



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113164577 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980080962.3

文尼

(22) 申请日 2019.10.04

马诺哈尔·多达帕尼尼

(30) 优先权数据

阿尼·维扬卡特拉奥·希托勒

201821038850 2018.10.12 IN

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司 11018

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

代理人 潘怀仁 康泉

2021.06.07

(51) Int. Cl.

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 39/00 (2006.01)

PCT/IN2019/050737 2019.10.04

A61K 39/02 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 39/13 (2006.01)

W02020/075184 EN 2020.04.16

A61K 39/29 (2006.01)

(71) 申请人 印度血清研究所私人有限公司

A61P 31/00 (2006.01)

地址 印度马哈拉施特拉邦

(72) 发明人 因德·吉特·夏尔马

拉凯什·库马尔

贾甘纳坦·森堡拉卡基安南·基尔

权利要求书13页 说明书46页

(54) 发明名称

包括降低剂量的灭活脊髓灰质炎病毒的组合疫苗组合物和用于制备其的方法

(57) 摘要

本公开涉及包括抗原/免疫原的组合的完全液体免疫原性组合物。免疫原性组合物包括最佳量的抗原/免疫原以针对许多疾病提供保护。组合物表现出改善的免疫原性和稳定性。还公开了用于制备疫苗组合物的方法。

1. 一种完全液体多剂量免疫原性组合物,包括:
 - (i) 白喉类毒素, (D);
 - (ii) 破伤风类毒素, (T);
 - (iii) 灭活全细胞百日咳, (wP) 或无细胞百日咳, (aP);
 - (iv) 乙肝病毒表面抗原, (HBsAg);
 - (v) b型流感嗜血杆菌抗原, (Hib);
 - (vi) 灭活脊髓灰质炎病毒抗原, (IPV), 其中1型IPV的量为1DU至50DU/0.5ml, 并且3型IPV的量为1DU至50DU/0.5ml; 和
 - (vii) 2-苯氧乙醇和至少一种其他防腐剂的组合。
2. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物, 其中所述组合物中的灭活全细胞百日咳为以1:1:0.25:0.25比例的百日咳博德特氏菌菌株134、菌株509、菌株25525和菌株6229。
3. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物, 其中所述无细胞百日咳抗原包括选自修饰的腺苷酸环化酶、百日咳类毒素 (PT)、丝状血凝素 (FHA)、百日咳杆菌粘附素 (P69或PRN) 或菌毛蛋白 (FIM 1、2和3) 中的一种或多种抗原。
4. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物, 其中所述Hib抗原为使用氰化缀合化学或还原胺化缀合化学缀合至载体蛋白的Hib磷酸多聚核糖基核糖醇 (PRP) 多糖, 其中所述氰化试剂选自溴化氰、1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐 (CDAP)、1-氰基-4-吡咯烷基吡啶四氟硼酸盐 (CPPT)、1-氰基咪唑, 即 (1-CI)、1-氰基苯并三唑 (1-CBT) 或2-氰基哒嗪-3 (2H) 酮 (2-CPO); 并且载体蛋白选自破伤风类毒素、CRM₁₉₇、白喉类毒素、脑膜炎奈瑟氏菌外膜复合物、破伤风类毒素的片段C、百日咳类毒素、流感嗜血杆菌的蛋白D、大肠杆菌LT、大肠杆菌ST和来自铜绿假单胞菌的外毒素A、外膜复合物c (OMPC)、孔蛋白、转铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌溶血素、肺炎链球菌表面蛋白A (PspA)、肺炎链球菌表面粘附素A (PsaA)、肺炎链球菌PhtD、肺炎链球菌表面蛋白BVH-3和BVH-11、炭疽杆菌的保护抗原 (PA) 以及炭疽杆菌的去毒水肿因子 (EF) 和致死因子 (LF)、卵白蛋白、钥孔血蓝蛋白 (KLH)、人血清白蛋白、牛血清白蛋白 (BSA)、结核菌素的纯化蛋白衍生物 (PPD)、合成肽、热休克蛋白、百日咳蛋白、细胞因子、淋巴因子、激素、生长因子、包括来自各种病原体来源的抗原, 比如N19的多个人CD4+T细胞表位的人工蛋白、铁摄取蛋白、来自艰难梭菌的毒素A或毒素B以及有或没有接头的无乳链球菌蛋白。
5. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物, 其中所述组合物另外包括含量为1DU至20DU/0.5ml的2型IPV。
6. 根据权利要求1和5所述的免疫原性组合物, 其中所述1型IPV是Mahoney毒株或Sabin毒株; 和/或其中所述2型IPV是MEF-1毒株或Sabin毒株; 和/或其中所述3型IPV是Saukett毒株或Sabin毒株。
7. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物, 其中所述其他防腐剂选自苄索氯铵 (Phemerol)、苯酚、间甲酚、甲醛、苯扎氯铵、苯甲醇、氯代丁醇、对氯间甲酚、苯甲醇和对羟基苯甲酸酯, 所述对羟基苯甲酸酯选自对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯。
8. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物, 其中所述组合物包括量为1mg至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇; 量为0.1mg至1.5mg/0.5ml (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯和量为0.05mg至

0.2mg/0.5ml (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

9. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述D、T、wP、HBsAg、Hib和IPV不吸附在佐剂上。

10. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述D、T和HBsAg单独吸附在佐剂上,所述佐剂选自铝盐(Al^{3+}),比如氢氧化铝($Al(OH)_3$)或磷酸铝($AlPO_4$)、明矾、磷酸钙、MPLA、3D-MPL、QS21、含CpG的寡脱氧核苷酸佐剂、脂质体或水包油乳液。

11. 根据权利要求10所述的免疫原性组合物,其中所述D、T、HBsAg单独吸附在磷酸铝($AlPO_4$)佐剂上。

12. 根据权利要求10所述的免疫原性组合物,其中所述D抗原以至少50%的吸附百分比吸附在铝盐上。

13. 根据权利要求10所述的免疫原性组合物,其中所述T抗原以至少40%的吸附百分比吸附在铝盐上。

14. 根据权利要求10所述的免疫原性组合物,其中所述HBsAg抗原以至少50%的吸附百分比吸附在铝盐上。

15. 根据权利要求1、5和6所述的免疫原性组合物,其中所述IPV抗原吸附在氢氧化铝($Al(OH)_3$)或磷酸铝($AlPO_4$)的铝盐上,1型IPV的吸附百分比的范围为10%至100%,2型IPV的吸附百分比的范围为60%至100%并且3型IPV的吸附百分比的范围为10%至100%。

16. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中Hib抗原在任何佐剂上的吸附百分比小于20%。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的免疫原性组合物,其中所述组合物中的总铝含量(Al^{3+})的量为0.1mg至0.6mg/0.5ml。

18. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述组合物进一步包括选自氯化钠或磷酸缓冲液盐水的缓冲液。

19. 根据权利要求18所述的免疫原性组合物,其中所述组合物以0.5%至1.5%的浓度包括氯化钠作为缓冲液。

20. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述组合物进一步包括药学上可接受的转运蛋白、赋形剂、粘结剂、载体、等渗剂、乳化剂或润湿剂。

21. 根据权利要求20所述的免疫原性组合物,其中所述组合物包括药学上可接受的赋形剂,所述赋形剂选自糖、多元醇、表面活性剂、聚合物、盐、氨基酸或pH修饰剂。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的免疫原性组合物,其中单剂量免疫原性组合物不含防腐剂。

23. 根据权利要求1所述的免疫原性组合物,其中所述组合物进一步包括选自下述中的一种或多种抗原:流感嗜血杆菌(a、c、d、e、f血清型和无荚膜菌株)、肝炎(A、C、D、E、F和G毒株)、轮状病毒、脑膜炎奈瑟氏菌A抗原、脑膜炎奈瑟氏菌C抗原、脑膜炎奈瑟氏菌W-135抗原、脑膜炎奈瑟氏菌Y抗原、脑膜炎奈瑟氏菌X抗原、肺炎链球菌抗原、脑膜炎奈瑟氏菌B抗原、金黄色葡萄球菌抗原、炭疽热、BCG、人乳头瘤病毒、伤寒沙门氏菌抗原、非伤寒沙门氏菌抗原、修饰的腺苷酸环化酶、疟疾抗原(RTS,S)、麻疹、腮腺炎、风疹、黄病毒抗原、登革热、寨卡、埃博拉、基孔肯雅病毒、日本脑炎和腹泻抗原。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括

量为10Lf至25Lf的D抗原；量为2Lf至10Lf的T抗原；量为约12IOU至16IOU的wP抗原；量为7 μ g至15 μ g的HBsAg；量为7 μ g至13 μ g的 Hib 抗原；IPV抗原，分别量为1DU至50DU的1型 (Mahoney 毒株或Sabin毒株) 和量为1DU至50DU的3型 (Saukett毒株或Sabin毒株)；量为0.1mg至0.6mg的总铝含量 (Al^{3+})；量为1mg至6mg (v/v) 的2-苯氧乙醇；量为0.1mg至1.5mg (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯。

25. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物，其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原；量为2Lf至10Lf的T抗原；量为12IOU至16IOU的wP抗原；量为7 μ g至15 μ g的HBsA；量为7 μ g至13 μ g的 Hib 抗原；IPV抗原，分别量为1DU至50DU的1型 (Mahoney 毒株或Sabin毒株)、量为1DU至20DU的2型 (MEF-1 毒株或Sabin毒株) 和量为1DU至50DU的3型 (Saukett毒株或Sabin毒株)；量为0.1mg至0.6mg的总铝含量 (Al^{3+})；量为约1mg至6mg (v/v) 的2-苯氧乙醇；量为0.1mg至1.5mg (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯。

26. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物，其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原；量为2Lf至10Lf的T抗原；量为12IOU至16IOU的wP抗原；量为7 μ g至15 μ g的HBsAg；量为7 μ g至13 μ g的 Hib 抗原；IPV抗原，分别量为1DU至50DU的1型 (Mahoney 毒株或Sabin毒株) 和量为1DU至50DU的3型 (Saukett毒株或Sabin毒株)；量为0.1mg至0.6mg的总铝含量 (Al^{3+})；量为1mg至6mg (v/v) 的2-苯氧乙醇；量为0.05mg至0.2mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

27. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物，其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原；量为2Lf至10Lf的T抗原；量为12IOU至16IOU的wP抗原；量为7 μ g至15 μ g的HBsAg；量为7 μ g至13 μ g的 Hib 抗原；IPV抗原，分别量为1DU至50DU的1型 (Mahoney 毒株或Sabin毒株)、量为1DU至20DU的2型 (MEF-1 毒株或Sabin毒株) 和量为1DU至50DU的3型 (Saukett毒株或Sabin毒株)；量为0.1mg至0.6mg的总铝含量 (Al^{3+})；量为1mg至6mg (v/v) 的2-苯氧乙醇；量为0.05mg至0.2mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

28. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物，其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原；量为2Lf至10Lf的T抗原；量为12IOU至16IOU的wP抗原；量为7 μ g至15 μ g的HBsAg；量为7 μ g至13 μ g的 Hib 抗原；IPV抗原，分别量为1DU至50DU的1型 (Mahoney 毒株或Sabin毒株) 和量为1DU至50DU的3型 (Saukett毒株或Sabin毒株)；量为0.1mg至0.6mg的总铝含量 (Al^{3+})；量为1mg至6mg (v/v) 的2-苯氧乙醇；量为0.1mg至1.5mg (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯；量为0.05mg至0.2mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

29. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物，其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原；量为2Lf至10Lf的T抗原；量为12IOU至16IOU的wP抗原；量为7 μ g至15 μ g的HBsAg；量为7 μ g至13 μ g的 Hib 抗原；IPV抗原，分别量为1DU至50DU的1型 (Mahoney 毒株或Sabin毒株)、量为1DU至20DU的2型 (MEF-1 毒株或Sabin毒株) 和量为1DU至50DU的3型 (Saukett毒株或Sabin毒株)；量为0.1mg至0.6mg的总铝含量 (Al^{3+})；量为1mg至6mg (v/v) 的2-苯氧乙醇；量为0.1mg至1.5mg (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯；量为0.05mg至0.2mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

30. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物，其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原；量为2Lf至10Lf的T抗原；量为约12IOU至16IOU的wP抗原；量为7 μ g至15 μ g的HBsAg；量为7 μ g至13 μ g的 Hib 抗原；IPV抗原，分别量为1DU至25DU的1型 (Mahoney

毒株或Sabin毒株)和量为1DU至20DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);量为0.1mg至0.6mg的总铝含量(Al^{3+});量为1mg至6mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg至1.5mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

31. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原;量为2Lf至10Lf的T抗原;量为12IOU至16IOU的wP抗原;量为7 μ g至15 μ g的HBsAg;量为7 μ g至13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为1DU至25DU的1型(Mahoney菌株或Sabi株),量为1DU至10DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为1DU至20DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);量为0.1mg至0.6mg的总铝含量(Al^{3+});量为约1mg至6mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg至1.5mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

32. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原;量为2Lf至10Lf的T抗原;量为12IOU至16IOU的wP抗原;量为7 μ g至15 μ g的HBsAg;量为7 μ g至13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为1DU至25DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为1DU至20DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);量为0.1mg至0.6mg的总铝含量(Al^{3+});量为1mg至6mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.05mg至0.2mg(w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

33. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原;量为2Lf至10Lf的T抗原;量为12IOU至16IOU的wP抗原;量为7 μ g至15 μ g的HBsAg;量为7 μ g至13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为1DU至25DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1DU至10DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为1DU至20DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);量为0.1mg至0.6mg的总铝含量(Al^{3+});量为1mg至6mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.05mg至0.2mg(w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

34. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原;量为2Lf至10Lf的T抗原;量为12IOU至16IOU的wP抗原;量为7 μ g至15 μ g的HBsAg;量为7 μ g至13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为1DU至25DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为1DU至20DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);量为0.1mg至0.6mg的总铝含量(Al^{3+});量为1mg至6mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg至1.5mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.05mg至0.2mg(w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

35. 根据权利要求1-23中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原;量为2Lf至10Lf的T抗原;量为12IOU至16IOU的wP抗原;量为7 μ g至15 μ g的HBsAg;量为7 μ g至13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为1DU至25DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1DU至10DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为1DU至20DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);量为0.1mg至0.6mg的总铝含量(Al^{3+});量为1mg至6mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg至1.5mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.05mg至0.2mg(w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙

醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

37.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

38.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

39.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

40.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

41.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ

g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg(w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

42.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

43.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为4DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为4DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为4DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg(w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

44.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的 Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg(v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg(w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g

的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯;

量为 25Lf 的 D 抗原; 量为 10Lf 的 T 抗原; 量为 16IOU 的 wP 抗原; 量为 15 μ g 的 HBsAg; 量为 13 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物, 其中 0.5ml 的所述组合物包括下述之一:

量为 10Lf 的 D 抗原; 量为 2Lf 的 T 抗原; 量为 12IOU 的 wP 抗原; 量为 8 μ g 的 HBsAg; 量为 8 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株)、量为 4DU 的 2 型 (MEF-1 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯; 或

量为 20Lf 的 D 抗原; 量为 4Lf 的 T 抗原; 量为 14IOU 的 wP 抗原; 量为 15 μ g 的 HBsAg; 量为 10 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株)、量为 4DU 的 2 型 (MEF-1 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯; 或

量为 25Lf 的 D 抗原; 量为 10Lf 的 T 抗原; 量为 16IOU 的 wP 抗原; 量为 15 μ g 的 HBsAg; 量为 13 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株)、量为 4DU 的 2 型 (MEF-1 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

46. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物, 其中 0.5ml 的所述组合物包括下述之一:

量为 10Lf 的 D 抗原; 量为 2Lf 的 T 抗原; 量为 12IOU 的 wP 抗原; 量为 8 μ g 的 HBsAg; 量为 8 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.9mg (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯; 或

量为 20Lf 的 D 抗原; 量为 4Lf 的 T 抗原; 量为 14IOU 的 wP 抗原; 量为 15 μ g 的 HBsAg; 量为 10 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.9mg (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯; 或

量为 25Lf 的 D 抗原; 量为 10Lf 的 T 抗原; 量为 16IOU 的 wP 抗原; 量为 15 μ g 的 HBsAg; 量为 13 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株) 和量为 16DU 的 3 型 (Saukett 毒株或 Sabin 毒株); 不大于 0.55mg 的总铝含量 (Al^{3+}); 量为 2.5mg (v/v) 的 2-苯氧乙醇; 量为 0.9mg (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯; 量为 0.1mg (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物, 其中 0.5ml 的所述组合物包括下述之一:

量为 10Lf 的 D 抗原; 量为 2Lf 的 T 抗原; 量为 12IOU 的 wP 抗原; 量为 8 μ g 的 HBsAg; 量为 8 μ g 的 Hib 抗原; IPV 抗原, 分别量为 20DU 的 1 型 (Mahoney 毒株或 Sabin 毒株)、量为 4DU 的 2 型 (MEF-1

毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为4DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为20DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为4DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为16DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

48.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

49.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型

(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯。

50.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

51.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为40DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为8DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为32DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

52.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙

醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

53.根据前述权利要求中任一项所述的免疫原性组合物,其中0.5ml的所述组合物包括下述之一:

量为10Lf的D抗原;量为2Lf的T抗原;量为12IOU的wP抗原;量为8 μ g的HBsAg;量为8 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为20Lf的D抗原;量为4Lf的T抗原;量为14IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为10 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为25Lf的D抗原;量为10Lf的T抗原;量为16IOU的wP抗原;量为15 μ g的HBsAg;量为13 μ g的Hib抗原;IPV抗原,分别量为7.5DU的1型(Mahoney毒株或Sabin毒株)、量为1.5DU的2型(MEF-1毒株或Sabin毒株)和量为6DU的3型(Saukett毒株或Sabin毒株);不大于0.55mg的总铝含量(Al^{3+});量为2.5mg (v/v)的2-苯氧乙醇;量为0.9mg (w/v)的对羟基苯甲酸甲酯;量为0.1mg (w/v)的对羟基苯甲酸丙酯。

54.一种制造完全液体多剂量免疫原性组合物的方法,所述免疫原性组合物包括:

- (i) 白喉类毒素(D);
- (ii) 破伤风类毒素,(T);
- (iii) 灭活全细胞百日咳,(wP)或无细胞百日咳,(aP);
- (iv) 乙肝病毒表面抗原,(HBsAg);
- (v) b型流感嗜血杆菌抗原,(Hib);
- (vi) 灭活脊髓灰质炎病毒抗原,(IPV)和
- (vii) 2-苯氧乙醇和至少一种对羟基苯甲酸酯的组合;

所述方法包括以下步骤:

- a).在掺混容器/器皿中添加生理盐水;
- b).添加包括白喉类毒素的组分I;
- c).添加包括破伤风类毒素的组分II;
- d).添加包括灭活全细胞百日咳抗原或无细胞百日咳,(aP)的组分III;
- e).添加包括乙肝表面抗原的组分IV;
- f).添加包括Hib抗原的组分V;

g).添加包括IPV抗原的组分VI,其中1型IPV(Mahoney毒株或Sabin毒株)的量为1DU至50DU/0.5ml;并且3型IPV(Saukett毒株或Sabin毒株)的量为1DU至50DU/0.5ml;

h). 添加选自下述的防腐剂组合:

量为1mg至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇和量为0.1mg至1.5mg/0.5ml (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯;或

量为1mg至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇和量为0.05mg至0.2mg/0.5ml (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯;或

量为1mg至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇,量为0.1mg至1.5mg/0.5ml (w/v) 的对羟基苯甲酸甲酯和量为0.05mg至0.2mg/0.5ml (w/v) 的对羟基苯甲酸丙酯;

i). 用氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至6.0至7.0;和

j). 添加生理盐水以补足体积。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述组分VI进一步包括量为1DU至20DU/0.5ml的2型(MEF-1菌株或Sabin菌株)IPV抗原。

56. 根据权利要求54所述的方法,其中制备所述组分I包括下述步骤:

a). 将磷酸铝转移在所述器皿/容器中;

b). 添加所述白喉类毒素;

c). 用乙酸/氢氧化钠将pH调节至4.5至5.5;

d). 稳定;

e). 用氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至5.5至6.5;和

f). 用组氨酸缓冲液稳定。

57. 根据权利要求54所述的方法,其中制备所述组分II包括下述步骤:

a). 将磷酸铝转移在所述器皿/容器中;

b). 添加所述破伤风类毒素;

c). 用乙酸/氢氧化钠将pH调节至4.5至5.5;

d). 稳定;

e). 用氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至5.5至6.5;和

f). 用组氨酸缓冲液稳定。

58. 根据权利要求54所述的方法,其中制备所述组分III包括下述步骤:

a). 在存在甲醛的情况下,将百日咳博德特氏菌菌株134在56°C下灭活10分钟至15分钟;

b). 在存在甲醛的情况下,将百日咳博德特氏菌菌株509在56°C下灭活10分钟至15分钟;

c). 在存在甲醛的情况下,将百日咳博德特氏菌菌株25525和菌株6229在56°C下灭活10分钟至15分钟;

c). 在存在甲醛的情况下,将百日咳博德特氏菌菌株6229在56°C下灭活10分钟至15分钟;

d). 随后以1:1:0.25:0.25的比例将灭活百日咳博德特氏菌菌株134、菌株509、菌株25525和菌株6229混合;和

e). 任选地吸附在铝类佐剂上;

其中所述方法不使用硫柳汞,并且灭活全细胞百日咳抗原保持不结块和均质,从而使得具有降低的反应原性并且在较长的持续时间内具有更好的效力。

59. 根据权利要求54所述的方法, 其中制备所述组分IV包括下述步骤:

- a). 将磷酸铝转移在器皿/容器中;
- b). 添加所述乙肝表面抗原;
- c). 用乙酸/氢氧化钠将pH调节至4.5至5.5;
- d). 稳定;
- e). 用氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至5.8至6.8; 和
- f). 稳定。

60. 根据权利要求54所述的方法, 其中制备所述组分V包括下述步骤:

- a). 发酵b型流感嗜血杆菌;
- b). 在存在0.1%甲醛的情况下在37°C下灭活2小时;
- c). 纯化Hib磷酸多聚核糖基核糖醇 (PRP) 多糖;
- d). 在存在己二酸二酰肼 (ADH) 接头的情况下, 使用溴化氰氰化缀合化学使步骤c的纯化产物缀合至破伤风类毒素 (TT);
- e). 纯化步骤d的缀合物; 和
- f). 过滤纯化的缀合物, 优选地通过0.22 μ m过滤器;

其中, 在总纯化Hib散装缀合物中, 游离PRP的百分比不大于5%。

61. 一种完全液体多剂量免疫原性组合物, 其中0.5ml的所述组合物包括量为10Lf至25Lf的D抗原; 量为2Lf至10Lf的T抗原; 量为12IOU至16IOU的wP抗原; 量为7 μ g至15 μ g的HBsAg; 量为7 μ g至13 μ g的Hib抗原; IPV抗原, 量为1DU至25DU的1型 (Mahoney菌株或Sabin毒株)、量为1DU至10DU的2型 (MEF-1毒株或Sabin毒株) 和量为1DU至20DU的3型 (Saukett毒株或Sabin毒株); 量为0.1mg至0.6mg的总铝含量 (Al^{3+}); 量为1mg至6mg (v/v) 的2-苯氧乙醇;

其中通过以下方法制备所述组合物:

- a). 在掺混容器/器皿中添加生理盐水;
- b). 添加包括白喉类毒素的组分I;
- c). 添加包括破伤风类毒素的组分II;
- d). 添加包括灭活全细胞百日咳抗原或无细胞百日咳, (aP) 的组分III;
- e). 添加包括乙肝表面抗原的组分IV;
- f). 添加包括Hib抗原的组分V;
- g). 添加包括IPV抗原的组分VI, 其中1型IPV (Mahoney毒株或Sabin毒株) 的量为1DU至25DU, 2型IPV (MEF-1毒株或Sabin毒株) 的量为1DU至10DU并且3型IPV (Saukett毒株或Sabin毒株) 的量为1DU至20DU;
- h). 添加量为1mg至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇;
- i). 用氢氧化钠/碳酸钠调节pH至6.0至7.0; 和
- j). 添加生理盐水以补足体积。

包括降低剂量的灭活脊髓灰质炎病毒的组合疫苗组合物和用于制备其的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及生物技术领域,更具体地,其涉及制备包括一组抗原/免疫原和防腐剂的多剂量组合疫苗组合物的方法。本公开进一步涉及组合疫苗生产领域中的改进方法。

背景技术

[0002] 可针对许多疾病提供免疫原性的组合疫苗总是优于单价疫苗,因为其减少注射次数、减少与多次肌肉内注射相关的并发症、减少施用和生产成本、减少存储成本、降低延迟或错过疫苗接种的风险,并且通过减少单独接种疫苗的次数改善了患者依从性。而且,组合疫苗的完全液体制剂具有优于那些需要重构的制剂的显著优点。与非完全液体疫苗相比,完全液体疫苗的平均制备时间几乎是其一半。几乎所有的卫生保健人员(97.6%)陈述了在他们的日常实践中偏好使用完全液体疫苗。(参考:Soubeyrand B等;Assessment of preparation time with fully-liquid versus non-fully liquid paediatric hexavalent vaccines.A time and motion study;Vaccine 2015;33:3976-82)。

[0003] 对于在易感人群中的许多疾病通过一次注射实现所需水平的安全性、效力和免疫原性,目前已知的和可用的组合疫苗可能不含有适当免疫原性形式的适当抗原的适当制剂。仅能够与少数额外抗原一起产生的不同疫苗组合的数目是相当大的。通过添加1至4种其他抗原组分(例如,HIB(冻干或液体)、HBV、IPV、HAV)至DTwP或DTaP,可产生44种可能的不同疫苗组合。如果考虑来自不同制造商的个别组分,则该数量将增加到数千。由于必须单独开发每一种个别的新组合疫苗(考虑根据来源的组分差异)以证明安全性、稳定性、相容性和效力,因此所有这些疫苗的开发成为挑战性任务。

[0004] 组合疫苗的抗原:

[0005] 白喉和破伤风抗原

[0006] 白喉和破伤风是分别由白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)和破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)引起的急性感染。在这两种情况下,临床疾病是由这些细菌的强效外毒素引起的。针对这些细菌提供保护的疫苗含有经化学修饰以形成类毒素的毒素,类毒素是一种不再有毒性但仍具有抗原性的化学修饰的毒素。白喉和破伤风毒素通过在含有牛提取物的培养基中培养白喉棒状杆菌和破伤风梭菌产生。使用以下处理来灭活毒素,所述处理包括热、UV、福尔马林/甲醛、戊二醛、乙酰氮丙啶等,以制备类毒素[白喉类毒素(D)和破伤风类毒素(T)]。关于牛海绵状脑病(BSE)、传染性海绵状脑病(TSE)、克罗茨费尔特-雅各布病(CJD和变体CJD病)的担忧可能是由于在含有牛提取物的生长培养基中使用的动物组分通过该疫苗扩散。(参考:WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products;2003& EMEA/CPMP/BWP/819/01;2001年4月24日)。

[0007] 百日咳抗原

[0008] 在20世纪40年代引入的由化学灭活和热灭活的百日咳博德特氏菌生物体组成的

全细胞疫苗,使得由百日咳博德特氏菌引起的百日咳的发病率显著降低。

[0009] 全细胞DTP疫苗通常与几种局部不良事件(例如,注射部位的红斑、肿胀和疼痛)、发热和其他轻度全身性事件(例如,困倦、焦躁和厌食)相关(参考:Cody CL,Baraff LJ,Cherry JD,Marcy SM,Manclarck CR;The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children,Paediatrics 1981;68:650-60)以及(参考:Long SS,DeForest A,Penridge Pediatric Associates等,Longitudinal study of adverse reactions following Diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in infancy,Paediatrics1990;85:294-302)。在接受全细胞DTP疫苗的儿童中,更严重的全身性事件(例如,惊厥{伴有或不伴有发热}和低渗低反应症状)发生的频率更低(比例为施用1750次剂量一例)(参考:Cody CL,Baraff LJ,Cherry JD,Marcy SM,Manclarck CR;The nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children.Paediatrics 1981;68:650-60)。急性脑病甚至更少发生(比例为施用一百万剂量0-10.5例)。专家们确实认为全细胞百日咳疫苗在一些罕见病例中引起持续的脑损伤。(参考:Institute of Medicine;DPT vaccine and chronic nervous system dysfunction,a new analysis;Washington D.C.,National Academy Press,1994)。

[0010] 引用了全细胞百日咳疫苗接种、反应原性以及严重副作用之间的关系的一些报道导致疫苗接受性的下降以及随之发生的新的流行病(Miller,D.L.,Ross,E.M.,Alderslade,R.,Bellman,M.H.和Brawson,N.S.B.(1981).Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children:Brit Med.J.282:1595-1599)。

[0011] 全细胞百日咳(wP)相关的不良反应妨碍了其在世界范围内的继续使用,并且因此在工业化的世界中,基于wP的组合疫苗逐渐被基于无细胞百日咳组合疫苗替代。

[0012] 最近,已经开发了限定组分的百日咳疫苗。先前已经报道了所有液体六价无细胞百日咳类疫苗(DTaP IPV PRP-T-HBsAg)(EP1028750)。

[0013] **Infanrix® Hexa**(GSK)是目前唯一全球销售的含有Salk IPV的六价儿科组合疫苗。该产品(DTaP3-IPV-HBV//Hib)作为与单独的小瓶中的冻干Hib抗原PRP-T缀合物共包装的五价产品的预充注射器出售,以在使用前与剩余的疫苗一起重构。

[0014] 第二种六价疫苗**Hexyon®**(也称为**Hexacima®**和**Hexaxim®**)是来自赛诺菲巴斯德(Sanofi Pasteur)的全液体六价疫苗;然而,它也具有aP。该疫苗有可能面向欧洲和全世界的私人市场。

[0015] Bharat Biotech International正在开发一种七价组合疫苗,该疫苗由DT、无细胞百日咳、沙宾IPV(I型:40DU,2型:8DU,3型:32DU)、单株灭活轮状病毒(G9株,即116E株)、与TT缀合的b型流感嗜血杆菌PRP缀合物以及重组体乙肝疫苗组成。

[0016] 然而,已经关注到关于无细胞百日咳(aP)疫苗的长期有效性,尤其是在发展中国家环境下。最近的报道表明,对百日咳的免疫在青春期减弱,并且这是造成在婴儿完全接种疫苗之前,六个月龄以下婴儿病例增加的原因。在婴儿时接种aP的8-12岁儿童中的疫苗效力估计为24%。在澳大利亚的观察性研究还显示,在婴儿时接种aP疫苗的青少年比接种wP疫苗的那些人具有更高的病例比例(相对风险为3.3,95%置信区间2.4-4.5)。

[0017] 从成本的角度来看,由于制造差异和特许权使用费成本,在历史上aP抗原的成本

超过wP抗原10至30倍,并且因此对发展中国家构成了经济负担。因此,基于wP的六价疫苗的成本将会更适合用于低资源国家的公共领域。

[0018] 因此,尤其是对于发展中国家,由于成本和新出现的关于aP疫苗的长期有效性的问题,在预期用于发展中国家的六价疫苗中使用全细胞百日咳(wP)变得尤为重要。

[0019] 与最好的全细胞百日咳(wP)疫苗相比,aP疫苗在大规模免疫计划中不那么有效(Vickers等,2006;Cherry 2012)。

[0020] 最近在高免疫群体中爆发的研究已经显示,aP疫苗的保护持续时间太短(Klein等,2012;Misegades等,2012),导致大龄儿童和青少年的免疫力降低,以及该年龄组中病例的相应增加(Skowronski等,2002;Klein等,2012)。这与wP疫苗形成了对比,wP疫苗在青少年中提供很好的保护(Klein等2012)。由于这些缺点,在20世纪90年代更换为aP疫苗的国家中,我们现在有一代儿童不仅受到免于患百日咳的保护较差,而且还可能对补强针的响应性也较差,因为儿童初免的疫苗可以确定其对之后的加强免疫的免疫应答(Podda等,1995;Mascart等,2007;Sheridan等,2012;Liko,Robison和Cieslak 2013;Smits等,2013)。

[0021] 促成wP反应原性的最重要因素之一是脂寡糖(LOS)(来自细菌外膜的内毒素)的存在。

[0022] 能够通过各种方法进行wP疫苗中毒素的灭活,但终产物中不应检测到活性不耐热毒素。许多制造商实施的用于灭活wP毒素的全细胞百日咳(wP)批量方法利用热处理/福尔马林。若干报道引述硫柳汞用于使wP失活的用途。然而,硫柳汞的使用导致IPV的抗原性丧失(Vaccine,1994年第12卷,第9 851-856号,Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine),并且因此,在含有IPV的组合疫苗的情况下,可能需要存在于与含硫柳汞的wP独立的小瓶中,以使得随时间推移保持其效力或改变源头百日咳批量灭活。一些抗原,即活性PT也可以起到免疫应答调节剂的作用,并且已经观察到不同疫苗之间对各种抗原的免疫应答的显著差异(WHO,1993)。

