



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월19일
(11) 등록번호 10-1960102
(24) 등록일자 2019년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7030060(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년04월15일
심사청구일자 2016년04월14일
(85) 번역문제출일자 2012년11월16일
(65) 공개번호 10-2013-0064741
(43) 공개일자 2013년06월18일
(62) 원출원 특허 10-2012-7025573
원출원일자(국제) 2011년04월15일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2011/002225
(87) 국제공개번호 WO 2011/129120
국제공개일자 2011년10월20일
(30) 우선권주장
61/324,542 2010년04월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Pharmaceutical Research 2008, 25(6),
1256-1273.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
신 니뽀 바이오메디칼 라보라토리즈, 엘티디.
일본국 891-1305 카고시마켄 카고시마시 미야노우
라쵸 2438
케이엠 바이올로지스 가부시기가이샤
일본 구마모토켄 구마모토시 기타쿠 오쿠보 1쵸메
6방 1고
(72) 발명자
나가타, 료이치
일본 8900081 가고시마 가고시마-시 도소 4-21-1
하루타, 순지
일본 8900041 가고시마 가고시마-시 조세이 2-9-3
(74) 대리인
양영준

전체 청구항 수 : 총 18 항

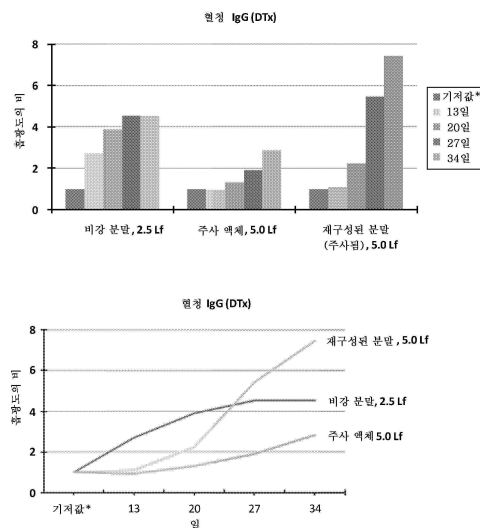
심사관 : 이민정

(54) 발명의 명칭 비강내 전달을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

건조 백신 분말 제형을 생성하는 방법이 본원에서 제공된다. 건조 백신 분말 제형은 비강내 전달로 사용될 수 있다. 또한, 비강내 백신 전달에 의해 국소 점막 및 전신 면역을 자극하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도17b



명세서

청구범위

청구항 1

- a. 하나 이상의 항원 및 하나 이상의 사카라이드를 포함하는 액체 제형을 제조하고, 여기서 하나 이상의 항원 및 하나 이상의 사카라이드의 중량비는 1:1 내지 1:100인 것인 단계;
- b. 상기 액체 제형을 1 내지 20분 동안 액체 질소에 접촉시킴으로써 급속 동결시켜 분쇄 공정 없이 10 내지 100 μm 의 평균 입경 크기를 갖는 동결-건조된 샘플을 형성하고, 여기서 급속 동결은 분무 동결을 포함하지 않는 것인 단계; 및
- c. 동결-건조된 샘플을 하나 이상의 부형제와 블렌딩하여 비강내 건조 백신 분말 제형을 생성하는 단계를 포함하는, 비강내 건조 백신 분말 제형의 생성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 바이러스 항원인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 인플루엔자 바이러스인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 H1N1 인플루엔자 바이러스인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 H5N1 인플루엔자 바이러스인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원이 H1N1 인플루엔자 바이러스, H3N2 인플루엔자 바이러스 또는 인플루엔자 B 바이러스인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 약독화 생 바이러스, 불활성화 전 바이러스, 분할 바이러스, 서브유닛 항원, 비로솜 또는 한랭-적응 인플루엔자 생 바이러스인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 박테리아 항원인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 사멸된 전 박테리아, 약독화 박테리아, 독소이드, 정제된 표면 단백질 또는 정제된 재조합 표면 단백질인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 과상독 독소이드인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 디프테리아 독소이드인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 원생생물 항원인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 중 적어도 하나가 단백질인 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 사카라이드 중 적어도 하나가 락토스인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 사카라이드 중 적어도 하나가 트레할로스인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 사카라이드 중 적어도 하나가 만니톨인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 액체 제형을 제조하는 단계가 하나 이상의 완충제를 첨가하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 완충제 중 적어도 하나가 포스페이트 완충제인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 교차-참조

[0002] 본 출원은 그의 전문이 본원에 참고로 포함된 2010년 4월 15일에 출원한 미국 가출원 일련번호 제61/324,542호의 이점을 청구한다.

배경 기술

[0003] 액체로 제형화된 인플루엔자 백신은 화학적 분해, 예를 들어 응집, 변성, 가수분해 및 산화되어 그의 불활성화를 초래할 수 있다. 또한, 액체 백신 제형은 온도에 민감할 수 있다: 고온은 불활성화를 증가시킬 수 있고, 동결 온도는 이를 얼려 백신 내 항원을 손상시킬 수 있다. 따라서, 불활성화를 막기 위해서, 액체 백신은 종종 2 내지 8℃의 온도 범위에서 보관 및 유통된다. 이러한 보관은 백신의 장기 보관 및 수송 둘 다에 대해서 및 기한만료로 인한 백신 손실로 인해 비용이 많이 들 수 있다. 실온에서 안정한 백신의 제조는 보관에 있어서 비용을 절감시키고, 비축을 용이하게 할 것이다. 실온에서 안정한 백신 제형, 예컨대 건조 분말 백신의 생성 방법이 필요하다.

[0004] 백신을 동결-건조하는 몇 가지 방법이 기술된 바 있다. 예를 들어, 인플루엔자 백신 용액의 냉동 건조 (동결-건조)를 이용하여 백신 분말을 생성할 수 있다. 그러나, 이 방법으로 생성된 인플루엔자 백신 분말은 단단한 덩어리일 수 있으며, 이는 일관되고 신뢰성 있는 투여에 용이하지 않다. 인플루엔자 백신 용액의 분무-동결-건조 (SFD)는 인플루엔자 백신 분말의 미립자를 제공할 수 있지만, SFD는 고-비용 방법이다. 따라서, 비교적 높은 유통성 및 비교적 낮은 흡습성을 갖는 미세 분말 백신을 생성하는 저-비용 방법이 필요하다.

[0005] 백신의 투여 방식은 그의 효능에 대해 역할을 할 수 있다. 하나의 투여 방식인 비-주사형 투여 (예를 들어, 비강)는 점막 및 전신 체액성 및 세포 매개 면역 반응을 유도 및 촉진할 수 있다. 점막 백신접종은 기도 및 구강 이후 영역에서의 분비성 IgA (sIgA) 반응을 유도할 수 있다. 점막 sIgA 항체의 한가지 특징은 이들이 항원성이

상이한 바이러스에 대해 교차-보호를 제공할 수 있다는 점이고, 따라서 점막 sIgA 반응은 백신을 생성하는 데 사용되는 균주로부터 소변이된(drift) 바이러스 균주 (예를 들어, 인플루엔자 바이러스 H1N1은 H2N1 또는 H1N2로 소변이될 수 있음)에 대해 보호를 제공할 가능성을 갖는다. 또한, sIgA는 점막 표면에서 바이러스 또는 다른 병원균의 결합을 도와, 보다 깊은 조직으로 병원균이 접근하는 것을 막고/거나 감염이 완전히 진행될 가능성을 감소시킬 수 있다. sIgA 유도 백신, 예를 들어 비-주사형 투여용 분말 백신 제형의 신규 생성 방법이 본원에 기재된다.

발명의 내용

[0006] <발명의 개요>

[0007] 하나 이상의 항원, 하나 이상의 사카라이드, 하나 이상의 완충제; 및 미세결정성 셀룰로스를 포함하는 건조 백신 분말 제형이 본원에 개시되어 있다. 본원에 기재된 백신 분말 제형 내 항원은 바이러스 항원일 수 있다. 바이러스 항원은 약독화 생 바이러스, 불활성화 전 바이러스, 분할-불활성화 바이러스, 서브유닛 항원, 비로솜 또는 한랭-적응 인플루엔자 생 바이러스일 수 있다. 바이러스 항원은 인플루엔자 바이러스일 수 있고, 예를 들어 항원은 H1N1; 또는 H5N1; 또는 H1N1, H3N2 및 인플루엔자 B형의 혼합물일 수 있다. 본원에 기재된 백신 분말 제형 내 항원은 박테리아 항원일 수 있다. 박테리아 항원은 사멸된 전 박테리아, 약독화 박테리아, 독소이드, 정제된 표면 단백질 또는 정제된 재조합 표면 단백질일 수 있다. 박테리아 항원은 파상풍 독소이드 또는 디프테리아 독소이드일 수 있다. 건조 백신 분말 제형 내 항원은 또한 원생동물일 수 있다. 또한, 항원은 단백질일 수 있다. 사용되는 사카라이드는 트레할로스, 만니톨 또는 락토스일 수 있다. 사용되는 사카라이드는 트레할로스일 수 있다. 사용되는 완충제는 포스페이트 완충제일 수 있다. 본원에 기재된 백신 분말 제형은 실온 및 60% 상대 습도에서 12개월 이상 동안 안정할 수 있다.

[0008] 또한, 항원을 포함하는 액체 제형을 제조하는 단계; 상기 액체 제형을 급속 동결시키고, 여기서 급속 동결은 분무 동결을 포함하지 않는 것인 단계; 동결-건조된 샘플을 하나 이상의 부형제와 블렌딩하여 건조 백신 분말 제형을 생성하는 단계를 포함하는, 건조 백신 분말 제형의 생성 방법이 제공된다. 바이러스 항원은 약독화 생 바이러스, 불활성화 전 바이러스, 분할-불활성화 바이러스, 서브유닛 항원, 비로솜 또는 한랭-적응 인플루엔자 생 바이러스일 수 있다. 바이러스 항원은 인플루엔자 바이러스일 수 있고, 예를 들어 항원은 H1N1; 또는 H5N1; 또는 H1N1, H3N2 및 인플루엔자 B형의 혼합물일 수 있다. 본원에 기재된 백신 분말 제형 내 항원은 박테리아 항원일 수 있다. 박테리아 항원은 사멸된 전 박테리아, 약독화 박테리아, 독소이드, 정제된 표면 단백질 또는 정제된 재조합 표면 단백질일 수 있다. 박테리아 항원은 파상풍 독소이드 또는 디프테리아 독소이드일 수 있다. 또한, 건조 백신 분말 제형 내 항원은 원생동물일 수 있다. 또한, 항원은 단백질일 수 있다. 액체 제형의 제조는 사카라이드, 예를 들어 트레할로스, 만니톨 또는 락토스의 첨가를 포함할 수 있다. 또한, 액체 제형의 제조는 완충제, 예컨대 포스페이트 완충제의 첨가를 포함할 수 있다. 분말은 미립자를 포함할 수 있다. 분말은 실온 및 60% 상대 습도에서 12개월 이상 동안 안정할 수 있다. 본원에 기재된 방법에서 유용한 부형제는 하나 이상의 비강 담체, 예컨대 미세결정성 셀룰로스 및 제3인산칼슘을 포함할 수 있다. 부형제는 분말의 유동성을 개선시키고/거나 분말의 흡습성을 감소시킬 수 있다. 본 방법에 의해 생성된 몇몇 백신 분말은 아주반트를 포함하지 않는다. 급속 동결은 액체 질소의 사용을 포함할 수 있다.

[0009] 본원에서 제공되는 또 다른 방법은, 대상체에게 건조 백신 분말 제형을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 항원에 대한 sIgA 반응을 자극하는 방법이며, 여기서 건조 분말 제형은 항원을 포함하고, 건조 분말 제형은 액체 백신 제형의 급속 동결에 의해 제조되며, 급속 동결은 분무-동결을 포함하지 않는다. 몇몇 예에서, IgG 반응도 또한 자극한다. sIgA 생성은 투여 부위 및/또는 투여 부위 이외의 점막 부위에서 자극될 수 있다. 투여는 비강내일 수 있다. 본원에 기재된 백신 분말 제형 내 항원은 바이러스 항원일 수 있다. 바이러스 항원은 약독화 생 바이러스, 불활성화 전 바이러스, 분할-불활성화 바이러스, 서브유닛 항원, 비로솜 또는 한랭-적응 인플루엔자 생 바이러스일 수 있다. 바이러스 항원은 인플루엔자 바이러스일 수 있고, 예를 들어 항원은 H1N1; 또는 H5N1; 또는 H1N1, H3N2 및 인플루엔자 B형의 혼합물일 수 있다. 본원에 기재된 백신 분말 제형 내 항원은 박테리아 항원일 수 있다. 박테리아 항원은 사멸된 전 박테리아, 약독화 박테리아, 독소이드, 정제된 표면 단백질 또는 정제된 재조합 표면 단백질일 수 있다. 박테리아 항원은 파상풍 독소이드 또는 디프테리아 독소이드일 수 있다. 또한, 건조 백신 분말 제형 내 항원은 원생동물일 수 있다. 또한, 항원은 단백질일 수 있다. 액체 제형의 제조는 사카라이드, 예를 들어 트레할로스, 만니톨 또는 락토스의 첨가를 포함할 수 있다. 또한, 액체 제형의 제조는 완충제, 예컨대 포스페이트 완충제의 첨가를 포함할 수 있다. 분말은 미립자를 포함할 수 있다. 분말은 실온 및 60% 상대 습도에서 12개월 이상 동안 안정할 수 있다. 본원에 기재된 방법에서 유용한 부형제

는 하나 이상의 비강 담체, 예컨대 미세결정성 셀룰로스 및 제3인산칼슘을 포함할 수 있다. 부형제는 분말의 유동성을 개선시키고/거나 분말의 흡습성을 감소시킬 수 있다.

[0010] 또한, 본원에 개시된 백신 분말 제형의 투여용 장치가 본원에서 제공된다. 상기 장치는 1회용으로 설정될 수 있다.

[0011] 참고 포함

[0012] 본 명세서에서 언급된 모든 공개공보, 특허 및 특허 출원은, 각각의 개별 공개공보, 특허 또는 특허 출원이 참고로 포함된 것으로 명확하게 및 개별적으로 명시된 바와 동일한 정도로 본원에 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 본 발명의 신규 특징은 첨부된 특허청구범위에 구체적으로 명시되어 있다. 본 발명의 특징 및 이점의 보다 양호한 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 명시한 하기 상세한 설명 및 다음의 첨부된 도면을 참고하여 얻어질 것이다.

[도 1] 도 1은 트레할로스, 만니톨 및 락토스를 사용하는 통상적인 완만 동결 및 동결-건조 방법을 이용하여 생성된 인플루엔자 백신 분말의 특성을 예시한다.

[도 2] 도 2는 액체 질소를 이용한 급속 동결로 건조 비강 백신 분말 제형을 제조하는 방법을 예시한다. 또한, 비강 담체를 첨가하기 전과 후의 분말의 예시적인 특성이 기재되어 있다.

[도 3] 도 3은 제공된 발명의 제조 방법의 실시양태를 예시한다.

[도 4] 도 4는 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형을 시험하기 위한 연구 설계를 예시한다.

[도 5a] 도 5a는 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 혈청 샘플에서 측정된 HI 역가를 표로 나타낸다.

[도 5b] 도 5b는 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 비강 세척액 샘플에서 측정된 HI 역가를 표로 나타낸다.

[도 6a] 도 6a는 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 6b] 도 6b는 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 비강 세척액 sIgA 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 7] 도 7은 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 측정된 IgG 및 sIgA 항체 역가를 그래프로 예시한다.

[도 8] 도 8은 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 혈청 및 비강 세척액 샘플에서 측정된 HI 역가를 표로 나타낸다.

[도 9] 도 9는 H1N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG 및 비강 세척액 sIgA 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 10] 도 10은 H5N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형을 시험하기 위한 연구 설계를 예시한다.

[도 11a] 도 11a는 H5N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 11b] 도 11b는 H5N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 비강 세척액 sIgA 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 12] 도 12는 H5N1 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 시험 중에 측정된 IgG 및 sIgA 항체 역가를 그래프로 예시한다.

[도 13] 도 13은 파상풍 독소이드 비강 백신 분말 제형을 시험하기 위한 연구 설계를 예시한다.

[도 14a] 도 14a는 파상풍 독소이드 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG의 흡광도 비를 표로 나타낸다.

[도 14b] 도 14b는 과상풍 독소이드 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG의 흡광도 비를 그래프로 예시한다.

[도 15] 도 15는 과상풍 독소이드 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 IFN 감마 수준을 표로 나타낸다.

[도 16] 도 16은 디프테리아 독소이드 비강 백신 분말 제형을 시험하기 위한 연구 설계를 예시한다.

[도 17a] 도 17a는 디프테리아 독소이드 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 17b] 도 17b는 디프테리아 독소이드 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG 항체 역가를 그래프로 예시한다.

[도 18] 도 18은 균질화된 난백알부민 비강 백신 분말 제형을 시험하기 위한 연구 설계를 예시한다.

[도 19a] 도 19a는 균질화된 난백알부민 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 19b] 도 19b는 균질화된 난백알부민 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 혈청 IgG 항체 역가를 그래프로 예시한다.

[도 20a] 도 20a는 균질화된 난백알부민 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 비강 세척액 sIgA 항체 역가를 표로 나타낸다.

[도 20b] 도 20b는 균질화된 난백알부민 비강 백신 분말 제형의 시험 중에 수집한 샘플에서 측정된 비강 세척액 sIgA 항체 역가를 그래프로 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시양태의 설명

본 발명의 상세한 설명

I. 개요

액체 인플루엔자 백신 제형을 위한 통상적인 동결-건조 방법, 예컨대 24시간에 걸쳐 실온에서 -40℃로 냉각시키는 방법은, 준최적의 입자 특성 또는 항원 (예를 들어, 인플루엔자 적혈구응집소 (HA)) 효력의 손실을 야기할 수 있다 (도 1). 예를 들어, 통상적인 동결-건조 방법에 노출된, 트레할로스를 포함하는 액체 인플루엔자 백신 제형은 부분적으로 덩어리진 분말을 형성할 수 있다 (도 1). 통상적인 동결-건조 방법에 노출된, 만니톨을 포함하는 액체 인플루엔자 백신 제형은 감소된 HA 효력을 가질 수 있다 (도 1). 통상적인 동결-건조 방법에 노출된, 락토스를 포함하는 액체 인플루엔자 백신 제형은 부분적으로 덩어리진 분말을 형성할 수 있고, 감소된 HA 효력을 가질 수 있다 (도 1).

본 개시내용은, 종래 동결 건조 방법의 한계점을 극복하여 높은 유동성을 갖는 높은 효력의 분말화된 백신을 생성하는, 급속 동결 단계를 포함하는 건조 백신 분말 제형을 생성하기 위한 방법을 제공한다 (예를 들어, 도 2 및 3 참조). 상기 방법은 하나 이상의 작용제 (예를 들어, 사카라이드 및/또는 완충제, 예를 들어 포스페이트 완충제)와 함께 하나 이상의 항원, 예컨대 병원균 또는 그의 성분 (예를 들어, 불활성화 인플루엔자 전 바이러스)을 함유하는 액체 제형을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 액체 백신 제형을 동결-건조 (예를 들어, 액체 질소에서의 급속 동결 포함)시켜, 분말 (예를 들어, 백신 분말)을 생성할 수 있다. 분말은 미립자를 포함할 수 있고, 실온에서 안정할 수 있다. 항원이 인플루엔자 바이러스인 경우, 분말은 높은 HA 효력 (예를 들어, 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)을 가질 수 있다. 동결 건조 후, 분말을 하나 이상의 부형제 (예를 들어, 비강 담체 및/또는 유동성 작용제)와 블렌딩하여 (예를 들어, 볼텍싱함으로써) 건조 백신 분말 제형을 형성할 수 있다.

본원에 기재된 건조 백신 분말 제형은 실온에서 안정할 수 있다. 이는, 실온에서 불안정하여 냉장 조건하의 고가의 보관 및 유통 (예를 들어, 콜드-체인(cold-chain) 유통)을 요구할 수 있는 액체 인플루엔자 백신에 비해 발전된 것이다. 몇몇의 백신 제조의 경우, 디사카라이드, 예를 들어 트레할로스 또는 락토스를 함유하는 액체 제형이 제조된다. 이러한 첨가제는 일반적으로 건조 인플루엔자 백신 분말 제형의 HA 효력이 유지되게 한다. 이러한 사카라이드 성분의 사용이 공지되어 있지만, 본원에 기재된 방법은 이러한 사카라이드 성분을 사용했을

때 단단한 덩어리가 형성되지 않는 건조 백신 형태를 제공할 수 있다. 단단한 덩어리화는 본원에 기재된 완충제 및 급속 동결 기술을 사용함으로써 피할 수 있다. 이어서, 급속 동결 및 건조된 항원의 제조로부터 생성된 분말은 하나 이상의 부형제, 예컨대 비강 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및/또는 유동성 작용제 (예를 들어, 제3인산칼슘)와 조합될 수 있다. 본 발명의 제형은 실온 및 촉진된 조건 하에서 안정할 수 있는, 비강내 전달용으로 적합한 건조 분말 백신이 될 수 있다. 본원에서 제공된 건조 백신 분말 제형은 비강 전달 장치로부터의 완전하고 지속적인 전달을 제공하여, 백신이 지향하는 항원/병원균에 대한 수용체의 면역 반응을 자극할 수 있다.

[0020] 본원에서 제공된 방법은 본원에서 제공된 건조 백신 분말 제형의 흡습성을 감소시키고, 유동성을 개선시킬 수 있다. 상기 방법은, 건조 백신 분말 제형의 흡습성을 감소시키고 유동성을 개선시키기 위해 생리학적으로 허용되는 작용제 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스)를 분말 제형에 첨가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0021] 본원에서 제공된 방법은 백신의 효능을 개선시킬 수 있다. 상기 방법은, 국부 면역 반응, 예를 들어 점막 면역 반응 (예를 들어, 점막 sIgA 포함)을 자극할 수 있는 건조 백신 분말 조성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. sIgA는 돌연변이 인플루엔자 바이러스 (예를 들어, 건조 백신 분말 제형은 유행성 인플루엔자 백신으로서 사용될 수 있음) 및/또는 유전적 부동을 겪은 바이러스에 대항한 교차-보호를 제공할 수 있다. 건조 백신 분말 제형, 예를 들어 건조 비강 인플루엔자 분말 제형은 원위 점막 부위에서의 보호를 유도할 수 있다. 예를 들어, 비강 점막에서의 본 개시내용의 백신의 도입은 보호 (예를 들어, 상부 기도, 하부 기도, 위장관 및 질에서의 sIgA 생성)로 이어질 수 있다. 건조 백신 분말 제형은 전신 면역 반응 (예를 들어, 혈청 IgG 생성)을 자극할 수 있다. 건조 백신 분말 조성물은 미세결정성 셀룰로스를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 건조 백신 분말 제형은 아주반트를 포함하지 않는다.

[0022] II. 분말 제형의 생성에 사용하기 위한 액체 제형

[0023] 건조 백신 분말 제형을 생성하기 위해, 액체 제형이 우선 생성될 수 있다. 액체 제형은 하나 이상의 항원 (예를 들어, 하나 이상의 병원균 또는 병원균의 성분), 하나 이상의 사카라이드, 하나 이상의 완충제 및 하나 이상의 다른 성분을 포함할 수 있다. 전형적으로, 액체 제형이 급속 동결 (예를 들어, 액체 질소에서의 침지에 의해) 및 동결-건조에 노출된 후, 건조 백신 분말 제형이 생성될 수 있다.

[0024] 액체 제형의 부피는 약 0.1 mL, 1.0 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 10 L, 50 L, 100 L, 250 L, 500 L 또는 1000 L일 수 있다. 액체 제형의 부피는 약 0.1 mL, 1.0 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L, 10 L, 50 L, 100 L, 250 L, 500 L 또는 1000 L 초과일 수 있다. 액체 제형의 부피는 약 0.01 내지 1 mL, 약 1 내지 10 mL, 약 10 내지 50 mL, 약 50 내지 100 mL, 약 1 내지 1000 mL, 약 100 내지 1000 mL, 약 1 내지 10 L, 약 10 내지 50 L, 약 50 내지 100 L, 약 100 내지 500 L, 약 100 내지 1000 L, 또는 약 1 내지 1000 L일 수 있다. 동결 건조 후, 생성된 건조 백신의 양은 약 0.05 mg 내지 500 mg, 약 0.005 mg 내지 1 mg, 약 1 mg 내지 약 100 mg, 또는 약 100 mg 내지 약 500 mg일 수 있다.

[0025] A. 바이러스 백신 성분

[0026] 본원에 기재된 건조 백신 분말 제형을 생성하는 방법을 이용하여 약독화 생 바이러스, 불활성화 전 바이러스, 분할 바이러스, 서브유닛 항원, 비로즘 또는 한랭-적응 인플루엔자 생 바이러스를 갖는 백신을 생성할 수 있다.

[0027] 본원에 기재된 건조 백신 분말 제형을 생성하는 방법을 이용하여 약독화 생 바이러스를 갖는 백신을 생성할 수 있다. 약독화 생 백신은 배양된 세포 (예를 들어, 인간 이배체 세포 (예를 들어, 태아 폐 조직, 다른 섬유아세포), 원숭이 신장 세포 및 병아리 배아 포함)에서의 연속 계대로부터 유래할 수 있다. 배양된 세포에서의 성장에 대한 바이러스의 적응은 천연 숙주에 대한 독성의 점차적인 손실에 의해 달성될 수 있다. 약독성은 예를 들어, 점 돌연변이의 축적에 의해 부여될 수 있다. 유전자 조작을 이용하여, 예를 들어 온도 민감성 돌연변이체의 생성, 결실 돌연변이체의 생성, 부위-지정 돌연변이유발 또는 재조합 생 바이러스의 생성에 의해, 바이러스 약독화를 달성할 수 있다.

