



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102470170 B

(45) 授权公告日 2015.03.18

(21) 申请号 201080031261.X

(22) 申请日 2010.01.25

(30) 优先权数据

1649/CHE/2009 2009.07.13 IN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.01.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IN2010/000041 2010.01.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/007363 EN 2011.01.20

(73) 专利权人 巴拉特生物技术国际有限公司

地址 印度海得拉巴

(72) 发明人 克里什纳·莫汉·瓦德雷夫

塞尔维·维尔拉巴德兰

萨伊·德瓦拉居鲁·普拉萨德

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 39/15(2006.01)

C12N 7/00(2006.01)

(56) 对比文件

WO 2007/132480 A2, 2007.11.22, 权利要求
1-43 和实施例 1.

US 6210683 B1, 2001.04.03, 说明书第 8 栏
第 4 段和第 15 栏第 3 段至第 16 栏第 6 段及附图
图 1A 和 1B.

EP 0947581 A1, 1999.10.06, 权利要求
1-13.

审查员 曹丙洲

权利要求书1页 说明书28页 附图23页

(54) 发明名称

用作轮状病毒疫苗的组合物及其方法

(57) 摘要

公开了涉及诸如轮状病毒的活的或活的减毒的预处理的病毒和典型的病毒的组合物和方法。减毒的活轮状病毒显示更好的稳定性特性且可用于预防儿童的轮状病毒感染和 / 或轮状病毒胃肠炎。

1. 一种组合物,所述组合物包括:

(a) 病毒抗原即预处理的减毒的活轮状病毒 116E,其中所述减毒的活轮状病毒 116E 感染在存在人血清白蛋白的情况下繁殖的 Vero 细胞,并且所述减毒的活轮状病毒 116E 是在存在 0.1% 人血清白蛋白的情况下繁殖的,且与在不存在人血清白蛋白的情况下繁殖的典型的减毒的活轮状病毒 116E 相比,在环境条件下储存时所述预处理的减毒的活轮状病毒 116E 能够显示出最小 0.8log/ml 到最大 1.1log/ml 的滴度增加;

(b) 药学上可接受的生理 pH 的缓冲剂,其选自 304mM 碳酸氢盐、0.1mM 到 1000mMHEPES 缓冲液;

(c) 非病毒蛋白,其为 0.05% 到 50% w/v 范围内的大豆蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,所述组合物是液体组合物或冻干组合物。

3. 根据权利要求 1 所述的组合物,所述组合物在 37°C 下稳定 6 周且在 2-8°C 下稳定 24 个月。

4. 一种用于生产权利要求 1 中的组合物的方法,所述方法包括:

(i) 用减毒的活轮状病毒感染宿主细胞;

(ii) 使受感染的细胞在能够支持所述细胞生长的 Vero 细胞培养基中生长,其中所述培养基用人血清白蛋白来补充;收获能够显示更好的稳定性的所述轮状病毒。

用作轮状病毒疫苗的组合物及其方法

发明领域

[0001] 本发明涉及含有能够显示更高的滴度值、改善的稳定性特性的轮状病毒的疫苗制剂。该制剂可以以液体或冻干形式存在并显示增加的储存期限同时保持其治疗效果。本发明还涉及生产这类病毒的方法和制备这类制剂的方法。本发明还涉及使用它们的预防方法和治疗方法。

[0002] 发明背景

[0003] 目前有许多的人用抗病毒疫苗在使用着。这些人用抗病毒疫苗包括甲型肝炎病毒疫苗、乙型肝炎病毒疫苗、流感病毒疫苗、日本乙型脑炎病毒疫苗、麻疹疫苗、腮腺炎疫苗、风疹 (MMR) 病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒疫苗、狂犬病毒疫苗、天花疫苗、水痘 - 带状疱疹疫苗、黄热病毒疫苗。除了数目不断增加的疫苗产品之外,有关于给定疫苗的不同组合物或制剂在使用着或正在被开发。活病毒疫苗的成功使用不仅依赖于该病毒的正确选择和递送,而且还依赖于保持免疫应答所需要的足够的滴度或效力。活病毒的固有的不稳定性在制造、储存和施用期间稳定和保持疫苗生存力方面呈现特别的制剂难题。有许多用于轮状病毒疫苗的制剂在本领域是已知的,但遇到关于储存期间的稳定性的或这或那的问题。

[0004] 轮状病毒是呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 中的一个双链 RNA 病毒属且通过粪 - 口途径传播。它感染小肠内侧的细胞并产生肠毒素,这引起胃肠炎,导致严重的腹泻且有时导致通过脱水的死亡。轮状病毒感染是在婴儿和幼儿中与腹泻相关的死亡的最大原因。每一年,轮状病毒胃肠炎导致全世界 310,000-590,000 的婴儿和幼儿死亡。

[0005] 目前开发的所有轮状病毒疫苗是基于已从人或动物中分离并体外重配、适应 (adapted to) 于细胞培养物、并随后配制用于口服递送的活轮状病毒毒株。单价和多价的基于动物的毒株两者已被证实作为候选疫苗的有效性。

[0006] 人轮状病毒毒株 116E (一种天然的人 - 牛重配株并天然减毒) 是一种人 G9 毒株,与 P[11] 基因区段同源的单个牛 VP4 基因 (VP = 病毒蛋白) 被天然地引入到其中。I321 毒株,也被命名为 G10P[11],主要由牛基因组成且只具有两个人源的基因区段 VP5 和 VP7。这两个轮状病毒疫苗毒株已在印度单独地作为单价的口服轮状病毒疫苗液体制剂的试制批制备用于将要进行的临床试验。

[0007] Bharat Biotech International Ltd. (BBIL) 根据与美国 Bethesda 的国立卫生研究院 (NIH) 的国立变态反应与感染性疾病研究所 (NIAID) 的材料转让协议,从 NIH 获得了人轮状病毒毒株 116E 和 I321。初始的 116E (G9[P11]) 和 I321 (G10P[11]) 通过在原代非洲绿猴肾 (AGMK) 细胞中的传代,然后在 MA104 细胞基底 (cell substrate) 中传代以及随后在连续传代的 AGMK (SPAGMK) 中传代而适应在细胞培养物中生长。MA104 和 SPAGMK 细胞基底未被国家管理局 (NRA) 批准用于商品化疫苗生产。因此,优选使 116E 和 I321 及其它轮状病毒疫苗毒株适应被批准的、有证明书的、有许可证的且完全表征的细胞基底如 Vero 细胞基底和 / 或人二倍体细胞如 MRC-5。

[0008] 申请人已知的现有技术包括 WO 02/11540A1,其描述了轮状病毒疫苗制剂,该轮状病毒疫苗制剂包括适于口服施用轮状病毒疫苗的缓冲剂。WO02/11540A1 中公开的制剂

还包括针对效力损失稳定疫苗组合物的化合物。更具体地, WO 02/11540 中公开的组合物需要糖、磷酸盐和至少一种羧酸盐, 至少一种人血清白蛋白或选自谷氨酸、谷氨酰胺和精氨酸的氨基酸。然而, 所获得的稳定性变化很大, 特别是在 20°C 以上的温度下似乎显示 WO 02/11540A1 的制剂在效力上的大量损失。

[0009] WO 99/62500(‘500)、WO 2005/058356(‘356)A2 和 WO 2001/012797(‘197) 公开了使用疫苗稳定剂用于制备疫苗制剂和冻干疫苗、储存稳定的病毒组合物, 分离轮状病毒变体和减毒的活轮状病毒液体疫苗的方法。‘500 公开了利用由水解明胶、山梨醇、磷酸盐、氯化钠、蔗糖、碳酸氢盐、葡萄糖、人血清白蛋白和柠檬酸盐组成的稳定剂制备的麻疹-腮腺炎-风疹冻干疫苗。该发明指望在 6.0 和 7.0 之间的 pH 下的增加量的二糖和多元醇的双重存在用于热稳定性。尽管需要许多成分使得该发明成本昂贵, 却不能在环境温度下获得稳定性。这进而增加对用于储存疫苗的特殊的基础设施的需求, 使得该发明成本更高。然而, 这些制剂的大部分提供有限的储存稳定性并因此不是商业上可行的。

[0010] PCT/IN07/00190 题目为“A Composition Useful as a Vaccine(用作疫苗的组合物)”公开了稳定的疫苗。该发明的本质是以第一蛋白即人血清白蛋白、至少部分水解的第二蛋白和三种不同的糖的组合的联合作用为中心。另外, 该发明还依赖于在病毒的适应期间在培养基中包含胰蛋白酶。所要求保护的疫苗在 37°C 下稳定 3 周、在 25°C 下稳定六个月、且在 2°C -8°C 下稳定一年。

[0011] 从前述描述中很明显: 尽管在疫苗制剂领域中的这些进步, 仍留有对具有改善的热稳定性和储存期限的商业上可行的活病毒疫苗的明确的需求。

[0012] 本发明通过提供无论是以来自同一批的病毒的三次单次收获的合并的原液(bulk)的形式、还是以液体或冻干制剂的形式, 都显示出更好的和改善的稳定性特性的活病毒或减毒的活病毒实现了此需求。本文中病毒(例如, 轮状病毒或轮状病毒疫苗)相关的稳定性应指在从培养细胞收获的时间开始经过原液阶段到所配制的疫苗的给定时间点处的病毒滴度。发明人在长时期的研究后开发了用作疫苗的本发明的组合物, 该组合物显示原液和制剂特别是在环境温度下的增强的稳定性。

[0013] 从统计学上显著方面来说, 改善的稳定性可以通过使用在细胞培养中的病毒生长和繁殖阶段期间已与人血清白蛋白接触或暴露于人血清白蛋白的病毒来获得。为了本发明的目的, 当病毒感染的宿主细胞在用人血清白蛋白补充的细胞培养基/生长培养基中繁殖时, 认为病毒与人血清白蛋白接触或暴露于人血清白蛋白。已经这样暴露于人血清白蛋白的病毒或病毒群体被称为“预处理的”病毒。尚未这样暴露于人血清白蛋白的病毒在本文被称为“典型的病毒”。预处理的病毒无论是在原液阶段还是以制剂即疫苗/配制的疫苗的形式, 都显示比典型的病毒更好的稳定性(从统计学上显著方面来说)。

[0014] 本发明还公开了病毒(无论是预处理的病毒还是典型的病毒)在制剂中的稳定性还可以进一步改善或至少被保持, 即稳定性可以通过实施系统(i)和系统(ii)在储存期间被保持或在最低限度上延迟逐渐达到无稳定性或零稳定性: 根据系统(i), 为了实现改善的或持久的稳定性, 用非病毒蛋白或其蛋白水解物或者植物蛋白或诸如人血清白蛋白的类似蛋白配制病毒。水解物可被示例但不限于乳白蛋白水解物、酵母水解物、蛋白胨、明胶水解物和卵蛋白水解物。植物蛋白包括但不限于谷物蛋白(corn protein)、小麦蛋白、鹰嘴豆蛋白(garbanzo bean protein)、四季豆蛋白(kidney bean protein)、扁豆蛋白(lentil

protein)、利马豆蛋白 (lima bean protein)、白豆蛋白 (navy bean protein)、大豆蛋白 (soybean protein)、裂荚豌豆蛋白 (split pea protein)。人血清白蛋白是天然来源或重组来源的。仅仅通过用非病毒蛋白或其蛋白水解物补充用于制造疫苗的制剂,用非病毒蛋白或其蛋白水解物配制病毒。应理解,此系统 (i) 意指单组分系统。根据系统 (ii),通过用蛋白或蛋白水解物和 1-2 种二糖补充用于制造疫苗的制剂,病毒与如在单组分系统中的非病毒蛋白或其蛋白水解物、以及 1-2 种二糖接触。应理解,依据含有病毒的制剂是用单种二糖 (两组分系统) 还是用两种不同的二糖的组合 (三组分系统) 来补充,此系统 (ii) 意指两组分系统或三组分系统。通过实施系统 (ii),单组分系统中所观察到的稳定性水平被进一步改善。

[0015] 因此,在一个通常的方面,本发明公开了显示改善的和 / 或持久的稳定性的含有预处理的病毒或典型的病毒的组合物。

[0016] 本发明的新颖性在于在繁殖病毒时用人血清白蛋白补充培养基以获得即使没有补充稳定剂也具有增加的滴度值、储存期限和热稳定性的病毒抗原和疫苗制剂。储存期限可以通过添加如本文之前所公开的稳定剂来进一步增加。这导致采用简单的有成本效益的商业上可行的方法的治疗上更好的疫苗。除了技术进步之外,本发明还符合具有经济意义的决定性考验的要求。

[0017] 发明目的

[0018] 本发明的主要目的是提供消除了有关现有技术的缺陷的、具有增加的储存期限的用作轮状病毒疫苗的组合物。

[0019] 另一个目的是提供能够在环境温度下显示更高的滴度值、改善的稳定性特性的含有减毒的活轮状病毒的疫苗制剂。

[0020] 该制剂可以是液体或冻干形式并显示增加的储存期限同时保持其治疗效果 / 效力。

[0021] 本发明还涉及生产这类病毒的方法和制备这类制剂的方法。

[0022] 本发明还涉及用于向患有这类感染的受治疗者施用疫苗制剂来控制轮状病毒感染的预防方法和治疗方法。

[0023] 附图简述

[0024] 图中提到的病毒滴度对应于每 0.5ml 轮状病毒 116E 收获物或半成品 (final bulk) 和配制的疫苗的病灶形成单位 (Focus-Forming Unit, FFU)。在本文的各个图中,提及生物过程 1 表示所使用的起始材料是典型的病毒而提及生物过程 2 表示所使用的起始材料是预处理的病毒。除非另外说明,图中的数据表示预处理的病毒的稳定性。图 1-12H 显示液体制剂的数据 (Liq = 液体),而图 13A-17C 显示冻干制剂的数据 (Lyo = 冻干的)。以百分比表示的数字表示按制剂 (组合物) 重量计的值。例如,80%蔗糖应理解为意指按制剂重量计的 80%蔗糖 (w/v)。所有时间点的标准误差在 ± 0.40 到 ± 0.45 的范围内。

[0025] 图 1 显示在五次实验中从生物过程 1 (典型的病毒) 的收获物和生物过程 2 (预处理的病毒) 的收获物获得的平均滴度。

[0026] 图 2 显示病毒收获物,即典型的病毒 (生物过程 1) 和预处理的病毒 (生物过程 2),各自在不存在 (图 2A) 或存在 (图 2B) 稳定剂即 5% LAH、80%蔗糖和 0.5%海藻糖时在液体制剂中在 37°C 下的稳定性数据。

[0027] 图 3(Liq) 显示四种不同制剂中的预处理的病毒在 2-8℃ (3A)、25℃ (3B) 和 37℃ (3C) 下的稳定性数据。在每种情况下:系列 1 是指含有 2.5%乳白蛋白水解物的制剂;系列 2 是指含有 10%乳白蛋白水解物和 0.5%海藻糖的制剂;系列 3 是指含有 20%乳白蛋白水解物的制剂;且系列 4 是指含有 2.5%乳白蛋白水解物、0.5%淀粉和 0.5%海藻糖的组合的制剂。

[0028] 图 4(Liq) 显示含有和不含 5%乳白蛋白水解物+80%蔗糖+0.5%海藻糖的制剂中的轮状病毒在 2-8℃ (4A)、25℃ (4B) 和 37℃ (4C) 下保存时的稳定性数据。

[0029] 图 5(Liq) 显示四种不同制剂中的轮状病毒在 2-8℃ (5A)、25℃ (5B) 和 37℃ (5C) 下的稳定性数据。在每种情况下:系列 1 是指含有 20%乳白蛋白水解物和 0.5%海藻糖的组合的制剂;系列 2 是指含有 10%乳白蛋白水解物、1.0%乳糖的组合的制剂;系列 3 是指含有 5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖的组合的制剂;且系列 4 是指含有 10%乳白蛋白水解物和 50%麦芽糖的组合的制剂。

[0030] 图 6(Liq) 显示四种不同的制剂中的轮状病毒在 2-8℃ (6A)、25℃ (6B) 和 37℃ (6C) 下的稳定性数据。在每种情况下:系列 1 是指含有 0.5%乳白蛋白水解物、10%大豆蛋白和 1.0%海藻糖的组合的制剂;系列 2 是指含有 0.5%乳白蛋白水解物、10%大豆蛋白和 1.0%乳糖的组合的制剂;系列 3 是指含有 5%乳白蛋白水解物、2.5%大豆蛋白和 80%蔗糖的组合的制剂;且系列 4 是指含有 5%乳白蛋白水解物、2.5%大豆蛋白和 50%麦芽糖的组合的制剂。

[0031] 图 7(Liq) 显示四种不同的制剂中的轮状病毒在 2-8℃ (7A)、25℃ (7B) 和 37℃ (7C) 下的高的稳定性数据。在每种情况下:系列 1 是指含有 10%乳白蛋白水解物、10%蔗糖和 1.0%海藻糖的组合的制剂;系列 2 是指含有 10%乳白蛋白水解物、5%麦芽糖和 1.0%海藻糖的组合的制剂;系列 3 是指含有 2.5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 1%海藻糖的组合的制剂;且系列 4 是指含有 2.5%乳白蛋白水解物、50%麦芽糖和 1%海藻糖的组合的制剂。

[0032] 图 8(Liq) 显示四种不同的制剂中的轮状病毒在 2-8℃ (8A)、25℃ (8B) 和 37℃ (8C) 下的稳定性数据。在每种情况下:系列 1 是指含有典型的病毒、5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组合的制剂;系列 2 是指含有预处理的病毒、5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组合的制剂;系列 3 是指含有典型的病毒、0.1%重组人血清白蛋白 (rHSA) 和 80%蔗糖、以及 0.5%海藻糖的组合的制剂;系列 4 是指具有预处理的病毒、0.1% rHSA、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组合的制剂;系列 5 是指含有典型的病毒、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组合的制剂;且系列 6 是指含有预处理的病毒、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组合的制剂。

[0033] 图 9(Liq) 显示五种不同的制剂中的轮状病毒在 37℃ 下的稳定性数据。

[0034] 图 10(Liq) 显示五种不同的制剂中的低滴度轮状病毒在 2-8℃ (10A) 和 37℃ (10B) 下的稳定性。

[0035] 图 11A(Liq) 显示含有 20%水解蛋白胨的预处理的轮状病毒制剂在 2-8℃、25℃ 和 37℃ 下的稳定性数据。

[0036] 图 11B(Liq) 显示含有 20%水解蛋白胨、1%海藻糖和 0.02%岩藻糖的组合的预处理的轮状病毒制剂在 2-8℃、25℃ 和 37℃ 下的稳定性数据。

