



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0047569
(43) 공개일자 2008년05월29일

- (51) Int. Cl.
A61K 39/39 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7007043
 (22) 출원일자 2008년03월24일
 심사청구일자 2008년04월08일
 번역문제출일자 2008년03월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/BR2006/000182
 국제출원일자 2006년09월12일
 국제공개번호 WO 2007/030901
 국제공개일자 2007년03월22일
- (30) 우선권주장
 PI0503817-0 2005년09월12일 브라질(BR)

- (71) 출원인
푼다싸웅 지 앙빠루 아 페스끼자 두 에스따두 지 싸웅 파울루 - 에피아빠에에씨빠
 브라질 에스피 싸웅 파울루 알토 다 라빠 1500 후 아 빠우 11
크리스탈리아 프로듀토스 퀴미코스 팔마제우티코스 엘티디에이.
 브라질 13970-000 이타피라 케이엠 14 로도비아 이타피라/린도아
- (72) 발명자
파체코, 오가리
 브라질 13974-250 이타피라 109 - 노바 이타피라 루아 돔 페드로아이
생트안나, 오스빌도 아우구스토
 브라질 05503-900 상파울루 1500 - 부탄탄 인스티튜토 부탄탄카트/세피드 - 에이브이. 비텔 브라질
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최광호

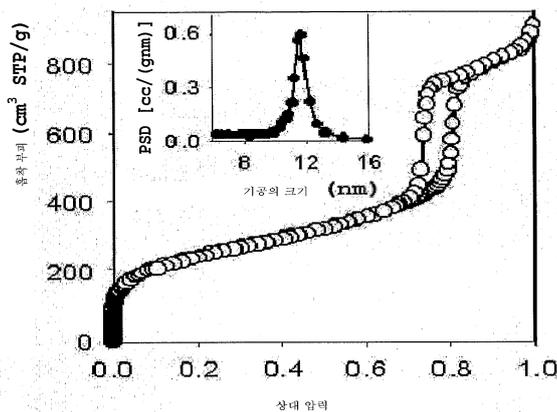
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 나노구조의 메소다공성 실리카에 의해 캡슐화된 백신항원에 의해 형성된 면역원 복합체

(57) 요약

본 발명은 고도로 배열된 나노구조의 메소다공성 실리카, 바람직하게는 실리카 SBA-15의 고체 입자를 특징으로 하는 보조제 및 뚜렷한 성질을 갖고 상기 종류의 보조제로 캡슐화된 백신 항원을 포함하는 "면역원 복합체"이라 불리는 생성물에 관한 것이다. 본 발명의 면역원 복합체는 안전하고, 점진적이며 또 서방성으로 림프구에 대하여 구성되는 항원의 제시를 허용함으로써 보다 효과적인 면역학적 기억을 초래하고, 항원의 면역원성을 증가시키며 또 항체 생산을 향상시킨다. 본 발명은 소량의 항원 및/또는 투여 회수를 적게한 백신 투여에 의해 효과적인 면역학적 보호를 달성할 수 있다. 또한 본 발명의 면역학적 착물의 특징은 효과적인 면역 유도를 증진시키고, "고 반응자 및 저반응자" 개체에서 균일하다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

머큐리, 루실데스

브라질 03342-000 상파울루 1295 씨택 - 유니버시
다데 크루제이로도 술 - 캠퍼스 아날리아 프랑코 -
에이브이. 레젠테 페이조

매토스, 지발도

브라질 05508-900 상파울루 748 라보라토리오 데
아날리제테르미카 프로프. 디알. 이보 기오리토 (라
티그) - 인스티튜토 테퀴미카 다 유에스피 - 에
이브이. 프로프. 디알. 리뉴 프레스테스

판티니, 마르시아

브라질 05508-970 상파울루 187 트라베사 알 인스
티튜토 데피지카 - 유에스피 - 데파르타멘토 데 피
지카 아플리카다 - 루아도 메테오

특허청구의 범위

청구항 1

2 내지 50 nm의 기공 크기를 갖는 나노구조의 메소다공성 실리카 입자 및 몇 가지 성질의 항원을 포함하며, 상기 항원은 면역화 보조제로서 작용하는 메소다공성 실리카의 입자에 의해 캡슐화되어 있는, 면역 유도를 위한 면역원 복합체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 항원은 단백질, 생물학적 활성 펩티드, 독소 및 바이러스 또는 세균 백신으로 구성된 군으로부터 선택되는 면역원 복합체.

청구항 3

제 1항에 있어서, 고도로 배열된 나노구조의 메소다공성 실리카는 메소다공성 실리카 SBA-15인 면역원 복합체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 항원 및 보조제가 1:5 내지 1:50의 비율로 사용되는 면역원 복합체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 항원 및 보조제가 1:25 의 비율로 사용되는 면역원 복합체.

청구항 6

면역원 복합체를 구성하는 항원의 림프구에 대한 제시가 안전하고, 점진적이며 또 서방성 방식으로 실시되게 하는 백신용 약학적 조성물을 생산하기 위한, 제1항에 따른 면역원 복합체의 용도.

청구항 7

면역원 복합체를 구성하는 항원의 면역원성을 증가시키기 위한 백신용 약학적 조성물을 생산하기 위한 제1항에 따른 면역원 복합체의 용도.

청구항 8

소량의 항원 및/또는 백신 투여의 적은 회수의 반복을 통하여 면역학적 보호를 확실히 하기 위한 백신용 약학적 조성물을 생산하기 위한 제1항에 따른 면역원 복합체의 용도.

청구항 9

고 반응자 및 저 반응자 개체에서 균질한 방식으로 면역 유도하는데 효과적인 백신용 약학적 조성물을 생산하기 위한 제1항에 따른 면역원 복합체의 용도.

청구항 10

의료 및 수의과에서 효과적인 면역화 및/또는 백신화를 위한 백신용 약학적 조성물을 생산하기 위한 제1항에 따른 면역원 복합체의 용도.

청구항 11

제1항에 따른 면역원 복합체 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하는 백신용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 면역학 분야에 관한 것이다.

<2> 본 발명은 면역원성 증가에 효과적이고, 본 발명에 나타난 바와 같이, 보조제로 작용하는, 규칙적으로 배열된

나노구조의 메소다공성 실리카의 고상 입자에 의해 캡슐화된 백신 항원에 의해 구성된 "면역원 복합체"로 표시한 생성물에 관한 것이다. 메소다공성 실리카에 의한 캡슐화는 대식세포에 의한 분해로부터 항원을 보호하고 또 림프구에 대한 노출을 연장시켜 고 반응자(high responder) 또는 저 반응자(low responder) 개인에서 항체 생산 유도에 효과적인 향상된 면역 반응을 증진시킨다. 본 발명의 면역원 복합체는 생물학적 활성 펩티드, 독소, 바이러스 및 세균 백신과 같은 뚜렷한 유형의 항원에 대한 일반적인 면역학적 활성에 이점을 가져온다.

