



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105147611 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201510416884. 3

A61K 39/205(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 07. 23

A61K 39/145(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/02(2006. 01)

60/952225 2007. 07. 26 US

A61M 37/00(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

A61P 31/00(2006. 01)

200880108192. 0 2008. 07. 23

A61P 37/04(2006. 01)

(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 K. 哈珀 M. 哈西亚

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 杜艳玲 吕彩霞

(51) Int. Cl.

A61K 9/12(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

A61K 39/05(2006. 01)

A61K 39/08(2006. 01)

A61K 39/102(2006. 01)

A61K 39/09(2006. 01)

A61K 39/29(2006. 01)

A61K 39/12(2006. 01)

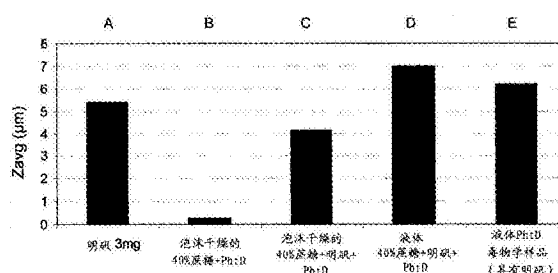
权利要求书3页 说明书18页 附图7页

(54) 发明名称

抗原佐剂组合物及其方法

(57) 摘要

本发明公开了一种抗原和佐剂的玻璃状组合物以及制备该组合物的方法。还公开了该玻璃状组合物的药学上可接受的制剂、重建的该玻璃状组合物的液体制剂、疫苗组合物以及含有该玻璃状组合物的药盒。还公开了用于将玻璃状组合物给药到哺乳动物的装置以及通过给药该组合物在哺乳动物中引发免疫反应的方法。



1. 一种玻璃状组合物,其包括至少一种抗原和至少一种佐剂。
2. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中所述佐剂包括铝盐佐剂。
3. 权利要求 2 中所述的玻璃状组合物,其中所述铝盐佐剂选自氢氧化铝佐剂(结晶氢氧化铝)、磷酸铝佐剂(无定形羟基磷酸铝)和明矾(硫酸铝钾)。
4. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中所述玻璃状组合物是实质上缺乏结晶结构的泡沫。
5. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中在所述组合物中至少 60% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。
6. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中在所述组合物中至少 50% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。
7. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中在所述组合物中至少 30% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。
8. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其包括至少一种多羟基化合物或合成聚合物。
9. 权利要求 8 中所述的玻璃状组合物,其中所述多羟基化合物包括单糖、碳水化合物糖或能够形成玻璃的稳定糖中的一种或多种。
10. 权利要求 8 中所述的玻璃状组合物,其中所述多羟基化合物或合成聚合物以超过 30% 的浓度存在。
11. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中所述抗原包括蛋白质或肽。
12. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中所述抗原选自白喉抗原、破伤风抗原、乙型流感嗜血杆菌抗原、肺炎球菌抗原、甲型肝炎抗原、乙型肝炎抗原、人乳突瘤病毒抗原、炭疽热抗原、大肠杆菌抗原、狂犬病抗原、流行性感胃抗原以及肺炎链球菌抗原。
13. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中所述玻璃状组合物的残余水分含量为 4% 或更少。
14. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中所述玻璃状组合物的残余水分含量为 3% 或更少。
15. 权利要求 1 中所述的玻璃状组合物,其中所述玻璃状组合物的残余水分含量为 2% 或更少。
16. 一种液体组合物,其包括抗原和佐剂的玻璃状组合物的重建制剂。
17. 权利要求 16 中所述的液体组合物,其中在所述液体组合物中至少 60% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。
18. 一种无定形固体组合物,其包括:
 - a) 天然盐佐剂;
 - b) 蛋白质或肽抗原;以及
 - c) 一种或多种多羟基化合物或合成聚合物;其中所述无定形固体组合物包括泡沫。
19. 权利要求 18 中所述的无定形固体组合物,其中在所述固体组合物被重建成液体之后,至少 60% 的蛋白质或肽抗原被吸附到佐剂上。
20. 权利要求 18 中所述的无定形固体组合物,其中所述多羟基化合物或合成聚合物的总浓度为至少 5%。

21. 一种机械稳定的干燥的多孔结构,其包括:
 - a) 至少一种铝盐佐剂;
 - b) 至少一种蛋白质抗原,其中至少 60% 的蛋白质抗原被吸附到铝盐佐剂上;以及
 - c) 至少一种单糖、碳水化合物糖或能够形成玻璃的稳定糖、或合成聚合物。
22. 一种制备抗原和佐剂的组合物的方法,该方法包括:
 - a) 制备所述抗原、所述佐剂和多羟基化合物或合成聚合物的粘性液体;以及
 - b) 使所述粘性液体在真空下沸腾以形成泡沫。
23. 一种制备玻璃状固体的方法,该方法包括:
 - a) 形成至少一种抗原、至少一种佐剂和至少一种多羟基化合物的混合物;
 - b) 使该溶液暴露于相对低的真空下以提高该混合物的粘度;
 - c) 使所述溶液在高真空下沸腾,直到形成泡沫;
 - d) 将所述泡沫干燥以使玻璃化转变温度提高;以及
 - e) 将所述泡沫在低于玻璃化转变温度下储藏。
24. 由权利要求 22 或 23 中所述的方法制备的组合物。
25. 一种药学上可接受的制剂,其包括吸附到佐剂上的抗原的固体玻璃状组合物。
26. 一种制备疫苗制剂并将其给药到哺乳动物的方法,该方法包括:
 - a) 将抗原和佐剂的玻璃状组合物溶解于水溶液中以得到抗原和佐剂的溶解组合物;以及
 - b) 将所述溶解组合物给药到哺乳动物。
27. 一种在哺乳动物中引发免疫反应的方法,该方法包括将抗原和佐剂的玻璃状组合物的重建制剂给药到所述哺乳动物,其中在所述哺乳动物中建立了针对所述抗原的免疫反应。
28. 一种药盒,其包括:
 - a) 含有抗原和佐剂的玻璃状固体;以及
 - b) 用于重建所述玻璃状固体的药学上可接受的重建溶液。
29. 一种涂覆有玻璃状固体的微针阵列,所述玻璃状固体包括抗原和佐剂。
30. 一种具有小于 10% 的残余水分含量的泡沫干燥的玻璃状组合物,其包括至少一种抗原和至少一种铝盐佐剂、以及至少一种多羟基化合物包括单糖、碳水化合物糖或能够形成玻璃的稳定糖中的一种或多种和 / 或合成聚合物,所述多羟基化合物或合成聚合物的浓度超过 30%。
31. 权利要求 30 中所述的玻璃状组合物,其中所述铝盐佐剂选自氢氧化铝佐剂、结晶氢氧化铝、磷酸铝佐剂、无定形羟基磷酸铝、明矾和硫酸铝钾。
32. 权利要求 30 中所述的玻璃状组合物,其中在所述组合物中至少 30% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。
33. 权利要求 30 中所述的玻璃状组合物,其中所述抗原包括蛋白质或肽。
34. 权利要求 30 中所述的玻璃状组合物,其中所述玻璃状组合物的残余水分含量小于 4%。
35. 一种液体组合物,其包括权利要求 30 中所述的抗原和佐剂的玻璃状组合物的重建制剂。

36. 权利要求 35 中所述的液体组合物,其中在所述液体组合物中至少 60% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。

37. 一种根据权利要求 30 的玻璃状组合物,其包括:

- a) 天然盐佐剂,例如铝盐佐剂;
- b) 蛋白质或肽抗原;以及
- c) 一种或多种多羟基化合物或合成聚合物;

其中所述玻璃状组合物包括泡沫,

任选地其中在所述玻璃状组合物被重建成液体之后,至少 60% 的蛋白质或肽抗原被吸附到佐剂上。

38. 一种制备玻璃状固体的方法,该方法包括:

a) 形成至少一种抗原、至少一种佐剂和至少一种多羟基化合物的混合物,其通过在 2-8℃ 混合至少一种抗原和至少一种佐剂至少 24 小时、随后以超过 30% 的浓度向其中加入至少一种多羟基化合物或合成聚合物制备液体而实施;

- b) 使该混合物暴露于相对低的真空下以提高其粘度;
 - c) 使所述溶液在高真空下沸腾,直到形成泡沫;
 - d) 将所述泡沫干燥以使玻璃化转变温度提高;以及
 - e) 将所述泡沫在低于玻璃化转变温度下储藏,
- 其中所述佐剂包括铝盐佐剂。

39. 一种药学上可接受的制剂,其包括药学上可接受的赋形剂和吸附到佐剂上的抗原的固体玻璃状组合物,其中所述佐剂包括铝盐佐剂,所述固体玻璃状组合物通过权利要求 38 的方法制备。

40. 一种权利要求 30, 35 或 36 中所述的组合物,其为疫苗或其在哺乳动物中引发免疫反应,其用于接种或在所述哺乳动物中引发免疫反应。

41. 一种药盒,其包括:权利要求 30 中所述组合物以及用于重建所述玻璃状组合物的药学上可接受的重建溶液。

42. 一种涂覆有权利要求 30 的玻璃状组合物的微针阵列。

43. 权利要求 32 的玻璃状组合物,其中在所述组合物中至少 50% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。

44. 权利要求 32 的玻璃状组合物,其中在所述组合物中至少 60% 的所述抗原被吸附到所述佐剂上。

45. 权利要求 33 的玻璃状组合物,其中所述抗原选自白喉抗原、破伤风抗原、乙型流感嗜血杆菌抗原、肺炎球菌抗原、甲型肝炎抗原、乙型肝炎抗原、人乳突瘤病毒抗原、炭疽热抗原、大肠杆菌抗原、狂犬病抗原、流行性感胃抗原以及肺炎链球菌抗原。

46. 权利要求 34 的玻璃状组合物,其中所述玻璃状组合物的残余水分含量小于 3%。

47. 权利要求 34 的玻璃状组合物,其中所述玻璃状组合物的残余水分含量小于 2%。

48. 从 Tris 或磷酸钠缓冲组合物制备的权利要求 30 的泡沫干燥的玻璃状组合物。

抗原佐剂组合物及其方法

[0001] 本申请是国际申请日为 2008 年 7 月 23 日、国际申请号为 PCT/CA2008/001386、进入国家阶段的申请号为 200880108192.0、发明名称为“抗原佐剂组合物及其方法”的 PCT 申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2007 年 7 月 26 日提出的临时申请号 60/952,225 的优先权,在此将其引入作为参考。

背景技术

[0004] 疫苗组合物一般包括一种或多种抗原,但也可包括一种或多种佐剂以及各种其它组分。虽然疫苗组合物经常以液体形式被给药到个体,但是对于储存和运输目的,常常优选干燥的疫苗组合物。相对于液体组合物,干燥的疫苗组合物的各组分的时间稳定性得到提高,并且干燥的组合物可能不需要冷藏。然后在给药到个体之前可将干燥的组合物重建为液体制剂。但是,制备干燥的疫苗组合物的方法,可能通过改变配成组合物的组分的完整性,能够影响该组合物的免疫原性。例如,冻干或冷冻干燥含有铝盐佐剂(例如磷酸铝佐剂、氢氧化铝佐剂、明矾)的组合物可造成组合物的免疫活性损失。

[0005] 除了其个别组分整体完整性之外,疫苗组合物内某些组分之间的相互作用也可影响该组合物的免疫原性。在一个例子中,抗原被吸附到铝盐佐剂上被认为增加了疫苗组合物内抗原的免疫原性。各种因素可影响抗原被吸附到疫苗组合物内的佐剂上的能力,包括例如抗原和佐剂两者的电子电荷、pH、温度、离子强度、存在赋形剂及其它因素。制备疫苗组合物的方法,包括制备干燥的组合物,通常也将影响抗原和佐剂之间的缔合。

[0006] 不能得到稳定的且产生免疫性的含抗原和天然盐佐剂(例如铝盐)的干燥的疫苗制剂可影响全世界的疫苗分配,特别是对于发展中国家来说。如果没有含抗原和佐剂两者的干燥制剂,一般采用稳定性较小并且温度敏感性更高的液体制剂。在该情形的一个例子中,通常使用铝盐佐剂的液体制剂来重建干燥的抗原组分。这种重建过程中的变化可影响疫苗产品的功效,特别是在缺少熟练医务人员的地区。世界卫生组织(WHO)已经将此确定为主要的关注地区。相比之下,含抗原和铝盐佐剂两者的单一干燥制剂的重建相对简单。

发明内容

[0007] 公开了抗原和佐剂的玻璃状组合物。在一个实施例中,玻璃状组合物呈泡沫形式。在一个实施例中,抗原是蛋白质或肽。在一个实施例中,佐剂是铝盐佐剂。在一个实施例中,玻璃状组合物包含可形成玻璃的多羟基化合物和/或合成聚合物。还公开了玻璃状组合物的药学上可接受的制剂以及重建液体制剂。制备该玻璃状组合物的方法以及给药并在哺乳动物中引发免疫反应的方法也被公开了。包含该玻璃状组合物的药盒和涂覆有该玻璃状组合物的微针阵列也被公开了。

