



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월06일
(11) 등록번호 10-1357685
(24) 등록일자 2014년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7014882
(22) 출원일자(국제) 2006년11월15일
심사청구일자 2011년11월15일
(85) 번역문제출일자 2008년06월19일
(65) 공개번호 10-2008-0070866
(43) 공개일자 2008년07월31일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2006/001855
(87) 국제공개번호 WO 2007/056847
국제공개일자 2007년05월24일
(30) 우선권주장
60/597,280 2005년11월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20020031527 A1*
US05869306 A*
W02005066333 A1
US04500512 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
사노피 파스퇴르 리미티드 / 사노피 파스퇴르 리미테
캐나다 엠2알 3티4 온타리오 토론토 스틸스 애비뉴 웨스트 1755
(72) 발명자
시가리니 상드렝
캐나다 온타리오 엠2알 3티4 토론토 스틸스 애비뉴 더블유 1755
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 김정희

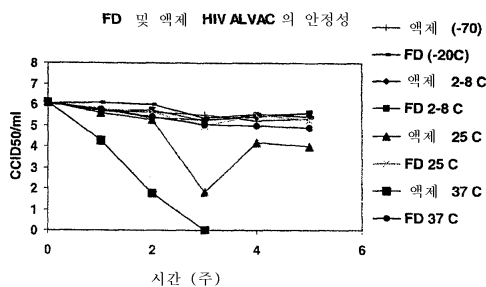
(54) 발명의 명칭 **제조합 바이러스용 안정화 제형**

(57) 요약

본 발명은 예를 들어, 백신 또는 기타 약제 또는 연구용의 바이러스 제제, 이의 안정화 방법 및 당해 제제를 제조하는 방법 뿐만 아니라 예를 들어, 백신 또는 바이러스 벡터로서의 이의 용도에 관한 것이다. 당해 제형은 당, 방부제, 분산제, 열 안정제, 완충제 및 3개 이하의 별개 유형의 아미노산을 포함하고 이들은 동결건조된 생성물의 구조적 외관에 영향을 주지 않는다.

대표도 - 도1

FD = 동결-건조 제형 F12
액제 = 액제 제형



특허청구의 범위

청구항 1

동결-건조(freeze-dried)되거나 동결건조(lyophilized)된 재조합 바이러스를 안정한 형태로 유지시키기 위한 제형으로서,

당; 방부제; 분산제; 열 안정제; 완충제; 및 아르기닌, 알라닌, 세린 및 글라이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1 종류의 아미노산을 포함하고,

상기 분산제는 폴리비닐 피롤리돈 40인 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 당이 슈크로스, 소르비톨, 또는 슈크로스와 소르비톨인 제형.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 완충제가 Tris인 제형.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 아미노산이 제형 중에 100mg/ml 미만의 농도로 존재하는 제형.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 아미노산이 제형 중에 80mg/ml의 농도로 존재하는 제형.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 5℃에서 15초 이하의 용해 시간을 갖는 제형.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 동결건조시 52주 동안 -20℃에서 보관 후 부드러운 백색 층의 물질로서 나타나는 제형.

청구항 8

제7항에 있어서, 재조합 바이러스가 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 폭스 바이러스 및 레트로바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형.

청구항 9

제8항에 있어서, 재조합 바이러스가 재조합 폭스 바이러스인 제형.

청구항 10

제9항에 있어서, 재조합 폭스 바이러스가 오르토폭스(*orthopox*) 바이러스 또는 아비폭스(*avipox*) 바이러스인 제형.

청구항 11

제10항에 있어서, 오르토폭스 바이러스가 백신니아, MVA 및 NYVAC로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형.

청구항 12

제10항에 있어서, 아비폭스 바이러스가 카나리폭스(*canarypox*), 파울폭스(*fowlpox*), TROVAC 및 ALVAC으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 재조합 바이러스가 이의 게놈 내에 병원성 유기체 또는 암과 관련된 항원을 암호화

하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 제형.

청구항 14

제13항에 있어서, 병원성 유기체가 코로나바이러스(*Coronavirus*), 사이토메갈로바이러스(*Cytomegalovirus*), 땡기열 바이러스(*Dengue virus*), 에볼라 바이러스(*Ebola virus*), 엡슈타인 바르 바이러스(*Epstein Barr Virus*), 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, HIV, 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 유행선염 바이러스(*Mumps virus*), 파필로마바이러스(*Papillomaviruses*), 폭스 바이러스(*pox viruses*), 폴리오 바이러스(*polio virus*), 라비 바이러스(*rabies virus*), 호흡기 세포융합 바이러스(*Respiratory Syncytial Virus*), 웨스트 나일 바이러스(*West Nile virus*) 및 옐로우 피버 바이러스(*Yellow Fever virus*)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형.

청구항 15

제13항에 있어서, 암이 결장암, 직장암, 유방암, 피부암, 폐암, 뇌암 및 혈액암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형.

청구항 16

제15항에 있어서, 핵산 서열이 종양 항원을 암호화하는 제형.

청구항 17

제1항 또는 제2항에 따른 제형을 포함하는 면역학적 제형.

청구항 18

제17항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 면역학적 제형.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 따른 제형을 포함하는 사람 또는 동물용 백신.

청구항 20

제19항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 백신.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 예를 들어, 백신으로서 또는 바이러스 벡터로서의 바이러스 제제의 용도 뿐만 아니라 예를 들어, 백신용 또는 기타 약제용 또는 연구용의 바이러스 제제, 이의 안정화 방법 및 당해 제제를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 백신용 및 기타 목적을 위해 생 바이러스 제제를 제조하기 위한 수많은 방법이 공지되어 있다. 연구용 또는 백신용의 생존 바이러스 제제를 이들의 활성을 보존하기 위해 동결시키거나 동결건조시키거나 보관하는데 유용한 제형 및 방법이 또한 공지되어 있다.
- [0003] 전형적으로, 제조합 바이러스는 인산 완충 생리식염수(PBS)중에 슈크로스, 카제인 가수분해물 및/또는 콜라겐을 함유하는 동결건조된 펠렛으로서 보관되었다. 이어서 이들 펠렛은 0.4 내지 0.9% NaCl과 같은 약제학적으로 허용되는 용액에서 재수화된다. 그러나, 당해 제형과 관련하여 상당한 단점이 있고 이는 당업계에서 공지되어 있다. 이들중에는 완전하게 규명되지 않은 성분인 동물 유래 물질의 사용, 복잡한 제조 과정, 고비용 및 바이러스의 특정 목적하는 특성을 유지하지 못한다는 단점이 있다.
- [0004] 당업계에서는 면역학적 제형 및 백신에 사용하기 위해 안정화된 바이러스 제제의 제조에 적합한 제형이 여전히 요구된다. 바이러스 생존력 및 감염력을 포함하는, 바이러스, 면역학적 제형 또는 백신의 목적하는 특성을 보존하는 안정화 제형을 제공하는 것이 요망될 수 있다. 또한, 당업계에서는 동물 매개 질환과 관련된 우려 때문에 동물 주요 생성물로부터 유래되지 않은 안정화 제형이 요구된다. 급속 동결-건조(freeze-drying) 처리에 맞는 고역가 저용량 제형을 제공하는 것이 추가로 요망된다. 당해 제형, 당해 동일한 목적에 사용하기 위한 제형 및 방법이 본원에 기재된다.

