



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월02일
(11) 등록번호 10-1557169
(24) 등록일자 2015년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/04 (2006.01) C12N 1/34 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-7026374
(22) 출원일자(국제) 2008년05월06일
심사청구일자 2013년04월16일
(85) 번역문제출일자 2009년12월17일
(65) 공개번호 10-2010-0028561
(43) 공개일자 2010년03월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/005840
(87) 국제공개번호 WO 2008/143782
국제공개일자 2008년11월27일
(30) 우선권주장
60/930,746 2007년05월18일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
AAPS PharSciTech, Vol. 7, No. 3, Article 60(
공개일: 2006. 7. 21.)*
US20030219475 A1
WO2007038420 A1
US6423252 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메디퐁 엘엘씨
미국 20878 메릴랜드주 게이트르스부르크 원 메디
퐁 웨이
(72) 발명자
베링 라인하르트
미국 94002 캘리포니아주 벨몬트 스카이몬트 드라
이브 4119
아오 이
미국 94306 캘리포니아주 팔로 알토 페나 코트
570
(74) 대리인
김진희

전체 청구항 수 : 총 20 항

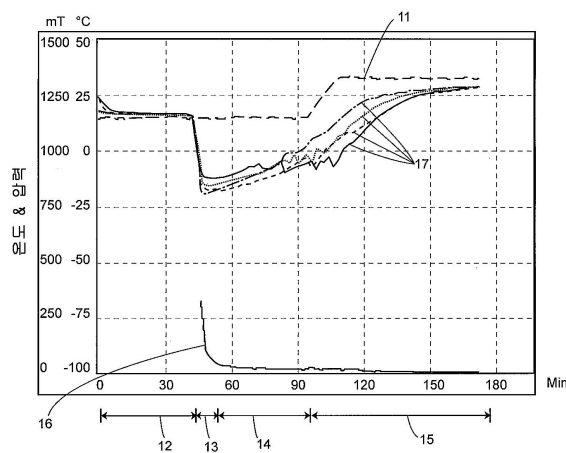
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 냉동 건조 발포체에 의한 생활성 물질의 보존

(57) 요약

본 발명은 건조 발포체 매트릭스 중에서 생활성 물질을 보존하기 위한 방법, 시스템 및 조성물을 제공한다. 상기 방법은 비등하지 않는 발포체 생성 단계 및 막의 상전이 온도에 근접한 온도에서 보존체 침투 단계를 제공한다. 저온 2차 건조 단계를 적용한 냉동-발포 과정에서 높은 초기 생존률로 생활성 물질을 보존할 수 있다.

대표도



명세서

청구범위

청구항 1

생활성 물질을 포함하는 안정한 건조 발포체 조성물을 제조하는 방법으로서,
 용매 중에 생활성 물질, 및 폴리올 또는 중합체를 포함하는 제제를 제조하는 단계;
 제제를 발포체로 팽창시키는 단계;
 발포체를 냉동시키는 단계;
 0℃ 이하의 발포 온도에서 승화를 통해 냉동 발포체를 1차 건조하는 단계; 및
 온도가 25℃ 이하인 환경에서 발포체를 2차 건조시켜, 잔류 수분 10% 이하를 갖는 발포체를 얻는 단계;
 를 포함하는 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 생활성 물질은 바이러스 또는 박테리아를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 생활성 물질은 리스테리아(*Listeria*) 균주 또는 인플루엔자(*influenza*) 바이러스주를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 제제를 발포체로 팽창시키는 단계 전에 바이러스 또는 박테리아의 막 상전이 온도의 2℃ 이내에서 제제를 유지시키는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 발포체를 냉동시키는 단계 후 얻어지는 발포체는 2 mm 이하의 두께를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 2차 건조 후 얻어지는 발포체는 잔류 수분 5% 이하를 갖는 것인 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 2차 건조 온도는 발포체의 유리 전이 온도 미만으로 유지되는 것인 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 평균 입자 크기가 0.1 μm~100 μm인 분말로 건조 발포체를 분쇄하는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 포유류에게 투여하기 위해 발포체를 액체로 재구성하는 단계 또는 발포체를 분말로 분쇄하는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 1차 건조 또는 2차 건조 단계는 100 Torr 이하의 압력에서 동결건조를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 11

생활성 물질을 포함하는 안정한 건조 발포체 조성물을 제조하는 방법으로서,
 용매 중에 생활성 물질, 및 폴리올 또는 중합체를 포함하는 제제를 제조하는 단계;
 제제를 발포체로 팽창시키는 단계;
 발포체를 냉동시키는 단계;
 발포체가 냉동되거나 또는 발포체의 유리 전이 온도 미만으로 유지되는 온도에서 승화를 통해 발포체를 1차 건조하는 단계; 및
 온도가 25℃ 이하인 환경에서 발포체를 2차 건조시켜, 잔류 수분 10% 이하를 갖는 발포체를 얻는 단계;
 를 포함하는 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 생활성 물질은 바이러스 또는 박테리아를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 발포체를 팽창시키기 전에 2분 이상 동안 생활성 물질의 막 전이 온도의 2℃ 이내 온도에서 제제를 유지시키는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 생활성 물질은 리스테리아 균주 또는 인플루엔자 바이러스주를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 발포체를 냉동시키는 단계 후 얻어지는 발포체는 2 mm 이하의 두께를 갖는 것인 제조 방법.

청구항 16

제11항에 있어서, 2차 건조 후 얻어지는 발포체는 잔류 수분 5% 이하를 갖는 것인 제조 방법.

청구항 17

생활성 물질을 포함하는 안정한 건조 발포체 조성물을 제조하기 위한 장치로서,
 내부 온도 및 내부 압력 제어부를 포함하는 환경 제어 챔버; 및
 상기 챔버 내에 발포체를 포함하고,
 상기 발포체는 용매 중에 생활성 물질, 및 폴리올 또는 중합체를 포함하고, 여기서 발포체는 2 mm 이하의 두께 또는 10 이상의 종횡비(aspect ratio)를 가지며,
 이를 통해 발포체가 2일 이하의 기간 동안 25℃ 이하의 온도에서 잔류 수분 10% 이하로 건조될 수 있는 것인 장치.

청구항 18

제17항에 있어서, 생활성 물질은 바이러스 또는 박테리아를 포함하는 것인 장치.

청구항 19

제17항에 있어서, 생활성 물질은 리스테리아 균주 또는 인플루엔자 바이러스주를 포함하는 것인 장치.

청구항 20

제17항에 있어서, 발포체는 1 mm 이하의 두께 또는 100 이상의 종횡비를 갖는 것인 장치.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제60/930,746호(2007년 5월 18일 출원; Reinhart Vehring 등; "Preservation of Bioactive Materials by Freeze Dried Foam")를 우선권으로 주장한다. 이 출원은 이전 미국 특허 출원 제 10/412,630호(현재, 미국 특허 제7,135,180호)(2003년 4월 10일 출원; Vu Truong-Le; "Preservation of Bioactive Materials by Freeze Dried Foam"), 및 이전 미국 가출원 제60/372,236호(2002년 4월 11일 출원; Vu Truong-Le; "Formulations and Methods for Preparation")과 관련이 있다. 상기 이전 출원들의 전체 개시 내용을 참조하여 본 발명에 포함시킨다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 저장 중에 생물학적 물질을 보존하는 분야에 속한다. 구체적으로, 본 발명은 예를 들어, 보존성 건조 발포체 매트릭스에 유리화시켜서 생활성 물질 및 생존 생물체를 보존하는 것에 관한 것이다. 바이러스 및 박테리아를 높은 생존률로 회수하는 방법 및 시스템을 제공한다.

배경 기술

[0005] 생물학적 물질, 예컨대 단백질, 진핵생물 세포, 박테리아 및 바이러스 등을 대체로 배지 또는 다른 액체 용액 중에 저장시에 불안정하다. 예를 들어, 엔벨로프 바이러스 예컨대 달걀 요지질막액으로부터 제조된 생 인플루엔자 바이러스 등은 냉장 온도, 즉 대략 4°C에서 보관 시 2 내지 3주 이내에, TCID₅₀(Tissue Culture Infectious Dose)으로 정의되는 역가가 1 log 손실된다. 실온 조건(대략 25°C) 및 보다 따뜻한 온도 예컨대 37°C에서, 각각, 바이러스는 수일 내지 수 시간 이내에 상기 역가가 손실된다. 수성 제제를 냉동시킨 후 승화에 의해 건조하는 동결건조 과정이 이러한 생물학적 물질을 안정화시키는데 통상 사용된다. 보호 물질, 예컨대 탄수화물의 치환 및 물 제거는 화학 분해, 변성 및 미생물 오염원 성장을 예방하여 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0006] 동결건조(냉동건조)에서, 생물학적 물질은 대체로 보호제와 함께 용액 또는 현탁액으로 혼합되어, 냉동된 후 승화 및 2차 건조에 의해 탈수된다. 승화에 의한 저온 냉동 및 건조는 분해 반응의 동역학을 늦출 수 있다. 그러나, 수반되는 저온 및 낮은 표면 대 부피 비율은 장기간의 건조 시간을 필요로 할 수 있다. 느린 냉동률과 생활성 물질을 냉동 상태로 유지되는 시간 길이로 인해 통상의 냉동 건조 과정에서는 종종 상당한 구조적 손상이 일어난다. 이러한 손상은 변성, 응집, 빙핵화 및 전파 단계 동안 형성된 빙정 구조로 인해 초래되는 기타 부적당한 물리적 응력이 수반될 수 있다. 이러한 이유로, 세포벽 또는 지질막을 보유하는 생물질은 바이러스, 박테리아 및 세포 등의 거대하고 보다 복잡한 실체의 생활성을 보존하는데 상당한 어려움이 있다.

[0007] 또한, 최적의 냉동 건조 조건 하에서도, 2차 건조 단계 동안 손상이 일어날 수 있다. 최근 연구는 냉동 건조에 의해 유발된 손상이 최종적으로 남은 수분량을 제거하는 2차 탈수 단계에서 주로 일어나는 것이라 시사하고 있

다(Webb, S.D. Effects of annealing lyophilized and spray- lyophilized formulations of recombinant human interferon-gamma.. J Pharm Sci 2003 Apr;92(4):715-29). 따라서, 동결건조 및 2차 건조 과정이 단백질 또는 세포를, 예를 들어 상당한 화학적 및 물리적 변화를 겪게 할 수 있다는 충분한 증거가 존재한다. 이러한 변화는 염의 농도, 침전/결정화, 전단 응력, pH 극단화, 및 냉동건조를 통해 남은 잔류 수분 등으로 인해 단백질의 활성 손실을 초래할 수 있다.

[0008] 보호제는 냉동 동안 세포 및 분자를 보호하고 저장 동안 안정성을 증강시키기 위해 제제에 추가되는 화학물이다. 예를 들어, 생바이러스 백신에 대한 안정화제는 동결건조 및 저장 동안 바이러스 안정성을 향상시키기 위해서, 대체로 고농도의 당류 예컨대 수크로스, 만니톨 또는 솔비톨을 포함한다. 그러나, 엔벨로프 바이러스, 및 다른 생물체의 경우, 보호제가 막 체적 내 활성 분자를 보호하기 위해 적절하게 침투될 수 없다. 그에 따라, 불안정한 생물체에 대해 적절한 안정성을 얻기 위한 최적 건조 과정 및 제제를 개발하는데 상당한 어려움이 존재한다.

[0009] 동결건조와 관련된 몇몇 문제들은 일정 건조 발포체 보존 과정을 통해 극복되었다. U.S 특허 제5,766,520호 (Bronshtein 등의 Preservation by Foam Formation)에서는, 용매 중 생물학적 용액 또는 현탁액을, 건조된 안정한 발포체를 형성시키기 위해 잔류 용매가 발포 비등하도록 강한 진공을 가하기 전에 중간정도의 진공 하에서 제1 건조를 통해 농축시킨다. 보통, 이러한 비등은 기포 표면 상에서 발생할 수 있는 산화 및 변성으로 인해 생물학적 물질의 처리 시에는 피하는 것이다. 또한, 진공하에서도, 비등은 가열을 요하며, 이는 생활성 물질의 안정성을 위태롭게 할 수 있다. 이러한 문제를 Bronshtein에서는 용액 또는 현탁액 중에 보호제, 예컨대 탄수화물 및 계면활성제를 포함시켜 감소시켰다. 이러한 유형의 건조 발포 보호 과정은 비등 중에 액체의 대류, 및 발포체 기포 표면으로 존재하는 증가된 표면적으로 인해 건조가 보다 빠르다는 장점을 갖는다. 그러나, 수분량을 줄이기 위한 열간 2차 건조는 세포 및 바이러스 생존률을 90% 이상 감소시킬 수 있다. 이러한 건조 발포체의 재구성성은 친수성 보호제 및 넓은 발포체 표면적의 존재로 인해 빨라질 수 있다. 건조 발포체는 재구성 시간을 더욱 개선시키기 위해서 또는 흡입을 통해 생물학적 물질의 투여를 위해 미분으로 밀링할 수 있다.

[0010] 상기 기술한 건조 발포체 보존 과정은 다양한 생물학적 물질을 보호하기 위한 유연성이 제한적이다. 예를 들어, 상기 과정은 냉동 단계(예를 들어, Bronshtein의 컬럼 1, 41줄 - "[f]reezing and other steps of the freeze-drying process are very damaging to many sensitive biological materials." 참조) 및 발포체에서 물 제거를 위한 수단으로서 얼음의 후속 승화를 배제한다. Bronshtein은 냉동을 피하기 때문에, 발포체를 냉동시키기 위해서, 잠열과 함께, 다량의 물이 손실되지 않도록 발포 및 건조 전에 제제가 농후화되어야한다. 냉동을 피하는 것은 통상의 냉동 건조 또는 분무 냉동 건조 과정 주기보다 낮은 진공 수준(7-24 Torr)에서 과정을 수행할 것이 요구된다. Bronshtein에서 비등은 필수적인 발포체 분출을 제공하기 위해 상당한, 가능하게는 불안정한 양의 열 투입을 요구한다.

[0011] Bronshtein 건조 발포체 과정은 지질막을 갖는 생물학적 물질의 보존에 특별하게 충분히 적합한 것은 아니다. 예를 들어, 상기 과정은 생물학적 물질, 예컨대 리포솜, 바이러스 또는 생존 세포의 보존에는 충분히 적합하지 않다. 지질막은 종종 둘러싸인 체적 내로 보호제가 침투되는 것을 방지하거나 또는 둘러싸인 체적내에서 수분의 적절한 제거를 방지한다. 보호제의 적절한 침투없이, 효소적 작용, 예컨대 단백질 가수분해, 및 화학 작용, 예컨대 산화 및 자유 라디칼 공격 등은 생물학적 물질의 활성 또는 생존성을 파괴할 수 있다. 막으로 둘러싸인 체적 내에 존재하는 저삼투압액은 생물학적 물질의 불안정성을 촉진할 수 있다. 열간 2차 건조는 세포를 죽일 수 있다.

[0012] 특히 빙점보다 높은 온도에서 저장되는 단백질, 비리온 및 세포 등의 생물학적 물질을 보존하기 위한 방법이 요구되고 있다. 높은 온도에 노출없이 적절한 건조 단계를 제공하는 과정을 통해 건조 발포체 보존 매트릭스를 제조하는 방법이 바람직하다. 저장되는 이러한 생물학적 물질을 보호할 수 있는 조성물은 의학 및 과학 연구에 혜택을 제공한다. 본 발명은 하기의 설명에서 분명하게 나타난 이의 장점 및 기타 특징을 제공한다.

[0013] -본 발명의 요약-

[0014] 본 발명은 저장되는 생활성 물질, 예컨대 펩티드, 단백질, 핵산, 항체, 백신, 박테리아, 바이러스, 리포솜, 혈소판 및/또는 세포 현탁액을 보존하기 위한 방법, 시스템 및 조성물을 포함한다. 대체로, 상기 방법은 예를 들어, 폴리올 및 생활성 물질의 제제를 발포체로 팽창시키고, 발포체를 냉동시킨 후, 상기 발포체를 안정한 건조 발포체 조성물로 건조시키는 과정을 제공한다. 상기 방법은 다양하게, 예를 들어 건조전에 발포체를 냉동시키는 단계, 제제에 발포체를 포함시키는 단계, 보호제의 침투를 증강시키기 위해 지질막의 상전이 온도에서 제제를 유지시키는 단계, 약 200 Torr~25 mTorr 압력에서 제제를 팽창시키는 단계, 박층 형태의 발포체를 2차 건조시

키는 단계, 및/또는 비교적 저온, 예컨대 실온 이하에서 발포체를 건조시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0015] 대체로, 본 발명의 방법은 폴리올을 포함하는 제제 중에 생활성 물질, 예를 들어 펩티드, 단백질, 핵산, 항체, 백신, 박테리아, 바이러스, 리포솜, 혈소판 및/또는 세포 현탁액을 제공하는 단계, 상기 제제를 발포체로 팽창시키는 단계, 발포체를 냉동시키는 단계, 동결건조 단계 및 저온에서 잔류 수분을 제거하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 생활성 물질의 안정한 건조 발포체 조성물을 제조하는 방법은 용매(예를 들어, 물) 중에 생활성 물질, 및 폴리올 또는 중합체를 포함하는 제제를 제조하는 단계; 상기 제제를 발포체로 팽창시키는 단계; 발포체를 냉동시키는 단계; 0℃ 이하의 발포 온도에서 증발 또는 승화를 통해 발포체를 1차 건조하는 단계; 및 잔류 수분 10% 이하로 발포체를 감소시키기에 충분한 시간 동안 온도가 25℃ 이하인 환경에서 발포체를 2차 건조하는 단계를 포함한다. 상기 방법의 선택적인 변형에서는, 용매 중에 생활성 물질, 및 폴리올 또는 중합체를 포함하는 제제를 제조하고; 상기 제제를 발포체로 팽창시키며; 상기 발포체를 냉동시키고; 이 발포체가 냉동되고 이의 유리 전이 온도 이하로 유지되는 온도에서 증발 또는 승화시켜 건조시킨 후, 잔류 수분 10% 이하로 상기 발포체를 감소시키는데 충분한 시간 동안 25℃ 이하의 환경에서 2차 건조시킨다. 지질막으로 둘러싸인 체적을 포함하는 생활성 물질에 대해서, 발포체를 팽창시키기 전에 2분 이상 동안 생활성 물질의 막 전이 온도의 2℃ 이내 온도에서 제제 또는 발포체를 유지시키는 것이 바람직하다.

[0016] 저온 건조 방법의 바람직한 구체예에서, 생활성 물질은 펩티드, 단백질, 핵산, 항체, 백신, 박테리아, 바이러스, 리포솜, 혈소판 및/또는 세포 현탁액을 포함한다. 일 구체예에서, 생활성 물질은 바이러스 또는 박테리아, 예를 들어, 리스테리아 균주 또는 인플루엔자 바이러스주를 포함한다. 일 구체예에서, 리스테리아는 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)이다. 다른 구체예에서, 리스테리아 모노사이토제네스의 약독화 균주를 사용한다. 다른 구체예에서, 항원성 펩티드를 발현하도록 백신으로서 재조합적으로 조작된 리스테리아 모노사이토제네시스 균주를 사용한다. 부속 서열을 포함하는 리스테리아계 백신의 구성체가 U.S. 가출원 제 60/532,696호, 제60/602,588호, 제60/615,548호 및 제60/617,564호(발명의 명칭 "EphA2 Vaccines"으로, 각각 2003년 12월 24일, 2004년 8월 18일, 2004년 10월 1일 및 2004년 10월 7일 출원됨), U.S. 가출원 제60/556,631호, 제60/615,470호 및 제60/617,544호(발명의 명칭 "Listeria-based EphA2 Vaccines"으로, 각각 2004년 3월 26일, 2004년 10월 1일 및 2004년 10월 7일 출원됨), 및 국제 공개 특허 WO 2005/067460 및 WO 2005/037233에 구체적으로 기술되어 있으며, 이들 각각을 전체로 참조하여 본 발명에 포함시킨다. 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스주는 인플루엔자 A 및 B 바이러스이다. 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스주는 생백신으로 사용하기 위해 약독화된 것이다.