[0028] 본원에 기재된 건조 백신 분말 제형을 생성하는 방법을 이용하여 불활성화 전 바이러스를 갖는 백신을 생성할 수 있다. 불활성화 바이러스는, 예를 들어 자외선, 낮은 pH (예를 들어, 산 (예를 들어, 카프틸산)), 저온 살균, 용매/세제, 나트륨 디옥시아네이트, 포르말린, 베타-프로피오락톤 또는 에틸렌이민을 사용하여 생성될 수 있다. 자외선은 핵산 이량체를 생성시킴으로써 DNA 전체를 손상시켜, 유전 물질의 복제를 방지함으로써 바이러스를 불활성화시킬 수 있다. 일부 바이러스는 낮은 pH 용액에 노출시 변성된다. 이러한 방법은 외피 바이러스에 대해 사용하는 경우에 특히 효과적일 수 있다. 저온 살균은 온도 유도된 변성에 의해 바이러스를 불활성화

시킬 수 있다. 용매/세제 불활성화는 지질 피복으로 둘러싸인 바이러스에 대해서만 효과적이다. 사용되는 세제는 전형적으로 트리톤(Triton)-X 100이다. 나트륨 티오시아네이트는 바이러스의 단백질 코팅을 변성시켜, 바이러스를 불활성화시킬 수 있다. 포르말린은 바이러스 코팅의 표면 단백질을 화학적으로 변형시켜, 감염을 방지할 수 있다. 에틸렌이민 및 베타-프로피오락톤은 단백질 코팅을 거의 비변형된 상태로 유지하면서 바이러스의 핵산에 대해 작용할 수 있다. 불활성화는 바이러스의 면역원성을 유지하면서 바이러스의 감염성을 파괴할 수 있다. 불활성화 바이러스의 다수의 응용물이 대상체에게 투여될 수 있다.

[0029] 본원에 기재된 건조 백신 분말 제형을 생성하는 방법을 이용하여 하나 이상의 병원균으로부터의 하나 이상의 항원 단백질 (백신 단백질)을 갖는 백신을 생성할 수 있다. 항원 단백질은 백신이 생성될 임의의 병원균으로부터의 것일 수 있다. 예를 들어 백신이 인플루엔자 바이러스를 표적으로 하는 경우, 항원 단백질은 적혈구응집소(HA) 및/또는 뉴라미니다아제(NA)일 수 있다. 적혈구응집소는 인플루엔자 A 바이러스의 항원 당단백질이며, 이의 주요 표면 단백질이다. 이는 세포의 표면 상의 시알산-함유 수용체에 대한 결합에 의해, 인플루엔자 바이러스 및 감염되는 세포간의 결합을 매개한다. 세포의 표면에 결합한 바이러스 입자는 엔도솜 내로 포식된다. 엔도솜 내에서 HA는 바이러스 막과 엔도솜 막의 융합을 매개하여, 바이러스 게놈을 세포 내로 방출시킨다. 구조적으로, HA는 나선형 코일 내로 조직화된 3개의 동일한 단량체로 이루어진다. 기능 차단 항체는 HA의 세포 결합 또는 막 융합 기능을 억제할 수 있다. 뉴라미니다아제는 인플루엔자 바이러스의 표면 상에서 발견되는 또 다른 당단백질이다. NA는 당단백질로부터 시알산 기를 절단시킴으로써 작용하는 효소이다. 이러한 절단은 2가지 기능, 즉 바이러스 응집을 예방하는 기능 및 자손 바이러스를 세포의 표면으로부터 방출하는 기능을 담당하는 것으로 보인다.

[0030] 적어도 16가지의 공지된 HA 아형이 있다. 백신 항원은 HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15 또는 HA16일 수 있다. 9가지의 공지된 NA 아형이 있다. 백신 항원은 NA1, NA2, NA3, NA4, NA5, NA6, NA7, NA8 또는 NA9일 수 있다. HA 및/또는 NA 아형으로부터 제조된 백신은 개별적으로 또는 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 HA 및 NA 항원 중 2가지 이상이 건조 백신 분말 제형의 제조 중에 혼합될 수 있거나, 또는 개별 HA 및 NA 항원의 건조 분말 제형이 조합될 수 있다. 항원 단백질은 병원균으로부터의 표면 단백질일 수 있다. 항원 단백질은 제조함으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 관심있는 항원을 코딩하는 핵산을 원핵 세포 (예를 들어, 박테리아), 진핵 세포 (예를 들어, 효모 세포 및 곤충 세포)에 도입할 수 있고, 단백질을 발현시켜 세포로부터 정제할 수 있다. 병원균이 바이러스인 경우, 비리온의 비필수 성분을 (예를 들어, 에테르 및 세제를 사용하여) 제거할 수 있다.

[0031] 본원에 기재된 건조 백신 분말 제형을 생성하는 방법을 이용하여 비로솜 백신을 생성할 수 있다. 비로솜 백신은 원형 바이러스의 유전 물질을 포함하지 않는 재구성된 바이러스 외피의 바이러스-유사 입자를 포함한다. 인플루엔자 비로솜은 삽입된 HA 및 NA 단백질을 포함하는 단층 인지질 이중층으로 이루어진 소포이다. 이들은 유전 물질을 갖고 있지 않으므로, 비로솜은 감염성이 아니다.

[0032] 액체 백신 제형 중의 백신 단백질 (예를 들어, 항원 또는 항원 함유 성분)의 농도는 약 0.05 mg/mL 내지 10 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 5 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 2.5 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 1 mg/mL, 약 0.1 mg/mL 내지 0.5 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 1 mg/mL, 약 0.05 mg/mL 내지 1 mg/mL, 또는 약 0.05 mg/mL 내지 2.5 mg/mL일 수 있다. 액체 백신 제형 중의 백신 단백질 (예를 들어, 항원 또는 항원 함유 성분)의 농도는 약 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.9 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.1 mg/mL, 1.2 mg/mL, 1.3 mg/mL, 1.4 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.7 mg/mL, 1.8 mg/mL, 1.9 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3 mg/mL, 3.5 mg/mL, 4 mg/mL, 4.5 mg/mL, 5 mg/mL, 5.5 mg/mL, 6 mg/mL, 6.5 mg/mL, 7.0 mg/mL, 8.0 mg/mL, 8.5 mg/mL, 9 mg/mL 또는 10 mg/mL일 수 있다. 액체 백신 제형 중의 백신 단백질 (예를 들어, 항원 또는 항원-함유 성분)의 농도는 약 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.9 mg/mL, 1.0 mg/mL, 1.1 mg/mL, 1.2 mg/mL, 1.3 mg/mL, 1.4 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.7 mg/mL, 1.8 mg/mL, 1.9 mg/mL, 2.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3 mg/mL, 3.5 mg/mL, 4 mg/mL, 4.5 mg/mL, 5 mg/mL, 5.5 mg/mL, 6 mg/mL, 6.5 mg/mL, 7.0 mg/mL, 8.0 mg/mL, 8.5 mg/mL, 9 mg/mL 또는 10 mg/mL 초과일 수 있다.

[0033] 건조 백신 분말 제형을 사용하여 1종 이상의 인플루엔자 바이러스에 의한 감염을 예방 및/또는 치료할 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 오르토믹소비리데(*Orthomyxoviridae*) 과의 바이러스에 속하며, 이는 다음의 5가지 속을 포함한다: 인플루엔자바이러스 A, 인플루엔자바이러스 B, 인플루엔자바이러스 C, 이사바이러스 및 토고토바이러스. 도리 바이러스는 토고토바이러스 속의 종이다. 인플루엔자 바이러스는 인간 및 다른 종을 감염시킬 수 있다. 인플루엔자 A형 바이러스는 인간, 조류, 돼지, 말, 기각류 및 다른 동물을 감염시킬 수 있다. 야생 조류

는 이들 바이러스에 대한 천연 숙주일 수 있다. 인플루엔자 A형 바이러스는 바이러스의 표면에 대한 다음의 2개 단백질을 기초로 아형으로 분류되며 명명될 수 있다: 적혈구응집소 (HA) 및 뉴라미니다아제 (NA). 예를 들어, "H7N2 바이러스"는 HA7 단백질 및 NA2 단백질을 갖는 인플루엔자 A 아형을 나타낸다. 유사하게, "H5N1" 바이러스는 HA5 단백질 및 NA1 단백질을 갖는다. 16가지의 알려진 HA 아형 및 9가지의 알려진 NA 아형이 있다. 여러 다양한 HA 및 NA 단백질의 조합이 가능하다. 여러 알려진 HA 아형 (HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15 및 HA16)을 여러 알려진 NA 아형 (NA1, NA2, NA3, NA4, NA5, NA6, NA7, NA8 및 NA9)과 조합하여 감염을 예방 또는 치료하기 위한 백신을 생성할 수 있다. 또한, HA 및 NA 아형은 감염을 예방 또는 치료하기 위한 백신에서 개별적으로 사용될 수 있다. 상이한 아형 백신을 사용시에 순서대로 또는 동시에 조합하여 감염을 예방 또는 치료할 수 있다. 현재, 몇몇 인플루엔자 A 아형 (예를 들어, H1N1, H1N2 및 H3N2)이 대체로 사람들 사이에서 활동하고 있다. 다른 아형은 다른 동물 종에서 발견될 수 있다. 예를 들어, H7N7 및 H3N8 바이러스는 말에서 질병을 유발할 수 있으며, H3N8은 또한 최근에 개에서 질병을 유발하는 것으로 나타났다 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).

[0034] 항바이러스제를 사용하여 고위험군 (예를 들어, 병원 단위에서의 개체, 중장년층을 돌봐주는 시설에서의 개체, 또는 면역억제된 개체)을 보호할 수 있다. 항바이러스제에 대한 잠재적인 용도는 예를 들어 조류 H5N1 또는 또 다른 인플루엔자 바이러스 균주 (예를 들어, H1N1)에 의해 유발되는지와는 무관하게 추가의 범유행병의 확산 및 강도를 제한하는 것이다. H5N1, H7N7 및 H7N3 바이러스를 비롯한 조류 인플루엔자 A 바이러스의 아형 H5 및 H7은 고병원성과 관련되어 있으며, 이들 바이러스에의 인간 감염은 경미한 질환 (예를 들어, H7N3, H7N7)부터 심각하며 치명적인 질환 (예를 들어, H7N7, H5N1)까지의 범위를 갖는다. 매우 경미한 증상 (예를 들어, 결막염)을 비롯한 저병원성 바이러스에의 감염으로 인한 인간 질병은 인플루엔자-유사 질병으로 기록된다. 인간에 감염되는 저병원성 바이러스의 예에는 H7N7, H9N2 및 H7N2가 포함된다 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).

[0035] 인플루엔자 B 바이러스는 인간에서 발견될 수 있으며, 또한 기각류를 감염시킬 수 있다. 인플루엔자 A 바이러스와는 다르게, 이들 바이러스는 아형에 의해 분류되지 않는다. 인플루엔자 B 바이러스는 사람들 사이에서 이환상태 및 사망을 유발할 수 있지만, 대체로 인플루엔자 A 바이러스에 비해 덜 심각한 유행병과 관련되어 있다. 비록 인플루엔자 B형 바이러스가 인간 유행병을 유발할 수 있지만, 이들은 범유행병을 유발하지는 않는다 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).

[0036] 인플루엔자 C형 바이러스는 인간에서 경미한 질병을 유발할 수 있으며, 유행병 또는 범유행병을 유발하지 않는다. 이들 바이러스는 또한 개 및 돼지를 감염시킬 수 있다. 이들 바이러스는 아형에 의해 분류되지 않는다 (<http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses>).

[0037] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 예를 들어 아벨슨 백혈병 바이러스, 아벨슨 류관 백혈병 바이러스, 아벨슨 바이러스, 급성 후두기관지염 바이러스, 애들라이트 리버 바이러스, 아데노 관련 바이러스 그룹, 아데노바이러스, 아프리카 마역 바이러스, 아프리카 돼지 열 바이러스, AIDS 바이러스, 알류산 밍크 질환 파보바이러스, 알파레트로바이러스, 알파바이러스, ALV 관련 바이러스, 아마파리 바이러스, 아프토바이러스, 아쿠아레오바이러스, 아르보바이러스, 아르보바이러스 C, 아르보바이러스 그룹 A, 아르보바이러스 그룹 B, 아레나바이러스 그룹, 아르헨티나 출혈열 바이러스, 아르헨티나 출혈열 바이러스, 아테리바이러스, 아스트로바이러스, 아텔린 헤르페스바이러스 그룹, 오체스키 질환 바이러스, 아우라 바이러스, 오스둑 질환 바이러스, 호주 박쥐 리사바이러스, 아비아데노바이러스, 조류 적혈구증 바이러스, 조류 감염성 기관지염 바이러스, 조류 백혈병 바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 조류 림프종증 바이러스, 조류 골수아세포증 바이러스, 조류 파라믹소바이러스, 조류 폐뇌염 바이러스, 조류 망상내피증 바이러스, 조류 육종 바이러스, 조류 C형 레트로바이러스 그룹, 아비헤파드나바이러스, 아비폭스바이러스, B 바이러스, B19 바이러스, 바반키 바이러스, 비비 헤르페스바이러스, 배콜로바이러스, 마마포레스트 바이러스, 베바루 바이러스, 베리마 바이러스, 베타레트로바이러스, 비르나바이러스, 비트너 바이러스, BK 바이러스, 블랙 크리크 커널 바이러스, 청설 바이러스, 불리비안 출혈열 바이러스, 보마 질환 바이러스, 양의 보더 질환 바이러스, 보르나 바이러스, 소 알파헤르페스바이러스 1, 소 알파헤르페스바이러스 2, 소 코로나바이러스, 소 유행열 바이러스, 소 면역결핍 바이러스, 소 백혈병 바이러스, 소 백혈증 바이러스, 소 유두염 바이러스, 소 유두종바이러스, 소 구진성 구내염 바이러스, 소 파보바이러스, 소 융합 바이러스, 소 C형 종양바이러스, 소 바이러스성 설사 바이러스, 버기 크리크 바이러스, 총알형 바이러스 그룹, 버남웨리 바이러스 슈퍼그룹, 버나바이러스, 버킷 림프종 바이러스, 브람파 열, CA 바이러스, 칼리시바이러스, 캘리포니아 뇌염 바이러스, 낙타두 바이러스, 카나리아두 바이러스, 개과동물 헤르페스바이러스, 개 코로나바이러스, 개 디스토퍼 바이러스, 개 헤르페스바이러스, 개 미니트 바이러스, 개 파보바이러스, 카노 델가디토 바이러스, 염소 관절염

바이러스, 염소 뇌염 바이러스, 염소 헤르페스 바이러스, 카프리폭스 바이러스, 카디오바이러스, 카비드 헤르페스 바이러스 1, 세르코피테시드 헤르페스 바이러스 1, 세르코피테신 헤르페스 바이러스 1, 세르코피테신 헤르페스 바이러스 2, 찬디푸라 바이러스, 찬귀놀라 바이러스, 채널 메기 바이러스, 샤를빌 바이러스, 수두 바이러스, 치쿤구니아 바이러스, 침팬지 헤르페스 바이러스, 처브 레오 바이러스, 첼 연어 바이러스, 코칼 바이러스, 은연어 레오 바이러스, 교미발진 바이러스, 콜로라도 진드기 열 바이러스, 콜티 바이러스, 컬럼비아 SK 바이러스, 감기 바이러스, 전염성 농창 바이러스, 전염성 고름물집 피부염 바이러스, 코로나 바이러스, 코리파르타 바이러스, 코감기 바이러스, 우두 바이러스, 콕사키 바이러스, CPV (세포질 다각체병 바이러스), 크리켓 마비 바이러스, 크리미안-콩고 출혈열 바이러스, 크루프 관련 바이러스, 크립토 바이러스, 사이포 바이러스, 거대세포 바이러스, 거대세포 바이러스 그룹, 세포질 다각체병 바이러스, 사슴 유두종 바이러스, 델타레트로 바이러스, 텅기 바이러스, 덴소 바이러스, 데펜도 바이러스, 도리 바이러스, 디플로르나 바이러스, 초파리 C 바이러스, 오리 B형 간염 바이러스, 오리 간염 바이러스 1, 오리 간염 바이러스 2, 듀오 바이러스, 듀벤헤이즈 바이러스, 날개 불구 바이러스 DWV, 동부 마 뇌염 바이러스, 동부 마 뇌척수염 바이러스, EB 바이러스, 에볼라 바이러스, 에볼라-유사 바이러스, 에코 바이러스, 에코 바이러스 10, 에코 바이러스 28, 에코 바이러스 9, 액트로멜리아 바이러스, EEE 바이러스, EIA 바이러스, EIA 바이러스, 뇌염 바이러스, 뇌심근염 그룹 바이러스, 뇌심근염 바이러스, 엔테로 바이러스, 효소 상승 바이러스, 효소 상승 바이러스 (LDH), 유행성 출혈열 바이러스, 가축 유행성 출혈성 질환 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 말과 동물 알파 헤르페스 바이러스 1, 말과 동물 알파 헤르페스 바이러스 4, 말과 동물 헤르페스 바이러스 2, 말 유산 바이러스, 말 동맥염 바이러스, 말 뇌증 바이러스, 말 감염성 빈혈 바이러스, 말 홍역 바이러스, 말 비폐렴 바이러스, 말 리노 바이러스, 운베난구 바이러스, 유럽 엘크 유두종 바이러스, 유럽 돼지 열 바이러스, 에버글레이즈 바이러스, 야치 바이러스, 고양이와 동물 헤르페스 바이러스 1, 고양이 칼리시 바이러스, 고양이 섬유육종 바이러스, 고양이 헤르페스 바이러스, 고양이 면역결핍 바이러스, 고양이 감염성 복막염 바이러스, 고양이 백혈병/육종 바이러스, 고양이 백혈병 바이러스, 고양이 범백혈구 감소증 바이러스, 고양이 파보 바이러스, 고양이 육종 바이러스, 고양이 융합 바이러스, 필로 바이러스, 플랑드르 바이러스, 플라비 바이러스, 구제역 바이러스, 포트 모건 바이러스, 포 코너스 한타 바이러스, 가금 아데노 바이러스 1, 계두 바이러스, 프렌드 바이러스, 감마레트로 바이러스, GB 간염 바이러스, GB 바이러스, 풍진 바이러스, 게타 바이러스, 긴팔원숭이 백혈병 바이러스, 선열 바이러스, 산양두 바이러스, 황금잉어 바이러스, 고노메타 바이러스, 거위 파보 바이러스, 과립병 바이러스, 그로스 바이러스, 얼룩다람쥐 B형 간염 바이러스, 그룹 A 아르보 바이러스, 구아나리토 바이러스, 기니 피그 거대세포 바이러스, 기니 피그 C형 바이러스, 한탄 바이러스, 한타 바이러스, 대합 레오 바이러스, 산토끼 섬유종 바이러스, HCMV (인간 거대세포 바이러스), 혈구 흡착 바이러스 2, 일본 적혈구 응집 바이러스, 출혈열 바이러스, 헨드라 바이러스, 헤니파 바이러스, 헤파드나 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스 그룹, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, 델타 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, F형 간염 바이러스, G형 간염 바이러스, 비-A형 비-B형 간염 바이러스, 간염 바이러스, 간염 바이러스 (비-인간), 간뇌척수염 레오 바이러스 3, 헤파토 바이러스, 헤론 B형 간염 바이러스, 헤르페스 B 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 1, 단순 헤르페스 바이러스 2, 헤르페스 바이러스, 헤르페스 바이러스 7, 헤르페스 바이러스 아텔레스, 헤르페스 바이러스 호미니스, 헤르페스 바이러스 감염, 헤르페스 바이러스 사이미리, 헤르페스 바이러스 수이스, 헤르페스 바이러스 바리셀라에, 하이랜즈 J 바이러스, 히라메 랫도 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 인간 아데노 바이러스 2, 인간 알파 헤르페스 바이러스 1, 인간 알파 헤르페스 바이러스 2, 인간 알파 헤르페스 바이러스 3, 인간 B 림프친화 바이러스, 인간 베타 헤르페스 바이러스 5, 인간 코로나 바이러스, 인간 거대세포 바이러스 그룹, 인간 거품형성 바이러스, 인간 감마 헤르페스 바이러스 4, 인간 감마 헤르페스 바이러스 6, 인간 A형 간염 바이러스, 인간 헤르페스 바이러스 1 그룹, 인간 헤르페스 바이러스 2 그룹, 인간 헤르페스 바이러스 3 그룹, 인간 헤르페스 바이러스 4 그룹, 인간 헤르페스 바이러스 6, 인간 헤르페스 바이러스 8, 인간 면역결핍 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스 1, 인간 면역결핍 바이러스 2, 인간 유두종 바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 I, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 II, 인간 T 세포 백혈병 바이러스 III, 인간 T 세포 림프종 바이러스 I, 인간 T 세포 림프종 바이러스 II, 인간 T 세포 림프친화 바이러스 1형, 인간 T 세포 림프친화 바이러스 2형, 인간 T 림프친화 바이러스 I, 인간 T 림프친화 바이러스 II, 인간 T 림프친화 바이러스 III, 이치노 바이러스, 소아 위장관염 바이러스, 감염성 소 비기관염 바이러스, 감염성 조혈기 괴사 바이러스, 감염성 채장 괴사 바이러스, 인플루엔자 바이러스 A, 인플루엔자 바이러스 B, 인플루엔자 바이러스 C, 인플루엔자 바이러스 D, 인플루엔자 바이러스 pr8, 곤충 무지개 바이러스, 곤충 바이러스, 이리도 바이러스, 일본 B 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, JC 바이러스, 후닌 바이러스, 카포시 육종-관련 헤르페스 바이러스, 케메로보 바이러스, 클리함 래트 바이러스, 클라마스 바이러스, 콜롱고 바이러스, 한국 출혈열 바이러스, 콧바 바이러스, 키야사나 포레스트 질환 바이러스, 키질아가시 바이러스, 라 크로스 바이러스, 락트산 데히드로게나제 상승 바이러스, 락트산 데히드로게나제 바이러스, 라고스 박쥐 바이러스, 랑구르 바이러스, 라핀 파보 바이러스

스, 라사 열 바이러스, 라사 바이러스, 라텐트 래트 바이러스, LCM 바이러스, 리키 바이러스, 렌티바이러스, 레포리폭스바이러스, 백혈병 바이러스, 류코바이러스, 괴상 피부 질환 바이러스, 림프절병 관련 바이러스, 림포크립토바이러스, 림프구 맥락수막염 바이러스, 림프세포종식성 바이러스 그룹, 마추포 바이러스, 광적 소양 바이러스, 포유동물 B형 중앙바이러스 그룹, 포유동물 B형 레트로바이러스, 포유동물 C형 레트로바이러스 그룹, 포유동물 D형 레트로바이러스, 유방 중앙 바이러스, 마푸에라 바이러스, 마르부르그 바이러스, 마르부르그-유사 바이러스, 메이슨 화이자 원숭이 바이러스, 마스트아테노바이러스, 마야로 바이러스, ME 바이러스, 홍역 바이러스, 메난글 바이러스, 멧고 바이러스, 멧고바이러스, 미텔버그 바이러스, 착유인 결절 바이러스, 밍크 장염 바이러스, 마우스의 미니트 바이러스, MLV 관련 바이러스, MM 바이러스, 모콜라 바이러스, 몰루치폭스바이러스, 몰사마귀 바이러스, 원숭이 B 바이러스, 원숭이두 바이러스, 모노네가비랄레스, 홍역바이러스, 마운트 엘곤 박쥐 바이러스, 마우스 거대세포바이러스, 마우스 뇌척수염 바이러스, 마우스 간염 바이러스, 마우스 K 바이러스, 마우스 백혈병 바이러스, 마우스 유방 중앙 바이러스, 마우스 미니트 바이러스, 마우스 폐렴 바이러스, 마우스 회색질척수염 바이러스, 마우스 폴리오마바이러스, 마우스 육종 바이러스, 마우스폭스 바이러스, 모잠비크 바이러스, 무감보 바이러스, 점막 질환 바이러스, 볼거리 바이러스, 췌관동물 베타헤르페스바이러스 1, 췌관동물 거대세포바이러스 2, 뮤린 거대세포바이러스 그룹, 뮤린 뇌척수염 바이러스, 뮤린 간염 바이러스, 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 결절 유발 바이러스, 뮤린 폴리오마바이러스, 뮤린 육종 바이러스, 뮤로메갈로바이러스, 머레이벨리 뇌염 바이러스, 점액종 바이러스, 믹소바이러스, 다형성 믹소바이러스, 믹소바이러스 파로티티디스, 나이로비 양 질환 바이러스, 나이로바이러스, 나니르나바이러스, 나리바 바이러스, 은두모 바이러스, 네이틀링 바이러스, 넬슨 베이 바이러스, 신경친화 바이러스, 뉴 월드 아레나바이러스, 신생아 폐렴 바이러스, 뉴캐슬 질환 바이러스, 니파 바이러스, 비-세포병원성 바이러스, 노르윙크 바이러스, 핵 다각체병 바이러스 (NPV), 니플 벡 바이러스, 오농농 바이러스, 옥켈보 바이러스, 중앙발생 바이러스, 중앙발생 바이러스 유사 입자, 온코르나바이러스, 오르비바이러스, 오르프 바이러스, 오로푸스 바이러스, 오르토헤파드나바이러스, 오르토크소바이러스, 오르토폭스바이러스, 오르토토크소바이러스, 오룬고, 양 유두종바이러스, 양 카타르 열 바이러스, 부엉이 원숭이 헤르페스바이러스, 팔리암 바이러스, 유두종바이러스, 유두종바이러스 실빌라지, 파포바바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 1형, 파라인플루엔자 바이러스 2형, 파라인플루엔자 바이러스 3형, 파라인플루엔자 바이러스 4형, 파라믹소바이러스, 파라폭스바이러스, 유사종두증 바이러스, 파보바이러스, 파보바이러스 B19, 파보바이러스 그룹, 페스티바이러스, 플레보바이러스, 바다표범 디스토펙 바이러스, 피코드나바이러스, 피코르나바이러스, 돼지 거대세포바이러스 - 비둘기두 바이러스, 피리 바이러스, 픽수나 바이러스, 마우스의 폐렴 바이러스, 뉴모바이러스, 회색질척수염 바이러스, 폴리오바이러스, 폴리드나바이러스, 다면체 바이러스, 폴리오마 바이러스, 폴리오마바이러스, 폴리오마바이러스 보비스, 폴리오마바이러스 세르코피테시, 폴리오마바이러스 호미니스 2, 폴리오마바이러스 마카카에 1, 폴리오마바이러스 뮤리스 1, 폴리오마바이러스 뮤리스 2, 폴리오마바이러스 파피오니스 1, 폴리오마바이러스 파피오니스 2, 폴리오마바이러스 실빌라지, 폰진 헤르페스바이러스 1, 돼지 유행성 설사 바이러스, 돼지 적혈구응집 뇌척수염 바이러스, 돼지 파보바이러스, 돼지 전염성 위장염 바이러스, 돼지 C형 바이러스, 폭스 바이러스, 폭스바이러스, 폭스바이러스 바리올라에, 프로스펙트 힐 바이러스, 프로바이러스, 가성우두 바이러스, 가성광견병 바이러스, 앵무새두 바이러스, 메추라기두 바이러스, 토끼 섬유종 바이러스, 토끼 신장 공포화 바이러스, 토끼 유두종바이러스, 광견병 바이러스, 라쿤 파보바이러스, 라쿤폭스 바이러스, 라니크헤트 바이러스, 래트 거대세포바이러스, 래트 파보바이러스, 래트 바이러스, 라우처 바이러스, 재조합 우두 바이러스, 재조합 바이러스, 레오바이러스, 레오바이러스 1, 레오바이러스 2, 레오바이러스 3, 파충류 C형 바이러스, 호흡기 감염 바이러스, 호흡기 융합 바이러스, 호흡기 바이러스, 망상내피증 바이러스, 랫도바이러스, 랫도바이러스 카르피아, 라디노바이러스, 리노바이러스, 리지디오바이러스, 리프트 벨리 열 바이러스, 릴레이 바이러스, 우역 바이러스, RNA 중앙 바이러스, 로스 리버 바이러스, 로타바이러스, 로우게올레 바이러스, 라우스 육종 바이러스, 풍진 바이러스, 홍역 바이러스, 루비바이러스, 러시아 가을 뇌염 바이러스, SA 11 시미안 바이러스, SA2 바이러스, 사비아 바이러스, 사기야마 바이러스, 사이미린 헤르페스바이러스 1, 타액선 바이러스, 모래파리 열 바이러스 그룹, 산드짐바 바이러스, SARS 바이러스, SDAV (타액누선염 바이러스), 바다표범두 바이러스, 샘리키 포레스트 바이러스, 서울 바이러스, 양두 바이러스, 쇼프 섬유종 바이러스, 쇼프 유두종 바이러스, 시미안 거품형성 바이러스, 시미안 A형 간염 바이러스, 시미안 인간 면역결핍 바이러스, 시미안 면역결핍 바이러스, 시미안 파라인플루엔자 바이러스, 시미안 T 세포 림프친화성 바이러스, 시미안 바이러스, 시미안 바이러스 40, 심플렉스바이러스, 신 놔브레 바이러스, 신드비스 바이러스, 천연두 바이러스, 남아메리카 출혈열 바이러스, 참새두 바이러스, 스푸마바이러스, 다람쥐 섬유종 바이러스, 다람쥐 원숭이 레트로바이러스, SSV 1 바이러스 그룹, STLV (시미안 T 림프친화 바이러스) I형, STLV (시미안 T 림프친화 바이러스) II형, STLV (시미안 T 림프친화 바이러스) III형, 구진성 구내염 바이러스, 상악하 바이러스, 수이드 알파헤르페스바이러스 1, 수이드 헤르페스바이러스 2, 수이폭스바이러스, 습지 열 바이러스, 돈두 바이러스, 스위스 마우

