(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 9/113 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년06월12일
(11) 등록번호 10-0726818
(24) 등록일자 2007년06월04일

(21) 출원번호 10-2000-0065477
(22) 출원일자 2000년11월06일
심사청구일자 2005년06월28일

(65) 공개번호 10-2001-0051463
(43) 공개일자 2001년06월25일

(30) 우선권주장 316121/1999 1999년11월05일 일본(JP)

(73) 특허권자
엔오에프 코오포레이션
일본 도오꾜도 시부야꾸 에비스 4쵸메 20-3

쥬리디컬 파운데이션 더 케모-세로-쎄라퓨틱 리서치 인스티튜트
일본 구마모또 구마모또-시 오꾸보 1-쪼메 6-1

(72) 발명자
사이토코이치
일본효고661-0012아마가사키-시미나미츄카구치-쵸2-20-8-101

키시모토요코
일본효고674-0081아카시-시유오쥬미-쵸니시키가오카1-7-8

미야하라토쿠지
일본쿠마모토861-1112키쿠치-군코우시-마치키쿠도미1866-1445

타카세코우조우
일본쿠마모토869-1236키쿠치-군오주-마치슈기미쥬3410-30

(74) 대리인
김진회
김태홍

(56) 선행기술조사문헌
JP 11106351A

심사관 : 신영신

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 오일 면역 보강제 백신

(57) 요약

본 발명은 분자량이 400 내지 20,000인 폴리에틸렌 글리콜 유도체 0.5 내지 20 중량%를 함유하는 외측 수성 상 및 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 내측 수성 상을 포함하는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신을

제공한다. 특정 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 외측 수성 상에 함유시킨 본 발명의 구성에 의하여, 높은 면역 보강 효과를 나타내고, 국소 반응과 같은 부작용은 적으며, 탁월한 제제 안정성을 갖고, 또 저점도에 의하여 사람에게 용이하게 주사할 수 있는 우수한 가동성(workability)을 갖는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신을 제조할 수 있다.

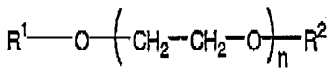
특허청구의 범위

청구항 1.

화학식 1로 표시되는 분자량 400 내지 20,000의 폴리에틸렌 글리콜 유도체 0.5 내지 20 중량%를 함유하는 외측 수성 상 및 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 내측 수성 상을 포함하는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신으로서,

상기 수성 상은 생리 식염수 및 포스페이트 완충 생리 식염수로부터 선택되는 수성 성분을 포함하고, 오일 상은 지방산 에스테르 또는 스쿠알렌 또는 지방산 에스테르 및 스쿠알렌을 오일 상의 20 중량% 이상의 비율로 함유하는 오일 성분을 포함하는 것인 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신:

[화학식 1]



(상기 식에서, R^1 및 R^2는 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 알킬이며, n은 중합도임)

청구항 2.

제1항에 있어서, 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 분자량이 1,000 내지 10,000인 오일 면역 보강제 백신.

청구항 3.

제1항에 있어서, 외측 수성 상이 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체 1 내지 10 중량%를 함유하는 오일 면역 보강제 백신.

청구항 4.

제1항에 있어서,

(a) 15℃ 내지 25℃ 범위의 온도에서 액체로 되고 지방산 에스테르 또는 스쿠알렌 또는 지방산 에스테르 및 스쿠알렌을 오일 상의 20 중량% 이상의 비율로 함유하는 오일 성분(A), HLB가 10 미만인 유화제(B) 및 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 생리 식염수이고 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 수성 성분(C)를 포함하는 W/O 에멀션을 제조하는 단계, 및

(b) HLB가 10 미만인 유화제(D), 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 생리 식염수인 수성 성분(E) 및 화학식 1로 표시되는 분자량 400 내지 20,000의 폴리에틸렌 글리콜 유도체 0.5 내지 20 중량%를 포함하는 액체 중에, 상기 W/O 에멀션을 분산 또는 유화시키는 단계에 의하여 제조되는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신.

청구항 5.

제1항에 있어서,

(a) 15℃ 내지 25℃ 범위의 온도에서 액체로 되고 지방산 에스테르 또는 스쿠알렌 또는 지방산 에스테르 및 스쿠알렌을 오일 상의 20 중량% 이상의 비율로 함유하는 오일 성분(A), HLB가 10 미만인 유화제(B) 및 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 생리 식염수이고 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 수성 성분(C)를 포함하는 W/O 에멀션을 제조하는 단계,

(b) HLB가 10 미만인 유화제(D) 및 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 생리 식염수인 수성 성분(E)를 함유하는 액체 중에 상기 W/O 에멀션을 분산 또는 유화시키는 단계, 및

(c) 화학식 1로 표시되는 분자량 400 내지 20,000의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 0.5 내지 20 중량%의 농도로 외측 수성상에 첨가하는 단계에 의하여 제조되는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신.

청구항 6.
삭제

청구항 7.
삭제

청구항 8.

제4항 또는 제5항에 있어서, 유화제(B)가 폴리옥시에틸렌 사슬을 갖는 비이온성 계면 활성제 및 지방산과 폴리히드릭 알콜의 부분적 에스테르로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 함유하는 오일 면역 보강제 백신.

청구항 9.
삭제

청구항 10.

제4항 또는 제5항에 있어서, 유화제(D)가 폴리옥시에틸렌 사슬을 갖는 비이온성 계면 활성제를 함유하는 오일 면역 보강제 백신.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

발명의 기술적 분야

본 발명은 오일 면역 보강제 백신에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 제제로서의 안정성 및 면역 보강 효과에 있어서 탁월한, W/O/W 타입의 오일 면역 보강제 백신에 관한 것이다.

발명의 배경

오일 면역 보강제 백신은 면역 작용을 효과적으로 강화시키는 것으로 오랜 동안 알려져 있다. 특히, 프로인트 면역 보강제(Freund's adjuvant)는 비활성 항원을 사용할 때 탁월한 면역 강화 효과를 나타내며, 동물 시험에 폭넓게 사용되는 대표적인 면역 보강제이다. 그러나, 상기 면역 보강제는 또한 중증 농양 및 육아종과 같은 강한 부작용을 일으키기 때문에, 단지 실험실에서만 사용된다.

그래서, 그러한 부작용을 감소시키고, 오일 면역 보강제를 일반적인 용도에 적용하기 위한 많은 시도가 있어 왔다. 오일 면역 보강제는 다양한 제제형을 갖는데, 예를 들어, 프로인트 면역 보강제와 같은 W/O 타입, 안전성면에서 우수한 O/W 타입, 복합형인 W/O/W 타입 등이 있다.

예를 들어, JP-B-6-81731은 계면 활성제로서 만니톨 올레산 에스테르 무수물 및 오일 성분으로서 액상 파라핀을 함유하는 W/O 타입 오일 면역 보강제를 공개하고, WO 91/00107(Kohyo No. 4-506521로 PCT 공개된 일본 특허 출원)은 식물유와 같은 대사성 오일(metabolizable oil) 및 광물유와 같은 비대사성 오일(unmetabolizable oil)의 배합물을 오일 성분으로서 함유하는 저점도 W/O 타입 오일 면역 보강제를 공개한다.

또한, WO 90/14837은 초미세 오일 점적 에멀션을 함유하는 면역 보강 제제로서의 O/W 타입 면역 보강제를 공개하며, EP-A-315153은 면역 자극제로서 글리코펩티드 및 POP-POE 블록 중합체를 포함하는 유화제를 함유하는 O/W 타입 백신 면역 보강제를 공개한다.

이들 면역 보강제 중에서, W/O 타입 오일 면역 보강제는 우수한 면역 강화 효과를 나타내지만, 제제의 연속 오일상에 기인하여 주사 부위에 잔류하는 경향이 있다. 드물지 않게, 그것은 접종 부위 근처에 무균 농양 및 육아종을 발병시키며, 접종 중에 심한 고통을 야기시킬 수도 있다. 따라서, 이러한 타입의 오일 면역 보강제는 신체에 직접적으로 접종하기 위한 제제로서의 용도에서 제한되어 왔다. O/W 타입 오일 면역 보강제는 주사 부위에서 경미한 국소 반응(topical response)을 나타내고, 안전성 면에서 우수하다. 그러나, 항원을 연속 상에 함유시키기 때문에, 주사 부위에서 빠르게 확산되어 충분한 효과를 가져오기 어려우며, 종종 특정 면역 자극제를 요하는 문제점이 있다.

