(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0132887
(43) 공개일자 2023년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) *A61K 47/18* (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 47/42* (2017.01)
A61K 9/19 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7030300(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년08월03일
심사청구일자 2023년09월05일
(62) 원출원 특허 10-2019-7005623
원출원일자(국제) 2017년08월03일
심사청구일자 2020년07월27일
(85) 번역문제출일자 2023년09월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/045375
(87) 국제공개번호 WO 2018/027075
국제공개일자 2018년02월08일
(30) 우선권주장
62/370,611 2016년08월03일 미국(US)

(71) 출원인
다케다 백신즈 인코포레이티드
미국 매사추세츠주 02139 캠브리지 시드니 스트리트 75
(72) 발명자
리벤굿 질 앤
미국 콜로라도주 80526 포트 콜린스 햄프셔 코트 2348
스트레인지 린다 마리
미국 매사추세츠주 01701 프레이밍햄 헤멘웨이 로드 65
에브 스티븐 마이클
미국 콜로라도주 80525 포트 콜린스 탱글우드 드라이브 2207
(74) 대리인
특허법인태평양

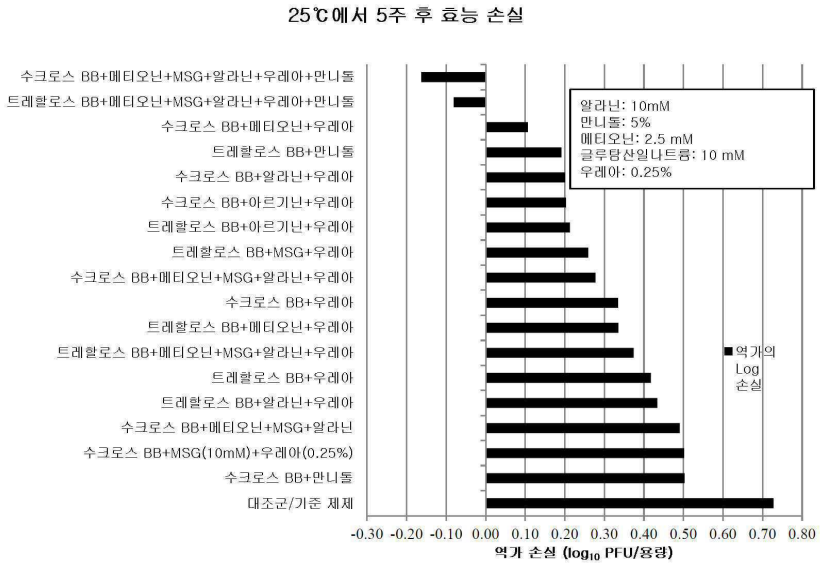
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **플라비바이러스를 개선된 제제로 안정화시키는 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본원의 실시양태는 플라비바이러스(Flavivirus)를 안정화시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 약독화된 또는 비약독화된(예를 들면, 살아있는 전체) 생플라비바이러스를 안정화시키는 것에 관한 것이다. 다른 실시양태는 약독화된 또는 비약독화된 생플라비바이러스의 분해를 감소시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 다른 실시양태는 제조, 저장, 가속화된 저장 및 수송 동안 약독화된 또는 비약독화된 생플라비바이러스의 안정화를 연장시키는 개선된 제제에 관한 것이다. 다른 실시양태는 수송 가능한 적용 및 방법을 위한 키트에 있어서 본원에 개시된 조성물의 사용에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/18 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
A61P 31/14 (2018.01)
A61K 2039/5254 (2013.01)
C12N 2770/24034 (2013.01)
C12N 2770/24134 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

약독화된 뎅기 생바이러스(live dengue virus);

트레할로스 및 수크로스 중 적어도 하나;

우레아;

인간 혈청 알부민(HSA)을 포함하는 단백질 물질;

아르기닌; 및

염화나트륨(NaCl), 인산나트륨(Na_2HPO_4), 염화칼륨(KCl) 또는 인산칼륨(KH_2PO_4)을 포함하는 적어도 하나의 염;을 포함하는 동결건조된 뎅기 바이러스 조성물로서,

상기 조성물은 약독화된 뎅기 생바이러스를 안정화시키는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 면역원성 조성물의 일부로서 상기 조성물을 대상체에게 투여하기 전에 부분적으로 또는 전체적으로 재수화되는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 조성물은 기초 완충제를 추가로 포함하고, 상기 기초 완충제는 인산염 완충 식염수(PBS), HEPES 완충제, 히스티딘 완충제 또는 트리스(Tris) 완충제를 추가로 포함하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 염은 10 mM 내지 200 mM의 농도로 NaCl을 포함하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

만니톨을 추가로 포함하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체를 추가로 포함하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체는 메티오닌, 알라닌 또는 이들의 조합물을 포함하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체는 글루탐산일나트륨(MSG)을 포함하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질 물질은 덱스트란, 폴리올 중합체 또는 젤라틴을 추가로 포함하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뎅기 바이러스는 뎅기 1/2 키메라, 변형된 약독화된 뎅기-2 생바이러스, 뎅기 3/2 키메라, 및 뎅기 4/2 키메라의 형태인 4가지 뎅기 혈청형을 포함하고, 상기 뎅기 1/2 키메라, 뎅기 3/2 키메라 및 뎅기 4/2 키메라의 골격으로서 상기 뎅기-2 바이러스는 PDK-53 뎅기-2 균주인 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 염화마그네슘($MgCl_2$)을 함유하지 않는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단백질 물질은 0.05% 내지 1.0%(w/v) 범위의 농도로 상기 조성물 내에 존재하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

상기 트레할로스 및 수크로스, 또는 트레할로스와 수크로스의 조합물은 0.5% 내지 15.0%(w/v) 범위의 농도로 상기 조성물 내에 존재하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 14

청구항 6 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체는 1.0 mM 내지 25.0 mM 범위의 농도로 상기 조성물 내에 존재하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 내의 우레아 농도는 0.01% 내지 1.0%(w/v)인 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 트레할로스, 수크로스, 또는 트레할로스와 수크로스의 조합물은 0.5% 내지 15.0%(w/v) 범위의 농도로 상기 조성물 내에 존재하고, 상기 조성물 내의 우레아의 농도는 0.01% 내지 1.0%(w/v)이고, 상기 조성물 내의 단백질 물질의 농도는 0.05% 내지 1.0%(w/v)인 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

상기 HSA의 농도는 0.05% 내지 0.5%(w/v)이고; 상기 수크로스, 트레할로스, 또는 수크로스와 트레할로스의 조합

물의 농도는 0.5% 내지 15.0%(w/v)이고; 상기 아르기닌의 농도는 1.0 mM 내지 약 20.0 mM이고; 및 상기 우레아의 농도는 0.1% 내지 0.3%(w/v)인 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 수크로스, 트레할로스, 또는 수크로스와 트레할로스의 조합물의 농도는 5.0% 내지 15.0%(w/v)인 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서,

상기 트레할로스 및 수크로스, 또는 트레할로스와 수크로스의 조합물은 10.0%(w/v) 미만의 농도로 상기 조성물 내에 존재하는 뎅기 바이러스 조성물.

청구항 20

트레할로스 및 수크로스 중 적어도 하나;

우레아;

인간 혈청 알부민(HSA);

아르기닌; 및

염화나트륨(NaCl), 인산나트륨(Na_2HPO_4), 염화칼륨(KCl) 또는 인산칼륨(KH_2PO_4)을 포함하는 적어도 하나의 염; 및

동결건조된 뎅기 바이러스 조성물;을 포함하는 조성물을 약독화된 뎅기 생바이러스와 조합하는 단계를 포함하는 약독화된 뎅기 생바이러스를 안정화시키기 위한 방법으로서,

상기 조성물은 약독화된 뎅기 생바이러스를 안정화시키는 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

상기 뎅기 바이러스는 뎅기 1/2 키메라, 변형된 약독화된 뎅기-2 생바이러스, 뎅기 3/2 키메라, 및 뎅기 4/2 키메라의 형태인 4가지 뎅기 바이러스 혈청형을 포함하고, 상기 뎅기 1/2 키메라, 뎅기 3/2 키메라 및 뎅기 4/2 키메라의 골격으로서 상기 뎅기-2 바이러스는 PDK-53 뎅기-2 균주인 방법.

청구항 22

청구항 20 또는 청구항 21에 있어서,

상기 동결건조된 뎅기 바이러스 조성물은 연장된 기간 동안 25℃에서 저장되는 방법.

청구항 23

청구항 20 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물을 면역원성 조성물의 일부로서 대상체에게 투여하기 전에 상기 조성물을 부분적으로 또는 전체적으로 재수화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

청구항 20 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 완충제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

청구항 20 내지 청구항 24 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 젤라틴, 덱스트란, 폴리올 중합체, 또는 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 물질을 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

청구항 20 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서,

상기 하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체는 알라닌, 메티오닌, MSG 또는 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 28

청구항 20 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 0.5% 내지 15.0%(w/v)의 트레할로스 및 수크로스 중 적어도 하나, 0.01% 내지 1.0%(w/v)의 우레아, 및 0.05% 내지 1.0%(w/v)의 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함하는 방법.

청구항 29

청구항 20 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,

상기 우레아는 0.01% 내지 0.5%(w/v) 범위의 농도로 상기 조성물 내에 존재하는 방법.

청구항 30

청구항 20 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 내의 HAS의 농도는 0.05% 내지 0.5%(w/v)이고; 상기 조성물 내의 수크로스, 트레할로스, 또는 수크로스와 트레할로스의 조합물의 농도는 0.5% 내지 15.0%(w/v)이고; 상기 조성물 내의 아르기닌의 농도는 1.0 mM 내지 약 20.0 mM이고; 및 상기 조성물 내의 우레아의 농도는 0.1% 내지 0.3%(w/v)인 방법.

청구항 31

청구항 30에 있어서,

상기 조성물 내의 수크로스, 트레할로스, 또는 수크로스와 트레할로스의 조합물의 농도는 5.0% 내지 15.0%(w/v)인 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 따른 조성물; 및

적어도 하나의 용기;를 포함하는 약독화된 뎅기 생바이러스를 안정화시키기 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권**

[0002] 본 PCT 출원은 2016년 8월 3일에 출원된 미국 가출원 제62/370,611호에 대한 이익을 35 USC § 119(e) 하에서 주장한다. 이 출원은 모든 목적을 위해 전체로서 본원에 참고로 도입된다.

[0003] **분야**

[0004] 본원의 실시양태는 플라비바이러스(flavivirus)를 안정화시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 약독화된 또는 비약독화된(예를 들면, 살아있는 전체) 생플라비바이러스를 안정화시키는 것에 관한 것이다. 다른 실시양태는 약독화된 또는 비약독화된 생플라비바이러스의 분해를 감소시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 다른 실시양태는 제조, 저장, 가속화된 저장, 수송 및 전달 동안 약독화된 또는 비약독화된 생플라비바이러스의 안정화를 연장시키는 개선된 제제(formulation)에 관한 것이다. 다른 실시양태는 수송 가능한 적용 및 투여 방법을 위한 키트에 있어서 본원에 개시된 조성물의 사용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 백신 및 백신 제제는 매우 다양한 질환들, 예컨대, 바이러스에 의해 야기된 질환의 유해 효과로부터 인간 및 동물을 보호하는 데 중요한 것으로 밝혀졌다. 바이러스 백신의 가장 성공적인 예방 기술들 중 하나는 바이러스의 약화된 또는 약독화된 균주("약독화된 생바이러스")로 동물 또는 인간을 면역화시키는 것이다. 면역원성 조성물의 부분인 적절하게 약독화된 바이러스 균주는 면역화 후 제한된 복제를 나타내므로, 질환을 발생시키지 않는다. 그러나, 약독화된 바이러스의 제한된 바이러스 복제는 바이러스 항원의 전체 레퍼토리를 발현하기에 충분하고 바이러스에 대한 강력한 장기 지속 면역 반응을 발생시킨다. 따라서, 바이러스의 병원성 균주에의 후속 노출 시, 면역화된 대상체는 질환을 발생시킬 감소된 가능성을 가진다. 이 약독화된 생바이러스 백신은 공중 보건에서 사용되는 가장 성공적인 백신들 중 하나이다.

[0006] 약독화된 생바이러스 백신이 효과적이기 위해, 이 백신은 면역화 후 복제할 수 있어야 하고, 예를 들면, 정확한 용량 농도가 대상체에게 전달되는 것을 보장하기 위해, 상기 바이러스 그 자신은 대상체에게 투여되기 전에 제조 및 수송 동안 분해로부터 보호되어야 한다. 일부 백신들은 극한의 온도에 민감하다; 과도한 가열 또는 우연한 냉동은 백신을 불활성화시킬 수 있다. 배포 전체에 걸쳐 이 "저온 유통 체계"를 유지하는 것은 개발도상국에서 특히 어렵다. 따라서, 백신의 제조뿐만 아니라 제제의 수송 및 전달도 개선하기 위해 기존 약독화된 생바이러스 및 생바이러스, 및 새로 개발된 약독화된 생바이러스 및 생바이러스 둘 다의 안정성을 개선할 필요성이 남아있다.

발명의 내용

[0007] 본원의 실시양태는 생플라비바이러스를 안정화시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 약독화된 또는 비약독화된 전체 생플라비바이러스를 안정화시키는 것에 관한 것이다. 다른 실시양태는 약독화된 또는 비약독화된 생플라비바이러스의 분해를 감소시키는 조성물 및 방법에 관한 것이다. 다른 실시양태는 제조(예를 들면, 백신 또는 항-바이러스 치료제), 저장, 수송 및 대상체에게의 투여 동안 약독화된 또는 비약독화된 생플라비바이러스의 안정화를 연장시키는 개선된 제제에 관한 것이다. 다른 실시양태는 수송 가능한 적용 및 방법을 위한 키트에 있어서 본원에 개시된 조성물 또는 제제의 용도에 관한 것이다.

[0008] 본원의 실시양태는 하나 이상의 생플라비바이러스, 하나 이상의 탄화수물 물질(agent), 및 하나 이상의 아미노산, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체를 포함할 수 있는 생바이러스를 안정화시키는 제제에 관한 것이다. 이 실시양태에 따르면, 본원에서 사용되는 제제는 생플라비바이러스를 안정화시킨다. 다른 실시양태에서, 본원에서 사용되는 제제는 상업적 용도를 위해 생플라비바이러스를 안정화시킨다.

[0009] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 플라비바이러스를 안정화시키는 제제들을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 플라비바이러스는 뎅기(dengue) 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 군진(Kunjin) 바이러스, 세인트 루이스(St. Louis) 뇌염 바이러스, 머레이 밸리(Murray Valley) 뇌염 바이러스, 지카(Zika) 바이러스, 또는 이들의 임의의 관련 바이러스를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0010] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 완충제를 추가로 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 완충제는 인산염 완충 식염수(PBS), 트리스(TRIS) 완충제, HEPES 완충제 등을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이 실시양태에 따르면, 완충제는 염화나트륨(NaCl), 인산일나트륨 및/또는 인산이나트륨(Na_2HPO_4), 염화칼륨(KCl) 및 인산칼륨(KH_2PO_4) 중 적어도 하나의 염을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제제의 완충제는 약 10.0 mM 내지 약 200.0 mM의 농도를 가진 염화나트륨(NaCl)을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를 안정화시키는 제제는 염화마그네슘($MgCl_2$)을 함유하지 않는

다.

[0011] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 하나 이상의 단백질 물질을 추가로 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 단백질 물질은 알부민, 젤라틴 및/또는 덱스트란을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 예를 들면, 알부민은 재조합 알부민, 천연 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 혈청 알부민(rHSA), 천연 인간 혈청 알부민(nHSA) 또는 알부민 유사 물질을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 다른 실시양태에서, 조성물 중의 하나 이상의 단백질 물질은 임의의 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 임의의 필적할만한 포유동물 혈청, 젤라틴, 덱스트란, 폴리올 중합체 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이 실시양태에 따르면, 본원에 개시된 제제 중의 하나 이상의 단백질 물질은 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v)의 농도를 가진 알부민, 예컨대, 인간 혈청 알부민 또는 재조합 알부민을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v)의 농도를 가진 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함할 수 있다.

[0012] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 제제의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스(예를 들면, D-트레할로스 탈수물), 갈락토스, 프럭토스, 락토스, 수크로스, 키토산, 만니톨 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 탄수화물 물질 농도는 약 0.5% 내지 약 15.0%(w/v)일 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제 중의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스 및/또는 수크로스를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 제제 중의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스 및 수크로스 중 적어도 하나와 함께 만니톨을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물 중의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스 및 수크로스 둘 다와 함께 만니톨을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 소르비톨을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 일부 제제는 폴록사머 407 또는 다른 폴록사머를 함유하지 않는다.

[0013] 일부 실시양태, 예를 들면, 상기 단락들 중 임의의 단락에 따른 실시양태에서, 제제 중의 하나 이상의 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 메티오닌 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산은 아미노산 유도체 또는 이의 염을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 아미노산 유도체는 글루탐산일나트륨(MSG) 또는 글루탐산칼륨을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체는 약 0.5 mM 내지 약 150.0 mM의 농도로 제제에 존재한다.

[0014] 일부 실시양태, 예를 들면, 상기 단락들 중 임의의 단락에 따른 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 하나 이상의 삼투질을 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 삼투질은 우레아(예를 들면, 카바마이드) 또는 다른 치환 가능한 물질, 예를 들면, 카프로락탐, PEG 400 또는 PEG 600을 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 삼투질 농도(예를 들면, 우레아)는 약 0.01% 내지 약 0.5%(w/v)일 수 있다.

[0015] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 완충제 및 우레아 중에 수크로스 및/또는 트레할로스를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 제제는 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산은 알라닌 및 메티오닌 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 이 제제는 만니톨 및 MSG 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 우레아 또는 아미노산 없이 완충제 중에 트레할로스 및 만니톨을 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 완충제는 PBS(또는 트리스, HEPES 또는 다른 적합한 완충제), NaCl 및 알부민(예를 들면, HSA)을 포함할 수 있다.

[0016] 일부 실시양태, 예를 들면, 상기 단락들 중 임의의 단락에 따른 실시양태에서, 제제는 기초 완충제, 수크로스, 알부민, 만니톨, 알라닌, 메티오닌, MSG 및/또는 우레아를 임의의 조합으로 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 특정 제제는 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v)의 농도를 가진 재조합 HSA, 약 1.0% 내지 약 15.0%(w/v)의 농도를 가진 수크로스 농도, 약 0.1% 내지 약 15.0%(w/v)의 농도를 가진 만니톨 농도, 약 0.5 mM 내지 약 100 mM의 농도를 가진 알라닌, 약 1.0 mM 내지 5.0 mM의 농도를 가진 메티오닌 농도, 약 1.0 mM 내지 약 50.0 mM의 농도를 가진 MSG 농도, 및 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v)의 농도를 가진 우레아 농도를 포함할 수 있다.

[0017] 일부 실시양태에서, 본원에서 고려되는 제제는 기초 완충제, 만니톨, 알라닌, 메티오닌, MSG 및 우레아 중에 재조합 알부민 또는 HSA, 트레할로스 및/또는 수크로스를 포함할 수 있다.

[0018] 일부 실시양태, 예를 들면, 상기 단락들 중 임의의 단락에 따른 실시양태에서, 재조합 HSA 농도는 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v)일 수 있고, 트레할로스 농도는 약 1.0% 내지 약 10.0%(w/v)일 수 있고, 수크로스 농도는 약 1.0% 내지 약 15.0%(w/v)일 수 있고, 만니톨 농도는 약 0.1% 내지 약 15.0%(w/v)일 수 있고, 알라닌은 약 0.5 mM 내지 약 100 mM일 수 있고, 메티오닌 농도는 약 1.0 mM 내지 5.0 mM일 수 있고, MSG 농도는 약 5.0 mM 내지

약 100.0 mM일 수 있고, 우레아 농도는 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v)일 수 있다.

[0019] 일부 실시양태, 예를 들면, 상기 단락들 중 임의의 단락에 따른 실시양태에서, 제제는 재조합 HSA, 수크로스, 알라닌 및 우레아를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 재조합 HSA 농도는 약 0.01% 내지 약 0.2%일 수 있고, 수크로스 농도는 약 1.0% 내지 약 15.0%(w/v)일 수 있고, 알라닌은 약 0.5 mM 내지 약 100 mM일 수 있고, 우레아 농도는 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v)일 수 있다. 이 단락에 관한 특정 실시양태에서, 수크로스는 약 1.0% 내지 약 10%(w/v) 농도의 트레할로스로 대체될 수 있다.

[0020] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 생플라비바이러스를 안정화시키는 것은 이 물질들 중 하나 이상의 물질을 함유하지 않은 조성물에 비해 냉동 시, 냉동건조 시, 냉장 온도에서, 실온에서 및 약 25℃에서 하나 이상의 생플라비바이러스의 손실 또는 분해를 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 고려되는 하나 이상의 생플라비바이러스를 안정화시키는 것은 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이상의 손실 또는 분해 감소를 수득하는 것을 포함할 수 있다.

[0021] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 생플라비바이러스를 포함하는 제제를 부분적으로 또는 전체적으로 탈수시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 방법은 면역원성 조성물(예를 들면, 백신 조성물)의 부분으로서 대상체에게 투여하기 전에 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를 포함하는 제제를 부분적으로 또는 전체적으로 재수화시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 방법은 본원에 개시된 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스 조성물을 냉동시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0022] 다른 실시양태는 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를 안정화시키는 키트에 관한 것이다. 이 실시양태에 따르면, 키트는 본원에 개시된 임의의 조성물 또는 제제 및 적어도 하나의 용기를 포함할 수 있다.

[0023] 특정 실시양태는 본원에 개시된 약독화된 생플라비바이러스 조성물, 및 의학적 상태, 예컨대, 하나 이상의 플라비바이러스에 의해 야기된 감염 또는 질환의 발생을 감소시킬 수 있거나 예방할 수 있는 면역원성 조성물(예를 들면, 백신)을 제조하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 약독화된 생플라비바이러스는 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 포함할 수 있는 약학 조성물의 부분일 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 약학 조성물은 대상체에게 투여되고/되거나 대상체에게 투여되도록 준비될 때 플라비바이러스 감염에 의해 야기된 상태의 발생을 감소시키기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체는 포유동물, 예를 들면, 사육 동물, 애완동물, 가축, 다른 동물 또는 인간 대상체(예를 들면, 성인, 청소년 또는 소아)일 수 있다.

[0024] 일부 실시양태에서, 조성물은 재조합 HSA 또는 HSA, 수크로스, 메티오닌 및 우레아를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 재조합 HSA 또는 HSA는 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 수크로스는 약 0.5% 내지 약 10.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 메티오닌은 약 1.0 mM 내지 약 5.0 mM의 농도를 가질 수 있고, 우레아는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, 재조합 HSA 또는 HSA, 수크로스, 메티오닌 및 우레아를 가진 제제는 약 5.0 mM 내지 약 25.0 mM의 알라닌, 약 1.0% 내지 약 15%(w/v)의 만니톨 및 약 1.0 mM 내지 약 20.0 mM의 글루탐산일나트륨(MSG) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이 단락의 조성물은 본원에 개시된 수크로스 기초 완충제에 존재할 수 있다. 다른 실시양태에서, 수크로스는 이 단락의 이 조성물에서 트레할로스로 대체될 수 있다.

[0025] 다른 실시양태에서, 조성물은 재조합 HSA, 수크로스 및/또는 트레할로스, 아르기닌 및 우레아를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 재조합 HSA 또는 HSA는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 수크로스 및/또는 트레할로스는 약 0.5% 내지 약 10.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 아르기닌은 약 1.0 mM 내지 약 50.0 mM의 농도를 가질 수 있고, 우레아는 약 0.01% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가질 수 있다.

[0026] 일부 실시양태에서, 조성물은 재조합 HSA, 수크로스 및/또는 트레할로스, MSG(글루탐산일나트륨) 및 우레아를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 재조합 HSA 또는 HSA는 약 0.05% 내지 약 2.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 수크로스 및/또는 트레할로스는 약 0.5% 내지 약 10.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, MSG는 약 1.0 mM 내지 약 20.0 mM의 농도를 가질 수 있고, 우레아는 약 0.01% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가질 수 있다.

[0027] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 하나 이상의 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를, 하나 이상의 탄수화물 물질 및 하나 이상의 아미노산, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체를 포함하는 제제와 조합하는 단계를 포함할 수 있다. 이 방법에 따르면, 본원에 개시된 제제는 하나 이상의 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를 분해로부터 안정화시킬 수 있다. 본원에 개시된 제제는 예를 들면, 플라비바이러스의 임의의 혈청형 또는 균주를 안정화시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 플라비바이러스는 외피 바이러스, 예를 들면, 뎅기 바이러스(예를 들면, 혈청형 1 내지 4), 황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스

및 지카 바이러스를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 하기 도면은 본 명세서의 부분을 형성하고 본원에 개시된 일부 실시양태의 특정 양태를 더 입증하기 위해 포함된다. 특정 실시양태는 본원에서 제공된 상세한 설명과 함께 이 도면들 중 하나 이상의 도면을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1은 본원에 개시된 일부 실시양태에 따라 다양한 제제들에서 생플라비바이러스의 안정성을 분석하는 동안 수행된 실험들로부터 수득된 데이터를 보여주는 예시적 히스토그램 도표를 나타낸다.

도 2는 본원에 개시된 일부 실시양태에 따라 동결건조 전, 동결건조 후, 및 동결건조 및 약 5주 동안 실온(예를 들면, 25℃) 저장 후 다양한 제제들에서 생플라비바이러스의 안정성을 분석하는 동안 수행된 실험들로부터 수득된 데이터를 보여주는 예시적 막대 그래프를 나타낸다.

도 3a 및 3b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 동결건조 후 5주 동안 실온(예를 들면, 25℃)에 노출시킨 후 생플라비바이러스의 안정성을 시험하기 위해 다양한 제제들을 사용한 실험들로부터의 데이터를 나타내는 예시적 그래프이다: 50% 벌크 약물 물질(BDS 용량)(직선 삼각형) 및 현재 용량(CTM 용량)(직선 사각형) 둘 다에서 log 손실(도 3a) 및 총 log 손실(도 3b).

도 4a 및 4b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 동결건조 후 5주 동안 실온(예를 들면, 25℃)에 노출시킨 후 생플라비바이러스의 안정성을 시험하기 위해 다양한 제제들을 사용한 실험들로부터의 데이터를 나타내는 예시적 그래프이다: 50% BDS(직선 삼각형) 및 CTM(직선 사각형) 둘 다에서 log 손실(도 4a) 및 총 log 손실(도 4b).

도 5a 및 5b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 동결건조 후 5주 동안 실온(예를 들면, 25℃)에 노출시킨 후 생플라비바이러스의 안정성을 시험하기 위해 다양한 제제들을 사용한 실험들로부터의 데이터를 나타내는 예시적 그래프이다: 50% BDS(직선 삼각형) 및 CTM(직선 사각형) 둘 다에서 log 손실(도 5a) 및 총 log 손실(도 5b).

도 6a 및 6b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 동결건조 후 5주 동안 실온(예를 들면, 25℃)에 노출시킨 후 생플라비바이러스의 안정성을 시험하기 위해 다양한 제제들을 사용한 실험들로부터의 데이터를 나타내는 예시적 그래프이다: 50% BDS(직선 삼각형) 및 CTM(직선 사각형) 둘 다에서 log 손실(도 6a) 및 총 log 손실(도 6b).

도 7a 내지 7d는 본원에 개시된 한 실시양태에서 액체 형태 및 동결건조된 형태 둘 다에서 플라비바이러스 바이러스 효능에 대한 (트레할로스를 함유하는 기초 완충제 중의) 단일 부형제의 효과를 보여주는 예시적 막대 그래프를 나타낸다.

도 8a 및 8b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 액체 형태 및 동결건조된 형태 둘 다에서 플라비바이러스 바이러스 효능, 안정성 손실(도 8a) 및 동결건조 log 손실(도 8b)에 대한 (수크로스를 함유하는 기초 완충제 중의) 단일 부형제의 효과를 보여주는 예시적 그래프를 나타낸다.

