



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0081254  
(43) 공개일자 2008년09월09일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) Int. Cl.<br/>A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)<br/>A61P 37/02 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7013164<br/>(22) 출원일자 2008년05월30일<br/>심사청구일자 없음<br/>번역문제출일자 2008년05월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2006/003880<br/>국제출원일자 2006년11월01일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/052163<br/>국제공개일자 2007년05월10일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>60/732,786 2005년11월01일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 게엠베하<br/>운트 콤파니 카게<br/>독일 35006 마르부르크 포스트파흐 1630</p> <p>(72) 발명자<br/>그레게르센, 엔스-페터<br/>독일 마르부르크 35041 에밀-본-베링-스트라세 76<br/>노바티스백신즈 앤드 다이아그노스틱스 게엠베하<br/>운트 콤파니 카게<br/>코스트, 홀거<br/>독일 마르부르크 35041 에밀-본-베링-스트라세 76<br/>노바티스백신즈 앤드 다이아그노스틱스 게엠베하<br/>운트 콤파니 카게</p> <p>(74) 대리인<br/>박종혁, 김정욱, 정삼영, 송봉식</p> |
|--|---|

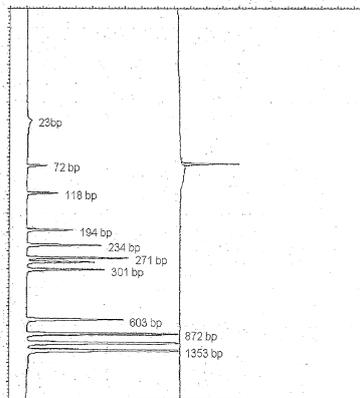
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 베타-프로피오락톤 처리에 의한 잔여 세포 DNA를 낮은수준으로 함유한 세포-유도성 바이러스 백신

(57) 요약

본 발명은 바이러스 감염의 치료 및 예방을 위한 백신 제품에 관한 것이다. 또한 세포 배양 백신의 제조와 관련된 오염물질을 감소하는 방법을 제공한다. 잔여 기능성 세포 배양물 DNA는 DNA 알킬화제, 예컨대 β-프로피오락톤(BPL) 처리에 의하여 분해되며, 따라서 세포 배양시 증식된 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질을 포함하며, 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한 백신을 제공한다.

대표도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

세포 배양물에서 증식된 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질을 포함하는 백신으로서, 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한 백신.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 모든 잔여 세포 배양물 DNA는 알킬화제 처리에 의하여 분해된 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 알킬화제는  $\beta$ -프로피오락톤(BPL)인 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 500 bp 이하인 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 200 bp 이하인 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 6

제3항에 있어서, 상기 잔여 세포 배양물 DNA는 0.1% 이하의  $\beta$ -프로피오락톤(BPL) 처리에 의하여 분해되는 것을 특징으로 하는 백신

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 백신은 감소된 수준의 응집을 나타내는 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 8

세포 배양물에서 증식된 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질을 포함하는 백신으로서, 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 500 bp 이하인 백신.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 잔여 세포 배양물 DNA는 알킬화제 처리에 의하여 분해되는 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 알킬화제는  $\beta$ -프로피오락톤(BPL)인 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 11

제8항에 있어서, 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 300 bp 이하인 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 12

제8항에 있어서, 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 200 bp 이하인 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 13

제8항에 있어서, 상기 잔여 세포 배양물 DNA는 0.1% 이하의  $\beta$ -프로피오락톤(BPL) 처리에 의하여 분해되는 것을 특징으로 하는 백신.

### 청구항 14

제8항에 있어서, 상기 백신은 감소된 수준의 응집을 나타내는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 15**

제10항에 있어서, 0.01% 이하의 유리 프로피온산 및  $\beta$ -프로피오락톤(BPL)이 혼합된 것을 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 16**

세포 배양물에서 증식된 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질을 포함하는 백신의 제조 방법으로서:

(i) 잔여 기능성 세포 배양물 DNA의 분해 단계; 및

(ii) 면역원성 단백질의 분리 단계

를 포함하는 백신의 제조 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 잔여 기능성 세포 배양물 DNA의 분해 단계는 기능성 세포 배양물 DNA를 알킬화제로 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 알킬화제는  $\beta$ -프로피오락톤(BPL)인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 세포 배양물 DNA는 0.1% 이하의  $\beta$ -프로피오락톤(BPL) 처리로 분해되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제16항에 있어서, 상기 백신은 감소된 수준의 응집을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

제16항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 있어서, 단계 (ii)는 비리온으로부터 DNA를 분리하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22**

제1항 또는 제8항에 있어서, 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스인 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 23**

제1항 또는 제8항에 있어서, 세포 배양물은 MDCK 세포, 베로(Vero) 세포, 및 PER.C.6 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 백신.

**청구항 24**

세포 배양에서 발견되는 재조합 단백질을 포함하는 제형으로서, 상기 제형은 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재하는 제형.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 모든 잔여 세포 배양물 DNA는 알킬화제 처리에 의하여 분해된 것을 특징으로 하는 제형.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 알킬화제는  $\beta$ -프로피오락톤(BPL)인 것을 특징으로 하는 제형.

**청구항 27**

제24항에 있어서, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 500 bp 이하인 것을 특징으로 하는 제형.

**청구항 28**

제24항에 있어서, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 200 bp 이하인 것을 특징으로 하는 제형.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 상기 잔여 세포 배양물 DNA는 0.1% 이하의  $\beta$ -프로피오락톤(BPL) 처리로 분해되는 것을 특징으로 하는 제형.

**청구항 30**

제24항에 있어서, 상기 제형은 감소된 수준의 응집을 나타내는 것을 특징으로 하는 제형.

**청구항 31**

세포 배양물에서 발현된 재조합 단백질을 포함하는 제형으로서, 잔여 기능성 세포 배양물 DNA의 길이는 500 bp 이하인 제형

**청구항 32**

제24항 또는 제31항에 있어서, 세포 배양물은 MDCK 세포, 베로(Vero) 세포, 및 PER.C6 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제형.

**명세서**

**기술분야**

- <1> 본원에서 인용한 모든 문헌 및 온라인 정보는 일체성을 지니고 참고자료로서 포함되어 있다.
- <2> 본 발명은 불순물을 감소시킨 개선된 세포 배양 산물 및 과정을 제공한다. 특히, 본 발명은 산물을 생성하는 세포 배양물과 관련하여 잔존하는 모든 잔여 기능성 세포 배양물 DNA를 분해하는 개선된 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 잔여 기능성 세포 배양물 DNA는 DNA 알킬화제, 예컨대  $\beta$ -프로피오락톤(BPL) 처리에 의하여 분해된다. 이 과정은 백신 및 재조합 단백질을 포함하는 세포 배양 산물의 범위를 처리하기 위하여 사용될 수 있다.

**배경기술**

- <3> 바이러스 백신의 상업적 생산에는 일반적으로 항원 공급원으로서 다량의 바이러스를 필요로 한다. 백신 생산을 위한 상업적 수량의 바이러스 세포 배양 시스템 내의 종자 바이러스의 배양 및 복제에 의하여 조달한다. 바이러스 복제에 적합한 세포 배양 시스템은 포유류, 조류 또는 곤충 세포를 포함하나, 포유류 세포 배양 시스템이 특히 바이러스 항원 단백질의 적합한 글리코실화 및 폴딩(folding)을 확보하기 위하여 바이러스 백신이 선호된다. 유사한 이유로, 포유류 세포 배양 시스템도 또한 재조합 단백질 발현용으로 선호된다.
- <4> 자연 발생 상태에서부터 비변형된 경우, 세포 배양물은 재생산 능력이 제한되어 있으며, 이와 아울러 상업적 백신 또는 재조합 단백질에 요구되는 양의 물질을 생산하기에 비실용적이며 불충분하다. 결과적으로, 제조 목적을 위하여는, 세포가 "계속적" 또는 "무한증식" 세포주로 변형되어 분화되는 횟수를 증가시키는 것이 선호된다. 다수의 이러한 변형은 종양발생 세포와 유관된 것과 유사한 기작을 사용한다. 이와 같이, 세포 배양 과정에서의 모든 잔기 물질, 예컨대 숙주 세포 DNA는 이러한 시스템 내에서 생산된 백신 또는 재조합 단백질 산물의 최종 제형에서 제거된다는 염려가 있다.
- <5> 잔기 숙주 세포 DNA 제거의 표준 방법은 DNase 처리에 의한 것이다. 이 유형의 편리한 방법은 유럽 특허 0870508 및 미국 특허 5948410에 관련되어 있으며, 이들은 2 단계 처리에 관한 것으로서, 우선 DNase(예컨대 벤조나아제)를 사용하고, 그 다음 양이온 세척제(예컨대 CTAB)를 사용한다.
- <6> 이러한 위험을 감소시키기 위한 현재의 노력은 잔여 숙주 세포 DNA의 총 농도를 감소시키는 것에 초점을 맞추고 있다. 본 발명의 목적은 모든 잔존 숙주 세포 DNA의 기능성을 제거함으로써 추가적으로 위험을 감소시키는 것이다.
- <7> 발명의 개요
- <8> 본 발명은 불순물을 감소시킨 개선된 세포 배양 산물 및 과정을 제공한다. 특히, 본 발명은 산물을 생성하는 세

포 배양과 관련하여 잔존하는 모든 잔여 기능성 세포 배양물 DNA를 분해하는 개선된 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 잔여 기능성 세포 배양물 DNA는 DNA 알킬화제, 예컨대  $\beta$ -프로피오락톤(BPL) 처리에 의하여 분해된다. 이 과정은 백신 및 제조합 단백질을 포함하는 세포 배양 산물의 범위를 처리하기 위하여 사용된다.

- <9> 본 발명은 세포 배양물에서 증식된 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질을 포함하는 백신을 포함하며, 여기서, 백신은 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한다. 이와 함께, 본 발명은 세포 배양시 발현된 제조합 단백질에 관한 것이며, 최종 제조합 단백질 제형은 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한다.
- <10> 모든 잔여 숙주 세포 DNA의 기능성은 DNA가 기능성 단백질을 암호화할 수 없을 정도로 충분히 작은 부분으로 절단하는 알킬화제로 DNA를 처리함으로써 제거되어 인간 수용체의 염색체로 전치되거나, 또는 그렇지 않으면 수용체 DNA 복제 기계에 의하여 인식되도록 할 수 있다. 바람직하기로는, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 500 베이스 페어(base pairs, bp) 이하이다. 더 바람직하기로는, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA는 200 bp 이하이다.

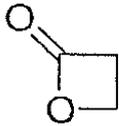
**발명의 상세한 설명**

- <11> 본 발명은 불순물을 감소시킨 개선된 세포 배양 산물 및 과정을 제공한다. 특히, 본 발명은 산물을 생성하는 세포 배양에 관련되어 잔존하는 모든 잔여 기능성 세포 배양물 DNA를 분해하는 개선된 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 잔여 기능성 세포 배양물 DNA는 DNA 알킬화제, 예컨대  $\beta$ -프로피오락톤(BPL) 처리에 의하여 분해된다. 이 과정은 백신 및 제조합 단백질을 포함하는 세포 배양 산물의 범위를 처리하기 위하여 사용될 수 있다.
- <12> 본 발명은 세포 배양물에서 증식된 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질을 포함하는 백신을 포함하며, 여기서 백신은 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한다. 이와 함께, 본 발명은 세포 배양시 발현된 제조합 단백질에 관한 것이며, 여기서 최종 제조합 단백질 제형은 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한다.
- <13> 모든 잔여 숙주 세포 DNA의 기능성은 DNA가 기능성 단백질을 암호화할 수 없을 정도로 충분히 작은 부분으로 절단하는 알킬화제로 DNA를 처리함으로써 제거되어 인간 수용체의 염색체로 전치되거나, 또는 그렇지 않으면 수용체 DNA 복제 기계에 의하여 인식되도록 할 수 있다. 분해된(비기능성) 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 1000 bp 이하 (예컨대 1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 또는 50 bp 이하)가 바람직하다. 바람직하게는, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 500 bp 이하이다. 더 바람직하게는, 분해되는 잔여 세포 배양물 DNA의 길이는 200 bp 이하이다.
- <14> 본원에서 사용된 바와 같이, "기능성 DNA" 또는 "기능성 RNA"라는 표현은 기능성 단백질로 번역되거나 또는 포유류 염색체로 전치될 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 일반적으로, 기능성 단백질로 번역될 수 있는 뉴클레오타이드 서열은 기능성 단백질의 프로모터 영역, 개시 코돈, 종결 코돈, 및 내부 암호화 서열을 필요로 한다. DNA 손상이 발생한 경우, 알킬화제의 첨가에 의하여, 다수의 이러한 영역이 변경되고 파괴되어, 번역을 길게 진행하거나 또는 진행만 하여 의도하는 단백질의 올리고펩타이드 서브유닛을 형성할 수 있게 된다.
- <15> "분해된 잔여 기능성 세포 배양물 DNA"는 기능성 단백질로 번역되거나 또는 포유류 염색체로 전치될 수 없는 기능성 DNA를 의미한다. 바람직하게는, "분해된 잔여 기능성 DNA"는 1000 bp 이하, 더 바람직하게는 500 bp 이하, 더욱더 바람직하게는 250 bp 이하, 및 가장 바람직하게는 100 bp 이하의 길이를 보유한다. 분해된 잔여 기능성 DNA의 길이는 겔 전기영동을 포함하는 표준 기법을 사용하여 측정될 수 있다.
- <16> 본 발명은 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한 백신 조성물 및 제조합 단백질 제형으로 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA 부재한다는 것은 200 bp 이하의 잔여 DNA 절편이 10 ng/0.5 ml 이하에서 검출가능한 조성물 또는 제형이라는 의미이다. 모든 잔여 세포 배양물 DNA의 크기는 모세관 겔 전기영동 및 핵산 증폭 기술을 포함하는 표준 기법을 사용하여 측정된다.
- <17> 본 발명에서 알킬화제 예컨대 BPL의 용도는 응집 및 오염물질의 감소에 추가적인 이점을 제공한다. 응집체가 감소된 백신 제형은 개선된 면역원성을 보유할 수 있다. 백신의 면역원성은 특정 바이러스 에피토프에 대한 항체의 특이성에 의존한다. 단백질의 표면이 원치않는 분자에 의하여 결합 또는 엄폐되거나 또는 대형 거대분자의 응집에 의하여 은폐되는 경우, 에피토프가 덜 인식되고 따라서 백신이 덜 효과적이다. 이와 함께, 응집체가 감소된 백신 제형은 추가의 가공 상의 유리한 점이 있을 수 있다. 분리정제 과정은 예컨대 인플루엔자 백신 내의 적혈구응집소 및 뉴라미다아제 등의 기대하는 단백질의 분리에 의존한다. 단백질이 응집체 또는 가교-결합의 존재에 의하여 구조적으로 변형되는 경우, 이는 인식할 수 없으며, 이후 컬럼 크로마토그래피, 여과, 또는 원심분

리에 의하여 실질적으로 제거된다.