[0037] 图 11C(Liq) 显示含有 20% 卵蛋白水解物的预处理的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0038] 图 11D(Liq) 显示含有 20% 卵蛋白水解物、0.5% 海藻糖、1% D- 山梨糖醇和 0.5% 甘露糖的组的预处理的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0039] 图 11E(Liq) 显示含有 20% 乳白蛋白水解物的预处理的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0040] 图 11F(Liq) 显示含有 20% 乳白蛋白水解物、0.5% 海藻糖的组的预处理的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0041] 图 11G(Liq) 显示含有 20% 酵母水解物的预处理的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0042] 图 11H(Liq) 显示含有 20% 酵母水解物、5% 麦芽糖和 0.5% 乳糖的组的预处理的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0043] 图 12A(Liq) 显示含有 20% 水解蛋白胨的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0044] 图 12B(Liq) 显示含有 20% 水解蛋白胨、1% 海藻糖和 0.02% 岩藻糖的组的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0045] 图 12C(Liq) 显示含有 20% 卵蛋白水解物的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0046] 图 12D(Liq) 显示含有 20% 卵蛋白水解物、0.5% 海藻糖、1% D- 山梨糖醇和 0.5% 甘露糖的组的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0047] 图 12E(Liq) 显示含有 20% 乳白蛋白水解物的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0048] 图 12F(Liq) 显示含有 20% 乳白蛋白水解物、0.5% 海藻糖的组的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0049] 图 12G(Liq) 显示含有 20% 酵母水解物的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0050] 图 12H(Liq) 显示含有 20% 酵母水解物、5% 麦芽糖和 0.5% 乳糖的组的典型的轮状病毒制剂在 2-8°C、25°C 和 37°C 下的稳定性数据。

[0051] 图 13(Lyo) 显示四种不同的冻干制剂中的轮状病毒在 2-8°C (13A)、25°C (13B) 和 37°C (13C) 下的稳定性数据。在每种情况下：系列 1 是指含有 0.5% 人血清白蛋白和 12% 蔗糖的制剂；系列 2 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物、0.5% 海藻糖的制剂；系列 3 是指含有 0.5% 大豆蛋白和 0.5% 海藻糖的制剂；且系列 4 是指 0.25% 聚乙烯吡咯烷酮、0.5% 海藻糖。

[0052] 图 14(Lyo) 显示四种不同的冻干制剂中的轮状病毒在 2-8°C (14A)、25°C (14B) 和 37°C (14C) 下的稳定性数据。在每种情况下：系列 1 是指含有 0.5% 人血清白蛋白、12% 蔗糖和 0.1% 淀粉的制剂；系列 2 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物、0.5% 海藻糖和 0.1% 淀粉的制剂；系列 3 是指含有 0.5% 大豆蛋白、0.5% 海藻糖和 0.1% 淀粉的制剂；且系列 4 是指 0.25% 聚乙烯吡咯烷酮、0.5% 海藻糖和 0.1% 淀粉。

[0053] 图 15(Lyo) 显示四种不同的冻干制剂中的轮状病毒在 2-8°C (15A)、25°C (15B) 和

37°C (15C) 下的稳定性数据。在每种情况下：系列 1 是指含有 0.5% 人血清白蛋白、12% 蔗糖、0.1% 淀粉和 304mM 碳酸氢盐的制剂；系列 2 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物、0.5% 海藻糖、0.1% 淀粉和 304mM 碳酸氢盐的制剂；系列 3 是指含有 0.5% 大豆蛋白、0.5% 海藻糖、0.1% 淀粉和 304mM 碳酸氢盐的制剂；系列 4 是指 0.25% 聚乙烯吡咯烷酮、0.5% 海藻糖、0.1% 淀粉和 304mM 碳酸氢盐。

[0054] 图 16 (Lyo) 显示四种不同的冻干制剂中的轮状病毒在 2-8°C (16A)、25°C (16B) 和 37°C (16C) 下的稳定性数据。在每种情况下：系列 1 是指含有 0.5% 人血清白蛋白、12% 蔗糖和 0.1% 阿拉伯树胶 (gum acacia) 的制剂；系列 2 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物、0.5% 海藻糖和 0.1% 阿拉伯树胶的制剂；系列 3 是指含有 0.5% 大豆蛋白、0.5% 海藻糖和 0.1% 阿拉伯树胶的制剂；且系列 4 是指 0.25% 聚乙烯吡咯烷酮、0.5% 海藻糖和 0.1% 阿拉伯树胶。

[0055] 图 17 (Lyo) 显示四种不同的冻干制剂中的轮状病毒在 2-8°C (17A)、25°C (17B) 和 37°C (17C) 下的稳定性数据。在每种情况下：系列 1 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物、0.25% 聚乙烯吡咯烷酮的制剂；系列 2 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物和 0.1% 阿拉伯树胶的制剂；系列 3 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物和 0.1% 盐酸吡多醇 (pyridoxine HCL) 的制剂；且系列 4 是指 0.5% 乳白蛋白水解物和 0.1% 淀粉。

[0056] 发明概述

[0057] 相应地本发明提供了一种组合物，包括：

[0058] (a) 病毒抗原即减毒的活轮状病毒，以及，

[0059] (b) 药学上可接受的生理 pH 的缓冲剂，

[0060] 其中，组合物关于病毒滴度的稳定性增加，因为在存在人血清白蛋白的情况下繁殖病毒对稳定性的作用大于在不存在人血清白蛋白的情况下繁殖病毒对稳定性的作用。

[0061] 根据一个实施方案，该组合物还可包括至少一种稳定剂，该稳定剂包括非病毒蛋白或其至少部分水解的蛋白水解物或者单种二糖或 2 种二糖的组合。

[0062] 非病毒蛋白或蛋白水解物可以是例如乳白蛋白水解物、酵母水解物、明胶水解物、卵蛋白水解物、水解蛋白胨或选自谷物蛋白、小麦蛋白、鹰嘴豆蛋白、四季豆蛋白、扁豆蛋白、利马豆蛋白、白豆蛋白、大豆蛋白、裂荚豌豆蛋白的植物蛋白或由人血清白蛋白示例的类似蛋白，优选乳白蛋白水解物或水解大豆蛋白，更优选乳白蛋白水解物。

[0063] 根据另外的实施方案，所利用的二糖可以是例如海藻糖或 2 种二糖包括蔗糖和海藻糖的组合。

[0064] 因此，本发明的组合物可包括 (a) 病毒抗原即减毒的活轮状病毒、(b) 药学上可接受的生理 pH 的缓冲剂、以及 (c) 非病毒蛋白或蛋白水解物。

[0065] 本文上面所公开的组合物可包括

[0066] (i) 以 10^3 FFU/0.5ml 到 10^8 FFU/0.5ml 的范围的滴度的、如本文前面所公开的病毒抗原即减毒的活轮状病毒，

[0067] (ii) 药学上可接受的缓冲剂，其是作为稀释剂 / 载体的 pH 6.8 到 8.0 的磷酸盐 - 柠檬酸盐缓冲剂 (310mM/100mM)，

[0068] (iii) 蛋白水解物，其是在 20-30% w/v 范围的乳白蛋白水解物，以及

[0069] (iv) 为约 0.5% w/v 的海藻糖或约 80% w/v 的蔗糖的二糖和为约 0.5% w/v 的海

藻糖的另一种二糖。

[0070] 组合物包括能够显示出与在不存在人血清白蛋白的情况下繁殖的减毒的活轮状病毒相比,在环境条件下在储存时平均滴度增加最小 0.8log/ml 到最大 1.1log/ml 的减毒的活轮状病毒。

[0071] 此外,所述减毒的活轮状病毒是在存在 0.1%重组人血清白蛋白的情况下繁殖的。

[0072] 根据本发明的另一方面,还提供了一种用于生产权利要求 1 中的减毒的活轮状病毒的方法,其包括:

[0073] (i) 用减毒的活轮状病毒感染宿主细胞;

[0074] (ii) 使受感染的细胞在能够支持所述细胞生长的细胞培养基中生长,其中所述培养基用人血清白蛋白补充,以及收获能够显示更好的稳定性的所述轮状病毒。

[0075] 在本发明的一个具体方面,公开了一种具有给定的稳定性的包含活的且预处理的病毒(或病毒群体)的组合物,其中病毒的稳定性是通过在含有活的预处理的病毒的组合物或含有活的典型的病毒的组合物两者各自于收获后在 37°C 下储存四周时,与活的典型的病毒(或病毒群体)相比较来表征的,活的典型的病毒(或病毒群体)不是在存在人血清白蛋白(指定为预处理)的情况下繁殖的并且显示大于 4.5FFU/0.5ml 和 7.5FFU/0.5ml 之间的差值的 log₄ 滴度的损失。组合物在制剂中包含药学上可接受的缓冲剂,含有或不含诸如蛋白水解物、蛋白胨、植物蛋白或二糖的补充的稳定剂。在另一个具体方面,本发明公开了一种含有能够显示与活的典型的病毒相比在环境条件下在储存时平均滴度增加最小 0.8log/ml 到最大 1.1log/ml 的活的且预处理的病毒(或病毒群体)、以及药学上可接受的缓冲剂的组合物,且预处理的病毒能够在组合物中不含诸如非病毒蛋白水解物、蛋白胨、植物蛋白和二糖的任何补充的稳定剂的情况下显示滴度。

[0076] 在涉及补充的稳定剂的程度的上述方面中的每一个中,乳白蛋白水解物是最优选的补充的稳定剂。二糖(例如,海藻糖)或不同二糖(例如,蔗糖和海藻糖)的组合是含有乳白蛋白水解物的组合物中的下一个优选的稳定剂。在一个实施方案中,组合物中的乳白蛋白水解物是约 5% w/v,蔗糖是约 80% w/v 且海藻糖是约 0.5% w/v。组合物可以含有作为另外的补充的稳定剂的重组人血清白蛋白(例如,0.1% w/v)。

[0077] 在一个实施方案中,病毒是活轮状病毒,例如减毒的活轮状病毒。优选地,活病毒是人活病毒,例如人轮状病毒。在一个特别优选的实施方案中,人轮状病毒是轮状病毒毒株 116E 或 I321。根据本发明的组合物是疫苗。在一个实施方案中,根据本发明的组合物可以具有滴度在 10³FFU/0.5ml 到 10^{8.5}FFU/0.5ml 的范围的减毒的活轮状病毒。活轮状病毒是预处理的轮状病毒。

[0078] 在另一个通常的方面中,提供了一种用于生产减毒的活的预处理的轮状病毒的方法。该方法包含以下步骤:用减毒的活轮状病毒感染宿主细胞,使受感染的细胞在用人血清白蛋白补充的并能够支持细胞生长的细胞培养基中生长,以及收获预处理的轮状病毒。收获的预处理轮状病毒显示出与未预处理的病毒或典型的病毒相比更好的稳定性。

[0079] 还在另一个通常的方面中,本发明还公开了一种使病毒适应诸如 Vero 细胞的合适的细胞基底,通过合适的培养基连续传代,在不存在或存在来源于人的人血清白蛋白或重组人血清白蛋白的培养基中进行每次传代的方法。

[0080] 发明详述

[0081] 本发明涉及关于减毒的活轮状病毒的组合和方法。减毒的活轮状病毒显示改善的稳定性特性并可用于预防儿童的轮状病毒感染和 / 或轮状病毒胃肠炎。

[0082] 具体地,本发明公开了用于提供显示出在给定的时间点处的改善的稳定性和经储存期间的时段的持久的稳定性的轮状病毒组合物的多种方法和系统。一种方法是使用预处理的病毒作为本发明的组合物中的起始材料。另一种方法是在所使用的病毒是预处理的病毒时,使用各种稳定剂来获得改善的稳定性。

[0083] 如上所定义的,从在含有人血清白蛋白的培养基中繁殖的细胞培养物收获的病毒或病毒群体被称为“预处理的”病毒或病毒群体。相反地,从不含人血清白蛋白的培养基中的细胞培养物收获的病毒或病毒群体被称为“典型的”病毒或病毒群体。减毒的活轮状病毒在本文中有时称为病毒抗原或疫苗抗原。

[0084] 如本文所公开的,预处理的病毒显示与典型的病毒相比改善的稳定性特性。与没有补充物的制剂相比,预处理的病毒和典型的病毒中的每一种显示在用一种或多种稳定剂补充的制剂中的在储存期间的持久的稳定性。在无论用作制剂的起始材料的病毒在收获后是否被预处理的情况下,用来保持稳定性的稳定剂应理解为宽泛地落入三种不同组分系统中。

[0085] 单组分系统含有作为制剂的一部分的非病毒蛋白或其蛋白水解物。非病毒蛋白或蛋白水解物用作稳定剂。两组分系统除了非病毒蛋白或其蛋白水解物之外含有二糖。在两组分系统中,二糖和蛋白或其水解物都用作稳定剂。三组分系统类似于两组分系统,但具有不同于两组分系统中的二糖的另外的二糖。

[0086] 在我们同时待审的申请第 842/CHE/2006 号中,我们已公开了一种组合物,其包括病毒抗原;选自人血清白蛋白或重组人白蛋白的第一蛋白和至少部分水解并选自乳白蛋白水解物、酵母水解物、蛋白胨和卵蛋白水解物的第二蛋白且优选地以及三种不同的二糖的组合,其中所使用的病毒在存在 HSA 的情况下不繁殖。液体组合物显示在 37°C 下 3-4 周、在 25°C 下六个月、且在 2°C -8°C 下一年的稳定性,而冻干组合物显示在 2°C -8°C、25°C、37°C 下超过 50 周的稳定性。

[0087] 本发明的液体组合物在 37°C 下稳定 6 周、在 25°C 下稳定 6 个月且在 2-8°C 下稳定 24 个月。

[0088] 本发明的冻干组合物在 37°C 下稳定 16 周、在 25°C 下稳定 6 个月且在 2-8°C 下稳定 24 个月。

[0089] 组合物可以是液体组合物或是冻干的(干型)。本发明公开了在 2-8°C 或环境条件下储存延长的时间段时显示更好的和改善的稳定性的减毒的活轮状病毒及其组合物。环境条件可以是在一个地方普遍和典型的大气状况(例如,25°C)但不超过约 37°C 的那些环境条件。本发明的组合物能够在制备期间和在商品化疫苗的储存期限所需的持续期间保持其免疫能力(即:组合物是稳定的)。

[0090] 因此,由于与外部添加的病毒相比,在存在人血清白蛋白的情况下的病毒的繁殖,本发明的组合物显示更长时期的稳定性。

[0091] 在一个实例中,本发明的组合物包括病毒抗原(预处理的病毒或典型的病毒)、非病毒蛋白或不同于病毒抗原的蛋白。术语“非病毒蛋白”意指乳白蛋白、酵母蛋白水解物、明胶、卵蛋白或为谷物蛋白、小麦蛋白、鹰嘴豆蛋白、四季豆蛋白、扁豆蛋白、利马豆蛋白、白

豆蛋白、大豆蛋白、裂荚豌豆蛋白的植物蛋白以及人血清白蛋白中的任一种，全部是天然来源或重组来源的。优选地，蛋白是至少部分水解的。换句话说，这些蛋白的水解物或蛋白胨可用于本发明的组合物。

[0092] 如本文所使用的，短语“蛋白是至少部分水解的”意味着是指其中水解蛋白已经至少部分地断裂成其相应的氨基酸结构单元的情景。因此，此短语还意指包括其中蛋白不再作为完整分子存在，而只是作为其片段的集合存在的情景。此短语还意指包括其中蛋白被完全水解的情景。所有这些情景还意指由短语“蛋白水解物”（其可包括完全水解的蛋白）所包括，即蛋白断裂成其相应的氨基酸、或蛋白部分地断裂，使得存在肽和氨基酸的集合。

[0093] 因此，蛋白或至少部分水解形式可以是乳白蛋白水解物、酵母水解物、蛋白胨、明胶水解物和卵蛋白水解物、或来自植物来源的蛋白或人同源蛋白，植物来源诸如谷物、小麦、鹰嘴豆、四季豆、扁豆、利马豆、白豆、大豆、裂荚豌豆，人同源蛋白诸如是人来源或重组来源的人血清白蛋白。这些蛋白和蛋白水解物可以由本领域技术人员例如通过酸解容易地制备，或可以由商业上获得。本文已显示在低浓度的轮状病毒下，特别是在制剂中轮状病毒浓度（滴度）是 10^3 FFU/0.5ml 时，当与非病毒蛋白 - 人血清白蛋白或牛血清白蛋白相比时，诸如乳白蛋白水解物或大豆蛋白的非病毒蛋白有助于更好的和改善的稳定性。乳白蛋白水解物是本领域技术人员已知的且是商业上可获得的。认为乳白蛋白水解物为轮状病毒蛋白 (rota protein) 提供在液体形式和在冻干形式中极好的均化作用，并甚至当病毒蛋白以低浓度存在时保持病毒蛋白的部分。替代乳白蛋白水解物或除了乳白蛋白水解物之外，还可以使用诸如酵母水解物、蛋白胨、明胶水解物和卵蛋白水解物的其它物质。组合物还包括二糖或两种二糖的组合以及药学上可接受的缓冲剂。二糖可以是蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、龙胆二糖、蜜二糖、松二糖和岩藻糖中的任一种。三组分系统除了非病毒蛋白或其蛋白水解物之外含有两种不同类型的二糖的组合。本文此段中的那些蛋白或蛋白水解物和二糖被称为“稳定剂”。

[0094] 稳定剂可被添加到在病毒的药物制剂中常规使用的赋形剂、稀释剂或载体（例如，药学上可接受的缓冲剂）。这样的赋形剂或载体在本领域是众所周知的。具体地，合适的稀释剂或药学上可接受的缓冲剂用一种或多种上面提到的稳定剂补充。在一个优选的实施方案中，向含有轮状病毒的样品首先添加 LAH，随后添加蔗糖。如果添加第二种二糖，那么海藻糖是接下来下一个优选的。不含稳定剂的组合物实质上是载体溶液或药学上可接受的缓冲剂。除了指定的稳定剂之外，组合物可以含有颜料、调味品、增甜剂、吸附剂和 / 或流动性促进剂。优选地，这些组合物在适当的 pH 下被缓冲，适当的 pH 通常在 6 和 8 之间、优选在 6.8 和 8.0 之间。例如，在一个实施方案中，根据本发明的组合物可以在 DME 培养基 (Dulbecco's Modified Eagles medium) 中配制。

