



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0100530
(43) 공개일자 2014년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/39 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7016728
(22) 출원일자(국제) 2012년11월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년06월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/065741
(87) 국제공개번호 WO 2013/078102
국제공개일자 2013년05월30일
(30) 우선권주장
61/563,213 2011년11월23일 미국(US)

(71) 출원인
머크 샤프 앤드 돔 코퍼레이션
미국 뉴저지 (우편번호 07065-0907) 라웨이 이스
트 링컨 애비뉴 126
(72) 발명자
티리오트, 데이빗, 에스.
미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 슝니타운
파이크 770
알, 패트릭, 엘.
미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 슝니타운
파이크 770
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
심미성, 양영준

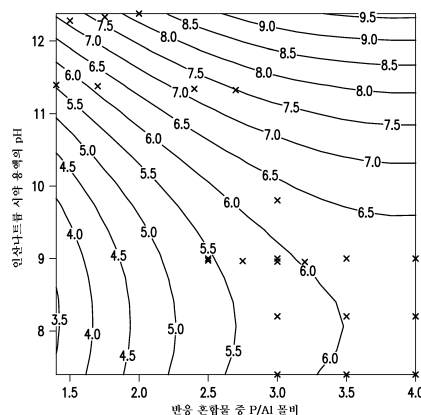
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 무정형 알루미늄 히드록시포스페이트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 알루미늄 염 및 포스페이트 용액을 완충제의 존재하에서 일정한 비로 공동-혼합한다. 바람직하게는, 완충제로 작용하기 위해 과량의 포스페이트 용액이 사용된다. 완충제의 존재에 기인하여, pH는 능동적인 조정없이 반응 동안 (초기 신속한 평형 후) 일정하게 유지된다. 본 방법은 특히 알루미늄 포스페이트 아주반트의 대규모 제조에 있어서 적용가능하다. 알루미늄 포스페이트는 백신 제제, 특히 단백질 또는 사카라이드 항원을 포함하는 백신 제제에서 아주반트로 사용된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

캐논, 제임

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 슝니타운
파이크 770

로벨, 가브리엘, 엠.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 슝니타운
파이크 770

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 알루미늄 염 용액을 포스페이트 용액과 한정된 P/Al 몰비로, 일정한 pH를 유지하는 완충제의 존재하에서 공동-혼합하는 단계, 및

(b) 완충제 교환 용액을 사용하여 완충제 교환하여 원 반응물로부터 임의의 과량의 포스페이트, 완충제 또는 다른 잔류 염의 80% 이상을 제거하는 단계를 포함하는, 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트(adjutant)의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 포스페이트 용액이 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼염기성 인산나트륨, 인산, 일염기성 인산칼륨, 이염기성 인산칼륨, 삼염기성 인산칼륨, 일염기성 인산암모늄, 이염기성 인산암모늄, 삼염기성 인산암모늄, 인산암모늄나트륨, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 포스페이트 용액이 7.4 내지 12.4, 8.0 내지 10.0, 또는 8.5 내지 9.5의 pH를 가지는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 포스페이트 용액이 이염기성 인산나트륨을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제가 포스페이트, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 피로포스페이트, HEPES, 트리스, MOPS, 숙시네이트 또는 보레이트인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 완충제가 포스페이트 용액과 동일한 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염이 염화알루미늄, 황산칼륨알루미늄, 황산알루미늄암모늄, 질산알루미늄, 브로민화알루미늄, 브로민산알루미늄, 염소산알루미늄, 아이오딘화알루미늄, 및 이들의 상이한 수화물 형태로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 알루미늄 염이 염화알루미늄 6수화물인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공동-혼합이 1.0 초과인 알루미늄에 대한 포스페이트의 몰비를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 공동-혼합이 1.5 이상의 알루미늄에 대한 포스페이트의 비를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 공동-혼합이 2.0-3.5 범위의 알루미늄에 대한 포스페이트의 비를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트가 하기 특성 중 하나 이상을 가지는 것인 방법:

4.2 내지 6.9, 4.7 내지 6.4, 또는 4.7 내지 5.4의 제타 전위 영전하점 (PZC);

40 μm 미만, 2 내지 10 μm , 또는 3 내지 6 μm 의 응집체 입자 크기 부피 중앙 직경, $d(v,0.5)$;

3.0 내지 8.0, 4.5 내지 7.2, 또는 4.5 내지 5.5 범위의 pH; 또는

0.6-1.2; 0.8-1.2 또는 0.9-1.1의 최종 침전된 고체에서 측정된 P/Al 몰비.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 평균 입자 크기 ($d(0.5)$)를 약 10 내지 40 μm 에서 약 2 내지 10 μm 또는 3 내지 6 μm 로 감소시키기 위해 단계 (b) 전에 크기 감소를 수행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 크기 감소의 수행이 고전단 회전자-고정자 혼합기, 임펠러에 의한 격렬한 혼합, 펌프를 통한 재순환, 또는 생성물을 유의한 전단 응력에 노출시키는 다른 수단을 사용하여 이루어지는 것인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제 교환을 위한 완충제 교환 용액이 염수 또는 히스티딘인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제 교환 단계가 한외여과에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 한외여과 완충제 교환의 정도가 4 내지 15 디아볼륨(diavolume) 또는 5 내지 7 디아볼륨인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b) 후에 용액을 멸균하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 멸균이 오토클레이빙 또는 계내 증기 멸균에 의해 이루어지는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 전체 반응에 걸쳐 일정한 포스페이트/알루미늄 (P/Al) 몰비 및 pH를 유지함으로써 무정형 알루미늄 히드록시포스페이트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 특히 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트의 대규모 제조에 있어서 적용가능하다. 알루미늄 히드록시포스페이트는 백신 제제, 특히 단백질 또는 사카라이드 항원을 포함한 백신 제제에서 아주반트(adjuvant)로서 전형적으로 사용된다.

배경기술

[0002] 백신에는 면역 반응을 유도하기 위해 복잡한 면역원, 예컨대 불활성화 바이러스 또는 박테리아가 전통적으로 사용되어 왔다. 이러한 백신은 종종 과민반응 및 불완전 불활성화와 관련된 위험을 포함한 부정적인 부작용과 관련되었다. 서브유닛 백신, 예컨대 항원-기제 백신의 사용으로 보다 복잡한 면역원을 사용하여 제조된 백신과 관련된 원치않는 부작용의 횟수 및 심각성이 감소되었다. 서브유닛 백신은 일반적으로 표적 병원체로부터의 단지 하나 또는 여러 단백질 또는 폴리사카라이드로 이루어진다. 일부 백신은 다수의 관련 혈청형에 대한 면역력을 제공하기 위해 보다 많은 수의 단백질 또는 폴리사카라이드를 가질 수 있다. 에피토프의 작은 크기 및 제한된 수에 기인하여, 서브유닛 백신은 그 자체로서는 약한 면역원성이 되는 경향이 있고, 종종 만족스러운 면역

반응을 유도하지 못하기도 한다. 효과적이기 위해서, 서브유닛 백신의 사용에 면역원성을 증강시키는 전략이 요구된다.

[0003] 백신 면역원성을 증강시키는 한 수단은 특이적 아주반트를 사용하는 것이다. 면역학적 아주반트는 항원에 대한 면역 반응을 강화시키는 백신의 요소(들)이다. 단수형으로, 일반적으로 백신 아주반트의 분야에서 알루미늄 아주반트 또는 "알룸"으로 지칭되는 침전된 알루미늄 염이 인간 백신에서 가장 널리 사용되는 아주반트이다. 이론에 구애됨이 없이, 알루미늄 아주반트가 면역계를 자극하는 방법에 대한 여러 이론이 제안되었다. 이러한 이론 중 하나는 알루미늄 아주반트가 투여 부위에서 항원의 보급소를 제공하여 점진적이고 연속적인 항원의 방출을 제공하여 항체 생성을 자극한다는 것이다. 알루미늄 아주반트는 또한 주사 부위에서의 약한 염증 반응을 유도함으로써 기능할 수 있는데, 이는 IgG1 및 IgE의 생성을 증강시키는 IL-4 및 T-헬퍼-2 세포를 주로 자극시킨다. 한 통상적인 알루미늄 아주반트는 알루미늄 히드록시드 ($\text{Al}(\text{OH})_3$)이며, 이는 OH^- 로 침전시킨 Al^{+3} 이다. 또 다른 통상적인 알루미늄 아주반트는 알루미늄 히드록시포스페이트이며, 이는 PO_4 및 OH^- 로 Al^{+3} 을 침전시켜 형성된다. 알루미늄 히드록시포스페이트 ($\text{Al}(\text{OH})_x(\text{PO}_4)_y$)는 고정된 화학량을 가지지 않는다. 알루미늄 아주반트 중 P/Al 몰비는 0 약간 초과 내지 (알루미늄 히드록시드와 유사) 내지 대략 1 (알루미늄 포스페이트와 유사) 범위일 수 있다. 알루미늄 아주반트에 결합하는 항원의 정도 및 강도는 알루미늄 아주반트의 특성, 특히 P/Al 몰비에 의해 전형적으로 정의되는 화학적 조성 및 1차 알루미늄 아주반트 입자의 표면 전하 및 크기의 영향을 받는다.

[0004] 알루미늄 히드록시포스페이트는 가장 통상적으로, 세 반응물, 즉 염화알루미늄 (또는 알루미늄의 다른 공급원, 예컨대 황산칼륨알루미늄), 인산나트륨 및 염기, 예컨대 수산화나트륨을 사용하여 배치식 침전 방법으로 제조된다. 배치식 침전의 과정 동안, 반응 혼합물의 조성은 극적으로 변하여, 배치의 시작에서 배치의 말단으로 가면서 다소 상이한 아주반트의 제조를 초래할 수 있다. 결과는 일종의 특성의 "평균"을 가지는 불균질 혼합물일 수 있다. 문헌 [Klein et al., 2000, J. Pharmaceutical Sciences 89:311-321]을 참조한다. 당연히, 상이한 공급자로부터의 시판되는 알루미늄 포스페이트들은 특성이 현저하게 다를 수 있다. 예를 들어, 알루미늄 히드록시포스페이트는 0.9보다 현저히 미만 내지 1 초과인, 침전된 고체 중 알루미늄에 대한 포스페이트의 몰비를 가질 수 있다. 다른 것들은 불량한 입자 크기 균일성을 나타낸다. 이러한 변동성은 백신의 상업적 판매에 있어서 일관성 문제를 나타낼 수 있다.

[0005] 일정 pH에서의 유가식 침전은 이러한 상황을 개선시키나, 능동적인 pH 제어 피드백 루프가 요구된다. 문헌 [Burrell et al., 2001, Vaccine 19:275-281] 및 문헌 [Burrell et al., 2001, Vaccine 19:282-287]을 참조한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 아주반트로서 사용하기 위한 알루미늄 포스페이트의 더욱 강건하고 재현가능한 제조 방법이 요구된다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 개요

[0008] 본 발명은 공정 동안 반응물을 동시에 그리고 연속적으로 조합하여, 즉 반응물을 공동-혼합하여 공정의 공정 동안 비교적 일정한 반응 조건을 유지하는 방식으로, 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트를 제조하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트의 제조를 위해 아래 단계를 포함한다:

[0009] (a) 용해된 알루미늄 염 용액 (1)과 포스페이트 용액 (2)을 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트를 침전시키기 위한 한정된 P/Al 몰비로, 일정한 pH를 유지하는 완충제 (3)의 존재하에서 공동-혼합하는 단계, 및

[0010] (b) 완충제 교환 용액 (4)을 사용하여 완충제를 교환하여 원 반응물로부터 임의의 과량의 포스페이트 (2), 완충제 (3) 또는 다른 잔류 염의 80% 이상을 제거하는 단계.

[0011] 본 발명의 특정 실시양태에서, 포스페이트 용액은 인산 및 인산나트륨, 인산칼륨 또는 인산암모늄의 형태, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 예를 들어, 포스페이트 용액은 일염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 삼

염기성 인산나트륨, 인산, 일염기성 인산칼륨, 이염기성 인산칼륨, 삼염기성 인산칼륨, 일염기성 인산암모늄, 이염기성 인산암모늄, 삼염기성 인산암모늄, 인산암모늄나트륨, 및 이들의 조합일 수 있다. 포스페이트 용액은 7.4 내지 12.4의 pH를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, pH 8.0 내지 10.0 또는 8.5 내지 9.5가 바람직하다. 바람직한 실시양태에서, 포스페이트 용액은 이염기성 인산나트륨을 포함한다.

[0012] 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 피로포스페이트, HEPES, 트리스, MOPS, 숙시네이트 또는 보레이트이다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 포스페이트 용액 (2)을 위한 완충제 (3)는 포스페이트 자체이다. 상기 경우, 포스페이트 용액 (2)의 명시된 pH는 용액을 제제화하는데 사용되는 포스페이트 염의 종 및 농도를 조정하여 획득된다.

[0013] 본 발명의 특정 실시양태에서, 알루미늄 염은 염화알루미늄, 황산칼륨알루미늄, 황산알루미늄암모늄, 질산알루미늄, 브로민화알루미늄, 브로민산알루미늄, 염소산알루미늄 또는 아이오딘화알루미늄, 및 이들의 상이한 수화물 형태로부터 선택된다. 예시적 알루미늄 염은 염화알루미늄 6수화물이다.

[0014] 알루미늄 히드록시포스페이트를 제조하기 위한 특정 실시양태에서, 공동-혼합은 1.0 이상 또는 1.5 이상의 알루미늄에 대한 포스페이트의 몰비 (초기 반응 조건)를 포함한다. 아주반트 고체 중 1.0 정도의 최종 P/Al 몰비를 가지는 알루미늄 히드록시포스페이트를 제조하기 위한 더 바람직한 실시양태에서, 공동-혼합은 2.0 이상의, 특히 2.0-3.5 범위를 포함하는 반응물인 알루미늄에 대한 포스페이트의 몰비를 포함한다. 이러한 실시양태에서, 4.0, 5.0, 5.5 또는 6.0의 상한이 부과될 수 있다.

[0015] 본 발명의 특정 실시양태에서, 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트는 아래 특성 중 하나 이상을 가진다:

[0016] 4.2 내지 6.9, 4.7 내지 6.4, 또는 4.7 내지 5.4의 제타 전위 영전하점 (PZC);

[0017] 40 μm 미만, 더 바람직하게는 2 내지 10 μm , 특히 3 내지 6 μm 범위의 응집체 입자 크기 부피 중앙 직경 (예를 들어, 정적 광 산란으로 측정된 $d(v,0.5)$);

[0018] 3.0 내지 8.0, 더 바람직하게는 4.5 내지 7.2, 및 특히 4.5 내지 5.5 범위의 pH; 또는

[0019] 0.6-1.2의 최종 침전된 고체에서 측정된 P/Al 몰비; 특정 실시양태에서는 0.8-1.2, 특히 0.9-1.1 범위가 바람직하다.

[0020] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 정적 광 산란으로 측정 시 약 10 내지 40 μm 에서 약 2 내지 10 μm 또는 3 내지 6 μm 로 알루미늄 아주반트 응집체의 부피 중앙 직경 ($d(v,0.5)$)을 감소시키기 위해 단계 (b) 전에 크기 감소를 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 부피 중앙 직경 $d(v,0.5)$ 은 분포의 50%가 상기 직경보다 크고, 50%는 작은 것인 직경이다. 달리 기재하지 않는 한, 응집체 입자 크기에 대한 언급은 정적 광 산란 (SLS)으로 측정된 부피 중앙 직경을 지칭한다.