스 백혈병 바이러스, TAC 바이러스, 타카리브 복합 바이러스, 타카리브 바이러스, 타나폭스 바이러스, 타테라폭스 바이러스, 텐치 레오바이러스, 타일러 뇌척수염 바이러스, 타일러 바이러스, 토고토 바이러스, 토타팔라암 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 티오만 바이러스, 토가바이러스, 토로바이러스, 종양 바이러스, 투파이아 바이러스, 칠면조 비기관염 바이러스, 칠면조두 바이러스, C형 레트로바이러스, D형 종양바이러스, D형 레트로바이러스 그룹, 케양 질환 람도바이러스, 우나 바이러스, 운쿠니에미 바이러스 그룹, 우두 바이러스, 공포화 바이러스, 수두대상포진 바이러스, 바리셀로바이러스, 바리콜라 바이러스, 대마마 바이러스, 마마 바이러스, 바신 기슈 질환 바이러스, VEE 바이러스, 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 베네수엘라 말 뇌척수염 바이러스, 베네수엘라 출혈열 바이러스, 소수포 구내염 바이러스, 메시쿨로바이러스, 빌류이스크 바이러스, 살무사 레트로바이러스, 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스, 비스나 메디 바이러스, 비스나 바이러스, 보엘폭스 바이러스, VSV (소수포 구내염 바이러스), 왈랄 바이러스, 와레고 바이러스, 사마귀 바이러스, WEE 바이러스, 웨스트 닐 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스, 서부 말 뇌척수염 바이러스, 와타로아 바이러스, 동계 구토 바이러스, 우드척 B형 간염 바이러스, 털복숭이 원숭이 육종 바이러스, 상처 종양 바이러스, WRSV 바이러스, 야바 원숭이 종양 바이러스, 야바 바이러스, 야타폭스바이러스, 황열 바이러스 및 유그 보그다노바크 바이러스를 비롯한 임의의 바이러스에 의한 감염의 예방 및/또는 치료에 유용할 수 있다.

[0038] **B. 비-바이러스성 병원균 백신 성분**

[0039] 본원에 기재된 백신은 박테리아, 진균, 또는 원생생물 세포 또는 이들의 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 박테리아 병원균에 대한 백신은 사멸된 박테리아 또는 이의 정제된 항원 결정기를 포함할 수 있다. 약독화 박테리아가 또한 항원으로 사용될 수 있다. 일부 예에서, 세포성 병원균 (예를 들어, 콜레라 독소)에 의해 생성된 독소에 대한 백신은, 불활성화 독소 (톡소이드)를 본원에 기재된 하나 이상의 백신 성분과 조합함으로써 생성될 수 있다. 표적 병원균으로부터의 항원 펩티드는 하나 이상의 백신 성분과의 조합 전에 근원 병원균으로부터 정제될 수 있고/거나 재조합적으로 생성될 수 있다. 접합 항원이 또한 사용될 수 있다. 접합 항원에서, 박테리아 병원균의 약한 항원 폴리사카라이드 외부 코트는 독성 단백질에 부착되어 면역 반응을 자극할 수 있다. 전형적으로, 비-바이러스성 병원균에 대한 백신은, 점막 표면에 영향을 주는 병원균에 대해 면역 반응을 생성 (예를 들어, sIgA 생성)하거나 점막 표면을 통해 신체에 접근하도록 설계될 것이다. 이러한 병원균의 비제한적 예로는 크립토코쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 쉬겔라 종(*Shigella spp.*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 사. 파라티피(*Sa. paratyphi*), 장독성 에셰리치아 콜리(*Escherichia coli*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 우레아플라스마 우레아리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*), 크립토스포리디움 종(*Cryptosporidium spp.*), 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 랩토스피라 인테로간스(*Leptospira interrogans*), 랩토스피라 키르쉬네리(*Leptospira kirschneri*), 랩토스피라 노구치이(*Leptospira noguchii*), 랩토스피라 알렉산데리(*Leptospira alexanderi*), 랩토스피라 웨일리이(*Leptospira weilii*), 랩토스피라 보르그페테르세니이(*Leptospira borgpetersenii*), 랩토스피라 산타로사이(*Leptospira santarosai*), 랩토스피라 크메티이(*Leptospira kmetzi*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 브루셀라 아보르투스(*Brucella abortus*), 브루셀라 캐니스(*Brucella canis*), 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*), 브루셀라 수이스(*Brucella suis*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 클라미도필라 시타시(*Chlamydophila psittaci*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 엔테로코쿠스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코쿠스 패시움(*Enterococcus faecium*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 랩토스피라 인테로간스(*Leptospira interrogans*), 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 미코박테리움 레프래(*Mycobacterium leprae*), 미코박테리움 울서란스(*Mycobacterium ulcerans*), 미코플라스마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumoniae*), 네이세리아 고노르로에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 리켓시아 리켓시이(*Rickettsia rickettsii*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 쉬겔라 손네이(*Shigella sonnei*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코쿠스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스타필로코쿠스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스트렙토코쿠스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아

(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스페르길루스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 크립토코쿠스 가티이(*Cryptococcus gattii*), 히스토플라스마 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 뉴모시스티스 지로베시이(*Pneumocystis jirovecii*), 스타키보트리스 카르타룸(*Stachybotrys chartarum*), 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*) 등이 포함된다.

[0040] **C. 항원 성분의 제조**

[0041] 병원균의 단백질 또는 다른 세포 성분의 항원 기능을 보존하기 위해, 본 개시는 항원 성분 (예를 들어, 바이러스, 단백질)의 3차원 배열의 일부 또는 모두를 보존할 수 있는 백신의 제조 방법을 제공한다. 따라서, 본원에서 제공된 방법은 병원균 또는 그의 성분 상의 항원 결정기가 무손상 상태로 보존되는 백신을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 백신 내 단백질의 3차원 구조의 보유는 면역 반응이 촉발될 수 있는 "형태적(conformational)" 에피토프를 보유하게 할 수 있다. "형태적" 에피토프는 단백질 폴딩(folding)에 의존하며 일반적으로는 완전히 선형 아미노산 (예를 들어, 소화되거나 선형화된 단백질)으로 구성되지 않은 것이다. 또한, 본원에서 제공된 백신 생성 방법은 항원 효력 (즉, 면역 반응 유도 능력)을 보유하게 할 수 있으므로, 소정량의 백신에 대한 반응에서 면역 반응의 수준이 병원균 또는 다른 천연-발생 항원 공급원에 대한 노출에 비해 적어도 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% 또는 50%이도록 한다. 추가로, 본원에서 제공된 방법은 특정 항원이 본원에 기재된 급속 동결 방법에 제공된 전체 항원 단백질의 고수준 항원 능력 (예를 들어, 적어도 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61%, 60%, 59%, 58%, 57%, 56%, 55%, 54%, 53%, 52%, 51% 또는 50%)을 보유하는 백신을 생성시킬 수 있다.

[0042] 이러한 방법의 한 실시양태는 도 2에 도시되어 있다. 이 예에서, 항원 (개방 원형으로 도시됨)은 안정화제 (트레할로스) 및 완충제 (포스페이트 완충제)와 조합된다. 성분은 혼합되고 동결-건조된다 (예를 들어, 액체 질소 중의 함침에 의해). 생성된 건조 백신 성분은 미립자를 포함하며 여기서 항원 또는 항원들은 여전히 면역 반응을 유도할 수 있고 실온에서 안정하다. 이어서, 백신 성분은 비강 투여에 적합한 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스)와 조합될 수 있다. 본원에 개시된 백신 성분의 비제한적 예는 하기에 제공된다.

[0043] 액체 제형의 성분은 특정 기능을 수행하도록 선택될 수 있다. 예를 들어, 한 성분은 백신 개발 중인 항원에 대한 안정성을 제공하는데 이용될 수 있다. 주로, 이러한 성분은 후속 동결 공정 동안 항원 분해를 방지할 수 있다. 이들 성분은 임의의 안정화 분자 또는 화합물, 예를 들어 당, 아미노산 및/또는 중합체를 포함할 수 있다. 이러한 하나 이상의 항원 안정화제가 제형 내에 사용될 수 있다. 전형적으로, 항원 안정화제는 전체적으로 또는 부분적으로 수용성일 것이다. 바람직한 항원 안정화제는 본원에 기재된 공정에서 단단한 덩어리를 생성하지 않을 것이다. 액체 백신 제형을 생성하는데 이용될 수 있는 예시적인 당으로는 트레할로스, 만니톨, 수크로스, 락토스, 이눌린, 소르보스, 멜레지토스, 라피노스, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 트레이톨, 스타키오스, 소르비톨, 글리세롤, 프룩토스, 만노스, 말토스, 아라비노스, 자일로스, 리보스, 람노스, 갈락토스, 글루코스 및/또는 L-글루코네이트 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이용될 수 있는 예시적인 아미노산으로는 이소류신, 발린, 류신, 아르기닌, 아스파라긴, 글루타민, 글리신, 히스티딘, 글루타메이트 및 리신이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이나, 이용될 수 있는 다른 중합체로는 텍스트란, 인간 혈청 알부민 (HSA), 비가수분해 젤라틴, 메틸 셀룰로스, 잔탄 검, 카라기난, 콜라겐, 콘드로이틴 술페이트, 시알화 폴리사카라이드, 액틴, 미오신, 미세관, 디네인, 키네틴, 폴리비닐 피롤리돈 및/또는 가수분해 젤라틴 등이 포함될 수 있다. 계면활성제는, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄 모노라우레이트 (트윈(Tween) 20), 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레이트 (트윈 80) 및/또는 폴리에틸렌과 폴리프로필렌 글리콜의 블록 중합체 (플루로닉(Pluronic))일 수 있다.

[0044] 상기 항원 안정화제가 백신 제제 중에 이용될 수 있지만, 본 방법에서 이들 안정화제 중 하나 이상의 사용은 건조 단단한 덩어리를 형성하지 않는 동결 백신 제형을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 트레할로스의 사용은 동결시 단백질에 대한 보호를 제공하는 것으로 알려져 있지만, 물질이 분무 동결되지 않는 경우에는 덩어리화를 유도한다 (예를 들어, 문헌 [Chefson et al., J Biotechnol. 2007 Jul 15;130(4):436-40] 참조). 그러나, 본원에서 제공된 한 실시양태는 트레할로스와 단백질성 항원, 포스페이트 완충제 및 급속 동결 방법 (예를 들어,

액체 질소에서의 노출)의 조합이다. 이러한 방법은 단백질이 단단한 덩어리의 형성 없이 활성 (예를 들어, 항원 능력)을 보유하는 미세 분말을 생성시킬 수 있다. 이는 단단한 덩어리의 분쇄가 백신 제조 공정 중 여분의 단계이며 가열 및/또는 기계 힘을 통해 단단한 덩어리 중 항원 단백질의 낮은 회수율 및 분해를 초래할 수 있다는 점에서 진보한 것이다.

[0045] 항원 대 안정화제의 비는, 예를 들어 약 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, 1:41, 1:42, 1:43, 1:44, 1:45, 1:46, 1:47, 1:48, 1:49, 1:50, 1:51, 1:52, 1:53, 1:54, 1:55, 1:56, 1:57, 1:58, 1:59, 1:60, 1:61, 1:62, 1:63, 1:64, 1:65, 1:66, 1:67, 1:68, 1:69, 1:70, 1:71, 1:72, 1:73, 1:74, 1:75, 1:76, 1:77, 1:78, 1:79, 1:80, 1:81, 1:82, 1:83, 1:84, 1:85, 1:86, 1:87, 1:88, 1:89, 1:90, 1:91, 1:92, 1:93, 1:94, 1:95, 1:96, 1:97, 1:98, 1:99 또는 1:100일 수 있다. 항원 대 안정화제의 비는, 예를 들어 약 1:110, 1:120, 1:130, 1:140, 1:150, 1:160, 1:170, 1:180, 1:190, 1:200, 1:210, 1:220, 1:230, 1:240, 1:250, 1:260, 1:270, 1:280, 1:290, 1:300, 1:310, 1:320, 1:330, 1:340, 1:350, 1:360, 1:370, 1:380, 1:390, 1:400, 1:410, 1:420, 1:430, 1:440, 1:450, 1:460, 1:470, 1:480, 1:490, 1:500, 1:510, 1:520, 1:530, 1:540, 1:550, 1:560, 1:570, 1:580, 1:590, 1:600, 1:610, 1:620, 1:630, 1:640, 1:650, 1:660, 1:670, 1:680, 1:690, 1:700, 1:710, 1:720, 1:730, 1:740, 1:750, 1:760, 1:770, 1:780, 1:790, 1:800, 1:810, 1:820, 1:830, 1:840, 1:850, 1:860, 1:870, 1:880, 1:890, 1:900, 1:910, 1:920, 1:930, 1:940, 1:950, 1:960, 1:970, 1:980, 1:990 또는 1:1000일 수 있다. 동결-건조 단계에 사용되는 백신 액체 제형은 하나 이상의 pH 완충제를 포함할 수 있다 (도 2 및 3). pH 완충제는, 예를 들어 인산칼륨, 인산나트륨, 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 수산화나트륨, 아세트산나트륨, 히스티딘, HEPES, ACES, ADA, ADA, 이나트륨 염, ADA 일나트륨 염, AMPPO, 2-아미노에탄올, 2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 3-아미노-1-프로판술폰산 나트륨 염, BES, 비신, 비스-트리스(Bis-Tris), 비스-트리스 HCl, 비스-트리스 프로판, CAPS, CAPSO, CHES, DIPSO, DIPSO 나트륨 염, 글리신아미드 HCl, 글리신, HEPPS, HEPPSO, MES, MOPS, MOPSO, PIPES, TAPS, TAPSO, TES, 트리신, 트리에탄올아민, 이미다졸, 시트르산나트륨, 숙신산나트륨, 이탄산암모늄 및/또는 탄산일 수 있다. 완충제는 포스페이트 완충 염수일 수 있다. pH는 약 pH 3 내지 약 pH 8, 약 pH 4 내지 8, 약 pH 5 내지 8, 약 pH 6 내지 8 또는 약 pH 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 또는 8.0에서 유지될 수 있다. 액체 제형은 하나 이상의 항원 및 하나 이상의 완충제를 포함하거나, 이들을 주성분으로 하거나, 이들로 이루어질 수 있다. 액체 제형은 하나 이상의 항원, 하나 이상의 안정화제 및 하나 이상의 완충제를 포함하거나, 이들을 주성분으로 하거나, 이들로 이루어질 수 있다.

[0046] 본원에 기재된 방법에 의해 분말 제형을 생성하는데 사용된 액체 제형은 하나 이상의 다른 약물, 벌킹제 및/또는 지속 방출 중합체를 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물에 유용한 다른 약물은, 예를 들어 침투 보조제, 충혈완화제, 세기관지 완화제, 거담제 및 진통제 등을 포함할 수 있다. 벌킹제는, 예를 들어 락토스, 만니톨 및/또는 히드록시에틸 전분 (HES)을 포함할 수 있다. 조성물의 지속 방출 반투과성 중합체 매트릭스는, 예를 들어 폴리락티드, L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 폴리(2-히드록시에틸) 메타크릴레이트 또는 리포솜을 포함할 수 있다.

[0047] 본원에 기재된 백신은 아주반트를 포함하지 않으면서 제조될 수 있다. 따라서, 최종 백신은 단지 병원균/항원, 안정화제 및 완충제만을 사용하여 생성된 다음 동결-건조될 수 있다. 동결-건조 후, 백신은 최종 백신 제품의 생산 전 아주반트를 첨가할 필요 없이 담체와 조합될 수 있다. 별법으로, 제형은 백신의 면역 반응을 개선하기 위해 백신에 첨가되는 물질인 아주반트를 포함할 수 있다. 아주반트는 동결 건조 전 또는 후에 첨가될 수 있다. 아주반트의 예로는 미네랄 염, 예를 들어 수산화알루미늄 및 인산 알루미늄 또는 칼슘 젤, 오일 에멀전 및 계면활성제 기재 제형, 예를 들어 MF59 (미세유동화 세제 안정화 수중유형 에멀전), QS21 (정제된 사포닌), AS02 ([SBAS2] (수중유형 + MPL + WS-21)), 몬타니드(Montanide) ISA-51 및 ISA-720 (안정화 유중수형 에멀전); 미립자 아주반트, (예를 들어, 비로솜 (인플루엔자 적혈구응집소를 포함하는 단층 리포솜 비히클), AS04 ([SBAS4] MPL 함유 A1 염), ISCOMS (사포닌 및 지질의 구조화된 복합체), 폴리락티드 코-글리콜리드 (PLG); 미생물 유도제 (천연 및 합성), 예를 들어 모노포스포릴 지질 A (MPL), 데톡스(Detox) (MPL + 엠. 플레이(M. Phlei) 세포 벽 골격), AGP [RC-529] (합성 아실화 모노사카라이드), DC_Chol (리포솜으로 자가 조직화될 수 있는 지질성 면역증강제), OM-174 (지질 A 유도제), CpG 모티프 (면역증강성 CpG 모티프를 함유하는 합성 올리고뉴클레오타이드), 변형된 LT 및 CT (비독성 아주반트 효과를 제공하는 유전적으로 변형된 박테리아 독소; 내인성 인간 면역조절제, 예를 들어 hGM-CSF 또는 hIL-12 (코딩된 단백질 또는 플라스미드로서 투여될 수 있는 시토킨), 이뮤답틴(Immudaptin) (C3d 직렬 배열); 비활성 비히클, 예컨대 금 입자; 및 스쿠알렌이 포함된다. 액체

제형 및 최종 건조 백신 분말 제형은 아주반트를 갖지 않을 수 있다.

[0048] **III. 동결 건조**

[0049] 액체 제형은 동결 건조에 의해 분말로 전환될 수 있다. 동결 건조는 물질을 동결시킨 후 승화에 의해 물을 제거하여 건조시키는 공정이다. 급속 동결은, 예를 들어 액체 질소 또는 한랭 가스 스트림에서 분무 액적의 즉각적 함침 (분무-동결 건조)에 의해 수행될 수 있다. 급속 동결은 또한 분무-동결 단계를 포함하지 않는 공정에 의해 수행될 수 있다. 급속 동결은 액체 백신 제형을 액체 질소 (-196℃)와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 급속 동결은 액체 백신 제형을 또 다른 화학물질과 조합된 액체 질소, 예를 들어 hexan/액체 질소 (-94℃), 메탄올/액체 질소 (-98℃) 및 펜탄 액체 질소 (-131℃)와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다 (문헌 [Gordon AJ and Ford RA "The Chemist's Companion. Wiley. New York 1972] 참조). 급속 동결은 액체 백신 제형을 드라이 아이스/유기 용매 (예를 들어, 에탄올, 메탄올, 에틸렌 글리콜, 사염화탄소, 아세토니트릴, 이소프로필 알콜 또는 아세톤) 배스, 예를 들어 사염화탄소/드라이 아이스 (-23℃), 아세토니트릴/드라이 아이스 (-42℃) 또는 아세톤 또는 이소프로필 알콜/드라이 아이스 배스 (-78℃)와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다 (상기 문헌 [Gordon] 참조). 급속 동결은 -40℃에 도달할 수 있는 얼음 및 무기 염 (예를 들어, NaCl 또는 CaCl₂)의 슬러리 중에 액체 백신 제형을 함침시킴으로써 수행될 수 있다. 액체 백신 제형이 동결될 수 있는 온도는 약 0℃, -5℃, -10℃, -15℃, -20℃, -25℃, -30℃, -35℃, -40℃, -45℃, -50℃, -55℃, -60℃, -65℃, -70℃, -75℃, -80℃, -85℃, -90℃, -95℃, -100℃, -105℃, -110℃, -115℃, -120℃, -125℃, -130℃, -135℃, -140℃, -145℃, -150℃, -155℃, -160℃, -165℃, -170℃, -175℃, -180℃, -185℃, -190℃, -195℃, -200℃, -205℃ 또는 -210℃ 미만일 수 있다. 액체 백신 제형이 동결될 수 있는 온도는 약 0℃ 내지 -210℃, -50℃ 내지 약 -210℃, -100℃ 내지 약 -210℃ 또는 -150℃ 내지 약 -200℃일 수 있다. 액체 백신 제형이 동결될 수 있는 온도는 약 0℃, -5℃, -10℃, -15℃, -20℃, -25℃, -30℃, -35℃, -40℃, -45℃, -50℃, -55℃, -60℃, -65℃, -70℃, -75℃, -80℃, -85℃, -90℃, -95℃, -100℃, -105℃, -110℃, -115℃, -120℃, -125℃, -130℃, -135℃, -140℃, -145℃, -150℃, -155℃, -160℃, -165℃, -170℃, -175℃, -180℃, -185℃, -190℃, -195℃, -200℃, -205℃ 또는 -210℃일 수 있다. 동결 방법은 액체 백신 제형 중 항원의 3차원 형상이 상실되는 것을 방지할 수 있다.

[0050] 본원에 개시된 일부 항원-함유 용액은 탄수화물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항원-함유 용액은 트레할로스, 만니톨, 수크로스, 락토스 또는 이눌린을 포함하나 이에 제한되지 않는 당을 함유할 수 있다. 이러한 당은 다양한 목적을 위해, 예를 들어 용액의 단백질성 성분이 동결시 항원 능력을 상실하거나 항원 능력이 감소되는 것으로부터 보호하기 위해 이용된다. 예를 들어, 용액에 트레할로스를 첨가하면, 단백질을 함유하는 액체 제형 (예를 들어, 액체 백신 액체 제형)에서 인플루엔자의 단백질, 예컨대 적혈구응집소 (HA)의 항원성 상실을 방지할 수 있다. 그러나, 트레할로스 및 다른 당의 첨가는, 분무 동결이 이용되지 않는 한 백신 제제에 단단한 덩어리를 형성시킬 수 있다. 본원에 개시된 신규 방법은 분무 동결을 필요로 하지 않으며 단단한 덩어리를 형성시키지 않는 급속 동결 방법에서 상기 당의 사용을 허용한다. 이는 단단한 덩어리의 분쇄를 필요로 하는 종래 접근법에 비해 진보한 것인데, 상기 처리가 생물학적 분자 성분의 항원성을 상실시킬 수 있기 때문이다. 항원-함유 용액 중 본원에 개시된 완충제와 당의 조합은 상기 결과를 허용한다. 본원에 개시된 당-함유 용액의 급속 동결은 분말을 생성시킬 수 있다.

