

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. ⁷ A61K 39/39 A61K 47/30	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2005년09월27일 10-0517114 2005년09월16일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2005-0015955 2005년02월25일	(65) 공개번호 (43) 공개일자
------------------------	--------------------------------	------------------------

(73) 특허권자 주식회사 바이오리더스
 대전광역시 유성구 용산동 559

 (주)엠디랩
 대전광역시 유성구 궁동 220 충남대학교수의학과

 한국생명공학연구원
 대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 성문희
 대전광역시 유성구 장대동 325-6 야베스빌라 302호

 김철중
 대전광역시 유성구 신성동 삼성한울아파트 103-801

 부하령
 대전광역시 유성구 지족동 858 열매아파트 408-501

 홍승표
 대전광역시 유성구 송강동 송강그린아파트 310-1503

 이종수
 경기도 안성시 낙원동 59

 김지연
 경기도 안양시 만안구 안양3동 873-234 101호

(74) 대리인 이처영

심사관 : 임혜준

(54) 폴리감마글루탐산을 함유하는 면역보강제 조성물

요약

본 발명은 폴리감마글루탐산을 함유하는 면역보강제(아주반트) 조성물 및 상기 면역보강제를 함유하는 백신용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 면역원성이 약한 항원과 함께 동물에 투여하여 항체생성율을 높일 수 있는 폴리감마글루탐산을 함유하는 것을 특징으로 하는 면역보강제 및 상기 면역보강제와 항원을 함유하는 백신용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 면역보강제는 독성 및 부작용이 거의 없으며, 면역원성이 불량한 항원과 함께 사용하여도 높은 항체가를 나타낼 수 있어, 암, 특히 전립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종뿐만 아니라 비전염성 만성 질병의 예방용 혹은 치료용 백신을 포함하는 의약 조성물에 첨가하여 사용될 수 있다.

대표도

도 1

색인어

폴리감마글루탐산, 면역보강제, 아주반트, 항원단백질, 유산균, 항체, 경구용 백신, 점막면역 증강

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 폴리감마글루탐산과 돼지 전염성 위장염 바이러스의 nucleoprotein (N) 항원을 토끼의 피하로 주사 후 일정 시일이 지난 뒤 혈청 내 nucleoprotein 항원에 대한 특이 IgG 항체가를 측정된 그래프이다.

도 2는 폴리감마글루탐산과 B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV)의 표면 항원(surface antigen; L particle)을 마우스의 복강으로 주사한 후 일정 시일이 지난 뒤 혈청 내 HBs 항원에 대한 특이 IgG 항체가를 측정된 그래프이다.

도 3은 폴리감마글루탐산과 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2를 표면발현하는 유산균을 마우스의 경구 및 비강으로 투여 후 일정 시일이 지난 뒤 혈청 내 VP2 항원에 대한 특이 IgG 항체가를 측정된 그래프이다.

도 4는 폴리감마글루탐산과 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2를 표면발현하는 유산균을 마우스의 경구 및 비강으로 투여 후 일정 시일이 지난 뒤 마우스의 장, 기관지 및 폐포 세척액내에서의 VP2 항원에 대한 IgA 항체가를 측정된 그래프이다.

도 5는 폴리감마글루탐산과 돼지 전염성 위장염 바이러스의 nucleoprotein (N) 항원을 표면발현하는 유산균을 사료와 함께 돼지에 경구로 투여한 후 일정 시일이 지난 뒤 혈청 내 nucleoprotein 항원에 대한 특이 IgG 항체가를 측정된 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 폴리감마글루탐산을 함유하는 면역보강제(아주반트) 조성물 및 상기 면역보강제를 함유하는 백신용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 면역원성이 약한 항원과 함께 동물에 투여하여 항체생성율을 높일 수 있는 폴리감마글루탐산을 함유하는 것을 특징으로 하는 면역보강제 및 상기 면역보강제와 항원을 함유하는 백신용 조성물에 관한 것이다.

현재까지 항원성 단백질이나 펩티드를 이용한 서브유닛 백신(subunit vaccine)과 항원 유전자를 이용한 유전자 백신(DNA vaccine) 및 다양한 재조합백신에 대한 연구가 활발히 진행되어 지고 있다. 이들 백신 후보물질들은 부작용이 적다는 장점이 있는가 반면에, 면역원성(immunogenicity)이 약하여 이들의 면역반응을 효율적으로 증강시키는 면역보강제(어주반트; adjuvant)의 개발이 당 분야에서 절실히 요구되고 있는 실정이다 (O'Hagan, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50:1-10, 1998).