발명의 상세한 설명

- [0008] 전형적으로, 아비폭스 바이러스(avipox virus) ALVAC와 같은 제조합 바이러스는 인산 완충 생리식염수(PBS)중에 슈크로스, 카제인 가수분해물 및/또는 콜라겐을 함유하는 동결-건조된(freeze-dried) 펠렛으로서 보관되었다. 이어서 이들 펠렛은 0.4 내지 0.9%의 NaCl과 같은 약제학적으로 허용되는 용액중에서 재수화시킨다. 그러나, 당해 제형과 관련하여 상당한 단점이 있고 취급하기가 곤란한 것으로 당업계에서 공지되어 있다. 따라서, 본 발명에서는 하기된 바와 같은 신규 안정화 제형을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 발현 벡터, 면역학적 제형 및/또는 백신으로서 사용하기 위해, 제조합 바이러스를 포함하는 바이러스를 안정하게 보관하고 보존하기 위한 제형을 제공한다. 당해 제형은 현재 유용한 제형과 비교하여 보다 용이하고 저렴하게 및 바이러스 활성에 큰 손실 없이, 당해 바이러스를 제조하고 보관하고 사용하는 방법에 유용하다. 당해 제형은 "안정화 제형"으로서 언급될 수 있고 전형적으로 당(즉, 슈크로스 또는 소르비톨, 트레할로스, 사카로스, 만니톨, 락토스), 방부제(당, 아미노산, 기타 성분일 수 있음), 분산제(즉, 폴리비닐 피롤리돈 40, 텍스트란, PEG), 열 안정제(즉, 우레아), 완충제(즉, Tris, 인산염 완충 식염수(PBS), 인산나트륨, 아세테이트, 보레이트, 헤페스, MOPS, PEG) 및 하나 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0010] 1개, 2개, 3개 또는 4개 이하의 아미노산이 당해 제형중에 포함되는 것이 바람직하다. 당업자는 조성물을 기재하는데 있어서 언급되는 아미노산이 제형의 제조에 이어서 제형에 첨가되는 바이러스, 보조제 또는 기타 성분내에 있거나 이로부터 제형에 방출되는 아미노산을 포함하는 것이 아님을 이해해야만 한다. 따라서, 제형의 일부로서 기재된 아미노산은 바이러스 또는 보조제를 제형에 첨가하기 전에 존재하는 것이다.
- [0011] 가장 바람직한 양태에서, 단일 아미노산이 당해 제형에 포함된다. 바람직한 양태에서, 당해 제형은 아르기닌, 세린 또는 글라이신중 하나 이상을 포함한다. 보다 바람직한 양태에서, 당해 제형은 아르기닌, 세린 또는 글라이신인 단일 아미노산을 포함한다. 아미노산(들)은 바람직하게 제형에 약 100 mg/ml로 또는 그 미만으로 존재한다. 보다 바람직하게, 아미노산(들)은 약 90-95 mg/ml, 약 85-90 mg/ml, 약 80-85 mg/ml, 또는 약 80 mg/ml로 당해 제형에 존재한다. 각각의 아미노산은 당업자에게 널리 유용하다.
- [0012] 안정화 제형은 바람직하게 액체 동결-건조된(freeze-dried) 제제, 동결건조된(lyophilized) 제제 또는 기타 형태로 바이러스를 보관하기 위해 사용된다. 액체에 관련하여, 액체 제형이 약제학적 제형인 것이 바람직하다. 동결-건조되거나(freeze-dried) 동결건조된(lyophilized) 제제는 전형적으로 약제학적으로 허용되는 담체와 같은 액체를 사용하여 이를 재구성함에 의해 액체 형태로 전환된다. 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어, 완충제 및 염(즉, PBS)을 함유하는 액체 담체일 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 기타 유형 뿐만 아니라 적합한 완충제 및 염의 예는 당업계에서 널리 공지되어 있다.
- [0013] 바이러스 제제를 보관하기 위한 특정 제형의 적합성을 평가하는데 있어서, 당해 제형의 가시적 외관은 적합성에

대한 중요한 지표로서 측정되었다. 예를 들어, 가장 적합한 제형은 동결건조 후 및 약 52주 동안 약 -20℃에서 보관한 후 부드러운 백색의 층 또는 바이엘의 측면으로부터 수축되지 않는 "케이크"를 제공한다. "용융된", "비등된" 또는 기타 기형의 외관을 나타내고 보관 후 바이엘 측면으로부터 수축되는 제형은 덜 적합하다. 하기에 제공된 실험 결과에서 나타난 바와 같이, 부드러운 백색 층은 본원에 기재된 제형의 또 다른 목적하는 특징인 보다 신속한 용해 시간과 관련되어 있다. 부드러운 백색 층의 케이크는 바이러스를 안정하게 보존하기 위해 유용한 제형과 강하게 연관되어 있다.

[0014] 상기 논의된 바와 같이, 용해 시간은 적합한 제형의 매우 중요한 특징이다. 바이러스 제제의 동결건조 후 당해 제형은 약제학적으로 허용되는 담체중에서 특정 용해 시간을 갖는데, 예를 들어, PBS는 약 5℃에서 약 52주동안 보관 후 약 20 내지 25초, 약 15 내지 20초 또는 바람직하게 약 15초 이하이다. 이것은 당업자에게 당해 분야에서 신속히 이용가능한 제형을 제공한다.

[0015] 바이러스가 안정화 제형에서 유지되는 온도는 보관 기간(즉, 약 52주 까지)에 따른 목적하는 상태(즉, 제제의 외관, 용해 시간, 역가 또는 기타 특징을 관찰함에 의해 측정됨)로 바이러스 제형을 유지시키는 임의의 온도이다. 당해 제형은 전형적으로 및 가장 간편하게는 약 10℃미만(즉 약 5℃)의 온도로 유지된다. 특정 상황에서, 제형은 -20℃에서 유지된다.

