



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월13일

(11) 등록번호 10-2144602

(24) 등록일자 2020년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/36 (2017.01) A61K 39/00 (2006.01)
 A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/08 (2006.01)
 A61K 39/112 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
 A61K 39/39 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)
 A61K 39/0275 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7013782

(22) 출원일자(국제) 2013년10월29일

심사청구일자 2018년10월23일

(85) 번역문제출일자 2015년05월26일

(65) 공개번호 10-2015-0076239

(43) 공개일자 2015년07월06일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/067212

(87) 국제공개번호 WO 2014/070709

국제공개일자 2014년05월08일

(30) 우선권주장

61/719,713 2012년10월29일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US05747475 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 보드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 아칸소

미국 72207 아칸소주 리틀 락 노쓰 유니버시티 애비뉴 2404

(72) 발명자

하기스, 빌리, 엠.

미국 72703 아칸소주 파에트빌 오크랜드 지온 로드 3229

폼포드, 네일, 알.

미국 72712 아칸소주 벤톤빌 오자크 아크레스 드라이브 3196

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 27 항

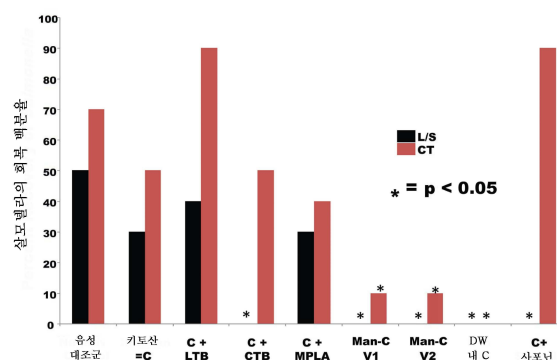
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 새로운 점막 보조제 및 전달 시스템

(57) 요약

알데히드로 가교된 키토산 또는 만노실화 키토산을 포함하는 보조제가 본원에 제공된다. 보조제를 만드는 방법 및 보조제를 항원과 결합하거나 연결하는 방법이 또한 제공된다. 보조제-항원 조합은 백신 제형에서 사용될 수 있고 백신 제형은 항원의 공급원으로부터 동물을 백신 접종 맞히거나 또는 대상체 내 면역 반응을 강화시키는 방법에 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/08 (2013.01)
A61K 39/099 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
C08B 37/003 (2013.01)
A61K 2039/523 (2013.01)
A61K 2039/552 (2013.01)
A61K 2039/6087 (2013.01)
C12N 2760/16134 (2013.01)

(72) 발명자

모건, 매리언

미국 72762 아칸소주 스프링데일 클레이턴 스트리트 1500

쉬바라마이아, 스리카이타나

인도 카르나타카주 560102 방갈로르 7 지구 에이치
에스알 레이아웃 23 크로스 12 메인 #515

텔레즈, 기예르모

미국 72703 아칸소주 파예트빌 하디 레인 2744

울펜덴, 아만다

미국 72751 아칸소주 피 리지 생 클레어 스트리트
1582

명세서

청구범위

청구항 1

시프(Schiff) 염기를 형성하도록 키토산에 결합된 탄수화물을 포함하며, 여기서 탄수화물은 개환 만노스인, 백신을 위한 보조제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 시프 염기가 환원되지 않는 것인 보조제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 시프 염기가 환원된 것인 보조제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 점막 투여를 위해 제형화된 보조제 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 강화 분자를 더 포함하고, 강화 분자가 파상풍 독소이드, 콜레라 독소 B 소단위, 이열성(heat-labile) 엔테로톡신 B 소단위, 또는 트리폴리포스페이트인 보조제 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 보조제 조성물 및 항원을 포함하는 백신 제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 항원이 단백질인 백신 제제.

청구항 8

제6항에 있어서, 항원이 미생물을 포함하는 것인 백신 제제.

청구항 9

제8항에 있어서, 미생물이 살모넬라(*Salmonella*), 에세리키아(*Escherichia*), 쉬겔라(*Shigella*), 보르데텔라(*Bordetella*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 마이코플라스마(*Mycoplasma*), 포도상구균(*Staphylococcus*), 연쇄상구균(*Streptococcus*), 바실루스(*Bacillus*), 인플루엔자(*Influenza*) 또는 아이메리아(*Eimeria*)인 백신 제제.

청구항 10

제8항에 있어서, 미생물이 불활성화된 또는 사멸된 것인 백신 제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 미생물이 포름알데히드, 글루타르알데히드 또는 포르말린을 사용하여 사멸된 것인 백신 제제.

청구항 12

항원에 대한 비-인간 대상체의 면역 반응을 강화하기에 효과적인 양으로 비-인간 대상체에게 제6항의 백신 제제를 투여하는 것을 포함하는, 항원에 대한 비-인간 대상체의 면역 반응을 강화시키는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 면역 반응이, 보조제 없이 백신을 투여하는 것과 비교하여 강화된 항체 반응을 포함하는 것인

방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 강화된 항체 반응이, 보조제 없이 항원을 투여하는 것과 비교하여 강화된 분비형 IgA 항체 반응인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 대상체가 비-인간 포유류 또는 가금류인 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 투여 경로가 피하, 점막 또는 경구인 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 백신 제제가 음식 또는 식수 내에 투여되는 것인 방법.

청구항 18

제12항에 있어서, 항원이 미생물을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 미생물이 불활성화된 또는 사멸된 것인 방법.

청구항 20

제6항에 있어서, 항원에 대한 대상체의 면역 반응을 강화하기 위한 백신 제제.

청구항 21

제20항에 있어서, 면역 반응이, 보조제 없이 백신을 투여하는 것과 비교하여 강화된 항체 반응을 포함하는 것인 백신 제제.

청구항 22

제21항에 있어서, 강화된 항체 반응이, 보조제 없이 항원을 투여하는 것과 비교하여 강화된 분비형 IgA 항체 반응인 백신 제제.

청구항 23

제20항에 있어서, 대상체가 포유류 또는 가금류인 백신 제제.

청구항 24

제20항에 있어서, 피하, 점막 또는 경구 투여되는 백신 제제.

청구항 25

제20항에 있어서, 음식 또는 식수 내에 투여되는 백신 제제.

청구항 26

제20항에 있어서, 항원이 미생물을 포함하는 것인 백신 제제.

청구항 27

제26항에 있어서, 미생물이 불활성화된 또는 사멸된 것인 백신 제제.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] <연관 기술의 상호-참조>

[0002] 이 특허출원은 2012년 10월 29일 출원된 미국 가 특허출원 제61/719,713호의 우선권을 주장하고, 그 전체가 참조문헌으로써 본원에 포함된다.

배경 기술

[0003] 보조제는, 약 또는 백신과 같은, 다른 약제의 효과를 변경하는 약학의 또는 면역학의 약제이다. 보조제는 주입된 이물질을 최소한으로 하면서, 제공된 항원에 대한 수용체의 면역 반응을 강화하도록 흔히 백신에 포함된다.

[0004] 보조제는 그 자체로 면역력을 부여하지 않는다. 보조제는 면역 시스템에 항원을 도입하는데 있어서 다양한 방식으로 작용할 수 있다. 보조제는 항원의 창고로서의 역할을 하여 긴 기간에 걸쳐 항원을 도입할 수 있고, 그래서 몸이 항원을 없애기 전에 면역 반응을 극대화한다. 창고 유형 보조제의 예는 프로인드(Freund)의 보조제와 같은 오일 에멀전이다. 보조제는 또한 몸이 그것의 면역 반응을 보장하고 증폭시키도록 하는 자극물로서의 역할을 할 수 있다. 과상풍, 디프테리아, 및 백일해 백신은, 예를 들면, 각 표적 박테리아에 의해 생성된 독소의 극미한 양을 함유할 뿐만 아니라, 수산화 알루미늄을 함유한다. 알루미늄 염은 미국에서 판매된 백신에서 흔한 보조제이고 70 년이 넘는 기간 동안 백신에 사용되었다.

[0005] 키토산은 무작위로 분포된 β -(1-4)-결합 D-글루코사민(탈아세틸화 단위) 및 N-아세틸-D-글루코사민(아세틸화 단위)으로 구성된 선형 다당류이다. 이는 새우 및 다른 갑각류 껍데기를 알칼리 수산화 나트륨으로 처리함에 의해 만들어진다. 키토산은 성공리에 경구 및 피하의 백신 둘 다를 위한 운반체로서 사용되었다. 여기서 기존에 사용된 알루미늄(Alum) 보조제보다 보조제로서 더 잘 수행하는 것으로 보여지는 새로운 키토산-기재 보조제 제형을 제시한다. 구체적으로는, 본원에서 제공된 키토산-기재 보조제는 IgA 반응을 자극하는 것에 효과적이다.

발명의 내용

[0006] 본원에서 제공된 것은 보조제, 보조제를 포함하는 백신 제형, 보조제를 만드는 방법 및 보조제 및 백신 제형을 사용하는 방법이다. 구체적으로는, 키토산 및 항원은 알데히드를 사용해 가교될 수 있다. 한 측면에 있어서, 0.5 % 내지 2 %의 알데히드 가교된 키토산 및 항원을 포함하는 조성물이 제공된다. 백신 조성물 내 알데히드의 최종 농도는 0.5 % 미만이다.

[0007] 또 다른 측면에 있어서, 시프(Schiff) 염기를 형성하도록 키토산에 결합된 탄수화물을 포함하는 보조제 조성물이 제공된다. 보조제는 항원과 결합될 수 있다. 탄수화물은 만노스일 수 있다.

[0008] 또 다른 측면에 있어서, 백신 제형이 제공된다. 백신 제형은 본원에 제공된 보조제 및 항원을 포함할 수 있다. 항원은 자연의 미생물 또는 단백질일 수 있고, 적절한 미생물은 세균, 효모, 또는 다른 진균류, 진핵 기생충 및 바이러스를 포함하고 약화된, 재조합체, 사멸된 또는 다르게는 불활성화된 것일 수 있다.

[0009] 또 다른 측면에 있어서, 보조제 및 백신 조성물을 만드는 방법이 본원에 제공된다. 키토산은 아세트 산의 용액에 용해되고, 항원은 용해된 키토산에 첨가된다. 마침내 항원 및 키토산은 알데히드와 결합되어 알데히드의 최종 농도는 0.02 %와 0.5 % 사이가 된다. 트리스(Tris)는 자유 알데히드를 켄칭하여 더 안정한 보조제가 되도록 보조제에 첨가될 수 있다.

[0010] 추가적 측면에 있어서, 항원에 대한 대상체의 면역 반응을 강화하는 방법이 또한 제공된다. 방법은 대상체에 본원에 개시된 항원 및 키토산-기재 보조제를 포함하는 백신 제형을 투여하는 것을 포함한다. 키토산-기재 보조제는 알데히드 가교된 키토산 또는 탄수화물-결합 키토산일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 일차적인 백신 접종 및 나타난 백신-보조제 제형으로의 증강(boost) 후에 칠면조 내 항-β-갈락토시다아제 IgG 항체 반응을 보여주는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 2는 일차적인 백신 접종 및 나타난 백신-보조제 제형으로의 증강 후에 칠면조 내 악성부종균(*Clostridium septicum*) IgG 항체 반응을 보여주는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 3은 백신 접종 및 나타난 바실루스-매개체(*Bacillus*-vectored) 조류 인플루엔자 백신-보조제 제형으로의 증강 이후 다양한 시점에 닭 내 IgG(도 3a) 및 IgA(도 3b) 항체 반응을 보여주는 그래프의 세트이다.

도 4는 경쟁적인 ELISA를 사용하여 측정된, 일차적인 백신 접종 및 나타난 백신-보조제 제형으로의 증강 후에 살모넬라(*Salmonella*)에 대한 IgG 항체 수준을 보여주는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 5는 경쟁적인 ELISA를 사용하여 측정된, 일차적인 백신 접종 및 나타난 백신-보조제 제형으로의 증강 후에 살모넬라에 대한 IgA 항체 수준을 보여주는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 6은 경쟁적인 ELISA를 사용하여 측정된, 일차적인 백신 접종 및 나타난 백신-보조제 제형으로의 증강 후에 살모넬라에 대한 IgG(도 6a) 및 IgA(도 6b) 항체 수준을 보여주는 그래프의 세트이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 7은 일차적인 백신 접종 이후 22 일(시도 이후 3 일)에 간 및 비장(L/S) 또는 맹장편도(CT) 내 살모넬라의 회복 백분율을 나타내는 그래프이다. 백신 접종 프로토콜은 도 6에서 사용된 것과 일치하고 *은 $P < 0.05$ 를 나타낸다.

