(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[5]
A61K 39/29

(45) 공고일자 1990년09월24일
(11) 공고번호 90-006887

(21) 출원번호	특1985-0007176	(65) 공개번호	특1986-0003336
(22) 출원일자	1985년09월28일	(43) 공개일자	1986년05월23일
(30) 우선권주장	656,833 1984년10월02일 미국(US)		
(71) 출원인 뉴우요오크 블루드 쎈터 인코오퍼레이션 아아론 켈너
미합중국 뉴우요오크주 10021 뉴우요오크 이스트 67 스트리이트 310

(72) 발명자 알프레드 메이어 프린스
미합중국 뉴우요오크주 10576 파운드릿지 스톤힐로우드
죤 브네크
미합중국 뉴우요오크주 10471 브론크 포스트 로우드 5133

(74) 대리인 장용식

심사관 : 정진수 (책자공보 제2035호)

(54) 간염 B항원 조성물

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

간염 B항원 조성물

[도면의 간단한 설명]

제1도는 순간 가열에 의하여 적은 구형입자로부터 생성된 사상체 형상에 대한 개략도로서, a.선형사상체; b.밀폐원형 또는 환형사상체; c. 분지를 갖는 사상체; d. 개방원형사상체; e. 분지를 갖는 원형사상체; f. 다수의 분지를 갖는 사상체이다.

제2도는 본 발명에 따르는 왁찐 제조방법의 공정도.

제3도는 단계 A~C에서 얻은 인텅크스텐산으로 부염색된 HBsAg함유 입자로서, 본 발명의 순간 가열처리를 받지 않고 대부분 18 내지 24㎜의 구형입자 형태인 HBsAg입자를 함유하는 것의 전자현미경사진.

제4도는 열처리를 받아서 선형, 분지를 갖는 또한 원형 사상체 형태로 전환된 입자를 나타내는 HBsAg함유입자의 형상을 나타내는, 제1도에 유사한 전자 현미경 사진.

제5도는 제4도에 도시한 용액을 20분간 8000g에서 원심분리하고 생성된 상청액을 여과하여 얻은 상청분획에 대한, 제3도 및 4도에 유사한 전자 현미경 사진.

제6도는 등장성식염을 최초 용량으로 재현탁시켜 20분간 8000g으로 원심분리하여 얻은 침강물의 제3도 내지 제5도에 유사한 전자 현미경 사진.

제7도는 본 발명으로 제조된 HBsAg 함유 입자로서 HBsAg 입자는 3mg/ml의 카프릴산 나트륨-처리된 혈청알부민의 존재하에 순간 가열 처리된 것인, 제3도 내지 제6도에 유사한 전자 현미경 사진.

제8도는 제3도 내지 제6도에 그의 형태가 도시된 제제의 새앙쥐에 있어서 정재된 HBsAg의 면역성에 대한 가열 비활성화 효과를 나타대는 도면.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 왁찐(vaccine)이나 왁찐 중간체로서 유용한 입자용액 또는 현탁액에 관한 것이다.

더욱 상세히 말하면 본 발명은 면역성이 높은 새로운 형태의 입자를 갖는 간염 B표면 항원(hepatitis B surface antigen HBsAg)에 관한 것이다.

본 발명은 상기 입자의 제조방법과, 사람과 침판지와 같은 동물의 간염 B 바이러스(HBV)애 한 면역

방법에 이들을 사용하는 것에도 관한 것이다.

상기 표기된 간염 B표면 항원(HBsAg)과 간염 B바이러스 사이의 상관관계는 수년전 알프레드 엠. 프린스(Alfred M.Prince,Pro Nat.Acad.Sci,U.S.60 814-821,1968)가 단정적으로 규명한 바 있다. 상기 항원은 주로 입도가 약 18 내지 24mm인 지방 단백입자와 유사한 직경의 사상체(系狀體)의 막에 묻혀 있는 단백질상에 위치한다.

이들은 현재 "데인"(Dane)입자라고도 알려진 HBV비리온(virion)을 포위하고 있는 것에 유사한 막편(膜片)을 나타내는 것으로 공지되어 있다.

그후 상기 입자를 함유하는 왁찐이 블럼버어그(Blumberg)씨등에 의하여 미국특허3,636,191에서 발표되었다. 프린스와 기타 여러 사람들은 그후 Dane 입자와 사상체로부터 유도된 막단백질을 함유하는 간염 B바이러스성 왁찐을 발표하였다. 이들 Dane 입자와 사상체는 간염 B 바이러스의 여러 만성 보균자에서 발견되는 간염 Be 항원을 함유하거나 이와 연관되어 있다.

상기 연구가 수행된 이래 간염 B바이러스에 대한 왁찐이 HBsAg를 포함하여 미국에 도입되었다. 이 왁찐은 상기 미국 특허 3636191에 다소 기술된 바와같이 만성 간염된 HBV 보균자의 혈장으로부터 유도된 입자를 함유하는 HBsAg의 효소소화에 의하여 생성된다 이 왁찐은 결과적으로 면역성을 실질적으로 손실케하는, 과다한 비용의 정제공정으로 제조된다. 그 결과 적당한 면역 응답을 확보하기 위하여는 생성항원(HBsAg)을 비교적 다량으로 투여하여야 한다. 이와같은 원인으로 이 왁찐은 1회용량당 약 30.00$이상의 비교적 고가로만 구입할 수 있다. 최초 주사와 2회의 증강법이 필요하기 때문에 미국에서도 간염 B바이러스에 대하여 면역 시키는데는 약 100.00불이 필요하며, 이와 같은 비용은 이 왁찐의 수요가 가장 높은 세계 여러 곳에서는 그와 같은 비용은 들일 수가 없다.

따라서 투여량이 보다 적고 비용을 적게할 수 있도록 면역성이 증가된 실질적으로 순수한 형태의 간염 B표면 항원을 함유하는 간염 B왁낀의 제공이 필요하게 되었다

또한 감염의 위험을 나타내지 않기 위하여는 출발혈장에 존재하는 감염성 바이러스가 완전히 비활성화되어야 힘도 물론 필수 요건이다

간염 B는 대부분 공중보건대책에 제한된 자금이 이용되고 있는 아시아 및 아프리카의 개발도상국의 거주민에서 감염된다. 현 20세기에 있어서 간염 B바이러스에 감염될 위기에 있고, 그 결과 간경변과 간암으로 발전될 위험에 있는 수백만의 사람을 보호할 상기의 왁찐을 제공하고, 그를 실용성 있는 가격으로 제공하는 것은 당연한 일이다.

발전하는 세게 여러곳에서, 왁낀이 이용되는 경우 1인당 1.00불 이하의 값으로 면역이 이루어져야 한다는 것이 요구되고 있다

본 발명을 요약하면 다음과 같다.

