



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년08월23일
 (11) 등록번호 10-1058978
 (24) 등록일자 2011년08월17일

(51) Int. Cl.

A61K 39/13 (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2005-7007733
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년10월30일
 심사청구일자 2008년09월30일
- (85) 번역문제출일자 2005년04월30일
- (65) 공개번호 10-2005-0075766
- (43) 공개일자 2005년07월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2003/012160
- (87) 국제공개번호 WO 2004/039399
 국제공개일자 2004년05월13일

(30) 우선권주장
 0225520.6 2002년11월01일 영국(GB)
 (뒷면에 계속)

- (56) 선행기술조사문헌
 WO1996040077 A2*
 WO2002000249 A2*
 WO2002005846 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티투
 트 89

(72) 발명자

메이에러스, 이브

벨기에 비-1330 릭센사르트 브루셀즈 루 드 린스
 티투트 89글락소스미클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

스테판, 장

벨기에 비-1330 릭센사르트 브루셀즈 루 드 린스
 티투트 89글락소스미클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

(74) 대리인

남상선

전체 청구항 수 : 총 29 항

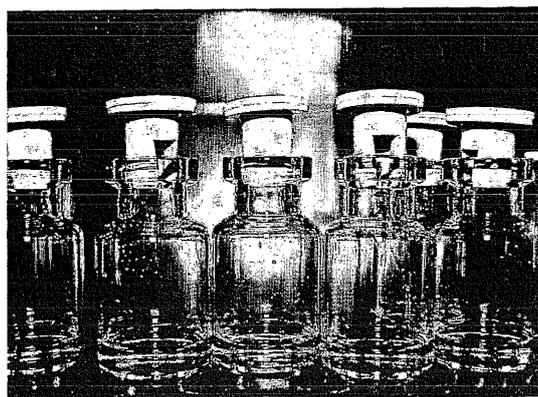
심사관 : 이수정

(54) 번역원성 조성물

(57) 요약

본 발명은 불활성화된 폴리오바이러스(IPV)의 건조된 고체 제형 또는 고점성의 액체 제형과 안정화제를 함유하되, IPV가 항원성 및/또는 면역원성을 보유하는 번역원성 조성물에 관한 것이다. 또한, IPV의 항원성/면역원성을 보유하는 IPV 건조 제형의 제조방법도 기술한다.

대표도 - 도1a



(30) 우선권주장

0225532.1 2002년11월01일 영국(GB)

0225543.8 2002년11월01일 영국(GB)

0317371.3 2003년07월24일 영국(GB)

0317380.4 2003년07월24일 영국(GB)

0317381.2 2003년07월24일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

불활성화된 폴리오 바이러스(Inactivated polio virus, IPV), 헤모필러스 인플루엔자 b(*Haemophilus influenzae* b, Hib)로부터의 헤파막 다당류 또는 올리고당류 항원 및 안정화제를 포함하고, 상기 성분들 모두 건조 조성물로서 제형화되며, 재구성 후 폴리오 바이러스에 대해 면역반응을 유발할 수 있는, 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 다당류 또는 올리고당류가 담체 단백질에 컨쥬게이팅된 면역원성 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 다당류 또는 올리고당류가 과산화물 유독소에 컨쥬게이팅된 면역원성 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 다당류 또는 올리고당류가 알루미늄 포스페이트 상에 흡착된 면역원성 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 수막구균(*N. meningitidis*) C로부터 유래된 헤파막 다당류 또는 올리고당류, 또는 수막구균(*N. meningitidis*) A, Y 또는 W 중 어느 하나로부터 유래된 헤파막 다당류 또는 올리고당류, 또는 이의 조합물을 포함하거나, 수막구균(*N. meningitidis*) C로부터 유래된 헤파막 다당류 또는 올리고당류를 포함하고 추가로 수막구균(*N. meningitidis*) A, Y 또는 W 중 어느 하나로부터 유래된 헤파막 다당류 또는 올리고당류, 또는 이의 조합물을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 수막구균 다당류 또는 올리고당류가 담체 단백질에 컨쥬게이팅된 면역원성 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 동일한 유형의 담체 단백질에 컨쥬게이팅된 Hib 다당류 또는 올리고당류, 및 1종 이상의 수막구균 다당류 또는 올리고당류를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상이한 담체 단백질에 컨쥬게이팅된 Hib 다당류 또는 올리고당류, 및 1종 이상의 수막구균 다당류 또는 올리고당류를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 페놀 레드를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 건조 조성물이 동결건조된, 면역원성 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 건조 조성물이 포말화된 유리질인, 면역원성 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 건조 조성물이 고점성 액체인, 면역원성 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 고점성 액체가 동결되지 않은, 면역원성 조성물.

청구항 14

제 1항의 면역원성 조성물을 수용액에서 재구성시키는 단계를 포함하여 백신을 제조하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 수용액이 디프테리아 유독소(D), 파상풍 유독소(T) 및 백일해 항원(무세포 또는 전세포)(P)을 포함하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 DTP 백신이 수산화알루미늄에 의해 전부 또는 일부가 에뮤번팅되는 방법.

청구항 17

제 15항에 있어서, 상기 수용액이 B형 간염 표면 항원을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1 컨테이너에 제 1항의 면역원성 조성물을 포함하고, 제2 컨테이너에 액체 DTP(무세포 또는 전세포) 백신을 포함하는 키트.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 제2 컨테이너에 B형 간염 표면 항원을 추가로 포함하는 키트.

청구항 20

제 1항의 면역원성 조성물을 포함하는 백신.

청구항 21

제 20항에 있어서, 사용 전에 수용액으로 재구성되는 백신.

청구항 22

제 20항의 백신을 함유하는 발수 내표면을 가진 컨테이너.

청구항 23

- a) 안정화제 용액에 불활성화된 폴리오 바이러스(Inactivated polio virus, IPV)를 현탁 또는 용해시켜 보존 시료를 제조하는 단계;
- b) 상기 보존 시료를 용매가 보존 시료로부터 상실되는 온도 및 압력 조건으로 처리하는 단계; 및
- c) 상기 보존 시료가 건조되어 IPV의 항원성이 보유되는 고체 또는 고점성 액체를 형성할 때까지 상기 용매를 제거하는 단계를 포함하는, IPV, Hib 다당류 또는 올리고당류 및 안정화제를 포함하는 조성물을 보존하는 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 보존 시료가 발수 내표면을 가진 컨테이너에서 건조되는 방법.

청구항 25

제 23항에 있어서, 상기 보존 시료가 단계 b) 동안 발포되어 포말(foam)을 형성하는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 시료가 상기 건조 단계 개시 이전에 전부 또는 부분적으로 동결되는 방법.

청구항 27

제 25항에 있어서, 상기 보존 시료가 단계 b) 동안 전부 또는 부분적으로 동결되는 보존방법.

청구항 28

제 23항에 있어서, 단계 b) 동안에 보존 시료를, 동결 또는 포말 형성에 수반되는 발포 없이, 증발에 의해 보존 시료가 용매를 상실하게 하는 온도 및 압력 조건으로 처리하여 점성 액체를 형성시키고, 단계 c) 동안에 보존 시료가 건조되어 고점성 액체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 방법.

청구항 29

제 24항에 있어서, 보존 시료가 N. 메닝기티디스 A, C, Y 또는 W 중 어느 하나로부터 유래된 다당류 또는 올리고당류 또는 이의 조합물을 포함하는 방법.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 면역원성을 보유하는 불활성화된 폴리오 바이러스(IPV)의 건조 고체 제형 또는 고점성 액체 제형을 함유하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 IPV의 건조 고체 또는 고점성 액체 제형을 함유하는 백신에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면은 건조 고체 또는 고점성 액체로서 불활성화된 폴리오바이러스(IPV)를 보존하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 IPV와 박테리아의 다당류를 안정화제 용액에 현탁 또는 용해시켜 시료를 제조하는 단계 및 이러한 시료로부터 용매를 제거시키는 온도 및 압력 조건으로 시료를 처리하는 단계를 포함한다. 압력 및 온도 조건은 용매가 제거되고 시료가 건조되어 고체 또는 고점성 액체를 형성하는 조건으로 유지되거나 조정된다. 이러한 제형은 사용전에 재구성되거나 또는 그대로 사용할 수도 있다.

배경기술

[0002] IPV는 백신 성분으로서 공지되어 있지만, Infanrix penta[®]에서와 같이 액체로 제조되어 있다. IPV를 동결건조하는 방법은 항원성 상실이 연관되어 IPV의 건조 형태를 포함하는 효과적인 백신을 제조하기가 어렵다. 건조된 백신 제형은 공지된 제형으로서, 특히 박테리아 다당류의 건조 제형은 잘 알려져 있다. 헤모필러스 인플루엔자 b(Hib)의 PRP 다당류는 흔히 건조 고체, 예컨대 Infanrix hexa[®](W099/48525)로 조제된다.

[0003] IPV의 건조 제형이 유리한 이유는 몇 가지가 있다. 건조 제형은 양호한 저장성이 있고, IPV를 함유하는 백신의 보관수명을 연장시킬 수 있다. 또한, IPV 건조 가능성은 IPV를 보다 유연한 백신 구성체로 만들어, 지금까지는 불가능했던 신규한 조합 백신으로의 제조가능성을 제공한다. 일부 백신은 액체 및 건조 고체 성분을 함유하여 투여 직전에 혼합된다(예컨대, Infanrix hexa[®]). Infanrix Hexa는 건조된 Hib 성분을 함유하는데, 이는 사용 직전에 DTPa-HepB-IPV로 재구성된다. 건조 고체로서 Hib와 함께 IPV를 조제하면, IPV와 비적합성일 수도 있는 백신의 액체 부분에 추가 성분을 첨가하는 것이 가능해질 수 있다.

[0004] 백신 성분을 건조하는 기술에는 여러 가지 방법이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 통상적으로, 건조는 물질의

용액을 제조한 뒤 시료를 동결시키는 동결 건조법을 이용하여 수행되어왔다. 1차 건조 단계 동안에 대부분의 물이 감압 조건하에서 얼음으로부터 승화되어 제거되고 다공성 "케이크(cake)"가 형성된다. 그 다음 보통 2차 건조 단계가 수행되는데, 이 때 압력과 온도가 변화되어 물이 고체 '케이크'로부터 증발된다. 그 결과 수득되는 동결건조된 시료는 액체 제형에 비해 향상된 안정성을 갖는다. 하지만, 동결 건조법은 시간이 오래 걸리고 생산 공정에서 속도 제한 단계일 수 있다.

[0005] 또한, 많은 시료가 대형 건조기 장치에서 회분식으로 동결건조될 때 산물의 가변성이 문제가 된다. 동결 건조기의 선반 상의 조건은 위치마다 달라서 시료를 다른 조건하에서 다른 속도로 동결건조시킨다. 생바이러스와 같은 특정 생물학적 물질에서는, 동결 건조법 동안에 유의적인 활성 상실이 초래될 수 있다(Pikal(1994) ACS Symposium 567: 120-133). 또한, 많은 동결건조 물질은 상온에서 여전히 불안정하다(Carpenter et al(1994) ACS Symposium 567; 134-147).

[0006] 동결 공정중에 유발되는 손상은 폴리올과 같은 동결보호제의 사용으로 어느 정도는 면할 수 있다. 동결건조법의 또 다른 개선은 공정 중에 시료를 동결시키지 않고 비등에 의해 물을 제거함으로써 이루어지기도 했다(WO96/40077; US630345). 이 방법은 보전될 시료와 함께 적당한 용매에서 유리질-매트릭스 형성 물질의 혼합물을 제조하는 단계, 이러한 혼합물로부터 다량의 용매를 증발시켜 시럽을 수득하는 단계, 이 시럽을 시럽의 비등을 유발하기에 충분한 압력과 온도에 노출시키는 단계 및 잔류 용매를 제거하는 단계를 수반한다.

[0007] 이와 유사한 방법이 US5,766,520에도 개시되어 있는데, 이 방법은 물을 일부 제거하여 점성 유체를 제조하는 단계 및 이 시럽을 진공으로 추가 처리하여 시럽을 '비등'시키는 단계 및 100°C 보다 상당히 낮은 온도로 추가 건조하는 단계를 수반한다. 그러나, 이 방법은 여전히 종래의 동결건조법의 문제점 일부를 갖고 있다. 즉, 이 공정이 대형 동결건조기에서 수행될 때, 시료는 선반 위치에 따라 다른 속도로 건조되어, 건조 공정 동안 다른 활성 양을 상실한 다른 시료가 만들어진다. 이는 한 회분 내 시료의 일관성 상실을 초래한다.

[0008] 오늘날까지 높은 항원성 및/또는 면역원성을 보유하는 IPV의 건조 고체 백신 제형의 제조에 대하여 보고된 성공된 사례는 없다.

발명의 상세한 설명

[0009] 따라서, 본 발명은 재구성 후 폴리오 바이러스에 대한 면역반응을 일으킬 수 있는 건조 조성물 또는 고점성 액체로 조제된, IPV와 안정화제를 포함하는 면역원성 조성물을 개시한다. 안정화제의 존재는 항원의 보존에 중요하며 폴리올은 효과적인 것으로 보인다. IPV는 원항원의 항원성 및/또는 면역원성이 높은 비율로 유지되게 하는 박테리아 다당류의 존재하에 건조되는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 바람직하게는 폴리올 및 박테리아 다당류의 존재하에, 항원성 및/또는 면역원성이 유지되는 IPV를 함유하는 조성물의 보존방법도 포함한다. 다당류 존재하에 IPV의 동결건조는 IPV만을 동결건조한 경우와 비교했을 때 IPV의 항원 보유능을 증가시킨다. 또한, Hib의 면역원성도 IPV와 함께 건조 고체 또는 고점성 액체로서 조제하면 증가된다. 구체적으로, 액체 DTP 백신(이하에 설명된다)으로 즉석에서 재구성시켰을 때, 본 발명자들은 Hib 역가가 IPV가 첨가되지 않았을 때와 같은 DTP 백신의 수산화알루미늄 성분에 의한 역가 감소가 일어나지 않음을 발견했다.

[0010] 또한, 사용되는 건조 방법도 IPV의 항원성 및/또는 면역원성 보유에 영향을 미칠 수 있다. IPV를 건조하는 포말 건조법은 IPV의 항원성 보유 면에서 종래의 동결건조 기술보다 더 효과적이었다. 또한, 놀랍게도, 포말 건조법에 동결 단계를 포함시킨 결과, 항원성 상실이 아닌 신속하고 효과적인 보존법이 되었다. 본 발명의 또 다른 바람직한 방법은 IPV를 함유하는 시료를 동결이나 포말 형성없이 건조하여 건조된 제형, 바람직하게는 고점성 액체 제형을 형성시킴으로써 IPV 항원성 및/또는 면역원성의 높은 수준을 유지한다.

[0011] 본 발명은 저장 안정성의 장점을 가진 IPV의 건조 제형을 제공한다. 건조 제형은 투여 직전에 신속하고 용이하게 재구성될 수 있다. 바람직한 포말 건조법이 사용되는 경우, 포말화된 케이크는 이러한 케이크의 보다 큰 표면적으로 인해 특히 쉽게 재구성된다.