<18> 알킬화제

<19> 본 발명에 사용되는 알킬화제는 알킬 라디칼을 화합물 내로 도입하는 물질을 포함한다. 바람직하게는, 알킬화제는 모노알킬화제, 예컨대 BPL이다. BPL은 다수의 백신 제조에 바이러스 불활성화에 널리 사용되는 모노알킬화제이다. BPL은 핵산을 포함하는 다양한 생물학적 분자와 반응하여 알킬화 및 퓨린제거에 의한 구조적 변형을 유발시킨다. BPL은 일반적으로 다음의 구조로 나타난다:

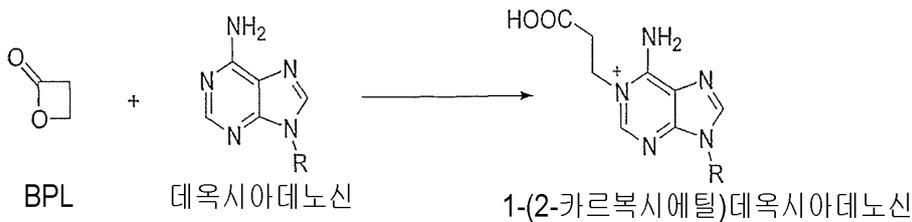


<20>

<21> 시험관 내에서, BPL은 일반적으로

<22> 친핵 치환 반응에 유리한 조건 하에서- 고온 가열, BPL 고농도, 및 비양자성 극성 용매- 고농도로 존재하는 친핵체와 반응하여 기능화된 프로피온산, 예컨대 7-(2-카르복시에틸)구아닌 또는 1-(2-카르복시에틸)테옥시아데노신을 형성한다(반응도 1). Boutwell et al. Annals New York Academy of Sciences, 751-764; Perrin et al. Biologicals, 23 (1995) 207-211; Chen et al. Carcinogenesis, 2(2) (1981) 73-80.

<23> 반응도 1 (Chen et al.):



<24>

<25> 이러한 DNA 염기의 결합 또는 알킬화는 염기쌍 치환, 특히 퓨린제거, 결실, 및 뉴클레오사이드의 가교결합을 포함하는 다수의 기작에 의하여 돌연변이유발을 유도한다. 고도의 돌연변이유발성 및 BPL의 반응성은 급속한 바이러스 사멸 및 비발암성 부산물로의 후속 DNA 분해에 상응한다.

<26> 모든 잔여 기능성 세포 배양물 DNA는 1% 이하의 BPL (예컨대 1%, 0.75%, 0.5%, 0.25%, 0.2%, 0.1%, 0.075%, 0.05%, 0.025%, 0.01%, 또는 0.005% 이하) 처리로 분해된다. 바람직하게는, 잔여 기능성 세포 배양물 DNA는 0.1% 내지 0.01% 사이의 BPL 처리로 분해된다.

<27> 알킬화제는 완충 용액에 첨가되는 것이 바람직하며 용액의 pH는 5 내지 10 사이로 유지하는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 용액의 pH는 6 내지 9 사이로 유지한다. 더욱 더 바람직하게는 용액의 pH는 7 내지 8 사이로 유지한다.

<28> 일 방법에 있어서, 알킬화제는 1회 이상 첨가된다. 예를 들면, 제1 BPL 처리를 수행한 이후에 제2 BPL 처리가 수행된다. 제1 처리 및 제2 처리 사이에 알킬화제 제거 단계가 존재할 수 있으나, 알킬화제는 제1 처리 단계에서 잔존한 모든 알킬화제를 제거하지 않고 제2 처리를 위하여 첨가될 수도 있다.

<29> 바람직하게는, 알킬화제는 백신에 사용된 바이러스에 대한 불활성화제로서 사용될 수 있다. 본 발명의 알킬화제는 단백질과 숙주 세포 DNA를 포함하는 다른 물질을 가교 결합할 수 있는 종래의 불활성화제, 예컨대 포름알데히드보다 선호된다. 이러한 가교 결합은 응집체(예컨대 단백질-단백질 응집체, 뉴클레오타이드 조합, 및 단백질-뉴클레오타이드 조합)의 형성을 유도할 수 있다. 알킬화제, 예컨대 BPL은 바이러스 불활성화를 위한 이러한 가교-결합 기작에 의존하지 않기 때문에, 바이러스 불활성화를 위한 이러한 알킬화제의 용도는 백신 산물 내의 응집체 및 다른 불순물의 형성을 최소화한다. 이러한 응집체는 다른 단백질에 이온적 또는 공유적으로 결합된 단백질, 다른 뉴클레오타이드에 이온적 또는 공유적으로 결합한 단백질, 및/또는 다른 뉴클레오타이드와 이온적 또는 공유적으로 결합한 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

<30> 본원에서 사용된 바와 같이, "응집" 또는 "응집체"라는 것은 함께 결합하여 큰 그룹 또는 입자를 형성하는 개별

유닛 또는 입자의 집단 또는 덩어리를 의미한다. 응집은 일반적으로 가능한 응집 단계의 전후 또는 응집체-분열법(예컨대, 세제 처리)의 적용 전후에 겔 전기영동 (예컨대 라에밀리(Laemmli) 시스템), 크로마토그래피, 용액 혼탁도, 또는 침전 연구법 및 기타 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의하여 소망하는 성분의 정량 측정에 의하여 결정될 수 있다.

- <31> 알킬화제, 특히 BPL 처리는 서로 다른 온도의 상태에서 관여될 수 있다. 예를 들면, 저온의 제1기(예컨대 2-8℃, 예컨대 약 4℃) 및 일반적으로 제1기 보다 최소한 10℃이상 높은 고온의 제2기(예컨대 25-50℃, 예컨대 약 37℃)가 존재할 수 있다. 이러한 두 상태의 과정은 알킬화제가 불활성화 및 DNA 분해에 모두 사용되는 경우 특히 유용하다. 일반적인 반응에 있어서, 바이러스 불활성화는 저온기에서 발생하고, DNA 분해는 보다 고온기에서 발생한다. 이하 더욱 상세하게 설명하는 바와 같이, 온도 증가는 열-민감성 알킬화제의 제거를 촉진한다.
- <32> *면역원성 단백질*
- <33> 본 발명에 사용되기 적합한 면역원성 단백질은 백신의 표적인 모든 바이러스로부터 유도될 수 있다. 면역원성 단백질은 불활성 (또는 사멸) 바이러스, 약독화 바이러스, 분열 바이러스 제형, 정제 서브유닛 제형, 바이러스로부터 분리, 정제 또는 유도된 바이러스 단백질, 및 바이러스 유사 입자(VLP)로서 제형화될 수 있다.
- <34> 본 발명의 면역원성 단백질은 바람직하게는 생활 주기의 최소한 하나의 단계에서 바이러스의 표면에 노출되는 에피토프를 포함하는 바이러스 항원이다. 바이러스 항원은 바람직하게는 다중 혈청형 또는 분리주에 걸쳐서 보존된다. 바이러스 항원은 하기하는 하나 이상의 바이러스로부터 유도된 항원 및 이하 확인된 특이적 항원의 예를 포함한다. 바이러스는 비-외피성 또는, 바람직하게는, 외피성일 수 있다. 바이러스는 바람직하게는 RNA 바이러스, 및 더 바람직하게는 ssRNA 바이러스이다. 이들은 센스 또는, 바람직하게는, 안티센스 게놈을 보유할 수 있다. 이들의 게놈은 비-분절 또는, 바람직하게는, 분절형이 될 수 있다.
- <35> 오르도마이옥스바이러스(*Orthomyxovirus*): 바이러스 항원은 오르도마이옥스바이러스(*Orthomyxovirus*), 예컨대 인플루엔자 A, B 및 C 등으로부터 유도된 것일 수 있다. 오르도마이옥스바이러스(*Orthomyxovirus*) 항원은 적혈구응집소(HA), 뉴라미다아제(NA), 핵단백질(NP), 기질단백질(M1), 막단백질(M2), 하나 이상의 전사효소 성분(PB1, PB2 및 PA)을 포함하는 하나 이상의 바이러스 단백질로부터 선택될 수 있다. 바람직한 항원은 HA 및 NA를 포함한다.
- <36> 인플루엔자 항원은 유행성(매년) 독감 균주로부터 유도될 수 있다. 대안적으로 인플루엔자 항원은 유행성 발병을 유발할 능력을 지닌 균주로부터 유도될 수 있다 (즉, 현재 순환되는 균주 내의 적혈구응집소에 비하여 새로운 적혈구응집소를 지닌 인플루엔자 균주, 또는 조류 대상체 내에서 병원성이며, 인간 집단에 수평적으로 전염시킬 수 있는 능력을 보유한 인플루엔자 균주, 또는 인간에 병원성인 인플루엔자 균주). 특정 계절 및 백신에 포함된 항원의 특성에 따라서, 인플루엔자 항원은 하나 이상의 다음의 적혈구응집소 서브타입으로부터 유도될 수 있다: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 또는 H16.
- <37> 본 발명의 인플루엔자 항원은 조류 인플루엔자 균주, 특히 고병원성 조류 인플루엔자 균주(HPAI)로부터 유도될 수 있다. Alexander, Avian Dis (2003) 47(3 Suppl):976-81.
- <38> 인플루엔자 바이러스 항원의 추가적 상세를 이하 제시한다.
- <39> 파라마이옥스비리데 바이러스(*Paramyxoviridae viruses*): 바이러스 항원은 파라마이옥스비리데 바이러스(*Paramyxoviridae viruses*), 예컨대 뉴모바이러스(RSV), 파라마이옥스바이러스(PIV) 및 모르빌리바이러스(홍역)로부터 유도될 수 있다.
- <40> 뉴모바이러스(*Pneumovirus*): 바이러스 항원은 뉴모바이러스(*Pneumovirus*), 예컨대 호흡기세포융합바이러스(RSV), 소 호흡기세포융합 바이러스, 마우스의 폐렴 바이러스, 및 칠면조 비기관지염 바이러스로부터 유도될 수 있다. 바람직하게는, 뉴모바이러스(*Pneumovirus*)는 RSV이다. 뉴모바이러스(*Pneumovirus*) 항원은 표면 단백질 융합(F), 글리코단백질(G) 및 소 소수성 단백질(SH), 기질 단백질 M 및 M2, 뉴클레오텍시드 단백질 N, P 및 L, 및 비구조적 단백질 NS1 및 NS2를 포함하는 하나 이상의 다음의 단백질로부터 선택될 수 있다. 바람직한 뉴모바이러스(*Pneumovirus*) 항원은 F, G 및 M를 포함한다. 예컨대, 문헌 J Gen Virol. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229를 참조한다. 뉴모바이러스(*Pneumovirus*) 항원은 키메라 바이러스로부터 유도되거나 또는 유도될 수 있다. 예를 들어, 키메라 RSV/PIV 바이러스는 RSV 및 PIV 두 종의 성분을 포함할 수 있다.
- <41> 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*): 바이러스 항원은 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*), 예컨대 파라인플루엔자 바이러스 타입 1-4(PIV), 볼거리, 쉐다이 바이러스, 시미안 바이러스 5, 소 파라인플루엔자 바이러스

및 뉴캐슬병 바이러스 등으로부터 유도될 수 있다. 바람직하게는, 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*)는 PIV 또는 볼거리이다. 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*) 항원은 하나 이상의 다음의 단백질로부터 선택될 수 있다: 적혈구응집소-뉴라미다아제(HN), 융합 단백질 F1 및 F2, 핵단백질(NP), 인단백질(P), 대형 단백질(L), 및 기질 단백질 (M). 바람직한 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*) 단백질은 HN, F1 및 F2를 포함한다. 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*) 항원은 키메라 바이러스로부터 유도되거나 또는 재형화될 수 있다. 예를 들어, 키메라 RSV/PIV 바이러스는 RSV 및 PIV 두 종의 성분을 포함할 수 있다. 상업적으로 구득가능한 볼거리 백신은 1가 형태 또는 홍역 및 풍진 백신(MMR)의 조합인 약독화 생 볼거리 바이러스를 포함한다.

