(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0098370
(43) 공개일자 2022년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) *C12N 7/04* (2006.01)
C12N 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7018894
(22) 출원일자(국제) 2020년11월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년06월03일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2020/000961
(87) 국제공개번호 WO 2021/090067
국제공개일자 2021년05월14일
(30) 우선권주장
62/931,909 2019년11월07일 미국(US)

(71) 출원인
세퀴러스 유케이 리미티드
영국 버크셔 메이든헤드 마켓 스트리트 29 포인트 (우: 에스엘6 8에이에이)
(72) 발명자
대드, 크리스토퍼
미국 27540 노스캐롤라이나주 홀리 스프링스 그린 오크스 파크웨이 475
스미스, 매튜
미국 27540 노스캐롤라이나주 홀리 스프링스 그린 오크스 파크웨이 475
리디아드, 데브라
미국 27540 노스캐롤라이나주 홀리 스프링스 그린 오크스 파크웨이 475
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 71 항

(54) 발명의 명칭 **감소된 입자 크기를 가지는 바이러스 백신을 제조하기 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본원에서 개시되는 것은 특히 인플루엔자 바이러스 백신의 제조에서 사용하기 위한, 감소된 입자 크기를 가지는 바이러스 백신을 제조하는 방법 및 조성물이다.

(52) CPC특허분류
A61P 31/12 (2018.01)
A61P 31/16 (2018.01)
C12N 7/04 (2013.01)
C12N 7/06 (2013.01)
A61K 2039/5252 (2013.01)
A61K 2039/5258 (2013.01)
C12N 2760/16011 (2013.01)
C12N 2760/16111 (2013.01)
C12N 2760/16134 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

a. 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 시약이 추가적으로 염을 포함하고, 여기서 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서브-비리온의 평균 유체역학적 반경이 150 nm 내지 350 nm의 범위인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 폴리소르베이트 80인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이온계 계면활성제가 세트리모늄 브로마이드 (CTAB)를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 이온계 계면활성제가 약 1.25 g/L - 3.0 g/L, 예컨대 약 1.5 g/L, 약 2.0 g/L, 약 2.5 g/L 또는 약 3.0 g/L의 CTAB를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 0-200 mM, 예컨대 약 25 mM, 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 폴리소르베이트 80을 포함하며, 이온계 계면활성제가 CTAB를 포함하고, 염이 소듐 클로라이드 NaCl을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c의 정제하는 것이 흡착 여과를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 흡착 여과 처리량이 적어도 약 50 L/m^2, 예컨대 적어도 약 100 L/m^2, 적어도 약 150 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 300 L/m^2 또는 적어도 약 350 L/m^2인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 서브-비리온의 입자 크기가 약 500 nm 미만, 예컨대 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만 또는 약 150nm 미만인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 서브-비리온의 입자 크기가 유체역학적 반경인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 서브-비리온의 크기가 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자가 인플루엔자 바이러스로부터의 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자가 인플루엔자 바이러스 A 균주로부터의 것인 방법.

청구항 18

제4항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키기 전에 0.3 g/L인 방법.

청구항 19

제4항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0-2.2 g/L의 범위로 증가하는 것인 방법.

청구항 20

제4항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0.3 g/L, 1.4 g/L 또는 2.5 g/L인 방법.

청구항 21

제8항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 0-25 mM 범위의 NaCl 농도가 여과 처리량 증가와 연관되는 것인 방법.

청구항 22

비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하며, 여기서 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 바이러스 입자 크기의 감소 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 시약이 추가적으로 염을 포함하고, 여기서 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인 방법.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 폴리소르베이트 80을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 이온계 계면활성제가 세트리모늄 브로마이드 (CTAB)를 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 이온계 계면활성제가 약 1.25 g/L - 3.0 g/L, 예컨대 약 1.5 g/L, 약 2.0 g/L, 약 2.5 g/L 또는 약 3.0 g/L의 CTAB를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제22항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 25-200 mM, 예컨대 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 폴리소르베이트 80을 포함하며, 이온계 계면활성제가 CTAB를 포함하고, 염이 소듐 클로라이드 NaCl을 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제22항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 흡착 필터를 통하여 처리된 바이러스 입자를 여과하는 것을 추가적으로 포함하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 흡착 필터의 처리량이 적어도 약 50 L/m^2, 예컨대 적어도 약 100 L/m^2, 적어도 약 150 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 250 L/m^2, 적어도 약 300 L/m^2 또는 적어도 약 350 L/m^2인 방법.

청구항 33

제22항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자 크기가 약 500 nm 미만, 예컨대 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만 또는 약 150nm 미만인 방법.

청구항 34

제22항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자 크기가 바이러스 입자의 유체역학적 반경인 방법.

청구항 35

제22항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자 크기가 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 36

제22항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자가 인플루엔자 바이러스로부터의 것인 방법.

청구항 37

제22항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자가 인플루엔자 바이러스 A 균주로부터의 것인 방법.

청구항 38

제24항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키기 전에 0.3 g/L인 방법.

청구항 39

제24항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0-2.2 g/L의 범위로 증가하는 것인 방법.

청구항 40

제24항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0.3 g/L, 1.4 g/L 또는 2.5 g/L인 방법.

청구항 41

제28항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 0-25 mM 범위의 NaCl 농도가 여과 처리량 증가와 연관되는 것인 방법.

청구항 42

a. 세포 배양물로부터 수확된 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 인플루엔자 바이러스 정제 과정에서의 바이러스 입자 크기의 감소 방법.

청구항 43

a. 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 44

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 시약이 추가적으로 염을 포함하고, 여기서 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인 방법.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 폴리소르베이트 80을 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제42항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제42항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제42항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 25-200 mM, 예컨대 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제46항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키기 전에 0.3 g/L인 방법.

청구항 51

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0-2.2 g/L의 범위로 증가하는 것인 방법.

청구항 52

제46항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0.3 g/L, 1.4 g/L 또는 2.5 g/L인 방법.

청구항 53

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 0-25 mM 범위의 NaCl 농도가 여과 처리량 증가와 연관되는 것인 방법.

청구항 54

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하여 정제된 바이러스 단백질을 생성시키는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 염을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 55

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하여 정제된 인플루엔자 바이러스 단백질을 생성시키는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 이온계 계면활성제 및 염을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 이온계 계면활성제 및 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화

되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 56

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 알킬화제를 사용하여 정제된 바이러스 입자를 처리함으로써, 바이러스 입자를 불활성화하는 단계;

c. 이온계 계면활성제를 사용하여 불활성화된 바이러스 입자를 처리하여 불활성화된 바이러스 입자를 파열시킴으로써, 서브비리온을 생성시키는 단계; 및

d. 서브-비리온을 정제하여 정제된 인플루엔자 바이러스 단백질을 생성시키는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b 및/또는 c의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 추가적으로 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 것인, 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 57

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 CTAB, NaCl 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하는 것인, 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키기 전에 0.3 g/L인 방법.

청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0-2.2 g/L의 범위로 증가하는 것인 방법.

청구항 60

제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0.3 g/L, 1.4 g/L 또는 2.5 g/L인 방법.

청구항 61

제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 0-25 mM 범위의 NaCl 농도가 여과 처리량 증가와 연관되는 것인 방법.

청구항 62

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 1.5-2.5 g/L CTAB, 0-150 mM NaCl 및 0-2.2 g/L 폴리소르베이트 80을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하는 것인, 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 63

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 1.5-2.5 g/L 이온계 계면활성제, 0-150 mM 염 및 0-2.2 g/L 비-이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하는 것인, 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 이온계 계면활성제가 CTAB인 방법.

청구항 65

제63항 또는 제64항에 있어서, 염이 NaCl인 방법.

청구항 66

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 비-이온계 계면활성제가 폴리소르베이트 80인 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키기 전에 0.3 g/L인 방법.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0-2.2 g/L의 범위로 증가하는 것인 방법.

