佳治療回應。

【0099】活性劑，例如疫苗，可以適宜的載劑或稀釋劑投予一個體，該載體或稀釋劑係與該劑共同投予。本案所用的術語「藥學上可接受的載劑」意圖包括稀釋劑，例如生理鹽水和水性緩衝溶液。該活性劑亦可腸胃外或腹膜內投藥。適用於注射的藥學組成物可藉由本領域已知的方式投予。舉例來說，可使用無菌水溶液(水溶性)或分散液和用於臨時製備無菌注射溶液或分散液的無菌粉末。在所有情況下，組成物和調配物可為無菌的並可為可容易地從注射器排出之程度的流體。

【0100】在常規的儲存和使用條件下，該等製劑可含有防止微生物生長的防腐劑。可進一步處理組成物和調配物，以避免微生物，例如細菌和真菌的污染作用。無菌注射溶液可藉由併入一定份量的活性化合物連同適當溶劑或視必要連同上述列舉的一種或多種成分之組合，爾後滅菌來製備。

【0101】在配製後，呈液體形式(溶液)的組成物和調配物可以與該劑量調配物相容的方式並以治療有效的份量投予。該調配物容易以各種劑型投予，例如上述可注射溶

液的類型。預想的到緩釋膠囊、定時釋放微粒等等亦可運用於投予本案的組成物。該等特定的水溶液尤其適用於靜脈內、肌內、皮下和腹膜內投藥。在一些具體例中，本案揭示的調配物可在暴露於本揭示內容的黃病毒之前、期間及/或之後投予。

套組

【0102】本案揭示的其他具體例涉及和本案揭示的組成物和方法一起使用的套組。組成物和活、減毒病毒調配物可在用於科學研究或用於遞送及/或用於投予一個體的套組中提供。根據該等具體例，套組可包括，但不限於，一適宜容器，活的或活、減毒黃病毒組成物，包括活、減毒黃病毒和一或多種額外劑，例如其他抗病毒劑、抗真菌劑或抗細菌劑。

【0103】在其他具體例中，套組可進一步包括用於欲接種或治療之個體的適當等分的組成物。此外，本案揭示的組成物和調配物可部分地或全部地脫水或可為水性的。取決於特定的調配物，本案設想到的套組可在室溫或本案揭示的冷藏溫度儲存。

【0104】在其他具體例中，套組一般可包括至少一小瓶、試管、燒瓶、瓶子、注射器或其他容器，其中可放置組成物，並適當地等分。在提供額外組分時，套組一般亦可含有一或多種額外的容器，其中可放置此劑或組分。本案的套組亦可包括置於容器中的組成物和任何其他(多個)試劑，以供商業銷售。此類容器可包括注射或吹塑塑

料容器，其中持留所欲的小瓶(譬如免疫性組成物或疫苗組成物)。

實施例

【0105】包括了以下實施例，以驗證本案呈現的某些具體例。熟習本領域技術者應當理解到，以下實施例所揭示的技術代表在本案揭示的實作中發現運作良好的技術，於是可被認為構成其實作的較佳模式。然而，熟習本領域技術者應當，在本揭示內容之教示下，理解到可對揭示的特定具體例進行許多改變，仍獲得類似或相似的結果，而無逸離本案的精神和範疇。

實施例1

緩衝液篩選

【0106】在某些例示性方法中，識別了適用於臨床前和臨床測試和使用黃病毒免疫性組成物或疫苗的液體組成物和可凍乾組成物。進行某些實驗以初步識別欲用於後續穩定性研究的候選緩衝液和賦形劑。受測的緩衝液包括HEPES、PBS和以Tris為基底的緩衝液。受測的賦形劑包括各種碳水化合物，例如海藻糖、半乳糖、果糖、山梨醇、乳糖、蔗糖、幾丁聚醣或其等之組合。受測的其他賦形劑包括各種蛋白質劑、血清白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)、重組HSA、牛血清白蛋白(BSA)、胎牛血清(FBS)、明膠、葡聚醣、多元醇聚合物、或其等之組合。經篩選的又其他賦形劑包括各種胺基酸或其鹽、酯或醯胺衍生物，例如丙胺酸、精胺酸、麩胺酸(譬如麩胺酸單鈉

(MSG))甲硫胺酸、或其等之組合。用於該等初始測試的其他組分包括各種多元醇/聚合物(譬如，甘露醇、明膠、葡聚醣)、滲透劑(譬如，尿素)、鹽(譬如，氯化鎂、氯化鈉)、和螯合劑(譬如，EDTA)。

【0107】在一些例示性方法中，使用活、減毒登革熱病毒作為用於臨床前和臨床測試的各種組成物中的例示性黃病毒。本案提供了用於該等方法的組成物。在一個例示性實驗中，使用預定量的活、減毒登革熱病毒疫苗。在另一例示性實驗中，使用活、減毒登革熱血清型3疫苗，因為它一般被認為是最不穩定和最低免疫性的，因此可用於開發可與其餘登革熱病毒血清型一起使用的穩定化組成物。預想的到任何減毒或未減毒黃病毒可用於該等例示性組成物，以增加黃病毒的穩定性並減少降解。

實施例2

篩選穩定調配物

【0108】在本案揭示的一些黃病毒調配物中，可使用水解明膠代替血清白蛋白作為蛋白質來源。然而，明膠，儘管提供活、減毒病毒穩定性，但在投予一個體時可能導致過敏反應，並且有時可能是疫苗相關不良事件的原因。本案揭示的某些組成物可包括提供減少活、減毒黃病毒變質之相仿結果的組分組合，同時提供在投予於一個體時具有降低的過敏反應的調配物。舉例來說，多元醇可用作本案揭示的黃病毒調配物中的蛋白質劑的額外或另擇來源。在一些例子中，創造了可相仿或提供活、減毒黃病毒

之增多穩定性的不具有白蛋白或明膠的調配物。該等調配物包括，但不限於，各種濃度的劑，例如以PBS為基底的緩衝液、一或多種碳水化合物劑、一或多種胺基酸、一或多種蛋白質劑及/或一或多種鹽劑。

【0109】使用各種穩定調配物測試活、減毒黃病毒疫苗的穩定性作為效力損失的函數(譬如，效價損失或Log_{10} PFU/藥量)。將登革熱病毒血清型3 (TDV-3)的樣本凍乾，隨後暴露於25°C，歷時5週。如圖1所示，對各種調配物評估了在此期間的效力損失、或效價損失的減少。使用的一個基底緩衝液是PBS連同50 mM NaCl、0.1% HSA、和10%碳水化合物。丙胺酸以10 mM存在，甲硫胺酸以2.5 mM存在，MSG以10 mM存在，甘露醇以5%存在，以及尿素以0.25%存在。將包含F-127、海藻糖、和白蛋白(FTA)的先前開發調配物用作參考物。如演示般，相較於該參考物，圖2所示的各種調配物係降低效力損失，因此提供了用於穩定黃病毒疫苗的經改良之方式。

【0110】凍乾的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)樣本在凍乾前/後和加速儲存穩定性期間的病毒效力結果係顯示於下表3。對於各個調配物，由於凍乾造成的病毒效力的log_{10}損失係藉由從初始效價(儲存在-80°C的冷凍液體對照組)減去儲存在-80°C的凍乾病毒樣本的效價來計算。此外，對於各個調配物，在加速穩定期間的效力的log_{10}損失係藉由從儲存在-80°C達5週的相同調配

物減去該凍乾調配物於25°C儲存後的效價來計算。

【0111】相較於正向對照組FTA，大多數調配物在凍乾過程期間證實改良的凍乾產率。在25°C的穩定性研究5週後，觀察到病毒穩定性的以下趨勢。在一例中，黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物只含有高海藻糖/蔗糖(10%)，病毒效力損失為以下順序：10%糖+ 0.1% HSA> 10%糖+ 0.1 % HSA + Met + MSG + Ala> 10%糖+ 0.1% HSA +尿素。在另一例中，黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物含有低海藻糖/蔗糖(1%)和甘露醇(4%)的組合，病毒效的損失為以下順序：1%糖 + 4%甘露醇 + 0.1% HSA> 1%糖 + 4%甘露醇 + 0.1% HSA +尿素> 1%糖 + 4%甘露醇 + 0.1% HSA + Met + MSG + Ala。在只含有甘露醇的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物中，病毒效力損失為以下順序：5%甘露醇 + 0.1% HSA> 5%甘露醇+ 0.1% HSA + 尿素> 5%甘露醇 + 0.1% HSA + Met + MSG + Ala。

表3：凍乾前、凍乾後和穩定後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效力。

編號(對應於表14)	樣本	液體	SD	-80°C	SD	25°C	SD	Lyo log 損失	穩定性 log 損失 (5W)	總 log 損失
1	1%海藻糖+0.1% HSA+4%甘露醇+ Met +MSG+Ala	4.54	0.07	4.31	0.10	4.25	0.05	0.23	0.06	0.29
5	10%蔗糖+0.1% HSA+尿素	5.06	0.12	4.82	0.03	4.38	0.09	0.24	0.44	0.68
3	1%蔗糖+0.1% HSA+4%甘露醇+ Met + MSG+Ala	4.63	0.05	4.48	0.07	3.99	0.10	0.15	0.49	0.64
2	10%海藻糖	4.71	0.08	4.68	0.08	4.17	0.07	0.03	0.51	0.54

	+0.1% HSA+尿素									
10	5%甘露醇+0.1% HSA+Met+MSG +Ala	4.57	0.11	4.12	0.01	3.42	0.07	0.45	0.70	1.15
6	1%蔗糖+0.1% HSA+ 4%甘露醇	4.66	0.13	4.58	0.15	3.87	0.12	0.08	0.71	0.79
4	1%海藻糖+0.1% HSA+4%甘露醇 +尿素	4.22	0.05	4.32	0.10	3.57	0.07	-0.1	0.75	0.65
13	10% 海藻糖 +0.1% HSA	5.04	0.08	4.53	0.06	3.78	0.10	0.51	0.75	1.26
9	1%蔗糖+0.1% HSA+4% 甘露醇 +尿素	4.77	0.04	4.56	0.07	3.78	0.10	0.21	0.78	0.99
8	10%蔗糖+0.1% HSA	5.02	0.06	4.84	0.08	4.05	0.11	0.18	0.79	0.97
14	FTA	5.03	0.04	4.57	0.04	3.76	0.04	0.56	0.81	1.37
12	10%蔗糖+0.1% HSA+Met+MSG +Ala	5.20	0.23	4.85	0.11	4.00	0.08	0.35	0.85	1.2
7	1% 海藻糖+0.1% HSA+ 4%甘露醇	4.55	0.12	4.52	0.14	3.65	0.15	0.03	0.87	0.9
11	10%海藻糖 +0.1% HSA+Met+MSG +Ala	4.90	0.04	4.60	0.04	3.72	0.03	0.30	0.88	1.18
15	5%甘露醇+0.1% HSA+尿素	3.62	0.13	3.84	0.02	0.00	n/a	-0.22	3.84	3.62
16	5% 甘露醇+0.1% HSA	4.01	0.14	4.08	0.08	0.00	n/a	-0.07	4.08	4.01

實施例3

預測剖析

【0112】作為用於評估各種調配物對黃病毒疫苗穩定化的效力的另外方法，可使用預測剖析方法作為向下選擇包括在調配物中的各種賦形劑及/或識別比其他更有效的賦形劑。各種賦形劑的效應係使用表現剖析(數據未顯示)在凍乾之後、凍乾之後5週、和凍乾之後5週及暴露於25°C來測試。將從預測剖析獲得的數據與期望值進行比較，其被用作測定在凍乾之後和暴露於25°C達5週之後的病毒效力的最佳保留的準則。使用該等預測剖析方法發現

蔗糖和海藻糖是可互換的。該等結果指出在凍乾並於25°C培育5週之後可產生增多之穩定性剖析曲線(數據未顯示)的賦形劑之間的正向交互作用。

實施例4

凍乾穩定性研究

【0113】為了評估各種賦形劑對登革熱病毒血清型3疫苗的穩定性的效應，將黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)疫苗的樣本調配物凍乾，並暴露於25°C達5週，如圖2所示(亦見下表4)。效價係於凍乾之前或凍乾前(實心黑色條，各一式三份)、和凍乾之後或凍乾後(實心淺灰色條，各一式三份)、和凍乾之後並暴露於25°C下5週(各為實心中灰色條；兩個分開的小瓶以一式三份滴定)獲得。將包含F-127、海藻糖和白蛋白(FTA)的先前開發調配物用作參考物。

【0114】該等結果指出於25°C培育5週後病毒效力保留在統計上的顯著改良。相較於參考物/對照組調配物，該等賦形劑的組合顯示出在固態時對於熱應力隨著時間的較高耐受性。

表4：各種凍乾黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物的例示性組成物。此表中的所有調配物皆在帶有30 mM NaCl，pH7.2的10 mM磷酸鈉緩衝液中製備。

調配物編號(對應於圖2)	組成物				
	海藻糖%	甘露醇(%)	Ala (mM)	HSA (%)	尿素(%)
1	10	1	20	0.3	0
2	10	1	10	0	0.250
3	1	1	0	0.3	0.125

4	1	1	20	0.1	0.250
5	10	5	0	0.1	0.000
6	10	3	0	0.3	0.250
7	5.5	3	10	0.1	0.125
8	1	5	0	0	0.250
9	5.5	5	20	0.3	0.250
10	1	3	20	0	0.000
11	10	5	20	0	0.125
12	5.5	1	0	0	0.000
13	1	5	10	0.3	0.000
14	FTA (15%海藻糖+0.1% HSA+1% Pluronic F127®)				

實施例5

用海藻糖和HSA模擬穩定研究

【0115】在穩定化調配物評估兩個賦形劑，海藻糖和HSA的影響，以供後續用於限定性篩選。評估了0.3% HSA和5%海藻糖濃度對於例示性活、減毒黃病毒在固態凍乾之後的穩定性的效應(數據未顯示)。此證實有效的穩定化調配物可包括5%的海藻糖和0.3%的HSA，如下表5所示。此外，需注意的是，亦分析了甘露醇和尿素穩定活、減毒病毒，例如黃病毒的能力。

表5：各種凍乾黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物的例示性組成物。

最大期望值	
組分	**濃度**
甘露醇	3.0%
海藻糖	5.0%
尿素	0.125%
HSA	0.3%

實施例6

篩選四價穩定化調配物

【0116】以黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)

(上述)的穩定化調配物獲得的數據可應用於其他登革熱病毒血清型，包括作為四價登革熱病毒調配物的一部分。在圖3-6中，對各個登革熱病毒血清型(TDV-1，TDV-2，黃病毒(譬如登革熱血清型-3和4，TDV-3和TDV-4))評估兩個不同的目標藥量，50% BDS (三角形)和CTM (正方形)。原料藥量目標調配物係由各個登革熱病毒血清型的約50%原料藥品物質(BDS)構成，通行藥量目標調配物係由各個登革熱病毒血清型的約2.5%原料藥品物質構成(亦稱為通行藥量或CD)。該通行和原料藥量目標調配物兩者亦包括甘露醇(3%)、海藻糖(5%)、和尿素(0.125%)。下表6列出了用於評估四價病毒穩定性的調配物。

表6：例示性四價登革熱病毒疫苗調配物

		和 BDS 調配後的最終賦形劑濃度						
CD 調配物編號	組成物	PF 127 (%)	天然 HSA (%)	recomb HSA (%)	海藻糖 (%)	甘露醇 (%)	尿素 (%)	葡聚醣 (%)
調配物 1 CD	甘露醇(3%)+海藻糖(5%)+尿素(0.125%)+葡聚醣(1%)(低葡聚醣)	0.02	0.002		5	3	0.125	1
調配物 2 CD	甘露醇(3%)+海藻糖(5%)+尿素(0.125%)+葡聚醣(5%)(高葡聚醣)	0.02	0.002		5	3	0.125	5
調配物 3 CD	甘露醇(3%)+海藻糖(5%)+尿素(0.125%)+重組 HSA(0.3%)	0.02	0.002	0.3	5	3	0.125	
調配物 4 CD	甘露醇(3%)+海藻糖(5%)+尿素(0.125%)+天然 HSA(0.3%)	0.02	0.3		5	3	0.125	
FTA_CD	FTA	1	0.1		15			
調配物 5 50%BDS	甘露醇(3%)+海藻糖(7.5%)+尿素(0.125%)+葡聚醣(1%)(低葡聚醣)	0.5	0.05		7.5	3	0.125	1
調配物 6	甘露醇(3%)+海藻糖(7.5%)+尿素	0.5	0.05		7.5	3	0.125	5

50%BDS	(0.125%)+葡聚醣(5%)(高葡聚醣)							
調配物7 50%BDS	甘露醇(3%)+海藻糖(7.5%)+尿素(0.125%)+重組HSA(0.3%)	0.5	0.05	0.3	7.5	3	0.125	
調配物8 50%BDS	甘露醇(3%)+海藻糖(7.5%)+尿素(0.125%)+天然HSA(0.3%)	0.5	0.3		7.5	3	0.125	
FTA_50%BDS	FTA	1	0.1		15			

【0117】四價登革熱病毒調配物的目標病毒效價係如下表7所示。

表7：四價登革熱疫苗調配物的目標病毒效價

	當前藥量標靶效價(CD) PFU/藥量	50% BDS 標靶效價(50%BDS) PFU/藥量
TDV-1	2.00E+04	5.09E+05
TDV-2	5.00E+03	1.27E+05
TDV-3	1.00E+05	2.54E+06
TDV-4	3.00E+05	8.03E+06

【0118】如圖3-6所示，測試的賦形劑是1%和5%的葡聚醣(作為HSA的替代物)、0.3%的重組HSA、和0.3%的天然HSA、以及FTA參考調配物。評估了各者在凍乾之後暴露於25°C達5週之後(圖3A、4A、5A和6A)以及在完全損失之後(圖3B、4B、5B和6B)的效應，其為凍乾(液體至固體)之後的效力損失以及暴露於25°C達5週之後的損失的總和。一般來說，效價損失越低，藥量之間的重疊越多，賦形劑的穩定效果越高。

實施例7

用海藻糖和HSA模擬穩定研究

【0119】基於上述關於海藻糖和HSA濃度的數據，

使用模擬研究來重新評估黃病毒穩定化調配物的設計空間(數據未顯示)。根據本案揭示的一個具體例，模擬數據測試了0.2% HSA和5%海藻糖濃度對凍乾之後的例示之活、減毒黃病毒的穩定性的影響，指出穩定化調配物可包括5%的海藻糖和0.2%的HSA (數據未顯示)。

實施例8

各種劑對調配物塊狀物完整性和病毒穩定性的效應

【0120】以凍乾調配物的不同濃度和組合評估各種調配物改善登革熱病毒穩定性(譬如登革熱病毒血清型3)的能力，以及形成用於眾多預期目的之帶有適宜外觀和適宜物理完整性的冷凍乾燥塊狀物。如本案所述，凍乾塊狀物係以1至3的主觀量表評等，其中1 = 差劣，2 = 尚可，3 = 良好。評等為1的塊狀物被區別為具有大規模的結構性塌陷、底部和側面上有回融、來自所有側面的顯著收縮和回縮、及/或顆粒的外觀。評級為2的塊狀物具有來自側面的局部收縮和回縮、底部中等回融、及/或水平地或垂直地穿過塊狀物的大型裂口或裂紋。評等為3的塊狀物是在藥學上美觀的、呈現為緊實的(主要是白色，取決於賦形劑組合)，塊狀物結構具有大致平坦的表面，並且從塊狀物頂部或小瓶側邊，該塊狀物沒有或有最少的收縮或回縮。使用安慰劑調配物測試碳水化合物，例如糖和甘露醇的變化比例對於塊狀物完整性的效應。選擇優化的糖/甘露醇比例來研究糖/甘露醇(譬如海藻糖或蔗糖對甘露醇)對於凍乾病毒的凍乾和穩定性對於病毒穩定性的效應。在