[0016] 재구성 후 제형을 위해 적합한 pH는 보관 기간(즉, 약 52주 까지)에 따른 목적하는 상태(즉, 생존력, 감염 역가, 용해 시간)로 제형을 유지시키는데 적합한 임의의 pH이다. 예를 들어, 액체 제형의 pH는 바람직하게 약 6-9, 6-8.5, 6.5-8.5, 7-8.5, 7.5-8.5, 6-8, 6.5-8, 7-8, 7.5-8, 또는 7-7.5이다. 제형이 약 7.5의 pH를 갖는 것이 바람직하다. 액체 제형은 임의의 적합한 컨테이너에 위치(예를 들어, 유지되거나 보관됨)할 수 있다. 전형적으로, 컨테이너는 바이러스 또는 기타 보관 컨테이너 형태로 유리 또는 플라스틱을 포함하거나 이들로 필수적으로 이루어지거나 이루어진다.

[0017] 본 발명을 수행하는데 있어서 많은 상이한 바이러스가 사용될 수 있다. 적합한 바이러스는 예를 들어 아데노바이러스(*Adenoviruses*), 아르보바이러스(*Arboviruses*), 아스트로바이러스(*Astroviruses*), 박테리오파지(*Bacteriophages*), 엔테로바이러스(*Enteroviruses*), 가스트로엔테리티스 바이러스(*Gastroenteritis Viruses*), 한타바이러스(*Hantavirus*), 콕사키에 바이러스(*Coxsackie viruses*), A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 헤르페스바이러스(*Herpesviruses*)(예를 들어, 엡슈타인 바르 바이러스(*Epstein Barr Virus*)(EBV), 사이토메갈로바이러스(*Cytomegalovirus*)(CMV) 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV)), 인플루엔자 바이러스, 노르윅 바이러스(*Norwalk Viruses*), 폴리오 바이러스(*Polio Viruses*), 코르도포스비리데(*Chordopoxviridae*) (즉, 5 오르토폭스바이러스(*Orthopoxvirus*), 백신니아(*vaccinia*), MVA, NYVAC, 아비폭스바이러스(*Avipoxvirus*), 카나리폭스(*canarypox*), ALVAC, ALVAC(2), 파울폭스(*fowlpox*), 랩도바이러스(*Rhabdoviruses*), 레오바이러스(*Reoviruses*), 리노바이러스(*Rhinoviruses*), 로타바이러스(*Rotavirus*), 레트로바이러스(*Retroviruses*), 바쿨로비리데(*Baculoviridae*), 칼리시비리데(*Caliciviridae*), 카울리모비리데(*Caulimoviridae*), 코로나비리데(*Coronaviridae*), 필로비리데(*Filoviridae*), 플라비비리데(*Flaviviridae*), 헤파드나비리데(*Hepadnaviridae*), 노다비리데(*Nodaviridae*), 오르토크소비리데(*Orthomyxoviridae*), 파라믹소비리데(*Paramyxoviridae*), 파포바비리데(*Papovaviridae*), 파르보비리데(*Parvoviridae*), 피코드나비리데(*Phycodnaviridae*), 피코마비리데(*Picomaviridae*), 및 토가비리데(*Togaviridae*), 및 이전의 또는 기타 적합한 임의의 바이러스로부터 유래하거나 이를 기초로 하거나 실질적으로 유사한 변형된 바이러스를 포함한다. 본 발명을 수행하는데 사용하기 위해 바람직한 바이러스는 폭스바이러스, 특히 ALVAC이다. 기타 적합한 바이러스는 예를 들어, 문헌[Fields et al., Virology (34th ed., Lippincott Williams & Wilkins (2001))]에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0018] 특정 양태에서, 재조합 바이러스는 이의 게놈내에 항원 또는 면역원을 암호화하는 핵산 서열을 포함하여 바이러스는 면역학적 제형 또는 백신에 사용될 수 있다. 용어 "재조합 바이러스"는 바이러스 게놈으로 천연적으로 바이러스 게놈의 일부가 아닌 이종성 유전자가 삽입된 임의의 바이러스를 언급한다. 면역학적 제형은 숙주에게 투여 즉시 바이러스에 의해 암호화된 항원 또는 면역원에 대해 지시되거나 이에 반응성인 면역 반응을 유도하는 제형이다. 당해 면역 반응은 보호성이거나 보호성이 아닐 수 있거나 숙주에 면역성을 부여하거나 부여하지 않을 수 있다. 백신은 숙주에 의해 암호화된 항원 또는 면역원에 대해 지시되거나 이에 반응성인 보호 면역 반응을 숙주에 유발하는 제형이다. 면역 반응은 ELISA, BIACORE, DOT-BLOT, 면역확산 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업자에게 유용한 많은 기술 중 어느 하나에 의해 측정될 수 있다.

[0019] 특정 경우에, 재조합 바이러스는 하나 이상의 종양 항원("TA")을 암호화할 수 있다. TA는 종양-관련 항원(TAA)

