(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0051186
(43) 공개일자 2023년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/02 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 9/19* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/099 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7004612
(22) 출원일자(국제) 2021년08월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년02월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/046055
(87) 국제공개번호 WO 2022/036298
국제공개일자 2022년02월17일
(30) 우선권주장
63/066,020 2020년08월14일 미국(US)

(71) 출원인
일리아드 바이오테크놀로지스, 엘엘씨
미국, 플로리다 33331, 웨스턴, 스위트 넘버260, 4581 웨스턴 로드
(72) 발명자
탈렌 마르셀
미국, 플로리다 33331, 웨스턴, 스위트 넘버260, 4581 웨스턴 로드
(74) 대리인
특허법인한얼

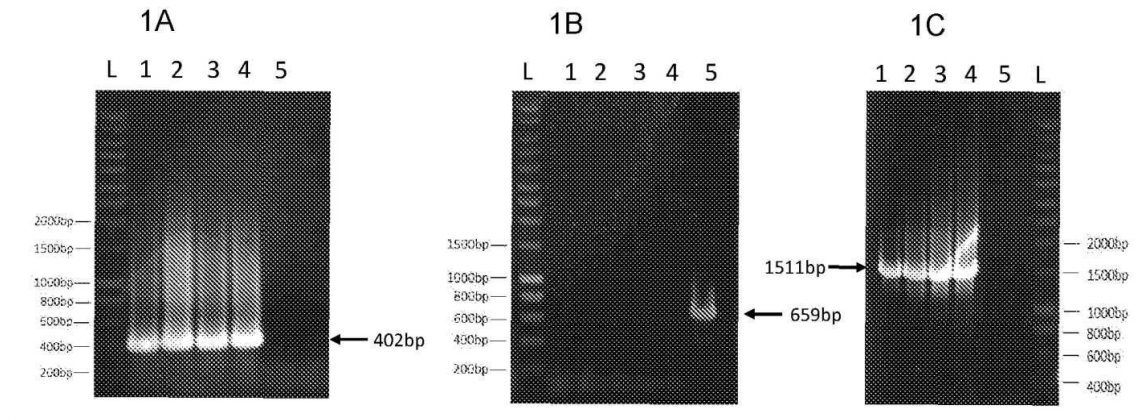
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **동결건조된 살아있는 보르데텔라 백신**

(57) 요 약

-20℃ 내지 22.5℃의 온도에서 저장되는 경우에 적어도 2년 동안 안정하고 살아있는 백신으로 사용하기에 충분한 세균 생존력과 효능을 나타내는 동결건조된 보르데텔라(Bordetella) 세균의 제형은, 0.4 내지 1.6의 OD_{600}에서 배양물로부터 보르데텔라 세균을 수확하고; 수확된 보르데텔라 세균을 5 내지 65중량%의 동결보호 당을 포함하고 온도가 2 내지 35℃인 동결건조 완충액과 혼합하고(여기서, 상기 수확된 보르데텔라 세균 대 동결건조 완충액의 비율은 5:1 내지 1:5 용적이다); 보르데텔라 세균과 동결건조 완충액의 혼합물을 동결건조시키고(여기서, 상기 수확 단계와 동결건조 단계 사이의 유지 시간은 48시간 미만이다); 동결건조된 보르데텔라 세균을 수집함으로써 제조된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/19 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61K 2039/522 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

살아있는 약독화된 보르데텔라(*Bordetella*) 세균을 포함하는 동결건조 백신(lypophilized vaccine)을 제조하는 방법으로서,

0.4 내지 1.6의 OD_{600}에서 배양물로부터 보르데텔라 세균을 수확(harvesting)하는 단계;

수확된 보르데텔라 세균을, 5 내지 65중량%의 동결보호 당(cryoprotectant sugar)을 포함하고 온도가 2 내지 35 ℃인 동결건조 완충액과 혼합하는 단계로서, 수확된 보르데텔라 세균 대 동결건조 완충액(buffer)의 비율은 5:1 내지 1:5 용적인, 단계;

보르데텔라 세균과 동결건조 완충액의 혼합물을 동결건조시키는 단계로서, 상기 수확 단계와 동결건조 단계 사이의 유지 시간은 48시간 미만인, 단계; 및

동결건조된 보르데텔라 세균을 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 보르데텔라 세균이 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*)의 균주인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 보르데텔라 페르투시스 균주가 BPZE 균주인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, BPZE 균주가 BPZE1인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 보르데텔라 세균이 0.4 내지 1.0의 OD_{600}에서 배양물로부터 수확되는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 보르데텔라 세균이 1.0 미만의 OD_{600}에서 배양물로부터 수확되는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 동결보호 당이 수크로스인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 동결건조 완충액이 영양 기질(nutrient substrate)을 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 영양 기질이 글루타메이트인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 수확 단계와 동결건조 단계 사이의 유지 시간이 36시간 미만인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 동결건조 단계가 사전-결정화 유지 단계(pre-crystallization hold step)를 포함하고, 보르데

텔라 세균과 동결건조 완충액의 혼합물이 추가 냉각 전에 0.5 내지 10시간 동안 혼합물의 결정화 온도보다 0.1 내지 10℃ 높은 온도에서 유지되는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 혼합 단계 전에, 수확된 보르데텔라 세균을 1.0 내지 30.0의 OD_{600}으로 농축하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 13

0.4 내지 1.6의 OD_{600}에서 배양물로부터 보르데텔라 세균을 수확하는 단계;

배양물로부터 수확된 보르데텔라 세균을 1.0 내지 30.0의 OD_{600}으로 농축하는 단계; 농축된 보르데텔라 세균이 5 내지 65중량%의 동결보호 당을 포함하고 온도가 2 내지 35℃인 동결건조 완충액과 혼합하는 단계로서, 농축된 보르데텔라 세균 대 동결건조 완충액의 비율은 5:1 내지 1:5 용적인, 단계;

보르데텔라 세균과 동결건조 완충액의 혼합물을 동결건조시키는 단계로서, 수확 단계와 동결건조 단계 사이의 유지 시간은 48시간 미만인, 단계; 및

동결건조된 보르데텔라 세균을 수집하는 단계

를 포함하는 방법에 따라 제조된 살아있는 약독화된 보르데텔라 세균을 포함하는 동결건조된 백신 제품.

청구항 14

제12항에 있어서, 제품이 22.5℃에서 저장되는 경우에 적어도 2년의 저장 수명(shelf life)을 갖고, 제품 내의 세균의 20% 이상이 동결건조 단계 후에 생존하는, 동결건조된 백신 제품.

청구항 15

제12항에 있어서, 동결건조 단계 후에, 수집된 동결건조된 세균이 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis)의 병원성 균주(pathogenic strain)에 의한 대상체(subject)의 호흡기의 감염을 예방 또는 감소시킬 수 있는, 동결건조된 백신 제품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본 출원은 2020년 8월 14일에 출원된 미국 가특허 출원 일련번호 제63/066,020호의 우선권을 주장한다.

[0003] 연방 정부가 후원하는 연구에 대한 진술

[0004] 해당 없음.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 미생물학, 백신 및 동결건조 분야에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 보르데텔라 세균을 동결건조하는 방법 및 이러한 방법에 따라 제조된 동결건조된 제형에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] BPZE1, 살아있는 약독화 비. 페르투시스(B. Pertussis) 균주는 이전에 백일해(whooping cough)(백일해(pertussis)) 백신에 사용하기 위해 개발되었다[참조: 미국 특허 제9,180,178호]. 이러한 백신 균주는, 피부괴사성 독소(toxin)를 유전적으로 제거하고, 기관 세포독소를 배경 수준으로 감소시키고, 백일해 독소를 불활성화함으로써 구성되었다. 비-인간 영장류 모델에서, BPZE1의 단일 비강 투여는, 매우 독성이 강한 최근의 임상적 비. 페르투시스 분리물에 의한 챌린지(challenge) 후에, 백일해 질환과 감염 모두에 대해 강력한 보호를 제공하는 것으로 밝혀졌다. BPZE1은 현재 임상 개발 중이고, 이미 2개의 I상 연구를 성공적으로 완료했으며, 이

는 백신이 성인 지원자에게 안전하고 인간 비강을 일시적으로 콜로니화할 수 있으며 비. 페르투시스 항원에 대한 항체 반응을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 이전 연구에서 사용된 BPZE1의 액체 제형은 세균 생존력(viability)을 유지하기 위해 -70℃에서 저장해야 한다. 대부분의 진료 현장 시설에는 초저온 냉동고가 구비되어 있지 않기 때문에, 이 요건은 BPZE1-기반 백신의 장래의 상업화에 장애가 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0008] 본 명세서에 기재된 것은, -20℃ 내지 22.5℃의 온도에서 저장하는 경우에 적어도 2년 동안 안정하고, 살아있는 백신으로서 사용하기에 충분한 세균 생존력 및 효능을 나타내는 동결건조된 보르데텔라 세균의 제형 및 이러한 제형을 제조하는 방법이다. 본 명세서에 기재된 작업 전에, 생물학적 분자, 특히 살아있는 세균의 성공적 동결건조가 몇몇 이유로 도전적 시도이기 때문에, 이러한 동결건조된 제형이 제조될 수 있는지조차 공지되지 않았다. 첫째, 세균 배양에 사용되는 성분은 동결-건조된 경우에도 세균 분자를 불안정하게 할 수 있다. 둘째, 세균 생존력은 공기/액체 계면과 용액/아이스 계면에서의 상호작용에 의한 동결건조 프로세스에서 손상될 수 있다. 셋째, 세균의 응집/클럼핑(clumping)이 종종 발생하여, 기능 또는 생존력의 상실을 유도한다. 넷째, 결정(아이스) 형성은 세균을 사멸시킬 수 있다. 그리고, 다섯째, 탈수는 단백질 구조 및 활동을 불안정화시킬 수 있다.

[0009] 또한, 보르데텔라-기반(예: BPZE1-기반) 백신의 대규모 동결건조에는 추가 과제가 있다. 예를 들면, 보르데텔라 종은 상피 세포에 결합할 수 있는 다수의 병원성 인자를 생산하지만, 이러한 인자는 세균을 서로 부착시켜, 생물반응기에서 높은 세포 밀도로 성장한 경우, 클럼핑(clumping) 및 생물막(biofilm) 형성에 의해 유발된 기능/생존력의 상실을 악화시킨다. 클럼핑 또는 생물막 형성은 불균일한 생성물을 유도할 수 있고, 이는 또한 접선 유동 여과(TFF) 단계 동안 필터 상의 생성물의 상당한 손실을 유도한다. 클럼핑은 생물반응기에서 교반을 증가시킴으로써 회피할 수 있지만, 이와 관련된 전단력(shear force)의 증가는 생존력의 손실을 유도할 수 있다. 또한, 수확 단계 및 동결건조의 개시 사이의 시간이 증가함에 따라, 생존력의 손실이 증가한다. 수확, 농축, 제형화 및 동결건조 바이알에 생성물의 충전이 20시간 이상 걸리는 대규모 제조의 경우, 일반적으로 생존력의 상당한 손실이 발생한다. 또한, 보르데텔라 등의 그람 음성 세균은 동결건조 프로세스의 동결 단계에서 생존력의 손실에 특히 영향을 받기 쉽다. 특히, BPZE1은 이의 모 야생형 균주보다 세포벽이 얇고, 돌연변이(돌연변이된 백일해 독소 유전자(ptx), 결실된 피부괴사 유전자(dnt), 및 동결건조를 견디는 세균의 능력에 영향을 미칠 수 있는 천연 보르데텔라 ampG 유전자를 치환하는 이종 ampG 유전자)를 갖는다[참조: 미국 특허 제9,180,178호].

