



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년09월10일
(11) 등록번호 10-0756677
(24) 등록일자 2007년09월03일

(51) Int. Cl.

A61K 47/00(2006.01)

(21) 출원번호 10-2001-7003305

(22) 출원일자 2001년03월14일

심사청구일자 2004년07월01일

번역문제출일자 2001년03월14일

(65) 공개번호 10-2001-0085796

공개일자 2001년09월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US1999/021182

국제출원일자 1999년09월14일

(87) 국제공개번호 WO 2000/15194

국제공개일자 2000년03월23일

(30) 우선권주장

09/153,133 1998년09월15일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US 4016252

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김경미

(54) 칼슘 포스페이트 전달 비이클 및 어쥬반트

(57) 요약

본 발명은 어쥬반트 활성 증진 수단을 포함한 개선된 칼슘 포스페이트 전달 비이클 또는 어쥬반트 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 어쥬반트는 의도하는 목적에 기초하여 적절하게 바람직한 제제로 제조될 수 있다. 입자 크기들은 어쥬반트 활성을 개선하기 위하여 조절될 수 있다. 원하는 바에 따라 적절한 비율로 다른 보충 물질들이 첨가되어 면역 시스템의 바람직한 성분들을 선택적으로 유도하고, 숙주반응에서 어쥬반트의 효과를 증진시킬 수 있다.

(56) 선행기술조사문헌

WO 98/16209 A1

US 5462751

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르기즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 남아프리카, 그라나다, 가나, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 감비아, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아

EA 유라시아특허 : , 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : , 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : , 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니비사우

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

칼슘 포스페이트, 및 병원체에 대하여 숙주를 보호하는 숙주 세포성 면역 반응을 유도하는 면역원을 포함하며, 상기 칼슘 포스페이트는 300~500nm의 입자를 포함하고, 경화하는 경우에 조성물의 전체 부피의 20% 이상을 차지하는 50~300 μ m의 대공극을 포함하는 주사가능한 경화성 페이스트 제제인 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 면역원은 박테리아 또는 그 단편, 바이러스 또는 그 단편, 핵산분자, 단백질, 합텐, 면역관용원 및 알레르겐으로 이루어지는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 40

제38항에 있어서, 어쥬반트를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 어쥬반트는 무라밀 디펩타이드, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 히드록시아파타이트, 불완전 프로인트(Freund's) 어쥬반트, 완전 프로인트 어쥬반트 및 중합체로 이루어진 군에서 선택되며, 상기 중합체는 PMMA, PLGA, PLA, 젤라틴, 폴리(포스파젠)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 어쥬반트는 세포성 면역 반응을 증진시키기 위해 선택되는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 어쥬반트는 같은 형태의 세포들로부터 세포성 면역 반응을 증진시키기 위해 선택되는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 44

제40항에 있어서, 상기 어쥬반트는 다른 형태의 세포들로부터 세포성 면역 반응을 증진시키기 위해 선택되는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 45

제38항에 있어서, 시토카인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 시토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, G-CSF, IL-15, GM-CSF, OSM, LIF, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , B7.1, B7.2, TNF- α , TNF- β , LT- β , CD40 리간드, 파스(Fas) 리간드, CD27 리간드, CD30 리간드, 4-1BBL, IL-8, MCP-1, MIP- α , MIP- β , RANTES, TGF- β , IL-1 α , IL-1 β , IL-1 RA, IL-10, IL-12 및 MIF로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 47

제38항에 있어서, 상기 칼슘 포스페이트는 비결정성 칼슘 포스페이트, 나노결정 칼슘 포스페이트, 거의 결정성 없는 칼슘 포스페이트, 디칼슘 포스페이트 디하이드레이트, 트리칼슘 포스페이트, 테트라칼슘 포스페이트, 모네타이트, 모노칼슘 포스페이트 모노하이드레이트, 옥타칼슘 포스페이트 또는 히드록시아파타이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 48

제38항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 포유류에서 세포성 면역 반응을 촉진하는 의약을 제조하기 위한 용도로 사용되는 것임을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

청구항 49

제38항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 포유류에서 항원의 면역원성을 증가시키기 위한 의약을 제조하기 위한 용도로 사용되는 것임을 특징으로 하는 면역학적 백신 전달 조성물.

명세서

기술 분야

<1> 본 발명은 개선된 칼슘 포스페이트 백신 전달 비이클, 어쥬반트 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 이상적인 백신 전달 시스템은 항원을 원하는 작용 위치에 도입하고, 적절하고 제어가능한 속도로 방출되도록 고안되어야 한다. 운반체(carrier) 또한 비독성이고 사용 후 숙주에 남지 않아야 한다. 어쥬반트(adjuvant) 및 항원 모두 약제학적으로 안정해야 하고, 전달 시스템은 적용하기에 쉬워야 한다. 또한, 항원에 대한 숙주 반응은 신속하게 최대 수준에 도달하여 백신 주입 후 가능한 빨리, 보호 효과를 나타내야 한다.
- <3> 통상적인 백신은 면역성을 유도하기 위하여 불활성화된 바이러스 또는 박테리아와 같은 복합 항원을 일반적으로 사용하였다. 이러한 백신들은 종종 부작용(예로서, 육아종(granuloma) 형성, 발열성(pyrogenicity) 및 과민성 반응(hypersensitivity))을 일으킨다. 서브 유니트 백신의 사용은 복잡한 항원들과 함께 생산된 백신과 관련된 원하지 않는 부작용의 횟수 및 정도(severity)를 감소시킨다. 서브 유니트 백신은 타겟(target) 병원체로부터의 단지 하나 또는 몇 개의 단백질 또는 다당체로 구성된다. Experientia(77, 1996, pp 451~465)지에서 스즈에(Suzue)등은 서브 유니트 백신으로서 열충격 단백질들(HSPs)을 개시하였다. 그 자체만으로는 작은 크기이기 때문에, 서브 유니트 백신은 단지 약한 면역원성만을 나타내거나, 종종 만족할 만한 정도의 면역원성을 유도하지 못하는 경향이 있다. 따라서, 서브 유니트 백신의 사용을 효과적으로 하기 위해서는, 강화된 어쥬반트들 및 특정 전달 전략의 사용과 같은 면역원성을 증진시키기 위한 전략이 필요하다.
- <4> 서브 유니트 백신에 대한 면역원성 반응을 개선시키기 위한 한 가지 방법은 이식가능한 데포(depot) 전달 시스템을 통한 조절된 방출(controlled release) 백신 전달의 사용을 통한 것이었다. 조절된 방출 기술은 면역계에 대한 항원 및 어쥬반트의 시간적 공간적 체를 최적화함으로써 개선된 효과를 제공하였다. 면역원의 조절된 장기 방출은 일반적으로 효과적인 백신을 생산하는데 필요한 항원 결정기의 수를 줄이고, 부스터(booster) 접종의 필요성을 없앤다. 이상적으로, 조절된 방출 기술은 면역원의 초기 볼러스(bolus)를 전달하고, 그 후 점차적으로 숙주에 방출되는 면역원의 양을 감소시킴으로써 자연 면역 과정(natural immune challenge)과 흡사하게 될 것이다. 조절된 전달 시스템은 의도된 백신에 관한 최적 면역 반응을 잠재적으로 유도하는 세포성 및 체액성 반응 모두를 일으키기 위하여 항원을 항원제공 세포들(antigen-presenting cells)(APCs)에 효과적으로 안내할 수

있다. 어쥬반트, 특히 재흡수가능한 어쥬반트(resorbable adjuvant)는 복잡한 맥동 역학(pulsatile kinetics) 및 항원 방출을 달성하기 위한 조절된 방출 장치로서의 역할을 한다. Journal of Pharmaceutical Sciences(85, 1996, p1261~1267)에서 자오(Zhao)는 중합체들을 종양 백신에 중점적으로 사용하는 조절된 방출 기술을 개시하고 있다.

<5> 조절된 방출 전략에 부가하여, 백신 면역원성은 특정 어쥬반트 선택에 의해 증진되었다. 서브 유닛 백신 뿐만 아니라 통상적인 백신도 일반적으로 어쥬반트들의 사용을 필요로 한다. 본 기술분야에서 알려진 일반적인 어쥬반트들은 알루미늄 화합물, 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide) 및 프로인트(Freund's) 완전 및 불완전 어쥬반트를 포함한다. 알루미늄 화합물들 및 합성 중합체들은 어쥬반트로서 널리 사용되어왔으나, 재흡수되지 않고 사용 후 체내에 잔류하며, 합성 중합체들을 생산하기 위하여 사용된 단량체는 독성일 수 있다(Pharmaceutica Acta Helvetica, 53, 1978, pp.17~23).

<6> 칼슘 포스페이트 물질들은 비독성이고, 안정하며 생체적합성이 있기 때문에 어쥬반트 및 전달 비이클로서 매력적이다. 또한, 칼슘 포스페이트류는 항원, 백신, 면역원, 단백질 및 다른 활성제에 대하여 높은 친화성 결합 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 칼슘 포스페이트 겔의 제조방법은 토웨이(Towey) 등의 미국특허 제 2,967,802호에 개시되어 있다. 토웨이는 정제 분해제(tablet disintegrators), 부유제, 응집제, 경구 해독 제산제 및 다른 용도 뿐만 아니라 백신 전달 비이클이나 면역학적 어쥬반트로서의 이들 칼슘 포스페이트 겔의 용도를 제시하고 있으나, 실제로 또는 구체예를 제시하지 못하고 있다. 그리고, 상기 제조된 겔을 이용하여 면역 반응을 증진시키거나 높이는 방법에 대한 언급이 없다. 미국특허 제 4,016,252호 및 생물학적 표준화의 발전(Developments in Biological Standardization)(65, 1985, pp131~136)에서 렐리벨드(Relyveld)는 백신을 흡착할 수 있는 주입가능한 칼슘 포스페이트 겔의 제조를 설명하고 있다. 렐리벨드의 칼슘 포스페이트 겔의 목적은 어쥬반트 활성(adjuvanticity)을 증가시키는 것이 아니라, 고도로 농축되고 안정된 백신을 제공하는 것이다.

<7> 어쥬반트 입자들은 백신의 어쥬반트 활성에 영향을 주기 위하여 사용될 수 있다. 백신(Vaccine)(6, 1988, pp. 125~129)에서, Kreuter 등은 입자 크기 직경의 감소를 통해 나노입자 중합체의 어쥬반트 효과를 증가시킬 수 있었음을 보고하였다. Arzneim-Frosch(21, 1971, pp. 903)에서 Grafe와 감염 및 면역(Infection and Immunology)(19, 1978 pp. 667)에서 Kreuter는 각각 Al_2O_3 어쥬반트와 γ 선-중합된 폴리(메틸 메타크릴레이트) 입자 어쥬반트를 사용하여 비슷한 결과들을 보고하였다. 미국특허 제 4,329,332호에서 Courvreur 등은 중합체의 생분해 속도와 비슷한 속도로 속주에 방출되는 생물학적 활성 물질을 포함하는 합성 중합체 나노입자들을 개시하였다. 유럽 약제학 및 생약제학지(European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics)(39, 1993, 173~191)에서 Alemann 등은 나노입자와 계속적으로 관련된 문제는 나노입자가 세망내피계(reticuloendothelial system: RES)에 의하여 신속하게 섭취되는 것이라고 논하였다. RES는 혈류로부터 작은 외래 입자를 제거하는 기능을 하기 때문에, 이러한 입자들 상에 포함된 약물은 그 목적지에 도달하지 못하고, 오히려 간 및 비장에서 고농도로 발견된다. 조절 방출지(Journal of Cotrolled Release)(16, 1991, pp.169~176)에서 Kreuter는 계면활성제, 자기장 및 다른 투여 경로들(예로서, 피하, 근육내 및 안구)의 사용과 같은 RES 나노입자 섭취를 피하기 위한 다양한 방법들을 개시하였다. 피하 및 근육내 주사 후, 이러한 방식으로 처리된 나노입자들은 주사 위치에 머무른다(Kreuter, 약제과학지(Journal of Pharmaceutical Sciences), 72, 1983, p1146~1149). 또한, 약물 및 항생제들은 나노입자와 결합되었을 때 독성의 감소 및/또는 증가된 효과를 나타내었다. 또한, 나노입자내에 통합된 후에 파일로카르핀(pilocarpine)의 전-각막(pre-corneal) 체류시간이 증가되었다는 것이 Gurny(안구 약물 전달의 생약학(Biopharmaceutics of Ocular Drug Delivery), CRC 출판, Boca Raton, 1993, p81-90)에 의해 보고되었다. 미국특허 제 5,443,832호에서 Amerongen 등은 또한 적당한 크기(0.01~0.1 미크론)의 히드록시아파타이트(hydroxyapatite) 입자는 상피를 가로질러 항원을 운반할 수 있다는 것을 개시하였으나, 입자 크기의 어쥬반트 활성을 설명하지는 못하였다. 더욱이, 히드록시아파타이트는 재흡수되지 않거나, 거의 재흡수되지 않는 것으로 알려졌다.

<8> 현재까지 많은 칼슘 포스페이트 어쥬반트가 개발되었으나, 어느 것도 어쥬반트 활성에 대해 최적화되지 않았다. 많은 이들 칼슘 포스페이트 어쥬반트들은 생체적합성의 부족, 낮은 재흡수성, 활성 물질의 조절된 방출의 제공 불능, 복수 면역화의 필요성 및 투여의 어려움 등과 같은 하나 이상의 단점들을 가지고 있다. 또한, 어느 것도 비결정성 칼슘 포스페이트이거나 나노결정질 칼슘 포스페이트인 적은 없었다. 실제로, 여기에 참고문헌으로 포함된 생물질과 면역계(Biomaterials and the Immune System)(Handbook of Biomaterials and Bioengineering Pt.A, Vol. 1, Marcel Dekker, New York, 1995)에서 Olson은 트리칼슘 포스페이트를 포함하는 세라믹 및 무기 복합체들이 면역학적으로 유리한 것으로 여겨진다고 보고하였다. 따라서, 보다 바람직한 특성들(예로서, 재흡수성, 조절된 방출, 생체적합성, 투여의 용이성)을 함께 포함하는 개선된 칼슘 포스페이트 전달 시스템이 요구된

다. 그리고, 바람직한 숙주 반응을 증진시키거나 높이는 개선된 생체적합성의 재흡수가능한 칼슘 포스페이트 어쥬반트들 및 전달 비이클이 요구된다.

<9> **발명의 요약**

<10> 본 발명은 비결정성 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 개시하고 있다. 거의 결정성이 없는 아파타이트성 칼슘 포스페이트 어쥬반트가 개시되어 있다. 또한, 어쥬반트 활성 증진 수단을 가진 칼슘 포스페이트 어쥬반트가 개시되어 있다. 상기 증진 수단은 외생 또는 내생적일 수 있으며, 단일 어쥬반트 제제 내에 조합될 수 있다.

<11> **정의**

<12> "어쥬반트(adjutant)" - 어쥬반트는 특정 활성 물질에 대한 숙주 반응을 일으키거나 증진시킬 수 있는 어떤 물질을 말한다. 때때로, 어쥬반트는 활성 물질을 사용하지 않고도, 그 자체로서 숙주 반응을 유발시킬 수 있다. "어쥬반트 활성(adjutantcity)"은 숙주 반응을 유발시킬 수 있는 어떤 물질의 능력을 나타낸다. 이러한 어쥬반트들은 본 명세서에서는 비특이적 어쥬반트 활성을 가지는 것으로 설명된다.

<13> "전달 비이클(delivery vehicle)" - 전달 비이클은 활성 물질을 숙주로 운반하거나 도입할 수 있는 어떤 물질을 말한다. 전달 비이클은 또한 어쥬반트일 수도 있다.

<14> "숙주 반응(host response)" - 숙주 반응은 어떤 외래 또는 이식된 물질이 숙주에 도입되거나 인식된 후 어떤 기간 내에 숙주에 의하여 발생하는 외래 또는 이식된 물질에 대한 생물학적 반응을 의미한다. 이러한 반응은 그 물질에 대한 염증, 면역, 세포 분열, 독성 또는 다른 어떤 반응일 수 있다. 상기 "숙주 반응"은 적응성 또는 고유적일 수 있으며, 이들 모두 완전한 기능 반응을 요구한다.

<15> "재흡수가능한(resorbable)" - "재흡수가능한"이라는 표현은 숙주로부터 물질의 제거를 설명하는데 사용된다. 상기 물질은 효소적인 과정, 세포성 반응, 분해(dissolution) 또는 다른 생물학적 또는 물리적 분해 기작에 의하여 재흡수될 수 있다. 재흡수는 수일에서 수년에 걸친 기간에 걸쳐 일어날 수 있다. 재흡수는 어떤 물질의 빠르게 리모델되는 것을 포함한다.

<16> "항원(antigen)" - "항원"은 숙주에 도입되었을 때, 어떠한 수단에 의하여 도입된 물질에 대하여 특정한 항체 반응을 유발시키는 어떠한 물질 또는 활성 물질을 의미한다.

<17> "활성 물질(active agent)" - "활성 물질"은 생물학적인 활성을 가진 어떤 물질을 말한다. 활성 물질들에는 항원, 백신, 면역관용원(tolerogens), 면역원, 성장인자, 단백질, 핵산 등이 포함된다.

