



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0002285
(43) 공개일자 2024년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 47/36 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61M 37/00 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/145 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0079199

(22) 출원일자 2022년06월28일

심사청구일자 2022년06월28일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

주식회사 주빅

서울특별시 구로구 디지털로 272, 208호(구로동, 한신아이티타워)

(72) 발명자

정형일

서울특별시 성북구 성북로 176, 105동 108호(성북동, 성북동외교관사택단지)

양희석

서울특별시 서초구 잠원로 157, 120동 810호(잠원동, 신반포16차아파트)

강진우

서울특별시 구로구 디지털로 235, 405호(가리봉동, 아리움)

(74) 대리인

특허법인이플리온

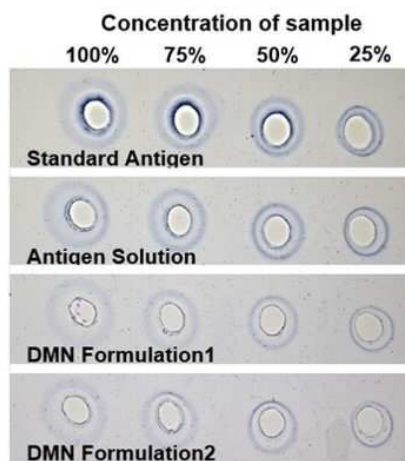
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 인플루엔자 백신을 포함하는 마이크로니들 및 이를 포함하는 인플루엔자 백신 패치

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 백신을 포함하는 마이크로니들, 특히 인플루엔자 백신을 함유하는 용해성 마이크로니들에 대한 것으로, 보다 상세하게는 수용성 고분자 및 첨가제를 특정 함량비로 포함하여 인플루엔자 백신의 안정성을 높이고 더 높은 면역 효과를 기대할 수 있는 인플루엔자 백신을 포함하는 마이크로니들 및 이를 포함하는 인플루엔자 백신 패치에 관한 것으로, 본 발명의 인플루엔자 백신을 포함하는 마이크로니들을 이용하는 경우, 백신의 안정성이 증가할 뿐만 아니라 피부 침투도 및 약물 전달 효과 또한 현저하여 우수하다.

대표도 - 도7



Sample	Loading antigen	Assay result	Activity
DMN Formulation 1	18 μ g	16.8 μ g	93.3%
DMN Formulation 2	17.4 μ g	15.4 μ g	88.5%

(52) CPC특허분류

A61K 47/36 (2013.01)

A61K 9/0021 (2013.01)

A61M 37/0015 (2013.01)

A61P 31/16 (2018.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

A61M 2037/0023 (2013.01)

A61M 2037/0053 (2013.01)

A61M 2205/583 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인플루엔자 백신, 수용성 고분자 및 첨가제를 포함하는 인플루엔자 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물에 포함되는 인플루엔자 백신의 용매는 포스페이트 완충제, 아세테이트 완충제, 시트레이트 완충제, 글리신 완충제, 암모늄 아세테이트 완충제, 석시네이트 완충제, 피로포스페이트 완충제, 트리스 아세테이트 완충제, 포스페이트 완충 식염수 및 트리스 완충 식염수에서 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물에 포함되는 수용성 고분자는 하이드록시에틸스타치, 하이드록시프로필메틸스타치, 젤라틴, 폴루란, 텍스트란, 콘드로이틴 황산 나트륨, 하이알루론산 나트륨, 카복시메틸셀룰로스, 폴리바이닐피롤리돈, 폴리옥시 에틸렌폴리옥시프로필렌 글라이콜, 폴리에틸렌글라이콜, 폴리바이닐알코올로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종인 것을 특징으로 하고,

상기 수용성 고분자는 전체 조성물에서 1% 이상 50% 이하로 포함되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물에 포함되는 첨가제는 트레할로스(trehalose), 수크로오스(sucrose), 칼슘-D-글루코네이트(calcium D-gluconate) 및 아르기닌(arginine)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것을 특징으로 하고,

상기 첨가제의 총 농도는 1% 내지 20%인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 첨가제가 2종으로 포함되는 경우,

상기 2종의 첨가제는 트레할로스 및 수크로오스이며 농도는 각각 1% 내지 10%인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 백신은 약독화된 생백신(LAV, Live-attenuated virus) 또는 사백신, 자가복제바이러스백터(Wr, Viral vector, replicating), 바이러스 유사 입자(Viral-like particles), 서브유닛 백신, 비자가복제바이러스백터(Viral vector, non-replicating), 합성 백신 또는 유전공학 백신으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 백신은 다가백신인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물로 제조되는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들로,

상기 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들은 지지부, 중단부 및 첨단부로 이루어지는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조성물의 위치는 중단부에 위치하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 중단부에 위치한 조성물은 코어부로 위치하거나 층으로 구분되어 존재하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 코어부는 상기 지지부 상에 형성되며 상기 조성물을 포함하며,

상기 코어부는 친수성 물질로 이루어지고,

상기 코어부의 높이(H2)는 상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)에 반비례하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 코어부는 상기 지지부 상에 형성되며 상기 조성물을 포함하며,

상기 코어부는 소수성 물질로 이루어지고,

상기 코어부의 높이(H2)는 상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)에 무관하게 일정한 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)는 상기 코어부 및 상기 첨단부를 형성하기 위한 유동화 공정 시간에 반비례하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)는 상기 코어부와 상기 지지부의 접합면에서 가장 작은 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)는 상기 코어부 전체에 걸쳐 균일한 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 지지부, 상기 코어부 및 상기 첨단부의 전체 높이(H) 및 상기 지지부의 높이(H1)가 일정한 경우, 상기 코어부의 높이(H2)와 상기 코어부의 선단에서 상기 첨단부의 선단까지의 높이(H3)는 반비례하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들.

청구항 17

제8항 내지 제16항 중 어느 한 항의 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 및;

상기 마이크로니들을 지지하는 기관층을 포함하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 어레이.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 마이크로니들 어레이는 면역증강제를 포함하는 마이크로니들을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 어레이.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 마이크로니들은 일정 간격을 두고 규칙적으로 배열되는, 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 어레이.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 마이크로니들의 높이는 500 내지 1000um인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 어레이.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항의 마이크로니들 어레이 배면에 지지체를 포함하는 인플루엔자 백신 패치.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 백신 패치는 소정의 정보를 표시하기 위하여 상기 지지체의 일면 또는 타면에 형성되는 마커를 포함하는, 인플루엔자 백신 패치.

청구항 23

제22항에 있어서,

상기 마커는 상기 마이크로니들이 피부에 삽입된 후, 외부 자극이 인가됨에 따라 색상이 변화하도록 형성되는, 인플루엔자 백신 패치.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 외부 자극은 열, 광, 수분 및 압력 중 적어도 하나를 포함하는, 인플루엔자 백신 패치.

청구항 25

제22항에 있어서,

상기 마커는 상기 마이크로니들이 피부에 삽입된 후, 시간이 경과함에 따라 색상이 변화하도록 형성되는, 인플루엔자 백신 패치.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 마커는 산화 반응이 일어날 수 있는 반응 물질을 포함하고,

상기 색상 변화는 상기 반응 물질의 산화 반응에 의하여 이루어지는, 인플루엔자 백신 패치.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 색상 변화가 완료되는데 소요되는 시간은 10분 이상이 되도록 형성되는, 인플루엔자 백신 패치.

청구항 28

제22항에 있어서,

상기 마커는 QR 코드(Quick Response code) 또는 문자를 포함하는, 인플루엔자 백신 패치.

청구항 29

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 인플루엔자 백신 조성물을 형성하는 단계;

마이크로니들 형상을 성형하는 단계; 및

점성용액을 마이크로니들 형상으로 고형화하는 단계를 포함하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 제조방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 성형 단계는 유동화, 몰딩, 원심 리소그래피 기법 및 송풍 인장 방식으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 백신을 포함하는 마이크로니들 및 이를 포함하는 인플루엔자 백신 패치에 관한 것으로, 보다 상세하게는 수용성 고분자 및 첨가제를 특정 함량비로 포함하여 인플루엔자 백신의 안정성을 높이고 더 높은 면역 효과를 기대할 수 있는 인플루엔자 백신을 포함하는 마이크로니들 및 이를 포함하는 인플루엔자 백신 패치에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 질병의 치료를 위한 수많은 약물 및 치료제 등이 개발되었지만 약물을 신체 내로 전달함에 있어서, 생물학적 장벽(biological barrier, 예를 들어, 피부, 구강점막 및 뇌-혈관 장벽 등) 통과 문제 및 약물 전달의 효율 문제는 여전히 개선되어야 할 점으로 남아 있다.

[0004] 약물은 일반적으로 정제제형 또는 캡슐제형으로 경구투여되지만, 수많은 약물들이 위장관에서 소화 또는 흡수되거나 간의 기전에 의하여 소실되는 등의 이유로 상기와 같은 투여 방법만으로는 유효하게 전달될 수 없다. 게다가, 몇몇 약물들은 장의 점막을 통과하여 유효하게 확산될 수 없다. 또한, 특정 간격으로 약물을 복용해야 하거나, 약을 복용할 수 없는 중환자의 경우 등 환자의 순응도 역시 문제가 된다.

[0005] 약물전달에 있어서 또 다른 일반적인 기술은 종래의 주사바늘(needle)을 이용하는 것이다. 이 방법은 경구 투여에 비하여 효과적인 반면에, 주사부위에서의 통증 수반 및 피부의 국부적 손상, 출혈 및 주사부위에서의 질병 감염 등을 야기하는 문제점이 있다.

[0006] 인플루엔자 백신 또한 항원의 활성을 안정적으로 유지하고, 용량을 절약하기 위한 방안이 요구되고 있는 실정이다. 상기와 같은 문제점들을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 인플루엔자 백신을 마이크로니들 구조체에 로딩하여 본 발명을 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에, 본 발명자들은 마이크로니들 구조체를 인체의 피부에 부착시키거나 또는 접촉된 상태로 압력을 가하면 니들의 끝단부가 피부에 침투한 상태에서 용융되어 니들에 포함된 약물성분이 인체로 전달될 수 있도록 예의 노력한 결과 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 인플루엔자 백신, 수용성 고분자 및 첨가제를 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 상기 조성물로 제조되는 백신 용해성 마이크로니들로, 상기 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들은 지지부, 중단부 및 첨단부로 이루어지는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또다른 목적은 상기 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 및; 상기 마이크로니들을 지지하는 기관층을 포함하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 어레이를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또다른 목적은 마이크로니들 어레이 배면에 지지체를 포함하는 인플루엔자 백신 패치를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또다른 목적은 상기 인플루엔자 백신 조성물을 형성하는 단계; 마이크로니들 형상을 성형하는 단계; 및 점성용액을 마이크로니들 형상으로 고형화하는 단계를 포함하는 마이크로니들 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속 하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0016] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 인플루엔자 백신, 수용성 고분자 및 첨가제를 포함하는 인플루엔자 백신 조성물을 제공한다.
- [0017] 일실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 인플루엔자 백신의 용매는 포스페이트 완충제, 아세테이트 완충제, 시트레이트 완충제, 글리신 완충제, 암모늄 아세테이트 완충제, 석시네이트 완충제, 피로포스페이트 완충제, 트리스 아세테이트 완충제, 포스페이트 완충 식염수 및 트리스 완충 식염수에서 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 일실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 수용성 고분자는 하이드록시에틸스타치, 하이드록시프로필메틸스타치, 젤라틴, 폴루란, 텍스트란, 콘드로이틴 황산 나트륨, 하이알루론산 나트륨, 카복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 글라이콜, 폴리에틸렌글라이콜, 폴리비닐알코올로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종인 것을 특징으로 하고, 상기 수용성 고분자는 전체 조성물에서 1% 이상 50% 이하로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 일실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 첨가제는 트레할로스(trehalose), 수크로오스(sucrose), 칼슘-D-글루코네이트(calcium D-gluconate) 및 아르기닌(arginine)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것을 특징으로 하고, 상기 첨가제의 총 농도는 1% 내지 20%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 일실시예에 있어서, 상기 첨가제가 2종으로 포함되는 경우, 상기 2종의 첨가제는 트레할로스 및 수크로오스이며 농도는 각각 1% 내지 10%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 일실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 백신은 약독화된 생백신(LAV, Live-attenuated virus) 또는 사백신, 자가 복제바이러스벡터(VVr, Viral vector, replicating), 바이러스 유사 입자(Viral-like particles), 서브유닛 백