- <42> 모르빌리바이러스(*Morbillivirus*): 바이러스 항원은 모르빌리바이러스(*Morbillivirus*), 예컨대 홍역으로부터 유도될 수 있다. 모르빌리바이러스(*Morbillivirus*) 항원은 하나 이상의 다음의 단백질로부터 선택될 수 있다: 적혈구응집소(H), 글리코단백질(G), 융합 인자(F), 대형 단백질(L), 핵단백질(NP), 폴리머라아제 인단백질 (P), 및 기질(M). 상업적으로 구득가능한 홍역 백신은 일반적으로 볼거리 및 풍진 백신(MMR)의 조합인 약독화 생 홍역 바이러스를 포함한다.
- <43> 피코르나바이러스(*Picornavirus*): 바이러스 항원은 피코르나바이러스(*Picornavirus*), 예컨대 엔테로바이러스(*Enterovirus*), 리노바이러스(*Rhinovirus*), 헤파르나바이러스(*Heparnavirus*), 카르디오바이러스(*Cardiovirus*) 및 아프토바이러스(*Aphthovirus*)로부터 유도될 수 있다. 엔테로바이러스(*Enterovirus*), 예컨대 폴리오바이러스(*Poliovirus*)로부터 유도된 항원이 바람직하다.
- <44> 엔테로바이러스(*Enterovirus*): 바이러스 항원은 엔테로바이러스(*Enterovirus*), 예컨대 폴리오바이러스(*Poliovirus*) 타입 1, 2 또는 3, 콕사키(*Coxsackie*) A 바이러스 타입 1 내지 22 및 24, 콕사키(*Coxsackie*) B 바이러스 타입 1 내지 6, 에코바이러스(ECHO) 바이러스 타입 1 내지 9, 11 내지 27 및 29 내지 34, 및 엔테로바이러스(*Enterovirus*) 68 내지 71로부터 유도될 수 있다. 바람직하게는, 엔테로바이러스(*Enterovirus*)는 폴리오바이러스(*Poliovirus*)이다. 엔테로바이러스(*Enterovirus*) 항원은 바람직하게는 하나 이상의 다음의 캡시드 단백질 VP1, VP2, VP3 및 VP4으로부터 선택된다. 상업적으로 구득가능한 소아마비 백신은 불활성 소아마비 백신 (IPV) 및 경구용 폴리오바이러스(*Poliovirus*) 백신(OPV)을 포함한다.
- <45> 헤파르나바이러스(*Heparnavirus*): 바이러스 항원은 헤파르나바이러스(*Heparnavirus*), 예컨대 A형 간염 바이러스(HAV)로부터 유도될 수 있다. 상업적으로 구득가능한 HAV 백신은 불활성 HAV 백신을 포함한다.
- <46> 토가바이러스(*Togavirus*): 바이러스 항원은 토가바이러스(*Togavirus*), 예컨대 루비바이러스(*Rubivirus*), 알파바이러스(*Alphavirus*), 또는 아르테리바이러스(*Arterivirus*)로부터 유도될 수 있다. 루비바이러스(*Rubivirus*), 예컨대 풍진바이러스로부터 유도된 항원이 바람직하다. 토가바이러스(*Togavirus*) 항원은 E1, E2, E3, C, NSP-1, NSP-2, NSP-3 또는 NSP-4. 토가바이러스(*Togavirus*) 항원은 E1, E2 또는 E3로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상업적으로 구득가능한 풍진 백신은 일반적으로 볼거리 및 홍역 백신(MMR)과 조합한 저온-적응 생 바이러스를 포함한다.
- <47> 플라비바이러스(*Flavivirus*): 바이러스 항원은 플라비바이러스(*Flavivirus*), 예컨대 진드기매개뇌염(*Tick-borne encephalitis*)(TBE), 뎅기(*Dengue*)(타입 1, 2, 3 또는 4), 황열(*Yellow Fever*), 일본 뇌염(*Japanese encephalitis*), 웨스트 나일 뇌염(*West Nile encephalitis*), 세인트루이스 뇌염(*St. Louis encephalitis*), 러시안 봄-여름 뇌염(*Russian spring-summer encephalitis*), 포와산 뇌염(*Powassan encephalitis*)으로부터 유도될 수 있다. 플라비바이러스(*Flavivirus*) 항원은 PrM, M, C, E, NS-1, NS-2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, 및 NS5로부터 선택될 수 있다. 플라비바이러스(*Flavivirus*) 항원은 바람직하게는 PrM, M 및 E로부터 선택된다. 상업적으로 구득가능한 TBE 백신은 불활성 바이러스 백신을 포함한다.
- <48> 페스티바이러스(*Pestivirus*): 바이러스 항원은 페스티바이러스(*Pestivirus*), 예컨대 소 바이러스 설사 바이러스(BVDV), 고전적 돼지열 바이러스(CSFV) 또는 보더병 바이러스(BDV)으로부터 유도될 수 있다.
- <49> 헤파드나바이러스(*Hepadnavirus*): 바이러스 항원은 헤파드나바이러스(*Hepadnavirus*), 예컨대 B형 간염 바이러스로부터 유도될 수 있다. 헤파드나바이러스(*Hepadnavirus*) 항원은 표면 항원 (L, M 및 S), 중심 항원 (HBc, HBs)로부터 선택될 수 있다. 상업적으로 구득가능한 HBV 백신은 표면 항원 S 단백질을 포함하는 서브유닛 백신을 포함한다.
- <50> C형 간염 바이러스: 바이러스 항원은 C형 간염 바이러스 (HCV)로부터 유도될 수 있다. HCV 항원은 하나 이상의 E1, E2, E1/E2, NS3/4 NS3-중심 다기능단백질, NS 3/4-중심 다기능단백질, 비구조 영역의 중심, 및/또는 펩타이드로부터 선택될 수 있다(Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14:381).

- <51> 라브도바이러스(*Rhabdovirus*): 바이러스 항원은 라브도바이러스(*Rhabdovirus*), 예컨대 리싸바이러스(*Lyssavirus*) (라비에스 바이러스(*Rabies virus*)) 및 베시쿨로바이러스(*Vesiculo virus*)(VSV)로부터 유도될 수 있다. 라브도바이러스(*Rhabdovirus*) 항원은 글리코단백질(G), 핵단백질(N), 대형 단백질(L), 비구조 단백질(NS)로부터 선택될 수 있다. 상업적으로 구득가능한 라비에스 바이러스(*Rabiesvirus*) 백신은 인간 이배체 세포 또는 태아 레서스 폐 세포 상에서 성장한 사멸 바이러스를 포함할 수 있다.
- <52> 칼리씨비리데(*Caliciviridae*); 바이러스 항원은 칼리씨비리데(*Caliciviridae*), 예컨대 노르웁 바이러스(*Norwalk virus*), 및 노르웁-유사 바이러스, 예컨대 하와이 바이러스(*Hawaii virus*) 및 쇼 마운틴 바이러스(*Snow Mountain virus*) 바이러스로부터 유도될 수 있다.
- <53> 코로나바이러스(*Coronavirus*): 바이러스 항원은 코로나바이러스(*Coronavirus*), SARS, 인간 호흡기 코로나바이러스(*Human Respiratory Coronavirus*), 조류 감염성 기관지염(IBV), 마우스 간염 바이러스(MHV), 및 돼지 감염성 위장자염 바이러스(*Porcine transmissible gastroenteritis virus*) (TGEV)로부터 유도될 수 있다. 코로나바이러스(*Coronavirus*) 항원은 스파이크(S), 외피(E), 기질(M), 뉴클레오캡시드(N), 및 적혈구응집소-에스테라아제 글리코단백질(HE)로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 코로나바이러스(*Coronavirus*) 항원은 SARS 바이러스로부터 유도된다. SARS 바이러스 항원은 WO 04/92360에 설명되어 있다.
- <54> 레트로바이러스: 바이러스 항원은 레트로바이러스, 예컨대 온코바이러스, 렌티바이러스 또는 스푸마바이러스등 으로부터 유도될 수 있다. 온코바이러스(*Oncovirus*) 항원은 HTLV-1, HTLV V-2 또는 HTLV V-5로부터 유도될 수 있다. 렌티바이러스(*Lentivirus*) 항원은 HIV-1 또는 HIV-2로부터 유도될 수 있다. 레트로바이러스 항원은 gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpr, 및 vpr로부터 선택될 수 있다. HIV 항원은 gag(p24gag 및 p55gag), env(gp160 및 gp41), pol, tat, nef, rev vpr, 미니단백질, (바람직하게는 p55 gag 및 gp140v 결실) 로부터 선택된다. HIV 항원은 하나 이상의 다음의 균주로부터 유도될 수 있다: HIV<sub>111b</sub>, HIV<sub>SF2</sub>, HIV<sub>LAV</sub>, HIV<sub>LAI</sub>, HIV<sub>MN</sub>, HIV-1<sub>CM235</sub>, HIV-1<sub>US4</sub>.
- <55> 레오바이러스(*Reovirus*): 바이러스 항원은 레오바이러스(*Reovirus*), 예컨대 오르소레오바이러스(*Orthoreovirus*), 로타바이러스(*Rotavirus*), 오르비바이러스(*Orbivirus*), 또는 콜티바이러스(*Coltivirus*)로부터 유도될 수 있다. 레오바이러스(*Reovirus*) 항원은 구조 단백질  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$ ,  $\mu 1$ ,  $\mu 2$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$ , 또는  $\sigma 3$ , 또는 비구조 단백질  $\sigma NS$ ,  $\mu NS$ , 또는  $\sigma 1s$ 로부터 선택된다. 바람직한 레오바이러스(*Reovirus*) 항원은 로타 바이러스(*Rotavirus*)로부터 유도된다. 로타바이러스(*Rotavirus*) 항원은 VP1, VP2, VP3, VP4(또는 분해 산물 VP5 및 VP8), NSP 1, VP6, NSP3, NSP2, VP7, NSP4, 또는 NSP5로부터 선택된다. 바람직한 로타바이러스(*Rotavirus*) 항원은 VP4 (또는 분해 산물 VP5 및 VP8), 및 VP7를 포함한다.
- <56> 파르보바이러스(*Parvovirus*): 바이러스 항원은 파르보바이러스(*Parvovirus*), 예컨대 파르보바이러스(*Parvovirus*) B19로부터 유도될 수 있다. 파르보바이러스(*Parvovirus*) 항원은 VP-1, VP-2, VP-3, NS-I 및 NS-2f로부터 선택된다. 바람직하게는, 파르보바이러스(*Parvovirus*) 항원은 캡시드 단백질 VP-2이다.
- <57> 델타 헤파티티스 바이러스(*Delta hepatitis virus*) (HDV): 바이러스 항원은 HDV, 특히 HDV의  $\delta$ -항원으로부터 유도될 수 있다(예컨대, 미국 특허 5378814).
- <58> E형 간염 바이러스(HEV): 바이러스 항원은 HEV로부터 유도될 수 있다.
- <59> G형 간염 바이러스(HGV): 바이러스 항원은 HGV로부터 유도될 수 있다.
- <60> 인간 헤르페스바이러스(*Human Herpesvirus*): 바이러스 항원은 인간 헤르페스바이러스(*Human Herpesvirus*), 예컨대 헤르페스 심플렉스 바이러스(*Herpes Simplex virus*) (HSV), 바리셀라-조스터 바이러스(*Varicella-zoster virus*) (VZV), 엡스타인-바 바이러스(*Epstein-Barr virus*) (EBV), 시토메갈로바이러스(*Cytomegalovirus*) (CMV), 인간 헤르페스바이러스 6 (*Human Herpesvirus 6*) (HHV6), 인간 헤르페스바이러스 7(*Human Herpesvirus 7*) (HHV7), 및 인간 헤르페스바이러스 8(*Human Herpesvirus 8*) (HHV8)로부터 유도될 수 있다. 인간 헤르페스 바이러스(*Human Herpesvirus*) 항원은 즉시 초기출현 단백질( $\alpha$ ), 초기출현 단백질( $\beta$ ), 및 만기출현 단백질( $\gamma$ )로부터 선택될 수 있다. HSV 항원은 HSV-I 또는 HSV-2 균주로부터 유도될 수 있다. HSV 항원은 글리코단백질 gB, gC, gD 및 gH, 융합 단백질(gB), 또는 면역 도피 단백질(gC, gE, 또는 gI)로부터 선택될 수 있다. VZV 항원은 중심, 뉴클레오캡시드, 표피, 또는 외피 단백질로부터 선택될 수 있다. 약독화 생 VZV 백신은 상업적으로 구득가능하다. EBV 항원은 초기출현 항원(EA) 단백질, 바이러스 캡시드 항원(VCA), 및 막 항원(MA)의 글리코 단백질로부터 선택될 수 있다. CMV 항원은 캡시드 단백질, 외피 글리코단백질(예컨대 gB 및 gH), 및 표피 단백

질로부터 선택될 수 있다.

- <61> 파포바바이러스(*Papovavirus*): 항원은 파포바바이러스(*Papovavirus*), 예컨대 파필로마바이러스(*Papillomavirus*) 및 폴리오마바이러스(*Polyomavirus*)로부터 유도될 수 있다. 파필로마바이러스(*Papillomavirus*)는 HPV 혈청형 1, 2, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 41, 42, 47, 51, 57, 58, 63 및 65를 포함한다. 바람직하게는, HPV 항원은 혈청형 6, 11, 16 또는 18로부터 유도될 수 있다. HPV 항원은 캡시드 단백질(L1) 및 (L2), 또는 E1-E7, 또는 이들의 융합체로부터 선택될 수 있다. HPV 항원은 바람직하게는 바이러스-유사 입자(VLPs)로 제형화될 수 있다.
- <62> 폴리오마바이러스(*Polyomyavirus*) 바이러스는 BK 바이러스 및 JK 바이러스를 포함한다. 폴리오마바이러스(*Polyomavirus*) 항원은 VP1, VP2 또는 VP3로부터 선택될 수 있다.
- <63> 문헌 Vaccines, 4th Edition (Plotkin and Orenstein ed. 2004); Medical Microbiology 4th Edition (Murray et al. ed. 2002); Virology, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2nd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991)에 설명된 바이러스 항원을 추가로 제공하며, 이들은 본 발명의 조성물과 관계되는 것으로 고려된다.
- <64> 본 발명의 사용에 적합한 면역원성 단백질은 호흡기 질환을 유발시키는 바이러스로부터 유도될 수 있다. 이러한 호흡기 항원의 예는 호흡기 바이러스 예컨대 오르도마이옥스(*Orthomyxovirus*) (인플루엔자), 뉴모바이러스(*Pneumovirus*) (RSV), 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*) (PIV), 모르빌리바이러스(*Morbillivirus*)(홍역), 토가바이러스(*Togavirus*)(풍진), VZV, 및 코로나바이러스(*Coronavirus*) (SARS)로부터 유도되는 단백질을 포함한다. 인플루엔자 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질이 특히 바람직하다.
- <65> 본 발명의 조성물은 소아 대상체에 사용되기 적합한 하나 이상의 면역원성 단백질을 포함할 수 있다. 소아 대상체는 일반적으로 약 3 세 이하, 또는 약 2 세 이하, 또는 약 1 세이다. 소아 항원은 6 개월, 1, 2 또는 3 년의 기간 동안 다수의 회수로 투여될 수 있다. 소아 항원은 소아 집단을 표적화할 수 있는 바이러스 및/또는 소아 집단에 감염되기 쉬운 바이러스로부터 유도될 수 있다. 소아 바이러스 항원은 하나 이상의 오르도마이옥스바이러스(*Orthomyxovirus*)(인플루엔자), 뉴모바이러스(*Pneumovirus*)(RSV), 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*) (PIV 및 볼거리), 모르빌리바이러스(*Morbillivirus*)(홍역), 토가바이러스(*Togavirus*) (풍진), 엔테로바이러스(*Enterovirus*)(소아마비), HBV, 코로나바이러스(*Coronavirus*)(SARS), 및 바리셀라-조스터 바이러스(*Varicella-zoster virus*) (VZV), 엡스타인 바 바이러스(*Epstein Barr Virus*)(EBV)로부터 유도되는 항원을 포함한다.
- <66> 본 발명의 조성물은 노령의 또는 면역손상 개체에 사용되기 적합한 하나 이상의 면역원성 단백질을 포함한다. 이러한 개체는 표적화된 항원에 대한 이들의 면역반응을 증진시키기 위하여 고 복용량 또는 항원보강제 제형으로 더 빈번하게 접종하여야 할 필요가 있다. 고령의 또는 면역손상 개체에 사용하기 위하여 표적화될 수 있는 항원은 하나 이상의 다음의 바이러스로부터 유도된 항원을 포함한다: 오르도마이옥스바이러스(*Orthomyxovirus*)(인플루엔자), 뉴모바이러스(*Pneumovirus*) (RSV), 파라마이옥스바이러스(*Paramyxovirus*)(PIV 및 볼거리), 모르빌리바이러스(*Morbillivirus*) (홍역), 토가바이러스(*Togavirus*)(풍진), 엔테로바이러스(*Enterovirus*)(소아마비), HBV, 코로나바이러스(*Coronavirus*)(SARS), 바리셀라-조스터 바이러스(*Varicella-zoster virus*)(VZV), 엡스타인 바 바이러스(*Epstein Barr virus*)(EBV), 및 시토메갈로바이러스(*Cytomegalovirus*)(CMV).
- <67> 바이러스 성장 이후, 알킬화제는 정제된 비리온 예컨대 정화된 세포 배양에 존재하는 비리온, 또는 이러한 정화된 세포 배양으로부터 정제된 비리온에 사용될 수 있다. 본 발명의 방법은 정화에 의한 세포성 물질의 제거 단계 및 이후의 예컨대 크로마토그래피에 의하여 정화된 세포 배양에 의한 비리온의 분리정제 단계가 관여될 수 있다. 알킬화제는 비리온 이러한 방식으로 정제된 비리온, 또는 추가 선택적인 초여과/정용여과의 단계 이후에 사용될 수 있다. 바람직한 방법은 감염된 세포 배양의 정화된 상청액 상에 알킬화제를 사용하는 것이 아니라, 이러한 정화된 상청액으로부터 정제된 비리온 상에 알킬화제를 사용하는 것이 아니다(cf. Morgeaux et al (1993) Vaccine 11:82-90).
- <68> 알킬화제는 내부독소 제거 단계를 거친 후에 사용되는 것이 바람직하다.
- <69> 방법 단계
- <70> 본 발명의 백신 조성물은 면역원성 단백질의 분리 및 잔여 기능성 숙주 세포 DNA의 분해에 의하여 제조될 수 있다. 이와 유사하게, 재조합 단백질 제형은 재조합 단백질의 분리 또는 분리정제 및 잔여 기능성 숙주 세포 DNA의 분해에 의하여 제조될 수 있다. 이러한 단계는 순차적으로 또는 동시에 수행될 수 있다. 잔여 기능성 세포