도 8은 경쟁적인 ELISA를 사용하여 측정된, 일차적인 백신 접종 및 표시된 투여 경로를 통한 나타난 백신-보조제 제형으로의 증강(12 일) 후에 22 일에 살모넬라에 대한 IgA 항체 수준을 보여주는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 9는 경쟁적인 ELISA에 의해 측정된, 나타난 백신-보조제 제형으로의 새끼 새의 백신 접종 이후 살모넬라에 대한 IgG 면역 반응을 보여주는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 10은 경쟁적인 ELISA에 의해 측정된, 나타난 백신-보조제 제형으로의 새끼 새의 백신 접종 이후 살모넬라에 대한 IgA 면역 반응을 보여주는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 11은 나타난 백신-보조제 제형으로 칠면조의 단일 비경구 백신 접종 이후 보르데텔라 아비움(*Bordetella avium*)에 대한 IgG 면역 반응을 나타내는 그래프이다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

도 12는 부화하는-날 칠면조의 나타난 백신-보조제 제형으로 피하 백신 접종에 뒤이어 14 일에 같은 백신-보조제 조합의 식수 투여 이후 보르데텔라 아비움에 대한 IgG 면역 반응을 보여주는 그래프이다. 반응은 21 일에 측정되었다. 다른 문자는 실질적인 차이($p \leq 0.05$)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본원에 제공되는 것은 키토산을 포함하는 보조제, 보조제를 포함하는 백신 제형, 보조제를 만드는 방법 및 보조제 및 백신 제형을 사용하는 방법이다. 요컨대, 비경구(주사)에 사용하는 것들과 같이, 다른 보조제와 비슷한 방법으로 사용될 수 있는 새로운 보조제 시스템이 본원에 개시된다. 기본 분자는, 많은 무척추 동물(새우, 게, 곤충, 등)의 외골격, 키틴의 탈아세틸화된 형태인 키토산을 포함한다. 키토산은 일반적으로 안전하다고 인정되는(GRAS) 화합물로 여겨지고 체중 감량, 콜레스테롤 감소, 불면증, 및 신장 기능 개선을 위해 사용된다. 키토산은 또한 다양한 점막 백신과 함께 사용되는 보조제로서 사용되지만(자발-길(Jabbal-Gill) 외, 2012), 본원에 기재된 키토산은 새롭고 실시예에서 보여지듯이 기존의 키토산보다 더 잘 기능한다.

[0013] 포름알데히드로 가교된 키토산-단백질 및 탄수화물-결합된 키토산은 백신 항원의 경구 또는 비경구 전달을 위한 독특한 보조제를 제공한다. 키토산은 경구 및 피하 백신 모두에 대한 운반체로서 사용되었다. 일부 제형에서

는, 항원은 포름알데히드 처리에 의해 키토산에 공유 결합된다. 다른 경우에는, 보조제 시스템은 키토산에 결합된 탄수화물(만노스, 푸코스, 및 갈락토스)의 첨가로, 항원 표출 세포(antigen presenting cell) 상의 만노스 수용체의 표적화를 허용하여, 그에 따라 키토산-항원 복합체에 대한 면역 반응을 강화시켜 개선된다. 포름알데히드로 가교된 키토산-단백질 및 만노실화(mannosylated)-키토산 단백질 복합체 모두, 불활성화 백신에 유례 없는, 비경구 및 경구(또는 다른 점막의) 전달 경로 모두에 의해 양호한 면역 반응을 가져온다.

[0014] 한 측면에 있어서, 시프 염기를 형성하도록 키토산에 결합된 탄수화물을 포함하는 보조제 조성물이 제공된다. 보조제는 항원과 결합될 수 있다. 탄수화물은 만노스, 만노비오스, 글루코스, 갈락토스 또는 프룩토스일 수 있다. 다른 적합한 탄수화물이 사용될 수 있다. 이론에 의해 제한되지 않고서, 탄수화물은 항원 표출 세포의 표면 상의 이런 탄수화물에 대한 수용체에 대해 키토산을 표적화하려는 목적을 위해 키토산에 첨가된다.

[0015] 본원에 사용된 탄수화물-키토산은 하기 실시예에서 더 구체적으로 설명된다. 본원의 방법은 키토산 상의 아미노기와 반응하는 이용 가능한 카보닐기를 갖는 개환 탄수화물을 이용하여 시프-염기를 형성하는 자야스리(Jayasree)(자야스리 외, 2011)를 바탕으로 한다. 이 시프-염기는 나트륨 시아노보로하이드라이드(NaCNBH_4)로 환원되어 안정될 수 있다. 도 6에서 키토산의 환원된 것(Man-C V1)은 환원되지 않은 형태(Man-C V2)와 비교되어 환원은 면역강화를 위해 필요한 것이 아님을 보여준다. 환원되지 않은 형태는 최상의 IgA 반응을 생성하여, 그에 따라 어느 형태도 사용될 수 있다. 게다가, 만노실화 키토산의 환원되지 않은 형태는 독성 화학물질(NaCNBH_4)의 첨가를 필요로 하지 않는다. 간단히 말하면, 탄수화물, 적절하게는 만노스($10 \mu\text{M}$)는, 60°C 에서 2 시간 동안 0.1 M 아세트산 나트륨 pH 4.0에 용해되고 키토산(0.2-2%)은 1.5% 아세트산에 용해된다. 용해된 만노스 및 용해된 키토산은 그 후 상온에서 결합되고 인큐베이션되어 키토산 상의 아민기가 설탕 상의 카보닐과 반응하게 하여 시프 염기를 생성한다. 시프 염기의 환원은 보조제가 기능하도록 하는데 필요하지 않고 정말로 실시예는 환원되지 않은 시프 염기가 더 좋은 보조제임을 보여준다(도 6 참조). 다른 실시양태에서, 시프 염기는 환원될 수 있다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 키토산 및 항원은 알데히드를 사용하여 가교될 수 있다. 한 측면에 있어서, 0.5% 내지 2%의 알데히드 가교된 키토산과 항원을 포함하는 조성물이 제공된다. 최종 백신 제형은 적절하게는 0.5% 내지 1.5% 키토산을 함유한다. 보조제는 0.5% 내지 3% 키토산, 적절하게는 0.5% 내지 2% 키토산, 적절하게는 0.5% 내지 1.5% 키토산, 적절하게는 0.5% 내지 1.2% 키토산을 함유할 수 있다. 백신 조성물 내 알데히드의 최종 농도는 적절하게는 0.5% 미만이다. 알데히드의 최대 농도는 백신 내 허용된 잔류 알데히드의 최대 수준에 기반한다. 더 높은 수준의 알데히드가 키토산을 가교하는데 사용될 수 있지만, 최종 백신 제형은 적절하게는 0.5% 미만의 알데히드를 함유한다. 실시예에서, 포름알데히드가 알데히드로 사용되어 키토산을 가교한다. 다른 알데히드, 예를 들면 포르말린, 글루타르알데히드, 아세트알데히드, 프로피온알데히드, 또는 부티르알데히드가 또한 사용될 수 있다. 알데히드는 키토산 아미노기를 다른 키토산 분자 또는 항원에 있는 것과 가교한다.

[0017] 알데히드로 가교된 키토산 및 항원을 포함하는 백신 제형을 만드는 방법이 또한 본원에 제공된다. 방법은 아세트산의 용액에 키토산을 용해시키는 것을 포함한다. 탄수화물-결합 키토산은 또한 이 방법에서 키토산으로서 사용될 수 있다. 적절하게 아세트산은 물에서 1.5% 최종 농도 또는 1L의 물에 용해된 15 mL의 아세트산으로 사용된다. 적절하게 키토산의 양은 0.5% 내지 2%이고, 적절하게는 0.5% 내지 1.5%이다. 항원은 적절한 수준에서 용해된 키토산에 첨가된다. 백신 제형에서 사용된 항원의 양과 형태는 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 마지막으로, 항원 및 키토산은 알데히드의 최종 농도가 0.02% 내지 0.5%이도록 알데히드와 결합된다. 알데히드는 키토산을 다른 키토산 분자에 및 키토산을 항원에 화학적으로 가교시킬 수 있다. 트리스-HCl(Tris-HCl)이 첨가되어 자유 알데히드를 켄칭(quench)할 수 있다. 트리스는 0.5 g/L의 최종 농도에 첨가될 수 있다.

[0018] 본원에 개시된 어느 보조제 조성물도 사포닌, 톨-유사(toll-like) 수용체, 세균 독소의 B 소단위, 세균 독소, 과산화물 독소이드, CpG 모티프(CpG motif), 리포솜 또는 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A)를 포함하지만 이로 제한되지 않는 강화 분자(enriching molecule)와 결합될 수 있다. 적절하게 강화 분자는 면역 시스템의 추가의 자극제로서 작용하고 대상체에 백신 제형의 투여 이후 발생하는 면역 반응을 강화시킨다.

[0019] 본원에 제공된 백신 제형은 본원에 기재된 키토산-기재 보조제 및 항원을 포함한다. 항원은 통상의 기술자에게 가능한 임의의 항원일 수 있다. 단백질, 합성 펩타이드, 운반체에 컨쥬게이션된 펩타이드, 또는 미생물과 같은 항원이 백신에 사용될 수 있다. 미생물은 세균, 효모, 기생충, 진균류, 바이러스, 유충(helminth) 또는 다른 질병을 일으키는 유기체를 포함한다. 미생물은 살아있고, 사멸되고, 약화되고, 재조합되고, 또는 불활성화된 유기체를 포함한다. 미생물의 예는 살모넬라, 에세리키아(*Escherichia*), 쉬겔라(*Shigella*), 보르테텔라

(*Bordetella*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 마이코플라스마(*Mycoplasma*), 포도상구균(*Staphylococcus*), 연쇄상구균(*Streptococcus*), 바실루스, 인플루엔자, 및 아이메리아(*Eimeria*)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 미생물은 사용하기에 앞서 열, 메탄올 또는 예를 들어 포름알데히드 또는 다른 알데히드와 같은 다른 고정액(fixative)으로 처리하여 불활성화되거나 사멸될 수 있다. 알데히드는 트리스-HCl의 차후의 첨가에 의해 0.5 g/L의 최종 농도로 켄칭될 수 있다. 적합한 항원은 또한 펩타이드 항원, 예를 들면, 인플루엔자 M2e, 헤마글루티닌(Hemagglutinin), 뉴라미니다아제(Neuraminidase), 또는 핵 단백질(nuclear protein); 아이메리아 TRAP 또는 MPP; 클로스트리듐 시알리다아제(*Clostridium* sialidase), SagA, 알파-독소, 넷B(NetB) 독소, 또는 철 수송 단백질을 포함할 수 있다. 다른 펩타이드 항원의 예는 적어도 미국 특허출원 제12/441,851호; 제12/740,631호; 제12/740,608호; 제13/574,504호; 및 제13/702,827호에서 찾을 수 있고, 이 모든 것은 그 전체로서 본원에 참고문헌으로써 포함된다. 키토산 기재 보조제는 이미 이용가능한 백신에 또는 새롭게 개발된 백신에 또는 자생 백신에 대한 면역 반응을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0020] 이 작업과 관련된 백신 접종에 두 가지 상당한 개선이 있다. 첫째로, 변형된 키토산이 비경구 경로로 불활성화된 백신과 공동-투여될 때, 알룸과 같은 다른 보조제로 관찰된 면역 반응보다, 최소의 주입-위치 반응으로, 면역 반응이 더 뛰어난 것이 밝혀졌다. 많은 보조제는 주입의 위치에 염증 반응을 일으키거나 주입 위치로부터 흡수를 지연시키거나, 또는 둘다에 의해 작동한다. 기존 보조제의 불리한 측면 중 하나는 그것이 종종 일부 반응, 쓰라림을 유발하고, 일부 경우에는 그것이 도살에서 식육-생산 동물의 다운그레이딩(downgrading) 또는 트리밍(trimming)을 유발하는 지속되는 병변(lesion)을 유발한다. 변형된 키토산은 다른 백신 보조제와 관련된 이런 우려를 감소시킬 수 있다. 이는 상업적인 백신으로 값싸게 생산할 수 있고 쉽게 만들 수 있다.

[0021] 게다가, 양호한 면역 반응은 사멸된 항원이 경구로 위관 영양법(gavage)에 의해 또는 식수에 포함함에 의해 둘 중 어느 하나로 공동-제공될 때 발생된다. 이는 가축-특히 가금류의 경우에 정말 중요한데, 비경구 주입을 다루는 것이 매우 노동 집약적이고 새 또는 다른 동물에게 스트레스를 유발할 수 있기 때문이다. 부화장은 제외하고, 투여 비용 때문에 가금류에 불활성화된 백신을 사용하기에는 일반적으로 너무 비싸다. 경구로 백신을 전달할 수 있는 능력은 우리가 동물에 백신 접종을 맞힐 수 있는 방식을 변화시킨다. 다량 투여를 위한 살아있는(수정되어 살아있는 또는 약화시킨 백신으로 불림) 것에는 두 주된 이점이 있다. 첫째로, 식수 또는 분사 적용에 의해 대량 가할 수 있다. 둘째로, 이런 살아있는 백신은 또한 국부적인 점막(대부분의 병원체가 감염시키는 곳인 기도 및 장관)에 면역력을 발생시킨다. 그렇듯이, 사멸된 또는 살아있는 백신 어느 것도 병으로부터 보호할 수 있지만, 살아있는 백신은 실제 전염을 방지하는데에 역사적으로 더 효과적이고, 따라서 바람직하다.

[0022] 사멸된 백신은 감염 및 질병 유발에 매우 낮은 위험으로 빠르게 생산될 수 있고, 그것은 질병-유발 부모형(parent type)으로 유전적으로 다시 바뀔 수 없고, 그것은 이런 이유로 훨씬 더 낮은 규제 쟁점을 가지므로 이에 큰 이점이 있다. 또한, 백신 회사가 규제된/허가된 백신을 개발하기에 충분히 흔하지 않은 크고 계속-늘어나는 수의 희귀병이 있고, 미국 법(및 많은 다른 나라)에는 특히 관심의, 사멸된, 및 공급원 무리(또는 동물 또는 인간 개체군)에 사용되는 병원체로부터 만들어진 "자생(autogenous)" 백신을 생산하는 것에 대한 항목이 있다. 개발도상국에서는 입수 가능하지 않은, 또는 발발을 다룰 수 있을 정도로 충분히 빠르게 또는 국소적으로 생성하기엔 기술적으로 가능하지 않은 백신이 필요한 희귀병이 발생한다. 본원에서 제공되는 보조제는 입수 가능하고 생산하기에 기술적으로 간단하다. 이는 사멸된 또는 불활성화된 미생물과 손쉽게 결합되어 백신을 만들어 내도록 할 수 있다.