[0021] 침전 이후 아주반트 응집체의 전형적 입자 크기 범위는 2 내지 40 μm 이다. 이러한 입자 크기는 침전 조건, 예컨대 반응물 농도 및 혼합 조건에 좌우된다. 필요 시, 크기 감소는 회전자-고정자 혼합기, 임펠러에 의한 격렬한 혼합, 또는 펌프를 통한 재순환의 사용과 같은 방법으로 수행할 수 있다. 크기 감소 단계는 또한 배치마다 일관된 응집체 입자 크기를 보장한다.

[0022] 최종 완충제 교환 단계는 삼투물질의 최종 농도를 (완충제 교환 용액 (4)의) 최종 목적하는 값으로 조정할 것이다. 바람직한 완충제 교환 용액에는 염수 및 히스티딘이 포함된다. 한 실시양태에서, 완충제 교환을 위한 완충제 교환 용액 (4)은 염수이다. 한 실시양태에서, 염 (염화나트륨)의 농도는 0.9% w/v로 조정한다. 이러한 완충제 교환은 침전/경사분리 방법 또는 한외여과로 수행할 수 있다. 한외여과가 침전/경사분리보다 훨씬 빠르므로 전형적으로 바람직하다. 특정 실시양태에서, 한외여과 완충제 교환의 정도는 4 내지 15 디아볼륨 (diavolume) 또는 5 내지 7 디아볼륨이다.

[0023] 또한, 상기 방법은 단계 (b) 후에 용액을 멸균하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 멸균은 오토클레이브 또는 가공 탱크 내 계내 멸균과 같은 방법으로 수행할 수 있다. 계내 멸균을 수행하는 한 방법은 탱크 재킷 및/또는 헤드공간을 증기처리 (steaming)하여 명시된 시간 동안 제어된 온도로 생성물을 가열하는 것이다. 냉각된 물, 글리콜 또는 또 다른 냉각 매질을 재킷을 통해 재순환시켜 생성물은 빠르게 냉각된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1. 인산나트륨 반응물의 pH 및 두 반응물 용액의 P/Al 몰비의 함수로서 알루미늄 포스페이트 아주반트의 pH (완충제 교환 이후, 오토클레이빙하지 않음). 측정된 데이터 점의 반응 공간 위치는 x 기호로 나타내어진다.

컨투어(contour) 표면을 샘플 세트 A 및 B로부터의 22개의 데이터 점을 사용하여 피팅한다.

도 2. 인산나트륨 반응물의 pH 및 두 반응물 용액의 P/Al 몰비의 함수로서 알루미늄 포스페이트 아주반트의 pH (완충제 교환 이후, 오토클레이브 이후). 측정된 데이터 점의 반응 공간 위치는 x 기호로 나타내어진다. 컨투어 표면을 샘플 세트 A, B 및 C로부터의 19개의 데이터 점을 사용하여 피팅한다.

도 3. 인산나트륨 반응물의 pH 및 두 반응물 용액의 P/Al 몰비의 함수로서 알루미늄 포스페이트 아주반트의 PZC (완충제 교환 이후, 오토클레이브하지 않음). 측정된 데이터 점의 반응 공간 위치는 x 기호로 나타내어진다. 컨투어 표면을 샘플 세트 A 및 B로부터의 22개의 데이터 점을 사용하여 피팅한다.

도 4. 인산나트륨 반응물의 pH 및 두 반응물 용액의 P/Al 몰비의 함수로서 알루미늄 포스페이트 아주반트의 PZC (완충제 교환 이후, 오토클레이브 이후). 측정된 데이터 점의 반응 공간 위치는 x 기호로 나타내어진다. 컨투어 표면을 샘플 세트 A, B 및 C로부터의 24개의 데이터 점을 사용하여 피팅한다.

도 5. 인산나트륨 반응물의 pH 및 두 반응물 용액의 P/Al 몰비의 함수로서 침전된 알루미늄 아주반트 고체 중 P/Al 몰비. 측정된 데이터 점의 반응 공간 위치는 x 기호로 나타내어진다. 컨투어 표면을 샘플 세트 A, B, C, D 및 E로부터의 34개의 데이터 점을 사용하여 피팅한다.

도 6. "배치식" 및 "공동-혼합식"으로 제조된 아주반트 샘플에 있어서 pH 측정의 비교.

도 7a-b. (a) "배치식" 및 (b) "공동-혼합식"으로 제조된 아주반트 샘플에 있어서 제타 전위 PZC (영전하점) 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 부분적으로, 반응 중 포스페이트 대 알루미늄의 몰비 및 침전 반응이 이루어지는 pH를 비롯한 알루미늄 히드록시포스페이트 침전 반응 동안의 특정 파라미터가 어떻게 제어되는지에 대한 것을 기초로 한다. 일반적인 경우, 반응이 이루어지는 pH는 반응 중 포스페이트 대 알루미늄의 몰비 및 완충된 포스페이트 용액의 pH 및 완충제 능력에 의해 제어된다. 부가적 완충제 또는 완충제들 없이 오로지 포스페이트만 사용하는 경우에 있어서, 본 발명은 부분적으로 아래 두 반응 파라미터의 제어를 기초로 한다: (1) 포스페이트 반응물 용액 대 알루미늄 염 반응물 용액의 몰비; 및 (2) 포스페이트 반응물 용액의 pH. 반응 공간 지도를 사용하여 이러한 두 파라미터의 선택이 아주반트의 최종 특성에 어떠한 결과를 가져오는지를 예측했다. 본 발명의 방법은 또한 제조 재현성 및 강인성을 개선시키는 반응물 혼합의 방법으로서 "공동-혼합"을 사용한다. 본 발명의 방법은 특히 대규모 제조에 적합하다.
- [0026] 다른 방법에 대비하여 본 방법의 일부 장점에는, 비제한적으로, 다음이 포함된다: (1) 오로지 두 반응물 스트림을 사용 (알루미늄 염 및 포스페이트 용액 또는 완충된 포스페이트 용액), (2) 수동적 수단을 통해 침전 동안 일정한 pH를 유지, (3) 응집체 입자 크기 제어 및 일관성, 및 (4) 한외여과를 통한 농축 및 완충제 교환.
- [0027] 특정 실시양태에서, 본 발명의 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트의 제조 방법은, 목적하는 물리-화학적 특성을 가지는 알루미늄 포스페이트 아주반트를 제조하는 편리한 수단을 제공하고, 반응 중 포스페이트 대 알루미늄의 몰비의 선택 및 포스페이트 반응물 용액의 pH를 기초로 여러 목적하는 용도에 상기 특성을 최적화시키는 편리한 수단을 제공한다. 예를 들어, 공동-혼합이 1.5 내지 4.0 범위의 반응물 용액 중 알루미늄에 대한 포스페이트의 몰비 및 7.4 내지 12.4의 포스페이트 반응물의 pH를 포함하는 실시양태에서, 알루미늄 포스페이트 아주반트의 특정 물리-화학적 파라미터의 값은 아래 범위 내로 제어할 수 있다:
- [0028] - 침전된 고체 중 P/Al 몰비: 0.6 내지 1.2 (침전된 고체 중 P/Al의 몰비가 초기 반응 용액 중 P/Al의 몰비와 상이함을 주목);
- [0029] - 제타 전위 영전하점 (PZC): 4.2 내지 6.9; 및
- [0030] - 물 또는 염수 중 침전된 고체의 pH (부가적 완충제 없이): 3.0 내지 8.0. 최종 아주반트의 pH는 필요 시 이후에 조정할 수 있음을 주목한다.
- [0031] 아주반트의 물리-화학적 특성을 조절하는 한 이유는 아주반트 입자에 대한 항원의 흡착을 증강시키기 위함일 것이다. 백신의 안정성 또는 면역원성을 증강시키기 위해 증가된 흡착력이 요구될 수 있다. 흡착의 기작이 정전기인 경우, 아주반트 영전하점은 주어진 pH에서의 흡착의 정도를 예측하는 것을 돕는다. 따라서 영전하점의 제어는 항원 흡착의 최적화를 가능하게 한다.

- [0032] 이러한 방법을 통해 최적화시킬 수 있는 또 다른 파라미터는 pH일 것이다. 하류의 백신 제제화 공정의 상세한 사항에 따라, 아주반트의 특정 pH가 요구될 수 있다. 공정의 후기에 별도의 pH 조절을 하지 않으면서 특이적 아주반트 pH를 표적화하기 위해 기재된 방법을 이용하는 것이 가능하다.
- [0033] 본원에 사용되는 "일정한 pH 유지"는 알루미늄 및 포스페이트 용액의 초기 첨가 이후 pH의 평형이 이루어진 후 경시적으로 pH가 좁은 범위, 예를 들어 ± 0.10 , ± 0.20 또는 ± 0.50 pH 단위 내로 고정되는 것을 지칭한다. pH는 임의의 pH 조절, 예를 들어 NaOH를 사용하지 않고 유지된다.
- [0034] 주어진 반응 조건의 선택 (예를 들어, 반응물 용액 중 P/Al 비의 선택, 및 포스페이트 용액의 pH 선택)에 있어서, 본 발명의 방법으로 제조되는 알루미늄 포스페이트 아주반트는 또한 종래 방법과 비교하여 우수한 재현성 (로트마다의 표준 편차)을 가질 것으로 예상될 것이다. pH 및 PZC 둘 다에 대한 최종 생성물에서 개선된 일관성에 대한 증거는 실시예 2에서 상술된다. 재현성의 이러한 개선은 배치식 공정 동안 침전된 생성물과 비교하여 공동-혼합 동안에 보다 균질한 생성물이 침전된다는 사실에 기인한 것일 수 있다.
- [0035] 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트가 정확한 용어이지만, 상기 아주반트에 대해 당업계에서 흔히 사용되는 용어는 알루미늄 포스페이트 아주반트이다. 본원에 사용되는, 알루미늄 포스페이트는 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트를 지칭한다.
- [0036] 반응물
- [0037] 알루미늄 포스페이트 아주반트의 제조에는 알루미늄의 공급원, 포스페이트의 공급원 및 반응 진행을 가능하게 하는 충분한 염기가 요구된다. 알루미늄 포스페이트 아주반트 고체의 최종 포스페이트/알루미늄 (P/Al) 비는 아주반트의 물리-화학적 및 항원 결합 특징을 제어한다. 본 발명의 방법은 목적하는 P/Al 몰비의 알루미늄 히드록시포스페이트의 제조를 가능하게 한다. 전형적인 목적하는 P/Al 비를 제조하는 것을 목표로 하는 본 발명의 한 실시양태에서, 알루미늄 포스페이트 아주반트는 0.8 내지 1.2의 최종 P/Al 비를 가질 수 있다. 바람직하게는, 최종 P/Al 비는 0.9-1.1 범위이다. 다수의 백신 적용에 있어서, 전형적인 목적하는 표적 P/Al 몰비는 대략 1일 것이나, 이러한 표적은 항원의 특성 및 아주반트에 대한 항원 흡착의 목적하는 정도에 좌우될 것이다. 허용되는 변동성은 적용 및 이러한 몰비를 측정하는데 사용되는 검정의 정확성에 따라, ± 0.10 , ± 0.15 및 ± 0.20 을 포함할 것이다.
- [0038] 일관되고 높은 P/Al 비의 알루미늄 포스페이트 아주반트를 제조하기 위해, 포스페이트 이외의 알루미늄 리간드의 경쟁은 침전 반응 동안 최소화되어야 한다. 고려해야 하는 다른 기타 경쟁은 알루미늄에 결합되는 포스페이트와 히드록시드 사이의 경쟁이다. P/Al 비는 경쟁하는 히드록시드의 보다 낮은 농도에서 (달리 말하면 보다 낮은 pH에서) 침전을 수행함으로써 최대화되고, 또한 포스페이트의 보다 높은 농도에 의해 증강된다. 포스페이트의 양은 바람직하게는 알루미늄에 대비한 포스페이트의 과량을 제공하도록 선택된다. 예를 들어, 반응물 중 알루미늄에 대한 포스페이트의 초기 몰비는 1.5 내지 4.0, 바람직하게는 2.0 내지 4.0이다. 특정 실시양태에서, 특히 바람직한 몰비는 2.0, 2.5, 3.0 및 3.5이다. 허용되는 변동성은 ± 0.05 , ± 0.10 , ± 0.15 및 ± 0.20 을 포함할 것이다. 표적 반응물 몰비는 전형적으로 용액의 공동-혼합 동안 알루미늄 및 포스페이트 용액 농도 및 부피 유량을 조정함으로써 달성된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 반응물의 부피 유량은 동등한 1:1 비이다.
- [0039] 알루미늄의 공급원은 비제한적으로, 염화알루미늄 6수화물 ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 황산칼륨알루미늄 ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$) 및 이의 수화물, 질산알루미늄 ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), 브로민화알루미늄 ($\text{AlBr}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 브로민산알루미늄 ($\text{Al}(\text{BrO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), 염소산알루미늄 ($\text{Al}(\text{ClO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 또는 아이오딘화알루미늄 수화물 ($\text{AlI}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)을 비롯한 알루미늄 염으로부터 선택된다. 바람직한 알루미늄 염은 염화알루미늄 (6수화물)이다. 선택된 알루미늄 염은 물의 적절한 부피에 용해된다.
- [0040] 충분한 염기가 역시 공급된다면 임의의 형태의 포스페이트 (H_3PO_4 내지 PO_4^{3-})를 사용할 수 있지만, 별도의 완충제 보다는, 포스페이트 및 염기 둘 다의 단일 공급원으로서 주로 2염기 형태의 과량의 포스페이트 완충제를 사용하는 것이 편리하고 유리할 수 있다. 포스페이트 완충제와의 공동-혼합의 이용은 pH 제어를 위한 능동적 피드백 루프 (예를 들어, 수산화나트륨의 반응물 흐름 스트림을 포함하며, 반응 동안 pH를 측정하고, 수산화나트륨 반응물 흐름 스트림에 대해 제어된 조절을 함)를 사용한 pH 모니터링의 필요성을 제거하여, 보다 단순하고 보다 강인한 제조 공정을 제공한다. 포스페이트 화합물은 물에 용해되고, 일부 실시양태에서, 포스페이트 용액의 pH는 최종 생성물에서 목적하는 특징을 제공할 표적 pH로 조정된다. 예를 들어, 적합한 양의 일염기성 인산나트

를 이염기성 인산나트륨에 첨가하여 목적하는 pH를 수득할 수 있다. 적합한 포스페이트 완충제에는, 비제한적으로, 인산나트륨, 인산칼륨, 오르토인산 (H_3PO_4), 인산암모늄 ($NH_4H_2PO_4$), 이염기성 인산암모늄 ($(NH_4)_2HPO_4$) 또는 다른 가용성 알칼리 포스페이트가 포함된다. 적합한 pH는 7.4 내지 12.4로부터의 임의의 pH를 포함할 것이나, 특정 실시양태에서 8.0 내지 10.0의 범위가 바람직하다. 예를 들어, pH는 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 또는 10.0이다. 허용되는 변동성은 ± 0.10 , ± 0.15 , ± 0.20 및 ± 0.30 을 포함할 것이다. 특정 실시양태에서 8.5 내지 9.5의 pH가 특히 바람직하다. 포스페이트 용액과 함께 완충제가 사용되는 실시양태에서, 적합한 완충제에는, 비제한적으로, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 피로포스페이트, HEPES, 트리스, MOPS, 속시네이트 및 보레이트가 포함된다. 이러한 실시양태에서, 완충제는 침전 반응 이전에 포스페이트 용액의 제제화 동안 첨가될 것이다.

