(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[7]
A61K 39/39
A61K 39/08

(45) 공고일자 2001년09월17일
(11) 등록번호 10-0291357
(24) 등록일자 2001년03월12일

(21) 출원번호 10-1995-0702817
(22) 출원일자 1995년07월07일
번역문제출일자 1995년07월07일
(86) 국제출원번호 PCT/AU1993/00677
(86) 국제출원일자 1993년12월24일
(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 뉴질랜드 미국 EP
유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 사이프러스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴

(65) 공개번호 특1996-0700070
(43) 공개일자 1996년01월19일
(87) 국제공개번호 WO 1993/15636
(87) 국제공개일자 1994년07월21일

(30) 우선권주장 08/002,485 1993년01월08일 미국(US)

(73) 특허권자 시에스엘 리미티드 터베이 피터.
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플러 로드 45
(72) 발명자 콕스,존,쿠퍼
오스트레일리아,3437,빅토리아,볼렌가룩크,바카스마쉬로드365
스팍스,로버트,에드워드
미합중국,미주리63122,커크우드,웨스트아담스애비뉴1318
제이콥스,어윈,클레이
미합중국,미주리63205,유레카,밸리트레일5
메이슨,노버트,사이먼
미합중국미주리63105세인트루이스,랭턴드라이브645
(74) 대리인 나영환, 이상섭

심사관 : 조명선

(54) 백신제제

명세서

[발명의 명칭]

백신 제제

[발명의분야]

본 발명은 백신 제제에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로는 조절 방출형 또는 지연 방출형 백신, 고동 방출형(pulsatile-release) 또는 펄스 방출형 (pulsed-release) 백신 및 1회 주사형 백신 등 다양한 유형을 갖는 백신 제제에 관한 것이다. 본 발명의 제제는 인체용 및 수의학용 백신으로 사용되며, 건성 분말 의 형태로 제공되어 이후에 투여용 액상 현탁제, 고형 환제(pellet) 또는 삽입물내 로 혼입 가능하다. 일반적으로, 액상 현탁제 형태인 본 발명의 백신 제제는 비경구 투여, 예를 들면 피하 주사 또는 근육내 주사에 의해 투여된다.

[발명의배경]

인체 의학 및 수의학 분야 양자 모두에 있어서 1회 투여로 백신을 완전하게 전달하는 과정에 대하여 관심이 집중되어 왔으며, 다수의 특허 및 기타 공보(예, 영국 특허 제1,567,503호)도 이러한 가능성에 관해 제시한 바 있다. 백신의 수의학 적용분야에서의 잇점으로는 다음과 같은 것들이 있다 :

(i) 시간 단축-동물들을 단 1회로 처리

(ii) 비용 절감-1회 수의사 방문 및 처리 비용 절감.

(iii) 처방된 투여 스케줄(투여 횟수, 투여 시간 간격)에 따른 보장된 복약 이행성

인체 의학에 있어서는, 상기 세가지 잇점들도 중요하지만, 특히 더욱 중요한 것은 복약 이행성(compliance)이다. 이는 유아에 대한 반복 진료가 개발 도상국 에서는 불가능하기 때문이다. 그 외에도, 특히 유아의 백신 접종시 통증 및 고통이 수반된다는 점은 인체 의학에 있어 1회 투여 백신이 바람직한 또 다른 이유가 된 다.

불활성화된 백신(일반적으로 테타누스 또는 디프테리아 톡소이드)을 사용하 는 백신 접종에 대한 초기 연구에서는 적어도 4주 간격으로, 바람직하게는 투여 간 격을 이보다 길게 해서 2회 이상으로 백신을 분할 투여하는 것이 효과적이라는 사 실이 입증되었다. 모체의 항체가 예비 면역 반응을 저해하는 특

히 어린 동물이나 유아로부터 적절한 면역 반응을 유도하기 위해서 3차 투여가 필요한 경우도 있다.

이론 면역학의 최근 연구는 이러한 사실을 뒷받침해주고 있으며 "친화도 성 숙(affinity maturation)"이란 용어를 등장시켰다. 친화도 성숙이란 목적하는 면 역원에 대한 친화성이 낮은 항체를 분비하는 혈장 세포가 소실됨에 따라 목적하는 면역원에 대한 친화성이 높은 항체를 분비하는 혈장 세포가 우선적으로 선별되는 과정을 말한다. 하지만, 이 과정은 항원 결합에 대해 여포성 수상돌기 세포와 혈장 세포가 서로 경합하는 것과 관련있는 과정이므로, 한정된 양의 항원의 존재하에서만 효과적으로 발생할 수 있다. 친화도 성숙 과정은 1차 백신 투여한지 2주 내지 3주 후에야 개시되며, 이 과정이 효과적으로 종결될 때까지 2차 항원 투여가 이루어져 서는 안된다는 것이 중요하다. 이러한 과정은 1차 투여분이 충분히 많은 양의 항원을 함유하고 있지 않을 것을 조건으로 수차례에 걸친 백신 접종 스케줄에 따라 용이하게 수행될 수 있다. 그러나, 단일 투여 지연 방출형 백신으로 상기 과정을 수행하기 위해서는 2차 및 후속 투여가 그 항원을 너무 일찍 방출하지 않아야 한다 는 것이 중요하다. 이를 성취하기 위해서, 항원은 한정된 분해 시간을 가진 매트릭 스 내에 포함되어 있어야 한다. 생체 적합성 매트릭스도 허용가능한 것으로 제안된 바 있으나, 이 매트릭스는 생체 분해성이어야 한다. 콕스 앤드 콜터(Cox & Coulter, 1992)에 의해 다수의 선택사항이 검토된 바 있다.

지연 방출형 백신을 개발하고자 하는 많은 노력이 엘드리지와 그의 동료 (Eldridge et al., 1990; 1991)의 연구에 집중되었는데, 이들은 생체 분해성 공중 합체-폴리락티드 코글리코리드를 사용하여 항원 함유 미소구를 생산해냈으며 생체 내에서 항원 함유물의 지연 방출 현상을 관찰하였다(참조:오스트레일리아 특허 명세서 제79929/87호 및 제33433/89호). 크루터(Kreuter, 1990)는 아크릴레이트 중합체로부터 생성된 소립자를 사용함으로써 유사한 관측이 이루어졌음을 보고한 바 있다. 상기 연구자에 의해서 지연 방출형 백신의 개념이 가능하다는 사실이 밝혀졌지만, 백신 제조시 이들을 이용한 과정은 많은 결점을 지니고 있어 일반적인 백신 제조에는 부적합하다. 주요 문제점은 다음과 같다;

(i) 변성의 물리 화학 조건에 생체 물질 노출

(ii) 대규모 생산 곤란

(iii) 친수성 화합물(예, 단백질) 혼입에 따른 낮은 효율

유럽 특허 공보 제0486959호 (출원인:Vectorpharma International SpA) 에는 약리학적 활성 물질을 함유하는 조절 방출형의 미립자형 약학 조성물이 개시되어 있는데, 이 조성물은 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 이것의 공중합체 같은 생체 분해성 중합체 및/또는 기타 중합체(예, 폴리사카라이드 겔화 중합체 및/또는 생체접착성 중합체), 양성 친화성 중합체, 입자의 계면 특성 변질화제 및 약리학적 활성 물질을 함유한다. 약학 조성물을 제조함에 있어, 중합체 성분은 용매의 부재 하에 또는 소량의 필수 용매의 존재하에서 계면 특성 변질화제와 함께 공동 용해시 키고, 약리학적 활성 물질을 중합체 용액에 용해 또는 분산시킨 후, 예를 들면 유화, 압출, 분무 건조 또는 분무 응고 기술에 의해 최종 입자를 형성한다. 전술한 바와같이, 상기 기술은 약리학적 활성 물질이 내부의 용매와 함께 중합체성 화합물 의 혼합물에 직접 노출되게 함으로써 약리학적 활성 물질로 사용된 생체 물질의 변성이 야기된다는 중요한 결점이 있다.