[0023] 본원에 기재된 기술에 대한 몇 가지 잠재적 응용이 가능하다. 사멸된 백신에 대한 전신 반응(systemic response)은 주입을 위한 보조제로서 변형된 키토산의 혼입에 의해 개선될 수 있다. 일부 질병은 이 보조제 플랫폼과 사멸된 백신의 경구 투여를 통해 방지할 수 있다. 이 보조제 플랫폼은, 경구로 투여될 때, 전신 및/또는 점막 반응을 자극하도록 표적화될 수 있는데-이는 살아있는 백신의 많은 이점을 가지지만, 상기 기재된 살아있는 백신의 쟁점을 피하는 것을 의미한다.

[0024] 본원에 기재된 보조제 및 백신 제형은 다른 약학적으로 허용 가능한 운반체와 결합될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 체내 투여에 적합한 임의의 운반체이다. 조성물에 사용하기 적합한 약학적으로 허용 가능한 운반체의 예는 물, 완충액, 포도당 용액, 유성의 또는 세균 배양액을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 조성물의 추가적인 성분은, 예를 들면, 안정제, 방부제, 희석액, 유화제 및 윤활제와 같은 부형제를 적절하게 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 희석액의 예는 탄수화물(예를 들면, 소르비톨, 만니톨, 녹말, 수크로스, 글루코스, 텍스트란)과 같은 안정제, 알부민 또는 카세인과 같은 단백질, 소 혈청 또는 탈지 우유와 같은 단백질-함유제 및 완충제(예를 들면, 포스페이트 완충제)를 포함한다. 특히 이러한 안정제가 조성물

에 첨가될 때, 조성물은 동결-건조 또는 분사-건조에 적합하다. 조성물은 또한 유효될 수도 있다.

- [0025] 본원에 기재된 조성물은 또한 다른 약제 조성물과 결합될 수 있고 이런 조성물은 임의의 순서로, 동시에 또는 통합된 조성물의 일부분으로 투여될 수 있다. 하나가 다른 것 이전에 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 12 시간, 16 시간, 20 시간, 1 일, 2 일, 4 일, 7 일, 2 주, 4 주 이상의 투여 시간 차이로 투여되도록 두 조성물이 투여될 수 있다.
- [0026] 본원에 사용된 것과 같이 백신 제형의 유효량 또는 치료 유효량은 표적화된 질병에 대한 대상체의 면역 반응을 강화시키기 위해 대상체에 투여된 조성물의 양이 표적화된 질병에의 감염 또는 노출과 관련된 이환율 또는 사망률을 제한하도록 세포-매개성 또는 항체 매개성 면역 반응과 같은, 면역 반응을 증가시킬 수 있는 조성물의 양을 의미한다. 적합하게는, 투여가 처리에 영향을 주거나 이환율 또는 사망률과 관련된 질병을 막는데 충분하도록 하는 수준으로 면역 반응이 강화된다. 치료 유효량은 백신, 제형 또는 조성물, 질병 및 그것의 심각성 및 대상체의 나이, 몸무게, 건강 상태 및 반응성에 따라 다양할 것이다. 예를 들어 백신 접종에 대응해 생성된 항체의 수준은 보조제 없는 또는 보조제로서 알룸을 사용한 같은 항원의 투여와 비교해서 본원에 기재된 보조제의 포함에 의해 2 배, 3 배, 4 배 이상으로 증가될 수 있다. 증가된 면역 반응은 IgA 반응, 또는 IgG 반응일 수 있다. 보조제는 또한 차후의 감염에 관련된 이환율 또는 사망률의 감소로 이어질 수 있다. 실시예에서 나타나듯이, 항원과 결합한 본원에 기재된 보조제의 사용은 항원 단독으로의 백신 접종 또는 항원 및 별개의 보조제로의 백신 접종과 비교해서 항원이 면역 반응을 유도하는 미생물의 차후의 감염률 또는 차후의 감염의 심각성의 감소로 이어질 수 있다. 감염의 심각성은 미생물이 시간이 지남에 따라 유기체 내에 도입 부위를 지나 조직에 침입, 복제 및/또는 지속하거나, 또는 이환율 또는 사망률을 유발할 수 있는 능력으로 측정될 수 있다. 백신 접종을 맞은 동물은 그 뒤에 병원체에 감염될 수도 있다. 이런 경우에는, 시도 이후 대상체 내 병원체의 성장 이 대조군이 투여된 대상체와 비교해서 백신이 투여된 대상체에서 적어도 $1 \log_{10}$, $2 \log_{10}$ 또는 심지어 $3 \log_{10}$ 까지 감소된다.
- [0027] 본원에 기재된 조성물은 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수단으로 투여될 수 있고, 이는 경구, 비강내, 복강내, 비경구, 정맥내, 근육내, 피하, 비인두, 또는 점막관통 흡수를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 따라서 화합물은 삼킬 수 있거나, 분사될 수 있거나 또는 주사될 수 있는 제형으로 제제될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여는 식수, 음식 위 분사, 동물 위 분사(예를 들어, 닭 또는 칠면조가 그것의 깃털을 다듬을 때 그것이 분사 내 백신을 삼킬 것이다)에 더하여 수반될 수 있다. 대상체는 사람, 소, 돼지, 고양이, 개 또는 다른 가축을 포함한 포유류 또는 가금류, 즉, 닭 또는 칠면조와 같이 포유류가 아닐 수 있다.
- [0028] 임의의 주어진 경우에서 투여된 구체적인 투여량(dosage) 및 투여의 시기(즉 일차적인 백신 접종 및 증강)가 투여된 제형, 표적화된 질병, 노출의 위험, 대상체의 상태, 및 대상체의 반응 또는 대상체에 제형을 제공하는 편의성을 변형시킬 수 있는 다른 관련 있는 의학적 요소에 따라서 조절될 것임이 인정될 것이다. 예를 들어, 대상체에 대한 구체적인 투여는 대상체의 유형, 나이, 몸 무게, 건강의 일반적인 상태, 식습관, 투여의 시기 및 방식, 배설율, 병용된 약제 및 백신이 표적화되는 특정 이상의 심각성에 의존한다. 처음의 백신 접종 및 증강은 다른 수단을 통해서 투여될 수 있다. 예를 들어, 피하 경로를 거치는 처음의 백신 접종은 식수 또는 음식 내 보조제-항원 복합체의 포함에 의해 증강될 수 있다. 백신 제형 내 키토산의 백분율은 일반적으로 0.2 내지 2 %, 적절하게는 0.5-1.5 %이다. 투여된 키토산의 총 양은 백신 접종 당 키토산의 1 mg 미만 내지 100 mg일 수 있고, 적절하게는, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 50, 75 또는 100 mg이다. 실시예에서, 투여 당 2-5 mg 키토산이 사용되었다. 미생물 항원과 결합될 때, 미생물은 투여 당 1×10^6 내지 1×10^9 미생물로 포함될 수 있다. 실시예에서, 투여 당 1×10^7 내지 1×10^8 미생물로 사용된다. 항원은 투여 당 10 μ g 내지 10 mg로 포함될 수 있다. 실시예에서, 투여 당 100 μ g이 사용되었다.
- [0029] 하기 실시예는 오직 예시적인 의미이고 발명의 또는 첨부된 특허청구범위의 범위에 제한으로서의 의미가 아니다. 본원에 인용된 모든 참조문헌은 그들 전체로서 참조문헌으로 포함된다.
- [0030] <실시예>
- [0031] 실시예 I : 일차적인 백신 접종 및 증강에 따른 β -갈락토시다아제에 대한 면역 반응
- [0032] 포름알데히드로 가교된 키토산-단백질 백신을 시험하기 위한 첫 번째 실험은 전형적인 단백질 β -갈락토시다아제(β -Gal)를 모델 단백질로서 사용하였다. 칠면조 새끼는 6 개 처리군과 1 개 대조군으로, 아래 표 1에 기재되었듯이, β -Gal로 백신 접종을 맞혔다. 새끼들은 부화하는-날에 비경구 피하(sq) 주사에 의해 식염수 또는

식염수, 15 % 알룸, 포름알데히드(포름)로 가교된 1 % 키토산(3 개 군) 중 어느 하나에 β -Gal 100 μ g(0.25 ml), 또는 포름알데히드로 가교되지 않은 1.5 % 키토산으로 백신 접종을 맞혔다. 모든 군은, 하나는 두 날 모두 경구 위관 영양법에 의해 1 % 키토산- β -Gal로 증강되고 하나는 분사에 의해 1 % 키토산- β -Gal(2 mL)로 증강되는, 1 % 키토산 군 중 두 개를 제외하고는 14 및 25 일에, 같은 배합물 sq로 증강시켰다.

[0033] β -갈락토시다아제에 대한 면역 반응은 β -갈락토시다아제에 대한 ELISA 내 혈청을 사용하여 측정하였고 결과는 도 1에 나타난다. 면역 반응의 수준은 간접적인 ELISA 내 흡수의 샘플 대 양성 대조군 비로서 보고된다. 더 높은 S/P 비는 더 높은 항- β -갈락토시다아제 항체 역가(titer)를 나타낸다. 식염수로 백신 접종된 칠면조로부터의 혈청을 사용한 ELISA에서는 교차반응성(cross-reactivity)이 거의 없었고 식염수에서 β -Gal로 백신 접종될 때 오직 약간의 수치 증가가 있었다. 현재 사용되는 흔한 상업적인 보조제는 15 % 알룸이고 이것이 사용되었을 때 좋은 면역 반응이 있었다. 우리의 키토산-면역자극된 및 포름알데히드 가교된 백신 시스템(1 % 키토산으로 규정됨)을 사용하면 모델 항원, β -Gal에 대한 면역 반응에 실질적인 증가가 있었다. 1.5 %의 더 높은 농도라도 키토산을 단독으로 사용하면 실질적으로 더 낮은 면역 반응이 있었다. 추가로, 항원이 분사 또는 경구 처리에 의해 1 % 키토산-포름알데히드 처리된 보조제로 증강되었을 때, 피하로 투여된 기준 보조제, 15 % 알룸에 필적하는 반응이 있었다.

[0034] <표 1 : 처리 군>

그룹	면역원	일차적인 부화하는-날 VX (100 μ g/0.25ml)	부화 이후 14 일에 증강
식염수	없음	SQ	SQ (100 μ g/0.5ml)
식염수 내 β G	β -갈락토시다아제	SQ	SQ (100 μ g/0.5ml)
15% 알룸	β -갈락토시다아제	SQ	SQ (100 μ g/0.5ml)
1% 키토산	β -갈락토시다아제	SQ	SQ (100 μ g/0.5ml)
포름 없는 1.5 % 키토산	β -갈락토시다아제	SQ	SQ (100 μ g/0.5ml)
1 % 키토산 두 번째 경구	β -갈락토시다아제	SQ	경구 위관 영양법 (100 μ g/0.5ml)
1 % 키토산 두 번째 분사	β -갈락토시다아제	SQ	분사 (100 μ g/ml) 20 평방 피트 내 20 버드 당 50 ml의 미립화 분사

[0035]

[0036] 실시예 II : 다양한 보조제로의 백신 접종에 따른 클로스트리듐에 대한 면역 반응

[0037] 상기 기재된 것과 비슷한 실험이 알룸 또는 포르말린-가교된 키토산 중 어느 하나 중의 4×10^8 cfu/ml 악성 부종균 박테린(bacterin)(CS)을, 부화하는-날 칠면조 새끼 피하에(0.25 mL) 단독으로 또는 12 % 알룸 또는 0.5 % 포르말린-가교된-키토산과 함께 새 당 최종 용량이 1×10^8 cfu/새가 되도록 투여함으로써 수행되었다. 모든 새는 같은 경로를 통해 같은 백신으로 14일에 증강된다. 그 결과의 면역 반응의 수준은 간접적인 ELISA 분석에 의해 측정되고 흡수의 샘플 대 양성 대조군 (S/P) 비로서 보고된다. 더 높은 S/P 비는 더 높은 항-CS 항체를 나타내는 것이다.

[0038] 보조제 없는 백신을 받은 새는 도 2에 나타나듯이 0.16의 S/P 비로 ELISA-감지가능 항체 반응을 야기한다. 이 항체 수준은 알룸으로 보조된 CS의 것과 통계적으로 다르지 않다. 한 번의 증강 이후에(일차적인 백신 접종 이후 14 일), 0.5 % 포르말린-가교된-키토산으로 보조된 CS 박테린으로 백신 접종된 새끼는 각각 0.4 및 0.16의 S/P 비가 보조제 없는 CS 박테린의 것에 대략 두 배의 결과가 되는 IgG 수준을 보였다. 수산화 알루미늄 보조제가 있는 CS 박테린은, 각각 0.27 및 0.4의, S/P 비로 비교된 키토산이 있는 CS에 의해 유발된 IgG 수준보다 대략 30 % 더 낮은 IgG 수준을 유발한다. (도 2 참조). 중요한 것은, 알룸은 항상 국소 염증 및 육아종(granulomas)을 만들어, 가끔 괴포성의 반흔 조직으로 진행되는 반면, 주입 위치 병변이 키토산 투여에 의해 72 시간(또는 더 늦게)에 더 적게 나타난다.

[0039] 실시예 III : 조류 인플루엔자 백신 접종 실험.