전술한 바에 따라, 본 발명에 의하여 HBs항원을 함유하는 입자를 포함하는 왁찐 또는 왁쩐 중간체가 제공되는바, 이것은 자연에서는 발견된 적이 없는 새로운 형태로 다량이 전이되고, 면역원성이 의외로 높은것이다

본 발명의 왁찐의 특징은 카프릴산 나트륨-안정화된 인간혈청 암부민 이외에 5중량% 이하의 혈청단백이 존재한다는 것과 혈청단백질을 실질적으로 함유하지 않는다는 것이다.

비활성화에 사용되는 특수한 헝태의 순간 가열에 의함으로써, 정제후에 잔류할 수 있는 모든 생바이러스는 침판지시험으로 측정된 것과 같이 비활성화 바이러스일뿐만 아니라 이 입자의 몇 %는 새로운 형태로 전환된다는 것이 발견되었다

이들은 가열 단계전에는 존재하지 않던 15 내지 30nm 직경의 사상체 형태를 취한다. 이들 사상체는 제1도에 전자현미경에 의하여 도시한 바와같은 새로운 형태를 갖는다.

이들 형태에는 직사상체, 밀페원형 또는 환형사상체 및 다양한 분지(分技)를 갖는 사상체가 포함된다. 대체로 기술하면, 상기와 같이 색다른 사상체 구조 형상의 입자를 함유하는 HBsAg의 백분율은 전자 현미경으로 측정했을 때 15 내지 75%이나, 상기와 같은 새로운 사상체 구조로 전환된 입자를 함유하는 HBsAg는입자를 함유하는 전체 HBsAg의 50%이상인 것이 바람직하다.

그외에 본 발명 왁찐의 특징은 그의 제조방법에 있을 수 있다. 대체로 본 발명 왁찐은 다음 단계로 제조된다.

A. 함유된 혈정단백질로부터 HBsAg를 분리하기 위하여 혈장을 폴리에틸렌 글리클과 접촉시킴으로써 혈장을 함유하는 인간혈장으로부터 HBsAg를 침전시키는 단계.

B. 대부분의 혈청단백질을 더 제거하기 위하여 히드록실 아파타이트상에 상기 분리된 HBsAg를 부흡착(負吸着)시키는 단계.

C. 잔류하는 본래의 Dane입자를 분리하고 또한 잔류하는 흔적량의 오염 혈청 단백질을 제거하기 위하여 흡착된 HBsAg를 등밀도 원심분리시키는 단계.

D. 원심분리로 분리된 입자를 0.5 내지 10mg/ml의 농도로 101。C 내지 104。C의 온도에서 2 내지 5분간 가열한 다음 가열된 입자를 예컨대 빙수욕에 도입시켜 냉각시킴으로써 입자를 가열 비활성화시키는 단계.

단계 A 내지 C는 중요하다. 그 이유는 가열처리를 받는 물질에 기타 혈청 단백질을 5량%이하로 함유하도록 HBsAg가 정제되는 것이 이들 단계에 의하기 때문이다. 환언하면, 가열처리되는 물질은 단백질 총중량을 기준으로 적어도 95%, 바람직하게는 99%의 HBsAg입자를 함유한다. 부가적 안정제로서 카르릴산나트륨-처러된 알부민을 가할 수 있으나 HBsAg를 다른 단백질로 희석시키지 않는 것이 바람직하다. 이상적으로, 가열 비활성화 단계(단계 D)에서 처리된 조성물의 특징은 그의 숨도, 특히 다

른 현장단백질이 존재하지 않는다는 점일 수 있다.

그러나 단계 A-C의 생성물의 가열비활성화 단계는 왁찐의 안정성에 기여할 뿐만 아니라, 가장 중요하게는 왁찐의 면역성을 증진시킨다는 점이다. 이 비활성화 단계는 단계 C로부터 생성되는 정제된 입자용액을101℃ 내지 104℃로 가열된 매제(즉 유욕)에 잠입된 2mm직경의 관(즉 황등이나 스테인레스 강절등)에 총2.5 내지 6.0분간 통과시킴으로써 101℃ 내지 104℃에서 수행하는 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서는 가열된 용액의 HBsAg 단백질농도가 0.1 내지 10mg/ml, 바람직하게는 약 0.5 내지 6 0mg/ml이어야 한다는것이 중요하다.

상기 공정을 이용함에 있어서는 관내의 용액을 101℃ 내지 104℃까지 가열하는데 에 약간의 시간이 소요되기 때문에 "전체 체류시간"은 용액이 101℃ 내지 104℃에 실제로 있는 시간보다 더 길다는 점을 인식하여야 한다. 그 차이는 물론 유동속도에 의하여 다르다.

용액이 100℃이상의 온도에 오게되는 경우 용액의 증발을 방지하기 위하여는 연속 유동순간 가열을 고압에서 수행하여야 한다는 것을 알아야 한다.

이것은 고압 액체 크로마트그라피 펌프와 수납용기로부터의 정수압헤드방산(head 放散)을 이용함으로써 용이하게 수행된다

선택적으로는 단계 C로부터 나온 정제된 항원을 예컨대 트윈 80(Tween 80)의 2% 수용액 동일 용적을 가해주는 것과 같이, 트윈 80과 같은 세정제로 처리함으로써, 부가적인 비활성화 단계를 수행할 수 있다. 이와같은 처리는 왁찐의 안전성을 더욱 증진시킨다. 그러나 비활성화 과정이 세정제 처리없이 수행되는 경우 생성물의 면역성이 더욱 크므로, 세정제 처리를 배제하는 것이 바람직하다.

필요에 따라서는 순간 가열 비활성화 단계후에 회수 정제된, 바이러스 비활성화 입자용액을 인산알루미늄이나 수산화 알루미늄겔에 흡착시킴으로써 보조제를 가할 수 있다.

열대지방에서 사용하기 위하여는 명반겔을 가하기전에 왁찐을 동결 건조하고, 요구에 따라 명반은 재수화(rehydration)후에 가하는 것이 바람직하다.

그 다음 0.15몰라르 Nac1과 같은 생리적으로 적당한 매제로 희석시킴으로써 최종 왁낀으로서 가공한다. 안전성을 최종적으로 확보하기 위하여는 명반 흡착된 왁찐을 최종 제품일 때 최종 용기에서 부가적인 가열 비활성화 단계를 밟게하는 것, 즉 65。C에 10-18시간 동안 노출시키는 것이 바람직하다.

침판지를 연구한 결과 최종의 저온살균법(pasteurization)단계는 HBV의 약 10,000개 감염성 용량을 비활성화시킬 수 있으며, 왁찐의 면역성에 대하여는 영향이 거의 없거나 전연 없는 것으로 알려졌다.