此實施例中，此實驗係以調配的原料藥品物質登革熱病毒血清型3 (譬如TDV3)進行。

【0121】所評估的安慰劑調配物的例示性清單係提供於表8。基於篩選安慰劑調配物的結果，選擇三個不同的糖對甘露醇比例，用於篩選病毒穩定性：僅只糖(10%)；糖對甘露醇的比例為1:4；以及僅只甘露醇(5%)。亦評估了先前研究識別的穩定化賦形劑(尿素和胺基酸)，並與不同的糖對甘露醇比例的組合。

表8：在凍乾穩定性和塊狀物研究期間檢查的糖/甘露醇調配物

糖/甘露醇調配物編號	糖	糖(w/v)(%)	甘露醇(w/v)(%)
1	海藻糖	1.0	4.0
2	海藻糖	2.0	4.0
3	海藻糖	2.0	3.0
4	海藻糖	10.0	0
5	蔗糖	1.0	4.0
6	蔗糖	2.0	4.0
7	蔗糖	2.0	3.0
8	蔗糖	10.0	0
9	無糖	0	5.0

【0122】所有調配物皆在帶有30 mM NaCl，pH7.2和0.1% HSA的10 mM磷酸鈉緩衝液中製備。作為此研究的一部分進行評估的含病毒調配物的清單係提供於表9。

表9：評估登革熱病毒(登革熱病毒血清型3)凍乾和加速穩定研究的調配物

調配物編號(對應於表 3)	組成物
1	10%海藻糖 +0.1%HSA

2	10%海藻糖 +0.1%HSA+0.25%尿素
3	10%海藻糖 +0.1%HSA+ 10 mM MSG+10 mM 丙胺酸+ 2.5 mM 甲硫胺酸
4	10%蔗糖+0.1%HSA
5	10%蔗糖+0.1%HSA+0.25%尿素
6	10%蔗糖+0.1%HSA+10 mM MSG+10 mM 丙胺酸+ 2.5 mM 甲硫胺酸
7	1%海藻糖+ 4%甘露醇 +0.1%HSA
8	1%海藻糖+ 4%甘露醇 +0.1%HSA+0.25%尿素
9	1%海藻糖+4%甘露醇+0.1%HSA+10 mMMSG+10 mM丙胺酸+ 2.5 mM 甲硫胺酸
10	1%蔗糖+ 4%甘露醇 +0.1%HSA
11	1%蔗糖+ 4%甘露醇 +0.1%HSA+0.25%尿素
12	1%蔗糖+4%甘露醇+0.1%HSA+ 10 mM MSG+10 mM丙胺酸+ 2.5 mM 甲硫胺酸
13	5%甘露醇 +0.1%HSA
14	5%甘露醇 +0.1%HSA+0.25%尿素
15	5%甘露醇 +0.1%HSA+ 10 mM MSG+10 mM 丙胺酸+ 2.5 mM 甲硫胺酸
16	FTA(15%海藻糖+0.1%HSA+1%PF127)

【0123】在某些方法中，評估了改變糖(譬如海藻糖及/或蔗糖)對甘露醇的比例對於凍乾樣本的塊狀物外觀以及後續對於黃病毒(譬如登革熱病毒)穩定性的效應。在一個方法中，為了評估糖對甘露醇的比例對於塊狀物完整性和外觀的效應，製備了安慰劑調配物並凍乾。凍乾後，評估塊狀物形成的物理完整性和外觀(數據未顯示)。就僅只甘露醇、糖對甘露醇比例為1:4和2:4而言，塊狀物完整性看似良好，然而，在糖對甘露醇比例為約2:3製備的調配物觀察到局部塌陷。在海藻糖和蔗糖調配物之間觀察到的塊狀物完整性並無顯著差異。當僅使用糖時，沒有出現塊狀物完整性，還有使用僅只甘露醇觀察測試。基於此例示

性研究的塊狀物完整性觀察，選擇下列組合用於病毒穩定性研究：僅只糖、糖對甘露醇的比例為1:4、以及僅只甘露醇。

【0124】在一例中，帶有選定之糖對甘露醇比例的黃病毒(登革熱血清型3)組成物係和作為額外賦形劑的胺基酸混合物或尿素合併來製備(參見表8)。凍乾後，評估塊狀物的物理完整性(數據未顯示)。在僅含糖的調配物的例子中，塊狀物完整性係類似於對照組FTA調配物。僅含甘露醇和糖對甘露醇比例為1：4的調配物形成了看似可接受外觀和良好物理完整性塊狀物。加入尿素或胺基酸混合物不會顯著影響塊狀物完整性。該等經證實的調配物似乎有益於用於免疫性調配物的藥學組成物。

實施例9

合併的半經驗篩選與實驗設計(DoE)

【0125】為了在實驗上趨近具經改良之穩定性的活病毒疫苗候選者的調配物開發，吾人將理想地測定病毒降解的原因和機制，隨後設計調配物以使其發生最小化。儘管已經用幾種病毒疫苗證實了此方式，但其主要集中在以液體為基底的調配物。常常需要更多的經驗性方式，包括傳統的賦形劑篩選研究、設計品質(QbD)方式(包括系統性整合風險管理和先前的科學知識連同實驗設計，DoE)或該兩種方式之組合。在此研究中，一組合方式係以逐步的方式，利用活減毒登革熱疫苗候選者作為模型活病毒疫苗來演示。為了識別實現目標產品概況的調配物，測試了

充分地長期儲存在2-8°C的一非經腸投藥、凍乾、多價的活病毒疫苗。首先，進行半經驗篩選，以識別病毒穩定劑，然後使用作為DoE設計預測統計模型的指導方針的探索性數據分析更詳細地評估頂級穩定化賦形劑「命中者(hits)」。逐步使用組合方式為早期產品開發期間的活病毒疫苗調配物開發提供了系統性、階段適當方式的基礎。

藥學賦形劑對黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)穩定性的初步篩選

【0126】就凍乾期間維持病毒效力和加速穩定性，同時該乾燥塊狀物在冷凍後產生可接受的物理完整性而言，初步篩選識別了許多潛在的穩定化賦形劑。(圖7和圖8)。對於此初始賦形劑篩選，黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物係在帶有30 mM NaCl，pH 7.2的10 mM磷酸鹽緩衝液中、含有海藻糖或蔗糖的基底緩衝液中製備。如上概述，亦評估了其他緩衝液，包括HEPES、Tris、磷酸鹽和組胺酸(有或無NaCl)。在上述緩衝液的儲存穩定性沒有觀察到差異；然而，當包括NaCl時，黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)更穩定(數據未顯示)。凍乾黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物係使用來自不同已知類別的藥學添加劑的各種賦形劑製備。凍乾黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物係使用各種賦形劑製備(參見表12)。該等添加劑是基於經驗、文獻檢索活病毒疫苗(已上市和調查型)的調配物組成和科學理論的組合來選擇。凍乾樣本的塊狀物外觀係基於評等系統

(1-3，其中1為最差，3為最佳)評估(表10和11)。

【0127】圖7A-7D和表10繪示了關於在海藻糖基底緩衝液中的不同穩定劑凍乾之前和之後的凍乾黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物和病毒效價。在凍乾以後計算病毒效價的損失(圖7A-7D)，亦基於視覺評等系統(如上所述)評估凍乾樣本的塊狀物外觀(表10)。該等結果證實，許多賦形劑能夠在包括尿素、EDTA、多元醇、蛋白質、聚合物和胺基酸的凍乾(於基底緩衝液)期間穩定黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)，其導致<0.2 log的效價損失。某些賦形劑並非個別地避免凍乾($MgCl_2$和PF127)，同時其他賦形劑(山梨醇)可在凍乾期間穩定病毒，但無法產生美觀的塊狀物結構而被排除在進一步分析之外。當在基底緩衝液中，以蔗糖置換海藻糖時，觀察到類似的賦形劑趨勢(圖8A-8B)。

【0128】在此例中，圖7A提供凍乾前和凍乾後樣本的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價，圖7B提供黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)在凍乾以後的效價損失。數據表示為平均值± s.d。病毒效價以log_{10}pfu/0.5ml給定。*表示低於LOD的效價。基底緩衝液在帶有30 mM NaCl，pH7.2的10 mM磷酸鹽緩衝液中含有10%海藻糖。關於海藻糖置換成蔗糖的該等例示性實驗，圖8A顯示凍乾以後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價損失。數據表示為平均值± s.d。病毒效價以log10 pfu/ml給定。

【0129】繪示於圖7A和8A的例示性實驗的特定賦形劑候選者係經由於25°C達2週的短期加速儲存穩定性來進一步評估穩定黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)的能力。就含海藻糖和蔗糖的基底緩衝液調配物而言，藉由噬菌斑試驗中的病毒效價測得的病毒效力、和病毒效價隨著時間的損失(以穩定性$\log_{10}$損失表示)係分別顯示於圖7C與7D與圖8B。圖7C提供加速穩定研究之後的凍乾樣本中的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價，圖7D提供在室溫(~25°C)2週之後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效價損失。圖8B顯示凍乾樣本在室溫(~25°C)儲存5週之後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價損失。該等結果表明，含有HSA、尿素、丙胺酸、甲硫胺酸、MSG、甘露醇、或明膠的調配物在基底調配物中展現類似的趨勢，並且在25°C儲存期間展現改良的病毒穩定性。該等結果指出，HSA、尿素、丙胺酸、甲硫胺酸、MSG、和甘露醇為黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)穩定劑，並被選擇用於使用相同海藻糖/-蔗糖基底緩衝液調配物的進一步篩選。

表10：基於含有海藻糖的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)之視覺外觀的凍乾調配物的視覺塊狀物完整性評等(參見圖7A-7D) (如上文詳述，1–3，其中1為最差且3為最佳)。

凍乾調配物	平均塊狀物外觀
$MgCl_2$	1
山梨醇	2
甘露醇	2

聚山梨醇酯 80	2
乳糖	3
蔗糖	3
HSA	3
尿素	3
丙胺酸	3
EDTA	3
甲硫胺酸	3
明膠	3
MSG	3
葡聚醣 40	3
PF127	3

表11：基於含有蔗糖的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)凍乾調配物之視覺外觀的凍乾調配物的視覺塊狀物完整性評等(如圖8A-8B所示) (如上文詳述，1–3，其中1為最差且3為最佳)。

凍乾調配物	**平均塊狀物外觀**
甘露醇	1
山梨醇	1
MgCl2	1
丙胺酸	2
尿素	2
HSA	3
乳糖	3
海藻糖	3
MSG	3
甲硫胺酸	3
EDTA	3
PS80	3
明膠	3
葡聚醣 40	3

PF127	3

【0130】該等結果證實，表12列示的許多賦形劑能夠在包括尿素、EDTA、多元醇、蛋白質、聚合物和胺基酸的凍乾(於基底緩衝液)期間穩定黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)，其導致<0.2 log的效價損失。$MgCl_2$和PF127添加劑賦予凍乾期間最低的病毒穩定潛力，個別地損失大於2 log (然而，PF127在其他賦形劑存在時具有協同穩定效應；詳見下文)。某些賦形劑(譬如$MgCl_2$和PF127)並無個別地避免凍乾，同時其他(譬如山梨醇)可在凍乾期間穩定病毒，但沒有產生美觀的塊狀物結構而被排除在進一步分析之外。當在基底緩衝液中，以蔗糖置換海藻糖時，觀察到類似的賦形劑趨勢(圖8)。

表12：篩選了在凍乾和加速儲存期間穩定黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒以及形成藥學上美觀的凍乾塊狀物的能力的賦形劑的摘要列表。賦形劑係於含本文所述額外添加劑的各種基底緩衝液的存在下評估。

類別	賦形劑
蛋白質/聚合物	人類血清白蛋白與 rHSA (0.1、0.3、與 2%) 明膠(3.0%) 葡聚醣 40 (1-10%)
糖	蔗糖(1-10%) D-海藻糖二水合物 (1-15%) 乳糖(%)
多元醇	山梨醇(3.0%) 甘露醇(1, 3, 5,%)
表面活性劑	聚山梨醇酯 80 (0.05%)、PF127 (1.0%)

胺基酸	l-麩胺酸單鈉(10 mM) 甲硫胺酸(2.5 mM) 丙胺酸(10 mM) 精胺酸(10 mM)
滲透劑	尿素(0.125 and 0.25%)
鹽	氯化鎂(100 mM)
螯合劑	EDTA (1 mM)

【0131】若干例示性賦形劑候選者係經由於25°C達2週的短期加速儲存穩定性來進一步評估穩定黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)的能力。藉由噬菌斑試驗中的病毒效價測得的病毒效力、和病毒效價隨著時間的損失(以穩定性$\log_{10}$損失表示)就含海藻糖的基底緩衝液調配物而言係顯示於圖7C與7D，就含蔗糖的基底緩衝液調配物而言係顯示於圖8A和8B。含有，舉例來說，HSA、尿素、丙胺酸、甲硫胺酸、MSG、甘露醇、及/或明膠的調配物在兩者基底調配物中展現類似的趨勢，並且在25°C儲存期間展現改良的病毒穩定性。有趣的是，葡聚醣與海藻糖一起係展現優異的穩定性，但和蔗糖基底緩衝液一起則無。儘管聚山梨醇酯80和乳糖展現良好的凍乾保護作用，但在25°C乾燥狀態的儲存期間，該等賦形劑不能穩定黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)。總之，HSA、尿素、丙胺酸、甲硫胺酸、MSG、和甘露醇被識別為潛在的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)穩定劑，並被選擇用於使用相同海藻糖/蔗糖基底緩衝液調配物的進一步篩選。

為黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)穩定性篩選賦形

劑組合

【0132】評估了合併不同濃度的前導賦形劑對於凍乾和加速穩定前後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效價的效應。現在參照圖9和圖15，基底緩衝液係帶有30 mM NaCl，pH 7.2、和0.1 % HSA的10 mM磷酸鹽緩衝液中含有10%海藻糖。圖9A和圖15A提供凍乾以後的FL黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價損失；圖9B和圖15B提供凍乾樣本在室溫(~25°C)儲存5週後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價損失。在兩個圖中，數據表示為平均值± s.d。病毒效價以$\log_{10}$ pfu/ml給定。

【0133】對於該等研究，將HSA (以0.1和0.2% w/v)加至該基底調配物中，因為初始篩選的結果指出HSA係作用為有效的冷凍保護劑(圖9和15)。在分別含有10%蔗糖或海藻糖的基底調配物中，觀察到在兩個HSA濃度凍乾後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效價的損失(<0.2 log損失) (圖9A和15A)。因此，後續的基底緩衝液調配物係製備成含有磷酸鹽緩衝液、NaCl、10%糖(海藻糖或蔗糖)連同0.1% HSA和指定的額外賦形劑。該等基底調配物之任一者的大多數賦形劑組合展現凍乾後和加速穩定樣本的經改良之病毒穩定性(圖9和15)。藉由使用加至基底調配物中的胺基酸和尿素組合來證實最大的冷凍保護作用。在25°C達5週後，已添加甘露醇和尿素，有或無胺基酸，例如丙胺酸、精胺酸、MSG和甲硫胺酸的任一基

底調配物皆展現了高度改良的病毒穩定性(圖9和15)。使基底調配物中的糖濃度增加至15%並無提供就保護病毒效價而言的任何額外優點。

表13：基於黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)凍乾調配物之視覺外觀的凍乾調配物的視覺塊狀物完整性評等(參見圖9A-9B) (如上文所詳述，1–3，其中1為最差且3為最佳)。

凍乾的調配物	平均塊狀物外觀
Met + MSG + Ala + 尿素 + Mann	2
15% Tre + 0.1% HSA	2
Met	2
Mann	3
10% Tre + 2% HSA	3
10% Tre + 0.1% HSA	3
Met + MSG + Ala + 尿素	3
MSG	3
Ala	3
尿素	3
Met + MSG + Ala	3
Met + MSG	3
Met + Ala	3
MSG + Ala	3
Met + 尿素	3
MSG + 尿素	3
Ala + 尿素	3
Arg	3
Arg + 尿素	3

【0134】最終篩選實驗調查了改變糖對甘露醇的比例對於黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效力和凍乾塊狀物完整性的效應。現在參照表9和圖10A-10B中詳述的組成物調配物，圖10A提供凍乾以後的黃病毒(譬如登革熱血清型

-3，TDV-3)病毒效價損失，圖10B提供凍乾樣本在室溫(~25°C)儲存5週後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價損失。基底緩衝液含有10 mM磷酸鹽緩衝液，連同30 mM NaCl，pH7.2、和0.1% HSA。數據表示為平均值± s.d。病毒效價以log10 pfu/ml給定。*N/A低於LOD。

【0135】帶有選定之糖對甘露醇比例的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物係與胺基酸混合物或尿素作為額外賦形劑於基底緩衝液中合併來製備(表9)。大多數調配物(從表3和9發現)顯示凍乾後的經改良之病毒效價回收率(表3)。相較於胺基酸混合物，在含有蔗糖或海藻糖的基底緩衝液中添加尿素展現在25°C儲存5週後的經改良之病毒穩定潛力(表3 & 9，調配物5和6；圖10A)。有趣的是，當將甘露醇加至該基底調配物時，胺基酸混合物比尿素展現出更好的病毒穩定潛力(表3 & 9，調配物9和10；圖10A)。但是，僅含甘露醇的某些調配物(譬如，13、14、和15)展現差劣的病毒穩定效應，無論添加尿素或胺基酸混合物。此證實了非晶質糖對病毒穩定性的必要性，就穩定病毒而言，此實驗確立了糖和甘露醇賦形劑的相互作用。是以，為了進一步研究該等有希望的穩定化賦形劑在冷凍乾燥和加速儲存期間對於黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)的效應，採用如下所述的實驗方式的合理設計。

實驗設計

【0136】現在參照圖11，其表示篩選研究期間所分析的每個調配物的綜合病毒效力損失數據集。將數據分為三個篩選階段，以篩選組1、2、和3表示，該等與圖8-10、和圖15表示的數據一致。該等數據顯示液體(pre-lyo)穩定性樣本、post-lyo穩定性樣本、與於25°C穩定性樣本5週後的log_{10} pfu/0.5 mL效價。圖11A和11B顯示識別提供保護免於冷凍乾燥與熱挑戰的統計學顯著項目(Log_{10} lyo損失(圖11A)與於 25°C的5週後的log_{10}下降(圖11B))。數據係使用逐步迴歸來模擬，以決定哪個項目在統計學上顯著地影響效力。除了使用貝氏訊息停止準則(Bayesian Information stopping Criterion)幫助收斂於最佳擬合模型以外，假使其概率值<0.05，則主要效應和交互作用項目被認為是顯著的。亦使用R^2值評估模型擬合的適足性。

