



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년11월27일
(11) 등록번호 10-0871021
(24) 등록일자 2008년11월21일

(51) Int. Cl.

C12N 7/04 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7015649

(22) 출원일자 2003년11월28일

심사청구일자 2007년05월28일

번역문제출일자 2003년11월28일

(65) 공개번호 10-2004-0025682

(43) 공개일자 2004년03월24일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2002/005883

국제출원일자 2002년05월29일

(87) 국제공개번호 WO 2002/97072

국제공개일자 2002년12월05일

(30) 우선권주장

0113083.0 2001년05월30일 영국(GB)

0204116.8 2002년02월21일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

W09842373 A

US 9856414 A

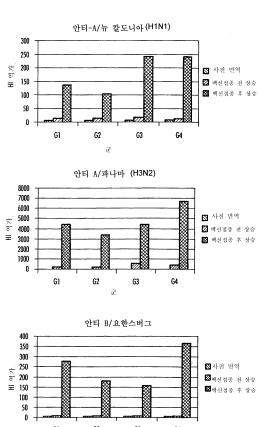
US 5919480 A

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김정태

(54) 인플루엔자 백신 조성물**(57) 요 약**

본 발명은 티메로살의 부재하에 또는 저수준의 티메로살의 존재하에 안정화된 헤마글루티닌 항원을 포함하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물로서, 헤마글루티닌이 SRD 검정에 의해 검출가능함을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물에 관한 것이다. 인플루엔자 바이러스 제조물은 헤마글루티닌을 안정화시키기 위해 충분한 양의 미셀 변형 부형체, 예를 들어, α-토코페롤 또는 이것의 유도체를 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도1

특허청구의 범위

청구항 1

티오머살(thiomersal)의 부재하에 또는 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 티오머살 수준하에 안정화된 헤마글루티닌(HA) 항원을 포함하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물로서, 헤마글루티닌이 단일원면역확산법(single radial immunodiffusion, SRD) 검정에 의해 검출가능하며, 헤마글루티닌 안정화제로서 α -토코페롤 숙시네이트를 포함하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 2

제 1항에 있어서, α -토코페롤 숙시네이트가 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 $10\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 존재함을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 3

제 2항에 있어서, α -토코페롤 숙시네이트가 10 내지 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재함을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 항원 제조물이 스플릿(split) 바이러스 항원 제조물, 서브유닛(subunit) 항원, 화학적으로 불활성화되거나 U.V. 또는 열에 의해 불활성화된 전체 바이러스로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 인플루엔자 항원 제조물이 스플릿 바이러스 항원 제조물임을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 6

제 1항에 있어서, A형 및 B형 균주 헤마글루티닌 둘 모두를 포함함을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 3가 인플루엔자 바이러스 제조물임을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 안정화된 B형 인플루엔자 헤마글루티닌을 포함함을 특징으로 하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중의 어느 한 항에 따른 인플루엔자 바이러스 제조물을 포함하는 인플루엔자 백신.

청구항 10

제 9항에 있어서, 각각의 인플루엔자 균주에 대한 헤마글루티닌 항원의 농도가 단일원면역확산법(SRD) 검정에 의해 측정하여 1 내지 $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 임을 특징으로 하는 인플루엔자 백신.

청구항 11

제 9항에 있어서, 애쥬번트를 추가로 포함함을 특징으로 하는 인플루엔자 백신.

청구항 12

α -토코페롤 또는 이것의 유도체의 존재하에서 항원을 정제시키는 것을 포함하여, 안정한 헤마글루티닌 항원을 제조하는 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

제 9항에 있어서, 피내, 비내, 근내, 경구 또는 피하 경로에 의해 전달됨을 특징으로 하는 인플루엔자 백신.

청구항 15

삭제

청구항 16

제 12항에 있어서, α -토코페롤의 유도체가 α -토코페롤 숙시네이트임을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

명세서

<1>

본 발명은 신규한 인플루엔자 바이러스 항원 제조물, 이들의 제조 방법 및 이들의 예방학적 또는 치료학적 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 전체 바이러스 백신보다 더 잘 분해되고, 유기수은 방부제의 부재하에 안정한 인플루엔자 백신을 불활성화시키는 방법에 관한 것이다. 게다가, 상기 백신은 표준 시험에 따라 안정한 헤마글루티닌을 함유한다. 상기 백신은 근육내, 피하내, 피내 또는 점막내 예를 들어, 비내 투여과 같은 이러한 백신에 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다.

<2>

인플루엔자 바이러스는 사람과 가축 둘 모두에 침범하는 바이러스중 전 세계에 가장 널리 편재되어 있는 바이러스중 하나이다. 인플루엔자의 경제적 영향은 상당하다.

<3>

인플루엔자 바이러스는 직경이 약 125nm인 입자 크기를 갖는 RNA 외피 바이러스이다. 바이러스는 기본적으로 리피드 이중층 구조 및 외부 글리코단백질을 갖는 바이러스 외피에 의해 둘러쌓여진 내부 뉴클레오캡시드 또는 핵단백질과 결합된 리보핵산(RNA)의 코어로 이루어져 있다. 바이러스 외피의 내부층은 주로 매트릭스 단백질로 이루어지며, 외부층은 주로 숙주-유래 리피드 물질로 이루어진다. 표면 글리코단백질 뉴라미니다아제(NA) 및 헤마글루티닌(HA)은 입자의 표면에 10 내지 12nm 길이의 스파이크로서 나타난다. 이러한 표면 단백질, 특히 헤마글루티닌은 인플루엔자 서브타입의 항원 특이성을 결정한다.

<4>

현재 이용가능한 인플루엔자 백신은 불활성화되거나 살아있으나 희석된 인플루엔자 바이러스이다. 불활성화된 인플루엔자 백신은 3가지의 가능한 형태의 항원 제조물; 불활성화된 전체 바이러스; 정제된 바이러스 입자가 세정제 또는 기타 시약으로 분해되어 이피드 외피가 용해되거나(소위 "스플릿(split)" 백신) HA; 및 NA가 정제된 (서브유닛 백신) 서브-비리온으로 이루어진다. 이러한 불활성화된 백신은 근육내(i.m.) 또는 비내(i.n.)로 제공될 수 있다. 살아있으나 희석된 백신은 시중에서 구입불가능하다.

<5>

모든 종류의 인플루엔자 백신은 일반적으로 3가 백신이다. 이들은 일반적으로 두개의 A형 균주 인플루엔자 바이러스 및 하나의 B형 균주 인플루엔자 바이러스로부터 유도된 항원을 함유한다. 대부분의 경우에 주입가능한 0.5ml의 표준 용량은 단일원면역확산법(single radial immunodiffusion, SRD)에 의해 측정된 바와 같이 각 유형으로부터의 헤마글루티닌 항원 성분 15 μ g을 함유한다(J.M. Wood et al.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J.Biol.Stand. 5(1997)237-247; J.M.Wood et al., International collaborative study of single radial diffusion and immunolectrophoresis

techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J.Biol.Stand. 9(1981)317-330).

- <6> 각 계절마다 인플루엔자 백신으로 혼입되는 인플루엔자 바이러스 균주는 국립 보건부 및 백신 제조업자와 협력하여 세계 보건 기구에 의해 결정된다.
- <7> 전형적인 인플루엔자 유행병원은 비위생 또는 대규모 사망 증가의 징후가 되는 폐렴 및 하부 호흡기 질환의 발병을 증가시킨다. 만성질환을 앓고 있는 노인이 주로 이러한 합병증에 걸릴 위험이 있지만, 유아들 또한 중증 질환으로 고통을 받을 수 있다. 따라서, 특히 이러한 집단들이 보호되어야 한다.
- <8> 매년 인플루엔자 유행병과 관련된 질병률 및 사망률을 제어하기 위한 현재의 노력은 근내 투여되는 불활성화된 인플루엔자 백신을 토대로 하고 있다. 호흡기 질환 및 인플루엔자 합병증을 예방하는데 있어서 이러한 백신의 효능은 건강한 성인의 경우 75% 내지 노인의 경우 50% 미만에 이르고 있다.
- <9> 인플루엔자 백신의 효능을 측정하는데는 국제적인 기준이 적용된다. 인플루엔자에 대한 효과적인 백신의 유럽 연합 약전 기준을 하기 표에 기재하였다. 이론적으로, 유럽 연합 요건을 충족시키기 위해서는, 백신에 포함된 인플루엔자에 모든 균주에 있어서, 인플루엔자 백신은 하기 표내의 기준중 단지 하나만 만족시키면 된다. 그러나, 실질적으로, 모든 균주, 특히 다양한 경로를 통해 전달하기 위한 신규한 백신과 같은 새로운 백신에 대해서는, 적어도 2개 또는 3개의 모든 기준이 충족되어야 한다. 이러한 정황하에서, 2개의 기준이면 충분할 수 있다. 예를 들어, 모든 균주에 있어서 3개의 기준중 2개의 기준을 충족시키고, 3번째 기준은 모든 균주에 있어서가 아니라 일부 균주(예를 들어, 3개의 균주중 2개의 균주)에 있어서만 충족될 수 있는 경우, 허용가능할 수 있다. 요건은 성인 집단(18~60세) 및 노인 집단(>60세)에 따라 상이하다.
- | | | |
|---------|--------|------|
| | 18-60세 | >60세 |
| 혈청전환율* | >40% | >30% |
| 전환 인수** | >2.5 | >2.0 |
| 보호율*** | >70% | >60% |
- <11> *혈청전환율은, 각각의 백신 균주에 있어서, 백신접종 후 혈청 헤마글루티닌 억제(HI) 역가가 4배 이상 증가된 백신 피접종자의 백분율로서 정의된다.
- <12> **전환 인수는, 각각의 백신 균주에 있어서, 백신접종 후 혈청 HI 기하 평균 역가(GMT)의 증가 배수로 정의된다.
- <13> ***보호율은 (각각의 백신 균주에 있어서,) 백신접종 후 1:40과 동일하거나 이보다 큰 혈청 HI 역가로 처리된 백신 피접종자의 백분율로서 정의되며, 일반적으로 보호성을 나타내는 것으로서 인식된다.
- <14> 상업적으로 유용한 신규한 인플루엔자 백신에 있어서, 이는 이러한 기준을 만족시켜야 하며, 또한 실질적으로, 현재 이용가능한 주입가능한 백신 이상의 효능을 가져야 할 것이다. 또한, 항원의 양 및 요구되는 투여 수에 있어서 상업적으로 존속될 수 있어야 할 것이다.
- <15> 현재 시장에서 구입가능한 인플루엔자 백신은 스플릿 또는 서브유닛 주입가능한 백신이다. 이러한 백신은 일반적으로 유기 용매 또는 세정제로 바이러스 입자를 분해하고, 바이러스 단백질을 다양한 정도로 분리하므로써 제조된다. 스플릿 백신은 전체 인플루엔자 바이러스, 즉 전염성 또는 불활성화된 인플루엔자 바이러스를 용해 가능한 농도의 유기 용매 또는 세정제로 단편화시킨 후, 용해제 및 일부 또는 대부분의 바이러스 리피드 물질을 제거하므로써 제조된다. 스플릿 백신은 일반적으로 오염 매트릭스 단백질 및 핵단백질, 및 때때로 리피드 및 멤브레인 외피 단백질을 함유한다. 스플릿 백신은 일반적으로 바이러스 구조 단백질 대부분 또는 모두를 함유 하나, 이들은 전체 단백질에서 발생하기 때문에 이들이 반드시 동일 비율로 존재하는 것은 아니다. 한편, 서브유닛 백신은 고도로 정제된 바이러스 표면 단백질, 헤마글루티닌 및 뉴라미나다아제를 필수 성분으로 하며, 이들은 백신접종시 원하는 바이러스의 중화 항체를 유도해내는 표면 단백질이다.
- <16> 현재 사용가능한 많은 백신은 손상을 방지하기 위한 보존제가 필요하다. 주로 사용되는 보존제는 티메로살(thimerosal)이며, 이는 수은 함유 화합물이다. 수은 함유 화합물의 영향에 대한 일부 대중적인 염려가 표출되어 왔다. 신경계 발달에서 유기수은의 양을 조절하기 위한 노력의 저하를 감시하기 위한 감시 시스템이 적소에 존재하지 않으며, 고용량의 유기수은을 수용한 아이들의 연구를 완료하기에는 수년이 걸릴 것이다. 특정 코멘테이터는 티메로살 함유 백신의 잠재적인 위험성이 과장되어서는 안된다고 강조하고 있다(Offit; P.A. JAMY Vol.283;No:16). 그럼에도 불구하고, 유리하게는 제공 공정시 티메로살을 대체할 수 있는 백신 제조의 대안적

인 방법을 발견하고자 할 것이다. 따라서, 해마다 적어도 특정 집단에 대해 권고되는, 인플루엔자 백신과 같은 티메로살 비함유 백신을 개발할 필요성이 있다.