배경 기술

- <3> 백신 항원에 대한 인간의 면역반응은 특정 인자에 따라 달라진다. 동일 조건하에서 동일 항원에 백신접종된 몇몇 개인들은 그 세기 및 지속 시간에서 상이한 반응을 나타낸다. 이러한 변화는 백신 보호 효과의 세기 및 지속 시간의 결정 인자이다.
- <4> 표준화된 항원 자극 후, 항체의 보호 역가를 생성하는 반응을 나타내는 개인은 고반응자라 칭하고 또 보호 역가를 생성하지 않는 개인은 저반응자라 칭한다.
- <5> 고반응자 또는 저반응자로부터 면역반응의 개선을 위한 안전하고 효과적인 전략을 개발하는 것이 아주 중요한 관심사이다. 첫 번째 경우, 소량의 항원을 사용하여 보호 반응을 생성하거나, 또는 항원에 대한 재노출 없이 장시간 지속되는 반응을 생성하는 것이다. 두 번째 경우, 불충분할 수 있었던 자극으로 보호 반응을 생성하는 것이다.
- <6> 현재, 상기 문제는 특정 항원에 대한 생물의 특정 면역반응을 연장시키는 물질로 정의된 보조제의 사용에 의해 [Edelman, R.; Tacket, C.O.; Adjuvants Intern. Ver. Immunol., 7 (1990) 51], 항원결정인자가 면역계의 세포에 제공되는 형태를 조절하는 것에 의해 또는 그의 면역원성을 증가시키는 것에 의해 부분적으로 해결된다. 보조제에 바람직한 다른 특징은 자극 기간을 유지하고, 항원의 제공 시간의 증가 및 그의 대사의 지연이다.
- <7> 분명히, 많은 보조제는 대식세포에 대한 독성 작용에 의해 자신의 활성을 나타낸다. 특정 항원에 대한 면역 반응을 조절하는, 예컨대 면역글로불린 이소형(isotype), 예컨대 IgG의 우세한 발현을 유도하는 보조제도 존재한다[Hadjipetrou-Kourounakis, L.; Moller, E.; Scand. J. Immunol., 19 (1984) 219].
- <8> 인간 백신에 인가되어 널리 사용되는 보조제는 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄과 같은 알루미늄 염의 유도체이다. 그러나, 이들은 IgG 항체의 바람직한 서브클래스(subclass) 및 관련 사이토카인에 대하여 높고 오래 지속되거나 또는 정성적으로 선택적인 면역반응을 유도하지 않는다.
- <9> 투여 부분에서 결정, 고립집 또는 육아종의 바람직하지 않은 형성을 증진하는 불완전 프로인트 보조제[IFA] 및 완전 프로인트 보조제[CFA]와 같은 수의과에서 사용되는 기타 보조제가 있다. 기타 보조제는 지질 A, 미세구 및 리포솜이며, 이들은 인간에서는 사용하지 않는다.
- <10> 따라서, 면역반응의 개발을 위해 안전하고 효과적인 전략의 개발에서 관심은 고반응자 또는 저반응자로부터 명백하게 남는다. 이렇게 하여, 재료 분야에서의 진전은 몇몇 영역에서 향상된 특성을 갖는 새로운 화합물의 제조를 가능하게 한다.
- <11> 무기 다공성 고체는 촉매적 및 분리 방법에서 중요한 공업적 용도를 제공한다. 이들 물질은 이들의 구조 및 표면 특성으로 인하여, 물질의 나노구조에 대한 접근을 허용하므로 그의 촉매적 및 흡수 활성을 증가시킨다.
- <12> 현재 사용되는 다공성 물질은 특징적 미세구조를 기본으로 하여 3개 종류로 분류될 수 있다: 준결정성(paracrystalline) 비정질 지지체, 변형된 층을 갖는 물질 및 결정성 분자체. 이들 물질의 미세구조 및 메소구조의 차이는 흡수 및 촉매 특징을 위해서뿐만 아니라 표면 영역, 기공 크기 및 그의 분포, X선 회절 표준(XRD)의 존재 또는 부재 및 이러한 표준의 상세한 내용, 및 그 미세구조를 투과 전자 현미경(TEM) 및 전자 회절법으로 연구할 때 물질의 특징이다.
- <13> 비정질 및 준결정성 물질은 이 공업 분야에서 다년간 사용된 다공성 무기 고체의 중요 종류를 나타낸다. 이들 물질의 전형적인 예는 촉매 형성에 흔히 사용되는 비정질 실리카, 및 산 고체 촉매 및 석유 변성 촉매에 대한 지지체로서 사용되는 과도적인 준결정성 알루미늄이다. 용어 비정질은, 거의 모든 물질이 어느 정도로 배열되지만 적어도 부분적 규모에서 롱-렌지 오더(long-range order)를 나타내지 않는 물질을 지시하기 위해 사용된다. 이러한 물질을 설명하기 위해 사용되는 다른 용어는 "무관한 X-선" 이다. 실리카의 미세구조는 10-25 nm의 조밀한 비정질 실리카의 입자로 구성되며, 이들 입자 사이의 빈 공간으로 인하여 다공성을 갖는다. 이들 물질에서 롱-렌지 오더가 존재하지 않기 때문에, 기공 크기는 넓은 범위에 걸쳐 분포되는 경향이 있다. 이러한 배열

(order)의 결여는 특징적 피이크를 갖지 않는 것으로 나타나는 X-선 회절 표준(XRD)에서 나타낸다.