[0012] IPV와 Hib의 건조된 고체 또는 고점성의 액체 제형의 또 다른 장점에는 Hib 성분의 면역원성 증가가 포함된다. 다성분 백신에서, 이러한 백신 제형의 다른 성분이 Hib 면역원성을 방해할 수 있음은 공지되어 있다(WO 96/40242, WO 97/00697). Hib를 보유한 건조 제형으로의 IPV의 포함은 이러한 문제점을 감소시킬 수 있으며, 특히 건조된 IPV-Hib 조성물이 투여 전에 디프테리아, 파상풍 및 백일해 성분과 혼합되면 효과적이다.

[0013] 박테리아 다당류 존재하에서의 IPV의 동결건조는 종래의 동결 건조법을 이용하여도 가능하지만, 동결 또는 포말 형성을 수반하지 않는 포말 건조법 또는 부드러운 동결법을 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 방법들은 IPV의

항원성 및/또는 면역원성 보유능을 훨씬 더 증가시키며, 최종 수득되는 케이크의 재구성도 보다 용이하고 신속하다. 또한, 이러한 방법들은 일반 동결건조법 보다 더 신속하고 보다 에너지 효율적이라는 장점도 갖고 있다. 백신 생산에 있어서 동결건조 단계는 종종 속도 제한 단계이므로, 이러한 바람직한 방법을 사용하면 설비에 추가 투자 없이도 백신을 다량으로 생산할 수 있을 것이다. 또한, 바람직한 포말 건조법에 동결 단계의 도입은 회분의 재현성을 향상시킨다.

실시예

[0166] 이하의 실시예는 다른 상세한 설명이 없는 한 당업자에게 공지되어 있는 통상적인 표준 기술을 사용하여 수행하였다. 본 실시예는 예시적 수단으로, 본 발명을 제한하는 것이 아니다.

[0167] **실시예 1. 증발 동결 공정**

[0168] 본 공정은 선반 온도가 1°C 내에서 조절될 수 있고, 응축기의 최종 온도가 -85°C이며, 압력이 용출용 밸브로 조절되며 산물의 온도 측정을 위해 6개의 열전쌍이 사용되는 동결건조기(Heto Drywinner 8-85)를 사용하여 수행했다.

[0169] 보존 시료를 안정화제(10% 트레할로스 또는 3.5% 수크로스)와 활성제를 수용액에 첨가하여 제조했다. 시료는 선반 온도가 공정을 통해 15°C의 고정된 설정 온도로 유지되는 동결 건조기에 투입했다. 압력을 초기에는 200mbar로 감소시켜 10분 동안 유지시킨 후, 추가로 압력을 감소시켰다. 1.5mbar에서 용액은 도 1에 도시된 바와 같이 증발 냉각으로 인해 동결되기 시작했다. 압력을 추가로 0.1mbar로 감소시킨 결과 시료가 완전 동결되기 시작했다. 압력을 그 다음 0.8mbar 내지 3.5mbar 사이로 증가시켰고, 이 압력에서 시료로부터 물이 상실됨에 따라 포말을 형성시켰다. 이러한 실험 조건하에서 물만을 함유하는 대조군 시료에서는 어떤 비등도 관찰되지 않았다. 즉, 시료는 비등 보다는 증발을 통해 물을 상실할 수 있다. 이러한 조건하에서 18시간 후, 시료를 건조시켜 포말화된 용액은 포말화된 유리질이 되었다.

[0170] 이와 유사한 공정을 선반 온도를 37°C 이하의 다른 온도로 유지시키면서 수행한 결과 성공적이었다.

[0171] **실시예 2. 동결 조건의 수립**

[0172] 시료는 물에 수크로스를 용해시켜 1%, 5%, 10% 및 20% 용액을 수득하여 제조했다. 이 시료를 선반 온도가 공정을 통해 15°C로 유지되는 동결 건조기에 투입했다. 압력은 초기에는 200mbar로 감소시켜 10분 동안 유지시킨 다음, 50mbar, 5mbar, 2.5mbar, 0.75mbar, 0.4mbar 및 0.2mbar로 추가로 감소시켰다. 각 압력 수준을 온도 평형이 이루어지도록 20분 동안 유지시키고 시료의 온도를 열전쌍을 이용하여 판독했다. 열전쌍은 여러 수크로스 농도의 샘플에 부착시켰으며, 표 1에 기록한 온도는 평균온도이다.

[0173] **결과**

[0174] 모든 시료는 존재하는 수크로스의 농도에 관계없이 1.66 내지 1.11mbar 사이에서 동결되었다. 상이한 압력에서 측정된 온도는 3중점 곡선에서 예측된 값과 매우 가까운 값이었다. 즉, 수크로스의 존재는 다른 압력에서 시료 온도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

[0175] 본 발명의 바람직한 방법에서는, 시료의 동결을 피하는 것이 필수적이다. 이것은 선반 온도가 15°C일 때 압력을 2mbar 이상으로 유지시키면 달성할 수 있다. 이보다 저온에서는 압력이 보다 높은 수준으로 유지되어야 하는 반면, 고온을 사용하는 경우 압력이 감소되어야 추가로 시료가 동결되지 않는다.

[0176] **표 1**

[0177]

압력	측정 온도	이론적 온도	액체/동결
1000mbar	15°C		액체
50mbar	15°C		액체
5mbar	1°C	1°C	액체
2.5mbar	-5°C	-7°C	액체
0.75mbar	-21°C	-21°C	동결
0.4mbar	-22°C	-27°C	동결
0.2mbar	-27°C	-32°C	동결

[0178] **실시예 3. 상이한 당 농도를 가진 시료에 대한 발포 조건**

[0179] 수크로스를 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 및 50%를 함유하는 보존시료를 제조했다. 이 시료를 선반 온도가 공정을 통해 15°C로 유지되는 동결 건조기에 투입했다. 압력은 초기에는 200mbar로 감소시켜 10분 동안 유지시킨 후, 추가 감소시켰다. 시료가 완전 동결되도록 압력은 0.1mbar로 추가 감소시켰다. 그 다음, 후속 실험에서는 압력을 0.788mbar, 0.812mbar 또는 3.5mbar로 증가시켰다. 이러한 조건은 3.5mbar 및 0.812mbar 실험에서는 3시간 동안 유지시키고 0.788mbar 실험에서는 6시간 동안 유지시켰다. 각 시료의 물리적 특징을 평가했다.

[0180] **결과**

[0181] 표 2에 제시된 바와 같이, 3.5mbar의 압력에서는 확실한 포말 형성에 50%의 높은 수크로스 농도가 필요했다. 이에 반해, 0.8mbar의 낮은 압력에서는 보다 낮은 10 내지 25%의 수크로스 농도가 확실한 포말 형성을 허용했다. 이와 같은 낮은 수크로스 농도의 사용은 보존 시료가 예컨대 백신으로 사용되는데 유리할 수 있다. 따라서, 0.8mbar 및 10 내지 25% 수크로스 함량을 이용한 공정이 바람직하다.

[0182] **표 2**

압력	수크로스 함량%	물리적 특성
3.5mbar	20	4/5 발포됨, 1/5 점성 액체
3.5mbar	25	2/5 발포됨, 3/5 점성 액체
3.5mbar	50	5/5 발포됨
0.812mbar	5	결정화 고리 및 기포
0.812mbar	10	모두 발포됨
0.812mbar	15	모두 발포됨
0.812mbar	20	모두 발포됨
0.812mbar	25	모두 발포됨
0.788mbar	5	결정화 고리 및 기포
0.788mbar	20	모두 발포됨
0.788mbar	25	모두 발포됨
0.788mbar	50	포말 및 시럽

[0184] **실시예 4. 실리콘 처리된 용기의 사용 효과**

[0185] 수크로스 5%, 10%, 15% 및 25%를 함유하는 보존 시료를 제조하고 유리병에 첨가했는데, 이 유리병 중 몇 개는 실리콘처리했다. 제1 실험에서, 시료를 선반 온도가 공정 동안 15°C로 유지되는 동결건조기에 투입했다. 압력은 초기에 200mbar로 감소시키고 10분 동안 유지시킨 다음, 추가로 압력을 감소시켰다. 압력은 2.8mbar로 3시간 동안 추가 감소시켰다. 이 기간 동안 수증기가 감소함에 따라 압력은 2.00mbar로 감소되었다. 각 시료의 물리적 특성을 평가했다.

[0186] 제2 실험에서는 시료를 선반 온도가 공정내내 37°C로 유지되는 동결건조기에 투입했다. 압력은 초기에 200mbar로 감소시키고 이 수준에서 10분 동안 유지시킨 다음 압력을 추가로 감소시켰다. 압력은 2.4mbar로 3시간 동안 추가 감소시켰다. 이 기간 동안 압력은 수증기 존재의 감소로 인해 1.06mbar로 저하되었다. 각 시료의 물리적 특성을 평가했다.

[0187] **결과**

[0188] 실리콘 처리는 시료의 탈기에 영향을 미쳤다. 200mbar로의 압력 감소는 실리콘처리된 유리병의 시료를 탈기시킨 반면, 실리콘처리되지 않은 유리병의 시료는 탈기되지 않았다. 탈기는 시료의 발포로 관찰되었다.

[0189] 또한, 유리병의 실리콘 처리는 발포 형성의 유발가능성 및 재현성을 증가시켰다(표 3). 유리병의 실리콘처리는 낮은 폴리올 농도에서도 포말 형성을 재현적으로 발생시켰다. 낮은 폴리올 농도는 시료 건조에 필요한 시간의 길이를 감소시키고, 메일라드 반응의 효과 또는 활성제에 유해한 폴리올과의 다른 상호작용을 감소시킨다. 함유된 시료가 백신인 경우에 낮은 폴리올 농도는 시료의 점도를 감소시켜 투여하기가 보다 쉬워진다.

[0190] **표 3**

온도 및 압력	수크로스 함량%	실리콘처리되지 않은 유리병 특징	실리콘처리된 유리병 특징
15°C, 2.8mbar	5%	점성 유체	
15°C, 2.8mbar	10%	점성 유체	발포됨

15℃, 2.8mbar	15%	점성 유체	
15℃, 2.8mbar	25%	점성 유체	
37℃, 2.4mbar	5%	3개 점성 유체 2개 발포됨	
37℃, 2.4mbar	10%	모두 점성 유체	5개 발포됨 1개 점성 유체
37℃, 2.4mbar	15%	모두 발포됨	
37℃, 2.4mbar	25%	모두 발포됨	

[0192] 실시예 5. 종래의 동결 건조 또는 포말 건조에 의한 Hib-IPV 보존 비교

[0193] 보존될 활성제는 헤모필러스 인플루엔자 b(Hib)의 PRP 다당류와 불활성화된 폴리오 바이러스(IPV)의 3종의 균주의 혼합물이다. 보존 시료는 Hib-IPV를 3.15% 수크로스 용액 또는 10% 트레할로스 용액에 용해시켜 제조했다.

[0194] 시료는 대형 동결건조기에서 수행 시 3일이 요구되는 종래의 동결 건조 방법을 사용하거나 실시예 1에 기술된 포말 건조 방법을 사용하여 동결건조시켰다.

[0195] 이러한 시료들을 물에 재구성시키고 3종의 폴리오 바이러스 균주의 항원성 보유능을 평가하기 위해 ELISA를 수행했다. 3종의 폴리클로날 항체와 3종의 모노클로날 항체를 각 ELISA에서 각 균주마다 하나씩 사용했다. 결과는 동결 건조 또는 포말 건조 공정이 수행되지 않은 시료에 의해 제공되는 판독값의 백분율로 제시했다.

[0196] 보존 시료의 생체내 면역원성은 재구성된 IPV-Hib를 10마리의 마우스 그룹에 접종한 뒤 마우스로부터 혈액을 채취하여 IPV 및 Hib 다당류에 대한 항체 수준을 예컨대 ELISA 또는 웨스턴 블롯팅으로 모니터링하여 평가했다. 예 방력은 항원투여 마우스 모델에서 평가했다.

[0197] 결과

[0198] 폴리올로서 수크로스 또는 트레할로스를 사용한 경우, IPV의 항원성은 종래의 동결 건조 보다 포말 건조 기법을 사용했을 때 우수하게 유지되었다.

[0199] 표 4

건조 방법	폴리올 함량	ELISA- 타입 1/2/3%	
		폴리클로날	모노클로날
동결건조	3.15% 수크로스	46/49/58*	25/0/0
포말건조	3.15% 수크로스	85/97/106	55/68/57
동결건조	10% 트레할로스	47/43/58	
포말건조	10% 트레할로스	93/86/84	72/75/87

[0201] * 3.15% 수크로스의 존재하에 동결 건조하는 실험은 5회 반복했으며, 제시된 결과는 대표적인 한 실험의 결과이다.

[0202] 실시예 6. Hib 다당류의 존재하에 동결 건조 IPV의 예방 효과

[0203] 3.15% 수크로스와 IPV 또는 IPV와 Hib 다당류의 혼합물을 함유하는 보존시료를 제조했다. 이 시료를 Heto Drywinner 8-85 동결건조기에 첨가하고 -32℃의 설정 온도에서 40시간 동안 동결건조시킨 다음 4℃에서 16시간 동안 연속 건조시켰다.

[0204] 시료를 물에 재구성시키고 ELISA를 사용하여 3종의 폴리오 바이러스 균주의 항원성 보유능을 평가했다. 3종의 모노클로날 항체를 각 균주마다 하나씩 각각 사용하는 ELISA를 수행하여 재구성된 동결 건조 시료의 항원성 보유 정도를 동결되지 않은 대조군 시료와 비교하여 평가했다. 결과는 동결 건조 또는 포말 건조 공정으로 처리되지 않은 시료에 의해 제공되는 판독값의 백분율로 제시했다.

[0205] 결과

[0206] 표 5에 제시한 바와 같이, IPV와 함께 존재하는 보존 시료 중의 Hib 다당류는 IPV 단독 동결건조시, 획득되는 항원 보유능 보다, 동결건조 후 보다 큰 IPV 항원 보유능을 유도했다. 즉, Hib 다당류는 안정화제로서 수크로스

를 사용함으로써 수득되는 보존 효과에 추가하여 IPV 항원성에 대한 보존 효과를 가진다.

[0207] 표 5

[0208]	동결건조된 조성물	폴리올 함량	ELISA-타입 1/2/3%
	IPV	3.15% 수크로스	26/25/0
	IPV-Hib	3.15% 수크로스	52/68/0

[0209] 실시예 7. IPV-Hib 동결건조에 미치는 상이한 안정화제의 효과

[0210] IPV-Hib를 함유하고 안정화제로서 3.15% 수크로스; 2.5% 소르비톨, 0.8% 글루타민 및 0.01% HSA; MMR 안정화제 및 락토스; 3% 글리신, 2% 아르기닌 및 4% 수크로스; 또는 4% 수크로스 및 2% 글리신을 사용하는 보존 시료를 제조했다. 본 실험에는 안정화제로서 3.15% 수크로스를 보유하고 2배 농도의 IPV-Hib를 사용하는 시료도 포함시켰다. 이러한 시료들을 회분식 동결 건조기에서 종래의 3일 동결 건조 사이클에 따라 동결건조시켰다.

[0211] 시료를 물에 재구성시키고 ELISA를 사용하여 3종의 폴리올 바이러스 균주의 항원성 보유능을 평가했다. 3종의 폴리클로날 항체 및 3종의 모노클로날 항체를 각 균주마다 하나씩 각각 사용하는 ELISA에 사용하였다. 결과는 동결 건조 또는 포말 건조 공정으로 처리되지 않은 시료에 의해 제공되는 판독값의 백분율로 제시했다.