附图说明

[0008] 在插入其中并且构成说明书的一部分的附图中,举例说明了疫苗组合物和生产疫苗组合物的方法的各个实施方式,以及下面给出的详细说明用于描述实施例。人们应意识到展示附图中举例说明的实施方式是为了举例说明的目的而不是为了限制。正如下面所公开的,人们应了解在不背离本发明精神和范围下,可以对附图中举例说明的实施方式进行改变、改良和偏离。

[0009] 图 1 举例说明了关于检查泡沫干燥对各种制剂中的铝佐剂稳定性的影响的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 2 中描述的那样,竖轴是以微米表示的平均颗粒尺寸。

[0010] 图 2 举例说明了关于检查泡沫干燥对各种制剂中的铝佐剂稳定性的影响的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 3 中描述的那样,竖轴是以微米表示的平均颗粒尺寸。

[0011] 图 3 举例说明了关于通过透射电子显微镜检查重建的包含磷酸铝佐剂的泡沫干燥的样品的外观的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 4 中描述的那样,照片 (A) 和 (B) 中的电子显微图片被直接放大了 150,000 倍,照片 (C) 中的电子显微图片被直接放大了 100,000 倍。

[0012] 图 4 举例说明了关于通过透射电子显微镜检查重建的包含氢氧化铝佐剂的泡沫干燥的样品的外观的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 4 中描述的那样,电子显微图片被直接放大了 100,000 倍。

[0013] 图 5 举例说明了关于检查泡沫干燥对含不同浓度蔗糖的各制剂中的铝佐剂稳定性的影响的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 5 中描述的那样,竖轴是总体积百分数的量度,水平轴是以微米表示的平均颗粒尺寸。

[0014] 图 6 举例说明了关于检查泡沫干燥对蛋白质抗原在铝佐剂上的吸附的影响的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 6 中描述的那样,吸附到佐剂上的蛋白质抗原的百分数被显示在 y 轴上,该试验被重复了两次(在 x 轴上表示为样品序号 1 和 2)。

[0015] 图 7 举例说明了关于检查随时间过去在泡沫干燥的制剂中蛋白质抗原在铝佐剂上的吸附的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 7 中描述的那样,吸附到佐剂上的蛋白质抗原的百分数被显示在 y 轴上。在 x 轴上显示了以周表示的时间,在该时间对各种样品进行了分析。

[0016] 图 8 举例说明了关于检查随时间过去在泡沫干燥的制剂中蛋白质抗原在铝佐剂上的吸附的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 8 中描述的那样,吸附到佐剂上的蛋白质抗原的百分数被显示在 y 轴上。在 x 轴上显示了以周表示的时间,在该时间对各种样品进行了分析。

[0017] 图 9 举例说明了如本文中的实施例 9 中所描述的那样制备的泡沫干燥的制剂的实施例小瓶。

[0018] 图 10 举例说明了关于检查随时间过去在 25℃ 进行了二次干燥的干燥的泡沫中蛋白质抗原在不同佐剂上的吸附的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 10 中描述的那样,被吸附到佐剂上的蛋白质佐剂的百分数被显示在 y 轴上。在 x 轴上显示了以周表示的时间,在该时间对各种样品进行了分析。

[0019] 图 11 举例说明了关于检查随时间过去在 37℃ 进行了二次干燥的干燥的泡沫中蛋

白质抗原在不同佐剂上的吸附的研究的实施例结果,如在此更详细地在实施例 10 中描述的那样,被吸附到佐剂上的蛋白质佐剂的百分数被显示在 y 轴上。在 x 轴上显示了以周表示的时间,在该时间对各种样品进行了分析。

具体实施方式

[0020] 本申请描述了抗原和佐剂的固体玻璃状组合物。在一个实施例中,玻璃状组合物呈机械稳定的多孔结构或泡沫形式。在一个实施例中,玻璃状组合物内的抗原被吸附到佐剂上。公开了制备玻璃状组合物的方法。在玻璃状组合物是泡沫的情况下,公开了制备该组合物的方法并且该方法被称为泡沫干燥。还公开了玻璃状组合物的药学上可接受的制剂和制备这些组合物的方法。公开了重建的液体形式的抗原和佐剂的固体玻璃状组合物。还公开了利用玻璃状抗原和佐剂组合物的制剂在哺乳动物中引发免疫反应的方法、包含该玻璃状组合物的药盒以及用于将该玻璃状组合物给药到哺乳动物的方法和装置。

[0021] 定义

[0022] 以下包括所选择的可在本公开全文中采用的术语的定义。该定义包括落在术语范围内并且可用于实施的各种实施例和 / 或形式。这些实施例的目的不是限制性的,术语的单数和复数形式两者都落在定义的范围。

[0023] 在此使用的“佐剂”是指调节抗原的免疫原性的试剂或物质。“调节免疫原性”包括增强由抗原刺激的免疫反应的大小、持续时间和 / 或特异性。

[0024] 在此使用的“无定形固体”是指基本上缺乏结晶结构的固体。

[0025] 在此使用的“抗原”是指能够引发和介导免疫反应的物质。刺激或加强了免疫反应的抗原被说成是免疫原性的并且可被称为免疫原。

[0026] 在此使用的“沸腾”是指当液体蒸发时出现的相变。“沸点”是液体在给定压力下的特性并且被定义为液体蒸汽压等于液体所暴露的外部压力时的温度。沸腾一般被直观地观察为在液体内的起泡。

[0027] 在此使用的“泡沫”是指具有机械稳定的多孔结构的无定形固体类型。泡沫也可被称为“发泡的玻璃”。

[0028] 在此使用的“泡沫干燥”是指形成泡沫的方法。泡沫干燥是一种玻璃化加工。

[0029] 在此使用的“玻璃”是指一种基本上无孔的无定形固体。

[0030] 在此使用的“玻璃转化温度”是指形成玻璃状固体的温度。在玻璃转化温度以下无定形固体处于玻璃态。玻璃转化温度可以被缩写为“T_g”。

[0031] 在此使用的“多羟基化合物”是指多元醇,并且更一般地可以被称为能够形成玻璃和 / 或泡沫的物质。

[0032] 在此使用的“疫苗”是指至少一种抗原的药学上可接受的制剂。这样的一种抗原的药学上可接受的制剂还可包括提高制剂或给药的活性、稳定性等等的佐剂、赋形剂、稀释剂等等。

[0033] 在此使用的“真空”是指小于 1 大气压或 760 托的压力。

[0034] 在此使用的“粘性的”是指液体的“粘稠度”或其内在的抗流动力。在本文中,一般被称为粘性的液体是在真空下可沸腾的液体,正如以下公开的在泡沫干燥加工中所进行的那样。粘性液体也可以被称为浆液。在此,粘性液体的粘度范围一般为 10⁶-10⁷帕斯卡·秒。

[0035] 在此使用的“玻璃状组合物”是指一种包括泡沫和玻璃的无定形固体。

[0036] 在此使用的“玻璃化”是指将一种材料转变成玻璃状组合物的方法。

[0037] 抗原

[0038] 抗原一般是能够激发免疫反应的物质（即抗原潜在地是免疫原性的）。由抗原激发的免疫反应可以是体液的或细胞的免疫反应中的一种或两者，并且对于抗原一般是特异性的。因此，抗原是可以被抗体分子或T细胞受体结合的物质。许多类型的生物学分子及其它分子可担当抗原的角度。例如，抗原可源自以下分子，其包括但不限于：蛋白质、肽、碳水化合物、多糖、低聚糖、糖、脂质、磷脂、代谢物、激素、核酸及其它分子及其片段和/或组合。这些来源和类型以及其它未列出的任何抗原可以被用于在此描述的玻璃状组合物和方法。

[0039] 抗原可源自天然来源（例如自体抗原、自身抗原、与肿瘤相关的抗原）或源自特定哺乳动物或其它动物外的来源（例如源自传染介质）。抗原可具有多重抗原决定簇以使得哺乳动物暴露于抗原可产生许多相应的抗体或具有不同特异性的细胞免疫反应。通过各种途径可将抗原有目的地引入哺乳动物以达到引起免疫反应（例如免疫作用）的目的，这些途径包括但不限于摄取、吸入、皮肤接触、皮下注射、静脉注射、肌肉内注射、皮内注射、与粘膜表面接触以及其它途径。

[0040] 抗原可包括或可以是大于单个分子的组分的一部分，例如细胞、细菌、病毒及其它微生物的全部或部分以及这些的部分或组合。细菌和病毒，特别是对哺乳动物中的疾病负责的那些，是可用于在此所述的玻璃状组合物和方法的抗原的来源。细菌抗原包括蛋白质、多糖及得自细胞的外表面、细胞的内部、鞭毛或其它组分的其它分子。其它抗原可以由受感染的细胞分泌的或在细胞死亡或分解时释放的那些。这些抗原的例子可包括白喉、破伤风和肉毒中毒毒素。

[0041] 可用于在此描述的玻璃状组合物中的抗原例子可以包括但不限于：来自轮状病毒的抗原、用于口蹄疫、流行性感、副流感、疱疹病毒物种（单纯疱疹病毒、EB病毒、水痘病毒、假狂犬病、细胞肥大病毒）、狂犬病病毒、脊髓灰质炎病毒、甲、乙、丙和戊型肝炎、瘟热、委内瑞拉马脑脊髓炎、猫白血病病毒、呼肠孤病毒、呼吸道合胞病毒、拉沙热病毒、多瘤病毒、犬细小病毒、乳突瘤病毒、蜱媒脑炎、牛瘟、鼻病毒、肠道病毒、门果病毒、副粘病毒（腮腺炎、麻疹、呼吸道合胞病毒）、鸡传染性支气管炎病毒、HTLV 1、HIV-1 和 -2、甲、乙和丙型肝炎病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、细小病毒、腺病毒、披膜病毒（风疹、黄热病、登革热（例如预膜和包膜蛋白质）、牛呼吸道合胞病毒、冠状病毒、日本脑炎病毒、脊髓灰质炎病毒、百日咳博德特氏菌、流产布氏杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌属、伤寒沙门氏菌、链球菌、弧菌（霍乱弧菌、副溶血弧菌）、志贺氏杆菌、假单胞菌、布氏菌属、克雷伯氏菌属、分支杆菌属（结核分枝杆菌、鸟分枝杆菌、卡介苗、麻风）、肺炎球菌、葡萄球菌、肠杆菌属、破伤风、炭疽热、肺炎链球菌、脑膜炎球菌 A, B, C, Y, W, W-135、幽门螺杆菌、亨氏罗卡利马氏体菌、巴斯德（氏）菌（溶血巴斯德菌、巴斯德杆菌）、衣原体（沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体、肺炎衣原体）、梅毒（梅毒密螺旋体）、嗜血杆菌属、乙型流感嗜血杆菌、支原体属、莱姆症（伯氏疏螺旋体）、军团病、肉毒中毒（肉毒杆菌）、白喉棒状杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、立克次氏体感染、洛基山斑疹热、斑疹伤寒、埃利希体属、寄生虫和原生动物包括疟疾（恶性疟原虫、间日疟原虫、三日疟原虫）、血吸虫、锥体虫、利什曼原虫、丝虫线虫、毛滴虫病、肉孢子虫病、绦虫属（牛肉绦虫、猪带绦虫）、鼠弓形体、旋毛虫病（旋毛线虫）、球虫病（艾美球虫属类）、

真菌包括新型隐球菌、白色念珠菌、烟曲霉、球孢子菌病及其它的试剂。

[0042] 在所公开的玻璃状组合物和方法中采用的抗原可以是得自其天然来源的抗原的天然存在形式。天然存在的抗原也可以被转变成其它形式,包括毒性较小的形式,其可以是片段或可以包含其它删除、增加或修饰。这些抗原的转变形式通常将保留免疫原性。白喉和破伤风类毒素是天然抗原的解毒形式的例子,在该例子中是通过化学药品(例如甲醛)处理而生产的。用来消除抗原的毒性的其它手段是众所周知的并且包括蛋白质抗原的酶促消化/裂解、变性(一般通过热或化学处理)、缀合、化学修饰及其它。

[0043] 在本领域中,通常是以单一疫苗制剂形式给药多重抗原以诱导抗多重疾病、感染剂、类型、血清型、血清变型及其它的保护作用,并且本公开的组合物类似地可包括多种抗原。这样组合的抗原的特定例子包括白喉、破伤风、百日咳及其它抗原。也可以使抗原与调解抗原的免疫原性的载体蛋白质缔合。该缀合的抗原的例子在本领域是众所周知的,并且在药物制剂中以疫苗形式从市场得到。可将所有这些例子的抗原、组合抗原、载体缔合的抗原及其它掺入在此所述的玻璃状组合物和方法中。

[0044] 在玻璃状组合物中抗原的浓度可以是任何浓度,但当给药到个人或哺乳动物时,通常足以激发免疫系统。在一个实施例中,一种或多种抗原的浓度是每毫升 10 μg 。在其它实施例中,一种或多种抗原的浓度可以是 20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在其它实施例中,抗原的浓度可以是 2、3、4、5、6、7、8、9、10 mg/ml 或甚至更大。一种或多种抗原的浓度也可以是在以上列出的任意两个值之间的范围内。