- <14> 과도적인 알루미늄과 같은 준결정성 물질은 기공 크기의 넓은 분포를 나타내지만, 일부 넓은 밴드로 구성되는 X-선 회절 표준으로부터 잘 정의된다. 이들 물질의 미세구조는 응축된 알루미늄 상의 작은 결정 영역으로 구성되며 또 이 물질의 다공성은 이들 영역 사이의 불규칙적인 빈 공간의 결과이다. 1개 물질 또는 다른 물질의 경우에서, 기공 크기를 물질에서 제어하는 룡-렌지 오더가 존재하지 않으므로, 이러한 크기에서의 다양성은 전형적으로 아주 높다. 이들 물질에서 기공 크기는 1.3 내지 2.0 nm 범위의 메소기공으로 불리는 밴드를 포함한다.
- <15> 구조적으로 덜 정의된 이들 고체와 대조적으로, 기공 크기가 아주 좁은 물질은, 물질의 결정 성질로부터 제어되기 때문에, 정확하게 제어되어 미세구조로서 표시된다. 이들 물질은 "분자체"라 칭하며, 가장 중요한 예는 제올라이트이다.
- <16> 천연 또는 합성의 분자체는 양성 이온을 함유하는 다양한 결정성 실리케이트를 포함한다.
- <17> 일반적으로, 다공성 물질은 기공 크기에 의해 분류되며, 2 nm 미만의 기공 크기를 갖는 물질은 미세다공성으로 분류되고, 2 내지 50 nm 는 메소다공성 물질로 분류되며 또 50 nm 이상은 마크로다공성 물질로 분류된다.
- <18> MCM-41 및 MCM-48을 비롯한 메소다공성 분자체 계열은 미국특허 5,057,296호 및 5,102,643호에 기재되어 있다. 이들 분자체는 크기가 균일한 메소기공이 규칙적으로 배열된 구조를 나타낸다. MCM-41은 벌집과 같은 직접 메소기공의 육방정계 배열을 나타내는 균일한 구조를 가지며, BET법으로 측정된 비표면적이 1000 m²/g이다.
- <19> 분자체는 무기 또는 유기 양이온을 주형으로 사용하여 제조되었다. 이들 메소다공성 분자체는 계면활성제를 주형으로 사용하는 액정 메카니즘을 통하여 합성되며 또 계면활성제 유형의 제어 또는 제조 공정 동안 적용된 합성 조건을 통하여 기공의 크기가 1.6 내지 10 nm 범위로 조절될 수 있는 이점을 갖는다.
- <20> SBA-1, SBA-2 및 SBA-3으로 표시한 분자체는 Science (1995) 268:1324에 기재되었다. 그의 채널은 규칙적으로 배열되는 한편, 구성원자는 비정질 실리카의 배열과 유사한 배열을 나타낸다. 메소다공성 분자체는 규칙적으로 배열된 채널을 가지며, 제올라이트에서의 채널보다는 더 크며, 이렇게 하여 비교적 큰 분자의 촉매적 전환의 흡착, 분리 또는 반응에 이용할 수 있게 한다.
- <21> 미국특허 6,592,764호는 고품질의 메소다공성 실리카 패밀리가 열수작용 안정성이며 산성 매질에서 양쪽성 블록 공중합체의 사용에 의한 합성을 통하여 초외연(ultra-extensive) 기공 크기이다. SBA-15 패밀리의 구성원은 벌집과 유사한 2차원(p6mm)에서 고도로 배열된 메소구조, 육방정계이다. 우리 형태의 입방정계인 다른 구조 또는 3차원 육방정계도 또한 형성된다. 500℃에서 하소 과정은 690 내지 1040 m²/g의 높은 BET 표면적과 2.5 cm³/g 이상의 기공 부피 및 7.45 내지 45 nm의 대형 면간(interplanary) 거리 d (100), 4.6 내지 50 nm의 기공 크기 및 3.1 내지 6.4 nm의 실리카벽 두께를 갖는 다공성 구조를 얻는다. SBA-15는 다양한 시중에서 구입할 수 있는 트리-블록 폴리옥시알칼리성을 비롯한 생체분해성 및 비독성 양쪽성 블록 공중합체를 사용하여 저온(35 내지 80 ℃)에서 광범위한 기공 크기의 밴드 및 기공 벽의 두께를 갖게 제조될 수 있다.
- <22> SBA-15의 독특한 특성은 생물학적 활성 중의 고정과 같은 생체 적용을 비롯한 몇 가지 적용에 적합하다. 그러나, 면역 반응성에 대한 이들 물질의 영향을 보호하는 문헌은 지금까지 확인되지 않았고, 반대로 문헌들은 이 목적에 이용될 수 없는 것으로 제시하였다.
- <23> 특히 대식세포에 대한 면역 반응에서 비정질 실리카의 영향에 관한 실험은 이미 실시되었지만, 이들은 실리카의 보조제로서의 역할은 포함하지 않았다 [Allison, A.C.; Harington, J. S.; Birbeck, M.; J. Exp. Med., 124 (1966) 141; Kampschmidt, R. F.; Worthington, M. L.; Mesecher, M.I.; J. Leukocyte Biol., 39 (1986) 123; Lotzova, E.; Cudkowicz, G.; J. Immunol., 113 (1974) 798; Lotzova, E; Gallagher, M. T.; Trentin, J.J. B medicine, 22(5) 387 1975; Vogel, S.N.; English, K. E.; O'brien, A. D.; Infect. Immun., 38 (1982) 681].
- <24> 다른 실험에서는[Gennari, M.; Bolthillier, Y.; ibanez, O.M.; Ferreira, V. C. A.; Mevel, J. C; Reis, M. A. ; Piatti, R. M.; Ribeiro, O.G.; Biozzi, G.; Ann. Inst. Pasteur Immunol., 138 (1987) 359.], 낮은 또는 높은 항체 생산에 따라 유전적으로 변형된 마우스가 사용되었고, 입자(particulated) 항원, 즉 이중 적혈구에 의해 면역화되기 전에, 4일 연속 동안 콜로이드성 실리카의 현탁액을 투여하였다. 이들 연구는 저 반응자(low responder) 동물의 항체 생산에서는 현저한 증가가 있었고 또 이러한 향상은 대식세포에 대한 실리카 작용과 직접 관련되며, 그의 기능의 일부에 영향을 주고, 이들 세포의 생존력을 변화시키며 또 항원 대사의 감소를 초래하여 림프구에 대한 항원 생산을 선호함을 보여준다.