신, 비자가복제바이러스벡터(Viral vector, non-replicating), 합성 백신 또는 유전공학 백신으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0022] 일실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 백신은 다가백신인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또한, 상기 조성물로 제조되는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들로, 상기 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들은 지지부, 중단부 및 첨단부로 이루어지는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들을 제공한다.
- [0024] 일실시예에 있어서, 상기 조성물의 위치는 중단부에 위치하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 일실시예에 있어서, 상기 중단부에 위치한 조성물은 코어부로 위치하거나 층으로 구분되어 존재할 수 있다.
- [0026] 일실시예에 있어서, 상기 코어부는 상기 지지부 상에 형성되며 상기 조성물을 포함하며, 상기 코어부는 친수성 물질로 이루어지고, 상기 코어부의 높이(H2)는 상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)에 반비례하는 할 수 있다.
- [0027] 일실시예에 있어서, 상기 코어부는 상기 지지부 상에 형성되며 상기 조성물을 포함하며, 상기 코어부는 소수성 물질로 이루어지고, 상기 코어부의 높이(H2)는 상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)에 무관하게 일정할 수 있다.
- [0028] 일실시예에 있어서, 상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)는 상기 코어부 및 상기 첨단부를 형성하기 위한 유동화 공정 시간에 반비례할 수 있다.
- [0029] 일실시예에 있어서, 상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)는 상기 코어부와 상기 지지부의 접합면에서 가장 작을 수 있다.
- [0030] 일실시예에 있어서, 상기 코어부 외부의 상기 첨단부의 두께(T)는 상기 코어부 전체에 걸쳐 균일할 수 있다.
- [0031] 일실시예에 있어서, 상기 지지부, 상기 코어부 및 상기 첨단부의 전체 높이(H) 및 상기 지지부의 높이(H1)가 일정한 경우, 상기 코어부의 높이(H2)와 상기 코어부의 선단에서 상기 첨단부의 선단까지의 높이(H3)는 반비례할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한, 상기 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 및; 상기 마이크로니들을 지지하는 기관층을 포함하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 어레이를 제공한다.
- [0033] 일실시예에 있어서, 상기 마이크로니들 어레이는 면역증강제를 포함하는 마이크로니들을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0034] 일실시예에 있어서, 상기 마이크로니들은 일정 간격을 두고 규칙적으로 배열될 수 있다.
- [0035] 일실시예에 있어서, 상기 마이크로니들의 높이는 500 내지 1000um인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명은 또한, 상기 마이크로니들 어레이 배면에 지지체를 포함하는 인플루엔자 백신 패치를 제공한다.
- [0037] 일실시예에 있어서, 상기 백신 패치는 소정의 정보를 표시하기 위하여 상기 지지체의 일면 또는 타면에 형성되는 마커를 포함할 수 있다.
- [0038] 일실시예에 있어서, 상기 마커는 상기 마이크로니들이 피부에 삽입된 후, 외부 자극이 인가됨에 따라 색상이 변화하도록 형성될 수 있다.
- [0039] 일실시예에 있어서, 상기 외부 자극은 열, 광, 수분 및 압력 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0040] 일실시예에 있어서, 상기 마커는 상기 마이크로니들이 피부에 삽입된 후, 시간이 경과함에 따라 색상이 변화하도록 형성될 수 있다.
- [0041] 일실시예에 있어서, 상기 마커는 산화 반응이 일어날 수 있는 반응 물질을 포함하고, 상기 색상 변화는 상기 반응 물질의 산화 반응에 의하여 이루어질 수 있다.
- [0042] 일실시예에 있어서, 상기 색상 변화가 완료되는데 소요되는 시간은 10분 이상이 되도록 형성될 수 있다.
- [0043] 일실시예에 있어서, 상기 마커는 QR 코드(Quick Response code) 또는 문자를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명은 또한, 상기 인플루엔자 백신 조성물을 형성하는 단계; 마이크로니들 형상을 성형하는 단계; 및 점성 용액을 마이크로니들 형상으로 고형화하는 단계를 포함하는 마이크로니들 제조방법을 제공한다.

[0045] 일실시예에 있어서, 상기 성형 단계는 유동화, 몰딩, 원심 리소그래피 기법 및 송풍 인장 방식으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 및 이를 포함하는 인플루엔자 백신 패치에 따르면 종래 근육 주사형 백신보다 접종 편의성을 개선할 수 있으며, 피부 진피층에 면역세포가 근육보다 더 많이 분포하므로 더 뛰어난 면역효과를 갖는다. 또한, 니들 자체가 분해되어 의료폐기물이 없으며, 고형상으로 냉장유통이 필요없이 보관 안정성 증대를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 용매, 고분자의 종류와 농도 및 첨가제의 조합에 따른 표준 항체 실험 및 Low pH 실험 결과를 나타낸다.
 도 2는 3,4차 스크리닝 결과 점성용액의 조성별로 농축액 대비 고형물 활성을 비교한 결과를 나타낸다.
 도 3은 마이크로니들 제작 공정별 활성을 분석한 결과로, 표준 항체 실험 및 Low pH 실험 결과를 나타낸다.
 도 4는 마이크로니들 제조 방법을 나타낸다.
 도 5는 마이크로니들의 모양 및 패치에 정렬되어 있는 모습을 나타낸다.
 도 6은 인플루엔자 백신이 피부에 용해, 전달되는 것을 확인한 결과를 나타낸다.
 도 7은 마이크로니들에 탑재된 인플루엔자 백신의 정량 분석 결과를 나타낸다.
 도 8은 마우스 접종 실험을 위한 실험군과 실험 과정을 나타낸다.
 도 9는 Flu-DMN 접종 후 항체가 측정 결과를 나타낸다.
 도 10은 Flu-DMN 접종 후 중화항체 역가 측정 결과를 나타낸다.
 도 11은 바이러스 접종 후 체중변화 및 생존율 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0051] 상술한 바와 같이, 본 발명은 인플루엔자 백신을 함유하는 용해성 마이크로니들에 대한 것으로, 마이크로니들 구조체를 인체의 피부에 부착시키거나 또는 접촉된 상태로 압력을 가하면 니들의 끝단부가 피부에 침투한 상태에서 용융되어 니들에 포함된 약물성분이 인체로 전달될 수 있다. 마이크로니들을 이용하여 인플루엔자 백신을 전달하는 경우, 항원의 활성을 안정적으로 유지하는 것이 중요하므로, 본 발명자들은 특정 첨가제를 특정 조성 비로 첨가하여 약물의 안정성을 극대화시켰으며, 약물의 위치를 마이크로니들의 중심부에 한정되도록 하여 약물의 안정성이 증가할 뿐만 아니라 피부 침투도 및 약물 전달 효과 또한 현저해지는 것을 확인하였다.

[0052] 따라서, 본 발명은 일관점에서 인플루엔자 백신, 수용성 고분자 및 첨가제를 포함하는 인플루엔자 백신 조성물을 제공한다.

[0053] 본 명세서의 용어, "백신"은 대상(subject)의 면역 반응에 긍정적으로 영향을 주는 조성물을 의미하는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 백신 조성물은 접종대상에게 체액성 면역 반응 (Humoral immune response), 예를 들어 항체에 의해 유발되는 향상된 전신적(systemic)/국소적(local) 면역반응뿐 아니라 세포성 면역 반응 (cellmediated immune response), 예를 들어 CTL(Cytotoxic Tlymphocyte) 반응 등을 제공한다.

[0054] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들에 포함되는 바이러스 항원은 인플루엔자 바이러스 유래 항원을 포함한다. 상기 항원은 바이러스 구성성분 중 면역반응을 일으킬 수 있는 항원을 의미하며, 바람직하게는 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌 구형 도메인(HAgd) 및 인플루엔자 A형(H1N1)주, A형(H3N2)주 및 B형주 바이러스의 항원 또는 이들의 단편일 수 있다.

[0055] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명의 백신은 약독화된 생백신(LAV, Live-attenuated virus) 또는

사백신, 자가복제바이러스벡터(VVr, Viral vector, replicating), 바이러스 유사 입자(Viral-like particles), 서브유닛 백신, 비자가복제바이러스벡터(VVnr, Viral vector, non-replicating), 합성 백신 또는 유전공학 백신일 수 있으며, 바람직하게는 사백신일 수 있다. 본 발명의 인플루엔자 백신 조성물은 적은 용량의 항원으로도 우수한 면역반응을 유도할 수 있다.