【0137】賦形劑和調配物的半經驗篩選產生了對於85個個別製備的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)調配物的冷凍液體(pre-lyo)、post-lyo、和加速穩定性(於25°C，5週)病毒效力量測的大量數據集(數據未顯示)。目視分析該綜合數據集透露出，藉由各個依序篩選實驗，除了經改良的塊狀物外觀以外，黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效力在各條件的保留性都有所增加。不同的賦形劑濃度及其組合在整個篩選過程中整合出經驗衍生的數據集，其可利用於使用迴歸模擬來建構探索性統計模型。

【0138】為了測定哪個賦形劑(或項目)個別地貢獻或相互作用，以影響黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效力損失，使用意圖用於回應表面方法(RSM)的JMP 11.2.0中可取得的逐步迴歸工具對數據集進行模擬。該迴歸分析係利用最小貝氏訊息停止準則，以達到最佳模型，並排除未顯示顯著性(概率統計< 0.05)的項目和交互作用。分別測定R^2值為0.44和0.73的模型擬合的$\log_{10}$ lyo損失和於25°C，5週後的$\log_{10}$下降(圖11A和11B)。對於在凍乾之後限制黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效力損失，包括HSA、尿素、甘露醇、以及糖蔗糖和海藻糖的賦形劑被識別為統計學上顯著的(數據未顯示)。類似的賦形劑組被顯示在加速儲存穩定性期間保護黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效力損失。添加劑尿素、甘露醇、和HSA顯示單一項目顯著性，而海藻糖或蔗糖與尿素、和海藻糖與甘露醇的組合被識別為具有顯著的兩項目交互作用。胺基酸丙胺酸、甲硫胺酸、和MSG被包括在模型中，因為其等在篩選階段似乎提供了穩定效應，但在此分析中顯示並無統計上顯著。利用該等探索模型作為指南，選擇了添加劑HSA、尿素、甘露醇和海藻糖或蔗糖作為進一步研究的有希望候選者。

表14：DOE調配物設計

DOE 調配物編	組成物				
	海藻糖	甘露醇	Ala (mM)	HSA (%)	尿素(%)

號	%	(%)			
1	10	1	20	0.3	0
2	10	1	10	0	0.250
3	1	1	0	0.3	0.125
4	1	1	20	0.1	0.250
5	10	5	0	0.1	0.000
6	10	3	0	0.3	0.250
7	5.5	3	10	0.1	0.125
8	1	5	0	0	0.250
9	5.5	5	20	0.3	0.250
10	1	3	20	0	0.000
11	10	5	20	0	0.125
12	5.5	1	0	0	0.000
13	1	5	10	0.3	0.000

【0139】現在參照表14和圖12，該表和圖提供如下：表14：DOE調配物設計。圖12A：在液體、凍乾樣本(儲存在-80°C)和穩定性樣本(凍乾調配物儲存於25°C，5週)的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價，圖12B：在凍乾期間和於25°C穩定5週的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效價損失。所有調配物皆含10 mM磷酸鈉、30 mM NaCl，pH7.2。圖12C：使用前向逐步迴歸和停止規則集分析DSD數據所生成的排序估算圖表，以使用JMP 11.2.0最小化經校正的赤池訊息準則(Akaike's Information Criterion) (AICc)。假使其概率值< 0.05，則主要效應和交互作用項目被認為是顯著的。亦使用R^2值評估模型擬合的適足性。

【0140】藉由探索性單變量迴歸和多變量數據分析所識別的前導賦形劑命中者和位準係整合至限定性篩選設計(DSD) (表14)，以藉由設計確認其對穩定性的影響的顯著性並探索各個賦形劑的最佳濃度範圍。儘管展現類似的統計學影響，但選擇海藻糖勝於蔗糖，因為其藉由探索性模型分析識別出額外的交互作用。儘管並無發現丙胺酸具顯著性，但其作為代表性胺基酸被包括在DSD，其在篩選期間存在於最有希望的調配物中。藉由回應表面模型預測剖析器(數據未顯示)得知了賦形劑濃度範圍的選擇，並且使用JMP 11.2.0中的實驗設計平台建構DSD，生成了用於評估的13個個別調配物。將黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)加至表14概述的各個調配物中，凍乾，並在25°C挑戰5週。限定性篩選設計(DSD)係為了在液體、凍乾樣本(儲存於80°C)和穩定性樣本(凍乾調配物儲存於25°C)的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)實驗調配物與效價所設計。假使其概率值< 0.05，則主要效應和交互作用項目被認為是顯著的。藍線表示p值閾值，橫穿此線的條狀物顯示顯著效應。亦使用R2值評估模型擬合的適足性。* N/A低於LOD。調配物細節如下：F1: 10%Tre + 1%Mann + Ala(20 mM) + 0.3% HSA ; F2:10%Tre + 1%Mann + Ala(10 mM) + 0.25%U ; F3:1%Tre + 1%Mann + 0.3%HSA + 0.125%U ; F4:1%Tre + 1%Mann + Ala(20 mM) + 0.1%HSA + 0.25%U ; F5:10%Tre + 5%Mann + 0.1%HSA ;

F6:10%Tre + 3%Mann + 0.3%HSA + 0.25%U ; F7:5.5%Tre + 3%Mann + Ala(10 mM) + 0.1%HSA + 0.125%U ; F8:1%Tre + 5%Mann + 0.250%U ; F9:5.5%Tre + 5%Mann + Ala (20 mM) + 0.3%HSA + 0.25%U ; F10:1%Tre + 3%Mann + Ala(20 mM) ; F11:10%Tre + 5%Mann + Ala(20 mM) + 0.125%U ; F12: 5.5%Tre + 1%Mann ; F13: 1%Tre + 5%Mann + Ala (10 mM) + 0.3%HSA. Mann，甘露醇；Tre，海藻糖二水合物；HSA，人類血清白蛋白；Ala，丙胺酸；以及U，尿素。

【0141】藉由噬菌斑試驗法測量冷凍液體(pre-lyo)、lyo後(時間0)、和5週穩定性樣本的病毒效力(圖12A和12B)。此次使用前向逐步迴歸和停止規則集分析DSD所生成的數據集，以使JMP 11.2.0中的經校正的赤池訊息準則(AICc)最小化。此逐步迴歸方式識別出最顯著的項目，並進一步點亮了各個受測賦形劑的設計空間(圖12C)。對於該等回應各者，模型擬合於0.79、0.89、和0.99之R^2值，包括log10總效力損失。對病毒效力損失的分析突顯出當低至中等濃度的甘露醇和中等至高濃度的尿素相結合時，中等至高濃度的海藻糖和HSA顯著地穩定了效力損失。丙胺酸繼續證實無統計學上顯著的效應(該模型無法識別)。

【0142】使用JMP的預測剖析器(數據未顯示)的JMP 11.2.0利用產生了顯示用於兩因子項目—海藻糖和HSA—

的限定性篩選設計回應表面模型的最佳化設計空間的輪廓剖析器，而且甘露醇和尿素分別具有3%和0.125%的鎖定混合值。從預測性DSD模型為各個回應生成該輪廓剖析器，識別出避免病毒效力損失的最佳賦形劑濃度為：5%海藻糖、3%甘露醇、0.3% HSA、和0.125%尿素。

評估用於四價登革熱疫苗劑型的賦形劑組合

表15：使用DOE的調配物設計

DOE 調配物編號	組成物
調配物_1	甘露醇 (3%) + 海藻糖 (5%) + 尿素(0.125%) + 葡聚醣 (1%) (低葡聚醣)
調配物_2	甘露醇 (3%) + 海藻糖 (5%) + 尿素(0.125%) + 葡聚醣 (5%) (高葡聚醣)
調配物_3	甘露醇 (3%) + 海藻糖 (5%) + 尿素(0.125%) + 重組 HSA (0.3%)
調配物_4	甘露醇 (3%) + 海藻糖 (5%) + 尿素(0.125%) + 天然 HSA (0.3%)

【0143】現在參照表15和圖13，分組係提供如下：表15：使用DOE的調配物設計，(圖13A：凍乾後的TDV血清型1-4 (在四價疫苗調配物)的效價損失，圖13B：凍乾樣本在25°C儲存5週後的TDV血清型1-4 (在四價疫苗調配物)的效價損失，圖13C：在凍乾並於25°C儲存5週後的TDV血清型1-4的總病毒效價損失，所有DOE調配物亦含有10 mM磷酸鈉、30 mM NaCl，pH 7.2 *未計算(低於LLOD)。

【0144】在含有海藻糖、甘露醇、磷酸鹽緩衝液和NaCl的基底調配物中，藉由改變葡聚醣濃度(DOE調配物

1 & 2)、rHSA濃度(DOE調配物3)、和nHSA濃度(DOE調配物4)來製備四價DOE調配物(TDV-1、-2、-3、-4) (表15)。DOE調配物係以凍乾塊狀物完整性(數據未顯示)和凍乾與加速穩定性以後的病毒效價的合併log_{10}損失(圖13B)的函數來評估及評等。當與含葡聚醣的調配物相比時，含有rHSA或nHSA的DOE調配物展現改良之病毒效力回收率。含有rHSA的DOE調配物展現就所有血清型而言的最高病毒效力回復，對於TDV-2至TDV-4為 <0.3 log損失和對於TDV-1為0.5 log損失(圖13B)。然而，觀察到含HSA的調配物有局部塊狀物塌陷(數據未顯示)。有趣的是，就塊狀物物理外觀而言，含葡聚醣的DOE調配物係更加美觀，但在凍乾後無法保留病毒效力(圖13B)。

四價登革熱疫苗調配物的即時穩定性研究

【0145】除了在25°C以四價TDV進行的加速穩定性研究之外，開始了4°C穩定性研究，以在目標長期儲存溫度產生即時穩定性。使各個DOE調配物儲存在4°C長達39週，在零、5、13、和39週時間執行病毒效力測量。現在參照圖14，DOE調配物1-4含有5%海藻糖、3%甘露醇、0.125%尿素，於10 mM磷酸鈉、30 mM NaCl pH 7.2和下列添加劑：1%葡聚醣(圖14A)、5%葡聚醣(圖14B)、0.3%重組HSA(圖14C)、或0.3%天然HSA (圖14D)。使凍乾樣本儲存在4°C，並在0、5、13、和39週重構，以測量病毒效力。突顯區域代表JMP 11.2.0測定的上下95%信賴區間。各圖表中的整合表格含有就各個血清型的液體

(Pre-Lyo)、時間0 (Post-Lyo(T0))而言的Log_{10} pfu/0.5 mL效價數據，以及在78週的預測效價 (Pred. 78 wks)。該預測效價係藉由使用英國PRISM培訓諮詢有限公司(PRISM Training and Consultancy Limited, UK)開發的Adapt2版本3.4.1工具(Adapt2 Version 3.4.1 Tool)來決定。

【0146】所有候選四價TDV調配物在4°C下39週後就所有血清型而言的病毒效力顯示出最小至無損失(圖14A-14D)。病毒效力隨著時間的顯著增加可解釋為零損失既定試驗變異性(基於內部觀察)。縱向時間點病毒效價係藉由78週(2x最後即時數據點)的最佳擬合線的外推法來預測(圖14A-14D)，並顯示隨著時間預測的病毒效力的最小損失。然而，與該等帶有任一HSA者相比，含葡聚醣的調配物在凍乾後損失了大量的病毒效價，使得含葡聚醣的調配物的總體淨效力損失更高。該等即時數據表明，識別和最佳化的候選調配物在目標儲存溫度下展現出所欲的固態穩定性剖析曲線。

表16：基於視覺評等系統(1–3，其中1為最差且3為最佳)評估凍乾樣本的塊狀物外觀(圖15A-15B)。

凍乾調配物	平均塊狀物外觀
Met + MSG + Ala + 尿素+ Mann	3
Met + MSG + Ala + 尿素	3
MSG + Ala	3
Met + 尿素	3

MSG + 尿素	3
Ala + 尿素	3
15% Suc + 0.1% HSA	3
10% Suc + 2.0% HSA	3
10% Suc + 0.1% HSA	3
Met	3
MSG	3
Ala	3
尿素	3
Mann	3
Met + MSG + Ala	3
Met + MSG	3
Met + Ala	3
Arg	3
Arg + 尿素	3

【0147】評估了合併不同濃度的前導賦形劑對於凍乾和加速穩定前後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效價的效應。對於該等研究，將HSA (以0.1和0.2% w/v)加至上述基底調配物中，因為初始篩選的結果指出HSA係作用為有效的冷凍保護劑(圖15)。圖15演示了篩選各種賦形劑組合(於含海藻糖的基底緩衝液)對於黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效力的效應的結果。基底緩衝液在帶有30 mM NaCl，pH7.2的10 mM磷酸鹽緩衝液中含有10%海藻糖。結果指出(圖15A)凍乾以後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價損失(圖15B)、凍乾樣本在室溫(~25°C)儲存5週的黃病毒(譬

如登革熱血清型-3，TDV-3)病毒效價損失。數據表示為平均值± s.d。病毒效價以log10 pfu/ml給定。

【0148】在圖15可看到，在分別含有10%蔗糖或海藻糖的基底調配物中，在兩個HSA濃度均觀察到凍乾後的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效價為<0.2 log損失(圖15A)。因此，後續的基底緩衝液調配物係製備成含有磷酸鹽緩衝液、NaCl、10%糖(海藻糖或蔗糖)連同0.1% HSA和指定的額外賦形劑。該等基底調配物之任一者的大多數賦形劑組合展現凍乾後和加速穩定樣本的經改良之病毒穩定性(圖15A-15B)。藉由使用加至基底調配物中的胺基酸和尿素組合來證實最大的冷凍保護作用。在25°C達5週後，已添加甘露醇和尿素，有或無胺基酸，例如丙胺酸、精胺酸、MSG和甲硫胺酸的任一基底調配物皆展現了最佳的病毒穩定性(圖15A-15B)。使基底調配物中的糖濃度增加至15%並無提供就保護病毒效價而言的任何額外優點。

【0149】在活減毒病毒疫苗中保存病毒效力對於在產品的保質期內的成功免疫是至關重要的，反過來說，其很大程度上取決於調配物的組成和最終藥學劑型的類型(即，液體與凍乾)。由於凍乾涉及冷凍和乾燥壓力，單一賦形劑常常不足以穩定病毒，因而常常需要添加劑組合來防止不同的降解機制。在用於冷凍保護其他活病毒疫苗的TDV病毒效價的該等凍乾調配物中，顯示出糖，例如蔗糖或海藻糖是必需的。舉例來說，與蔗糖和山梨醇的組合

相比，海藻糖與明膠的組合證實了對活減毒腮腺炎疫苗的更良好穩定性。相反地，相對於僅有海藻糖，蔗糖和乳白蛋白給予活、減毒的小反芻獸疫(PPR)疫苗優異的熱保護作用。

【0150】在此項研究中，蔗糖和海藻糖兩者與其他賦形劑合併對於黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)穩定性的效應係經系統性地研究。含有尿素、EDTA、多元醇、蛋白質、聚合物和胺基酸的調配物在凍乾後展現了高度的病毒回復率，與糖類型(海藻糖對蔗糖)無關，黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效價為<0.2 log損失。在研究的賦形劑當中，在以含有$MgCl_2$和PF127的調配物凍乾後，病毒效力損失最高。$MgCl_2$在穩定脊髓灰白質炎病毒是眾所周知的；然而，此項研究提供了對於TDV病毒穩定性的不利效應。於是，$MgCl_2$的穩定效應可能是病毒依存性的。

【0151】一旦識別出前導賦形劑，即對選定的賦形劑組合測試其保存黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)效力的能力。含有某些組合的胺基酸和尿素的調配物展現出顯著的可觀察到的黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)冷凍保護作用，並且當進一步與甘露醇合併時，在25°C儲存5週後賦予最高的病毒效力穩定性。儘管不希望受限於任何理論，但尿素在保護脫水期間的病毒完整性/穩定性可能具有重要角色。胺基酸的添加改善了儲存期間的含蔗糖調配物中各種蛋白質的穩定性，並且可能經由

優化的水合及/或增加的溶劑表面張力在穩定化中潛在地發揮作用。甘露醇主要用作填積劑及/或穩定劑，並且已經與用於凍乾生藥調配物的非晶質糖合併使用。已報導甘露醇係藉由作為冷凍保護劑、自由基清除劑、以及藉由提高脫水顆粒的機械強度來穩定病毒。

【0152】在此項工作中，為凍乾活病毒疫苗候選者的調配物設計採用的方式是半經驗實驗和增強探索性數據分析的組合。基於文獻回顧、藥學經驗和最終目標產品概況的考量，此項工作欲檢驗的藥學賦形劑的起始清單係使用科學理論降至18個添加劑(見表9)。賦形劑組合的經驗篩選生成了一個歷史數據集，其藉由多變量分析和可視化進行詢問，以從初始模型中生成探索性圖形，從而引導選擇關鍵賦形劑、彼等的潛在範圍、以及就彼等的病毒穩定化效應而言的賦形劑交互作用。從一開始建構實驗數據集，而非設計多變量篩選實驗，避免在設計的研究中添加無作用的賦形劑及/或使用不適當範圍的賦形劑。

【0153】建構實驗性病毒穩定性數據集、進行探索性數據分析並將該等數據追溯擬合為「初始」迴歸模型並不是沒有其限制。這就是為何在此階段生成的模型被描述為探索性(圖11A和11B)，在於彼等有助於引導以統計學方式設計的實驗可能產生更可靠的預測模型(DSD；表15)。非以統計學方式設計用於精確、預測模擬的歷史數據集可能包含不必要的數據點、不一致的回應測量、及/或對於回應參數的不完整測量數據。該等類型的數據集工

件不太可能得到準確可靠的統計模型。此係藉由凍乾後效價的log_{10}損失模型擬合的低R^2值來例示(圖11A)。此可能部分地由於很難模擬受測的兩個濃度的HSA (0.1%和2%)之間的空間，其造成人為地誇大HSA*HSA交互作用的顯著性(圖12A)，於是識別可能的誤導曲線型項目。對數據集有明確的科學理解賦予了合理地利用探索性數據分析和初步統計模型作為選擇賦形劑及其濃度的指導方針的能力。

【0154】前導賦形劑的選擇及其潛在的工作濃度對於從設計的實驗中衍生之預測模型的有效性進入及最大化是至關重要的。檢查DSD篩選模型(圖12C)的回應數據，並經由JMP中的預測剖析器識別最理想的設置和範圍，最終創建能夠說明和測繪用於穩定凍乾黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)的最佳調配物的設計空間的輪廓圖(數據未顯示)。該DSD識別出海藻糖和HSA之間的顯著交互作用，發現穩定化特性與丙胺酸無關，並能夠確認甘露醇和尿素的最佳濃度。該DSD模型具有高R^2值的良好擬合，為模型的可靠性提供信心，容許了前導調配物的最終選擇。

【0155】當前導凍乾調配物被製備成含有TDV-1、-2、-3、和-4的四價混合物並在加速(25°C達5週)與即時穩定性研究(4°C達39週)被挑戰時，該等模型被認證為預測和驗證。如DSD模型所預測的，發現調配物3和4在凍乾和儲存在25°C後的病毒效力損失有限。儘管就含葡聚