도 9a 및 9b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 액체 형태 및 동결건조된 형태 둘 다에서 플라비바이러스 바이러스 효능, 동결건조 log 손실(도 9a) 및 안정성 손실(도 9b)에 대한 (트레할로스를 함유하는 기초 완충제 중의) 단일 부형제 및 부형제 조합물의 효과를 보여주는 예시적 그래프를 나타낸다.

도 10a 및 10b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 플라비바이러스 안정성 및 log 손실에 대한 (염기 완충제 중의) 상이한 물질들, 탄수화물(예를 들면, 트레할로스 및 수크로스) 및 만니톨의 효과에 대한 스크리닝으로부터의 데이터를 나타내는 예시적 그래프이다.

도 11a 및 11b는 본원에 개시된 한 실시양태에서 플라비바이러스 효능 손실에 대한 부형제 스크리닝 데이터 세트의 예시적 요약이다.

도 12a 내지 12c는 본원에 개시된 일부 실시양태에서 동결건조된(-80℃에서 저장된), 액체에서의 역가를 위해 제제화된 플라비바이러스에 대한 실험 제제들의 확정적 스크리닝 디자인(DSD) 디자인, 및 수송될 샘플(25℃에서 저장된 동결건조된 제제)의 전체 안정성(도 12a) 및 안정성 추세(도 12b) 및 시험된 다양한 조건들 하에서의 log 하락을 보여주는 예시적 막대 그래프이다.

도 13a 내지 13c는 본원에 개시된 일부 실시양태에서 제제 디자인 및 바이러스 역가 손실에 대한 (4가 면역원성 조성물 중의) 플라비바이러스 혈청형을 나타내는 예시적 막대 그래프이다.

도 14a 내지 14d는 본원에 개시된 일부 실시양태에서 약 39주 동안 냉장 온도(예를 들면, 4℃)에서 저장된 동결

건조된 면역원성 제제로서 상이한 플라비바이러스들(예를 들면, 뎅기-1, 뎅기-2, 뎅기-3 및 뎅기-4)을 나타내는 예시적 선 그래프이다.

도 15a 및 15b는 본원에 개시된 일부 실시양태에서 플라비바이러스 효능, 동결건조 log 손실(도 15a) 및 안정성 log 손실(도 15b)에 대한 다양한 부형제 조합물들의 효과에 대한 스크리닝으로부터의 데이터를 나타내는 예시적 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] **정의**

[0030] 본원에서 사용된 바와 같이, 단수형 용어는 하나 또는 하나 초과의 항목, 성분 또는 요소를 의미할 수 있다.

[0031] 본원에서 사용된 바와 같이, "약"은 플러스 또는 마이너스 5 퍼센트까지 포함할 수 있다는 것을 의미할 수 있고, 예를 들면, 약 100 mM은 95 mM 및 최대 105 mM을 의미할 수 있다.

[0032] 본원에서 사용된 바와 같이, "TDV"는 예시적 뎅기 바이러스(예를 들면, 약독화된 뎅기 생바이러스 혈청형, TDV-1), 뎅기-뎅기 키메라, 뎅기-2 골격을 가진 뎅기 키메라(예를 들면, 뎅기-2 PDK-53, 또는 PDK-53 등과 적어도 95% 상동성을 가진 이의 변형된 버전)를 지칭한다.

[0033] 본원에서 사용된 바와 같이, "DMEM"은 둘베코의 변형된 최소 필수 배지를 의미할 수 있다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이, "PBS"는 인산염 완충 식염수를 의미할 수 있다.

[0035] 본원에서 사용된 바와 같이, "FBS"는 태아 소 혈청을 의미할 수 있다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이, "HSA"는 인간 혈청 알부민을 의미할 수 있다.

[0037] 본원에서 사용된 바와 같이, "Lyo"는 기준물의 프레임에 따라 동결건조 또는 탈수를 의미할 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "대상체" 또는 "대상체들"은 포유동물, 예컨대, 인간(예를 들면, 성인, 청소년, 어린 소아 또는 유아) 또는 사육된 또는 야생 포유동물, 예를 들면, 개, 고양이, 다른 가정 애완동물(예를 들면, 햄스터, 기니 피그, 마우스, 래트), 흰담비, 토끼, 돼지, 염소, 말, 소, 다른 가축, 프레리도그, 야생 설치류 또는 동물원 동물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "바이러스 키메라", "키메라 바이러스", "플라비바이러스 키메라" 및 "키메라 플라비바이러스"는 한 구축물로 표시된 적어도 2개의 상이한 바이러스들을 가진 키메라를 의미할 수 있고, 예를 들면, 플라비바이러스 키메라의 구축물은 각각의 플라비바이러스로부터의 비-구조 요소 및 구조 요소를 포함함으로써 표시된 2개의 상이한 플라비바이러스들을 가진다. 플라비바이러스 키메라의 예로는 뎅기 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 지카 바이러스 및 이들의 임의의 조합물이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 예를 들면, 뎅기-뎅기, 뎅기-지카 또는 황열/뎅기 키메라가 고려된다.

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "뎅기-뎅기 키메라"는 뎅기-뎅기 키메라를 구성하는 적어도 2개의 상이한 뎅기 바이러스 혈청형들을 의미할 수 있다.

[0041] 본원에서 사용된 바와 같이, "핵산 키메라"는 적어도 2개의 상이한 바이러스들로부터의 핵산 서열을 포함하는 본 개시의 구축물을 의미할 수 있고, 예를 들면, 본원에 개시된 키메라 플라비바이러스 또는 뎅기-뎅기 키메라는 핵산 키메라일 수 있다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, "생플라비바이러스"는 (예를 들면, 약독화된 생플라비바이러스를 제조하는 데 사용되는) 야생형 생플라비바이러스를 의미할 수 있다. "약독화된 생플라비바이러스"는 돌연변이를 가진 생플라비바이러스, 플라비바이러스 키메라, 또는 형질에 대해 선택된 다른 플라비바이러스를 의미할 수 있고, 이때 상기 바이러스는 감소된 감염성을 갖거나 감염성을 갖지 않고 감소된 증폭을 갖거나 (예를 들면, 모기를 통해) 한 숙주로부터 또 다른 숙주로 전파될 수 없고 면역원성 조성물의 제조에 있어서 유용하고, 다른 형질은 감소된 병독성, 증가된 안전성, 증가된 효능 또는 개선된 생장 등을 포함할 수 있다.

[0043] **상세한 설명**

[0044] 하기 단락들에서, 다양한 실시양태들을 상세히 설명하기 위해 다양한 예시적 조성물들 및 방법들이 기재된다. 다양한 실시양태들을 실시하는 것이 본원에 요약된 특정 세부사항들 전부 또는 심지어 이들의 일부의 사용을 요

구하지 않고, 오히려 농도, 시간 및 다른 특정 세부사항들이 관례적인 실험을 통해 변형될 수 있다는 것은 관련 분야에서 숙련된 자에게 자명할 것이다. 일부 실시양태에서, 잘 공지되어 있는 방법 또는 성분은 설명에 포함되지 않았다.

[0045] 특정 실시양태에서, 면역원성 또는 백신 제제에서 사용되는 생플라비바이러스의 안정성은 본원에 개시된 다양한 제제에서 연구되었다. 특정 실시양태에서, 플라비바이러스 안정성을 증가시켜 액체 생플라비바이러스 제제, 냉동된 생플라비바이러스 제제, 동결건조된 생플라비바이러스 제제, 부분적으로 동결건조된 생플라비바이러스 제제 및 재수화된 생플라비바이러스 제제의 역가 손실을 감소시키는 제제가 입증되었다.

[0046] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 플라비바이러스를 안정화시키는 제제들을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 플라비바이러스는 뎅기 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 군진 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 머레이 밸리 뇌염 바이러스, 지카 바이러스, 또는 이들의 임의의 관련 바이러스를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0047] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 완충제를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 완충제는 인산염 완충 식염수(PBS), 히스티딘, 트리스, 2-[4-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설폰산(HEPES) 또는 유사한 완충제를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이 실시양태에 따르면, 완충제는 염화나트륨(NaCl), 인산일나트륨 및/또는 인산이나트륨(Na_2HPO_4), 염화칼륨(KCl) 및 인산칼륨(KH_2PO_4) 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제제의 완충제는 약 10.0 mM 내지 약 200.0 mM; 또는 10 mM 내지 약 150 mM; 또는 약 15 mM 내지 약 75 mM; 또는 약 15 mM 내지 약 50 mM의 농도를 가진 NaCl, 인산일나트륨 및/또는 인산이나트륨(Na_2HPO_4), 염화칼륨(KCl) 및 인산칼륨(KH_2PO_4) 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 생플라비바이러스를 안정화시키는 제제는 염화마그네슘($MgCl_2$)을 함유하지 않는다.

[0048] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 하나 이상의 단백질 물질을 추가로 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 단백질 물질은 알부민, 젤라틴 및/또는 덱스트란을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 예를 들면, 알부민은 재조합 알부민, 천연 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 알부민 유사 물질을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 다른 실시양태에서, 조성물 중의 하나 이상의 단백질 물질은 임의의 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 임의의 필적할만한 포유동물 혈청, 젤라틴, 덱스트란, 폴리올 중합체 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0049] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제제 중의 하나 이상의 단백질 물질은 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v); 또는 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v); 또는 0.05% 내지 약 0.5%(w/v); 또는 0.075% 내지 0.2%(w/v); 또는 0.1% 내지 0.3%(w/v)의 농도를 가진 알부민, 예컨대, 인간 혈청 알부민 또는 재조합 알부민을 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 본원에 개시된 임의의 제제는 약 0.01% 내지 약 2.0%의 농도를 가진 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함할 수 있다.

[0050] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 제제의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스, 갈락토스, 프럭토스, 락토스, 수크로스, 키토산, 만니톨 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 탄수화물 물질 농도는 약 0.5% 내지 약 15.0%(w/v); 또는 약 1.0% 내지 약 10%; 또는 약 5.0% 내지 약 8.0%일 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물 중의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스 및/또는 수크로스를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물 중의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스 및 수크로스 중 적어도 하나와 함께 만니톨을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물 중의 하나 이상의 탄수화물 물질은 트레할로스 및 수크로스 둘 다와 함께 만니톨을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제의 하나 이상의 탄수화물 물질은 10%(w/v) 이하의 탄수화물 농도를 가진다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 제제의 하나 이상의 탄수화물 물질은 10%(w/v) 미만의 탄수화물 농도를 가진다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 소르비톨을 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 폴록사머 407 또는 다른 폴록사머를 함유하지 않는다.

[0051] 일부 실시양태에서, 제제 중의 하나 이상의 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 메티오닌 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산은 아미노산 유도체 또는 이의 염을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 아미노산 유도체는 글루탐산일나트륨(MSG) 또는 글루탐산칼륨을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 또는 이의 유도체는 약 0.5 mM 내지 약 150.0 mM; 또는 약 0.5 mM 내지 100 mM; 또는 약 1 mM 내지 약 50 mM; 또는 약 1.0 mM 내지 약 15.0 mM; 또는 약 2.5 mM 내지 10 mM의 농도로 제제에 존재한다.

[0052] 일부 실시양태, 예컨대, 상기 단락들 중 임의의 단락에 따른 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 하나 이상의 삼투질을 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 삼투질은 우레아(예를 들면, 카바마이드) 또는 다른 치환 가능한 물질, 예를 들면, 카프로락탐, PEG 400 또는 PEG 600을 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 삼투질 농도는 약 0.01% 내지 약 1.0%(w/v); 또는 약 0.01% 내지 약 0.5%(w/v); 또는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v); 또는 약 0.075% 내지 약 0.4%(w/v) 또는 약 0.125%(w/v)일 수 있다.

[0053] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 수크로스 또는 트레할로스, 하나 이상의 아미노산 및 우레아를 추가로 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 이 제제는 만니톨, MSG 및 우레아 중 적어도 하나를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 적합한 완충제 중의 트레할로스 및 완충제 중의 만니톨을 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 완충제는 PBS 또는 트리스 또는 HEPES 또는 다른 적합한 완충제, NaCl 및 알부민(예를 들면, HSA)을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 완충제는 PBS 또는 HEPES이다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산은 알라닌 및/또는 메티오닌을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 제제는 적합한 완충제 중의 수크로스 및 우레아를 포함할 수 있다.

[0054] 특정 실시양태에서, 플라비바이러스 제제는 하나 이상의 생플라비바이러스, 완충제, 하나 이상의 아미노산, 및 하나 이상의 탄수화물 물질을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 예를 들면, 본원에 개시된 면역원성 조성물 및 백신 제제는 염 및 트레할로스, 수크로스, 또는 트레할로스와 수크로스의 조합물과 함께 또는 이들 없이 약 1.0 내지 30.0 mM 인산염 완충제, 약 1.0 내지 30.0 HEPES 완충제, 약 1.0 내지 30.0 히스티딘 완충제, 약 1.0 내지 30.0 트리스 완충제의 농도를 가진 완충제를 포함할 수 있다. 다른 예시적 면역원성 조성물 또는 백신 제제는 약 7.2의 pH에서 약 10.0 내지 약 100 mM 염화나트륨을 가진 약 1.0 내지 30.0 mM 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함할 수 있다. 하기 표 1을 참조한다.

표 1

면역원성 조성물의 예시적 제제

번호	당	완충제	NaCl
1	트레할로스(10%) + 0.1% HSA	10 mM 인산염 완충제(pH: 7.2)	-
2		10 mM 인산염 완충제(pH: 7.2)	50 mM
3		10 mM HEPES 완충제(pH: 7.2)	-
4		10 mM HEPES 완충제(pH: 7.2)	50 mM
5		10 mM 히스티딘 완충제(pH: 7.2)	-
6		10 mM 히스티딘 완충제(pH: 7.2)	50 mM
7		10 mM 트리스 완충제(pH: 7.2)	-
8		10 mM 트리스 완충제(pH: 7.2)	50 mM
9	수크로스(10%) + 0.1% HSA	10 mM 인산염 완충제(pH: 7.2)	-
10		10 mM 인산염 완충제(pH: 7.2)	50 mM
11		10 mM HEPES 완충제(pH: 7.2)	-
12		10 mM HEPES 완충제(pH: 7.2)	50 mM
13		10 mM 히스티딘 완충제(pH: 7.2)	-
14		10 mM 히스티딘 완충제(pH: 7.2)	50 mM
15		10 mM 트리스 완충제(pH: 7.2)	-
16		10 mM 트리스 완충제(pH: 7.2)	50 mM
17	대조군 기준 제제 (15% 트레할로스 + 0.1% HSA + % Pluronic F127®)	10 mM 인산염 완충제(pH: 7.4)	137 mM

[0055]

[0056] 다른 실시양태에서, 제제는 기초 완충제, 수크로스, 알부민, 만니톨, 알라닌, 메티오닌, MSG 및/또는 우레아를 임의의 조합으로 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 특정 제형은 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v) 또는 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v)의 농도를 가진 재조합 HSA, 약 1.0% 내지 약 15%(w/v) 또는 10%(w/v) 미만의 농도를 가진 수크로스 농도, 약 0.5% 내지 약 15.0%(w/v)의 농도를 가진 만니톨 농도, 약 0.5 mM 내지 약 100 mM 또는 약 5.0 mM 내지 약 50 mM의 농도를 가진 알라닌, 약 1.0 mM 내지 5.0 mM 또는 약 1.5 mM 내지 약 3.0 mM의 농도를 가진 메티오닌 농도, 약 5.0 mM 내지 약 100.0 mM 또는 약 5.0 mM 내지 약 25 mM의 농도를 가진 MSG 농도, 및 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v) 또는 약 0.1% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가진 우레아 농도를 포함할 수 있다.

[0057] 일부 실시양태에서, 본원에서 고려되는 제제는 재조합 알부민 또는 HSA, 트레할로스, 만니톨, 알라닌, 메티오닌, MSG 및 우레아를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 재조합 HSA 농도는 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v) 또는 약 0.05% 내지 약 1.0%일 수 있고, 트레할로스 농도는 약 1.0% 내지 약 15.0%(w/v) 또는 약 2.5% 내지 10% 미만일 수 있고, 만니톨 농도는 약 0.1% 내지 약 10.0%(w/v)일 수 있고, 알라닌은 약 1.0 mM 내지 약 50 mM 또는 약 5 mM 내지 약 25 mM일 수 있고, 메티오닌 농도는 약 0.05 mM 내지 약 5.0 mM 또는 약 0.1 mM 내지 약 4.0 mM일 수 있고, MSG 농도는 약 1.0 mM 내지 약 50.0 mM 또는 약 5.0 mM 내지 약 25.0 mM일 수 있고, 우레아 농도는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v) 또는 약 0.05% 내지 약 0.3%(w/v)일 수 있다.

[0058] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 재조합 HSA, 수크로스, 알라닌 및 우레아를 포함할 수 있다. 다른 실

시양태에서, 재조합 HSA 농도는 약 0.01% 내지 약 2.0%(w/v) 또는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v)일 수 있고, 수크로스는 약 1.0% 내지 약 10% 또는 약 5%의 농도일 수 있고, 알라닌 농도는 약 1.0 mM 내지 약 50 mM일 수 있고, 우레아 농도는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v) 또는 약 0.05% 내지 약 0.3%(w/v)일 수 있다.

[0059] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 생플라비바이러스를 안정화시키는 것은 이 물질들 중 하나 이상의 물질을 함유하지 않은 조성물에 비해 냉동 시, 냉동건조 시, 냉장 온도에서, 실온에서 및 약 25℃에서 하나 이상의 생플라비바이러스의 손실 또는 분해를 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 고려되는 하나 이상의 생플라비바이러스를 안정화시키는 것은 본원에 개시된 조성물 및 방법에 의해 제제화될 때 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 손실의 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이상의 감소를 수득하는 것을 포함할 수 있다.

[0060] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 생플라비바이러스를 포함하는 제제를 부분적으로 또는 전체적으로 탈수시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 방법은 면역원성 조성물(예를 들면, 백신 조성물)의 부분으로서 대상체에게 투여하기 전에 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를 포함하는 제제를 부분적으로 또는 전체적으로 재수화시키는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 방법은 본원에 개시된 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스 조성물을 냉동시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0061] 본원에 개시된 특정 실시양태는 약독화된 생플라비바이러스 조성물, 및 의학적 상태, 예컨대, 본원에서 고려되는 플라비바이러스들 중 하나 이상의 플라비바이러스에 의해 야기된 감염 또는 질환의 발생을 감소시킬 수 있거나 예방할 수 있는 면역원성 조성물(예를 들면, 백신)을 제조하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 약독화된 생플라비바이러스는 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 포함할 수 있는 약학 조성물의 부분일 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 약학 조성물은 대상체에게 투여되고/되거나 대상체에게 투여되도록 준비될 때 플라비바이러스 감염에 의해 야기된 상태의 발생을 감소시키기 위해 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체는 포유동물, 예를 들면, 사육 동물, 애완동물, 가축, 다른 동물 또는 인간 대상체(예를 들면, 성인, 청소년 또는 소아)일 수 있다.

[0062] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 재조합 HSA 또는 HSA, 수크로스, 메티오닌 및 우레아를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 재조합 HSA는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 수크로스는 약 0.5% 내지 약 10.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 메티오닌은 약 1.0 mM 내지 약 5.0 mM의 농도를 가질 수 있고, 우레아는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, 재조합 HSA 또는 HSA, 수크로스, 메티오닌 및 우레아를 가진 제제는 약 5.0 mM 내지 약 25.0 mM의 알라닌, 약 1.0% 내지 약 15%(w/v)의 만니톨 및 약 1.0 mM 내지 약 20.0 mM의 글루탐산일나트륨(MSG) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이 단락의 조성물은 본원에 개시된 수크로스 기초 완충제에 존재할 수 있다.

[0063] 다른 실시양태에서, 조성물은 재조합 HSA, 수크로스 및/또는 트레할로스, 아르기닌 및 우레아를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 재조합 HSA 또는 HSA는 약 0.05% 내지 약 1.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 수크로스 및/또는 트레할로스는 약 0.5% 내지 약 10.0%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 아르기닌은 약 1.0 mM 내지 약 50.0 mM의 농도를 가질 수 있고, 우레아는 약 0.01% 내지 약 0.5%(w/v) 또는 약 0.05% 내지 약 0.3%(w/v)의 농도를 가질 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에서, 조성물은 재조합 HSA, 수크로스 및/또는 트레할로스, MSG(글루탐산일나트륨) 및 우레아를 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 재조합 HSA 또는 HSA는 약 0.05% 내지 약 0.5%(w/v)의 농도를 가질 수 있고, 수크로스 및/또는 트레할로스는 약 0.5% 내지 약 15.0%(w/v) 또는 10%(w/v) 미만의 농도를 가질 수 있고, MSG는 약 1.0 mM 내지 약 20.0 mM의 농도를 가질 수 있고, 우레아는 약 0.01% 내지 약 0.5%(w/v) 또는 약 0.05% 내지 약 0.3%(w/v)의 농도를 가질 수 있다.

[0065] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 하나 이상의 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를, 하나 이상의 탄수화물 물질 및 하나 이상의 아미노산, 또는 이의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체를 포함하는 제제와 조합하는 단계를 포함할 수 있다. 이 방법에 따르면, 본원에 개시된 제제는 하나 이상의 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를 분해로부터 안정화시킬 수 있다. 본원에 개시된 제제는 예를 들면, 플라비바이러스의 임의의 혈청형 또는 균주를 안정화시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 플라비바이러스는 외피 바이러사, 예를 들면, 뎅기 바이러스(예를 들면, 혈청형 1 내지 4), 황열 바이러스, 웨스트 나일 바이러스 및 지카 바이러스를 포함한다.

[0066] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 완충제 중의 플라비바이러스, 우레아, 및 알라닌, 아르기닌, 메티

오닌 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는 하나 이상의 아미노산, 및 수크로스, 트레할로스 및/또는 만니톨 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는 하나 이상의 탄수화물 물질을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 특정 조성물은 염 또는 염 용액도 포함할 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 이 플라비바이러스 제제는 조성물에서 바이러스 역가의 유의미한 손실 없이 약 -80℃ 내지 약 40℃ 또는 더 높은 온도에서 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 액체, 냉동된 또는 동결건조된 저장을 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 본원에 개시된 제제를 사용하여 4℃ 및 25℃에서의 장기간 저장을 달성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 조성물은 부분적으로 또는 전체적으로 탈수될 수 있고/있거나 수화될 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 본원에 개시된 플라비바이러스 제제의 장기간 저장은 동결건조된 제제의 가속화된 저장 및 5주 초과의 장기간 동안 실온에서의 수송 또는 저장을 포함할 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 본 개시의 조성물 및 제제로부터 이익을 얻을 것으로 본원에서 고려되는 생플라비바이러스는 뎅기 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 황열 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 군진 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 머레이 밸리 뇌염 바이러스, 지카 바이러스 및 이들의 임의의 관련 플라비바이러스를 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이 실시양태에 따르면, 백신에서 사용되는 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스는 다양한 온도에서 저장될 수 있고, 이때 본원에 개시된 제제는 예를 들면, 플라비바이러스의 분해를 감소시킴으로써, 예컨대, 제제에서 플라비바이러스의 역가 손실을 감소시킴으로써 제제의 안정성을 증가시킨다. 따라서, 플라비바이러스를 보존하기 위한 이 제제의 사용은 감소된 생산 비용 및 시간으로 면역원성 조성물의 형태로 공지된 용량의 플라비바이러스를 효율적으로 제조하고 수송하고 전달하는 용액을 제공한다. 개시된 제제는 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스 면역원성 조성물을, 이러한 조성물을 필요로 하는 환자에게 보다 더 정확히 전달할 수 있게 한다.

[0068] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 백신 조성물을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 데 사용되는 백신 조성물을 제조하는 방법에서 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 플라비바이러스 감염 또는 이의 합병증에 대한 면역원성 조성물이 제공된다. 예를 들면, 본원에 개시된 조성물은 백신 또는 면역원성 조성물을 제조하기 위해 사용될 수 있고, 이때 개선된 저장 조건 및 감소된 플라비바이러스 분해가 추구된다. 다른 실시양태에서, 공지된 양의 플라비바이러스를 대상체에게 더 정확히 전달하기 위해 하나 이상 또는 모든 4개의 뎅기 바이러스 혈청형들을 본원에 개시된 면역원성 조성물로 제조하여 플라비바이러스의 분해를 감소시킬 수 있거나 바이러스 역가를 보존할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조합될 때, 면역원성 조성물은 플라비바이러스의 하나 초과의 종 또는 균주에 의한 감염으로부터의 동시적인 보호를 보다 더 정확히 부여하기 위해 다가(예를 들면, 2가, 3가 및 4가) 백신 조성물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 플라비바이러스는 생플라비바이러스 및/또는 약독화된 생플라비바이러스를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 플라비바이러스의 하나 초과의 혈청형 또는 균주, 또는 상이한 플라비바이러스들 또는 키메라들이 면역원성 조성물에서 조합될 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 본원에 개시된 조성물은 플라비바이러스에 대한 면역원성 조성물을 보다 더 정확히 전달하기 위한 안정화 제제를 제공할 수 있고, 이때 생플라비바이러스의 수송 및 저장 생존이 개선된다.

[0069] 특정 조성물에서, 약독화된 생플라비바이러스는 2개 이상의 상이한 플라비바이러스들, 예컨대, 키메라로부터의 하나 이상의 단백질을 코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물 및 제제는 TDV-1(예를 들면, 뎅기 혈청형 1, 뎅기 1/2 키메라), TDV-2(예를 들면, 뎅기 혈청형 2, 변형된 약독화된 뎅기-2 생바이러스), TDV-3(예를 들면, 뎅기 혈청형 3, 뎅기 3/2 키메라) 및 TDV-4(예를 들면, 뎅기 혈청형 4, 뎅기 4/2 키메라), 및 이들의 조합물로서 언급된 하나 이상의 뎅기 혈청형을 포함할 수 있다. 임의의 뎅기 바이러스 구축물(예를 들면, 임의의 플라비바이러스 키메라) 또는 약독화된 뎅기 생바이러스가 본원에 개시된 제제에 의해 안정화될 수 있다고 생각된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 약독화된 뎅기 생바이러스 키메라는 하나의 뎅기 바이러스(예를 들면, 뎅기-2 바이러스)의 비-구조 단백질 유전자 또는 이의 균등물, 및 적어도 제2 플라비바이러스(예를 들면, 황열, 다른 뎅기 혈청형, 지카 바이러스)의 구조 단백질 유전자들 또는 이들의 면역원성 부분들 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 예를 들면, 특정 실시양태는 하나 이상의 플라비바이러스에 대한 1가, 2가, 3가 또는 4가 제제로서 뎅기-뎅기, 뎅기-황열, 뎅기-지카, 뎅기-웨스트 나일, 뎅기-JEV 또는 다른 플라비바이러스 키메라에 관한 것이다.

[0070] 일부 실시양태는 하나 이상의 플라비바이러스를, 본원에 개시된 플라비바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있는 조성물과 조합하는 단계를 포함하나 이것으로 한정되지 않는, 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 불활성화를 감소시키는 방법에 관한 것으로서, 이때 상기 조성물은 플라비바이러스의 불활성화를 감소시킨다. 이 실시양태에 따르면, 생플라비바이러스는 특정 플라비바이러스, 예컨대, 외피 플라비바이러스, 예컨대, 뎅기 바이러스 혈청형과 유사한 특징을 가진 플라비바이러스; 및 플라비바이러스, 예컨대, 뎅기 바이러스, 지카

바이러스 및 황열 바이러스와 유사한 유전자 구성, 구조 및 비-구조 단백질 배치 및/또는 이차 구조 등을 가진 다른 플라비바이러스를 포함할 수 있다. 예를 들면, 이 제제는 특정 과정, 예컨대, 캡시드화 과정, 제조 과정, 수송 과정, 및 제제화된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 과정 등 동안 플라비바이러스의 분해를 감소시킬 수 있다. 플라비바이러스는 여러 공통된 특징, 예컨대, 공통된 크기(40 내지 65 nm), 대칭(외피, 20면체 뉴클레오캡시드), 핵산(약 10,000개 내지 11,000개 염기의 양성 센스 단일 가닥 RNA)을 공유한다. 임의의 플라비바이러스 또는 RNA 외피 바이러스가 본원에 개시된 조성물에 의해 안정화될 수 있다고 생각된다.