[0010] 따라서, 활성제로서 살아있는 약독화된 보르데텔라 세균을 포함하는 동결건조된 백신을 제조하는 방법이 본 명세서에 기재된다. 이들 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다: 0.4 내지 1.6의 OD_{600}에서 배양물로부터 보르데텔라 세균을 수확(harvesting)하는 단계; 수확된 보르데텔라 세균을, 5 내지 65중량%의 동결보호 당(cryoprotectant sugar)을 포함하고 온도가 2 내지 35℃인 동결건조 완충액(buffer)과 혼합하는 단계(여기서, 수확된 보르데텔라 세균 대 동결건조 완충액의 비율은 5:1 내지 1:5 용적이다); 보르데텔라 세균 및 동결건조 완충액의 혼합물을 동결건조시키는 단계(여기서, 수확 단계와 동결건조 단계 사이의 유지 시간은 48시간 미만(예를 들면, 36시간 미만)이다); 및 동결건조된 보르데텔라 세균을 수집하는 단계. 보르데텔라 세균은 BPZE 균주 등의 보르데텔라 페르투시스의 균주(예: BPZE1)일 수 있다. 이 방법의 일부 변형에서, 보르데텔라 세균은 0.4 내지 1.0 또는 1.0 미만의 OD_{600}에서 배양물로부터 수확된다. 동결보호 당은 수크로스일 수 있고, 동결건조 완충액은 글루타메이트 등의 영양 기질(nutrient substrate)을 포함할 수 있다.

[0011] 동결건조 단계는 사전-결정화 유지 단계(pre-crystallization hold step)를 포함할 수 있고, 여기서 보르데텔라 세균과 동결건조 완충액의 혼합물은, 추가 냉각 전에, 0.5 내지 10시간 동안 혼합물의 결정화 온도보다 0.1 내지 10℃ 높은 온도에서 유지된다. 이 방법은 또한 혼합 단계 전에 수확된 보르데텔라 세균을 1.0 내지 30.0의 OD_{600}으로 농축하는 단계를 특징으로 할 수 있다.

[0012] 또한, 본 명세서에 기재된 것은, 상기 방법 및 본 명세서의 다른 곳에 기재된 방법에 따라 제조된 살아있는

약독화된 보르데텔라 세균을 포함하는 동결건조된 백신 제품이다. 동결건조된 백신 제품은 22.5℃에서 저장되는 경우에 적어도 2년의 저장 수명(shelf life)을 가질 수 있으며, 제품 내의 세균의 적어도 20%는 동결건조 단계 후에도 생존할 수 있다. 백신 제품 중의 수확된 동결건조 세균은 또한 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*)의 병원성 균주(pathogenic strain)에 의한 대상체(subject)(예: 인간 또는 마우스 등의 포유동물 대상체)의 호흡기의 감염을 예방 또는 감소시키는 능력을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 하기에 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 및 특허원은 이의 전체가 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. 상충하는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선한다. 또한, 하기에 설명된 특정 실시형태는 예시적일 뿐이며, 제한되는 것을 의도하지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은, BPZE1의 액체 제형과 비교하여 동결건조된 보르데텔라 *세균(비. 페르투시스*의 BPZE1 균주) 제형의 유전자좌의 PCR 분석을 나타내는 일련의 겔 사진이다. BPSM 야생형 대조군(레인 5) 뿐만 아니라, 액체 BPZE1 제형(레인 1 및 2)의 2개 로트(lot) 및 동결건조된 BPZE1 제형(레인 3 및 4)의 2개 로트의 이. 콜라이(E. coli) ampG(패널 A), 비. 페르투시스(B. pertussis) ampG(패널 B) 및 비. 레르투시스 dnt 측면 영역(패널 C).

도 2는 백일해 독소(PTX) S1 서브유닛-코딩 DNA의 정량적-PCR(q-PCR) 증폭의 결과를 나타내는 그래프이다. 액체 BPZE1 제형(BPZE1 액체), 동결건조된 BPZE1 제형(BPZE1lyo), BPSM 및 BPSM-스파이크 동결건조된 BPZE1(스파이크)의 S1 서브유닛 유전자에 대한 결과가 제시되어 있다.

도 3은 -70℃에서 2년간의 저장에 걸쳐 다양한 시점에서 액체 BPZE1 제형의 미생물학적 안정성(CFU로 측정)을 나타내는 그래프이다. 10^7 CFU/용량(중간 라인, 저용량), 10^8 CFU/용량(상부 라인, 중간 용량) 및 10^9 CFU/용량(하부 라인, 고용량)에서 액체 BPZE1 제형에 대한 결과가 제시되어 있다.

도 4는 동결건조된 BPZE1 제형의 시간 경과에 따른 미생물학적 안정성(CFU로 측정됨)을 나타내는 그래프이다. 10^9 CFU/용량의 동결건조된 BPZE1 제형은 -20℃ ± 10℃(상부 라인), 5℃ ± 3℃(중간 라인) 및 22.5℃ ± 2.5℃(하부 라인)에서 2년간 저장하고, CFU는 지정된 시점에서 정량화되었다. 점선과 실선은 하기 표 1에 표시된 사양의 상한 및 하한을 나타낸다.

도 5는, 10^5 CFU의 액체 BPZE1 제형(흑색 막대) 또는 재구성된 동결건조된 BPZE1 제형(회색 막대)을 비강내 투여하고, 이어서 3시간(0일), 1 또는 3일차에 희생시킨 BALB/c 마우스에서 액체 제형과 비교하여 동결건조된 BPZE1 제형의 생체내 콜로니화 동역학을 나타내는 일련의 그래프이다. 그래프 A는, 액체 BPZE1 제형의 CFU 계수와, 동결건조 직후에 재구성하여 투여된, 재구성 동결건조된 BPZE1 제형의 CFU 계수의 비교를 나타낸다. 그래프 B는, 액체 BPZE1 제형의 CFU 계수와, -20℃ ± 10℃(밝은 회색 막대), 5℃ ± 3℃(중간 회색 막대) 또는 22.5℃ ± 2.5℃(진한 회색 막대)에서 6개월 저장한 후에 재구성 동결건조된 BPZE1 제형의 CFU 계수의 비교를 나타낸다. 그래프 C는, 액체 BPZE1 제형의 CFU 계수와, -20℃ ± 10℃(밝은 회색 막대), 5℃ ± 3℃(중간 회색 막대) 또는 22.5℃ ± 2.5℃(진한 회색 막대)에서 24개월 저장한 후에 재구성된, 재구성 동결건조된 BPZE1 제형의 CFU 계수의 비교를 나타낸다. 결과는 평균 +/- SEM으로 표시된다. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$; ns, 유의하지 않음.

도 6은, BALB/c 마우스에서 액체 제형과 비교한 동결건조 BPZE1 제형의 효능을 나타내는 일련의 그래프이고, 10^5 CFU의 액체 BPZE1 제형(흑색 막대) 또는 재구성 동결건조된 BPZE1 제형(회색 막대)를 비강내 투여하거나, 또는 모의 대조군으로서 PBS(백색 막대)를 비강내 투여하고, 이어서 4주 후에 10^6 CFU의 비. 페르투시스의 독성 균주(BPSM)를 비강내 챌린지했다. 폐에 존재하는 CFU는 챌린지 후 3시간(D0) 및 7일(D7)에 정량화했다. 그래프 A는, 액체 BPZE1 제형의 효능과, 동결건조 직후에 재구성하여 투여된, 재구성 동결건조된 BPZE1 제형의 효능을 비교한 것이다. 그래프 B는 액체 BPZE1 제형의 효능과, -20℃ ± 10℃(밝은 회색 막대), 5℃ ± 3℃(중간 회색 막대) 또는 22.5℃ ± 2.5℃(진한 회색 막대)에서 6개월 저장 후에 재구성된, 재구성 동결건조된 BPZE1 제형의 효능의 비교를 나타낸다. 그래프 C는, 액체 BPZE1 제형의 효능과, -20℃ ± 10℃(밝은 회색 막대),

5℃ ± 3℃(중간 회색 막대) 또는 22.5℃ ± 2.5℃(진한 회색 막대)에서 24개월 저장 후에 재구성된, 재구성 동결건조된 BPZE1의 효능의 비교를 나타낸다. 결과는 평균 +/- SEM으로 표시된다. *, p < 0.005.

도 7은 하기 실시예 섹션에 기재된 바와 같이 상이한 방법을 사용하여 동결건조 후에 3개의 상이한 GMP 실행의 CFU 계수의 비교를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 명세서에 기재된 것은, -20℃ 내지 22.5℃의 온도에서 저장되는 경우에 적어도 2년 동안 안정한 활성제(active agent)로서 살아있는 약독화된 보르데텔라 세균을 함유하는 동결건조된 제형이며, 이는 살아있는 백신으로서 사용하기에 충분한 세균 생존력 및 효능을 나타낸다. 이러한 동결건조된 제형을 제조하는 방법도 기재되어 있다. 하기 기재된 실시형태는 이러한 제형 및 방법의 대표적인 예를 예시한다. 그럼에도 불구하고, 이러한 실시형태의 설명으로부터, 본 발명의 다른 측면이 하기 제공된 설명에 기초하여 작성 및/또는 실행될 수 있다.

[0016] 백신으로 사용하기에 적합한, 살아있는 약독화 *보르데텔라* 세균을 함유하는 동결건조된 제형을 제조하는 일반적 방법.

[0017] 살아있는 약독화된 보르데텔라 세균을 함유하는 동결건조 제형은, 적절한 성장 단계에서 배양물로부터 보르데텔라 세균을 수확하고, 임의로 배양물로부터 수확된 보르데텔라 세균을 농축하고, 농축된 보르데텔라 세균을, 동결보호 당을 함유하는 동결건조 완충액과 혼합하고; 이어서 보르데텔라 세균 및 동결건조 완충액의 혼합물을 동결건조시킴으로써 제조된다.