[0017] 바람직한 방법에서, 발포체는 예를 들어, 25℃ 이하, 20℃ 이하, 15℃ 이하의 저온에서 2차 건조를 촉진하기 위해서, 2 mm 이하의 두께를 포함한다. 발포체를 잔류 수분 10% 이하, 5% 이하, 3% 이하 또는 1% 이하로 감소시키기에 충분한 시간 동안 건조시키는 것이 최종 산물을 위해 바람직하다. 2차 건조 온도는 발포체 폴리올 매트릭스의 유리 전이 온도 이하로 유지시키는 것이 대체로 바람직하다. 1차 건조 및/또는 2차 건조 단계는 예를 들어 저온에서 발포체로부터 수분 제거를 가속화하기 위해, 100 Torr 이하, 50 Torr 이하, 10 Torr 이하, 1 Torr, 100 mTorr, 10 mTorr, 또는 그 이하의 압력에서 용매 제거를 포함하는 것이 바람직하다.

[0018] 건조된 발포체는 시트 또는 거대 입자 형태일 수 있다. 경우에 따라서, 건조된 발포체는 저장 또는 흡입 투여를 위해, 평균 입자 크기가 예를 들어, 약 0.1 μm~약 100 μm인 분말로 분쇄될 수 있다. 경우에 따라서, 발포체는 재구성된 액체로서, 예를 들어 주사를 통해 포유류에 투여될 수 있다.

[0019] 본 발명은 안정한 건조 발포체 조성물을 제조하는 방법을 효과적으로 실시하기 위한 시스템을 포함한다. 예를 들어, 비교적 저온, 예컨대 20℃ 이하에서 신속한 2차 건조를 가능하게 하는 시스템은 얇은 시트 형태로 강한 진공에 발포체를 개방 노출시킬 수 있다. 생활성 물질의 안정한 건조 발포체 조성물을 제조하기 위한 시스템은 내부 온도 및 내부 압력 제어부를 제공하는 환경 제어 챔버; 및 상기 챔버 내에 용매 중 생활성 물질 및 폴리올 또는 중합체를 포함하는 발포체를 포함할 수 있다. 건조는 두께가 2 mm 이하 및/또는 종횡비(두께에 대한 너비 또는 길이)가 10 이상; 또는 두께가 1 mm 이하 및/또는 종횡비가 100 이상인 발포체를 제공하여 가속화시킬 수 있다. 발포체는 바람직하게 25℃ 이하의 온도에서 2일 이하의 기간 동안, 잔류 수분 10% 이하로 건조시킨다.

[0020] 상기 방법에 따르면, 상기 시스템의 생활성 물질은 임의의 생활성 물질일 수 있다. 그러나, 현재 공지된 시스템은 특히 바이러스 또는 박테리아, 예를 들어 리스테리아 균주 또는 인플루엔자 바이러스주의 생존성에 특히 유익하다. 일 구체예에서, 리스테리아는 리스테리아 모노사이토제네스이다. 다른 구체예에서, 리스테리아 모노사이토제네스의 약독화 균주가 사용된다. 또 다른 구체예에서, 항원성 펩티드를 발현하기 위한 백신으로서 재조합적으로 조작된 리스테리아 모노사이토제네시스 균주가 사용된다. 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스주는 인플

루엔자 A 및 B 바이러스이다. 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스주는 생백신으로서 사용하기 위해 약독화된 다.

[0021] 본 발명은 안정한 건조 발포체 조성물을 포함한다. 예를 들어, 상기 조성물은 펩티드, 단백질, 핵산, 항체, 백신, 박테리아, 바이러스, 리포솜, 혈소판 및/또는 세포 현탁액을, 잔류 수분을 10% 이하로 포함하는 건조 발포체 매트릭스 중에 포함할 수 있고, 여기서 매트릭스는 폴리올 및/또는 중합체를 포함하고, 건조 발포체는 0.5 log₁₀ 생존률 손실보다 낮은 생활성 물질의 액상 제제로부터 제조되었다. 이러한 생존률 유지는 발포체를 잔류 수분 5% 이하로 건조시키는 경우에도 본 발명에 기술된 바에 따라 용이하게 얻을 수 있다. 일 구체예에서, 바이러스 또는 박테리아의 생활성 물질은 예를 들어, 리스테리아 균주 또는 인플루엔자 바이러스주를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 리스테리아는 리스테리아 모노사이토제네스이다. 다른 구체예에서는 리스테리아 모노사이토제네스의 약독화 균주를 사용한다. 또 다른 구체예에서, 항원성 펩티드를 발현하기 위한 백신으로서 재조합적으로 조작된 리스테리아 모노사이토제네스의 균주를 사용하며, 예를 들어 여기서 상기 펩티드는 천연 리스테리아 펩티드가 아니다. 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스주는 인플루엔자 A 및 B 바이러스이다. 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스주는 생백신으로 사용하기 위해 약독화된 것이다. 상기 바이러스 또는 박테리아는 예를 들어, 리스테리아 균주 또는 인플루엔자 바이러스주를 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 방법 및/또는 시스템을 사용하여 수반되는, 처리과정 중 생존률 손실은 0.5 log₁₀ 손실 미만, 0.3 log₁₀ 손실 미만, 0.1 log₁₀ 손실 미만이다.

[0022] -정의-

[0023] 본 발명은 특정 시스템 또는 방법에 제한되지 않고, 변경가능하다는 것을 이해해야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어는 특정 구체예를 설명하고자 하는 목적이므로, 이에 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용하는 단수형은 달리 명확하게 표시하지 않는 한 복수 대상을 포함하는 것이다. 따라서, 예를 들어, "표면"은 "2 이상의 표면"의 조합을 포함하고, "박테리아"는 박테리아 혼합물을 포함한다.

[0024] 달리 정의하지 않으면, 본 명세서에서 사용하는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속한 분야의 숙련가가 통상 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 기술한 것과 유사하거나 균등한 임의의 방법 및 물질을 과도한 실험없이 본 발명을 실시하는데 사용할 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법을 본 명세서에 기술한다. 본 발명을 기술하고 청구하는데 있어서, 이하 용어들을 하기 기술한 정의에 따라 사용하게 된다.

[0025] "주변(ambient)" 온도 또는 조건은 소정 환경에 소정 시점에서의 것을 의미한다. 대체로, 주변 실온은 22℃이고, 주변 대기압, 및 주변 습도는 용이하게 측정할 수 있고 연간, 기후 조건, 고도 등에 따라 다양해진다.

[0026] "비등(boiling)"은 예를 들어, 액체의 온도가 이의 비등점 이상일 때 발생하는 액체에서 기체로의 급속한 상전이를 의미한다. 당분야의 당업자에게 공지된 바와 같이, 비등점은 액체의 증기압이 적용된 압력과 동일한 온도이다. 비등은 비등점인 액체에 열이 가해질 때 특히 활발해 질 수 있다.

[0027] "완충액"은 산-염기 공액 성분의 작용에 의해 pH 변화를 견디는 완충된 용액을 의미한다. 완충액의 pH는 대체로 선택한 활성 물질을 안정화시키도록 선택되고, 당분야의 당업자들이 확인할 수 있는 것이다. 대체로, 일부 단백질이 광범위한 pH 범위, 예를 들어 산성 pH에서 안정할 수 있지만, 완충액은 생리적 pH 범위이다. 따라서, 바람직한 pH 범위는 약 1 내지 약 10이고, 약 3 내지 약 8이 특히 바람직하다. 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 8.0이고, 보다 더욱 바람직하게는 약 7.0 내지 약 7.4이며, 가장 바람직하게는 약 7.0 내지 약 7.2이다. 적절한 완충액은 pH 7.2 포스페이트 완충액 및 pH 7.0 시트레이트 완충액이다. 당분야의 당업자들이 인지하는 바와 같이, 사용가능한 다수의 적절한 완충액이 존재한다. 적절한 완충액은 이에 제한되는 것은 아니며, 인산칼륨, 인산나트륨, 아세트산나트륨, 히스티딘, 이미다졸, 시트르산나트륨, 숙신산나트륨, 중산탄암모늄 및 탄산염을 포함한다. 대체로, 완충액은 몰농도 약 1 mM 내지 약 2 M에서 사용되고, 약 2 mM 내지 약 1 M이 바람직하며, 약 10 mM 내지 약 0.5 M이 특히 바람직하고, 25 mM 내지 50 mM이 구체적으로 바람직하다.

[0028] "가스제거(Degassing)"는 가스의 분압이 적용된 압력보다 높을 때 액체 중 용액에서 가스가 방출되는 것을 의미한다. 물이 1 기압(약 760 Torr)에서 질소 가스에 노출되고, 수증기 질소의 분압이 가스상 압력과 평형이 되면, 질소는 가스 압력이 내려가면 물에서 기포화될 수 있다. 이는 비등이 아니며, 용매가 비등하는 압력보다 높은 압력에서 종종 일어날 수 있다. 예를 들어, CO₂ 가스의 분압이 높은 병에 담긴 탄산 음료는, 병 뚜껑을 열어 압력이 내려가면 빠르게 기포화된다(비등하지 않음).

- [0029] "분산성(Dispersibility)"은 분산된 입자가 대상체의 폐로 호흡되거나 또는 흡입될 수 있도록 분말 조성물이 기류 중에서 분산(즉, 현탁)될 수 있는 정도를 의미한다. 즉, 20%만 분산가능한 분말이란 입자 질량의 20%만이 폐 흡입을 위해 현탁될 수 있다는 것이다.
- [0030] 건조된 발포체 조성물에서 "건조"는 잔류 수분 함량이 약 10% 보다 낮은 것을 의미한다. 건조된 발포체 조성물은 통상 잔류 수분 5% 이하, 또는 약 3%~0.1%로 건조된다. "건조 발포체"는 잔류 수분 함량이 10% 보다 낮은 안정화된 발포체, 1차 건조 후 발포체, 및/또는 2차 건조 후 발포체일 수 있다. 흡입용 입자에서 "건조"는 조성물이 에어로졸을 형성하기 위해 입자가 흡입 장치에 쉽게 분산될 수 있는 수분 함량을 갖는 것을 의미한다. 본 명세서에서 기술하는 방법에서 1차 건조는 발포체의 초기 냉동 시점부터 2차 건조가 시작되는 시점까지 수행되는 건조를 의미한다. 대체로, 대량의 1차 건조는 빙점에서 승화를 통해 수행한다. 본 명세서에서 기술하는 방법에서 2차 건조는 빙점(예를 들어, 0°C 또는 냉동 제제의 빙점)보다 높은 온도에서 수행하는 건조를 의미한다. 전형적인 냉동-발포체 건조 과정에서, 2차 건조 단계는 발포체의 잔류 수분이 약 25% 내지 10% 값 또는 그 이하가 되게 한다.
- [0031] "부형제" 또는 "보호제"(냉동보호제 및 동결보호제 포함)는 대체로 분무 냉동 건조 과정 동안 치료제의 안정성을 보장하거나 증가시키기 위해, 그리고 이후 분말 산물의 장기 안정성 및 유동성을 위해 부가되는 화합물 또는 물질을 의미한다. 적절한 부형제는 수분과 접촉시 중합하거나 응축되지 않는, 대체로 비교적 자유로운 유동성 미립자 고체이고, 환자가 흡입할 경우 기본적으로 무해하고 치료제의 생물학적 활성을 변경시키는 방식으로 유의하게 상호작용하지 않는다. 적절한 부형제는 이하에 기술하였으며, 이에 제한되지는 않고, 단백질 예컨대 인간 및 소 혈청 알부민, 젤라틴, 면역글로불린, 단당류(갈락토스, D-만노스, 솔보스 등), 이당류(락토스, 트레할로스, 수크로스 등), 시클로덱스트린 및 다당류(라피노스, 말토덱스트린, 텍스트란 등)을 포함하는 탄수화물; 아미노산 예컨대 1나트륨 글루타메이트, 글리신, 알라닌, 아르기닌 또는 히스티딘을 비롯하여 소수성 아미노산(트립토판, 티로신, 류신, 페닐알라닌 등); 메틸아민 예컨대 베타인; 부형제 염 예컨대 황산마그네슘; 폴리올 예컨대 3수산기 또는 고급 당 알콜, 예를 들어 글리세린, 에리트리톨, 글리세롤, 아라비톨, 자일리톨, 솔비톨 및 만니톨; 프로필렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; Pluronic; 계면활성제; 및 이의 조합을 포함한다.
- [0032] "유리" 또는 "유리질 상태" 또는 "유리질 매트릭스"는 이의 유동성을 잃은 액체, 즉 점도가 매우 높은 액체를 의미하는데, 이때 점도는 $10^{10} \sim 10^{14}$ 파스칼-초 범위이다. 분자가 진동 운동하지만 매우 느린(거의 측정불가능) 회전 및 병진하는 성분을 갖는 준안정성 비정질 시스템으로서 볼 수 있다. 준안정성 시스템으로서, 유리 전이 온도보다 낮게 적절하게 보관시에 장기간 동안 안정하다. 유리는 열역학적 평형 상태가 아니기 때문에, 유리 전이 온도 또는 그 근처 온도에서 보관되는 유리는 이완되어 평형 상태로 되고 이의 높은 점성을 잃는다. 생성된 고무 또는 시럽같은, 유동성 액체는 대체로 화학적 및 구조적으로 불안정하다. 유리는 여러 다양한 경로를 통해 얻을 수 있지만, 어떠한 경로를 통해서건, 마이크로 수준에서는 물리적 및 구조적으로 동일한 물질로 나타난다. 그러나, 본 발명의 냉동 발포체는 예를 들어, 종래 냉동 건조 물질에서 발견되지 않는 예를 들어 발포된 개방 셀 및/또는 폐쇄된 셀 마크로구조가 포함된다는 것은 주목할만하다. 본 발명의 목적을 위해 유리질 매트릭스를 얻는데 사용하는 방법은 대체로 용매 승화 및/또는 증발법이다.
- [0033] "유리 전이 온도"는 기호 T_g 로 나타내며 조성물이 유리 또는 유리질 상태에서부터 시럽 또는 고무성 상태로 변하는 온도이다. 대체로, T_g 는 시차 주사 열량계(DSC)를 사용하여 측정하고 전이 전반에 걸쳐 주사시에 조성물의 열용량 변화(C_p)가 시작되는 온도로서 표준적으로 측정된다. T_g 의 정의는 항상 임의적이며 현재 국제적인 협약은 존재하지 않는다. T_g 는 전이의 시작점, 중간점 또는 종료점으로서 정의할 수 있고, 본 발명의 목적을 이해, 본 발명자들은 DSC를 사용시 C_p 변화의 시작점을 사용한다. 문헌 ["Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers" by C. A. Angell: Science, 267, 1924-1935 (Mar. 31, 1995)] 및 문헌 ["Differential Scanning Calorimetry Analysis of Glass Transitions" by Jan P. Wolanczyk: Cryo-Letters, 10, 73-76 (1989)]을 참조한다. 보다 구체적인 수학적 표현법은 문헌 ["Nature of the Glass Transition and the Glassy State" by Gibbs and DiMarzio: Journal of Chemical Physics, 28, NO. 3, 373-383 (March, 1958)]을 참조한다. 이들 문헌을 참조하여 본 발명에 포함시키다.
- [0034] "침투 증강제"는 점막 또는 내막을 통한 약물 침투를 촉진하고 대체로 이러한 특징이 바람직한 경우에, 예를 들어 비강내, 직장 내 및 질내로 사용할 수 있는 표면 활성 화합물이다.
- [0035] "약학적으로 허용되는" 부형제(비히클, 첨가제)는 사용되는 활성 성분의 유효 용량을 제공하도록 대상 포유류에게 합당하게 투여할 수 있는 것들이다. 바람직하게, 이들은 FDA가 현재까지 GRAS(Generally Regarded as Saf

e)라고 지정한 부형제이다.

- [0036] "약학 조성물"은 활성 성분의 생물학적 활성이 확실히 유효할 수 있게 하는 형태로 존재하고, 이 조성물이 투여되는 대상체에게 독성을 갖는 추가 성분을 함유하지 않는 조제물을 의미한다.
- [0037] "폴리올"은 다수의 히드록실 기를 갖는 유기 물질로서, 예를 들어, 당류(환원당 및 비환원당), 당 알콜 및 당 산을 포함한다. 본 발명에서 바람직한 폴리올은 분자량이 약 600 kDa(예를 들어, 약 120 내지 약 400 kDa 범위)보다 작은 것이다. "환원당"은 금속 이온을 환원시킬 수 있거나 또는 단백질 내 리신 및 다른 아미노산과 공유적으로 반응할 수 있는 헤미아세탈 기를 함유하는 폴리올이다. "비환원당"은 환원당의 특성을 갖지 않는 당이다. 환원당의 예는 프룩토스, 만노스, 말토스, 락토스, 아라비노스, 자일로스, 리보스, 람노스, 갈락토스 및 글루코스 등이다. 비환원당은 수크로스, 트레할로스, 솔보스, 멜레지토스 및 라피노스 등이 있다. 당 알콜의 예로는 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 트레이톨, 솔비톨 및 글리세롤 등이 있다. 당 산으로서, L-글루코네이트 및 이의 금속성 염이 포함된다.
- [0038] "분말"은 비교적 자유롭게 유동적이고 흡입 장치에 용이하게 분산될 수 있는 미세 분산 고체 입자로 이루어진 조성물로서 이후에 환자가 흡입한 후에 상기 입자는 비점막을 포함한 상기도를 통한 비강내 또는 폐 투여에 적합하다.
- [0039] 조성물에 대한 "추천 저장 온도"는 일관적인 전달 용량을 보장하기 위해 조성물의 저장 수명 동안 약물의 안정성을 유지하도록 분말화 약물 조성물을 저장할 수 있는 온도(T_s)이다. 이 온도는 조성물의 제조자가 처음에 결정하고 판매를 위한 조성물 승인을 담당하는 정부 기관(예를 들어, 미국에서는 식품의약국(FDA))이 승인한다. 상기 온도는 활성 약물 및 제품 내 다른 물질의 온도 감응성에 따라서 각 승인된 약물 제품에 대해 다양하다. 추천 저장 온도는 약 0°C~약 40°C로 다양하지만, 대체로 주위 온도, 즉 약 25°C이다. 일반적으로 약품은 추천 저장 온도 또는 그 이하의 온도에서 유지시킨다.
- [0040] 소정 시점에서 생물학적 활성 물질, 예컨대 효소의 생물학적 활성이 예를 들어 결합 검정법에서 측정된 약학 조성물 제조시에 나타나는 생물학적 활성의 약 10%(검정법 오차 내) 이내이면, 그 생물학적 활성 물질은 약학 조성물 중에서 "이의 생물학적 활성을 유지하는 것이다". 생바이러스 또는 박테리아의 경우에서, 생물학적 활성은 조성물의 바이러스 역가 또는 콜로니 계수가 초기 역가 또는 계수의 1 log 이내인 경우에 유지되는 것으로 간주할 수 있다. 생존 세포에 대한, 생물학적 활성은 조성물의 생존 세포 계수가 초기 계수의 50% 이내인 경우에 유지되는 것으로 간주한다. 인플루엔자 생바이러스 역가를 결정하기 위해 사용되는 검정법은 형광 초점(Fluorescent Focus Assay) 검정법(FFA)이다. 이 검정법에 의한 역가는 ml 당 log 형광 초점 단위(log FFU/ml)로 기록한다. 1 log FFU/ml은 대략 ml 당 1 log 조직 배양 감염성 용량(log TCID₅₀/ml)과 동일하다. 다른 "생물학적 활성" 검정법을 이하에 설명한다.
- [0041] 소정 시점에서 화학적 안정성이 있어서, 생물학적 활성 물질이 본 발명에서 정의한 바와 같이 이의 생물학적 활성을 유지하는 것으로 간주된다면, 생물학적 활성 물질은 약학 조성물 중에서 "이의 화학적 안정성을 유지한다". 화학적 안정성은 생물학적 활성 물질의 화학적으로 변경된 형태를 검출 및 정량하여 평가할 수 있다. 화학적 변경은 크기 변화(예를 들어, 단백질의 클립핑)를 포함하는데, 이는 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE 및/또는 MALDI/TOF MS(Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry)를 사용하여 평가할 수 있다. 다른 유형의 화학적 변화는 전하 변화(예를 들어, 탈아미드화 결합으로 발생)를 포함하며, 이는 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피를 통해 평가할 수 있다.
- [0042] 색상 및/또는 투명성의 육안 검사, 또는 UV 광산란법 또는 크기 배제 크로마토그래피를 통해 측정시 응집, 침전 및/또는 변성의 유의한 증가가 없는 것으로 나타나면 생물학적 활성 물질은 약학 조성물 중에서 "이의 물리적 안정성을 유지하는 것이다".
- [0043] "안정한" 제제 또는 조성물은 거기에 존재하는 생물학적 활성 물질이 저장시에 이의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 실질적으로 유지하는 것이다. 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석법은 당분야에서 입수가능하고 예를 들어, 문헌 [Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)]을 참조한다. 안정성은 선택된 시간 기간 동안 선택 온도에서 측정할 수 있다. 경향 분석법을 사용하여 상기 기간 동안 물질을 실제 보관하기 전에 예상 저장 수명을 추정할 수 있다. 생 인플루엔자 바이러스에 대한 안정성은 1 log의 FFU/ml 또는 1 log의 TCID₅₀/ml이 손실되는데 걸리는 시간으로서 정의한다. 바람직하게, 조성물은 3개월 이상 동안 실온(~25°C)에서 안정하거나, 또는 1개월 이상동안 40°C에서, 및/또는 1년 이상 동안 2

~8℃에서 안정하다. 또한, 조성물은 조성물의 냉동(예를 들어, -70℃까지) 및 해동 이후에 안정하다.

