



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0003662  
(43) 공개일자 2016년01월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/12* (2006.01) *A61K 35/76* (2015.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 47/22* (2006.01)  
*A61K 47/26* (2006.01) *A61K 47/42* (2006.01)  
*A61K 9/20* (2006.01) *A61K 9/50* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 39/12* (2013.01)  
*A61K 35/76* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7029550  
(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2015년10월14일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/026570  
(87) 국제공개번호 WO 2014/151855  
국제공개일자 2014년09월25일
- (30) 우선권주장  
61/784,122 2013년03월14일 미국(US)
- (71) 출원인  
다케다 백신즈 인코포레이티드  
미국 일리노이주 60015 디어필드 원 다케다 파크  
웨이  
(72) 발명자  
스틴치콤 단 티.  
미국 콜로라도주 80528 포트 콜린스 카운티 로드  
3 8409  
리벤굿 질 에이.  
미국 콜로라도주 80526 포트 콜린스 햄프셔 코트  
2348  
바르가 라즐로  
미국 콜로라도주 80525 포트 콜린스 파크 프론트  
드라이브 2520  
(74) 대리인  
특허법인태평양

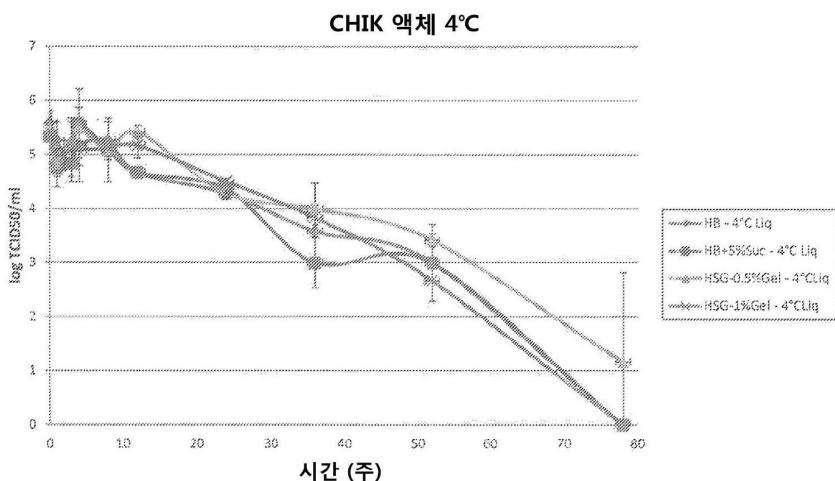
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 생 약독화 알파바이러스 제형을 위한 조성물 및 방법

### (57) 요약

본 명세서의 구현예들은 생 약독화 알파바이러스를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 구현예들에서, 생 약독화 바이러스 조성물은 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스 및 이러한 생 약독화 알파바이러스의 불활성화 및/또는 분해를 감소시키는 조성물을 포함하나, 이에 한정되지 아니한다. 다른 구현예들에서, 생 약독화 바이러스 조성물은 백신 조성물일 수 있다. 또 다른 조성물들에서, 생 약독화 알파바이러스 조성물은 HEPES 완충용액을 포함할 수 있다. 다른 구현예들에서, 위 HEPES 완충용액은 탄수화물 및 젤라틴 및/또는 염을 더 포함할 수 있다.

### 대 표 도



(52) CPC특허분류

*A61K 47/22* (2013.01)  
*A61K 47/26* (2013.01)  
*A61K 47/42* (2013.01)  
*A61K 9/20* (2013.01)  
*A61K 9/5057* (2013.01)  
*A61K 2039/5254* (2013.01)  
*C12N 2770/36134* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하나 이상의 생 약독화 알파바이러스;

1.0 내지 40.0 mM의 HEPES 완충용액;

하나 이상의 탄수화물 제제; 및

젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제;를 포함하는 생 약독화 알파바이러스 조성물로서,

상기 조성물은 생 약독화 알파바이러스 조성물을 안정화시키는 바이러스 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 생 약독화 알파바이러스는 치쿤군야 바이러스(chikungunya virus), 오니옹니옹(o'nyong'nyong) 바이러스, 로스 리버(Ross River) 바이러스, 동부마형 뇌염(eastern equine encephalitis) 및 서부마형 뇌염(western equine encephalitis), 다른 셀리키 삼림열 바이러스(Semliki Forest virus), 또는 다른 토가 바이러스 (Togavirus) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 바이러스 조성물.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 생 약독화 알파바이러스는 치쿤군야 바이러스(chikungunya virus)인 바이러스 조성물.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 수성 형태인 바이러스 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 부분적으로 또는 전체적으로 탈수된 바이러스 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 하나 이상의 탄수화물 제제는 트레할로오스, 갈락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 키토산, 소르비톨, 만니톨 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 바이러스 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 하나 이상의 탄수화물 제제는 하나 이상의 수크로오스와 트레할로스를 포함하는 바이러스 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 HEPES, 수크로오스 및 젤라틴을 포함하는 바이러스 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 젤라틴 농도는 0.01 내지 5.0%를 포함하는 바이러스 조성물.

### 청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 젤라틴 농도는 0.1 내지 2.0%를 포함하는 바이러스 조성물.

### 청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 HEPES 완충용액은 1 내지 20mM이고;

상기 탄수화물 제제의 농도는 1 내지 25%이며;

상기 젤라틴의 농도는 0.01 내지 5.0%(w/v)인 바이러스 조성물.

### 청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 HEPES 완충용액은 5 내지 15mM이고,

상기 젤라틴의 농도는 0.5 내지 1.5%인 바이러스 조성물.

### 청구항 13

청구항 1에 있어서,

10 내지 200mM의 염을 더 포함하는 바이러스 조성물.

### 청구항 14

하나 이상의 생 약독화 알파바이러스를, 0.1 내지 40.0 mM의 HEPES 완충용액; 하나 이상의 탄수화물 제제; 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제;를 포함하는 조성물과 조합하는 단계를 포함하는 약독화 된 알파바이러스 조성물의 불활성화를 감소시키는 방법으로서, 상기 조성물은 상기 생 약독화 알파바이러스 조성물의 불활성화를 감소시키는 방법.

### 청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 생 약독화 알파바이러스는 치쿤군야 바이러스(chikungunya virus), 오니옹니옹(o'nyong'nyong) 바이러스, 로스 리버(Ross River) 바이러스, 다른 셈리키 삼립열 바이러스 복합체, 동부마형 뇌염(eastern equine encephalitis) 및 서부마형 뇌염(western equine encephalitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

### 청구항 16

청구항 14에 있어서,

상기 조합물을 부분적으로 또는 전체적으로 탈수하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 17

청구항 14에 있어서,

투여 전에 상기 조성물을 부분적으로 또는 전체적으로 재-수화하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 18

청구항 14에 있어서,

상기 조성물은 수성 바이러스 조성물의 저장-수명을 향상시키는 것인 방법.

### 청구항 19

청구항 14에 있어서,

상기 HEPES 완충용액은 1 내지 20mM이고;

상기 탄수화물 제제의 농도는 1 내지 25%이며;

상기 젤라틴의 농도는 0.01 내지 5.0%(w/v)인 방법.

### 청구항 20

청구항 14에 있어서,

상기 생 약독화 알파바이러스 조성물은 건강 증상의 개시를 감소시키거나 방지하기 위하여 대상에게 투여되는 약물로서 이용되도록 제형화되는 것인 방법.

### 청구항 21

적어도 하나의 용기;

0.1 내지 40.0mM의 HEPES 완충용액; 하나 이상의 탄수화물 제제; 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제를 포함하는 조성물; 및

알파바이러스;

를 포함하는 생 약독화 알파바이러스 조성물의 불활성화를 감소시키기 위한 키트.

### 청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 생 약독화 알파바이러스는 치쿤군야 바이러스(chikungunya virus), 오니옹니옹(o'nyong'nyong) 바이러스, 로스 리버(Ross River) 바이러스, 셈리키 삼림열 바이러스 복합체, 동부마형 뇌염(eastern equine encephalitis) 및 서부마형 뇌염(western equine encephalitis) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

#### 우선권

본 PCT 출원은 2013년 3월 14일에 출원된 미국 가출원 제61/784,122호에 대해 우선권을 주장한다. 상기 가출원은 그 전체가 모든 목적을 위해 참조로서 본 명세서에 통합된다.

#### 기술분야

본 명세서의 구현예들은 생 약독화 바이러스를 안정화시키기 위한 조성물 및 방법들에 관한 것이다. 다른 구현 예들은 생 약독화 바이러스의 분해(degradation)을 감소시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 또한, 다른 구현예들은 이러한 조성물들의 간편한 적용을 위한 키트로의 이용 및 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

바이러스 감염을 방지하기 위한 백신은 인간 또는 동물의 질병의 발생을 감소시키기 위해 효과적으로 이용되어 왔다. 바이러스 백신에 대한 가장 성공적인 기술들 중 하나는 동물 또는 인간을 약화된 또는 약독화 된 바이러스주("생 약독화 바이러스")로 면역시키는 것이다. 면역화 이후의 제한된 복제로 인해, 상기 약독화 된 주는 질

병을 일으키지 않는다. 그러나 상기 제한된 바이러스 복제도 바이러스 항원의 전체 레퍼토리를 발현하기에는 충분하여, 바이러스에 대해 잠재적이고 오래 지속되는 면역 반응을 일으킨다. 그로 인해, 이후 상기 바이러스의 병원성 주에 노출되더라도, 면역된 개체는 질병으로부터 보호된다. 이러한 생 약독화 바이러스 백신은 공중 보건에 이용되는 가장 성공적인 백신들 중 하나이다.

[0006] 미국에서 판매를 위해 허가된 바이러스 백신의 대부분은 생 약독화 바이러스이다. 매우 성공적인 살아 있으면서 바이러스 백신은 황열 17D 바이러스(yellow fever 17D virus); 사빈 폴리오바이러스(Sabin poliovirus) 타입 1, 2 및 3; 홍역(measles), 이하선염(mumps), 풍진(rubella), 수두(varicella) 및 백시니아(vaccinia) 바이러스이다. 천연두의 발발을 조절하기 위한 백시니아 바이러스 백신의 이용은 처음이자 유일하게 인간의 질병을 박멸시켰다. 사빈 폴리오바이러스 백신은 전세계에 걸쳐 장애를 초래하는 질병(crippling disease)을 방지해 왔고, 소아마비를 박멸하기 위한 노력에 이용되고 있다. 홍역, 이하선염, 풍진 및 수도 백신을 이용한 아동들의 백신 접종은 국제적으로 수백만명의 죽음과 병을 방지한다.

[0007] 모기-매개 바이러스 질병인 치쿤군야 열은 최근 아프라카 및 아시아에서 다시 발생하여 수백만 건의 극심하고 종종 만성적이기까지 한 관절통(arthralgia)을 야기시켰다. 치쿤군야는 최근 카리브해 지역에서도 발생하여, 서반구로 확대되고 있음을 보였다. 이러한 질환에 대한 백신은 세계의 풍토병 지역에서 질병을 방지할 뿐만 아니라, 미국 및 아메리카 대륙의 다른 지역으로 유입될 위험을 감소시킬 것이다.

[0008] 재편성(reassortment), 역유전학(reverse genetics) 및 저온 적응(cold adaptation)과 같은 최근의 기술적인 진보는 인플루엔자 및 로타바이러스에 대한 생 약독화 바이러스를 승인하도록 하였다. 재조합 DNA 기술을 이용하여 개발된 다수의 살아 있는 바이러스 백신들이 동물 및 인간에 대해 임상 시험 중이다. 이러한 재조합 바이러스 백신은 잘 밝혀진 약독화 된 바이러스 백신의 조작에 의존한다. 안전하면서 약독화 된 바이러스는 다른 바이러스 또는 세균 병원체에 대한 보호성 항원을 발현하도록 유전적으로 조작된다.

[0009] 생 약독화 바이러스 백신이 효과를 나타내기 위해서는, 이것들이 면역된 후에 복제될 수 있어야 한다. 따라서 바이러스를 불활성화시키는 모든 요소는 백신이 제대로 기능을 못하게 만들 수 있다. 동결건조에 더하여, 생 약독화 바이러스 백신 내의 바이러스를 안정화시킬 수 있는 다양한 첨가제들이 밝혀졌다(예를 들면, Burke, Hsu 등, 1999 참고).

[0010] 보통 이용되는 다른 백신들은 극단의 온도에 민감하다; 과량의 열이나 우연한 냉동은 백신을 불활성화시킬 수 있다. 배포 시 이러한 "저온 유통체계(cold chain)"를 유지하는 것이 개발도상국에서는 특히 어렵다. 따라서 현준하거나 새롭게 개발된 생 약독화 바이러스 백신 제형 모두의 안정성을 항상시킬 필요가 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 명세서의 구현예들은 생 약독화 알파바이러스 조성물의 변질(deterioration) 또는 불활성화를 감소시키거나 방지하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 개시된 일부 조성물은 생 약독화 알파바이러스의 변질을 감소시키는 구성들의 조합을 포함할 수 있다. 본 명세서의 다른 구현예들은 생 약독화 알파바이러스의 안정성을 크게 향상시키는 부형제(excipients)의 조합에 관한 것이다. 본 명세서의 또 다른 조성물 및 방법은 더 낮은 온도(예컨대, 냉장 또는 냉동 보관)에 대한 필요성을 줄이는 반면, 수성(aqueous) 및/또는 재구성된 생 약독화 알파바이러스의 저장 수명을 향상시키는 것에 관한 것이다. 이러한 구현예들에 따르면, 생 약독화 알파바이러스 조성물은 개체 내에서 알파바이러스에 대한 면역 반응을 유도하는데 이용될 수 있고, 이러한 개체는 알파바이러스에 의해 야기되는 감염의 빈도를 낮출 수 있다.

