



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111163789 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 201880054847.4

(22)申请日 2018.07.11

(30)优先权数据

62/604,591 2017.07.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/041626 2018.07.11

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2019/014338 EN 2019.01.17

(71)申请人 通用稳定技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 维克托·布罗施坦

(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 刘小立 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 35/76(2015.01)

A61K 35/74(2015.01)

A61K 47/10(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 47/26(2006.01)

F26B 5/06(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页 附图5页

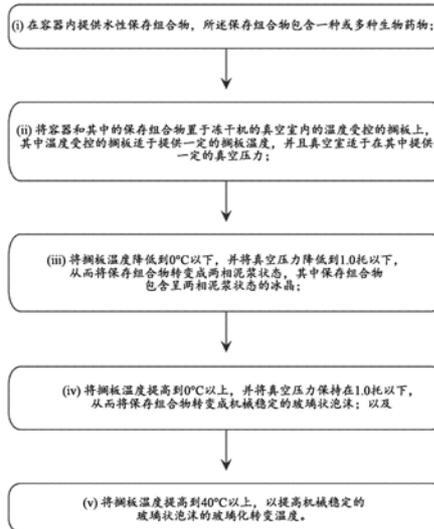
(54)发明名称

用于保存生物药物的方法

(57)摘要

本披露涉及使用常规冻干机执行PBV方案以保存生物药物的方法。还描述了保持生物药物隔离以使用所述常规冻干机实现无菌干燥的步骤。作为附带的益处,本发明提供了使用设置在洁净室区域外部的常规冻干机实现生物药物组合物的无菌干燥的符合优质生产规范(GMP)的方法。最后,披露了用于保存适于粘膜或透皮递送给患者的生物药物的方法和制剂。

用于保存生物药物的方法



1. 一种用于保存生物药物的方法,所述方法依次包括以下步骤:
  - (i) 在容器内提供水性保存组合物,所述保存组合物包含一种或多种生物药物;
  - (ii) 将所述容器和其中的所述保存组合物置于冻干机的真空室内的温度受控的搁板上,其中所述温度受控的搁板适于提供一定的搁板温度,并且所述真空室适于在其中提供一定的真空压力;
  - (iii) 将所述搁板温度降低到0℃以下,并将所述真空压力降低到1.0托以下,从而将所述保存组合物转变成两相泥浆状态,其中所述保存组合物包含呈所述两相泥浆状态的冰晶;
  - (iv) 将所述搁板温度提高到0℃以上,并将所述真空压力保持在1.0托以下,从而将所述保存组合物转变成机械稳定的玻璃状泡沫;以及
  - (v) 将所述搁板温度提高到40℃以上,以提高所述机械稳定的玻璃状泡沫的玻璃化转变温度。
2. 如权利要求1所述的方法,其中在步骤(iv)中,将所述搁板温度提高到20℃以上,并将所述冻干机的真空室内的所述真空压力降低到0.3托以下。
3. 如权利要求1所述的方法,其中在步骤(iv)中,在第一持续时间内,将所述搁板温度提高到20℃以上,并将所述真空室内的所述真空压力降低到0.3托以下,并且在所述第一持续时间之后,将所述搁板温度提高到30℃以上,并将所述真空室内的所述真空压力保持在0.3托以下。
4. 如权利要求1所述的方法,其中在步骤(v)中,将所述搁板温度提高到50℃以上。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述水性保存组合物包含液体或凝胶。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述保存组合物包含:一种或多种非还原糖、一种或多种糖醇或其组合。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述一种或多种非还原糖中的至少一种选自自由以下组成的组:蔗糖、海藻糖、棉子糖、甲基葡萄糖苷和2-脱氧葡萄糖。
8. 如权利要求6所述的方法,其中所述一种或多种糖醇中的至少一种选自自由以下组成的组:甘露糖醇、异麦芽酮糖醇、山梨糖醇和木糖醇。
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述保存组合物包含:一种或多种细胞内低温保护剂、一种或多种细胞外低温保护剂或其组合。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述一种或多种细胞内低温保护剂中的至少一种选自自由以下组成的组:甘油、丙二醇、赤藓糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、甲基葡萄糖苷和聚乙二醇。
11. 如权利要求9所述的方法,其中所述一种或多种细胞外低温保护剂中的至少一种选自自由以下组成的组:谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、赖氨酸、半胱氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和羟乙基淀粉。
12. 如权利要求1所述的方法,其中所述保存组合物包含一种或多种消泡剂。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述一种或多种消泡剂中的至少一种选自自由以下组成的组:聚丙二醇和乙二醇。
14. 如权利要求1所述的方法,所述方法进一步包括:在步骤(i)之前,将所述生物药物与一种或多种渗透性细胞内低温保护剂一起装载,然后将所述装载的生物药物与保存溶液

混合以形成所述保存组合物。

15. 如权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种生物药物包含:细菌、病毒、蛋白质或其组合。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述一种或多种生物药物包含一种或多种细菌、一种或多种病毒以及一种或多种蛋白质的组合。

17. 如权利要求1所述的方法,其中所述容器是以下之一:血清小瓶、塑料瓶、金属容器或托盘。

18. 如权利要求1所述的方法,其中所述容器包含孔径小于或等于0.25 $\mu\text{m}$ 的多孔膜,并且其中所述保存组合物通过所述多孔膜与所述真空室的环境隔离。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述容器密封在灭菌袋内。

20. 如权利要求18所述的方法,其中在所述容器的容积内提供多个金属球或陶瓷球。

21. 如权利要求20所述的方法,所述方法进一步包括:在步骤(v)之后,使用包含在所述容器中的所述金属球或陶瓷球研磨所述容器内的所述机械稳定的玻璃状泡沫。

22. 如权利要求1所述的方法,其中所述保存组合物包含相对于一份糖醇而言至少五份的二糖。

23. 如权利要求22所述的方法,其中所述保存组合物进一步包含水溶性氨基酸或其盐。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述水溶性氨基酸或其盐包含:精氨酸、谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸或其组合。

25. 一种用于无菌生产热稳定性生物药物的方法,所述方法包括以下步骤:

i. 在洁净室的第一区域内:

将保存组合物置于容器内,所述保存组合物包含一种或多种生物药物;

用多孔膜密封所述容器的开口以形成膜密封的容器,其中所述多孔膜具有小于或等于0.25微米的孔尺寸;

将所述膜密封的容器置于无菌的医用级灭菌袋中,并热密封所述灭菌袋;

ii. 将所述灭菌袋和其中的膜密封的容器从所述洁净室的第一区域输出到第二区域,其中所述方法进一步包括:

将所述灭菌袋和其中的膜密封的容器置于冻干机的真空室内的温度受控的搁板上;

调节真空压力和搁板温度以执行干燥方案,其中所述干燥方案包括将所述保存组合物转变成机械稳定的玻璃状泡沫;

iii. 在执行所述干燥方案之后,从所述灭菌袋中取出所述膜密封的容器,然后将所述膜密封的容器返回到所述洁净室的第一区域,其中在所述洁净室的第一区域中,所述方法进一步包括:

用无菌杯代替所述多孔膜或用不透水的无菌贴纸覆盖过滤器,以确保所述容器内的所述机械稳定的玻璃状泡沫在随后的储存过程中保持与外部湿度隔离;以及

任选地将所述容器内的所述机械稳定的玻璃状泡沫转变成粉末。

## 用于保存生物药物的方法

### 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及生物药物；并且更具体地，涉及使用常规冻干机保存生物药物的改进方法。

### 背景技术

[0002] 随着2016年10月18日发布的美国专利号9,469,835中披露的某些著名方法(称为“汽化保存(Preservation by Vaporization, PBV)”)的出现,与生物药物保存技术相关的领域最近获得了进展并取得了显著改善。