[0095] 在一个方面中，本发明公开了一种制剂，其含有减毒和预处理的活轮状病毒群体。预处理的轮状病毒在组合物中在没有任何补充的稳定剂的药学上可接受的赋形剂中显示一定程度的稳定性。与没有如此预处理的活的减毒的典型的轮状病毒群体相比时，预处理的轮状病毒群体的稳定性更好。当收获后在 37°C 下储存四周时，典型的轮状病毒群体在其稳定性特性方面显示 \log_4 滴度的损失，而预处理的病毒显示明显小于 \log_4 滴度损失的损失。

[0096] 在另一个方面中，本发明公开了一种组合物，其含有活的减毒的预处理的轮状病

毒,能够显示当组合物中没有任何补充的稳定剂地在环境条件下储存时,与活的减毒的典型的轮状病毒相比,滴度增加最小 0.8log/ml 到最大 1.1log/ml。

[0097] 两种情况中,如果将诸如乳白蛋白水解物、酵母水解物、明胶水解物和卵蛋白水解物、蛋白胍、植物蛋白和人血清白蛋白的至少一种稳定剂添加到组合物,可以改善预处理的病毒的稳定性。改善的稳定性可以通过将二糖或不同二糖的组合添加到组合物进一步改善。因此,在一个最优化的实施方案中,组合物含有病毒抗原即预处理轮状病毒、至少部分水解的不同于所述病毒抗原的蛋白以及二糖或两种二糖的组合,所述蛋白诸如例如乳白蛋白、酵母蛋白、蛋白胍、明胶和卵蛋白、谷物蛋白、小麦蛋白、鹰嘴豆、四季豆、扁豆、利马豆、白豆、大豆、裂荚豌豆或从人中分离的人血清白蛋白或重组人血清白蛋白。当稳定剂存在于组合物中时,具有典型的病毒的组合物也是优选的,因为与没有这些稳定剂的组合物中的典型的病毒相比,在这样的组合物中可以获得典型的病毒的更好的稳定性。

[0098] 单独的或以两种蛋白的组合形式的蛋白可以在 0.01% (w/v) 到 80% (w/v) 的范围、优选在 0.05% 到 50% 的范围存在。优选地,用作稳定剂的蛋白是乳白蛋白水解物、人血清白蛋白和大豆蛋白中的任一种。乳白蛋白水解物可以以约 0.01% 到 70%、优选 0.1% 到 30% 在组合物中存在。大豆蛋白可以以约 0.01% 到 70%、优选 0.05% 到 20% 在组合物中存在。人血清白蛋白优选为重组来源的且可以以约 0.01% 到 20%、优选 0.1% 到 0.5% 在组合物中存在。

[0099] 优选地,用作稳定剂的二糖可以是海藻糖、乳糖和蔗糖中的任一种。优选的海藻糖浓度是在约 0.01% 到 70%、最优选 0.5% 到 20%。两种不同二糖的组合可以是蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、龙胆二糖、蜜二糖和松二糖中的任两种。例如,两种二糖的组合可以是蔗糖和麦芽糖、蔗糖和乳糖、蔗糖和海藻糖、麦芽糖和海藻糖、或海藻糖和乳糖中的任一种。优选的二糖的组合是蔗糖和海藻糖。优选地,蔗糖以约 1-10% 和 70% (w/v) 到 85% (w/v)、更优选以 5% 到 10% 和 80% 到 85% (w/v) 存在而海藻糖以约 0.01% (w/v) 到 50.0% (w/v)、优选 0.5% 到 20% (w/v) 存在。组合的二糖或单种二糖的浓度可以是约 1-10% 或约 20% -85% (w/v)。在一个实施方案中,二糖的浓度可以是如下值:蔗糖约 1-10% 和 70% 到 85% (w/v)、优选 5 到 10% 或 80% 到 85% (w/v),乳糖约 0.1% 到 20.0% (w/v)、优选 0.5% 到 10% (w/v),麦芽糖约 0.1% (w/v) 到 50% (w/v)、优选 5% 到 50% (w/v),海藻糖约 0.01% (w/v) 到 70.0% (w/v)、优选 0.5% 到 20.0% (w/v)。

[0100] 优选地,组合物使用磷酸盐-柠檬酸盐缓冲剂来缓冲。优选地,磷酸盐-柠檬酸盐缓冲剂是大约 310mM 磷酸盐和大约 100mM 柠檬酸盐。药学上可接受的缓冲剂可以具有在 6.8 到 8.0 的范围的 pH 值。缓冲剂可以是磷酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐、Tris、HEPES 缓冲剂中的任一种及其组合。磷酸盐可以具有在 10mM 到 1000mM、优选 50mM 到 310mM 的范围的浓度。碳酸盐可以具有在 10mM 到 1000mM、优选 50mM 到 300mM 的范围的浓度。柠檬酸盐可以具有在 10mM 到 400mM、优选 50mM 到 100mM 的范围的浓度。Tris 可以具有在 0.1mM 到 1000mM、优选 5mM 到 20mM 的范围的浓度。HEPES 可以具有在 0.1mM 到 1000mM、优选 10mM 到 20mM 的范围的浓度。

[0101] 在一些实施方案中,淀粉也可以用作稳定剂。淀粉的实例是谷物淀粉 (corn starch)、小麦淀粉、玉米淀粉 (maize starch) 和米淀粉。淀粉可以是可溶性淀粉、不溶性淀粉、部分水解的淀粉或完全水解的淀粉中的任一种。淀粉可以以约 0.01% 到 10%、优选

0.1%到3.0%存在。

[0102] 组合物可以含有至少一种稀释剂,所述稀释剂诸如组织培养基、生理盐水、磷酸缓冲盐水或水。优选的稀释剂是DME培养基(DMEM)。组合物还可以含有至少一种化学品,所述化学品诸如抗坏血酸、阿拉伯胶(gum arabic)、阿拉伯树胶、聚乙烯吡咯烷酮、盐酸吡多醇(维生素B6),且浓度可以为按组合物重量计约0.1%到20%、优选0.25%到5%。组合物优选为含减毒的活轮状病毒的液体制剂。优选的液体制剂含有预处理的轮状病毒或典型的轮状病毒和稳定剂,即20-30% w/v范围的乳白蛋白水解物(LAH)和约0.5% w/v的海藻糖。另一种优选的液体制剂含有预处理的轮状病毒或典型的轮状病毒和稳定剂,即组合物中约5% w/v的乳白蛋白水解物、约80% w/v的蔗糖和约0.5% w/v的海藻糖。根据本发明的组合物可以用于抗病毒感染和与病毒相关的疾病的接种的疫苗。轮状病毒毒株116E(G9P[11])和I321(G10P[11])是天然的人-牛重配株、天然减毒并赋予婴儿和幼儿中的实质水平的免疫性。虽然人轮状病毒是优选的,可以根据本发明配制的其它轮状病毒是牛轮状病毒、猪轮状病毒和人-牛重配株轮状病毒、羔羊轮状病毒、绵羊轮状病毒。鉴于已知在储存期间使低亲代滴度值(parent titer)的稳定性保持持久是挑战性的任务,需要如本文所公开的合适的组合物和制剂使低滴度轮状病毒即 10^3 的稳定性保持持久。显示改善的和/或持久的稳定性的轮状病毒疫苗可以用于预防病毒感染,优选全世界儿童的轮状病毒感染和/或轮状病毒胃肠炎。优选地,治疗或预防包括向婴儿施用三次口服剂量的有效量的组合物,在第1次剂量的时候婴儿年龄在8-20周内。

[0103] 下表(表1)给出典型的轮状病毒的制剂即在不存在人血清白蛋白的情况下(1到8)和在存在人血清白蛋白的情况下(1A到8A)繁殖的典型的轮状病毒的制剂之间的比较,且清楚地显示出包括在存在人血清白蛋白的情况下繁殖的病毒的制剂显示更大的稳定性。

[0104] 表1

[0105]

样品号	在 37°C 下的 Log 损失	时间点	在 25°C 下的 Log 损失	时间点
1	5	4 周	1.19	24 周
1A	3.73	12 周	0.91	24 周
2	4	4 周	1.09	24 周
2A	3.63	20 周	0.76	24 周
3	4.45	3 周	3.48	16 周
3A	3.3	12 周	2.21	24 周
4	4.43	4 周	1.9	20 周
4A	3.72	12 周	1.61	24 周
5	4.96	4 周	1.66	24 周
5A	3.39	8 周	1.08	24 周
6	4.77	8 周	0.86	24 周
6A	3.32	12 周	0.39	24 周
7	5.39	4 周	1.98	24 周
7A	2.44	12 周	0.28	24 周
8	4.46	4 周	1.96	24 周
8A	3.1	20 周	0.34	24 周

[0106] 本研究还提供用于使轮状病毒例如天然的人-牛重配株、天然减毒轮状病毒毒株 116E(G9P[11]) 和 I321(G10P[11]) 适应合适的细胞如 Vero 细胞的方法。在一个实施方案中,适应包括连续传代,2-20 次传代、优选 2-5 次传代。优选地,每次传代在 24 小时到通常 6 天且最大 10 天的范围的时间段内发生。优选地,病毒是人轮状病毒。该方法包括优化剂量的胰蛋白酶 (0.1 μ g/ml 到 30 μ g/ml) 和 / 或氯化钙 (100 μ g/ml 到 1000 μ g/ml) 用于病毒活化和病毒维持培养基,其中高滴度 (10^4 FFU/ml 到 10^8 FFU/ml) 的病毒收获在 48 小时到六天内。设想还使用适应的毒株用于生产稳定的、活的、单价的液体轮状病毒疫苗组合物。本发明还公开了如何生产典型的轮状病毒和预处理的轮状病毒。此外,本发明提供使用病毒抗原、蛋白、一种或两种不同的二糖的组合来制造根据本发明的组合物,用于治疗或预防与病毒相关的疾病、优选与轮状病毒相关的疾病。

[0107] 操作实施例

[0108] 提供以下操作实施例来说明本发明的优选的实施方案,但当然不应解释为以任何方式限制本发明的范围。除了另外详细描述之外,下面的实施例使用本领域技术人员熟知和常规的常规技术来进行。此外,本领域技术人员应理解,实施例中所公开的技术表示发明人所发现的在本发明的实践中起良好作用的技术,并因此可被认为构成用于本发明的实施的优选模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应理解可以在所公开的具体实施方案中进行许多改变并仍获得相似或类似结果而没有背离本发明的精神和范围。

[0109] 实施例 1. 典型的和预处理的轮状病毒群体的大量生产及其稳定性特性:

[0110] Bharat Biotech International Ltd(BBIL) 按照与美国 Bethesda 的国立卫生研究院 (NIH) 的国立变态反应与感染性疾病研究所 (NIAID) 的材料转让协议,从 NIH 获得人轮状病毒毒株 116E 和 I321。使原始的 116E(G9[P11]) 和 I321(G10P[11]) 通过在原代

非洲绿猴肾 (AGMK) 细胞中传代、然后在 MA 104 细胞基底中传代且随后在连续地传代的 AGMK (SPAGMK) 细胞中传代来适应在细胞培养物中生长。MA 104 和 SPAGMK 细胞基底未被国家管理局 (NRA) 批准用于在商品化疫苗生产中使用。因此使这两种人轮状病毒疫苗毒株 (116E 和 I321) 适应 Vero 细胞, 在这些细胞中单独生长以产生大量病毒群体 (viral bulk population) 并单独制备为单价的、活的、减毒的、口服轮状病毒疫苗液体制剂的试剂批用于人的临床试验。人轮状病毒毒株 116E (一种天然人-牛重配株且天然减毒的) 是一种人 G9 毒株, 与 P[11] 基因区段同源的单个牛 VP4 基因 (VP = 病毒蛋白) 被天然地引入到其中。I321 毒株, 被命名为 G10P[11], 主要由牛基因组成且只具有两个人源的基因区段 VP5 和 VP7。本文的具体实例是关于活的且减毒的毒株 116E 描述的。

[0111] 一般说来, 生产过程是如下所述: 使用 Vero 细胞的工作细胞库 (Working Cell Bank) 来培养轮状病毒。在含有 5-10% 胎牛血清的 DME 培养基 (DMEM) (Sigma® , MO, USA) 中繁殖 Vero 细胞。轮状病毒需要在氯化钙的存在下胰蛋白酶裂解两个主要的外壳蛋白 (outer coat protein) 之一 VP4 以便在体外有效感染 Vero 细胞。将轮状病毒毒株制成主病毒库 (Master Virus Bank) 和工作病毒库 (Working Virus Bank) 的种子批系统 (seed lot system)。用选择的毒株感染无血清培养基中的 Vero 细胞且每 48 小时后进行单次收获, 持续 144 小时的时间。将三次单次收获物集中作为一份原液并添加蔗糖磷酸盐谷氨酸稳定剂。将如此集中的原液在 -70°C 或 2-8°C 下储存。随后进行两种制造生物过程的方法来生产大量的减毒的活病毒群体。

[0112] 典型的病毒的生产: 使用储存在液氮中的 Vero 细胞的工作细胞库用于生产过程的单层 Vero 细胞的复苏和生长。将工作细胞库的两个冷冻管从液氮储存容器中小心地取出解冻, 将细胞转移到两个 T-150 聚苯乙烯无菌培养瓶中用于复苏并用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 补充。将培养瓶在 37°C 下孵育 24 小时。在孵育期后, 从培养物中倾析培养基并用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基补充以促进汇合的单层的形成。

[0113] 在显微镜下观察培养瓶, 观察它们形态和在所使用的培养基中扩增的能力。将细胞进一步繁殖为两个更多传代以获得若干容器的细胞来用于用轮状病毒 116E 或 I321 感染。

[0114] 轮状病毒 116E 或 I321 选自种子批系统的工作病毒库并且被胰蛋白酶-活化和接种以感染细胞。根据细胞群进行感染复数的计算。细胞被感染并在 37°C 下保持一小时用于吸附。在吸附时间之后, 用不含血清的 DMEM 装满细胞培养物。将感染的细胞培养物保持在 35°C 下, 并每 48 小时后收集单次收获物, 持续 144 小时的时间。在每次单次收获后用不含血清的 DMEM 补充细胞培养物。在第三次单次收获后终止细胞培养物。将经过滤的单次收获物收集到无菌容器中并储存在 2-8°C 下。将单次收获物合并以形成合并的原液并保持在 2-8°C 下。进行取样以测试每次单次收获物和合并的原液的病毒含量、无菌性 (sterility)。合并的原液在 SPG 稳定剂 (蔗糖 7.46%、磷酸二氢钾 0.0515%、磷酸氢二钾 0.128% 和谷氨酸 0.101%) 中在 -70°C 或 2-8°C 下储存。还从不含稳定剂单次收获物取出样品的等份用于获得不同温度下的稳定性数据。

[0115] 预处理的病毒的生产: 使用储存在液氮中的 Vero 细胞的工作细胞库用于生产过程的单层 Vero 细胞的复苏和生长。将工作细胞库的两个冷冻管从液氮储存容器中小心地取出解冻, 将细胞转移到两个 T-150 聚苯乙烯无菌培养瓶中用于复苏并用含有 5% 胎牛血

清和 0.1% 人血清白蛋白的 DMEM 补充。将培养瓶在 37°C 下孵育 24 小时。在孵育期后,从培养瓶倾析培养基并用含有 5% 胎牛血清和 0.1% 人血清白蛋白的 DMEM 补充以促进汇合的单层的形成。

[0116] 第二组细胞培养物设置为每个在 DMEM 中含有 0.1%、0.2%、0.3%、0.5% 或 1% 人血清白蛋白(人来源的)连同 5% 胎牛血清。第三组细胞培养物也设置为每个在 DMEM 中含有 0.1%、0.2%、0.3%、0.5% 或 1% 人血清白蛋白(重组来源)连同 5% 胎牛血清。

[0117] 轮状病毒 116E 或 I321 冷冻管选自种子批系统的工作病毒库,并且制备接种物以感染 Vero 细胞培养物。根据细胞群进行感染复数的确定。将细胞培养物用 pH 7.4 到 7.6 的磷酸缓冲盐水洗涤两次。细胞培养物被感染并在 37°C 下保持一小时用于病毒的吸附。在吸附时间之后,用含有 0.1% 人血清白蛋白的 DMEM 装满细胞培养物。将人来源的人血清白蛋白或重组人血清白蛋白添加到细胞培养物。将感染的细胞培养物保持在 37°C 下,并每 48 小时后收集多次收获物且用它们各自的含有人血清白蛋白(人来源的人血清白蛋白和重组人血清白蛋白)的培养基补充培养物。将收获物收集在无菌容器中。在 2-8°C 下储存收获物。将感染的培养物保持在 37°C 下用于病毒增殖并维持细胞直到第三次收获,在它们第三次收获后终止培养物。合并来自每组的三次收获以形成合并的原液并保持在 2-8°C 下。进行取样以测试每次单次收获合并的原液的病毒含量和无菌性。合并的原液在 SPG 稳定剂(蔗糖 7.46%、磷酸二氢钾 0.0515%、磷酸氢二钾 0.128% 和谷氨酸 0.101%)中在 -70°C 或 2-8°C 下储存。从不含稳定剂的单次收获物收集等份用于获得不同温度下的稳定性数据。

[0118] 图 1 中显示的是在五次实验中从典型的病毒和预处理的病毒获得的平均滴度数据。所有五次实验使用相同的参数来进行以证明在轮状病毒在 Vero 细胞基底上增殖期间,培养基中存在 HSA 比不含 HSA 确实导致更高的滴度。收集感染后的第 2 天、第 4 天和第 6 天的三次单次收获物并合并;滴度是 2-8°C 下 3 次收获物的平均值。预处理的病毒显示出更高的滴度收率。平均滴度显示最小滴度差为 0.8log/ml 和最大为 1.1log/ml。

[0119] 实施例 2. 液体和冻干形式的典型的轮状病毒和预处理的轮状病毒的制剂以及每种制剂对稳定性特性的影响:

[0120] 将在 2-8°C 或 -70°C 下储存的合并的原液基于 10^3 FFU/0.5mL 到 10^8 FFU/0.5mL 的目标滴度配制成半成品并作为疫苗填充。基于合并的原液的滴度,取出计算的体积的合并的原液并添加到预定体积的含有稳定剂、抗生素和缓冲剂的半成品中。配制的半成品作为疫苗填充到小瓶中。在制剂中以不同组合和浓度使用的各种稳定剂是乳白蛋白水解物(LAH)、海藻糖、蔗糖、淀粉、乳糖、麦芽糖、大豆蛋白、rHSA(不包括可能已与从预处理的病毒生产过程收获的预处理的病毒一起被带出的任何残留的 rHSA)。将含有病毒的制剂的 0.5ml 等份无菌地转移至 2.0ml 小瓶中并在 2-8°C、25°C 和 37°C 下储存。以定期的时间间隔测试稳定性参数以证明用各种稳定剂(见表 2)配制后的典型的病毒和预处理的病毒的稳定性。