[0044] 약학적 의미로, 생물학적 활성 물질의 "치료 유효량"은 질병의 예방 또는 치료에 유효한 양을 의미하는데, 여기서 "질병"은 생물학적 활성 물질로 치료하여 혜택이 있는 임의의 상태이다. 여기에는 포유류가 해당 질병에 걸리기 쉬운 병적 상태를 포함하는 만성 및 급성 질병 또는 질환을 포함한다.

[0045] "치료"는 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 처치 둘 모두를 의미한다. 치료를 요하는 것에는 질병이 이미 있는 것과 질병을 예방해야하는 것을 포함한다.

[0046] "단위 제형"은 본 발명의 조성물의 치료 유효량을 함유하는 저장체를 의미한다.

[0047] 박테리아에 대한 "생존성"은 박테리아의 성장에 적합한 영양 배지 상에서 콜로니를 형성할 수 있는 능력을 의미한다. 바이러스에 대해 생존성은 적절한 숙주 세포를 감염시켜 번식할 수 있는 능력, 예를 들어 결과적으로 숙주 세포 층 상에서 플라크를 형성하는 것을 의미한다.

발명의 상세한 설명

[0062] 본 발명의 방법 및 조성물은 건조 발포체의 유리질 매트릭스 내에 생활성 물질, 예컨대 펩티드, 단백질, 핵산, 항체, 백신, 박테리아, 바이러스, 리포솜, 혈소판 및/또는 세포 현탁물의 장기 저장물을 제공할 수 있다. 본 발명의 방법은 예를 들어, 용매 중에 폴리올 또는 중합체와 생활성 물질을 포함하는 제제(발포제 포함 또는 비포함)를 제조하는 단계, 상기 제제를 발포체로 팽창시키기 위해 감압하는 단계(가스제거, 비등 및/또는 유입된 기포의 팽창 등을 포함), 및 발포체로부터 용매를 증발 또는 승화시켜 발포체를 안정화시키는 단계(발포체를 냉동시키거나 또는 냉동시키지 않음)에 의해 건조 발포체 보존 조성물을 제공한다. 상기 방법에서, 예를 들어, 특히 지질막을 포함하는 생활성 물질의 보존에 특히 적합한 방법에서, 생활성 물질은 보호제를 포함하는 현탁물로 제제화되고, 사전냉각된 후, 막의 상전이 온도 근방의 온도에서 유지시켜 보호제가 막을 침투할 수 있게 한 후 발포체로 제제를 팽창시키고, 얇은 발포체층으로 건조시키고, 매우 낮은 압력에서 건조하고, 예를 들어 실온 근방의 낮은 2차 건조 온도에서 건조시킬 수 있다.

[0063] 발포 건조 과정에서 미생물 생존률 손실은 고전단력, 비등의 공동현상, 산화 스트레스 및 발포의 기타 표면 미세 환경성 스트레스, 냉동 및 냉동-해동 스트레스, 온도 및 탈수 스트레스 등의 조합에 의해 일어날 수 있다. 특히 일부 바이러스 및 박테리아에 대한 놀라운 결과로서, 본 발명자들은, 특히 2차 건조 단계에서 온도 스트레스가 로그 사멸에 대한 주요 원인일 수 있다는 것을 발견하였다. 표준 비발포 동결 건조에서는 동일한 건조 온도가 유해하지 않더라도, 그러할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 냉동 발포 동결 건조 과정 전반에서 생존률을 유지하기 위한 독창적인 시스템 및 방법을 개발하였다.

안정한 건조 발포체의 제조 방법

[0065] 생활성 물질의 보존을 위한 안정한 건조 발포체를 제조하는 방법은, 대체로 예를 들어, 용액 또는 현탁물 중에서 폴리올 및/또는 중합체와 생활성 물질을 배합한 제제를 제조하는 단계, 발포를 개시하기 위해 상기 제제에 대해 감압을 가하는 단계, 발포체를 냉동하는 단계, 동결건조에 의해 발포체를 1차 건조하는 단계, 및 약 25℃ 또는 그 이하의 온도에서 잔류 수분 10% 이하로 발포체를 2차 건조하는 단계를 포함한다.

[0066] 생바이러스 및/또는 미생물, 예컨대 박테리아를 보존하기 위한 바람직한 구체예에서, 발포 건조 과정은 예를 들어, 미생물 및 폴리올 제제를 대략 미생물 막의 상전이 온도에서 유지시키는 것을 포함한다. 상기 제제를 빙점의 10℃ 이내로 냉각시킨 후 주위 압력 조건 이하의 대기압 또는 감압을 통해 상기 제제를 발포체로 팽창시킨다. 잠열 손실 및/또는 주변 냉각으로 발포체가 냉동된다. 발포체에 대해서 동결건조를 통해 약 60% 또는 75% 고체, 또는 그 이상으로 사전건조를 수행한다. 2차 건조는 빙점 이상의 온도 환경에서 수행한다. 제2 건조기 전체 또는 대부분 동안, 발포체는 냉동 상태로 존재하고/하거나 발포체의 유리 전이 온도(T_g) 이하로 유지되는 것이 바람직하다. 2차 건조는 대체로 잔류 수분이 약 10% 또는 그 이하, 바람직하게는 약 5%로 감소되었을 때 완료된다.

[0067] 일 구체예에서, 예를 들어, 용매 중 생활성 물질, 폴리올 및/또는 중합체의 제제는 약 200 Torr 내지 약 25 Torr의 압력 하에서 발포체로 팽창시킨 후 이 발포체를 안정화 및 건조시킨다. 이 구체예는 예를 들어, 적절한 발포체 팽창을 이루기 위해 강력한 진공(25 Torr 또는 그 이하의 압력)을 요구하지 않는다는 점에서 상기 기술한 종래 기술과 차이가 있다. 이 구체예에서, 적절한 발포는 고압에서 이루어질 수 있는데 본 발명의 방법은 예를 들어, 제제로부터 포화된 가스의 탈가스화로부터, 제제로부터 고증기압 용매의 비등, 가스 형성 화합물, 및/또는 제제에 주입되거나 포획된 기포의 확장으로 발포체 팽창 단계를 제공하기 때문이다. 이 구체예의 제제는

예를 들어 사전냉각되고/되거나 발포체의 팽창 동안 실질적으로 잠열이 손실되거나 또는 건조되어 경우에 따라 발포체의 냉각 및/또는 동결건조가 일어날 수 있다. 1차 건조 단계가 종료된 후, 안정화된 건조 발포체를 예를 들어 50 mTorr 이하의 압력에서 2차 건조 온도에서 유지시켜 제제의 건조를 종료할 수 있다.

[0068] 다른 구체예에서, 발포체는 예를 들어 비등하면서 또는 비등없이 발포체 팽창 및/또는 제어가 이루어지도록 제제에 존재한다. 예를 들어, 발포제, 생활성 물질, 및 폴리올 및/또는 중합체를 함유하는 제제에 대해서 감압을 가하여 상기 제제가 발포체로 팽창되고(발포제 작용에 의한), 안정화되며 건조된다. 발포체는 예를 들어, 제제 중에서 용액 중 가스, 고증기압(휘발성) 용매, 탄산염, 활성 금속, 식료, 미세 기포의 현탁물 등, 하기 제제의 발포 부분에서 기술하는 바와 같은 것들일 수 있다.

[0069] 본 발명의 다른 구체예는 예를 들어, 생활성 물질의 보존을 위한 동결건조된 발포체 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 생활성 물질, 및 폴리올 및/또는 중합체를 포함하는 제제를 감압하에서 발포체로 팽창시키고, 냉동 및 승화시켜서 동결건조된 발포체 조성물을 제공한다. 이 구체예에서, 냉동은 예를 들어, 제제에서 열을 제거하고/하거나 용매 증발 또는 승화에 의한 잠열 손실을 통해 수행할 수 있다.

[0070] 본 발명은 예를 들어, 지질막 성분을 갖는 생물학적 물질의 보존 방법을 제공한다. 지질막을 포함하는 생활성 물질을 보존하는 방법은 예를 들어, 약 2%~40%의 폴리올 보호제를 함유하는 용액 중에서 약 30분 동안 생물학적 물질 제제를 약 45°C~0°C의 막 상전이 온도로 냉각시키는 것을 포함할 수 있다. (보호제는 예를 들어, 상전이로 막을 침투하여 막으로 싸인 체적 내 생물학적 분자를 안정화시킬 수 있다. 막 상전이 온도는 유동(높은 운동성) 상에서 보다 견고한 겔-결정성 상으로 지질막이 전이하는 온도이다. 지질막은 지질 이중층의 특징적인 상전이 온도에서 외부 환경의 수동 확산이 통과되는 경향이 있으므로, 안정화제/보호제를 세포에 충전하는 방법 중 하나는 이러한 상전이시에 사전향은반응시키는 것이다.) 이어서, 압력을 내려, 예를 들어 상기 제제를 비등시키고 발포체를 생성시킨다. 잠열과 함께 수분이 제제로부터 빠르게 손실되어, 예를 들어 발포체가 냉동될 수 있다. 물은 예를 들어, 수 분 동안 승화에 의해 계속 손실되어 실질적으로 건조된 발포체 조성물이 제공된다. 온도를 승온시켜서 예를 들어, 추가의 잔류 수분 및 수화수를 제거하여 건조 발포체의 물리적 및/또는 화학적 안정성을 증강시킬 수 있다.

[0071] 도 1은 본 발명의 예시적인 냉동 발포체 건조 과정을 도시한 것이다. 시간에 따른 진공 챔버의 온도 및 압력 그래프 위에는 다양한 건조 단계에서 엔벨로프 바이러스 함유 제제의 사진 이미지를 나타내었다. 챔버 온도 선 그래프(11)는 냉동 발포 과정 동안 진공 챔버의 온도를 나타낸 것이다. 챔버 온도는 침투 단계(12), 발포 단계(13) 및 초기(1차) 건조 단계(14)에 걸쳐, 대략 바이러스의 상전이 온도, 또는 약 15°C로 유지시킨다. 챔버 온도는 2차 건조기(15) 동안 약 33°C의 건조 온도로 상승된다. 챔버 압력 그래프(16)는 침투 단계 동안 대기압 또는 그 이상으로 유지하고, 발포 단계 동안은 약 2500 mTorr로 강하되며, 초기 건조 단계 동안은 약 250 mTorr로, 2차 건조 단계 동안은 약 50 mTorr로 내려간다. 바이알 온도 그래프(17)는 과정 동안 대표적인 바이알 내 제제에 존재하는 열전대에서 측정된 온도를 나타낸다. 상기 바이알은 침투 단계 동안은 막 상전이 온도로 유지되지만 제제로부터 수분 증발 및 승화로 인한 잠열 손실로 인해 발포 단계 동안 압력 강하에 따라 급격하게 냉각된다. 바이알 온도는 잔류 수분 손실률이 2차 건조 단계 동안 점차 감소됨에 따라 챔버 건조 온도 근처 온도로 점진적으로 상승된다.

[0072] 도 2A 내지 2D는 냉동 발포 건조 단계 동안 제제의 대표적인 바이알의 사진 이미지를 도시한 것이다. 도 2A에서, 바이알 바닥에 액체 제제는 챔버 내 압력이 강해지기 시작하면서 비등하기 시작한다. 도 2B에서, 발포 매트릭스는 수분이 손실되고 온도가 낮아지면 농후화되면서 안정화되기 시작하였다. 도 2C에서, 발포체를 냉각하고 대부분의 초기 건조 단계에서 수분이 손실되었다. 도 2D는 2차 건조 단계에서 잘 건조된 발포체 유리질 매트릭스를 도시한 것이다.

[0073] 상기 방법의 일 구체예에서, 예를 들어, 제제는 40% 수크로스, 5% 젤라틴, 0.02% Pluronic F68, 및 pH 7.2 포스페이트 완충액의 용액 중 생 약독화 인플루엔자 바이러스 생활성 물질을 포함한다. 상기 제제를 멸균된 10 mL 실리코화 유리 바이알에 분취하고 약 30분간 15°C(바이러스 엔벨로프의 대략 상전이 온도, 도 3 참조)로 사전냉각시킨다. 대략 30분 동안 약 50 mTorr로 압력을 빠르게 감압하여 전체적으로 빙핵형성 및 얼음 전파된 발포체가 생성된다. 초기 발포 및 냉동후, 얼음 승화 및 증발로 물리적으로 안정된 발포체가 생성된다. (이러한 발포체는, 제제가 발포체를 함유하는 경우에, 약 400 Torr 내지 7.7 Torr 또는 그 이하, 또는 2.5 Torr 내지 약 50 mTorr의 진공에서 생성시킬 수 있다). 2차 건조 단계에서 온도는 약 2일 동안 약 33°C로 승온시켜 조성물의 잔류 수분을 목적 수준으로 감소시킨다. 바이알은 멸균 밀봉하여 저장 동안의 안정성을 위해 오염물 및 수분을 배제시킨다.

- [0074] 제제의 제조
- [0075] 본 발명의 제제는 예를 들어, 폴리올, 중합체, 발포제, 계면활성제 및/또는 완충액을 함유하는 용액 또는 현탁액으로 제제화된 생활성 물질을 포함할 수 있다. 상기 제제 성분은 당분야의 당업자들이 인지하는 바와 같이, 성분에 적절한 방법을 사용하여 단계적으로 배합할 수 있다. 예를 들어, 중합체 및/또는 고농도의 폴리올을 교반하면서 가열 수용액에 용해시킨 후 냉각시키고 생활성 물질과 혼합할 수 있다. 생활성 물질, 예컨대 바이러스 또는 박테리아는 예를 들어, 농축시키고 원심분리 또는 여과를 통해 성장 배지에서 분리한 후 제제로 재현탁할 수 있다.
- [0076] 생활성 물질은 예를 들어, 임의의 생활성, 예컨대 효소 활성, 유전자 정보 저장, 친화성 상호작용, 면역 반응의 유도, 세포 증식, 감염, 세포 성장 억제, 세포 성장 자극, 치료 효능, 약리 효능, 항미생물 효능 등을 제공하는 관심 물질일 수 있다. 예를 들어, 생활성 물질은 효소, 항체, 호르몬, 핵산, 박테리아, 바이러스, 리포솜, 혈소판, 다른 세포 등일 수 있다. 생활성 물질은 예를 들어 생존 세포 및/또는 생바이러스일 수 있다. 생활성 물질은 백신 또는 치료제용 전달 비히클로 유용한 리포솜 또는 비생존 세포일 수 있다. 본 발명의 바이러스 생활성 물질은 예를 들어, 생바이러스 및 생 약독화 바이러스, 예컨대 인플루엔자 바이러스, 과라인플루엔자 바이러스, AAV, 아테노바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 단순 포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스, SARS 바이러스, 코로나 바이러스 패밀리를 구성원, 인간 메타뉴모바이러스, 엠스테인-바 바이러스 등일 수 있다.
- [0077] 본 방법의 보호제는 예를 들어, 임의의 다양한 폴리올을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리올 예컨대 수크로스는 생활성 물질을 물리적으로 둘러싸서 건조 과정 전반에 걸쳐 분자 구조 유지를 촉진하고 건조 상태인 유리질 매트릭스에 구조적 강성을 부여한다. 폴리올의 다른 기능은 예를 들어, 유해한 빛, 산소, 수분 등에 대한 노출로부터 생활성 물질을 보호하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리올, 예컨대 수크로스는 생활성 물질을 물리적으로 둘러싸서 유해한 빛, 산소, 수분 등에 대한 노출로부터 생활성 물질을 보호할 수 있다. 폴리올은 예를 들어, 건조 동안 수화수 손실을 대체하여 물질의 생분자 변성을 방지할 수 있다. 본 발명의 방법에서, 폴리올은 보존 조성물의 건조 발포체 구조물을 발포시키는 기포의 형성 및 안정화를 촉진하기 위해 점성을 갖는 점성제를 제공할 수 있다. 본 발명이 임의의 특정 폴리올에 국한되지는 않지만, 제제 및 발포체 조성물은 예를 들어, 수크로스, 트레할로스, 솔보스, 멜레지토스, 솔비톨, 스타키오스, 라피노스, 프룩토스, 만노스, 말토스, 락토스, 아라비노스, 자일로스, 리보스, 램노스, 갈락토스, 글루코스, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 트레이톨, 솔비톨, 글리세롤, L-글루코네이트 등을 포함할 수 있다. 대부분의 폴리올은 혼합물에 대해 예를 들어, 약 1 중량%~약 45 중량%, 약 2 중량%~약 40 중량% 또는 약 5 중량%~약 20 중량% 범위의 양으로 제제에 쉽게 용해될 수 있다.
- [0078] 중합체는 본 발명의 제제에 포함되어, 예를 들어 보호 효과 및/또는 발포체 구조 안정성을 제공할 수 있다. 폴리올과 유사하게, 중합체는 예를 들어, 생활성 물질에 물리적 및 화학적 보호성을 제공할 수 있다. 중합체는 대체로 예를 들어, 단순 중합체보다 제제에 대해서 중량만큼 보다 농후한 점도를 제공할 수 있다. 중합체의 선형 또는 분지 가닥은 예를 들어, 본 발명의 건조된 발포체 조성물에 대해 예를 들어, 구조적 강도를 증가시킬 수 있다. 다양한 중합체가 예를 들어, 물에 고도로 가용성이므로, 이들은 건조 발포체의 재구성을 유의하게 방해하지 않는다. 본 발명의 방법에서, 중합체 보호제는 예를 들어, 가수분해된 젤라틴, 비가수분해된 젤라틴, 수용성 중합체, 예컨대 폴리비닐 피롤리돈, 오발부민, 콜라겐, 콘드로이틴 설페이트, 시알레이트 다당류, 액틴, 미오신, 마이크로튜블, 다이네인, 키네틴, 인간 혈청 알부민 등을 포함할 수 있다.
- [0079] 발포제는 예를 들어, 감압 적용하에서 제제를 발포체로 팽창시킬 수 있는 제제의 성분일 수 있다. 발포제는 예를 들어, 감압시에 팽창될 수 있는 제제에 현탁된 소형 기포, 및/또는 제제 내에서 가스 기포를 발생시킬 수 있는 성분일 수 있다. 발포제는 예를 들어, 용액 내 가스, 가스 형성 화학물, 용이하게 비등하는 용매, 포획 또는 현탁된 기포, 주입 기포 등일 수 있다.
- [0080] 계면활성제는 예를 들어, 다른 제제 성분에 대해 증가된 가용성, 발포시 일정 생분자의 표면 장력 유도된 변성에 대한 보호성, 기포 안정성, 빠른 재구성성 등을 제공하도록 본 발명의 방법의 제제에 포함시킬 수 있다. 계면활성제는 예를 들어, 적절한 이온성 또는 비이온성 계면활성제, Tween 계면활성제, Pluronic 계면활성제 등일 수 있다.
- [0081] 완충액을 본 발명의 제제에 첨가하여, 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법의 제제에 대해 적절히 안정한 pH를 제공할 수 있다. 본 발명의 대표적인 완충액은 예를 들어, 인산칼륨, 인산나트륨, 아세트산나트륨, 히스티딘, 이미다졸, 시트르산나트륨, 숙신산나트륨, 중탄산암모늄 및/또는 탄산암모늄 등을 포함한다. 완충액은 예를 들어, 약 pH 4~약 pH 10 범위의 pH 안정성을 제공하도록 적절한 산 및 염 형태로 조정될 수 있다. 중성 근처 pH,

예를 들어, pH 7.2가 여러 조성물에 대해 바람직하다.