및 종양 특이적 항원(TSA) 둘다를 포함하고 이때, 암세포가 항원의 공급원이다. TAA는 정상 세포상에서 관찰되는 것 보다 고량으로 종양 세포의 표면에 발현되는 항원이거나 태아 발육동안에 정상 세포상에서 발현되는 항원이다. TSA는 종양 세포에 유일하고 정상 세포상에서는 발현되지 않는 항원이다. TA는 추가로 TAA 또는 TSA, 이의 항원 단편 및 이의 항원성을 보유하는 변형된 버전을 포함한다. TA는 전형적으로 이의 발현 패턴, 기능 또는 유전자 기원에 따라 하기의 5가지의 카테고리로 분류된다; 암-고환(CT) 항원(즉, MAGE, NY-ESO-I); 흑색 세포 분화 항원(즉, 멜란(Melan) A/MART-1, 티로시나제, gp100); 돌연변이성 항원(즉, MUM-I, p53, CDK-4); 과발현된 자가 항원(즉, HER-2/neu, p53); 및, 바이러스 항원(즉, HPV, EBV). 본 발명을 수행할 목적에서, 적합한 TA는 TA가 투여된 숙주에서 항-종양 면역 반응을 유도하거나 증진시키는 임의의 TA이다. 적합한 TA는 예를 들어, "야생형"(즉, 정상적으로 게놈에 의해 암호화된, 천연적으로 존재하는)이거나, 변형되거나, 돌연변이된 버전을 포함하여, gp100 (Cox et al., Science, 264:716-719 (1994)), MART-I /멜란 A (Kawakami et al., y. Exp. Med., 180:347-352 (1994)), gp75 (TRP-I) (Wang et al., y. Exp. Med., 186:1131-1140 (1996)), 티로시나제(Wolfel et al., Eur. J. Immunol., 24:759-764 (1994); WO 2001 751 17; WO 2001 75016; WO 2001 75007), NY-ESO-I (WO 98/ 14464; WO 99/ 1 8206), 흑색종 프로테오글리칸 (Hellstrom et al., J. Immunol., 130:1467-1472 (1983)), MAGE 계열 항원(즉, MAGE-I, 2,3,4,6, and 12; Van der Bruggen et al., Science, 254: 1643-1647 (1991)); U.S. Pat. Nos. 6,235,525), BACE 계열 항원(Boel et al., Immunity, 2: 167-175 (1995)), GAGE 계열 항원(즉, GAGE-1, 2; Van den Eynde et al., J. Exp. Med., 182:689-698 (1995); U.S. Pat. No. 6,013,765), RAGE 계열 항원(즉, RAGE-I; Gaugler et al., Immunogenetics, 44:323-330 (1996); U.S. Pat. No. 5,939,526), N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제-V (Cuilloux et al., / Exp. Med., 183:1173-1183 (1996)), pi 5 (Robbins et al., / Immunol. 154:5944-5950 (1995)), β -카테닌 (Robbins et al., / Exp. Med., 183:1185-1192 (1996)), MUM-I (Coulie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7976-7980 (1995)), 사이클린 의존성 키나제-4 (CDK4) (Wolfel et al., Science, 269: 1281-1284 (1995)), p21-ras (Fossum et al., Int. J. Cancer, 56:40-45 (1994)), BCR-a/(Bocchia et al., Blood, 85:2680-2684 (1995)), p53 (Theobald et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11993-11997 (1995)), pi 85 HER2/neu (erb-B1; Fisk et al., J. Exp. Med., 181:2109-2117 (1995)), 상피 성장 인자 수용체(ECFR) (Harris et al., Breast Cancer Res. Treat, 29:1-2 (1994)), 암배아 항원(CEA) (Kwong et al., / Natl. Cancer Inst, 85:982-990 (1995) U.S. Pat. Nos. 5,756,103; 5,274,087; 5,571,710; 6,071,716; 5,698,530; 6,045,802; EP 263933; EP 346710; and, EP 784483); 암종 관련 돌연변이된 뮤신(즉, MUC-I 유전자 생성물; Jerome et al., / Immunol., 151:1654-1662 (1993)); EBV의 EBNA 유전자 생성물(즉, EBNA-I; Rickinson et al., Cancer Surveys, 13:53-80 (1992)); 사람 파필로마바이러스의 E7, E6 단백질(Ressing et al., / Immunol, 154:5934-5943 (1995)); 전립선 특이적 항원(PSA; Xue et al., The Prostate, 30:73-78 (1997)); 전립선 특이적 막 항원(PSMA; Israeli, et al., Cancer Res., 54:1807-1811 (1994)); 이디오타입 에피토프 또는 항원, 예를 들어, 면역글로불린 이디오타입 또는 T 세포 수용체 이디오타입 (Chen et al., / Immunol., 153:4775-4787 (1994)); KSA (U.S. Patent No. 5,348,887), 키네신 2 (Dietz, et al. Biochem Biophys Res Commun 2000 Sep 7;275(3):731-8), HIP-55, TGF β -1 항-아포토시스 인자(Toomey, et al. BrJ Biomed Sci 2001 ;58(3):177-83), 종양 단백질 D52 (Bryne J.A., et al., Genomics, 35:523-532 (1996)), H1 FT, NY-BR-I (WO 01/47959), NY-BR-62, NY-BR-75, NY-BR-85, NY-BR-87, NY-BR-96 (Scanlan, M. Serologic and Bioinformatic Approaches to the Identification of Human Tumor Antigens, in Cancer Vaccines 2000, Cancer Research Institute, New York, NY), BCY1, BFA4, BCA4, 및 BFY3 뿐만 아니라, 이의 기타 단편 및 유도체를 포함한다. 이들 임의의 TA는 단독으로 또는 동시 면역화 프로토콜에서 하나 이상의 다른 TA와 병용하여 사용될 수 있다.

[0020]

또 다른 경우에, 재조합 바이러스는 병원성 유기체로부터 유래된 항원 또는 면역원을 암호화할 수 있다. 예시적인 감염성 질환 제제는 세균, 바이러스, 진균류 및 기생충들을 포함한다. 특히 예시적인 감염성 제제는 무엇보다 바실러스 종(*Bacillus spp.*)(즉, 비. 안트라시스(*B. anthracis*)), 보르데텔라 종(*Bordetella spp.*)(즉, 비. 브로키셉티카(*B. brochiseptica*), 비. 파라페르투스시스(*B. parapertussis*), 비. 페르투스시스(*B. pertussis*)), 보렐리아(*Borellia*)(즉, 비. 부르그도르페리(*B. burgdorferi*)), 브루셀라 종(*Brucella spp.*), 캄필로박터 종(*Campylobacter spp.*), 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*)(즉, 씨. 트라코마티스(*C. trachomatis*)), 클로스트리디움 종(*Clostridium spp.*) (즉, 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) (즉, 씨. 디프테리아(*C. diphtheria*)), 엔테로박터 종(*Enterobacter spp.*), 에스케리치아 종(*Escherichia spp.*)(즉, 이. 콜리(*E. coli*)), 헤모필러스 종(*Haemophilus spp.*)(즉, 에이취. 인플루엔자(*H. influenzae*)), 헬리코박터 종(*Helicobacter spp.*)(즉, 에이취. 파이로리(*H. pylori*)), 클렙시엘라 종