- <25> 따라서, 이들 효과는 대식세포의 작용성에 관련하여 뚜렷한 특징을 나타내는 마우스 스트레인(strain)의 반응성을 비교함으로써 분석하였다. 이것은 최대 표현형 또는 최소 항체 반응을 갖는 마우스 스트레인을 선택하는 실험 모델을 이용함으로써 달성되었다. 이러한 스트레인은 연속되는 세대 동안 극한 표현형을 갖는 개체 사이를 교배한 후 얻었다. 약 15 세대 후, 항체 수준에서 극한 표현형을 나타내는 동물은 특정 항원에 대한 반응성을 제어하는 관련 대립유전자의 동형접합을 달성하였다. 이 모델을 이용하여 셀렉션 IVA의 높은[H] 또는 낮은 [L] 항체 반응 라인을 얻을 수 있었다[Cabrera, W. H.; Ibanez, O.M.; Oliveira, S. L.; Sant'Anna, O.A.; Siqueira, M.; Mouton, D.; Biozzi, G.; Immunogenetics, 16 (1982) 583]. 이들 동물에서 반응의 차이는 더 높거나[L_{IVA} 마우스 라인] 또는 더 낮은[H_{IVA} 마우스 라인] 대식세포 대사 활성, 항원의 효과적인 제시의 배제 또는 선호와 관련된다.
- <26> 상술한 연구는 L_{IVA} 마우스는 이전에 광범위하게 비정질 실리카 현탁액으로 처리된 다음 항원으로 면역화되었을 때, 그의 항체 생산이 증가되어 H_{IVA} 마우스의 반응에 접근하였고[Biozzi, G.; Mouton, D.; Sant'Anna, O.A.; Passos, H. C; Gennari, M.; Reis, M.H.; Ferreira, V.C.A.; Heumann, A.M.; Bouthillier, Y.; Ibanez, O.M.; Stiffel, C; Siqueira, M.; Current Topics In Microbiology Immunology, 85 (1979) 31.], 다른 유사한 실험 모델에서는 독립적인 유전자 선택 III에 의해 얻은 H_{III} 및 L_{III} 마우스를 사용하였고, 비정질 실리카의 동일 현탁액으로 처리한 후, 저 반응자 마우스의 항체 생산의 조절은 관찰되지 않았다. 이들 H_{III} 및 L_{III} 동물에서, 높은 수준 또는 낮은 수준의 항체 생산은 대식세포의 작용성과는 관련이 없지만, 그의 림프구의 잠재성에 관련된다.
- <27> 이들 연구는 면역화 과정에 있어서 대식세포의 생체내 역할을 이해하기 위한 지지를 제공하는 기초였고, 아울러 면역의 유도에 사용된 효과적인 보조제의 경우, 대식세포의 고도의 대사 활성에 대해 투여된 항원을 보호하여 림프구에 대한 항원 결정기를 제시해야 한다.
- <28> 대형 백신 캠페인에서, 균일한 면역화 생성물 및 방법은 일반적으로 개체의 대형 및 이질 군에 대해 적용된다. 이들 조건하에서, 항체의 다양한 역가의 생산이 관찰될 수 있으며, 일부는 비-보호성이다. 개체 부분의 효과적인 면역화를 방해한다.
- <29> 이러한 사실은 상술한 실험에 도시된 바와 같은 메카니즘에 의해 설명되며 또 효과적인 형태 또는 림프구에 대한 항원결정기의 제시로 인식될 수 있는 동일 종의 개체의 표현형 다양성에 기인한다.
- <30> 예컨대, 정상 내지 아주 높은 것으로 분류될 수 있는 림프구 이펙터(effector) 활성 또는 정상으로 된 대식세포 활성을 갖는 림프구를 갖는 개체는 항체 생산과 관련하여 더욱 신속하게 반응하는 경향이 있는데, 이는 림프구에 의해 더욱 효과적으로 확인되는 항원의 확률이 크기 때문이다. 이들은 천연 집단에서는 고반응자 개체일 것이다.
- <31> 반대로, 정상에서 감소된 림프구 활성, 및 매우 높은 대식세포 활성을 제공하는 개체는 투여된 항체를 더욱 신속하게 대사시키는 경향이 있다. 이것은 항체가 림프구에 노출될 기회를 낮추어서 효과가 없는 면역 반응을 초래한다. 이것은 천연 집단에서 "저 반응자" 개체일 것이다. 이러한 상황은 더욱 내성인 병원체의 천연 선택을 선호한다. 현재의 백신 제제에 대해 저반응자 개체에서도 보호성 항체 역가 생산을 선호하고 촉진하는 더욱 효과적인 백신의 개발이 필요하다. 따라서, 이러한 분화된 세포 거동은 분화 인자의 영향을 최소화하기 위하여 보조제의 선택에 고려되어야한다.
- <32> 이와 같은 개념의 적용은 기존에 존재하지 않으며, 우리는 그에 따라 제조된 생성물 및/또는 백신을 찾고 있다.

발명의 상세한 설명

- <33> 본 발명의 목적은, 나노구조의 메소다공성 실리카에 혼입되거나 캡슐화된 항원이 면역반응의 유도에 효과적인고 효능 면역원 복합체를 형성하며 또 이러한 나노구조의 메소다공성 실리카는 배양액에서 대식세포의 생존능 및 식균능에 영향을 주지 않음을 나타내는 것이다.
- <34> 본 발명은 몇 개의 성질을 갖는 항원에 의해 구성되며, 보조제로 작용하는 고도로 배열된 나노구조의 메소다공성 실리카에 의해 캡슐화되어 면역성 유도 및 항원에 대한 항체의 생산을 향상시켜서 그 성질, 구조 및 복합성에 관하여 구별되는 신규 면역원 복합체에 관한 것이다.
- <35> 본 발명에 따른 면역원 복합체는 항원 및 나노구조의 메소다공성 실리카 입자의 특정 비율의 조합물로부터 생긴

생성물에 관한 것이다.