배양물 DNA 분해 단계는 알킬화제 예컨대 BPL의 첨가에 의하여 수행될 수 있다.

- <71> 알킬화제 및 모든 잔기 부산물은 백신 또는 재조합 단백질의 최종 제형화 전에 제거되는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 백신 조성물 또는 재조합 단백질 제형은 0.1% 이하의 유리 프로피온산 및 결합된 BPL을 함유한다(예컨대 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 또는 0.01% 이하). 바람직하게는, 최종 백신 조성물 또는 재조합 단백질 제형은 0.01% 이하의 BPL을 함유한다.
- <72> BPL는 가열에 의하여 쉽게 제거되어, 무독성  $\beta$ -하이드록시프로피온산으로 가수분해된다. 가수분해에 요구되는 시간은 BPL의 총량 및 온도에 의존한다. 고온은 더 급속한 가수분해를 하게되나, 너무 높으면 활성 단백질 성분이 손상을 받게되므로 온도를 너무 높여서는 안된다. 하기하는 바와 같이, 약 37°C로 2-2.5 시간 가열이 BPL의 제거에 적합하다.
- <73> DNA 처리 후에, 잔여 DNA 산물은 최종 면역원성 또는 재조합 조성물 내에 잔존하게 될 수 있다. 더 바람직하게는, 그러나, 이들은 소망하는 성분으로부터 분리되며, 예컨대 비리온/단백질로부터 분리된다. 이러한 방식의 분리는 DNA 분해 산물을 부분적으로 또는 완전하게 제거시킬 수 있으며, 바람직하게는 200 bp 이상의 모든 분해된 DNA를 제거한다. 따라서 본 발명의 방법은 비리온으로부터 DNA 분리 단계를 포함할 수 있다. 이러한 분리 단계에는 예컨대 하나 이상의 초여과, 초원심분리(성분 초원심분리), 바이러스 중심 펠릿화 및 상청액 분획화, 크로마토그래피 (예컨대 이온 교환 크로마토그래피 예컨대 음이온 교환), 흡착, 등이 관여할 수 있다.
- <74> 전반적으로, 따라서, 방법에는 잔여 DNA의 길이를 분해하는 알킬화제로 처리 단계, 및 잔여 DNA의 제거를 위한 분리정제(분해된 DNA이 제거 포함) 단계가 관여될 수 있다.
- <75> *세포 배양*
- <76> 본 발명의 백신은 세포 배양물에서 증식된 바이러스에 의하여 제조된다. 이와 함께, 본 발명은 세포 배양물에서 발현된 재조합 단백질의 제형을 포함한다. 포유류 세포 배양물은 바이러스 복제 및 재조합 단백질 발현에 모두 바람직하다.
- <77> 다수의 포유류 세포주는 공지되어 있으며, 인간 또는 비인간 영장류(예컨대 원숭이) 세포(예컨대 PER.C6 세포, 예를 들어, WO 01/38362, WO 01/41814, WO 02/40665, WO 2004/056979, 및 WO 2005/080556에서 설명되었으며, 일체성을 가지고 본원에 참고자료로서 포함되어 있고, ECACC 수탁 번호 96022940로 기탁되어 있다), MRC-5(ATCC CCL-171), WI-38(ATCC CCL-75), HEK 세포, HeLa 세포, 태아 레서스 폐 세포(ATCC CL- 160), 인간 배아성 신장 세포 (293 세포, 일반적으로 전단된 아데노바이러스 타입 5 DNA에 의하여 형질전환됨), 베로(Vero) 세포(원숭이 신장), 말, 소(예컨대 MDBK 세포), 양, 개(예컨대 개 신장 MDCK 세포, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) 또는 MDCK 33016, 수탁 번호 DSM ACC 2219, WO 97/37000 및 WO 97/37001), 고양이, 및 설치류(예컨대 햄스터 세포, 예컨대 BHK21-F, HKCC 세포, 또는 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포)로부터 유도된 세포주를 포함하며, 예를 들어 성체, 유체, 태아 및 배아를 포함하는 다양한 발달 단계에서 획득할 수 있다.
- <78> 적합한 원숭이 세포는 예컨대 아프리카 그린 원숭이 세포로서, 예컨대 신장 세포는베로 세포주이다. 적합한 개 세포는 예컨대 신장 세포로서 MDCK 세포주이다. 따라서 적합한 세포주는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; 등. 포유류 세포의 용도는 예컨대 닭 DNA, 계란 단백질 (예컨대 난알부민 및 난점질), 등의 물질이 무재할 수 있는 것을 의미하며, 따라서 알러지 유발성을 감소시킨다.
- <79> 본 발명의 특정 실시상태에서, 세포는 무한증식 세포이다(예컨대 PER.C6 세포; ECACC 96022940). 본 발명의 바람직한 실시상태에서, 포유류 세포가 활용되며, 하나 이상의 다음의 무제한 세포 타입으로부터 선택 및/또는 유도된 것일 수 있다: 섬유모세포 세포(예컨대 피부, 폐), 내피 세포(예컨대 대동맥, 심장, 폐, 맥관, 피부 모세혈관, 제대), 간세포, 각질세포, 면역 세포(예컨대 T 세포, B 세포, 대식세포, NK, 수지상 세포), 유선 세포(예컨대 상피 세포), 평활근 세포(예컨대 맥관, 대동맥, 심장, 동맥, 자궁, 기관지, 자궁경부, 망막 주위 세포), 멜라닌세포, 신경 세포(예컨대 별아교세포), 전립선 세포(예컨대 상피, 평활근), 신세포 또는 신장 세포(예컨대 상피, 혈관세포간, 근위 세포관), 골격 세포(예컨대 연골 세포, 파골 세포, 골모세포), 근육 세포 (예컨대 근육모세포, 골격근, 활근, 기관지), 간세포, 망막세포 또는 망막모세포, 폐세포, 및 간질 세포.
- <80> WO97/37000 및 WO97/37001는 현탁액 및 무혈청 배지에서 성장할 수 있는 동물 세포 및 세포주의 생산을 설명하며, 바이러스, 특히 인플루엔자 바이러스의 생산 및 복제에 유용하다. 추가적인 상세는 WO03/023021 및 WO03/023025에 설명되어 있다.

- <81> 인플루엔자 바이러스 성장용 바람직한 포유류 세포주는 다음을 포함한다: MDCK 세포, 메디안 더비 카닌 신장으로부터 유도; 배로 세포, 아프리카 그린 원숭이 (세르코피테쿠스 아에티오프스(*Cercopithecus aethiops*)) 신장으로부터 유도; 또는 PER.C6 세포, 인간 배아성 망막모세포로부터 유도. 이러한 세포주는 예컨대 아메리칸 타입 셀 컬처(ATCC) 콜렉션, 코리엘 셀 레포지토리(Coriell Cell Repositories), 또는 유러피언 콜렉션 오브 셀 컬처(ECACC) 등으로부터 광범위하게 활용가능하다. 예를 들어, ATCC는 다양한 다른 배로 세포를 카탈로그 번호 CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 및 CRL-1587에서 공급하며, 이는 MDCK 세포를 카탈로그 번호 CCL-34에서 공급한다. PER.C6는 ECACC로부터 수탁 번호 96022940로서 활용가능하다.
- <82> 인플루엔자 바이러스 성장에 가장 바람직한 세포주는 MDCK 세포주이다. 원 MDCK 세포주는 ATCC에서 CCL-34로서 이용가능하나, 이 세포주의 유도체를 사용할 수도 있다. 예를 들면, WO97/37000는 현탁액 배양시 성장에 적응된 MDCK 세포주를 개시하였다('MDCK 33016', 수탁 번호 DSM ACC 2219). 이와 유사하게, EP-A-1260581 (WO 01/64846)는 현탁액의 무혈청 배양시 성장하는 MDCK-유도성 세포주를 개시하였다('B-702', 수탁 번호 FERM BP-7449). WO 2006/071563는 비-종양유발성 MDCK 세포로서, 'MDCK-S'(ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101'(ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102'(ATCC PTA-6502) 및 'MDCK-SF103'(PTA-6503)를 포함하는 세포를 개시하였다. WO 2005/113758는 'MDCK.5F1' 세포(ATCC CRL-12042)를 포함하는 감염에 대한 고 민감성 MDCK 세포주를 개시하였다. 모든 이러한 MDCK 세포주를 사용할 수 있다.
- <83> 현탁액 및 유착 배양시의 MDCK 세포 배양의 조작은 WO 97/37000, WO 97/37001, WO 03/023021, 및 WO 03/023025에서 설명되었다. 특히, WO 03/023021 및 WO 03/023025는 무혈청 배지, 화학적으로 정의된 배지, 및 무단백질 배지 내에서의 실험실적 및 상업적 규모의 세포 배양 부피의 MDCK 현탁액 세포를 설명한다. 각 참고자료는 일체성을 가지고 본원에 포함되었다.
- <84> 포유류 공급원에 대한 대안으로서, 본 발명에 사용되는 세포주는 조류 공급원 예컨대 닭, 오리, 거위, 메추라기 또는 꿩으로부터 유도될 수 있다. 조류 세포주는 성체, 유체, 및 배아를 포함하는 다양한 발달 단계에서 유도될 수 있다. 바람직하게는, 세포주는 배아 세포, 예컨대 배아 섬유모세포, 세균 세포, 또는 신경, 뇌, 망막, 신장, 간, 심장, 근육, 또는 배아의 조직 및 배아를 보호하는 막을 포함하는 개별 기관으로부터 유도될 수 있다. 조류 세포주의 예는 조류 배아 줄기 세포(WO 01/85938 및 WO 03/076601) 및 오리 망막 세포(WO 2005/042728)를 포함한다. 적합한 조류 배아 줄기 세포는 닭 배아 줄기 세포, EB45, EB14, 및 EB14-074로부터 유도된 EBx 세포주를 포함한다(WO 2006/108846). 닭 배아 섬유모세포(CEF)가 사용될 수 있다. 이러한 조류 세포는 특히 인플루엔자 바이러스 성장에 적합하다.
- <85> 곤충 세포 발현 시스템, 예컨대 바칼로바이러스 재조합 발현 시스템, 등은 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지되어 있으며, 예컨대, 문헌 Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)에 설명되어 있다.
- <86> 바칼로바이러스/곤충 세포 발현 시스템을 위한 재료 및 방법은 상업적으로 구득가능한 키트 형태로서, 특히, Invitrogen(San Diego CA)사 제품이다. 바칼로바이러스 발현 벡터를 사용하는 곤충 세포는 특히, 이집트 숲모기 (*Aedes aegypti*), 형광 누에(*Autographa californica*), 백강잠(*Bombyx mori*), 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*), 거염나방유충(*Spodoptera frugiperda*), 및 양배추은무늬밤나방(*Trichoplusia ni*) 이다.
- <87> 단백질의 재조합 발현은 박테리아 숙주 예컨대 에서리시아 콜리(*Escherichia coli*), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 스트렙토코커스 아중(*Streptococcus spp.*) 내에서 수행된다. 단백질의 재조합 발현에 적합한 효모 숙주는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 말토사(*Candida maltosa*), 한세눌라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*), 클루이베로마이세스 프라질리스(*Kluyveromyces fragilis*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 피치아 구일레리몬디(*Pichia guilliermondii*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 스킨조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 및 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*)를 포함한다.
- <88> 상기 세포 타입의 배양 조건은 다양한 문헌에 잘 소개되어 있으며, 또는 다른 배양 배지, 보충물 및 조건은 상업적으로 구득이 가능하다, 예를 들어, 카탈로그 및 추가 문헌인 Cambrex Bioproducts (East Rutherford, NJ) 에 설명되어 있다.
- <89> 본 발명의 특정 실시상태에서, 본원에서 설명한 방법에 사용되는 숙주 세포는 무혈청 및/또는 무단백질 배지 내에서 배양된다. 배지는 본원에서 무혈청 배지라는 의미로 사용되며, 인간 또는 동물 기원의 혈청에 첨가제를 부가하지 않은 것이다.