청구항 69

제66항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80의 농도가 파열시키는 동안 0.3 g/L, 1.4 g/L 또는 2.5 g/L인 방법.

청구항 70

제65항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 0-25 mM 범위의 NaCl 농도가 여과 처리량 증가와 연관되는 것인 방법.

청구항 71

a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

c. 서브-비리온을 정제하는 단계

를 포함하며, 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 표 1의 조건 1 내지 27로 이루어진 군에서 선택되는 양의 CTAB, NaCl 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하는 것인, 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 개시되는 것은 감소된 입자 크기를 가지는 바이러스 백신을 제조하기 위한 조성물 및 방법이다.

배 경 기 술

[0002] 바이러스 백신의 항원은 그의 병독성을 상실하도록 변형된 바이러스 (예컨대 불활성화된 바이러스)의 정제된 구

성요소 (예컨대 재조합 바이러스 단백질) 또는 단편을 포함할 수 있다. 예를 들면, 일부 인플루엔자 백신은 알킬화를 사용한 처리에 의해 비가역적으로 불활성화됨으로써 그의 바이러스 핵산 또는 단백질이 변경된 인플루엔자 바이러스를 함유한다. 항원 구성요소에 관계없이, 모든 백신은 제조 후 그것이 환자에게 투여될 수 있기 전에 광범위한 처리 및 정제에 적용되어야 한다. 정제는 종종 항원의 제조시 생성되는 원치 않는 부산물, 예를 들면 숙주 세포의 구성요소 또는 과정에 따라 첨가되는 화학물질을 제거하기 위한 크로마토그래피 및 여과 단계를 포함한다.

[0003] 일부 인플루엔자 백신은 살아있는 바이러스를 불활성화하는 것에 의해 제조된다. 바이러스는 무-병원체 난 또는 배양된 세포주에서 성장된 후 그의 숙주 세포로부터 그것이 수확 및 정제될 수 있다. 바이러스는 이후 열 또는 화학물질에 의해 불활성화될 수 있으며, 이어서 바이러스 입자가 파괴되어 더 작은 서브-비리온(sub-virion)을 형성하는 파열 단계에 적용된다. 파열 동안의 조건에 따라, 서브-비리온은 단분산성 및/또는 원하는 크기를 달성하지 못할 수도 있는데, 이는 하류의 정제 과정에 영향을 줄 수 있다. 예를 들면, 파열 동안의 염 농도는 정전기 전하의 부적정한 차폐를 제공함으로써, 서브-비리온 단위체들이 응집하여 더 큰 입자를 형성하도록 할 수 있다. 이러한 응집물은 이후 정제 컬럼을 훼손하고 필터를 오염시킴으로써, 감소된 처리량, 더 낮은 전체적 수율, 및 백신 제조 능력의 부재로 이어질 수 있다. 이에 따라, 특히 계절성 인플루엔자 백신 제조의 증대 동안, 또는 범유행 동안 필터 처리량 및 수율을 증가시킬 수 있는 개선된 방법이 요구된다.

[0004] 본 발명자들은 놀랍게도 비-이온계 계면활성제, 이온계 계면활성제 및 염으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1종의 성분을 포함하며 여기서 상기 적어도 1종의 성분은 서브-비리온의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재하는 시약을 사용하여 입자를 처리하는 것에 의해, 파열된 서브-비리온의 크기가 감소될 수 있다는 것을 발견하였다. 본 개시내용은 감소된 입자 크기를 가지는 바이러스 백신을 제조하는 데에 사용될 수 있는 방법 및 조성물을 제공한다. 본 개시내용은 또한 바이러스 입자를 파열시켜 서브-비리온을 형성시키기 위한 방법 및 조성물을 제공하며, 인플루엔자 바이러스 백신의 제조에서의 그의 용도를 고려한다.

[0005] 본 개시내용이 나타내는 바와 같이, 서브-비리온 입자의 크기는 필터 처리량과 역으로 상관된다. 따라서, 바이러스 백신 제조 동안 필터 처리량 및 수율을 증가시키기 위한 전략에는 파열시키는 것을 통하여 서브-비리온 입자 크기를 감소시키는 것, 또는 과정 내내 서브-비리온의 응집을 방지하는 이상적인 조건을 유지하는 것이 포함될 수 있다. 이는 파열시키는 단계와 연관되어 있는 조건 및 시약 (예컨대 염, 계면활성제)의 상대적인 양을 변화시키는 것을 포함하는 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 달성될 수 있다.

발명의 내용

[0006] **[발명의 개요]**

[0007] 본 개시내용은 감소된 입자 크기를 가지는 바이러스 백신을 제조하기 위한 방법 및 조성물, 그리고 바이러스 입자를 파열시켜 서브-비리온을 형성시키기 위한 방법 및 조성물을 제공하며, 인플루엔자 바이러스 백신의 제조에서의 이들의 용도를 고려한다.

[0008] 본 개시내용은 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0009] a. 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0010] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0011] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0012] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 상기 시약은 추가적으로 염을 포함하며, 여기서 상기 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 상기 서브-비리온의 평균 유체역학적 반경은 150 nm 내지 350 nm의 범위이다.

[0015] 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트(polysorbate) 80이다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 이온계 계면활성제는 세트리모늄 브로마이드

(CTAB)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이온계 계면활성제는 약 1.25 g/L - 3.0 g/L, 예컨대 약 1.5 g/L, 약 2.0 g/L, 약 2.5 g/L 또는 약 3.0 g/L의 CTAB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 0-200 mM, 예컨대 약 25 mM, 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함하며, 이온계 계면활성제는 CTAB를 포함하고, 염은 소듐 클로라이드 NaCl을 포함한다.

[0016] 방법의 일부 실시양태에서, 단계 c의 정제하는 것은 흡착 여과를 포함한다. 일부 그와 같은 실시양태에서, 흡착 여과 처리량은 적어도 약 50 L/m^2, 예컨대 적어도 약 100 L/m^2, 적어도 약 150 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 300 L/m^2 또는 적어도 약 350 L/m^2이다. 일부 다른 실시양태에서, 서브-비리온의 입자 크기는 약 500 nm 미만, 예컨대 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만 또는 약 150nm 미만이다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온의 상기 입자 크기는 유체역학적 반경이다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온의 크기는 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정된다.

[0017] 방법의 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스 A 균주로부터의 것이다.

[0018] 본 개시내용은 또한 바이러스 입자 크기의 감소 방법을 제공하며, 상기 방법은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하며, 여기서 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 시약은 추가적으로 염을 포함하고, 여기서 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 이온계 계면활성제는 세트리모늄 브로마이드 (CTAB)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이온계 계면활성제는 약 1.25 g/L - 3.0 g/L, 예컨대 약 1.5 g/L, 약 2.0 g/L, 약 2.5 g/L 또는 약 3.0 g/L의 CTAB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 25-200 mM, 예컨대 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함하며, 이온계 계면활성제는 CTAB를 포함하고, 염은 소듐 클로라이드 NaCl을 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 추가적으로 흡착 필터를 통하여 처리된 바이러스 입자를 여과하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 흡착 필터의 처리량은 적어도 약 50 L/m^2, 예컨대 적어도 약 100 L/m^2, 적어도 약 150 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 250 L/m^2, 적어도 약 300 L/m^2 또는 적어도 약 350 L/m^2이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자 크기는 약 500 nm 미만, 예컨대 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만 또는 약 150nm 미만이다. 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 입자 크기는 바이러스 입자의 유체역학적 반경이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자 크기는 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정된다.

[0021] 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스 A 균주로부터의 것이다.

[0022] 본 개시내용은 또한 인플루엔자 바이러스 정제 과정에서의 바이러스 입자 크기의 감소 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0023] a. 세포 배양물로부터 수확된 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0024] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0025] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0026] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0027] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0028] a. 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0029] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0030] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0031] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0032] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0033] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0034] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0035] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0036] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0037] 일부 실시양태에서, 상기 시약은 추가적으로 염을 포함하며, 여기서 상기 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 25-200 mM, 예컨대 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함한다.