[0051] 액체 백신 제형은 차가운 액체, 예를 들어 액체 질소에 약 30초 내지 5분, 1분 내지 60분, 1분 내지 50분, 1 내지 40분, 1 내지 30분, 1 내지 20분, 1 내지 10분 또는 1 내지 5분 동안 노출될 수 있다. 액체 백신 제형은 차가운 액체, 예를 들어 액체 질소에 약 30초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분 또는 60분 동안 노출될 수 있다. 액체 백신 제형은 차가운 액체, 예를 들어 액체 질소에 약 30초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분 또는 60분 초과 동안 노출될 수 있다. 액체 백신 제형은, 액체 백신 제형을 용기에 넣고, 용기를 차가운 액체 (예를 들어, 액체 질소)에 담금으로써 차가운 액체에 노출될 수 있다. 액체 백신 제형은, 액체 백신 제형을 차가운 액체 (예를 들어, 액체 질소)에 직접 도입함으로써 차가운 액체에 노출될 수 있다. 액체 백신 제형은, 차가운 액체 (예를 들어, 액체 질소)를 액체 백신 제형 상에 부음으로써 차가운 액체에 노출될 수 있다.

[0052] **건조**

[0053] 예를 들어, 액체 질소 중에서 급속 동결된 후, 동결 제형은 동결-건조기에서 동결 건조될 수 있다. 동결 건조

는 하나 이상의 단계 (예를 들어, 동일한 압력에서의 상이한 온도)로 발생할 수 있다. 동결 건조는, 예를 들어 약 -210℃, -205℃, -200℃, -195℃, -190℃, -185℃, -180℃, -175℃, -170℃, -165℃, -160℃, -155℃, -150℃, -145℃, -140℃, -135℃, -130℃, -125℃, -120℃, -115℃, -110℃, -105℃, -100℃, -95℃, -90℃, -85℃, -80℃, -75℃, -70℃, -65℃, -60℃, -55℃, -50℃, -45℃, -40℃, -35℃, -30℃, -25℃, -20℃, -15℃, -10℃, -5℃, 0℃, 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃ 또는 30℃에서 발생할 수 있다. 동결 건조는, 예를 들어 약 -210℃, -205℃, -200℃, -195℃, -190℃, -185℃, -180℃, -175℃, -170℃, -165℃, -160℃, -155℃, -150℃, -145℃, -140℃, -135℃, -130℃, -125℃, -120℃, -115℃, -110℃, -105℃, -100℃, -95℃, -90℃, -85℃, -80℃, -75℃, -70℃, -65℃, -60℃, -55℃, -50℃, -45℃, -40℃, -35℃, -30℃, -25℃, -20℃, -15℃, -10℃, -5℃, 0℃, 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃ 또는 30℃ 초과에서 발생할 수 있다. 동결 건조는, 예를 들어 약 -80℃ 내지 30℃, 약 -50℃ 내지 25℃, 또는 약 -40℃ 내지 20℃에서 발생할 수 있다. 동결-건조는 하나의 온도, 2개의 상이한 온도, 3개의 상이한 온도, 4개의 상이한 온도, 5개의 상이한 온도, 6개의 상이한 온도, 7개의 상이한 온도, 8개의 상이한 온도, 9개의 상이한 온도 또는 10개의 상이한 온도에서 발생할 수 있다.

[0054] 동결-건조는 하나 이상의 상이한 압력에서 발생할 수 있다. 압력은, 예를 들어 약 10 mtorr 내지 300 mtorr, 약 25 mtorr 내지 300 mtorr, 약 50 mtorr 내지 250 mtorr 또는 약 50 mtorr 내지 200 mtorr일 수 있다. 동결-건조는 약 10 mtorr, 20 mtorr, 30 mtorr, 40 mtorr, 50 mtorr, 60 mtorr, 70 mtorr, 80 mtorr, 90 mtorr, 100, mtorr, 110 mtorr, 120 mtorr, 130 mtorr, 140 mtorr, 150 mtorr, 160 mtorr, 170 mtorr, 180 mtorr, 190 mtorr, 200 mtorr, 210 mtorr, 220 mtorr, 230 mtorr, 240 mtorr, 250 mtorr, 260 mtorr, 270 mtorr, 280 mtorr, 290 mtorr 또는 300 mtorr에서 발생할 수 있다. 동결-건조는 약 10 mtorr, 20 mtorr, 30 mtorr, 40 mtorr, 50 mtorr, 60 mtorr, 70 mtorr, 80 mtorr, 90 mtorr, 100, mtorr, 110 mtorr, 120 mtorr, 130 mtorr, 140 mtorr, 150 mtorr, 160 mtorr, 170 mtorr, 180 mtorr, 190 mtorr, 200 mtorr, 210 mtorr, 220 mtorr, 230 mtorr, 240 mtorr, 250 mtorr, 260 mtorr, 270 mtorr, 280 mtorr, 290 mtorr 또는 300 mtorr 초과에서 발생할 수 있다.

[0055] 각각의 동결-건조 단계의 지속시간은 약 1시간 내지 48시간, 약 1시간 내지 36시간, 약 1시간 내지 24시간, 약 4시간 내지 24시간, 약 6시간 내지 24시간, 또는 약 8시간 내지 24시간일 수 있다. 각각의 동결-건조 단계의 지속시간은 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간, 25시간, 26시간, 27시간, 28시간, 29시간, 30시간, 31시간, 32시간, 33시간, 34시간, 35시간, 36시간, 37시간, 38시간, 39시간, 40시간, 41시간, 42시간, 43시간, 44시간, 45시간, 46시간, 47시간, 또는 48시간일 수 있다. 각각 동결-건조 단계의 지속시간은 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간, 25시간, 26시간, 27시간, 28시간, 29시간, 30시간, 31시간, 32시간, 33시간, 34시간, 35시간, 36시간, 37시간, 38시간, 39시간, 40시간, 41시간, 42시간, 43시간, 44시간, 45시간, 46시간, 47시간, 또는 48시간 초과일 수 있다.

[0056] 하나 이상의 건조 단계가 본원에 개시된 방법에 이용될 수 있다. 동결 샘플의 1차 건조는 임의의 관련 방법론, 예를 들어 냉동 건조에 의해 수행될 수 있다. 2차 건조는 예를 들어, 더 높은 온도의 진공 챔버에서의 지속적인 동결 건조, 온도 제어된 표면의 접촉 노출, 또는 볼텍스 또는 온도/습도 제어된 기체의 유동층에서의 입자의 현탁에 의해 수행될 수 있다. 건조된 분말 입자 생성물은, 예를 들어 공정 용기로부터, 또는 공정 기체 스트림으로부터의 입자의 분리 및 침강에 의해 회수될 수 있다.

[0057] 다른 건조 절차는, 예를 들어 공기 건조, 질소 퍼지(purge) 하의 건조 (분쇄 및 체질(sieving)을 포함함), 동결-건조 (제분 및 체질을 포함함), 및 초임계 유체 건조 (SCF)를 포함한다. 건조 절차는 항원의 3차원 구조를 보존시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 절차는 인플루엔자 HA 항원의 구조를 보존시켜 높은 HA 효력을 제공할 수 있다.

[0058] 동결 건조 후, 분말은 약 4 내지 25℃의 온도에서 보관 (보존)될 수 있다. 보존 조건의 상대 습도는 약 0% 내지 70%, 약 0% 내지 60%, 약 0% 내지 50%, 약 0% 내지 40%, 약 0% 내지 30%, 약 0% 내지 20%, 약 0% 내지 10%, 또는 약 0% 내지 5%일 수 있다. 보존의 상대 습도는 약 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만일 수 있다.

- [0059] 동결 건조 후 분말의 수분 함량은 약 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1%일 수 있다. 동결 건조 후 분말의 수분 함량은 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.01% 미만일 수 있다.
- [0060] 동결 건조 후 생성된 분말의 평균 입경 크기는 약 5 내지 100 μm , 약 5 내지 60 μm , 또는 약 5 내지 30 μm 일 수 있다. 동결 건조 후 생성된 분말의 평균 입경 크기는 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 또는 95 μm 미만일 수 있다.
- [0061] **IV. 담체**
- [0062] 본원에 기재된 동결 건조 방법에 의해 생성된 분말을 하나 이상의 추가의 성분과 블렌딩하여 건조 백신 분말 제형을 생성할 수 있다. 상기 성분에는 제약상 허용되는 담체, 예를 들어 점막 투여에 적절한 담체가 포함된다. 점막 투여에 적합한 담체는 생리학상 허용되는 물질, 예컨대 미세결정성 셀룰로스일 수 있다. 미세결정성 셀룰로스는 더 큰 비표면적을 갖는 특정 미세결정성 셀룰로스일 수 있다. 비록 임의의 미세결정성 셀룰로스가 이용될 수 있지만, 몇몇 실시양태에서, 본 출원의 백신을 생성하기 위해 사용된 미세결정성 셀룰로스는 세올루스(Ceolus) (등록상표) PH-F20JP 또는 아비셀(Avicel) (등록상표) PH-105일 수 있다.
- [0063] 담체의 분말 입자, 또는 완전한 백신을 규정하는 하나의 방법은 평균 입도를 기반으로 한다. 미세결정성 셀룰로스 및/또는 백신 입자의 평균 입도는 당업계에 공지된 임의의 수단, 예를 들어 감별(sifting), 체질 또는 레이저 회절에 의해 측정될 수 있다. 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및/또는 백신의 평균 입도는, 예를 들어 약 10 μm , 11 μm , 12 μm , 13 μm , 14 μm , 15 μm , 16 μm , 17 μm , 18 μm , 19 μm , 20 μm , 21 μm , 22 μm , 23 μm , 24 μm , 25 μm , 26 μm , 27 μm , 28 μm , 29 μm , 30 μm , 31 μm , 32 μm , 33 μm , 34 μm , 35 μm , 36 μm , 37 μm , 38 μm , 39 μm , 40 μm , 41 μm , 42 μm , 43 μm , 44 μm , 45 μm , 46 μm , 47 μm , 48 μm , 49 μm , 50 μm , 51 μm , 52 μm , 53 μm , 54 μm , 55 μm , 56 μm , 57 μm , 58 μm , 59 μm , 60 μm , 61 μm , 62 μm , 63 μm , 64 μm , 65 μm , 66 μm , 67 μm , 68 μm , 69 μm , 70 μm , 71 μm , 72 μm , 73 μm , 74 μm , 75 μm , 76 μm , 77 μm , 78 μm , 79 μm , 80 μm , 81 μm , 82 μm , 83 μm , 84 μm , 85 μm , 86 μm , 87 μm , 88 μm , 89 μm , 90 μm , 91 μm , 92 μm , 93 μm , 94 μm , 95 μm , 96 μm , 97 μm , 98 μm , 99 μm , 100 μm , 110 μm , 120 μm , 130 μm , 140 μm , 150 μm , 160 μm , 170 μm , 180 μm , 190 μm , 또는 200 μm 일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 백신 조성물용 담체로 사용된 미세결정성 셀룰로스는, 예를 들어 레이저 회절, 체질 또는 감별에 의해 측정시 25 μm , 39 μm , 또는 57 μm 의 평균 입도를 가질 수 있다.
- [0064] 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및/또는 백신 분말은 유용한 입도 분포로 제조될 수 있다. 담체 및/또는 백신의 체제는, 예를 들어 10 - 200 μm , 20 - 200 μm , 30 - 200 μm , 40 - 200 μm , 50 - 200 μm , 60 - 200 μm , 70 - 200 μm , 80 - 200 μm , 90 - 200 μm , 100 - 200 μm , 110 - 200 μm , 120 - 200 μm , 130 - 200 μm , 140 - 200 μm , 150 - 200 μm , 160 - 200 μm , 170 - 200 μm , 180 - 200 μm , 190 - 200 μm 의 입도 분포, 또는 임의의 포함된 상기 입도 분포의 하위-범위를 가질 수 있다. 본원에 기재된 분말은 추가의 입도 분포, 예를 들어 10 - 100 μm , 20 - 100 μm , 30 - 100 μm , 40 - 100 μm , 50 - 100 μm , 60 - 100 μm , 70 - 100 μm , 80 - 100 μm , 90 - 100 μm , 10 - 50 μm , 10 - 60 μm , 20 - 60 μm , 30 - 70 μm , 40 - 80 μm , 50 - 90 μm , 60 - 100 μm , 70 - 110 μm , 80 - 120 μm , 90 - 130 μm , 100 - 140 μm , 110 - 150 μm , 120 - 160 μm , 130 - 170 μm , 140 - 180 μm , 150 - 190 μm , 160 - 200 μm 의 입도, 또는 임의의 포함된 상기 입도의 하위-범위를 가질 수 있다. 담체 및/또는 백신은, 예를 들어 10 - 50 μm , 11 - 50 μm , 12 - 50 μm , 13 - 50 μm , 14 - 50 μm , 15 - 50 μm , 16 - 50 μm , 17 - 50 μm , 18 - 50 μm , 19 - 50 μm , 20 - 50 μm , 21 - 50 μm , 22 - 50 μm , 23 - 50 μm , 24 - 50 μm , 25 - 50 μm , 26 - 50 μm , 27 - 50 μm , 28 - 50 μm , 29 - 50 μm , 30 - 50 μm 의 입도 분포, 또는 임의의 포함된 상기 입도의 하위-범위를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 담체 및/또는 백신은 19 - 60 μm 의 입도 분포, 또는 19 - 50 μm 의 입도 분포를 가질 수 있다.
- [0065] 본원에 기재된 백신의 제조를 위해 유용한 미세결정성 셀룰로스 분말, 또는 다른 담체 화합물은 특정 물리적 측면과 관련하여 명시되거나 또는 명시되지 않을 수 있다. 예를 들어, 미세결정성 셀룰로스 분말은 폐를 보호할 수 있는 더 큰 입자를 갖는 것으로 명시될 수 있다. 미세결정성 셀룰로스 분말은 면역 반응을 증대시킬 수 있는 더 작은 입자를 갖는 것으로 명시될 수 있다. 분말의 물리적 특징은 체질에 의해 세분화될 수 있거나 또는 이와 달리, 예를 들어 약 10 μm 미만, 약 20 μm 미만, 약 30 μm 미만, 약 40 μm 미만, 약 50 μm 미만, 약 60 μm 미만, 약 70 μm 미만, 약 80 μm 미만, 약 90 μm 미만, 약 100 μm 미만인 입자의 존재를 최소화하기 위해 처리되고/되거나, 약 20 μm 초과, 약 30 μm 초과, 약 40 μm 초과, 약 50 μm 초과, 약 60 μm 초과, 약 70 μm 초과, 약 80 μm 초과, 약 90 μm 초과, 약 100 μm 초과, 약 110 μm 초과, 약 120 μm 초과, 약 130 μm 초과, 약 140 μm 초

과, 약 150 μm 초과, 약 160 μm 초과, 약 170 μm 초과, 약 180 μm 초과, 약 190 μm 초과, 또는 약 200 μm 초과인 입자를 최소화하기 위해 처리될 수 있다.

[0066]

본원에 기재된 원하는 결과 (예를 들어, 증진된 면역원성)를 달성하기 위해 변화될 수 있는 분말 조성물의 추가의 파라미터는 분말의 비표면적이다. 예를 들어, 분말 조성물은, 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및/또는 백신의 비표면적이 1.0 m^2/g , 1.1 m^2/g , 1.2 m^2/g , 1.3 m^2/g , 1.4 m^2/g , 1.5 m^2/g , 1.6 m^2/g , 1.7 m^2/g , 1.8 m^2/g , 1.9 m^2/g , 2.0 m^2/g , 2.1 m^2/g , 2.2 m^2/g , 2.3 m^2/g , 2.4 m^2/g , 2.5 m^2/g , 2.6 m^2/g , 2.7 m^2/g , 2.8 m^2/g , 2.9 m^2/g , 3.0 m^2/g , 3.1 m^2/g , 3.2 m^2/g , 3.3 m^2/g , 3.4 m^2/g , 3.5 m^2/g , 3.6 m^2/g , 3.7 m^2/g , 3.8 m^2/g , 3.9 m^2/g , 4.0 m^2/g , 4.1 m^2/g , 4.2 m^2/g , 4.3 m^2/g , 4.4 m^2/g , 4.5 m^2/g , 4.6 m^2/g , 4.7 m^2/g , 4.8 m^2/g , 4.9 m^2/g , 5.0 m^2/g , 5.1 m^2/g , 5.2 m^2/g , 5.3 m^2/g , 5.4 m^2/g , 5.5 m^2/g , 5.6 m^2/g , 5.7 m^2/g , 5.8 m^2/g , 5.9 m^2/g , 6.0 m^2/g , 6.1 m^2/g , 6.2 m^2/g , 6.3 m^2/g , 6.4 m^2/g , 6.5 m^2/g , 6.6 m^2/g , 6.7 m^2/g , 6.8 m^2/g , 6.9 m^2/g , 7.0 m^2/g , 7.1 m^2/g , 7.2 m^2/g , 7.3 m^2/g , 7.4 m^2/g , 7.5 m^2/g , 7.6 m^2/g , 7.7 m^2/g , 7.8 m^2/g , 7.9 m^2/g , 8.0 m^2/g , 8.1 m^2/g , 8.2 m^2/g , 8.3 m^2/g , 8.4 m^2/g , 8.5 m^2/g , 8.6 m^2/g , 8.7 m^2/g , 8.8 m^2/g , 8.9 m^2/g , 9.0 m^2/g , 9.1 m^2/g , 9.2 m^2/g , 9.3 m^2/g , 9.4 m^2/g , 9.5 m^2/g , 9.6 m^2/g , 9.7 m^2/g , 9.8 m^2/g , 9.9 m^2/g , 10.0 m^2/g , 10.1 m^2/g , 10.2 m^2/g , 10.3 m^2/g , 10.4 m^2/g , 10.5 m^2/g , 10.6 m^2/g , 10.7 m^2/g , 10.8 m^2/g , 10.9 m^2/g , 11.0 m^2/g , 11.1 m^2/g , 11.2 m^2/g , 11.3 m^2/g , 11.4 m^2/g , 11.5 m^2/g , 11.6 m^2/g , 11.7 m^2/g , 11.8 m^2/g , 11.9 m^2/g , 12.0 m^2/g , 12.1 m^2/g , 12.2 m^2/g , 12.3 m^2/g , 12.4 m^2/g , 12.5 m^2/g , 12.6 m^2/g , 12.7 m^2/g , 12.8 m^2/g , 12.9 m^2/g , 13.0 m^2/g , 13.1 m^2/g , 13.2 m^2/g , 13.3 m^2/g , 13.4 m^2/g , 13.5 m^2/g , 13.6 m^2/g , 13.7 m^2/g , 13.8 m^2/g , 13.9 m^2/g , 14.0 m^2/g , 14.1 m^2/g , 14.2 m^2/g , 14.3 m^2/g , 14.4 m^2/g , 14.5 m^2/g , 14.6 m^2/g , 14.7 m^2/g , 14.8 m^2/g , 14.9 m^2/g , 15.0 m^2/g , 15.1 m^2/g , 15.2 m^2/g , 15.3 m^2/g , 15.4 m^2/g , 15.5 m^2/g , 15.6 m^2/g , 15.7 m^2/g , 15.8 m^2/g , 15.9 m^2/g , 16.0 m^2/g , 16.1 m^2/g , 16.2 m^2/g , 16.3 m^2/g , 16.4 m^2/g , 16.5 m^2/g , 16.6 m^2/g , 16.7 m^2/g , 16.8 m^2/g , 16.9 m^2/g , 17.0 m^2/g , 17.1 m^2/g , 17.2 m^2/g , 17.3 m^2/g , 17.4 m^2/g , 17.5 m^2/g , 17.6 m^2/g , 17.7 m^2/g , 17.8 m^2/g , 17.9 m^2/g , 18.0 m^2/g , 18.1 m^2/g , 18.2 m^2/g , 18.3 m^2/g , 18.4 m^2/g , 18.5 m^2/g , 18.6 m^2/g , 18.7 m^2/g , 18.8 m^2/g , 18.9 m^2/g , 19.0 m^2/g , 19.1 m^2/g , 19.2 m^2/g , 19.3 m^2/g , 19.4 m^2/g , 19.5 m^2/g , 19.6 m^2/g , 19.7 m^2/g , 19.8 m^2/g , 19.9 m^2/g , 또는 20.0 m^2/g 이도록 제조될 수 있다. 분말의 비표면적은, 예를 들어 약 21 m^2/g , 22 m^2/g , 23 m^2/g , 24 m^2/g , 25 m^2/g , 26 m^2/g , 27 m^2/g , 28 m^2/g , 29 m^2/g , 30 m^2/g , 31 m^2/g , 32 m^2/g , 33 m^2/g , 34 m^2/g , 35 m^2/g , 36 m^2/g , 37 m^2/g , 38 m^2/g , 39 m^2/g , 40 m^2/g , 41 m^2/g , 42 m^2/g , 43 m^2/g , 44 m^2/g , 45 m^2/g , 46 m^2/g , 47 m^2/g , 48 m^2/g , 49 m^2/g , 또는 50 m^2/g 일 수 있다. 특정 실시양태에서, 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및/또는 백신 분말의 비표면적은 1.3 m^2/g 이하, 1.3 m^2/g 이상이거나 또는 약 2.3 m^2/g 일 수 있다.

[0067]

분말 조성물 (담체 및/또는 백신)을 기술할 수 있는 또 다른 파라미터는 부피 밀도에 의한 것이다. 몇몇 실시양태에서, 사용된 분말은 부피 밀도 범위를 가질 수 있다. 본 발명의 분말은, 예를 들어 0.10 - 1.00 g/cm^3 , 0.10 - 0.90 g/cm^3 , 0.10 - 0.80 g/cm^3 , 0.10 - 0.70 g/cm^3 , 0.10 - 0.60 g/cm^3 , 0.10 - 0.50 g/cm^3 , 0.10 - 0.40 g/cm^3 , 0.10 - 0.30 g/cm^3 , 0.20 - 1.00 g/cm^3 , 0.20 - 0.90 g/cm^3 , 0.20 - 0.80 g/cm^3 , 0.20 - 0.70 g/cm^3 , 0.20 - 0.60 g/cm^3 , 0.20 - 0.50 g/cm^3 , 0.20 - 0.40 g/cm^3 , 0.20 - 0.30 g/cm^3 , 0.30 - 1.00 g/cm^3 , 0.30 - 0.90 g/cm^3 , 0.30 - 0.80 g/cm^3 , 0.30 - 0.70 g/cm^3 , 0.30 - 0.60 g/cm^3 , 0.30 - 0.50 g/cm^3 , 0.30 - 0.40 g/cm^3 , 0.40 - 1.00 g/cm^3 , 0.40 - 0.90 g/cm^3 , 0.40 - 0.80 g/cm^3 , 0.40 - 0.70 g/cm^3 , 0.40 - 0.60 g/cm^3 , 0.40 - 0.50 g/cm^3 , 0.50 - 1.00 g/cm^3 , 0.50 - 0.90 g/cm^3 , 0.50 - 0.80 g/cm^3 , 0.50 - 0.70 g/cm^3 , 0.50 - 0.60 g/cm^3 , 0.60 - 1.00 g/cm^3 , 0.60 - 0.90 g/cm^3 , 0.60 - 0.80 g/cm^3 , 0.60 - 0.70 g/cm^3 , 0.70 -

1.00 g/cm³, 0.70 - 0.90 g/cm³, 0.70 - 0.80 g/cm³, 0.80 - 1.00 g/cm³, 0.80 - 0.90 g/cm³, 0.9 - 1.0 g/cm³의 부피 밀도, 또는 임의의 포함된 하위 범위를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 0.13 - 2.9 g/cm³ 또는 0.26 - 0.48 g/cm³의 부피 밀도를 갖는 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및/또는 백신 분말이 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 분말은, 예를 들어 0.10 g/cm³, 0.11 g/cm³, 0.12 g/cm³, 0.13 g/cm³, 0.14 g/cm³, 0.15 g/cm³, 0.16 g/cm³, 0.17 g/cm³, 0.18 g/cm³, 0.19 g/cm³, 0.20 g/cm³, 0.21 g/cm³, 0.22 g/cm³, 0.23 g/cm³, 0.24 g/cm³, 0.25 g/cm³, 0.26 g/cm³, 0.27 g/cm³, 0.28 g/cm³, 0.29 g/cm³, 0.30 g/cm³, 0.31 g/cm³, 0.32 g/cm³, 0.33 g/cm³, 0.34 g/cm³, 0.35 g/cm³, 0.36 g/cm³, 0.37 g/cm³, 0.38 g/cm³, 0.39 g/cm³, 0.40 g/cm³, 0.41 g/cm³, 0.42 g/cm³, 0.43 g/cm³, 0.44 g/cm³, 0.45 g/cm³, 0.46 g/cm³, 0.47 g/cm³, 0.48 g/cm³, 0.49 g/cm³, 0.50 g/cm³, 0.51 g/cm³, 0.52 g/cm³, 0.53 g/cm³, 0.54 g/cm³, 0.55 g/cm³, 0.56 g/cm³, 0.57 g/cm³, 0.58 g/cm³, 0.59 g/cm³, 0.60 g/cm³, 0.61 g/cm³, 0.62 g/cm³, 0.63 g/cm³, 0.64 g/cm³, 0.65 g/cm³, 0.66 g/cm³, 0.67 g/cm³, 0.68 g/cm³, 0.69 g/cm³, 0.70 g/cm³, 0.71 g/cm³, 0.72 g/cm³, 0.73 g/cm³, 0.74 g/cm³, 0.75 g/cm³, 0.76 g/cm³, 0.77 g/cm³, 0.78 g/cm³, 0.79 g/cm³, 0.80 g/cm³, 0.81 g/cm³, 0.82 g/cm³, 0.83 g/cm³, 0.84 g/cm³, 0.85 g/cm³, 0.86 g/cm³, 0.87 g/cm³, 0.88 g/cm³, 0.89 g/cm³, 0.90 g/cm³, 0.91 g/cm³, 0.92 g/cm³, 0.93 g/cm³, 0.94 g/cm³, 0.95 g/cm³, 0.96 g/cm³, 0.97 g/cm³, 0.98 g/cm³, 0.99 g/cm³, 또는 1.00 g/cm³의 특정 부피 밀도를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및/또는 백신 분말은 0.23 g/cm³ 또는 0.41 g/cm³의 부피 밀도를 가질 수 있다.