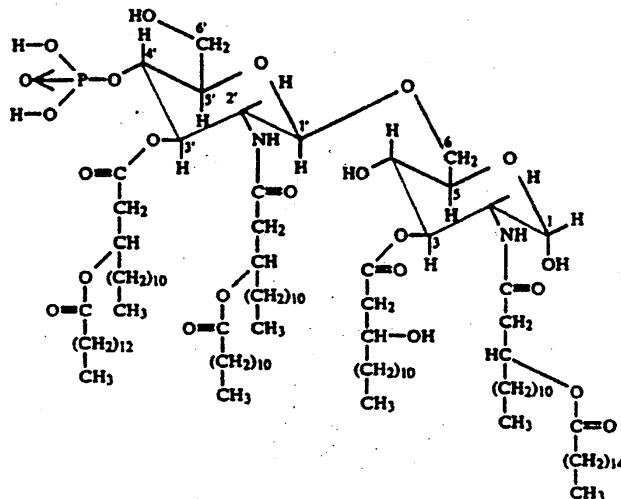
- <17> 생산/정제 공정 동안 및/또는 최종 백신에서 통상적인 불활성화된 인플루엔자 백신에 대한 보존제가 오늘날까지 표준적으로 사용되어 왔다. 보존제는 정제의 다양한 스테이지 동안 미생물이 성장하는 것을 방지하는데 필요하다. 란-유래된 인플루엔자 백신에 있어서, 티메로살은 전형적으로 미가공 알란토인성 유체에 첨가되며, 또한 바이러스 처리 동안 2회 첨가될 수 있다. 따라서, 공정 말기에는 티메로살이 잔류하며, 이는 추가적으로 최종 백신중의 원하는 보존제 농도 예를 들어, 약 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 조절될 수 있다.
- <18> 인플루엔자 백신에서 보존제로서의 티메로살의 용도의 부작용은 안정화 효과이다. 통상적인 인플루엔자 백신의 티메로살은 특히 백신의 HA 성분을 안정화시키는 작용을 하나, B형 균주 인플루엔자의 HA만 배타적으로 안정화시키는 것은 아니다. 특정 A형 균주 헤마글루티닌 예를 들어, H3 또한 안정화가 요구될 수 있다. 따라서, 인플루엔자 백신으로부터 티메로살을 제거하거나, 적어도 최종 백신중의 티메로살 농도를 감소시키는 것이 바람직 할 수 있지만, 티메로살 없이는 HA가 충분히 안정적이지 못할 것이라는 해결해야 할 과제가 생긴다.
- <19> 본 발명에서, 유기수은을 함유하지 않는 대안적인 시약을 사용하여 불활성화된 인플루엔자 제조물에서 HA를 안정화시키는 것이 가능하다는 것을 발견하였다. HA는 안정화된 상태로 유지되어 시간에 따라 역가 표준법 특히, SRD에 의해, 안정화 부형제 없이 동일한 방법으로 생성된 비안정화된 항원 제조물 보다 더 큰 범위로 검출될 수 있다. 중요하게는, HA는 최종 인플루엔자 백신에 요구되는 기준인 12달 이하 동안 안정화된 상태로 유지된다.
- <20> 제 1 양태에서, 본 발명은 티메로살의 부재 또는 저수준의 티메로살의 존재하에 안정화된 헤마글루티닌 제제를 포함하는 불활성화된 인플루엔자 바이러스 제조물을 제공하고 있으며, 여기서, 헤마글루티닌은 SRD 검정에 의해 검출가능하다.
- <21> 저수준의 티메로살은, 인플루엔자 B로부터 유래된 HA의 안정성이 감소되어 안정화 부형제가 안정화된 HA를 위해 요구되는 수준을 말한다. 저수준의 티메로살은 일반적으로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하이다.
- <22> 일반적으로, 안정화된 HA는 역가 표준법 특히, SRD에 의해 안정화 부형제 없이 동일한 방법으로 생성된 비안정화된 항원 제조물 보다 더 큰 범위로 시간에 따라 검출될 수 있는 HA이다. HA의 안정화는 바람직하게는, 1년에 걸쳐 사실상 일정한 HA 활성을 유지한다. 바람직하게는, 안정화로 인해 HA를 포함하는 백신이 6개월, 더욱 바람직하게는 1년의 저장 기간 후에도 저장이 가능해질 수 있다.
- <23> 적합하게는, 안정화는 부형제, 바람직하게는 미셀 변형 부형제를 안정화시키므로써 수행된다. 미셀 변형 부형제는, 일반적으로 멤브레인 단백질 HA를 용해시키는데 사용되거나 적합한 세정제 예컨대, 세정제 트윈 80, 트리톤 X100 및 데옥시콜레이트를 개별적으로 또는 혼합하여 사용하므로써 형성된 미셀로 혼입될 수 있는 부형제이다.
- <24> 이론에 의해 한정하고자 하는 것은 아니지만, 부형제는 최종 제조물중의 리피드, 세정제 및/또는 단백질과의 상호작용에 의해 HA를 안정화시키는 작용을 하는 것으로 여겨진다. 단백질 및 리피드와의 부형제의 혼합된 미셀은 예컨대, 트윈 및 데옥시콜레이트와 잔여 리피드 및/또는 트리톤 X-100의 미셀이 형성될 수 있다. 표면 단백질은 이러한 복합 미셀에 의해 용해되는 것으로 여겨진다. 바람직하게는, 단백질 응집은 적합한 부형제를 함유하는 미셀 예컨대, 음이온으로 하전된 세정제를 함유하는 미셀의 전하 반발에 의해 제한된다.
- <25> 적합한 미셀 변형 부형제는 양이온, 음이온 또는 쌍성 이온으로 하전된 양친매성 분자 예컨대, 알킬 술페이트 또는 알킬-아릴-술페이트; 비이온성 양친매성 분자 예컨대, 알킬 폴리글리코시드 또는 이들의 유도체, 예컨대, 플란타케어[?](Plantacare[?]: 헨젤 KGa로부터 구입가능), 또는 알킬 폴리 알킬렌 에테르 또는 이들의 유도체 예컨대, 라우레스-9(Laureth-9)를 포함한다.
- <26> 바람직한 부형제는 α -토코페롤, 또는 α -토코페롤의 유도체 예컨대, α -토코페롤 숙시네이트이다. 본 발명에 사용하기 위한 기타 바람직한 토코페롤 유도체는 D- α 토코페롤, D- δ 토코페롤, D- γ 토코페롤 및 DL- α -토코페롤을 포함한다. 사용될 수 있는 토코페롤의 바람직한 유도체는 아세테이트, 숙시네이트, 인산 에스테르, 포르미에이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 술페이트 및 글루코네이트를 포함한다. 알파-토코페롤 숙신이트가 특히 바람직하다. α -토코페롤 또는 유도체는 헤마글루ти닌을 안정화시키는데 충분한 양으로 존재한다.
- <27> 기타 적합한 부형제는 종래의 표준 방법에 의해 확인될 수 있으며, 예를 들어, 본원에 설명된 바와 같은 안정화도 검정을 위한 SRD 방법을 사용하여 시험될 수 있다.

- <28> 바람직한 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 안정한 B형 균주 인플루엔자 헤마글루티닌 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 항원 제조물을 제공한다.
- <29> 추가의 양태에서, 본 발명은 안정화된 미셀 변형 부형체 바람직하게는, α -토코페롤 또는 이것의 유도체 예컨대, α -토코페롤 속시네이트의 존재하에 항원을 정제하는 것을 포함하여, 안정한 헤마글루티닌 항원을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- <30> 추가로, 본 발명은 본원에 설명된 항원 제조물을 포함하는 백신, 및 본 발명에 따른 백신을 피검체에 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 인플루엔자 감염 또는 질환을 예방하는 방법에 있어서의 백신의 용도를 제공한다.
- <31> 이러한 백신은 적합한 전달 경로 예컨대, 피내, 점막내 예를 들어, 비내, 경구내, 근육내 또는 피하내에 의해 투여될 수 있다. 기타 전달 경로는 당해분야에 널리 공지되어 있다.
- <32> 피내 전달이 바람직하다. 피내 전달에 적합한 기구 예컨대, US 4,886,499, US 5,190,521, US 5,328,483, US 5,527,288, US 4,270,537, US 5,015,235, US 5,141,496, US 5,417,662에 설명된 것과 같은 솟 니들(short needle)이 사용될 수 있다. 피내 투여용 백신은 또한, 본원에 참고문헌으로서 인용된 WO 99/34850 및 EP1092444에 설명된 것과 같은 피부로의 바늘의 효과적인 침투 깊이를 제한하는 기기 및 이들과 동일한 기능의 장치들에 의해 투여될 수 있다. 각막충을 관통하여 젯이 진피에 도달하게 하는 액체 젯 주입기 또는 바늘을 통해 액체 백신을 진피에 전달하는 젯 주입 기기 또한 적합하다. 젯 주입 기기는 예를 들어, US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 및 WO 97/13537에 기재되어 있다. 피부의 외층을 통해 분말 형태의 백신을, 압축 기체를 사용하여 진피로 가속시키는 탄도성 분말/입자 전달 기기 또한 적합하다. 또한, 피내 투여의 전통적인 망투 방법인 통상적인 주사기가 사용될 수 있다. 그러나, 통상적인 주사기는 고도로 숙련된 조작원에 의해서 사용되어져야 하며, 따라서 고도로 숙련된 사용자 없이 정확하게 전달 할 수 있는 기기가 바람직하다.
- <33> 이와 같이, 본 발명은 본 발명에 따른 인플루엔자 백신을 피검체에 피내 투여하는 것을 포함하여, 피검체의 인플루엔자 감염 또는 질환을 예방하는 방법을 제공한다.
- <34> 본 발명은 또한, 특히 예를 들어, WO 99/34850 또는 EP 1092444에 기재된 기술과 본 발명에 따른 백신을 조합한 피내 주입 기기에 까지 확대된다.
- <35> 또한, 본 발명은 인플루엔자 백신의 제조시 헤마글루티닌 안정화제로서 미셀 변형 부형체 바람직하게는, α -토코페롤 또는 이것의 유도체의 용도를 제공한다.
- <36> 본 발명은 특히 B형 균주 인플루엔자 헤마글루티닌에 적용되지만, 여기에만 배타적으로 적용되는 것은 아니다.
- <37> 바람직하게는, 본 발명의 안정화된 HA는 6달, 더욱 바람직하게는 12달 동안 안정적이다.
- <38> 바람직하게는, α -토코페롤은 에스테르, 더욱 바람직하게는 속시네이트 또는 아세테이트, 가장 바람직하게는 속시네이트 형태로 존재한다.
- <39> α -토코페롤 또는 이것의 유도체에 대한 바람직한 농도는 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ - $10\text{mg}/\text{ml}$, 더욱 바람직하게는 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ - $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다.
- <40> 본 발명에 따른 백신은 일반적으로, A형 균주 및 B형 균주 바이러스 항원 모두를, 전형적으로 2개의 A형 균주 및 1개의 B형 균주의 3가 조성물중에 함유한다. 그러나, 2가 및 1가 백신이 배제되는 것은 아니다. 1가 백신은 유리하게는, 범유행성 상황에서 유리할 수 있는데, 이는 예를 들어, 가능한 신속하게 많은 백신을 생성하여 투여하는 것이 중요하기 때문이다.
- <41> 본 발명에 사용하기 위한 살아있지 않은 인플루엔자 항원 제조물은 스플릿 바이러스 항원 제조물, 서브유닛 항원(전체 바이러스로부터 제조합적으로 발현되거나 제조됨), 예를 들어, 포름알데히드, β -프로피오락톤으로 화학적으로 불활성화되거나, 예를 들어, U.V 불활성화되거나 열에 의해 불활성화될 수 있는 불활성화된 전체 바이러스로 구성된 균으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 항원 제조물은 스플릿 바이러스 제조물, 또는 특히, 스플릿 처리 후 표면 항원을 정제하므로써 전체 바이러스로부터 제조된 서브유닛 항원이다. 스플릿 바이러스 제조물이 가장 바람직하다.
- <42> 바람직하게는, 인플루엔자 바이러스 제조물의 각각의 균주에 대한 헤마글루티닌 항원의 농도는 SRD 검정에 의해

측정된 바와 같은 1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 더욱 바람직하게는 3-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 가장 바람직하게는 약 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다.

<43> 본 발명에 따른 백신은 추가로 애쥬번트 또는 면역증강제 예컨대, 임의의 공급원으로부터의 해독된 리피드 A 및 리피드 A의 비독성 유도체, 사포닌 및 TH1형 반응을 자극할 수 있는 기타 시약을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<44> 장내세균 리포폴리사카라이드(LPS)가 이의 독성으로 인해 이의 애쥬번트로서의 용도가 한정되어 있지만, 면역계의 효능있는 증강제인 것으로 오랫동안 공지되어 왔다. LPS의 비독성 유도체, 즉 환원 말단 글루코사민으로부터 코어 카르보히드레이트기 및 인산염이 제거된 모노포스포릴 리피드 A(MPL)은 문헌[Ribi et al(1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419)]에 기술되어 있으며, 하기 구조를 갖는다.



<45>

<46> MPL의 추가의 해독된 형태는 디사카라이드 베본의 3 위치로부터 아실 사슬을 제거하므로써 유도되며, 이는 3-O-데아실화된 모노포스포릴 리피드 A(3D-MPL)로서 칭해진다. 이는 GB 2122204B에 교시된 방법에 의해 정제되고 제조될 수 있으며, 상기 참고문헌에는 또한 디포스포릴 리피드 A 및 이것의 3-O-데아실화된 변형물의 제법이 기재되어 있다.