[0045] 佐剂

[0046] 佐剂通常是能够增强抗原的免疫原性的物质。常将佐剂掺入玻璃状组合物中并且在玻璃状组合物被给药到个人或哺乳动物期间及之后起作用。佐剂可在后天获得的或先天的(例如 Toll 样受体)免疫性两方面起作用,并且可能以各种方式起作用,这些方式没有全都被了解。

[0047] 许多物质,天然的和合成的物质两者都已经显示出发挥佐剂的功能。例如,佐剂可包括但不限于天然盐、角鲨烯混合物、胞壁酰肽、皂甙衍生物、分支杆菌细胞壁制剂、某些乳液、单磷酸基脂质 A、霉菌酸衍生物、非离子型嵌段共聚物表面活性剂、Quil A、霍乱毒素 B 亚单位、聚磷腈及其衍生物、免疫刺激复合物 (ISCOMs)、细胞因子佐剂、MF59 佐剂、脂质佐剂、粘膜佐剂、某些细菌外毒素及其它成分、某些寡核苷酸、PLG 及其它。可将这些佐剂用于在此所述的玻璃状组合物和方法中。

[0048] 在佐剂中,可用于在此公开的玻璃状组合物中的是天然盐佐剂,特别是铝和钙盐佐剂。铝盐佐剂包括氢氧化铝佐剂(结晶碱式氢氧化铝或 $\text{Al}(\text{OH})_3$)、磷酸铝佐剂(无定形羟基磷酸铝)和明矾(硫酸铝钾或 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$)。当在组合物中采用的佐剂是铝盐佐剂时,该组合物通常不应该被暴露在极端的温度,即冰点 (0°C) 以下或极端的热量(例如 70°C),至少持续长的时期,正如众所周知的,暴露在极端温度下可影响铝佐剂的免疫原性活性以及所吸附的抗原两者。

[0049] 在本领域中已知抗原可吸附到铝盐佐剂上。静电吸引可能至少部分地对抗原吸附到这些佐剂上负责。通过考虑抗原的等电点 (IEP) 和铝盐佐剂的表面电荷(零电荷点或 PZC),可使抗原和佐剂之间的静电相互作用最优化。在一个实施例中,确定了蛋白质抗原的

IEP 并且选择了在所需 PH 值下具有相反表面电荷的铝盐佐剂。例如,在大约中性 PH 下,IEP < 7 的蛋白质抗原对于氢氧化铝佐剂 (PZC > 7) 的吸附将比对于磷酸铝佐剂 (PZC > 7) 的吸附更好。相比之下,在中性 pH 值下,IEP > 7 的蛋白质抗原对于磷酸铝佐剂的吸附将比对于氢氧化铝佐剂的吸附更好。

[0050] 如在此所公开的,泡沫干燥过程可部分地克服抗原和佐剂之间的小于最优的静电相互作用以增强抗原被吸附到佐剂上。已经由下列所表明:与没有进行泡沫干燥的制剂中抗原在铝盐佐剂上的吸附相比,在泡沫干燥的抗原和佐剂的制剂中抗原在铝盐佐剂上的吸附增加了。在本公开的实施例中更充分地描述了这些研究结果。因此,泡沫干燥方法可提供一种使用抗原和佐剂的非最优组合的手段并且可提供新的抗原和佐剂组合。在一个实施例中,泡沫干燥方法可提供吸附到磷酸铝佐剂上的 IEP < 7 的蛋白质抗原的组合物。在一个实施例中,泡沫干燥方法可提供吸附到氢氧化铝佐剂上的 IEP > 7 的蛋白质抗原的组合物。也可以生产其它的抗原和佐剂的组合物,在一个实施例中,生产了吸附到氢氧化铝佐剂上的 IEP < 7 的蛋白质抗原组合物。在一个实施例中,生产了吸附到磷酸铝佐剂上的 IEP > 7 的蛋白质抗原组合物。

[0051] 在玻璃状组合物中佐剂的浓度可以是任何浓度,但当给药到个人或哺乳动物时,通常足以提高抗原激发免疫系统的能力。在一个实施例中,一种或多种佐剂的浓度是 0.1mg/ml。在其它实施例中,一种或多种佐剂的浓度可以是 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 或甚至 10.0mg/ml 或甚至更大。一种或多种佐剂的浓度也可以在以上列出的任意两个值之间的范围内。

[0052] 形成玻璃和泡沫的物质

[0053] 将要进行玻璃化加工,例如泡沫干燥的组合物通常将含有一种或多种能够形成玻璃状组合物或促进玻璃状组合物形成的物质,例如发泡的玻璃。通常,可将包含这些物质的液体制剂冷却以形成实质上不含有结晶结构的固体,例如玻璃或泡沫。通常由液体向玻璃或泡沫的转化或转变发生在玻璃化温度 (T_g) 或其附近。通常,这些物质不会妨碍玻璃状组合物内的抗原或佐剂的活性。这些物质还可使抗原和 / 或佐剂稳定,并且通常对生物成分的活性没有负面影响。这些物质还可提高或促进抗原和 / 或佐剂的活性以便经受得住干燥加工和随后的储藏。

[0054] 可以使用能够形成玻璃或泡沫或促进玻璃或泡沫形成的各种物质。一些这样的物质包括糖、碳水化合物、多羟基化合物、聚合物、蛋白质、肽、氨基酸 (例如甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺) 及其它。可使用这些物质的组合。可利用各种名称或商标称呼这些物质。例如,一些这样的物质可被称为稳定剂、玻璃或泡沫形成剂、玻璃化增强剂、多羟基化合物、杀虫剂、玻璃或泡沫基体形成材料以及其它名称。

[0055] 在一个实施例中,可使用多羟基化合物。多羟基化合物的例子可包括单糖 (例如葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、木酮糖、核糖、甘露糖、果糖、棉子糖、海藻糖及其它) 或碳水化合物糖类 (甘露醇、山梨糖醇、赤藻糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、异麦芽糖醇、乳糖醇及其它)。在某些情形中,像乳糖、棉子糖、海藻糖、蔗糖及其它的物质可被称为稳定糖。可采用像山梨糖、阿洛酮糖、核酮糖、赤藓酮糖和二羟基二甲基酮的物质。可采用的甲基化的单糖的例子包括某些吡喃阿拉伯糖苷、吡喃半乳糖苷、吡喃葡萄糖苷、吡喃甘露糖苷或吡喃木糖苷。在某些

实施例中,可采用术语“多羟基化合物”来通称能够形成、促进形成玻璃和 / 或泡沫的物质。

[0056] 单糖、二糖、三糖、寡糖及其相应的糖醇可以被用于形成或促进形成玻璃或泡沫。可采用糖醇苷。可采用多羟基化合物,像碳水化合物衍生物和化学改性的碳水化合物。可采用 Palatinit(一种 α -D-吡喃葡萄糖基-1 $\rightarrow$ 6-山梨糖醇(GPS)和 α -D-吡喃葡萄糖基-1 $\rightarrow$ 6-甘露醇(GPM))的混合物或其单个的GPS或GPM成分。在某些实施例中,蔗糖、甲基 α -D-葡萄糖苷、2-HP- β -环糊精和精氨酸可被单独使用或以其各种组合被使用。还可采用多糖。

[0057] 在一个实施例中,也可使用聚合物来形成或促进或提高在此公开的玻璃状组合物的形成。可使用的某些聚合物的例子包括聚乙二醇、羟乙基淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯亚胺及其它。还可采用糖共聚物,像菲可(Ficoll)和右旋糖苷。

[0058] 多羟基化合物或其它泡沫-或玻璃-形成或促进物质或物质的组合的浓度通常足以得到粘性液体组合物或在为了提高液体粘度而设计的加工步骤(参见以下关于该步骤的讨论)后得到粘性液体组合物。在一个实施例中,多羟基化合物、合成的聚合物及其它玻璃-或泡沫-形成物质的总浓度为5%。在一个实施例中,多羟基化合物、合成的聚合物及其它玻璃-或泡沫-形成物质的总浓度至少为5%。在其它实施例中,这些物质的总浓度为10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或甚至更高。一种或多种玻璃-或泡沫-形成物质的浓度也可以是在以上列出的任意两个值之间的范围内。

[0059] 含有抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物的液体

[0060] 通常,将含有抗原、佐剂和玻璃- / 泡沫-形成或促进物质(例如多羟基化合物)以及将在以下讨论的其它可能物质的液体混合在液体中,然后进行如下所述的泡沫干燥加工。可以以各种方式将这些成分混合在液体中。在一个实施例中,首先将抗原和佐剂混合在液体中并且随后加入多羟基化合物。在添加多羟基化合物之前,让抗原和佐剂在液体中共同存在一段时间(例如24-48小时)。在添加多羟基化合物之前,可将抗原和佐剂在各种温度(例如2-8 $^{\circ}$ C)下温育。这可促进抗原和佐剂之间的缔合。在另一实施例中,将抗原、佐剂和多羟基化合物同时加入液体中,也可能添加这些组分的其它组合。

[0061] 含有抗原、佐剂和多羟基化合物的液体通常是含水液体,虽然,如果有机物与所使用的抗原、佐剂和多羟基化合物相容,有机物有可能以至少某一浓度存在。在水性液体的情形中,该液体可以是缓冲液。通常,所使用的缓冲体系与所使用的抗原、佐剂和多羟基化合物是相容的。

[0062] 其它物质

[0063] 可将除了抗原、佐剂和多羟基化合物之外的物质引入玻璃状组合物中。通常,可将这些其它物质加入将在泡沫干燥加工中使用的含有抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物的液体中。例如,这些附加物质可包括有助于溶解将要被泡沫干燥的作为所述液体的组分的抗原、佐剂或多羟基化合物的物质、增加玻璃或泡沫形成或稳定玻璃或泡沫的物质、影响T_g的物质、增强玻璃或泡沫干燥的物质、稳定(例如防止降解(美拉德反应)或聚集)玻璃或泡沫中的抗原和 / 或佐剂的物质、以及发挥其它作用的物质。也可将盐加入将要被泡沫干燥的液体中并将其掺入玻璃状组合物中。还可加入其它物质,像生物制剂、生物改性剂、药剂及其它。

[0064] 泡沫及泡沫干燥

[0065] 通过玻璃化可制备玻璃状的固体形式的抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物组合物。玻璃化是一种将物质转变成基本上不含有结晶结构的玻璃状无定形固体的方法。玻璃化也谈及将物质转变成泡沫。玻璃状固体的凝固发生在玻璃化转变温度 (T_g), 这是物质的特性, 并且发生在物质冷却期间。玻璃化转变温度通常可应用于全部或部分无定形相例如玻璃和塑料。在玻璃化转变温度时或以下, 无定形物质的物理性质被转变成玻璃状无定形固体。

[0066] 在此公开的玻璃状固体形式可以是泡沫。泡沫通常是具有大面积的稳定的多孔结构。泡沫材料可以是厚度不同的并且通常比具有类似组成的非泡沫形式 (例如真正的玻璃) 的密度更小。在此公开的泡沫也被称为发泡的玻璃、发泡的玻璃基体、干燥的泡沫和稳定化的泡沫。已经公开了泡沫干燥工序和用于实施该方法和工序的设备 (参见美国专利号 5, 766, 520、6, 509, 146 和 6, 964, 771, 将其全部教导引入作为参考)。泡沫干燥工序通常与其它玻璃化方案的不同在于泡沫的形成。可由各种液体、分散体、悬浮体、乳液、混合物和溶液来制备泡沫。通常, 至少在其中液体含有抗原的实施例中, 所制备的液体与生物制剂是相容的。

[0067] 泡沫干燥方法采用在真空中使液体沸腾来引起液体从样品蒸发并且形成泡沫。在真空中进行沸腾以使样品不会经受在大气压下 (即不存在真空) 沸腾液体所需的高温。在一个实施例中, 使沸腾液体所处的真空是比较高的真空。在一个实施例中, 压力 < 25 托 (小于约 0.033 大气压)。在其它实施例中, 压力 < 10 托 (小于约 0.013 大气压)、 < 8 托 (小于约 0.010 大气压) 或 < 5 托 (小于约 0.007 大气压)。通常, 保持真空直至泡沫形成, 虽然可在泡沫形成后将真空保持一段时间。连续施加真空可导致已形成的泡沫的残余水分含量减少。例如, 可将真空保持约 4 小时, 但是真空持续时间可以比这多或少。在其它实施例中, 可将真空保持约 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24 或甚至 48 小时。

[0068] 在沸腾过程期间发生的液体蒸发通常对样品具有冷却作用并且样品温度在沸腾期间下降。液体蒸发通常也有提高样品的玻璃化转变温度 (T_g) 的效果并且样品的 T_g 在沸腾期间升高。在沸腾过程期间的某些时间点, 样品温度和 T_g 一致并且相同。在该时间点, 并且当样品温度继续下降到正在升高的 T_g 以下时, 形成了玻璃状固体。在一个实施例中, 玻璃状固体是泡沫。