[0039] 특정 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제 중 폴리소르베이트 80의 농도는 바이러스 입자의 불활성화 후 파열시키기 전에 0.3 g/L를 포함한다. 다른 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제 중 폴리소르베이트 80의 농도는 파열시키는 동안 0-2.2 g/L의 범위로 증가한다. 이에 따라, 파열시키는 동안의 잠재적인 폴리소르베이트 80 농도는 0.3 g/L, 1.4 g/L 및 2.5 g/L를 포함할 수 있다.

[0040] 본 개시내용은 또한 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0041] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0042] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0043] c. 서브-비리온을 정제하여 정제된 바이러스 단백질을 생성시키는 단계,

[0044] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 염을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0045] 본 개시내용은 또한 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0046] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0047] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0048] c. 서브-비리온을 정제하여 정제된 인플루엔자 바이러스 단백질을 생성시키는 단계,

[0049] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 이온계 계면활성제 및 염을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 이온계 계면활성제 및 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0050] 본 개시내용은 또한 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0051] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0052] b. 알킬화제를 사용하여 정제된 바이러스 입자를 처리함으로써, 바이러스 입자를 불활성화하는 단계;

[0053] c. 이온계 계면활성제를 사용하여 불활성화된 바이러스 입자를 처리하여 불활성화된 바이러스 입자를 파열시킴으로써, 서브비리온을 생성시키는 단계; 및

[0054] d. 서브-비리온을 정제하여 정제된 인플루엔자 바이러스 단백질을 생성시키는 단계,

[0055] 여기서 단계 b 및/또는 c의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 추가적으로 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0056] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0057] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0058] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0059] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0060] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 CTAB, NaCl 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다.

[0061] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0062] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0063] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0064] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0065] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 1.5-2.5 g/L CTAB, 0-150 mM NaCl 및 0-2.2 g/L 폴리소르베이트 80을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다.

[0066] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0067] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0068] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0069] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0070] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 1.5-2.5 g/L 이온계 계면활성제, 0-150 mM 염 및 0-2.2 g/L 비-이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 상기 이온계 계면활성제는 CTAB이다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 NaCl이다. 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1A-C: DLS에 의해 측정되었을 때의 상이한 파열 조건하에서 생성된 인플루엔자 B/빅토리아(Victoria) 계통 서브-비리온의 평균 입자 크기. CTAB, 폴리소르베이트 80 및 NaCl의 상대적인 양을 가변시켰다.

도 2A-C: DLS에 의해 측정되었을 때의 상이한 파열 조건하에서 생성된 인플루엔자 A H3N2 아형 서브-비리온의

평균 입자 크기. CTAB, 폴리소르베이트 80 및 NaCl의 상대적인 양을 가변시켰다.

도 3A-C: DLS에 의해 측정되었을 때의 상이한 파열 조건하에서 생성된 인플루엔자 A H3N2 아형 서브-비리온의 평균 입자 크기. CTAB, 폴리소르베이트 80 및 NaCl의 상대적인 양을 가변시켰다.

도 4: 서브-비리온 입자 크기의 함수로서의 서브-비리온 정제 동안의 흡착 필터의 필터 처리량. 나타낸 것은 IVR-180 및 TT1384로 지정된 H1N1 균주가다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 본 개시내용의 일부를 형성하는 첨부 도면과 함께 고려되는 하기 상세한 설명을 참조하면, 개시되는 방법 및 조성물이 더 쉽게 이해될 수 있다.

[0074] 본 문서 전체에 걸쳐, 설명은 바이러스 백신을 제조하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 개시내용이 바이러스 백신의 제조 방법과 관련된 특징 또는 실시양태를 개시하거나 청구하는 경우, 그와 같은 특징 또는 실시양태는 바이러스 백신에도 동등하게 적용가능하다. 마찬가지로, 본 개시내용이 바이러스 백신과 관련된 특징 또는 실시양태를 개시하거나 청구하는 경우, 그와 같은 특징 또는 실시양태는 바이러스 백신을 제조하기 위한 방법 또는 조성물에도 동등하게 적용가능하다. 값 범위가 표현될 때, 그것은 범위 내 임의의 특정 값을 사용하는 실시양태를 포괄한다. 또한, 범위로 설명되는 값의 언급은 그 범위 내의 각 값 및 모든 값을 포괄한다. 선행사 "약"을 사용하여 값이 개략치로 표현되는 경우, 그것은 특정 값이 또 다른 실시양태를 형성한다는 것으로 이해되게 된다. "또는"의 사용은 그의 사용에 관한 구체적인 문맥상 달리 지정되지 않는 한 "및/또는"을 의미하게 된다. 본원에서 인용되는 모든 참고문헌은 그 전체가 참조로 포함된다. 참고문헌과 명세서가 충돌하는 경우, 명세서가 우선하게 된다. 명료성을 위하여 본원에서 별도 실시양태의 맥락으로 개시되는 개시 방법 및 조성물의 소정 특징들은 단일 실시양태에서 조합으로서 제공될 수도 있다는 것을 알아야 한다. 반대로, 간결성을 위하여 단일 실시양태의 맥락으로 개시되는 개시 방법 및 조성물의 다양한 특징들이 별도로, 또는 임의의 하위-조합으로 제공될 수도 있다.

[0075] 본원에서 사용될 때, 단수 형태인 "하나"는 문맥상 분명하게 달리 지정되지 않는 한 복수 형태를 포함한다. 상세한 설명 및/또는 청구범위 중 어느 하나에서 사용되는 "포함한", "포함하다", "가지는", "가지다", "~을 동반하는"이라는 용어 또는 이들의 변형은 "포함하는"이라는 용어와 동일한 방식으로 포괄적이고자 하는 것이다. 본원에 포함되어 있는 교시에서 통상의 기술자에게 드러나는 바와 같이, 숫자 값 및 범위의 맥락에서 사용될 때의 "약" 또는 "대략"이라는 용어는 약 더하기 또는 빼기 10 %까지인, 실시양태가 예정대로 수행될 수 있도록 언급되는 값 또는 범위를 개산한 것이거나 그에 가까운 값 또는 범위를 지칭하는 것이다. 일부 실시양태에서, 약은 숫자 양의 더하기 또는 빼기 10 %를 의미한다.

[0076] "포함하다(comprise)", "가지다(have)" 및 "포함하다(include)"라는 용어들은 개방-종료형의 연결 동사이다. 이들 동사 중 1종 이상의 임의의 형태 또는 시제, 예컨대 "포함하다(comprises)", "포함하는", "가지다(has)", "가지는", "포함하다(includes)" 및 "포함한" 역시 개방-종료형이다. 예를 들어, 하나 이상의 단계들을 "포함하거나", "가지거나" 또는 "포함하는" 임의의 방법이 그 하나 이상의 단계들만을 보유하는 것으로 제한되는 것은 아니며, 다른 열거되지 않은 단계도 포괄할 수 있다. 마찬가지로, 하나 이상의 특징들을 "포함하거나", "가지거나" 또는 "포함하는" 임의의 조성물이 그 하나 이상의 특징들만을 보유하는 것으로 제한되는 것은 아니며, 다른 열거되지 않은 특징을 포괄할 수 있다. 본원에서 특정 실시양태에 관한 것을 전제로 하는 임의의 모든 예 또는 예시적인 언어 (예컨대 "예컨대")의 사용은 단순히 본 개시내용을 더 잘 조명하고자 하는 것으로, 달리 청구되는 본 개시내용의 영역에 제한을 두는 것은 아니다.

[0077] 본 개시내용은 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0078] a. 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0079] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0080] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0081] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1종의 성분을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과

적인 양으로 존재한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 상기 시약은 추가적으로 염을 포함하며, 여기서 상기 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 상기 서브-비리온의 평균 유체역학적 반경은 150 nm 내지 350 nm의 범위이다.