본 발명의 주목적은 백신 제제, 및 면역원에 구조 변화가 일어나지 않도록, 다르게 말하면 면역원의 본래 구조가 유지되도록 면역원성 물질이 용해된 형태로 존재시 이를 유기 용매나 기타 다른 유기상에 노출시키지 않고 백신 제제를 제조하 는 방법을 제공하는 것이다.

[발명의 개요]

본 발명의 첫 번째 양태는 알루미늄염 애쥬번트(adjuvant)에 흡착된 면역원 을 함유하는, 분무 건조에 의해 제조한 안정한 건성 미립 형태의 속방형 (immediate release) 백신 제제를 제공하는 것이다.

상기 본 발명의 양태는 또한, 알루미늄염 흡착된 면역원의 수성 현탁액을 형 성하고, 상기 현탁액을 분무 건조시키는 단계를 포함하여, 전술한 바 있는 안정한 건성 미립 형태의 속방형 백신 제제를 제조하는 방법을 제공한다.

유사 제제의 동결 건조 또는 냉동 건조 과정은 문헌 "미국 특허 제 4,578,270호(Csizer et al.)"에 기술되어 있다. 이 과정은 알루미늄 겔 구조가 부 분적으로 유지될 수 있도록 덱스트란(40mg/㎖) 및 단백질(6-4mg/㎖) 양자 모두를 다량 첨가해야 한다는 점에서 가장 큰 단점을 가지는 것은 물론 이외에도 많은 단 점을 가진다. 다량 첨가 단백질은 알루미늄 겔을 백신 항원으로 대체하는데 작용할 뿐 아니라, 그외에도 많은 경우에 있어 면역원으로 작용하여 그 결과 백신 항원에 대한 면역 반응을 저하시키는 경향이 있다. 냉동 건조에 따른 다른 문제점은 대규모 생산이 곤한하고 설비 비용이 지나치게 높으며 생산된 제품이 자유 유동성 미세 과립 보다는 박편을 형성하는 경향이 있다는 것이다.

놀랍게도, 알루미늄 겔의 겔 형성 특성은 안정화 효과를 발휘할 수 있는 임 의의 다른 물질(최소량의 백신 항원과 별도로, 통상 1 내지 10㎍/㎖의 용량)의 부 재하에서도 분무 건조 동안 완전히 유지된다는 것이 밝혀졌다. 분무 건조시킨 분말 에 물을 첨가한 결과 즉각적으로 겔이 형성되며 그 침강 특성은 출발 재료와 유사 하다.

본 발명의 두 번째 양태는 각기 구별되는(discrete) 면역원 함유 부위들을 포함한 생체 분해성 중합체의 연속 매트릭스를 함유하는 안정한 건성 미립 형태의 조절 방출형 또는 지연 방출형 백신제제로서, 상기 미립자가 분무 건조에 의해 제조 한 미소구형 입자인 백신 제제를 제공하는 것이다.

상기 양태에 있어, 본 발명은 생체 분해성 중합체가 용해된 연속 유기상중에 면역원과 임의의 애쥬번트 함유한 수성 현탁액의 유화액을 형성시키고 이후, 이 유중수형 유화액을 분무 건조시켜, 각기 구별되는 면역원 함유 부위들을 포함한 중합 체의 연속 매트릭스를 함유하는 미소구형 입자를 형성시키는 단계를 포함하여, 잔술 한바 있는 안정한 미립 형태의 조절 방출형 또는 지연 방출형 백신 제제를 제조하는 방법을 제공한다.

이 조절 방출형 또는 지연 방출형 백신제제 제법의 대안 방법은, 상기 생체 분해성 중합체가 용해된 연속 유기상중 면역원 함유 미립자 물질, 바람직하게는 상 기에서 광범위하게 기술한 바 있는 안정

한 미립자 형태의 속방형 백신 제제와 임의의 애쥬번트의 현탁액을 분무 건조시켜 각기 구별되는 면역원 함유 부위들을 포함 한 중합체의 연속 매트릭스를 함유하는 상기 미소구형 입자를 형성시킴으로써 제조한다.

이들 두 과정은 전술한 방법, 예를 들면 엘드리지와 그의 동료(Eldridge et at. 1991), 오하간과 그의 동료(O'Hagan et al. 1991), 싱과 그의 동료(Singh et al. 1991) 및 보드마이어 앤드 쳉(Bodmeier & Cheng 1998)이 제시한 방법 에 비해 상당히 유리하다. 엘드리지와 그의 동료 (1991) 및 보드마이어 앤드쳉(1988)의 방법에서는 PLG를 용해시키는데 필요한 유기용매에 단백질을 직접 노출시킨다. 그결과, 항원이 변성되며, 대부분의 항원은 수용성이기 때문에 낮은 혼입효율이 나타난다. 호하간과 그의 동료(1991)및 싱과 그의 동료 (1991)는 복합 과정들을 고안하여 이러한 단점을 해소하고자 노력했다. 그러나 이들중 어떠한 과정도 시판 규모로 부적합하며, 또한 전자의 오하간등의 방법은 낮은 혼입 효율을 나 타내는 반면, 후자의 싱등이 제시한 방법은 다량의 외부 단백질 주입이 불가피하다.

결론적으로, 이들 종래 방법중 어느 것도 실질적으로 애쥬번트의 동시 혼입에는 적합치 않다.

본 발명의 속방형 백신 제제 및 조절 방출형 또는 지연 방출형 제제 양자 모 두는 바람직하게는 10㎜ 내지 250㎛ 범위, 더욱 바람직하게는 1㎛ 내지 100㎛ 범위의 미소구형 입자 형태이다.

안정한 미립 형태의 백신 제제는 적어도 1종의 속방형 백신 제제 및/또는 적 어도 1종의 조절 방출형 또는 지연 방출형 백신 제제를 약제용 또는 수의학용으로 허용되는 담체 또는 희석제와 배합함으로서 투여용 백신 조성물로 제조할 수도 있다. 비경구 토여용의 백신 제제 제조에 사용하기 적합한 담체 또는 희석제는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 대안 방법으로는, 공지의 담체 물질과 함께 고형 환 제 또는 삽입물 형태로 백신 조성물을 제조할 수도 있다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명에 따르면, 매우 높은 생산율의 1 단계 제조 공정을 통해 조절 방출 형 또는 지연 방출형 백신 제제의 면역원 함유 미소구가 제조된다. 최종 생성물은 자유 유동성 분말이다. 일반적으로 공정의 필수 성분은 아니지만, 면역원과 함께 애쥬번트를 이들 미소구내로 혼입시키면 다음과 같은 많은 잇점이 제공된다:

(i) 건조 공정중에 면역원은 선택된 구조로 유지된다.