[0068] 담체, 예를 들어 미세결정성 셀룰로스는, 건조 백신 분말 제형의 질량의 약 25% 내지 약 98%를 차지할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 담체는 건조 백신 분말 제형의 약 98%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 또는 25% 이하를 차지할 수 있다.

[0069] 본 발명의 백신에 유용한 또 다른 담체는 제3인산칼슘 (TCP)일 수 있다. TCP는 건조 백신 분말 제형의 약 0.5% 내지 약 5%를 차지할 수 있다. TCP는 건조 백신 분말 제형의 약 0.5%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.2%, 1.4%, 1.6%, 1.8%, 2%, 2.2%, 2.4%, 2.6%, 2.8%, 3%, 4%, 또는 5% 이하를 차지할 수 있다.

[0070] 담체는 블렌딩, 예를 들어 볼텍싱하여 첨가될 수 있다. 블렌딩, 예를 들어 볼텍싱의 지속기간은 약 30초 내지 120분, 약 30초 내지 2분, 약 30초 내지 7.5분, 약 20초 내지 15분, 약 30초 내지 30분, 약 30초 내지 45분, 약 30초 내지 60분, 약 30초 내지 75분, 약 30초 내지 90분, 약 30초 내지 120분일 수 있다. 블렌딩, 예를 들어 볼텍싱의 지속기간은 약 30초, 1분, 2분, 4분, 8분, 10분, 15분, 20분, 30분, 45분, 60분, 90분 또는 120분 초과일 수 있다. 블렌딩, 예를 들어 볼텍싱의 지속기간은 약 30초, 1분, 5분, 10분, 15분, 30분, 45분, 60분, 75분, 90분 또는 120분일 수 있다.

[0071] 블렌딩 시, 동결 건조된 항원-함유 분말 및 담체를 포함하는 건조 백신 제형의 입도는 관심있는 해부학적 부위의 건조 분말 백신의 전달을 위한 임의의 적절한 크기일 수 있다. 추가적으로, 입자의 크기는 상이한 전달 장치에 대해 조정될 수 있다. 따라서, 본원의 방법에 의해 생성된 동결 건조된 항원 (예를 들어, 인플루엔자) 및 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스)를 함유하는 건조 분말 백신 제형의 평균 입경 크기는 약 10 μm, 11 μm, 12 μm, 13 μm, 14 μm, 15 μm, 16 μm, 17 μm, 18 μm, 19 μm, 20 μm, 21 μm, 22 μm, 23 μm, 24 μm, 25 μm, 26 μm, 27 μm, 28 μm, 29 μm, 30 μm, 31 μm, 32 μm, 33 μm, 34 μm, 35 μm, 36 μm, 37 μm, 38 μm, 39 μm, 40 μm, 41 μm, 42 μm, 43 μm, 44 μm, 45 μm, 46 μm, 47 μm, 48 μm, 49 μm, 50 μm, 51 μm, 52 μm, 53 μm, 54 μm, 55 μm, 56 μm, 57 μm, 58 μm, 59 μm, 60 μm, 61 μm, 62 μm, 63 μm, 64 μm, 65 μm, 66 μm, 67 μm, 68 μm, 69 μm, 70 μm, 71 μm, 72 μm, 73 μm, 74 μm, 75 μm, 76 μm, 77 μm, 78 μm, 79 μm, 80 μm, 81 μm, 82 μm, 83 μm, 84 μm, 85 μm, 86 μm, 87 μm, 88 μm, 89 μm, 90 μm, 91 μm, 92 μm, 93 μm, 94 μm, 95 μm, 96 μm, 97 μm, 98 μm, 99 μm, 100 μm, 110 μm, 120 μm, 130 μm, 140 μm, 150 μm, 160 μm, 170 μm, 180 μm, 190 μm, 또는 200 μm 미만일 수 있다.

[0072] 동결 건조된 항원-함유 분말 및 담체를 포함하는 건조 백신 제형은, 예를 들어 10 - 200 μm, 20 - 200 μm, 30 - 200 μm, 40 - 200 μm, 50 - 200 μm, 60 - 200 μm, 70 - 200 μm, 80 - 200 μm, 90 - 200 μm, 100 - 200 μm, 110 - 200 μm, 120 - 200 μm, 130 - 200 μm, 140 - 200 μm, 150 - 200 μm, 160 - 200 μm, 170 - 200 μm, 180

- 200 μm , 190 - 200 μm 의 입도 범위, 또는 임의의 포함된 상기 입도의 하위-범위를 가질 수 있다. 동결 건조된 항원-함유 분말 및 담체를 포함하는 건조 백신 제형은, 예를 들어 10 - 100 μm , 20 - 100 μm , 30 - 100 μm , 40 - 100 μm , 50 - 100 μm , 60 - 100 μm , 70 - 100 μm , 80 - 100 μm , 90 - 100 μm , 10 - 50 μm , 20 - 60 μm , 30 - 70 μm , 40 - 80 μm , 50 - 90 μm , 60 - 100 μm , 70 - 110 μm , 80 - 120 μm , 90 - 130 μm , 100 - 140 μm , 110 - 150 μm , 120 - 160 μm , 130 - 170 μm , 140 - 180 μm , 150 - 190 μm , 160 - 200 μm 의 입도 범위, 또는 임의의 포함된 상기 입도의 하위-범위를 가질 수 있다.

[0073] 동결 건조된 항원-함유 분말 및 담체를 포함하는 건조 백신 제형은 체질에 의해 세분화될 수 있거나 또는 이와 달리, 예를 들어 약 10 μm 미만, 약 20 μm 미만, 약 30 μm 미만, 약 40 μm 미만, 약 50 μm 미만, 약 60 μm 미만, 약 70 μm 미만, 약 80 μm 미만, 약 90 μm 미만, 약 100 μm 미만인 입자를 최소화하기 위해 처리되고/되거나, 약 20 μm 초과, 약 30 μm 초과, 약 40 μm 초과, 약 50 μm 초과, 약 60 μm 초과, 약 70 μm 초과, 약 80 μm 초과, 약 90 μm 초과, 약 100 μm 초과, 약 110 μm 초과, 약 120 μm 초과, 약 130 μm 초과, 약 140 μm 초과, 약 150 μm 초과, 약 160 μm 초과, 약 170 μm 초과, 약 180 μm 초과, 약 190 μm 초과 또는 약 200 μm 초과인 입자를 최소화하기 위해 처리할 수 있다.

[0074] V. 안정성 및 흡습성

[0075] 본원에 기재된 바와 같이 제조된 건조 백신 분말 제형은 실온 (25℃ 및 60% 상대 습도)에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 또는 36개월 이상 동안 안정할 수 있다. 또한, 건조 백신 분말 제형의 안정성은 가속화된 조건 (45℃ 및 75% 상대 습도) 하에서 연장된 시간 기간 동안 안정할 수 있다. 가속화된 조건 하에서, 건조 백신 분말 제형은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 또는 36개월 이상 동안 안정할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이 제조된 건조 백신 분말 제형은 다른 온도 (예를 들어, -20℃ 내지 55℃) 및 상대 습도 (0% 내지 100%)에서 안정할 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같이, 안정성은 보관 조건 하에서 건조 백신 분말의 몇 가지 측면을 나타낼 수 있다. 이러한 측면의 한 가지는 백신 효력, 즉, 백신의 항원 성분의 항원성의 유지이다. 안정성, 예를 들어 HA를 포함하는 건조 인플루엔자 백신 분말 제형의 안전성의 이러한 측면은 HA 항원성을 측정하여 결정될 수 있다. 특정 조건 하에서 특정 시간 (예를 들어, 가속화된 조건 하에서 18개월) 후, (초기 효력에 비해) 50% 항원성을 초과하여 유지한다면 백신 분말은 안정한 것으로 간주된다.

[0077] 다르게는, 안정성은 보관 조건 하에서 대기 수분(environmental water)의 흡수를 저해하는 건조 분말의 능력을 나타낼 수 있다. 이러한 수분 흡수는 군집(clumping)을 증가시킬 수 있고, 결국 감소된 유동성 및 감소된 생체 이용률과 같은 바람직하지 못한 특성을 야기할 수 있다.

[0078] 본원에 기재된 건조 백신 분말 제형은 낮은 흡습성을 가질 수 있다. 건조 백신 분말 제형의 흡습성은 시간에 따른 건조 백신 분말 제형의 칭량에 의해 측정될 수 있다. 중량의 증가는 수분의 획득을 나타낸다. 분말이 밀폐 용기, 밀폐되지 않은 용기 또는 개방 시스템에 보관되는 경우, 흡습성은 본 발명의 건조 백신 분말에 의해 흡수된 수분의 양에 의해 결정될 수 있다.

[0079] VI. 투여 경로 및 수단

[0080] 몇몇 실시양태에서, 장치는 건조 백신 분말 치료 제형의 단일 용량의 상당 부분을 대상체의 외비공으로 전달하도록 설정될 수 있다. 몇몇 경우에서, 장치는 장치 내에 잔류하는 많은 양의 건조 백신 분말 치료 제형의 상당 부분을 대상체의 외비공으로 전달하도록 설정될 수 있다. 몇몇 경우에서, 건조 백신 분말 치료 제형 또는 그의 상당 부분은 장치의 단일 인게이지먼트(engagement) 후에 전달될 수 있다. 몇몇 경우에서, 분말 치료 제형 또는 그의 상당 부분은 장치의 다중 인게이지먼트, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 인게이지먼트 후에 전달될 수 있다. 몇몇 경우에서, 장치의 다중 인게이지먼트는 장치의 단일 사용을 구성할 수 있다. 본원에 기재된 방법, 장치 및 조성물에 따라, 장치에 의해 전달된 건조 백신 분말 치료 제형의 상당 부분은 건조 분말 의학 치료제의 양, 예를 들어 단일 용량 중의 양 또는 장치에 남아있는 양의 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.5%, 99.9%, 99.95%, 또는 100% 이상을 포함한다.

[0081] 제공된 발명의 방법에 의해 생성된 건조 백신 분말 제형과 함께 사용하기에 적절한 비강 도포기는 계류중인 미국 출원 일련번호 제61/260,367호에 기재되어 있고, 그의 전문은 본원에 참고로 포함된다.

[0082] **VII. 면역에서의 건조 분말 제형의 효과**

[0083] 제공된 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 국소 면역 반응을 자극할 수 있다. 국소 면역 반응은 말초 림프 조직에서 있을 수 있다. 예를 들어, 백신 건조 분말 제형을 비강내 투여하여 점막-관련 림프 조직 (MALT)을 자극할 수 있고, 이는 점막 면역에 대해 역할을 할 수 있다. 점막의 예에는 혀 점막, 식도 점막, 위 점막, 창자 점막, 비강 점막, 후각 점막, 구강 점막, 기관지 점막, 자궁 점막, 자궁내막 (자궁의 점막) 및 음경 점막이 포함된다. 특히, 비강인두-관련 림프 조직 (NALT)이 표적이 될 수 있다. NALT는 T 헬퍼 1 및 T 헬퍼 2 세포, 및 IgA-위탁(committed) B 세포의 생성에 대해 역할을 할 수 있다. 비강내 면역화는 점막 및 전신 면역 구획 둘다에서 항원-특이적 보호 면역을 유도할 수 있다.

[0084] 제공된 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 점막 면역 체계의 주요 항체인 분비성 IgA (sIgA)의 생성을 자극할 수 있다 (도 6, 7, 9, 11, 12 및 20). sIgA는 2개 또는 4개의 단량체, J-쇄 폴리펩티드, 및 분비 성분이라고 지칭되는 폴리펩티드쇄로 구성된 이량체 또는 사량체이다. J-쇄 폴리펩티드는 혈청 및 분비성 IgA 둘 다의 중합을 용이하게 할 수 있다. 분비 성분은 점막의 상피 세포에 의해 생성된 70 kDa 폴리펩티드이고, 점액 분비물 내 단백질 분해 효소에 대해 덜 민감하게 하여 sIgA를 보호할 수 있다. sIgA는 항원 샘플링에 대해 설계된 조직화된 점막 림프 기관에서 최초 자극된 전구체로부터 유래한 점막 형질 세포에 의해 국소 생성될 수 있다. 최초 촉발 후, 전구체 세포는 국소 림프절, 림프 및 혈액을 통과하여 점막 부위 중에 광범위하게 분산될 수 있고, 이에 따라 투여 부위 (예를 들어, 비강 투여) 이외의 점막 부위에서 보호가 이루어질 수 있다. 국소 형질 세포로부터의 분비 후, sIgA는 상피 세포 표면 수용체와 결합할 수 있고, 복합체는 상피 세포를 지나 분비물의 일부가 될 수 있고, 이는 항원의 흡수를 억제하는 비염증성 면역 장벽으로서 작용할 수 있다.

[0085] 점막 (즉, sIgA) 반응을 자극하는 것에 추가로, 본원에 개시된 건조 분말 제형은 또한 IgG 반응 (도 6, 7, 9, 11, 12, 14, 17 및 19)을 자극할 수 있다. 이러한 자극은, 예를 들어 체액 반응을 기폭시켜, 본원에 개시된 백신에 의해 유도된 sIgA에 의해 제공되는 보호를 피하거나 모면하는 병원균에 대해 반응하게 하여 추가의 보호층을 생성할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본원에 개시된 백신은 점막 및 체액 항체 반응 둘 다를 유도할 수 있다.

[0086] **실시예**

[0087] 실시예 1: 전 불활성화 H1N1 건조 백신 분말 제형의 제조 및 시험

[0088] 본 실시예에서는, 계절성 인플루엔자 백신 (H1N1)의 다양한 건조 분말 제형을 생성하고 시험하였다. 본 발명의 바람직한 실시양태를 또한 계절성 인플루엔자 백신의 전통적인 액체 비강 및 주사 제형에 대해서도 시험하였다.

[0089] 실시예 1A: 비-급속 동결 기술을 이용한 인플루엔자 백신 (H1N1) 분말의 제조

[0090] 본 실험에서는, 다양한 항원 안정화제를 통상적인 동결-건조 방법에서 사용하여 백신 분말을 생성한 후, 일관성 및 안정성에 대해 시험하였다. 10 mL 병에서 전 불활성화 인플루엔자 (H1N1, 군주 A/브리즈번 (Brisbane)/59/2007, 더 켈-세로-테라퓨틱 리서치 인스티튜트(The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute))의 1.6 mg/mL 용액 0.4 mL를 pH 7.4인 0.4 mL의 포스페이트 완충 염수 (PBS 또는 포스페이트 완충제) 중의 안정화제 (13.6 mg)와 배합하여 1:21의 최종 항원 대 안정화제 비를 얻었다. 혼합물을 5시간에 걸쳐 -40°C에서 완만 동결시켰다. 이어서, 동결된 조성물을 다음의 4단계로 동결 건조하였다: 24시간 동안 -40°C, 140 mtorr 미만; 24시간 동안 -30°C, 130 mtorr 미만; 4시간 동안 -10°C, 100 mtorr 미만; 및 4시간 동안 20°C, 50 mtorr 미만. 생성된 냉동 건조 분말은 인플루엔자 백신 분말 1 mg 당 인플루엔자 백신 단백질 29 µg을 함유하였다. 인플루엔자 백신 분말을 비표면적이 그램 당 1.3 제곱 미터 초과인 비강 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및 제3인산칼슘 (TCP) (Ca₃(PO₄)₂)과 배합 (블렌딩)하였다. 인플루엔자 백신 분말 (49.3 mg, 인플루엔자 백신 단백질 1.44 mg을 포함함)을 10 mL 유리병에서 309.1 mg의 세올루스 (등록상표) PH-F20JP 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 57 µm; 부피 밀도: 0.23 g/cm³; 비표면적: 2.3 m²/g), 40.0 mg의 세올루스 (등록상표) PH-301 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 39 µm; 부피 밀도: 0.41 g/cm³) 및 1.6 mg의 TCP와 배합하고, 상기 성분들을 1분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 블렌딩하였다. 생성된 건조 인플루엔자 백신 분말 제형은 건조 인플루엔자 백신 분말 제형 25 mg 당 인플루엔자 백신 단백질 90 µg을 함유하였다. 한 경우에서, 트레할로스를 안정화제로 사용하여, 부분적으로 덩어리지고 안정한 HA 효력을 갖는 인플루엔자 백신 분말을 생성하였다. 또 다른 경우에서, 만니톨을 안정화제로 사용하여, 미립자를 포함하고 불안정한 HA 효력을 갖는 인플루엔자 백신 분말을 생성하였다. 또 다른 경우에서, 락토스를 안정화제로 사용하여, 부분적으로 덩어리지고 안정

한 HA 효력을 갖는 인플루엔자 백신 분말을 생성하였다 (도 1). 이 실시예에서, 안정성은 동결 건조 후 50%를 초과하는 HA 효력을 보유하는 것으로 정의되고; 불안정성은 동결 건조 후 50% 이하의 HA 효력이고; 결과는 표 1에 요약되어 있다. 제형은 완전한 HA 효력 및 우수한 유동성이 모두 없기 때문에, 이러한 접근법은 효과적이고 완전하게 전달가능한 비강내 백신을 생성하기 위해서 개선이 요구된다.

표 1

비-급속 동결 기술에 의해 생성된 인플루엔자 (H1N1) 백신 분말			
항원 안정화제	총 항원 단백질/ 안정화제 비 (중량 기준)	분말 특성	HA 효력 안정함, >50%; 불안정함, ≤50%
트레할로스	1:21	덩어리짐	안정함
만니톨	1:21	미세함	불안정함
락토스	1:21	덩어리짐	안정함

실시예 1B: 급속 동결 방법을 이용한 비강 인플루엔자 (H1N1) 백신 분말의 제조

본 실험에서는, 다양한 안정화제를 급속 동결 및 건조 방법에서 사용하여 백신 분말을 생성한 후, 일관성 및 안정성에 대해 시험하였다. 일반적인 제조 방법은 도 2 및 3에 개괄되어 있고; H1N1 비강 백신 제형의 생성에 관한 구체적인 세부사항은 아래에 제공하였다. 10 mL 병에서 전 불활성화 인플루엔자 (H1N1, 균주 A/브리즈번/59/2007)의 1.6 mg/mL 용액 0.4 mL를 pH 7.4인 0.4 mL의 포스페이트 완충 염수 (PBS 또는 포스페이트 완충제) 중의 안정화제 (13.6 mg)와 배합하여 1:21의 최종 항원 대 안정화제 비를 얻었다. 혼합물을 10분 동안 액체 질소에서 급속 동결시키고, 인플루엔자 분말을 다음의 4단계의 동결-건조 방법으로 생성하였다: 24시간 동안 -40 °C, 140 mtorr 미만; 24시간 동안 -30 °C, 130 mtorr 미만; 4시간 동안 -10 °C, 100 mtorr 미만; 및 4시간 동안 20 °C, 50 mtorr 미만. 인플루엔자 백신 분말 1 mg 당 인플루엔자 백신 단백질 29 µg을 함유하는 분말은 미립자로 이루어져 있고, 실온에서 안정하였으며, 여기서 안정성은 50%를 초과하는 HA 효력을 보유하는 것으로 정의된다 (표 2). 인플루엔자 백신 분말을 비표면적이 그램 당 1.3 제곱 미터 초과인 비강 담체 (예를 들어, 미세 결정성 셀룰로스) 및 제3인산칼슘 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)과 배합 (블렌딩)하였다. 인플루엔자 백신 분말 (49.3 mg, 1.44 mg의 인플루엔자 백신 단백질 및 30.60 mg의 트레할로스를 포함함)을 10 mL 유리병에서 309.1 mg의 세올루스 (등록상표) PH-F20JP 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 57 µm; 부피 밀도: 0.23 g/cm³; 비표면적: 2.3 m²/g), 40.0 mg의 세올루스 (등록상표) PH-301 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 39 µm; 부피 밀도: 0.41 g/cm³) 및 1.6 mg의 TCP와 배합하고, 상기 성분들을 1분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 블렌딩하였다. 생성된 건조 인플루엔자 백신 분말 제형은 건조 인플루엔자 백신 분말 제형 25 mg 당 인플루엔자 백신 단백질 90 µg을 함유하였다. 한 경우에서, 트레할로스를 항원 안정화제로 사용하여, 안정한 HA 효력 및 미립자 크기를 갖는 제형을 생성하였다. 또 다른 경우에서, 락토스를 항원 안정화제로 사용하여, 또한 미립자 크기로 이루어진 안정한 제형을 생성하였다. 만니톨은 H1N1 백신 분말에 대한 항원 안정화제로서 시험되지 않았다.

표 2

급속 동결 기술에 의해 생성된 인플루엔자 (H1N1) 백신 분말			
항원 안정화제	총 항원 단백질/ 안정화제 비 (중량 기준)	분말 특성	HA 효력 안정함, >50%; 불안정함, ≤50%
트레할로스	1:21	미세함	안정함
만니톨	시험하지 않음	시험하지 않음	시험하지 않음
락토스	1:21	미세함	안정함

실시예 1C: 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 연구 설계 및 결과

본 실험에서는, 면역 반응을 야기하는 건조 분말 H1N1 백신의 능력을 시험하고, 통상적인 비강 및 주사 액체 제형과 비교하였다. 상기 설명된 바와 같이, 급속 동결 방법을 이용하여 백신을 제조하고, 미세결정성 셀룰로스 담체와 블렌딩하였다. 각 조건에서, 0.09 mg의 인플루엔자 백신 단백질 (H1N1, 균주 A/브리즈번/59/2007, 전 불활성화 인플루엔자 백신)을 4개 군의 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)에게 투여하였다. 사이노몰거

스 원숭이는 인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응을 갖는다. 1군에는, 상기 개략된 급속 동결 방법에 의해 제조되고, 인플루엔자 백신 단백질 0.09 mg, 트레할로스 1.91 mg, 세울루스 (등록상표) PH-F20JP 19.28 mg, 세울루스 (등록상표) PH-301 2.50 mg 및 TCP 0.10 mg을 함유하는 25 mg의 비강 인플루엔자 (H1N1) 백신 분말 제형을 투여하고; 2군에는 0.09 mg의 인플루엔자 백신 단백질을 함유하는 0.1 ml의 비강 인플루엔자 백신 용액을 투여하고; 3군에는 0.02 mg의 아주반트 알파-갈락토실세라마이드와 함께 인플루엔자 백신 단백질 0.09 mg, 트윈 80 0.5 μ l를 함유하는 0.1 ml의 비강 인플루엔자 백신 용액을 투여하고; 4군에는 0.09 mg의 인플루엔자 백신 단백질을 함유하는 0.5 mL의 SC 인플루엔자 백신 용액을 투여하였다. 도 4에 기재한 바와 같이 백신을 투여하고 샘플을 수집하였다. 적혈구응집 억제 (HI) 및 효소면역측정법 (ELISA)에 의해 항체 수준을 측정하였다.

[0097] 혈청 및 비강 세척액 샘플에서 적혈구응집 억제 (HI) 항체 역가를 다음과 같이 측정하였다. 샘플을 37°C에서 15 내지 18시간 동안 수용체 파괴 효소 (RDE, 덴카 세이켄 컴퍼니 리미티드(Denka Seiken Co Ltd., 일본 도쿄 소재))로 처리한 다음, 56°C에서 1시간 동안 열에 의해 불활성화시켰다. 2배 연속 희석한 일련의 샘플을 제조하고, 웰 당 4개의 적혈구응집 유닛의 농도로 H1N1 (균주 A/브리즈번/59/2007) HA 항원 (덴카 세이켄)과 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 각 웰에, 닭 적혈구 0.5% 현탁액 50 μ l를 첨가하고, 1시간 후에 적혈구응집을 평가하였다. 적혈구응집을 억제한 샘플의 최고 희석액을 샘플의 HI 타이틀로 하였다.

[0098] 본 연구에서 수집된 샘플의 HI 시험 결과를 도 5a 및 b에 나타내었고, 이에는 전 불활성화 H1N1 바이러스 (균주 A/브리즈번/59/2007) 백신의 다양한 제형에 노출된 원숭이에 의해 생성된 HI 역가의 표가 포함된다. 혈청 샘플에서 측정된 HI 역가는 도 5a에서 찾을 수 있고; 비강 세척액 샘플에서 측정된 HI 역가는 도 5b에서 찾을 수 있다. SC 주사 백신 (4군)이 혈청 샘플에서 가장 높은 HI 역가를 생성하였으나, 비강 세척액 샘플에서는 HI 역가의 증가가 전혀 검출되지 않았다. 비강 제제 중에서, 전 불활성화 비강 인플루엔자 (H1N1, 균주 A/브리즈번/59/2007) 백신 분말 제형은 혈청 및 비강 세척액 샘플 모두에서 가장 높은 역가를 생성하였고, 이는 액체 제형에 비해 명백히 향상되었음을 설명한다. 이로 미루어 볼 때, 이들 결과는 혈청 및 비강 세척액 모두의 HI 역가가 시험 1군에서 상승되었음을 설명한다.

[0099] 혈청 및 비강 세척액 샘플에서의 효소면역측정법 (ELISA) 항체 역가를 다음과 같이 측정하였다. ELISA 플레이트를 4°C에서 17시간 동안 항원으로 코팅하고, 세척하고, 실온에서 1시간 동안 100 μ l의 차단 용액 (포스페이트 완충제 중 0.5% 소 혈청 알부민)에서 차단시켰다. 세척 후, 시험 샘플의 2배 연속 희석액을 0.5% BSA 및 PBS 중에서 만들고, 희석액을 ELISA 플레이트의 웰에 첨가하였다. 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 세척하고, 홀스래디쉬 퍼옥시다아제 (HRP)-접합된 염소 항-원숭이 IgG 또는 HRP-접합된 양 항-원숭이 분비 성분 검출 항혈청과 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서 플레이트를 세척하고, o-페닐렌디아민 (OPD)과 함께 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하고, 1 M 황산 (H₂SO₄) 100 μ l를 첨가하여 발색 반응을 중지시켰다. 샘플을 ELISA 판독기에서 OD492에 의해 측정하였다.