이러한 관점에서, 최근 몇 년간, 새로운 타입의 오일 면역 보강제인 W/O/W 타입 오일 면역 보강제의 개발을 위한 연구가 수행되어 왔다.

예를 들어, WO 91/00106은 주사 후에 동물의 체온에 노출되면 W/O 타입으로 되는 W/O/W 타입 다중-상 에멀션을 공개한다. 그러나 이러한 기술은, 오일 면역 보강제가 체내에서 W/O 타입 면역 보강제의 형태로 존재하기 때문에, 국소 반응 등과 같은 종래의 W/O 타입 오일 면역 보강제와 관련한 모든 문제를 해결하지 못한다.

W/O/W 타입 오일 면역 보강제는 복합 에멀션 형태를 취하기 때문에, W/O 타입 및 O/W 타입 오일 면역 보강제와 비교할 때, 제제로서의 안정성이 쉽게 유지될 수 없다. 따라서, 우수한 면역 보강력을 나타내는 W/O 타입의 특성 및 안전성 면에서 우수한 O/W 타입의 특성을 동시에 나타낼 것이 기대되는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신은, 상기 두 가지 타입의 특성을 잘 조화시켜 나타낼 수 있는 오일 면역 보강제를 개발할 수 있는가에 앞서, 해결할 많은 문제점을 안고 있다.

본 발명자들은 안전성 및 제제 안정성이 우수한 W/O 타입 오일 면역 보강제 백신 및 W/O 백신을 수성 상에 분산시켜 수득한 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신에 관한 USP 5,814,321에 나타나 있다.

그러나, 종래의 기술에 의하여 제조한 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신은 제제 및 제제화 방법에 따라 성질에 많은 변화를 나타낸다. 이는, 항원 성분이 종종 점도를 매우 증가시키고, W/O 타입 오일 면역 보강제와 비교할 때 면역의 안정한 도입이 용이하지 않다는 문제점과 관련된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

발명의 요약

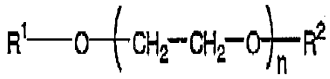
따라서, 본 발명의 목적은 제제로서의 저장 안정성이 개선되고, 우수한 면역학적 효과를 나타내며, 주사 부위에서의 국소 반응이 개선된 W/O/W 타입 오일 면역 보강제를 제공하는 것이다.

본 발명에 따라, 외측 수성 상에 특정 분자량을 갖는 특정량의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 포함하는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신이 제공되는데, 상기 백신은 제제로서의 높은 안정성, 국소 반응 등에 관한 우수한 안전성 및 높은 면역 강화 효과를 나타낸다.

따라서, 본 발명은 하기의 것을 제공한다.

(1) 화학식 1로 표시되는 분자량 400 내지 20,000의 폴리에틸렌 글리콜 유도체 0.5 내지 20 중량%를 함유하는 외측 수성 상 및 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 내측 수성 상을 포함하는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신:

화학식 1



상기 식에서, R^1 및 R^2는 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 알킬이며, n은 중합도이다.

(2) 전술한 (1)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 분자량이 1,000 내지 10,000인 오일 면역 보강제 백신.

(3) 전술한 (1)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 외측 수성 상이 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체 1 내지 10 중량%를 함유하는 오일 면역 보강제 백신.

(4) 전술한 (1)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 실온에서 액체로 되는 오일 성분(A), 유화제(B) 및 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 수성 성분(C)로부터 제조된 W/O 에멀션을, 유화제(D) 및 수성 성분(E)를 함유하며 분자량이 400 내지 20,000인 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체 0.5 내지 20 중량%를 포함하는 액체 중에 분산 또는 유화시킴에 의하여 제조되는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신.

(5) 전술한 (1)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 실온에서 액체로 되는 오일 성분(A), 유화제(B) 및 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 수성 성분(C)로부터 제조된 W/O 에멀션을 유화제(D) 및 수성 성분(E)를 함유하는 액체 중에 분산 또는 유화시킨 후, 분자량이 400 내지 20,000인 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 0.5 내지 20 중량%의 농도로 외측 수성 상에 첨가함에 의하여 제조되는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신.

(6) 전술한 (4) 또는 (5)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 실온에서 액체로 되는 오일 성분(A)가 지방산 에스테르 및/또는 스쿠알렌을 오일 상의 20 중량% 이상의 비율로 함유하는 오일 면역 보강제 백신.

(7) 전술한 (4) 또는 (5)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 유화제(B)의 HLB가 10 미만인 오일 면역 보강제 백신.

(8) 전술한 (7)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 유화제(B)가 폴리옥시에틸렌 사슬을 갖는 비이온성 계면 활성제 및 지방산과 폴리히드릭 알콜의 부분적 에스테르로부터 선택된 1종 이상을 함유하는 오일 면역 보강제 백신.

(9) 전술한 (4) 또는 (5)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 유화제(D)의 HLB가 10 이상인 오일 면역 보강제 백신.

(10) 전술한 (9)의 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 유화제(D)가 폴리옥시에틸렌 사슬을 갖는 비이온성 계면 활성제를 함유하는 오일 면역 보강제 백신.

발명의 구성

발명의 상세한 설명

본 발명의 오일 면역 보강제 백신은 실온에서 액체로 되는 오일 성분(A), 유화제(B) 및 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양의 항원을 함유하는 수성 성분(C)로부터 제조한 W/O 에멀션(단계 1)을, 유화제(D) 및 수성 성분(E)를 함유하는 액체 중에 분산 또는 유화시킴(단계 2)에 의하여 제조한다. 상기에서 최종적으로 수득되는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 외측 수성 상은 특정 분자량을 갖는 특정량의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 함유한다.

실온에서 액체로 되는 오일 성분 (A)는 단계 1에서 제조된 W/O 에멀션의 연속 상을 구성하고, 단계 2에서 수득되는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 분산 상으로 되는 오일 상을 구성한다. 본 발명에 있어서, 오일 상은 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신에서의 오일 상을 의미한다. 본원 명세서에 있어서, "실온에서"는 15 내지 25℃ 범위의 온도를 의미한다. 실온에서 액체로 되는 오일 성분(A)는, 실온에서 액체로 되는, 식품용으로 통상 사용되는 에스테르 및 비에스테르 오일 기재, 약학적 생성물, 화장품 등으로부터 사용을 위하여 선택할 수 있다.

실온에서 액체로 되는 비에스테르 오일 기재는 예를 들어, 경 액상 파라핀, 스쿠알렌, 스쿠알란, 폴리부텐 등과 같은 탄화수소, 중쇄 포화 지방산(예, 카프릴산, 카프르산 등), 장쇄 불포화 지방산(예, 올레산, 리놀산, 리놀렌산 등) 등과 같은 지방산, 중쇄 또는 장쇄 지방족 알콜 등일 수 있다. 실온에서 액체로 되는 에스테르 오일 기재의 예로는 카프릴산 및 카프르산과 같은 중쇄 포화 지방산 또는 올레산 및 리놀산과 같은 장쇄 불포화 지방산과 알콜로부터 유도되는 다양한 지방산 에스테르, 및 자연적으로 생성되는 지방산 에스테르, 예컨대, 액상 식물유(예, 땅콩유, 올리브유, 홍화유, 해바라기유, 호호바유 등) 및 오렌지 러피 오일(orange roughy oil)과 같은 동물로부터 얻어지는 액상 오일 등이 있다.

오일 성분 (A)로서, 상기 예들 중 1종을 사용하거나, 상기 예들 중에서 2 종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 상기 오일 성분들 중에서 지방산 에스테르, 식물유 및 스쿠알렌과 같은 오일은 산화에 대한 비교적 높은 내성 및 신체에 대한 높은 친화성을 갖는 이점이 있다. 따라서, 본 발명의 오일 면역 보강제 백신용으로 사용하는 오일 성분으로서, 이들 오일 중에서 1종 이상을 선택하는 것이 바람직하다. 특히, 지방산 에스테르로서, 생물학적 지질의 구성 성분이기도 한 16 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 시스-△9-불포환 지방산과 1 내지 3개의 탄소 원자를 갖는 알콜의 에스테르화 성분으로부터 제조되는 오일 기재가 바람직하다.

또한, 지방산 에스테르 및/또는 스쿠알렌을 오일 상에 20 중량% 이상의 비율로 함유시킴에 의하여, 최종 오일 면역 보강제 백신에 있어서의 국소 반응 등과 같은 부작용을 감소시키고, 안전성도 개선시킬 수 있다. 지방산 에스테르와 스쿠알렌을 동시에 사용하는 경우, 그들의 총량은 오일 상의 적어도 20 중량% 이상이 되어야 한다.