[0041] 바람직한 실시양태에서, 알루미늄 포스페이트 아주반트는 적절한 농도의 염화알루미늄 (6수화물)의 수용액과 pH 9의 인산나트륨을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0042] 침전

[0043] 본 발명의 방법에서, 공동-혼합을 이용하여 반응에 첨가되는 반응물의 일정한 비를 제공한다. 본원에 사용되는, "공동-혼합"은 일정한 비의 반응물이 반응 용기에 첨가되는 임의의 방법을 지칭한다. 대조적으로, 배치식 침전에서, 1종 이상의 반응물은 이미 반응 용기 내에 있는 1종 이상의 반응물에 첨가된다. 따라서, 배치식 침전에서, 반응물의 비는 반응의 과정에 걸쳐 변화한다. 배치식 침전은 전형적으로 알루미늄 염 용액, 인산나트륨 및 수산화나트륨과 같은 염기를 포함하며, 이중 하나 또는 둘은 반응에 걸쳐 일정하고 나머지는 반응에 첨가된다.

[0044] 공동-혼합은 일정한 속도로 적절한 혼합을 하여 알루미늄 염 및 포스페이트 완충제의 두 반응 용액을 합쳐서 달성된다. 경시적으로 고정된 일정한 비로 반응물이 공동-혼합식 공정에 첨가되므로, 공동-혼합 반응은 시간-독립적 파라미터에 의해 단순한 형식에 가깝게 만들 수 있다. 알루미늄 포스페이트 반응을 공동-혼합하는 초기 조건은 두 가지 차원으로 설명할 수 있다: 반응물 용액에 대한 포스페이트 대 알루미늄의 몰비 및 인산나트륨 반응물 용액의 pH. 또한, 포스페이트 완충제와의 공동-혼합은 내재된 pH 제어를 제공한다. 포스페이트 및 염기 둘 다의 정확한 양을 동시에 제공하여 목적하는 결과를 달성하는 포스페이트 용액의 적절한 선택으로, 출발에서부터 마무리까지의 반응은, 피드백 pH 제어가 필요 없이, 대략 일정한 pH 하에서 이루어진다.

[0045] 공동-혼합의 원리는 여러 다양한 장비를 사용하여 다수의 여러 방식으로 시행될 수 있다. 실험실 규모에서, 두 반응 용액의 한정된 부피를 주사기 펌프 또는 연동 펌프를 사용하여 조합할 수 있다. 이는 한 쌍의 중력 흐름 뷰렛을 사용하여 또는 한정된 속도로 두 흐름 스트림을 전달하고 이를 혼합하는 임의의 다른 수단으로 실시할 수 있다. 한정된 일정한 유량으로 두 반응물을 반응 용기에 첨가하는 동안, 자석 교반막대와 같은 당업계에 공지된 수단을 이용하여 빠른 혼합을 수행한다. 대규모에서는, 두 한정된 흐름을 전달하는 다수의 기작 (예, 매칭된 펌프, 매칭된 중력 공급물 탱크 등) 및 혼합 (예, T-혼합, 정적 인라인 혼합기, 교반 탱크, 재순환 루프 등)을 이용할 수 있다.

[0046] 한 실시양태에서, 공동-혼합 반응은 제어된 실온 ($17^{\circ}C$ - $33^{\circ}C$)에서 이루어진다. 비제한적으로 재킷 및 수조를 비롯한 온도 제어의 다른 수단을 사용할 수 있다.

[0047] 공동-혼합을 달성하기 위한 한 바람직한 수단은 T-혼합을 통한 침전에 의한 것이다. T-혼합은 "T"자 모양으로 놓여진 배관 및 관을 포함한다. 두 반응물 용액은 수평 축을 따라 펌핑된다. 유량은 제어된다. 용액은 수직 축과 "만나고", 생성물 용기 안으로 흘러 들어간다. 예를 들어, T-혼합 구성은 각각의 반응물 용기에서 연동 펌프를 통해 용액을 조합하는 배관 연결자 "T"로 연결되는 3/8" ID 백금-경화된 실리콘 배관으로 이루어질 수 있다. T-혼합 장치는 또한 유사한 구성의 경질 금속 또는 1회용 플라스틱 관으로 이루어질 수 있다.

[0048] T-혼합 동안, 반응물 유량은, 예를 들어 대략 300 mL/min 내지 5.0 L/min 또는 300 mL/min 내지 2.0 L/min 범위일 수 있다. 바람직한 유량은 시행되는 배치 크기 및 재료, 예컨대 배관 또는 관 길이 및 직경에 좌우된다. 파일럿 규모 배치, 예를 들어 5-15L에 있어서, 바람직한 유량은 300 mL/min-1.2 L/min 범위이다. 대규모에서는, 예를 들어 100-500 L에서, 2.0-5.0 L/min 범위의 보다 빠른 유량이 바람직하다. 적절한 유량 및 배관 직경 및 길이는 생성물 용기로 들어가기 전 두 스트림의 완전 난류 혼합을 가능하게 할 것이다. T-혼합의 특이적 경우에서, 배관 내 혼합은 생성물 용기 내 혼합보다 결정적인데, 이는 침전 반응이 거의 순간적으로 이루어지기 때문이다. 난류를 보장하기 위해 T-혼합된 스트림 내 흐름 조건의 대략적인 근사치로서 레이놀드 수 (Reynolds number)를 사용할 수 있다. 추가로, 특징적 마이크로혼합 시간은 이러한 T-혼합 침전 단계의 스케일

-업 및 스케일-다운에 있어서 또 다른 유용한 파라미터이다. T-혼합과 유사한 적용에 있어서 스케일링 파라미터로서 레이놀드 수 및 특징적 마이크로혼합 시간의 논의를 위해 문헌 [Mahajan et al., 1996, AIChE Journal 7:1801-1814] 및 문헌 [Johnson et al., 2003, AIChE Journal 9:2264-2282]을 참조할 수 있다.

[0049] 바람직한 실시양태에서, 반응물 유량은 탱크로 전달되는 염화알루미늄 및 인산나트륨 반응물의 총 부피가 합리적으로 달성될 수 있는 만큼 1:1에 가깝도록 정확하고 정밀하게 제어되어야 한다. 각 반응물의 $\pm 5\%$, $\pm 2.5\%$, 또는 $\pm 1\%$ 이내의 평균 유량이 적용에 따라 일반적으로 허용된다. 이러한 정확성은 침전된 생성물 중 알루미늄 농도, 침전된 생성물의 pH 및 공정의 전체 일관성에 직접적으로 연관될 것이다.

[0050] T-혼합기를 사용하는 대규모의 침전에 있어서, 이 단계 동안 생성물의 가능한 최량의 혼합을 보장하기 위해, 가능하다면 침전 공정의 시작 시에 생성물 용기 내 임펠러를 켜야 한다. 임펠러를 즉시 켤 수 없다면, 되도록 빨리 켜야 한다 (예를 들어, 탱크 내 액체 높이가 임펠러 블레이드의 바닥에 이를 때). 침전된 중간체는 T-혼합기를 통한 반응물의 전달에 걸쳐 연속적으로 혼합된다. 반응물 전달 및 T-혼합의 완결 시, 다음 가공 단계 이전에 침전의 완결 및 균질한 중간체를 보장하기 위해 혼합은 바람직하게는 10분 이상 내지 15분 동안 탱크 내에서 계속한다.

[0051] 입자 크기 감소

[0052] 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트는 정적 광 산란 (SLS)으로 측정 시 대략 2 내지 40 μm (d(v,0.5)) 범위일 수 있는 보다 큰 응집체를 형성하는 비교적 작은 1차 입자 (10 내지 120 nm 디스크)로 이루어진다. 아주반트 응집체의 입자 크기 제어는 종종 생성물 품질 일관성에 있어서 중요하고 백신의 효능에 있어서 중요할 수 있다. 10 μm 미만의 아주반트 응집체 입자가 백신 제제화에 있어서 전형적으로 최적인 것으로 고려된다. 응집체 입자 크기가 중요하게 고려되므로, 이러한 속성을 조정하고 일관성을 보장하는 절차가 상기 방법에 있어서 바람직하다.

[0053] 한 실시양태에서, 알루미늄 포스페이트 응집체 입자 크기는 고 전단 회전자-고정자 혼합기를 통한 재순환으로 감소된다. 정적 광 산란 (SLS)으로 측정되는 입자 크기 (d(v,0.5))는 침전 후 10 μm 초과에서 출발하여 약 40 μm 까지 커질 수 있다. 크기 감소 유닛 조작은 입자를 약 2-10 μm , 더 전형적으로 3-6 μm 로 밀링할 것이다. 예를 들어, 대규모 공정에 있어서, 사각-구멍 고전단 고정자를 가지는 실버슨(Silversen) 275UHS 고 전단 혼합기를 사용할 수 있다. 소규모 공정에 있어서, 사각-구멍 고전단 고정자를 가지는 실버슨 L4RT-A를 사용할 수 있다. 아래 문단들은 공정을 추가로 상세하게 설명한다.

[0054] 생성물 용기 내 혼합은 입자 크기 감소 공정에 걸쳐 계속된다. 생성물은 이 단계 동안 잘 혼합되어 균질성을 보장한다. 생성물은 탱크에서 고전단 혼합기를 통해 재순환된다. 실물 규모에서, 회전엽(lobe) 펌프는 고전단 혼합기의 주입구에서 목적하는 압력을 제공하는 표적 유량으로 재순환하는 동안 동작한다. 한 실시양태에서, 이 유량은 약 90 L/min이다. L4RT-A를 사용하는 소규모에서, 고전단 혼합기는 충분한 흐름을 생성하여 재순환을 촉진하기 위해 제2 펌프가 필요하지 않다. 이러한 적용에 사용될 수 있는 275UHS 모델 혼합기는 지역 전력 표준에 따라 3000 RPM 내지 3600 RPM의 표준 속도로 동작한다. 실현가능하다면, 혼합기 속도를 3000 RPM에서 3600 RPM으로 증가시켜 입자 크기 감소에 필요한 총 시간을 줄이기 위해 가변-주파수 운전 (VFD)이 권고된다. 보다 높은 회전자 깃끝 속도는 최종 생성물 크기에 영향을 주지 않으면서 일반적으로 유의하게 보다 나은 크기 감소 효율을 초래한다. 소규모 L4RT-A는 실물 규모에서의 회전자 깃끝 속도에 접근하기 위해 전형적으로 8000 RPM에서 동작한다.

[0055] 온도는, 제어되지 않는다면 고전단 혼합으로부터의 전력 투입으로 인해 발생할 온도 상승을 경감시키기 위해 생성물 용기의 재킷 또는 온도-제어된 수조와 같은 수단으로 실온 가까이로 제어되어야 한다. 크기 감소 동안 허용되는 온도 범위는 17°C-33°C이다.

[0056] 완충제 교환

[0057] 농축/정용여과 한외여과 단계는, 생성물을 농축시키고, 알루미늄 히드록시포스페이트 침전 단계로부터 잔존하는 과량의 포스페이트 및 다른 잔류 염을 용액으로부터 제거하기 위해 이용할 수 있다. 정용여과 이전에, 생성물을 농축시켜 정용여과의 효율을 증강시키고, 멸균되고 분배될 총 생성물 부피를 감소시킨다. 생성물을 이 단계 동안 전형적으로 1.25x 내지 2.0x, 바람직하게는 1.4x 내지 1.6x로 농축시켜 생성물 부피를 최소화하면서 정용여과 공정의 강인성을 보장한다. 그 후, 생성물에 선택된 정용여과 완충제에 대비해 4-15 디아볼륨 정용여과를 수행한다. 표적인 상기 범위 내 6 디아볼륨은, 표적 유리 포스페이트 제거를 일관되게 달성하면서 과량의 완충제 교환을 최소화하는 것으로 확인되었다. 세공 크기가 10kD 내지 300kD인 생성물 상용성 막을 상기 한외여과

를 위해 사용할 수 있다. 사용할 수 있는 대표적 막에는, 비제한적으로, 밀리포어(Millipore) 10kD 및 300kD 펠리콘(Pellicon) 2 바이오맥스(Biomax) (PES) V-스크린 한외여과막이 포함된다. 밀리포어 300kD 펠리콘 2 바이오맥스 (PES) V-스크린 여과막을 사용한다면, 보유물 압력, 투과물 플럭스 및 교차흐름 (보유물 유량)을 제어하는 것이 권고된다. 교차흐름은 710-750 리터/(미터²-시) 범위이어야 한다. 투과물 플럭스는 25-38 리터/(미터²-시) 범위이고, 보유물 압력은 5 내지 15 psig로 제어된다. 필터 카세트를 가로지르는 압력 강하 (ΔP) 및 막간차압 (TMP)은 공정 동안 모니터링 해야하지만 제어하지는 않는다.

[0058] 다양한 완충제를 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트 입자의 목적하는 배경에 따라 완충제 교환 단계에 사용할 수 있다. 바람직한 완충제에는 염수 및 히스티딘이 포함된다. 한 바람직한 실시양태에서, 완충제 교환을 위한 용액은 염수이다. 한 실시양태에서, 염 (염화나트륨)의 농도는 0.9% w/v이다. 부가적 제약상 허용되는 부형제 및/또는 아주반트가 이 단계 동안 포함될 수 있다.

[0059] 침전/경사분리 공정 또한 완충제 교환에 사용할 수 있는 것으로 인식되지만, 한외여과가 훨씬 빠른 공정이므로 바람직하다.

[0060] 증기 멸균

[0061] 정용여과 완결 후, 생성물의 오토클레이빙 병 또는 생성물 용기 내 계내 멸균을 비롯한 당업계에 널리 공지된 수단으로 생성물을 증기 멸균할 수 있다. 알루미늄 포스페이트 생성물의 멸균은 생성물 품질 속성, 가장 특히 pH, 영전하점 (PZC), 용액 (유리) 포스페이트 농도 및 아주반트 고체 중 P/AI 몰비에 영향을 줄 것이다. 일부 경우 (고체 중 P/AI 몰비는 약 1입), 증기 멸균 동안 나타나는 고온(121-130℃)에의 노출은 생성물의 pH를 강하시키고, PZC를 강하시키고, 포스페이트를 고체로부터 유리시켜 상청액 중 용액 포스페이트를 증가시키고 아주반트 고체 중 P/AI 비를 감소시킨다. 이러한 변화의 정도는 초기 반응물에 사용되는 원 파라미터, 완충제 교환의 정도 및 멸균 시간에 좌우된다. 예로써, pH는 0.5 pH 유닛 감소될 수 있고, PZC는 0.5 pH 유닛 감소될 수 있고, 용액 포스페이트는 약 3-8mM에서 약 13-22mM로 증가될 수 있고, P/AI 비는 약 1.1 내지 1.0 감소될 수 있다. 멸균 시 용액 (유리) 포스페이트의 변화는 아주반트 농도에 좌우되는 한편, pH, PZC 및 P/AI 비의 변화는 아주반트 농도에 훨씬 덜 좌우되거나 이에 전혀 좌우되지 않는다.

[0062] 멸균은 전형적 오토클레이브 멸균 사이클 동안 아주반트 응집체의 크기를 전형적으로는 변화시키지 않는다. 그러나, 멸균 후 아주반트 현탁액을 매우 천천히, 예를 들어 12시간에 걸쳐 냉각시키면 아주반트 응집체 크기가 유의하게 증가되는 것으로 확인되었다. 상기 경우, 응집체 크기는 멸균 전 3.9 μm (SLS에 의한 d(0.5))에서 멸균 이후 11.6 μm 로 증가되는 것으로 확인되었다.

[0063] 멸균 동안의 생성물 변화에 대한 이해가 중요한데, 이는 최종 생성물 표적 특징을 성공적으로 충족시키기 위해, 이러한 변화가 이루어지도록 초기 반응물 조건을 조정할 수 있기 때문이다. 경험상 122℃ 내지 130℃의 온도에서 4.3시간 이하 동안 유리 내에서 생성물을 증기 멸균하여도, 반응물 조건의 설계에서 이러한 기간의 멸균이 고려되었다면, 여전히 허용되는 생성물 품질 속성을 충족시킬 수 있는 것으로 확인된다. 생성물이 이렇게 긴 멸균 사이클 동안 유지될 수 있어도, 가능하다면 열 노출을 최소화하는 것이 권고된다. 일단 최적화되면, 전형적 계내 증기 멸균 사이클은 생성물을 35분 이내에 122℃ 내지 127℃로 가열하고, 24 내지 30분 동안 멸균 설정치에 "머물고", 생성물을 30분 이내에 30℃ 미만으로 냉각시킬 것으로 예상할 수 있다.

