(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 39/395

(45) 공고일자 2004년02월11일
(11) 등록번호 10-0404312
(24) 등록일자 2003년10월22일

(21) 출원번호	10-1997-0708265	(65) 공개번호	10-1999-0014919
(22) 출원일자	1997년11월18일	(43) 공개일자	1999년02월25일
번역문제출일자	1997년11월18일		
(86) 국제출원번호	PCT/FR1996/000791	(87) 국제공개번호	WO 1996/37222
(86) 국제출원일자	1996년05월24일	(87) 국제공개일자	1996년11월28일
(81) 지정국	국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 북한 대한민국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국		

(30) 우선권주장 95-06417 1995년05월24일 프랑스(FR)

(73) 특허권자 파스퇴르 메리오 세룸 에 박신
프랑스공화국 F-69007 리용, 아베뉴 레콜레르, 58
(72) 발명자 알미뇽 프랑소와
프랑스공화국 F-69004 리용, 블레바르 드 라 크로와-루쎄, 17
까띠에르 쟝-르네
프랑스공화국 F-69005 리용, 루 졸리오-꾸리에, 55
(74) 대리인 백남훈, 허상훈

심사관 : 김희진

(54) 폴리리보실리비톨포스페이트를함유한백신조성물과이들의제조방법

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 백신 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐이나 또는 파상풍 아나톡신과 결합된 고분자량의 폴리리보실리비톨 포스페이트로 이루어진 최소 1 종 이상의 항원을 포함하고 있는 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

<2> 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입에 의한 감염을 예방하기 위한 인체용 예방백신으로 사용될 수 있는 항원은 이미 공지되어 있다. 특히 라첼 쉐니얼슨 등(Rachel Schneerson et al, Infect. Immun. May 1986)이 발표한 "헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입과 폐렴구균 6A 타입의 다당류 캡슐의 파상풍 독소 접합체에 의해 성인에게서 유발된 혈청 항체에 대한 정성 및 정량분석"이란 논문에 이미 잘 나타나 있다. 여기서의 항원은 세균들의 다당류 캡슐, 즉 담체 단백질인 파상풍 아나톡신과 결합되어 T-의존적인 폴리리보실리비톨 포스페이트(이하, "PRP"라 한다.)로 형성되어 있다. 이 논문에 따르면, 어린 리서스 원숭이들에 대하여 수행한 실험결과, 항원이 수산화알루미늄과 결합된 경우 면역반응이 보다 강력하고 동시에 보다 빠른 속도로 일어난다는 사실을 보고하고 있다. 그러나, "18 ~ 23 개월된 어린이에게 수행한 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐 단독처리 경우와 파상풍 독소가 결합된 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐에 대한 임상 및 면역 반응"[Bo A. Claesson and al, The Journal of Pediatrics, May 1988]이라는 또다른 논문에서는 수산화알루미늄에 흡착된 이러한 항원을 염용액에서 보관하면 다당류가 더욱 분해되기 때문에 면역력이 더욱 떨어진다는 사실을 보고하고 있다.

<3> 이러한 PRP-T의 안정성 문제를 해결하기 위한 방법으로 종래에는 이들을 동결건조시키는 방법이 개시되어 있다. 그러나, 이런 동결건조 방법은 비록 항원이 장시간동안 자신의 면역 특성을 유지할 수 있다 하더라도, 이들의 제조공정상 상기 용액을 동결건조하는 등의 여러 조건을 수행하므로써 생산공정을 복잡하게 할뿐만 아니라 그로 인해 단가를 높히는 등의 여러 문제점을 야기시킨다. 또한, 투약시에는 다시금 동결건조물에 액체를 첨가시켜야 하는 바, 이에 처치의사에게 부수적인 제약을 가하게 되고, 어떠한 처치에서는 생명에 위험을 초래하게 된다.

<4> 또한, 약간의 액체 백신조성물은 알루데늄계 부형제에 흡착된 항원을 지니고 있으며, 이는 면역성을 잃지 않은 상태로 PRP-T에 의해 형성된 항원을 첨가할 수 있다는 점에서 장점을 지니고 있다. 그러

나, 종래 기술에서 특별히 주사제로서 제안된 액체 백신 조성물은 투약시에만 혼합사용하는 두 성분(첫번째 성분은 동결 건조 형태의 PRP-T, 그리고 두번째 성분은 물에 현탁된 형태의 항원)으로 구성되어 있으며, 따라서 이러한 용액은 생산 원가 또는 실제 처치의사 경우에 만족스럽지 못한 문제점이 있다.

