



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0009157
(43) 공개일자 2011년01월27일

(51) Int. Cl.

A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7025694

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년04월16일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년11월16일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/054491

(87) 국제공개번호 WO 2009/127676

국제공개일자 2009년10월22일

(30) 우선권주장

61/045,291 2008년04월16일 미국(US)

(71) 출원인

글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 리셴사르트(비-1330) 루 드 린스티튜트 89

(72) 발명자

발로우 주니어, 윌리엄 리플레이
벨기에 비-1330 리셴사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
하느, 엠마누엘, 줄레스
벨기에 비-1330 리셴사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

(74) 대리인

남상선

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 백신

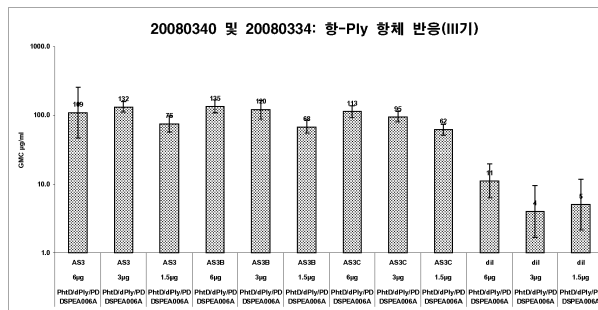
(57) 요약

본 발명은 스트렙토코쿠스 뉴모니에 항원과, 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는데, 본 발명의 면역원성 조성물에서 상기 수중유 에멀전은, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가능한 오일, 0.5-11 mg의 토클 및 0.1-4 mg의 유화제를 포함한다.

대표도 - 도14a

AS03의 상이한 희석액 중의 S. 뉴모니에 단백질에 대한 면역 반응을 보여주는 ELISA 결과

뉴몰리신에 대한 면역 반응



특허청구의 범위

청구항 1

컨주게이션되지 않은 스트렙토코쿠스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*) 단백질과, 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물을 포함하는 면역원성 조성물로서, 상기 수중유 에멀전이, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가 가능한 오일(metabolisable oil), 0.5-11 mg의 토클(tocol) 및 0.1-4 mg의 유화제를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 2

컨주게이션되지 않은 스트렙토코쿠스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*) 단백질과, 수중유 에멀전으로 이루어진 애주번트 조성물을 포함하는 면역원성 조성물로서, 상기 수중유 에멀전이, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가 가능한 오일, 0.5-11 mg의 토클 및 0.1-4 mg의 유화제를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 3

컨주게이션되지 않은 스트렙토코쿠스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*) 단백질과, 하나 이상의 추가의 면역 자극물질(immunostimulants)을 포함하는 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물을 포함하는 면역원성 조성물로서, 상기 수중유 에멀전이, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가 가능한 오일, 0.5-11 mg의 토클 및 0.1-4 mg의 유화제를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 4

컨주게이션되지 않은 스트렙토코쿠스 뉴모니에 단백질과, 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물을 포함하는 백신 조성물로서, 상기 수중유 에멀전이, 인간 용량당, 0.5-10 mg 대사가 가능한 오일, 0.5-11 mg 토클 및 0.1-4 mg 유화제를 포함하는, 백신 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전이, 인간 용량당, 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 또는 5-6 mg(예를 들어, 2-3, 5-6, 또는 9-10mg)의 대사가 가능한 오일을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전이, 인간 용량당, 0.5-11, 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6(예를 들어, 10-11, 5-6, 2.5-3.5 또는 1-3 mg)의 토클을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전이, 인간 용량당, 0.1-5, 0.2-5, 0.3-4, 0.4-3 또는 2-3 mg(예를 들어, 0.4-1.2, 2-3 또는 4-5 mg)의 유화제를 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사가 가능한 오일의 양이, 인간 용량당, 5.35 mg인, 면역원성 조성물.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사가 가능한 오일의 양이, 인간 용량당, 2.14 mg인, 면역원성 조성물.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 토클의 양이, 인간 용량당, 5.94 mg인, 면역원성 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 토클의 양이, 인간 용량당, 2.38 mg인, 면역원성 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유화제의 양이, 인간 용량당, 2.425 mg인, 면역원성 조성물.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유화제의 양이, 인간 용량당, 0.97 mg인, 면역원성 조성물.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사가가능한 오일이 스쿠알렌인, 면역원성 조성물.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 토클이 알파-토코페롤인, 면역원성 조성물.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유화제가 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레레이트인, 면역원성 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레레이트가 Polysorbate® 80 및 Tween® 80을 포함하는 군에서 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 18