[0012] 조성물에 관한 일부 구현예들은 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스를 HEPES 완충용액, 하나 이상의 탄수화물 및 젤라틴과 함께 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 이러한 구현예들에 따르면, 상기 조성물에는 모든 HEPES 완충용액 및 개체에 이용될 수 있는 모든 젤라틴 제품이 이용될 수 있다. 젤라틴의 공급원(source)은 포유류 기원에서 유래된 것들에서부터 합성적으로 생성된 젤라틴 형태에 이르기까지 다양할 수 있다. 상기 조성물에 이용되는 탄수화물은 수크로오스, 락토오스, 갈락토오스, 트레할로오스, 프룩토오스, 소르비톨, 텍스트로오스, 만니톨 및 다른 탄수화물 공급원을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 일부 구현예들에서는, 생 약독화 알파바이러스 조성물의 안정화를 위해 이러한 세 가지 구성들이 모두 요구된다. 다른 구현예들에서는, 상기 조성물에 염분(salinity) 또는 오스몰랄 농도(osmolality)를 제공하기 위해, 상기 조성물에

염(예컨대, 염화나트륨 또는 다른 염)이 추가될 수 있다. 일부 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 약 1 내지 40mM HEPES에서 약 pH 6.0 내지 pH 10.0로 완충된 HEPES, 하나 이상의 탄수화물 제제 약 1 내지 25% (w/v), 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제 약 0.01 내지 5.0%(w/v)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니하고, 상기 조성물은 생 약독화 알파바이러스의 불활성화 및/또는 분해(degradation)를 감소시킨다.

[0013] 본 명세서에서 의도되는 조성물은 치쿤군야 바이러스(chikungunya virus), 오니옹니옹 바이러스(o'nyong'nyong virus), 로스 리버 바이러스(Ross River virus), 동부마형 뇌염 바이러스(eastern equine encephalitis virus), 베네주엘라마형 뇌염 바이러스(Venezuelan Equine Encephalitis Virus), 서부마형 뇌염 바이러스(western equine encephalitis virus), 또는 코로나바이러스과 및 토가바이러스과의 다른 알파바이러스를 포함하거나 이에 한정되지 아니하는, 생 약독화 알파바이러스의 안정화를 향상시키고/향상시키거나 불활성화 및/또는 분해를 감소시킬 수 있다. 다른 셈리키 삼립열 바이러스 복합체들은 베바루 바이러스(Bebaru virus), 마야로 바이러스(Mayaro virus), 아류(Subtype): 우나 바이러스(Una virus), 오니옹니옹 바이러스(O'Nyong Nyong virus): 아류: 아류: 이그보-오라 바이러스(Igbo-Ora virus), 로스 리버 바이러스: 아류: 베바루 바이러스; 아류: 게타 바이러스(Getah virus); 아류: 사기야마 바이러스(Sagiyama virus), 셈리키 삼립열 바이러스: 아류: 메 트리 바이러스(Me Tri virus)를 포함하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 치쿤군야 바이러스는 약 11.6kb의 양성 센스 단일 가닥의 RNA 계놈을 가진 알파바이러스이다. 이는 셈리키 삼립열 바이러스 복합체의 일원이고, 로스 리버 바이러스, 오니옹니옹 바이러스 및 셈리키 삼립열 바이러스와 가깝게 관련되어 있다. 본 명세서에 개시된 조성물은 모든 종류의 셈리키 삼립열 바이러스 복합체에 대하여, 백신 조성물에 이용되는 생 약독화 바이러스의 안정성을 향상시키거나 분해를 감소시키는데 이용될 수 있다.

[0015] 인간 상피, 내피, 1차 섬유아세포 및 단핵구-유래 대식세포는 인 비트로에서 치쿤군야 바이러스에 관대하고, 바이러스 복제가 매우 세포변성적(cytopathic)이지만 타입 I 및 II 인터페론에 민감하다. 인 비보에서, 치쿤군야 바이러스는 섬유아세포, 골격근 전구세포 및 근섬유에서 복제되는 것으로 보인다.

[0016] 다른 구현예들은 생 약독화 바이러스 조성물 및 본 명세서에서 의도되는 하나 이상의 알파바이러스에 의해 야기되는 질병의 발생을 감소시키거나 방지할 수 있는 백신 또는 면역성 조성물에 관한 방법에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 약학적 조성물은 인간, 길들여진 동물이나 가축과 같은 동물 등의 개체에 주입하기 위해 제조 또는 제형화되는 조성물에 관한 것이다.

[0017] 일부 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 부분적으로 또는 전체적으로 탈수 또는 수화될 수 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 조성물은 생 약독화 알파바이러스 조성물의 동결 건조 동안 및 동결 건조 후에 이용될 수 있다. 이러한 구현예들에 따르면, 조성물은 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상, 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 90% 또는 95% 이상 탈수될 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물은 수성 또는 재수화된 생 약독화 알파바이러스의 저장 수명을 향상시킬 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물은 생 약독화 알파바이러스의 안정성을 실온, 영하의 온도, 동결건조 또는 액체/냉동 조건 아래에서 상승된 온도(예컨대, -80°C 내지 37°C 및 그 이상)과 같은 넓은 범위의 온도에서 향상시킨다. 일부 구현예들에서는, 본 명세서에 개시된 조성물들이 적어도 HEPES 완충용액, 탄수화물 및 젤라틴에 노출되지 않은 살아 있으면서 약독화된 바이러스들 보다, 생 약독화 알파바이러스의 안정성을 2배, 4배, 10배 또는 그 이상 향상시킬 수 있다.

[0018] 다른 구현예들은 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스를, 하나 이상의 단백질 제제; 하나 이상의 당류 또는 폴리올 제제; 및 하나 이상의 완충용액을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 생 약독화 바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있는 조성물과 조합하는 단계를 포함하나 이에 한정되지 아니하는, 생 약독화 알파바이러스의 불활성화를 감소시키는 방법에 관한 것으로서, 상기 조성물을 상기 살아있는 약독화 된 바이러스의 불활성화를 감소시킨다. 이러한 구현예들에 따르면, 상기 생 약독화 바이러스는 토가바이러스 또는 코로나바이러스, 또는 일부 구현예들에서는 모든 알파바이러스를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0019] 일부 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 실온(예컨대, 약 20°C 내지 25°C 또는 심지어 37°C만큼 높은 온도) 또는 냉장 온도(예컨대, 약 0°C 내지 약 10°C)에서 12 내지 24시간 이상, 수화된 생 약독화 알파바이러스의 불활성화 및/또는 분해를 감소시킬 수 있다. 일부 구현예들에서는, 조합 조성물이 상기 생 약독화 알파바이러스를 24시간 이상 동안 약 100% 유지할 수 있다. 게다가, 본 명세서에서 의도되는 조합 조성물은 적어도 2회의 냉동 및 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회 및 그 이상의 해동 사이를 동안 수화된 생 약독화 바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있다. 다른 방법들은 냉장 온도(예컨대 약 0°C 내지 약 10°C)에서 24시간 내지 50일 동안 수화된 생 약독화 바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있는 조합 조성물에 관한 것이다.

이러한 방법들에서 의도되는 조성물들은 완충용액, HEPES 완충용액, 수크로오스 또는 트레할로오스와 같은 하나 이상의 탄수화물, 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제를 포함하나, 이에 한정되지 아니한다. 일부 구현예들에서는, 상기 생 약독화 바이러스 조성물이 약 37°C에서 20시간 이상 경과 후 약 100%의 바이러스 역가를, 4°C 근처의 냉장 온도에서 50일 경과 후 약 100% 바이러스 역가를 유지한다. 본 명세서의 다른 구현예들은 약 21°C에서 7일 경과 후 약 90% 또는 약 80%의 바이러스 역가를, 4°C 근처의 냉장 온도에서 50일 경과 후 약 90% 또는 약 80%의 바이러스 역가를 유지하는 생 약독화 알파바이러스 조성물을 포함할 수 있다. 의도되는 다른 구현예들은 본 기술분야에 알려진 다른 조성물과 비교하여 약 37°C에서 수 시간(예컨대, 20시간) 경과 후 약 3x 내지 약 10x의 농도의 바이러스 역가를 유지하는 생 약독화 바이러스 조성물을 포함한다(예를 들면, 도 3 및 도 4 참고). 본 명세서에 개시된 조성물은 상기 조성물이 약 37°C에서 보관될 때 생 약독화 바이러스의 분해를 감소시킨다.

[0020] 다른 구현예들은 용기; 및 약 1 내지 30 mM HEPES에서 약 pH 6.0 내지 pH 10.0로 완충된 HEPES, 하나 이상의 탄수화물 제제(예컨대, 수크로오스 및/또는 트레할로오스) 약 1 내지 25% (w/v), 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제 약 0.01 내지 5.0%(w/v)를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 아니하는 조성물;을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니하는, 생 약독화 바이러스 조성물의 불활성화를 감소시키는 키트에 관한 것으로서, 상기 조성물은 생 약독화 알파바이러스의 불활성화 및/또는 분해(degradation)를 감소시킨다. 이러한 구현예들에 따르면, 키트는 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스를 더 포함할 수 있다. 다른 구현예들에서는, 키트가 염 또는 염 용액(예컨대, 염화나트륨)을 더 포함할 수 있다.

[0021] 다른 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 다가 양이온을 미량으로 포함되거나 또는 전혀 포함되지 않을 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 칼슘/마그네슘( $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ )을 미량으로 포함되거나 또는 전혀 포함되지 않을 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0022] 하기 도면들은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 명세서의 특별한 구현예의 일부 측면을 추가로 설명하기 위해 포함된다. 상기 구현예들은 이를 도면 하나 이상과 본 명세서에서 제공된 상세한 설명을 조합하여 참조함으로써 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1은 37°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 다양한 조성물들을 이용한 실험의 예시적인 막대 그래프(histogram)를 나타낸다.

도 2는 4°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 서로 다른 탄수화물 제제를 갖는 조성물들을 이용한 실험의 예시적인 막대 그래프를 나타낸다.

도 3은 37°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 다양한 조성물들을 이용한 실험의 예시적인 막대 그래프를 나타낸다.

도 4는 37°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 다양한 조성물들을 이용한 실험의 예시적인 막대 그래프를 나타낸다.

도 5는 4°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 다양한 액체 조성물들을 이용한 실험의 결과를 도식화한 예시적인 그래프를 나타낸다.

도 6은 -80°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 다양한 액체 조성물들을 이용한 실험의 결과를 도식화한 예시적인 그래프를 나타낸다.

도 7은 4°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 다양한 동결건조된 조성물을 이용한 실험의 결과를 도식화한 예시적인 그래프를 나타낸다.

도 8은 -80°C에서 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 다양한 동결건조된 조성물을 이용한 실험의 결과를 도식화한 예시적인 그래프를 나타낸다.

도 9는 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 서로 다른 젤라틴 제형을 갖는 다양한 조성물들을 이용한 실험의 예시적인 막대 그래프를 나타낸다.

도 10은 농동-해동 처리 후의 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 서로 다른

겔라틴 제형을 갖는 다양한 조성물들을 이용한 실험의 예시적인 막대 그래프를 나타낸다.

도 11은 동결건조 후의 예시적인 약독화 된 알파바이러스 조성물들의 안정성을 시험하기 위해 서로 다른 젤라틴 제형을 갖는 다양한 조성물들을 이용한 실험의 예시적인 막대 그래프를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0023] 정의

명세서에서 이용된 "한" 또는 "하나"는 한 아이템의 하나 이상을 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 "약"은 ±5% 까지를 포함할 수 있으며, 예를 들면 약 100은 95 및 105까지를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 "탄수화물" 제제는 하나 이상의 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 갈락토오스, 리보오스, 만노오스, 람노오스, 탈로오스, 자일로오스 또는 알로오스 아라비노오스), 하나 이상의 디사카라이드(예컨대, 트레할로오스, 수크로오스, 말토오스, 이소말토오스, 셀리바이오스, 젠티오바이오스, 라미나리보오스, 자일로바이오스, 만노바이오스, 락토오스 또는 프룩토오스), 트리사카라이드(예컨대, 아카르보오스, 라페노오스, 멜리지토오스, 판노오스 또는 셀로트리오스) 또는 당 폴리머(예컨대, 엑스트란, 잔탄, 풀루란, 시클로엑스트란, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 녹말, 셀로올리고사카라이드, 셀룰로오스, 말토올리고사카라이드, 글리코겐, 키토산 또는 키틴)를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 CHIKV는 치쿤군야 바이러스를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 TCID<sub>50</sub>은 50% 조직배양감염량을 의미할 수 있다

본 명세서에서 이용된 HB는 HEPES 완충용액 식염수를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 HBS는 HEPES 완충용액 식염수+수크로오스를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 HSG는 HEPES 완충용액 식염수+수크로오스+겔라틴을 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 IRES는 내부리보솜유입점을 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 DMEM은 둘베코의 수정 최소 필수 배지를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 사용된 MCT는 마이크로원심분리기 튜브를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 PBS은 인산염 완충용액 식염수를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 FBS는 소 태아 혈청을 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 Pre-MVS는 프리-마스터 바이러스 시드(Pre-Master Virus Seed)를 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 Lyo는 기준 제형에 따라 동결건조된 또는 탈수된 것을 의미할 수 있다.

본 명세서에서 이용된 젤라틴은 다양한 동물 부산물 또는 다른 것들에서 얻어진 콜라겐으로부터 유래된 반투명한, 무색의, 잘 부러지는(건조할 때), 풍미 없는 고체 물질일 수 있다. 이것은 일반적으로 젤화제로 이용되고, 상업적으로 입수가능하다. 상업적으로 입수 가능하고, 분리되거나 합성의 모든 젤라틴 제제가 본 명세서에서 의도된다.

본 명세서에서 이용된 "약독화 된 바이러스"는 동물에 투여되었을 때 질병의 임상적 증상이 없거나 감소되었음을 보여주는 바이러스를 의미할 수 있다.

#### [0041] 상세한 설명

하기 섹션에서는 다양한 구현예를 상술하기 위하여 다양한 예시적인 조성물 및 방법이 설명된다. 본 명세서에서 약술한 특정 세부 사항의 일부 또는 짐작어 전부는 이러한 다양한 구현예를 실시할 때 반드시 적용하여야 하는 것이 아니며, 농도, 시간 및 다른 특정 세부 사항들은 일상적인 실험을 통해 변경될 수 있음이 당업자에게는 자명할 것이다. 어떤 경우, 잘 알려진 방법 또는 구성이 설명에 포함되어 있지 않을 수 있다.