[0084] 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 이온계 계면활성제는 세트리모늄 브로마이드 (CTAB)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이온계 계면활성제는 약 1.25 g/L - 3.0 g/L, 예컨대 약 1.5 g/L, 약 2.0 g/L, 약 2.5 g/L 또는 약 3.0 g/L의 CTAB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 0-200 mM, 예컨대 약 25 mM, 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함하며, 이온계 계면활성제는 CTAB를 포함하고, 염은 소듐 클로라이드 NaCl을 포함한다.

[0085] 방법의 일부 실시양태에서, 단계 c의 정제하는 것은 흡착 여과를 포함한다. 일부 그와 같은 실시양태에서, 흡착 여과 처리량은 적어도 약 50 L/m^2, 예컨대 적어도 약 100 L/m^2, 적어도 약 150 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 300 L/m^2 또는 적어도 약 350 L/m^2이다. 일부 다른 실시양태에서, 서브-비리온의 입자 크기는 약 500 nm 미만, 예컨대 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만 또는 약 150nm 미만이다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온의 상기 입자 크기는 유체역학적 반경이다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온의 크기는 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정된다.

[0086] 방법의 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스 A 균주로부터의 것이다.

[0087] 본 개시내용은 또한 바이러스 입자 크기의 감소 방법을 제공하며, 상기 방법은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 1종의 성분을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것으로 포함하며, 여기서 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이온계 계면활성제는 세트리모늄 브로마이드 (CTAB)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이온계 계면활성제는 약 1.25 g/L - 3.0 g/L, 예컨대 약 1.5 g/L, 약 2.0 g/L, 약 2.5 g/L 또는 약 3.0 g/L의 CTAB를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 25-200 mM, 예컨대 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함하며, 이온계 계면활성제는 CTAB를 포함하고, 염은 소듐 클로라이드 NaCl을 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 추가적으로 흡착 필터를 통하여 처리된 바이러스 입자를 여과하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 흡착 필터의 처리량은 적어도 약 50 L/m^2, 예컨대 적어도 약 100 L/m^2, 적어도 약 150 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 250 L/m^2, 적어도 약 300 L/m^2 또는 적어도 약 350 L/m^2이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자 크기는 약 500 nm 미만, 예컨대 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만 또는 약 150nm 미만이다. 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 입자 크기는 바이러스 입자의 유체역학적 반경이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자 크기는 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정된다.

[0090] 일부 실시양태에서, 상기 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스 A 균주로부터의 것이다.

[0091] 본 개시내용은 또한 인플루엔자 바이러스 정제 과정에서의 바이러스 입자 크기의 감소 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0092] a. 세포 배양물로부터 수확된 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0093] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0094] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0095] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0096] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0097] a. 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0098] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0099] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0100] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제인 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0101] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0102] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0103] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0104] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0105] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0106] 일부 실시양태에서, 상기 시약은 추가적으로 염을 포함하며, 여기서 상기 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 소듐 클로라이드 (NaCl)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 25-200 mM, 예컨대 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함한다.

[0107] 본 개시내용은 또한 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0108] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0109] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0110] c. 서브-비리온을 정제하여 정제된 바이러스 단백질을 생성시키는 단계,

[0111] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제 및 염을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 염은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0112] 본 개시내용은 또한 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0113] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0114] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0115] c. 서브-비리온을 정제하여 정제된 인플루엔자 바이러스 단백질을 생성시키는 단계,

[0116] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 이온계 계면활성제 및 염을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 이온계 계면활성제 및 염은 바이러스 입자의 입자 크

기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0117] 본 개시내용은 또한 정제된 바이러스 단백질을 포함하여 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0118] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0119] b. 알킬화제를 사용하여 정제된 바이러스 입자를 처리함으로써, 바이러스 입자를 불활성화하는 단계;

[0120] c. 이온계 계면활성제를 사용하여 불활성화된 바이러스 입자를 처리하여 불활성화된 바이러스 입자를 파열시킴으로써, 서브비리온을 생성시키는 단계; 및

[0121] d. 서브-비리온을 정제하여 정제된 인플루엔자 바이러스 단백질을 생성시키는 단계,

[0122] 여기서 단계 b 및/또는 c의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 추가적으로 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함하고, 상기 비-이온계 계면활성제 및 이온계 계면활성제는 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0123] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0124] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0125] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0126] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0127] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 CTAB, NaCl 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다.

[0128] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0129] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0130] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0131] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0132] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 1.5-2.5 g/L CTAB, 0-150 mM NaCl 및 0-2.2 g/L 폴리소르베이트 80을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다.

[0133] 본 개시내용은 또한 서브-비리온 형태로 제제화되는 인플루엔자 바이러스 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하며:

[0134] a. MDCK 세포의 수확된 세포 배양물로부터 바이러스 입자를 정제하는 단계;

[0135] b. 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시켜 서브-비리온을 생성시키는 단계; 및

[0136] c. 서브-비리온을 정제하는 단계,

[0137] 여기서 단계 b의 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양의 1.5-2.5 g/L 이온계 계면활성제, 0-150 mM 염 및 0-2.2 g/L 비-이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다.

[0138] 일부 실시양태에서, 상기 이온계 계면활성제는 CTAB이다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 NaCl이다. 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다.

[0139] 제조 방법

[0140] 본원에서 개시되는 것은 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신의 제조 방법이다. 본원에서 사용될 때, "바이러스 백신"이라는 용어는 대상체에게 투여되었을 때 특정 질환에 대한 면역을 제공할 수 있는, 바이러스로부터 제조되는 생물학적 조제물을 지칭한다. 백신 조성물은 1종 이상 바이러스 또는 바이러스 균주 유래의 1종

이상 항원을 포함할 수 있는데, 대상체에서 면역학적 반응을 생성시키도록 하는 충분한 양의 항원(들)을 함유하게 된다. 본원에서 사용될 때, "서브-비리온 형태"라는 용어는 본 개시내용의 백신 조성물이 일반적으로 (a) 바이러스 지질 외피가 용해되거나 붕괴되어 있는 파열된 바이러스의 형태, 또는 (b) 1종 이상의 정제된 바이러스 단백질을 포함하는 서브유닛 바이러스의 형태로 제제화되게 된다는 것을 의미한다. 본원에서는, 서브-비리온을 형성시키거나 "파열시키는" 방법이 기술된다.

[0141] 배양물 중에서의 성장

[0142] 본원에서 개시되는 바이러스 백신은 난 또는 세포 배양물에서 성장된 바이러스로부터 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 바와 같은 바이러스는 특정 무-병원체 (SPF) 발육 계란(embryonated hen egg)에서 성장된 후, 난 내용물 (요막액(allantoic fluid))로부터 정제된다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 동물 세포 배양물 중에서 성장된 바이러스로부터 제조되는 바이러스 백신이 더 적은 알레르기 반응을 야기할 수 있다. 본원에서 사용되는 바이러스를 생성시키는 데에 사용될 수 있는 대표적인 동물 세포주로는 햄스터, 소, 영장류 (인간 및 원숭이 포함) 및 개 세포가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 바와 같은 바이러스는 동물 세포 배양물 중에서 성장된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 바와 같은 바이러스는 포유동물 세포 배양물 중에서 성장된다. 본원에서 사용되는 바이러스를 생성시키는 데에 사용될 수 있는 대표적인 포유동물 세포 유형에는 신장 세포, 섬유모세포, 망막 세포 및 폐 세포가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 미국 미생물 보존 센터(American Type Culture Collection) (ATCC)로부터 CCL 34로 입수가능한 원형 MDCK 세포주 또는 그의 유도 세포주들 중 어느 것이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 바이러스는 MDCK 세포 중에서 성장된다. MDCK 세포와 같은 세포주에서의 성장에 있어서, 바이러스는 현탁액 또는 부착 배양물 중 세포에서 성장될 수 있다. 한 가지 적합한 현탁 배양용 MDCK 세포주는 MDCK 33016 (DSM ACC 2219로 기탁되어 있음)이다. 적합한 세포주의 추가적인 예는 물론 세포 배양 방법을 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 WO 2007/052055호에서 찾아볼 수 있다. 세포 배양물로부터 바이러스 예컨대 인플루엔자 바이러스를 정제하는 방법에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0143] 본원에서 개시되는 방법 및 조성물은 관련 기술분야에 알려져 있는 모든 바이러스로부터 바이러스 백신을 제조하는 데에 사용될 수 있다. 대표적인 바이러스에는 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 헤르페스 바이러스, 간염 바이러스, 인간 파필로마바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 소아마비 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 광견병 바이러스, 풍진 바이러스, 두창 바이러스, 수두-대상포진 바이러스 및 황열 바이러스가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스 A 균주로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 인플루엔자 바이러스 B 균주로부터의 것이다.