[0003] 目前,常规冻干机(冷冻干燥机)没有被设计用于使用PBV方案执行生物药物和其他组合物的保存。

[0004] 另外,常规冷冻干燥方案经常使生物药物组合物暴露于极低的温度下,这往往会影响这些组合物的活性。

[0005] 因为许多实验室和工业设施都具有常规冷冻干燥机,所以通常使用过时的方案(诸如常规冷冻干燥)来保存生物药物组合物,这会降低产品的活性和稳定性。

### 发明内容

#### 技术问题

[0006] 需要使用常规冻干机保存生物药物的改进方法。

[0007] 更具体地,需要根据PBV技术的改进方法,所述改进方法结合使用用于保存生物药物的常规冻干机。

[0008] 另外,当根据这些方法保存生物药物时,需要保持生物药物组合物的无菌隔离。

[0009] 在执行PBV方案期间,将需要独特的保存制剂来保护生物药物组合物。

#### 问题的解决方案

[0010] 本披露涉及使用常规冻干机执行PBV方案以保存生物药物的方法。

[0011] 本披露还涉及保持生物药物隔离以使用常规冻干机实现无菌干燥的步骤。

[0012] 另外,本披露涉及使用设置在洁净室区域外部的常规冻干机实现生物药物组合物的无菌干燥的符合优质生产规范(GMP)的方法。

[0013] 最后,本披露涉及用于生产适于粘膜或透皮递送给患者的环境温度稳定的微粉化生物药物的方法和制剂。

[0014] 本领域技术人员在对所附说明书、附图和权利要求书进行透彻审查后将理解问题的这些解决方案和其他解决方案。

#### 发明的有利效果

[0015] 汽化保存(PBV)是生物药物保存技术领域中的首选技术,因为该过程利用同时发生的水沸腾、冰晶升华以及蒸发,以在初始干燥(也称为“初次干燥”步骤,这一步骤是从保存组合物中除去大部分水的步骤)过程中获得相对温和的环境。温和的环境对敏感的蛋白质、病毒、细菌和其他细胞物质特别柔和,可以用于在环境温度下稳定疫苗、血液和微生物

组成分。随后的逐步干燥(也称为“二次干燥”)巧妙地提高了保存组合物的玻璃化转变温度,从而获得了机械稳定的无定形干燥玻璃状泡沫,其中包封在泡沫内的生物药物得到保护和保存,以(i)储存超过九十天(“长期储存”),以及(ii)在以后的某个时间进行重构或递送给患者。所披露的方法允许技术人员根据适于使用常规冻干机执行的PBV方案保存生物药物。因此,不需要专用设备就可使用PBV技术保存生物药物组合物。

[0016] 与使用常规冷冻干燥技术保存的相同组合物相比,使用PBV技术保存的生物药物组合物具有更高的功效。据认为,使用常规冷冻干燥技术经历的极端温度往往会破坏这些组合物的蛋白质表位和有用成分,从而使所得产品劣于PBV保存的组合物。

[0017] 可以使用本文披露的方法来实现生物药物组合物(诸如但不限于疫苗)的GMP生产。实际上,这些方法为工业应用的稳定化提供了改进的且更有效的符合GMP的材料处理。

[0018] 披露了在保存过程中保护生物药物并防止材料反玻璃化的某些保存制剂和方案。

[0019] 本领域普通技术人员在对其他有利效果进行透彻审查后将认识到这些有利效果。

### 附图说明

[0020] 图1示出了用于保存生物药物的方法。

[0021] 图2示出了在微粉化且随后储存后与PBV LAIV的实验测试活性有关的结果图。

[0022] 图3示出了与本文详述的一个实验相关联的DSC图。

[0023] 图4示出了与本文详述的另一个实验相关联的DSC图。

[0024] 图5示出了与本文详述的另一个实验相关联的DSC图。

### 具体实施方式

[0025] 出于解释而非限制的目的,下文提供了某些优选实施例的细节和描述,以使得本领域普通技术人员能够在其各个方面和实施例中制造和使用本发明。然而,这些细节和描述仅代表某些优选实施例,本领域技术人员在对本披露进行透彻审查后将容易理解许多未明确描述的其他实施例。因此,本披露的任何审查者都应通过权利要求书来解释本发明的范围,因为这种范围并不旨在由本文所述和所示的实施例来限制。

[0026] 现在,在一般实施例中,披露了一种用于保存生物药物的方法。所述方法依次包括以下步骤:

[0027] 步骤(i):在容器内提供水性保存组合物,所述保存组合物包含一种或多种生物药物;

[0028] 步骤(ii):将容器和其中的保存组合物置于冻干机的真空室内的温度受控的搁板上,其中温度受控的搁板适于提供一定的搁板温度,并且真空室适于在其中提供一定的真空压力;

[0029] 步骤(iii):将搁板温度降低到0°C以下,并将真空压力降低到1.0托以下,从而将保存组合物转变成两相泥浆状态,其中保存组合物包含呈两相泥浆状态的冰晶;

[0030] 步骤(iv):将搁板温度提高到0°C以上,并将真空压力保持在1.0托以下,从而将保存组合物转变成机械稳定的玻璃状泡沫;以及

[0031] 步骤(v):将搁板温度提高到40°C以上,以提高机械稳定的玻璃状泡沫的玻璃化转变温度。

[0032] 出于本文的目的,术语“保存组合物”一般是指用于保存生物药物以在-30℃至+40℃的环境温度下长期储存并且随后进行重构或递送给患者的组合物。所述保存组合物一般包含一种或多种糖以及一种或多种生物药物,其中生物药物可包含一种或多种细菌、一种或多种病毒、一种或多种蛋白质或其组合。所述保存组合物在其初始状态是水性的,即它是—定百分比的水组成大于百分之一的液体或凝胶。在该初始状态下,选择各种成分(诸如生物药物、糖、糖醇和其他成分)并将其混合在一起。然而,在PBV方案的初始干燥步骤(也称为“初次干燥”)中,在真空压力下通过同时发生的沸腾、蒸发和升华从水性组合物中除去水。因此,在初次干燥之后,所述保存组合物将基本上不含水,并且一般将体现为生物药物固定在其中的无定形干燥玻璃状基质或泡沫(本文为“机械稳定的玻璃状泡沫”)。

[0033] 因此,并且同样出于本文的目的,术语“机械稳定的玻璃状泡沫”是指PBV初次干燥后的保存组合物,其中所述保存组合物基本上不含水并且形成具有足以维持结构形态的机械强度的无定形干燥玻璃状泡沫。具体地,在PBV保存过程中,一旦保存组合物开始沸腾,气泡就会在组合物内部成核并生长,气泡在所述过程的早期将是运动的(不稳定的)泡沫,直到由于脱水形成的组合物粘度阻止水蒸气气泡进一步生长,并且气泡会在初次干燥快要结束时或大部分水蒸发后且泡沫变得机械稳定时固定在组合物内部。

[0034] 在一个实施例中,在步骤(iv)中,将搁板温度提高到20℃以上,并将冻干机的真空室内的真空压力降低到0.3托以下。

[0035] 在其他实施例中,在步骤(iv)中,在第一持续时间内,将搁板温度提高到20℃以上,并将真空室内的真空压力降低到0.3托以下,并且在第一持续时间之后,将搁板温度提高到30℃以上,并将真空室内的真空压力保持在0.3托以下。

[0036] 在一些实施例中,在步骤(v)中,将搁板温度提高到50℃以上。

[0037] 在各个实施例中,水性保存组合物(在初次干燥之前)包含液体或凝胶。

[0038] 可以通过在保存溶液中包括的聚合物之间或在聚合物与其他分子或离子之间进行化学交联来产生凝胶。离子可包括阳离子即Ca<sup>++</sup>或阴离子。

[0039] 可以通过在升温含有单独的交联成分的冻滴的混合物过程中进行化学交联来产生凝胶。可以使用低温制粒例如将溶液喷洒在低温液体诸如液氮(LN<sub>2</sub>)中来产生冻滴。