[0018] *보르데텔라 세균*

[0019] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에 사용되는 보르데텔라 세균은 보르데 텔라에(*Bordetellae*)의 임의의 적합한 종 또는 균주일 수 있다. 보르데텔라 종에는 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*), 보르데텔라 파라페르투시스(*Bordetella parapertussis*) 및 보르데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)가 포함된다. 바람직한 보르데텔라 세균은, 감염성 질환(예를 들면, 백일해)에 대한 백신으로서 활성을 나타내거나, 기타 유익한 예방 또는 치료 효과(예를 들면, 염증 감소 또는 알레르기 치료)를 갖는 것들이다. 백일해, 기타 감염성 질환과 관련된 병리를 예방 또는 감소시키는데 효과적이거나, 기타 유익한 예방 또는 치료 효과를 갖는 다수의 살아있는 약독화된 비. 페르투시스 균주가 제조되었고, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에 사용하기에 바람직하다. 이는 BPZE1(미국 특허 제9,180,178호에 기재되어 있고; 수탁 번호 CNCM I-3585하에 2006년 3월 9일에 프랑스 파리의 컬렉션 나쇼날 드 컬쳐 드 미크로오르가니즘(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)에 기탁됨) 등의 다양한 BPZE 균주, 및 이들의 변이체, 예컨대, 사상 헤마글루티닌(FHA)의 N-말단 단편 및 이종성 에피토프(epitope) 또는 항원성 단백질 또는 단백질 단편을 포함하는 하이브리드 단백질을 발현하도록 변형된 BPZE1(미국 특허 제9,528,086호에 기재됨), 아데닐레이트 사이클라제-결핍 BPZE 균주, 예컨대, BPAL10(미국 특허 제10/369,207호에 기재되고; 2015년 10월 23일, 수탁 번호 V15/032164하에 호주 3207 빅토리아 포트 멜버른 1/153 베르티에 스트리트의 네셔널 메이져먼트 인스티튜트(National Measurement Institute)에 기탁됨) 및 BPZE1AS(WO2020049133에 기재되고; 2018년 9월 4일에 수탁 번호 CNCM I-5348로 컬렉션 나쇼날 드 컬쳐 드 미크로오르가니즘(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)에 기탁됨), 페르탁틴-결핍 BPZE 균주, 예컨대, BPZE1-P(미국 특허 제11,065,276호에 기재되고; 2016년 12월 12일에 수탁 번호 CNCM-I-5150하에 컬렉션 나쇼날 드 컬쳐 드 미크로오르가니즘(Collection Nationale de Cultures de Microorganisms)에 기탁됨), 및 Fim2- 및 Fim3-생산 BPZE 균주, 예컨대, BPZE1f3(미국 특허 출원 제16/848,793호에 기재되고; 2017년 10월 11일에 수탁 번호 CNCM I-5247하에 컬렉션 나쇼날 드 컬쳐 드 미크로오르가니즘(Collection Nationale de Cultures de Microorganisms)에 기탁됨)이 포함된다.

[0020] 보르데텔라 세균의 사전-동결건조 처리

[0021] 살아있는 약독화 보르데텔라 세균을 포함하는 동결건조 백신(lyophillized vaccine) 제품을 제조하는 방법은 생물반응기로부터 보르데텔라 세균을 배양하고 수확하는 것으로 시작한다. 적합한 배지 및 배양 조건은 하기 실시예 섹션에 기재되어 있다. 배양된 세균의 수확은 표준 방법으로 수행된다. 초기 연구는 예기치 않게 BPZE1 등의 보르데텔라 세균이 배양물에서 특히 응집/클럼핑되기 쉬운 것으로 나타났기 때문에, 이러한 응집/클럼핑으로 인한 생존력의 상실을 방지하기 위해, 배양이 0.4 내지 1.6; 0.5 내지 1.5, 0.6 내지 1.4, 0.7 내지 1.3, 0.8 내지 1.2, 0.9 내지 1.1, 1.0 또는 1.0 미만(예를 들면, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 또는

0.9에서)의 OD_{600}에 도달하는 경우에 수확을 수행하는 것이 바람직하다. 보르데텔라 세균이 수확된 후, 이들은 임의로 농축(예: 최종 CFU/용량 요건을 충족하기 위해)시킬 수 있고/있거나, 정용여과에 제공하여 염을 감소시키거나 완충액을 교환할 수 있다. 예를 들면, 수확된 보르데텔라 세균은 혼합 단계 전에 1.0 내지 30.0(예: 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 +/- 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 또는 0.5)의 OD_{600}으로 농축시킬 수 있다. 수확 및 농축/정용여과(수행된 경우) 후, 세균은 적합한 동결건조 완충액과 혼합한다. 세균과 혼합되는 경우, 동결건조 완충액은 일반적으로 2 내지 35℃(예: 4 내지 30℃, 8 내지 25℃, 10 내지 20℃ 또는 4+/-1, 2, 또는 3℃)의 온도에 있다. 적합한 동결보호제는 5 내지 65%의 중량비의 동결건조 완충액(예를 들면, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60 +/- 0, 1, 2, 3, 4 또는 5%)으로 동결건조 완충액에 포함된다(또는 혼합 단계에서 첨가된다). 상이한 동결보호제의 비교에 기초하여, 동결보호제 당(특히 수크로스)이 바람직하다. 혼합물 중의 보르데텔라 세균 대 동결건조 완충액의 용적 비율은 5:1 내지 1:5(예: 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 4:1 내지 1:4의 사이, 3:1 내지 1:3의 사이, 또는 2:1 내지 1:2의 사이)이다. 수확 및 동결건조 개시 사이의 시간은 생존력의 현저한 손실을 회피하기 위해 48시간 미만(예: 44, 40, 36, 32, 28, 24, 20 또는 16시간 미만)이어야 한다.

[0022] 동결건조

[0023] 세균과 동결건조 완충액의 제조된 혼합물은 5×10^{6} 내지 1×10^{10}(예를 들면, 1×10^{6}, 5×10^{6}, 1×10^{7}, 5×10^{7}, 1×10^{8}, 5×10^{8}, 1×10^{9}, 2×10^{9}, 또는 3×10^{9} +/- 10, 20, 30, 40, 또는 50%) CFU의 세균을 함유하는 동결건조 용기(container)(예: 유리 바이알)에 분취된다. 이어서, 충전된 용기는 동결건조기에 넣고, 동결건조 프로세스를 개시한다. 1차 건조는 적절한 압력(예: 50 내지 250 마이크로바 또는 100 +/- 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90 마이크로바)에서 -40 내지 0℃(예: 34℃)의 범위에서 수행할 수 있다. 이 1차 건조 단계는 통상 피라니 및 정전용량 압력계 판독치가 수렴될 때까지 지속하고, 이는 승화가 종료되었음을 나타낸다. 1차 건조는, 예를 들면, 수시간에 걸쳐(예: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18시간) 1차 건조 온도에서 2차 건조 온도로 +20 내지 +40℃(예를 들면, +30 =/- 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10℃)사이의 온도 경사로 수행되고, 이어서 밸브를 응축기 챔버로 닫은 후(제품이 건조되었음을 나타냄)에 압력 상승이 10마이크로바 미만으로 증가할 때까지 2차 건조 온도에서 온도를 유지한다. 이어서, 용기를 폐쇄하고, 냉각(예: +4℃)시키고, 언로드(unload)하고, 이어서 캡핑한다(예: 알루미늄 캡 사용).

[0024] 대규모 생산을 위해, 동결건조 단계는 바람직하게는 바이알-대-바이알(vial-to-vial) 생존력을 감소시키기 위해 사전-결정화 유지 단계를 포함한다. 아이스 결정 형성은, 염을 포함하여 동결건조 완충액의 용해된 성분의 몰농도가 증가하는 것을 의미한다. 높은 염 농도는 비. 페르투시스 또는 임의의 기타 세균, 효모, 진균 또는 바이러스의 외막을 손상시킬 가능성이 있고, 따라서 높은 염 농도가 존재하는 상의 기간을 가능하면 단축해야 한다. 유리 바이알은 가열/냉각을 매우 불충분하게 수행하고, 통상 동결 중에 단지 3개 지점에서만 동결건조기 선반과 접촉하기 때문에, 이러한 불충분한 전도는 바이알의 불균일한 냉각을 유도하여, 다른 바이알의 액체는 액체 상태를 더 오래 유지하는 동안, 일부 바이알의 액체가 결정 형성이 개시될 것이다. 하기 실시예 섹션에서 기재된 바와 같이, 동결건조 완충액이 매우 서서히 냉각되는 경우, 바이알 중의 아이스 결정 형성은 유리 전이 온도(Tg') 이상의 특정 온도에서 갑자기 발생했다. 이 특정 온도(결정화 점)에서 유지되는 경우, 대부분의 바이알은 서로 수분 이내에 급격한 결정 형성을 나타냈다. 반면, 냉각 단계가 유지 기간에 영향을 받지 않는 경우, 상이한 바이알 사이의 아이스 결정 형성은 1시간 이상 달라질 수 있고, 이는 바이알 사이의 생존력에 큰 차이를 유도한다.

[0025] Tg'로 동결하기 전에 사전-결정화 유지 단계의 도입은 다음과 같다. 소정 동결건조 완충액의 경우, 결정화 온도는 완충액을 서서히 냉각시키고 결정화의 개시가 발생하는 온도에 주의함으로써 결정된다. 사전-결정화 유지 단계는, 동결건조기 선반을 통한 냉각 액체 유동의 온도의 변동성에 따라, 결정화 점보다 0.1 내지 수 ℃(예를 들면, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8) 높은 온도에서 동결건조기의 크기에 따라 30분 내지 수시간(예: 0.5, 0. 6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8)의 유지 단계로서 정의될 수 있다.

[0026] 실시예

[0027] 실시예 1 - 재료 및 방법

[0028] *세균 균주 및 성장 조건*

[0029] 독성 비. 페르투시스 BPSM[참조: Menozzi et al., Infect Immun 1994, 62:769-778)는, 100㎍/ml 스트렙토마이신을 함유하는 보르데트-겐고우(Bordet-Gengou; BG) 아가 상에서 37℃로 성장시키고, 문헌[참조: Mielcarek et al., PLoS Pathog 2006; 2: e65]에 기재된 바와 같이 1% 글리세롤 및 10% 탈섬유화 양 혈액을 보충했다. 성장 후, 세균은, 플레이트를 스크래핑하고 목적하는 밀도로 인산염 완충 식염수(PBS)에 재현탁하여 수확했다. BPZE1 백신 균주(Mielcarek et al., PLoS Pathog 2006; 2: e65) 워킹 셀 뱅크(Working Cell Bank; WCB)를 완전 합성 Thijs 배지[참조: Thalen et al., Biologicals 2006, 34:213-220]에서 교반하에 성장시켰다. 20% 용적/용적의 86% 글리세롤을 첨가하고 극저온-바이알에 1.5mL 분취량을 충전시킨 후, WCB는, 기재된 바와 같이[참조: Thorstensson et al., PLoS ONE 2014; 9, e83449; and Jahnmatz et al., Lancet Infect Dis 2020, 20:1290-1301], 추가로 사용할 때까지 저장했다.