- <90> 무단백질은 세포를 조작하여 단백질, 성장 인자, 기타 단백질 첨가제 및 비혈청 단백질의 배제로 발생하며, 선택적으로 단백질 예컨대 바이러스 성장에 필수적인 트립신 또는 기타 단백질분해효소를 포함할 수 있는 배양을 의미한다. 이러한 배양액 내에서의 세포 성장에 의하여 자연적으로 자신들의 단백질을 보유하게 된다.
- <91> 공지의 무혈청 배지는 이스코브 배지, 초-CHO 배지(BioWhittaker) 또는 EX-CELL(JRH Bioscience)를 포함한다. 일반적인 혈청-함유 배지는 이글 바셀 배지(BME) 또는 최소 필수영양 배지(MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) 또는 돌베코 변형 이글 배지(DMEM 또는 EDM)를 포함하며, 10% 까지의 소 태아 혈청 또는 유사한 첨가제와 함께 사용되는 것이 일반적이다. 선택적으로, 최소 필수영양 배지 (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) 또는 돌베코 변형 이글 배지(DMEM 또는 EDM)는 어떠한 혈청 함유 보충물 없이 사용될 수 있다. 무단백질 배지 유사 PF-CHO (JHR Bioscience), 화학적으로 정의된 배지 유사 ProCHO 4CDM(BioWhittaker) 또는 SMIF 7(Gibco/BRL Life Technologies) 및 분열촉진 펩타이드 유사 프리막톤, 펩티카아제 또는 HyPep™(모두 Quest International) 또는 락탈부민 가수분해물(Gibco 및 기타 제조자)이 선행기술로서 알려져 있다. 식물 가수분해물을 기초로 한 배지 첨가제는 바이러스, 미코플라스마 또는 미지의 감염체에 의한 오염이 배제될 수 있다는 특별한 이점이 있다.
- <92> 세포 배양 조건(온도, 세포 밀도, pH 값, 등)은 본 발명에 따라 사용된 세포주의 민감성에 의하여 매우 광범위한 다양성을 갖게 되며, 특정 바이러스 성장 조건 또는 재조합 발현 상체에 대한 요구를 채택할 수 있다.
- <93> 세포는 다양한 방법, 예컨대 현탁액, 유착 배양, 미소담체 등에서 성장될 수 있다.
- <94> 세포는 바이러스 복제시 37℃(예컨대, 30-36℃) 이하에서 성장된다(WO 97/37001).
- <95> 배양된 세포내의 바이러스 증식 방법은 일반적으로 배양된 세포를 배양된 균주로 접종하는 단계, 예를 들어 바이러스 티터 또는 항원 발현에 의하여 측정하여 (예컨대 접종 후 24 내지 168 시간) 바이러스 증식을 위한 소망하는 시간 동안 감염된 세포를 수확하는 단계, 및 증식된 바이러스를 수거하는 단계를 포함한다. 배양된 세포는 바이러스(PFU 또는 TCID<sub>50</sub>로 측정)로, 세포비가 1:500 내지 1:1, 바람직하게는 1:100 내지 1:5, 더 바람직하게는 1:50 내지 1:10이 되도록 접종할 수 있다. 바이러스 세포의 현탁액에 첨가되거나 또는 세포의 단일층에 도포될 수 있으며, 바이러스는 세포에 최소한 60 분간 흡수되나 일반적으로 300 분 이하, 바람직하게는 90 내지 240 분으로, 25℃ 내지 40℃, 바람직하게는 28℃ 내지 37℃이다.
- <96> 감염된 세포 배양물(예컨대 단일층)은 냉동-해동법 또는 수확된 배양 상청액의 바이러스 함량을 증가시키는 효소 반응 등에 의하여 제거될 수 있다. 수확된 유체를 불활성 또는 냉동 저장한다. 배양된 세포는 감염다중도 ("m.o.i.")가 약 0.0001 내지 10, 바람직하게는 0.002 내지 5, 더 바람직하게는 0.001 내지 2로 감염될 수 있다. 더욱더 바람직하게는, 세포는 m.o.i가 약 0.01로 감염된다.
- <97> 감염된 세포는 감염 후 30 내지 60 시간 후 수확된다. 바람직하게는, 세포는 감염 후 34 내지 48 시간 후 수확된다. 더욱더 바람직하게는, 세포는 감염 후 38 내지 40 시간 후 수확된다. 단백질분해효소(일반적으로 트립신)는 일반적으로 세포 배양 중에 첨가되어 바이러스 방출이 되도록 하며, 단백질분해효소는 배양 중 모든 적합한 단계에서 첨가될 수 있다.
- <98> 본 발명의 백신 조성물은 일반적으로 서브-비리온 형태 예컨대 분할 바이러스 형태로 제형화되며, 여기서 바이러스 지질 외피는 용해되거나 또는 파괴되어 있으며, 또는 하나 이상의 정제된 바이러스 단백질의 형태이다. 백신 조성물은 충분한 양의 항원(들)을 함유하게 되어 환자 내에서 면역학적 반응을 생성하게 된다.
- <99> 바이러스, 예컨대 인플루엔자 바이러스의 분할 방법은 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대 WO 02/28422, WO 02/067983, WO 02/074336, WO 01/21151, 등을 참조한다. 바이러스의 분할은 감염성(야생형 또는 약독성) 또는 비감염성(예컨대 불활성) 모두, 분할제의 파괴 농도로 전체 바이러스의 파괴 또는 절편화에 의하여 수행된다. 분할제는 일반적으로 친수성 헤드에 부착된 소수성 테일을 보유한 지질막을 깨뜨리고, 용해시킬 수 있는 약제를 일반적으로 포함한다. 가장 바람직한 분할제는 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB)이다. 분할에 대한 추가적인 상세는 인플루엔자 바이러스에 대한 의미에서 주어지고 있다.
- <100> 파괴는 바이러스 통합성을 변경시키는 바이러스 단백질의 전부 또는 부분적 용해성을 나타내게 된다. 바람직한 분할제는 비이온성 및 이온성 (예컨대 양이온성) 계면활성제 예컨대 알킬글리코사이드, 알킬티오글리코사이드, 아실 당, 설포베타인, 베타인, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, N,N-디알킬-글루카마이드, 헤카메그(Hecameg), 알킬페녹시-에톡시에탄올, 4차 암모늄 화합물, 사르코실, CTAB(세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드), 트리-N-부틸 인산염, 세타브론, 미리스틸트리메틸암모늄염, 리포펙틴, 리포펙타민, 및 DOT-MA, 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥

시에탄올(예컨대, 트리톤 계면활성제, 예컨대 트리톤 X-100 또는 트리톤 N101), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(트윈 계면활성제), 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴리옥시에틸렌 에스테르, 등이다.

- <101> 바이러스의 개별 단백질의 정제 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 여과, 크로마토그래피, 원심분리 단계 및 증공사 용출법을 포함한다. 일 실시상태에서, 단백질은 이온 교환 수지에 의하여 정제된다.
- <102> 추가의 대안들로서, 백신은 전 바이러스 예컨대 약독화 생 바이러스 전체 또는, 바람직하게는, 불활성 전 바이러스를 포함할 수 있다. 포유류 세포를 감염시킬 수 있는 능력을 파괴하기 위한 바이러스의 불활성화 또는 사멸 방법이 기술 분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은 물리적 및 화학적 수단이 모두 포함된다. 바이러스를 불활성화시키기 위한 화학적 수단은 하나 이상의 다음의 제제의 유효량으로의 처리를 포함한다: 세척제, 포름알데히드, 포르말린, BPL, 또는 UV 광. 불활성화를 위한 추가적인 화학적 수단은 메틸렌 블루, 소랄렌, 카복시플러렌(C60) 또는 모든 이들의 조합으로의 처리를 포함한다. 바이러스 불활성화하는 다른 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 예컨대 예를 들어 바이너리 에틸아민, 아세틸 에틸렌이민, 또는 감마선 조사이다. 바람직하게는, 바이러스는 BPL에 불활성이다.
- <103> *약학적 조성물*
- <104> 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능하다. 이들은 일반적으로 항원과 함께 성분을 포함하며, 예컨대 이들은 일반적으로 하나 이상의 약학적 담체(들) 및/또는 부형제(들)를 포함한다. 이러한 성분에 대한 철저한 논의는 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; 20th edition, ISBN: 0683306472)에서 찾을 수 있다.
- <105> 조성물은 일반적으로 수성 형태이다.
- <106> 조성물은 하나 이상의 보존제, 예컨대 티오메살 또는 2-페녹시에탄올을 포함할 수 있다. 바람직한 것은, 그러나, 백신에 실질적으로 수은성 물질이 부재(즉 5 µg/ml 이하), 예컨대 무-티오메살이어야 한다(Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96; WO 02/097072). 수은을 함유하지 않은 백신이 더 바람직하다. 무-보존제 백신이 특히 바람직하다.
- <107> 생리학적 염을 포함하는 것이 바람직하다, 예컨대 등장성을 조절하기 위한 나트륨염이다. 염화 나트륨(NaCl)이 바람직하며, 1 내지 20 mg/ml 사이에 존재할 수 있다. 존재할 수 있는 기타 염은 염화 칼륨, 인산 2수소 칼륨, 디나트륨 인산염 디하이드레이트, 염화 마그네슘, 염화 칼슘, 등을 포함한다.
- <108> 조성물은 일반적으로 삼투압이 200 mOsm/kg 내지 400 mOsm/kg, 바람직하게는 240-360 mOsm/kg이며, 더 바람직하게는 290-310 mOsm/kg의 범위에 있다.
- <109> 조성물은 하나 이상의 완충제를 포함할 수 있다. 일반적인 완충제는: 인산염 완충제; 트리스 완충제; 붕산염 완충제; 숙신산염 완충제; 히스티딘 완충제(특히 수산화 알루미늄 항원보강제와 함께); 또는 시트르산 완충제를 포함한다. 완충제는 일반적으로 5-20 mM의 범위로 포함된다.
- <110> 조성물의 pH는 일반적으로 5.0 내지 8.1, 더 일반적으로 6.0 및 8.0 예컨대 6.5 내지 7.5이다. 본 발명의 방법은 따라서 포장 전에 충전 백신의 pH를 조절하는 단계를 포함한다.
- <111> 조성물은 무균상태인 것이 바람직하다. 조성물은 바람직하게는 비발열성, 예컨대 1 EU(내부독소 유닛, 표준 측정) 이하/복용량, 바람직하게는 0.1 EU 이하/복용량을 함유한다. 조성물은 바람직하게는 무 글루텐이다.
- <112> 본 발명의 조성물은 세척제 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제('트윈'으로 알려짐), 옥트옥시놀(예컨대 옥트옥시놀-9 (트리톤 X-100) 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올), 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드 ('CTAB'), 또는 나트륨 데옥시콜레이트를 포함할 수 있다. 세척제는 단지 소량으로 존재하게 된다.
- <113> 조성물은 단일 예방접종용 물질을 포함할 수도 있으며, 다중 예방접종용 물질을 포함할 수도 있다(즉 '다중복용' 키트). 보존제의 함유는 다중복용 준비에 유용하다. 다중복용 조성물 내의 보존제 함유의 대안(또는 이와 함께)으로서, 조성물은 물질 제거용 무균 어댑터를 보유한 용기에 함유될 수 있다.
- <114> 백신은 일반적으로 약 0.5 ml의 복용부피로 투여되며, 그 절반 투여량(즉 약 0.25 ml)가 어린이에게 투여될 수 있다.
- <115> 조성물 및 키트는 바람직하게는 2°C 내지 8°C로 저장된다. 이들이 동결되어서는 아니된다. 이들은 직사광선을 피하여 보관되는 것이 이상적이다.