본 발명에 있어서, 약학적 생성물 및 식품용으로 통상 사용되며 신체에 대한 높은 안전성을 나타내는 1종 이상의 계면 활성제는 오일 면역 보강제 백신을 구성하는 유화제(B) 및 유화제(D)로서 선택하고 사용할 수 있다.

유화제(B)는 항원을 함유하는 수성 성분(C) 및 오일 성분(A)로 구성되는 W/0 에멀션의 제조를 위하여 단계 1에서 사용한다.

유화제(B)로서 사용하는 계면 활성제는, 최종 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 안정성 측면에서 볼 때, 친유성인 것이 바람직하다. 즉, 비교적 낮은 HLB(친수성-친유성 밸런스)를 갖는 것이 바람직하고, HLB가 10 미만인 것이 특히 바람직하다. 유화제(B)는 1종 단독 또는 2종 이상의 배합물로 사용할 수 있다. 이러한 경우에 있어서, 유화제(B)는 전체 HLB가 10 미만이 되도록 선택하는 것이 바람직하다.

보다 구체적으로, 폴리히드릭 알콜 및 지방산의 부분적 에스테르, 예를 들어, 소르비탄 지방산 에스테르(예, 소르비탄 모노올레에이트, 소르비탄 디올레에이트, 소르비탄 세스퀴올레에이트 등), 글리세롤 지방산 에스테르(예, 글리세롤 모노올레에이트 등), 폴리글리세롤 지방산 에스테르(예, 디글리세롤 모노올레에이트, 디글리세롤 디올레에이트 등) 등; 분자 내에 폴리옥시에틸렌 사슬을 갖는 비이온성 계면 활성제, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 (폴리소르베이트) [예, 폴리옥시에틸렌(20)소르비탄 모노올레에이트 등], 폴리옥시에틸렌 수첨 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 글리콜 등을 사용한다. 자연 발생적 레시틴을 함유하는 글리세로인지질도 사용할 수 있다.

이들 중에서, 소르비탄, 글리세롤 및 폴리글리세롤과 같이 분자 내에 3 내지 10개의 히드록실기를 갖는 폴리히드릭 알콜 및 12 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 지방산의 부분적 에스테르, 및 폴리옥시에틸렌 수첨 캐스터 오일로 대표되는 폴리옥시에틸렌 사슬을 갖는 히드록시 지방산 트리글리세라이드는 특히 배합물로 사용하는데, 이때, 유화제(B)의 전체 HLB는 10 미만이 되도록 한다. 이러한 방법으로, 제제로서 매우 뛰어난 안정성을 갖는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신을 수득할 수 있다.

본 명세서에 있어서, HLB는 W.C. 그리핀[W.C. Griffin, J. Soc. Cosmetic. Chemists, 1, 311(1949)]에 의하여 제안된 식에 따라 결정한다.

본 발명의 오일 면역 보강제 백신을 제조하기 위하여, 유화제 조성물은, 전술한 유화제(B)와 함께, 실온에서 액체로 되는 비이온성 계면 활성제인 지방산과 3개 이상의 히드록실기를 갖는 폴리히드릭 알콜의 부분적 에스테르, 및 분자 내에 5개 이상의 히드록실기를 갖는 비환원 당 또는 당 알콜을 함유하는 수성 용액 및 아미노산 또는 그의 염을 미리 혼합함에 의하여 얻어진 항원 용액을 포함하는 W/O 에멀션을 구성하는 성분으로서 사용하여 오일 면역 보강제의 효력 및 제제 안정성을 향상시킨다. 수성 용액의 형성에 사용되는 당 또는 당 알콜 및 아미노산 또는 그의 염은 일본 약학 코덱스(Japanese Pharmaceutical Codex) 약물 및 일본 약전(Japanese Pharmacopoeia)에 열거된 약학적 생성물, 및 식품용으로 통상 사용되는 것으로부터 선택할 수 있다. 본원에서 사용한 항원 용액은 그것이 액체이기만 하면 어떠한 형태로도 사용할 수 있는데, 용액, 현탁액 등을 예시할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 또는 그의 염은 글리신, 알라닌, 아르기닌 히드로클로라이드, 히스티딘, 페닐알라닌, 소듐 아스파르테이트, 포타슘 아스파르테이트, 소듐 글루타메이트, 포타슘 글루타메이트 또는 그들의 수산화물일 수 있는데, 이때, 당 및 당 알콜은 트레할로스, 크실리톨, 소르비톨, 만니톨, 말티톨, 락티톨 등으로부터 선택하는 것이 바람직하다.

전술한 유화제 조성물은 전술한 아미노산 또는 그의 염 및 전술한 당 또는 당 알콜을 함유하는 수성 용액을 제조한 후, 그 수성 용액을 전술한 비이온성 계면 활성제와 10:1 내지 1:1(수성 용액:계면 활성제)의 중량비로 혼합하고 교반함에 의하여 수득된다. 유화제 조성물은 항원 용액을 포함하는 W/O 에멀션의 약 1 내지 20 중량%, 바람직하게 약 2 내지 10 중량%의 비율로 사용한다.

유화제(D)는 유화제(D) 및 수성 성분(E)를 함유하는 액체 중에 전술한 W/O 에멀션을 분산 또는 유화시키기 위하여 단계 2에서 사용한다.

유화제(D)로서 사용하는 계면 활성제는, 최종 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 안정성 측면에서 볼 때, 친수성인 것이 바람직하고, 비교적 높은 HLB 값, 특히 10 이상의 HLB 값을 갖는 것이 바람직하다. 이러한 유화제(D)는 필요에 따라 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 경우에 있어서, 유화제(D)는 전체 HLB가 10 이상이 되도록 선택하는 것이 바람직하다.

보다 구체적으로, 분자 내에 폴리옥시에틸렌 사슬을 갖고, HLB가 10 이상인 비이온성 계면 활성제, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르(들), 폴리옥시에틸렌 수첨 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 글리콜 등을 사용한다. 이러한 계면 활성제는 폴리히드릭 알콜 및 지방산의 부분적 에스테르, 예를 들어, 소르비탄 지방산 에스테르, 글리세롤 지방산 에스테르, 슈크로스 지방산 에스테르, 폴리글리세롤 지방산 에스테르 등, 및 자연 발생적 레시틴을 함유하는 글리세로인지질의 배합물로서 사용할 수 있다. 이들 중에서, 특히 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 글리콜 단독 또는 다른 계면 활성제와의 혼합물을 사용하면 탁월한 제제 안정성을 갖는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신을 제조할 수 있다.

유화제(B) 또는 유화제(D)로서 사용하는 글리세로인지질로는 예를 들어, 자연 발생적 인지질, 예컨대, 달걀 노른자위 및 대두로부터 추출하여 정제한 인지질 및 그의 수첨 부가 생성물, 및 아실 부분 및 염기 부분의 조성이 조절된 다양한 합성 인지질 및 리소인지질이 있다.

본 발명의 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신에 있어서, 수성 성분(C)는 단계 1에서 제조한 W/O 에멀션 중의 분산 상인 수성 상을 구성하며, 최종 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신 중의 분산 상인 오일 상 중에 분산된 내측 수성 상을 구성한다. 수성 성분(C)는 다양한 항원을 함유한다.

수성 성분(C) 중에 함유되는 항원은 다양한 종류일 수 있고, 다양한 형태일 수 있다. 보다 구체적으로, 비활성 세포, 비활성 바이러스 입자, 비활성 미코플라스마를 통상적으로 사용하며, 또한 병원체 감염 예방 인자, 예를 들어, 부착 단백질, 피막 항원 등을 부단위(subunit) 백신용으로 사용한다. 비활성 세포는 그램-음성 박테리아, 예를 들어, *악티노바실러스 플루로뉴모니아(Actinobacillus pleuropneumoniae)*, *대장균(Escherichia coli)* 등, 그램-양성 박테리아, 예를 들어, *에리시펠로트릭스 러시오패티아(Erysipelothrix rhusiopathiae)* 등일 수 있다. 비활성 바이러스 입자의 바이러스는 예를 들어 일본 뇌염 바이러스 등을 포함한다. 비활성 미코플라스마의 미코플라스마로는 돼지 및 닭의 미코플라스마를 예시할 수 있다. 병원체 감염 예방 인자로는 뉴 캐슬 질병(New castle disease) 바이러스의 F 단백질을 예시할 수 있다. 다수의 항원을 함유하는 혼합 백신을 사용할 수도 있다.