최종 왁찐에서 HBsAg함유 단백질농도는 0.1 내지 10마이크로그램/ml이다. 적당한 주사 투여량은 환자의 나이에 의한다 성인 남자에 대한 전형적인 투여량은 1 내지 10마이크로그램의 HBsAg이며, 근육내에, 피하에 또는 피내에 투여할 수 있다.

본 발명을 구체 예를들어 제2도에 마라 설명하면 다음과 같다. 일반적으로 HBsAg를 함유하며, 바람직하게는 간염 Be 항원(HBeAg)도 함유하는 100/의 혈장을 pH 4.6으로 조정한 후 처리하고, 연속유동 원심분리기에서 폴리에틸렌 글리콜(분자량 2000 내지 8000)로 3 내지 8%의 농도에서 정화(淨化)하여 침전시킨다.

침전은 HBsAg함유 입자를 포함하고 있다.

다른 혈청 단백질을 함유하는 상청액을 제거하고, 침전은 증류수를 가하여 24/의 용적이 되게 함으로써 재용해시키고, pH를 7 5~8.0으로 조정한다.

다음에 용액을 pH 5.0으로 조정하고, 생성침전을 제거한다.

다음에 조성물은 pH를 3.5~5.0, 선택적으로는 4.6으로 조정한 다음 폴리에틸렌글리콜(분자량 2000 내지8000)로 처리하여 폴리에틸렌글리콜 함량이 2.5 내지 6중량%가 되게 하여 HBsAg를 함유하는 두번째의 침전을 형성시킨다 이에 의하여 잔류 혈청단백질을 함유하는 상청액이 제거된다.

증류수를 가하여 PH를 6.0 내지 8.0으로, 이상적으로는 pH 6.8로 조정함으로써 상기 pH 5.0 침전단계를 거친 후 두번째 침전을 용해시켜서 총용적이 8/ 가 되게 한다

pH 6.8인 0.005M 인산염 판층액내의 HBsAg 함유 용액을 충전 히드록실아파타이트와 접촉시킨다 다음에 상청액은 0.02M 및 0.05M 인산염 완충세척용액과 함께 다이아 여과(Diafiltration)에 의하여 0.3/까지농축시키고, 부유-등밀도-대상 원심분리시킨다.

이 단계에서 농축된 HBsAg는 고체 KBr에 의하여 1.23 내지 1.30g/ml의 밀도로 조정하고, 동력에 의하여 1.05 내지 1.2ml/KBr의 선상 구배로 1.3 2g/ml 쿠션에 걸쳐 로우터에서 로우딩시킨다. 이 구배 부분은 16 내지 24시간 동안 25,000 내지 35,000 RPM으로 원심분리하고, 로우터의 중심으로 수분을 펌핑함으로써 분획시킨다. 1,17 내지 1.22g/ml의 밀도에 의한 분획을 수집한다.

HBsAg를 0.5 내지 10mg/ml의 농도까지 희석시키기 위하여, 생성된 분획을 N-식염수로 1 내지 10/용적까지 조정한다 그 다음 선택적으로 이 용액을 동일용적의 트윈 80 세정제나 기타 쌍생이온성 세정제로,1 내지 3중량% 농도인 그의 수용액을 사용하여 처리할 수 있다. HBsAg 함유물길을 0.5 내지 24시간동안 4 내지 25。C에서 세정제와 접촉시킨다.

다음에 이 조성물을 0.22미크론 여과기로 여과하고, 이를 101℃ 내지 104℃에서 1 내지 15분간 선택적으로는 2 내지 5분간 가열하고, 이 조성물을 상기한 압력하에 102℃ 내지 105℃에 유지된 유욕내에 있는 0.1내지 10mm직경, 선택적으로는 3mm 직경의 스테인레스 강철관에 통과시켜서 가열 비활성화시킨다 상기압력은 800 내지 1000mmHg에서, 특히 900 내지 1000mmHg로서, 비등을 방지하기에 충분

하여야 한다.

이와같이 가열된 물질은 다음에 빙수욕에 있는 용기에 수집하는 것과 같은 방법으로 냉각시킨다. 일반적으로 가열처리 종단 후 5분대에 2~4。C까지의 냉각이 이루어진다 그러나 최적의 결과를 얻기 위하여는 20내지 100。C의 온도에 조정된 욕대의 제2코일에 용액을 통과시킬 수도 있다.

다음에 정제 및 순간 가열 비활성화된 HBsAg 함유 물질은 인산알루미늄 보조제를 사용함으로써 적당히 보조한다. 일반적으로 전-살균한 인산 알루미늄을 무균조건 하에 비활성화된 희석 항원에 가하여 희석 항원ml당 0.3 내지 0.6mg의 인산 알루미늄을 제공한다. 그다음 보조제를 가한 조성물을 적당한 용기에 무균총전시킨다. 부가적인 살균단계로서 최종용기를 10시간 동안 65℃에 더 유지시켜 ("저온 살균")최종 생성물의 안전성을 확실히 한다. 면역에 사용하기 전에 왁찐은 2 내지 6℃에 3년까지 보관된다.

상기한 방법으로 HBsAg를 정제하고, 비교적 순수한 HBsAg 함유 입자를 0.1 내지 10mg/ml의 온도로 상기한 열처리를 받게 한 결과, 제4도 내지 제7도에 도시한 비상한 형상의 HBsAg 입자가 생성된다. 최초의 HBsAg 함유입자는 일반적으로 구형이며 18 내지 24nm(제3도)의 크기로 큰반면에, 본 발명 방법으로 유도된 입자는 특히 제1도, 4도 및 6도에 도시된 바와같이 다형태 사상체로 대부분이 전환된다.

제4도 내지 제7도, 특히 제5도에 도시된 바와같이 현재까지 볼 수 없었던 사상체가 특히 주목된다.

HBsAg 항원성을 갖는 이와같은 사상체의 특징은 분지를 갖거나 환형상이란 점이다

이들은 형상이 곡선이거나 직선일 수 있다.

대체로 말하면 사상체는 적어도 50nm의 길이를 갖고, 일반적으로 100 내지 1000nm 법위에 있마. 사상체 구조가 분지를 갖는 경우, 이들은 적어도 50nm 종종 100 내지 300nm길이를 갖는 구조로 분지되어 있다.

본 발명 방법으로 얻은 사상체의 몇은 사상체 구조당 적어도 3개의 분지를 가지며, 불규칙한 형상을 가지며, 그의 최저길이는 적어도 100nm 바람직하게는 200 내지 1000nm이다.

이와같은 분지되거나 원형(환형상의)인사상체는 상기와 같은 순간 가열처리를 하지 않은 혈청유도 HBsAg 관련 입자에서는 볼 수 없었던 점이 강조된다.