본 명세서에 개시된 일부 구현예들에서 알파바이러스 백신의 안정성이 평가되었다. 일부 구현예들에는, 액체,

동결, 동결건조 및 재탈수된 생 약독화 알파바이러스 제형의 역가의 손실에 대해 현저한 보호 효과를 부여하는 제형이 나타나 있다. 일부 구현예들에서, 본 명세서에 개시된 조성물은 HEPES 완충용액, 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제 및 하나 이상의 탄수화물 제제의 구성들 중, 두 가지 이상 또는 세 가지 모두의 조합에 관한 것이다. 일부 구현예들에서는, 본 명세서에 개시된 조성물(예컨대, 약학적 수준 또는 개체에 투여될 수 있는 수준)이 HEPES 완충용액, 수크로오스 또는 트레할로오스 중 적어도 하나를 포함하는 탄수화물 및 모든 공급원에서 유래한 젤라틴에 알파바이러스를 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 일부 조성물들은 염 또는 염 용액을 포함한다. 이러한 제형들은 약 -80°C 내지 약 37°C에서 생 약독화 알파바이러스의 액체, 동결 또는 동결건조된 저장 또는 CHIK 백신의 현저한 손실 없는 저장에 이용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 제형의 경우에는 4°C에서의 장기간 저장 또한 가능하다.

[0044] 본 명세서에 개시된 구현예들은 생 약독화 알파바이러스 조성물의 변질 또는 불활성화를 감소 또는 방지하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 명세서에 개시된 일부 조성물들은 생 약독화 바이러스의 변질을 감소시키는 구성들의 조합을 포함할 수 있다. 본 명세서의 다른 구현예들은 생 약독화 바이러스의 안정성을 크게 향상시킬 수 있는 부형제들의 조합에 관한 것이다. 본 명세서의 또 다른 조성물 및 방법은 더 낮은 온도(예컨대, 냉장 또는 냉동 보관)에 대한 필요성을 줄이는 반면, 수성(aqueous) 및/또는 재구성된 생 약독화 알파바이러스의 저장 수명을 향상시키는 것에 관한 것이다.

[0045] 이러한 구현예들에 따르면, 일부 생 약독화 바이러스는 알파바이러스에 관한 것이다. 조성물에 관한 일부 구현예들은 HEPES 완충용액, 하나 이상의 탄수화물 및/또는 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제와 함께 조합되는 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스와 같이, 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 일부 구현예들에서는, 본 명세서에 개시된 알파바이러스 제형이 적어도 3 가지 구성을 모두 포함한다. 다른 구현예들에서는, 상기 제형의 완충 능력을 향상시키기 위해 염이 추가될 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 의도되는 조성물은 치쿤군야 바이러스, 오니옹니옹 바이러스, 로스 리버 바이러스, 동부마형 뇌염 바이러스, 베네주엘라마형 뇌염 바이러스, 서부마형 뇌염 바이러스, 또는 코로나바이러스과 및 토가바이러스과의 다른 알파바이러스를 포함하나 이에 한정되지 아니하는, 생 약독화 알파바이러스의 안정화를 향상시키고/향상시키거나 불활성화 및/또는 분해를 감소시킬 수 있다.

[0047] 다른 구현예들은 생 약독화 바이러스 조성물 및 본 명세서에서 의도되는 하나 이상의 알파바이러스에 의해 야기되는 질병의 발생을 감소시키거나 방지할 수 있는 백신 조성물에 관한 방법에 관한 것이다. 일부 구현예들에서, 생 약독화 알파바이러스는 모기 내에서 복제될 수 있는 것이다. 다른 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 생 약독화 알파바이러스가 진핵세포적인 조절 하에 있도록 조작(예컨대, IRES 서열의 삽입)된다.

[0048] 일부 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 부분적으로 또는 전체적으로 탈수화 또는 수화될 수 있다. 다른 구현예들에서는, 본 명세서의 조성물에서 이용되는 것으로 의도되는 탄수화물 제제가 수크로오스, 프룩토오스, 갈락토오스 및 트레할로오스를 포함하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0049] 일부 구현예들에서는, HEPES 완충용액이 약 1mM 내지 약 40mM이고; 탄수화물 농도가 약 1 내지 약 25%(w/v)이며; 젤라틴이 약 0.01% 내지 약 5%이다. 다른 구현예들에서는, HEPES 완충용액이 약 1mM 내지 약 20mM이고; 탄수화물 농도가 약 5 내지 약 20%(w/v)이며; 젤라틴이 약 0.1% 내지 약 2%이다. 또 다른 구현예들에서는, HEPES 완충용액이 약 5mM 내지 약 15mM이고; 탄수화물 농도가 약 5 내지 약 25%(w/v)이며; 젤라틴이 약 0.5% 내지 약 1.5%이다. 일부 구현예들에서는, 제형들이 10-150mM의 염(예컨대, 염화나트륨 또는 본 기술분야에서 알려진 다른 적절한 염)을 더 포함할 수 있다. 본 명세서의 일부 조성물에서는 다른 완충제들이 상기와 같은 3 가지 필수 구성들과 조합되어 이용될 수 있다.

[0050] 본 명세서의 일부 구현예들은 부분적으로 또는 전체적으로 탈수된 생 약독화 알파바이러스 조성물에 관한 것이다. 이러한 구현예들에 따르면, 조상물은 20% 이상; 30% 이상; 40% 이상; 50% 이상; 60% 이상; 70% 이상; 80% 이상; 또는 90% 이상 탈수될 수 있다. 또 다른 구현예들에서는, 본 명세서에 개시된 조성물이 완전히 동결건조된 조성물일 수 있다.

[0051] 다른 구현예들은 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스를, 하나 이상의 단백질 제제; 하나 이상의 탄수화물, 사카라이드 또는 폴리올 제제; 및 HEPE 완충용액;을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 생 약독화 알파바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있는 조성물과 조합하는 단계를 포함하나 이에 한정되지 아니하는, 생 약독화 알파바이러스의 불활성화를 감소시키는 방법에 관한 것으로서, 상기 조성물은 상기 생 약독화 알파바이러스의 불활성화를 감소시킨다. 이러한 구현예들에 따르면, 상기 생 약독화 바이러스는 CHIK에 관련된 것들과 같은 특별한 알파

바이러스(예컨대, 셈리키 삼립열 복합체 바이러스)를 포함할 수 있다.

[0052] 추가적으로, 본 명세서에 개시된 방법들 및 조성물들은 상기 조합물을 위한 동결건조 또는 다른 탈수 방법을 포함할 수 있다. 이러한 방법들 및 조성물들에 따르면, 상기 방법들 및 조성물들은 상기 동결건조된, 또는 부분적으로 또는 전체적으로 탈수된 생 약독화 바이러스의 불활성화를 감소시킨다. 다른 방법들에서는, 생 약독화 바이러스의 불활성화를 감소시키는 조성물이 수성의 조성물일 수 있고, 탈수 후에 재수화된 조성물을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 설명된 조성물은 수성 또는 재수화된 생 약독화 알파바이러스의 저장 수명을 향상시킬 수 있다.

[0053] 일부 구현예들에서, 본 명세서에서 의도되는 조성물은 실온(예컨대, 약 20°C 내지 25°C 또는 심지어 37°C만큼 높은 온도) 또는 냉장 온도(예컨대, 약 0°C 내지 약 10°C)에서 12 내지 24시간 이상, 수화된 생 약독화 알파바이러스의 불활성화 및/또는 분해를 감소시킬 수 있다. 일부 구현예들에서는, 조합 조성물이 상기 생 약독화 알파바이러스를 24시간 이상 동안 약 100% 유지할 수 있다. 게다가, 본 명세서에서 의도되는 조합 조성물은 적어도 2회의 냉동 및 해동 사이클(또는 3회, 4회 또는 5회 이상) 동안 수화된 생 약독화 바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있다. 다른 방법들은 냉장 온도(예컨대 약 0°C 내지 약 10°C)에서 24시간 내지 50일 이상의 기간 동안 수화된 생 약독화 바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있는 조합 조성물에 관한 것이다. 이러한 방법들에서 의도되는 조성물은 완충용액, HEPES 완충용액, 수크로오스 또는 트레할로오스와 같은 하나 이상의 탄수화물, 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제를 포함하나, 이에 한정되지 아니한다. 일부 구현예들에서는, 상기 생 약독화 바이러스 조성물이 약 37°C에서 20시간 이상 경과 후 약 100%의 바이러스 역가를, 4°C 근처의 냉장 온도에서 50일 경과 후 약 100% 바이러스 역가를 유지한다. 본 발명의 다른 구현예들은 약 21°C에서 7일 경과 후 약 90% 또는 약 80%의 바이러스 역가를, 4°C 근처의 냉장 온도에서 50일 경과 후 약 90% 또는 약 80%의 바이러스 역가를 유지하는 생 약독화 알파바이러스 조성물을 포함할 수 있다. 의도되는 다른 구현예들은 본 기술 분야에 알려진 다른 조성물과 비교하여 약 37°C에서 수 시간(예컨대, 20시간) 경과 후 약 3x 내지 약 10x의 농도의 바이러스 역가를 유지하는 생 약독화 바이러스 조성물을 포함한다(실시예 부분 참고). 본 명세서에 개시된 조성물은 상기 조성물이 약 37°C 뿐만 아니라 다른 온도에서 보관될 때 생 약독화 바이러스의 분해를 감소시킨다.

[0054] 다른 구현예들은 용기; 및 약 pH 6.0 내지 pH 10.0로 완충된 HEPES, 하나 이상의 탄수화물 제제(예컨대, 수크로오스 및/또는 트로할로오스), 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 아니하는 조성물;을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 아니하는, 생 약독화 바이러스 조성물의 불활성화를 감소시키는 키트에 관한 것으로서, 상기 조성물은 생 약독화 알파바이러스의 불활성화 및/또는 분해(degradation)를 감소시킨다. 이러한 구현예들에 따르면, 키트는 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스를 더 포함할 수 있다. 이러한 구현예들에 따르면, 키트는 약 1 내지 40 mM HEPES에서 약 pH 6.0 내지 pH 10.0로 완충된 HEPES, 하나 이상의 탄수화물 제제(예컨대, 수크로오스 및/또는 트로할로오스) 약 1 내지 25% (w/v), 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질 제제 약 0.01 내지 5.0% (w/v)를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 아니하는 조성물;을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 아니하고, 상기 조성물은 생 약독화 알파바이러스의 불활성화 및/또는 분해를 감소시킨다.

[0055] 다른 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 다가 양이온을 미량으로 포함하거나 또는 전혀 포함하지 않을 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 의도되는 조성물이 칼슘/마그네슘( $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ )을 미량으로 포함하거나 또는 전혀 포함하지 않을 수 있다.

[0056] 생 약독화 알파바이러스 백신에 대하여, 2~8°C 이상의 온도에서 동결건조된 제형의 장기 안정성을 제공하는 제형은 알려져 있지 않다. 그리고 수 시간 이상 동안 수성 백신의 역가 손실을 방지하고 분해를 안정화 또는 감소시키는 제형은 알려져 있지 않다.

[0057] 다른 생 약독화 바이러스에 대한 제형 또한 알려져 있다(예를 들면 Burke, Hsu 등 1999 참고). SPGA라고 일컬어지는 일반 안정화제는 2 내지 10%의 수크로오스, 인산염(phosphate), 글루탐산 칼륨(potassium glutamate) 및 0.5 내지 2%의 혈청 알부민의 혼합물이다(예를 들어, Bovarnick, Miller 등 1950 참고). 이러한 기본 제형에, 다른 양이온을 이용하고, 수크로오스를 녹말 가수분해물 또는 텍스트란로 대체하고, 혈청 알부민을 카제인 가수분해물 또는 폴리비닐피롤리돈으로 대체한, 다양한 변형물들이 알려져 있다. 다른 제형들은 단백질 공급원으로 혈청 알부민 대신 가수분해 된 젤란틴을 이용한다(Burke, Hsu 등 1999 참고). 그러나 젤란틴은 면역화된 아동에게서 알리지 반응을 유발할 수 있고, 백신-관련 부작용의 원인이 될 수도 있다. 미국 특허 제6,210,680호는 백신 제형에서 인간 혈청에서 분리된 알부민을 제조한 인간 혈청 알부민으로 대체하는 것을 설명하고 있다.

[0058] 본 명세서의 구현예들은 종래 기술의 조성물들에 비해, 생 약독화 바이러스 백신의 안정성을 향상시키고/향상시키거나 변질을 감소시키는 조성물을 개시한다. 본 명세서에 개시된 일부 조성물들은 약 37°C에서 2시간까지; 3시간까지; 4시간까지 및 21시간 이상 동안 수성의 바이러스의 안정성을 제공한다. 본 명세서에 개시된 일부 조성물들은 약 실온(예컨대 25°C)에서 1일 내지 약 1주일 이상까지 수성의 바이러스의 안정성을 제공한다. 본 명세서에서 의도되는 구현예들은 예를 들어 동결 및/또는 해동, 및/또는 상승된 온도로부터 생 약독화 바이러스의 증가된 보호를 제공한다. 일부 구현예들에서는, 본 명세서의 조성물들이 실온 조건(예컨대, 약 25°C)에서 탈수된 생 약독화 바이러스 제품을 안정화시키고/안정화시키거나, 분해를 감소시키고/감소시키거나 불활성화를 방지할 수 있다. 다른 구현예들에서는, 본 명세서에서 의도되는 조성물들이 약 25°C 또는 약 37°C까지의 온도에서 수성의 생 약독화 바이러스 제품을 안정화시키고/안정화시키거나, 분해를 감소시키고/감소시키거나 불활성화를 방지할 수 있다. 본 명세서에 개시된 조성물들 및 방법들은 선진국 및 후진국 지역에서 바이러스 백신의 저장, 배포, 운반 및 투여를 촉진시킬 수 있다.

[0059] 본 기술분야의 당업자는 본 명세서의 조성물들 또는 제형들이 세포 계대 배양, 재배열(reassortment), 감염성 클론에서의 돌연변이 도입, 역유전학, 다른 재조합 DNA 또는 RNA 조작을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 모든 수단에 의해 약독화 된 바이러스에 관한 것임을 알 수 있을 것이다. 또한, 본 기술분야의 당업자는 다른 구현예들이 재조합 알파바이러스를 포함하나 이에 한정되지 아니하는, 모든 다른 단백질 또는 RNA를 발현하도록 조작된 바이러스에 관한 것임을 알 수 있을 것이다. 이러한 바이러스는 감염성 질병에 대한 백신, 종양 증상을 치료하기 위한 백신, 또는 질병을 치료하기 위해 단백질 또는 RNA의 발현을 도입하기 위한 바이러스(예컨대, 유전자 치료, 안티센스 치료, 리보자임 치료 또는 작은 억제성(small inhibitory) RNA 치료)로 이용될 수 있다.

