



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102933230 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201180027287.1

A61K 35/76(2015.01)

(22) 申请日 2011.04.15

A61K 39/00(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 47/26(2006.01)

61/324,542 2010.04.15 US

A61K 47/38(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 31/04(2006.01)

2012.11.30

A61P 31/12(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/JP2011/002225 2011.04.15

CN 101601860A, 2009.12.16,

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 1893973A, 2007.01.10,

W02011/129120 EN 2011.10.20

CN 101296705A, 2008.10.29,

(73) 专利权人 株式会社新日本科学

审查员 程婷

地址 日本鹿儿岛县

专利权人 一般财团法人化学及血清疗法研究所

(72) 发明人 永田良一 治田俊二

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 39/145(2006.01)

A61K 9/19(2006.01)

A61K 35/74(2015.01)

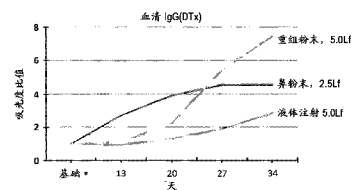
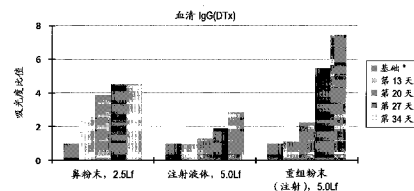
权利要求书1页 说明书32页 附图25页

(54) 发明名称

用于鼻内递送的方法和组合物

(57) 摘要

本文提供了产生干疫苗粉末制剂的方法。干疫苗粉末制剂可用于鼻内递送。还提供了通过鼻内疫苗递送来刺激局部黏膜和全身免疫的方法。



1. 一种产生鼻内干疫苗粉末制剂的方法,包括:
 - a. 制备包含磷酸盐缓冲剂中的一种或多种抗原和一种或多种水溶性糖的液体制剂;
 - b. 在不存在研磨法的情况下快速冷冻所述液体制剂以形成平均粒径为 5-100 微米的冻干样品,其中所述快速冷冻不包括喷雾冷冻,以制备所述一种或多种抗原和糖的冻干粉未;和
 - c. 将所述冻干样品与一种或多种赋形剂混合以产生鼻内干疫苗粉末制剂。
2. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为病毒抗原。
3. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为流感病毒。
4. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为 H1N1 流感病毒。
5. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为 H5N1 流感病毒。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种抗原包括 H1N1 流感病毒、H3N2 流感病毒、和流感 B 病毒。
7. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为减毒活病毒、全灭活病毒、裂解病毒、亚单位抗原或病毒颗粒。
8. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为细菌抗原。
9. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为死亡全菌、减毒细菌、类毒素、纯化表面蛋白、或纯化重组表面蛋白。
10. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为破伤风类毒素。
11. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为白喉类毒素。
12. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为原生生物抗原。
13. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为蛋白质。
14. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种水溶性糖为乳糖。
15. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种水溶性糖为海藻糖。
16. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种水溶性糖为甘露醇。
17. 权利要求 1 的方法,其中制备所述液体制剂进一步包括加入一种或多种缓冲剂。
18. 权利要求 1 的方法,其中至少一种所述一种或多种抗原为冷适应流感活病毒。

用于鼻内递送的方法和组合物

技术领域

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 4 月 15 日提交的美国临时申请序列号 61/324, 542 的权益, 其通过引用全部并入本文。

背景技术

[0003] 配制为液体的流感疫苗可经受化学降解, 例如聚合、变性、水解、和氧化, 这可导致它们灭活。液体疫苗制剂也可对温度敏感: 高温可增加灭活, 而冷冻温度可导致结冰, 这可破坏疫苗中的抗原。因此, 为了防止灭活, 经常于 2 至 8 摄氏度的温度范围内储存和配送液体疫苗。对于疫苗的长期储存和运输而言、及对于由于过期的疫苗损失, 这种储存是昂贵的。生产室温稳定的疫苗将导致储存方面的节省并将利于库存。存在对生产室温稳定的疫苗制剂, 例如干粉末疫苗的方法的需求。

[0004] 已经描述了若干种冷冻 - 干燥疫苗的方法。例如, 流感疫苗溶液的冻干法 (冷冻 - 干燥) 可用以生产疫苗粉末。然而, 通过该方法制备的流感疫苗粉末可为一种硬块, 其不利于一致和可靠的施用。流感疫苗溶液的喷雾 - 冷冻 - 干燥 (SFD) 可提供流感疫苗粉末的精细颗粒; 然而, SFD 为高成本方法。因此, 存在对生产具有相对高的流动性和相对低的吸湿性的精细粉末疫苗的低成本方法的需求。

[0005] 疫苗的施用方式可在其疗效中发挥作用。一种施用方式, 非亲施用 (nonparental administration, 例如, 经鼻), 可诱导和促进黏膜和全身体液和细胞介导的免疫应答。黏膜接种疫苗可导致在呼吸道和口咽区域中诱导分泌型 IgA (sIgA) 应答。黏膜 sIgA 抗体的一个特征是它们可提供针对抗原性不同病毒的交叉保护; 因此, 黏膜 sIgA 应答具有提供针对由用以生产疫苗的病毒株变化而来 (例如, 流感病毒 H1N1 可变至 H2N1 或 H1N2) 的病毒株的保护的潜力。此外, sIgA 可有助于将病毒或其它病原体结合至黏膜表面, 阻止病原体进入更深层组织和 / 或降低全面感染的可能性。本文描述了用于生产诱导 sIgA 的疫苗, 例如用于非亲施用的粉末疫苗制剂的新方法。

发明内容

[0006] 本文公开了一种干疫苗粉末制剂, 包含: 一种或多种抗原、一种或多种糖、一种或多种缓冲剂; 和微晶纤维素。本文所描述的疫苗粉末制剂中的抗原可为病毒抗原。病毒抗原可为减毒活病毒、全灭活病毒、分裂 - 灭活病毒、亚单位抗原、病毒颗粒、或冷适应流感活病毒。病毒抗原可为流感病毒; 例如, 抗原可为 H1N1; 或 H5N1; 或 H1N1、H3N2 和 B 型流感的混合物。本文所描述的疫苗粉末制剂中的抗原可为细菌抗原。细菌抗原可为死亡全菌、减毒细菌、类毒素、纯化表面蛋白、或纯化重组表面蛋白。细菌抗原可为破伤风类毒素或白喉类毒素。干疫苗粉末制剂中的抗原也可为原生生物。抗原也可为蛋白质。所用的糖可为海藻糖、甘露醇、或乳糖。所用的糖可为海藻糖。所用的缓冲剂可为磷酸盐缓冲剂。本文所描述的疫苗粉末制剂于室温和 60% 相对湿度下可稳定至少 12 个月。

[0007] 本文也提供了一种生产干疫苗粉末制剂的方法,包括:制备包含抗原的液体制剂;快速冷冻所述液体制剂,其中所述快速冷冻不包括喷雾冷冻;将所述冻干样品与一种或多种赋形剂混合以产生干疫苗粉末制剂。病毒抗原可为减毒活病毒、全灭活病毒、分裂-灭活病毒、亚单位抗原、病毒颗粒、或冷适应流感活病毒。病毒抗原可为流感病毒;例如,抗原可为 H1N1;或 H5N1;或 H1N1、H3N2 和 B 型流感的混合物。本文所描述的疫苗粉末制剂中的抗原可为细菌抗原。细菌抗原可为死亡全菌、减毒细菌、类毒素、纯化表面蛋白、或纯化重组表面蛋白。细菌抗原可为破伤风类毒素或白喉类毒素。干疫苗粉末制剂中的抗原也可为原生生物。抗原也可为蛋白质。液体制剂的制备可包括加入糖,例如海藻糖、甘露醇、或乳糖。液体制剂的制备也可包括加入缓冲剂,例如磷酸盐缓冲剂。粉末可包含精细颗粒。粉末于室温和 60%相对湿度下可稳定至少 12 个月。用于本文所描述方法的赋形剂可包括一种或多种鼻载体,例如微晶纤维素和磷酸三钙。赋形剂可改善粉末的流动性和/或降低粉末的吸湿性。通过本文方法制备的某些疫苗粉末不包含佐剂。快速冷冻可包括使用液氮。

[0008] 本文提供的另一种方法是刺激受试者对抗原的 sIgA 应答的方法,包括向受试者施用干疫苗粉末制剂,其中所述干粉末制剂包含抗原并且其中所述干粉末制剂通过快速冷冻液体制剂而产生,其中所述快速冷冻不包括喷雾-冷冻。在某些情况下,也刺激了 IgG 应答。可在施用位点和/或除施用位点外的黏膜位点刺激 sIgA 产生。施用可为鼻内。本文所描述的疫苗粉末制剂中的抗原可为病毒抗原。病毒抗原可为减毒活病毒、全灭活病毒、分裂-灭活病毒、亚单位抗原、病毒颗粒、或冷适应流感活病毒。病毒抗原可为流感病毒;例如,抗原可为 H1N1;或 H5N1;或 H1N1、H3N2 和 B 型流感的混合物。本文所描述的疫苗粉末制剂中的抗原可为细菌抗原。细菌抗原可为死亡全菌、减毒细菌、类毒素、纯化表面蛋白、或纯化重组表面蛋白。细菌抗原可为破伤风类毒素或白喉类毒素。干疫苗粉末制剂中的抗原也可为原生生物。抗原也可为蛋白质。液体制剂的制备可包括加入糖,例如海藻糖、甘露醇或乳糖。液体制剂的制备也可包括加入缓冲剂,例如磷酸盐缓冲剂。粉末可包括精细颗粒。粉末于室温和 60%相对湿度下可稳定至少 12 个月。用于本文所描述方法的赋形剂可包括一种或多种鼻载体,例如微晶纤维素和磷酸三钙。赋形剂可改善粉末的流动性和/或降低粉末的吸湿性。

[0009] 本文也提供了一种用于施用本文所公开的疫苗粉末制剂的装置。所述装置设置为单次使用。

[0010] 以引用方式并入

[0011] 本说明书中提及的全部出版物、专利、和专利申请以好似具体地和单独地指出每个单独的出版物、专利、或专利申请以引用方式并入一样的程度以引用方式并入本文。

附图说明

[0012] 本发明的新颖特征具体阐明于附加的权利要求书中。本发明特征和优点的更好理解将通过参考以下阐明说明性实施方案的详细描述而获得,其中利用本发明的原理,且其附图为:

[0013] [图 1] 图 1 阐明了使用常规缓慢冷冻和冷冻-干燥方法用海藻糖、甘露醇和乳糖产生的流感疫苗粉末的性质。

[0014] [图 2] 图 2 阐明了通过使用液氮快速冷冻制备干鼻疫苗粉末制剂的方法。也描述

了加入鼻载体之前和之后粉末的示例性的性质。

[0015] [图 3] 图 3 阐明了本发明提供的一种生产方法的实施方案。

[0016] [图 4] 图 4 阐明了一种用于测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂的研究设计。

[0017] [图 5A] 图 5A 列出了测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的血清样品中测量的 HI 滴定度。

[0018] [图 5B] 图 5B 列出了测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的鼻洗样品中测量的 HI 滴定度。

[0019] [图 6A] 图 6A 列出了测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 抗体滴定度。

[0020] [图 6B] 图 6B 列出了测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的鼻洗 sIgA 抗体滴定度。

[0021] [图 7] 图 7 用图阐明了测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间测量的 IgG 和 sIgA 抗体滴定度。

[0022] [图 8] 图 8 列出了测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的血清和鼻洗样品中测量的 HI 滴定度。

[0023] [图 9] 图 9 列出了测试 H1N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 和鼻洗 sIgA 抗体滴定度。

[0024] [图 10] 图 10 阐明了一种用于测试 H5N1 鼻流感疫苗粉末制剂的研究设计。

[0025] [图 11A] 图 11A 列出了测试 H5N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 抗体滴定度。

[0026] [图 11B] 图 11B 列出了测试 H5N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的鼻洗 sIgA 抗体滴定度。

[0027] [图 12] 图 12 用图阐明了测试 H5N1 鼻流感疫苗粉末制剂期间测量的 IgG 和 sIgA 抗体滴定度。

[0028] [图 13] 图 13 阐明了一种用于测试破伤风类毒素鼻疫苗粉末制剂的研究设计。

[0029] [图 14A] 图 14A 列出了测试破伤风类毒素鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 的吸光度比值。

[0030] [图 14B] 图 14B 用图阐明了测试破伤风类毒素鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 的吸光度比值。

[0031] [图 15] 图 15 列出了测试破伤风类毒素鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的 IFN γ 水平。

[0032] [图 16] 图 16 阐明了一种用于测试白喉类毒素鼻疫苗粉末制剂的研究设计。

[0033] [图 17A] 图 17A 列出了测试白喉类毒素鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 抗体滴定度。

[0034] [图 17B] 图 17B 用图阐明了测试白喉类毒素鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 抗体滴定度。

[0035] [图 18] 图 18 阐明了一种用于测试同质化卵清蛋白鼻疫苗粉末制剂的研究设计。

[0036] [图 19A] 图 19A 列出了测试同质化卵清蛋白鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 抗体滴定度。

[0037] [图 19B] 图 19B 用图阐明了测试同质化卵清蛋白鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的血清 IgG 抗体滴定度。

[0038] [图 20A] 图 20A 列出了测试同质化卵清蛋白鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的鼻洗 sIgA 抗体滴定度。

[0039] [图 20B] 图 20B 用图阐明了测试同质化卵清蛋白鼻疫苗粉末制剂期间收集的样品中测量的鼻洗 sIgA 抗体滴定度。

具体实施方式

[0040] 发明详述

[0041] I. 概述

[0042] 用于液体流感疫苗制剂的常规冷冻 - 干燥方法, 例如在 24 小时内从室温冷却至 -40 摄氏度, 可导致不是最理想的颗粒特性或抗原 (例如流感红血球凝聚素 (HA)) 效力的损失 (图 1)。例如, 经受常规冷冻 - 干燥方法的含有海藻糖的液体流感疫苗制剂可形成部分结块的粉末 (图 1)。经受常规冷冻 - 干燥方法的含有甘露醇的液体流感疫苗制剂可具有降低的 HA 效力 (图 1)。经受常规冷冻 - 干燥方法的含有乳糖的液体流感疫苗制剂可形成部分结块的粉末并可具有降低的 HA 效力 (图 1)。

[0043] 本公开内容提供了用于产生干疫苗粉末制剂的包括快速冷冻步骤的方法 (参见例如, 图 2 和 3), 其克服了之前冷冻干燥方法的局限性, 形成具有高流动性的高效力粉末化的疫苗。所述方法可包括产生含一种或多种抗原 (例如病原体或其成分 (例如, 全灭活流感病毒)) 及一种或多种试剂 (例如, 糖和 / 或缓冲剂, 例如, 磷酸盐缓冲剂) 的液体制剂的步骤。可冻干 (例如, 包括在液氮中快速冷冻) 液体疫苗制剂以产生粉末 (例如, 疫苗粉末)。所述粉末可包含精细颗粒并可于室温下稳定。如果抗原为流感病毒, 所述粉末可具有高 HA 效力 (例如, 至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%)。冷冻干燥后, 可将所述粉末与一种或多种赋形剂 (例如, 鼻载体和 / 或流动性试剂) 混合 (例如, 通过涡流) 以形成干疫苗粉末制剂。

[0044] 本文所描述的干疫苗粉末制剂可于室温下稳定。这是优于液体流感疫苗的优点, 所述液体流感疫苗室温不稳定并可需要昂贵的冷冻条件下储存和配送 (例如, 冻链配送)。在某些疫苗制备中, 制备含二糖, 例如, 海藻糖或乳糖的液体制剂。这类添加剂通常允许维持干流感疫苗粉末制剂 HA 的效力。虽然这种糖成分的使用是已知的, 但本文所描述的方法可提供干疫苗形式, 其使用这些糖成分不形成硬块。使用本文所描述的缓冲剂和快速冷冻技术可避免结硬块。随后可将由快速冷冻和干燥抗原制品而制备的粉末与一种或多种赋形剂, 例如鼻载体 (例如, 微晶纤维素) 和 / 或流动性试剂 (例如, 磷酸三钙) 混合。本制剂可形成适用于鼻内递送的干粉末疫苗, 其可于室温和加速条件下稳定。本文所提供的干疫苗粉末制剂可由鼻递送装置提供完整且一致的递送且导致刺激接受者对疫苗所涉及的抗原 / 病原体的免疫应答。

[0045] 本文所提供的方法可允许降低本文所提供的干疫苗粉末制剂的吸湿性并改善本文所提供的干疫苗粉末制剂的流动性。所述方法可包括向粉末制剂加入生理学可接受的试剂 (例如, 微晶纤维素) 以降低干疫苗粉末制剂的吸湿性并改善干疫苗粉末制剂的流动性。

[0046] 本文所提供的方法可允许提高疫苗的疗效。所述方法可包括产生可刺激局部免疫

应答,例如,黏膜免疫应答(例如,包括黏膜 sIgA)的干疫苗粉末组合物的步骤。sIgA 可提供针对变异流感病毒(例如,干疫苗粉末制剂可用作大流行性流感疫苗)和/或已经经历遗传漂变的病毒的交叉保护。干疫苗粉末制剂,例如,干鼻流感粉末制剂可诱导远端黏膜位点的保护。例如,将本公开内容的疫苗引入鼻黏膜处可形成保护(例如,上呼吸道、下呼吸道、胃肠道、和阴道中产生 sIgA)。干疫苗粉末制剂可刺激全身免疫应答(例如,产生血清 IgG)。干疫苗粉末组合物可包含微晶纤维素。在某些实施方案中,干疫苗粉末制剂不包含佐剂。

[0047] II. 用于产生粉末制剂的液体制剂

[0048] 为产生干疫苗粉末制剂,可先产生液体制剂。所述液体制剂可包含一种或多种抗原(例如,一种或多种病原体或病原体的成分)、一种或多种糖、一种或多种缓冲剂、和一种或多种其它成分。典型地,在制备干疫苗粉末制剂之前,使所述液体制剂经受快速冷冻(例如,通过浸入液氮中)和冷冻-干燥。

[0049] 液体制剂的体积可为约 0.1mL、1.0mL、10mL、25mL、50mL、100mL、250mL、500mL、1L、10L、50L、100L、250L、500L、或 1000L。液体制剂的体积可为大于约 0.1mL、1.0mL、10mL、25mL、50mL、100mL、250mL、500mL、1L、10L、50L、100L、250L、500L、或 1000L。液体制剂的体积可为约 0.01-1mL、约 1-10mL、约 10-50mL、约 50-100mL、约 1-1000mL、约 100-1000mL、约 1-10L、约 10-50L、约 50-100L、约 100-500L、约 100-1000L、或约 1-1000L。冷冻干燥后,所制备的干疫苗的量可为约 0.05mg-500mg、约 0.05mg-1mg、约 1mg-约 100mg、或约 100mg-约 500mg。

[0050] A. 病毒疫苗成分

[0051] 本文所描述的产生干疫苗粉末制剂的方法可用于制备含有减毒活病毒、全灭活病毒、裂解病毒、亚单位抗原、病毒颗粒、或冷适应流感活病毒的疫苗。

[0052] 本文所描述的产生干疫苗粉末制剂的方法可用于制备含有减毒活病毒的疫苗。减毒活疫苗可衍生自培养细胞中的连续传代,所述培养细胞包括,例如,人二倍体细胞(例如胎儿肺组织、其它成纤维细胞)、猴肾细胞、和鸡胚胎。病毒对培养细胞中生长的适应可伴有天然宿主毒性的逐渐丧失。无毒性可例如通过点突变的积累获得。基因工程可用于通过例如产生温度敏感突变体、产生缺失突变体、定点诱变、或产生活重组病毒来实现病毒衰减。

[0053] 本文所描述的产生干疫苗粉末制剂的方法可用于制备含有全灭活病毒的疫苗。灭活病毒可例如通过使用紫外线、低 pH(例如,酸,如,辛酸)、加热杀菌法、溶剂/洗涤剂、硫氰酸钠、福尔马林、 β -丙内酯、或乙撑亚胺产生。UV 线可通过生成核酸二聚体破坏 DNA,这可通过阻止遗传物质的复制来灭活病毒。某些病毒暴露于低 pH 溶液之后变性。当针对包膜病毒使用该方法时,其可特别有效。加热杀菌法可依靠温度诱导的变性来灭活病毒。溶剂/洗涤剂灭活仅针对包膜于脂质衣壳内的病毒有效。所用的洗涤剂典型地为 Triton-X 100。硫氰酸钠可使病毒的蛋白质衣壳变性、致使所述病毒灭活。福尔马林可化学改性病毒衣壳的表面蛋白质,这可阻止感染。乙撑亚胺和 β -丙内酯可作用于病毒的核酸而使蛋白质衣壳几乎不改性。灭活可破坏病毒的传染性而维持其免疫原性。可向受试者施用灭活病毒的多种应用。

[0054] 本文所描述的产生干疫苗粉末制剂的方法可用于制备含有来自一种或多种病原体的一种或多种抗原蛋白(疫苗蛋白)的疫苗。抗原蛋白可来自疫苗将要针对其制备的任

意病原体。例如,当疫苗要靶向流感病毒时,抗原蛋白可为红血球凝聚素(HA)和/或神经氨酸苷酶(NA)。红血球凝聚素为抗原糖蛋白并为流感A病毒的主要表面蛋白。其通过结合细胞表面上含唾液酸的受体来介导流感病毒与被感染细胞之间的结合。结合至细胞表面的病毒颗粒被卷入内涵体中。在内涵体中,HA介导病毒膜与内涵体膜的融合,向细胞释放病毒基因组。结构上,HA由三个组织成螺旋线圈的相同单体组成。功能阻断抗体可抑制HA的细胞结合或膜融合功能。神经氨酸苷酶为于流感病毒表面上发现的另一种糖蛋白。NA为通过从糖蛋白切割唾液酸基团而起作用的酶。所述切割似乎提供两种功能:阻止病毒丛生和从细胞表面释放子代病毒。

[0055] 有着至少16种已知的HA亚型。疫苗抗原可为HA1、HA2、HA3、HA4、HA5、HA6、HA7、HA8、HA9、HA10、HA11、HA12、HA13、HA14、HA15、或HA16。有着9种已知的NA亚型。疫苗抗原可为NA1、NA2、NA3、NA4、NA5、NA6、NA7、NA8、或NA9。由HA和/或NA亚型制备的疫苗可单独使用或以任意联合使用。例如,可在制备干疫苗粉末制剂期间将各种HA和NA抗原的两种或多种混合、或可将单独HA和NA抗原的干粉末制剂混合。抗原蛋白可为来自病原体的表面蛋白。可重组制备抗原蛋白。例如,可将编码目标抗原的核酸引入原核细胞(例如细菌)、真核细胞(例如,酵母细胞和昆虫细胞),并且蛋白可由细胞表达和纯化。当病原体为病毒时,可(例如,使用醚和洗涤剂)将病毒粒子的非必需成分移除。

[0056] 本文所描述的产生干疫苗粉末制剂的方法可用于制备病毒颗粒疫苗。病毒颗粒疫苗包含无天然病毒遗传物质的重构的病毒包膜的病毒样颗粒。流感病毒颗粒为由夹有HA和NA蛋白质的单层磷脂双分子层组成的囊泡。由于它们不具有遗传物质,病毒颗粒没有感染性。