(ii) 모든 펄수 방출시에 면역계를 자극하는데 애주번트가 유용하게 사용 된다.

(iii) 생체내 체류 시간중에 지연 방출형 중합체가 생체 분해되는 동안, 면 역원은 고형 지지체에 부착되어 있어 열 및 발생 가능한 효소 변성으로부터 보호된다.

본 발명의 연구 작업중에, 속방형 조성물이 안정한 고형의 건성 형태로 제공 될 수 있다는 사실이 밝혀진 것은 놀라왔는데, 그 이유는 일반적으로 복잡한 기술을 사용하지 않거나 또한 과량의 안정화제를 사용하지 않고서는 알루미늄염 흡착된 면 역원을 분말 또는 기타 건성 형태로 제조할 수 없는 것으로 여겼기 때문이다(예, Csizer et al.), 그러나, 본 발명의 첫 번째 양태에 따라, 수성 현택액에서 생성된 알루미늄염 흡착된 면역원을 건조시킴으로써 안정한 고형 생성물을 자유 유동 분말 형태로 제조할 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 면역원은 예를 들면 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄과 같은 알루미늄염 애주번트상에 흡착될 수 있다. 현탁액은 단백질 안정화제도 함유하고 있는 것이 바람직하며, 적합한 안정화제로는 예를 들면 트레할로스, 락토스, 덱스트로스 및 글루코사민 같은 당(sugar)과 당 유도체가 포함된다. 생성된 현탁액은 건조, 바람직하게 분무 건조에 의해 자유 유동 분말을 형성시킨다. 전술한 바와 같이, 알루미늄염 흡착된 면역원을 건조시키는 과정은 면역원을 변성시키지도 않고, 알루미늄염 애쥬번트를 분해하지도 않으며, 예비 실험의 실제 결과에서 면역원의 면역원성은 이러한 분말 제형에서 강화될 수 있음이 확인 되었다.

본 발명의 두 번째 양태는 조절 방출형 또는 지연 방출형의 미세캅셀화된 백 신의 제조 방법을 제공하는 것이다. 이 공정은 바람직하게는 애쥬번트와 함께 백신 면역원을(이때 이들 모두는 수성상임) 생체 분해성 중합체가 용해된 연속 유기상내 로 유화시키는 단계를 포함한다. 그후, 애쥬번트와 함께, 적어도 하나, 그러나 바 람직하게는 다수의 면역원 포켓(=부위)들을 둘러싸고 있는 중합체의 연속 매트릭스를 함유하는 미소구를 생성시키기에 적합한 조건하에서 상기 유중수형 유화액을 분무 건조시킨다.

이러한 공정과 관련하여 분무 건조에 앞서 형성된 유화액은 유중수형 유화액 이며, 반면 전술한 선행 기술의 지연 방출형 백신 조성물의 제조시에는 수중유형 유화액이 생성된다.

바로 앞서 기술한 공정을 변형시키면, 유기 용매중의 중합체 용액에 극미립 자 면역원을 현탁시킨 현탁액을 함유하는 미소적을 분무 건조시킴으로써 미소구를 제조할 수 있는데, 이때 미립자 항원은 중합체 용액에 용해되지 않는 형태 및 바람 직하게는 안정한 미립자 형태의 속방형 백신 제제이다.

본 발명의 백신 제제는 인체용 및 수의학용 백신 모두에서 공지된 광범위한 면역원, 예를 들면 테타누스 톡소이드, 디프테리아 톡소이드, 페르투시스 추출 백 신, 인풀루엔자 바이러스등 사용시에 적용가능하다.

본 발명에 사용된 생체 분해성 중합체는 비수성상으로 존재할 수 있고, 생체 적합성이며, 생체내에서 지연 분해될 수 있는 중합체 물질일 수 있다. 적합한 중합 체로는 예를 들면 폴리에스테르, 폴리오르토에스테르, 폴리무수물 및 시아노아크릴 레이트 뿐 아니라 단백질과 폴리사카라이드를 비롯한 각종 천연 중합체등이 있다. 특히 본 발명에 사용하기 적합한 중합체는 D-, L- 및 DL- 폴리락트산(D-PLA; L-PLA; DL-PLA) 및 폴리글리콜산(PGA)의 동종중합체 및 각종 공중합체(PLG) 등이 있다. 유중수형 유화액 제조시, 1종 이상의 유화제를 사용하는 것이 바람직하며, 적합한 유화제로는 예를 들면 트윈 80, 스판 85 및 각종 레시틴 및 레시틴 유도체가 포함된다.

본 발명에 따라, 지연 방출형 백신 제제에 혼입하기 적합한 애쥬번트로는 전술한 알류미늄염 애쥬번트(수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄) 뿐 아니라 백신 관련분야에 공지된 기타 미립자 및 비미립

자 애쥬번트가 포함된다. 적합한 애쥬번트는 콕스 앤드 콜터(1992)에 의한 실시예 방법에 기술되어 있다.

본 발명의 백신 제제 및 이것의 제조 방법의 그외 특징들은 하기의비 제한 실시예로부터 알 수 있다.

[실시예]

속방형 테타누스 백신의 제조

단백질 부재 카제인 가수분해산물 배지에서 6일 동안 클로스트리디움 테타니 (Clostridium tetani)를 배양한 결과, 대략 60Lf/㎖(생체외 응집 단위)의 테타누스 독소가 생성되었다. 원심분리시켜 박테리아 세포와 잔류물을 제거한 후, 독소를 농축시키고 30,000 MW 컷-오프(cut-off) 한외여과막상에서 세척하였다. 최종 농도가 각각 0.3% 및 0.9%w/v 로 되도록 포름알데히드와 리신 용액을 첨가하고 37℃에서 2주동안 방치하여 톡소이딩(toxoiding)을 진행시켰다. 생성된 톡소이드 를 황산 암모늄으로 침전시켜 정제하였다.

지속적으로 교반하면서 알루미늄 애쥬번트의 현탁액에 항원을 서서히 첨가하 여 알루미늄염 애쥬번트(수산화 알루미늄 또는 인사 알루미늄)에 테타누스 톡소이드를 흡착시켰다. 밤새 계속 교반하였다. 수산화 알루미늄겔로는 덴마크의 수퍼포스(Superfos)에서 제조한 "알히드로겔 (Alhydrogel)"을 사용하였다. 염화 알루미늄 용액을 인산삼 나트륨으로 역적정하여 인산 알루미늄겔을 제조하였다. 필요에 따라서는, 농도가 50%(w/v)로 되도록 안정화제를 수중에 용해시킨 후, 흡착된 테타누스 톡소이드에 첨가하여 하기 표 1에 기술된 바와 같은 요구 최종 농도를 얻었다.

40/100/120 원형 노즐이 장착된 드라이텍 컴펙트 레보레이토리 스프레이 드라이어(Dryrec Compact Laboratory Spray Dryer)로 80psi의 분무압 및 60℃의 분출구 온도에서 알루미늄염 흡착된 테타누스 톡소이드의 수성 현탁액을 분무 건조시켰다. 생성된 미소구의 크기 범위는 직경이 3㎛ 정도인바, 자유 유동 분말 형태로 수거하였다.