[0121] 液体制剂 1-25 的制备:在无菌条件下通过计算稳定剂、缓冲剂的体积和病毒抗原的体积以及目标滴度来制备各种制剂。无菌地进行从每种制剂取样并单独地标记以指示样品号、制备日期以及打算用于特定温度储存的样品。样品瓶在 2-8°C、25°C 和 37°C 下储存。样品号被编码并按照稳定性研究计划定期地测试它们的滴度。结果在图 1 至图 12 的图中表示。

[0122] 冻干制剂 26-45 的制备：在无菌条件下通过计算稳定剂、缓冲剂的体积和病毒抗原的体积以及目标滴度来制备各种制剂。将配制的半成品无菌地填充到冷冻干燥瓶中并使它们经历 42 小时到 48 小时冷冻干燥过程。冷冻干燥过程通常有三部分：预冷、初次干燥和二次干燥。冷冻干燥周期被设置为有利于不同制剂中所使用的各种稳定剂的共熔点。完成冷冻干燥后，将小瓶在真空下适当地密封。无菌地进行从每种制剂取样并单独地标记以指示样品号、制备日期以及打算用于特定温度储存的样品。样品瓶在 2-8℃、25℃和 37℃下储存。按照稳定性研究计划定期地测试样品的滴度。冻干瓶使用 WFI 重构。

[0123] 表 2

[0124]

F. No. (图)	稳定剂											
	LAH	蔗糖	海藻糖	淀粉	乳糖	麦芽糖	大豆蛋白	HSA	PVP	bicarb mM	Gum	Pyr HCL
1 (2B)	5.0	80.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2 (3)	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3 (3)	10.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4 (3)	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5 (3)	2.5	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6 (4)	5.0	80	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7 (5)	20.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8 (5)	10.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9 (5)	5.0	80	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0125]

F. No. (图)	稳定剂											
	LAH	蔗糖	海藻糖	淀粉	乳糖	麦芽糖	大豆蛋白	HSA	PVP	bicarb mM	Gum	Pyr HCL
(5)												
11 (6)	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12 (6)	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13 (6)	5.0	80.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
14 (6)	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15 (7)	10.0	10	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
16 (7)	10.0	0.0	1.0	0.0	0.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
17 (7)	2.5	80	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18 (7)	2.5	0.0	1.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19 (8)	5.0	80.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20 (8)	5.0	80.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21 (8)	0.0	80	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
22 (8)	0.0	80	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
23 (8)	0.0	80	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
24 (8)	0.0	80	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
25 (2A 9&10)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
26 (13)	0.0	12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0

[0126]

F. No. (图)	稳定剂											
	LAH	蔗糖	海藻糖	淀粉	乳糖	麦芽糖	大豆蛋白	HSA	PVP	bicarb mM	Gum	Pyr HCL
27 (13)	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
28 (13)	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
29 (13)	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.25	0.0	0.0	0.0
30 (14)	0.0	12.0		0.1	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
31 (14)	0.5	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
32 (14)	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
33 (14)	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.25	0.0	0.0	0.0
34 (15)	0.0	12.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	304	0.0	0.0
35 (15)	0.5	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	304	0.0	0.0
36 (15)	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	304	0.0	0.0
37 (15)	0.0	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.25	304	0.0	0.0
38 (16)	0.0	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.1	0.0
39 (16)	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
40 (16)	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
41 (16)	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.25	0.0	0.1	0.0
42 (17)	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.25	0.0	0.0	0.0
43	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0

[0127]

F. No. (图)	稳定剂											
	LAH	蔗糖	海藻糖	淀粉	乳糖	麦芽糖	大豆蛋白	HSA	PVP	bicarb mM	Gum	Pyr HCL
(17)												
44 (17)	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
45 (17)	0.5	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0128] * 缩写和解释：

[0129] F. No. - 制剂编号

[0130] PVP- 聚乙烯吡咯烷酮

[0131] Bicarb-304mM 碳酸氢盐

[0132] Gum- 阿拉伯树胶

[0133] PyrHCL- 盐酸吡多醇

[0134] 制剂 1-24 是含有稳定剂的液体制剂

[0135] 制剂 19、20、23 和 24 使用典型的病毒

[0136] 制剂 21 和 22 使用预处理的病毒

[0137] 制剂 25- 只含有缓冲剂不含稳定剂的液体制剂

[0138] 制剂 26-45 是冻干制剂

[0139] 图 2 中显示的是在液体制剂（制剂编号 1）中不存在（2A）或存在（2B）稳定剂 5% LAH+80%蔗糖 +0.5%海藻糖的情况下典型的病毒和预处理的病毒在 37°C 下储存的稳定性数据。在此温度下，观察到在含有或不含稳定剂的情况下，病毒的稳定性从 0 天开始到第 16 周逐渐地下降。在不含稳定剂的情况下，预处理的病毒的滴度的下降是在 37°C 下在 4 周后 3.2log，而典型的病毒的滴度的下降是 4.0log。如从图 2B 可以注意到的，稳定剂的存在确实延迟滴度下降到不存在稳定剂的情况下观察到的水平。此外，含有或不含稳定剂，滴度的减小在预处理的病毒的情况中比在典型的病毒的情况中慢一些，证明生产过程中使用的 HSA 确实实质上有助于稳定性。

[0140] 图 3 中显示的是在四种不同的制剂中的轮状病毒在 2-8°C（3A）、25°C（3B）和 37°C（3C）下的稳定性数据。在每种情况下，系列 1 是指含有 2.5%乳白蛋白水解物的制剂，系列 2 是指含有 10%乳白蛋白水解物和 0.5%海藻糖的制剂，系列 3 是指含有 20%乳白蛋白水解物的制剂且系列 4 是指具有 2.5%乳白蛋白水解物、0.5%淀粉和 0.5%海藻糖的组合的制剂。在 2-8°C 下，在系列 3 中直到二十四个月之后没有滴度下降，而在 2-8°C 下在系列 1、2&4 中在 14 个月到 24 个月之后观察到 0.09log 到 0.49log 的滴度下降。在 25°C 下，系列 1 到 4 显示滴度下降在 3 个月之后在 0.94log 到 2.69log 的范围，且在 6 个月之后在 1.19 到 4.19log 范围以及在 12 个月之后在 1.89 到 5.39 的范围。在 37°C 下，系列 1 到 4 显示滴度下降在六周之后在 1.39 到 2.49log 的范围，且系列 2 和 3 显示在 10 周之后 2.99 到 3.09log 的滴度下降。在系列 1 和 4 中，滴度在十周之后变成零。

[0141] 图 4 中显示的是在含有或不含稳定剂 -5%乳白蛋白水解物 +80%蔗糖 +0.5%海藻

糖 - 的制剂中的轮状病毒 116E 在 2-8°C (4A)、25°C (4B) 和 37°C (4C) 下保存的稳定性数据。在 2-8°C 下, 不含乳白蛋白水解物和两种二糖的轮状病毒制剂显示逐渐的滴度损失, 直到 24 个月的时间时为 1.84log。含有 5% 乳白蛋白水解物和 80% 蔗糖与 0.5% 海藻糖的组合的轮状病毒显示直到 24 个月的时间没有滴度下降。在 25°C 下, 不含乳白蛋白水解物和两种二糖的组合的轮状病毒制剂显示滴度损失, 直到 12 个月的时间时为 6.0log。含有 5% 乳白蛋白水解物和 80% 蔗糖与 0.5% 海藻糖的组合的轮状病毒显示逐渐的滴度下降, 直到 12 个月的时间时为 2.81log。在 37°C 下, 不含乳白蛋白水解物和两种二糖的组合的轮状病毒制剂在 6 周之后显示总滴度损失。含有 5% 乳白蛋白水解物和 80% 蔗糖与 0.5% 海藻糖的组合的轮状病毒显示逐渐的滴度下降, 直到 16 周的时间时为 3.85log。

[0142] 图 5 中显示的是在四种不同的制剂中的轮状病毒在 2-8°C (5A)、25°C (5B) 和 37°C (5C) 下的稳定性数据。在每种情况下, 系列 1 是指含有 20% 乳白蛋白水解物和 0.5% 海藻糖的组合的制剂, 系列 2 是指含有 10% 乳白蛋白水解物、1.0% 乳糖的组合的制剂, 系列 3 是指含有 5% 乳白蛋白水解物、80% 蔗糖的组合的制剂且系列 4 是指含有 10% 乳白蛋白水解物和 50% 麦芽糖的组合的制剂。在 2-8°C 下, 在系列 1 和 3 中直到 24 个月滴度没有下降, 而系列 2 和 4 显示直至九个月没有滴度下降且在 24 个月之后观察到 0.37log 到 0.57log 的下降。在 25°C 下, 在全部四个系列中在 25°C 下直到 3 个月没有滴度下降且在系列 1 和 3 中在 7 个月之后损失 1.47log。在系列 2 和 4 中, 在七个月之后滴度下降 3.47log 到 4.07log。在 37°C 下, 系列 1 到 4 显示滴度下降在四周之后在 1.37log 到 2.77log 范围以及在 6 周之后在 1.77log 到 4.07log 的范围。

[0143] 图 6 中显示的是轮状病毒 116E 液体制剂在 2-8°C (6A)、25°C (6B) 和 37°C (6C) 下的稳定性数据。在每种情况下, 系列 1 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物、10% 大豆蛋白和 1.0% 海藻糖的组合的制剂, 系列 2 是指含有 0.5% 乳白蛋白水解物、10% 大豆蛋白和 1.0% 乳糖的组合的制剂, 系列 3 是指含有 5% 乳白蛋白水解物、2.5% 大豆蛋白和 80% 蔗糖的组合的制剂, 且系列 4 是指含有 5% 乳白蛋白水解物、2.5% 大豆蛋白和 50% 麦芽糖的组合的制剂。在 2-8°C 下, 在系列 3 和 4 中直到二十四个月没有滴度下降, 而系列 1 和 2 显示 0.17log 和 0.27log 的可忽略不计的滴度下降。在 25°C 下, 系列 1-4 显示滴度下降在 3 个月之后在 1.07log 到 2.17log 的范围以及滴度下降在八个月之后在 2.7log 到 4.47log 的范围。在 37°C 下, 系列 1 到 4 显示滴度下降在四周之后在 1.16log 到 5.07log 的范围, 以及在八周之后在系列 2、3 和 4 中滴度下降在 2.1log 到 6.17log 的范围且在系列 1 中滴度下降到零。

[0144] 图 7 中显示的是轮状病毒 116E 液体制剂在 2-8°C (7A)、25°C (7B) 和 37°C (7C) 下的高稳定性数据。在每种情况下, 系列 1 是指含有 10% 乳白蛋白水解物、10% 蔗糖和 1.0% 海藻糖的组合的制剂, 系列 2 是指含有 10% 乳白蛋白水解物、5% 麦芽糖和 1.0% 海藻糖的组合的制剂, 系列 3 是指含有 2.5% 乳白蛋白水解物、80% 蔗糖和 1% 海藻糖的组合的制剂, 且系列 4 是指含有 2.5% 乳白蛋白水解物、50% 麦芽糖和 1% 海藻糖的组合的制剂。在 2-8°C 下, 在系列 3 和 4 中直到二十四个月没有滴度下降, 而系列 1 和 2 显示在 15 个月之后 0.19log 到 0.41log 的下降。在 25°C 下, 系列 1 到 4 显示在三个月之后滴度下降在 0.89log 到 1.59log 的范围且在七个月之后滴度下降在 2.89log 到 4.49log 的范围。在 37°C 下, 系列 1 到 4 显示在四周之后滴度下降在 0.69log 到 3.19log 的范围且在六周之后滴度下降在

1.39log 到 4.89log 的范围。

[0145] 图 8 中显示的是轮状病毒 116E 液体制剂在 2-8°C (8A)、25°C (8B) 和 37°C (8C) 下的高稳定性数据。在每种情况下,系列 1 是指含有典型的轮状病毒、5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组的制剂,系列 2 是指含有预处理的轮状病毒、5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组的制剂,系列 3 是指含有来自生物过程 1 的抗原、0.1% HSA 和 80%蔗糖、以及 0.5%海藻糖的组的制剂且系列 4 是指含有来自生物过程 2 的抗原、0.1% HSA、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组的制剂,系列 5 是指含有来自生物过程 1 的抗原、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组的制剂,系列 6 是指含有来自生物过程 2 的抗原、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组的制剂。在 2-8°C 下,在系列 1、2 和 4 中在 24 个月之后没有滴度下降且系列 3、5 和 6 显示直到 18 个月没有损失,且在 24 个月之后观察到大约 0.2log 的下降。在 25°C 下,系列 1、2、3 和 4 显示在六个月之后滴度下降在 0.64log 到 1.44log 的范围且在十一个月之后滴度下降在 2.64log 到 3.05log 的范围。系列 5 和 6 显示在六个月之后滴度下降在 2.44log 和 2.82 的范围且在 11 个月之后下降在 5.09log 和 5.02log 的范围。在 37°C 下,系列 1、2、3 和 4 显示在六周之后滴度下降在 1.51log 到 4.83log 的范围且在十六周之后滴度下降在 4.0log 到 5.04log 的范围。系列 5&6 显示滴度下降在六周之后在 2.92log 到 3.54log 的范围且在十六周之后滴度变成零。

[0146] 图 9 中显示的是在五种不同的制剂中的轮状病毒在 37°C 下的稳定性数据。没有稳定剂的制剂显示滴度值有很大的下降且在六周之后变成零。含有 80%蔗糖和 0.5%海藻糖的预处理的病毒的半成品在 4 周之后下降 2.2log,在六周之后下降 2.92log,在 8 周之后下降 6.02log 且在十周之后变成零。含有 20%乳白蛋白水解物的半成品显示在四周之后下降 1.39log,在六周之后下降 2.09log,在八周之后下降 2.29log 以及在 16 周之后下降 5.39log。含有 20%乳白蛋白水解物和 0.5%海藻糖的半成品显示在 16 周之后滴度下降 4.97。含有 5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组的半成品显示从第一周到第 16 周的逐渐的下降;在 6 周之后下降 1.1log,在 12 周之后下降 2.42log 以及在 16 周之后下降 3.85log。当半成品是用 80%蔗糖、0.5%海藻糖配制的时,观察到疫苗在 37°C 下的稳定性一直到一周且缓慢降低直到四周并在六周之后急剧下降。用 20%乳白蛋白水解物配制的半成品显示更好的稳定性且能够保持小于 1.5log 的滴度下降直到四周并观察到滴度的逐渐下降直到 16 周。当与只含有 20%乳白蛋白的疫苗相比时,在 20%乳白蛋白水解物和 0.5%海藻糖的情况下在 37°C 下在 16 周之后没有观察到滴度的如此显著的下降。当半成品是用 5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖配制的时,观察到在六周之后下降小于 1.5log 且在 16 周之后下降 3.85log。

[0147] 图 10 中显示的是在五种不同的制剂中的低滴度 (小于 10^4) 轮状病毒疫苗在 2-8°C (10A) 和 37°C (10B) 下的稳定性。在 2-8°C 下,没有稳定剂的制剂显示滴度值下降且在 24 个月之后变成 0.6。具有 80%蔗糖和 0.5%海藻糖的制剂显示在 24 个月之后下降 1.8log,具有 20%乳白蛋白水解物的制剂以及具有 20%乳白蛋白水解物和 0.5%海藻糖的制剂显示下降 0.8log 和 0.89log,且具有 5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的制剂显示在 24 个月之后滴度下降 0.7log。在 37°C 下,没有稳定剂的制剂显示滴度值有很大的下降且在四周之后变成 0.8。用 80%蔗糖和 0.5%海藻糖配制的半成品在 4 周之后下降

2.06log,而含有 20%乳白蛋白水解物的半成品显示在六周之后下降 2.48log,用 20%乳白蛋白水解物和 0.5%海藻糖配制的半成品显示在 8 周之后滴度下降 2.79。用 5%乳白蛋白水解物、80%蔗糖和 0.5%海藻糖的组合配制的半成品显示从第一周到第 10 周的逐渐的下降;观察到在 4 周之后下降 1.2log,在 8 周之后下降 1.7log 以及在 10 周之后下降 2.5log。图 10 证明了特定浓度的乳白蛋白水解物明确地改善低滴度轮状病毒疫苗在 37℃下的稳定性的事实。

[0148] 图 11A 到 11H 中显示的是含有不同稳定剂的预处理的病毒的液体制剂的稳定性数据。相同的内容在下面表 3 中重现。

[0149] 图 12A 到 12H 中显示的是含有不同稳定剂的典型的病毒的液体制剂的稳定性数据。相同的内容在下面表 4 中重现。

[0150]

表-3

[0151]

轮状病毒 116E 液体制剂

制剂明细

水解蛋白胨-20%

0 天

滴度	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	5.99	5.48	4.85	4.05	3.72	2.98	2.26							
25°C	5.99	6.01	6	6.08	5.89	5.94	5.98	5.82	5.69	5.08				
2°C-8°C	5.99			6.02			6.05			5.97	6.01	5.95	6.13	6.02

制剂明细

水解蛋白胨-20%

海藻糖-1%

岩藻糖-0.02%

0 天

滴度	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	6.28	6.11	5.65	5.45	5.28	4.97	4.05	3.32	2.65					
25°C	6.28	6.12	6.13	6.03	6.05	5.98	6.2	5.94	5.82	5.52				
2°C-8°C	6.28			6.15			6.02			6.17	6.15	6.12	6.25	6.16

制剂明细

卵蛋白水解物 -20%

0 天

滴度	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	6.11	5.56	5.68	4.56	4.11	3.98	2.81	6.11	5.56					
25°C	6.11	6.1	6	5.98	5.97	6.14	4.99	4.25	3.95	3.9				

[0154]

0 天														
滴度	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	6.13	5.93	4.75	3.21	1.13									
25°C	6.13	6.18	6.23	6.31	6.08	6.1	5.98	5.55	5.28	4.94	6.08	5.99	6.11	6.23
2°C-8°C	6.13			6.19			6.22							
制剂明细														
水解蛋白胨-20%														
海藻糖-1%														
岩藻糖-0.02%														
0 天														
滴度	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	6.31	6.11	4.59	3.34	2.32									
25°C	6.31	6.28	6.13	6.01	6.05	5.95	6.38	5.75	5.52	5.22	6.17	5.93	6.12	6.31
2°C-8°C	6.31			6.35			6.28							
制剂明细														
卵蛋白水解物 -20%														
0 天														
滴度	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	6.02	4.54	2.67	1.57										
25°C	6.02	6.17	6.19	6.08	5.97	5.18	4.37	3.68	2.54					
2°C-8°C	6.02			6.18			6.23							
制剂明细														
卵蛋白水解物 -20%														
海藻糖 0.5%														