[0057] 液体疫苗制剂中疫苗蛋白(例如,抗原或含抗原成分)的浓度可为约0.05mg/mL-10mg/mL、约0.1mg/mL-10mg/mL、约0.1mg/mL-5mg/mL、约0.1mg/mL-2.5mg/mL、约0.1mg/mL-1mg/mL、约0.1mg/mL-0.5mg/mL、约0.5mg/mL-1mg/mL、约0.05mg/mL-1mg/mL、或约0.05mg/mL-2.5mg/mL。液体疫苗制剂中疫苗蛋白(例如,抗原或含抗原成分)的浓度可为约0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL、1.3mg/mL、1.4mg/mL、1.5mg/mL、1.6mg/mL、1.7mg/mL、1.8mg/mL、1.9mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3mg/mL、3.5mg/mL、4mg/mL、4.5mg/mL、5mg/mL、5.5mg/mL、6mg/mL、6.5mg/mL、7.0mg/mL、8.0mg/mL、8.5mg/mL、9mg/mL、或10mg/mL。液体疫苗制剂中疫苗蛋白(例如抗原或含抗原成分)的浓度可为大于约0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6mg/mL、0.7mg/mL、0.8mg/mL、0.9mg/mL、1.0mg/mL、1.1mg/mL、1.2mg/mL、1.3mg/mL、1.4mg/mL、1.5mg/mL、1.6mg/mL、1.7mg/mL、1.8mg/mL、1.9mg/mL、2.0mg/mL、2.5mg/mL、3mg/mL、3.5mg/mL、4mg/mL、4.5mg/mL、5mg/mL、5.5mg/mL、6mg/mL、6.5mg/mL、7.0mg/mL、8.0mg/mL、8.5mg/mL、9mg/mL、或10mg/mL。

[0058] 干疫苗粉末制剂可用于预防和/或治疗一种或多种流感病毒的感染。流感病毒属于病毒的正粘病毒科,其包括五类:流感病毒A、流感病毒B、流感病毒C、Isa病毒(Isavirus)、和托高土病毒(Thogotovirus)。多里病毒(Dhori virus)为托高土病毒属的一种。流感病毒可感染人类和其它物种。流感A型病毒可感染人类、鸟、猪、马、海豹和其它物种。野生禽类可为这些病毒的天然宿主。流感A型病毒可分成亚型并基于病毒表面上的两种蛋白命名:红血球凝聚素(HA)和神经氨酸苷酶(NA)。例如,“H7N2病毒”指流感A亚

型,其具有 HA7 蛋白和 NA2 蛋白。类似地,“H5N1”病毒具有 HA 5 蛋白和 NA 1 蛋白。有着 16 种已知的 HA 亚型和 9 种已知的 NA 亚型。HA 和 NA 蛋白的多种不同结合是可能的。任何数量的已知的 HA 亚型 (HA1、HA2、HA3、HA4、HA5、HA6、HA7、HA8、HA9、HA10、HA11、HA12、HA13、HA14、HA15、和 HA16) 可与任何数量的已知的 NA 亚型 (NA1、NA2、NA3、NA4、NA5、NA6、NA7、NA8、和 NA9) 联合以制备疫苗从而预防或治疗感染。所述 HA 和 NA 亚型也可单独用于疫苗中以预防或治疗感染。可在使用时相继或同时地联合不同亚型的疫苗以预防或治疗感染。某些流感 A 亚型 (例如, H1N1、H1N2、和 H3N2) 目前通常在人群中传播。其它亚型可发现于其它动物物种。例如, H7N7 和 H3N8 病毒可引起马生病,以及 H3N8 也在最近被证实引起狗生病 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>)。

[0059] 抗病毒试剂可用于保护高风险群体 (例如, 医疗单位的个体、老年护理机构的个体、或免疫抑制的个体)。抗病毒试剂的潜在用途为限制未来流行病的传播和严重性, 无论其由例如禽类 H5N1 引起还是由流感病毒的其它病毒株 (例如, H1N1) 引起。禽类流感 A 病毒的亚型 H5 和 H7, 包括 H5N1、H7N7、和 H7N3 病毒, 与高致病性相关, 并且人类感染这些病毒的范围从轻微 (例如, H7N3、H7N7) 到严重以及致命疾病 (例如, H7N7、H5N1)。归因于低致病性病毒感染的人类疾病已被记载, 包括非常轻微的症状 (例如, 结膜炎) 至流感样疾病。已感染人类的低致病性病毒的实例包括 H7N7、H9N2、和 H7N2。 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>)。

[0060] 流感 B 病毒可发现于人类且也可感染海豹。与流感 A 病毒不同, 这些病毒不依照亚型分类。流感 B 病毒可在人类中引起发病率和死亡率, 但通常与不如流感 A 病毒严重的流行病相联系。虽然 B 型流感病毒可引起人类流行病, 但它们不引起大流行病。 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>)。

[0061] 流感 C 型病毒可在人类中引起轻微疾病且不引起流行病或大流行病。这些病毒也可感染狗和猪。这些病毒不依照亚型分类。 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>)。

[0062] 本文所描述的方法和组合物可用于任意病毒感染的预防和 / 或治疗, 所述病毒包括, 例如, 阿伯尔森白血病病毒、阿伯尔森鼠科白血病病毒、阿伯尔森氏病毒、急性喉气管支气管炎病毒、阿德莱德河病毒、腺相关病毒组、腺病毒、非洲马瘟病毒、非洲猪瘟病毒、AIDS 病毒、阿留申水貂细小病毒、 α 逆转录病毒、 α 病毒、ALV 相关病毒、阿马帕里病毒、口蹄疫病毒、水生呼肠孤病毒、虫媒病毒、虫媒病毒 C、虫媒病毒组 A、虫媒病毒组 B、沙粒病毒组、阿根廷出血热病毒、阿根廷出血热病毒、动脉炎病毒、星状病毒、Ateline 疱疹病毒组、Aujezky 氏病病毒、奥拉病毒、Ausduk 病病毒、澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒、禽类腺病毒、禽类骨髓成红血细胞增多症病毒、禽类感染性支气管炎病毒、禽类白血病病毒、禽类白血性增生病毒、禽类淋巴瘤病病毒、禽类成髓细胞瘤病毒、禽类副粘病毒、鸡瘟病毒 (avian pneumoencephalitis virus)、禽类网状内皮组织增殖病毒、禽类肉瘤病毒、禽类 C 型逆转录病毒组、禽类肝病毒、禽类痘病毒、B 病毒、B19 病毒、Babanki 病毒、狒狒疱疹病毒、杆状病毒、巴马森林病毒、贝巴鲁病毒、贝里马病毒、 β 逆转录病毒、双 RNA 病毒 (Birnavirus)、比特纳病毒、BK 病毒、黑港渠病毒、蓝舌病毒、玻利维亚出血热病毒、博马病病毒、羊边界病病毒、博尔纳病毒、1 型牛 α 疱疹病毒、2 型牛 α 疱疹病毒、牛冠状病毒、牛流行热病毒、牛免疫缺陷病毒、牛白血病病毒、牛白血性增生病毒、牛乳头炎病毒、牛乳头瘤病毒、牛丘疹性口

腔炎病毒、牛细小病毒、牛合胞病毒、牛 C 型肿瘤病毒、牛病毒性腹泻病毒、车溪病毒、弹状病毒组、本扬委那病毒超组、本扬病毒、伯基特氏淋巴瘤病毒、布汪巴热、CA 病毒、杯状病毒、加利福尼亚脑炎病毒、骆驼痘病毒、金丝雀痘病毒、犬疱疹病毒、犬冠状病毒、犬瘟热病毒、犬疱疹病毒、犬微小病毒、犬细小病毒、Cano Delgadito 病毒、山羊关节炎病毒、山羊脑炎病毒、山羊疱疹病毒、羊痘病毒、心脏病毒、1 型豚鼠疱疹病毒、1 型猕猴疱疹病毒、1 型猴疱疹病毒、2 型猴疱疹病毒、金迪普拉病毒、张格罗拉病毒、斑点叉尾鮰病毒、查尔维尔病毒、水痘病毒、基孔肯雅病毒、黑猩猩疱疹病毒、鲑鱼呼肠孤病毒、大马哈鱼病毒、科卡尔病毒、银鲑鱼呼肠孤病毒、性交疹病毒、科罗拉多壁虱热病毒、Colti 病毒、哥伦比亚 SK 病毒、普通感冒病毒、传染性腺疮病毒、传染性脓疱皮炎病毒、冠状病毒、科里帕塔病毒、鼻炎病毒、牛痘病毒、柯萨奇病毒、CPV(质型多角体病毒)、蟋蟀麻痹病毒、克里米亚 - 刚果出血热病毒、义膜性喉炎相关病毒、Crypto 病毒、Cypo 病毒、巨细胞病毒、巨细胞病毒组、质型多角体病毒、鹿乳头瘤病毒、 δ 逆转录病毒、登革热病毒、浓核病毒、依赖性病毒、多里病毒、双核糖核酸病毒、果蝇 C 病毒、鸭乙肝病毒、1 型鸭肝炎病毒、2 型鸭肝炎病毒、轮状病毒 (duovirus)、达温黑格病毒、畸翅病毒 DWV、东部马脑炎病毒、东部马脑脊髓炎病毒、EB 病毒、埃博拉病毒、埃博拉样病毒、埃可病毒、埃可病毒、10 型埃可病毒、28 型埃可病毒、9 型埃可病毒、鼠痘病毒、EEE 病毒、EIA 病毒、EIA 病毒、脑炎病毒、脑心肌炎组病毒、脑心肌炎病毒、肠道病毒、酶升高病毒、酶升高病毒 (LDH)、流行性出血热病毒、家畜流行性出血性疾病病毒、Epstein-Barr 病毒、1 型马 α 疱疹病毒、4 型马 α 疱疹病毒、2 型马疱疹病毒、马流产病毒、马动脉炎病毒、马器质性脑病病毒、马感染性贫血病毒、马麻疹病毒、马鼻肺炎病毒、马鼻病毒、Eubengu 病毒、欧洲麋鹿乳头瘤病毒、欧洲猪瘟病毒、大沼泽病毒、Eyach 病毒、1 型猫疱疹病毒、猫杯状病毒、猫纤维肉瘤病毒、猫疱疹病毒、猫免疫缺陷病毒、猫感染性腹膜炎病毒、猫白血病 / 肉瘤病毒、猫白血病病毒、猫泛白细胞减少症病毒、猫细小病毒、猫肉瘤病毒、猫合胞病毒、纤丝病毒、法兰德斯病毒、黄病毒、足口病病毒、堡摩根病毒、四角汉坦病毒、1 型禽类腺病毒、鸡痘病毒、弗里德病毒、 γ 逆转录病毒、GB 肝炎病毒、GB 病毒、风疹病毒、盖塔病毒、长臂猿白血病病毒、腺热病毒、羊痘病毒、金体美鳊鱼病毒 (golden shinner virus)、枯叶蛾病毒、鹅细小病毒、颗粒层增殖病毒、格罗斯病毒、地面松鼠乙肝病毒、A 组虫媒病毒、瓜纳里托病毒、豚鼠巨细胞病毒、豚鼠 C 型病毒、汉坦病毒、汉坦病毒、文蛤呼肠孤病毒、兔纤维瘤病毒、HCMV(人类巨细胞病毒)、2 型血细胞吸附病毒、日本仙台病毒、出血热病毒、亨德拉病毒、亨尼帕病毒、嗜肝 DNA 病毒、甲肝病毒、乙肝病毒组、丙肝病毒、丁肝病毒、 δ 肝炎病毒、E 肝炎病毒、F 肝炎病毒、G 肝炎病毒、非甲非乙型肝炎病毒、肝炎病毒、肝炎病毒 (非人)、3 型肝脑脊髓炎呼肠孤病毒、嗜肝病毒、鹭乙肝病毒、疱疹 B 病毒、单纯疱疹病毒、1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、疱疹病毒、7 型疱疹病毒、蜘蛛猴疱疹病毒、人疱疹病毒、疱疹病毒感染、松鼠猴疱疹病毒、猪疱疹病毒、水痘疱疹病毒、高地 J 病毒、牙鲆弹状病毒、猪瘟病毒、2 型人腺病毒、1 型人 α 疱疹病毒、2 型人 α 疱疹病毒、3 型人 α 疱疹病毒、人 B 淋巴细胞病毒、5 型人 β 疱疹病毒、人冠状病毒、人巨细胞病毒组、人泡沫病毒、4 型人 γ 疱疹病毒、6 型人 γ 疱疹病毒、人甲肝病毒、人疱疹病毒 1 组、人疱疹病毒 2 组、人疱疹病毒 3 组、人疱疹病毒 4 组、6 型人疱疹病毒、8 型人疱疹病毒、人免疫缺陷病毒、1 型人免疫缺陷病毒、2 型人免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、人 T 细胞白血病病毒、I 型人 T 细胞白血病病毒、II 型人 T 细胞白血病病毒、III 型人 T 细胞白血病病毒、I 型人 T 细胞淋巴瘤病毒、II 型人 T 细

胞淋巴瘤病毒、1 型人 T 细胞淋巴细胞病毒、2 型人 T 细胞淋巴细胞病毒、I 型人 T 淋巴细胞病毒、II 型人 T 淋巴细胞病毒、III 型人 T 淋巴细胞病毒、姬蜂病毒、婴儿肠胃炎肠炎病毒、感染性牛鼻气管炎病毒、感染性造血性坏疽病毒、感染性胰腺坏疽病毒、流感病毒 A、流感病毒 B、流感病毒 C、流感病毒 D、流感病毒 pr8、昆虫虹彩病毒、昆虫病毒、虹彩病毒、日本 B 病毒、日本脑炎病毒、JC 病毒、胡宁病毒、卡波西氏肉瘤相关疱疹病毒、克麦罗沃病毒、基尔汉氏鼠病毒、克拉马斯病毒、科隆各病毒、韩国出血热病毒、昆巴病毒、Kysanur 森林病病毒、披膜病毒 (Kyzylgach virus)、拉克罗斯病毒、乳汁脱氢酶升高病毒、乳汁脱氢酶病毒、拉各斯蝙蝠病毒、叶猴病毒、兔细小病毒、拉沙热病毒、拉沙病毒、潜鼠病毒、LCM 病毒、漏病毒、慢病毒、兔痘病毒、白血病毒、白血病毒、粗糙皮肤病病毒、淋巴结病相关病毒、淋巴滤泡病毒、淋巴球脉络丛脑膜炎病毒、淋巴增殖性病毒组、马丘波病毒、狂痒病毒、哺乳动物 B 型肿瘤病毒组、哺乳动物 B 型逆转录病毒、哺乳动物 C 型逆转录病毒组、哺乳动物 D 型逆转录病毒、乳腺癌病毒、Mapuera 病毒、马尔堡病毒、马尔堡样病毒、梅森辉瑞猴病毒、哺乳动物腺病毒、马亚罗病毒、ME 病毒、麻疹病毒、梅那哥病毒、门戈病毒、门戈病毒、米德尔堡病毒、挤奶人结节病毒、貂肠炎病毒、鼠微小病毒、MLV 相关病毒、MM 病毒、莫可拉病毒、软疣痘病毒、传染性软疣病毒、猴 B 病毒、猴痘病毒、单股反链病毒、麻疹病毒、埃尔贡山蝙蝠病毒、鼠巨细胞病毒、鼠脑脊髓炎病毒、鼠肝炎病毒、鼠 K 病毒、鼠白血病毒、鼠乳腺癌病毒、鼠微小病毒、鼠肺炎病毒、鼠急性骨髓灰白质炎病毒、鼠多瘤病毒、鼠肉瘤病毒、鼠痘病毒、莫桑比克病毒、穆坎博病毒、黏膜病病毒、腮腺炎病毒、1 型鼠 β 疱疹病毒、2 型鼠巨细胞病毒、鼠科巨细胞病毒组、鼠科脑脊髓炎病毒、鼠科肝炎病毒、鼠科白血病毒、鼠科结核诱导病毒、鼠科多瘤病毒、鼠科肉瘤病毒、鼠巨细胞病毒、墨累谷脑炎病毒、粘液瘤病毒、粘液病毒、新城疫病毒 (Myxovirus multiforme)、粘液病毒腮腺炎、奈洛比羊疾病病毒、内罗病毒、NAnirna 病毒、NAriva 病毒、Ndumo 病毒、结节性皮肤病病毒、纳尔逊海湾病毒、亲神经病毒、新大陆沙粒病毒、新生儿肺炎病毒、纽卡斯尔病病毒、尼帕病毒、非细胞病变性病毒、诺沃克病毒、核多角体病毒 (NPV)、乳头颈病毒、O'nyong'nyong 病毒、Ockelbo 病毒、瘤原性病毒、瘤原性病毒样颗粒、致肿瘤 RNA 病毒、环状病毒、羊传染性脓疱病毒、奥罗波克病毒、正嗜肝 DNA 病毒、正粘液病毒、正痘病毒、正呼肠孤病毒、奥轮谷, 绵羊乳头瘤病毒、绵羊鼻黏膜炎热病毒、猫头鹰猴疱疹病毒、Palyam 病毒、乳头瘤病毒、乳头瘤病毒 sylvilagi、乳头多瘤空泡病毒、副流感病毒、1 型副流感病毒、2 型副流感病毒、3 型副流感病毒、4 型副流感病毒、副粘病毒、副痘病毒、副牛痘病毒、细小病毒、细小病毒 B19、细小病毒组、瘟病毒、白蛉病毒、海豹瘟热病毒、小脱氧核糖核酸病毒、小 RNA 病毒、猪巨细胞病毒 - 鸽子痘病毒、派尔里病毒、皮克孙纳病毒、鼠肺炎病毒、肺病病毒、急性骨髓灰白质炎病毒、骨髓灰白质炎病毒、多 DNA 病毒、多角体病毒、多瘤病毒、多瘤病毒、牛多瘤病毒、猴多瘤病毒、2 型人多瘤病毒、多瘤病毒 maccacae 1、1 型缪里斯多瘤病毒、2 型缪里斯多瘤病毒、多瘤病毒 papionis 1、多瘤病毒 papionis 2、多瘤病毒 sylvilagi、1 型 Pongine 疱疹病毒、猪流行性腹泻病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、猪细小病毒、猪传染性肠胃炎肠炎病毒、猪 C 型病毒、痘病毒、痘病毒、天花痘病毒、展望山病毒、前病毒、假牛痘病毒、伪狂犬病病毒、鸚鵡痘病毒、鹌鹑痘病毒、兔纤维瘤病毒、兔肾空泡病毒 (rabbit kidney vacuolating virus)、兔乳头瘤病毒、狂犬病病毒、浣熊细小病毒、浣熊痘病毒、兰尼克特病毒、鼠巨细胞病毒、鼠细小病毒、鼠病毒、劳舍尔氏病毒、重组牛痘病毒、重组病毒、呼肠孤病毒、1 型呼肠孤病毒、2 型呼肠孤病毒、3 型

呼肠孤病毒、爬行动物 C 型病毒、呼吸感染病毒、呼吸合胞病毒、呼吸病毒、网状内皮组织增生病毒、弹状病毒、鲤鱼弹状病毒、弹状病毒、鼻病毒、根前毛菌病毒、裂谷热病毒、莱利氏病毒、牛瘟病毒、RNA 瘤病毒、罗斯河病毒、轮状病毒、麻疹病毒、鲁斯氏肉瘤病毒、风疹病毒、麻疹病毒、风疹病毒、俄国秋脑炎病毒、SA 11 猿病毒、SA2 病毒、Sabia 病毒、Sagiyama 病毒、1 型松鼠猴疱疹病毒、唾腺病毒、白蛉热病毒组、Sandjimba 病毒、SARS 病毒、SDAV (涎管泪腺炎病毒)、海豹痘病毒、森林脑炎病毒、汉城病毒、羊痘病毒、舒普纤维瘤病毒、舒普乳头瘤病毒、猿泡沫病毒、猿甲肝病毒、猿人免疫缺陷病毒、猿免疫缺陷病毒、猿副流感病毒、猿 T 细胞淋巴营养病病毒、猿病毒、猿病毒 40、单纯病毒、辛农布雷病毒、辛德毕斯病毒、天花病毒、南美洲出血热病毒、麻雀痘病毒、泡沫病毒、松鼠纤维瘤病毒、松鼠猴逆转录病毒、SSV 1 病毒组、I 型 STLV (猿 T 淋巴细胞病毒)、II 型 STLV (猿 T 淋巴细胞病毒)、III 型 STLV (猿 T 淋巴细胞病毒)、丘疹性口腔炎病毒、下颚病毒、1 型 suid α 疱疹病毒、2 型 suid 疱疹病毒、猪痘病毒、疟疾病毒、猪痘病毒、瑞士鼠白血病病毒、TAC 病毒、塔卡里伯复合物病毒、塔卡里伯病毒、特纳痘病毒、Taterapox 病毒、丁鲷呼肠孤病毒、泰勒氏脑脊髓炎病毒、泰勒氏病毒、托高土病毒、索托帕拉雅病毒、蜚传脑炎病毒、刁曼病毒、披膜病毒、环曲病毒、瘤病毒、树鼩病毒、火鸡鼻气管炎病毒、火鸡痘病毒、C 型逆转录病毒、D 型肿瘤病毒、D 型逆转录病毒组、溃疡病弹状病毒、乌纳病毒、尤库尼米病毒组、牛痘病毒、空泡病毒、水痘带状疱疹病毒、水痘病毒、Varicola 病毒、大天花病毒、天花病毒、Vasin Gishu 病病毒、VEE 病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒、委内瑞拉出血热病毒、水疱性口腔炎病毒、水泡性病病毒、Vilyuisk 病毒、蝰蛇逆转录病毒、病毒性出血性败血病病毒、维思纳梅迪病毒、维思纳病毒、野鼠痘病毒、VSV (水疱性口腔炎病毒)、Wallal 病毒、Warrego 病毒、疣病毒、WEE 病毒、西尼罗河病毒、西部马脑炎病毒、西部马脑脊髓炎病毒、沃达罗河病毒、冬季呕吐病毒、美洲旱獭乙肝病毒、毛猿肉瘤病毒、创伤瘤病毒、WRSV 病毒、亚巴猴瘤病毒、Yaba 病毒、亚塔痘病毒、黄热病毒、和 Yug Bogdanovac 病毒。

[0063] B. 非病毒病原体疫苗成分

[0064] 本文所描述的疫苗可包含细菌、真菌、或原生生物细胞或其成分。例如，针对细菌病原体的疫苗可包含死亡细菌或其纯化抗原决定簇。减毒细菌也可用作抗原。在某些情况下，针对由细胞病原体制备的毒素（例如，霍乱毒素）的疫苗可通过将灭活毒素（类毒素）与一种或多种本文所描述的疫苗成分混合来制备。来自靶病原体的抗原肽可在与一种或多种疫苗成分混合之前由源病原体纯化和 / 或重组制备。也可使用结合抗原。在结合抗原中，细菌病原体的低抗原多糖外壳结合可刺激免疫应答的毒性蛋白质。典型地，针对非病毒病原体的疫苗将被设计以产生对感染黏膜表面、或经由黏膜表面进入机体的病原体的免疫应答（例如，产生 sIgA）。这类病原体的非限制性实例包括新型隐球菌、志贺菌、伤寒沙门菌、副伤寒沙门菌 (Sa. paratyphi)、肠毒素性大肠杆菌、鼠疫杆菌、结核杆菌 (Mycobacterium tuberculosis)、解脲支原体、隐孢子虫、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、脑膜炎奈瑟菌、百日咳杆菌、肺炎链球菌、炭疽杆菌、致病性钩端螺旋体、寇氏钩端螺旋体 (Leptospira kirschneri)、野口钩端螺旋体、亚历山大钩端螺旋体、韦氏钩端螺旋体、波帕特森钩端螺旋体、圣地罗西钩端螺旋体、kmetyi 钩端螺旋体、伯氏疏螺旋体、布鲁氏菌、布鲁氏菌犬种、马尔他布鲁氏杆菌、犬布鲁杆菌、空肠弯曲菌、肺炎衣原体、沙眼衣原体、鸚鵡热衣原体、肉毒杆菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、粪肠球菌、屎肠球菌、土拉弗朗西斯、流感嗜血

杆菌、幽门螺旋杆菌、嗜肺军团菌、钩端螺旋体、李斯特菌、麻风杆菌、溃疡分支杆菌、肺炎支原体、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、绿脓杆菌、立氏立克次体、伤寒沙门菌、鼠伤寒沙门菌、宋内志贺菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、梅毒螺旋体、霍乱弧菌、白色念珠菌、烟曲霉、黄曲霉、隐球菌、荚膜组织胞浆菌、杰氏肺囊虫肺炎、黑葡萄穗霉、恶性疟原虫等。