면역보강제(adjuvant)는 항원에 대한 특정 체액 및/또는 세포 반응을 증가시킬 수 있는 물질을 말하는 것이다. 면역보강제의 체액성 반응(B 세포 반응)은 특정 항원에 대한 강력한 항체 반응을 나타내는 것으로, 그 작용은 신속한 분해 대사로부터 항원을 보호하는 침착물(deposit)을 형성하는 것과 비특이적으로 면역반응을 자극하는 것으로 알려져 있다. 침착물이 형성되는 경우, 이는 항원을 저장하고 시간이 지남에 따라 유리시킬 수 있기 때문에 일정 기간 동안 면역계에 자극을 연장하여 항원 용량이 훨씬 적으면서도 항체반응은 보다 더 지속적으로 유지될 수 있고, 면역보강제 자체가 비특이적으로 면역계의 세포를 자극하여 함유된 항원에 대한 반응을 증가시키는 역할 즉 림포카인의 레벨을 높임으로서 면역반응을 자극하는 작용도 있게 된다.

면역보강제의 또 다른 특징인 강력한 T세포 매개 면역반응(세포성 반응)의 야기는 항원과 함께 투여시 항원제시세포(APC)에 의해 인식되어 면역계를 활성화시켜 예방 백신 및 치료 백신의 효능을 증가시키는 용도를 갖는다.

이러한 면역보강제는 감염질환 및 암에 대해 숙주 저항성을 갖는 비특이적 자극작용과, 예방 백신의 면역원성 상승작용 및 치료 백신의 면역원성 상승작용으로서의 용도를 가진다.

기존에 보고된 면역보강제중 대표적인 것으로 프로인트(Freund's adjuvant)가 있다. 프로인트는 광물질에 계면활성제인 Arlacel-A를 가한 것으로 여기에 가용성 항원을 잘 혼합하여 현탁액으로 만들어 피내 혹은 피하에 주사하여 항체생성력을 높이는 것으로, 항체생성률이 높아서 실험동물에 가장 널리 이용되는 면역보강제이지만 독성이 강해서 사람에게는 사용할 수 없다는 단점이 있다. 이외에 박테리아 산물로 면역자극 효과를 나타내는 여러 가지의 성분들이 동정되어 면역보강제로 개발되어 쯤고(LPS; lipopolysaccharide, muramyl depeptide, Cholera toxin B subunit), 식물에서 분리한 사포닌(Saponin)의 일종인 QuilA와 면역자극 복합체(ISCOMs; immunostimulating complexes)의 형태로서 특히 담즙산염과 인지질 등의 배합 조제 등이 면역보강제로 개발되어 졌다. 그러나 이들 대부분은 안전성이 확보되지 않은 제제들이다.

현재 어쥬반트 중 인체에 사용이 승인된 것은 알루미늄(aluminum)류가 거의 유일하나, 이는 다른 어쥬반트들보다 비교적 약한 면역 반응 증강 효과를 나타내고 있다. 알루미늄류는 면역반응면에서도 Th2 면역반응을 자극하여 주로 체액성 면역을 증강시키므로(Audibert and Lise, *Immunol. Today*, 14:281-284, 1993), 세포독성(cytotoxic) T 세포 면역반응의 증강이 필요한 백신의 어쥬반트로 사용하는 데에 한계가 있다. 또한, 알루미늄 어쥬반트를 함유한 백신은 생체 내 분해가 어렵고, 알루미늄이 동결시 응집 침강하는 물성으로 인하여 동결건조 형태로 보관하기가 어려운 단점이 있다. 그리고 알루미늄화합물(황산알루미늄, 수산화알루미늄, 인산 알루미늄 등)등은 인체용 백신에 사용가능하나 제조시 품질이 달라지기 쉽고 정제조작이 어려우므로 대량생산에 부적합한 단점이 있다.

이러한 면역보강제들 이외에도 보다 안전하고 효과적인 면역보강제들의 개발이 수행되어 지고 있고 사이토카인과 같은 보강제들이 백신항원과 함께 투여되는 등의 방법들이 당 분야에서 연구되고 있다. 그러나, 이들 사이토카인 역시 그 안정성 면에서는 크게 개선되어야 할 필요성이 있다.

대부분의 병원체들의 침투 경로는 점막 표면을 통해서이고 많은 감염이 점막 및 점막 밑조직에서 우선적으로 일어나게 된다. 따라서 통상의 비경구백신들은 점막 면역 반응의 유발에 매우 비효과적이고 최적의 점막 면역화를 위한 체계개발에 상당한 노력이 있어 왔다. 이러한 노력들 중 점막 밑 조직의 면역세포에 대한 항원의 전달을 향상시키는 면역보강제(리포솜, 면역자극 복합체, 중심체 등)의 개발 역시 병행되어졌고, 개발되어 실험한 예가 보고되어 있다 (Sjolander *et al*, *J. Leukocyte Biol.* 64:713-723, 1998). 그러나 점막 면역화가 여러 상황에서 효과적일지라도, 많은 감염에서 효과적인 면역 반응의 유발을 위해서는 점막 및 비점막 면역화 두가지의 결합이 필요하다.