[0155]

D-山梨糖醇-1%

甘露糖-0.5%

0天

滴度	1周	2周	3周	4周	6周	8周	12周	16周	20周	24周	36周	48周	72周	97周
37℃	5.58	3.28	2.76	1.59										
25℃	6.05	6.11	6.14	5.94	5.97	6.13	5.29	4.51	4.12					
2℃-8℃	6.02			6.23			6.12			6.28	6.33	6.15	6.01	6.17

制剂明细

乳白蛋白水解物-20%

0天

滴度	1周	2周	3周	4周	6周	8周	12周	16周	20周	24周	36周	48周	72周	97周
37℃	4.96	2.81	1.78	1.12										
25℃	6.12	6.21	5.96	6.22	5.89	6.01	5.92	5.43	4.98	4.42				
2℃-8℃	6.08			6.18			6.36			6.11	6.06	5.99	6.12	6.23

制剂明细

乳白蛋白水解物-20%

海藻糖-0.5%

0天

滴度	1周	2周	3周	4周	6周	8周	12周	16周	20周	24周	36周	48周	72周	97周
37℃	4.56	3.46	2.66	2.06	1.89	1.35								
25℃	6.21	6.15	6.06	6.13	6.18	6.25	6.31	5.85	5.67	5.26				
2℃-8℃	6.12			6.32			6.21			6.26	6.11	6.15	6.01	6.07

制剂明细

酵母水解物-20%

		0 天	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	滴度	6.22	6.01	3.35	1.76	0.83										
	25°C	6.22	6.1	6.23	6.03	6.13	5.76	5.28	5.18	5.02	4.89	4.24	6.16	6.04	6.15	6.27
	2°C-8°C	6.22				6.28			6.45							6.35
制剂明细																
酵母水解物-20%																
麦芽糖-5%																
乳糖-0.5%																
		0 天	1 周	2 周	3 周	4 周	6 周	8 周	12 周	16 周	20 周	24 周	36 周	48 周	72 周	97 周
37°C	滴度	5.98	6.03	3.45	2.58	1.52										
	25°C	5.98	6.13	6.32	6.22	6.18	6.23	6.31	5.98	5.38	4.88	4.02	6.13	6.22	6.11	6.18
	2°C-8°C	5.98				6.03			6.15							

[0156] 图 13-17 中显示的是轮状病毒 116E 冻干制剂（制剂编号 26-45）在每种情况下，在 2-8°C (A)、25°C (B) 和 37°C (C) 下的稳定性数据。

[0157] 此实施例证明某些制剂适于在 2-8°C 下维持稳定性持续延长的时间。其还证明某些制剂特别适于在 25°C 或甚至 37°C 下储存。

[0158] 说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请公布表示本发明所属领域的技术人员的水平。所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文达到如同明确地和单独地指明每个单独的出版物或专利申请通过引用被并入的程度。虽然为了清楚地理解的目的已通