[0065] C. 抗原成分的制备

[0066] 为了保持蛋白质或病原体其它细胞成分的抗原功能，本公开内容提供了制备可保持抗原成分（例如，病毒、蛋白质）的某些或全部三维结构的疫苗的方法。因此，本文所提供的方法可允许制备其中病原体或其成分上的抗原决定簇以完整状态保持的疫苗。例如，在疫苗中保持蛋白质的三维结构可允许保持可引发免疫应答的“构象”表位。“构象”表位为依赖蛋白质折叠并通常不是完全由线型形式的氨基酸组成的那些（例如，消化或线性化蛋白质）。此外，本文所提供的制备疫苗的方法可导致抗原效力（即，诱导免疫应答的能力）的保持，以致与暴露于病原体或其它天然存在的抗原源相比较，反应中对给定量疫苗的免疫应答的水平为至少约 100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、或 50%。另外，本文所提供的方法可允许制备其中特定抗原保持了经受本文所描述的快速冷冻方法的总抗原蛋白的抗原能力的高水平（例如，至少约 100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、53%、52%、51%、或 50%）的疫苗。

[0067] 所述方法学的一个实施方案示于图 2。在该实施例中，抗原（显示为开环）与稳定剂（海藻糖）和缓冲剂（磷酸盐缓冲剂）混合。混合所述成分并冻干（例如，通过浸入液氮中）。所制备的干疫苗成分包含精细颗粒，其中一种或多种抗原仍能够引发免疫应答并于室温下稳定。然后将所述疫苗成分与适于经鼻施用的载体（例如，微晶纤维素）混合。以下提供本文所公开的疫苗成分的非限制性实例。

[0068] 可选择液体制剂的成分以实现某些功能。例如，可利用一种成分以提供对疫苗开发所针对的抗原的稳定性。首先，这种成分可防止抗原在后续的冷冻过程期间降解。这些成分可包括任意稳定分子或化合物，例如糖、氨基酸和 / 或聚合物。一种或多种这类抗原稳定剂可用于制剂中。典型地，抗原稳定剂将完全水溶性或部分水溶性。优选的抗原稳定剂在本文所描述的方法中将不生成硬块。可用以制备液体疫苗制剂的示例性的糖包括，但不限于海藻糖、甘露醇、蔗糖、乳糖、菊粉、山梨糖、松三糖、蜜三糖、甘露醇、木糖醇、赤藻糖醇、苏糖醇、水苏糖、山梨醇、甘油、果糖、甘露糖、麦芽糖、树胶醛糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、L- 葡糖酸等。可用的示例性的氨基酸包括，但不限于异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、谷氨酸和赖氨酸。示例性的聚合物为聚乙二醇 (PEG)，但其它可用的聚合物可包括右旋糖苷、人血清白蛋白 (HSA)、非水解凝胶、甲基纤维素、黄原胶、角叉胶、胶原蛋白、硫酸软骨素、唾液酸化多糖 (sialated polysaccharide)、肌动蛋白、肌浆球蛋白、微管、动力蛋白、激动素、聚乙烯吡咯烷酮、水解凝胶和 / 或类似物。表

面活性剂可为,例如,聚乙二醇、山梨糖醇酐单月桂酸酯(吐温 20)、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(吐温 80)、聚乙烯和聚丙二醇的嵌段共聚物(Pluronic)和/或类似物。

[0069] 虽然这种抗原稳定剂已用于疫苗制备中,本方法中使用这些一种或多种稳定剂可生成冷冻的疫苗制剂,其在干燥之后不形成硬块。例如,已知使用海藻糖在冷冻时提供对蛋白质的保护,但如果所述物质不是喷雾冷冻,则导致结块(参见,例如,Chafson 等. J Biotechnol. 2007 年 7 月 15 日;130(4):436-40)。然而,本文所提供的一个实施方案为将海藻糖与蛋白质抗原、磷酸盐缓冲剂和快速冷冻法(例如,暴露于液氮)结合。这种方法可导致生成精细粉末,其中蛋白保持活性(例如,抗原能力)而不形成硬块。这是一种优势,因为研磨硬块是疫苗制备方法中的额外步骤并可导致低回收率和硬块中抗原蛋白通过加热和/或机械力的降解。

[0070] 抗原对稳定剂的比率可为,例如,约 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、1 : 11、1 : 12、1 : 13、1 : 14、1 : 15、1 : 16、1 : 17、1 : 18、1 : 19、1 : 20、1 : 21、1 : 22、1 : 23、1 : 24、1 : 25、1 : 26、1 : 27、1 : 28、1 : 29、1 : 30、1 : 31、1 : 32、1 : 33、1 : 34、1 : 35、1 : 36、1 : 37、1 : 38、1 : 39、1 : 40、1 : 41、1 : 42、1 : 43、1 : 44、1 : 45、1 : 46、1 : 47、1 : 48、1 : 49、1 : 50、1 : 51、1 : 52、1 : 53、1 : 54、1 : 55、1 : 56、1 : 57、1 : 58、1 : 59、1 : 60、1 : 61、1 : 62、1 : 63、1 : 64、1 : 65、1 : 66、1 : 67、1 : 68、1 : 69、1 : 70、1 : 71、1 : 72、1 : 73、1 : 74、1 : 75、1 : 76、1 : 77、1 : 78、1 : 79、1 : 80、1 : 81、1 : 82、1 : 83、1 : 84、1 : 85、1 : 86、1 : 87、1 : 88、1 : 89、1 : 90、1 : 91、1 : 92、1 : 93、1 : 94、1 : 95、1 : 96、1 : 97、1 : 98、1 : 99、或 1 : 100。抗原对稳定剂的比率可为,例如,约 1 : 110、1 : 120、1 : 130、1 : 140、1 : 150、1 : 160、1 : 170、1 : 180、1 : 190、1 : 200、1 : 210、1 : 220、1 : 230、1 : 240、1 : 250、1 : 260、1 : 270、1 : 280、1 : 290、1 : 300、1 : 310、1 : 320、1 : 330、1 : 340、1 : 350、1 : 360、1 : 370、1 : 380、1 : 390、1 : 400、1 : 410、1 : 420、1 : 430、1 : 440、1 : 450、1 : 460、1 : 470、1 : 480、1 : 490、1 : 500、1 : 510、1 : 520、1 : 530、1 : 540、1 : 550、1 : 560、1 : 570、1 : 580、1 : 590、1 : 600、1 : 610、1 : 620、1 : 630、1 : 640、1 : 650、1 : 660、1 : 670、1 : 680、1 : 690、1 : 700、1 : 710、1 : 720、1 : 730、1 : 740、1 : 750、1 : 760、1 : 770、1 : 780、1 : 790、1 : 800、1 : 810、1 : 820、1 : 830、1 : 840、1 : 850、1 : 860、1 : 870、1 : 880、1 : 890、1 : 900、1 : 910、1 : 920、1 : 930、1 : 940、1 : 950、1 : 960、1 : 970、1 : 980、1 : 990、或 1 : 1000。用于冷冻-干燥步骤中的疫苗液体制剂可包含一种或多种 pH 缓冲剂(图 2 和 3)。所述 pH 缓冲剂可为,例如,磷酸钾、磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠、乙酸钠、组氨酸、HEPES、ACES、ADA、ADA、二钠盐、ADA 单钠盐、AMPSO、2-氨基乙醇、2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇、2-氨基-2-甲基-1-丙醇、3-氨基-1-丙烷磺酸钠盐、BES、二羟乙基甘氨酸、Bis-Tris、Bis-Tris HCl、Bis-Tris 丙烷、CAPS、CAPSO、CHES、DIPSO、DIPSO 钠盐、甘氨酸 HCl 盐、甘氨酸、HEPPS、HEPPSO、MES、MOPS、MOPSO、PIPES、TAPS、TAPSO、TES、麦黄酮(tricine)、三乙醇胺、咪唑、柠檬酸钠、琥珀酸钠、碳酸氢铵、和/或碳酸盐。缓冲剂可为磷酸盐缓冲盐水。pH 可维持在约 pH 3-约 pH 8、约 pH 4-8、约 pH 5-8、约 pH 6-8、或约 pH 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、或 8.0。液体制剂可包含一种或多种抗原和一种或多种缓冲剂、基本上由一种或多种抗原和一种或多种缓冲剂

组成、或由一种或多种抗原和一种或多种缓冲剂组成。液体制剂可包含一种或多种抗原、一种或多种稳定剂、和一种或多种缓冲剂、基本上由一种或多种抗原、一种或多种稳定剂、和一种或多种缓冲剂组成、或由一种或多种抗原、一种或多种稳定剂、和一种或多种缓冲剂组成。

[0071] 用以通过本文所描述的方法产生粉末制剂的液体制剂可包含一种或多种其它药物、填充剂、和 / 或持续释放聚合物。用于本发明组合物的其它药物可包括,例如,渗透助剂、解充血药、支气管松弛剂、除痰剂、止痛剂等。填充剂可包括,例如,乳糖、甘露醇、和 / 或羟乙基淀粉 (HES)。组合物的持续释放半可渗透聚合物基质可包括,例如,聚交酯、L- 谷氨酸和 γ - 乙基-L- 谷氨酸的共聚物、聚(2- 羟乙基甲基丙烯酸酯、或脂质体。

[0072] 本文所描述的疫苗可不包括佐剂而制备。因此,最终疫苗可仅使用病原体 / 抗原、稳定剂、和缓冲剂制备,随后将其冻干。冷冻 - 干燥后,可将疫苗与载体混合而无需在制备最终疫苗产品之前加入佐剂。或者,制剂可包括佐剂,其为一种加入疫苗以提高疫苗的免疫应答的物质。佐剂可在冷冻干燥之前、或之后加入。佐剂的实例包括矿物盐,例如,氢氧化铝和磷酸铝或磷酸钙凝胶、油乳剂和表面活性剂基制剂,例如, MF59(微流化洗涤剂稳定的水包油乳剂)、QS21(纯化皂角苷)、AS02([SBAS2](水包油 +MPL+WS-21))、Montanide ISA-51 和 ISA-720(稳定的油包水乳剂);颗粒佐剂、(例如, virsomes(单层脂质体介质结合流感血凝素)、AS04([SBAS4] 含 MPL 的 A1 盐)、ISCOMS(皂角苷和脂质的结构复合物)、聚交酯共乙交酯 (PLG);微生物衍生物(天然和合成的),例如,单磷酰脂质 A(MPL)、Detox(MPL+M. Phlei 细胞壁骨架)、AGP[RC-529](合成酰化单糖)、DC_cho1(能够自组成为脂质体的类脂免疫刺激剂)、OM-174(脂质 A 衍生物)、CpG 基序(含免疫刺激剂 CpG 基序的合成寡核苷酸)、改性 LT 和 CT(基因改性的细菌毒素以提供无毒佐剂效果);内源性免疫调节剂,例如, hGM-CSF 或 hIL-12(可作为蛋白质或编码质体施用的细胞因子)、Immudaptin(C3d 串联阵列);惰性介质,例如金颗粒;和角鲨烯。所述液体制剂和最终干疫苗粉末制剂可不含有佐剂。

[0073] III. 冷冻干燥

[0074] 可通过冷冻干燥将液体制剂转化为粉末。冷冻干燥是将材料冷冻并随后通过升华除水而干燥的方法。快速冷冻可通过,例如,将喷雾液滴(喷雾 - 冷冻干燥)立即浸入液氮或冷气流中而实现。快速冷冻也可通过不包括喷雾 - 冷冻步骤的方法而实现。快速冷冻可通过将液体疫苗制剂与液氮(-196 摄氏度)接触而实现。快速冷冻可通过将液体疫苗制剂与混有其它化学物质的液氮,例如,己烷 / 液氮(-94 摄氏度)、甲醇 / 液氮(-98 摄氏度)、和戊烷 / 液氮(-131 摄氏度)接触而实现(Gordon AJ 和 Ford RA "The Chemist's Companion. Wiley. New York 1972)。快速冷冻可通过将液体疫苗制剂与干冰 / 有机溶剂(例如,乙醇、甲醇、乙二醇、四氯化碳、乙腈、异丙醇、或丙酮)浴,例如,四氯化碳 / 干冰(-23 摄氏度)、乙腈 / 干冰(-42 摄氏度)、或丙酮或异丙醇 / 干冰浴(-78 摄氏度)接触而实现。(Gordon, supra)。快速冷冻可通过将液体疫苗制剂浸入冰和无机盐(例如, NaCl 或 CaCl₂)的浆液中而实现,所述浆液可达到 -40 摄氏度。液体疫苗制剂可被冷冻的温度可为小于约 0 摄氏度、-5 摄氏度、-10 摄氏度、-15 摄氏度、-20 摄氏度、-25 摄氏度、-30 摄氏度、-35 摄氏度、-40 摄氏度、-45 摄氏度、-50 摄氏度、-55 摄氏度、-60 摄氏度、-65 摄氏度、-70 摄氏度、-75 摄氏度、-80 摄氏度、-85 摄氏度、-90 摄氏度、-95 摄氏度、-100 摄氏度、-105 摄氏度、-110 摄氏

度、-115 摄氏度、-120 摄氏度、-125 摄氏度、-130 摄氏度、-135 摄氏度、-140 摄氏度、-145 摄氏度、-150 摄氏度、-155 摄氏度、-160 摄氏度、-165 摄氏度、-170 摄氏度、-175 摄氏度、-180 摄氏度、-185 摄氏度、-90 摄氏度、-195 摄氏度、-200 摄氏度、-205 摄氏度、或 -210 摄氏度。液体疫苗制剂可被冷冻的温度可为约 0 摄氏度至 -210 摄氏度、-50 摄氏度至约 -210 摄氏度、-100 摄氏度至约 -210 摄氏度、或 -150 摄氏度至约 -200 摄氏度。液体疫苗制剂可被冷冻的温度可为约 0 摄氏度、-5 摄氏度、-10 摄氏度、-15 摄氏度、-20 摄氏度、-25 摄氏度、-30 摄氏度、-35 摄氏度、-40 摄氏度、-45 摄氏度、-50 摄氏度、-55 摄氏度、-60 摄氏度、-65 摄氏度、-70 摄氏度、-75 摄氏度、-80 摄氏度、-85 摄氏度、-90 摄氏度、-95 摄氏度、-100 摄氏度、-105 摄氏度、-110 摄氏度、-115 摄氏度、-120 摄氏度、-125 摄氏度、-130 摄氏度、-135 摄氏度、-140 摄氏度、-145 摄氏度、-150 摄氏度、-155 摄氏度、-160 摄氏度、-165 摄氏度、-170 摄氏度、-175 摄氏度、-180 摄氏度、-185 摄氏度、-190 摄氏度、-195 摄氏度、-200 摄氏度、-205 摄氏度、或 -210 摄氏度。所述冷冻方法可防止液体疫苗制剂中抗原的三维形状的损失。

[0075] 本文所公开的某些含抗原溶液可包含碳水化合物。例如含抗原溶液可包含糖，包括，但不限于海藻糖、甘露醇、蔗糖、乳糖或菊粉。这种糖用于多种目的，例如保护溶液的蛋白成分以免在冷冻时损失或降低抗原能力。例如，向溶液中加入海藻糖可防止含蛋白质的液体制剂（例如，液体疫苗液体制剂）中的蛋白质，例如流感红血球凝聚素（HA）的抗原性的损失。然而，海藻糖和其它糖的加入可导致疫苗制品中硬块的形成，除非利用喷雾冷冻。本文所公开的新方法允许在快速冷冻方法中使用这种糖而不需要喷雾冷冻，且并不导致硬块的形成。这与需要研磨硬块的现有方法相比是一种优势，因为那种处理可导致成分生物分子抗原性的损失。在含抗原溶液中组合本文所公开的缓冲剂和糖允许这种结果。本文所公开的含糖溶液的快速冷冻可导致粉末的生成。

[0076] 可将液体疫苗制剂暴露于冷液体，例如，液氮中约 30 秒 -5min、1min-60min、1min-50min、1-40min、1-30min、1-20min、1-10min、或 1-5min。可将液体疫苗制剂暴露于冷液体，例如，液氮中约 30 秒、1min、2min、3min、4min、5min、6min、7min、8min、9min、10min、11min、12min、13min、14min、15min、16min、17min、18min、19min、20min、25min、30min、35min、40min、45min、50min、55min、或 60min。可将液体疫苗制剂暴露于冷液体，例如，液氮中大于约 30 秒、1min、2min、3min、4min、5min、6min、7min、8min、9min、10min、11min、12min、13min、14min、15min、16min、17min、18min、19min、20min、25min、30min、35min、40min、45min、50min、55min、或 60min。可将液体疫苗制剂通过将所述液体疫苗制剂放入容器中并将容器浸入冷液体（例如，液氮）中而暴露于冷液体中。可将液体疫苗制剂通过直接将液体疫苗制剂引入冷液体（例如，液氮）而暴露于冷液体中。可将液体疫苗制剂通过将冷液体（例如，液氮）倒于液体疫苗制剂之上而暴露于冷液体中。

[0077] 干燥

[0078] 快速冷冻后，例如，于液氮中的快速冷冻后，冷冻的制剂可在冷冻 - 干燥器中冷冻干燥。冷冻干燥可发生于一个或多个步骤（例如，相同压力下的不同温度）。冷冻干燥可发生于，例如，约 -210 摄氏度、-205 摄氏度、-200 摄氏度、-195 摄氏度、-190 摄氏度、-185 摄氏度、-180 摄氏度、-175 摄氏度、-170 摄氏度、-165 摄氏度、-160 摄氏度、-155 摄氏度、-150 摄氏度、-145 摄氏度、-140 摄氏度、-135 摄氏度、-130 摄氏度、-125 摄氏度、-120

摄氏度、-115 摄氏度、-110 摄氏度、-105 摄氏度、-100 摄氏度、-95 摄氏度、-90 摄氏度、-85 摄氏度、-80 摄氏度、-75 摄氏度、-70 摄氏度、-65 摄氏度、-60 摄氏度、-55 摄氏度、-50 摄氏度、-45 摄氏度、-40 摄氏度、-35 摄氏度、-30 摄氏度、-25 摄氏度、-20 摄氏度、-15 摄氏度、-10 摄氏度、-5 摄氏度、0 摄氏度、5 摄氏度、10 摄氏度、15 摄氏度、20 摄氏度、25 摄氏度、或 30 摄氏度。冷冻干燥可发生于,例如,大于约 -210 摄氏度、-205 摄氏度、-200 摄氏度、-195 摄氏度、-190 摄氏度、-185 摄氏度、-180 摄氏度、-175 摄氏度、-170 摄氏度、-165 摄氏度、-160 摄氏度、-155 摄氏度、-150 摄氏度、-145 摄氏度、-140 摄氏度、-135 摄氏度、-130 摄氏度、-125 摄氏度、-120 摄氏度、-115 摄氏度、-110 摄氏度、-105 摄氏度、-100 摄氏度、-95 摄氏度、-90 摄氏度、-85 摄氏度、-80 摄氏度、-75 摄氏度、-70 摄氏度、-65 摄氏度、-60 摄氏度、-55 摄氏度、-50 摄氏度、-45 摄氏度、-40 摄氏度、-35 摄氏度、-30 摄氏度、-25 摄氏度、-20 摄氏度、-15 摄氏度、-10 摄氏度、-5 摄氏度、0 摄氏度、5 摄氏度、10 摄氏度、15 摄氏度、20 摄氏度、25 摄氏度、或 30 摄氏度。冷冻干燥可发生于,例如,约 -80 摄氏度至 30 摄氏度、约 -50 摄氏度至 25 摄氏度、或约 -40 摄氏度至 20 摄氏度。冷冻 - 干燥可发生于一种温度、两种不同的温度、三种不同的温度、四种不同的温度、五种不同的温度、六种不同的温度、七种不同的温度、八种不同的温度、九种不同的温度、或十种不同的温度。

[0079] 冷冻 - 干燥可发生于一种或多种不同的压力。压力可为,例如,约 10 毫托 -300 毫托、约 25 毫托 -300 毫托、约 50 毫托 -250 毫托、或约 50 毫托 -200 毫托。冷冻 - 干燥可发生于约 10 毫托、20 毫托、30 毫托、40 毫托、50 毫托、60 毫托、70 毫托、80 毫托、90 毫托、100 毫托、110 毫托、120 毫托、130 毫托、140 毫托、150 毫托、160 毫托、170 毫托、180 毫托、190 毫托、200 毫托、210 毫托、220 毫托、230 毫托、240 毫托、250 毫托、260 毫托、270 毫托、280 毫托、290 毫托、或 300 毫托。冷冻 - 干燥可发生于大于约 10 毫托、20 毫托、30 毫托、40 毫托、50 毫托、60 毫托、70 毫托、80 毫托、90 毫托、100 毫托、110 毫托、120 毫托、130 毫托、140 毫托、150 毫托、160 毫托、170 毫托、180 毫托、190 毫托、200 毫托、210 毫托、220 毫托、230 毫托、240 毫托、250 毫托、260 毫托、270 毫托、280 毫托、290 毫托、或 300 毫托。

[0080] 每个冷冻 - 干燥步骤的持续时间可为约 1 小时 -48 小时、约 1 小时 -36 小时、约 1 小时 -24 小时、约 4 小时 -24 小时、约 6 小时 -24 小时、或约 8 小时 -24 小时。每个冷冻 - 干燥步骤的持续时间可为约 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时、18 小时、19 小时、20 小时、21 小时、22 小时、23 小时、24 小时、25 小时、26 小时、27 小时、28 小时、29 小时、30 小时、31 小时、32 小时、33 小时、34 小时、35 小时、36 小时、37 小时、38 小时、39 小时、40 小时、41 小时、42 小时、43 小时、44 小时、45 小时、46 小时、47 小时、或 48 小时。每个冷冻 - 干燥步骤的持续时间可为大于约 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时、17 小时、18 小时、19 小时、20 小时、21 小时、22 小时、23 小时、24 小时、25 小时、26 小时、27 小时、28 小时、29 小时、30 小时、31 小时、32 小时、33 小时、34 小时、35 小时、36 小时、37 小时、38 小时、39 小时、40 小时、41 小时、42 小时、43 小时、44 小时、45 小时、46 小时、47 小时、或 48 小时。

[0081] 一种或多种干燥步骤可用于本文所公开的方法。冷冻样品的初级干燥可通过任意相关方法进行,例如,通过冻干法进行。二级干燥可通过,例如,在真空室中于较高温度下的持续冷冻干燥、接触暴露于温度控制的表面、或通过颗粒悬浮于温度 / 湿度控制气体的

旋涡或流化床中来进行。干燥粉末颗粒产物例如可从工艺容器回收、或通过从工艺气流筛分和沉淀颗粒回收。

[0082] 其它干燥方法包括,例如,空气干燥、氮气吹扫干燥(包括研磨和筛分)、冷冻-干燥(包括研磨和筛分)、和超临界流体干燥(SCF)。所述干燥方法可保持抗原的三维结构。例如,所述方法可保持流感 HA 抗原的结构,提供高 HA 效力。

[0083] 冷冻干燥后,可于约 4-25 摄氏度的温度下储存(保存)所述粉末。保存条件的相对湿度可为约 0% -70%、约 0% -60%、约 0% -50%、约 0% -40%、约 0% -30%、约 0% -20%、约 0% -10%、或约 0% -5%。保存的相对湿度可为小于约 80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、24%、23%、22%、21%、60%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、或 1%。

[0084] 冷冻干燥后粉末的含水量可为约 12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、或 0.1%。冷冻干燥后粉末的含水量可为小于 12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、或 0.01%。

[0085] 冷冻干燥后生成的粉末的平均粒径可为约 5-100 微米、约 5-60 微米、或约 5-30 微米。冷冻干燥后生成的粉末的平均粒径可为小于约 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、或 95 微米。