실시예 2

속방형 디프테리아 백신의 제조

카제인 가수분해산물을 혼입시켜 전체질소 함량이 0.2%(w/v)가 되고 1.5%(w/v) 말토스를 함유하도록 변형시킨 배지에서 코르니에박테리움 디프테리아 (Cornyebacterium diphtheria)를 배양하였다.

듀브내에서 24사간 종자를 표면 배양한 후, 표면 배양물을 250㎖ 용적이 되도록 500㎖ 어렌마이어 플라스크내에 접종하고, 200rpm으로 회전하는 테이블위에 서 3일 동안 35℃로 이를 항온처리 하였다.

여과하여 박테리아를 제거함으로써 독소를 정화시키고 한외여과(50,000MW 컷-오프)하여 최초 용액의 1%로 농축시킨후, 최초 용적의 절반이 되는 용적의 PBS로 세척하였다. 세파덱스 G-100 컬럼상에서 최종적으로 정제시킨 결과, 순도가 2200Lf/㎎ 단백질 질소를 얻었다. 이 공정은 콕스(Cox, 1975)에 의해 상세히 기술된 바있다. 최종 농도가 각각 0.3% 및 0.9%(w/v)로 되도록 포름알데히드 및 리신 용액을 첨가하고 37℃에서 4주 동안 방치하여 톡소이딩을 진행시켰다.

데타누스 톡소이드에 대해 전술한 바와 같은 알루미늄염 애쥬번트에 디프테리아 톡소이드를 흡착시키고 전술한 바(실시예 1)와 같이 알루미늄염 흡착된 디프 테리아 톡소이드의 수성 현탁액을 분무 건조시켰다.

실시예 3

속방형 보툴리눔 C & D 백신의 제조

스턴(Sterne, 1958) 장치로 부터 기조한 셀로판-쌕(sac) 장치내에서 클로 스트리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum) 균주 C & D를 배양하였다. 쌕외부의 생장 배지는 투석 쌕내에서 PBS로 평형화시켜 변형시킨 콘 스팁(corn steep)배지였다. C, 보툴리눔의 종자 배양물의 PBS 내로 접종시키고 혐기성 조건하에서 18 일 동안 37℃로 항온처리하였다. 투석 쌕의 내용물을 수거한 후, 원심분리시켜 세포를 제거하고, 최종 농도가 0.5%(w/v)로 되도록 포름알데히드를 첨가했다. 37℃에서 톡소이딩이 완전히 일어날 때까지(7-14일) 방치한 후, 문헌 "British Pharmacopoeia-Veterinary (1985)"에 기술된 방법으로 효능을 측정하였다.

보툴리눔 톡소이드 유형 C 및 D를 퀼(Quil) A (Superfos)와 혼합하고 테타누스 톡소이드에 대해 전술한 바(실시예1)와 같이 분무 건조시켰다.

실시예 4

보르데텔라 페르투시스 유래된 PTD 속방형 백신의제조

진탕 플라스크내에 1㎎/㎖의 2,6-디메틸 β시클로덱스트린이 함유되도록 변 형시킨 스테이너 앤드 숄테 배지(Stainer & Sholte, 1970)에서 보르델텔라 페르투시스(Bordetella pertussis)를 배양하였다. 180rpm으로 서서히 교반하면서 37℃에서 42시간 동안 프라스크를 항온처리한 결과 세포 밀도가 2.0x1010 유기체/㎖ 정도로 되었다.

여과에 의해 정화시킨 후, 배양 상층액에서 페르투시스 독소(PTX)를 정제하였다. 세쿠라의 그의 동료(Sekura et al., 1985)에 의해 기술된 바와 거의 동일한 친화 크로마토그래피에 의해 아시알로페투인에 PTX가 특이적으로 결합되면 세척한 후, 50mM 트리스/4M 우레아 완충액(pH 9.0)으로 용출 시켰다.

2.5mM 글루타르알데히드의 존재하에 4℃에서 48시간 동안 pH 9.6으로 PTX를 톡소이딩시킨후, 9mM 리신을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 이 방법의 주요 내용은 오스트레일리아 특허 명세서 제601415호(71581/87)에 기술되어 있다. 전술한 바와 같은 방법으로 알루미늄염 애쥬번트에 생성된 페르투시스 톡소이드 (PTD)를 흡착시키고 분무 건조시켰다.

실시예 5

지연 방출형 테타누스 독소의 제조

A. 유화액 공정

버밍햄 폴리머스 리미티드(Birmingham Polymets Ltd., 미국 알라바마주 버밍행 소재)로부터 폴리락티드와 폴리글리콜드(PLG)의 50:50 및 85:15 공중 합체 및 폴리락트산 (PLA)의 동종 중합체를 입수하였다. 용해도가 10% w/v로 되도록 클로로포름 또는 트리클로로에틸렌 5부와 1,1,2-트리클로로에탄 3부의 혼합 액중에 상기 공중합체를 용해시켰다. 상기 중합체 용액 각각의 경우에 대해 다음과 같은 방법으로 유화액을 제조하였다.

(a) 중합체 용액 93부에 대두 레시틴 1부 및 알루미늄염 흡착된 테타누스 톡소이드의 수성 현탁액 6부를 첨가하는 방법, 또는

(b) 중합체 용액 88부에 트위 80 및 스판 85의 1:5 혼합물 1부 및 알루미늄염 흡착된 테타누스 톡소이드의 수성 현탁액 11부를 첨가하는 방법.

알루미늄염 흡착된 테타누스 톡소이드의 수성 현탁액을 제조하는 방법은 상기 실시예 1에 기술되어 있다. 초음파 프로브 또는 고속 배합기(예, 실버손 배합기)를 이용하여 혼합물을 격렬히 교반한 결과 농도와 형태가 밀크와 같은 안정한 유중수형 유화액이 생성되었다. 40/100/120 원형 노즐이 장착된 드라이텍 컴펙트 레보레이토리 스프레이 드라이어를 이용하여 30psi의 분무압 및 35℃의 분출구 온도에서 상기 유화액을 분무 건조시켰다. 생성된 미소구의 크기 범위는 직경이 30㎛정도인 바, 자유 유동 분말 형태로 수거되었다. 진공 증발로 미량의 잔류 유기 용매를 제거하였다. 다음의 변동 사항을 고려하여 다수의 제제를 만들었다:

(a) 중합체 선택 - 50 : 50 PLG

85 : 15 PLG

PLA

(b) 애쥬번트 선택 - 수산화 알루미늄

- 인산 알루미늄

(c) 안정화제 선택 - 0,0.5 및 5.0% 트레할로스

B. 현탁액 공정

상기 A부에서 기술한 방법으로 중합체 용액을 제조한 후, 실시예 1에서 기 술한 방법으로 제조한 미립 속방형 알루미늄염 흡착된 테타누스 톡소이드의 미소구 를 최종 1% w/v 현탁액이 되도록 첨가하였다. 혼합물을 충분히 교반시켜 균질한 현탁액으로 유지시키고, 입자 크기가 30㎛ 정도로 되도록 A 항에서 기술한 방법으로 분무 건조시켰다. 몇몇 실험에서는, 알루미늄염 애쥬번트 부재하에 소형 미소구로 분무 건조되 테타누스 톡소이드를 유사한 방법으로 중합체 용액중에 현탁시키고, 대형 미소그를 전술한 방법으로 분무 건조 시켰다.