[0212] 이러한 보존시료들의 생체내 면역원성은 재구성된 IPV-Hib를 10마리의 마우스 그룹에게 접종한 뒤, 마우스로부터 혈액을 채취한 다음, IPV 및 Hib 다당류에 대한 항체 수준을 예컨대 ELISA 또는 웨스턴 블롯팅으로 모니터링하여 평가했다. 보호능은 항원투여 마우스 모델에서 평가했다.

[0213] 결과

[0214] IPV 용량을 40/8/32 DU/용량에서 80/16/64 DU/용량으로 증가시킨 경우, 표 6에 제시된 바와 같이 IPV 항원성의 보유능이 증가했다. 또한, 안정화제의 변화는 4% 수크로스/2% 글리신 및 2.5% 소르비톨/0.8% 글루타민/0.01% HSA를 보유한 항원의 보유능에 영향을 미치어, ELISA 데이터로 확인되듯이 보다 높은 항원 보유능을 제공했다.

[0215] 표 6

[0216]	안정화제	폴리클로날 ELISA 결과	모노클로날 ELISA 결과
	3.15% 수크로스	50/50/70	25/0/0
	2.5% 소르비톨	55/72/72	33/50/0
	0.8% 글루타민		
	0.01% HSA		
	MMR 안정화제	59/62/65	28/25/0
	락토스		
	3.15% 수크로스	84/92/120	102/138/0
	IPV-Hib 2배 용량		
	3% 글리신		
	2% 아르기닌		
	4% 수크로스		
	4% 수크로스	46/62/78	25/50/15
	2% 글리신		

[0217] 실시예 8. 동결건조, 포말 건조 또는 동결 단계를 보유한 포말 건조 후의 시료 품질의 재현성

[0218] 활성제로서 IPV, 유행성이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, CMV, 간염 바이러스, HSV1, HSV2, 호흡기 합포체 바이러스, 뎅기열바이러스, 파라믹소바이러스과, 예컨대 파라인플루엔자, 토가바이러스과 및 인플루엔자 바이러스, 및/또는 Hib를 함유하는 보존 시료를 제조했다. 이러한 활성제를 폴리올을 함유하는 수용액에 용해시켰다. 다수의 시료를 동결건조하거나 실시예 1에 기술된 프로토콜에 따라서 동결 단계를 이용하여 포말 건조하거나 또는 실시예 4에 기술된 프로토콜에 따라서 동결단계 없이 포말 건조하여 보존시켰다. 시료를 수용액에 재구성시킨 후 활성을 평가했다. 활성 평가는 천연 항원에 특이적인 항체를 사용하여 실시예 5에 기술된 ELISA 분석법으로 수행했다. 생바이러스인 경우에, 각 시료의 역가는 적당한 숙주 세포를 감염시키는 바이러스를 사용하여 플라크 형성이나 면역세포화학에 의해 감염성을 평가하여 수득했다. 면역원성 조성물 또는 백신이 포말 건조된 경우에는, 면역원성의 보유능은 포말 건조 또는 동결 건조된 백신을 동물 그룹

에게 예방접종한 후, 추가 예방접종을 예컨대 1차 예방접종 후 14일 및 28일째 수행하여 동물 모델에서 검사할 수 있다. 혈청은 예방접종 계획 완료시에 동물로부터 채취하고, 백신에 대한 혈청의 역가는 표준 검사법, 예컨대 ELISA, 면역세포화학, 웨스턴 블롯팅, 면역침전, 혈청 살균 분석 또는 응집 분석을 사용하여 검사했다. 결과는 먼저, 동결건조, 동결 단계를 이용한 포말 건조, 또는 동결 단계 없는 포말 건조 후의 활성제의 활성을 비교하여 수득했다. 그 다음, 3가지 보존 방법 각각으로 시료를 처리한 후의 활성의 범위를 비교하여 보존 기법의 재현성 정도를 평가했다.

[0219] **실시예 9. 동결 건조 및 포말 건조에 의한 보존된 활성제의 장기 보관성**

[0220] 보존 시료는 활성제로서 IPV, 유행성이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, 풍진 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, CMV, 간염 바이러스, HSV1, HSV2, 호흡기 합포체 바이러스, 텡그열바이러스, 파라믹소바이러스과, 예컨대 파라인플루엔자, 토가바이러스과 및 인플루엔자 바이러스, 및/또는 Hib를 사용하여 제조했다. 이러한 활성제를 폴리올을 함유하는 수용액에 용해시켰다. 다수의 시료를 동결건조하거나 실시예 1에 기술된 프로토콜에 따라서 동결 단계를 이용하여 포말 건조하거나 또는 실시예 4에 기술된 프로토콜에 따라서 동결단계 없이 포말 건조하여 보존시켰다. 각 시료를 37℃ 또는 23℃에서 보관하여 7일 동안 노화시키고 4℃에서 보관된 시료와 활성을 비교했다. 시료를 수용액에 재구성시킨 후 활성을 평가했다. 활성 평가는 천연 항원에 특이적인 항체를 사용하여 실시예 5에 기술된 ELISA 분석법으로 수행했다. 생바이러스인 경우에, 각 시료의 역가는 적당한 숙주 세포를 감염시키는 바이러스를 사용하여 플라크 형성이나 면역세포화학에 의해 감염성을 평가하여 수득했다. 결과는 먼저, 상층 온도에서 보관한 활성제 활성과 4℃에서 보관한 활성제 활성을 비교하여 수득했다. 그 다음, 각 조건으로 시료를 처리한 후의 활성 범위를 비교하여 보존 기법의 재현성 정도를 평가했다.

[0221] **실시예 10. 동결 또는 포말 형성 없는 건조 방법**

[0222] 수크로스 5%, 10%, 15% 및 25%를 함유하는 보존 시료를 제조하고 유리병에 첨가했다. 시료를 공정 동안 설정 온도가 15℃인 동결건조기에 투입했다. 압력은 초기에는 200mbar로 감소시키고 이 수준에서 10분 동안 유지시켜 탈기되도록 한 다음, 압력을 추가로 감소시켰다. 압력은 2 내지 3시간 동안 8mbar로 추가 감소시켰으며, 그 동안 시료 내부의 열전쌍을 통해, 시료 온도가 증발 냉각으로 인해 4℃로 감소한 것을 나타내었다. 2 내지 3시간 후, 시료의 온도는 15℃로 재구성되었는데, 이는 이러한 온도 및 압력 조건하에서 증발이 거의 종료되었음을 시사한다. 이러한 공정 단계 동안의 시료는 포말형성을 위해 비등하거나 동결되지 않아서 시료 중의 활성제가 가능한 한 적은 스트레스에 노출되었다. 이러한 시료들은 최종 산물과 유사한 고체 외관을 보였다.

[0223] 시료의 추가 건조는 선반 온도를 15℃로 유지시키면서 압력을 0.1mbar로 추가 감소시켜 수득했다. 이러한 조건은 10 내지 16시간 동안 추가로 유지시켰다. 이 기간 동안 시료 온도는 느린 증발 속도로 인해 15℃로 유지되었다. 추가 건조를 수행한 후 수득되는 시료는 고체 외관을 나타냈다. 시료를 측면에 배치한 경우, 시료 함유물은 수일 또는 수개월동안에 걸쳐 매우 느리게 유동했고, 이는 시료가 고점성의 액체 유리질임을 시사해준다. 도 2는 고점성 액체를 보유하는 용기를 뒤집었을 때 고점성 액체의 즉각적인 유동이 유발되지 않음을 보여준다.

[0224] **실시예 11 동결 또는 포말 형성 없이 건조한 후의 IPV 면역원성의 보유능**

[0225] 실시예 10의 방법에 따라 건조한 시료는 포말 형성을 수반하는 발포 또는 동결과 관련된 스트레스를 받지 않았다. 이러한 방법이 IPV 건조에 사용되었을 때 높은 항원 보유능을 제공하는지를 평가하기 위해 실험을 실시했다.

[0226] 안정화제로서 10% 수크로스 또는 10% 트레할로스를 함유하는 수용액에 IPV를 재현탁시켜 3가지 독립된 실험을 수행했다. 시료는 실리콘 처리된 유리병에 투입시켜 Heto Drywinner 8-85 동결건조기에 넣고 온도는 15℃로 설정했다. 압력은 초기에는 시료의 탈기를 위해 35mbar로 감소시켰다. 10분 후, 압력을 8mbar로 추가 감소시키고 이 수준에서 2시간 동안 유지시켰다. 이 시간 동안 온도 설정은 15℃로 유지시키고 시료 내부의 온도를 모니터링했다. 시료로부터 물이 증발되어 온도는 4℃로 감소했으나, 2시간이 종료될 때 온도는 느린 증발 속도로 인해 15℃로 재구성되었다. 이러한 조건하에서 발포 또는 포말 형성은 일어나지 않았다. 그 다음, 압력을 0.1mbar로 추가로 감소시키고 이 조건을 처음 2가지 실험에서는 16시간 더 유지시키고 3번째 실험에서는 10시간 더 유지시켰다.

[0227] 시료를 물에 재구성시키고 3종의 폴리오 바이러스 균주의 항원성 보유능 평가를 위해 ELISA를 수행했다. ELISA에는 타입 3 IPV에 대한 모노클로날 항체를 사용하여 재구성된 동결건조 시료의 항원 보유성 정도를, 동결되지 않은 대조군 시료와 비교하여 평가했다. 결과는 건조 공정으로 처리되지 않은 시료에 의해 제공되는 관독값의 백분율로 제시했다.

[0228] **결과**

[0229] 건조 시료는 외관은 고체이지만, 용기를 실온에서 뒤집어 놓은 경우 건조 고체는 수일에 걸쳐 유동할 수 있었으므로 고점성 액체/유리질 형태인 것으로 보였다.

[0230] 표 7. 모노클로날 항체를 이용하여 ELISA로 측정된 타입 3 IPV 항원의 보유성(발포 또는 동결 없는 건조)

[0231] 제형	1차 실험 (18시간 사이클)	2차 실험 (18시간 사이클)	3차 실험 (12시간 사이클)
10% 수크로스	75%	78%	91%
10% 트레할로스	82%	79%	93%

[0232] 이러한 수준의 타입 3 IPV 항원 보유성은 타입 3에 대한 모노클로날 항체가 사용되었을 때 동일 ELISA판에서 매우 낮은 값이 일반적으로 관찰되는 동결 건조 결과와 비교했을 때 매우 바람직한 것이다.

[0233] 표 8. 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체를 이용한 ELISA 측정시의 타입 1, 2 및 3 IPV 항원의 보유능(동결 건조)

[0234] 건조 방법	폴리올 함량	ELISA-타입 1/2/3%	
		폴리클로날	모노클로날
동결 건조	3.15% 수크로스	46/49/58*	19/25/0
동결 건조	10% 트레할로스	47/43/58	25/0/0

[0235] * 본 동결 건조 실험은 3.15% 수크로스의 존재하에 5회 반복하였으며, 제시된 결과는 대표적인 한 실험의 결과이다.

[0236] **실시예 12. 고점성 액체/유리질로서 보관된 건조 IPV의 장기간 보관 안정성**

[0237] 실시예 11에 기술된 방법을 사용하여 건조한 IPV를 4°C에서 9개월간 보관했다. 이 시료를 150mM NaCl을 보유한 물에서 재구성시키고 3종의 폴리오 바이러스 균주의 항원성 보유능을 평가하기 위해 ELISA를 수행했다. 재구성된 보관 시료의 항원 보유능 정도를 평가하기 위한 각 ELISA를 위해 3가지 모노클로날 항체를 각 균주에 하나씩 사용했다. 보관 전의 동일 회분에서 채취한 재구성 시료에도 유사한 ELISA를 수행했다. 모든 결과는 건조되지 않은 대조군 시료와 비교했다. 결과는 건조 공정이 수행되지 않은 시료에 의해 제공된 판독값의 백분율로 제시했다..

[0238] **결과**

[0239] 표 9. 9개월간 고점성 액체로서 보관된 후의 IPV 항원의 보유능

[0240] 처리	타입 1 ELISA	타입 2 ELISA	타입 3 ELISA
건조/재구성 보관되지 않음	72%	75%	88%
건조/재구성 4°C에서 9개월간	70%	94%	90%

[0241] 즉, 실시예 11에 기술된 방법으로 건조시킨 IPV는 항원성 상실없이 적어도 9개월간 4°C에서 보관될 수 있다.

[0242] **실시예 13. 고점성 액체 형성을 위한 건조 및 재구성 후의 IPV의 생체내 면역원성과 건조처리되지 않은 IPV의 면역원성 비교**

[0243] 10마리의 위스타(Wistar) 래트 그룹에게 실시예 10에 개시된 방법을 사용하여 10% 수크로스 존재하에 건조시켜 고점성 액체를 제조하고 재구성시킨 다양한 희석율의 IPV를 접종했다. 다른 위스타 래트 그룹 10마리에게는 동일 방식으로 제조했으나 건조처리되지 않은 IPV의 대조군 시료를 접종했다.

[0244] 21일 후, 모든 래트로부터 혈청을 채취하고, 이 혈청들을 타입 1, 타입 2 및 타입 3 폴리오 바이러스를 이용하는 각 면역침전 분석법으로 검사했다.

[0245] 표 10에는, a) 각 IPV 희석율에 대한 반응 래트의 수; b) 면역침전 분석으로 평가 시 래트의 50%를 혈청전환시

키는데 필요한 용량인 ED50; 및 c) 미건조된 대조군 IPV와 비교한 건조 및 재구성된 IPV의 상대적 효능의 결과를 제시했다.

[0246] 표 10. 미건조된 대조군 IPV(JLE097)와 비교한, 고점성 액체 형성을 위해 건조(JLE017/05) 및 재구성한 IPV의 면역원성

[0247]

시료		반응 래트의 수			ED50	RP 상대적 효능
		1/1.25	1/3.125	1/7.81		
	희석되지 않음					
JLE017/05						
타입 1	10	9	6	5	6.37	0.956
타입 2	6	4	3	3	7.14	0.825
타입 3	6	8	2	1	18.18	1.051
JLE097						
타입 1	10	10	10	7	3.33	1.120
타입 2	8	6	5	2	3.12	0.951
타입 3	7	6	4	1	16.91	1.172
대조군						
타입 1		10	8	4	6.37	
타입 2		7	5	2	2.93	
타입 3		5	3	0	22.57	

[0248] JLE017/05는 고점성 액체 형성을 위해 건조되고 이어서 재구성된 IPV 회분이다. JLE097은 미건조된 대조물이다.

[0249] 표 10은 각 희석율의 IPV를 접종한 반응 래트의 수가 건조 및 재구성된 IPV의 2 회분과 미건조된 대조군 시료 사이에 유사하다는 결과를 보여준다. 일반적으로 타입 1 IPV는 면역반응을 가장 많이 유도했고, 타입 2는 이보다 약간 적은 수의 래트에서 면역반응을 유도했다. 타입 3은 가장 약한 면역반응을 유도했다.

[0250] 즉, 고점성 액체 형성을 위한 건조 공정은 생체내에서 면역침전성 항체를 유도해내는 IPV의 능력을 손상시키지 않는다. 1.0의 상대적 효능(RP) 판독값은 시료가 대조군 시료와 동등한 반응을 유도한다는 것을 시사한다. 건조 시료는 3종의 폴리오 바이러스 모두에 대해 1.0과 근사한 RP 판독값을 제공하는 바, 건조 공정이 면역반응을 유도하는 시료의 능력에 영향을 미치지 않음을 보여주었다.