[0030] *BPZE1의 발효*

[0031] 1.5ml 용적의 WCB는 28.5ml의 Thijs 배지를 함유하는 엘렌마이어 플라스크에 접종했다[참조: Thalen et al., Biologicals 2006, 34:213-220]. 0.5L Thijs 배지를 갖는 2L 엘렌마이어로 구성된 제2 사전-배양은 0.1의 OD_{600}에서 접종되었고, 이는 각각 0.5L Thijs 배지를 갖는 5×2L 플라스크용 접종물로서 사용되었다. 5개의 배양물을 풀링하고, 20L Thijs 배지를 갖는 50L 생물반응기(Sartorius, 50L SUB)에 첨가하여, 생물반응기가 0.1의 OD_{600}에서 개시하도록 했다. 발효는 35℃에서 수행하고, 용해된 산소는 스파저(sparger)를 통해 공급되는 압축 공기를 사용하여 20%로 조절하고, pH는 0.2M 젖산을 사용하여 pH 7.5로 조절했다. 배양물 및 배지 플라스크, 용기, 튜브, 필터, 커넥터 및 생물 반응기 등의 모든 제품 접촉 재료는 단일 사용이었다. 1.1 내지 1.4의 목표 OD_{600}에 도달한 후, 8L 배양물의 샘플을, 중공 섬유 접선 유동 여과(TFF; 750 kDA mPES 막 1400cm^2, Spectrum)를 사용하여 0.3bar의 최대 막관통 압력에서 명시된 바와 같이 OD_{600}으로 농축 및/또는 정용여과했다.

[0032] *BPZE1의 동결건조*

[0033] 초기 배양 및 동결건조 발달은 소규모의 동결건조 완충액 및 동결건조 사이클을 초래했다. 모든 대규모의 배양을 위해, +4℃로 냉각된 동결건조 완충액을, 주요 동결방지제로서 100g/L 수크로스를 사용하여, 세균 현탁액에 1:1 비율로 첨가했다. 이어서, 생성된 제형 혼합물을 13mm 브로모부틸 동결건조 스토퍼를 갖는 DIN 2R 바이알에 충전하고, 피라니 및 커패시턴스 마노미터 판독치가 수렴될 때까지 -34℃에서 100마이크로바에서 1차 건조로 구성된 보존적 사이클을 사용하여 동결건조하고, 이는 승화가 종료했음을 나타낸다. 1차 건조 후에, 12시간 동안 -34에서 +30℃로의 경사를 수행하고, 밸브를 응축기 챔버로 닫은 후에 압력 상승이 10마이크로바 미만으로 증가할 때까지 온도를 30℃로 유지하고, 이는 생성물이 건조된 것을 나타낸다. 스토퍼 후, 언로딩할 때까지 바이알을 +4℃로 냉각하고, 이어서 바이알을 알루미늄 캡으로 캡핑했다.

[0034] *플레이트 계수*

[0035] 콜로니 형성 단위(CFU)의 계수는, 15% 양 혈액이 보충된 보르데트 겐고우 아가 플레이트에 제형 샘플의 10배 희석액을 1, 2 및 5회 플레이팅하여 수행했다. 모든 희석액을 3중으로 플레이팅하여, 평균 9개의 플레이트를 계수하여 단일 결과를 수득했다. 동결건조 후 제형의 사양은 0.2 내지 4.0 × 10^9 CFU/ml로 설정되었다.

[0036] *약물 물질 및 제형에 대한 미생물 안전성 시험*

[0037] 스타필로콕쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 슈도모나스 에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 및 담즙 내성 생물의 부재는 미국 약전, 시험 62(USP<62>)(미국 약전, USP42-NF37, 2019)에 따라 시험한 반면, 약물 물질 및 제형 둘 모두의 순도는 USP<61>에 따라 시험되었다. 모든 실행은 USP 안전 시험을 모두 준수했다.

[0038] *마우스 콜로니화 및 효능 검정*

[0039] BALB/c 마우스는 찰스 리버(Charles Rivers)로부터 구입하고, 특정 병원균-비함유 조건에서 동물 시설에 보관했다. 콜로니화 검정을 위해, 다양한 BPZE1 현탁액을 20㎕당 10^5 CFU로 희석하고, 이를 6주령 BALB/c 마우스에 비강내 투여했다. 마우스를 감염 후 3시간, 24시간 또는 3일에 희생시키고, 비강 균질액을 문헌[참조: Solans et al., Mucosal Immunol 2018, 11:1753-1762]에 기재된 바와 같이 제조하고, 이어서 BG 혈액 아가 플레이트에 10배 연속 희석액으로 플레이팅하고, 3 내지 5일 동안 37℃에서 배양하여 CFU 계수에 의해 콜로니화를 정량

화한다. 다양한 BPZE1 제형의 효능을 측정하기 위해, 6주령의 야생형 BALB/c 마우스에게 10^5 CFU의 BPZE1을 비강내 백신접종하거나, 문헌[참조: Debrie et al., Vaccine 2018, 36:1345-1352]에 기재된 바와 같이 PBS를 비강내 제공받았다. 4주 후, 마우스는 10^6 CFU의 독성 BPSM으로 비강내 챌린지했다. 폐 콜로니화는 챌린지 후 3시간 및 7일에서 결정되었다.

[0040] *유전적 안정성 검정*

[0041] 다양한 BPZE1 제제의 유전적 안정성을 문헌[참조: Feunou et al., Vaccine 2008, 26:5722-5727]에 기재된 바와 같이 dnt 및 ampG 유전자를 표적화하는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 평가했다. 백일해 독소(PT) S1 서브유닛 유전자 ptxA를 정량적 PCR(Q-PCR)에 의해 PT를 불활성화시키기 위해 도입된 2개의 코돈 변화의 역전의 부재에 대해 분석했다[참조: Mielcarek et al., PLoS Pathog 2006; 2:e65]. 약 10^{10} CFU의 BPZE1 제제는 원심분리에 의해 수확하고, RNaseA 및 프로테이나제 K를 함유하는 완충액 B1(Qiagen, #19060)에 현탁시키고, 37℃에서 30분 동안 인큐베이팅했다. 이어서, 세균을 50℃에서 30분 동안 용해 완충액에서 용해시키고, 퀴아겐(Qiagen) 게놈=팁 100/G 컬럼에 적용했다.

[0042] 제조업자의 지시에 따라 세척 및 용출 후, DNA를 이소프로판올(CarloErba)로 침전시키고, 5,000 × g에서 15분 동안 원심분리하고, 아이스 냉각 70% 에탄올로 세척하고, 10분 동안 공기 건조시키고, 100㎕ 이중-증류수에 재현탁시켰다. DNA 농도는 나노드롭(NanoDrop) 2000c 분광광도계를 사용하여 측정되었다. 10^7 게놈 카피에 상응하는 1㎕ BPZE1, BPSM 또는 BPSM-스파이크 BPZE1 DNA를, 96-웰 라이트사이클러(LightCycler) 480 플레이트 중에 0.5μM의 프라이머 쌍을 함유하는 19㎕의 라이트사이클러(LightCycler) 480 SYBR 그린 I 마스터 믹스와 혼합했다. 플레이트는 특정 플라스틱 필름으로 밀봉되고, 라이트사이클러 480으로 옮기고, 95℃에서 15분간 인큐베이션에 제공하고, 이어서 95℃에서 15초 동안 1 내지 40 사이클의 변성, 68℃에서 8초 동안 어닐링 및 72℃에서 18초 동안 신장을 수행했다. 이어서, 라이트사이클러 480 소프트웨어 릴리스 1.5.0을 사용하여 데이터를 분석했다. 게놈의 10^6 카피 중에서 하나의 잠재적 복귀를 검출할 수 있는 검정의 민감도를 제어하기 위해, BPSM DNA의 10 카피를 BPZE1 DNA의 10^7 카피와 혼합했다. 모든 프라이머는 유로겐텍(Eurogentec)(벨기에 리에주)에서 구입했다.

[0043] 실시예 2 - 결과

[0044] *BPZE1 제형 개발*

[0045] 비. 페르투시스는 상피 세포 뿐만 아니라 서로에 대한 결합을 가능하게 하는 다수의 병원성 인자를 생성하고, 생물막 형성이 가능하다. 생물반응기에서, 생물막 형성은 세균 클럼핑을 유도하고, 따라서 본질적으로 비균질한 백신 제형을 유도한다. 생물반응기의 클럼핑은 교반을 증가시켜 회피할 수 있지만, 발효 또는 한외여과 동안 너무 높은 전단력은, 동결 건조 후에 낮은 생존율로 해석되는 세포 손상을 유도한다. 8L 배지를 갖는 20-L 생물반응기에서, 6 블레이드 러쉬톤(Rushton) 임펠러를 사용하여 400RPM에서 실행하면, 동결건조 후의 생존율은 45%를 초과하지 않은 반면, 20L 배지를 갖는 50-L 생물반응기에서는, 3-블레이드 해양 임펠러를 사용하여 150RPM에서 실행하면, 유사한 조건하에 최대 65%의 동결건조 후 생존율을 나타냈다(데이터는 제시되지 않음).

[0046] 8L 생물반응기 규모에서, 0.5의 현탁액 OD_{600}은 약간의 클럼핑을 나타냈지만, >1.0의 OD_{600}과 비교하여 동결건조 후 불량한 생존을 나타냈다. 따라서, 모든 후속 배양물은 1.1 내지 1.6의 OD_{600}에서 수확되었다. 이러한 OD_{600}은, 모든 배지 기질이 소비되기 훨씬 전에, 최대 OD_{600}의 약 50 내지 80%에 상응하여, 세균은 동결건조 후 높은 생존율을 초래하는 생리학적 상태에 있었다. 동결건조기의 선반에서 수확과 동결까지의 기간 동안 세포 대사를 정지시키기 위해, 차가운 동결건조 완충액의 첨가가 적합한 것으로 밝혀졌다.

[0047] 동결건조 후 생존에 대한 생물반응기 및 TFF 형상의 영향을 최소화하기 위해, 모든 50-L 생물반응기를 발효 및 한외여과 동안 동일한 보존적 조건을 사용하여 실행하여, 클럼핑을 회피하면서 전단 응력을 최소화하는 것을 절충했다.

[0048] *동결건조 완충액 개발*

[0049] 제형에 대한 제조 프로세스 개발은 완충제 및 일치하는 동결건조 사이클을 포함하는 동결건조 제형을 개발하는 것 뿐만 아니라, 개발된 프로세스가 BPZE1 제형의 생물학적 활성을 방해하지 않는다는 것을 검증하는 것으로

구성되었다. 제형이 뮤린 보호 검정에서 폐의 세균 부하를 적어도 2차수 감소시키는 이의 능력을 유지하는 것이 특히 중요하다. 표적 제형 속성은 표 1에 제시되어 있다.