실시예 6

유화액 공정에 의한 지연 방출형 보툴리눔 C & D 백신의 제조

PLG의 50:50 및 85:15 공중합체와 동종 중합체 PLA를 디클로로메탄중에 10% w/v로 용해 시켰다. 이들 중합체 용액 각각에 대해 다음과 같은 방법으로 유 중수형 유화액을 제조하였다:중합체 용액 88부에 트윈 80과 스판 85의 1:5 혼합물 1부, 및 보툴리눔 C 및 D 톡소이드와 퀼(Quil) A의 수정 혼합물 11부를 첨가하였다. 고속 배합기를 사용하여 이 혼합물을 격렬하게 교반한 직후, 60/100/120 노즐이 장착된 드라이텍 컴팩트 레보레이토리 스프레이 드라이어를 이용하여 15psi의 분무압과 65℃의 유입구 온도에서 분무 건조시켰다. 생성된 미소구의 크기 범위는 직경이 20㎛ 정도인바, 자유 유동 분말 형태로 수거하였다. 진공 증발시켜 미량의 잔류 유기 용매를 제거하였다.

실시예 7

삽입물내로 미소구 혼입

본 발명의 미소구형 입자는 특히 가축 및 애완 동물의 피하 조직내로 삽입하 기 위한 삽입물내에서 형성시킬 수도 있다. 이 방법은 간단하고 용이하게 패키지된 장치로 다수의 미소구를 전달할 수 있다는 잇점이 있다. 삽입물은 백신이나 활성 면역원의 종류에 따라 요구되는 방출 형태를 제공하도록 "속방형 미소구","지연 방출형 미소구"또는 지연 방출형과 속방형 미소구 양자 모두의 한정된 혼합물을 함유할 수 있다. 이들 삽입물은 보통 원통형 이며 표준 약학 정제화 과정에 의해 제조 된다. 인산 컬슘, Emcompress® 락토스. 덱스트로스. 리신 및 마그네슘 스테아레이트 같은 각종 부형제를 압착 및 정제화 과정중에 첨가할 수도 있다. 또한 삽입시 미소구의 분산 특성을 중대시키기 위해 붕해제(예, 나트륨 스타치 글리콜레이트; Explotab®) 같은 기타 부형제를 첨가할 수도 있다. 삽입물의 크기는 투여분당 욕되는 미소구의 양에 따라 달라질 수 있으나 통상 직경 2-4㎜ 및 길이 3-10㎜ 범위이다. 삽입후 활성 면역원의 방출을 가속시키거나 지연시키기 위해 삽입물에 추가로 중합체 피복제를 적용할 수도 있다.

실시예 8

A. 백신 제제의 시험

(a) 생체외 시험

초종 농도가 10% w/v인 구연산나트륨을 함유하는 식염수중에 2㎎ A1P04/㎖로 희석시켜 인산 알루

미늄겔을 용해시켰다. 밤새 또는 완전히 투명해질 때까지 시료를 37℃에서 항온처리하였다. 이러한 처리 결과 생성된 수용액은 후술하는 분석에 필요한 사전 결합된 단백질 분자를 제공하였다.

테타누스 프로토톡신

자가분해 시행에 앞서 수거된 클로스트리디움 테타니의 세포로부터 추출하여 정제된 테타누스 프로토톡신을 생성하였다. 접종후 72 내지 90시간에 세포를 수거 하고 즉시 4℃에서 냉각하며 후속 공정을 수행하는 동안 상기 온도를 유지시켰다. 10.000g에서 25분 동안 배양물을 원심분리하고 0.15M NaC1에서 2회 세척한 후, 1mM페닐메틸설포닐 클로라이드(PMSF), 1㎎/㎖ 펩스타틴 및 1㎎/㎖ 류펩틴을 함유한 1M NaC1, 0.1M 구연산 나트륨(pH7.5)중에 최초 용적의 1/30으로 재현탁시켰다. 16시간 후, 원심분리에 의해 세포 잔류물로부터 추출 프로토톡신을 분리해냈다. 침전시키고 40% 포화 황산 암모늄으로 세척한 후, 1mM PMSF, 1㎎/㎖ 펩스타틴 및 1㎎/㎖ 류펩틴을 함유한 0.1M 인산염 완충액(pH6.8)중에 재현탁 시킴으로써 초기 프로토톡신 정제과정을 수행하였다. FPLC의 음이온 교환 컬럼에서 상기 완충액을 사용하여 최종 정제과정을 수행하였다.

디프테리아 톡신

실시예 2에 기술된 방법으로 디프테리아 톡신을 정제하엿으며 2200Lf/mg 단백질 질소의 순도를 얻었다.

보툴리눔 C 및 D 톡신

여과에 의해 보툴리눔 독소를 정화시킨 후, 농축시키고 한외여과(50,000 MW 컷-오프)하여 부분 정제시켰다.

보르데델라 페르투시스 PTX

실시예 4에 기술된 방법으로 PTX를 정제하였다. 최종 순도는 99%를 초과 하였다.

효소 면역분석

정제된 항원을 0.05M 중탄산 나트륨 완충액(pH9.6)중에서 10㎍/㎖(대략 5Lf/㎖)로 희석하고 이를 사용하여 4℃에서 반새 폴리스티렌 평판(Maxisorb/NUNC, 덴마크)을 코팅하였다. 상기 항온처리 과정 말기에 내용물을 흡인하여 수집하고, 20℃에서 1시간 동안 0.01M 인산염 완충 식염수(PBS) pH7.2 중에 카세인을 용해시킨 용액(1㎎/㎖)으로 웰을 후처리 피복하였다. 내용물을 재차 폐기 처리하고, 안정화 용액으로 웰을 세정한 후, 평판을 건조시키고 밀봉된 금속 호일 자루에 보관하였다.

모든 혈청 희석과정은 카제인을 함유하는 PBS 트윈 희석제인 블루 희석제 (CSL, 오스트레일리아)중에서 수행하엿다. 시험 시료를 20℃에서 60분 동안 항원 처리하고(0.1/㎖ 웰), PBS 트윈으로 6회 세척한 후, 말 래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-결합된 양 항-생쥐 Ig, 양 항-말 Ig 또는 토끼 항-양 Ig와 함께 유사한 방법으로 항온처리하였다. H_2O_2 및 테트라메틸 벤지딘을 함유하는 기질 용액 0.1m/웰을 첨가 하여 퍼옥시다제 활성도를 측정하였다. 실온에서 5분후, 0.05㎖/웰에 0.5M H_2SO_4를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 자동 EIA 평판 판독기로 450nm에서의 흡광도값을 측정하였다. 모든 평판에 대해 115 IU/㎖의 보조 표준 혈청을 적정하였다.

(b) 생체내 시험

0.1 내지 1.0Lf 테타누스 톡소이드, 1㎍의 디프테리아 톡소이드 및 1㎍의 PTD 전체를 어린 마우스에게 피하 투여했다. 일정한 시간 간격으로 마우스가 눈물을 흘렸으며, 전술한 효과적인 분석법을 이용하여 EIA으로 마우스의 혈청 항체레벨을 시험하였다.

2cpu/투여분의 보툴리눔 C 톡소이드, 21.8cpu/투여분의 보툴리눔 D 톡소이드 및 0.4㎎의 퀼 A를 함유하는 2가 보툴리눔을 양에게 투여했다.