[0144] 바이러스의 불활성화 및 파열

[0145] 본원에서 사용될 때, "불활성화하는 것"이라는 용어는 바이러스 구성요소의 화학적 변경 또는 표면 변경에 의해 바이러스를 불활성이고/거나, 복제할 수 없고/거나, 감염시킬 수 없게 되도록 하는 과정을 지칭한다. 인플루엔자 바이러스와 같은 바이러스를 불활성화하는 방법에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 문헌 [Budowsky et al., *Vaccine*, (1999) 9(6):398-402]; WO2011/138229호; 및 WO2011/138682호를 참조한다. 대표적인 바이러스 불활성화 방법에는 저온살균, 건조열, 증기열, 용매/세제, 알킬화제 및/또는 낮은 pH를 사용한 처리가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 알킬화제는 바이러스 단백질을 변형시킴으로써 바이러스 세포 진입 또는 바이러스 게놈의 방출을 억제할 수 있다. 알킬화제는 또한 바이러스의 단백질 캡시드를 투과하여 바이러스 핵산을 화학적으로 불활성화할 수 있다. 본원에서 사용하기 위한 바이러스를 불활성화하는 데에 사용될 수 있는 대표적인 알킬화제에는 포르말린, β-프로피오락톤 (β-PL) 및 N-아세틸-아지리딘이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 불활성화는 알킬화제를 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자의 불활성화는 β-프로피오락톤을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것에 의해 수행된다.

[0146] 본원에서 사용될 때, "파열시키는 것"이라는 용어는 감염성인지 (야생형 또는 약독화된 것) 또는 비-감염성인지 (예컨대 불활성화된 것)에 관계없이 붕괴 농도의 파열 작용제를 사용하여 온전한 바이러스를 붕괴시키거나 단편화하는 것을 지칭한다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 일반적으로 파열 작용제에는 통상적으로 친수성 헤드에 결합된 소수성 테일(tail)을 가지는 지질 멤브레인을 파괴하고 용해시킬 수 있는 작용제가 포함된다. 붕괴는 바이러스 단백질의 전체적이거나 부분적인 가용화를 초래함으로써, 바이러스의 완전성을 변경할 수 있다.

[0147] 인플루엔자 바이러스와 같은 바이러스를 파열시키는 방법에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들면 WO02/28422호, WO02/067983호, WO02/074336호, WO01/21151호 등을 참조한다. 바이러스 입자의 파열은 비-이온계 계면활성제 및/또는 이온계 (예컨대 양이온계) 계면활성제 중 1종 이상을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함할 수 있다. 본원에서 사용될 때, "계면활성제"는 2개 상 사이의 표면 장력 (또는 계면 장력)을 저하시킬 수 있는 작용제를 지칭한다. 계면활성제는 세제, 습윤제, 에멀션화제, 발포제 및 분산제로 작용할 수 있다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 계면활성제는 일반적으로 소수성의 "헤드" 및 1 또는 2개의 친수성 "테일"을 가지는 양친매성이다. 본원에서 사용될 때, "비-이온계 계면활성제"라는 용어는 그의 헤드상에 하전된 기를 가지지 않는 계면활성제를 지칭하는 반면, "이온계 계면활성제"라는 용어는 그의 헤드상에 순수 양성 (양이온성) 또는 순수 음성 (음이온계) 전하를 가지는 계면활성제를 지칭한다. 대표적인 비-이온계 계면활성제에는 알킬글리코시드, 알킬티오글리코시드, 아실 당, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 (예컨대 폴리소르베이트 20 또는 트윈 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60 또는 폴리소르베이트 80), 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올 (예컨대 트리톤(Triton) 계면활성제, 예컨대 트리톤 X-100 또는 트리톤 N101), 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴리옥시에틸렌 에스테르, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 헤카메그(Hecameg), N,N-디알킬-글루카미드 및 알킬 페녹시 폴리에톡시 에탄올이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 대표적인 이온계 계면활성제에는 술포베타인, 베타인, 사르코실, 4차 암모늄 화합물, 예컨대 CTAB (세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드), 세트리미드 (미리스틸트리메틸암모늄 브로마이드), 리포펙틴, 리포펙타민 및 DOT-MA가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0148] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자를 파열시키는 것은 비-이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 비-이온계 계면활성제는 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 약 0.2, 약 0.4, 약 0.6, 약 0.8, 약 1.0, 약 1.2, 약 1.4, 약 1.6, 약 1.8, 약 2.0, 약 2.2, 약 2.4, 약 2.6, 약 2.8 또는 약 3.0 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 적어도 약 1.0 g/L, 예컨대 적어도 약 1.5 g/L, 적어도 약 2.0 g/L 또는 적어도 약 2.5 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-이온계 계면활성제는 약 0.0 g/L - 2.2 g/L의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자를 파열시키는 것은 이온계 계면활성제를 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 이온계 계면활성제는 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드 또는 세트리모늄 브로마이드 (CTAB)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이온계 계면활성제는 약 1.25 g/L - 3.0 g/L의 CTAB, 예컨대 약 1.5-2.5 g/L, 약 2.0 g/L, 약 2.5 g/L 또는 약 3.0 g/L의 CTAB를 포함한다.

[0149] 바이러스 입자를 파열시키는 것은 또한 1종 이상의 염을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함할 수도 있다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니나, 염은 바이러스 입자 및 서브-비리온을 안정화할 수 있다. 사용될 수 있는 대표적인 염에는 소듐 클로라이드, 칼륨 클로라이드, 마그네슘 클로라이드, 칼륨 포스페이트, 칼슘 포스페이트가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자를 파열시키는 것은 염을 포함하는 시약을 사용하여 바이러스 입자를 처리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 염은 NaCl이다. 일부 실시양태에서, 염은 0-200 mM의 NaCl, 예컨대 약 25 mM, 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 125 mM, 약 150 mM 또는 약 175 mM의 NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서는, 비-이온계 계면활성제, 이온계 계면활성제 및/또는 염이 각각 바이러스 입자의 입자 크기를 감소시키는 데에 효과적인 양으로 존재한다.

[0150] 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 또한 유리하게도 매트릭스 단백질을 분해하여 서브-비리온 입자 크기를 감소시키는 효소를 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 대표적인 효소로는 프로테아제 (예컨대 프로테이나제 K, 트립신, 펩신, 엘라스타제, 트롬빈, 키모트립신, 파페인 등) 및 뉴클레아제 (예컨대 벤조나제, RNAse A, RNAse H 등)가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 또한 프로테아제를 첨가하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 프로테아제는 트립신이다. 일부 실시양태에서, 프로테아제는 프로테이나제 K이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자를 불활성화하고 파열시키는 것은 또한 뉴클레아제를 첨가하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 프로테아제는 벤조나제이다.

[0151] 파열된 비리온의 정제

[0152] 바이러스로부터 서브-비리온, 개별 단백질 또는 항원을 정제하는 방법에 대해서는 관련 기술분야 통상의 기술자에게 잘 알려져 있는데, 예를 들면 여과, 크로마토그래피, 원심분리, 한외여과 및 투석여과가 포함된다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온은 크기-배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 정제된다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온은 초원심분리에 의해 정제된다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온은 흡착 여과에 의해 정제된다. 일부 실

시양태에서, 서브-비리온은 중합체 수지를 사용한 흡착 여과에 의해 정제된다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온은 한외여과 또는 투석여과에 의해 정제된다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온은 초원심분리, 흡착 여과, 한외여과 및 투석여과 중 1종 이상에 의해 정제된다.