표 1

[0050] 동결건조된 BPZE1 제형에 대한 표적 제형 속성.

속성	표적 사양	방법
동결건조 전의 유지 시간	24 내지 48시간	보르데트 겐고우 플레이트의 플레이트 계수
재구성시 외관	불투명한 액체, 가시적 클럼핑 없음	육안 검사 USP<790>
동결건조 후 보존 기간	2년 이상 동안 0.2 내지 4 × 10^9 CFU/ml	보르데트 겐고우 플레이트의 플레이트 계수
동결건조 후 생존 시간	≥0%	보르데트 겐고우 플레이트의 플레이트 계수
잔류 수분 함량(RMC)	≤2.5%	칼 피셔, USP<921> (미국 약전, USP42-NF37, 2019)
유리 전이 온도(Tg)	≥35℃	시차 주사 열량계
뮤린 비강의 유착 및 콜로니화	콜로니화 3일 후 액체 Ib 제형과 유사	뮤린 비강의 균질화, 이어서 보르데트 겐고우 플레이트에 균질물을 플레이팅
효능 검정	대조군과 비교하여 100배 이상의 세균 부하의 감소	BPSM 챌린지의 3시간 및 7일 후 뮤린 폐의 균질화, 이어서 균질물을 보르데트 겐고우 플레이트에 플레이팅

[0051] 동결건조 완충액의 제형은, 5 내지 10%의 수크로스 또는 트레할로스를 함유하는 일반적으로 사용되는 동결보호제를 기반으로 하고, 하이드록시 에틸 전분(HES) 또는 나트륨 글루타메이트(MSG) 등의 기타 동결보호제와 때때로 조합되었다. 단일 세균 현탁액을 사용하여, 표 2에 나타낸 모든 제형을 생성했다. 모든 제형은 2.5% 표적 미만의 잔류 수분 함량(RMC)과 35℃ 표적 이상의 유리 전이 온도(Tg)를 나타냈다. 수크로스는, 단독으로 사용하면, 동결보호제로서 트레할로스보다 우수한 것으로 나타났다. HES 또는 MSG를 트레할로스 또는 수크로스에 첨가하는 것은 생존율을 향상시키지 않았다. 수크로스 및 트레할로스를 사용한 반복 실험은, 절대 생존율은 실험마다 상이하지만, 유사한 결과를 나타냈다. 따라서, 추가 개발을 위해 10% 수크로스가 선택되었다.

표 2

[0052] 동결건조 완충액 조건의 함수로서 잔류 수분 함량, 유리 전이 온도 및 세균 생존.

트레할로스	수크로스	HES[1]	나트륨 글루타메이트	RMC (%)	TG (℃)	생존율(%)[2]
-	5%	-	-	1.0	43	44
-	10%	-	-	1.8	36	38
-	5%	5%	-	0.2	48	25
-	10%	7%	-	0.3	46	44
5%	-	-	-	0.6	65	24
10%	-	-	-	0.4	53	33
5%	-	5%	-	0.2	54	24
10%	-	7%	-	0.3	54	26
5%	-	7%	1%	0.3	54	22
10%	-	7%	2%	0.3	57	31

[0053] [1] HES, 하이드록시 에틸 전분; RMC, 잔류 수분 함량; Tg, 유리 전이 온도. [2] 생존율은 바이알의 동결건조 전 및 후의 함량을 비교하는 CFU의 백분율로 표시된다.

[0054] 동일한 유형의 생물 반응기에서 모두 수행되는 다양한 실행의 개요는 표 3에 제시되어 있으며, 이는 제조 방법, 예를 들면, 동결건조 완충액에서 배양물의 직접 희석, 배양물의 농축 및 정용여과, 이어서 동결건조 완충액에 의한 희석 및 배양물의 농축, 이어서 동결건조 완충액에 의한 희석 등의 제조 방법을 나타낸다. 다양한 정용여과 완충액은 NaCl 및 트리스가 없는 Thijs 배지 및 Thijs의 보충이 없는 Thijs 배지를 포함하는 농축된 세균 현탁액을 가변적 성공으로 세척하려고 시도했다. BPZE1 약물 물질을 정용여과하는 주요 이유는 배지로부터 나오는 염 함량(1.66g/L NaCl 및 0.765g/L 트리스)을 감소시키기 위한 것이었고, 이는 이러한 염의

존재로 인해 염이 없을 때보다 동결건조 사이클이 지연되기 때문이다. 그러나, 농축되고 정용여과된 모든 약물 물질에서, 어느 정도의 클럼핑이 관찰되었다(표 3).

표 3

[0055] 상이한 수확 방법을 비교하여, 20L 배지를 갖는 50-L 단일 사용 생물반응기에서 수행된 다양한 실행의 개요.

배치:		실행 1[1]		실행 2[2]	실행 3[3]	실행 4[3]	실행 5[3]	실행 6[3]		실행 7[3]
		1a	1b					6a	6b	
제조사:		직접 희석[4]		농축 및 정용여과[5]					직접 희석[4]	농도[6]
시험	제안된 사양	결과	결과	결과	결과	결과	결과	결과	결과	결과
유지 시간	24 내지 48시간	6	6	16	28	31	26	28	28	32
균일성	균일한 현탁액	미검증	미검증	작은 클럼핑	작은 클럼핑	작은 클럼핑	심한 클럼핑	심한 클럼핑	합격	합격
플레이트 계수 사전 동결건조	0.4 - 8.0 × 10^9 CFU/ml	1.1×10^9	2.4×10^9	6.8×10^9	3.2×10^9	1.8×10^9	7.7×10^9	2.4×10^9	2.2×10^9	8.3×10^9
동결건조 후 플레이트 계수	0.2 - 4.0 × 10^9 CFU/ml	0.7×10^9	1.1×10^9	3.2×10^9	0.6×10^9	0.3×10^9	0.4×10^9	0.2×10^9	0.4×10^9	1.9×10^9
생존율 %	-	64	46	47	19	17	5	8	18	23

[0056] [1]) 실행 1은 <50 바이알로 충전시키고, 동결건조는 6시간 미만의 유지 시간으로 개시했다.

[0057] [2]) 실행 2는 <700 바이알로 충전시키고, 동결건조는 16시간 미만의 유지 시간으로 개시했다.

[0058] [3]) 실행 3 내지 7을 수확하고, 제형당 2000 내지 7000 바이알에서 동결건조하고, 24 내지 36시간의 유지 시간 후에 동결건조를 개시했다.

[0059] [4]) 직접 희석: 동결건조 완충액으로 배양물 1:1의 희석

[0060] [5]) 농축 및 정용여과: 배양물의 농축, 이어서 정용여과, 및 동결건조 완충액으로 1:1 희석,

[0061] [6]) 농도: 배양물의 농축, 이어서 동결건조 완충액으로 1:1 희석.

[0062] Thijs 배지는 화학적으로 정의되며, 일반적으로 모두 안전한 것으로 간주되는 구성요소로 구성된다. 따라서, 품질의 관점에서 BPZE1 제형으로부터 이러한 구성요소를 제거할 필요가 없다. 동결건조 완충액으로 직접 희석되거나(표 3, 실행 1a 및 6b), 농축된 후에 동결건조 완충액으로 희석된 배양물(표 3, 실행 7)은 수확 직후 및 충전 직전에 클럼핑의 어떠한 징후도 나타내지 않았다. 제형의 CFU 표적을 충족시키기 위해, 배양물을 5.0의 OD_{600}으로 농축시키고, 이어서 세균 현탁액을 저온 동결건조 완충액으로 1:1로 희석했다(표 3, 실행 17).

[0063] 수확과 동결건조 개시 사이의 유지 시간은 동결건조 전과 후 둘 다의 세균 생존에 주요 영향을 미쳤다. 제1 실행은 동결건조 완충액을 사용한 배양액의 1:1 직접 희석을 사용하여 64%의 높은 동결건조 후 생존율을 나타냈고(표 3, 실행 1a), 정용여과된 배양은 46% 및 47% 생존율을 나타냈다(표 3, 실행 1b 및 실행 2). 이러한 제형은 수확 및 제형화 후 16시간 이내에 동결건조된 반면, 모든 후속 실행은 수확 후 26시간 내지 32시간 사이에 동결건조되었다. 실행 6b 및 7은, 제형화 직후 및 +4℃에서 48시간 저장 후의 제형에서 세균의 생존력

에 대해 시험되었다. 양쪽 제형 모두는 CFU의 약 절반을 소실했고, 이는 각각 실행 6b 및 7에 대해 18% 및 23%의 비교적 낮은 생존율을 설명한다(표 3). 따라서, 동결건조 전의 저장 기간은 동결 건조 후의 생존에 현저한 영향을 미쳤고, 그렇지 않으면, 실행 1a와 실행 7 사이의 생존은 더 유사했기 때문이다.

[0064] *액체 및 동결건조된 BPZE1 제형의 유전적 비교*

[0065] 동결건조된 제형을 -70℃에 저장된 액체 제형과 비교하여, BPZE1을 생성하기 위해 비. 페르투시스 게놈에 도입된 돌연변이, 특히 dnt 유전자의 결실, 이. 콜라이 ampG 유전자에 의한 비. 페르투시스 ampG 유전자의 치환, 및 PT S1 서브유닛 유전자에서 2개의 돌연변이된 코돈의 존재가 보존된 것을 검증했다. 제1 2개 유전적 변형은 문헌[참조: Feunou et al., Vaccine 2008, 26:5722-5727]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 검증했다. 이. 콜라이 ampG 유전자의 존재는 이. 콜라이 ampG 유전자의 내부 단편에 상응하는 402-bp 단편의 증폭에 의해 검출되었다. 2개의 동결건조된 BPZE1 제형 및 2개의 액체 BPZE1 제형 대조군은 예상된 402-bp 단편을 생성한 반면, 이는 BPSM 대조군 샘플에서는 나타나지 않았다(도 1A). 반대로, 비. 페르투시스 ampG 유전자에 상응하는 659-bp 단편은 BPSM 대조군 샘플에서 증폭되었지만 어떤 BPZE1 제형에서도 증폭되지 않았으며(도 1B), 이는 액체 및 동결건조된 BPZE1 제형 모두가 비. 페르투시스 ampG를 결여하고 있지만 이. 콜라이 ampG를 함유하고 있음을 나타낸다. dnt 유전자의 결실은, 결실된 dnt 유전자에 인접하는 프라이머를 사용하여 PCR로부터 발생하는 1,511-bp 단편의 증폭에 의해 나타났다. 2개의 동결건조된 BPZE1 제형 및 2개의 액체 BPZE1 제형 대조군은 예상된 1,511-bp 단편을 생성한 반면, 이는 BPSM 대조군 샘플에서는 나타나지 않았다(도 1C).