<47>

3D-MPL의 바람직한 형태는 직경이 0.2 μm 미만의 작은 입자 크기를 갖는 에멀션 형태이며, 이의 제조법은 WO 94/21292에 기술되어 있다. 모노포스포릴 리피드 A 및 계면활성제를 포함하는 수성 제형은 WO9843670A2에 기술되어 있다.

<48>

본 발명의 조성물중에 제형화되는 박테리아 피로폴리사카라이드 유도된 애쥬번트는 박테리아 공급원으로부터 정제되고 처리될 수 있거나, 대안적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 정제된 모노포스포릴 리피드 A는 상기 문헌[Ribi et al 1986]에 기술되어 있으며, 살모넬라 sp.로부터 유도된 3-O-데아실화된 모노포스포릴 또는 디포스포릴 리피드 A는 GB 2220211 및 US 4912094에 기술되어 있다. 기타 정제되고, 합성된 리포폴리사카라이드는 문헌[Hilgers et al., 1986, Int.Arch.Allergy.Immunol., 79(4):392-6; Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1):141-6; and EP 0 549 074B1]에 기술되어 있다. 특히 바람직한 박테리아 리포폴리사카라이드 애쥬번트는 3D-MPL이다.

<49>

따라서, 본 발명에 사용될 수 있는 LPS 유도체는 LPS 또는 MPL 또는 3D-MPL의 구조와 유사한 구조를 갖는 면역증강제이다. 본 발명의 기타 양태에서, LPS 유도체는 아실화된 모노사카라이드일 수 있으며, 이는 MPL의 상기 구조의 하위 일부에 속한다.

<50>

사포닌은 문헌[Lacaille-Dubois, M and Wagner H.(1996, A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2 pp 363-386)]에 교시되어 있다. 사포닌은 식물 및 해양 동물계에 널리 분포된 스테로이드 또는 트리테르펜 글리코시드이다. 사포닌은 물중의 콜로이드성 용액을 형성하는 것으로 주목을 받아 왔으며, 이는 교반시 거품이 발생하며, 콜레스테롤을 침전시킨다. 사포닌이 세포막 근처에 위치하는 경우, 이들은 막에 포어형 구조를 형성하여 막이 터지게 한다. 적혈구의 용혈은 이러한 현상의 예이며, 이는 사포닌의 모든 성질을 나타내는 것은 아니지만, 특정한 성질을 나타낸다.

<51>

사포닌은 전시 투여용 백신에서 애쥬번트로서 공지되어 있다. 애쥬번트 및 개별적인 사포닌의 용혈 활성을 당

해분야에서 광범위하게 연구되었다(Lacaille-Dubois and Wagner, supra). 예를 들어, 쿨 A(Quil A: 사우스 아메리카 나무 쿨라야 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)의 껍질로부터 유래됨), 및 이것의 분획물은 US 5,057,540, 문헌["Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C.R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12(1-2):1-55], 및 EP 0 362 279B1에 기술되어 있다. 쿨 A의 분획물을 포함하는 미립자 구조, 즉 면역 증가 복합물(Immune Stimulating Complexes: ISCOMS)은 용혈성이어서, 백신의 제조에 사용되어 왔다(Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739). 용혈성 사포닌 QS21 및 QS17(쿨 A의 HPLC 정제된 분획물)은 효능있는 전신 애쥬번트로서 기술되었으며, 이의 제조 방법은 US 특허 5,057,540 및 EP 0 362 279B1에 기재되어 있다. 전식 백신 연구에 사용되는 기타 사포닌은 집소필라(Gypsophila) 및 사포나리아(Saponaria)와 같은 기타 식물종으로부터 유래된 사포닌을 포함한다(Bomford et al., Vaccine, 10(9):572-577, 1992).

<52> 강화된 시스템은 비독성 리피드 A 유도체와 사포닌 유도체의 혼합물, 특히 QS21과, WO 94/00153에 기술된 3D-MPL 또는 WO 96/33739에 기재된 바와 같이 QS21이 콜레스테롤로 켄칭되는 덜 반응유발성/reactogenic인 조성물과의 혼합물을 포함한다.

<53> 수중유 에멀션중의 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 특히 효능있는 애쥬번트 제형은 WO 95/17210에 설명되어 있으며, 이는 바람직한 제형이다.

<54> 따라서, 본 발명의 한 구체예는 해독된 리피드 A 또는 리피드 A의 비독성 유도체로 보조된, 더욱 바람직하게는 모노포스포릴 리피드 A 또는 이들의 유도체로 보조된 본 발명의 인플루엔자 항원 제조물을 포함하는 백신을 제공한다.

<55> 바람직하게는, 백신은 추가적으로 사포닌, 더욱 바람직하게는 QS21을 포함한다.

<56> 바람직하게는, 제형은 추가로 수중유 에멀션을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 항원 제조물과 약제학적으로 허용되는 부형제 예컨대, 3D-MPL을 포함하는 것을 포함하여, 백신 제형을 제조하는 방법을 제공한다.

<57> 본 발명에 따른 백신은 추가로 특히 비이온성 계면활성제일 수 있는 하나 이상의 계면활성제를 포함할 수 있다. 적합한 비이온성 계면활성제는 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올(예를 들어, 트리톤™(Triton™) 시리즈로서 시중에서 구입가능), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(트윈™ 시리즈), 및 하기 일반식의 폴리옥시에틸렌 에테르 또는 에스테르, 또는 이들의 2개 이상의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다:

<58> (I) $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$

<59> 상기 식에서, n은 1-50이며, A는 결합 또는 $-\text{C}(=\text{O})-$ 이며, R은 C_{1-50} 알킬 또는 페닐 C_{1-50} 알킬이다.

<60> 화학식 (I)에 포함되는 바람직한 계면활성제는 n이 4-24, 더욱 바람직하게는 6-12, 가장 바람직하게는 9이며, R 성분은 C_{1-50} , 바람직하게는 $\text{C}_4\text{-}\text{C}_{20}$ 알킬, 가장 바람직하게는 C_{12} 알킬인 문자이다.

<61> 옥틸페녹시 폴리옥시에탄올 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 문헌["Surfactant systems" Eds: Attwood and Florence(1983, Chapman and Hall)]에 기술되어 있다. t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올(트리톤 X-100™)을 포함하는 옥틸페녹시 폴리옥시에탄올(옥톡시놀)은 또한 문헌[Merck Index Entry 6858(Page 1162, 12th Edition, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3)]에 기술되어 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(트윈 80™)을 포함하는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르는 문헌[Merck Index Entry 7742(Page 1308, 12th Edition, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3)]에 기술되어 있다. 이 둘은 상기에 설명된 방법에 따라 제조될 수 있거나, 시그마 인크(Sigma Inc.)와 같은 시중의 공급원으로부터 구입할 수 있다.

<62> 특히 바람직한 비이온성 계면활성제는 트리톤 X-45, t-옥틸페녹시 폴리에톡시에탄올(트리톤 X-100), 트리톤 X-102, 트리톤 X-114, 트리톤 X-165, 트리톤 X-205, 트리톤 X-305, 트리톤 N-57, 트리톤 N-101, 트리톤 N-128, 브레이즈 35(Breij 35), 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르(라우레스 9) 및 폴리옥시에틸렌-9-스테아릴 에테르(스테아레스 9)를 포함한다. 트리톤 X-100 및 라우레스 9가 특히 바람직하다. 또한, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(트윈 80™)이 특히 바람직하다.

<63> 추가로, 일반식 (I)의 적합한 폴리옥시에틸렌 에테르는 하기 군으로부터 선택된다: 폴리옥시에틸렌-8-스테아릴

에테르, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-35-라우릴 에테르 및 폴리옥시에틸렌-23-라우릴 에테르.

<64> 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르에 대한 대안적인 용어 또는 명칭은 CAS 등록부에 기재되어 있다. 폴리옥시에틸렌-9 라우릴 에테르의 CAS 등록번호는 9002-92-0이다. 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르와 같은 폴리옥시에틸렌 에테르는 문헌[Merck index(12th ed: entry 7717, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA; ISBN 0911910-12-3)]에 기재되어 있다. 라우레스 9는 에틸렌 옥사이드를 도데실과 반응시키므로써 형성되며, 평균 9 개의 에틸렌 옥사이드 단위체를 갖는다.

<65> 설명된 계면활성제의 상이한 군으로부터의 2개 이상의 비이온성 계면활성제가 본원에 설명된 백신 제형중에 존재할 수 있다. 특히, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 예컨대, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(트윈 80TM) 및 옥톡시놀 예컨대, t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올(트리톤) X-100TM의 혼합물이 바람직하다. 특히 바람직한 비이온성 계면활성제의 혼합물은 라우레스 9와 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 또는 옥톡시놀, 또는 이들 모두와의 혼합물을 포함한다.

<66> 상기 설명된 바와 같은 비이온성 계면활성제는 하기와 같이 최종 조성물중에 바람직한 농도로 존재한다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 예컨대, 트윈 80TM: 0.01 내지 1%, 가장 바람직하게는 약 0.1%(w/v); 옥틸- 또는 노닐페녹시폴리옥시에탄올 예컨대, 트리톤 X-100TM 또는 트리톤 계열의 기타 세정제: 0.001 내지 0.1%, 가장 바람직하게는 0.005 내지 0.02%(w/v); 라우레스 9와 같은 일반식 (I)의 폴리옥시에틸렌 에테르; 0.1 내지 20%, 바람직하게는 0.1 내지 10%, 가장 바람직하게는 0.1 내지 1% 또는 약 0.5%(w/v).

<67> 특정 백신 제형에 있어서, 기타 백신 성분은 제형중에 포함될 수 있다. 본 발명의 제형은 또한 바일산(bile acid) 또는 이것의 유도체, 특히 염형태를 포함할 수 있다. 이들은 콜릭산(cholic acid) 또는 이들의 염, 특히 콜릭산의 나트륨염 또는 콜릭산 유도체를 포함한다. 바일산 및 이들의 유도체의 예로는 콜릭산, 테옥시콜릭산, 케노데옥시콜릭산, 리토콜릭산, 우르소데옥시콜릭산, 히오데옥시콜릭산 및 유도체 예컨대, 상기 언급된 바일산의 글리코-, 타우로-, 아미도프로필-1-프로판술폰산-, 아미도프로필-2-히드록시-1-프로판술폰산 유도체, 또는 N,N-비스(3D글루코노아미도프로필)데옥시콜아미드를 포함한다. 특히 바람직한 예는 나트륨 테옥시콜레이트(NaDOC)이며, 이는 최종 백신 투여량에 존재할 수 있다.

<68> 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 백신으로 충전된 백신 투여 기기를 포함하는 약제 키트를 제공한다. 이러한 투여 기구는 니들, 액체 젯 기구, 분말 기기 및 스프레이 기구(비투여에 사용하기 위해)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<69> 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 항원 제조물은 통상적인 자충포장란으로부터 유래되거나, 조직 배양을 이용하여 바이러스를 성장시키거나, 재조합 인플루엔자 바이러스 표면 항원을 발현시키는 새로운 생성 방법으로 유래될 수 있다. 바이러스를 성장시키기 위한 적합한 세포 기질은 예를 들어, 개 신장(dog kidney) 세포 예컨대, MDCK 또는 MDCD의 클론으로부터의 세포, MDCK형 세포, 원숭이 신장 세포 예컨대, 베로(Vero) 세포를 포함하는 AGMK 세포, 적합한 돼지 세포주, 또는 백신 목적을 위해 인플루엔자 바이러스를 생성하기에 적합한 기타 포유동물 세포 유형을 포함한다. 적합한 세포 기질은 또한, 사람 세포 예를 들어, MRC-5 세포를 포함한다. 적합한 세포 기질은 세포주에만 제한되는 것은 아니며; 예를 들어, 일차 세포 예컨대, 계태아세포 또한 포함된다.

<70> 인플루엔자 바이러스 항원 제조물은 상업적으로 적용 가능한 많은 방법 예를 들어, 본원에 참고문헌으로 인용된 특허 DD 300 833 및 DD 211 444에 기술된 스플릿 인플루엔자 공정에 의해 생성될 수 있다. 전형적으로, 스플릿 인플루엔자는 용매/세정제 처리 예컨대, 트윈TM과 함께 혼합된 디에틸에테르("트윈 에테르" 스플릿팅으로서 공지되어 있음) 또는 트리-n-부틸 인산염을 사용하여 생성될 수 있으며, 이러한 공정은 여전히 일부 생산 시설에서 사용되고 있다. 현재 사용되는 기타 스플릿팅 제제는 본원에 참고문헌으로 인용된 특허 DD 155 875에 기술된 바와 같은 세정제 또는 단백질가수분해 효소 또는 바일염 예를 들어, 나트륨 테옥시콜레이트를 포함한다. 스플릿팅 제제로서 사용될 수 있는 세정제는 양이온성 세정제 예를 들어, 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB), 기타 이온성 세정제 예를 들어, 라우릴설페이트, 타우로데옥시콜레이트, 또는 비이온성 세정제 예컨대, 트리톤 X-100(예를 들어, 문헌[Lina et al, 200, Biologicals 28, 95-103]에 기술된 공정) 및 트리톤 N-101을 포함하는 상기 기술된 세정제, 또는 2개 이상의 세정제의 혼합물을 포함한다.