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백신 조성물 부피가 0.4 내지 1.5 ml인, 면역원성 조성물.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 용량 부피가 0.5 ml인, 면역원성 조성물.

청구항 20

제 18항에 있어서, 상기 용량 부피가 0.7 ml인, 면역원성 조성물.

청구항 21

제 18항에 있어서, 상기 용량 부피가 1.0 ml인, 면역원성 조성물.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 컨주게이션되지 않은 스트렙토코쿠스 뉴모니에 단백질이 PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, 뉴몰리신, LytB, LytC, LytA, Sp125, SP101, Sp128, Sp130, Sp133 또는 미국 특허 제 6699703호에 개시된 SEQ ID NOs: 5225, 5200, 3166, 4360, 5137, 4263, 3166, 5226, 3716, 4360, 5243, 3964, 5179, 3850, 4263, 5137, 5226, 5325, 3850, 5179 또는 5325로 제시되거나 상기 서열번호의 서열에 의해 엔코딩된 S. 뉴모니에 단백질을 포함하는, 미국 특허 6699703호에 개시된 단백질, 또는 이들이 면역학적 기능적 균등물로 이루어진 군에서 선택되는, 면역원성 조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서, 2개 이상의 컨주게이션되지 않은 단백질을 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 24

제 23항에 있어서, 컨주게이션되지 않은 폐렴구균 PhtD 및 컨주게이션되지 않은 폐렴구균 뉴몰리신을 포함하는,

면역원성 조성물.

청구항 25

제 1항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물을 폐렴구균성 감염 또는 질환을 앓고 있거나 상기 감염 또는 질환에 걸리기 쉬운 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균성 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 26

폐렴구균성 감염 또는 질환의 예방적 치료 또는 치료에 사용하기 위한 제 1항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물.

청구항 27

폐렴구균성 감염 또는 질환의 예방적 치료 또는 치료에 사용하기 위한 약제(medicament)의 제조에 있어서, 제 1항 내지 제 24항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물의 용도.

청구항 28

제 27항에 있어서, 상기 애주번트 조성물이 하나 이상의 면역자극물질을 추가로 포함하는, 용도.

명세서

기술분야

[0001] **기술 분야**

[0002] 본 발명은 개선된 백신과 면역원성 조성물 및 의약으로의 이들의 용도와 관련이 있다. 특히, 본 발명은 수중유(oil-in-water) 에멀전 애주번트를 포함하는 백신 또는 면역원성 제형 및 의약으로의 이들의 용도, 특히 S. 뉴모니아(*S. pneumoniae*) 항원을 포함하는 다양한 항원에 대한 면역 반응을 개시시키는데 있어서 이들의 용도 및 상기 백신 또는 면역원성 제형의 제조 방법과 관련이 있으며, 상기 수중유 에멀전은 토폴, 대사가능한 오일 및 유화제를 포함한다.

배경 기술

[0003] **기술 배경**

[0004] 개선된 면역원성을 지니는 신규한 조성물 또는 백신은 항상 필요하다. 한가지 전략으로써, 애주번트가 임의의 주어진 항원에 대하여 생성되는 면역 반응을 시도 및 개선시키고/거나 숙주에서 반응성(reactogenicity)/독성을 감소시키는데 사용되어 왔다.