- [0040] 조류 인플루엔자(AI)는 중요한 공중 보건 관심사이며 전 세계적 상업적인 가금업에 심각한 경제적 위협이다. 우리의 이전 자료는 CD154에 관련하여 M2e를 발현하는 살모넬라-매개체 백신이 AI에 대해 효과적임을 주장하였다. 매개체로서 고초균(*Bacillus subtilis*) 및 면역자극 분자로 M2e 항원결정기를 사용하는 새로운 구축물이 시험되었다. M2e 특이적 혈청 IgG 및 점막 IgA 항체 수준은 부화 후 11, 15 및 21 일에 ELISA에 의해 측정되었다. 부화하는-날에 새끼 새들은 바실루스 야생형(BSBB), 살아있는 백신으로써 바실루스 매개체 조류 인플루엔자 백신(BSAI), 포르말린 불활성화 후 BSAI, 포르말린 불활성화, 동결 건조 및 식염수로의 재구성 후 BSAI, 또는 포르말린 불활성화 및 1 % 키토산으로 가교 후 BSAI로 피하 주사 또는 경구 위관 영양법 중 어느 하나에 의해 백신 접종 되었다. 각 백신은 0.25 ml 또는 0.25 ml 식염수 내 10^6 cfu/새끼 새로 투여된다. 부화-후 10 일에 두 군(살아있는 BSAI, 불활성화 및 동결건조된 BSAI)의 새끼 새들에는 그들이 0 일에 받은 같은 처리의 부스터 백신 접종이 주어졌고 모든 다른 군은 두 번째 백신 투여를 받지 않았다.
- [0041] 혈청 IgG 및 점막 IgA 샘플을 그 후 부화 후 11, 15 및 21 일에 모든 그룹 내 새들로부터 얻었고 항체 포획 ELISA에서 사용하였다. 플레이트는 BSA에 컨쥬게이션된 M2e($10 \mu\text{g/ml}$)로 코팅되고, 막히고, 2 % FBS/PBS 내 1:50으로 희석된 각 처리 군으로부터의 혈청과 인큐베이션되고, 그 후 1:7,500으로 희석된 HRP-컨쥬게이션된 이차 항체로 인큐베이션되고, TMB 기질을 사용하여 현상하였다. 그 결과는 평균 S/P 비(샘플 평균 - 음성 대조군 평균)/(양성 대조군 평균 - 음성 대조군 평균) \pm SEM(n=20)로 나타난다.
- [0042] 바실루스 백신 대조군(BSBB)과 비교될 때, 각 시험된 시점에 각 백신 접종된 군에서 M2e 특이적 IgG 항체 반응에 상당한 증가가 있었다. 그러나, 여섯 개의 백신 접종된 군의 어떤 것 사이의 각 시점 내에서도 증가된 IgG 항체 반응의 차이점이 발견되지 않았다(도 3a 참조). 면역 반응 내 실제 차이는 점막 IgA 특이적 항체 반응을 볼 때 분명하다(도 3b 참조). BSAI + 1 % 키토산은 대조군 또는 샘플링된 세 시점 모두에서 백신 접종을 받은 추가의 다섯 처리 군과 비교될 때 특이적 IgA 항체 반응에서 뚜렷한 증가를 보여주었다.
- [0043] 요약하자면, 가교된 키토산을 사용한 실험에서 우리는 이 키토산의 변형이 비경구 및 경구 경로 모두를 통해 수산화 알루미늄보다 더 좋은 보조제임을 입증하였다(도 1 및 2). 가교제로서의 포르말데히드로 처리된 키토산은 포르말데히드가 없는 키토산보다 더 효과적이라고 보여졌다(도 1). 경구로 사용되었을 때, 키토산은 IgG(도 3a)보다 우선적으로 IgA(도 3b)의 생성을 강화시켰다.
- [0044] 실시예 IV : 키토산 보조제의 강화
- [0045] 보조제는 잠재적 강화 분자 또는 대체적 전달 전략의 추가로 키토산-기재 보조제를 개선하도록 설계된 일련의 실험을 거쳐 더 강화되었다. 면역자극성 화합물은 보조제와 사용되었을 때 잠재적으로 반응을 개선할 수 있고 몇은 이전에 연구되었다; (문헌[가이(Guy), 2007; 뮤튀리(Mutwiri) 외, 2011]) 리뷰 참조. 잠재적 보조제는 사포닌, 세균 성분, 톨-유사 수용체와 같은 선천적 면역 시스템과 상호작용하는 화합물, CpG 모티프와 같은 핵산, 바이러스, 리포솜을 포함하는 에멀전, 또는 이런 성분의 임의의 조합을 포함한다. 선천적 면역 시스템과 상호작용하는 더 유망한 면역자극성 분자의 일부는 과상풍 독소이드(TT), 이열성(heat-labile) 엔테로톡신 B 소단위(LTB), 및 콜레라 독소 B 소단위(CTB)이다. 선천적 화학적 성질을 통해 경험적으로 면역 시스템을 강화시키는 것으로 보여지는 다른 화합물은 사포닌 및 모노포스포릴 지질 A(MPLA)를 포함한다. 만노스 또는 다른 설탕을 사용하여 대식세포 수용체의 결합을 표적화하는 것은 면역 기능(immune function)을 강화시킬 수 있다. 상이한 보조제들의 조합은 예컨대 IL-12 또는 다른 시토킨(cytokine)과 면역 반응을 자극하도록 상승적으로 작용할 수 있다.
- [0046] 보조제를 개선하기 위한 첫 번째 실험은, 상기 도 1-3에서 나타난 자료를 만들기 위해 포르말데히드를 사용하여, 0.5 % 키토산과 가교된 관심의 항원으로 이루어진 포르말데히드-가교된 키토산 보조제를 비교한다. 이 보조제 시스템은 그 후 선택된 후보 면역 강화 분자의 최상의 조합의 선택을 위한 대조군 또는 기준으로 사용된다. 시험 면역원은 10^8 cfu/ml로 자라고 포르말데히드로 불활성화된 살모넬라 엔테리티디스(SE) 박테리아였다. 가교된 키토산 보조제가 더 개선될 수 있을지 결정하기 위해서, 시험 면역원(키토산이 있는 살모넬라 박테리아는 새 당 1×10^7 cfu의 최종 투여로 4×10^7 cfu/ml임)은 가교된 키토산 단독으로 또는 과상풍 독소이드(TT), 이열성 엔테로톡신 B 소단위(LTB), 또는 만노실화 키토산으로 강화된 것과 2:1 비율로 혼합되고 식수 또는 음식 내에 투여된다. 그 결과는 도 4에 나타난다.
- [0047] TT는 잠재적 면역 강화 분자일 수 있고 백신 개발에 광범위하게 사용되었다. 대장균으로부터의 이열성 엔테로톡신은 강력한 면역자극 분자로 나타났지만 매우 유독하고, 따라서, 보조제로서 적합하지 않다. 이열성 엔테로톡신은 중심핵 LTA 및 다섯 소단위의 LTB인, 두 소단위로 구성된다(문헌[다호라(da Hora) 외, 2011]). LTB 소

단위는 면역 보조제 성질을 유지하지만 유독하지 않다. 따라서, 이는 안전한 잠재적 보조제 성분이다. 만노스 및 일부 다른 탄수화물(예컨대 갈락토스 및 푸코스)은 대식세포를 활성화시키는 수용체에 대한 리간드이다. 만노실화 키토산은, 아연의 첨가 없이 문헌[알파니(Yalpani) 및 홀(Hall)(1980 및 1985)] 및 문헌[자야스리 외,(2011)]에 의해 이전에 설명된 것과 비슷한 방법에 의해 조제된다. 간단히 말해서, 0.1 M 아세트산 나트륨의 1 부피 내 만노스의 2 몰 당량이 2 시간 동안 60 °C에서 가열되었다. 용액은 그 후 0.15 % 아세트산 내 2 % 키토산의 1 몰 당량의 2 부피에 첨가되고 상온에서 10 분 동안 반응하여 1.5 % 만노실화 키토산을 생성하도록 하였다. SE 박테린은 그 후 2 대 1 비율로 1.5 % 만노실화 키토산에 첨가되었다. 형성된 시프 염기는 그 후 나트륨 시아노보로하이드라이드(NaCNBH_4)로 환원된다.

[0048] 추가로, 면역강화 분자에, 상기 언급되었듯이 다른 전달 시스템이 또한 연구되었다. 가금업에 사용된 전형적인 식수 전달 시스템은 약 또는 화학물질 1 부 대 물 128 부로 희석시킨다. 도 1-3에 사용된 오리지널 키토산 배합물은 잠재적 전달 시스템으로서 식수에 1:128로 희석되었다. 최종 시험 군은 트리폴리인산염(TPP)에 적가하여 피포된 SE 박테린(오리지널 키토산 배합물)과 포름알데히드로 가교된 키토산 0.5 %이고 그 후 건조되고 0.5 % (wt/wt)의 비율로 음식에 첨가하기 위한 분말로 갈아진다.

[0049] 부화하는-날 육용 새끼 새들은 상기 설명되었듯이 나타난 제제 0.25 ml로 피하로 사전준비 되었다. 이런 군은 키토산 단독 그룹과 같이 사전준비 되었다. 새끼 새들은 각각 1:128로 물에 또는 0.5 % (wt/wt)로 음식에 8 시간 동안 증강된 식수 및 TPP 군을 제외하고 12 일의 나이에 경구 위관 영양법에 의해 증강되었다. 22 일에 혈청(IgG) 및 회장 점막(IgA) 내 항체 수준은 경쟁적인 ELISA 키트(IDEXX)로 결정되었다. 감소된 흡수 수준 또는 샘플 대 대조군 비는 SE 플라젤린(flagellin) 코팅된 플레이트를 인식하는 항체의 더 높은 수준을 나타낸다.

[0050] 상기 도 1 및 2에서 언급되었듯이 키토산 보조제는 양호한 면역 반응을 생성하는데 알룸보다 더 뛰어나다. 여기서 각 키토산 기재 보조제는, 키토산 단독으로 피하로 투여된 것과 비교해서 IgG 및 IgA 모두의 실질적으로 더 높은 수준으로, SE 박테린에 대한 양호한 반응을 생성할 수 있었다(각, 도 4 및 5). TT 및 건조 분말 TPP 군은 sq 증강 키토산 보조제로 사전준비된 sq보다 실질적으로 더 높은 면역 반응을 가졌다(도 4 및 5). 다른 세 군, LTB와 키토산, 만노실화 키토산, 및 식수 내 키토산 증강은 피하로 키토산 단독 투여된 것과 비교해 항체 생성에서 일관되게 뛰어났다(도 4 및 5).

[0051] 실험의 다음 세트에서, 이전 실험으로부터의 최상의 세 군(LTB, DW 내 키토산 증강, 및 환원된 만노실화 키토산)은 음성 대조군(식염수) 및, 알룸보다 뛰어나다고 이전에 나타난, 일차적인 및 증강 백신 접종을 위해 sq 투여된 포름알데히드-가교된-키토산 0.5 %의 기준 대조군(benchmark control)으로 반복되었다. 이 실험에서, 우리는 콜레라 독소 B 소단위(CTB), 살모넬라로부터의 지질 A(MPLA), 또는 사포닌 중 어느 하나로 면역 강화된 포름알데히드-가교된 키토산 0.5 %의 기준 대조군을 사용한 세 개의 새로운 처리 군을 첨가하였다. 또한 이 실험에서 첨가된 것은, 이전 실험에서 훌륭한 보조제로 나타난 만노실화 키토산 처리 군과 비슷한 또 다른 처리 군이었지만(만노실화 키토산 형태 1, Man-C V1), 이 군은 NaCNBH_4 (Man-C V2)로 환원되지 않았다.

[0052] SE 플라젤린 경쟁적인 ELISA는 다시 일차적인 및 증강 모두를 위한 0.5 % 키토산(C)으로 피하로 백신 접종된 새가 혈청 내에 더 높은 수준의 면역글로불린을 가졌음을 보여준다(도 6a). CTB(C + CTB), Man-C V2와 0.5 % 키토산 및 사포닌(C + 사포닌)과 키토산으로 백신 접종된 새는 최상의 IgG 반응을 가져온다(도 6a). Man-C V2는 숫자상으로 최상의 IgA 반응을 가져온다(도 6b). 이런 처리 군 세 개 모두는 기준 군(일차적인 및 증강 모두를 위해 0.5 % 키토산 sq 백신 접종됨)과 실질적으로 다르다(도 6).

[0053] 추가로, 새는 19 일에 5×10^7 cfu/새끼 새로 살아있는 살모넬라로 시험되었다. 시도-후 3 일 새는 맹장편도(CT) 및 간/비장(L/S)에서 살모넬라를 위해 배양되었다. CTB와 키토산, 만노실화 키토산의 두 형태, 식수 증강에서 키토산, 및 키토산 + 사포닌은 음성(식염수 백신 접종됨) 대조군과 비교했을 때 간/비장(L/S)에서 살모넬라를 검출 한계 아래까지 상당히 감소시킨다(도 7; $p < 0.05$). 장(CT)에서, 살모넬라의 수준은 두 형태의 만노실화 키토산 중 어느 하나를 사용하여 및 식수 내 1:128로 희석된 0.5 % 키토산으로 증강된 군에서 상당히 감소되었다. 만노실화 키토산 군에서의 상당한 감소는 만노스 수용체에 대한 리간드로의 대식세포의 직접 표적화가 키토산 보조제의 효능을 증가시킨을 나타낸다. 또한, 매우 중요한 것은 만노실화 키토산의 비-환원 시프-염기 제형이 잠재적으로 해로운 화학물질의 추가를 가지지 않는 NaCNBH_4 환원된 만노실화 키토산과 같이 효과적이라는 것이다. 또 다른 매우 놀라운 일은 증강을 위해 사용된 식수 내 1:128로 희석된 0.5 % 키토산이 오직 비경구 백신 접종만 한 것에 비해 살모넬라의 콜로니화의 감소에 뛰어난 결과를 보였다는 것이다(도 7).