- [0056] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 상기 백신은 다가백신일 수 있다. 다가백신(polyvalent vaccine)은 항원이 여러개인 백신으로, 복수의 병원체의 단일 백신주에 대한 후천면역을 형성하는 것을 목적으로 하는 양태를 말한다. 사람의 인플루엔자백신이나 폴리오백신과 같이 동종(同種)의 많은 형, 즉 인플루엔자의 경우 A1, A2, B형, 폴리오의 경우 II, I, III형을 섞어서 만든다. 이러한 병원체는 항원형이 몇 개로 나뉘어 있어, 따로 포함되어 있는 백신(단가백신)으로 예방접종한 경우, 질병 유형이 백신과 전혀 다른 유형으로 발생한다면 도움이 되지 않기 때문에 다가백신을 활용하고 있다.
- [0057] 이 때 다가백신의 대상이 되는 병원체들은 생체에서 복합질환을 일으키는 병원체들일 수 있으며, 이 경우 다가백신은 복합질환을 예방할 수 있는 장점이 있다. 또한 다가백신의 대상이 되는 병원체들은 생체에 가장 주요한 피해를 주는 주요질환을 일으키는 것 수 있으며, 이 경우 다가백신은 가장 위험성이 높은 질병들에 대한 면역을 형성할 수 있는 장점이 있다.
- [0058] 본 발명의 인플루엔자 백신 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 백신 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 인플루엔자 백신 조성물에는 첨가제로 백신 보조제(아주번트, adjuvant)가 포함될 수 있으며, 아주번트는 약물적인 혹은 면역학적인 물질로 다른 물질의 효과를 바꾸기 위해 첨가된다. 백신에 첨가되어 더 많은 항체를 더욱 오래 면역을 만들어 내도록 하는 면역반응을 증가시킬 수 있으며, 이를 통해 항원 접종량을 최소화할 수 있다. 보조제는 또한 특정 면역계 세포를 면역반응 하도록 조절하여 백신의 효과를 높일 수 있다.
- [0060] 보조제는 예를 들어 케모카인(예를 들어, 디펜신, HCC-1), HCC-4, MCP-1, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-15, MIP-3 α , MIP-2, RANTES, 케모카인수용체(e.g., CCR1, CCR-2, CCR-5, CCR-6, CXCR-1)의 다른 리간드 사이토카인(예를 들어, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF), 해당 사이토카인, 열충격 단백질 및 이의 유도체에 대한 수용체의 다른 단백질 리간드, E1F4a의 리슈마니아 동족체 및 이의 유도체 박테리아, ADP-리보실화엑소독신 및 이의 유도체(예를 들어, 유전자 돌연변이체, A 및/또는 B 서브유닛-함유단편, 화학적으로 독소화된 버전), 박테리아 ADP-리보실화엑소독신 또는 이의 유도체를 포함하는 화학적 접합체 또는 유전적 재조합체, C3D 텐덤어레이 그리고 초항원을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다(Nohria et al.(바이오테라피, 다른 유용한 보조제에 대한 7:261-269, 1994) 및 Richards et al.(in Vaccine Design, Eds. Powell et al., Plenum Press, 1995)).
- [0061] 본 발명의 인플루엔자 백신 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0062] 본 발명에서 인플루엔자 백신 이외에 추가적으로 포함되는 고분자 및 첨가제의 최적의 조합 및 비율을 특정하는 경우, 인플루엔자 백신의 안정성이 증가하며 고형상의 형태를 유지할 수 있어 항원의 활성을 안정적으로 유지할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 구체적인 일실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 백신 조성물은 바람직하게는 점성용액을 지칭할 수 있다. 이 경우 추가의 부형제로 백신의 안정성 유지를 위한 첨가제와 고형상의 형태 유지를 위한 고분자를 포함할 수 있다.
- [0064] 예시적인 부형제에는, 예를 들어, 완충제, 탄수화물, 중합체, 아미노산, 펩티드, 계면활성제, 단백질, 비휘발성 비수성 용매, 산, 염기, 산화방지제 및 사카린이 포함될 수 있다.
- [0065] 하나 이상의 완충제가 상기 하나 이상의 부형제의 일부로서 사용될 수 있다. 완충제는 일반적으로 용해성 마이크로니들을 제조하는 단계에서 pH를 안정화시키는 기능을 할 수 있다. 사용되는 특정 완충제는 본 발명의 인플루엔자 백신의 함량에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.

- [0066] 본 발명의 인플루엔자 백신 조성물에는 백신 안정화제 또한 포함될 수 있으며, 백신 조성물을 안정화시키기 위한 어떠한 물질이라도 제한없이 사용될 수 있으며, 설포부틸에테르 베타 사이클로텍스트린(SBECTD), 메글루민 또는 이의 염이 포함될 수 있다.
- [0067] 일실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 인플루엔자 백신의 용매는 포스페이트 완충제, 아세테이트 완충제, 시트레이트 완충제, 글리신 완충제, 암모늄 아세테이트 완충제, 석시네이트 완충제, 피로포스페이트 완충제, 트리스 아세테이트 완충제, 포스페이트 완충 식염수 및 트리스 완충 식염수에서 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 구체적인 일실시예에 있어서, 백신의 용매 변경을 위하여 포스페이트 완충 식염수(이하 'PBS'), 암모늄 아세테이트 완충제, 포타슘 포스페이트 완충제를 이용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 일실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 수용성 고분자는 하이드록시에틸스타치, 하이드록시프로필메틸스타치, 젤라틴, 폴루란, 텍스트란, 콘드로이틴 황산 나트륨, 하이알루론산 나트륨, 카복시메틸셀룰로스(CMC), 폴리바이닐피롤리돈(PVP), 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌 글라이콜, 폴리에틸렌글라이콜, 폴리바이닐알코올(PVA)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종인 것을 특징으로 하나, 생체 적합한 수용성 고분자라면 제한없이 사용 가능하다. 상기 수용성 고분자는 전체 점성용액 조성물에서 1% 이상 50% 이하로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 수용성 고분자가 전체 점성용액 조성물에서 1% 이하로 포함되는 경우, 조성물을 고형상의 마이크로니들로 형성하는 것이 어려울 수 있으며 마이크로니들의 물리적 강도가 피부를 투과하기에 부족할 수 있다. 상기 수용성 고분자가 전체 점성용액 조성물에서 50% 이상 포함되는 경우, 고분자와 백신이 균질화되기 어려울 수 있으며 마이크로니들의 탑재 백신 방출 속도가 현저히 저하될 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 상기 수용성 고분자에 마이크로니들의 서방성을 나타내기 위하여 실크 피브로인이 추가적으로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 "피브로인(Fibroin)"은 집누에나방 유충 등의 다른 나방 속에 의해 생산되는 실크에 포함된 불용성 단백질을 의미한다. 본 발명에서 용어 "실크"는 가잠견(*Bombyx mori* silkworm, 집누에) 또는 야잠견(*Tussah*, Giant silkworm, 들 누에)을 통칭하여 누에로부터 추출한 피브로인 및 실크 그 자체를 의미할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 상기 실크 피브로인은, 예를 들어 재생된 실크 피브로인 및/또는 재조합 실크 피브로인을 포함할 수 있으며, 본 발명의 인플루엔자 백신 조성물의 용해 가능한 염기에 적용된 형태로 포함될 수 있다.
- [0072] 탄수화물의 혼합물을 포함하여, 하나 이상의 탄수화물이 상기 하나 이상의 부형제의 일부로서 사용될 수 있다. 탄수화물은 단당류, 이당류, 및 다당류를 포함하는 당류일 수 있으며, 예를 들어, 라피노스, 스타키오스, 수크로스, 및 트레할로스와 같은 비환원당; 및 단당류 및 이당류와 같은 환원당을 포함할 수 있다. 예시적인 단당류에는 아피오스, 아라비노스, 디기톡소스, 푸코스, 프럭토스, 갈락토스, 글루코스, 굴로스, 하마멜로스, 이도스, 릭소스, 만노스, 리보스, 타가토스, 소르비톨, 자일리톨, 및 자일로스가 포함될 수 있다. 예시적인 이당류에는, 예를 들어, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스, 겐티오비오스, 락토스, 락툴로스, 말토스, 멜리비오스, 프리메베로스, 루티노스, 실라비오스, 소포로스, 투라노스, 및 비시아노스가 포함될 수 있다. 또 다른 양태로서, 수크로스, 트레할로스, 프럭토스, 말토스, 또는 그 조합이 이용될 수 있다. 예시된 당의 모든 광학 이성체 (D, L, 및 라세미 혼합물)가 또한 본 발명에 포함된다.
- [0073] 다당류에는, 예를 들어, 전분, 예를 들어, 하이드록시에틸 전분, 전호화 옥수수 전분, 펜타전분, 텍스트린, 텍스트란 또는 텍스트란 설페이트, 감마-사이클로텍스트린, 알파-사이클로텍스트린, 베타-사이클로텍스트린, 글루코실-알파-사이클로텍스트린, 말토실-알파-사이클로텍스트린, 글루코실-베타-사이클로텍스트린, 말토실-베타-사이클로텍스트린, 2-하이드록시-베타-사이클로텍스트린, 2-하이드록시프로필-베타-사이클로텍스트린, 2-하이드록시프로필-감마-사이클로텍스트린, 하이드록시에틸-베타-사이클로텍스트린, 메틸-베타-사이클로텍스트린, 설포부틸에테르-알파-사이클로텍스트린, 설포부틸에테르-베타-사이클로텍스트린, 및 설포부틸에테르-감마-사이클로텍스트린이 포함될 수 있다. 실시 형태에서, 하이드록시에틸 전분, 텍스트린, 텍스트란, 감마-사이클로텍스트린, 베타-사이클로텍스트린, 또는 그 조합이 이용될 수 있다. 실시 형태에서, 평균 분자 질량이 35,000 내지 76,000인 텍스트란이 이용될 수 있다.
- [0074] 상기 하나 이상의 탄수화물은 셀룰로오스일 수 있다. 적합한 셀룰로오스에는, 예를 들어, 하이드록시에틸 셀룰로오스 (HEC), 메틸 셀룰로오스 (MC), 미정질 셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스 (HPMC), 하이드록시에틸메틸 셀룰로오스 (HEMC), 하이드록시프로필 셀룰로오스 (HPC) 및 그 혼합물이 포함될 수 있다.
- [0075] 하나 이상의 아미노산이 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 적합한 아미노산에는,

예를 들어, 라이신, 히스티딘, 시스테인, 글루타메이트, 라이신 아세테이트, 사르코신, 프롤린, 트레오닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루탐산, 글루타민, 아이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 혈청 트립토판, 타이로신, 발린, 알라닌, 아르기닌, 및 글리신이 포함될 수 있다. 많은 경우에, 수성 매질 또는 제형에서의 아미노산의 수성 용해도를 증가시키기 위해 아미노산의 염 형태가 사용될 수 있다.

[0076] 하나 이상의 펩티드가 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 펩티드를 구성하는 아미노산은 동일할 수 있거나, 또는 적어도 일부가 서로 상이할 수 있다. 적합한 폴리아미노산 (동일한 아미노산)에는, 예를 들어, 폴리히스티딘, 폴리아스파르트산, 및 폴리라이신이 포함될 수 있다.

[0077] 하나 이상의 단백질이 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 적합한 단백질에는, 예를 들어, 인간 혈청 알부민 및 생체공학적인 인간 알부민이 포함될 수 있다.

[0078] 하나 이상의 사카린은 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 일례로, 사카린은 사카린 소듐 다이하이드레이트이다.

[0079] 하나 이상의 지질이 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 일례로, 지질은 다이팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC)일 수 있다.

[0080] 하나 이상의 산 및/또는 염기가 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 약산, 약염기, 강산, 강염기, 또는 그의 일부 조합이 사용될 수 있다. 산 및 염기는 인플루엔자 백신 및/또는 용량-연장 성분을 가용화시키거나 안정화시키기 위한 목적의 역할을 할 수 있다. 이러한 산 및 염기는 반대이온으로서 지칭될 수 있다. 이러한 산 및 염기는 유기 또는 무기일 수 있다. 예시적인 약산에는, 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 펜탄산, 시트르산, 석신산, 글리콜산, 글루콘산, 글루쿠론산, 락트산, 말산, 피루브산, 타르타르산, 타르트론산, 푸마르산, 글루탐산, 아스파르트산, 말론산, 부티르산, 크로톤산, 다이글리콜산, 및 글루타르산이 포함된다. 예시적인 강산에는, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 질산, 설펡산, 황산, 말레산, 인산, 벤젠 설펡산, 및 메탄 설펡산이 포함된다. 예시적인 약염기에는, 예를 들어, 암모니아, 모르폴린, 히스티딘, 라이신, 아르기닌, 모노에탄올아민, 디에탄올아민, 트라이에탄올아민, 트로메타민, 메틸글루카민, 및 글루코사민이 포함된다. 예시적인 강염기에는, 예를 들어, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화칼슘, 및 수산화마그네슘이 포함된다.

[0081] 하나 이상의 계면활성제가 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 상기 하나 이상의 계면활성제는 양쪽성, 양이온성, 음이온성, 또는 비이온성일 수 있다. 적합한 계면활성제에는, 예를 들어, 레시틴, (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 및 폴리소르베이트 80과 같은) 폴리소르베이트, 글리세롤, 소듐 라우로암포아세테이트, 소듐 도데실 설페이트, 세틸피리디늄 클로라이드 (CPC), 도데실트라이메틸암모늄 클로라이드 (DoTAC), 소듐 데크시콜레이트, 벤즈알코늄 클로라이드, 소르비탄 라우레이트, 및 (라우레스-4와 같은) 알코실화 알코올이 포함될 수 있다.