[0005] 수중유 에멀전 그 자체는 당업계에서 잘 알려져 있고, 애주번트 조성물로서 유용함이 제안되어 왔다(EP399843호; W095/17210호).

[0006] W095/17210호는 2 내지 10% 스퀴알렌, 2 내지 10% 알파 토크페롤 및 0.3 내지 3% 트윈(tween) 80을 포함하는 수중유 에멀전과 단독으로 또는 QS21 및/또는 3D-MPL과 조합하여 이러한 수중유 에멀전을 사용하는 것을 개시하고 있다.

[0007] W099/12565호는 대사가능한 오일, 사포닌 및 스테롤을 포함하는 수중유 에멀전 조성물을 개시하고 있다. 수중유 에멀전은 3D-MPL을 추가로 포함한다.

[0008] W099/11241호는 대사가능한 오일 및 사포닌을 포함하는 수중유 에멀전을 개시하고 있는데, 여기서 상기 오일과 사포닌은 1:1 내지 200:1의 비율로 존재한다.

[0009] 적합한 면역 반응을 제공하고 숙주에서 더 적은 반응성을 나타내는 개선된 백신과 면역원성 조성물에 대한 필요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0010] 발명의 진술

[0011] 본 발명자들은 조성물내의 항원 또는 항원성 조성물에 대한 견줄만한 면역 반응을 여전히 유지하면서 사용될 수 있는 수중유 에멀전의 각 성분을 더 적은 양으로 포함하는 백신 또는 면역원성 조성물을 개발하였다. 본 발명의 백신 또는 면역원성 조성물은 숙주 수령체 내부에서 반응성은 감소된 채 항원에 대한 면역원성 수준을 유지하는 이점을 제공한다.

[0012] 따라서, 본 발명의 첫 번째 양상에서, 스트렙토코쿠스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*) 항원을 포함하는 면역원성 조성물, 및 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물이 제공되는데, 여기서 상기 수중유 에멀전은, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가가능한 오일, 0.5-11 mg의 토클 및 0.4-4 mg의 유화제를 포함한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 양상에서, 스트렙토코쿠스 뉴모니에 항원을 포함하는 백신 조성물, 및 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물이 제공되는데, 여기서 상기 수중유 에멀전은, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가가능한 오일, 0.5-11 mg의 토클 및 0.4-4 mg의 유화제를 포함한다.

[0014] 본 발명의 추가 양상에서, 폐렴구균성 감염 또는 질환의 치료, 완화 또는 예방을 위한, 면역원성 조성물의 제조에 있어서, 스트렙토코쿠스 뉴모니에 항원을 포함하는 백신 또는 면역원성 조성물, 및 0.5-10 mg의 대사가가능한 오일, 0.5-11 mg의 토클 및 0.4-4 mg의 유화제를 포함하는 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물의 용도가 제공된다.

[0015] 추가 양상에서, 면역원성 조성물 내의 항원이 유래된 병원균의 변이체(varient)인 병원균에 의해 유발된 감염 또는 질환에 대한 보호를 위한, 위에서 정의한 것과 같은 방법 또는 용도가 제공된다. 또 다른 구체예에서, 면역원성 조성물 중의 그러한 항원의 변이체인 항원을 포함하는 병원균에 의해 유발된 감염 또는 질환에 대한 보호를 위한 위에서 정의한 것과 같은 방법 또는 용도가 제공된다.

[0016] 도면의 간단한 설명

[0017] **도 1:** 임상 시험: 상이한 시험에서의 항-HA 항체에 관한 기하 평균 역가(geometric mean titers, GMTs)(면역원성에 관한 ATP 코호트(cohort)).

[0018] **도 2:** 임상 시험: 0일 및 21일째의 95% 신뢰 구간을 갖는 HI 항체 역가에 관한 혈청방어율(seroprotection rate, SPR)(면역원성에 관한 ATP 코호트).