<18> "백신(vaccine)" - "백신"은 병원체에 대하여 면역 또는 부분 면역을 일으키는 적응성 숙주 반응을 유도하는 어떤 물질을 의미한다. 백신은 한정되지 않으며, 생, 약독화(비병원성) 또는 사멸된 병원체, 항원 또는 병원체로부터 유래한 단지 하나 또는 몇개의 단백질 또는 다당체인 서브 유닛 백신일 수 있다.

<19> "어쥬반트 활성 증진 수단(adjutantcity enhancing means)" - "어쥬반트 활성 증진 수단"은, 이 수단의 부재 시 어쥬반트에 대한 숙주 반응에 비해 어쥬반트에 대한 숙주 반응이 증가되는 어떤 물질, 처리 또는 어쥬반트 구조(configuration)이다. 증가된 어쥬반트 활성은 면역 또는 외래 물질 반응의 어떤 요소의 증진되거나 또는 상승된 측면(예로서, 마크로파아지, CD4, CD8, 림프구 또는 체액성 또는 세포성 경로에 있어서의 특정한 증가와 같은 특정 면역 세포 형태의 증가)으로 종종 측정될 수 있다.

<20> 상기 증진 수단은 외생적 또는 내생적일 수 있다. "외생적 증진 수단"은 어떤 칼슘 포스페이트 전달 시스템에 대한 표준 숙주 반응을 더 증가시키는 상기 전달 시스템에 하나 또는 그 이상 추가되는 것으로 여겨진다. 어떤 외생적 증진 수단은 어쥬반트인 칼슘 포스페이트 물질을 제조하기 전, 제조 중 또는 제조 후에 그 어쥬반트에 적용될 수 있다. 이러한 외생적 증진 수단의 포함은 활성 물질들을 어쥬반트에 포함시키는 것(예로서, 흡착, 혼합, 공유결합)에 비교해 유사한 방식으로 이루어질 수 있다. 바람직한 외생적 증진 수단들은 시토킨(cytokines) 및 무라밀 디펩타이드, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 프로인트 완전 어쥬반트, 프로인트 불완전 어쥬반트 및 중합체들과 같은 어쥬반트를 포함한다. "내생적 증진 수단"은 증진된 어쥬반트 활성을 나타내게 하는 어쥬반트 그 자체의 변화 또는 증진을 의미한다. 일반적으로, 상기 내생적 증진 수단들은 제조 과정 중에 어쥬반트에 포함되어지나, 그러한 변형은 어쥬반트가 제조된 후에 이루어질 수도 있다. 내생적 어쥬반트 활성 증진 수단의 예들은 칼슘 포스페이트 물질 내의 결정화도의 정도를 증가시키는 것, 본 명세서에 개시된 실시예에 따른 특정 화학적 및/또는 상 조성물을 변화시키는 것, 어쥬반트 물질의 증가된 거칠도(roughness) 및 입자 크기 및 수(부피 퍼센트로 측정됨)가 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

- <21> "비결정성 칼슘 포스페이트" - 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP)는 현저한 비결정성 특성을 가진 칼슘 포스페이트 물질을 말한다. 현저한 비결정성 특성은 75% 이상의 비결정 함량, 바람직하게는 90% 이상의 비결정 함량을 고려한 것으로서, 넓고, 특징없는 X선 회절(XRD) 패턴에 의하여 특징지어진다.
- <22> "거의 결정성이 없는 아파타이트성 칼슘 포스페이트" - "거의 결정성이 없는 아파타이트성 칼슘 포스페이트"(PCA 칼슘 포스페이트)는 거의 결정성이 없는 합성 아파타이트성 칼슘 포스페이트를 의미한다. 상기 PCA 칼슘 포스페이트 물질은 특징적인 XRD 및 푸리에 전이 적외선(FTIR) 분광 패턴을 가진다면 반드시 단일 칼슘 포스페이트 상에 한정되지 않는다. 어떤 PCA 칼슘 포스페이트는 실질적으로 뼈와 동일한 XRD 스펙트럼을 가진다. 상기 스펙트럼은 하나는 26° 에서 중심을 가지고 다른 하나는 32° 에 중심을 가지는 $20^\circ \sim 35^\circ$ 의 영역내의 2θ 값에서 단지 두개의 넓은 피크 및 $27^\circ \sim 34^\circ$ 의 2θ 값에서 쇼울더들(shoulders) 및 가파른 피크들의 부재에 의하여 특징지어진다. 특히, 밀러 지수(Miller's Indices) 210, 112 또는 300에 해당하는 가파른 피크들 또는 쇼울더들이 없다. 쇼울더들은 29° 및 33.6° 의 약 2θ 값에서 나타날 수 있다. 이는 또한 563cm^{-1} , 1034cm^{-1} , 1638cm^{-1} 및 $3432\text{cm}^{-1} (\pm 2\text{cm}^{-1})$ 에서의 FTIR 피크에 의하여 특징지어진다. 가파른 쇼울더들은 1442cm^{-1} 와 1457cm^{-1} 에서 최대치를 가지는 더블렛(doublet)을 가지고, 603cm^{-1} 및 875cm^{-1} 에서 관찰된다.
- <23> "나노입자(nanoparticle)" - "나노입자"라는 표현은 본 명세서에서 어쥬반트 입자의 물리적인 직경을 설명하기 위하여 사용된다. 나노입자는 $1.0\text{nm} \sim 1,000\text{nm}$ 또는 $1.0\mu\text{m}$ 범위이다. 본 명세서에서 밝힌 바와 같이, 어쥬반트 크기는 특별히 언급이 없으면, 주사 전자 현미경에 의하여 결정된 것과 같은 평균 나노입자 크기를 의미한다.

발명의 상세한 설명

- <24> 본 발명은 단독으로 제공되거나 또는 항원 또는 백신과 같은 하나 또는 그 이상의 활성 물질과 조합되어 제공될 때 항원 또는 백신에 대한 숙주 반응을 유발하거나 증가시키는 칼슘 함유 어쥬반트 및 백신 전달 비이클을 제공한다. 본 발명의 어쥬반트 또는 전달 비이클은 항원 또는 다른 활성 물질의 숙주로의 연속적이고, 지연된, 순차적 및/또는 간헐적인 데포 전달을 제공할 수 있다. 다른 경우들에서, 상기 물질은 활성 물질의 1회 투여량을 신속하게 숙주로 전달할 수 있다.
- <25> **칼슘 함유 어쥬반트의 특징들**
- <26> 본 발명의 어쥬반트는 칼슘 함유 물질이다. 칼슘 포스페이트 및 칼슘 설페이트가 바람직하지만, 어떠한 칼슘 화합물도 사용될 수 있다. 비결정성 및 거의 결정성이 없는 아파타이트성 칼슘 포스페이트가 특히 바람직하다. 몇몇 예에서는, 칼슘 베이스의 어쥬반트들과 연결된 추가 물질들이 어쥬반트 활성을 증가시키기 위하여 제시될 수 있다. 일반적으로, 칼슘 화합물은 주입가능한 겔 또는 고체상 나노입자로 성형된다. 바람직한 어쥬반트 또는 비이클은 항원, 서브 유닛 백신 또는 다른 활성 물질을 흡수, 결합, 포괄(entrap) 또는 아니면 포함 또는 제공하도록 설계될 수 있다. 유용한 칼슘 어쥬반트들은 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP), 거의 결정성이 없는 아파타이트성 칼슘 포스페이트(PCA), 디칼슘 포스페이트 디하이드레이트(DCPD), 트리칼슘 포스페이트(TCP), 테트라칼슘 포스페이트(TTCP), 모네타이트(monetite), 모노칼슘 포스페이트 모노하이드레이트(MCPM), 옥타칼슘 포스페이트(OCP), 히드록시아파타이트(HA)와 같은 칼슘 설페이트 및 칼슘 포스페이트를 포함하나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 이들 칼슘 포스페이트의 카보네이트 또는 다른 치환된 물질들 또한 본 발명에서 고려된다. 본 발명의 어쥬반트로서 유용한 적합한 칼슘 포스페이트의 제조 및 특성에 관한 상세한 설명은 "반응성 비결정성 칼슘 포스페이트에 대한 방법 및 생성물(Methods and Products Related to the Physical Conversion of Reactive Amorphous Calcium Phosphates)"이라는 제목의 U.S.S.N. 제 08/729,344호 및 미국특허 Lee 등의 제 5,683,461호; 및 Lee 등의 제 5,783,217호에 나타나 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참고 문헌으로서 포함된다. 경구 생물학 및 약제에서의 칼슘 포스페이트(Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine), Karger Pub. Co., New York, 1991에서 LeGeros R.Z.는 추가의 유용한 칼슘 화합물을 열거하고 있다.

<27> **재흡수성(Resorbability)**

- <28> 대부분의 경우, 본 발명의 어쥬반트는 재흡수가능하다. 일반적으로 재흡수성은 백신접종 과정의 완료 후에 전달 비이클을 외과적으로 제거할 필요성을 없애준다. 재흡수가능한 칼슘 어쥬반트는 또한 항원과 같은 활성 물질들이 특정한 속도로 조절되어 숙주에 전달되는 것이 가능하도록 한다. 항원은 일반적으로 재흡수 속도에 비교할 수 있는 속도로 숙주에 전달된다. 본 발명의 어쥬반트의 통상적으로 설계된 재흡수성 특성은 면역의 개발에 요구되는 것과 같은 특정한 면역원들에 대해 선택된 전달 속도를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 약하게 재흡수되는 칼슘 어쥬반트들은 항원의 숙주로의 서방성 데포 전달을 제공하는데 사용될 수 있을 것이다. 다른 구체예

에서는, 상기 칼슘 어쥬반트는 강하게 재흡수가 가능한 것일 수 있고, 항원 투여량을 빠르고, 신속하게 속주에로 전달하기 위한 수단을 제공할 것이다. 또 다른 구체예에서는, 약한 재흡수성 및 강한 재흡수성 칼슘 포스페이트의 조합은 일차 면역화 및 이에 연이은 부스터(booster)들을 모방하기 위하여 변동(variable) 또는 맥동(pulsatile) 역학적 방출을 만들기 위하여 사용될 것이다. 실시예 34는 변동 전달 속도가 다른 재흡수 속도를 가지는 어쥬반트들의 조합의 결과인 맥동 전달 어쥬반트의 사용을 증명하고 있다. 재흡수 속도, 결과적으로 전달 속도는 다양하게 재흡수하는 성분들의 제조를 변화시킴으로써 시간, 일, 주, 월 및 심지어는 년으로 조정될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 어쥬반트는 바람직한 항원 전달 속도로 재흡수될 수 있을 것이다.

<29> 본 발명의 어쥬반트의 재흡수성은 특정한 적용의 필요성에 따라 조정될 수 있다. 어떤 경우에는, 칼슘 베이스의 어쥬반트는 재흡수불가능하여 무한히 체내에 잔류할 수 있다. 소성된(sintered) 칼슘 포스페이트(예를 들면, 고도로 결정성인 하이트록시아파타이트)와 같은 세라믹 어쥬반트는 백신 전달의 완료 후에도 체내에 잔류한다. 바람직한 구체예에서, 어쥬반트는 재흡수가 가능하다. 재흡수가 가능한 어쥬반트는 시간이 지남에 따라 생분해되어 결국에는 체내에 잔류하지 않거나 거의 잔류하지 않게 된다. 어쥬반트는 강하게 재흡수가 가능하거나 약하게 재흡수가 가능할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 강하게 재흡수되는 어쥬반트는 다음과 같이 특징지어진다: 적어도 1g(바람직하게는 1~5g)이 피하 또는 근육 부위에 이식되고, 어쥬반트의 적어도 80%가 일년 내에 재흡수된다. 더욱 바람직한 구체예에서, 1g의 어쥬반트가 9월, 6월, 3월 그리고 이상적으로는 1월 이하의 시간 내에 재흡수된다. 약하게 재흡수가 가능하다는 것은 초기 어쥬반트의 약 80% 이하가 일년 후 재흡수된다는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 재흡수는 활성 세포 또는 효소에 근거한 과정 뿐만 아니라 용해도에 근거한 용해 과정을 포함한다. 바람직한 칼슘에 근거한 어쥬반트는 활성 세포 또는 효소 과정을 통하여 재흡수된다. 어쥬반트의 활성 분해의 속도를 조절함으로써, 본 발명의 어쥬반트는 선형의 재흡수 속도를 가지도록 조정될 수 있다.

<30> 본 발명의 칼슘 포스페이트 비이클의 재흡수성은 비이클 크기, 비이클 입자 크기, 공극률, 밀도 및/또는 결정성을 포함하는 하나 이상의 물리적 변수를 조절함으로써 변화될 수 있다. 일반적으로 둘 이상의 이들 변수는 최종 재흡수 속도를 세밀하게 조절하기 위하여 협동적으로 조정될 수 있다. 더욱이, 체내에서 통상적으로 비이클 재흡수를 매개하는 세포성 또는 효소성 과정에 영향을 미침으로써 재흡수 속도에 영향을 주기 위하여 사용될 수 있는 어떤 분자적 인자가 비이클 내에 결합될 수 있다. 이들 결합된 인자들은 종종타골세포(osteoclasts) 및/또는 골아세포(osteoblasts)의 활성과 같은 뼈 대사 과정에 영향을 미치는 생리 활성 분자 또는 이들의 집합체이다. 다른 예에서는, 상기 결합된 인자들은 마크로파아지, 모노사이트 또는 외래(foreign body) 거대 세포(giant cell) 중 하나 이상의 활성을 끌어들이거나 아니면 영향을 미친다. 그러한 유용한 인자에는 다음과 같은 것이 포함된다: 성장 인자, 효소 저해제, 세포외 매트릭스 성분, 시토킨 등.

<31> 결국, 재흡수 속도는 어쥬반트 재흡수 속도에 미치는 제제 조정의 정확한 영향을 검사하기 위하여 하나 이상의 작은 동물 모델에서 어쥬반트의 근육 내 또는 피하 이식함으로써 경험적으로 결정될 수 있다. 이들 모델 시스템에서, 다양한 후보 제제가 동시에 시험될 수 있고 재흡수 속도는 표준 조직학적, 방사선학적(radiographic) 또는 공지의 다른 방법들을 사용하여 다양한 시간에서 비교될 수 있다.

<32> 어쥬반트 제조

<33> 입자 크기.

<34> 일반적으로, 어떤 칼슘 포스페이트에 대하여, 작은 입자크기는 큰 입자에 비하여 더 빨리 재흡수된다. 단암 장치(monolithic devices)상의 1g은 동일 물질 1g이 입자상 형태 내에 있을 때 보다 더 천천히 재흡수 된다. 침전된 칼슘 포스페이트에 대하여, 입자크기는 침전속도를 주의깊게 조절함으로써 조절될 수 있다. 빨리 침전시킨 후, 빨리 회수하는 것은 작은 입자 크기(예를 들면, 입자 크기 범위 5~150nm)를 생산하는데 유용하다. 예로서, 실시예 1에 기술된 바와 같이 ACP(30초 동안 성숙되었다(aged))는 주사전자현미경에 의하여 결정된 바에 의하면, 입자 크기 범위 5~50nm를 가진다. 침전제 또는 모액의 존재하에서 장기간 동안 침전을 유지하는 것 뿐만 아니라, 침전 속도가 느린 것도 또한 큰 입자 크기의 성장을 촉진한다(예를 들면, 입자 크기 300nm 이상). 예로서, 실시예 13에 기술된 아파타이트성 칼슘 포스페이트 어쥬반트(48시간 동안 성숙되었다)는 평균 입자 크기 약 300nm를 가진다. 공지의 표준 분쇄 과정(예를 들면, 볼 밀(ball mill), 로울러 밀, 체트 밀)을 사용한 후 정밀한 체로 처리하는 것은 특정 크기 입자의 비이클을 제조하는 것에 있어 또한 유용할 것이다. 또 다른 예에서, 공지의 기술로서 알려진 바와 같은 에멀션 또는 슬러리로부터 제조된 물질이 유용한 입자 크기의 물질을 생산할 수 있다. 1 μ m 이하, 바람직하게는 0.5 μ m 이하의 입자 크기는 6월 내에 재흡수되도록 의도된 어쥬반트 및 전달 비이클에 대하여 일반적으로 바람직하다. 한 바람직한 구체예에서, ACP 칼슘 포스페이트 입자는 걸러져 평균 크

기 약 100nm로 되고 3월 이내의 기간에 재흡수될 수 있다.

<35> 본 발명의 가장 바람직한 구체예들에서, 최대 어쥬반트 활성이 바람직한 경우, 웅스트롬 또는 나노미터 수준의 최소 입자크기를 사용하는 것이 바람직하다. 이들 예들에서, 재흡수 속도를 조절하기 위하여 추가의 입자 크기 조절을 하는 것은 적절하지 않을 수 있고, 어쥬반트 밀도 또는 결정성 또는 재흡수 속도에 영향을 미치는 단백질 또는 성장 인자의 추가와 같은 다른 물리적 인자를 변화시킴으로써 재흡수 속도를 추가로 조절 또는 세밀하게 조절하기에 더 이로울 수 있다.

<36> 밀도.