10Lf/ 투여분의 테타누스 톡소이드를 말에게 근육내 경로로 투여했다.

B. 속방형 제제에 대한 결과

표 1은 실시예 1의 방법으로 제조한 미소형의 속방형 백신 제제에 대한 생체외 및 생체내 시험 데이타를 나타낸 것이다. 그룹 7은 양성 대조군이며; 역가 100을 기준으로 간주한다. 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄에 흡착된 테타누스 톡소이드와 함께 5% 트레할로스를 포함시킨 결과, 생체외 활성도가 높게 유지되고 면역원성이 감소되지 않는 미소구가 형성되었음을 알 수 있었다(그룹 2 및 6)

[표 1]

그룹	투여분	중간 역가	% EIA 활성도
1	TT-$AlPO_4$ s/d	100	3.9
2	TT-$AlPO_4$ s/d + 5% 트레할로스	1500	70.2
3	TT-$AlPO_4$ s/d + 5% 글루코사민	1150	74.3
4	TT-$AlPO_4$ s/d + 5% 락토스	900	74.4
5	TT-$Al(OH)_3$ s/d	100	테스트 안됨
6	TT-$Al(OH)_3$ s/d + 5% 트레할로스	1550	테스트 안됨
7	TT-$AlPO_4$ 현탁액	1540	100
8	TT-$Al(OH)_3$ 현탁액	1600	테스트 안됨
9	TT s/d	100	67.0

표 2는 마우스에 대해 미소구형의 속방형 디프테리아-톡소이드(DT) 및 보르데텔라 페르투시스 PTD 백신을 생체내 시험한 데이타를 나타낸 것이다. 모든 경우에 있어, 건조시 손실이 일어나지 않는다는 가정하에서, 동일 투여 레벨로 제공시, 건조시킨 극미립 백신이 이것으로부터 제조한 액상 백신만큼 최소한 면역원성이 낮았다.

[표 2]

그룹	백신	항체 중간 역가(주)					
		2	4	8	12	16	20
1	DT-$AlPO_4$ 건조	1600	850	700	530	500	200
2	액상	500	테스트 안됨	500	240	190	130
3	PTD-$AlPO_4$ 건조	150	430	190	45	60	40
4	액상	40	190	테스트 안됨	테스트 안됨	52	36

표 3은 말에 대해 미소구형의 속방형 테타누스 백신을 생체내 시험한 데이타 를 나타낸 것이다. 결과는 2차 투여 4주후에 측정한 두 번째 역가를 나타낸 것이 다(투여는 4주 간격으로 이루어졌음). 모든 말은 1차 면역 4주후에 혈청음성을 나타내었다. 건성 백신으로 추가 자극시킨 말(말 1, 2 및 7)이 액상 백신으로 추가 자극시킨 말(말 8)보다 더 높은 평균 역가를 나타냈다.

[표 3]

번호	투여분(2차)	역가	
		4 주	8 주
1	건성 속방형 백신	무검출	500
2	건성 속방형 백신	무검출	7500
3	85:15 지연 방출형 백신*	무검출	100
4	85:15 지연 방출형 백신*	무검출	500
5	85:15 지연 방출형 백신*	무검출	400
6	85:15 지연 방출형 백신*	무검출	400
7	건성 속방형 백신	무검출	12500
8	액상 백신	무검출	1000
9	무	무검출	무검출
10	무	무검출	무검출

* 지연 방출형 성분은 1차 투여분과 함께 제공되었다.

표 4는 양에 대해 퀼 A가 애주번트로 보강된 미소구형의 속방형 보툴리눔 C & D 백신을 생체내 시험한 것이다. 그룹당 5마리의 동물에게 투여했다. 제2회 분의 건조시킨 속방형 백신이 12주 검사 기간 중에 2회분의 정상의 액상 백신과 동등한 결과를 나타낸다는 사실을 알 수 있었다(그룹 2 cf 그룹 1)

[표 4]

번호	투여분		항체 역가(유니트)		
	1°	2°	4 주	8 주	12 주
1	액상 백신	액상 백신	1.3	14.3	3.4
2	건성 속방형 백신	건성 속방형 백신	2.0	12.0	4.4
3	50:50 지연-방출형 백신	-	12.2	3.9	1.3
4	85:15 지연-방출형 백신	-	5.8	2.1	3.6
5	건성 속방형 백신 + 50:50 지연-방출형 백신	-	7.2	2.3	1.0
6	건성 속방형 백신 + 85:15 지연-방출형 백신	-	6.9	8.3	1.7

C. 지연 방출형 제제에 대한 결과

표 5는 미소구형의 지연 방출형 백신에 대한 생체내 시험을 나타낸 것이다. 음성 대조군인 그룹 1을 제외하고는 모든 생쥐에게 1Lf 테타누스 톡소이드를 투여 했다. 그룹 2는 양성 대조군(액상 알루미늄 흡착된 테타누스 톡소이드)이고 그룹 3은 비흡착된 항원이다. 그룹 4 내지 7은 현탁액 공정에 의해 제조하였으며, 그룹 8 내지 13은 유화액 공정에 의해 제조했다. 실질적인 지연 방출 반응은 특히 그룹 9, 11 및 13에서 관찰 할 수 있었다.

[표 5]

그룹 번호	백신	중간 항체 역가		
		2 주	4 주	8 주
1	무처리	100	100	100
2	TT-AlPhos 현탁액	2250	4200	5950
3	가용성 TT	350	300	400
4	50:50 PLG s/d TT	850	700	2500
5	50:50 PLG s/d TT-AlPhos	700	500	3950
6	85:15 PLG s/d TT	700	1350	1700
7	85:15 PLG s/d TT AlPhos	1450	1050	2700
8	50:50 PLG 액상 TT	900	1000	2950
9	50:50 PLG 액상 TT-AlPhos	700	1450	6300
10	85:15 PLG 액상 TT	550	550	1750
11	85:15 PLG 액상 TT-AlPhos	500	700	6900
12	100% PLA 액상 TT	550	450	4300
13	100% PLA 액상 TT-AlPhos	600	450	5350

s/d = 분무 건조

TT = 테타누스 톡소이드

표 6은 미소구형의 지연 방출형 백신에 대한 생체내 시험을 나타낸 것이다. 이들 백신은 항원 안정화제로서 트레할로스(5% w/v)를 이용하여 제조하였으며 투여분당 0.1Lf 테타누스 톡소이드를 생쥐에게 투여했다. 모든 백신은 단일 투여분으로 제공 했으며, 분석을 위해 지정된 시간에 채혈하였다. 그 결과 단지 액상이나 건조된 형태중 한 형태의 속방형 백신을 투여한 그룹의 경우(그룹 1 내지 3) 반응에서 침하가 일어난데 비해 모든 지연 방출형 백신의 경우 현저한 지연 방출 반응을 나타냈다.