상기 기술 내용들을 고려할 때, 상업적으로 생존가능하며 유효한 백신을 개발하려면 선택된 항원성 물질의 대규모 생산을 비롯하여 이의 효과를 극대화하면서 안전하게 전달할 수 있는 면역증강제가 비용면에서 효과적 이어야 한다. 또한, 경피, 점막 또는 전신 투여가 가능하며 면역 반응을 적절하게 조절 및 집중하기 위한 면역보강제가 필요하다.

이에 본 발명자들은 보다 효과적이고 안전한 면역보강제의 개발을 위하여 예의 노력한 결과, 바실러스균이 생산하는 폴리감마글루탐산이 다양한 항원 및 백신 후보물질의 효과를 증강시키는 것을 입증함으로써 폴리감마글루탐산이 면역보강제로 유용하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

결국, 본 발명의 주된 목적은 유효량의 폴리감마글루탐산을 함유하는 면역보강제(어쥬반트) 조성물을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 면역보강제 및 항원을 함유하는 백신용 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유효량의 폴리감마글루탐산과 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 면역보강제(아주반트) 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산의 분자량은 10kDa~10,000kDa인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명은 또한, 상기 면역보강제 조성물 및 항원성 물질을 함유하는 백신용 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 항원성 물질은 펩티드, 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 발현하는 유산균, 단백질, 상기 단백질을 발현하는 유산균, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 재조합 박테리아 및 재조합 바이러스로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

또한, 상기 항원성 물질은 돼지 전염성 위장염 바이러스의 뉴클레오프로틴(N), 개파보바이러스 항원단백질 VP2 또는 B형 간염바이러스의 표면항원(L particle)인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 뉴클레오프로틴(N) 항원성 물질은 뉴클레오프로틴(N)을 발현하는 유산균이고, VP2 항원성 물질은 VP2를 발현하는 유산균인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 따른 백신용 조성물은 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균 백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 서브바이러스(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N--디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제2보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명에 따른 백신용 조성물은 진립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종으로 선택된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 질병의 예방용 또는 치료용인 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명은 또한, 상기 백신용 조성물을 인간을 제외한 동물에 주입하여 항원에 대한 항체 생성률을 높이는 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 동물은 포유류 또는 조류인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 주입은 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 및 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

본 발명의 폴리감마글루탐산을 포함하는 면역보강제(아주반트)는 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishig Co., Easton PA). 또한, 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산을 포함하는 면역보강제는, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

폴리감마글루탐산을 포함하는 면역보강제 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제로는 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 글리세린, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

제제화할 경우에는 보통 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 폴리감마글루탐산에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제 등이 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 폴리감마글루탐산 함유 면역증강제는 투여대상의 나이, 성별, 체중 등에 따라 투여량이 달라질 수 있고, 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서도 백신의 투여량이 증감될 수 있다.

본 발명에서 사용되는 폴리감마글루탐산 자체는 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 안심하고 사용할 수 있는 면역보강제이다. 본 발명의 폴리감마글루탐산을 백신용 면역보강제(아주반트)로 사용하여 함께 조성할 수 있는 항원성 성분으로는 면역원성이 불량한 항원이나 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 또는 이들의 상응하는 핵산 서열, 또는 백신의 관심 대상인 대상 세포 또는 이들의 배합물로 구성된 균 그리고 백신으로 사용가능한 재조합의 박테리아나 바이러스로부터 선택될 수 있다.

본 발명의 백신용 면역보강제(아주반트)는 비경구, 점막(경구 및 비강 등) 및 경피성 경로에 의한 백신 투여시 함께 사용할 수 있다. 항원성 단백질을 발현하는 미생물을 백신의 용도로 사용할 경우, 본 발명의 폴리감마글루탐산을 면역보강제(아주반트)로 사용하는 것이 바람직하다. 특히, 상기 항원성 단백질을 발현하는 유산균을 경구용 백신으로 사용할 경우, 본 발명의 폴리감마글루탐산을 백신용 면역보강제(아주반트)로 함께 사용하는 것이 바람직하다.

또한 본 발명의 폴리감마글루탐산은 암, 특히 전립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종 뿐만 아니라 비전염성 만성 질병을 예방하고 치료하는 데에 사용되는 예방용 혹은 치료용백신을 포함하는 의약 조성물에 첨가하여 사용될 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1. 폴리감마글루탐산의 제조

폴리감마글루탐산 제조용 기본배지(5%의 L-글루탐산이 첨가된 GS배지; glucose 5%, (NH₄)₂SO₄ 1%, KH₂PO₄ 0.27%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.42%, NaCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.3%, 비타민 용액 1ml/L, pH 6.8) 3L가 채워진 5L 발효기에, 바실러스 서브틸리스 청국장(Bacillus subtilis var chungkookjang, KCTC 0697BP)균주의 배양액을 1% 접종하여, 교반속도 150rpm, 공기주입속도 1vvm으로 37℃에서 72시간 동안 배양한 다음, 2N 황산용액을 가하여 pH가 3.0이 되도록 조절하고 폴리감마글루탐산 함유 시료액을 수득하였다.