[0071] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 약독화된 생플라비바이러스 또는 생플라비바이러스 키메라는 약학 조성물로 제제화될 수 있고, 이때 상기 약학 조성물은 단독으로 또는 다른 면역원성 물질과 함께 투여될 수 있고/있거나, 대상체에게 투여될 백신 조성물을 제조하는 데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물을 사용하여 1가, 2가, 3가 또는 4가 뎅기 바이러스 조성물을 약학 조성물로 제제화하여, 예를 들면, 수송 동안 제제의 분해를 감소시킬 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 플라비바이러스는 본원에 개시된 임의의 제제에서 동결건조될 수 있고 역가의 유의미한 손실 없이 실온에서 수송될 수 있다(일부 예시적 제제들 및 방법들에 대해서는 실시예를 참조한다).

[0072] 본원의 실시양태는 약독화된 생플라비바이러스의 분해 및/또는 불활성화를 감소시키거나 방지하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 이 실시양태에 따르면, 특정 조성물은 생플라비바이러스 및/또는 약독화된 생플라비바이러스의 분해 및/또는 불활성화를 감소시키는 성분들의 조합물을 포함할 수 있다. 본원의 다른 실시양태는 이 플라비바이러스들의 안정성을 향상시킬 수 있는 물질들의 조합물에 관한 것이다. 본원의 다른 조성물 및 방법은 수성 및/또는 재구성된 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 저장 수명을 증가시키면서 저온(예를 들면, 냉장 또는 냉동 저장)에 대한 필요성을 감소시키는 것에 관한 것이다.

[0073] 이 실시양태에 따르면, 하나 이상의 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스는 하나 이상의 아미노산 및 하나 이상의 탄수화물과 조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 플라비바이러스 제제는 적어도 3개의 성분들, 즉 PBS 기초 완충제 또는 다른 완충제 및 우레아를 포함한다. 다른 실시양태에서, 염 물질은 제제의 완충 성능 또는 다른 성질을 향상시키기 위해 이 조성물에 첨가될 수 있다.

[0074] 특정 실시양태에서, 본원의 조성물에 사용될 것으로 예상되는 탄수화물 물질은 수크로스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 만니톨 또는 다른 유사한 탄수화물을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 제제에서 사용될 것으로 예상되는 아미노산 또는 이의 유도체는 알라닌, 아르기닌, 메티오닌, 글루타메이트, 글루탐산일나트륨(MSG), 또는 이들의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 제제에서 사용되는 단백질 물질은 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 형태의 알부민, 소 혈청 알부민(BSA), 태아 소 혈청(FBS), 젤라틴, 덱스트란, 폴리올 중합체 또는 이들의 조합물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 단백질 물질은 특정 면역원성 조성물의 약 0.05% 내지 약 2.0%의 농도로 알부민을 포함한다.

[0075] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 제제 및 조성물은 염화나트륨(NaCl), 인산일나트륨 및/또는 인산이나트륨(Na_2HPO_4) 중 적어도 하나를 가진 인산염 완충 식염수(PBS) 기초 완충제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기초 완충제는 염화칼륨(KCl) 및/또는 인산칼륨(KH_2PO_4)도 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 완충제, 예를 들면, 기초 완충제는 약 10.0 mM 내지 약 200.0 mM의 농도로 염화나트륨을 포함할 수 있다. $MgCl_2$는 생플라비바이러스의 안정성에 악영향을 미치는 것으로 입증되었기 때문에 본원에 개시된 제제들 중 임의의 제제에 포함되지 않는 것으로 생각된다.

[0076] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스를 동결건조시키고/시키거나 재수화시키고, 냉동부터 실온까지 다양한 온도에서 플라비바이러스를 수송하고 개선된 안정성과 함께 다른 저장 특징을 부여하는 데 사용될 수 있다. 본원에서 고려되는 조성물은 가공 및 정제 동안, 수송 및 전달 동안, 및 냉동-해동 주기 동안 다양한 저장 온도에서 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 안정화를 증가시킬 수 있고/있거나 이 바이러스들의 불활성화 및/또는 분해를 감소시킬 수 있다.

[0077] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 부분적으로 또는 전체적으로 탈수될 수 있거나 수화될 수 있다. 추가로, 본원에 개시된 조성물은 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스 조성물의 동결건조 동안 및 후에 사용될 수 있다(예를 들면, 하기 표 2 참조). 이 실시양태에 따르면, 조성물은 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상 탈수될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 수성 또는 재수화된 플라비바이러스 조성물의 저장 수명을 증가시킬 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 본원

에 개시된 조성물은 동결건조 또는 액체/냉동 조건 하에서 광범위한 온도, 예컨대, 실온, 0℃ 미만의 온도, 상승된 온도(예를 들면, -80℃부터 40℃ 이상까지)에서 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 안정성을 증가시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 안정성을, 적어도 기초 완충제(예를 들면, PBS 기초 완충제, 트리스, HEPES 또는 히스티딘 등), 하나 이상의 탄수화물 물질 및 하나 이상의 아미노산을 함유하는 조성물로 제제화되지 않은 약독화된 생플라비바이러스 조성물보다 2배, 4배 또는 10배 이상 증가시킬 수 있다.

표 2

본원에 개시된 제제의 예시적 동결건조 파라미터

	냉동			일차/이차 건조		최종
단계	1	2	3	1	2	1
저장 온도(℃)	-45	-45	-45	-37	+ 25	4
상승 속도(℃/분)	-	1.7	-	0.1	0.1	1.0
시간(분)	-	120	120	2400	360	유지
진공(mT)	-	-	50	50	50	50

[0078]

[0079] 특정 실시양태에서, 본원에서 고려되는 조성물은 다양한 온도(예를 들면, 약 20℃ 내지 약 25℃ 또는 심지어 40℃만큼 높은 온도) 또는 냉장 온도(예를 들면, 약 0℃ 내지 약 10℃ 또는 최대 20℃)에서 24시간 초과의 시간 동안 수화된 생플라비바이러스의 불활성화 및/또는 분해를 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 24시간 이상의 시간 동안 90% 이상의 플라비바이러스에 대한 안정성을 유지할 수 있다. 추가로, 본원에서 고려되는 제제 및 조성물은 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회 또는 더 많은 횟수의 냉동-해동 주기 동안 수화된 플라비바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있다. 다른 조성물 및 방법은 냉장 온도(예를 들면, 약 0℃ 내지 약 10℃)에서 약 24시간 내지 약 26주 또는 더 긴 시간 동안 수화된 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스의 불활성화를 감소시킬 수 있는 제제 및 조성물에 관한 것이다.

[0080] 다른 방법은 예를 들면, 동결건조 후 및/또는 특정 기간 후 및/또는 특정 온도에의 노출 후 플라비바이러스 역가의 손실을 50% 이상 감소시키기 위해 제제 및 조성물을 사용하는 것에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 본원에 개시된 제제를 갖지 않은 조성물 또는 제제에 비해 동결건조 및 25℃ 온도에의 노출 후 5주, 6주 또는 7주 이상의 기간 동안 플라비바이러스 역가의 손실을 감소시킬 수 있는 제제 및 조성물을 제공한다.

[0081] 특정 양태에서, 제제는 단백질 물질로서 혈청 알부민 대신에 가수분해된 젤라틴 또는 덱스트란을 포함할 수 있다. 그러나, 특정 제제에서, 젤라틴은 이것이 동물 생성물이라는 사실을 비롯한 다양한 이유로 배제될 수 있다. 다른 고려사항은 젤라틴이 면역화된 소아 및 성인에서 알레르기 반응을 야기할 수 있고 백신 관련 부작용의 원인일 수 있다는 것이다. 추가로, 젤라틴은 소 또는 돼지 뼈 및 척추 재료로부터 유래할 수 있다. 이들 공급원은 외래 물질을 포함할 수 있고 안전성 우려를 발생시킬 수 있다. 추가로, 알부민은 인간으로부터 채취될 수 있고, 이것도 안전하지 않은 외래 물질의 도입이라는 잠재적 위험을 제기할 수 있다. 따라서, 약독화된 또는 비약독화된 생플라비바이러스에 대한 동등한 안정화 효과를 가진, 동물 부산물 이외의 물질을 사용하는 특정 조성물이 고려된다. 특정 실시양태에서, 재조합 알부민은 다른 알부민의 부작용을 감소시키기 위해 본원에 개시된 제제에서 사용될 수 있다.

[0082] 본원에 개시된 조성물은 예를 들면, 냉동 및/또는 해동 온도, 및/또는 상승된 온도로부터 생플라비바이러스의 증가된 보호를 제공할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 실온 조건(예를 들면, 약 25℃)에서 탈수된 약독화된 생바이러스 생성물을 안정화시킬 수 있고/있거나, 이 생성물의 악화를 감소시킬 수 있고/있거나 이 생성물의 불활성화를 방지할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에서 고려되는 제제 및 조성물은 약 25℃ 이상 또는 약 40℃에서 수성 약독화된 생바이러스 생성물을 안정화시킬 수 있고/있거나, 이 생성물의 악화를 감소시킬 수 있고/있거나 이 생성물의 불활성화를 방지할 수 있다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 개발된 지역 및 미개발된 지역에서 바이러스 백신의 저장, 배포, 전달 및 투여를 용이하게 할 수 있다.

[0083] 당분야에서 숙련된 자는 본원의 조성물 또는 제제가 세포 배양 계대, 재분류, 감염성 클론 내로의 돌연변이의 도입, 역유전학, 삽입, 결실, 다른 재조합 DNA 또는 RNA 조작을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 방법에 의해 약독화된 또는 비약독화된 바이러스에 관한 것이라는 것을 인식할 것이다. 추가로, 당분야에서 숙련된 자는 다른 실시양태가 재조합 플라비바이러스들을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 임의의 다른 단백질 또는 플라비바이러스 RNA를 발현하도록 조작된 바이러스에 관한 것이라는 것을 인식할 것이다. 이러한 바이러스는 감염성 질환을 위한 백신, 종양학적 상태를 치료하기 위한 백신, 또는 단백질 또는 RNA를 발현시켜 장애를 치료하기 위해(예를 들면, 유전자 요법, 안티센스 요법, 리보자임 요법 또는 작은 억제 RNA 요법) 도입되는 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0084] 약학 조성물

[0085] 본원의 일부 실시양태는 수성 또는 동결건조된 형태로 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스에 대한 약학 조성물에 관한 것이다. 당분야에서 숙련된 자는 본 개시에 기초하여 바이러스 안정성(예를 들면, 열 안정성)을 개선하고 본원에 개시된 약학 조성물의 냉동-해동 불활성화를 방지하는 제제가 액체 생성물, 분말화된 생성물, 냉동건조된 생성물 또는 동결건조된 생성물을 개선할 수 있고 당분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 재구성 후, 이러한 안정화된 백신 제제 및 면역원성 조성물은 피내 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 코내 투여, 흡입, 폐 투여 또는 경구 투여를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 경로들에 의해 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 임의의 약학 조성물을 투여하기 위한 전달 디바이스가 고려된다. 이 실시양태에 따르면, 주사기 및 바늘 주사, 이분된 바늘 투여, 피내 패치 또는 펌프에 의한 투여, 피내 바늘 부재 제트 전달(피내 등), 피내 입자 전달 또는 에어로졸 분말 전달을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 백신 전달 디바이스들이 당분야에서 공지되어 있다.

[0086] 특정 실시양태에서, 전형적으로 생리학적으로 허용 가능한 완충제를 포함하는 조성물이 기재될 수 있다. 당분야에서 숙련된 자는 PBS 기초 완충제, 트리스 기초 완충제, HEPES 기초 완충제, 히스티딘 기초 완충제 및 완충제 시스템이 본원에 개시된 플라비바이러스 제제 및 조성물에 대한 예상외의 안정화 효과를 가진 것으로 발견되었다는 것을 인식한다. 추가로, 당분야에서 숙련된 자는 염 농도를 거의 생리학적 수준(예를 들면, 식염수 또는 0.15 M 총 염)으로 조절하는 것이 주사 부위에서 세포 손상 및/또는 통증을 방지하기 위한 조성물의 비경구 투여에 최적일 수 있다는 것을 인식한다. 당분야에서 숙련된 자는 탄수화물 농도가 증가함에 따라 염 농도가 감소하여 제제와 동등한 오스몰농도 및 오스몰농도를 유지할 수 있다는 것도 인식할 것이다. 특정 실시양태에서, 6.0 초과의 pH 내지 약 pH 10을 가진 완충 매질이 고려된다. 다른 실시양태에서, 6.8 초과의 pH 내지 약 8.0의 pH를 가진 완충 매질이 고려된다. 다른 실시양태에서, 7.0 초과의 pH 내지 약 7.5의 pH를 가진 완충 매질이 고려된다.

[0087] 본원의 실시양태는 생체내로 약학적으로 투여하기에 적절한 생물학적으로 적합한 형태의 면역원성 조성물 및 백신 제제를 대상체에게 투여하는 것을 제공한다. "생체내로 투여하기에 적절한 생물학적으로 적합한 형태"는 투여되는 활성 물질(예를 들면, 약독화된 생플라비바이러스 조성물)의 형태를 지칭하고, 이때 활성 물질의 치료 효과는 임의의 독성 효과를 능가한다. 치료 활성 양의 치료 조성물의 투여는 원하는 결과를 달성하기 위해 필요한 용량에서 이러한 결과를 달성하기에 필요한 기간 동안 효과적인 양으로서 정의된다. 예를 들면, 화합물의 치료 활성 양은 질환 상태, 개체의 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 제제의 능력과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 용법은 최적 치료 반응을 제공하도록 조절될 수 있다.

[0088] 활성 물질, 예컨대, 백신은 이 물질과 함께 투여되는 적절한 담체 또는 희석제에 함유된 상태로 대상체에게 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 희석제, 예컨대, 식염수 및 수성 완충제 용액을 포함하기 위한 것이다. 활성 물질은 비경구 또는 복강내 투여될 수도 있다. 주사에 적합한 약학 조성물은 당분야에서 공지된 수단에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 멸균 수성 용액(수용성) 또는 분산액, 및 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말이 사용될 수 있다. 모든 경우에서, 조성물 및 제제는 멸균 상태일 수 있고 주사기로부터 용이하게 배출될 수 있을 정도로 유동성을 가질 수 있다.

[0089] 통상의 저장 및 사용 조건 하에서, 이 제제는 미생물의 생장을 방지하기 위해 보존제를 함유할 수 있다. 조성물 및 제제는 미생물, 예컨대, 세균 및 진균의 오염 작용을 방지하도록 처리될 수도 있다. 멸균 주사 가능한 용액은 요구된 경우 적절한 용매와 함께, 또는 상기 나열된 성분들 중 하나 또는 이들의 조합물과 함께 일정한 양의 활성 화합물을 도입한 후 멸균함으로써 제조될 수 있다.

[0090] 특정 실시양태에서, 액체 형태(용액)의 조성물 및 제제는 제형에 적합한 방식으로 치료 유효량으로 투여될 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 제제는 다양한 제형들, 예컨대, 전술된 주사 가능한 용액의 유형으로 용이하게 투

여된다. 서방출 캡슐, 지효 방출(timed-release) 미립자 등도 본원의 조성물을 투여하는 데 사용될 수 있다고 생각된다. 이 특정 수성 용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 특히 적합하다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제제는 본 개시의 플라비바이러스에의 노출 전, 동안 및/또는 후에 투여될 수 있다.

[0091] 분석 방법

[0092] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 생바이러스의 안정성을 개선하는 부형제를 확인하는 방법은 실험 바이러스 안정성 데이터세트를 생성하는 단계; 상기 안정성 데이터세트에 대한 일변량 회귀 및 다변량 데이터 분석을 수행함으로써 탐색적 통계 모델을 구축하는 단계; 및 하나 이상의 생바이러스의 안정성을 증가시키는 적어도 하나의 부형제를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 이 방법에 따르면, 적어도 하나의 부형제의 히트(hit) 및 수준은 확정적 스크리닝 디자인(DSD) 내로 통합될 수 있다. 다른 방법에서, 적어도 하나의 부형제에 대한 최적 부형제 농도를 확인할 수 있고, 이때 최적 부형제 농도는 적어도 하나의 부형제를 사용하지 않는 바이러스에 비해 바이러스 효능 손실을 감소시킨다. 다른 실시양태에서, 반응 표면 방법(RSM)을 위한 JMP 11.2.0에서 이용될 수 있는 단계별 회귀 수단을 이용하여 실험 바이러스 안정성 데이터세트를 모델링할 수 있다. 이 방법에 따르면, 하나 이상의 생바이러스는 플라비바이러스를 포함할 수 있다.

[0093] 플라비바이러스의 안정성을 위한 최적 조건을 확인하는 추가 방법은 트레할로스, 갈락토스, 프럭토스, 수크로스, 키토산, 소르비톨, 만니톨, 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 태아 소 혈청(FBS), 젤라틴, 덱스트란, 폴리올 중합체, 알라닌, 아르기닌, 메티오닌, MSG 및 우레아를 포함하나 이들로 한정되지 않는 부형제를 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 이 방법은 임의의 바이러스 또는 약독화된 생바이러스 제제를 위한 안정화 제제를 확인하는 데 유용한 것으로 생각된다.

[0094] 키트

[0095] 본원에 개시된 다른 실시양태는 본원에 개시된 조성물 및 방법과 함께 사용되는 키트에 관한 것이다. 조성물 및 약독화된 생바이러스 제제는 과학적 연구에서 사용되는 키트, 또는 대상체에게 투여하기 위해 전달되고/되거나 사용되는 키트 내에 제공될 수 있다. 이 실시양태에 따르면, 키트는 적합한 용기, 약독화된 생플라비바이러스를 포함하는 생플라비바이러스 또는 약독화된 생플라비바이러스 조성물, 및 하나 이상의 추가 물질, 예컨대, 다른 항바이러스 물질, 항진균 물질 또는 항균 물질을 포함할 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0096] 다른 실시양태에서, 키트는 적절한 경우 백신접종되거나 치료될 대상체에서 사용되는, 적절하게 분취된 조성물을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본원에 개시된 조성물 및 제제는 부분적으로 또는 전체적으로 탈수될 수 있거나 수성을 띨 수 있다. 본원에서 고려되는 키트는 구체적인 제제에 따라 본원에 개시된 바와 같이 실온 또는 냉장 온도에서 저장될 수 있다.

[0097] 다른 실시양태에서, 키트는 일반적으로 조성물이 배치되고 적절하게 분취될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기를 포함할 수 있다. 추가 성분이 제공되는 경우, 키트는 일반적으로 이 물질 또는 성분이 배치될 수 있는 하나 이상의 추가 용기도 함유할 수 있다. 본원의 키트는 시판용 용기 내에 조성물 및 임의의 다른 시약(들)을 포함할 수도 있다. 이러한 용기는 원하는 바이알(예를 들면, 면역원성 또는 백신 조성물)이 보유되는 사출 또는 취입 성형 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0098] <u>실시예</u>

[0099] 하기 실시예는 본원에서 제공된 특정 실시양태들을 입증하기 위해 포함된다. 당분야에서 숙련된 자는 하기 실시예에 개시된 기법들이 본원에 개시된 실시에서 잘 작동하도록 개발된 기법들을 대표하므로, 그의 실시를 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것을 인식한다. 그러나, 본 개시에 비추어 볼 때, 당분야에서 숙련된 자는 본원의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 개시된 특정 실시양태에 대한 많은 변화를 만들 수 있고 여전히 비슷한 또는 유사한 결과를 수득할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0100] 실시예 1

[0101] 완충제 스크린

[0102] 특정 예시적 방법에서, 플라비바이러스 면역원성 조성물 또는 백신의 임상전 및 임상 시험 및 사용에 적합한 액체 조성물 및 동결건조 가능한 조성물을 확인하였다. 특정 실험을 수행하여, 후속 안정화 연구에서 사용될 후보 완충제 및 부형제를 먼저 확인하였다. 시험된 완충제는 HEPES, PBS 및 트리스 기초 완충제를 포함하였다. 시험된 부형제는 다양한 탄수화물들, 예컨대, 트레할로스, 갈락토스, 프럭토스, 소르비톨, 락토스, 수크로스, 키토산 또는 이들의 조합물을 포함하였다. 시험된 다른 부형제는 다양한 단백질 물질들, 혈청 알부민, 인간 혈청 알

부민(HSA), 재조합 HSA, 소 혈청 알부민(BSA), 태아 소 혈청(FBS), 젤라틴, 덱스트란, 폴리올 중합체 또는 이들의 조합물을 포함하였다. 스크리닝된 다른 부형제는 다양한 아미노산들, 또는 이들의 염, 에스테르 또는 아마이드 유도체, 예컨대, 알라닌, 아르기닌, 글루타메이트(예를 들면, 글루탐산일나트륨(MSG)), 메티오닌, 또는 이들의 조합물을 포함하였다. 이 초기 시험에서 사용된 다른 성분은 다양한 폴리올/중합체(예를 들면, 만니톨, 젤라틴, 덱스트란), 삼투질(예를 들면, 우레아), 염(예를 들면, 염화마그네슘, 염화나트륨), 및 킬레이팅제(예를 들면, EDTA)를 포함하였다.

[0103] 일부 예시적 방법들에서, 임상전 및 임상 시험을 위해 다양한 조성물들에서 약독화된 뎅기 생바이러스를 예시적 플라비바이러스로서 사용하였다. 이 방법들을 위한 조성물은 본원에서 제공된다. 한 예시적 실험에서, 소정량의 약독화된 뎅기 생바이러스 면역원성 조성물을 사용하였다. 또 다른 예시적 실험에서, 약독화된 뎅기 혈청형 3 생바이러스 면역원성 조성물을 사용하였다. 이 혈청형은 가장 적은 안정성 및 가장 적은 면역원성을 가진 것으로서 간주될 수 있으므로, 덜 안정한 혈청형 이외의 다른 뎅기 바이러스 혈청형과 함께 사용될 수 있는 안정화 조성물을 개발하는 데 사용되었다는 것을 주목한다. 임의의 약독화된 또는 비약독화된 플라비바이러스가 플라비바이러스의 안정성을 증가시키고 분해를 감소시키기 위해 이 예시적 조성물들에서 사용될 수 있다고 생각된다.

[0104] **실시예 2**

[0105] 안정화 제제에 대한 스크리닝

[0106] 본원에 개시된 일부 플라비바이러스 제제들에서, 가수분해된 젤라틴은 단백질 공급원으로서 혈청 알부민 대신에 사용될 수 있다. 그러나, 젤라틴은 약독화된 생바이러스에게 안정성을 제공하지만 대상체에게 투여될 때 알레르기 반응을 야기할 수 있고 종종 백신 관련 부작용의 원인일 수 있다. 본원에 개시된 특정 조성물은 대상체에게 투여될 때 감소된 알레르기 반응을 가진 제제를 제공하면서 약독화된 생플라비바이러스의 악화를 감소시키기 위해 필적할만한 결과를 제공하는 성분들의 조합물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 폴리올은 본원에 개시된 플라비바이러스 제제에서 단백질 물질의 추가 또는 대안적 공급원으로서 사용될 수 있다. 일부 예에서, 약독화된 생플라비바이러스에게 필적할만한 또는 증가된 안정성을 제공할 수 있는, 알부민 또는 젤라틴을 갖지 않은 제제를 생성하였다. 이 제제는 다양한 농도의 물질, 예컨대, PBS 기초 완충제, 하나 이상의 탄수화물 물질, 하나 이상의 아미노산, 하나 이상의 단백질 물질, 및/또는 하나 이상의 염 물질을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0107] 다양한 안정화 제제들을 사용하여 효능 손실(예를 들면, 역가 손실 또는 Log_{10} PFU/용량)의 함수로서 약독화된 생플라비바이러스 면역원성 조성물의 안정성을 시험하였다. 뎅기 바이러스 혈청형 3(TDV-3)의 샘플을 동결건조시킨 후 5주 동안 25℃에 노출시켰다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 다양한 제제들에 대해 이 기간에 걸친 효능 손실 또는 역가 손실의 감소를 평가하였다. 사용된 한 기초 완충제는 50 mM NaCl, 0.1% HSA 및 10% 탄수화물을 가진 PBS이었다. 알라닌은 10 mM로 존재하였고, 메티오닌은 2.5 mM로 존재하였고, MSG는 10 mM로 존재하였고, 만니톨은 5%로 존재하였고, 우레아는 0.25%로 존재하였다. F-127, 트레할로스 및 알부민을 포함하는 이전에 개발된 제제(FTA, 양성 대조군 제제)를 기준물로서 사용하였다. 입증된 바와 같이, 도 2에 표시된 다양한 제제들은 (플라비바이러스 안정성을 개선하는 것으로 이미 입증된) 기준물보다 훨씬 더 효능 손실을 감소시키므로, 플라비바이러스 백신을 안정화시키는 개선된 수단을 제공한다.

[0108] 동결건조된 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 샘플의 동결건조 전/후 및 가속화된 저장 안정성 동안 바이러스 효능 관찰은 하기 표 3에 표시되어 있다. 각각의 제제에 대해, 초기 역가(-80℃에서 저장된 냉동된 액체 대조군)로부터 -80℃에서 저장된 동결건조된 바이러스 샘플의 역가를 차감함으로써 동결건조로 인한 바이러스 효능의 log_{10} 손실을 계산하였다. 추가로, 각각의 제제에 대해, 5주 동안 -80℃에서 저장된 동일한 제제로부터 25℃에서의 동결건조된 제제의 저장 후 역가를 차감함으로써 가속화된 안정성 동안 효능의 log_{10} 손실을 계산하였다.

[0109] 대다수의 제제들은 양성 기준물 대조군인 FTA에 비해 동결건조 과정 동안 개선된 동결건조 수율을 나타내었다. 25℃에서의 5주 안정성 연구 후, 바이러스 안정성의 하기 추세가 관찰되었다. 일례, 즉 고농도의 트레할로스/수크로스만(10%)을 함유하는 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제에서, 바이러스 효능 손실은 하기 순서로 나타났다: 10% 당 + 0.1% HSA > 10% 당 + 0.1% HSA + 메티오닌 + MSG + 알라닌 > 10% 당 + 0.1% HSA + 우레아. 또 다른 예, 즉 저농도의 트레할로스/수크로스(1%)와 만니톨(4%)의 조합물을 함유하는 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제에서, 바이러스 효능 손실은 하기 순서로 나타났다: 1% 당 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA > 1% 당 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA + 우레아 > 1% 당 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA + 메티오닌 + MSG + 알라닌. 만니톨만을 함유하는 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제에서, 바이러스 효

능 손실은 하기 순서로 나타났다: 5% 만니톨 + 0.1% HSA > 5% 만니톨 + 0.1% HSA + 우레아 > 5% 만니톨 + 0.1% HSA + 메티오닌 + MSG + 알라닌.