[0100] 본 연구에서 수집된 샘플에서 측정된 ELISA 항체 역가의 결과는 도 6 및 7에 나타내었다. 도 6a 및 b는 상이한 인플루엔자 백신 제형에 노출된 원숭이에 의해 생성된 sIgA (6b) 및 IgG (6a) 항체 역가의 표이다. 도 7은 데이터의 도식을 나타내고, 시험한 각 동물 (상이한 라인으로 나타낸 상이한 동물들)로부터 유사한 결과를 나타내었다. SC 인플루엔자 백신 용액은 모든 시험 물품 중에서 최대의 IgG를 생성하였다. 비강 인플루엔자 (H1N1, 균주 A/브리즈번/59/2007) 백신 분말 제형은 모든 비강 제제 중에서 최대의 IgG를 생성하였다. 비강 인플루엔자 백신 분말 제형은 모든 시험 물품 중에서 최대의 sIgA를 생성하였다. SC 주입된 인플루엔자 백신은 모든 시험 물품 중에서 최소의 sIgA를 생성하였다. 아주반트를 갖는 비강 인플루엔자 백신 용액은 아주반트를 첨가했음에도 불구하고, 모든 비강 제제 중에서 최소의 sIgA를 생성하였다.

[0101] 실시예 1D: 회복 기간 동안의 HI, IgG 및 sIgA 역가

[0102] 실시예 1C로부터의 동물의 아집단을 실험 종료에 이어서 모니터링하여 상승된 항체 역가가 유지되었는지 여부를 측정하였다. 혈청 및 비강 세척액 샘플을 80일 (마지막 백신접종 이후 31일째), 101일 (백신접종 후 52일째) 및 115일 (백신접종 후 66일째)에 취하였다. 결과는 도 8 및 9에서 찾을 수 있다. 도 8은 HI 역가의 표를 포함하고; 도 9는 IgG 및 sIgA 역가의 표를 포함한다. 항체 역가 수준은 비강 분말 제형으로 처리된 동물에서 높은 수준으로 유지되었다 (도 8 및 9, 1군). 아주반트를 첨가하지 않거나 (2군) 첨가한 (3군) 비강 액체 제형으로 처리된 동물에서의 항체 역가 수준은 더 낮은 수준으로 유지되었다. 액체 제형이 주사된 동물에서 (4군) IgG 및 HI 역가 수준은 회복 기간 전반에 걸쳐 현저히 감소하였고; sIgA 항체의 수준은 주사 백신 제형으로 처리된 동물에서 유의하게 상승되지 않았다.

- [0103] 실시예 1E: 생존가능성/항원투여 연구.
- [0104] 본 실시예에서는, 후속하는 항원투여로부터 동물을 보호하는 인플루엔자 백신의 능력을 측정하였다. 이전 실험에서 백신접종된 원숭이의 비강 항원투여를 최종 면역화로부터 3주 후에 수행하였다. 발육한 성장된 개과 인플루엔자 (A/브리즈번/59/2007 IVR-148) 바이러스를 동물에 항원투여하였다. 각 동물들은 총 2 ml 부피 중 대략 10^7 TCID₅₀의 바이러스를 투여받았다. 가상의 항원투여를 위해, 바이러스가 없는 요막액 2 ml를 원숭이에 항원투여하였다. 추가의 대조군으로서, 3마리의 백신접종하지 않은 원숭이를 10^7 TCID₅₀의 바이러스에 노출시키거나 바이러스가 없는 요막액 2 ml로 항원투여하였다.
- [0105] 각 군의 동물을 질량 지수, 저체온증, 일반적인 외관 및 임상적 증상에 대해 매일 모니터링하였다. 항원투여 후 28일 동안 원숭이의 인플루엔자-관련된 임상적 징후에 대해 관찰하였다. 모든 원숭이에게 표준 식이를 공급하고, 물은 무제한 이용가능하였다. 연구된 각 군에 대해, 비강 면봉 및 혈액 샘플을 초기 항원투여 7일 전, 3일 후, 7일 후, 14일 후 및 28일 후에 취하였다. 각 동물에 대해 항체 역가 (sIgA 및 IgG)를 측정하였다.
- [0106] 실시예 1F: 건조 백신 분말 제형의 안정성 및 흡습성 측정.
- [0107] 본 실시예에서는, 건조 백신 분말 제형의 안정성 및 흡습성을 시험하였다. 건조, 전 불활성화 H1N1 인플루엔자 백신 분말 제형을 공지 발명의 방법에 의해 생성하였다. 백신 분말 제형의 안정성을 45℃에서 및 20℃ 내지 25℃에서 시험하였다. 시험되는 건조 백신 분말 제형을 밀봉된 병 및 밀봉되지 않은 용기 모두에서 보관하였다. 안정성은 HA 항원성을 정량하는 것으로 측정하였다.
- [0108] 건조 백신 분말 제형의 흡습성을 시간에 걸친 샘플의 질량을 정량함으로써 측정하였다. 건조 백신 분말의 흡습 안정성에 대한 상이한 환경 조건의 영향을 측정하기 위해, 50 mg의 백신 분말을 다양한 조건 하에서 보관하였다. 건조 백신 분말의 샘플을 밀폐 조건하, 밀봉 용기 및 개방 용기에서 보관하였다. 샘플을 6개월 동안 매달 칭량하였다. 무게 증가는 수분의 획득을 나타내었다.
- [0109] 6개월 보다 더 오랫동안 보관된 백신 분말 제형을 비강 전달 장치에서 시험하였다. 장치로부터 전달된 백신 분말 제형의 백분율을 측정하고 갓 만들어진 백신 분말 제형의 백분율과 비교하였다.
- [0110] 실시예 2: 전 불활성화 H5N1 건조 백신 분말 제형의 제조 및 시험
- [0111] 본 실시예에서는, 조류 인플루엔자 백신 (H5N1)의 다양한 건조 분말 제형을 생성하고 시험하였다. 본 발명의 바람직한 실시양태를 또한 조류 인플루엔자 백신의 전통적인 액체 비강 및 주사 제형에 대해서도 시험하였다.
- [0112] 실시예 2A: 급속 동결 방법을 이용한 비강 인플루엔자 (H5N1) 백신 분말의 제조
- [0113] 본 실시예를 수행하여 H5N1 비강 백신 분말을 생성하는 급속 동결 및 건조 방법에서 사용하기 위한 최적의 항원 안정화제, 및 항원 대 안정화제의 비를 결정하였다. 일반적인 제조 방법은 도 2 및 도 3에 개략하였고; H5N1 비강 백신 제형의 생성과 관련한 구체적인 사항은 이하에서 제공된다. 4가지의 항원 대 안정화제 비 (1:11, 1:21, 1:49 및 1:101)를 시험하였고; 하기 언급된 수는 1:49 비의 제형에 상응한다. 10 mL 병에서 전 불활성화 H5N1 바이러스 (균주 A/베트남(Vietnam)/1194/2004, 시노박 바이오테크 리미티드(Sinovac Biotech Ltd))를 함유한 0.526 mg/mL 항원 용액 0.4 mL를 pH 7.2의 포스페이트 완충제 0.4 mL 중의 10.4 mg의 안정화제 (트레할로스, 만니톨 또는 락토스)와 배합하여 1:49의 항원 대 안정화제의 최종 비를 얻었다. 혼합물을 액체 질소 중에서 10분 동안 빠르게 동결시키고, 4단계 (24시간 동안 -40℃, 140 mtorr 미만; 36시간 동안 -30℃, 130 mtorr 미만; 4시간 동안 -10℃, 100 mtorr 미만; 및 4시간 동안 20℃, 50 mtorr 미만)의 동결-건조 방법에 의해 인플루엔자 분말을 생성하였다. 생성된 분말은 분말 1 mg 당 항원 11.2 µg을 함유하였다. 인플루엔자 백신 분말을, 비표면적이 그램 당 1.3 제곱 미터 초과인 비강 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및 제3인산칼슘 (TCP) (Ca₃(PO₄)₂)과 배합 (블렌딩)하였다. 인플루엔자 백신 분말 (104 mg, 1.2 mg의 인플루엔자 백신 단백질을 포함함)을, 254.4 mg의 세올루스 (등록상표) PH-F20JP 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 57 µm; 부피 밀도: 0.23 g/cm³; 비표면적: 2.3 m²/g); 40.0 mg의 세올루스 (등록상표) PH-301 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 39 µm; 부피 밀도: 0.41 g/cm³), 및 1.6 mg의 TCP와 10 mL의 유리병에서 배합하고, 볼텍스 혼합기를 이용하여 상기 성분들을 1분 동안 배합하였다. 생성된 건조 인플루엔자 백신 분말 제형은 건조 인플루엔자 백신 분말 제형 20 mg 당 인플루엔자 백신 단백질 58.9 µg을 함유하였다. 안정화제로서 트레할로스, 만니톨 및 락토스를 사용함으로써 1:21 및 1:49의 항원 대 안정화제의 비에서 미립자로 구성된 안정한 분말이 생성되었다. 1:101의 항원 대 안정화제의 비에서는, 트레할로스 및 락토스 모두를 함유하는 제형은 덩어리졌지만 안정한 분말을 생성

하였고; 만니톨을 함유하는 제형은 1:101의 항원 대 안정화제의 비에서 미립자로 구성된 안정한 분말을 생성하였다. 트레할로스, 만니톨 및 락토스를 사용함으로써 1:11의 항원 대 안정화제의 비에서 불안정한 제형이 생성되었다. 결과는 하기 표 3에 요약하였다.

표 3

[0114]

급속 동결 기술에 의해 생성된 인플루엔자 (H5N1) 백신 분말						
총 항원 단백질 / 안정화제 비 (중량 기준)	트레할로스		만니톨		락토스	
	분말 특성	HA 효력 안정함: >50 % 불안정함 ≤50%	분말 특성	HA 효력 안정함: >50 % 불안정함 ≤50%	분말 특성	HA 효력 안정함: >50 % 불안정함 ≤50%
1:11	미세함	불안정함	미세함	불안정함	미세함	불안정함
1:21	미세함	안정함	미세함	안정함	미세함	안정함
1:49	미세함	안정함	미세함	안정함	미세함	안정함
1:101	덩어리짐	안정함	미세함	안정함	덩어리짐	안정함

[0115] 실시예 2B: 비강 인플루엔자 백신 분말 제형의 연구 설계 및 결과

[0116] 본 실험에서는, 사이노몰거스 원숭이에서 면역 반응을 야기하는 건조 분말 백신의 능력을 시험하고, 통상적인 비강 및 주사 액체 제형과 비교하였다. 사이노몰거스 원숭이는 인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응을 갖는다. 건조 분말 백신을 급속 동결 및 후속의 동결 건조 방법을 이용하여 전 불활성화 H5N1 (균주 A/베트남/1194/2004) 항원으로부터 제조하고, 상기 기재한 바와 같이 미세결정성 셀룰로스 담체와 배합하였다. 20 mg의 비강 인플루엔자 (H5N1) 백신 분말 제형 각각에 대해, 58.9 µg의 전 불활성화 H5N1 바이러스를 트레할로스 2.9 mg, 세올루스 (등록상표) PH-F20JP 12.7 mg, 세올루스 (등록상표) PH-301 2.0 mg, 및 제3인산칼슘 0.08 mg과 함께 전달하였다. 각 조건에서, 30 µg의 H5N1 항원을 투여하였다. 1군에서는 각 외비공에 20 mg의 비강 백신 분말 (총 항원 30 µg)을 투여하고; 2군에서는 각 외비공에 0.15 mL의 비강 인플루엔자 분무제 (총 항원 30 µg)를 투여하고; 3군에는 근육내 주사 (IM)로 0.3 mL의 액체 백신을 투여하였다. 도 10의 계획에 따라 백신을 투여하고, 샘플을 수집하였다. 실시예 1에 개략된 방법에 따라 효소면역측정법 (ELISA)에 의해 샘플을 시험하였다.

[0117] 본 연구에서 수집한 샘플 중에서 측정한 ELISA 항체 역가 결과는 도 11 및 도 12에 도시하였다. 도 11은 상이한 인플루엔자 백신 제형에 노출된 원숭이에 의해 생성된 sIgA (11b) 및 IgG (11a)의 역가를 제공한다. 도 12는 상이한 선에 의해 나타내어지는 상이한 동물에 대한 데이터의 도식적 표현을 제공한다. 액체 제형을 주사하여 백신접종한 동물들 (3군)은 본 연구에서 가장 높은 IgG 역가를 생성하였지만, 이 동일한 군은 거의 검출할 수 없는 수준의 sIgA 항체를 생성하였다. 비강 액체 제형을 사용하여 백신접종한 동물들 (2군)은 본 실험에서 가장 낮은 수준의 IgG 항체를 생성하였고, 상기 군은 또한 낮은 수준의 sIgA 항체를 생성하였다. 비강 분말 제형으로 백신접종한 동물들 (1군)은 비강 백신의 가장 높은 수준의 IgG 항체를 생성하였고; 비강 분말 제형은 또한 sIgA 항체 수준에 의해 측정하여 가장 높은 수준의 면역 반응을 이끌어내었다. 상기 결과는 H5N1 비강 분말 백신 제형으로 처리한 동물에서 sIgA 및 IgG 항체 역가가 둘 다 성공적으로 상승하였음을 나타낸다.

[0118] 실시예 2C: 스트레스 조건하에서의 안정성 시험의 시험 방법 및 결과

[0119] 본 실험에서, 실시예 2A에 기재된 바와 같이 제조된 건조 분말 H5N1 백신 제형의 안정성을 스트레스 조건하에 두고 H5N1 비강 인플루엔자 분무 제형과 비교하였다. 캡슐화된 형태의 H5N1 인플루엔자 백신 분말을 60°C 및 0% 상대 습도에서 보관하고, 2주 및 3주 시점에 시험하였다. 2주에 분말은 미립자로 이루어졌으나, 3주에 분말의 부분적인 응집이 관찰되었다. 또 다른 시험에서, H5N1 인플루엔자 백신 분말을 1회용 전달 장치 (신 니폰 바이오메디칼 라보라토리, 엘티디(Shin Nippon Biomedical Laboratory, LTD))에 적재하고 알루미늄 캐니스터 내에 2주 동안 60°C 및 75% 상대 습도에서 산소 및 수분 흡수 건조제 (파마킵(PharmaKeep) KC-20, 미쯔비시 가스 케미칼 컴파니, 인코포레이티드(Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.))와 함께 보관하였으며, 그 후에도 분말은 여전히 미립자로 이루어졌다. 또 다른 시험에서, H5N1 인플루엔자 백신 분말을 병에 넣고 60°C 및 0% 상대 습도에서 보관하고 2주 및 3주 시점에 HA 효력에 대해 시험하였다. 두 시점에서 모두, H5N1 비강 백신 분말의 HA 효력은 안정하였다. HA 효력의 또 다른 시험에서, H5N1 인플루엔자 백신 분말을 병에 넣고 2주 동안 60°C 및 75% 상대 습도에서 산소 및 수분 흡수 건조제 (파마킵 KC-20, 미쯔비시 가스 케미칼 컴파니, 인코포레

이티드)와 함께 보관하였으며, 그 후 HA 효력은 안정한 것으로 측정되었다. 상기 결과는 표 4에 요약하였다. H5N1 비강 분말 백신과 대조적으로, 폴리프로필렌 마이크로튜브에 보관된 H5N1 비강 분무 백신은 60℃에서 2주 후 모든 HA 효력을 상실하였다. 이는 승온에서의 증가된 안정성이 비강 분말 제형에서 달성됨을 증명한다.

표 4

H5N1 인플루엔자 백신 분말 스트레스 시험 결과				
	분말 특성		HA 효력	
			(안정함: >50%, 불안정함 ≤50%)	
시간	캡슐화됨	전달 장치에 적재됨	병에 넣음	패키징함
초기	미립자	미립자	안정함	안정함
2주	미립자	미립자	안정함	안정함
3주	부분적으로 응집됨		안정함	

실시에 3: 3종의 HA 분할 불활성화 균주 건조 백신 분말 제형의 혼합물의 제조 및 시험

본 실시예에서, 3종의 분할-불활성화 균주 (H1N1 A/캘리포니아(California)/7/2009, H3N2 A/빅토리아(Victoria)/210/2009 및 B/브리즈번/60/2008 - 집합 명사로: "3가 HA 인플루엔자")의 혼합물을 함유하는 비강 분말 백신의 다양한 건조 분말 제형을 생성하고 시험하였다.

실시에 3A: 급속 동결 방법을 사용한 3가 HA 인플루엔자 백신 분말의 제조

3가 HA 인플루엔자 비강 백신 분말을 생성하기 위한 급속 동결 및 건조 방법에서 사용하기 위한, 최적의 항원 안정화제, 및 항원 대 안정화제 비를 결정도록 본 실험을 실행하였다. 일반적인 제조 방법은 도 2 및 3에 개괄하였고; 3가 HA 인플루엔자 비강 백신 제형의 생성에 관한 상세 사항은 하기에 제공되어 있다. 4가지의 항원 대 안정화제 비 (1:26, 1:56, 1:111 및 1:222)를 시험하였고; 하기 언급된 수는 1:111 비의 제형에 상응한다. 10 mL 병에서, 3가 HA 인플루엔자 (H1N1 A/캘리포니아/7/2009, H3N2 A/빅토리아/210/2009 및 B/브리즈번/60/2008, 덴카 세이켄 컴퍼니 리미티드)를 함유하는 > 0.09 mg/mL 항원 용액 0.6 mL를 0.2 mL의 초순수 중 6 mg의 안정화제 (트레할로스, 만니톨 또는 락토스)와 배합하여, 1:111의 항원 대 안정화제의 최종 비를 수득하였다. 혼합물을 액체 질소 중에서 10분 동안 급속 동결시키고 다음의 4단계 동결-건조 방법에 의해 인플루엔자 분말을 생성하였다: 24시간 동안 -40℃, 140 mtorr 미만; 36시간 동안 -30℃, 130 mtorr 미만; 4시간 동안 -10℃, 100 mtorr 미만; 및 4시간 동안 20℃, 50 mtorr 미만. 생성된 분말은 분말 1 mg 당 > 4.6 µg의 항원을 함유하였다. 인플루엔자 백신 분말을 비표면적이 그램 당 1.3 제곱 미터 초과인 비강 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및 제3인산칼슘 (TCP) (Ca₃(PO₄)₂)과 배합 (블렌딩)하였다. 10 mL 유리병에서, 인플루엔자 백신 분말 (97.75 mg, 0.45 mg의 인플루엔자 백신 단백질 포함)을 350.2 mg의 세올루스 (등록상표) PH-F20JP 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 57 µm; 부피 밀도: 0.23 g/cm³; 비표면적: 2.3 m²/g), 50.0 mg의 세올루스 (등록상표) PH-301 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 39 µm; 부피 밀도: 0.41 g/cm³), 및 2.0 mg의 TCP와 배합하고, 1분 동안 볼텍스 혼합기를 사용하여 상기 성분들을 블렌딩하였다. 생성된 건조 인플루엔자 백신 분말 제형은 건조 인플루엔자 백신 분말 제형 25 mg당 > 45 µg의 인플루엔자 백신 단백질을 함유하였다. 1:26의 항원 대 안정화제 비에서 트레할로스, 만니톨 및 락토스를 사용한 제조는 미립자로 이루어진 불안정한 분말을 생성하였다. 트레할로스 및 락토스를 함유하는 제형은 둘 다 1:56 및 1:111의 항원 대 안정화제 비에서 미립자 크기를 갖는 안정한 분말을 생성하였고, 상기 비에서, 안정화제로서의 만니톨의 사용은 미립자 크기와 함께 불안정한 HA 효력을 제공하였다. 1:222의 항원 대 안정화제 비에서, 트레할로스 및 락토스를 함유하는 제형은 둘 다 안정한 HA 효력을 갖는 덩어리진 분말을 생성하였고; 동일한 비에서, 만니톨 함유 제형은 미립자로 이루어진 안정한 분말을 생성하였다. 결과는 표 5에 요약하였다.

표 5

[0125]

급속 동결 기술에 의해 생성된 3가 HA 인플루엔자 백신 분말						
통상적인 동결 및 건조중량 비/부형제 사용	트레할로스		만니톨		락토스	
	입도	HA 효력 안정함: >50% 불안정함: ≤50%	입도	HA 효력 안정함: >50% 불안정함: ≤50%	입도	HA 효력 안정함: >50% 불안정함: ≤50%
1:26	미세함	불안정함	미세함	불안정함	미세함	불안정함
1:56	미세함	안정함	미세함	불안정함	미세함	안정함
1:111	미세함	안정함	미세함	불안정함	미세함	안정함
1:222	덩어리짐	안정함	미세함	안정함	덩어리짐	안정함

[0126]

실시예 3B: 스트레스 조건하에서의 안정성 시험의 시험 방법 및 결과

[0127]

본 실험에서, 급속 동결 방법을 사용하여 제조되고 미세결정성 셀룰로스 담체와 블렌딩된 건조 분말 3가 HA 인플루엔자 백신 제형의 안정성을 스트레스 조건하에서 시험하고 비강 분무 3가 HA 인플루엔자 백신 제형에 대해 비교하였다. 캡슐화된 형태의 3가 HA 인플루엔자 백신 분말을 60℃ 및 0% 상대 습도에서 보관하고 2주 및 3주 시점에 시험하였다. 2주에 분말은 미립자로 이루어졌으나, 3주에 분말의 부분적인 응집이 관찰되었다. 또 다른 시험에서, 3가 HA 인플루엔자 백신 분말을 병에 넣고 60℃ 및 0% 상대 습도에서 보관하고 2주 및 3주 시점에 HA 효력에 대해 시험하였다. 두 시점에서 모두, 3가 HA 인플루엔자 백신 분말의 HA 효력은 안정하였다. 상기 결과는 표 6에 요약하였다. 3가 HA 비강 분말 백신과 대조적으로, 폴리프로필렌 마이크로튜브에 보관된 비강 분무 3가 HA 비강 분무 백신은 60℃에서 2주 후 모든 HA 효력을 상실하였다. 이는 승온에서의 증가된 안정성이 비강 분말 제형에서 달성됨을 증명한다.

표 6

[0128]

병에 넣은 3가 HA 인플루엔자 비강 분말 백신 스트레스 시험 결과		
시간	분말 일관성	HA 효력 안정함: >50% 불안정함: ≤50%
초기	미립자	안정함
2주	미립자	안정함
3주	부분적으로 응집됨	안정함

[0129]

실시예 4: 과상품 독소이드 (TTx) 건조 백신 분말 제형의 제조 및 시험

[0130]

본 실시예에서, 과상품 독소이드 (TTx) 백신의 다양한 건조 분말 제형을 생성하고 시험하였다. 본 발명의 바람직한 실시양태를 또한 TTx 백신의 전형적인 액체 주사 제형에 대해서도 시험하였다.

[0131]

실시예 4A: 급속 동결 방법을 이용한 과상품 독소이드 백신 분말의 제조

[0132]

과상품 독소이드 비강 백신 분말을 생성하기 위한 급속 동결 및 건조 방법에서 사용하기 위한, 최적의 항원 안정화제, 및 항원 대 안정화제 비를 결정하기 위해 본 실험을 실행하였다. 일반적인 제조 방법은 도 2 및 3에 개괄하였고; 과상품 독소이드 비강 백신 제형의 생성에 관한 상세 사항은 하기에 제공되어 있다. 5가지의 항원 대 안정화제 비 (1:26, 1:53, 1:111, 1:231 및 1:420 초과)를 시험하였고; 하기 언급된 수는 1:53 비의 제형에 상응한다. 10 mL 병에서, 0.08 mg/mL 미만의 흡착된 과상품 독소이드 항원 용액 (덴카 세이켄 컴퍼니 리미티드) 0.5 mL를 0.3 mL 초순수 중 2.1 mg의 안정화제 (트레할로스, 만니톨 또는 락토스)와 배합하여, 1:53의 항원 대 안정화제의 최종 비를 얻었다. 혼합물을 액체 질소 중에서 10분 동안 급속 동결시키고, 다음의 4단계 동결-건조 방법에 의해 항원 분말을 생성하였다: 24시간 동안 -40℃, 140 mtorr 미만; 36시간 동안 -30℃, 130 mtorr 미만; 4시간 동안 -10℃, 100 mtorr 미만; 및 4시간 동안 20℃, 50 mtorr 미만. 생성된 분말은 분말 1 mg 당 4.7 µg 미만의 항원을 함유하였다. 과상품 독소이드 백신 분말을 비표면적이 그램 당 1.3 제곱 미터 초과인 비강 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및 제3인산칼슘 (TCP) (Ca₃(PO₄)₂)과 배합 (블렌딩)하였

다. 10 mL 유리병에서, 과상품 독소이드 백신 분말 (8.54 mg 미만, 0.04 mg 미만의 항원 단백질 포함)을 35.46 mg의 세올루스 (등록상표) PH-F20JP 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 57 μm ; 부피 밀도: 0.23 g/cm^3 ; 비표면적: 2.3 m^2/g), 5 mg의 세올루스 (등록상표) PH-301 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 39 μm ; 부피 밀도: 0.41 g/cm^3), 및 0.2 mg의 TCP와 배합하고, 1분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 상기 성분들을 블렌딩하였다. 생성된 건조 과상품 독소이드 백신 분말 제형은 전체 분말 25 mg당 20 μg 미만의 항원 단백질을 함유하였다. 트레할로스, 만니톨 및 락토스의 사용은 1:26, 1:53, 1:105 및 1:210의 항원 대 안정화제 비에서 미립자로 이루어진 항원 분말을 생성하였다. 1:420의 항원 대 안정화제 비에서, 3가지 안정화제 (트레할로스, 만니톨 및 락토스)는 모두 덩어리진 분말을 생성하였다. 결과는 표 7에 요약하였다.