[0082] 하나 이상의 무기 염이 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 적합한 무기 염에는, 예를 들어, 염화나트륨 및 염화칼륨이 포함될 수 있다.

[0083] 비휘발성, 비수성 용매가 또한 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 예에는 프로필렌 글리콜, 다이메틸설폭사이드, 글리세린, 1-메틸-2-피롤리딘, N,N-다이메틸포름아미드 등이 포함될 수 있다.

[0084] 하나 이상의 산화방지제가 상기 하나 이상의 부형제의 적어도 일부를 위해 사용될 수 있다. 적합한 산화방지제에는, 예를 들어, 시트르산나트륨, 시트르산, 아스코르브산, 메티오닌, 아스코르브산나트륨 및 그 조합이 포함될 수 있다.

[0085] 일실시에에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 첨가제는 트레할로스(trehalose), 수크로오스(sucrose), 칼슘-D-글루코네이트(calcium D-gluconate) 및 아르기닌(arginine)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것을 특징으로 하고, 상기 첨가제의 총 농도는 1% 내지 20%인 것을 특징으로 할 수 있다. 일실시에에 있어서, 상기 첨가제가 2종으로 포함되는 경우, 바람직하게 첨가제는 트레할로스 및 수크로오스이며 농도는 각각 1% 내지 10%인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0086] 일실시에에 있어서, 상기 인플루엔자 백신 조성물이 히알루론산, 트레할로스, 수크로오스, 인플루엔자 백신으로 구성되는 경우, 점성 조성물을 기준으로 상기 히알루론산은 10 내지 30 중량%, 상기 트레할로스는 1 내지 5 중량%, 상기 수크로오스는 1 내지 5 중량%, 상기 인플루엔자 백신은 0.1 내지 1 중량%로 포함되는 것을 특징으로

할 수 있고, 바람직하게는 상기 히알루론산은 15 내지 25 중량%, 상기 트레할로스는 2 내지 4 중량%, 상기 수크로오스는 2 내지 4 중량%, 상기 인플루엔자 백신은 0.3 내지 0.8 중량%로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 중량%는 점성 조성물의 전체 함량을 기준으로 한다.

[0087] 본 발명의 일실시예에서 상기 첨가제의 조합 및 비율이 아닌 경우 고형물 함량이 충분하게 나타나지 않거나, 인플루엔자 백신의 안정성이 현저하게 나타나지 않을 수 있다.

[0089] 본 발명은 또한, 상기 조성물로 제조되는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들로, 상기 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들은 지지부, 중단부 및 침단부로 이루어지는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들을 제공한다.

[0090] 본 발명의 일 형태에 따르면, 마이크로니들은 코어 형태 또는 층으로 인플루엔자 백신이 탑재되는 중단부를 구비하며, 중단부를 제외한 상단과 하단에는 각각 인플루엔자 백신이 탑재되지 않은 침단부와 지지부를 포함하는 마이크로니들로 구성될 수 있다.

[0091] 상기 중단부는, 인플루엔자 백신과 백신의 활성 유지를 위한 첨가제와 면역 효능 향상을 위한 면역증강제와 고형상의 형태를 유지하기 위한 고분자로 구성될 수 있다.

[0092] 상기 침단부는 피부층을 물리적으로 투과하기 위해 충분한 강도를 가지기 위한 고분자와 피부 내에서 빠르게 용해되기 위한 첨가제로 구성될 수 있다.

[0093] 상기 지지부는 마이크로니들이 피부에 투과되고 함유한 백신을 모두 전달하기에 충분한 강도를 가지기 위한 고분자와 피부 내에서 빠르게 용해되기 위한 첨가제와 피부 투과를 위해 생긴 미세 상처를 회복시키기 위한 첨가제로 구성될 수 있다.

[0094] 본 명세서의 용어, "면역증강제"는 일반적으로 항원에 대한 체액 또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질을 의미한다.

[0095] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 본 발명의 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 이에 대한 설명은 하기에 기재되어 있다.

[0096] 마이크로니들 고형분을 기준으로 상기 히알루론산은 70 내지 75 중량%, 상기 트레할로스는 10 내지 15%, 상기 수크로오스는 10 내지 15%, 상기 인플루엔자 백신은 1 내지 3 중량%로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게는 상기 히알루론산은 72 내지 74 중량%, 상기 트레할로스는 11 내지 13%, 상기 수크로오스는 11 내지 13%, 상기 인플루엔자 백신은 1 내지 2 중량%로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 중량%는 마이크로니들 전체 함량을 기준으로 한다.

[0097] 본 발명의 구체적인 일실시예 나타난 바와 같이, 특정 조성비로 중심부에 인플루엔자 백신을 농축함으로써, 피부 침투도가 높고 약물 전달 효과가 우수해지는 효과가 나타난다.

[0099] 따라서, 일실시예에 있어서, 상기 조성물의 위치는 마이크로니들의 중단부에 위치하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0100] 일 실시예에 있어서, 상기 중단부에 위치한 조성물은 코어부로 위치하거나 층으로 구분되어 존재할 수 있다. 이때, 피부층을 물리적으로 투과하고, 피부 내에서 빠르게 용해되기 위한 침단부 및 지지부를 구성하는 생체적합성 수용성 고분자에 의해 둘러싸여 있으며 노출되는 부위없이 마이크로니들구조체에 탑재될 수 있다. 혹은 일부 측면이 노출될 수 있다.

[0102] 지지부는 지지체에 일정한 높이로 형성된다. 지지부는 약물의 정량 전달은 돕기 위한 것으로, 약물을 포함하는 코어부가 피부에 충분히 삽입될 수 있도록 일정한 높이로 형성될 수 있다. 따라서 지지부는 약물을 포함하지 않는다.

[0103] 이를 통해, 본 발명의 일 실시예에 따른 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들은 약물을 포함하는 코어부가 피부 내에 충분히 삽입될 수 있으므로 약물의 정량 전달을 신뢰성 높게 보장할 수 있다.

[0104] 코어부는 유효한 약물을 탑재하는 부위로서, 지지부 상에 형성된다. 여기서, 코어부는 친수성 물질 또는 수소성

물질로 이루어질 수 있다. 일례로, 코어부는 히알루론산(HA; Hyaluronic Acid) 또는 PCL(Polycaprolactone)을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 아울러, 코어부는 파우더(power) 또는 액상으로 이루어질 수 있다.

- [0105] 이때, 코어부는 제조되는 물질에 따라 다양한 형상을 가질 수 있다. 일례로, 코어부는 친수성 물질로 이루어진 경우, 침단부의 형상과 유사하게 형상을 가질 수 있다. 즉, 코어부는 유동화 공정에 의한 영향을 받기 때문에 침단부의 팁부의 형상과 유사하게 형성될 수 있다.
- [0106] 이와 달리, 코어부는 소수성 물질로 이루어진 경우, 침단부 내에서 원형으로 구비될 수 있다. 여기서, 코어부의 형상은 특별히 한정되지 않는다. 다만, 코어부는 침단부의 형상과 무관한 형상을 갖는다. 즉, 코어부는 친수성 물질의 경우와는 다르게 유동화 공정에 의한 영향이 거의 없기 때문에 침단부의 팁부의 형상과 유사하게 형성되지 않을 수 있다.
- [0107] 침단부는 백신 용해성 마이크로니들의 전체적인 모양을 형성하기 위한 것으로 지지부 상에서 코어부를 덮도록 형성된다. 여기서, 침단부는 약물이 탑재되지 않은 폴리머로 이루어질 수 있다. 침단부는 커버층 및 팁부를 포함할 수 있다.
- [0108] 커버층은 코어부의 약물을 보호하기 위한 것으로 코어부가 외부로 노출되지 않도록 완전히 덮을 수 있다.
- [0109] 팁부는 피부에 삽입이 용이하도록 선단이 뾰족하게 형성될 수 있다. 이때, 침단부는 물리적으로 높은 강도(strength)를 갖는 물질로 이루어지거나 이를 위한 제조 공정으로 제조될 수 있다.
- [0110] 여기서, 침단부는 유동화 공정에 의한 원심 리소그래피 방법에 의해 형성될 수 있다. 따라서 침단부는 유동화 공정 시간에 따라 모양이 변경될 수 있다.
- [0111] 이때, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)와 코어부의 높이(H2) 사이의 관계는 코어부를 이루는 물질에 따라 결정될 수 있다. 여기서, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)는 유동화 공정 시간에 영향을 받을 수 있다. 즉, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)는 유동화 공정 시간에 반비례할 수 있다.
- [0112] 일례로, 코어부가 친수성 물질로 이루어진 경우, 코어부의 높이(H2)는 유동화 공정 시간에 영향을 받을 수 있다. 보다 구체적으로, 코어부의 높이(H2)는 코어부 외부의 침단부의 두께(T)에 반비례할 수 있다. 즉, 코어부의 높이(H2)는 코어부 외부의 침단부의 두께(T)가 감소할수록 증가할 수 있다.
- [0113] 이때, 코어부의 선단에서 침단부의 선단까지의 높이(H3)는 코어부 외부의 침단부의 두께(T)가 작을수록 감소할 수 있다. 따라서 코어부의 선단에서 침단부의 선단까지의 높이(H3)는 코어부 외부의 침단부의 두께(T)에 비례할 수 있다.
- [0114] 여기서, 지지부, 코어부 및 침단부의 전체 높이(H) 및 지지부의 높이(H1)가 일정한 경우, 코어부의 높이(H2)와 코어부의 선단에서 침단부의 선단까지의 높이(H3)는 유동화 공정 시간에 영향을 받을 수 있다. 이때, 코어부의 높이(H2)에 유동화 공정 시간에 비례하여 증가하기 때문에 코어부의 높이(H2)와 코어부의 선단에서 침단부의 선단까지의 높이(H3)는 서로 반비례할 수 있다.
- [0115] 다른 예로서, 코어부가 소수성 물질로 이루어진 경우, 코어부의 높이(H2)는 유동화 공정 시간에 영향을 받지 않는다. 즉, 코어부의 높이(H2)는 코어부 외부의 침단부의 두께(T)에 무관하게 일정할 수 있다.
- [0116] 이때, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)는 1~50 μ m일 수 있다. 여기서, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)가 1 μ m 미만인 경우, 침단부는 충분한 강도를 제공하지 못하므로 코어부의 외부로 노출되거나 커버층으로부터 누설될 수 있다. 따라서 백신 용해성 마이크로니들은 약물의 안전한 보호를 보장하지 못한다.
- [0117] 반면, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)가 50 μ m를 초과하는 경우, 필요 이상으로 침단부가 형성되어 침단부에 의한 효과의 향상없이 재료를 낭비할 수 있다.
- [0118] 또한, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)는 코어부의 물성 또는 형상에 따라 위치별로 상이할 수 있다. 일례로, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)는 코어부와 지지부의 접합면에서 가장 작을 수 있다. 이에 의해, 백신 용해성 마이크로니들은 유동화 공정 조건을 최적화하지 않고도 용이하게 제조될 수 있다.
- [0119] 다른 예로서, 코어부 외부의 침단부의 두께(T)는 코어부 전체에 걸쳐 균일할 수 있다. 이에 의해, 침단부는 코어부에 포함된 약물의 보호를 더 안전하게 보장할 수 있다.
- [0121] 본 발명은 또한, 상기 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 및; 상기 마이크로니들을 지지하는 기관층을 포함

하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 어레이를 제공한다.