[0082] 다른 부형제가 제제에 포함될 수 있다. 예를 들어, 아미노산, 예컨대 아르기닌 및 메티오닌이 상기 제제 및 조성물의 성분일 수 있다. 아미노산은 예를 들어, 생활성 물질의 비특이적 결합을 방지하는 저장 용기 및 프로세싱 표면 상의 하전된 기를 차단하는 양쪽성 이온으로서 작용할 수 있다. 아미노산은 예를 들어, 산화제 소거(scavenging), 탈아미드화제 소거 및, 단백질 구조 안정화를 통해 조성물 안정성을 증가시킬 수 있다. 다른 예에서, 글리세롤을 본 발명의 제제에 첨가시켜서, 건조된 발포체 조성물 중에서 폴리올 및/또는 가소제로서 작용할 수 있다. EDTA를 제제에 포함시켜서 파괴적인 자유 라디칼 화학반응을 개시할 수 있는 금속 이온을 소거시킬 수 있다.

[0083] 제제의 냉각

[0084] 본 발명의 제제는 예를 들어, 생활성의 안정화, 제제의 농후화, 막을 통한 제제 성분의 침투 증강 및/또는 동결 건조 전 제제의 냉동 등의 장점을 제공하기 위해, 발포체 팽창, 발포체 안정화, 냉동 및/또는 건조 전에 냉동시킬 수 있다.

[0085] 냉각은 당분야에 공지된 임의의 적절한 방법으로 통해 수행할 수 있다. 예를 들어, 냉각은 냉장 설비와의 접촉으로 수행하거나, 냉유체 스트립과의 접촉, 잠열 손실 등에 의해 수행할 수 있다. 대체로, 제제는, 이 제제가 제어된 온도와 평형을 유지하게 되는, 온도 제어된 프로세스 챔버 내 금속 랙 상의 유리 용기에서 유지된다. 챔버는 예를 들어, 냉각이 제제 용매의 증발 또는 승화로부터의 잠열 손실에 의해 이루어지도록 압력 제어부를 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명의 제제는 예를 들어, 보호제의 침투를 증강시키기 위해 지질막과 연합된 생물학적 물질의 상전이 온도로 사전냉각시킬 수 있다. 생물학적 막의 지질 이중층, 일부 리포솜의 단층은 주요 상전이 온도(T_m) 보다 높은 온도에서 유동상으로 존재할 수 있고 T_m 보다 낮은 온도에서 결정상으로 존재할 수 있다. 유동상막 및 결정상막은 친수성 분자 침투에 대해 연속적인 소수성 장벽으로 존재할 수 있다. 임의의 특정 이론에 제한되지 않고, T_m 근방 온도에서, 경막 결합이 지질막 상의 유동상 및 결정상 영역 사이 경계에 존재할 수 있다고 여겨진다. 이러한 경막 결합은 소수성 분자, 예컨대 본 발명의 다양한 보호제에 대한 투과성을 증가시킬 수 있다. 또한, 제제가 고체 함량이 높기 때문에, 화학적 구배가 생성되어 용질, 예컨대 보호제가 막으로 더욱 유입될 수 있다. 이후에 제제로부터 수분이 제거되면, 보호제는 안정한 수준으로 막 내부에서 유지될 수 있다. 막 상전이 온도(도 3 참조)에서 보호제에 노출된 바이러스에 대해 증강된 프로세스 안정성 및 저장 안정성을 도 4 및 5에 각각 도시하였다.

[0087] 여러 지질막의 T_m 은 본 발명의 제제의 유리 전이 온도(T_g) 및 빙점보다 높다. 이는 대략 지질막의 T_m 에서 지질막을 통해서 액체 용액 중 보호제의 확산이 용이하도록 한다. 예를 들어, 40% 수크로스 용액은 통상의 막 T_m 인 15°C에서 세포의 효과적인 침투성을 위해 액체로 남게 된다. 상 전이시에 막을 통해서 액체 용액 중 보호제의 침투 증가는 막 내부의 생물학적 분자를 보호할 수 있다.

[0088] 막의 T_m 은 예를 들어 FTIR 현미경, 굽힘 강성법, 이온 침투법 등으로 측정할 수 있다. 본 발명의 방법에서, 지질막을 갖는 생활성 물질의 제제는 예를 들어, 약 0°C~약 70°C, 약 20°C~약 45°C, 약 12°C~16°C 또는 약 15°C에서 유지시킬 수 있다. 15°C의 추정 상전이 온도에서 건조된 생 인플루엔자 바이러스 발포체(도 3 참조)가 처리과정 관련 역가 손실에 대해 보다 저항력이 있고(도 4) 10°C 및 20°C에서 건조된 발포체보다 실온에서 장기 안정성이 상당히 향상된 것으로 나타났다(도 5 참조). 제제를 T_m 에서 유지시켜 보호제의 적절한 침투가 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 제제를 약 10~약 60분, 또는 약 30분 동안 지질막 T_m 에서 유지시킬 수 있다.

[0089] 제제의 발포

[0090] 발포는 예를 들어, 제제에서 방출되는 가스의 포획 및/또는 현탁액에 사전 존재하는 기포의 팽창에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 제제 전체의 기체압력이 내려가면, 용매 성분의 비등점이 제제의 온도보다 떨어져서, 용매가 급속하게 증발하거나 비등하게 된다. 예를 들어, 용매에 용해된 가스의 분압보다 기압이 내려가는 경우, 가스제거에 의해 기체가 발생되어, 제제에서 상당량의 기포화가 일어날 수 있다. 기포 형성은 화학적으로 유도될 수 있다. 다르게, 기포화는 용기의 바닥을 통해, 예를 들어 소결 유리를 통해 가스를 유입시켜 물리적으로 유도될 수 있다.

- [0091] 발포체로 제제의 팽창은 예를 들어, 적용된 압력을 감압시켜 제제 내 기포의 팽창에 의해 수행될 수 있다. 기포는 예를 들어, 사전 존재한 것, 주입된 것 및/또는 인 시츄로 발생된 것일 수 있다. 기포는 예를 들어, 팽창 전에 제제 내로 현탁되거나, 팽창 전 또는 팽창 동안 제제로 주입되거나 또는 비등, 가스제거 또는 가스 형성 화학 반응을 통해 생성될 수 있다. 예를 들어, 발포체로 제제의 팽창을 촉진시키기 위해 포함되는 제제 성분은 본 발명의 발포제일 수 있다.
- [0092] 제제의 팽창은 예를 들어, 제제의 비등을 통해서 이루어질 수 있다. 비등은 예를 들어, 용매의 비등점에서 일어나거나, 또는 제제 용매의 증기압이 주위 압력을 넘을 때 일어날 수 있다. 비등은 예를 들어, 제제의 온도를 조정하여(고온은 고증기압을 일으킴) 및/또는 적용된 압력을 조정하여 제어될 수 있다. 대체로, 본 발명의 제제는 생활성 물질의 안정성에 보다 도움이 되는 낮은 비등점을 제공하기 위해 감압(진공, 또는 대기압보다 낮은 압력) 하에서 비등시킬 수 있다.
- [0093] 가스제거는 예를 들어, 발포체로 제제의 팽창을 제공할 수 있다. 가스는 액체 내 가스의 분압과 주위 대기압 간에 평형이 이루어질 때까지 액체 용매로 확산되어 용해될 수 있다. 주위 대기압이 예를 들어, 급격하게 강해지면, 가스는 기포로서 액체에서 빠르게 빠져나갈 수 있다. 예를 들어, 대기압에서 가스와 평형을 이룬 수용액이 보다 낮은 압력에 노출되는 경우, 가스 기포가 용기 벽 상에 형성되거나 또는 "피즈(fizz)"로서 용액에서 분출될 수 있다. 이는 비등이 아니고, 용액으로부터 용해 가스의 방출, 또는 가스제거이다. 압력을 더욱 낮추면, 가스는 실질적으로 용액으로부터 제거될 수 있다. 실제로, 용매, 온도 및 압력에 따라서, 용액의 용매가 비등을 시작할 수 있다. 본 발명의 제제는 가스제거에 의한 감압 하에서 발포체로 팽창될 수 있다. 제제가 적절한 압력, 예컨대 1 기압(해면에서 약 760 Torr)~약 500 대기압에서 가스에 노출되어, 가스가 제제 내로 유도될 수 있다. 가스가 고압(1 기압 이상)에서 제제와 평형일 경우, 팽창 제공을 위한 감압은 진공일 필요는 없다(1 기압 미만). 가스가 주변 압력, 또는 그 이하에서 제제와 평형을 이루는 경우, 기포의 팽창이 개시되는 감압은 진공일 수 있다. 본 발명의 발포체로서 작용할 수 있는 가스는 당 분야에 공지된 임의의 가스, 예컨대 공기, 산화질소, 질소, 산소, 저분자량 탄화수소, 불활성 가스, 이산화탄소 등일 수 있다.
- [0094] 예를 들어, 가스를 발생하는 화학 반응을 통해 발포체로의 제제 팽창을 제공할 수 있다. 본 발명의 발포제는 예를 들어, 당분야의 당업자에게 이해할 수 있는, 가스 발생 화학 반응에 포함되는 화학물일 수 있다. 예를 들어, 제제 내 탄산염은 산과 반응하여 CO₂ 가스를 생성할 수 있다. 다른 반응에서, 예를 들어, 물 존재하에서, 활성 금속, 예컨대 나트륨 또는 리튬이 반응하여 수소 가스를 제공할 수 있다. 직류를 사용한 전해질 반응을 사용하여, 예를 들어, 전극에서 수소 및/또는 산소 가스를 제공할 수 있다. 제제 내에서 발생하는 가스는 예를 들어, 단일적으로 팽창되거나 또는 일정 압력하에서 제제를 발포체로 팽창시킬 수 있다. 경우에 따라, 제제 내에서 화학적으로 발생된 가스는 적용된 압력의 감압에 의해 팽창되어 제제를 발포체로 팽창시킬 수 있다.
- [0095] 기포를 예를 들어, 기계적 과정을 통해 제제로 유입시킬 수 있다. 제제는 예를 들어, 제제로 가스 기포를 강력하게 도입시키고/시키거나 감압 하에서 주입된 소형 기포를 팽창시켜 발포체로 팽창될 수 있다. 예를 들어, 기포를 제제 내로 교반, 휘핑, 균질화, 송풍, 분사, 섭동, 휘젓기, 초음파처리, 와류, 블렌딩할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 점성 제제로 도입 후, 기포는 팽창 기간 동안 매트릭스 구조 내에 현탁되어 남아있을 수 있다. 현탁된 기포는 예를 들어, 감압을 가하여 팽창시키고/시키거나 제제의 건조 또는 냉각을 통해 안정화시킬 수 있다. 일 구체예에서, 소형 기포(예를 들어, 직경 0.01~0.1~1 mm)를 여과 멤브레인을 통한 가압 가스의 힘에 의해 제제로 도입될 수 있다.
- [0096] 발포는 제제 전체에 압력을 감압하여 개시되거나 팽창될 수 있다. 발포는 제제로부터의 가스제거, 도입된 소형 기포의 팽창 및/또는 용매의 비등에 의해 이루어질 수 있다. 분출된 가스는 예를 들어 제제의 점성 보호제 및/또는 계면활성제에 의해 포획될 수 있다. 발포 단계의 결과로 예를 들어, 제제의 초기 건조, 농후화 및 구조적 안정화 및/또는 발포체의 냉각이 이루어질 수 있다.
- [0097] 지질막을 포함하는 생활성 물질의 보존 과정은 예를 들어, 제제의 냉각이 일어날 수 있는 진공 조건 및 상전이 온도로의 사전냉각의 조합을 포함한다. 냉동은 냉동 건조 동안 단백질(및 막) 손상의 주요 원인이 될 수 있기 때문에, 종래에는 냉각을 방지하기 위해서 고압(예를 들어, ~100 Torr 이상), 농축 용액 및/또는 보다 높은 초기 온도를 사용하도록 하였다. 다양한 냉동보존제를 함유하는 제제의 사용 및 본 발명의 처리과정 매개 변수는 발포체 팽창, 발포체 안정화 또는 처리과정 중 건조 단계 동안 냉동되어야 하는 생활성 단백질 및/또는 막을 냉동보호할 수 있다.
- [0098] 제제로부터의 용매 증발은 진공 하에 제제의 초기 건조를 가속화시킬 수 있다. 용매의 비등은 예를 들어, 제제

외부로 용매의 신속한 이동, 제제의 대류 전환, 및 표면적 증가를 통해, 제제의 초기 건조를 가속화시킨다. 여러 경우에, 기포가 너무 크거나 제제가 용기에서 유출될 수 있기 때문에 제제를 비등시키는 것은 바람직하지 않다.

[0099] 증발이 진행됨에 따라서, 발포체 구조가 안정화될 수 있다. 용매가 제제로부터 빠져나가면, 용액 중 보호제가 농축되고 농후화될 수 있다. 용매의 증발 및 잠열 손실로 제제가 냉각된다. 일정 시점에서, 냉각 및 농축된 보호제가 이의 유리 전이 온도에 도달하고 액체로서의 유동성이 멈추게 된다. 잠열 손실로 제제가 냉동될 수 있다. 대체로, 냉동은 차가운 표면 및/또는 차가운 대기와의 접촉에 의해 열이 제거된 결과이다. 유리질 및/또는 냉동 제제는 안정한 발포체 구조를 보존할 수 있다. 용기의 바닥에서 기포 형성을 촉진하기 위해 홀딩(holding) 용기에 예칭된 유리 바닥을 제공하여서, 전체적으로 개방셀 발포체 구조물을 제공할 수 있다. 농후화된 제제를 통해 상부 이동한 기포는 개방셀 발포체의 상호연결 공간을 형성할 수 있다. 개방셀 발포체는 또한 기포가 없는 제제의 침전 또는 제제 상의 밀봉 표면부의 형성을 방지하는 급속 건조 및 농후화를 통해 조성될 수 있다. 개방셀 발포체는 2차 건조 시간 및 재구성 시간을 단축시킬 수 있다.

[0100] 발포는 예를 들어, 제제 성분의 유형 및 농도, 제제 온도, 가해진 압력 수준, 압력 변화율등의 조건에 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 계면활성제 또는 증점제의 존재는 덜 조밀한 발포체를 위해 기포를 안정화시킬 수 있다. 다른 예에서, 잠열 손실을 예를 들어, 프로세스 챔버 가열로 교체하여 용매의 비등을 연장시킬 수 있다. 다른 예에서, 보다 낮은 압력을 통해 보다 강렬하거나 또는 연속적인 비등 및/또는 팽창을 제공할 수 있다. 압력은 예를 들어, 본 발명의 방법에서 바람직한 발포 및/또는 냉동이 이루어지도록, 약 400 Torr 보다 낮게, 약 200 Torr 이하, 약 100 Torr 내지 약 25 Torr 또는 그 이하, 25 Torr 내지 7.7 Torr 또는 그 이하, 또는 2500 mTorr 내지 약 50 mTorr, 또는 약 25 mTorr 이하로 감압시킬 수 있다. 예를 들어, 발포, 발포체 안정화, 발포체 초기 건조를 완료하기 위해, 진공은 약 1시간 또는 약 2시간 동안 유지시킬 수 있다.

[0101] 본 발명의 방법에서 초기(예를 들어, 1차) 건조는 예를 들어, 동결건조를 포함할 수 있다. 교체없이 잠열이 손실되거나 또는 열이 전도되어 버렸을 때, 예를 들어, 제제의 냉동 온도에 도달할 수 있다. 증발, 접촉 전달 및/또는 승화로 인해 추가로 열이 손실되면 제제는 냉동되어, 예를 들어 발포체 구조가 안정화된다. 초기 건조는 예를 들어, 추가 용매를 진공으로 승화를 통해 제거하면서, 연속할 수 있다. 승화 및/또는 증발은 예를 들어, 응축 또는 탈수를 통해 발포체 주변 가스 환경에서 용매(수분)를 제거하여 유도시킬 수 있다.

[0102] 2차 건조

[0103] 구조적으로 안정하고 초기에 건조된 발포체의 2차 건조는 예를 들어, 주위 온도에서 장기간 동안 보관시 안정한 조성물을 제공하기 위해, 포획된 용매, 또는 분자 수화수를 제거할 수 있다. 2차 건조는 예를 들어, 수 시간 내지 수일 동안 강한 진공 하에서 냉온 내지 온난한 온도의 적용을 포함할 수 있다. 생물 형태를 포함하는 생활성 물질의 보호를 위한 바람직한 구체예에서, 생존물은 예를 들어, 2차 건조 단계 동안 실온 또는 그 이하의 온도에서 온도 감속(moderation)에 상당히 의존적이라는 것을 확인하였다.

[0104] 예를 들어, 잔류 용매를 제거하기 위해 초기에 건조시킨 발포체에 열을 가할 수 있다. 발포체를 적당하게 가열하기 위해서, 예를 들어, 실질적인 양의 부가 열을 가하지 않거나, 또는 발포체의 온도를 높이지 않고, 증발 또는 승화의 잠열을 교체하도록 경제적으로 열을 가할 수 있다. 열은 예를 들어, IR 광으로서, 감압 분위기를 가열하여 가할 수 있고/있거나, 선반, 트레이 및 유리 바이알 등의 연관된 하드웨어를 통해서 발포체에 열을 전도할 수 있다. 건조 온도는 예를 들어, 발포체 구조의 붕괴를 방지하기 위해서 남은 조성물의 유리 전이 온도보다 낮을 수 있다. 본 발명의 방법은, 비정질 유리질 매트릭스 내에 1 이상의 생물학적 활성 물질을 포함하는 약학적으로 허용되는, 유리질 매트릭스를 생성시킨다. 유리질 매트릭스는 중공 발포체 기포 셀 둘레에 거대한 규모의 발포체 매트릭스 벽 구조를 형성하는 고체 물질일 수 있다. 바람직하게, 상기 조성물은 거의 완전하게 건조된다. 일부 수분 또는 다른 수성 용매가 조성물 중에 잔존할 수 있지만, 대체로, 중량으로 10% 를 넘지 않는 잔류 수분이 남는다. 건조 온도는 약 10°C~약 70°C, 약 25°C~약 45°C 또는 약 35°C 범위일 수 있다. 많은 생활성 물질에 대한 전형적인 2차 건조 과정은 예를 들어, 약 30°C~약 35°C의 건조 온도로 온도를 승온시키는 단계, 및 약 0.5일~약 5일 동안 유지시켜 잔류 수분이 0.1%~약 10%, 또는 약 3%인 안정한 건조 발포체 조성물을 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 미생물 및 바이러스의 보존을 위한 바람직한 구체예에서, 2차 건조 온도는 30°C 미만, 보다 바람직하게는 25°C, 20°C 또는 그 이하일 수 있다. 미생물의 2차 건조를 위한 바람직한 구체예에서, 건조 온도는 서서히 그리고 연속적으로(예를 들어, 온도 구배 프로파일로) 1차 건조 조건에서부터 서서히 승온시키거나, 또는 일련의 소규모 단계식으로 서서히 승온시킨다. 본 명세서에서 사용하는 "건조", "건조된", 및 "실질적으로 건조된"은 수분이 약 0%~약 5%인 조성물을 포함한다. 바람직하게, 유리질 매트릭스는 칼 피서

방법을 사용하여 측정된 수분 함량이 약 0.1%~약 3%이다.