[0066] PT S1 유전자에서 2개의 돌연변이 코돈의 존재를 검증하기 위해, 정량적 PCR법을 개발했고, 이는 돌연변이 유전자의 10^6 카피 중에서 야생형 유전자의 1 카피를 검출할 수 있다. 이를 위해, 10^7 카피의 BPSM DNA, 및 10 카피의 BPSM DNA로 스파이킹된 10^7 카피의 BPZE1 DNA를 BPSM- 또는 BPZE1-특이적 올리고뉴클레오티드를 사용하여 qPCR에 적용했다. 10^7 카피의 BPSM DNA가 대조군으로 사용되었다. 양성의 역치는 35 qPCR 사이클로 설정되었다. 동결건조된 BPZE1 제형 및 액체 BPZE1 제형은 구별할 수 없는 증폭 패턴을 나타냈고, 즉 BPSM-특이적 프라이머에서는 증폭이 관찰되지 않았지만, BPZE1-특이적 프라이머를 사용하면, 앰플리콘은 12.21 내지 13.32 사이의 Cp 값으로 검출되었다. 대조적으로, BPSM DNA는 BPSM-특이적 프라이머로 증폭되었지만 BPZE1-특이적 프라이머로는 증폭되지 않은 반면, 스파이킹된 BPZE1 DNA는 양쪽 프라이머 쌍으로 증폭되었다(도 2). 이러한 결과는 BPZE1이 코돈 변형을 유지했으며, $1/10^6$ 초과의 빈도로 복귀가 발생하지 않았음을 나타낸다.

[0067] *미생물학적 안정성*

[0068] -70℃에서 저장된 액체 BPZE1 제형의 안정성은 3개의 상이한 제형, 10^7(저용량), 10^8(중간 용량) 및 10^9 CFU/용량(고용량)에서 -70℃에서 2년 저장으로 수행했다. 도 3에 도시된 바와 같이, -70℃에서 저장된 액체 BPZE1 제형은 시험된 각 용량에서 최소 2년 동안 안정적이었다.

[0069] -20℃ ± 10℃, 5℃ ± 3℃ 및 22.5℃ ± 2.5℃에서 10^9 CFU/용량으로 제형화된 동결건조 BPZE1 제형의 미생물학적 안정성을 시험했다. 도 4에 도시된 바와 같이, 모든 시험된 온도에서, 10^9 CFU/용량의 동결건조된 BPZE1 제형은 22.5℃ ± 2.5℃에서 최소 2년 동안 저장한 경우에도 CFU 사양을 충족했다. -20℃ ± 10℃ 또는 5℃ ± 3℃에 저장된 제형에서는 CFU 손실 징후가 나타나지 않았지만, 22.5℃ ± 2.5℃에서 저장된 제형은 저장의 최초 수개월 동안 생존력의 약간의 손실을 나타냈지만, 그 후 적어도 2년까지 안정적으로 유지되었다. 그럼에도 불구하고, 이 경우에도, CFU 계수는 사양 내에서 유지되었다. 배양물을 농축하고 이를 동결건조 완충액으로 희석하여 생산된 실행 7의 안정성 데이터는 실행 6과 유사하지만, 동결건조 완충액을 첨가하기 전의 농축 단계로 인해 CFU 계수가 더 높았다.

[0070] *생물학적 안정성*

[0071] 동결건조된 BPZE1 제형의 생물학적 안정성은 2개의 상이한 마우스 검정: 생체내 콜로니화 검정 및 효능 검정에서 평가되었다. 각각의 이러한 검정에서, 다양한 온도에서 저장된 BPZE1 제형의 성능을 -70℃에서 저장된 BPZE1의 본래의 액체 제형의 성능과 비교했다.

[0072] 생체내 콜로니화의 동역학을 정량화하기 위해, 상이한 온도 또는 액체 BPZE1 제형 대조군에서 저장된 약 10^5 CFU의 재구성 동결건조된 BPZE1 제형을 마우스에게 비강내 접종했다. 투여 3시간, 1일 및 3일 후에, 마우스를 희생시키고, 비강 균질물에 존재하는 CFU를 계수했다. 먼저, 동결건조의 효과 및 동결건조 완충액의 조성은 동

결건조 직후에 액체 제형을 동결건조 제형과 비교하여 비교했다. 도 5A에 도시된 바와 같이, 양쪽 제형 모두는 뮤린 비강 공동을 동등하게 충분히 콜로니화시켰고, 액체 제형과 동결건조 제형 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었기 때문이다. 이어서, 동결건조된 제형을 -20℃ ± 10℃, 5℃ ± 3℃ 또는 22.5℃ ± 2.5℃에서 2년 동안 저장하고, 저장의 6개월(도 5B) 및 24개월(도 5C) 후에 콜로니화 동역학을 평가하고, 액체 제형의 것과 비교했다. 6개월 저장 후에도, -20℃ ± 10℃에서 저장된 재료는 0일차에 약간 더 양호하게 부착되었고, 다른 온도에서 저장된 물질보다 투여 1일 후에 더 신속하게 콜로니화되었지만, 이러한 차이는 투여 3일 후에 더 이상 검출되지 않았다(도 5B). 그러나, 24개월 저장 후, 5℃±3℃ 및 22.5℃±2.5℃에서 저장된 동결건조 제형은 0일차에 약간 적게 부착되었고, -20℃ ± 10℃에서 저장된 제형보다 투여 1일 및 3일 후에 약간 더 느리게 콜로니화되었다(도 5C).

[0073] 상이한 온도에서 저장 후 BPZE1 제형의 효능을 평가하기 위해, 마우스는 10^5 CFU의 재구성된, 동결건조된 BPZE1 제형 또는 BPZE1 액체 제형 대조군으로 비강내 면역화하고, 이어서 독성 BPSM으로 비강내 챌린지했다. BPSM 챌린지 후 3시간 또는 7일에 마우스를 희생시켜, 폐의 세균 부하를 평가했다. 먼저, 액상 제형은 동결건조 직후에 시험한 동결건조 제형과 비교했다. 양쪽 제형은, 폐의 CFU가 0일차(3시간) 및 챌린지 후 7일차 사이에 2배 감소했기 때문에, 마우스를 동등하게 양호하게 보호한 반면, 비-백신접종 마우스의 폐에서는 0일차 내지 7일차 사이에 세균 부하가 증가했다(도 6A). 시험된 모든 온도에서 6개월 동안 동결건조된 제형의 저장은 백신 효능에 영향을 미치지 않았고, 챌린지 7일 후에, 비-백신접종 마우스는 감염 후 3시간보다 이들의 폐에 약 10배 더 많은 BPSM 세균을 운반한 반면, 모든 백신접종 마우스는, 비-백신접종 대조군과 비교하여, 이들의 폐에서 CFU가 약 100배 감소했다(도 6B). 액체 BPZE1 제형으로 면역화된 마우스와 동결건조된 BPZE1 제형으로 면역화된 마우스 사이에 통계적 차이는 나타나지 않았고, 저장 온도의 영향은 검출되지 않았다. 따라서, 0일차의 약간 더 느린 부착, 및 -20℃ ± 10℃에서 저장된 제품과 비교하여, 5℃ ± 3℃ 또는 22.5℃ ± 2.5℃에서 저장된 동결건조된 BPZE1 제형에 의한 1일차 마우스 비강의 더 느린 콜로니화에도 불구하고, 이는, 6개월 동안 저장한 경우, BPSM 챌린지에 대한 보호를 제공하는 동결건조된 제형의 능력에 영향을 미치지 않았다.

[0074] 24개월 저장 후, 5℃ ± 3℃ 또는 22.5℃ ± 2.5℃에서 저장된 동결건조 제형은, -20℃ ± 10℃에서 저장된 동결건조 제형과 비교하여, 약하지만 유의한 효능 감소를 나타냈다(도 6C). 그러나, 비-백신접종 마우스와 비교하여, 5℃ ± 3℃ 또는 22.5℃ ± 2.5℃에서 저장된 제형을 제공받은 마우스는 여전히 폐의 세균 부하의 거의 1000배 감소를 나타냈다.

[0075] 이들 데이터는 함께, 적어도 2년 동안 -20℃ ± 10℃ 및 22.5℃ ± 2.5℃ 사이에서 동결건조된 BPZE1 제형의 저장 후, 동결건조된 BPZE1이 비강을 콜로니화하는 이의 능력을 유지하고 사양 내에서 독성 비. 페르투시스 챌린지로부터 마우스를 보호하는 이의 능력을 유지했음을 나타낸다.

[0076] 논의

[0077] 이전 연구에서, BPZE1의 단일 비강 투여는 마우스[참조: Mielcarek et al., PLoS Pathog 2006; 2:e65; and Solans et al., Mucosal Immunol 2018, 11: 1753-1762] 및 비인간 영장류[참조: Locht, et al., J Infect Dis 2017, 216:117-124]에서 비. 페르투시스 챌린지에 대한 보호를 제공하는 것으로 나타났고, IFN-γ 수용체 KO 마우스 및 MyD88-결핍 마우스 등의 심각하게 면역저하 동물에서도 안전한 것으로 밝혀졌다. BPZE1은 또한 2개의 1상 임상 시험에서 인간에게 안전하고 면역원성인 것으로 나타났다.

[0078] 지금까지 모든 임상전 및 임상 연구는, 10^7 CFU/ml, 10^8 CFU/ml 및 10^9 CFU/ml에서 적어도 2년 동안 적합한 온도인 ≤-70℃에서 저장되어야 하는 BPZE1의 액체 제형으로 수행되었다(도 3). 그러나, -70℃에서의 저장은 추가 임상 및 상업적 개발과 양립할 수 없다. 따라서, -20℃ ± 10℃, 5℃ ± 3℃ 또는 22.5℃ ± 2.5℃에서 적어도 2년 동안 안정한 동결건조된 BPZE1 제형이 수득될 수 있다고 설명한다.

[0079] 표 1에 수록된 바와 같이, BPZE1 프로세스 개발을 개시하기 전에, 몇몇 제품 표적 속성을 제형화했다. 20%의 동결건조 후 생존율이 표적화되었고, 이는 1상 시험에서 사용된 액체 BPZE1 제형의 생존율이었다[11, 12]. 동결건조된 BPZE1 제형의 표적은, CFU 계수가 +4℃에서 적어도 2년의 저장 기간에 걸쳐 10^9 CFU/ml 사이로 유지되어야 한다는 것이다.

[0080] 살아있는 생물의 동결건조 후의 생존은 동결건조 사이클, 동결건조 완충액 및 동결건조 이전의 생물의 생리학적 상태에 의존한다. 이러한 파라미터(parameter)는 상호의존적일 수 있다. 그러나, 동결건조 후의 BPZE1의 생존은 배양 및 수확 조건, 특히 전단 응력 및 수확 흡광도가 동결건조 후의 생존에 현저한 영향을 미

친다는 것이 명백해졌다.