<71> 스플릿 백신용 제조 방법은 다양한 많은 여과 및/또는 기타 분리 단계 예컨대, 다양한 조합된 초원심분리, 초여과, 띠원심분리 및 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환) 단계들을 포함하며, 선택적으로 스플릿팅 전후에 수

행될 수 있는 예컨대, 열, 포름알데히드 또는 β -프로피오락톤 또는 U.V.로 인한 불활성화 단계를 포함할 것이다. 스플릿팅 공정은 회분식, 연속 또는 반연속 공정으로서 수행될 수 있다.

<72> 본 발명에 따른 바람직한 스플릿 인플루엔자 항원 제조물은 생성 공정으로부터 잔류하게 되는 잔류량의 트윈 80 및/또는 트리톤 X-100(이들은 첨가될 수도 있음) 또는 스플릿 항원의 제조 후에 조절된 농도의 트윈 80 및/또는 트리톤 X-100을 포함한다. 바람직하게는, 트윈 80 및 트리톤 X-100 둘 모두가 존재한다. 백신 용량중의 이러한 비이온성 계면활성제의 최종 농도의 바람직한 범위는 하기와 같다:

트윈 80: 0.01 내지 1%, 바람직하게는 약 0.1%(v/v)

트리톤 X-100: 0.001 내지 0.1(%w/v), 더욱 바람직하게는 0.005 내지 0.02(%w/v).

<75> 대안적으로, 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 항원 제조물은 살아있는 인플루엔자 바이러스 이외의 공급원으로부터 유래될 수 있으며, 예를 들어, 헤마글루티닌 항원이 재조합적으로 생성될 수 있다.

<76> 본 발명은 하기 비제한적인 실시예에서 추가로 설명될 것이다.

실시예

<77> 실시예 1 - 보존제 비함유 백신(티메로살-감소된 백신)에 대한 안정화제로서 α -토코페롤 숙시네이트를 사용하여 인플루엔자 바이러스 항원 제조물을 제조하는 방법

하기 공정에 따라 1가 스플릿 백신을 제조하였다.

바이러스 접종원의 제조

<80> 자충포장란의 접종일에, 0.5mg/ml의 젠타마이신 슬레이트와 25 μ g/ml의 히드로코르티손을 함유하는 인산염 완충된 염수와 작업 시드 럽(seed lot)과 혼합하므로써 제조하였다(바이러스 균주에 따라). 바이러스 접종원을 2-8°C로 유지시켰다.

자충포장란의 접종

<82> 9 내지 11일된 자충포장란을 바이러스 복제에 사용하였다. 껍질의 오염물을 제거하였다. 자충포장란을 0.2ml의 바이러스 접종원으로 접종시켰다. 접종된 란을 (바이러스 균주에 따라) 적합한 온도에서 48 내지 96시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 말기에, 냉각시켜 배아를 치사시키고, 란을 2-8°C에서 12-60시간 동안 저장하였다.

채취

<84> 냉장된 자충포장란으로부터 알란토인성 유체를 채취하였다. 일반적으로, 1개의 란 당 8 내지 10ml의 미가공 알란토인성 유체를 수집하였다.

알란토인성 유체로부터의 전체 바이러스의 농축물 및 정제

1. 정화

<87> 채취된 알란토인성 유체를 완만한 속도의 원심분리에 의해 정화하였다(4000 - 14000g).

2. 흡착 단계

<89> 정화된 바이러스 풀중의 CaHPO₄ 젤을 수득하기 위해, 바이러스 균주에 따라 0.5mol/L의 Na₂HPO₄ 및 0.5mol/L의 CaCl₂ 용액을 첨가하여 CaHPO₄의 최종 농도가 1.5g 내지 3.5g CaHPO₄/리터가 되게 하였다.

<90> 8시간 이상 동안 침전시킨 후, 상청액을 제거하고, 사용되는 CaHPO₄의 양에 따라 0.26mol/L EDTA-Na₂ 용액을 인플루엔자 바이러스를 함유하는 침전물에 첨가하므로써 재용해시켰다.

3. 여과

<92> 재현탁된 침전물을 6 μ m 필터막으로 여과하였다.

4. 수크로스 구배 원심분리

<94> 100 μ g/ml 티메로살을 함유하는 선형 구배의 수크로스(0.55%(w/v))로 등밀도 원심분리에 의해 인플루엔자 바이러

스를 농축시켰다. 유량은 8-15리터/시간이었다.

<95> 원심분리 말기에, 로터 함유물(the content of the rotor)을 4개의 상이한 분획으로 회수하였다(수크로스는 굴절계로 측정됨):

<96> - 분획물 1 55-52% 수크로스

<97> - 분획물 2 약 52-38% 수크로스

<98> - 분획물 3 38-20% 수크로스*

<99> - 분획물 4 20-0% 수크로스

<100> * 바이러스 균주에 따라: 분획물 3의 수크로스는 15% 수크로스로 감소될 수 있다.

<101> 추가의 백신 제조를 위해서는, 단지 분획물 2와 3을 사용하였다.

<102> 수크로스 함량을 약 6% 미만으로 감소시키기 위해 분획물 3을 인산염 완충액에 의한 정용여과에 의해 세척하였다. 이러한 희석된 분획물에 존재하는 인플루엔자 바이러스를 펠렛화시켜 가용성 오염물을 제거하였다.

<103> 펠렛을 재현탁시키고, 완전히 혼합하여 균질의 혼탁액을 수득하였다. 분획물 2와 분획물 3의 재현탁된 펠렛을 폴링(pooling)시키고, 인산염 완충액을 첨가하여 약 40리터의 용적을 수득하였다. 이러한 생성물이 1가 전체 바이러스 농축물이다.

5. 나트륨 데옥시콜레이트로의 수크로스 구배 원심분리

<104> 1가 전체 인플루엔자 바이러스 농축물을 ENI-Mark II 초원심분리기에 가하였다. K3 로터는 선형 구배의 수크로스(0.55%(w/v))를 함유하며, 여기서 나트륨 데옥시콜레이트 구배가 추가적으로 중첩된다. 트윈 80은 스플릿 동안 0.1%(w/v) 이하로 존재하였으며, B형 균주 바이러스에 있어서는, 토코페롤 숙시네이트를 0.5mM 이하로 첨가하였다. 최대 나트륨 데옥시콜레이트 농도는 0.7-1.5%(w/v)이며, 이는 바이러스 균주에 의존적이다. 유속은 8-15 리터/시간이다.

<105> 원심분리 말기에, 로터 함유물을 3개의 상이한 분획으로 회수하였으며(수크로스는 굴절계에 의해 측정됨), 분획물 2를 추가의 공정에 사용하였다. 분획물의 수크로스 함량 제한(47-18%)은 바이러스 균주에 따라 상이하며, 평가후 결정된다.

6. 멸균 여과

<106> 스플릿 바이러스 분획물을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 0.025%(w/v)의 트윈 80 및 (B형 균주 바이러스에 있어서) 0.5mM의 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충액을 희석에 사용하였다. 여과된 분획물 2의 최종 용적은 원래의 분획 부패의 5배였다.

7. 불활성화

<107> 여과된 1가 물질을 최대 84 시간 동안 $22\pm2^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다(바이러스 균주에 따라, 인큐베이션 시간이 단축될 수 있음). 총 단백질 함량을 최대 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 저하시키기 위해 0.025%(w/v)의 트윈 80을 함유하는 인산염 완충액을 첨가하였다. B형 균주 바이러스에 있어서는, 0.025%(w/v)의 트윈 80 및 0.25mM 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수를 가하여 희석시켜 총 단백질 함량을 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 저하시켰다. 포름알데히드를 첨가하여 최종 농도가 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게하고, 72시간 이상 동안 $20^\circ\text{C}\pm2^\circ\text{C}$ 에서 불활성화를 수행하였다.

8. 초여과

<108> 불활성화된 스플릿 바이러스 물질을, 20kDa MWCO를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 막이 구비된 초여과 장치에서 2 배 이상 농축시켰다. 그 후, 물질을 0.025%(w/v)의 트윈 80을 함유하는 인산염 완충액으로 세척하고, 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 0.1mM 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수로 세척하였다. B형 균주 바이러스에 있어서는, 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 0.1mM 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수를 사용하여 세척하였다.

9. 최종 멸균 여과

<109> 초여과 후에, 물질을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 필터막을 린스하고, 물질을 필요에 따라 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 (B 바이러스에 있어서) 0.1mM의 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수로 희석시켜 단백질 농도가 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하지 않게 하였다.

<115> 10. 저장

1가 최종 벌크를 최대 18달 동안 2-8°C에서 저장하였다.

<117> 안정도

표 1. 1가 최종 벌크에서 SRD에 의해 측정된 시간에 따른 HA 함량($\mu\text{g}/\text{mL}$) 비교

| 균주 | 안정화제 | 생성 후 | 30°C에서 4주 | 2-8°C에서 6달 | 2-8°C에서 12달 |
|------------------------------------|---|------|------------|------------|-------------|
| B/ 야마나쉬(Yamana shi)/166/98 | 토코페릴숙시네 이트(잔여 수은 $3\mu\text{g}/\text{mL}$) | 169 | 139(82%) | 172(>100%) | ND |
| B/ 야마나쉬/166/98 | 티메로살($108\mu\text{g}/\text{mL}$) | 192 | 160(83%) | 186(97%) | 178(93%) |
| B/ 야마나쉬/166/98 | 비함유(잔여 수 은 $3\mu\text{g}/\text{mL}$) | 191 | 122(60%) | 175(92%) | 154(81%) |
| B/ 요한스버그(Joha nnesburg)/5/99 | 토코페릴숙시네 이트(잔여 수은 $4\mu\text{g}/\text{mL}$) | 166 | 183(>100%) | 158(95%) | 179(>100%) |
| B/ 요한스버그/5/99 | 토코페릴숙시네 이트(잔여 수은 $4\mu\text{g}/\text{mL}$) | 167 | 179(>100%) | 158(95%) | 178(>100%) |
| B/ 요한스버그/5/99 | 토코페릴숙시네 이트(잔여 수은 $3\mu\text{g}/\text{mL}$) | 144 | 151(>100%) | 130(90%) | 145(>100%) |
| B/ 요한스버그/5/99 * | 티메로살 | 159 | ND | 172(>100%) | 154(97%) |
| B/ 요한스버그/5/99 ** | 비함유 | 169 | 107(63%) | 153(90%) | ON |

<120> *허용된 플루아릭스™(FLUARIX™)에 따라 생성됨, **토코페롤숙시네이트 없이 실시예 1에 따라 생성됨, ON: 진행 중, ND: 측정되지 않음.

<121> 실시예 2 - 티메로살-감소된 백신에 대한 안정화제로서 α-토코페롤 숙시네이트를 사용하여 인플루엔자 백신을 제조하는 방법

<122> 3 균주의 1가 최종 벌크, 즉 A/뉴 칼도니아(New Caldonia)/20/99(H1N1) IVR-116, A/파나마(Panama)/2007/99(H3N2) 레스비르(RESVIR)-17 및 B/야마나쉬/166/98을 실시예 1에 설명된 방법에 따라 생성시켰다.

<123> 풀링

<124> 적합한 양의 1가 최종 벌크를 풀링시켜, A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116 및 A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17에 있어서는 각각 최종 HA 농도가 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 하고, B/야마나쉬/166/98에 있어서는 $39\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 하였다. 트윈 80 및 트리톤 X-100을 각각 $580\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $90\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조절하였다. 최종 용적을 인산염 완충된 염수로 3 L로 조절하였다. 3가 풀(pool)을 말단이 $0.8\mu\text{m}$ 인 셀룰로오스 아세테이트 막을 사용하여 여과시켜 3가의 최종 벌크를 수득하였다. 3가 최종 벌크를 각각 0.5mL 이상으로 주사기에 충전시켰다.