[0105] 진공을 2차 건조 과정에 제공하여 수분 제거율 증가시키고/시키거나 잔류 수분 정도를 낮추도록 제거를 촉진할 수 있다. 2차 건조 동안 진공은 예를 들어, 400 Torr 미만, 100 Torr 미만, 2.5 Torr 미만, 500 mTorr 미만, 100 mTorr 미만, 50 mTorr 미만 또는 바람직하게는 약 25 mTorr일 수 있다. 미생물을 보호하기 위한 바람직한 구체예에서, 비교적 낮은 압력을 2차 건조 시에 적용하는데, 예를 들어, 10 Torr 미만, 1 Torr 미만, 500 mTorr 미만, 100 mTorr 미만, 50 mTorr 미만으로 하고, 따라서 저온에서 고속 건조가 적용된다. 생물 형태의 보존을 위해서, 매우 낮은 절대압으로 2차 건조를 진행하고 임의의 장기간 동안 고온 2차 건조는 피하는 것이 바람직하다.

[0106] 냉동 발포체 건조 과정으로 얻은 생성물은 대체로, 비정질 고체(예를 들어, 도 8)이고, 여기서 유리질 부형제 물질, 예컨대 수크로스가 비정질 유리질 상태로 존재하고 생물학적 물질이 싸여져서, 그 결과 유리질 조성물 내 화합물 및 다른 분자의 이동성이 상당히 감소되어 단백질 비폴딩이 방지되고 분자 상호작용 또는 교차 반응성이 상당히 지연된다. 이러한 과정은 즉, 수분 교환을 통해서 단백질 상의 극성 및 하전된 기와의 수소 결합을 통해서 또는 비정질 유리에 의한 단백질의 기계적 고정화를 통해서 일어나는 것으로 여겨지며, 따라서 건조에 의해 유도된 변성을 방지하고 추가적인 분해적 상호작용이 억제된다. 유리질 고체가 이의 유리 전이 온도보다 낮은 온도이고 부형제에 남은 잔류 수분이 비교적 적게 존재하는 한, 불안정한 단백질 및/또는 지질 함유 생활성 물질은 비교적 안정하게 존재할 수 있다. 유리질 상태를 얻는 것은 일부 활성 성분은 보다 결정 상태로 존재하는 것이 양호할 수 있기 때문에 장기 안정성을 위해 필수적인 선결조건이 아님을 주지해야 한다. 생물질이 대체로 비정질 유리 상태로 건조시 안정화가 용이하다고 인식되고 있지만, 이러한 유리질 상태가 장기 보존을 위해 필수적이거나 충분하지 않은 경우도 존재한다. 생물학적 물질의 안정성에 기여하는 기전이 다원적일 수 있고 활성 성분이 내포되어 있는 분말 매트릭스의 비정질성에 제한되지 않는다는 것을 인지하는 것이 중요하다. 본 명세서에서 기술하는 과정 하에서 안정성은 이에 제한되는 것은 아니나 구조적 이동성 및 단백질 측쇄의 유연성 감소 및/또는 내장 결과로서 자유 부피의 감소, 매트릭스의 구조적 강성의 개선, 안정화제의 물리적 침투, 활성 성분으로부터 부형제의 상 분리 감소, 최종 수소 결합 도너 선택에 의한 물 치환도의 향상 등을 포함하는 다수의 인자가 포함될 수 있다. 후자는 안정화된 단백질, 핵산, 탄수화물 또는 지질의 표면에 대한 부형제의 친화성 및 결합성(avidity)의 기능이다. 대체로, 고체가 이의 유리 전이 온도 이하의 온도이고 부형제에 남은 잔류 수분이 비교적 낮게 존재하는 한, 불안정한 단백질 및/또는 지질막을 함유하는 생활성 물질은 비교적 안정하게 존재할 수 있다.

[0107] 충전 및 투여

[0108] 제제는 예를 들어, 발포 및 건조 전에 용기에 충전하거나 또는 바람직하다면, 사용을 위한 개별 용기에 분취할 수 있다. 제제는 예를 들어, 안정한 발포체로 처리하기 위하여 표준 유리 동결건조 바이알에 충전시킬 수 있다. 유리 바이알은 예칭된 바다과 기밀 마개와 함께 멸균된다. 본 발명의 생활성 물질은 예를 들어, 재구성된 용액 또는 현탁액으로 주사되거나, 또는 미분된 발포체 분말 입자의 흡입을 통해 투여될 수 있다.

[0109] 본 명세서에서 기술하는 조성물은 안정한데, 즉 이들은 내포된 생물학적 활성 물질의 생물학적 활성을 보존하고 화학적 및/또는 물질적으로 안정하다. 조성물은 이들에 대해 고온(예를 들어, 37°C)에서 노화시키고, 제제의 생물학적 활성, 화학적 및/또는 물리적 안정성을 측정하여 안정성을 시험하였다. 생 약독화 인플루엔자 바이러스 백신(FluMist™)에 대한 예로서, 이러한 실험의 결과는 이들 제제에 배합된 바이러스가 50°C에서 1개월 이상 동안 안정하였고 37°C에서 3개월 이상 동안 안정하다는 것을 보여주었다(도 6 참조). 안정성은 1 log 형광 측정 단위/ml(FFU/ml) 역가 손실에 대한 시간으로 정의한다. 25°C에서, 생 인플루엔자 바이러스는 1년 이상 동안 안정하였다(도 7 참조). 이러한 제제는 고농도의 생물학적 활성 물질을 사용한 경우에도 안정하였다. 따라서, 이러한 제제는 이들을 장기간 동안 실온 또는 그 이상의 온도에서 운송 및 저장할 수 있다는 점에서 이롭다.

[0110] 건조 후 제공된 비정질 유리질 매트릭스 내 생활성 물질의 안정한 조성물(도 8 참조)은 당분야에 공지된 방법을 사용하여 후속 처리될 수 있다. 예를 들어, 유리 매트릭스는 절단, 밀링 또는 다른 분할법으로 용이하게 분할될 수 있다. 분쇄 또는 분말화 약물에 대한 처리는 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 해머밀, Entoleter 밀로 알려진 충격밀, 제트밀, 편밀, 윌리밀 또는 유사한 밀링 장치를 사용할 수 있다. 바람직한 입자 크기는 약 100 μm~약 0.1 μm, 바람직하게는 50 μm 미만이다. 약 10 μm 미만의 입자 크기가 예를 들어, 흡입에 의한 폐 투여에 적합하며, 반면 보다 큰 입자가 상기도 및 비강 영역 투여에 적합할 수 있다. 입자 크기는 다양한 분산물 및 유동성을 얻도록 선택할 수 있다. 예를 들어, 자유 유동성 분말이 특히 비강내 또는 폐 전달용으로 적합하다. 본 발명의 분말화 조성물은 물, 염수 또는 다른 유체로 용이하게 재수화시킬 수 있다.

- [0111] 건조 발포체 조성물은 주사 또는 흡입에 의한 투여용으로 적절한 수성 완충액으로 재구성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 정맥내, 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하내, 관절내, 활액내, 수막강내, 경구, 국소, 비강내 또는 폐 경로를 통해서 생활성 물질을 전달하여 포유류에 투여할 수 있다. 발포체의 거대 표면적 및 여러 보호제의 높은 가용성은 본 발명의 건조 발포체를 원래 제제보다 저농도 또는 고농도로 재구성시킬 수 있게 한다. 일부 경우에서, 예를 들어, 생활성 물질은 소량의 피하 주사로 적절한 용량의 전달을 위해서, 고농도, 예컨대 약 400 mg/ml 이하로 재구성될 수 있다. 덜 농축된 재구성 용액을 흡입을 통한 에어로졸로서 투여할 수 있다. 투여 경로의 선택은 작용 부위, 약리학적 사항 등에 따라 좌우될 수 있다. 본 발명의 방법에서 대표적인 생활성 물질의 용량은 0.01 ng/kg~약 15 mg/kg이다.
- [0112] 생물학적 활성 물질의 적절한 용량("치료 유효량")은 생물학적 활성 물질이 예방 또는 치료 목적인지에 무관하게, 예를 들어, 치료하려는 병태, 병태의 과정 및 중증도, 사전 요법, 환자의 임상 병력 및 생물학적 활성 물질에 대한 반응도, 사용하려는 생물학적 활성 물질의 유형 및 참관인의 판단에 따라 좌우된다. 생물학적 활성 물질은 1회, 또는 일련의 치료에 걸쳐서 환자에게 적절하게 투여될 수 있고, 환자에게 진단 이후에 임의 회수로 환자에게 투여될 수 있다. 생물학적 활성 물질은 단독 치료제로서 투여되거나 또는 대상 병태를 치료하는데 유용한 다른 약물 또는 치료제와 함께 투여될 수 있다.
- [0113] 일반적인 계획안으로서, 투여되는 생물학적 활성 물질의 치료 유효량은 1회 또는 그 이상의 투여에 무관하게 환자 체중 1 kg 당 약 0.01 ng/kg~약 50 mg 범위일 수 있고, 예를 들어, 1일 투여시에, 사용되는 단백질의 전형적인 범위는 약 0.05 ng/kg~약 20 mg/kg, 보다 바람직하게는 약 0.1 ng/kg~약 15 mg/kg일 수 있다. 이러한 치료의 진행은 통상의 방법을 통해 모니터링할 수 있다.
- [0114] 본 발명의 다른 구체예에서, 제조된 제품은 본 발명의 약학 조성물을 보유한 용기를 포함하여 제공되고, 경우에 따라서는 사용 지침서를 제공한다. 적절한 용기는 예를 들어, 병, 바이알 및 시린지를 포함한다. 용기는 다양한 재료 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 예시적인 용기는 3~20 cc 단일 사용 유리 바이알일 수 있다. 다르게, 다수 용량 제제를 위해서, 용기는 3~100 cc 유리 바이알일 수 있다. 용기는 제제를 보유하고, 용기와 함께 또는 용기 상의 라벨에 사용 지침이 표시될 수 있다. 제품은 또한 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 및 사용 지침이 있는 포장 삽입물을 포함하는 상업상 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 포함할 수 있다.
- [0115] 본 발명의 조성물
- [0116] 본 발명의 조성물은 생활성 물질 및 폴리올 및/또는 중합체의 건조 발포체 조성물을 포함한다. 상기 조성물은 건조 전에 냉동을 통해 제조되기 때문에, 우선 냉동없이 건조된 발포체와는 구조 및 기능에서 근본적으로 상이하다. 예를 들어, 단순하게 제제를 건조하는 것과 제제를 냉동 건조하는 것 간의 차이보다는, 거시적 수준에서도 차이가 있다. 본 발명의 조성물은 예를 들어, 본 발명의 방법을 통해 제조할 수 있다. 본 발명의 조성물은 예를 들어, 폴리올 및 지질을 갖는 생활성 물질의 제제를 제조하는 단계, 대략 지질막의 상전이 온도의 온도로 제제를 냉각하는 단계, 제제에 대한 압력을 낮추어 발포체를 형성하는 단계, 발포체를 냉동하는 단계, 냉동 발포체로부터 수분을 승화시켜 냉동건조된 발포체 조성물을 제공하는 단계를 통해 제조할 수 있다. 제2 건조 조건을 적용하여 추가로 발포체를 건조시킬 수 있다. 본 발명의 조성물은 예를 들어, 수성 완충액 중에 재구성된 건조 발포체를 포함할 수 있다.
- [0117] 일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 생 약독화 인플루엔자 바이러스의 백신이다. 상기 조성물은 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라서 유리 전이 온도 이하의 건조 온도, 예컨대 20℃~35℃ 이하의 건조 온도에서, 6시간 내지 5일간 발포체를 2차 건조하여 잔류 수분이 약 5% 미만인 최종 조성물을 제공하는 것을 포함한다. 이러한 조성물은 1년 이상 동안 약 25℃에서 저장시 안정한 상태로 존재할 수 있다. 처리 과정 동안 초기 생존율은 막 상전이 온도(예를 들어, 약 15℃; 도 4 참조) 근방의 온도에서 제제 중에 바이러스를 유지시키고/시키거나 비교적 저온(예를 들어, 22℃)에서 2차 건조를 통해 실질적으로 향상시킬 수 있다.
- [0118] 생존 생활성 물질에 대해서, 본 발명의 특정 방법은 종래 발포 건조에 비하여 생존율을 유지하는 능력을 나타낸다. 단일 세포 미생물 및 바이러스는 대략 막의 상전이 온도에서 폴리올과 상기 물질의 사전처리, 저온에서 발포 개시, 승화에 의한 1차 건조, 2차 건조 중 유리 전이 온도 이하로 유지, 2차 건조 중 약 30℃ 이하로 유지, 보다 강한 진공 적용으로 건조 가속화 및/또는 비교적 얇은 발포체의 2차 건조의 조합으로 특히 이득을 얻는 것으로 확인되었다. 이러한 방법을 사용하여, 높은 수준의 생존율을 유지하면서 잔류 수분이 10% 미만인 발포체 중 생활성 물질의 조성물을 제조할 수 있었다. 예를 들어, 엔테로박테리아과에 속하는 박테리아를 폴리올 및/또는 중합체와 배합하고, 진공에 노출시켜 발포체를 생성시키고, 냉동 및 동결건조한 후, 수 시간 또는 수 일 동

안 약 25℃(또는 그 이하)의 온도에서 2차 건조하여, 초기 액체 제제에서 확인된 생존 콜로니 계수의 25%, 50%, 75%, 90% 또는 그 이상을 유지하는 조성물을 생성할 수 있다.

[0119] 도 5 및 6은 본 발명의 건조 발포체에 보존되고 25℃, 37℃ 및 50℃에서 저장한 엔벨로프 바이러스의 안정성 결과를 나타낸 도면이다. 개별 결과를 나타낸 시간에 따른 역가(mL 당 형광 측정 단위- FFU/mL) 그래프는 점 또는 네모로서 시간점을 나타내었다. 추세선(51) 및 95% 신뢰구간(52)은 25℃에서 본 발명의 조성물에 저장된 바이러스에 대한 약 40개월의 예상 안정성(1 log 역가 손실을 넘지 않음)을 나타낸 것이다.

[0120] 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 예를 들어, 건조 발포체 중 생활성 물질로서 안정한 저장체에 보관된 혈액 혈소판을 포함한다. 혈액 혈소판은 출혈을 방지하고 복구를 개시하기 위해 혈관 병변 부위에 응집될 수 있는 거대핵세포 유래의 세포질 단편이다. 환자에 혈소판 주입은 외상, 질환 또는 약물 유도된 기능장애로 인한 순환 혈소판의 결핍 또는 기능 이상을 회복시키기 위해 사용된다. 예를 들어, 특발성 혈소판 감소증, 겸상 적혈구 빈혈증을 앓고있는 환자, 및 절제 화학요법을 받고있는 환자는 혈소판 주입으로 치료할 수 있다. 광범위하게 다양한 악성종양에 대해 절제 화학요법 사용이 증가된 결과 대체 혈소판 요법에 대한 요구가 증대되었다. 단리된 혈소판을 사용하는데 있어서 주요한 어려움은 이들의 수명이 짧다는 것이다. 혈소판은 실온에서 최대 5일간 액체 상태로 저장하는 것에 대해서만 FDA로부터 승인 받았는데, 이 기간 동안 기능적 특성이 빠르게 저하된다. 이는 민간 및 군 의학 양쪽에서 수많은 물류 문제를 야기한다.

[0121] 혈소판 보존을 위한 조성물은 당분야에서 임의의 공지된 방법을 통해서 혈소판 풍부 혈장(PRP)를 얻은 후 적절한 항응고제로 혈액을 회수하여 제조할 수 있다. 혈소판은 본 발명의 방법에 따라 처리하여 혈소판을 포함하는 안정한 건조 발포체를 얻을 수 있다. 혈소판은 바이러스보다 크고 보다 복잡한 구조이므로, 이의 특징적인 상전이에서 건조가 특히 중요하다. 건조된 혈소판은 주입 전에 생리적으로 허용되는 완충액에 재현탁하여 재구성될 수 있다. 치료 용도로서, 완충액은 멸균된다. 완충액은 적절한 pH의 임의 완충액일 수 있다. 바람직하게, 재구성 완충액은 이에 제한되는 것은 아니로, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 히드록시에틸 전분(HES)을 포함하는, 높은 콜로이드성 삼투압을 나타내는 물질 또는 물질들을 함유할 수 있다. 바람직하게, 완충액은 염수 중 1 내지 5% 인간 혈청 알부민(HSA)이다. 바람직한 구체예에서, 혈소판, 리포솜, 동물 세포 및 식물 세포 보관은, 예를 들어 보호제의 막 상전이 온도 주입을 사용하고 저온/고진공 2차 건조를 사용하여, 다른 미생물에 대해 추천된 바와 같이 처리하였다.

[0122] 건조 발포체 조성물 제조를 위한 제제

[0123] 본 발명의 건조 발포체 조성물의 제조를 위한 제제는 예를 들어, 중합체, 폴리올, 발포제, 계면활성제 및/또는 완충액을 포함할 수 있다. 이러한 제제는 본 발명의 방법에 따라 처리되어 생활성 물질의 저장 및 투여를 위한 안정한 조성물을 제공할 수 있다.

[0124] 본 발명의 생활성 물질은 예를 들어, 생물 시스템 중에서 검출가능한 생활성을 갖는 물질, 분석용 생물학적 세포 및 분자, 의학에서 사용되는 생물학적 세포 및 분자, 연구 분야에서 사용되는 생물학적 세포 및 분자 등을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 조성물의 생활성 물질은 펩티드, 단백질, 호르몬, 핵산, 항체, 백신, 박테리아, 바이러스, 리포솜, 혈소판, 세포 현탁물 등을 포함할 수 있다.

[0125] 조성물 중 지질막을 포함하는 생활성 물질은, 대체로 생존, 및/또는 약독화된, 생물학적으로 활성있는, 생존 또는 비생존 세포, 바이러스, 미생물(예컨대 박테리아) 및/또는 리포솜 등이다. 예를 들어, 생활성 제제는 백신, 바이러스, 리포솜, 박테리아, 혈소판 및/또는 세포를 포함할 수 있다. 생존 생활성 제제는 예를 들어, 인플루엔자 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, AAV, 아데노바이러스, 호흡기 합포체 바이러스, 단순 포진 바이러스, SARS 바이러스, 인간 메나뉴모바이러스, 코로나 바이러스 패밀리 구성원, 사이토메갈로바이러스 및/또는 엡스테인-바 바이러스를 포함할 수 있으며, 이들은 본 발명의 제제에 약 10^1 TCID₅₀/mL 또는 그 이상, 약 10^3 TCID₅₀/mL ~ 약 10^{12} TCID₅₀/mL, 또는 약 10^6 TCID₅₀/mL ~ 약 10^9 TCID₅₀/mL 범위의 양으로 존재할 수 있다. 생활성 물질은 대체로 약 1 중량% 미만, 보다 바람직하게는 약 0.001 중량% 미만, 가장 바람직하게는 약 0.0001 중량% 미만의 양으로 존재하게 된다.