제4도 내지 7도를 참조하면 본 발명의 HBsAg 함유입자는 환형입자, 분지된 사상체 및 선형 사상체 상입자는 물론 구형의 16~25nm HBsAg 입자도 함유한다는 것은 관찰할 수 있다.

이 새로운 형태학적 형상에는 돌출되는 사상체부분을 갖는 환형 입자도 있다.

이들 사상체는 적어도 50nm의 길이를 갖는 것이 일반적이며, 대체로 길이가 100 내지 300nm이다. 세정제 처리가 사용되는 경우 분지를 갖지 않는 사상체의 특징은 20℃에서의 밀도가 1.210 내지 1.230Gm/cc(평균치 1.224Gm/cc)이며, 따라서 소위 Dane 입자 그리고/또는 관련 사상체를 갖고 있는 만성 HBsAg의 보균자의 혈장에서 볼수 있는 비-분지 사상체와는 구별된다는 것이다. 후자, 즉 비-분지 사상체는 평균밀도가 1.200이다.

"환형상"입자에는 실질적으로 완전한 원이나 환은 물론 실질적으로 한 영역을 에워싸는 형상도 포함된다. 포위하는 HBsAg 함유물질로 한정되는 영역은 타원형과 도오넛형등 어떠한 형상일 수도 있다. 즉 규칙적이거나 불규칙 형상을 가질 수 있다

관찰된 새로운 형태학적 형상은 전술한 미셀형(micellar)입자와는 극적으로 판이하다. 상기 미셀형 입자의 특징은 중심이 폴리펩티드 쇄의 소수성(疎水性)말단으로 구성되고, 그의 친수 부분은 구형임자 표면으로 거칠게 연장되는 반면, 본 발명에 따라 제조된 사상체는 중신에 연결되지 않는다는 점이다

어떤 사상체는 돌출사상체를 가질 수 있는 불규칙한 환형상이다. 그러나 일반적으로 상기 돌출 사상체는 3개 미만으로, 흔히는 두개 또는 단 한개이다. 물론 본 발명의 입자가 외향 돌출섬조를 갖는 농밀 긴착된 심부(芯部)를 갖는 것은 아니다.

본 발명과 본 발명의 실시방법을 설명하기 위하여 다음의 실시예를 기술하는 바이다.

[실시예 1]

만성 HBsAg 보균자로부터 얻은 HBeAg와 HBsAg를 모두 함유하는 혈장을 모아서 pH 4.6으로 조정하고, 웨스트팔리아(Westphalia)연속유동 원심분리기에서 10,000RPM으로 정화시킨다. 정화된상청액을 4。C에서 최종농도가 4% PEC 6000이 되게 조정하고 20분간 교반한다.

침전은 원심분리하지 않고 2시간 동안 침강법으로 회수하고, pH를 7.5~8.0으로 조정함으로써 증류수로 최초 용적의 5/1이 되게 용해시킨다. 다음에 pH를 5.0으로 낮추고, 생성되는 침전은 원심분리로 회수한다. 상청액의 pH를 4.6으로 조정하고 최종농도가 3% 될때까지 PEG를 가한다. 4℃에서 하룻밤 침강시킨 후 중화에 의하여 침전을 재용해 시키고, 전술한 바와같이 pH를 5.0으로 낮춘 다음에 현탁액을 정화시킨다. 이물질의 pH를 6.8로 조정하고, 0.005M 인산염 완충액을 가한 다음 동일 용적의 충전 히드록실아파타이트에2~3회 연속 흡착시켜서 더욱 정제한다.

다음에 히드록실아파타이트 첨가물을 0.02M 및 0.05M 인산염 완충액으로 세척한다. 최종적으로 원래의 상청액과 히드록실아파타이트 침강물 세척액을 모아서 원심분리로 정화시키고, 아미콘(Amicon)중공 파이버 카트릿지로 출발 혈장용적의 약 0.1%까지 농축시킨다.

다음에 농축된 HBsAg는 고체 KBr로 1.25gm/ml의 밀도가 되도록 조정하고,1.05 내지 1.2g/ml KBr선형 구배하에 1.3g/ml의 쿳션에 걸쳐 베크만 Ti-14 로우터에 기계적으로 로우딩시킨다. 이 구배물은 18

시간 28,000rpm으로 원심 분리하고 로우터의 중심으로 수분을 펌핑함으로써 분획시킨다. 1.17 내지 1.22g/ml 밀도범위에 상응하는 분획을 수집한다.

정제된 항원의 농도를 1mg/ml 농도($OD_{280,\ E_{1cm}^{0.1\%}=3.73}$ 기준으로)가 되게 조정하고, 동일 용적의 2% 트윈 80세정제로 희석시킨다.

이와같은 세정제 처리는 Dane 입자의 외막을 벗겨서 이들이 비-감염성이 되게 한다. 이것은 또한 약간의 지질(lipid)을 제거하게 되는 결과로 잔류입자의 수성밀도를 평균치 1.200g/ml로부터 1.224g/ml까지 변화시킨다.

실온에서 1시간 후 이 용액을 0.22미크론 밀리포어(Millipore)여과기로 여과한다. 그 다음, 정제된 항원은950mmHg 압력하에, 102℃의 온도의 유욕에 현수된, 2mm 직경의 스태인레스 강철코일로 물질이 102℃에서 2분간 유지될 정도의 속도로 통과시킨다.

이것은 전체 체류시간이 2분 40초가 되게 한다. 희석후 생성되는 조성물에 살균된 인산 알루미늄 보조제를 가한다. 최종의 명반 흡착 왁찐은 부가적인 바이러스 비활성화 단계로서 65℃에서 10시간 처리한다.

[비교 실시예 2]

102℃에서의 가열 비활성화 단계와 다음 단계를 제의하고는 실시예 1의 과정을 반복한다.

실시예 1에 나타낸 바와같이 단백질농도가 1.18mg/ml인 HBsAg 함유물질이 얻어진다. 다가 및 1가의 항-인간 혈청단백 항-혈청으로 겔확산을 검토한 결과 HBsA9의 순도는 95%이상이다. 따라서 이 조성물은 대부분이 검지할만한 양의 인간 혈정 단백질을 함유하지 않는다.

2% 인텅크스텐산으로 부염색시킨 후 195,000배율로 전자현미경 사진을 촬영한다. 이 시료의 전자 현미경 사진이 제3도에 도시되어 있다.

[실시예 3]

실시예 2에 기술한 시료의 일부를 102℃ 유욕에 잠입된 2mm 직경의 스테인레스 강철관에 선체 체류시간2분 40초 동안 통과시킴으로써 102℃에 노출시켜 가열 처리한다.102℃의 온도에 도달하는 데에는 40초가 소요된다. 마라서 단백조성물은 102℃에서 2분간 가열된다

이 시료는 약간 유백색으로 되어서 약간의 응고가 일어나는 것을 나타낸다 시료의 일부를 부염색시키고,그의 전자 현미경사진을 촬영한다.