<5> 따라서, PRP-T로 형성된 항원을 포함하고 있는 액체 백신 조성물이 장시간의 경과에도 매우 좋은 면역성을 유지할 수 있으면서 동시에 이 백신 조성물의 제조공정상 생산 원가를 최하로 줄일 수 있는 것이 바람직하다.

발명의 상세한 설명

<6> 이러한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알루미늄계 부형제 뿐만 아니라 파상풍 아나톡신과 결합된 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐이나 또는 고분자량의 폴리리보실리비톨 포스페이트로 이루어진 최소 1 종 이상의 항원을 포함하고 있는 백신 조성물에 있어서, 상기 알루미늄계 부형제는 대략 7.2 이하의 영점전하(point of zero charge; PZC)를 갖는 것을 그 특징으로 한다.

<7> 이러한 조건하에서 액체 매질내에서의 PRP-T가 장시간 경과 후에도 매우 우수한 면역 특성을 유지할 수 있다는 것은 주목할 만한 일이다.

<8> 따라서, 본 발명은 음이온이 부가된 수산화알루미늄이 함유된 알루미늄계 부형제에 그 특징이 있다. 이로써, 액체 매질내에 PRP-T를 보관하는 동안에도 매우 우수한 면역 특성을 유지하게 되는 백신용으로 아주 적합한 부형제를 사용할 수 있다.

<9> 또한, 본 발명은 포스페이트 또는 시트레이트 중에서 선택된 음이온에 또다른 특징이 있다.

<10> 이로써, 본 발명의 백신 조성물은 백신 투약시에 필수적으로 요구되는 모든 안전 사항들을 지닌다.

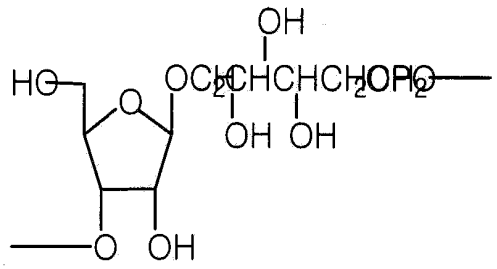
<11> 또한, 본 발명에 따른 백신 조성물에 디프테리아(diphtheria), 파상풍(tetanus), 백일해(whooping cough), B형 간염(hepatitis B) 및 회백수염(poliomyelitis) 중에서 선택된 하나 이상의 백신 결합가(vaccine valency)를 추가적으로 함유시키는 것도 본 발명에 포함된다. 이렇게 함으로써, 처치의사의 별도의 부수적인 조작없이 몇몇 종류의 질병을 동시에 예방할 수 있도록 여러 종류의 항원을 포함하고 있는 안정한 액체 백신 조성물을 제조할 수 있으며, 따라서 생산원가 및 소비자의 경우 약국 방문횟수를 줄일 수 있어 보다 경제적인 잇점이 있다.

<12> 또한, 본 발명은 파상풍 아나톡신과 결합된 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐이나 또는 고분자량의 폴리리보실리비톨 포스페이트로 이루어진 최소 1 종 이상의 항원을 포함하고 있는 백신 조성물을 제조하는 방법에 있어서, 상기 백신 조성물에 부형제로서 대략 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체를 현탁 첨가하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

<13> 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

<14> 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐로 이루어진 항원은 리보오스, 리비톨 및 포스페릭 엑시드로 구성된 다음 화학식 1로 표시되는 단량구조(monomeric structure)의 선형 중합체이다:

<15> [화학식 1]



<17> 본 발명에 따른 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐은 상기와 같은 구조의 단량체를 100 개 이상 지니고 있으며, 그 분자량은 500,000 내지 1,000,000이다.

<18> 이러한 항원을 파상풍 아나톡신으로 이루어진 담체 단백질과 연결시켜 어린이들에게 T-세포성 면역 반응을 유도한다.

<19> 예를 들면, 이러한 항원은 라첼 쉐니얼슨 등[Rachel Schneerson et al, Infect. Immun. 52: 519 (1986)]이 발표한 "헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입과 폐렴구균 6A 타입의 다당류 캡슐의 파상풍 독소 접합체에 의해 성인에게서 유발된 혈청 항체에 대한 정성 및 정량분석"이란 논문에 설명된 방법에 따라서도 얻을 수 있다.

<20> 그러나, 본 발명은 많은 수의 단량체로 이루어진 다당류들, 담체 단백질의 특성, 그리고 이들 다당류와 담체 단백질 사이의 연결 특성과 같은 이러한 항원에 적절한 특징들 때문에 매우 좋은 면역성과 같은 특이한 성질을 나타내게 되는 것이다.