[0126] 건조 발포체 조성물의 제조를 위한 제제는 예를 들어, 실질적으로 전체로 고체(용매, 예컨대 물을 뺀 성분)를 포함할 수 있다. 총 고체의 대부분은 생활성 물질, 폴리올 및/또는 중합체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리올은 약 2 중량% ~ 약 50 중량%, 약 5 중량% ~ 약 45 중량%, 또는 약 20 중량% ~ 약 40 중량% 범위의 농도로 제제에 존재할 수 있다. 다른 예에서, 중합체는 약 1 중량% ~ 약 10 중량%, 또는 약 5 중량%의 농도 범위로 제제에

존재할 수 있다. 바람직하게, 제제는 발포 개시전에 고체 함량이 높으며, 대체로 약 5%~70%, 또는 약 30%~50%이다. 본 발명의 제제의 점도는 대체로 5 센티포즈(cP) 보다 높고, 보다 바람직하게는 10 cP 보다 높다. 바람직한 제제는 ~12 cP이다.

[0127] 본 발명의 폴리올은 예를 들어, 다양한 당류, 탄수화물, 및 알코올을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리올은 비환원 당, 수크로스, 트레할로스, 솔보스, 멜레지토스 및/또는 라피노스를 포함할 수 있다. 폴리올은 예를 들어, 만노스, 말토스, 락토스, 아라비노스, 자일로스, 리보스, 람노스, 갈락토스 및 글루코스, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 트레이톨, 솔비톨, 글리세롤 또는 L-글루코네이트를 포함할 수 있다. 제제가 냉동-해동에 안정한 것이 바람직한 경우에, 폴리올은 제제 내 생물학적 활성 물질이 불안정화되지 않도록 빙점(예를 들어, -20℃)에서 결정화되지 않는 것이 바람직하다. 결정 형성을 억제하기 위해 2 이상의 상이한 폴리올을 포함하는 것이 이롭다.

[0128] 본 발명의 중합체는 예를 들어, 다양한 탄수화물, 폴리펩티드, 선형 및 분지형 사슬 친수성 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제제의 중합체는 젤라틴, 가수분해 젤라틴, 오발부민, 폴리비닐피롤리돈, 콜라겐, 콘드로이틴 설페이트, 시알레이트화 다당류, 액틴, 미오신, 마이크로튜블, 다이네인, 키네틴 또는 인간 혈청 알부민을 포함할 수 있다. 이러한 첨가제는 단독으로 불활성화에 대해 생물학적 활성 물질을 반드시 안정화시킬 필요는 없고, 또한, 동결건조 및 고체 상태로 후속 저장 동안 냉동 건조된 물질의 물리적 붕괴를 방지하는데 도움이 될 수 있다. 안정화제로서 작용할 수 있는 다른 젤라틴 대체물로는 천연 콜라겐 및 알기네이트가 포함된다.

[0129] 바람직하게, 젤라틴, 및 보다 바람직하게, 가수분해 젤라틴을 사용한다. "가수분해 젤라틴"은 분자량이 약 1 kDa 내지 약 50 kDa, 또는 약 3 kDa인 부분 가수분해 젤라틴이 생성되도록 부분 가수분해된 젤라틴을 의미한다. 이 젤라틴 가수분해 생성물은 대략 젤라틴과 동일한 아미노산 조성을 갖는다. 대체로 가수분해된 젤라틴의 아미노산 조성은 공지되어 있다. 부분 가수분해 젤라틴은 임의의 시판물로부터 얻을 수 있다. 부분 가수분해된 젤라틴은 또한 단백질 가수분해 효소, 예컨대 파파인, 키모파파인 및 브로멜린 등을 통해서 젤라틴을 효소적으로 가수분해해서 얻을 수 있는데, 다른 공지된 가수분해 수단, 예를 들어 산가수분해도 사용할 수는 있다. 바람직하게, 분자량이 약 1 kDa 내지 50 kDa인 젤라틴을 사용한다. 약 3 kDa 이하로 가수분해된 젤라틴이 전체 길이 젤라틴보다 알레르기를 덜 일으킨다. 젤라틴은 돼지 및 소를 포함하여, 다양한 공급원에서 유래된 것일 수 있다. 인간화 콜라겐과 고도로 처리된 콜라겐, 예를 들어, Miyagi Chemical Industrial Co, Ltd.에서 구매가능한 알레르겐성이 감소된 약학 젤라틴인 FreAlagin을 사용할 수 있다. 또한, 제제에 사용되는 젤라틴의 양은 제제의 전체 조성 및 이의 용도에 따라 다양할 수 있다. 대체로, 젤라틴의 농도는 약 1~약 7%; 보다 바람직하게는 약 1~5%이다. 바람직한 제제는 약 5%의 젤라틴을 포함한다.

[0130] 본 발명의 조성물의 제조를 위한 제제는 예를 들어, 제제 성분의 가용성 및 안정성을 보조하고, 발포를 돕고 발포체를 안정화시키기 위해서 1 이상의 계면활성제를 포함할 수 있다. 계면활성제는 예를 들어, 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 솔비탄 모노라우레이트(Tween 20), 폴리옥시에틸렌솔비탄 모노올레이트(Tween 80), 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌 글리콜의 블록 공중합체(Pluronic) 등을 포함할 수 있다. 제제는 이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 본 발명의 제제 및 조성물은 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜/폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜 알킬 에테르, 폴리프로필렌 글리콜 알킬 에테르, 폴리에틸렌 글리콜/폴리프로필렌 글리콜 에테르 블록 공중합체, 알킬아릴설포네이트, 페닐설포네이트, 알킬 설페이트, 알킬 설포네이트, 알킬 에테르 설페이트, 알킬 아릴 에테르 설페이트, 알킬 폴리글리콜 에테르 포스페이트, 폴리아릴 페닐 에테르 포스페이트, 알킬설포숙시네이트, 올레핀 설포네이트, 파라핀 설포네이트, 석유 설포네이트, 타우리드, 사르코시드, 지방산, 알킬나프탈렌설포산, 나프탈렌설포산, 리그노설포산, 설포화 나프탈렌과 포름알데히드이 축합물 또는 설포화 나프탈렌과 포름알데히드 및 페놀의 축합물, 리그닌-설포이트 페액체, 알킬 포스페이트, 4차 암모늄 화합물, 아민 산화물, 베타인 등을 포함할 수 있다. 계면활성제는 약 0.001 중량%~약 2 중량%, 또는 약 0.01 중량%~약 1 중량% 범위의 농도로 본 발명의 제제에 존재할 수 있다.

[0131] 완충액은 예를 들어, pH를 제어하고, 안정성을 증강시키고, 성분 가용성에 영향을 주며, 투여 시 편안함을 제공하도록, 건조 발포체 조성물의 제조를 위한 제제에 존재할 수 있다. 제제 pH는 약 pH 4~약 pH 10, 약 pH 6~약 pH 8, 또는 약 pH 7.2 범위로 제어될 수 있다. 바람직한 완충액은 대체로 생활성 물질의 특정 투여 경로에 대해 안전한 것으로 인식되는 음이온 완충액의 염 형태 및 짝산이다. 본 발명의 제제 및 조성물에서 사용하는 통상의 완충액은 예를 들어 인산칼륨, 인산나트륨, 아세트산나트륨, 시트르산나트륨, 시스티딘, 이미다졸, 나트륨, 수시네이트, 중탄산나트륨, 탄산염 등을 포함할 수 있다.

[0132] 일 구체예에서, 제제는 상기 확인된 제제(즉, 생물학적 활성 물질, 폴리올, 계면활성제 및 젤라틴)를 함유하고, 1 이상의 보존제, 예컨대 벤질 알콜, 페노일, m-크레졸, 클로로부탄올 및 베네토늄 클로라이드 등이 실질적으로 없다. 다른 구체예에서, 특히 제제가 다수용량 제제인 경우에, 제제에 보존제가 포함될 수 있다.

[0133] 1 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 예컨대 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기술된 것들을 제제에 포함시킬 수 있으며, 단 이들이 제제의 바람직한 특성에 역작용을 주지 않는 것을 조건으로 한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 농도 및 용량에서 수용체에게 비독성이고 추가의 완충제, 공용매, 염형성 반대이온 예컨대 칼륨 및 나트륨, 산화방지제 예컨대 메티오닌, N-아세틸 시스테인 또는 아스코르브산, 킬레이팅제, 예컨대 EDTA 또는 EGTA를 포함한다. 아미노산, 예컨대 아르기닌 및 메티오닌이 제제에 포함될 수 있다. 아르기닌은 약 0.1 중량%~약 5 중량% 범위의 양으로 제제에 존재할 수 있다. 메티오닌은 1 mM~약 50 mM 또는 약 10 mM의 농도 범위로 제제에 존재할 수 있다. 글리세롤은 약 0.1 중량%~약 5 중량%, 또는 약 1 중량%의 농도 범위로 제제에 존재할 수 있다. EDTA는 약 1 mM~약 10 mM, 또는 약 5 mM의 농도 범위로 제제에 존재할 수 있다.

실시예

[0134] 이하 실시예를 설명을 위해 제공하지만, 청구된 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

[0135] 실시예 1 : 생 약독화 바이러스의 제조

[0136] 이 실시예는 125일 동안 37°C에서 저장 후 단백질 본래 상태 및 안정성을 유지하는 조성물에 대해 기술하였다.

[0137] 1가의 생 약독화 인플루엔자 바이러스 B/하얼빈(CAZ039 lot)을 40% 수크로스, 5% 젤라틴, 0.02% Pluronic F68, 25 mM 7.2 pH KPO₄ 완충액을 함유하는 8.0 log FFU/ml 역가 용액(바이러스 스톡 용액의 총 단백질 농도~10 µg/ml)으로 제제화하였다. 이 용액의 1 ml 분취액을 동결건조 마개가 부분적으로 덮힌, 10 ml 유리 동결건조 바이알에 분배하고, VirTis Genesis 25EL 동결건조기(VirTis(Gardiner, NY)에서 구매)를 사용하여 하기의 사이클 조건으로 동결건조하였다:

- [0138] 1) 15°C로 선반 사전냉각(-60°C로 설정된 컨테서가 구비된 동결건조기 선반 상에 건조제 포함);
- [0139] 2) 바이알을 적재하고 30분간 평형화함;
- [0140] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0141] 4) 60분간 유지;
- [0142] 5) 약 0.7°C/분으로 33°C로 승온;
- [0143] 6) 48시간 동안 유지; 및
- [0144] 7) 바이알에 마개를 함.

[0145] 얻어진 발포체는 수분 함량이 대략 2.2%(w/w)이고 T_g는 약 43°C였다.

[0146] 실시예 2 : 제제

[0147] B/하얼빈 인플루엔자 바이러스 또는 위약을 사용하여 본 발명의 방법에 따라 하기 제제를 제조하였다. 제제의 pH는 수산화나트륨 또는 수산화칼륨을 사용하여 조정하였다.

[0148]

ID	글루타메이트	폴리올	중합체 첨가제	계면활성제	기타
AVS1	20%	10% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	2% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS2	20%	10% 수크로스	-	0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS3	25%	15% 수크로스	--	0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 5 mM EDTA, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS4	25%	15% 수크로스	--	0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액

AVS5	25%	5% 수크로스	--	0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS1A	20%	10% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	2% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS2A	20%	10% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS3A	25%	15% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS4A	25%	15% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS5A	25%	5% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액

[0149]

AVS6	20%	10% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	2% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌
AVS7	20%	10% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS8	25%	15% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 5 mM EDTA, 10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS9	25%	15% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS10	25%	5% 수크로스		0.1% Pluronic F68	5% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS11	10%	20% 수크로스 10% 라피노스		0.2% Pluronic F68	1% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS12	20%	20% 라피노스		0.2% Pluronic F68	1% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS13	25%	10% 수크로스 2% 라피노스		0.2% Pluronic F68	5% 아르기닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS14	20%	10% 수크로스		0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 50 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS15	20%	10% 수크로스	1% 젤라틴	0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌
AVS16	20%	10% 수크로스	1% 젤라틴	0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌
AVS17	20%	2% 라피노스	1% 젤라틴	0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌
AVS18	20%	10% 라피노스		0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌
AVS19	20%	10% 수크로스		0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 100 mM 7.0 시트레이트 완충액
AVS20	20%	10% 수크로스	1% 젤라틴	0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 100 mM 7.0 시트레이트 완충액
AVS21	20%	10% 수크로스 2% 라피노스	1% 젤라틴	0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 100 mM 7.0 시트레이트 완충액

[0150]

AVS22	20%	2% 라피노스	1% 젤라틴	0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 100 mM 7.0 시트레이트 완충액
AVS23	20%	10% 라피노스		0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 100 mM 7.0 시트레이트 완충액
AVS24	20%	10% 수크로스 5% 라피노스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS25	20%	15% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS26	20%	15% 라피노스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액

AVS27	20%	10% 수크로스 5% 라피노스		0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS28	20%	10% 수크로스 5% 라피노스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	2% 오발부민, 10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS29		40% 라피노스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS30	10%	40% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS31	10%	40% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액, 1% 글리세롤
AVS32	20%	15% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS33	20%	15% 수크로스	1% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS34	20%	15% 수크로스		0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS35	20%	20% 수크로스	5% 젤라틴	0.1% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS36	20%	20% 수크로스		0.1% Pluronic F68	2% 오발부민, 10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS37	10%	20% 수크로스 10% 라피노스		0.1% Pluronic F68	1% 아르기닌, 10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액

[0151]

AVS38	20%	20% 수크로스	1% 젤라틴	0.2% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS39	20%	20% 수크로스	5% 젤라틴	0.005% Tween20	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS40	20%	20% 수크로스		0.005% Tween20	2% 오발부민, 10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS41	10%	40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS42	10%	40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액, 1% 글리세롤
AVS43		40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS44		40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액, 1% 글리세롤
AVS45	10%	40% 수크로스	5% 젤라틴		10 mM 메티오닌, 1% 글리세롤
AVS46		50% 수크로스	1% 젤라틴		10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액, 1% 글리세롤
AVS47	10%	40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액, 1% 글리세롤
AVS48		40% 수크로스 5% 트레할로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액, 1% 글리세롤
AVS49		40% 수크로스	3% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액

AVS50		40% 수크로스	1% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS51		40% 수크로스		0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS52		40% 수크로스	5% 젤라틴		10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS53		40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS54		40% 수크로스	5% 젤라틴		20 mM 7.2 KPO ₄ 완충액

[0152]

AVS55		20% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS56		10% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS57		40% 수크로스		0.02% Pluronic F68	5% 오발부민, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS58A		40% 수크로스	5% 젤라틴 (Sigma AD)	0.02% Pluronic F68	25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS58B		40% 수크로스	5% 젤라틴 Sigma (R)	0.02% Pluronic F68	25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS59		40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS60		40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS61		20% 수크로스	2.5% 젤라틴	0.01% Pluronic F68	5 mM 메티오닌, 12.5 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS62		40% 수크로스		0.02% Pluronic F68	5% 아르기닌, 10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS63		40% 수크로스		2.5% PEG 1000, 0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS64		40% 수크로스		2.5% PVP 10,000, 0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS65		40% 수크로스		2.5% Ficoll 400K, 0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS66		20% 수크로스	2% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	10 mM 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS67		40% 수크로스	5% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	1% 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS68		20% 수크로스	2% 젤라틴	0.02% Pluronic F68	1% 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS69		40% 수크로스		0.02% Pluronic F68	5% 아르기닌, 1% 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액
AVS70		20% 수크로스		0.02% Pluronic F68	5% 아르기닌, 1% 메티오닌, 25 mM 7.2 KPO ₄ 완충액

[0153]

동결건조 후 37℃ 또는 50℃에서 저장한 이후에 상기 제제의 열안정성을 측정하였다. log FFU/ml 또는 TCED₅₀/ml로 측정된, 역가 손실을 감소로서 확인된 바와 같이 열안정성 증가를 관찰할 수 있었다. FFU/ml 단위로 1 log 차수 손실에 요구되는 시간을 하기에 본 발명의 다양한 제제에 대해 나타내었다.

[0154]

제제	37℃에서 안정성
AVS43	125일
AVS41	97일
AVS44	142일
AVS30	93일
AVS31	48일
AVS42	146일

[0155]

실시예 3 : 발포 건조 조건

[0156]

제제를 하기의 동결건조/건조 챔버 조건을 사용하여 제조하였다:

[0157]

사이클 1:

[0158]

1) 25℃로 선반 사전냉각;

[0159]

2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;

[0160]

3) 50 mTorr로 진공 설정;

[0161]

4) 30분간 유지;

[0162]

5) 45℃로 승온;

[0163]

6) 1시간 동안 유지;

[0164]

7) 온도를 37℃로 조정하고 1시간 동안 유지; 및

[0165]

8) 바이알을 마개로 막음.

[0166]

사이클 2:

[0167]

1) 30℃로 선반 사전냉각;

[0168]

2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;

[0169]

3) 50 mTorr로 진공 설정;

[0170]

4) 2시간 동안 유지;

[0171]

5) 37℃로 승온;

[0172]

6) 16시간 동안 유지; 및

[0173]

7) 바이알을 마개로 막음.

[0174]

사이클 3:

[0175]

1) 15℃로 선반 사전냉각;

[0176]

2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;

[0177]

3) 50 mTorr로 진공 설정;

[0178]

4) 60분간 유지;

[0179]

5) 37℃로 승온;

[0180]

6) 20시간 동안 유지; 및

[0181]

7) 바이알을 마개로 막음.