- <36> 본 발명의 면역원 복합체는 현재 사용되는 생성물 및 방법에 저 반응자 개체의 효과적인 면역화를 허용한다. 이것은 림프구에 대한 항원의 보다 안정하고 효과적인 제시에 기인한다.
- <37> 본 발명의 면역원 복합체는 나노구조 메소다공성 실리카 입자에 의해 혼입되거나 캡슐화된 1 이상의 항원에 의해 구성된다. 면역화 보조제로서 효과적으로 작용하는 이외에, 실리카 입자는 생체활성 중, 이 경우 면역원에 대한 지지체 또는 매트릭스로 작용한다.
- <38> 본 발명의 면역원 복합체의 형성에 사용될 수 있는 항원은 생물학적 활성 펩티드, 독소 및 바이러스성 및 세균성 백신이다.
- <39> 본 발명의 면역원 복합체의 제조에는 다양한 나노구조의 메소다공성 실리카가 보조제로서 사용될 수 있지만, 바람직하게는 SBA-15로 표시되는 실리카가 사용된다.
- <40> 고도로 배열된 나노구조의 메소다공성 실리카, SBA-15는 규칙적인 공동과 2내지 50 나노미터의 일정한 크기를 갖는 산화실리콘 입자로 구성된다. 항원은 캡슐화를 위해 이들 나노공동(nanocavities)에 고정된다. 그와 동시에, 이것은 대식세포에 의한 분해를 보호하고 림프구에 대한 점진적이고 보다 효과적인 제시를 제공하여 면역과정의 효능을 증가시킨다.
- <41> SBA-15 실리카 및 유사한 메소다공성 물질의 제조방법은 예컨대 과학 논문 (Zhao et al. , Science (1998) 279:548; J. Am. Chem. Soc.(1998) 120:6024; Matos et al., Chem. Mater.(2001) 13:1726) 및 미국특허 6,592,764호에 기재되어 있다.
- <42> 본 발명의 목적은 면역원 복합체를 제조하기 위하여 나노구조의 메소다공성 실리카에 항원을 혼입하거나 또는 캡슐화하는 방법을 제공하는 것이다.
- <43> 실리카 상의 항원의 캡슐화는, pH 7.4의 생리학적인 용액에 희석된, 항원을 함유하는 미리 제조된 용액과 실리카 현탁액의 혼합물을 포함하는 공정에 의한다. 실리카에 대한 항원의 중량비는 1:5 내지 1:50, 바람직하게는 1:25 일 수 있다. 바람직한 비율은 25 μ g의 실리카에 대하여 1 μ g의 항원으로 볼 수 있다. 제조는 바람직하게는 실온에서 실시되며 또 배양 시간 이전에 약 2시간 이전에 가끔 교반하에서 유지하였다.
- <44> 본 발명의 다른 목적은 예방 목적을 위한 백신 조성물의 제조에서 면역원 복합체의 용도를 제공하는 것이다.
- <45> 본 발명의 면역원 복합체 및 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하는 약학적 조성물은 의료 및 수의학 용도로 적합하다.
- <46> 이러한 가능성은 공중 위생에 중요한 영향을 주는데 이는 규칙적인 백신 프로그램에 대한 다수의 부모의 낮은 참여로 인하여 이들의 자녀들은 매스컴에 의한 대형 캠페인 동안 주로 면역화한다. 낮은 투여량으로 보호 면역성을 유도하는 가능성은 참여 문제의 결핍을 최소화하여 캠페인의 이점을 이용하고 되돌아갈 필요없이 수백만명의 어린이를 효과적으로 면역화한다.

실시예

- <51> 이하의 실시예는 예시적으로 기재하며 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다.
- <52> **실시예 1-** 면역원 복합체의 면역화 보조제로서 성분인 실리카 SBA-15의 제조 및 특징화
- <53> 본 발명의 1개 이점은 적은 양의 항원을 사용하여 고 반응자 및 저반응자에서 동일한 면역 반응의 유도를 증진하기 위한 면역원 복합체의 용도로 구성된다. 이러한 요지는 공중 건강에 경제적 및 사회적 중요성을 갖는다.
- <54> 항원은 백신 생산에 높은 비용을 갖는 원료이다. 효과적인 면역 반응의 유도에 필요한 양의 감소는 다수의 백신의 생산 비용에 실질적인 감소를 초래할 수 있다.
- <55> 한편, 동일 항원량으로 다량의 투여량 생산은 간단한 경제적 요점을 뛰어넘는 의미를 갖는다. 경제적 제한 요소 부재하에서도 생산 속도가 제한되는 항원이 있다. 유행병 동안, 소량의 항원의 면역화 가능성의 최적화 및 최대화는 수백만의 생명을 구하는데 필수적일 수 있다.
- <56> 본 발명의 다른 중요한 특징은 항원 제시를 위한 시간을 증가시키는 것을 통한 자극 기간의 연장에 존재한다. 이것은 보다 효과적인 면역학적 기억 유도를 초래하고, 보다 낮은 투여 회수로 보호를 보장한다. 몇 개의 백신은 효과적인 보호를 유도하기 위하여 3회 이상의 투여와 주기적인 보강을 필요로 한다. 항원의 한결같은 제시는

일부 경우에서 재백산화 회수를 감소시킬 수 있다.

- <57> 반응기에서, 4g의 트리-블록 공중합체 Pluronic P123을 40℃에서 자기 교반에 의해 28 g의 탈이온수 및 122 g의 2M HCl 용액에 분산시켰다. 이어, 8.6 g의 TEOS를 부가하여 40℃에서 기계적 및 자기 교반하에서 균질 용액을 얻었다. TEOS를 부가한 지 15분 후에, 젤리상 침전물의 형성이 관찰될 수 있다. 이 젤을 40℃에서 24시간 동안 교반하에 유지시킨 다음 테플론-라인 오토클레이브에 전달하고 100℃의 제어되는 온도에서 2일간 멸균기에 두었다. 이어 고체 생성물을 여과하고, 탈이온수로 세척하고 실온에서 공기 건조시켰다. 마지막으로, 합성된 샘플을 건조 N₂ 유량하에서 유량 속도 100 mL분⁻¹ 로 540℃에서 1℃분⁻¹의 가열 속도를 이용하여 하소(calcine)시켰다. 540℃에서 5시간 동안 가열한 후, 질소 가스의 유량을 공정의 중단없이 공기로 변경하고, 또 3시간 동안 하소시켰다.
- <58> 육방형 대칭의 채널 형태의 SBA-15의 배열된 2차원 구조는 작은 각 X-선 회절(SAXRD)에 의해 평가하였고 또 N₂ 흡착(구조적 및 표면 특성을 정의하기 위하여, 물질의 제조에 존재하는 중합체의 함량에 관하여)의 측정은 투과 전자 현미경(TEM)으로 측정하였다. 물질 특징화의 결과는 표 1에 요약하고 본 발명의 도 1, 도 2 및 도 3에 도시하였다. 이러한 특징은 몇개의 분자 호스트에 대한 탁월한 매트릭스로서 물질을 고려하기에 적합하다.

표 1

SBA-15 특징화의 결과

변수	결과
작은 각 X-선 회절 (SAXRD)	12.7 nm (127 Å)
비표면적 (a)	900 m ² /g
전체 기공 부피	1.39 cm ³ /g
최대 기공 크기 (w) *	11.6 nm (116 Å)
실리카 벽의 두께 (b) **	1.1 nm (11 Å)

