



등록특허 10-2356875



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년02월08일  
(11) 등록번호 10-2356875  
(24) 등록일자 2022년01월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 9/107* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/145* (2006.01) *A61K 39/385* (2006.01)  
*A61K 47/12* (2006.01) *A61K 9/08* (2006.01)  
*A61P 31/16* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 9/1075* (2013.01)  
*A61K 39/145* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7004652(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2011년12월30일  
심사청구일자 2021년03월17일
- (85) 번역문제출일자 2021년02월17일
- (65) 공개번호 10-2021-0021128
- (43) 공개일자 2021년02월24일
- (62) 원출원 특허 10-2020-7011186  
원출원일자(국제) 2011년12월30일  
심사청구일자 2020년05월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2011/001781
- (87) 국제공개번호 WO 2012/090002  
국제공개일자 2012년07월05일
- (30) 우선권주장  
1022147.1 2010년12월31일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문현  
KR1020100067094 A

- (73) 특허권자  
알티뮨 유케이 리미티드  
영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 로얄 컬리지 스트리트 2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
- (72) 발명자  
브라운 칼튼 브래들리  
영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 로얄 컬리지 스트리트 2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
- 조르쥬 베르트랑 빅토르 질베르  
영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 로얄 컬리지 스트리트 2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
- 타비에 장 프랑수와  
영국 런던 엔더블유1 0엔에이치 로얄 컬리지 스트리트 2 런던 바이오사이언스 이노베이션 센터
- (74) 대리인  
유미특허법인

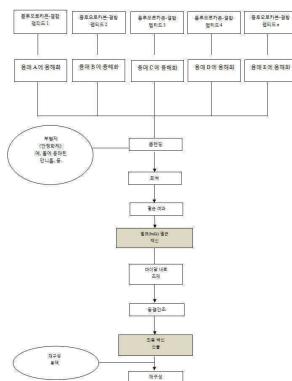
전체 청구항 수 : 총 27 항

심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 플루오로카본-결합 웹티드 제제

**(57) 요 약**

본 발명은 약제학적으로 허용되는 플루오로카본-결합 웹티드 제제의 제조에서 사용하기에 적절한 수성 산성 제제를 제공하고, 수성 제제는 제1 플루오로카본-결합 웹티드를 포함하고, 상기 플루오로카본에 결합된 웹티드는 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어진 길이이고, 50% 이상의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고 7 이상의 등전점을 갖고; 및 상기 플루오로카본-결합웹티드는 미셀에 존재한다.

**대 표 도 - 도1**

(52) CPC특허분류

*A61K 39/385* (2013.01)

*A61K 47/12* (2013.01)

*A61K 9/08* (2013.01)

*A61P 31/16* (2018.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61K 2039/60* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

플루오로카본-결합 웨티드(fluorocarbon-linked peptide)의 멸균 건조 혼합물로서,

상기 혼합물은 직경이  $0.22\mu\text{m}$  미만의 직경을 가진 미셀(micelle)로 존재하는 하나 이상의 플루오로카본-결합 웨티드를 포함하고,

상기 플루오로카본-결합 웨티드 중 하나 이상이 물에 불용성이며,

상기 플루오로카본-결합 웨티드는 수성 용액에서 가시적 입자를 형성하거나 수성 용액을 탁하게 하거나 둘 다이고, 아세트산에서는 미셀을 형성하며,

각각의 플루오로카본-결합 웨티드는 20 내지 50개의 아미노산 잔기 길이이고, B형 간염 바이러스(HBV)로부터 유래된 하나 이상의 T 세포 에피토프를 포함하는 면역성 웨티드이며,

상기 혼합물은 고체 형태인,

건조 혼합물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 고체 형태가 무정형 케이크 또는 분말로 동결건조된 것인, 건조 혼합물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 고체 형태가 진공 건조, 분무 건조, 동결 건조 또는 유동층 건조에 의해 건조된 것인, 건조 혼합물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 고체 형태가 동결 건조된 것인, 건조 혼합물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 혼합물은 바이알, 앰플 또는 시린지로 분배되는, 건조 혼합물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는, 건조 혼합물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 플루오로카본이 3 내지 20개의 탄소 원자로부터의 사슬을 포함하고, 하나 이상의 불소 모이어티가 염소, 브롬 또는 요오드의 할로겐 모이어티; 메틸기; 또는 수소로 선택적으로 대체된 것인, 건조 혼합물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 플루오로카본이 식  $\text{C}_8\text{F}_{17}(\text{CH}_2)_2$ 를 포함하는, 건조 혼합물.

#### 청구항 9

희석제에서 재구성된, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 멸균 건조 혼합물을 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 균질 수용액.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 희석제가 물, 히스티딘 완충 용액 또는 인산염 완충 식염수인, 균질 수용액.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 포유 동물에서 면역 반응을 유도하기 위해 사용되거나, 포유 동물에서 병원성 감염을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한, 균질 수용액.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, 주사로 투여되는, 균질 수용액.

#### 청구항 13

제9항에 있어서, 비경구, 피하, 표피, 피내, 근육 내, 동맥 간, 복강 내 또는 정맥 내 주사에 의해 투여되는, 균질 수용액.

#### 청구항 14

제9항에 있어서, 경구, 또는 피부 또는 점막 조직에 국소 투여되는, 균질 수용액.

#### 청구항 15

제9항에 있어서, 미분 스프레이로 제공되고 폐 또는 호흡 경로에 의해 투여되는, 균질 수용액.

#### 청구항 16

제9항에 있어서, 상기 플루오로카본이 3 내지 20개의 탄소 원자로부터의 사슬을 포함하고, 하나 이상의 불소 모이어티가 염소, 브롬 또는 요오드의 할로겐 모이어티; 메틸기; 또는 수소로 선택적으로 대체된 것인, 균질 수용액.

#### 청구항 17

제9항에 있어서, 상기 플루오로카본이 식  $C_8F_{17}(CH_2)_2$ 를 포함하는, 균질 수용액.

#### 청구항 18

a) 플루오로카본-결합 웨티드를 아세트산에 용해시키는 단계로서, 상기 플루오로카본-결합 웨티드는 물에 불용성이고 아세트산 용매에서는 미셀을 형성할 수 있는, 단계;

b) 단계 a)의 아세트산 용매와 동일하거나 상이할 수 있는 용매에서 하나 이상의 플루오로카본-결합 웨티드를 용해시키는 단계;

c) 단계 a) 및 b)로부터의 용해된 플루오로카본-결합 웨티드를 블렌딩하는 단계;

d) 블렌딩된 용해된 플루오로카본-결합 웨티드를 여과 살균하는 단계로서, 여기서 플루오로카본-결합 웨티드는 직경이  $0.22\mu m$  미만인 미셀로 존재하는, 단계; 및

e) 여과 살균된 플루오로카본-결합 웨티드를 건조하여 약제학적 제형을 제조하는 단계

를 포함하는,

하나 이상의 플루오로카본-결합 웨티드(fluorocarbon-linked peptide)를 포함하는 약제학적 제형의 제조 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 플루오로카본에 결합된 각각의 웨티드가 20 내지 50개의 아미노산 잔기 길이이고, B형 간염 바이러스(HBV)로부터 유래된 하나 이상의 T 세포 에피토프를 포함하는 면역성 웨티드인, 방법.

#### 청구항 20

제18항에 있어서, 건조된 플루오로카본-결합 웨티드는 비정질 케이크 또는 분말로서 동결 건조되는, 방법.

#### 청구항 21

제18항에 있어서, 건조된 플루오르카본-결합 웨티드는 진공 건조, 분무 건조, 동결 건조 또는 유동층 건조에 의해 건조되는, 방법.

### 청구항 22

제18항에 있어서, 건조된 플루오르카본-결합 웨티드를 밀봉된 바이알, 앰플 또는 시린지기에 분배하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 23

제18항에 있어서, 여과-살균된 플루오로카본-결합 웨티드를 건조하는 단계 전에 밀봉된 바이알, 앰플 또는 시린지에 여과-살균된 플루오로카본-결합 웨티드를 분배하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 24

제18항에 있어서, 상기 플루오로카본이 3 내지 30개의 탄소 원자로부터의 사슬을 포함하고, 하나 이상의 불소 모이어티가 염소, 브롬 또는 요오드의 할로겐 모이어티; 또는 메틸기로 선택적으로 대체된 것인, 방법.

### 청구항 25

제18항에 있어서, 상기 플루오로카본이 식  $C_8F_{17}(CH_2)_2$ 를 포함하는, 방법.

### 청구항 26

제18항에 있어서, 블렌딩된 용해된 플루오로카본-결합 웨티드에 하나 이상의 부형제 또는 보조제를 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 27

제18항에 있어서, 단계 b)의 용매가 물, 아세트산, 인산염 완충 식염수, 프로판올, 부탄올, DMSO 또는 아세톤인, 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 플루오로카본-결합 웨티드를 포함하는 약제학적으로 허용되는 제제, 이러한 약제학적으로 허용되는 제제의 제조에 유용한 제제, 이러한 제제를 제조하는 방법 및 이러한 제제의 백신 및 면역치료제로서의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 합성 웨티드 항원은 감염성 질환 (예를 들면 바이러스, 박테리아, 기생충 및 균류 감염)을 예방하기 위한 백신에서의 용도를 위해 관심대상이다. 합성 웨티드 항원은 또한 감염의 치료, 암 세포에 대한 면역의 자극, 폴리웨티드 호르몬의 하향 조절(down-regulation) 및 아나필락시스 및 알레르기와 같은 부적절한 면역 반응의 제어를 포함한, 면역치료제의 분야에서 관심대상이다.

[0003] 웨티드-기반 백신 및 면역치료제의 실질적 사용에서의 어려움은 항원 제시 세포로의 웨티드 항원의 효율적인 전달에 의한 면역 반응의 유도를 보장하는 것이다. 이러한 표적화가 없다면, 실시하기 어려운(unfeasible) 양의 웨티드가 요구될 수 있고, 이는 제조자에게 비경제적이고 또한 독성 문제를 초래할 수 있다.

[0004] 웨티드 전달의 강화는 특화된 전달 비하icles(vehicel), 예를 들면 지속적 방출을 가능하게 하는 입자-기반 구조체(structure)를 통하여 달성될 수 있다. 또한, 전달-강화제(delivery-enhancing agent)에 공유결합으로 결합된 목적 웨티드를 포함하는 웨티드 유도체 또는 변형된 웨티드가 특정 표적 세포 및 수용체에 대한 웨티드의 생체 이용률 및 제시(presentation)를 개선하기 위해 개발되었다.

[0005] 항원 제시 세포로의 전달(delivery)을 개선하기 위해 변형된 웨티드의 하나의 특정 종류는 플루오로카본 사슬의 웨티드의 N- 또는 C-말단, 또는 사이의 위치로의 공유 결합을 통해 작제(construct)되어, 플루오로카본-결합 웨티드 (FCP)를 생성한다. 플루오로카본-결합 웨티드의 예는 WO2005/099752 및 WO2009/027688에 주어지고 웨티드

에 대한 면역 반응의 강화에서, 플루오로카본 결합에 의해 제공되는 장점이 제공된다.

[0006] 하나 이상의 웨티드가 더 넓은 예방 또는 면역치료 효과를 제공하는 것이 요구될 수 있다는 것을 백신 설계자에 의해 이해될 것이다. 이러한 다중성분 산물(multi-component product)은 적절한 면역 반응을 유도하기에 더 효과적일 수 있어 바람직하다.

[0007] 이러한 성질의 약제학적 산물을 제조하기 위해, 플루오로카본-결합 웨티드를 합성하고, 정제하고, 적절한 비율로 함께 블렌딩하고, 멸균시키고 투여를 위해 적절한 균일한 형태(homogenous format)로 제공해야 한다.

### 발명의 내용

[0008] 본 발명자들은 플루오로카본-결합 웨티드가 결합되지 않은 웨티드가 수성 매질에서 용해성인 경우에도, 수성 매질, 예를 들면 물 또는 인산염 완충 식염수에서 종종 난용성(poorly soluble)인 것을 발견하였다. 본 발명자들은 또한 플루오로카본-결합 웨티드의 웨티드 성분의 길이 및 소수성이 플루오로카본-결합 웨티드의 용해도에 영향을 준다는 것을 발견하였다. 특히, 더 우수한 면역원성(immunogenetic property)을 보이는 더 길고, 더 소수성인 웨티드에 연결된 플루오로카본 벡터가 특히 불용성이라는 것을 발견하였다.

[0009] 플루오로카본-결합 웨티드는 양친매성이고, 특징적으로, 극성(양성자성 및 비양성자성) 및 비극성 용매 모두에서 다분자 미셀-타입 구조체(multimolecular micellar-type structure)를 형성한다. 이러한 구조체는 원형의(native) 비결합 웨티드에 의해 통상적으로 형성되지 않는다. 그러나, 본 발명자들은 많은 플루오로카본-결합 웨티드, 특히 최선의 면역원성을 갖는 플루오로카본-결합 웨티드가 수성 매질 및 기타 용매에서 가시적으로 큰 응집체(large visible aggregate)를 형성하는 경향이 있다는 것을 발견하였다. 이러한 응집체의 형성은 균일하고, 규명가능한 제제(homogeneous, characterisable formulation)의 생산을 필요로 하는 약제학적 제조방법에 허용가능하지 않다.

[0010] 이 문제점을 확인하고, 본 발명자들은 이것을 다루고 플루오로카본-결합 웨티드의 용해도를 지지하는 초분자 구조체가 유지되는 것인 플루오로카본-결합 웨티드 제제를 제조하는 방법을 고안하였다. 본 발명자들에 의해 개발된 제제화 방법은 제제화하는데 문제가 있는 것으로 확인한 면역성 플루오로카본-결합 웨티드를 포함하는 안정한 산물을 제조하는 것을 가능하게 하고, 이 산물을 약제학적으로 허용되는 용액을 수득하기 위해 수성 매질을 이용하여 재구성하는 것이 용이하다.

[0011] 특히, 본 발명자들은 산성 용액 사용이 미셀(micelle) 형성을 촉진하고 불용성 응집체의 형성을 방지하는 것을 발견하였다. 용해화된 플루오로카본-결합 웨티드는 용액으로부터 플루오로카본-결합 웨티드의 손실없이 여과에 의해 멸균될 수 있다. 냉동 건조(freeze drying) 후, 통상적으로 동결방지제의 존재에서, 플루오로카본-결합 웨티드는 안정한 형태로 저장되고, 수성 매체에 용해되어, 투여하기 위한 약제학적으로 허용되는 용액이 수득될 수 있다.

[0012] 본 발명자들은 아세트산이 상이한 웨티드의 전하 및 소수성의 고도의 다양성에도 불구하고, 광범위한 플루오로카본-결합 웨티드에 대하여 특히 적합한 용매라는 것을 확인하였다. 따라서 아세트산은 플루오로카본-결합 웨티드의 혼합물을 용해화하는데 특히 적합하다.

[0013] 따라서, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 플루오로카본-결합 웨티드 제제의 제조에서 사용하기에 적합한 수성 산성 제제로서, 상기 제제는 제1 플루오로카본-결합 웨티드를 포함하고:

[0014] (i) 플루오로카본에 결합된 웨티드는 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어진 길이이고, 50% 이상의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고 7 이상의 등전점을 갖고; 및

[0015] (ii) 상기 플루오로카본-결합 웨티드는  $0.22 \mu\text{m}$  미만의 직경을 가진 미셀(micelle)에 존재하는 것인 제제를 제공한다.

[0016] 바람직하게, 상기 제제는 아세트산을 포함한다. 수성 제제는 예를 들면 5 이하의 pH를 가질 수 있다.

[0017] 상기 제제는  $0.22 \mu\text{m}$  미만의 직경을 가진 미셀에 존재하는 하나 이상의 추가적 플루오로카본-결합 웨티드를 포함할 수 있다. 바람직하게 상기 제제에 존재하는 플루오로카본-결합 웨티드 미셀의 80% 이상은  $100 \text{ nm}$  미만의 직경을 갖는다.

[0018] 일 구체예에서, 본 발명에 따른 제제는 플루오로카본에 결합된 웨티드는: (i) 7 미만의 등전점을 갖고; (ii) 상기 플루오로카본에서 면 마지막 15개의 연속된(contiguous) 아미노산에 양전하 아미노산을 포함하지 않고; 및/ 또는 (iii) 80% 보다 높은 비율의 소수성 아미노산 잔기를 포함하는 20개의 아미노산 잔기의 연속된 서열을 포

함하는 것인, 플루오로카본-결합 웨티드를 포함하지 않는다.

[0019] 플루오로카본에 결합된 웨티드는 전형적으로 병원체(pathogen), 자기 유래(autologous) 단백질 또는 종양 세포로부터 유래된 면역성(immunogenic) 웨티드이다. 본 발명에 따른 제제는 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제 및/또는 아쥬반트를 더 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 하기를 제공한다:

[0021] - 약제학적으로 허용되는 플루오로카본-결합 웨티드 제제를 수득하는 방법으로서, 상기 방법은

[0022] (i) 아세트산에 플루오로카본-결합 웨티드를 용해화하는 단계;

[0023] (ii) 용해화된 플루오로카본-결합 웨티드를 여과-멸균하는 단계; 및

[0024] (iii) 여과-멸균된 플루오로카본-결합 웨티드를 건조하는 단계를 포함하는 것인 방법;

[0025] - 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한 플루오로카본-결합 웨티드 제제;

[0026] - 6개의 플루오로카본-결합 웨티드를 포함하는 약제학적으로 허용되는 제제로서, 플루오로카본에 결합된 웨티드는 서열번호 1 내지 6에 기재된 서열을 포함하고 상기 제제는 다른 플루오로카본-결합 웨티드를 포함하지 않는 것인 제제;

[0027] - 요법(therapy)에 의해 인간 또는 동물 신체를 치료하는 방법에 사용하는 본 발명에 따른 약제학적으로 허용되는 제제;

[0028] - 병원성 감염, 자가면역 질환 또는 암을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 본 발명에 따른 약제학적으로 허용되는 제제;

[0029] - 병원성 감염, 자가면역 질환 또는 암을 치료 또는 예방하기 위한 약물의 제조에서 본 발명에 따른 약제학적으로 허용되는 제제의 용도; 및

[0030] - 병원성 감염, 자가면역 질환 또는 암을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 본 발명에 따른 약제학적으로 허용되는 제제의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

### 도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 전형적 플루오로카본-결합 웨티드 제조 공정도의 예를 보여준다.

도 2는 대안적 플루오로카본-결합 웨티드 제조 공정도를 보여준다.

도 3은 다양한 용매에 용해화된 개별적인 FCP의 시각 검사(visual examination)의 결과를 보여주는 표이다. 볼텍싱(vortex) 후 각각의 용액을 선명도에 대하여 육안으로 검사하고 투명한 용액에 대하여 부여된 "+++"의 점수 내지 매우 흐린(cloudy) 용액에 대한 "—"의 점수를 부여했다. 거품(foam) 형성 및 입자의 존재의 정도도 기록했고, "+++"는 높은 수준을 나타내고 및 "—"는 갖각의 부재를 나타냈다. "\*"는 용액이 점성이 있게 된 것을 나타낸다.

도 4는 만니톨 용액으로 희석 후 다양한 용매에서 용화화된 개별적인 FCP의 시각 검사의 결과를 보여주는 표이다. 각각의 용액을 선명도에 대하여 육안으로 검사하고 투명한 용액에 대하여 부여된 "+++"의 점수 내지 매우 흐린(cloudy) 용액에 대한 "—"의 점수를 부여했다. 거품(foam) 형성 및 입자의 존재의 정도도 기록했고, "+++"는 높은 수준을 나타내고 및 "—"는 각각의 부재를 나타냈다.

도 5는 동적 광 산란 (DLS)에 의해 평가된, 희석 및 블렌딩 후 용액 중 플루오로카본-결합 웨티드의 입자 크기를 보여준다.

도 6은 투과전자현미경(TEM)에 의해 평가된, 희석 및 블렌딩 후 용액 중 플루오로카본-결합 웨티드 입자의 크기 및 형태를 보여준다.

도 7은 DLS에 의해 평가된 멸균 등급 여과(sterilising grade filtration) 전(A) 및 후(B) 플루오로카본-결합 웨티드 입자의 부피에 의한 크기 분포(size distributions by volume)를 보여준다.

도 8은 DLS에 의해 평가된 Tris 10 mM pH 7.85 (A) 및 물 (B)에서 재구성된 플루오로카본-결합 웨티드의 부피에 의한 크기 분포를 보여준다.

도 9는 24 시간 동안 50% (v/v) 아세트산에 노출된 7개의 플루오로카본-결합 웨티드의 혼합물의 RP-HPLC 분석의 결과를 보여준다.

도 10은 손으로 혼든 후 플루오로카본-결합 웨티드의 제제화된 혼합물 및 제제화되지 않은(unformulated) 혼합물의 사진을 보여준다. 바이알 A: 제제화된 혼합물 + 만니톨/물; 바이알 B: 제제화된 혼합물+ 만니톨/히스티딘; 바이알 C: 제제화 되지 않은 혼합물 + 만니톨/물; 바이알 D: 제제화되지 않은 혼합물 + 만니톨/히스티딘.