[0251] 실시예 14. 생체내 면역침전성 면역반응을 유도하는 IPV 능력에 미치는, 안정화제로서 수크로스 또는 트레할로스를 이용한 고점성 액체 형성을 위한 건조의 효과

[0252] 10마리의 위스타 래트 그룹에게 실시예 2에 기술된 바와 같이 10% 수크로스 또는 10% 트레할로스 존재하에 건조시킨 뒤 재구성된 IPV를 접종했다. 또 다른 위스타 래트 그룹 10마리에게는 대조군 시료로서 건조되지 않은 동등량의 IPV를 접종했다.

[0253] 21일 후, 모든 래트로부터 혈청을 채취하여 실시예 5에 기술한 바와 같은 면역중화 분석법을 사용하여 타입 1, 타입 2 및 타입 3 폴리오 바이러스 각각에 대해 유발되는 면역중화 항체의 양을 측정했다.

[0254] 상대적 효능은 미건조된 대조군 시료에 의해 유도되는 면역반응과 각 시료의 면역반응을 비교하여 계산했다.

[0255] 결과는 표 11에 제시한 바와 같다.

[0256] 표 11. 수크로스 및 트레할로스에서 건조 시의 비교

[0257]

번호	존재하는 당	타입1/타입2/타입3의 생체내 상대적 효능	칼피셔법의 습도 %	기간(시간)
Jle017	10% 트레할로스	0.95/0.82/1.05	nd	7
31C03/01	10% 수크로스	0.69/1.20/0.97	4.6%	18
31C03/02	10% 트레할로스	0.60/0.94/0.9	11.5%	18
03D02/01	10% 수크로스	0.74/1.05/0.96	5.9%	12
03D02/02	10% 트레할로스	0.58/0.98/1.06	10.6%	12

[0258] 시료에 남아있는 물의 양은 칼피셔법으로 측정 시, 안정화제로서 수크로스를 사용한 경우는 약 5%의 습도로서,

안정화제로서 10% 트레할로스를 사용한 경우의 약 10% 습도에 비해 보다 낮았다.

[0259] 수크로스 및 트레할로스는 모두 재구성된 IPV가 3종의 폴리오 바이러스에 대해 대부분 1.0에 근사한 상대적 효능 관독값을 제시하도록 건조 공정 동안 IPV 안정화에 효과적이었다. 상대적 효능은 면역원성을 비교적 용이하게 상실하는 타입 3 폴리오 바이러스에서 특히 양호했다.

[0260] **실시예 15: 칼피셔법에 의한 습도 측정**

[0261] 분석은 칼피셔 부피분석계(titrometer: Aqua 30.00 - Elektrochemie Halle)를 사용하여 수행했다. 시료는 칭량한 뒤 80°C로 설정된 오븐에 넣었다. 시료를 질소 기체로 세정한 뒤 하이드라날 시약(Riedel de Hahn)에 첨가하여 전량계로 분석을 수행했다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 포말 건조 공정의 여러 단계에 있는 보존 시료를 함유한 유리병 사진이다.

[0015] A - 액체 제형으로서 동결 건조에 투입된 보존 시료의 외관.

[0016] B - 압력을 1.5mbar로 감소시켰을 때의 보존 시료의 외관. 이 시료는 각 유리병마다 상이한 조건으로 인해 약간 다른 속도로 동결하기 시작한다.

[0017] C - 모든 시료가 완전 동결되기 시작했을 때, 0.1mbar에서의 보존 시료의 외관.

[0018] D - 압력이 0.8 내지 3.5mbar로 증가되었을 때의 보존 시료의 외관. 보존 시료가 발포되고 용매가 증발되면 포말화된 유리질이 형성된다.

[0019] 도 2는 뒤집힌 유리병에 담긴 고점성 액체 사진이다.

[0020] **상세한 설명**

[0021] 본 발명의 면역원성 조성물

[0022] 본 발명은 건조 고체 또는 고점성 액체로 제조되고 IPV 및 안정화제를 함유하며, IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 재구성 후에도 보유되는 면역원성 조성물을 제공한다. 이러한 IPV의 건조 고체 또는 고점성 액체 제형은, 바람직하게는 재구성 및 접종 후에, 폴리오바이러스에 대한 면역반응, 바람직하게는 예방 면역 반응을 발생시킬 수 있는 것이다.

[0023] IPV는 불활성화된 폴리오 바이러스를 의미한다(바람직하게는, 백신 기술분야에 일반적인 타입 1, 2 및 3을 함유하는 것이고, 가장 바람직하게는 솔크(Salk) 폴리오 백신인 것이다). IPV의 백신 용량에는 타입 1(Mahoney)의 20 내지 80, 바람직하게는 40 또는 80 D-항원 단위, 타입 2(MEF-1)의 4 내지 16, 바람직하게는 8 또는 16 D-항원 단위, 타입 3(Saukett)의 20 내지 64, 바람직하게는 32 또는 64 D-항원 단위가 포함된다.

[0024] 본 발명의 방법으로 건조되었을 때, 폴리오 바이러스의 타입 1, 2 및 3 중 1개, 2개 또는 총 3개의 항원성이 보유되는 것이 바람직하고; 보다 바람직하게는, 타입 1; 타입 2; 타입 3; 타입 1과 타입 2; 타입 1과 타입 3; 타입 2와 타입 3; 또는 타입 1, 타입 2 및 타입 3의 항원성이 건조 공정으로 처리되지 않은 대조군 시료의 항원성의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98%의 수준으로 유지되는 것이 좋다. 이러한 항원성은 건조 고체 또는 고점성 액체를 수용액에 재구성시킨 후, 폴리오 바이러스 타입 1, 2 및/또는 3에 대해 폴리클로날 및/또는 모노클로날 항체를 사용하는 ELISA 등을 비롯한 임의의 적합한 방법을 통해 측정할 수 있다.

[0025] 본 발명의 방법으로 건조된 경우, 폴리오 바이러스의 타입 1, 2 및 3 중 1개, 2개 또는 3개 모두의 면역원성이 보유되는 것이 바람직하고; 보다 바람직하게는, 타입 1; 타입 2; 타입 3; 타입 1과 타입 2; 타입 1과 타입 3; 타입 2와 타입 3; 또는 타입 1, 타입 2 및 타입 3의 면역원성이 건조 공정으로 처리되지 않은 대조군 시료의 면역원성의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98%의 수준으로 유지되는 것이 좋다. 이러한 면역원성은 건조 고체 또는 고점성 액체를 수용액에 재구성시킨 후, 임의의 적합한 방법을 통해 측정할 수 있다. 바람직한 방법에서, 건조 제형은 수용액에 재구성된 후, 동물, 바람직하게는 래트에게 접종된다. 적당한 시간 후, 접종된 동물의 항혈청을 채취하여 혈청전환을 검사한다. 건조되지 않은 대조군 시료와 비교했을 때 상대적 역가가 적어도 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 또는 0.9인 것이 바람직하다.

[0026] 건조 고체 조성물은 동결건조, 승화, 증발 또는 습기제거(desiccation)의 공정을 통해 잔류 용매가 15% 이하, 12% 이하, 10% 이하, 7% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 바람직하게는 3% 이하, 2% 이하, 또는 가장 바람직하게는 1%

이하가 되도록 용매를 제거한 제형이다. "건조 고체"란 용어에는 외관이 고체인 유리질, 고무질 또는 결정형 고체가 포함된다. 이러한 건조 고체의 제조를 위해 전술한 방법 중 임의의 방법을 사용할 수 있다. 용매는 승화, 비등 또는 증발로 제거하고, 증발이 바람직하다.

[0027] 고점성 액체는 용매 함량이 15% 이하, 12% 이하, 10% 이하, 바람직하게는 8% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하 또는 1% 이하인 물질을 의미한다. 고점성 액체는 용매 함량이 충분히 낮아서 활성제가 4℃에서 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 또는 24개월 동안 안정된 상태로 보존되고, 이 기간 동안 적어도 40%, 50%, 60%, 바람직하게는 70%, 80%, 90%, 95%의 항원성 및/또는 면역원성을 보유하는 것이다. 이러한 고점성 액체는 포말 형성시 수반되는 기포 형성에 노출되지 않았다. 이러한 고점성 액체는 외관은 고체이지만 유리질이고 수일에 걸쳐, 바람직하게는 수주에 걸쳐, 보다 바람직하게는 수개월에 걸쳐 매우 느리게 유동할 수 있는 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명의 면역원성 조성물은 IPV와 안정화제, 바람직하게는 박테리아 다당류를 함유하는 건조 고체 또는 고점성 액체로 제조된다. 안정화제는 이하에 설명되는 임의의 조성물이다. 박테리아 다당류에는 임의의 박테리아, 바람직하게는 나이세리아 메닝기티디스, 헤모필러스 인플루엔자 b, 스트렙토코커스 뉴모니아, 그룹 A 스트렙토코커스, 그룹 B 스트렙토코커스, 스타필로코커스 아우레우스 또는 스타필로코커스 에피데미디스 중 1종 이상의 박테리아로부터 유래되는 헤파 다당류가 포함된다.

[0029] 바람직하게는, 헤모필러스 인플루엔자 b의 PRP 헤파 다당류가 건조 고체 또는 고점성 액체로서 제공되는 것이 좋다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 면역원성 조성물에는 나이세리아 메닝기티디스의 혈청군 A, C, W-135 및 Y 중에서 1종 이상으로부터 유래되는 헤파 다당류(수막구균 다당류)의 건조 고체 또는 고점성 액체 제형이 포함된다. 또 다른 바람직한 구체예에는 스트렙토코커스 뉴모니아에서 유래되는 헤파 다당류의 건조 고체 또는 고점성 액체 제형이 포함된다. 폐렴구균 헤파 다당류 항원은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F 중에서 선택되는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F 중에서 선택되는 것이다. 또 다른 바람직한 구체예에는 스타필로코커스 아우레우스 타입 5, 타입 8 또는 336의 헤파 다당류가 함유된다. 또 다른 바람직한 구체예에는 스타필로코커스 에피데미디스 타입 I, 타입 II 또는 타입 III의 헤파 다당류가 포함된다. 또 다른 바람직한 구체예에는 그룹 B 스트렙토코커스의 타입 Ia, 타입 Ic, 타입 II 또는 타입 III 헤파 다당류가 포함된다. 또 다른 바람직한 구체예에는 그룹 A 스트렙토코커스의 헤파 다당류가 포함되며, 바람직하게는 추가로 1종 이상의 M 단백질, 더 바람직하게는 여러 종류의 M 단백질을 함유하는 것이 좋다.

[0030] 본 발명의 일 구체예에서, 박테리아 다당류는 정제된 천연 다당류로서 전장의 길이인 것이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 다당류는 보다 손쉬운 취급성을 위해 크기가 2 내지 20배 적고, 바람직하게는 2 내지 5배 적거나, 5 내지 10배 적거나, 10 내지 15배 적거나 또는 15 내지 20배 적은 것이다. 바람직한 구체예에서는 올리고당류가 사용된다. 올리고당류는 일반적으로 2 내지 20개의 반복 단위를 함유하는 것이다.

[0031] 본 발명은 추가로 1종 이상의 박테리아 다당류와 IPV를 함유하는, 건조 고체 또는 고점성 액체인 면역원성 조성물을 제공한다. 여기서, IPV는 Hib(헤모필러스 인플루엔자 타입 b) PRP 다당류 및/또는 수막구균 A, C, W 및/또는 Y 다당류 및/또는 폐렴구균 다당류 중 1종 이상과 배합되는 것이 바람직하다. 가장 바람직한 것은, 활성제가 IPV 및 Hib; IPV 및 MenC; IPV 및 Hib 및 MenC; IPV 및 MenA 및 C; IPV 및 Hib 및 Men A 및 C; IPV 및 Hib 및 Men A 및 C 및 Y; 또는 IPV 및 Hib 및 Men C 및 Y를 함유하는 것이다.

[0032] 이와 같이 특정된 활성제는 추가로 이하에 기술되는 1종 이상의 폐렴구균 헤파 다당류를 함유할 수도 있다.

[0033] 다당류가 사용되는 전술한 조성물에는, 올리고당류도 사용될 수 있다(전술한 바와 같다).

[0034] 이러한 조성물들은 애쥬번팅(이하에 기술된다)될 수 있으나, 애쥬번팅되지 않거나 알루미늄 염을 함유하지 않는 것이 바람직하다.

[0035] 본 발명의 다당류 또는 올리고당류는 T-헬퍼 에피토프를 함유하는 펩타이드 또는 담체 단백질(이하에 설명된다)에 접합된 것이 바람직하다.

[0036] 본 발명의 면역원성 조성물에 존재하는 헤파 다당류에는 과상풍 유독소, 과상풍 유독소 단편 C, 디프테리아 유독소, CRM197, 뉴모라이신, 단백질 D(US6342224)와 같은 담체 단백질이 접합되거나 접합되지 않은 것이다. 과상풍 독소, 디프테리아 독소 및 뉴모라이신은 유전자 돌연변이 및/또는 바람직하게는 화학적 처리를 통해 해독된 것이다. 본 발명의 바람직한 구체예는 과상풍 유독소에 접합된 Hib이다.