본 발명의 오일 면역 보강제 백신은, 항원에 더하여 항원과 다른 유효 성분, 예를 들어 항생제를 함유할 수 있다. 항생제의 예로는 카나마이신 설페이트 (Kanamycin sulfate), 옥시테트라사이클린 히드로클로라이드 등이 있다.

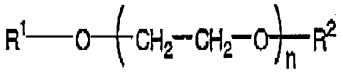
수성 성분(C) 중에 포함되는 항원의 생물학적으로 허용되는 양으로서 유효한 양은 사용하는 항원의 종류 및 목적에 따라 적절하게 결정한다.

본 발명에 있어서, 전술한 항원은 내측 수성 상에 포함된다. 항원 부분이 본 발명의 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 제조 공정 중에 외측 수성 상으로 누출될 때조차도, 본 발명의 효과는 손상되지 않는다.

본 발명에 있어서, 수성 성분(E)는 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 외측 수성 상을 구성한다. 보다 구체적으로, 수성 성분(E)는 최종 면역 보강제 백신의 신체에 대한 안전성 및 안정성을 고려하여 적절한 것을 선택한다. 예를 들어, 생리 식염수, 포스페이트 완충 생리 식염수 등을 사용한다.

본 발명에 따라, 오일 면역 보강제 백신의 외측 수성 상에 함유되는 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 하기 화학식 1로 표시된다:

[화학식 1]



상기 식에서, R^1 및 R^2는 동일하거나 상이할 수 있고, 각각 수소 원자 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 알킬이며, n은 중합도이다.

전술한 화학식 1에 있어서, R^1 및 R^2에서 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 알킬은 직쇄 또는 분지쇄일 수 있고, 그 예로서 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸 및 tert-부틸 등을 들 수 있다. 적당한 R^1 및 R^2는 수소 원자, 메틸 및 에틸이며, 이중에서 수소 원자가 특히 적당하다. R^1 및 R^2의 적당한 배합은 수소 원자 및 수소 원자, 수소 원자 및 메틸, 수소 원자 및 에틸, 메틸 및 메틸 등이다. 수소 원자 및 수소 원자의 배합이 특히 적당하다. n은 분자량을 400 내지 20,000의 범위로 만드는 중합도이다.

전술한 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 400 내지 20,000, 바람직하게 1,000 내지 10,000, 특히 바람직하게 3,000 내지 9,000의 분자량을 갖는다. 그것은 외측 수성 상의 0.5 내지 20 중량%, 바람직하게 1 내지 10 중량%, 보다 바람직하게 1 내지 5 중량%의 비율로 상기 외측 수성 상에 포함된다.

폴리에틸렌 글리콜 유도체의 분자량이 400 미만인 경우 또는 그 함량이 0.5 중량% 미만인 경우, 충분한 점도-감소 효과를 달성할 수 없다. 또한, 면역 보강제로서의 효과도 약화될 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 분자량이 20,000을 초과하는 경우, 외측 수성 상 자신의 점도가 증가되어, 전체로서 오일 면역 보강제 백신의 점도를 증가시킴에 의하여, 불충분한 점도-감소 효과를 가져오게 된다. 그 함량이 20 중량%를 초과하는 경우, 내측 수성 상 및 외측 수성 상은 완전히 상이한 삼투압을 나타낸다. 그 결과, 안정한 W/O/W 타입 에멀션이 제공되지 않아, 안정한 오일 면역 보강제 백신 제제를 제조할 수 없게 된다.

본 발명에 있어서, 보다 고분자량의 전술한 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 사용하면 외측 수성 상의 점도가 보다 높게 되어, 그 결과 오일 면역 보강제 백신이 보다 높은 점도를 갖게 된다. 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 분자량에 따라 그 함량을 전술한 범위에 속하도록 조절하는 것이 바람직하다.

본 발명에 따라, 분자량이 400 내지 20,000 범위인 앞에서 예시한 것들 중에서 선택된 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 단독으로 사용하거나, 상이한 분자량을 갖는 2종 이상의 유도체의 배합물로 사용할 수 있다.

최종 오일 면역 보강제 백신의 면역 보강 효과 및 제제로서의 안정성의 관점에서, 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 분자량은 1000 내지 10,000인 것이 바람직하고, 특히 외측 수성 상의 1 내지 10 중량%, 바람직하게 1 내지 5 중량%의 비율로 상기 외측 수성 상에 포함시키는 것이 바람직하다.

본 발명에 따라 제조한 오일 면역 보강제 백신은 폴리에틸렌 글리콜 유도체가 외측 수성 상에 존재한다는 사실에 기인하는 저점도 및 탁월한 면역 보강 효과에 의하여 특징지워 진다. 일반적으로, W/O/W 타입 에멀션은 종종 W/O 입자의 점도 및 응집이 매우 증가됨을 보이는데, 이는 내측 수성 상에 함유된 물질의 효과 및 상이한 성분들이 내측 수성 상 및 외측 수성 상에 함유된다는 사실에 기인한 것이다. 특히, 오일 면역 보강제 백신용으로 사용하는 항원은 세포 성분 및 배지 성분과 같은 다양한 성분들을 고농도로 함유할 수 있다. 따라서, W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신으로서 사용함에 있어서, 동일한 성분을 갖는 W/O/W 타입 에멀션은 사용되는 항원 용액 중의 다른 성분들의 효과에 기인하여 극히 상이한 수준의 점도 및 안정성을 나타낼 수 있다. 이러한 사실은 다양한 종류의 항원을 혼합하여 백신을 제조하는 경우에 특히 심각한 문제를 나타내며, 백신의 제조 및 제어 중에 반드시 회피될 것이 요구된다. 그러나, 본 발명에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 외측 수성 상에 함유되어, 내측 수성 상의 조성 또는 성분과 관계없이 점도를 감소시키는 바, 이는 그러한 문제를 해결한 것이다. 오일 면역 보강제 백신이 고점도를 가지는 경우, 신체 투여 중의 가동성(workability)이 좋지 않게 되어, 신체에서의 확산 성능이 떨어지게 되고, 국소 반응과 같은 불리한 효과가 나타나며, 주사 부위에 백신이 잔류할 수 있다. 외측 수성 상에 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 첨가함에 의하여, 이러한 양상들도 개선될 수 있다.

W/O/W 타입 오일 면역 보강제의 성질에 영향을 미치는 주요한 인자 중의 하나는 외측 수성 상에 포함된 W/O 에멀션의 입자 크기이다. 일반적으로, 외측 수성 상에 포함된 W/O 에멀션의 입자 크기가 큰 경우, W/O/W 타입 오일 면역 보강제는 접종 시에 W/O 타입 오일 면역 보강제의 행동 양상을 나타낸다. 이는 면역 보강 효과는 높아지나, 국소 반응과 같은 부작용도 강해진다는 것을 의미한다. 또한, 입자들이 응집되는 경향을 나타냄에 의하여, 제제로서의 안정성이 낮아진다. 반면에, W/O 에멀션이 비교적 작은 입자를 함유하는 경우, 그 제제는 높은 안정성을 나타내며, 부작용이 감소되고, 약한 면역 보강 효과를 나타낸다. 본 발명에 의하여 제조한 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신은 W/O 에멀션 입자가 비교적 작을 때조차도 우수한 면역 강화 효과를 나타낸다. 그래서, 본 발명의 백신은 탁월한 제제 안정성, 적고 낮은 수준의 부작용 및 뛰어난 효력(유효성)을 나타낸다. 제제로서의 안정성 및 부작용 감소의 측면에서 볼 때, W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신을 구성하는 거의 모든 W/O 에멀션 입자가 50㎛ 이하의 입자 크기 및 20㎛ 이하의 평균 입자 크기를 갖는 것이 바람직하다.

본 발명의 오일 면역 보강제 백신의 제조 방법은 특히 제한되지 않으며, 공지의 방법일 수 있다. 본 발명의 오일 면역 보강제 백신을 제조할 때, 단계 1에서 제조하는 W/O 에멀션은 오일 성분(A)를 30 내지 90 중량%, 바람직하게 40 내지 80 중량%의 비율로 함유하고, 유화제(B)를 1 내지 20 중량%, 바람직하게 2 내지 15 중량%의 비율로 함유하며, 항원을 포함하는 수성 성분(C)를 5 내지 75 중량%, 바람직하게 15 내지 60 중량%의 비율로 함유하는 것이 바람직한데, 상기에서 중량%는 모두 W/O 에멀션에 대한 것이다. 단계 2에서 사용하는 유화제(D)는 유화제(D), 수성 성분(E) 및 폴리에틸렌 글리콜 유도체 전체의 0.1 내지 20 중량%, 바람직하게 0.5 내지 10 중량%의 비율로 사용한다.