표 7

[0133]

급속 동결 기술에 의해 생성된 과상품 독소이드 백신 분말			
총 항원 단백질/ 안정화제 비 (중량 기준)	트레할로스	만니톨	락토스
	분말 특성	분말 특성	분말 특성
1:26	미세합	미세합	미세합
1:53	미세합	미세합	미세합
1:105	미세합	미세합	미세합
1:210	미세합	미세합	미세합
1:420	덩어리짐	덩어리짐	덩어리짐

실시예 4B: 비강 과상품 독소이드 백신 분말 제형의 연구 설계 및 결과

본 실험에서, 사이노몰거스 원숭이에서 면역 반응을 끌어내는데 대한 과상품 독소이드 비강 분말 백신의 능력을 시험하고, 통상적인 주사 액체 제형과 비교하였다. 사이노몰거스 원숭이는 인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응을 갖는다. 급속 동결에 이어 동결 건조 방법을 사용하여 흡착된 과상품 독소이드 항원으로부터 건조 분말 백신을 제조하고, 실시예 4A에 기재된 바와 같이 미세결정성 셀룰로스 담체와 블렌딩하였다. 모든 비강 과상품 독소이드 백신 분말 제형 25 mg에 대해, 흡착된 과상품 독소이드 항원 2.5 Lf를 트레할로스 1.1 mg, 세올루스 (등록상표) PH-F20JP 17.9 mg, 세올루스 (등록상표) PH-301 2.6 mg, 및 제3인산칼슘 0.1 mg과 함께 전달하였다. 다중 투여 수준을 비교하였다. 1군은 각각의 외비공에서 비강 백신 분말 25 mg (5 Lf 용량)을 투여하였고, 2군은 각각의 외비공에서 비강 백신 분말 25 mg을 2회 (10 Lf 용량) 투여하였고, 3군은 각각의 외비공에서 비강 백신 분말 25 mg을 4회 (20 Lf 용량) 투여하였고, 4군은 피하 주사에 의해 액체 백신 2.0 mL (10 Lf 용량)를 투여하였다. 도 13의 계획에 따라 백신을 투여하고 샘플을 수집하였다. 샘플을 실시예 1에 약술된 방법에 따라 효소면역측정법 (ELISA) 및 효소면역스팟 (ELISpot)에 의해 시험하였다.

ELISpot 측정법을 다음과 같이 수행하였다. 마우스 항-인간/원숭이 인터페론-감마 (IFN 감마), 모노클로날 항체, 비접합 클론 GZ-4 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 맵테크(MabTech, 스웨덴 소재))를 멀티스크린 플레이트 (밀리포어 (Millipore, 미국 소재))에 첨가하고 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 플레이트를 AIM-V (라이프 테크놀로지스(Life Technologies, 미국 소재)) 완전 배지로 차단하였다. 원숭이 전혈로부터 분리된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 4×10^5 개의 세포 및 흡수된 과상품 독소이드 25 mLf를 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 웰을 PBS로 세척하고 마우스 항-인간 IFN 감마, 모노클로날 항체, 비오티닐화된 클론 7-B6-1 (맵테크) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 웰을 PBS로 세척하였다. 1:1000으로 희석된 스트렙타비딘-알칼린 포스파타아제 (맵테크)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 웰을 PBS로 세척하였다. 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트 / 니트로블루 테트라졸륨 (BCIP/NBT-플러스 기질) (모스(Moss, 미국 소재))을 사용하여 염색을 수행하였다. 플레이트를 건조시키고 각각의 웰 중의 점의 개수를 - 내지 ++의 스케일로 평가하였다.

본 연구에서 수집한 샘플에서 측정된 항체 역가를 도 14 및 15에 나타내었다. 도 14a는 다양한 인플루엔자 백신 제형에 노출된 원숭이에 의해 생성된 혈청 IgG의 흡광도 비를 제공하고, 도 14b는 이와 동일한 결과를 그래프 형태로 나타낸다. 도 15는 수집한 혈청 샘플의 ELISpot 시험의 결과를 표로 나타낸다. 도 15에서 스코어는 다음과 같다: (-)는 음성 조절 수준을 나타내고, (+/-)는 낮은 수준을 나타내고, (+)는 중간 수준을 나타내고, (++)는 높은 수준을 나타낸다. ELISA 및 ELISpot 시험 모두에서, TTx 백신의 주사 액체 제형이 가장 큰 면역 반응을 생성하였다. 비강 분말 20 Lf 용량은 ELISA에 의해 측정되는 바와 같은 연구 동안 IgG 항체 역가에서

검출가능한 증가를 유도하였다. ELISpot 측정은 TTx 비강 분말 백신의 세 용량이 모두 용량-의존성 면역 반응을 생성할 수 있음을 나타내었다.

[0138] 실시예 5: 디프테리아 독소이드 (DTx) 건조 백신 분말 제형의 제조 및 시험

[0139] 본 실시예에서, 디프테리아 독소이드 백신의 다양한 건조 분말 제형을 생성하고 시험하였다. 또한, 본 발명의 바람직한 실시양태를 디프테리아 독소이드 백신의 전통적인 액체 주사 제형에 대해서도 시험하였다. 처리 동안의 디프테리아 독소이드 항원의 안정성을 시험하기 위해, 상기 상술된 급속 동결 및 동결 건조 방법에 의해 생성된 항원 분말을 액체 제형으로 다시 수화하였다. 이 제형은 하기에서 재구성된 분말로 지칭될 것이다.

[0140] 실시예 5A: 급속 동결 방법을 이용한 디프테리아 독소이드 백신 분말의 제조

[0141] 본 실험은 디프테리아 독소이드 비강 백신 분말을 생성하는 급속 동결 및 건조 방법에 사용하기 위한 최적의 항원 안정화제, 및 항원 대 안정화제의 비를 결정하기 위해 수행되었다. 일반적인 제조 공정은 도 2 및 3에 요약되어 있고, 디프테리아 독소이드 비강 백신 제형의 생성에 관한 구체적인 상세한 기술은 하기에서 제공된다. 5가지의 항원 대 안정화제 비 (2.5 Lf : 1.1 mg, 2.5 Lf : 2.1 mg, 2.5 Lf : 4.2 mg, 2.5 Lf : 8.4 mg 및 2.5 Lf : 16.8 mg)를 시험하였고; 하기 언급된 수는 2.5 Lf : 2.1 mg 비의 제형에 상응한다. 10 mL 병에서, 5 Lf/mL 미만의 흡착된 디프테리아 독소이드 항원 용액 (DTx, 미생물 질병 연구원 (오사카 대학)) 0.5 mL를 0.3 mL 초순수 중의 안정화제 (트레할로스, 만니톨, 또는 락토스) 2.1 mg과 배합하여 2.5 Lf : 2.1 mg의 항원 대 안정화제의 최종 비를 얻었다. 혼합물을 10분 동안 액체 질소에서 급속 동결시키고 다음의 4단계 동결-건조 방법에 의해 항원 분말을 생성하였다: 24시간 동안 -40℃, 140 mtorr 미만, 36시간 동안 -30℃, 130 mtorr 미만, 4시간 동안 -10℃, 100 mtorr 미만, 및 4시간 동안 20℃, 50 mtorr 미만. 생성된 분말은 분말 1 mg당 항원 0.28 Lf 미만을 함유하였다. 디프테리아 독소이드 백신 분말을, 비표면적이 그램당 1.3 제곱 미터 초과인 비강 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및 제3인산칼슘 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)과 배합 (블렌딩)하였다. 디프테리아 독소이드 백신 분말 (1 mg, 항원 단백질 0.28 Lf 미만을 포함함)을 10 mL 유리병에서 세울루스 (등록상표) PH-F20JP 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 57 μm , 부피 밀도: 0.23 g/cm^3 , 비표면적: 2.3 m^2/g) 35.96 mg, 세울루스 (등록상표) PH-301 미세결정성 셀룰로스 (평균 입도: 39 μm , 부피 밀도: 0.41 g/cm^3) 5 mg, 및 TCP 0.2 mg과 배합하고, 상기 성분들을 1분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 배합하였다. 생성된 건조 디프테리아 독소이드 백신 분말 제형은 총 분말 25 mg당 항원 단백질 1.25 Lf 미만을 함유하였다. 결과는 표 8에 요약되어 있다. 트레할로스, 만니톨 또는 락토스를 사용하여 항원 대 안정화제의 비가 2.5 Lf : 1.1 mg, 2.5 Lf : 2.1 mg, 2.5 Lf : 4.2 mg 및 2.5 Lf : 8.4 mg인 미립자로 이루어진 분말을 생성하였다. 항원 대 안정화제 비가 2.5 Lf : 16.8 mg인 경우, 사용된 3가지 안정화제는 모두 상기 방법을 이용하여 덩어리진 분말을 생성하였다.

표 8

[0142] 급속 동결 기술에 의해 생성된 디프테리아 독소이드 백신 분말

Lf / 안정화제	트레할로스	만니톨	락토스
	분말 특성	분말 특성	분말 특성
2.5 LF / 1.1 mg	미세합	미세합	미세합
2.5 LF / 2.1 mg	미세합	미세합	미세합
2.5 LF / 4.2 mg	미세합	미세합	미세합
2.5 LF / 8.4 mg	미세합	미세합	미세합
2.5 LF / 16.8 mg	덩어리짐	덩어리짐	덩어리짐

[0143] 실시예 5B: 비강 디프테리아 독소이드 백신 분말 제형의 연구 설계 및 결과

[0144] 본 실험에서, 사이노몰거스 원숭이에서 면역 반응을 끌어내는데 대한 디프테리아 독소이드 비강 분말 백신의 능력을 시험하고, 통상적인 주사 액체 제형 및 재구성된 분말 제형과 비교하였다. 사이노몰거스 원숭이는 인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응을 갖는다. 급속 동결에 이어 동결 건조 방법을 이용하여 흡착된 디프테리아 독소이드 항원으로부터 건조 분말 백신을 제조하고, 상기 기재된 바와 같이 미세결정성 셀룰로스 담체와 블렌딩하였다. 모든 비강 디프테리아 독소이드 백신 분말 제형 25 mg에 대해, 디프테리아 독소이드 항원 1.25 Lf를 트레할로스 1.1 mg, 세울루스 (등록상표) PH-F20JP 21.3 mg, 세울루스 (등록상표) PH-301 3.0 mg, 및 제3인산칼슘 0.12 mg과 함께 전달하였다. 1군은 각각의 외부공에서 비강 백신 분말 25 mg (2.5 Lf 용량)을 투여받았고, 2군은 피하 주사에 의해 액체 백신 1.0 mL (5 Lf 용량)을 투여받았고, 3군은 피하 주사에 의해 재구성된

분말 백신 1.0 mL (5 Lf 용량)를 투여받았다. 도 16의 계획에 따라 백신을 투여하고 샘플을 수집하였다. 실시예 1에 약속된 방법에 따라 효소면역측정법 (ELISA)에 의해 샘플을 시험하였다.

[0145] 본 실험에서 측정된 항체 역가를 도 17에 나타내었다. 도 17a는 혈청 IgG의 흡광도 비의 표이고, 17b는 17a의 데이터의 막대 그래프 (상부) 및 선 그래프 (하부)이다. 재구성된 분말 제형 및 통상적인 주사 액체 제형은 혈청 IgG 수준의 증가를 성공적으로 유도하였다. 비강 분말 제형은 주사 제형의 용량의 절반을 투여하였음에도 불구하고 IgG 항체 역가를 증가시키는데 또한 성공적이었다. 종합하면, 이들 결과는 본원에 개시된 급속 동결 건조 방법론이 동물에서의 디프테리아 독소이드 백신 효력을 보존함을 나타낸다.

[0146] 실시예 6: 난백알부민 건조 백신 분말 제형의 제조 및 시험

[0147] 본 실시예에서, 난백알부민 (OVA, SIGMA A5503-IG)의 건조 분말 제형을 생성하고 사이노몰거스 원숭이에서 면역 반응을 끌어내는데 대한 능력을 시험하였다. 비강 투여된 건조 백신 분말 제형을 전통적인 비강 및 주사 액체 제형과 비교하였다. 그 결과, 본원에 기재된 제형을 사용한 예시적 단백질 항원의 비강 투여가 동물에서의 면역 반응을 끌어낼 수 있음이 입증되었다.

[0148] 실시예 6A: 난백알부민 건조 백신 분말의 제조

[0149] 비표면적이 그램당 1.3 제곱 미터 초과인 비강 담체 (예를 들어, 미세결정성 셀룰로스) 및 제3인산칼슘 (TCP) ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)과 다양한 양의 hOVA 분말을 블렌딩함으로써 균질화된 난백알부민 (hOVA) 비강 분말의 3가지 제형을 생성하였다. hOVA가 분말화된 형태로 제공되었기 때문에, 급속 동결에 이은 동결 건조 단계가 불필요하였다. 제형 1에서, hOVA 분말 13.3 mg을 10 mL 병에서 세올루스 PH-F20JP 354.1 mg, 세올루스 PH-301 40 mg, 및 제3인산칼슘 (TCP) 1.6 mg과 배합하고, 1분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 블렌딩하였다. 생성된 혼합물은 분말 제형 30 mg당 항원 1 mg을 함유하였다. 제형 2에서, hOVA 분말 66.7 mg을 10 mL 병에서 세올루스 PH-F20JP 291.7 mg, 세올루스 PH-301 40 mg, 및 제3인산칼슘 (TCP) 1.6 mg과 배합하고, 1분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 블렌딩하였다. 생성된 혼합물은 분말 제형 30 mg당 항원 5 mg을 함유하였다. 제형 3에서, hOVA 분말 200 mg을 10 mL 병에서 세올루스 PH-F20JP 158.4 mg, 세올루스 PH-301 40 mg, 및 제3인산칼슘 (TCP) 1.6 mg과 배합하고, 1분 동안 볼텍스 혼합기를 이용하여 블렌딩하였다. 생성된 혼합물은 분말 제형 30 mg당 항원 15 mg을 함유하였다.

[0150] 실시예 6B: 비강 난백알부민 백신 분말 제형의 연구 설계 및 결과

[0151] 본 실험에서, 사이노몰거스 원숭이에서 면역 반응을 끌어내는데 대한 난백알부민 비강 분말 백신의 능력을 시험하고, hOVA가 포스페이트 완충제 중에 용해되어 있는 통상적인 주사 비강 액체 제형과 비교하였다. 사이노몰거스 원숭이는 인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응을 갖는다. 균질화된 난백알부민 분말로부터 건조 분말 백신을 제조하고, 상기 기재된 바와 같이 부형제와 블렌딩하였다. 1군은 각각의 외비공에서 비강 백신 분말 제형 1을 30 mg (2 mg 용량) 투여받았고, 2군은 각각의 외비공에서 비강 백신 분말 제형 2를 30 mg (10 mg 용량) 투여받았고, 3군은 각각의 외비공에서 비강 백신 분말 제형 3을 30 mg (30 mg 용량) 투여받았고, 4군은 각각의 외비공에서 액체 백신 0.1 mL (20 mg 용량)을 투여받았고, 5군은 각각의 외비공에서 액체 백신 0.1 mL (30 mg 용량)를 투여받았고, 6군은 피하 주사에 의해 액체 백신 1.0 mL (20 mg 용량)를 투여받았고, 7군은 피하 주사에 의해 액체 백신 1.0 mL (30 mg 용량)를 투여받았다. 도 18의 계획에 따라 백신을 투여하고 샘플을 수집하였다. 실시예 1에 약속된 방법에 따라 효소면역측정법 (ELISA)에 의해 샘플을 시험하였다.

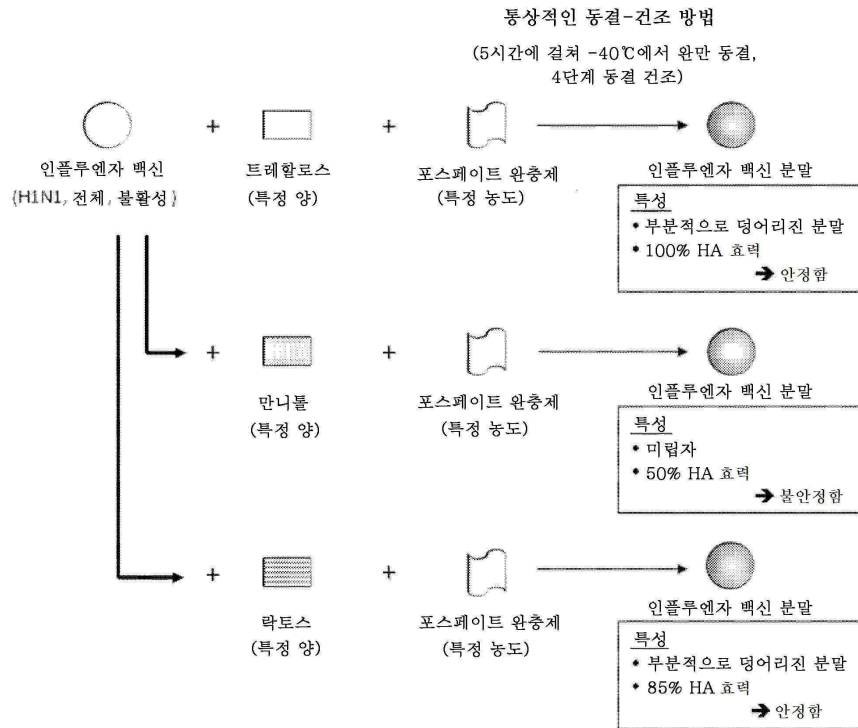
[0152] 본 실험 동안 수집한 혈청 샘플에서 측정된 IgG 항체 역가를 도 19에 나타내었다. 도 19a는 IgG 항체 역가의 표이고, 19b는 19a의 데이터를 나타내는 막대 그래프 (상부) 및 선 그래프 (하부)이다. 비강 분말 제형 및 주사 액체 제형은 모두 유사하게 높은 수준으로 면역 반응을 끌어낼 수 있었으나, 가장 높은 역가는 비강 분말 제형으로 치료한 동물에서 보다 이른 시점에 검출되었다. 비강 액체 제형은 IgG 항체 역가에 의해 측정된 바와 같이 검출가능한 면역 반응을 끌어내는데 실패하였다. 본 실험 동안 수집한 혈청 샘플에서 측정된 sIgA 항체 역가는 도 20에 나타내었다. 도 20a는 sIgA 항체 역가의 표이고, 20b는 20a의 데이터를 나타내는 막대 그래프 (상부) 및 선 그래프이다. 오직 비강 분말 제형만이 sIgA 항체 역가에 의해 측정된 바와 같이 검출가능한 면역 반응을 끌어낼 수 있었다. 비강 액체 또는 주사 액체 제형으로 백신접종한 동물에서 sIgA 역가의 증가는 검출되지 않았다. 종합하면, 이들 결과는, 본원에 기재된 비강 분말 제형이 예시적 단백질 항원을 사용하여 동물에서 점막 및 전신 면역원성 모두를 끌어낼 수 있음을 제시하였다.

[0153] 본 발명의 바람직한 실시양태를 본원에 나타내고 기재하였으나, 이러한 실시양태는 단지 예로서 제공되는 것임이 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명을 벗어나지 않으면서 많은 변화, 변경 및 치환이 당업자에게 일어날 것

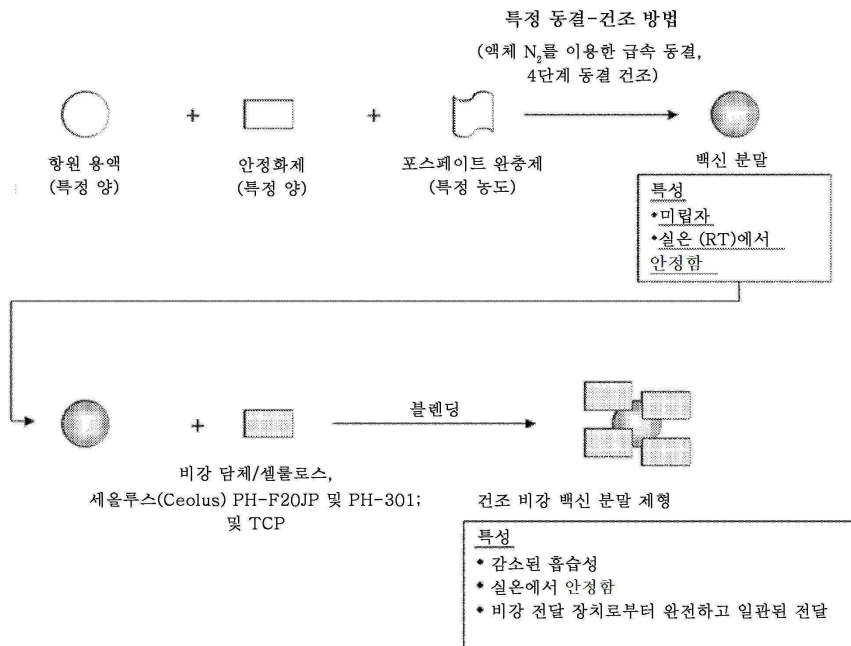
이다. 본 발명을 실시하는데 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 하기 특허청구범위는 본 발명의 범위를 한정하고 이들 특허청구범위 내의 방법 및 구조 및 이들의 등가물이 이에 따라 포함되도록 의도된다.

도면

도면1



도면2



도면3

백신 분말의 제조 방법

A. 백신 용액의 제조

재료 a), b) 및 c)를 10 mL 유리병에서 혼합한다.

- a) 항원 용액
- b) 안정화제 (트레할로스, 만니톨 또는 락토스)
- c) 포스페이트 완충제 또는 초순수

B. 급속 동결

백신 용액을 액체 질소에서 10분 동안 동결시킨다.

C. 동결 상태에서 건조

동결된 백신 용액을 하기 조건 하에 동결-건조기에서 건조시킨다.

- 단계 1: 24시간 동안 -40℃, 140 mtorr 미만
- 단계 2: 24-36시간 동안 -30℃, 130 mtorr 미만
- 단계 3: 4시간 동안 -10℃, 100 mtorr 미만
- 단계 4: 4시간 동안 20℃, 50 mtorr 미만

백신 분말 → 항원성 미립자

D. 블렌딩





재료 a) 내지 d)를 10 mL 유리병에 두고, 블렌딩 혼합기를 이용하여 블렌딩한다.

- a) 제조된 백신 분말
- b) 세울투스® PH-F20JP, 미세결정성 셀룰로스
- c) 세울투스® PH-301, 미세결정성 셀룰로스
- d) 제3인산칼슘 (TCP)

건조 비강 백신 분말 제형

도면4

시험 동물: 사이노몰거스(Cynomolgus) 원숭이
(인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응)

시험 물품	투여 경로	용량 (총 단백질)	투여 계획	수집 샘플	샘플링 계획
1군 (n=3)  비강 인플루엔자 분말 (H1N1 백신)	비강내	90μg/시간	0, 21, 35 및 49일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (IgA의 경우)	-7, 7, 14, 28, 42, 56 및 66일
2군 (n=3)  비강 인플루엔자 백신 용액	비강내	90μg/시간	0, 21, 35 및 49일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (IgA의 경우)	-7, 7, 14, 28, 42, 56 및 66일
3군 (n=3)  비강 인플루엔자 백신 용액 + 아주반트*	비강내	90μg/시간	0, 21, 35 및 49일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (IgA의 경우)	-7, 7, 14, 28, 42, 56 및 66일
4군 (n=2)  SC 인플루엔자 백신 용액	SC 주사	90μg/시간	0, 21, 35 및 49일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (IgA의 경우)	-7, 7, 14, 28, 42, 56 및 66일

* α-갈락토실세라미드는 마우스 및 래트 연구에 효과적인 것으로 보고된 비강 아주반트임.