[0153] 예컨대 비-이온계 계면활성제, 이온계 계면활성제 및 염을 사용하는 본원에서 개시되는 방법 및 조성물은 유리하게는 계면활성제 또는 염 없이 제조되는 것과 비교하였을 때 감소된 입자 크기를 가지는 서브-비리온 형태로 제제화되는 바이러스 백신을 제조할 수 있다. 감소된 입자 크기를 가지는 바이러스 입자는 향상된 여과 처리량 및 더 높은 수율을 초래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 흡착 여과 처리량은 적어도 약 5 L/m^2, 예컨대 적어도 약 10 L/m^2, 적어도 약 15 L/m^2 또는 적어도 약 20 L/m^2이다. 본 개시내용의 대안적인 대규모 제조 실시양태에서는, 흡착 처리량이 적어도 약 50 L/m^2 내지 350 L/m^2, 예를 들면 적어도 약 50 L/m^2, 적어도 약 100 L/m^2, 적어도 약 200 L/m^2, 적어도 약 300 L/m^2 또는 적어도 약 350 L/m^2이다.

[0154] 바이러스 입자 크기를 측정하는 방법에 대해서는 관련 기술분야 통상의 기술자에게 잘 알려져 있으며, 소-각(small-angle) X-선 산란 (SAXS), 동적 광 산란 (DLS), 공명 질량 측정, 크기-배제 크로마토그래피 (SEC) 및 레이저 회절이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 액체 크로마토그래피와 같은 다른 입자 크기분석 기술들이 침습성인 샘플 조제, 시험 샘플과 상호작용하는 컬럼-수지의 바람직하지 않은 표면 화학, 또는 잠재적으로 고-차 구조를 변경할 수 있는 높은 컬럼 압력으로 인하여 적합하지 않을 수 있는 반면, DLS는 피분석물을 고-차 구조의 완전성을 훼손하지 않으면서 그의 자연 상태로 시험할 수 있는, 빠르고 비-접촉성이며 비침습성인 입자 크기분석 기술이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자 크기는 동적 광 산란 (DLS)에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 및 서브-비리온 입자 크기는 SAXS에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 및 서브-비리온 입자 크기는 공명 질량 측정에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 및 서브-비리온 입자 크기는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 입자 크기는 바이러스 입자의 유체역학적 반경 (R_H)에 의해 규정된다. 일부 실시양태에서, 입자 크기는 바이러스 입자의 회전운동(gyration) 반경 (R_G)에 의해 규정된다. 일부 실시양태에서, 서브-비리온의 입자 크기는 약 500 nm 미만, 예컨대 약 400 nm 미만, 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만 또는 약 150 nm 미만이다.

[0155] 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되는 하기의 실시예로서 본 개시내용을 추가 예시한다. 본 출원은 물론 도면 전체에서 인용되는 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원 공개의 내용은 모든 목적에 있어서 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0156] **[실시예]**

[0157] 하기 실시예들은 상기에서 개시된 개시내용의 영역에 대한 제한이 아니라 예시적인 것으로 간주되어야 한다.

[0158] **실시예 1:**

[0159] 방법: 수확된 세포 배양물로부터의 바이러스 입자의 정제

[0160] 중공 섬유 멤브레인을 사용하여 인플루엔자 바이러스를 포함하는 MCDK 세포 배양물로부터의 정화된 수확물을 농축 및 투석여과하였다. 정화된 수확물을 한외여과 탱크 (UF0)의 잔류물 용기(retentate vessel)에 충전하고, 목표 부피로 농축한 다음, 염-함유 트리스 완충제에 대하여 투석여과하였다. 투석여과 후, 잔류물을 다시 농축한 다음, 동일 완충제로 플러싱함으로써, 생성물을 회수하였다. 다음에, 생성물을 크로마토그래피 단계에서 처리함으로써, 숙주 세포 단백질 (HCP)을 제조하고, 바이러스 입자를 정제하였다. 농축 및 투석여과된 세포 수확물을 컬럼 통과 사전-평형화 필터상에 적재하였다. 유통물에서 생성물을 수집하여, 중공 섬유 멤브레인이 구비된 한외여과 탱크 (UF1)의 잔류물 용기에 첨가하였다. 생성물을 목표 부피로 농축한 다음, $MgCl_2$를 함유하는 완충제를 사용하여 일정한 부피로 투석여과하였다. 벤조나제 용액을 첨가한 다음, DNA의 분해를 가능하게 하기 위하여 한외필터를 통해 생성물을 재순환시켰다. 분해 후, 소듐 포스페이트를 사용하여 일정 부피로 이차 투석여과를 수행함으로써, 생성물을 불활성화를 위한 경량 완충제(right buffer)로 교환하였다.

[0161] 방법: 바이러스 입자의 불활성화 및 파열

[0162] UF1으로부터의 생성물에 소듐 포스페이트 중 폴리소르베이트 80 (PS80)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 인큐베이팅하였다. 다음에, b-프로피오락톤 (BPL)을 사용하여 인플루엔자 바이러스를 불활성화하였다. 간단하게 말하자면, 바이러스와 PS80 혼합물을 5 ℃로 냉각한 후, 인플루엔자 바이러스의 불활성화를 위하여 BPL을 첨가하

였다. 불활성화 후, 혼합물을 37 ℃로 가온하여 BPL을 가수분해하였다. 다음에, 하기에서 논의되는 바와 같은 PS80의 첨가에 앞서 혼합물을 실온이 되도록 하였다.

[0163] 다음에, 표 1에 나타낸 바와 같은 농도로 추가적인 PS80을 혼합물에 첨가하였다. 다음에, 표 1에 나타낸 바와 같은 농도로 소듐 클로라이드를 첨가하였다. 마지막으로, 표 1에 나타낸 바와 같은 농도로 CTAB를 첨가한 다음, 실온에서 인큐베이팅하고, 이후 초원심분리기로 옮겼다.

[0164] 방법: 서브-비리온의 정제

[0165] 가용화된 표면 항원을 연속 초원심분리에 의해 바이러스 코어로부터 분리하였다. 소듐 포스페이트를 사용하여 초원심분리기를 플러싱함으로써, 생성물 회수율을 향상시켰다. 바이러스 항원을 함유하는 유통물을 흡착 용기에 수집하였다. PS80을 첨가하여 2.5 g/L의 최종 농도를 만들었다. 다음에, 소듐 포스페이트 중 중합체 수지를 첨가하고, CTAB의 흡착이 이루어지기에 충분한 시간 동안 혼합물과 함께 인큐베이팅하였다. 인큐베이션 후, 생성물을 수지로부터 제거하여, 한외여과 전에 0.5/0.2 μm 필터를 통해 여과하였다. 흡착 필터로부터의 전체적인 생성물 회수 수율을 도 4에 나타낸 바와 같이 처리량으로서 측정하였다.