<37> 비이클 밀도 또한 재흡수 속도에 중요한 영향을 미친다. 밀도는 어쥬반트를 압축한 후 구성하므로써 가장 쉽게 조절될 수 있다. 8MPa~50MPa의 압축력은 몰드 및 프레스의 사용을 통하여 적용될 수 있다. 압축에 부가하여, 비이클 밀도를 조절하기 유용한 다양한 다른 방법들이 공지되어 있고 사용될 수 있다. 본 발명의 어쥬반트 및 비이클용 칼슘 포스페이트 밀도는 헬륨 비중계(HP 밀도)와 같은 비중계를 사용함으로써 가장 잘 결정된다. 약 3.0gm/cm^3 의 HP 밀도로 제조된 칼슘 포스페이트는 천천히 재흡수되는 비이클의 생산에 유용할 것이다. 더 빨리 재흡수되는 비이클은 일반적으로 $2.5\sim 2.8\text{ gm/cm}^3$, 바람직하기로는 2.5 gm/cm^3 범위의 HP 밀도를 가진 칼슘 포스페이트로부터 제조될 수 있다. 2.5 gm/cm^3 이하 값을 가진 HP 밀도는 특히 빨리 재흡수되도록 의도된 비이클에 대하여 종종 바람직하다.

<38> 결정성.

<39> 일반적으로, 어쥬반트의 결정성의 정도 및 결정의 크기를 주의깊게 조절하는 것은 전체 비이클 재흡수 속도에 영향을 미치기 위하여 사용될 수 있다. 인에 대한 칼슘의 비율 1.3~1.75인 아파타이트성 칼슘 포스페이트에 대하여, 거의 결정성이 없는 형태가 고도로 결정성인 형태 보다 빨리 재흡수된다고 여겨진다. 고도로 결정성인 양론적(stoichiometric) 하이드록시아파타이트(예를 들면, NIST^R 카탈로그# 2910)는 약하게 재흡수가 가능한 비이클의 예이다. 다른 칼슘 포스페이트에 대하여, 어떤 주어진 인에 대한 칼슘의 비율에 대하여, 보다 비결정성 형태가 일반적으로 보다 결정성인 형태보다 용해성이 더 크다. 재흡수 속도는 이온 공백(vacancies) 또는 치환과 같은 격자 결함을 포함하는 아파타이트성 칼슘 포스페이트의 생산을 통하여 증가될 수 있다. 바람직한 구체예에는 모두 생체내 재흡수 속도를 증가시키는 경향이 있는 탄산화된 또는 다른 칼슘 부족 아파타이트가 포함된다. 유사한 그러한 칼슘 포스페이트의 생산에 관한 추가의 설명은 Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates(Elsevier, Amsterdam, 1994, by J.C. Elliott)에서 발견할 수 있고, 이 문헌에 포함된 참고 문헌은 모두 본 명세서에 참고 문헌으로서 포함되어진다.

<40> 공극률.

<41> 본 발명의 전달 비이클은 면역원 전달을 위한 바람직한 특성을 제공하는 어떠한 공극물이라도 될 수 있다. 공극률은 물질들의 본 발명의 물질로의 확산 및 본 발명의 물질로부터의 물질들의 확산을 촉진시키고, 어떤 적용에서는 세포 및 세포 과정의 물질 매질로의 투과를 촉진시킨다. 따라서, 낮은 공극률의 어쥬반트는 높은 공극률의 어쥬반트에 비하여 생체내에서 더 천천히 재흡수된다. 본 발명의 한 실시예에서, 공극률은 조절된 입자 크기 반응물의 건조된 혼합물을 사용함을 통하여 증가된다. 예를 들면, 실시예 1~16에 기재된 물질인 큰 입자 크기(예를 들면 300~500nm)를 가진 반응물은 더 다공성인 물질을 생산할 것이다. 다른 실시예에서, 화학적 또는 물리적 에칭 및 침출(leaching) 기술이 공극률을 변화시키기 위하여 채용될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, NaCl 결정(예를 들면, 50~500 μm)이 수동 프레스에 의하여 페이스트 물질 속에 결합되고 실시예 16에 따라 제조된다. 사용된 결정의 크기는 바람직한 공극 크기에 따라 선택된다. 일반적으로, 결정의 양은 20중량% 이하일 것이다. 페이스트 물질은 경화되고 NaCl 결정은 증류수 또는 식염수와 같은 결정을 용해시키기 위한 적당한 수용액을 사용하여 경화된 물질로부터 세척된다. 최초 NaCl 결정의 표면 공극 또는 대공극(macrovvoid) 크기는 그러한 처리로부터 유래할 수 있다.

<42> 주어진 비이클의 백분율 공극율 외에, 공극크기 분포도 또한 재흡수 특성과 관련하여 중요하다. 큰 입자 공극(대공극(macrovvoid))(예를 들면, 50 μm 또는 그 이상)의 존재 또는 부재는 재흡수 속도에 중요한 영향을 미친다. 그러한 대공극은 세포성 재흡수를 촉진시킬 수 있다. 빨리 재흡수되는 비이클의 바람직한 구체예에서, 직경 50~300 μm 의 대공극이 존재할 것이다. 어떤 구체예에서는, 비이클 내의 대공극의 백분율은 전체 부피의 20% 이상일 것이다. 많은 구체예에서, 비이클 부피의 10% 이하가 대공극으로 이루어질 것이다. 더 천천히 재흡수되는 몇몇 구체예에서, 비이클 부피의 1% 이하가 50 μm 이상의 대공극으로 나타날 것이다. 대공극은 어쥬반트 제조 중

결정성, 입자성 및/또는 섬유상 당, 전분 및/또는 염과 같은 침출가능한 고체성 포로젠(porogen)의 사용을 통하여 포함되어질 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, NaCl 결정은 20중량%의 비율로 실시예 16 및 17의 칼슘 포스페이트에 직경 200~300 μ m의 대공극을 나타낸다. 이러한 포로젠은 제조(fabrication) 후 어쥬반트로부터 침출될 수 있다.

<43> 재흡수 인자의 결합

<44> 뼈생성 세포 및/또는 마크로파아지를 유인하거나 저해하는 인자의 결합은 어쥬반트 재흡수 속도에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명의 어쥬반트에 뼈 변태(morphogenetic) 단백질을 결합시키는 것은 특히 부드러운 조직 이식 부위에서 비이كل의 더 빠른 재흡수를 유도할 것이다. 더욱이, 타골세포를 유인하는 인자들(예를 들면, 인터루킨-1, 림포톡신, 칼시토닌)은 비이كل의 분해를 촉진하기 위하여 사용될 수 있다. 타골세포 또는 마크로파아지 활성 저해제(예를 들면, 중성 포스페이트, 글루코코르티코이드, 플리카마인신, 갈륨 니트레이트)가 재흡수 과정을 지연시키기 위하여 사용될 수 있다. 라미넌(laminen), RDG 펩티드, 콜라겐, 피브로블락틴과 같은 세포외 매트릭스 성분도 또한 어쥬반트와 함께 포함될 수 있다. 칼슘 포스페이트 재흡수 속도의 조절에 유용한 특정 인자에 관한 추가의 지침은 PCT/US97/18528에서 발견할 수 있을 것이며, 이는 참고문헌으로서 본 명세서에 포함되어진다. 일반적으로, 이러한 인자들은 20중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하, 대부분의 구체예에서는, 5중량% 이하의 농도로 본 발명의 어쥬반트에 포함되어진다.

<45> 많은 경우, 어쥬반트 재흡수성은 바람직한 것이다.; 그러나, 그것이 반드시 필요하거나 바람직한 것은 아니다. 어떤 구체예에서는, 본 발명의 어쥬반트 활성 증진은 약하게 재흡수가능하거나 재흡수 불가능한 칼슘 어쥬반트와 함께 얻어질 수 있다. 재흡수 불가능한 어쥬반트는 지연된 항원 전달이 수년에 걸쳐 일어나야 하는 때에 사용될 수 있다. 재흡수 불가능한 어쥬반트는 이 어쥬반트가 조직 회복 또는 성장을 위한 지지 매트릭스로서, 질병 또는 예방접종 과정에 대한 처치로서 추가적으로 사용되는 경우에 또한 바람직하다. 재흡수 불가능한 칼슘 포스페이트 어쥬반트는 그들의 뛰어난 생체적합성으로 인하여 숙주에 치명적인 영향없이 체내에 잔류할 수 있다. 대안적으로, 재흡수 불가능한 어쥬반트는 원하는 전달 기간이 지난 후에 외과적으로 제거될 수도 있다. 적당한 재흡수 불가능하거나 약하게 재흡수 가능한 칼슘 포스페이트 어쥬반트에는 소성 히드록시 아파타이트로부터 제조되는 것들이 포함될 수 있다.

<46> 어쥬반트 활성

<47> 어쥬반트 활성은 어쥬반트가 면역 반응을 유발하는 영향의 정도를 의미한다. 비이클에 의하여 변화된 면역 반응을 유도하는 어쥬반트 또는 전달 비이클에 대한 어떠한 변형은 어쥬반트 활성에 영향을 미칠 것으로 여겨진다. 어쥬반트 활성 증진 수단은 항원 또는 다른 외래 물질에 대한 세포성 면역 반응, 체액성 면역 반응 또는 어떠한 다른 반응 중 하나 이상을 특이적으로 유발하기 위하여 사용될 수 있다. 어쥬반트 활성에 영향을 미칠 수 있는 전달 시스템에 대한 적당한 변형에는 다음이 포함될 수 있다.: 어쥬반트의 세포성 인식, 면역원의 세포성 인식 및 몇몇의 경우, 어쥬반트 생체적합성에 영향을 미치는 변화. 외래 변화에는 면역 반응을 국부적으로 변화시키는 면역 조절 분자(예를 들면, fas-L)의 어쥬반트에로의 결합이 포함된다. 어쥬반트에 내재적인 다른 인자들은 다음과 같은 것이 세포성 인식에 영향을 미치기 위하여 변화될 수 있다: 입자 크기, 입자 모양, 입자 거칠기, 비표면적, pH, 공극률, 화학적 반응성/발열유발성(pyrogenicity). 그러나, 바람직한 구체예에는 종종, 원하는 숙주 반응을 일으키도록 하는 방식으로 배열된 전술한 변수들의 조합에 관한 것이다.

<48> 입자 크기.

<49> 어쥬반트 입자 크기는 칼슘에 근거한 물질의 어쥬반트 활성을 내생적으로 변화시키기 위하여 조정될 수 있다. 상기 칼슘 포스페이트 전달 비이클은 어쥬반트 그 자체와 동일하거나 유사한 물질로부터 제조되는 나노입자의 존재하에서 구성되거나 전달될 수 있다. 대개 이들 입자들은 또한 면역원을 포함할 것이다. 나노입자들의 존재는 면역원에 대한 숙주 반응을 증가시키는 효과를 가진다. 바람직한 구체예에서, 나노입자들은 1~100%의 어쥬반트를 포함한다. 더욱 바람직한 구체예에서, 나노입자들은 25~100%의 어쥬반트를 포함한다. 선택적으로, 나노입자들은 50~100%의 어쥬반트를 포함한다.

<50> 특정한 면역 체계로부터 증진된 반응을 직접적으로 유발하는 어떤 입자 크기의 칼슘 염이라도 어쥬반트로서 사용될 수 있다. 실시예 28에서는 특정적으로 원하는 숙주 반응을 증가시키기 위하여 다양한 입자크기를 사용한 것을 예시하고 있다. 일반적으로, 본 발명의 어쥬반트 활성에 영향을 미치기 위한 바람직한 입자 크기는 약 0.1nm~약 50 μ m의 범위이다. 더욱 바람직한 구체예에서는, 입자 크기는 약 0.1~약 900nm의 범위, 더욱 바람직하기로는 1.0~약 500nm의 범위이고, 가장 바람직하기로는 약 100~약 250nm의 범위이다. 선택적으로, 입자 크기는

약 20~약 80nm의 범위이다. 몇몇 경우 5~50 μ m의 범위가 어쥬반트 활성을 증진시키기에 유용하였다. 큰 입자(50 μ m 이상)는 일반적으로 숙주 반응을 증진시키기 위하여 포함되는 시토킨, 다른 어쥬반트 또는 물리적 인자(예를 들면, 공극률)와 같은 다른 어쥬반트 활성 증진제를 사용한다.

<51> 다양한 입자크기를 가진 데포 전달 시스템이 빠른 RES 섭취를 회피하여, 결과적으로 더 효과적인 전달 방법을 제공하기 위하여 사용될 수 있다. 특정한 면역원이 어쥬반트에 흡착되거나 공유결합된 그 구체예들에 대하여, 어쥬반트로부터 면역원의 방출 양상(profile)은 입자 크기에 민감하게 의존한다. 작은 입자들(예를 들면, 나노 입자)은 부피에 대한 표면적 비율이 크기 때문에 큰 입자들 보다 더 높은 속도로 항원을 방출한다. 큰 입자들(예를 들면, 마이크로입자들)은 더 작은 입자로 분해되기 전까지는 식세포성 부세포(phagocytic accessory cells)에 의해 섭취될 수 없다; 그러므로, 큰 입자들은 계속적인 항원성 자극의 데포(저장소)로서의 역할을 한다. 이러한 큰 입자들로부터 항원 방출의 속도는 적어도 간접적으로 입자 그 자체의 재흡수 속도에 의존한다. 한 실시예에서, 작은 입자 및 큰 입자의 조합은 항원 방출의 맥동성 양상을 만들 수 있고, 그렇게 함으로써 일반적으로 최초 1차 접종 및 뒤따르는 많은 2차 접종(부스터, booster)을 이용하는 면역 시나리오 동안에 관찰된 일반적인 항원 농도 양상을 모방할 수 있게 된다.

<52> 입자 모양.

<53> 개별 입자들 및 어쥬반트 그 자체의 모양은 내생적으로 어쥬반트 활성에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로, ACP 어쥬반트는 구형 및/또는 때때로 융합된 것으로 보이는 입자를 포함한다. 구형 ACP 입자들은 실시예 1에 따라 제조된다. PCA 칼슘 포스페이트 입자들은 보통 외관에 있어 바늘과 같다(needle-like). 바늘과 같은 입자를 포함하는 어쥬반트는 평판같은(platelet-like) 또는 구형 입자만을 포함하는 입자와 비교하였을 때 더 큰 반응을 일으킨다. 몇몇 바람직한 구체예에서, 어쥬반트는 실시예 12에 따라 제조된 바늘같은 입자를 포함할 것이다. 다른 경우에는, 평판같은 입자 뿐만 아니라 구형 및 바늘 모양 입자 모두가 사용될 수 있을 것이다. 실시예 13에 따라 제조된 어쥬반트 입자들은 다른 입자 모양의 조합을 나타낸다.

<54> 입자 거침.

<55> 어쥬반트 활성은 또한 물리적인 표면 형상 또는 방출 패턴으로서 기술되는 어쥬반트를 포함하는 개별 입자 또는 어쥬반트 그 자체의 입자 거침도를 조정함으로써 내생적으로 조절될 수 있다. 공극률, 결정성 및 에칭과 같은 인자들과 관련된 변수들이 입자 거침도를 조정하기 위하여 채용될 수 있다. 표면 거침도의 정도는 극한 표면 거침도를 가지면 생체적합성이 감소하는 것으로 알려진 바와 같이, 생체적합성에 특징적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이상적으로, 바람직한 구체예에서, 어쥬반트는 면역 반응을 증진시킬 수 있으면서 생체에 적합할 수 있을 것이다. 그러나, 어떤 경우에는 표면 거침성을 증가시킴으로써 입자성 물질에 대한 숙주 반응의 얼마간의 수준을 희생시키는 경우도 허용될 수 있다. Handbook of Biomaterials and Bioengineering Pt. A, Vol. 1, Marcel Dekker, New York, 1995에는 더 큰 숙주 방어 반응을 유도할 수 있는 뼈 보다 더 높은 결정성을 가진 칼슘 포스페이트 물질을 기술하고 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참고 문헌으로서 포함되어진다. 표면 거침도 뿐만 아니라 전체 표면적은 공극률 및/또는 공극 크기를 증가시킴으로써 증진될 수 있다. Shanbhag은 최근 티타니아(titania) 및 폴리스티렌 입자의 높은 표면적에 상응하여 IL-1 수준의 증가를 보고하였다(Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 28, p81~90, 1994). 표면적이 크면 면역 반응을 증가시키는 것을 촉진한다. 그램 당 표면적(비표면적)으로 알려진 입자 표면적은 기체 흡착에 의하여 측정될 수 있다. Quantachrome Corporation으로부터 구입할 수 있는 ChemBET^R3000은 입자에 질소 및 헬륨의 다양한 혼합물을 흘려 주고 액체 질소로 냉각시킴으로써 표면적을 측정한다.

<56> 입자 거침도는 어쥬반트의 표면상에서 찾을 수 있는 에칭의 진폭 또는 깊이에 의하여 더 특징지어진다. 입자 거침도는 어쥬반트를 구성하는 입자의 모양(예를 들면, 구형, 바늘, 소평판)에 의하여 영향받을 수 있다. 어떤 구체예에서, 입자 거침도의 정도는 원하는 세포 또는 면역 반응(예를 들면, 세포성 및/또는 체액성 활성)을 끌어들이는(recruitment) 것에 영향을 미칠 수 있다. 거침도가 큰 입자를 포함하는 어쥬반트는 일반적으로 부드러운 입자를 가진 어쥬반트 보다 원하는 세포를 더 끌어들이는 것이다. 거칠게된 표면(정상 및 굴곡)을 가진 어쥬반트(외래 물질)는 완전한 보호 또는 공격에 대하여 더 큰 면역 반응을 야기시킴으로, 숙주에 더 위협적인 것처럼 보일 것이다. 더욱이, 뼈 성장과 같은 다른 기술에 있어서, 표면 거침도는 뼈 형성 세포의 부착을 위한 개선된 흡착 구조 또는 발판(scaffold)을 제공한다(Suzuki, 1997). 이 개념은 면역 반응과 관련되는 세포를 끌어들이고 확보하기 위하여 어쥬반트의 표면에 적용될 수 있다. 입자 거침도의 정도는 다른 정교한 표면 측정 기구 뿐만 아니라 주사전자현미경에 의하여 결정될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 거친 표면을 가진 로드된(loaded) 어쥬반트는 원하는 면역세포(예를 들면, 항체)의 부착을 위한 흡착 구조를 제공할 수 있다.