- [0122] 본 발명에 따른 마이크로니들 어레이가 점막 또는 피부에 적용될 때, 상기 용해성 마이크로니들은 점막 내 또는 피부 내로 도달할 수 있고, 마이크로니들부가 용해되어, 인플루엔자 백신이 작용한다. 마이크로니들 어레이의 기관은 점막 또는 피부 내의 고습도 환경하에서 점막 또는 피부의 굴곡에 따라 밀착되며, 기관에 함유되어 있는 인플루엔자 백신 또한 높은 항체 생성 효과를 유발시킨다.
- [0123] 마이크로니들 어레이를 피부에 적용할 때에는, 적당한 정도로 꺾기 어렵고, 또한, 인플루엔자 백신을 침투하기 쉽게 하기 위해서, 중량 평균 분자량이 10만 이상인 고분자량 고분자 물질과 중량 평균 분자량이 5만 이하인 저분자량 고분자 물질의 혼합물로 마이크로니들 어레이를 형성할 수 있다. 상기 고분자량 고분자 물질의 중량 평균 분자량은 5만 이상 200만 이하가 바람직하다. 또한, 저분자량 고분자 물질의 중량 평균 분자량은 1000 이상 5만 이하가 바람직하다. 일실시예에 있어서, 중량 평균 분자량은 겔 투과 크로마토 그래피(GPC)에 의해 측정될 수 있다.
- [0124] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마이크로니들은 일정 간격을 두고 규칙적으로 배열될 수 있다.
- [0125] 일실시예에 있어서, 상기 마이크로니들의 높이는 500 내지 1000um인 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 600 내지 950um일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 700 내지 900um 일 수 있다.
- [0126] 지지부는 상기 기관층에 일정한 높이로 형성된다. 지지부는 약물의 정량 전달을 돕기 위한 것으로, 약물을 포함하는 중단부가 피부에 충분히 삽입될 수 있도록 일정한 높이로 형성될 수 있다. 따라서 지지부는 약물을 포함하지 않는다.
- [0127] 이를 통해, 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 마이크로니들은 인플루엔자 백신을 포함하는 중단부가 피부 내에 충분히 삽입될 수 있으므로 약물의 정량 전달을 신뢰성 높게 보장할 수 있다.
- [0129] 본 발명은 또한, 상기 마이크로니들 어레이 배면에 지지체를 포함하는 인플루엔자 백신 패치를 제공한다.
- [0130] 상기 지지체는, 적용 부위에 따라서, 취급하기 쉬운 크기와 형상으로 제작할 수 있으며, 예를 들어 마이크로니들 어레이의 외측 에지로부터 3 내지 20mm 정도 크게 하는 것이 바람직하다. 지지체의 두께는, 마이크로니들 어레이 기관의 두께와 동일하거나, 더 얇거나, 더 두꺼울 수 있으며, 마이크로니들 어레이를 지지할 수 있도록 유연하고 얇게 또한, 사용시 취급이 용이한 두께로 제작할 수 있다.
- [0131] 상기 지지체는, 마이크로니들 어레이의 점막 또는 피부에서의 밀착력을 보강하기 위하여, 점막 또는 피부와의 점착성을 가지는 것이 바람직하다.
- [0132] 지지체의 점착성을 위한 하나의 형태로서, 지지체에 점착성 물질이 코팅되어 있는, 즉, 점착제를 도포한 지지체를 사용할 수 있다.
- [0133] 점착성 물질로는, 패치 제제에 통상 사용되는 점착제를 사용할 수 있으며, 예를 들어 아크릴계, 실리콘계, 고무계 점착제의 습윤면 점착성이 있는 그레이드가 바람직하다.
- [0134] 지지체의 점착성을 위한 다른 형태로서, 지지체는 수용성일 수 있다. 폴리비닐피롤리돈(PVP), 카르복시메틸셀룰로오스(CMC), 폴리비닐알코올(PVA) 등의 저분자량 수용성 필름을 사용하여, 점막, 피부의 수분에 의해 점착성을 나타낼 수 있다. 이 경우, 적용하고자 하는 점막, 피부 등의 반대측에는 점착하지 않도록, 수용성 지지체의 반대측에 대치하는 면은 비수용성 고분자 필름을 더 적층하는 것이 바람직하다.
- [0135] 상기 지지체는 마이크로니들이 피부에 투과되고 함유한 백신을 모두 전달하기에 충분한 강도를 가지기 위한 고분자와 피부 내에서 빠르게 용해되기 위한 첨가제를 포함한다. 또한, 추가적으로 피부 투과를 위해 생긴 미세 상처를 회복시키기 위한 첨가제를 포함할 수 있으며, 본 발명의 기술 분야에 속하는 통상의 기술자가 선택할 수 있는 범위 내에서 어떠한 첨가제이든 제한없이 사용 가능하다.
- [0136] 본 발명의 마이크로니들 어레이 및 마이크로니들 패치는, 점막 또는 피부 등과 같이 단위 면적당 마이크로니들 어레이에 포함되는 인플루엔자 백신의 양 및 마이크로니들 어레이의 크기를 적절히 설정할 수 있다.
- [0137] 구체적인 일실시예에서, 마이크로니들 패치에는 850 ± 50 um의 길이의 마이크로니들이 패치 당 61개가 배열된 바 있다.
- [0138] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 백신 패치는 소정의 정보를 표시하기 위하여 상기 지지체의 상기 일면 또는

타면에 형성되는 마커를 포함할 수 있다.

- [0139] 상기 정보는 마이크로니들 및 마이크로니들 패치에 관한 정보를 포함할 수 있다. 예를 들어, 마이크로니들에 의하여 체내로 투여되는 투여 물질의 종류, 용량, 제품의 정보 및 이에 대한 주의사항에 관한 정보를 포함할 수 있다.
- [0140] 본 실시예에서, 사용자는 문자 표시를 확인함으로써, 제품 명칭 및 제품 번호를 곧바로 확인할 수 있다. 또한, 사용자는 스마트폰 등과 같은 사용자 단말을 이용하여 QR 코드를 스캔함으로써, 체내로 투여되는 약물의 종류, 용량, 제품의 정보, 투여 시간 및 주의사항 등 많은 정보를 쉽고 간편하게 획득할 수 있다.
- [0141] 나아가, 마커는 사용자 외의 제 3 자에게 상기 정보 외에 다른 정보를 전달할 수 있다. 예를 들어, 제 3 자로서 의료진 또는 검역 관리인이 포함될 수 있으며, 사용자로서 의료진의 관리를 받는 환자 또는 특정 시설을 출입하거나 국경을 통과하는 사람이 있을 수 있다.
- [0142] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마커는 상기 복수의 마이크로니들이 피부에 삽입된 후, 외부 자극이 인가됨에 따라 색상이 변화하도록 형성된 것일 수 있다.
- [0143] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 외부 자극은 열, 광, 수분 및 압력 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0144] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마커는 상기 복수의 마이크로니들이 상기 피부에 삽입된 후, 시간이 경과함에 따라 색상이 변화하도록 형성된 것일 수 있다.
- [0145] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마커는 산화 반응이 일어날 수 있는 반응 물질을 포함할 수 있다.
- [0146] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 색상 변화는 상기 반응 물질의 산화 반응에 의하여 이루어진 것일 수 있다.
- [0147] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 색상 변화가 완료되는데 소요되는 시간은 10분 이상이 되도록 형성된 것일 수 있다.
- [0148] 상기 소요되는 시간은 마이크로니들에 포함된 인플루엔자 백신 중 일정 양, 예를 들어 80% 이상이 체내에 투여되는데 소요되는 시간으로 설정될 수 있다. 보다 구체적으로, 소요되는 시간은 마이크로니들이 삽입된 후로부터 10분 이상이 되도록 설정될 수 있다. 이와 같이, 목표한 양의 인플루엔자 백신이 체내로 투여되는데 필요한 최소한의 시간과 상기 마커의 색상이 변화하는데 소요되는 시간을 조정함으로써, 사용자에게 투여량과 관련된 실질적인 적용 시간에 관한 정보를 전달할 수 있다.
- [0149] 이때, 마커의 색상이 변화하는데 소요되는 시간은 반응 물질의 종류, 농도 및 혼합되는 다른 물질의 선택 등을 변경하며 수행되는 반복적인 실험을 통하여 도출해낼 수 있을 것이다.
- [0150] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마커는 QR 코드(Quick Response code) 또는 문자를 포함할 수 있다. 본 명세서에서, QR 코드는 사각형의 가로세로 격자무늬에 다양한 정보를 담고 있는 2차원(매트릭스) 형식의 코드를 의미한다.
- [0152] 본 발명은 또한, 상기 인플루엔자 백신 조성물을 형성하는 단계; 마이크로니들 형상을 성형하는 단계; 및 점성 용액을 마이크로니들 형상으로 고정화하는 단계를 포함하는 인플루엔자 백신 용해성 마이크로니들 제조방법을 제공한다.
- [0153] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 성형 단계는 유동화, 물딩, 원심 리소그래피 기법 및 송풍 인장 방식으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0154] 본 발명의 구체적인 일실시예에서, 마이크로니들은 지지체에 제1조성물을 디스펜싱하는 제1디스펜싱 단계; 상기 제1조성물을 건조하여 베이스층을 형성하는 건조 단계; 상기 베이스층 상에 약물을 포함하는 제2조성물을 디스펜싱하는 제2디스펜싱 단계; 상기 베이스층 상에 상기 제2조성물을 덮도록 제3조성물을 디스펜싱하는 제3디스펜싱 단계; 및 유동화 및 원심 리소그래피 기법으로 상기 제2조성물에 의한 코어층 및 상기 제3조성물에 의한 셸층을 형성하는 성형 단계를 포함하여 제조되었다. 제1조성물에는 수용성 고분자인 Sodium Hyaluronate 30kDa 65%(w/v)가 PBS를 용매로 하여 포함되었으며, 베이스층 위에 인플루엔자 백신을 최종으로 함유하고 있는 조성물을 갖는 용액(제2조성물)을 도포하였다. 제2조성물을 덮도록 Sodium hyaluronate 30 kDa 65% (w/v)가 PBS를 용매로 하여 제3조성물이 도포되었으며, 이후 유동화 및 원심 리소그래피 단계를 거쳐 제2조성물에 의한 코어층 및 제3조성물에 의한 셸층을 형성하였다.

[0156] 본 발명의 인플루엔자 백신은 마이크로니들을 이용하는 경우, 콜드체인 문제 해결, 용량 절약 효과, 자가 투여 등 많은 이점을 보여줄 수 있는 유망한 분야 중 하나이다. 또한, 마이크로니들은 고체 형태이기 때문에 액상 주사제에 비해 로딩된 항원의 활성을 안정적으로 유지할 수 있다. 아울러, 마이크로니들은 면역 관련 세포(항원 제시 세포)가 풍부한 진피층에 직접 항원을 전달하기 때문에 적은 양의 항원으로도 높은 항체 생성 효과를 기대할 수 있다.