표 1: 파열시키는 데에 사용된 PS80, NaCl 및 CTAB의 농도

조건	PS80 (g/L)	NaCl (mM)	CTAB (g/L)	하기 도면에 나타냄
1	0	0	1.5	1A, 2A, 3A
2	0	0	2.0	1B, 2B, 3B
3	0	0	2.5	1C, 2C, 3C
4	0	75	1.5	1A, 2A, 3A
5	0	75	2.0	1B, 2B, 3B
6	0	75	2.5	1C, 2C, 3C
7	0	150	1.5	1A, 2A, 3A
8	0	150	2.0	1B, 2B, 3B
9	0	150	2.5	1C, 2C, 3C
10	1.1	0	1.5	1A, 2A, 3A
11	1.1	0	2.0	1B, 2B, 3B
12	1.1	0	2.5	1C, 2C, 3C
13	1.1	75	1.5	1A, 2A, 3A
14	1.1	75	2.0	1B, 2B, 3B
15	1.1	75	2.5	1C, 2C, 3C
16	1.1	150	1.5	1A, 2A, 3A
17	1.1	150	2.0	1B, 2B, 3B
18	1.1	150	2.5	1C, 2C, 3C
19	2.2	0	1.5	1A, 2A, 3A
20	2.2	0	2.0	1B, 2B, 3B
21	2.2	0	2.5	1C, 2C, 3C
22	2.2	75	1.5	1A, 2A, 3A
23	2.2	75	2.0	1B, 2B, 3B
24	2.2	75	2.5	1C, 2C, 3C
25	2.2	150	1.5	1A, 2A, 3A
26	2.2	150	2.0	1B, 2B, 3B
27	2.2	150	2.5	1C, 2C, 3C

[0166]

[0167] 결과

[0168] 하기 3종의 상이한 인플루엔자 바이러스 샘플에서 상기 방법 부문에 상술한 바와 같이 연구를 수행하였다: (1) 인플루엔자 B/빅토리아 계통 (도 1A-C에 나타냄), (2) 메인 유래 인플루엔자 A H3N2 (도 2A-C에 나타냄) 및 (3) 사우스 캐롤라이나 유래 인플루엔자 A H3N2 (도 3A-C에 나타냄). 3종 샘플에 대하여 상이한 조건에서 DLS에 의해 측정된 평균 입자 크기를 각각 도 1A-C, 2A-C 및 3A-C에 나타내었다. 오차 막대는 반복 측정의 범위를 표시한다. 도 1A-C, 2A-C 및 3A-C에 나타낸 바와 같이, 더 낮은 농도의 CTAB 및 더 높은 농도의 양 폴리소르베이트 80이 일반적으로 더 작은 입자 크기를 가지는 서브-비리온을 생성시켰다.

[0169] **실시예 2**: 동적 광 산란에 의한 입자 크기 측정

[0170] 와이어트 테크놀로지스 다이나프로 플레이트 리더(Wyatt Technologies DynaPro Plate Reader) II 기기에서 동적 광 산란 (DLS)을 사용하여 서브-비리온 형태 바이러스 입자의 입자 크기를 측정하였다. 측정 전 및 동안, 0.1 μm 아노탑(anotop) 주사기 필터를 사용하여, 또는 고정각 벤치탑 원심분리기에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원추형 튜브 중에서 샘플을 원심분리하는 것에 의해 먼지를 제거하였다. 수용액 중 0.25 mg/mL인 14 kDa 라이

소자임의 참조 표준을 기준으로 사용하였다. 샘플 및 참조 표준을 384-웰 유리저 마이크로플레이트 (그레이너(Greiner) P/N 781892) 상에 적재하고, 스윙-버킷(swinging-bucket) 원심분리기에서 2,000×g로 2분 동안 마이크로플레이트를 회전시킴으로써, 기포를 소산시켰다. 마이크로플레이트를 DLS 기기에 적재하고, 25 ℃에서 각각 25초 획득 시간(acquisition time)에서의 14 데이터 획득을 수행하였다.

[0171] 다이나믹스(DYNAMICS) 소프트웨어 패키지에 의해 데이터 분석을 수행함으로써, 가우스 큐뮬런트(Gaussian cumulant) 결과 및 규칙화된 결과로부터의 제곱-합(sum-of-square) 차이를 생성시켜 기록하였다. ≤ 57 %의 다분산도를 가지는 결과의 단일모드 분석을 생성시키기 위한 곡선-피팅 동안에는 단일 가우스 분포의 상관율을 사용하였다. 낮은 제곱-합 값 (≤ 20)을 나타내는 결과는 측정된 상관 곡선과 큐뮬런트 피팅된 곡선 사이의 합리적인 수학적 일치를 표시하였으며, 샘플이 낮은 다분산도를 가지는 단일모드, 특히 조밀한 크기 분포일 가능성이 있다는 것을 시사하였다. > 20의 SOS 및/또는 > 57 %의 % 다분산도를 나타낸 결과는 다중모드로 기록하였으며, 규칙화된 그래프로부터의 결과를 기록하였다.

[0172] 실시예 2의 결과는 필터 처리량 대 DLS 평균 입자 크기를 측정하여 비교한 도 4에 나타내었다. 나타낸 바와 같이, 입자 크기가 감소될수록, 필터를 통한 전체적인 처리량은 증가하며, 이는 증가된 수율을 초래하였다.

[0173] **실시예 3**: A/터키/터키 균주를 사용한 흡착 여과 실험

[0174] 흡착 여과 실험을 수행하였는데, A/터키(turkey)/터키/1/2005 NIBRG-23 (H5N1)을 사용하여 4종의 파열 조건을 시험하였다. 더 구체적으로, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, 시험된 파열 조건은 다양한 농도의 CTAB, NaCl 및 PS80을 사용한 흡착 여과능을 위한 것이었다.

[0175] 하기 표 3에 나타낸 바와 같이, A/터키/터키/1/2005 NIBRG-23 (H5N1)에 대한 추적 흡착 여과 실험을 수행하였다.

표 2: 파열 조건 및 여과능 결과

[0176]

여과 조건	CTAB (g/L)	NaCl (mM)	PS80 (g/L)	평균 필터 처리량 (L/m²)
1a	1.6	150	0.2	3.53
1b	1.6	150	0.2	3.87
2a	2.5	150	0.2	3.57
2b	2.5	150	0.2	4.53
3a	2.5	80	1.2	5.37
3b	2.5	80	1.2	10.9
4a	2.5	24	2.2	254
4b	2.5	24	2.2	138

[0177] 표 2의 결과는 더 높은 농도의 CTAB 및 PS80, 그리고 더 낮은 농도의 NaCl이 A/터키/터키 (H5N1) 균주에 대하여 최적의 여과 성능을 나타낸다는 것을 시사한다 (예컨대 여과 조건 4a 및 4b참조). 기존 조건에 비해 36-72배 더 우수한 처리량을 산출하는 파열 조건들이 확인되었다.

표 3: 여과능 결과

[0178]

여과 조건	CTAB (g/L)	NaCl (mM)	PS80 (g/L)	상청액 혼탁도 (NTU)	평균 필터 처리량(L/m²)	Vmax (L/m²)
1	2.5	0	2.2	15	82	104
2	2.5	25	2.2	16	76	93
3	2.5	50	2.2	22	31	36
4	2.5	75	2.2	44	12	13

[0179] 표 3의 결과는 2.5 g/L CTAB 및 2.2 g/L PS80의 일정한 농도에서, 증가하는 NaCl이 증가되는 상청액 혼탁도 및 감소되는 필터 처리량과 상관된다는 것을 시사한다. 이에 따라, 감소된 NaCl은 A/터키/터키 (H5N1) 균주에 대한 여과능의 상당한 향상을 제공하는 것으로 보인다. 일정한 CTAB (2.5 g/L) 및 일정한 PS80 (2.2 g/L)에서, 여과능 (처리량)은 NaCl이 75 mM에서 0으로 감소되었을 때 약 7-배 향상되었다.