제4도에 도시한 바와같이 가열후 대체로 원형인 선형, 분지된 사상체 형상의 표연 항원 입자가 나타난다. 이들 입자는 최초의 제제에는 존재하지 않는 것이다. 이들 입자는 단순한 응집에서 생성되는 것이 아니고 실질적인 막융합으로부터 생성되는 것이다. 왜냐하면 초음파에 30분 노출시켜도 그의 형상에 아무런 영향을 끼치지 않기 때문이다.

사상체 입자와 구헝입자의 상대적인 면역성을 측정하기 위하여 이들을 원심분리로 서로 부분 분리시킨다.

[실시예 4]

실시예 3의 가열된 제제를 8000g에서 20분간 원심분리하고, 상청액 분획을 분리시키고, 이것에 50Ml/ml의 트윈 20을 가한 후 0.22미크론 밀리포어 박막에 통과시켜 여과하여 여과에 기인되는 손실물을 감소시킨다. 이 상청분획의 일부를 부염색시키고 전자 현미경사진을 찍었는바 제5도의 전자현미경사진을 얻었다.

[실시예 5]

실시예 4의 여과에서 얻은 침강물을 등장성 식염수에 재현탁시켜 최초용적이 되게하고, 부염색을 행한 후전자현미경 사진을 찍었는바 제5도와 같다.

[실시예 6]

알부민 존재하에서의 순간 가열 비활성화

카프릴산 나트륨으로 안정화시킨 인간 혈청 알부민 3mg/ml의 존재하에, 제제를 실시예 3에 기술한 것과 같이 순간 가열한다 다형태의 사상체 형상이 또다시 얻어졌다(제7도).

[실시예 7]

보조제를 가한 단백조성물의 제조

실시예 2와 3의 조성물 30마이크로 / 와, 실시예 4의 조성물 40마이크로 /와 실시예 5의 조성물 90마이크로 /을 각각 10ml의 무균 N-식염수에 가하여 OD_{280} 을 기준으로 약 4마이크로그램/ml가 되게 한다. 이것은 가열 공정의 결과인 유백화에 기인되는 단백질 농도를 대략 평가한 것임을 알 수 있다.

이들 시료의 더욱 정확한 단백질 항량은 BIORAD 단백질 분석으로 얻는다.

이 용액을 리즈크스연구소(Rijks Inst Voor de Volksgesundheid of Bilthoven, Holland)에서 제조한 동일용량의 인산염겔(1.2mg/ml)로 조정하여 0 3mg 명반 인산염 겔에 흡착된 1회 용량이 약 1마이크로그램/0 5ml가 되게 한다. 각개 항원 1/4과 1/16을 함유하는 식염수 희석액을 상기와 같이 명반 보조제에 흡착시켜서 대략의 투여량이 0.25 및 0 6마이크로그램이 되게 한다. 항원 용액대신에 식염수를 사용하여 대조표준도 역시 제조한다.

새앙귀에 대한 접종

체중이 20 내지 22g인 암컷의 ICR Swiss 새앙쥐 20마리군을 여러가지 제제 0.5cc로 복강내에 접종시킨다. 각개 시료를 60마리 새앙쥐에 접종시키고,20마리는 3개 희석액을 접종시킨다

10마리에는 대조표준 보조제를 투여한다

모든쥐를 심장 출혈시킨다. 헐액을 각개 튜우브에 수집하고, 실온에서 응고시키고, 원심분리된(3000r.p.m.15분)응괴로부터 혈정을 회수하기 전에 4℃에서 하룻밤 방치한다

각개 혈청은 AUSAB ® 시현키트(Abbott Laboratories,Chicago,Illinois)를 사용하여 정량 평행선 방사선면역측정법으로 시험하여 ml당 100국제단위(IU)를 함유하는 WHO 국제 HBIG와 비교한다. 선형곡선 관련 희석 범위내에서 것보다 큰 방사능을 나타내는 시료와, 분당의 수치(CPM)에서 음성 대조표준 평균CPM을 제한(minus)것은 1:10과 1:100의 희석물로 재시험하였다. 시료의 HBsAg 항원성은 AUSRIA® 시험키트(Abbott Laboratories North Chicago,Illinois)를 사용하여 평행선 방사선 면역분석 법으로 평가하고 U.S.F.D.A.애서 제공한 잠정적 HBsAg/ad 표준과 비교하있다. 이 표준으로 얻은 결과는 GennanNational HBsAg/ad 표준을 사용하여 독자적으보 얻은 것과 동일하였다.

다음표 I에는 실시예 2 내지 5의 여러가지 시료에 대한 단백질 함량과 항원성 및 이들 사이의 비율, 즉"비항원성"(比抗原性)이 기재되여 있다,

가열은 비항원성을 약 50%로 감소시킨다는 것을 알 수 있다. 이 현상은, 제6도에서 볼수 있는 바와 같이 사상체 형상이 많은 실시예 5에서 특히 현저하다.

제8도는 4종의 제제를 희석하여 단일 주사한지 28~30일후에 적어도 1mIU/ml의 항-HBs에서 발육하는 쥐의 백분율을 나타내는 것이다.

이 판정기준으로 볼때 현저히 증진된 면역성을 갖는 것으로 나타났다. 쥐의 50% 열청전환에 소요되는 용량을 평가한 결과 다음 표 2의 실측치로 나타내는 바와같이 열처리가 면역성의 7.4배 상승작용을 가져온다는 것이 나타났다.

사상체 분획(실시예 5)이 29.5배 상승작용을 가져서 가장 면역성이 컸다.

[표 1]

비항원성에 대한 가열효과

실시예	물 질	HBsAg 단백질① (mg/ml)	HBsAg 항원성② (mg/ml)	원래의 항원성③ (%)
2	미처리된 HBsAg	1.44	0.55	0.38 100
3	102℃ 2분 Rx HBsAg	1.44	0.27	0.19 50
4	102℃ 2분 8000g 상청액	0.74	0.23	0.31 81
5	102℃ 2분 8000g 침강물	0.35	0.02	0.06 16

① : BIORAD 단백질분석에 의한것

② : FDA 잠정 HBsAg/ad 표준에 비교하여, AUSRIA시험을 이용한 평행선 방사선면역분석 (RIA)에 의한것.

③ : 비항원성: RIA에 의한 μg HBsAg 대(對) HBsAg/ad 표준/BIORAD 단백질 분석에 의한 μg HBsAg 단백질.