[0040] 也可以通过冷却变成0℃以下的凝胶的保存组合物来产生凝胶。

[0041] 在一些实施例中,通过低温制粒来冷却可以在冷却过程中发泡成凝胶的聚合物溶液。低温制粒是在冷却之前将材料分散成许多滴的过程。

[0042] 虽然可能有多种制剂,但所述保存组合物一般包含:一种或多种非还原糖、一种或多种糖醇或其组合。

[0043] 在一些实施例中,所述一种或多种非还原糖中的至少一种选自由以下组成的组:蔗糖、海藻糖、棉子糖、甲基葡萄糖苷和2-脱氧葡萄糖。然而,可类似地实施本领域技术人员已知的其他非还原糖。

[0044] 在一些实施例中,所述一种或多种糖醇中的至少一种选自由以下组成的组:甘露糖醇、异麦芽酮糖醇、山梨糖醇和木糖醇。然而,可类似地实施本领域技术人员已知的其他非还原糖。

[0045] 所述保存组合物可包含:一种或多种细胞内低温保护剂、一种或多种细胞外低温保护剂或其组合。

[0046] 在一些实施例中,所述一种或多种细胞内低温保护剂中的至少一种选自由以下组成的组:甘油、丙二醇、赤藓糖醇、山梨糖醇、甘露糖醇、甲基葡萄糖苷和聚乙二醇。

[0047] 在一些实施例中,所述一种或多种细胞外低温保护剂中的至少一种选自由以下组成的组:谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、精氨酸、丙氨酸、赖氨酸、半胱氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和羟乙基淀粉。

[0048] 所述保存组合物可进一步包含一种或多种消泡剂。

[0049] 在一些实施例中,所述一种或多种消泡剂中的至少一种选自由以下组成的组:聚丙二醇和乙二醇。

[0050] 在某些实施例中,所述方法可进一步包括在步骤(i)之前,将这些生物药物与一种或多种渗透性细胞内低温保护剂一起装载,然后将这些装载的生物药物与保存溶液混合以形成保存组合物。

[0051] 所述一种或多种生物药物包含:细菌、病毒、蛋白质或其组合。

[0052] 在一个实施例中,所述一种或多种生物药物包含一种或多种细菌、一种或多种病毒以及一种或多种蛋白质的组合。

[0053] 在各个实施例中,容器可包含以下之一:血清小瓶、塑料瓶、金属容器或托盘。

[0054] 在一些实施例中,容器可包括孔径小于或等于0.25 $\mu\text{m}$ 的多孔膜,并且保存组合物可通过多孔膜与真空室的环境隔离。多孔膜可包括用于水溶液灭菌的任何常规过滤器。

[0055] 在一些实施例中,容器还被密封在灭菌袋内。

[0056] 在一些实施例中,容器可容纳多个金属球或陶瓷球,这些金属球或陶瓷球与保存组合物一起提供在容器的容积内。

[0057] 在一些实施例中,所述方法进一步包括在步骤(v)之后,使用包含在容器中的金属球或陶瓷球研磨容器内的机械稳定的玻璃状泡沫(“球磨”),以将机械稳定的玻璃状泡沫转变成颗粒/粉末。

[0058] 在一些实施例中,特别是在旨在将生物药物用于粘膜或透皮递送的情况下,所述保存组合物可包含相对于一份糖醇而言至少五份的二糖。另外,所述保存组合物可进一步包含水溶性氨基酸或其盐。在一些实施例中,水溶性氨基酸或其盐可包含:精氨酸、谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸或其组合。

[0059] 在另一方面,披露了一种用于无菌生产热稳定性生物药物的方法。所述方法包括以下步骤:

[0060] 在洁净室的第一区域内:将保存组合物置于容器内,所述保存组合物包含一种或多种生物药物;用多孔膜密封容器的开口以形成膜密封的容器,其中所述多孔膜具有小于或等于0.25微米的孔尺寸;并且将膜密封的容器置于无菌的医用级灭菌袋中,并热密封灭菌袋;

[0061] 将灭菌袋和其中的膜密封的容器从洁净室的第一区域输出到第二区域,其中所述方法进一步包括:将灭菌袋和其中的膜密封的容器置于冻干机的真空室内的温度受控的搁板上;调节真空压力和搁板温度以执行干燥方案,其中所述干燥方案包括将保存组合物转变成机械稳定的玻璃状泡沫;以及

[0062] 在执行干燥方案之后,从灭菌袋中取出膜密封的容器,然后将膜密封的容器返回到洁净室的第一区域,其中在洁净室的第一区域中,所述方法进一步包括:用无菌杯代替多

孔膜或用不透水的无菌贴纸覆盖过滤器,以确保容器内的机械稳定的玻璃状泡沫在随后的储存过程中保持与外部湿度隔离;并且任选地将容器内的机械稳定的玻璃状泡沫转变成粉末。

[0063] 洁净室通常被设计成包括三个区域,这三个区域通常被称为:A、B和C。A是洁净室的第一部分也是最无菌的部分。根据FDA规定,如果个体穿着洁净的衣服和/或覆盖物,则他们可以从事某些工作或者可以在洁净室的区域A外(区域B和C中)。不允许人员进入最洁净的区域A。只允许戴着无菌手套的手在短时间内越过将A区域与B区域分开的线以执行小型操作,如将瓶子或仪器递送到区域A内,或者打开或关闭容器或类似操作。在将工具或瓶子移动到区域A内之前,应将它们与环境隔离,同时使它们位于区域A外。例如,应将它们置于无菌袋中,在将工具或瓶子置于区域A中之前将无菌袋移除,以确保区域A保持无菌状态。

[0064] 在各个实施例中,干燥泡沫由于蒸气泡在沸腾过程中成核并生长而累积,并且表现为在液体干燥过程中形成的气泡状泡沫,或者可表现为含有气体夹杂物的干燥水凝胶。

[0065] 这些实施例和其他实施例是根据以下实验实例构思和证实的,其中:

#### 实例1:汽化保存(PBV)

[0066] 汽化保存(PBV)是一种用于在环境温度(AT)下稳定脆弱疫苗和其他生物药物的相对较新的技术。PBV执行需要同时控制温度和真空压力。这可以通过使干燥室与真空源接触并为干燥样本提供热量以抵抗水汽化所致的冷却来完成。热源可以是电磁加热或来自加热架的常规热流,在干燥过程中将样本置于所述加热架上。可能有很多可以执行PBV过程的真空干燥设备的设计。也可使用常规冻干机(例如,当前用于使用冷冻干燥方案来生产干燥生物制品的冻干机)来执行PBV。因为执行冷冻干燥通常需要使用相对较高的真空,所以如果干燥室内的压力高于1托或在一些情况下高于2托,则常规冻干机无法自动控制真空压力。这限制了可以使用常规冻干法自动执行的PBV过程的范围。然而,在本文的各个实施例中,披露了如何将常规冻干机用于在环境温度下保存生物药物,以及如何将干燥方案编程为自动执行PBV方案而无需操作者的参与,这将是GMP生产以及FDA批准和美国以外的各种监管机构批准所必需的。

[0067] 根据PBV技术,初次干燥应从部分冷冻的泥浆状态进行。因此,为了对给定的保存组合物(诸如包含生物悬浮液与保存溶液(PS)的保存混合物(PM)的样本或包含生物制品和PS的水凝胶)执行PBV,应首先将其部分冷冻。冷冻意味着样本内有冰晶形成。部分冷冻意味着样本温度比 $T_g'$ 高至少 $10^\circ\text{C}$ ,其中 $T_g'$ 是如下的温度:低于所述温度时保存组合物呈固态,其包含结晶固体和无定形固体(玻璃),没有液相残留。PBV与常规冷冻干燥之间的一个主要区别在于,样本的温度在初次冷冻干燥(或冻干)过程中应等于或低于 $T_g'$ 。然而,PBV初次干燥步骤中的样本温度应比 $T_g'$ 高至少 $10^\circ\text{C}$ ,以确保冰晶之间存在液相。而且,为了确保该液体不仅蒸发而且沸腾,室内的真空压力应低于液体上方的平衡水蒸气压力。在此,与普遍接受的术语一致,初次干燥被定义为初始干燥步骤,在所述步骤中样品损失样品中初始水量的大约90%。