- [0037] 본 발명의 면역원성 조성물에 1종 이상의 접합된 다당류가 존재한다면, 다당류는 동일한 담체 단백질에 접합되거나 또는 다른 담체 단백질에 접합된다. 본 발명의 바람직한 구체예에는 담체 단백질에 접합된 수막구균 다당류가 포함된다. 접합된 Hib와 수막구균 다당류가 존재하는 경우에, 이들은 동일한 담체 단백질에 접합되거나 상이한 담체 단백질에 접합된다.
- [0038] 다당류 접합체는 공지된 임의의 커플링 기술로 제조할 수 있다. 바람직한 커플링 기술에는 다당류를 티오에테르 결합을 통해 커플링시키는 방법이 있다. 이 접합 방법은 시아네이트 에스테르를 형성시키기 위한, 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)를 이용한 다당류의 활성화를 필요로 한다. 활성화된 다당류는 결과적으로 담체 단백질 상의 아미노기에 직접 커플링되거나 또는 스페이서기를 통해 커플링될 수 있다. 시아네이트 에스테르는 핵산 디아민과 커플링되고, 아미노 유도체화된 다당류는 티오에테르 결합의 형성을 수반하는 헤테로결합 화학을 이용하여 담체 단백질에 접합되는 것이 바람직하다. 이러한 접합체는 PCT 공개 출원번호 WO 93/15760(Uniformed Services University)에 기술되어 있다.
- [0039] 이러한 접합체는 또한 US 4365170(Jennings) 및 US 4673574(Anderson)에 기술된 바와 같은 직접 환원적 아민화법을 이용하여 제조할 수도 있다. 다른 방법은 EP-0-161-188, EP-208375 및 EP-0-477508에 기술되어 있다.
- [0040] 또 다른 방법에는 아디프산 하이드라자이드(AH)에 의해 유도체화된 시아노겐 브로마이드 활성화된 다당류를 카르보디이미드 축합을 통해 단백질 담체에 커플링시키는 방법이 있다(Chu C. et al. Infect.Immunity, 1983 245-256).
- [0041] 본 발명의 면역원성 조성물의 일부로서 포함되는 다당류는 미흡착 상태이거나 또는 애쥬번트, 바람직하게는 알루미늄 염(인산알루미늄 또는 수산화알루미늄), 가장 바람직하게는 인산알루미늄 상에 흡착될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 면역원성 조성물은 습기제거 공정 동안의 손상 방지를 도울 수 있는 안정화제를 함유한다. 유리질 형성 폴리올을 비롯하여, 이하에 기술되는 임의의 안정화제가, 본 발명의 방법들에 의한 건조 고체, 포말화된 유리질 또는 고점성 액체 조성물 여부에 관계없이 면역원성 조성물에 포함될 수 있다. 바람직한 안정화제에는 수크로스, 소르비톨, 락토스 및 트레할로스가 있다.
- [0043] 본 발명의 방법들에 의해 건조된 바람직한 복합물은 건조된 성분의 재구성에 사용되는 습기제거되거나 액체 제형인 조합 백신에서 다른 항원과 배합될 수 있다.
- [0044] 추가 성분
- [0045] IPV와 안정화제를 함유하는 본 발명의 건조 고체 또는 고점성 액체 제형은 추가로 다른 백신 성분과 함께 조제될 수 있다. 바람직한 백신에는 추가의 백신 성분을 함유하는 액체 제형과 혼합될 수 있는, IPV 및 박테리아 다당류의 건조 고체 또는 고점성 액체 제형이 포함된다. 이와 같이 액체 성분을 이용하여 고체 성분을 재구성시킨 후, 전체 백신을 주사를 통해 투여한다.
- [0046] 추가 성분에는 나이세리아 메닝기티디스, 스트렙토코커스 뉴모니아, 그룹 A 스트렙토코커스, 그룹 B 스트렙토코커스, 스타필로코커스 아우레우스 또는 스타필로코커스 에피더미디스 중의 1종 이상에서 유래되는 협막 다당류가 포함된다. 바람직한 구체예에서, 면역원성 조성물에는 나이세리아 메닝기티디스의 혈청군 A, C, W-135 및 Y 중에서 1종 이상으로부터 유래되는 협막 다당류가 포함된다. 또 다른 바람직한 구체예에서는 스트렙토코커스 뉴모니아에서 유래되는 협막 다당류가 포함된다. 폐렴구균 협막 다당류 항원은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F 중에서 선택되는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F 중에서 선택되는 것이다. 또 다른 바람직한 구체예에서는 스타필로코커스 아우레우스 타입 5, 타입 8 또는 336의 협막 다당류가 함유된다. 또 다른 바람직한 구체예에서는 스타필로코커스 에피더미디스 타입 I, 타입 II 또는 타입 III의 협막 다당류가 포함된다. 또 다른 바람직한 구체예에서는 그룹 B 스트렙토코커스의 타입 Ia, 타입 Ic, 타입 II 또는 타입 III 협막 다당류가 포함된다. 또 다른 바람직한 구체예에서는 그룹 A 스트렙토코커스의 협막 다당류가 포함되며, 바람직하게는 추가로 1종 이상의 M 단백질, 보다 바람직하게는 복수 종류의 M 단백질을 함유하는 것이 좋다.
- [0047] 본 발명의 면역원성 조성물은 단백질 항원으로 조제될 수 있다. 바람직한 폐렴구균 단백질 항원은 폐렴구균의 외막 표면에 노출된 폐렴구균 단백질(폐렴구균의 생활사 중 적어도 일부 기간 동안에 숙주의 면역계에 의해서 인식될 수 있다) 또는 폐렴구균에 의해 분비 또는 방출되는 단백질이다. 가장 바람직하게는, 단백질은 독소, 부착소, 2 성분 신호 전달인자(signal transducer) 또는 스트렙토코커스 뉴모니아의 지단백질 또는 이의

단편이다. 특히 바람직한 단백질에는 다음과 같은 것이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다: 뉴모라이신(바람직하게는 화학적 처리 또는 돌연변이에 의해 획득된 것)[Mitchell et al. Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18 (13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from Streptococcus pneumoniae types 1 and 2.", Mitchell et al. Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007 (1) : 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in Escherichia coli : rapid purification and biological properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton et al), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA 및 이의 막횡단 결실 변이체(US 5804193 - Briles et al.); PspC 및 이의 막횡단 결실 변이체(WO 97/09994 - Briles et al); PsaA 및 이의 막횡단 결실 변이체 (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64(12): 5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae"); 폐렴구균 콜린 결합 단백질 및 이의 막횡단 결실 변이체; CbpA 및 이의 막횡단 결실 변이체(WO 97/41151; WO 99/51266); 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소(Infect. Immun. 1996 64: 3544); HSP70(WO 96/40928); PcpA(Sanchez-Beato et al. FEMS Microbiol Lett 1998, 164 : 207-14); M 유사 단백질(EP 0837130) 및 부착소 18627(EP 0834568). 또 다른 바람직한 폐렴구균 단백질 항원에는 WO 98/18931에 개시된 항원, 특히 WO 98/18930 및 PCT/US99/30390 중에서 선택되는 항원이 포함된다.

[0048] 본 발명의 면역원성 조성물로 조제되기에 바람직한 나이세리아 단백질에는 TbpA(W093/06861; EP586266; W092/03467; US5912336), TbpB(W093/06861; EP586266), Hsf(W099/31132), NspA(W096/29412), Hap (PCT/EP99/02766), PorA, PorB, OMP85(D15로도 알려져 있음)(W000/23595), PilQ(PCT/EP99/03603), PldA(PCT/EP99/06718), FrpB(W096/31618, 서열 38 참조), FrpA 또는 FrpC 또는 이 둘에 공통적인 적어도 30개, 50개, 100개, 500개, 750개 아미노산의 보존 부분(W092/01460), LbpA 및/또는 LbpB(PCT/EP98/05117; Schryvers et al Med. Microbiol. 1999 32: 1117), FhaB(W098/02547), HasR(PCT/EP99/05989), lipo02(PCT/EP99/08315), MitA (W099/57280) 및 ctrA(PCT/EP00/00135)가 포함된다. 나이세리아 단백질은 정제된 단백질로서 또는 외막 소포체 제조물의 일부로서 첨가될 수 있다.

[0049] 본 발명의 면역원성 조성물은 디프테리아, 파상풍 및 보르데텔라 퍼투시스 감염 중 1종 이상의 감염에 대한 예방을 제공하는 항원으로 조제되는 것이 바람직하다. 백일해(퍼투시스) 성분은 사멸된 전세포 B.퍼투시스(Pw)이거나, 또는 바람직하게는 PT, FHA 및 69kDa 퍼탁틴 유래의 적어도 하나의 항원(바람직하게는 2개 또는 3개 모두)을 함유하는 무세포 퍼투시스(Pa)이다. 또한, 다른 임의의 무세포 백신에는 Fim2 및 Fim3과 같은 어글루티노젠도 포함되며, 이러한 백신 역시 본 발명에 사용될 수 있다. 일반적으로, 디프테리아 및 파상풍에 대한 예방 역할을 하는 항원은 디프테리아 유독소 및 파상풍 유독소이다. 이러한 유독소들은 예컨대 포르말알데하이드 처리 후와 같이 화학적으로 불활성화된 독소이거나 또는 하나 이상의 점 돌연변이 도입으로 불활성화된 독소이다.

[0050] 또는, 본 발명의 면역원성 조성물은 한 용기에 건조 고체, 포말화된 유리질 또는 고점성 액체를 보유하고 다른 용기에 액체 DTPa 또는 DTPw를 함유하는 키트로서 제공될 수 있다. 이러한 키트에는 예컨대 동일 주사기 내의 다른 챔버에 함유된 건조 성분 및 액체 성분을 보유하는 2중 챔버 주사기가 포함될 수 있다. 건조 성분은 단일 백신으로 주사하기 직전에 액체 백신에 의해 재구성된다. 따라서, 예컨대 본 발명의 건조 고체, 포말화된 유리질 또는 고점성 액체는 액체 DTPa 또는 DTPw 백신(바람직하게는 즉석에서)을 이용하여 재구성시킨 후 단일 백신으로서 투여된다. DTPa 또는 DTPw 백신은 인산알루미늄 및/또는 수산화알루미늄과 같은 알루미늄 염으로 최소한 부분적으로 에유번팅되는 것이 일반적이다(예컨대, 글락소스미드클라인 바이올로지컬스 소시에테아노님의 Infanrix® 및 Tritanrix® 백신).

[0051] 면역원성 조성물은 경우에 따라 형별불능 헤모필러스 인플루엔자, RSV에 대해 숙주를 예방할 수 있는 1종 이상의 항원 및/또는 인플루엔자 바이러스에 대해 숙주를 예방할 수 있는 1종 이상의 항원으로 조제된다. 바람직한 형별불능 H.인플루엔자 단백질 항원에는 펄브린 단백질(US 5766608) 및 이 단백질 유래의 펄타이드를 함유하는 융합체(예, LB1 융합체)(US5843464-오하이오 스테이트 리서치 파운데이션), OMP26, P6, 단백질 D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap, 및 D15가 포함된다.

[0052] 바람직한 인플루엔자 바이러스 항원에는 계란 또는 MDCK 세포, 또는 배로 세포에서 증식된 전 바이러스, 생바이러스 또는 불활성화된 바이러스, 부분 인플루엔자 바이러스, 또는 전 인플루엔자 바이로솜(virosome)(R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920에 기술된 바와 같은 것) 또는 이의 정제 단백질 또는 재조합 단백질, 예컨대 HA, NP, NA 또는 M 단백질 또는 이의 혼합물이 포함된다.

[0053] 바람직한 RSV(호흡기 합포체 바이러스) 항원에는 F 당단백질, G 당단백질, HN 단백질 및 M 단백질 또는 이의 유도체가 포함된다.

- [0054] DTP-Hib를 함유하는 조합 백신은 당해기술분야에 공지되어 있다. 하지만, 다른 항원과 Hib의 단순 혼합을 수반하는 임의의 배합 시에는 관련된 문제점이 있다. 조심스럽게 배합하지 않으면, Hib 성분에 대해 유발된 항체 역가는 백신의 다른 성분의 방해로 인해, 별도로 접종된 Hib의 동일 용량에 의해 유발되는 역가보다도 감소될 수 있다. 이러한 문제점은 당해기술분야에 공지되어 있고 다양한 방식의 해결방안이 제시되어 있지만, 건조 고체 또는 고점성 액체로서 Hib와 IPV를 함께 배합한 본 발명의 면역원성 조성물은 본 문제점에 대한 또 다른 해결방안을 제시한다.
- [0055] 본 발명의 면역원성 조성물은 IPV와 Hib가 키트의 일 성분으로 존재하고, 전술한 바와 같은 추가 성분이 제2 성분으로서 존재하는 백신 키트의 일부분을 형성할 수 있다. 그 예에는 본 명세서에 설명된 바와 같은 2중 챔버 주사기가 있다. 이러한 2가지 성분은 백신 투여 직전에 함께 혼합된다. 이러한 제형에서, IPV와 Hib를 함유하는 성분은 경우에 따라 액체로 제조될 수는 있으나, 건조 고체, 포말화된 유리질 또는 고점성 액체인 것이 바람직하다. 이러한 제형은 헤모필러스 인플루엔자 b 병원균에 대한 예방작용을 제공하기에 임상적으로 허용되는 Hib 성분에 대해 항체 역가를 산출한다. 일반적으로, 이러한 조합 백신에서의 항체 역가는 일가 Hib 백신에서의 Hib의 동일 용량에 의해 유발되는 역가의 적어도 85%, 90%, 바람직하게는 약 100% 또는 그 이상이다.
- [0056] 본 발명의 백신
- [0057] 전술한 본 발명의 면역원성 조성물은 백신으로 제조되는 것이 바람직하다. 이러한 백신은 면역원에 대한 면역반응을 향상시키기에 충분한 양의 애주번트를 함유하는 것이 바람직하다. 적당한 애주번트에는 수산화알루미늄 및 인산알루미늄과 같은 알루미늄 염, 스쿠알렌 혼합물(SAF-1), 무라밀 펩타이드, 사포닌 유도체, 마이코박테리아 세포벽 제조물, 모노포스포릴 지질 A, 마이콜산 유도체, 비이온 블록 공중합체 계면활성제, Quil A, 콜레라 독소 B 서브유닛, 폴포스파젠 및 유도체, 문헌(Takahashi et al. (1990) Nature 344: 873-875)에 기술된 바와 같은 면역자극성 복합체(ISCOMs) 등이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 수의용 및 동물에서의 항체 생산용인 경우에는 프로인드 애주번트의 분열촉진성 성분이 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 백신 제형은 사용전에 재구성되는 것이 바람직하다. 재구성은 백신의 액체 성분과 본 발명의 건조 고체, 포말화된 유리질 또는 고점성 액체 제형과의 혼합을 수반한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신을 함유하고 내면이 발수성인 용기도 제공한다. 이러한 용기의 사용은 건조 조성물이 재구성되기에 보다 용이한 형태의 튜브의 바닥에 안착되기 때문에 유리하다.
- [0059] 또한, 본 발명의 건조 조성물을 보다 용이하게 육안관찰하기 위해서는 저장 시료에 유색 염료를 첨가하는 것이 유리하다. 이러한 방법은 건조 고체 또는 고점성 액체가 사용 전에 충분히 재구성되도록 하기 위해 재구성하는 동안에 특히 중요하다. 유색 염료는 중성 pH에서 자신의 색을 유지하고 환자에게 주사하기에 적당한 것이 바람직하다. 유색 염료는 페놀 레드인 것이 가장 바람직하다.
- [0060] 모든 면역원성 조성물 또는 백신과 마찬가지로, 면역원의 면역학적 유효량은 실험적으로 측정될 수 있다. 고려해야 하는 요인에는 면역원이 애주번트 또는 담체 단백질 또는 다른 담체와 착물을 형성하고 있는지 또는 공유 결합되어 있는지의 여부를 불문하고 면역원성, 투여 경로 및 투여되는 면역화 투약량의 횟수가 포함된다. 이러한 요인은 백신 기술분야에 공지되어 있고, 면역학자라면 상기 요인의 결정은 과도한 실험 없이도 용이하게 수행할 수 있는 것이다.
- [0061] 본 발명의 면역원성 조성물에 함유되는 물질은 다양한 농도로 존재할 수 있다. 일반적으로 물질의 최소 농도는 목적 용도 달성에 필요한 양이며, 최대 농도는 초기 혼합물 내에 균일하게 분산되거나 용액 상태로 유지될 수 있는 최대량이다. 예를 들어, 치료제의 최소량은 단독 치료적 유효량을 제공하는 양인 것이 바람직하다. 또한, 결정화 전에 포말화된 유리질이 형성되는 경우에는 과포화 용액을 사용할 수도 있다. 생체활성 물질인 경우에, 최소 농도는 재구성시 생체활성에 필요한 양이고, 최대 농도는 균일한 현탁액이 유지될 수 없는 시점의 양이다. 단독 투여 단위인 경우에, 그 함량은 단독 치료 사용시의 양이다. 일반적으로, 각 용량은 단백질 항원 1 내지 100 μ g, 바람직하게는 5 내지 50 μ g, 가장 바람직하게는 5 내지 25 μ g을 함유할 것으로 예상된다. 박테리아 다당류의 바람직한 용량은 10 내지 20 μ g, 10 내지 5 μ g, 5 내지 2.5 μ g 또는 2.5 내지 1 μ g 범위이다. 물질의 바람직한 양은 물질 마다 다양하지만 당업자라면 용이하게 결정할 수 있을 것이다.
- [0062] 본 발명의 방법
- [0063] 본 발명의 방법은 IPV와 안정화제를 함유하는 조성물을 보존하여 IPV의 항원성이 유지되는 조성물을 제공하는 방법이다. 박테리아 다당류는 건조될 시료에 함유되어 있는 것이 바람직하다.