[0023] LOS的化学提取导致内毒素含量显著降低(20%)并且内毒素相关毒性的显著下降(高达97%),取决于所使用的体外或体内测试。LOS提取不影响产品的完整性,更重要的是,不影响DTP的效力和/或稳定性。此外,几乎没有观察到抗体和T细胞应答的任何差异。(参考:Waldely Oliveira Dias等;An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin;Human Vaccines&Immunotherapies 9:2,339-348;2012年2月)

[0024] 乙肝抗原

[0025] 存在多种肝炎病毒的毒株。乙肝是由乙肝病毒(HepB)导致的疾病,其感染人的肝脏并且导致称为肝炎的炎症。抗该疾病的疫苗含有病毒包膜蛋白、乙肝表面抗原(HBsAg)之一。现已用于大量免疫的疫苗是可获得的,例如Merck的产品Recombivax HB®和Comvax®,Glaxo SmithKline Biologicals的Engerix-B®和Pediatrix®。与HepB单抗原疫苗相比,具有乙肝组分的组合疫苗与更高的完成和依从性结果相关。(参考:Kurosky等;Effect of Combination Vaccines on Hepatitis B Vaccine Compliance in Children in the United States;The Pediatric Infectious Disease Journal.36(7):e189-e196,2017年7月)。一些参考文献引述了将乙肝表面抗原与其他抗原组合吸附在磷酸铝上。Hexavac®为由于乙肝组分的低免疫原性而退市的组合疫苗。因此,需要包含具有足够或

增强的免疫原性的乙肝抗原的组合疫苗组合物。

[0026] 流感嗜血杆菌 (Hib) 抗原

[0027] 流感嗜血杆菌是革兰氏阴性球菌,其是上呼吸道菌群的正常部分。b型流感嗜血杆菌 (Hib b) 是幼儿脑膜炎侵袭性血源性感染的主要原因以及2岁前脑膜炎的主要原因。针对流感嗜血杆菌的免疫始于1987年在加拿大使用多糖疫苗[磷酸多聚核糖基核糖醇 (PRP)]。Hib的磷酸多聚核糖基核糖醇 (PRP) 荚膜是生物体的主要毒力因子。针对PRP的抗体是血清杀菌活性的主要贡献,并且抗体水平增加与降低侵袭性疾病的风险相关。PRP是T细胞非依赖性抗原,因此特征在于,a) 在小于18月龄的婴儿和儿童中诱导差的抗体应答,b) 相比于T细胞依赖性抗原观察到的,可变且数量较少的抗体应答,c) 产生更高比例的免疫球蛋白M (IgM),和 (d) 不能诱导加强应答。

[0028] 仅基于PRP组分的初始疫苗被证明在婴儿中是无效的。进一步的努力涉及PRP缀合疫苗,其中PRP缀合至称为载体蛋白的蛋白,例如脑膜炎奈瑟氏菌的外膜蛋白、白喉类毒素、破伤风类毒素和CRM197。组合疫苗中包含Hib-缀合物组分与Hib免疫原性降低有关。此外,Hib-缀合物在水性介质中不稳定,不能以这种形式长期储存。因此,流感嗜血杆菌b (Hib) 的PRP多糖通常被配制成干燥固体,其在递送时与其他抗原的液体制剂一起重构。例如在 **Infanrix®** 六价疫苗中 (WO 99/48525)。

[0029] 脊髓灰质炎抗原

[0030] 可获得不同种类的疫苗:

[0031] • 由Dr. Albert Sabin在1961年开发的口服脊髓灰质炎减毒 (减弱) 活疫苗 (OPV)。口服给予包含Sabin毒株的OPV。

[0032] • 由Dr. Jonas Salk在1955年开发的脊髓灰质炎灭活 (杀死) 疫苗 (IPV)。作为注射剂给予包含Salk毒株的IPV。

[0033] • 最近,已经开发了通过用福尔马林灭活Sabin毒株脊髓灰质炎病毒制备的Sabin灭活脊髓灰质炎病毒,其用于注射并且已经可在商业产品中获得。

[0034] 脊髓灰质炎减毒活疫苗 (OPV) 和脊髓灰质炎灭活疫苗 (IPV) 均在世界范围内有效控制脊髓灰质炎疾病。脊髓灰质炎病毒疫苗可包括Salk毒株或Sabin毒株。

[0035] 1955年,Dr. Jonas Salk成功灭活了野生型脊髓灰质炎病毒,由此使得其能够用于注射型制剂,并将其命名为Salk毒株,其包括已经在针对脊髓灰质炎疾病的疫苗中使用的1型Mahoney毒株、2型MEF毒株和3型Saukett毒株。Sabin毒株包括1型Sabin毒株和2型Sabin毒株。

[0036] 脊髓灰质炎疫苗在目前可接受的标准剂量含有40D抗原单位的1型灭活脊髓灰质炎病毒 (Mahoney)、8D抗原单位的2型灭活脊髓灰质炎病毒 (MEF-I) 和32D抗原单位的3型灭活脊髓灰质炎病毒 (Saukett),例如 **Infanrix-hexa®** (WO99/48525)。

[0037] IPV目前可作为无佐剂的独立制剂或各种组合获得,包括DT-IPV (与白喉和破伤风类毒素一起) 和六价-IPV疫苗 (另外具有百日咳、乙肝、流感嗜血杆菌b和佐剂),例如 **Infanrix®** 六价疫苗 (WO99/48525)。

[0038] 然而,当与OPV相比时,IPV的总生产成本显著更高。这主要由于其要求:(i) 每剂量更多的病毒;(ii) 另外的下游加工 (即,浓缩、纯化和灭活),以及相关的QC测试;(iii) 下游抗原的损失或较差回收率;以及iv) 控制 (containment)。直到现在,财务挑战已经成为IPV

创新以及在低收入国家和中等收入国家实施的主要缺点。

[0039] 在根除脊髓灰质炎病毒之后,未来全球对IPV的需求可从8千万剂/年的目前水平增加到4.5亿剂/年。因此,可能需要“延长”IPV供应的方法。

[0040] 本申请的申请人已经出人意料地发现,当与标准剂量的IPV抗原相比时,减少剂量的IPV显示出针对脊髓灰质炎的非劣性/等效保护。在常规疫苗的供应不足以满足全球需要或常规疫苗的生产成本阻碍疫苗以发展中国家可负担的价格出售的情况下,使用较低剂量的IPV抗原提供针对感染的保护的剂量减少的有效疫苗制品是令人希望的。与现有市售制剂相比,暴露于更低剂量的IPV可能更安全。因此,需要评估使IPV能够以更可负担的价格可用的不同策略。因此,包括降低剂量的IPV的组合疫苗可使其更便宜并且易于施用。

[0041] 在大流行流感疫苗的情况下,佐剂的使用已经允许降低剂量、增加可及性和降低疫苗的成本。因此,据推测,IPV的佐剂化疫苗制剂将降低成本并且增加全世界可获得的IPV剂量的数量。

[0042] 此外,铝盐被认为是安全的,已被用于含有IPV的组合疫苗,具有最低的开发障碍并且制造成本低。然而,已知铝佐剂不允许显著的剂量减少。

[0043] 另外,六价疫苗中存在的全细胞百日咳抗原已被证明是强免疫刺激剂。由于磷酸铝佐剂和全细胞百日咳疫苗的免疫刺激作用,我们推测用降低剂量的IPV能够获得良好的免疫应答。

[0044] 其他抗原

[0045] 可包含在组合疫苗中的其他抗原是流感嗜血杆菌(a、c、d、e、f血清型和未封装菌株)、肝炎(A、C、D、E、F和G毒株)、脑膜炎奈瑟氏菌A、B、C、W、X、Y、流感、肺炎球菌、链球菌、炭疽、登革热、疟疾、麻疹、腮腺炎、风疹、BCG、日本脑炎、轮状病毒,天花、黄热病、伤寒、带状疱疹、水痘病毒等。

[0046] 用于组合疫苗的抗原的范围和类型取决于待使用的目标群体的年龄,例如婴儿、幼儿、儿童、青少年和成人。最早已知的可以预防来自百日咳博德特氏菌、破伤风梭菌、白喉棒状杆菌、以及任选地灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)和/或乙肝病毒和/或B型流感嗜血杆菌感染的组合疫苗是已知的(见,例如WO 93/24148、WO 97/00697、WO 2000/030678、WO 2008/028956、US 6013264和WO 2005089794)。

[0047] 然而,有完备记载的抗原竞争现象十分复杂并且阻碍了多价疫苗的发展。该种现象是指以下观察结果:相对于单独给予时对某些抗原的免疫应答,一起给予多种抗原通常导致对这些抗原的应答减弱。

[0048] 同时,多剂量疫苗应包括防腐剂以避免被有害微生物污染。对于向不发达国家输出的疫苗产品,考虑到使用疫苗的环境、分发方法等,优选含有防腐剂的多剂量疫苗。已经使用的防腐剂的实例,包括苊索氯铵(Phemerol)、硫柳汞、苯酚、甲醛以及2-苯氧乙醇(2-PE)是本领域已知的。适用于疫苗的防腐剂应是环境安全的,对细菌以及酵母和其他真菌有效,并且对疫苗的免疫原性作用没有负面影响。

[0049] 硫柳汞是乙基汞的衍生物,其已经在许多疫苗中被广泛用作防腐剂。已知硫柳汞在疫苗产品的储存或使用过程中用于防止污染微生物的生长并维持无菌条件,而且,已经获得WHO资格预审(PQ)的许多组合疫苗都含有硫柳汞作为防腐剂。然而,有关于对硫柳汞的某些过敏反应(在约16%的群体中)的报道,这些反应主要是延迟型局部超敏反应的形式,

包括注射部位的发红和肿胀。

[0050] 此外,灭活脊髓灰质炎疫苗常规地使用2-PE代替硫柳汞作为防腐剂,因为已知在灭活脊髓灰质炎疫苗中使用硫柳汞作为防腐剂甚至是在冰箱中储存时,疫苗效力在一周内也会降低50%或更多。(Vaccine 1994第12卷No.9 851-856,Deleterious effect of thimerosal on the potency of inactivated poliovirus vaccine)。

[0051] 组合疫苗(包括D、T、wP、Hib、HBsAg和IPV)还使用浓度为5mg/mL的2-PE(W02010046934、W02008020322和W02012093406)。

[0052] 然而,已经发现2-PE在2°C至8°C下在基于DPT的组合疫苗中,针对酵母和真菌具有比硫柳汞更弱的抗微生物活性。通过增加2-PE的量以满足所要求的标准来改善组合疫苗的防腐效力是选项之一。然而,增加2-PE浓度在作为接受组合疫苗受试者的幼儿种会引起安全性问题,从而导致批准此类疫苗的监管障碍。

[0053] 因此,通过将2-PE与满足安全性和监管标准的至少一种其他防腐剂组合来改善组合疫苗的防腐效力将是有益的。可以使用的除2-PE之外的防腐剂的实例,包括苄索氯铵(Phemerol)、对羟基苯甲酸酯、苯酚、甲醛是本领域已知的。

[0054] 发现对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、苯甲醇通过了根据USP、BP和EP的抗微生物测试。进一步,这些防腐剂是无毒但有效的。对羟基苯甲酸酯的毒性相对较低,这是由于身体排除这些药物的容易程度和快速性。小鼠腹膜内的对羟基苯甲酸甲酯的LD50为1g/kg。从未发现对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯的混合物用于商业疫苗。

[0055] 本申请的申请人已发现,与单独的2-苯氧乙醇相比,2-苯氧乙醇和对羟基苯甲酸酯的混合物(例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)的防腐效力相对更有效。

[0056] 此外,本申请的申请人发现,组合疫苗组合中抗原的正确形式的免疫原性、反应原性、稳定性和维持取决于配制组合物的方式,包括:

[0057] a) 制备单个抗原的方法

[0058] b) 添加抗原的顺序

[0059] c) 针对某些抗原使用特定量的特定佐剂,

[0060] d) 抗原在佐剂上的单独吸附或组合吸附,其中组合吸附具有操作简便的优点,而缺点包括其中第一预吸附抗原会在加入后续抗原期间部分或完全解吸。在最后一步加入的抗原可能不能完全吸附,因为先前的抗原可能已经使吸附能力饱和。弱吸附的抗原可能在储存时发生解吸。

[0061] e) 抗原吸附在佐剂上的程度

[0062] f) 使用最小的明矾浓度

[0063] g) 使用防腐剂的最佳浓度和类型

[0064] h) 使用各种参数,包括搅拌、温度和pH。

[0065] 目的

[0066] 本文的至少一种实施方式满足的本公开的一些目的如下:

[0067] 本公开的目的是改善现有技术的一个或多个问题或至少提供有用的替代方案。

[0068] 本公开的另一个目的是提供完全液体组合疫苗,适用于防止和预防由白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、流感嗜血杆菌和乙肝引起的感染,或适用于预防、减轻或延迟其临床表现的出现或进展。

[0069] 本公开的仍另一个目的是提供含有各种降低剂量的灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV) 抗原的完全液体组合疫苗, 其与标准剂量的 IPV 抗原相比, 显示出针对脊髓灰质炎的非劣性/等效保护。

[0070] 本公开的又一目的是提供含有至少一种对羟基苯甲酸酯 (即, 对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯防腐剂) 和 2-苯氧乙醇 (2-PE) 的完全液体组合疫苗, 以改善多剂量组合疫苗的防腐效力。

[0071] 本公开的又一目的是提供制造组合疫苗的这种组合物/制剂的改进的方法, 其中疫苗显示出改善的免疫原性、降低的反应原性、改善的稳定性, 并且进一步满足针对每种所述免疫原性组分的血清保护的标准。

[0072] 从以下描述中, 本公开的其他目的和优点将变得更加显而易见, 其不旨在限制本公开的范围。

发明内容

[0073] 组合疫苗组合物以及其制备方法, 其包含与其他抗原/免疫原组合的低剂量的灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV) 抗原和用作防腐剂的至少一种对羟基苯甲酸酯, 即, 对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯和 2-苯氧乙醇 (2-PE), 其中改善了多剂量组合疫苗的防腐效力。

[0074] 本公开涉及组合疫苗组合物, 包括:

[0075] a) 高度纯化的白喉类毒素 (D) 和破伤风类毒素 (T), 其使用半合成培养基生产, 随后去毒并且单独吸附至磷酸铝佐剂上, 从而产生增强的免疫原性。

[0076] b) 使用对以特定比例的百日咳博德特氏菌菌株特定的热灭活和化学灭活的组合制备的全细胞百日咳博德特氏菌 (wP) 组分, 产生降低的反应原性和增加的效力。

[0077] c) 缀合至载体蛋白 (CP) 的 b 型流感嗜血杆菌 (Hib) 荚膜多糖抗原 (PRP)

[0078] d) 低剂量的 Salk 或 Sabin (灭活脊髓灰质炎病毒) IPV, 与通过利用改进的甲醛灭活和任选地吸附在磷酸铝佐剂上的方法制备的标准剂量相比, 其显示出相当的效力。

[0079] e) 单独吸附在磷酸铝佐剂上的乙肝 (HepB) 表面抗原, 从而产生增强的免疫原性

[0080] f) 最小的明矾含量, 从而确保降低的反应原性

[0081] g) 作为防腐剂的至少一种对羟基苯甲酸酯, 即, 除 2-苯氧乙醇 (2-PE) 之外的对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯。

具体实施方式

[0082] 尽管本公开可受到不同实施方式的影响, 但是在以下详细讨论中示出了某些实施方式, 应理解, 本公开可认为是本公开原理的例证, 并且不旨在将本公开的范围限制于在本说明书中阐释和公开的范围。提供实施方式以便向本领域技术人员充分且充分地传达本公开的范围。阐述了涉及特定组成和方法的许多细节, 以提供对本公开的实施方式的完整理解。对于本领域的技术人员显而易见的是, 在实施方式中提供的细节不应被解释为限制本公开的范围。在一些实施方式中, 未详细地描述公知的组合物、公知的方法以及公知的技术。

[0083] 在本公开中使用的术语仅用于解释特定实施方式的目的, 并且这种术语不应视为限制本公开的范围。如在本公开中所使用的, 除非上下文另外清楚地提示, 否则形式“一个