표 3

동결건조 전, 동결건조 후 및 안정성 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 효능

번호 (표 14 에 상응함)	샘플	액체	SD	-80℃	SD	25℃	SD	동결건조 log 손실	안정성 log 손실 (5W)	총 log 손실
1	1% 트레할로스 + 0.1% HSA + 4% 만니톨 + 메티오닌 + MSG + 알라닌	4.54	0.07	4.31	0.10	4.25	0.05	0.23	0.06	0.29
5	10% 수크로스 + 0.1% HSA + 우레아	5.06	0.12	4.82	0.03	4.38	0.09	0.24	0.44	0.68
3	1% 수크로스 + 0.1% HSA + 4% 만니톨 + 메티오닌 + MSG + 알라닌	4.63	0.05	4.48	0.07	3.99	0.10	0.15	0.49	0.64
2	10% 트레할로스 + 0.1% HSA + 우레아	4.71	0.08	4.68	0.08	4.17	0.07	0.03	0.51	0.54
10	5% 만니톨 + 0.1% HSA + 메티오닌 + MSG + 알라닌	4.57	0.11	4.12	0.01	3.42	0.07	0.45	0.70	1.15
6	1% 수크로스 + 0.1% HSA + 4% 만니톨	4.66	0.13	4.58	0.15	3.87	0.12	0.08	0.71	0.79
4	1% 트레할로스 + 0.1% HSA + 4% 만니톨 + 우레아	4.22	0.05	4.32	0.10	3.57	0.07	-0.1	0.75	0.65
13	10% 트레할로스 + 0.1% HSA	5.04	0.08	4.53	0.06	3.78	0.10	0.51	0.75	1.26
9	1% 수크로스 + 0.1% HSA + 4% 만니톨 + 우레아	4.77	0.04	4.56	0.07	3.78	0.10	0.21	0.78	0.99
8	10% 수크로스 + 0.1% HSA	5.02	0.06	4.84	0.08	4.05	0.11	0.18	0.79	0.97
14	대조군 기준 제제	5.03	0.04	4.57	0.04	3.76	0.04	0.56	0.81	1.37
12	10% 수크로스 + 0.1% HSA + 메티오닌 + MSG + 알라닌	5.20	0.23	4.85	0.11	4.00	0.08	0.35	0.85	1.2
7	1% 트레할로스 + 0.1% HSA + 4% 만니톨	4.55	0.12	4.52	0.14	3.65	0.15	0.03	0.87	0.9
11	10% 트레할로스 + 0.1% HSA + 메티오닌 + MSG + 알라닌	4.90	0.04	4.60	0.04	3.72	0.03	0.30	0.88	1.18
15	5% 만니톨 + 0.1% HSA + 우레아	3.62	0.13	3.84	0.02	0.00	n/a	-0.22	3.84	3.62
16	5% 만니톨 + 0.1% HSA	4.01	0.14	4.08	0.08	0.00	n/a	-0.07	4.08	4.01

[0110]

[0111] **실시예 3**

[0112] 예측 프로파일링

[0113] 플라비바이러스 백신 안정화에 대한 다양한 제제들의 효능을 평가하는 추가 방법으로서, 예측 프로파일링 방법은 제제에 포함된 다양한 부형제들을 추려내고/내거나 다른 부형제들보다 더 효과적인 부형제를 확인하는 방법으로서 이용될 수 있다. 동결건조 후, 동결건조한 지 5주 후, 및 동결건조하고 25℃에 노출시킨 지 5주 후 발현 프로파일링을 이용하여 다양한 부형제들의 효과를 시험하였다(데이터는 제시되지 않음). 예측 프로파일링으로부터 수득된 데이터를, 동결건조 후 및 5주 동안 25℃에의 노출 후 바이러스 효능의 가장 우수한 보유를 확인하기 위한 지침으로서 사용된 바람직한 값과 비교하였다. 이 예측 프로파일링 방법을 이용할 때 수크로스와 트레할로스는 상호교환될 수 있는 것으로 확인되었다. 동결건조하고 5주 동안 25℃에서 항온처리한 후 플라비바이러스 안정성 프로파일을 증가시킬 수 있는 부형제들 사이에 양성 상호작용이 관찰되었다(데이터는 제시되지 않음).

[0114] **실시예 4**

[0115] 동결건조 안정화 연구

[0116] 뎅기 바이러스 혈청형 3 백신의 안정성에 대한 다양한 부형제들의 효과를 평가하기 위해, 도 2에 나타낸 바와 같이, 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 백신의 샘플 제제를 동결건조시키고 5주 동안 25℃에 노출시켰다(하기 표 4도 참조). 동결건조에 앞서 또는 동결건조 전(각각의 삼중실험에서 직선 흑색 막대, 각각의 시험의 좌측에 있는 막대), 동결건조 다음에 또는 동결건조 후(각각의 삼중실험에서 직선 밝은 회색 막대, 각각의 시험의 중간에 있는 막대), 및 동결건조 및 5주 동안 25℃에의 노출 후(각각의 시험의 우측에 있는 직선 중간 회색 막대; 2개 별개의 바이알들이 삼중실험에서 적정되었음) 역가를 수득하였다. F-127, 트레할로스 및 알부민(FTA)을 포함하는 대조군 기준 제제를 사용하여, 잠재적인 개선된 제제 특징을 평가하였다.

[0117] 5주 동안 25℃에서 항온처리한 후 바이러스 효능 보유의 통계학적으로 유의미한 개선이 관찰되었다. 이 부형제들의 조합물은 기준/대조군 제제에 비해 시간의 경과에 따라 고체 상태에서 열 스트레스에 대한 보다 더 높은 내성을 나타낸다.

표 4

다양한 동결건조된 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제들의 예시적 조성. 이 표의 모든 제제들은 30 mM NaCl 을 가진 10 mM 인산나트륨 완충제(pH 7.2)에서 제조되었다.

[0118]

제제 번호 (도 2에 상응함)	조성				
	트레할로스 %	만니톨(%)	알라닌(mM)	HSA(%)	우레아(%)
1	10	1	20	0.3	0
2	10	1	10	0	0.250
3	1	1	0	0.3	0.125
4	1	1	20	0.1	0.250
5	10	5	0	0.1	0.000
6	10	3	0	0.3	0.250
7	5.5	3	10	0.1	0.125
8	1	5	0	0	0.250
9	5.5	5	20	0.3	0.250
10	1	3	20	0	0.000
11	10	5	20	0	0.125
12	5.5	1	0	0	0.000
13	1	5	10	0.3	0.000
14	대조군 기준 샘플(15% 트레할로스 + 0.1% HSA + 1% Pluronic F127®)				

[0119] **실시예 5**

[0120] 트레할로스 및 HSA를 사용한 모델링 안정화 연구

[0121] 확정적 스크린에서 후속적으로 사용될 안정화 제제에 대한 2종의 부형제들, 즉 트레할로스 및 HSA의 잠재적 영향을 평가하였다. 고체 상태 동결건조 후 예시적 약독화된 생플라비바이러스의 안정성에 대한 0.3%(w/v) HSA 및 5%(w/v) 트레할로스 농도의 효과를 평가하였다(데이터는 제시되지 않음). 하기 표 5에 표시된 바와 같이, 이 실험은 효과적인 안정화 제제가 보다 더 낮은 농도의 트레할로스(5%(w/v)) 및 HSA(0.3%(w/v))를 포함할 수 있다는 것을 입증하였다. 만니톨 및 우레아도 약독화된 생바이러스, 예컨대, 플라비바이러스를 안정화시키는 그들의 능력에 대해 분석되었고 플라비바이러스 안정화에 대한 긍정적 효과를 가진 것으로 입증되었다는 것을 주목한다.

표 5

다양한 동결건조된 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제들의 예시적 조성

최대 바람직함	
성분	**농도**
만니톨	3.0%(w/v)
트레할로스	5.0%(w/v)
우레아	0.125%(w/v)
HSA	0.3%(w/v)

[0122]

[0123] **실시예 6**

[0124] 예시적 4가 안정화 제제에 대한 스크리닝

[0125] 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)에 대한 안정화 제제에 대해 수득된 데이터(상기)는 4가 뎅기 바이러스 제제의 부분으로서 포함되는 다른 뎅기 바이러스 혈청형에 적용될 수 있다. 도 3 내지 도 6에 표시된 각각의 뎅기 바이러스 혈청형 (TDV-1, TDV-2, TDV-3 및 TDV-4)에 대해 두 상이한 목표 용량인 50% BDS(삼각형) 및 CTM(사각형)을 평가하였다. 벌크 용량 목표 제제는 각각의 뎅기 바이러스 혈청형에 대해 약 50%의 벌크 약물 물질(BDS)을 포함하였고, 현재 용량 목표 제제는 각각의 뎅기 바이러스 혈청형에 대해 약 2.5%의 벌크 약물 물질(현재 용량 또는 CD로서도 지칭됨)을 포함하였다. 현재 용량 목표 제제 및 벌크 용량 목표 제제 둘 다가 만니톨(3.0%(w/v)), 트레할로스(5%(w/v)) 및 우레아(0.125%(w/v))도 포함하였다. 하기 표 6은 4가 바이러스 안정성을 평가하기 위해 사용된 제제를 나열한다.

표 6

예시적 4가 뎅기 바이러스 백신 제제

		BDS를 사용한 제제화 후 최종 부형제 농도						
CD 제제 번호	조성	PF 127 (%)	천연 HSA (%)	rHSA (%)	트레할로스 (%)	만니톨 (%)	우레아 (%)	덱스트란 (%)
제제 1 CD	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 덱스트란(1%)(낮은 덱스트란)	0.02	0.002		5	3	0.125	1
제제 2 CD	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 덱스트란(5%)(높은 덱스트란)	0.02	0.002		5	3	0.125	5
제제 3 CD	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 재조합 HSA(0.3%)	0.02	0.002	0.3	5	3	0.125	
제제 4 CD	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 천연 HSA(0.3%)	0.02	0.3		5	3	0.125	
FTA_CD	FTA	1	0.1		15			
제제 5 50% BDS	만니톨(3%) + 트레할로스(7.5%) + 우레아(0.125%) + 덱스트란(1%)(낮은 덱스트란)	0.5	0.05		7.5	3	0.125	1
제제 6 50% BDS	만니톨(3%) + 트레할로스(7.5%) + 우레아(0.125%) + 덱스트란(5%)(높은 덱스트란)	0.5	0.05		7.5	3	0.125	5
제제 7 50% BDS	만니톨(3%) + 트레할로스(7.5%) + 우레아(0.125%) + 재조합 HSA(0.3%)	0.5	0.05	0.3	7.5	3	0.125	
제제 8 50% BDS	만니톨(3%) + 트레할로스(7.5%) + 우레아(0.125%) + 천연 HSA(0.3%)	0.5	0.3		7.5	3	0.125	
CON_50% BDS	기준물/대조군	1	0.1		15			

[0126]

[0127] 4가 뎅기 바이러스 제제에 대한 목표 바이러스 역가는 하기 표 7에 표시되어 있다.

표 7

4가 뎅기 바이러스 백신 제제에 대한 목표 바이러스 역가

[0128]

	현재 용량 목표 역가(CD) PFU/용량	50% BDS 목표 역가(50% BDS) PFU/용량
TDV-1	2.00E + 04	5.09E + 05
TDV-2	5.00E + 03	1.27E + 05
TDV-3	1.00E + 05	2.54E + 06
TDV-4	3.00E + 05	8.03E + 06

[0129] 도 3a 및 도 3b 내지 도 6a 및 6b에 나타낸 바와 같이, 시험된 부형제는 FTA 양성 기준 제제와 함께 (HSA에 대한 대체물로서) 1%(w/v) 및 5%(w/v)의 덱스트란, 0.3%(w/v)의 재조합 HSA 및 0.3%(w/v)의 천연 HSA이었다. 동결건조 후 5주 동안 25℃에 노출시킨 후 각각의 효과(도 3a, 4a, 5a 및 6a)를 평가한 후, (액체에서 고체로) 동결건조한 후 효능 손실과 5주 동안 25℃에 노출시킨 후 효능 손실의 합계인 총 손실(도 3b, 4b, 5b 및 6b)을 평가하였다. 일반적으로, 역가 손실이 낮고 용량들 사이의 중첩이 많을수록, 부형제의 안정화 효과가 높다.

[0130] **실시예 7**

[0131] 트레할로스 및 HSA를 사용한 모델링 안정화 연구

[0132] 트레할로스 및 HSA의 농도에 관한 상기 데이터를 기초로, 모델링 연구를 이용하여 플라비바이러스 안정화 제제를 위한 디자인 공간을 재평가하였다(데이터는 제시되지 않음). 본원에 개시된 한 실시양태에 따라, 동결건조 후 예시적 약독화된 생플라비바이러스의 안정성에 대한 0.2% HSA 및 5% 트레할로스 농도의 영향을 시험한 모델링 데이터는 안정화 제제가 5%의 트레할로스 및 0.2%의 HSA를 포함할 수 있다는 것을 시사하였다(데이터는 제시되지 않음).

[0133] **실시예 8**

[0134] 제제 케이크 완전성 및 바이러스 안정성에 대한 다양한 물질들의 효과

[0135] 뎅기 바이러스(예를 들면, 뎅기 바이러스 혈청형 3) 안정성을 개선하고 다양한 의도된 목적에 적합한 외관 및 적합한 물리적 완전성을 가진 냉동건조된 케이크를 형성하는 능력에 대해 다양한 제제들을 상이한 농도에서 동결건조된 제제로 함께 평가하였다. 본원에 기재된 바와 같이, 동결건조된 케이크를 1부터 3까지 주관적 등급으로 평가하였다(이때, 1 = 나쁨, 2 = 괜찮음, 및 3 = 우수함). 1의 등급을 가진 케이크는 광범위한 구조적 붕괴, 바닥 및 측면에서의 멜트백(meltback), 모든 측면들로부터의 상당한 수축 및 오그라듬, 및/또는 과립의 외관을 가진 것으로서 구별되었다. 2의 등급을 가진 케이크는 측면으로부터의 부분적 수축 및 오그라짐, 바닥에서의 적당한 멜트백, 및/또는 수평으로 또는 수직으로 케이크 전체를 통해 뻗어 있는 큰 균열 또는 열극을 가졌다. 3의 등급을 가진 케이크는 일반적으로 평평한 표면을 갖고 케이크의 상부 또는 바이알의 측면으로부터 케이크의 수축 또는 오그라짐을 갖지 않거나 최소한으로 가진 조밀한 (대체로 흰색, 부형제 조합에 따라 달라짐) 케이크 구조물로서 보이면서 약학적으로 훌륭하였다. 플라세보 제제를 사용하여 케이크 완전성에 대한 효과에 대하여 다양한 비의 탄수화물, 예컨대, 당 및 만니톨의 효과를 시험하였다. 동결건조와 관련하여 바이러스 안정성 및 동결건조된 바이러스의 안정성에 대한 당/만니톨(예를 들면, 트레할로스 또는 수크로스 대 만니톨)의 효과를 연구하기 위해 최적화된 당/만니톨 비를 선택하였다. 이 예에서, 뎅기 바이러스 혈청형 3(예를 들면, TDV3)에 대한 제제화된 벌크 약물 물질을 사용하여 이 실험을 수행하였다.

[0136] 평가된 플라세보 제제의 예시적 목록은 하기 표 8에 제공되어 있다. 플라세보 제제를 스크리닝한 결과를 기초로, 바이러스 안정성을 스크리닝하기 위해 3개의 상이한 당 대 만니톨 비를 선택하였다: 당(10%(w/v)) 단독; 1:4의 당 대 만니톨 비; 및 만니톨 단독(5%(w/v)). 이전 연구로부터 확인된 안정화 부형제(우레아 및 아미노산)도 상이한 당 대 만니톨 비와 함께 평가하였다.

표 8

동결건조 안정성 및 케이크 연구 동안 조사된 당/만니톨 제제

당/만니톨 제제 번호	당	당(w/v) (%)	만니톨(w/v) (%)
1	트레할로스	1.0	4.0
2	트레할로스	2.0	4.0
3	트레할로스	2.0	3.0
4	트레할로스	10.0	0
5	수크로스	1.0	4.0
6	수크로스	2.0	4.0
7	수크로스	2.0	3.0
8	수크로스	10.0	0
9	당 부재	0	5.0

[0137]

[0138] 30 mM NaCl 및 0.1%(w/v) HSA를 가진 10 mM 인산나트륨 완충제(pH 7.2)에서 모든 제제들을 제조하였다. 이 연구의 부분으로서 평가된 바이러스 함유 제제들의 목록은 표 9에 제공되어 있다.

표 9

뎅기 바이러스(뎅기 바이러스 혈청형 3) 동결건조 및 가속화된 안정성 연구를 위해 평가된 제제

제제 번호 (표 3에 상응함)	조성
1	10% 트레할로스 + 0.1% HSA
2	10% 트레할로스 + 0.1% HSA + 0.25% 우레아
3	10% 트레할로스 + 0.1% HSA + 10 mM MSG + 10 mM 알라닌 + 2.5 mM 메티오닌
4	10% 수크로스 + 0.1% HSA
5	10% 수크로스 + 0.1% HSA + 0.25% 우레아
6	10% 수크로스 + 0.1% HSA + 10 mM MSG + 10 mM 알라닌 + 2.5 mM 메티오닌
7	1% 트레할로스 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA
8	1% 트레할로스 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA + 0.25% 우레아
9	1%트레할로스 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA + 10 mM MSG + 10 mM 알라닌 + 2.5 mM 메티오닌
10	1% 수크로스 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA
11	1% 수크로스 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA + 0.25% 우레아
12	1% 수크로스 + 4% 만니톨 + 0.1% HSA + 10 mM MSG + 10 mM 알라닌 + 2.5 mM 메티오닌
13	5% 만니톨 + 0.1% HSA
14	5% 만니톨 + 0.1% HSA + 0.25% 우레아
15	5% 만니톨 + 0.1% HSA + 10 mM MSG + 10 mM 알라닌 + 2.5 mM 메티오닌
16	FTA(15% 트레할로스 + 0.1% HSA + 1% PF127)

[0139]

[0140] 특정 방법에서, 동결건조된 샘플의 케이크 외관 및 그 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 바이러스) 안정성에 대한 당(예를 들면, 트레할로스 및/또는 수크로스) 대 만니톨 비의 변경 효과를 평가하였다. 한 방법에서, 케이크 완전성 및 외관에 대한 당 대 만니톨 비의 효과를 평가하기 위해, 플라세보 제제를 제조하고 동결건조하였다. 동결건조 후, 케이크 형성의 물리적 완전성 및 외관을 평가하였다(데이터는 제시되지 않음). 만니톨만을 사용하거나 1:4 및 2:4의 당 대 만니톨 비를 사용하였을 때 케이크 완전성은 우수한 것으로 보였으나, 약 2:3의 당 대 만니톨 비로 제조한 제제를 사용하였을 때 부분적 붕괴가 관찰되었다. 트레할로스 제제와 수크로스 제제 사이에 관찰된 케이크 완전성의 현저한 차이는 없었다. 당을 단독으로 사용하였을 때, 케이크 완전성은 보이지 않았고 만니톨을 단독으로 사용하였을 때 시험도 관찰되지 않았다. 이 예시적 연구의 케이크 완전성 관찰을 기초로, 바이러스 안정성 연구를 위해 하기 조합물들을 선택하였다: 당 단독, 1:4의 당 대 만니톨 비, 및 만니톨 단독.

[0141] 일례에서, 선택된 당 대 만니톨 비를 가진 플라비바이러스(뎅기 혈청형 3) 조성물을 추가 부형제로서 아미노산 혼합물 또는 우레아와 조합하여 제조하였다(표 8 참조). 동결건조 후, 케이크의 물리적 완전성을 평가하였다(데

이터는 제시되지 않음). 당만을 함유하는 제제의 예에서, 케이크 완전성은 대조군 FTA 제제와 유사하였다. 만니톨만을 함유하는 제제 및 1:4의 당 대 만니톨 비를 가진 제제는 허용 가능한 외관 및 우수한 물리적 완전성인 것처럼 보이는 외관 및 물리적 완전성을 가진 케이크를 형성하였다. 우레아 또는 아미노산 혼합물의 첨가는 케이크 완전성에 유의미하게 영향을 미치지 않았다. 이 입증된 제제들은 면역원성 제제에서 사용되는 약학 조성물에 유용할 듯하다.

[0142] **실시예 9**

[0143] 조합된 반경험적 스크리닝 및 실험의 디자인(DoE)

[0144] 개선된 안정성을 가진 생바이러스 백신 후보의 제제 개발을 실험적으로 접근하기 위해, 이상적으로 바이러스 분해의 원인 및 기작을 확인한 후 이들의 발생을 최소화하도록 제제를 디자인할 것이다. 이 방법이 여러 바이러스 백신들에 의해 입증되었지만, 이것은 주로 액체 기초 제제에 초점을 맞추었고 동결건조된 제제에 초점을 맞추지 않았다. 전통적인 부형제 스크리닝 연구, 디자인 기반 품질고도화(QbD) 방법(위험 관리 및 종래 과학적 지식과 실험의 디자인(DoE)의 체계적 통합을 포함함), 또는 상기 두 방법들의 조합을 포함하는 보다 더 경험적인 방법들이 종종 요구된다. 이 연구에서, 약독화된 뎅기 생바이러스 백신 후보를 모델 생바이러스 백신으로서 사용하는 단계별 방식으로 조합 방법을 입증하였다. 비경구 투여된 동결건조된 다가 생바이러스 백신의 목표 생성물 프로파일을 달성하는 제제를 확인하기 위해, 이 백신을 2℃ 내지 8℃에서 충분한 장기간 동안 저장함으로써 시험하였다. 먼저, 바이러스 완정화제를 확인하기 위해 반경험적 스크리닝을 수행한 후, 상위 안정화 부형제 "히트"를 사용하는 보다 더 상세한 평가, 및 DoE에 의한 예측 통계 모델의 디자인을 위한 지침으로서 작용하는 탐색적 데이터 분석을 수행하였다. 조합 방법의 단계별 이용은 초기 제품 개발 동안 생바이러스 백신 제제 개발을 위한 체계적인 단계 적절한 방법에 대한 기초를 제공한다.

[0145] 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 안정성에 대한 약학 부형제의 예비 스크리닝

[0146] 예비 스크리닝은 냉동 후 건조된 케이크의 허용 가능한 물리적 완전성을 생성하면서 동결건조 및 가속화된 안정성 동안 바이러스 효능을 유지한다는 면에서 다수의 잠재적 안정화 부형제들을 확인하였다(도 7 및 8 참조). 이 초기 부형제 스크리닝을 위해, 30 mM NaCl을 가진 10 mM 인산염 완충제(pH 7.2) 중에 트레할로스 또는 수크로스를 함유하는 기초 완충제에서 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제를 제조하였다. 상기 요약된 바와 같이, (NaCl을 갖거나 갖지 않고) HEPES, 트리스 및 히스티딘을 포함하는 다른 완충제도 평가하였다. 상기 언급된 완충제들의 저장 안정성의 차이는 관찰되지 않았으나, 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)는 NaCl이 포함되었을 때 추가 안정성을 갖는 듯하였다(데이터는 제시되지 않음). 약학 첨가제의 상이한 공지된 범주로부터 다양한 부형제들을 사용하여 동결건조된 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제를 제조하였다. 다양한 부형제들을 사용하여 동결건조된 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제를 제조하였다(표 12 참조). 경험, 생바이러스 백신(시판되는 백신 및 임상시험 중인 백신)의 제제 조성의 문헌 검색 및 과학적 논거의 조합을 기초로 이 첨가제들을 선택하였다. 평가 시스템(관찰 및 물리적 특징에 의해 1 내지 3, 이때 1은 가장 좋지 않은 케이크 프로파일이고 3은 가장 우수한 케이크 프로파일임)을 기초로 동결건조된 샘플의 케이크 외관을 평가하였다(표 10 및 11).

[0147] 도 7a 내지 7d 및 표 10은 동결건조된 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제, 및 트레할로스 기초 완충제 중의 상이한 안정화제와 관련하여 동결건조 전 및 후 바이러스 역가를 보여준다. 동결건조 후 바이러스 역가의 손실을 계산하였고(도 7a 내지 7d), (전술된 바와 같이) 시각적 평가 시스템을 기초로 동결건조된 샘플의 케이크 외관도 평가하였다(표 10). 이 결과는 우레아, EDTA, 폴리올, 단백질, 중합체 및 아미노산을 포함하는 많은 부형제들이 0.2 log 미만의 역가 손실을 야기할 정도로 (기초 완충제에서의) 동결건조 동안 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)를 안정화시킬 수 있었다는 것을 입증하였다. 특정 부형제들(예를 들면, $MgCl_2$ 및 폴록사머 407)은 동결건조로부터 개별적으로 보호하지 못한 반면, 다른 부형제들(소르비톨)은 동결건조 동안 바이러스를 안정화시킬 수 있었으나, 훌륭한 케이크 구조를 생성하지 못하였고 추가 분석으로부터 배제되었다. 따라서, 이 물질들은 본원에 개시된 제제에서 사용되지 않았다. 기초 완충제에서 수크로스가 트레할로스를 대체하였을 때 유사한 부형제 추세가 관찰되었다(도 8a 및 8b).

[0148] 이 예에서, 도 7a는 동결건조 전 및 후 샘플의 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스 역가를 보여주고, 도 7b는 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실을 보여준다. 데이터는 평균 값 ± 표준편차로서 표시된다. 바이러스 역가는 $\log_{10}$ pfu/0.5 mℓ로 제공된다. *는 LOD 미만의 역가를 표시한다. 이 예의 기초 완충제는 30 mM NaCl을 가진 10 mM 인산염 완충제(pH 7.2) 중에 10% 트레할로스를

함유하였다. 트레할로스가 수크로스로 대체되어 있는 이 예시적 실험과 관련하여, 도 8a는 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스 역가 손실을 보여준다. 데이터는 평균 값 ± 표준편차로서 표시된다. 바이러스 역가는 log_{10} pfu/mℓ로 제공된다.

[0149] 2주 동안 25℃에서 단기간 가속화된 저장 안정성을 통해 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)를 안정화시키는, 도 7a 및 8a에 나타낸 예시적 실험으로부터의 특정 부형제 후보들의 능력을 더 평가하였다. 플라크 어세이에서 바이러스 역가에 의해 측정되었을 때, 트레할로스 및 수크로스 함유 기초 완충제 제제들에 대한 바이러스 효능 및 시간의 경과에 따른 바이러스 역가의 손실(안정성 log_{10} 손실로서 표현됨)은 각각 도 7c 및 7d, 및 도 8b에 나타나 있다. 도 7c는 가속화된 안정성 연구 후 동결건조된 샘플의 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스 역가를 나타내고, 도 7d는 실온(약 25℃)에서 2주 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실을 나타낸다. 도 8b는 동결건조된 샘플이 실온(약 25℃)에서 5주 동안 저장된 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스 역가 손실을 나타낸다. 이 결과는 HSA, 우레아, 알라닌, 메티오닌, MSG, 만니톨 또는 젤라틴을 함유하는 제제가 두 기초 제제들에서 유사한 추세를 나타내었고 25℃에서 저장하는 동안 개선된 바이러스 안정화를 나타내었다는 것을 보여준다. 이 결과는 HSA, 우레아, 알라닌, 메티오닌, MSG 및 만니톨이 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 안정화제이고 동일한 트레할로스/- 수크로스 기초 완충제 제제를 사용한 추가 스크리닝을 위해 선택되었다는 것을 시사한다.

표 10

(도 7a 내지 7d에 나타낸 바와 같이) 트레할로스를 함유하는 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 동결건조된 제제에 대한 시각적 외관에 기초한, 동결건조된 제제의 시각적 케이크 완전성 평가(상기 상세히 기재된 바와 같이, 1 내지 3, 이때 1은 가장 좋지 않음이고 3은 가장 우수함이다.)

동결건조된 제제	평균 케이크 외관
$MgCl_2$	1
소르비톨	2
만니톨	2
폴리소르베이트 80	2
락토스	3
수크로스	3
HSA	3
우레아	3
알라닌	3
EDTA	3
메티오닌	3
젤라틴	3
MSG	3
덱스트란 40	3
기준 물질, 폴록사머 407	3

[0150]

표 11

(도 8a 및 8b에 나타낸 바와 같이) 수크로스를 함유하는 플라비바이러스 (예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 동결건조된 제제에 대한 시각적 외관에 기초한, 동결건조된 제제의 시각적 케이크 완전성 평가(상기 상세히 기재된 바와 같이, 1 내지 3, 이때 1은 가장 좋지 않은 케이크 외관 및 물리적 특징을 갖고 3은 가장 우수한 케이크 외관 및 물리적 특징을 가진다.)

동결건조된 제제	평균 케이크 외관
만니톨	1
소르비톨	1
$MgCl_2$	1
알라닌	2
우레아	2
HSA	3
락토스	3
트레할로스	3
MSG	3
메티오닌	3
EDTA	3
PS80	3
젤라틴	3
덱스트란 40	3
PF127	3

[0151]

[0152] 이 결과는 우레아, EDTA, 폴리올, 단백질, 중합체 및 아미노산을 포함하는, 표 12에 나열된 많은 부형제들이 0.2 log 미만의 역가 손실을 야기할 정도로 (기초 완충제에서의) 동결건조 동안 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)를 안정화시킬 수 있었다는 것을 입증하였다. 첨가제 $MgCl_2$ 및 폴록사머 407은 개별적으로 2 log 초과의 손실로 동결건조 동안 가장 낮은 개별 물질 바이러스 안정화 잠재력을 부여하였다(그러나, 폴록사머 407은 다른 부형제의 존재 하에서 상승작용적 안정화 효과를 가졌다; 보다 더 상세한 내용에 대해서는 하기 설명을 참조한다). 특정 부형제들(예를 들면, $MgCl_2$ 및 폴록사머 407)은 동결건조로부터 개별적으로 보호하지 않은 반면, 다른 부형제들(예를 들면, 소르비톨)은 동결건조 동안 바이러스를 안정화시킬 수 있었다. 기초 완충제에서 수크로스가 트레할로스를 대체하였을 때 유사한 부형제 추세가 관찰되었다(도 8).