[0086] IV. 载体

[0087] 通过本文所描述的冷冻干燥方法制备的粉末可与一种或多种额外的成分混合以产生干疫苗粉末制剂。这种成分包括药学上可接受的载体,例如,适于黏膜施用的载体。适于黏膜施用的载体可为生理学可接受的物质例如微晶纤维素。微晶纤维素可为具有较大比表面积 of 特定微晶纤维素。虽然可利用任意的微晶纤维素,在某些实施方案中,用于制备本申请疫苗的微晶纤维素可为 Ceolus(注册商标)PH-F20JP 或 Avicel(注册商标)PH-105。

[0088] 定义载体的粉末化颗粒、或完整疫苗的一种方式为基于平均粒径。微晶纤维素和/或疫苗颗粒的平均粒径可通过本领域已知的任意方式测量,例如,筛滤、筛分或激光衍射。载体(例如,微晶纤维素)和/或疫苗的平均粒径可为,例如,约 10 微米、11 微米、12 微米、13 微米、14 微米、15 微米、16 微米、17 微米、18 微米、19 微米、20 微米、21 微米、22 微米、23 微米、24 微米、25 微米、26 微米、27 微米、28 微米、29 微米、30 微米、31 微米、32 微米、33 微米、34 微米、35 微米、36 微米、37 微米、38 微米、39 微米、40 微米、41 微米、42 微米、43 微米、44 微米、45 微米、46 微米、47 微米、48 微米、49 微米、50 微米、51 微米、52 微米、53 微米、54 微米、55 微米、56 微米、57 微米、58 微米、59 微米、60 微米、61 微米、62 微米、63 微米、64 微米、65 微米、66 微米、67 微米、68 微米、69 微米、70 微米、71 微米、72 微米、73 微米、74 微米、75 微米、76 微米、77 微米、78 微米、79 微米、80 微米、81 微米、82 微米、83 微米、84 微米、85 微米、86 微米、87 微米、88 微米、89 微米、90 微米、91 微米、92 微米、93 微米、94 微米、95 微米、96 微米、97 微米、98 微米、99 微米、100 微米、110 微米、120 微米、130 微米、140 微米、150 微米、160 微米、170 微米、180 微米、190 微米、或 200 微米。在某些实施方案中,用作本文所描述的疫苗组合物的载体的微晶纤维素可具有例如通过激光衍射、筛分或筛滤测量的 25 微米、39 微米、或 57 微米的平均粒径。

[0089] 载体(例如,微晶纤维素)和/或疫苗粉末可制备成为有用的粒径分布。载体和

/或疫苗的制品可具有例如 10-200 微米、20-200 微米、30-200 微米、40-200 微米、50-200 微米、60-200 微米、70-200 微米、80-200 微米、90-200 微米、100-200 微米、110-200 微米、120-200 微米、130-200 微米、140-200 微米、150-200 微米、160-200 微米、170-200 微米、180-200 微米、190-200 微米的粒径分布,或粒径分布的任意所包括的子范围。本文所描述的粉末可具有粒径额外的粒径分布,例如 10-100 微米、20-100 微米、30-100 微米、40-100 微米、50-100 微米、60-100 微米、70-100 微米、80-100 微米、90-100 微米、10-50 微米、10-60 微米、20-60 微米、30-70 微米、40-80 微米、50-90 微米、60-100 微米、70-110 微米、80-120 微米、90-130 微米、100-140 微米、110-150 微米、120-160 微米、130-170 微米、140-180 微米、150-190 微米、160-200 微米、或粒径的任意所包括的子范围。载体和 / 或疫苗可具有例如, 10-50 微米、11-50 微米、12-50 微米、13-50 微米、14-50 微米、15-50 微米、16-50 微米、17-50 微米、18-50 微米、19-50 微米、20-50 微米、21-50 微米、22-50 微米、23-50 微米、24-50 微米、25-50 微米、26-50 微米、27-50 微米、28-50 微米、29-50 微米、30-50 微米的粒径分布,或粒径的任意所包括的子范围。在一个具体实施方案中,载体和 / 或疫苗可具有 19-60 微米的粒径分布、或 19-50 微米的粒径分布。

[0090] 对于一个特定的物理方面,用于制备本文所描述的疫苗的微晶纤维素粉末、或其它载体化合物可为指定或非指定的。例如微晶纤维素粉末可指定为具有较大的颗粒,其可保护肺脏。微晶纤维素粉末可指定为具有较小的颗粒,其可增强免疫应答。粉末的物理特征可通过筛分或其它最小化所存在的颗粒(例如其小于约 10 微米、小于约 20 微米、小于约 30 微米、小于约 40 微米、小于约 50 微米、小于约 60 微米、小于约 70 微米、小于约 80 微米、小于约 90 微米、小于约 100 微米)和 / 或最小化颗粒(其大于约 20 微米、大于约 30 微米、大于约 40 微米、大于约 50 微米、大于约 60 微米、大于约 70 微米、大于约 80 微米、大于约 90 微米、大于约 100 微米、大于约 110 微米、大于约 120 微米、大于约 130 微米、大于约 140 微米、大于约 150 微米、大于约 160 微米、大于约 170 微米、大于约 180 微米、大于约 190 微米、或大于约 200 微米)的方法来指定。

[0091] 可变化以实现本文所描述的所需结果(例如,增强免疫原性)的粉末组合物的额外参数为粉末的比表面积。例如,可制备粉末组合物以使载体(例如,微晶纤维素)和 / 或疫苗的比表面积为 1.0m²/g、1.1m²/g、1.2m²/g、1.3m²/g、1.4m²/g、1.5m²/g、1.6m²/g、1.7m²/g、1.8m²/g、1.9m²/g、2.0m²/g、2.1m²/g、2.2m²/g、2.3m²/g、2.4m²/g、2.5m²/g、2.6m²/g、2.7m²/g、2.8m²/g、2.9m²/g、3.0m²/g、3.1m²/g、3.2m²/g、3.3m²/g、3.4m²/g、3.5m²/g、3.6m²/g、3.7m²/g、3.8m²/g、3.9m²/g、4.0m²/g、4.1m²/g、4.2m²/g、4.3m²/g、4.4m²/g、4.5m²/g、4.6m²/g、4.7m²/g、4.8m²/g、4.9m²/g、5.0m²/g、5.1m²/g、5.2m²/g、5.3m²/g、5.4m²/g、5.5m²/g、5.6m²/g、5.7m²/g、5.8m²/g、5.9m²/g、6.0m²/g、6.1m²/g、6.2m²/g、6.3m²/g、6.4m²/g、6.5m²/g、6.6m²/g、6.7m²/g、6.8m²/g、6.9m²/g、7.0m²/g、7.1m²/g、7.2m²/g、7.3m²/g、7.4m²/g、7.5m²/g、7.6m²/g、7.7m²/g、7.8m²/g、7.9m²/g、8.0m²/g、8.1m²/g、8.2m²/g、8.3m²/g、8.4m²/g、8.5m²/g、8.6m²/g、8.7m²/g、8.8m²/g、8.9m²/g、9.0m²/g、9.1m²/g、9.2m²/g、9.3m²/g、9.4m²/g、9.5m²/g、9.6m²/g、9.7m²/g、9.8m²/g、9.9m²/g、10.0m²/g、10.1m²/g、10.2m²/g、10.3m²/g、10.4m²/g、10.5m²/g、10.6m²/g、10.7m²/g、10.8m²/g、10.9m²/g、11.0m²/g、11.1m²/g、11.2m²/g、11.3m²/g、11.4m²/g、11.5m²/g、11.6m²/g、11.7m²/g、11.8m²/g、11.9m²/g、12.0m²/g、12.1m²/g、12.2m²/g、12.3m²/g、12.4m²/g、12.5m²/g、12.6m²/g、12.7m²/g、12.8m²/g、12.9m²/g、13.0m²/g、13.1m²/g、13.2m²/g、13.3m²/g、

13.4m²/g、13.5m²/g、13.6m²/g、13.7m²/g、13.8m²/g、13.9m²/g、14.0m²/g、14.1m²/g、14.2m²/g、14.3m²/g、14.4m²/g、14.5m²/g、14.6m²/g、14.7m²/g、14.8m²/g、14.9m²/g、15.0m²/g、15.1m²/g、15.2m²/g、15.3m²/g、15.4m²/g、15.5m²/g、15.6m²/g、15.7m²/g、15.8m²/g、15.9m²/g、16.0m²/g、16.1m²/g、16.2m²/g、16.3m²/g、16.4m²/g、16.5m²/g、16.6m²/g、16.7m²/g、16.8m²/g、16.9m²/g、17.0m²/g、17.1m²/g、17.2m²/g、17.3m²/g、17.4m²/g、17.5m²/g、17.6m²/g、17.7m²/g、17.8m²/g、17.9m²/g、18.0m²/g、18.1m²/g、18.2m²/g、18.3m²/g、18.4m²/g、18.5m²/g、18.6m²/g、18.7m²/g、18.8m²/g、18.9m²/g、19.0m²/g、19.1m²/g、19.2m²/g、19.3m²/g、19.4m²/g、19.5m²/g、19.6m²/g、19.7m²/g、19.8m²/g、19.9m²/g、或 20.0m²/g。粉末的比表面可为,例如,约 21m²/g、22m²/g、23m²/g、24m²/g、25m²/g、26m²/g、27m²/g、28m²/g、29m²/g、30m²/g、31m²/g、32m²/g、33m²/g、34m²/g、35m²/g、36m²/g、37m²/g、38m²/g、39m²/g、40m²/g、41m²/g、42m²/g、43m²/g、44m²/g、45m²/g、46m²/g、47m²/g、48m²/g、49m²/g、或 50m²/g。在具体实施方案中,载体(例如,微晶纤维素)和/或疫苗粉末的比表面积可为等于或小于 1.3m²/g、等于或大于 1.3m²/g 或可为约 2.3m²/g。

[0092] 可描述粉末化组合物(载体和/或疫苗)的另一个其它参数为体积密度。在某些实施方案中,所用粉末可具有体积密度范围。本发明的粉末可具有例如,0.10-1.00g/cm³、0.10-0.90g/cm³、0.10-0.80g/cm³、0.10-0.70g/cm³、0.10-0.60g/cm³、0.10-0.50g/cm³、0.10-0.40g/cm³、0.10-0.30g/cm³、0.20-1.00g/cm³、0.20-0.90g/cm³、0.20-0.80g/cm³、0.20-0.70g/cm³、0.20-0.60g/cm³、0.20-0.50g/cm³、0.20-0.40g/cm³、0.20-0.30g/cm³、0.30-1.00g/cm³、0.30-0.90g/cm³、0.30-0.80g/cm³、0.30-0.70g/cm³、0.30-0.60g/cm³、0.30-0.50g/cm³、0.30-0.40g/cm³、0.40-1.00g/cm³、0.40-0.90g/cm³、0.40-0.80g/cm³、0.40-0.70g/cm³、0.40-0.60g/cm³、0.40-0.50g/cm³、0.50-1.00g/cm³、0.50-0.90g/cm³、0.50-0.80g/cm³、0.50-0.70g/cm³、0.50-0.60g/cm³、0.60-1.00g/cm³、0.60-0.90g/cm³、0.60-0.80g/cm³、0.60-0.70g/cm³、0.70-1.00g/cm³、0.70-0.90g/cm³、0.70-0.80g/cm³、0.80-1.00g/cm³、0.80-0.90g/cm³、0.9-1.0g/cm³的体积密度,或任意所包括的子范围。在具体实施方案中,可使用体积密度为 0.13-2.9g/cm³或 0.26-0.48g/cm³的载体(例如,微晶纤维素)和/或疫苗粉末。在其它实施方案中,粉末可具有例如 0.10g/cm³、0.11g/cm³、0.12g/cm³、0.13g/cm³、0.14g/cm³、0.15g/cm³、0.16g/cm³、0.17g/cm³、0.18g/cm³、0.19g/cm³、0.20g/cm³、0.21g/cm³、0.22g/cm³、0.23g/cm³、0.24g/cm³、0.25g/cm³、0.26g/cm³、0.27g/cm³、0.28g/cm³、0.29g/cm³、0.30g/cm³、0.31g/cm³、0.32g/cm³、0.33g/cm³、0.34g/cm³、0.35g/cm³、0.36g/cm³、0.37g/cm³、0.38g/cm³、0.39g/cm³、0.40g/cm³、0.41g/cm³、0.42g/cm³、0.43g/cm³、0.44g/cm³、0.45g/cm³、0.46g/cm³、0.47g/cm³、0.48g/cm³、0.49g/cm³、0.50g/cm³、0.51g/cm³、0.52g/cm³、0.53g/cm³、0.54g/cm³、0.55g/cm³、0.56g/cm³、0.57g/cm³、0.58g/cm³、0.59g/cm³、0.60g/cm³、0.61g/cm³、0.62g/cm³、0.63g/cm³、0.64g/cm³、0.65g/cm³、0.66g/cm³、0.67g/cm³、0.68g/cm³、0.69g/cm³、0.70g/cm³、0.71g/cm³、0.72g/cm³、0.73g/cm³、0.74g/cm³、0.75g/cm³、0.76g/cm³、0.77g/cm³、0.78g/cm³、0.79g/cm³、0.80g/cm³、0.81g/cm³、0.82g/cm³、0.83g/cm³、0.84g/cm³、0.85g/cm³、0.86g/cm³、0.87g/cm³、0.88g/cm³、0.89g/cm³、0.90g/cm³、0.91g/cm³、0.92g/cm³、0.93g/cm³、0.94g/cm³、0.95g/cm³、0.96g/cm³、0.97g/cm³、0.98g/cm³、0.99g/cm³、或 1.00g/cm³的特定的体积密度。在某些实施方案中,载体(例如,微晶纤维素)和/或疫苗粉末的体积密度可为 0.23g/cm³或 0.41g/cm³。

[0093] 载体,例如微晶纤维素可占干疫苗粉末制剂质量的约 25% - 约 98%。在某些实

施方案中,载体可占干疫苗粉末制剂的不大于约 98%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、或 25%。

[0094] 用于本发明疫苗的其它载体可为磷酸三钙 (TCP)。TCP 可占干疫苗粉末制剂的约 0.5% - 约 5%。TCP 可占干疫苗粉末制剂的不大于约 0.5%、0.8%、0.9%、1%、1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2%、2.2%、2.4%、2.6%、2.8%、3%、4%、或 5%。

[0095] 可通过混合,例如,通过涡流加入载体。混合例如涡流的持续时间可为约 30 秒 -120 分钟、约 30 秒 -2 分钟、约 30 秒 -7.5 分钟、约 20 秒 -15 分钟、约 30 秒 -30 分钟、约 30 秒 -45 分钟、约 30 秒 -60 分钟、约 30 秒 -75 分钟、约 30 秒 -90 分钟、约 30 秒 -120 分钟。混合例如涡流的持续时间可为大于约 30 秒、1 分钟、2 分钟、4 分钟、8 分钟、10 分钟、15 分钟、20 分钟、30 分钟、45 分钟、60 分钟、90 分钟、或 120 分钟。混合例如涡流的持续时间可为约 30 秒、1 分钟、5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、60 分钟、75 分钟、90 分钟、或 120 分钟。

[0096] 混合之后,包含冷冻干燥的含抗原粉末和载体的干疫苗制剂的粒径可为任意适于向目标解剖位点递送干粉末疫苗的尺寸。另外,可针对不同递送装置调整粒径。因此,通过本文方法生成的含冷冻干燥抗原(例如,流感)和载体(例如,微晶纤维素)的干粉末疫苗制剂的平均粒径可为小于约 10 微米、11 微米、12 微米、13 微米、14 微米、15 微米、16 微米、17 微米、18 微米、19 微米、20 微米、21 微米、22 微米、23 微米、24 微米、25 微米、26 微米、27 微米、28 微米、29 微米、30 微米、31 微米、32 微米、33 微米、34 微米、35 微米、36 微米、37 微米、38 微米、39 微米、40 微米、41 微米、42 微米、43 微米、44 微米、45 微米、46 微米、47 微米、48 微米、49 微米、50 微米、51 微米、52 微米、53 微米、54 微米、55 微米、56 微米、57 微米、58 微米、59 微米、60 微米、61 微米、62 微米、63 微米、64 微米、65 微米、66 微米、67 微米、68 微米、69 微米、70 微米、71 微米、72 微米、73 微米、74 微米、75 微米、76 微米、77 微米、78 微米、79 微米、80 微米、81 微米、82 微米、83 微米、84 微米、85 微米、86 微米、87 微米、88 微米、89 微米、90 微米、91 微米、92 微米、93 微米、94 微米、95 微米、96 微米、97 微米、98 微米、99 微米、100 微米、110 微米、120 微米、130 微米、140 微米、150 微米、160 微米、170 微米、180 微米、190 微米、或 200 微米。

[0097] 包含冷冻干燥的含抗原粉末和载体的干疫苗制剂可具有例如 10-200 微米、20-200 微米、30-200 微米、40-200 微米、50-200 微米、60-200 微米、70-200 微米、80-200 微米、90-200 微米、100-200 微米、110-200 微米、120-200 微米、130-200 微米、140-200 微米、150-200 微米、160-200 微米、170-200 微米、180-200 微米、190-200 微米的粒径范围,或粒径的任意所包括的子范围。包含冷冻干燥的含抗原粉末和载体的干疫苗制剂可具有例如 10-100 微米、20-100 微米、30-100 微米、40-100 微米、50-100 微米、60-100 微米、70-100 微米、80-100 微米、90-100 微米、10-50 微米、20-60 微米、30-70 微米、40-80 微米、50-90 微米、60-100 微米、70-110 微米、80-120 微米、90-130 微米、100-140 微米、110-150 微米、120-160 微米、130-170 微米、140-180 微米、150-190 微米、160-200 微米的粒径范围,或粒径的任意所包括的子范围。

[0098] 包含冷冻干燥的含抗原粉末和载体的干疫苗制剂可通过筛分或其它最小化颗粒(例如其小于约 10 微米、小于约 20 微米、小于约 30 微米、小于约 40 微米、小于约 50 微米、小于约 60 微米、小于约 70 微米、小于约 80 微米、小于约 90 微米、小于约 100 微米)和 / 或

最小化颗粒（其大于约 20 微米、大于约 30 微米、大于约 40 微米、大于约 50 微米、大于约 60 微米、大于约 70 微米、大于约 80 微米、大于约 90 微米、大于约 100 微米、大于约 110 微米、大于约 120 微米、大于约 130 微米、大于约 140 微米、大于约 150 微米、大于约 160 微米、大于约 170 微米、大于约 180 微米、大于约 190 微米、或大于约 200 微米）的方法来指定。

[0099] V. 稳定性和吸湿性

[0100] 如本文所述制备的干疫苗粉末制剂可于室温（25 摄氏度和 60% 相对湿度）下稳定至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、或 36 个月。干疫苗粉末制剂的稳定性也可在加速条件（45 摄氏度和 75% 相对湿度）下稳定延长的时间期限。在加速条件下，干疫苗粉末制剂可稳定至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、或 36 个月。如本文所述制备的干疫苗粉末制剂可在其它温度（例如，-20 摄氏度至 55 摄氏度）和相对湿度（0% -100%）下稳定。

[0101] 如本文所使用，稳定性可指干疫苗粉末于储存条件下的几个方面。一个这种方面为疫苗效力，即，疫苗抗原成分的抗原性的保持力。例如包含 HA 的干流感疫苗粉末制剂的该稳定性方面可通过测量 HA 抗原性来测定。如果其在特定条件下特定时间（例如，加速条件下 18 个月）之后保持大于 50% 的抗原性（与初始效力相比），则认为疫苗粉末是稳定的。

[0102] 或者，稳定性可指在储存条件下干粉末抵抗环境水吸收的能力。这种水吸收可导致结块增加，其从而可导致不良性质例如降低的流动性和降低的生物有效性。

[0103] 本文所描述的干疫苗粉末制剂可具有低吸湿性。干疫苗粉末制剂的吸湿性可通过随时间称重干疫苗粉末制剂来测量。重量增加表明获得水。当将本发明干疫苗粉末储存于气密的容器、非气密的容器或开放体系中时，可通过粉末所吸收的水量来测定吸湿性。

[0104] VI. 施用途径和方式

[0105] 在某些实施方案中，可构造装置以将相当大一部分的单剂量的干疫苗粉末治疗制剂递送至受试者的鼻孔。在某些情况下，可构造装置以将相当大一部分存在于所述装置中的干疫苗粉末治疗制剂的量递送至受试者的鼻孔。在某些情况下，可在装置的单次插入之后递送干疫苗粉末治疗制剂或其相当大的一部分。在某些情况下，可在装置的多次插入，例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 次插入之后递送粉末化的治疗制剂或其相当大的一部分。在某些情况下，装置的多次插入可构成装置的单次使用。依照本文所描述的方法、装置、和组合物，通过所述装置递送的相当大一部分的干疫苗粉末治疗制剂包括干粉末化的药物治疗量例如单剂量的药物治疗量或存在于装置中的量的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.5%、99.9%、99.95%、或 100%。

[0106] 适于与通过本发明的方法制备的干疫苗粉末制剂一起使用的鼻施药器在未决美国申请序列号 61/260,367 中描述，其通过引用以其整体并入本文。

[0107] VII. 干粉末制剂对免疫性的作用

[0108] 本发明的方法和组合物可用于刺激局部免疫应答。局部免疫应答可在外周淋巴组织中。例如，疫苗干粉末制剂可鼻内施用以刺激黏膜相关淋巴组织（MALT），其可在黏膜免疫中发挥作用。黏膜的实例包括颊黏膜、食道黏膜、胃黏膜、肠黏膜、鼻黏膜、嗅黏膜、口腔黏膜、支气管黏膜、子宫黏膜、子宫内膜（子宫的黏膜）、和阴茎黏膜。具体地，鼻咽相关淋巴组

织 (NALT) 可被靶向。NALT 可在辅助性 T 细胞 1 和辅助性 T 细胞 2、以及 IgA- 定型 B 细胞 (IgA-committed B cells) 的产生中发挥作用。鼻内免疫可在黏膜和全身免疫部分导致抗原 - 特异保护性免疫的诱导。

[0109] 本发明方法和组合物可用于刺激黏膜免疫系统的主要抗体——分泌型 IgA (sIgA) 的产生 (图 6、7、9、11、12 和 20)。sIgA 为由两个或四个单体、J- 链多肽、和称为分泌型成分的多肽链组成的二聚体或四聚体。J- 链多肽可促进血清和分泌型 IgA 的聚合。分泌型成分为通过黏膜上皮细胞产生的 70kDa 多肽并可通过使其更加不易被黏液分泌物中的分解蛋白酶影响来保护 sIgA。sIgA 可通过源于在设计用于抗原取样的成有机体的、黏膜淋巴器官中初始刺激的前体的黏膜血浆细胞局部产生。初始引发之后, 所述前体细胞可经由区域淋巴结、淋巴、和血液传递而广泛地散布于黏膜位点间, 从而导致在除施用位点 (例如, 经鼻施用) 外的黏膜位点的保护。自局部血浆细胞分泌之后, sIgA 可结合至上皮细胞表面受体, 并且该复合物可通过上皮细胞进入分泌物, 其可在这里作为炎症性免疫屏障以抑制抗原的吸收。

[0110] 除刺激黏膜 (即, sIgA) 应答之外, 本文所公开的干粉末制剂也可刺激 IgG 应答 (图 6、7、9、11、12、14、17 和 19)。这种刺激可导致额外的保护层, 例如通过激发体液应答以与躲避或逃避由本文公开疫苗所引起的 sIgA 所提供的保护的病原体起反应。因此, 在一种实施方案中, 本文所公开的疫苗可诱导黏膜和体液的抗体应答。