- <57> pH.
- <58> 대부분의 경우, 어쥬반트의 pH는 중성이고 그 자체로서는 숙주 반응을 유발시키지 않는다. 어쥬반트 pH는 사용되는 어쥬반트 및 항원(어떤 항원의 안정성은 pH에 의하여 영향을 받는다)의 적용에 의존하여 변할 것이다. 일반적으로, 어쥬반트 pH는 약 4.0~약 10.0이다; 더욱 바람직하기로는 pH 값은 약 6.0~약 9.0이어야 한다. 어떤 구체예에서, 어쥬반트 pH는 발열성(pyrogenic) 또는 세포독성 숙주 반응을 유발하기 위하여 더 산성(예를 들면 0~3) 또는 염기성 pH(예를 들면, 11~14)일 수 있다.
- <59> 바람직한 구체예에서, 칼슘에 근거한 어쥬반트의 내생적 pH는 제조과정 중에 원료 또는 전구체로 조정된다. 출발 물질의 제조 및 비율은 어쥬반트의 pH를 조절하기 위하여 변화될 수 있다. 다른 경우에 있어서, 침전물 또는 겔의 pH가 조정될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 칼슘 염은 pKa로 어쥬반트의 원하는 pH 또는 그 근방의 pH에서 선택될 것이다. 다른 구체예에서, pH는 산 또는 산 버퍼(예를 들면, 인산, 염산, 일염기성 소듐 포스페이트 아세트산)를 첨가함으로써 낮아질 수 있다. 또한, pH는 염기 또는 알칼리 버퍼(예를 들면, 포타슘 하이드록사이드, 칼슘 하이드록사이드, 소듐 하이드록사이드)를 첨가함으로써 또는 공지된 원하는 범위에 있어서의 pKa를 가진 버퍼제를 사용하는 것을 통하여 높일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 페이스트 또는 슬러리 형태인 어쥬반트의 pH는 수화제로서 특정한 pH로 완충된 용액을 도입함으로써 조절될 수 있다. 극한 pH는 항원 항체 결합의 정전기적 결합을 약화시킬 수 있기 때문에, 바람직한 구체예에서, 어쥬반트의 pH는 항원 항체 복합체의 pH와 상관된다. 그러나, 흔하지 않은 구체예에서, 어쥬반트 활성을 돕기 위하여 어쥬반트 생체적합성은 포기되고 pH는 극한 값으로 확장될 수 있다.
- <60> 선택적인 면역 반응 증진
- <61> 내생적 및 외생적 다양한 증진 수단은 면역 반응의 특정 성분을 증가, 증진 또는 어떤 경우에는 억제하기 위하여 사용될 수 있다. 마크로파아지(예를 들면, Mac-3), T 세포(예를 들면, CD3e, CD4, CD8a) 및 B 세포(예를 들면, CD45R/B220)는 특정한 제제에 의하여 내생적으로 증가된 어쥬반트 활성을 가진 다른 칼슘 포스페이트 어쥬반트(실시예 18)의 주사 또는 이식 후 선택적으로 증가될 수 있다. 특정한 면역 반응 성분의 조작은 또한 주입 루트, 어쥬반트 조합, 항원 사용, 시토카인의 존재 및/또는 다양한 운반체를 사용한 면역화의 선택을 통하여 영향받을 수 있다. 특정한 백신에 대하여 이러한 어쥬반트 조작의 접근법을 적용하기 위하여, 면역 시스템의 성분이 어느 것을 목표로 하는 지(예를 들면, 체액성 또는 세포성)를 확인하는 것이 도움이 된다. 결국, 모든 면역 체계의 성분은 공격으로부터 신체를 보호하기 위하여 기능하나, 어떤 경우에는 다른 성분 보다 먼저 한 성분이 유도되는 것이 바람직한 경우도 있다. 예를 들면, 호산구들(eosinophils)은 기생충 감염에 대한 방어에 적합하고 마스트 세포는 알러지 반응에 중요하다. 더욱이, 세포 매개성 면역 반응이 바람직한 때에는 T-헬퍼 세포형이 자극될 수 있고, 체액성 반응이 바람직한 때에는 B 세포가 자극될 수 있다. 더욱이, 종양 세포를 목표로 하는 경우에는 종양 세포에 맞서 싸우는 것으로 알려진 CD8 세포가 재공급(recruited)될 수 있거나 시토카인이 어쥬반트와 결합될 수 있다. 일단 원하는 세포 반응 형태가 확인되면, 원하는 세포 또는 세포 형태로부터 증진된 반응을 유발하기 위하여 본 명세서에 기술된 바와 같이 상기의 변수가 조정될 수 있을 것이다. 실시예 18의 표 1은 원하는 면역 반응에 근거한 적절한 어쥬반트 제제를 선택하기 위한 지침을 제공한다. 세포성 면역 반응의 수준은 반응이 크면 클수록 더 큰 어쥬반트 활성을 보이는 제조된 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 어쥬반트 활성 지표이다. 예를 들면, 특정한 ACP 어쥬반트(실시예 7에 따라 제조되었다)가 증가된 B 세포 및 마크로파아지 반응을 유발하기 위하여 사용된다. 추가 지침은 골딩(Golding)(Annuals New York Academy of Sciences, 754, 1995, p127~137) 및 뉴만(Newman)(The Journal of Immunology, 148, 1992, p2357~2362)의 글에서 찾을 수 있다.
- <62> 실시예 24는 종양에 맞서기 위하여 사용되는 외생적으로 첨가된 시토카인/어쥬반트 조합의 사용에 관하여 기술하고 있다. 종양 세포 근처에서 지속적으로 고농도인 시토카인(예를 들면, IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF)은 항원 특이적인 및 비특이적인 T 세포 모두에 의하여 종양에 대한 면역 반응을 증폭시킴으로써 항종양 활성을 자극하는 것으로 알려져 있다. 면역 반응에 적당한 본 발명의 어쥬반트를 조화시킴으로써, 시토카인 유전자에 근거한 암 백신은 일반적으로 주입된 종양 세포를 제거할 수 있는 것 외에 장기의 계통적인 항종양 활성을 유도할 수 있다. 감마 인터페론 및 IL-2와 같은 시토카인의 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트제로의 외생적인 결합은 결합된 항원에 대한 체액성 및 세포성 반응 모두를 증진시킬 수 있다. IL-1은 B 림프구를 직접적으로 자극함으로써 항체 생산을 증가시키고 IL-2의 생산을 증가시킴으로써 T 세포 증식을 강화하는 것으로 알려져 있다. IL-6에는 면역글로불린 생산을 촉진시키는 능력이 있다. IFN- γ 는 헬퍼 T 세포를 활성화시킨다. IL-12는 바이러스 감염을 조절하기 위한 세포 매개 면역을 증가시키는 것으로 실증되었다. 어쥬반트에서 시토카인의 사용에 관한 추가의 지침은 Vaccine Design(Powell, Plenum Press, New York, 1995) 및 ImmunoBiology, Appendix II(Current Biology Ltd./Garland Publishing, New York, 1996)에서 찾을 수 있고, 이들 내용은 그 문헌 전체

로서 본 명세서에 참고 문헌으로서 포함되어진다. 조절된 방출 칼슘 포스페이트 어쥬반트는 종양 성장을 조절하고 저해하기 위한 시토카인의 전달에 특히 유용하다. 큰 마이크로구($20\sim40\mu\text{m}$)에 캡슐화된 항원은 항원의 느린 방출을 위하여 사용될 수 있는 반면, 마이크로 단위 미만의 입자($<1\mu\text{m}$)에 캡슐화된 항원들은 빠른 마크로파아지 섭취 및 가공을 유발하기 위하여 사용될 수 있다. 특히적으로 시토카인 방출을 유발하고, 그렇게 함으로써 반응 증가에 이르게 하는 어쥬반트의 사용 또한 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 여겨진다.

<63> 어떤 구체예에서, 칼슘에 근거한 어쥬반트는 외생적 어쥬반트 활성 증진 수단과 조합하여 제조될 수 있다. 더욱 특히적으로는, 어쥬반트 활성 증진제는 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 무라밀 디펩티드, 생분해가능한 중합체성 마이크로구, 리포솜 등과 같은 다른 알려진 어쥬반트일 수 있다. 예를 들면, 완전 프로인트 어쥬반트(CFA)는 Th1 세포를 자극하여 지연형 과민성 반응(delayed-typed hypersensitivity)을 유발하고, 반면 알루미늄(alum)은 Th2 세포를 자극하여 체액성 반응을 유발시킨다. 각 어쥬반트는 그 자체만으로 독특한 반응을 제공하기 때문에, 어쥬반트의 조합은 단일 어쥬반트로부터 보다 훨씬 더 강력한 면역 반응을 제공할 수도 있다. 그러한 어쥬반트 조합은 특정한 형태의 면역 반응을 증가시키기 위하여 부가된 별개의 성분으로 될 수 있고, 부가적이거나 협동적인 최종 효과를 유발할 수 있다. 예를 들면, 체액성(B 세포) 반응(실시예1, 3 및 5에 따라 제조된다)을 유발하기 위한 적절한 특징들을 가진 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트는 세포성(T 세포) 효과를 유도하는 것으로 알려진 무라밀 디펩타이드와 조합되어, 완전한 숙주 반응을 일으킬 수 있다. 항원의 선택 및 원하는 어쥬반트 활성과 같은 많은 결정 인자들이 어쥬반트의 적절한 조합을 결정할 것이다. 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트는 기본 또는 일차적 어쥬반트 및 어떤 내생적 반응 증진의 원천으로서 역할을 할 수 있다; 추가적인 외생적 어쥬반트 활성 증진제가 그들의 특정한 생물학적 반응을 위하여 첨가될 것이다. 바람직한 구체예에서, 칼슘 포스페이트 물질(실시예 1~17에 따라 제조된다)은 $>50\%$, 더욱 바람직하기로는 $>75\%$ 및 가장 바람직하기로는 $>90\%$ 의 어쥬반트를 포함할 것이다. 나머지 어쥬반트 성분은 단독으로 또는 조합으로 선택될 것이다. 이런식으로, 상기 어쥬반트는 특정 예방접종 요건 및 원하는 반응에 따라 만들어질 것이다. 대부분의 경우, 알루미늄 하이드록사이드를 채용하는 구체예는 재흡수 불가능하거나 거의 재흡수할 수 없는 칼슘 포스페이트 어쥬반트와 관련될 것이다. 무라밀 디펩타이드는 숙주 반응, 더욱 특정적으로는 세포성 면역을 증진시키거나 증가시키기 위하여 칼슘 포스페이트 어쥬반트에 결합되어 질 수 있다. 더욱이, QS-21 및 MPL-A와 같은 다른 어쥬반트 활성 증진제가 세포성 반응을 유도하기 위하여 첨가될 수 있다.

<64> 리포솜 및 중합체(예를 들면, PMMA, PLGA, PLA, 젤라틴, 폴리(포스파젠)(poly(phosphazene))), 특히 생분해성 중합체 또한 그 자체가 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 위한 전달 비이클로서 역할을 함으로써 어쥬반트 활성을 증가시킬 수 있다. 더욱이, 리포솜 및 중합체는 Liposomal presentation of Antigens(Vaccine Design, ed. Powell, Plenum Press, New York, 1995)에 글뤼크(Gluck)가 보고한 바와 같이 어쥬반트 가능성을 가진 것으로 여겨지고 있다. 바람직한 구체예에서, 리포솜 또는 중합체는 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 캡슐화하여, 마이크로구를 만들것이다. 중합체 및 리포솜을 사용한 캡슐화법(method of encapsulation)은 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로구의 크기는 제조과정 중에서 조절된다. 작은 마이크로구($<10\mu\text{m}$) 및 큰 마이크로구($>10\mu\text{m}$)를 조화되게 사용함으로써 일반적으로 일차 및 2차면역 및 부스터(boosters) 각각에서 관찰되는 항원 방출의 맥동 역학(pulsatic kinetics)을 형성할 수 있다. 항원은 리포솜 또는 중합체 칼슘 포스페이트 어쥬반트 또는 둘 다와 조합(결합되거나 흡착된다)될 수 있다. 상기 칼슘 포스페이트/리포솜 어쥬반트는 또한, 원하는 시토카인, 다른 어쥬반트 및 복합 물질과 같은 백신을 개선시키는 어떤 물질을 포괄할 수 있다.

<65> 복합체

<66> 어떤 경우에는, 순수한 어쥬반트 물질만으로는 가능하지 않은 정도로 칼슘 베이스의 어쥬반트의 특정한 물리적 특성들을 변화시키는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 예에서, 상기 어쥬반트는 하나 이상의 보조물질들의 첨가를 통하여 복합체 형태로 사용될 수도 있다. 보조물질은 본 발명의 어쥬반트에 첨가되어 인장 강도, 탄성률 또는 굴곡(flexion)과 같은 어쥬반트의 물리적 특징 또는 특성을 변화시키는 물질이다. 어떤 경우에는, 상기 보조물질이 또한 증진 수단으로서 기능할 수도 있다. 상기 보조물질은 어떠한 적절한 형태(예를 들면, 입자상, 섬유상)로 공급될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 보조물질은 합성 중 또는 제조 후에 부피 분율 1~50% 및 더 바람직하기로는 1~20%로 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트에 첨가될 수 있다. 재흡수 가능한 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 포함하는 구체예에서, 상기 보조물질은 또한 생분해가능한 것이 바람직하다; 그러나, 재흡수 속도는 변할 수 있다.

<67> 복합체 어쥬반트 시스템들은 통상적인 일차/부스터 면역화 전략에서 관찰되는 것과 유사한 전달 동력학으로 설계될 수 있다. 이러한 구체예에서, 최적 면역화와 관련된 적절한 항체 반응 수준을 유도하기 위하여, 항원은 계산된 간격 및/또는 속도로 방출된다. 이러한 복합체 어쥬반트들은 보다 더 재흡수가능한 어쥬반트 및 덜 재흡수

가능한 어쥬반트 모두에서 바람직한 특성들을 포함하기 때문에 유용하다. 추가적인 선택사항으로, 다른 재흡수 프로파일들을 가진 비이클들을 생성하기 위하여 상대 비율은 변화될 수 있다. 어떤 구체예들에서, 복합체들은 이의 제조, 외과적 또는 저장중 특성들에 관련된 어쥬반트의 하나 이상의 추가적인 성질들을 개선시킬 것이다.

<68> 본 발명의 복합체로서의 칼슘 포스페이트 어쥬반트들의 제조는 상기 어쥬반트에 하나 이상의 보충 물질들을 첨가하는 것을 필요로 한다. 보충 물질들은 그 자체가 복합체일 수 있다. 상기 보충 물질들은 칼슘 어쥬반트에 대한 매트릭스로서의 역할을 할 수 있으며, 칼슘 어쥬반트는 상기 매트릭스 내에 섞이지거나 분산된다. 선택적으로, 상기 칼슘 어쥬반트는 그 안에서 분산되어지는 상기 보충 물질들에 대한 매트릭스로서의 역할을 할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 칼슘 베이스의 어쥬반트는 유연성의 증가를 위해 폴리-L-락트산(PLLA) 및/또는 폴리글리콜라이드(PGA)와 조합된다. 칼슘 포스페이트 복합체들의 생성에 대한 설명은 여기에 참고문헌으로 포함된 계류중인 출원 제 08/732,016호에서 찾을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 칼슘 포스페이트 어쥬반트는 다른 재흡수 속도(실시예 34 참조)를 가진 칼슘 포스페이트의 복합체로서 제조된다. 하나의 어쥬반트 시스템 내에서 다른 재흡수 속도들을 가지는 복수의 칼슘 포스페이트들을 조합함으로써 다양한 전달 동력학을 이룰 수 있다.

<69> 강도 및 탄성

<70> 바람직한 기계적 성질들(예로서, 강도 및 탄성)을 가지는 어쥬반트들은 칼슘 포스페이트 복합체로서 제조될 수 있다. 특이적인 이식 위치들에서는, 굽혀지거나 또는 꼬일 수 있는(예로서, 피하 위치 또는 초내(intrathecal) 위치) 유연한 어쥬반트를 가지는 것이 바람직하다. 다른 경우들에서는, 보다 단단한 어쥬반트가 바람직하다(예로서, 복강 또는 중추신경계). 일반적으로, 복합체 물질들의 생산자 및 제조자들에게 잘 알려진 방법들이 이러한 경우들에 유용할 것이다. 본 기술분야에서 알려진 충진제와 결합체와 같은 보충 물질들은, 복합체 칼슘 어쥬반트의 강도 및 탄성을 변경하는데 사용될 수 있다. 한 바람직한 구체예에서, 10~20부피%의 텍스트란?(Sigma?화학 회사 제품)은 유연성을 증대시키기 위하여 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트에 첨가된다. 텍스트란?의 양을 증가시키면 유연성의 정도도 증가하게 된다.