단계 2에서 W/O 에멀션(단계 1에서 제조), 및 유화제(D)와 수성 성분(E)를 함유하는 액체의 혼합 비율은 선택된 항원의 종류 또는 목적에 따라 적절하게 결정한다. W/O 에멀션 : 유화제(D)와 수성 성분(E)를 함유하는 액체의 중량비 = 2:1 내지 1:10, 특히 2:1 내지 1:5인 것이 바람직하다.

본 발명에 따라, 폴리에틸렌 글리콜 유도체는 유화제(D)와 수성 성분(E)를 함유하는 전술한 액체에, 미리 분자량이 400 내지 20,000인 전술한 화학식 1의 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 부분적으로 또는 전체적으로 첨가함에 의하여 외측 수성 상에 첨가한다. 별법으로서, W/O/W 타입 오일 면역 보강제를 제조한 후, 물, 생리 식염수 또는 완충액에 별도로 용해시킨 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 첨가한다. 첨가하는 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 양은 전술한 바와 같다.

다양한 종류의 항원을 포함하는 오일 면역 보강제 백신을 제조하는 경우, 추후 나타내는 바와 같이, 내측 수성 상에 각 종류의 항원을 함유한 W/O 에멀션을 제조하여 혼합한 후, 유화제(D) 및 수성 성분(E)를 함유하는 액체에 분산시킨다. 별법으로서, 추후 언급하는 바와 같이, 다수의 임의의 항원에 대한 W/O/W 타입 오일 면역 보강제를 제조한 후, 혼합한다.

약학적 생성물로서 본 발명의 오일 면역 보강제 백신은 완충제, 방부제, 삼투압 조절제 등과 같이 면역 보강 작용에 직접 관련되지 않는 다양한 첨가제를 함유할 수 있다.

본 발명의 오일 면역 보강제 백신의 제조 시, 유화시킬 수 있는 임의의 장치는 내측 수성 상 중에 항원을 함유하는 W/O 에멀션을 제조하고(단계 1), 유화제(D)와 수성 성분(E)을 함유하는 액체에 W/O 에멀션을 분산 또는 유화시키는(단계 2) 두 단계 모두에 사용할 수 있다. 전형적 유화 장치[예, 호모믹서(homomixer), 호모지나이져(homogenizer), 클리어믹스(CLEARMIX, M TECHNIQUE에서 제조) 등], 다공성 막을 사용하는 막 유화 장치, 고압 제트 유화 장치 등을 사용할 수 있다. 필요에 따라, 본 발명의 오일 면역 보강제 백신을 구성하는 W/O 에멀션을 막 여과기에 통과시켜 입자 크기를 일정 수준 미만으로 만들 수 있다.

또한, 백신의 제조에 있어서, 사용하는 각각의 성분은 그의 성질에 따라 미리 멸균 처리할 수 있다. 예를 들어, 가열에 의한 멸균 처리 및 여과에 의한 멸균 처리 등이 가능하다.

본 발명에 의하여 제조한 오일 면역 보강제 백신을 신체에 적용할 때, 적당한 투여 경로를 사용하는데, 예를 들어, 피하, 근육내 및 복강내 주사, 및 비강(nasal cavity) 및 장 내강(intestinal lumen)의 점막을 통하여 투여할 수 있다. 투여량 및 투여 빈도는 관련 분야에서 사용하는 통상적에 방법에 따라 소정의 면역학적 효과를 달성하기에 적절하게 결정된다.

예시적 실시예를 참고하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명은 이들 실시예에 의하여 어떠한 방식으로도 제한되지 않는다.

하기 실시예에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜[이하에서 PEG 또는 매크로골 (Macrogol)로도 언급함]은 폴리에틸렌 글리콜 유도체로서 사용하였다.

[오일 면역 보강제 백신의 제조]

하기 실시예 각각에서 사용한 오일 면역 보강제 백신은 클리어믹스 CLM-0.8S (M TECHNIQUE)를 사용하는 방법에 따라 제조하였다. 유화 반응은 실온에서 수행하였고, 필요에 따라 냉수를 사용하였다. 하기 조성물의 각 성분은 적당한 멸균 방법에 의하여 멸균 처리하였다. 각각의 교반 조작, 유화 조작 등은 멸균 환경에서 수행하였다. 실시예에 있어서, "부"는 "중량부"를 의미한다.

하기 오일 면역 보강제 백신의 제조에 있어서, "외측 수성 상"은 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 제조를 위하여 W/O 에멀션과 혼합하는 액체를 의미한다.

실시예 1: 백신 1의 제조

표 1의 W/O-1의 조성에 따라 항원 현탁액 외의 각 성분을 칭량하여 비이커에 넣었다. 폴리옥시에틸렌 수첨 캐스터 오일은 사용 전에 50℃로 가열하여 용해시켰다. 소듐 글루타메이트 및 소르비톨의 수성 용액을 소르비탄 세스퀴올레에이트와 1/1의 중량비로 혼합하고, 교반하여 첨가하였다. 남은 소르비탄 세스퀴올레에이트는 이미 첨가하였다. 거기에 항원 현탁액을 교반하면서 서서히 첨가하고, 클리어믹스 CLM-0.8S (M TECHNIQUE) 중에서 통상 온도에서 5분 동안 12,000rpm으로 교반함으로써 혼합하여 W/O 타입 에멀션(W/O-1)을 수득하였다.

표 3의 외측 수성 상 1의 조성에 따라, 각 성분을 포스페이트 완충 식염수(PBS, pH7.4)에 용해시켰다(외측 수성 상 1). 전술한 W/O-1(1부) 및 외측 수성 상 1(1부)을 칭량하여 비이커에 넣고, 클리어믹스 CLM-0.8S를 사용하여 5분 동안 9,000rpm으로 혼합하여 오일 면역 보강제 백신 1을 수득하였다. 하기 실시예들 및 비교 실시예들에 있어서, 특별한 언급이 없다면, W/O 에멀션 및 외측 수성 상은 실시예 1의 백신 제조를 위한 조건과 동일한 조건 하에서 혼합하였다.

실시예 2: 백신 2의 제조

실시예 1에서 제조한 W/O 타입 에멀션(W/O-1, 1부) 및 표 3의 외측 수성 상 2의 조성에 따라 제조한 외측 수성 상 2(1부)를 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 2를 제조하였다.

실시예 3: 백신 3의 제조

표 1의 W/O-2의 조성에 따라 항원 현탁액 외의 각 성분을 칭량하여 비이커에 넣었다. 폴리옥시에틸렌 수첨 캐스터 오일은 사용 전에 50℃로 가열하여 용해시켰다. 일본 약전 매크로골 6000을 항원 현탁액에 미리 균질하게 용해시켰다. 실시예 1에서와 동일한 조건 하에, W/O 타입 에멀션(W/O-2)을 제조하였다.

그 후, W/O-2(3부) 및 표 3의 외측 수성 상 3의 조성에 따라 제조한 외측 수성 상 3(2부)을 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 3을 제조하였다.

실시예 4: 백신 4의 제조

표 3의 외측 수성 상 4의 조성에 따라 각 성분을 칭량하였다. 성분들을 약 60℃로 가열하고, 완전히 혼합하고, 분산시킨 후, 외측 수성 상 4로서 사용하기 위하여 실온으로 냉각시켰다. 그 후, 실시예 3에서 제조한 W/O 타입 에멀션(W/O-2, 1부) 및 외측 수성 상 4(3부)를 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 4를 제조하였다.

실시예 5: 백신 5의 제조

표 1의 W/O-3의 조성에 따라 항원 현탁액 외의 각 성분을 칭량하여 비이커에 넣었다. 실시예 1에서와 동일한 방법으로 혼합물을 교반하면서 항원 현탁액을 서서히 첨가하였고, 실시예 1에서와 동일한 방법으로 W/O 타입 에멀션(W/O-3)을 제조하였다.

그 후, W/O 타입 에멀션(W/O-3, 2부) 및 외측 수성 상 2(3부)를 칭량하여 비이커에 넣고, 오일 면역 보강제 백신 5를 제조하였다.