[0069] 在沸腾过程期间, 样品的温度可以波动, 但通常被保持在一定的范围内, 使得在样品内生物材料的所需性质 (例如免疫原性) 被保留。在一个实施例中, 在沸腾过程期间的温度可在 100°C 以下, 并且可在 0°C 以上。在一个实施例中, 样品温度保持在 70°C 以下, 并且 0°C 以上。其它温度范围也是可能的。在一个实施例中, 至少部分样品可能至少暂时地降至 0°C 以下。形成浆液是有可能的。为了获得泡沫, 用于实施该沸腾步骤的装置通常具有控制该过程期间的真空和样品温度两者的能力。在某些情形中, 可采用常规冷冻干燥机或改进的冷冻干燥机。

[0070] 在上述泡沫干燥加工的“沸腾”步骤之前, 可进行如下加工步骤, 该步骤被设计成用来增加将经历泡沫干燥加工的沸腾步骤的液体、分散体、悬浮体、乳液、混合物或溶液的粘度。在某些情况下, 该步骤可以是任选的。该“粘度增加”步骤可通过各种方法来实施。在一种方法中, 可将液体样品置于比较低的真空下 (例如范围在约为 0.9–0.1 大气压内的压力)。在一个实施例中, 可采用约为 0.2 大气压或 152 托的压力。也可采用其它压力, 例如压力可以是 < 1 大气压、 < 0.9 大气压、 < 0.8 大气压、 < 0.7 大气压、 < 0.6 大气压、 < 0.5

大气压、 < 0.4 大气压、 < 0.3 大气压、 < 0.2 大气压、或甚至 < 0.1 大气压。可在室温或其它温度下施加比较低的真空。在另一种方法中,可通过在真空下沸腾而将液体蒸发。该步骤可与已经描述过的泡沫干燥方法的沸腾步骤分开或与其连续,后面的方法可在与前述沸腾步骤相似的条件下进行,尽管真空和施加真空的持续时间可以是不同的。在该粘度增加过程步骤结束时,通常得到具有比起始液体的粘度更高粘度的液体。在某些例子中,更高粘度的液体可被称为浆液。如上所述,可使更高粘度的液体进行沸腾步骤以获得泡沫。

[0071] 在沸腾步骤之后,可能包括一种加工步骤,该步骤被设计成用来干燥或减少由沸腾步骤产生的泡沫的水分含量。在某些情形中,该步骤是任选的。可通过各种方法来进行该步骤。在一个实施例中,可使泡沫材料经受真空(真空干燥)。在一个真空干燥的实施例中,压力可以是 < 5 托(小于约 0.007 大气压)。在另一实施例中,压力可以是 < 1 托(小于约 0.0013 大气压)。在真空干燥步骤中也可以采用其它压力。在另一实施例中,可在干燥剂 DRIERITE™ 的存在下保存泡沫。在另一实施例中,可在干燥剂的存在下对泡沫进行真空干燥。可采用其它用来减少泡沫的水分含量的方法。可以在各种温度下实施该“二次干燥”步骤并持续不同的时间。例如,可以在 25 、 37 、 40 、 55°C 或其它温度下进行二次干燥。例如,可进行二次干燥几个小时、几天、几周或几个月的时期。通常,二次干燥步骤将进行延长的时间,这取决于样品的尺寸、初始水分浓度等等。在一个实施例中,该步骤进行了超过 12 小时并且通常大于 24 或 48 小时的时期。通过常规实验,本领域技术人员能够确定更精确的参数来达到足够的干燥度。另一方面,可通过各种传感器系统来确定样品中的水分浓度以使二次干燥步骤可在达到所需的样品残余水分含量时被停止。

[0072] 通常,在二次干燥加工步骤完成时,样品的残余水分含量小于在进行二次干燥步骤之前样品的残余水分含量。例如,已经完成二次干燥加工的样品的残余水分含量可以是小于 10% 、小于 5% 、小于 4% 、小于 3% 、小于 2% 、小于 1% ,或甚至更小。可利用不同的方法来测量水分含量。在一个实施例中,采用卡尔·费歇尔方法来测量玻璃状固体的残余水分含量。与不是泡沫的玻璃状组合物相比,按照该步骤完成的减少泡沫的水分含量是通过增加泡沫的表面积来促进的。

[0073] 正如由上述二次干燥步骤所提供的那样,进一步减少样品的水分含量被认为提高了样品的玻璃化转变温度(T_g)。如上所述,在沸腾步骤期间,当样品冷却到 T_g 以下时形成了玻璃态。随后的二次干燥步骤通常引起水分含量的额外减少和玻璃状样品的 T_g 的增大。在玻璃状样品的 T_g 或以上加热或存储玻璃状样品可引起玻璃状样品的变化,该变化可能不利于样品成分的长期稳定性。因此,通常将玻璃状样品存储在其 T_g 以下。通过减少水分含量,并由此提高 T_g ,样品可被存储在较高的温度下(并且可能减少了对于冷链或温度控制的链的需要)而不会影响样品或其成分的稳定性。通常,在二次干燥步骤结束时或之后,可将样品冷却到 T_g 以下的温度,以使样品在存储期间保持稳定形态,直至样品被重建为液体并给药到个体。

[0074] 在此处例举的一个实施例中,利用如下所述的泡沫干燥方法制备了玻璃状固体形式的抗原/佐剂/多羟基化合物组合物:

[0075] (1) 制备包括抗原、佐剂和多羟基化合物的粘性液体;

[0076] (2) 通过在真空下沸腾形成机械稳定的多孔结构(“泡沫”);

[0077] (3) 将泡沫暴露在提高的真空度下来从样品中除去水分,其足以将该混合物的玻

璃化转变温度提高到所需存储温度之上的温度点；以及

[0078] (4) 将样品在玻璃化转变温度之下冷却以得到抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物组合物的玻璃状固体形式,其在存储温度下具有长期稳定性。

[0079] 该玻璃状组合物的一个特征是该组合物的抗原和佐剂两者都保持了其完整性(即它们没有显著降解或聚集)。例如,发现玻璃状组合物中的抗原没有显著降解,甚至当含有抗原的玻璃状组合物被存储一段时间时,也实质上保持了抗原的完整性。在一个实施例中,在泡沫干燥的制剂中的蛋白质抗原在 25、37 或 55℃ 下存储 52 周后没有显著降解并保持纯度。在玻璃状组合物中也保持了佐剂的完整性。在一个实施例中,正如通过光扫描所测得的那样或正如通过透射电子显微镜观察到的那样,经过泡沫干燥的铝盐佐剂没有聚集或降解。

[0080] 该玻璃状组合物的一个特征是抗原被吸附到佐剂上。抗原被吸附到佐剂上在此也可被称为抗原被结合到佐剂上,或抗原或佐剂之间的缔合。玻璃和发泡的制剂的一个特征是,与没有经历玻璃化过程的抗原和佐剂的液体制剂相比,通常在那些制剂中更多的抗原被吸附到佐剂上。在一个实施例中,在泡沫干燥的制剂被重建成液体形式之后,测量泡沫干燥的制剂中抗原在佐剂上的吸附。在一个实施例中,通过离心并且从液体中分离可使这些重建的制剂中的佐剂沉淀。然后可确定与佐剂缔合或吸附到佐剂上的抗原的量。在一个实施例中,在玻璃状组合物中至少 10% 的抗原被吸附到佐剂上。在一个实施例中,在玻璃状组合物中至少 20% 的抗原被吸附到佐剂上。在一个实施例中,在玻璃状组合物中至少 30% 的抗原被吸附到佐剂上。在其它实施例中,在玻璃状组合物中至少 40%、50%、60%、70%、80%、90% 或甚至 100% 的抗原被吸附到该组合物中的佐剂上。当将玻璃状组合物在各种温度下存储几周、几个月或甚至几年的时期时,仍然保持了抗原和佐剂之间的缔合。在一个实施例中,显示在将玻璃状组合物于各种 25、37 或 55℃ 下存储 52 周后抗原被吸附在佐剂上。可采用其它存储温度。

[0081] 制剂和给药

[0082] 在固体玻璃状组合物中以及在玻璃状组合物的重建液体制剂中的抗原保留了其免疫原性活性或其在被给药了该组合物的个人或哺乳动物中激发免疫反应的能力。同样地,在固体玻璃状组合物中以及在玻璃状组合物的重建液体形式中的佐剂保留了其增强该组合物的抗原的免疫原性的能力。

[0083] 在一个实施例中,抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物组合物的玻璃状固体形式可用于制备疫苗。通常,疫苗是抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物的玻璃状组合物的药学上可接受的制剂。除了抗原、佐剂和多羟基化合物组分之外,疫苗组合物还可以包括一种或多种赋形剂,其可包括稳定剂、乳化剂、防腐剂、载体以及影响 pH 和 / 或等渗性的物质。可以包括其它物质,包括其它治疗剂。这些物质可以是玻璃状组合物的一部分并且可以被添加到该玻璃状组合物的重建液体制剂中。这些物质可起到多种作用,包括增强稳定性、改进在药学上的可接受性、传送性及其它。

[0084] 疫苗组合物的药学上可接受的制剂也可包括稀释剂和其它赋形剂。稀释剂的例子可包括粘合剂、崩解剂或分散剂,例如淀粉、纤维素衍生物、苯酚、聚乙二醇、丙二醇或甘油。另外的赋形剂可包括聚山梨糖醇酯(吐温)80 及其它。

[0085] 现有的抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物组合物的玻璃状固体形式可以呈药盒形式,其

包括抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物组合物的玻璃状固体形式和含有一种或多种药学上可接受的稀释剂的重建溶液,所述稀释剂用来促进玻璃状固体重建以便利用常规或其它装置向哺乳动物给药。该药盒将任选地包括用于给药液体形式的组合物的装置(例如皮下注射器、微针阵列)和 / 或使用说明书。

[0086] 本公开还提供了通过将该玻璃状疫苗组合物或其制剂给药到个体或其它哺乳动物来在哺乳动物中引发免疫反应的方法。这可通过将该组合物的药学上可接受的制剂给药到哺乳动物来起到使抗原 / 佐剂暴露于哺乳动物的免疫系统的作用而达到。给药可进行一次或可进行多次。在一个实施例中,一次或多次给药可作为所谓的“引发一强化”方案的一部分而进行。其它给药系统可包括定时释放、延迟释放或缓释递送系统。

[0087] 可接受的给药途径包括皮内给药(通过注射器或微针阵列体系)、口服、直肠给药、局部给药、鼻腔给药、粘膜给药、肌肉内、静脉内、皮下或其它非肠道给药途径。使哺乳动物暴露于在此公开的组合物可导致在该哺乳动物中建立临时或永久的免疫反应。该免疫反应可保护哺乳动物避免以后暴露于抗原而受害,常常避免由于后来暴露于衍生抗原的感染剂而受害。治疗效果也是可能的。

[0088] 也可以将在此公开的组合物和疫苗掺入各种递送系统中。在一个实施例中,可将该组合物应用到用于给药的“微针阵列”或“微针贴片”递送系统。这些微针阵列或贴片通常包括连附在衬底材料上并涂覆有干燥形式的疫苗的多个针状凸起。当将针状凸起应用到哺乳动物的皮肤时,其刺穿皮肤并完成疫苗的递送,使受治疗的哺乳动物免疫。

[0089] 在一种实施方式中,在泡沫干燥加工之前,将含有抗原 / 佐剂 / 多羟基化合物组合物的溶液应用到微针阵列,并且然后使涂覆后的微阵列进行泡沫干燥加工。在另一实施方式中,将在泡沫干燥加工的初始步骤(即在沸腾加工步骤之前)中制备的粘性溶液涂覆到微针阵列的表面上,然后将泡沫干燥工序的残余物施加到涂覆了粘性溶液的微针阵列。在任一工序下,得到了涂覆有含至少一种抗原和至少一种佐剂的玻璃状组合物的微针阵列。该阵列可用于将抗原以及抗原和佐剂给药到哺乳动物来达到对于抗原的免疫反应和对哺乳动物的疫苗接种。

[0090] 实施例

[0091] 以下实施例是用于举例说明本发明实施方式的目的的,而不应被解释为限制性的。

[0092] 实施例 1. 抗原和佐剂的泡沫干燥

[0093] 制备了含有 3mg 明矾或磷酸铝佐剂 /ml、来自被称为 PhtD(Adamou 等人, Infect. Immun. 69 :949-958, 2001) 的肺炎链球菌的 200 μ g 蛋白质抗原 /ml 以及在磷酸钠缓冲液(pH 7.2) 中的 40% 蔗糖的混合物。在这些研究中使用的 PhtD 蛋白质具有预知的等电点 5.1。根据前述制备含有 PhtD 蛋白质和蔗糖但完全没有铝佐剂的对照样品。在干燥之前将该混合物在 2-8°C 储藏,以使蛋白质降解的可能性减至最小并且促进抗原和佐剂的缔合(例如 24-48h)。另一方面,在干燥加工之前,将磷酸铝的磷酸盐缓冲溶液和 PhtD 蛋白质单独温育,稍后加入蔗糖。将混合物的各部分分配到各个容器中并在低真空下(流体静压 $P = 0.2$ 大气压)在环境温度下干燥 4h。然后使样品在高真空下($P < 0.01$ 大气压)沸腾 4h。在这后一步骤期间,在各个容器中形成了稳定的干燥的泡沫。然后将样品在真空下于 55°C 在 DRIERITE™(W. A. Hammond Drierite Co, Ltd. Xenia, OH54385) 上储存 8 天(二次干燥)。