<21> 대략 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체를 사용하면 액체 매질내에서도 장시간 동안 상기와 같은 성질을 계속 유지할 수 있다. 즉, PRP-T가 상기한 알루미늄 복합체와 결합되면 액체 매질내에서 장시간 보관하여도 상기와 같은 면역성을 계속 유지할 수 있으며, 이러한 면역성은 PRP-T가 알

루미늄 복합체상에 고정화되는 정도에 따라 결정된다.

<22> 알루미늄 복합체의 영점전하(PZC)는 단백질의 등전점과 동일한 의미를 나타낸다. 즉, 영점전하(PZC)란 알루미늄 복합체 표면의 전하량이 0인 pH 값을 말한다. 사실 이러한 영점전하(PZC)는 전기영동에 기초적인 방법을 이용하여 제타 포텐셜(zeta potential)을 측정함으로써 알 수 있다. 이때, 측정 도구로는 DELSA 440(Coulter Electronics, Hialeah, F1, USA.)을 사용한다.

<23> 측정방법과 측정도구들은 상이할 수도 있으며, 얻어진 결과치 또한 마찬가지로 다양할 수 있다. 본 발명에서는 대략 7.2(이 값은 단지 개략적인 값이다.) 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체를 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에서는 원래부터 상기한 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체 뿐만 아니라 영점전하(PZC)를 7.2 이하로 낮출 수 있는 알루미늄 복합체도 사용할 수 있다.

<24> 원래부터 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체에 있어서, 백신 부형제 분야에서는 통상적으로 알루미늄 포스페이트를 지칭하지만, 화학적 관점에서는 상기 알루미늄 포스페이트 이외의 다른 염들도 포함한다.

<25> 예를 들면, 슈퍼포스 바이오섹터(SUPERFOS BIOSECTOR a/s)사에서 생산되는 ADJUFOS™ 상표의 알루미늄 포스페이트가 있다.

<26> 또한, PBS 완충액내에서 포타슘 및 알루미늄 설페이트에 대한 탄산나트륨 반응으로도 본 발명에 따른 알루미늄 복합체를 얻을 수도 있다.

<27> 이러한 알루미늄 복합체와 PRP-T가 완전히 또는 부분적으로 결합되어 있기만하면, 본 발명의 백신 조성물의 면역성은 장시간 동안 계속 유지된다.

<28> 또한, 본 발명에서는 사실상 7.2 이상의 영점전하(PZC)를 가지고 있으나 이를 변형시켜 전하량을 낮춘 알루미늄 복합체를 사용할 수도 있다.

<29> 백신 부형제 분야에서는 알루미늄 복합체가 수산화알루미늄으로부터 형성되는 것으로 공지되어 있지만, 화학적 관점에서 알루미늄 복합체는 수산화알루미늄으로부터만 형성되는 것은 아니다. 이러한 알루미늄 복합체는 슈퍼포스 바이오섹터(SUPERFOS BIOSECTOR a/s)에서 ALHYDROGEL™ 상표로 제공하고 있는 수산화알루미늄, 파스퇴르 메릭스사(PASTEUR MERIEUX S & V)에 의해 D.T. Coq™으로 상품화하여 부형제로 사용된 제품, 또는 머크사(MERCK)에 의해 Recombivax™로 상품화하여 부형제로 사용된 제품도 가능할 수도 있다.

<30> 본 발명에 따르면, 이러한 알루미늄 복합체는 음이온을 첨가하면 변형된다. 이러한 음이온들은 백신용으로 필수적인 안전요건들을 지니고만 있다면, 각기 다른 특성을 지닌 음이온을 첨가할 수도 있다. 본 발명의 목적에 특히 적합하기로는 시트레이트 이온이나 포스페이트 이온을 첨가하는 것이다. 여기서, 포스페이트 이온은 특히 모노포타슘 포스페이트, 디소듐 포스페이트 및 염화나트륨을 포함하고 있는 용액으로부터 제공되어진다.

<31> 또한, 본 발명에서는 포스페이트 이온 및 카보네이트 이온의 결합체와 같이 서로 다른 음이온의 결합체를 사용할 수도 있다.

<32> 본 발명은 알루미늄 복합체의 현탁액에 음이온을 먼저 첨가한 후에 PRP-T를 첨가하여 백신 조성물 용액을 제조하거나, 또는 PRP-T에 먼저 음이온을 첨가한 후 이를 알루미늄 복합체와 접촉시켜 백신 조성물을 제조할 수도 있다. 그러나, 본 발명은 편의상 부형제와 음이온을 접촉시키기 이전에 일정한 음이온을 포함하고 있는 용액내에 PRP-T를 현탁시키는 방법을 주로 사용하고 있다.