醣的調配物而言，凍乾後的效力損失升高，但預測所有四個調配物在所有血清型以固態儲存在4°C長達78週(2x最後穩定性時間點)期間皆維持最小至無損失，於是顯示識別用於穩定單價黃病毒(譬如登革熱血清型-3，TDV-3)的候選凍乾調配物在25°C對於所有四個登革熱病毒血清型皆穩定。目前，許多疫苗製造商希望以rHSA置換人類衍生的HSA，以避免與人類衍生產品相關的潛在風險。用葡聚醣和rHSA置換天然HSA係試圖解決此一考量。在最近的臨床研究中，帶有rHSA的M-M-R®II展現出與使用健康兒童的HSA製造的M-M-R®II類似的安全性和免疫性特徵，佐證了帶有rHSA的調配物3可有利於病毒穩定性以及臨床安全性。

【0156】本研究提供了有效率的案例研究，藉其可使用合併的經驗篩選和統計模擬分析來識別和確認用於候選凍乾活病毒疫苗之穩定化和調配物開發的主要貢獻者(及其最佳濃度)。此針對凍乾活病毒疫苗的調配物開發的合併方法不僅可節省資金和時間，還可建立增強的病毒穩定性數據包，以支援並行過程和調配物開發工作，以及提呈給推薦設計品質方式來開發疫苗產品的監管機構。

材料和方法

【0157】在一個例示性方法中，使溶於FTA緩衝液(1% Pluronic F127® (F) 15%海藻糖 (T)、與0.1% HSA (A)，溶於PBS緩衝液，pH 7.4)中的冷凍登革熱病毒原液(譬如TDV-3)原液：~7.30 X 10^7 pfu/mL) (舉例來說，在

某些方法中，使用批號：DMV013-3)儲存在-80°C。將庫存液在37°C水浴中解凍並等分(100 μL置於1.5 mL管)。將該等分物儲存於-80°C直到使用。在某些方法中，該等分物可不止一次冷凍和解凍。舉例來說，該些等分物的熱歷史等同於兩次凍融循環。冷凍登革熱病毒庫存液係藉由溫和振盪混合來解凍。樣本係於下列緩衝液中製備：10 mM Tris (pH 7.2)、10 mM組胺酸(pH 7.2)、10 mM HEPES (pH 7.2)、10 mM磷酸鈉(pH 7.2)，全部有或無50 mM NaCl，還有10 mM磷酸鹽，帶有137 mM NaCl (PBS)。在彼等分別的緩衝液中製備所有賦形劑庫存液並將pH調成7.2或7.4。為了製備某些病毒調配物，將病毒原液和調配物緩衝液混合，以達到大約$2x10^5$ pfu/mL的最終病毒濃度。

【0158】在一例中，隨後將六百五十微升(650 μL)的各個登革熱病毒調配物(譬如四價登革熱調配物)等分至2 mL小瓶中，使該等小瓶凍乾或儲存於-80°C作為凍乾前的對照組。使用保守型凍乾循環，以確保正在評估的候選調配物被合宜地冷凍乾燥。將所有樣本載至預冷裝置，直到-45°C。將熱電偶放置在FTA對照組/安慰劑小瓶。將熱電偶以下列方式放置在架子內：一個在中間，一個在前面，兩個在後面。一旦該循環完成，用氮氣回填腔室，直到室壓達到580托，並將小瓶完全閉塞。容許該腔室達到大氣壓(760托)。此時，打開釋放閥，並且移出含有閉塞凍乾小瓶的托盤。隨後將所有小瓶密封。冷凍乾燥的小瓶

隨後以目視評估並以數位相機拍攝(8百萬像素)，以記錄塊狀物外觀和結構。隨後使凍乾的病毒調配物儲存在-80°C。

【0159】所有安慰劑和病毒樣本係於含有10 mM磷酸鈉(pH 7.2)和30 mM NaCl與0.1% HSA的基底緩衝液中製備。FTA係於10 mM PBS (磷酸鹽緩衝鹽水，帶有137 mM NaCl (pH 7.4))中製備。在彼等分別的緩衝液中製備所有賦形劑庫存液並將pH調成約7.0至約8.0或約7.2至約7.4。使用微量滴定IFA試驗來評估凍乾前後兩者的病毒樣本的效力。在約室溫(譬如25°C) (4個小瓶)進行選定病毒與凍乾調配物的穩定性研究，達五週。儲存在-80°C (4個小瓶)達五週的樣本係用作對照組。

【0160】在另一例中，在磷酸鹽緩衝液、15%海藻糖、1% PF127與0.1% HSA-中的冷凍TDV-1、TDV-2、與TDV-4病毒原液係由武田疫苗(Takeda Vaccines, Inc.)供應，並冷凍於-80°C直到進一步使用。蔗糖與海藻糖購自Pfanstiehl Laboratories (Waukegan, Illinois)。L-精胺酸、甲硫胺酸、L-麩胺酸單鈉、EDTA、葡聚醣40、氯化鎂、甘露醇、山梨醇、明膠購自Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri)。Pluronic F127樣本係承接自BASF。用於製備緩衝液的鹽、聚山梨醇酯80、尿素購自Fisher Scientific and Acros。人類血清白蛋白購自Octapharma以及重組HSA (rHSA)係獲自Novazymes。

【0161】在另一例中，病毒效價係藉由噬菌斑試驗

使用96孔微量滴定法測定。簡言之，以單價或四價病毒的稀釋液感染附著性猴腎細胞單層，接著添加黏性覆蓋物。視血清型而定，隨後使盤於37°C培育2或3天，隨後洗滌並固定染色。使用血清型特異性單株抗體進行染色。對於血清型1至4，該試驗分別具有± 0.34、0.17、0.19、與0.19 log10 pfu/0.5 mL (藥量)的工作變量範圍，其係藉由趨勢對照分析測定。各個樣本以一式三份測量，結果報告為該等值的平均。

【0162】*病毒調配物和凍乾*。各個賦形劑的散裝溶液係於含30 mM NaCl的磷酸鹽緩衝液中製備並將pH調成7.2。將所欲份量的賦形劑和帶有30 mM NaCl的磷酸鹽緩衝液混合，以獲得最終濃度，隨後加入適量的病毒原液，以達到$2*10^5$ pfu/ml。所有病毒製備工作皆在第II類生物安全櫃(Labconco, Kansas City, MO)執行。

【0163】在某些方法中，將約650 µl病毒疫苗調配物分配在無菌的2mL小瓶中，並用無菌橡膠塞部分地密封。使用保守型凍乾循環，在歷經2天的過程中，在50毫托壓力下，使溫度從−45升至25°C，以產生凍乾調配物。將樣本裝入具有設定成-45°C的預冷擱板的FTS Lyo Star II (SP Scientific)。在−45°C達2 h的冷凍步驟之後，向下減壓至50 mTorr (約2 hr.)，使溫度增至-37°C，升溫速率為0.1°C /min。在初次乾燥結束時，溫度升高至25°C，升溫速率為0.1°C /min，繼續乾燥6 hr。在二次乾燥完成後，使擱板冷卻至 4°C並保持在4°C直到循環完成(詳見

表2)。循環完成後，將小瓶回填氮氣，並於真空閉塞(580,000托)，然後從該腔室移出，隨後以鋁密封作緊封。該凍乾循環係藉由將熱電偶放置於每批至少三個安慰劑小瓶的底部中心並使用比對壓力測量來監測(派藍尼真空計(pirani) vs.電容壓力計)。

〔0164〕*凍乾病毒調配物的熱穩定性測試*。使選定的凍乾疫苗調配物儲存在4°C冰櫃中以及25°C的穩定室中。在指定的時間長度後，將小瓶取樣並用0.5 ml注射用無菌水復水。使用微量滴定試驗評估重構疫苗的病毒感染性。為了評估凍乾以後的病毒穩定性，藉由微量滴定試驗測定復水疫苗的感染效力。藉由從初始效價(儲存於-80°C的冷凍液體對照組樣本)減去儲存於-80°C的凍乾病毒樣本的效價來計算凍乾以後的病毒效價損失。同樣地，藉由比對培育樣本的病毒感染性和儲存於-80°C的凍乾後樣本的感染性來測定即時和加速儲存期間的病毒效力損失。藉由使用以下方程式的誤差傳播方法來計算損失的誤差。$SD(c)=\sqrt{SD(a)^2+SD(b)^2}$。對於各個條件，樣本係以一式三份滴定，並計算平均$\log_{10}$效價。

〔0165〕*統計分析*。回應表面方法係使用逐步迴歸工具擬合，限定性篩選設計係使用JMP剖析器v11.2.0 (JMP Corporation, Cary, NC)可取得的實驗設計平台生成。

〔0166〕*藥學塊狀物品質測定*。凍乾塊狀物係以1至3的主觀量表評等，其中其中1＝差劣，2＝尚可，3＝良好。評等為1的塊狀物被區別為具有大規模的結構性塌

陷、底部和側面上有回融、來自所有側面的顯著收縮和回縮、及/或顆粒的外觀。評級為2的塊狀物具有來自側面的局部收縮和回縮、底部中等回融、及/或水平地或垂直地穿過塊狀物的大型裂口或裂紋。評等為3的塊狀物是在藥學上美觀的、呈現為緊實的(主要是白色，取決於賦形劑組合)，塊狀物結構具有大致平坦的表面，並且從塊狀物頂部或小瓶側邊，該塊狀物沒有或有最少的收縮或回縮。

【0167】縮寫：

CM：電容壓力計

DOE：實驗設計

HSA：人類血清白蛋白

HEPES：2-[4-(2-羥乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸

IFA：免疫聚焦試驗

MSG：麩胺酸單鈉

NaCl：氯化鈉

PBS：磷酸鹽緩衝鹽水

rHSA：重組人類血清白蛋白

THAM/ Tris：參(羥甲基)胺基甲烷

Pfu：噬菌斑形成單位

PF127：Pluronic F-127®，泊洛沙姆407 (poloxamer 407)

【0168】由上述討論，將可理解，本發明可以多種形式來體現，包含但不限於下列：

範例1. 一種黃病毒組成物，包含：

一或多種活黃病毒；

海藻糖和蔗糖的至少一者；以及

尿素；

其中該組成物穩定該一或多種活黃病毒。

範例2. 如範例1之黃病毒組成物，其中該組成物進一步包含一基底緩衝液，該基底緩衝液包含磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、HEPES緩衝液、組胺酸緩衝液或Tris緩衝液。

範例3. 如範例1或2之黃病毒組成物，該組成物包含至少一鹽，該鹽包含氯化鈉(NaCl)、磷酸鈉(Na_2HPO_4)、氯化鉀(KCl)或磷酸鉀(KH_2PO_4)。

範例4. 如範例1至3中任一者之黃病毒組成物，其中該至少一鹽包含濃度為10 mM至200 mM的NaCl。

範例5. 如範例1至4中任一者之黃病毒組成物，該組成物進一步包含甘露醇。

範例6. 如範例1至5中任一者之黃病毒組成物，該組成物進一步包含一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物。

範例7. 如範例6之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物包含甲硫胺酸、精胺酸、丙胺酸或其等之組合。

範例8. 如範例6之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物包含麩胺酸單鈉(MSG)。

範例9. 如範例6或7中任一者之黃病毒組成物，其中

該一或多種胺基酸或其鹽、酯或醯胺衍生物包含丙胺酸和甲硫胺酸。

範例10. 如範例1至9中任一者之黃病毒組成物，該組成物進一步包含一蛋白質劑，其包含血清白蛋白、葡聚醣、多元醇聚合物或明膠。

範例11. 如範例1至10中任一者之黃病毒組成物，其中該一或多種活黃病毒係選自由以下構成之群組：登革熱病毒、西尼羅河病毒(West Nile virus)、蜱傳腦炎病毒、黃熱病病毒、日本腦炎病毒、昆津病毒(Kunjin virus)、聖路易斯腦炎病毒(St. Louis encephalitis virus)、墨萊溪谷腦炎病毒(Murray Valley encephalitis virus)、茲卡病毒(Zika virus)、或其任何相關之黃病毒。

範例12. 如範例1至11中任一者之黃病毒組成物，其中該一或多種活黃病毒包含活、減毒黃病毒。

範例13. 如範例1至12中任一者之黃病毒組成物，其中該一或多種活黃病毒包含登革熱病毒。

範例14. 如範例1至13中任一者之黃病毒組成物，其中該組成物進一步包含一緩衝液。

範例15. 如範例10之黃病毒組成物，其中該血清白蛋白包含重組血清白蛋白、天然白蛋白、人類血清白蛋白、牛血清白蛋白或白蛋白樣劑(albumin-like agent)。

範例16. 如範例10或15中任一者之黃病毒組成物，其中該一或多種蛋白質劑具有自0.05%至1.0% (w/v)的濃度。

範例17. 如範例1至16中任一者之黃病毒組成物，其中該海藻糖和蔗糖或海藻糖和蔗糖之組合係以介於自0.5%至10.0% (w/v)之範圍的濃度存在於該組成物中。

範例18. 如範例1至16中任一者之黃病毒組成物，其中該海藻糖和蔗糖或海藻糖和蔗糖之組合係以少於10.0% (w/v)的濃度存在於該組成物中。

範例19. 如範例6至18中任一者之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物係以介於自1.0 mM至25.0 mM之範圍的濃度存在於該組成物中。

範例20. 如範例1至19中任一者之黃病毒組成物，其中該組成物中的該尿素濃度係自0.01%至0.5% (w/v)。

範例21. 如範例14之黃病毒組成物，其中該組成物包含HSA、甘露醇、丙胺酸、甲硫胺酸和MSG。

範例22. 如範例21之黃病毒組成物，其中該HSA濃度係自0.05%至0.5% (w/v)；其中該蔗糖、海藻糖或蔗糖和海藻糖之組合的濃度係自0.5%至10.0% (w/v)；其中該甘露醇濃度係自1.0%至15.0% (w/v)；其中該丙胺酸濃度係自5.0 mM至25.0 mM；其中該甲硫胺酸濃度係自1.0 mM至5.0 mM；其中該MSG濃度係自1.0 mM至20 mM；且其中該尿素濃度係自0.01%至0.5% (w/v)。

範例23. 如範例1之黃病毒組成物，其中該組成物包含HSA、蔗糖、和丙胺酸。

範例24. 如範例23之黃病毒組成物，其中該HSA濃度

係自0.05%至0.5% (w/v)；其中該蔗糖濃度係自0.5%至10.0% (w/v)；其中該丙胺酸濃度係自5.0 mM至25.0 mM；且其中該尿素濃度係自0.01%至0.5% (w/v)。

範例25. 如範例1之黃病毒組成物，其中該組成物包含HSA、蔗糖、甲硫胺酸和尿素。

範例26. 如範例25之黃病毒組成物，其中該HSA濃度係自0.05%至0.5% (w/v)；其中該蔗糖濃度係自0.5%至10.0% (w/v)；其中該甲硫胺酸濃度係自1.0 mM至5.0 mM；且其中該尿素濃度係自0.01%至0.5% (w/v)。

範例27. 如範例1之黃病毒組成物，其中該組成物包含HSA、精胺酸和尿素。

範例28. 如範例27之黃病毒組成物，其中該HSA濃度係自0.05%至0.5% (w/v)；其中該蔗糖、海藻糖或蔗糖和海藻糖之組合的濃度係自0.5%至10.0% (w/v)；其中該精胺酸濃度係自1.0 mM至約20.0 mM；且其中該尿素濃度係自0.1%至0.3% (w/v)。

範例29. 如範例1之黃病毒組成物，其中該組成物進一步包含HSA、MSG和尿素。

範例30. 如範例29之黃病毒組成物，其中該HSA濃度係自0.05%至0.5% (w/v)；其中該海藻糖濃度係自0.5%至10.0% (w/v)；其中該MSG濃度係自1.0 mM至20 mM；且其中該尿素濃度係自0.01%至0.5% (w/v)。

範例31. 一種黃病毒組成物，包含

一或多種活黃病毒；

海藻糖和蔗糖中的至少一者；以及

甘露醇或MSG中的至少一者；

其中該組成物穩定該一或多種活黃病毒。

範例32. 如範例31之黃病毒組成物，其中該黃病毒組成物進一步包含一基底緩衝液，該基底緩衝液包含磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、HEPES緩衝液、組胺酸緩衝液或Tris緩衝液。

範例33. 如範例31或32之黃病毒組成物，該組成物進一步包含一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物。

範例34. 如範例33之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物包含甲硫胺酸、精胺酸、丙胺酸或其等之組合。

範例35. 如範例33之黃病毒組成物，其中該黃病毒組成物包含蔗糖、甲硫胺酸、丙胺酸和MSG。

範例36. 一種用於穩定活黃病毒的方法，包含：

將一或多種活黃病毒與一組成物組合，該組成物包含：

海藻糖和蔗糖的至少一者；以及

尿素；

其中該組成物穩定該一或多種活黃病毒。

範例37. 如範例36之方法，其中該一或多種活黃病毒係選自由以下構成之群組：登革熱病毒、西尼羅河病毒、蜱傳腦炎病毒、黃熱病病毒、日本腦炎病毒、昆津病毒、

聖路易斯腦炎病毒、墨萊溪谷腦炎病毒、茲卡病毒、或其任何相關病毒。

範例38. 如範例37之方法，其中該一或多種活黃病毒包括登革熱病毒。

範例39. 如範例36至38中任一者之方法，其中黃病毒組成物係被凍乾的。

範例40. 如範例36至39中任一者之方法，其中該被凍乾的黃病毒組成物係於25°C長期儲存。

範例41. 如範例39或40之方法，該方法進一步包含在將該組成物作為免疫性組成物的一部分投予一個體之前，先將該組成物部分地或全部地復水。

範例42. 如範例36至38中任一者之方法，進一步包含一緩衝液。

範例43. 如範例36之方法，進一步包含選自由以下構成之群組的一或多種蛋白質劑：血清白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、重組血清白蛋白、牛血清、明膠、葡聚醣、多元醇聚合物、或其等之組合。

範例44. 如範例36至43中任一者之方法，進一步包含一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物。

範例45. 如範例44之方法，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物係選自由以下構成之群組：丙胺酸、精胺酸、甲硫胺酸、MSG或其等之組合。

範例46. 如範例36至45中任一者之方法，其中該尿素係以介於自0.01%至0.5% (w/v)之範圍的濃度存在於該組

成物中。

範例47. 一種用於穩定活黃病毒的套組，包含：

如範例1至35中任一者之組成物；以及

至少一容器。

範例48. 一種用於識別一賦形劑的方法，該賦形劑改良一或多種活病毒之穩定性，該方法包含：

生成一實驗病毒穩定性數據集；

藉由對該穩定性數據集進行單變量迴歸和多變量數據分析，建構一探索性統計模型；

識別至少一賦形劑，其中該至少一賦形劑增加一或多種活病毒的穩定性。

範例49. 如範例48之方法，該方法進一步包含將該至少一賦形劑的命中者(hits)和位準整合至一限定性篩選設計(definitive screening design)(DSD)中。