过说明和实施例相当详细地描述了前述发明,但可以在所附权利要求的范围内实施某种改变和修改将是明显的。

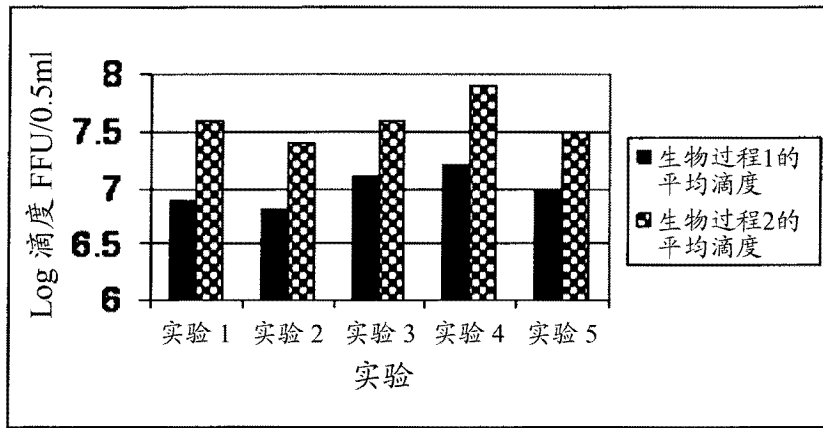


图 1

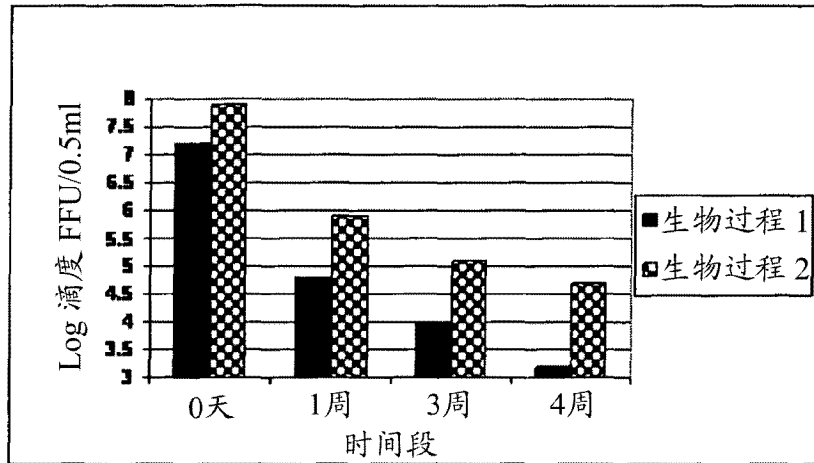


图 2A

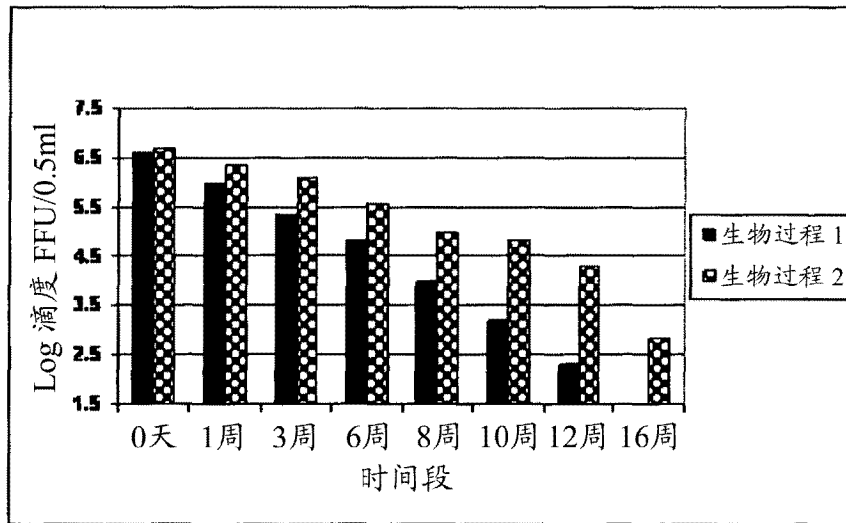


图 2B

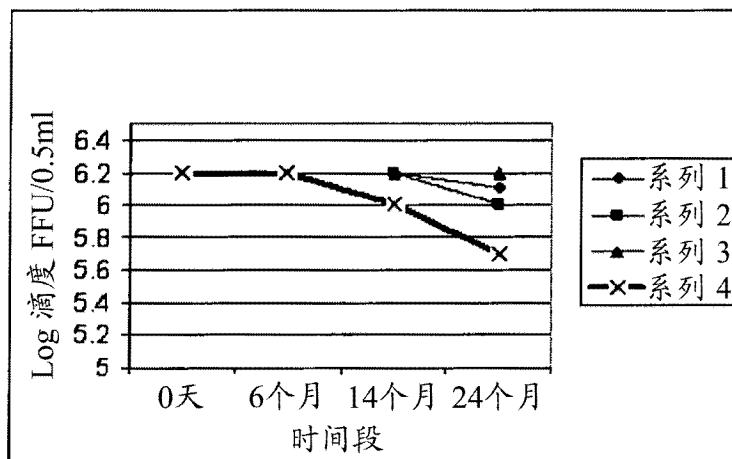


图 3A

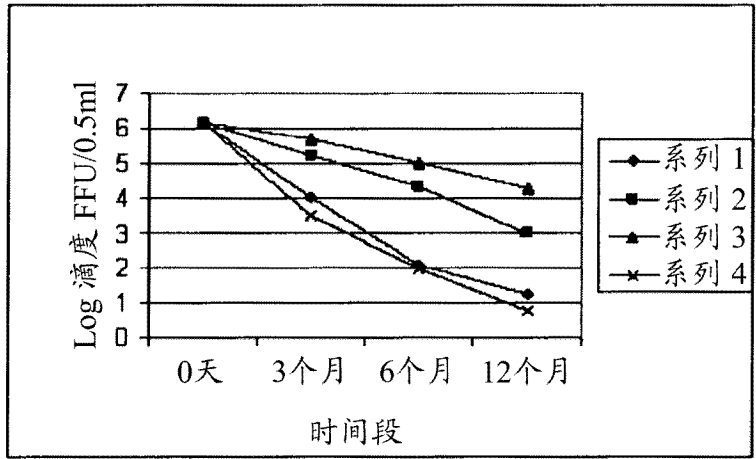


图 3B

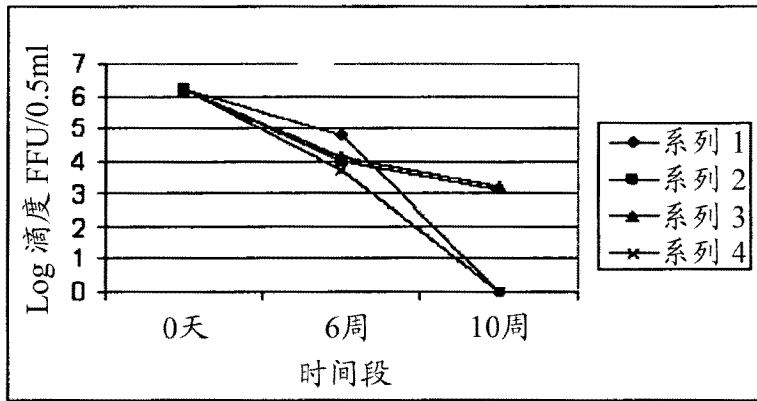


图 3C

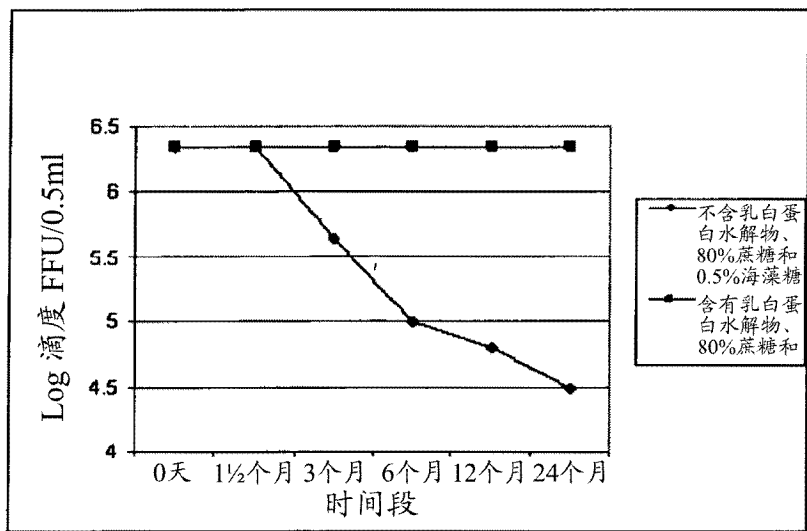


图 4A

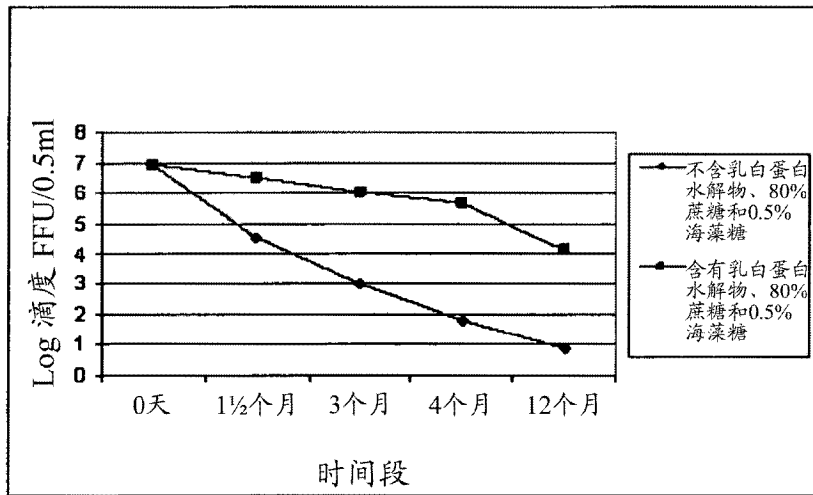


图 4B

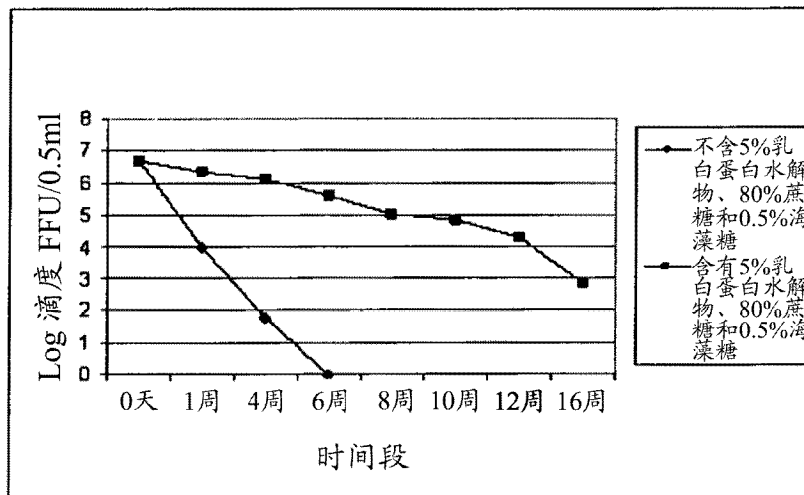


图 4C

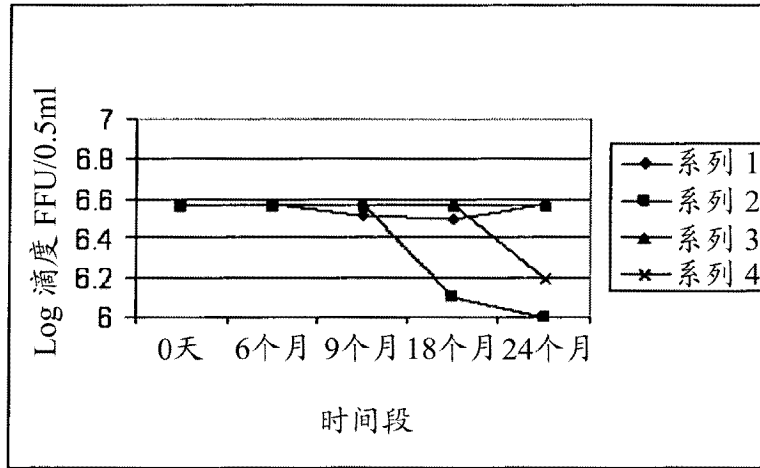


图 5A

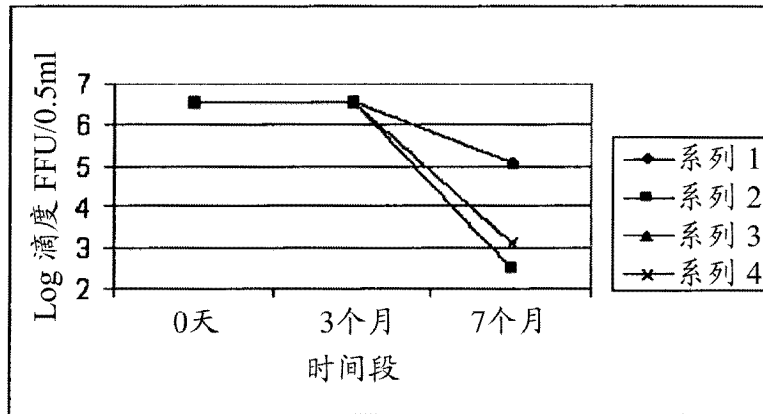


图 5B

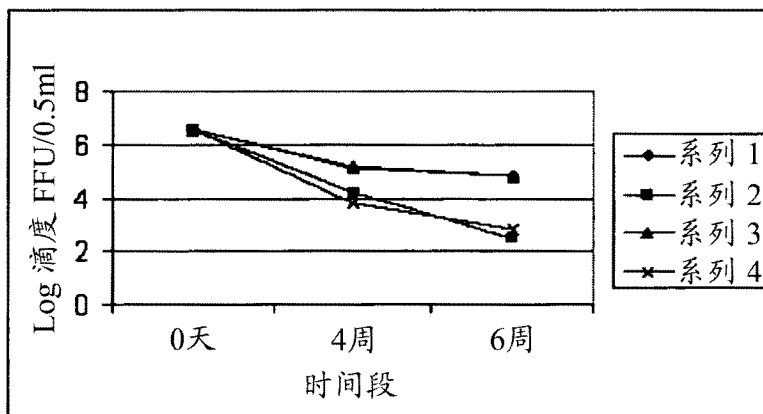


图 5C

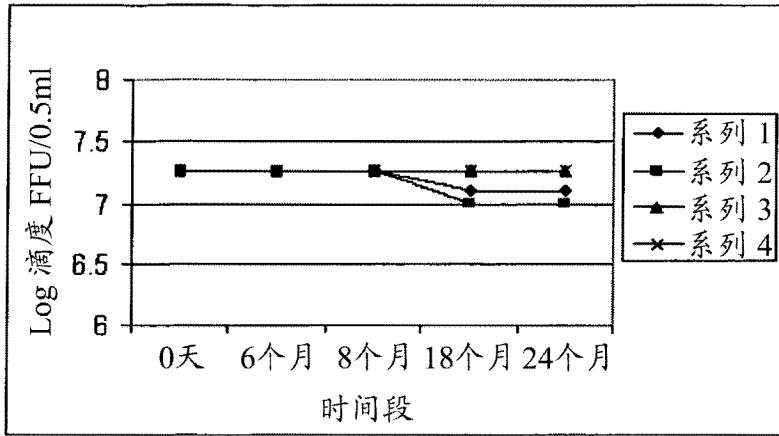


图 6A

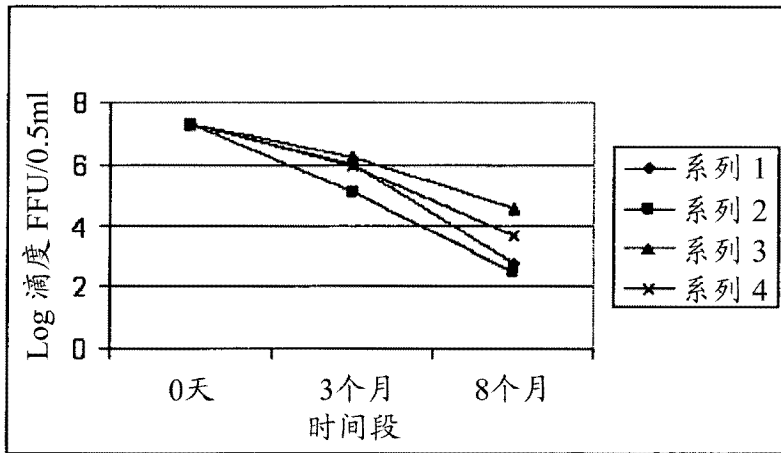


图 6B

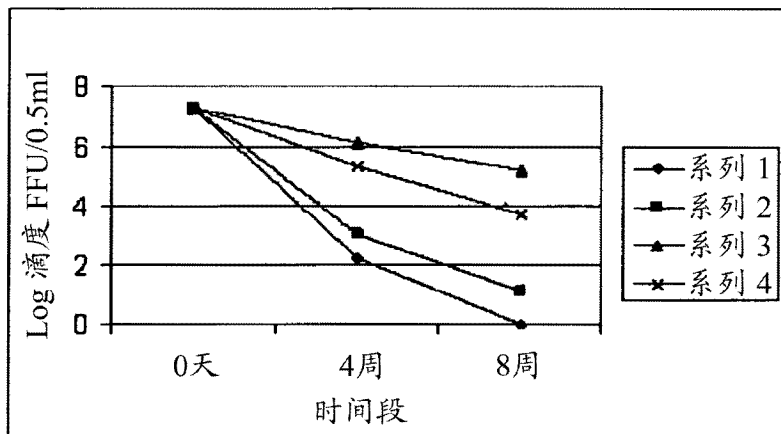


图 6C

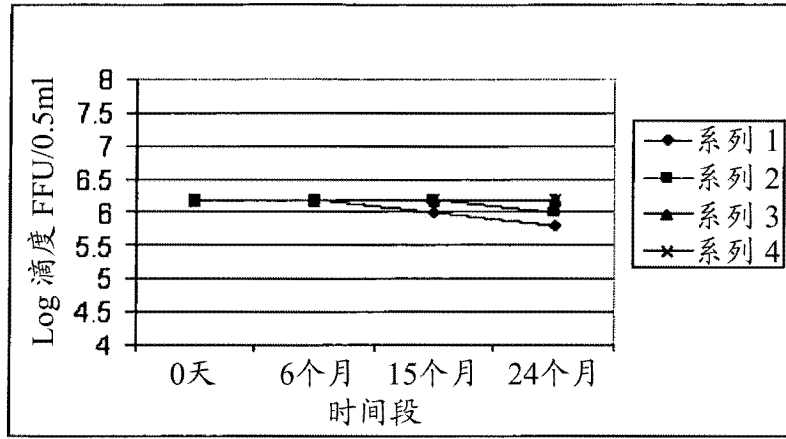


图 7A

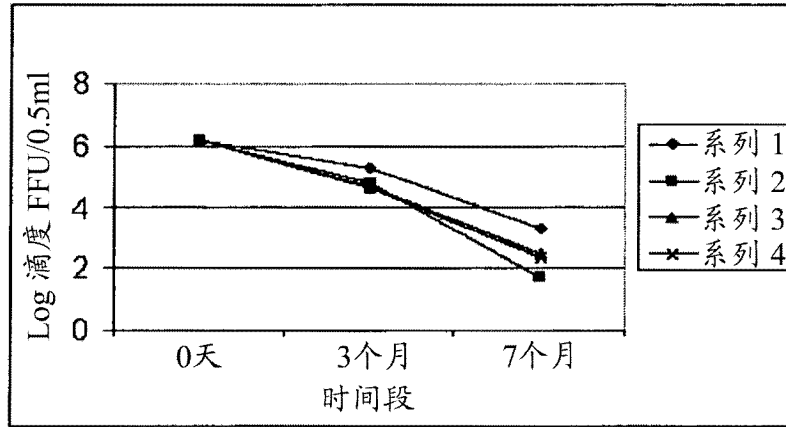


图 7B

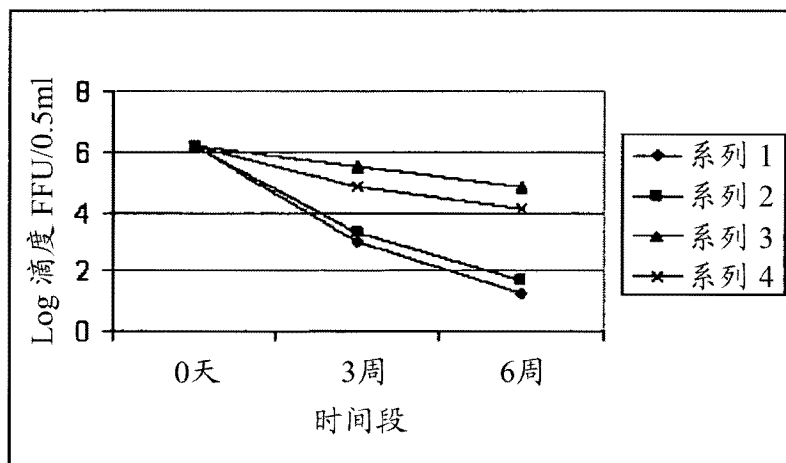