상기 시료액을 4℃에서 10시간 동안 정치시켜 발효액 내의 다당류를 제거하고, 여기에 에탄올을 발효액의 2배 부피가 되게 첨가한 다음, 충분히 혼합하였다. 상기 혼합액을 4℃에서 10시간 동안 정치시킨 다음, 원심분리하여 폴리감마글루탐산 침전물을 얻었다. 상기 침전물에 증류수를 가하여 용해시키고, 단백질 분해효소를 100µg/ml가 되도록 가하여 37℃ 항온기에서 6시간 동안 정치 반응시켜 시료에 존재하는 세포의 단백질을 분해시켰다. 상기 폴리감마글루탐산이 포함된 시료를 충분한 양의 증류수에서 투석하여 유리된 글루탐산을 제거한 후 농축하여 순수한 폴리감마글루탐산을 얻었다.

용도에 따라 필요한 경우, 상기 제조된 폴리감마글루탐산을 적절한 방법으로 절단하여 일정한 분자량으로 제조하여 사용하거나, 적절한 방법으로 분리하여 일정한 분자량 별로 회수하여 사용할 수 있으며, 이하 실시예에서는 5kDa, 10kDa, 20kDa, 50kDa, 100kDa 및 200kDa의 폴리감마글루탐산을 사용하였다.

실시예 2. 폴리감마글루탐산에 의한 TGE 바이러스 항원에 대한 항체 생산

본 실시예에서는 본 발명의 폴리감마글루탐산이 soluble 항원에 대하여 특이적 면역 증진효과를 나타내는지 조사하기 위하여, 항체 특이적인 면역반응 중, 특히 항체 생산과 관련이 있는 B세포에 의한 체액성 면역반응(humoral immune response)에 미치는 영향을 조사하였다. 항원으로는 돼지의 전염성 소화기 질병을 유발하는 돼지의 전염성 위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis virus, TGE)의 nucleoprotein(N)을 사용하였으며, 실험동물로는 토끼를 사용하였다.

우선 대조군으로는 TGEN 항원(400µg/PBS ml)을 단독으로 피하 주사한 토끼를 사용하였고, TGEN 항원(400µg/PBS ml)과 분자량이 각각 5kDa, 10kDa, 20kDa 및 50kDa인 폴리감마글루탐산을 혼합하여 피하주사로 투여하여 실험군으로 사용하였다.

처음 피하주사 후, 2주 뒤에 동일한 양의 항원 및 분자량별 폴리감마글루탐산을 투여하였다. 처음 피하주사 후에 각 2주 별로 토끼의 혈청을 채취하여 혈청 중의 TGEN 항원에 대한 항체의 역가(titer)를 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)법으로 측정하였다.

상기 ELISA법은 TGEN 항원(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 코팅된 플레이트를 PBS/5% 우태아 혈청을 사용하여 블로킹한 후, 대조 토끼 및 실험군 토끼의 혈청을 다양한 일련의 희석율에서 인큐베이션하였다. 그 후, Horse raddish peroxidase가 부착된 토끼 항-IgG 항체(Fc에 대해 특이적임)를 첨가하였다. 상기 모든 인큐베이션은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 수행하였으며, 언급된 각각의 단계 후에는 PBS/0.05% Tween 20을 사용하여 3회 세척하였다. 기질로는 ABTS(2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolinesulfonic acid)) 1mg/ml를 첨가하여 반응을 전개시킨 후, 450nm에서의 흡광도를 30분 후 ELISA 판독기로 측정하였다.

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 분자량별 폴리감마글루탐산과 TGEN 항원을 함께 피하주사한 토끼에서의 TGEN 항원에 대한 항체 역가는 TGEN 항원만을 피하주사한 토끼에서의 TGEN 항원에 대한 항체 역가 보다 높게 나타났다. 특히, 폴리감마글루탐산 50kDa을 함께 처리한 토끼의 항체 역가가 가장 높게 나타났다. 그리고 항체역가 상승에 대한 지속성은 최초 주사 후, 최소한 6주까지는 대조군에 비하여 유의하게 증진되는 결과를 보였다.

실시예 3. 폴리감마글루탐산에 의한 HBV 바이러스 항원에 대한 항체 생산

본 실시예에서는 폴리감마글루탐산이 다른 soluble 항원에 대하여 복강투여 방법에 의해서 특이적 면역(체액성 면역반응; humoral immune response) 증진효과를 나타내는지를 효모 유래 B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV)의 표면 항원(surface antigen; L particle)을 사용하여 Balb/c mice를 실험동물로 사용하여 확인하였다.