<125> 표 2. 주사기로부터 회수된 3가 최종 벌크에서 SRD에 의해 측정된 시간에 따른 HA 농도 비교

| 백신 제형 | 균주 | 0 달 | 2 달 | 4 달 | 6 달 |
|----------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 안정화제 비함유 인플루엔자 | A/NCal/20/99 | 33(32-34) | 32(31-33) | 36(34-38) | 31(30-32) |
| | A/Pan/2007/99 | 29(27-31) | 31(28-34) | 34(32-36) | 32(31-33) |
| | B/Yam/166/98 | 36(34-38) | 33(32-34) | 32(30-34) | 31(29-33) |

| | | | | | |
|---------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 알파-토코페롤 숙시네이트 함유 인플루엔자 백신 | A/NCA1/20/99 | 31(30-32) | 32(31-33) | 36(34-38) | 32(31-33) |
| | A/Pan/2007/99 | 33(30-36) | 33(30-36) | 36(35-37) | 33(31-35) |
| | B/Yam/166/98 | 37(35-39) | 36(34-38) | 38(35-41) | 36(33-39) |

<127> 실시예 3 - 헤마글루티닌 함량을 측정하는데 사용된 SRD 방법

유리 플레이트(12.4-10.0cm)를 NIBSC에 의해 제안된 농도의 안티-인플루엔자 HA 혈청을 함유하는 아가로스 젤로 피복하였다. 젤을 셋팅한 후, 72개의 샘플 웰(3mm Ø)을 아가로스에 편성시켰다. 10마이크로리터 희석액의 대조군 및 샘플을 웰에 로딩하였다. 플레이트를 수분 챔버에서 실온(20 내지 25°C)하에 24시간 동안 인큐베이션 시켰다. 그 후, 플레이트를 NaCl-용액으로 밤새 함침시키고, 중류수로 간단히 세척하였다. 그 후, 젤을 압축 건조시켰다. 완전히 건조되면, 플레이트를 10분 동안 코마시에 브릴란트 블루(Coomassie Brilliant Blue) 용액을 염색하고, 선명하게 규정된 영역이 가시화될 때 까지 메탄올과 아세트산의 혼합물중에서 2회 탈색시켰다. 플레이트 건조 후, 항원 웰을 둘러싸는 염색된 영역의 직경을 직각으로 두 방향으로 측정하였다. 대안적으로, 표면을 측정하기 위한 장치를 사용하였다. 표면에 따른 항원 희석액의 용량-반응 곡선을 작성하고, 결과를 표준 기울기비 분석법에 따라 계산하였다(Finney, D.J.(1952). Statistical Methods in Biological Assay. London: Griffin, Quoted in: Wood, JM, et al(1977). J.Biol.Standar. 5,237-247).

<129> 실시예 4 - α-토코페롤 안정화된 인플루엔자 백신의 임상 실험(감소된 티메로살)

실시예 2에 설명된 바와 같이 수득된 주사기를 임상 실험에 사용하였다.

H3N2: A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17

H1N1: A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116

B: B/야마나쉬/166/98

표 3

| | 성인 18-60세 | | | | | | |
|---------------|-----------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 백신 처리전 | GMT | 티오-감소됨 | | 티오-첨가 | | | |
| | | H3N2 | H1N1 | B | H3N2 | H1N1 | B |
| 역가<10[%] | | 10.3% | 13.8% | 1.7% | 5.3% | 12.3% | 8.8% |
| 역가≥40, SPR[%] | | 60.3% | 55.2% | 75.9% | 70.2% | 52.6% | 75.4% |
| | | | | | | | |

| 백신 처리후 | 혈청전환율[%] | 10.3% | 13.8% | 1.7% | 5.3% | 12.3% | 8.8% |
|--------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 항체 역가의 현저한 증가[%] | 58.6% | 74.1% | 58.6% | 63.2% | 73.7% | 52.6% |
| | 혈청전환율[%] | 58.6% | 74.1% | 58.6% | 63.2% | 73.7% | 52.6% |
| GMT | | 328 | 525 | 766 | 324 | 359 | 588 |
| GMT 배수 | | 7.3 | 13.0 | 6.9 | 5.9 | 9.8 | 5.9 |

| | | | | | | |
|--|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | | | | | |
| | 역가 ≥ 40 , SPR[%] | 100.0% | 100.0% | 100.0% | 100.0% | 100.0% |

<137> n.d. = 비율 p에 대한 C.I. = $p*(1-p)*N < 95$ 인 경우, n/N은 규정되지 않음.

<138> n/N = (하위)집단 피검체 수(N)의 일부로서의 반응자(n), 즉 혈청전환율 또는 현저한 증가, 참조: [CPMP/BWP/214/96 12 March 1997, p 17ff].

<139> GMT = 기하평균역가, 역수

<140> 95% C.I. = 95% 신뢰구간,

<141> SPR = 혈청보호율: 백신접종 전 또는 백신접종 후의 ≥ 40 의 보호 역가를 갖는 피검체의 비율

<142> 역가 = HI-항체 역가

<143> 혈청전환율 = 백신접종전 <10에서 백신접종 후 ≥ 40 으로 증가된 항체를 갖는 피검체의 비율

<144> GMT 배수 = GMT의 증가 배수

<145> 현저한 증가 = 백신접종전 ≥ 10 의 항체역가를 가지나, 백신접종후 4배 증가된 항체를 갖는 피검체의 비율(2단계의 역가)

<146> req. = EU 필요

<147> 혈청전환 = 네거티브에서 파지티브로 또는 g.e. 4배(네거티브: 역가<10, 파지티브: 역가 ≥ 40) = 혈청전환(<10에서 ≥ 40) 또는 현저한 증가를 갖는 피검체의 비율

<148> 결과는 백신이 보존제로서 티메로살을 함유하는 백신과 동일한 보호유를 제공할 수 있음을 보여준다.

<149> 실시예 5a - 티메로살 비합유 백신에 대한 안정화제로서 α-토코페롤 숙시네이트를 사용한 인플루엔자 바이러스 항원 제조물의 제조

<150> 1가 스플릿 백신을 하기 공정에 따라 제조하였다.

<151> **바이러스 접종원의 제조**

<152> 자충포장란의 접종일에, 0.5mg/ml의 젠타마이신 슬레이트와 25 μ g/ml의 히드로코르티손을 함유하는 인산염 완충된 염수와 작업 시드 럽(seed lot)과 혼합하므로써 제조하였다(바이러스 균주에 따라). 바이러스 접종원을 2-8°C로 유지시켰다.

<153> **자충포장란의 접종**

<154> 9 내지 11일된 자충포장란을 바이러스 복제에 사용하였다. 접질의 오염물을 제거하였다. 자충포장란을 0.2ml의 바이러스 접종원으로 접종시켰다. 60,000개의 접종된 란을 (바이러스계에 따라) 적합한 온도에서 48 내지 96시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 말기에, 냉각시켜 배아를 치사시키고, 란을 2-8°C에서 12-60시간 동안 저장하였다.

<155> **채취**

<156> 냉장된 자충포장란으로부터 알란토인성 유체를 채취하였다. 일반적으로, 1개의 란 당 8 내지 10ml의 미가공 알란토인성 유체를 수집하였다.

<157> **알란토인성 유체로부터의 전체 바이러스의 농도 및 정제**

<158> **정화**

<159> 채취된 알란토인성 유체를 완만한 속도의 원심분리에 의해 정화하였다(4000 - 14000g).

<160> **침전 단계**

<161> 정화된 바이러스 풀중의 최종 암모늄 염 농도가 0.5mol/L이 되도록 포화된 암모늄 슬레이트 용액을 첨가하였다. 1시간 이상 동안 침전시킨 후, 침전물을 필터 깊이에 따른 여과에 의해 제거하였다(전형적으로, 0.5 μ m).

<162> **여과**

<163> 정화된 미가공 전체 바이러스 벌크를, 말단이 유효한 멀균 막(전형적으로, $0.2\mu\text{m}$)으로 된 필터막으로 여과하였다.

<164> **초여과**

<165> 멀균 여과된 미가공 1가 전체 바이러스 벌크를 1000kDa 엠더블유코 바이오막스(MWCO BIOMAXTM)가 구비된 카세트로 6배 이상 농축시켰다. 농축된 분비폐지물을 1.8배 이상의 인산염 완충된 염수로 세척하였다.

<166> **수크로스 구배 원심분리**

<167> 선형 구배의 수크로스(0.55%(w/v))로 등밀도 원심분리에 의해 인플루엔자 바이러스를 농축시켰다. 유량은 8-15리터/시간이었다.

<168> 원심분리 말기에, 로터 함유물을 4개의 상이한 분획으로 회수하였다(수크로스는 굴절계로 측정됨):

<169> - 분획물 1 55-52% 수크로스

<170> - 분획물 2 약 52-38% 수크로스

<171> - 분획물 3 38-20% 수크로스*

<172> - 분획물 4 20-0% 수크로스

<173> * 바이러스 균주에 따라: 분획물 3의 수크로스는 15% 수크로스로 감소될 수 있다.

<174> 추가의 백신 제조를 위해서는, 단지 분획물 2를 사용하거나, 분획물 2와 추가로 정제된 분획물 3을 사용하였다.

<175> 수크로스 함량을 약 6% 미만으로 감소시키기 위해 분획물 3을 인산염 완충액에 의한 정용여과에 의해 세척하였다. 선택적으로 이러한 단계는 생략될 수 있다. 이러한 희석된 분획물에 존재하는 인플루엔자 바이러스를 펠렛화시켜 가용성 오염물을 제거하였다.

<176> 펠렛을 재현탁시키고, 완전히 혼합하여 균질의 혼탁액을 수득하였다. 분획물 2와 분획물 3의 재현탁된 펠렛을 풀링시키고, 인산염 완충액을 첨가하여 약 40리터의 용적을 수득하였다. 이러한 생성물이 1가 전체 바이러스 농축물이다.

<177> **나트륨 데옥시콜레이트로의 수크로스 구배 원심분리**

<178> 1가 전체 인플루엔자 바이러스 농축물을 ENI-Mark II 초원심분리기에 가하였다. K3 로터는 선형 구배의 수크로스(0.55%(w/v))를 함유하며, 여기서 나트륨 데옥시콜레이트 구배가 추가적으로 중첩된다. 트윈 80은 스플릿 동안 0.1%(w/v)하로 존재하였으며, B형 균주 바이러스에 있어서는, 토코페릴숙시네이트를 0.5mM 이하로 첨가하였다. 최대 나트륨 데옥시콜레이트 농도는 0.7-1.5%(w/v)이며, 이는 바이러스 균주에 의존적이다. 유속은 8-15리터/시간이다.

<179> 원심분리 말기에, 로터 함유물을 3개의 상이한 분획으로 회수하였으며(수크로스는 굴절계에 의해 측정됨), 분획물 2를 추가의 공정에 사용하였다. 분획물의 수크로스 함량 제한(47-18%)은 바이러스 균주에 따라 상이하며, 평가후 결정된다.

<180> **멀균 여과**

<181> 스플릿 바이러스 분획물을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 0.025%(w/v)의 트윈 80 및 (B형 균주 바이러스에 있어서) 0.5mM의 토코페릴숙시네이트를 함유하는 인산염 완충액을 희석에 사용하였다. 여과된 분획물 2의 최종 용적은 원래의 분획 부피의 5배였다.

<182> **불활성화**

<183> 여과된 1가 물질을 최대 84 시간 동안 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다(바이러스 균주에 따라, 인큐베이션 시간이 단축될 수 있음). 총 단백질 함량을 최대 $450\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 저하시키기 위해 0.025%(w/v)의 트윈 80을 함유하는 인산염 완충액을 첨가하였다. B형 균주 바이러스에 있어서는, 0.025%(w/v)의 트윈 80 및 0.25mM 토코페릴숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수를 가하여 희석시켜 총 단백질 함량을 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 저하시켰다. 포름알데히드를 첨가하여 최종 농도가 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게하고, 72시간 이상 동안 $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 불활성화를 수행하였다.

<184> 초여과

<185> 불활성화된 스플릿 바이러스 물질을, 20kDa MWCO를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 막이 구비된 초여과 장치에서 2 배 이상 농축시켰다. 그 후, 물질을 0.025%(w/v)의 트윈 80을 함유하는 인산염 완충액으로 세척하고, 0.01%(w/v)의 트윈을 함유하는 인산염 완충된 염수로 세척하였다. B형 균주 바이러스에 있어서는, 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 0.1mM 토코페릴숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수를 사용하여 세척하였다.

<186> 최종 멸균 여과

<187> 초여과 후에, 물질을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 필터막을 린스하고, 물질을 필요에 따라 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 (B 바이러스에 있어서) 0.1mM의 토코페릴숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수로 회석시켜 단백질 농도가 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하지 않게 하였다.

<188> 저장

<189> 1가 최종 별크를 최대 18달 동안 2-8°C에서 저장하였다.

<190> 안정도

<191> 표 4. 1가 최종 별크에서 SRD에 의해 측정된 시간에 따른 HA 함량($\mu\text{g}/\text{ml}$) 비교

| 균주 | 안정호제 | 생성 후 | 30°C에서 4주 | 2-8°C에서 6달 |
|----------------|------------|------|-----------|------------|
| B/요한스버그/5/99* | 토코페롤 숙시네이트 | 214 | 196(92%) | 206(96%) |
| B/요한스버그/5/99** | 비함유 | 169 | 107(63%) | 153(90%) |

<193> **토코페릴숙시네이트 없이 실시예 1에 따라 생성됨

<194> 실시예 5b - 티메로살 비함유 백신에 대한 안정화제로서 α-토코페롤 숙시네이트를 사용한 인플루엔자 바이러스 항원 제조물의 제조

<195> 실시예 5a에 기술된 방법의 바람직한 변형은 하기와 같다:

<196> 전체 바이러스의 채취 후에 침전 단계(암모늄 술페이트 침전)를 수행하였다. 그 후, 유체를 완만한 속도의 원심분리에 의해 정화하였다(4000 - 14000g). 이렇게 실시예 5a와 비교하여 침전과 여과 단계의 순서를 바꾸었다.

<197> 그 후, 실시예 5a와 같이 멸균 여과, 초여과 및 초원심분리(수크로스 구배 원심분리) 단계를 수행하였다. 그러나, 초원심분리 단계로부터 생성된 분획물을 재처리하는 단계를 필요하지 않다.