<33> 이때, 음이온은 사용될 알루미늄 복합체의 영점전하(PZC)를 대략 7.2 이하 값으로 낮출수 있을 만큼의 양을 첨가한다. 따라서, 이러한 음이온은 완충 물질에 의해 발생하는 음이온의 양 뿐만 아니라 알루미늄 복합체의 성질에 따라 다양하게 첨가한다. 이들 음이온의 양은 당해 기술 분야에 속하는 통상의 전문가라면 용이하게 결정할 수 있다.

<34> 이상에서와 같은 방법으로 액체 상태에서 안정한 백신 조성물, 즉 조성물내의 PRP-T가 계속하여 면역 특성을 유지하고 있는 백신 조성물을 얻을 수 있다.

<35> 또한, 음이온을 첨가하면 알루미늄 복합체상에서의 PRP-T 고정화가 감소되며, 따라서 원래 상태로 보전되고, 그럼으로써 자체의 면역성이 유지된다.

<36> 비록 선호되는 것은 아니나, 본 발명에서는 사실상 약 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체에 음이온을 첨가할 수도 있으며, 그 결과 영점전하(PZC)를 보다 낮출 수 있을 뿐만 아니라 알루미늄 복합체상에 PRP-T 고정화를 감소시킬 수 있다. 여기서, 고정화란 용어는 어떤 형태로든 연결되어 있어 원심분리후 상층액만을 따로 수집하는 경우 그 수집액내에 PRP-T가 포함되지 않도록 되는 것을 의미한다.

<37> 본 발명에 따른 백신 조성물은 PRP-T로 이루어진 백신 항원을 포함하고 있으며, 또한 디프테리아, 파상풍, 백일해(세포성 또는 무세포성), 회백수염, A형 간염, B형 간염 등의 예방을 위한 또 다른 백신 항원을 포함시킬 수도 있다. 사실, PRP-T 및 알루미늄 복합체와 함께 양립 가능한 모든 백신 조성물은 본 발명에 따른 백신 조성물의 성분이 될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라 제조한 액체 백신 조성물은 단 한번의 투약만으로도 몇몇 가지의 질병들을 함께 예방할 수 있는 장점을 가지고 있다. 특히, 본 발명은 어린 아이들에게 적합하다.

<38> 또한, 2, 4 및 6개월째에 이미 예방주사를 맞은 12개월된 어린 유아에게 본 발명에 따른 액체 백신 조성물을 예방접종하면, 이미 파스퇴르 메릭스사(PASTEUR MERIEUX Serums et Vaccins)에 의해 상품화된 TETRAct-HIB™을 가지고 똑같은 조건하에서 예방접종한 경우와 비교하여 보다 증가된 항-PRP-T 항체를

얻을 수 있게 된다.

<39> 실시예 1

<40> 다음과 같은 원료성분으로부터 백신 조성물을 제조하였다.

· 정제 파상풍 아나톡신(PTA) 1 백신 단위

정제 디프테리아 아나톡신(PDA) 1 백신 단위

백일해 세포 혼합물 15 OU (opacimetric unit)

· PRP-T(PRP의 무게로 표현됨) 12 ㎍

머티올레이트(Merthiolate) 43.75 ㎍

D.T Coq™내에 존재하는 것과 같은 수산화알루미늄(Al로 표현됨)

0.3 ㎎

· 포스페이트 30 ㎛ol

· 8.5% 수크로스를 함유한 10 ㎜ol 트리스(tris) 완충용액

0.125㎖

· 주사용 물 0.5㎖

<43> 모노포타슘 포스페이트, 디소듐 포스페이트 및 염화나트륨을 포함하고 있는 원료용액에 포스페이트 이온을 첨가하였다.

<44> 실시예 2

<45> 종래에 TETRAct-HIB™이란 이름으로 상품화된 백신과 면역성을 비교하기 위하여 상기 실시예 1에서 제조한 백신 조성물의 면역성을 어린 유아에게서 측정하였다. 이때, 종래에 상품화된 백신 조성물인 TETRAct-HIB™는 상기 실시예 1에서 제조한 백신과 똑같은 백신 결합가를 지니고 있으나, 백일해 세포 혼합물 뿐만 아니라 디프테리아 및 파상풍 아나톡신을 포함하고 있는 백신 조성물을 주사하기 바로 직전에 이미 동결건조되어 보호 유지된 PRP-T의 결합가를 재조정하여야 한다.