[0060] 일부 구현예들에서는, 본 명세서의 조성물들이 토가바이러스, 코로나바이러스 또는 토가바이러스 과의 다른 모든 알파바이러스의 막 외피(membrane envelopes)를 갖는 하나 이상의 바이러스{예컨대, 외피형 바이러스(enveloped viruses)}를 함유할 수 있다. 다른 구현예에서는, 본 명세서의 조성물들이 토가바이러스 또는 코로나바이러스 과의 하나 이상의 외피성 양성 가닥 RNA 바이러스를 함유할 수 있다. 일부 구현예들에서는, 조성물들이 백신 조성물에서 이용되는 상기 바이러스의 약독화를 유도하는 하나 이상의 삽입, 삭제 또는 변이를 가진, 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스(예컨대, 치쿤군야 바이러스)를 함유할 수 있다.

[0061] 일부 구현예들에서는, 생 약독화 알파바이러스 조성물들이 2009년 1월 23일에 미국에서 출원되고 발명의 명칭이 "ATTENUATED RECOMBINANT ALPHAVIRUSES INCAPABLE OF REPLICATING IN MOSQUITOES AND USES THEREOF"인 출원번호 제PCT/US2009/000458호 및 2010년 7월 23일에 출원된 미국 특허출원 제12/804,535호에서 설명된 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스 구조체를 포함할 수 있고, 이들 출원들 및 이들 출원의 계속 출원 및 분할출원은 그 전체가 모든 목적을 위해 참조로서 통합된다.

[0062] 본 명세서의 일부 구현예들은 수성 또는 동결건조된 형태의 생 약독화 바이러스용 조성물에 관한 것이다. 본 기술분야의 당업자는 바이러스의 열 안정성을 향상시키고 냉동-해동 불활성화를 방지하는 제형들이 액상, 분말상, 냉동건조 또는 동결건조된 제품 및 본 기술분야에 알려진 방법들에 의해 제조된 제품을 개선할 것임을 알 수 있을 것이다. 재구성 후, 이러한 안정화된 백신은 피내 투여, 피하 투여, 근육 내 투여, 비강 내 투여, 폐 투여 또는 경구 투여를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 다양한 경로로 투여될 수 있다. 주시기 및 바늘 주입, 양갈래(bifurcated) 바늘 투여, 피내 폐치 또는 펌프에 의한 투여, 피내 바늘-없는 제트 전달(피내 등), 피내 입자 전달 또는 에어로졸 분말 전달을 포함하나 이에 한정되지 아니하는, 상기 백신의 전달을 위한 다양한 수단이 본 기술분야에 알려져 있다.

[0063] 구현예들은 하나 이상의 생 약독화 바이러스(전술한 바와 같음) 및 HEPES 완충용액 또는 유사한 완충용액; 하나 이상의 탄수화물; 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질;의 혼합물로 구성되는 조성물을 포함할 수 있다. 일부 구현예들에서는, 조성물들이 하나 이상의 생 약독화 알파바이러스; HEPES 완충용액 또는 유사한 완충용액; 하나 이상의 수크로오스 또는 트레할로오스; 및 젤라틴을 포함하는 하나 이상의 단백질을 포함하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0064] 일부 구현예들에서는, 상기 탄수화물이 당 또는 폴리올이다. 당은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 갈락토오스, 리보오스, 만노오스, 람노오스, 탈로오스, 자일로오스 또는 알로오스 아라비노오스), 디사카라이드(예컨대, 트레할로오스, 수크로오스, 말토오스, 이소말토오스, 셀리바이오스, 젠티오바이오스, 라미나리보오스, 자일로바이오스, 만노바이오스, 락토오스 또는 프룩토오스), 트리사카라이드(예컨대, 아카르보오스, 라피노오스, 멜리지토오스, 판노오스 또는 셀로트리오스) 또는 당 폴리머(예컨대, 텍스트란, 잔탄, 폴루란, 시클로텍스트란, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 녹말, 셀룰로리고사카라이드, 글리코겐, 키토산

또는 키틴)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다. 폴리올은 만니톨, 소르비톨, 아라비톨, 에리트리톨, 말티톨, 자일리톨, 글리시톨, 글리콜, 폴리글리시톨, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 글리세롤을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0065] 낮은 수분 조건을 견딜 수 있는 무수생물태성(anhydrobiotic) 생물은 많은 양의 트레할로오스를 함유한다. 트레할로오스는 구조 과정에서 막의 불안정화를 야기시킬 수 있는 막 융합 현상(membrane fusion events)과 상 전이(phase transition)를 모두 방지하는 것으로 밝혀져 있다. 구조 분석은 트레할로오스가 지질 이중층 내의 극성 머리 작용기들(polar head groups) 사이에 잘 맞아 들어가는 것으로 제시하고 있다. 트레할로오스는 또한 구조 과정에서 불안정한 단백질의 변성을 방지한다. 트레할로오스는 극성 단백질 잔기와의 수소 결합에 의해 단백질을 안정화시키는 것으로 생각된다. 트레할로오스는 2개의 글루코오스 분자가 1:1로 결합되어 이루어진 디사카라이드이다. 상기 1:1의 결합으로 인해, 트레할로오스는 환원력이 거의 없거나 전혀 없으며, 따라서 본질적으로 아미노산 및 단백질과 반응하지 않는다. 이러한 환원력의 부재는 단백질에 대한 트레할로오스의 안정화 영향을 향상시킬 수 있다. 일부 구현예들에서, 트레할로오스는 생 약독화 바이러스에 대한 안정성을 제공한다. 트레할로오스의 이러한 활성은 바이러스의 막과 피막 단백질(coat protein)을 모두 안정화시키는 능력 때문일 수 있다.

[0066] 일부 구현예들에서는, 조성물들이 전형적으로 생리학적으로 허용가능한 완충용액을 포함하는 것으로 설명될 수 있다. 본 기술분야의 당업자는 HEPES가 본 명세서에 개시된 알파바이러스 조성물에 예측할 수 없는 안정화 효과를 나타낸다는 점이 밝혀졌음을 알고 있다. 또한, 본 기술분야의 당업자는 주사 부위에서의 세포 손상 및/또는 통증을 방지하기 위하여 염의 농도를 거의 생리학적 수준(예컨대, 생리식염수 또는 0.15 M 총 염)으로 조정하는 것이 조성물의 비경구 투여를 위해 최적일 수 있음을 알고 있다. 본 기술분야의 당업자는 또한 제형에 동등한 오스몰 농도(osmolarity)를 유지하기 위하여, 탄수화물의 농도를 증가시키면 염 농도는 감소될 수 있음을 알 것이다. 일부 구현예들에서는, 6.8 이상 내지 10.0의 pH를 갖는 완충용액 배지가 고려된다; 일부 생 약독화 바이러스(예컨대, 알파바이러스)는 낮은 pH에서 불안정하다.

[0067] 본 명세서의 일부 생 약독화 바이러스 백신 조성물은 감소된 면역원성(immunogenicity)을 갖거나 비-면역원성인 것에 더하여, 생 약독화 바이러스의 안정성을 향상시키고/향상시키거나 변질을 감소시키는 조성물에 관한 것이다.

### 약학적 조성물

[0069] 본 명세서의 구현예들은 인 비보에서 약학적 투여에 적합한, 생물학적으로 상용가능한 형태로 개체에 조성물을 투여하는 것을 제공한다. "인 비보에서 투여에 적합한, 생물학적으로 상용가능한 형태"란 투여되는 활성 제제(예컨대, 상기 구현예들의 생 약독화 바이러스 조성물)의 치료 효과가 모든 독성 효과보다 큰, 활성 제제의 형태를 의미한다. 치료학적 조성물의 치료학적으로 활성인 양의 투여는 원하는 결과를 얻기 위해 필요한 복용량 및 기간 동안의 유효량으로 정의된다. 예를 들면, 화합물의 치료학적으로 활성인 양은 개체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 상기 개체에서 원하는 반응을 일으키기 위한 제형의 능력과 같은 요소에 따라 변화할 수 있다. 복용량 처방계획은 최적의 치료 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다.

[0070] 일부 구현예들에서는, 조성물(예컨대, 구현예의 약학적 화학물질, 단백질, 웹티드)이 피하, 경맥, 경구 투여, 흡입, 경피 적용, 질내 적용, 국소 적용, 비강 또는 직장 투여와 같은 편리한 방식으로 투여될 수 있다. 보다 특별한 구현예에서는, 상기 화합물이 경구 또는 피하 투여될 수 있다. 다른 구현예에서는, 상기 화합물이 정맥 투여될 수 있다. 한 구현예에서는, 상기 화합물이 흡입과 같이 비강 내 투여될 수 있다.

[0071] 화합물은 상기 조성물과 함께 투여되는 적합한 담체 또는 희석제(diluent) 내에서 개체에게 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "약학적으로 허용가능한 담체"라는 용어는 식염수 및 수성 완충용액과 같은 희석제를 포함하는 것으로 의도된다. 상기 활성 제제는 또한 비경구 또는 복강 내로 투여될 수 있다. 또한, 분산액이 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 내 및 오일 내에서 제조될 수 있다. 통상의 저장 및 사용 조건 하에서, 이를 제조물은 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유할 수 있다.

[0072] 주사용으로 적합한 약학적 조성물은 본 기술분야에 알려진 수단에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 멸균된 주사 용액 또는 분산액을 즉석 제조하기 위한 멸균 수용액(수용성) 또는 분산액 및 멸균 분말이 사용될 수 있다. 모든 경우에서, 상기 조성물은 멸균될 수 있고, 주사가능성(syringability)이 용이하게 되는 정도의 유체일 수 있다. 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 추가로 보존될 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체

체는, 예를 들면 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성(fluidity)은, 예를 들면 레시틴과 같은 코팅을 이용하거나, 분산액의 경우에는 원하는 입자 크기를 유지하거나, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

[0073] 멸균 주사 용액은 일정량의 활성 화합물을 멸균한 후, 필요시 적절한 용매 또는 상기에 나열한 성분 중 하나 또는 조합에 포함시킴으로써 제조될 수 있다.

[0074] 제형의 경우, 용액은 복용 제형과 상용가능한 방식 및 치료학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 상기 제형은 상기에서 설명한 주사 용액 타입과 같은 다양한 복용 형태로 용이하게 투여될 수 있다. 또한, 서방형 캡슐, 시간-방출 미세입자 등이 본 명세서의 투여 조성물에 적용될 수 있는 것으로 고려된다. 이를 특별한 수용액은 정맥 내, 근육 내, 피하 및 복강 내 투여에 특히 적합하다. 일부 구현예들에서는, 본 명세서에 개시된 제형들이 본 발명의 알파바이러스에 노출되기 전, 노출되는 동안 및/또는 노출된 후에 투여될 수 있다.

[0075] 다른 구현예에서는, 관심 화합물을 전달하기 위하여 비강 용액 또는 스프레이, 에어로졸 또는 흡입제가 이용될 수 있다. 다른 투여 방식에 적합한 추가적인 제형은 좌약(suppository) 및 질내삽입약(pessary)을 포함한다. 직장 삽입약 또는 좌약이 이용될 수도 있다.

[0076] 경구용 제형은 예를 들어 약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 녹말, 스테아르산 마그네슘, 사카린 나트륨, 셀룰로오스, 탄산 마그네슘 등과 같이, 보통 적용되는 부형제들을 포함한다. 일부 구현예들에서, 경구용 약학적 조성물은 불활성 희석제 또는 동화형 식용 담체를 포함할 수 있거나, 경질 또는 연질 껌질의 젤라틴 캡슐 내에 동봉될 수 있거나, 정제로 압착될 수 있거나, 식이용 음식에 직접 포함될 수 있다. 경구용 치료용 투여의 경우, 상기 활성 화합물은 부형제와 함께 포함될 수 있고, 섭취용 정제, 구강용 정제, 트로키제, 캡슐, 엘릭시르제, 혼탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 이용될 수 있다. 이러한 조성물 및 제제들은 적어도 0.1%의 활성 화합물을 함유할 수 있다. 상기 조성물 및 제제들의 백분율은 물론 다양할 수 있으며, 편리하게는 단위 중량의 약 2 내지 약 75% 사이, 또는 바람직하게는 25-60% 사이일 수 있다. 이러한 약학적으로 유용한 조성물 내의 활성 화합물의 양은 적합한 복용량이 얻어질 수 있는 정도이다.

## 키트

[0077] 추가의 구현예들은 본 명세서에서 설명된 방법들 및 조성물들과 함께 이용하기 위한 키트에 관한 것이다. 조성물 및 살아 있는 바이러스 제형들은 상기 키트 내에 제공될 수 있다. 상기 키트는 또한 적합한 용기, 본 명세서에서 상술한 생 약독화 바이러스 조성물, 및 선택적으로는 다른 항바이러스제, 항진균제 또는 항균제와 같은 하나 이상의 추가적인 제제를 포함할 수도 있다.

[0078] 상기 키트는 이를 필요로 하는 개체에 사용하기 적합하게 나뉘어진 조성물을 추가로 포함할 수 있다. 더욱이, 본 명세서의 조성물은 부분적으로 또는 전체적으로 탈수되거나 수성일 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 키트는 개별 제형에 따라 본 명세서에 개시된 바와 같이 실온 또는 냉장 온도에서 저장될 수 있다.

[0079] 상기 키트의 용기 수단은 일반적으로 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함하여 그 내부에는 조성물이 배치되고, 바람직하게는 적절하게 나뉘어진다. 또한, 추가 성분이 제공되는 경우, 상기 키트는 일반적으로 상기 제제 또는 구성이 배치될 수 있는 하나 이상의 추가적인 용기를 포함할 것이다. 또한, 상업적 판매를 위하여, 본 명세서의 키트는 전형적으로 상기 제제, 조성물 및 모든 다른 시약 용기를 엄격히 밀봉된 형태로 함유하기 위한 수단을 포함할 것이다. 이러한 용기는 사출 또는 취입 성형된 플라스틱 용기를 포함하여 그 내부에 원하는 바이알이 보유될 수 있다.