<198> 공정의 잔류 단계는 실시예 5a에 설명되어 있다.

<199> 이와 같이, 본 실시예의 공정을 요약하면 하기와 같다:

<200> 채취

<201> 침전(암모늄 술페이트)

<202> 정화

<203> 멸균 여과

<204> 초여과

<205> 초원심분리

<206> 스플릿팅(바람직하게는, 나트륨 데옥시콜레이트)

<207> 멸균 여과

<208> 불활성화

<209> 초여과

<210> 최종 멸균 여과

<211> 실시예 5a의 또 다른 바람직한 변형은 제 1 멸균 여과 전에 사전 여과 단계를 포함하는 것이다. 이러한 단계는 멸균 여과되지는 않지만, 멸균 여과전에 오염물 예컨대, 알부민을 제거할 수 있는 막을 사용하였다. 이는 더욱 양호한 수율을 수득할 수 있게 한다. 사전여과의 적합한 막은 약 $0.8\mu\text{m}$ 내지 약 $1.8\mu\text{m}$, 예를 들어, $1.2\mu\text{m}$ 이다. 사전여과 단계는 실시예 5a 또는 실시예 5b에 방법에 이용될 수 있다.

<212> 실시예 6 - 티메로살 비합유 백신에 대한 안정화제로서 α-토코페롤 숙시네이트를 사용하여 인플루엔자 백신을 제조하는 방법

<213> 3 균주의 1가 최종 벌크, 즉 A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116, A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17 및 B/야마나쉬/166/98을 실시예 5에 설명된 방법에 따라 생성시켰다.

<214> 풀링

<215> 적합한 양의 1가 최종 벌크를 풀링시켜, A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116 및 A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17에 있어서는 각각 최종 HA 농도가 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 하고, B/요한스버그/5/97에 있어서는 $36\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 하였다. 트윈 80 및 트리톤 X-100을 각각 $580\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $90\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조절하였다. 최종 용적을 인산염 완충된 염수로 3 L로 조절하였다. 3가 풀을 말단이 $0.8\mu\text{m}$ 인 셀룰로오스 아세테이트 막을 사용하여 여과시켜 3가의 최종 벌크를 수득하였다. 3가 최종 벌크를 각각 0.5mL 이상으로 주사기에 충전시켰다.

<216> 표 5. 3가 최종 벌크에서 SRD에 의해 측정된 시간에 따른 HA 농도 비교

| 백신 제형 | 균주 | 0 달 | 30°C에서 4주 | 2-8°C에서 6달 |
|---------------------------|---------------|-----|-----------|------------|
| 안정화제 비합유 인플루엔자 | A/NCa1/20/99 | 31 | 32 | 30 |
| | A/Pan/2007/99 | 31 | 34 | 33 |
| | B/Joh/5/99* | 35 | 25 | 31 |
| 알파-토코페롤 숙시네이트 함유 인플루엔자 백신 | A/NCa1/20/99 | 34 | 35 | 34 |
| | A/Pan/2007/99 | 33 | 33 | 34 |
| | B/Joh/5/99** | 29 | 25 | 28 |

<218> *제형은 $39\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표적 농도를 기준으로 한다. **제형은 $34\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표적 농도를 기준으로 한다.

<219> 실시예 7 - 보존제 비합유 백신에 대한 안정화제로서 나트륨 라우릴 숤페이트를 사용하여 인플루엔자 항원 제조물을 제조하는 방법(티메로살 감소된 백신)

<220> 실시예 1에 설명된 바와 같이 B/요한스버그/5/99의 1가 전체 바이러스 농축물을 수득하였다.

<221> 나트륨 테옥시콜레이트로의 수크로스 구배 원심분리

<222> 1가 전체 인플루엔자 바이러스 농축물을 ENI-Mark II 초원심분리기에 가하였다. K3 로터는 선형 구배의 수크로스($0.55\%(w/v)$)를 함유하며, 여기서 나트륨 테옥시콜레이트 구배가 추가적으로 중첩된다. 트윈 80은 스플릿 동안 $0.1\%(w/v)$ 이하로 존재하였다. 최대 나트륨 테옥시콜레이트 농도는 $0.7\text{-}1.5\%(w/v)$ 이며, 이는 바이러스 균주에 의존적이다. 유속은 8-15 리터/시간이다.

<223> 원심분리 말기에, 로터 함유물을 3개의 상이한 분획으로 회수하였으며(수크로스는 굴절계에 의해 측정됨), 분획 물 2를 추가의 공정에 사용하였다. 분획물의 수크로스 함량 제한(47-18%)은 바이러스 균주에 따라 상이하며, 평가후 결정된다.

<224> 멸균 여과

<225> 10mL의 분획물 2 샘플을 추가의 공정에 사용하였다. 스플릿 바이러스 분획물을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. $0.025\%(w/v)$ 의 트윈 80 및 0.5mM 의 나트륨 라우릴 숤페이트를 함유하는 인산염 완충액을 희석에 사용하였다. 여과된 분획물 2의 최종 용적은 원래의 분획 부피의 5배였다.

<226> 불활성화

<227> 여과된 1가 물질을 최대 84 시간 동안 $22\pm2^{\circ}\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다(바이러스 균주에 따라, 인큐베이션 시간이 단축될 수 있음). 총 단백질 함량을 최대 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 저하시키기 위해 0.025%(w/v)의 트윈 80 및 0.5mM의 나트륨 라우릴 숤페이트를 함유하는 인산염 완충된 염수를 첨가하였다. 포름알데히드를 첨가하여 최종 농도가 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게하고, 72시간 이상 동안 $20^{\circ}\text{C}\pm2^{\circ}\text{C}$ 에서 불활성화를 수행하였다.

초여과

<229> 불활성화된 스플릿 바이러스 물질을, 20kDa MWCO를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 막이 구비된 초여과 장치에서 2배 이상 농축시켰다. 그 후, 물질을 0.001%(w/v)의 트윈 80 및 0.5mM 나트륨 라우릴 숤페이트를 함유하는 4배 용적의 인산염 완충된 염수로 세척하였다.

최종 멸균 여과

<231> 초여과 후에, 물질을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 필터막을 린스하고, 물질을 필요에 따라 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 0.5mM의 나트륨 라우릴 숤페이트를 함유하는 인산염 완충된 염수로 희석시켜 단백질 농도가 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하지 않게 하였다.

저장

<233> 1가 최종 벌크를 $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다.

<234> 표 7. 1가 최종 벌크에서 SRD에 의해 측정된 시간에 따른 HA 함량 비교

| | 안정화제 | 생성 후 | 30°C 에서 4주 |
|--------------|--------------|------|----------------------------|
| B/요한스버그/5/99 | 비함유* | 182 | 139(77%) |
| B/요한스버그/5/99 | 나트륨 라우릴 숤페이트 | 288 | 264(92%) |

<236> * 나트륨 라우릴 숤페이트를 첨가하지 않은채 실시예 7에 따라 생성됨

<237> 실시예 8 - 보존제 비함유 백신에 대한 안정화제로서 플란타케어 또는 라우레스-9를 사용하여 인플루엔자 바이러스 항원 제조물을 제조하는 방법(티메로살 감소된 백신)

<238> 실시예 1에 설명된 바와 같이 B/야마나쉬/166/98의 1가 전체 바이러스 농축물을 수득하였다.

단편화

<240> pH7.4의 인산염 완충된 염수로 1가 전체 인플루엔자 바이러스 농축물을 단백질 농도를 $1,000\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하였다. 플란타케어⁷ 2000 UP 또는 라우레스-9를 첨가하여 최종 농도가 1%(w/v)가 되게하였다. 물질을 30분 동안 서서히 혼합하였다. 그 후, 물질을 베켓에서 수크로스 쿠션 15%(w/w)상에서 중첩되었다. 베멘 스위 아웃 로터 SW 28(Beckman swing out rotor SW 28)에서 초여과를 25,000rpm하에서 2h동안 20°C 에서 수행하였다.

멸균 여과

<242> 상청액을 추가의 공정에 사용하였다. 스플릿 바이러스 분획물을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다.

불활성화

<244> 총 단백질 함량을 최대 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 저하시키기 위해 필요에 따라 인산염 완충된 염수를 첨가하였다. 포름알데히드를 첨가하여 최종 농도가 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게하고, 6일 이상 동안 $20^{\circ}\text{C}\pm2^{\circ}\text{C}$ 에서 불활성화를 수행하였다.

초여과

<246> 불활성화된 물질중의 트윈 80 및 트리톤 X 100을 각각 0.15% 및 0.02%로 조절하였다. 불활성화된 스플릿 바이러스 물질을, 20kDa MWCO를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 막이 구비된 초여과 장치에서 2배 이상 농축시켰다. 그 후, 물질을 4배 용적의 인산염 완충된 염수로 세척하였다.

최종 멸균 여과

<248> 초여과 후에, 물질을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 필터막을 린스하고, 물질을 인산염 완충된 염수로 희석시켜 단백질 농도가 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하지 않게 하였다.

<249> 저장

1가 최종 벌크를 2-8°C에서 저장하였다.

표 8. 1가 최종 벌크에서 SRD에 의해 측정된 시간에 따른 HA 함량 비교

| | 안정화제 | 생성 후 | 30°C에서 4주 |
|------------------|----------------------------|------|------------|
| B/야마나ishi/166/98 | 비합유 | 143 | 98(68%) |
| B/야마나ishi/165/98 | 플란타케어 ⁷ 2000 UP | 476 | 477(100%) |
| B/야마나ishi/165/98 | 라우레스-9 | 468 | 494(>100%) |

<253> 실시예 9 - ID 및 IM 투여에 의한 α-토코페롤 안정화된 인플루엔자 백신의 노인을 대상으로 한 임상 실험(감소된 티메로살)

A. 인플루엔자 바이러스 항원 제조물의 제조 방법

1가 스플릿 백신을 하기 공정에 따라 제조하였다.

바이러스 접종원의 제조

<257> 자충포장란의 접종일에, 0.5mg/ml의 젠타마이신 슬레이트와 25μg/ml의 히드로코르티손을 함유하는 인산염 완충된 염수와 작업 시드 랫과 혼합하므로써 제조하였다(바이러스 균주에 따라). 바이러스 접종원을 2-8°C로 유지시켰다.

<258> 자충포장란의 접종

<259> 9 내지 11일된 자충포장란을 바이러스 복제에 사용하였다. 접질의 오염물을 제거하였다. 자충포장란을 0.2ml의 바이러스 접종원으로 접종시켰다. 접종된 란을 (바이러스계에 따라) 적합한 온도에서 48 내지 96시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 말기에, 냉각시켜 배아를 치사시키고, 란을 2-8°C에서 12-60시간 동안 저장하였다.

<260> 채취

<261> 냉장된 자충포장란으로부터 알란토인성 유체를 채취하였다. 일반적으로, 1개의 란 당 8 내지 10ml의 미가공 알란토인성 유체를 수집하였다.

<262> 알란토인성 유체로부터의 전체 바이러스의 농축물 및 정제

<263> 1. 정화

<264> 채취된 알란토인성 유체를 완만한 속도의 원심분리에 의해 정화하였다(4000 - 14000g).

<265> 2. 흡착 단계

<266> 정화된 바이러스 풀중의 CaHPO₄ 젤을 수득하기 위해, 바이러스 균주에 따라 0.5mol/L의 Na₂HPO₄ 및 0.5mol/L의 CaCl₂ 용액을 첨가하여 CaHPO₄의 최종 농도가 1.5g 내지 3.5g CaHPO₄/리터가 되게 하였다.

<267> 8시간 이상 동안 침전시킨 후, 상청액을 제거하고, 사용되는 CaHPO₄의 양에 따라 0.26mol/L EDTA-Na₂ 용액을 인플루엔자 바이러스를 함유하는 침전물에 첨가하므로써 재용해시켰다.

<268> 3. 여과

<269> 재현탁된 침전물을 6μm 필터막으로 여과하였다.

<270> 4. 수크로스 구배 원심분리

<271> 100μg/ml 티메로살을 함유하는 선형 구배의 수크로스(0.55%(w/v))로 등밀도 원심분리에 의해 인플루엔자 바이러스를 농축시켰다. 유량은 8-15리터/시간이었다.

<272> 원심분리 말기에, 로터 함유물을 4개의 상이한 분획으로 회수하였다(수크로스는 굴절계로 측정됨):

<273> - 분획물 1 55-52% 수크로스

<274> - 분획물 2 약 52-38% 수크로스

<275> - 분획물 3 38-20% 수크로스*

<276> - 분획물 4 20-0% 수크로스

<277> * 바이러스 균주에 따라: 분획물 3의 수크로스는 15% 수크로스로 감소될 수 있다.

<278> 추가의 백신 제조를 위해서는, 단지 분획물 2와 3을 사용하였다.

<279> 수크로스 함량을 약 6% 미만으로 감소시키기 위해 분획물 3을 인산염 완충액에 의한 정용여과에 의해 세척하였다. 이러한 희석된 분획물에 존재하는 인플루엔자 바이러스를 펠렛화시켜 가용성 오염물을 제거하였다.