도면5a

수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 HI 역가, H1N1 백신 시험

군	경로	동물의 번호	혈청, HI 역가						
			-7	7	14	28	42	56	66
1군		1	10	10	20	160	320	320	320
비강 분말, -아주반트	i.n.	2	10	10	20	40	40	80	80
90 µg/외비공/시간		3	10	10	10	40	80	80	160
			10.0	10.0	15.9	63.5	100.8	127.0	160.0
2군		4	10	10	10	20	20	40	40
비강 액체, -아주반트	i.n.	5	10	10	40	80	80	80	160
90 µg/외비공/시간		6	10	10	20	40	40	40	40
			10.0	10.0	20.0	40.0	40.0	50.4	63.5
3군		7	10	10	20	20	20	40	40
비강 액체, + 아주반트	i.n.	8	10	N	10	10	20	20	20
90 µg/외비공/시간		9	20	20	20	40	40	40	40
			12.6	14.1	15.9	20.0	25.2	31.7	31.7
4군	s.c.	10	10	20	40	160	160	320	160
SC 주사, -아주반트		11	10	20	80	640	640	640	640
90 µg/시간			10.0	20.0	56.6	320.0>	320.0>	452.5>	320.0>
NS: 샘플이 없음									

도면5b

수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 HI 역가, H1N1 백신 시험

군	경로	동물의 번호	비강 세척액 (우측), HI 역가						
			-7	7	14	28	42	56	66
1군		1	10	10	10	10	10	10	20
비강 분말, -아주반트	i.n.	2	10	10	10	10	10	40	40
90 µg/ 외비공/시간		3	10	10	10	10	40	80	80
			10.0	10.0	10.0	10.0	15.9	31.7	40.0
2군		4	NS	10	10	10	10	10	10
비강 액체, -아주반트	i.n.	5	10	10	10	10	10	20	40
90 µg/ 외비공/시간		6	10	10	10	10	10	10	10
			10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	12.6	15.9
3군		7	10	10	10	10	10	10	20
비강 액체, + 아주반트	i.n.	8	10	10	10	10	10	10	10
90 µg/ 외비공/시간		9	10	10	10	10	10	10	10
			10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	12.6
4군	s.c.	10	10	10	10	10	10	10	10
SC 주사, -아주반트		11	10	10	10	10	10	10	10
90 µg/시간			10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
NS: 샘플이 없음									

도면6a

수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 항체 역가, H1N1 백신 시험

군	경로	동물의 번호	혈청 IgG						
			-7	7	14	28	42	56	66
1군		1	-	128	256	4096	16384	16384	16384
비강 분말, -아주반트 90 µg/ 외비공/시간	i.n.	2	-	16	32	2048	2048	4096	4096
		3	-	-	32	1024	4096	4096	8192
			-	45.3	64.0	2048.0	5160.6	6502.0	8192.0
2군		4	-	-	-	512	1024	2048	2048
비강 액체, -아주반트 90 µg/ 외비공/시간	i.n.	5	-	-	16	4096	4096	4096	4096
		6	-	32	256	1024	2048	2048	1024
			-	32.0	64.0	1290.2	2048.0	2580.3	2048.0
3군		7	-	16	16	64	512	1024	1024
비강 액체, + 아주반트 90 µg/ 외비공/시간	i.n.	8	-	-	-	256	256	512	512
		9	-	-	128	512	1024	1024	1024
			-	16.0	45.3	203.2	512.0	812.7	812.7
4군	s.c.	10	-	16	1024	16384	16384	16384	16384
SC 주사, -아주반트 90 µg/시간		11	-	32	4096	65536	65536	65536	65536
			-	23	2048	32768	32768	32768	32768

-: 컷 오프 값 미만

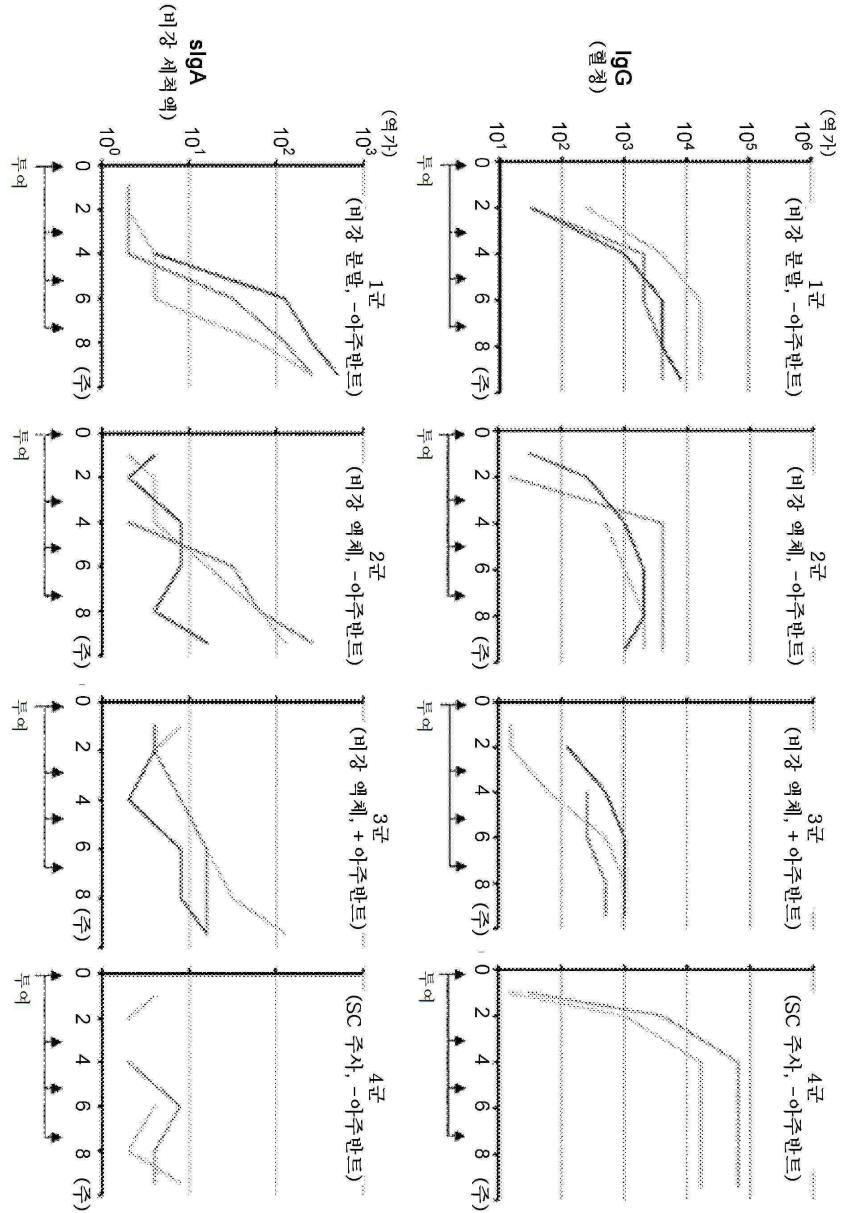
도면6b

수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 항체 역가, H1N1 백신 시험

군	경로	동물의 번호	비강 세척액 (우측, sIgA)						
			-7	7	14	28	42	56	66
1군		1	-	2	2	4	4	64	256
비강 분말, -아주만트	i.n.	2	-	2	2	2	32	128	256
90 µg/ 외비공/시간		3	-	4	-	4	128	256	512
			2.5	2.0	3.2	25.4	128.0	322.5	
2군		4	-	2	4	4	16	64	128
비강 액체, -아주만트	i.n.	5	-	-	-	2	32	64	256
90 µg/ 외비공/시간		6	1	4	2	8	8	4	16
			2.8	2.8	4.0	16.0	25.4	80.6	
3군		7	-	8	4	8	16	32	128
비강 액체, + 아주만트	i.n.	8	1	4	4	8	16	16	16
90 µg/ 외비공/시간		9	-	4	4	2	8	8	16
			5.0	4.0	5.0	12.7	16.0	32.0	
4군	s.c.	10	-	4	2	-	4	2	8
SC 주사, -아주만트		11	-	-	-	2	8	4	4
90 µg/시간			4.0	2.0	2.0	5.7	2.8	5.7	

-: 컷 오프 값 미만

도면7



각각의 선은 명시된 시험군에 속한 1마리의 동물로부터의 시험 결과를 나타냄.

도면8

수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 HI 역가, H1N1 백신 시험

군	경로	동물의 번호	혈청, HI			비강 세척액 (우측), HI		
			80	101	115	80	101	115
1군	i.n.	1	320	320	160	40	40	80
비강 분말, -아주반트 90 µg /시간								
2군	i.n.	6	20	20	20	10	10	10
비강 액체, -아주반트 90 µg /시간								
3군	i.n.	7	20	20	10	10	10	10
비강 액체, + 아주반트 90 µg /시간								
4군	s.c.	10	160	80	40	10	10	10
SC 주사, -아주반트 90 µg/시간		11	640	320	160	10	10	NS
NS: 샘플이 없음								

도면9

수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 항체 역가, H1N1 백신 시험




군	경로	동물의 번호	혈청 IgG			비강 세척액 (우측), sIgA		
			80	101	115	80	101	115
1군	i.n.	1	16384	16384	16384	256	512	512
비강 분말, -아주반트								
90 µg/시간								
2군	i.n.	6	1024	1024	1024	32	16	32
비강 액체, -아주반트								
90 µg/시간								
3군	i.n.	7	512	512	256	64	64	64
비강 액체, + 아주반트								
90 µg/시간								
4군	s.c.	10	8192	4096	2048	8	4	2
SC 주사, -아주반트								
90 µg/시간								
		11	32768	16384	8192	4	2	NS

NS: 샘플이 없음

항체 역가 (컷 오프 값보다 높은 흡광도를 나타낸 샘플의 최대 희석 배수)

도면10

시험 동물: 사이노몰거스 원숭이 (인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응)

시험 물품	투여 경로	용량 (HA 단백질)	투여 계획	수집 샘플	샘플링 계획
1군 (n=5)  비강 인플루엔자 분말 (H5N1)	비강내	30 µg/시간 (15 µg/외비공)	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (IgA의 경우)	-7, -1, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 및 69일
2군 (n=5)  비강 인플루엔자 분말 (H5N1)	비강내	30 µg/시간 (15 µg/외비공)	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (IgA의 경우)	-7, -1, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 및 69일
3군 (n=3)  IM 인플루엔자 백신 용액 (H5N1)	IM 주사	30 µg/시간	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (IgA의 경우)	-7, -1, 13, 20, 27, 34, 41, 48, 55, 62 및 69일

도면11a

수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 항체 역가, H5N1 백신 시험

군	경로	동물의 번호	혈청 IgG					
			-	-	-	-	-	-
			1	13	27	41	55	70
1군		1	-	-	-	32	64	32
비강 분말	i.n.	2	-	-	-	-	16	32
30 µg 항원		3	-	-	-	32	128	128
(15 µg/외비공/시간)	각각의 외비공	4	-	-	32	128	256	512
		5	-	-	64	256	512	512
					45	76	111	128
2군		6	-	-	-	64	64	64
비강 액체	i.n.	7	-	-	-	-	-	-
30 µg 항원		8	-	-	-	-	32	32
(15 µg/외비공/시간)	각각의 외비공	9	-	-	-	16	32	32
		10	-	-	16	32	64	64
					16	32	45	45
3군		11	-	256	2048	2048	8192	8192
IM 주사	I.M.	12	-	512	2048	2048	4096	4096
30 µg 항원		13	-	512	2048	2048	8192	16384
(30 µg/신체/시간)					2048	2048	6502	8192

-: 컷 오프 값 미만

IM 주사의 27일 및 41일에 혈청 IgG의 역가는 2048을 초과함.

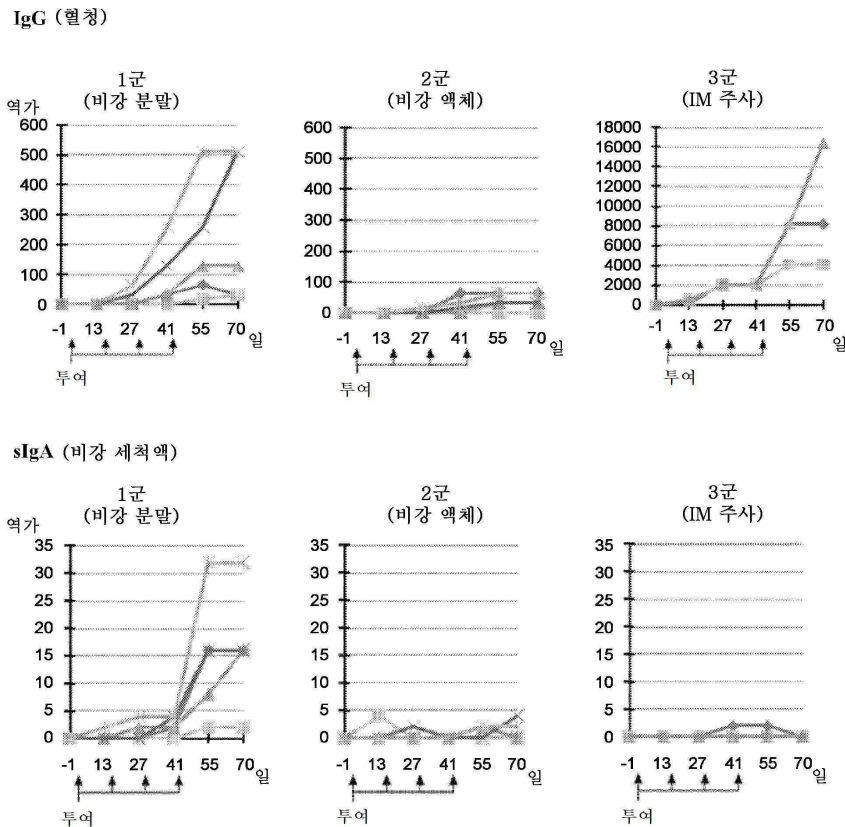
도면11b

수컷 사이노볼거스 원숭이에서의 항체 역가, H5N1 백신 시험

군	경로	동물의 번호	비강 세척액 (우측), sIgA					
			-					
			1	13	27	41	55	70
1군		1	-	-	-	2	16	16
비강 분말	i.n.	2	-	-	-	-	2	2
30 µg 항원		3	-	-	2	2	8	16
(15 µg/외비공/시간)	각각의 외비공	4	-	-	-	4	16	16
		5	-	2	4	4	32	32
			-	2	3	3	11	12
2군		6	-	-	-	-	-	-
비강 액체	i.n.	7	-	4	-	-	-	-
30 µg 항원		8	-	-	-	-	2	-
(15 µg/외비공/시간)	각각의 외비공	9	-	-	2	-	-	4
		10	-	-	-	-	2	2
			-	4	2	-	2	3
3군		11	-	-	-	2	2	-
IM 주사	I.M.	12	-	-	-	-	-	-
30 µg 항원		13	-	-	-	-	-	-
(30 µg/신체/시간)			-	-	-	2	2	-

-: 컷 오프 값 미만





도면12



각각의 선은 명시된 시험군에 속한 1마리의 동물의 시험 결과를 나타냄.

도면13

시험 동물: 사이노몰거스 원숭이 (인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응)

시험 물품	투여 경로	총 단백질	투여 계획	수집 샘플	샘플링 계획
1군 (n=1)  비강 분말 (파상풍 백신)	비강 내	5Lf/시간 (2.5Lf/외비공)	0, 14 및 21일	혈청 (IgG의 경우)	-1, 13, 20, 27 및 34일
2군 (n=1)  비강 분말 (파상풍 백신)	비강 내	10Lf/시간 (2.5Lf/외비공X2)	0, 14 및 21일	혈청 (IgG의 경우)	-1, 13, 20, 27 및 34일
3군 (n=1)  비강 분말 (파상풍 백신)	비강 내	20Lf/시간 (2.5Lf/외비공X4)	0, 14 및 21일	혈청 (IgG의 경우)	-1, 13, 20, 27 및 34일
4군 (n=1)  주사 액체 (파상풍 백신)	SC 주사	10Lf/시간	0, 14 및 21일	혈청 (IgG의 경우)	-1, 13, 20, 27 및 34일

도면14a

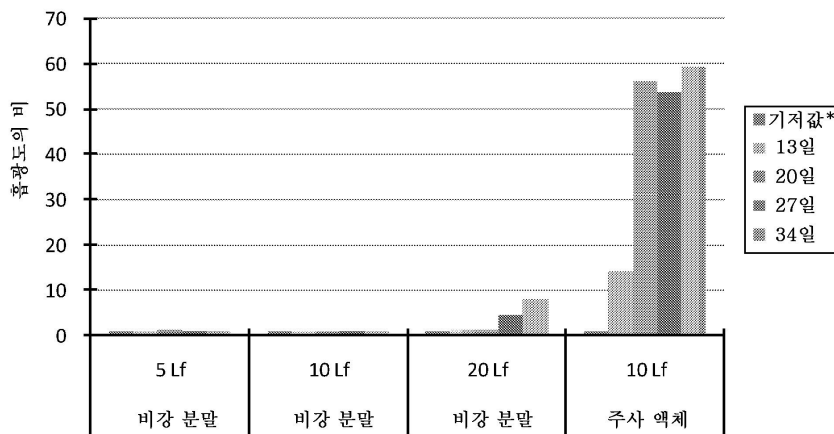
수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 혈청 IgG의 흡광도 비
파상풍 독소이드 백신 시험 (TTx)

혈청 IgG의 흡광도 비							
동물의 번호	제형	TTx	일				
			기저값*	13	20	27	34
1	비강 분말	5Lf	1.00	0.87	1.07	1.00	0.94
2	비강 분말	10Lf	1.00	0.99	0.96	0.96	0.88
3	비강 분말	20Lf	1.00	1.29	1.08	4.33	7.88
4	주사 액체	10Lf	1.00	14.12	56.23	53.58	59.33

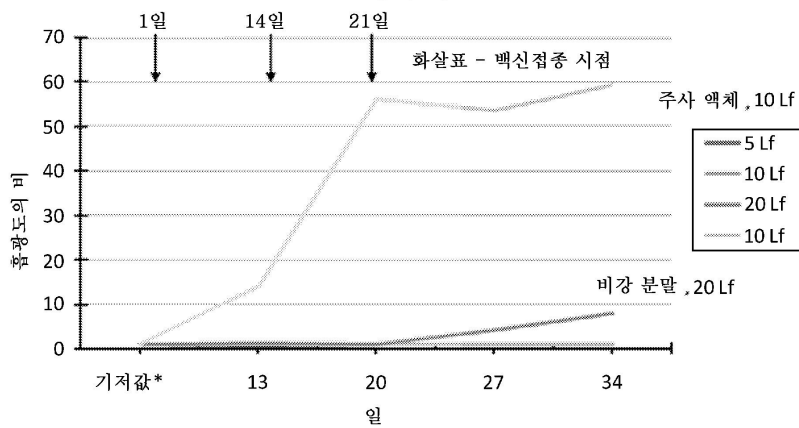
* 기저값 (-6일 및 -1일의 평균)을 1.00으로 조정함.

도면14b

혈청 IgG (TTx)



혈청 IgG (TTx)



도면15




수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 TTx-특이적 IFN 감마 스팟-형성 세포의 수
파상풍 독소이드 백신 시험 (TTx)

혈청 내 TTx-특이적 IFN 감마 스팟-형성 세포의 수						
동물의 번호	제형	TTx	일			
			1	13	20	27
1	비강 분말	5 Lf	—	—	—	±
2	비강 분말	10 Lf	—	—	—	±
3	비강 분말	20 Lf	—	—	±	++
4	주사 액체	10 Lf	—	++	+	+

양성 신호의 수준을 -, ±, + 또는 ++로 평가하였음.

도면16

시험 동물: 사이노몰거스 원숭이 (인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응)

시험 물품	투여 경로	총 단백질	투여 계획	수집 샘플	샘플링 계획
1군 (n=1)  비강 분말 (디프테리아 백신)	비강내	2.5 Lf/시간 (1.25 Lf/외비공)	0, 14 및 21일	혈청 (IgG의 경우)	-1, 13, 20, 27 및 34일
2군 (n=1)  액체 주사 (디프테리아 백신)	SC 주사	5 Lf/시간	0, 14 및 21일	혈청 (IgG의 경우)	-1, 13, 20, 27 및 34일
3군 (n=1)  재구성된 분말 (디프테리아 백신)	SC 주사	5 Lf/시간	0, 14 및 21일	혈청 (IgG의 경우)	-1, 13, 20, 27 및 34일

도면17a

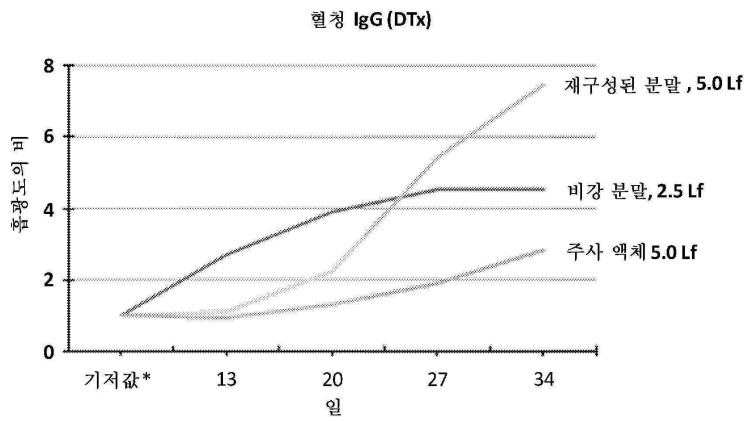
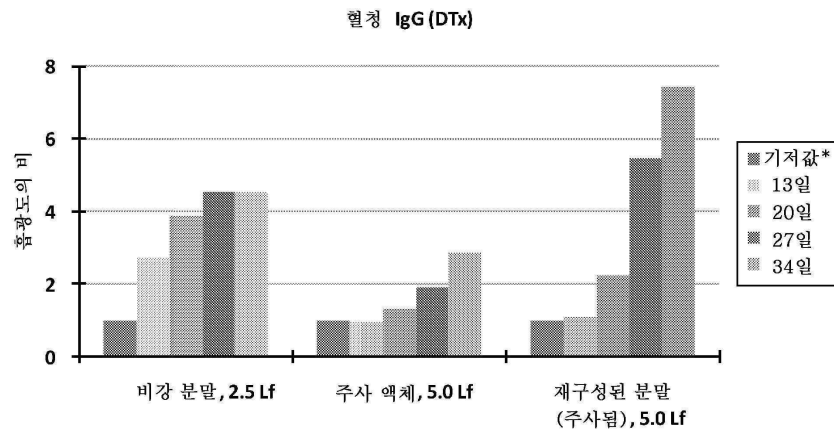
수컷 사이노몰거스 원숭이에서의 혈청 IgG의 흡광도 비
디프테리아 백신 시험 (DTx)

혈청 IgG의 흡광도 비							
동물의 번호	제형	DTx	일				
			기저값*	13	20	27	34
1	비강 분말	2.5Lf	1.00	2.72	3.88	4.54	4.54
2	주사 액체	5.0Lf	1.00	0.96	1.32	1.89	2.85
3	재구성된 분말 [#]	5.0Lf	1.00	1.11	2.24	5.44	7.45

* 기저값 (-6일 및 -1일의 평균)을 1.00으로 조정함.

[#] 재구성된 분말. 동결 건조 조건은 비강 분말과 동일함.

도면17b



도면18

시험 동물: 사이노몰거 원숭이 (인간과 유사한 비강 구조 및 유사한 면역 반응)

시험 물품	투여 경로	총 단백질	투여 계획	수집 샘플	샘플링 계획
1군 (n=1)  비강 분말 (hOVA)	비강내	2mg/시간 (1mg/외비공)	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (sIgA의 경우)	-7, -1, 13, 27, 41 및 55일
2군 (n=1)  비강 분말 (hOVA)	비강내	10mg/시간 (5mg/외비공)	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (sIgA의 경우)	-7, -1, 13, 27, 41 및 55일
3군 (n=1)  비강 분말 (hOVA)	비강내	30mg/시간 (15mg/외비공)	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (sIgA의 경우)	-7, -1, 13, 27, 41 및 55일
4군 (n=1)  비강 액체 (hOVA)	비강내	20mg/시간 (10mg/외비공)	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (sIgA의 경우)	-7, -1, 13, 27, 41 및 55일
5군 (n=1)  비강 액체 (hOVA)	비강내	30mg/시간 (15mg/외비공)	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (sIgA의 경우)	-7, -1, 13, 27, 41 및 55일
6군 (n=1)  주사 액체 (hOVA)	SC 주사	20mg/시간	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (sIgA의 경우)	-7, -1, 13, 27, 41 및 55일
7군 (n=1)  주사 액체 (hOVA)	SC 주사	30mg/시간	0, 14, 28 및 42일	혈청 (IgG의 경우) 비강 세척액 (sIgA의 경우)	-7, -1, 13, 27, 41 및 55일

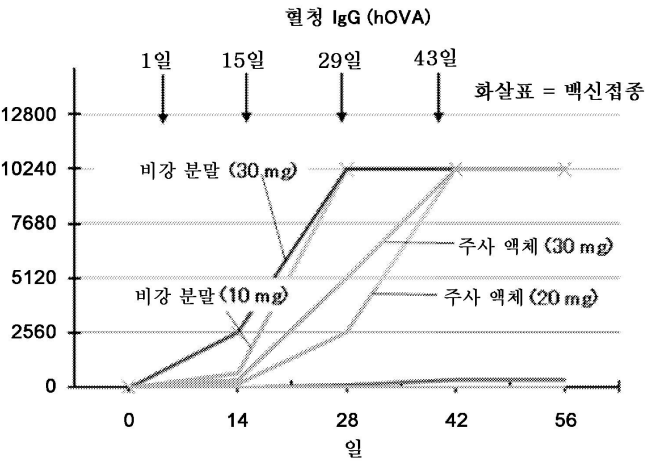
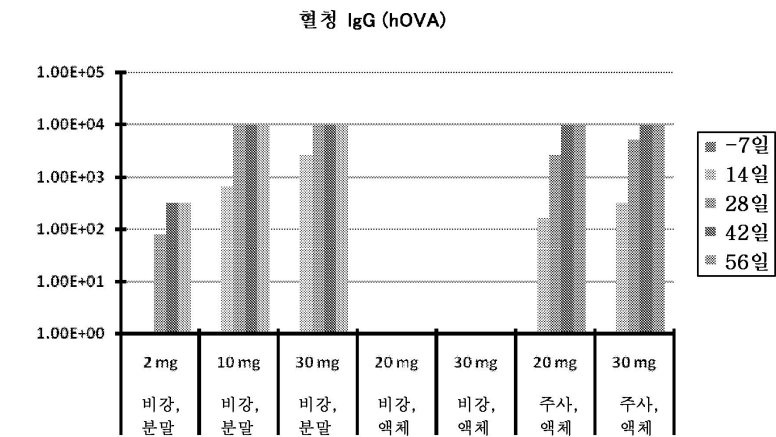
도면19a

암컷 사이노몰거스 원숭이에서의 혈청 IgG의 항체 역가
균질화된 난백알부민 (hOVA)

혈청 IgG의 역가							
동물의 번호	제형	hOVA	일				
			0	14	28	42	56
1	비강, 분말	2 mg	—	N.D.	80	320	320
2	비강, 분말	10 mg	—	640	10240	10240	10240
3	비강, 분말	30 mg	—	2560	10240	10240	10240
4	비강, 액체	20 mg	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	비강, 액체	30 mg	—	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	주사, 액체	20 mg	—	160	2560	10240	10240
7	주사, 액체	30 mg	—	320	5120	10240	10240

항체 역가 (컷 오프 값보다 높은 흡광도를 나타낸 샘플의 최대 희석 배수)

도면19b



도면20a

(A) 암컷 사이노물거스 원숭이에서의 비강 세척액 sIgA의 항체 역가
균질화된 난백알부민 (hOVA)

좌측 비강 세척액 sIgA의 역가							
동물의 번호	제형	hOVA	일				
			0	14	28	42	56
1	비강, 분말	2 mg	—	—	—	—	4
2	비강, 분말	10 mg	—	—	32	64	32
3	비강, 분말	30 mg	—	8	16	16	16
4	비강, 액체	20 mg	—	—	—	—	—
5	비강, 액체	30 mg	—	—	—	—	—
6	주사, 액체	20 mg	—	—	—	—	—
7	주사, 액체	30 mg	—	—	—	—	—

항체 역가 (컷 오프 값보다 높은 흡광도를 나타낸 샘플의 최대 회석 배수)

도면20b