[0068] 在PBV保存之前,应将生物药物与被设计成保护生物药物免受冷冻和干燥的破坏作用的保存溶液(PS)混合。正确选择PS对于确保成功保存很重要。冷冻温度越低,在PS中包括常规低温保护剂就越重要。很重要的是要同时使用渗透到细胞物质内的细胞内低温保护

剂以及保护细胞和病毒膜和包膜的细胞外低温保护剂。

### 实例2:动物细胞的保存

[0069] CTV-1是人类T细胞白血病细胞系。使CTV-1细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中生长,并在含有青霉素-链霉素的RPMI培养基(85%-90%)和热灭活的FBS(10%-15%)中悬浮培养。每4-5天分离一次细胞,维持在1E6个细胞/mL左右。然后收获细胞,并通过离心浓缩至大约0.5-1E7个细胞/mL。

[0070] 程序:将5.5g细胞培养物与0.5ml 50%甘油混合,并使其在室温(RT)下装载30分钟。通过将装载的细胞与两倍体积的以下两种保存溶液混合来制备两种保存混合物(PM):PS1,含有30%蔗糖、15%MAG;PS2,含有30%蔗糖、15%甲基葡萄糖苷(MAG)和5%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。用箔纸将PM包在5ml血清小瓶中(每小瓶0.5ml),并使用下述PBV方案在冷冻干燥机内进行干燥。

[0071] 所使用的PBV方案包括以下步骤:

[0072] 通过将搁板温度降低到-18℃并在-18℃下保持18分钟来部分冻结所述PM;

[0073] 将干燥室内的真空压力降低到0.1托,并保持该压力5分钟以确保PM冻结;

[0074] 将搁板温度提高到0℃并将真空压力提高到0.9托,并保持该压力和搁板温度50分钟;

[0075] 将搁板温度提高到10℃并将真空压力降低到0.5托,并保持该压力和搁板温度22分钟;

[0076] 将搁板温度提高到10℃并将真空压力降低到0.5托,并保持该压力和搁板温度22分钟;

[0077] 将搁板温度提高到20℃并将真空压力降低到0.1托,并保持该压力和搁板温度22分钟;

[0078] 将搁板温度提高到30℃并将真空压力保持在0.1托,并保持该压力和搁板温度20小时;以及

[0079] 将搁板温度提高到40℃并将真空压力保持在0.1托,并保持该压力和搁板温度20小时。

[0080] 保存后,将PBV样品用0.5ml RPMI培养基重构,另外以1:2用RPMI培养基进行稀释。使用Invitrogen Tali™基于图像的细胞仪与Tali™Viability Kit(活力试剂盒)-Dead Cell Red(死细胞红,一种碘化丙啶溶液)测试细胞活力。碘化丙啶对活细胞是不可渗透的,但会进入死细胞(膜受损的细胞),并在与核酸结合后发出红色荧光。活力试剂盒包括用于测量的方案:(<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp10786.pdf>)。Tali™细胞仪用于利用碘化丙啶方案监测细胞健康状况/活力,计算活/死细胞的百分比,并测量平均细胞大小。仪器上的测量是在碘化丙啶荧光(PIF)阈值设置为440RFU并且平均细胞大小截止值限制为4-20μm的情况下进行的。

[0081] 结果:用PS1干燥后的细胞存活率低于10%;用PS2干燥后的细胞存活率高于75%。因此,PVP在保存过程中提供了对细胞膜的保护。

### 实例3:细菌细胞的保存

[0082] 将细菌细胞的悬浮液以3:1与9%的于PBS中的甘油混合。之后,通过将悬浮液与两倍体积的以下3种保存溶液混合来制备3种PM:

- [0083] (PS1):谷氨酸7.86%、蔗糖10%、甘露糖醇5%、NaOH 2%和PVP 4.76%,调节至pH=7;
- [0084] (PS2):谷氨酸7.86%、蔗糖10%、甘露糖醇5%、NaOH 2%,调节至pH=7;以及
- [0085] (PS3):谷氨酸7.86%、蔗糖10%、甘露糖醇5%、NaOH 2%和PEG 4.76%,调节至pH=7。
- [0086] 程序:用箔纸将PM包在5ml血清小瓶中(每小瓶0.5ml),并使用下述PBV方案在冻干机内进行干燥。
- [0087] 所使用的PBV方案包括以下步骤:
- [0088] 通过将搁板温度降低到-18℃并在-18℃下保持18分钟来部分冻结所述PM;
- [0089] 将干燥室内的真空压力降低到0.1托,并保持该压力5分钟以确保PM冻结;
- [0090] 将搁板温度提高到0℃并将真空压力提高到0.9托,并保持该压力和搁板温度50分钟;
- [0091] 将搁板温度提高到10℃并将真空压力降低到0.5托,并保持该压力和搁板温度22分钟;
- [0092] 将搁板温度提高到10℃并将真空压力降低到0.5托,并保持该压力和搁板温度22分钟;
- [0093] 将搁板温度提高到20℃并将真空压力降低到0.1托,并保持该压力和搁板温度22分钟;以及
- [0094] 将搁板温度提高到30℃并将真空压力保持在0.1托,并保持该压力和搁板温度20小时。
- [0095] 结果:PBV干燥后,将材料用0.5ml PBS重构,并在连续稀释后平板涂布在BHI琼脂上。将板在37℃的培养箱中储存24小时。用PS3干燥后的细菌存活率低于30%,用PS2干燥后的细胞存活率低于60%,用PS1干燥后的细胞存活率高于90%。因此,PVP在保存过程中为细菌提供了额外的保护。

#### 实例4:过程验证和扩大血清小瓶中的干燥

[0096] 进行这些研究是为了验证PBV干燥过程的可重复性。在这些实验中,将人白蛋白用作模型蛋白质。将2ml保存混合物(包含20mg重组人白蛋白(Novozymes ALBiX)、266mg蔗糖和133mg异麦芽酮糖醇)装入20ml血清小瓶中,置于钢托盘上,并置于得自维缇斯公司(Virtis)的冻干机(冷冻干燥机)中的搁板上。托盘装满总共120个小瓶。PBV泡沫干燥方案包括在-15℃至30℃的温度下且在1500毫托下进行3小时的初次干燥以及在50℃下进行20小时的二次干燥。干燥泡沫(机械稳定的玻璃状泡沫)的外观在小瓶之间看起来非常一致,没有可见的飞溅。

#### 玻璃化转变温度(Tg)测量

[0097] 目的:测量从干燥托盘的不同区域获取的PBV白蛋白样品的Tg,以测试冻干机中的一致的干燥条件。

[0098] 实验程序:从完全干燥的托盘的四个角收集5个PBV白蛋白样品小瓶(总共20个样品小瓶)。在干燥室中使用每个样品小瓶中的干燥材料制备3个DSC样品盘。每个样品含有大约5mg手动研磨的PBV泡沫。使样品盘在带有自动进样器的DSC 8000(美国马萨诸塞州珀金埃尔默公司(Perkin Elmer,Massachusetts,USA))中运行。以-20℃/min的速率从-50℃到

80℃扫描每个盘,并使用Pyris Data Analysis软件计算Tg(参见下面的计算实例)。

[0099] 结果:

表1:PBV白蛋白的Tg

组号	组平均值 (Tg)
1	48.18±3.17℃
2	47.08±2.07℃
3	49.48±3.07℃
4	48.65±1.99℃

#### 水活性测量

[0100] 目的:测量从干燥托盘的不同区域获取的PBV白蛋白样品的水活性( $a_w$ ),以测试冻干机中的一致干燥条件。

[0101] 实验程序:从完全干燥的托盘的四个角收集5个PBV白蛋白样品小瓶(总共20个样品小瓶)。将每个小瓶中的PBV泡沫手动研磨成粉末。在置于干燥室中的Aqualab 4TE露点水活性仪(美国华盛顿州Decagon Devices公司)中测试每个小瓶中大约150mg的粉末。

[0102] 结果:

表2:PBV白蛋白的水活性

组号	组平均值 ( $a_w$ )
1	0.1287±0.0060
2	0.1290±0.0012
3	0.1319±0.0017
4	0.1305±0.0032

实例5:在1升用0.2μm灭菌过滤器(膜)覆盖并与室环境隔离的塑料瓶内进行干燥。

[0103] 与前面的实例类似地制备PM,并以150g/容器将其装入1升塑料容器中。制备PM后,用0.2μm用于水溶液灭菌的过滤器覆盖每个容器。

[0104] 将搁板温度降低到-18℃,然后将真空压力降低到0.1托以下并保持等于0.1托,直到所述过程结束。接下来,将搁板温度提高到30℃并在30℃下保持24小时。然后,将搁板温度提高到40℃并在40℃下保持24小时。

#### 实例6:减毒活流感疫苗(LAIV)的保存

[0105] 使用汽化保存(PBV)技术保存冷冻LAIV菌株(A/17/Texas/2012/30(H3N2))的单一高效价储液。为了保存,将LAIV解冻并以1:1与不同的pH 7的保存溶液(PS)混合,以形成保存混合物(PM)。将PM分配到血清小瓶中,并使用二次干燥温度为45℃和50℃的PBV过程进行干燥。使用CDC提供的改良LAIV TCID50测定方案对不同疫苗制剂的活性进行测试。

#### 实验Flu-1:

[0106] 在实验Flu-1中,我们使用了7种不同的PS,包括:

[0107] PS1:蔗糖30%、甲基葡萄糖苷(MAG)10%、明胶0.5%;

[0108] PS2:蔗糖30%、甲基葡萄糖苷(MAG)1140%、白蛋白0.5%;

[0109] PS3:蔗糖30%、甘露糖醇10%;

[0110] PS4:蔗糖30%、甘露糖醇10%、明胶0.5%;

[0111] PS5:蔗糖30%、乙酰葡萄糖10%;

[0112] PS6:蔗糖30%、乙酰葡萄糖10%、明胶0.5%；以及

[0113] PS7:蔗糖30%、MAG 10%。

[0114] 遗憾的是,PS6在干燥过程中结晶出来,因此没有对其进行研究。我们假设溶液PS6过饱和,而明胶以某种方式影响乙酰葡萄糖晶体的成核。

[0115] 结果:下表示出了PBV且随后在室温 (RT) 下储存1.6年后干燥疫苗的活性 (TCID<sub>50</sub>/ml的log<sub>10</sub>)。

表3:PBV和储存后干燥疫苗的活性

制剂	室温下1.6年后
PS1	7.35
PS2	7.51
PS3	7.26
PS4	7.43
PS5	7.35
PS7	7.1
冷冻对照	8.8

#### 实验Flu-2:

[0116] 在实验Flu-2中,我们使用了含有较低浓度的甘露糖醇 (33%蔗糖+7%甘露糖醇) 的PS以及50℃的二次干燥温度。

[0117] 本实验在我们首次建立并优化内部TCID<sub>50</sub>方案的过程中进行,因此,我们仅在建立可靠的测定测量后在室温下储存5个月后才首次测量保存疫苗的活性。PBV干燥且室温储存5个月后,疫苗效价 (2E7 TCID<sub>50</sub>/ml) 的活性仅比冷冻对照降低0.62log。来自所述制剂的样品用于下文的微粉化研究。

#### 实验Flu-3

[0118] 在实验Flu-3中,我们研究了几种新制剂,其中一种制剂的甘露糖醇浓度进一步降低 (35%蔗糖+5%甘露糖醇),并保持50℃的较高二次干燥温度。

[0119] 结果:下表示出了在室温 (RT) 和37℃下储存后FLU-3制剂的活性 (TCID<sub>50</sub>/ml)。

表4:储存后FLU-3的活性

	在室温下 3 个月后	在 37℃ 下 3 个月后
<b>保存溶液</b>	<b>使用优化的 SOP 进行测量</b>	
冷冻对照	8.25E + 07	8.25E + 07
15%蔗糖、10%山梨糖醇、10% MgCl <sub>2</sub> 、15% MSG	1.53E + 06	7.11E + 03
35%蔗糖、5%甘露糖醇	4.00E + 07	8.62E + 06

[0120] 结论:在包括在50℃下进行的二次干燥步骤的过程中,用35%蔗糖和5%甘露糖醇制剂对LAIV进行PBV干燥,可以产生热稳定性LAIV。

### 实例7:使用球磨技术配制颗粒范围适合鼻腔递送的干粉状热稳定性LAIV PBV干燥安慰剂制剂的球磨

[0121] 首先,我们使用安慰剂样品研究了PBV制剂的球磨。如下制备和评估安慰剂样品:

[0122] (i) 为了制备安慰剂PM,将100g无菌细胞培养基与100g包含33%蔗糖和7%甘露糖醇的PS混合;

[0123] (ii) 干燥前,将PM分装到20mL血清小瓶中(2mL/小瓶);

[0124] (iii) 使材料经受与在先前实验中用于干燥疫苗的PBV方案相同的方案,其中二次干燥在45°C下进行1天;

[0125] (iv) 干燥后,首先用无菌刮刀将PBV安慰剂泡沫压入血清小瓶中,以破坏PBV泡沫,从而将粒径减小至数百微米;

[0126] (v) 随后使用LabWizz实验室规模的球磨机以15Hz的频率(这是我们先前已经确定获得约20微米的颗粒的合适频率)进行45、75或90分钟的微粉化;

[0127] (vi) 将粉末通过网格尺寸为63 $\mu$ m的铜筛,以除去任何团块或较大的颗粒。记录不会通过筛的粉末材料部分。选择网格尺寸为63 $\mu$ m,因为该尺寸被指定用于筛分LactoHale乳糖粉末,所述粉末在制备用于呼吸道递送的干LAIV疫苗中用作干粉延长剂。我们还发现,可以通过该网格的颗粒明显小于63 $\mu$ m,非常适合呼吸道递送;以及

[0128] (vii) 在干燥室内将粉末悬浮在矿物油中,并使用常规显微镜进行评估。

[0129] 我们已经发现(见下表),使用15Hz的振荡频率和45-90分钟范围内的研磨时间,可以将PBV泡沫球磨成适合呼吸道递送的粒径。较短的研磨时间往往会产生更多可变的粒径,从而增加不会通过63 $\mu$ m筛的颗粒百分比。我们的结论是,以15Hz的振荡频率研磨75分钟是产生用于呼吸道递送的微粉化疫苗粉末的最佳方案。

[0130] 结果在图2中示出。

#### 微粉化且随后储存后PBV LAIV的活性。

[0131] 在这部分研究中,我们评估了研磨时间对使用包含33%蔗糖和7%甘露糖醇的PS在实验Flu-2中产生的疫苗的影响。如上所述,即对安慰剂样品进行疫苗微粉化。

[0132] 结果:以下示出了每毫克以15Hz微粉化45、75和90分钟并且随后在4°C、室温和37°C下储存1.5个月后的PBV LAIV干粉的活性(TCID50)。

#### 表5:干燥PBV LAIV微粉化粉末的活性

	活性 (TCID <sub>50</sub> /mg)	活性损失的对数
研磨前 FLU-3 的 PBV 泡沫	1.41E + 05	0
研磨 45 分钟且在室温下 1.5 个月后	1.26E + 05	-0.05
研磨 45 分钟且在 4°C 下 1.5 个月后	2.55E + 04	-0.74
研磨 45 分钟且在 37°C 下 1.5 个月后	1.94E + 04	-0.86
研磨 75 分钟且在室温下 1.5 个月后	5.55E + 04	-0.40
研磨 75 分钟且在 4°C 下 1.5 个月后	4.66E + 04	-0.48
研磨 75 分钟且在 37°C 下 1.5 个月后	3.68E + 03	-1.58
研磨 90 分钟且在室温下 1.5 个月后	5.98E + 04	-0.37
研磨 90 分钟且在 4°C 下 1.5 个月后	3.84E + 04	-0.56
研磨 90 分钟且在 37°C 下 1.5 个月后	1.32E + 04	-1.03