- [0054] 실시예 V : 백신 접종에 대한 투여 경로
- [0055] 백신 접종에 대한 최상의 경로 및 보조제 조합을 연구하였다. 부화하는-날 새끼 새에 도 8에서 나타나듯이 식염수 또는 각 보조제 혼합물이 있는 백신 0.25 mL를 투여하였다. 비교되는 보조제가 포름알데히드-가교된 키토산, 환원된 만노실화 키토산(Man C V1), 비-환원 만노실화 키토산(Man C V2)을 포함하고, 각 보조제는 항원과 결합되어 피하 또는 식수 중 어느 하나로 부화하는-날에 투여된다. 새는 피하로, 식수에 또는 경구 위관 영양법을 통하는 것 중 어느 하나로 같은 보조제-항원 조합의 두 번째 투여로 증강된다. 식수(DW)에 백신 접종된 군은 물에 1:128로 희석되었다. 경구 위관 영양법으로 증강된 것은 0.25 ml 주어져다. 점막 IgA 반응은 상기 기재되었듯이 경쟁적인 SE 플라젤린 ELISA 분석(IDEXX)을 사용하여 측정되었다. 비록 도 8에서 최종 다섯 처리 군은 실질적으로 다르지 않았지만, 수치상으로 가장 낮은 군은 일차적인 백신 접종 및 증강을 위한 DW에서의 1:128 희석에서 sq 전달된 만노실화 키토산 V2이었다. 이 군은 sq 일차적인 백신 접종 및 sq 또는 DW 증강 중 어느 하나로 0.5 % 키토산과 비교해서 회장에서 실질적으로 더 높은 수준의 IgA를 가졌다. 환원된 및 비-환원된 형태의 만노실화 키토산 사이에 또는 증강이 식수 또는 경구 위관 영양법을 통할 때에 실질적인 차이가 관찰되지 않았다.
- [0056] 실시예 VI : 미네랄 오일 기재 보조제와의 비교
- [0057] 만노실화 키토산은 그 후 상업적으로 이용가능한 미네랄 오일 기재 보조제와 비교되고 결합된다. 10^8 cfu/ml로 자라고 포름알데히드로 불활성화된 살모넬라 엔테리티디스(SE) 박테린은 항원으로서 사용되었다. 살모넬라 박테린은 키토산, 만노실화 키토산, 미네랄 오일 보조제, 키토산 및 미네랄 오일 보조제의 조합 또는 새 당 1×10^7 cfu의 최종 용량을 갖는 4×10^7 cfu/ml의 PBS와 2:1 비로 혼합되었다. 부화하는-날 육용 새끼 새들은 상기 설명되었듯이 피하로 나타난 제제 0.25 ml로 사전준비 되었다. 새끼 새들은 12 일의 나이에 경구 위관 영양법에 의해 증강되었다. 22 일에 혈청(IgG) 및 회장 점막(IgA) 내 항체 수준은 경쟁적인 ELISA 키트(IDEXX)로 결정되었고 결과는 도 9 및 10에 각각 나타난다. 샘플 대 대조군 비의 감소된 흡수 수준은 SE 플라젤린 코팅된 플레이트를 인식하는 항체의 더 높은 수준을 나타낸다. 만노실화 키토산 백신 접종 및 증강 프로토콜은 각 다른 군에 비교해서 상당히 증가된 IgG 및 IgA 수준을 생성한다.
- [0058] 실시예 VII : 단일 투여 이후 IgG 반응
- [0059] 단일 비경구 백신 접종 이후 IgG 면역 반응을 연구하기 위해, 부화하는-날 새끼 새들을 식염수, 보통 키토산 또는 만노실화 키토산과 결합한 보르데텔라 아비움 박테린 2.5×10^8 cfu/새끼로 피하로 백신 접종을 맞혔다. 혈청은 14 일에 수집하였고 보르데텔라 특이적 IgG는 ELISA에 의해 측정하였다. 결과는 도 11에 나타나고 나타난 처리에 대한 흡수의 샘플 대 양성 대조군 비를 보여준다. 흡수의 더 높은 수치는 증가된 특이적 IgG를 나타내는 것이다. 보르데텔라 항원과 결합된 만노실화 키토산은 가장 높은 수치의 IgG를 생성하였다.
- [0060] 실시예 VIII : 식수 내 증강 이후 IgG 반응
- [0061] 보르데텔라 아비움 박테린의 피하로의 투여에 이은 14일에 식수 증강 이후 IgG 면역 반응을 조사. 부화하는-날 새끼 새들을 식염수, 보통 키토산 또는 만노실화 키토산과 결합한 보르데텔라 아비움 박테린 2.5×10^8 cfu/새끼로 피하로 백신 접종을 맞혔다. 14 일에, 백신 접종에 대한 증강으로서 보르데텔라 아비움 박테린 7.8×10^6 cfu/mL이 식수에 포함되었다. 21 일, 증강-후 7 일에 혈청이 수집되었고 특이적 IgG 반응이 ELISA에 의해 측정되었다. 도 12에 그 결과가 나타나고 나타난 처리에 대한 흡수의 샘플 대 양성 대조군 비를 보여준다. 흡수의 더 높은 수치는 증가된 특이적 IgG를 나타내는 것이다. 보르데텔라 항원과 결합된 만노실화 키토산은 대조군 또는 변형되지 않은 키토산과 비교해 실질적으로 더 높은 수준의 IgG를 생성하였다.
- [0062] 보조제 제조 방법 :
- [0063] 포름알데히드로 가교된 키토산-단백질 백신의 제조:
- [0064] 만노스 없는 키토산의 최종 생성물은 백신 제형 내 0.5 % 키토산의 최소 최종 농도로부터 2 % 키토산의 최대 최종 농도까지의 범위일 수 있다. 키토산은 탈이온수 L 당 15 ml의 빙초산을 적절한 농도(물에 1.5 % 아세트산)로 함유하는 용액에 용해된다. 일반적으로 브로쓰 배양을 위해 배양액의 2 부피가 1.5 % 키토산(최종 백신 제형 내 0.5 % 키토산)의 1 부피와 혼합된다. 다른 항원은 가능한한 최소한으로 희석되어 1.5 % 키토산까지의 최종 농도가 된다. 포름알데히드는 그 후 항원-용해된 키토산 혼합물에 첨가되어 최종 농도는 0.2 % 포름알데히드 또는 0.008 M 포름알데히드가 되도록 한다. 상기 실시예에서, 37 % 포름알데히드 용액이 사용되었다. 트리

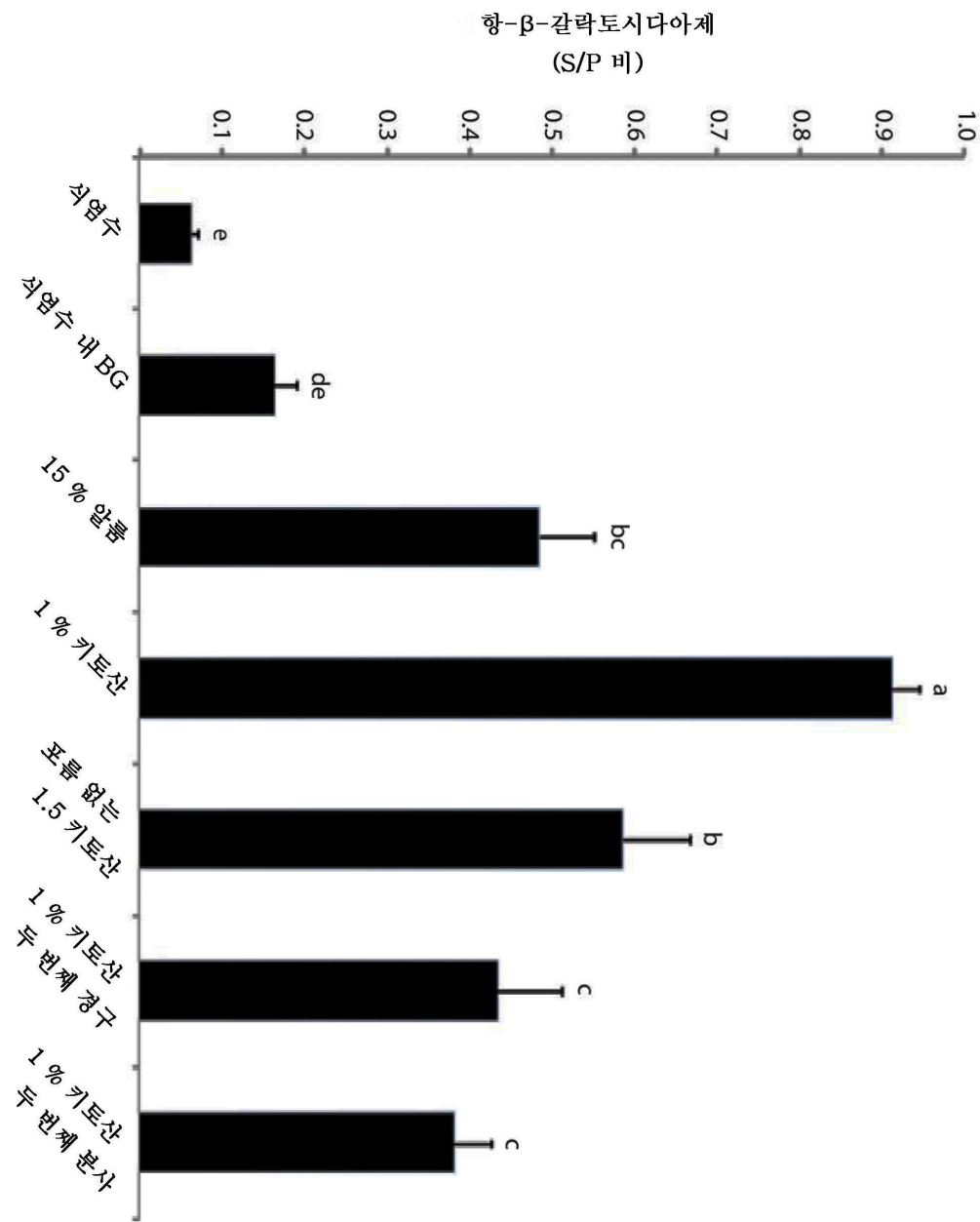
스-HCl은 최종 농도 0.5 g/L에 첨가될 수 있다.

만노실화 키토산의 제조:

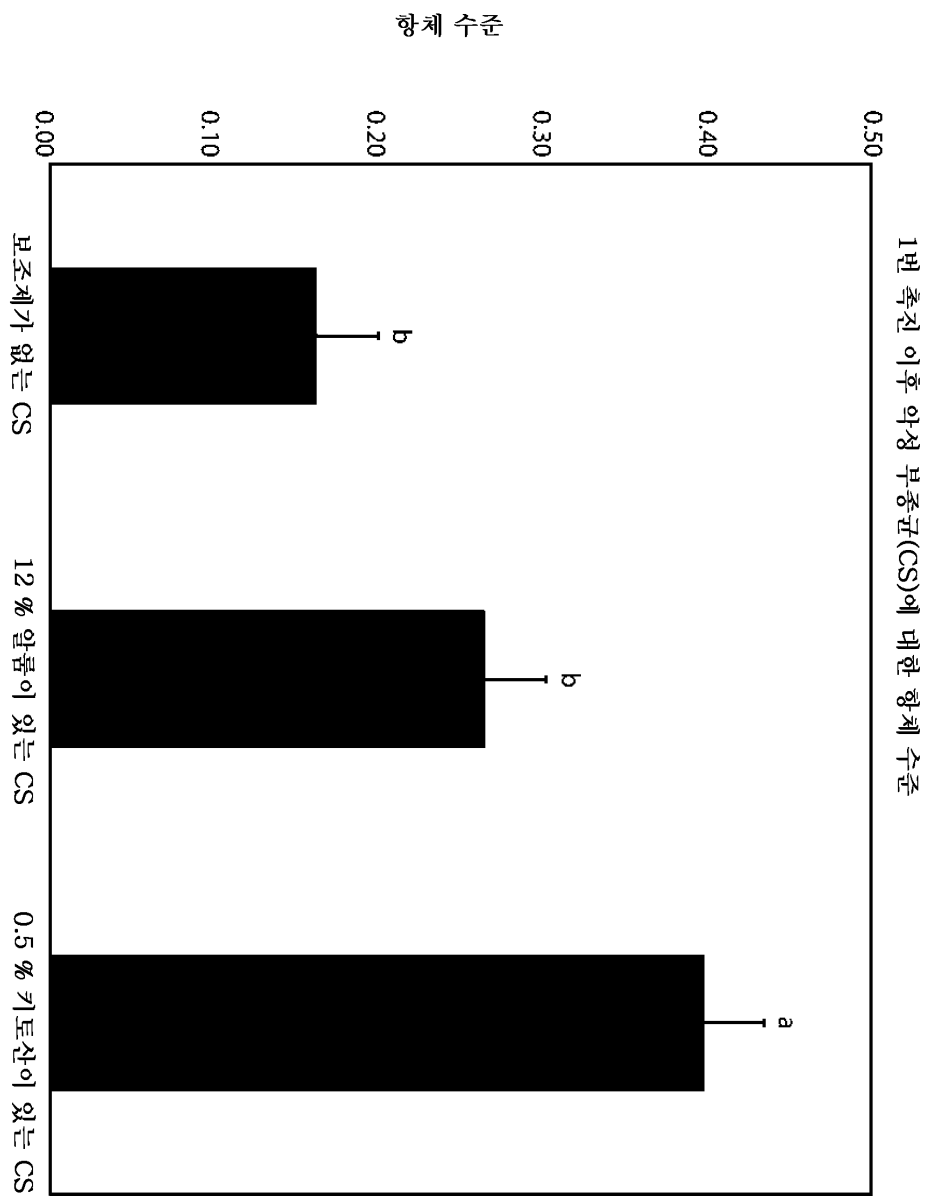
pH 4.0, 0.1 M 아세트산 나트륨의 1 부피 내 만노스 2 몰 당량을 2 시간 동안 60 ℃에서 가열하였다. 용액은 그 후 0.15 % 아세트산 내 2 % 키토산 1 몰 당량의 2 부피에 첨가하였고 10 분 동안 상온에서 반응하여 1.5 % 만노실화 키토산 용액을 생성하도록 하였다. 이는 그 후 2 부피의 배양액이 1.5 % 만노실화 키토산의 1 부피에 혼합되도록 브로쓰 배양액과 혼합된다. 농축된 항원은 가능한한 최소한으로 또는 원하는만큼 희석될 수 있다. 트리스-HCl은 최종 농도 0.5 g/L에 첨가될 수 있다.