範例50. 如範例49之方法，該方法進一步包含識別該至少一賦形劑的最佳賦形劑濃度，其中相較於無該至少一賦形劑的病毒，該最佳賦形劑濃度減少了病毒效力損失。

範例51. 如範例48至50中任一者之方法，該實驗病毒穩定性數據集係使用意圖用於回應表面方法(RSM)的JMP 11.2.0中可取得的逐步迴歸工具來模擬。

範例52. 如範例48至51中任一者之方法，其中該一或多種活病毒包含黃病毒。

範例53. 如範例48至52之方法，其中該至少一賦形劑包括海藻糖、半乳糖、果糖、蔗糖、幾丁聚醣、山梨醇、

甘露醇、血清白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、胎牛血清(FBS)、明膠、葡聚醣、多元醇聚合物、丙胺酸、精胺酸、甲硫胺酸、MSG和尿素

【0169】本案揭示和主張的所有組成物和方法可依據本揭示內容在無過度實驗下進行和執行。儘管已就較佳實施例說明了組成物和方法，但對於熟習本領域技術者顯而易見的是，可將變化應用於該組成物和方法及本案所述方法的步驟或步驟順序，而不逸離本案概念、精神和範疇。更明確地說，化學上和生理上皆相關的某些劑可以本案所述之劑取代，同時達到相同或相似的結果。對於熟習本領域技術者顯而易見的所有此類相似取代物和修飾被認為落在隨附申請專利範圍所界定的精神、範疇和概念以內。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種黃病毒組成物，包含：

一或多種活黃病毒，其包含登革熱病毒；

海藻糖和蔗糖的至少一者；以及

尿素；

其中該組成物穩定該一或多種包含登革熱病毒之活黃病毒。

【請求項2】如請求項1之黃病毒組成物，其中該組成物進一步包含一基底緩衝液，該基底緩衝液包含磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、HEPES緩衝液、組胺酸緩衝液或Tris緩衝液。

【請求項3】如請求項1或2之黃病毒組成物，該組成物包含至少一鹽，該鹽包含氯化鈉(NaCl)、磷酸鈉(Na_2HPO_4)、氯化鉀(KCl)或磷酸鉀(KH_2PO_4)。

【請求項4】如請求項3之黃病毒組成物，其中該至少一鹽包含濃度為10 mM至200 mM的NaCl。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之黃病毒組成物，該組成物進一步包含甘露醇。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之黃病毒組成物，該組成物進一步包含一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物。

【請求項7】如請求項6之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物包含甲硫胺酸、精胺酸、丙胺酸或其等之組合。

【請求項8】如請求項6之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物包含麩胺酸單鈉(MSG)。

【請求項9】如請求項6或7中任一項之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其鹽、酯或醯胺衍生物包含丙胺酸和甲硫胺酸。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之黃病毒組成物，該組成物進一步包含一蛋白質劑，其包含血清白蛋白、葡聚醣、多元醇聚合物或明膠。

【請求項11】如請求項1至10中任一項之黃病毒組成物，其中該一或多種活黃病毒包含活減毒黃病毒。

【請求項12】如請求項10之黃病毒組成物，其中該血清白蛋白包含重組血清白蛋白、天然白蛋白、人類血清白蛋白(HAS)、牛血清白蛋白或白蛋白樣劑(albumin-like agent)。

【請求項13】如請求項1至12中任一項之黃病毒組成物，其中該登革熱病毒包含呈下述形式的四種登革熱血清型：一登革熱1/2嵌合體、一經修飾的活減毒登革熱-2病毒、一登革熱3/2嵌合體、及一登革熱4/2嵌合體，其中作為該登革熱1/2嵌合體、該登革熱3/2嵌合體及該登革熱4/2嵌合體的骨架的登革熱-2病毒係一PDK-53登革熱-2株。

【請求項14】如請求項1至13中任一項之黃病毒組成物，其中該組成物不含氯化鎂($MgCl_2$)。

【請求項15】如請求項1至14中任一項之黃病毒組成

物，其中該一或多種蛋白質劑具有自0.05%至1.0% (w/v)的濃度。

【請求項16】如請求項1至15中任一項之黃病毒組成物，其中該海藻糖和蔗糖或海藻糖和蔗糖之組合係以介於自0.5%至15.0% (w/v)之範圍的濃度存在於該組成物中。

【請求項17】如請求項1至15中任一項之黃病毒組成物，其中該海藻糖和蔗糖或海藻糖和蔗糖之組合係以少於10.0% (w/v)的濃度存在於該組成物中。

【請求項18】如請求項6至17中任一項之黃病毒組成物，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或鹽、酯或醯胺衍生物係以介於自1.0 mM至25.0 mM之範圍的濃度存在於該組成物中。

【請求項19】如請求項1至18中任一項之黃病毒組成物，其中該組成物中的該尿素濃度係自0.01%至1.0% (w/v)。

【請求項20】如請求項12之黃病毒組成物，其中該組成物包含HSA、精胺酸和尿素。

【請求項21】如請求項1至20中任一項之黃病毒組成物，其中該HSA濃度係自0.05%至0.5% (w/v)；其中該蔗糖、海藻糖或蔗糖和海藻糖之組合的濃度係自0.5%至15.0% (w/v)；其中該精胺酸濃度係自1.0 mM至約20.0 mM；且其中該尿素濃度係自0.1%至0.3% (w/v)。

【請求項22】如請求項21之黃病毒組成物，其中該蔗糖、海藻糖或蔗糖和海藻糖之組合的濃度係自5.0%至

15.0% (w/v)。

【請求項23】一種用於穩定活黃病毒的方法，包含：

將一或多種包含登革熱病毒之活黃病毒與一組成物組合，該組成物包含：

海藻糖和蔗糖的至少一者；以及

尿素；

其中該組成物穩定該一或多種包含登革熱病毒之活黃病毒。

【請求項24】如請求項23之方法，其中該登革熱病毒包含呈下述形式的四種登革熱病毒血清型：一登革熱1/2嵌合體、一經修飾的活減毒登革熱-2病毒、一登革熱3/2嵌合體、及一登革熱4/2嵌合體，其中作為該登革熱1/2嵌合體、該登革熱3/2嵌合體及該登革熱4/2嵌合體的骨架的登革熱-2病毒係一PDK-53登革熱-2株。

【請求項25】如請求項23或24之方法，其中黃病毒組成物係被凍乾的。

【請求項26】如請求項23至25中任一項之方法，其中該被凍乾的黃病毒組成物係於25°C長期儲存。

【請求項27】如請求項25或26之方法，該方法進一步包含在將該組成物作為免疫性組成物的一部分投予一個體之前，先將該組成物部分地或全部地復水。

【請求項28】如請求項23至27中任一項之方法，進一步包含一緩衝液。

【請求項29】如請求項23之方法，進一步包含選自由

以下構成之群組的一或多種蛋白質劑：血清白蛋白、人類血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、重組血清白蛋白、牛血清、明膠、葡聚醣、多元醇聚合物、或其等之組合。

【請求項30】如請求項23至29中任一項之方法，進一步包含一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物。

【請求項31】如請求項30之方法，其中該一或多種胺基酸或其衍生物或其鹽、酯或醯胺衍生物係選自由以下構成之群組：丙胺酸、精胺酸、甲硫胺酸、MSG或其等之組合。

【請求項32】如請求項23至31中任一項之方法，其中該尿素係以介於自0.01%至0.5% (w/v)之範圍的濃度存在於該組成物中。

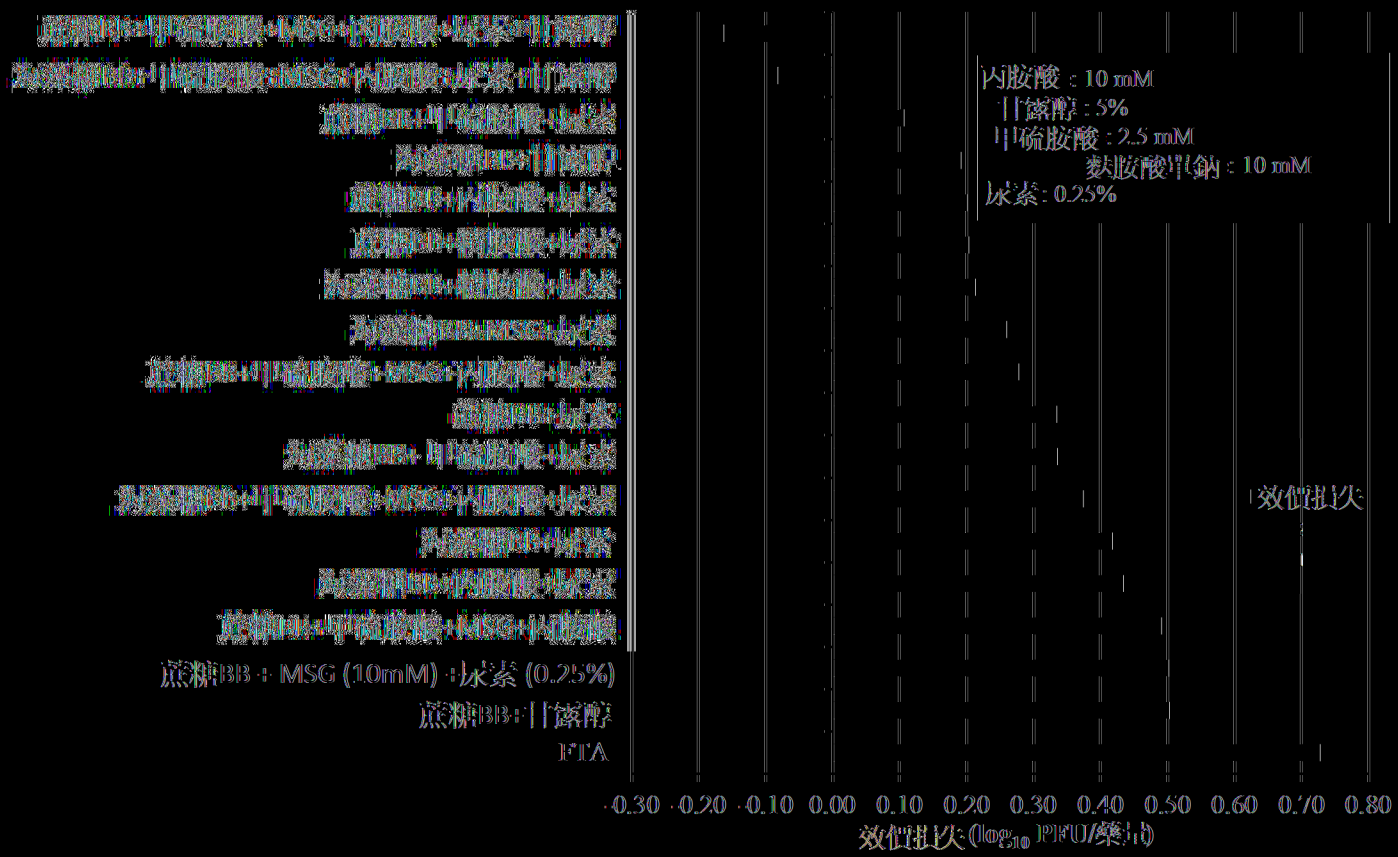
【請求項33】一種用於穩定活黃病毒的套組，包含：

如請求項1至22中任一項之組成物；以及

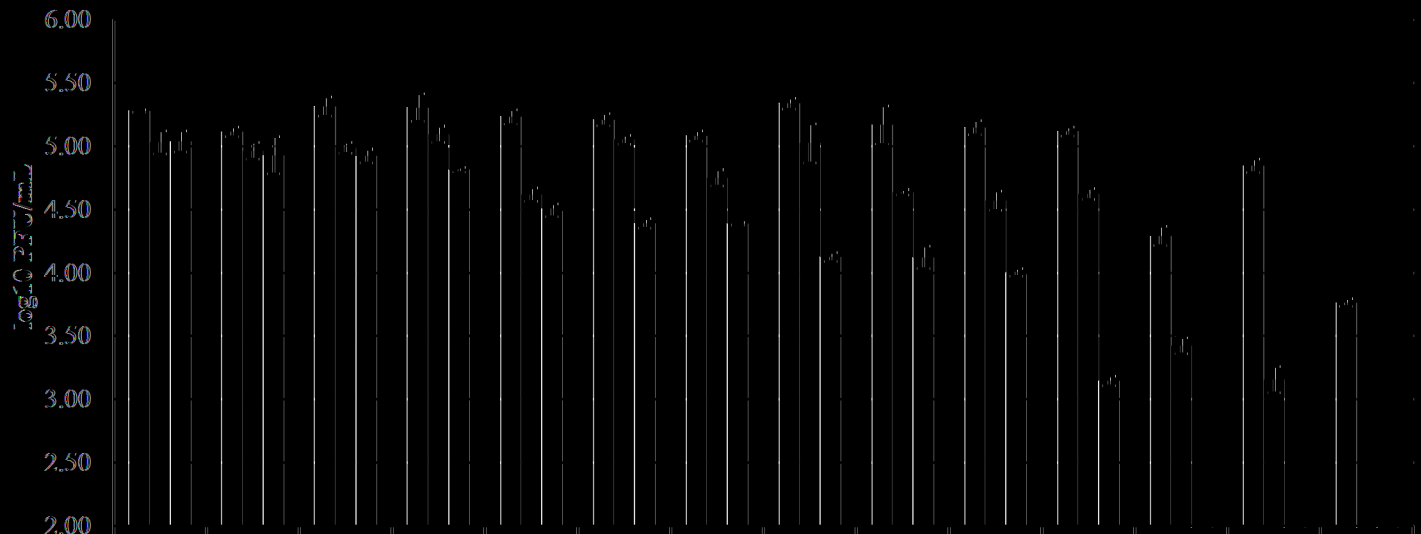
至少一容器。

【發明圖式】

於25℃，5週後的效力損失



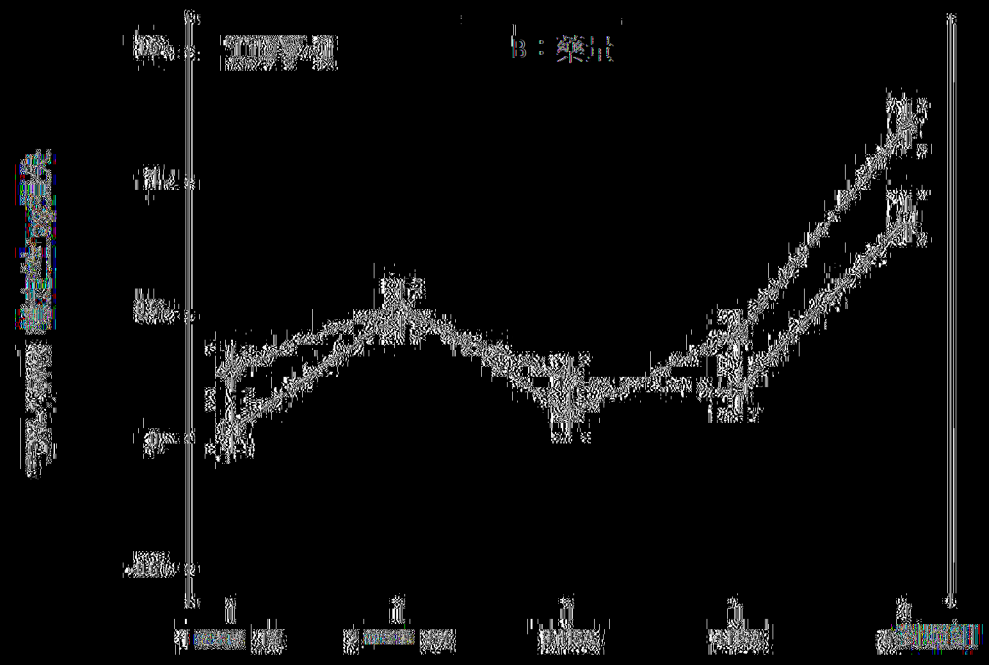
【圖1】



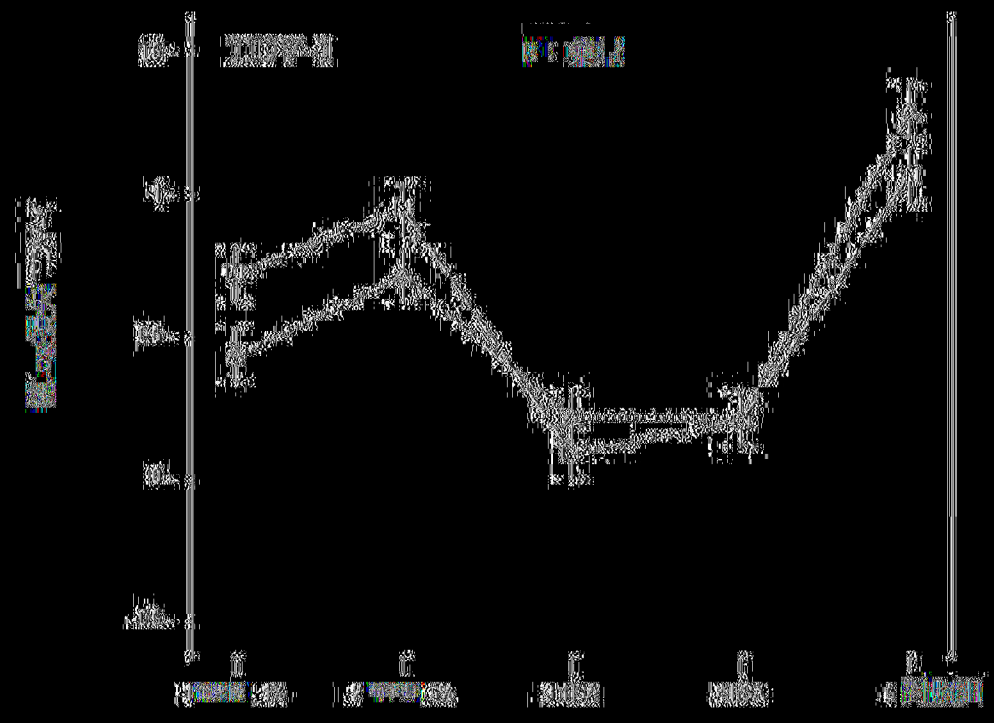
	Treh (10%) + Mann (3%) + Ala (0mM) + HSA(0.3%) + 尿素(0.25%)	Treh (5.5%) + Mann (3%) + Ala (10mM) + HSA(0.1%) + 尿素(0.125%)	Treh (5.5%) + Mann (5%) + Ala (20mM) + HSA(0.3%) + 尿素(0.25%)	Treh (10%) + Mann (5%) + Ala (0mM) + HSA(0.1%) + 尿素(0%)	Treh (10%) + Mann (5%) + Ala (20mM) + HSA(0%) + 尿素(0.125%)	Treh (10%) + Mann (1%) + Ala (20mM) + HSA(0.3%) + 尿素(0%)	Treh (1%) + Mann (1%) + Ala (0mM) + HSA(0.3%) + 尿素(0.125%)	FTA pH 7.4	Treh (1%) + Mann (5%) + Ala (10mM) + HSA(0.3%) + 尿素(0%)	Treh (10%) + Mann (1%) + Ala (10mM) + HSA(0%) + 尿素(0.25%)	Treh (1%) + Mann (1%) + Ala (20mM) + HSA(0.1%) + 尿素(0.25%)	Treh (1%) + Mann (5%) + Ala (0mM) + HSA(0%) + 尿素(0.25%)	Treh (1%) + Mann (3%) + Ala (20mM) + HSA(0%) + 尿素(0%)	Treh (5.5%) + Mann (1%) + Ala (0mM) + HSA(0%) + 尿素(0%)
前	5.28	5.11	5.31	5.30	5.23	5.21	5.08	5.34	5.17	5.15	5.12	4.29	4.84	3.76
後	5.03	4.96	4.99	5.09	4.62	5.05	4.75	5.02	4.64	4.57	4.62	3.43	3.16	0.00
25C	5.04	4.93	4.92	4.82	4.49	4.39	4.39	4.13	4.12	4.00	3.15	0.00	0.00	0.00
	6	7	9	5	11	1	3	14	13	2	4	8	10	12