[표 2]

새앙쥐의 면역성에 대한 정제된 HBsAg의

가열 비활성화 효과. 요약

(A) 50% 혈청전환에 소요되는 용량에 대한 효과(ED_{50})

실시예	물 질	평가된 ED_{50}		상승효과인수
		Log_{10}ng/쥐	ng/쥐	
2	미처리된 HBsAg	2.91	813	1.0
3	102℃ 2분 Rx HBsAg	2.04	110	7.4
4	102℃ 2분 8000g 상청액	2.46	288	2.8
5	102℃ 2분 8000g 침강물	1.44	27.6	29.5

(B) 응답체에 있어서 평균 항 -HB_S수준에 대한 효과

1.5Log_1mIU/ml(32mIU)를 나타내는 상승효과인수 용량평가치

		Log_{10}ng/쥐	ng/쥐	
2	미처리된 HBsAg	3.18	1500	1.0
3	102℃ 2분 RxHBsAg	2.40	250	6.0
4	102℃ 2분 8000g 상청액	2.46	288	5.2
5	102℃ 2분 8000g 침강물	1.95	89	16.8

상기 실측치로부터 상기 분리과정으로 얻은 실질적으로 순수한 HBsAg 입자의 가열은 실제로 HBsAg의 면역성을 상승시키며 따라서 항체수준이 제공된다는 결론이 얻어졌다.

정성 매개변수는 1.5Log_{10} mIU/ml(32mIU)의 기하 평균 항 -HBs 수준을 나타내는데 소요되는 용량을 평가하여 유도한다. 이 매개변수를 사용함으로써 102℃에서 2분간 가열하면 면역성을 6배 증가시키는 것으로 평가된다. 이와같이, 본 발명의 단백질 물질의 특징은 직경이 18내지 24nm인 구형 HBsAg 입자로 주로 구성되는 단백 물질의 면역성보다 4 내지 10배 큰 면역성을 갖는 것이다.

물론 구형의 18-24nm 입자로부터 본 발명의 사상체 구조를 분리함으로써, 생성되는 조성물은, 실시예 5의 조성물에 대하여 상기 표로부터 확실한 바와같이 20 내지 30배 정도로 대단히 증진된 면역성을 가질 수 있다.

그러나 의외로 발견된바는, 상기한 바와같이 102℃에서 2분간 본발명 방법으로 정제된 HBsAg를 비활성화시킴으로써 잔류 감염성이 의도한 바와같이 저감될뿐만 아니라, 의외에도 면역성이 극적으로 증가한다는 것이다. 이와같이 증진된 면역성은 왁찐 제제의 단백함량을 적게 할 수 있으며, 따라서 왁찐제조의 총체적 비용을 절감시키고, 이에 따라 현재 사용되는 왁찐의 값보다 저렴하게 할 수 있다.

[실기예 8]

다른 정제 방법으로 얻은 가열 비활성화된 왁찐과, 이와 유사하나 본 발명 단계로 얻은 정제된 항원의 비활성화에 의한 가열 비활성화 방법으로 얻은 것과의 비교 평가 HBsAg를 폴리에틸렌 글리클로 2회 첨전시킨 다음 히드록실 아파타이트에 부흡착시키고, 동밀도 원심분리로 정제함으로써 상기한 방법으로 정제하였다. 이와같이 부분정제된 물질은 시료 A로 표시한다. 부분정제된 또다른 HBsAg조성물을 시료 B로 표시하고, 부루벨후이스씨등의 방법(Preparation of Hepatitis BVaccine by Heat Inactivation in Hepatitis B Vaccine,in Serum Symposium No.18 ,Eds P.Maupasand P.Guesry,Elsevier/North-Holland Biomedical Pres,1981)으로 제조하였다.

시료 A를 인산염 완충된 식염수로 1mg/ml,2mg/ml,,4mg/ml 및 6mg/ml로 희석하고, 다음에 기술하는 바와같이 열처리한다 시료 B는 부루벨후이스 방법으로 규정한 바와같이 20g HBsAg/ml 농도까지 조정한 재현탁된 HBsAg의 최종 입자를 사용하여 열처리하였다.

시료 A와 B를 내경이 2mm이고, 짧은 실리콘 고무관으로 연장시키고 금속 나사마개로 밀봉한 금속관에 넣었다. 가열 비활성화는 102℃로 가열된 항온유욕에 상기 관을 잠입시킴으로써 수행하였다.

102℃의 온도에서 시료 A와 B의 체류시간은 2분이었다. 그 다음 이들관을 빙수욕으로 이동시켜 냉각시켰다.

생성물 시료는 제3도 내지 6도와 동일한 방법으로 부염색, 즉 인텅그스텐산으로 부염색시킨 다음 전자현미경으로 관찰하였다. 시료 A(1-6mg/ml)의 전자현미경사진은 제4도 내지 제6도에 나타난 동일한 다형태 사상체를 나타내었다.

네델란드 적십자사의 방법에 따라 제조된 시료 즉 시료 B는 HBsAg에 부가하여 적어도 약 3mg/ml의 다른 혈청단백질을 함유하였다.

이의 전자 현미경사진은 실질적으로 HBsAg의 사상체상 입자를 나타내지 않았다 실시예 6에서와 같이 1-3m9/ml에 카프릴산 나트륨-안정화된 알부민을 첨가하여도 다형태 형상(제7도)으로의 전환이 일어나지 않았고, 또는 면역성의 증진도 일어나지 않는다는 것을 발견하였다.

결론적으로 말하면, HBsAg가 정제되는 방법은 물론 이것이 가열되는 농도가 후속의 순간가열 처리를 좌우하여서 HBsAg 입자가 제4도 내지 제6도에 도시한 신규의 비상한 다형태 형상으로 전환된다.

이와같이 가열 비활성화자체가 다형태 효과의 결정원인이 아니고, 오히려 면역성을 증진시키는 인자인 신규한 다형태는 이용된 정제 방법과 실제적인 가열 비활성화 과정이 잘 조합된 결과로 초래되는 것이다

전술한 바는 본 발명을 수행하는 가장 좋은 형태로 생각되는 것을 기술한 것이다. HBsAg의 비상한 다형태 형상을 발생시킨 최초의 연구에서, 정제된 HBsAg는, 가열 비활성화가 HBsAg에 끼칠 수 있는 역효과로부터 이를 보호하기 위하여 즉, 이를 변성되지 않게 하기 위하여 혈청알부민과 같은 혼화성 단백질로 희석시켰다. 그후에 프린스씨와 김씨(Merrers Prince and Kim)가 비활성화는 상기 희석조작이 없이도 수행될 수 있으며, 따라서 본 발명의 바람직한 수행방법은 정제되고 희석되지 않은 HBsAg에 대하여도 수행하는 것임을 발견하였다.