[0111] 实施例

[0112] 实施例 1: 全灭活 H1N1 干疫苗粉末制剂的制备和测试

[0113] 在该实施例中, 制备并测试季节性流感疫苗 (H1N1) 的各种干粉末制剂。还测试本发明的优选实施方案, 对比季节性流感疫苗的常规液体鼻和注射制剂。

[0114] 实施例 1A: 使用非快速冷冻技术制备流感疫苗 (H1N1) 粉末

[0115] 在该实验中, 多种抗原稳定剂用于常规冷冻 - 干燥方法以产生疫苗粉末, 然后检查所述粉末的一致性和稳定性。在 10mL 瓶中, 将 0.4mL 的 1.6mg/mL 全灭活流感溶液 (H1N1, 品系 A/Brisbane/59/2007, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute) 与 0.4mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS 或磷酸盐缓冲剂) (pH 7.4) 中的稳定剂 (13.6mg) 结合以得到抗原对稳定剂的最终比例为 1 : 21。在 -40 摄氏度下经过 5 小时缓慢冷冻所述混合物。然后以四个步骤冷冻干燥所述冷冻的组合物: -40 摄氏度、小于 140 毫托下 24 小时; -30 摄氏度、小于 130 毫托下 24 小时; -10 摄氏度、小于 100 毫托下 4 小时; 和 20 摄氏度、小于 50 毫托下 4 小时。所得冻干粉末含有 29 微克 (micro g) 的流感疫苗蛋白每 1mg 流感疫苗粉末。将流感疫苗粉末与比表面积大于 1.3 平方米每克的鼻载体 (例如, 微晶纤维素) 和磷酸三钙 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 结合 (混合)。在 10mL 玻璃瓶中将流感疫苗粉末 (49.3mg, 包括 1.44mg 流感疫苗蛋白) 与 309.1mg 的 Ceolus (注册商标) PH-F20JP 微晶纤维素 (平均粒径: 57 微米; 体积密度: $0.23\text{g}/\text{cm}^3$; 比表面积: $2.3\text{m}^2/\text{g}$)、40.0mg 的 Ceolus (注册商标) PH-301 微晶纤维素 (平均粒径: 39 微米; 体积密度: $0.41\text{g}/\text{cm}^3$)、和 1.6mg 的 TCP 结合, 并使用旋涡搅拌器混合所述成分一分钟。所得干流感疫苗粉末制剂每 25mg 干流感疫苗粉末制剂含有 90 微克流感疫苗蛋白。在一种情况下, 使用海藻糖作为稳定剂以产生部分结块并具有稳定的 HA 效力的流感疫苗粉末。在另一种情况下, 使用甘露醇作为稳定剂以产生包含精细颗粒并具有不稳定的 HA 效力的流感疫苗粉末。仍然在另一种情况下, 使用乳糖作为稳定剂以产生部

分结块并具有稳定的 HA 效力的流感疫苗粉末 (图 1)。在该实施例中,定义稳定为冷冻干燥后保持大于 50% 的 HA 效力;不稳定是冷冻干燥后等于、或小于 50% 的 HA 效力;结果总结于表 1。由于所述制剂缺乏完全的 HA 效力和良好的流动性,这种方法需要改进以制备有效并可完全递送的鼻内疫苗。

[0116] [表 1]

[0117] 通过非快速冷冻技术产生的流感 (H1N1) 疫苗粉末

[0118]

抗原稳定剂	抗原总蛋白/稳定剂的比例 (重量)	粉末性质	HA 效力 稳定, >50%; 不稳定, ≦ 50%
海藻糖	1:21	块状	稳定
甘露醇	1:21	精细	不稳定
乳糖	1:21	块状	稳定

[0119] 实施例 1B :使用快速冷冻方法制备鼻流感 (H1N1) 疫苗粉末

[0120] 在该实验中,多种抗原稳定剂用于快速冷冻和干燥方法以产生疫苗粉末,然后检查所述粉末的一致性和稳定性。一般制备方法概述于图 2 和 3;以下提供与 H1N1 鼻疫苗制剂的产生相关的具体细节。在 10mL 瓶中,将 0.4mL 的 1.6mg/mL 全灭活流感溶液 (H1N1, 品系 A/Brisbane/59/2007) 与 0.4mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS 或磷酸盐缓冲剂) (pH 7.4) 中的稳定剂 (13.6mg) 结合以得到抗原对稳定剂的最终比例为 1 : 21。将所述混合物在液氮中快速冷冻 10 分钟并通过 4 步骤冷冻-干燥过程生成流感粉末: -40 摄氏度、小于 140 毫托下 24 小时; -30 摄氏度、小于 130 毫托下 24 小时; -10 摄氏度、小于 100 毫托下 4 小时; 和 20 摄氏度、小于 50 毫托下 4 小时。每 1mg 流感疫苗粉末含有 29 微克流感疫苗蛋白的粉末由精细颗粒组成并于室温下稳定,定义稳定为保持大于 50% 的 HA 效力 (表 2)。将所述流感疫苗粉末与比表面积大于 1.3 平方米每克的鼻载体 (例如,微晶纤维素) 和磷酸三钙 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 结合 (混合)。在 10mL 玻璃瓶中将流感疫苗粉末 (49.3mg, 包含 1.44mg 流感疫苗蛋白和 30.60mg 海藻糖) 与 309.1mg 的 Ceolus (注册商标) PH-F20JP 微晶纤维素 (平均粒径: 57 微米; 体积密度: $0.23\text{g}/\text{cm}^3$; 比表面积: $2.3\text{m}^2/\text{g}$)、40.0mg 的 Ceolus (注册商标) PH-301 微晶纤维素 (平均粒径: 39 微米; 体积密度: $0.41\text{g}/\text{cm}^3$)、和 1.6mg 的 TCP 结合,并使用旋涡搅拌器混合所述成分一分钟。所得干流感疫苗粉末制剂每 25mg 干流感疫苗粉末制剂含有 90 微克流感疫苗蛋白。在一种情况下,使用海藻糖作为抗原稳定剂,得到具有稳定的 HA 效力和精细粒径的制剂。在另一种情况下,使用乳糖作为抗原稳定剂,其也制备了由精细粒径组成的稳定制剂。未测试甘露醇作为 H1N1 疫苗粉末的抗原稳定剂。

[0121] [表 2]

[0122] 通过快速冷冻技术产生的流感 (H1N1) 疫苗粉末

[0123]

抗原稳定剂	抗原总蛋白/稳定剂的比例 (重量)	粉末性质	HA 效力 稳定, >50%; 不稳定, ≤ 50%
海藻糖	1:21	精细	稳定
甘露醇	未测试	未测试	未测试
乳糖	1:21	精细	稳定

[0124] 实施例 1C: 鼻流感疫苗粉末制剂的研究设计和结果

[0125] 在该实验中, 测试干粉末 H1N1 疫苗引起免疫应答的能力并将其与常规鼻和注射液体制剂相比较。如上所述, 使用快速冷冻方法制备疫苗并将其与微晶纤维素载体混合。在每个条件下, 将 0.09mg 流感疫苗蛋白 (H1N1, 品系 A/Brisbane/59/2007, 全灭活流感疫苗) 施用至 4 组食蟹猴。食蟹猴具有与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答。向组 1 施用 25mg 鼻流感 (H1N1) 疫苗粉末制剂, 所述粉末通过如上所述的快速冷冻方法制备, 含 0.09mg 流感疫苗蛋白、1.91mg 海藻糖、19.28mg Ceolus (注册商标) PH-F20JP、2.50mg Ceolus (注册商标) PH-301、和 0.10mg TCP; 向组 2 施用 0.1ml 鼻流感疫苗溶液, 其含 0.09mg 流感疫苗蛋白; 向组 3 施用 0.1ml 鼻流感疫苗溶液, 其含 0.09mg 流感疫苗蛋白、0.5 毫升吐温 80 和 0.02mg 佐剂 α -半乳糖神经酰胺; 和向组 4 施用 0.5mL SC 流感疫苗溶液, 其含 0.09mg 流感疫苗蛋白质。施用疫苗并如图 4 所述收集样品。通过血凝抑制 (HI) 和酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定抗体水平。

[0126] 如下测定血清和鼻洗样品中的血凝抑制 (HI) 抗体滴定度。用受体破坏酶 (RDE, Denka Seiken Co Ltd., 东京, 日本) 于 37 摄氏度下处理样品 15-18 小时并随后于 56 摄氏度下热灭活 1 小时。制备两倍连续稀释样品系列, 以 4 个血凝抑制单位每孔的浓度将其与 H1N1 (品系 A/Brisbane/59/2007) HA 抗原 (Denka Seiken) 混合、并室温培养 1 小时。向每孔中加入 50 微升 (micro L) 0.5% 鸡红细胞悬液并在 1 小时后评价血凝。抑制血凝的样品最高稀释度为样品的 HI 名称。

[0127] 该研究中收集的样品 HI 测试结果显示于图 5A 和 B, 其含有通过暴露于不同的全灭活 H1N1 病毒 (品系 A/Brisbane/59/2007) 疫苗制剂的猴产生的 HI 滴定度表。血清样品测量的 HI 滴定度见 5A; 鼻洗样品测量的 HI 滴定度见 5B。SC 注射疫苗 (组 4) 产生血清样品中的最高 HI 滴定度; 然而, 鼻洗样品中未检测到 HI 滴定度的增加。对于鼻制剂, 全灭活鼻流感 (H1N1, 品系 A/Brisbane/59/2007) 疫苗粉末制剂产生血清和鼻洗样品中的最高滴定度, 表明高于液体制剂的明显改善。总之, 这些结果表明血清和鼻洗 HI 滴定度均在测试组 1 中得到提高。

[0128] 如下测定血清和鼻洗样品的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 抗体滴定度。4 摄氏度下用抗原将 ELISA 板包被 17 小时, 洗涤, 并在 100 微升阻断溶液 (0.5% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲剂) 中室温阻断 1 小时。洗涤后, 在 0.5% BSA 和 PBS 中制备 2 倍连续稀释的测试样品并将所述稀释液加入 ELISA 板的孔中。37 摄氏度培养 1 小时后, 洗涤板并在 37 摄氏度下用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的山羊抗猴 IgG 或 HRP- 缀合的绵羊抗猴分泌型成分检测抗血清培养 1 小时。随后洗涤所述板, 37 摄氏度下用 o- 苯二胺 (OPD) 培养 15 分钟, 并通过

加入 100 微升 1M 硫酸 (H_2SO_4) 终止颜色反应。在 ELISA 读数仪上通过 OD492 测量样品。

[0129] 该研究中收集的样品中测量的 ELISA 抗体滴定度结果示于图 6 和 7。图 6A 和 B 为通过暴露于不同的流感疫苗制剂的猴产生的 sIgA (5B) 和 IgG (5A) 抗体滴定度表。图 7 提供了数据的图形表示,并指示来自每个测试动物(不同动物通过不同的线表示)的相似结果。SC 流感疫苗溶液产生全部测试制品中的最高 IgG。鼻流感 (H1N1, 品系 A/Brisbane/59/2007) 疫苗粉末制剂产生全部鼻制剂中的最高 IgG。鼻流感疫苗粉末制剂产生全部测试制品中的最高 sIgA。SC 注射流感疫苗产生全部测试制品中的最低 sIgA。含有佐剂的鼻流感疫苗溶液产生全部鼻制剂中的最低 sIgA,即使其加入了佐剂。

[0130] 实施例 1D :恢复期间的 HI、IgG 和 sIgA 滴定度

[0131] 在实验结束之后监控来自实施例 1C 的动物子集以测定是否保持升高的抗体滴定度。在第 80 天(最后一次接种疫苗后 31 天)、101 天(接种疫苗后 52 天)和 115 天(接种疫苗后 66 天)收取血清和鼻洗样品。结果见图 8 和 9。图 8 含有 HI 滴定度表;图 9 含有 IgG 和 sIgA 滴定度表。用鼻粉末制剂处理的动物中抗体滴定度水平保持为高水平(图 8 和 9, 组 1)。用鼻液体制剂处理的动物中抗体滴定度水平保持为较低水平,不加入(组 2)或加入(组 3)佐剂。注射液体制剂的动物(组 4)中 IgG 和 HI 滴定度水平在整个恢复期间显著减少;用注射疫苗制剂处理的动物中 sIgA 抗体水平未明显上升。

[0132] 实施例 1E :生存能力 / 免疫性试验研究。

[0133] 在该实施例中,测定流感疫苗保护动物免受随后的免疫性试验的能力。在最终免疫之后,对在之前实验中接种疫苗的猴进行鼻免疫性试验 3 周。用含胚鸡蛋培育的大流感 (A/Brisbane/59/2007IVR-148) 病毒对动物进行免疫性试验。每个动物接受总共约 10^7 TCID₅₀ 的 2ml 体积病毒。对于模拟的免疫性试验,用 2ml 无病毒尿囊液对猴进行免疫性试验。作为进一步的对照,将 3 只未接种疫苗的猴暴露于 10^7 TCID₅₀ 的病毒或用 2ml 无病毒尿囊液对其进行免疫性试验。

[0134] 每日监控每组动物的体重、体温降低、一般外观和临床症状。免疫性试验后观察猴的流感相关临床体征 28 天。对全部猴饲喂标准饮食并且水可随意取用。对于每个研究组,在最初免疫性试验之后的第 -7 天、3 天、7 天、14 天和 28 天收集鼻洗和血液样品。对每只动物测定抗体滴定度 (sIgA 和 IgG)。

[0135] 实施例 1F :测定干疫苗粉末制剂的稳定性和吸湿性。

[0136] 在该实施例中,测试干疫苗粉末制剂的稳定性和吸湿性。通过本发明方法制备干全灭活 H1N1 流感疫苗粉末制剂。在 45 摄氏度和 20 摄氏度 -25 摄氏度下测试疫苗粉末制剂的稳定性。将待测干疫苗粉末制剂储存于密封瓶和非密封容器中。通过测定 HA 抗原性来测量稳定性。

[0137] 通过测定一定时间之后的样品质量来测量干疫苗粉末制剂的吸湿性。为了测定不同环境条件对干疫苗粉末吸湿稳定性的影响,在各种条件下储存 50mg 疫苗粉末。将干疫苗粉末样品储存于气密条件下、密封容器中和开放容器中。以每月的时间间隔对样品称重 6 个月并称重。重量的增加表示水的获得。

[0138] 在鼻递送装置中测试储存长于 6 个月的疫苗粉末制剂。测定由装置递送的疫苗粉末制剂的百分数并与新鲜制备的疫苗粉末制剂的百分数相比较。

[0139] 实施例 2 :全灭活 H5N1 干疫苗粉末制剂的制备和测试

[0140] 在该实施例中,制备并测试禽流感疫苗(H5N1)的各种干粉制剂。还测试本发明的优选实施方案,对比禽流感疫苗的常规液体鼻和注射制剂。

[0141] 实施例 2A :使用快速冷冻方法制备鼻流感(H5N1)疫苗粉末

[0142] 进行该实施例以决定用于产生 H5N1 鼻疫苗粉末的快速冷冻和干燥方法的最优抗原稳定剂和抗原对稳定剂的比例。一般制备方法概述于图 2 和 3 ;以下提供与 H5N1 鼻疫苗制剂的产生相关的具体细节。测试四种抗原对稳定剂的比例(1 : 11、1 : 21、1 : 49、和 1 : 101) ;以下引用的数字对应于 1 : 49 比例的制剂。在 10mL 瓶中,将 0.4mL 的 0.526mg/mL 含全灭活 H5N1 病毒(品系 A/Vietnam/1194/2004, Sinovac Biotech Ltd)的抗原溶液与 0.4mL 磷酸盐缓冲剂(pH 7.2)中的 10.4mg 稳定剂(海藻糖、甘露醇、或乳糖)结合以得到抗原对稳定剂的最终比例为 1 : 49。将所述混合物在液氮中快速冷冻 10 分钟并通过 4 步骤冷冻-干燥过程生成流感粉末 : -40 摄氏度、小于 140 毫托下 24 小时 ; -30 摄氏度、小于 130 毫托下 36 小时 ; -10 摄氏度、小于 100 毫托下 4 小时 ; 和 20 摄氏度、小于 50 毫托下 4 小时。所得粉末每 1mg 粉末含有 11.2 微克抗原。将所述流感疫苗粉末与比表面积大于 1.3 平方米每克的鼻载体(例如,微晶纤维素)和磷酸三钙(TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 结合(混合)。在 10mL 玻璃瓶中将流感疫苗粉末(104mg, 包括 1.2mg 流感疫苗蛋白)与 254.4mg 的 Ceolus(注册商标)PH-F20JP 微晶纤维素(平均粒径 : 57 微米 ; 体积密度 : 0.23g/cm³ ; 比表面积 : 2.3m²/g)、40.0mg 的 Ceolus(注册商标)PH-301 微晶纤维素(平均粒径 : 39 微米 ; 体积密度 : 0.41g/cm³)、和 1.6mg 的 TCP 结合,并使用旋涡搅拌器混合所述成分 1 分钟。所得干流感疫苗粉末制剂每 20mg 干流感疫苗粉末制剂含有 58.9 微克流感疫苗蛋白。使用海藻糖、甘露醇和乳糖作为稳定剂产生由精细颗粒组成的、抗原对稳定剂比例为 1 : 21 和 1 : 49 的稳定粉末。在 1 : 101 的抗原对稳定剂比例下,含海藻糖和乳糖的制剂产生块状但稳定的粉末 ; 甘露醇产生由精细颗粒组成的、抗原对稳定剂比例为 1 : 101 的稳定粉末。使用海藻糖、甘露醇和乳糖在抗原对稳定剂比例为 1 : 11 下制得不稳定的制剂。所述结果总结于表 3。

[0143] [表 3]

[0144] 通过快速冷冻技术产生的流感(H5N1)疫苗粉末

[0145]

抗原总蛋 白/稳定剂 比例	海藻糖		甘露醇		乳糖	
	粉末 性质	HA 效力 稳定 : >50%	粉末 性质	HA 效力 稳定 : >50%	粉末 性质	HA 效力 稳定 : >50%

[0146]

(重量)		不稳定 : \leq 50%		不稳定 : \leq 50%		不稳定 : \leq 50%
1:11	精细	不稳定	精细	不稳定	精细	不稳定
1:21	精细	稳定	精细	稳定	精细	稳定
1:49	精细	稳定	精细	稳定	精细	稳定
1:101	块状	稳定	精细	稳定	块状	稳定

[0147] 实施例 2B :鼻流感疫苗粉末制剂的研究设计和结果

[0148] 在该实验中,测试干粉末疫苗引起食蟹猴免疫应答的能力并将其与常规鼻和注射液体制剂相比较。食蟹猴具有与人类相似的相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答。如上所述,使用快速冷冻随后冷冻干燥方法,由全灭活 H5N1(品系 A/Vietnam/1194/2004) 抗原制备干粉末疫苗并将其与微晶纤维素载体混合。对于每 20mg 鼻流感(H5N1) 疫苗粉末制剂,58.9 微克全灭活 H5N1 病毒与 2.9mg 海藻糖、12.7mg Ceolus(注册商标)PH-F20JP、2.0mg Ceolus(注册商标)PH-301、和 0.08mg 磷酸三钙一同递送。在每种条件下,施用 30 微克 H5N1 抗原。向组 1 的每个鼻孔施用 20mg 鼻疫苗粉末(30 微克总抗原);向组 2 的每个鼻孔施用 0.15mL 鼻流感喷雾(30 微克总抗原);和通过肌肉注射(IM) 向组 3 施用 0.3mL 液体疫苗。施用疫苗并依照图 10 的时间表收集样品。依照实施例 1 所述方法通过酶联免疫吸附测定法(ELISA) 测试样品。

[0149] 该研究中收集的样品所测得的 ELISA 抗体滴定度测量结果示于图 11 和 12。图 11 提供了通过暴露于不同流感疫苗制剂的猴产生的 sIgA(11B) 和 IgG(11A) 滴定度。图 12 提供了以不同的线表示的不同动物的数据图形表示。通过液体制剂注射接种疫苗的动物(组 3) 产生该研究中最高 IgG 滴定度;然而,该相同组产生几乎检测不到的 sIgA 抗体水平。使用鼻液体制剂接种疫苗的动物(组 2) 产生该实验中最低的 IgG 抗体水平;该组也产生低水平 sIgA 抗体。用鼻粉末制剂接种疫苗的动物(组 1) 产生鼻疫苗的最高的 IgG 抗体水平;所述鼻粉末制剂也引起通过 sIgA 抗体水平测量的最高水平的免疫应答。这些结果显示 sIgA 和 IgG 抗体滴定度在用 H5N1 鼻粉末疫苗制剂处理的动物中均被成功地提高。

[0150] 实施例 2C :应力条件下稳定性测试的测试方法和结果

[0151] 在该实验中,使干粉末 H5N1 疫苗制剂(如实施例 2A 所述制备) 稳定性经受应力条件并与 H5N1 鼻流感喷雾制剂相比较。将包封形式的 H5N1 流感疫苗粉末储存于 60 摄氏度和 0% 相对湿度下并在 2 周和 3 周时间点检测。两周时,粉末由精细颗粒组成;然而,3 周时,观察到了粉末的部分聚集。在另一个测试中,将 H5N1 流感疫苗粉末装入单次使用的递送装置(Shin Nippon Biomedical Laboratory, LTD) 并和氧气和湿气吸收干燥剂(PharmaKeep KC-20, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) 一起在 60 摄氏度和 75% 相对湿度下在铝筒中储存 2 周,之后所述粉末仍由精细颗粒组成。仍然在另一个测试中,将 H5N1 流感疫苗粉末放入瓶中并于 60 摄氏度和 0% 相对湿度下储存,并在 2 周和 3 周时间点检测 HA 效力。在这两个时间,H5N1 鼻疫苗粉末的 HA 效力稳定。在另一个 HA 效力试验中,将 H5N1 流感疫苗粉末放入瓶中并和氧气和湿气吸收干燥剂(PharmaKeep KC-20, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.) 一起在 60 摄氏度和 75% 相对湿度下储存 2 周,所述时间之后 HA 效力被测定为稳定。这些结果总结于表 4。与 H5N1 鼻粉末疫苗相反,在 60 摄氏度下在聚丙烯微管中储存 2 周后的 H5N1 鼻喷雾疫苗损失全部 HA 效力。这表明鼻粉末制剂实现了在高温下稳定性增加。

[0152] [表 4]

[0153] H5N1 流感疫苗粉末应力测试结果

[0154]

时间	粉末性质		HA 效力 (稳定: >50%, 不稳定: ≤50%)	
	包封的	装入递送装置	瓶装	包装
初始	精细颗粒	精细颗粒	稳定	稳定
2 周	精细颗粒	精细颗粒	稳定	稳定
3 周	部分聚集		稳定	

[0155] 实施例 3:3 种 HA 分裂灭活品系干疫苗粉末制剂混合物的制备和测试

[0156] 在该实施例中,产生并测试含 3 种分裂 - 灭活品系 (H1N1A/California/7/2009、H3N2 A/Victoria/210/2009、和 B/Brisbane/60/2008- 一起称为:“三价 HA 流感”) 的混合物的鼻粉末疫苗的多种干粉末制剂。