실시예 6: 백신 6의 제조

실시예 5에서 제조한 W/O 타입 에멀션(W/O-3, 2부) 및 표 4의 외측 수성 상 5의 조성에 따라 제조한 외측 수성 상 5(2부)를 칭량한 후, 클리어믹스 CLM-0.8S를 사용하여 5분 동안 9,000rpm으로 혼합함으로써 에멀션을 수득하였다. 일본 약전 매크로골 6000을 10 중량%의 농도로 PBS에 용해시켜 생성된 용액(1부)을 첨가하였다. 혼합물을 서서히 교반하여 오일 면역 보강제 백신 6을 수득하였다.

실시예 7: 백신 7의 제조

표 2의 W/O-4의 조성에 따라 항원 현탁액 외의 각 성분을 칭량하여 비이커에 넣었다. 실시예 1에서와 동일한 방법으로 클리어믹스 CLM-0.8S를 사용하여, W/O 타입 에멀션(W/O-4)을 제조하였다.

그 후, W/O-4(1부) 및 표 3의 외측 수성 상 4의 조성에 따라 제조한 외측 수성 상 4(1부)를 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 7을 제조하였다.

실시예 8: 백신 8의 제조

표 2의 W/O-5의 조성에 따라 항원 현탁액 외의 각 성분을 칭량하여 비이커에 넣었다. 폴리옥시에틸렌 수첨 캐스터 오일은 사용 전에 60℃로 가열하여 용해시켰다. 항원 현탁액을 교반하면서 서서히 첨가하여, 실시예 1에서와 동일한 방법으로 W/O 타입 에멀션(W/O-5)을 제조하였다.

그 후, W/O-5(1부) 및 외측 수성 상 2(1부)를 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 8을 제조하였다.

실시예 9: 백신 9의 제조

표 2의 W/O-6의 조성에 따라 항원 현탁액 외의 각 성분을 칭량하여 비이커에 넣었다. 달걀 노른자위 레시틴을 오일 상에 균질하게 용해시키고, 폴리옥시에틸렌 수첨 캐스터 오일은 사용 전에 60℃로 가열하여 용해시켰다. 항원 현탁액을 교반하면서 서서히 첨가하여, 실시예 1에서와 동일한 방법으로 W/O 타입 에멀션(W/O-6)을 제조하였다.

그 후, W/O-6(3부) 및 외측 수성 상 3(2부)을 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 9를 제조하였다.

비교 실시예 1: 백신 10의 제조

실시예 1에서 제조한 W/O-1(1부) 및 표 4에 나타낸 외측 수성 상 5(1부)를 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 10을 제조하였다.

비교 실시예 2: 백신 11의 제조

실시예 1에서 제조한 W/O-1(1부) 및 표 4에 나타낸 외측 수성 상 6(1부)을 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 11을 제조하였다.

비교 실시예 3: 백신 12의 제조

실시예 3에서 제조한 W/O-2(3부) 및 표 4에 나타낸 외측 수성 상 7(2부)을 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 12를 제조하였다.

비교 실시예 4: 백신 13의 제조

실시예 5에서 제조한 W/O-3(2부) 및 표 4에 나타낸 외측 수성 상 5(3부)를 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 13을 제조하였다.

비교 실시예 5: 백신 14의 제조

실시예 7에서 제조한 W/O-4(1부) 및 표 4에 나타낸 외측 수성 상 8(1부)을 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 14를 제조하였다.

비교 실시예 6: 백신 15의 제조

실시예 8에서 제조한 W/O-5(1부) 및 표 4에 나타낸 외측 수성 상 6(1부)을 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 15를 제조하였다.

비교 실시예 7: 백신 16의 제조

실시예 9에서 제조한 W/O-6(3부) 및 표 4에 나타낸 외측 수성 상 7(2부)을 칭량하여, 오일 면역 보강제 백신 16을 제조하였다.

실시예 및 비교 실시예의 백신을 위하여 사용한 W/O 에멀션의 조성은 표 1 및 2에 나타내며, 외측 수성 상의 조성은 표 3 및 4에 나타내고, 백신의 W/O 에멀션 및 외측 수성 상의 혼합 비율은 표 5에 나타낸다.

[표 1]

W/O 에멀션의 조성-1

첨가 성분	혼합 비율(중량%)		
화합물	**W/O-1**	**W/O-2**	**W/O-3**
에틸 올레에이트	40	-	-
스쿠알렌	-	55	20
정제된 대두유	-	-	15
소르비탄 세스퀴올레에이트	10	10	10
폴리옥시에틸렌(20) 수첨 캐스터 오일*1)	-	-	5
폴리옥시에틸렌(40) 수첨 캐스터 오일*1)	5	3	-
폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레에이트*1)	-	2	-
소듐 글루타메이트 및 소르비톨의 수성 용액*2)	5	-	-
항원 현탁액	40	29	50
일본 약전 매크로골 6000*3)	-	1	-
총계	100	100	100

*1) 괄호 안의 숫자는 첨가한 에틸렌 옥사이드의 평균 몰수를 나타낸다.

*2) 소듐 글루타메이트 일수화물(25g) 및 소르비톨(10g)을 증류수에 용해시켜서 제조한 수성 용액(100㎖).

*3) 매크로골을 미리 항원 현탁액에 용해시켰다.

[표 2]

W/O 에멀션의 조성-2

첨가 성분	혼합 비율(중량%)		
화합물	**W/O-4**	**W/O-5**	**W/O-6**
올레일 올레에이트	40	-	30
스쿠알렌	-	-	20
이소프로필 미리스테이트	-	60	-
정제된 노른자위 레시틴	-	-	2
글리세롤 모노올레에이트	15	10	8
폴리옥시에틸렌(10) 수첨 캐스터 오일*1)	5	5	-
폴리옥시에틸렌(60) 수첨 캐스터 오일*1)	-	5	5
항원 현탁액	40	20	35
총계	100	100	100

*1) 괄호 안의 숫자는 첨가한 에틸렌 옥사이드의 평균 몰수를 나타낸다.

[표 3]

오일 면역 보강제 백신의 외측 수성 상의 조성-1

첨가 성분	첨가 비율(%)			
화합물	**외측 수성상 1**	**외측 수성상 2**	**외측 수성상 3**	**외측 수성상 4**
폴리옥시에틸렌(60) 수첨 캐스터 오일*1)	2	-	-	2
폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레에이트*1)	-	-	2	-
폴리옥시에틸렌(196) 폴리옥시프로필렌(67) 글리콜*1)	1	3	-	-
정제된 노른자위 레시틴	-	-	-	2
매크로골 1000*2)	-	-	-	1
일본 약전 매크로골 4000	-	4	1	-
일본 약전 매크로골 6000	3	-	1	-
포스페이트 완충 식염수(PBS)	94	93	96	95
총계	100	100	100	100

*1) 괄호 안의 숫자는 첨가한 에틸렌 옥사이드의 평균 몰수를 나타낸다.

*2) 일본 약학적 부형제 허용 생성물.

[표 4]

오일 면역 보강제 백신의 외측 수성 상의 조성-2

첨가 성분	혼합 비율(%)			
화합물	**외측 수성상 5**	**외측 수성상 6**	**외측 수성상 7**	**외측 수성상 8**
폴리옥시에틸렌(60) 수첨 캐스터 오일*1)	2	-	-	2
폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레에이트*1)	-	-	2	-
폴리옥시에틸렌(196) 폴리옥시프로필렌(67) 글리콜*1)	1	3	-	-
정제된 노른자위 레시틴	-	-	-	2
포스페이트 완충 식염수(PBS)	97	97	98	96
총계	100	100	100	100

*1) 괄호 안의 숫자는 첨가한 에틸렌 옥사이드의 평균 몰수를 나타낸다.

[표 5]

각 백신 제조에 사용하는 W/O 에멀션 및 외측 수성 상, 및 그들의 첨가량

백신 No.		W/O 에멀션	외측 수성 상
실시예	백신 1	W/O-1 (1부)	외측 수성 상 1 (1부)
	백신 2	W/O-1 (1부)	외측 수성 상 2 (1부)
	백신 3	W/O-2 (3부)	외측 수성 상 3 (2부)
	백신 4	W/O-2 (1부)	외측 수성 상 4 (3부)
	백신 5	W/O-3 (2부)	외측 수성 상 2 (3부)
	백신 6	W/O-3 (2부)	외측 수성 상 5 (2부) 매크로골 용액 (1부)*1)
	백신 7	W/O-4 (1부)	외측 수성 상 4 (1부)
	백신 8	W/O-5 (1부)	외측 수성 상 2 (1부)
	백신 9	W/O-6 (3부)	외측 수성 상 3 (2부)
비교 실시예	백신 10	W/O-1 (1부)	외측 수성 상 5 (1부)
	백신 11	W/O-1 (1부)	외측 수성 상 6 (1부)
	백신 12	W/O-2 (3부)	외측 수성 상 7 (2부)
	백신 13	W/O-3 (2부)	외측 수성 상 5 (3부)
	백신 14	W/O-4 (1부)	외측 수성 상 8 (1부)
	백신 15	W/O-5 (1부)	외측 수성 상 6 (1부)
	백신 16	W/O-6 (3부)	외측 수성 상 7 (2부)

*1) 상세한 제조 방법은 명세서의 실시예 6을 참조하라.