然后将这些样品储存各种不同的时间,直至再次悬浮形成水溶液。然后将重建的样品用于各种研究中,如以下实施例中所述的那样。

[0094] 实施例 2. 泡沫干燥对铝佐剂的稳定性的影响

[0095] 为了评估泡沫干燥对铝佐剂的完整性的影响,利用粒子分析器 (Malvern Zetasizer) 分析了实质上按照实施例 1 中的公开制备的泡沫干燥的材料的重建样品,相对于已知尺寸的标准进行校准,来测定样品中所含颗粒的平均粒度。如果泡沫干燥加工对铝佐剂的完整性有不利影响,这可因样品内颗粒的平均粒度变化而被检测出来。例如,如果泡沫干燥引起铝佐剂降解,则在重建的样品中的粒度将小于未被泡沫干燥的相当的样品中的那些粒度。相比之下,如果泡沫干燥引起铝佐剂聚集,则在重建的样品中的粒度将大于未被泡沫干燥的相当的样品中的那些粒度。

[0096] 在附图的图 1 中,将含有 PhtD 蛋白质和蔗糖 (B) 或含有 PhtD 蛋白质、明矾和蔗糖 (C) 的重建的泡沫干燥的样品中的粒度与未进行泡沫干燥的液体样品进行了比较。未被泡沫干燥的液体样品包括单独的明矾 (A)、PhtD 蛋白质、明矾和蔗糖 (D),以及 PhtD 蛋白质和蔗糖 (E)。如图中所示,对于非泡沫干燥的明矾 (A) 所显示的平均粒度指示了既未降解也未聚集的明矾的粒度。含有 PhtD 蛋白质、明矾和蔗糖 (D),以及 PhtD 蛋白质和蔗糖 (E) 的未泡沫干燥的样品的平均粒度与未泡沫干燥的单独的明矾 (A) 的那些平均粒度相似。含有 PhtD 蛋白质、明矾和蔗糖 (C) 的重建的泡沫干燥的样品的平均粒度也与未泡沫干燥的样品 (A)、(D) 和 (E) 的那些平均粒度相似。这些数据指示泡沫干燥没有导致铝佐剂的显著降解或聚集。含有 PhtD 蛋白质和蔗糖 (B) 的重建的泡沫干燥的样品的平均粒度似乎小于其它的测试样品。

[0097] 实施例 3. 泡沫干燥对铝佐剂的稳定性的影响

[0098] 在关于佐剂稳定性的另外的研究中,将磷酸铝或氢氧化铝佐剂、PhtD 蛋白质和 40% 蔗糖,实质上按照实施例 1 中的公开进行配制。重建泡沫干燥的样品并利用粒子分析器 (Malvern Mastersizer 2000) 来进行分析。相对于已知尺寸的标准进行校准,来测定样品中所含颗粒的平均粒度。

[0099] 在附图的图 2 中,将含有磷酸铝佐剂 (A) 或含有氢氧化铝佐剂 (B) 的重建的泡沫干燥的样品的平均粒度与未进行泡沫干燥的液体样品 (分别为 (C) 和 (D)) 进行了比较。如图中所示,显示的泡沫干燥的磷酸铝 (A) 的平均粒度与液体磷酸铝 (C) 的平均粒度相似。相似地,显示的泡沫干燥的氢氧化铝 (B) 的平均粒度与液体氢氧化铝 (D) 的平均粒度相似。这些数据指示泡沫干燥没有导致铝佐剂的显著降解或聚集。

[0100] 实施例 4. 由透射电子显微镜 (TEM) 检测的重建的泡沫干燥的佐剂制剂的外观

[0101] 为了评估泡沫干燥对铝佐剂的完整性的影响,将实质上按照实施例 1 (除了略去 PhtD 蛋白质之外) 中的公开制备的泡沫干燥的材料的重建样品重建并且然后准备好用于透射电子显微镜检查 (TEM)。未被泡沫干燥的液体样品也被准备好用于 TEM。作为对照,还使用了直接准备好用于 TEM 的铝佐剂 (无蔗糖)。在直接放大倍数为 $\times 100,000$ 至 $\times 150,000$ 下摄取了电子显微照片。

[0102] 在附图的图 3 中,显示了泡沫干燥的磷酸铝佐剂 (A)、未泡沫干燥的磷酸铝佐剂 (B) 和直接准备好用于 TEM 的磷酸铝佐剂 (C)。在附图的图 4 中,显示了泡沫干燥的氢氧化铝佐剂 (A)、未泡沫干燥的氢氧化铝佐剂 (B) 和直接准备好用于 TEM 的氢氧化铝佐剂 (C)。

这些数据指示泡沫干燥没有导致铝佐剂的显著聚集。

[0103] 实施例 5. 在泡沫干燥期间多羟基化合物浓度对铝佐剂的稳定性的影响

[0104] 为了评估在泡沫干燥期间多羟基化合物的不同浓度对铝佐剂完整性的影响,实质上按照实施例 1 中的公开,将泡沫干燥的磷酸铝佐剂 (3mg/ml)、PhtD 蛋白质 (200 μ g) 和浓度为 40%、30% 或 5% 的蔗糖进行泡沫干燥。然后重建样品并且利用粒子分析器 (Malvern Mastersizer 2000) 进行分析,相对于已知尺寸的标准进行校准,来测定样品中所含颗粒的平均粒度。

[0105] 在附图的图 5 中,将包含 40% (A)、30% (B) 和 5% (C) 的蔗糖的重建的泡沫干燥的样品的粒度与未被泡沫干燥的含有磷酸铝佐剂、PhtD 蛋白质和 5% 蔗糖的液体样品 (D) 进行了比较。如图中所示,在 40% 的蔗糖 (A) 和 30% 的蔗糖 (B) 存在下,被泡沫干燥后的铝佐剂的平均粒度彼此相似,也与未被泡沫干燥的 5% 蔗糖样品 (D) 相似。这些样品的样品尺寸与图 1 和 2 中所示的那些相似。在 5% 蔗糖 (D) 的存在下被泡沫干燥的重建的样品的平均粒度大于其它样品的平均粒度。这可指示,在较低浓度的多羟基化合物 (在该实施例中是蔗糖) 下,可出现一些铝佐剂 (在该实施例中是磷酸铝佐剂) 的聚集。

[0106] 实施例 6. 泡沫干燥对抗原和铝佐剂之间缔合的影响

[0107] 为了评估由于泡沫干燥加工而产生的抗原和铝佐剂之间的缔合或蛋白质抗原被吸附到铝佐剂上,进行了下述研究。该研究检查了在干燥状态下,泡沫干燥的保藏能力,在液体中所形成的抗原和佐剂之间的缔合以及当干燥的样品被重建时,在干燥的泡沫中抗原和佐剂之间的缔合被维持的程度。

[0108] 在该研究中,实质上按照实施例 1 中的公开,将 PhtD 蛋白质和磷酸铝佐剂在 40% 蔗糖中进行泡沫干燥。然后将干燥的样品在溶液中重建。作为对照,将未泡沫干燥的 PhtD 蛋白质、铝佐剂和 40% 蔗糖的相同溶液在旋转下于 2-8 $^{\circ}$ C 温育 3.5h。然后将泡沫干燥的和未泡沫干燥的样品两者离心以使该样品中包含的铝佐剂连同结合或吸附到该佐剂上的任何蛋白质佐剂一起成为丸粒。利用 Micro BCA 蛋白质分析试剂盒 (产品序号 23235 ;Thermo Fisher Scientific ;Rockford, Illinois, USA),对由离心而得的上层清液进行蛋白质含量分析,通过与标准比较,来确定上层清液中存在的蛋白质的量。上层清液中的蛋白质是未结合到铝佐剂上的蛋白质,并且在溶液中是游离的。因为在该泡沫干燥的样品中的蛋白质总量是已知的 (200 μ g/ml ;见实施例 1),由样品中的蛋白质总量减去未结合到佐剂上的蛋白质的量 (正如通过用于分析上层清液中的蛋白质的比色反应所测定的) 得到吸附到佐剂上的蛋白质的量。

[0109] 研究结果被示于附图的图 6 中,结合到佐剂上的蛋白质抗原的百分数被示于 y 轴上。将该试验重复两次并且将样品序号 1 和 2 指示在 x 轴上。该数据显示:在泡沫干燥的样品 (A) 中,有更多的蛋白质佐剂被吸附到磷酸铝佐剂 (该研究中约为 30-40%) 上,与在未泡沫干燥的样品 (B ;该研究中约为 10-20%) 中相比。这些数据指示泡沫干燥增强了溶液中形成的抗原与佐剂的缔合或吸附。这些数据还指示当样品被重建时,在干燥的制剂中保持了抗原与佐剂之间的缔合。

[0110] 实施例 7. 随时间过去泡沫干燥对抗原和铝佐剂之间缔合的影响

[0111] 为了评估随时间过去由于泡沫干燥而产生的抗原和铝佐剂之间的缔合,进行了以下研究。在第一研究中,实质上按照实施例 1 中的公开,将 PhtD 蛋白质和铝佐剂进行泡沫

干燥。将泡沫干燥的样品在 25℃ 储藏 0-52 周的时期,并然后重建。在将泡沫干燥的样品重建之前约 24h,将未泡沫干燥的液体样品 (PhtD 蛋白质、磷酸铝佐剂、40% 蔗糖) 配制在磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.2 中,并且在 2-8℃ 下温育 24h。将这些后来的样品用作未泡沫干燥制剂的对照。对于每个时间点,将泡沫干燥的样品和未泡沫干燥的样品两者进行离心以使样品中包含的铝佐剂连同结合到该佐剂上的任何蛋白质佐剂一起变成丸粒。利用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法分析由离心所得的上层清液,通过与标准比较,来确定上层清液中存在的蛋白质的量。如实施例 6 中那样,使用上层清液中的蛋白质的量来计算吸附到佐剂上的蛋白质的量。

[0112] 研究结果被示于附图的图 7 中,吸附到佐剂上的蛋白质抗原的百分数被示于 y 轴上。在 25℃ 储藏泡沫干燥的样品的时间 (以周表示) 被示于 x 轴上。泡沫干燥样品被指示为 (B),未泡沫干燥样品被指示为 (A)。在该实施例研究中,在 0 周时,发现在泡沫干燥的样品中大约 60% 的蛋白质抗原被吸附到铝佐剂上。将这与在未泡沫干燥的液体对照样品中大约 10% 的蛋白质抗原被吸附到铝佐剂上相比较。在该研究中,在 8 和 26 周时两者,发现在泡沫干燥的样品中吸附到铝佐剂上的蛋白质抗原的量大约为 70%,同时在这两个时间点,在未泡沫干燥的液体样品中被吸附到铝佐剂上的蛋白质抗原的量仍保持在 20% 以下。在该研究中,发现在泡沫干燥的样品中被吸附到铝佐剂上的蛋白质抗原的量在 52 周时减少了,但在该时间点,这个量仍然高于未泡沫干燥的液体对照样品。这些数据指示:随时间过去在 25℃ 时储藏的泡沫干燥的制剂中抗原和佐剂之间的缔合是稳定的。

[0113] 实施例 8. 随时间过去储藏温度对泡沫干燥的制剂中抗原和铝佐剂之间缔合的影响

[0114] 为了评估在不同温度下储藏样品时,随时间过去泡沫干燥的样品中抗原和佐剂之间的缔合,进行了以下研究。实质上按照实施例 1 中的教导,将抗原和佐剂在蔗糖中的制剂进行泡沫干燥。然后将干燥的样品在 25℃ 或 37℃ 储藏 8 或 12 周的时间。在储藏期结束时,将干燥的样品在水溶液中重建,然后将该样品进行离心以使样品中包含的铝佐剂连同吸附到该佐剂上的任何蛋白质佐剂一起变成丸粒。利用 RP-HPLC 分析由离心所得的上层清液,以确定上层清液中存在的蛋白质的量以及吸附到佐剂上的蛋白质的量,如实施例 7 中所述的那样。在每个时间点,将在泡沫干燥的样品中吸附到佐剂上的蛋白质的量与作为对照的在未泡沫干燥的液体样品中吸附到佐剂上的蛋白质的量进行了比较。