* 기공 크기 분포(PSD)에 의해 얻음 ; ** b = a-w

- <59>
- <60> 도 1은 천연 상태 (NC) 및 분쇄된(GC) 하소된 육방형의 SBA-15 샘플에 대해 얻은 작은 각 X-선 회절을 도시한다. 이 결과는 배열된 메소다공성 물질(회절 피이크)의 구조가 마노 모르타르에서 분말로 분쇄한 후에도 변하지 않음을 나타낸다. 피이크의 분석 및 연계는 비-구조화된 스프레딩 백그라운드를 제거한 후에 실시한다.
- <61> 도 2는 모세관 용측 단계에서 등온 흡착의 하향 경사로부터 추측될 수 있는 바와 같이 고도의 배열을 제시한 하소된 실리카 SBA-15의 질소 흡착의 등온선을 도시한다.
- <62> 도 3은 평행 채널의 배열, 특히 이러한 물질의 유형이 관측될 수 있는 하소된 실리카 SBA-15의 구조적 배열을 특징화하기 위해 사용된 투과전자현미경(TEM)을 도시한다.
- <63> **실시예 2** - SBA-15에 의한 모델 항원의 흡착율의 결정
- <64> 소의 혈청 알부민(BSA)를 항원으로 사용하여, 상이한 비율로 SBA-156와의 혼합물을 제조한 다음 각 비율에 대하여 실리카에 의한 항원의 흡착율을 결정하였다. 표 2에 제시된 결과에 따르면, 25 μg의 SBA-015에 대한 1 μg의 BSA 비율은 SBA-15에 의한 BSA의 높은 흡착율을 나타내었다.

표 2

실리카 SBA-15 에서 소 혈청 알부민 [66 kDa]의 흡착에 대한 최고 비율의 측정

BSA : SBA-15	흡착 %
1:5	27.5
1:10	65.5
1:25	91

- <65>
- <66> 그러나, 본 발명의 면역원 복합체를 구성할 수 있는 항원의 다양성으로 인하여 항원 및 SBA-15의 비율을 최적화

하는 것은 항원의 복합성 함수로 고려되어야 함이 중요하다.

<67> **실시예 3-** 대식세포에 대한 SBA-1 효과의 제시

<68> 시험관내 실험으로 나노구조화된 실리카 SBA-15는 골수에 기인한 대식세포 식균작용능에서 생존능에 영향을 주지도 않고 방해하지 않는다는 것을 알게되었고, 30시간까지 배양액에 유지되었다. 이와 반대로, 이들 세포를 통하여 식균작용을 강화시키는 것으로 나타낸다. 표 3은 SBA-15를 사용한 치료는 다음 스트레인에서 효모 세포의 식균 과정을 방해하지 않는다는 것을 나타낸다: 유전학적으로 선택된 저반응성[L_{IIVA}], 유전학적으로 이질성 [SWISS] 또는 동종동계[BALB/c].

표 3

상이한 마우스 스트레인 대식세포를 사용한 시험관내 실험

스트레인	감염됨	효모의 갯수
L_{IIVA}	효모의 존재	
20µg SBA-15 + 효모 2h	68.2%	496
20µg SBA-15 + 효모 17h	61.8%	350
10µg SBA-15 + 효모 2h	78.9%	474
10µg SBA-15 + 효모 17h	65.2%	326
2.5µg SBA-15 + 효모 2h	79.5%	503
2.5µg SBA-15 + 효모 17h	67.8%	379
효모 2h	53.9%	217
효모 6h	59.2%	230
효모 17h	82.8%	472
효모 21h	59.9%	224
효모 30h	50.2%	164
스트레인	감염됨	효모의 갯수
SWISS	효모의 존재	
20µg SBA-15 + 효모 2h	84.9%	591
10µg SBA-15 + 효모 2h	81.7%	528
10µg SBA-15 + 효모 17h	70.8%	325
2.5µg SBA-15 + 효모 2h	81.9%	468
2.5µg SBA-15 + 효모 17h	74.7%	448
효모 2h	78.2%	479
효모 6h	73.3%	437
효모 17h	54.1%	284
효모 21h	56.2%	218
효모 30h	53.9%	195
스트레인	감염됨	효모의 갯수
BALB/c	효모의 존재	
효모 2h	82%	622
효모 6h	76.8%	438
효모 21h	68.5%	424
효모 30h	51.5%	209

<69>

<70>

<71> **실시예 4** - 마우스 스트레인에 규칙적으로 사용되는 보조제와 비교할 때 항-Int β 항체 및 항-독소 미크루루스 이비보카(*Micrurus ibiboca*) 상에서 면역학적 착물(항: SBA-15)의 보조제 효과

<72> 고반응성 항체 [H_{III} 라인], 저반응성 [L_{IVA} 라인] 및 동종동계 라인의 마우스[유전학적으로 동일한 동물] BALB/c 에 따라 유전학적으로 선택한 4-5 마리 그룹을 뚜렷한 실험으로 시험하였다. SBA-15의 강력한 효과는, SBA-15 [1:10 Int1β:SBA-15]에 흡착되거나 또는 불완전 프로인트 조제(IFA)에 부착된, 16.5 kDa의 세균 대장균의 재조합 단백질 β-이티민 [Int1β]에 대한 반응을 비교하여 측정하였다. 항체 형성에 대한 반응성은, 84 내지 7 kDa의 분자량을 갖는 20개 이상의 단백질로 구성되고 SBA-15 [1:10 Micru:SBA-15]에 흡착된 미크루루스 이비보보카 (*Micrurus ibiboboca*)속, 엘리피다에(Elapdae) 뱀과의 전체 독에 대한 평가를, IFA와 혼합된 독액에 대한 반응과 대조하여 실시하였다. 이들 모든 실험은 피하 경로에 의해 면역화한 후에 실시하였다. 표 4 및 5에 나타낸 데이터[평균 ± 표준 편차 (log)₂]는 SBA-15가 IFA로서 효과적이고, 높은 항체 역가를 증진시키며 면역 기억 유도에 아주 효과적이다.

표 4

면역화한지 15일 후 항 -Int1β 역가 [log₂]

마우스 스트레인	SBA-15		IFA	
	N	x ± σ	n	x ± σ
L _{IVA}	4	11.3 ± 0.5	4	4.5 ± 0.5
H _{III}	4	11.3 ± 0.4	3	13.3 ± 0.5
BALB/c	4	6.2 ± 3.2	5	9.8 ± 2.3

<73>

표 5

면역화한지 14일 후 항 -미크루루스 역가 [log₂]

마우스 스트레인	SBA-15		IFA	
	n	x ± σ	n	x ± σ
L _{IVA}	4	8.1 ± 0.5	3	5.2 ± 0.3
BALB/c	4	9.2 ± 1.3	4	6.4 ± 0.8

<74>

<75> 또한 IFA를 투여했을 때 생기는 것과는 반대로, SBA-15는 분명한 과립종을 형성하지 않으며, 지역적 염증 반응이 약하며, 피하 경로에 의해 SBA-15를 면역원을 접종한 후 24-48 시간 후에 측정할 때, 단구 및 핵 다형체의 감소된 레벨을 제시한다.