## 실시예

[0080] 하기 실시예들은 본 명세서에서 제시된 일부 구현예들을 나타내기 위해 포함된다. 본 기술분야의 당업자는 하기 실시예들에 개시된 기술들이 본 명세서에 개시된 실례들(practices)에 잘 적용되는 것으로 밝혀진 기술들을 나타낸 것이고, 따라서 그 실례에 대한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 고려될 수 있다고 인식할 것이다. 그러나, 본 기술분야의 당업자는, 본 명세서의 견지에서, 개시된 특정 구현예들에 많은 변화가 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 비슷한 또는 유사한 결과 또한 얻을 수 있다는 점을 인식할

것이다.

## 실시예 1

### [0083] 완충용액 스크린

[0084] 일부 예시적인 방법에서, 전임상 및 임상 시험에 적합한 액체 조성물과 동결건조 가능한 조성물, 및 알파바이러스 백신의 용도를 확인하였다. 이러한 예시적인 조성물들에 따른 액체 조성물에 관한 한 가지 고려사항은 일부 알파바이러스가 pH(예컨대, 낮은 pH)에 민감하다는 점이다. 따라서 본 명세서에 개시된 조성물의 구성은 pH에 관한 신중한 고려를 포함한다. 일부 예시적인 조성물들에서, 제형의 pH는 약 pH 6 내지 10이었고, 다수의 제형들이 pH 6.5 내지 7.5 부근, 그리고 9.5 부근까지 였다.

[0085] 일부 방법들에서, 약독화 된 치쿤군야 바이러스(이하 CHIK)가 전임상 및 임상 시험을 위한 알파바이러스 조성물의 예로 이용된다. 이러한 방법들을 위한 조성물들이 제공된다. 한 예시적인 실험에서, 미리 정해진 양의 CHIK-IRES 백신(pMVS)이 이용되었는데, 이러한 약독화 된 바이러스는 IRES 유입의 조절 하에 있다. 이러한 예시적인 조성물들에서 모든 약독화 된 알파바이러스가 상기 조성물의 안정성을 향상시키고 분해를 감소시키기 위하여 이용될 수 있다. 먼저, DMEM, PBS, HEPES 등과 같은 많은 다른 기본 완충용액이 시험되었다.

[0086] 상기 약독화 된 바이러스 제형의 안정성을 시험하기 위하여 37°C에서 21시간까지 배양하는 등의 일부 시험을 수행하였다. 샘플을 취하여, 96 웰 플레이트 내 베로 세포 상에서 TCID<sub>50</sub>를 통해 감염성 바이러스의 존재를 적정하였다. (배양되지 않은) 백신 대조군의 투입값과 비교하여, 잔존하는 바이러스의 백분율을 산출하였다. PBS 단독, 20% DMEM 또는 텍스트로오스로 완충된 DMEM을 함유하는 조성물 내에서 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>의 CHIK 바이러스 백신의 배양은 그 효능에 급격한 손실이 나타났다. 일부 예시적인 조성물들, 예를 들어 약 1 내지 약 30mM HEPES와 같은 다양한 농도의 HEPES 완충용액(4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산)을 함유하는 조성물이 CHIK 바이러스 백신과 같은 약독화 된 알파바이러스를 안정화시키는데 효과적인 것으로 밝혀졌다(데이터 미도시). 한 실시예에서, 150mM NaCl 및 15mM HEPES(HEPES 완충용액 식염수 - HS)를 포함하는 조성물이 대조군에 비해 약독화 된 알파바이러스에 향상된 안정성을 제공하는 것으로 밝혀졌다(도 1).

[0087] 도 1 및 도 2는 37°C에서 21일 동안 다양한 조성물들에서 배양한 후 남아 있는 약독화 된 알파바이러스인 CHIK 백신의 효능을 도식화한 예시적인 막대 그래프를 나타낸다. 다른 농도의 HEPES를 포함하는 조성물들은 다른 완충용액 조성물들에 비해 CHIK 백신의 안정성을 현저히 향상시켰다(20%-55% 대 10% 이하, 데이터 미도시). 도 1에서, 150mM NaCl을 가지는 15mM HEPES 또는 15mM HEPES를 포함하는 조성물들은 다른 것들에 비해 백신 안정성 및 효능에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

## 실시예 2

[0088] 일부 다른 예시적인 방법들에서는, 하나 이상의 탄수화물이 CHIK 백신 안정성에 긍정적인 영향을 가진다는 점을 포함한 관찰에 기초하여, 다양한 탄수화물(예컨대, 당)이 알파바이러스 백신, 예를 들어 CHIK 바이러스 백신의 안정성에 미치는 영향을 분석하기 위해 4°C에서의 장기 안정성 실험을 수행하였다. HEPES 및 수크로오스, 락토오스, 트레할로오스, 갈락토오스, 프룩토오스, D-소르비톨, 텍스트로오스 및 D-만니톨과 같은 탄수화물을 포함하는 조성물이 제조되었다. 미리 정해진 농도의 CHIK-IRES 백신(pMVS)의 개별 분배물들을 이러한 조성물들로 제형화하였고, 4°C에서 12주에 걸쳐 배양하였다. 샘플들은 도 2에 나타낸 시점에 회수하여, 베로 세포 상에서 적정하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, HEPES 완충된 식염수(HB)와 조합된 약 15% 트레할로오스; 15% 수크로오스 또는 10% D-만니톨;의 조성물은 바이러스 안정성에서 거의 동등하게 나타났고, 다른 조성물들에 비해 더욱 우수한 것으로 나타났다.

[0089] 일부 예시적인 방법들에서는, 알파바이러스 백신 및 다른 제형들의 향상된 안정성과 관련된 물성들에 대하여, 수크로오스나 트레할로오스를 포함하는 제형들이 시험되었다. 일부 방법들에서는, 단백질의 존재 또는 부재 하에서 수크로오스 또는 트레할로오스의 농도를 증가시키면서 다양한 HEPES 완충용액(HB)의 조성물로 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>의 CHIK 바이러스 백신을 실온, 37°C에서 배양하였다. 도 3의 막대 그래프 도표에 도시된 바와 같이, HEPES 완충용액과 5% 수크로오스(HBS라고 함) 또는 HEPES 완충용액과 15% 트레할로오스를 포함하는 조성물이 HEPES 완충용액

과 인간 혈청 알부민 또는 다른 탄수화물 농도의 조성물에 비해 더욱 높은 안정성을 나타내었다.

[0090] 도 2는 4°C에서 12주에 걸쳐, HEPES 완충된 식염수 및 다양한 탄수화물들을 포함하는 액체 알파바이러스 조성물인 CHIK 백신 조성물의 안정성을 나타내는 예시적인 그래프이다. 도 2는 0.1% HSA의 존재 또는 부재 하에서, HEPES 완충용액, 150mM NaCl 및 다양한 농도의 탄수화물, 예컨대 수크로오스 또는 트레할로오스를 포함하는 조성물로 4°C에서 수주 동안 배양한 후, 총 바이러스 잔량의 백분율을 도시하는 예시적인 막대 그래프 도표를 나타낸다.

### 실 시 예 3

[0091] 단백질 유도 안정성 제형의 스크리닝

[0092] 다른 예시적인 방법들에서는, 대조군에 대비한 알파바이러스 제형의 향상된 안정성에 대하여, 단백질 없이 또는 다른 단백질들에 대한 다양한 단백질 제제들이 분석되었다. 표적 단백질 제제와 함께, HB 또는 HBS를 포함하는 조성물을 분석하였다. 실험 조건 당 약  $10^5$ 의 약독화 된 CHIK 백신 조성물을 (37°C에서 ~21시간 동안) 배양한 다음, 분배물을 제거하고 TCID<sub>50</sub>로 베로 세포의 성장을 적정하였다. 그런 다음, 잔류 바이러스 역가의 백분율을 분석하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 탄수화물이 존재 또는 부재하는 상기 조성물에 젤라틴의 첨가는 37°C에서 알파바이러스 백신 안정성을 향상시켰다(도 4 참고).

[0093] 도 4는 HEPES 완충된 식염수 및 락토페린, 트립تون, 락토알부민 및 젤라틴과 같은 단백질을 포함하는 조성물로 37°C에서 ~21시간 동안 배양 후, 남아 있는 CHIK 백신 역가의 총 퍼센트를 도시하는 예시적인 막대 그래프를 나타낸다. 시험된 모든 조성물들 중에서, 백신 안정성의 측면에서, 젤라틴 및 HB 완충용액을 포함하는 조성물이 실온에서 상기 알파바이러스의 분해를 감소시킴으로써 향상된 안정성을 나타내었다. 상기 조성물에 수크로오스와 같은 탄수화물이 포함된 경우에는, 가산 이상의 효과가 관찰되었다.

[0094] FBS 또는 PBS 만을 포함하는 배양 배지에서 저장된 백신에 비하여, 알파바이러스 백신의 안정성에서의 현저한 향상이 관찰되었다. 매우 안정적인 바이러스 백신을 생산하는 한 예시적인 제형은 HEPES 완충용액, 수크로오스 및 젤라틴 제형인 것으로 결정되었다. 상기 제형에 재조합 젤라틴을 포함시키는 것은 이 알파바이러스 백신의 불안정성을 크게 감소시켰다.

### 실 시 예 4

[0095] 장기 안정성 연구

[0096] 일부 예시적인 방법들에서는, 어느 농도의 젤라틴이 알파바이러스 조성물에 대해 가장 우수한 안정화 효과를 나타내는지 결정하기 위하여, 젤라틴의 농도 범위가 분석되었다. 일 방법에서는, 두 농도의 젤라틴이 일부 조성물들에서 HBS와의 조합 사용을 위해 선택되었다(HBS+0.5% 젤라틴 및 HBS+1% 젤라틴). 그런 다음, 젤라틴 및 HBS를 포함하는 조성물을 이용하여, 4°C 또는 -80°C에서 액체 CHIK 백신을 평가하는 장기 안정성 연구가 수행되었다. 이러한 조성물들의 예들이 하기에 제공된다.

[0097] 예시적인 조성물들:

[0098] 1. HB - HEPES 완충용액 식염수 15mM HEPES 및 150mM NaCl

[0099] 2. HBS - HEPES 완충용액 식염수 및 5% 수크로오스

[0100] 3. HSG (0.5% 젤라틴) - HEPES 완충용액 식염수 및 5% 수크로오스 및 0.5% 젤라틴

[0101] 4. HSG (1% 젤라틴) - HEPES 완충용액 식염수 및 5% 수크로오스 및 1% 젤라틴

### 표 1

[0102] 장기 안정성 연구 설계

주	0	1	3	4	8	12	24	36
4°C	X	X	X	X	X	X	X	X

-80°C	X	X	X	X	X	X	X	X
-------	---	---	---	---	---	---	---	---

[0103] 이러한 조성물로 제형화된 백신 샘플들을 1.5 ml MCT에서 500 $\mu$ l 부피로 저장하였다. 제형마다, 15개의 샘플들은 4°C에 저장하였고(Micro Climate Chamber; Model# MCB-12-33-33-H/AC), 15개의 샘플들은 -80°C에 저장하였다(Thermo; Model# ULT2186-6- D43).

[0104] 샘플들을 취하여, 표 1 및 도 5 내지 도 6에 기재된 시점에서의 효능 평가를 수행하였다. 36주에 걸친 역사의 경향을 나타내기 위해, 4°C에서 배양된 샘플들(도 5)을 -80°C에서 배양된 샘플들과 나란히 분석하였다. 도 5의 그래프에 도시된 바와 같이, 이러한 조성물들로 제형화된 백신들은 4°C에서 12주까지 역가 손실이 현저히 감소되었다. 24주 동안 배양한 후, 1 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub> 이상의 바이러스 역가의 손실이 관찰되었다. 젤라틴의 첨가가 알파바이러스 백신 제형(약독화 된 CHIK)의 안정성에 현저히 긍정적인 효과를 나타내었다. 상기 연구 기간 동안 시험된 모든 조성물들에서 상기 알파바이러스 조성물은 -80°C에서 안정하였다.

### 실 시 예 5

#### 동결건조된 제형들

[0105] 다른 예시적인 방법에서는, 동결건조된 약독화 된 알파바이러스 제형(예컨대, CHIK 백신 제형)의 장기 안정성이 평가되었다. 상기 동결건조된 백신 제형들을 4°C(도 7) 또는 -80°C(도 8)에서 저장하였다. 기재된 시점에 취해진 샘플들을 재구성하였고, TCID<sub>50</sub>에 의해 베라 세포에서 적정하였다. HSG(0.5% 및 1% 젤라틴 모두)로 제형화된 상기 예시적인 약독화 된 CHIK 백신은 4°C에서 80주 이상의 기간 동안 바이러스 역가의 최소 손실을 나타낸 반면, HB 또는 HBS 조성물은 24주 후에 약 1 log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>의 바이러스 역가가 유실되었다. 80주 이상의 기간 동안 시험된 모든 조성물들에서 상기 CHIK 백신은 -80°C에서 매우 안정하였다.

[0106] 다른 하나의 예시적인 방법에서는, 상기 CHIK 백신을 안정화시키는 능력에 대하여, 다른 공급원으로부터 유래한 젤라틴이 비교되었다. 시그마사(Sigma), 머크사(Merck), 테크니사(Tekni) 및 제리타사(Gelita)를 포함한 모든 제조사간에 차이가 관찰되지 않았다(도 9).

[0107] 도 5 내지 도 6은 HB, HBS 또는 HSG를 포함하는 조성물들에 4°C(도 5) 또는 -80°C(도 6)에서 80-90주까지의 기간 동안 저장된 상기 액체의 약독화 된 알파바이러스 백신 제형(예컨대, CHIKV)의 향상된 안정성을 나타내는 예시적인 그래프를 나타낸다. 도 7 내지 도 8은 HB, HBS 또는 HSG를 포함하는 조성물에서 4°C(도 7) 또는 -80°C(도 8)에서 80-90주의 기간 동안 동결건조된 상기 CHIKV 백신의 효능을 나타내는 예시적인 그래프를 나타낸다.

[0108] 도 9는 다른 공급원들에서 유래한 젤라틴이 CHIK 백신을 안정화시키는데 미치는 영향을 비교한 예시적인 막대 그래프를 제공한다.