[0064] 아주반트 특성

[0065] **pH**

[0066] 아주반트 pH는 아주반트의 적용 및 사용되는 항원 (특정 항원의 안정성은 pH의 영향을 받음)에 따라 조정할 수 있다. 이러한 조정은, 반응물 중 P/AI 몰비를 조종하거나, 들어오는 포스페이트 완충제의 pH를 조정하거나, 백신 제제화 이전에 생성물의 최종 pH 조정을 수행하여 달성할 수 있다. 일반적으로, 아주반트 pH는 3.0 내지 약 8.0일 수 있고, 특정 바람직한 실시양태에서 pH 값은 약 4.5 내지 약 7.2이다. 본 발명의 한 특히 바람직한 실시양태는 4.5 내지 5.5의 pH를 초래한다.

[0067] **영전하점**

[0068] 알루미늄 아주반트의 제타 전위는 아주반트 입자 상의 표면 전하와 연관되고, 정전기적 상호작용으로 알루미늄 아주반트에 결합되는 항원의 흡착에 영향을 줄 것이다. 알루미늄 아주반트의 표면 전하를 정량하는데 사용되는 한 파라미터는 영전하점 (PZC)이며, 이는 입자의 제타 전위가 0인 pH이다. PZC는 당업계에 공지된 표준 방법을

이용하여 측정한다.

[0069] 일반적으로, 아주반트 PZC는 4.2 내지 6.9이고, 특정 바람직한 실시양태에서 PZC 값은 약 4.7 내지 6.4이다. 본 발명의 한 특히 바람직한 실시양태는 4.7 내지 5.4의 PZC를 초래한다.

[0070] 입자 크기

[0071] 아주반트 응집체 입자 크기는 백신 제품에서 중요할 수 있다. 예를 들어, 응집체 입자 크기는 세포 흡수에 영향을 주고, 또한 면역원성 반응에 영향을 줄 수 있으나, 이러한 효과는 마찬가지로 항원에 따라 달라진다. 본 발명의 특정 적용에서, 표적 응집체 입자 크기는 2-10 μm , 더 바람직하게는 3-6 μm 이다.

[0072] 포스페이트/알루미늄 몰비

[0073] 아주반트 고체 중 포스페이트 대 알루미늄의 몰비 (P/Al 몰비)는 아주반트의 조성을 정의하고, 대부분의 물리적 특징, 예컨대 PZC 및 1차 입자 모양/크기에 영향을 준다. 특히, 아주반트의 PZC에 대한 효과는 항원의 결합 특성에 영향을 줄 수 있다. P/Al 비는 또한 알루미늄 고체에 배위되는 히드록실의 양과 연관된다. 포스페이트의 비가 증가함에 따라, Al에 결합된 히드록실의 양은 감소될 것으로 예상된다. 일반적으로, 본원에 기재되는 방법을 이용했을 때, P/Al 몰비는 0.6 내지 1.2이다. 본 발명의 한 실시양태는 0.8 내지 1.2, 바람직하게는 0.9 내지 1.1의 P/Al 몰비를 목표로 한다. P/Al 비는, 상기 논의된 바와 같이 반응물 조건을 조정하여 특정 적용에 적합하도록 변화시킬 수 있다.

[0074] 항원 흡착

[0075] 본 발명의 알루미늄 포스페이트 아주반트를 1종 이상의 활성제, 예를 들어 항원 및 또한 부가적 아주반트와 조합할 수 있다. 한 실시양태에서, 백신 제제화 공정 동안 특정 활성제와 혼화성인 완충 시스템의 존재하에서 활성제를 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트와 혼합하고 가능하게는 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트 상에 흡착시킨다. 활성제를 흡착시키는 것에 대한 추가적 지침은 미국 특허 3,925,545 및 4,016,252 및 문헌 [Relyveld, 1986, Dev Biol Stand 65:131-136]에서 확인할 수 있다.

[0076] 활성제가 항원인 경우, 항원은 바람직하게는 단백질 항원 또는 사카라이드 항원 (임의로 접합됨)이다. 바람직한 항원에는, 비제한적으로 아래 박테리아의 항원이 포함된다: 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 보르데텔라 페르투스(*Bordetella pertussis*), 클라미디아 뉴모니아에(*Chlamydia pneumoniae*), 클라미디아 트라코니아티스(*Chlamydia trachoniatis*), 헤모필루스 인플루엔자 B(*Haemophilus influenzae B*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), N. 고노레아에(*N. gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) (B형 연쇄상구균), 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) (A형 연쇄상구균) 및 스트렙토코쿠스 뉴모니아에. 바람직한 항원에는 또한, 비제한적으로, 아래 바이러스의 항원이 포함된다: 플라비바이러스 (예컨대, 황열 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 탱기 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스로부터의 것), A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 유두종바이러스, 파르보바이러스 (예, 파르보바이러스 B19), 폴리오바이러스 (불활성화) 및 치쿤군야(Chikungunya) 바이러스. 바람직한 항원에는 또한 디프테리아 독소이드 및 파상풍 독소이드가 포함된다. 모든 항원은 당업계에 공지된 방법으로 다른 유기체에서 재조합적으로 생성될 수 있다.

[0077] 조성물 중 항원은 전형적으로 각각 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 존재할 것이다. 일반적으로, 임의의 주어진 항원의 농도는 그 항원에 대한 면역 반응을 유발하기에 충분한 것이다.

[0078] 사카라이드 또는 탄수화물 항원이 사용되는 경우, 이는 면역원성을 증강시키기 위해 담체 단백질에 바람직하게 접합된다. 바람직한 담체 단백질은 박테리아성 독소 또는 독소이드, 예컨대 디프테리아 또는 파상풍 독소이드이다. CRM₁₉₇ 디프테리아 독소이드가 특히 바람직하다. 다른 적합한 담체 단백질에는 네이세리아 메닝기티데스 외부 막 단백질, 보르데텔라 페르투스 단백질, H. 인플루엔자로부터의 단백질 D, C. 디피실레(*C. difficile*)로부터의 독소 A 또는 B 등이 포함된다.

[0079] 백신 조성물

[0080] 본 발명의 방법으로 제조되는 알루미늄 히드록시포스페이트 아주반트는, 당업계에서 널리 공지된 실시 및 조성물에 따라 백신을 제제화하기 위해 그대로 또는 항원에 흡착시켜 사용할 수 있다.

[0081] 백신 조성물의 제제화는 일반적으로 당업계에 공지되어 있고, 편의상 문헌 [Remington's Pharmaceutical

Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, USA]을 참조할 수 있다.

실시예

실시예 1

바람직한 알루미늄 포스페이트 아주반트 특성을 초래하는 반응 조건을 확인하기 위한 실험실 규모에서의 알루미늄 포스페이트 "반응 공간" 스크리닝

반응 공간을 스크리닝하고 어떠한 반응 조건이 바람직한 알루미늄 포스페이트 아주반트 특성을 야기하는지 이해하기 위해 알루미늄 포스페이트 아주반트의 다수의 샘플을 실험실 규모로 공동-혼합식 방법으로 제조했다. 샘플을 모두 동일한 경우로 제조하지는 않았다. 샘플 사이에 변화시킨 주요 변수는 1) 두 반응물 용액 (인산나트륨 용액 및 염화알루미늄 6수화물 용액)의 초기 포스페이트/알루미늄 (P/Al) 몰비, 및 2) 인산나트륨 반응물 용액의 pH이었다. (아래 기재되는 바와 같이, 제법의 다른 상세사항은 제법마다 약간 달랐으나, 이러한 차이는 보다 적은 중요성을 갖는 것으로 고려했고, 상이한 경우로 제조된 샘플로부터의 결과는 분석 동안 모두 단일 군으로 고려했다).

샘플의 분석은 1) 완충제 교환 후, 오토클레이빙 전 pH의 측정; 2) 완충제 교환 후, 오토클레이빙 후 pH의 측정; 3) 완충제 교환 후, 오토클레이빙 전 제타 전위 영전하점 (PZC); 4) 완충제 교환 후, 오토클레이빙 후 제타 전위 영전하점; 5) ICP (유도 결합 플라즈마 원자 방출 분광분석)에 의한 침전된 고체 중 P/Al 몰비를 포함했다. (ICP에 의해 측정된 샘플의 대부분 또는 전체는 완충제 교환 후, 오토클레이빙 후였다.) 샘플 모두를 상기 다섯 가지 방법 모두로 분석하지는 않았다.

표 1

침전 반응 공간을 스크리닝하기 위해 제조된 알루미늄 포스페이트 아주반트의 실험실-규모 제법.

샘플 세트	반응물 용액의 초기 P/Al 몰비	인산나트륨 반응물 용액의 pH	완충제 교환 후, 오토클레이빙 전 pH	완충제 교환 후, 오토클레이빙 후 pH	완충제 교환 후, 오토클레이빙 전 PZC	완충제 교환 후, 오토클레이빙 후 PZC	침전된 고체 중 P/Al 몰비
A	1.50	12.28	7.24		5.00	4.90	0.72
A	1.75	12.33	7.96		4.97	4.94	0.63
A	2.00	12.38	8.45		5.24	5.13	0.51
A	2.50	8.97	5.56	5.04	6.03	5.57	0.88
A	2.75	8.96	5.88	5.39	5.89	5.36	0.84
A	3.00	8.96	6.02	5.56	5.80	5.25	0.86
A	3.20	8.95	6.10	5.66	5.73	5.22	0.89
A	1.40	11.39	5.21		6.21	5.81	0.90
A	1.70	11.38	6.13		5.68	5.29	0.86
A	2.40	11.34	6.83		5.21	4.98	0.83
A	2.70	11.32	7.17		4.98	4.83	0.80
B	3.00	7.4 [†] (7.40) [‡]	5.63	5.12	6.05	5.41	0.94
B	3.00	8.2 [†] (8.23) [‡]	6.00	5.53	5.83	5.28	1.00

B	3.00	9.0 [†] (8.99) [‡]	6.02	5.62	5.85	5.22	1.01
B	3.50	7.4 [†] (7.40) [‡]	5.83	5.38	5.94	5.30	1.03
B	3.50	8.2 [†] (8.24) [‡]	6.13	5.76	5.81	5.20	0.85
B	3.50	9.0 [†] (8.95) [‡]	6.17	5.81	5.81	5.18	0.98
B	4.00	7.4 [†] (7.41) [‡]	6.06	5.67	5.86	5.24	1.01
B	4.00	8.2 [†] (8.24) [‡]	6.20	5.83	5.77	5.19	1.00
B	4.00	9.0 [†] (8.95) [‡]	6.27	5.89	5.71	5.15	0.96
B	2.50	9.0 [†] (8.98) [‡]	5.51	5.00	6.07	5.57	1.00
B	3.00	9.8 [†] (9.91) [‡]	6.01	5.59	5.87	5.33	0.87
C	1.80	9.00	4.02	2.90			0.97
C	2.00	8.99	4.18	3.17			1.01
C	2.20	8.98	4.96	4.12		6.25	1.00
C	2.50	8.97	5.56	4.88		5.77	1.00
D	1.00	12.18	4.92	4.18			0.81
D	1.20	12.22	5.91	5.56			0.72
D	2.00	11.36	6.06	5.71			0.81
E	2.20	8.98	4.82				0.93
E	2.20	8.98	4.83				0.93
E	2.20	8.98	4.82				0.95
E	2.20	8.98	4.82				0.95
E	2.20	8.98	4.80				0.97

[†]표적 값, 아래 도 1-5에 사용됨.

[‡]측정된 값.

[0088]

[0089]

반응 공간 및 알루미늄 포스페이트 아주반트에서 목적하는 특성을 달성하는 방법을 이해하기 위한 목적으로, 수학적으로 계산된 표면을 사용하여 피팅하여 데이터를 시각화하고 컨투어 플롯으로 나타내는 것이 편리했다 (도 1-5 참고).

[0090]

각각의 5개의 샘플 세트 (A, B, C, D 및 E)에 대한 제법 상세사항은 다음과 같다.

[0091]

세트 A

[0092]

혼합 후 알루미늄의 최종 농도가 1.8 mg의 알루미늄/mL가 되도록, 세트 A 샘플을, 동등한 부피의 염화알루미늄 6수화물 용액 및 인산나트륨 용액을 혼합하여 제조했다. 이에 염화알루미늄 6수화물로부터 3.6 mg/mL 알루미늄 용액의 제조가 요구되었다. (알루미늄은 26.98 g/mol이고, 염화알루미늄 6수화물은 241.43 g/mol이다). 염화알루미늄 6수화물 용액은 먼저 115.99 g의 염화알루미늄 6수화물을 물 중에 용해시킨 후 (알루미늄이 12.96 mg/mL인 용액을 생성함), 278 mL의 상기 용액과 722 mL의 물을 혼합하여 3.6 mg/mL의 알루미늄 용액 1 L를 제공하여 제조했다. 염화알루미늄 6수화물 용액은 모든 11개의 샘플에 있어서 동일했으나, 인산나트륨 용액은 모든 11개의 샘플에 있어서 상이했다. 인산나트륨 용액은 이염기성 인산나트륨 및 삼염기성 인산나트륨의 더욱 농축된 원액의 희석물 및 혼합물을 제조하여 제작했다. 이염기성 인산나트륨 원액은 0.5 M이었다. 샘플의 일부에 사용된 삼염기성 인산나트륨 용액은 0.25 M이었고, 샘플 중 다른 것에 대해서는 0.333 M인 삼염기성 인산나트륨의 상이한 원액이 사용되었다. 70 mL의 각각의 11개의 상이한 포스페이트 용액을 아래 표에 기재된 바와 같이 제조했다.

표 2

샘플 세트 "A"에 대한 제법 상세사항.

반응물 용액에 대한 P:AI의 표적 몰비	포스페이트 반응물 용액에 대한 포스페이트의 표적 농도 (M)	삼염기성 인산나트륨 으로부터의 농도 (M)에 대한 기여	이염기성 인산나트륨 으로부터의 농도 (M)에 대한 기여	삼염기성 인산나트륨 원액의 농도 (M)	이염기성 인산나트륨 원액의 농도 (M)	삼염기성 인산나트륨 부피 (mL)	이염기성 인산나트륨 원액의 부피 (mL)	물의 부피 (mL)
1.5	0.200	0.200	0	0.25		56.0	0	14.0
1.75	0.233	0.233	0	0.25		65.4	0	4.6
2	0.267	0.267	0	0.3333		56.0	0	14.0
2.5	0.334	0	0.334		0.5	0	46.7	23.3
2.75	0.367	0	0.367		0.5	0	51.4	18.6
3	0.400	0	0.400		0.5	0	56.0	14.0
3.2	0.427	0	0.427		0.5	0	59.8	10.2
1.4	0.187	0.093	0.093	0.25	0.5	26.2	13.1	30.8
1.7	0.227	0.113	0.113	0.25	0.5	31.8	15.9	22.4
2.4	0.320	0.160	0.160	0.25	0.5	44.8	22.4	2.8
2.7	0.360	0.180	0.180	0.3333	0.5	37.8	25.2	7.0

[0093]

[0094]

염화알루미늄 6수화물 용액을 60 mL 1회용 플라스틱 주사기로 빨아들였다. 인산나트륨 용액을 상이한 60 mL 1회용 플라스틱 주사기로 빨아들였다. 짧은 길이의 실리콘 배관을 각각의 주사기 말단에 부착했다. 각각의 배관의 다른 말단에 짧은 플라스틱 정적 인라인 혼합기 (콘프로텍(Conprotec) MB6.5-16S)의 상부에 있는 두 주입구 중 어느 하나에 부착시켰다. 인라인 혼합기를 통해 통과시킨 후, 혼합물을 비커에 수집하고 이를 자석 교반 막대로 교반했다. 두 개의 60 mL 주사기를, 2개의 주사기를 수용하며 두 주사기 플런저를 움직이는 단일 금속 막대를 사용하여 동일한 속도로 누르는 주사기 펌프 상에 위치시켜, 동일한 1:1 부피비로 배출시켰다. 각 주사기에 60 mL가 있으므로, 혼합물의 최종 부피는 120 mL이었다. 주사기의 내용물을 정적 인라인 혼합기를 통해 혼합하여 6분 미만 내에 교반되는 비커에 넣었다.