도 11은 볼텍싱 및 초음파처리된 후 플루오로카본-결합 웨티드의 제제화된 혼합물 및 제제화되지 않은 혼합물의 사진을 보여준다. 바이알 A: 제제화된 혼합물 + 만니톨/물; 바이알 B: 제제화된 혼합물 + 만니톨/히스티딘; 바이알 C: 제제화되지 않은 혼합물 + 만니톨/물; 바이알 D: 제제화되지 않은 혼합물 + 만니톨/히스티딘.

도 12는 6개의 플루오로카본-결합 인플루엔자 웨티드 (FP-01.1)를 포함하는 제제의 투과 전자 현미경 사진을 보여준다.

도 13은  $t_0$  (위쪽의 패널) 및 24시간 후 (아래쪽의 패널)에, 여과 후 FR01.1의 HPLC 프로파일을 보여준다.

도 14는 물에서 재구성 후 FP01.1의 HPLC 프로파일을 보여준다.

도 15는 물에서 재구성된, 제제화된 플루오로카본 웨티드 (FP01.1) 및 제제화되지 않은 웨티드의 비교를 보여준다. 왼쪽 사진은 20 분 정치 후 찍었고 오른쪽 사진은 3분 초음파처리 후 찍었다.

도 16은 28 mM L-히스티딘에서 재구성된, 제제화된 플루오로카본 웨티드 (FP01.1) 및 제제화되지 않은 웨티드의 비교를 보여준다. 왼쪽 사진은 20 분 정치 후 찍었고 오른쪽 사진은 3분 초음파처리 후 찍었다.

도 17은 랙트(rat)에서 부피 조정 용량 반응값(volume adjusted dose response)을 보여준다. FP-01.1는 용량의존성 방식에서 검사된 모든 용량 수준에서 양성 IFN- $\gamma$  T 세포 반응을 유도하였다.

도 18은 *ex vivo* IFN- $\gamma$  ELISpot 분석을 사용하여 관찰된 백신-유도된 T 세포 반응을 보여준다. PBMC를 18 시간 동안 6개의 개별 웨티드(백신 중에 함유된 웨티드에 대응)로 자극하였다. 양성 분석 반응은 음성 대조군 웰 중 스팟의 갯수 평균 +2 평균의 표준 편차로 정의하였다. 6개의 웨티드의 각각에 대한 스팟의 갯수는 "긴 웨티드를 위한 총계(sum for long peptide)"를 수득하기 위해 누적시키고 백만 개의 인풋 PBMC 당 스팟의 갯수로 표현하였다.

#### 서열 목록의 간단한 설명

하기 표에 표시된 바와 같이 서열 목록은 실시예에서 사용된 펩티드에 대응된다.

서열	펩티드
서열번호 1	N-말단 라이신 없는 P1
서열번호 2	N-말단 라이신 없는 P8
서열번호 3	N-말단 라이신 없는 P9
서열번호 4	N-말단 라이신 없는 P2
서열번호 5	N-말단 라이신 없는 P4
서열번호 6	N-말단 라이신 없는 P5
서열번호 7	N-말단 라이신 없는 P1 변이체
서열번호 8	N-말단 라이신 없는 P8 변이체
서열번호 9	N-말단 라이신 없는 P8 변이체
서열번호 10	N-말단 라이신 없는 P10
서열번호 11	N-말단 라이신 없는 P3
서열번호 12	N-말단 라이신 없는 P4 변이체
서열번호 13	N-말단 라이신 없는 P6
서열번호 14	N-말단 라이신 없는 P7
서열번호 15	N-말단 라이신 없는 P11
서열번호 16	N-말단 라이신 없는 P12
서열번호 17	N-말단 라이신 있는 P1
서열번호 18	N-말단 라이신 있는 P8
서열번호 19	N-말단 라이신 있는 P9
서열번호 20	N-말단 라이신 있는 P2
서열번호 21	N-말단 라이신 있는 P4
서열번호 22	N-말단 라이신 있는 P5
서열번호 23	N-말단 라이신 있는 P3
서열번호 24	N-말단 라이신 있는 P6
서열번호 25	N-말단 라이신 있는 P7
서열번호 26	N-말단 라이신 있는 P10
서열번호 27	N-말단 라이신 있는 P11
서열번호 28	N-말단 라이신 있는 P12

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032]

본 발명은 인간 또는 동물에게 투여하기 위한 플루오로카본-결합 펩티드를 제제화하는 방법 및 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 약제학적으로 허용되는 플루오로카본-결합 펩티드 제제를 제공한다. 본 발명의 방법은 산성 용액, 바람직하게 아세트산에 플루오로카본-결합 펩티드를 용해화하는 단계를 포함한다. 또한 본 발명은 산성이어서 인간 또는 동물에게 투여하기 부적절하지만 약제학적으로 허용되는 제제를 수득하기 위해 중요한 수성 제제를 제공한다.

[0033]

전형적으로, 본 발명의 제제화 방법에 사용되거나 본 발명의 수성 산성 제제(aqueous acidic formulation) 또는 약제학적으로 허용되는 제제에 존재하는 하나 이상의 플루오로카본-결합 펩티드는 50% 이상의 소수성 아미노산 잔기를 갖고 7 이상의 등점점을 갖는, 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어진 펩티드를 포함한다.

[0034]

본 발명의 제제는 하나 이상의 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하거나 본 발명의 제제화 방법은 상기 하나 이상의 플루오로카본-결합 펩티드를 사용하고, 상기 펩티드는 50% 이상의 아미노산이 소수성인, 20 개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 제제에 존재하는 다른 플루오로카본-결합 펩티드는 20개의 아미노산으로 이루어진 길이 보다 짧고 또는/및 50% 미만의 소수성 잔기를 포함할 수 있다.

[0035]

본 발명의 제제는 7개 이상 내지 약 100개의 아미노산, 예를 들면 약 9 내지 약 50 개의 아미노산, 바람직하게 약 15 내지 약 45개의 아미노산, 더욱 바람직하게 약 20 내지 약 40개의 아미노산, 예를 들면 약 25 내지 약 38 개의 아미노산, 예를 들면 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 또는 37개의 아미노산의 서열을 포함하는 플루오로카본-결합 펩티드를 함유할 수 있다.

- [0036] 본 발명의 제제는 플루오로카본-결합 펩티드 중 50% 이상의 아미노산이 소수성인 하나 이상의 플루오로카본-결합 펩티드를 포함할 수 있다. 전형적으로, 약 50% 내지 약 80%, 예를 들면 약 70% 또는 약 75%의 잔기가 소수성이다. 하한은 48% 또는 49%일 수 있다. 바람직하게, 상기 펩티드는 약 55% 내지 약 60 또는 약 65%의 소수성 잔기를 포함한다. 상기 제제가 추가적 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하는 경우, 추가적 플루오로카본-결합 펩티드는 50% 미만의 소수성을 가질 수 있다. 예를 들면, 추가적 플루오로카본-결합 펩티드의 펩티드 성분은 약 30% 내지 약 70%의 소수성 잔기, 예를 들면 약 40%, 약 45%, 50%, 55%, 60% 또는 65%의 소수성 잔기를 포함할 수 있다. 트립토판 (W), 티로신 (Y), 이소루신 (I), 페닐알라닌 (F), 류신 (L), 발린 (V), 메티오닌 (M), 아르기닌 (A), 프롤린 (P), 글리신 (G) 및 시스테인 (C)이 소수성 아미노산이다. 바람직한 구체예에서, 상기 제제 중에 존재하는 펩티드 중 어느 것도 80% 보다 높은 비율의 잔기가 소수성인, 20개 이상의 연속된 아미노산 잔기의 연속된 서열을 포함하지 않는다.
- [0037] 하나 이상의 추가적 플루오로카본-결합 펩티드는 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어진 길이이고; 50% 이상의 소수성 아미노산 잔기를 포함하고; 및/또는 7 이상의 등전점을 갖는 펩티드를 포함할 수 있다. 제1 플루오로카본-결합 펩티드 및/또는 하나 이상의 추가적 플루오로카본-결합 펩티드는 플루오로카본에서 먼 마지막 15개의 연속된 아미노산(last 15 contiguous amino acids distal to the fluorocarbon) 중에 양전하 아미노산을 포함하고; 및/또는 80% 보다 많은 소수성 아미노산 잔기를 포함하는 20개 아미노산 잔기의 연속된 서열을 포함하지 않는 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0038] 일 구체예에서, 본 발명의 제제 중 7 미만의 등전점을 갖고, 플루오로카본에서 먼 마지막 15개의 연속된 아미노산 중에 양전하 아미노산을 포함하지 않고, 및/또는 80% 보다 많은 소수성 아미노산 잔기를 포함하는 20개 아미노산 잔기의 연속된 서열을 포함하는 펩티드는 없다.
- [0039] 본 발명의 제제 중 플루오로카본-결합 펩티드는 전형적으로 0.22  $\mu\text{m}$  미만의 직경을 갖는 미셀에 존재한다. 상기 미셀은 전형적으로 약 15 내지 약 200 nm, 전형적으로 약 20 nm 내지 약 100 nm, 예를 들면 약 20 nm 내지 약 30 nm 또는 약 30 nm 내지 약 50 nm의 직경을 갖는다. 그러나, 일부 더 큰 미셀이 존재할 수 있다. 일반적으로, 20% 이하, 예를 들면 약 10% 내지 약 15%의 응집체는 100 nm 보다 더 큰 직경을 갖는다. 바람직하게, 80% 이상의 플루오로카본-결합 펩티드 미셀은 100 nm 미만의 직경을 갖는다. 미셀 크기는 동적 광 산란 (DLS)과 같은 적절한 방법 또는 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0040] 미셀의 형성은 산성 용액에 플루오로카본-결합 펩티드를 용해화함으로써 촉진될 수 있다. 예를 들면, 플루오로카본-결합 펩티드는 본 명세서에 기재된 아세트산 중에서 용해화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 제제의 제조에 사용하기 위한 본 발명의 수성 제제는 산성이고 예를 들면 pH 5이하를 가질 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 제제는 건조된 형태, 예를 들면 동결건조된 형태일 수 있다. 본 발명의 약제학적으로 허용되는 제제는 수성 용액, 예를 들면 동결건조물 또는 다른 건조된 제제를 수성 매질에 용해시켜 형성된 수성 용액일 수 있다. 수성 용액은 전형적으로 중성 pH이다.
- [0042] 본 발명의 수성 (액체) 제제에서, 용액은 일반적으로 가시적인(visible) 응집체가 없고 투명하다. 특히, 볼텍성 및 초음파처리에 의한 변화(perturbation) 후 상기 용액 중 입자가 보이지 않는다. 이는 산성 제제 및 약제학적으로 허용되는 제제 모두에 적용된다.
- [0043] 펩티드는 전형적으로 인간을 포함한 동물에서 면역 반응을 유도할 수 있는 펩티드 항원 또는 알레르겐이고, 즉 펩티드는 전형적으로 면역성 펩티드이다. 바람직하게 면역 반응은 숙주에서 유익한 효과를 가질 것이다. 면역성 펩티드는 바이러스, 세균, 마이코박테리아, 기생충 또는 균류와 같은 감염원 (병원체) 또는 암 항원 (종양 세포로부터 유래된 단백질)과 같은 자기 유래 단백질, 또는 알레르겐으로부터 유래될 수 있다.
- [0044] 바이러스의 예는 인플루엔자, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 간염 C형 바이러스 (HCV), 간염 B형 바이러스 (HBV), 간염 A형 바이러스 (HAV), 호흡 장애 바이러스(Respiratory Syncytial Virus, RSV), 베네주엘라 말 뇌염 바이러스(Venezuelan Equine Encephalitis virus, VEE), 일본 뇌염 바이러스 (JEV), 세포거대바이러스 (Cytomegalovirus, CMV), 앱스타인 바 바이러스(Epstein Barr Virus, EBV), 헤르페스 바이러스 (HSV-1 또는 HSV-2), 에볼라, 마르버그(Marburg), 뎅기(Dengue), 웨스트 나일 및 황열 바이러스, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 및 고양이 면역결핍증 바이러스 (Feline Immunodeficiency Virus, FIV)와 같은 동물 및 인간 바이러스를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 박테리아 및 마이코박테리아의 예는 마이코박테리움 투베르콜로시스(Mycobacterium tuberculosis), 레지오넬라 (Legionella), 리케차(Rickettsiae), 클라미디아(Chlamydiae), 및 리스테리아 모노시토게네스(Listeria

*monocytogenes*)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0046] 기생충의 예는 열대열밀리리아 원충(*Plasmodium falciparum*) 및 원충과(Plasmodial family)의 다른 종을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0047] 균류의 예는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 로도토풀라(*Rhodotorula*) 및 뉴모시스티스(*Pneumocystis*)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0048] 자기 유래 또는 자기항원은 암과 관련된 하기 항원, P53, MAGE-A3, NY-ESO-1, SURVIVIN, WT1, HER-2/neu, MUC 1, hTERT, MAGE-1, LAGE-1, PAP, T21, TRP-2, PSA, Livin, HAGE, SSX-1, PRAME, PASD1, IMP-3, SSX-4, CDCA-1 및/또는 BAGE을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0049] 알레르겐은 벌(bee)에 대한 중증 반응과 관련된 포스포리파아제 A<sub>2</sub> (API m1), 집먼지진드기(house-dust mite) 세로무늬 먼지진드기 (*Dermatophagoides pteronyssinus*)에 대한 반응과 관련된 Derp-2, Der p 2, Der f, Der p 5 및 Der p 7, 바퀴벌레 알레르겐 Bla g 2 및 주된 자작나무 화분(major birch pollen) 알레르겐 Bet v 1을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0050] 일 구체예에서, 웨티드는 인플루엔자 바이러스로부터 유래될 수 있다. 인플루엔자 웨티드 항원은 인플루엔자 타입 A 단백질, 인플루엔자 타입 B 단백질 또는 인플루엔자 타입 C 단백질로부터의 하나 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 인플루엔자 A 및 B 타입 모두로부터의 인플루엔자 바이러스 단백질의 예는 조합 중 헤마글루티닌, 뉴라미나다아제, 매트릭스(matrix) (M1) 단백질, M2, 핵단백질(NP), PA, PB1, PB2, NS1 또는 NS2를 포함한다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 용어 "면역성(*immunogenic*)"은 T 세포 수용체 (TCR) 또는 B 세포 수용체 (BCR 또는 항체)와 같은 면역성 수용체에 의해 인식될 능력을 갖은 분자를 의미한다. 면역성 웨티드는 하나 이상의 에피토프, 예를 들면 T 세포 및/또는 B 세포 에피토프를 제공한다면 천연 또는 비천연일 수 있다. 웨티드는 헬퍼 T 세포 에피토프 및/또는 세포독성 T 림포사이트 (CTL) 에피토프를 포함한 하나 이상의 T 세포 에피토프, 및/또는 하나 이상의 B 세포 에피토프 또는 T 및 B 세포 에피토프의 조합, 예를 들면 MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II 에피토프를 함유할 수 있다. 에피토프를 식별하는 방법이 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다.

[0052] 웨티드는 하나 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 웨티드는 함께 결합된 둘 이상의 에피토프를 포함할 수 있다. 이러한 일 예는 무차별(promiscuous) 헬퍼 T 세포 에피토프가 하나 또는 복수 개의 CTL 에피토프 또는 하나 또는 복수 개의 B 세포 에피토프에 공유결합으로 연결될 수 있는 것인 융합 웨티드의 용도이다. 예로서, 무차별 헬퍼 T 에피토프는 PADRE 웨티드, 파상풍 톡소이드(tetanus toxoid) 웨티드 (830-843) 또는 인플루엔자 헤마글루티닌, HA(307-319)일 수 있다.

[0053] 에피토프는 웨티드가 조밀하게 가득찬 다중-특이 에피토프(densely packed multi-specific epitope)의 클러스터를 포함하도록 중첩된 선형 에피토프(linear epitope)일 수 있다.

[0054] 플루오로카본 부착물(attachment)에 콘쥬게이트(conjugate)되지 않은 웨티드의 말단은 미셀의 형성을 통하여 구조체(construct)의 용해도를 촉진하기 위해 변형될 수 있다. 예를 들면, 양으로 하진된 아미노산이 미셀의 조립을 촉진하기 위해 웨티드에 첨가될 수 있다. 웨티드의 N-말단 또는 C-말단은 구조체를 형성하기 위해 벡터에 커플링(couple) 될 수 있다. 구조체의 대규모(large-scale) 합성을 촉진하기 위해, 웨티드의 N- 또는 C-말단 아미노산 잔기가 변형될 수 있다. 원하는 웨티드가 웨티다제에 의한 절단에 특히 민감한 경우, 정상 웨티드 결합이 절단될 수 없는 웨티드 모방체(mimetic)에 의해 대체될 수 있다. 이러한 결합 및 합성 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0055] MHC 분자와 상호작용하는 웨티드의 능력을 간섭하지 않고 천연 서열을 인식하는 T 세포와 교차-반응성(cross-reaction)을 유지한다면, 비표준(non-standard), 비천연 아미노산도 웨티드 서열에 통합될 수 있다. 비천연 아미노산은 프로테아제에 대한 웨티드 저항성 또는 화학적 안정성을 개선하기 위해 사용될 수 있다. 비천연 아미노산의 예는 D-아미노산 및 시스테인 변형(cysteine modification)을 포함한다.

[0056] 웨티드는 원형(native) 단백질로부터 정제에 의해 유래될 수 있거나 재조합 기법 또는 화학적 합성에 의해 제조될 수 있다. 웨티드의 제조를 위한 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0057] 더 광범위한 예방 또는 면역요법의 효과를 제공하기 위해 둘 이상의 웨티드가 요구될 수 있다는 것이 백신 설계자에 의해 이해될 것이다. 적절한 면역 반응을 끌어내기에 더 효과적일 가능성이 있으므로, 이러한 다중-성분 산물은 바람직하다. 예를 들면, 인플루엔자 백신의 최적 제제는 상이한 인플루엔자 단백질로부터 유래한 다수의

펩티드 에피토프를 포함하거나 HIV 면역치료제의 최적 제제는 상이한 HIV 단백질로부터 유래한 다수의 에피토프를 포함할 수 대안적으로, 다양한 병원체에 대한 면역을 부여하기 위해 다중 에피토프가 제제로 포함(incorporate)될 수 있다. 예를 들면 호흡기 감염 백신은 인플루엔자 바이러스 및 호흡 장애 바이러스(respiratory syncytial virus)로부터 유래된 에피토프를 함유할 수 있다.

[0058] 본 발명의 제제는 복수 개의 면역성 펩티드를 포함할 수 있다. 전형적으로 각각의 펩티드는 상이한 에피토프를 포함한다. 각각의 펩티드는 공통의 플루오로카본 벡터에 결합될 수 있다. 더 현실적으로, 플루오로카본-결합 펩티드의 조합물은 본 발명의 제제에 존재할 수 있고, 이때 상이한 펩티드가 독립적으로 플루오로카본 사슬에 결합된다. 플루오로카본-결합 펩티드의 혼합물에서, 각각의 펩티드는 단일 구조의 플루오로카본 사슬에 결합될 수 있다. 대안적으로, 상기 혼합물은 상이한 구조를 갖는 플루오로카본 사슬에 결합된 펩티드를 포함할 수 있다.

[0059] 본 발명의 제제는 하나 이상, 바람직하게 약 2 내지 약 20개, 바람직하게 약 3 내지 약 10개의 플루오로카본-결합 펩티드를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서 다중 성분 백신(multi component vaccine)은 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 플루오로카본-결합 펩티드를 함유할 수 있다. 이는 다중-에피토프 면역 반응(multi-epitopic immune response)의 생성을 보조한다.

[0060] 다중-성분 산물에 존재하는 상이한 펩티드는 동일한 병원체로부터 유래된 상이한 항원이거나 상이한 병원체로부터 유래한 항원일 수 있다. 대안적으로, 펩티드는 상이한 종양 항원 또는 자기 유래 단백질의 상이한 부분으로부터 유래한 항원일 수 있다.

[0061] 면역성 인플루엔자 펩티드를 포함하는 플루오로카본-결합 펩티드가 실시예에서 사용된다. 본 발명은 이러한 특정 펩티드에 한정되지 않고 상술한 특성을 갖는 면역성 펩티드로 확장된다. 그러나, 본 발명의 바람직한 제제는 PA, PB1, PB2, NP 및 M1 단백질의 고도로 보존된 세그먼트로부터 선택된 하나 이상의 하기 6개의 면역성 인플루엔자 펩티드를 포함한다:

[0062] HMAI IKKYTSGRQEKNPSLRMKWMMAMKYPITADK (서열번호 1)

[0063] VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVYIEVLHLTQG (서열번호 2)

[0064] YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE (서열번호 3)

[0065] APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRQIPAEMLA (서열번호 4)

[0066] DQVRESRNPNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS (서열번호 5)

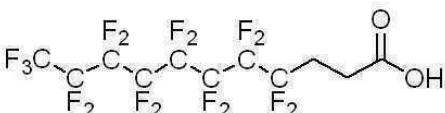
[0067] DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSER (서열번호 6).