표 12

동결건조 및 가속화된 저장 동안 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스를 안정화시키고 약학적으로 훌륭한 동결건조된 케이크를 형성하는 능력에 대해 스크리닝된 부형제들의 요약 목록. 본문에 기재된 바와 같이 추가 첨가제를 함유하는 다양한 기초 완충제들의 존재 하에서 부형제들을 평가하였다.

범주	부형제
단백질/중합체	인간 혈청 알부민 및 rHSA(0.1%, 0.3% 및 2%)
	젤라틴(3.0%)
	덱스트란 40(1% 내지 10%)
당	수크로스(1% 내지 10%)
	D-트레할로스 이수화물(1% 내지 15%)
	락토스(4%)
폴리올	소르비톨(3.0%)
	만니톨(1%, 3%, 5%)
계면활성제	폴리소르베이트 80(0.05%) PF127(1.0%)
아미노산	l-글루탐산일나트륨(10 mM)
	메티오닌(2.5 mM)
	알라닌(10 mM) 아르기닌(10 mM)
삼투질	우레아(0.125% 및 0.25%)
염	염화마그네슘(100 mM)
킬레이팅제	EDTA(1mM)

[0153]

[0154] 2주 동안 25℃에서 단기간 가속화된 저장 안정성을 통해 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)를 안정화시키는 일부 예시적 부형제 후보들의 능력을 더 평가하였다. 플라크 어세이에서 바이러스 역가에 의해 측정되었을 때, 트레할로스 함유 기초 완충제 제제에 대한 바이러스 효능 및 시간의 경과에 따른 바이러스 역가의 손실(안정성 $\log_{10}$ 손실로서 표현됨)은 도 7c 및 도 7d에 표시되어 있고, 수크로스 함유 기초 완충제 제제에 대한 바이러스 효능 및 시간의 경과에 따른 바이러스 역가의 손실(안정성 $\log_{10}$ 손실로서 표현됨)은 도 8a 및 도 8b에 표시되어 있다. 예를 들면, HSA, 우레아, 알라닌, 메티오닌, MSG, 만니톨 및/또는 젤라틴을 함유하는 제제는 두 기초 제제들에서 유사한 추세를 나타내었고, 25℃에서 저장하는 동안 개선된 바이러스 안정화를 나타내었다. 흥미롭게도, 덱스트란은 트레할로스 기초 완충제와 함께 사용 시 보다 더 우수한 안정성을 나타내었으나 수크로스 기초 완충제와 함께 사용 시 이러한 안정성을 나타내지 않았다. 폴리소르베이트 80 및 락토스가 우수한 동결보호를 나타내었음에도 불구하고, 이 부형제들은 25℃에서 건조된 상태로 저장하는 동안 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)를 안정화시킬 수 없었다. 요약하건대, HSA, 우레아, 알라닌, 메티오닌, MSG 및 만니톨은 잠재적 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 안정화제로서 확인되었고 동일한 트레할로스/수크로스 기초 완충제 제제를 사용한 추가 스크리닝을 위해 선택되었다.

[0155] 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 안정성에 대한 부형제 조합물의 스크리닝

[0156] 동결건조 및 가속화된 안정성 전 및 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가에 대한 상이한 농도의 선두(lead) 부형제들의 조합 효과를 평가하였다. 도 9 및 15를 참조하건대, 기초 완충제는 30 mM NaCl 및 0.1% HSA를 가진 10 mM 인산염 완충제(pH 7.2) 중에 10% 트레할로스를 함유하였다. 도 9a 및 15a는 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실을 보여주고; 도 9b 및 15b는 동결건조된 샘플을 실온(약 25℃)에서 5주 동안 저장한 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스 역가 손실을 보여준다. 이 도면들에서, 데이터는 평균 값 ± 표준편차로서 표시된다. 바이러스 역가는 $\log_{10}$ pfu/mℓ로 제공된다.

[0157] 이 연구를 위해, 초기 스크린과 관련된 특정 방법에서 HSA가 효과적인 동결보호제로서 작용하는 것으로 시사되었기 때문에 (0.1% 및 0.2%(w/v)의) HSA를 기초 제제에 첨가하였다(도 9 및 15). 두 HSA 농도에서 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가의 손실(0.2 log 미만의 손실)이 각각 10% 수크로스 또는 트레할로스를 함유하는 기초 제제들에서 관찰되었다(도 9a 및 15a). 따라서, 인산염 완충제, NaCl, 0.1% HSA를 가진 10% 당(트레할로스 또는 수크로스) 및 표시된 추가 부형제를 함유하는 후속 기초 완충제 제제를 제조하였다. 이 기초 제제들 중 어느 한 기초 제제에서 대다수의 부형제 조합물들은 동결건조 후 샘플 및 가속화된 안정성 후 샘플 둘 다에서 개선된 바이러스 안정성을 나타내었다(도 9 및 15). 기초 제제에 첨가된 아미노산과 우레아의 조합물을 사용함으로써 최대 동결보호를 입증하였다. 25℃에서 5주 후, 아미노산, 예컨대, 알라닌, 아르기닌, MSG 및 메티오닌과 함께 또는 이러한 아미노산 없이 만니톨 및 우레아가 첨가된 기초 제제는 매우 개선된 바이러스 안정성을 나타내었다(도 9 및 15). 기초 제제에서 당 농도를 15%까지 증가시키는 것은 바이러스 역가의 보호 면에서 임의의 추가 장점을 제공하는 것으로 보이지 않았다.

표 13

(도 9a 및 9b에서 관찰된 바와 같이) 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 동결건조된 제제에 대한 시각적 외관에 기초한, 동결건조된 제제의 시각적 케이크 완전성 평가(상기 상세히 기재된 바와 같이, 1 내지 3, 이때 1은 가장 좋지 않은 케이크 외관 및 물리적 특징을 표시하고 3은 가장 우수한 케이크 외관 및 물리적 특징을 표시한다.)

동결건조된 제제	평균 케이크 외관
메티오닌 + MSG + 알라닌 + 우레아 + 만니톨	2
15% 트레할로스 + 0.1% HSA	2
메티오닌	2
만니톨	3
10% 트레할로스 + 2% HSA	3
10% 트레할로스 + 0.1% HSA	3
메티오닌 + MSG + 알라닌 + 우레아	3
MSG	3
알라닌	3
우레아	3
메티오닌 + MSG + 알라닌	3
메티오닌 + MSG	3
메티오닌 + 알라닌	3
MSG + 알라닌	3
메티오닌 + 우레아	3
MSG + 우레아	3
알라닌 + 우레아	3
아르기닌	3
아르기닌 + 우레아	3

[0158]

[0159] 최종 스크리닝 실험은 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 효능 및 동결건조된 케이크 완전성에 대한 당 대 만니톨 비의 변화 효과를 조사하였다. 표 9, 및 도 10a 및 10b에 상세히 나타낸 조성물 제제를 참조하건대, 도 10a는 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실을 보여주고, 도 10b는 동결건조된 샘플을 실온(약 25℃)에서 5주 동안 저장한 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실을 보여준다. 기초 완충제는 30 mM NaCl 및 0.1% HSA를 가진 10 mM 인산염 완충제(pH 7.2)를 함유하였다. 데이터는 평균 값 ± 표준편차로서 표시된다. 바이러스 역가는 $\log_{10}$ pfu/mℓ로 제공된다. * N/A는 LOD 미만을 표시한다.

[0160] 선택된 당 대 만니톨 비를 가진 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제를 기초 완충제에서 추가 부형제로서 아미노산 혼합물 또는 우레아와 조합하여 제조하였다(표 9). 대다수의 제제들(표 3 및 9에서 발견됨)은 동결건조 후 개선된 바이러스 역가 수율을 나타내었다(표 3). 우레아의 첨가는 5주 동안 25℃ 저장 후 수크로스 또는 트레할로스를 함유하는 기초 완충제에서 아미노산 혼합물에 비해 개선된 바이러스 안정화 잠재력

을 나타내었다(표 3 및 9, 제제 5 및 6; 도 10a). 흥미롭게도, 만니톨을 기초 제제에 첨가하였을 때, 아미노산 혼합물은 우레아에 비해 증가된 바이러스 안정화 잠재력을 나타내었다(표 3 및 9, 제제 9 및 10; 도 10a). 그럼에도 불구하고, 만니톨만을 함유하는 특정 제제들(예를 들면, 13, 14 및 15)은 우레아 또는 아미노산 혼합물의 첨가와 관계없이 좋지 않은 바이러스 안정화 효과를 나타내었다. 이 관찰은 바이러스 안정성에 대한 비결정질 당의 중요한 효과를 입증하고, 이 실험은 플라비바이러스 안정화의 관점에서 중요한 부형제로서 당과 만니톨의 상호작용도 입증한다. 냉동건조 및 가속화된 저장 동안 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)에 대한 이 기대되는 안정화 부형제들의 효과를 더 연구하기 위해, 이하에 기재된 바와 같이 합리적인 디자인의 실험 방법을 이용하였다.

[0161] 실험의 디자인

[0162] 도 11을 참조하건대, 도 11은 스크리닝 연구 동안 분석된 모든 제제들에 대한 포괄적인 바이러스 효능 손실 데이터세트를 보여준다. 데이터를 도 8 내지 10 및 도 15에 제공된 데이터와 일치하는 군 1, 2 및 3을 스크리닝함으로써 표시된 3개의 스크리닝 단계들로 분류하였다. 이 데이터는 액체(동결건조 전) 샘플, 동결건조 후 샘플, 및 25℃에서 5주 동안 안정성 샘플에 대한 log_{10} pfu/0.5 ㎖ 역가를 보여준다. 도 11a 및 11b는 냉동건조 및 열적 챌린지로부터의 보호(Log_{10} 동결건조 손실(도 11a) 및 25℃에서 5주 후 log_{10} 하락(도 11b))을 제공하는 통계학적으로 유의미한 항들의 확인을 보여준다. 어느 항이 통계학적으로 관찰되었을 때 효능에 유의미하게 영향을 미치는 지를 확인하기 위해 단계별 회귀를 이용하여 데이터를 모델링하였다. 가장 우수한 피트 모델에 수렴하는 것을 돕기 위해 베이지안(Bayesian) 정보 중단 기준을 이용하는 것 이외에, 주요 효과 및 상호작용 항들은 이들의 확률 값이 0.05 미만인 경우 유의미한 것으로서 간주되었다. R^2 값을 사용하여 모델 피트의 적절성도 평가하였다.

[0163] 부형제 및 제제의 반경험적 스크리닝은 개별적으로 제조된 85개의 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 제제들에 대한 냉동된 액체(동결건조 전) 바이러스 효능 측정, 동결건조 후 바이러스 효능 측정 및 가속화된 안정성(25℃에서 5주) 바이러스 효능 측정의 큰 데이터세트를 생성하였다(데이터는 제시되지 않음). 포괄적인 데이터세트의 분석은 각각의 순차적인 스크리닝 실험을 이용할 때 개선된 케이크 외관 이외에 각각의 조건에 대한 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 효능 보유의 증가가 있다는 것을 시각적으로 보여준다. 스크리닝 실시 전체에 걸쳐 부형제 농도 및 이들의 조합의 변경은 회귀 모델링을 이용하여 탐색적 통계 모델을 구축하는 데 사용될 수 있는 경험적으로 유도된 데이터세트를 조립하였다.

[0164] 어느 부형제(또는 항)가 개별적으로 기여하거나 상호작용하여 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 효능 손실에 영향을 미치는 지를 확인하기 위해, 반응 표면 방법(RSM)용 JMP 11.2.0에서 이용될 수 있는 단계별 회귀 수단을 이용하여 데이터세트를 모델링하였다. 회귀 분석은 최소 베이지안 정보 중단 기준을 이용하여 가장 우수한 모델에 도달하였고, 유의성(확률 통계 < 0.05)을 보이지 않은 항 및 상호작용은 배제되었다. 동결건조 후 log_{10} 손실 및 25℃에서 5주 후 log_{10} 하락에 대해 각각 0.44 및 0.73의 R^2 값을 가진 모델 피트를 확인하였다(도 11a 및 11b). HSA, 우레아, 만니톨, 및 당 수크로스 및 트레할로스를 비롯한 부형제들은 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 효능 손실을 제한하는 데 있어서 통계학적으로 유의미한 것으로서 확인되었다(데이터는 제시되지 않음). 유사한 세트의 부형제들이 가속화된 저장 안정성 동안 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 효능 손실을 보호하는 것으로 입증되었다. 특정 첨가제들, 즉 우레아, 만니톨 및 HSA는 단일 항 유의성을 나타낸 반면, 트레할로스 또는 수크로스와 우레아의 조합물, 및 트레할로스와 만니톨의 조합물은 유의미한 2 항 상호작용을 가진 것으로서 확인되었다. 아미노산인 알라닌, 메티오닌 및 MSG는 스크리닝 단계 동안 안정화 효과를 제공하는 듯하였기 때문에 모델에 포함되었으나, 이 분석에서 통계학적으로 유의미하지 않은 것으로 밝혀졌다. 이 탐색적 모델을 지침으로서 사용하여, 첨가제 HSA, 우레아, 만니톨 및 트레할로스 또는 수크로스를, 추가 연구를 위한 기대되는 후보로서 선택하였다.

표 14

DOE 제제 설계

DOE 제제 번호	조성				
	트레할로스 %	만니톨(%)	알라닌(mM)	HSA(%)	우레아(%)
1	10	1	20	0.3	0
2	10	1	10	0	0.250
3	1	1	0	0.3	0.125
4	1	1	20	0.1	0.250
5	10	5	0	0.1	0.000
6	10	3	0	0.3	0.250
7	5.5	3	10	0.1	0.125
8	1	5	0	0	0.250
9	5.5	5	20	0.3	0.250
10	1	3	20	0	0.000
11	10	5	20	0	0.125
12	5.5	1	0	0	0.000
13	1	5	10	0.3	0.000

[0165]

[0166] 표 14 및 도 12를 참조하건대, 이 표 및 도면은 다음과 같은 내용을 제공한다: 표 14: DOE 제제 디자인, 도 12a: 액체 샘플, 동결건조된(-80℃에서 저장된) 샘플 및 안정성 샘플(25℃에서 5주 동안 저장된 동결건조된 제제)의 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스 역가, 도 12b: 동결건조 및 25℃에서의 5주 안정성 동안 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실. 모든 제제들은 예시적 완충제로서 10 mM 인산나트륨 및 30 mM NaCl(pH 7.2)을 함유하였다. 도 12c는 JMP 11.2.0을 이용하여 보정된 아카이케(Akaike) 정보 기준(AICc)을 최소화하기 위해 정방향 단계별 회귀 및 중단 규칙 세트를 이용하여 DSD 데이터를 분석함으로써 생성된 3개의 분류된 평가 차트를 나타낸다. 주요 효과 및 상호작용 항은 이들의 확률 값이 0.05 미만인 경우 유의미한 것으로서 간주되었다. R^2 값을 사용하여 모델 피트의 적절성도 평가하였다.

[0167] 탐색적 일변량 회귀 및 다변량 데이터 분석에 의해 확인된 선두 부형제 히트 및 수준은 안정성에 미치는 그들의 영향의 유의성을 디자인으로 확인하고 각각의 부형제에 대한 최적 농도 범위를 조사하기 위해 확정적 스크리닝 디자인(DSD) 내로 통합되었다(표 14). 유사한 통계학적 영향을 나타낼지라도, 탐색적 모델 분석에 의해 확인된 트레할로스의 추가 상호작용 때문에 수크로스보다 트레할로스를 선택하였다. 알라닌은 유의미한 것으로 발견되지 않았지만, 스크리닝 동안 가장 기대되는 제제에 존재하는 대표적인 아미노산으로서 알라닌을 DSD에 포함시켰다. 부형제 농도 범위의 선택을 반응 표면 모델 예측 프로파일러(데이터는 제시되지 않음)로 알아내었고, JMP 11.2.0에서 실험의 디자인 플랫폼을 이용하여 DSD를 구축하였고, 평가를 위해 13개의 개별 제제들을 생성하였다. 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)를 표 14에 요약된 각각의 제제에 첨가하고 동결건조하고 5주 동안 25℃에서 챌린지하였다. 각각의 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)에 대한 실험 제제들의 확정적 스크리닝 디자인(DSD) 디자인, 및 액체 샘플, 동결건조된(80℃에서 저장된) 샘플 및 안정성 샘플(25℃에서 저장된 동결건조된 제제)의 역가가 표시되었다. (도 11a 및 11b) 주요 효과 및 상호작용 항은 이들의 확률 값이 0.05 미만인 경우 유의미한 것으로서 간주되었다. 수직 직선은 p 값 역치를 나타내고, 이 선들을 교차하는 임의의 막대는 유의미한 효과를 입증한다. R^2 값을 사용하여 모델 피트의 적절성도 평가하였다. *N/A는 LOD 미만을 표시한다. 제제 세부사항은 다음과 같다: F1: 10% Tre + 1% Mann + Ala(20 mM) + 0.3% HSA; F2: 10% Tre + 1% Mann + Ala(10 mM) + 0.25% U; F3: 1% Tre + 1% Mann + 0.3% HSA + 0.125% U; F4: 1% Tre + 1% Mann + Ala(20 mM) + 0.1% HSA + 0.25% U; F5: 10% Tre + 5% Mann + 0.1% HSA; F6: 10% Tre + 3% Mann + 0.3% HSA + 0.25% U; F7: 5.5% Tre + 3% Mann + Ala(10 mM) + 0.1% HSA + 0.125% U; F8: 1% Tre + 5% Mann + 0.250% U; F9: 5.5% Tre + 5% Mann + Ala(20 mM) + 0.3% HSA + 0.25% U; F10: 1% Tre + 3% Mann + Ala(20 mM); F11: 10% Tre + 5% Mann + Ala(20 mM) + 0.125% U; F12: 5.5% Tre + 1% Mann; F13: 1% Tre + 5% Mann + Ala(10 mM) + 0.3% HSA. Mann, 만니톨; Tre, 트레할로스 이수화물; HSA, 인간 혈청 알부민; Ala, 알라닌; 및 U, 우레아.

[0168] 냉동된 액체(동결건조 전) 샘플, 동결건조 후(0시간) 샘플, 및 5주 안정성 샘플을 플라크 어세이로 바이러스 효능에 대해 측정하였다(도 12a 및 12b). JMP 11.2.0에서 보정된 아카이케 정보 기준(AICc)을 최소화하기 위해 이번에는 정방향 단계별 회귀 및 중단 규칙 세트를 이용하여 DSD에 의해 생성된 데이터세트를 분석하였다. 이 단계별 회귀 방법은 가장 유의미한 항을 확인시켜주었고 시험된 부형제들 각각에 대한 디자인 공간도 밝혀주었다(도 12c). $\log_{10}$ 총 효능 손실을 포함하는, 각각의 반응에 대한 0.79, 0.89 및 0.99의 R^2 값을 가진 모델 피트. 바이러스 효능 손실의 분석은 중간 내지 높은 농도의 트레할로스 및 HSA가 낮은 내지 중간 농도의 만니톨 및 중간 내지 높은 농도의 우레아와 함께 사용될 때 효능 손실을 유의미하게 안정화시켰다는 것을 강조하였다. 알라닌은 통계학적으로 유의미한 효과를 나타내지 않았다는 것을 주목한다(모델에 의해 확인되지 않음).

[0169] JMP 11.2.0을 이용하여(JMP의 예측 프로파일러를 이용하여), 각각 3% 및 0.125%의 짜 맞춘 혼합물 값을 가진 만니톨 및 우레아와 함께 2개의 인자 항들, 즉 트레할로스 및 HSA에 대한 확정적 스크린 디자인 반응 표면 모델을 위한 최적화된 디자인 공간을 보여주는 등고선(contour) 프로파일러를 생성하였다(데이터는 제시되지 않음). 각각의 반응에 대한 예측 DSD 모델로부터 생성된 등고선 프로파일러는 바이러스 효능 손실로부터 보호하는 최적 부형제 농도가 5% 트레할로스, 3% 만니톨, 0.3% HSA 및 0.125% 우레아임을 확인시켜주었다.

[0170] 4가 뎅기 백신 제형에 대한 부형제 조합물의 평가

표 15

DOE를 이용한 제제 설계

DOE 제제 번호	조성
제제_1	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 덱스트란(1%)(낮은 덱스트란)
제제_2	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 덱스트란(5%)(높은 덱스트란)
제제_3	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 재조합 HSA(0.3%)
제제_4	만니톨(3%) + 트레할로스(5%) + 우레아(0.125%) + 천연 HSA(0.3%)

[0171]

[0172] 표 15 및 도 13을 참조하건대, 패널은 다음과 같은 내용을 제공한다: 표 15: DOE를 사용한 제제 디자인, 도 13a: 동결건조 후 4가 제제, 즉 TDV 혈청형 1 내지 4(면역원성 제제)의 역가 손실, 도 13b: 동결건조된 샘플을 5주 동안 25℃에서 저장한 후 (4가 백신 제제에서) TDV 혈청형 1 내지 4의 역가 손실, 도 13c: 동결건조 및 5주 동안 25℃ 저장 후 TDV 혈청형 1 내지 4의 총 바이러스 역가 손실. 모든 DOE 제제들은 10 mM 인산나트륨 및 30 mM NaCl도 함유하였다(pH 7.2). * 계산되지 않음(LLOD 미만).

[0173] 트레할로스, 만니톨, 인산염 완충제 및 NaCl을 함유하는 기초 제제에서 덱스트란(DOE 제제 1 및 2), rHSA(DOE 제제 3) 및 nHSA(DOE 제제 4)의 농도를 변경시킴으로써 4가 DOE 제제들(TDV-1, TDV-2, TDV-3, TDV-4)을 제조하였다(표 15). 동결건조 및 가속화된 안정성 후 동결건조된 케이크 완전성(데이터는 제시되지 않음) 및 바이러스 역가의 조합된 $\log_{10}$ 손실(도 13b)의 함수로서 DOE 제제들을 평가하고 등급을 매겼다. rHSA 또는 nHSA를 함유하는 DOE 제제들은 덱스트란 함유 제제에 비해 개선된 바이러스 효능 수율을 나타내었다. rHSA를 함유하는 DOE 제제는 TDV-2 내지 TDV-4에 대해 0.3 log 미만의 손실 및 TDV-1에 대해 0.5 log 손실로 모든 혈청형들에 대한 가장 높은 바이러스 효능 회복을 나타내었다(도 13b). 그러나, HSA 함유 제제의 사용 시 부분적 케이크 붕괴가 관찰되었다(데이터는 제시되지 않음). 흥미롭게도, 덱스트란을 함유하는 DOE 제제는 케이크 물리적 외관 면에서 더 훌륭하였으나, 동결건조 후 바이러스 효능을 보존할 수 없었다(도 13b).

[0174] 4가 뎅기 백신 제제의 실시간 안정성 연구

[0175] 25℃에서 4가 TDV를 사용하는 가속화된 안정성 연구 이외에, 목표 장기간 저장 온도에서 실시간 안정성을 생성하기 위해 4℃ 안정성 연구를 시작하였다. 0주, 5주, 13주 및 39주의 시간에서 바이러스 효능을 측정하면서 최대 39주 동안 4℃에서 각각의 DOE 제제를 저장하였다. 도 14를 참조하건대, DOE 제제 1 내지 4는 30 mM NaCl을 가진 10 mM 인산나트륨(pH 7.2) 중에 5% 트레할로스, 3% 만니톨, 0.125% 우레아 및 하기 첨가제들을

함유하였다: 1% 덱스트란(도 14a), 5% 덱스트란(도 14b), 0.3% 재조합 HSA(도 14c) 또는 0.3% 천연 HSA(도 14d). 동결건조된 샘플을 4℃에서 저장하였고 0주, 5주, 13주 및 39주에서 바이러스 효능을 측정하기 위해 재구성하였다. 강조된 영역은 JMP 11.2.0에서 확인된 상한 및 하한 95% 신뢰간격을 나타낸다. 각각의 그래프에서 삽입된 표는 액체(동결건조 전) 및 0시간(동결건조 후(T0))에서 각각의 혈청형에 대한 Log_{10} pfu/0.5 ㎖ 역가 데이터, 및 78주에서 예측된 역가(예측 78주)를 함유한다(주: 예측된 역가는 PRISM 트레이닝 앤드 컨설턴시 리미티드(Training and Consultancy Limited)(영국 소재)에 의해 개발된 Adapt2 버전 3.4.1 수단을 이용함으로써 측정되었다).

[0176] 모든 후보 4가 TDV 제제들은 4℃에서 39주 후 모든 혈청형들에 대한 최소한의 바이러스 효능 손실을 나타내었거나 바이러스 효능 손실을 나타내지 않았다(도 14a 내지 14d). 시간의 경과에 따른 바이러스 효능의 겉보기 증가는 (인-하우스 관찰을 기초로) 어세이 가변성을 고려할 때 제로 손실로서 해석될 수 있다. 세로방향 시점 바이러스 역가는 78주(2배 마지막 실시간 데이터 점)에서 가장 우수한 피트 선으로부터의 외삽에 의해 예측되었고(도 14a 내지 14d), 시간의 경과에 따라 예측된 바이러스 효능의 최소 손실을 입증하였다. 그러나, 덱스트란을 함유하는 제제는 HSA를 함유하는 제제에 비해 동결건조 후 유의미한 양의 바이러스 역가를 손실함으로써, 덱스트란을 함유하는 제제의 총 순 효능 손실이 HSA를 함유하는 제제보다 더 높게 만드는 듯하였다. 이 실시간 데이터는 확인되고 최적화된 후보 제제가 목표 저장 온도에서 원하는 고체 상태 안정성 프로파일을 나타낸다는 것을 암시한다.

표 16

동결건조된 샘플의 케이크 외관을 시각적 평가 시스템(1 내지 3, 이때 1은 가장 좋지 않음이고, 3은 가장 우수함임)에 기초하여 평가하였다(도 15a 및 15b).

[0177]

동결건조된 제제	평균 케이크 외관
메티오닌 + MSG + 알라닌 + 우레아 + 만니톨	3
메티오닌 + MSG + 알라닌 + 우레아	3
MSG + 알라닌	3
메티오닌 + 우레아	3
MSG + 우레아	3
알라닌 + 우레아	3
15% 수크로스 + 0.1% HSA	3
10% 수크로스 + 2.0% HSA	3
10% 수크로스 + 0.1% HSA	3
메티오닌	3
MSG	3
알라닌	3
우레아	3
만니톨	3
메티오닌 + MSG + 알라닌	3
메티오닌 + MSG	3
메티오닌 + 알라닌	3
아르기닌	3
아르기닌 + 우레아	3

[0178] 특정 실험에서, 동결건조 및 가속화된 안정성 전 및 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가에 대한 상이한 농도의 선두 부형제들의 조합 효과를 평가하였다. 이 연구를 위해, 초기 스크린의 결과는 HSA가 효과적인 동결보호제로서 작용하였다는 것을 시사하였기 때문에, (0.1% 내지 0.2%(w/v)의) HSA를 전술된 기초 제제에 첨가하였다(도 15). 도 15는 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 바이러스 효능에 대한 (트레할로스를 함유하는 기초 완충제 중의) 다양한 부형제 조합물들의 효과를 스크리닝함으로써 수득된 결과를 나타낸다. 기초 완충제는 30 mM NaCl을 가진 10 mM 인산염 완충제(pH 7.2) 중에 10% 트레할로스를 함유하였다.

결과는 (도 15a) 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실, 및 (도 15b) 동결건조된 샘플을 실온(약 25℃)에서 5주 동안 저장한 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가 손실을 표시한다. 데이터는 평균 값 ± 표준편차로서 표시된다. 바이러스 역가는 $\log_{10}$ pfu/mℓ로 제공된다.