우선 대조군은 정제된 HBsAg(hepatitis B virus surface antigen) L particle 항원(1 $\mu\text{g}/\text{PBS ml}$)을 단독으로 복강주사한 6주령 Balb/c 암컷 마우스를 사용하였고, 실험군은 HBsAg L particle 항원(1 $\mu\text{g}/\text{PBS ml}$)과 분자량이 각각 10kDa, 50kDa 및 1000kDa인 폴리감마글루탐산(γ -PGA)을 혼합하여 복강주사하였다. 또한 항원의 농도를 달리하여 정제된 HBsAg L particle 항원(0.5 $\mu\text{g}/\text{PBS ml}$)을 단독으로 복강주사한 마우스 및 HBsAg L particle 항원(0.5 $\mu\text{g}/\text{PBS ml}$)과 분자량이 각각 10kDa, 50kDa 및 1000kDa인 폴리감마글루탐산을 혼합하여 복강주사로 투여한 실험군으로 나누었다. 상기 실험군과 대조군은 복강접종 후 5주째에 채혈하여 혈청내 HBsAg L particle에 대한 양전율 및 항체의 역가를 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)법으로 측정하였다.

ELISA는 HBsAg L particle 항원(1mg/ml)이 코팅된 플레이트를 사용하여 실시예 2의 방법과 동일하게 수행하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 분자량별 폴리감마글루탐산을 포함한 HBsAg L particle 항원을 복강주사한 마우스에서의 HBsAg L particle 항원에 대한 항체 양전율 및 역가는 HBsAg L particle 항원의 양과 비례하게 항원만을 피하주사한 마우스에서의 항원에 대한 항체 양전율 및 역가 보다 높게 나타났다. 특히, 폴리감마글루탐산 1000kDa을 함께 처리한 마우스의 항체 양전율 및 역가가 가장 높게 나타났다.

실시예 4. 폴리감마글루탐산에 의한 개 파보바이러스의 항원단백질이 표면발현된 유산균의 백신효과 분석

본 실시예에서는 soluble 항원들 이외에 항원성 단백질을 발현하는 미생물을 백신의 용도로 사용할 경우, 본 발명의 폴리감마글루탐산이 면역보강제로 사용되어 항원들에 대한 특이적 면역(체액성 면역반응; humoral immune response 및 점막면역 반응; mucosal immune response) 증진효과를 나타내는 지를 확인하였다.

항원으로는 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2를 사용하였다. 본 발명자들은 상기 캡시드 항원단백질인 VP2를 표면발현하는 유산균을 새로운 경구백신으로 개발하려는 시도를 하였고 이에 대한 특허를 출원한바 있다(대한민국특허출원 제2004-007321호). 본 실시예에서는 상기 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2를 표면발현하는 유산균을 이용하여 폴리감마글루탐산의 항체생성을 증강 여부를 조사하였다.

구체적으로, 본 발명에서 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2를 표면발현하는 유산균을 일정한 세균농도가 되도록 수확한 후, 세포를 완충용액(PBS buffer, pH7.4)으로 세척하고, 항원이 표면발현된 락토바실러스 5×10^9 균을 4-6주령의 C57BL/6 마우스의 구강으로 1일 간격으로 다섯번 그리고 1주 뒤 다시 1일 간격으로 다섯번 그리고 2주 뒤에 역시 1일 간격으로 다섯번 투여하였다. 또한 항원이 표면발현된 락토바실러스 1×10^9 균을 마우스의 비강으로 1일 간격으로 세번 그리고 1주 뒤 다시 1일 간격으로 세번 그리고 2주 뒤에 다시 1일 간격으로 세번 투여하여 대조군으로 하였다. 또한, 상기 대조군과 동일한 균을 조성하여 이 균의 마우스에는 각각의 투여 유산균에 2000kDa의 폴리감마글루탐산 100 μg 씩을 혼합하여 투여시킨 후 폴리감마글루탐산 비투여군과 혼합투여군의 마우스내 캡시드 항원단백질인 VP2에 대한 항체형성을 측정·비교하였다.

경구와 비강투여 후 2주 간격으로 각각의 마우스군 혈청을 취하여 혈청내 캡시드 항원단백질에 대한 IgG 항체가 및 마우스의 내장부위를 취하여 장의 내부를 씻은 부유액내 및 기관지와 폐포의 내부를 씻은 부유액내에서의 캡시드 항원단백질에 대한 IgA 항체를 엘리자 방법으로 항원에 대한 항체를 측정하였다.

도 3은 마우스 혈청내 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2 항원에 대한 IgG 항체를 나타낸 것으로, A는 캡시드 항원단백질인 VP2 항원을 표면발현하는 유산균을 단독으로 각각 경구 및 비강으로 투여한 마우스 그룹의 항체를 나타낸 것이고 B는 캡시드 항원단백질인 VP2 항원을 표면발현하는 유산균과 폴리감마글루탐산을 혼합하여 각각 경구 및 비강으로 투여한 마우스 그룹의 항체를 나타낸 것이다.