(*Klebsiella spp.*), 레지오넬라 종(*Legionella spp.*), 리스테리아 종(*Listeria spp.*), 마이코박테리움 종(*Mycobacterium spp.*)(즉, 엠. 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*)), 마이코플라스마 종(*Mycoplasma spp.*), 나이세리아 종(*Neisseria spp.*)(즉, 엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*), 엔. 고노르호에아(*N. gonorrhoeae*)), 노카디아 종(*Nocardia spp.*), 파스퇴렐라 종(*Pasteurella spp.*), 프로테우스 종(*Proteus spp.*), 리케치아 종(*Rickettsia spp.*), 살모넬라 종(*Salmonella spp.*)(즉, 에스. 엔티리디티스(*S. enteritidis*), 에스. 티피(*S. typhi*)), 쉬겔라 종(*Shigella spp.*) (즉, 쉬겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*)), 스타필로코커스 종(*Staphylococcus spp.*)(즉, 에스. 아우레우스(*S. aureus*)), 스트렙토코커스 종(*Streptococcus spp.*)(즉, 에스. 뉴모니아(*S. pneumoniae*)), 비브리오 종(*Vibrio spp.*)(즉, 브이. 콜레라(*V. cholerae*)), 코로나바이러스(*Coronavirus*), CMV, 뎅기열 바이러스(*Dengue virus*), 에볼라 바이러스(*Ebola virus*), EBV, 간염 바이러스(즉, A형, B형, C형, D형 및 E형 간염 바이러스), 헤르페스 바이러스, HIV, 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스(*Mumps virus*), 파필로마바이러스(*Papillomaviruses*) (사람), 폭스 바이러스(*pox viruses*)(즉, 백시니아, 천연두), 폴리오 바이러스(*polio virus*), 라비 바이러스(*rabies virus*), RSV, 웨스트 나일 바이러스(*West Nile virus*), 옐로우 피버 바이러스(*Yellow Fever virus*), 아스페질러스 종(*Aspergillus spp.*), 블라스토마이세스 종(*Blastomyces spp.*), 캔디다 종(*Candida spp.*), 콕시디오이데스 종(*Coccidioides spp.*), 크립토코커스 종(*Cryptococcus spp.*), 히스토플라스마 종(*Histoplasma spp.*), 콕시디아 종(*Coccidia spp.*), 크립토스포리듐 종(*Cryptosporidium spp.*), 엔타모에바 종(*Entamoeba spp.*)(즉, 이. 히스톨리티카(*E. histolytica*)), 기아디아 종(*Giardia spp.*)(즉, 기아디아 람블리아(*Giardia lamblia*)), 레슈마니아 종(*Leshmania spp.*), 플라스모디움 종(*Plasmodium spp.*), 쉬스토소마 종(*Schistosoma spp.*), 톡소플라스마 종(*Toxoplasma spp.*)(즉, 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*)), 트리시넬라 종(*Trichinella spp.*), 및 트리파노소마 종(*Trypanosoma spp.*)을 포함한다.

[0021]

특정 양태에서, 본 발명의 면역원성 제형 또는 백신은 면역반응을 촉진시키는 하나 이상의 보조제와 병용하여 투여될 수 있다. 예시적인 보조제는 하기 표 1에 나타난다.

표 1

면역학적 보조제의 유형

보조제 유형	일반적 예	특정 예/문헌
1 겔 형	수산화알루미늄 / 인산알루미늄 보조제 ("alum")	(Aggerbeck and Heron, 1995)
	인산 칼슘	(Relyveld, 1986)
2 미생물성	무라밀 디펩타이드 (MDP)	(Chedid et al., 1986)
	세균 외독소	콜레라 독소 (CT), 이. 콜리 불안정 독소 (LT)(Freytag and Clements, 1999)
	내독소계 보조제	모노포스포릴 지질 A (MPL) (Ulrich and Myers, 1995)
	기타 세균성	CpG올리고뉴클레오타이드(Corral and Petray, 2000), BCG 서열 (Krieg, et al. <i>Nature</i> , 374:576), 파상풍 독소 (Rice, et al. <i>J. Immunol.</i> , 2001, 167: 1558-1565)
3 입자형	생분해성 중합체 미소구	(Gupta et al., 1998)
	면역자극 복합체 (ISCOMs)	(Morein and Bengtsson, 1999)
	리포솜	(Wassef et al., 1994)
4 오일-에멀전 및 계면활성제계 보조제	프로인트 불완전 보조제	(Jensen et al., 1998)
	미세유동화 에멀전	MF59 (Ott et al., 1995)
		SAF (Allison and Byars, 1992) (Allison, 1999)
	사포닌	QS-21 (Kensil, 1996)
5 합성	무라밀 펩타이드 유도체	무라부타이드 (Lederer, 1986) 트레오닐-MDP (Allison, 1997)
	미이온성 블록 공중합체	L121 (Allison, 1999)
	폴리포스포젠 (PCPP)	(Payne et al., 1995)
	합성 폴리뉴클레오타이드	폴리 A:U, 폴리 I:C (Johnson, 1994)

[0022]

[0023]

본 발명은 하기의 실시예에 추가로 기재된다. 당해 실시예는 단지 발명을 설명하기 위해 제공된 것이고 어떠한 방식으로든지 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

실시예

[0024]

바이러스 안정화 제형 - 재료

[0025]

하기의 화학물질, 필터 및 바이엘은 하기된 실험을 위해 사용되었다: 우레아(로트 번호 101K0040 시그마); L.Ala 산제 (로트 번호 042K0900 시그마); MSG (로트 번호 91K0096 시그마); L. Arg 산제(로트 번호 42K0183 시그마); EAA(로트 번호 3065605 Gibco); 글라이신 산제(로트 번호 32K2502 시그마); Tris(로트 번호 73378B BioRad); L.Ser 산제(로트 번호 111K0883 시그마); D 만니톨 (로트 번호 22K0111 시그마); NEAA (로트 번호 3065603 Gibco); NaCl (BDH 로트 번호 12833/M089160); 농축 HCl(로트 번호 299102 BDH); 슈크로스(로트 번호 51 K0026); 슈크로스(로트 번호 022K0065 시그마, 로트 번호 K27819853/0076535B Merck kGAA); PVP₄₀(로트 번호 120K0117, 로트 번호 71K0064 시그마); 소르비톨(로트 번호 51K0005 시그마, 로트 번호 042K01351 시그마); 글루탐산(로트 번호 91K0096 시그마); 바이엘(BV0030, 3ml의 백색 관모양의 유리 바이엘); 스톱퍼(3101820, 13mm V-32 4432/50 Gray Butyl Serum Stopper Latex free); 밀봉체 (CS0001, 13mm 한 조각 알루미늄 밀봉체); 필터 0.2 μ m (로트 번호 476291 Nalgene[®] AC, 로트 번호 M2MN00586 ZapCap). HIV 항원 gp120을 암호화하는 ALVAC 바이러스 vCP307(로트 번호 PX-0246 및 로트 번호 PX-0230)은 하기된 실험을 위한 전형적인 바이러스로서 사용되

었다.

[0026] 방법 - pH

[0027] 동결-건조(freeze-drying) 및 보관과 같은 조작은 pH를 변화시킬 수 있기 때문에 ALVAC 동결 건조된 제형의 pH 측정은 안정성에 대한 중요한 측정이다. pH 측정기(VWR Scientific Products SB301, symphony)는 예상된 샘플의 pH 범위에 걸쳐 있는 표준 pH 완충액(Orion Application Solutions, pH 완충액 7.00, 10.01 및 4.01)으로 보정한다. 새로운 샘플 일부를 시험 튜브에 넣고 전극을 거기에 침지시킨다. 디지털 디스플레이가 일정한 판독을 나타내는 경우, 판독을 2자리 소수로 기록한다. 삼투압 농도

[0028] 삼투압 농도는 수용액의 총 용질 농도이다. 삼투압 측정기는 분자량 또는 이온 전하와 상관없이 용질 입자의 수를 측정한다. 본 연구는 어드밴스드 마이크로-삼투압 측정기 모델 3300(Advanced Micro-Osmometer Model 3300)을 사용하였고 이는 삼투압 농도를 측정하는데 있어서 동결점 강하에 의존한다. 삼투압 측정기는 제조 지침서에 따라 50mOsm/kg 및 850 mOsm/kg 보정 표준물을 사용하여 보정하였다. 보정은 클리니트론 290 표준 용액을 사용하여 확인하였다. 20 μ L의 샘플을 플런저에 로딩하고 측정을 위한 삼투압 측정기 샘플 포트에 삽입하였다. 디지털 디스플레이가 일정한 판독을 나타내는 경우 판독을 기록하였다.