<46> 이러한 실험은 262명의 유아그룹을 이용하여 수행하였다. 262명 중 130명은 실시예 1에서 제조한 백신을 이용하여 예방접종하였고, 또다른 132명은 시판중인 TETRAct-HIB™를 이용하여 예방접종 실험을 수행하였다. 이때, 백신은 2, 6 및 12 개월째에 근육주사를 통해 투약하였다.

<47> 예방접종전, 항-PRP 항체의 GMT 역가는 본 발명에 따른 백신접종그룹과 선행기술에 따른 백신접종그룹의 두 그룹 모두에서 0.2 ㎍/㎖를 나타내었다; 그러나, 두 번째의 예방접종 후의 항-PRP 항체의 GMT 역가는 각각 1.9 및 1.4 ㎍/㎖이었으며, 세 번째 예방접종 후 항-PRP 항체의 GMT 역가는 각각 5.9 및 5.8이었다.

<48> 두 번째 예방접종 후, 접종받은 유아의 각각 98%(본 발명에 따른 백신 접종 경우) 및 93%(선행기술에 따른 백신 접종 경우)가 0.15 ㎍/㎖ 이상 수준의 항-PRP 항체를 보유하고 있었으며; 세 번째 예방접종 후 접종받은 유아의 항체 보유수준은 본 발명에 따른 백신의 접종 경우 100%까지 증가되었으며, 선행기술에 따른 백신의 접종 경우 99%의 유아가 항체를 보유하게 되었다.

<49> 세 번째 예방접종 후, 각 백신의 백신결합가(vaccine valencies) 각각에 결합된 항체의 양은 다음 표 1에 평균값으로 하여 나타내었다.

[표 1]

구 분	선행기술에 의한 백신	본 발명에 따른 백신
디프테리아(UI/㎖)	1.35	1.56
파상풍(UI/㎖)	5.1	4.9
백일해 응집역가 GMT	597	601
PRP(㎍/㎖)	5.8	5.9

<51> 12 개월된 유아에게 예방접종 주사후의 항체의 양은 다음 표 2와 같았다.

[표 2]

구 분	선행기술에 의한 백신	본 발명에 따른 백신
디프테리아(UI/㎖)	3.2	4.5
파상풍(UI/㎖)	12.0	11.5
백일해 응집역가 GMT	2447	2560
PRP(㎍/㎖)	19.4	32.6

<53> 사실 이미 18 개월전에 제조된 백신을 이용하여 12 개월된 유아에게 수행한 본 실험 결과들은 본 발명에 따라 제조한 백신 조성물이 안정하다는 사실을 보여주는 것이다. 즉, 이러한 결과들은 그 조성물 내의 각각의 항원이 여전히 면역성을 계속 유지하고 있다는 사실을 보여주고 있다.

<54> 또한, 똑같은 백신결합가를 갖고 있는 선행 기술상의 백신을 이용하여 얻은 예방접종 효과와 비교하여 본 발명에 따른 백신 조성물의 경우 명확히 보다 높은 예방접종 효과가 얻어졌다.

<55> 실시예 3

<56> 상기 실시예 1에서 제조한 것과 동일한 백신 조성물을 18 ~ 24 개월 동안 +4℃에 보관하였고, 그런 다음 104 명의 어린이에게 임상 실험을 하는데 사용하였다.

<57> 각 백신의 백신결합가 각각에 대하여 얻은 역가는 다음 표 3에 요약하였다.

[표 3]

구 분	예방접종 전	예방접종 후
디프테리아 G.M.T.	0.013	0.736
파상풍 G.M.T.	0.181	3.831
PRP G.M.T. ㎍/㎖	0.22	6.40

<59> 이와 같이, +4℃에서 장기간 보관한 후에도 본 발명에 따른 백신 조성물은 다른 백신용 항원은 물론 PRP-T에 관련된 면역 특성을 계속 유지한다는 사실을 보여주고 있다.

<60> 실시예 4

<61> 각기 다른 형태 및 다른 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체내에 각각 PRP/㎖당 20㎍의 농도로 PRP-T를 포함하고 있는 백신 조성물을 제조하였다. 이때, 알루미늄 복합체의 양은 백신 조성물내의 알루미늄 농도가 0.6g/ℓ가 되도록 하였다.

<62> 백신 조성물 1: PMsv.사에 의해 상품화된 D.T. Coq™ 이라는 상표명의 백신에서 사용된 것과 같은 수산화알루미늄으로 이루어진 알루미늄 복합체(PZC = 11.3).

<63> 백신 조성물 2: Merck.사에 의해 상품화된 Recombivax™ 이라는 상표명의 백신에서 사용된 것과 같은 수산화알루미늄으로 이루어진 알루미늄 복합체(PZC = 7.4).