[0158] 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 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0160] 1차 스크리닝

[0161] 백신의 용매를 변경하여 마이크로니들 상에서 적용이 가능하되, 손실을 최소화하고, 회수율을 높이기 위하여 3가지 용매로 변경하는 스크리닝을 진행하였다. PBS, 150mM ammonium acetate (pH 7.4), 100mM potassium phosphate (pH 7.4)를 후보로 하여 스크리닝을 진행하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

표 1

[0162]

Buffer exchange & concentration	Original	PBS	150mM ammonium acetate (pH 7.4)	100mM potassium phosphate (pH 7.4)
Protein conc. (ug/ml)	516	22,500	16,600	20,400
HA conc. (ug/ml)	-	6,500	4,492	5,356
Volume (ul)	-	500	85	112
Total protein (ug)	-	11,250	1,411	2,284.8
손실분 (ug)		2,166	1,169	1,169
회수율 (%)		83.9	54.7	88.6

[0163] 1차 스크리닝 결과, 단백질 농도, HA농도 및 회수율에 있어서, PBS가 가장 우수했으며, Phosphate, Acetate 순이었다.

실시예 2

[0165] 2차 스크리닝

[0166] 8개의 점성용액을 만들어 용매에 따른 고분자의 종류(carboxymethyl cellulose 250, Gelatin from cold water fish)와 농도(1%, 5%, 10%), 첨가제의 조합(Trehalose, Arginine 및 Sucrose, Calcium D-gluconate)을 확인하였다. 이 때 사용한 독감백신 및 독감백신 hemagglutinin의 농도는 6.5mg/mL를 유지하였다. 8가지 점성 용액의 조성은 다음의 [표 2]와 같다.

표 2

점성용액 번호	Buffer	독감백신	독감백신 hemagglutinin 농도 (mg/mL)	고분자	고분자 농도 (w/v)	첨가제1	첨가제1 농도 (w/v)	첨가제2	첨가제2 농도 (w/v)
1	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250	1%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
2	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250	1%	Arginine	5%	Calcium D-gluconate	5%
3	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
4	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250	5%	Arginine	5%	Calcium D-gluconate	5%
5	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	Gelatin from cold water fish	10%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
6	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	Gelatin from cold water fish	10%	Arginine	5%	Calcium D-gluconate	5%
7	150 mM ammonium acetate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
8	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%

[0167]

[0169]

각각의 용액당 두 개의 샘플을 이용하였으며, 이에 대한 구체적인 샘플정보는 하기 [표 3]과 같다. 또한, HA 비율(w/w), 토출량(mg), HA양(mg), HA양(ug)을 나타냈다. 마이크로니들 한 패치당 15ug가 탑재될 수 있도록 계산한 결과이다.

표 3

점성용액	샘플#	용매	고분자	첨가제	HA 비율 (w/w)	토출량 (mg)	HA 양 (mg)	HA 양 (ug)
1	1-3	Phosphate	CMC 1%	TRE 5%, SUC 5%	0.004841	2.7	0.0131	13.1
	1-4	Phosphate	CMC 1%	TRE 5%, SUC 5%	0.004841	2.7	0.0131	13.1
2	2-2	Phosphate	CMC 1%	ARG 5%, CHG 5%	0.004841	2.9	0.0140	14.0
	2-3	Phosphate	CMC 1%	ARG 5%, CHG 5%	0.004841	2.9	0.0140	14.0
3	3-1	Phosphate	CMC 5%	TRE 5%, SUC 5%	0.004674	3.4	0.0159	15.9
	3-2	Phosphate	CMC 5%	TRE 5%, SUC 5%	0.004674	3.5	0.0164	16.4
4	4-1	Phosphate	CMC 5%	ARG 5%, CHG 5%	0.004674	2.8	0.0131	13.1
	4-3	Phosphate	CMC 5%	ARG 5%, CHG 5%	0.004674	3.0	0.0140	14.0
5	5-2	Phosphate	FG 10%	TRE 5%, SUC 5%	0.004480	4.0	0.0179	17.9
	5-3	Phosphate	FG 10%	TRE 5%, SUC 5%	0.004480	4.0	0.0179	17.9
6	6-2	Phosphate	FG 10%	ARG 5%, CHG 5%	0.004480	3.1	0.0139	13.9
	6-3	Phosphate	FG 10%	ARG 5%, CHG 5%	0.004480	2.9	0.0130	13.0
7	7-1	Acetate	CMC 5%	TRE 5%, SUC 5%	0.004674	1.9	0.0089	8.9
	7-3	Acetate	CMC 5%	TRE 5%, SUC 5%	0.004674	1.8	0.0084	8.4
8	8-1	PBS	CMC 5%	TRE 5%, SUC 5%	0.004674	2.5	0.0117	11.7
	8-3	PBS	CMC 5%	TRE 5%, SUC 5%	0.004674	2.5	0.0117	11.7

[0170]

[0171]

위 샘플에 대한 표준 항체 실험 및 Low pH 실험 결과는 도 1과 같다.

[0173]

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

[0174]

항원-항체 반응을 이용하여 인플루엔자의 HA를 정량 분석하였다. 표준 항체 실험방법의 경우 96 well plate에 NIBSC 표준 항원을 코팅하고 인플루엔자의 HA를 포함하는 샘플을 처리하여 항체에 결합한 HA의 양을 정량화 하였다.

[0176]

Low pH 실험

[0177]

Low pH 실험방법의 경우 표준 항체 실험방법과 유사하게 96 well plate를 준비하고 인플루엔자의 HA를 포함하는 샘플을 피부 내 pH 환경과 유사한 약산성 조건으로 준비하여 항체에 결합한 HA의 양을 정량화 하였다.

[0179]

그 결과, 8개의 샘플에서 ELISA 결과, 농축액 BSA Assay, SRID 결과를 종합하여 얻은 점수를 하기 [표 4]에 나타내었다. 자체 기준으로 스코어링한 결과, PBS가 1등이었으며, Phosphate는 2~7등, Acetate는 8등이었다.

표 4

시험군	농축액			고형물							
	Phos	Ace	PBS	Phos						Ace	PBS
				1	2	3	4	5	6	7	8
점수	7.1969 3	6.037678 899	7.145689 655	6.804348 837	6.4580 23	6.9685 35	6.9692 09	6.8660 23	6.5398 6	5.7985 78	8.3689 66
농축액 대비 고형물 활성				95%	90%	97%	97%	95%	91%	96%	117%
등수				5	7	3	2	4	6	8	1

이러한 결과를 바탕으로 PBS 고형물 2종, Phosphate 고형물 1종을 선정하였다. 또한, Acetate 고형물 활성은 8 등이었으나, 레퍼런스에서 활성이 좋아 1종을 선정하였고, 이후 3차 스크리닝을 진행하였다.

실시예 3

3차 스크리닝, ELISA

3, 4차 스크리닝 샘플은 [표 5]와 같다. 2차 스크리닝 결과에서 우수한 결과를 나타냈던 PBS 고형물 2종, Phosphate 고형물 1종을 포함하고, Acetate 고형물을 실험군에 포함하였다.

표 5

번호	실험군	상세내용	비고
1	고형물(실험군)	Phosphate buffer	
2		Acetate buffer	
3		PBS buffer	
4		PBS buffer	
5	농축액	PBS buffer	고형물 제작에 사용한 동일 농축액
6		Phosphate buffer	
7		Acetate buffer	
8	표준항원	NIBSC 표준 항원	-
9	고형물(Blank)	Polymer1, Excipient1	-
10		Polymer1, Excipient2	-
11		Polymer2, Excipient1	-
12		Polymer2, Excipient2	-

상기 표에서 고형물 실험군의 상세 조성 정보는 하기 [표 6]과 같다.

표 6

번호	Buffer	독감백신	독감백신 hemagglutinin 농도 (mg/mL)	고분자	고분자 농도 (w/v)	첨가제1	첨가제1 농도 (w/v)	첨가제2	첨가제2 농도 (w/v)
1	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
2	150 mM ammonium acetate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
3	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
4	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Arginine	5%	Calcium D-gluconate	5%

그 결과는 하기 [표 7]에 나타냈으며, 결과값은 ELISA 결과, 농축액 BCA Assay, SRID 결과를 종합하여 얻은 점수를 나타낸다.

표 7

표준항체 실험1				
시험군	Phos	Ace	PBS	
	1--1	2--1	3--1	4--1
결과값	2.916594	2.233676	2.950281	2.844101
농축액 대비 고형물 활성	82%	62%	98%	95%
표준항체 실험2				
시험군	Phos	Ace	PBS	
	1--2	2--2	3--2	4--2
결과값	2.568178	2.173461	2.510393	2.464888
농축액 대비 고형물 활성	80%	67%	96%	94%
Low pH 실험1				
시험군	Phos	Ace	PBS	
	1--1	2--1	3--1	4--1
결과값	3.226634	2.55998	3.488764	3.397753
농축액 대비 고형물 활성	83%	64%	106%	104%
Low pH 실험2				
시험군	Phos	Ace	PBS	
	1--2	2--2	3--2	4--2
결과값	2.965069	2.475353	3.223315	3.005899
농축액 대비 고형물 활성	71%	62%	96%	89%

자체 기준 스코어링 결과, PBS 고형물 활성이 가장 높았다. Blank 고형물은 ELISA Binding이 없었다.

실시예 4

4차 스크리닝, SRID

SRID(Single Radial Immune Diffusion)를 사용하여 백신 중의 헤마글루티닌 (HA) 단백질의 양을 측정하였다. 스크리닝에 이용된 샘플의 함량은 하기 [표 8]과 같다.

표 8

번호	이름	Buffer	독감백신	독감백신 hemagglutinin 농도 (mg/mL)	고분자	고분자 농도 (w/v)	첨가제1	첨가제1 농도 (w/v)	첨가제2	첨가제2 농도 (w/v)
1	고PBS1	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
2	고PBS2	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Arginine	5%	Calcium D- gluconate	5%
3	고phos	100 mM potassium phosphate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
4	고ace	150 mM ammonium acetate (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%

그 결과, 하기 [표 9]와 같이 SRID 실험결과 PBS > Phosphate > Acetate 순으로 활성이 좋았으며, Blank 고형물은 SRID Binding이 없었다.

표 9

순번	용매	고분자	첨가제	1차			2차		
				예상 HA양	SRID결과 HA양	활성(%)	예상 HA양	SRID결과 HA양	활성(%)
1	PBS	CMC	TRE+SUC	21.2	23.1	109.0%	22.1	24.0	108.6%
2	PBS	CMC	ARG+CHG	26.3	24.8	94.2%	27.2	25.2	93.9%
3	Phos	CMC	ARG+CHG	37.0	33.9	91.7%	38.6	35.4	91.7%
4	Ace	CMC	ARG+CHG	31.1	24.5	78.7%	31.7	24.9	78.6%

3,4차 스크리닝 결과 농축액 대비 고형물 활성은 도 3에 나타냈다. 점성 용액 조성별 ELISA 결과 및 SRID 실험 분석 결과를 바탕으로 PBS 고형물 2종을 최종적으로 선정하였다.

실시예 5

MN 제작 공정별 활성 분석

표 10

번호	실험군	상세내용
1	농축액	PBS buffer
2	고형물	Polymer1, Excipient1
3	MN	알루미늄백에 포장이 완료된 MN 패치
4	MN반제품	MN패치의 제조 직후 반제품

실험군 상세 조성정보는 다음과 같다.