[0109] 도 10은 다른 공급원에서 유래한 젤라틴이 냉동-해동(F-T) 처리 후의 CHIK 백신의 안정성에 미치는 영향을 비교한 예시적인 막대 그래프 도표를 나타낸다. CHIK 백신 조성물은 HEPES (HS) 완충용액과 0.5% 젤라틴을 포함한다. 시그마사, 머크사, 테크니사, 제리타사 및 니타사(Nitta)를 포함한 5개의 다른 공급원으로부터 유래한 젤라틴이 시험되었다. CHIK 백신 조성물을 1(1x), 3(3x) 또는 5(5x) 회의 F-T 처리에 노출시켰다. 젤라틴의 상기 다른 공급원들 간에 특별한 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 이러한 데이터들은 모든 공급원의 젤라틴이 본 명세서에 개시된 조성물에서 상기 생 약독화 바이러스의 안정성을 향상시키기 위해 본 제형에서 이용될 수 있음을 뒷받침한다.

[0110] 도 11은 액체 배양과 비교하여, 다른 공급원에서 유래한 젤라틴이 동결건조 후의 CHIK 백신의 안정성에 미치는 영향을 비교한 예시적인 막대 그래프 도표를 도시한다. CHIK 백신 조성물은 HEPES (HS) 완충용액과 0.5% 또는 1.0% 젤라틴을 포함한다. 머크사와 니타사(beMatrix)에서 유래한 젤라틴이 시험되었다. 머크사와 니타사에서 유래한 젤라틴 사이에는 특별한 차이가 관찰되지 않았다. 두 CHIK 백신 조성물 모두 액체 제형과 비교하였을 때 동결건조로부터 재구성되었을 때 현저한 역가를 유지하는 안정한 동결건조된 케이크(cake)로 제조되었다.

### 표 2

[0112]

## 약어 목록

CHIKV	치쿤고야 바이러스
TCID <sub>50</sub>	50% 조직 배양감염량
HB	HEPES 완충용액 식염수
HBS	HEPES 완충용액 식염수 + 수크로오스
HSG	HEPES 완충용액 식염수 + 수크로오스 + 젤라틴
IRES	내부 리보솜 유입점
DMEM	둘베코의 수정 최소 필수 배지
MCT	마이크로원심분리기 튜브
PBS	인산염 완충된 식염수
FBS	우 태아 혈청
Pre-MVS	프리-마스터 바이러스 시드

## 재료 및 방법

[0114]

미리 정해진 복용량의 CHIK-IRES 백신(pre-MVS)의 개별 분배물을, HEPES 완충된 식염수(HB), 수크로오스를 함유하는 HEPES 완충된 식염수(HBS), 수크로오스 및 젤라틴을 함유하고 젤라틴의 농도를 달리하는 HEPES 완충된 식염수(HSG)(예컨대, 0.5% 및 1% 젤라틴)를 포함하는 완충용액을 포함하는 조성물들로 제형화하였다. 제형화된 수화 또는 액체 백신을 실온 37°C, 동결 4°C 또는 급속 냉동 -80°C와 같은 일부 온도에서 배양하였다. 미리 정해진 간격으로 이러한 제형들로부터 샘플들을 취하여, 예를 들어 96 웰 플레이트에서 TCID<sub>50</sub>을 통해 베로 세포로 감염성 바이러스의 존재가 적정되었다.

## 세포 주 및 조직 배양

[0116]

출원인의 cGMP 생산용 세포 은행에서 유래한 연구-수준의 베로 세포 은행이 준비되어 이러한 실험들을 수행하였다.

[0117]

베로 세포를 베로(WHO) 생산용 세포 은행 계대: 142 (lot#INV-VERO-WCB-001; 5x10<sup>6</sup>)로 수득하였고, 액체 질소에 저장하였다. 바이알을 수조에서 급격히 해동하였고, T-75cm<sup>2</sup> 플라스크에서 페니실린-스트렙토마이신, 40mL L-글루타민 및 10% FBS를 포함하는 약 19mL의 미리-데워진 cDMED(둘베코의 수정 최소 필수 배지)로 직접 접종하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 세포들이 밀집될 때까지 성장시켰고, PBS, 트립신(HyClone, for example, cat#SH30042.01) 및 cDMEM-10을 이용하여 계대배양하였다. 이 플라스크를 2개의 T-185cm<sup>2</sup> 플라스크로 확대하였고, 세포를 100% 밀집도에 다다를 때까지 성장시켰다. 트립신화를 통해 세포를 수득하였고, 800x에서 10분 동안 원심분리하였으며, 20%> FBS 및 10%> DMSO를 포함하는 DMEM으로 1x10<sup>7</sup> 세포/ml의 농도로 재현탁하였다. 이러한 세포들(총 20ml)을 동결 바이알(20x1ml)로 분배하여 베로 WHO WCB p#142-2 (Waisman) (WWCB) 1ml 1x10<sup>7</sup> 세포/ml, 13Jan12 LV라고 라벨하였으며, 액체 질소에 저장하였다.

[0118]

베로 WWCB WHO 세포들 dmf 페니실린-스트렙토마이신 및 10% FBS(HyClone)을 함유하는 DMEM에서 성장 및 유지시켰다. 세포를 유지하는데 트립신을 이용하였다. 바이러스 흡착 2일 전에, 96 웰 플레이트에 웰당 100 μl의 DMEM-FBS-10% 내의 1.4x10<sup>5</sup> 세포/ml로 평판 배양하였다. 기재된 온도를 유지하기 위해 배양기를 매일 모니터링 하였다. 바이러스 흡착, 흡착 및 TCID<sub>50</sub> 분석은 cDMEM-FBS 2%에서 수행하였다.

## [0119] CHIK 약독화 된 바이러스

[0120]

설명된 다양한 병법들에서 이용된 CHIK 백신의 분자적 생성은 CHIK-002로 지정된다(앞에서 설명됨). CHIK 백신은 베로 세포에서 생성 및 전파되었다. 프리-마스터 바이러스 시드 원액을 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml의 농도로 상기 실험들에 이용하였다. 간단히 설명하여, 상기 CHIK 프리-MVS는 베로 세포의 단일층의 감염 후에 생성되었다. 백신-바이러스는 상층액으로 분비되고, 상기 바이러스는 죽은 베로 세포의 정화/제거 후에 배지로부터 수득된다. 상기 CHIK-프리-MVS는 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 안정화되고, -80°C에서 저장된다.

## [0121] 평가 방법

TCID<sub>50</sub> 평가 방법은 백신 제조 과정에서 존재하는 감염성 바이러스의 양(효능 또는 안정성)을 정량하기 위해 이용된다. TCID<sub>50</sub>는, 예를 들어 CPE(세포변성효과)에 의해 입증되는 바와 같이, 96 웰 플레이트 내 감염된 웰의 일련의 복제물들 중 절반이 바이러스 감염의 신호를 나타낼 때의 바이러스의 희석 수준으로 정의된다. 베로 세포 (WWCBI WHO)를 페니실린-스트렙토마이신, L-글루타민 및 10% FBS(HyClone)를 포함하는 DMEM(DMEM 10%-FBS)에서 성장하고 유지시킨다. 상기 제형화된 샘플들의 분배물들을 수조에서 급속히 해동하고 혼합하였다. 프리-MVS의 사용 농도로의 초기 희석을 수행하고, 상기 샘플의 10배 희석물을 96 웰 플레이트에서 예를 들어, cDMEM-2% FBS로 제조하였다. 베로 세포 단일층의 접종 전에 4°C에서 희석된 바이러스를 유지시켰다. 평가 시점에, 96 웰 플레이트로부터 성장 배지를 흡입되었고, 각 바이러스 희석액 100 $\mu$ l를 상기 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 3-5일간 배양하였다. 역가는 Spearman-Karber 방법을 이용하여 산출하였다.

## [0123] 백신 제형

안정성 실험은 연구-수준의 백신 제제들과 인비라젠에서 유래한 CHIK-IRES pMVS를 포함하는 백신을 이용하여 준비되었다. 부형제의 스크리닝과 본 명세서에서 제공되는 다양한 조성물들을 이용한 안정성 연구를 위해, 샘플 당 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL의 바이러스를 포함하는 백신 제형들을 최종 부피 500 $\mu$ l로 준비하였다. 샘플들을 완충용액/제형으로 표시하여 대량으로 준비하였고, 투입 샘플들을 연구가 시작되기 전에 초기 역가의 척도로 삼았다. 샘플들을 MCT로 분배하였고, 표시된 시간과 온도로 저장하였다. 4가지 제형들 각각을 샘플 당 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL의 바이러스를 갖는 500 $\mu$ l의 최종 부피로 준비하였다. 제형 당 60개의 샘플들이 대량으로 준비되었고, 투입 샘플들은 500 $\mu$ l를 포함하는 1.5mL MCT로 분배되기 전에 취해졌다.

## [0125] 제형화된 백신 저장

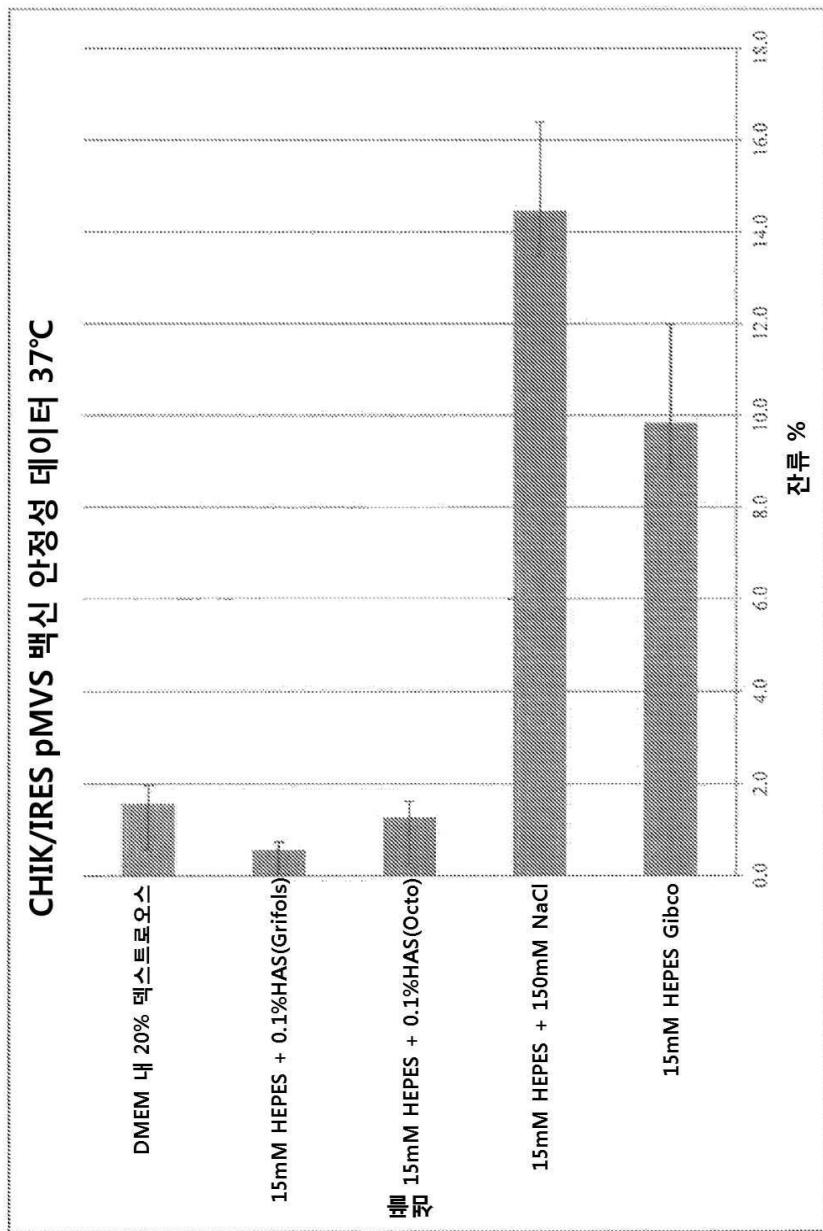
백신 제형은 4°C(Micro Climate Chamber; Model# MCB-12-33-33-H/AC) 및 -80°C(REVCO Elite Plus; Model# ULT2186-6-D43)에서 저장되었다. 두 시스템 모두 Dickson Wizard2-900MHZ Logger (Model#WT-220는 4°C 및 WT-240는 -80°C)로 모니터링되었다.