[0095]

실험실 규모 완충제 교환 공정은, 약 1 L의 0.9% 염화나트륨 용액을 약 100 mL의 침전된 알루미늄 아주반트에 첨가하고 수동으로 혼합하여 알루미늄 아주반트를 재현탁시킴으로써 고체를 침전시키고 (종종 밤새), 약 1 L의 상청액을 제거하고 (알루미늄 아주반트 고체는 남기고), 상기 공정을 수회 반복하여 수행했다. 5회의 이러한 "침전/경사분리" 절차를 대략 1주일에 걸쳐 수행하여 샘플을 0.9% 염화나트륨 용액으로 완충제 교환했다.

[0096]

완충제 교환 후, 오토클레이빙 전 및 후에 샘플에서 측정할 수 있도록 각 샘플을 두 분취량으로 나누었다. 오토클레이빙에는 60분 동안 121°C에서의 액체 사이클이 이용되었다.

[0097]

세트 B

[0098]

세트 B 샘플을 세트 A 샘플과 유사한 (그러나 동일하지 않은) 방식으로 제조했다. 세트 A 샘플에 있어서 사용한 것과 동일한 염화알루미늄 6수화물 원액을 세트 B 샘플에 있어서 사용했다. 이를 동일한 방식으로 희석시켰다. 0.6 M 이염기성 인산나트륨 및 0.6 M 일염기성 인산나트륨의 원액을 제조했다. 이염기성 인산나트륨 (FW 141.96 g/mol)에 있어서, 85.172 g을 1 L의 물에 용해시키고, 개별적으로 42.591 g을 0.5 L의 물에 용해시켜 0.6 M의 두 용액을 제공했다. 일염기성 인산나트륨 1수화물 (FW 137.99)에 있어서, 82.793 g을 물에 용해시켜 0.6 M의 용액을 제공했다. 포스페이트 완충제에 있어서 4개의 pH 표적은 9.0, 8.2, 7.4 및 9.8이었다. pH 9 표적은 이염기성 인산나트륨 용액만을 사용하여 도달했고, 이는 8.95-8.99의 측정된 pH를 제공했다. 8.2 및 7.4의 pH 표적은 0.6 M 일염기성 인산나트륨을 0.6 M 이염기성 인산나트륨에 첨가하여 달성했다. 9.8의 pH 표적은 0.6 M 이염기성 인산나트륨 용액에서 출발하여 적은 부피 (~2%, 적은 포스페이트 희석은 무시함)의 1 N 수산화나트륨 용액을 첨가하여 달성했다. pH 조정된 0.6 M 인산나트륨 원액을 사용하여 11개의 상이한 포스페이트 용액 (각각 140 mL의 부피를 가짐)을, 아래 표에 기재한 바와 같이 물로 희석하여 제조했다.

표 3

샘플 세트 "B"에 대한 제법 상세사항

반응물 용액에 대한 P:Al의 표적 몰비	포스페이트 반응물 용액에 대한 표적 pH	pH-조정된 0.6M 인산나트륨의 부피	물의 부피	인산나트륨 반응물 용액의 생성 농도 (M)
3.00	7.4	93.4	46.6	0.400
3.00	8.2	93.4	46.6	0.400
3.00	9.0	93.4	46.6	0.400
3.50	7.4	109.0	31.0	0.467
3.50	8.2	109.0	31.0	0.467
3.50	9.0	109.0	31.0	0.467
4.00	7.4	124.5	15.5	0.534
4.00	8.2	124.5	15.5	0.534
4.00	9.0	124.5	15.5	0.534
2.50	9.0	77.8	62.2	0.333
3.00	9.8	93.4	46.6	0.400

[0099]

[0100] 세트 A의 샘플에 있어서, 두 반응물 용액을 60 mL 주사기로 빨아들이고, 반응 비커 안으로 동일한 속도로 1:1 부피비로 배출시켰다. 세트 B에 대한 반응은 "T" 또는 정적 인라인 혼합기를 사용하지 않는다는 점에서 세트 A와 상이하다. 짧은 길이의 실리콘 배관을 각각의 반응물 용액 주사기 말단에 부착했고, 두 반응물 용액을 비커에 적가하여 공동-혼합을 달성했다. 비커 안에는 자석 교반막대가 있고, 이는 반응물이 비커에 첨가되는 동안, 그리고 그 이후 짧은 시간 (수 분) 동안 혼합을 제공했다. 각 샘플에 있어서, 반응물 용액 주사기에 2회 적재하고 배출시켰는데, 이는 샘플 세트 A에서 제조된 것에 비해 제조된 부피를 두 배로 만든다.

[0101] 0.9% 염수 용액으로의 완충제 교환은, 6회의 "침전/경사분리"를 실시한 것을 제외하고는, 세트 A 샘플에서 실시한 것과 유사한 방식으로 수행했다. 완충제 교환 후, 오토클레이빙 전 및 후에 샘플에서 측정할 수 있도록 각 샘플을 두 분취량으로 나누었다. 오토클레이빙에는 60분 동안 121°C에서의 액체 사이클이 이용되었다.

[0102] 세트 C

[0103] 염화알루미늄 6수화물 (FW 241.43 g/mol)의 단일 용액을, 19.33 g을 600 mL의 물 중에 용해시켜 제조했다. 이는 3.6 g 알루미늄/mL 농도의 용액을 초래했다. 이염기성 인산나트륨 (FW 141.98 g/mol)의 4개의 용액을, 이염기성 인산나트륨의 4가지 상이한 농도로, 그러나 pH 조정없이 제조했다. 생성된 4개의 이염기성 인산나트륨 용액의 pH는 모두 9.00-8.97 범위 내로 측정되었다. 포스페이트 용액을 아래 표에 기재한 바와 같이 제조했다.

표 4

샘플 세트 "C"를 제조하는데 사용되는 포스페이트 용액

반응물 용액에 대한 P:Al의 표적 몰비	150 mL 물 중에 용해된 이염기성 인산나트륨의 양
1.8	5.1223 그램
2.0	5.6858 그램
2.2	6.2549 그램
2.5	7.1087 그램

[0104]

[0105] 두 반응물 용액을 60 mL 주사기에 적재했다. 샘플 세트 A의 경우에서와 같이, 혼합물을 교반되는 비커 안으로 적가하기 전에, 반응물 용액을 소형 플라스틱 정적 인라인 혼합기를 통해 흐르게 했다. 샘플 세트 B의 경우에서와 같이, 각각의 4개의 샘플에 있어서, 반응물 주사기에 2회 적재하고 배출하여 약 220 mL의 각각의 4개의 샘플을 제조했다. 유량은 두 주사기에 있어서 1 mL/초였다 (0.5 mL/초/주사기). 두번째 쌍의 반응물 주사기를 배출시킨 후 빠른 교반을 5분 동안 계속했다. 완충제 교환은 4 사이클의 침전/경사분리를 포함했고, 1.8 mg 알루미늄/mL에서 0.9 mg 알루미늄/mL로의 아주반트에 대한 희석 단계를 포함했다. 오토클레이빙 전에 샘플을 측정했고, 60분 동안 121°C에서 액체 사이클을 이용한 오토클레이빙 후에 측정했다.

[0106] 세트 D

[0107] 염화알루미늄 6수화물 (FW 241.43 g/mol)의 단일 용액을, 16.1054 g을 1 L의 물 중에 용해시켜 제조했다. 이로써 1.8 g 알루미늄/mL의 농도를 가지는 용액이 생성되었다. 이염기성 인산나트륨 (FW 141.96 g/mol)의 원액 (0.5 M)을, 70.98 g 이염기성 인산나트륨을 1 L의 물 중에 용해시켜 제조했다. 삼염기성 인산나트륨 12수화물

(FW 380.13)의 원액 (0.25 M)을, 95.03 g을 1 L의 물 중에 용해시켜 제조했다. 인산나트륨 반응물 용액을 제조하기 위해, 인산나트륨 원액을 아래 표에 나타난 바와 같이 희석하고 조합했다.

표 5

샘플 세트 "D"에 대한 제법 상세사항

반응물 용액에 대한 P/Al의 표적 몰비	염화알루미늄 반응물 용액 중 알루미늄의 농도	포스페이트 반응물 용액 중 삼염기성 인산나트륨의 농도 (mM)	포스페이트 반응물 용액 중 이염기성 인산나트륨의 농도 (mM)
1.00	66.7 mM	66.7 mM	0 mM
1.20	66.7 mM	80 mM	0 mM
2.00	66.7 mM	66.7 mM	66.7 mM

반응이 상기한 바와 유사한 방식으로 이루어졌다. 반응물의 농도는 샘플 세트 A, B 및 C에서 사용된 것의 절반이었다. 0.9% 염수로 완충제를 교환하는 동안 4회의 침전/경사분리를 수행했다. 각 회의 침전/경사분리는 50 mL의 침전된 알루미늄 아주반트 현탁액을 약 1 L의 0.9% 염수로 희석시키고, 혼합하고, 현탁액이 침전될 때까지 기다린 후, 약 1 L의 맑은 상청액을 제거하는 것을 포함했다. 샘플 세트 D의 완충제 교환은 실온에서 1개월 초과의 기간에 걸쳐 실시했다. 오토클레이빙에는 60분 동안 121°C에서의 액체 사이클이 이용되었다.

세트 E

공동-혼합식 방법에 의한 알루미늄 포스페이트 아주반트 침전 반응을 동일한 표적 반응 파라미터를 가지고 독립적으로 5시간 동안 수행했다. 반응물 용액의 포스페이트/알루미늄 몰비는 2.2이었고, 포스페이트 용액은 이염기성 인산나트륨, pH 9 (조정하지 않음)이었다. 염화알루미늄 반응물 용액 중 알루미늄의 표적 농도는 1.8 mg 알루미늄/mL이었다. 아래 표에는 5개의 염화알루미늄 6수화물 반응물 용액 및 5개의 이염기성 인산나트륨 반응물 용액을 제조한 방법을 기재했다.

표 6

샘플 세트 "E"에 대한 제법의 상세사항.

포스페이트 반응물 용액을 제조하기 위해 1 L의 물 중에 용해시킨 이염기성 인산나트륨 (FW 141.96 g/mol)의 그램수	알루미늄 반응물 용액을 제조하기 위해 600 mL의 물 중에 용해시킨 염화알루미늄 6수화물 (FW 241.43 g/mol)의 그램수
20.8470	9.6752
20.8316	9.6791
20.8484	9.6655
20.8420	9.6684
20.8308	9.6598

60 mL 주사기에 반응물 용액을 적재하고, 소형 플라스틱 정적 인라인 혼합기를 통해 빠르게 교반되는 용기 안으로 공동-혼합했다. 용기 안으로의 총 유량은 1 mL/초이었다. 교반은 첨가가 완결된 후 5분 동안 계속했다. 완충제 교환은 샘플 세트 A, B, C 및 D에 있어서 실시한 것과 유사했다. 오토클레이빙에는 60분 동안 다른 샘플 세트보다 2°C 높은 평균 123°C에서의 액체 사이클이 이용되었다.

요약하면, 침전 반응을 위해 이러한 실험실 규모 반응 공간 스크리닝 동안 적용되는 일반적 절차는 염화알루미늄 6수화물 용액 (1.8 mg/mL 내지 3.6 mg/mL)과 1:1 부피의 인산나트륨 용액의 공동-혼합이었다. 알루미늄 반응물 용액 중 알루미늄에 대한 포스페이트 반응물 용액 중 포스페이트의 몰비는 1.0 내지 4.0 범위였다. 인산나트륨 용액의 pH는 >12 내지 7.4 범위였다. 포스페이트 용액을 개별 인산나트륨 화합물 (이염기성 인산나트륨, 삼염기성 인산나트륨)로부터, 또는 인산나트륨 화합물의 혼합물 (일염기성 인산나트륨 + 이염기성 인산나트륨, 이염기성 인산나트륨 + 삼염기성 인산나트륨)로부터, 또는 부가적 염기 (수산화나트륨)가 첨가된 인산나트륨 화합물로부터 제조했다. 공동-혼합을 두 반응물 스트림에 함께 실시하거나 (즉, 정적 인라인 혼합기를 통해), 두 반응물 스트림에 직접 함께 실시하지는 않지만 이를 동일한 교반되는 용기에 개별적으로 첨가하여, 반응물을 공동-혼합했다. 0.9% 염화나트륨으로의 완충제 교환은 상이한 횟수의 "침전/경사분리"에 의해 달성되었다. 샘플을 오토클레이빙 전 및 후 모두에서 분석했다. 오토클레이빙 시, 조건은 121-123°C의 평균 온도에서 60분이었다.