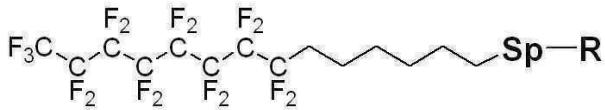
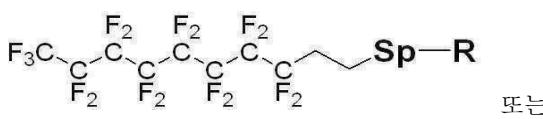
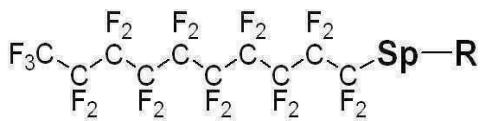
[0068] 펩티드는 바람직하게 각각 개별적으로 플루오로카본 벡터에 결합된다. 본 발명의 특히 바람직한 제제는 전술된 플루오로카본-결합 펩티드의 6개 모두를 포함하고 서열번호 13, 14, 23 및 24 중 하나에 표시된 서열을 갖는 펩티드를 포함하는 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하지 않는다. 다른 플루오로카본-결합 펩티드가 본 발명의 바람직한 제제에 포함될 수 있다. 그러나, 상기 제제는 상술한 6개의 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하고 다른 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하지 않는 것이 바람직하다.

[0069] 전술된 6개의 펩티드 중 하나 이상은 1개, 2개 또는 3개의 아미노산 치환을 포함한 변이 펩티드(variant peptide)에 의해 치환될 수 있다. 변이 펩티드는 상이한 인플루엔자 균주로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1은 서열번호 7에 의해 대체되고, 서열번호 2는 서열번호 8 또는 9에 의해 대체되고, 서열 번호 3은 서열번호 10에 의해, 서열번호 4는 서열번호 11에 의해 및/또는 서열번호 5는 서열번호 12에 의해 대체될 수 있다.

[0070] 펩티드는 플루오로카본 벡터에 하기 기재된 바와 같은 스페이서 모이어티(spacer moiety)를 통해 결합될 수 있다. 스페이서 모이어티는 바람직하게 라이신 잔기이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 제제는 펩티드가 서열번호 17 내지 22에 기재된 서열의 하나 이상을 가질 수 있는 것인 플루오로카본-결합 펩티드를 포함할 수 있다. 상기 펩티드 중 N-말단 라이신은 식  $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ 를 갖는 플루오로카본에 바람직하게 연결된다. 상기 플루오로카본은 바람직하게 N-말단 라이신 잔기의 엡실론 사슬에 연결된다.

[0071] 따라서, 일 바람직한 구체예에서, 본 발명은 서열번호 1 내지 6을 포함하는 6개의 플루오로카본-결합 펩티드 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제 및 선택적으로 아쥬반트(adjuvant)로 이루어지거나 이들로 필수적으로 이루어진 약제학적으로 허용되는 제제를 제공한다.

- [0072] 6개의 플루오로카본-결합 웨티드의 각각에서, 상기 웨티드는 바람직하게 첨가된 N-말단 라이신 잔기를 갖는 서열번호 1 내지 6의 하나(즉, 서열번호 17 내지 22 중 하나)로 이루어지고, 상기 라이신 잔기는 식  $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ 을 갖는 플루오로카본 사슬에 상기 라이신 자기의 앵실론 사슬을 통해 연결된다.
- [0073] 플루오로카본-결합 웨티드 중 플루오로카본 부착물(attachment)은 퍼플루오로카본(perfluorocarbon) 또는 혼합된 플루오로카본/히드로카본(fluorocarbon/hydrocarbon) 라디칼로부터 유래된 하나 이상의 사슬을 포함할 수 있고, 포화 또는 불포화될 수 있으며, 각 사슬은 3 내지 30 개의 탄소 원자를 가질 수 있다.
- [0074] 따라서, 상기 플루오로카본 부착물(attachment)에서 사슬은 전형적으로 포화 또는 불포화되고, 바람직하게 포화된다. 상기 플루오로카본 부착물에서 사슬은 직쇄형 또는 분지형이나, 바람직하게 직쇄형일 수 있다. 각각의 사슬은 전형적으로 3 내지 30, 바람직하게 5 내지 25, 더욱 바람직하게 8 내지 20개의 탄소 원자를 갖는다.
- [0075] 플루오로카본 부착물을 웨티드에 공유결합으로 결합(link)시키기 위해, 예를 들면 반응기, 또는 리간드,  $CO^-$ ,  $-NH^-$ ,  $S^-$ ,  $O^-$  또는 다른 적절한 기가 포함된다. 공유 결합(covalent linkage)을 달성하기 위한 이러한 리간드의 사용은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 반응기는 플루오로카본 분자 상의 임의의 위치에 놓일 수 있다.
- [0076] 웨티드로의 플루오로카본 모이어티의 커플링(coupling)은 자연적으로 존재하거나 웨티드의 어느 자리 상에 도입된  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$  및  $-NH_2$  작용기를 통해 달성될 수 있다. 이러한 결합(linkage)의 예는 아미드, 히드라존, 디솔피드(disulphide), 티오에테르 및 옥심 결합을 포함한다.
- [0077] 선택적으로, 스페이서 요소 (웨티드 또는 비-웨티드)는 항원-제시 세포 내에서 가공을 위해 플루오로카본 요소로부터 웨티드의 절단을 허용하고 상기 웨티드의 입체 제시(steric presentation)를 최적화하기 위해 포함될 수 있다. 스페이서는 또한 분자의 합성을 보조하고 그의 안정성 및/또는 용해도를 개선하기 위해 포함(incorporate)될 수 있다. 스페이서의 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 단백질 분해 효소에 의해 절단될 수 있는 라이신 아르기닌과 같은 아미노산을 포함한다.
- [0078] 일 구체예에서, 플루오로카본-결합 웨티드는  $m = 3$  내지 30이고,  $n \leq 2m + 1$ 이며,  $y = 0$  내지 15이고,  $x \leq 2y$ ,  $(m + y) = 3$  내지 30이며 Sp가 선택적 화학 스페이서 모이어티(chemical spacer moiety)이고 R이 웨티드 항원인, 화학 구조  $C_mF_n-C_yH_x-(Sp)-R$  또는 그의 유도체를 가질 수 있다. 전형적으로  $m$  및  $n$ 은  $2m-1 \leq n \leq 2m + 1$ , 바람직하게  $n = 2m + 1$  관계를 만족한다. 전형적으로  $x$  및  $y$ 는  $2y-2 \leq x \leq 2y$ , 바람직하게  $x = 2y$  관계를 만족한다. 바람직하게  $C_mF_n-C_yH_x$  모이어티는 선형(linear)이다.
- [0079]  $m$ 은 5 내지 15, 더 바람직하게 8 내지 12인 것이 바람직하다.  $y$ 는 0 내지 8, 더욱 바람직하게 0 내지 6 또는 0 내지 4가 또한 바람직한다. 따라서  $C_mF_n-C_yH_x$  모이어티가 포화되고 (즉,  $n = 2m + 1$ 이고  $x=2y$ ) 선형이고,  $m = 8$  내지 12이고  $y = 0$  내지 6 또는 0 내지 4인 것이 특히 바람직하다.
- [0080] 특정한 구체예에서, 플루오로카본 부착물은 하기 식의  $2H$ ,  $2H$ ,  $3H$ ,  $3H$ -퍼플루오로운데칸산(perfluoroundecanoic acid)으로부터 유래된다:
- 
- [0081]
- [0082] 따라서, 바람직한 플루오로카본 부착물은 선형 포화 모이어티  $C_8F_{17}(CH_2)_2^-$ 이다.
- [0083] 플루오로카본 부착물의 추가적 예는 하기 식을 갖는다:  $C_6F_{13}(CH_2)_2COOH$ ,  $C_7F_{15}(CH_2)_2COOH$ ,  $C_9F_{19}(CH_2)_2COOH$ ,  $C_{10}F_{21}(CH_2)_2COOH$ ,  $C_5F_{11}(CH_2)_3COOH$ ,  $C_6F_{13}(CH_2)_3COOH$ ,  $C_7F_{15}(CH_2)_3COOH$ ,  $C_8F_{17}(CH_2)_3COOH$  and  $C_9F_{19}(CH_2)_3COOH$ 로부터 각각 유래된  $C_6F_{13}(CH_2)_2^-$ ,  $C_7F_{15}(CH_2)_2^-$ ,  $C_9F_{19}(CH_2)_2^-$ ,  $C_{10}F_{21}(CH_2)_2^-$ ,  $C_5F_{11}(CH_2)_3^-$ ,  $C_6F_{13}(CH_2)_3^-$ ,  $C_7F_{15}(CH_2)_3^-$ ,  $C_8F_{17}(CH_2)_3^-$  및  $C_9F_{19}(CH_2)_3^-$ .
- [0084] 플루오로카본 벡터-항원 구조체에 대한 적절한 구조의 바람직한 예는 하기 식을 갖는다:



[0088] 식에서 Sp 및 R은 앞서 정의된 바와 같다. 바람직하게 Sp는 라이신 잔기로부터 유래되고 식  $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-$ 를 갖는다. 바람직하게 R은 서열번호 1 내지 6 중 하나이다. 서열번호 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 N-말단 아미노산의 아미노기는 따라서 식  $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CO}-$ 의 스페이서의 C-말단 카르복실기와 아미드 결합을 형성한다.

[0089] 본 발명의 상황에서 플루오로카본 부착물(attachment)은 결과적으로 수득된 화합물이 웹티드를 항원체시세포에 여전히 전달할 수 있도록 변형될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 다수의 불소 원자가 염소, 브롬 또는 요오드와 같은 다른 할로겐 원자로 대체될 수 있다. 또한, 다수의 불소 원자를 메틸기로 대체하고 본 명세서에 기재된 분자의 특성을 여전히 유지하는 것이 가능하다.

[0090] 본 발명은 하나 이상, 예를 들면 둘 이상의 플루오로카본-결합 웹티드 및 선客栈으로 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 산성 수성 제제 및 약제학적으로 허용되는 제제를 모두 제공한다. 바람직하게, 상기 제제 중 하나 이상의 플루오로카본-결합 웹티드는 20개 이상의 아미노산 잔기로 이루어지고, 50% 이상의 소수성 아미노산 잔기를 갖고 7 이상의 등전점을 갖는 웹티드를 포함한다. 부형제는 효율적인 동결건조에 필요한 안정화제 또는 벌킹제일 수 있다. 예는 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐피로리돈 및 이들의 혼합물, 바람직하게 만니톨을 포함한다. 존재할 수 있는 다른 부형제는 당해 기술분야에서 잘 알려진 황산화제, 윤활제, 동결보존제 및 결합제와 같은 보존제를 포함한다.

[0091] 본 발명은 본 발명의 제제를 제조하는 방법을 제공한다.

[0092] 본 발명의 방법에서, 약제학적 산물을 제제화하는 제1 단계로서 하나 이상의 플루오로카본-결합 웹티드를 아세트산에 용해화시킨다. 출발 물질로서 사용되는 플루오로카본-결합 웹티드는 전형적으로 건조시킨 형태이다. 아세트산에 용해화된 플루오로카본-결합 웹티드(들)는 전형적으로 약 50% 이상의 아미노산이 소수성인 약 20개 이상의 아미노산으로 이루어진 길이인 웹티드를 포함한다. 다른 플루오로카본-결합 웹티드는 아세트산 또는 다른 용매에서 용해화될 수 있다. 특히, 20개의 아미노산 보다 더 짧은 웹티드를 포함하고 및/또는 50% 미만의 소수성 잔기를 갖는 플루오로카본-결합 웹티드는 아세트산이 아닌 다른 용매에서 용해화될 수 있다.

[0093] 용어 "용해화(solubilisation)"는 멸균 여과(sterile filtration) 시 물질을 상실하지 않는 시각적으로 투명한 용액을 형성하는 용매 중 플루오로카본-결합 웹티드의 분산을 의미하기 위해서 본 명세서에서 사용된다. 플루오로카본-결합 웹티드는 다분자 미셀 구조체(multimolecular micellar structure)에 존재할 수 있다. "분산(dispersions)"은 입자를 깨뜨려(disrupt) 미셀 구조체의 형성을 통하여 용해도를 달성하기 위한 동결건조된 플루오로카본-결합 웹티드의 용해를 의미한다.

[0094] 용어 "응집체.aggregate)"는 고분자 플루오로카본-결합 웹티드 구조체를 기술하기 위해 본 명세에서 사용된다. 플루오로카본-결합 웹티드의 미셀 응집체는 용해화를 보조할 수 있다. 플루오로카본-결합 웹티드의 큰 응집체(gross aggregate)는 가시적인 입자를 초래한다. 용어 "입자(particulate)"는 육안으로 보이는 플루오로카본-결합 웹티드의 응집체를 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용된다.

[0095] 아세트산 중 플루오로카본-결합 웹티드의 용해화는 전형적으로 플루오로카본-결합 웹티드의 미셀 응집체를 함유하는 투명한(clear) 용액의 형성을 가져온다. 미셀 응집체는 일반적으로 약 20 nm 내지 약 50 nm, 예를 들면 약 17 nm 내지 약 30 nm의 직경을 갖는다. 그러나, 약 50 nm 보다 더 큰 직경을 갖는 일부 더 큰 응집체, 전형적으

로 20% 이하, 예를 들면 약 10 내지 약 15%의 응집체는 100 nm보다 더 큰 직경을 갖는다. 바람직하게, 욕안으로 보이는 응집체는 없다. 입자 크기는 동적 광 산란 (DLS)와 같은 적절한 방법 또는 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들면, 음성 염색(negative staining)에서 TEM을 이용하여, 20  $\mu\text{l}$ 의 플루오로카본-결합 웨티드 용액을 포름바르 카본(Formvar carbon) 코팅된 구리 전자 현미경 그리드(copper electron microscope grid) (300 메시)에 침적(deposit)시킨다. 그 후 20  $\mu\text{l}$ 의 우라닐 아세테이트 (1% 수성)을 첨가한다. 30초 후, 과다한 용액은 와트만 (Whatman) 필터 종이에 신속하게 흡수된다(wick away). 그 후 샘플은 분석 전에 2 분 이상 동안 건조되게 한다. 그 후 투과전자현미경 관찰을 120 kV 가속 전압에서 Philips CM120 biotwin에서 수행한다. 이미지 획득을 50000x 내지 150000x 범위의 직접 배율에서 수행한다.

[0096] 용액 중 플루오로카본-결합 웨티드의 농도는 전형적으로 약 0.1 mM 내지 약 10 mM, 예를 들면 약 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 2.5 mM 또는 5 mM이다. 적절한 농도의 예는 약 10 mg/ml이다.

[0097] 최종 산물 제시(final product presentation)를 통해 초기 용해화 단계에서 시작하는 전형적 제조 방법 흐름의 예가 도 1 및 2에 제공된다. 이는 용매가 플루오로카본-결합 웨티드 용해도를 달성하고 가능한 안정화제와의 블렌딩, 멸균 여과 및 동결건조를 포함한 다운스트림 공정과 적합해야 한다는 요건을 강조한다. 흐름도에서 문자  $n$ 은 제제에 포함될 수 있는 추가적 플루오로카본-결합 웨티드의 가변적 갯수를 의미하기 위해 사용된다.

[0098] 당업자에게 알려진 바와 같이, 동일한 수득 산물 특성을 달성하기 위해, 공정 흐름에 대한 변형이 허용되고, 즉, 주입 성분(input components)이 분산된 응집체와 원하는 비율로 함께 균일하게 블렌딩되고, 멸균되고, 투여를 위한 적절한 형태로 제공된다. 이러한 예는 용해화를 촉진하기 위한 블렌딩-후 또는 희석-후 단계에서 볼텍싱 및/또는 초음파처리의 도입을 포함할 수 있다. 본 제조 방법 흐름의 다른 변형(permuation)은 공정의 초기 단계에서 수행된 멸균 여과 또는 액체 최종 제시(liquid final presentation)를 허용하기 위한 동결건조의 생략을 포함할 수 있다.

[0099] 대안적으로, 플루오로카본-결합 웨티드의 일 세트를 개별적으로 하나의 유기 용매에서 용해화시킬 수 있고, 그 후 함께 블렌딩하고 멸균 여과하고, 플루오로카본-결합 웨티드의 제2 세트를 대안적 용매에 용해화시키고, 블렌딩하고, 멸균여과하고, 그 후 두 세트의 플루오로카본-결합 웨티드가 추가적 가공을 위해 블렌딩된다 (도 2).

[0100] 하나 이상의 플루오로카본-결합 웨티드가 아세트산에 용해화되고 하나 이상의 플루오로카본-결합 웨티드가 적절한 특성을 갖는 또 다른 용매에 용해화될 수 있도록, 최초 용매는 각각의 플루오로카본-결합 웨티드에 대해 동일하거나 다를 수 있다. 예를 들면 도 1의 공정 흐름에서, B는 A와 상이한 용매일 수 있다.

[0101] 대안적으로, 아세트산은 상이한 플루오로카본-결합 웨티드에 대한 최초 용매로서 사용될 수 있지만, 상이한 플루오로카본-결합 웨티드에 대해 상이하고 최적화된 농도에서 사용될 수 있다. 예를 들면 도 1의 공정 흐름에서, B는 A와 동일한 용매의 다른 농도일 수 있다.

[0102] 상이한 플루오로카본-결합 웨티드는 용해화 전에 혼합될 수 있다.

[0103] 아세트산은 5 내지 80% (v/v) 아세트산 수용액, 예를 들면 10 내지 70% (v/v)의 농도, 예를 들면 20% (v/v) 또는 50% (v/v)의 농도에서 사용될 수 있다. 플루오로카본-결합 웨티드의 혼합물을 제제화하는 방법에서, 상이한 웨티드가 블렌딩 전에 상이한 농도의 아세트산에서 용해화될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 플루오로카본-결합 웨티드는 10% (v/v) 아세트산에서 용해화되고 하나 이상의 웨티드는 80% (v/v) 아세트산에서 용해화될 수 있다.

[0104] 하나 이상의 용매가 제조 방법에서 사용되는 경우, 사용되는 각각의 용매는 전형적으로: 상대적으로 높은 농도 (예를 들면, 10 밀리몰 이하, 예를 들면 2 밀리몰 이하)에서 용해화되는데 사용되는 플루오로카본-결합 웨티드를 용해화시킬 수 있고; 동결건조 전에 물에 의한 희석을 촉진하기 위해 물-혼화성이 있고; 제조 방법에서 사용될 수 있는, 동결건조 안정화제, 예를 들면 만니톨과 양립될 수 있고; 약학적 규제 기관에서 사용가능한 안전성 프로파일을 갖고, 예를 들면 USP 잔여 용매 (USP Residual Solvents) <467> (완제품 중 50 mg/일의 잔여 용매 허용치 또는 5000 ppm 또는 0.5% 미만)에 의해 정의된 III 분류 용매의 요건 및 ICH Q3C의 요건 (Note for Guidance on Impurities: Residual Solvents)을 준수하고; 동결건조를 처리할 수 있고, 즉 동결건조시 안전 수준가지 제거될 수 있도록 충분히 휘발성이 있고; 멸균 등급 여과시 수율 손실을 최소화하도록 재현가능하고 균일한 방식으로 효율적으로 플루오로카본-결합 웨티드를 분산시킬 수 있고; 플루오로카본-결합 웨티드 분자와 반응할 수 없거나, 또는 플루오로카본-결합 웨티드 분자의 분해를 촉진할 수 없고; 및/또는 약제학적 산물제조에 일상적으로 사용되는 물질(용기/여과막/배관 등)과 양립 가능하다.

[0105] 블렌드(blend)에서 하나 이상의 플루오로카본-결합 웨티드를 분산시키기 위해 사용될 수 있는 용매의 예는 인산

염 완충 식염수 (PBS), 프로판-2-올, tert-부탄올, 아세톤 및 다른 유기 용매를 포함한다.

[0106] 상이한 플루오로카본-결합 웨티드가 개별적으로, 예를 들면 상이한 용매 또는 아세트산의 상이한 농도에서 용해화되는 경우, 용해화된 웨티드는 플루오로카본-결합 웨티드의 혼합물을 형성하기 위해 블렌딩된다.

[0107] 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 아쥬반트가 또한 용해화된 플루오로카본-결합 웨티드 또는 플루오로카본-결합 웨티드의 혼합물에 첨가될 수 있다.

[0108] "부형제(*excipient*)"는 플루오로카본-결합 웨티드에 대한 담체로서 사용되는 불활성 물질을 의미한다. 전형적으로, 용해화된 플루오로카본-결합 웨티드는 부형제와 혼합된다. 본 제조 방법에서 사용될 수 있는 가능한 부형제는 효율적인 동결건조를 위해 필요한 안정화제 또는 벌킹제를 포함한다. 예는 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐파롤리돈 및 이들의 혼합물, 바람직하게 만니톨을 포함한다. 다른 부형제는 당해 기술분야에서 잘 알려진 황산화제, 윤활제, 동결보존제 및 결합제와 같은 보존제를 포함한다.