표 11

번호	이름	Buffer	독감백신	독감백신 hemagglutinin 농도 (mg/mL)	고분자	고분자 농도 (w/v)	첨가제1	첨가제1 농도 (w/v)	첨가제2	첨가제2 농도 (w/v)
1	농축액, 고형물, MN, MN+디미	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%

MN 제작 공정별 활성을 분석한 결과는 도 3과 같다. 전술한 표준항체 실험과 Low pH 실험을 수행하였다. HA 단백질 양 초기값 100ng부터 1/2 serial dilution 하여 코팅하였다. 도 3에서 Y축은 항원을 코팅하지 않고 진행한 (-) control 0.D값의 2배보다 높은 0.D값을 갖는 마지막 희석배수 값을 나타낸다. 표준은 NIBSC 표준항원을 의미하며, '농' : 농축액, 'F2, F5' : 고형물, 'F3, F4' : MN, 'F6, F7' : MN반제품을 나타낸다. 그 결과, rhdjwd별로 활성이 손실되지 않고, 값이 유지되는 것을 확인하였다.

상기 실험 결과에 따라 최종적으로 확정된 조성 정보는 다음과 같다.

상기 실험 결과에 따라 버퍼의 종류 및 첨가제의 조합과 농도를 확정하였으며, 공정상 피부에서 용해도가 높은 제형을 선택하기 위하여 고분자로 Sodium Hyaluronate 30kD를 추가적으로 최종 제형으로 확정하였다.

표 12

번호	Buffer	독감백신	독감백신 hemagglutinin 농도 (mg/mL)	고분자	고분자 농도 (w/v)	첨가제1	첨가제1 농도 (w/v)	첨가제2	첨가제2 농도 (w/v)
1	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	carboxymethyl cellulose 250 kDa	5%	Trehalose	5%	Sucrose	5%
2	Phosphate-buffered saline (pH 7.4)	A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)	6.5	Sodium hyaluronate 30 kDa	30%	Trehalose	5%	Sucrose	5%

실시예 6

마이크로니들 제조 방법

도 4에 나타난 바와 같이, 마이크로니들은 지지체에 제1조성물을 디스펜싱하는 제1디스펜싱 단계; 상기 제1조성물을 건조하여 베이스층을 형성하는 건조 단계; 상기 베이스층 상에 약물을 포함하는 제2조성물을 디스펜싱하는 제2디스펜싱 단계; 상기 베이스층 상에 상기 제2조성물을 덮도록 제3조성물을 디스펜싱하는 제3디스펜싱 단계; 및 유동화 및 원심 리소그래피 기법으로 상기 제2조성물에 의한 코어층 및 상기 제3조성물에 의한 셀층을 형성하는 성형 단계를 포함하여 제조될 수 있다.

구체적으로, 제 1조성물에는 Sodium Hyaluronate 30kDa 65%(w/v)가 PBS를 용매로 하여 포함될 수 있다. 제1조성물을 건조하여 베이스층이 형성되면, 베이스층 위에 상기 [표 12]에 기재된 것과 같이 인플루엔자 백신을 최종으로 함유하고 있는 조성을 갖는 점성 조성물(제2조성물)을 도포한다. 제2조성물을 덮도록 Sodium hyaluronate 30 kDa 65% (w/v)가 PBS를 용매로 하여 제3조성물이 도포될 수 있다. 이후 유동화 및 원심 리소그래피 단계를 거쳐 제2조성물에 의한 코어층 및 제3조성물에 의한 셀층을 형성할 수 있다.

하기 [표 13]은 점성 조성물 기준으로 한 각 조성비 비율이며, [표 14]는 마이크로니들 고형분을 기준으로 한 조성비 비율이다.

표 13

항목	buffer	Hyaluronic acid	Trehalose	Scrose	Influenza HA	Sum
질량	1000	300	50	50	6.5	1406.5
비율	71.1%	21.3%	3.6%	3.6%	0.5%	100.0%

표 14

항목	Hyaluronic acid	Trehalose	Scrose	Influenza HA	Sum
질량	300	50	50	6.5	406.5
비율	73.8%	12.3%	12.3%	1.6%	100.0%

실시예 7

Flu-DMN: Influenza vaccine loaded dissolving microneedle (DMN) patch

DMN의 모양은 도 5와 같다. 패치에 DMN이 정렬되어 있음을 확인할 수 있다. 61개의 DMN을 접착 패치에 정렬하고 피부 표면에 30분간 부착하여 직경 1.5cm의 둥근 부위에 인플루엔자 백신을 전달하였다. DMN의 길이와 직경은 각각 $850 \pm 50 \mu\text{m}$ 및 $35 \pm 15 \mu\text{m}$ 였다.

인플루엔자 백신을 피부에 용해, 전달하는 것을 확인하기 위해 인플루엔자 백신/형광염료가 부착된 DMN 패치를 돼지 사체 피부에 적용하였다. 그 결과, DMN에 로딩된 형광염료의 91%와 99%는 각각 10분 및 30분 동안 적용 시 피부에 전달되는 것을 확인하였다(도 6).

패치에 로딩된 인플루엔자 항원의 양은 단일 방사형 면역확산(SRID)으로 분석되었다. 인플루엔자 항원은 활성 약학 성분(API)으로 패치당 15~17 μg 을 정량하였다.

패치에 로딩한 인플루엔자 항원의 양은 Loading antigen으로, SRID로 분석된 실제 패치 내 항원의 측정값은 Assay result로 표기하였다. 또한, 패치에 로딩한 항원 대비 실제 패치 내 항원 측정값의 비율을 Activity로 표기하였으며, 결과적으로 마이크로니들 조성1과 2에서 88~93%의 활성을 확인하였다(도 7).

실시예 8

in vivo Flu-DMN 접종

- [0223] 마우스 접종 실험은 세 가지 다른 용량과 부스팅 유무에 관계없이 Flu-DMN의 효능을 확인하기 위해 수행되었다.
- [0224] 8개의 실험군으로 나누어, 각 군별로 5마리씩 대상으로 하였고, 투여 경로로는 경피 투여로 Intradermal, 'ID'로 나타내었으며, 근육투여로는 Intramuscular, 'IM'으로 나타냈다. 부스팅 유무와 약물의 양을 5ug, 10ug, 15ug로 하였다. 실험군 정보는 도 8에 나타났다.
- [0225] 8개 실험군에 대한 백신 접종 일정에 대한 정보를 도 8 하단부에 나타냈다. 실험 시작 직후 (Day 0)에 8개 실험군을 각각의 접종방법에 따라 동물에 투여하였고, 실험 시작 2주 후 (2 week)에 Boosting을 하는 실험군은 추가 투여를 실시하였다. 실험군 접종 후 동물 체내에 생성된 항체 농도를 분석하기 위해 실험 시작 2주 후 (2 week), 4주 후(4 week)에 동물의 안와정맥총에서 채혈 (eye bleeding)을 실시하였다.
- [0227] Flu-DMN 접종 후 항체가를 측정하기 위해 혈구응집 억제 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 부스팅을 시행한 Flu-DMN이 부스팅을 하지 않은 양성대조군에 비해 더 높은 항체가를 보였고, 백신 용량이 증가할수록 항체가가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 9

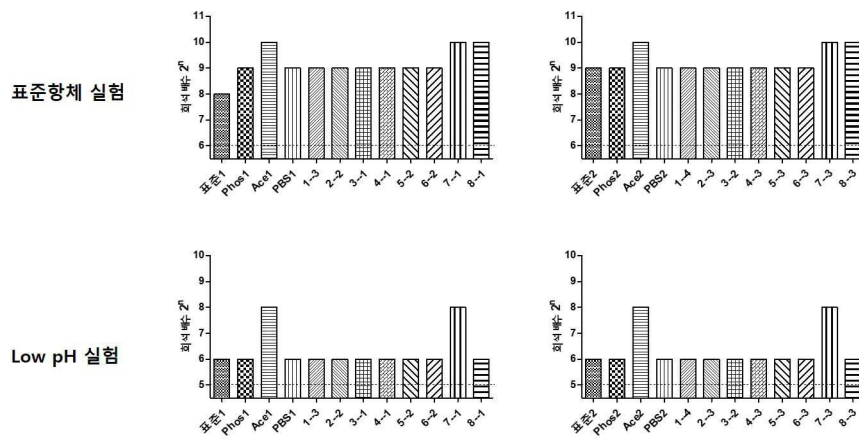
- [0229] **중화항체 역가 측정**
- [0230] Flu-DMN 접종 후 중화항체 역가를 측정하기 위해 플라크 감소 중화 시험(PRNT)을 수행하였다.
- [0231] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 부스팅을 시행한 Flu-DMN이 부스팅을 하지 않은 양성대조군에 비해 더 높은 중화항체역가를 보였으며, 백신 용량이 증가할수록 항체가가 증가함을 확인하였다.

실시예 10

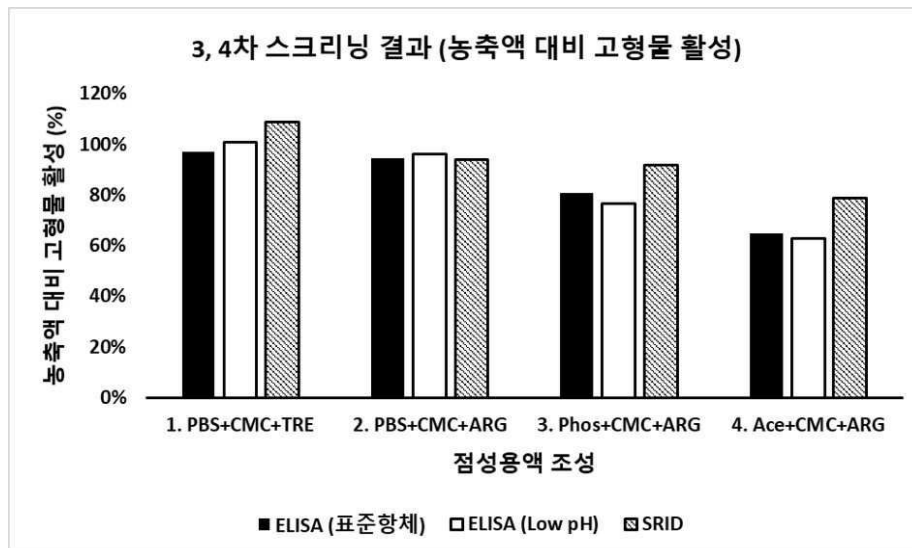
- [0233] **바이러스 접종 후 체중 변화 및 생존율 관찰**
- [0234] 2회 채혈 후 MLD50(마우스의 치사량 중앙값)의 2배에 해당하는 야생형 바이러스를 마우스에 접종하고 2주간 체중 변화 및 생존율을 관찰하였다.
- [0235] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, Flu-DMN 백신을 접종한 모든 마우스는 생존하였다. 반면 음성대조군은 3마리, 양성대조군은 2마리가 사망했다.
- [0237] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 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.