[0081] 수확과 동결건조 개시 사이의 액체 세균 현탁액의 유지 시간의 결정적 중요성은 또한 실제 생산의 실행 중에 명백해졌다. 동결건조의 개시가 16시간 이내에 수확을 수행한 초기 실행은 46 내지 64%의 세균 생존율을 제공한 반면, 26시간 내지 32시간의 유지 시간은 생존율을 약 20% 감소시켰다. 24시간 내지 48시간의 유지 시간 후에 생존을 평가하는 것은 대규모 생산에 특히 중요하고, 세균 현탁액의 수확, 농축 및 제형화 및 특히 배치당 >200,000 바이알의 충전에는 24시간 내지 48시간이 걸릴 가능성이 높기 때문이다.

[0082] 동결건조 제형의 RMC는 2.5% 미만으로 일관되게 나타났고, 이는 일반적으로 5℃ 이하에서 장기 안정성과 양립할 수 있다. 그러나, 온도와 동결건조 후 생존의 관계는, 동결건조된 제품에 잔류하는 물이 다시 이동하는 온도인 Tg에 의해 결정되어, 생존력의 손실의 가속화를 유도한다. 표적 Tg는 물류 및 공급망 상의 이유로 ≥35℃로 설정되었고, +22.5 ± 2.5℃에서 2년 동안 동결건조 제형의 안정성에 의해 확인된 바와 같이, 주변 온도, 그러나 제어된 온도에 대한 제형의 비교적 단시간 노출(수시간 내지 수일)이 제형에 현저한 영향을 미치지 않기 때문이다.

[0083] 동결건조된 BPZE1 제품의 제조 프로세스는 약독화 BPZE1 백신의 주요 분자 특성, 즉, 이. 콜라이 유전자에 의한 비. 페르투시스 ampG 유전자의 치환, 특이적 PCR에 의해 평가된 dnt 유전자의 결실, 및 qPCR 절차에 의해 평가된 바와 같이, 10^6 게놈 등가물 중에서 하나의 추정 복귀를 검출할 수 있는, 유전적으로 불활성화된 PT를 초래하는 PT S1 서브유닛 유전자의 변형에 영향을 미치지 않았다.

[0084] RMC 및 Tg는 일반적으로 예상되는 안정성을 나타내지만, 실시간 안정성을 대체할 수 있는 것은 없다. 따라서, 동결건조된 BPZE1 제형은 -20℃ ± 10℃, 5℃ ± 3℃ 및 22.5℃ ± 2.5℃에서 실시간 안정성 연구를 수행했다. 직접 희석 및 농축 및 정용여과에 의해 제조된 동결건조된 BPZE1 제형은, CFU 계수가 저장 동안 0.2 내지 4 10^9 CFU/ml의 사양 이하로 저하되지 않았기 때문에, 적어도 24개월에 걸쳐 -20℃ ± 10℃, 5℃ ± 3℃ 및 22.5℃ ± 2.5℃에서 저장하면, 제형이 안정적인 것을 나타낸다.

[0085] 액체 및 동결건조 제형 중의 부착 및 콜로니화 동역학은, PBS 중 5% 수크로스를 함유하는, -70℃에 저장된 액체 제형을 사용하여 마우스에서 평가했다. 1b상 임상 연구에서는, PBS가 호흡기의 염분과 비교하여 고장성(hypertonic)임에도 불구하고, 이 액체 제형이 대상체의 >80%의 콜로니화를 유도하는 것을 나타냈다. 액체 제형 중의 PBS + 5% 수크로스로부터 Thijs 배지 + 10% 수크로스의 더 낮은 삼투압으로의 염분의 감소는 뮤린 비강의 부착 또는 콜로니화에 영향을 미치지 않았다. 생체내 콜로니화 동역학 및 보호 효능은 또한 3개의 상이한 온도에서 최대 24개월의 저장 기간 동안 평가했다. +5℃ ± 3℃ 또는 +22.5℃ ± 2.5℃에서 2년 저장은 부착 및 콜로니화 속도를 약간, 그러나 현저히 감소시키는 것으로 나타났지만, 이는 백신 효능에 최소한의 영향만을 미쳤고, 이는 시험된 임의의 온도에서 24개월 동안 저장된 동결건조된 BPZE1 제형은 여전히 보호를 제공했고, 즉 챌린지의 7일 후에 비-백신접종 대조군과 비교하여 세균 부하의 100배 이상의 감소를 제공했기 때문이다.

[0086] 유리 바이알은, 일반적으로 동결건조기 선반에 대한 유리 하부의 접촉이 3개 지점으로 제한되기 때문에, 열/냉각을 매우 불량하게 수행한다. 냉동하는 동안, 이러한 불량한 전도는 바이알의 균일하지 않은 냉각을 유도하고, 즉, 일부 바이알의 액체는 결정 형성을 개시한 반면, 다른 바이알의 액체는 더 오래 액체 상태를 유지한다. 특히, 더 큰 동결건조기에서, 이러한 불균일한 열/냉각 전달 문제는 동결하는 제1 바이알과 최후 바이알 사이에서 시간의 비교적 큰 차이를 유도할 수 있다.

[0087] 아이스 결정 형성의 개시로부터 Tg, 즉 물이 더 이상 이동하지 않는 온도에 도달하기까지의 기간의 차이는 동결건조가 완료된 후의 세균 생존에 영향을 미친다고 가정되었다. 아이스 결정 형성은, 염을 포함하여 동결건조 완충액의 용해된 성분의 몰농도가 증가하는 것을 의미한다. 높은 염 농도는 비. 페르투시스 또는 임의의 기타 세균, 효모, 진균 또는 바이러스의 외막을 손상시킬 가능성이 있고, 따라서 높은 염 농도가 존재하는 상의 지속시간을 가능하면 단축해야 한다. 소규모 연구에서는, 사용된 동결 건조 완충액의 경우, 매우 서서히 냉각되었을 때, 바이알의 아이스 결정 형성이 결정화 지점인 -5.8℃에서 갑자기 발생했으며, 대부분의 바이알은 수분 이내에 급격한 결정 형성을 나타낸 반면, 일반적으로 제1 및 제후 바이알 사이의 아이스 결정이 1시간 이상 걸릴 수 있음을 나타냈다.

[0088] 이 제형의 Tg'는 -34℃에서만 도달하지만, -5.8℃에서 거의 동시에 모든 바이알에서의 결정 형성의 개시는, 결정화 전의 개시점이 모든 바이알에서 동일하기 때문에, 바이알 사이의 균일성이 증가할 것이라는 것을 의미한다. 예를 들면, 도 7에서는, 생산 규모 동결건조기에서 동결건조시킨, 3회의 실행(GMP 실행 1, 2 및 3)을

비교한다. GMP 실행 1 및 2의 바이알은 1℃/분의 경사를 사용하여 주위 온도로부터 -50℃까지 냉각시켰다. GMP 실행 3의 바이알은 분당 1℃의 속도로 주변 온도로부터 -5℃까지 냉각하고, 이 온도에서 1.5시간 동안 유지하고, 이어서 1℃/분의 속도로 -50℃까지 동결시켰다. GMP 실행 1, 2 및 3의 CFU 계수를 도 7에서 비교하고, 이는 GMP 실행 2 및 1에 대한 최고 CFU 계수와 최저 CFU 계수 사이에 각각 3배 내지 거의 6배의 차이를 나타낸다. GMP 실행 3의 경우, 최고 바이알과 최저 바이알의 차이는 2배 미만이다. 표 5는, 각 배치에 대한 최고 CFU 계수를 100%로 정규화하는, 동일한 정보를 나타낸다.

표 5

[0089] 배치당 최고 CFU 계수를 100%로 정규화한, 표 형식의 GMP 실행 1, 2 및 3의 CFU 계수의 비교.

바이알	GMP 실행 1	GMP 실행 2	GMP 실행 3
1	100	100	100
2	71	94	100
3	68	64	98
4	59	60	93
5	51	53	89
6	41	50	88
7	39	49	87
8	34	46	86
9	27	40	64
10	17	34	63
11		33	60
12			59
13			57
14			56

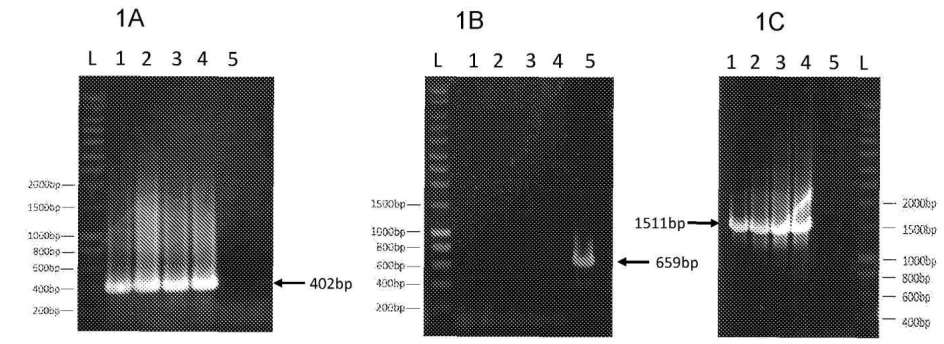
[0090] Tg'로 동결하기 전에 사전-결정화 유지 단계의 도입은 다음과 같다. 소정 동결건조 완충액의 경우, 결정화 온도는 완충액을 서서히 냉각시키고, 결정화의 개시가 발생하는 온도에 주의함으로써 결정된다. 사전-결정화 유지 단계는, 동결건조기 선반을 통한 냉각 액체 실행의 온도 변동성에 따라, 결정화 온도보다 0.1℃ 내지 몇도 높은 온도에서, 동결건조기의 크기에 따라, 30분 내지 수시간의 유지 단계로 정의할 수 있다.