[표 6]

그룹 번호	백신	노즐	중간 ELA 역가			
			2 주	4 주	8 주	12 주
1	TT-$AlPO_4$ 현탁액		100	100	100	100
2	TT-$AlPO_4$ 분무 건조	40/100/120	200	200	300	200
3	TT-$AlPO_4$ 분무 건조	60/100/120	250	200	150	100
4	무처리		100	100	100	100
5	50:50 PLG 중 TT-$AlPO_4$	40/100/120	750	1200	6750	1100
6	50:50 PLG 중 TT-$AlPO_4$	60/100/120	500	500	4650	450
7	85:15 PLG 중 TT-$AlPO_4$	40/100/120	500	700	2200	1650
8	85:15 PLG 중 TT-$AlPO_4$	60/100/120	550	600	2250	2400
9	100% PLA 중 TT-$AlPO_4$	40/100/120	500	800	900	600
10	100% PLA 중 TT-$AlPO_4$	60/100/120	350	800	1700	2100

주:모든 제제는 5% 트레할로스를 함유한다.

표 3은 말에서의 테타누스 톡소이드 백신의 결과를 나타낸 것이다. 속방형 백신을 1회 투여한 경우(말 9 및 10)는 8주의 연구 기간중에 말에게서 검출 가능 한 항체 레벨을 유도하는데 실패했음을 알 수 있었다. 반대로, 속방형 및 지연 방출형 성분 양자 모두를 함유하는 백신을 1회 투여한 말의 경우(말 3 - 6)는 지연 방출의 결과로서 8주째에 명확한 항체 역가를 나타냈다. 8주에서의 역가는 백신을 2회 투여한 말의 경우보다 높지는 않았으나 이 역가는 장기간 유지될 것으로 예상 된다.

표 4는 양에게 보툴리눔 C 및 D를 백신 접종한 결과를 나타낸 것이다. 단 독투여 경우(그룹 3 및

4) 및 속방형 백신을 함께 배합한 경우 양자 모두의 단일 투여분의 지연 방출형 백신은 12주째에 역가를 나타냈는데 이는 2회 투여분의 속방형 백신과 필적할 수 있을 만한 결과이며, 단일 투여분의 속방형 백신으로부터 예상 을 훨씬 능가하는 것이다. 이 결과가 중요한 것은 애쥬번트로서 퀼 A를 사용하여 얻어졌다는 사실이다.

실시예 9

분무 건조시키는 현탁액 공정에 의한 조절 방출형 백신의 제조

톡소이드 현탁액의 소량 시료, 통상 10㎖중 0.6 내지 1gm, 또는 60㎖ 중 1.6 내지 2gm을 사용하여 방법을 진행시키므로 본 방법에서는 표준 분무 건조기를 사용하지 않았다. 이렇게 소량을 처리하기 위해서 압전전기를 동력으로 하는 초음파 노즐을 사용하여 슬러리를 분무시키는 특별한 분무 건조기(Sono-Tek Corp Model 8700-120MS)를 사용하였다. 이러한 노즐의 잇점은 다량의 제2유액을 사용하지 않고서도 또는 소량의 재료 회수를 어렵게 하는 넓은 공간과 표면을 요구하는 고압을 사용하지 않고서도 소적을 만들 수 있다는 점이다. 이 장치에는 뜨거운 공기와 차가운 공기의 공급원 및 필터가 제공되어 있다. 뜨거운 공기는 분무된 수증기를 운반하여 물이 증발되도록 한다. 그후, 차가운 공기는 뜨거운 공기와 혼합된 후, 필터상에 건조된 시료가 수거된다. 직경 11㎝ 필터의 바닥이 진공 공급원에 연결되어 있다. 이 장치에는 3개의 열전쌍 온도계가 있는데, 하나는 노즐 근방의 상부에 있고, 다른 하나는 장치의 중간부에 있으며, 마지막 다른 하나는 필터에 있다.

2가지 유형의 시료 즉, (1) 각각의 병이 피로겐 유리수 12㎖중에 0.6g의 $A1PO_4$를 함유하는, $A1PO_4$ 상에 흡착된 30,000Lf 테타누스 톡소이드의 "포화" 제제 및 (2) 피로겐 부재수 60㎖중에 1.65g의 $A1PO_4$ 상에 흡착된 30,000Lf 테타누스 톡소이드의 "포화/3" 제제를 처리하였다. 두 시료 모두 멸균된 것이다. 교반 조건하에서 첨가하는 슬러리의 공급 속도는 1 내지 3㎖/분이었다. 120khz로 작동하는 노즐의 공급 전력은 약 7와트였다. 필터는 500cm^3/분으로 수은 진공과 차가운 공기중에서 6으로 설정되었다. 열전쌍 온도계 판독 결과 노즐 근방의 상부는 63 내지 86℃, 중간부는 83 내지 85 ℃, 그리고 회수용 필터 근방의 바닥은 46 내지 58℃였다.

생성물의 현미경 사진에 의하면, 보다 희석한 샘플의 경우 5 내지 20 미크론의 구이고, 보다 농축된 시료의 경우 10 낸지 30 미크론의 구인 것으로 나타났다. 고형분의 회수율은 40 내지 70% 범위였다.

"포화된" 시료로부터 얻은 생성물을 3부분으로 분할하여, 각각이 0.865g의 고체가 되게 하였다. 200㎖의 용매중에 각기 20gm의 중합체를 포함하는 세개의 용액을 제조하였다. 폴리(DL-락티드)(고유 점도 0.5g/d1에서 0.73) 및 85/15 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)(고유 점도 0.5g/d1에서 0.65)를 5부의 트리클로로에틸렌, 3부의 1,1,2-트리클로로에탄에 용해시키고, 50/50 폴리(DL-락티드-코-글리콜리드)(고유 점도 0.5g/d1에서 0.71)는 5부의 클로로포름 및 3부의 1,1,2-트리클로로에탄에 용해시켰다. 고체를 용액에 분산시키고 30분 동안 교반한 후, 20psi 에서 2중-유액 노즐(스프레잉 시스템즈, 유액 캡 40100, 에어 캡 120)을 사용하여 분무했다. 실온 공기로 분무하고 건조후 직물 필터 상에 회수하였다. 104 미크론 체로 입자를 분리해냈다.

"포화/3" 시료로부터 얻은 생성물을 거의 동일한 방법으로 처리하는데 단 이 경우에는 각각의 최종 분무 유류에 15gm의 시료를 이용하므로. 중합체에 대한 톡소이드 고체의 비율은 1.5 내지 20였으나 반면 "포화"의 경우는 0.965 내지 20였다.

실시예 10

분무 건조시킨 유화액 기술에 의한 폴리락티드 캅셀화 톡소이드의 제조

버밍햄 폴리머스, 인코오포레이티드(Birmingham Polymers, Inc.)에 의해 제공된 폴리(DL-락티트)(고유점도 0.73g/dl) 20g을 자기 회전 막대로 밤새 교반 하여 105㎖의 트리클로로에틸렌과 70㎖의 톨루엔 혼합물중에 용해시켰다. 나트륨 도커세이트(2.0gm)로도 공지된 나트륨 디옥틸 설포숙시네이트를 완전히 용해될 때가지 교반하면서 첨가했다. 알루미늄염 흡착된 테라누스 톡소이드의 포화 수성 현탁액(12㎖)을 묽은 유류 형태로 회전 막대를 사용하여 교반하면서 중합체 용액에 첨가했다. 또한, 초음파 프로브를 사용하여 안정한 유화액 제제에 필요한 전단력을 소량의 용액에 제공하였다. 주사기를 사용하여 분무 건조 챔버에 포함된 2-유액 분무 노즐로 혼합물을 대략 30㎖/분의 속도로 공급하였다. 분무 챔버의 유입구 온도는 주위 온도였으며 노즐 압력은 20psi로 조절하였다. 건조후 생성물을 분출구 필터 자루로부터 제거해냈다.