<64> 백신 조성물 3: 염화나트륨과 트리소듐 포스페이트를 혼합하여 얻은 알루미늄 포스페이트로 이루어진 알루미늄 복합체(PZC = 6.2).

<65> 백신 조성물 4: 알룸(Alum)이라 불리는 산물로 이루어져 있으며 인산완충용액내에서 포타슘 및 알루미늄 설페이트와 탄산나트륨의 반응에 의해 얻어진 알루미늄 복합체(PZC = 5.4).

<66> 상기한 알루미늄 복합체들과 PRP-T를 포함한 현탁액을 단순히 혼합함으로써 백신 조성물을 얻었다.

<67> 실시예 5

<68> 상기 실시예 4에서 얻은 각기 다른 조성의 조성물을 가지고 마우스를 이용하여 면역성 실험을 수행하였다.

<69> 본 발명에 따른 조성물의 면역 안정성을 입증하기 위하여 우선, 백신 조성물을 37℃에서 2 주간 보관하는 등 변질조건을 보다 강화하여 보관하였다.

<70> 다음으로, 몸무게 22 ~ 24g 마우스에게 각각 2.5㎍의 PRP를 함유한 백신을 매일 0.5㎖씩, 첫째 날부터 14일째 되는 날까지 피하에 계속 투약하고 면역성 실험을 하였다.

<71> 그리고, 14일째 되는 날과 21일째 되는 날에 마우스의 혈액을 채취하였고, 혈액내 항체수준을 방사성면역분석법으로 측정하였다. 이때, 각각의 백신 조성물을 8마리씩의 마우스에 접종하였다.

<72> 그리고, 그 결과가 다음과 같다면 만족스러운 것으로 판단한다.

<73> · 21일째 되는 날에 혈액을 채취한 마우스 중 적어도 75%의 마우스가 0.5 이상의 역가를 갖는다.

<74> · 14일째 되는 날에 혈액을 채취하여 분석한 결과와 21일째 되는 날에 혈액을 채취하여 분석한 결과 사이에 유의성 있는 차이점이 나타난다.

<75> 상기에서 변질조건을 보다 강화한 후 얻은 결과가 만족스럽다면, 백신 조성물이 안정하다고 판단할 수 있는 것이다.

<76> 결과적으로 본 실험에서 얻어진 결과는 다음 표 4에 요약하고 있다.

[표 4]

구 분	PZC	면역 실험
백신 조성물 1	11.3	불만족
백신 조성물 2	7.4	불만족
백신 조성물 3	6.2	만족
백신 조성물 4	5.4	만족

<78> 이상에서와 같이, 알루미늄 복합체의 영점전하(PZC)가 산성 pH인 경우의 백신 조성물이 보다 안정하다는 사실을 알 수 있다.

<79> 실시예 6

<80> 실시예 4에서 제조한 각각의 조성물에 대하여 알루미늄 복합체상에 고정화된 PRP-T의 백분율을 조사하였다.

<81> 이 경우, 각각의 조성물을 원심분리하였고, 그런 다음 상층액만을 다로 수집한 후 그 상층액내에서 고정화되지 않은 PRP-T의 양을 효소결합면역흡착검사법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay;ELISA)이나 또는 방사성면역분석법(Radio-Immunological Assay; RIA)으로 측정하였다.

<82> 그리고, 고정화된 PRP-T의 백분율은 출발 백신 조성물내의 PRP-T 농도와 상기의 상층액내에서 측정된 PRP-T의 양사이의 차이로부터 결정할 수 있었다.

<83> 상기로부터 얻어진 결과는 다음 표 5에 요약하고 있다.

[표 5]

구 분	백신 조성물 1	백신 조성물 2	백신 조성물 3	백신 조성물 4
고정화율(%)	100	100	100	70

<85> 실시예 7

<86> 상기 실시예 4에서 제조한 백신 조성물 1에 포스페이트 이온을 첨가하여 변질시켰고, 농도 50 mmol/ℓ이 되도록 하였다. 이러한 백신 조성물의 변질조건을 보다 강화한 후, 마우스에게 대해 면역성 실험을 수행하였고, 만족스러운 결과를 얻어냈다.

<87> 이러한 조건하에서 제조한 백신 조성물에 대하여 알루미늄 복합체상에 고정화된 PRP-T의 백분율을 조사하였고, 그 결과 단지 20%의 PRP-T가 고정화되어 있었다.

<88> 실시예 8

<89> 상기 실시예 4에서 제조한 백신 조성물 1에 시트레이트 이온을 첨가하여 변질시켰고, 농도 200 mmol/ℓ이 되도록 하였다. 이러한 백신 조성물의 변질조건을 보다 강화한 후, 마우스에게 대해 면역성 실험을 수행하였고 만족스러운 결과를 얻어냈다.