- [0115] 스테인레스강 프로브를 사용하여 IQ240 pH 측정기 상에서 pH를 측정했다. 일반적으로, 2개의 상이한 측정기/프로브를 사용하여 pH를 2회 측정하고, 두 pH 측정의 평균을 보고했다.
- [0116] 알루미늄 함유 아주반트를 대략 20 mM 트리스:아세테이트 완충제 중 대략 15 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석시켜 PZC를 측정했다. 여러 별도의 트리스:아세테이트 완충제를 트리스:아세테이트 완충제를 사용하여, 전형적으로 1.0 pH 유닛의 증분으로, 4.0-8.0의 pH 범위를 커버했다. 그 후, 제타 전위를 제타사이저(Zetasizer) 기구를 사용하여 측정했다. 데이터는 pH (x-축) 대 제타 전위 (y-축)로 플롯팅했고, 영전하점을 제공하는 x 절편을 계산했다.
- [0117] 알루미늄 함유 아주반트의 상청액 및 고체 분획 모두에서 ICP를 측정하여 인 및 알루미늄 농도를 수득했다. 10 mL의 각 샘플을 15 mL 원뿔형 튜브에 넣고, 대략 2000 rcf로 원심분리했다. 상청액을 제거해내어 인 및 알루미늄 농도에 대해 시험했다. 그 후, 알루미늄 함유 아주반트의 펠릿을 10 mL로 0.9% 염화나트륨 용액을 사용하여 재현탁시키고, 인 및 알루미늄 농도에 대해 시험했다. 반응이 완결될 것인지 확인하고 용액 중 과량의 포스페이트의 양을 확인하기 위해 상청액 농도를 사용했다. 특정 반응 조건으로부터 초래된 고체 중 P/Al (포스페이트 대 알루미늄) 물비를 계산하기 위해 펠릿 분석을 이용했다.
- [0118] 도 1-5는 컨투어가 데이터에 피팅된 표면으로부터 생성된 반응 공간 플롯이다. 다수의 샘플로부터의 결과를 기초로, 이러한 플롯은 두 반응 파라미터 (반응물 용액의 포스페이트:알루미늄 물비 및 포스페이트-함유 용액의 pH)의 함수로서 pH, PZC 및 P/Al 비에 대한 예측 값을 나타낸다. 이러한 플롯은 본 발명의 방법으로 제조되는 알루미늄 아주반트의 표적 특성을 달성하는 방법의 예측을 가능하게 하고, 제조 공정의 스케일-업 시에 가이드 역할을 한다. 실험실 규모 작업은 알루미늄 포스페이트 제조의 이러한 방법이 제조 설정을 설계 및 제어하는데 잘 적합될 것임을 시사했다.
- [0119] **실시예 2**
- [0120] **공동-혼합에 의해 또는 배치식 침전 방법에 의해 제조된 알루미늄 포스페이트 아주반트의 비교**
- [0121] 공동-혼합은 알루미늄 포스페이트 아주반트의 배치식 침전에 비해 특정한 이론적 장점을 가진다. 배치식 공정과 비교하여 어떠한 차이가 있는지 이해하기 위해, 공동-혼합과 배치식 침전 방법 사이의 실험실-규모 비교 연구를 수행했다.
- [0122] 알루미늄 포스페이트의 6개의 샘플을 공동-혼합식 방법으로 제조했고, 6개의 샘플은 배치식 방법으로 제조했다. 배치식 방법은 염화알루미늄 반응물 용액 모두를 혼합 용기에 채우고, 경시적으로 인산나트륨 반응물 용액을 용기에 첨가하는 것을 포함했다. 비교의 유효성을 보장하기 위해 여러 예방책을 취했다. 이는 동일한 경우로 상응하는 "공동-혼합" 및 "배치" 샘플을 제조하고, 동일한 시약을 사용하여 샘플을 제조하고, 동일한 장비를 사용하여 샘플을 제조하고, 샘플의 두 세트의 분석을 동일한 경우로 동일한 기구 및 방법을 사용하여 수행하는 것을 포함했다.
- [0123] 알루미늄 반응물 용액을, 물 중 염화알루미늄 6수화물 (37.58 g 염화알루미늄 6수화물/리터)을 용해시켜 4.2 g 알루미늄/mL로 제조했다. 반응물 용액에 대한 포스페이트 대 알루미늄의 표적 물비는 3:1이었다. 포스페이트 반응물 용액의 표적 pH는 8.0이었다. 표적 물비 및 pH를 달성하기 위해, 0.467 M 이염기성 인산나트륨 (66.3 g/리터) 및 0.467 M 일염기성 인산나트륨 1수화물 (64.4 g/리터)의 용액을 제조했다. pH 측정기로 pH를 모니터링하는 동안, pH 8.0에 도달할 때까지 보다 작은 부피의 일염기성 인산나트륨 용액을 보다 큰 부피의 이염기성 인산나트륨 용액에 첨가했다. 일염기성 인산나트륨 용액은 포스페이트 반응물 용액의 최종 부피의 약 5% 미만으로 기여했다. 알루미늄 및 포스페이트 반응물 용액의 1:1 부피비로 반응시킨 후, 알루미늄 포스페이트 아주반트 현탁액 중 알루미늄의 최종 농도는 2.1 g 알루미늄/mL이었다.
- [0124] 공동-혼합식 방법으로 샘플을 제조하기 위해, 동일한 유량으로 동작하는 두 연동 펌프를 사용하여 시약 용액을 2 L 비커로 전달했고, 이를 7.2 cm 교반 막대를 사용하여 중간 속도로 교반했다. 각 펌프의 유량은 10.7 mL/min이었고, 펌핑을 20분 동안 작동하여 (계속 교반하면서), 약 428 mL의 아주반트 현탁액을 생성했다. 펌핑을 정지한 후 약 10분 동안 교반을 계속했다.
- [0125] 배치식 침전 방법으로 샘플을 제조하기 위해, 공동-혼합식 방법에 가한 한 가지 개질은, 20분에 걸쳐 분배했을 염화알루미늄 용액의 전체 부피 (214 mL)를 동작 시작 시 비커에 첨가한 것이었고, 인산나트륨 용액을 전달하는 펌프만 20분의 분배 시간 동안 동작시킨 것이다. 상기한 바와 같이 펌핑 완결 후에도 약 10분 동안 혼합을 계속했다.
- [0126] "공동-혼합" 및 "배치" 제조 방법 샘플 둘 다를, 염수 중 재현탁, 알루미늄 아주반트 고체의 침전 및 고체-무함

유 상청액의 제거 ("침전/경사분리")의 반복된 사이클을 통해 0.9% 염화나트륨 용액으로 완충제 교환했다. 오토클레이빙 전 및 후에 샘플을 측정했다. 오토클레이빙은 121℃에서 1시간 동안 액체 사이클을 사용하는 본원의 전형적 실험실-규모 조건을 따랐다.

[0127] 생성된 12개의 샘플 (6개의 공동-혼합, 6개의 배치)을 pH, 제타 전위 PZC 및 최종 P/AI 비에 대해 분석하여 각 방법의 일관성 및 두 방법의 차이점에 대해 특징규명했다. 각 방법으로부터의 평균 결과의 표준 편차를 비교함으로써 보여지는 바와 같이, 공동-혼합식 방법은 시험한 배치식 방법에 비해 일관성 장점을 가지는 것으로 보인다.

표 7

공동-혼합 및 배치 샘플에 대한 pH 측정, 평균 $\pm$ 표준 편차.

	완충제 교환 전	완충제 교환 후, 오토클레이빙하지 않음	완충제 교환 후 및 오토클레이빙 후
배치식 방법	6.23 ± 0.04	5.85 ± 0.15	5.24 ± 0.16
공동-혼합식 방법	5.97 ± 0.03	5.91 ± 0.02	5.41 ± 0.05
N=	5	6	6

[0128]

[0129] 도 6은 배치 및 공동-혼합 샘플에 대한 pH 측정의 도해적 비교이다. 배치식 방법으로 제조된 샘플의 pH는 공동-혼합된 샘플에 비해 훨씬 큰 정도로, 제조와 오토클레이빙 사이에 하향하는 것으로 확인되었다. 따라서, 공동-혼합식 방법을 이용했을 때 pH 안정성 및 pH 일관성 장점 모두가 나타나는 것으로 보인다.

[0130] 12개 샘플의 제타 전위 PZC를 오토클레이빙 전 및 후에 측정했다. pH에 대한 경우와 마찬가지로, 공동-혼합식 방법으로 제조된 샘플은 배치식 방법으로 제조한 것보다 일관적이었다.

[0131] 도 7a-b는 배치 및 공동-혼합 샘플에 대한, 각 방법으로부터 수득된 결과에 대한 평균 및 표준 편차를 비롯한, 제타 전위 PZC (영전하점) 측정의 도해적 비교이다.

[0132] 침전된 고체 중 인 대 알루미늄의 몰비는, 공동-혼합 샘플에 있어서 배치 샘플에 있어서 오토클레이빙 시에 보다 큰 변화를 가진다. 공동-혼합 샘플은 이러한 검정의 측정을 통해 약간 더 일관적인 것으로 보인다. 표 8에는 각 방법에 의한 6개의 샘플로부터의 평균 P/AI 몰비, $\pm$ 표준 편차를 기재한다.

표 8

상이한 방법으로 제조된 알루미늄 포스페이트 고체의 P/AI 몰비.

	완충제 교환 후, 오토클레이빙 전	완충제 교환 후, 오토클레이빙 후
배치식 방법	1.03 ± 0.04	0.85 ± 0.06
공동-혼합식 방법	1.03 ± 0.03	0.94 ± 0.01
N=	6	6

[0133]

[0134] 이러한 실험실-규모 비교로부터의 데이터는, 침전된 고체 중 일관된 pH, PZC 및 P/AI 몰비를 가지는 알루미늄 포스페이트 아주반트를 제조하기 위해, 공동-혼합식 방법이 배치식 방법보다 우수하다는 발상을 지지한다.

[0135] 실시예 3

[0136] 파일럿-규모 알루미늄 포스페이트 아주반트 제조

[0137] 본 실시예는 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)의 작은 배치의 상용 제조를 위한 파일럿-규모 공정을 기재한다.

[0138] (1) 본 공정에서 사용되는 원료를 아래 표 9에 요약했다.

표 9

APA 제조에 사용되는 원료 및 용액

원료/용액	목적
염화알루미늄 (6수화물)	반응물
이염기성 인산나트륨 (무수물)	반응물
멸균 증류수	용매, 희석제
주사용수 (WFI)	UF 필터 플러싱
0.5 N 수산화나트륨	UF 필터 위생처리
0.9% 염화나트륨	정용여과 완충제

[0139]

[0140]

(2) 염화알루미늄 반응물 (156 mM Al)을 아래와 같이 제조했다. 3-인치 자석 교반 막대를 넣은 깨끗한 5 L 유리병을 자석 교반 플레이트가 장착된 벤치 탑 저울 상에서 칭량했다. 약 4000 g의 멸균 증류수를 병에 넣었다. 187.9 g의 염화알루미늄 (6수화물)의 표적을 용기에 채우고 고체가 용해될 때까지 혼합했다. 교반하는 동안, 5050 g의 표적 순 중량에 도달할 때까지 멸균 증류수를 첨가했다. 염화알루미늄 용액을 이후 가공 때까지 실온에서 저장했다.

[0141]

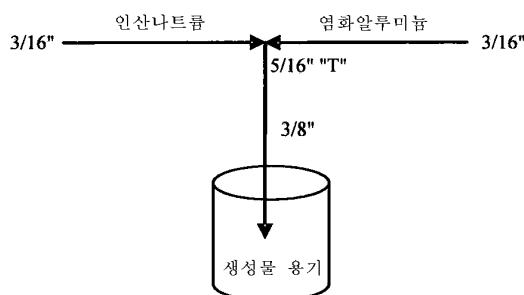
(3) 인산나트륨 반응물 (390 mM 포스페이트)을 아래와 같이 제조했다. 3-인치 자석 교반 막대를 넣은 깨끗한 10 L 유리병을 자석 교반 플레이트가 장착된 벤치 탑 저울 상에서 칭량했다. 약 5000 g의 멸균 증류수를 병에 넣었다. 331.5 g의 이염기성 인산나트륨 (무수물)의 목표를 용기에 채우고 고체가 용해될 때까지 혼합했다. 교반하는 동안, 6251 g의 목표 순 중량에 도달할 때까지 멸균 증류수를 첨가했다. 인산나트륨 용액을 밀리팩 (Millipak)-60 0.22 μ m 멸균 등급 필터를 통해 여과하여 미립자를 제거하고 낮은 바이오버든(bioburden)을 보장했다. 인산나트륨 용액을 이후 가공 때까지 실온에서 저장했다.

[0142]

(4) T-혼합 셋업을 아래 보여지는 바와 같이 두 길이의 3/16" 실리콘 배관 및 한 길이의 3/8" 실리콘 배관을 5/16" "T"에 연결하여 구성했다. 각 길이의 3/16" 배관을 적절한 크기의 연동 펌프를 통해 끼웠다. 3-인치 교반 막대를 넣은 깨끗한 10 L 유리 용기를 자석 교반 플레이트가 장착된 벤치 탑 저울 상에서 칭량했다. 아래 도식으로 보여지는 바와 같이 3/8" 배관의 배출구를 깨끗한 유리병 안으로 향하게 하고, 3/16" 배관 길이의 주입구는 염화알루미늄 및 인산나트륨 반응물 용액 안에 두었다.

[0143]

침전 T-혼합 구성



[0144]

[0145]

(5) 각각의 연동 펌프를 600 mL/min으로 설정하고, 라인을 5/16" "T"로 프라임 업(prime up)시켰다. 프라임의 완결 시, 두 펌프를 동시에 켜서 T-혼합 침전을 시작했다. 수집 용기 내 유체의 높이가 교반 막대 위로 올라가면, 수집 용기 내 혼합을 개시했다. 수집 용기가 7070 g의 표적 순 중량에 도달하면 펌프를 동시에 켜다. 침전 중간체를 약 10분 동안 T-혼합을 따라 혼합한 후, 다음 단계 이전에 샘플링했다.

[0146]

(6) 1.25" 직경 회전자 및 정사각형 구멍 고전단 고정자를 가지는 실버슨 L4RT-A 고전단 혼합기를 크기-감소 단계에 사용했다. 크기-감소 단계의 목적은 표적 크기 범위 내에서 일관되고 균일한 응집체 입자 크기를 보장하는 것이다. 크기 감소 단계는 8000 RPM의 혼합 속도로 120분 동안 실버슨 혼합기를 통해 생성물을 재순환시켜 수행했다. 생성물 용기 내 혼합은 공정에 걸쳐 교반 막대를 사용하여 유지했고, 실버슨 혼합기와 생성물 용기 사이의 모든 연결에 1/2" 실리콘 배관을 사용했다. 크기-감소된 중간체를 샘플링하고 이후 가공 때까지 2-8°C에서 저장했다.

[0147]

(7) 한외여과 (UF) 단계로 투입되는 크기-감소된 중간체의 순 중량은 6923 g이었다. 냉 저장으로부터 제거해낸

후, 생성물을 90분 동안 혼합하여 생성물을 재현탁시키고 실온으로 평형이 이루어지도록 했다. 밀리포어 펠리콘-2 미니홀더 필터 하우징 (카탈로그 번호 XX42PMINI) 및 0.2 m²의 총 필터 면적에 있어서 2 x 0.1 m² 밀리포어 300 kD 바이오맥스 PES 필터 (cat# P2B300V01)를 사용하여 UF 시스템을 설치했다. 3/4" 압력 게이지를 필터 홀더의 침투물, 공급물 및 보유물 포트에 설치하여 공정에 걸쳐 막간차압 (TMP) 및 압력 강하 (ΔP)를 모니터링했다. 3/4" 수동 보유물 제어 밸브를 보유물 압력 게이지의 하류에 설치했다. 적절한 크기의 위생 배관을 사용하여 필터 홀더를 생성물, 침투물, UF 완충제 및 플러시 용기에 필요에 따라 연결했다. 연동 펌프를 사용하여 공급물 유량 및 침투물 유량을 제어했다.

- [0148] (8) 인스톨한 후, UF 시스템을 표준 절차에 따라 WFI로 플러싱하고 시스템에 무결성 시험을 실시하여 시스템의 총 누출(gross leak)의 부재를 보장했다. 그 후, 필터를 0.5 N NaOH를 사용하여, 먼저 약 2 L를 약 1000 mL/min의 공급 유량 및 약 1 psig의 보유물 압력으로 보유물 및 투과물을 통과하여 플러싱시켜 위생처리했다. 그 다음, 또 다른 2 L를 약 1000 mL/min의 공급 유량 및 약 1 psig의 보유물 압력으로 30분 동안 보유물 및 투과물을 통과하여 재순환시켰다. 위생처리에 이어, 보유물 및 투과물 오수가 대략 중성 pH에 도달할 때까지 표준 절차를 이용하여 WFI로 필터를 다시 플러싱했다.
- [0149] (9) 필터 준비에 이어, 투과물을 수집 용기로 보내어 생성물을 약 2x로 농축시키고, 공급물 유량을 2400 mL/min으로, 투과물 유량을 83 mL/min으로 설정했다. 보유물 압력을 보유물 압력 제어 밸브를 사용하여 약 5 psig로 일관되게 제어했다. 농축 후, 시스템으로부터 투과물이 배출되는 것과 동일한 유량으로 생성물 용기에 UF 완충제 (0.9% 염화나트륨)를 첨가하기 시작하여 정용여과를 개시했다. 수집되는 투과물의 순 중량을 모니터링하고 적절한 중량에서 공정을 정지하여 6 디아볼륨 완충제 교환을 완결했다. 농축 및 정용여과에 걸쳐 교반 막대로 생성물 용기를 혼합했다.
- [0150] (10) 정용여과의 완결 시 UF 완충제 플러싱을 실시하여 필터로부터 생성물 정체를 회수했다. 이는 투과물 라인 클램프로 집어 놓고 약 1000 mL/min으로 생성물 용기 안으로 공급물/보유물을 통과해 1250 g의 새로운 0.9% 염화나트륨을 플러싱하여 실시했다. 샘플링하고 다음 단계로 진행하기 전에 정용여과한 생성물 중간체를 5분 동안 혼합했다. 정용여과한 중간체의 순 중량은 4265 g이었다.
- [0151] (11) 정용여과한 중간체를 재현탁시키고 증기 멸균을 위해 깨끗한 1 L 유리병에 200 mL 분취량으로 분배했다. 배치는 분배 단계로부터 병 당 약 200 mL 정용여과한 생성물의 21개 병을 제공했다.
- [0152] (12) 21 x 1 L 생성물 병을 123°C에서 62분 동안 "오픈 컨테이너" 증기 오토클레이브 사이클로 멸균했다. 생성물 병을 사이클의 완결 직후 오토클레이브로부터 제거하여 실온으로 평형이 이루어지도록 하고, 이어 2-8°C에서 저장했다.
- [0153] 파일럿 규모로 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 제조한 후, 재료를 여러 분석 방법으로 특징규명했다. 표 10은 이러한 결과의 요약이다.