調配物編號(表A)

(圖2)



（圖3A）



（圖3B）

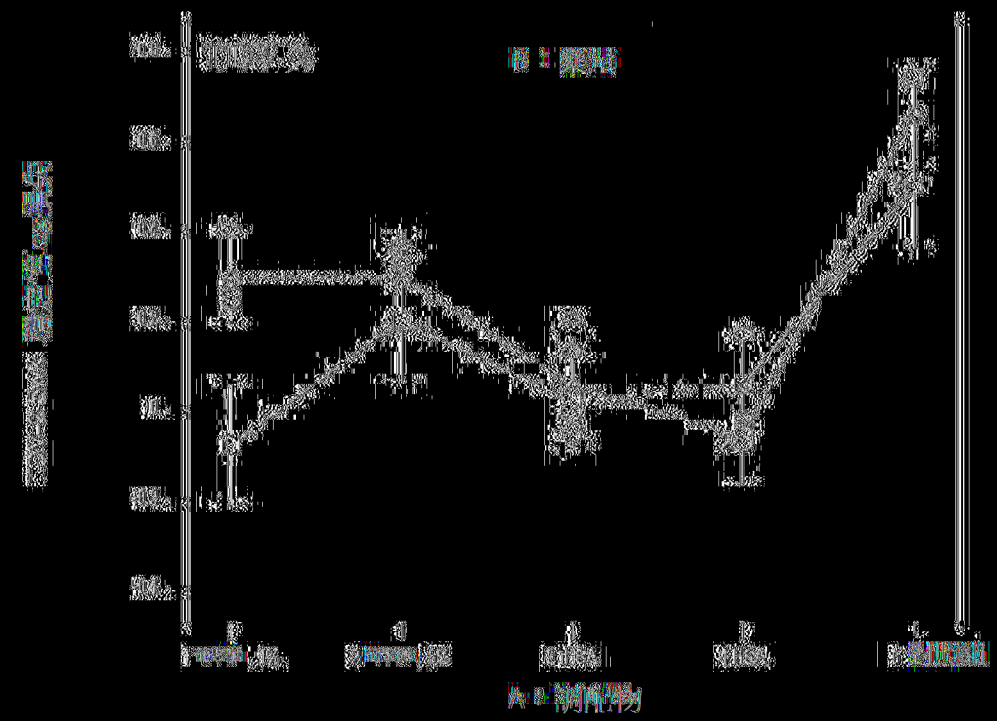


圖 1A

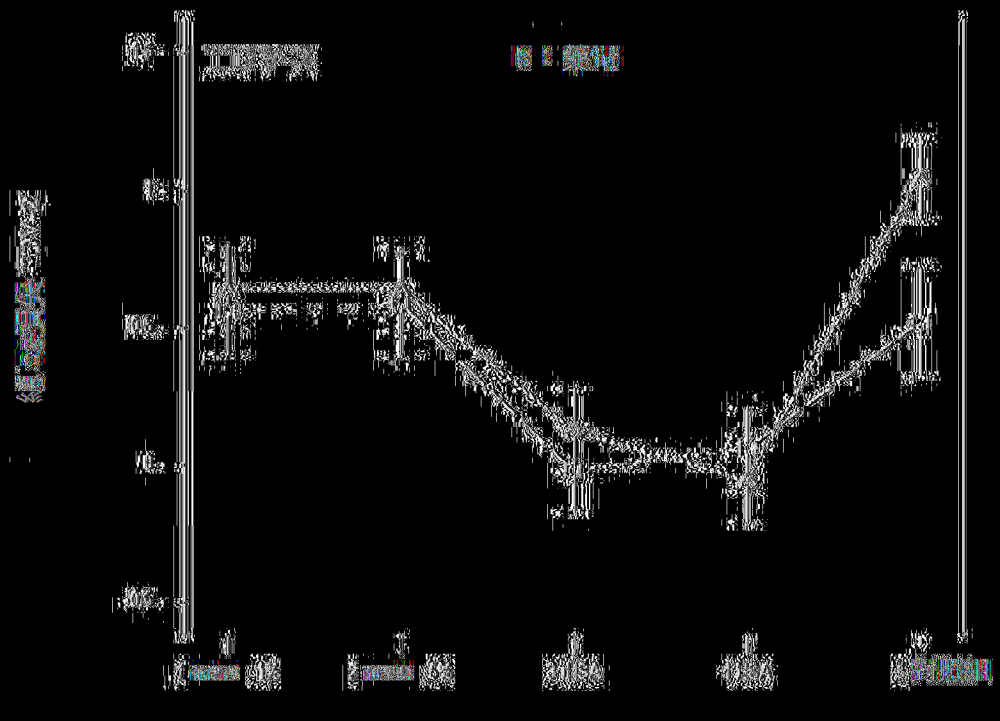
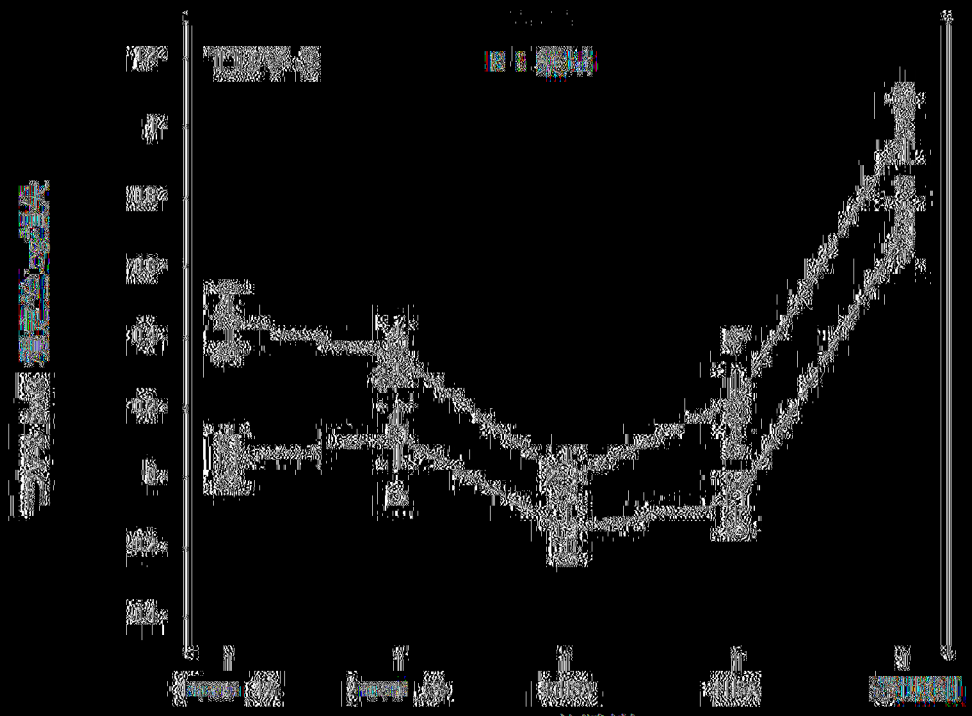
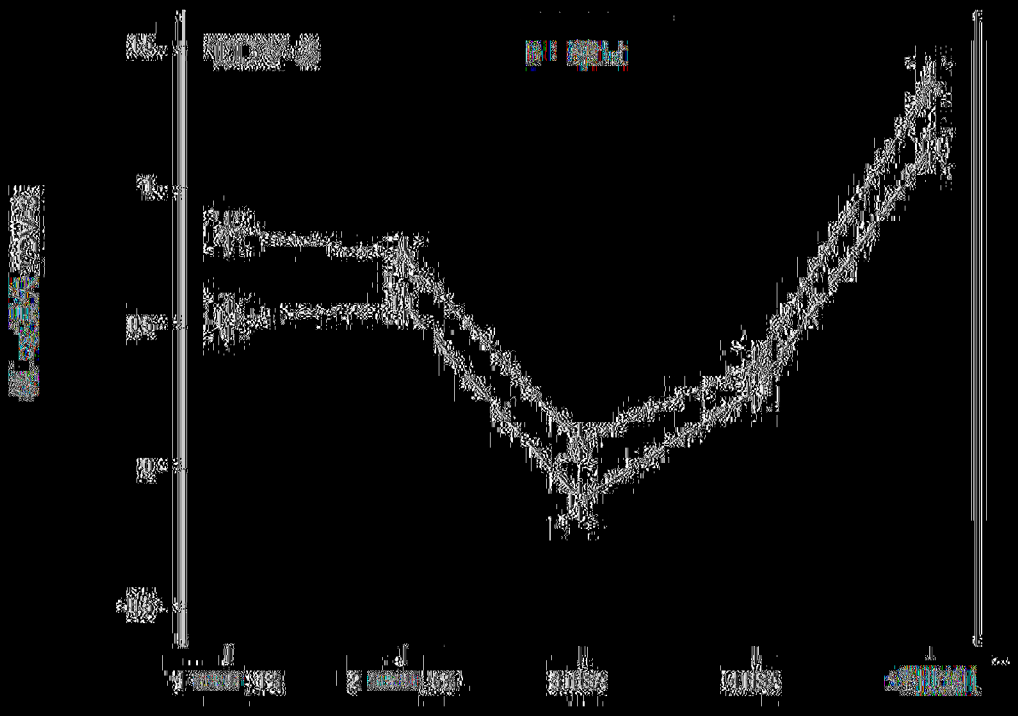