[0133] 球磨导致的活性损失较低,并且微粉化疫苗在室温下保持稳定至少1.5个月。但是,我们发现与非微粉化疫苗制剂相比,微粉化疫苗在37°C储存期间的稳定性显著降低。这可能是由于甘露糖醇或蔗糖从过饱和蔗糖/甘露糖醇玻璃中结晶所致。该结晶可以通过在研磨过程中发生的断裂表面上的甘露糖醇晶体成核作用来引发。

实例8:微粉化对PBV保存的减毒活轮状病毒疫苗 (LARV) 的影响:

[0134] 将LARV疫苗以1:1与包含30%蔗糖和10%甘露糖醇的PS混合,并通过PBV保存。与当前讨论的流感疫苗类似,减小粒径分两个步骤进行:手动研磨,使用Laarmann Labwizz实验室规模的球磨机进行然后进行球磨(微粉化)。首先,打开已经在室温下储存3个月的小瓶,并在相对湿度为15%至18%的干燥室内使用刮刀手动研磨小瓶内的干燥泡沫材料。从每个小瓶中回收大约120mg手动研磨的泡沫。手动研磨后的粒度通常为几百微米。接下来,将手动研磨的泡沫置于2mL的金属容器中,每个容器包含3个2mm的钢球。将容器置于球磨机内,并以15Hz的速度振荡30分钟,以将颗粒尺寸减小到大约50微米。将一部分粉末在45°C下真空干燥一天。

[0135] 我们发现,微粉化且随后在室温下储存5个月后病毒活性损失非常小(<0.2log)。但是,在37°C下储存5个月后,我们损失了0.8log的活性,这在微粉化制剂中是未观察到的。该观察结果与PBV流感疫苗在上述微粉化后的稳定性降低有关。

[0136] 我们使用差示扫描量热仪测量T<sub>g</sub>对以下工作假设提供了支持:即微粉化样本中37

℃下的病毒活性下降可能与糖从在级分表面上成核的晶体中结晶出来有关。

[0137] 我们研究了用包含30%蔗糖和10%甘露糖醇的PS制备的PBV制剂。对于每种制剂，我们准备了密封在铝盘内的3个独立样本。对于非微粉化制剂，我们没有看到任何意外的结果，并且能够在从-50℃至80℃的第一次、第二次和第三次DSC运行期间测量T<sub>g</sub>。参见图3，其示出了手动研磨且未微粉化的Rota-1 PM4粉末3次运行的DSC扫描。

[0138] 但是，仅对于微粉化粉末而言，每个样品盘的第一次运行都具有可观察到的玻璃化转变行为，此后，我们清楚地观察到与升温过程中结晶有关的DSC输出迅速下降。这种现象也称为反玻璃化现象，通常是在高于玻璃化转变温度的亚稳态过饱和混合物中观察到的，这时低粘度不会阻止通常在玻璃态级分表面上形成的晶体的生长。图4示出了用于干燥的微粉化PM4制剂的DSC运行。

[0139] 反玻璃化是在冷却期间没有结晶并因此在低于T<sub>g</sub>时形成稳定玻璃的过饱和溶液中的不可逆的动力学结晶过程。通常，在冷却过程中不会发生结晶，这是因为在低于晶体生长温度的温度下会形成晶体核，或者仅在玻璃态的断裂表面上会发生晶体成核。在升温到T<sub>g</sub>以上的过程中，当溶液的粘度降低时，在较低温度下形成的晶核开始以随着温度升高而增加的速度生长，从而使材料不可逆地转变成结晶态。对于给定的升温速率，T<sub>g</sub>越高，发生反玻璃化的温度就越高。

[0140] 我们还测量了在45℃下额外真空干燥了一天的微粉化干燥制剂样品的T<sub>g</sub>。在这些样品中，未检测到从玻璃态下升温过程中的反玻璃化作用。图5示出了干燥的微粉化PM4制剂在45℃下额外干燥后的DSC运行。

[0141] 在将干燥的微粉化制剂额外干燥后，T<sub>g</sub>测量值(T<sub>g</sub>略高于50℃)显著高于没有额外干燥步骤的微粉化制剂的T<sub>g</sub>测量值(T<sub>g</sub>略高于30℃)。这解释了为什么在额外干燥的粉末中没有观察到反玻璃化。

[0142] 反玻璃化不一定发生在所有玻璃化混合物中，而是取决于混合物的组成。根据我们的初步观察，与含MAG的混合物相比，含甘露糖醇的混合物更明显。本文中预期T<sub>g</sub>的升高将减少或消除反玻璃化。

#### 工业应用性

[0143] 要求保护的本发明适用于制药工业，特别是疫苗工业，但是制药工业的其他部分也适用。

#### 引用列表

[0144] 2016年10月18日发布的美国专利号9,469,835。

[0145] Pushkar, N.S. 和 V.L. Bronshtein. 1988. The mechanism of ice formation on rewarming of the frozen cryoprotectant solutions [结冰对冷冻保护剂溶液复温的机理]. Proc. Ukrainian Acad. Sci. [乌克兰科学院院刊] 10:68-70。