[0157] 实施例 3A :使用快速冷冻方法制备三价 HA 流感疫苗粉末

[0158] 进行该实验以确定用于产生三价 HA 流感鼻疫苗粉末的快速冷冻和干燥方法的最优抗原稳定剂、和抗原对稳定剂的比例。一般制备方法概述于图 2 和 3 ;以下提供与三价 HA 流感鼻疫苗制剂的产生相关的具体细节。测试四种抗原对稳定剂的比例 (1 : 26、1 : 56、1 : 111、和 1 : 222) ;以下引用的数字对应于 1 : 111 比例的制剂。在 10mL 瓶中,将 0.6mL 的 > 0.09mg/mL 含三价 HA 流感 (H1N1A/California/7/2009、H3N2A/Victoria/210/2009、和 B/Brisbane/60/2008,Denka Seiken Co Ltd) 的抗原溶液与 0.2mL 超纯水中的 6mg 稳定剂 (海藻糖、甘露醇或乳糖) 结合以得到抗原对稳定剂的最终比例为 1 : 111。将所述混合物在液氮中快速冷冻 10 分钟并通过 4 步骤冷冻 - 干燥过程生成流感粉末: -40 摄氏度、小于 140 毫托下 24 小时; -30 摄氏度、小于 130 毫托下 36 小时; -10 摄氏度、小于 100 毫托下 4 小时; 和 20 摄氏度、小于 50 毫托下 4 小时。所得粉末每 1mg 粉末含有 > 4.6 微克抗原。将所述流感疫苗粉末与比表面积大于 1.3 平方米每克的鼻载体 (例如,微晶纤维素) 和磷酸三钙 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 结合 (混合)。在 10mL 玻璃瓶中将流感疫苗粉末 (97.75mg, 包括 0.45mg 流感疫苗蛋白) 与 350.2mg 的 Ceolus (注册商标) PH-F20JP 微晶纤维素 (平均粒径: 57 微米; 体积密度: 0.23g/cm³; 比表面积: 2.3m²/g)、50.0mg 的 Ceolus (注册商标) PH-301 微晶纤维素 (平均粒径: 39 微米; 体积密度: 0.41g/cm³)、和 2.0mg 的 TCP 结合, 并使用旋涡搅拌器混合所述成分 1 分钟。所得干流感疫苗粉末制剂每 25mg 干流感疫苗粉末制剂含有 > 45 微克流感疫苗蛋白。在 1 : 26 的抗原对稳定剂比例下使用海藻糖、甘露醇和乳糖的制剂产生由精细颗粒组成的不稳定粉末。在 1 : 56 和 1 : 111 的抗原对稳定剂比例下, 含海藻糖和乳糖的制剂产生具有精细粒径的稳定粉末; 在这些比例下, 使用甘露醇作为稳定剂得到具有精细粒径但不稳定的 HA 效力。在 1 : 222 的抗原对稳定剂比例下, 含海藻糖和乳糖的制剂产生具有稳定 HA 效力的块状粉末; 在相同比例下, 含甘露醇的制剂产生由精细颗粒组成的稳定粉末。所述结果总结于表 5。

[0159] [表 5]

[0160] 通过快速冷冻技术产生的三价 HA 流感疫苗粉末

[0161]

常规冷冻, 和干重比 例/使用赋 形剂	海藻糖		甘露醇		乳糖	
	粒径	HA 效力 稳定: >50% 不稳定: ≤50%	粒径	HA 效力 稳定: >50% 不稳定: ≤50%	粒径	HA 效力 稳定: >50% 不稳定: ≤50%
1:26	精细	不稳定	精细	不稳定	精细	不稳定
1:56	精细	稳定	精细	不稳定	精细	稳定
1:111	精细	稳定	精细	不稳定	精细	稳定
1:222	块状	稳定	精细	稳定	块状	稳定

[0162] 实施例 3B:应力条件下稳定性测试的测试方法和结果

[0163] 在该实验中,在应力条件下测试干粉三价 HA 流感疫苗制剂(使用快速冷冻方法制备并与微晶纤维素载体混合)的稳定性并与鼻喷雾三价 HA 流感疫苗制剂相比较。将包封形式的三价 HA 流感疫苗粉末储存于 60 摄氏度和 0%相对湿度下并在 2 周和 3 周时间点检测。两周时,粉末由精细颗粒组成;然而,3 周时,观察到了粉末的部分聚集。仍然在另一个测试中,将三价 HA 流感疫苗粉末放入瓶中并于 60 摄氏度和 0%相对湿度下储存,并在 2 周和 3 周时间点检测 HA 效力。在这两个时间,三价 HA 鼻疫苗粉末的 HA 效力稳定。这些结果总结于表 6。与三价 HA 鼻粉末疫苗相反,在 60 摄氏度下在聚丙烯微管中储存 2 周后的鼻喷雾三价 HA 鼻喷雾疫苗损失全部 HA 效力。这表明鼻粉末制剂实现了在高温下稳定性增加。

[0164] [表 6]

[0165] 瓶装三价 HA 流感鼻粉末疫苗应力测试结果

[0166]

时间	粉末一致性	HA 效力 稳定: >50% 不稳定: ≤50%
初始	精细颗粒	稳定
2 周	精细颗粒	稳定
3 周	部分聚集	稳定

[0167] 实施例 4:破伤风类毒素(TTx)干疫苗粉末制剂的制备和测试

[0168] 在该实施例中,制备并测试破伤风类毒素(TTx)疫苗的多干粉制剂。还测试本发明的优选实施方案,对比 TTx 疫苗的常规液体注射制剂。

[0169] 实施例 4A:使用快速冷冻方法制备破伤风类毒素疫苗粉末

[0170] 进行该实验以确定用于产生破伤风类毒素鼻疫苗粉末的快速冷冻和干燥方法的最优抗原稳定剂、和抗原对稳定剂的比例。一般制备方法概述于图 2 和 3;以下提供与破

伤风类毒素鼻疫苗制剂的产生相关的具体细节。测试五种抗原对稳定剂的比例 (1 : 26、1 : 53、1 : 111、1 : 223、和 1 : 大于 420) ;以下引用的数字对应于 1 : 53 比例的制剂。在 10mL 瓶中,将 0.5mL 的小于 0.08mg/mL 吸附破伤风类毒素的抗原溶液 (Denka Seiken Co LTD) 与 0.3mL 超纯水中的 2.1mg 稳定剂 (海藻糖、甘露醇或乳糖) 结合以得到抗原对稳定剂的最终比例为 1 : 53。将所述混合物于液氮中快速冷冻 10 分钟并通过 4 步骤冷冻 - 干燥过程生成抗原粉末 : -40 摄氏度、小于 140 毫托下 24 小时 ; -30 摄氏度、小于 130 毫托下 36 小时 ; -10 摄氏度、小于 100 毫托下 4 小时 ; 和 20 摄氏度、小于 50 毫托下 4 小时。所得粉末每 1mg 粉末含有小于 4.7 微克抗原。将所述破伤风类毒素疫苗粉末与比表面积大于 1.3 平方米每克的鼻载体 (例如,微晶纤维素) 和磷酸三钙 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 结合 (混合)。在 10mL 玻璃瓶中将破伤风类毒素疫苗粉末 (小于 8.54mg, 包含小于 0.04mg 抗原蛋白) 与 35.46mg 的 Ceolus (注册商标) PH-F20JP 微晶纤维素 (平均粒径 : 57 微米 ; 体积密度 : 0.23g/cm³ ; 比表面积 : 2.3m²/g)、5mg 的 Ceolus (注册商标) PH-301 微晶纤维素 (平均粒径 : 39 微米 ; 体积密度 : 0.41g/cm³)、和 0.2mg 的 TCP 结合,并使用旋涡搅拌器混合所述成分 1 分钟。所得干破伤风类毒素疫苗粉末制剂每 25mg 总粉末含有小于 20 微克抗原蛋白。使用海藻糖、甘露醇和乳糖产生由精细颗粒组成的、抗原对稳定剂比例为 1 : 26、1 : 53、1 : 105、和 1 : 210 的抗原粉末。在 1 : 420 的抗原对稳定剂比例下,全部三种稳定剂 (海藻糖、甘露醇和乳糖) 产生块状粉末。所述结果总结于表 7。

[0171] [表 7]

[0172] 通过快速冷冻技术产生的破伤风类毒素疫苗粉末

[0173]

抗原总蛋白/稳定剂 比例 (重量)	海藻糖	甘露醇	乳糖
	粉末性质	粉末性质	粉末性质
1:26	精细	精细	精细
1:53	精细	精细	精细
1:105	精细	精细	精细
1:210	精细	精细	精细
1:420	块状	块状	块状

[0174] 实施例 4B : 鼻破伤风类毒素疫苗粉末制剂的研究设计和结果

[0175] 在该实验中,测试破伤风类毒素鼻粉末疫苗引起食蟹猴免疫应答的能力并将其与常规注射液体制剂相比较。食蟹猴具有与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答。如实施例 4A 所述,使用快速冷冻随后冷冻干燥方法,由吸附破伤风类毒素的抗原制备干粉末疫苗并将其与微晶纤维素载体混合。对于每 25mg 鼻破伤风类毒素疫苗粉末制剂,2.5Lf 吸附破伤风类毒素抗原与 1.1mg 海藻糖、17.9mg Ceolus (注册商标) PH-F20JP、2.6mg Ceolus (注册商标) PH-301、和 0.1mg 磷酸三钙一起递送。比较多个剂量水平。向组 1 的每个鼻孔施用 25mg 鼻疫苗粉末 (5Lf 剂量) ; 向组 2 的每个鼻孔施用 25mg 鼻疫苗粉末两次 (10Lf 剂量) ; 向组 3 的每个鼻孔施用 25mg 鼻疫苗粉末四次 (20Lf 剂量) ; 和,通过皮下注射向组 4 施用 2.0mL 液体疫苗 (10Lf 剂量)。施用疫苗并依照图 13 的时间表收集样品。依

照实施例 1 所述方法通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和酶联免疫吸附点 (ELISpot) 测试样品。

[0176] 如下进行 ELISpot 试验。将小鼠抗人 / 猴干扰素 - γ (IFN γ)、单克隆抗体、非结合、无性系 GZ-4 (15 微克 /mL, MabTech, Sweden) 加入到多屏板 (Millipore, USA) 中并于 4 摄氏度培养过夜。第二天,用 AIM-V (Life Technologies, USA) 完全介质阻断所述板。加入分离自猴全血的外周血单核细胞 (PBMC) 的 4×10^5 个细胞和 25mLf 吸附破伤风类毒素,并于 37 摄氏度培养板 24 小时。然后用 PBS 洗涤孔并加入 1 微克 /mL 小鼠抗人 IFN γ 、单克隆抗体、生物素化、无性系 7-B6-1 (MabTech)。2 小时室温培养后,用 PBS 洗涤孔。加入 1 : 1000 稀释的链酶亲和 - 碱性磷酸酶 (MabTech)。1 小时室温培养后,用 PBS 洗涤孔。使用 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶磷酸盐 / 四氮唑蓝 (BCIP/NBT- 加基质) (Moss, USA) 进行染色。干燥板并以 - 至 ++ 等级评价每个孔中的点数。本研究收集的样品中测量的抗体滴定度示于图 14 和 15。图 14A 提供了通过将猴暴露于不同流感疫苗制剂产生的血清 IgG 吸光度比值;图 14B 以图形形式显示了这些相同结果。图 15 列出了所收集的血清样品的 ELISpot 测试结果。图 15 中的得分如下: (-) 显示阴性对照水平、(+/-) 显示低水平、(+) 显示中等水平、和 (++) 显示高水平。在 ELISA 和 ELISpot 试验中,TTx 疫苗的注射液体制剂产生最大免疫应答。20Lf 剂量的鼻粉末在通过 ELISA 测量的研究期间引起 IgG 抗体滴定度可检测的增加。ELISpot 测量显示全部三种剂量的 TTx 鼻粉末疫苗都能够产生剂量依赖的免疫应答。

[0177] 实施例 5 :白喉类毒素 (DTx) 干疫苗粉末制剂的制备和测试

[0178] 在该实施例中,制备并测试白喉类毒素疫苗的各种干粉末制剂。还测试本发明的优选实施方案,对比白喉类毒素疫苗的常规液体注射制剂。为了测试加工期间白喉类毒素抗原的稳定性,将通过如前详述的快速冷冻和冷冻干燥方法制得的抗原粉末再水合成液体制剂。以下将该制剂称为重组粉末。

[0179] 实施例 5A :使用快速冷冻方法制备白喉类毒素疫苗粉末

[0180] 进行该实验以确定用于产生白喉类毒素鼻疫苗粉末的快速冷冻和干燥方法的最优抗原稳定剂、和抗原对稳定剂的比例。一般制备方法概述于图 2 和 3 ;以下提供与白喉类毒素鼻疫苗制剂的产生相关的具体细节。测试五种抗原对稳定剂的比例 (2.5Lf : 1.1mg、2.5Lf : 2.1mg、2.5Lf : 4.2mg、2.5Lf : 8.4mg 和 2.5Lf : 16.8mg) ;以下引用的数字对应于 2.5Lf : 2.1mg 比例的制剂。在 10mL 瓶中,将 0.5mL 的小于 5Lf/mL 吸附白喉类毒素抗原溶液 (DTx, Research Institute for Microbial Disease, 大阪大学) 与 0.3mL 超纯水中的 2.1mg 稳定剂 (海藻糖、甘露醇或乳糖) 结合以得到抗原对稳定剂的最终比例为 2.5Lf : 2.1mg。将所述混合物于液氮中快速冷冻 10 分钟并通过 4 步骤冷冻 - 干燥过程生成抗原粉末 : -40 摄氏度、小于 140 毫托下 24 小时 ; -30 摄氏度、小于 130 毫托下 36 小时 ; -10 摄氏度、小于 100 毫托下 4 小时 ; 和 20 摄氏度、小于 50 毫托下 4 小时。所得粉末每 1mg 粉末含有小于 0.28Lf 抗原。将所述白喉类毒素疫苗粉末与比表面积大于 1.3 平方米每克的鼻载体 (例如,微晶纤维素) 和磷酸三钙 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 结合 (混合)。在 10mL 玻璃瓶中将白喉类毒素疫苗粉末 (1mg, 包含小于 0.28Lf 抗原蛋白) 与 35.96mg 的 Ceolus (注册商标) PH-F20JP 微晶纤维素 (平均粒径 : 57 微米 ; 体积密度 : 0.23g/cm³ ; 比表面积 : 2.3m²/g)、5mg 的 Ceolus (注册商标) PH-301 微晶纤维素 (平均粒径 : 39 微米 ; 体积密度 : 0.41g/cm³)、和 0.2mg 的 TCP 结合,并使用旋涡搅拌器混合所述成分 1 分钟。所得干白喉类毒素疫苗粉

末制剂每 25mg 总粉末含有小于 1.25Lf 抗原蛋白。所述结果总结于表 8。使用海藻糖、甘露醇或乳糖产生由精细颗粒组成的、抗原对稳定剂比例为 2.5Lf : 1.1mg、2.5Lf : 2.1mg、2.5Lf : 4.2mg 和 2.5Lf : 8.4mg 的粉末。在 2.5Lf : 16.8mg 的抗原对稳定剂比例下使用该方法,所用的全部三种稳定剂产生块状粉末。

[0181] [表 8]

[0182] 通过快速冷冻技术产生的白喉类毒素疫苗粉末

[0183]

Lf/稳定剂	海藻糖	甘露醇	乳糖
	粉末性质	粉末性质	粉末性质
2.5 LF/1.1 mg	精细	精细	精细
2.5 LF/2.1 mg	精细	精细	精细
2.5 LF/4.2 mg	精细	精细	精细
2.5 LF/8.4 mg	精细	精细	精细
2.5 LF/16.8 mg	块状	块状	块状

[0184] 实施例 5B :鼻白喉类毒素疫苗粉末制剂的研究设计和结果

[0185] 在该实验中,测试白喉类毒素鼻粉末疫苗引起食蟹猴免疫应答的能力并将其与常规注射液体制剂和重组粉末制剂相比较。食蟹猴具有与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答。如上所述,使用快速冷冻随后冷冻干燥方法,由吸附白喉类毒素的抗原制备干粉末疫苗并将其与微晶纤维素载体混合。对于每 25mg 鼻白喉类毒素疫苗粉末制剂,1.25Lf 白喉类毒素抗原与 1.1mg 海藻糖、21.3mg Ceolus(注册商标)PH-F20JP、3.0mg Ceolus(注册商标)PH-301、和 0.12mg 磷酸三钙一起递送。向组 1 的每个鼻孔施用 25mg 鼻疫苗粉末(2.5Lf 剂量);通过皮下注射向组 2 施用 1.0mL 液体疫苗(5Lf 剂量);和,通过皮下注射向组 3 施用 1.0mL 重组粉末疫苗(5Lf 剂量)。施用疫苗并依照图 16 的时间表收集样品。依照实施例 1 所述方法通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测试样品。

[0186] 本实验中测量的抗体滴定度示于图 17。图 17A 为血清 IgG 吸光度比值表;17B 为 17A 中数据的条形图(顶部)和线状图(底部)。重组粉末制剂和常规注射液体制剂成功地引起血清 IgG 水平的增加。虽然施用量为注射制剂的一半,鼻粉末制剂也成功地增加了 IgG 抗体滴定度。总之,这些结果显示本文所公开的快速冷冻干燥方法学保持了动物中白喉类毒素疫苗的效力。

[0187] 实施例 6 :卵清蛋白干疫苗粉末制剂的制备和测试

[0188] 在该实施例中,制备卵清蛋白(OVA, SIGMA A5503-IG)的干粉末制剂并测试其引发食蟹猴免疫应答的能力。将经鼻施用的干疫苗粉末制剂与常规鼻和注射液体制剂相比较。结果表明使用本文所述制剂的示例性蛋白抗原的鼻施用能够引发动物的免疫应答。

[0189] 实施例 6A :卵清蛋白干疫苗粉末的制备

[0190] 通过将不同量的卵清蛋白(hOVA)粉末与比表面积大于 1.3 平方米每克的鼻载体(例如,微晶纤维素)和磷酸三钙(TCP)(Ca₃(PO₄)₂)混合来制备同质化卵清蛋白鼻粉末的三种制剂。由于 hOVA 以粉末形式提供,所以不需要快速冷冻并随后冷冻干燥步骤。在制剂 1

中,在 10mL 瓶中将 13.3mg hOVA 粉末与 354.1mg Ceolus PH-F20JP、40mg CeolusPH-301、和 1.6mg 磷酸三钙 (TCP) 结合,并使用旋涡搅拌器混合 1 分钟。所得混合物每 30mg 粉末制剂含有 1mg 抗原。在制剂 2 中,在 10mL 瓶中将 66.7mg hOVA 粉末与 291.7mg Ceolus PH-F20JP、40mg CeolusPH-301、和 1.6mg 磷酸三钙 (TCP) 结合,并使用旋涡搅拌器混合 1 分钟。所得混合物每 30mg 粉末制剂含有 5mg 抗原。在制剂 3 中,在 10mL 瓶中将 200mg hOVA 粉末与 158.4mg Ceolus PH-F20JP、40mg CeolusPH-301、和 1.6mg 磷酸三钙 (TCP) 结合,并使用旋涡搅拌器混合 1 分钟。所得混合物每 30mg 粉末制剂含有 15mg 抗原。

[0191] 实施例 6B:鼻卵清蛋白疫苗粉末制剂的研究设计和结果

[0192] 在该实验中,测试卵清蛋白鼻粉末疫苗引起食蟹猴免疫应答的能力并将其与常规注射和鼻液体制剂(其中 hOVA 溶解于磷酸盐缓冲剂中)相比较。食蟹猴具有与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答。如上所述,由同质化卵清蛋白粉末制备干粉末疫苗并将其与赋形剂混合。向组 1 的每个鼻孔施用 30mg 鼻疫苗粉末制剂 1(2mg 剂量);向组 2 的每个鼻孔施用 30mg 鼻疫苗粉末制剂 2(10mg 剂量);向组 3 的每个鼻孔施用 30mg 鼻疫苗粉末制剂 3(30mg 剂量);向组 4 的每个鼻孔施用 0.1mL 液体疫苗(20mg 剂量);向组 5 的每个鼻孔施用 0.1mL 液体疫苗(30mg 剂量);通过皮下注射向组 6 施用 1.0mL 液体疫苗(20mg 剂量);和,通过皮下注射向组 7 施用 1.0mL 液体疫苗(30mg 剂量)。施用疫苗并依照图 18 的时间表收集样品。依照实施例 1 所述方法通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测试样品。

[0193] 在本实验期间收集的血清样品中测量的 IgG 抗体滴定度示于图 19。图 19A 为 IgG 抗体滴定度表;19B 为 19A 中数据的条形图(顶部)和线状图(底部)表示。鼻粉末制剂和注射液体制剂都能够引发类似高水平的免疫应答;然而,在更早的时间点,在用鼻粉末制剂处理的动物中检测到最高滴定度。如 IgG 抗体滴定度测量,鼻液体制剂未能引起可检测的免疫应答。在本实验期间收集的血清样品中测量的 sIgA 抗体滴定度示于图 20。图 20A 为 sIgA 抗体滴定度表;20B 为 20A 中数据的条形图(顶部)和线状图(底部)表示。如 sIgA 抗体滴定度测量,只有鼻粉末制剂可引发可检测的免疫应答。在用鼻液体或注射液体制剂接种疫苗的动物中未检测到 sIgA 滴定度的增加。总之,这些结果显示本文所描述的鼻粉末制剂能够在使用示例性蛋白抗原的动物中引发黏膜和全身免疫原性。

[0194] 尽管本文已经显示并描述了本发明的优选实施方案,对本领域技术人员而言显而易见的是这种实施方案仅以举例的方式提供。目前本领域技术人员将在不背离本发明的情况下想到多种变形、改变和替代。应当理解在实践发明时将使用本文所述发明的实施方案的各种可替代方案。以下权利要求意欲限定发明范围并因此覆盖这些权利要求范围之内的方法和结构及其等价物。