<76> 대조용 동물에 비교하여, SBA-15를 투여받은 마우스의 거동 및 생명력에는 아무런 변화가 없고, 11개월 후, 처리된 동물에서 아무런 형태적 변화도 관찰되지 않았다.

<77> **실시예 5** - 보통 사용되는 보조제와 비교할 때, 시간 함수로 항-Int β 항체 상에서 면역원 복합체(항원:SBA-15)의 보조제 효과

<78> 다른 에세이에서, BALB/c 마우스 그룹을 SBA-15, Al(OH)₃ 중의 Int β (대장균으로부터 얻음)으로 경구경로에 의해 면역화시키고, 또는 SBA-15, Al(OH)₃ 및 IFA중의 Int β 로 피하경로 및 복강내 경로에 의해 면역화시켰다. 장시간에 걸쳐 항 -Int β 반응을 실시하였다. 도 4는 분명한 면역화 경로에 따른 대장균의 단백질 인티민 Int β 에 대한 반응을 제시한다. 공지 보조제 Al(OH)₃, 불완전 프로인트 보조제(IFA) 및 원래의 SBA-15 나노구조화된 실리카로 면역화시킨 후 일차 반응[PR] 동안 199일까지의 [d]의 동일유전자 스트레인 BALB/c 마우스의 평균 및 표준 편차 (대장균으로부터 얻음). 분석된 기간 동안 항체 수준은 특히 SBA-15 에서 항원을 받은 그룹에서 높게 유지되었다.

<79> 모든 결과는 SBA-15가 비-면역원성, 비독성 및 항체에 대한 높은 반응성을 증진하는 효과적인 캐리어이고 또 효

과적인 면역학적 기억을 가짐을 나타낸다.

<80> 본 발명에 의해 도시된 바와 같은 SBA-15 실리카와 같은 고도로 배열된 나노구조의 메소다공성 실리카는 백신 제제 또는 조성물에 대해 계를 제공한다.

<81>

도면의 간단한 설명

<47> 도 1은 SBA-15 실리카 (NC)(천연 하소) 및 SBA-15 (GC)(분쇄 하소)의 작은 각 X-선 회절을 도시한다.

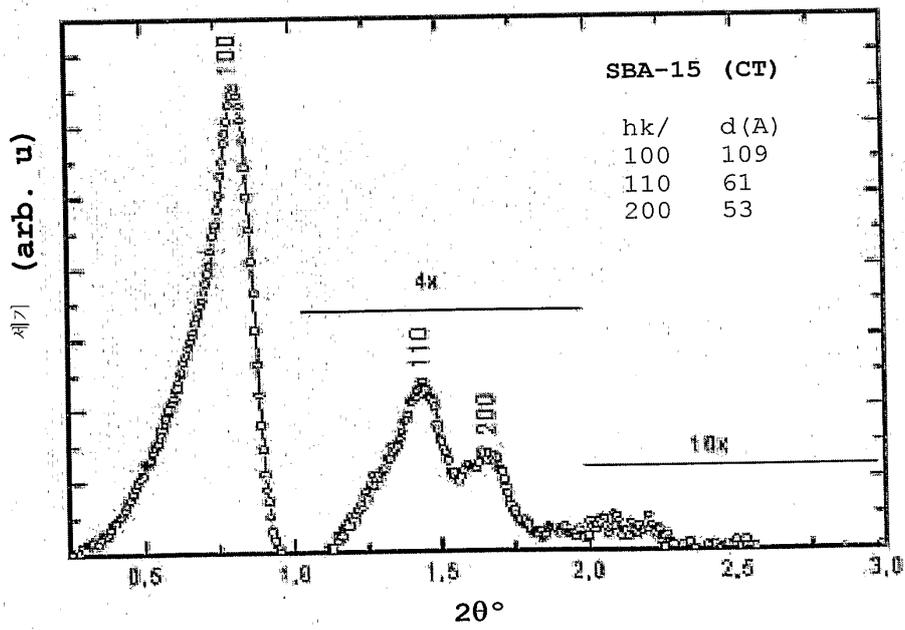
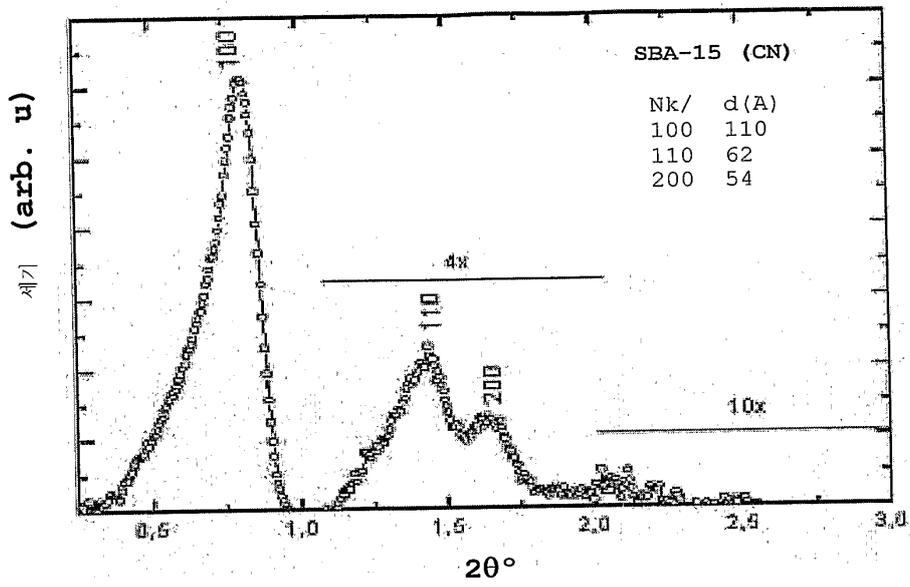
<48> 도 2는 77K에서 질소 흡착의 등온선 및 하소된 실리카 SBA-15의 상응하는 기공 크기 분포(PSD)를 도시한다.

<49> 도 3은 하소된 실리카 SBA-15의 투과전자현미경(TEM)의 영상을 도시한다.