도면

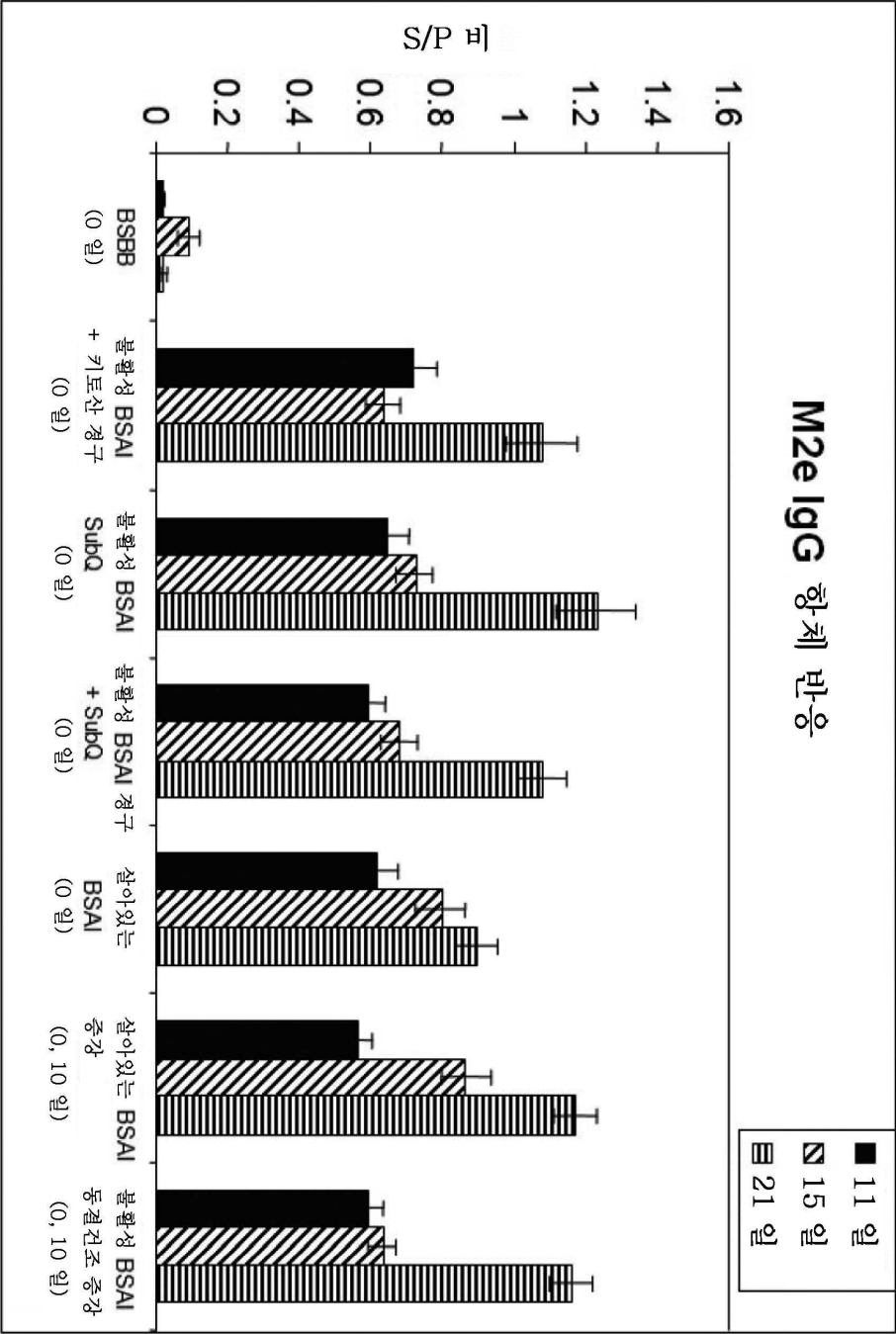
도면1



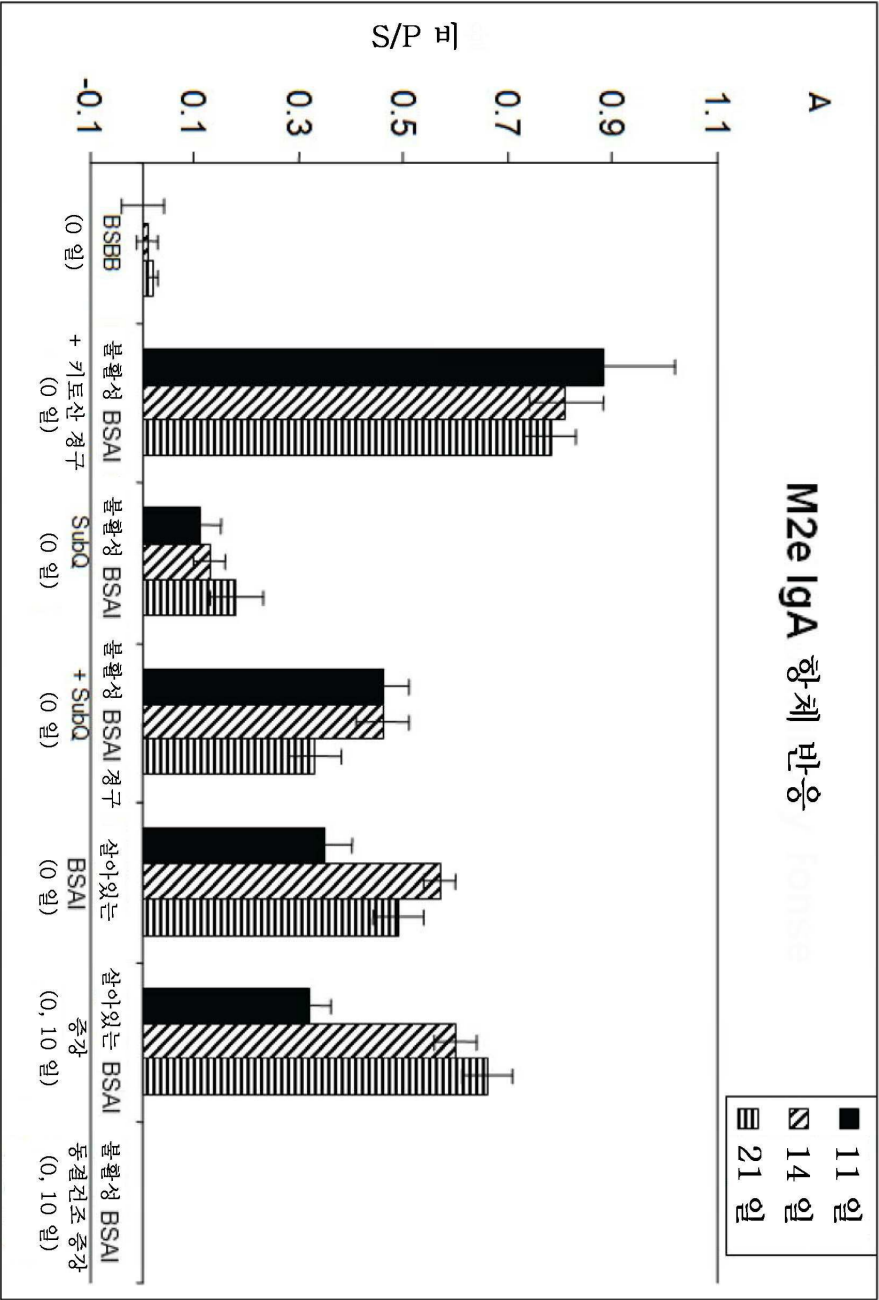
도면2



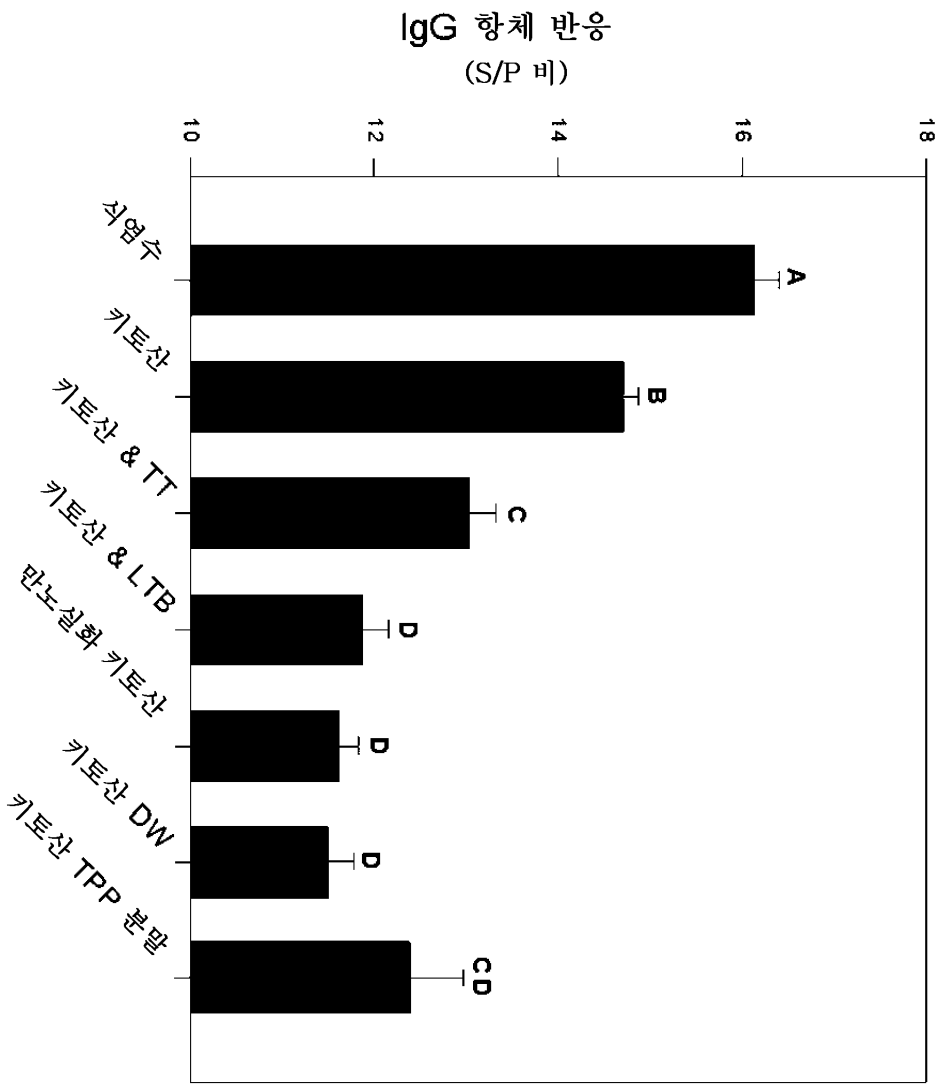
도면3a



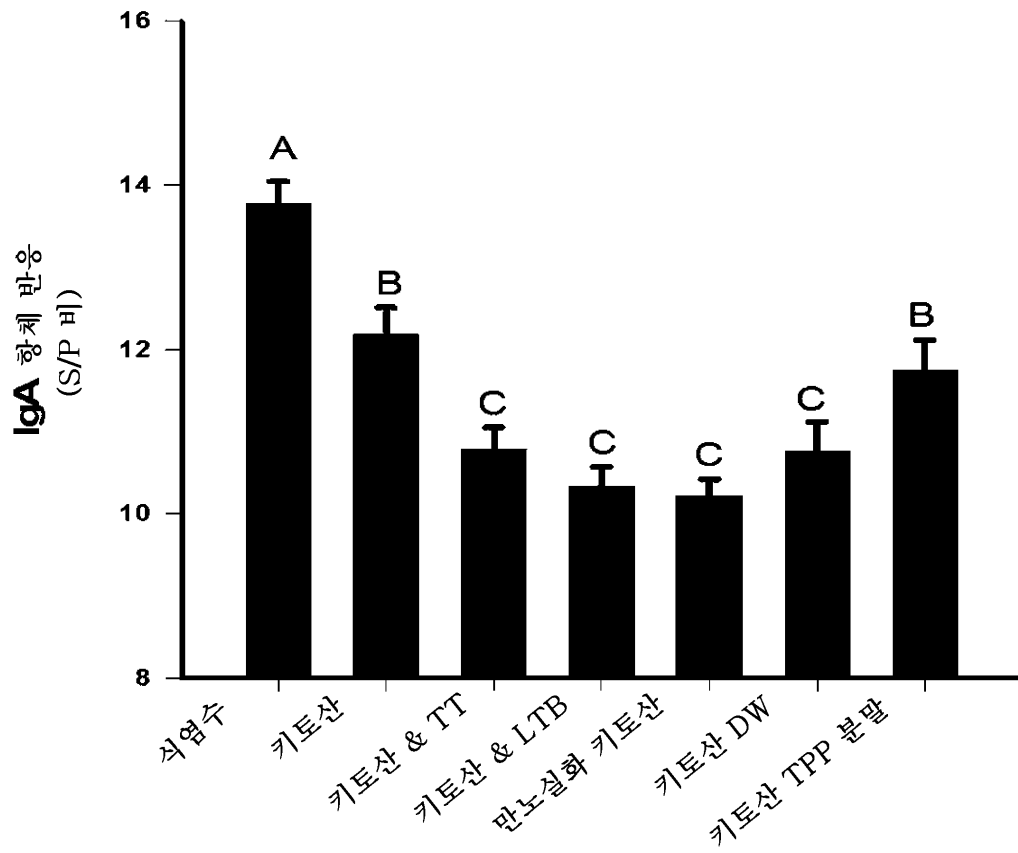