이와같은 바람직한 수행방법도 역시 상기한 개량된 다형태 형상의 HBsAg를 생성시키는 것으로서, 프린스씨와 김씨의 이름으로 출원될 별도의 특허출원의 주제이다

본 발명자들은 본 발명의 원리 즉 고농도의 정제된 박막제제를 순간 가열 비활성화시킴으로써 지질막 이유노겐의 면역성을 증진시킨다는 원리는 다른 기타의 왁찐 예컨대 성숙핵세포에서 생성된 재결합 DNA유도 왁찐, 예를들면 효모나 또는 세포배양 유도 재결합 DNA 기질의 간염 B왁찐과 기타 왁찐은 물론, 인플루엔자, 광견병, 마진, 포진군의 바이러스에 대한 것과 같은 중화된 왁찐, HTLVI, II 및 III과 같은 재귀바이러스에 대한 왁찐, 기생충 왁찐 및 현재 사용되거나 개발과정에 있는 기타 왁찐의 효력증진과/또는 소요투여량의 저감화에도 용이하게 이용될 것이다

(57) 청구의 범위

청구항 1

신규한 형상의 HBsAg 입자를 포함하고, 이 HBsAg 입자는 사상체, 분지된 사상체, 밀폐원형이나 분지된 밀폐원형 사상체인 입자를 함유하는 것을 특징으로 하는 HBsAg 입자로 구성되는 단백질 물질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사상체, 분지된 사상체, 밀폐원형 또는 분지된 밀폐원형 사상체가 15 내지 20nm의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질

청구항 3

제1항에 있어서, 카프릴산나트륨-안정화된 인간 현청 알부민이외에 5중량%미만의 혈청단백질을 함유하는 것을 특징으로 하는 단백질 물질

청구항 4

제3항에 있어서, 실질적으로 혈청단백질을 함유하지 않는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단백질 물질이 필폐원형 사상체로부터 의향 돌출하는 사상체를 부가적으로 갖는 입자를 함유하는 밀폐원형 사상체 HBsAg을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 사상체 입자가 적어도 50nm의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 사상체 입자가 100 내지 1000nm의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질물질.

청구항 8

제1항에 있어서,18 내지 24nm 입도인 구형 형태의 HBsAg로 주로 구성되는 조성물보다 적어도 4배 큰 면역성을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단백질 물질이 18 내지 24nm 크기의 구형 HBsAg 입자로 주로 구성되는 단백질 물질의 6 내지 30배의 면역성을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질

청구항 10

제8항에 있어서, 카프릴산 나트륨-안정화된 인간혈청 알부민외에 5중량%이하의 다른 혈청 단백질을 함유하는 것을 특징으로 하는 단백질 물질

청구항 11

제10항에 있어서, 다른 혈청 단백질을 실질적으로 함유하지 않는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 12

사상체 구조의 형상으로 응융된 HBsAg입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 사상체 구조가 적어도 50㎚의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 사상체 구조가 100 내지 1000㎚의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질물질.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 사상체 구조가 분지구조이며 구조체의 분지중 적어도 하나는 적어도 50㎚의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 사상체 구조에 적어도 3개의 분지가 있는 것을 특징으로 하는 단백질 물질.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 사상체가 분지되었거나 분지되지 않은 것으로,15 내지 20㎚의 직경과 적어도 50㎚의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 물질

청구항 18

제1항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제-를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁씬.

청구항 19

제2항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐

청구항 20

제3항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐.

청구항 21

제5항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐.

청구항 22

제6항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐.

청구항 23

제11항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐.

청구항 24

제13항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석체를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐.

청구항 25

제14항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐.

청구항 26

제15항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐

청구항 27

제16항의 단백질 물질과 생리적으로 적당한 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 왁찐

청구항 28

A. HBsAg를 폴리에틸렌 글리콜과 접촉시켜서 그에 함유된 기타 혈청 단백질로부터 HBsAg를 히드록실아파타이트에 부흡착시킴으로써 혈장으로부터 HBsAg를 등밀도 원심분리시키는 단계, 그리고 D. 상기 원심분리에 의하여 분리된 입자를, 적어도 1㎎/㎖의 농도로 , 800 내지 1000㎜Hg의 압력하에 101 내지 104℃의 온도에서 1 내지 15분간 가열한 다음 이와 같이 가열된 입자를 냉각시킴으로써 가열 비활성화시키는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는, 제3항의 단백물질 제조하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 입자가 1 내지 15분간 101 내지 104℃의 온도로 800내지 1000㎜Hg의 압력하에 있는 가열매제에 현탁되어 있는 직경 0.1 내지 10㎜의 관내에서 가열되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 30

제18항에 있어서, 혈청 단백질인 검지 가능한 HBV DNA를 실질적으로 함유하지 않고, HGsAg, HGsAg와 Pre-S 항원 결정기를 함유화는 것을 특징으로 하는 왁찐.

청구항 31

제 28항에 있어서, 상기 입자를 가열전에 세정제로 처리하여, 이로써 이들 입자의 수크로오스 구배내 수성밀도를 1.200으로부터 1.224Gm/cc로 상승시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 32

제28항에 있어서 상기 입자를 가열된 매제에 잠입된 관에 통과시키면서 101 내지 104℃로 가열하고,상기관의 직경이 0.1 내지 10mm인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 입자를 상기관에 통과시키는 동안 800내지 1000mmHg의 압력을 가하여 상기 입자의 상기관내 체류시간이 1 내지 15분 되게 하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 34

제 28항에 있어서 HBsAg 입자를 가열 처리하기 전에 카프릴산 나트륨-안정화된 인간혈청 알부민으로 희석하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 35

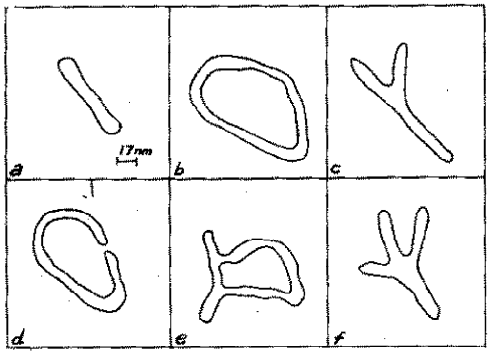
제28항에 있어서, 가열처리할 용액내의 상기 HBsAg 입자의 농도가 적어도 0.1mg/ml인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 36

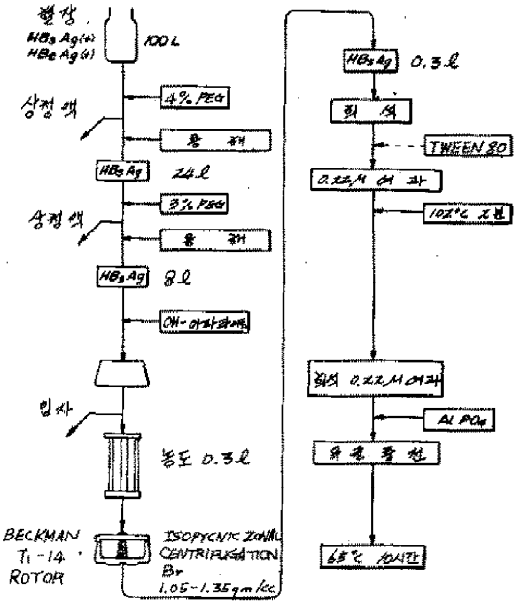
제35항에 있어서, 가열처리한 혈청내 HBsAg 입자의 농도가 0.1과 10mg/ml사이인것을 특징으로 하는 제조방법.