<90> 이러한 조건하에서 제조한 백신 조성물에 대하여 알루미늄 복합체상에 고정화된 PRP-T의 백분율을 조사하였고, 그 결과 PRP-T는 더 이상 전혀 고정화되지 않았다.

<91> 실시예 9

<92> 상기 실시예 4에서 제조한 백신 조성물 2에 포스페이트 이온을 첨가하여 변형시켰고, 농도 20 mmol/ℓ이 되도록 하였다. 이러한 백신 조성물의 변질조건을 보다 강화한 후, 마우스에게 대해 면역성 실험을 수행하였고 만족스러운 결과를 얻어냈다.

<93> 이러한 조건하에서 제조한 백신 조성물에 대하여 알루미늄 복합체상에 고정화된 PRP-T의 백분율을 조사하였고, 그 결과 PRP-T는 더 이상 전혀 고정화되지 않았다.

<94> 실시예 10

<95> 상기 실시예 4에서 제조한 백신 조성물 3에 포스페이트 이온을 다른 양으로 첨가하여

변질시켰고, 알루미늄 복합체상에 고정된 PRP-T의 백분율을 조사하였다.

<96> 만일 백신 조성물내의 포스페이트 농도가 2 mmol/ℓ가 되도록 포스페이트 이온을 첨가하면, 고정화된 PRP-T는 10% 까지 감소하였다.

<97> 또한, 만일 백신 조성물내의 포스페이트 농도가 4 mmol/ℓ가 되도록 포스페이트 이온을 첨가하면, PRP-T는 더 이상 전혀 고정화되지 않았다.

<98> 이러한 백신 조성물의 변질조건을 보다 강화한 후, 마우스에게 대해 면역성 실험을 수행하였고 만족스러운 결과를 얻었다.

<99> 실시예 11

<100> 상기 실시예 4에서 제조한 백신 조성물 4에 포스페이트 이온을 첨가하여 변질시켰고, 농도 60 mmol/ℓ이 되도록 제조하였다.

<101> 이러한 조건하에서 제조한 백신 조성물에 대하여 알루미늄 복합체상에 고정화된 PRP-T의 백분율을 조사하였고, 그 결과 단지 30%의 PRP-T만이 고정화되어 있었다.

<102> 이러한 백신 조성물의 변질조건을 보다 강화한 후, 마우스에게 대해 면역성 실험을 수행하였고 만족스러운 결과를 얻어냈다.

<103> 실시예 12

<104> 다음과 같은 원료성분으로부터 백신 조성물을 제조하였다.

- 수산화알루미늄(Al로 표현됨) 0.25 mg
- PRP-T(PRP의 무게로 표현됨) 10 ㎍
- 정제 디프테리아 아나톡신(PDA) 1 백신단위
- 정제 파상풍 아나톡신(PTA) 1 백신단위
- 포스페이트 15 μmol
- 폴리오(Polio) 항원 타입 I 40 U
  타입 II 8 U
  타입 III 32 U
- 백일해 아나톡신 25 ㎍
  백일해 F-HA 25 ㎍
- 42.5% 수크로스를 함유한 50 mmol 트리스(tris) 완충용액 0.125㎖
- 주사용 물 qsp 0.5㎖

<107> 37℃에서 1 개월간 보관된 용액, 25℃에서 2개월간 보관된 용액, 그리고 4℃에서 6개월간 보관된 용액 뿐만 아니라 상기에서와 같은 조성으로 제조된 용액을 이용하여 마우스에 대하여 PRP-T에 관한 면역성 실험을 수행하였고, 그 결과 상기와 같은 환경에서도 PRP-T가 안정한 효과를 나타내는 만족스러운 결과를 얻었다.

<108> 실시예 13

<109> 다음과 같은 원료성분으로부터 백신 조성물을 제조하였다.

- 수산화알루미늄(Al로 표현됨) 0.3 ㎎
- PRP-T(PRP의 무게로 표현됨) 10 ㎍
- 정제 디프테리아 아나톡신(PDA) 1 백신단위
- 정제 파상풍 아나톡신(PTA) 1 백신단위
- 백일해 아나톡신 25 ㎍
- F-HA 25 ㎍
- 헤모글로빈 단백질(GenHevac B PASTEUR™ 백신내에 존재) 20 ㎍
- 폴리오(Polio) 항원 타잎 I 40 U
  타잎 II 8 U
  타잎 III 32 U
- 포스페이트 20 ㎛ol
- 카보네이트 5 ㎛ol
- 42.5% 수크로스를 함유한 50 ㎜ol 트리스(tris) 완충용액 0.125㎖
- 주사용 물 0.5㎖

<111> 상기에서와 같은 조성으로 제조된 백신 용액의 안정성을 확인하기 위하여 37℃에서 2 주간 보관한 다음 상기 실시예 5에서와 동일한 방법으로 마우스에 대하여 PRP-T에 관한 면역성 실험을 수행하였다. 그리고, 만족스러운 결과를 얻었다.