[0029] 잔여 수분

[0030] 잔여 수분(RM)은 1차 건조 후 동결건조된 생성물에 잔류하는 결합수의 양이다. 본 연구에 사용되는 잔여 수분에 대해 시험하기 위한 칼 피셔(Karl Fisher) 기술은 용적 적정에 의해 물 함량을 측정한다. 이것은 건조된 생성물의 총 중량과 비교하여 잔류하는 물의 중량%로서 측정된다. RM은 보관 동안에 수분에 대한 노출이 생성물을 불안정화시킬 수 있기 때문에 안정성에 대한 지표이다. 유럽 약전(V 판)은 3% 미만의 RM을 추천한다. 이러한 RM은 화학적 및 물리적 분해를 예방할 뿐만 아니라 미생물 발육을 피하도록 도와준다. 칼 피셔 전량측정 방법은 암페어 측정으로 종점을 측정하는 미쓰비시, 모델 CA-06 자동 적정 시스템(Mitsubishi, Model CA-06 Automatic Titration system)을 사용하기 위해 디자인된 시험 방법과 함께 사용한다. 이것은 오산화인의 사용 및 20 내지 25°C의 온도 범위에서 일정한 건기류가 분당 약 5ml인 15% 상대습도 미만으로 유지되는 건조 박스에서 작업한다. 건조 박스에 위치한 사르토리우스(Sartorius) 천칭기에서 칭량한다

[0031] 감염 역가(CCID₅₀)

[0032] CCID₅₀은 바이러스의 역가(감염력), 이 경우 용해 후 동결건조된 ALVAC 제형의 역가를 측정하는데 사용되는 기술이다. 역가는 주어진 배취의 접종 세포 배양물의 50%를 감염시키는데 요구되는 바이러스의 희석값으로 나타낸다. 당해 분석은 세포독성 바이러스 입자(세포병리 효과(CPE)를 유발할 수 있는 것)의 존재 및 검출에 의존한다. 숙주 세포는 전형적으로 희석된 바이러스 적정액을 첨가된 96웰 플레이트에서 건강한 컨플루언트 단일층으로 성장한다. 배양시, 당해 바이러스는 복제하고 자손 바이러스가 방출되며 이들은 이어서 건강한 세포를 감염시킨다. CPE가 일정 시간동안 나타나도록 방지하고 CPE의 존재 또는 부재에 대해 웰을 스코어한다. 당해 방법은 희석당 웰의 수를 증가시키면 보다 정확해진다. 당해 시험은 보관동안에 약독화된 ALVAC 바이러스의 활성 손실을 측정하는데 중요하다.

[0033] ALVAC 바이러스 동결 건조된 생성물의 샘플은 SOP 넘버(Number) 22 PD-039 v.1.0에 따라 96웰 플레이트상으로 연속으로 적정하였다. QT35 (메추라기) 세포의 현탁액을 각각의 96웰 플레이트에 첨가하였다. 36°C $\pm$ 1°C에서 6일동안 배양 기간 후, 세포병리 효과(CPE)를 나타내는 웰을 계수하였다. 생성물에서 바이러스의 농도는 최소 제곱법을 사용하여 계산하고 생성물 ml당 50% 감염 용량 수로서 나타내었다.

[0034] 동결-건조(Freeze-Drying) 주기

[0035] 동결 건조(lyophilization)는 건조 상태가 습윤 물질을 동결시키고 수득한 얼음을 진공하에서 승화 과정(용융 없이)을 통해 증발시킴에 의해 성취되는 탈수 기술이다. 당해 과정은 통상적으로 3가지 단계로 나뉘어진다: 예비 동결, 1차 또는 승화 건조 및 2차 또는 탈착 건조. ALVAC 기본 발현 벡터의 24시간 동결 건조 주기는 하기 표 2에 요약된 바와 같이 수행하였다.

표 2

단계	파라미터	예정 수치
동결 (3 시간)	로딩 온도 동결 말기 온도	5°C -40°C
승화 (1차 건조) (16 시간, 30 분)	압력 저장 온도까지 상승 시간 저장 온도 지속 시간 저장 온도까지 상승 시간	70μBar 1 시간 -17°C 13 시간 2 시간, 30 분
탈착 (2차 건조) (4 시간)	저장 온도 효과적 진공을 재설정하기 위한 생성물 온도	45°C 25°C
마개 닫기	질소하	질소하

[0036]

[0037]

안정화 제형에서 아미노산, 당(슈크로스, 소르비톨, 만니톨) 및 중합체(폴리-비닐-피롤리돈(PVP))와 같은 다양한 성분의 정성적 및 정량적 기여는 상이한 안정화제 제형에서 평가하였다. 당해 성분 및 농도는 표 3에 나타난다. 이어서 제형 안정성을 하기의 분석을 사용하여 평가하였다: 외관, 용해 시간, 용해 후 외관, 수소 농도(pH), 잔류 수분 및 감염력(CCID₅₀).

[0038]

각각의 안정화 제형은 층류 조건하에서 제조하였다. 각각의 제형의 pH는 각각의 제형에 대해 약 7.2 내지 7.4가 되도록 조정하였다. 각각의 제형은 0.2 μm 폴리-비닐 디-플루오라이드(PVDF) 1회용 필터를 통해 여과하고 표지시키고 로트 번호를 부여하고 이어서 동결건조때까지 5°C에서 보관하였다.

[0039]

동결-건조(freeze-drying) 전 날, 바이러스 ALVAC 조 수거물(10mM Tris (pH 9.0) 완충액중)을 30°C ±2°C의 물욕조에서 해동시켰다. 2개의 회석물(1/2 및 1/6)을 조 수거물로부터 제조하고 120ml의 최종 벌크 생성물(FBP)을 제조하였다. 농축된 안정화제를 사용하여 제1 회석물을 제조하고 제2 회석물은 주사용수(WFI)로 1.2배 희석된 안정화제를 사용하여 제조하였다.