도면3b



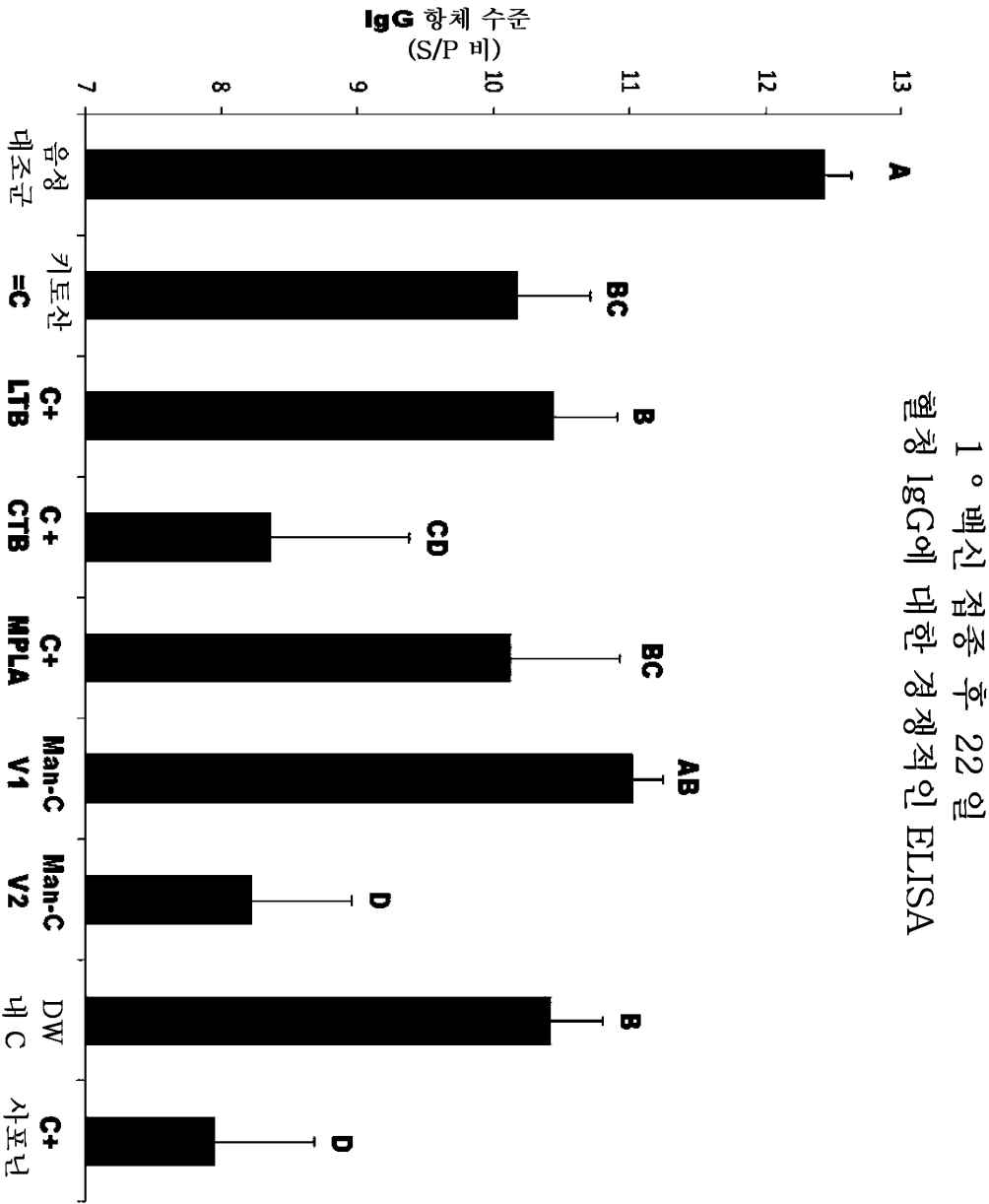
도면4



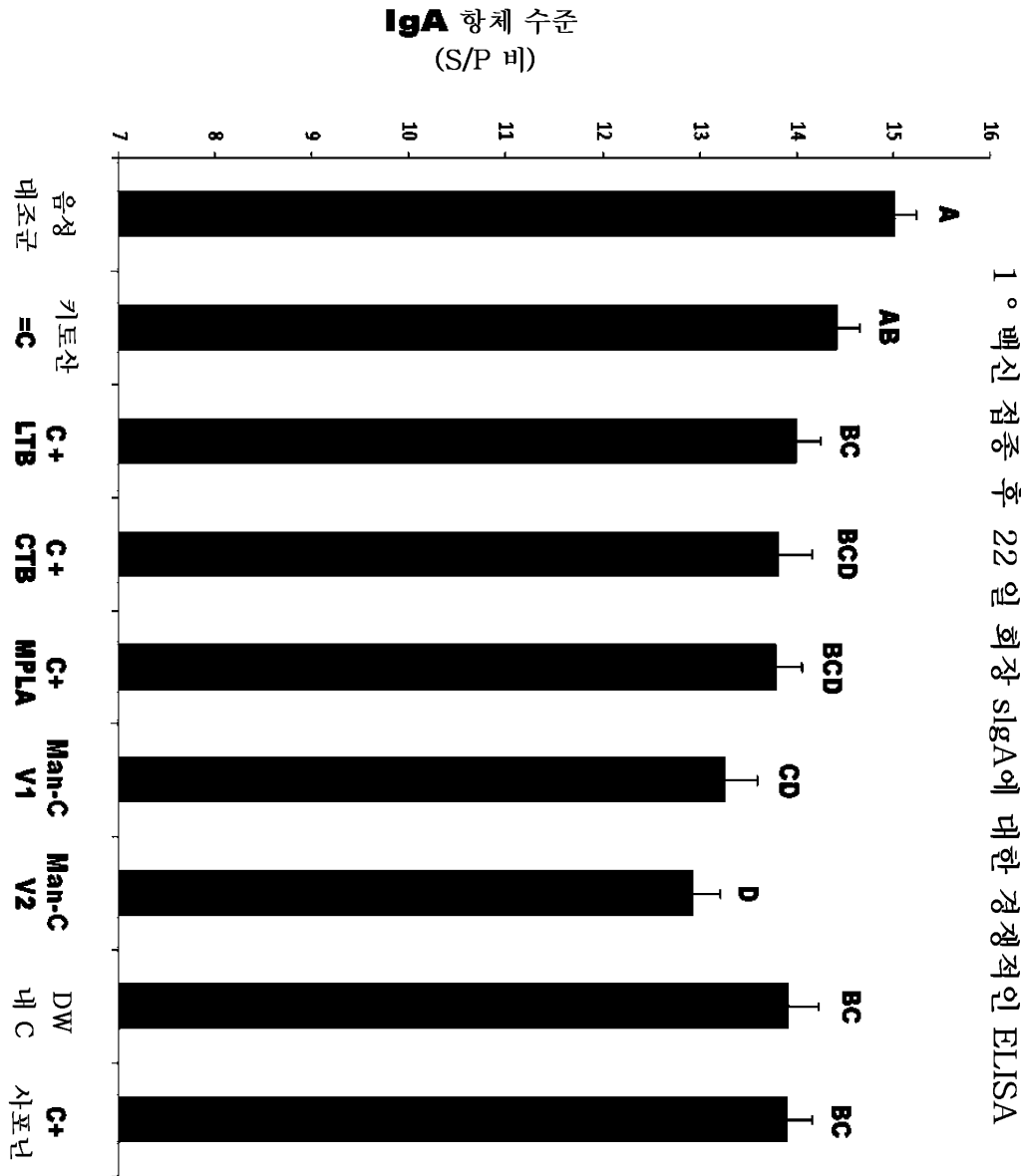
도면5



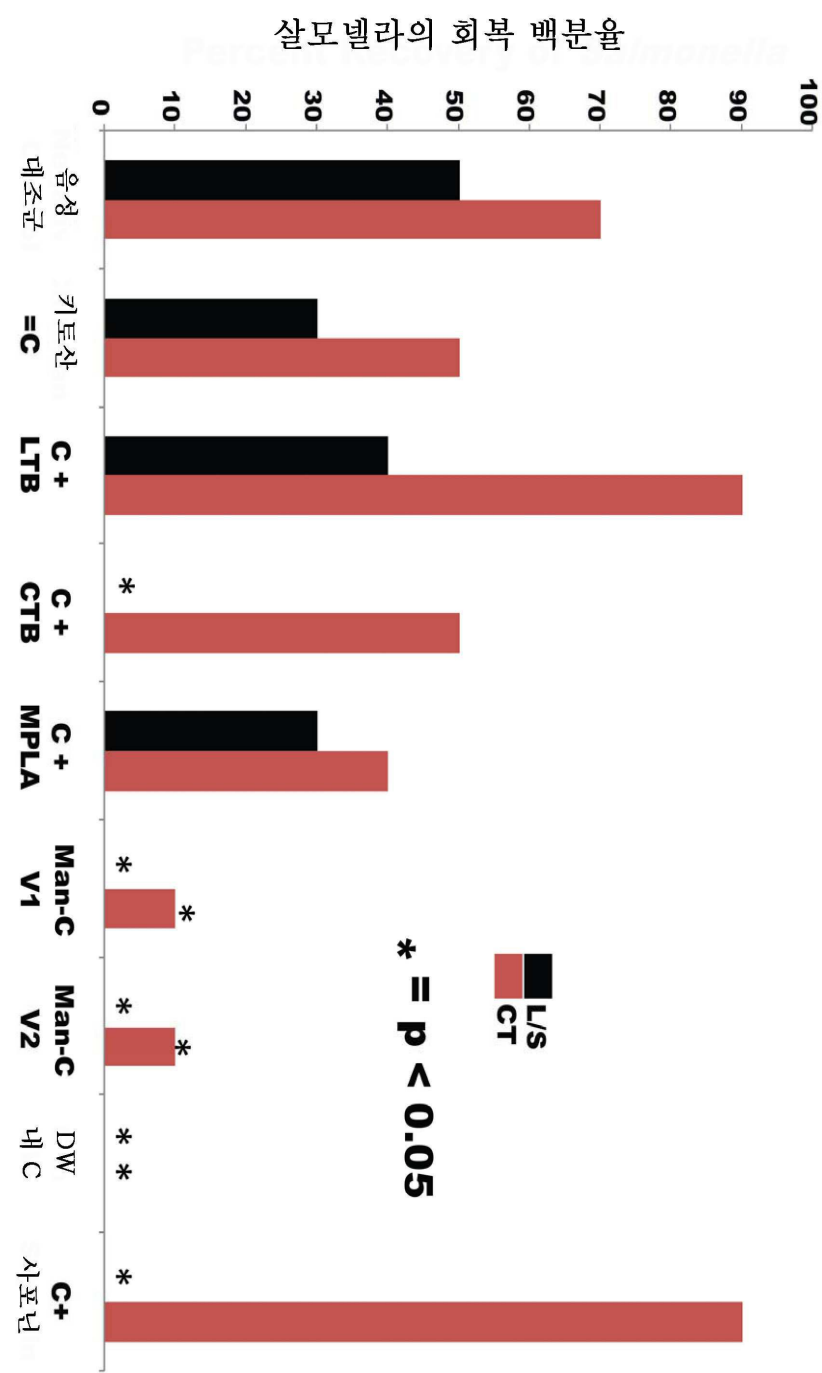
도면6a



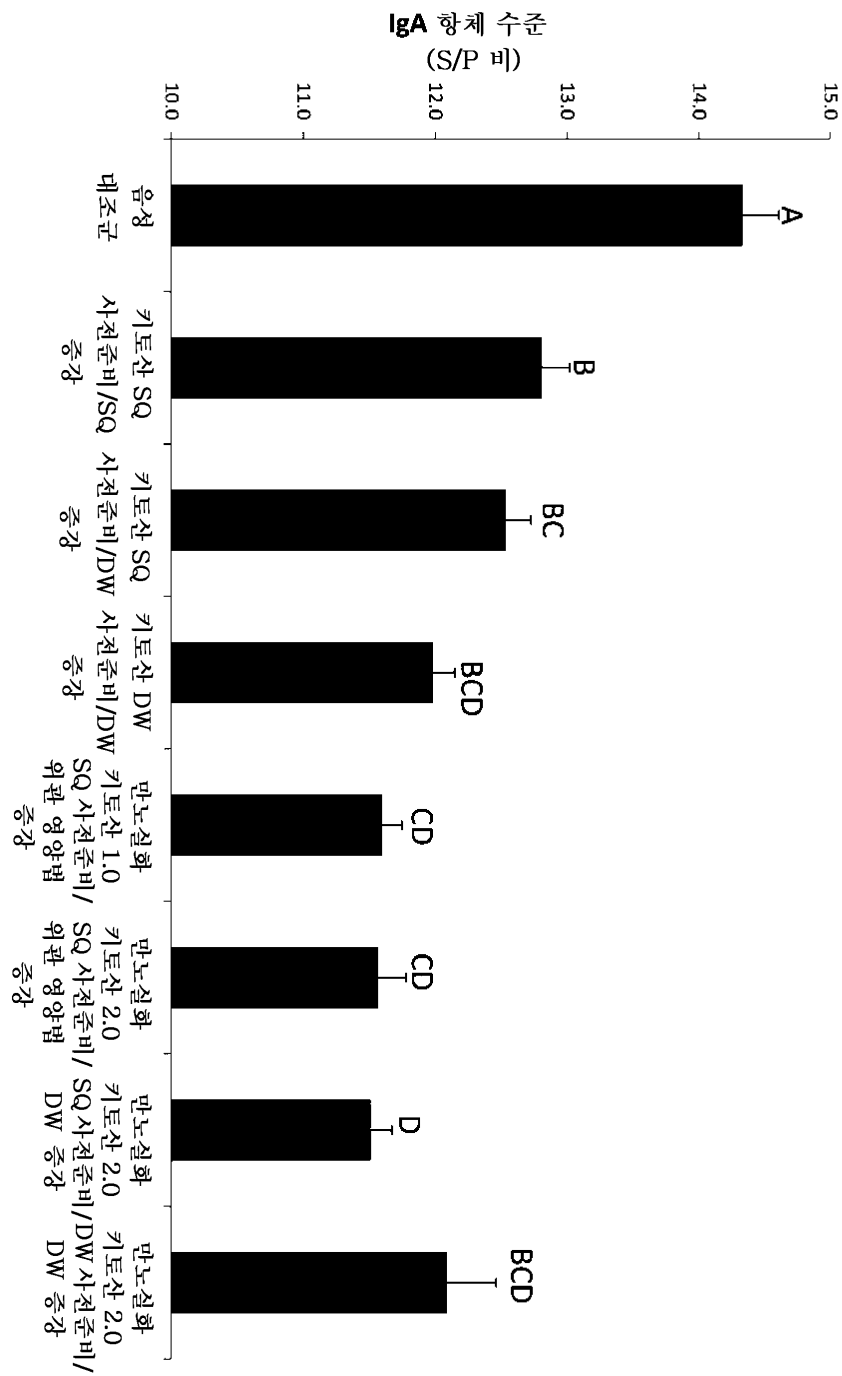