<280> 펠렛을 재현탁시키고, 완전히 혼합하여 균질의 혼탁액을 수득하였다. 분획물 2와 분획물 3의 재현탁된 펠렛을 풀링시키고, 인산염 완충액을 첨가하여, 120,000란/배취에 적당한 용적인 약 40리터의 용적을 수득하였다. 이러한 생성물이 1가 전체 바이러스 농축물이다.

5. 나트륨 테옥시콜레이트로의 수크로스 구배 원심분리

<282> 1가 전체 인플루엔자 바이러스 농축물을 ENI-Mark II 초원심분리기에 가하였다. K3 로터는 선형 구배의 수크로스(0.55%(w/v))를 함유하며, 여기서 나트륨 테옥시콜레이트 구배가 추가적으로 중첩된다. 트윈 80은 스플릿 동안 0.1%(w/v) 이하로 존재하였으며, B형 균주 바이러스에 있어서는, 토코페롤 숙시네이트를 0.5mM 이하로 첨가하였다. 최대 나트륨 테옥시콜레이트 농도는 0.7-1.5%(w/v)이며, 이는 바이러스 균주에 의존적이다. 유속은 8-15 리터/시간이다.

<283> 원심분리 말기에, 로터 함유물을 3개의 상이한 분획으로 회수하였으며(수크로스는 굴절계에 의해 측정됨), 분획물 2를 추가의 공정에 사용하였다. 분획물의 수크로스 함량 제한(47-18%)은 바이러스 균주에 따라 상이하며, 평가후 결정된다.

6. 멸균 여과

<285> 스플릿 바이러스 분획물을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 0.025%(w/v)의 트윈 80 및 (B형 균주 바이러스에 있어서) 0.5mM의 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충액을 희석에 사용하였다. 여과된 분획물 2의 최종 용적은 원래의 분획 부피의 5배였다.

7. 불활성화

<287> 여과된 1가 물질을 최대 84 시간 동안 $22\pm2^\circ\text{C}$ 에서 인큐베이션하였다(바이러스 균주에 따라, 인큐베이션 시간이 단축될 수 있음). 총 단백질 함량을 최대 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 저하시키기 위해 0.025%(w/v)의 트윈 80을 함유하는 인산염 완충액을 첨가하였다. B형 균주 바이러스에 있어서는, 0.025%(w/v)의 트윈 80 및 0.25mM 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수를 가하여 희석시켜 총 단백질 함량을 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 저하시켰다. 포름알데히드를 첨가하여 최종 농도가 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게하고, 72시간 이상 동안 $20^\circ\text{C}\pm2^\circ\text{C}$ 에서 불활성화를 수행하였다.

8. 초여과

<289> 불활성화된 스플릿 바이러스 물질을, 20kDa MWCO를 갖는 셀룰로오스 아세테이트 막이 구비된 초여과 장치에서 2 배 이상 농축시켰다. 그 후, 물질을 0.025%(w/v)의 트윈 80을 함유하는 인산염 완충액으로 세척하고, 0.01%(w/v)의 트윈을 함유하는 인산염 완충된 염수로 세척하였다. B형 균주 바이러스에 있어서는, 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 0.1mM 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수를 사용하여 세척하였다.

9. 최종 멸균 여과

<291> 초여과 후에, 물질을 말단이 $0.2\mu\text{m}$ 막으로 된 필터막으로 여과시켰다. 필터막을 린스하고, 물질을 필요에 따라 0.01%(w/v)의 트윈 80 및 (B 바이러스에 있어서) 0.1mM의 토코페롤 숙시네이트를 함유하는 인산염 완충된 염수로 희석시켜 단백질 농도는 $1,000\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하지 않게 하고, 헤마글루티닌 농도는 $180\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과하지 않게 하였다.

10. 저장

<293> 1가 최종 벌크를 최대 18달 동안 $2-8^\circ\text{C}$ 에서 저장하였다.

B. 인플루엔자 백신의 제조

<295> 3 균주의 1가 최종 벌크, 즉 A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116, A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17 및 B/요한스버그/5/99를 상기 A 파트에 설명된 방법에 따라 생성시켰다.

풀링

<297> 적합한 양의 1가 최종 벌크를 풀링시켜, A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116 및 A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17에 있어서는 각각 최종 HA 농도가 $60\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 하고, B/요한스버그/5/97에 있어서는 $68\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 하였다. 트윈 80, 트리톤 X-100 및 토포페롤 숙시네이트를 각각 $1,000\mu\text{g}/\text{mL}$, $110\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 $90\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조절하였다. 최종 용적은 인산염 완충된 염수로 3 mL로 조절하였다. 3가 풀을 말단이 $0.8\mu\text{m}$ 인 셀룰로오스 아세테이트 막을 사용하여 여과시켜 3가의 최종 벌크를 수득하였다. 3가 최종 벌크를 각각 0.165mL 이상으로 주사기에 충전시켰다.

백신 투여

<299> 백신을 사전 충전된 주사기에 공급하고, 삼각근 영역에서 피내 투여하였다. 피내투여(ID) 니들은 EP 1092444에 기술되어 있으며, 피부 침투 리미터로 적합한 피내 주입이 가능하게 하였다. 주입 부위에서의 발진(구진) 형성으로 ID 투여의 양호함을 확인할 수 있기 때문에, 대상 관찰자는 백신접종 30분 후에 발진의 정확한 크기를 측정하였다.

<300> 1회 투여량($100\mu\text{l}$)은 하기 성분들을 함유하였다:

| | | |
|------------------------------|---|-----------------------------------|
| 3 인플루엔자 균주로부터의 헤마글루티닌 | | |
| A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116 | : | $6.0\mu\text{g}$ |
| A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17 | : | $6.0\mu\text{g}$ |
| B/요한스버그/5/99 | : | $6.0\mu\text{g}$ |
| 티메로살 보존제 | : | $0.4\mu\text{g} - 0.8\mu\text{g}$ |

<302> B 상기 백신을 표준 3가 스플릿 인플루엔자 백신인 플루아릭스™와 비교하였다. 플루아릭스 백신을 사전 충전된 주사기에 공급하고, 삼각근 영역에서 피내 투여하였다. 2.5cm 이상/1인치 길이(23 표준)의 바늘을 사용하여 적합하게 피내 주입하였다.

<303> 1회 투여량(0.5mL)은 하기 성분들을 함유하였다:

| | | |
|------------------------------|---|-------------------|
| 3 인플루엔자 균주로부터의 헤마글루티닌 | | |
| A/뉴 칼도니아/20/99(H1N1) IVR-116 | : | $15.0\mu\text{g}$ |
| A/파나마/2007/99(H3N2) 레스비르-17 | : | $15.0\mu\text{g}$ |
| B/요한스버그/5/99 | : | $15.0\mu\text{g}$ |
| 티메로살 보존제 | : | $50.0\mu\text{g}$ |

결과

<306> 백신 투여 시간에서 총 접단의 평균 연령은 70.4 ± 6.2 세 표준편차(S.D.)이며, 여성/남성 비는 1.7:1이다.

| 면역원성 결과: 유래된 면역원성 변수 검정은 하기와 같다: | | | | | | | |
|----------------------------------|---|----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| 변수 | | 플루-레드 ID(N=65) | | | 플루아릭스™ IM(N=65) | | |
| | | GMT | LL | UL | GMT | LL | UL |
| A/뉴 칼도니아 | 전 | 99.5 | 76.9 | 128.7 | 90.0 | 70.1 | 115.7 |
| | 후 | 165.1 | 129.2 | 211.0 | 174.3 | 133.3 | 227.9 |
| A/파나마 | 전 | 75.5 | 54.7 | 104.2 | 69.2 | 51.9 | 92.4 |
| | 후 | 128.6 | 99.1 | 166.8 | 164.3 | 126.0 | 214.1 |
| B/요한스버그 | 전 | 236.0 | 187.7 | 296.8 | 222.6 | 176.9 | 280.2 |
| | 후 | 341.2 | 276.0 | 421.7 | 402.4 | 312.1 | 518.9 |
| 혈청전환율 | | % | LL | UL | % | LL | UL |
| A/뉴 칼도니아 | | 15.4 | 7.6 | 36.5 | 18.5 | 9.9 | 30.0 |
| A/파나마 | | 20.0 | 11.1 | 31.8 | 29.2 | 18.6 | 41.8 |

| | | | | | | | |
|--------------|---|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| B/요한스버그 | | 9.2 | 3.5 | 19.0 | 16.9 | 8.8 | 28.3 |
| 전환 인수 | | GMR | LL | UL | GMR | LL | UL |
| A/뉴 칼도니아 | | 1.7 | 1.4 | 2.0 | 1.9 | 1.6 | 2.3 |
| A/파나마 | | 1.7 | 1.4 | 2.1 | 2.4 | 1.9 | 3.0 |
| B/요한스버그 | | 1.4 | 1.2 | 1.7 | 1.8 | 1.5 | 2.1 |
| 혈청보호율 | | % | LL | UL | % | LL | UL |
| A/뉴 칼도니아 | 전 | 87.7 | 77.2 | 94.5 | 90.8 | 81.0 | 96.5 |
| | 후 | 92.3 | 83.0 | 97.5 | 96.9 | 89.3 | 99.6 |
| A/파나마 | 전 | 75.4 | 63.1 | 85.2 | 81.5 | 70.0 | 90.1 |
| | 후 | 90.8 | 81.0 | 96.5 | 93.8 | 85.0 | 98.3 |
| B/요한스버그 | 전 | 98.5 | 91.7 | 100.0 | 96.9 | 89.3 | 99.6 |
| | 후 | 100.0 | 94.5 | 100.0 | 98.5 | 91.7 | 100.0 |

N: 허용가능한 결과를 갖는 대상의 수: %: 제공된 파라미터내에 존재하는 피검체의 백분율;

LL/UL: 95%CI의 하한값 및 상한값; 전: 백신 투여 전; 후: 백신 투여하고 21일 후

<308> 10/65(15.4%) 백신에 의해 보고된 주입 부위 통증은 플루아릭스™의 IM 투여 후의 가장 일반적인 증상이다. ID 군에서, 통증은 3/65(4.6%) 백신에서 유발되었다. 이러한 차이는 통계학적으로 상당한 값에 해당한다($p=0.038$; 피셔 추출 시험). 따라서, 티메로살 감소된 생성물의 ID 전달이 바람직하다.

<309> 결론

<310> 노인 집단에서 티오-감소된 인플루엔자 백신의 ID 및 IM 투여는 100% 혈청보호율을 나타내었다.

<311> 기하평균 역가, 혈청보호율, 혈청전환율 및 전환 인수에 대한 백신접종에 대한 비교가능한 반응을 IM 및 ID 백신접종한 개체에서 확인하였으며, 여기서 ID군에는 2.5배 적은 양의 항원을 처리하였다. 두 처리군에서 백신-관련 유도된/비유도된 전신 증상의 전반적인 발생에 대한 식별가능한 차이는 관찰되지 않았다.

<312> 실시예 10 - 티메로살-감소된 인플루엔자 백신의 피내 전달

<313> 실시예 9에 설명된 바와 같이 제조된(단 플링은 독립적으로 수행되며, 백신을 주사기로 충전시키지 않았음) 티메로살 감소된 스플릿 인플루엔자 백신의 면역원성을 표준 니들을 사용하여 기니아 피그에 ID 전달하여 평가하였다.

<314> 각 5마리 군을 총 $200\mu\text{l}$ 용적중에 각각 $5\mu\text{g}$ 의 HA를 함유하는 불활성화된 3가 전체 인플루엔자 바이러스로 비내로 프라이밍시켰다. 프라이밍시키고 28일 후, 상기 동물들을 피내 또는 근내 경로를 통해 백신접종시켰다. 0.1, 0.3 또는 $1.0\mu\text{g}$ 의 3가 티메로살-감소된 스플릿 인플루엔자를 함유하는 0.1ml 의 피내 투여량을 표준 니들을 사용하여 기니아 피그의 등에 투여하였다. $1.0\mu\text{g}$ 의 3가 티메로살-감소된 스플릿 인플루엔자를 포함하는 0.1ml 의 근내 투여량을 기니아 피그의 뒷다리에 투여하였다. 군은 하기와 같다:

- <315> · 군 1 - $0.1\mu\text{g}$ 의 3가 티메로살-감소된 스플릿 인플루엔자 ID;
- <316> · 군 2 - $0.3\mu\text{g}$ 의 3가 티메로살-감소된 스플릿 인플루엔자 ID;
- <317> · 군 3 - $1.0\mu\text{g}$ 의 3가 티메로살-감소된 스플릿 인플루엔자 ID;
- <318> · 군 4 - $1.0\mu\text{g}$ 의 3가 티메로살-감소된 스플릿 인플루엔자 ID;

<319> 백신접종 14일 후에, 동물을 체혈하여, 표준 혜마글루틴화 억제 검정법(HI)을 이용하여 백신접종에 의해 유도된 항체 역가를 평가하였다. 결과는 도 1에 도시되어 있다. 백신접종에 의해 모든 3 군주에 대해 강한 HI 반응을 유발시켰다. ID 경로로 투여할 경우, 매우 낮은 용량의 티메로살-감소된 항원이 매우 유효한 HI 항체 반응을 유발할 수 있다는 것을 암시하는 어떤 명백한 반응도 관찰되지 않았다. ID 또는 IM 백신접종에 의해 유도된 HI 역가간의 현저한 차이는 관찰되지 않았다. 따라서, 기니아 피그로부터 수득된 결과는 티어머살-감소된 3가 스플릿 인플루엔자 항원이 IM 경로와 비교하여 ID 경로로 투여될 경우, 동물에서 유사한 수준의 HI 항체를 유도한다는 것을 확인시켜 주었다.