\*\*\*\*\*

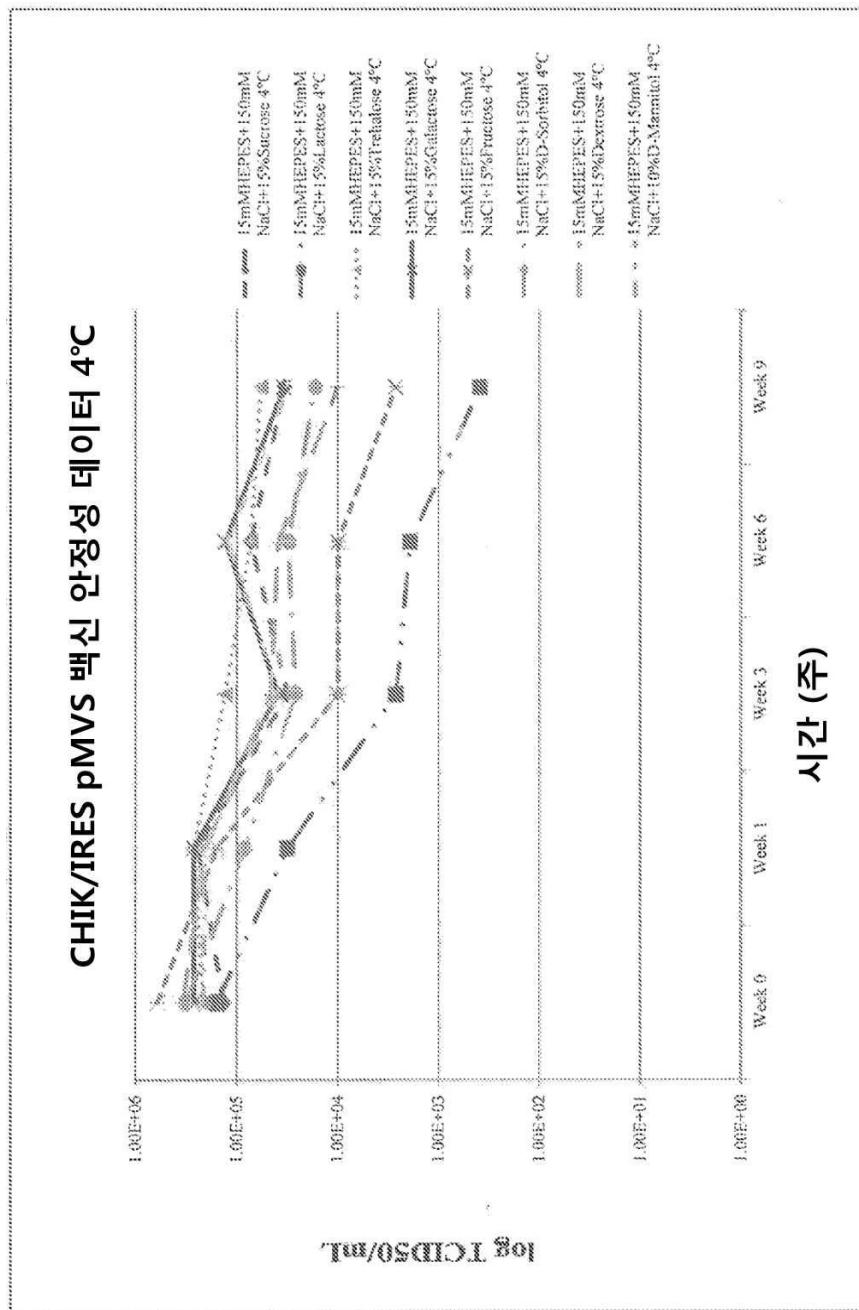
[0128] 본 명세서에 개시 및 청구된 모든 조성물들 및 방법들은 본 발명의 견지에서 과도한 실험없이 이루어지고 수행될 수 있다. 상기 조성물들 및 방법들은 바람직한 구현예의 관점에서 개시되었지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 상기 조성물들 및 방법들 및 본 명세서에 개시된 방법의 단계 또는 단계의 순서에 변형이 적용될 수 있음은 본 기술분야의 당업자에게 있어서 자명하다. 보다 구체적으로, 본 명세서에 개시된 제제가 화학적 및 생리적으로 모두 관련된 일부 제제로 대체될 수 있고, 동일 또는 유사한 결과가 달성될 수 있다. 본 기술분야의 당업자에게 자명한 이러한 유사한 치환들 및 변형들은 모두 첨부된 특허청구범위에 의해 정의된 사상, 범위 및 개념 내인 것으로 간주된다.

도면

도면1

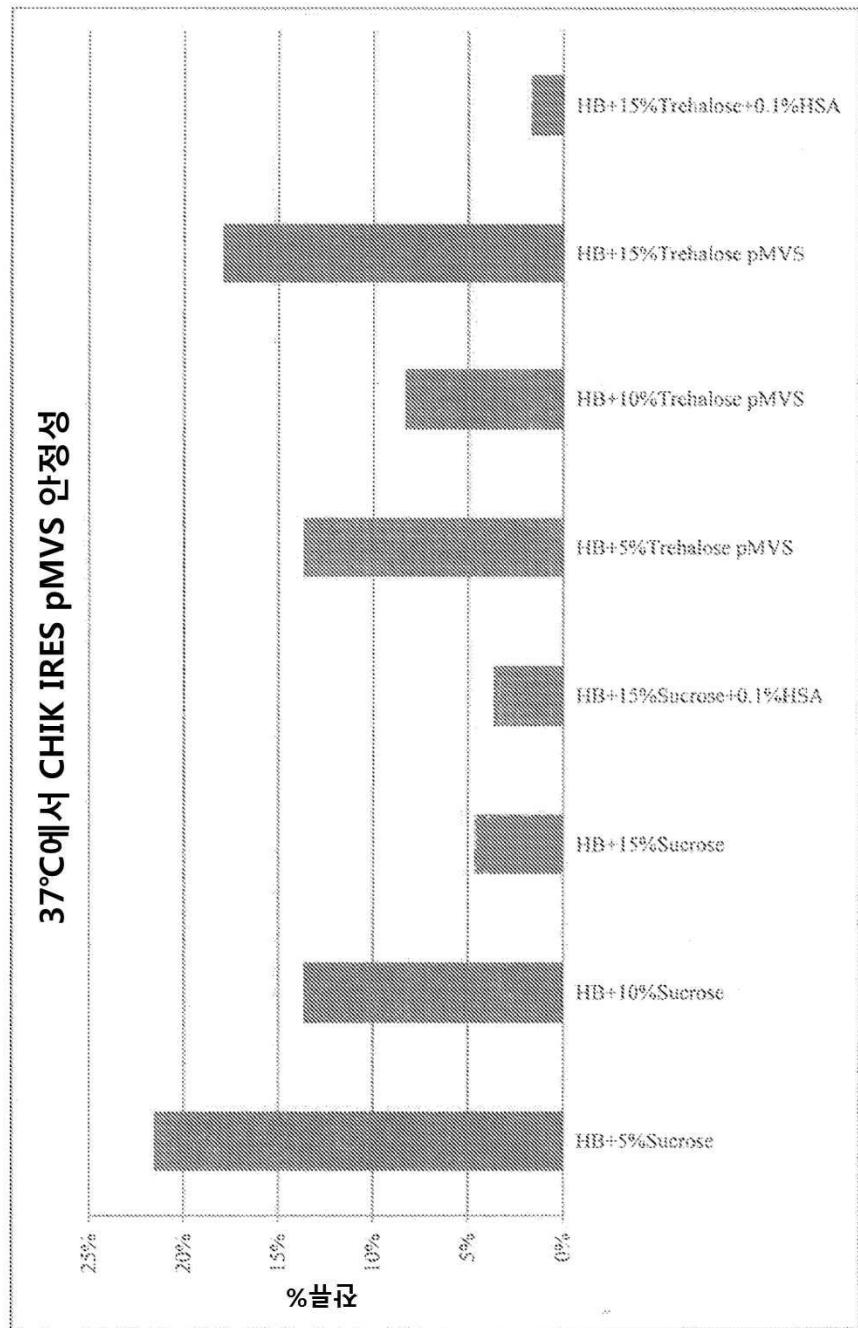


## 도면2

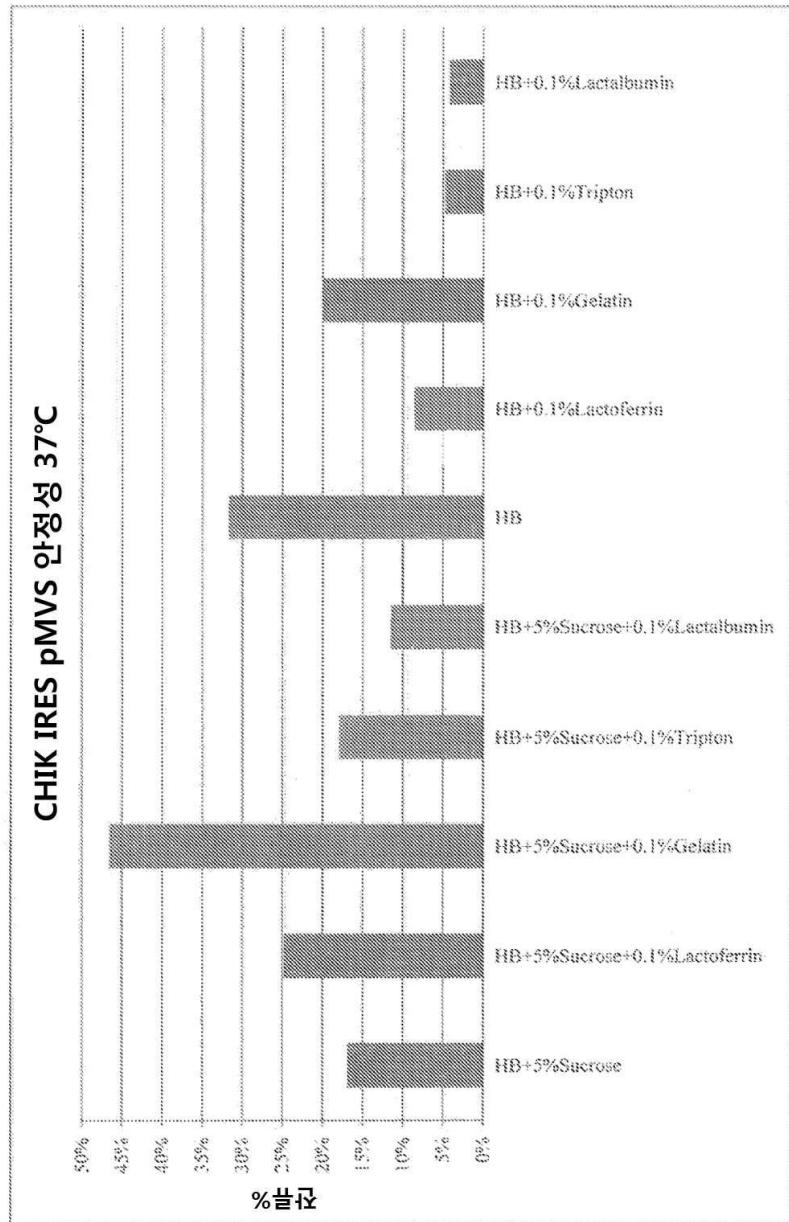


시간(주)