도 4는 장의 내부를 씻은 부유액 및 기관지와 폐포의 내부를 씻은 부유액내에서의 캡시드 항원단백질인 VP2 항원에 대한 IgA 항체를 엘리자 방법으로 나타낸 것으로, A와 C는 캡시드 항원단백질인 VP2 항원을 표면발현하는 유산균을 단독으로 경구투여 및 비강투여한 군에서의 IgA 항체를 나타내고, B와 D는 캡시드 항원단백질인 VP2 항원을 표면발현하는 유산균과 폴리감마글루탐산을 혼합하여 각각 경구 및 비강으로 투여한 마우스 그룹의 IgA 항체를 나타낸다.

도 3 및 4에 나타난 바와 같이, 캡시드 항원단백질인 VP2 항원을 표면발현하는 유산균과 폴리감마글루탐산을 함께 투여한 C57BL/6 마우스군의 혈청, 내장세척액 및 기관지 폐 세척액에서 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2 항원에 대한 IgG 항체가 및 IgA 항체가 대조군에 비해 상당히 높게 나타난다는 것을 확인할 수 있었다.

이 결과로부터 본 발명에 의한 개 파보바이러스의 캡시드 항원단백질인 VP2 항원을 표면발현하는 유산균과 혼합되어 적용된 폴리감마글루탐산은 경구용 점막백신의 효능을 극대화시킬 수 있는 면역보강제임을 알 수 있었다.

실시예 5. 폴리감마글루탐산에 의한 전염성 위장염 바이러스의 항원단백질이 표면발현된 유산균의 백신효과 분석

본 실시예에서는 돼지의 전염성 소화기 질병을 유발하는 돼지의 전염성 위장염 바이러스 (Transmissible Gastroenteritis virus, TGE)의 nucleoprotein(N) 항원을 표면 발현하는 유산균을 폴리감마글루탐산과 함께 돼지에 경구 투여시 면역보강제로서의 증강 여부를 조사하였다.

구체적으로, 본 발명에서 돼지 전염성 위장염 바이러스의 뉴클레오캡시드 항원단백질인 N을 표면발현하는 유산균을 일정한 세균농도가 되도록 수확한 후, 세포를 완충용액(PBS buffer, pH7.4)으로 세척하고, 항원이 표면발현된 유산균을 분말화 하였다. 대조군은 분말화된 유산균을 돼지사료의 0.3%가 되도록 혼합을 시킨 후 이 혼합사료를 3개월령의 돼지 3마리에 2kg/day가 되도록 4주동안 섭취시켰다. 폴리감마글루탐산 실험군은 분말화된 유산균의 3%가 되도록 2000kDa의 폴리감마글루탐산을 혼합한 후 이 분말을 돼지사료의 0.3%가 되도록 혼합을 시켜 역시 이 혼합사료를 3개월령의 돼지 3마리에 2kg/day가 되도록 4주동안 섭취시켰다. 섭취시작 후 2주간격으로 혈청을 채취하여 혈청내 N 항원단백질에 대한 IgG 항체를 엘리자 방법으로 측정하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 뉴클레오캡시드 항원단백질인 N 항원을 표면발현하는 유산균을 단독으로 급여한 돼지의 혈청의 IgG 항체가 N 항원을 표면발현하는 유산균에 폴리감마글루탐산을 혼합 급여한 돼지의 혈청에서의 IgG 항체가보다 높은 수치인 것을 확인할 수 있었다.

상기 결과로부터, 본 발명에 따른 폴리감마글루탐산은 경구용 점막백신의 효능을 극대화시킬 수 있는 면역보강제임을 확인할 수 있었다.

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

발명의 효과

본 발명은 유효량의 폴리감마글루탐산을 함유하는 면역보강제(아췌반트) 조성물을 제공하는 효과가 있다. 본 발명은 또한, 상기 면역보강제 및 항원을 함유하는 백신용 조성물을 제공하는 효과가 있다.

본 발명에 따른 면역보강제는 독성 및 부작용이 거의 없으며, 면역원성이 불량한 항원과 함께 사용하여도 높은 항체가를 나타낼 수 있어, 아, 특히 전립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종뿐만 아니라 비전염성 만성 질병의 예방용 혹은 치료용 백신을 포함하는 의약조성물에 첨가하여 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

유효량의 폴리감마글루탐산과 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는 면역보강제(아주반트) 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 폴리감마글루탐산의 분자량은 10kDa~10,000kDa인 것을 특징으로 하는 면역보강제(아주반트) 조성물.

청구항 3.

제1항의 면역보강제 조성물 및 항원성 물질을 함유하는 백신용 조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 항원성 물질은 펩티드, 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 발현하는 유산균, 항원단백질, 상기 항원단백질을 발현하는 유산균, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 재조합 박테리아 및 재조합 바이러스로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

청구항 5.

제3항에 있어서, 상기 항원성 물질은 돼지 전염성 위장염 바이러스의 뉴클레오프로틴(N), 개파보바이러스 항원단백질 VP2 또는 B형 간염바이러스의 표면항원(L particle)인 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

청구항 6.