圖 1B



A：調配物

（圖5A）



（圖5B）

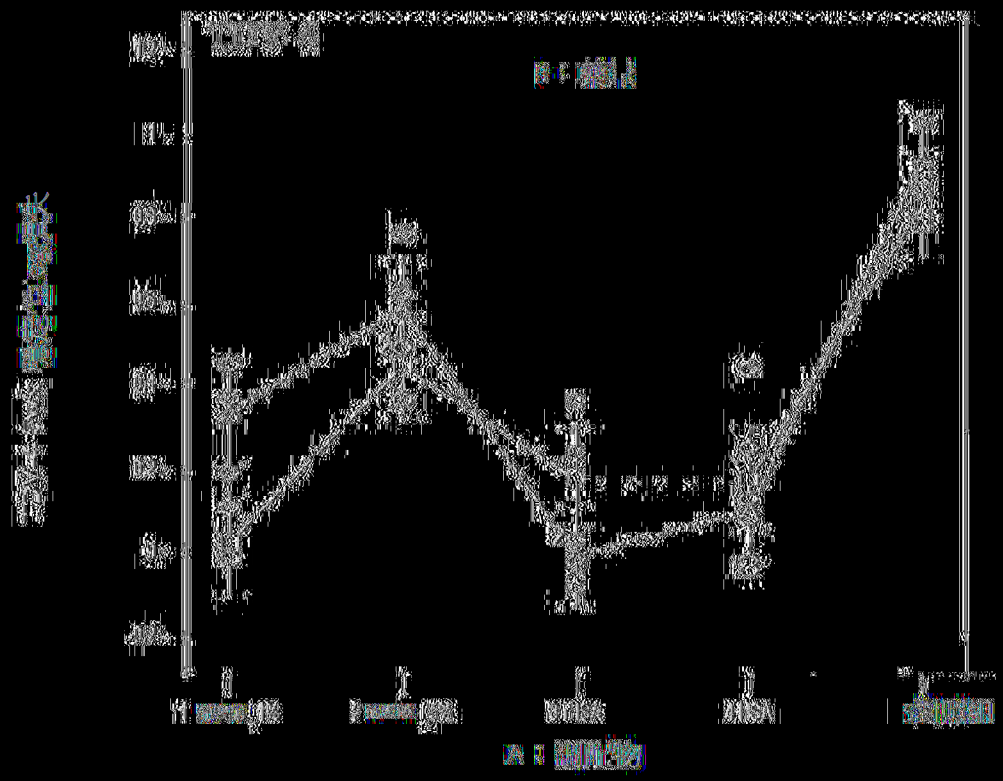


圖6A

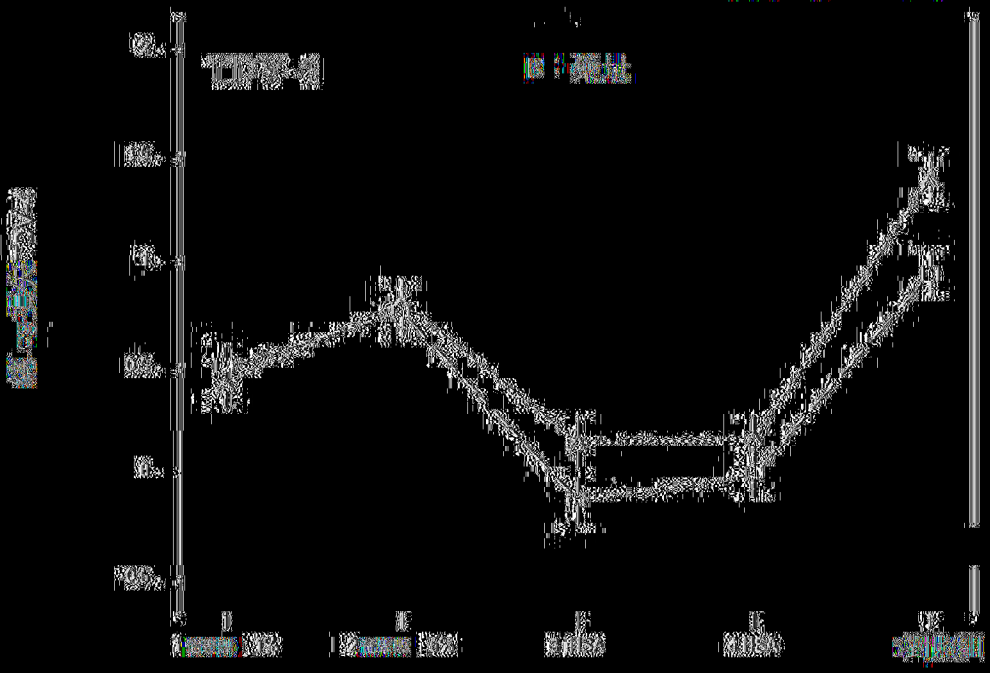


圖6B



圖1A

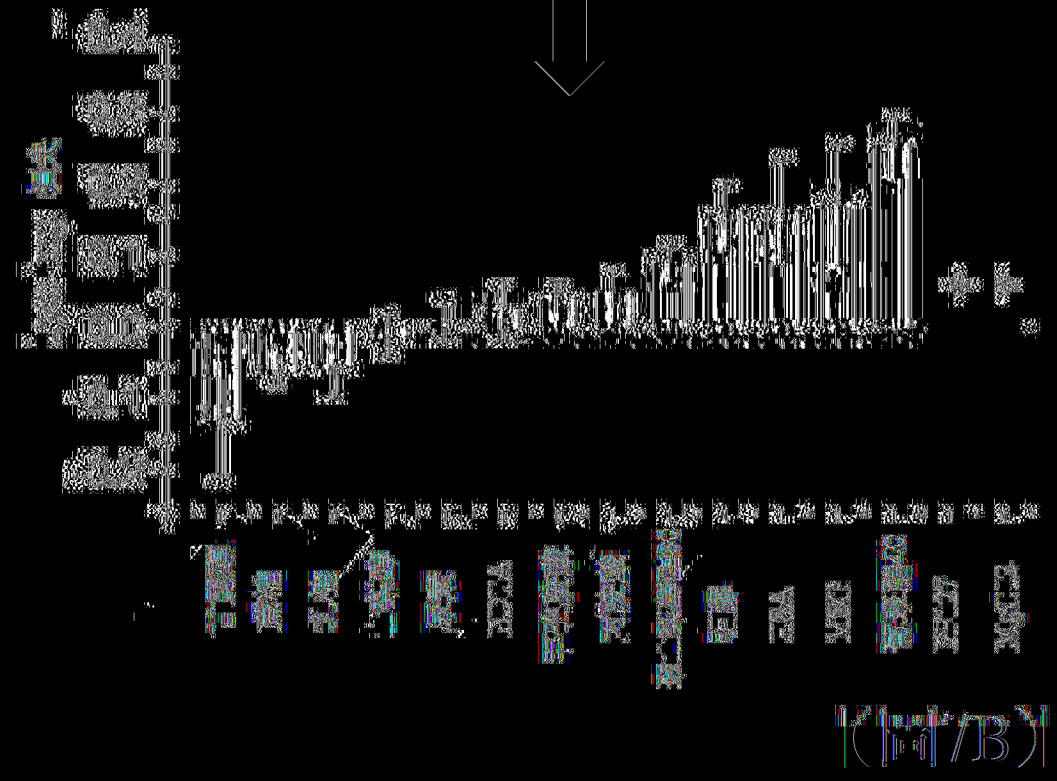
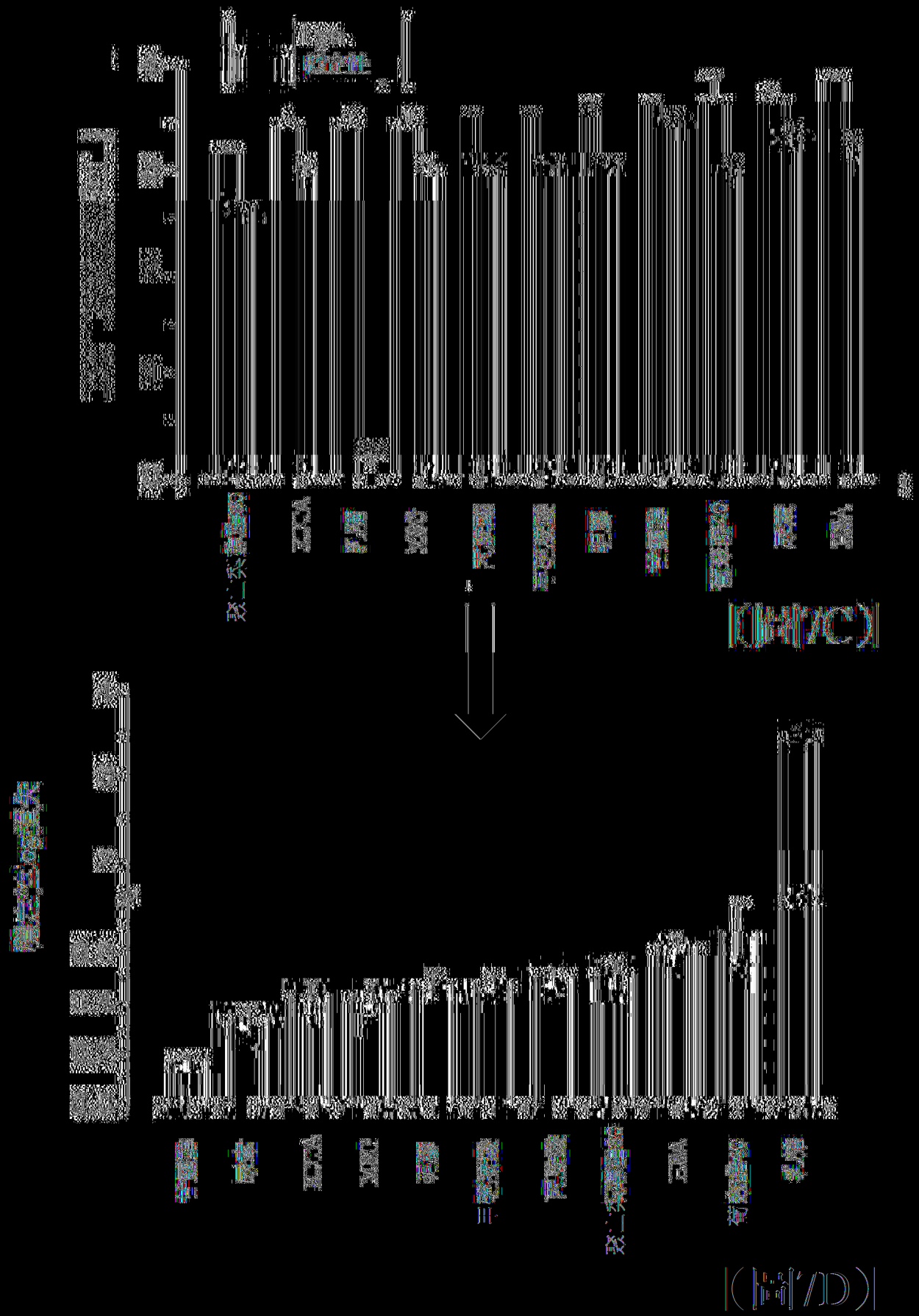
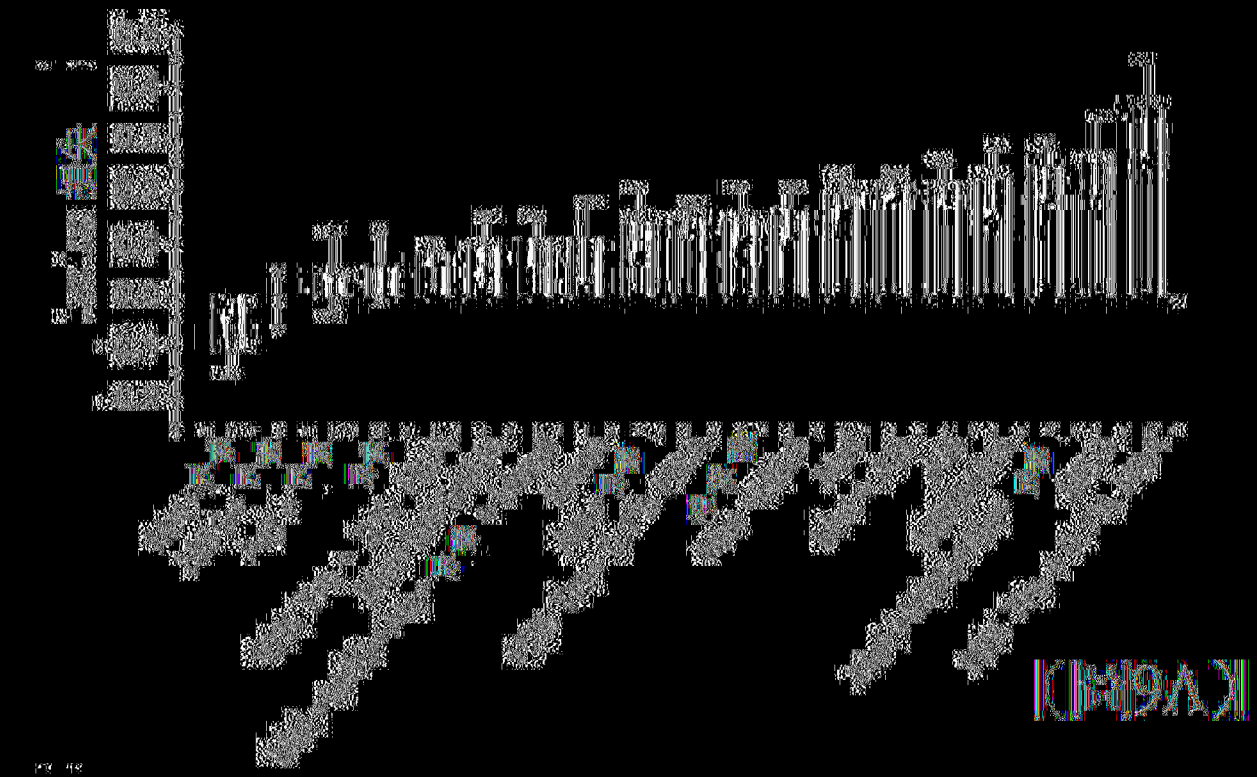


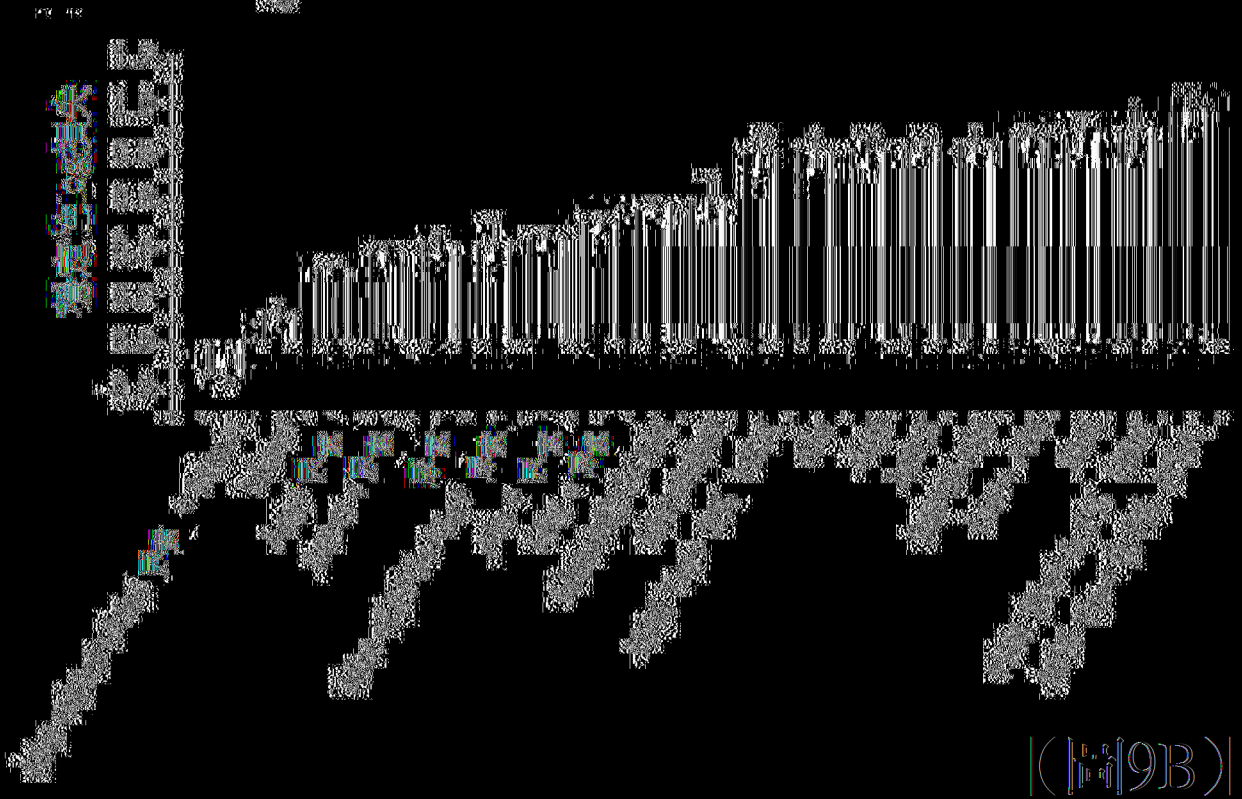
圖1B

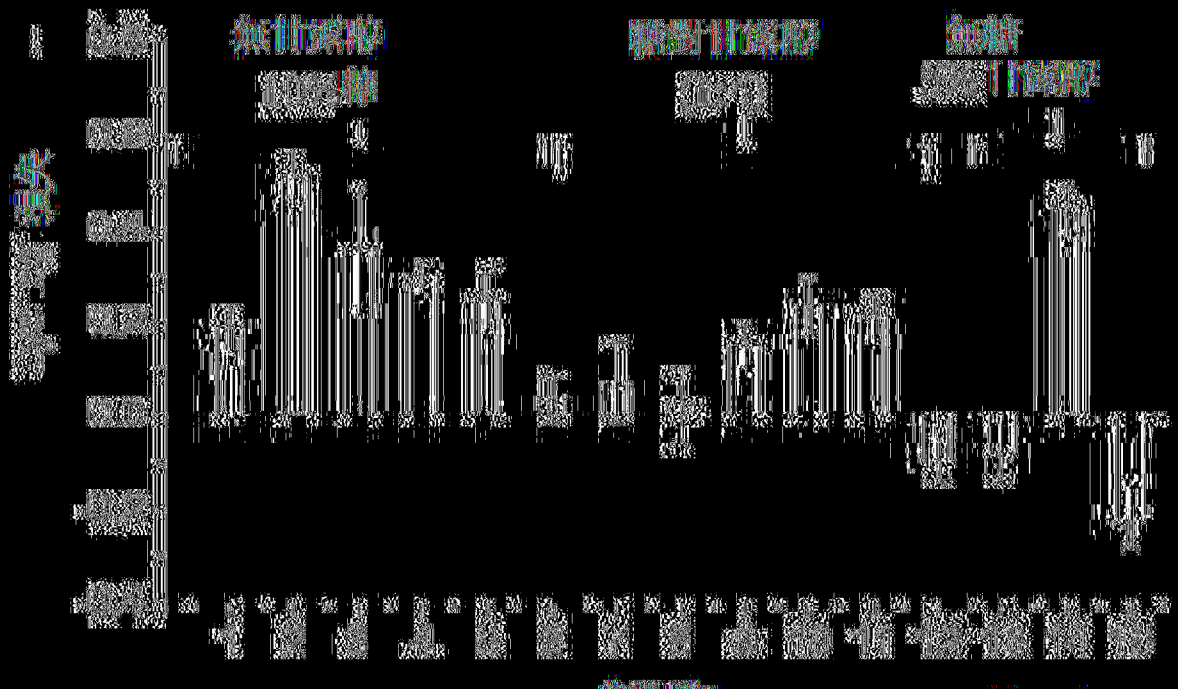


圖(18A)

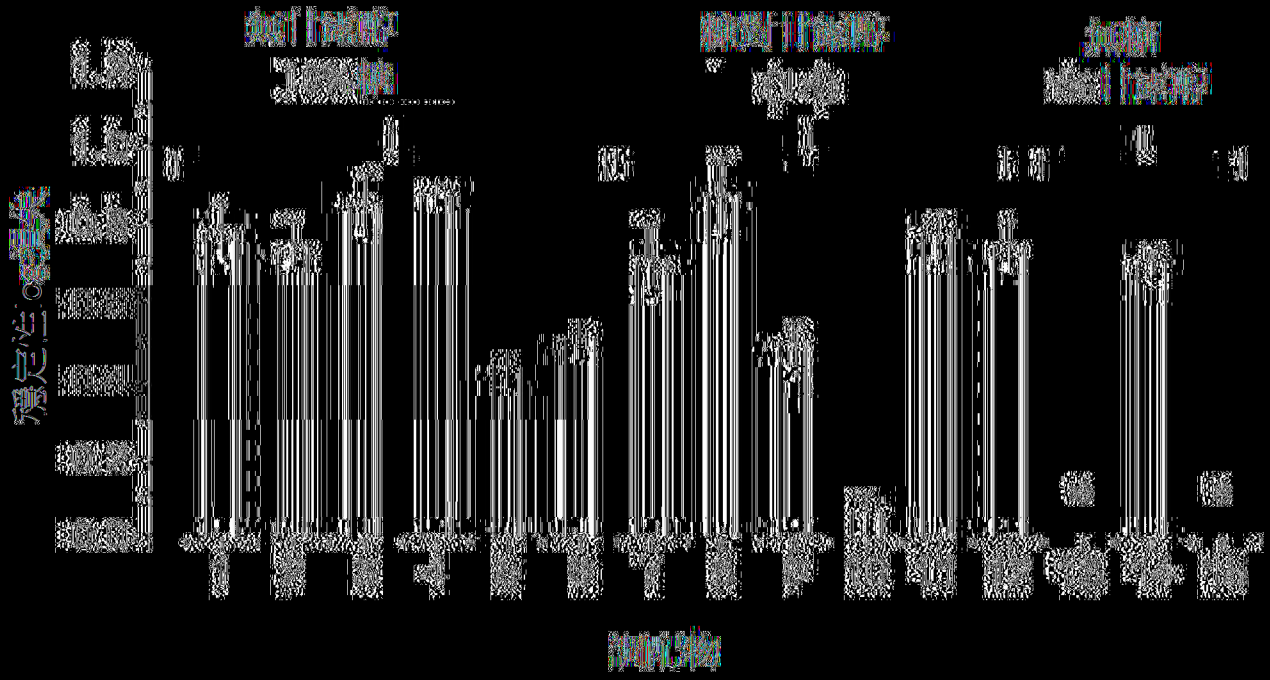
圖(18B)







(圖10A)



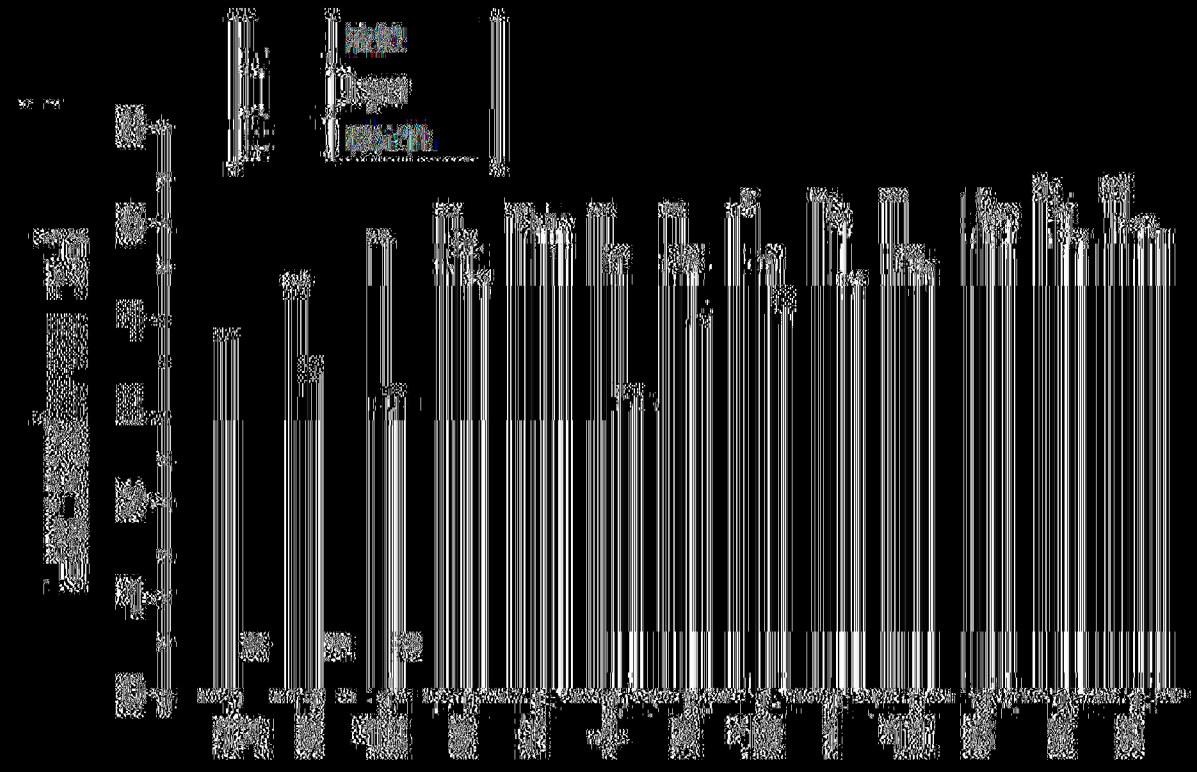
(圖10B)

項目	[illegible]	t 比率		Prob>|t|
(HSA (%)-0.188986)*(HSA (%)-0.188986)	0.204587	-4.18		0.0001*
HSA (%)	0.342905	4.13		0.0001*
[illegible] (%)	0.136389	-3.59		0.0007*
[illegible] %	0.008072	-3.47		0.0010*
[illegible] (%)	0.07305	-2.86		0.0058*
([illegible] (%)-0.85507)*([illegible] (%)-0.85507)	0.022518	2.80		0.0069*
[illegible] %	0.00811	-2.56		0.0135*
Met (mM)	0.015594	-1.15		0.2545
Ala (mM)	0.003898	0.48		0.6298
MSG (mM)	0.003854	0.25		0.8004

圖11A

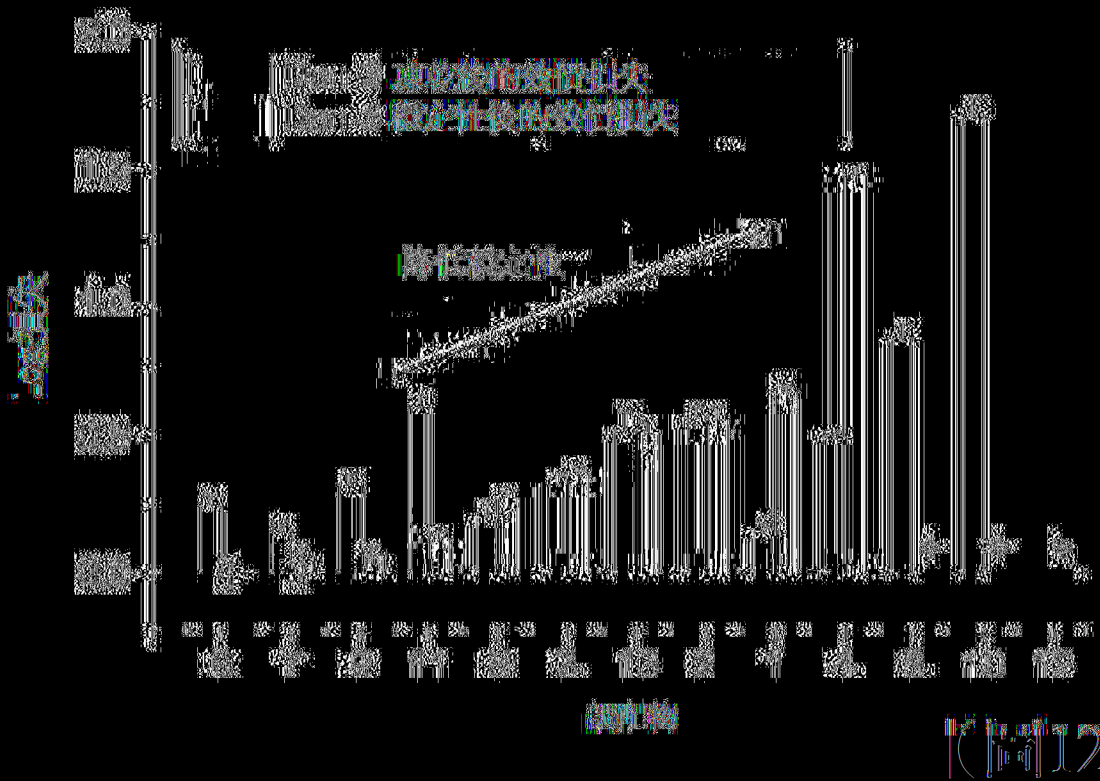
項目	[illegible]	t 比率		Prob>|t|
[illegible] (%)	0.163159	-7.01		<.0001*
[illegible] (%)	0.01842	-5.49		<.0001*
([illegible] %-4.81818)*([illegible] %)-0.07576	0.06008	-3.92		0.0003*
([illegible] %-4.81818)*([illegible] (%)-0.81818)	0.003985	-2.95		0.0047*
([illegible] %-4.51515)*([illegible] (%)-0.07576)	0.060134	-2.85		0.0062*
HSA (%)	0.488094	2.23		0.0301*
(HSA (%)-0.198418)*(HSA (%)-0.198418)	0.263228	-2.15		0.0382*
[illegible] %	0.011029	-1.91		0.0584
([illegible] %-4.51515)*([illegible] (%)-0.81818)	0.004138	-1.80		0.0780
Ala (mM)	0.004622	-1.05		0.2971
[illegible] %	0.011031	-1.00		0.3208
Met (mM)	0.018489	-0.59		0.5555
MSG (mM)	0.004657	-0.33		0.7418