图 7C

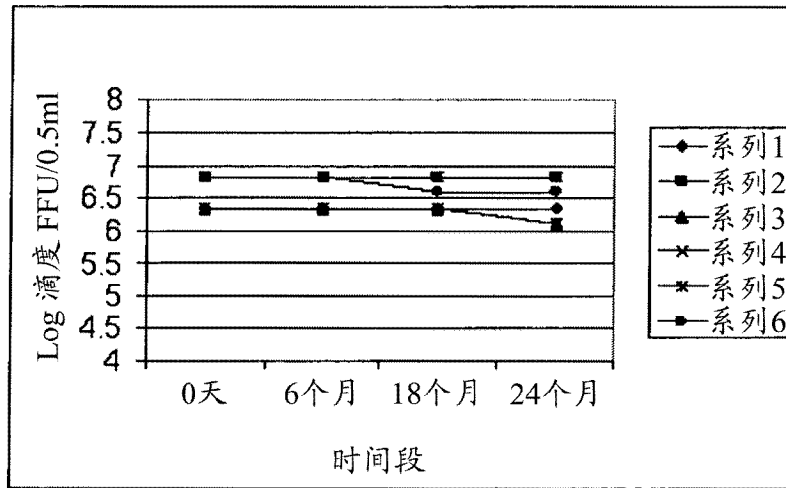


图 8A

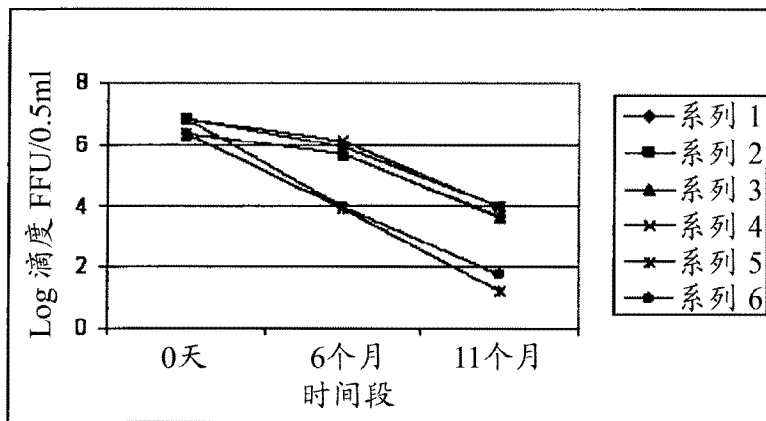


图 8B

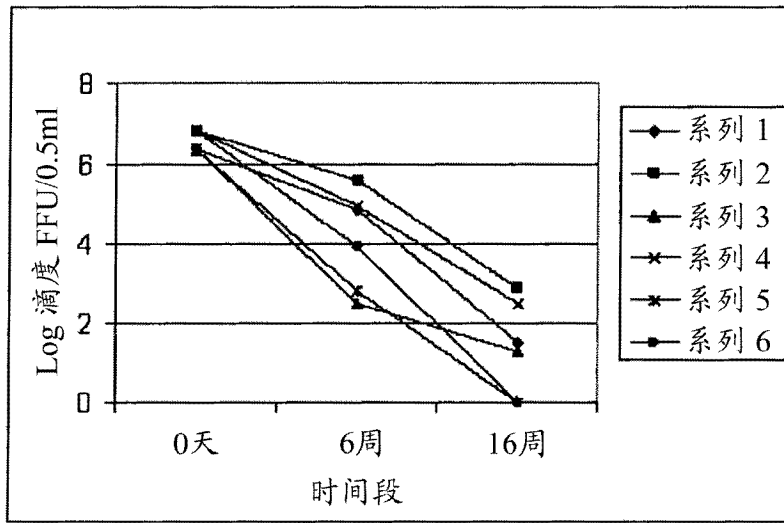


图 8C

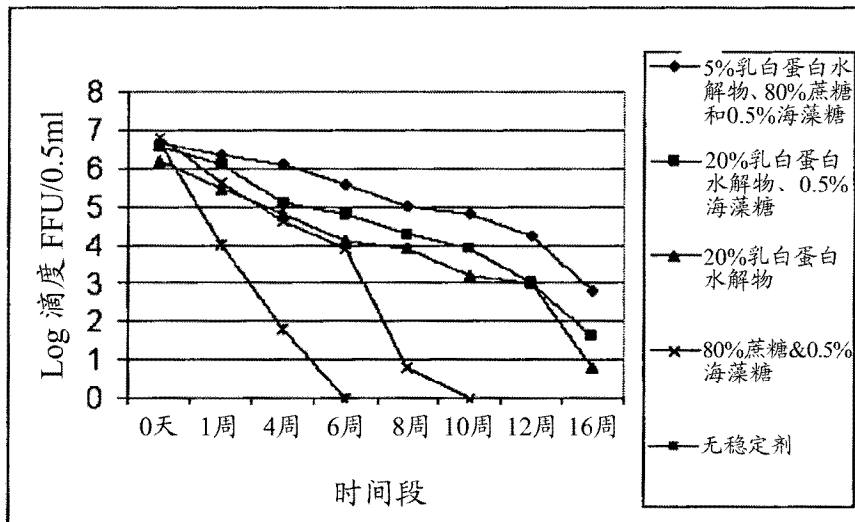


图 9

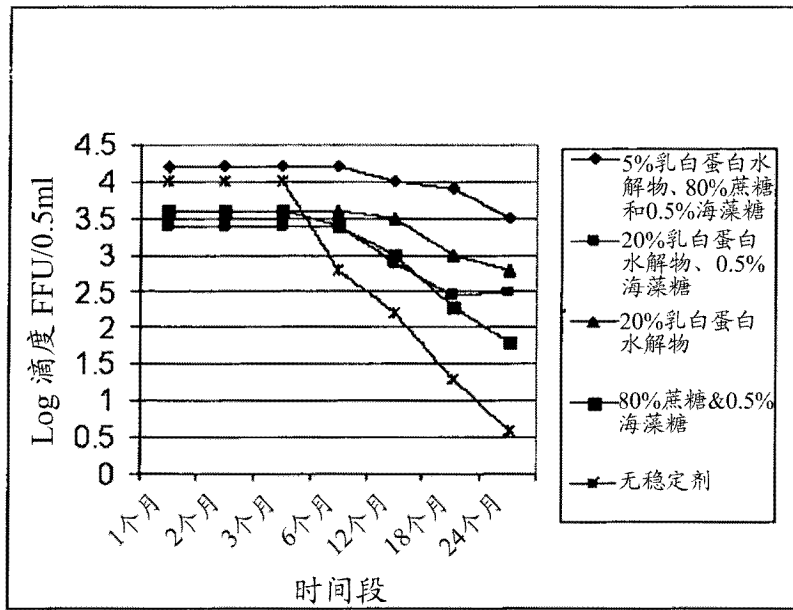


图 10A

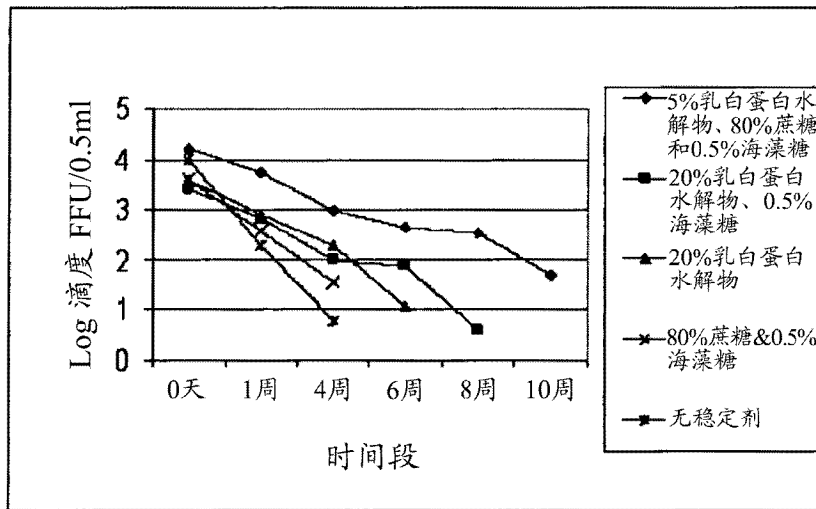


图 10B

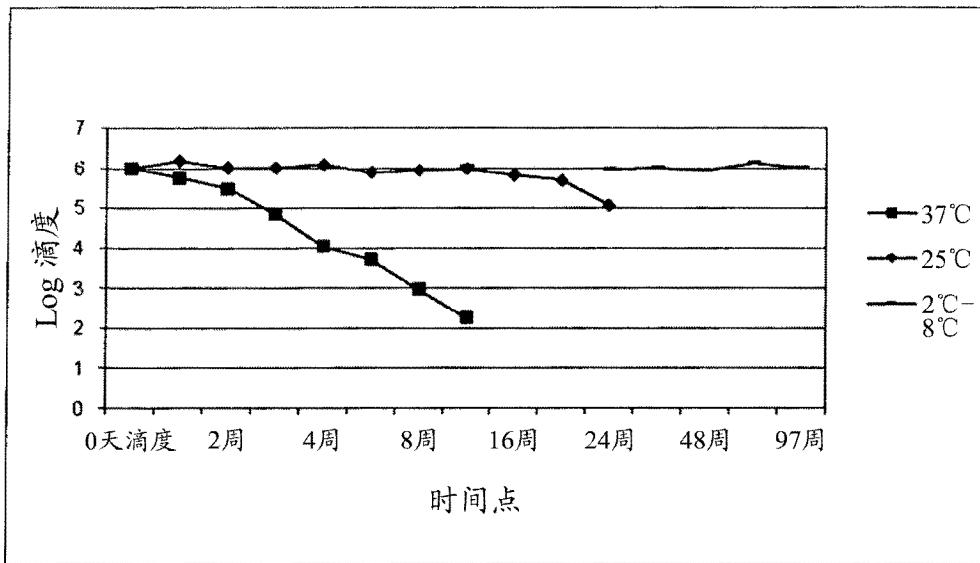


图 11A

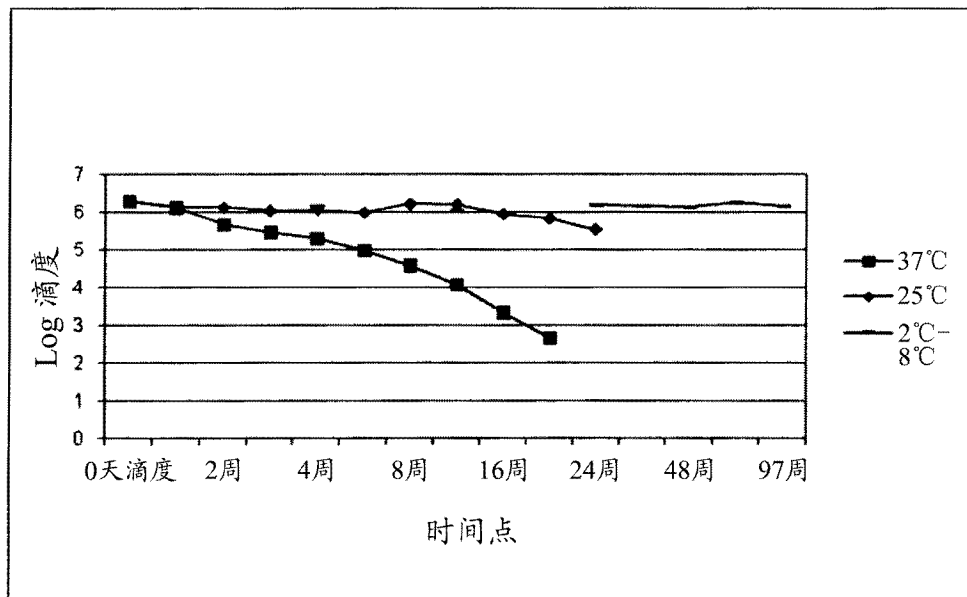


图 11B

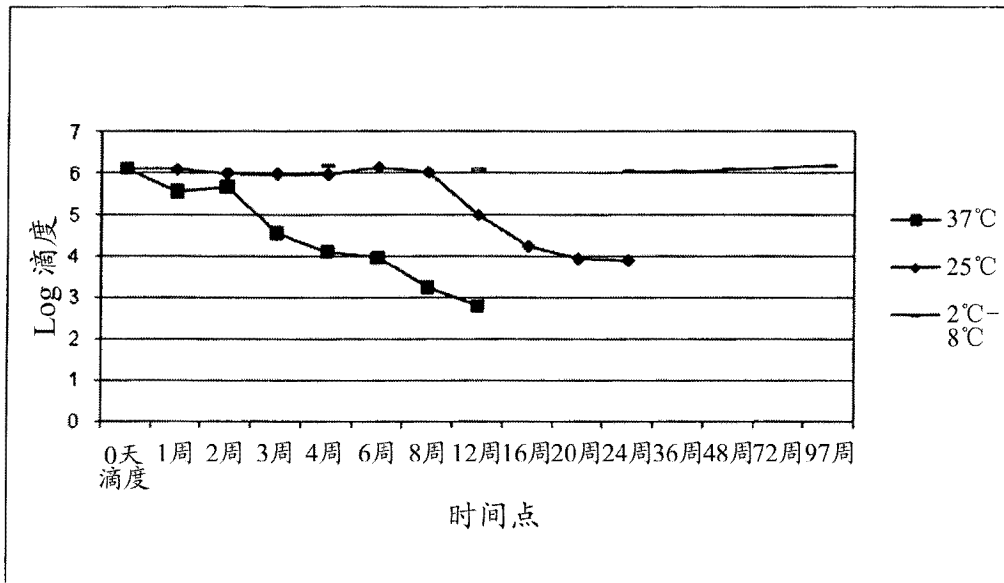


图 11C

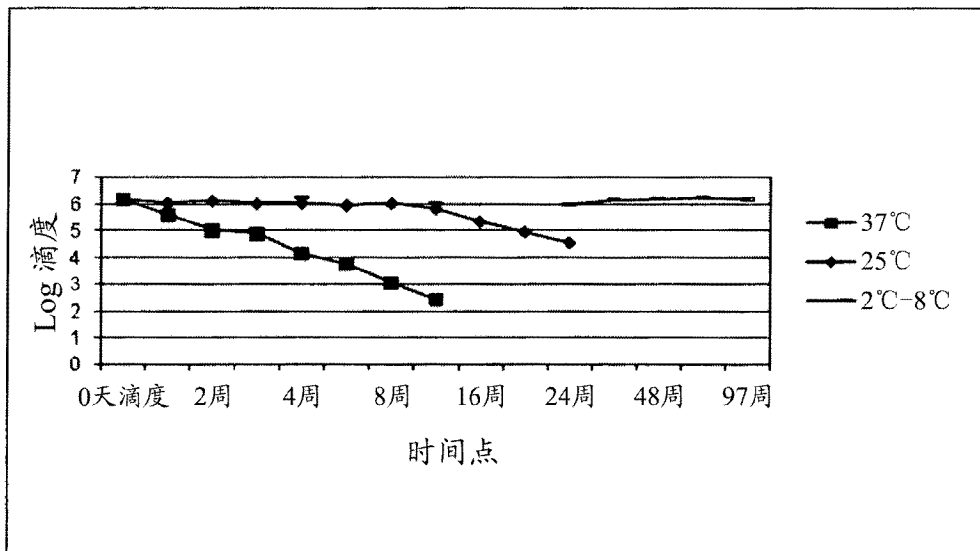


图 11D

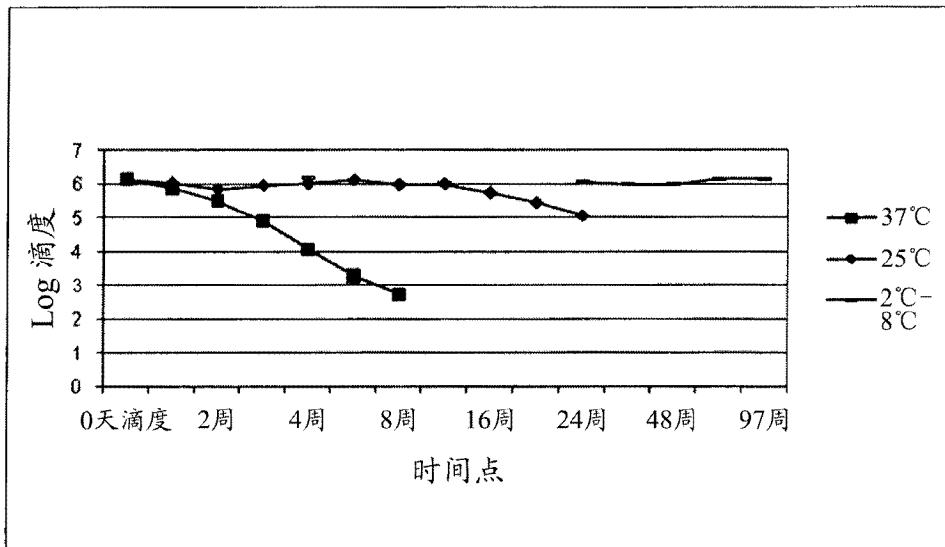


图 11E

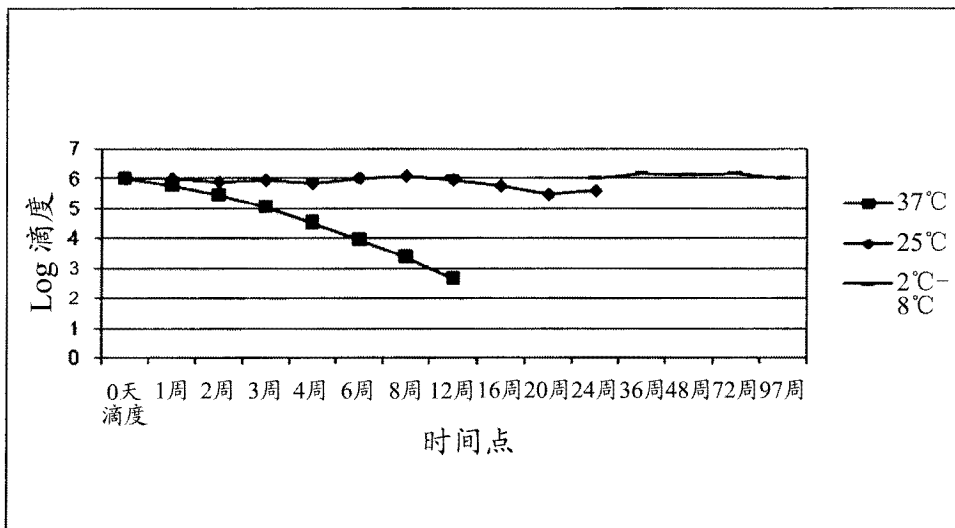


图 11F

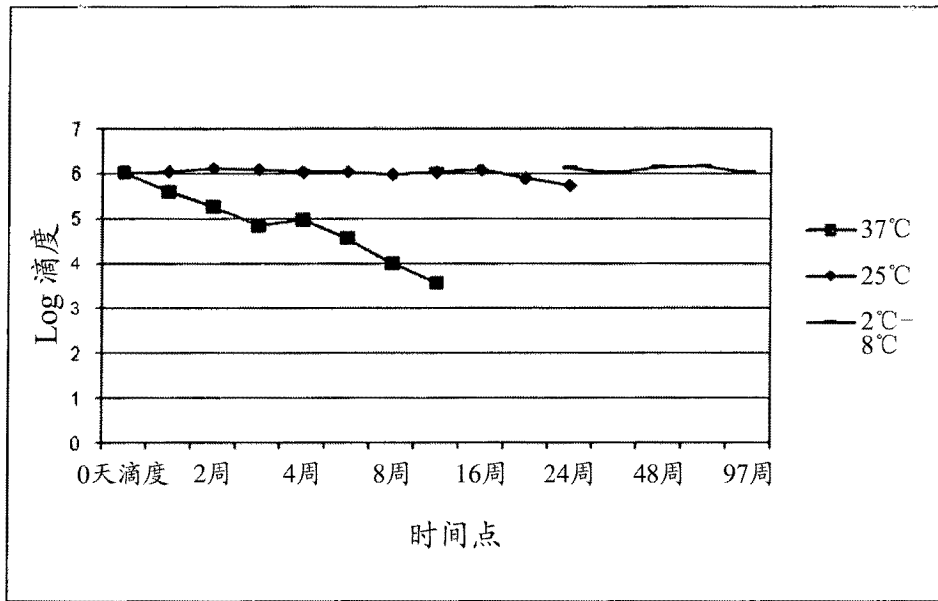


图 11G

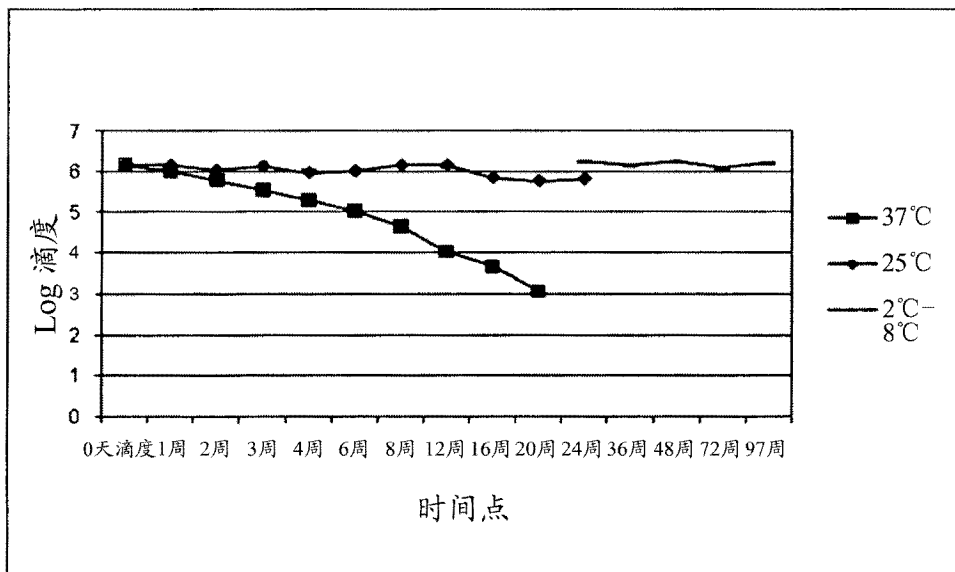


图 11H

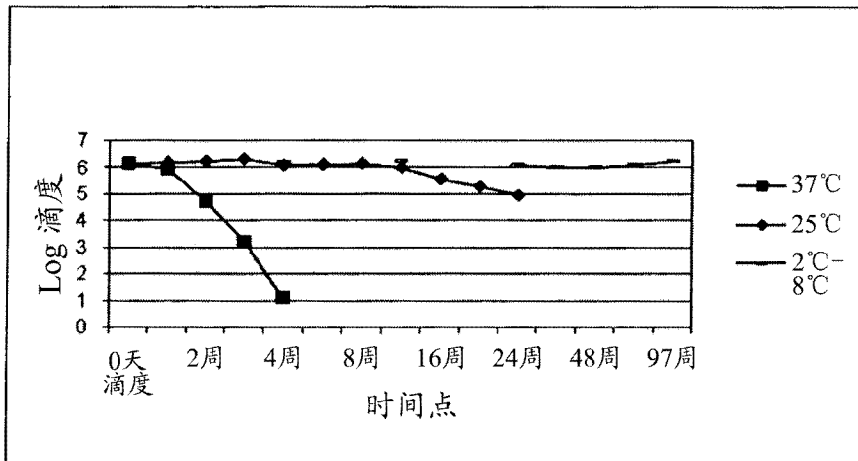


图 12A

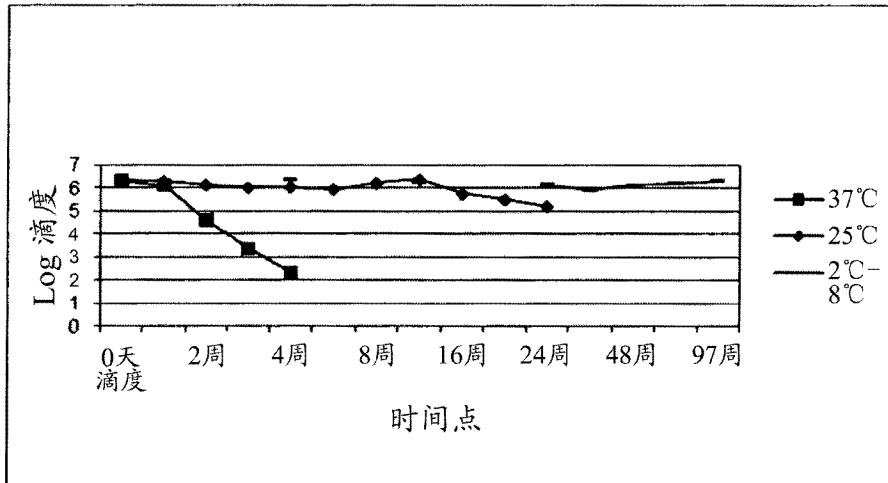


图 12B

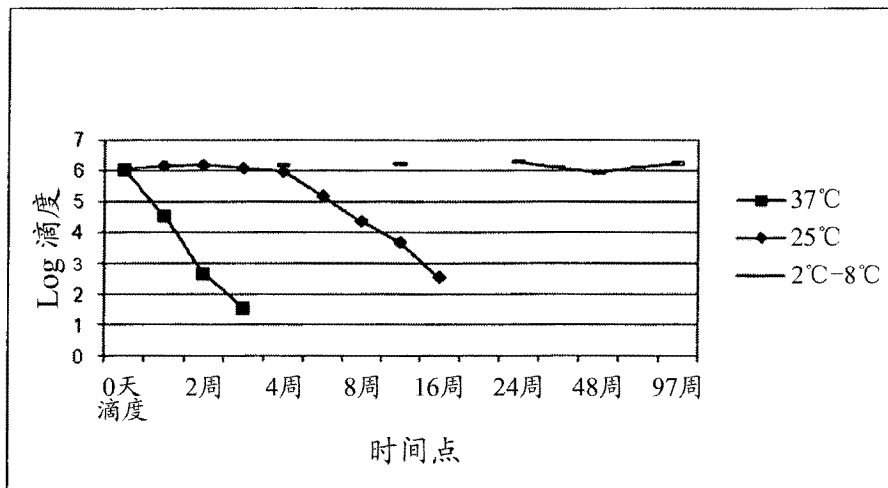


图 12C

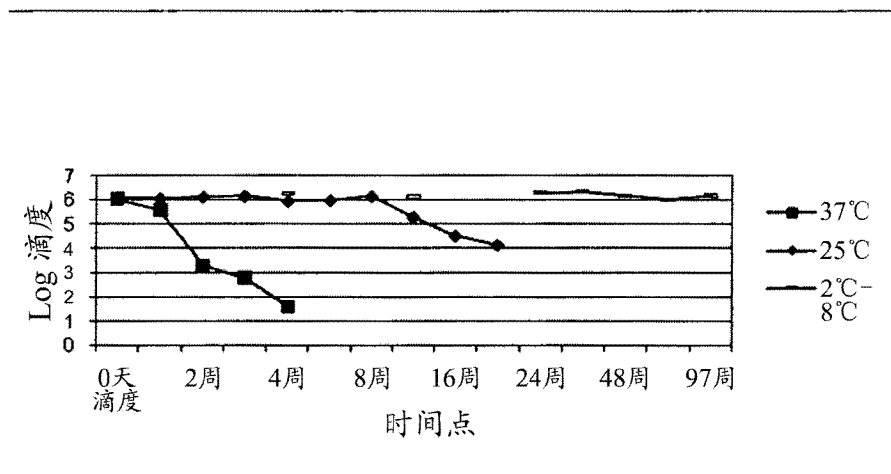


图 12D

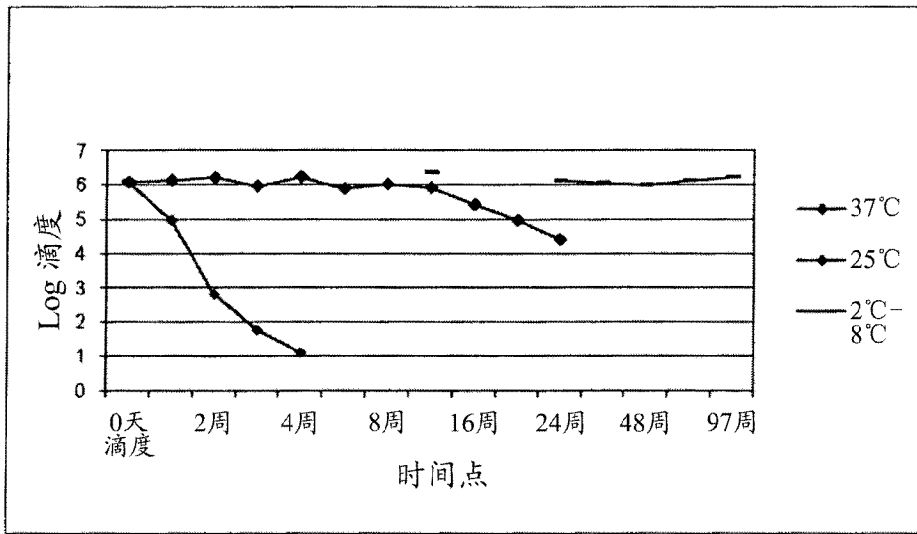