[0179] 도 15에 나타낸 바와 같이, 각각 10% 수크로스 또는 트레할로스를 함유하는 기초 제제들 중의 두 HSA 농도에서 동결건조 후 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가의 0.2 log 미만의 손실이 관찰되었다(도 15a). 따라서, 인산염 완충제, NaCl, 0.1% HSA를 가진 10% 당(트레할로스 또는 수크로스), 및 표시된 추가 부형제를 함유하는 후속 기초 완충제 제제를 제조하였다. 이 기초 제제들 중 어느 한 기초 제제에서 대다수의 부형제 조합물들은 동결건조 후 샘플 및 가속화된 안정성 샘플 둘 다에서 개선된 바이러스 안정성을 나타내었다(도 15a 및 15b). 기초 제제에 첨가된 아미노산과 우레아의 조합물을 사용함으로써 최대 동결보호를 입증하였다. 25℃에서 5주 후, 아미노산, 예컨대, 알라닌, 아르기닌, MSG 및 메티오닌과 함께 또는 이 아미노산 없이 첨가된 만니톨 및 우레아를 가진 기초 제제들 중 어느 한 기초 제제는 현저히 개선된 바이러스 안정성을 나타내었다(도 15a 및 15b). 기초 제제 중의 당 농도를 15%까지 증가시키는 것은 바이러스 역가의 보호 면에서 임의의 추가 장점을 제공하는 것으로 보이지 않았다.

[0180] 약독화된 생바이러스 백신에서 바이러스 효능의 보존은 제제의 조성 및 최종 약학 제형의 유형(즉, 액체 대 동결건조된 형태)에 주로 의존하는, 생성물의 저장 수명 전체에 걸쳐 성공적인 면역화를 위해 매우 중요하다. 동결건조는 냉동 및 건조 스트레스를 수반하기 때문에, 단일 부형제는 종종 바이러스 안정화에 충분하지 않으므로, 첨가제들의 조합물은 상이한 분해 기작으로부터 보호하기 위해 종종 요구된다. 당, 예컨대, 수크로스 또는 트레할로스는 플라비바이러스 역가의 동결보호 및 다른 생바이러스 백신을 위한 이 동결건조된 제제에서 매우 중요한 듯하였다. 예를 들면, 젤라틴과 조합된 트레할로스는 수크로스와 소르비톨의 조합물에 비해 약독화된 볼거리 생바이러스 백신을 더 잘 안정화시키는 것으로 입증되었다. 반대로, 수크로스 및 락트알부민은 트레할로스 단독과 대조적으로 약독화된 가성우역(PPR) 생바이러스 백신보다 더 우수한 열 보호를 부여하였다.

[0181] 특정 예시적 방법에서, 다른 부형제와 조합된 수크로스 및 트레할로스 둘 다가 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)의 안정성에 미치는 효과를 체계적으로 연구하였다. 우레아, EDTA, 폴리올, 단백질, 중합체 및 아미노산을 함유하는 제제는 당 유형(트레할로스 대 수크로스)과 관계없이 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 역가의 0.2 log 미만의 손실과 함께 동결건조 후 높은 바이러스 회복을 나타내었다. 연구된 부형제들 중에서, 다른 제제에 비해 $MgCl_2$ 및 폴록사머 407을 함유하는 제제의 사용 시 동결건조 후 바이러스 효능 손실은 유의미한 것으로 관찰되었다. $MgCl_2$은 폴리오바이러스를 안정화시키는 것으로 잘 공지되어 있으나, 본 방법은 플라비바이러스 안정성에 대한 유해 효과의 증거를 제공한다. $MgCl_2$의 안정화 효과는 바이러스에 의존할 수 있다.

[0182] 일단 이 방법들의 선두 부형제가 확인되면, 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3) 효능을 보존하는 선택된 부형제 조합물들의 능력을 시험하였다. 아미노산 및 우레아의 특정 조합물들을 함유하는 제제는 유의미한 관찰 가능한 플라비바이러스 동결보호를 나타내었고, 만니톨과 추가로 조합되었을 때, 5주 동안 25℃ 저장 후 가장 높은 바이러스 효능 안정화를 부여하였다. 임의의 엄격한 제제에 의해 구속받고자 하지는 않지만, 우레아는 탈수 동안 플라비바이러스 완전성/안정성을 보호하는 데 있어서 중요한 역할을 하는 듯하다. 아미노산의 첨가는 저장 동안 수크로스 함유 제제에서 다양한 단백질들의 안정성을 개선하였고 우선적 수화 및/또는 증가된 용매 표면 장력을 통해 안정화에 있어서 잠재적으로 역할을 할 수 있다. 만니톨도 플라비바이러스에 대한 개선된 안정화 효과를 나타내었다.

[0183] 동결건조된 생플라비바이러스 백신 후보의 제제 디자인을 위해 채택된 한 방법은 반경험적 실험과 향상된 탐색적 데이터 분석의 조합이었다. 문헌 보고서에 기초한 과학적 논거, 약학적 경험 및 최종 목표 생성물 프로파일의 고려를 이용하여 이 작업을 위해 조사할 약학 부형제들의 출발 목록을 18개의 첨가제들로 감소시켰다(표 9 참조). 부형제 조합물들의 경험적 스크리닝은 핵심 부형제들의 선택을 안내한 초기 모델, 이들의 잠재적 범위, 및 이들의 바이러스 안정화 효과의 관점에서 부형제 상호작용으로부터 탐색적 그래프를 생성하기 위해 다변량 분석 및 가시화에 의해 조사된 기왕(historical) 데이터세트를 생성하였다. 다변량 스크리닝 실험을 디자인하는 대신에 출발 목록으로부터 실험적 데이터세트를 구축하는 것은 디자인된 연구에서 부형제에 대한 부적절한 범위의 효과 및/또는 사용을 갖지 않은 부형제를 첨가하는 것을 피하였다.

[0184] 실험적 바이러스 안정성 데이터세트를 구축하고, 탐색적 데이터 분석을 수행하고 데이터를 '초기' 회귀 모델에 소급적으로 피팅하는 것은 그의 한계를 갖지 않는 것은 아니다. 이것은 이 단계에서 생성된 모델들이 보다 더

신뢰할 수 있는 예측 모델(DSD; 표 15)을 생성하기 위해 통계학적으로 디자인된 실험을 안내하는 데 도움을 준다는 점에서 탐색적으로서 기재된(도 11a 및 11b) 이유이다. 정확한 예측 모델링을 위해 통계학적으로 디자인되지 않은 기왕 데이터세트는 반응 파라미터에 대한 비필수 데이터 점, 불일치 반응 측정치 및/또는 불완전한 측정 데이터를 함유할 수 있다. 이 유형의 데이터세트 인공물은 정확하고 신뢰할 수 있는 통계 모델에 기여할 것 같지 않다. 이것은 동결건조 후 역가의 log_{10} 손실의 모델 피트에 대한 낮은 R^2 값으로 나타난다(도 11a). 이것은 HSA*HSA 상호작용의 유의성을 인위적으로 부풀림으로써(도 12a), 가능한 오도하는 곡선 항을 확인하는 데 기여하는, 시험된 HSA의 두 농도(0.1% 및 2%) 사이의 공간을 모델링하기 어렵다는 점에 부분적으로 기인할 수 있다. 데이터세트를 명확히 과학적으로 이해하는 것은 부형제 및 이의 농도의 선택을 위한 지침으로서 탐색적 데이터 분석 및 초기 통계 모델을 합리적으로 사용하는 능력을 부여한다.

[0185] 선두 부형제 및 이의 잠재적 작업 농도의 선택은 디자인된 실험으로부터 유도된 예측 모델 내로 공급하고 이 모델의 효능을 최대화하는 데 필수적이다. DSD 스크리닝 모델(도 12c)에서 반응 데이터를 조사하고 JMP의 예측 프로파일러를 통해 가장 바람직한 셋팅 및 범위를 확인함으로써, 동결건조된 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)의 안정화를 위한 최적 제제의 디자인 공간을 보여주고 맵핑할 수 있는 등고선도를 생성하였다(데이터는 제시되지 않음). DSD는 트레할로스와 HSA 사이의 유의미한 상호작용을 확인하였고, 안정화 특징이 알라닌과 무관하다는 것을 발견하였고, 만니톨 및 우레아의 최적 농도를 확인할 수 있었다. DSD 모델은 선두 제제의 최종 선택을 가능하게 하는 모델의 신뢰성에서 확신을 제공한 높은 R^2 값과 잘 맞았다.

[0186] 플라비바이러스(예를 들면, TDV-1, TDV-2, TDV-3 및 TDV-4의 4가 혼합물)를 함유하는 선두 동결건조된 제제를 제조하고 가속화된 안정성 연구(5주 동안 25℃) 및 실시간 안정성 연구(39주 동안 4℃)에서 시험하였을 때, 모델은 예측 능력을 갖고 검증된 것으로서 인정되었다. DSD 모델에 의해 예측된 바와 같이, 동결건조 및 25℃에서의 저장 후 바이러스 효능의 제한된 손실은 제제 3 및 4에 대해 발견되었다. 덱스트란 함유 제제에 대한 동결건조 후 효능의 상승된 손실에도 불구하고, 모든 4종의 제제들은 최대 78주(2배 마지막 안정성 시점) 동안 4℃에서 모든 혈청형들에 대해 고체 상태로 저장되는 동안 최소한의 효능 손실 내지 효능 손실 부재를 유지할 것으로 예측됨으로써, 25℃에서 1가 플라비바이러스(예를 들면, 뎅기 혈청형-3, TDV-3)의 안정화에 대해 확인된 후보 동결건조된 제제가 모든 4종의 뎅기 바이러스 혈청형들에 대해 안정화시킨다는 것을 입증하였다. 현재, 많은 백신 제조자들은 인간 유래의 생성물과 관련된 잠재적 위험을 피하기 위해 인간 유래의 HSA를 rHSA로 대체하기를 원한다. 천연 HSA를 덱스트란 및 rHSA로 대체하는 것은 이 우려를 해결하기 위한 시도이었다.

[0187] 본 연구는 후보 동결건조된 생바이러스 백신의 안정화 및 제제 개발을 위해 일차 기여자들(및 이들의 최적 농도)을 찾고 확인하기 위해 조합된 경험적 스크리닝 및 통계 모델링 분석과 함께 이용될 수 있는 효율의 사례 연구를 제공한다. 동결건조된 생바이러스 백신의 제제를 개발하기 위한 이 조합된 방법은 돈 및 시간 둘 다를 절약할 수 있을 뿐만 아니라, 병행 과정 및 제제 개발 노력뿐만 아니라 백신 제품 개발에 대한 디자인 기반 품질고도화 전략을 권장하는 규제 관청에의 제출도 뒷받침할 수 있는 향상된 바이러스 안정성 데이터 포장의 구축도 가능하게 한다.

[0188] **재료 및 방법**

[0189] 한 예시적 방법에서, FTA 완충제(PBS 완충제(pH 7.4) 중의 1% Pluronic F127®(F) 폴록사머 407, 15% 트레할로스(T) 및 0.1% HSA(A)) 중의 냉동된 뎅기 바이러스 스톡(예를 들면, TDV-3 스톡: 약 7.30 X 10^7 pfu/㎖)(예를 들면, 특정 방법에서 로트 번호 DMV013-3이 사용됨)을 -80℃에서 저장하였다. 스톡을 37℃ 수조에서 해동시키고 분취하였다(1.5 ㎖ 튜브 내의 100 ㎕). 분취물을 사용할 때까지 -80℃에서 저장하였다. 특정 방법에서, 분취물을 1회 이상 냉동시키고 해동시킬 수 있다. 예를 들면, 이 분취물의 열 이력은 2회 냉동 해동 주기에 해당한다. 냉동된 뎅기 바이러스 스톡을 해동시키고 약한 볼텍싱으로 혼합하였다. 샘플을 하기 완충제에서 제조하였다: 10 mM 트리스(pH 7.2), 10 mM 히스티딘(pH 7.2), 10 mM HEPES(pH 7.2) 및 10 mM 인산나트륨(pH 7.2)(이들 모두 50 mM Nacl을 갖거나 갖지 않음), 및 137 mM NaCl을 가진 10 mM 인산염(PBS). 모든 부형제 스톡 용액들을 이들 각각의 완충제에서 제조하였고, pH를 7.2 또는 7.4로 조절하였다. 특정 바이러스 제제를 제조하기 위해, 바이러스 스톡을 제제 완충제와 혼합하여 대략 2x10^5 pfu/㎖의 최종 바이러스 농도를 달성하였다.

[0190] 일례에서, 육백오십 마이크로리터(650 ㎕)의 뎅기 바이러스 제제(예를 들면, 4가 뎅기 제제) 각각을 2 ㎖ 바이알 내로 분취하였고, 바이알을 동결건조시켰거나 동결건조 전 대조군으로서 -80℃에서 저장하였다. 보존적 동결건조 주기를 이용하여, 평가되는 후보 제제가 적절하게 냉동건조된다는 것을 보장하였다. 모든 샘플들을 -45℃

까지 미리 냉각된 디바이스 내에 적재하였다. 열전대를 기준(예를 들면, FTA) 대조군/플라세보 바이알 내에 배치하였다. 열전대를 선반 내에 하기 방식으로 배치하였다: 중간에 하나, 정면에 하나, 후면에 2개. 일단 주기가 완결되면, 챔버 압력이 580 Torr에 도달할 때까지 챔버를 질소로 다시 충전시켰고 바이알의 마개를 완전히 닫았다. 챔버가 대기압(760 Torr)에 도달하게 하였다. 이 시점에서, 방출 밸브를 열었고, 마개가 닫힌 동결건조된 바이알을 함유하는 트레이를 제거하였다. 그 다음, 모든 바이알들을 밀봉하였다. 그 다음, 냉동건조된 바이알을 시각적으로 평가하였고 디지털 카메라(8-메가화소)로 사진촬영하여, 케이크 외관 및 구조를 기록하였다. 그 다음, 동결건조된 바이러스 제제를 -80℃에서 저장하였다.

[0191] 30 mM NaCl 및 0.1% HSA를 가진 10 mM 인산나트륨(pH 7.2)을 함유하는 기초 완충제에서 모든 플라세보 및 바이러스 샘플들을 제조하였다. 137 mM NaCl을 가진 10 mM PBS(인산염 완충 식염수)(pH 7.4)에서 FTA를 제조하였다. 모든 부형제 스톡 용액들을 이들 각각의 완충제에서 제조하였고, pH를 약 7.0 내지 약 8.0, 또는 약 7.2 내지 약 7.4로 조절하였다. 마이크로타이터 IFA 어세이를 이용하여 효능에 대해 동결건조 전 바이러스 샘플 및 동결건조 후 바이러스 샘플 둘 다를 평가하였다. 선택된 바이러스 및 동결건조된 제제에 대한 안정성 연구를 5주 동안 약 실온(예를 들면, 25℃)(4개 바이알)에서 수행하였다. 5주 동안 -80℃에서 저장된 샘플(4개 바이알)을 대조군으로서 사용하였다.

[0192] 또 다른 예에서, 인산염 완충제, 15% 트레할로스, 1% 폴록사머 407(F127®) 및 0.1% HSA 중의 냉동된 뎅기 바이러스 스톡(예를 들면, TDV-1, TDV-2 및 TDV-4 바이러스)을 공급하였고 추가 사용 시까지 -80℃에서 냉동된 상태로 저장하였다. 수크로스 및 트레할로스를 판스티엘 래브러토리스(Pfanstiehl Laboratories)(일리노이주 워키건 소재)로부터 구입하였다. L-아르기닌, 메티오닌, L-글루탐산나트륨, EDTA, 덱스트란 40, 염화마그네슘, 만니톨, 소르비톨 및 젤라틴을 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 구입하였다. 폴록사머 407(F127®) 샘플을 BASF로부터 제공받았다. 완충제 제조용 염, 폴리소르베이트 80 및 우레아를 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific) 및 아크로스(Acros)로부터 구입하였다. 인간 혈청 알부민을 옥타파마(Octapharma)로부터 구입하였고, 재조합 HSA(rHSA)를 노바자임스(Novazymes)로부터 입수하였다.

[0193] 다른 예에서, 96-웰 마이크로타이터 방법을 이용하여 플라크 어세이로 바이러스 역가를 측정하였다. 요약하건대, 부착된 Vero 세포 단일층을 1가 또는 4가 바이러스의 희석물로 감염시킨 후, 점성 오버레이(overlay)를 첨가하였다. 그 다음, 플레이트를 혈청형에 따라 2일 또는 3일 동안 37℃에서 항온처리한 후, 세척하고 염색을 위해 고정시켰다. 혈청형 특이적 단일클론 항체를 사용하여 염색을 수행하였다. 상기 어세이는 트렌딩(trending) 대조군 분석에 의해 확인되었을 때 혈청형 1 내지 4에 대해 각각 ± 0.34, 0.17, 0.19 및 0.19 $\log_{10}$ pfu/0.5 mℓ(용량)의 작업 가변 범위를 가진다. 각각의 샘플을 삼중실험으로 측정하였고, 결과를 값의 평균으로서 보고하였다.

[0194] 바이러스 제제화 및 동결건조. 30 mM NaCl을 함유하는 인산염 완충제에서 각각의 부형제의 벌크 용액을 제조하였고, pH를 7.2로 조절하였다. 원하는 양의 부형제를, 30 mM NaCl을 가진 인산염 완충제와 혼합하여 최종 농도를 수득한 후, 적절한 양의 바이러스 스톡을 첨가하여 $2x10^5$ pfu/mℓ를 달성하였다. 클래스 II 생물안전성 캐비넷(Labconco, 미주리주 칸사스 시티 소재)에서 모든 바이러스 제조 작업을 수행하였다.

[0195] 특정 방법에서, 약 650 ㎕의 바이러스 백신 제제를 멸균 2 mℓ 바이알 내에 분배하였고 멸균 고무 마개로 부분적으로 밀봉하였다. 2일 이상의 과정에 걸쳐 50 mTorr의 압력에서 온도를 -45℃부터 25℃까지 상승시키는 과정으로 보존적 동결건조 주기를 이용하여 동결건조된 제제를 생성하였다. 샘플을 -45℃로 설정된 미리 냉각된 선반을 가진 FTS Lyo Star II(SP Scientific)에 적재하였다. 2시간 동안 -45℃에서 냉동 단계를 수행하고 50 mTorr의 압력까지 감소시킨 후(약 2시간), 온도를 0.1℃/분의 상승 속도로 -37℃까지 증가시켰다. 일차 건조의 말기에, 온도를 0.1℃/분의 상승 속도로 25℃까지 상승시켰고 6시간 동안 건조를 계속 수행하였다. 이차 건조의 완결 후, 선반을 4℃까지 냉각시켰고, 주기가 완결될 때까지 4℃에서 유지하였다(보다 더 상세한 내용에 대해서는 표 2를 참조한다). 주기 완결 시, 바이알을 질소로 다시 충전시켰고 챔버로부터 제거되기 전에 진공(580,000 Torr) 하에서 마개를 닫은 후, 알루미늄 밀봉재로 단단히 밀봉하였다. 배치(batch)당 적어도 3개의 플라세보 바이알들의 바닥 중심에 열전대를 배치하고 비교 압력 측정(피라니(pirani) 대 정전용량 압력계(capacitance manometer))을 이용함으로써 동결건조 주기를 모니터링하였다.

[0196] 동결건조된 바이러스 제제의 열 안정성 시험. 선택된 동결건조된 백신 제제를 4℃의 냉장고 및 25℃의 안정성 챔버 내에서 저장하였다. 표시된 길이의 시간 후, 바이알을 샘플링하고 0.5 mℓ의 주사용 멸균수로 재수화시켰다. 마이크로타이터 어세이를 이용하여 재구성된 백신의 바이러스 감염성을 평가하였다. 동결건조 후

바이러스 안정성을 평가하기 위해, 재수화된 백신의 감염성 효능을 마이크로타이터 어세이로 측정하였다. 초기 역가(-80℃에서 저장된 냉동된 액체 대조군 샘플)로부터 -80℃에서 저장된 동결건조된 바이러스 샘플의 역가를 차감함으로써 동결건조 후 바이러스 역가의 손실을 계산하였다. 유사하게, 항온처리된 샘플의 바이러스 감염성을, -80℃에서 저장된 동결건조 후 샘플의 감염성과 비교함으로써 실시간 및 가속화된 저장 동안 바이러스 효능의 손실을 측정하였다. 하기 방정식을 이용하여 오차의 전파 방법으로 손실에 대한 오차를 계산하였다: $SE(C) = \sqrt{SE(A)^2 + SE(B)^2}$. 각각의 조건에 대해, 샘플을 삼중실험으로 적정하였고, 평균 $\log_{10}$ 역가를 계산하였다.

[0197] 통계 분석. 단계별 회귀 수단을 이용하여 반응 표면 방법을 피팅하였고, JMP 프로파일러 v11.2.0(JMP Corporation, 노스캐롤라이나주 캐리 소재)에서 이용될 수 있는 실험의 디자인 플랫폼을 이용하여 확정적 스크리닝 디자인을 생성하였다.

[0198] 약학적 케이크 품질 확인. 동결건조된 케이크를 1 내지 3의 주관적 등급으로 평가하였다(이때, 1 = 나쁨, 2 = 괜찮음, 및 3 = 우수함). 1의 등급을 가진 케이크는 광범위한 구조적 붕괴, 바닥 및 측면에서의 멜트백, 모든 측면들로부터의 상당한 수축 및 오그라듬, 및/또는 과립의 외관을 가진 것으로서 구별되었다. 2의 등급을 가진 케이크는 측면으로부터의 부분적 수축 및 오그라짐, 바닥에서의 적당한 멜트백, 및/또는 수평으로 또는 수직으로 케이크 전체를 통해 뻗어 있는 큰 균열 또는 열극을 가졌다. 3의 등급을 가진 케이크는 일반적으로 평평한 표면을 갖고 케이크의 상부 또는 바이알의 측면으로부터 케이크의 수축 또는 오그라짐을 갖지 않거나 최소한으로 가진 조밀한 (대체로 흰색, 부형제 조합에 따라 달라짐) 케이크 구조물로서 보이면서 약학적으로 훌륭하였다.

[0199] 약어:

[0200] CM: 정전용량 압력계

[0201] DOE: 실험의 디자인

[0202] HSA: 인간 혈청 알부민

[0203] HEPES: 2-[4-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설폰산

[0204] IFA: 면역초점 어세이

[0205] MSG: 글루탐산일나트륨

[0206] NaCl: 염화나트륨

[0207] PBS: 인산염 완충 식염수

[0208] rHSA: 재조합 인간 혈청 알부민

[0209] THAM/트리스: 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄

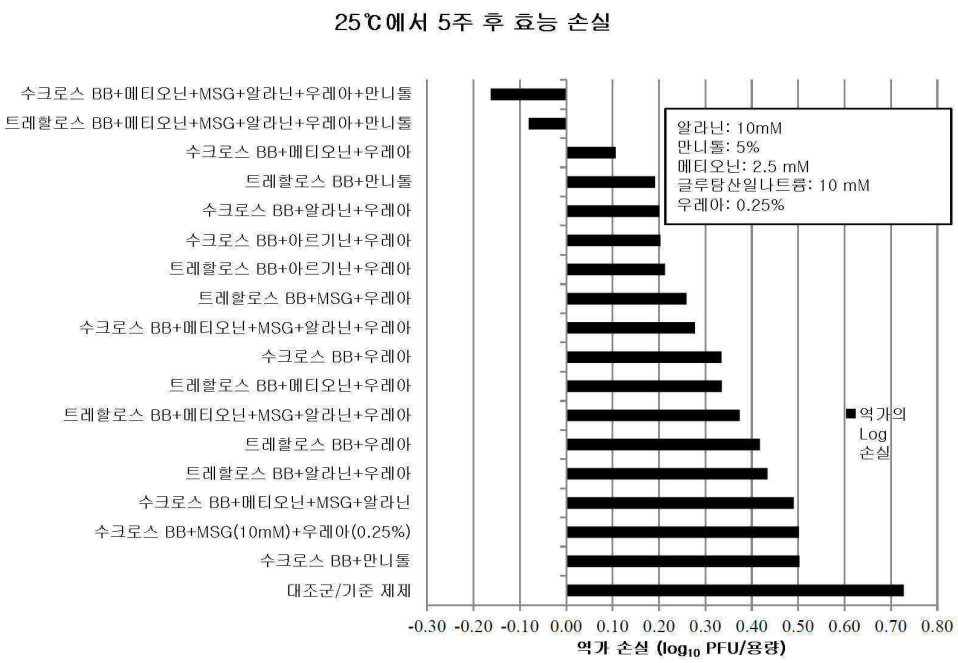
[0210] Pfu: 플라크 형성 유닛

[0211] PF127: Pluronic F-127®, 폴록사머 407

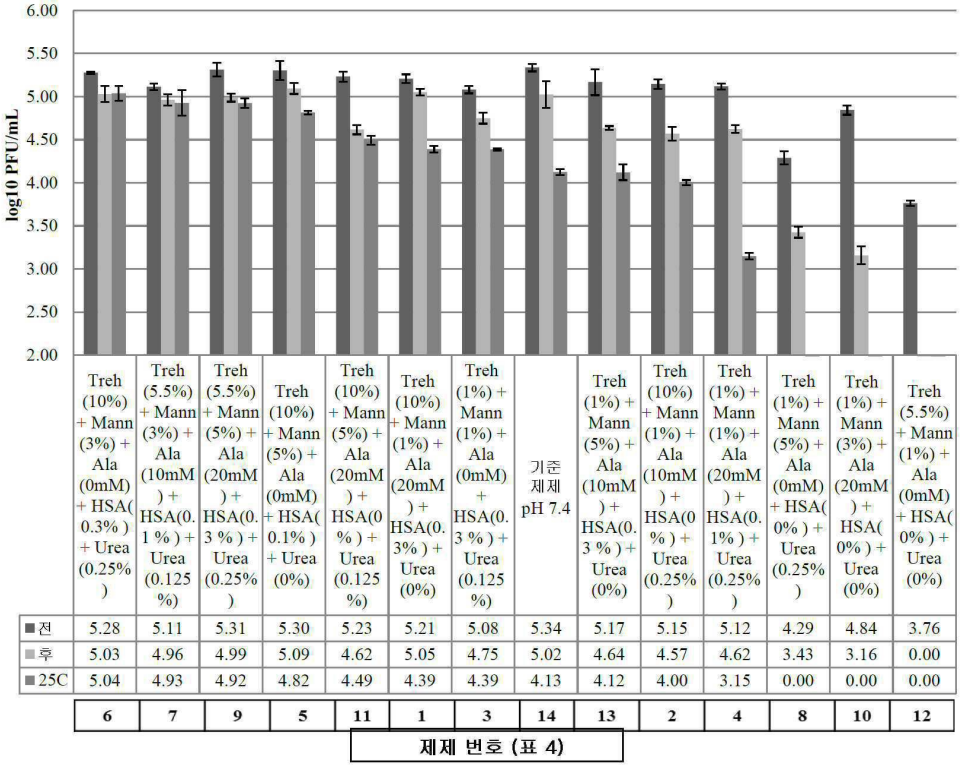
[0212] 본 개시에 비추어 볼 때, 본원에 개시되고 청구된 모든 조성물들 및 방법들을 과도한 실험 없이 만들고 실시할 수 있다. 상기 조성물들 및 방법들이 바람직한 실시양태의 관점에서 기재되어 있지만, 본원의 개념, 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 상기 조성물들 및 방법들, 및 본원에 기재된 방법의 단계들 또는 단계의 순서에 변경을 적용할 수 있다는 것은 당분야에서 숙련된 자에게 자명하다. 보다 구체적으로, 동일한 또는 유사하 결과를 달성하면서, 본원에 기재된 물질들을 화학적으로 및 생리학적으로 관련된 특정 물질들로 대체할 수 있다. 당분야에서 숙련된 자에게 명확한 모든 이러한 유사한 대체물들 및 변형물들은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 사상, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