(a)”、“一个(an)”和“所述”可旨在也包括复数形式。

[0084] 术语第一、第二、第三等不应解释为限制本公开的范围,因为前述术语可仅用于将一个元件、部件、区域、层或部分与另一部件、区域、层或部分区分开。当在本文中使用时,术语,比如第一、第二、第三等不暗示特定的顺序或次序,除非本公开清楚地指出。本公开提供了免疫原性组合物和用于制备其的方法。

[0085] 术语“疫苗”任选地用术语“免疫原性组合物”代替,并且反之亦然。

[0086] “D-抗原单位”(也称为“国际单位”或IU):脊髓灰质炎病毒的D抗原形式诱导保护性中和抗体。本文提及的D抗原单位(例如,在本发明的疫苗中)是在配制最终疫苗之前测量的每种未吸附的大量IPV抗原类型的总D抗原单位,其以配制疫苗的每人分剂量(通常0.5mL最终体积)添加。测量D-抗原单位的可靠方法是本领域公知的,并且例如由欧洲药典公开。例如,可以使用如在以下实施例1中描述的ELISA测试(“通过ELISA的D-抗原定量”)测量D-抗原单位。欧洲药典提供了测试样品(European Pharmacopoeia Biological Reference Preparation-可获自Ph.Eur.Secretariat,例如代码P216 0000)用于在制造商之间将这种方法标准化(Pharmeuropa Special Issue,Bio 96-2)。因此,D-抗原单位值是本领域公知的。

[0087] 本文中的术语“剂量”通常是指本发明的疫苗的一次施用,通常是一次注射。典型的人剂量是0.5mL。当然,可在疫苗施用方案中施用不同的剂量。

[0088] 术语“IPV”或本文中包括这些组分的免疫原性组合物旨在意指1型灭活脊髓灰质炎病毒(例如,优选使用Mahoney)、2型(例如,MEF-1)或3型(例如,Saukett)或这些类型中的两种或全部三种的Sabin血清型1、2、3组合。出于本发明的目的,全(或标准)剂量(分别是40-8-32D抗原单位的Salk类1型、2型和3型IPV)IPV免疫原性组合物的实例可为Poliovac®(印度血清研究所(Serum Institute of India Pvt))。因此,当本文描述与标准剂量的Salk类IPV相比,本发明的免疫原性组合物中存在一倍、两倍、三倍的剂量减少(降低)时,其是指在所述疫苗的每个剂量中配制分别等于1型、2型和/或3型IPV的40、8和/或32D-抗原单位的剂量减少X%的D-抗原单位(如在每批次IPV抗原类型中测量的)。

[0089] 遍及本说明书,术语“糖”可指代多糖或寡糖并且包括两者。荚膜糖抗原可为全长多糖,或其可外延至细菌“大小的糖”和“寡糖”(其天然具有少量的重复单元,或是易处理的尺寸减小的多糖,但仍能够在宿主中诱导保护性免疫应答)。

[0090] 根据本公开的第一实施方式,组合疫苗组合物包括但不限于选自以下的组中的抗原/免疫原:白喉类毒素(D)、破伤风类毒素(T)、全细胞百日咳博德特氏菌(wP)、b型流感嗜血杆菌(Hib)PRP-CP缀合物、乙肝(HepB)、减少剂量的灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)以及另外包括2-苯氧乙醇和至少一种对羟基苯甲酸酯防腐剂的组合。

[0091] 根据本公开的第二实施方式,组合疫苗组合物可进一步包括一种或多种抗原,所述抗原分别选自但不限于由下述组成的组中:流感嗜血杆菌(a、c、d、e、f血清型和无荚膜菌株)、肝炎(A、C、D、E、F和G毒株)、脑膜炎奈瑟氏菌A、B、C、Y、W-135或X、流感、金黄色葡萄球菌、伤寒沙门氏菌抗原、无细胞百日咳抗原、修饰的腺苷酸环化酶、疟疾抗原(RTS、S)、肺炎球菌、链球菌、炭疽热、登革热、疟疾、麻疹、腮腺炎、风疹、BCG、人乳头瘤病毒、日本脑炎、登革热、寨卡、埃博拉、基孔肯雅病毒、轮状病毒、天花、黄热病、黄病毒、带状疱疹、水痘病毒抗原。

[0092] 根据本公开的第三实施方式,组合疫苗组合物中使用的IPV毒株包括选自1型、2型和3型的灭活Sabin毒株或选自Mahoney 1型、MEF 2型和Saukett 3型灭活Salk毒株。

[0093] 在第三实施方式的一个方面,脊髓灰质炎病毒可通过以下方法生长:

[0094] • 使用CCL81-VERO(猴肾)细胞系作为生长脊髓灰质炎病毒(即,Sabin毒株和Salk毒株)的宿主细胞。

[0095] • 在用所希望的脊髓灰质炎病毒株感染宿主细胞并温育72小时后,将含有病毒和细胞碎片的培养基合并并且收集在单个容器中。

[0096] • 将滤液用100KDa盒进行切向流过滤;使用磷酸盐缓冲液渗滤并且使用阴离子交换色谱进行纯化。

[0097] • 在向患者施用之前,必须利用适当的灭活方法来灭活病毒。

[0098] 然而,本公开的发明人已经出人意料地发现,甲醛灭活后D-抗原的高百分比损失可能是由于磷酸盐缓冲液的存在,该磷酸盐缓冲液出乎意料地引起脊髓灰质炎病毒颗粒的不希望的聚集。

[0099] 因此,本公开的重要方面包括,改进的福尔马林灭活方法,包括以下步骤:

[0100] a) 在pH为7至7.5之间的条件下使纯化的病毒库进行磷酸盐缓冲液和Tris缓冲液(30至50mM)的缓冲液交换,

[0101] b) 向上述混合物中添加含有甘氨酸(5gm/l)的M-199培养基,

[0102] c) 添加0.025%甲醛并且随后混合,

[0103] d) 随后将该混合物在37°C下温育5至13天,同时在磁力搅拌器上连续搅拌病毒散装物,

[0104] e) 温育后的混合物在第7天经历中间TFF系统(100KDa,0.1m²)处理,并且在失活后进行最终过滤,

[0105] f) 之后在2°C至8°C下储存过滤的散装物,

[0106] g) 进行D-Ag ELISA用于D-Ag单位测定。

[0107] 根据本公开的第四实施方式,组合疫苗组合物中所使用的IPV毒株包括选自1型、2型和3型的剂量减少的灭活Sabin毒株或选自Mahoney 1型、MEF 2型和Saukett 3型的灭活Salk毒株。

[0108] 根据本公开的第五实施方式,IPV(Sabin毒株或Salk毒株)可不单独吸附在任何佐剂上并且随后添加至最终组合疫苗组合物中。

[0109] 根据第五实施方式的优选方面,IPV(Sabin毒株或Salk毒株)可吸附在佐剂上,更优选吸附在存在于组合疫苗中的磷酸铝盐或氢氧化铝上,其中IPV抗原,对于1型IPV的吸附百分比可在10%至30%的范围内,2型IPV的吸附百分比可在60%至100%的范围内,并且3型IPV的吸附百分比可在0%至25%的范围内。

[0110] 根据本公开的第六实施方式,IPV(Sabin毒株或Salk毒株)组分可单独吸附至选自有以下组成的中的佐剂上:铝盐(Al³⁺),比如氢氧化铝(Al(OH)₃)或磷酸铝(AlPO₄)、明矾、磷酸钙、MPLA、3D-MPL、QS21、含CpG的寡脱氧核苷酸佐剂、脂质体或水包油乳液或其组合。(例如,在与其他组分(如果存在的话)混合之前或之后)。如果吸附,一种或多种IPV组分可单独或一起作为混合物吸附在氢氧化铝(Al(OH)₃)或磷酸铝上。

[0111] IPV(Sabin毒株或Salk毒株)组分可通过以下程序吸附至铝盐上:

[0112] • 取期望体积的高压灭菌 $\text{Al}(\text{PO})_4$ 或 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 以达到在50ml容器中最终明矾(Al^{3+})浓度为0.1mg至0.8mg/剂量,

[0113] • 添加具有调整的D-Ag单位的散装IPV并且用稀释剂(10x M-199+0.5%甘氨酸)补足体积,

[0114] • 调节最终制剂的pH并且获得pH为6与7.5之间的最终制剂。

[0115] 在第六实施方式的一个方面中,福尔马林灭活的IPV的吸附可以在浓度选自0.1mg/剂量、0.2mg/剂量、0.3mg/剂量、0.4mg/剂量、0.5mg/剂量、0.6mg/剂量、0.7mg/剂量和0.8mg/剂量,优选地0.1mg/剂量至1.25mg/剂量/血清型且在pH选自6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7和6.8优选地6.5的明矾(Al^{3+})上进行。

[0116] 在第六实施方式的又一方面,在存在Tris的情况下,福尔马林灭活后D-抗原的回收百分比可为50%、60%、70%或80%,并且磷酸铝吸附后的吸附百分比可为70%至80%、80%至90%,或90%至99%或95%至99%。

[0117] 根据本公开的第七实施方式,白喉毒素(外毒素)和破伤风毒素(外毒素)分别从白喉棒状杆菌和破伤风梭菌获得,并且随后用适合的灭活方法去毒。可使用凝胶过滤色谱法纯化由此获得的白喉类毒素(D)和破伤风类毒素(T)。将由此获得的纯化的DT进一步用于配制组合疫苗。

[0118] 在第七实施方式的一个方面中,白喉毒素通过在以下述组合中任一种的最佳浓度的半合成培养基中生长白喉棒状杆菌来产生,该半合成培养基由以下成分组成:

[0119] 组合1:

[0120] 酪蛋白水解产物、麦芽糖一水化物、冰乙酸、乳酸钠、硫酸镁、 β -丙氨酸、庚二酸、烟酸、硫酸铜、硫酸锌、氯化锰、L-胱氨酸、氯化钙二水合物、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸亚铁和注射用水。

[0121] 组合2:

[0122] 酪蛋白水解产物、麦芽糖一水化物、冰醋酸、乳酸钠、硫酸镁、 β -丙氨酸、庚二酸、烟酸、氯化锰、L-胱氨酸、氯化钙二水合物、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸亚铁和注射用水。

[0123] 组合3:

[0124] 酪蛋白水解产物、麦芽糖一水化物、冰醋酸、乳酸钠、 β -丙氨酸、庚二酸、烟酸、硫酸铜、硫酸锌、氯化锰、L-胱氨酸、氯化钙二水合物、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和注射用水。

[0125] 组合4:

[0126] 酵母提取物、麦芽糖一水化物、冰醋酸、乳酸钠、硫酸镁、 β -丙氨酸、庚二酸、烟酸、硫酸铜、硫酸锌、氯化锰、L-胱氨酸、氯化钙二水合物、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸亚铁和注射用水。

[0127] 根据第七实施方式的第二方面,通过在以下述组合中任一种的最佳浓度的半合成培养基中培养破伤风梭菌来产生破伤风毒素,该半合成培养基由以下成分组成:

[0128] 组合1:

[0129] 酪蛋白消化物、氯化钙、磷酸氢二钾、无水右旋糖、氯化钠、硫酸镁、核黄素、硫胺素盐酸盐、吡哆醇盐酸盐、泛酸钙、烟酸、L-胱氨酸、氯化铁、维生素B12溶液、生物素、浓HCl、NaOH、纯乙醇和注射用水

[0130] 组合2:

[0131] 酪蛋白消化物、氯化钙、β-丙氨酸、磷酸氢二钾、无水右旋糖、氯化钠、硫酸镁、硫酸亚铁、核黄素、硫胺素盐酸盐、吡哆醇盐酸盐、泛酸钙、烟酸、L-胱氨酸、氯化铁、维生素B12溶液、生物素、浓HCl、NaOH、纯乙醇和注射用水

[0132] 组合3:

[0133] 酪蛋白消化物、氯化钙、磷酸氢二钾、无水右旋糖、氯化钠、硫酸锌、核黄素、硫胺素盐酸盐、吡哆醇盐酸盐、泛酸钙、烟酸、L-胱氨酸、氯化铁、维生素B12溶液、生物素、浓HCl、NaOH、纯乙醇和注射用水

[0134] 组合4:

[0135] 酪蛋白水解产物、氯化钙、磷酸氢二钾、无水右旋糖、氯化钠、硫酸镁、氯化锰核黄素、硫胺素盐酸盐、吡哆醇盐酸盐、泛酸钙、烟酸、L-胱氨酸、氯化铁、维生素B12溶液、生物素、浓HCl、NaOH、纯乙醇和注射用水

[0136] 在第七实施方式的又一方面中,利用以下灭活方法中的一种或组合将白喉毒素和破伤风毒素去毒,所述灭活方法包括热、UV、福尔马林/甲醛、乙酰氮丙啶等。

[0137] 根据本公开的第八实施方式,组合疫苗组合物中使用的肝炎(Hep)抗原包括来源于乙肝毒株(HBsAg)的表面的肝炎抗原。

[0138] 在第九实施方式的一个方面中,HBsAg可通过下述方法之一来制备:

[0139] • 通过从慢性乙肝携带者的血浆中纯化颗粒形式的抗原,因为在HBV感染期间在肝脏中合成大量HBsAg并释放到血流中

[0140] • 通过重组DNA方法表达蛋白

[0141] 根据本公开的第九实施方式,白喉类毒素(D)、破伤风类毒素(T)、乙肝表面抗原(HBsAg)单独吸附在选自铝盐(Al^{3+}),比如氢氧化铝($Al(OH)_3$)或磷酸铝($AlPO_4$)、明矾、磷酸钙、MPLA、3D-MPL、QS21、含CpG的寡脱氧核苷酸佐剂、脂质体或水包油乳液或其组合的佐剂上。

[0142] 仍优选地,白喉类毒素(D)、破伤风类毒素(T)和乙肝表面抗原(HBsAg)单独吸附在磷酸铝上。

[0143] 在第九实施方式的一个方面中,白喉类毒素(D)抗原以至少50%的吸附百分比吸附在磷酸铝上。

[0144] 在第九实施方式的另一方面中,破伤风类毒素(T)抗原以至少40%的吸附百分比吸附在磷酸铝上。

[0145] 在第九实施方式的又一方面中,乙肝表面抗原(HBsAg)以至少70%的吸附百分比吸附在磷酸铝上。

[0146] 根据本公开的第十实施方式,本公开的组合疫苗中使用的Hib抗原来源于B型流感嗜血杆菌(Hib)菌株760705的荚膜多糖。

[0147] 根据第十实施方式的一个方面,Hib PRP抗原缀合至选自但不限于以下的载体蛋白:CRM197、白喉类毒素,脑膜炎奈瑟氏菌外膜复合物、破伤风类毒素的片段C、百日咳类毒素、流感嗜血杆菌的D蛋白、大肠杆菌LT、大肠杆菌ST和来自铜绿假单胞菌的外毒素A、外膜复合物c(OMPC)、孔蛋白、运铁蛋白结合蛋白、肺炎球菌溶血素、肺炎链球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎链球菌表面粘附素A(PsaA)、肺炎链球菌PhtD、肺炎链球菌表面蛋白BVH-3和BVH-11、炭疽杆菌的保护抗原(PA)和炭疽杆菌的去毒水肿因子(EF)和致死因子(LF)、卵白

蛋白、钥孔血蓝蛋白 (KLH)、人血清白蛋白、牛血清白蛋白 (BSA) 和结核菌素的纯化蛋白衍生物 (PPD)、合成肽、热休克蛋白、百日咳蛋白、细胞因子、淋巴因子、激素、生长因子、包含来自各种病原体来源的抗原 (例如N19) 的多个人CD4+T细胞表位的人工蛋白、铁摄取蛋白、来自艰难梭菌的毒素A或毒素B和无乳链球菌蛋白。

[0148] 仍优选地,在Kniskern等,“Conjugation:design,chemistry,and analysis”,Ellis等,Development and clinical uses of Haemophilus influenzae type B conjugate vaccines.New York:Marcel Dekker,1994:37-69中已经公开了通过CNBr化学方法、还原胺化化学方法、氰化化学方法或任何其他化学方法将Hib PRP缀合至破伤风类毒素 (TT)。

[0149] 根据第十实施方式的第二方面,在本公开的组合物中,载体蛋白以游离和缀合形式存在,未缀合形式优选不大于组合物中作为整体的载体蛋白总量的20%,并且更优选地,以按重量计小于5%存在。