[0182]

사이클 4:

[0183]

1) 12℃로 선반을 사전냉각;

[0184]

2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;

- [0185] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0186] 4) 25분간 유지;
- [0187] 5) 33℃로 승온;
- [0188] 6) 24시간 동안 유지; 및
- [0189] 7) 바이알을 마개로 막음.
- [0190] 사이클 5:
- [0191] 1) 17℃로 선반 사전냉각;
- [0192] 2) 바이알을 적재하고 10분간 평형화시킴;
- [0193] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0194] 4) 60분간 유지;
- [0195] 5) 37℃로 승온;
- [0196] 6) 48시간 동안 유지;
- [0197] 7) 40℃로 승온;
- [0198] 8) 48시간 동안 유지; 및
- [0199] 9) 바이알을 마개로 막음.
- [0200] 사이클 6:
- [0201] 1) 20℃로 선반 사전냉각;
- [0202] 2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;
- [0203] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0204] 4) 60분간 유지;
- [0205] 5) 33℃로 승온;
- [0206] 6) 72시간 동안 유지; 및
- [0207] 7) 바이알을 마개로 막음.
- [0208] 사이클 7:
- [0209] 1) 15℃로 선반 사전냉각;
- [0210] 2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;
- [0211] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0212] 4) 60분간 유지;
- [0213] 5) 25℃로 승온;
- [0214] 6) 72시간 동안 유지; 및
- [0215] 7) 바이알을 마개로 막음.
- [0216] 사이클 8:
- [0217] 1) 7℃로 선반 사전냉각;
- [0218] 2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;
- [0219] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0220] 4) 120분간 유지;

- [0221] 5) 20℃로 승온;
- [0222] 6) 72시간 동안 유지; 및
- [0223] 7) 바이알을 마개로 막음.
- [0224] 사이클 9:
- [0225] 1) 15℃로 선반 사전냉각;
- [0226] 2) 바이알을 적재하고 30분간 평형화시킴;
- [0227] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0228] 4) 60분간 유지;
- [0229] 5) 33℃로 승온;
- [0230] 6) 48시간 동안 유지; 및
- [0231] 7) 바이알을 마개로 막음.
- [0232] 사이클 10:
- [0233] 1) 15℃로 선반 사전냉각;
- [0234] 2) 바이알을 적재하고 30분간 평형화시킴;
- [0235] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0236] 4) 18시간 동안 유지;
- [0237] 5) 0.2℃/분으로 25℃로 승온;
- [0238] 7) 5시간 동안 유지;
- [0239] 8) 0.2℃/분으로 33℃로 승온;
- [0240] 9) 19시간 동안 유지; 및
- [0241] 10) 바이알을 마개로 막음.
- [0242] 사이클 11:
- [0243] 1) 7℃로 선반 사전냉각;
- [0244] 2) 바이알을 적재하고 평형화시킴;
- [0245] 3) 50 mTorr로 진공 설정;
- [0246] 4) 3시간 동안 유지;
- [0247] 5) 0.2℃/분으로 15℃로 승온;
- [0248] 6) 16시간 동안 유지;
- [0249] 7) 0.2℃/분으로 25℃로 승온;
- [0250] 8) 2시간 동안 유지;
- [0251] 9) 0.2℃/분으로 33℃로 승온;
- [0252] 10) 27시간 동안 유지; 및
- [0253] 11) 바이알을 마개로 막음.
- [0254] 실시예 4 : 제제
- [0255] 실시예 1에 나타난 건조 사이클을 적용하여 생 B/하일빈 인플루엔자 바이러스를 안정화시켰다. 하기 표에는 25℃에서 10개월 동안 저장한 후 이들 제제에서 관찰된 안정화 프로파일을 요약한 것이다:

제제	KPO4 buff. pH 7.2 (mM)	수크로스 (%)	젤라틴 (%)	메티오닌 (mM)	Pluronic F68 (%)	기울기 at 25 °C	개월 ~ 1 log FFU/ml 손실	처리과정 (Log FFU/ml)
AVS068	25	10	0	0	0.02	-0.167	6	0.20
AVS071	25	10	0	10	0	-0.245	4.1	0.13
AVS072	25	10	0	66.7	0.2	-0.047	21.4	0.37
AVS073	25	10	2	0	0.2	-0.089	11.2	0.63
AVS074	25	10	2	10	0.02	-0.056	17.8	1.13
AVS075	25	10	2	66.7	0	-0.154	6.5	0.43
AVS076	25	10	5	0	0	-0.145	6.9	0.67
AVS077	25	10	5	10	0.2	-0.008	121.2	0.47
AVS078	25	10	5	66.7	0.02	-0.050	20.0	0.27
AVS079	25	10	5	66.7	0.2	-0.043	23.1	0.83
AVS080	25	20	0	0	0	-0.132	7.6	0.50
AVS081	25	20	0	10	0.02	-0.060	16.8	0.53
AVS082	25	20	0	66.7	0.2	-0.045	22.4	0.07
AVS083	25	20	2	0	0.02	-0.040	24.9	2.27
AVS084	25	20	2	10	0	-0.096	10.4	0.33
AVS085	25	20	2	66.7	0.2	-0.040	25.0	0.43
AVS086	25	20	5	0	0.2	-0.022	44.6	0.30
AVS087	25	20	5	10	0.2	-0.005	200.4	0.40
AVS088	25	20	5	66.7	0	-0.060	16.7	-0.07
AVS089	25	20	5	66.7	0.02	-0.022	44.5	0.67
AVS090	25	40	0	0	0.2	-1.283	0.8	0.63
AVS091	25	40	0	10	0.2	-1.117	0.9	0.77
AVS092	25	40	0	66.7	0	-0.120	8.3	0.50
AVS093	25	40	0	66.7	0.02	-0.033	30.2	0.73
AVS094	25	40	2	0	0	-0.116	8.6	0.83
AVS095	25	40	2	10	0.2	-0.016	63.8	0.47
AVS096	25	40	2	66.7	0.02	-0.030	33.2	0.80
AVS097	25	40	2	66.7	0.2	-0.017	58.1	0.27
AVS053s	25	40	5	0	0.02	-0.022	44.6	0.47
AVS098	25	40	5	0	0.2	-0.023	43.4	0.37
AVS052b	25	40	5	10	0	-0.087	11.6	0.67
AVS043c	25	40	5	10	0.02	-0.037	27.2	0.77
AVS099	25	40	5	66.7	0	-0.067	15.0	0.40

[0256]

실시예 5 : 높은 생존률을 제공하는 과정

[0257]

[0258]

이전 실험에서, 본 발명자들은 바이러스 및 박테리아의 처리과정 중 생존률 손실이 대체로 동일한 제제를 사용하는 표준 동결건조보다 냉동 발포체 건조에서 보다 높다는 것을 확인하였다. 본 발명자들은 과정에서 주요 차이로 인한 편차로 예측하였다: 즉 표준 동결건조 과정과 비교하여 발포-냉동 과정에서 냉동 전에 발포 및 비등 사전건조 단계, 처리 단계, 시간, 온도 및 건조도에 따른 처리과정 중 생존률 손실을 조사하고 특징을 규명하기 위한 실험을 수행하였다.

[0259]

리스테리아 모노사이토제네스를 주요 시점에서 분석하기 위해 샘플 분리하고 발포 냉동 건조 순서를 통해 수크로스를 주성분으로하는 제제 중에서 처리하였다. 도 9는 과정 전반에 걸쳐 수크로스 질량 분획(건조 수준)에 따른 바이알 온도에 대한 그래프를 도시한 것이다. 리스테리아 제제의 바이알을 압력 및 온도 제어 챔버에 위치시켰다. 과정은 15°C에서 약 30% 수크로스의 제제 중 리스테리아를 사용하여 시작하였다(80). 상기 제제를 발포 단계(81)에서 팽창시켜 발포체를 생성시켰다. 이후 발포체를 냉동(82)하고 증발 및 승화(83)를 통해 15°C의 선반 온도에서 1차 건조 단계에서 물을 제거하였다. 약 25% 수분이 남았을 때, 2차 건조 단계(84)를, 본 발명자의 표준 비발포 동결건조에 대한 것처럼, 약 33°C로 신속하게 챔버 온도를 승온시켜 가속화하였다. 2차 건조는 잔류 수분이 약 3%가 될 때까지 계속하였다(85). 리스테리아 콜로니 계측을 위해서 과정 동안 다양한 시점에서 샘플을 채취하였다.

[0260]

놀랍게도, 냉동-발포 과정에 고유한 초기 발포 및 냉동 단계 덕분에 발포-냉동 과정 중에 생존률 손실이 매우 적었다. 이와 같이, 예상외로 이들이 발포 및 비발포 동결건조 과정 간의 생존률 차이의 실질적인 원인은 아니었다. 적용된 건조 온도가 산업계의 수많은 동결건조 2차 건조 단계와 비교하여 비교적 낮고, 표준 동결건조 과정에 대한 것과 냉동-발포에 대해서 동일하였기 때문에, 본 발명자들은 과정 간 생존률 차이에서 건조가 주요한 요인인 것을 예상치 못했었다. 다시 말해서, 냉동-발포에서의 주요 생존률 손실이 2차 건조(대략 -1.5 log₁₀)와 관련있다는 것이 본 발명자들에게는 놀라웠다. 본 발명자들은, 비록 온도가 표준 동결건조에서는 문제가 되지 않지만, 상기 손실이 시간에 따른 열 및 탈수 스트레스의 조합에 의한 것이라고 이론화하였다.

[0261]

상기 실험을 반복하였는데, 이때 1차 건조 15°C 선반 온도를 잔류 수분이 10% 이하로 감소되기에 충분한 시간 동안 2차 건조 단계 전체로 연장시켰다. 여기서, 잔류 수분 10%에 도달하는데 15°C에서 약 4시간 내지 5시간이

소요되었다. 전체적으로, 15℃에서 1차 및 2차 건조를 16시간 동안 계속한 결과 잔류 수분이 약 7%에 도달하였다. 다음으로, 최종 건조 단계는 단계적으로 온도를 33℃로 승온시키는 것이 포함되었다. 도 10에 도시한 바와 같이, 냉동-발포 건조와 관련된 생존률 손실은 대체로 잔류 수분 10% 지점에 도달하는 2차 건조 온도의 선택에 기인하였다. 처리과정 시간 및 궁극적인 탈수 수준이 냉동-발포 건조 과정에서의 생존률에 미치는 영향은 비교적 적은 편인 것으로 확인되었다.

[0262] 냉동-발포 건조 및 표준 동결건조 과정 간의 주요 차이는 냉동 전에 일어나는 발포 및 대류성 비등 건조, 및 냉동-발포 과정에 포함된 연장된 2차 건조 시간이었다. 이러한 실험은 이들 인자들이 냉동 발포 및 표준 동결건조 과정과 비교시에 관찰된 생존률 손실에 대한 주요 원인이 아니라는 놀라운 결과를 제공하였다. 이 실험으로 생존률 결과에 주요 영향을 주는 인자 중에서 1가지 변수가 확인되었다. 냉동-발포 건조 동안 2차 건조 온도를 감소시켜서, 본 발명자들은 표준 동결건조 중에서 처럼 상당한 생존률을 얻을 수 있다는 것을 확인하였다.

[0263] 실시예 6 : 급속 저온 2차 건조를 위한 시스템

[0264] 상기 기술한 바와 같이, 냉동-발포 보존 과정은 2차 건조 단계 동안 보다 낮은 온도를 제공하는 것이 이로울 수 있다. 그러나, 이는 제조 생산성에 영향을 줄 수 있는 처리과정 시간을 지연시킬 수 있다. 하기 실시예에서는 본 발명의 일정한 냉동-발포 건조 과정에서 사용되는 저온 2차 건조를 가속화할 수 있는 시스템 성분을 확인하였다.

[0265] 냉동 발포 건조된 물질의 표면 대 부피 비율은 예를 들어, 여러 동결 건조 또는 분무 건조 과정에 비하여 비교적 낮을 수 있다. 이러한 단점은 실질적으로 폐쇄된 용기, 예컨대 동결건조 바이알에서 갇거나 두꺼운 냉동 발포체를 건조시켜야하는 경우에 특히 문제가 될 수 있다. 본 발명자들은 낮은 2차 건조 온도에서의 2차 건조를 실질적인 시간 규모에서 수행할 수 있고, 예를 들어, 용기의 건조 방해물 감소시키고/시킴거나 수분이 발포체를 빠져나가기 위해 이동해야하는 거리를 감소시켜서, 바이러스 및 미생물에 대해 높은 생존률을 얻을 수 있다고 생각되어진다.

[0266] 시스템은 냉동 발포체의 저온 건조를 가속화시키도록 설계할 수 있다. 예를 들어, 도 11에서, 시스템은 예를 들어, 내부 온도 및 압력 제어부가 제공된 환경 제어 챔버(110)를 포함할 수 있다. 챔버 내부는 발포 및 냉동을 위해서 생활성 물질 제제(111)(액체 용액 및/또는 현탁액)가 존재할 수 있다. 제제를 표면(112) 상에 위치시킬 수 있다. 표면이 용기의 내면일지라도, 보다 빠른 건조를 위해서, 용기의 내면이 아닌 것이 바람직하다. 챔버의 내부 압력은 제제를 발포체(113)로 팽창시키기 위해 감압시킬 수 있다. 발포체는 예를 들어, 냉각된 내부 분위기에 노출, 증발 냉각 및/또는 표면 냉각(112)을 통해서 냉동시킬 수 있다. 바람직한 구체예에서, 냉동 발포체는 두께(114)가 약 10 mm 보다 작고, 5 mm 보다 작으며, 2 mm 보다 작고, 약 1 mm 또는 그 이하이다. 용기의 간섭없이 내부 챔버 환경에 직접 노출시킨, 얇은 발포체는 2차 건조를 통해서 빠르게 잔류 수분 10% 이하로 진행될 수 있다.

[0267] 본 발명의 시스템에서, 냉동 발포체를, 예를 들어, 거대 용기, 플레이트, 벨트 또는 드럼(115)의 표면 상에서, 뱃치식 또는 연속식으로 동결건조하고 2차 건조할 수 있다. 도시한 연속 공정 시스템에서, 드럼 표면 상에서 층을 분사하여 제제를 도포할 수 있다. 내부 진공을 통해 상기 층을 발포체 층으로 팽창시킬 수 있다. 발포체는 1차 건조를 동결건조를 통해 수행하면서 표면 상에서 냉동시킬 수 있다. 드럼은 예를 들어, 열 교환기, 온도 제어된 가스 스트림, 적외선광, 열전기 장치 등을 통해서, 회전에 따라 상이한 지점에서, 회전하면서 열을 층의 내부 또는 외부로 전달할 수 있다. 예를 들어, 발포가 종료되는 드럼 표면을 지나는 지점에서, 이 드럼 표면을 냉각하여 발포체를 냉동시킬 수 있다. 다음으로, 승화를 통해 열 손실을 교체하도록 드럼 회전 위치를 더 지난 지점에서 약하게 가열될 수 있다. 드럼 회전을 더욱 지나 2차 건조 지점에서, 추가열을 표면에 가하여 예를 들어, 약 25℃를 유지하여 잔류 수분을 제거할 수 있다. 마지막으로, 냉동-발포 건조된 생활성 물질 생성물을 예를 들어, 스크래핑을 통해서 드럼에서 회수할 수 있다.

[0268] 다르게, 도포, 발포, 냉동, 1차 건조, 2차 건조 및 회수는 전체 처리과정 표면 상에서 뱃치식 순서의 과정으로 수행할 수 있다. 예를 들어, 제제를 거대한 개방 입구 용기의 바닥 또는 플레이트 상에 붓거나 살포하여 얇은 층을 형성할 수 있다. 이 시트를 환경 제어 챔버에 위치시키고 감압을 통해 제제를 얇은 발포체(예를 들어, 1 mm 내지 10 mm)로 팽창시킬 수 있다. 발포체는 이 발포체로부터의 열 전도 및 잠열 손실의 조합을 통해 냉동될 수 있다. 1차 건조는 온도 제어 챔버의 주변 대기로부터 교체된 잠열 승화를 통해 수행할 수 있다. 2차 건조는 상대 습도 5%를 얻는데 필요한 시간 동안 15~25℃의 분위기에 발포체를 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 발포체 시트를 입자로 분쇄하고 저장을 위해 이들을 통상의 용기에 부어서 발포체를 회수할 수 있다.

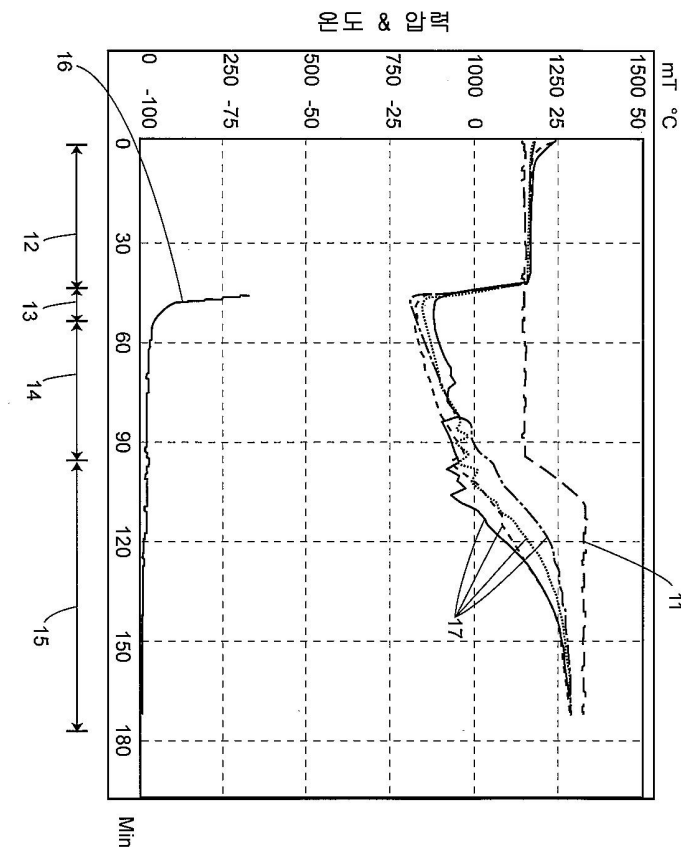
- [0269] 실시예 7 : 연장된 저온 건조
- [0270] 리스테리아의 생존률은 저온 진공 건조를 2차 단계로 연장시켜서 증가시킬 수 있다. 도 12A에 도시한 바와 같이, 리스테리아 모노사이토제네스의 생존률은 15°C의 챔버 온도에서 1차 및 2차 건조 동안 비교적 안정한 상태로 유지되었다. 그러나, 33°C에서 2차 건조 종료시, 생존률 손실이 가속화되었다.
- [0271] 간단하게 15°C 건조 온도를 건조 종료시까지 연장하여서, 도 12B에 도시한 바와 같이, 잔류 수분이 약 5%로 감소시키면서도, 생존률이 높은 수준으로 유지되었다.
- [0272] 실시예 8 : 단계적인 2차 건조
- [0273] 리스테리아의 생존률은 단계적인 온도 증가를 사용하여 건조를 종결하는 연장된 저온 진공 2차 건조를 통해서 증가되었다.
- [0274] 도 13에 도시한 바와 같이, 리스테리아를 약 7°C에서 1차 건조 및 초기 2차 건조한 후, 15°C에서 후속 2차 건조하여 보존할 수 있다. 이러한 단계식 건조는 실제 처리 시간 동안 잔류 수분이 약 7%가 될 때 높은 생존률을 제공하였다. 약 25°C에서 추가 2차 건조 및 약 33°C에서 최종 건조는 도 12A에 도시한 바와 같이, 33°C에서 건조와 비교하여 실질적으로 생존률을 감소시키지 않았다. 이러한 방식으로, 최종 33°C 건조 단계를 사용하면서도, 높은 생존률을 유지하면서, 잔류 수분 5% 미만으로의 건조를 수행하였다.
- [0275] 실시예 9 : 생존률에 대한 비유리질 매트릭스의 영향
- [0276] 미생물의 생존률을 실질적으로 변화시키지 않으면서, 매트릭스 T_g 이하 및 이상에서 건조된 폴리올 매트릭스에 리스테리아를 보존하였다.
- [0277] 리스테리아를 수크로스 제제(순수 T_g 34.5°C) 및 트레할로스 제제(순수 T_g 53.9°C)에 냉동 발포 건조하였다. 상기 제제를 수크로스 제제의 T_g 보다는 높지만 트레할로스 제제의 T_g 보다는 낮은 온도의 바이알에서 건조하였다. 도 14에 도시한 바와 같이, 처리과정 단계 전만 및 최종 건조 생성물의 리스테리아 생존률은 건조 과정 동안 매트릭스가 유리질 상태로 존재하는가에 의해 유의하게 영향받지 않았다.
- [0278] 본 명세서에 기술한 실시예 및 구체예는 설명을 위한 목적으로만 제공된 것이며, 이의 다양한 변형 또는 변경이 당 분야의 당업자에게 제안될 수 있고 본 출원서의 범주 및 범위, 및 첨부된 청구항의 범주 내에 속하게 된다는 것을 이해할 것이다.
- [0279] 앞서 발명을 분명함과 이해를 위한 목적으로 일부 구체적으로 설명하였지만, 본 개시 사항을 통해서 본 발명의 진정한 범주를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항을 다양하게 변경시킬 수 있다는 것은 당분야의 당업자에게 자명하다. 예를 들어, 상기 기술한 제제, 기법 및 장치는 다양한 조합으로 사용할 수 있다. 본 명세서에서 언급한 모든 공개물, 특허, 특허 출원서 및/또는 다른 문헌을 각각의 개별 공개물, 특허, 특허 출원서 및/또는 다른 문헌들이 개별적으로 모든 목적을 위해 참조하여 포함되는 것으로 표시한 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체로 참조하여 포함된다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0048] 도 1은 예시적인 발포 건조 과정 동안 시간에 따른 온도 및 압력 그래프이다.
- [0049] 도 2A 내지 2D는 유리 바이알 내 제제 냉동 발포체 건조의 사진 이미지이다.
- [0050] 도 3은 FTIR(Fourier transformed infrared spectroscopy)을 사용하여 FluMist™ A/시드니 인플루엔자 바이러스의 상전이를 보여주는 도면이다.
- [0051] 도 4는 10°C, 15°C 및 20°C에서 건조를 수행한 냉동 건조 발포 과정 이후 B/하얼빈 인플루엔자 바이러스 백신에 대한 처리과정 중 활성(바이러스 역가) 손실을 나타내는 도면이다.
- [0052] 도 5는 1차 건조를 10°C, 15°C 또는 20°C에서 실시한 냉동 건조 발포 과정을 수행한 B/하얼빈 인플루엔자 바이러스 백신의 안정성 경향을 나타내는 도면이다.
- [0053] 도 6은 37°C 및 50°C에서 저장한 발포 건조된 B/엔 아버 인플루엔자 바이러스의 역가에 대한 안정성 경향을 나타내는 도면이다.
- [0054] 도 7은 제제 AVS53에 건조된 3종의 상이한 바이러스주의 인플루엔자 바이러스 백신 발포체의 안정성 경향을 나

타내는 도면이다.