<71> 본 발명은 RES가 활성물질의 전달을 방해하지 않는 방식으로 어쥬반트 입자들을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 어쥬반트의 RES 섭취는 표면처리제, 코팅제, 계면활성제 및/또는 자기장의 사용동안 회피되기 때문에, 특이적으로, 특정의 적절한 면역 세포들의 도입이 증대된다. 폴록사머(poloxamers)(예로서, 폴록사머 188 및 폴록사머 338)와 같은 비이온성 계면활성제들은 RES 섭취를 지연시키기 위하여 나노입자들의 표면을 코팅하는데 사용되어왔다. 바람직한 구체예에서, 상기 칼슘 포스페이트 어쥬반트/면역원-나노입자들은 식염수 또는 나노입자들의 표면에 강하게 흡착하는 선택된 폴록사머를 1% 포함하는 물에 부유된다. 상기 코팅된 입자들은 특히 정맥 투여에 유용하다. 코팅된 입자들은 특히 정맥주사되었을 경우 코팅되지 않은 입자들보다 다른 타겟 위치들(예로서, 종양조직)에 더 잘 도달할 수 있다. 본 기술분야에서 알려진 다른 적합한 코팅제들 및 계면활성제들 또한 항원을 운반한 입자들을 바람직한 위치들로 보내는데 유용할 수 있다. 계면활성제들의 사용에 대한 보다 자세한 설명은 Illum(FEBS Letters, 167, 1984. p79~82)과 Leu(Journal of Pharmaceutical Science, 73, 1984. p1433~1437)에서 찾을 수 있다.

<72> 몇가지 경우들에서, 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트들과 자기성 물질들을 조합하는 것은 활성물질의 타겟 위치로의 조절된 전달을 안내하는데 바람직할 수 있다. 효율을 향상시키기 위하여 타겟 주변에 자기장을 위치시킬 수 있다. 자기성 어쥬반트 물질들은 자기장에 부착되어 타겟 주변에 농축되는 경향이 있어, 따라서 활성물질을 적절한 위치에 중점적으로 전달한다. 이러한 한 구체예에서, 칼슘 포스페이트 어쥬반트/항원-나노입자들은 증류수 또는 식염수 내에서 적절한 양의 자철광과 조합된다. 상기 코팅된 나노입자들은 정맥투여된다. 대부분의 경우에, 어떤 위치가 선택되더라도 종양 위치들은 특이적으로 타겟되어진다. 자기성 물질들의 사용에 대한 보다 자세한 설명은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 Widder(European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 19, 1983, p135~139 및 p141~147)에 나타나 있다.

<73> 다른 구체예들에서, 칼슘염들과 다른 부가물질들의 복합체들은 칼슘 어쥬반트와 보충 물질들의 혼합물에 액을 첨가함으로써 페이스트상으로 제조된다. 상기 페이스트는 그 후 건조 또는 경화 반응에서 경화된다.

<74> 어쥬반트의 제조

<75> 본 발명의 칼슘 어쥬반트들은 원하는 정도에 따라서 면역원들을 재흡수 및/또는 전달하도록 제조될 수 있다. 필요에 따라 조절될 수 있는 변수들은 표면처리제, 공극율, 입자크기 등을 포함한다. 저온조건에서 제조된 히드록시아파타이트와 같은 칼슘 포스페이트 및 PCA 칼슘 포스페이트는 비결정성 칼슘 포스페이트와 함께 바람직한 어

유반트들이다. 이러한 칼슘 포스페이트들의 제조는 계류중인 U.S.S.N. 08/554,817과 Lee 등의 등록특허 제 5,650,176호, Lee 등의 등록특허 제 5,676,976 및 Lee 등의 등록특허 제 5,683,461 및 여기 설명된 실시예 1~17에서 각각 잘 설명되어 있다. 바람직한 구체예들에서, 상기 어유반트들은 겔, 페이스트, 펠렛, 게이지/메쉬 또는 소결된 덩어리들로서 제조된다. 겔들은 일반적으로 침전에 의해 형성된다. 상기 침전 성숙(aging)시간은 다른 입자크기들을 생성하기 위하여 변화될 수 있다. 일반적으로, 성숙시간이 보다 길수록, 입자크기는 커진다. 어떤 구체예들에서, 여과 및 세척 후, 겔은 어유반트 물질로서 사용될 수 있다. 다른 구체예들에서, 겔은 생리학/멸균 식염수 또는 물과 같은 수상 매질에 다양한 농도로 혼합되어 페이스트 또는 퍼티(putty)를 형성한다. 또다른 구체예들에서, 겔은 동결건조되어 분말로 형성된다. 상기 분말은 식염수와 같은 수상매질과 함께 다른 농도들로 혼합되어 페이스트 또는 퍼티를 형성한다. 상기 페이스트 또는 겔은 경화될 수 있다. 바람직한 구체예들에서, 아파타이트성 칼슘 포스페이트 어유반트는 약 37℃ 또는 신체에서 경화된다. 상기 경화된 물질은 깨지거나, 갈거나, 체분되거나 분쇄되어 다양한 크기의 입자를 형성할 수 있다. 입자 크기들은 상기에서 설명된 것과 같이 변경되거나 조절될 수 있다. 이러한 칼슘 화합물들은 본 기술분야에서 알려진 어떤 적합한 수단들(예로서, 흡착, 공동침전을 통하여 또는 결합체 또는 충전제의 사용을 통하여)에 의해 활성 물질들을 결합함으로써 어유반트로서 형성될 수 있다.

<76> 어유반트들은 특정 입자 크기 또는 입자 크기 분포로 제조될 수 있다. 침간반응으로부터 어유반트 겔을 제조하는 경우, 상기 결정성 구조 및 수반되는 입자 크기는 성숙(maturation)동안 및/또는 온도를 사용하여 조절될 수 있다. 개시의 목적으로, 성숙은 모액과 접촉하는 동안의 침전 성숙시간으로 간주될 수 있다. 바람직한 구체예들에서, 입자크기는 겔의 성숙시간을 증가시키므로써 증가될 수 있다. 보다 짧은 성숙시간을 요구하는 보다 비결정성인 형태들에 비하여, 보다 결정성인 아파타이트성 칼슘 포스페이트들은 보다 긴 성숙시간을 필요로 한다. 일반적으로 보다 높은 온도들에서 보다 결정성인 입자들이 생성된다.

<77> 선택적으로, 상기 겔은 동결건조되어 건조 분말을 형성할 수 있다. 상기 분말의(동결건조되거나 동결건조되지 않은) 입자 크기는 체를 사용하거나, 체분 또는 다른 온도들에서 처리하므로써 조절될 수 있다. 체를 사용하여 상기 분말 입자들을 크기에 따라, 일반적으로 최소크기에서 최대 크기로 분리할 수 있다. 바람직한 구체예들에서, 상기 분말은 체분된다. 대부분의 경우에, 체분시간이 길수록 입자크기는 보다 작게 된다. 다른 구체예들에서, 상기 분말은 여러 온도들로 가열된다. ACP 분말의 결정성을 증가시키기 위하여 보다 고온을(예로서, 400℃~600℃) 사용할 수 있다. 그러나, 온도들이 약 450℃로 상승되면, ACP의 비결정성 성질은 보존되지만, 분말입자를 감소시키는 특이적인 표면영역은 감소한다. 다른 구체예들에서, 경화된 형태의 칼슘 베이스의 어유반트들의 체분, 분쇄 및 다른 방법에 의해 입자들로 깨어질 수 있다. 나노미터 또는 이보다 더 작은 크기범위의 미세한 입자들(예로서, ACP)은 몰드내에서 압축될 수 있으며(예로서, 압축강도: 500psi), 그 후 체분되고 체로 걸러져서 원하는 입자크기를 얻는다. 입자크기를 조절하기 위하여 사용되는 본 기술분야에서 알려진 다른 방법들은 본 발명의 범위내인 것으로 여길 수 있다.

<78> **활성물질을 칼슘 포스페이트 어유반트로 운반**

<79> 상기 어유반트는 면역원 및 어유반트 활성 증진제와 같은 하나 이상의 활성물질들과 조합될 수 있다. 추가 성분(moiety)을 가지는 상기 활성 물질들은 용해, 흡착, 공-침전, 수화 매질 내 원심분리, 캡슐화, 분산을 기초로 한 과정들 또는 본 기술분야에서 알려진 다른 방법을 통해서 칼슘 베이스의 어유반트와 조합될 수 있다. 바람직한 구체예들에서, 상기 활성물질은 제조동안 특이적인 활성물질과 양립될 수 있는 버퍼 시스템의 존재하에서 칼슘 어유반트상으로 흡착된다. 바람직한 구체예들에서, 흡착은 최소 버퍼농도(예로서, 0.001M TRIS pH7.0) 존재하에서 일반적으로 포스페이트 이온이 소량이거나 없는(예로서, < 0.1M), 비교적 낮은 이온강도(예로서, 0.001M~0.2M NaCl) 조건하에서 일어날 것이다. 활성물질 흡착에 대한 보다 상세한 설명은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 Relyveld의 미국특허 제 3,925,545호 및 제 4,016,252호, 그리고 Relyveld의 Development in Biological Standardization(65, 1985, pp.131~136)에서 찾을 수 있다. Towey 등의 미국특허 제 2,967,802호는 칼슘 포스페이트 항원 겔 조성물의 제조방법을 설명하고 있다. 바람직한 구체예에서, 특히 칼슘 포스페이트에 잘 흡착되는 단백질과 핵산들에 유용한, (실시예 16에 따라 제조된)칼슘 포스페이트 어유반트는 상기 뉴클레오타이드 또는 단백질 면역원을 포함하는 버퍼된 낮은 이온강도(예로서, 0.001M NaCl; 0.01M TRIS pH 7.4)의 수성 매질 내에 위치될 것이다. 상기 뉴클레오타이드 또는 단백질 면역원의 농도는 다양할 것이며, 일반적으로 10.0 mg/ml 보다 낮다. 상기 면역원은 상기 어유반트의 표면에 흡착할 것이다. 표면에 완전히 흡착되지 않은 어떤 면역원을 제거하기 위하여 상기 어유반트는 행거될 수 있다.

<80> 상기 어유반트는 이후에 고체화 및/또는 경화되는 침전물, 페이스트 또는 겔로서 제조되어지며, 활성물질은 필수적으로 비이클과 함께 제조될 수 있다. 특이적으로, 상기 물질은 용액, 일반적으로 상기 물질의 생물학적 활

성이 보유되거나 증대되고, 경화과정이 일어날 수 있는 버퍼된 용액내에 부유될 수 있다. 이러한 용액은 그 후, 어쥬반트의 전구체들과 혼합되어 페이스트, 겔 또는 고체를 형성하거나 또는 침전 반응에 첨가되어 함께 공침전되거나 그렇지 않으면 결과의 침전물에 의해 또는 그 안에서 포집된다(entrapped). 상기 활성물질은 그 후 어쥬반트의 통합된 성분이 된다. 어쥬반트 제조의 완료 후, 어쥬반트/비이클은 수용체내로 이식된다. 이러한 완료된 어쥬반트/비이클들은 일반적으로 단일장치의 형태 또는 미립자 형태로 존재한다.

<81> 다른 구체예들에서, 활성물질은 본 발명의 칼슘 베이스의 어쥬반트내에 포집된다. 상기 활성물질은 어쥬반트 입자와 함께 덩어리를 형성하여 입자/물질 응집물을 형성할 수 있다. 또다른 바람직한 구체예들에서, 다르게는 상기 활성물질은 칼슘 어쥬반트에 부착된다. 상기 부착방법은 이에 제한되지는 않지만, 침지(dipping), 롤링(rolling), 분사(spraying), 압착(pressing), 접착(gluing), 페이스팅(pasting) 및 도장(painting)을 포함한다. 선택적으로, 상기 활성물질 및/또는 다른 성분들은 장치 제작에 사용되는 충전제 또는 결합체내에 존재할 수 있다. 이러한 방법 등은 본 기술분야에 잘 알려져 있다. 화학결합(공유결합, 이온결합 및 수소결합)은 어쥬반트와 항원을 결합하기 위해 사용되는 또다른 방법이다. 한 바람직한 구체예에서, 면역원은 본 기술분야에 잘 알려진 방법에 의해, 단백질 분해에 민감한 링커(linker)의 사용을 통하여 공유결합에 의해 비이클에 부착된다.

<82> 또다른 구체예에서, 항원 및 존재할 수 있는 다른 성분들은, 상기 어쥬반트에 의해 둘러싸이거나 캡슐화될 것이다. 이러한 구체예들에서, 상기 어쥬반트는 항원을 포함하는 캡슐로서의 역할을 할 것이다. 이러한 어쥬반트는 재흡수가 가능하기때문에, 상기 항원은 어쥬반트가 분해될 때 체내로 도입되어 일회의 항원 투여량을 숙주에게 제공할 것이다. 어떤 구체예들에서, 상기 완료된 어쥬반트/비이클 장치는 충전 형태로 활성물질을 포함할 것이다. 이러한 충들은 활성물질이 충들로부터 실질적으로 차례로 방출되도록 설계되어 복수회의 투여를 가능하게 할 수 있다. 일반적으로, 이러한 형태로 제조된 장치들은 적절한 전달 특성을 위해 충들의 용해특성에 의존할 것이다. 어쥬반트가 삼투성이고 또한 흡수가능한 또다른 구체예들에서, 캡슐화된 것이 재흡수 과정에 의해 파괴될 때까지 상기 캡슐화된 항원은 조절된 전달 방식으로 어쥬반트/비이클로부터 분산되어 나올 것이다. 이러한 때에 잔류된 항원이 최종 전달 펄스에서 방출된다. 충전 구조를 사용하거나 또는 고체 유리형(free-form) 기술을 사용하여 활성물질을 둘러싸는 비이클의 제조에 대한 구체적인 구체예들은 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 Cima의 미국특허 제 5,490,962와 제 5,518,680호에 설명된 것과 같다. 고체 유리형 기술은 어쥬반트의 삼차원 구조를 변화시키므로써 어쥬반트 성질들(예로서, 방출 속도, 어쥬반트 활성)을 변경시킬 수 있다. 이러한 기술은 생활성 물질의 조절된 방출 및 세포들의 이식 및 성장에 유용하다. 한 고체 유리형태의 구체예에서, 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 등록된 Lee 등의 미국특허 제 5,676,976호에서 설명된 것과 같은 재흡수가능한 칼슘 포스페이트 분말은 이미 면역원을 운반하고 있는, 재흡수성이 낮은 칼슘 포스페이트 분말들을 캡슐화하기 위한 매트릭스로서 사용된다. 상기 면역원은 또한 매트릭스 내에 존재한다. 보다 느리게 재흡수되는 칼슘 포스페이트의 존재는 면역원의 전달 역학이 장기간이 되는 것을 보장한다.

<83> 어떤 구체예들에서는, 어쥬반트와 활성물질간의 계면을 향상시키기 위하여 칼슘 어쥬반트의 표면을 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 어쥬반트는 본 기술분야에서 알려진 두 상들 사이의 계면을 변경하기 위하여 플라즈마 에칭이나 스퍼터 코팅과 같은 방법으로 표면처리될 수 있다. 표면처리는 단백질과 같은 활성물질들에 대한 어쥬반트의 친화력을 증가시키거나 증진시키기 위해 사용될 수 있다. 플라즈마 에칭은 장치의 생물학적 적합성 또는 활성물질 또는 다른 성분의 어쥬반트에 대한 결합특성을 변경할 수 있는 변경되거나 거친 어쥬반트 표면을 제공할 수 있다. 플라즈마 에칭을 이용하는 방법 및 적용들에 대한 보다 자세한 설명은 여기에 참고문헌으로서 포함된 계류중인 특허출원 U.S.S.N. 제 09/008,650호에서 찾을 수 있다.

<84> 입자 거칠기(roughness)는 항원과 같은 활성물질을 어쥬반트에 결합시킬 때 종종 중요한 역할을 한다. 대부분의 경우에, 입자 거칠기의 증가는 활성물질의 칼슘 포스페이트 어쥬반트와의 결합능을 증진시킬 것이다. 다른 경우들에서, 입자 거칠기는 세포들(예로서, 마크로파아지)의 본 발명의 어쥬반트와 상호작용하도록 하는 능력에 영향을 주기 위하여 조절될 수 있다. 본 발명의 어쥬반트는 적합한 면역반응 세포들을 제공하도록 설계될 수 있으며, 적절하게 거친 표면은 이러한 세포들의 어쥬반트-항원 구조에의 부착을 증진시킬 것이다. 입자 거칠기는 침전 물질의 성숙시간 또는 결정성 및 여기에 설명된 것과 같이 에칭, 코팅 및 고체 유리형 기술과 같은 표면처리에 따라 변화할 수 있다.

<85> 본 발명의 어쥬반트의 결정성의 정도는 공유결합 또는 흡착 방법여부에 관계없이, 항원의 어쥬반트에 대한 부착에 영향을 미칠 것이다. 일반적으로, 결정성이 높을수록 부착에 대한 친화력은 커진다. 결정성은 X선 회절방법으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 결정성은 침전된 어쥬반트들에 대한 성숙시간을 길게 하므로써 또한 가열이

나 소결에 의해 증가될 수 있다.