[0150] 根据第十实施方式的第三方面,Hib抗原基本上不吸附在任何佐剂上。

[0151] 根据第十实施方式的第四方面,Hib抗原可不有意或故意吸附在任何佐剂上。

[0152] 根据第十实施方式的第五方面,Hib抗原吸附在任何佐剂上的吸附百分比小于20%。

[0153] 根据本公开的第十一实施方式,制备本公开的组合疫苗组合物中使用的全细胞百日咳 (wP) 抗原优选地由以特定比例混合的百日咳博德特氏菌菌株134、菌株509、菌株25525和菌株6229,并且随后通过利用缺乏硫柳汞的灭活的改进方法来灭活而制成,因此导致反应原性降低和效力增加,并且wP抗原可吸附或不吸附在铝类佐剂上。

[0154] 根据第十一实施例的一个方面,用于本公开的组合疫苗组合物中的全细胞百日咳 (wP) 抗原制剂优选地由以1:1:0.25:0.25的比例混合的百日咳博德特氏菌菌株134、菌株509、菌株25525和菌株6229制成。

[0155] 根据第十一实施例的第二方面,利用包括热、UV、福尔马林/甲醛、乙酰氮丙啶等灭活处理中的一种或多种来灭活用于该组合疫苗组合物中的全细胞百日咳 (wP) 抗原制剂。

[0156] 仍优选地,利用热处理和化学处理的组合来灭活用于所述组合疫苗组合物中的全细胞百日咳 (wP) 抗原制剂。仍优选地,在存在甲醛的情况下,在 $56 \pm 2^\circ\text{C}$ 下热灭活10分钟至15分钟,其中散装wP保持不结块并且容易均质化,由此导致降低的反应原性并且在更长的持续时间内获得更好的wP效力。

[0157] 根据第十一实施方式的第三方面,制备用于组合疫苗组合物种的全细胞百日咳 (wP) 抗原可以吸附或不吸附在铝类佐剂,例如氢氧化铝、磷酸铝或其组合上 (例如,与其他组分 (如果存在的话) 混合之前或之后)。如果吸附,则一个或多个wP菌株 (即菌株134、菌株509、菌株25525和菌株6229) 可单独吸附或作为混合物一起吸附。

[0158] 根据本公开的第十二实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

表 1

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一

[0159]

[0160]

6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 8 或 4 或 16 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0161]

根据本公开的第十三实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

表 2

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	MEF-1 2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 1.5 或 2 或 4 或 8 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0162]

[0163]

根据本公开的第十四实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

表 3

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
[0164] 1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之

		PRP	—
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型			
[0165] 6	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0166] 根据本公开的第十五实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

表 4

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
[0167] 1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型			
6	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选地 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0168] 根据本公开的第十六实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0169]

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一

[0170]

6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 8 或 4 或 16 DU
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一

[0171] 根据本公开的第十七实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0172]

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	MEF-1 2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 1.5 或 2 或 4 或 8 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一

[0173] 根据本公开的第十八实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
[0174]	1 白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
	2 破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
	3 灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
	4 HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
	5 Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
	6 灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
[0175]	7 总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
	8 2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
	9 对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一

[0176] 根据本公开的第十九实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
[0177]	1 白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
	2 破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
	3 灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
	4 HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
	5 Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
	6 灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
	7 总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
	8 2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
	9 对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一

[0178] 根据本公开的第二十实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

表 9

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
[0179] 5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 8 或 4 或 16 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一

[0180] 9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一
----------	----------	------------------	----------------------------

[0181] 根据本公开的第二十一实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

表 10

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选地 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
[0182] 6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	MEF-1 2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 1.5 或 2 或 4 或 8 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0183] 根据本公开的第二十二实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型			
6	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0184]

[0185] 根据本公开的第二十三实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型			
6	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一
9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0186]

[0187] 根据本公开的第二十四实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 8 或 4 或 16 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0188]

[0189] 根据本公开的第二十五实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0190]

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	MEF-1 2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 1.5 或 2 或 4 或 8 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0191]

[0192] 根据本公开的第二十六实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0193] 表 15

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型			
6	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0194] 根据本公开的第二十七实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0195] 表 16

号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型			
6	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	对羟基苯甲酸甲酯	0.1 mg 至 1.5 mg	优选 0.7 或 0.9 或 1 mg 之一
9	对羟基苯甲酸丙酯	0.05 mg 至 0.2 mg	优选 0.05 或 0.1 或 0.15 mg 之一

[0197] 根据本公开的第二十八实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0198] 表 17

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μg 至 15 μg	优选 8 或 10 或 15 μg 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μg 至 13 μg 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μg 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 8 或 4 或 16 DU 之一
7	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
	总铝含量(Al ³⁺) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一

[0199] 根据本公开的第二十九实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0200] 表 18

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μg 至 15 μg	优选 8 或 10 或 15 μg 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μg 至 13 μg 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μg 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	MEF-1 2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 1.5 或 2 或 4 或 8 DU 之一
7	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
	总铝含量(Al ³⁺) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一

[0201]

[0202] 根据本公开第三十实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型			
6	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al ³⁺) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选地不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一

[0203]

[0204] 根据本公开的第三十一实施方式,多剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型			
6	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al ³⁺) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63
8	2-苯氧乙醇	1 mg 至 6 mg	优选 2 或 2.5 或 3 mg 之一

[0205]

[0206]

[0207] 根据本公开的第三十二实施方式,最终单剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0208]

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 8 或 4 或 16 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63

[0209] 根据本公开的第三十三实施方式,最终单剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0210]

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	MEF-1 2 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 1.5 或 2 或 4 或 8 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al^{3+}) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63

[0211] 根据本公开的第三十四实施方式,最终单剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

[0212]

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Sabin 血清型		
	1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 5 或 10 或 20 DU 之一
	3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al ³⁺) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于 0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63

[0214] 根据本公开的第三十五实施方式,最终单剂量组合疫苗组合物/制剂包括:

序号	制剂组分	抗原单位/0.5ml 剂量	优选的抗原单位/0.5ml 剂量 (在任何组合中)
1	白喉类毒素(D)	10 Lf 至 25 Lf	优选 10 或 20 或 25 Lf 之一
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf 至 10 Lf	优选 2 或 4 或 10 Lf 之一
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原 (wP)	12 IOU 至 16 IOU	优选 12 或 14 或 16 IOU 之一
4	HBs 抗原	7 μ g 至 15 μ g	优选 8 或 10 或 15 μ g 之一
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	7 μ g 至 13 μ g 的 PRP	优选 8 或 10 或 13 μ g 的 PRP 之一
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV) Salk 血清型		
	Mahoney 1 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 7.5 或 10 或 20 或 40 DU 之一
	Saukett 3 型(D 抗原单位)	1 DU 至 50 DU	优选 6 或 10 或 16 或 32 DU 之一
7	总铝含量(Al ³⁺) (作为磷酸铝)	0.1 mg 至 0.6 mg	优选不大于(NMT)0.3 或不大于 0.55 或不大于 0.63

[0216] NMT-不大于

[0217] 根据本公开的第三十六实施方式,最终组合疫苗组合物的一种或多种抗原可基本上不吸附在任何佐剂上。

[0218] 根据本公开的第三十七实施方式,免疫原性组合物的pH可在pH 6.0至pH 8.0的范围内;更优选地在pH 6.0至pH 7.5的范围内;又更优选地在pH 6.2至pH 7.2的范围内;和最优选地在pH 6.3至pH 6.8的范围内。

[0219] 根据本公开的第三十八实施方式,免疫原性组合物可另外包括选自由下述组成的组中的缓冲剂:碳酸盐、磷酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、葡萄糖酸盐和酒石盐,以及更复杂的有机缓冲剂,包括磷酸盐缓冲剂,该磷酸盐缓冲剂以选定的比例含有磷酸钠和/或磷酸钾以达到期望的pH。在另一实施例中,缓冲剂含有的三(羟甲基)氨基甲烷,或“Tris”,配制为达到期望的pH。在仍另一实施例中,缓冲剂可为具有Hanks盐的最低限度基本培养基。本公开还设想其他缓冲液,例如HEPE、哌嗪-N,N'-双(PIPES)和2-乙磺酸

(MES)。缓冲液有助于稳定本公开的免疫原性组合物。缓冲液的量可以在0.1mM至100mM的范围内,优选地选自5mM、6mM、7mM、22mM、23mM、24mM、25mM、26mM、27mM、28mM、29mM和30mM。

[0220] 实施方式的又一方面,免疫原性组合物可另外包括选自由下述组成的组中的药学上可接受的赋形剂:表面活性剂、聚合物和盐。表面活性剂的实例可包括非离子表面活性剂,比如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80等。聚合物的实例可包括葡聚糖、羧甲基纤维素、透明质酸、环糊精等。盐的实例可包括NaCl、KCl、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 MgCl_2 等。优选地,盐可为NaCl。通常,盐的量可在100mM至200mM范围内。

[0221] 可添加氨基酸,比如,组氨酸、甘氨酸、精氨酸和赖氨酸,以稳定免疫原性组合物。

[0222] 根据本公开的第三十九实施方式,免疫原性组合物可另外包括选自下述的组中的一种或多种佐剂:铝盐(Al^{3+}) (比如,氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)或磷酸铝(AlPO_4))、明矾、磷酸钙、MPLA、3D-MPL、QS21、含有CpG的寡脱氧核苷酸佐剂、脂质体或水包油乳液。

[0223] 仍优选地,组合物包括作为佐剂的磷酸铝(AlPO_4)。

[0224] 仍优选地,组合物包括作为佐剂的氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)。

[0225] 在第三十九实施方式的一个方面中,最终制剂的抗原可吸附在原位磷酸铝凝胶或现成的磷酸铝凝胶或它们的组合上。

[0226] 在第三十九实施方式的一个优选方面中,本公开的组合物可含有的佐剂的量为2.5mg/0.5ml或更少,并且具体地,佐剂的量为1.5mg/0.5ml至0.1mg/0.5ml。

[0227] 根据本公开的第四十实施方式,免疫原性组合物可另外包括选自由下述组成的组中的免疫刺激组分:油和水乳液、MF-59、脂质体、脂多糖、皂苷、脂质A、脂质A衍生物、单磷酸脂质A、3-脱酰基单磷酸基脂质A、AS01、AS03、寡核苷酸、包含至少一种未甲基化的CpG的寡核苷酸和/或脂质体、弗氏佐剂、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、聚合物、共聚物,比如聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物,包括嵌段共聚物,聚合物p1005、CRL-8300佐剂、胞壁酰二肽、TLR-4激动剂、鞭毛蛋白、来源于革兰氏阴性细菌的鞭毛蛋白、TLR-5激动剂、能够结合TLR-5受体的鞭毛蛋白的片段、 α -C-半乳糖神经酰胺、壳聚糖、白介素-2、QS-21、ISCOMS、角鲨烯混合物(SAF-1)、Quil A、霍乱毒素B亚单位、聚磷腈和衍生物、分枝杆菌细胞壁试剂、分枝菌酸衍生物、非离子嵌段共聚物表面活性剂、OMV、fHbp、皂苷与甾醇和脂质的组合。

[0228] 根据本公开的第四十一实施方式,免疫原性组合物可另外包括选自由下述组成的组中的防腐剂:苜素氯铵(Phemerol)、苯酚、间甲酚、硫柳汞、甲醛、苯扎氯铵、苯甲醇、氯代丁醇、对氯间甲酚,或苯甲醇或其组合。疫苗组合物可包括用于单次免疫的防腐剂,或可包括用于多次免疫的防腐剂(即“多剂量”试剂盒)。在多剂量安排中优选包含防腐剂。作为在多剂量组合物中包括防腐剂的替代方案(或另外),组合物可包含在具有用于移除材料的无菌接头的容器中。典型地,防腐剂的量可在0.1mg至50mg的范围内。

[0229] 根据本公开的第四十二实施方式,该免疫原性组合物可另外包括辅助材料(比如,湿润或乳化剂)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、增味剂、着色剂等,这取决于期望的施用途和制剂。

[0230] 根据本公开的第四十三实施方式,免疫原性组合物可以完全是液体,但不限于此。合适的形式的液体制剂可包括缓冲至期望pH的溶液、悬液、乳液、糖浆剂、等渗水溶液、粘性组合物和酞剂。

[0231] 本公开的免疫原性组合物可以为经皮制剂的形式,包括洗液、凝胶、喷雾、药膏或

其他适当的技术。如果期望经鼻或呼吸(粘膜)施用(例如,气溶胶吸入或吹入),组合物可处于一种形式并且通过挤压喷雾分散器、泵分散器或气溶胶分散器来分散。气溶胶通常压力下借助于烃来分散。泵分散器可优选地分散计量的剂量或具有特定粒度的剂量。当在一些实施方式中为溶液、悬浮液和凝胶的形式时,免疫原性组合物除了活性成分外还包含大量水(优选纯化水)。

[0232] 根据本公开的第四十四实施方式,所述组合疫苗可在2°C至8°C下保持稳定12至36个月;在25°C下保持稳定2至6个月;在37°C下保持稳定1至4周。

[0233] 根据本公开的第四十五实施方式,免疫原性组合物可配制为用于减少包括白喉、破伤风、百日咳、乙肝病毒、b型流感嗜血杆菌、脊髓灰质炎病毒感染的健康病况的出现或预防的方法,其涉及经肠胃外或皮下或皮内、肌内或腹膜内或静脉内施用或可注射的施用或由植入物缓释或通过滴眼剂或经鼻施用或直肠或含服或阴道施用、经口或胃内或粘膜或全脑膜、肺泡或牙龈或嗅觉或呼吸粘膜施用或任何其他免疫途径向人类受试者施用免疫有效量的免疫原性组合物。

[0234] 根据本公开的第四十六实施方式,免疫原性组合物可配制为单剂量小瓶或多剂量小瓶(2剂量或5剂量或10剂量小瓶)或多剂量试剂盒或预填充注射器,其中所述免疫原性组合物可以按单剂量方案给予,或优选地多剂量方案,其中初次接种疫苗过程后再接种1-3单独剂量,如果需要的话,在1-3年后以后续时间间隔给予。剂量方案还将至少部分根据给予保护性免疫所需的加强剂量的需要来确定。

[0235] 仍优选地,免疫原性组合物可配制为用于根据由第一剂量和在1-3年后以后续时间间隔的第二剂量组成的两剂量方案,施用至2岁或以下的人类受试者或儿童。

[0236] 优选地,免疫原性组合物可以与其他药物或任何其他疫苗同时施用。

[0237] 根据本公开的第四十七实施方式,申请人已经发现,当通过下面公开的方法制造疫苗时,可获得具有提高的免疫原性和降低的反应原性的多剂量完全液体组合疫苗,该方法考虑了:i)制造单个抗原的方法,ii)添加抗原的顺序,iii)针对某些抗原以特定量使用的特定佐剂,iv)抗原单独吸附或组合吸附在佐剂上,v)抗原吸附在佐剂上的程度,vi)使用最小明矾浓度,vii)使用最佳浓度和类型的防腐剂,和viii)使用各种参数包括搅拌、温度和pH。

[0238] 用于SIIPL组合疫苗中的菌株的生物来源:

[0239] 白喉类毒素:

[0240] 白喉杆菌PW8 CN2000菌株由National Control Authority Central Research Institute(C.R.I.)Kasauli,Himachal Pradesh,India从英国伦敦的Wellcome Research Laboratory获得,其为1973年的冻干形式。在C.R.I.Kasauli使该菌株复苏并在主种子批(白喉棒状杆菌CN2000 A1)下进一步冷冻干燥。

[0241] 破伤风类毒素:

[0242] 破伤风梭菌Harvard菌株号49205由National Control Authority Central Research Institute(C.R.I.)Kasauli,Himachal Pradesh,India从The Rijks Institute Voor de Volksgezondheid(荷兰)获得,其为冷冻干燥形式。

[0243] 百日咳:

[0244] 在SIIPL制造百日咳疫苗批次涉及利用百日咳博德特氏菌的四种菌株,即,菌株

134、菌株509、菌株6229和菌株25525。菌株134和菌株509的主种子最初来自荷兰的Rijks Institute,通过National Control Authority Central Research Institute (C.R.I.) Kasauli, Himachal Pradesh, India获得。菌株6229和菌株25525的主种子最初来自英格兰的Lister Institute。

[0245] 乙肝:

[0246] Rhein Biotech (德国) 构建了含有HBsAg表面抗原基因的重组多形汉逊酵母菌株。Rhein Biotech还制造了主细胞库 (MCB汉逊酵母K3/8-1菌株ADW, 12/94) 并进行对该细胞库进行了所有表征测试。