도면

도면1

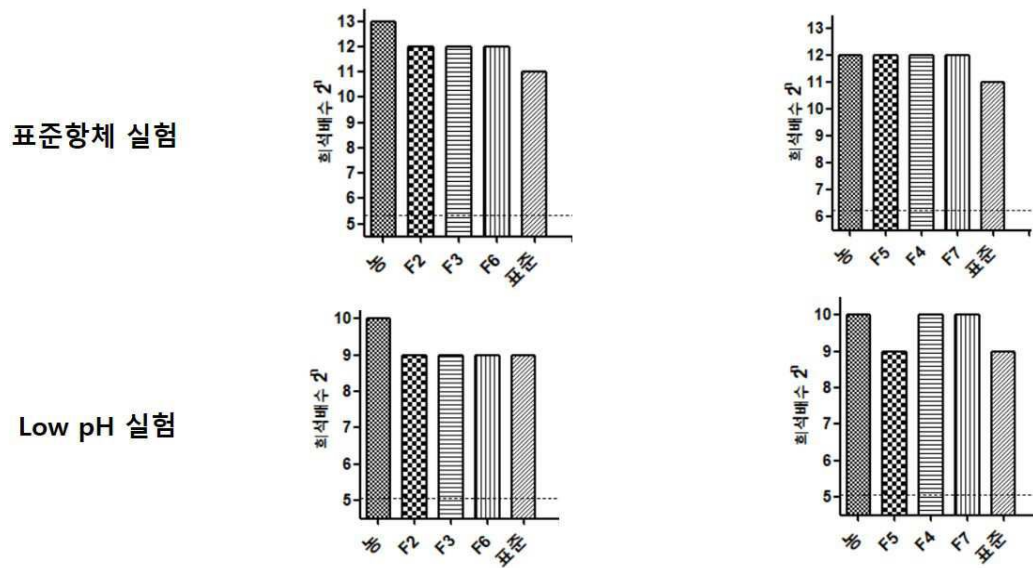


도면2

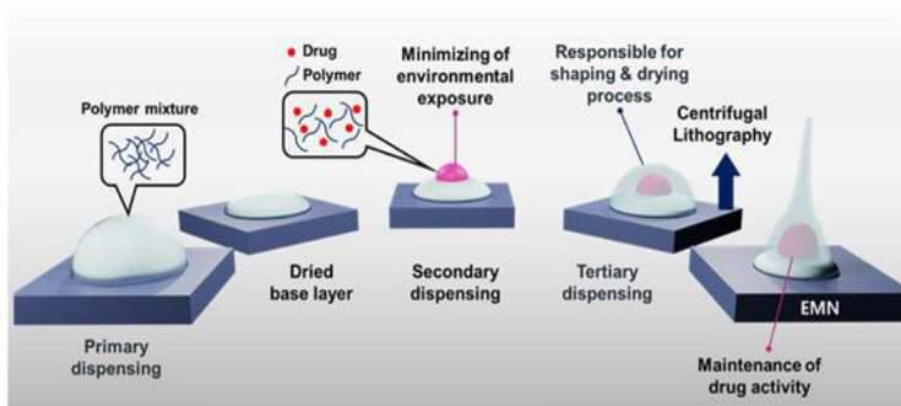


점성용액 조성	ELISA (표준항체)	ELISA (Low pH)	SRID
1. PBS+CMC+TRE	97%	101%	108.8%
2. PBS+CMC+ARG	94%	96%	94.0%
3. Phos+CMC+ARG	81%	77%	91.7%
4. Ace+CMC+ARG	65%	63%	78.6%

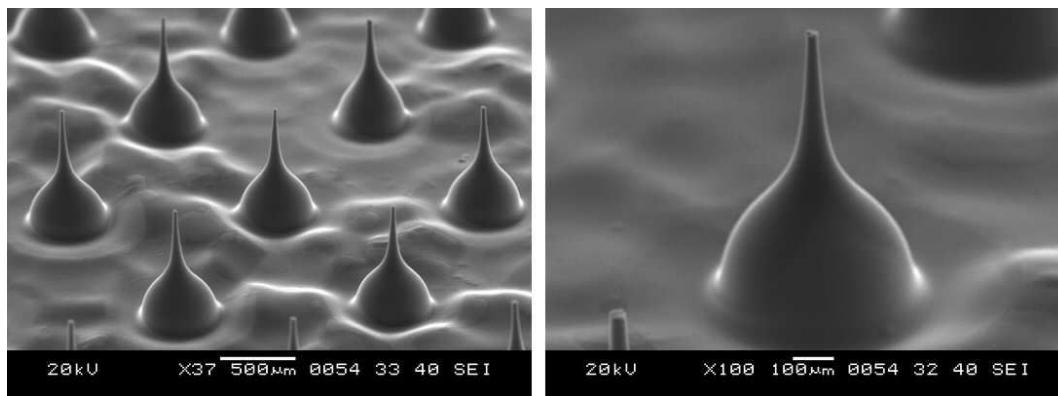
도면3



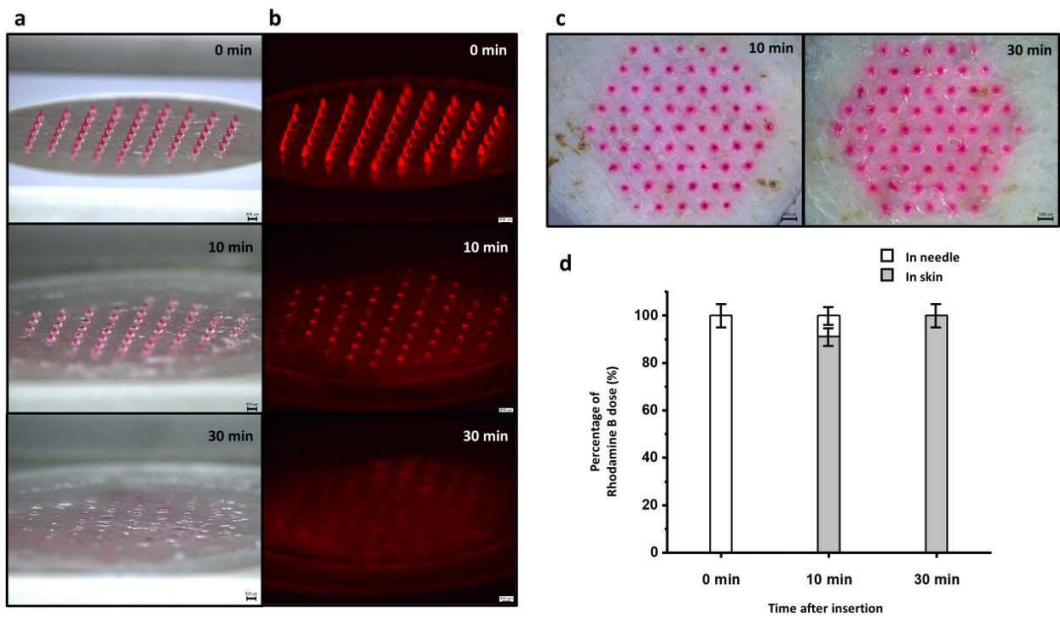
도면4



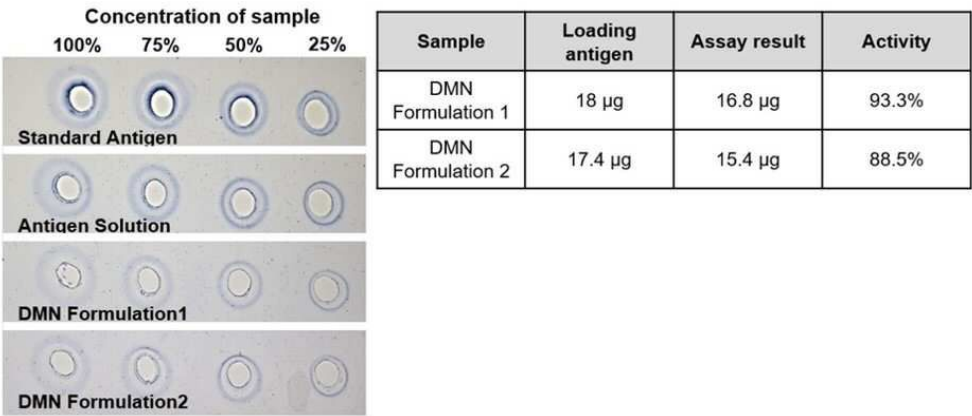
도면5



도면6



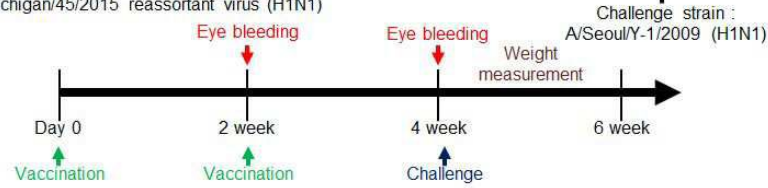
도면7



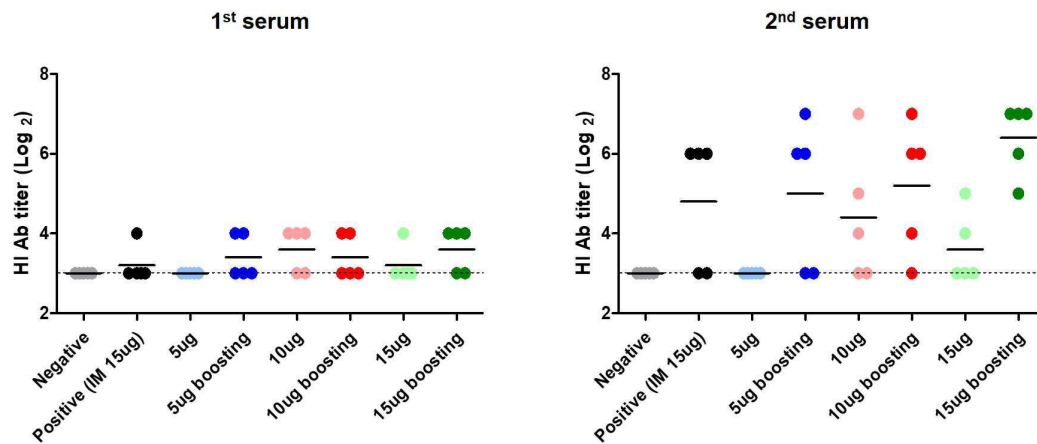
도면8

Group	Test material	Boosting	Dose	Route	Challenge	# of animals
1	Blank DMN (Negative control)	-	-	ID	2MLD ₅₀	5 / group
2	Injection (Positive control)	X	15ug/100ul	IM		
3	Flu-DMN	X	5ug/patch	ID		
4		O	5ug/patch	ID		
5		X	10ug/patch	ID		
6		O	10ug/patch	ID		
7		X	15ug/patch	ID		
8		O	15ug/patch	ID		

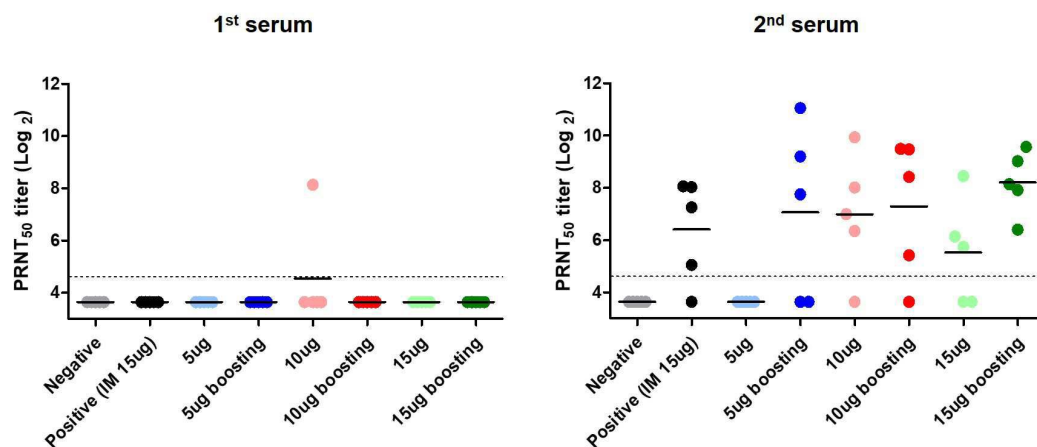
※ Loading strain : A/Michigan/45/2015 reassortant virus (H1N1)



도면9



도면10



도면11