- <86> 본 발명의 칼슘 어쥬반트는 숙주로 전달되어질 활성물질에 대해 독립적으로 선택될 것이다. 다른 경우들에서, 최적의 항원-어쥬반트의 매치(match)를 결정하기 위하여 테스트들이 수행될 수 있다.
- <87> 다양한 이온 농도와 버퍼화 물질들의 존재하에서 상기 어쥬반트들의 항원과의 결합능력은 검색되어(예로서, 형광표지 또는 방사성 원소 표지), 최적의 매치는 다양한 이온강도 내에서 성분들의 고체 칼슘 포스페이트에 대한 결합을 평가하는 본 기술분야에 알려진 방법들 중에서 선택된다. 항원이 베이스 분자와 강하게 상호작용하여 이에 결합될 때 항원 또는 다른 성분의 효율적인 통합(incorporation)이 일어난다. 이러한 경우들에, 항원은 대개 분자에 결합된 채로 남아 어쥬반트 내에 포집될 수 있다.
- <88> 상기 활성 물질은, 이에 제한되지는 않지만 항원, 백신, 이차 어쥬반트들, 박테리아 또는 바이러스 또는 이들의 절편, 핵산, 단백질, 열충격 단백질들(HSPs), 합텐(haptens), 면역관용원, 알레르겐(allergens), 면역원, 항생 물질 및 다른 생활성 성분들 또는 생합성 경로의 성분들을 포함한다. 숙주로의 전달에 적합한 화합물들의 보다 완전한 열거는 본 명세서에 참고문헌으로 포함된 Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach(Powell 등(eds), Plenum Press, New York, 1995)에 나타나 있다.
- <89> 어떤 구체예들에서, 본 발명의 어쥬반트들은 활성물질의 부재하에서 면역반응을 촉진하는데 사용될 수 있을 것이다. 예로서, 종양 가까이에의 활성물질이 없는 어쥬반트의 국부 이식은 종양에 거부반응을 나타내기에 충분한 국부 반응을 일으키기에 충분할 것이다. 이런 경우들에서는, 특정 시토카인의 포함이나 표면이 거칠게 된 비이클의 사용과 같은, 하나 이상의 어쥬반트 활성 증진제 또는 증진 전략들을 사용하는 것이 유리할 것이다. 다른 경우에서, 어쥬반트와 항원은 단일형태로서 결합되지 않고, 어쥬반트가 항원이 도입되기 전 또는 그 후에 숙주로 도입된다.
- <90> **투여량**
- <91> 본 발명의 어쥬반트에 의해 전달될 면역원의 정확한 투여량은 각 적용에 대해 결정되어야 한다. 절대적인 투여량은 어쥬반트상에서 운반되어지는 활성물질의 총량인 반면, 장기 투여량은 시간단위당 방출되어 수용체에게로 전달되는 활성물질의 양이다. 투여량에 대한 이들 두 측면의 상대적인 중요성은 투여 목적 및 활성물질의 성질에 따라 다르다. 일반적으로, 투여량이 보다 많은 백신들은 면역학적 메모리의 수립이 요구될 수 있다. 투여량은 바람직하게는 어쥬반트 재흡수 속도에 관련되어 조절된다: 재흡수가 보다 빠른 어쥬반트들은 재흡수가 보다 느린 어쥬반트보다 신속하게 투여량을 전달할 수 있을 것이며, 이는 숙주내로 보다 신속하고 증가된 농도로 도입되기 때문이다. 보다 바람직한 구체예에서, 어쥬반트의 재흡수 속도는 연속된 또는 이후 부스터 면역화가 일어나는 통상적인 초기 면역화와 유사할 것이다. 면역화사이의 일정길이의 기간은 휴지기간이라고 하며, 이는 대개 항원 특이적인 림프구들, 특히 메모리 B 림프구들의 도입과 효과적인 백신화를 위해 요구된다. 일반적으로, 휴지기간이 보다 길수록(예로서, 몇 주 또는 달) 최대 항체 반응이 일어날 수 있다.
- <92> **숙주로의 도입**
- <93> 전달 비이클 또는 어쥬반트는 제한된 경우들에서 바람직하게는 겔 또는 페이스트로서 수용체에 도입되며, 고체, 슬러리 또는 액체일 수 있다. 미립자화된 형태에서, 어쥬반트는 일반적으로 1nm~200 μ m, 바람직하게는 1nm~10 μ m, 가장 바람직하게는 1nm~900nm의 입자직경을 가질 것이다. 이러한 입자들은 단독으로 또는 보다 큰 입자들과 함께 존재할 것이다. 전달 비이클 또는 어쥬반트는 어떤 효과적인 방법에 의해 숙주로 도입될 수 있다.
- <94> 바람직한 구체예에서, 페이스트 어쥬반트는 제조된 후 주입되어 체내에서 경화된다. 실시예 17에 따라 제조된 아파타이트성 칼슘 포스페이트 어쥬반트는 피하주사 또는 근육주사로 주입될 수 있으며 체온(37 $^{\circ}$ C)에서 경화된다. 주입가능한 페이스트는 피하, 근육내, 내피 또는 다른 주사경로를 통하여 숙주에 도입될 수 있다. 다른 구체예들에서, 어쥬반트 입자들은 페이스트와 혼합되어 주입된다(예로서, 근육내, 피하, 정맥내). 입자의 페이스트에 대한 부피 백분율은 바람직한 투여량 또는 어쥬반트 활성에 따라 조절될 수 있다. 또한, 다른 구체예에서, 페이스트는 로션과 같이 퍼발라져서 피부를 통한 전달 및/또는 점액성 전달을 제공할 수 있다.
- <95> 어쥬반트가 펠렛 또는 블록과 같은 고체인 경우, 이는 일반적으로 외과적으로 이식될 수 있다. 또한 좌약으로서 제공될 수도 있다. 전달 배관(cannula)을 사용하는 방법 또한 사용될 수 있다.
- <96> 어떤 구체예들에서, 어쥬반트는 액체 또는 다른 점액성 물질들에 부유될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 나노미터 크기의 어쥬반트 입자들은 슬러리 또는 액체내에 부유되어져서 어떤 적합한 수단, 바람직하게는 주사에 의해 투여된다. 슬러리 내의 입자들의 부피 백분율은 바람직한 투여량 또는 어쥬반트 활성에 따라 조절될 수 있다.

어떤 경우들에서, 어쥬반트는 경구적 또는 안구 경로 또는 흡입(비강 투여)을 통하여 투여될 수 있다. 흡입에 의한 투여는 나노 또는 마이크로 미립자 형태의 건조(비수화된) 비이클을 이용할 수 있다. 어쥬반트의 안구 투여를 사용하는 구체예는 전형적으로, 비독성 수성매질에 부유되어 점안기로서 투여되는 약물이 포함된 나노입자들을 포함한다. 어떤 경우에는, 입자들은 연고형태이며, 눈을 통해 투여된다.

<97> **사용 - 데포 전달 및 조절된 방출**

<98> 본 발명의 어쥬반트는 위치 특이적인 전달 또는 계통적인 전달이라는 장점을 제공한다. 일단 숙주에 도입되면, 상기 어쥬반트/장치는 활성물질을 전달할 것이다. 본 발명의 어쥬반트는 바람직한 속도로 항원을 전달한다. 바람직한 구체예들에서, 어쥬반트는 항원의 데포 전달을 숙주에게 제공할 것이다. 또한, 상기 어쥬반트는 항원의 위치 특이적인 전달을 제공할 것이다. 타겟 위치 특이적인 전달은 활성물질의 치료효과를 향상시키고 바람직하지 않은 부작용들을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 특이적인 타겟들은 종양 조직, 활성물질 주입 전 또는 주입후의 위치 및/또는 거부반응이 바람직한 어떤 위치를 포함하거나, 또는 특이적인 항원에 대한 백신화의 경우에 바람직한 위치들은 최적 면역화를 유도하는 위치들이다(예로서, 비장, 간, 신장, 림프절 등).

<99> 본 발명은 다음의 실시예들을 참조하여 더 예시되며, 이들은 단지 본 발명을 예시하는 목적으로 여기 제공되는 것일 뿐, 본 발명을 제한하는 것으로 여겨져서는 안된다.

<100> **실시예 1**

<101> 본 실시예는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP) 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<102> 상온에서 55g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50g NaOH; 30g NaHCO_3 를 1.3리터의 증류수에 신속하게 용해시켜 용액 A를 제조하였다. 상온에서 43g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 를 0.5리터의 증류수에 신속하게 용해시켜 용액 B를 제조하였다.

<103> 그 후, 용액 B를 신속하게 교반되는 용액 A에 신속하게 첨가하여 탄산화된 비결정성 칼슘 포스페이트를 상온에서 제조하였다. 이에 따라 형성된 겔과 같은 비결정성 칼슘 포스페이트의 침전을 성숙시키거나 상온에서 약 30초동안 정치하여 두었다. 성숙 후, 중간 여과속도 및 약 10^{-2} 토르의 진공압으로 여과지(0.05m^2)를 사용하여 상기 침전물을 여과하였다. 상기 침전물은 얇은 덩어리를 형성하였으며, 여과관내로 물을 첨가하므로써 약 4리터의 증류수로 이를 세척하였다. pH 프로우브를 사용하여 상기 겔의 pH를 측정하였으며 pH는 13.5였다.

<104> **실시예 2**

<105> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<106> 침전물을 성숙시키거나 상온에서 5분동안 정치하여 두는 변경을 제외하고는, 실시예 1에 따라 ACP 어쥬반트를 제조하였다. 그 후 세척한 물질을 약수저를 사용하여 모아, 2.5리터 용기 내의 액체질소내에 침지시켰다. 단단하게 얼은 조각이 형성된 후, 상기 용기를 진공 챔버(10^{-1} ~ 10^{-2} 토르)내로 옮겨 미세하고 건조한 분말이 얻어질때까지 24시간동안 방치하였다.

<107> **실시예 3**

<108> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP) 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<109> 침전물을 모액의 존재하에서 상온에서 2시간동안 성숙시키는 변경을 제외하고는, 실시예 2에 따라 ACP 어쥬반트를 제조하였다.

<110> **실시예 4**

<111> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP) 어쥬반트의 단계적인 제조를 설명한다.

<112> 다음의 변경을 수행하여 실시예 1에 따라 ACP 어쥬반트를 제조하였다. 상온에서 80g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 40g NaHCO_3 ; 1g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 를 1.0리터의 증류수에 신속하게 용해시켜 용액 A를 제조하였다. 상온에서 35g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1g $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 0.5리터의 증류수에 신속하게 용해시켜 용액 B를 제조하였다. 이에 따라 형성된 겔과 같은 비결정성 칼슘 포스페이트의 침전을 성숙시키거나 상온에서 약 30초동안 정치하여 두었다. 모액 존재하에서 성숙 후, 중간 여과속도 및 약 10^{-2} 토르의 진공압으로 여과지(0.05m^2)를 사용하여 상기 침전물을 여과하였다. 상기 물질은 얇은 덩어리를 형성하였으며, 여과관내로 물을 첨가하므로써 약 4리터의 증류수로 이를

세척하였다. pH 프로우브로 측정한 상기 침전물의 pH는 7.3이었다.

<113> 실시예 5

<114> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP) 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<115> 다음의 변경을 수행하여 실시예 4에 따라 ACP 어쥬반트를 제조하였다. 그 후 세척한 물질을 약수저를 사용하여 모아, 2.5리터 용기 내의 액체질소내에 침지시켰다. 얼린 후, 상기 물질을 진공 챔버(10^{-1} ~ 10^{-2} 토르)내로 옮겨 미세하고 건조한 분말이 얻어질때까지 24시간동안 방치하였다.

<116> 실시예 6

<117> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP) 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<118> 다음의 변경을 수행하여 실시예 5에 따라 상기 ACP 어쥬반트를 제조하였다. 이 침전물을 상온에서 30분동안 성숙시켰다.

<119> 실시예 7

<120> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<121> 다음의 변경을 수행하여 실시예 1에 따라 상기 ACP 어쥬반트를 제조하였다. 상온에서 55g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20g NaOH; 50g NaHCO_3 ; 2g $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 를 1.3리터의 증류수에 신속하게 용해시켜 용액 A를 제조하였다. 상온에서 100g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 0.7리터의 증류수에 신속하게 용해시켜 용액 B를 제조하였다. pH 프로우브로 측정한 상기 겔의 pH는 9.0이었다.

<122> 실시예 8

<123> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP) 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<124> 다음의 변경을 수행하여 실시예 7에 따라 ACP 어쥬반트를 제조하였다. 침전물을 상온에서 30분동안 성숙시켰다. 그 후 세척한 물질을 약수저를 사용하여 모아, 2.5리터 용기 내의 액체질소내에 침지시켰다. 얼린 후, 상기 용기를 진공 챔버(10^{-1} ~ 10^{-2} 토르)내로 옮겨 미세하고 건조한 분말이 얻어질때까지 24시간동안 방치하였다.

<125> 실시예 9

<126> 본 실시예에서는 비결정성 칼슘 포스페이트(ACP) 어쥬반트의 제조를 설명한다.

<127> 침전물을 상온에서 2시간동안 성숙시키는 변경을 제외하고는 실시예 7에 따라 ACP 어쥬반트를 제조하였다.

<128> 실시예 10

<129> 본 실시예에서는 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트의 전형적인 제조를 설명한다.

<130> 1.2리터의 증류수 내의 디소듐 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 218g의 용액과 0.5리터 내의 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 용액을 제조하였다. 상온에서 교반하면서 칼슘 용액을 포스페이트 용액내로 신속히 부었다. 침전은 바로 일어나서 실질적으로 완료되었다. 산성 칼슘 포스페이트의 형성을 방지하기 위하여 상기 침전물에 소듐 하이드록사이드 용액을 첨가하여 pH를 6.4로 조정하였다. 이 침전물을 여과하기 전에 상온에서 5분동안 성숙시켰다. 그 후 이 침전물을 부크너(Buchner) 필터(약 0.1m²의 총 표면적)를 통하여 여과하고 약 3리터의 증류수로 세척하였다. 여과지 상에서 저결정성의 칼슘 포스페이트를 얻었다.

<131> 실시예 11

<132> 본 실시예에서는 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트의 전형적인 제조를 설명한다.

<133> 다음의 변경을 수행하여 실시예 10에 따라 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트를 제조하였다. 그 후 세척한 물질을 약수저를 사용하여 모아, 2.5리터 용기 내의 액체질소내에 침지시켰다. 얼린 후, 상기 용기를 진공 챔버(10^{-1} ~ 10^{-2} 토르)내로 옮겨 미세하고 건조한 분말이 얻어질때까지 24시간동안 방치하였다.

<134> 실시예 12

<135> 본 실시예에서는 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트의 전형적인 제조를 설명한다.

- <136> 소듐 하이드록사이드 용액을 첨가함으로써 침전물의 pH를 7.1로 조절한 것을 제외하고는 실시예 10에 따라 칼슘 포스페이트 아파타이트를 제조하였다.
- <137> **실시예 13**
- <138> 본 실시예에서는 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트의 전형적인 제조를 설명한다.
- <139> 소듐 하이드록사이드를 적정하여 침전물의 pH를 7.1로 조절한 것을 제외하고는 실시예 11에 따라 칼슘 포스페이트 아파타이트를 제조하고, 여과 전에 상온에서 48시간동안 성숙시켰다.
- <140> **실시예 14**
- <141> 본 실시예에서는 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트의 전형적인 제조를 설명한다.
- <142> 다음의 변경을 수행한 것을 제외하고 실시예 10에 따라 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트를 제조하였다. 그 후 세척한 물질을 약수저를 사용하여 모아, 2.5리터 용기 내의 액체질소내에 침지시켰다. 얼린 후, 침전물을 진공 챔버(10^{-1} ~ 10^{-2} 토르)내로 옮겨 미세하고 건조한 분말이 얻어질때까지 24시간동안 방치하였다.
- <143> **실시예 15**
- <144> 본 실시예에서는 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트의 전형적인 제조를 설명한다.
- <145> 여과 전에 소듐 하이드록사이드를 첨가하여 침전 용액의 pH를 7.1로 조절한 것을 제외하고는 실시예 10에 따라 칼슘 포스페이트 아파타이트 어쥬반트를 제조하고, 상온에서 48시간동안 성숙시켰다.
- <146> **실시예 16**
- <147> 본 실시예에서는 아파타이트성 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 제조를 설명한다.
- <148> 용액 B(17.1g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.250리터 증류수; pH 5.5~6)를 교반된 용액 A(10g $\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$; 0.5리터 증류수; pH 7.8)에 신속히 첨가함으로써 상온에서 디칼슘 포스페이트 디하이드레이트(DCPD)를 제조하였다. 그 후 즉시, 약 10^{-2} 토르의 진공압으로 여과지(0.05m^2)를 사용하여 상기 침전물을 여과하였다. 상기 물질은 얇은 덩어리를 형성하였으며, 약 2리터의 증류수로 이를 세척하고 상온에서 24~72시간동안 건조하였다.
- <149> 실시예 1에 따라 반응성 비결정성 칼슘 포스페이트를 제조하였다. 그 후, 세척한 물질을 약수저를 사용하여 모아, 2.5리터 용기 내의 액체질소내에 침지시켰다. 얼린 후, 상기 물질을 진공 챔버(10^{-1} ~ 10^{-2} 토르)내로 옮겨 미세하고 건조한 분말이 얻어질때까지 24시간동안 방치하였다. 그 후, 상기 물질을 $455^\circ (\pm 3^\circ\text{C})$ 에서 80분동안 가열하였다.
- <150> 반응성 비결정성 칼슘 포스페이트를 막자와 막자사발을 이용하여 3~5분동안 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 물리적으로 50:50으로 건조혼합하였다. 그후 상기 분말 혼합물에 물(1ml/g 혼합물)을 첨가하여 페이스트와 같은 점조성의 수화된 전구물질을 만들었다. 첨가된 물의 양은 진한 페이스트와 묽은 페이스트 중 어느것이 바람직하냐에 따라 달라진다. 상기 페이스트 물질을 체온에(37°C)에 도달하는 촉촉한 조직환경하에 두었으며, 이는 고체 덩어리로 경화되었다. 이 경화과정은 4°C 의 냉장온도에 두므로써 몇시간 동안 지연될 수 있다.
- <151> **실시예 17**
- <152> 본 실시예에서는 건조 전구체들의 자동 혼합을 사용한 PCA 칼슘 포스페이트의 제조를 설명한다.
- <153> 실시예 16에 따라 건조 ACP와 DCPD 전구체들을 제조하였다. 막자와 막자사발을 사용하여 혼합하는 대신에, SPEX 8510 실험용 제분기와 SPEX 8505 알루미늄 세라믹 그라인딩(grinding) 챔버를 2분동안 사용하여 ACP와 DCPD를 혼합하였다. 혼합된 건조 전구체들 1그램당 0.7~1.5ml의 물을 첨가하여 수화된 전구체의 제조를 수행하였다.
- <154> **실시예 18**
- <155> 본 실시예에서는 쥐에 12개의 테스트 칼슘 베이스의 어쥬반트들을 두 위치에 일회 주사하여 나타나는 국부적인 피하 반응을 설명한다. 결과들은 특이적인 칼슘 포스페이트 어쥬반트들에 의한 세포 면역 반응의 특이적인 측면을 선택적으로 증진시키는 능력을 예증하여준다.
- <156> 주사 대조군으로서 식염수가 사용되었다. 실시예 1~8, 11~13, 15에 따라 테스트 어쥬반트들을 제조하였으며, 그 후 식염수 내 슬러리로 만들어 피하주사로 견갑골쪽과 등쪽의 가슴 부위에 대칭적으로 투여하였다. 투여량은 각

주사위치에 대해 0.05ml로 하였다. 잘 지워지지 않는 마커로 원을 그려서 각 주사위치를 표시하였다. 특정 시간(주사후 72시간, 7일, 14일후)에 동물들을 안락사시켰다.