[0115] 研究结果被显示在附图的图 8 中。结合到佐剂上的蛋白质抗原的百分数被示于 y 轴上。在 x 轴上指示了在分析之前储藏泡沫干燥的样品的时间 (以周表示)。在 0 周时,样品 (A) 显示在 2-8℃ 在磷酸盐缓冲液中,在未被泡沫干燥的含有蛋白质和佐剂的液体样品中结合到佐剂上的蛋白质的量是 40-50%。在 0 周时的样品 (B) 和 (C) 显示已经在 25℃ (B) 或 37℃ (C) 储藏了最短时期并然后在水溶液中重建的泡沫干燥样品中吸附到佐剂上的蛋白质的量。这些数据显示在样品 (B) 和 (C) 两者中吸附到佐剂上的蛋白质的百分数约为 60%。当在重建之前将泡沫干燥的样品储藏 8 周时,在 25℃ (B) 和 37℃ (C) 两个温度时,吸附到佐剂上的蛋白质的量与在 0 周时分析的样品中所发现的那些相似。同样地,当在重建和分析之前将泡沫干燥的样品储藏 12 周时,在 25℃ (B) 和 37℃ (C) 两个温度时,吸附到佐剂上的抗原的量相似于、并且可能甚至高于在 0 和 8 周两者时吸附到佐剂上的抗原的量。这些数据指示在 25℃ 和 37℃ 两个温度时,随时间过去在泡沫干燥的制剂中蛋白质抗原和

佐剂之间的缔合是稳定的。

[0116] 实施例 9. 不同的稳定剂、二次干燥温度和不同的储藏温度对泡沫干燥的制剂中蛋白质抗原的影响

[0117] 为了评估多个因素（例如泡沫干燥的制剂的稳定剂、二次干燥温度和储藏温度）对泡沫干燥的制剂中蛋白质佐剂的稳定性的影响，进行了以下研究。如下表 1 所示制备了混合物并然后实质上按照实施例 1 中的公开对其进行泡沫干燥。在形成泡沫的沸腾步骤之后，对某些样品在 40℃，而对其它样品在 55℃进行二次干燥。

[0118] 表 1. 用于泡沫干燥的制剂

[0119]

混合物组成 (100ml) ¹		
制剂	稳定剂	佐剂
F1	40g 蔗糖	300mg 磷酸铝
F2	40g 蔗糖 5g 精氨酸 5g 谷氨酸一钠	无
F3	20g 蔗糖 20g 甲基 α -D-葡萄糖苷	无
F4	40g 2-HP- β -环糊精 5g 精氨酸 5g 谷氨酸一钠	无
F5 ²	40g 蔗糖	600mg 磷酸铝
F6	13.2g 2-HP- β -环糊精 4.98g 精氨酸 1.65g 谷氨酸一钠 13.3 g 蔗糖	无
¹ 所有混合物都是在 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 中制备的并且含有 200 μ g 的 PhtD 蛋白质/ml。		
² 通过在添加多羟基化合物之前在 2-8℃温育 PhtD 蛋白质和磷酸铝佐剂 24h 而制备的。		

[0120] 在完成二次干燥步骤之后，记录样品的外观（附图的图 9）。该样品通常呈现泡沫的外观（F1、F2、F3、F5 和 F6）。一个样品（F4）呈现致密蛋糕的外观。

[0121] 在完成二次干燥步骤之后，利用卡尔·费歇尔容量滴定法测定了样品的残余水分含量（参见美国专利号 4,740,471）。该方法测量水的重量相对于干燥的产物的总重量的百分数。这些数据被显示在下表 2 中。

[0122] 表 2. 泡沫干燥的制剂的残余水分含量

[0123]

制剂	在特定温度下二次干燥后的残余水分（%重量）	
	40℃	55℃
F1	2.75	1.05
F2	3.67	1.79
F3	0.58	0.21
F4	0.41	0.18
F5	3.06	1.44
F6	2.28	1.21

[0124] 结果显示在 55℃时进行了二次干燥的样品中残余水分含量通常小于在 40℃时进行了二次干燥的样品中的残余水分含量。

[0125] 然后将泡沫干燥的样品在 23-27℃（指示为 25℃）、35-39℃（指示为 37℃）或 53-57℃（指示为 55℃）储藏 12 个月的时期,在此期间,于 25 和 37℃时储藏的样品的外观似乎没有实质性的变化,除了色彩上有某些变化之外。但是对于在 55℃储藏的样品,在 12 个月后泡沫通常似乎是“熔融的”。然而, F6 样品在 55℃时储藏 12 个月后仍然看上去是泡沫。

[0126] 为了测定在 12 个月储藏期间在各种温度下储藏的泡沫干燥的样品中蛋白质抗原的稳定性,在各种时间将泡沫干燥样品重建为水溶液并然后利用 RP-HPLC 进行分析。通过测定在由 RP-HPLC 柱得到的主蛋白质峰中存在的蛋白质的量并且将该值除以在由该柱得到的全部蛋白质峰中存在的蛋白质的量来计算蛋白质抗原的纯度百分数。纯度百分数是随时间过去蛋白质的稳定性的指示剂。

[0127] 结果显示:通常,对于全部测试的制剂,对于在 40 和 50℃两个温度时的二次干燥,在整个 12 个月储藏期上,对于储藏该样品的所有温度（即 25、37 和 55℃）,蛋白质纯度一般都保持在 80-90%以上。

[0128] 在该研究中,由 RP-HPLC 柱回收的输入蛋白质的总回收率通常在 80%左右,然而,在某些情形中,回收率似乎更低。发现在 1 周后从含佐剂的 F1 和 F5 制剂中回收蛋白质的回收率在 20%以下,其中已经在 40℃对该制剂进行了二次干燥并已将其在 55℃储藏。而且,从 F1 制剂回收蛋白质的回收率约为 60-65%,其中已经在 55℃对该制剂进行了二次干燥并已将其在所有测试温度（即 25、37 和 55℃）下储藏。

[0129] 实施例 10. 采用不同的铝佐剂的泡沫干燥的制剂的形成和品质

[0130] 为了评估采用不同的铝佐剂（即磷酸铝佐剂和氢氧化铝佐剂）的泡沫干燥的制剂的形成和品质,进行了以下研究。按照下列表 3 中所示制备了混合物并然后实质上按照实施例 1 中的公开进行泡沫干燥,在 55℃时进行二次干燥。

[0131] 表 3. 用于泡沫干燥的制剂

[0132]

制剂	混合物组成 (100ml) ¹	
	佐剂	缓冲液
F6	300mg 磷酸铝	10mM 磷酸钠
F7	无	10mM 磷酸钠
F8	125mg 氢氧化铝	10mM Tris-HCl
F9	无	10mM Tris-HCl
F10	300mg 磷酸铝	磷酸盐缓冲液

¹ 所有混合物含有 40g 蔗糖和 200 μg PhtD 蛋白质/ml。通过在添加蔗糖之前将 PhtD 蛋白质±佐剂在 2-8℃ 轻柔混合 24h 而制备了所有混合物。

[0133] 在形成泡沫干燥的制剂之后,利用卡尔·费歇尔容量滴定技术测定了样品的残余水分含量。这些数据被显示在下表 4 中。

[0134] 表 4. 泡沫干燥的制剂的残余水分含量

[0135]

制剂	在 55℃ 时进行二次干燥后的残余水分 (%重量)
F6	1.38
F7	1.60
F8	1.40
F9	1.22
F10	1.61

[0136] 然后将泡沫干燥的样品在 23-27℃ (指示为 25℃) 或 35-39℃ (指示为 37℃) 储藏 12 个月,在此期间,没有观察到各样品外观的实质性差异。如实施例 9 中所述测定蛋白质抗原的纯度百分数,对于 12 个月的储藏时期,对于在 25℃ 储藏的制剂,仍保持在 95% 以上,而对于在 37℃ 储藏的制剂,通常在 90% 以上。还按照实施例 9 中所述的那样,测定了输入蛋白质的总回收率,在 12 个月期间,对于给定的制剂,该总回收率通常保持一致。

[0137] 为了评估随时间过去蛋白质抗原在铝佐剂上的吸附,将泡沫干燥的制剂在溶液中重建并且按照实施例 7 中所述测定了吸附到铝佐剂上的蛋白质的百分数。

[0138] 对于在 25℃ 储藏泡沫干燥的制剂,吸附试验结果被显示在图 10 中,而对于在 37℃ 储藏泡沫干燥的制剂,吸附试验结果被显示在图 11 中。在这两个图中,显示了对于 F8(*), F6(•) 和 F10(-) 随以周表示的时间的过去 (x 轴),吸附到佐剂上的蛋白质的百分数 (y 轴)。数据显示在 Tris 缓冲液 (F8) 中 PhtD 蛋白质在氢氧化铝上的吸附好于在磷酸钠缓冲液 (F6) 中 PhtD 蛋白质在磷酸铝上的吸附,在磷酸钠缓冲液 (F6) 中 PhtD 蛋白质在磷酸铝

上的吸附好于在 PBS (F10) 中 Phd 蛋白质在磷酸铝上的吸附。

[0139] 虽然已经通过说明书举例说明了实施例组合物、方法等等,但申请人并不打算限定或以任何方式限制本申请的范围。当然,为了描述在此所述的组合物、方法等等的目的,不可能描述组分或方法的每一个可以想象的组合。对于本领域技术人员来说,其它优点和修饰是显而易见的。因此,本发明不限于所示及所述的具体的细节、代表性的装置和举例说明性的实施例。因此,本申请旨在包括落在本申请范围内的变更、修饰和变化。此外,前述说明不意味着限制本发明的范围。而是,本发明范围由所附的权利要求书及其等价物确定。在这个程度上,在详细的说明书或权利要求书中使用术语“或”(例如 A 或 B) 时,其目的是想要指“A 或 B 或两者”。当申请人想要指示“仅 A 或 B 而非两者”时,则使用术语“仅 A 或 B 而非两者”。因此,在此使用术语“或”是包容性的使用,而不是排他性的使用。