[0040]

동결 건조 과정을 위한 셋업은 다수의 단계를 포함하였다. 첫번째로, 제형당 400개의 바이엘에 3ml의 US 유리 바이엘을 사용하는 분리기에서 0.3ml의 FBP를 충전시켰다. 2번째로, 4개의 상이한 선반상의 트레이에 모든 바이엘을 로딩하고 현재 동결 건조된 안정화제, P06 및 P07을 대조군으로서 사용하였다. 붕괴를 예방하기 위해, 각각의 트레이를 각각의 선반 중앙에 위치시키고 내부에 방치하여 선반과의 직접적인 접촉을 회피하였다. 열전대를 포함하는 바이엘을 챔버 앞에 위치시켜 생성물의 온도를 모니터링할 수 있게 하였다. 최종적으로, 적용된 24시간 ALVAC 동결건조 주기를 수행하였다 (재료 및 방법 참조).

[0041]

수행 후, 바이엘을 제거하고 폴리-비닐-카본(PVC) 스톱퍼로 막고 밀폐시키기 위해 Alu-Alu 캡으로 캡핑하였다. 제거 동안에 트레이의 가장자리, 중앙 및 전후면으로부터 바이엘의 케이크의 균질성에 대해 관찰하였다. 동결 건조기 그래프를 분석하여 주기가 각 단계에서 복잡하게 되지 않도록 하였다. 이어서 바이엘은 추가의 샘플 채취 및 시험을 위해 -20°C에서 보관하였다.

[0042]

동결-건조된 단백질의 안정성에 대한 제형의 효과는 실시간 및 가속화 안정성 연구 둘다를 사용하여 조사하였다. 각각의 분석은 다양한 시점 및 다양한 온도(-20°C, 2 내지 8°C, 35 내지 39°C, 각각 1 내지 6주, 8주, 12주, 26주 및 52주)에서 5개 샘플의 각각의 세트에서 수행하였다. 이어서 각각의 샘플의 하기의 특성을 기록하였다: 동결건조물의 외관, 용해 시간, 용해 후 외관, pH 및 감염 역가(CCID₅₀).

[0043]

이어서 추가의 안정성 연구는 가장 목적하는 특성을 갖는 제형을 사용하여 수행하였다. 각각의 분석은 다양한 시점 및 다양한 온도(-20°C, 2-8°C, 37°C, 및 45°C, 각각 0, 3, 7, 11, 14, 21, 25, 28, 35, 56, 84, 182, 및 364일)에서 4개 내지 6개 샘플의 각각 세트상에서 수행하였다. 이어서 각각의 샘플의 하기의 특성을 기록하였다: 동결건조물의 외관, 용해 시간, 용해 후 외관, pH, 잔류 수분 및 감염성 역가(CCID₅₀). 45W에서 추가된 추

가의 관찰 시점을 대조군 F12(n=6)에 대해 추가하였다

- [0044] 동결-건조된(freeze-dried) ALVAC 제형 F12(초기 연구로부터 추가 시점의 샘플)의 최종 안정성 연구는 1, 3, 5, 8 및 12 주(n=6)에서 바이엘 세트에 대해 23 내지 27℃에서 수행하였다. 당해 제형은 이어서 감염성 역가(CCID₅₀), pH, 재구성 시간, 외관 및 삼투압 농도에 대해 평가하였다.
- [0045] 안정화 제형
- [0046] 여러 새로운 안정화 제형을 개발하고 시험하였다. 각각의 당해 제형중에 포함된 성분들은 표 3에 나타낸다. PVP40을 당해 제형중에 첨가하는 경우 특별히 주의해야만 함을 주지해야한다. 교반 속도는 특정 시간동안 증가되어야만 하고 이어서 PVP40이 용해되는 경우 감소되어야만 한다. 속도가 증가되지 않는 경우, 전형적으로 목적하지 않은 응집체가 나타날 것이다. 혼합을 위한 시간 및 속도는 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 제조된 용적에 의존한다.
- [0047] 실험 결과
- [0048] 동결건조물의 외관
- [0049] -20℃ 및 5℃에서 보관한지 52주 후에, 상이한 제형에 대한 동결건조물의 외관을 평가하였다. 실험 제1 세트에서 제형 F9, F10, F11 및 F12의 케이크의 외관은 요구되는 조건(바이엘의 가장자리로부터 수축되지 않은 부드러운 백색 층)을 충족하였다. 이들 요구되는 "케이크" 외관 조건은 제형이 바이러스 및 주변 환경을 우발적인 붕괴 또는 용융으로부터 보호하여 바이러스의 물리화학적 온전한 상태를 유지시킬 수 있음을 지적한다. 케이크의 붕괴는 침해성 동결 건조 과정 또는 장기 보관 또는 고온과 같은 보관 조건 때문일 수 있다. 적당한 케이크 외관을 갖는 제형이 바이러스 안정화를 위해 적합한 환경을 제공하는지를 측정하였다. 이전에 사용된 20개 필수 및 비필수 아미노산의 혼합물이 동결건조물의 구조적 외관에 영향을 주지 않고 고농도에서 L-아르기닌, L-알리닌, 세린 및/또는 글라이신으로 대체될 수 있는지를 측정하였다.
- [0050] 여러 다른 제형은 바이엘의 가장자리로부터 비등/용융, 수축된 외관을 가졌고 비-균질의 외관(즉, 부드러운 백색 층이 아님)을 나타냈으며 그와 같이 이들은 외관 기준을 충족하지 못하여 거부되었다. 하기에 논의되는 바와 같이, 당해 외관은 목적하지 않은 증가된 용해 시간과 관련이 있다. 이들 거부된 제형의 각각에는 분산제(즉, 폴리비닐 피롤리돈(PVP40), 소르비톨)이 결여되어 있었고 따라서 당해 성분이 케이크의 구조에 상당한 영향을 미칠 수 있음을 입증한다. 당해 제형에 대한 케이크는 바이엘의 가장자리로부터 느슨하거나 수축된 외관을 갖고 결과적으로 또한 외관 기준을 근거로 거부되었다.
- [0051] 용해 시간, 용해 후 외관, pH 및 삼투압 농도
- [0052] 제형 F9에 대한 용해 시간은 15초 미만으로 용해된 다른 안정화제(F10-12)와 비교하여 -20℃ 및 5℃에서 52주 보관 후 약간 증가하였다. 각각의 바이엘은 1ml의 NaCl 0.4%로 재구성하였고 전체 케이크가 용해될때까지 수동으로 혼합하였다. 결론적으로 PVP40의 함유가 최종 생성물의 용해 시간에 포지티브하게 영향을 미쳤다. 스트레스 조건(35 내지 37℃)하에서 보관된 당해 샘플에 대해, 용해 시간은 모든 제형에 대해 15초에서 1분 이상으로 상당히 증가하였다. 추가로, 케이크의 외관이 용융된 경우, 당해 생성물이 바이엘에 접촉되어 동결건조물의 재구성을 어렵게 한다.
- [0053] 모든 시험된 조건하에서 모든 제형에 대해, pH는 7.5 ± 0.5 유니트사이에서 안정하게 유지되었다.
- [0054] F12 제형에 대해 삼투압 농도 범위는 350 ± 100mOsm/kg이다.
- [0055] 잔여 수분(RM)
- [0056] 제형 F12에 대해, 잔여 수분 결과는 <3% 이었고 유럽 약전(V 판)의 권장사항을 충족하였다. 다른 제형은 시험되지 않았다.