[0247] b型流感嗜血杆菌:

[0248] 用于产生细胞底物的源生物是b型流感嗜血杆菌菌株760705。该菌株最初在1976年11月分离自2岁2月龄的男婴 (出生于74年8月14日)。在阿姆斯特丹大学的Academic Medical Centre (AMC) 进行该菌株的三次传代,之后在-70°C下存储。作为SI IPL与Netherlands Vaccines Institute (NVI, 荷兰) 之间协作的一部分,将该菌株转移至SI IPL。

[0249] IPV:

[0250] 下面给出了Salk脊髓灰质炎病毒的毒株和来源。

[0251] 1型脊髓灰质炎病毒:

[0252] 毒株:Mahoney

[0253] 来源:Bilthoven Biologicals, 荷兰

[0254] 2型脊髓灰质炎病毒:

[0255] 毒株:MEF1

[0256] 来源:Bilthoven Biologicals, 荷兰

[0257] 3型脊髓灰质炎病毒:

[0258] 毒株:Saukett

[0259] 来源:Bilthoven Biologicals, 荷兰

[0260] 遍及本说明书,词语“包括(comprise)”,或其变形比如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”将被理解为暗示包括陈述的元件、整数或步骤,或元件、整数或步骤的组,但不排除任何其他元件、整数或步骤,或元件、整数或步骤的组。

[0261] 表述“至少”或“至少一种”的使用表明使用一个或多个元件或成分或数量,因为用途可以在本发明的实施例中用于实现一个或多个期望的目的或结果。虽然已经描述了本发明的某些实施方式,但这些实施方式仅以举例的方式呈现,而不是旨在限制本发明的范围。在检查本文的公开时,本领域的普通技术人员可以想到在本发明的范围内的对本发明的制剂的变化或修改。这样的变化或修改完全包括在本发明的精神内。

[0262] 对各种物理参数、尺寸和量给出的数值仅是近似值,并且除非说明书中相反地陈述,否则认为高于分散给物理参数、尺寸和量的数值的值落入本发明的范围内。

[0263] 虽然在此已经着重强调了优选实施方式的具体特征,但是应该理解,在不脱离本公开的的原理的情形下,可以添加许多附加特征并且可以在优选实施方式中做出许多改变。通过本文的公开内容,本公开的优选实施方式中的这些和其他变化对于本领域技术人员将是显而易见的,由此将清楚地理解,上述描述性内容应被解释为仅是本公开的说明而不是限制。

[0264] 优点

[0265] 上文描述的本公开具有若干技术进步和优点,包括但不限于,实现了包括D、T、wP、HBsAg、Hib PRP-TT缀合物和IPV的组合疫苗组合物及制造其的方法。当与其他组合疫苗组合物相比较时,本公开提供了下述优点:

[0266] 1、完全液体组合疫苗

[0267] 2、与标准剂量相比减少的IPV抗原剂量显示出与标准剂量(40-8-32DU)相比相当的功效

[0268] 3、提高了D、T、wP、HepB、Hib、IPV抗原的免疫原性

[0269] 4、在12个月的时间内测试的,在2°C至8°C和室温下改善的稳定性

[0270] 5、使用不含传染性海绵状脑病(TSE)或牛海绵状脑病(BSE)的半合成培养基产生的高度纯化的白喉类毒素(D)和破伤风类毒素(T)。

[0271] 6、全细胞百日咳博德特氏菌(wP)抗原以1:1:0.25:0.25的比例包括百日咳博德特氏菌菌株134、菌株509、菌株25525和菌株6229,从而提高了针对百日咳博德特氏菌的效力和免疫原性。

[0272] 7、使用热灭活和甲醛灭活的组合改进了使全细胞百日咳博德特氏菌(wP)组分灭活的方法。该方法不使用硫柳汞,并且灭活全细胞百日咳抗原保持不结块并且为均质的,从而产生降低的反应原性并在较长的持续时间内具有更好的效力。

[0273] 8、总b型流感嗜血杆菌PRP-TT缀合物批次中低的游离PRP(小于7%)。

[0274] 9、Hib抗原在任何佐剂上的吸附百分比小于20%。

[0275] 10、改善了单独吸附至磷酸铝佐剂上的白喉类毒素抗原(D)、破伤风类毒素(T)抗原和乙肝(HepB)表面抗原的吸附曲线,从而提高了效力和免疫原性。

[0276] 11、最小总明矾含量(Al^{3+})从而确保降低的反应原性。

[0277] 12、优化浓度的2-苯氧乙醇(2-PE)和至少一种对羟基苯甲酸酯(对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)作为防腐剂,因此有效地保持多剂量完全液体组合疫苗的抗微生物能力。

[0278] 实施例

[0279] 包括以下实施例以表明本发明的优选实施方式。本领域技术人员应理解,以下实施例中公开的组合物和技术代表了本发明人发现的在本发明实践中功能良好的技术,因此可被认为构成实践中的优选方式。然而,鉴于本公开,本领域的普通技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对公开的具体实施方式进行许多改变并且仍获得相同或相似的结果。

[0280] 实施例1:根据本公开的疫苗组合物的各种组合

表-25: 包括 IPV (1 型(Mahoney)或 2 型(MEF)或 3 型(Saukett) Salk 毒株)的组合疫苗

序号	制剂组分	根据本公开的组合物[每 0.5ml 剂量]											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	白喉类毒素(D)	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf
3	灭活百日咳博德德氏菌抗原(wP)	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	14 IOU	14 IOU	14 IOU	14 IOU
4	HBs 抗原	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP
6	灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV)												
	1 型 (D 抗原单位)	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40
	2 型 (D 抗原单位)	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--
7	总铝含量(Al ³⁺) (作为磷酸铝)	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg	不大于 0.55 mg
		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
8	2- 苯氧	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

[0281]

[0282]

	乙醇	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	--	--	--	--	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--

[0283]

表-25 续

序号	制剂组分	根据本公开的组合物[每 0.5ml 剂量]											
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	白喉类毒素(D)	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	25 Lf							
2	破伤风类毒素(T)	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf
3	灭活百日咳博德特氏菌抗原(wP)	14 IOU	14 IOU	14 IOU	14 IOU	16 IOU							
4	HBs 抗原	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	10 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP	13 µg 的 PRP							
6	灭活脊髓灰质炎病毒(IPV)												
	1 型(D 抗原单位)	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40	7.5 或 10 或 20 或 40
	2 型(D 抗原单位)	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--	1.5 或 2 或 4 或 8	--

[0284]

	3 型(D 抗原单位)	6 或 10 或 16 或 32											
7	总铝含量 (Al ³⁺) (作为磷酸铝)	不大于 0.55 mg											
8	2-苯氧乙醇	2.5 mg											
9	对羟基苯甲酸甲酯	--	--	--	--	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	--	--	--	--
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--

[0285] 另外用氢氧化钠/碳酸钠将如上公开的组合物的pH调节至约6.0至7.0,并且通过添加生理盐水(0.9%)以补足体积。疫苗可含有在制造过程中使用的痕量戊二醛、甲醛、新霉素、链霉素和多粘菌素B。

[0286]

序号	制剂组分	根据本公开的组合组合物[每 0.5ml 剂量]												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	白喉类毒素(D)	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf
2	破伤风类毒素(T)	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	02 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf
3	灭活百日咳博德德氏菌抗原(wP)	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	12 IOU	14 IOU	14 IOU	14 IOU	14 IOU
4	HBs 抗原	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	8 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	8 µg 的 PRP	10 µg 的 PRP			

[0287]

6	灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV)												
	1 型 (D 抗原单位)	5 或 10 或 20											
	2 型 (D 抗原单位)	4 或 8 或 16	--										
	3 型 (D 抗原单位)	10 或 16 或 32											
7	总铝含量 (Al ³⁺) (作为磷酸铝)	不大于 0.55 mg											
8	2-苯氧乙醇	2.5 mg											
9	对羟基苯甲酸甲酯	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	--	--	--	--	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--

[0288]

表-26 续

序号	制剂组分	根据本公开的组合组合物[每 0.5ml 剂量]											
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	白喉类毒素 (D)	20 Lf	20 Lf	20 Lf	20 Lf	25 Lf							
2	破伤风类毒素 (T)	4 Lf	4 Lf	4 Lf	4 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf	10 Lf
3	灭活百日咳博德氏	14 IOU	14 IOU	14 IOU	14 IOU	16 IOU							

[0289]

	菌抗原 (wP)												
4	HBs 抗原	15 μg											
5	Hib PRP-TT 缀合物抗原	10 μg 的 PRP	13 μg 的 PRP										
6	灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV)												
	1 型(D 抗原单位)	5 或 10 或 20											
	2 型(D 抗原单位)	4 或 8 或 16	--										
	3 型(D 抗原单位)	10 或 16 或 32											
7	总铝含量 (Al ³⁺) (作为磷酸铝)	不大于 0.55 mg											
8	2-苯氧乙醇	2.5 mg											
9	对羟基苯甲酸甲酯	--	--	--	--	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	0.9 mg	--	--	--	--
10	对羟基苯甲酸丙酯	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--	0.1 mg	0.1 mg	--	--

[0290] 另外用氢氧化钠/碳酸钠将上面公开的组合物的pH调节至约6.0至7.0,并且通过添加生理盐水(0.9%)以补足体积。疫苗可以含有在制造过程中使用的痕量戊二醛、甲醛、新霉素、链霉素和多粘菌素B。

[0291] 实施例2:b型流感嗜血杆菌缀合物散装物的制造方法

[0292] 图1的流程图中示出了制造步骤的示意图。如下简要描述方法的53个步骤中的每一个步骤:

[0293] 步骤1:接种阶段I摇瓶(S1):

[0294] 利用工作种子批次小瓶来接种接种体阶段摇瓶,其含有0.22μm过滤的种子培养

基。使用工作体积为25mL的一次性PETG 125mL烧瓶。该阶段在培养箱摇床中在受控的搅拌(200±50rpm)和温度(36±2℃)下进行。在实现适当的细菌生长($OD_{590} \geq 1.0$)之后,将培养物转移到下一接种体阶段(S2阶段),其描述在步骤2中。进行革兰氏染色作为过程中对照以确保培养物纯度(革兰氏阴性球杆菌)。

[0295] 步骤2:接种体阶段II摇瓶(S2):

[0296] S2接种阶段由工作体积为800mL的2L费恩巴赫烧瓶(S2A和S2B)组成。S2A烧瓶用于 OD_{590} 测量,直到 OD_{590} 在接受标准内,S2B烧瓶用于S3阶段的接种。用过滤灭菌的培养基分批培养两个烧瓶,培养基与S1接种物阶段相同。S1阶段烧瓶用于接种两个阶段II摇瓶。该阶段在具有受控的搅拌(200±50rpm)和温度(36±2℃)下的培养箱摇床中进行。在实现适当的细菌生长($OD_{590} \geq 1.0$)之后,将培养物转移至下一接种物阶段(S3阶段),其描述在步骤3中。进行革兰氏染色作为过程中对照以确保培养物纯度(革兰氏阴性球杆菌)。

[0297] 步骤3:接种体阶段III发酵罐:

[0298] S3接种阶段由工作体积为35L的120L发酵罐组成。发酵罐用与先前接种阶段相同的培养基分批培养。S2阶段烧瓶用于接种物发酵罐的接种。生长在接种物发酵罐中在温度(36±2℃)、DO(10%设定点)、搅拌(300-600rpm)、通气(1-5LPM)和背压(0.2巴)下进行。在实现适当的细菌生长($OD_{590} \geq 1.0$)之后,将培养物转移至下一生产阶段(S4阶段),其描述在步骤4中。进行革兰氏染色作为过程中对照以确保培养物纯度(革兰氏阴性球杆菌)。

[0299] 步骤4:1200L规模产生发酵:

[0300] 1200L生产发酵罐的工作体积为800L。将其用基础培养基组分分批培养并且原位蒸汽灭菌。随后,在通过0.22μm过滤器之后添加各种培养基补充物。用从步骤3获得的S3阶段培养物接种发酵罐。在受控的溶解氧(20%-设定点)、温度(36±2℃)、pH(7.1-7.4)、搅拌(40-400rpm)、通气(50-300LPM)和背压(0.2巴)下进行发酵。在发酵过程中添加两个分开的营养物峰值。通过测量 OD_{590} ($OD_{590} \geq 3.5$)监测生长,并且在达到稳定阶段后认为发酵完成。在生长期和稳定阶段,分泌多糖产物并且在培养液中积累。进行革兰氏染色作为过程中对照以确保培养物纯度(革兰氏阴性球杆菌)。

[0301] 步骤5:福尔马林处理:

[0302] 在该步骤中通过使用化学试剂(福尔马林)实现生物负荷减少。添加0.1%福尔马林并且将发酵液在37℃下温育不少于2小时。在福尔马林处理之后,将容器快速冷却至<15℃。确认福尔马林的添加以实现生物负荷减少。这通过在温育期后的培养板得到验证。该生物负荷减少的发酵液准备好用于收获,如步骤6中所述。

[0303] 步骤6:连续离心收获:

[0304] 采用连续离心作为初级收获步骤。进行该步骤,以从灭活的生物质中分离含多糖的粗制培养液。为了去除>90%的生物质使用了连续离心机,如通过 OD_{590} 降低所测量的。在约15000g和200-500L/h的液体流速下操作离心机。如步骤7中所述,进一步处理离心的上清液。

[0305] 步骤7:50LP深度过滤:

[0306] 使离心的上清液通过50LP深度过滤器以去除粗粒物质,比如细胞碎片。该步骤允许产物通过滤液,并且与另外的深度过滤器串联,如步骤8中所述。

[0307] 步骤8:90LP深度过滤:

[0308] 使来自50LP深度过滤器的滤液进一步通过90LP深度过滤器(标称0.22 μ m等级)以进一步除去可能未被先前的深度过滤器保留的任何不溶性物质。该步骤确保滤液基本上不含细胞碎片,并且可顺利地通过0.22 μ m过滤器。在步骤9中描述了随后的过滤步骤。

[0309] 步骤9和步骤10:0.22 μ m过滤:

[0310] 使来自90LP深度过滤器的滤液进一步通过0.22 μ m过滤器,并且将滤液收集在贮存罐中。

[0311] 步骤11和步骤12:100kD浓缩和渗滤:

[0312] 进行该步骤以除去培养基组分和小分子量杂质。此外,进行浓缩以减小工作体积。由于Hib多糖(PRP)的分子量 \geq 500kD,因此选择100kD的截留分子量。将该发酵液浓缩至大约10倍并且随后使用0.01M PBS缓冲液(pH 7.2)渗滤不少于5体积。截留物中的所得产物被称为“粗PRP”并且如步骤13中所述进一步处理。将浓缩的发酵液经由0.22 μ m过滤器通过转移口转移至DSP区域,以确保没有细菌被带到DSP区域。

[0313] 步骤13:CTAB沉淀:

[0314] CTAB(十六烷基-三甲基溴化铵)是一种阳离子洗涤剂,用于多糖的沉淀。CTAB由亲水区以及疏水部组成,并且使蛋白质、核酸和多糖沉淀。将从步骤12获得的粗PRP在1%CTAB浓度下沉淀并且温育 $>$ 2小时。在步骤14中描述了CTAB颗粒收获。

[0315] 步骤14、步骤15和步骤16:CTAB颗粒离心、收集和存储:

[0316] 在SEZ-3,FF中,使用连续离心机以15000rpm将CTAB颗粒离心。收获CTAB颗粒,称重,等分并且储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下用于进一步处理。这是第一过程中保持步骤。

[0317] 步骤17和步骤18:CTAB浆料解冻和溶出:

[0318] 将冷冻的CTAB浆料解冻至室温。将解冻的颗粒溶于5.85%的NaCl溶液。溶解在搅拌罐中进行,并且将多糖产物溶于水相。罐含有一些未溶解的物质,其来自沉淀的蛋白质和核酸。如步骤19中所述进一步处理该悬浮液。

[0319] 步骤19:离心:

[0320] 将从步骤18获得的物质在 2°C 至 8°C 、5000rpm至6500rpm下离心20分钟至30分钟以除去未溶解的物质。收集离心的上清,并且如步骤20中所述进一步处理。

[0321] 步骤20:72%乙醇沉淀:

[0322] 使用72%的乙醇沉淀PRP。针对步骤19中获得的上清,使用96%的乙醇生成72%终浓度的乙醇。在 2°C 至 8°C 下进行沉淀过夜。如步骤21中所述收获所得沉淀物。