- <116> 치료 방법, 및 백신의 투여
- <117> 본 발명의 조성물은 동물 (및, 특히, 인간) 환자에 투여되기에 적합하며, 본 발명은 환자에 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 환자의 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다.
- <118> 본 발명은 또한 의약으로서 사용되는 본 발명의 조성물 또는 키트를 제공한다.
- <119> 본 발명은 또한 환자의 면역 반응을 증진시키는 의약의 제조시, 세포 배양물에서 증식된 바이러스로부터 유도된 면역원성 단백질의 용도를 제공하며, 여기서 상기 백신은 실질적으로 잔여 기능성 세포 배양물 DNA가 부재한다.
- <120> 이러한 방법 및 용도에 의하여 증진된 면역 반응은 일반적으로 항체 반응, 바람직하게는 보호성 항체 반응을 포함한다. 항체 반응의 사정, 능력의 중화 및 바이러스 예방접종 후 보호 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 인플루엔자 바이러스에 대하여, 예를 들면, 인간 연구는 HA에 대한 항체 티터는 보호와 연관되어 있다는 것을 보여주었다(약 30-40의 혈청 시료 적혈구응집-억제 티터는 동종 바이러스에 의한 감염으로부터 약 50% 보호한다) [Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75].
- <121> 본 발명의 조성물은 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 가장 바람직한 예방접종 경로는 근육내 주입(예컨대 팔 또는 다리)에 의한 것이나, 다른 활용할 수 있는 경로에는 피하조직 주입, 비강내, 구강, 진피내, 경피성, 경피, 등을 포함한다.
- <122> 본 발명에 따라 제조된 백신은 성인 및 어린이 모두의 치료에 사용될 수 있다. 환자는 1 세 이하, 1 내지 5세, 5 내지 15세, 15 내지 55세, 또는 최소한 55 세일 수 있다. 환자는 고령(예컨대 50 세 이상, 60 세 이상, 및 바람직하게는 65 세 이상), 유아(예컨대 5 세 이하), 입원 환자, 영양중인 작업자, 군인 및 군사 요원, 임산부, 만성 환자, 면역결핍 환자, 백신 투여 전 7일 이내에 항바이러스 화합물 (예컨대 인플루엔자용 오셀타미비르 또는 자나미비르 화합물; 하기 참조)을 복용한 환자, 계란 알러지가 있는 사람 및 국외 여행중인 환자일 수 있다. 백신은 이러한 그룹에 단독으로 적합하지는 않다, 그러나, 일반적으로 집단적으로 사용될 수 있다.
- <123> 치료는 단일 투여 계획 또는 다중 투여 계획에 의할 수 있다. 다중 투여는 1차 예방접종 계획 및/또는 추가 예방접종 계획에 사용될 수 있다. 다중 투여 계획에 있어서, 다양한 복용량은 동일 또는 다른 경로 예컨대 1차 비경구 및 추가 점막, 1차 점막 및 추가 비경구, 등에 의하여 제공될 수 있다. 일 복용량 이상의 투여(일반적으로 2 복용량)은 특히 면역학적으로 미경험 환자에 유용하다. 다중 투여는 일반적으로 최소한 1 주 간격(예컨대 약 2 주, 약 3 주, 약 4 주, 약 6 주, 약 8 주, 약 10 주, 약 12 주, 약 16 주, 등.)으로 투여될 수 있다.
- <124> 본 발명에 의하여 생산되는 백신은 다른 백신과 실질적으로 동시(예컨대 동일한 의학적 자문 또는 의료 전문가 또는 예방접종 센터에 방문시에)에 환자에 투여될 수 있으며, 예컨대 박테리아 백신, 예컨대 디프테리아 백신, 파상풍 백신, 백일해 백신, DTP 백신, 컨주게이트된 H. 인플루엔자 타입 b 백신, 수막구균 컨주게이트 백신 (예컨대 4가 A-C-W135-Y 백신), 폐렴구균 컨주게이트 백신, 등과 실질적으로 동시에 투여될 수 있다.
- <125> 이와 유사하게, 본 발명의 백신은 백신의 바이러스에 대하여 효과적인 항바이러스 화합물과 실질적으로 동시(예컨대 동일한 의학적 자문 또는 의료 전문가 방문시에)에 투여될 수 있다. 백신이 인플루엔자 백신인 경우, 예를 들면, 화합물(들)은 뉴라미다아제 억제제(예컨대 오셀타미비르 및/또는 자나미비르)일 수 있다. 이러한 항바이러스는 (3R,4R,5S)-4-아세틸아미노-5-아미노-3(1-에틸프로폭시)-1-시클로헥센-1- 카르복시산 또는 5-(아세틸아미노)-4-[(아미노이미노메틸)-아미노]-2,6-안하이드로-3,4,5-트리테옥시-D-글리세로-D-갈락토논-2-에논산이며, 이들의 에스테르(예컨대 에틸 에스테르) 및 이들의 염(예컨대 인산염 염)을 포함한다. 인플루엔자에 대하여 효과적인 바람직한 항바이러스는 (3R,4R,5S)-4-아세틸아미노-5-아미노-3(1-에틸프로폭시)-1-시클로헥센-1-카르복시산, 에틸 에스테르, 인산염(1:1)이며, 이는 오셀타미비르 인산염(TAMIFLU™)으로 알려져 있다.
- <126> 숙주 세포 DNA
- <127> 잔기 숙주 세포 DNA의 측정은 당해 기술 분야의 숙련자의 능력의 범위에 있다. 본 발명의 조성물 내의 잔여 DNA의 총량은 바람직하게는 20 ng/ml 이하, 예컨대 10 ng/ml 이하, 5 ng/ml 이하, 1 ng/ml 이하, 100 pg/ml 이하, 10 pg/ml 이하, 등이다. 전술한 바와 같이, 실질적으로 모든 이 DNA는 길이가 500 bp 이하인 것이 바람직하다.
- <128> DNA 측정에 사용되는 측정법은 일반적으로 입증된 측정법이다(Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001; Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197). 입증된 측정법의 성능 특성은 수학적 및 정량적인 용어로 설명될 수 있으며, 이들의 에러(error)의 가능한 공급원은 이미 알려져 있다. 측정법은 일반적으로 예컨대

정확성, 정밀도, 특이성의 특성에 대하여 시험되었다. 측정이 비교되는 경우(예컨대 숙주 세포 DNA의 알려진 표준량과 비교) 및 시험되는 경우, 그 다음으로 정량적 DNA 측정을 통상적으로 수행할 수 있다. DNA 정량을 위한 3종의 기본 기법이 사용될 수 있다: 혼성화 방법, 예컨대 서던 블롯 또는 슬롯 블롯 (Ji et al. (2002) *Biotechniques*. 32:1162-7); 면역분석 방법, 예컨대 Threshold™ 시스템 (Briggs (1991) *J Parenter Sci Technol.* 45:7-12.; 및 정량적 PCR (Lahijani et al. (1998) *Hum Gene Ther.* 9:1173-80). 이러한 방법들은 당해 기술 분야의 숙련자에게 익숙한 것이나, 각 방법의 정확한 특성은 숙주 세포 예컨대 혼성화용 프로브의 선택, 증폭을 위한 프라이머 및/또는 프로브의 선택, 등의 문제에 달려있다. Molecular Devices사의 Threshold™ 시스템은 총 DNA의 피코그램 수준의 정량적 측정법이며, 생약학적 물질 내의 DNA 오염 수준을 모니터링하기 위하여 사용되어 왔다(Briggs (1991) 전제서). 일반적인 측정법은 바이오틴화 ssDNA 결합 단백질, 우레아제-퀵유게이트 항-ssDNA 항체, 및 DNA 간의 복합 반응의 비-서열-특이적 형성에 관련되어 있다. 모든 측정 성분은 제조자로부터 구입가능한 완전한 총 DNA 분석 키트 내에 포함되어 있다. 다양한 상업적 제조사들이 잔기 숙주 세포 DNA를 검출하기 위한 정량적 PCR 측정법을 제공한다. 예컨대 AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, 등. 인간 바이러스 백신의 숙주 세포 DNA 오염을 측정하기 위한 화학발광 혼성화 측정법 및 총 DNA Threshold™ 시스템의 비교는 문헌 Lokteff et al. (2001) *Biologicals*. 29:123-32에서 찾을 수 있다.

- <129> 이러한 다양한 분석법을 잔기 숙주 세포 DNA의 길이를 측정하기 위하여 사용할 수 있다. 전술한 바와 같이, 알킬화제 처리 후의, 잔기 숙주 세포 DNA의 평균 길이는 바람직하게는 500 bp 이하, 또는 200 bp 이하이다.
- <130> 특히, 건치 세포, 예컨대 MDCK 세포에 관하여 게놈 분석은 13 암호화 서열(500 bp 이하의 길이), 3 서열(200 bp 이하) 및 1 서열(100bp 이하)라는 것을 알려준다. 따라서 200bp 이하의 DNA 절편은 실질적으로 모든 암호화 서열을 제거하며, 어떠한 절편이 그러한 길이 부근의 3 유전자 중의 하나에 사실상 상응하는 것 같지는 않다(즉: 세크레틴 81 bp; PYY 108 bp; 및 오스테오칼신 135bp).
- <131> *항원보강제*
- <132> 본 발명의 조성물은 항원보강제를 포함할 수 있으며, 이들은 조성물 수용 환자 내에서 유발된 면역 반응(체액성 및/또는 세포성)을 증진시키는 기능을 한다. 바이러스 백신의 항원보강제의 용도는 예컨대 간염 백신, 소아마비 백신, 등에 잘 알려져 있다. FLUAD™ 인플루엔자 백신은 수중유 에멀전 항원보강제를 포함한다.
- <133> 본 발명에 사용될 수 있는 항원보강제는 알루미늄 염, 면역자극 올리고뉴클레오타이드, 사포닌, 지질 A 유사체(예컨대 3dMPL) 및 수중유 에멀전을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 및 다른 항원보강제는 문헌 Powell & Newman (*Vaccine Design: The Submit and Adjuvant Approach*, Plenum Press 1995, ISBN 0-306-44867-X) 및 O'Hagan (*Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series, ISBN: 1-59259-083-7)에 상세하게 개시되어 있다.
- <134> 수산화 알루미늄 및 알루미늄 인산염으로 알려진 항원보강제가 사용될 수 있다. 이러한 명칭은 통상적인 것이나, 편의를 위한 것일 뿐이며, 제공된 실제 화학적 화합물의 정확한 명세가 아니다 (예컨대 문헌 Powell & Newman의 9장을 참조). 본 발명은 일반적으로 항원보강제로 사용되는 모든 "수산화물" 또는 "인산염" 항원보강제를 사용할 수 있다. 이러한 염에 흡착이 바람직하다.
- <135> 항원보강제 활성을 지닌 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 잘 알려져 있다. 이들은 CpG 모티프(인산염 결합에 의하여 구아노신에 링크된 탈메틸화 사이토신을 함유하는 디뉴클레오타이드 서열), TpG 모티프, 올리고-dT 서열 올리고-dC 서열, 이중-가닥 RNA, 회문형 서열, 폴리(dG) 서열, 등을 함유할 수 있다. 면역자극 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 최소한 20 뉴클레오타이드를 포함하며, 100 뉴클레오타이드 이하를 포함할 수도 있다.
- <136> 사포닌(문헌 Powell & Newman의 22장)은 이종유래 그룹의 스테롤 글리코사이드 및 트리테르페노이드 글리코사이드로서 다양한 식물 종의 껍질, 잎, 줄기, 뿌리, 및 잎에서 발견된다. 장미과 퀴라야(*Quillaia saponaria Molina*) 나무 수피의 사포닌은 항원보강제로서 많이 연구되어왔다. 사포닌 항원보강제 제형은 정제된 제형, 예컨대 QS21, 및 지질 제형, 예컨대 ISCOMs를 포함한다. 사포닌 조성물은 HPLC 및 RP-HPLC를 사용하여 정제되어 왔으며, 이러한 기법을 사용한 특이적 정제 분획이 확인되어왔고, QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B 및 QH-C를 포함한다. 바람직하게는, 사포닌은 QS21이다. QS21의 생산 방법은 미국 특허 5057540에 설명되어 있다. 사포닌 제형은 스테롤, 예컨대 콜레스테롤을 포함할 수 있다(WO 96/33739). 사포닌 및 콜레스테롤의 조합은 면역자극 복합체(ISCOMs)라고 하는 독특한 입자를 형성하기 위하여 사용될 수 있으며, ISCOMs는 일반적으로 인지질을 포함할 수 있다.

- <137> 3dMPL (3-0-아실화 모노포스포릴 지질 A 또는 3-0-데사실-4'-모노포스포릴 지질 A)는 항원보강제로서, 모노포스포릴 지질 A 내의 환원 말단 글루코사민의 3 위치가 데-아실화되었다. 3dMPL는 살모넬라 미네소타 (*Salmonella minnesota*)의 무헵토스(heptoseless) 돌연변이로부터 제조되었으며, 지질 A와 화학적으로 유사하나, 산-불안정성 포스포릴기 및 염기-불안정성 아실기가 결핍되어 있다. 3dMPL는 이들의 아실화에 의하여 다양화된 관련 분자의 혼합물의 형태를 취할 수 있다(예컨대 3, 4, 5 또는 6 아실 사슬을 보유하며, 다른 길이가 될 수 있다).
- <138> 항원보강제 활성을 지닌 다양한 수중유 에멀전이 공지되었다. 이들은 일반적으로 최소한 하나의 오일 및 최소한 하나의 계면활성제가, 생분해성(대사가능성) 및 생체적합성 오일(들) 및 계면활성제(들)과 함께 포함된다. 에멀전 내의 오일 액적은 일반적으로 서브-마이크론 직경을 지니며, 이러한 작은 크기는 극소액체화기(microfluidiser)에 의하여 달성되어 안정한 에멀전을 제공하게 된다. 220nm 이하 크기의 액적이 평균 여과를 하기에 바람직하다.
- <139> 본 발명에 유용한 특이적 수중유 에멀전 항원보강제는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다:
- <140> ● 스쿠알렌, 트윈 80, 및 스팬 85의 서브마이크론 에멀전. 부피부 에멀전 조성물은 약 5% 스쿠알렌, 약 0.5% 폴리소르베이트 80 및 약 0.5% 스팬 85가 될 수 있다. 중량의 면에서, 이러한 비율은 4.3% 스쿠알렌, 0.5% 폴리소르베이트 80 및 0.48% 스팬 85이 된다. 이 항원보강제는 'MF59'로 알려져 있으며, 문헌 Powell & Newman의 10장 및 문헌 O'Hagan의 12장에 보다 상세하게 설명되어 있다. MF59 에멀전은 시트르산 이온, 예컨대 10mM 나트륨 시트르산 완충제를 포함하는 것이 유리하다.
- <141> ● 스쿠알렌, 토크페롤, 및 트윈 80의 에멀전. 이 에멀전은 인산염 완충제 식염수를 포함할 수 있다. 또한 이는 스팬 85 (예컨대 1%) 및/또는 레시틴을 포함할 수 있다. 이러한 에멀전은 2 내지 10% 스쿠알렌, 2 내지 10% 토크페롤 및 0.3 내지 3% 트윈 80을 포함할 수 있으며, 중량 비율로 스쿠알렌 토크페롤은 더 안정적인 에멀전을 제공하기 위하여 바람직하게는 1 이하이다. 스쿠알렌 및 트윈 80은 약 5:2의 부피비로 존재할 수 있다. 이러한 하나의 에멀전은 트윈 80을PBS에 용해시켜 2% 용액화하고, 그 다음 90 ml의 이 용액을 (5 g의 DL- $\alpha$ -토크페롤 및 5 ml의 스쿠알렌)의 혼합물과 혼합한 뒤, 혼합물을 극소액체화하여 제조할 수 있다. 결과 에멀전은 예컨대 100 내지 250 nm, 바람직하게는 약 180 nm의 평균 직경의 서브마이크론 오일 액적을 보유하게된다.
- <142> ● 스쿠알렌, 토크페롤, 및 트리톤 세척제(예컨대, 트리톤 X-100)의 세척제. 이 에멀전은 3d-MPL를 포함할 수 있다. 에멀전은 인산염 완충제를 포함할 수 있다.
- <143> ● 폴리소르베이트 (예컨대, 폴리소르베이트 80), 트리톤 세척제 (예컨대, 트리톤 X-100) 및 토크페롤 (예컨대,  $\alpha$ -토크페롤 숙신산염)을 포함하는 에멀전. 이 에멀전은 이러한 세 성분은 약 75:11:10 (예컨대 750  $\mu$ g/ml 폴리소르베이트 80, 110  $\mu$ g/ml 트리톤 X-100 및 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -토크페롤 숙신산염)의 질량비로 포함될 수 있으며, 이러한 농도는 항원의 이러한 성분의 모든 부담분을 포함하여야한다. 에멀전은 스쿠알렌을 포함할 수 있다. 에멀전은 또한 3d-MPL를 포함할 수 있다. 수성상은 인산염 완충제를 포함할 수 있다.
- <144> 인플루엔자 백신
- <145> 본 발명은 인플루엔자 바이러스 백신의 생산에 특히 적합하다. 다양한 형태의 인플루엔자 바이러스 백신은 현재 구입이 가능하며, 예컨대 문헌 Plotkin & Orenstein(Vaccines, 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0)의 17 및 18장을 참조한다. 이들은 일반적으로 생 바이러스 또는 불활성 바이러스를 기초로 한다. 불활성 백신은 전 비리온, '분할' 비리온, 또는 정제된 표면 항원(적혈구응집소 포함)을 기초로 한다. 인플루엔자 항원은 바이로솜(무핵산 바이러스-유사 리포솜 입자)의 형태로 제공될 수도 있다. 재조합 숙주에서 정제된 항원(예컨대 바클로바이러스 벡터를 사용하는 곤충 세포주 내에서)이 사용될 수도 있다.
- <146> 바이러스를 불활성화시키는 화학적 수단은 하나 이상의 다음의 제제의 유효량으로의 처리를 포함한다: 세척제, 포르말데히드,  $\beta$ -프로피오락톤, 메틸렌 블루, 소랄렌, 카복시플러렌(C60), 바이너리 에틸아민, 아세틸 에틸렌이민, 또는 이들의 조합. 바이러스 불활성화시키는 비-화학적 방법은 기술분야에 공지되어 있으며, 예컨대 예를 들어 UV 광 또는 감마선 조사이다.
- <147> 비리온은 다양한 방법에 의하여 바이러스-함유 유체로부터 수확될 수 있다. 예를 들어, 분리정제 과정에서는 세척제를 포함한 선행 설탕 성분 용액을 사용한 구역 원심분리를 사용하여 비리온을 파괴시킬 수 있다. 항원은 그 뒤 여과작용에 의하여 선택적 회석 후 정제된다.
- <148> 분할 비리온은 정제된 비리온을 세척제 (예컨대 에틸 에테르, 폴리소르베이트 80, 테옥시콜레이트, 트리-N-부틸