[0109] 웨티드 항원에 대하여 일어나는(mount) 면역 반응의 범위 및 강도를 강화시키기 위해, 하나 이상의 아쥬반트 및/또는 다른 면역증강제가 본 제제에 포함될 수 있다. 본 맥락에서 "아쥬반트(*adjuvant*)"는 그 자체가 주어지는 경우 직접적 효과가 거의 없는 반면 병용-투여된 항원에 대한 면역 반응을 조절할 수 있는 작용제이다. 이러한 아쥬반트는 규모(magnitude) 및/또는 사이토카인 프로파일의 면에서 면역 반응을 증강시킬 수 있다.

[0110] 적절한 아쥬반트는

[0111] (1) 프로인드(Freund) 아쥬반트 & 그의 유도체, 뮤라밀디펩티드(muramyl dipeptide, MDP) 유도체, CpG, 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A)와 같은 박테리아의 천연 성분으로부터 천연 또는 합성으로 유래된 정제물(refinement);

[0112] (2) 사포닌, 알루미늄 염 및 사이토카인과 같은 기타 공지된 아쥬반트 또는 증강제;

[0113] (3) 서브마이크론 수중유 에멀젼 MF-59와 같은 수중유(oil in water) 아쥬반트, 유중수(water-in-oil) 아쥬반트, 면역자극 복합체(immunostimulating complex, ISCOM), 리포좀, 제제화된 나노-입자 및 마이크로-입자;

[0114] (4) 박테리아 독소 및 톡소이드(toxoid); 및

[0115] (5) 당업자에게 잘 알려진 기타 유용한 아쥬반트를 포함한다.

[0116] 용해화 및 블렌딩 후 플루오로카본-결합 웨티드(들)의 용액을 회석시킨다. 예를 들면, 블렌다는 물로 회석될 수 있다.

[0117] 플루오로카본-결합 웨티드를 함유하는 용액은 바람직하게 멸균된다. 멸균은 제제가 전신 용도(systemic use)를 위해 의도되는 경우 특히 바람직하다. 멸균의 적절한 수단, 예를 들면 UV 멸균 또는 여과 멸균이 사용될 수 있다. 바람직하게, 여과 멸균이 사용된다. 멸균 여과는 0.45  $\mu\text{m}$  및 뒤이어 0.22  $\mu\text{m}$  멸균 등급 필터 트레인(sterilizing grade filter train)을 포함할 수 있다.

[0118] 멸균은 부형제 및/또는 아쥬반트의 첨가 전 또는 후에 수행될 수 있다.

[0119] 여과 멸균 후, 멸균 용액에 존재하는 플루오로카본-결합 웨티드의 수율은 전형적으로 멸균 전에 존재하는 플루오로카본-결합 웨티드의 양의 80% 이상, 바람직하게 90% 이상, 더 바람직하게 95% 이상이다. 95% 보다 높은 수율, 예를 들면 98%, 99% 이상의 수율, 예를 들면 100%의 수율이 달성될 수 있다.

[0120] 멸균 후, 플루오로카본-결합 웨티드는 전형적으로 약 20 nm 내지 약 100 nm, 예를 들면 30 nm 내지 약 50 nm의 직경을 갖는 미셀 구조체로 용액 중에 존재한다. 멸균 전에 용액 중에 존재하는 더 큰 입자는 여과 멸균에 의해 개조(reshape)될 수 있다. 멸균된 용액은 멸균 용기 중에 보관될 수 있다.

[0121] 멸균 제제는 아세트산을 제거하기 위해 건조된다. 제제의 건조는 또한 장기 보관을 가능하게 한다. 적절한 건조 방법이 사용될 수 있다. 동결건조가 바람직하나 다른 적절한 건조 방법 예를 들면, 진공 건조, 분무-건조, 분무 냉동-건조 또는 유동층 건조가 사용될 수 있다. 건조 방법은 플루오로카본-결합 웨티드가 그 내부에 포함된 무정형 케이크(amorphous cake)의 형성을 초래할 수 있다.

[0122] 장기 보관을 위해, 멸균 제제가 동결건조될 수 있다. 동결건조(lyophilisation)는 냉동-건조(freeze-drying)에 의해 달성될 수 있다. 냉동-건조는 전형적으로 냉동 및 그 후 건조를 포함한다. 예를 들면, 플루오로카본-결합 웨티드 혼합물은 2시간 동안 -80 °C에서 냉동되고 24시간 동안 냉동 건조기에서 냉동-건조될 수 있다.

- [0123] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 제제는 고체 조성물일 수 있다. 플루오로카본-결합 펩티드 조성물은 건조 파우더 형태로 수득될 수 있다. 동결건조로부터 수득된 케이크(cake)는 파우더 형태로 분쇄(mill)될 수 있다. 본 발명에 따른 고체 조성물은 따라서 자유 유동성 입자(free-flowing Particle)의 형태를 가질 수 있다. 고체 조성물은 전형적으로 봉인된 바이알, 앰플 또는 시린지 중 분말로서 제공될 수 있다. 흡입을 위한 경우, 분말은 건조 분말 흡입기로 제공될 수 있다. 고체 매트릭스는 대안적으로 폐치로서 제공된다. 분말은 정제 형태로 압축될 수 있다.
- [0124] 건조된, 예를 들면 동결건조된, 플루오로카본-결합 펩티드 제제는 투여 전 재구성될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "재구성(reconstitution)"은 사용 전에 건조된 백신 제품을 용해시키는 것을 의미한다. 건조, 예를 들면 동결건조 후, 플루오로카본-결합 펩티드 제품은 등장성, pH 중성, 균일 혼탁액을 형성하기 위해 바람직하게 재구성된다. 제제는 전형적으로 수성 상에서 재구성되고, 예를 들면 주사용수(Hyclone), 히스티딘 베퍼 용액(예를 들면 28 mM L-히스티딘 베퍼) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 첨가하여 재구성된다. 재구성된 제제는 전형적으로 멸균 용기, 예를 들면 바이알, 시린지 또는 보관 또는 투여를 위한 다른 적절한 형태(format) 내로 분배된다.
- [0125] 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한 플루오로카본-결합 펩티드 제제를 제공한다. 상기 제제는 약제학적 산물의 제조에서 중간물(intermediate)일 수 있다.
- [0126] 본 발명은 인간 또는 동물에게 투여하기 위한 플루오로카본-결합 펩티드 제제의 제조에서 중간물로서 사용하기 위해 적절한 수성 제제를 제공하고, 이 때 수성 조성물은 산성이고 상술된 하나 이상의 용해화된 플루오로카본-결합 펩티드를 포함한다. 산성 용액은 전형적으로 아세트산을 포함한다. 하나 이상의 플루오로카본-결합 펩티드는 20개 이상의 아미노산으로 이루어진 길이이고, 50% 이상의 소수성 잔기를 포함하고 7 이상의 등전점을 갖고; 및/또는 0.22  $\mu\text{m}$  미만의 직경을 갖는 미셀로 존재한다. 수성 용액은 바람직하게 멸균된 것이다. 수성 용액은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0127] 본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 플루오로카본-결합 펩티드 제제를 제공한다. 약제학적으로 허용되는 제제는 고체, 예를 들면 파우더, 케이크 또는 정제일 수 있다. 약제학적 제제는 수성 용액일 수 있다.
- [0128] 상기 제제는 용기, 예를 들면 멸균 바이알 또는 시린지에 보관될 수 있다.
- [0129] 따라서 본 발명은 일 구체예에서 미셀 구조체로 존재하는 플루오로카본-결합 펩티드, 및 약제학적으로 허용되는 양의 아세트산을 포함하는 제제를 제공한다. 본 발명의 다른 제제에서, 아세트산은 건조 단계에 의하여 완전히 제거된다.
- [0130] 아세트산의 ICH 권장 최고치는 1일 50 mg이다. 전형적으로, 본 발명의 제제중 아세테이트 수준은 USP 잔여 용매 <467>에 의해 정의된 III 분류 용매에 대한 요건에 따라 5000 ppm 또는 0.5% 미만이다. 본 발명은 또한 아세트산에 용해화된 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하는 중간 제제(intermediate formulation)를 제공한다.
- [0131] 일 양태에서, 본 발명은 둘 이상의 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하는 제제를 제공하고, 상기 플루오로카본-결합 펩티드는 미셀 구조체로 존재한다.
- [0132] 또 다른 양태에서, 본 발명은 플루오로카본-결합 펩티드를 포함하는 제제를 제공하고, 상기 플루오로카본-결합 펩티드는 미셀 구조체로 존재하고 상기 제제는 동결건조된 형태이다.
- [0133] 본 발명의 제제에서, 플루오로카본-결합 펩티드는 전형적으로 다중 미셀 구조체로 존재한다. 미셀 구조체는 전형적으로 약 20 nm 내지 약 100 nm, 예를 들면 50 nm 또는 70 nm의 직경을 갖는다. 상기 제제에 존재하는 미셀 구조체의 80% 이상, 예를 들면 90% 이상 또는 95% 이상은 100 nm 미만의 직경, 예를 들면 약 20 nm 내지 약 50 nm의 직경을 갖는 것이 바람직하다.
- [0134] 추가적 양태에서, 본 발명의 제제는 약제학적으로 허용되는 부형제 및/또는 아쥬반트를 더 포함한다. 예를 들면, 일 구체예에서 상기 제제는 만니톨 및/또는 다른 부형제를 더 포함한다.
- [0135] 또 다른 양태에서 본 발명은 인간 또는 동물에서 면역 반응을 유도하기 위한 약물의 제조에서 본 발명의 제제의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 인간 또는 동물 신체의 질병을 치료 또는 예방하기 위한 약물의 제제에서 본 발명의 제제의 용도를 제공한다.
- [0136] 추가적 양태에서, 본 발명은 요법에 의해 인간 또는 동물 신체를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 제제를 제공한다. 또한 인간 또는 동물에서 면역 반응을 자극하는 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 제제 및

인간 또는 동물 신체의 질병을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 제제가 제공된다.

- [0137] 추가적 양태에서, 본 발명은 필요로 하는 인간 또는 동물에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 예방 또는 치료량의 본 발명의 제제를 상기 인간 또는 동물에게 투여하는 단계를 포함한다. 면역 반응은 질병의 치료 또는 예방에서 효과적일 수 있다.
- [0138] 질병은 전형적으로 감염성 질병, 자가면역 질환, 알레르기, 호르몬 질환 또는 암이다. 제제 중 플루오로카본-결합 펩티드는 감염성 질환을 유발하는 병원체, 자가면역 질환 또는 호르몬 질환에 관련된(implicate) 자기 유래 단백질, 상기 알레르기의 원인이 되는 알레르겐 또는 상기 암 세포 상에 발현된 중앙 항원으로부터 유래된 하나 이상의 에피토프를 포함하도록 선택된다.
- [0139] 본 발명의 플루오로카본-결합 펩티드 제제를 이용하여 치료 또는 예방될 수 있는 감염성 질병의 예는 하기 바이러스, 박테리아, 마이코박테리아, 기생충 및 균류에 의해 유발된 감염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 인플루엔자, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 간염 C형 바이러스 (HCV), 간염 B형 바이러스 (HBV), 간염 A형 바이러스 (HAV), 호흡 장애 바이러스 (RSV), 베네주엘라 말 뇌염 바이러스 (VEE), 일본 뇌염 바이러스 (JEV), 세포거대바이러스 (CMV), 엡스타인 바 바이러스 (EBV), 헤르페스 바이러스 (HSV-1 또는 HSV-2), 에볼라, 마르버그, 맹기, 웨스트 나일 및 황열 바이러스, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 (PRRSV), 고양이 면역결핍증 바이러스 (FIV), 마이코박테리움 투베르콜로시스, 레지오넬라, 리케차, 클리미디아 및 리스테리아 모노시토게네스, 열대 열말라리아 원충 및 원충과의 다른 종, 칸디다 알비칸스, 크립토코커스, 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 로도토풀라(*Rhodotorula*) 및 뉴모시스티스(*Pneumocystis*).
- [0140] 본 발명의 플루오로카본-결합 펩티드를 이용하여 치료 또는 예방될 수 있는 암의 예는 유방암, 흑색종 (melanoma), 대장암 비인두 암종(colorectal cancer naopharyngeal carcinoma), 벼킷 림프종(Burkitt's lymphoma) 및 기타 인간 암을 포함한다.
- [0141] 바람직한 구체예에서 본 발명의 제제는 인플루엔자를 치료하거나 인플루엔자에 대한 백신 접종(vaccinate)을 하기 위해 사용된다. 본 구체예의 추가적 양태에서, 인플루엔자 백신 제제는 아만이딘(amanidine), 리만티딘(rimantidine), 자나미비르(zanamivir) 또는 오셀타미비르(oseltamivir)와 같은 뉴라미니다제(neuraminidase) 억제제 치료제(treatment)를 포함한 항바이러스 치료 조성물과 조합되어 투여될 수 있다. 추가적 양태에서, 인플루엔자 백신 제제는 기타 인플루엔자 백신, 예를 들면 통상적인 항체 생성 인플루엔자 백신(conventional antibody generating influenza vaccine)과 조합으로 투여될 수 있다. 기타 인플루엔자 백신은 바람직하게 계절성(seasonal) 인플루엔자 백신이다.
- [0142] 투여는 동시에 발생하거나 시간적으로 분리될 수 있다. 본 발명의 약제학적으로 허용되는 제제는 항바이러스 치료 조성물 및/또는 다른 인플루엔자 백신 전에, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다.
- [0143] 인플루엔자 펩티드, 특히 서열번호 1 내지 6으로 표시된 서열을 갖는 6개의 인플루엔자 펩티드를 포함하는 제제가 인플루엔자에 대한 백신접종 방법에서 사용하기 위해 제공된다. 따라서, 이러한 펩티드를 포함하는 본 발명의 약제학적으로 허용되는 제제는 인플루엔자를 치료 또는 예방하기 위한 약물의 제조에서 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 인플루엔자를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 발명의 플루오로카본-결합 인플루엔자 펩티드 제제의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0144] 본 발명의 제제는 다양한 공지된 경로 및 기법을 이용하여 인 비보로 인간 또는 동물 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 제제는 주사가능한 용액, 혼탁액 또는 에멀젼으로서 제공될 수 있고, 통상적인 주사바늘 및 시린지, 또는 액체 제트 주사 시스템(liquid jet injection system)을 이용한 비경구, 피하, 경구, 상피, 피내, 근육 내, 동맥 간(interarterial), 복강 내(intraperitoneal), 정맥 내(intravenous) 주사를 통하여 투여될 수 있다. 상기 제제는 피부 또는 점막 조직으로 국소적으로, 예를 들면 비강, 기관내, 장, 설하, 직장 또는 질로 투여되거나, 호흡 또는 폐 투여를 위해 적절한 미분된(finely divided) 스프레이로 제공될 수 있다.
- [0145] 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 액체 주사로서 투여하기에 적절한 제제로 혼합물을 가공하는 단계를 더 포함한다. 바람직하게, 상기 방법은 복용 또는 폐의 경로를 통해 투여하기에 적절한 제제로 혼합물을 가공하는 단계를 더 포함한다.
- [0146] 제제는 투여 제제에 적합하고 예방적 및/또는 치료적으로 유효할 것인 양으로 개체에게 투여된다. 본 발명의 제제의 투여는 "예방(prophylactic)" 또는 "치료(therapeutic)" 목적을 위한 것일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "치료(therapeutic)" 또는 "처치(treatment)"는 하기 중 하나 이상을 포함한다: 감염 또는 재감염의 예방; 증상의 감소 및 제거; 및 병원체의 감소 또는 완전한 제거. 처치는 (감염 전) 예방 또는 (감염 후) 치료적으로

효과적일 수 있다.

- [0147] 요구되는 경우 담체의 선택은 종종 조성물의 전달 경로의 함수(function)이다. 본 발명 내에서, 조성물은 적절한 투여 경로 및 수단을 위해 제제화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제는 경구, 안구(ocular), 직장, 비강, 국소(구강(buccal) 및 설하(sublingual) 포함), 질 또는 비경구(폐하, 근육내, 정맥내, 피내(intradermal), 경피 포함) 투여를 위해 적절한 제제에서 사용되는 것을 포함한다.
- [0148] 제제는 적절한 제형, 예를 들면 액체, 고체, 에어로졸, 또는 기체로 투여될 수 있다. 예를 들면, 경구 제제는 에멀젼, 시럽 또는 용액 또는 정제 또는 캡슐제의 형태를 취할 수 있고, 이들은 위에서의 분해로부터 활성 성분을 보호하기 위해 장용 코팅될 수 있다. 비강(nasal) 제제는 스프레이 또는 용액일 수 있다. 경피 제제는 특정 전달 시스템을 위해 개조될 수 있고 패치를 포함할 수 있다. 주사용 제제는 증류수 또는 또 다른 약제학적으로 허용되는 용매 또는 혼탁제 중 용액 또는 혼탁액일 수 있다.
- [0149] 환자에게 투여될 백신 또는 면역 치료제의 적절한 용량은 병원에서 결정될 수 있다. 그러나, 가이드로서, 바람직한 투여 경로에 의존할 수 있는, 적절한 인간 용량은 1 내지 1000  $\mu\text{g}$ , 예를 들면 약 100  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{g}$  또는 500  $\mu\text{g}$ 일 수 있다. 복수 용량이 면역 또는 임상 효과를 달성하기 위해 요구될 수 있고, 이는 요구되는 경우 전형적으로 2 내지 12 주 떨어져 투여될 것이다. 더 긴 기간에 걸쳐 면역 반응의 신장(boost)이 요구되는 경우, 1 개월 내지 5년 간격으로 반복 용량이 적용될 수 있다.
- [0150] 하기 실시예가 본 발명을 예시한다.
- [0151] 실시예 1: 펩티드의 합성**
- [0152] 서열번호 1 내지 6, 10, 11 및 13 내지 16에 표시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 합성하였다. 각각의 펩티드의 합성을 고전적 Fmoc/t-부틸 전략(strategy) 및 Tentagel HL NH<sub>2</sub> 수지를 이용하여 고체 상에서 수행하였다. 라이신 잔기를 각 서열의 N-말단에 첨가하였다. 첨가된 N-말단 라이신 잔기를 갖는 서열은 서열번호 17 내지 28로 표시된다. N-말단 라이신 잔기의 첨가 후, 수지 블록을 두 부분으로 분할하였다. 플루오로카본-결합 펩티드(FCP)를 수득하기 위해 일 부분은 N-말단 라이신의 엡실론-사슬 상에 플루오로카본 사슬( $\text{C}_8\text{F}_{17}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ )을 포함(incorporate)시키는데 사용하였다. 비교 연구에서 사용하기 위한 천연 펩티드를 수득하기 위해 제2 부분으로, N-말단 라이신의 엡실론-사슬의 아세틸화를 수행하였다. 정제된 플루오로카본-결합 펩티드(FCP) 및 천연 펩티드를 트리플루오로아세트산(TFA)의 존재하에서의 절단 및 역상-고성능 액체 크로마토그래피(reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)에 의한 최종 정제를 통해 수득하였다. 하기 기재된 FCP 및 천연 펩티드는 C-말단에 아미도기를 갖는다. 모든 제제는 95% 이상의 순도를 갖고 건조, 동결건조된 분말로 제공되었다. 순 펩티드 질량(net peptide mass)은 질소 함량 분석에 기초하여 산출하였다.
- [0153] 하기 펩티드 P1 내지 P12를 플루오로카본 사슬에 연결하여 FCP를 생성하거나, 아세틸화하여 천연 펩티드를 생성하였다(아미노산의 표준 단일 문자 코드 표현을 사용하였음; X = 플루오로카본 벡터 (플루오로카본-결합 펩티드); Z = 아세틸 (천연 펩티드)):
- [0154] P1: NH<sub>2</sub>-K(X 또는 Z)HMAI IKKYTSGRQEKNPSLRMKWMAMKYPITADK-CONH<sub>2</sub>
- [0155] P2 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)APIMFSNKMARLGKGYMFESKRMKLRQIPAEMLA-CONH<sub>2</sub>
- [0156] P3 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)APIMFSNKMARLGKGYMFESKSMKLRQIPAEMLA-CONH<sub>2</sub>
- [0157] P4 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)DQVRESRNPNGNAEIEDLIFLARSALILRGSVAHKS-CONH<sub>2</sub>
- [0158] P5 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)DLEALMEWLKTRPILSPLTKGILGFVFTLTVPSER-CONH<sub>2</sub>
- [0159] P6 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)SPGMMMGMFNMLSTVLGVSIILNLGQKKYTKTTY-CONH<sub>2</sub>
- [0160] P7 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)KKKSYINKTGTFEFTSFFYRYGFVANFSMELPSFG-CONH<sub>2</sub>
- [0161] P8 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)VAYMLERELVRKTRFLPVAGGTSSVIEVLHLTQG-CONH<sub>2</sub>
- [0162] P9 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)YITRNQPEWFRNVLSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE-CONH<sub>2</sub>

[0163] P10 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)YITKNQPEWFRNILSIAPIMFSNKMARLGKGYMFE-CONH<sub>2</sub>

[0164] P11 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)QSRMQFSSLTVNVRGSGMRILVRGNSPVFNYNK-CONH<sub>2</sub>

[0165] P12 : NH<sub>2</sub>- K(X 또는 Z)PDLYDYKENRFIEIGVTRREVHIYYLEKANKIKSE-CONH<sub>2</sub>

[0166] 천연 펩티드의 물리화학적 특성이 하기 표 1에 기재된다. 소수성으로 간주되는 잔기는 W, Y, I, F, L, V, M, A, P, G, 및 C이다. 하전된 잔기는 (+): K, R, H. (-): D, E이다.