<320> 실시예 11 - 티메로살-감소되고, 보조된 인플루엔자 백신의 피내 전달

<321> 프로토콜

<322> 기니아 피그를 0일째에 200 μl 중의 5 μg 3가 전체 불활성화된 인플루엔자 바이러스로 비내로 프라이밍시켰다.

<323> 백신접종 - 28일 - 실시예 9에 설명된 바와 같이(단, 풀링 단계로 실시예 9에서의 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 비교하여, 100 μl 중에 0.1 μg 의 용량을 제공하도록 각각 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항원에 대한 최종 농도를 유도하였다) 균주 3가 스플릿 인플루엔자 당 0.1 μg HA를 함유하는 백신을 제조하였다. 100 μl 의 보조되거나 비보조된 최종 3가 제형을 투베르큘린 주사기를 사용하여 피내 투여하였다.

<324> 채혈 - 42일

<325> 보조화 효과를 HI 검정에 의해 항체 반응을 측정하므로써 평가하였다(0, 28, 42일).

<326> 모든 ID 실험을 표준 니들로 수행하였다.

<327> 결과

<328> G1 - G5는 군당 5마리의 기니아 피그의 5군을 의미하다.

<329> G1 스플릿 3가 티메로살 감소된 0.1 μg

<330> G2 스플릿 3가 티오 레드 0.1 μg + 3D-MPL 50 μg

<331> G3 스플릿 3가 티오 레드 0.1 μg + 3D-MPL 10 μg

<332> G4 스플릿 3가 티오 레드 0.1 μg + 3D-MPLin 50 μg + QS21 50 μg

<333> G5 스플릿 3가 티오 레드 0.1 μg + 3D-MPLin 10 μg + QS21 10 μg

<334> 3D-MPLIN + QS21은 콜레스테롤을 포함하며, 디올레오일을 포함하는 리피드 이중층을 갖는 유니라멜라 소포를 포함하는 보조 제형으로서, 여기서 QS21 및 3D-MPL은 리피드 이중층과 관련되거나 이중층내에 포함된다. 이러한 애쥬번트 제형은 본원에 참고문헌으로 인용된 EP 0 822 831 B에 기술되어 있다.

<335> HI 역가 안티-A/뉴 칼도니아/20/99

<336>

| NC | 사전-면역 | 백신접종 전-상승 | 백신접종 후-상승 |
|----|-------|-----------|-----------|
| G1 | 5 | 10 | 92 |
| G2 | 5 | 10 | 70 |
| G3 | 5 | 11 | 121 |
| G4 | 7 | 9 | 368 |
| G5 | 5 | 10 | 243 |

<337> HI 역가 안티-A/파나마/2007/99

<338>

| P | 사전-면역 | 백신접종 전-상승 | 백신접종 후-상승 |
|----|-------|-----------|-----------|
| G1 | 5 | 485 | 7760 |
| G2 | 5 | 279 | 7760 |
| G3 | 5 | 485 | 8914 |
| G4 | 7 | 485 | 47051 |
| G5 | 5 | 320 | 17829 |

<339> HI 역가 안티-B/요한스버그/5/99

<340>

| J | 사전-면역 | 백신접종 전-상승 | 백신접종 후-상승 |
|----|-------|-----------|-----------|
| G1 | 5 | 23 | 184 |
| G2 | 5 | 11 | 121 |
| G3 | 5 | 11 | 70 |
| G4 | 6 | 15 | 557 |
| G5 | 5 | 13 | 320 |

<341> 이와 같이, 보조 여부에 상관없이, 티어머살-감소된 3가 스플릿 인플루엔자 항원은 효능있는 면역원이며, ID 또

는 IM 경로에 의해 투여될 경우 강한 HI 반응을 유발할 수 있다. 이러한 반응은 표준 플루아릭스 제조물에 의해 유도된 반응 이상으로 효능있는 것으로 보여진다.

실시예 12 - 돼지에서 피내로 전달된 티메로살-함유 백신과 티메로살-비함유 백신의 비교

ID 경로에 의해 투여된 스플릿 인플루엔자 백신(티메로살 함유 및 비함유)의 면역원성을 평가하기 위해, 프라이밍된 돼지 모델을 사용하였다. 집단원의 대부분의 사람은 인플루엔자에 의해 한번 이상은 감염되었기 때문에, 인플루엔자 백신은 이미 존재하는 면역 반응을 상승시킬 수 있을 것이다. 따라서, 사람의 상황을 가장 잘 모방하기 위한 노력으로서 동물은 프라이밍시켰다.

이 실험에서, 4주된 돼지를 비내 경로에 의해 프라이밍시켰다. 6군의 각각의 5마리를 하기와 같이 프라이밍시켰다:

군 1 - 0 및 14일에 3가 전체 불활성화된 바이러스(각각 HA 50 μ g)로 2회 프라이밍; 군 2 - 0 및 14일에 3가 전체 불활성화된 바이러스(각각 HA 50 μ g)로 2회 프라이밍; 군 3 - 0일에 3가 전체 불활성화된 바이러스(각각 HA 50 μ g)로 1회 프라이밍; 군 4 - 0 및 14일에 3가 전체 불활성화된 바이러스(각각 HA 25 μ g)로 2회 프라이밍; 군 5 - 0일에 3가 전체 불활성화된 바이러스(각각 HA 25 μ g)로 1회 프라이밍; 군 6 - 0 및 14일에 3가 전체 불활성화된 바이러스(각각 HA 12.5 μ g)로 2회 프라이밍.

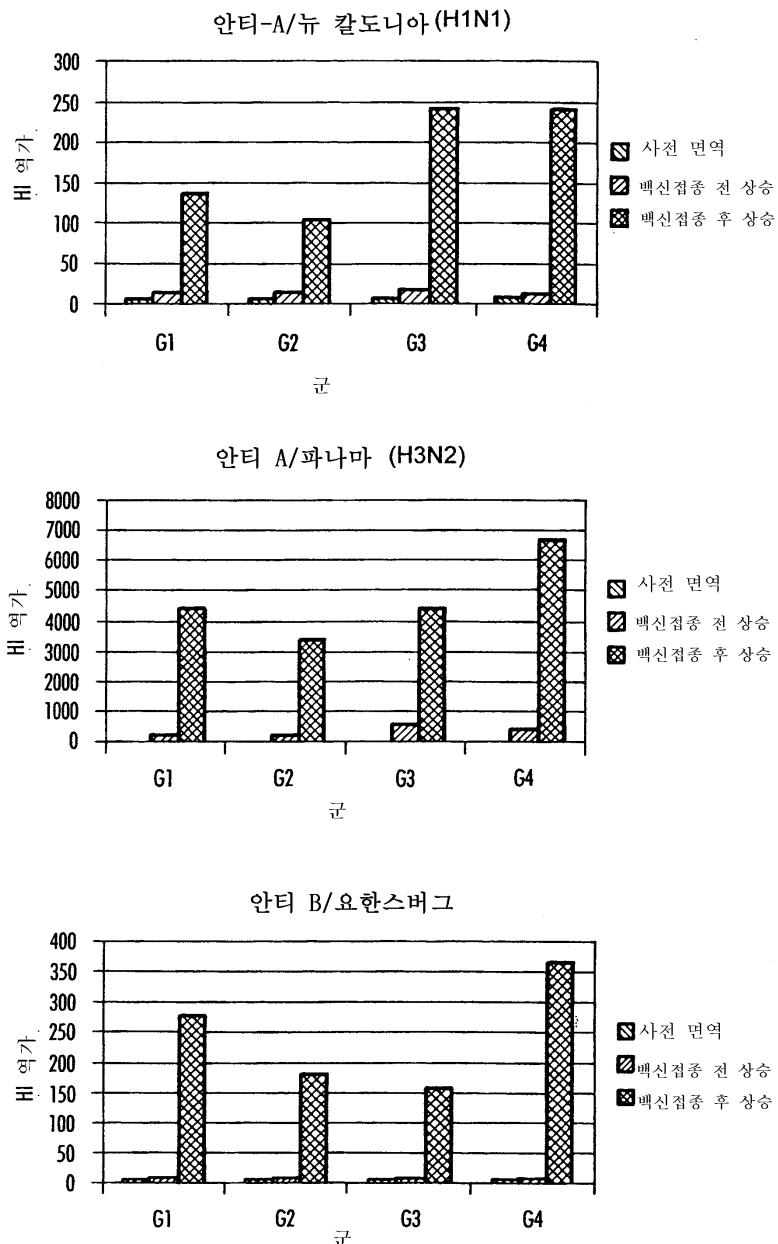
28일에 최종 프라이밍하고, 동물을 ID 경로에 의해 100 μ l중의 각각의 3 μ g의 HA 3가 스플릿 항원(균주 A/뉴 칼도니아 H1N1, A/파나마 H3N 및 B/요한스버그)로 백신접종하였다. 군 1에 백신 항원으로서 티메로살 보존제를 함유하를 표준 플루아릭스TM를 투여하였다. 나머지 모든 군에는 보존제 비함유 항원을 투여하였다.

이러한 실험으로부 수득된 HI 결과는 도 2에 도시하였다(다양한 용량의 항원으로 프라이밍되고, 피내 경로에 의해 티메로살 함유 또는 비함유 3가 인플루엔자 항원 3 μ g으로 백신접종한 돼지에서 유도된 안티-인플루엔자 혈마글루틴화 억제 역가).

본 실험에서 B형 균주에 대한 비교적 낮은 HI 역가가 유도되었으며, A/H3N2 균주에 대한 상태는 높았다. 백신 접종에 있어서의 유리한 효과는 프라이밍 용량이 감소된 경우 관찰되었다. 대부분의 경우, 항원 농도 또는 프라이밍 처리(50 μ g으로 2회 프라이밍) 횟수의 감소는 백신접종에 대한 증가된 반응을 유도하였다. 백신접종을 위해 50 μ g으로 2회 프라이밍된 군 1 및 2에서 동물의 반응이 분명하지는 않지만, 보존제 비함유 항원(군 2)이 이러한 조건하에서 플루아릭스TM(군 1) 이상으로 작용하는 것이 분명하다. 택일적으로 프라이밍된 동물(군 3-6)에서 ID 경로에 의해 투여된 보존제 비함유 3가 인플루엔자로의 백신접종에 대한 강한 반응이 명백하였으며, HI 역가가 낮게 유지됨에도 불구하고, B형 균주에 있어서도 이러한 반응이 관찰되었다.

도면

도면1

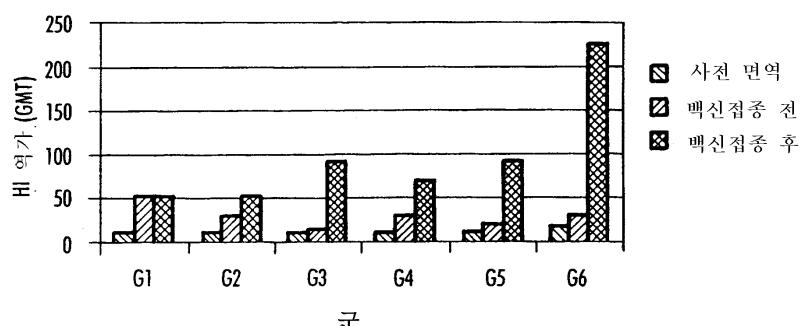


도면2

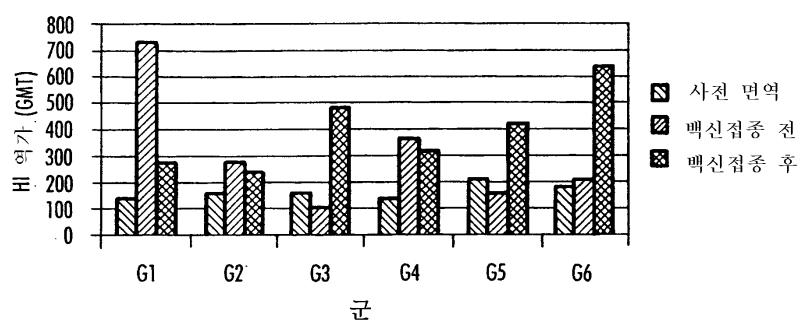
군 1: 2 IN 프라이밍 : 티오 + Ag
 군 2: 2 IN 프라이밍 : 티오 레드
 군 3: 1 IN 프라이밍 : 티오 레드

군 4: 2 IN 프라이밍 : 티오 레드
 군 5: 1 IN 프라이밍 : 티오 레드
 군 6: 2 IN 프라이밍 : 티오 레드

안티-A/뉴 칼도니아 H1N1



안티 A/파나마 H3N2



안티 B/요한스버그