도면

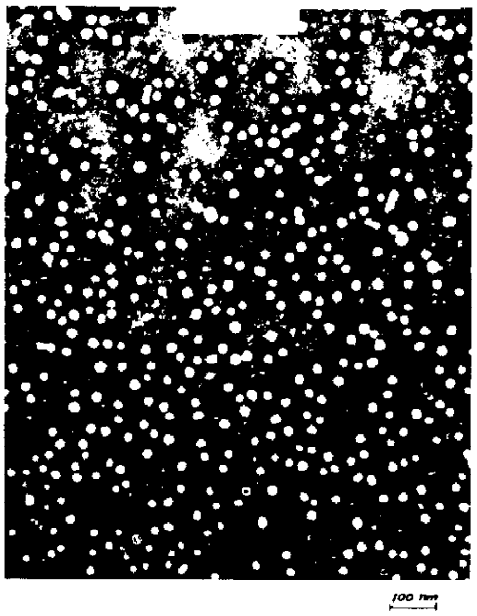
도면1



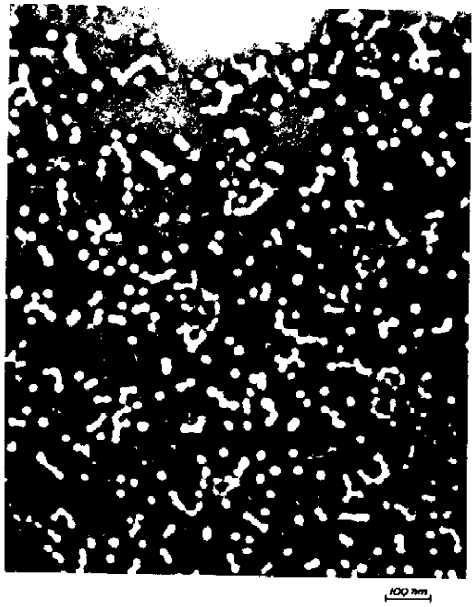
도면2


혈장
HBsAg(+)
HBeAg(+)
100L
상정액
4% PEG
용 해
HBsAg
24ℓ
상정액
3% PEG
용 해
HBsAg
8ℓ
OH-이차결합
입사
농도 0.3ℓ
BECKMAN
Ti-14
ROTOR
ISOPYCNIC ZONAL
CENTRIFUGATION
Br
1.05-1.35gm/cc
HBsAg 0.3ℓ
희 석
TWEEN 80
0.22μ OH 과
102°C 1분
희석 0.22μ OH과
Al PO4
유출물 선
65°C 10시간

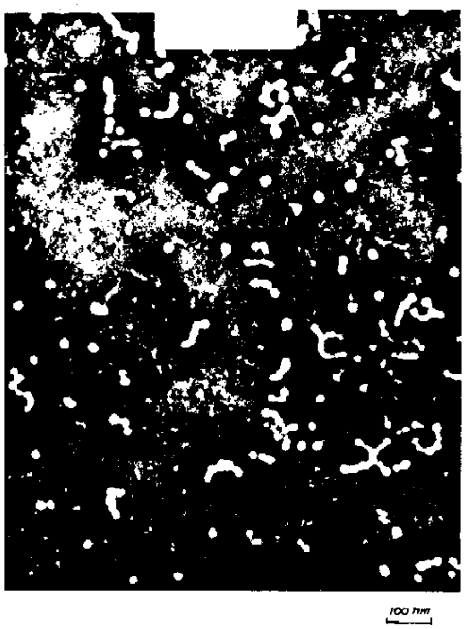
도면3


100 nm

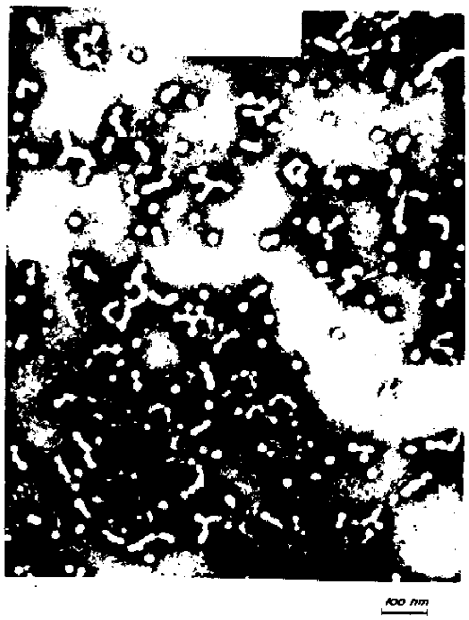
도면4



도면5



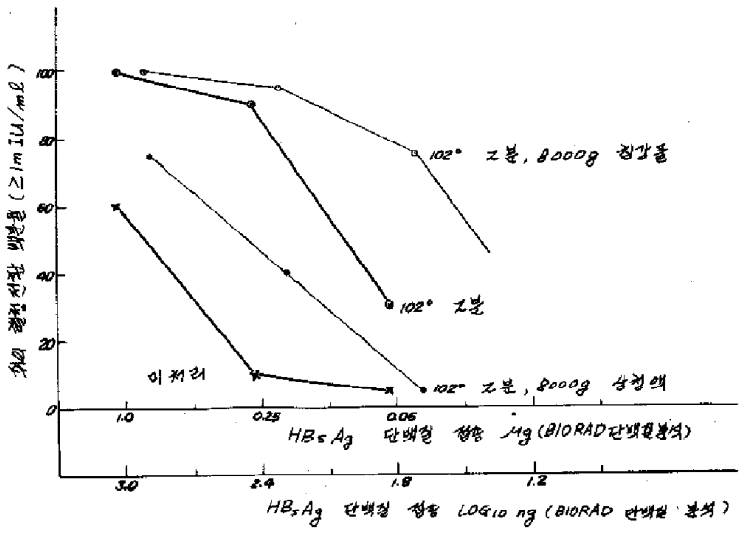
도면6



도면7



도면8


100
80
60
40
20
0
1.0
0.25
0.06
3.0
2.4
1.8
1.2
102° 2분, 8000g 침강물
102° 2분
102° 2분, 8000g 상청액
미처리
HBsAg 단백질 점용 μg (BIORAD 단백질분석)
HBsAg 단백질 점용 LOG10 ng (BIORAD 단백질 분석)