### 표 1

표 1: 선택된 펩티드의 물리화학적 특성

펩티드	소수성 잔기 백분율	양전하 (N-말단에 첨가된 라이신 잔 기 포함)	음전하
P1	51	10	2
P2	60	8	2
P3	60	7	2
P4	49	7	5
P5	60	5	4
P6	61	4	0
P7	55	6	2
P8	60	6	3
P9	60	6	2
P10	60	6	2
P11	48	6	0
P12	46	9	7

[0168] **실시예 2: 물 중 천연 펩티드 및 FCP의 용해도** 물에서 각각의 FCP의 용해도를 평가하였다. 각각의 FCP를 1.333 mM의 최종 농도까지 300  $\mu$ l의 물에 분산시키고 블록상하고 초음파처리하였다. 전형적 분산 조건은 30초 블록상이 사이에 배치된 4 차례의 3분 중탕 초음파처리(bath sonication)였다. 검사 후, 수득된 용액을 만니톨 용액으로 희석하였다 (후보 동결건조 매질, 펩티드 최종 농도 0.167 mM, 1.33% (w/v) 만니톨). 결과적으로 수득된 분산액의 탁도(cloudiness)의 시각적 관찰(등급(scaled): 투명(clean) / 탁함 -(cloudy -) / 탁함(cloudy) / 탁함 +(cloudy +) ) 및 입자의 존재에 의해 용해도를 평가하였다. 그 결과를 표 2에 표시한다.

[0169] 표 2: 물 및 1.33% (w/v) 만니톨 용액 중 FCP 분산성 및 용해도

플루오로카본-결합 웨티드	물 중 분산액	만니톨:물 중 추가적 회석
	용해도	용해도
FCP1	탁함 / 입자	투명 / 입자
FCP2	탁함 - / 입자 無	투명 / 입자 無
FCP3	탁함 - / 입자	투명 / 입자
FCP4	투명 / 입자 無	투명 / 입자 無
FCP5	탁함 / 입자	탁함 - / 입자
FCP6	탁함 - / 입자	투명 / 입자
FCP7	탁함 + / 입자 無	탁함 + / 입자 無
FCP8	탁함 / 입자	탁함 / 입자
FCP9	탁함 - / 입자	투명 / 입자
FCP10	탁함 - / 입자	투명 / 입자
FCP11	투명 / 입자 無	투명 / 입자 無
FCP12	탁함 / 입자	탁함 - / 입자

[0170]

[0171] 물에서 최초 분산 후 개별적 플루오로카본-결합 웨티드의 시각적 조사(visual inspection)는 P4 및 P11만이 물에서 완전히 용해되고; 이러한 용액의 각각은 입자의 부재로 투명하다는 것을 보여주었다. 모든 나머지 용액은 탁하고 입자를 함유하여, 이러한 FCP가 완전히 용해되지 않는 것을 나타내었다. 만니톨 용액을 이용한 후속 회석시, P2, P4 및 P11은 투명한 용액으로 가시적 입자(visible particulate) 없이 완전히 용해되었다. 용액 P1, P3, P6, P9 및 P10은 또한 투명하지만 입자가 관찰되어, 이들은 만니톨/물 용액에서 부분적으로 용해되었다는 것을 나타내었다. P5, P7, P8 및 P12는 만니톨/물 용액에서 용해되지 않아, 입자를 함유하는 탁한(cloudy) 용액을 생성했다. 웨티드 서열의 소수성 비율 또는 양전하 또는 음전하 중 어느 것도 용해도와 상관없다는 것으로 확인하였다.

[0172]

비교를 위해, 또한 물에서 천연 웨티드 용해도를 동일한 분자 농도(molecular concentration)에서 평가하였다; P8을 제외한 모든 천연 웨티드에 대해 용액은 투명하고 입자가 시각적으로 검출되지 않았다.

[0173]

결론적으로, 각각의 플루오로카본-결합 웨티드의 용해도는 그것의 응집 특성에 의존하고, 대다수의 FCP는 물 또는 만니톨 용액에 완전하게 용해되지 않았다. 각각의 FCP의 용해도는 그의 물리화학적 특성으로부터 예측될 수 없었다. 동등한 천연 웨티드가 FCP 보다 동일한 농도에서 물에서 용해도가 더 높았다.

[0174]

플루오로카본-결합 웨티드의 혼합물의 용해도를 또한 평가하였다. 8가 제제(octavalent formulation) (각 웨티드의 최종 농도 0.167 mM, 1.33% (w/v) 만니톨, 표 3에 제공된 FCP 조성물)를 제조하였다. 멸균 여과(0.22  $\mu\text{m}$  Millex 25 mm PVDF 필터) 후 각 웨티드의 회수율을 RP-HPLC에 의해 결정하였다.

표 3: FCP의 8가 혼합물의 조성물 및 멸균 여과 후 각각의 FCP의 회수율(recovery)

플루오로카본-결합 펩티드	블렌딩 후 MIX 1	수율 %	플루오로카본-결합 펩티드	블렌딩 후 MIX 2	수율%
FCP1	입자로 인해 탁함	89.9	FCP10	입자로 인해 탁함	90.7
FCP4		25.1	FCP2		97.3
FCP5		93.8	FCP4		82.3
FCP6		74.1	FCP5		35.6
FCP7		31.7	FCP6		8.8
FCP3		28.6	FCP7		63.2
FCP9		22.9	FCP8		25.3
FCP12		29.6	FCP11		49.4

[0177] 시각적 관찰(visual observation)을 HPLC 여과 회수율 결과에 의해 확인하였다. 총 RP-HPLC 여과 회수 수율 (recovery yield)은 각각 MIX 1 및 MIX2에 대하여 약 50% 및 57% 이어서, FCP의 큰 입자가 여과 시 제거되었다는 것을 나타냈다. 따라서 FCP의 혼합물도 물에 난용성(poorly soluble)이다.

#### 실시예 3: 부형제 및 분산제(dispersant) 중 FCP의 용해도

[0179] 물에서 플루오로카본-결합 펩티드의 용해도를 개선하기 위해, 약제학적 산물 제조에서 이전에 유익한 것으로 입증된 다양한 부형제 및 분산제를 평가하였다. 이들은 폴리에틸렌 글리콜, 플루로닉(pluronic) 계면활성제, 레시틴, 글리세린, 대두유, 해바라기유, 글리코푸롤(glycofurool), 디팔미토일 포스파티딜콜린, 라브라파(Labrafac) CC (중쇄 글리세리드), 히드록실 프로필 베타시클로덱스트린 (HPBCD) 및 술포부틸 에테르 베타-시클로덱스트린 및 이들의 조합물을 포함하였다. 플루오로카본-결합 펩티드의 7가의 에퀴매식 혼합물(equimassic mixture)의 용해도를 현미경 검사에 의해 결정하였다 (최종 농도 2.5 mg/ml).

[0180] 검사된 조건의 어느 것도 플루오로카본-결합 펩티드의 우수한 분산(dispersion)을 달성할 수 없었다. HPBCD는 용해화를 개선하는 것으로 확인하였으나, 70-80% 용해도를 달성하기 위해 상온에서 1일 동안의 인큐베이션이 필요했다. 결론적으로, 플루오로카본-결합 펩티드는 시클로덱스트린, 계면활성제 또는 블록-공중합체와 같은 분산제의 작용에 내성이 있었다(resistant).

#### 실시예 4: 유기 용매 중 FCP의 용해도

[0182] 다양한 유기 용매에서 플루오로카본-결합 펩티드의 용해도를 평가하였다. 80% (v/v) 프로판-2-올, *tert*-부탄올, DMSO 및 아세톤에 대하여 1.33 mM의 동일한 플루오로카본-결합 펩티드 최종 농도로 용액을 제조하였다. 80% (v/v) 아세트산의 경우 플루오로카본-결합 펩티드의 최종 농도가 2.0 mM이었다. 결과를 도 3에 나타낸다.

[0183] 결론적으로, 모든 플루오로카본-결합 펩티드가 80% v/v 아세트산에서 용해성이고, 거품(foam) 또는 입자가 관찰되지 않았다. 80% (v/v) 프로판-2-올, *tert*-부탄올, DMSO 및 아세톤 용액은 평가된 FCP에 대한 완전한 용해도를 제공할 수 없었다.

#### 실시예 5: 용해화에 대한 만니톨의 효과

[0185] 다양한 용매 중 용해화에 대한 만니톨의 희석 및 침가의 효과를 조사하였다. 각각의 플루오로카본-결합 펩티드를 도 4에 따른 물 중 80% v/v 용매에 분산시키고, 볼텍싱하고, 뒤이어 만니톨 용액으로 7배 희석하였다. 80% v/v 프로판-2-올, *tert*-부탄올, DMSO 및 아세톤에 대하여 0.167 mM의 동일한 플루오로카본-결합 펩티드 최종 농도 및 1.33% (w/v)의 최종 만니톨 농도로 용액을 제조하였다. 80% (v/v) 아세트산의 경우 플루오로카본-결합 펩티드의 최종 농도가 0.25 mM이었다. 결과를 도 4에 나타낸다.

[0186] 또한 각각의 용매에 하기의 펩티드를 함유하는 플루오로카본-결합 펩티드의 등몰(equimolar) 혼합물을 전술된 바와 같이 제조하였다:

Mix 1: FCP1, FCP3, FCP4, FCP5, FCP6, FCP7, FCP9, FCP12.

Mix 2: FCP2, FCP4, FCP5, FCP6, FCP7, FCP8, FCP10, FCP11.

[0189] 개별적 FCP 및 Mix 1 및 2의 효과적인 용해도는 도 4에 나타낸 바와 같이 80% (v/v) 아세트산을 이용해서만 달성가능하였다.

실시예 6: FCP 용액의 멸균 여과 후 FCP의 회수

[0191] 실시예 4에서 제조된 혼합물 중 각각의 플루오로카본-결합 웨티드의 멸균 여과 (0.22  $\mu\text{m}$  Millex 25 mm PVDF 필터) 후 회수율(recovery)을 RP-HPLC에 의해 결정하였다. 그 결과는 하기 표 4 및 5에 표시된다.

표 4

표 4: 8가 혼합물 Mix 1로부터 개별적 FCP의 % 여과 회수율

플루오로카본-결합 웨티드	80% v/v 아세트산	80% v/v 프로판-2-올	80% v/v Tert- 부탄올	80% v/v DMSO	80% v/v 아세톤
FCP1	100.2	97.8	96.1	95.1	89.9
FCP12	100.2	16.9	6.6	32.0	12.7
FCP3	100.5	97.9	102.0	100.8	99.6
FCP4	99.8	20.5	19.3	77.2	24.4
FCP7	99.4	90.9	99.9	47.8	42.7
FCP9	99.8	84.3	84.9	87.7	69.1
FCP5	100.2	34.3	90.2	17.2	3.2
FCP6	101.3	78.4	62.3	85.8	63.2
평균	100.2	65.1	70.2	67.9	50.6

표 5

표 5: 8가 혼합물 Mix 2로부터 개별적 FCP의 여과 회수 백분율

플루오로카본-결합 웨티드	80% v/v 아세트산	80% v/v 프로판-2-올	80% v/v Tert- 부탄올	80% v/v DMSO	80% v/v 아세톤
FCP11	99.5	57.4	52.3	85.4	76.4
FCP2	99.8	92.7	99.5	98.2	85.4
FCP4	100	21.6	10.0	73.0	4.5
FCP7	93.3	90.5	89.2	46.4	43.7
FCP8	99.8	20.7	21.2	34.9	17.6
FCP10	98.1	87.7	87.3	89.4	79.4
FCP5	99.1	35.9	51.8	18.1	2.9
FCP6	97.4	69.5	82.1	91.0	64.1
평균	98.4	59.5	61.7	67.1	46.7

[0194] 80% (v/v) 아세트산을 이용하여 제조된 혼합물의 경우 멸균 여과 후 플루오로카본-결합 웨티드의 상실이 검출되지 않았다. 후속 수성 회석을 갖는 아세트산이 플루오로카본-결합 웨티드의 용해 및 여과에 대하여 선호되는 용매이지만, 최종 산물에서 잔여 아세트산의 수준을 최소화하기 위해 사용되는 농도를 줄일 필요가 있을 것을 결론지었다.

실시예 7: FCP의 용해도에 대한 아세트산의 농도의 효과

[0195] 제제화 과정의 하류(downstream) 및 최종 산물에서 아세트산의 농도를 제한(limit)하기 위해, 효율적인 분산을 달성하고 가시적 용해도(visible solubility)를 유지하기 위해 필요한 물 중 아세트산의 최저 농도를 각각의 플루오로카본-결합 웨티드에 대하여 결정하였다. 만니톨을 동결방지제(cryoprotectant)로 이용하는 경우, 안정한 무정형 동결-건조된 산물을 달성하기 위해 동결건조 단계에서 아세트산 농도를 최소화하는 것이 중요하다. 개별 플루오로카본-결합 웨티드의 허용가능한 분산성 및 용해도를 달성하기 위한 최소 아세트산 농도를 결정하였다. 최초 아세트산 분산(dispersion) 후 플루오로카본-결합 웨티드의 최종 농도는 2  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 이고, 만니톨로 회석 후 0.250  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 이었다.

표 6

표 6: 아세트산 중 개별적 FCP 및 7가의 혼합물 (Mix 3)의 분산성 및 용해도

플루오로카본-결합 펩티드	비율 아세트산 (% v/v)	초음파처리 / 볼텍싱에 의한 분산의 용이	분산 후 시작적 외 관	분산 후 혼합물의 시작적 외관: Mix 3
FCP1	10	+++	투명	투명
FCP2	10	+++	투명	
FCP4	10	+++	투명	
FCP8	80	+	투명	
FCP9	80	+	투명	
FCP5	10	+++	투명	
FCP6	80	+	투명	

[0198] 10% v/v만큼 낮은 아세트산의 농도가 여러 플루오로카본-결합 펩티드에 대하여 적절한 분산(dispersion)을 제공하는 것을 확인하였다. 그러나, 일부 플루오로카본-결합 펩티드는 완전한 용해화를 달성하기 위해 80% (v/v) 미만의 아세트산을 필요로 하고, 그 결과 수득된 제제는 시간의 경과에 따라 겔 또는 용해성 입자가 형성됨과 함께 물리적으로 불안정한 것으로 입증되었다(예를 들면 FCP6, FCP8 및 FCP9). 이 3개의 펩티드에 대하여, 80% (v/v) 아세트산이 물리적 상태에서 변화를 방지하면서 완전한 분산을 달성하는 것으로 확인하였다. 여과 회수율을 멀균 여과 전 및 후 Mix 3 혼합물 내 각각의 플루오로카본-결합 펩티드의 피크 면적을 비교한 RP-HPLC에 의해 측정하였다. 회수 백분율을 각각의 FCP에 대하여 측정하고 각각의 개별 FCP의 회수 백분율의 평균으로서 평균 회수율을 산출하였다. 블렌딩 및 회석 후 측정된 전체 여과 회수율(0.22  $\mu\text{m}$  필터 기초)은 전형적으로 95% 보다 높았다.

표 7

표 7: 여과 회수율

FCP	여과 회수율
FCP1	100.0
FCP2	99.3
FCP4	98.6
FCP5	98.7
FCP6	100.0
FCP8	97.0
FCP9	95.4
평균	98.4

[0200] **실시예 8: 플루오로카본-결합 펩티드에 의해 형성된 구조의 특성 분석**자가-조립된 다중분자 미셀 구조의 형성이 플루오로카본-결합 펩티드의 용해화 방법에서 중심적 역할을 할 수 있다. 이런 방식으로, 플루오로카본-결합 펩티드의 용해도는 분산 및 그 이후 제제화 과정 내내, 특히, 동결건조된 산물의 재구성에서 유지될 수 있다. 분산 동안 조립된 다중분자 구조의 물리적 특성 분석을 동적 광 산란 (DLS) 및 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 수행하였다.

[0201] DLS에 기초한 플루오로카본-결합 펩티드의 혼합물의 입자 크기를 모니터링하기 위해 (0.6 nm 내지 6 마이크론 입자의 측정이 가능한) Zetasizer Nano S를 이용하였다. Mix 1(FCP1, FCP3, FCP4, FCP5, FCP6, FCP7, FCP9 및 FCP12)을 만니톨 회석제를 이용하여 실시예 1(표 3)에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0202] 각 혼합물의 평균 입자 크기(nm)를 25°C에서 Nanosizer (Zetasizer Nano Series ZS, Malvern Instruments, UK)를 이용해 측정하였다. 250  $\mu\text{l}$ 의 용액을 사용하고 플라스틱 마이크로큐벳에 디스패치(dispatch)하였다. 상관 시간(correlation time)은 런(run) 당 10초에 기초하고 측정 당 총 5회 런(total of 5 runs per measurement)을 수행했다. 그 결과를 Dispersion Technology Software (Malvern Instruments, UK)를 이용하여 분석하였다. Mix 1에 대해 부피별 및 강도의 크기 분포(size distribution by volume and in intensity)를 수득하였다. 부피의 측정에 기초한 평균 크기를 Dispersion Technology Software에 의해 산출하였다.

- [0203] 용액 중 플루오로카본-결합 펩티드의 DLS는 약 20 내지 50 nm에 집중된 (부피 기준 95% 초과) 100 nm 보다 더 큰 크기 직경의 다중분자 구조(multimolecular structure)의 존재를 보여주고, 집단의 약 12-16% (강도 기준)는 100 nm 보다 큰 크기를 가졌다 (도 5).
- [0204] TEM은 DLS와 일치하는 치수의 구형 구조의 균일한 집단(homogenous population)의 존재를 보여준다.
- [0205] **실시예 9: 다중분자 FCP 구조에 대한 멸균 등급 여과(sterilising Grade Filtration)의 영향**
- [0206] 다중분자구조에 대한 멸균 등급 여과(sterilising grade filtration)의 영향을 조사하였다. 실시예 7로부터의 Mix 1을 멸균 0.22  $\mu\text{m}$  Millex 25mm PVDF 필터를 통하여 여과하고 그 후 실시예 7에 기재된 바와 같이 Zetasizer Nano S를 이용하여 DLS에 의해 분석하였다.
- [0207] DLS 분석은 형성된 구조체가 1 세트의 분석 내에서조차 가변적 재현성(variable reproducibility)을 갖고 매우 동적이라는 것을 보여주었다. 5 내지 7개의 측정값을 평균 입자 크기를 산출하기 위해 수집하였다 (도 7에서 상이한 프로파일에 의해 표시됨).
- [0208] 놀랍게도, 0.22  $\mu\text{m}$  여과는 아세트산에서 초기에 용해화된 플루오로카본-결합 펩티드에 의해 형성된 다중분자 구조체를 재형성(reshape)할 수 있다는 것을 확인하였다. 큰 입자가 여과 후 더 작은 입자로 재형성되고 또한 Kcount (용액 중 입자의 갯수와 상관되는 파라미터)가 여과 후 급격하게 감소된다는 것을 DLS는 보여준다 (여과 전, 200 Kcounts; 여과후, 120 Kcounts). 또한, 0.22  $\mu\text{m}$  필터 앞에 0.45  $\mu\text{m}$  필터의 도입이 여과 회수율을 감소시키지 않았다. 따라서 멸균 등급 여과는 단순히 제제로부터 큰 입자를 제거하고 제조 공정의 (수반되는 수율의 감소와 함께) 하류로의 통과를 제한하는 것에 의해서가 아니라, 변형에 의해 구조를 재형성하여 그것이 필터를 통과할 수 있도록 하여, 조립된 구조의 결과적인 크기에 영향을 줄 수 있다. 200 nm 초과의 크기를 갖는 입자는 DLS 데이터에 따르면 혼합물 중 입자의 약 12 내지 16% (강도 기준)를 나타낸다. HPLC에 의해 결정된 여과 회수율이 97%를 초과하므로, 이들은 용액으로부터 제거되지 않는 것으로 보인다.
- [0209] 또한 MIX 1 제제 입자 크기 분포를 Tris-HCl 10 mM 또는 물에서 샘플의 재구성 후 냉동-건조 후 평가하였다 (도 8). MIX 1 제제를 쉽게 재구성하여 각각 물 또는 Tris-HCl 10 mM으로 투명하거나 약간 오페스(opalescent) 용액을 달성하였다. 입자 크기는 약 20-50 nm에 집중(center)되었고, 제제화(동결건조-전) 동안 관찰된 것과 전반적으로 유사한 프로파일을 가졌다. 이는 재구성-후(post-reconstitution); FCP 다중분자 구조가 큰 가시적 용집체의 형성 없이 유지되는 것을 보여준다.
- [0210] **실시예 10: FCP의 화학적 안정성**
- [0211] 플루오로카본-결합 펩티드의 화학적 안정성을 7개의 플루오로카본-결합 펩티드의 동결건조된 제제를 50% (v/v) 아세트산에 24 시간 동안 노출시켜 평가하였다. Mix 3을 아세트산(실시예 6에 주어진 바와 같은 각각의 FCP에 대한 용매의 농도)에서 FCP의 초기 용해화, 뒤이은 만니톨 용액화에 의한 희석 및 블렌딩에 의해 제조하였다. 수득된 혼합물을 그 후 50% (v/v) 아세트산에서 재구성하기 전에 동결건조하였다.
- [0212] 미처리 대조군에 대비 분해가 RP-HPLC에 의해 관찰되지 않았다 (도 9 참조). 이는 선택된 플루오로카본-결합 펩티드가 50% v/v 아세트산에서 약제학적 제조 과정 동안 전형적 블렌딩 단계의 지속 기간 동안 화학적으로 안정하다는 것을 보여준다.
- [0213] **실시예 11: 최종 제제 중 잔류 아세테이트 농도**
- [0214] 하류 제제화(downstream formulation)에서 아세트산 농도를 최소화하는 것이 중요하다. 이는 동결건조 동안 안정한 케이크(cake)의 형성을 가능하게 하고 제제의 pH를 원하는 중성에 더 가깝게 상승시킬 것이다. 아세트산은 휘발성이고 그의 함량의 동결-건조 과정 동안 따라서 감소한다.
- [0215] 동결건조 동안, 실시예 9에서 기재된 바와 같이 제조된 Mix 3의 제제(1.4 ml 부피로 채워진 3 ml 동결-건조 바이알)를 먼저 2시간 동안 -80°C 냉동고에서 처음으로 냉동시키고 그 후 24 시간 동안 동결-건조하였다(벤치탑(benchtop) Christ Alpha2-4 LSC). 이 과정은 안정한 구조 및 균일한 농도를 갖는 동결건조된 케이크의 제조를 가능하게 한다. 상기 제제 중 아세테이트의 동결건조 전 농도는 8.8% v/v로 계산되었다.
- [0216] 3개의 다른 배치에 대해, 바이알 중 동결건조-후 잔류 아세테이트 농도 (아세테이트 반대이온 및 아세트산)가 각각 0.3 - 0.4, 0.7 및 0.5% (w/w)로 실험에 의해 결정되었다. 아세테이트의 경우 이 분석의 표준 편차는 +/- 0.07% (w/w); 정량 한계는 0.1% (w/w)로서 입증되었다. 잔류 아세테이트의 평균값은 ICH 권고 (일일 최대 50mg) 보다 훨씬 낮은, 인간 용량 당 약 0.35 mg의 허용가능한 수준과 동일하다.