도면1



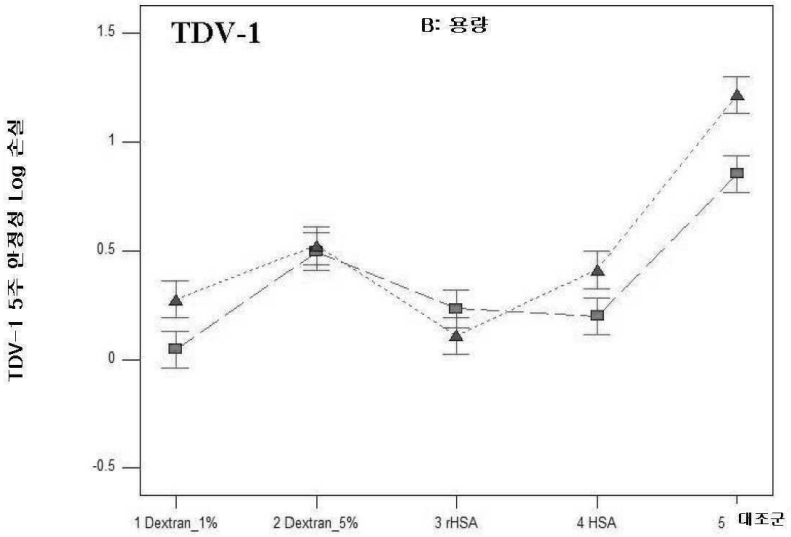
도면2



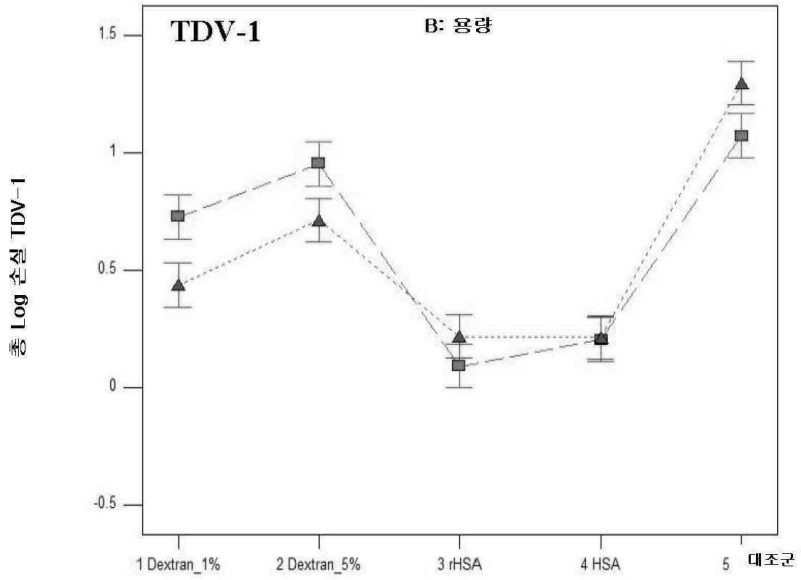
	6	7	9	5	11	1	3	14	13	2	4	8	10	12
■전	5.28	5.11	5.31	5.30	5.23	5.21	5.08	5.34	5.17	5.15	5.12	4.29	4.84	3.76
■후	5.03	4.96	4.99	5.09	4.62	5.05	4.75	5.02	4.64	4.57	4.62	3.43	3.16	0.00
■25C	5.04	4.93	4.92	4.82	4.49	4.39	4.39	4.13	4.12	4.00	3.15	0.00	0.00	0.00

제제 번호 (표 4)

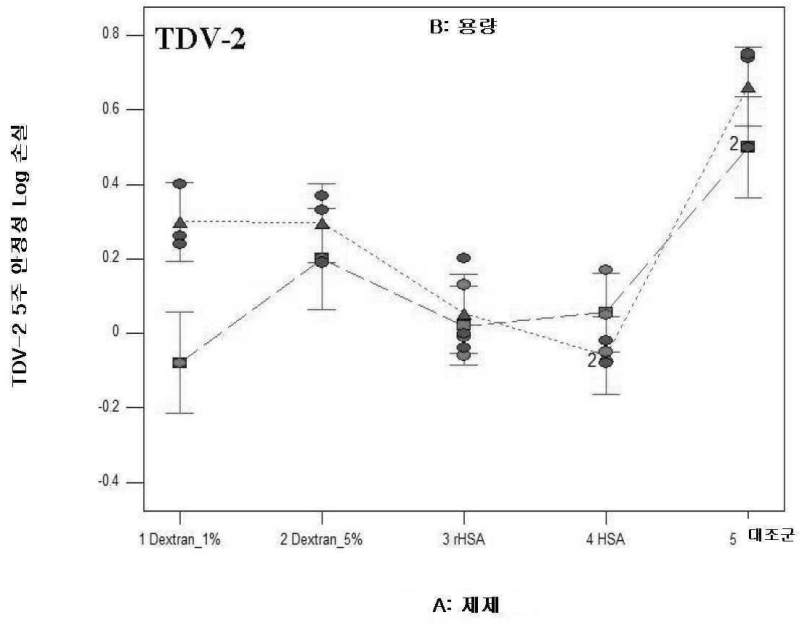
도면3a


TDV-1
B: 용량
TDV-1 5주 안정성 Log 손실
1.5
1
0.5
0
-0.5
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군

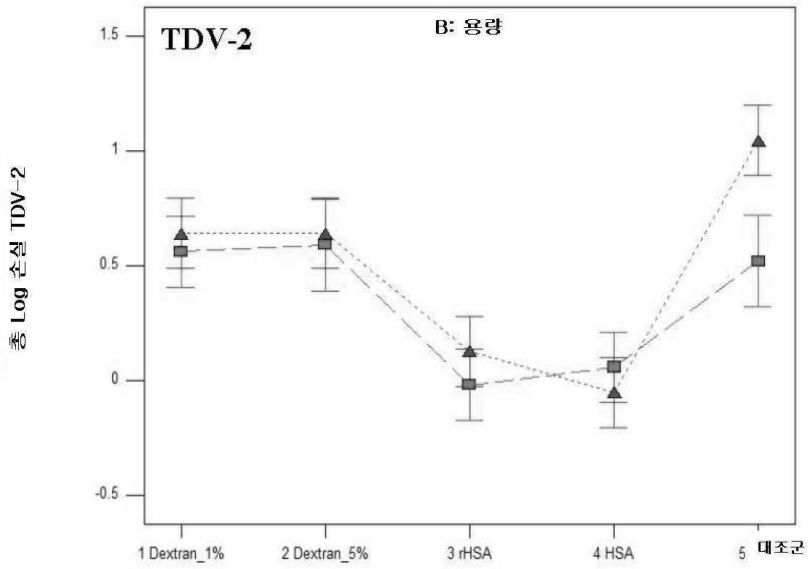
도면3b


TDV-1
B: 용량
총 Log 손실 TDV-1
1.5
1
0.5
0
-0.5
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군

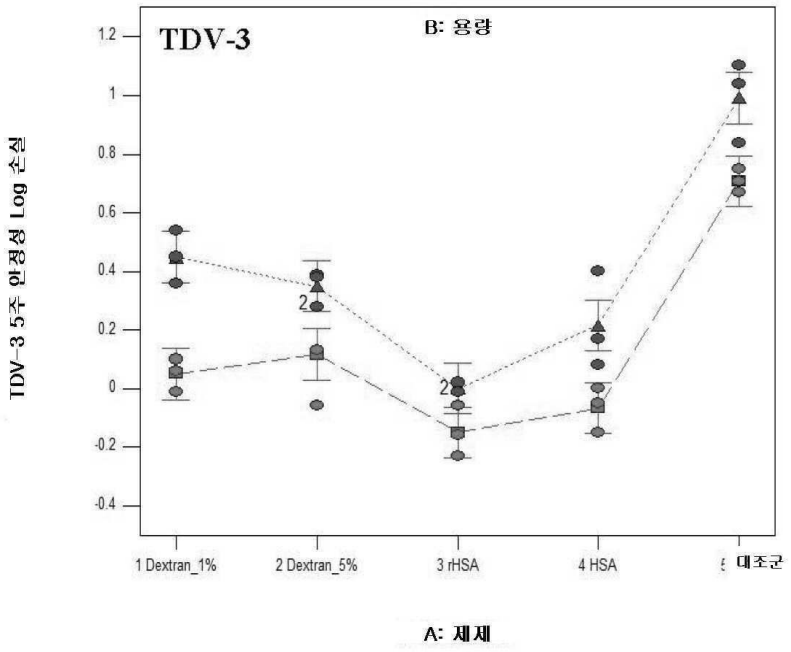
도면4a


TDV-2
B: 용량
TDV-2 5주 안정성 Log 손실
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
2
2
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군
A: 제제

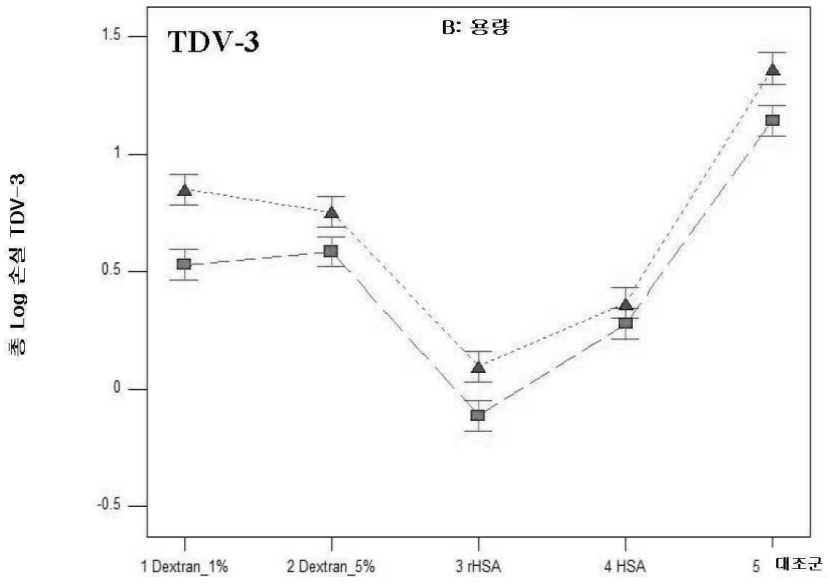
도면4b


TDV-2
B: 용량
총 Log 손실 TDV-2
1.5
1
0.5
0
-0.5
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군

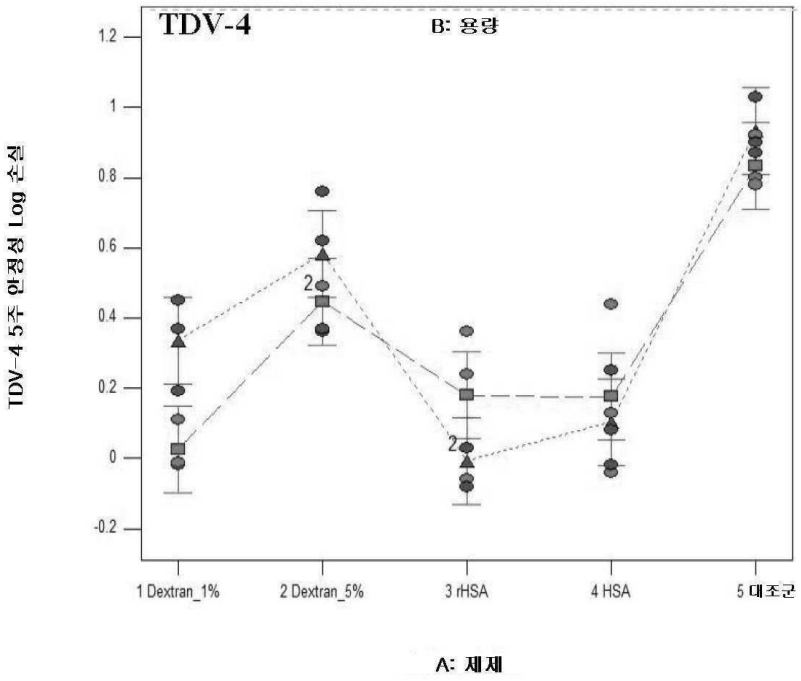
도면5a


TDV-3
B: 용량
TDV-3 5주 안정성 Log 손실
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군
A: 제제

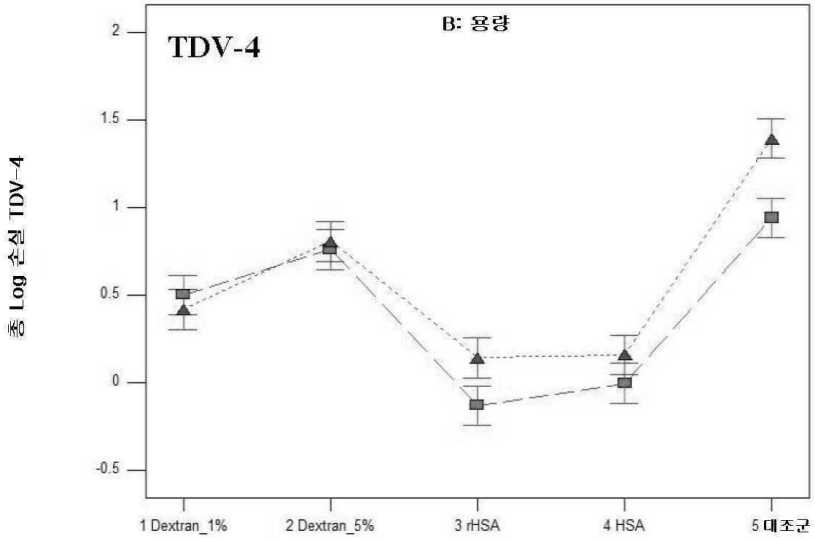
도면5b


TDV-3
B: 용량
총 Log 손실 TDV-3
1.5
1
0.5
0
-0.5
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군

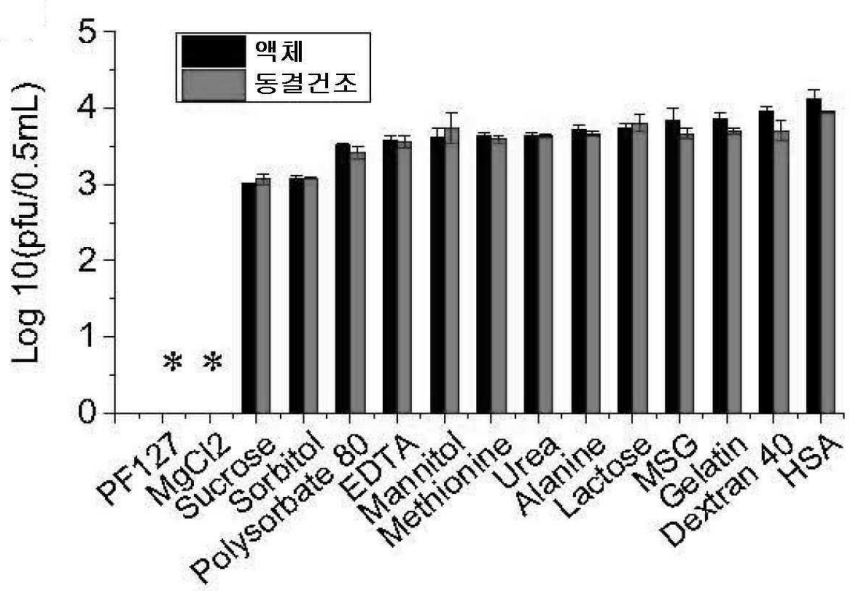
도면6a


TDV-4
B: 용량
TDV-4 5주 안정성 Log 손실
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
2
2
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군
A: 제제

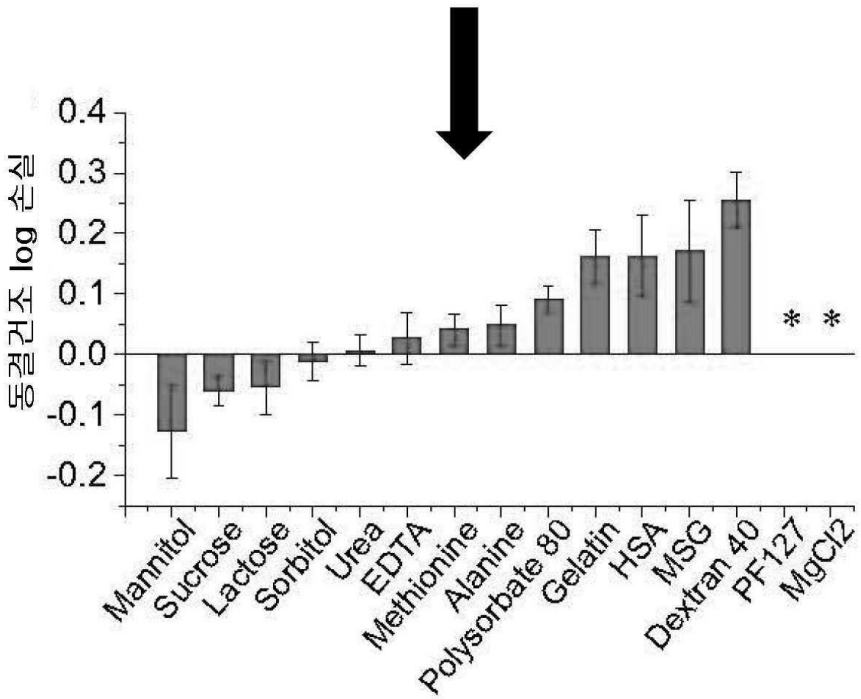
도면6b


B: 용량
TDV-4
총 Log 손실 TDV-4
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
1 Dextran_1%
2 Dextran_5%
3 rHSA
4 HSA
5 대조군

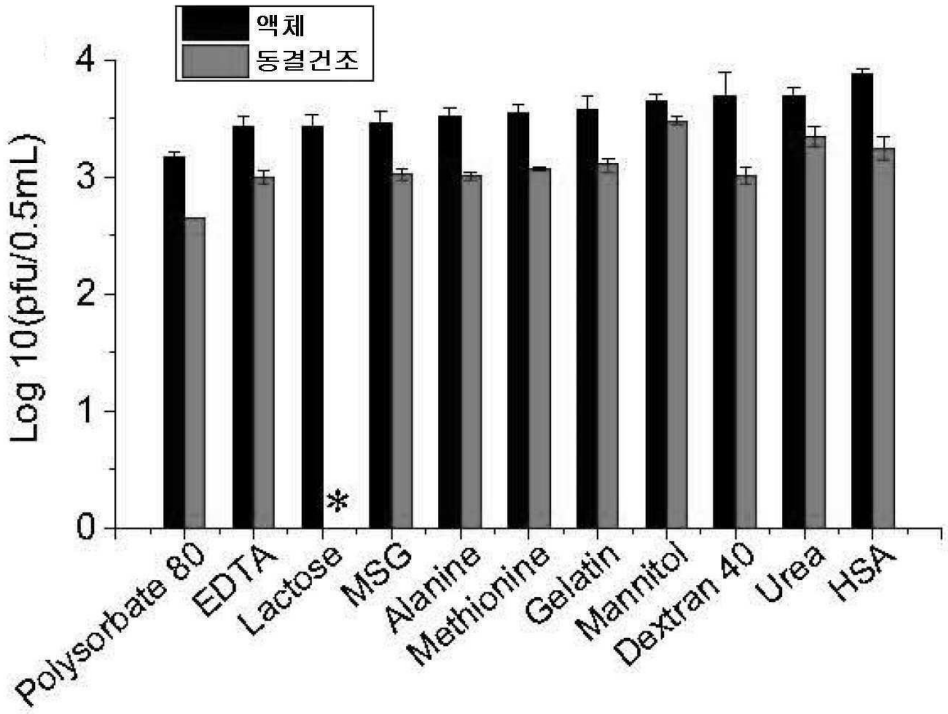
도면7a


액체
동결건조
Log 10(pfu/0.5mL)
5
4
3
2
1
0
* *
PF127
MgCl2
Sucrose
Sorbitol
Polysorbate 80
EDTA
Mannitol
Methionine
Urea
Alanine
Lactose
MSG
Gelatin
Dextran 40
HSA

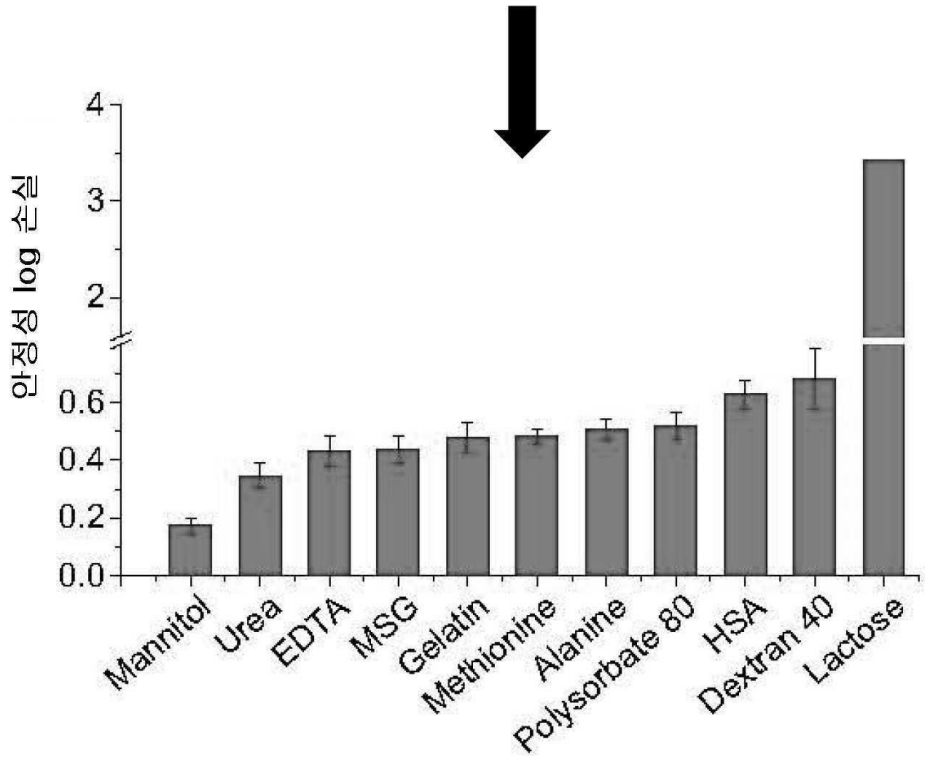
도면7b


동결건조 log 손실
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
* *
Mannitol
Sucrose
Lactose
Sorbitol
Urea
EDTA
Methionine
Alanine
Polysorbate 80
Gelatin
HSA
MSG
Dextran 40
PF127
MgCl2

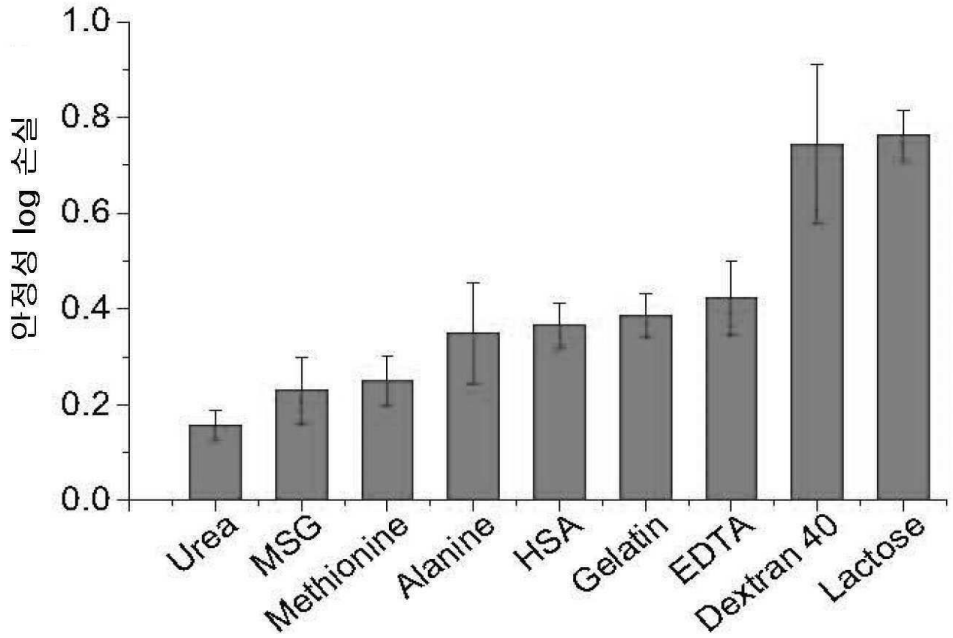
도면7c


액체
동결건조
Log 10(pfu/0.5mL)
0
1
2
3
4
*
Polysorbate 80
EDTA
Lactose
MSG
Alanine
Methionine
Gelatin
Mannitol
Dextran 40
Urea
HSA

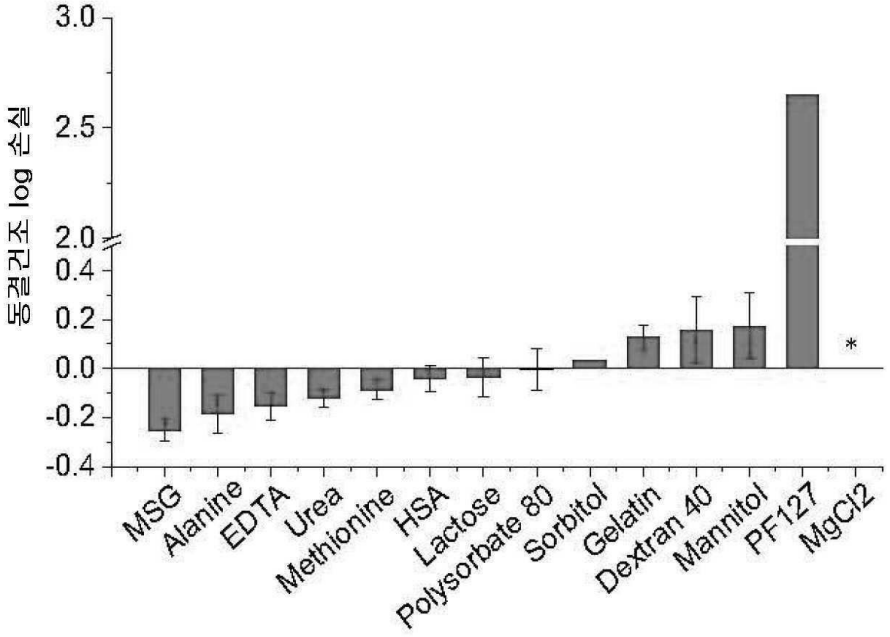
도면7d


안정성 log 손실
0.0
0.2
0.4
0.6
2
3
4
Mannitol
Urea
EDTA
MSG
Gelatin
Methionine
Alanine
Polysorbate 80
HSA
Dextran 40
Lactose

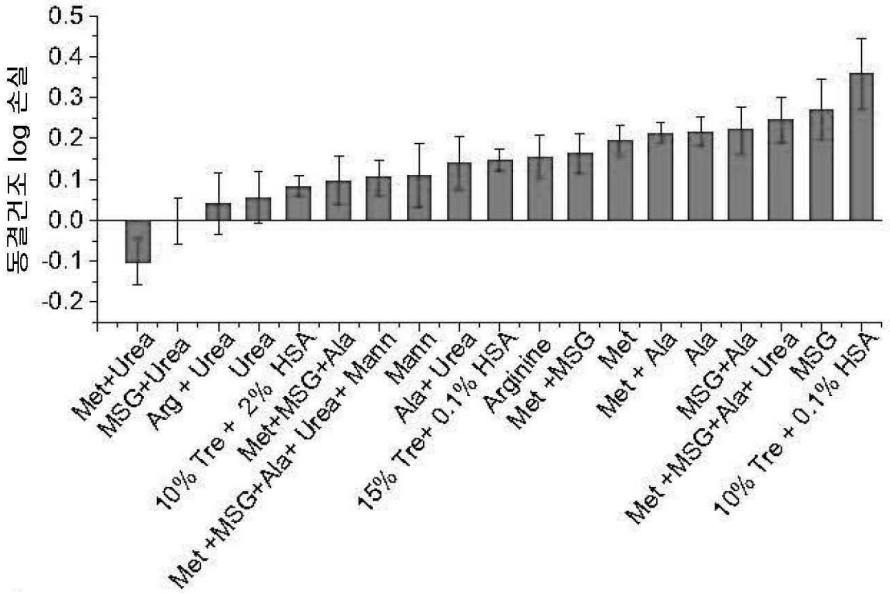
도면8a


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
안정성 log 손실
Urea
MSG
Methionine
Alanine
HSA
Gelatin
EDTA
Dextran 40
Lactose