- [0064] 일 구체예에서, 본 발명의 방법은 IPV 건조 단계를 수반하며 다음과 같은 단계로 구성된다:
- [0065] · 안정화제 용액에 IPV를 현탁 또는 용해시켜 보존 시료를 제조하는 단계; 박테리아 다당류 및/또는 유리질 형성 폴리올은 이 보존 시료에 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0066] · 이러한 보존 시료를 이 시료로부터 용매가 상실되는 온도 및 압력 조건으로 처리하는 단계; 및
- [0067] · 보존 시료가 건조되어 IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 보유되는 고체 또는 고점성 액체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 단계.
- [0068] 바람직한 구체예에서, 보존 시료는 건조 전에 내면이 발수성인 용기에 삽입하는 것이 좋다.
- [0069] 본 발명의 또 다른 방법은 포말 건조를 수반하며, 다음과 같은 단계로 구성된다:
- [0070] · 안정화제 용액에 IPV를 현탁 또는 용해시켜 보존 시료를 제조하는 단계; 박테리아 다당류 및/또는 유리질 형성 폴리올은 이 보존 시료에 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0071] · 이러한 보존 시료를 이 시료가 포말을 형성하는 온도 및 압력 조건으로 처리하는 단계; 및
- [0072] · 포말이 건조되어 IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 보유되는 고체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 단계.
- [0073] 본 발명의 바람직한 포말 건조법은 내면이 발수성인 용기를 사용하고 다음과 같은 단계를 함유하는 것이다:
- [0074] · 안정화제 용액에 IPV 및 바람직하게는 박테리아 다당류를 현탁 또는 용해시켜 보존 시료를 제조하는 단계;
- [0075] · 이러한 보존 시료를 내면이 발수성인 용기에 삽입하는 단계;
- [0076] · 이러한 보존 시료를 함유하는 용기를 이 보존 시료가 포말을 형성하는 온도 및 압력 조건으로 처리하는 단계; 및
- [0077] · 포말이 건조되어 IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 보유되는 고체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 단계.
- [0078] 전술한 본 발명의 포말 건조법은 경우에 따라 동결 단계를 포함할 수도 있다. 여기서, 보존 시료는 완전 또는 부분 동결될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일부 방법은 다음과 같은 단계를 포함하는 것이다:
- [0079] · 안정화제 용액에 IPV 및 바람직하게는 박테리아 다당류를 현탁 또는 용해시키고 이 혼합물을 동결시켜 적어도 부분적으로 동결된 보존 시료를 제조하는 단계;
- [0080] · 이러한 적어도 부분적으로 동결된 보존 시료를 이 보존 시료가 포말을 형성하는 온도 및 압력 조건으로 처리하는 단계; 및
- [0081] · 포말이 건조되어 IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 보유되는 고체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 단계.
- [0082] 상기 방법의 동결 단계는 압력의 감소로 증발 동결이 이루어지는 켄치 동결법으로 수행되는 것이 바람직하다. 이러한 방법은 항원 손실이 보다 적은 시료의 급속 동결을 유도한다. 따라서, 본 발명의 방법은 다음과 같은 단계를 포함하는 것이다:
- [0083] · 안정화제 용액에 IPV 및 바람직하게는 박테리아 다당류를 현탁 또는 용해시켜 보존 시료를 제조하는 단계;
- [0084] · 이러한 보존 시료가 적어도 부분적으로 동결되도록 보존 시료를 감압 처리하는 단계;
- [0085] · 적어도 부분적으로 동결된 보존 시료를, 이 보존 시료가 포말을 형성하는 온도 및 압력 조건으로 처리하는 단계; 및
- [0086] · 포말이 건조되어 IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 보유되는 고체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 단계.
- [0087] IPV 보존에 사용될 수 있는 본 발명의 또 다른 바람직한 방법은 다음과 같은 단계를 포함하는 것이다:
- [0088] · 안정화제 용액에 IPV를 현탁 또는 용해시켜 보존 시료를 제조하는 단계;
- [0089] · 이러한 보존 시료를 이 보존 시료가 포말을 형성하는 기포주입 없이, 바람직하게는 동결 없이 증발에 의해 용매를 상실하는 온도 및 압력 조건으로 처리하는 단계; 및
- [0090] · 시료가 건조되어 IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 보유되는 고점성 액체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 단계.

- [0091] 본 발명의 방법은 장기간 보관에 견딜 수 있고, 그 동안 IPV의 항원성 및/또는 면역원성이 보유되는 IPV 제형을 생산한다. IPV는 4℃에서 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 24개월 동안 본래의 항원성 및/또는 면역원성을 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 바람직하게는 80%, 90%, 95% 보유하는 것이 바람직하다. 항원성과 면역원성은 전술한 바와 같은 적당한 방법을 사용하여 적당한 수용액에서 IPV를 재구성시킨 후 측정한다.
- [0092] 동결 또는 포말 형성없이 건조하는 방법은 건조되어야 하는 활성제가 동결이나 포말형성과 관련된 기포주입에 노출됨으로 인해 건조 과정 동안 활성 및/또는 항원성을 상실하기 쉬운 경우에 사용하기에 특히 적합하다. 또한, 유리질 형성 폴리올의 보다 낮은 농도가 유리하고(하거나) 건조 공정의 기간이 짧을수록 바람직한 경우에 사용하기에 특히 적합하다.
- [0093] 안정화제
- [0094] 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 안정화제에는 유리질 형성 폴리올이 포함되는 것이 바람직하다. 적당한 물질에는 모든 폴리올, 예컨대 탄수화물 및 비탄수화물 폴리올이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 안정화 폴리올은 활성제가 변성, 응집 또는 다른 방식에 의해 실질적인 활성 상실없이 보관될 수 있게 해주는 것이 바람직하다. 특히 적당한 물질에는 당, 당 알코올 및 탄수화물 유도체가 포함된다. 유리질 형성 폴리올은 탄수화물 또는 이의 유도체인 것이 바람직한데, 그 예에는 글루코스, 말토로스, 이소-말토로스, 락툴로스, 수크로스, 말토스, 락토스, 이소-말토스, 말티톨, 락티톨, 팔라티니트, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스 또는 텍스트란, 가장 바람직하게는 트레할로스, 수크로스, 소르비톨, 라피노스, 만니톨, 락토스, 락티톨 또는 팔라티니트가 있다.
- [0095] 박테리아 다당류는 안정화제로서 작용하며, 본 발명의 바람직한 구체에는 박테리아 다당류를 안정화제의 일 성분으로 함유한다. 박테리아 다당류는 본 구체에서 안정화제 및 면역원의 이중 역할을 한다.
- [0096] 탄수화물에는 단당류, 이당류, 삼당류, 올리고당류 및 이의 대응하는 당 알코올, 폴리하이드록실 화합물, 예컨대 탄수화물 유도체 및 화학적 변형된 탄수화물, 하이드록시에틸 전분 및 당 공중합체가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 천연 및 합성 탄수화물 모두 사용하기에 적합하다. 합성 탄수화물에는 글루코시드 결합이 티올 또는 탄소 결합으로 치환된 것이 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 탄수화물의 D형 및 L형이 모두 사용될 수 있다. 탄수화물은 비환원성이거나 환원성일 수 있다. 환원성 탄수화물이 사용되는 경우에는 메일라드(Maillard) 반응의 억제제를 첨가하는 것이 바람직하다.
- [0097] 본 발명에 사용하기에 적합한 환원성 탄수화물은 당해기술분야에 공지되어 있는데, 그 예에는 글루코스, 말토스, 락토스, 프럭토스, 갈라토스, 만노스, 말토로스 및 락툴로스가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 비환원성 탄수화물에는 당 알코올 및 기타 다른 직쇄형 폴리알코올 중에서 선택되는 폴리하이드록실 화합물의 비환원성 글리코시드가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 다른 유용한 탄수화물에는 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 수크로스, 셀리비오스, 만노비오스 및 당 알코올이 포함된다. 당 알코올 글리코시드는 모노글리코시드, 특히 락토스, 말토스, 락툴로스 및 말토로스와 같은 이당류의 환원에 의해 수득되는 화합물인 것이 바람직하다.
- [0098] 특히 바람직한 탄수화물에는 트레할로스, 수크로스, 소르비톨, 말티톨, 락티톨, 팔라티니트 및 글루코피라노실-1→6-만니톨이 있다.
- [0099] 아미노산은 안정화제로서 작용할 수 있고 단독으로 사용될 수 있지만 폴리올과 함께 사용되는 것이 바람직하다. 임의의 아미노산, 또는 아미노산 혼합물, 펩타이드, 가수분해된 단백질 또는 혈청 알부민과 같은 단백질이 안정화제로서 작용할 수도 있으나, 바람직한 아미노산에는 글리신, 알라닌, 아르기닌, 리신 및 글루타민이 포함된다.
- [0100] 보존 시료는 본 발명의 건조 고체 또는 고점성 액체에서 결정 형성을 억제할 수 있는 성분을 함유하는 것이 바람직하다. 아미노산 및 페놀 레드를 비롯한 염 및 기타 다른 분자도 결정 형성을 억제한다.
- [0101] 본 발명의 방법에 사용되는 안정화제의 농도는 1 내지 50w/v%, 바람직하게는 1 내지 5w/v%, 5 내지 10w/v%, 15 내지 20w/v%, 20 내지 25w/v% 또는 25 내지 50w/v%, 가장 바람직하게는 25w/v% 미만일 수 있다. 필요한 안정화제의 양은 존재하는 염의 양에 비례한다. 따라서, 안정화제의 양이 3 내지 10w/v%가 바람직하지만, 염 함량이 높은 건조 시료에는 10 내지 25w/v%의 고농도가 필요로 될 수 있다.
- [0102] 용기
- [0103] 여러 혼합물과 다양한 용기 형태 및 크기가 동시에 제조될 수 있다. 이상적으로는, 사용되는 용기 크기는 초기

혼합물을 함유하고 이로부터 형성되는 건조 제형의 부피를 수용하기에 충분한 것이다. 일반적으로, 이러한 크기는 유리질 형성 물질의 질량, 용기의 표면적 및 포말의 형성 여부를 결정하는 온도 및 압력 조건에 따라 결정된다. 유리질 형성 물질의 질량은 경우에 따라 포말화되기도 하는 점성 시럽을 제공하기에 충분한 양으로서, 실제 용기 표면의 단위 면적당 최소 질량으로서 해석된다. 이러한 비율은 혼합물 및 사용되는 용기마다 다를 수 있으나, 당업자라면 본 명세서에 기술된 방법에 따라 실험적으로 용이하게 측정할 수 있을 것이다. 이러한 용기에는 휘튼 성형 유리병 및 튜브 절단형 유리병을 비롯하여 모든 용기가 사용될 수 있다.

[0104] 본 발명의 방법에는 내면이 발수성인 용기가 사용되는 것이 바람직하다. 이러한 성질은 내면에 소수성 조성물을 코팅하여, 예컨대 실리콘처리하여 획득할 수 있다. 실리콘처리는 당해기술분야에 공지된 방법으로 수행한다. 한 가지 방법으로서, 용기의 내면을 실리콘 에멀전으로 세정한 뒤, 고온, 일반적으로 350℃의 오븐을 통해 처리함으로써 용기를 실리콘처리하는 방법이 있다. 또는, 발수성 조성물로 용기를 제조하여 발수성 내면을 획득할 수도 있다.

[0105] 내면이 발수성인 용기는 포말 형성이 유발될 가능성 및 재현성을 보다 증가시켜 준다. 이러한 성질로 인해, 보존 시료에 사용될 수 있는 폴리올의 농도를 낮출 수 있고, 결과적으로 시료 건조에 필요한 시간을 줄이고, 메일라드 반응의 효과 또는 폴리올과 활성제 사이의 다른 유해한 상호작용의 영향을 감소시킬 수 있다. 보존 시료가 백신을 함유하는 경우에, 결과적으로 획득되는 포말화된 유리질은 존재하는 폴리올의 양이 보다 적고 결과적으로 획득되는 백신 용액의 점성이 낮기 때문에 신속하고 용이하게 재구성되며, 투여도 보다 용이하다. 발수성 내면은 시료가 용기의 바닥에 보유되도록 하여 보다 용이하게 효과적으로 재구성되도록 하기 때문에 건조 고체 또는 고점성 액체의 재구성을 보다 용이하게 해준다.

[0106] 본 발명에는 단독 형태가 사용될 수는 있지만, 1종 이상의 안정화제, 1종 이상의 첨가제 및 1종 이상의 물질이 사용될 수도 있다. 이러한 성분들의 효과적인 양은 당업자라면 용이하게 결정할 수 있다.

[0107] 용매

[0108] 보존 시료는 IPV 및 안정화제를 물에 용해/현탁시켜 수용액으로 제조함으로써 획득된다. 물은 보존 시료에 5 내지 98부피%, 보다 바람직하게는 80 내지 98부피%, 가장 바람직하게는 85 내지 98부피%의 함량으로 존재하는 것이 바람직하다.

[0109] 용매의 부피는 다양할 수 있으며, 안정화제 및 첨가되는 물질 뿐만 아니라 임의의 첨가에 따라 달라질 수 있다. 필요한 최소 부피는 다양한 성분을 용해시키는데 필요한 양이다. 하지만, 물질(들)의 균일 분산 현탁액이 사용될 수도 있다. 특정 구제예에서 적당한 성분의 양은 본 명세서에 제시된 실시예에 비추어 당업자라면 용이하게 결정할 수 있다.

[0110] 다양한 첨가제가 보존 시료에 첨가될 수 있다. 일반적으로 첨가제는 포말 형성 및/또는 건조 공정을 향상시키고(거나) 물질의 용해성에 영향을 미친다. 또는, 첨가제는 고체에 함유된 물질의 안정성에 영향을 미친다. 첨가제는 1종 이상이 제공될 수 있다.

[0111] 일 예로서, 휘발성/발포성 염의 첨가는 초기 부피를 증가시켜 포말화된 유리질 내부의 표면적으로 확대시키며, 이에 따라 우수한 포말 형성 및 보다 신속한 건조에 유리한 영향을 미친다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 휘발성 염은 포말화된 유리질 생산에 사용되는 조건하에서 휘발하는 염이다. 적당한 휘발성 염의 예에는 아세트산암모늄, 중탄산암모늄 및 탄산암모늄이 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 기체 산물을 제공하기 위해 분해되는 염은 또한 향상된 포말 형성 및 보다 신속한 건조에 영향을 미친다. 이러한 염의 예에는 중탄산나트륨 및 메타중아황산나트륨이 있다. 휘발성 염은 약 0.01 내지 5M의 양으로 존재하는 것이 바람직하다. 최고 5M의 농도가 본 발명에서 사용하기에 적당하다. 결과적으로 획득되는 포말화된 유리질은 균일한 포말 형태를 갖고 있고, 휘발성/발포성 염이 사용되지 않은 포말화된 유리질과 비교했을 때 상당히 더 건조되어 있다.