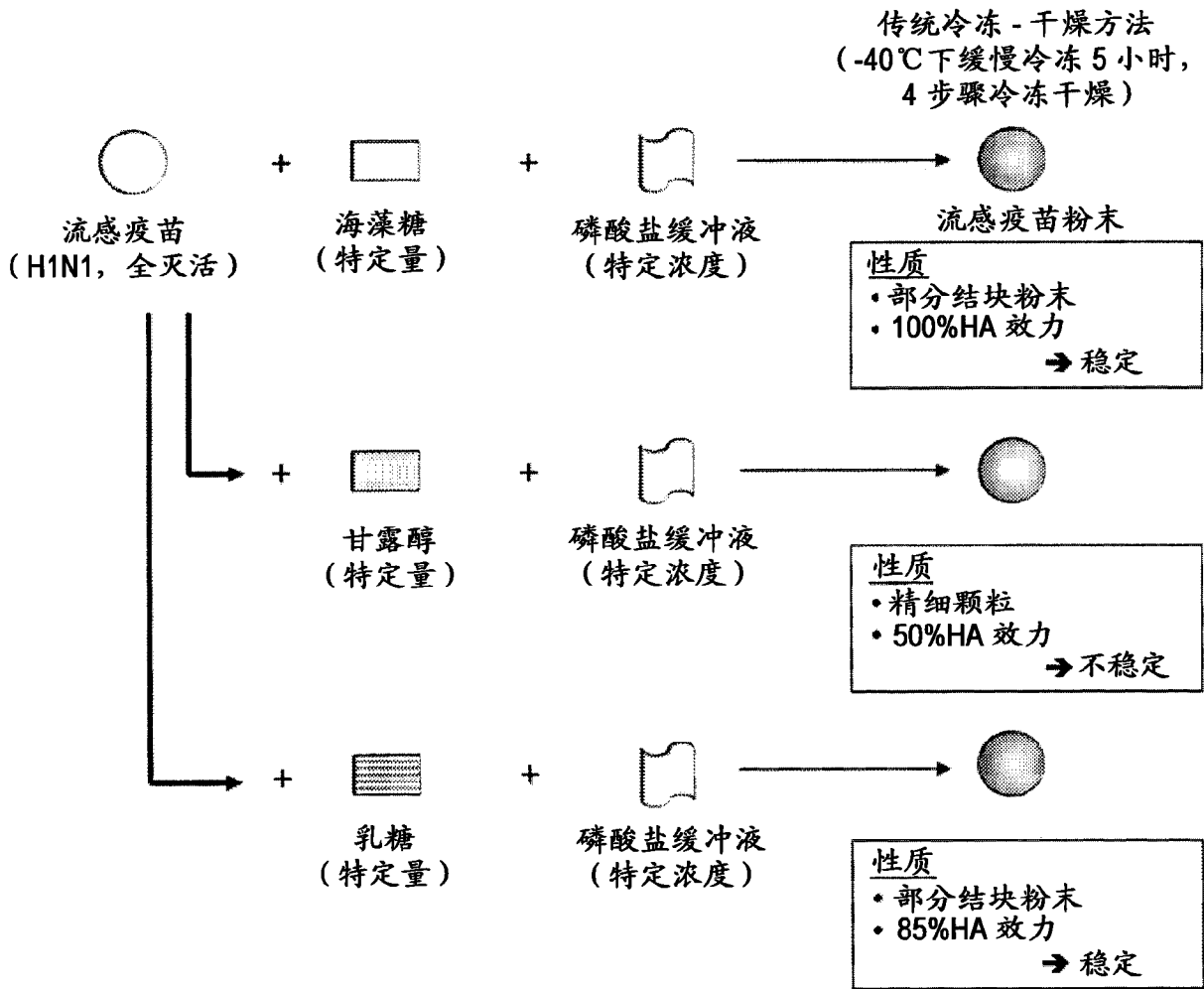


图 1

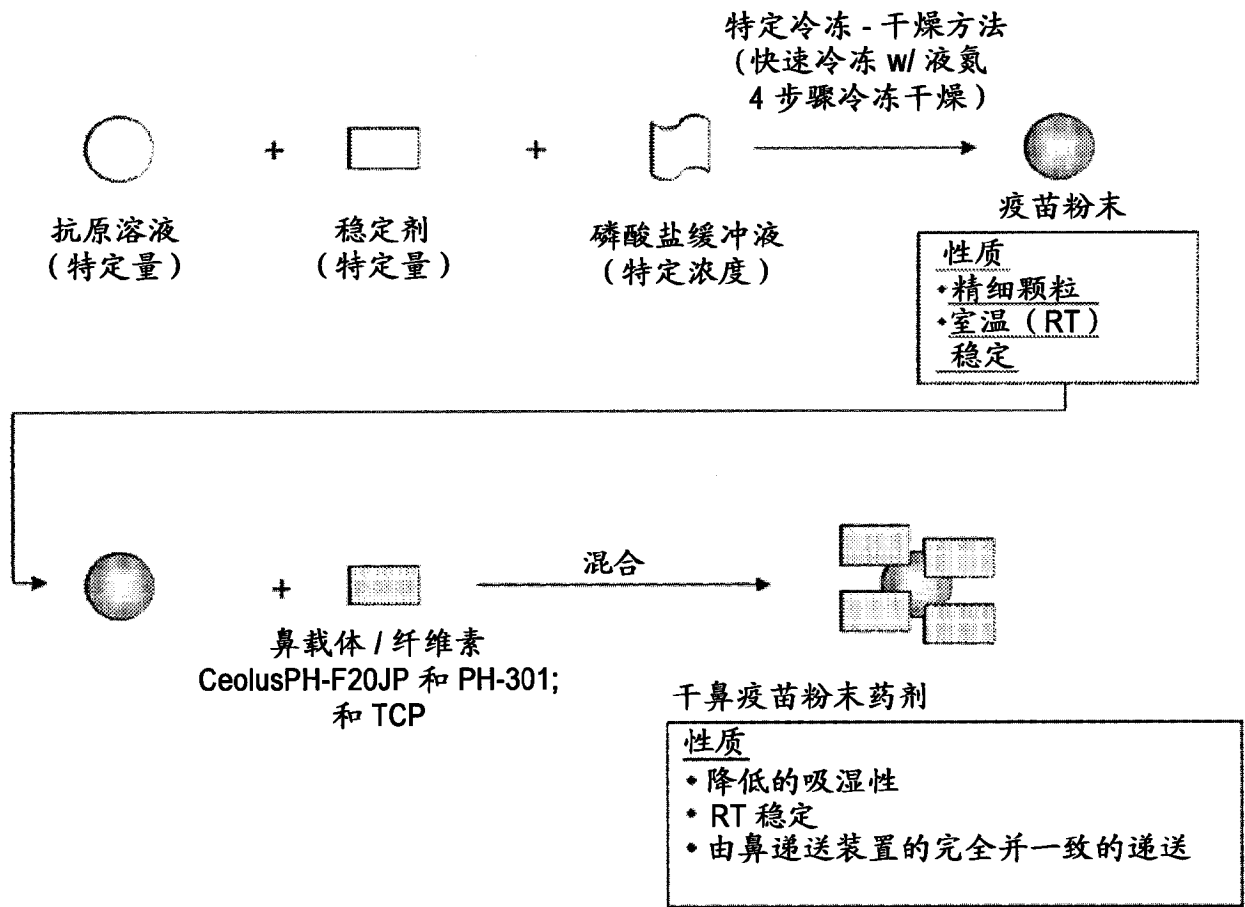


图 2

疫苗粉末的制造过程

A. 疫苗溶液的制备

在 10mL 玻璃瓶中混合材料 a)、b) 和 c)

- a) 抗体溶液
- b) 稳定剂 (海藻糖、甘露醇、或乳糖)
- c) 磷酸盐缓冲液或超纯水

B. 快速冷冻

疫苗溶液于液氮中冷冻 10 分钟

C. 冷冻状态下干燥

在冷冻-干燥器中、在以下条件下干燥冷冻的疫苗溶液

- 步骤 1: -40℃, 小于 140 毫托, 24h
- 步骤 2: -30℃, 小于 130 毫托, 24-36h
- 步骤 3: -10℃, 小于 100 毫托, 4h
- 步骤 4: 20℃, 小于 50 毫托, 4h

疫苗粉末 → 抗原精细颗粒

D. 混合





将材料 a) 至 d) 放入 10mL 玻璃瓶中并使用旋涡搅拌器混合

- A) 所制备的疫苗粉末
- B) Ceolus® PH-F20JP, 微晶纤维素
- c) Ceolus® PH-301, 微晶纤维素
- d) 磷酸三钙 (TCP)

干鼻疫苗粉末制剂

图 3

测试动物：食蟹猴（与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答）

	测试制品	施用途径	剂量 (总蛋白)	施用 时间表	收集的 样品	取样 时间表
组 1 (n=3)	 鼻流感粉末 (H1N1 疫苗)	鼻内	90 μg/ 次	第 0、21、 35 和 49 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 IgA)	第 -7、7、 14、28、 42、56 和 66 天
组 2 (n=3)	 鼻流感疫苗 溶液	鼻内	90 μg/ 次	第 0、21、 35 和 49 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 IgA)	第 -7、7、 14、28、 42、56 和 66 天
组 3 (n=3)	 鼻流感疫苗 溶液 w/佐剂*	鼻内	90 μg/ 次	第 0、21、 35 和 49 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 IgA)	第 -7、7、 14、28、 42、56 和 66 天
组 4 (n=2)	 SC 流感疫苗 溶液	SC 注射	90 μg/ 次	第 0、21、 35 和 49 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 IgA)	第 -7、7、 14、28、 42、56 和 66 天

* α-半乳糖神经酰胺为鼻佐剂，其被报道在小鼠和大鼠研究中有效。

图 4

雄性食蟹猴中 HI 滴定度, H1N1 疫苗测试

组	途径	动物号	血清, HI 滴定度						
			-7	7	14	28	42	56	66
组 1 鼻粉末, -adj 90 μ g/鼻孔/次	i.n.	1	10	10	20	160	320	320	320
		2	10	10	20	40	40	80	80
		3	10	10	10	40	80	80	160
			10.0	10.0	15.9	63.5	100.8	127.0	160.0
组 2 鼻液体, -adj 90 μ g/鼻孔/次	i.n.	4	10	10	10	20	20	40	40
		5	10	10	40	80	80	80	160
		6	10	10	20	40	40	40	40
			10.0	10.0	20.0	40.0	40.0	50.4	63.5
组 3 鼻液体, +adj 90 μ g/鼻孔/次	i.n.	7	10	10	20	20	20	40	40
		8	10	N	10	10	20	20	20
		9	20	20	20	40	40	40	40
			12.6	14.1	15.9	20.0	25.2	31.7	31.7
组 4 SC 注射, -adj 90 μ g/次	s.c.	10	10	20	40	160	160	320	160
		11	10	20	80	640	640	640	640
			10.0	20.0	56.6	320.0>	320.0>	452.5>	320.0>

NS: 无样品

图 5A

雄性食蟹猴中 HI 滴定度, H1N1 疫苗测试

组	途径	动物号	鼻洗 (右侧), HI 滴定度						
			-7	7	14	28	42	56	66
组 1 鼻粉末, -adj 90 μ g/ 鼻孔 / 次	i.n.	1	10	10	10	10	10	10	20
		2	10	10	10	10	10	40	40
		3	10	10	10	10	40	80	80
			10.0	10.0	10.0	10.0	15.9	31.7	40.0
组 2 鼻液体, -adj 90 μ g/ 鼻孔 / 次	i.n.	4	NS	10	10	10	10	10	10
		5	10	10	10	10	10	20	40
		6	10	10	10	10	10	10	10
			10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	12.6	15.9
组 3 鼻液体, +adj 90 μ g/ 鼻孔 / 次	i.n.	7	10	10	10	10	10	10	20
		8	10	10	10	10	10	10	10
		9	10	10	10	10	10	10	10
			10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	12.6
组 4 SC 注射, -adj 90 μ g/ 次	s.c.	10	10	10	10	10	10	10	10
		11	10	10	10	10	10	10	10
			10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

NS: 无样品

图 5B

雄性食蟹猴中抗体滴定度, H1N1 疫苗测试

组	途径	动物号	血清 IgG						
			-7	7	14	28	42	56	66
组 1 鼻粉末, -adj 90 μ g/鼻孔/次	i.n.	1	-	128	256	4096	16384	16384	16384
		2	-	16	32	2048	2048	4096	4096
		3	-	-	32	1024	4096	4096	8192
			-	45.3	64.0	2048.0	5160.6	6502.0	8192.0
组 2 鼻液体, -adj 90 μ g/鼻孔/次	i.n.	4	-	-	-	512	1024	2048	2048
		5	-	-	16	4096	4096	4096	4096
		6	-	32	256	1024	2048	2048	1024
			-	32.0	64.0	1290.2	2048.0	2580.3	2048.0
组 3 鼻液体, +adj 90 μ g/鼻孔/次	i.n.	7	-	16	16	64	512	1024	1024
		8	-	-	-	256	256	512	512
		9	-	-	128	512	1024	1024	1024
			-	16.0	45.3	203.2	512.0	812.7	812.7
组 4 SC 注射, -adj 90 μ g/次	s.c.	10	-	16	1024	16384	16384	16384	16384
		11	-	32	4096	65536	65536	65536	65536
			-	23	2048	32768	32768	32768	32768
			-	23	2048	32768	32768	32768	32768

-: < 截止值

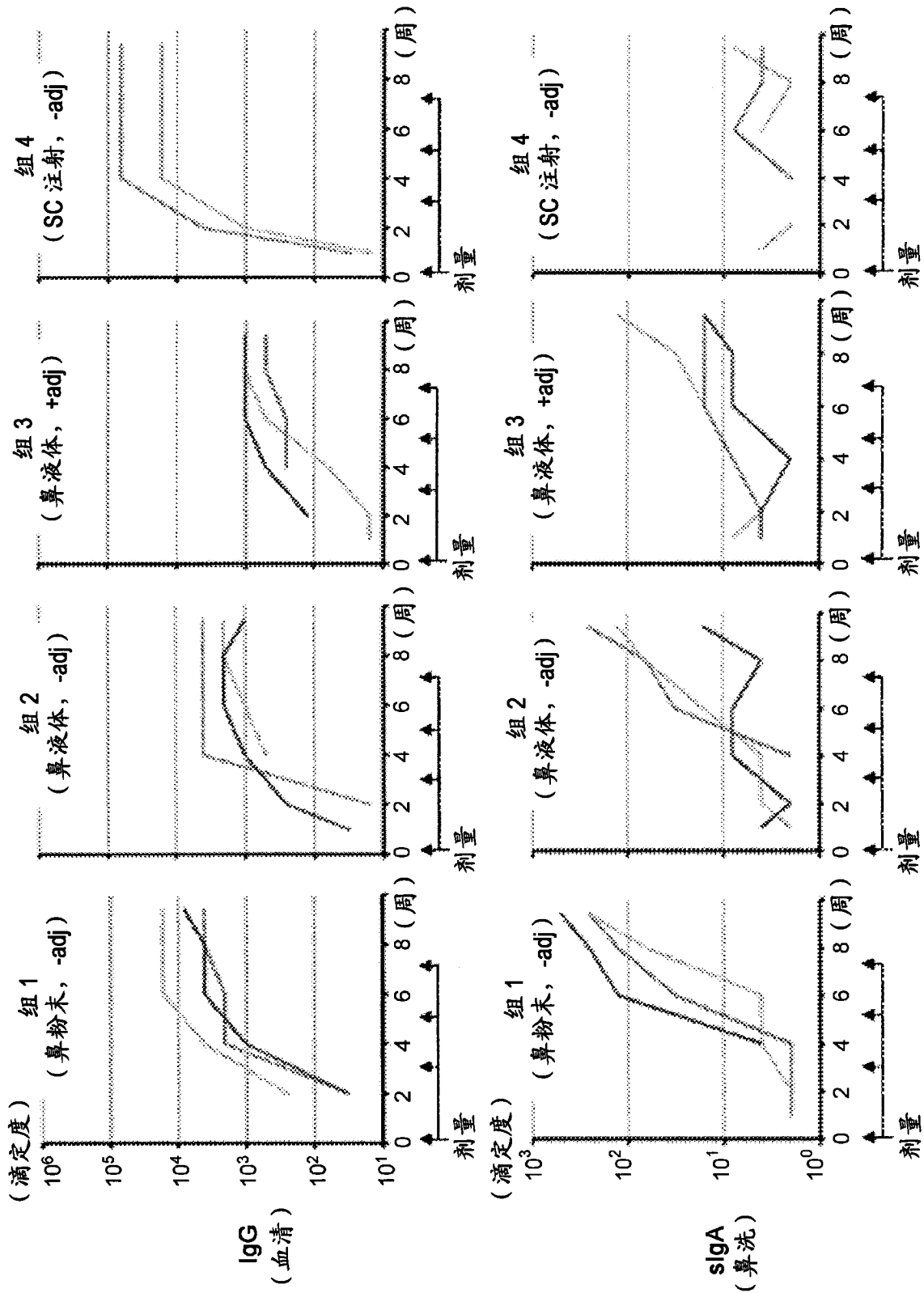
图 6A

雄性食蟹猴中抗体滴定度, H1N1 疫苗测试

组	途径	动物号	鼻洗 (右侧), sIgA						
			-7	7	14	28	42	56	66
组 1 鼻粉末, -adj 90 μg/ 鼻孔 / 次	i.n.	1	-	2	2	4	4	64	256
		2	-	2	2	32	128	256	
		3	-	4	-	4	128	256	512
				2.5	2.0	3.2	25.4	128.0	322.5
组 2 鼻液体, -adj 90 μg/ 鼻孔 / 次	i.n.	4	-	2	4	4	16	64	128
		5	-	-	-	2	32	64	256
		6	1	4	2	8	8	4	16
				2.8	2.8	4.0	16.0	25.4	80.6
组 3 鼻液体, +adj 90 μg/ 鼻孔 / 次	i.n.	7	-	8	4	8	16	32	128
		8	1	4	4	8	16	16	16
		9	-	4	4	2	8	8	16
				5.0	4.0	5.0	12.7	16.0	32.0
组 4 SC 注射, -adj 90 μg/ 次	s.c.	10	-	4	2	-	4	2	8
		11	-	-	-	2	8	4	4
				4.0	2.0	2.0	5.7	2.8	5.7

-: < 截止值

图 6B



每条线代表所表示的测试组中一只动物的测试结果

图 7

雄性食蟹猴中 HI 滴定度, H1N1 疫苗测试

组	途径	动物号	血清, HI			鼻洗 (右侧), HI		
			80	101	115	80	101	115
组 1 鼻粉末, -adj 90 μ g/ 次	i.n.	1	320	320	160	40	40	80
组 2 鼻液体, -adj 90 μ g/ 次	i.n.	6	20	20	20	10	10	10
组 3 鼻液体, +adj 90 μ g/ 次	i.n.	7	20	20	10	10	10	10
组 4 SC 注射, -adj 90 μ g/ 次	s.c.	10	160	80	40	10	10	10
		11	640	320	160	10	10	NS

NS: 无样品

图 8

雄性食蟹猴中抗体滴定度，H1N1 疫苗测试

组	途径	动物号	血清 IgG			鼻洗 (右侧), sIgA		
			80	101	115	80	101	115
组 1 鼻粉末, -adj 90 μ g/ 次	i.n.	1	16384	16384	16384	256	512	512
组 2 鼻液体, -adj 90 μ g/ 次	i.n.	6	1024	1024	1024	32	16	32
组 3 鼻液体, +adj 90 μ g/ 次	i.n.	7	512	512	256	64	64	64
组 4 SC 注射, -adj 90 μ g/ 次	s.c.	10	8192	4096	2048	8	4	2
		11	32768	16384	8192	4	2	NS

NS: 无样品

抗体滴定度 (样品的最大稀释倍显示比切断值更高的吸光率)

图 9

测试动物：食蟹猴（与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答）




	测试制品	施用途径	剂量 (HA 蛋白)	施用 时间表	收集的 样品	取样时间表
组 1 (n=5)	 鼻流感粉末 (H5N1)	鼻内	30 μ g/次 (15 μ g/鼻孔)	第 0、14、 28 和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 IgA)	第-7、-1、13、 20、27、34、41、 48、55、62、 和 69 天
组 2 (n=5)	 鼻流感喷雾 (H5N1)	鼻内	30 μ g/次 (15 μ g/鼻孔)	第 0、14、 28 和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 IgA)	第-7、-1、13、 20、27、34、41、 48、55、62、 和 69 天
组 3 (n=3)	 IM 流感疫苗 溶液 (H5N1)	IM 注射	30 μ g/次	第 0、14、 28 和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 IgA)	第-7、-1、13、 20、27、34、41、 48、55、62、 和 69 天

图 10

雄性食蟹猴中抗体滴定度, H5N1 疫苗测试

组	途径	动物号	血清 IgG					
			-	1	13	27	41	55
组 1 鼻粉末 30 μ g 抗原 (15 μ g/ 鼻孔 / 次)	i.n. 每个 鼻孔	1	-	-	-	32	64	32
		2	-	-	-	-	16	32
		3	-	-	-	32	128	128
		4	-	-	32	128	256	512
		5	-	-	64	256	512	512
					45	76	111	128
组 2 鼻液体 30 μ g 抗原 (15 μ g/ 鼻孔 / 次)	i.n. 每个 鼻孔	6	-	-	-	64	64	64
		7	-	-	-	-	-	-
		8	-	-	-	-	32	32
		9	-	-	-	16	32	32
		10	-	-	16	32	64	64
					16	32	45	45
组 3 IM 注射 30 μ g 抗原 (30 μ g/ 机体 / 次)	I.M.	11	-	256	2048	2048	8192	8192
		12	-	512	2048	2048	4096	4096
		13	-	512	2048	2048	8192	16384
					2048	2048	6502	8192

-: < 截止值

IM 注射在第 27 和 41 天的血清 IgG 滴定度大于 2048

图 11A

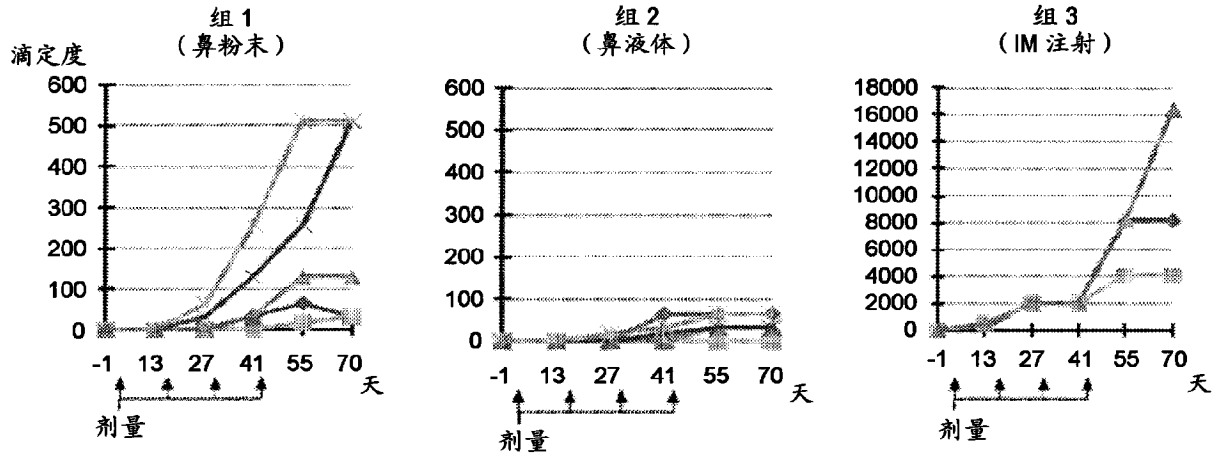
雄性食蟹猴中抗体滴定度，H5N1 疫苗测试

组	途径	动物号	鼻洗 (右侧), sIgA					
			1	13	27	41	55	70
组 1 鼻粉末 30 μ g 抗原 (15 μ g/ 鼻孔 / 次)	i.n. 每个 鼻孔	1	-	-	-	2	16	16
		2	-	-	-	-	2	2
		3	-	-	2	2	8	16
		4	-	-	-	4	16	16
		5	-	2	4	4	32	32
			-	2	3	3	11	12
组 2 鼻液体 30 μ g 抗原 (15 μ g/ 鼻孔 / 次)	i.n. 每个 鼻孔	6	-	-	-	-	-	-
		7	-	4	-	-	-	-
		8	-	-	-	-	2	-
		9	-	-	2	-	-	4
		10	-	-	-	-	2	2
			-	4	2	-	2	3
组 3 IM 注射 30 μ g 抗原 (30 μ g/ 机体 / 次)	I.M.	11	-	-	-	2	2	-
		12	-	-	-	-	-	-
		13	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	2	2	-

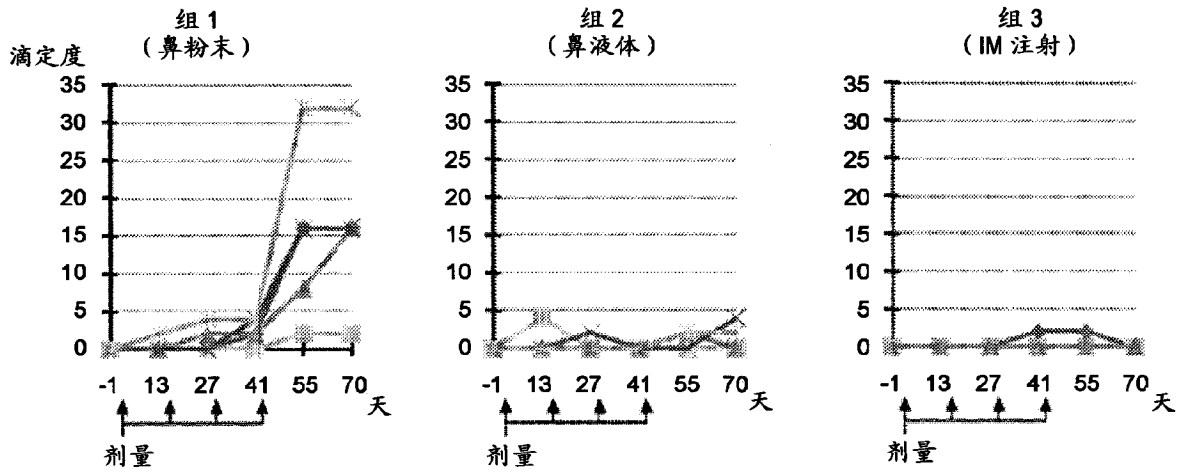
-: < 截止值

图 11B

IgG (血清)



slgA (鼻洗)



每条线代表所表示的测试组中一只动物的测试结果

图 12

测试动物：食蟹猴（与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答）



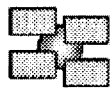

测试制品	施用途径	总蛋白	施用时间表	收集的样品	取样时间表
 组 1 (n=1) 鼻粉末 (破伤风疫苗)	鼻内	5Lf/ 次 (2.5Lf/ 鼻孔)	第 0、14、 和 21 天	血清 (对于 IgG)	第 -1、13、 20、27、 和 34 天
 组 2 (n=1) 鼻粉末 (破伤风疫苗)	鼻内	10Lf/ 次 (2.5Lf/ 鼻孔 × 2)	第 0、14、 和 21 天	血清 (对于 IgG)	第 -1、13、 20、27、 和 34 天
 组 3 (n=1) 鼻粉末 (破伤风疫苗)	鼻内	20Lf/ 次 (2.5Lf/ 鼻孔 × 4)	第 0、14、 和 21 天	血清 (对于 IgG)	第 -1、13、 20、27、 和 34 天
 组 4 (n=1) 注射液体 (破伤风疫苗)	SC 注射	10Lf/ 次	第 0、14、 和 21 天	血清 (对于 IgG)	第 -1、13、 20、27、 和 34 天