[면역 시험]

다양한 항원을 함유하는 오일 면역 보강제 백신을 사용하여 면역 시험을 행하였다. 각각의 실험예에서 사용한 백신의 심볼은 전술한 실시예 및 비교 실시예에서 사용한 것에 상응한다.

실험예 1: 돼지 *에리시펠로트릭스 러시오패티아 (Erysipelothrix rhusiopathiae)* (Er) 비활성 백신

5% 소 혈청 및 뇌 심장 주입 브로스(BHIB)를 함유하는 매질 중의 *에리시펠로트릭스 러시오패티아(Erysipelothrix rhusiopathiae)* SE-9 균주의 배지(AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION)를 포르말린으로 비활성화시켜 항원을 수득하였다. 항원을 사용하여 백신 1, 3, 5, 7, 10, 12 및 14를 제조하였다. 제조를 위하여, 각 백신의 항원 농도는 포스페

이트 완충 식염수(PBS)를 사용하여 5.0 x 10^8 CFU/㎖로 적절히 조정하였다. 각 백신용으로 항원 용액 대신에 PBS를 함유하는 플라세보를 제조하였다. 각 백신을 상응하는 플라세보로 희석하여 일련의 5-배(fold) 희석액을 얻었다. 대조용으로서, 프로인트 미완성 면역 보강제(IFA), 면역 보강제(IFA-PEG)(여기에서, PEG 1000은 내측 수성 상의 5%의 비율로 IFA의 내측 수성 상에 첨가하였다) 및 면역 보강제로서 알루미늄 히드록시드를 함유하는 백신을 제조하였다.

각각의 백신 (또는 희석 백신)을 5주된 깨끗한 마우스(그룹당 5마리)의 안쪽 허벅다리에 피하로 접종(0.25㎖/마우스)하였다. 면역 처치로부터 3주일 후, Er 후지사와 균주[일본 수의 생물학 협회(JAVA)]를 각 마우스의 안쪽 허벅다리 내로 피하 주사(2.2 x 10^6 CFU/0.1㎖/마우스)하였다. 주사 후, 10일 동안 마우스의 생존율을 모니터링하였고, PD_{50}으로 표현되는 바와 같은 50% 생존 백신 희석 배수를 계산하였다. 면역 처치로부터 2주일 후, 비희석 백신 및 5-배 희석 백신을 마우스에 접종(각 제제에 대하여 10마리)하였고, 주사 부위를 촉진(palpation)에 의하여 조사하여 경변 정도를 측정하였다. 경변 정도는 5 등급(0: 없음, 1: 경미 ~ 4: 심각)의 스코어로 표시하였고, 각각의 제제에 대한 평균을 계산하였다.

이번에 제조한 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신은 레이저 회절 입자 크기 분석기 SALD-2100 (시마쯔 코오퍼레이션: SHIMADZU CORPORATION)을 사용하여 평균 입자 크기를 측정하였다.

유효성(PD_{50})의 결과를 표 6에 요약한다.

[표 6]

돼지 에리시펠라스 - 마우스 면역 처치 시험 결과 (실험예 1)

	시험 결과(생존 마우스/시험 마우스)							PD_{50}
	비희석 백신	X 5	X 25	X 125	X 625	X 3125	X 15625	(배)
[면역 처치 군]								
백신 1	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	0/5	2660.4
백신 3	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	1397.5
백신 5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	1928.2
백신 7	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397.5
[비교용 면역 처치 군]								
백신 10	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	532.1
백신 12	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	1/5	0/5	385.7
백신 14	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	0/5	0/5	279.5
IFA	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3670.7
IFA-PEG	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	1397.5
알루미늄 겔	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	77.1

상기 결과는 희석 백신(또는 비희석 백신)으로 접종한 생존 마우스의 숫자 및 그의 PD_{50} 값을 나타낸다. 본원에서 사용한 바와 같이, 보다 큰 PD_{50}은 보다 큰 유효성을 나타낸다. 면역 처치 군 중에서, 백신 1, 3, 5, 7 접종 군은 1300이상의 PD_{50}를 보여, IFA에 비하여 탁월한 유효성을 나타내었다. 반면에, 대조용 면역 처치 군(백신 10, 12, 14 및 알루미늄 겔 면역 보강제를 투여한 것)은 532.1, 385.7, 279.5 및 77.1의 PD_{50}값을 나타내었다. 본 발명에 따라 제조한 백신이 매우 높은 PD_{50}값을 나타낸다는 것은 명백하다. 이러한 결과는 본 발명에 따라 제조한 백신이 매우 효과적이라는 것을 증명해 준다.

그 다음, 주사 부위를 촉진에 의하여 조사하여 경변 정도를 측정하였다. W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 평균 입자 크기는 경변 정도와 함께 표 7에 나타낸다.

[표 7]

돼지 에리시펠라스 - 마우스의 주사 부위의 국소 반응 (실험예 1)

	주사 부위의 국소 반응(평균)	평균 입자 크기(㎛)
[면역 처치 군]		
백신 1	0.1	6.8
백신 3	0.2	8.1
백신 5	0	7.2
백신 7	0.2	7.9
[비교용 면역 처치 군]		
백신 10	0.3	7.5
백신 12	0.2	8.5
백신 14	0.8	8.8
IFA	3.8	-
IFA-PEG	3.2	-
알루미늄 겔	0	-

주사 부위에서의 국소 반응의 스코어 (0: 없음, 1: 경미 ~ 4: 심각).

면역 처치 군은 주사 부위에서 거의 반응을 나타내지 않았는데, 이는 주사액이 매우 안전함을 입증하는 것이다. 평균 입자 크기는 7.7 ~ 8.1 또는 20㎛ 보다 크지 않았다. 한편, 비교용 면역 처치 군은 거의 동일한 수준의 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 평균 입자 크기를 나타내었고, IFA 및 IFA-PEG를 제외한 비교용 면역 처치 군은 그 주사 부위에서의 반응이 적었다. 그러나, IFA 및 IFA-PEG 주사 군의 마우스는 반응 스코어가 극히 높은 심각한 경변을 나타내었는데, 이 때 IFA 또는 IFA-PEG를 접종한 마우스의 약 3/4 이상은 걸음걸이 장애로 고통받았다.

전술한 결과는 본 발명의 오일 면역 보강제 백신이 매우 탁월한 유효성을 보일 뿐만 아니라 알루미늄 겔 백신을 사용한 경우와 같이 주사 부위에서 매우 경미한 반응만을 나타냄을 증명한다. 본 발명의 백신은 매우 안전하다.

실험예 2: 돼지 미코플라스마 비활성 백신

돼지 혈청으로 보충한 BHL 매질 내에서 배양하고, 포르말린으로 비활성화시킨 *미코플라스마 히오뉴모니아(Mycoplasma hyopneumoniae)* 92-28 균주(야생 돼지로부터 분리한 균주; Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute)로부터 백신 2, 4, 6, 11 및 13을 제조하였다. 제조를 위하여, 각 백신의 항원 함량은 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 사용하여 8.0 x 10^8 CCU/㎖의 항원 농도로 조절하였다. 4%의 최종 농도로, 알루미늄 히드록시드 겔에 일본 약전 매크로골 4000을 첨가하여 수득한 백신(백신 AL-PEG), 및 면역 보강제로서 알루미늄 히드록시드 겔(ALHYDROGEL 85, Superfos, 알루미늄 전환 9㎎/㎖)을 사용한 백신(백신 AL)을 동일한 항원 농도를 갖도록 조절하였다.