제5항에 있어서, 뉴클레오프로틴(N) 항원성 물질은 뉴클레오프로틴(N)을 발현하는 유산균이고, VP2 항원성 물질은 VP2를 발현하는 유산균인 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

청구항 7.

제3항에 있어서, 안정제, 유화제, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, pH 조정제, 계면활성제, 리포솜, 이스콤(iscom) 보조제, 합성 글리코펩티드, 증량제, 카복시폴리메틸렌, 세균 세포벽, 세균 세포벽의 유도체, 세균백신, 동물 폭스바이러스 단백질, 서브바이러스(subviral) 입자 보조제, 콜레라 독소, N, N--디옥타데실-N',N'-비스(2-하이드록시에틸)-프로판디아민, 모노포스포릴 지질 A, 디메틸디옥타데실-암모늄 브로마이드 및 이의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제2보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

청구항 8.

제3항에 있어서, 전립선암, 결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 두경부암, 외음부암, 방광암, 뇌암 및 신경교종으로 선택된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 질병의 예방용 또는 치료용인 것을 특징으로 하는 백신용 조성물.

청구항 9.

제3항의 조성물을 인간을 제외한 동물에 주입하여 항원에 대한 항체 생성률을 높이는 방법.

청구항 10.

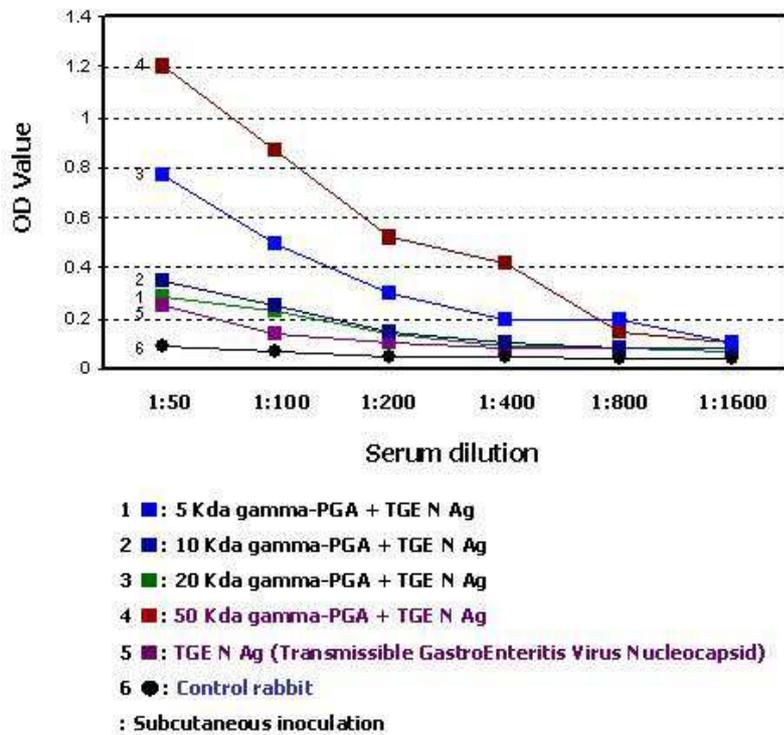
제9항에 있어서, 상기 동물은 포유류 또는 조류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

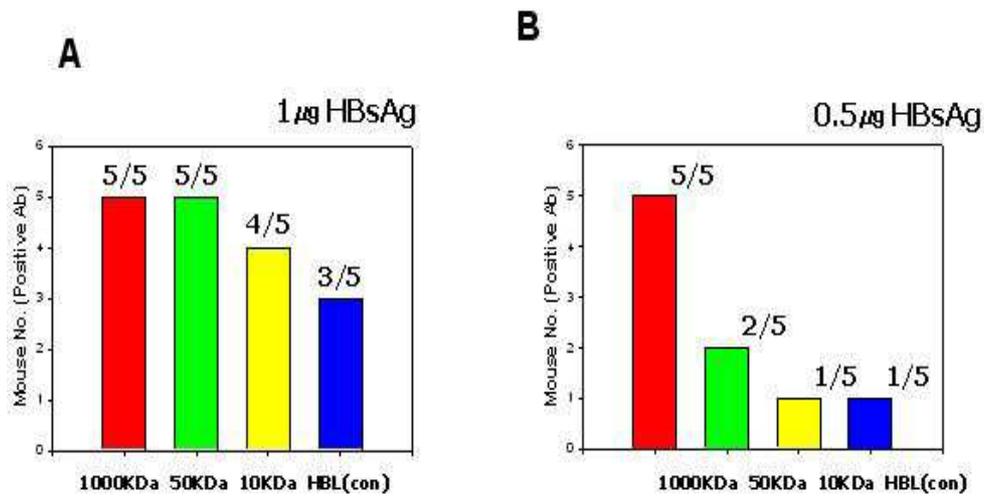
제9항에 있어서, 주입은 피하주사, 근육내 주사, 피하내 주사, 복막내 주사, 비강투여, 구강투여, 경피투여 및 경구투여로 구성된 군에서 선택된 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