圖11B



調配物

（圖12A）

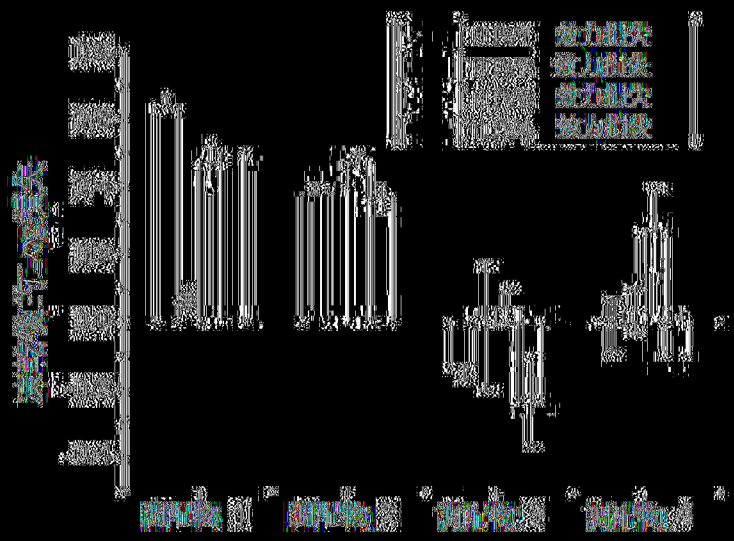


調配物

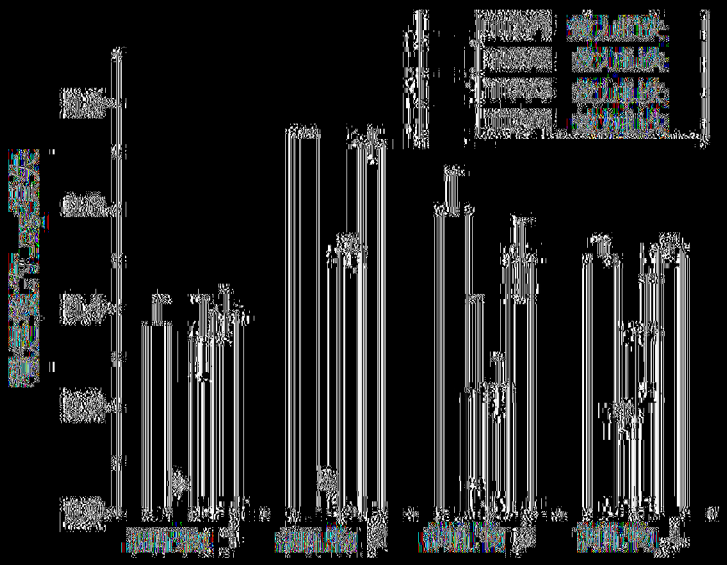
（圖12B）



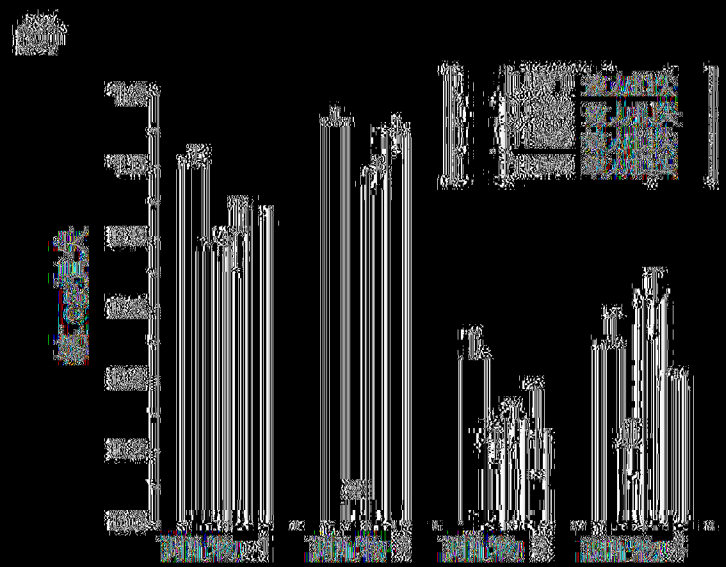
(化12C)



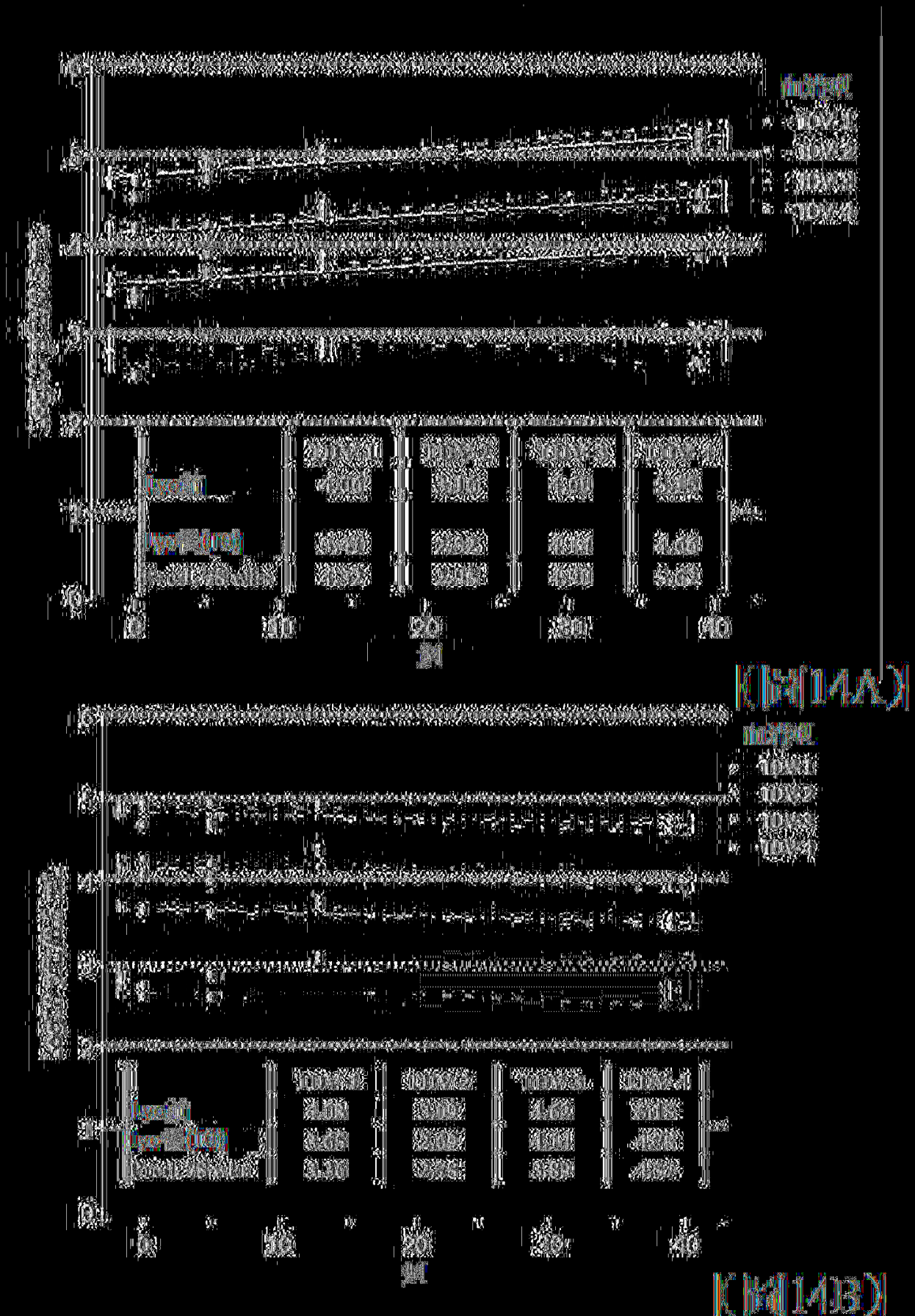
【圖13A】

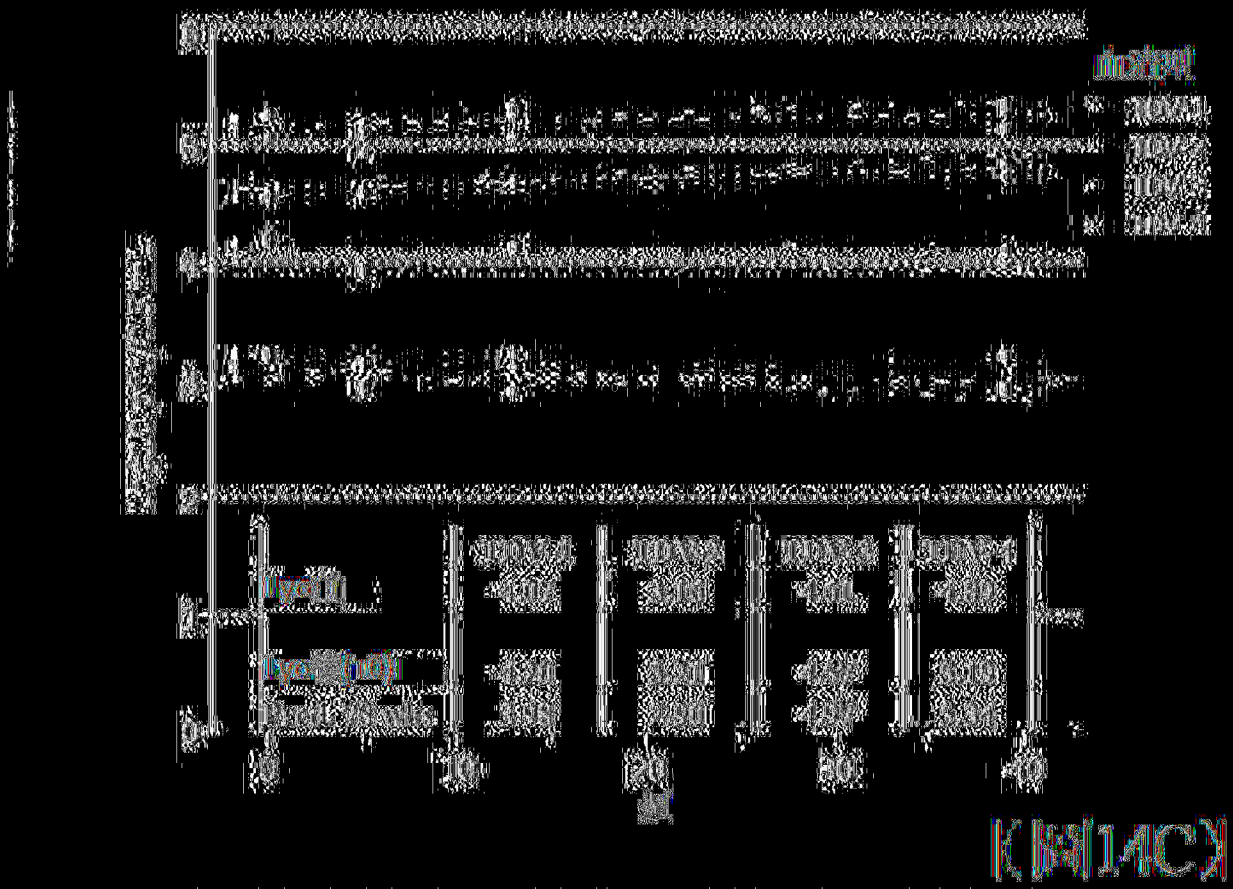


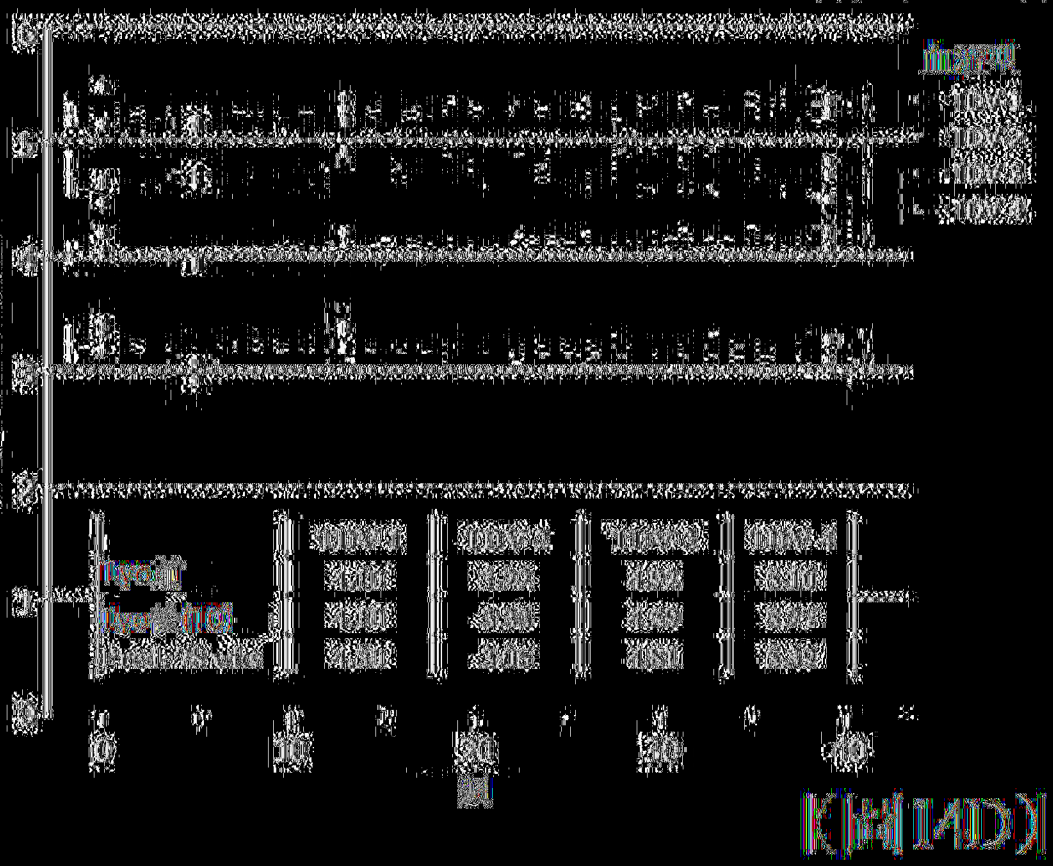
【圖13B】



【圖13C】







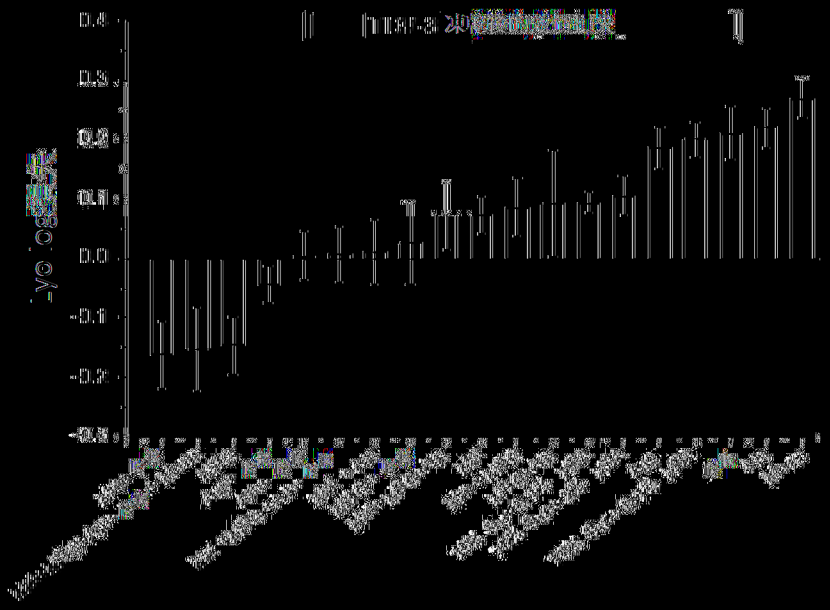


圖15A

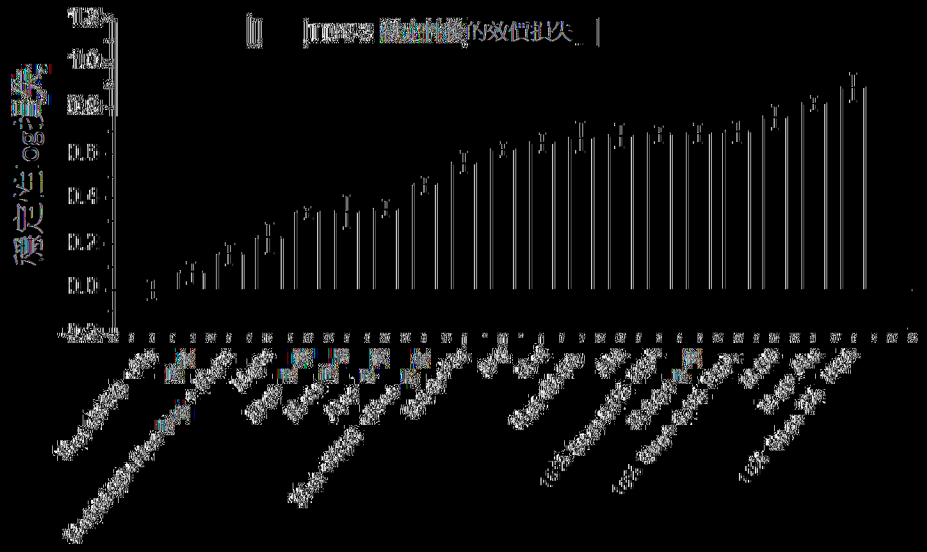


圖15B