각 백신(2㎖/돼지)은 SPF(특정 병원체가 없는) 돼지(8 돼지/군, 첫 번째 면역 처치 시에 4주된 돼지)에게 2주의 간격을 두고 경부 근육을 통하여 2회 접종하였다. 두 번째 면역 처치로부터 1주일 후, *미코플라스마 히오뉴모니아(Mycoplasma hyopneumoniae)* 92-28 균주(야생 돼지로부터 분리한 균주; Juridical Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute)로 감염된 돼지로부터 유도한 폐 균등액(3 x 10^6 CCU/6㎖/돼지)을 기관내로 투여하였다. 투여한 날로부터 4주일 후, 돼지를 검시 해부하였고, 폐 손상을 관찰하였다. 각각의 폐 손상을 스코어로 나타내고, 비-면역 처치 대조군 돼지의 손상과 비교하여 각 백신에 의한 손상의 감소율(%)을 계산하였다.

결과를 표 8에 나타낸다.

[표 8]

돼지 미코플라스마 감염 - 마우스 면역 처치 시험 결과 (실험예 2)

	면역 처치 군			비교용 면역 처치 군				
	백신 2	백신 4	백신 6	백신 11	백신 13	백신 AL	백신 AL-PEG	비면역 처치 대조군
손상 스코어 (각 개체)	0	0	0	15.2	16.4	23.6	50.2	5.5
	1.5	2.0	0	0.5	5.5	15.2	16.5	11.8
	0.5	9.6	3.6	9.1	22.0	5.5	22.1	14.5
	16.2	30.2	5.8	4.5	4.58	19.6	25.9	32.7
	2.6	5.5	18.6	14.2	19.5	56.3	30.6	15.9
	9.2	16.3	20.6	23.0	23.3	12.4	11.1	40.2
	3.5	1.5	9.6	38.6	36.2	28.4	9.1	25.5
	19.6	10.5	10.2	10.2	14.4	30	30	45.5
(평균)	6.6	9.5	8.6	14.4	17.7	23.9	24.4	24.0
손상의 감소율(%)	72.3	60.5	64.3	39.8	26.0	0.3	-2.0	-

백신 2, 4 및 6을 접종한 면역 처치 군은 60% 이상의 손상 감소율을 보였는 바, 이는 탁월한 유효성을 나타내는 것이다. 두 번째 유화 단계 후에 PEG를 첨가한 백신 6은 다른 면역 처치 군과 거의 동일한 효과를 나타내었다. 반면에, 백신 11 및 13을 투여한 비교용 면역 처치 군은 각각 39.8% 및 26.0%의 손상 감소율을 나타내었고, PEG의 첨가 여부와 관계 없이, 알루미늄 겔 백신은 백신에 의한 손상 감소 효과를 전혀 나타내지 않았다.

전술한 효과는 본 발명의 오일 면역 보강제 백신이, 미코글라스마를 항원으로 사용할 때에도, 탁월한 효과를 나타낸다는 것을 증명한다. 또한, 상기 결과는 두 번째 유화 단계 전이나 후에 외측 수성 상에 PEG를 첨가하는 것이 효과적이라는 것을 증명한다.

[에멀션의 점도 측정]

제조한 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 점도를 측정하였다. 전술한 실험예 1에서 제조한 돼지 *에리시펠로트릭스 러시오패티아(Erysipelothrix rhusiopathiae)* 백신(백신 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14), 뿐만 아니라 동일한 항원 현탁액 제제 하에서 비교를 행할 수 있게 하기 위하여, 항원으로서 돼지 *에리시펠로트릭스 러시오패티아*를 사용하여 백신 2, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15 및 16의 제조 방법에 따라 제조한 각각의 백신을 측정에 사용하였다. 점도는 백신 제조일로부터 1주일에 E 타입 회전식 점도계(TOKI SANGYO CO., LTD., RE105H 타입)를 사용하여 25℃에서 측정하였다. 결과를 표 9에 나타낸다.

[표 9]

백신 제제의 점도

백신 No.		점도(mPa · s, 25℃)
실시예	백신 1	33
	백신 2	28
	백신 3	42
	백신 4	35
	백신 5	31
	백신 6	32
	백신 7	38
	백신 8	45
	백신 9	29

비교 실시예	백신 10	153
	백신 11	161
	백신 12	206
	백신 13	187
	백신 14	470
	백신 15	396
	백신 16	315

표 9에 나타낸 바와 같이, 실시예의 모든 백신은 25℃에서 50mPa·s 이하의 점도를 나타내었다. 그러한 점도는 매우 낮은 것이며, 그것의 주사를 용이하게 한다. 반면에, 비교 실시예의 백신들은 150mPa·s 이상의 점도를 나타내었으며, 이는 주사를 위하여 상당한 힘과 시간을 요한다는 것을 의미한다.

전술한 결과는 본 발명의 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신이 외측 수성 상에 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 함유함에 의하여 점도가 상당히 감소될 수 있었으며, 따라서 본 발명에 따른 백신을 투여할 때 노동력을 상당히 절약할 수 있음을 암시하는 것이다.

[에멀션의 봉입율(inclusion) 측정]

제조한 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 봉입율을 측정하였다. 전술한 실험예 2에서 사용한 돼지 미코플라스마 백신(백신 2, 4, 6, 11, 13), 뿐만 아니라 동일한 항원 현탁액 제제 하에서 비교를 행할 수 있게 하기 위하여, 항원으로서 상기 미코플라스마를 사용하여 백신 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15 및 16의 제조 방법에 따라 제조한 각각의 백신을 측정에 사용였다. 제조한 백신을 PBS로 희석한 후, 원심 분리하여 외측 수성 상으로부터 에멀션 부분을 분리하였다. 이들을 수집하여 외측 수성 상의 단백질 양을 측정하였다. 외측 수성 상의 단백질 양을 W/O 에멀션을 제조하는 중에 첨가한 항원 현탁액(내측 수성 상을 구성함)의 단백질 양으로부터 빼서, 내측 수성 상에 남아 있는 단백질의 양을 결정하였다. 봉입율은 하기 식에 따라 계산하였다.

봉입율(%)=[(첨가한 항원 용액 중의 단백질 양)-(외측 수성 상 중의 단백질 양)]/첨가한 항원 현탁액 중의 단백질 양

백신은 제조 후 4℃에서 저장하였고, 봉입율은 백신을 제조한 다음날 및 3개월 후에 측정하였다.

봉입율의 결과를 표 10에 나타낸다.

[표 10]

제조한 백신의 봉입율

		봉입율(%)	
		제조한 다음날	제조일로부터 3개월 후
실시예	백신 1	98	97
	백신 2	98	98
	백신 3	93	90
	백신 4	94	92
	백신 5	93	93
	백신 6	92	90
	백신 7	94	92
	백신 8	97	97
	백신 9	92	89

비교 실시예	백신 10	97	95
	백신 11	98	98
	백신 12	81	71
	백신 13	91	90
	백신 14	96	96
	백신 15	94	94
	백신 16	87	85

실시예 및 비교 실시예 양자 모두에 있어서, 제조한 다음날 및 제조일로부터 3개월 후에 70% 이상의 높은 봉입율이 관찰되었는 바, 이는 우수한 안정성을 증명하는 것이다. 특히, 실시예들의 백신들은 표 9에 나타낸 바와 같은 극히 낮은 점도 및 탁월한 단백질 봉입율을 나타내었다.

상기 결과는 극히 낮은 점도를 갖는 본 발명의 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신이 매우 안정적임을 증명하는 것이다.

발명의 효과

표 6 내지 표 10에 나타낸 결과로부터 명확하게 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 오일 면역 보강제 백신은 W/O 타입 오일 면역 보강제의 탁월한 유효성(효력) 특성 및 O/W 타입 오일 면역 보강제의 현저한 안전성 특성, 양자 모두의 특성을 균형있게 나타낸다. 특정 폴리에틸렌 글리콜 유도체를 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신의 외측 수성 상에 함유시킨 본 발명의 구성에 의하여, 내측 수성 상에 함유된 성분의 영향으로부터 자유로우며, 탁월한 제제 안정성을 갖고, 또 저점도에 의하여 사람에게 용이하게 주사할 수 있는 우수한 가동성을 갖는 유용한 오일 면역 보강제 백신을 제조할 수 있다.

본 발명의 W/O/W 타입 오일 면역 보강제 백신은 높은 면역 보강 효과를 제공하며, 탁월한 제제 안정성을 나타내고, 국소 반응과 같은 부작용은 적게 나타낸다.

본 출원은 일본에서 출원된 출원 번호 제316121/1999에 기초한 것이며, 이 출원은 본원에 참고 인용되어 있다.