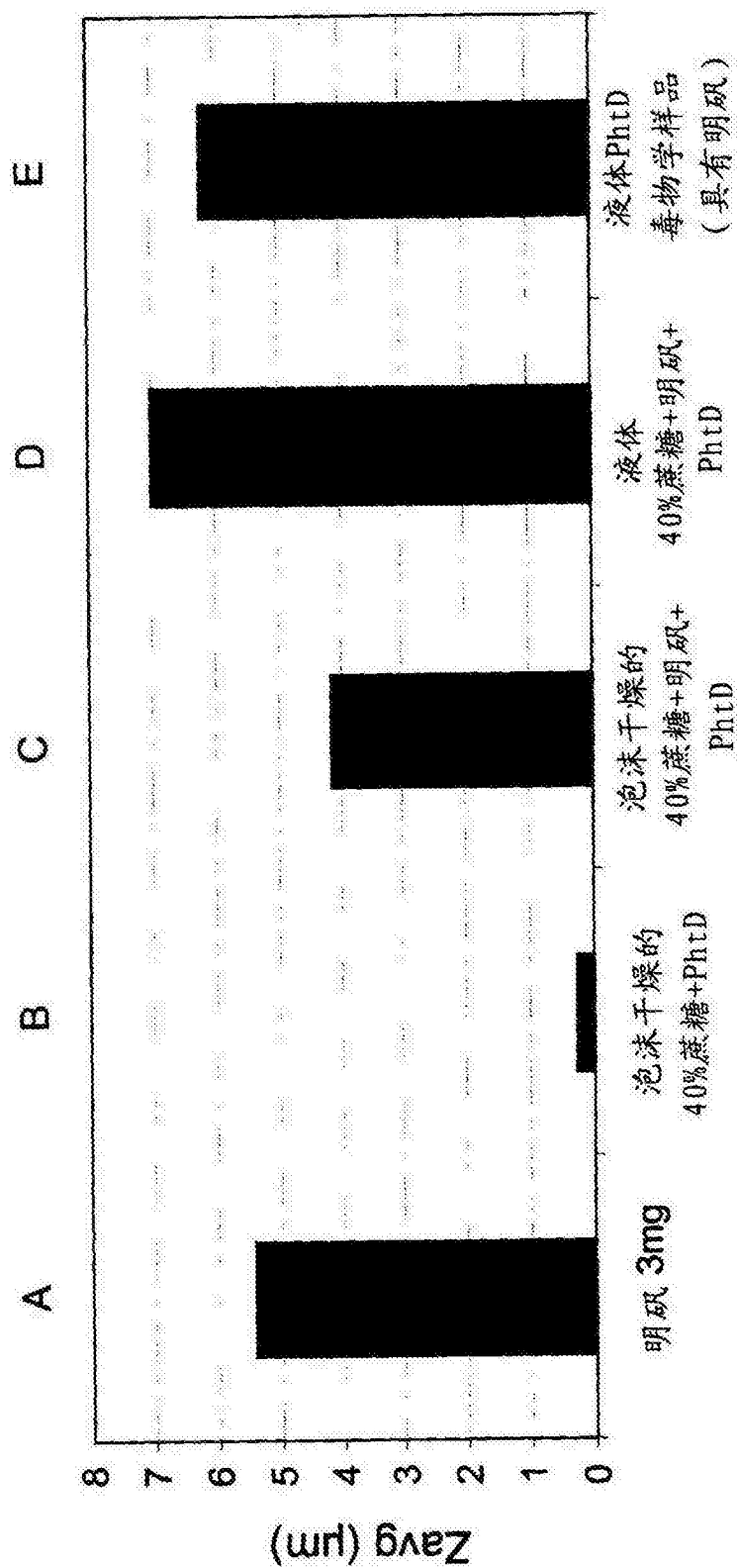


图 1

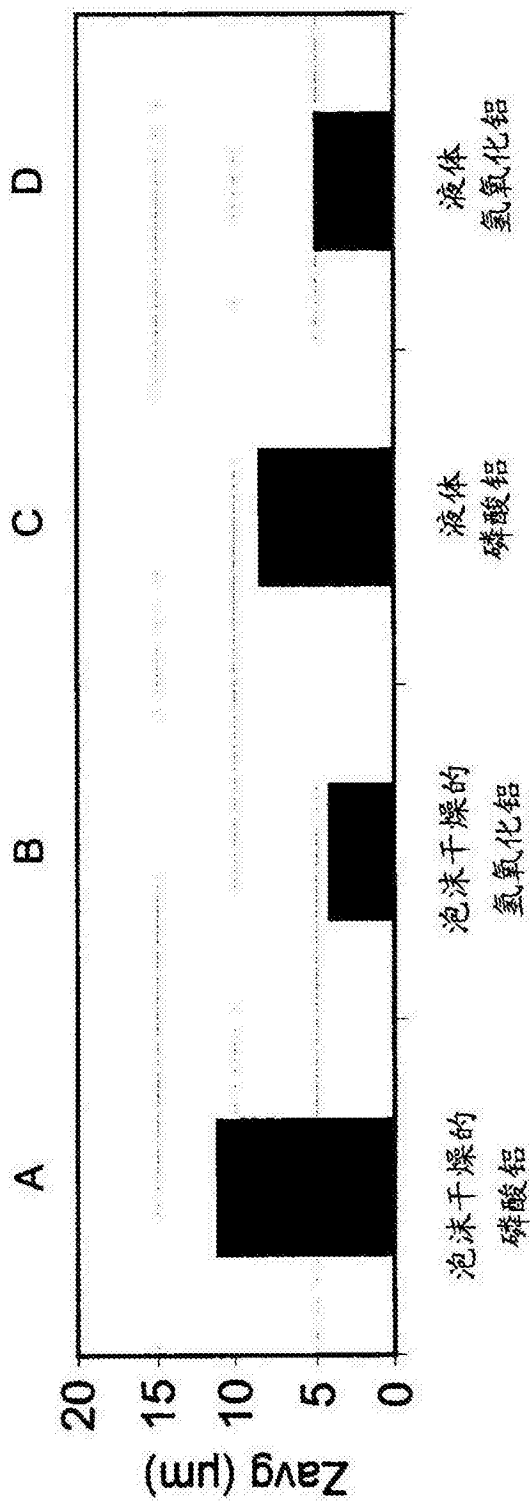


图 2

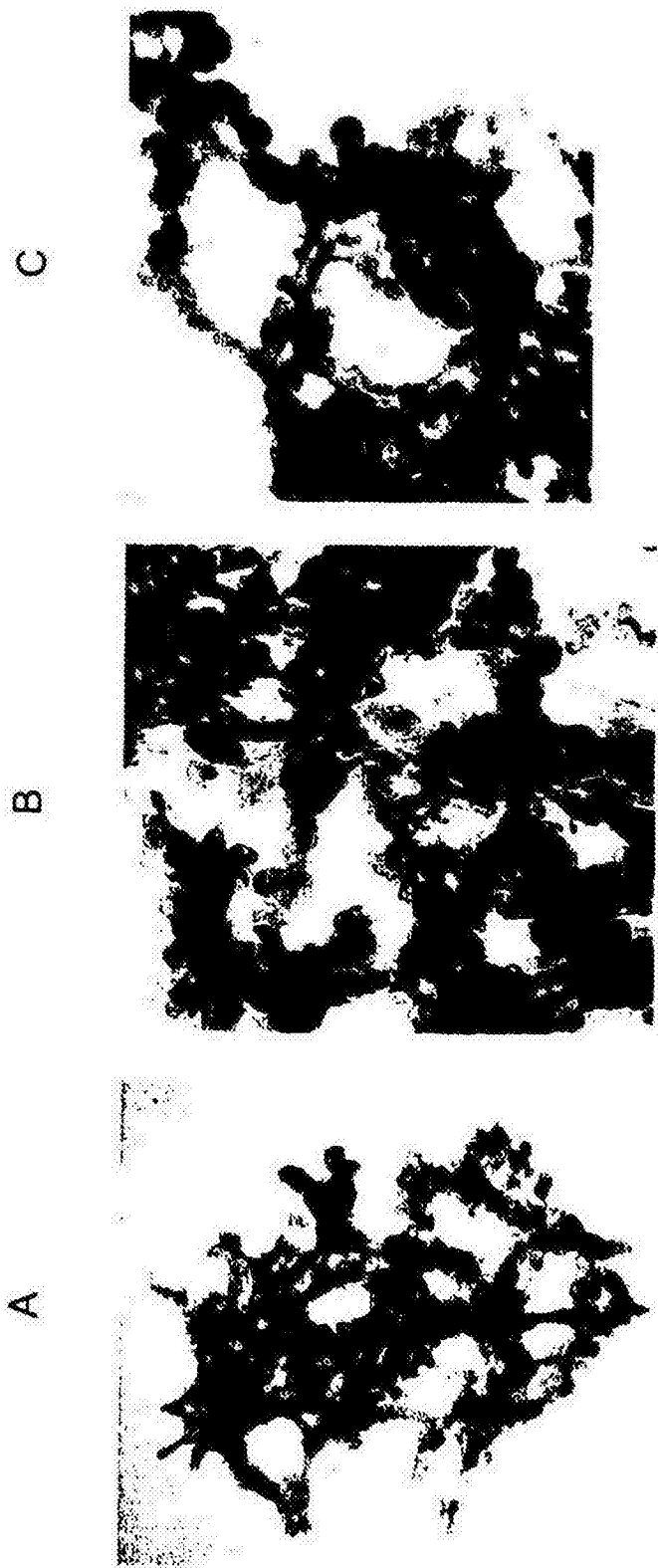


图 3

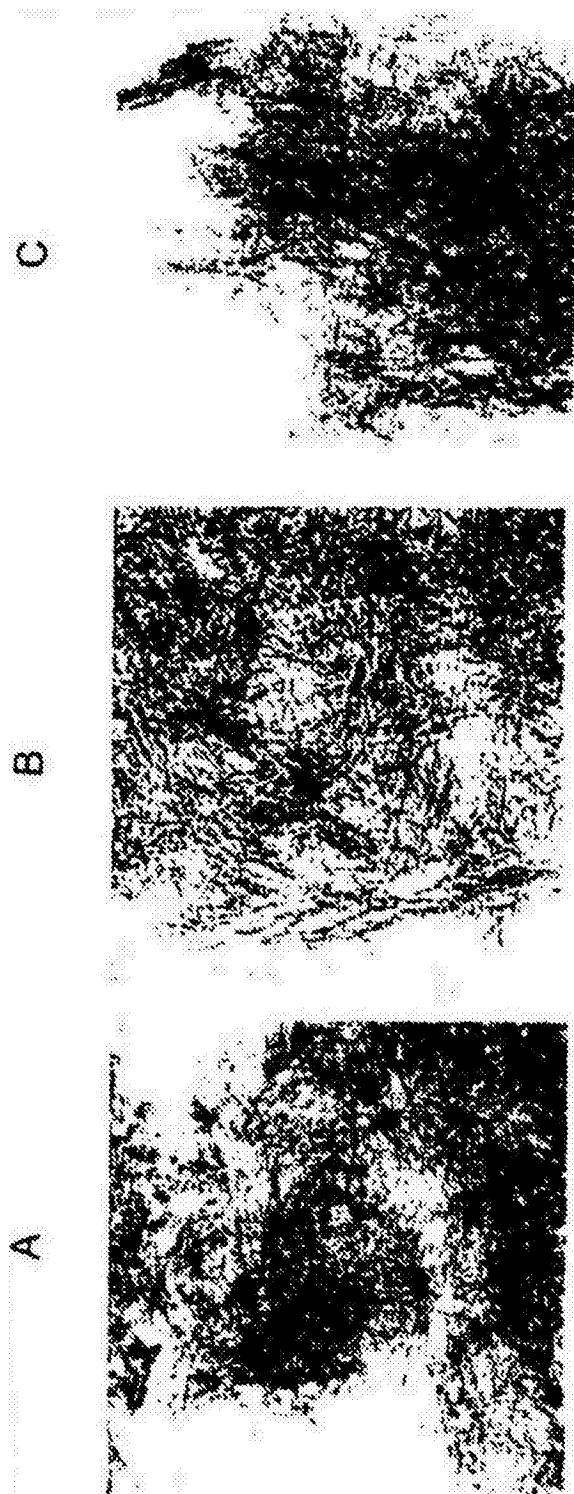


图 4

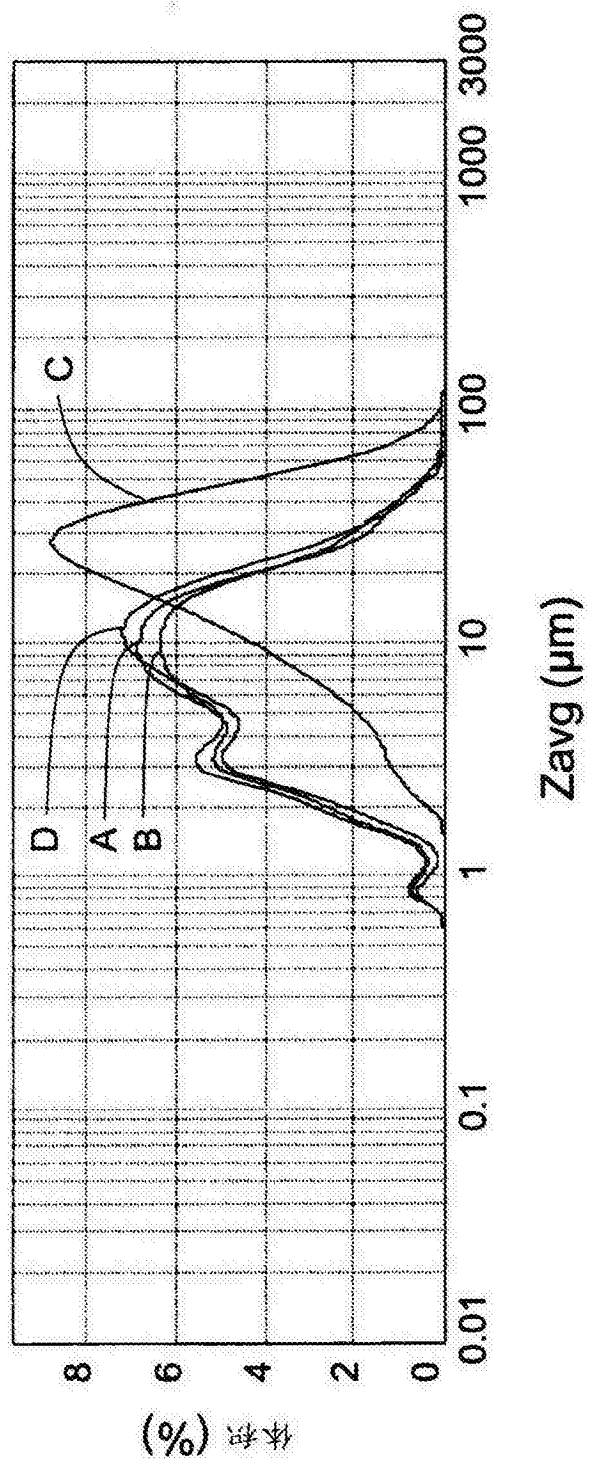


图 5

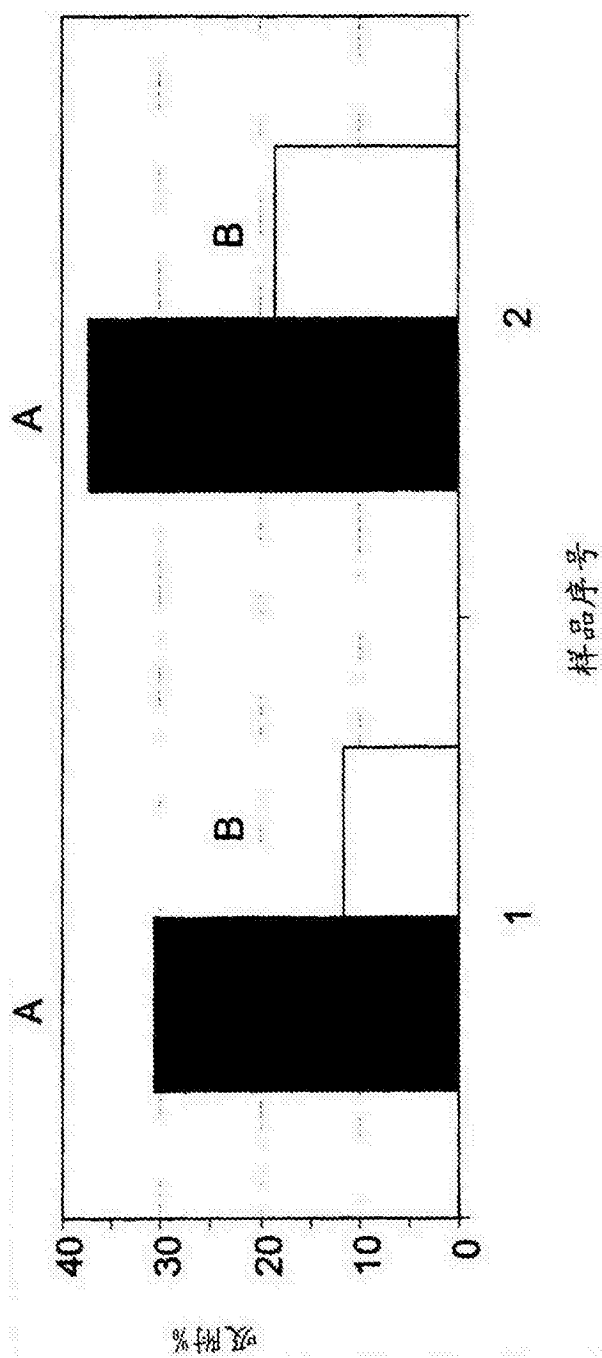