[0112] 또 다른 적당한 첨가제는 휘발성 또는 분해 염과 함께 사용될 수 있는 포말 안정화제이다. 이 안정화제는 점증제(예컨대, 구아검 및 이의 유도체)와 같이 포말 시럽의 점성을 증가시키는 제형이거나 또는 양쪽성 분자와 같은 표면활성 성분(즉, 예컨대 인지질 및 계면활성제)일 수 있다.

[0113] 또 다른 첨가제는 메일라드 반응의 억제제이다. 물질 및/또는 유리질 기질 형성 물질이 카르보닐 및 아미노, 아미노 또는 구아니디노 기를 함유한다면, 본 발명의 조성물은 추가로 조성물내의 아미노기 및 반응성 카르보닐기의 축합을 실질적으로 방지하기에 효과적인 양의 메일라드 반응의 1종 이상의 생리학적 허용성 억제제를 함유하는 것이 바람직하다. 메일라드 반응의 억제제는 당해기술분야에 공지된 임의의 성분일 수 있다. 억제제는 아미노기 및 반응성 카르보닐기의 축합을 방지하거나 또는 실질적으로 방지하기에 충분한 양으로 첨가한다. 일반적

으로, 아미노기는 물질에 존재하고 카르보닐기는 유리질 기질 형성 물질에 존재하거나 그 반대일 수도 있다. 하지만, 아미노산과 카르보닐기는 물질이나 탄수화물 중 어느 하나에 분자내 존재할 수도 있다.

[0114] 메일라드 반응에 억제 효과를 나타내고 이에 따라 본 명세서에 기술된 조성물에 사용될 수 있는 화합물에는 다양한 종류가 공지되어 있다. 이러한 화합물은 일반적으로 메일라드 반응의 경쟁적 또는 비경쟁적 억제제이다. 경쟁적 억제제에는 아미노산 잔기(D형 및 L형), 아미노산 잔기의 혼합물 및 펩타이드가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 특히 바람직한 것은, 리신, 아르기닌, 히스티딘 및 트립토판이다. 리신 및 아르기닌이 가장 효과적이다. 비경쟁적 억제제에는 다수의 종류가 공지되어 있다. 그 예에는 아미노구아니딘 및 이의 유도체와 암포테리신 B가 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. EP-A-0433679는 또한 4-하이드록시-5,8-디옥소퀴놀린 유도체를 함유하는 적당한 메일라드 억제제를 기술하고 있다.

[0115] 활성제

[0116] 본 발명의 방법은 불활성화된 폴리오 바이러스(IPV - 바람직하게는 백신 기술분야에 표준인 타입 1, 2 및 3을 함유하는 것, 가장 바람직하게는 솔크 폴리오 백신)의 보존에 사용된다. IPV는 타입 1(Mahoney)의 20 내지 80, 바람직하게는 40 또는 80 D-항원 단위, 타입 2(MEF-1)의 4 내지 20, 바람직하게는 8 또는 16 D-항원 단위, 타입 3(Saukett)의 20 내지 64, 바람직하게는 32 또는 64 D-항원 단위를 포함한다. IPV 백신 제형은 바람직하게는 추가의 백신 성분을 함유하는 수용액에서 재구성시킨 후 주사하기에 적합하다.

[0117] 본 발명의 방법에 의해 포함되는 박테리아 다당류에는 나이세리아 메닝기티디스, 헤모필러스 인플루엔자 b, 스트렙토코커스 뉴모니에, 그룹 A 스트렙토코커스, 그룹 B 스트렙토코커스, 스타필로코커스 아우레우스 또는 스타필로코커스 에피더미디스 중 1종 이상의 박테리아로부터 유래되는 협막 다당류가 포함되며, 바람직한 것은 헤모필러스 인플루엔자의 PRP 협막 다당류이다. 바람직한 협막 다당류에는 또한 나이세리아 메닝기티디스의 혈청군 A, C, W-135 및 Y 중에서 1종 이상으로부터 유래되는 협막 다당류가 포함된다. 또 다른 바람직한 협막 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니에에서 유래되는 협막 다당류이다. 폐렴구균 협막 다당류 항원은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F 중에서 선택되는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F 중에서 선택되는 것이다. 또 다른 바람직한 구체예에는 스타필로코커스 아우레우스 타입 5, 타입 8 또는 336의 협막 다당류가 함유된다. 또 다른 바람직한 구체예에는 스타필로코커스 에피더미디스 타입 I, 타입 II 또는 타입 III의 협막 다당류, 그룹 B 스트렙토코커스의 타입 Ia, 타입 Ic, 타입 II 또는 타입 III 협막 다당류가 포함된다. 또 다른 바람직한 다당류에는 그룹 A 스트렙토코커스의 협막 다당류가 포함되며, 바람직하게는 추가로 1종 이상의 M 단백질, 보다 바람직하게는 복수 종류의 M 단백질을 함유하는 것이 좋다.

[0118] 본 발명의 방법을 사용하여 보존시킬 활성제의 바람직한 배합물에는 IPV가 함유된다. IPV는 Hib PRP 다당류 및/또는 수막구균 A, C, W 및/또는 Y 다당류 및/또는 폐렴구균 다당류 중 1종 이상을 함유하는 박테리아 다당류와 배합되는 것이 바람직하다. 가장 바람직한 배합물에는, IPV 및 Hib; IPV 및 MenC; IPV 및 MenA 및 C; IPV 및 Hib 및 Men C 또는 IPV, Hib, Men A 및 C가 포함된다. 각 박테리아 다당류는 1 내지 5 μ g, 5 내지 10 μ g, 10 내지 20 μ g 또는 20 내지 40 μ g의 용량으로 존재할 수 있다.

[0119] 박테리아 다당류는 파상풍 유독소, 파상풍 유독소 단편 C, 디프테리아 유독소, CRM197, 뉴모라이신 또는 단백질 D(US6342224)와 같은 담체 단백질이 접합되거나 접합되지 않은 것이다.

[0120] 다당류 접합체는 임의의 공지된 커플링 기법으로 제조한다. 바람직한 접합 방법은 시아네이트 에스테르를 형성 시키기 위한, 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)를 이용한 다당류의 활성화를 필요로 한다. 활성화된 다당류는 결과적으로 담체 단백질 상의 아미노기에 직접 커플링되거나 또는 스페이서기를 통해 커플링될 수 있다. 시아네이트 에스테르는 핵산 디아민과 커플링되고, 아미노 유도체화된 다당류는 티오에스테르 결합의 형성을 수반하는 헤테로결합 화학을 이용하여 담체 단백질에 접합되는 것이 바람직하다. 이러한 접합체는 PCT 공개 출원번호 WO 93/15760(Uniformed Services University)에 기술되어 있다.

[0121] 이러한 접합체는 경우에 따라 US 4365170(Jennings) 및 US 4673574(Anderson)에 기술된 바와 같은 직접 환원적 아민화법을 이용하여 제조할 수도 있다. 다른 방법은 EP-0-161-188, EP-208375 및 EP-0-477508에 기술되어 있다.

[0122] 또 다른 방법에는 아디프산 하이드라자이드(ADH)에 의해 유도체화된 시아노겐 브로마이드 활성화된 다당류를 카르보디이미드 축합을 통해 단백질 담체에 커플링시키는 방법이 있다(Chu C. et al. Infect.Immunity, 1983 245-256).

- [0123] 건조 방법
- [0124] 일 구체예에서, 본 발명은 방법은 IPV를 안정화제의 존재하에, 바람직하게는 박테리아 다당류의 존재하에 건조시키는 단계를 수반한다. 이러한 방법에서, 보존 시료는 저하된 온도 및 압력 조건으로 처리된다. 온도는 20℃ 미만 또는 0℃ 미만, 바람직하게는 -10℃ 또는 -20℃ 미만, 보다 바람직하게는 -40℃ 또는 -60℃로 저하시킨다. 압력은 1mbar 미만, 바람직하게는 0.5, 0.1 이하, 보다 바람직하게는 0.05 또는 0.01mbar의 압력으로 감소시킨다. 저하된 온도와 압력 조건은 적어도 10시간, 12시간, 16시간, 20시간, 바람직하게는 24시간, 36시간, 보다 바람직하게는 48시간 또는 72시간 동안 유지시킨다. 용매는 보존 시료가 건조되어 고체를 형성할 때까지 제거한다.
- [0125] 본 명세서를 통해 사용된 고체라는 용어에는 시료가 건조될 때 형성되는 유리질, 고무 및 결정이 포함된다. 이러한 고체는 수분 함량이 10 내지 20% 또는 5 내지 10%, 바람직하게는 5 내지 6%, 4 내지 5%, 또는 3 내지 4%, 또는 2 내지 3%, 보다 바람직하게는 1 내지 2% 또는 0 내지 1%(w/w)인 것이 바람직하다.
- [0126] 포말 건조
- [0127] 본 발명의 바람직한 방법에는 보존 시료를 이러한 시료가 기포를 형성하기 시작하여 포말을 형성하는 압력 및 온도 조건으로 처리하는 단계를 수반한다.
- [0128] 보존 시료 내부의 온도는 증발 공정의 흡열 성질로 인해 시료 외측의 온도와 다를 수 있다. 온도는 보존 시료의 외측 조건을 참고로 하며, 예를 들어 대형 산업용 동결건조기가 사용되는 경우에는 선반의 온도를 참고로 한다. 이는 일반적으로 동결건조기 온도 설정에도 해당된다.
- [0129] 본 발명의 바람직한 구체예에서는 온도 조건을 유지하면서 압력을 감소시킴으로써 포말형성을 달성한다. 압력은 8, 7, 6, 바람직하게는 5, 4, 3, 보다 바람직하게는 2, 1.5, 1, 가장 바람직하게는 0.8 또는 0.5mbar 이하로 조정하는 한편, 온도는 0℃ 이상, 바람직하게는 10 내지 15℃; 15 내지 20℃; 20 내지 25℃; 25 내지 30℃; 또는 30 내지 37℃ 사이의 온도로 설정하여 유지시키는 것이 좋다. 이러한 조건은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 16 또는 24시간 동안 유지시킨다.
- [0130] 본 발명의 다른 구체예에서는 감소된 압력 조건을 유지시키면서 온도를 변화시켜 포말 형성을 달성하기도 한다. 온도 설정은 20℃ 이상, 바람직하게는 20 내지 30℃; 30 내지 40℃; 40 내지 50℃; 또는 50 내지 70℃ 사이로 증가시키거나; 또는 온도 설정은 10 내지 50℃, 바람직하게는 20 내지 40℃, 보다 바람직하게는 25 내지 35℃ 사이로 유지시킨다. 압력 조건은 8, 7, 6, 바람직하게는 5, 4, 3, 보다 바람직하게는 2, 1.5, 1, 가장 바람직하게는 0.8 또는 0.5mbar 이하의 감소된 수준으로 유지시킨다. 이러한 조건은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 16 또는 24시간 동안 유지시킨다.
- [0131] 포말 유리질을 형성하기 위한 용매 제거
- [0132] 본 발명의 포말 건조 방법의 후속 단계로는 포말이 건조되어 고체가 형성될 때까지 용매를 제거하는 단계가 수반된다. 본 발명의 일 구체예에서, 포말 건조는 포말 형성을 위해 적용된 압력 및 온도 조건을 유지시켜 달성하기도 한다. 예를 들어, 압력은 8, 7, 6, 바람직하게는 5, 4, 3, 보다 바람직하게는 2, 1.5, 1, 가장 바람직하게는 0.8 또는 0.5mbar 이하로 유지시키면서, 온도는 0℃ 이상, 바람직하게는 2 내지 10℃, 10 내지 20℃; 20 내지 30℃; 30 내지 35℃; 35 내지 40℃, 가장 바람직하게는 5 내지 25℃ 사이의 온도로 설정하여 유지시키는 것이 좋다. 이러한 온도 및 압력 조건은 용매 함량이 10, 8, 5, 4, 바람직하게는 3, 2 또는 가장 바람직하게는 1%(w/w) 이하인 고체를 수득하기 위하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18시간 이상 동안 유지시킨다.
- [0133] 본 발명의 다른 구체예에서는 용매 제거 동안의 온도 설정을 본 공정 이전에 유지된 온도 보다 높은 온도 설정으로 증가시킬 수도 있다. 이러한 구체예는 용매를 시료로부터 보다 빠른 속도로 제거할 수 있어서 본 발명의 방법이 보다 단시간에 완료될 수 있기 때문에 유리하다. 예를 들어, 온도 설정은 0℃ 이상, 바람직하게는 2 내지 10℃; 10 내지 20℃; 20 내지 30℃; 30 내지 40℃; 40 내지 50℃; 50 내지 60℃ 사이로 증가시키고, 압력은 8, 7, 6, 바람직하게는 5, 4, 3, 보다 바람직하게는 2, 1.5, 1, 가장 바람직하게는 0.8 또는 0.5mbar 이하의 수준으로 유지시킨다. 이러한 온도 및 압력 조건은 수분 함량이 10, 8, 5, 4, 바람직하게는 3, 2 또는 가장 바람직하게는 1%(w/w) 이하인 고체를 수득하기 위해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 시간 이상 동안 유지시킨다.
- [0134] 본 발명의 또 다른 구체예에서는 용매 제거 동안의 압력 설정을 포말 형성동안 사용된 압력 보다 낮은 압력 설정으로 감소시킬 수도 있다. 이러한 구체예는 용매를 시료로부터 보다 빠른 속도로 제거할 수 있어서 본 발명의

방법이 보다 단시간에 완료될 수 있기 때문에 유리하다. 예를 들어, 압력 설정은 5, 4, 3, 바람직하게는 2, 1, 0.8, 보다 바람직하게는 0.5, 0.1, 가장 바람직하게는 0.05 또는 0.01mbr 이하로 감소시키는 한편, 온도는 0℃ 이상, 바람직하게는 10 내지 20℃; 20 내지 30℃; 30 내지 35℃; 또는 40℃ 이상으로 유지시킨다. 이러한 온도 및 압력 조건은 용매 함량이 5, 4, 바람직하게는 3, 2 또는 보다 바람직하게는 1%(w/w)이하인 고체를 수득하기 위해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 시간 이상 동안 유지시킨다.