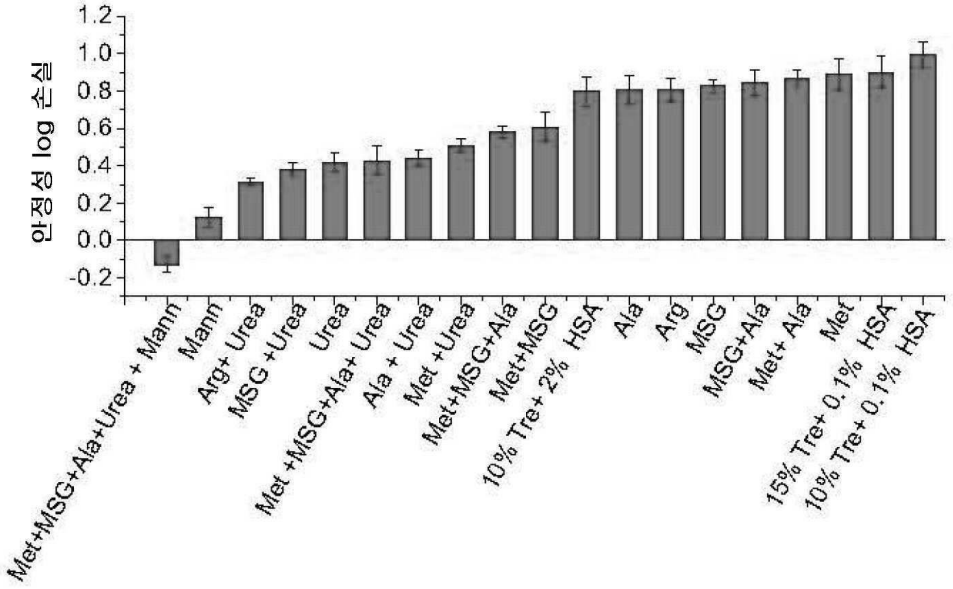
도면8b


3.0
2.5
2.0
0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
동결건조 log 손실
*
MSG
Alanine
EDTA
Urea
Methionine
HSA
Lactose
Polysorbate 80
Sorbitol
Gelatin
Dextran 40
Mannitol
PF127
MgCl2

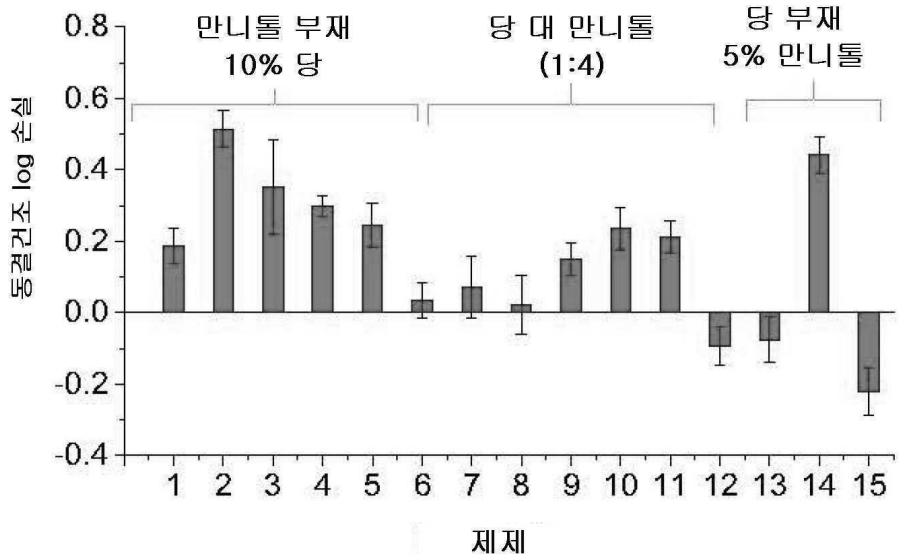
도면9a


동결건조 log 손실
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
Met+Urea
MSG+Urea
Arg + Urea
Urea
10% Tre + 2% HSA
Met+MSG+Ala
Met +MSG+Ala+ Urea+ Mann
Mann
Ala+ Urea
15% Tre+ 0.1% HSA
Arginine
Met +MSG
Met
Met + Ala
Ala
MSG+Ala
Met +MSG+Ala+ Urea
MSG
10% Tre + 0.1% HSA

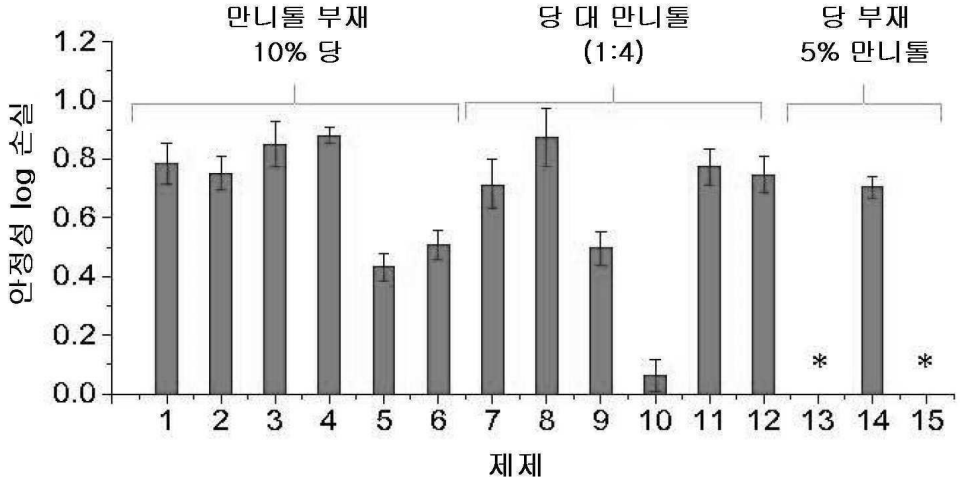
도면9b


안정성 log 손실
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Met+MSG+Ala+Urea + Mann
Mann
Arg+ Urea
MSG +Urea
Urea
Met +MSG+Ala+ Urea
Ala + Urea
Met +Urea
Met+MSG+Ala
Met+MSG
10% Tre+ 2% HSA
Ala
Arg
MSG
MSG+Ala
Met+ Ala
Met
15% Tre+ 0.1% HSA
10% Tre+ 0.1% HSA

도면10a



도면10b



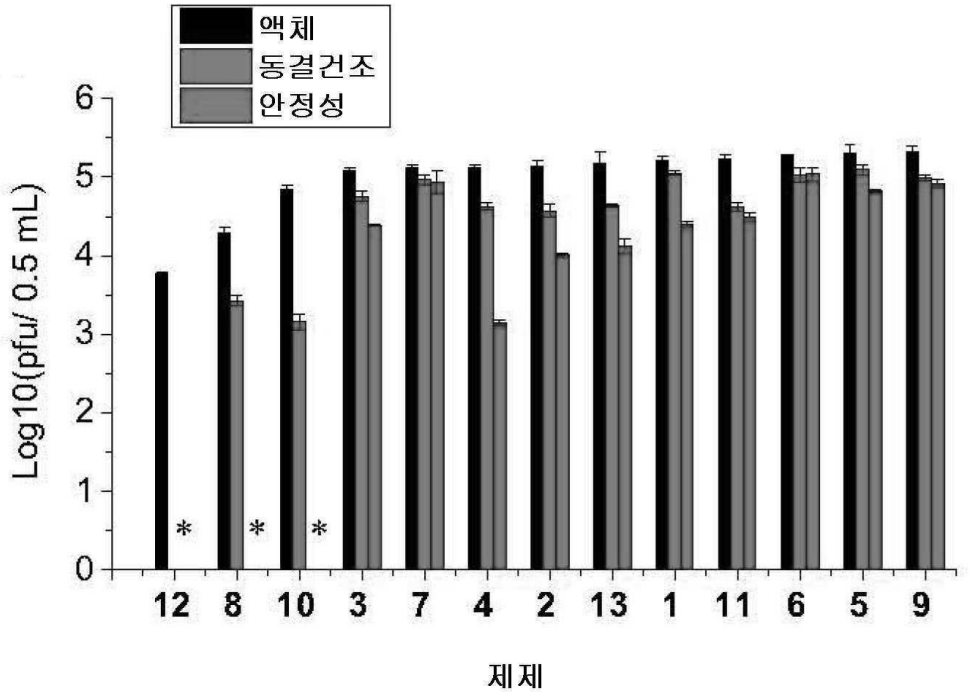
도면11a

항	표준 오차	t 비	확률>|t|
(HSA (%)-0.18986)*(HSA (%)-0.18986)	0.204587	-4.18	0.0001*
HSA (%)	0.342905	4.13	0.0001*
우레아 (%)	0.136339	-3.59	0.0007*
수크로스 %	0.008072	-3.47	0.0010*
만니톨 (%)	0.07305	-2.86	0.0058*
(만니톨 (%)-0.85507)*(만니톨 (%)-0.85507)	0.022518	2.80	0.0069*
트레할로스 %	0.00811	-2.56	0.0133*
Met (mM)	0.015594	-1.15	0.2546
Ala (mM)	0.003898	0.48	0.6298
MSG (mM)	0.003854	0.25	0.8004

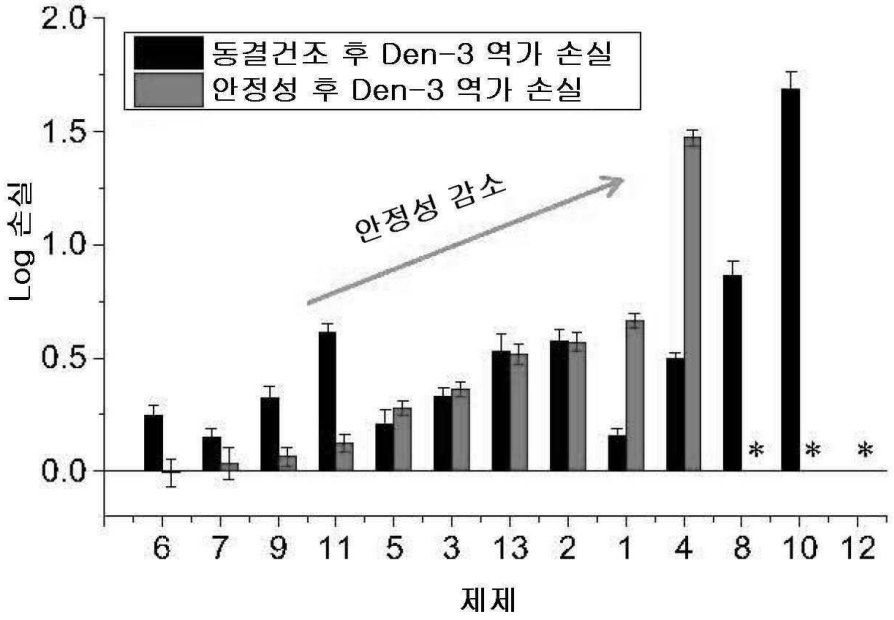
도면11b

항	표준 오차	t 비	확률>|t|
우레아 (%)	0.165159	-7.11	<.0001*
만니톨 (%)	0.01342	-5.49	<.0001*
(트레할로스 %-4.81818)*(우레아 (%)-0.07576)	0.06008	-3.92	0.0003*
(트레할로스 %-4.81818)*(만니톨 (%)-0.81818)	0.003985	-2.95	0.0047*
(수크로스 %-4.51515)*(우레아 (%)-0.07576)	0.060134	-2.85	0.0062*
HSA (%)	0.438094	2.23	0.0301*
(HSA (%)-0.19848)*(HSA (%)-0.19848)	0.263223	-2.13	0.0382*
수크로스 %	0.011029	-1.94	0.0584
(수크로스 %-4.51515)*(만니톨 (%)-0.81818) 8)	0.004138	-1.80	0.0780
Ala (mM)	0.004622	-1.05	0.2971
트레할로스 %	0.011031	-1.00	0.3208
Met (mM)	0.018489	-0.59	0.5555
MSG (mM)	0.004657	-0.33	0.7418

도면12a



도면12b



도면12c

Log10 동결건조 하락 모델 피트의 요약: R^2=0.79

항	표준 오차	t 비	확률>|t|
HSA (%)(0,0.3)	0.18675	-3.04	0.0189*
만니톨 (%)*우레아	0.218268	2.75	0.0285*
만니톨 (%)*HSA (%)	0.215885	2.62	0.0342*
우레아(0,0.25)	0.189131	-2.22	0.0615
만니톨 (%)(1,5)	0.189131	-1.28	0.2428

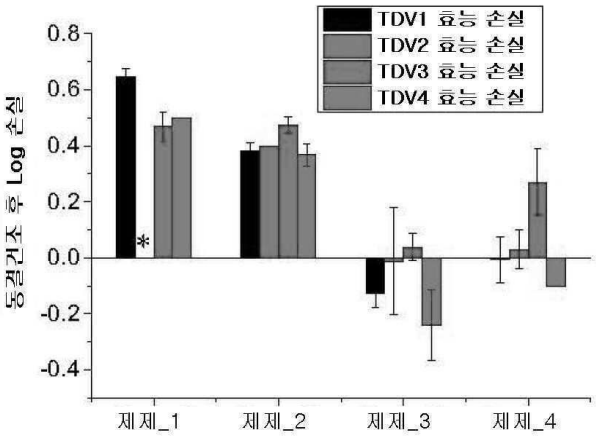
25℃에서 5주 Log10 하락 모델 피트의 요약 R^2=0.89

항	표준 오차	t 비	확률>|t|
트레할로스 %(1,10)	0.15198	-4.51	0.0020*
트레할로스 %*HSA (%)	0.167607	4.08	0.0035*
HSA (%)(0,0.3)	0.149696	-3.63	0.0067*
트레할로스 %*트레할로스 %	0.315586	3.31	0.0106*

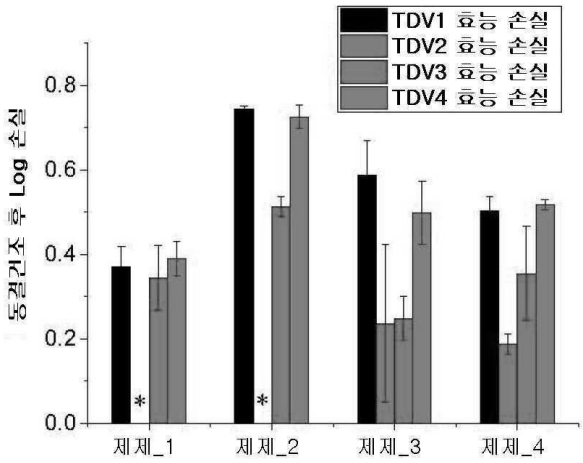
Log10 총 손실 모델 피트의 요약 R^2=0.99

항	표준 오차	t 비	확률>|t|
HSA (%)(0,0.3)	0.087618	-13.22	<.0001*
트레할로스 %(1,10)	0.087923	-10.21	<.0001*
HSA (%)*HSA (%)	0.210133	6.46	0.0007*
트레할로스 %*HSA (%)	0.109792	5.88	0.0011*
우레아(0,0.25)	0.087923	-3.82	0.0087*
우레아*우레아	0.207974	3.32	0.0160*

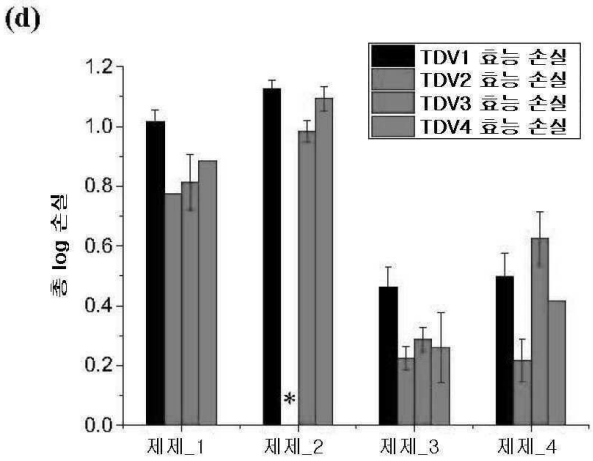
도면13a



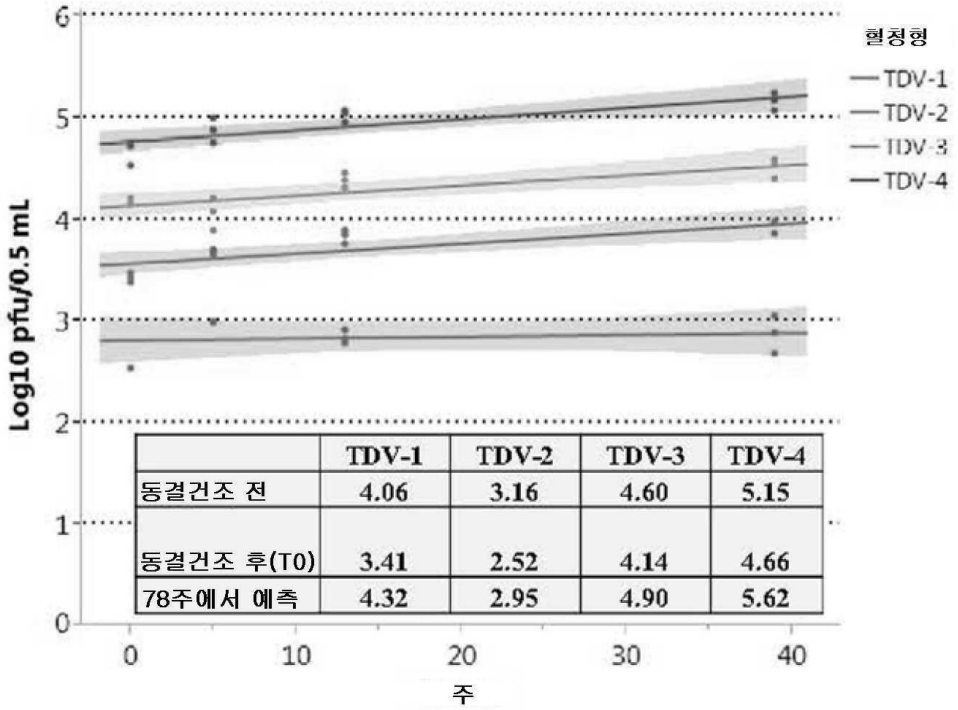
도면13b



도면13c

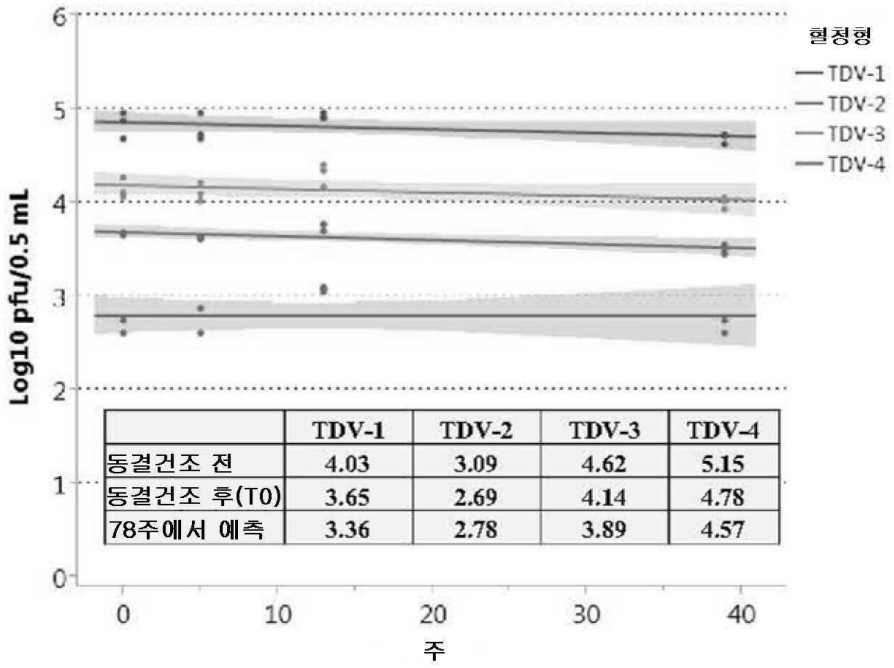


도면14a



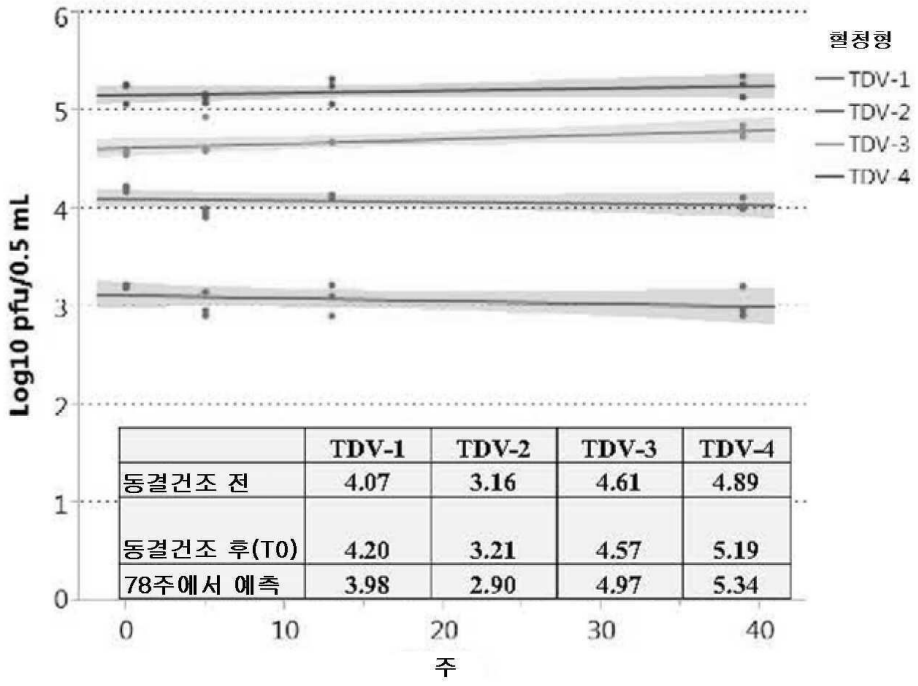
	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
동결건조 전	4.06	3.16	4.60	5.15
동결건조 후(T0)	3.41	2.52	4.14	4.66
78주에서 예측	4.32	2.95	4.90	5.62

도면14b



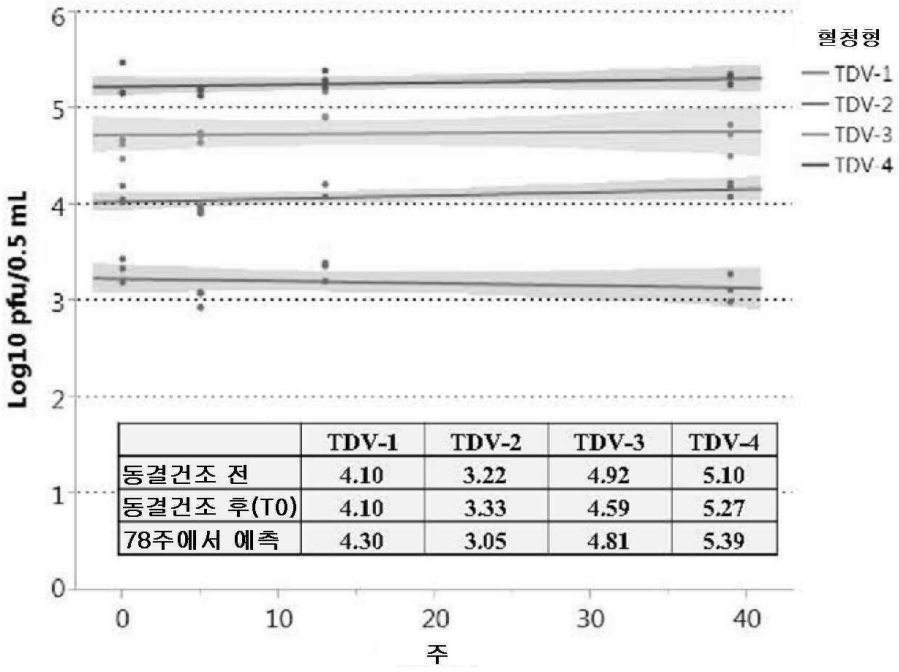
	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
동결건조 전	4.03	3.09	4.62	5.15
동결건조 후(T0)	3.65	2.69	4.14	4.78
78주에서 예측	3.36	2.78	3.89	4.57

도면14c



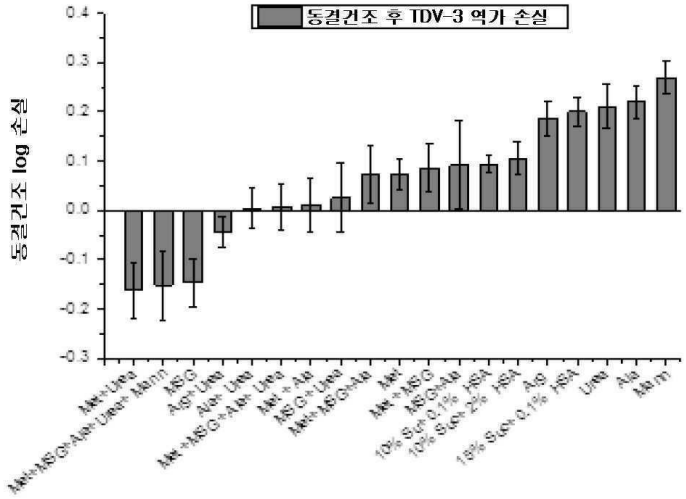
	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
동결건조 전	4.07	3.16	4.61	4.89
동결건조 후(T0)	4.20	3.21	4.57	5.19
78주에서 예측	3.98	2.90	4.97	5.34

도면14d

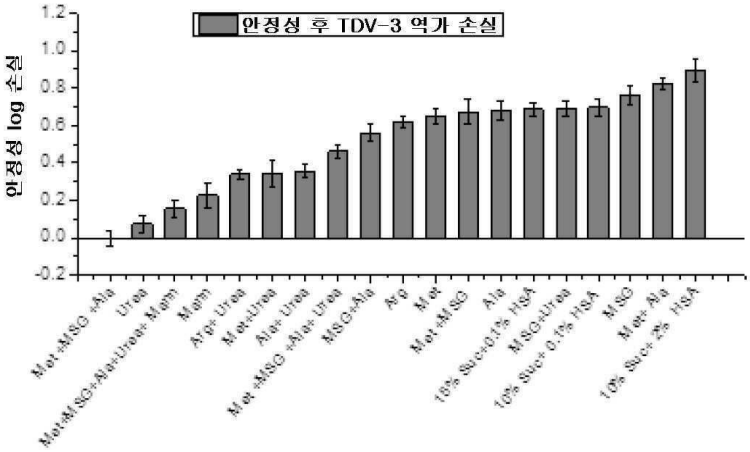


	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
동결건조 전	4.10	3.22	4.92	5.10
동결건조 후(T0)	4.10	3.33	4.59	5.27
78주에서 예측	4.30	3.05	4.81	5.39

도면15a


동결건조 후 TDV-3 역가 손실
동결건조 log 손실
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
Met+Urea
Met+MSG+Ala+Urea+ Man(n)
MSG
Arg+ Urea
Ala+ Urea
Met+MSG+Ala+ Urea
Met + Ala
MSG+Urea
Met+MSG+Ala
Met
Met+MSG
MSG+Ala
10% Suc+ 0.1% HSA
10% Suc+ 2% HSA
Arg
1% Suc+ 0.1% HSA
Urea
Ala
Man(n)

도면15b


안정성 후 TDV-3 역가 손실
안정성 log 손실
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Met+MSO +Ala
Urea
Met+MSO+Ala+Urea+ Man(n)
Man(n)
Arg+ Urea
Met+Urea
Ala+ Urea
Met+MSO +Ala+ Urea
MSO+Ala
Arg
Met
Met+MSO
Ala
10% Suc+0.1% HSA
MSO+Urea
10% Suc+ 0.1% HSA
MSO
Met+ Ala
10% Suc+ 2% HSA