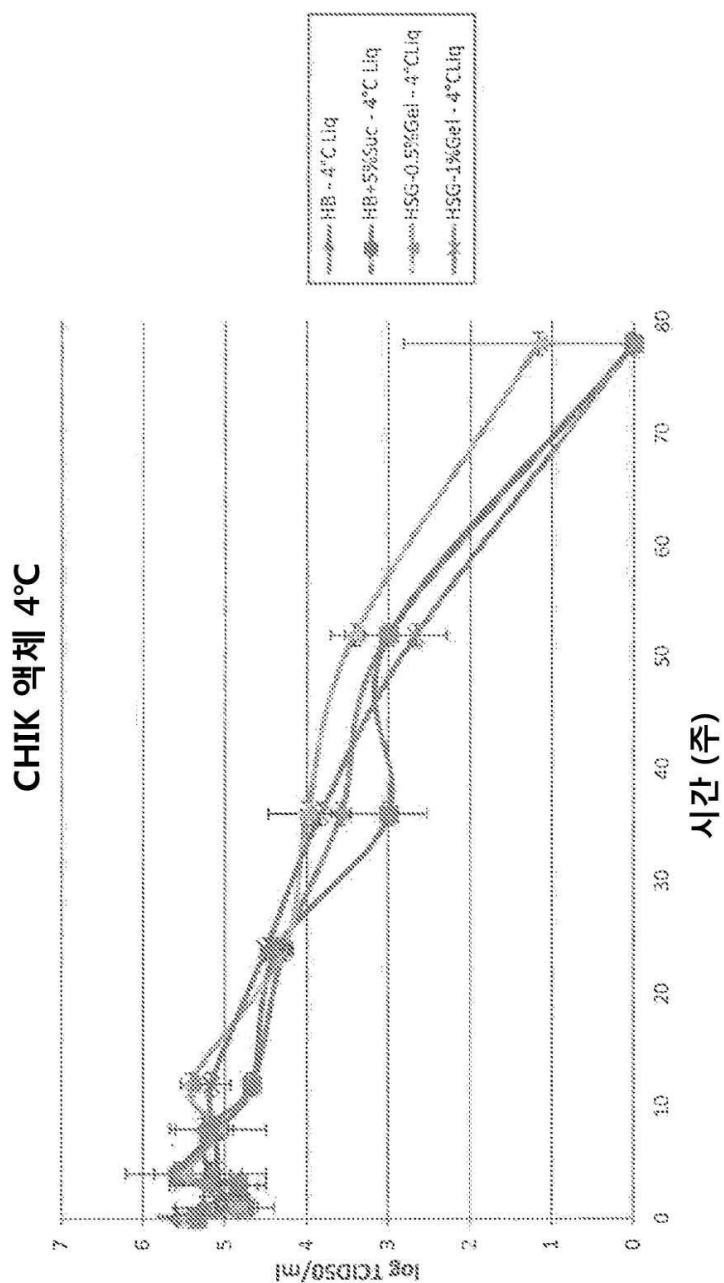
## 도면3



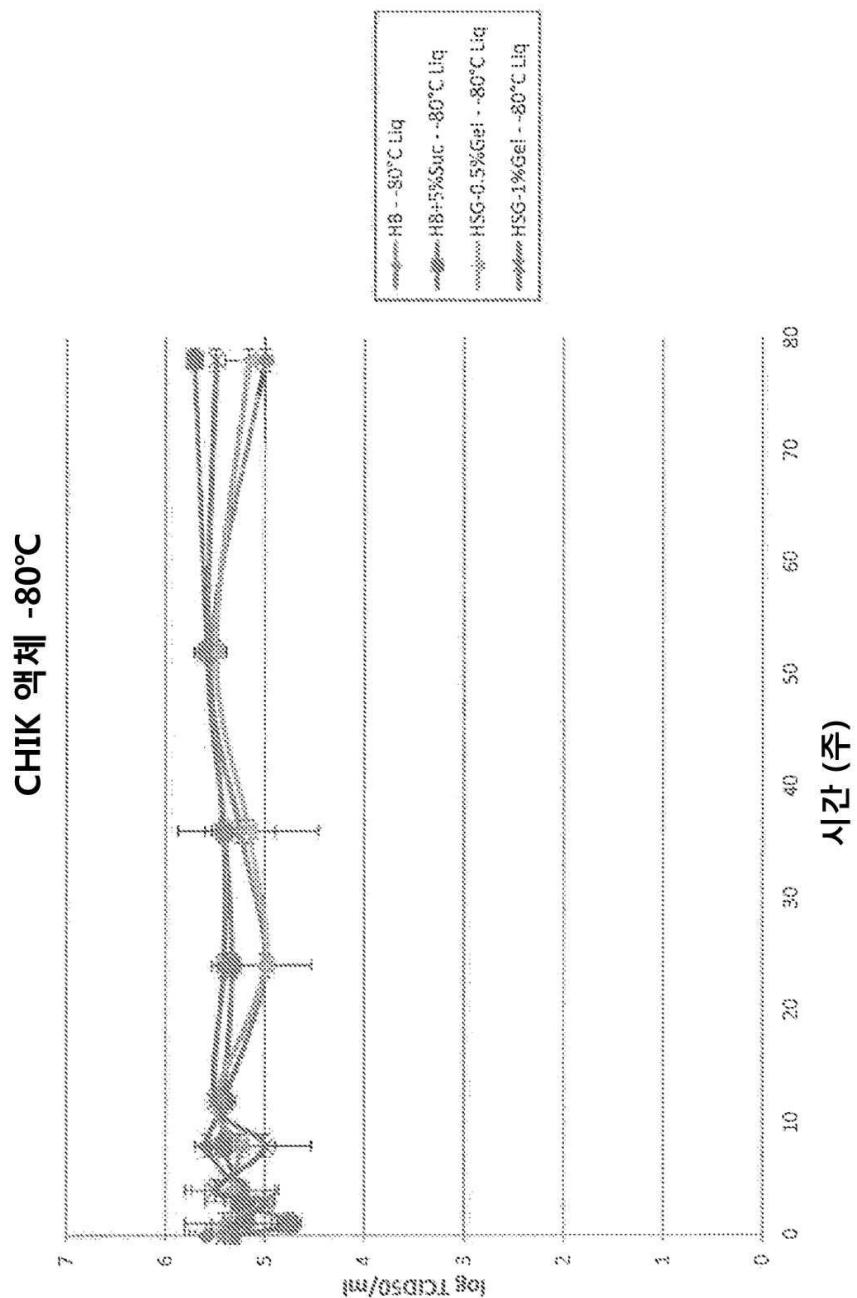
## 도면4



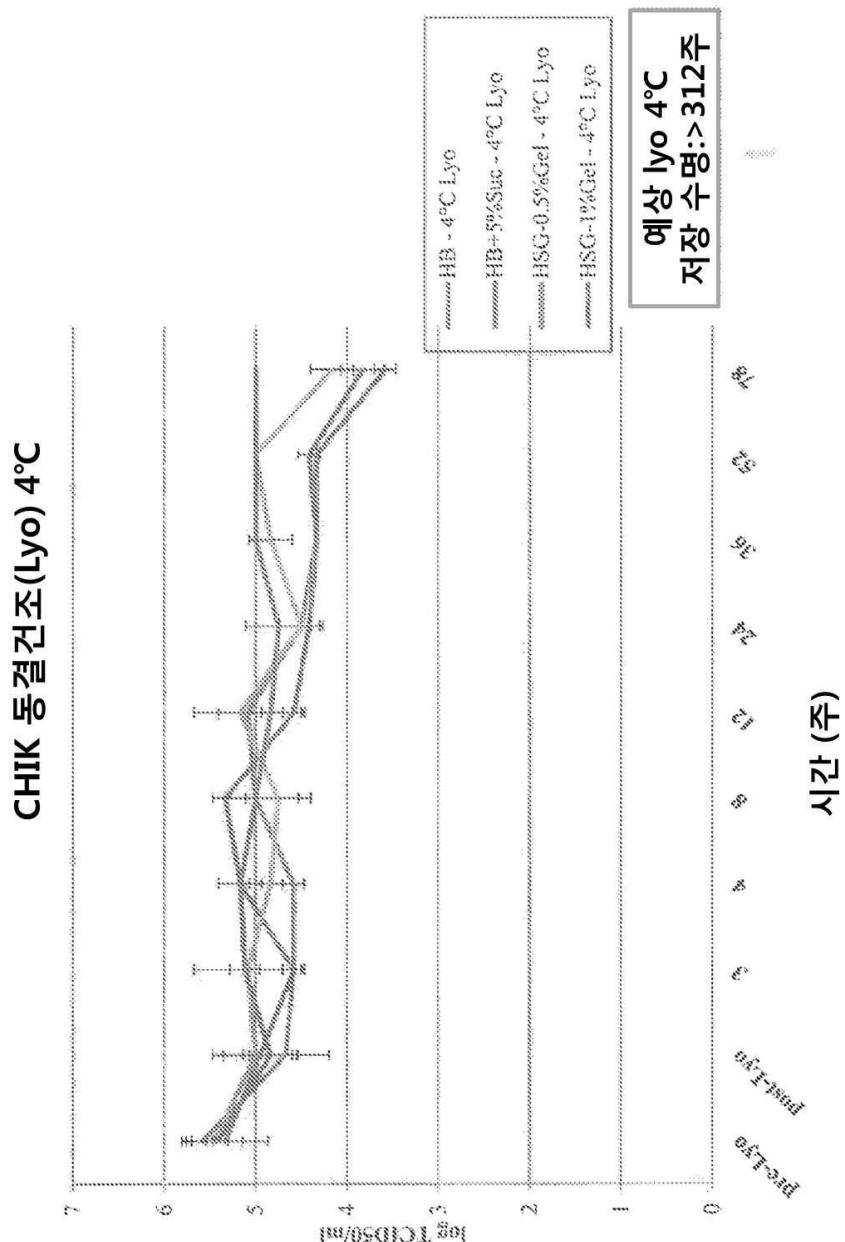
## 도면5



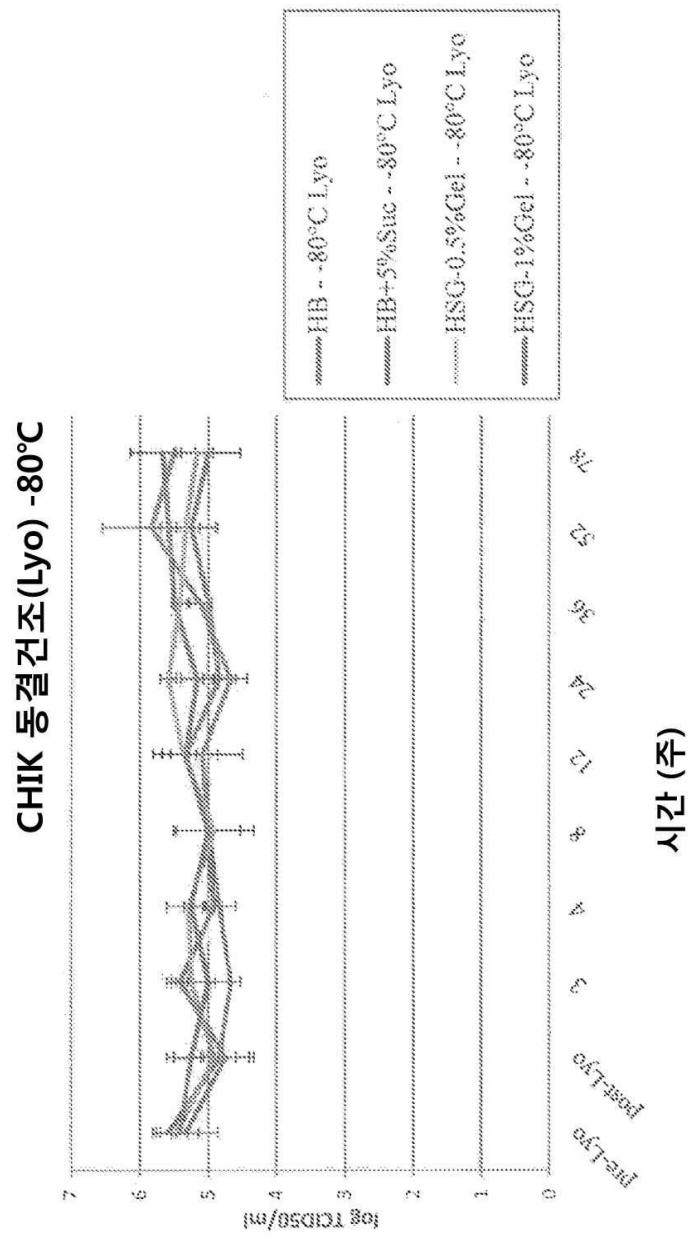
## 도면6



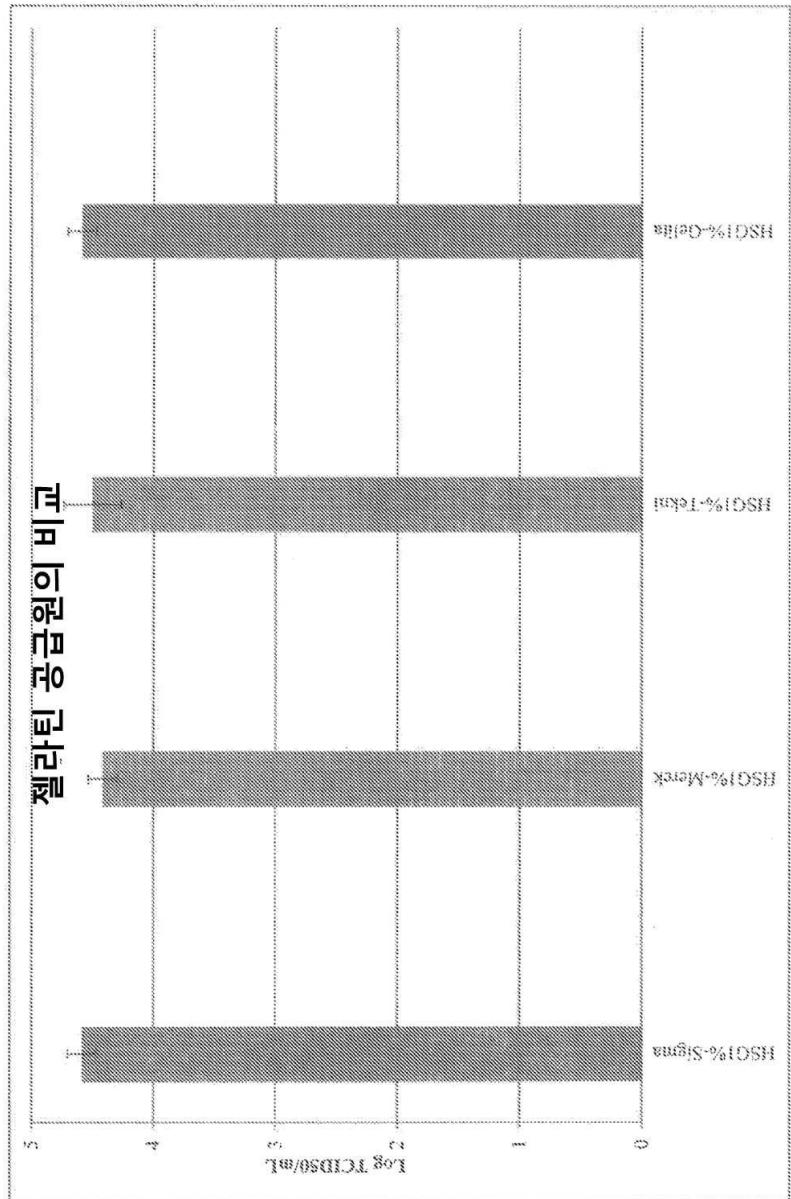
## 도면7



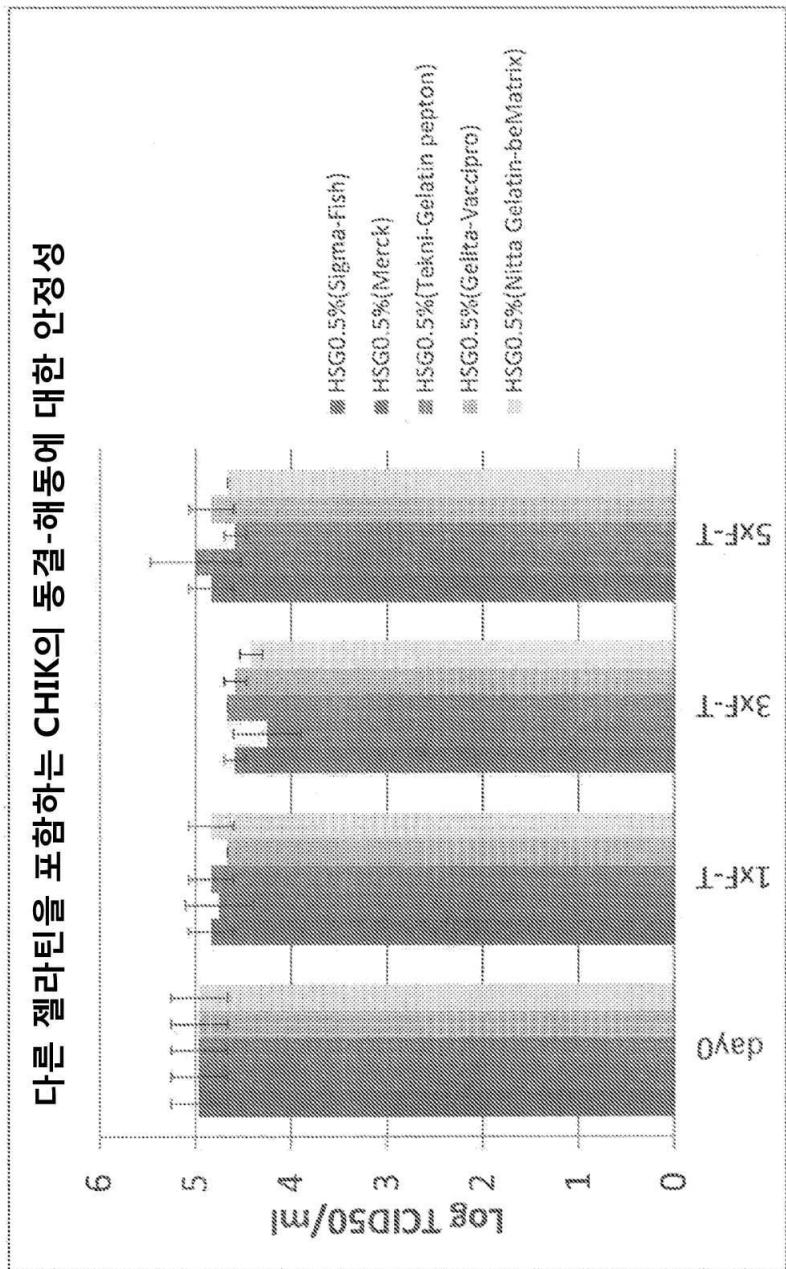
## 도면8



## 도면9



## 도면10



도면11