图 12E

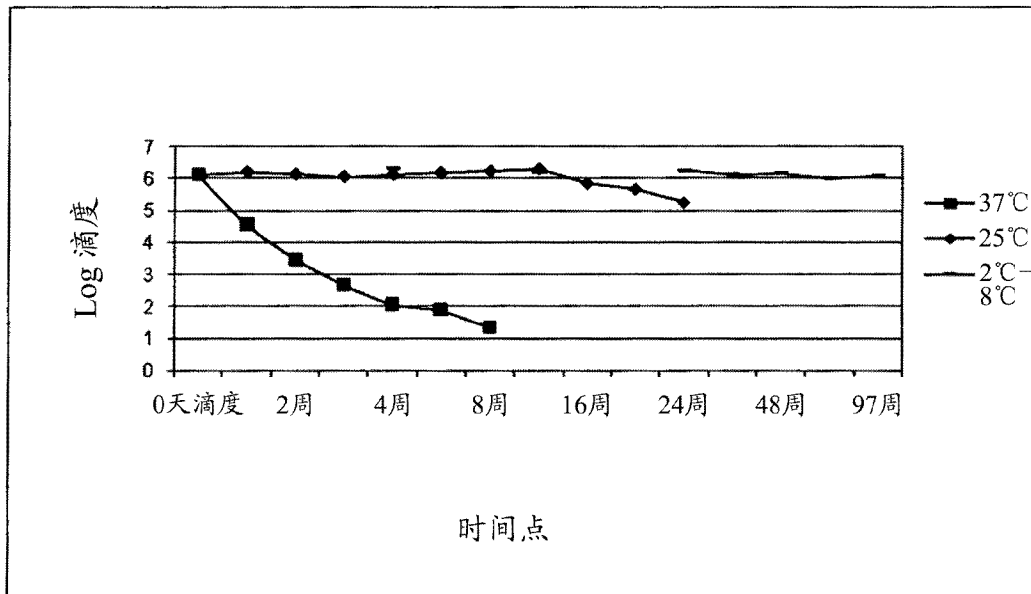


图 12F

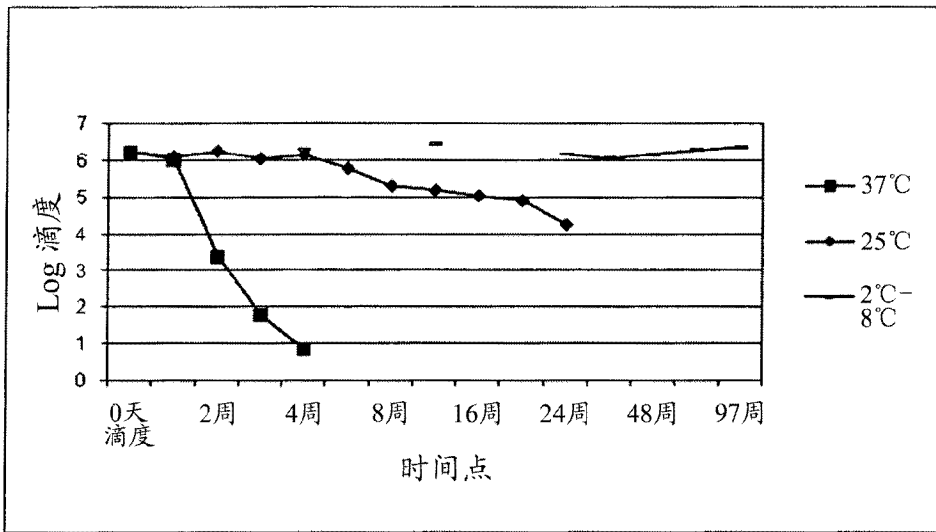


图 12G

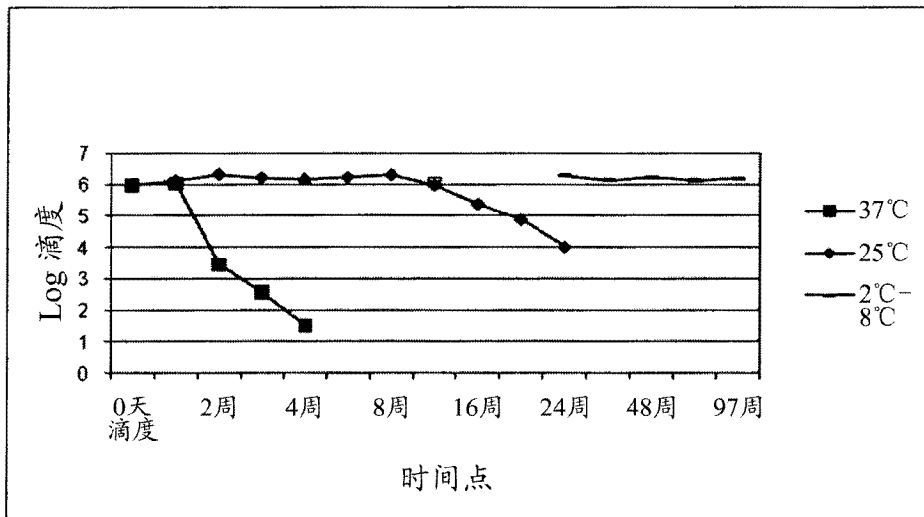


图 12H

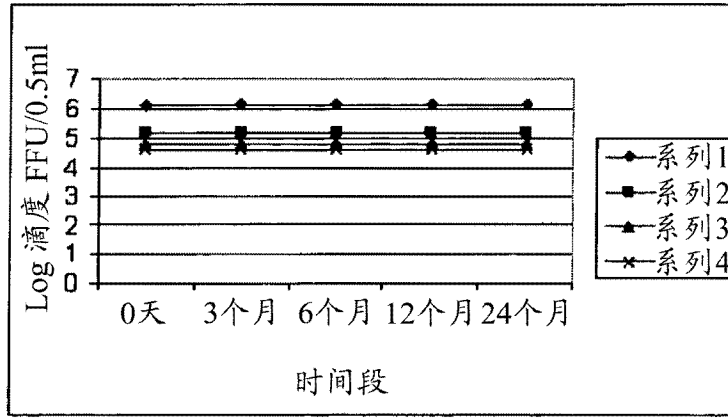


图 13A

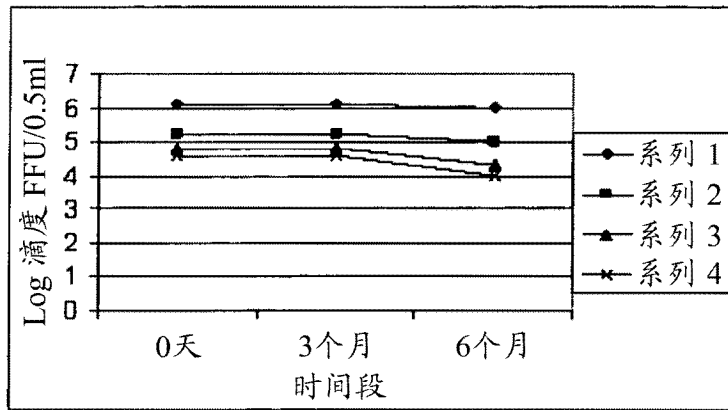


图 13B

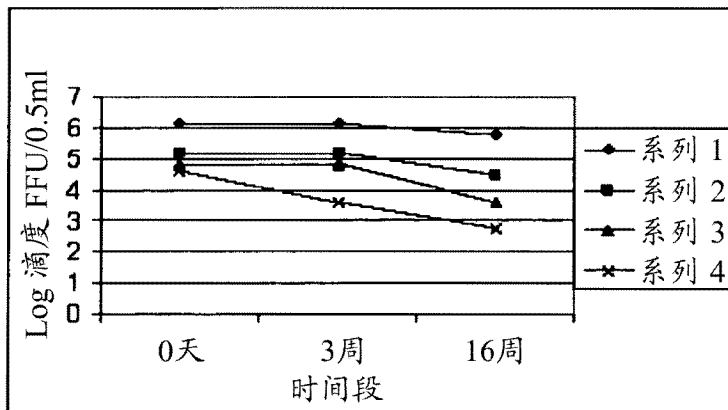


图 13C

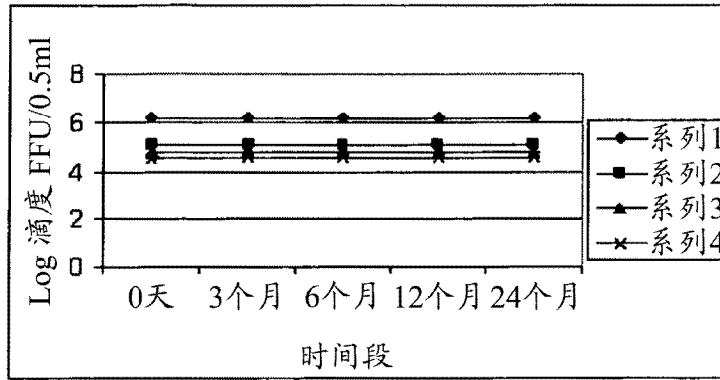


图 14A

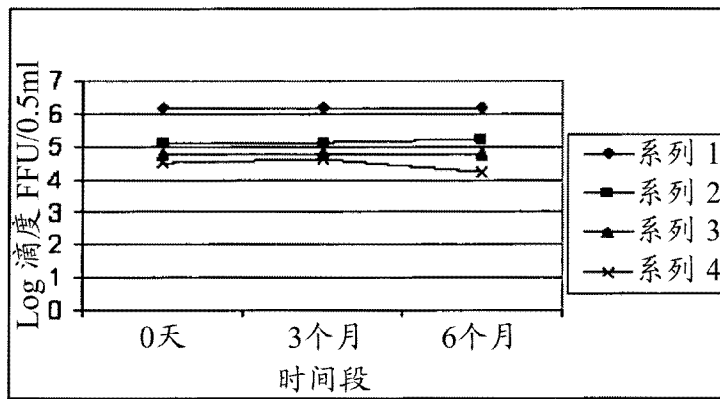


图 14B

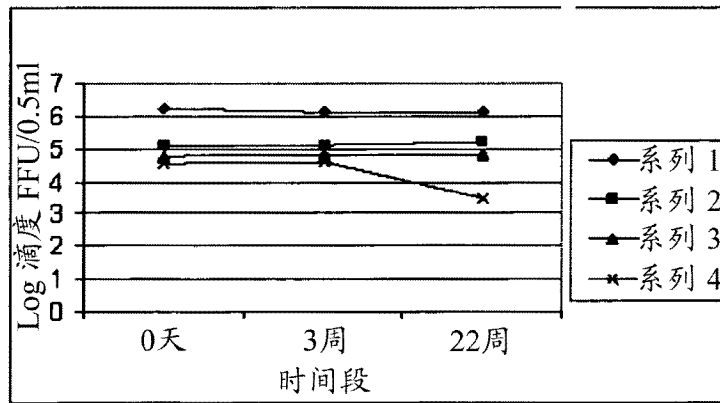


图 14C

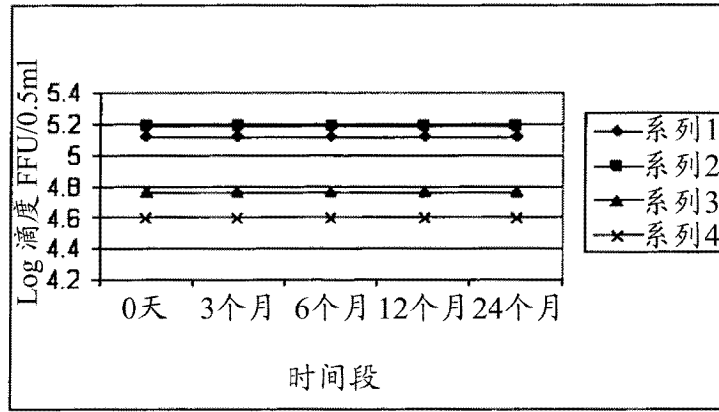


图 15A

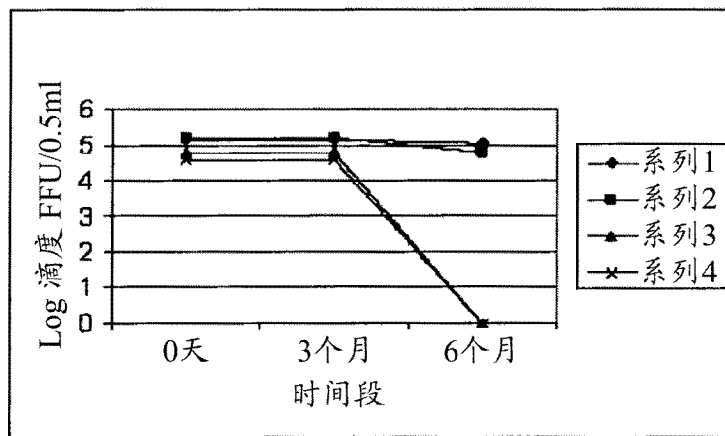


图 15B

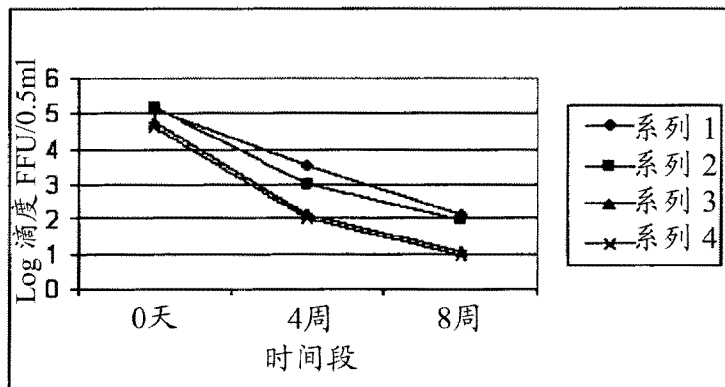


图 15C

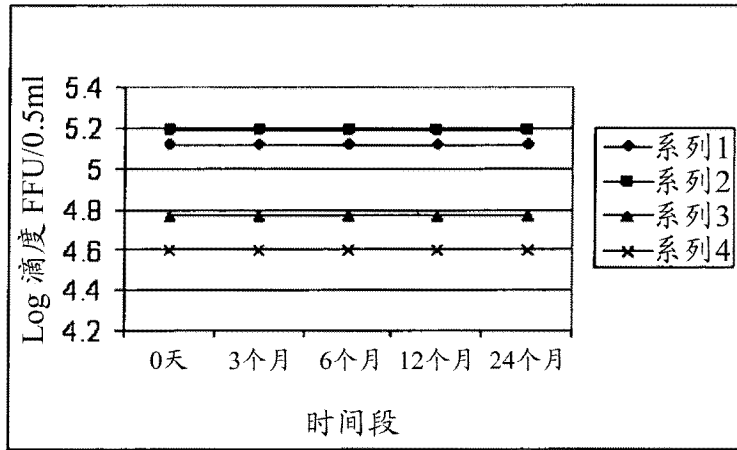


图 16A

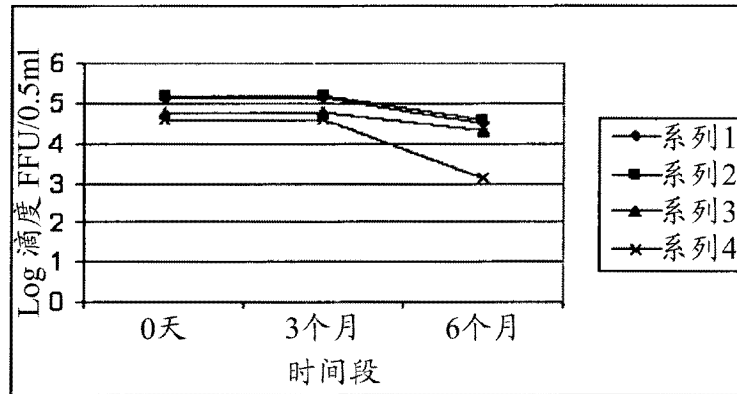


图 16B

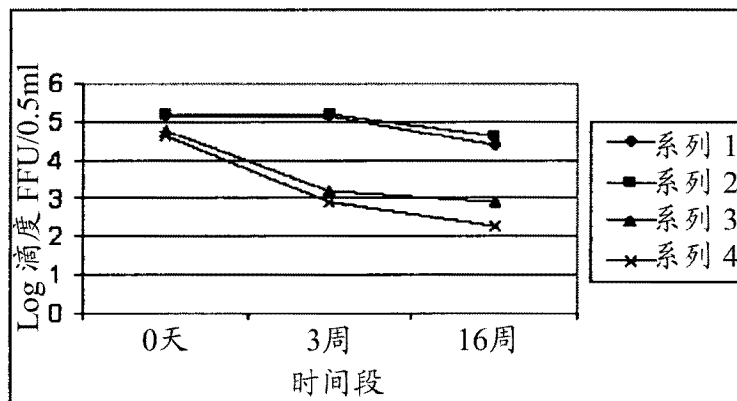


图 16C

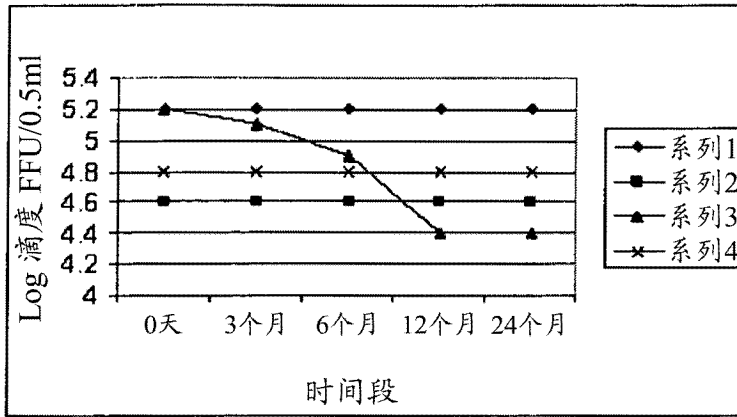


图 17A

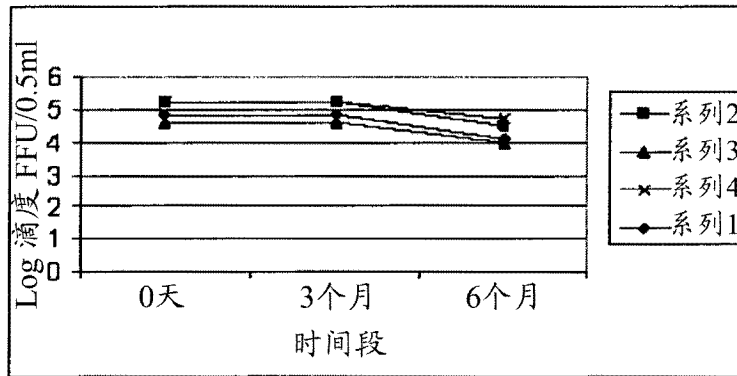


图 17B

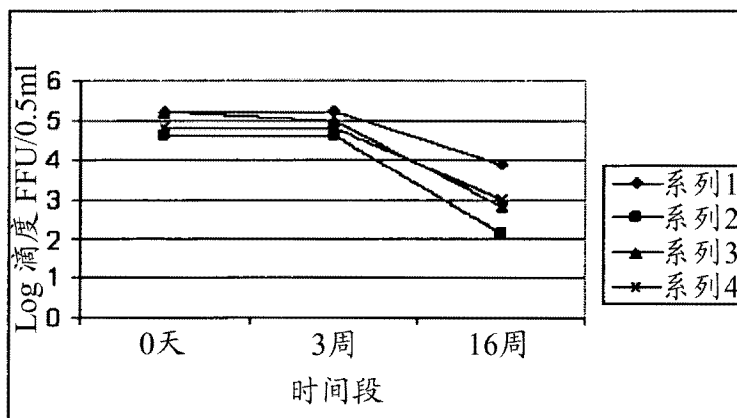


图 17C