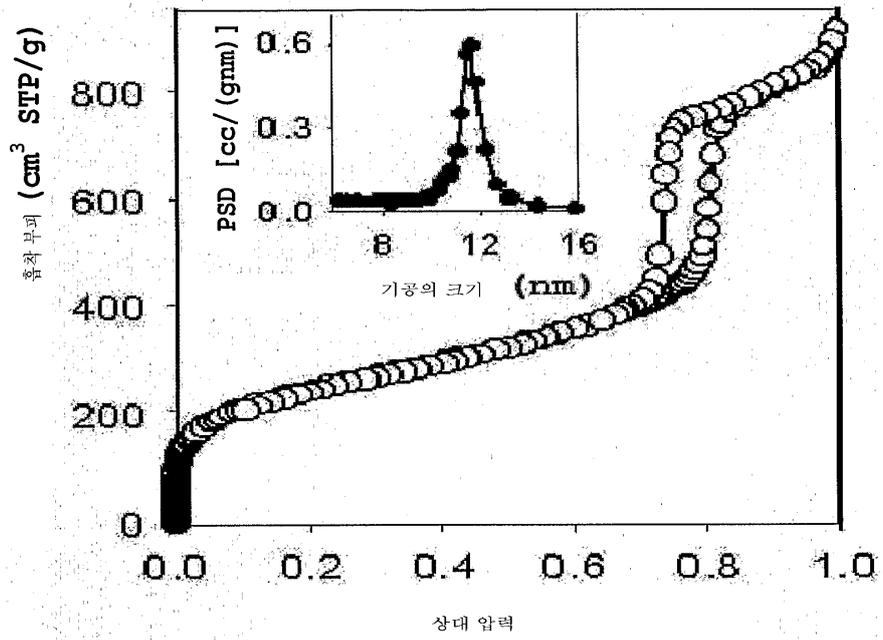
<50> 도 4는 SBA-15의 보조체 특성을 다른 보조체와 비교할 때 경구 투여, 복강내 투여 및 피하 투여 후에 대장균의 IgG 아이소토프 항-인티민 1 β 의 마우스 항체의 결정을 도시한다.

도면

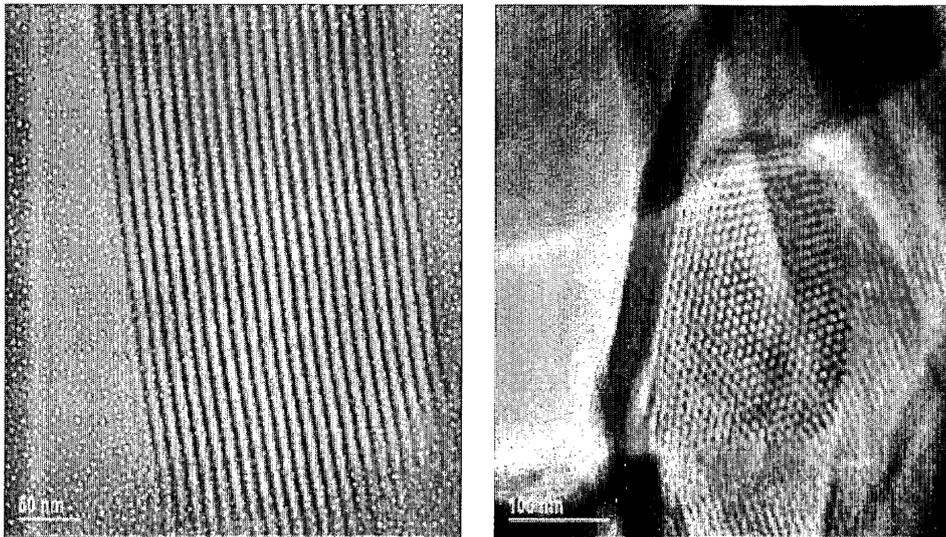
도면1



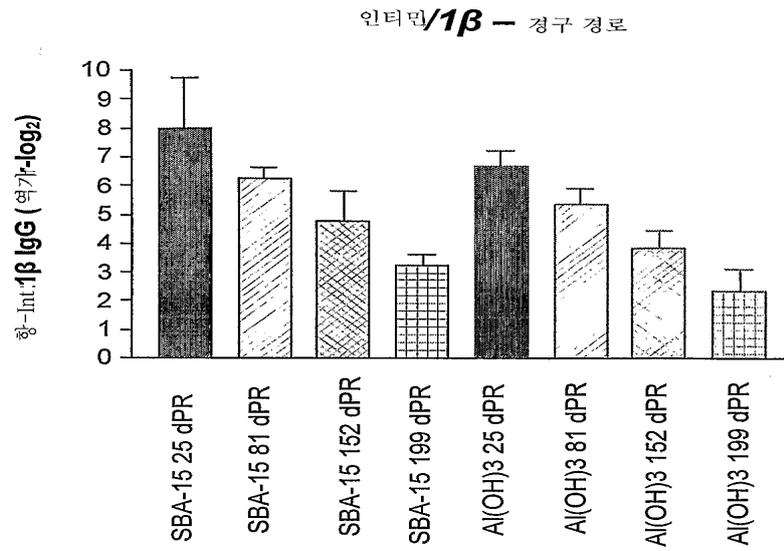
도면2



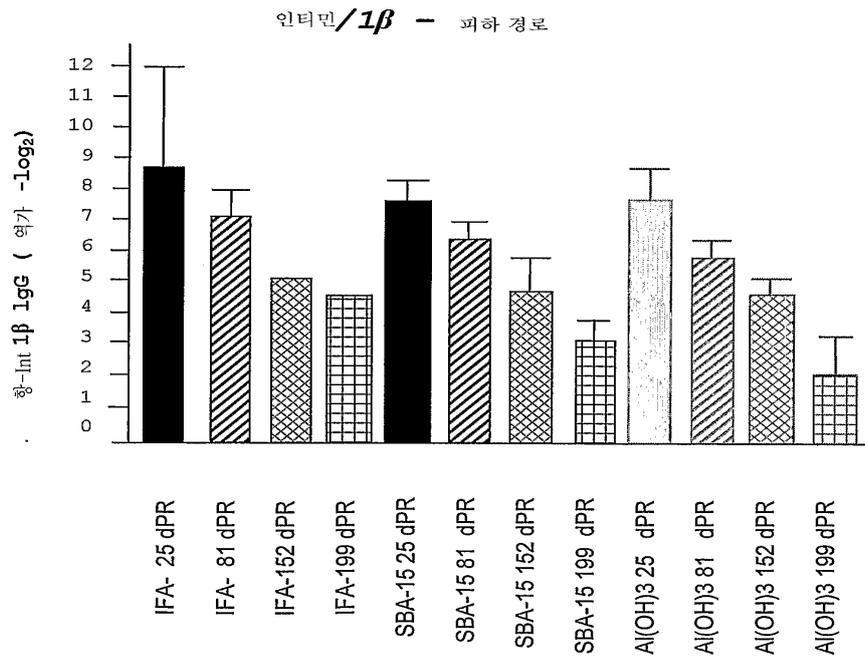
도면3



도면4a



도면4b



도면4c