- [0135] 동결 단계를 수반하는 포말 건조
- [0136] 본 발명의 방법은 경우에 따라 시료를 동결시키는 단계를 수반하기도 한다. 포말 건조 이전에 시료의 동결은 회분 중의 시료 사이의 재현성을 증가시키는 장점이 있다. 이러한 효과는 모든 시료가 동결되어 있는 동일한 물리적 조건에서부터 공정을 개시하기 때문이다. 보존 시료는 완전 동결되거나 부분 동결될 수 있다.
- [0137] 동결은 경우에 따라 보존 시료를 동결시키기에 적당한 시간 동안 0℃ 이하의 온도에 방치함으로써, 시료를 감압으로 처리하기 전에 수행할 수도 있다. 사용되는 온도는 -10℃, -15℃, -20℃, -30℃, -40℃, -70℃ 또는 -140℃ 이하인 것이 바람직하다. 시료는 동결이 일어나도록 하기 위하여 0℃ 이하의 온도에 1, 2, 3, 4, 5, 8, 16시간 또는 그 이상의 시간 동안 방치될 수 있다.
- [0138] 일부 시료, 특히 세포 제조물 또는 다른 생물학적 시스템과 같이 용매 결정 형성에 의해 쉽게 손상되는 시료는, 시간당 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5℃ 이하의 속도로 시료를 서서히 동결시키는 것이 바람직하다. 다른 조성물은 즉시 동결시킴으로써, 예를 들어 액체 질소 중에서 순간 동결시킴으로써 보다 효과적으로 보존되기도 한다. 이러한 방법은 단백질 또는 바이러스 입자에 특히 유리하다. 증발에 의한 동결 역시 시료의 급속 동결을 초래한다.
- [0139] 대안적으로, 보존 시료는 시료를 감압으로 처리함으로써 동결되어 시료가 완전 동결되거나 부분 동결되기도 한다. 이러한 켄치 동결은 벌크 동결 건조기 장치에서, 0℃, 10℃, 15℃, 20℃, 30℃, 37℃ 이상의 선반 온도에서 수행한다. 선반 온도는 5 내지 35℃인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 10 내지 20℃ 범위이며, 가장 바람직하게는 15℃이다. 압력은 경우에 따라 초기에 5, 10, 20, 30, 60분 이상 동안 200mbar로 감소시켜 탈기시킬 수도 있다. 시료의 동결을 위해, 압력은 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1mbar 이하의 압력으로 추가 감소시킨다. 이러한 압력은 시료가 완전 또는 부분 동결될 때까지 적어도 5, 10, 20 또는 30분 동안 유지시킨다.
- [0140] 포말 형성 및 용매 제거에 의한 고체 형성의 후속 단계는 전술한 바와 같다.
- [0141] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 동결건조기에서 시료를 동결시키고 포말을 형성시키는 단계는 일정한 온도에서, 바람직하게는 압력 조건을 변화시킴으로써 수행된다.
- [0142] 또 다른 바람직한 구체예에서, 동결건조기에서 시료를 건조시키는 단계, 포말 형성 단계 및 용매 제거로 고체를 형성시키는 단계는 일정 온도에서, 바람직하게는 압력 조건을 변화시켜 수행하기도 한다.
- [0143] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 압력 및 온도 조건은 시료의 동결건조 단계, 포말 형성 단계 및 용매 제거로 인한 고체 형성 단계 동안 다를 수도 있다.
- [0144] 이러한 본 발명의 방법은 내면이 발수성인 용기를 사용하는 것이 바람직하다. 이는 내면에 소수성 조성물을 코팅하여, 예컨대 실리코처리하여 수득할 수 있다. 실리코처리는 당해기술분야에 공지된 방법으로 수행한다. 또는, 발수성 조성물로 용기를 제조하여 발수성 내면을 수득할 수도 있다.
- [0145] 용기에 발수성 내면의 존재는 포말 형성이 유발될 가능성 및 재현성을 보다 증가시켜 준다. 이러한 성질로 인해, 보존 시료에 사용될 수 있는 폴리올의 농도를 낮출 수 있고, 결과적으로 시료 건조에 필요한 시간을 줄이고, 메일라드 반응의 효과 또는 폴리올과 활성제 사이의 다른 유해한 상호작용의 영향을 감소시킬 수 있다. 보존 시료가 백신을 함유하는 경우에, 결과적으로 수득되는 고체는 존재하는 폴리올의 양이 보다 적고 결과적으로 수득되는 백신 용액의 점성이 낮기 때문에 신속하게 재구성되고, 투여도 보다 용이하다.
- [0146] 동결 또는 포말 형성을 수반하지 않는 건조
- [0147] 본 발명의 특히 바람직한 방법은 안정화제 및 바람직하게는 박테리아 다당류 존재하에서, IPV를 동결 또는 포말 형성에 노출시키지 않는 부드러운 공정을 통해 IPV를 건조시키는 단계를 수반하여, IPV가 건조 공정 동안의 압박을 덜 받고 고도의 항원성을 보유하는 것이다.
- [0148] 이러한 방법은 저농도의 유리질 형성 폴리올, 예컨대 10w/v% 이하, 보다 바람직하게는 5w/v% 이하의 농도가 유리하고 보다 짧은 건조 시간이 바람직한 경우에 사용하기에 특히 적당하다.

- [0149] 증발에 의한 용매 상실(증발 건조 - 단계 b)
- [0150] 동결 EH는 포말 형성을 수반하지 않는 건조 방법은 보존 시료를 동결하거나 또는 포말 형성하는 기포주입 없이 증발에 의해 보존 시료의 용매를 제거할 수 있는 압력 및 온도 조건으로 보존 시료를 처리하는 단계를 수반한다.
- [0151] 보존 시료 내부의 온도는 때로 증발 공정의 흡열 성질로 인해 시료 외측의 온도와 다를 수 있다. 온도는 보존 시료의 외측 조건을 참고로 하며, 예를 들어 대형 산업용 동결건조기가 사용되는 경우에는 선반의 온도를 참고로 한다. 이는 일반적으로 동결건조기 온도 설정에도 해당된다.
- [0152] 경우에 따라 보존 시료의 예비 탈기 단계가 본 발명의 방법에 사용될 수도 있다. 이 경우에, 압력은 추가 압력 감소 전에 적어도 5분 동안 200mbar 이하, 바람직하게는 200 내지 35mbar 사이로 감소된다.
- [0153] 본 발명의 바람직한 구체예는 온도 조건을 조절하면서 압력을 감소시켜 증발 건조를 달성하는 것이다. 이 때 압력은 30, 25, 20, 바람직하게는 5, 12, 가장 바람직하게는 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1mbar 이하로 조정하고, 반면 온도는 0℃ 이상, 바람직하게는 4 내지 37℃, 4 내지 10℃, 10 내지 15℃; 15 내지 20℃; 20 내지 25℃; 25 내지 30℃; 또는 30 내지 37℃; 또는 37 내지 45℃ 사이로 설정 온도를 유지시킨다. 이러한 조건은 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 16 또는 24시간, 바람직하게는 2 내지 4시간, 4 내지 6시간, 6 내지 8시간, 8 내지 12시간 또는 12 내지 18시간 동안 유지시킨다. 특히 바람직한 구체예에서, 압력은 시료의 동결을 방지하기 위해 설정 온도가 15℃인 경우에 압력은 2mbar 이상으로 유지시키는 것이 좋다. 바람직한 구체예에서, 온도는 15℃로 유지시키고 압력은 5 내지 10mbar, 보다 바람직하게는 6 내지 9mbar 사이, 가장 바람직하게는 약 8mbar로 설정한다. 설정 온도가 보다 높은 경우에는 시료를 동결시키지 않기 위해 약간 더 낮은 압력을 사용할 수 있고, 설정 온도가 보다 낮은 경우에는, 동결 방지를 위해 압력을 보다 높은 수준으로 유지시켜야 한다. 이러한 조건은 시료의 온도가 시료 외측의 온도와 거의 동일하도록 증발 속도를 지연시킨 충분한 시간 동안 유지되는 것이 바람직하다.
- [0154] 보존 시료는 포말 형성을 위해 동결되거나 비등되지 않아야 하고 용매를 제거하여 점성 액체 또는 고점성 액체를 형성하는 것이 바람직하다.
- [0155] 고점성 액체 형성을 위한 용매 제거
- [0156] 본 발명의 방법의 후속 단계는 보존 시료가 건조되어 포말 형성 없이, 바람직하게는 동결 없이 고점성 액체를 형성할 때까지 용매를 제거하는 단계를 수반한다.
- [0157] 본 발명의 일 구체예에서, 이러한 단계는 최초 증발 건조 단계에 적용된 압력 및 온도 조건을 그대로 유지시켜 달성한다. 예를 들어, 압력은 30, 25, 20, 바람직하게는 15, 12, 가장 바람직하게는 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1mbar 이하로 유지시키는 한편, 설정 온도는 0℃ 이상, 바람직하게는 5 내지 37℃, 5 내지 10℃, 10 내지 15℃; 15 내지 20℃; 20 내지 25℃; 25 내지 30℃; 또는 30 내지 37℃ 사이로 유지시킨다. 15℃의 설정 온도에서는, 5 내지 10mbar, 바람직하게는 6 내지 9mbar, 가장 바람직하게는 약 8mbar의 압력을 4 내지 24시간, 바람직하게는 1 내지 4시간, 4 내지 8시간, 8 내지 12시간 또는 12 내지 16시간 동안 유지시키는 것이 좋다. 이러한 온도 및 압력 조건은 용매 함량이 15, 12, 바람직하게는 10, 8, 5, 4, 3, 2 또는 1w/w% 이하인 고점성 액체를 수득하기 위하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18시간 이상 동안 유지시킨다.
- [0158] 본 발명의 또 다른 구체예에서는 용매 제거 동안 설정 온도를 본 공정 이전에 유지된 온도 보다 높은 설정 온도로 증가시킬 수도 있다. 이러한 구체예는 용매를 시료로부터 보다 빠른 속도로 제거할 수 있어서 본 발명의 방법이 보다 단시간에 완료될 수 있도록 한다. 예를 들어, 온도 설정은 0℃ 이상, 보다 바람직하게는 20℃ 이상, 바람직하게는 5 내지 37℃, 5 내지 10℃, 10 내지 20℃; 20 내지 30℃; 보다 바람직하게는 30 내지 40℃; 보다 바람직하게는 40 내지 50℃; 가장 바람직하게는 50 내지 60℃ 사이로 증가시키고, 압력은 30, 25, 20, 바람직하게는 15, 12, 가장 바람직하게는 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1mbar 이하의 수준으로 유지시킨다. 이러한 온도 및 압력 조건은 수분 함량이 15, 12, 바람직하게는 10, 8, 5, 4, 3, 2 또는 1% 이하인 고체를 수득하기 위해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 시간 이상 동안 유지시킨다. 이러한 구체예는 활성제가 본 발명의 방법이 성공적으로 수행되는데 사용된 온도에서 열 안정성일 것을 필요로 한다.
- [0159] 본 발명의 바람직한 구체예에서는 용매 제거(단계 c) 동안의 압력 설정을 본 공정의 이전 단계(단계 b)에 사용된 압력 보다 낮은 설정 압력으로 감소시킬 수도 있다. 이러한 구체예는 용매를 시료로부터 보다 빠른 속도로 제거할 수 있어서 본 발명의 방법이 보다 단시간에 완료될 수 있도록 한다. 또한, 제거되는 용매의 비율을 증가

시키기도 한다. 예를 들어, 압력 설정은 7, 6, 바람직하게는 5, 4, 3, 보다 바람직하게는 2, 1.5, 1, 가장 바람직하게는 0.8, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 또는 0.005mabr 이하로 감소시키는 한편, 온도는 0℃ 이상, 바람직하게는 10 내지 20℃; 20 내지 30℃; 30 내지 35℃; 또는 40℃ 이상으로 유지시킨다. 이러한 온도 및 압력 조건은 용매 함량이 칼 피셔 전량계 수분 분석기(Eur.J.Pharm.Biopharm. (2000) 50; 277-284)로 측정 시 15, 12, 바람직하게는 10, 8, 5, 4, 3, 2 또는 1%(w/w) 이하인 고체를 수득하기 위해 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 시간 이상 동안 유지시킨다.

[0160] 단계 b) 및 c)는 18시간, 보다 바람직하게는 16, 14, 12, 가장 바람직하게는 10, 8, 6 또는 4시간 이하의 시간 내에 완료되어야 하는 것이 바람직하다.

[0161] 건조 조성물은 용매가 증발, 비등 또는 승화에 의해 제거되어 용매 함량이 바람직하게는 칼 피셔법으로 측정했을 때, 15, 12, 10, 보다 바람직하게는 8, 5, 4, 3, 2 또는 1%(w/w) 이하인 조성물이다. 용매 함량 범위는 1 내지 3%, 3 내지 5%, 5 내지 10% 또는 10 내지 15%(w/w)인 것이 바람직하다. 건조 조성물이란 용어에는 고점성 액체 뿐만 아니라 건조 포말화된 유리질 및 동결건조된 고체도 포함된다.

[0162] 고점성 액체는 비등 없이 증발에 의해 용매가 제거되어 용매 함량이, 바람직하게는 칼 피셔법으로 측정했을 때 15, 12, 10, 보다 바람직하게는 8, 5, 4, 3, 2 또는 1%(w/w) 이하인 물질로서 정의되는 것이다. 용매 함량 범위는 1 내지 3%, 3 내지 5%, 5 내지 10% 또는 10 내지 15%(w/w)인 것이 바람직하다. 이러한 고점성 액체는 활성제가 4℃에서 적어도 3, 6, 9, 12 또는 24개월 동안 안정된 상태로 보존되어 이 기간 동안 활성제가 적어도 40, 50, 60, 바람직하게는 70, 80, 90 또는 95%의 활성 및/또는 항원성을 보유할 정도로 충분히 낮은 용매 함량을 보유한다. 고점성 액체는 외관은 고체이지만, 유리질이고 2, 4, 또는 6일, 보다 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10 또는 12개월에 걸쳐 매우 느리게 유동할 수 있는 것이 바람직하다. 극히 느린 유동은 고점성 액체를 함유하는 용기를 뒤집어서 고점성 액체의 유동이 관찰될 때까지 실온에서 방치하여 측정할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 고점성 액체는 뒤집힌 위치에서 2, 4 또는 6일, 바람직하게는 2, 3 또는 4주, 보다 바람직하게는 2, 4, 6, 8, 10 또는 12개월 후에도 유동하지 않는 것이다.

[0163] 점성 액체는 용매 제거의 1차 단계의 산물을 의미하는 것으로서, 이 단계의 완료 시에는 용매의 대부분이 시료로부터 제거되어 있다. 이 시점은 벌크 증발의 흡열 효과가 상실되어 시료의 온도가 상온으로 복귀될 정도로 증발 속도가 느려지기 때문에 인지할 수 있다.

[0164] 포말화된 유리질은 유리질 형성 폴리올을 함유하는 건조 조성물로서, 시료가 건조될 때 포말이 형성되도록 시료를 강력하게 발포시키거나 비등시키는 온도 및 압력 조건으로 보존 시료를 처리하는 방법에 의해 형성된다.

[0165] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌 또는 특허출원들은 본원에 참고원용된 것이다.

도면

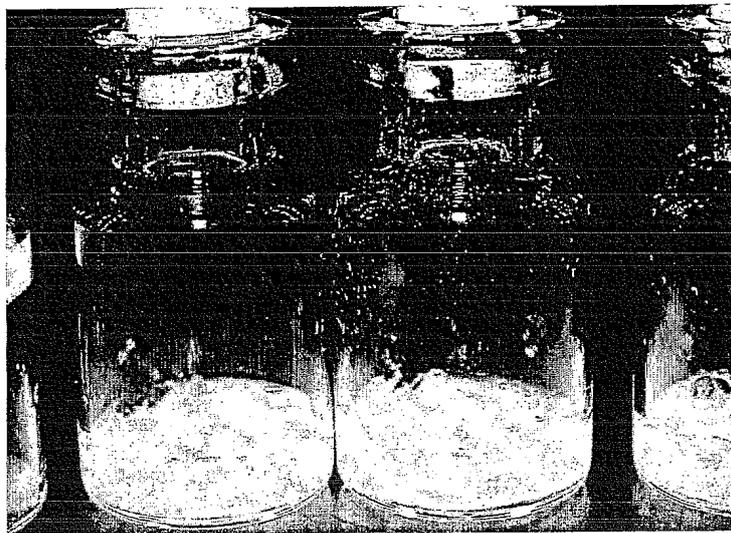
도면1a



도면1b



도면1c



도면1d



도면2