인산염, 트리톤 X-100, 트리톤 N101, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드, 등.)로 처리하여 서브비리온 제조함으로써 획득할 수 있으며, '트윈-에테르' 분할 과정을 포함한다. 인플루엔자 바이러스의 분할 방법은 예컨대 WO 02/28422, WO 02/067983, WO 02/074336, WO 01/21151, WO 02/097072, WO 2005/113756 등에서 알려져 있다. 바이러스의 분할은 일반적으로 분할제의 파괴 농도로 감염성 또는 비-감염성 전 바이러스를 파괴 또는 절편화시킴으로써 수행된다. 파괴에 의하여 바이러스의 통합성을 변형시키는, 바이러스 단백질의 전체 또는 일부 용해화가 된다. 바람직한 분할제는 비이온성 및 이온성 (예컨대 양이온성) 계면활성제 예컨대, 알킬글리코사이드, 알킬티오글리코사이드, 아실 당, 설포베타인, 베타인, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, N,N-디알킬-글루카마이드, 헤카메그 (Hecameg), 알킬페녹시-에톡시에탄올, 4차 암모늄 화합물, 사르코실, CTABs(세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드), 트리-N-부틸 인산염, 세타브론, 미리스틸트리메틸암모늄 염, 리포펙틴, 리포펙타민, 및 DOT-MA, 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올 (예컨대 트리톤 계면활성제, 예컨대 트리톤 X-100 또는 트리톤 N101), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(트윈 계면활성제), 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴리옥시에틸렌 에스테르, 등이다. 유용한 하나의 분할 과정은 나트륨 데옥시콜레이트 및 포름알데히드의 연속 효과를 사용하며, 분할은 초기 비리온 분리정제시 발생할 수 있다(예컨대, 설탕 밀도 성분 용액 내에서). 따라서 분할 과정은 비리온-함유 물질의 정화(비-비리온 물질을 제거하기 위함), 수확된 비리온의 농도(예컨대, 흡착 방법, 예컨대 CaHPO<sub>4</sub> 흡착을 사용), 비-비리온 물질로부터 전 비리온의 분리, 밀도 성분 원심분리 단계에서 분할제를 사용하는 비리온 분할(분할제 예컨대, 나트륨 데옥시콜레이트를 함유한 설탕 성분을 사용), 및 원치않는 물질을 제거하기 위한 후속적인 여과(예컨대 초여과)가 관여될 수 있다. 분할 비리온은 나트륨 인산염-완충 등장성 염화 나트륨 용액에 유용하게 재현탁될 수 있다.

- <149> 정제된 표면 항원 백신은 인플루엔자 표면 항원 적혈구응집소 및, 일반적으로, 또는 뉴라미다아제를 포함한다. 정제된 형태 내의 이러한 단백질 제조 과정은 당해 기술 분야에 공지되어 있다.
- <150> 백신에 사용되는 인플루엔자 바이러스 균주는 계절별로 변화될 수 있다. 현재의 대유행기간 사이에서, 백신은 일반적으로 두 인플루엔자 A 균주(H1N1 및 H3N2) 및 하나의 인플루엔자 B 균주를 포함하며, 및 3가 백신이 일반적이다. 본 발명은 유행성 균주(즉, 백신 수용자 및 일반 인간 개체군이 면역학적으로 미경험인 균주)의 HA, 예컨대 H2, H5, H7 또는 H9 서브타입 균주(특히 인플루엔자 A 바이러스의 균주)를 사용할 수도 있으며, 유행성 균주용 인플루엔자 백신은 1가가 되거나 또는 유행성 균주에 의하여 보충된 정상 3가 백신에 기초할 수 있다. 그러나, 계절 및 백신에 포함된 항원의 특성에 따라, 본 발명은 하나 이상의 인플루엔자 A 바이러스 적혈구응집소 서브타입 H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 또는 H16에 대하여 보호될 수 있다.
- <151> 유행가 사이의 균주에 대한 접종에 적합할 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 유행성 균주에 대한 접종에 특히 유용하다. 유행성 발병을 유발할 수 있는 능력을 부여하는 인플루엔자 균주의 특성은: (a) 이는 현재-순환되는 인간 균주 내의 적혈구응집소에 비하여 신규의 적혈구응집소를 함유하며, 즉, 10년 이상 인간 개체군에게 명백하지 않거나(예컨대 H2), 또는 이전에 인간 개체군에서 발견되지 않은 것(예컨대 H5, H6 또는 H9, 일반적으로 조류 개체군에서만 발견)으로서, 인간 개체군이 균주의 적혈구응집소에 면역학적으로 미경험인 것; (b) 인간 개체군에 수평적으로 감염될 수 있는 것; 및 (c) 인간에 병원성인 것. H5 적혈구응집소 타입을 보유한 바이러스는 유행성 인플루엔자, 예컨대 H5N1 균주에 대한 면역접종에 바람직하다. 그 밖의 가능한 균주는 H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 및 H7N7, 및 기타 발생하는 잠재적인 유행성 균주를 포함한다. H5 서브타입 내에서, 바이러스는 HA 클레이드 1, HA 클레이드 1', HA 클레이드 2 또는 HA 클레이드 3 (World Health Organization (2005) Emerging Infectious Diseases 11(10): 1515-21.)에 해당될 수 있으며, 클레이드 1 및 3는 특히 관련되어 있다. 조성물 내에 유용하게 포함될 수 있는 항원의 그 밖의 균주는 저항성 유행성 균주를 포함하는 항바이러스 요법에 내성(예컨대 오셀타미비르 및/또는 자나미비르에 내성)인 균주이다.
- <152> 본 발명의 조성물은 인플루엔자 A 바이러스 및/또는 인플루엔자 B 바이러스를 포함하는, 하나 이상의(예컨대 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의) 인플루엔자 바이러스 균주의 항원(들)을 포함할 수 있다. 3가 백신은 두 종의 인플루엔자 A 바이러스 균주 및 하나의 인플루엔자 B 바이러스 균주의 항원을 포함하는 것이 바람직하다.
- <153> 인플루엔자 바이러스는 재배열(재분류) 균주가 될 수 있으며, 역 유전자 기법에 의하여 획득할 수 있다. 따라서, 인플루엔자 A 바이러스는 A/PR/8/34 바이러스의 하나 이상의 RNA 부분(일반적으로 백신 균주의 HA 및 N 부분을 보유한 A/PR/8/34의 6 부분, 즉 6:2 재분류)을 포함할 수 있다. 이는 A/WSN/33 바이러스, 또는 백신 제조를 위하여 재분류 바이러스를 생산하기에 유용한 다른 바이러스 균주의 하나 이상의 RNA 부분을 포함할 수 있다. 일반적으로, 본 발명은 인간-대-인간 감염이 가능한 균주에 대하여 보호하며, 따라서 균주의 계능은 일반적

으로 포유류 (예컨대 인간) 인플루엔자 바이러스에서 유래한 최소한 하나의 RNA 부분을 포함하게 된다. 이는 조류 인플루엔자 바이러스에서 유래한 NS 부분을 포함할 수도 있다.

<154> HA는 현재의 불활성 인플루엔자 백신 내의 주 면역원이며, 백신 투여량은 일반적으로 SRID에 의하여 측정된 HA 수준으로 표준화되었다. 현존하는 백신은 일반적으로 약 15 µg의 HA를 균주당 함유하나, 예컨대 아동용으로, 또는 유행성인 경우, 또는 항원보강제를 사용하는 경우에는 적은 투여량으로 사용될 수도 있다. 분할 투여량 예컨대 1/2 (즉, 7.5 µg HA/ 균주), 1/4 및 1/8가 고복용량(예컨대 3x 또는 9x 투여량)으로 사용될 수 있다. 따라서 백신은 0.1 내지 150 µg의 HA/인플루엔자 균주, 바람직하게는 0.1 내지 50 µg, 예컨대 0.1-20 µg, 0.1-15 µg, 0.1-10 µg, 0.1-7.5 µg, 0.5-5 µg, 등을 포함할 수 있다. 특정 투여량은 예컨대 균주 당 약 15, 약 10, 약 7.5, 약 5, 약 3.8, 약 1.9, 약 1.5, 등을 포함한다.

<155> 생백신의 경우, 투여량은 HA 함량보다는 정중 조직 배양 감염성 투여량(TCID<sub>50</sub>)에 의하여 측정되며, TCID<sub>50</sub>가 균주당 10<sup>6</sup> 내지 10<sup>8</sup> (바람직하게는 10<sup>6.5</sup>-10<sup>7.5</sup>)인 것이 일반적이다.

<156> 본 발명에 사용되는 HA는 바이러스에서 발견되는 천연 HA일 수 있으며, 또는 변형될 수 있다. 예를 들면, HA는 결정기(예컨대, HA1 및 HA2의 분할 부위 부근의 과염기성 영역)를 제거하여 바이러스가 조류 종에서 고병원성이 되도록 변형된다고 알려져 있다.

<157> 비리온-함유 조성물로 처리하여 숙주 세포 DNA(예컨대 BPL을 보유)를 분해한 후, 분해 산물은 예컨대 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 비리온으로부터 제거되는 것이 바람직하다.

<158> 인플루엔자 바이러스가 특정 균주에 대하여 정제된 경우, 진술한 바와 같이 다른 균주로부터 바이러스와 결합하여 3가 백신을 제조할 수 있다. 각 균주를 별도로 처리하는 것이 바람직하며, 바이러스 혼합 및 다가 혼합물로부터 DNA 분해보다는 충전물을 혼합하며 최종 다가 혼합물을 제공하는 것이 바람직하다.

<159> 일반

<160> 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함(including)" 및 "구성(consisting)"을 포괄하며 예컨대 X를 "포함하는" 조성물 배타적으로 X로 구성되거나 또는 추가적인 무엇인가를 포함할 수 있으며, 예컨대 X + Y 이다.

<161> 단어 "실질적으로(substantially)"는 "완전히(completely)"를 배제하지 않는다. 예컨대 Y가 "실질적으로 부재하는" 조성물은 Y가 완전히 부재할 수도 있다. 필요한 경우, 단어 "실질적으로"는 본 발명의 정의에서 생략될 수 있다.

<162> 용어 "약"은 수치 X에 관하여, 예를 들어, x+10%를 의미한다.

<163> 용어로서 "분리된" 및 "정제된"은 최소한 50% 순수, 더 바람직하게는 60% 순수(대부분의 분할 백신), 더 바람직하게는 70% 순수, 또는 80% 순수, 또는 90% 순수, 또는 95% 순수, 또는 99% 이상 순수를 의미한다.

<164> 특별한 언급이 없다면, 이 이상의 성분이 혼합되는 단계를 포함하는 과정은 특이적 혼합 순서를 요하는 것이 아니다. 따라서 성분들은 어떠한 순서로 혼합될 수도 있다. 세 성분이 존재하는 경우, 두성분이 서로 결합될 수 있고, 그 후 제3 성분 등과 결합하여 조합될 수 있다.

<165> 동물(및 특히 소) 물질이 세포 배양에 사용되는 경우, 감염성 해면상뇌증(TSE), 및 특히 소 해면상뇌증(BSE)이 없는 공급원으로부터 획득하여야한다. 전반적으로, 동물-유도성 물질이 전부 부재한 배양 세포가 바람직하다.

<166> 화합물이 조성물의 일부로서 신체에 투여되는 경우, 이후 화합물이 적합한 전구약물에 의하여 대체될 수 있다.

<167> 세포 기질이 재배열 또는 역 유전학 절차에 사용되는 경우, 인간 백신 생산에 승인된 것이 바람직하며, 예컨대 Ph Eur general chapter 5.2.3이다.