[0091] 기타 실시형태

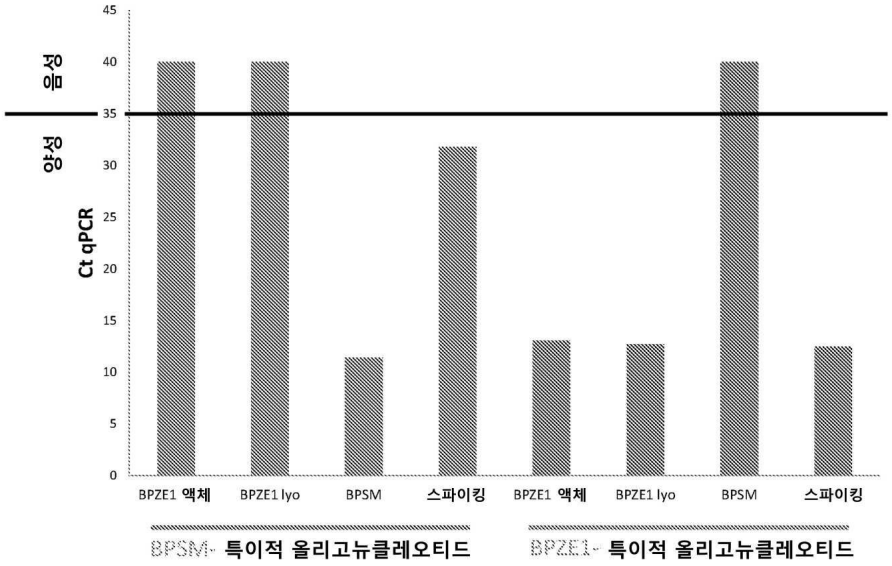
[0092] 본 발명은 이의 상세한 설명과 함께 설명되었지만, 전술한 설명은 첨부된 특허청구범위의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이지 제한하기 위한 것은 아님을 이해해야 한다. 기타 측면, 이점 및 변경은 하기 특허청구범위 내에 있다.

도면

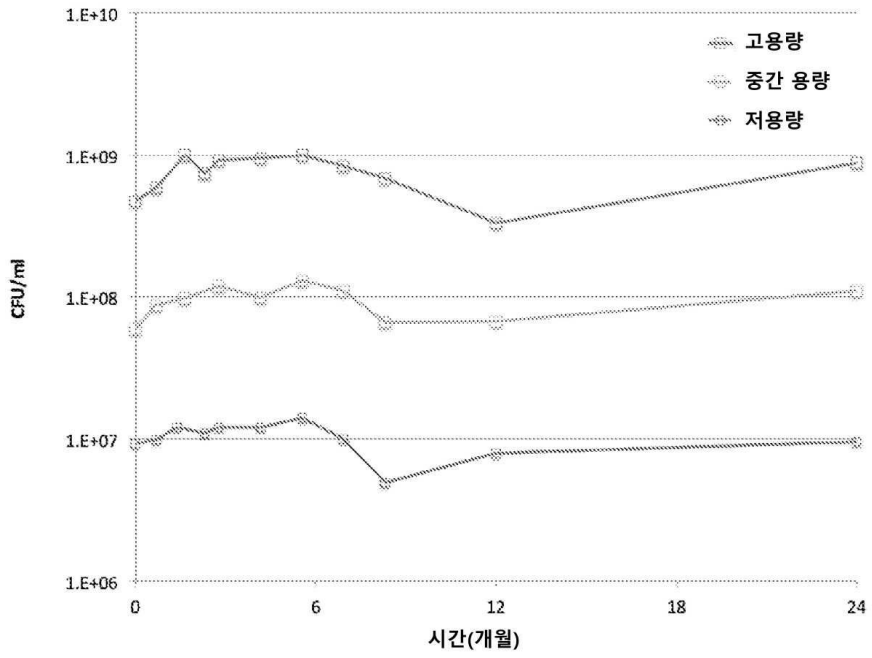
도면1



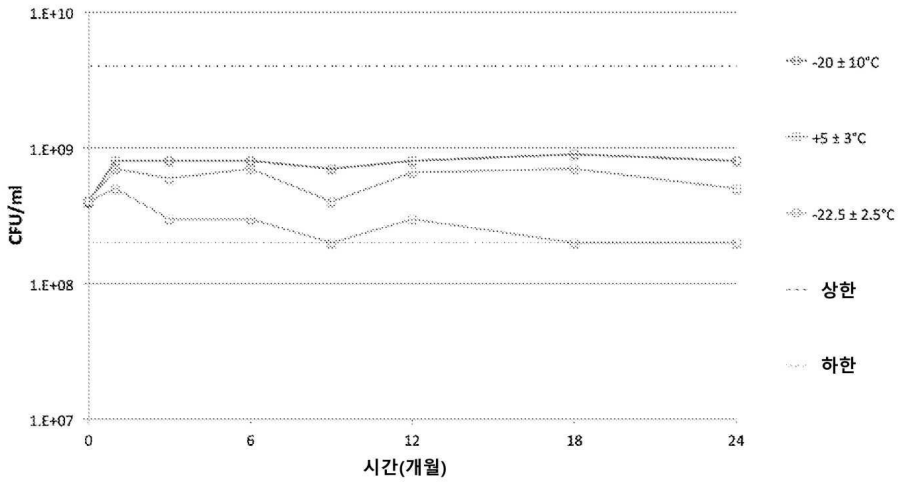
도면2


음성
양성
Ct qPCR
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
BPZE1 액체
BPZE1 lyo
BPSM
스파이킹
BPZE1 액체
BPZE1 lyo
BPSM
스파이킹
BPSM- 특이적 올리고뉴클레오티드
BPZE1- 특이적 올리고뉴클레오티드

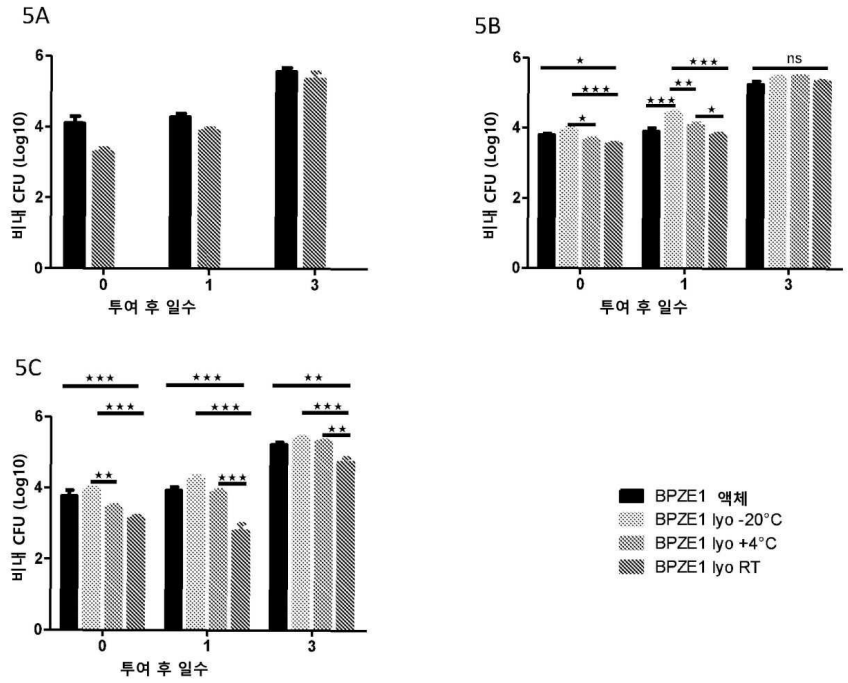
도면3


1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
CFU/ml
고용량
중간 용량
저용량
0
6
12
18
24
시간(개월)

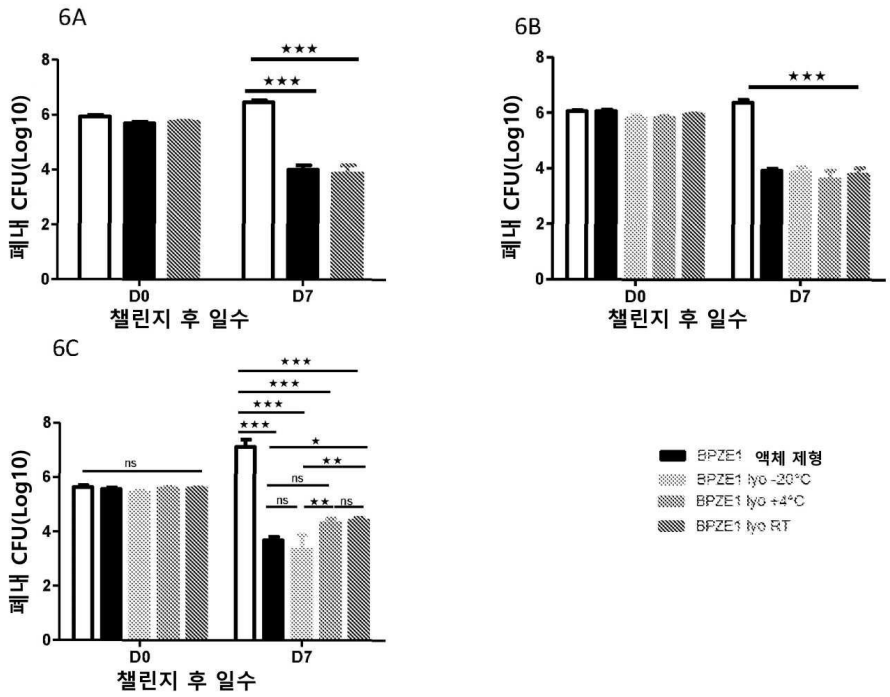
도면4


1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
CFU/ml
0
6
12
18
24
시간(개월)
-20 ± 10°C
+5 ± 3°C
-22.5 ± 2.5°C
상한
하한

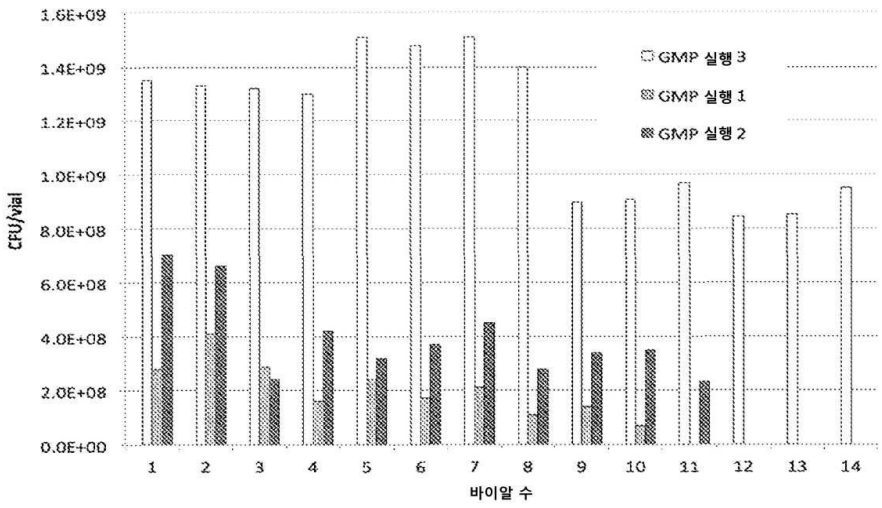
도면5


5A
비내 CFU (Log10)
투여 후 일수
5B
비내 CFU (Log10)
투여 후 일수
ns
5C
비내 CFU (Log10)
투여 후 일수
BPZE1 액체
BPZE1 lyo -20°C
BPZE1 lyo +4°C
BPZE1 lyo RT

도면6



도면7



GMP 실행 1, 2 및 3의 CUF 계수의 비교