<157> 부분적인 성장 병리학적 검사는 등쪽의 가슴부위/견갑골쪽 피하주사 위치(왼쪽과 오른쪽)에 제한되었으며, 주변 세포들은 모두 안락사된 동물들에서 즉각적으로 수행되었다. 처리 후 72시간, 7일, 14일에 안락사된, 다양한 칼슘 베이스의 어류번트들이 투여된 모든 군들에서 귀의 피하주사 위치(왼쪽 및 오른쪽)의 각 부분에서 하나의 단단하고 얇은 솜은 부위를 확인하였다. 이들 솜은 부위들을 테스트 어류번트들의 피하주사로 인한 것으로 생각된다.

<158> 해부를 완료하고, 동물의 확인 표시들을 10% 중성 버퍼화된 포르말린 내에 유지시켰다(그러나, 이로 공정처리하지는 않았음). 완전히 안락사된 동물들의 뇌, 비장, 흉선, 오른쪽과 왼쪽 등쪽 가슴/견갑골 피부(주사위치들), 아래턱 림프절, 간 및 폐를 다듬어서 보존하였다. 각 연구대상 동물에서, 조직생리학적 검사를 위해 오른쪽 피하 주사위치를 파라핀 왁스에 고정(embedding)시키고, 얇게 잘라 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하였다. 다음 항체들을 사용하여 왼쪽 주사위치를 평가하였다: CD3, CD4, CD8, CD45R/B220(또는 선택적으로 CD19)과 Mac-3. 죽은 쥐들의 오른쪽 주사 위치들을 OCT 매질내에 직접적으로 고정시켜, 얼리고 CD3e, CD4와 CD8a로 염색하였다. 죽은 쥐들의 왼쪽 주사위치들을 6~24시간동안 10% 중성 버퍼화된 포르말린으로 고정(fix)하고, 파라핀 왁스내에 고정하고, 헤마톡실린과 에오신 및 CD45R/B220과 Mac-3으로 염색하였다. 동결 조직을 크리오스탯(cryostat)을 사용하거나 또는 파라핀 고정 조직들을 회전 마이크로톰을 사용하여 조직을 6 um 절편으로 자르고, Mac-3 또는 몇몇 CD 항원들(CD3e, CD4, CD8a와 CD45R/B220)에 대한 파밍겐(Pharmingen) 모노클로날 쥐 또는 햄스터 항-쥐 일차 항체들을 사용하여 60분동안 염색하였다.

<159> AEC 크로모젠(chromogen)과 함께, 표지된 스트렙트아비딘-비오틴 복합체/HRP 검출 시스템(Dako사, K377호)을 사용하여 항원들을 시각화하였다. 절편들을 Gill의 III 헤마톡실린으로 역염색하였다. 항-햄스터 IgG(CD3e에 대해), 염소 항-쥐 Ig(CD8a, CD45R/B220 및 CD4 및 쥐 항-쥐(rat) IgG1/IgG2a(Mac-3에 대해) 및 햄스터 IgG 이소타입(isotype) 표본(CD3e에 대해)을 적절히 희석하여 반응의 특이성을 증명하기 위하여 음성 시약 대조구 조직 절편상에 일차 항체로서 치환하였다.

<160> N(음성)과 P(양성) 확인 표준방법을 사용하여 반정량 기술로 면역조직화학적 염색을 평가하였다. 세포질성의 붉은 푸스키아(fuschia) 염색 및 양성 대조구 조직내에서 다양한 CD들 또는 Mac-3으로 염색된 세포에 해당하는 세포 형태가 존재하는 경우, 세포는 양성으로 여겨진다.

【표 1】 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 면역조직화학적 평가

	CD3			CD4			CD8a			CD45R/B220			Mac-3		
	72 시간	7일	14일	72 시간	7일	14일	72 시간	7일	14일	72 시간	7일	14일	72 시간	7일	14일
실시예 1	N	N	1	N	N	1	1	1	1	1	4	4	3	2	3
실시예 2	N	1	1	N	1	1	N	1	N	1	2	2	1	3	3
실시예 3	N	1	1	N	1	1	N	1	1	1	2	3	1	3	4
실시예 4	N	N	N	1	1	1	2	N	N	N	2	2	3	3	4
실시예 5	N	N	N	1	N	1	N	N	1	1	1	3	1	2	2
실시예 6	2	1	2	1	1	1	1	N	1	N	1	1	1	2	3
실시예 7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	2	1	2	3	2	4
실시예 8	N	1	1	N	N	1	N	N	N	N	N	1	2	2	2
실시예 11	1	1	1	N	1	3	N	N	1	2	2	2	1	2	3
실시예 12	N	N	2	1	1	2	N	1	2	N	3	1	N	4	4
실시예 13	N	1	1	N	N	1	N	N	N	N	2	2	3	3	4
실시예 15	N	1	2	N	1	1	N	1	1	1	3	2	1	3	4

<161>

<162>

약어: 다음 등급 시스템을 사용하여 주사 위치에서의 특이적인 세포의 양을 정량하였다: N(0개 세포/필드/40X, 음성), 1(1~3개 세포/필드/40X, 조금(slight), 적은 세포들), 2(4~8개 세포/필드/40X, 중간(mild)정도 수의 세포들), 3(9~15개의 세포/필드/40X, 적당한(moderate) 수의 세포들), 4(16개 이상/필드/40X, 현저한(marked) 수의 세포들). 본 연구 결과들은 상기 표 1에 요약하였다. 어쥬반트에 대한 세포 반응은 일반적으로 다음 군들 중 하나의 군으로 카테고리화되어질 수 있다: 강한 군, 지연된 군 및 일시적인 군.

<163>

면역조직화적 검사: Mac-3 항체로 시각화된 마크로파아지(다핵성 거대 세포들 포함)는 일반적으로 모든 회복기에서 대부분의 어쥬반트 제제의 주사 위치에서 주요한 세포 유형이다. 마크로파아지들의 양은 일반적으로 여러 군에서 시간에 따라 증가하는 정도에 따라 조금에서 현저한 정도로 등급을 매겼다. 실시예 2, 4, 12 및 13은 강한 마크로파아지 반응을 나타내었다. 지연된 마크로파아지 반응이 실시예 3, 6, 11 및 15에서 관찰되었다. 일시적인 마크로파아지 반응은 실시예 1과 7에서 나타났다. Mac-3 양성 세포들은 우선적으로 테스트 어쥬반트에 인접하여 관찰되었으며 종종 어쥬반트의 주변영역에 침투되었다. 이들은 때때로 어쥬반트와 양립되는 세포질내 물질을 포함하였으며, 이는 Mac-3 양성 세포들(마크로파아지)이 우선적으로 여러 어쥬반트들의 재흡수에 포함되었다는 것을 제시한다.

<164>

CD45R/B220 항체로 검출된 B 림프구들은 주사 위치에서 발견되는 두번째로 가장 많은 세포 유형이었다. 이들 군들(대개 조금에서 적당한 정도로 등급화됨)내에서 CD45R/B220 양성 세포들의 양과 양성 B 림프구들을 가진 군들의 발생은 처리후 72시간에 안락사된 경과에 비하여 7일과 14일에 증가하였다. B 세포들은 실시예 6과 8에 따라 제조된 어쥬반트들을 주입받은 쥐의 주사 위치에서 가장 적었다. 보다 특이적으로, 상기 B 세포 반응은 지연된 군, 강한 군 또는 일시적인 군으로 분류될 수 있다. 실시예 1은 7일에 강한 B 세포 반응을 나타내었다. 실시예 3과 5의 어쥬반트들은 지연된 반응을 나타내었다. 일시적인 B 세포 반응은 실시예 7, 12 및 15에서 관찰되었다. 주사 위치에서 비교적 많은 수의 B 림프구들의 존재는 체액성 면역 반응의 매개물들이 테스트 물질과 관련

된 염증 과정에서 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 제시한다.

<165> 양성 T 림프구들(CD3e, CD4 및 CD8a)을 가지는 군들은 시간에 따라 그 비율이 증가하는 것이 관찰되었다. 각 안락사 기간 후에, 여러 어쥘반트들 내에서 관찰된 양성 T 세포의 가장 흔한 유형은 CD4였다. 처리 후 7일과 14일에 안락사된, CD3e가 두번째로 가장 많이 관찰되는 T 세포였다.

<166> 이러한 결과들을 아래 표 2에 나타내었다:

【표 2】

	72 시간	7 일	14 일
CD3e	2	6	9
CD4	4	7	11
CD8a	3	5	7
처리된 군의 총 수	12	2	12

<167>

<168> 이러한 군들에서, T 세포들의 양은 처리후 72시간, 7시간 및 14일에 안락사된 쥐들에서 조금(1~3개 세포/필드/40X)인 것으로 평가되었다.

<169> 주사위치에서 이러한 다른 유형들의 T 세포들의 면역조직화학적 탐지.

<170> T 림프구들의 수는 일반적으로 B 세포들 및 마크로파아지들보다 적으나, 주사 위치에서의 이들의 존재는 어쥘반트에 반응하는 활성 국부 면역 반응을 나타내는 것이다. 실시예 4, 5, 7, 8 및 13에 따라 제조된 어쥘반트로 처리된 쥐들에서는 다른 어쥘반트들로 처리된 쥐들에 비해 T 림프구들이 없거나 적은 양으로 존재하였다. 실시예 12 및 13은 CD3에 대해 지연된 T 세포 반응을 나타낸 반면, 실시예 6에서는 CD3에 대한 일시적인 T 세포반응이 관찰되었다. 실시예 11 및 12는 CD4에 대해 지연된 T 세포 반응을 나타내었다. 실시예 4는 CD8a에 대해 일시적인 T 세포 반응을 나타낸 반면, 실시예 12는 CD8a에 대해 지연된 T 세포 반응을 나타내었다.

<171> 바람직한 구체예들에서, 시토카인은 그 활성에 따라 어쥘반트와 결합되어 그 어쥘반트의 효과를 더욱 증대시킬 것이다. 예로서, IFN- γ , IL-1 α 및 IL-2 β 와 같은 시토카인들은 마크로파아지 반응들을 유도하는 것으로 나타나는 선택적인 어쥘반트들과 결합될 수 있다. 다른 경우들에서, 실시예 1, 3 또는 5에 따라 제조된 어쥘반트는 IL-4 또는 IL-13과 결합되어 B 세포 반응을 증대시킬 수 있다. 또한, CD27리간드, IL-2 및 IL-8과 같은 시토카인들은 실시예 4, 6, 11, 12 및 15의 어쥘반트들에 첨가되어 T 세포 반응을 증진시킬 수 있다. 시토카인 선택에 대한 보다 자세한 설명은 첨부 II에 나타내었다: 본 명세서에 포함된 시토카인류 및 이들의 수용체들(면역생물학: 건강과 질병에 있어서의 면역 시스템, Janeway-Travers, Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., 1996).

<172> **조직병리학적 검사:** 여러 유형의 칼슘 포스페이트 어쥘반트 제제들로 인한 조직병리학적 변화는 다양한 어쥘반트를 둘러싸고 있는 섬유상의 캡슐 형성 및 염증성 세포 침투였다. 처리후 72시간, 7일 및 14일에 안락사된 모든 쥐들의 검사된 주사위치들에서 이러한 변화가 관찰되었다. 상기 염증성 세포반응은 다양한 비율의 모노클로날 세포들(마크로파아지, 림프구 및 플라즈마 세포들 포함), 호중구, 호산구 및/또는 다핵성 거대세포들의 침투에 의해 특징지어진다. 보다 가벼운 염증성 세포 반응 및 섬유상 캡슐 형성은 다른 제제들을 투여받은 쥐들에 비해서 실시예 3, 5, 7, 11 및 15의 칼슘 포스페이트 어쥘반트들을 투여받은, 모든 회복기에 있는 쥐들의 주사 위치에 존재하는 것으로 나타났다. 모노클로날 염증성 세포들은 항상 주사 위치에서 나타났으며, 그 정도는 조금에서 적당한 정도로 나타났다. 다핵화된 거대 세포들은 처리 후 7일 및 14일에 안락사된 쥐들에서 우선적으로 나타났으며, 그 정도는 조금에서 적당한 정도로 나타났다. 칼슘 포스페이트 어쥘반트 처리된 군들의 다수에서, 모노클로날 염증성 세포들과 다핵화된 거대 세포들의 침투 및 섬유상 캡슐 형성은 일반적으로 시간에 따라 증가되었다. 호중구들 및 호산구들은 72시간의 회복기간 후에 안락사된 쥐들에서 우선적으로 나타났으며, 그 정도는 조금에서 중간정도로 나타났다. 호산구들과 호중구들의 침투의 정도는 시간에 따라 감소하였다. 주사 위치에서

어쥬반트의 양은 중간정도에서 심각한(또는 현저한)정도로 나타났다. 72시간에 안락사된 쥐들에 비해, 7일과 14일에 안락사된 다르게 처리된 쥐들에서는 어쥬반트가 조금~중간정도로 감소하였다.

<173> 실시예 19

<174> 본 실시예에서는 독감용 백신을 제조하기 위해 *Bordetella pertussis*를 어떻게 본 발명의 어쥬반트 내로 운반하는지를 설명한다.

<175> 모든 용액들을 멸균제조하였다. 다음의 변경을 수행하여, 실시예 1~16에 따라 칼슘 어쥬반트를 제조하였다. 사멸되어 원심분리된 *Bordetella pertussis*(Pasteur Vaccins으로부터 상업적으로 구입가능) 바실러스들을 0.07M 이염기 소듐 포스페이트 멸균 용액내에서 균질화시켜 $\text{mL당 } 4 \times 10^{10}$ 개의 바실러스를 얻었다. 이렇게 얻은 균들의 세균 현탁액을 용액 B와 혼합되기 전의 용액 A와 혼합하였다. *B. pertussis*는 본 발명의 칼슘 포스페이트 침전물에 흡수되었다.

<176> 실시예 20

<177> 본 실시예에서는 어쥬반트 표면상의 활성 물질의 흡착을 설명한다.

<178> 상기 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 실시예 16 또는 17에 따라 제조하였다. 상기 침전물은 37°C에서 경화되었다. 사멸되어 원심분리된 *Bordetella pertussis*(Pasteur Vaccins으로부터 상업적으로 구입가능) 바실러스들을 0.07M 이염기 소듐 포스페이트 멸균 용액내에서 균질화시켜, $\text{mL당 } 4 \times 10^{10}$ 개의 바실러스를 얻었다. *B. pertussis*를 포함하는 이 현탁액 내에 어쥬반트(경화된 칼슘 포스페이트 침전물)를 위치시켜서(예로서, 담금), 어쥬반트의 표면에 흡착시켰다. *B. pertussis*가 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 표면에 흡착되도록 적어도 한시간동안 두었다.

<179> 실시예 21

<180> 본 실시예에서는 인간에 알레르겐과 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 사용을 설명한다.