图 6

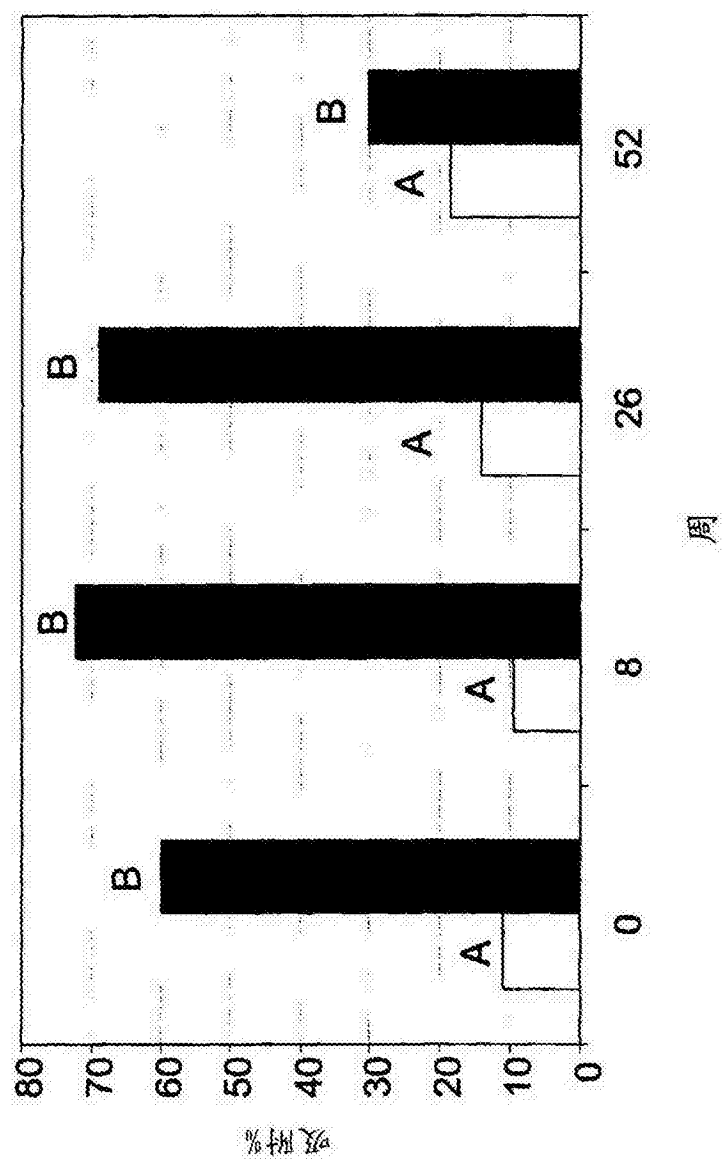


图 7

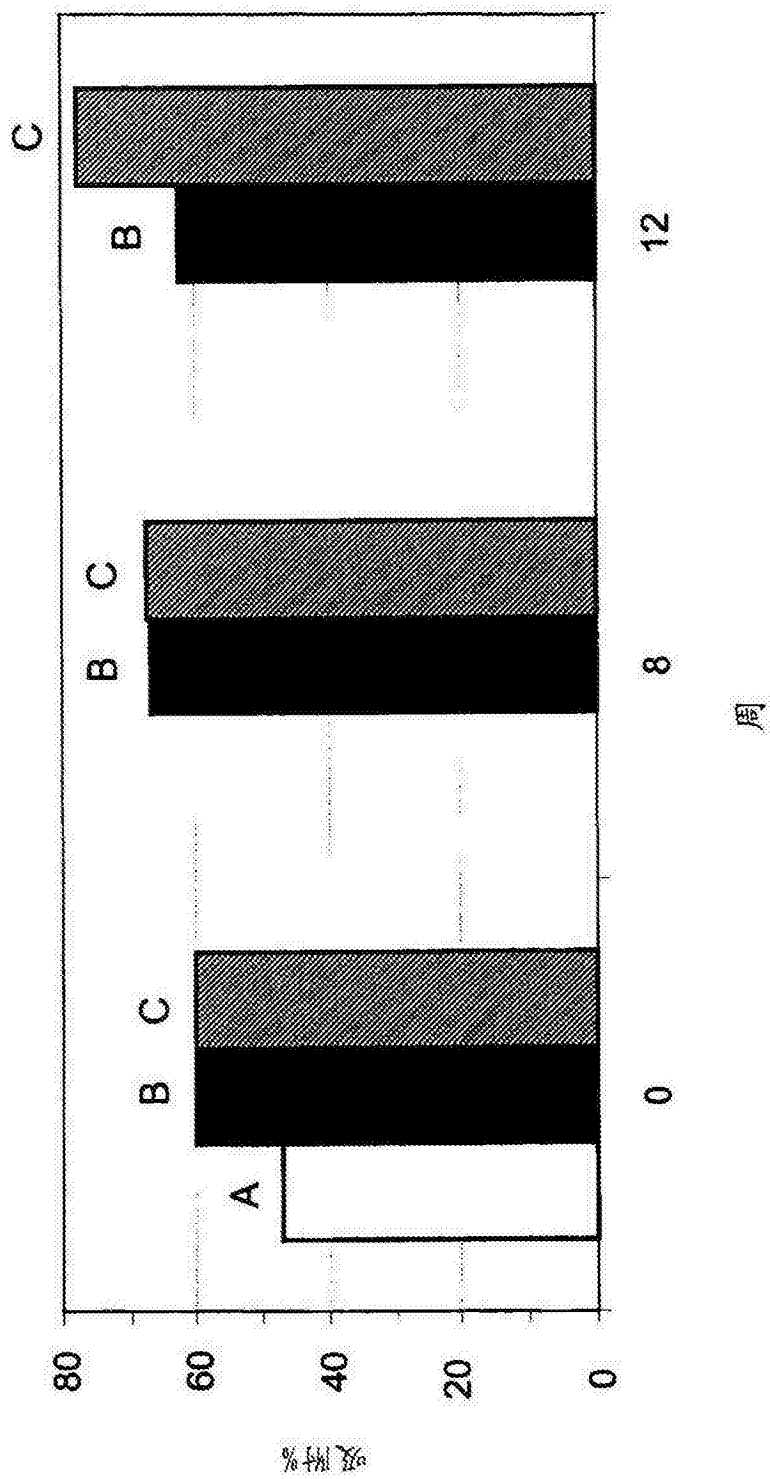


图 8

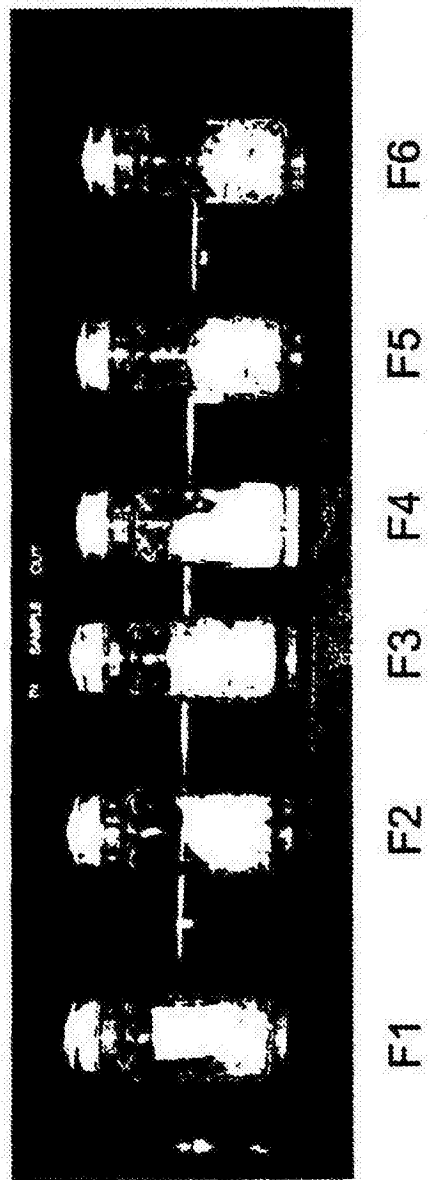


图 9

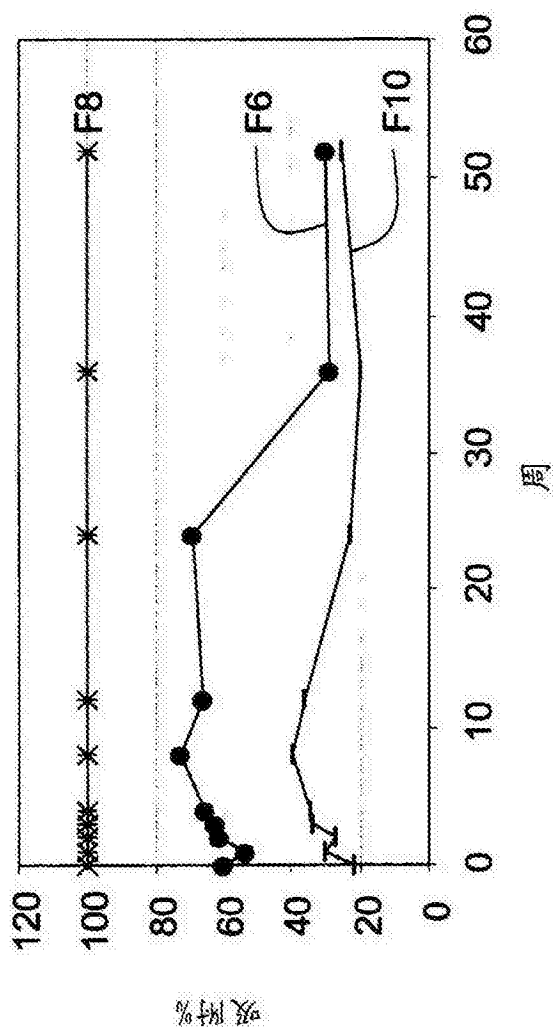


图 10

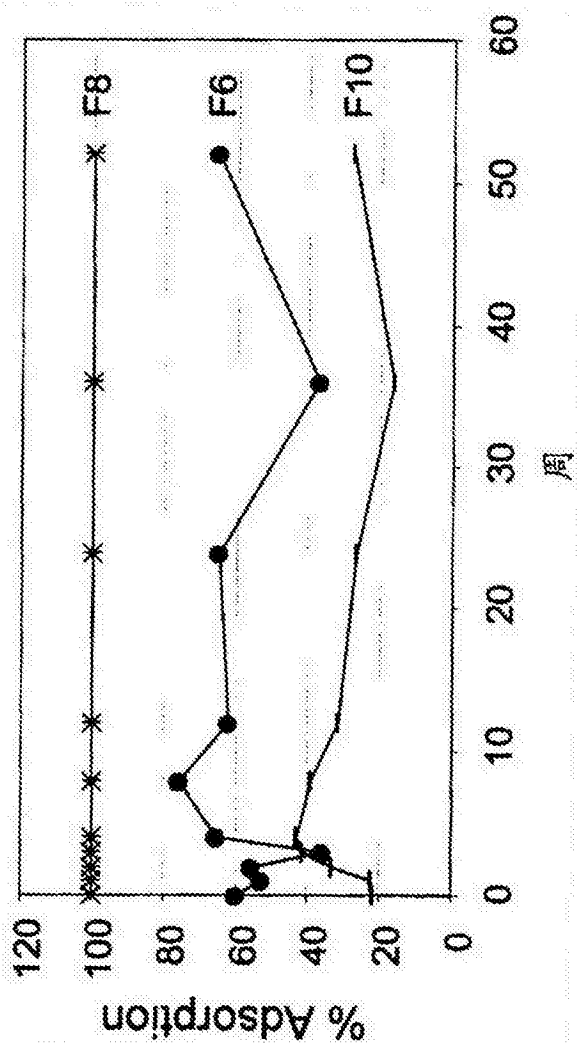


图 11