도면6b



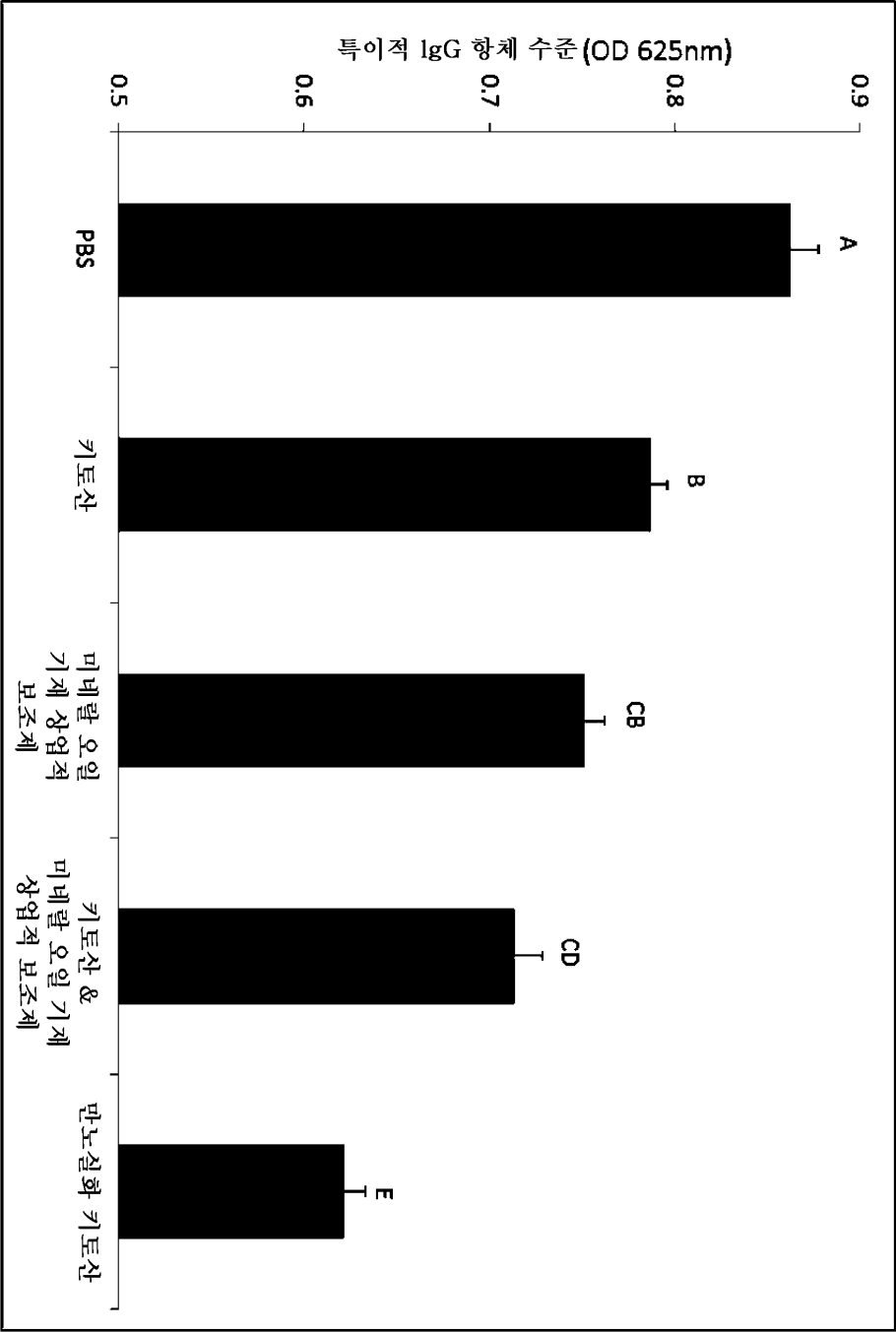
도면7



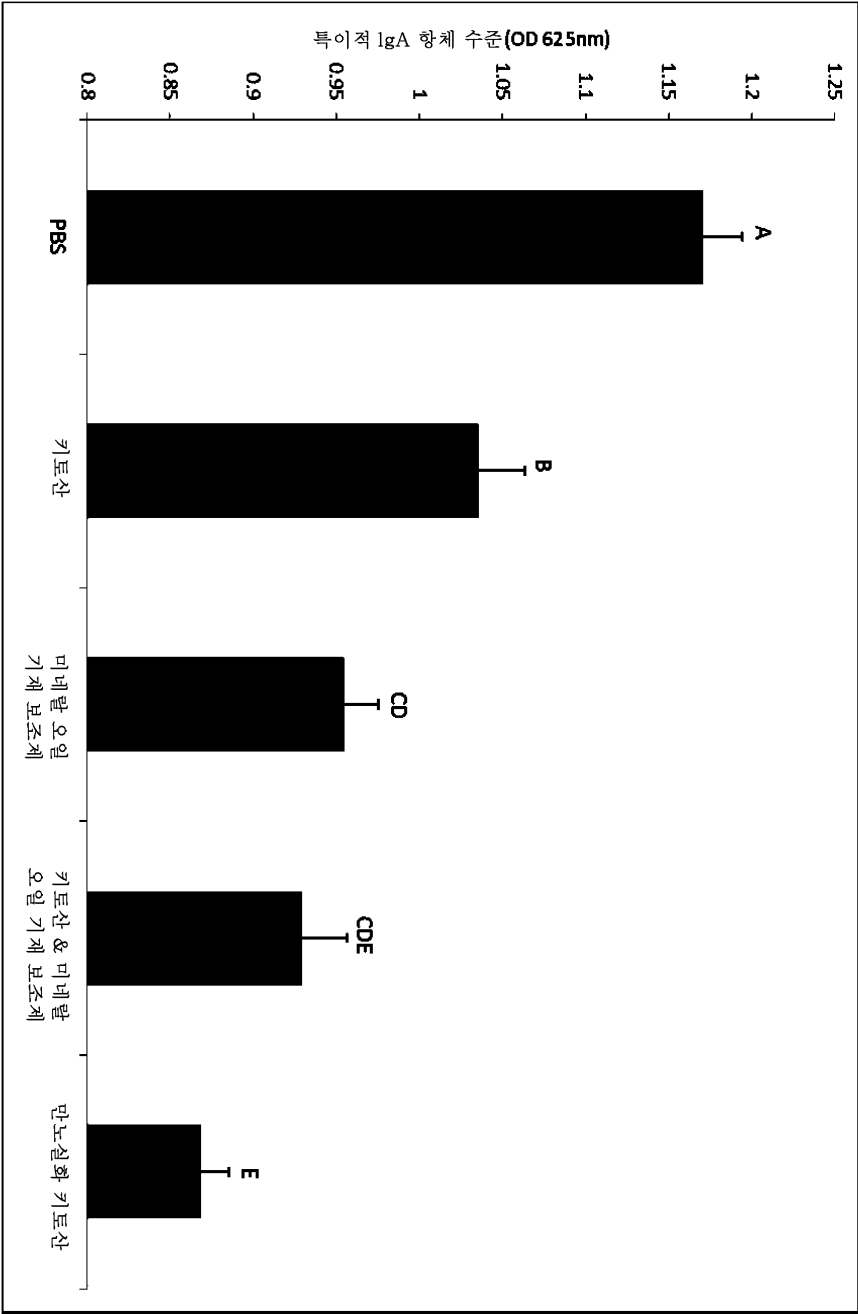
도면8



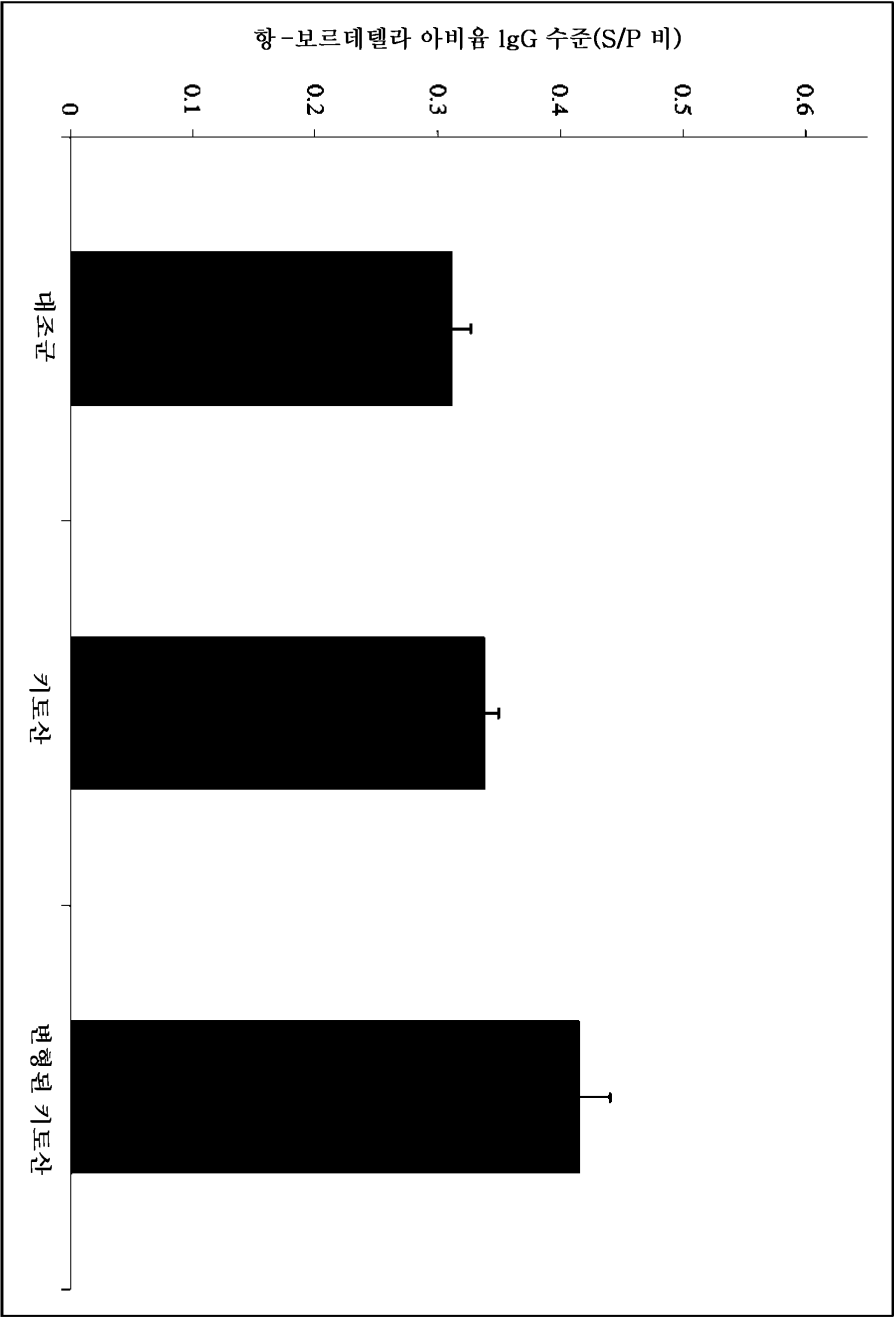
도면9



도면10



도면11



도면12