## 用于保存生物药物的方法

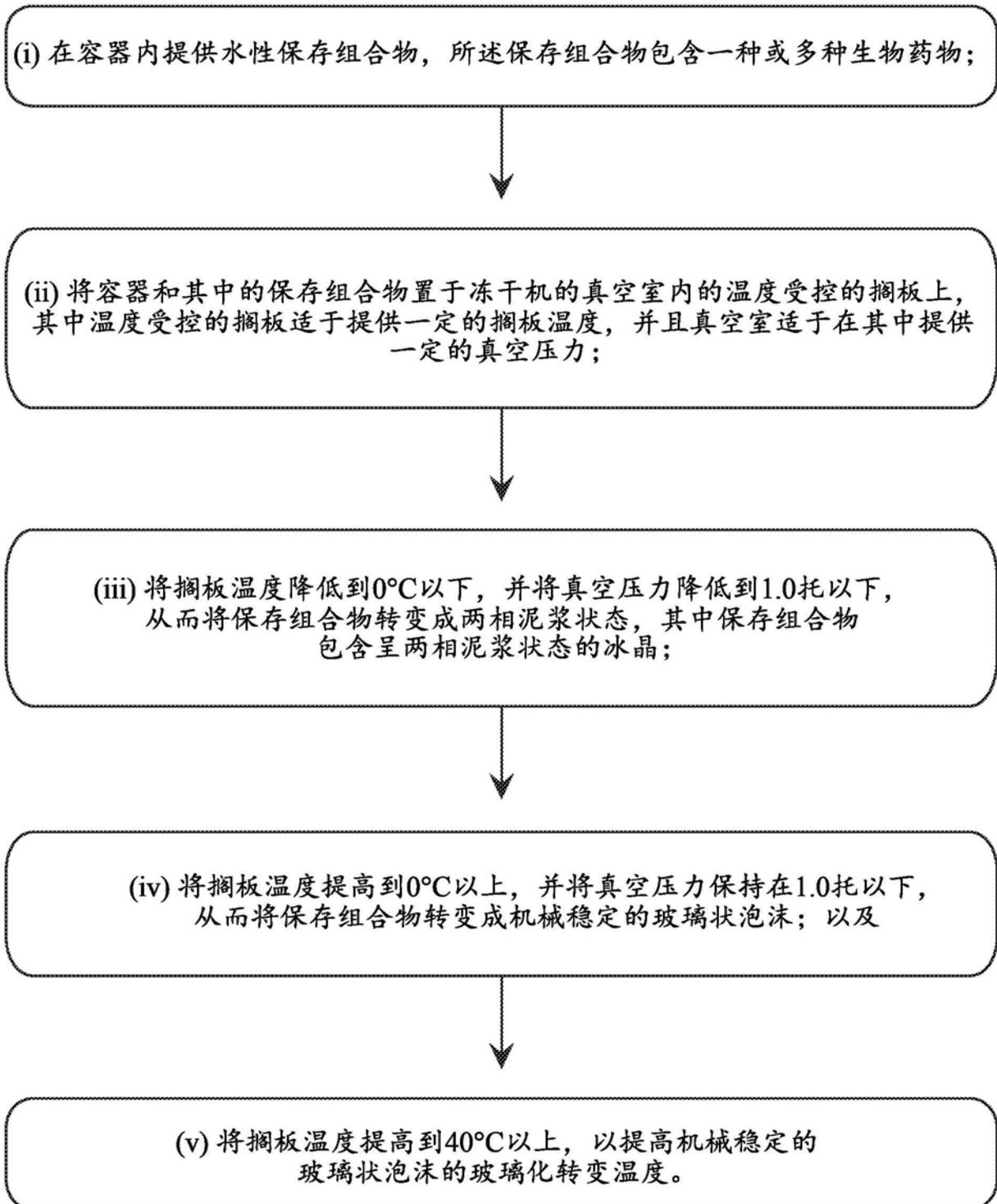


图1

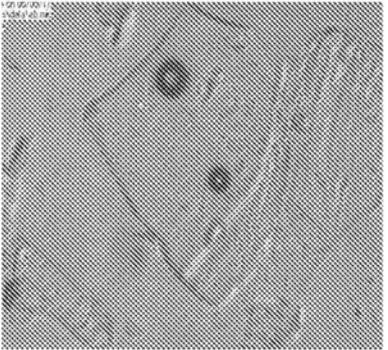
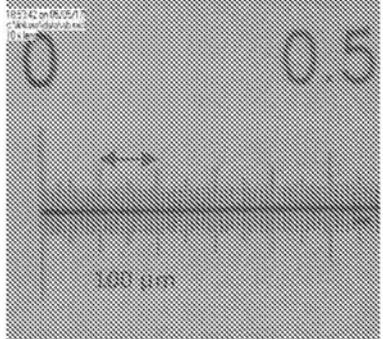
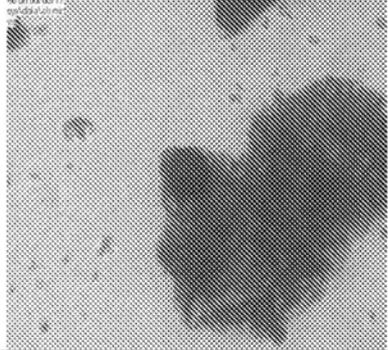
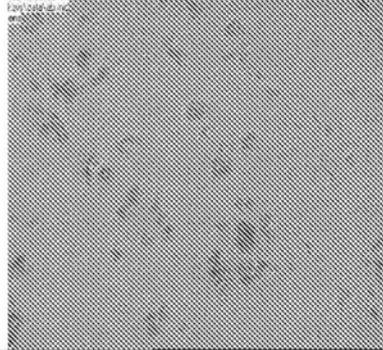
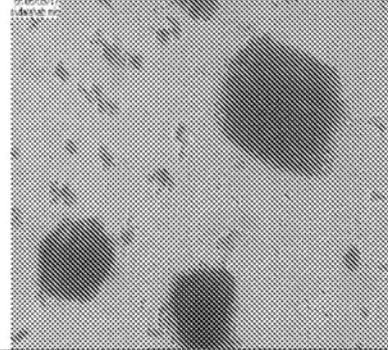
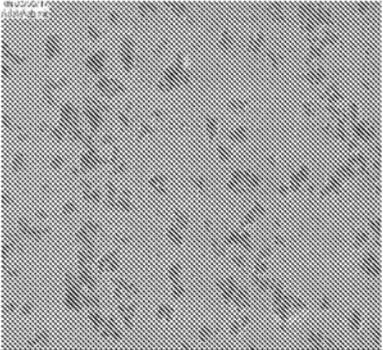
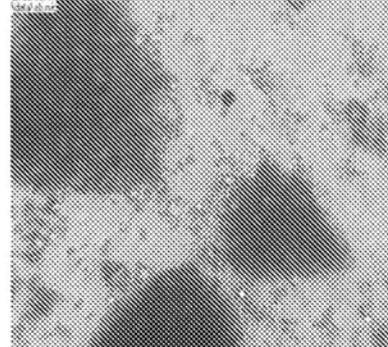
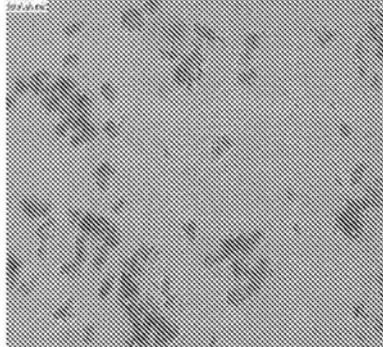
研磨时间	通过的颗粒的Wt. %	未通过筛的颗粒的图片	通过筛的颗粒的图片
0 分钟	0.0%		
45 分钟	38.5%		
75 分钟	89%		
90 分钟	97.3%		