图 13

雄性食蟹猴中血清 IgG 的吸光度比值
破伤风类毒素疫苗测试 (TTx)

动物号	制剂	TTx	血清 IgG 的吸光度比值				
			基础*	13	20	27	34
1	鼻粉末	5Lf	1.00	0.87	1.07	1.00	0.94
2	鼻粉末	10Lf	1.00	0.99	0.96	0.96	0.88
3	鼻粉末	20Lf	1.00	1.29	1.08	4.33	7.88
4	注射液体	10Lf	1.00	14.12	56.23	53.58	59.33

*将基础值 (第 -6 和 -1 天的平均值) 调至 1.00。

图 14A

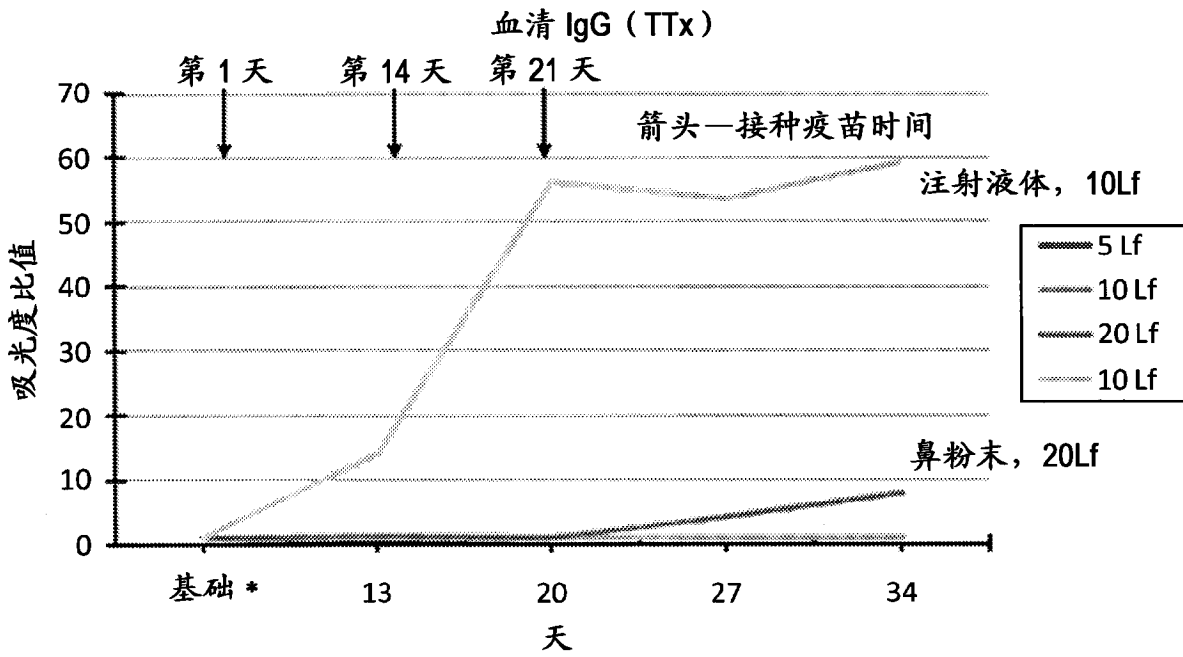
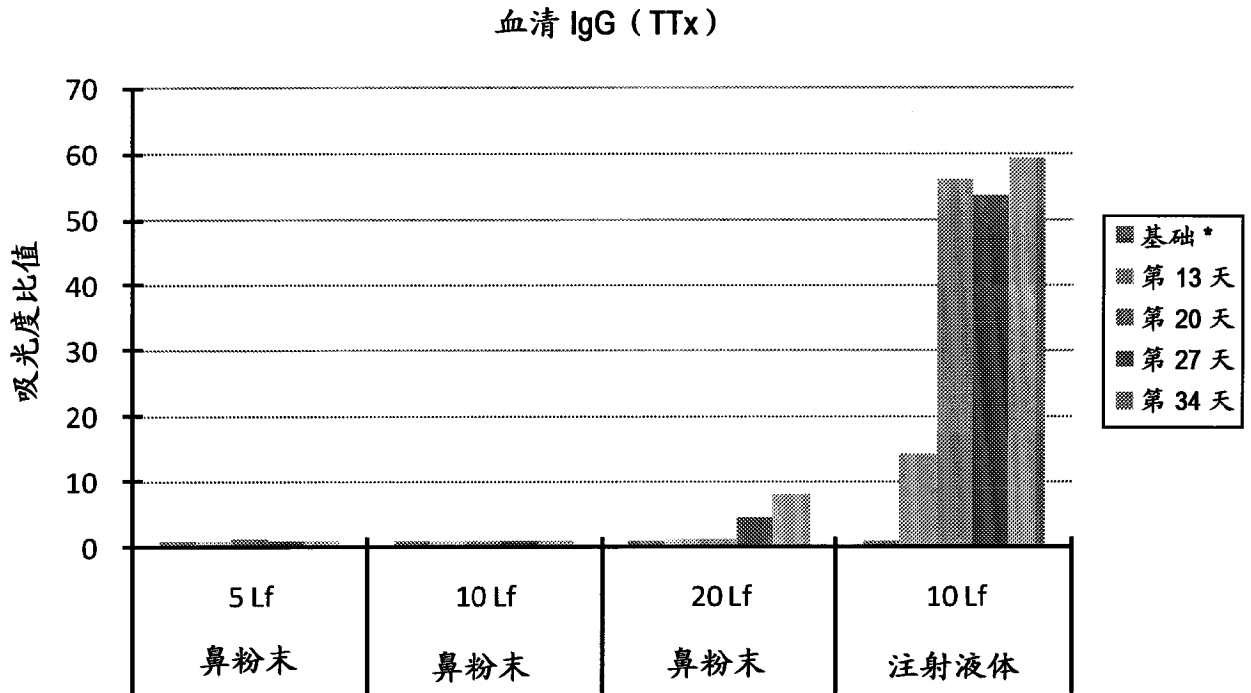


图 14B

雄性食蟹猴中 TTx- 特异性 IFN γ 点 - 形成细胞数
破伤风类毒素疫苗测试 (TTx)

血清中 TTx- 特异性 IFN γ 点 - 形成细胞数						
动物号	制剂	TTx	天数			
			1	13	20	27
1	鼻粉末	5 Lf	-	-	-	±
2	鼻粉末	10 Lf	-	-	-	±
3	鼻粉末	20 Lf	-	-	±	++
4	注射液体	10 Lf	-	++	+	+

阳性信号水平评价为：-、±、+、或++。

图 15

测试动物：食蟹猴（与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答）




	测试 制品	施用 途径	总蛋白	施用 时间表	收集的 样品	取样 时间表
组 1 (n=1)	 鼻粉末 (白喉疫苗)	鼻内	2.5 Lf/ 次 (1.25 Lf/ 鼻孔)	第 0、14、 和 21 天	血清 (对于 IgG)	第 -1、13、 20、27、 和 34 天
组 2 (n=1)	 液体注射 (白喉疫苗)	SC 注射	5 Lf/ 次	第 0、14、 和 21 天	血清 (对于 IgG)	第 -1、13、 20、27、 和 34 天
组 3 (n=1)	 重组粉末 (白喉疫苗)	SC 注射	5 Lf/ 次	第 0、14、 和 21 天	血清 (对于 IgG)	第 -1、13、 20、27、 和 34 天

图 16

雄性食蟹猴中血清 IgG 的吸光度比值
白喉疫苗测试 (DTx)

血清 IgG 的吸光度比值							
动物号	制剂	DTx	天数				
			基础 *	13	20	27	34
1	鼻粉末	2.5Lf	1.00	2.72	3.88	4.54	4.54
2	注射液体	5.0Lf	1.00	0.96	1.32	1.89	2.85
3	重组粉末 #	5.0Lf	1.00	1.11	2.24	5.44	7.45

* 将基础值 (第 -6 和 -1 天的平均值) 调至 1.00。

重组粉末。冷冻干燥条件与鼻粉末相同。

图 17A

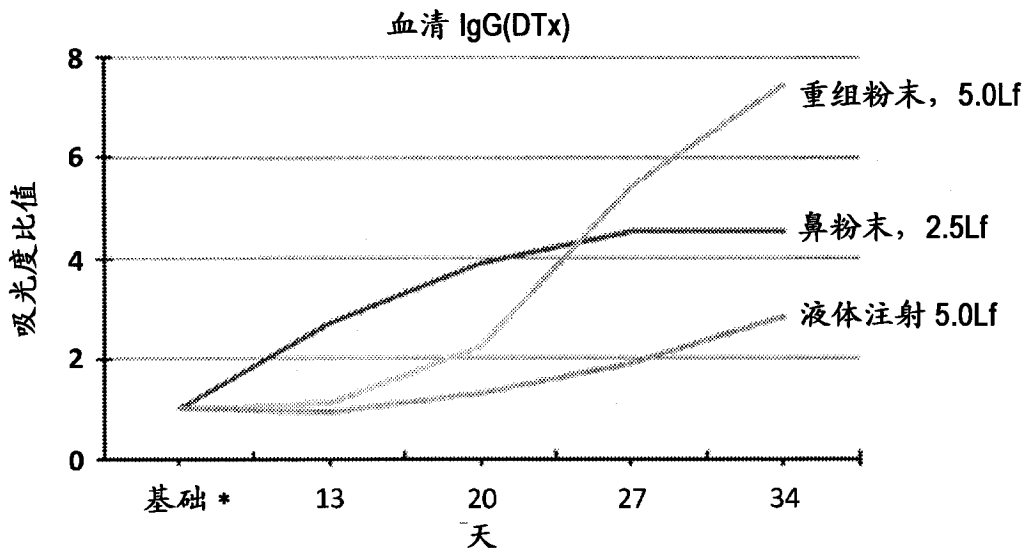
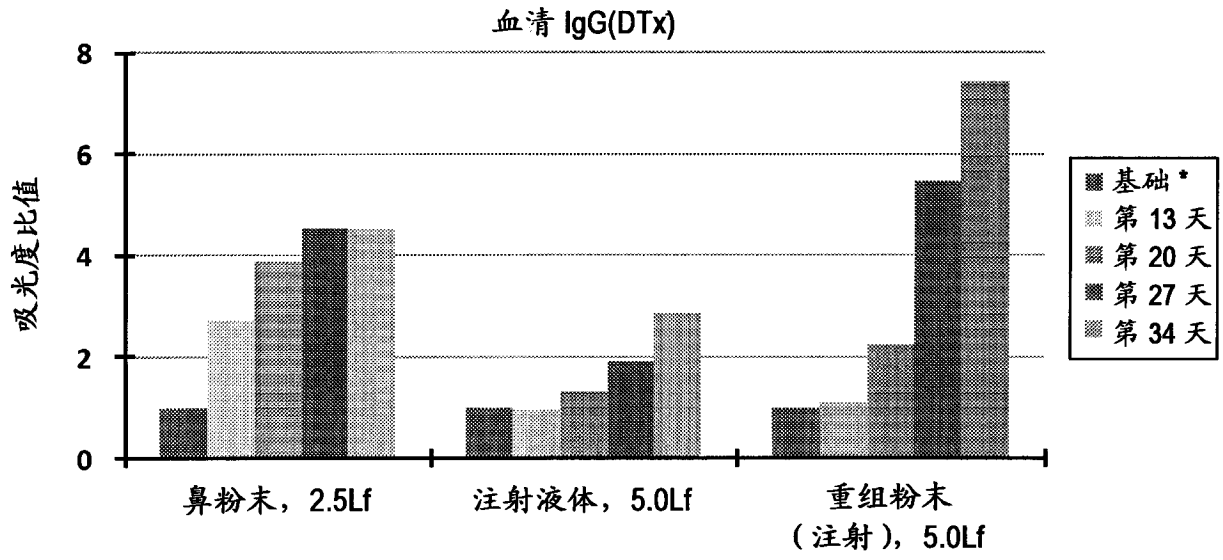


图 17B

测试动物：食蟹猴（与人类相似的鼻腔解剖学和相似的免疫应答）



测试制品	施用途径	总蛋白	施用时间表	收集的样品	取样时间表
组 1 (n=1)  鼻粉末 (hOVA)	鼻内	2 mg/ 次 (1 mg/ 鼻孔)	第 0、14、 28、和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 sIgA)	第 -7、-1、 13、27、41、 和 55 天
组 2 (n=1)  鼻粉末 (hOVA)	鼻内	10 mg/ 次 (5 mg/ 鼻孔)	第 0、14、 28、和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 sIgA)	第 -7、-1、 13、27、41、 和 55 天
组 3 (n=1)  鼻粉末 (hOVA)	鼻内	30 mg/ 次 (15 mg/ 鼻孔)	第 0、14、 28、和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 sIgA)	第 -7、-1、 13、27、41、 和 55 天
组 4 (n=1)  鼻液体 (hOVA)	鼻内	20 mg/ 次 (10 mg/ 孔)	第 0、14、 28、和 42 天	血清 (对于 sIgA) 鼻洗 (对于 IgG)	第 -7、-1、 13、27、41、 和 55 天
组 5 (n=1)  鼻液体 (hOVA)	鼻内	30 mg/ 次 (15 mg/ 鼻孔)	第 0、14、 28、和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 sIgA)	第 -7、-1、 13、27、41、 和 55 天
组 6 (n=1)  注射液体 (hOVA)	SC 注射	20 mg/ 次	第 0、14、 28、和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 sIgA)	第 -7、-1、 13、27、41、 和 55 天
组 7 (n=1)  注射液体 (hOVA)	SC 注射	30 mg/ 次	第 0、14、 28、和 42 天	血清 (对于 IgG) 鼻洗 (对于 sIgA)	第 -7、-1、 13、27、41、 和 55 天

图 18

雌性食蟹猴中血清 IgG 抗体滴定度
同质化卵清蛋白 (hOVA)

血清 IgG 滴定度							
动物号	制剂	hOVA	天数				
			0	14	28	42	56
1	鼻, 粉末	2 mg	-	N.D.	80	320	320
2	鼻, 粉末	10 mg	-	640	10240	10240	10240
3	鼻, 粉末	30 mg	-	2560	10240	10240	10240
4	鼻, 液体	20 mg	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	鼻, 液体	30 mg	-	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	注射, 液体	20 mg	-	160	2560	10240	10240
7	注射, 液体	30 mg	-	320	5120	10240	10240

抗体滴定度 (样品的最大稀释倍显示比切断值更高的吸光率)

图 19A

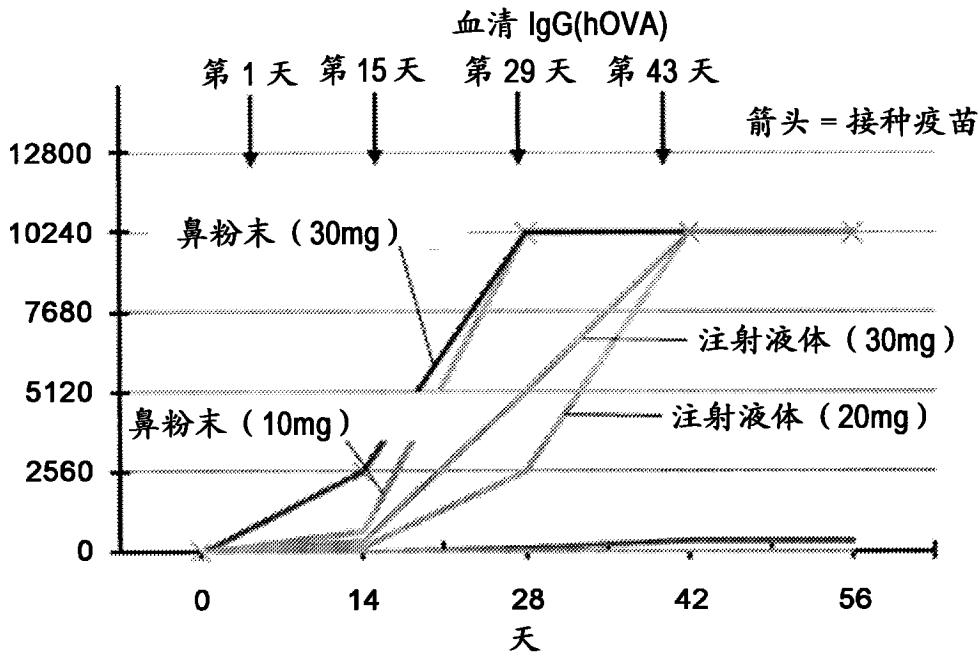
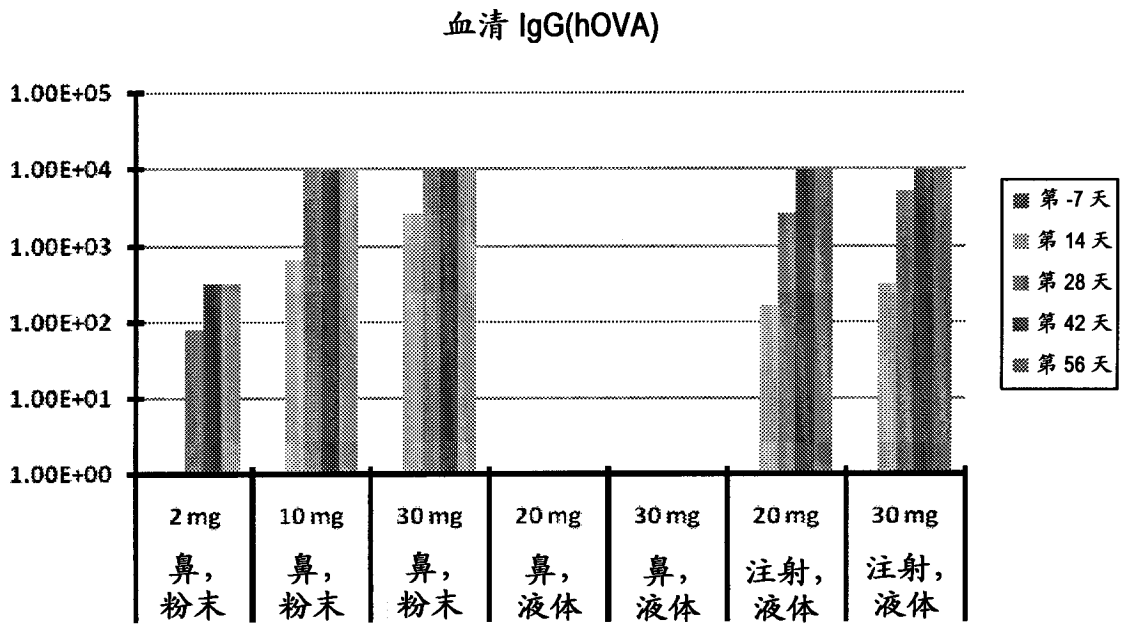


图 19B

(A) 雌性食蟹猴中鼻洗 sIgA 抗体滴定度
同质化卵清蛋白 (hOVA)

左侧鼻洗 sIgA 滴定度							
动物号	制剂	hOVA	天数				
			0	14	28	42	56
1	鼻, 粉末	2 mg	-	-	-	-	4
2	鼻, 粉末	10 mg	-	-	32	64	32
3	鼻, 粉末	30 mg	-	8	16	16	16
4	鼻, 液体	20 mg	-	-	-	-	-
5	鼻, 液体	30 mg	-	-	-	-	-
6	注射, 液体	20 mg	-	-	-	-	-
7	注射, 液体	30 mg	-	-	-	-	-

抗体滴定度 (样品的最大稀释倍显示比切断值更高的吸光率)

图 20A

左侧鼻洗 sIgA (hOVA)

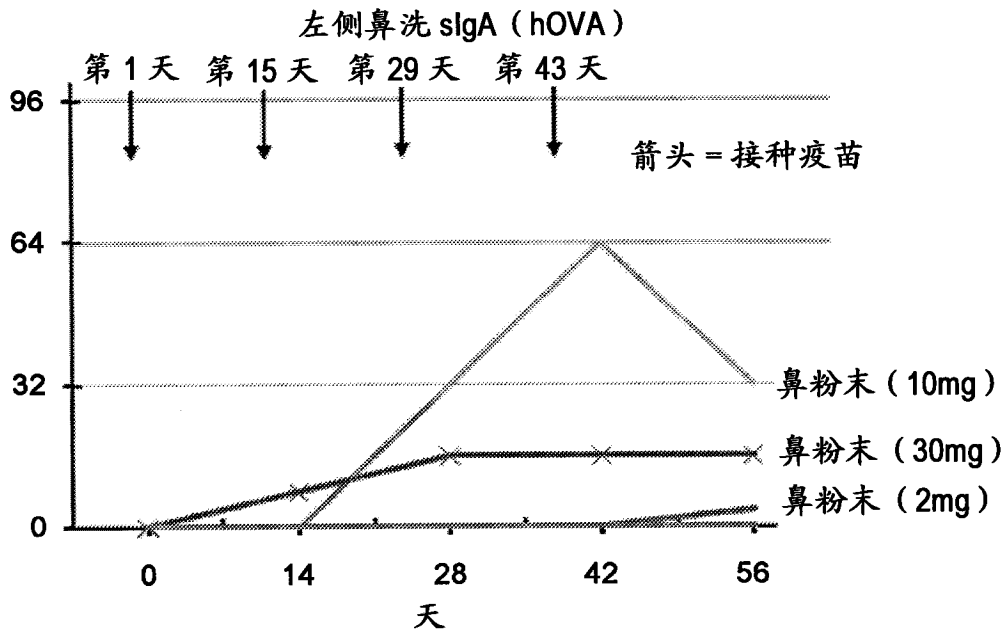
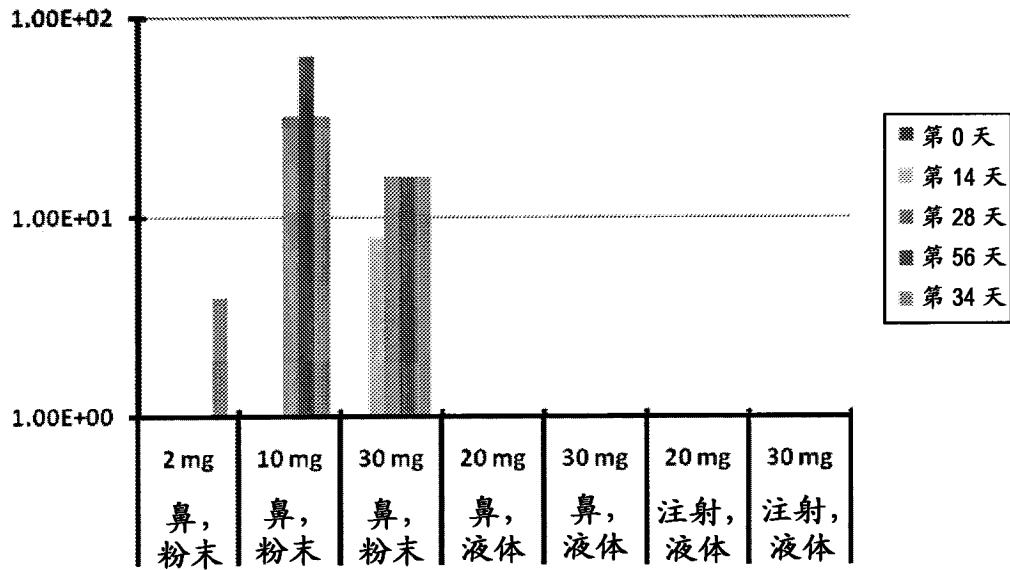


图 20B