<181> 실시예들 1~16에 따라 분말(입자크기 10nm~300nm)로서 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 제조하였다. 소듐 포스페이트 버퍼로 집 먼지를 추출하고, 암모늄 설페이트 침전물로 정제하여 집 먼지 추출물을 제조하였다. 상기 먼지 추출물을 식염수내 0.5mg/mL의 농도로 제조하여 수화 매질로 사용하였다. 분말을 치약정도의 점도($10^4 \sim 10^8$ 포아세)로 부유시켰다. 칼슘 포스페이트 어쥬반트된 알레르겐을 2.0mL 투여량으로 팔의 외측에 피하주사하였다. 1년의 간격으로 같은 시기에 평균 13회 주사를 맞는, 면역치료 과정의 전과 후에 혈액 샘플을 채취하였다. 혈청 샘플들을 30°C에서 저장하고, 총 IgE 농도 및 특이적인 IgE 평가를 수행하였다. 면역치료 전과 후에 측정한 농도는 총 IgE에 대해서 IU/mL 및 환자의 혈청/특이적인 IgE에 대한 음성 기준 혈청(방사성 동위원소 표지)의 비로서 나타내었다. 한벌의 t-테스트들은 치료 전과 후의 IgE 수준의 통계적 평가를 위해 사용되었다. 정상분포를 얻기 위하여 총 IgE 결과들에 대해 로그값들을 사용하였다.

<182> 실시예 22

<183> 본 실시예에서는 쥐에서의 항원으로서 전체 바이러스가 분할된 불활성화된 인간 면역결핍 바이러스-2(HIV-2)에 대한 칼슘 베이스의 어쥬반트의 사용을 설명하고 있다.

<184> 실시예 1~17에 따라 어쥬반트를 제조하였다. 불활성화된 HIV-2 분할 전체 바이러스는 버퍼화된 용액 내에 0.5mg/mL의 농도로 부유시켜 실시예 20에 설명된 방법에 따라 어쥬반트상에 흡착시켰다. 각 쥐들은 0일에 복부 피부하에 0.5mL의 어쥬반트를 피하주사 받았다. 10주 후에 쥐들을 죽여서, 그 혈액을 채취하고 혈청을 분리하고 HIV-2 항체들에 대해 각각 분석하였다. HIV-2 항체들의 존재에 대해서, ELISA법 및 웨스턴 블롯방법으로 혈청을 분석하였다.

<185> 실시예 23

<186> 본 실시예에서는 백신 전달을 위한 칼슘 베이스의 어쥬반트의 사용을 설명한다.

<187> 키홀-림펫 헤모시아닌(Keyhole-limpet hemocyanin)(Sigma로부터 상업적으로 구입가능, 제품번호: H2133 및 H7017)을 포스페이트 버퍼화된 pH 7.0의 식염수내에서 0.5mg/mL의 농도로 제조하였다. 이 용액 0.8mL를 실시예 1~9의 비결정성 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 침전물에 첨가하였다. IL-2는 실시예 19의 방법에 따라 ACP 어쥬반트내로 포함되었다. 그 후, 형성된 결과의 겔은 등글게 성형하여 쥐의 피하내에 이식시켰다. 이 과정을 4달 후

반복하였다. 혈액 샘플을 정기적으로 채취하고, 항 키홀-립렛 헤모시아닌 항체 역가를 결정하기 위하여 ELISA법을 사용하였다.

<188> 실시예 24

<189> 본 실시예에서는 계통적인 항종양 면역을 유도하기 위한 시토카인과 칼슘 베이스의 어쥬반트의 사용을 설명한다.

<190> 실시예 1~17에 따라 상기 어쥬반트를 제조하였다. Retsch ZM 100 분쇄기를 사용하여 나노입자들을 제조하였다. PeperoTech?사로부터의 상업적으로 구입가능한 제품번호 300-03인, 과립구 마크로파아지-콜로니 자극인자(GM-CSF)는 실시예 19의 흡착방법에 따라 어쥬반트 내로 통합되었다. 1:1의 비율로 존재하는 B16-F10 변환된 종양 세포들(4×10^6)과 500nm의 GM-CSF 포함 나노파티클을 위의 왼쪽 옆구리에 피하주사하였다. 2주 후, 상기 쥐들의 오른쪽 옆구리에 살아있는 야생형 B16 흑색종 세포들 10^5 을 투여하였다. 종양 성장은 촉진(palpation)으로 한주에 두차례 평가하였다.

<191> 실시예 25

<192> 본 실시예에서는 칼슘 베이스의 어쥬반트를 사용한 단백질 백신 전달을 예증한다.

<193> 실시예 1에 따라 선별적인 체로 걸러, 평균 입자크기 30nm 이하의 비결정성 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 제조하였다. Pasteur Vaccins으로부터 상업적으로 구입가능한 단백질 백신들, 디프테리아 및 파상풍 독소(DPT)들을 실시예 19에 설명된 어쥬반트 상에 0.5mg/ml의 농도로 흡착시켰다. DPT-흡착된 칼슘 포스페이트 어쥬반트 0.5ml를 쥐에 피하주사하였다. 주사 후, 14일 및 3달째에 혈액 샘플을 채취하여, 항-디프테리아 및 항-파상풍 역가수준을 결정하기 위하여 ELISA 방법으로 평가하였다.

<194> 실시예 26

<195> 본 실시예에서는 본 발명의 칼슘 어쥬반트를 유전자적 면역화에 사용하는 것을 예증한다. *Plasmodium yoelii* 서컴스포로조아이트(circumsporozoite) 단백질(PyCSP) 플라스미드는 기생체-억제성 항체들과 보호성 세포독성 T 세포들을 유도하는 것으로 알려졌다.

<196> 상기 칼슘 어쥬반트를 실시예 1~17에 따라 제조하였다. 상기 플라스미드, PyCSP는 Journal of Immunology(V155, 1995, p2039)내의 Mor의 방법에 따라 제조되었다. 상기 어쥬반트 페이스트는 수화단계동안 말라리아 기생충 *Plasmodium yoelii*(PyCSP)의 서컴스포로조아이트 단백질을 암호화하는 플라스미드 DNA와 단지 혼합하므로써 결합된다. 점도가 $1.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^6$ 포아세인 본 발명의 어쥬반트 페이스트 0.5ml 투여량을 쥐에게 근육내 주사하였다. 2달동안 매주 혈청 샘플들을 채취하여 rPyCS.1 단백질과 반응성인 IgM 또는 IgG 항체들의 존재에 대해 분석하였다. 여러 시간대들에서, 쥐들은 역행-궤도 파괴에 의해 출혈되고 혈청은 분석 전까지 -20℃에서 저장되었다. 쥐들을 안락사시키고, 그 장기들을 무균적으로 제거하였다. 비장, 서혜부 및 장간막성 림프절, 골수 및 사두근(quadricep) 근육으로부터, 10% FCS로 보충된 RPMI1640를 포함하는 매질 내에서 단일 세포 현탁액들을 제조하였다. 유도된 면역반응의 성질을 검사하기 위해 민감성이고 특이적인 시토카인 ELISpot 분석을 사용하였다.

<197> 실시예 27

<198> 본 실시예에서는 다당류 백신을 체내로 전달하는데 사용되는 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 사용을 설명한다.

<199> 상기 어쥬반트를 실시예 1~17에 따라 제조하였다. 선택적으로 체 처리하여 평균 입자크기 500nm를 얻었다. *Streptococcus pneumoniae*를 실시예 20에 설명된 것과 같이 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 표면위로 흡착시켰다. 덴마크 페럼구균 혈청형 1,2,3,4,6A,7F,8,9N,12F,14,18C,19F,23F 및 25로부터 각 캡슐형 다당체를 채취하여 혈청형을 분리하였다. 제른(Jerne) 용혈성 플라그 분석 및 방사면역측정방법(RIA)을 사용하여 *S. Pneumococcal* 항체들의 농도를 측정하므로써 체액성 면역 응답 또는 B 세포들의 존재를 평가하였다.

<200> 실시예 28

<201> 본 실시예에서는 사멸된 바이러스 또는 박테리아를 전달하기 위해 사용되는 본 발명의 어쥬반트의 사용을 설명한다.

- <202> 실시예 1에 따라 선택된 입자크기 50nm이하인 어쥬반트를 제조하였다. 불활성화된 척수성 소아마비 백신(Pasteur Vaccines로부터 상업적으로 구입가능)을 실시예 19에 따라 어쥬반트에 부착시켰다. 0.5ml의 어쥬반트 투여량을 쥐에 피하주사하였다. 3달 후에, 상기 쥐에 전체 척수성 소아마비 백신을 투여하였다. 상기 쥐의 생존을 평가하였다.
- <203> **실시예 29**
- <204> 본 실시예에서는 살아있는 약독화된 바이러스를 전달하는데 사용되는 본 발명의 어쥬반트의 사용을 설명한다.
- <205> 실시예 16~17에 따라 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 제조하였다. 5 μ m의 평균 입자크기를 선택적으로 체 처리하였다. 백신은 Pasteur Vaccins으로부터 구입가능한 OKA 균주 수두(varicella)-대상포진(zoster) 바이러스(VZV)의 세포-유리(cell-free) 제제이다. VZV는 5.0mg/ml의 농도로 수화매질 내에 포함되었다. 2.0ml의 페이스트 백신을 피하주사 투여하였다. 4주 후, 혈액 샘플들을 취하여, 효소 면역분석법(ELA), 라텍스 응집(latex agglutination), 간접 형광 항체 및 형광항체 막 항원 분석을 사용하여 VZV 항체들에 대해 혈청을 분석하였다.
- <206> **실시예 30**
- <207> 본 실시예에서는 본 발명의 칼슘 어쥬반트를 사용하여 하나 이상의 항원의 전달을 예증한다.
- <208> 실시예 1과 17에 따라 칼슘 어쥬반트를 제조하였다. 상업적으로 제조된 간염 B 바이러스(Hevac B)와 디프테리아-과상풍-백일해(DTP)-소아마비 백신을 Pasteur Vaccins으로부터 구입하였다. 상기 백신들을 포름알데히드로 실시예 1의 어쥬반트에 대해서 불활성화하고, 용액 A와 용액 B를 혼합하는 동안 상기 어쥬반트와 조합하였다. 백신은 실시예 17의 어쥬반트에 대해서, 5.0mg/ml의 농도로 수화매질 내에 포함되었다. 이어서, 상기 페이스트를 습한 환경에서 37℃에서 경화시키고, 그 후 250nm의 입자크기로 분쇄하였다. 6달 후에 두번째 주사를 하고, 다시 6달 후에 세번째 주사를 하였다. 첫번째 주사일과 그 후의 각 주사일에 혈액 샘플들을 채취하였다. HB 바이러스 세릭(seric) 마커들(HbsAg, 항-HBS, 항-HBc)을 상업적인 방사면역방법(Abbott Laboratories)으로 테스트하였다. 과상풍 및 디프테리아에 대한 항-독소 역가는 글루타르알데히드에 의해 칠면조 적혈구에 커플링된 고도로 정제된 독소들을 사용하는 수동 적혈구 응집반응 기술에 의해 결정되었다. 백일해 응집소들을 결정하기 위하여, 측정은 마이크로정적 플레이트내에서 실행되는 응집테스트를 사용하여 이루어진다.
- <209> **실시예 31**
- <210> 본 실시예에서는 여러 입자크기가 본 발명의 어쥬반트 활성화에 어떤 영향을 미치는지 예증한다.
- <211> 아래 변경을 수행하여, 실시예 1~17에 따라 어쥬반트를 제조하였다. 여과전의, 최종 침전물의 성숙시간은 30초, 5분, 30분, 2시간, 24시간 및 48시간으로 선택되었다. 건조 후, 칼슘 포스페이트 분말을 분쇄하고, 체로 처리하여 평균 입자크기를 10nm, 100nm, 250nm, 500nm 및 900nm로 하여 주사전자현미경으로 확인하였다. 쥐들에게 키홀 림펫 헤모시아닌의 존재 또는 부재에서 칼슘 포스페이트 어쥬반트 2.0ml를 주사하여 실시예 18에 따라 평가하였다.
- <212> **실시예 32**
- <213> 본 실시예에서는 아파타이트성 칼슘 포스페이트 어쥬반트를 예시한다. 헬륨 비중법에 의해 2.33~2.8gm/cm³, 바람직하게는 2.5gm/cm³로 측정된 밀도를 가지는, 거의 결정성이 없는 아파타이트성 칼슘 포스페이트 비이클/어쥬반트를 실시예 16 또는 17에 따라 제조하였다. 겉보기 밀도는 약 0.9~1.2gm/cm³이었으며, 평균 마이크로 기공의 크기는 85Å이었다. PCA 물질을 0.5mg/ml의 키홀-림펫 헤모시아닌 수화 매질 존재하에서 페이스트로서 제조하였다. 어쥬반트 1ml 투여량을 페이스트로서 주사하거나 또는 시험관내에서 경화시키고 동결건조한 후, 페이스트로 재현탁하여 주사하였다.
- <214> **실시예 33**
- <215> 본 실시예에서는 다른 어쥬반트 입자 크기들을 가지는 면역화 스케줄이 총 면역화의 최적화에 어떤 영향을 미치는지 예시한다.
- <216> 불활성화된 간염 A 백신(SmithKline Beecham으로부터 상업적으로 구입가능함)을 각 어쥬반트 입자크기에 대해 수화매질 내에서 0.5mg/ml의 농도로 제조하였다. 실시예 16으로부터의 어쥬반트를 백신함유 수화매질로 수화시켜서 건조 분말(예로서, 조소용 점토와 같음)을 제조하였다. 그 후, 이 물질을 37℃, 100% 습도에서 1시간동안 경화시켰다. 그런다음 경화된 물질을 분쇄하고 체 처리하여 200nm 및 750nm 입자들을 분리하여 채취하였다. 0.5ml의 각 면역화 어쥬반트(200nm, 750nm)를 0, 4, 8주 스케줄로 피하에 투여하였다. 두번째 0.5ml의 각 면역화를

0, 4, 24주 스케줄로 피하에 투여하였다. 각 면역화 후 24시간에 혈액 샘플들을 채취하고 혈청들을 분리하였다. 각 시간대에서, ELISA를 사용하여 항-간염 A 항체역가들을 측정하였다.

<217> 실시예 34

<218> 본 실시예에서는 하나의 어쥬반트내에 약하게 그리고 강력하게 재흡수가능한 칼슘 포스페이트의 조합을 사용을 예시한다.

<219> 실시예 16에 따라 강하게 재흡수가능한 칼슘 포스페이트들을 제조하였다. Ison 제 5,683,496호의 실시예 1, 2 또는 3 또는 Chow 제 5,522,893호의 실시예 4 또는 8에 따라 약하게 재흡수가능한 칼슘 포스페이트 물질을 제조하였다. 두 물질을 모두 SPEX8505 알루미늄 세라믹 분쇄 챔버를 사용하여 SPEX 8510 실험실용 분쇄기내에서 2분 동안 각각 분쇄하였다. 물질 모두를 체로 처리하여 100nm~250nm 크기의 입자들을 모았다. 키홀-립렛 헤모시아닌 0.5mg/ml를 포함하는 버퍼화된 용액을 적당한 양으로 사용하여, 약하게 재흡수되는 입자와 강하게 재흡수되는 입자를 1:5의 질량 또는 부피비로 섞은 것을 주사가능한 슬러리로 제조하였다. 0.5ml의 상기 어쥬반트 페이스트를 쥐에 피하주사하였다. 7일, 14일 및 3달째에 혈액 샘플을 채취하여 혈청을 분리하였다. 항-키홀 립렛 헤모시아닌 항체 역가수준을 ELISA를 사용하여 측정하였다.

<220> 실시예 35

<221> 본 실시예에서는 칼슘 포스페이트 어쥬반트의 다양한 복합 제제를 예시한다.

<222> 실시예 17에 따라 칼슘 포스페이트를 제조하였다. 식염수와 같은 수화매질 내에서 선택된 활성물질을 0.5mg/ml의 농도로 제조하여, 어떤 경우에는 보충물질을 흡착시켰다. 칼슘 포스페이트는 활성물질을 포함하는 매질을 사용하여 수화되었다. 보충물질을 0.5mg/ml의 농도로 단순 혼합하므로써 수화된 칼슘 포스페이트에 첨가하였다. 0.5ml의 각 어쥬반트 페이스트를 쥐에 피하주사하였다. 표 3은 본 발명의 어쥬반트의 다양한 제제들을 나타낸다. 각 제제는 실시예 18에 따라 평가되었다. 또한, 항원 또는 항원들을 포함하는 제제들에서 혈액 샘플들을 취하고 혈청을 분리하였다. ELISA를 사용하여 각 항체 역가들을 측정하였다.

【표 3】 본 발명의 칼슘 포스페이트 어쥬반트들을 사용한 복합 제제

어쥬반트	보충물질 (보충물: 칼슘 포스페이트 어쥬반트 (중량/중량))					어쥬반트 활성 증진제			면역원 (0.5 mg/ml)		보충물질의 입자크기 분포		
	PMMA	클라겐	PIA	소결된 IIA	CaSO ₄	GM-CSF	MDP	IL-2	DPT	VZV	10nm- 100nm	250nm- 750nm	750nm- 10 μ m
A	1:25		1:10	1:10					X		33%	33%	34%
B						1:25			X	X	90%		10%
C						1:25			X	X	10%		90%
D				1:5	1:5					X	100%		
E			1:1		1:5					X		100%	
F				1:10	1:5					X			100%
G					1:5				x	x	10%	60%	30%
H	1:25					1:25				X	50%	50%	
I							1:10	x				100%	
J							1:10		X				100%
K			1:25				1:15			X		25%	75%
L		1:10						X				64%	36%
M				1:10						X		100%	
N	1:25								X			100%	
O						1:25				X		100%	