참고 문헌:

1. Cox, J.C. and Coulter, A.R. (1992), "Advances in adjuvant technology and application" in *Animal Parasite Control Utilising Biotechnology*, ed. W.K.Yong, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp49-112.

2. Eldridge, J.H., Hammond, C.J., Meulbroek, J.A., Staas, J.K., Gilley, R.M. and Tice, T.R. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches, *J.Control. Release*, 11, 205, 1990.

3. Eldridge, J.H., Staas, J.K., Meulbroek, J.A., McGhee, J.R., Tice, T.R. and Gilley, R.M. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol. Immunol.* 28, 287, 1991.

4. Kreuter, J. Large-scale production problems and manufacturing of nanoparticles, in *Specialized Drug Delivery Systems. Manufacturing and Production Technology*. Tyle, P., Ed., Marcel Dekker, New York, 1990, 257.

5. O'Hagan, D.T., Jeffery, H., Roberts, M.J.J., McGee, J.P. and Davis, S.S. Controlled release microparticles for vaccine development. *Vaccine* 9, 768, 1991.

6. Singh, M., Singh, A. and Talwar, G.P. Controlled delivery of diphtheria toxoid using biodegradable poly (D,L-lactide)microcapsules. *Pharm. Res.* 8, 958, 1991.

7. Bodmeier, R. and Cheng, H. Preparation of biodegradable poly(±) lactide microparticles using a spray-drying technique. *J.Pharm.Pharmacol*, 40, 754, 1988.

8. Cox, J. New methods for the large-scale preparation of diphtheria toxoid : Purification of toxin. *App. Microbiol.* 29, 464, 1975.

9. Sterne, M. The growth of *Brucella abortus* strain 19 in aerated dialysed medium. *J. Gen. Micro.* 18, 747, 1958.

10. British Pharmacopoeia-Veterinary (1985). Her Majesty's Stationery Office, London.

11. Stainer, D. and Sholte, M. A simple chemically defined medium for the production of Phase I *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Micro.* 63, 211, 1970.

12. Sekura, R.D., Zhang, Y.I. and Quentin-Millet, M-J.B. Pertussis toxin : Structural elements involved in the interaction with cells. Pertussis toxin. Ed. Sekura *et al.*, Academic Press, p.45, 1985.

(57) 청구의 범위

청구항 1

안정한 건성의 미립자 형태의 속방형 백신 제제에 있어서, 상기 입자가 알루미늄염 애쥬번트(adjuvant)에 흡착된 면역원을 포함하며, 분무 건조에 의해 제조된 미소구형 입자이고, 상기 백신 제제가 자유 유동성 분말인 것을 특징으로 하는 속방형 백신 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알루미늄염 애쥬번트가 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄인 속방형 백신 제제.

청구항 3

제1항에 있어서,

당 도는 당 유도체인 안정화제를 더 포함하는 속방형 백신 제제.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 안정화제가 트레할로스, 락토스, 덱스트로스 및 글루코사민으로 구성된 그룹중에서 선택된 것인 속방형 백신 제제.

청구항 5

알루미늄염이 흡착된 면역원의 수성 현탁액을 형성시키고, 이후 상기 현탁액을 분무 건조시키는 단계를 포함하여, 제1항의 속방형 백신 제제를 제조하는 방법.

청구항 6

안정한 건성 미립자 형태의 , 조절 방출형 또는 지연 방출형 백신 제제에 있어서, 상기 입자가 각기 구별되는 하나 이상의 면역원 함유 부위들을 포함하고, 그 면역원 부위는 애쥬번트를 포함하는 생체분해성 중합체의 연속 매트릭스를 함유하며, 또한 그 입자는 분무 건조에 의해 제조한 미소 구형 입자이고, 상기 백신 제제는 자유 유동성 분말인 것을 특징으로 하는 조절 방출형 또는 방출형 백신 제제.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 면역원 함유 부위들이 알루미늄염 애쥬번트에 흡착된 면역원을 함유한 입자를 포함하는 조절 방출형 또는 방출형 백신 제제.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 생체분해성 중합체가 폴리락트산, 폴리글리콜산 및 이것의 공중합체로 구성된 그룹중에서 선택된 것인 조절 방출형 또는 방출형 백신 제제.

청구항 9

생체분해성 중합체가 연속 유기상중에 면역원과 애쥬번트를 포함하는 수성 현탁액의 유화액을 형성시키고, 이후 이 유중수형 유화액을 분무 건조 시켜 미소구형 입자를 형성시키는 단계를 포함하여, 제6항의 조절 방출형 또는 방출형 백신 제제를 제조하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 유화액이 유화제를 포함하는 방법.

청구항 11

생체분해성 중합체가 용해된 연속 유기상중의 면역원 함유 미립자 물질과 애쥬번트의 현탁액을 형성시키고 이후, 이 현탁액을 분무 건조시켜 미소구형 입자를 형성시키는 단계를 포함하여 제6항의 조절 방출형 또는 방출형 백신 제제를 제조하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 면역원 함유 미립 물질이 알루미늄염 애쥬번트에 흡착된 면역원을 포함하는 방법.

청구항 13

약학적으로 또는 수의학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께, 제1항 내지 제3항 및 제4항중 어느 하나의 항에 따른 적어도 1종의 속방형 백신 제제를 포함하는 백신 조성물.

청구항 14

약학적으로 또는 수의학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께, 제8항, 제7항 및 제8항중 어느 하나의 항에 따른 적어도 1종의 조절 방출형 또는 지연 방출형 백신 제제를 포함하는 백신 조성물.

청구항 15

(i) 제6항, 제7항, 제8항중 어느 하나의 항에 따른 하나 이상의 조절 방출형 백시 제제 또는 지연 방출형 백신 제제 및

(ii) 제1항 내지 제3항 및 제4항중 어느 하나의 향에 따른 하나이상의 속방방출형 백신 제제 및 약학적 또는 수학적 허용 담체 또는 희석제를 포함하는 배신 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 속방형 백신 제제가 알루미늄염 애쥬번트에 흡착된 면역원을 포함하는 백신 조성물.

청구항 17

제13항에 있어서.

비경구 투여에 적합한 형태인 백신 조성물.

청구항 18

제13항에 있어서,

상기 담체가 고형담체이고, 상기 백신 조성물이 고형 환제 또는 삽입물의 형태인 백신 조성물.

청구항 19

제13항내지 18항중 어는 한 항에 따른 백신 조성물을 인체를 제외한 동물 환자에게 투여하는 것을 포함하여 그 환자를 백신 접종시키는 방법.

청구항 20

제14항에 있어서,

비경구 투여에 적합한 형태인 백신 조성물.

청구항 21

제14항에 있어서,

상기 담체가 고형 담체이고, 상기 백신 조성물이 고형 환제 또는 삽입물의형태인 백신 조성물.

요약

본 발명은 안정한 미립 형태의 백신 제제에 관한 것이다. 속방형 백신 제제는 알루미늄염 애쥬번트에 흡착된 면역원을 포함한다. 제어-방출형 또는 지연-방출형 제제는 불연속적인 면역원-함유 부위를 포함한 생체분해성 중합체의 연속성 매트릭스를 함유하는 미소구형 입자를 함유한다.