- [0055] 도 8은 본 발명의 발포 조성물의 비정질성을 검증한 전자 현미경 사진 및 X선 회절 결과를 나타내는 도면이다.
- [0056] 도 9는 33°C 2차 건조 단계로 종료된 냉동 발포 과정 동안의 과정 온도 및 누적 생존률 손실을 나타내는 그래프이다.
- [0057] 도 10은 냉동 발포 과정에서 물 제거에 따른 리스테리아 생존률을 나타내는 그래프이다. 저온에서의 2차 건조는 보다 높은 온도에서 2차 건조한 동일 물질보다 잔류 수분이 5% 적은 건조 발포체의 생존률을 10배 향상시켰다.
- [0058] 도 11은 저온 냉동-발포 건조를 위한 예시적인 시스템의 개략도이다.
- [0059] 도 12A 및 12B는 중온 건조에 비하여 저온 2차 건조가 미생물 생존률에 이롭다는 것을 보여주는 도면이다.
- [0060] 도 13은 비단계적 과정에 비하여 단계적 2차 건조 온도가 어떻게 생존률을 증가시키면서 최종 수분량을 감소시킬 수 있는지 보여주는 도면이다.
- [0061] 도 14는 미생물의 냉동 발포 건조시의 생존률이 발포체 매트릭스의 비유리질 상태 경험 유무에 의해 실질적으로 영향받지 않음을 보여주는 도면이다.

도면

도면1



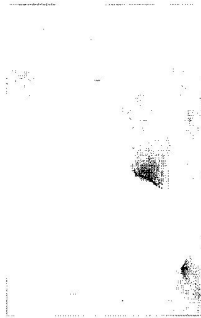
도면2



(a)



(b)

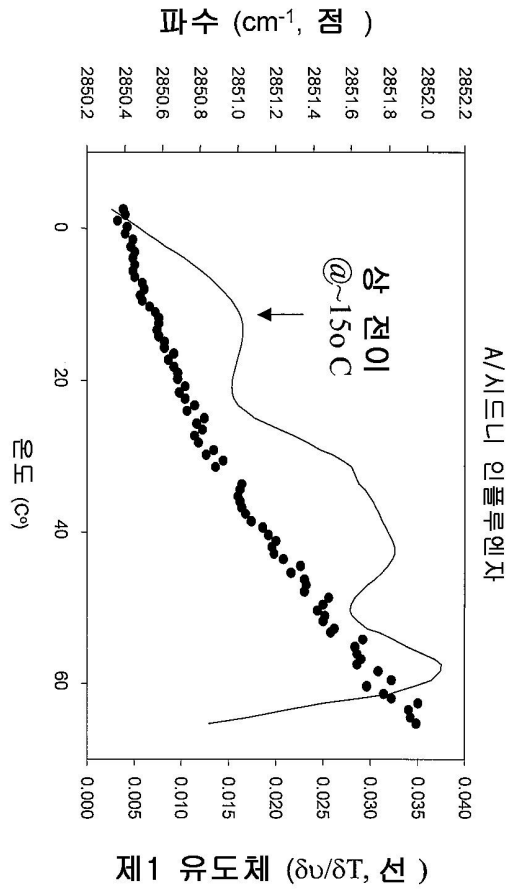


(c)

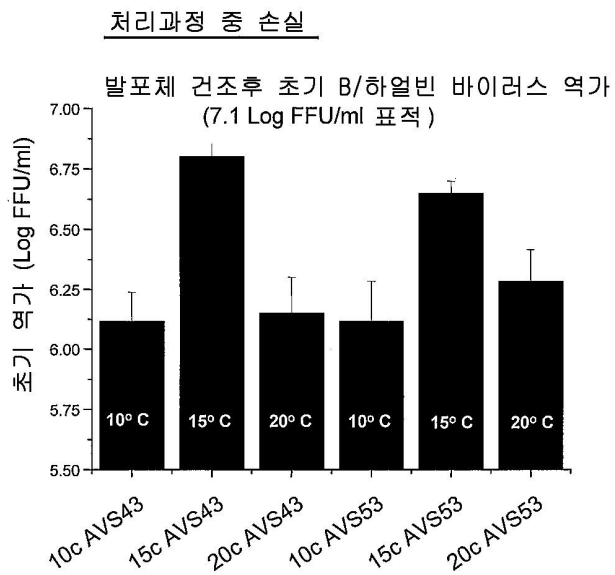


(d)

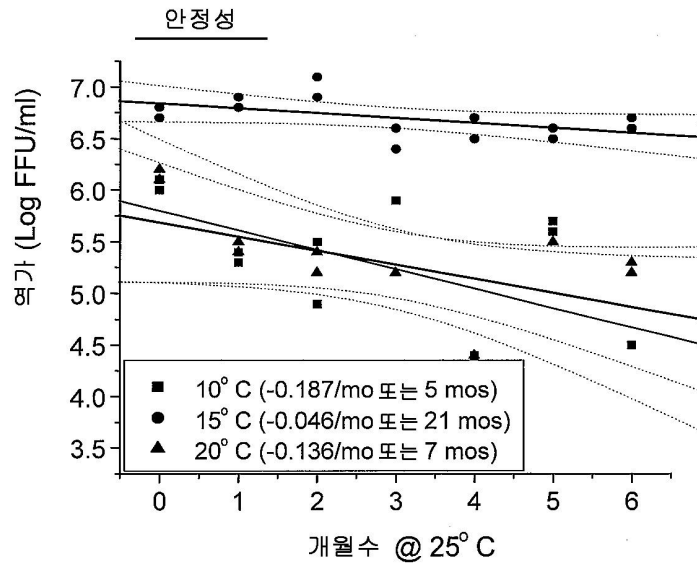
도면3



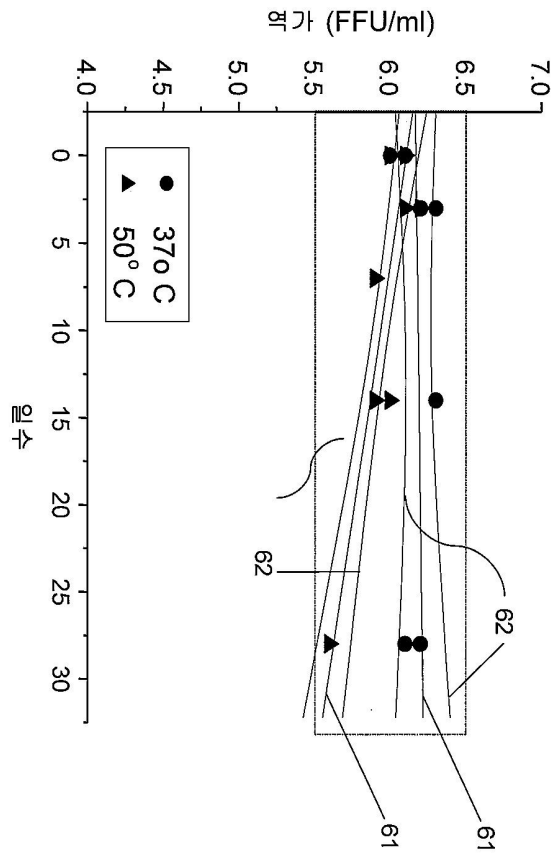
도면4



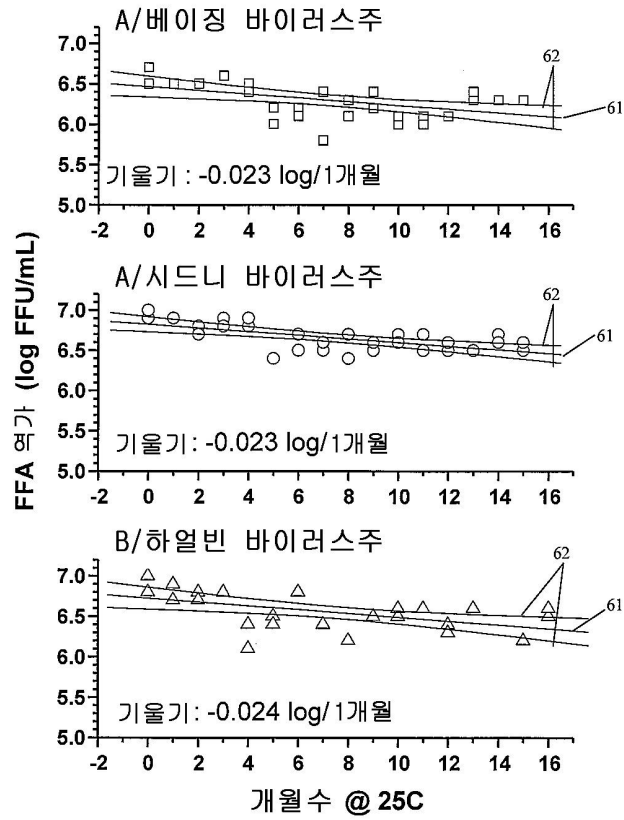
도면5



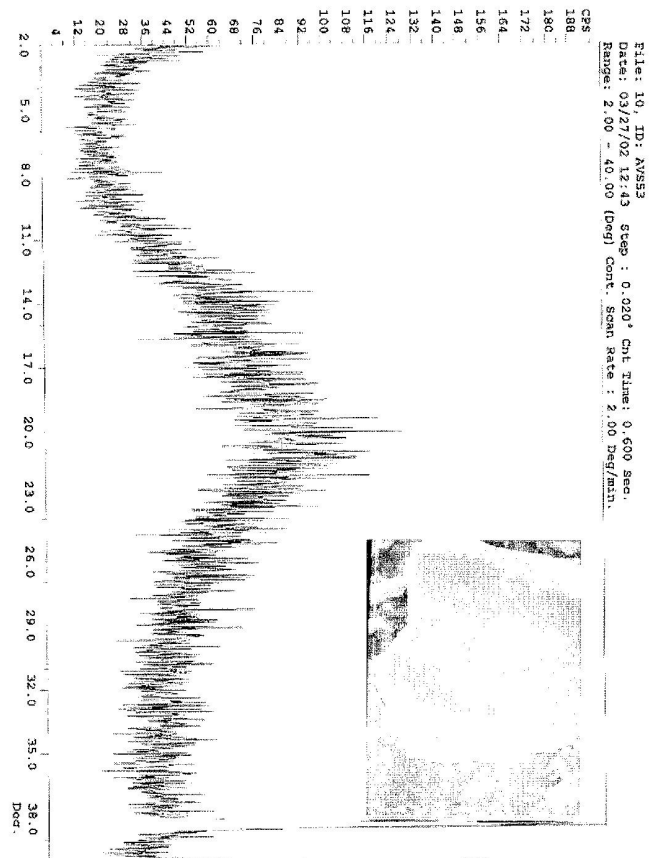
도면6



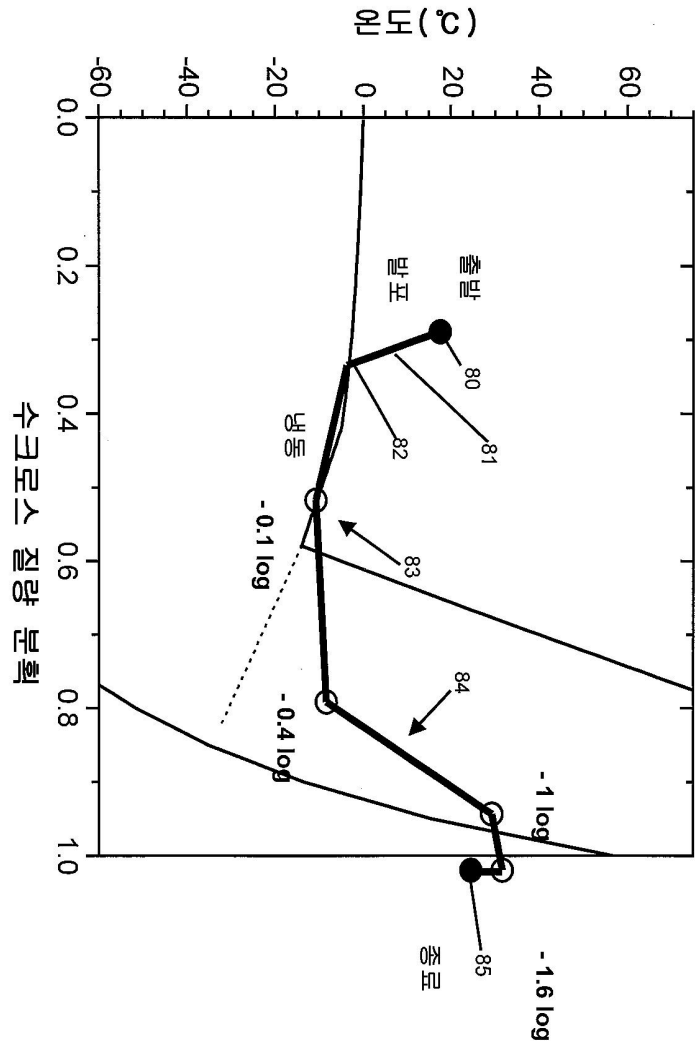
도면7



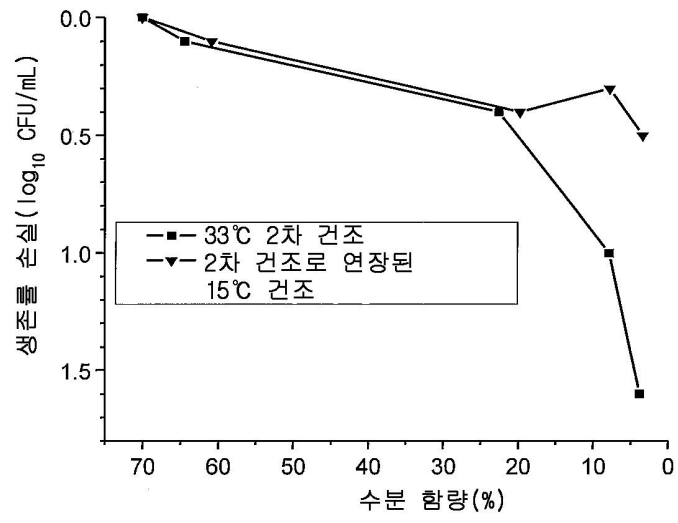
도면8



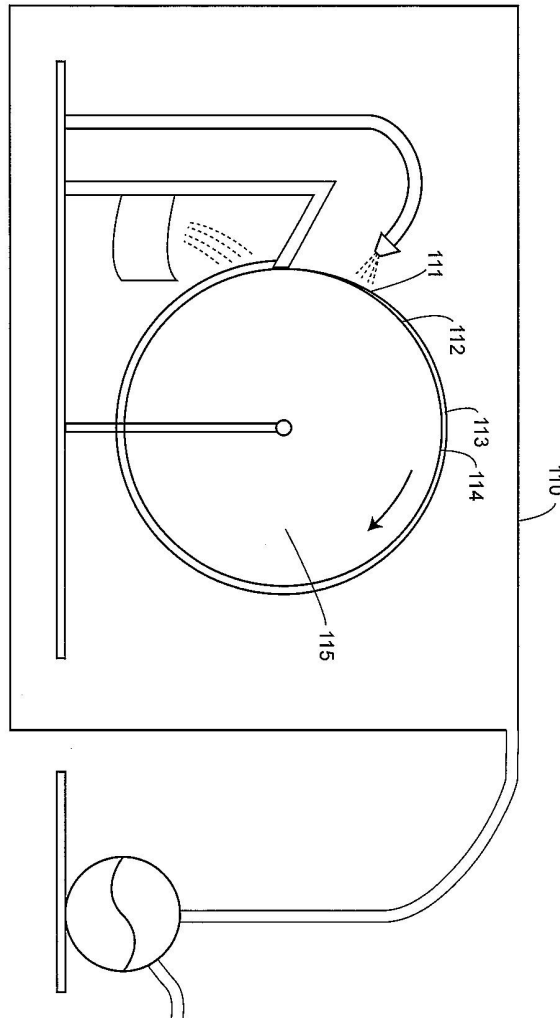
도면9



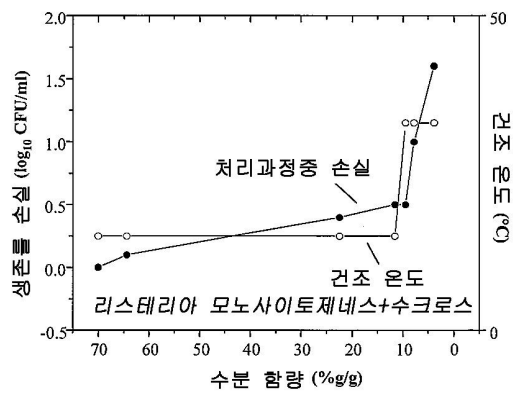
도면10



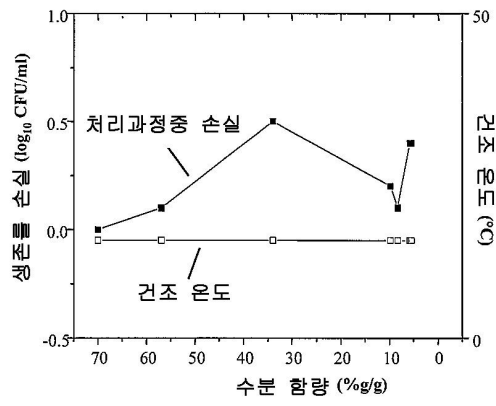
도면11



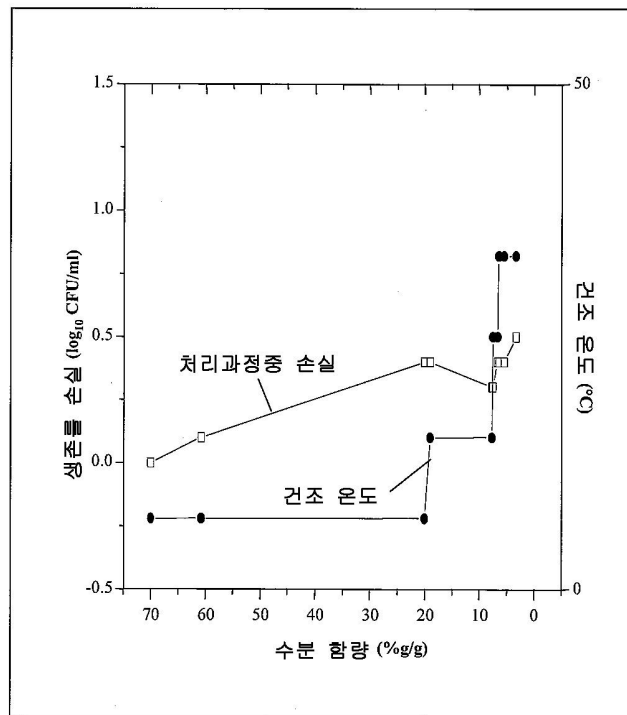
도면12a



도면12b



도면13



도면14