표 4: 표 2 및 3의 여과능 결과 요약

조건	CTAB (g/L)	NaCl (mM)	PS80 (g/L)	H1 (SRD)	SP1 (SRD/ BCA)	가장 유사한 DOE 조건	웨스턴에 의한 NA	SDS-PAGE	흡착 여과 처리량 (L/m^2)
이전 권장 조건	1.6	150	0.2	571	0.83	7	희미함	일부 MP 및 NP	3.87
수율 & SP 최적	2.5	75	2.2	637	0.87	24	존재	일부 MP 및 NP	12
여과 최적	2.5	0	2.2	398	0.68	21	존재	MP 없음 및 NP 관찰	82
권장 조건	2.5	25	2.2	502	0.77	21&24, 더 큰 가능성으로 21	시험되지 않았으나, 21과 24 사이의 중간일 것으로 예측		254; 76*

[0180]

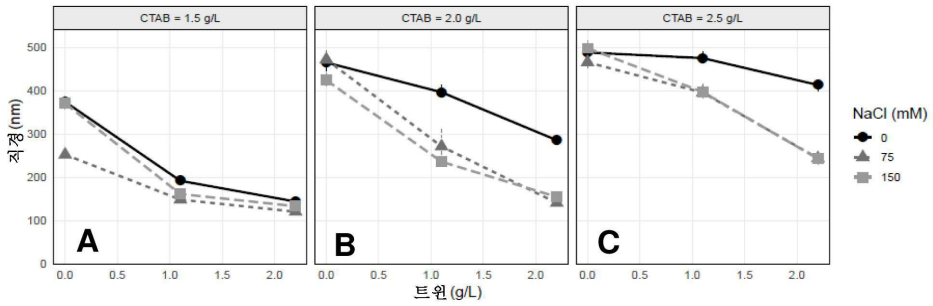
[0181] **실시예 4:**

[0182] 방법: 대규모 제조 조건하에서의 수확된 세포 배양물로부터의 바이러스 입자의 정제

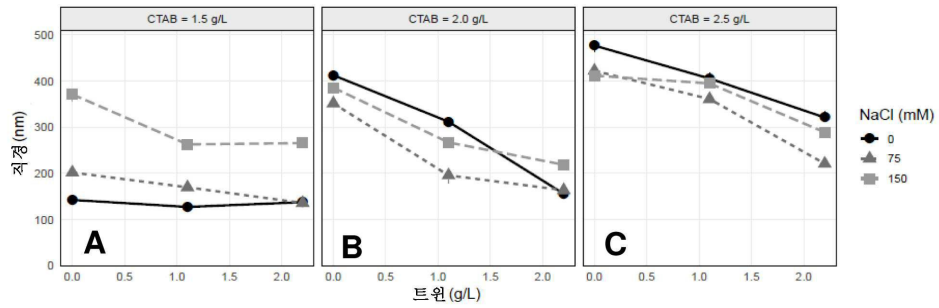
[0183] 염-함유 트리스 완충제에 대해 중공 섬유 멤브레인을 사용하여 인플루엔자 바이러스를 포함하는 MCDK 세포 배양물로부터의 정화된 수확물을 농축 및 투석여과한다. 다음에, 수확된 생성물을 추가적으로 농축하고, 동일한 완충제를 사용하여 시스템을 플러싱함으로써, 생성물을 회수한다. 이와 같은 재료를 1.2 μm 컬럼 가드 필터로 통과시키고, 정제된 온전 바이러스에의 도달을 위한 HCP의 제거를 위하여 크로마토그래피 컬럼에 적용한다. 정제된 온전 바이러스를 중공 섬유 멤브레인을 사용하여 마그네슘 함유 완충제로 농축 및 투석여과한다 (UF/DF1). 벤조나제를 첨가하여 DNA를 제거한다. 이차 투석여과를 수행하여 포스페이트 완충제로 정제된 온전 바이러스를 교환하고, 동일 완충제를 사용하여 시스템을 플러싱함으로써, 생성물을 회수한다. 2-8 ℃에서 폴리소르베이트 80 및 BPL의 존재하에 정제된 온전 바이러스를 불활성화한다. 불활성화 후, 37 ℃에서 BPL을 가수분해한다. 폴리소르베이트 80, 소듐 클로라이드 및 CTAB의 균주 특이적 첨가에 의해 바이러스 파열을 야기함으로써, 각각 1.0-2.5 g/L, 0-200 mM 및 1.25-3.0 g/L의 범위 이내로, 또는 대안적으로는 표 1에 나타낸 바와 같이 표면 항원을 가용화한다. 연속 유동 초원심분리에 의해 바이러스 코어를 제거하고, 가용성 분획을 중합체 수지와 접촉시켜 CTAB를 제거한다. 생성물 슬러리를 60 μm 메시 백으로 통과시킴으로써 수지를 제거한 다음, 0.5/0.2 μm 필터를 통하여 가용성 바이러스 표면 항원을 처리한다. 0.2 μm 필터를 통한 처리 전에, 카세트 멤브레인을 사용하여 최종 제제화 완충제로 여과된 항원을 농축 및 투석여과한다 (UF/DF2).

도면

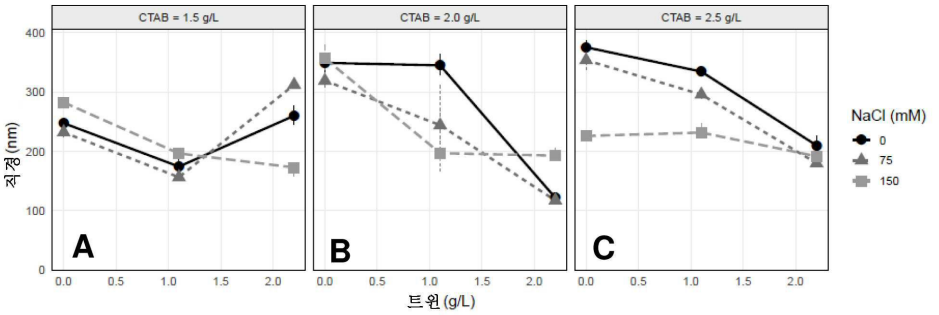
도면1



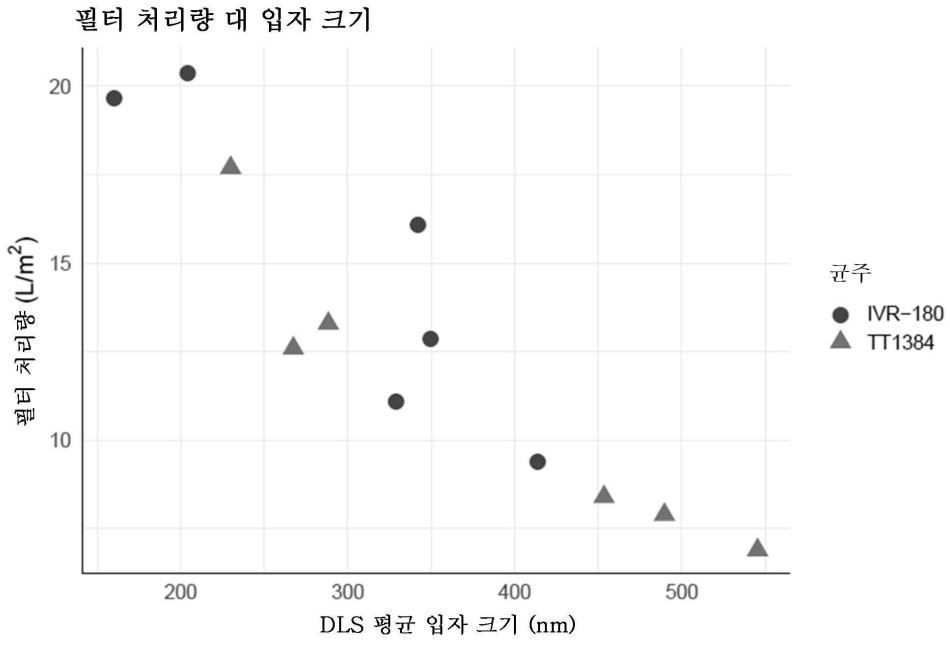
도면2


CTAB = 1.5 g/L
CTAB = 2.0 g/L
CTAB = 2.5 g/L
직경(nm)
트윈(g/L)
NaCl (mM)
0
75
150
A
B
C

도면3


CTAB = 1.5 g/L
CTAB = 2.0 g/L
CTAB = 2.5 g/L
직경(nm)
트윈(g/L)
NaCl (mM)
0
75
150
A
B
C

도면4


필터 처리량 대 입자 크기
필터 처리량 (L/m²)
DLS 평균 입자 크기 (nm)
균주
IVR-180
TT1384