표 4

잔여 수분 - 제형 F12

제형	샘플	물		
		1차 수행 CA-03-031	2차 수행 CA-03-044	3차 수행 CA-03-059
F12	1	1.47	1.19	.99
	2	1.34	1.20	1.08
	3	1.48	1.25	1.02

[0057]

[0058]

감염성 역가

[0059]

바이러스 활성의 상당한 감소는 약 10 내지 20% 이상의 활성 강화로 사료된다. 모든 제형은 -20℃ 및 2 내지 8℃에서의 52주 보관 후 관찰시 상당한 손실 없이 감염성 역가를 유지하는 것으로 나타났다. 시험된 모든 제형은 당해 방법의 정확성($\pm 0.3 \log 10$ CCID₅₀/ml)을 입증하는 대조군과 유사하였다. 스트레스 조건에서, 대조군 및 시험된 제형의 감염성 역가는 35 내지 37℃에서 8주 보관 동안 완전히 유지되었다.

[0060]

액체 제형 대 동결건조된 제형의 안정성

[0061]

상기된 결과에 따라, F12(동결-건조된)를 액체 제형(10 mM Tris-HCl중의 ALVAC, 0.9% NaCl, pH9.0)과 비교하기 위해 선택하였다. 이들 제형을 "실시간"(2 내지 8℃) 및 스트레스 또는 가속화 조건(23 내지 25℃ 및 35 내지 39℃) 둘다에서 역가 안정성에 대해 비교하고 대조군 조건(-70℃ 및 -20℃)과 비교하였다. 당해 제제 둘다는 ALVAC 제거된 수거물의 동일한 용적 및 동일한 양으로 제조하였다. 역가는 CCID₅₀ 분석을 사용하여 측정하였다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 동결 건조된 F12는 2 내지 8℃(이뿐만 아니라 대조군 온도 -20℃ 및 -70℃에서)에서 액체 제형과 유사한 역가를 나타내었고 25℃ 및 37℃에서는 액체 제형보다 우수한 역가를 나타내었다. F12가 당업자에 의해 선호되는 제형 포맷인 동결 건조된 제형이라는 사실로부터 F12가 이전에 유용한 액체 제형 보다 우수한 것으로 결론지을 수 있다.

[0062]

본 연구는 본원에서 PVP40 및/또는 소르비톨과 같은 분산제가 목적하는 용해 성질을 기능적으로 단정하는 동결 건조된 제형의 외관(즉, "케이크")을 유지하는데 필수적임을 기재하고 있다. 추가로, 이전에 사용된 20개의 필수 및 비필수 아미노산의 혼합물이 동결건조물의 구조적 외관에 영향을 주지 않고 감염성 역가를 유지시키면서 고농도에서 L-아르기닌, L-알라닌, 세린 및/또는 글라이신으로 대체될 수 있음이 명백하다. 이것은 특히 제형화 제조 공정을 단순화시키고 이와 관련된 비용을 절감시킨다는 면에서 중요하다. 감염성 역가 데이터를 기준으로 하는 결과는 다양한 제형간에 어떠한 유의적인 차이를 지적하지 못했다. 모든 제형은 2 내지 8℃에서 52주동안 감염성 역가를 유지시킬 수 있었다.

[0063]

본 발명이 바람직한 양태 측면에서 기재되었지만 변화 및 변형이 당업자에 의해 수행될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서 첨부된 청구항은 청구된 바와 같은 발명의 범위내에 있는, 당해 모든 등가의 변형을 포함하는 것으로 의도된다.

표 3

제형	EAA	NEAA	슈크로스	소르비톨	MSG	PVP40	Tre	우레아	만니톨	L-Arg	L-Ala	L-Ser	Gly	52-주 용해 시간@ 5℃	의관
테존군	40	40	10	10	1	2	1,452	1	0	0	0	0	0	5.12	백제중, 부드러운세이키 백제중, 부드러운세이키
P9	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0	0	80	0	0	29	백제중, 부드러운세이키 백제중, 부드러운세이키
F10	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0	80	0	0	0	15	백제중, 부드러운세이키 백제중, 부드러운세이키
F11	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0	0	0	80	0	15	백제중, 부드러운세이키 백제중, 부드러운세이키
F12	0	0	10	10	1	2	1,452	1	0	0	0	0	80	15	백제중, 부드러운세이키 백제중, 부드러운세이키

정정적 및 정량적 제형

도면의 간단한 설명

도 1은 다양한 온도에서 재조합 바이러스 제제의 안정성에 대해, 액체 제형과, 본 발명의 한 양태인 신규 동결-건조된(freeze-dried) 제형 F12(FD)를 비교한 것이다. 각각의 바이러스 제형의 감염 역가(CCID₅₀)는 지정된 시간에서 측정하였다.

발명의 개요

본 발명은 면역학적 제형 및 백신에서의 용도를 포함하는 다양한 용도를 위해, 바이러스 백터와 같은 바이러스를 보존하기 위한 안정화 제형("안정화제")을 제공한다. 한 양태에서, 당해 제형은 당, 방부제, 분산제, 열 안정제, 완충액 및 3개 이하의 별개 유형의 아미노산(즉, 하나, 2개 또는 3개의 별개 유형의 아미노산(들))을 포함한다. 한 양태에서, 당해 제형은 3개의 별개 유형의 아미노산을 포함한다. 또 다른 양태에서, 당해 제형은 2개의 별개 유형의 아미노산을 포함한다. 또 다른 양태에서, 당해 제형은 단지 1개 유형의 아미노산을 포함한다. 아미노산(들)이 아르기닌, 알라닌, 세린 또는 글라이신인 것이 바람직하다. 추가로 아미노산(들)이 아르기닌, 세린 또는 글라이신인 것이 추가로 바람직하다. 당해 바이러스는 안정화 제형에 첨가되고 목적하는 시간 동안 특성의 측정가능한 특성(즉, 생존력, 감염력)을 유지한다. 바람직한 제형은 하기된 바이러스의 존재하의 특정 조건하에서 적합한 외관 및 용해 시간과 같은 특성의 요망되고 측정가능한 특성을 유지한다. 본 발명의 또 다른 양태는 하기의 기재, 실시예 및 청구항에서 명백할 것이다.

도면

도면1

FD = 동결-건조 제형 F12
액제 = 액체 제형