[0217] 실시예 12: 동결건조된 FCP 제제의 재구성

[0218] 제제화된 플루오로카본-결합 웨티드(7가, Mix 3)의 재구성을 제제화되지 않은 동등한 제제와 비교하였다. 개별적 FCP를 실시예 9에서 기재된 바와 같이 아세트산에 용해화하고, 만니톨 용액과 블렌딩하고 희석하고 동결건조하였다 (FCP당 최종 농도 0.35 mg). 제제화된 혼합물의 일 바이알을 0.7 ml의 주사용수 (Hyclone)으로 재구성하였다; 추가적 바이알을 0.7 ml의 28 mM 히스티딘 버퍼 용액으로 재구성하였다. 제제화되지 않은 혼합물의 경우, 0.35 mg의 각각의, 미처리(untreated) FCP를 추가적 가공 없이 바이알로 분배하였다. 제제화된 바이알의 것과 동일한 부형제 농도를 제공하기 위해 제제화되지 않은 혼합물의 바이알 하나를 0.7 ml의 4.5% 만니톨 용액으로 재구성하였다. 제제화되지 않은 혼합물의 추가적 바이알을 4.5% 만니톨 용액 중 28 mM 히스티딘 0.7 ml로 재구성하였다.

[0219] 하기 사진 (도 10 및 11)은 수동 진탕(shaking)에 의한 초기 분산, 뒤이은 30초 동안 블렉싱 및 1시간 동안 중탕 초음파처리 후 FCP의 용해도를 도시한다.

[0220] 만니톨/물 및 히스티딘 버퍼 용액에 의해 재구성 후 제제화되지 않은 시료의 시각적 검사는 용액이 완전히 분산 (disperse) 및 용해화되지 않았다는 것을 보여주었다. 각각의 용액은 턱하고 큰 입자가 관찰될 수 있었고, 특히 유리 바이알의 측면에 부착된 입자가 관찰될 수 있었고, 이들은 시간의 경과에 따라 분산되지 않았다. 반면에, 물 및 히스티딘 버퍼 용액에 분산된, 제제화된 백신의 용액은 입자가 존재하지 않고 투명하였다.

[0221] 이러한 결과는 초기 용해화의 방법이 최종 재구성된 제제의 응집 특성에 영향을 갖는다는 것을 보여준다. 제제화 방법의 초기에 아세트산 중 FCP의 분산은 미셀 구조의 형성을 유도(direct)하고, 이는 후속하는 블렌딩, 여과 및 동결건조 방법을 통해 유지된다. 이는 입자가 없는 형태의 수성 상에서 최종 동결건조된 제제의 재구성을 가능하게 한다.

[0222] 결론

[0223] 아세트산은 평가된 모든 개별적인 플루오로카본-결합 웨티드에 대하여 우수한 용매로 입증되었다. 완전한 용해화는 높은 FCP 농도 (2000 nmol/ml 이하; 약 10 mg/ml)에서 달성할 수 있었고, 블렉싱 및 초음파처리에 의한 변화(perturbation) 후 입자가 관찰되지 않았다. 동적 광 산란 및 투과 전자 현미경에 의해 관찰된 바와 같은 자발적으로 자가-조립된 마크로분자 구조의 형성을 유도하는 플루오로카본-결합 웨티드의 양친매성 특성으로 인해 추가적 하류 가공 동안 용해도가 유지되었다. 따라서 상기 용매는 이중 역할에 기여한다; 첫째로 큰 비정돈 (disordered) 입자 구조가 파괴(disrupt)되는 것을 보장하는 파괴(disruptive) 능력이 있다는 것을 보장하고 및 둘째로 다중분자, 정돈된, 미셀 구조가 형성되고 지지될 수 있는 환경을 지지한다. 이러한 구조는 멸균 여과시 물질의 손실이 발생하지 않도록 FCP의 용해화를 가능하게 할 정도로 충분히 작다. 또한 미셀 구조는 동결건조 동안 유지되고 인간에게 투여하기 전에 수성 매질 중 동결건조물의 재용해화를 가능하게 하기 위해 필수적이다. 아세트산에서 이전에 용해화되지 않았던 FCP는 물 또는 히스티딘 버퍼에서 동결-건조된 상태로부터 만족하게 재구성될 수 없었다 (실시예 12).

[0224] 80% (v/v) 아세트산은 모든 FCP를 용해화하는 것으로 확인되었다. 그러나, 과량의 아세트산은 동결-건조 후 허용가능한 동결건조물 케이크의 형성을 방지할 수 있다. 또한, 약제학적 산물 중 아세테이트의 수준에 대하여 부과된 규제 제약이 있다. 따라서 아세트산의 더 낮은 농도가 검사되고; 7개의 FCP 중 4개에 대해 10% (v/v)가 적절한 것으로 입증되고, 반면에 80% (v/v)가 나머지 3개의 FCP에 대하여 실행가능한 최저 농도이었다. 가공 후, 7개의 FCP의 블렌드는 인간 용량 당 아세테이트의 순응하는(compliant) 수준을 갖는 허용가능한 동결 건조물 케이크를 생성하였다.

[0225] 조사된 모든 다른 용매는 모든 FCP의 완전한 용해화를 달성할 수 없었다. 플루오로카본 사슬이 분자에 대하여 특이한 물리화학적 특성을 부여하므로, 아세트산의 성공은 예측할 수 없었다 (예를 들면, FCP와 실시예 1의 FCP와 동등한 천연 웨티드 비교). 또한, FCP를 용해화하는데 10% (v/v) 아세트산의 성공과 웨티드의 소수성 또는 하전된 잔기 함량 사이의 상관관계가 없었다.

[0226] 요약하면, 아세트산은 하기 장점을 갖는다:

[0227] - 개별적 FCP 및 이들의 혼합물에 대하여 적절한 용해도를 제공할 수 있고;

[0228] - 평가된 모든 FCP에 대하여 적절하고;

[0229] - 일관된 수율 및 균일한 산물을 제공하고;

- 사용하기 위해 의도된 농도(10-80% (v/v)에서 수-흔화성이고;
- 상대적으로 높은 농도 (10 밀리몰 이상)에서 FCP를 용해화할 수 있고;
- 인간에게 사용하기에 적절한, ICH 분류 III 용매로 열거되고;
- (전형적 냉동-건조 단계 후 수준이 감소되고) 동결건조로 처리할 수 있고;
- 후속 블렌딩 및 희석 후, 최소 수율 손실로 멸균 등급 여과를 겪을 수 있는 용액을 가져오고;
- 동결건조 후, 등장성, pH 중성, 균질한 혼탁액을 형성하기 위해 쉽게 재구성될 수 있는 산물을 가져오며;
- 플루오로카본-결합 펩티드와 반응하지 않거나, 플루오로카본-결합 펩티드의 분해를 촉진하지 않고; 및
- 약제학적 산물 제조에 일상적으로 사용되는 물질과 양립될 수 있다.

#### 실시예 13: 플루오로카본-결합 펩티드 인플루엔자 백신의 제조

이 연구(study)의 목적은 서열번호 1 내지 6에 표시된 아미노산 서열을 갖는 펩티드를 포함하는, 6개의 플루오로펩티드를 함유한 약제학적으로 허용되는 범용(universal) 인플루엔자-A 백신(FP01.1)의 GMP(good manufacturing practice) 생산을 위해 설계된 제제화 방법의 이익을 보여주는 것이다. 특정 목표는 다음과 같다:

1. FP-01.1의 제조를 위한 중요 제제화 파라미터를 평가한다.

a. 아세트산 용액 중 플루오로펩티드 용해화의 용이;

b. 여과의 지점에서 미셀 크기 결정;

c. 여과 회수율;

d. 플루오로펩티드의 화학적 및 물리학적 안정성; 및

2. 재구성된 FP-01.1 백신 (제제화된 플루오로펩티드)의 양을 제제화되지 않은 플루오로펩티드를 함유하는 동등한 제제와 비교한다.

본 발명자들은 제제화 방법을 개발하고 이를 서열번호 1 내지 6을 각각 포함하는 6개의 플루오로카본-결합 펩티드로 구성된 범용 인플루엔자-A 백신 FP-01.1의 제조에 적용하였다. 서열번호 1 내지 6에 표시된 서열을 갖는 6개의 펩티드는 N-말단 라이신 스페이서의 앱실론 사슬을 통하여 플루오로카본 사슬  $C_8F_{17}(CH_2)_2COOH$ 에 커플링된다(couple). 6개의 플루오로카본-결합 펩티드는 따라서 선행하는 실시예에 기재된 FCP1, FCP8, FCP9, FCP2, FCP4 및 FCP5에 해당한다. 제제화 방법은 공정 동안 플루오로펩티드의 물리적 및 화학적 안정성을 유지하면서 플루오로펩티드의 우수한 분산성(dispersability)을 보장하는 것으로 확인한 산성 용매인 아세트산의 용도에 기초한 것이다. 아세트산은 높은 휘발성이고 동결-건조 동안 승화될 수 있고, 본 발명자들은 아세트산이 재구성된 산물의 pH에 거의 영향을 갖지 않는 잔류 수준까지 일관되게 감소되는 것을 확인하였다.

하기 기재된 제제화 방법은 중성 pH (6-7.5) 및 허용가능한 삼투질 농도 (280-320mOsm)을 갖는 안정하고 균일한 용액 (가시적 응집체가 없음)을 생성시키기 위해 베퍼 용액 (28 mM L-히스티딘)으로 재구성될 동결-건조된 FP01.1 백신(장기간 안정성을 보장)의 제조를 달성한다. 여러 GMP 임상 회분(batch)을 유용하게 생산하고 본 발명자들은 산물이 인간에게 면역성이고 안전함을 입증하였다.

#### 재료 및 기구

- 아메리칸 펩티드 사(American Peptide Company)에 의해 제조된 플루오로펩티드 (FP-01.1에 함유됨)

- Glacial 아세트산 (Sigma#27225), D-만니톨 (Merck Improve)

- Hyclone 물 (Fisher#HYC-001-189G)

- Millex, PVDF Durapore, 0.2  $\mu$ m ( $\frac{1}{3}$  33 mm) Millipore.

- 30 개의 오토클레이브된(Autoclaved) (냉동 건조된 바이알 (Adelphi#VC002-13C) +스톱퍼(stopper) (Adelphi#FDW13)).

- Discovery 컬럼 C18, 250x2.1 mm, 5  $\mu$ m [ 구비된 HPLC

[0255] - Combitips 피펫 팁(pipette tip) 10ml (Fisher#PMP-117-523N) + Eppendorf 스텝퍼(Stepper)

[0256] - 냉동 건조기(Freeze drier) 2-4-LSC (Christ)

[0257] - Osmomater : Osmomat 030 (Gonotec)

[0258] - micro Inlab® 전극이 구비된 pH 계측기(meter) (Mettler)

## [0259] 방법

### [0260] 용액 제조

[0261] 1. 4°C에서 냉각한, 물 50 ml 중 3.3 %w/w 만니톨 (200 ml 물에서 6.6 g).

[0262] 2. 멸균수 중 10% (v/v) 아세트산의 5 ml 용액.

[0263] 3. 멸균수 중 80% (v/v) 아세트산의 5 ml 용액.

### [0264] 플루오로카본-결합 웨티드 침량

#### [0265] 표 8: FCP 침량 및 분산

FCP	질량 (mg) (net)	펩티드 함량 (%)	질량 (mg) 이론적. (gross)	질량 (mg) 실험.	아세트산 농도(%)	아세트산- 이론적 부피(μl).	아세트산- 이론적 부피(μl).
FCP1	10	87.0	11.49	12.27	10	1000	1068
FCP2	10	87.6	11.41	12.49	10	1000	1094
FCP4	10	90.6	11.04	11.68	10	1000	1058
FCP5	10	92.0	10.87	11.67	10	1000	1074
FCP9	10	90.3	11.07	11.60	80	1000	1048
FCP8	10	92.0	10.87	11.78	80	1000	1084

[0266]

### [0267] FP-01.1에 대한 제제화 준비

[0268] 1. 2 ml 유리 바이알에서 각각의 웨티드(10 mg 순 웨티드 목표)를 침량한다.

[0269] 2. 물 중 10% 또는 80% 아세트산 용액의 ~1.0 ml (정확히 10 mg net/ml을 얻기위해 침량의 합수로 부피를 조절)에서 10mg net/ml로 각각의 플루오로웨티드를 분산시킨다 (표 10 참조),

[0270] 3. 볼텍싱 및 초음파처리하고 및 시각적 외관을 기록한다.

[0271] 4. 완전한 용해화(complete dissolution)까지 단계 3을 반복한다.

[0272] 5. 6개의 분산된 플루오로웨티드 각각의 950 μl을 40 ml 유리 용기 내로 함께 블렌딩한다. 그 후 950 μl의 아세트산 80%를 첨가한다 (총 부피 6.65 ml). 각각의 웨티드는 40% 아세트산 중 1.428 mg/ml의 농도이다.

[0273] 6. 블렌딩된 용액의 시각적 양상을 기록한다.

[0274] 7. 블렌딩된 플루오로웨티드를 25.39 ml의 3.3% 만니톨(각각의 웨티드의 0.2915 mg/ml의 용액)으로 희석하고, 총 아세트산 8.16%를 수득한다.

[0275] 8. 희석된 용액의 시각적 양상을 기록한다.

[0276] 9. Millex PVDF 33mm, 0.2 μm를 이용해 ~32 ml 용액을 여과한다 (여과 회수 동안 0.3 ml의 여과되지 않은 용액 유지함).

### [0277] 충진(Filling)

[0278] 10 ml 콤비팁(combitip)을 사용하여 표 9에 따라 표지된 2 ml 동결물(freeze)을 분취(aliquot)한다 (충전 부피: 각각의 제제에 대하여 1.2 ml).

[0279] 표 9: 플루오로펩티드 제제 FP-01.1의 제조

총 부피 (ml)	펩티드 농도 (mg/pept/ml)	동결건조물을 위한 분취량 ( $\mu$ l)	펩티드 양 ( $\mu$ g/바이알/펩 티드)	재구성을 위한 버퍼 부피 ( $\mu$ l)	재구성 후 최종 농도
29-30	0.2915/ind	1200 (24-25 바이알)	350	700	0.500mg/pept/ml

[0280] 냉동 건조

1. 1시간 동안 -80°C에서 바이알을 냉동한다.

2. 40 시간 동안 냉동 건조한다.

3. 냉동 건조 환기(freeze drying ventilation)를 질소하에 수행하고 바이알 스텈퍼링(vials stoppering)을 400 내지 600 mbar의 압력에서 수행한다.

[0285] 제제화되지 않은 플루오로펩티드를 이용한 FP-01.1-등가물(equivalent)의 제조

6개의 플루오로펩티드인 FCP1, FCP8, FCP9, FCP2, FCP4 및 FCP5 각각 0.35 mg을 함유하는 2개의 바이알을 제조하였다.

[0287] 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy)음성 염색법에서 TEM, 20  $\mu$ l의 플루오로카본-결합 펩티드 용액을 포룸바르 카본 코팅된 구리 전자 현미경 그리드 (300 메시) 상에 침적시킨다. 20  $\mu$ l의 우라닐 아세테이트 (1% 수성)를 그 후 첨가한다. 30초 후, 과량의 용액을 와트만 필터 종이에 신속하게 흡수시킨다. 샘플을 그 후 분석 전에 2분 이상 동안 건조되게 한다. 투과전자현미경을 그 후 120 kV 가속 전압에서 Philips CM120 biotwin에서 수행한다. 이미지 획득은 50000x 내지 150000x의 직접 배율에서 수행한다.[0289] RP-HPLC 분석

HPLC 방법: FP-01.1

• 컬럼: Discovery C18: 2.1x25 mm, 5  $\mu$ m Flow 0.3 ml/min.

• 용매 A: 90% 물/10% 아세토니트릴/0.04% TFA

• 용매 B: 90% 아세토니트릴/10% 물/0.04% TFA.

• 구배(gradient) :

시간 (분)	용매 B
0.01	10%
1	10%
6	28%
46	44%
50	57%
60	70%
68	82%
70	82%
71	10%

[0295]

[0296] 결과[0297] 제제화 단계 (동결 건조 전)[0298] 펩티드 분산(peptide dispersion)

표 10: 볼텍싱/초음파처리 사이클 후 각각의 웨티드의 용해 용이성(ease of solubility)

FCP	사이클 1		사이클 2		사이클 3	
	볼텍싱	초음파처리	볼텍싱	초음파처리	볼텍싱	초음파처리
FCP1	투명	투명	투명	투명	투명	투명
FCP2	투명	투명	투명	투명	투명	투명
FCP4	투명	투명	투명	투명	투명	투명
FCP5	투명	투명	투명	투명	투명	투명
FCP9	입자-	투명	투명	투명	투명	투명
FCP8	입자+	약간의 입자	약간의 입자	1 또는 2개의 입자	1 또는 2개의 입자	투명

[0300]

웨티드는 초음파처리 요구 없이 쉽게 용해되는 반면에, 80% 아세트산에 용해성이 있는 두개의 웨티드는 1 사이클 이상의 초음파처리를 필요로 하였다.

[0302]

블렌딩 / 회석

[0303]

블렌딩된 6개의 웨티드의 용액은 투명하였다 (보이는 응집체가 없음). 3.3%에서 만니톨로 회석된 후, 상기 용액은 여전히 투명하였다 (보이는 응집체가 없음).

[0304]

표 11: 제제의 시각적 외관

웨티드	아세트산 비율 (% v/v)	분산의 용이함 (표 12 참조)	분산 후 시각적 외관	블렌딩 후 혼합물의 시각적 외관	회석 후 혼합물의 시각적 외관
FCP1	AcOH 10%	+++	투명	투명	투명
FCP2	AcOH 10%	+++	투명		
FCP4	AcOH 10%	+++	투명		
FCP5	AcOH 10%	+++	투명		
FCP9	AcOH 80%	++	투명		
FCP8	AcOH 80%	+	투명		

[0305]

여과 회수율(filtration recovery)

[0306]

매우 우수한 여과 회수율을 달성하였다 (각각의 웨티드에 대하여 >99%).

[0308]

표 12: 여과 후 웨티드 회수율

FCP	FCP1	FCP2	FCP4	FCP5	FCP9	FCP8
웨티드 회수율 %	100.2	101.6	100.8	100.2	99.8	99.6

[0309]

투과전자현미경(TEM) 이미징

[0311]

여과 전 형성된 미셀의 TEM 분석은 17-30 nm 크기를 갖는 작은 구형 미셀의 균일한 집단(homogenous population)의 존재를 보여준다 (도 12).

[0312]

화학적 안정성 (여과 후)

[0313]

화학적 안정성을 여과 후  $T_0$  및 24 시간 후에 RP-HPLC에 의해 결정하였다. 그 결과를 도 13 및 표 13에서 표시한다.