표 10

파일럿-규모 APA의 특성

특성	방법	결과
알루미늄 농도	유도 결합 플라즈마 분광분석 (ICP)	알루미늄으로서 2.9 mg/mL
포스페이트 대 알루미늄 몰비 (P/Al, 아주반트 고체 단독)	ICP	1.02
pH	pH	5.39
영전하점 (PZC)	제타 전위	5.23
응집체 입자 크기	정적 광 산란 (SLS)에 의한 d(v,0.5)	3.97 μ m
유리 포스페이트	말라카이트 그린 포스페이트 검정	18.0 mM
염화나트륨	% 염화나트륨으로 전환한 질산은 적정에 의한 클로라이드	0.97%

- [0154]
- [0155] 모든 결과는 목적하는 범위 안에 있었다.
- [0156] 실시예 4

[0157] 상업적-규모 알루미늄 포스페이트 아주반트 제조

[0158] 본 실시예는 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)의 상용 제조를 위한 상업적-규모 방법을 기재한다.

[0159] (1) 본 방법에서 사용되는 원료를 아래 표 11에 요약했다.

표 11

APA 제조에 사용되는 원료 및 용액

원료/용액	목적
염화알루미늄 (6수화물)	반응물
이염기성 인산나트륨 (무수물)	반응물
주사용수 (WFI)	용매, 회석제, UF 필터 플러싱
염화나트륨	정용여과 완충제

[0160]

[0161] (2) 본 방법에 사용되는 주요 장비/재료를 표 12에 요약했다.

표 12

APA 제조에 사용되는 장비 및 재료

장비/재료	목적
Q-믹스 스테인레스강 용기 및 200 L와 1000 L 회용 백을 가지는 ATMI 뉴믹스 패드-드라이브 (Newmix Pad-Drive) 1000 혼합 시스템	반응물 및 UF 완충제 제조
유입 공기 필터 및 통기 필터를 가지는 제킷 250 L 탱크	생성물 용기, 계내 멸균
회전 엽 펌프	한외여과 동안 세순환 및 크기 감소
실버스 275UHS 고전단 혼합기	입자 크기 감소
밀리포어 CUF-1 필터 홀더 및 카트	한외여과
밀리포어 펠리온 2 바이오맥스 PES 울트라필터, 300kD	한외여과
연동 펌프	반응물 T-혼합, UF 완충제 첨가, UF 투과물 흐름
바닥 저울	분배된 생성물의 양 측정
45 L 유리병	생성물 저장

[0162]

[0163] (3) 염화알루미늄 반응물 (156 mM Al)을 아래와 같이 제조했다. 패들 혼합 교반 장치가 장착된 ATMI 뉴믹스 패드-드라이브 1000 혼합 시스템을 본 공정에 사용했다. 깨끗한 200 L 회용 백을 200 L Q-믹스 스테인레스강 용기 상에 적재했다. 약 145.9 kg의 WFI를 백에 충전했다. 표적인 5.65 kg의 염화알루미늄 (6수화물)을 백에 충전하고, 20도 패들 각을 이용하고 패들을 교대 (30초 간격)하며 65의 회전 속도로 약 60분 동안 혼합했다. 염화알루미늄의 용해가 혼합의 완결 시 시각적으로 확인되었다. 이후 가공 전에 염화알루미늄 용액으로부터 샘플을 취했다. 염화알루미늄 반응물 용액의 pH는 3.02로 측정되었고, 전도성은 35.6 mS/cm로 측정되었다. 염화알루미늄 용액은 이후 가공 때까지 실온에서 저장했다.

[0164] (4) 인산나트륨 반응물 (390 mM 포스페이트)을 아래와 같이 제조했다. 패들 혼합 교반 장치가 장착된 ATMI 뉴믹스 패드-드라이브 1000 혼합 시스템을 본 공정에 사용했다. 깨끗한 200 L 회용 백을 200 L Q-믹스 스테인레스강 용기 상에 적재했다. 약 148.3 kg의 WFI를 백에 충전했다. 표적 8.30 kg의 이염기성 인산나트륨 (무수물)을 백에 충전하고, 20도 패들 각을 이용하고 패들을 교대 (30초 간격)하며 65의 회전 속도로 약 60분 동안 혼합했다. 인산나트륨의 용해가 혼합의 완결 시 시각적으로 확인되었다. 이후 가공 전에 인산나트륨 용액으로부터 샘플을 취했다. 인산나트륨 용액의 pH는 8.96으로 측정되었고, 전도성은 36.8 mS/cm로 측정되었다. 인산나트륨 용액은 이후 가공 때까지 실온에서 저장했다.

[0165] (5) 염화나트륨 한외여과 완충제 (0.9% w/v)를 아래와 같이 제조했다. 패들 혼합 교반 장치가 장착된 ATMI 뉴믹스 패드-드라이브 1000 혼합 시스템을 본 공정에 사용했다. 깨끗한 1000 L 회용 백을 1000 L Q-믹스 스테인레스강 용기 상에 적재했다. 약 996L의 WFI를 백에 충전했다. 표적 9.00 kg의 염화나트륨을 백에 충전하고,

20도 패들 각을 이용하고 패들을 교대 (30초 간격)하며 65의 회전 속도로 약 60분 동안 혼합했다. 염화나트륨의 용해가 혼합의 완결 시 시각적으로 확인되었다. 염화나트륨 용액의 pH는 5.85로 측정되었고, 전도성은 15.67 mS/cm로 측정되었다. 염화나트륨 용액은 이후 가공 때까지 실온에서 저장했다.

[0166] (6) 염화알루미늄 및 인산나트륨 반응물의 T-혼합을 용액 당 3.0 L/min의 유량으로 연동 펌프를 통해 각각의 용액을 펌핑하여 수행했다. T-혼합을 제어된 실온 조건하에서 수행하여, 공정을 시작하기 전에 출발 생성물 반응물이 17-33℃ 이내이도록 보았다. 각각의 용액을 바이오버든 및 미립자 감소를 확인하기 위해 0.22 μ m 필터를 통해 여과한 후, 바로 0.37"의 내부 직경을 가지는 1/2" (공칭) 관의 "T"에서 서로를 충돌시켰다. 반응물 유량이 잘 제어되고 안정한 것으로 확인될 때까지 초기 T-혼합된 생성물을 드레인으로 향하도록 공정은 자동화되었다. 생성된 침전된 알루미늄 히드록시포스페이트 중간체를 그 후 250 L 탱크에 수집했다. 탱크 내 생성물이 25 kg의 중량에 도달하면 탱크의 교반기를 50 RPM의 속도로 켜었다. 탱크 내 생성물이 50 kg의 중량에 도달하면 교반기 속도를 140 RPM의 속도로 증가시켰다. 탱크 순 중량이 200 kg에 도달하면 연동 펌프를 정지시켰다. T-혼합되고 생성물 용기에 첨가된 인산나트륨 및 염화알루미늄의 양은 각각 99.0 L 및 99.1 L였다. 반응시킨 염화알루미늄에 대한 인산나트륨의 부피비는 따라서 0.999이었다. 탱크 교반기는 T-혼합 후 10분 동안 켜 놓아 다음 공정 단계로 진행하기 전에 생성물 중간체가 균질하도록 보았다. 이 단계의 완결 시 생성물 샘플을 취했다. 생성물 중간체를 다음 단계로 진행하기 전에 교반기를 끈 상태로 약 25.5시간 동안 정치시켰다.

[0167] (7) 2.75" 직경 회전자 및 정사각형 구멍 고전단 고정자를 가지는 실버슨 275UHS 고전단 혼합기를 크기 감소 단계에 사용했다. 생성물을 먼저 140 RPM의 교반기 속도로 45분 동안 재현탁시켰다. 그 후, 크기 감소 단계를, 3600 RPM의 고전단 혼합기 속도로 125 부피 회전을 동안 실버슨 혼합기를 통해 생성물을 재순환시켜 수행했다. 약 90 L/min의 재순환 유량을 이용하여 고전단 혼합기의 주입구에서의 적절한 압력 (약 0.48-0.52 barg) 및 배출구에서의 적절한 압력 (약 0.59-0.64 barg)을 보았다. 회전 펌프를 약 128 RPM으로 동작하여 이러한 유량을 수득했고, 이는 본 특정 배치에 있어서 표적 횡수의 회전을 달성하기 위한 약 4시간 내지 20분의 가공 시간을 초래했다. 140 RPM에서 교반기를 동작시켜 생성물 용기 내 혼합을 크기 감소 조작 동안 유지했다. 고전단 혼합기 및 회전 펌프에 의한 에너지 투입에 기인한 임의의 온도 증가를 경감시키기 위해 탱크 재킷에 냉각된 물을 투입하여 크기 감소 단계 동안 생성물 온도를 17-33℃로 제어했다. 이 단계 동안 및 이 단계의 완결 시 생성물 샘플을 취했다. 다음 단계로 진행하기 전에 교반기를 끈 상태로 약 24시간 동안 생성물 중간체를 정치시켰다.

[0168] (8) UF 장비는 밀리포어 CUF-1 필터 홀더/카트와 8 m²의 총 필터 면적에 있어서 4 x 2 m² 펠리콘 2 300 kD 바이오맥스 PES 필터 (cat# P2B300V20)로 이루어졌다. 투과물, 공급물 및 보유물 스트림 상에서 압력 전송기를 사용하여 공정에 걸쳐 막간차압 (TMP) 및 압력 강하 (Δ P)를 모니터링했다. 회전 펌프를 사용하여 보유물 유량을 제어하고, 연동 펌프를 사용하여 투과물 및 완충제 첨가 유량을 제어했다.

[0169] (9) UF 시스템을 사용 전에 표준 절차에 따라 WFI로 플러싱했다. 이 특정 배치는 인간에게 사용하기 위한 목적의 것이 아니므로, UF 필터의 위생처리는 요구되지 않았다. 인간에게 사용하는 것으로 의도되는 배치에 있어서는, 표준 절차에 따라 소독에 0.1 N 또는 0.5 N NaOH 용액을 사용할 것이다.

[0170] (10) 한외여과 (UF) 단계로 투입되는 크기-감소된 중간체의 순 중량은 183.0 kg이었다. UF 전에, 생성물을 먼저 140 RPM의 교반기 속도를 이용하여 45분 동안 재현탁시켰다. 그 후, 균질성을 유지하기 위해 140 RPM으로 UF 공정 동안 생성물을 연속적으로 교반했다. 필터 플러시에 이어, 생성물을 약 1.5x로 농축했다. 투과물 밸브를 잠근 상태로 97.3 L/min (730 L/(m²-hr))의 보유물 유량으로 필터를 통한 재순환을 시작하여 공정을 개시했다. 보유물 압력은 공정 동안 일관되게 약 0.70-0.73 barg이었고, 제어가 요구되지 않았다. 보유물이 표적 유량에 도달하면, 투과물 밸브를 열고 투과물 유량을 천천히 약 10분에 걸쳐 4.0 L/min으로 증가시켰다. 농축의 종점은 순 생성물 중량으로 결정했다. 이 때, 투과물이 시스템으로부터 배출되는 것과 동일한 유량 (4.0 L/min)으로 생성물 용기에 UF 완충제 (0.9% 염화나트륨)의 첨가를 시작하여 정용여과를 개시했다. 종점을 결정하기 위해 총괄 투과물 유량을 이용하여 6.0 디아볼륨 완충제 교환을 완결했다. TMP는 농축 동안 0.04 내지 0.14 barg 범위였고, 정용여과 동안 0.14 및 0.26 barg 범위였다. 압력 강하 (Δ P)는 농축 동안 1.04 내지 1.12 barg 범위였고, 정용여과 동안 1.12 내지 1.20 barg 범위였다. 회전 펌프에 의한 에너지 투입에 기인한 임의의 온도 증가를 경감시키기 위해 탱크 재킷에 냉각된 물을 투입하여 한외여과 단계 동안 생성물 온도를 17-33℃로 제어했다.

[0171] (11) 정용여과의 완결 시 UF 완충제 플러싱을 실시하여 필터로부터 생성물 정체를 회수했다. 이는 투과물 라인을 잠근 상태로 약 5.7 mL/min으로 생성물 용기 안으로 공급물/보유물을 통과해 10 L의 새로운 0.9% 염화나트

를 플러싱하여 실시했다. 이 단계의 완결 시 정용여과한 생성물 중간체를 샘플링했다. 정용여과한 중간체의 순 중량은 130.6 kg이었다. 다음 단계로 진행하기 전에 교반기를 끈 상태로 약 24.5시간 동안 생성물 중간체를 정치시켰다.

[0172] (12) 정용여과한 중간체를 140 RPM의 교반기 속도를 이용하여 45분 동안 재현탁시켰다. 그 후, 생성물을 아래 방식으로 증기 멸균했다. 용기 채킷에 증기를 적용하여 생성물을 121℃로 가열했다. 이 때, 증기를 또한 용기 헤드공간에 주입하여 나머지 가열을 용이하게 하고, 헤드공간으로부터 공기를 제거하는 것을 돕고, 내부 탱크 요소의 완전 멸균을 보장했다. 그 후, 생성물을 124℃의 표적 체류 온도로 가열하고 이 온도에서 24분 동안 유지했다. 주위 온도에서 체류 온도로의 총 가열 시간은 32분이었다. 체류의 완결 시, 탱크 채킷을 통해 냉각된 물을 재순환시켜 생성물을 약 22℃로 냉각시켰다. 생성물을 124℃에서 30℃ 미만으로 냉각시키는데 약 30분 걸렸다. 140 RPM의 교반기 설정값에서 멸균 사이클에 걸쳐 생성물을 혼합했다. 멸균 후, 생성물 순 중량은 124.8 kg이었다. 멸균한 벌크 생성물을 본 단계의 완결 시에 샘플링했다. 다음 단계로 진행하기 전에 교반기를 끈 상태로 약 72.5시간 동안 멸균한 생성물을 정치시켰다.

[0173] (13) 멸균한 생성물을 140 RPM의 교반기 속도를 이용하여 45분 동안 재현탁시켰다. 저장을 위해 생성물을 4 x 45 L 유리병으로 분배했다. 병을 채운 직후, 최종 생성물 샘플을 각각의 생성물 병으로부터 취했다.

[0174] 상업적 규모로 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 제조한 후, 재료를 여러 분석 방법으로 특징규명했다. 표 13은 이러한 결과의 요약이다.