[0323] 步骤21和步骤22:离心和颗粒溶出:

[0324] 通过在 2°C 至 8°C 、5000rpm至6500rpm下离心20分钟至30分钟收集72%的乙醇沉淀物。将所得颗粒溶于注射用水中直至获得视觉澄清度。步骤23中描述了溶解的颗粒的后续处理。

[0325] 步骤23:DOC和32%乙醇沉淀:

[0326] 向从步骤22获得的材料中添加6%的乙酸钠和1%的脱氧胆酸钠(DOC)。使用96%的乙醇来生成终浓度32%的乙醇。DOC和32%醇均会驱动蛋白质杂质的沉淀,同时允许多糖处于液相中。在 2°C 至 8°C 下进行该沉淀过夜(不少于8小时)。

[0327] 步骤24:离心:

[0328] 将从步骤23获得的物质在 2°C 至 8°C 、5000rpm至6500rpm下离心20分钟至30分钟以

除去沉淀物。收集离心的上清并且如步骤25中所述进一步处理。

[0329] 步骤25:深度过滤和碳过滤:

[0330] 步骤24中获得的上清含有可溶性PRP并且进行深度过滤,随后进行碳过滤以去除核酸和着色物质。通过在260nm间歇地测量吸光度(A_{260})来监测核酸的去除。在到达目标 A_{260} 之后,通过0.22 μm 过滤器过滤该溶液,并且如步骤26中所述进一步处理该过滤的溶液。

[0331] 步骤26:64%乙醇沉淀:

[0332] 将在步骤25中获得的过滤物质用终浓度64%乙醇的96%乙醇沉淀。该沉淀在2 $^{\circ}\text{C}$ 至8 $^{\circ}\text{C}$ 下进行过夜。通过离心收获所得沉淀物,并且如步骤27中所述进一步处理。

[0333] 步骤27:颗粒收集和溶出:

[0334] 倾析并且丢弃上清以收集颗粒。在室温下将颗粒溶于注射用水中。

[0335] 步骤28:300kD浓度和透析过滤:

[0336] 使用300kD NMWCO膜浓缩溶解的颗粒溶液。利用注射用水将其进一步渗滤不小于(NLT)8次。如步骤29中所述进一步处理所得截留物。

[0337] 步骤29和步骤30:0.22 μm 过滤和纯化PRP储存:

[0338] 作为澄清步骤,使300kD UF截留物通过0.22 μm 过滤器以使生物负荷最小化。将得到的纯化的PRP等分并储存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 下,直到如步骤31中所述进一步使用。将纯化的PRP样品送去质量控制分析。

[0339] 步骤31:解冻和合并:

[0340] 基于缀合物批次大小,将获自步骤30的合适量的天然多糖解冻。测定合并的物质的PRP含量,其为如步骤32中所述进一步加工所需的。

[0341] 步骤32:100kD浓度:

[0342] 要求合并的纯化多糖为最低浓度(8至12mg/mL)以用于进一步处理。如果合并的多糖浓度低于目标,则通过利用100kD UFNWCO膜浓缩合并的多糖溶液。在浓缩之后抽取样品以确保对于后续步骤(步骤33)达到最小浓度。

[0343] 步骤33:碱解聚:

[0344] 在温和的碱性条件下,使用碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液将获自步骤32的浓缩多糖(相当于74g/110g)解聚。在达到目标多糖尺寸后,如步骤34中所述活化解聚的多糖。

[0345] 步骤34:多糖激活:

[0346] 使用溴化氰活化获自步骤33的解聚的多糖。该活化在氮气环境下进行。溴化氰是高毒性化学品,并且在处理这种化学品时应保持适当注意。

[0347] 步骤35:接头衔接:

[0348] 在6分钟至10分钟内将新鲜制备的己二酸二酰肼(ADH)溶液添加到获得自步骤34的反应混合物中。反应在2 $^{\circ}\text{C}$ 至10 $^{\circ}\text{C}$ 下进行不少于16小时。ADH接头的作用是提供缀合反应所需的多糖中的胺基。

[0349] 步骤36:浓度和渗滤:

[0350] 将获自步骤35的反应混合物浓缩并且用磷酸盐缓冲盐水(PBS)使用10kD NMWCO UF膜逐体积渗滤以除去游离的ADH。在HPLC上监测ADH的去除并且继续渗滤直至游离ADH水平达到低于5%。将所得截留物进一步用不少于5X MES-NaCl缓冲液渗滤。将其进一步浓缩以获得不少于20mg/mL的浓度。将该浓缩处理的PRP保持在2 $^{\circ}\text{C}$ 至8 $^{\circ}\text{C}$ 下,直到如步骤37中所

描述的进一步使用。

[0351] 步骤37和步骤38:0.22 μ m过滤和处理的PRP储存:

[0352] 使来自步骤36的截留物通过0.22 μ m过滤器,该过滤器用作澄清步骤。这也确保了在该处理过程中控制生物负荷水平,该处理是在C级区域中进行的。收集、取样、等分过滤活化的多糖并且在2 $^{\circ}$ C至8 $^{\circ}$ C下储存直至进一步处理。从处理的多糖库中取样用于分析,该分析包括PRP分子大小(kD)、PRP含量和PRP活化度。在步骤40中描述处理的PRP的进一步处理。

[0353] 步骤39:TT 10kD浓缩和渗滤:

[0354] 缀合反应需要两种组分,即,处理的多糖和载体蛋白(TT)。将载体蛋白浓缩并且使用10kDUF NMWCO膜用MES-NaCl缓冲液渗滤。然后使用相同的膜将这种渗滤的载体蛋白进一步浓缩至不少于20mg/mL。

[0355] 步骤40:缀合:

[0356] 缀合反应需要两种组分,即,处理的多糖和载体蛋白(TT)。活化的多糖组分得自步骤38。载体蛋白得自步骤39。在存在EDC的情况下,在搅拌下,以PRP:TT=1:1(w/w)的比例以适当的量混合这两种组分。在HPLC上监测缀合反应并且继续反应直至达到 $\geq 85\%$ 的蛋白质转化(基于游离的蛋白质转化为缀合物)。

[0357] 步骤41:淬灭:

[0358] 在缀合反应已经进行到其转化的接受标准(步骤40)之后,通过淬灭终止反应。使用磷酸盐EDTA缓冲液淬灭缀合反应。随后如步骤42所述进行该缀合反应。

[0359] 步骤42:30SP和0.22微米过滤:

[0360] 将获自步骤41的缀合物通过30SP过滤器进行过滤,随后通过0.22 μ m过滤。这确保了能够去除任何大的聚集体。如步骤43中所述处理过滤的缀合物。

[0361] 步骤43:300kD超滤和透析过滤:

[0362] 使用300kD UF NMWCO膜,用0.05%的盐水渗滤从步骤42获得的缀合反应混合物。进行渗滤以去除缀合试剂和未反应的TT。如步骤44中所述进一步处理所得截留物。

[0363] 步骤44和步骤45:0.22 μ m过滤和粗缀合物存储:

[0364] 使来自步骤43的截留物通过0.22 μ m过滤器,该过滤器用作澄清步骤。这还确保了在该处理过程中控制生物负荷水平,该处理是在C级区域中进行的。收集过滤的粗缀合物,取样并储存在2 $^{\circ}$ C至8 $^{\circ}$ C直至进一步处理。步骤46中描述了粗缀合物的进一步处理。

[0365] 步骤46:粗缀合物稀释:

[0366] 如果需要,将来自步骤45的粗缀合物用注射用水稀释至 4 ± 1 mg/mL的目标浓度,并且通过步骤47中描述的沉淀步骤进一步处理。

[0367] 步骤47:硫酸铵沉淀:

[0368] 使用硫酸铵(50%w/v母液)进一步处理稀释的缀合反应混合物以去除游离的PRP。该沉淀步骤在小于15 $^{\circ}$ C下在搅拌下进行。沉淀步骤驱动沉淀物中的缀合物,并将游离PRP留在上清中。在添加硫酸铵之后,在不搅拌的情况下将所得悬浮液在小于15 $^{\circ}$ C下储存不少于12小时。

[0369] 步骤48:颗粒收集和溶出:

[0370] 将从步骤47获得的悬浮液以约7000g在2 $^{\circ}$ C至8 $^{\circ}$ C下离心 40 ± 10 分钟。通过倾析丢弃上清,并且将获得的颗粒溶于Tris-盐水中。

[0371] 步骤49:300kD渗滤:

[0372] 通过30SP深度过滤器过滤得自步骤48的溶液并且使用300kD NMWCO膜用20mM Tris-盐水渗滤。

[0373] 步骤50:GPC色谱纯化:

[0374] 将来自步骤49的所得溶液上样至用于尺寸排阻色谱的含有Toyopearl HW-65F羟甲基丙烯酸聚合物珠粒凝胶的约70L GPC柱。对处理的缀合物(硫酸铵处理后)使用GPC色谱法降低了所得物质中的游离PRP水平。用20mM Tris 0.9%NaCl洗脱该柱,并且基于 A_{280} 收集馏份。基于接受标准,针对游离PRP、比例和分子大小合并适当的馏份,并进一步处理该合并物,如步骤51中所述。

[0375] 步骤51:300kD渗滤:

[0376] 使用300kD UFNWCO膜,用20mM Tris渗滤得自步骤50的合并的缀合物洗脱物。该截留物体积的目的是使其中的PRP含量为约1mg/mL。

[0377] 步骤52和步骤53:0.22 μ m过滤:

[0378] 将获自步骤51的散装缀合物在A级环境下通过0.22 μ m过滤器过滤以确保无菌。对该0.22 μ m过滤器进行完整性测试。将来自过滤的散装缀合物的样品送至质量控制用于完全分析。将过滤的缀合物标记为“无菌Hib散装缀合物”并且储存在2°C至8°C下。散装缀合物将在2°C至8°C下储存最多达3个月,并且此后如果没有使用的话,则其可在-70°C下储存长达1年的总持续时间。

[0379] 获得的Hib PRP-TT缀合物抗原的质量特征如下:

[0380] PRP含量(μ g/0.5ml):8.1

[0381] 比例(PRP:TT):0.5

[0382] 游离PRP(%):4.8%

[0383] PMW(kD):983

[0384] 平均MW(kD):752

[0385] 实施例3:制造灭活wP抗原的方法

[0386] 全细胞百日咳(wP)抗原的灭活方法:

[0387] 在进行不同实验之后进行灭活方法优化,这些实验包括在存在甲醛的情况下在56°C下灭活10分钟,在存在甲醛的情况下在56°C下灭活15分钟,在存在乙胺的情况下在56°C下灭活10分钟,在存在乙胺的情况下在56°C下灭活15分钟,以及仅在56°C下加热30分钟。用这些方法没有观察到效力的显著差异。在这些方法中,选择在存在甲醛的情况下56°C持续10分钟,因为与以上提及的其他方法相比,使用这种方法产生的百日咳细胞物质更均质。

[0388] 制造灭活wP抗原的过程包括下述步骤:

[0389] a). 在存在甲醛的情况下,百日咳博德特氏菌菌株134在56°C下灭活10分钟至15分钟

[0390] b). 在存在甲醛的情况下,百日咳博德特氏菌菌株509在56°C下灭活10分钟至15分钟

[0391] c). 在存在甲醛的情况下,百日咳博德特氏菌菌株25525和菌株6229在56°C下灭活10分钟至15分钟

[0392] c). 在存在甲醛的情况下,百日咳博德特氏菌菌株6229在56°C下灭活10分钟至15

分钟

[0393] d). 随后以1:1:0.25:0.25的比例混合灭活百日咳博德特氏菌菌株134、菌株509、菌株25525和菌株6229。

[0394] e). 任选地吸附至铝类佐剂上。

[0395] 该方法不含硫柳汞, 并且灭活全细胞百日咳抗原保持不结块和均质, 从而具有降低的反应原性并且在较长的持续时间内具有更好的效力。

[0396] 实施例4: 制造灭活脊髓灰质炎病毒 (IPV) 的方法

[0397] 1、可通过以下方法生长脊髓灰质炎病毒:

[0398] a) CCL81-VERO (猴肾) 细胞系用作宿主细胞, 用于脊髓灰质炎病毒即Sabin毒株和Salk毒株的生长。

[0399] b) 在用期望的脊髓灰质炎病毒株感染宿主细胞并且温育72小时后, 合并含有病毒和细胞碎片的培养基并且收集在单个容器中。

[0400] c) 将滤液用100KDa盒进行切向流过滤; 使用磷酸盐缓冲液渗滤并且使用阴离子交换色谱进行纯化。

[0401] d) 在施用至患者之前, 病毒必须使用适当的灭活方法灭活。

[0402] 2、福尔马林灭活包括以下步骤:

[0403] a) 在pH为7至7.5之间的条件下使纯化的病毒库进行磷酸盐缓冲液和Tris缓冲液(30mM至50mM)的缓冲液交换,

[0404] b) 向上述混合物中添加含有甘氨酸(5gm/l)的M-199培养基,

[0405] c) 添加0.025%的甲醛并且随后混合,

[0406] d) 随后将该混合物在37°C下温育5天至13天, 同时在磁力搅拌器上连续搅拌病毒散装物,

[0407] e) 温育后的混合物在第7天经历中间TFF系统(100KDa, 0.1m²)处理, 并且在失活后进行最终过滤,

[0408] f) 之后在2°C至8°C下储存过滤的散装物,

[0409] g) 进行D-Ag ELISA用于D-Ag单位测定

[0410] h) 随后混合形成三价或二价IPV (Salk或沙宾血清型)的1型IPV、2型IPV和3型IPV的单价合并散装物

[0411] i) 调节最终制剂的pH并获得pH为6至6.8的最终制剂。

[0412] j) 随后将该IPV抗原 (Sabin毒株或Salk毒株) 添加至吸附在组合疫苗中存在的佐剂(磷酸铝盐)上的最终组合疫苗组合中, 其中, 发现IPV抗原, 1型IPV的吸附百分比在10%至30%的范围内, 2型IPV的吸附百分比在60%至100%的范围内, 并且3型IPV的吸附百分比在0%至25%的范围内。

[0413] 3、当单独地吸附在铝盐上时, IPV (Sabin毒株和Salk毒株) 的配制程序:

[0414] a) 取期望体积的高压灭菌的AlPO₄以在50ml容器中得到最终明矾(Al³⁺)浓度在0.1mg至0.8mg/剂量之间,

[0415] b) 添加具有经调节的D-Ag单位的IPV散装物, 并且用稀释剂(10x M-199+0.5%甘氨酸)补足体积,

[0416] c) 调节最终制剂的pH并且获得pH为6至6.8的最终制剂。

[0417] 4、明矾吸附的单价库相应地配制成三价或二价IPV (Salk或Sabin血清型)

[0418] 结果:

[0419] 其中吸附至磷酸铝 (AlPO_4) 盐上的1型IPV、2型IPV和3型IPV (Sabin和Salk) 吸附百分比为至少90%。

[0420] 申请人已经能够实现脊髓灰质炎病毒抗原的2倍剂量减少 (而脊髓灰质炎病毒抗原的标准剂量是1型-40DU、2型-8DU、3型-32DU)。

[0421] 表27:磷酸铝上Sabin IPV的吸附研究

[0422]	样品	效价 (每剂量)	病毒颗粒 (以K计)	SUP 中的游离%	吸附在凝胶上的%	
	1 型, AlPO_4	对照	5.84	691	NA	
		Al^{3+} 125 μg /剂量	3.49	3	0.43	99.57
		Al^{3+} 250 μg /剂量	3.09	1.2	0.17	99.83
		Al^{3+} 500 μg /剂量	2.94	0.87	0.12	99.87
	2 型, AlPO_4	对照	5.49	309		
		Al^{3+} 125 μg /剂量	3.15	1.41	0.45	99.5
[0423]		Al^{3+} 250 μg /剂量	3.09	1.23	0.39	99.6
		Al^{3+} 500 μg /剂量	3.09	1.23	0.39	99.6
		3 型, AlPO_4	对照	5.59	389	NA
		Al^{3+} 125 μg /剂量	5.34	218	56.04	43.94
		Al^{3+} 250 μg /剂量	5.24	173	44.47	55.53
		Al^{3+} 500 μg /剂量	5.16	144	37.01	63.9

[0424] 实施例5:制造组合疫苗的方法

[0425] 本实施例给出了制造组合疫苗的过程的简要描述,该组合疫苗组合物包含D、T、wP、HBsAg、Hib PRP-TT缀合物、IPV和防腐剂:

[0426] 组分I-明矾吸附白喉类毒素

[0427] 组分II-明矾吸附破伤风类毒素

[0428] 组分III-wP抗原 (如实施例3中公开)

[0429] 组分IV-明矾吸附乙肝表面抗原

[0430] 组分V-Hib PRP缀合物 (如实施例2中公开)

[0431] 组分VI-IPV抗原 (如实施例4种公开)

[0432] 1、包含明矾吸附的白喉类毒素的组分I的制备:

[0433] a) 在容器/器皿中转移磷酸铝

[0434] b) 添加白喉类毒素

[0435] c) 用乙酸/氢氧化钠将pH调节至4.5至5.5

- [0436] d) 等待稳定
- [0437] e) 氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至5.5至6.5
- [0438] f) 等待稳定
- [0439] 2、包含明矾吸附的破伤风类毒素的组分II的制备：
- [0440] a) 在容器/器皿中转移磷酸铝
- [0441] b) 添加破伤风类毒素
- [0442] c) 用乙酸/氢氧化钠将pH调节至4.5至5.5
- [0443] d) 等待稳定
- [0444] e) 用氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至5.5至6.5
- [0445] f) 等待稳定
- [0446] 3、包含明矾吸附的乙肝表面抗原的组分IV的制备：
- [0447] a) 在容器/器皿中转移磷酸铝
- [0448] b) 添加乙肝表面抗原
- [0449] c) 用乙酸/氢氧化钠将pH调节至4.5至5.5
- [0450] d) 等待稳定
- [0451] e) 用氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至5.5至6.5
- [0452] f) 等待稳定
- [0453] 4、制备包括D、T、wP、HBsAg、Hib PRP-TT缀合物、IPV和防腐剂的组合疫苗组合物的方法
- [0454] 1、向掺混容器/器皿中添加生理盐水；
- [0455] 2、添加组分I
- [0456] 3、将组分II混合到组分I中，并在室温下搅拌30分钟至45分钟。
- [0457] 4、将组分III添加至上述混合物中，随后在室温下搅拌30分钟至60分钟。
- [0458] 5、将组分IV添加至步骤4获得的混合物中，随后在室温下搅拌30分钟至60分钟。
- [0459] 6、将组分V添加至步骤5获得的混合物中，随后在6℃至16℃下搅拌30分钟至60分钟。
- [0460] 7、将组分VI添加至步骤6获得的混合物中，随后在6℃至16℃下搅拌。
- [0461] 8、向步骤7获得的混合物中添加如下公开的防腐剂组合之一，并在6℃至16℃下搅拌。
- [0462] a) 量为约1mg/0.5ml至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇；或
- [0463] b) 量为约1mg/0.5ml至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇，和以0.1mg至1.5mg/0.5ml (w/v) 的浓度使用的对羟基苯甲酸甲酯；或
- [0464] c) 量为约1mg/0.5ml至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇，和以0.05mg至0.2mg/0.5ml (w/v) 的浓度使用的对羟基苯甲酸丙酯；或
- [0465] d) 量为约1mg/0.5ml至6mg/0.5ml (v/v) 的2-苯氧乙醇、以0.1mg至1.5mg/0.5ml (w/v) 的浓度使用的对羟基苯甲酸甲酯和以0.05mg至0.2mg/0.5ml (w/v) 的浓度使用的对羟基苯甲酸丙酯。
- [0466] 9、检查pH，如果有需要，用氢氧化钠/碳酸钠将pH调节至pH 6.0至7.5。
- [0467] 10、用步骤9中获得的盐水(0.9%)补足体积，随后搅拌3小时。

[0468] 实施例6:抗原的吸附、效力和稳定性表现

表 28: 该表给出了在 2℃至 8℃条件下保存 12 个月的 SHPL 组合疫苗中单个抗原的吸附百分比、效力和稳定性表现的简要说明

测试	限制/说明	0 天	6 个月	12 个月
乙肝体内效力 R.P(95% CL)	(0.61-1.12)	0.83	NA	合规
Hib PRP 含量 (µg/0.5 ml) (总 PRP)	实际值	9.3µg/0.5ml	8.46 µg/0.5ml	10.03
游离 PRP(%)		8	NA	NA
白喉组分效力(IU/剂量)	不少于 30 IU/剂量	98.5120 IU/剂量 (69.9650-137.247)	NA	95.8463 IU/剂量
破伤风组分效力(IU/剂量)	不少于 40 IU/剂量	139.030 IU/剂量 (88.2850-208.688)	NA	382.079 IU/剂量
百日咳组分效力(IU/剂量)	不少于 4 IU/剂量	4.6749 IU/剂量 (2.6492-8.2763)	4.8410IU/剂量 (2.7331-8.6081)	5.131
吸附肝炎-B(%)	实际值	89.44	82.65	75.52
吸附: 破伤风组分(%)	实际值	63.0	59.0	NA
吸附: 白喉组分(%)	实际的值.	81.0	72.0	NA
D 抗原(DU/0.5 ml) (=标称值 75%是可接受的)	1 型= 20 DU/0.5 ml	22.414	合规	合规
	2 型=4 DU/0.5 ml	4.692	合规	合规
	3 型=16 DU/0.5 ml	22.084	合规	合规
总铝含量	不大于 0.6 mg/0.5 ml	0.2768	NA	NA

[0470] NA-不可得

表 29: 在 25±2℃条件下保存 12 个月的组合疫苗中单个抗原的吸附百分比、效力和稳定性特征的简要说明

测试	限制/说明	0 天	6 个月	12 个月
乙肝体内效力 R.P (95% CL)	不少于 1.0	合规	N.A	合规
Hib PRP 含量 (µg/0.5 ml) (总 PRP)	实际值.	8.6 µg/0.5 ml	8.20 µg/0.5 ml	NA
白喉组分效力(IU/剂量)	不少于 30 IU/剂量.	98.5120 IU/剂量 (69.9650-137.247)	N.A	96.5482 IU/剂量 (65.9292-137.687)

[0471]

[0472]	破伤风组分效力 (IU/剂量)	不少于 40 IU/剂量	139.030 IU/剂量 (88.2850-208.688)	N.A	N.A
	百日咳组分效力 (IU/剂量)	不少于 4 IU/剂量	4.6749 IU/剂量 (2.6492-8.2763)	4.5170 IU/剂量 (2.4894-8.2672)	3.4899 IU/剂量 (1.8699*-6.4750)
	吸附肝炎-B(%)	实际值	89.44	83.92	83.00
	吸附: 破伤风组分(%)	实际值	59.0	31.0	40.0
	吸附: 白喉组分(%)	实际值	79.0	72.0	69.0
	D 抗原 (DU/0.5 ml) (= 标称值的 75%是可接受的)	1 型= 20 DU / 0.5 ml	22.414	合规	合规
		2 型=4 DU / 0.5 ml	4.692	合规	合规
3 型=16 DU / 0.5 ml		22.082	合规	合规	
总铝含量	不大于 0.6 mg / 0.5 ml	0.2846	NA	NA	

[0473] NA-不可得

表 30: 具有减少剂量和标准剂量 IPV 的组合疫苗的体内效力

序号	描述	1 型脊髓灰质炎病毒			3 型脊髓灰质炎病毒			结果
		效力	下限	上限	效力	下限	上限	
1	六价疫苗, 具有 40-8-32 DU IPV	253.3%	124.9%	705.6%	212.2%	95.3%	755.5%	合规
2	六价疫苗, 具有 20-4-16 DU IPV	164.4%	63.9%	571.3%	143.2%	64.3%	418.6%	合规
3	六价疫苗, 具有 20-4-16 DU IPV	170.0%	76.4%	472.5%	132.3%	62.6%	340.5%	合规
4	脊髓灰质炎疫苗, 具有全剂量 IPV	98.5%	30.9%	279.4	122.8	57.3%	269.8%	合规

[0475] 观察:

[0476] • 用半剂量浓度的IPV制造的六价疫苗批次已经显示出有前景的测试结果。

[0477] • 发现在半浓度的IPV下制造的六价疫苗的IPV体内效力与具有全剂量IPV的目前可得的疫苗 (SIIIPL制造的已上市的Poliovac) 相当。

[0478] 实施例7: 抗微生物效力测试

[0479] 本发明人在开发含有D、T、wP、Hib、HBsAg和IPV疫苗的多剂量组合疫苗的同时, 已经通过首先以2.5mg/0.5ml剂量的浓度添加2-苯氧乙醇 (2-PE) 对其抗微生物能力进行了测试, 所述2-苯氧乙醇 (2-PE) 在本领域中已常规用作防腐剂。然而, 发现在基于DPT的组合疫苗中, 2-PE针对酵母和真菌的抗微生物活性比硫柳汞更弱。

[0480] 增加2-PE (防腐剂) 的量以满足所要求的标准可引起作为接受疫苗的受试者的幼儿的安全问题, 并且还可能影响最终产品的稳定性。此外, 疫苗中所含防腐剂的量应满足美

国药典、欧洲药典、WHO药典或其组合中关于疫苗安全性所定义的要求。

[0481] 对此,本发明人已经进行了实验,致力于开发一种新型组合物,其可以通过在多剂量组合疫苗中将2-PE与满足安全性和抗微生物能力的标准的其他防腐剂(如对羟基苯甲酸酯)组合来满足抗微生物能力的要求。在本公开中,根据WHO对疫苗产品要求的欧洲药典目录B(EP-B)标准进行抗微生物能力测试。

组合	1	2	3	4	5	6
[0482] 羟苯甲酸甲酯(MP)	--	0.18%	0.18%	0.18%	--	0.18%
对羟基苯甲酸丙酯(PP)	--	0.02%	0.02%	--	0.02%	0.02%
2-苯氧乙醇(PE)	0.5%	0.5%	0.4%	0.5%	0.5%	--

[0483] 抗微生物效力的筛选:

[0484] 将如在实施例1中公开的六价组合疫苗制剂用总计六种微生物接种,这些微生物包括四种不同种类的细菌-金黄色葡萄球菌(ATCC NO.-6538)、铜绿假单胞菌(ATCC NO.-9027)、大肠杆菌(ATCC NO.-8739)和阿尔莱特葡萄球菌(环境分离株EMI);一种酵母-白色念珠菌(ATCC NO.-10231)和一种真菌-巴西曲霉(ATCC NO.-16404),分别以 10^5 至 10^6 CFU/mL的量在0小时接种到疫苗制剂中。然后,在0小时、24小时、第7天、第14天和第28天收集细菌、真菌、酵母样品,在固体培养基中培养,并且在第3天至第5天之间对菌落数进行计数并计算菌落的对数减少。结果显示在下表38中。

序号	培养物	回收的 CFU/mL 阳性 对照(0 小时)	回收的 CFU 编号/ml				结果
			24 小时	第 7 天	第 14 天	第 28 天	
[0485]	金黄色葡萄球菌	2×10^5 /mL	87000	900	0	-	相符
	铜绿假单胞菌	1.8×10^5 /mL	28000	100	0	-	
	大肠杆菌	10×10^5 /mL	9000	0	-	-	
	阿尔莱特葡萄球菌(EMI)	2.8×10^5 /mL	114000	1600	100	0	
	白色念珠菌	1.9×10^5 /mL	NA	400	0	-	
	巴西曲霉	2.4×10^5 /mL	NA	1600	100	0	

[0486]

制剂 2 0.5% 2PE+0.18%MP+0.02%PP	金黄色葡萄球菌	2×10 ⁵ /mL	0	-	-	-	相符
	铜绿假单胞菌	1.8×10 ⁵ /mL	0	-	-	-	
	大肠杆菌	10×10 ⁵ /mL	0	-	-	-	
	阿尔莱特葡萄球菌(EMI)	2.8×10 ⁵ /mL	0	0	-	-	
	白色念珠菌	1.9×10 ⁵ /mL	NA	0	-	-	
	巴西曲霉	2.4×10 ⁵ /mL	NA	0	-	-	
制剂 3 0.4% 2PE+0.18%MP+0.02%PP	金黄色葡萄球菌	2×10 ⁵ /mL	10	0	-	-	相符
	铜绿假单胞菌	1.8×10 ⁵ /mL	0	-	-	-	
	大肠杆菌	10×10 ⁵ /mL	0	-	-	-	
	阿尔莱特葡萄球菌(EMI)	2.8×10 ⁵ /mL	10	0	-	-	
	白色念珠菌	1.9×10 ⁵ /mL	NA	0	-	-	
	巴西曲霉	2.4×10 ⁵ /mL	NA	0	-	-	
制剂 4 0.5% 2PE+0.18%MP	金黄色葡萄球菌	2×10 ⁵ /mL	10	0	-	-	相符
	铜绿假单胞菌	1.8×10 ⁵ /mL	170	10	0	-	
	大肠杆菌	10×10 ⁵ /mL	0	-	-	-	
	阿尔莱特葡萄球菌(EMI)	2.8×10 ⁵ /mL	20	0	-	-	
	白色念珠菌	1.9×10 ⁵ /mL	NA	0	-	-	
	巴西曲霉	2.4×10 ⁵ /mL	NA	0	-	-	
制剂 5 0.5% 2PE+0.02%PP	金黄色葡萄球菌	2×10 ⁵ /mL	20	0	-	-	相符
	铜绿假单胞菌	1.8×10 ⁵ /mL	0	-	-	-	
	大肠杆菌	10×10 ⁵ /mL	10	0	-	-	
	阿尔莱特葡萄球菌(EMI)	2.8×10 ⁵ /mL	100	0	-	-	
	白色念珠菌	1.9×10 ⁵ /mL	NA	0	-	-	
	巴西曲霉	2.4×10 ⁵ /mL	NA	10	0	-	
制剂 6 0.18%MP+0.02%PP	金黄色葡萄球菌	2×10 ⁵ /mL	70000	700	0	-	相符
	铜绿假单胞菌	1.8×10 ⁵ /mL	21000	0	0	-	
	大肠杆菌	10×10 ⁵ /mL	6000	0	0	-	
	阿尔莱特葡萄球菌(EMI)	2.8×10 ⁵ /mL	101000	900	0	-	
	白色念珠菌	1.9×10 ⁵ /mL	NA	100	0	-	
	巴西曲霉	2.4×10 ⁵ /mL	NA	700	0	-	

[0487] NA-不可得;0.5% 2PE-2.5mg/0.5ml 剂量;0.4% 2PE-2mg/0.5ml 剂量;0.18% MP-0.9mg/0.5ml 剂量;0.02% PP-0.1mg/0.5ml 剂量;CFU-菌落形成单位

[0488] 观察:

[0489] • 据观察,发现以不同组合制造的所有六价疫苗均符合欧洲药典目录B的防腐剂效力。然而,发现当使用不同的组合时,效力不同。

[0490] • 发现与其他防腐剂组合,即,仅2PE、2PE与PP、2PE与MP以及PP与MP相比,含有2PE、MP和PP的六价疫苗的防腐效力非常有效。

[0491] • 还注意到,发现含有0.5%2PE与PP和MP的六价疫苗的防腐效力与相同的组合(但具有0.4%2PE)相比更有效。

[0492] 实施例8:SI IPL的减少剂量组合疫苗与Easy Six (Panacea) 相比较

[0493] 表33:该表提供了SI IPL的剂量减少组合疫苗与Easy Six (Panacea) 之间单个抗原的吸附百分比、效力、游离PRP含量的比较

[0494]

测试描述	具有剂量减少 IPV 的 SIPL 六价疫苗	具有全剂量 IPV 的 Panacea Easy-Six™ 组合疫苗
HB 体外效力(μg/ml)	46.969	23.167
HB 吸附(%)	91.8	大于 90.0
HB 体内效力	1.18	0.71 (0.42-1.13)
总 PRP(μg/0.5 ml)	9.18	13.20
游离 PRP(%)	9.0	19.45
游离甲醛(% W/V)	0.0011	0.0011
2-PE(% W/V)	0.499	0.660
白喉吸附(%)	82	38
破伤风吸附(%)	63	30
1 型(DU/0.5 ml)	22.414	43.504
2 型(DU/0.5 ml)	4.692	8.056
3 型(DU/0.5 ml)	22.084	39.84
铝(mg/剂量)	0.2846	0.6034
体内效力 1 型 IPV	170.0%	未检测
3 型 IPV	132.3%	
白喉效力	98.5120 IU/剂量 (69.9650-137.247)	大于 40
破伤风效力	139.030 IU/剂量 (88.2850-208.688)	大于 50
百日咳效力	4.6749 IU/剂量 (2.6492-8.2763)	3.2221 (1.8032-5.7706)