[0314] 표 13: 시간의 경과에 따른 여과 후 순도

	T0	2 hrs	8 hrs	24 hrs
순도 %	96.9	97.1	97.1	96.9
HPLC 파일	8644	8645	8649	8651

[0315] 완료된 FP-01.1 산물에 수행한 분석 (냉동-건조 후)

[0316] 냉동 건조 후 케이크 양태

[0317] 표 14: 케이크 검사 결과

산물	세련된 케이크(elegant cake)	붕괴된 케이크(collapsed cake)	총 바이알
FP01.1	25	0	25

[0318] [0319] 냉동-건조된 산물은 세련된 고체 균일 케이크(elegant solid uniform cake)를 형성한다.

[0320] 냉동 건조된 FP-01.1 산물의 순도 분석

[0321] 0.5 mg/펩티드의 농도를 얻기 위해 샘플을 0.70 mL에서 재구성하였다. 냉동 건조 동안에 분해가 일어나지 않았고, 순도는 97%였다.

[0322] 냉동-건조된 FP-01.1의 재구성 -제제화되지 않은 플루오로펩티드와의 비교

[0323] FP-01.1의 제조에 적용된 제제화 방법의 잇점을 보여주기 위해, 재구성된 FP-01.1 백신 (제제화된 플루오로펩티드)의 품질을 제제화되지 않은(non-formulated) 플루오로펩티드를 함유하는 동등한(equivalent) 제제와 비교하였다.

[0324] [0325] 제제화되지 않은 플루오로펩티드에 기초한 FP-01.1-동등물은 단일 바이알(0.35 mg의 각각의 펩티드) 중 6개의 플루오로펩티드를 칭량하여 제조하였다. 제제화되지 않은 FP-01.1-동등물을 (FP-01.1에 동등하도록 4.5% 만니톨을 함유하는) 0.7 mL의 물 또는 (4.5% 만니톨을 함유하는) 28 mM L-히스티딘으로 재구성하고, (전술된 제제화 방법을 통해 수득된) 제제화된 FP-01.1 과 비교하고 동일한 조건에서 재구성하였다. 재구성된 제제 FP01.1을 RP-HPLC에 의해 분석하고 그 분석 결과를 도 14에 표시한다.

[0326] 제제화된 FP-01.1 산물은 물에서 쉽게 재구성된 반면에 제제화되지 않은 FP-01.1 동등물은 불용성이어서 큰 응집체가 혼탁되고 유리 벽에 부착하였다(도 15 참조). 물에서 재구성된 FP-01.1은 가시적인 응집체가 없는, 약간 오플색의 균일한 용액을 형성한다. 제제화되지 않은 플루오로펩티드는 심지어 초음파처리 및 볼텍싱 후에 시간이 경과해도 용해도를 달성할 수 없다.

[0327] 유사하게, 제제화된 FP-01.1 산물은 28 mM L-히스티딘(증성 pH를 달성하기 위한 임상 제품을 위해 설계된 베퍼)에서 용이하게 재구성된 반면 제제화되지 않은 펩티드는 불용성이다 (큰 응집체의 형성) (도 16 참조). 물에서 재구성된 FP-01.1은 응집체가 보이지 않고 약간 오플색의 균일한 용액을 형성한다. 제제화되지 않은 플루오로펩티드는 심지어 초음파처리 및 볼텍싱 후에 시간이 경과해도 용해도를 달성할 수 없다.

[0328] 이러한 결과에 기초하여, 제제화되지 않은 플루오로펩티드에 기초한 산물은 그것의 열등한 분산성 및 제제의 균일성(homogeneity)의 부재로 인해 약제학적으로 허용되는 것으로 간주될 수 없다.

[0329] L-히스티딘 중 제제의 삼투질 농도 및 pH

[0330] 표 15: L-히스티딘에서 재구성된 제제의 pH 및 삼투질 농도

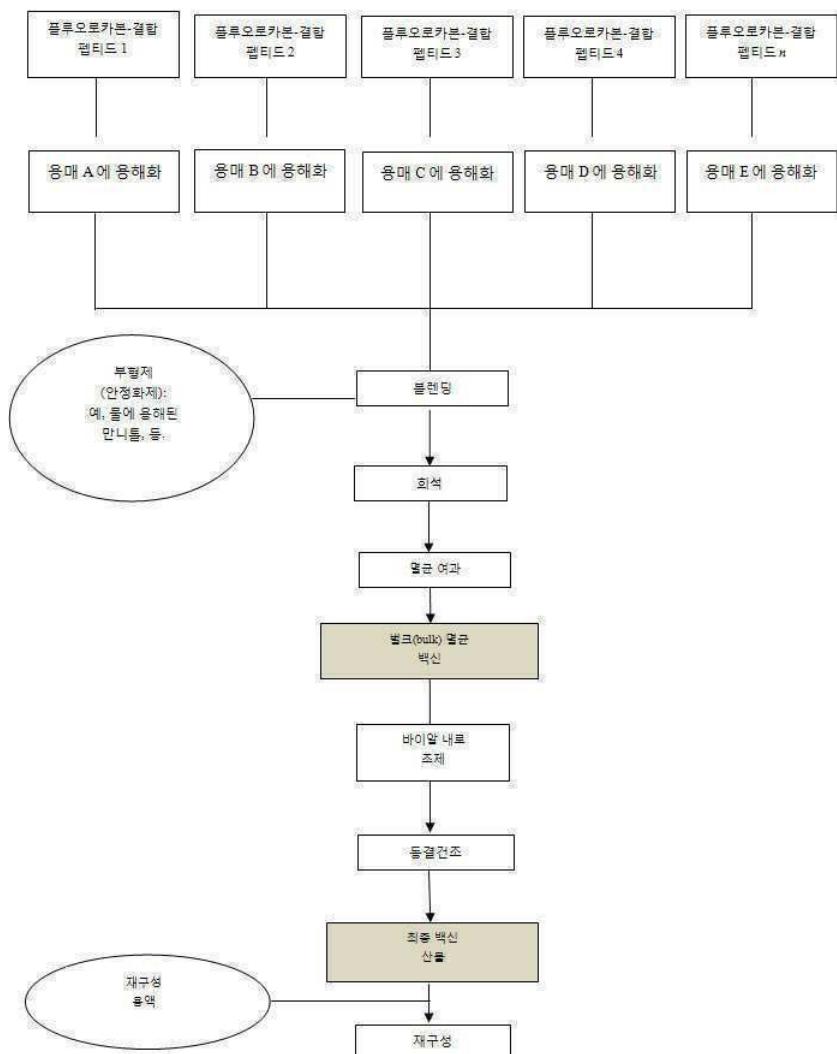
	히스티딘 28 mM에서 재구성된 FP-01.1
삼투질 농도 (mOsm/kg)	302
pH	6.65

[0331] [0332] 결론

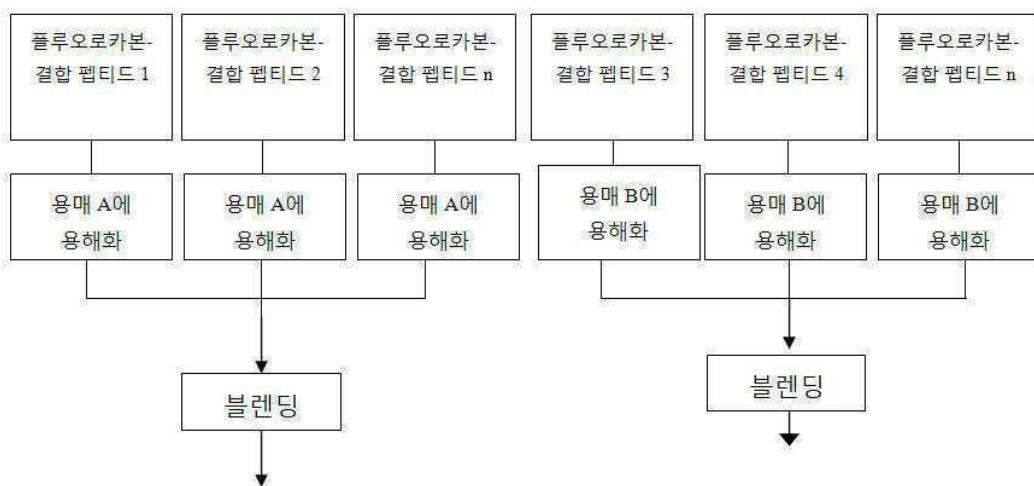
- [0333] - 모든 플루로오펩티드가 분산시(point of dispersion) 완전한 용해도를 달성하였다.
- [0334] - 미셀을 멀균 여과(220 nm 컷오프(cut-off))에 적합한(compatible) 17 내지 30 nm의 크기로 형성하였다.
- [0335] - 멀균 여과 회수율이 모든 플루오로펩티드에 대하여 99%를 넘었다.
- [0336] - FP-01.1은 그의 전용 28 mM L-히스티딘 베퍼 시스템으로 쉽게 재구성되어, 중성 pH 및 허용가능한 삼투질 농도 (~300 mOsm)에 가까운 균일한 약간의 오발색의 용액을 형성했다.
- [0337] - 제제화되지 않은 플루오로펩티드로부터 수득된 FP-01.1-동등한 제제는, 플루오로펩티드가 큰 불용성 응집체를 형성하고, 높은 비율이 유리벽에 부착하여, 재구성하기 어렵다는 것을 보여주었다. 이는 제제화된 FP-01.1의 재구성과 대조되고 약제학적으로 허용되는 산물의 생성에서 제제화 방법의 잇점을 보여준다.
- [0338] **실시예 14: 랫트(rat)에서 FP01.1의 면역성**
- [0339] FP-01.1 제제에 의해 생성될 수 있는 면역 반응을 GD\_RD004에 따라 Imperial College, St Mary의 Campus, CBS의 직원에 의해 하부 좌측 옆구리(lower left flank)에 근육 내로 접종된(immunised) 랫트에서 평가하였다.
- [0340] **비장세포(splenocyte)의 준비**
- [0341] 랫트를 본사 규정(home office regulation) 및 GD\_RD004에 따라 희생시켰다. 비장을 수집하고 (비정상 비장은 사진촬영함) 단일 세포 혼탁액을 GD\_RD007에 따라 제조하고, GD\_RD001(TruCount 방법)에 기재된 바와 같이 세포 수를 결정하였다. 비장세포를 완전 매질에  $1 \times 10^7 / \text{mL}$ 로 재현탁시키고, IFN- $\gamma$  ELISpot 및 CBA를 위해 플레이팅하였다.
- [0342] **IFN- $\gamma$  ELISpot**
- [0343] 자극을 위한 항원을 스톡(stock)으로부터 4 X 농도로 신선하게 준비하고 IFN- $\gamma$  ELISPOT를 위해 2배수의 웰 (duplicate well)에 플레이팅(plate)하였다. 세포를 50  $\mu\text{l}$ 의 4X 항원 제제 (즉, 자극을 위한 개별적 긴 펩티드 및 LPMIX6) 및 100  $\mu\text{l}$ 의 완전 매질(complete media) (총 부피 = 200  $\mu\text{l}$ )과 함께,  $0.5 \times 10^6$  비장세포/웰로 플레이팅하였다. ELISpot 플레이트를 습한(humidified) 환경에서 18시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 인큐베이션하였다.
- [0344] FP-01.1의 3개의 용량을 펩티드 당 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 일정한 FCP 농도를 유지하면서 부피에 의해 조정하였다. SD 랫트를 0일 및 14일차에 FP-01.1의 12.5, 50 또는 100  $\mu\text{g}/\text{펩티드}$ 로 IM 주사하고, FP-01.1로부터의 개별적 천연 펩티드와 18 시간 인큐베이션 후 랫트의 비장을 IFN- $\gamma$  ELISPOT를 위해 24 일차에 수집하였다. 12.5  $\mu\text{g}/\text{펩티드}$  및 50  $\mu\text{g}/\text{펩티드}$  용량 모두를 각각 25  $\mu\text{l}$  및 100  $\mu\text{l}$ 의 부피로 단일 부위에 주사한 반면, 100  $\mu\text{g}/\text{펩티드}$  용량은 두 개의 다른 부위에 2 x 100  $\mu\text{l}$  부피로 주사하였다.
- [0345] 검사된 모든 용량 수준에서 FP-01.1은 용량 의존 방식(dose dependent fashion)으로 양성 IFN- $\gamma$  T 세포 반응을 유도하였다 (도 17).
- [0346] **실시예 15: FP01.1을 위한 임상 실험 데이터**
- [0347] 1일차 29일차에 투여된, 증가되는 용량의 FP-01.1 (50, 150, 500  $\mu\text{g}/\text{펩티드}$ ) 및 위약을 안전성, 내약성 (tolerability) 및 면역성에 대하여 임상 I 기에서 총 48명의 건강한 개체에서 평가하였다.
- [0348] 2회의 근육 내 주사후, FP-01.1은 모든 3개의 코호트(cohort)에서 우수한 내약성을 보였다. TEAE의 발생율, 실험실 파라미터 또는 주사 부위 반응에서 용량-의존성 관계의 명확한 증거는 없었다. 3개의 코호트 중에서 제1 또는 제2 노출(exposure)에서 백신 접종에 대한 뚜렷한 국소 또는 전신 반응을 나타낸 개체는 없었다.
- [0349] 백신-유도 T 세포 반응을 엑스 비보(ex vivo) IFN- $\gamma$  ELISpot 분석을 이용해 평가하였다. PBMC를 18시간 동안 6 개의 개별적 펩티드(백신에 함유된 펩티드에 해당)로 자극하였다. 양성 검정 분석을 음성 대조군 웰의 스팟의 수의 평균, 상기 평균의 표준 편차 + 2로 정의하였다. 6개의 펩티드의 각각에 대한 스팟의 수는 "긴 펩티드에 대한 합(sum for long peptide)"을 수득하기 위해 누적시키고 백만 개의 인풋(input) PBMC 당 스팟의 수로 표현하였다.
- [0350] FP-01.1은 면역성인 것으로 입증되었다. 도 18에서 관찰되는 바와 같이 150  $\mu\text{g}$  FP-01.1 용량군은 나머지 2개의 백신 용량 및 위약군에 비하여 더 높은 반응을 보인다. 이 용량군에서, 제2 주사 후 부스터(booster) 효과가 관찰되어 펩티드 백신에 대한 복수 주사에 의한 부스터 확대(booster amplification)의 개념을 지지한다.

## 도면

## 도면1



## 도면2



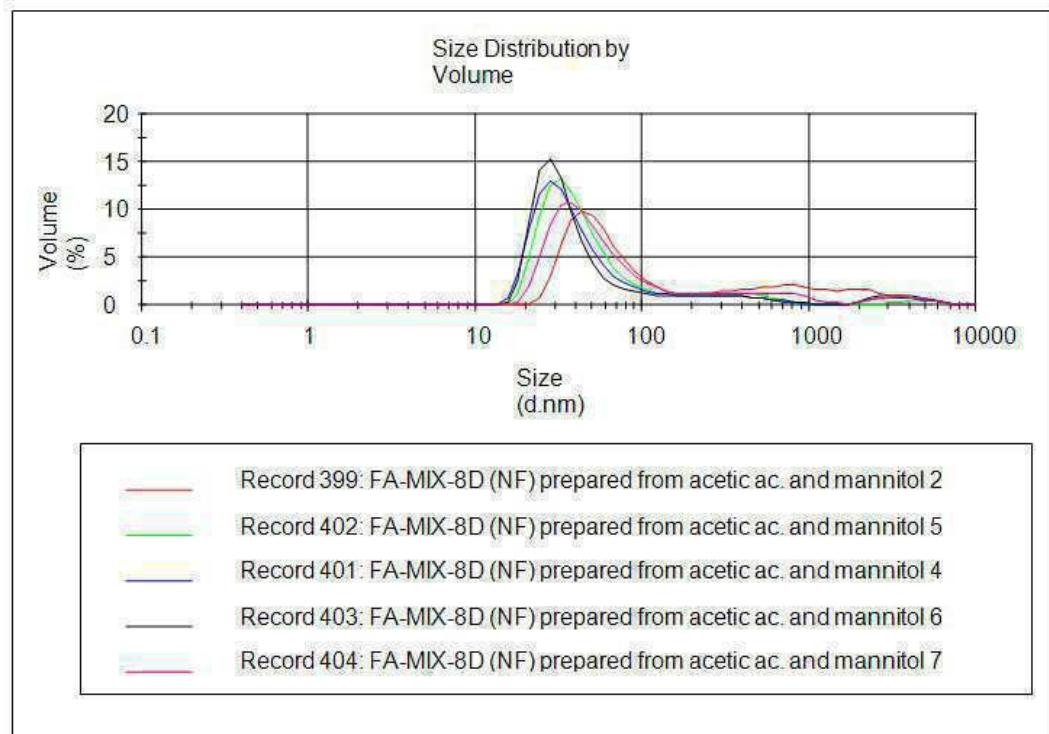
## 도면3

FCP	80% v/v 아세트산				80% v/v 프로판-2-올				80% v/v tetr-부단을				80% v/v DMSO				80% v/v 아세톤			
	투명도	거품/입자	투명도	입자	투명도	거품/입자	투명도	거품/입자	투명도	거품/입자	투명도	거품/입자	투명도	거품/입자	투명도	거품/입자	투명도	거품/입자	투명도	거품/입자
FCP1	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP2	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP3	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP4	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP5	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP6	+++	-/-	+	++	+	-/++	+	+++/++*	+	+++/++*	+	+++/++*	+	+++/++*	+	+++/++*	+	+++/++*	+	+++/++*
FCP7	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP8	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP9	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP10	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP11	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++
FCP12	+++	-/-	-	++	+	-/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++	+	+++/++

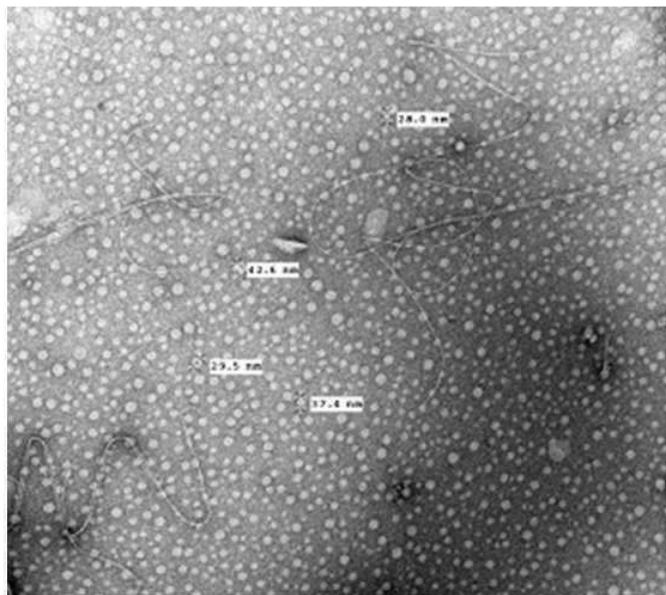
## 도면4

FCP	80% v/v 아세트산	80% v/v 프로판-2-올	80% v/v tert-부탄올	80% v/v DMSO	80% v/v 아세톤
투명도	거품 / 일자	투명도	거품 / 일자	투명도	거품 / 일자
FCP1	+++	-/-	+++	-/-	+++
FCP2	+++	-/-	+++	-/-	+++
FCP3	+++	-/-	+++	-/-	+++
FCP4	+++	-/-	+++	-/-	+++
FCP5	+++	-/-	-/+	+++	-/+
FCP6	+++	-/-	+	+++	-/-
FCP7	+++	-/-	+++	-/-	+
FCP8	+++	-/-	-	+++/-	+
FCP9	+++	-/-	+++	-/-	+++
FCP10	+++	-/-	+++	-/-	+++
FCP11	+++	-/-	-	+++/-	+
FCP12	+++	-/-	-	+++/-	+
Mix 1	+++	-/-	++	-/+	-/+
Mix 2	+++	-/-	++	-/+	+