### 실시예

<172> WO 97/37000, WO 03/23025 및 WO 04/92360의 설명에 따라 인플루엔자 바이러스 (A/NewCaledonia/20/99(H1N1), A/Panama/2007/99(H3N2); B/Jiangsu/10/2003; A/Wyoming/3/2003(H3N2))를 현탁액 배양으로 MDCK 세포 내에서 성장시켰다. 최종 배양 배지를 정화시켜 비리온을 제공하였으며, 그 다음에 이를 크로마토그래피 및 초여과/여과를 가하였다. 결과 물질 내의 비리온을 β-프로피오락톤을 사용하여 불활성화시켰다(최종 농도 0.05% v/v; 16-20 시간 동안 2-8°C로 배양 후, 37°C로 2-2.5 시간 동안 배양하여 가수분해). 그 다음 CTAB를 사용하여 비리온을 분할하고, 다양한 추가 처리 단계를 가하여 정제된 표면 단백질을 함유한 최종 1가 충전 백신을 얻었다.

<173> MDCK DNA는 제조 과정의 3 단계에서 양, 크기 및 통합성을 평가하여 특성화되었다: (A) 초여과/여과작용 단계 이후; (B) β-프로피오락톤 처리 이후; 및 (C) 최종 1가 충전물. 모세관 겔 전기영동 및 핵산 증폭을 사용하여 모든 잔기 게놈 DNA의 크기, 통합성 및 생물학적 활성을 조사하였다.

<174> 크기 측정

<175> 전술한 바와 같이, 잔기 숙주 세포 DNA의 크기를 (A), (B) 및 (C) 단계에서 모세관 겔 전기영동으로 분석하였다. 분석은 5 개의 별도의 바이러스 배양물에서 수행하였다.

<176> 500 ml 시료를 이 세 시점에서 제거하여, 56°C에서 16 내지 22 시간 동안 10 ml의 단백질분해효소 K로 처리하였으며, 그 다음 제조사 설명서에 따라 DNA 추출 키트(Wako Chemicals)로 총 DNA 추출을 하였다. DNA를 P/ACE MDQ 분자 특성화 시스템 (Beckman Coulter)으로 20°C의 일정 온도로 전기영동하기 위하여 500 ml의 초순수에 재현탁시켰다. 72 내지 1353 bp의 11 분자 크기 마커를 사용하였다. 이 방법의 핵산 검출 한계(DL)는 0.7 pg/ml이다.

<177> DNA 밴드의 크기 마커 및 상대적 밀도를 기초로 하여, DNA 절편의 분포 및 크기로 측정되었으며, 200 bp 이하 내지 1000 bp 이상의 범위의 4 종의 다른 크기의 범주로 지정되었다. 도 6은 (C) 시료 단계의 모세관 전기영동을 나타낸다. 분석은 이 시료 내의 모든 검출가능한 잔여 DNA는 길이가 실질적으로 200 bp 이하라는 사실을 나타낸다

<178> 5개의 배양물의 결과 평균을 다음의 표에 나타내었다:

단 계	DNA 양	200bp 이하	200-500 bp	500-1000 bp	1000 bp 이상
A	47mg	25%	12%	6%	55%
B	5mg	79%	18%	3%	4%
C	0.07mg	99% 이상	DL 이하	DL 이하	DL 이하

<180> 따라서 BPL 처리에 의하여 DNA 양이 10-배 감소하였으며, 긴 서열부터 200 bp이하의 작은 절편까지 분포를 이동시켰다. 크로마토그래피 및 초여과 단계를 포함하는 단계 (B) 및 (C)에서의 추가 처리는 총 DNA 수준을 또다시 70 배까지 감소시켰으며, 200 bp 이상의 모든 검출가능한 DNA를 제거하였다.

<181> DNA 증폭

<182> 신생물 세포 형질전환은 변형된 원종양유전자 및/또는 변형된 종양 억제 유전자와 빈번하게 관련된 현상이다. 이러한 견치 유전자 다수의 서열을 BPL 처리, 즉 (A) 및 (B) 시점의 전 및 후에 PCR에 의하여 분석하였다. 이와 함께, 미감염된 MDCK 세포의 DNA에 처리하고 시험하였다. 시험된 원종양유전자는: H-ras 및 c-myc이다. 시험된 종양 억제 유전자는: p53; p21/waf-1; 및 PTEN이다. 이와 함께, 반복 SINE 서열을 PCR로 분석하였다. SINE의 많은 복제수에 의하여 민감성 검출이 촉진되었다.

<183> 모든 시료를 시험 제조 및 PCR의 질을 모니터링하기 위한 외부 대조구 DNA(pUC19 절편)로 처리(spike)하였다. 모든 실험에 있어서 처리 대조구의 일정한 증폭을 관찰하였으며, PCR 혼합물 내에 존재하는 잔여 가수분해 BPL 및 부산물이 분석상에서 억제 효과를 가지지 못한다는 사실 및 시료 생산 및 PCR의 충분한 질을 확보하였다는 것을 확인하였다. PCR 산물이 검출되지 않을 때까지, 시료를 증폭 전에 10 배 희석하였으며, 따라서 DNA 수증의 로그적 감소를 확인하였다. PCR 분석의 검출 한계는 55 pg이다.

<184> PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동에 의하여 분석되었다. 도 1은 미감염된 MDCK 세포에서 획득한 결과를 나타내며, 도 2는 바이러스 배양시 획득한 결과이다. 모든 6 개의 분석된 유전자는 BPL 처리 전 강한 증폭 신호를 나타내었으나, BPL에 노출 후에는 신호 강도가 감소하였다. 시험된 모든 생산 부분에서, 잔기 MDCK 게놈 DNA는 BPL 노출 후 최소한 2 로그값이 감소하였다.

<185> 도 2가 (B) 단계의 결과를 나타내기 때문에, 추가의 분리정제 전, 결과물인 과다-제공된 DNA가 최종 충전 백신에 존재하게 된다. 그러나, SINE 서열을 사용하는 경우 민감성에 기인하여, PCR은 최종 1가 충전물의 (C) 단계에서도 가능하다. 이 분석의 결과를 도 3에 나타내었다. (A) 및 (B)에서의 DNA 증폭은 SINE 영역에 대하여 상대적으로 유사하며, BPL이 작은 DNA 서열에 대하여 덜 활성화된다는 사실을 확인하였다. 이러한 작은 서열에 대하여도, 그러나, 모든 분석 시료에서 주목할만한 증폭 신호의 감소가 존재하였다. 시료 집결점 (B) 및 (C) 간의 PCR 신호 강도 비교는 중간 분리정제 단계에 기인한 잔여 DNA의 감소를 반영한다.

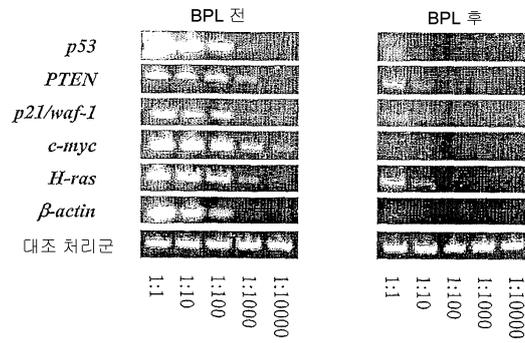
- <186> 유전자 기초 분석에 의한 외삽법 및 SINE-기초 분석에 직접적으로 기초하여, 최종 백신에서 총 DNA 수준이 투여 당 1 ng 이하, 및 때로는 투여당 100 pg 이하일 것이 기대된다.
- <187> 온도
- <188> 바이러스 불활성화시 BPL 처리는 두 개의 독립 단계를 가진다: (1) BPL을 비리온-함유 혼합물에 2-8℃에서 혼합하는 단계; 그 다음 (2) 온도를 37℃로 상승시켜 BPL을 가수분해하는 단계. MDCK DNA 불활성화 및 절편화에 대한 두 BPL 단계의 효과를 조사하였다.
- <189> 미감염된 MDCK 세포의 정제된 게놈 DNA는 최종 농도 0.05%(v/v)의 BPL로 2-8℃에서 16 시간 동안, 또는 37℃ 또는 50℃에서 6.5 시간까지 처리하였다. DNA의 절편화를 이후 점검하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 이러한 실험에서 세포성 DNA에 대한 BPL의 활성을 확인하였으나, 바이러스 성장 후 미감염된 세포는 MDCK의 상태를 반영하지 못하였으며, 이는 세포성 DNA가 세포자멸사에 기인하여 이미 고도로 절편화되었기 때문이다.
- <190> 2-8℃에서, 아가로스 겔 상에서의 미처리 및 처리된 DNA 간의 차이는 무시해도 좋으며, 이는 BPL에 의한 DNA의 분절화가 이러한 조건 하에서 실질적으로 발생하지 않는다는 것을 의미한다. 이와 대조적으로, DNA는 가속화된 반응 역학을 유도하는 고온에 의하여 37℃ 및 50℃ 모두에서 크게 변형되었다. 미처리 세포의 DNA는 아가로스 겔 상에서 분해 산물의 얼룩을 지닌, 상대적으로 선명한 밴드를 나타낸다(도 5, 선 3). 37℃의 단기 BPL 배양 후, 그러나, MDCK DNA는 겔 슬롯에서 희미해지고, 신호 강도도 감소되었다(도 5, 선 2). 장기 배양기간에 의하여 대형 게놈 DNA 분자는 소멸하였으며, MDCK DNA의 절편화가 증진되었다.
- <191> 추가 실험에 의하여, BPL을 1차적으로 세포와 함께 4℃에서 16 시간 동안 배양하였다. 제1 집단에서, 온도를 37℃로 2 시간 동안 상승시켰으며; 제2 집단에서는, BPL을 원심분리 여과에 의하여 제거하고, 그 다음 온도를 증가시켰다. 더욱 낮은(2 로그 이상 낮은) 잔여 DNA 수준이 제1 집단에서 관찰되었다.
- <192> 따라서 BPL 처리시 관찰되는 DNA 절편화는 2-8℃에서의 바이러스 불활성화 단계보다는 37℃의 BPL 가수분해 단계에서 주로 발생하는 것 같다.
- <193> 본 발명을 실시예에 의하여 설명하였지만, 본 발명의 범위 및 사상을 벗어나지 않는 범위에서 본 발명이 변형될 수 있다는 사실을 이해하여야 한다.

**도면의 간단한 설명**

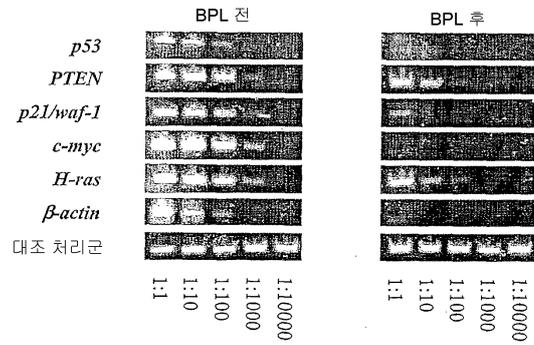
- <168> 도 1 및 2는 MDCK 게놈 내의 6 개의 명명된 표적의 PCR 증폭 결과를 나타낸다. 일부 시료는 적시한 바와 같이, PCR 전에 1:10000 까지 희석되었다.
- <169> 도 3은 MDCK 게놈 내의 SINE 서열 PCR 증폭의 결과를 나타낸다. 도 1 및 2에서 나타낸 바와 같이, DNA는 PCR 전에 희석되기도 하였다. 하부패널에서, 도는 PCR(fg)에서의 DNA 개시량이다.
- <170> 도 4는 MDCK DNA 크기에 대한 BPL 처리 효과를 나타낸다. 게놈 DNA는 BPL과 함께 다른 온도 및 다른 시간 동안 배양된다. 도 5는 유사한 결과를 나타낸다. 아가로스 겔은 SYBRGoId로 염색되었다.
- <171> 도 6은 인식되는 크기를 보유한 마커(하단)에 대한 잔여 DNA (상단)의 모세관 전기영동을 나타낸다.

도면

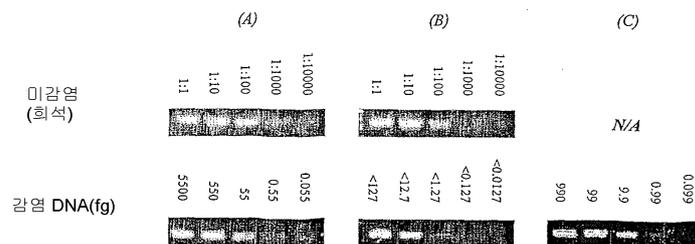
도면1



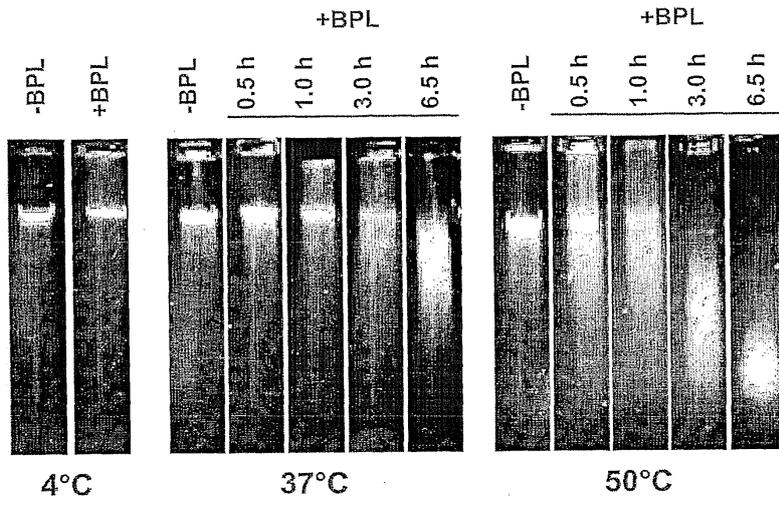
도면2



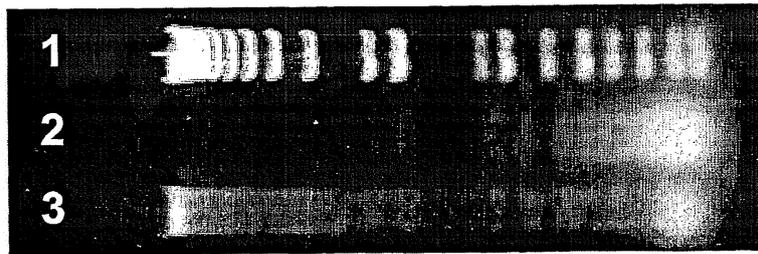
도면3



도면4



도면5



도면6