图2

手动研磨且未微粉化的Rota-1 PM4粉末的DSC扫描，运行3次。  
第1次运行=红色，第2次运行=蓝色，第3次运行=绿色

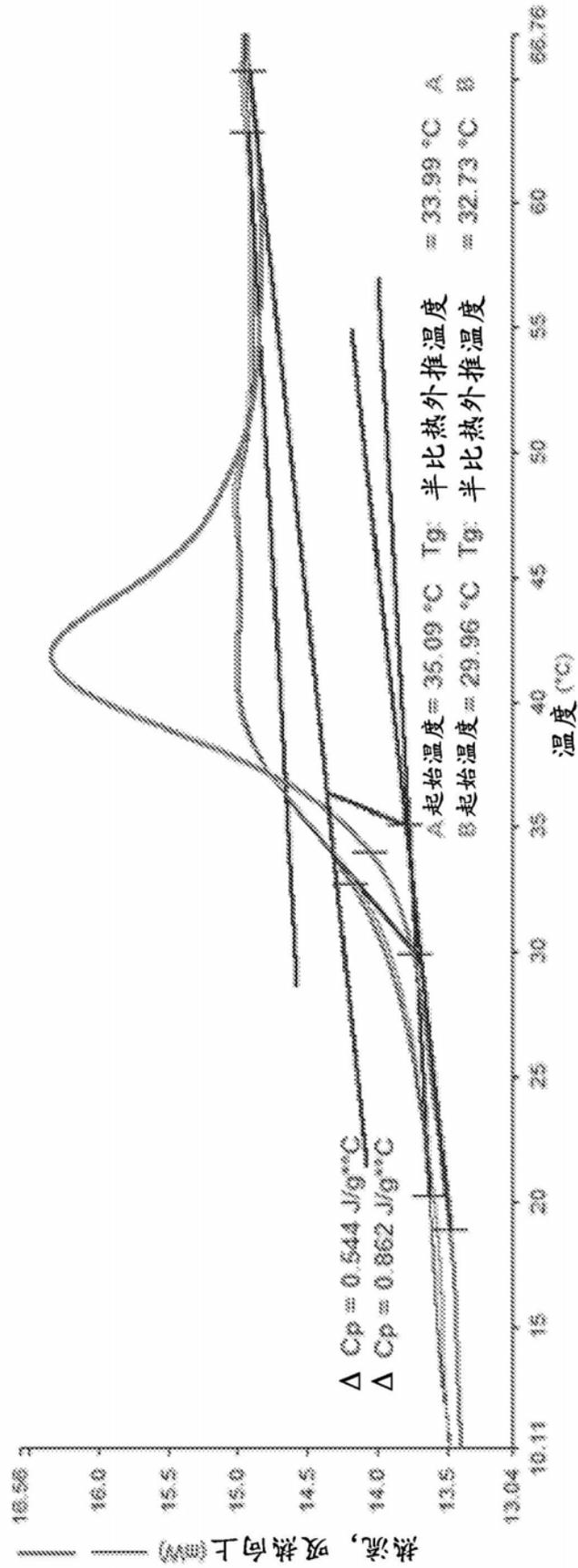


图3

干微粉化的PM4制剂的DSC运行。  
第1次运行=红色，第2次运行=蓝色，第3次运行=黑色。

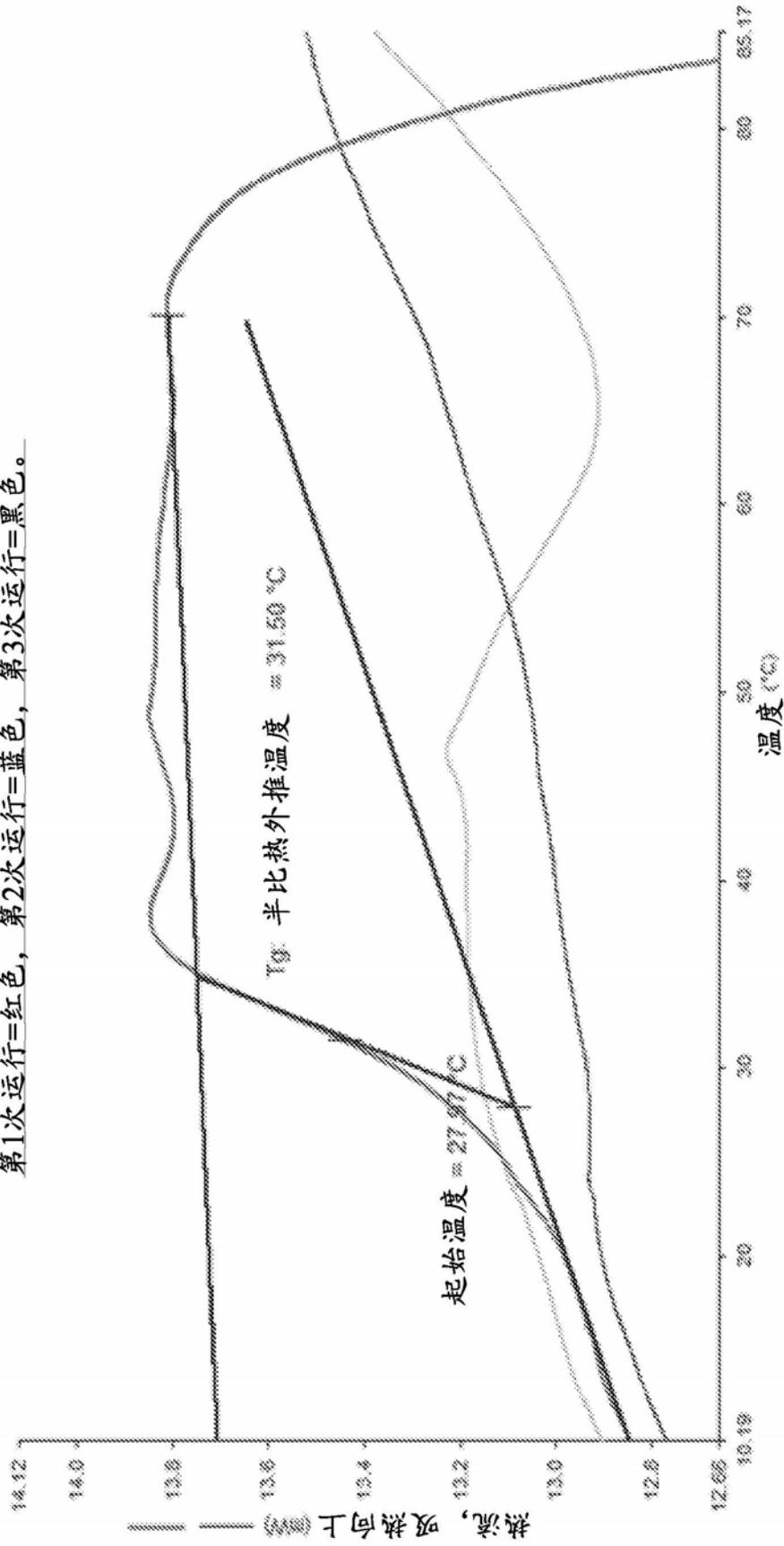


图4

干微粉化的PM4制剂在45°C额外干燥后的DSC运行。  
第1次运行=黑色，第2次运行=粉色，第3次运行=蓝色。

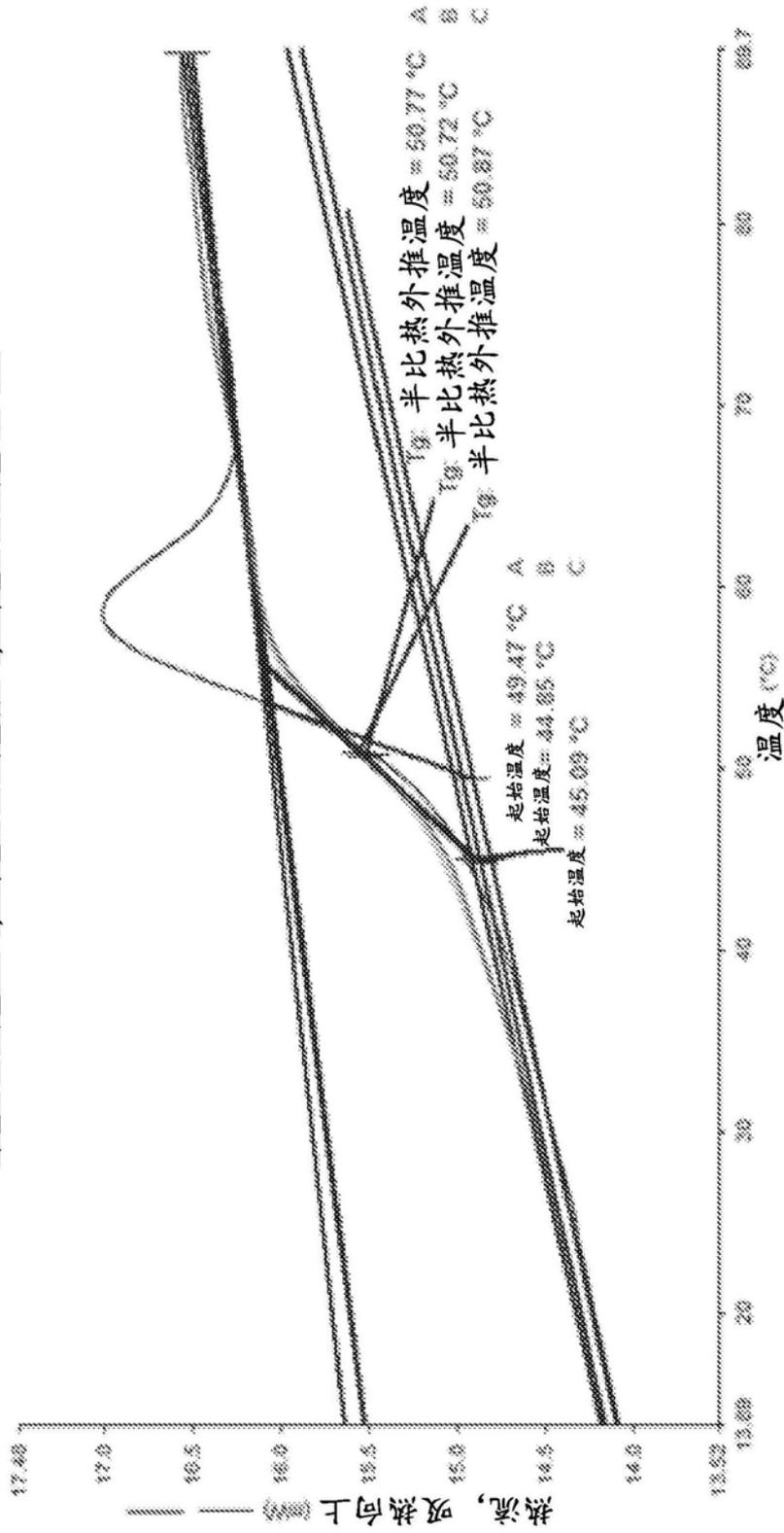


图5