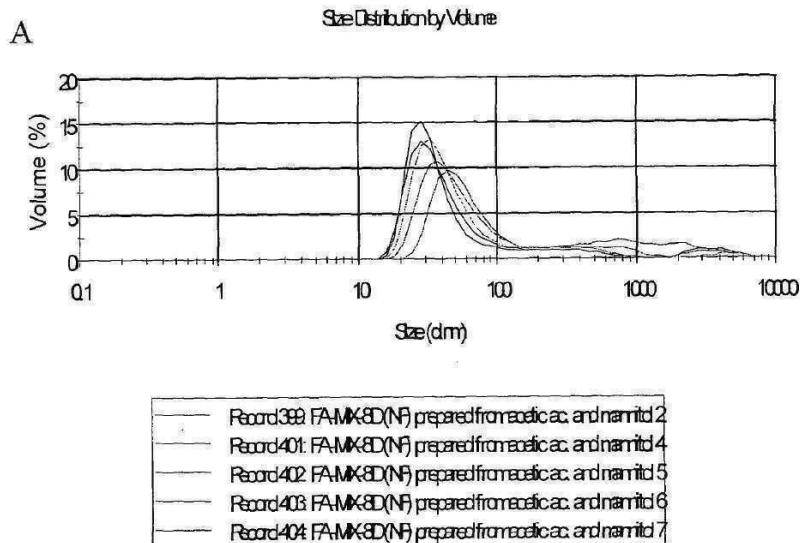
도면5



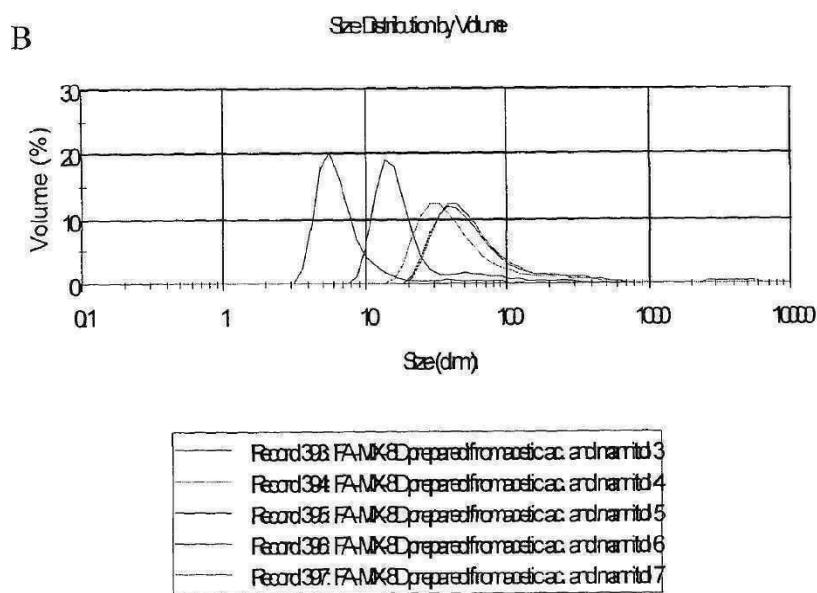
도면6



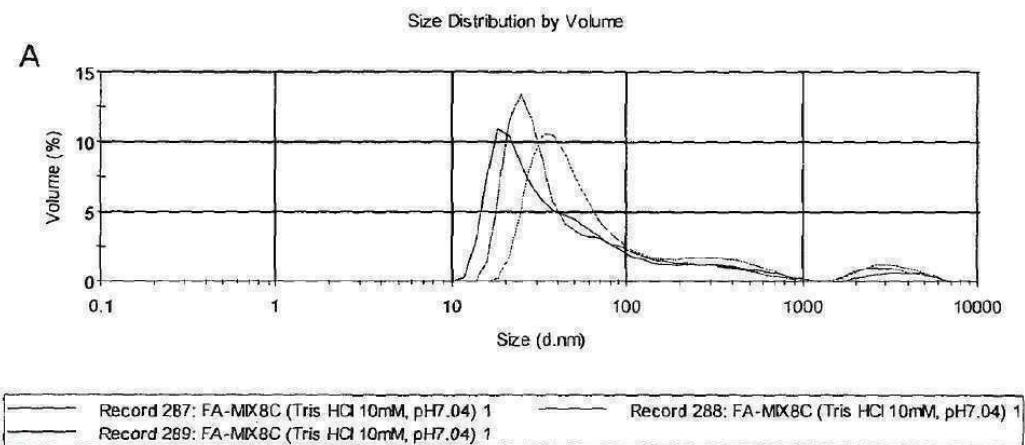
## 도면7a



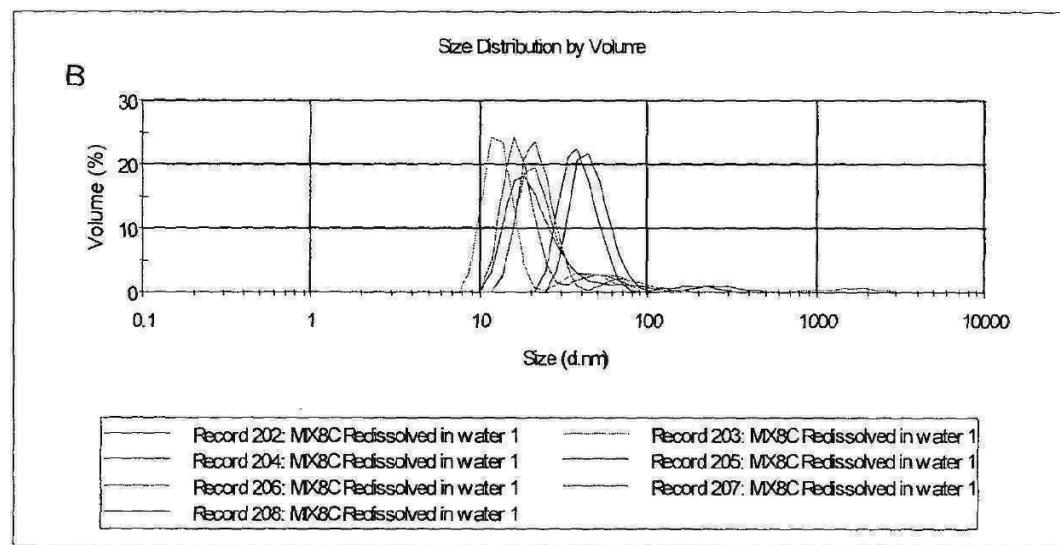
## 도면7b



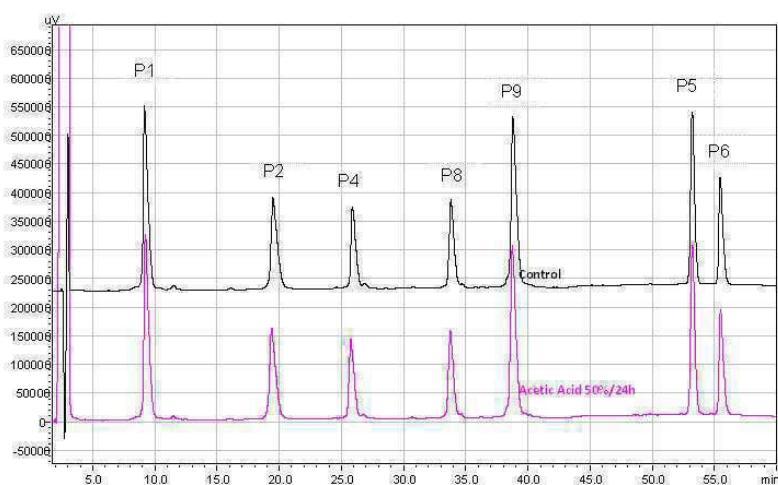
## 도면8a



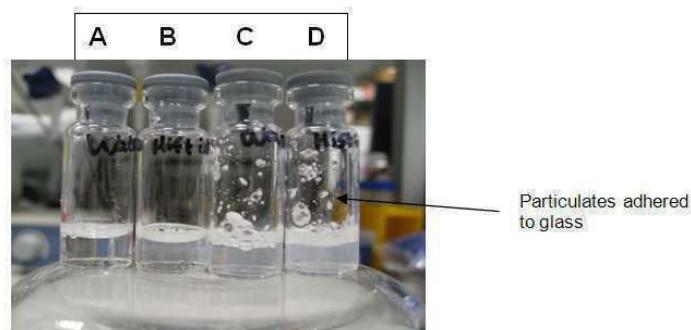
## 도면8b



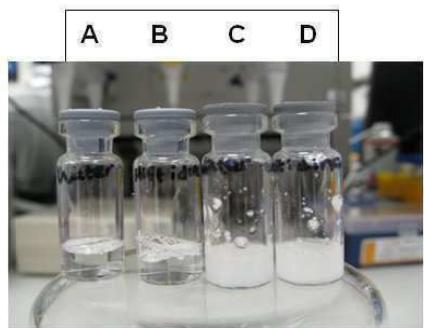
## 도면9



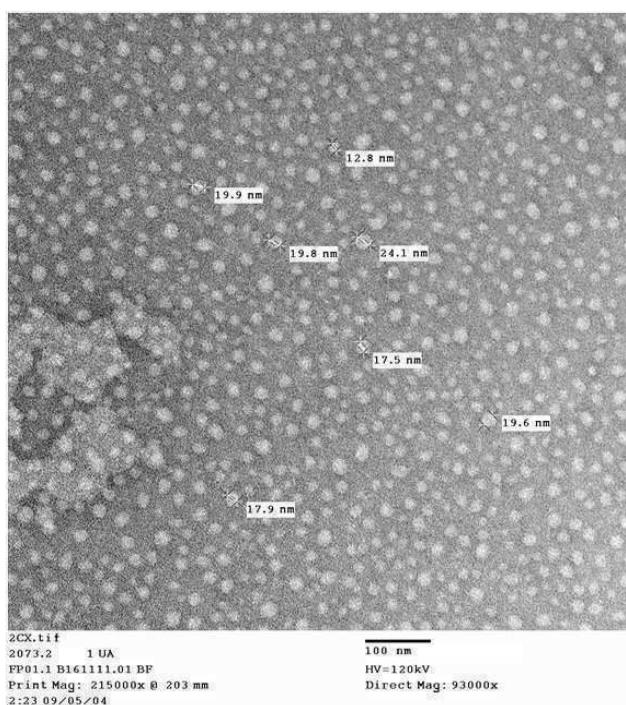
## 도면10



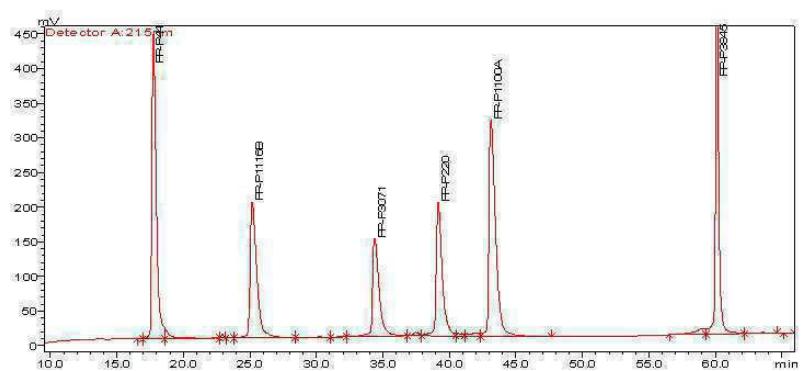
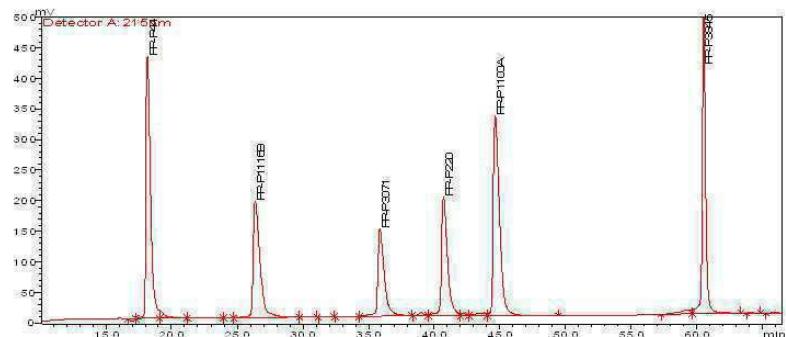
도면11



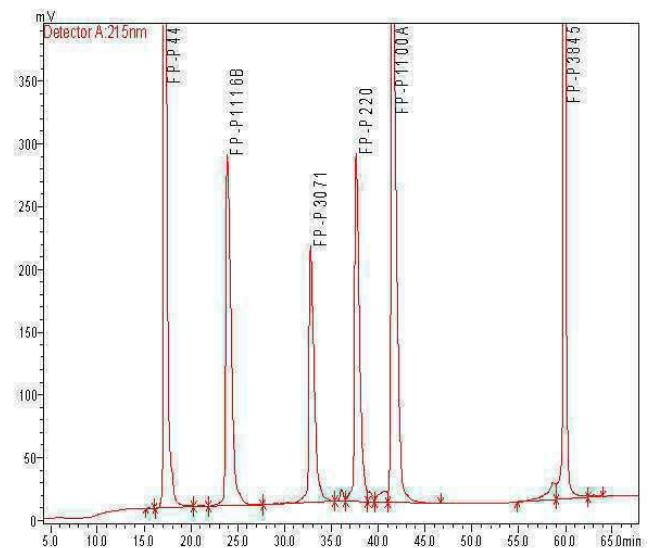
도면12



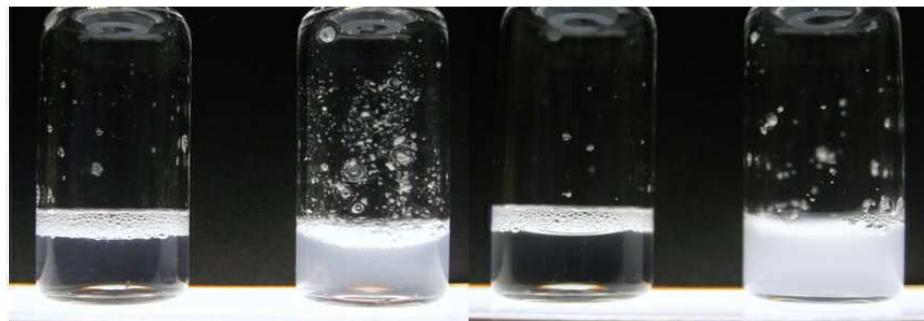
도면13



도면14



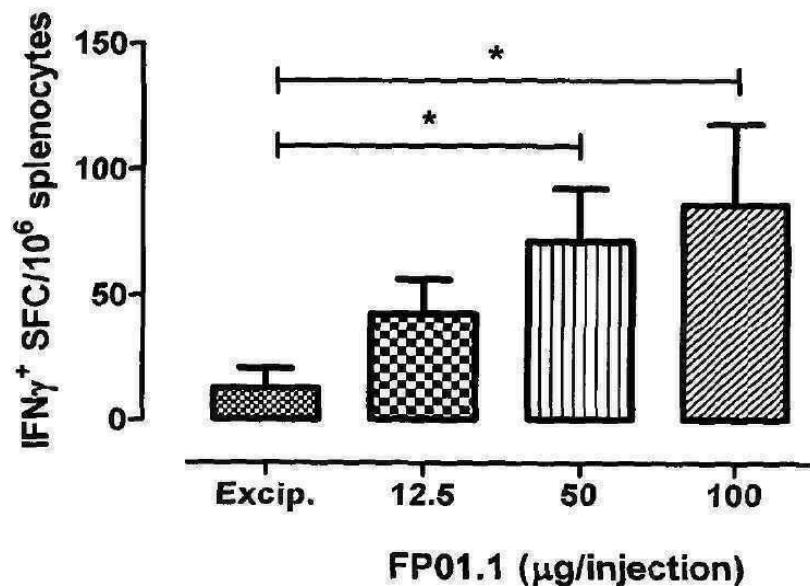
도면15



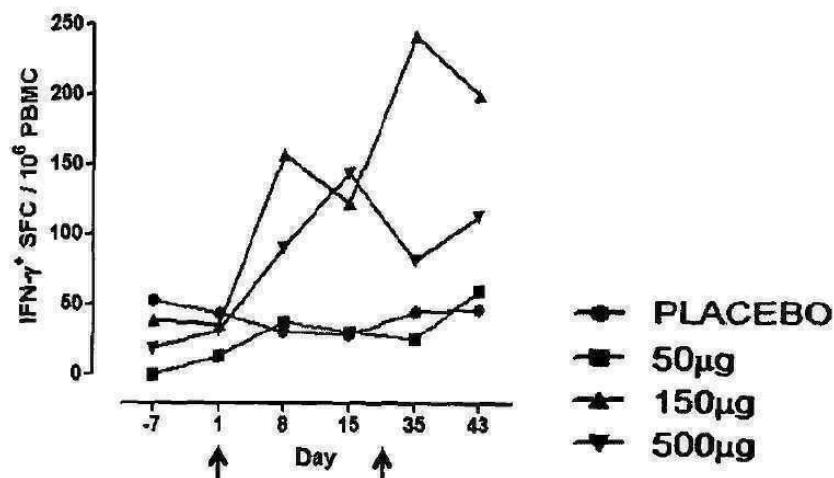
도면16



도면17



## 도면18



## 서 열 목록

- <110> Immune Targeting Systems (ITS) Ltd  
 <120> Fluorocarbon-linked peptide formulation  
 <130> N110619A  
 <150> GB 1022147.1  
 <151> 2010-12-31  
 <160> 28  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Influenza virus  
 <400> 1

His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn

1 5 10 15

Pro Ser Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr

20 25 30

Ala Asp Lys

35

- <210> 2  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Influenza virus

&lt;400&gt; 2

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu

1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu

20 25 30

Thr Gln Gly

35

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 3

Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val Leu Ser Ile

1 5 10 15

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr

20 25 30

Met Phe Glu

35

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 4

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr

1 5 10 15

Met Phe Glu Ser Lys Arg Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala Glu

20 25 30

Met Leu Ala

35

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 5

Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp

1 5 10 15

Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala

20 25 30

His Lys Ser

35

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 6

Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser

1 5 10 15

Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val Pro

20 25 30

Ser Glu Arg

35

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 7

His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys Asn

1 5 10 15

Pro Ala Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile Thr

20 25 30

Ala Asp Lys

35

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 8

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu

1 5 10 15

Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Ile Tyr Ile Glu Val Leu His Leu

20 25 30

Thr Gln Gly

35

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 9

Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe Leu

1 5 10 15

Pro Val Ser Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His Leu

20 25 30

Thr Gln Gly

35

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 10

Tyr Ile Thr Lys Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Ile Leu Ser Ile

1 5 10 15

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr

20 25 30

Met Phe Glu

35

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 11

Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly Tyr

1 5 10 15

Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala Glu

20 25 30

Met Leu Ala

35

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 12

Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp

1 5 10 15

Leu Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala

20 25 30

His Lys Ser

35

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 13

Ser Pro Gly Met Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val Leu

1 5 10 15

Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Lys Tyr Thr Lys Thr Thr

20 25 30

Tyr

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 14

Lys Lys Lys Ser Tyr Ile Asn Lys Thr Gly Thr Phe Glu Thr Ser

1 5 10 15

Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu Pro

20 25 30

Ser Phe Gly

35

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 15

Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly Ser

1 5 10 15

Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr Asn

20 25 30

Lys

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 16

Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly Val

1 5 10 15

Thr Arg Arg Glu Val His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys Ile

20 25 30

Lys Ser Glu

35

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 17

Lys His Met Ala Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Ser Gly Arg Gln Glu Lys

1 5 10 15

Asn Pro Ser Leu Arg Met Lys Trp Met Met Ala Met Lys Tyr Pro Ile

20 25 30

Thr Ala Asp Lys

35

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 18

Lys Val Ala Tyr Met Leu Glu Arg Glu Leu Val Arg Lys Thr Arg Phe

1 5 10 15

Leu Pro Val Ala Gly Gly Thr Ser Ser Val Tyr Ile Glu Val Leu His

20 25 30

Leu Thr Gln Gly

35

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 19

Lys Tyr Ile Thr Arg Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Val Leu Ser

1 5 10 15

Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly

20 25 30

Tyr Met Phe Glu

35

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 20

Lys Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly

1 5 10 15

Tyr Met Phe Glu Ser Lys Arg Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala

20 25 30

Glu Met Leu Ala

35

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 21

Lys Asp Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu

1 5 10 15

Asp Leu Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val

20 25 30

Ala His Lys Ser

35

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 22

Lys Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr Arg Pro Ile Leu

1 5 10 15

Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Thr Val

20 25 30

Pro Ser Glu Arg

35

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 23

Lys Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly

1 5 10 15

Tyr Met Phe Glu Ser Lys Ser Met Lys Leu Arg Thr Gln Ile Pro Ala

20 25 30

Glu Met Leu Ala

35

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 24

Lys Ser Pro Gly Met Met Gly Met Phe Asn Met Leu Ser Thr Val

1 5 10 15

Leu Gly Val Ser Ile Leu Asn Leu Gly Gln Lys Lys Tyr Thr Lys Thr

20 25 30

Thr Tyr

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 25

Lys Lys Lys Lys Ser Tyr Ile Asn Lys Thr Gly Thr Phe Glu Phe Thr

1 5 10 15

Ser Phe Phe Tyr Arg Tyr Gly Phe Val Ala Asn Phe Ser Met Glu Leu

20 25 30

Pro Ser Phe Gly

35

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 26

Lys Tyr Ile Thr Lys Asn Gln Pro Glu Trp Phe Arg Asn Ile Leu Ser

1 5 10 15

Ile Ala Pro Ile Met Phe Ser Asn Lys Met Ala Arg Leu Gly Lys Gly

20 25 30

Tyr Met Phe Glu

35

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 27

Lys Gln Ser Arg Met Gln Phe Ser Ser Leu Thr Val Asn Val Arg Gly

1 5 10 15

Ser Gly Met Arg Ile Leu Val Arg Gly Asn Ser Pro Val Phe Asn Tyr

20 25 30

Asn Lys

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 28

Lys Pro Asp Leu Tyr Asp Tyr Lys Glu Asn Arg Phe Ile Glu Ile Gly

1 5 10 15

Val Thr Arg Arg Glu Val His Ile Tyr Tyr Leu Glu Lys Ala Asn Lys

20 25 30

Ile Lys Ser Glu

35