<112> 헤모글로빈 단백질에 대한 면역성 실험을 수행하였다. 이 실험은 마우스를 대상으로 하였으며, 효소결합면역흡착검사법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay;ELISA)을 이용하여 항-헤모글로빈 항체를 측정하였고, 그런 다음 중간유효량(ED_{50})을 측정하였다. 이때, 실험결과 만족스러운 것으로 여겨지려면 헤모글로빈 단백질이 0.970㎍ 이하여야 한다.

<113> 상기에서와 같은 조성으로 제조되어 실험전 37℃에서 2 주간 보관된 용액을 이용한 실험 결과는 만족스러웠다.

<114> 실시예 14

<115> 다음과 같은 원료성분으로부터 백신 조성물을 제조하였다.

· 수산화알루미늄(Al로 표현됨)		0.3 mg
· PRP-T(PRP의 무게로 표현됨)		10 ㎍
· 정제 디프테리아 아나톡신(PDA)		1 백신단위
· 정제 파상풍 아나톡신(PTA)		1 백신단위
· 백일해 아나톡신		10 ㎍
· F-HA		5 ㎍
· 핌브리아(fimbriae)		5 ㎍
· 퍼탁틴(pertactin)		3 ㎍
· 헤모글로빈 단백질(GenHevac B PASTEUR™ 백신내에 존재)		20 ㎍
· 폴리오(Polio) 항원	타잎 I	40 U
	타잎 II	8 U
	타잎 III	32 U
· 포스페이트		20 μmol
카보네이트		10 μmol
· $MgCl_2$		5 μmol
· 42.5% 수크로스를 함유한 50 mmol 트리스(tris) 완충용액		0.125㎖
· 주사용 물		0.5㎖

<118> 상기 실시예 5에서와 동일한 방법에 의하여 PRP-T에 관련된 면역성 실험과 상기 실시예 13에서와 동일한 방법에 의하여 헤모글로빈과 관련된 면역성 실험을 수행하였고, 그 결과 본 발명에 따른 백신 조성물은 안정성을 나타내었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

알루미늄계 부형제 뿐만 아니라 파상풍 아나톡신과 결합된 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐이나 또는 고분자량의 폴리리보실리비톨 포스페이트로 이루어진 최소 1종 이상의 항원을 포함하고 있는 백신 조성물에 있어서, 상기 알루미늄계 부형제가 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 알루미늄계 부형제는 음이온이 첨가된 수산화알루미늄인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 음이온은 포스페이트 및 시트레이트 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 알루미늄계 부형제는 알루미늄 포스페이트인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 알루미늄계 부형제는 포타슘 및 알루미늄 설페이트인 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백신 조성물은 디프테리아(diphtheria), 파상풍(tetanus), 백일해(whooping cough), B형 간염(hepatitis B) 및 회백수염(poliomyelitis) 중에서 선택된 하나 이상의 백신 결합가(vaccine valency)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물.

청구항 7

파상풍 아나톡신과 결합된 헤모필러스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐이나 또는 폴리리보실리비톨 포스페이트로 이루어진 최소 1종 이상의 항원을 포함하고 있는 백신 조성물에 있어서, 상기 백신 조성물에 부형제로서 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 알루미늄 복합체를 현탁 첨가하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물의 제조방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 알루미늄 복합체에 포스페이트 및 시트레이트 중에서 선택된 음이온을 첨가하는 것을 특징으로 하는 백신 조성물의 제조방법.

요약

본 발명은 헤모필러스 알루미늄계 부형제 뿐만 아니라 파상풍 아나톡신과 결합된 고분자량의 인플루엔자(Haemophilus influenzae) b 타입의 다당류 캡슐이나 또는 폴리리보실리비톨 포스페이트로 이루어진 최소 1 종 이상의 항원을 포함하고 있는 백신 조성물에 있어서, 상기 알루미늄 부형제가 자연 상태 또는 음이온 첨가상태에서 대략 7.2 이하의 영점전하(PZC)를 갖는 것을 특징으로 하는 백신 조성물 및 이러한 백신 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.