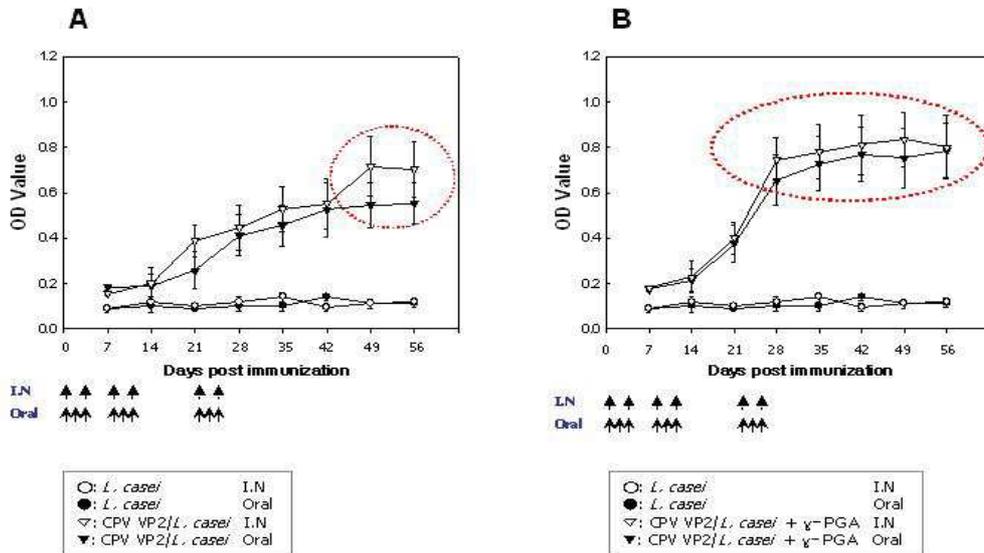
도면1



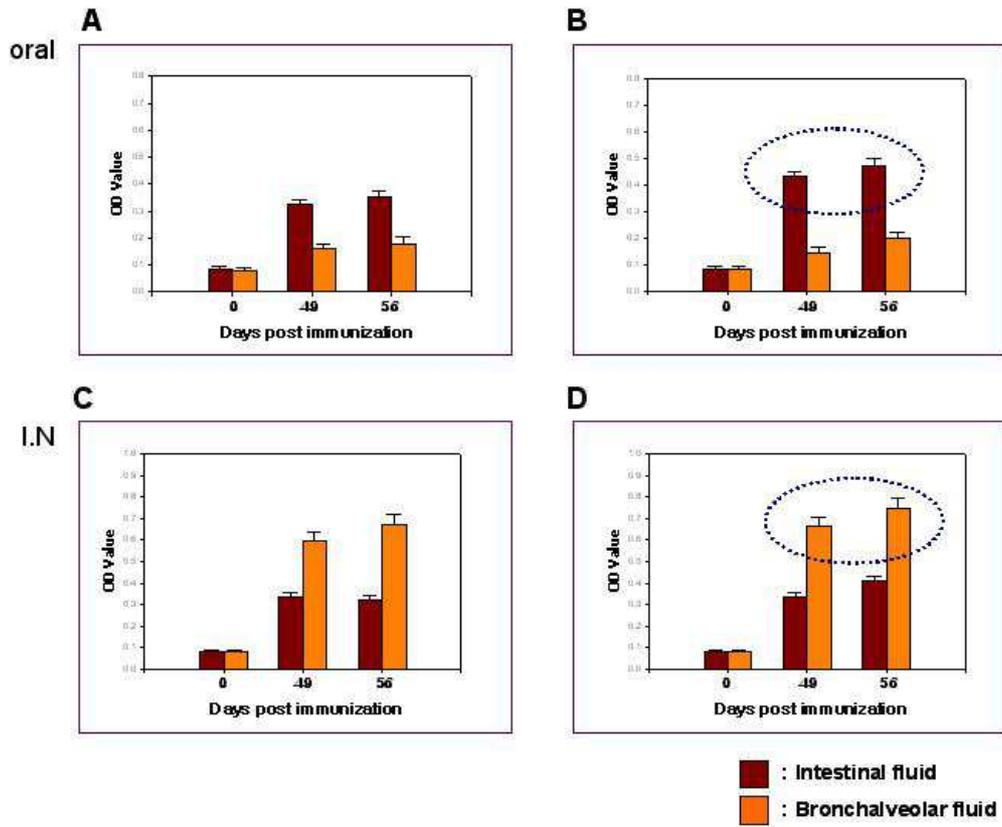
도면2



도면3



도면4



도면5