표 13

상업적-규모 APA의 특성

특성	방법	결과
알루미늄 농도	유도 결합 플라즈마 분광분석 (ICP)	알루미늄으로서 2.8 mg/mL
포스페이트 대 알루미늄 몰비 (P/Al, 아주반트 교체 단독)	ICP	0.95
pH	pH	5.26
영전하점 (PZC)	제타 전위	5.15
응집체 입자 크기	정적 광 산란 (SLS)에 의한 d(v,0.5)	6.98 μm
유리 포스페이트	말라카이트 그린 포스페이트 검정	13.1 mM
염화나트륨	% 염화나트륨으로 전환한 모세관 전기영동 (CE)에 의한 클로라이드	0.92%

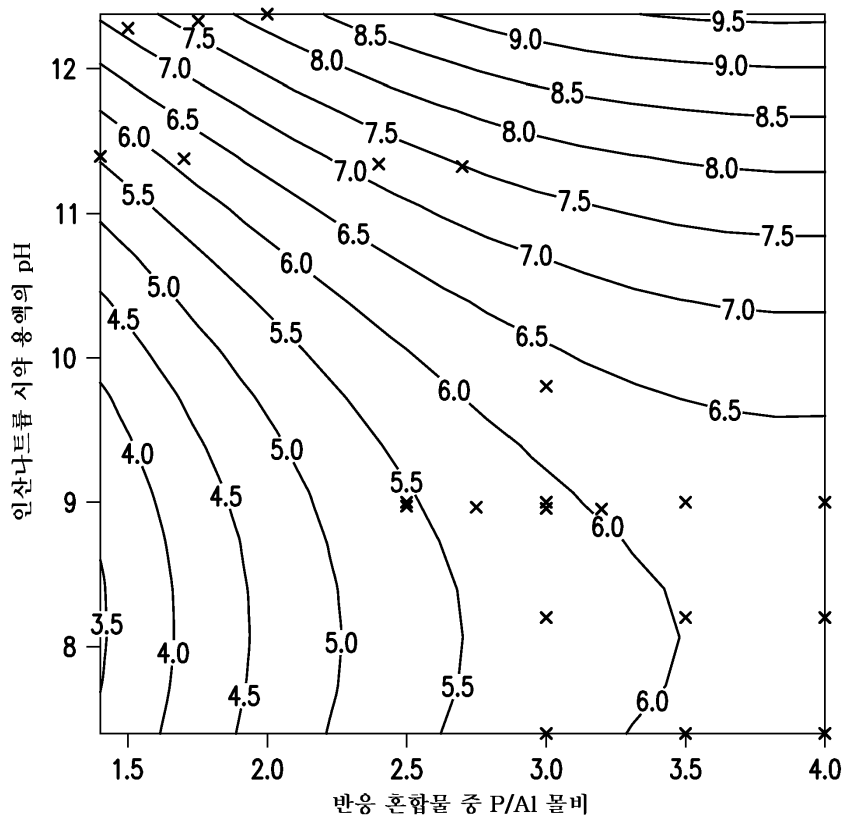
[0175]

[0176] 모든 결과는 목적하는 범위 안에 있었다.

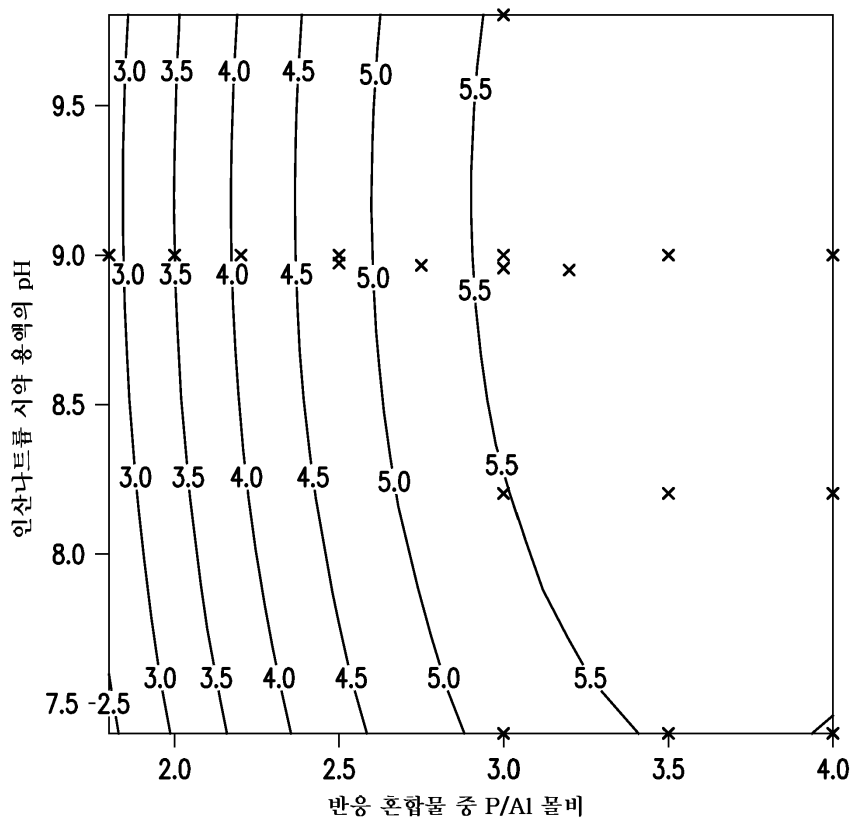
[0177] 다양한 상기 논의된 및 기타 특징부 및 기능, 또는 이의 대안이 다수의 다른 여러 시스템 또는 적용으로 바람직하게 조합될 수 있음이 인식될 것이다. 또한 이의 다양한, 여기서는 뜻하지 않은 또는 예상치 않은 이의 대안, 개질, 변동 또는 개선이 당업자에 의해 후속하여 이루어질 수 있으며, 이는 또한 하기 특허청구범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

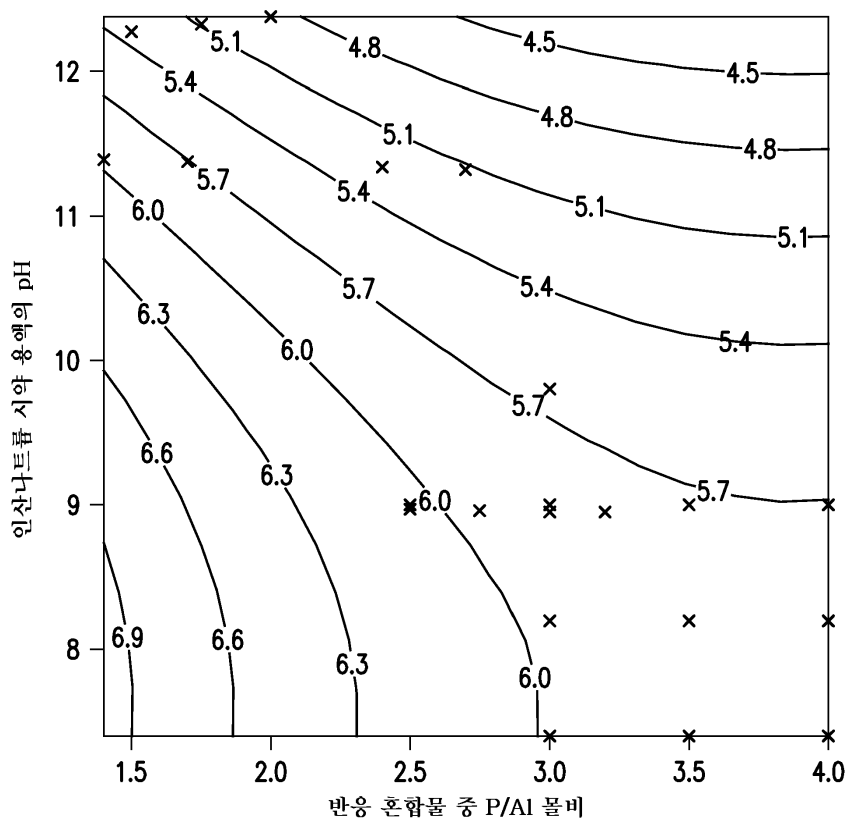
도면1



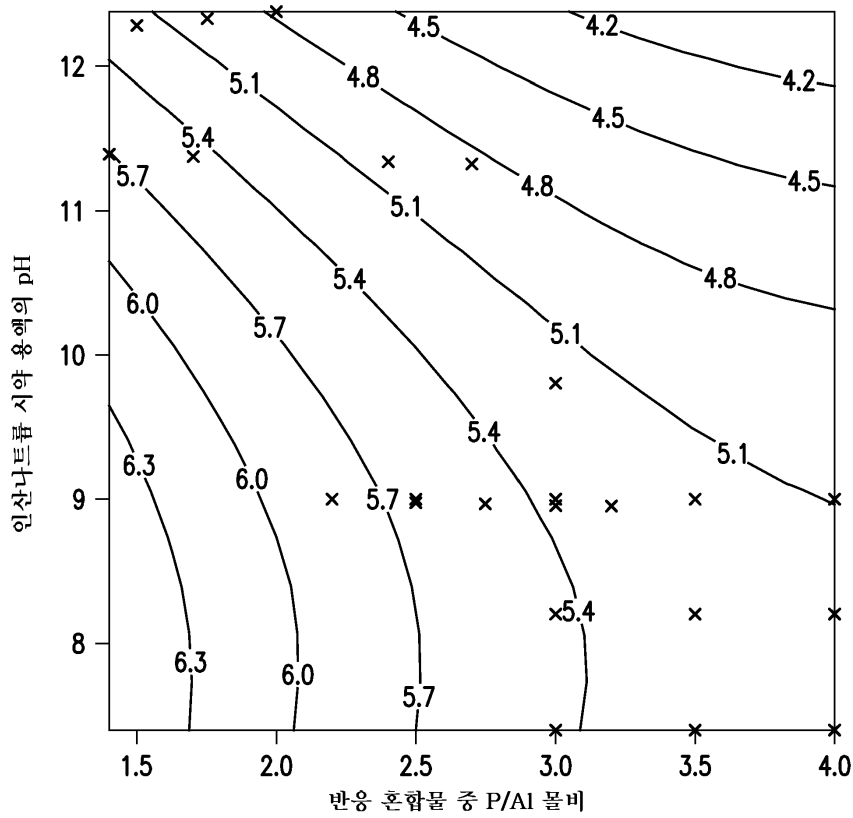
도면2



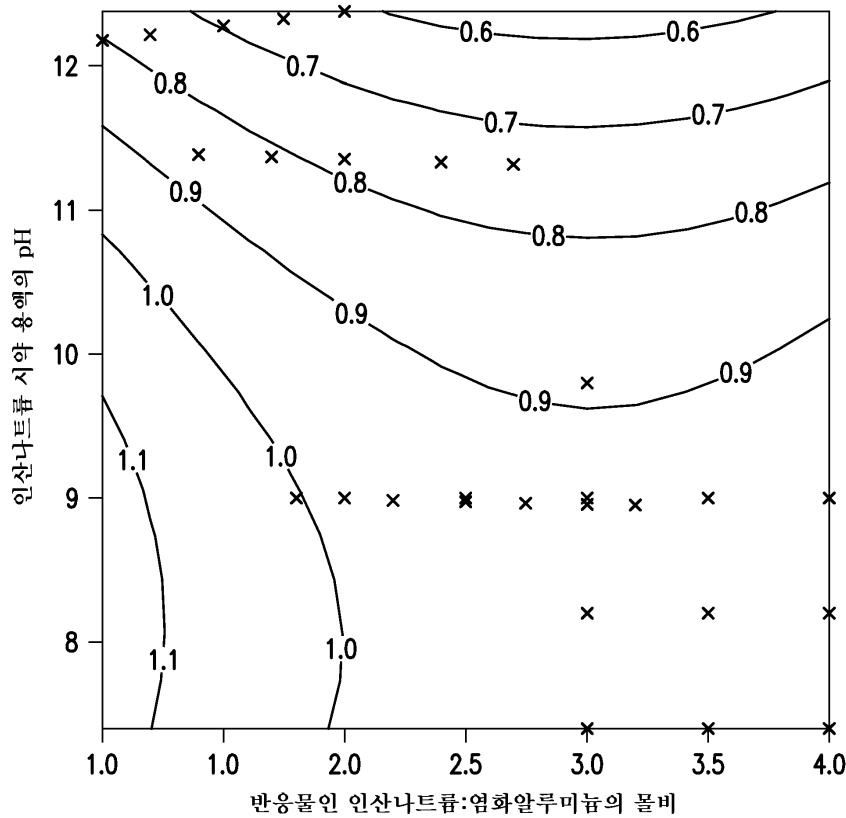
도면3



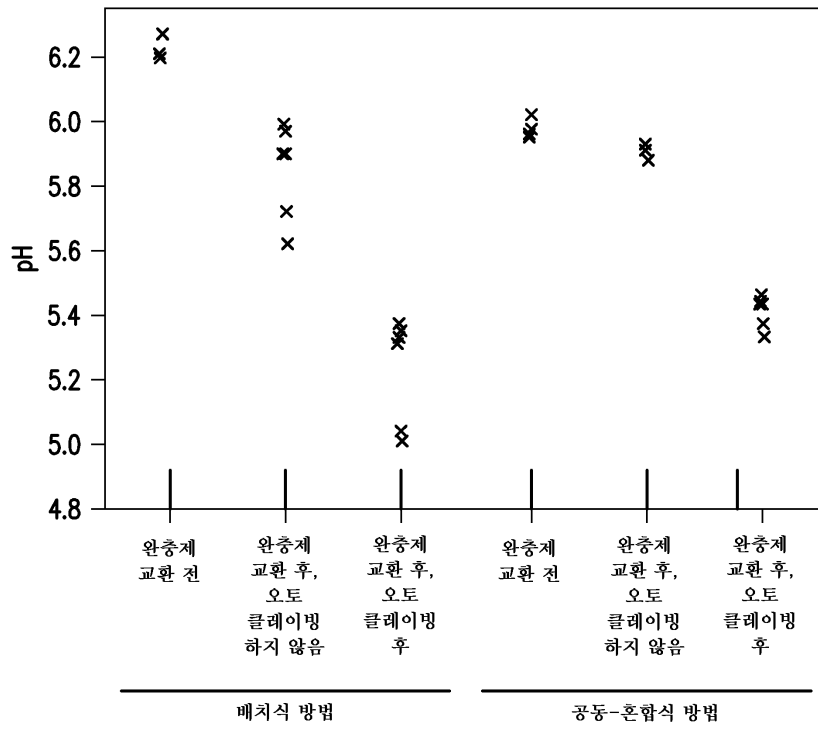
도면4



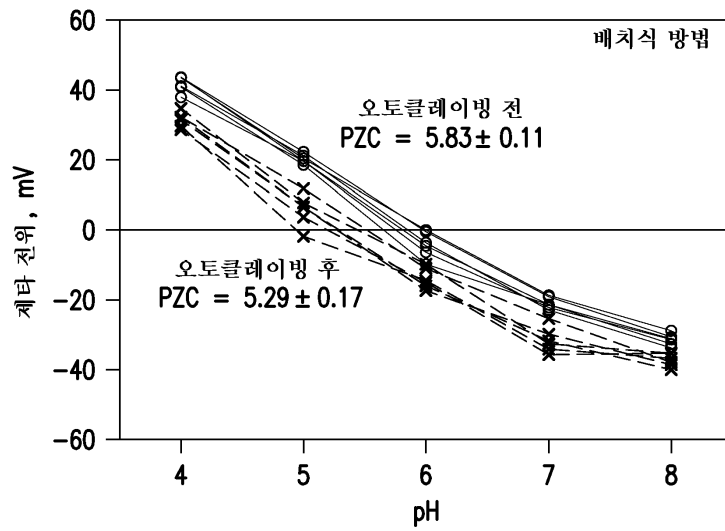
도면5



도면6



도면7a



도면7b