[0019] **도 3:** 임상 시험: 21일째의 95% 신뢰 구간을 갖는 HI 항체 역가에 관한 혈청전환률(seroconversion rate, SCR)(면역원성에 관한 ATP 코호트).

[0020] **도 4:** 임상 시험: 21일째의 95% 신뢰 구간을 갖는 HI 항체 역가에 관한 혈청전환지수(seroconversion factor, SCF)(면역원성에 관한 ATP 코호트).

[0021] **도 5:** 마우스 연구: 이종아형 균주(heterosubtypic strains)(용량 범위 AS03)로 프라이밍한 BALB/c 마우스에서의 헤마글루티닌 억제 시험(GMT +/- IC95). **도 5A:** 항-A/뉴 칼레도니아(New Caledonia)/20/99 HI 역가; **도 5B:** 항-A/파나마(Panama)/2007/99 HI 역가. **도 5C:** 항- B/산둥(Shandong)/7/97 HI 역가.

[0022] **도 6:** 마우스 연구: 이종아형 균주로 프라이밍한(용량 범위 AS03) C57BI/6 마우스에서의 헤마글루티닌 억제 시험.

[0023] **도 7:** 마우스 연구: 이종아형 균주로 프라이밍한(용량 범위 AS03) C57BI/6 마우스로부터의 PBMC에서의 세포 면역 반응(CD4+ T 세포).

[0024] **도 8:** 마우스 연구: 이종아형 균주로 프라이밍하고(용량 범위 AS03) 용량 범위 AS03로 애주번팅된 저 용량 항원(0.5 µg)으로 면역접종한 C57BI/6 마우스로부터의 PBMC에서의 세포 면역 반응(CD4+ T 세포).

[0025] **도 9:** 마우스 연구: 면역접종후 14일째에 (GMT +/- IC95) 다음 2가지 상이한 항원 용량에 관한 H5N1-특이적 혈청 Ig ELISA 역가(A 및 B) 및 항-H5N1 IgG1(C 및 D) 및 IgG2b(E 및 F) 이소형 반응: 1.5 µg(A, C 및 E) 또는 0.38 µg(B, D 및 F).

[0026] **도 10:** 마우스 연구: 다음 2가지 상이한 항원 용량에 대한 면역접종후(GMT +/- IC95) 21일째에 적혈구응집억제 시험(Hemagglutination inhibition test)(GMT +/- IC95): 1.5 µg(A) 또는 0.38 µg(B).

[0027] **도 11:** 마우스 연구: 용량 범위 AS03로 애주번팅된 상이한 용량의 H5N1 백신 (1.5 또는 0.38 µg)으로 면역화시

킨 무경험 C57BI/6 마우스에서의 세포 면역 반응 (CD4+ T 세포): (A) 1.5 µg HA Ag(항원) 또는 (B) 0.38 µg HA Ag(항원).

[0028] **도 12:** 돼지 연구. 동종 균주(homologous strains)로 프라이밍한 돼지에서의 헤마글루티닌 억제 시험(GMT +/- IC95).

[0029] **도 13:** 마우스 연구. 250, 125 또는 62.5 µg의 SB62를 함유하는 AS03 애주번트 중의 각각 3 µg의 dPly, PhtD 및 단백질 D로 면역화시킨 C57b1 마우스에서 ELISA로 측정된 체액성 면역 반응.

[0030] **도 14:** 마우스 연구. 250, 125 또는 62.5 µg의 SB62를 함유하는 AS03 애주번트 중의 각각 6, 3 또는 1.5 µg의 dPly, PhtD 및 단백질 D로 면역화시킨 C57b1 마우스에서 ELISA로 측정된 체액성 면역 반응.

[0031] **발명의 상세한 설명**

[0032] 본 발명자들은, 모든 경우에서, 본 명세서에 사용된 용어 "포함하는(comprising)", "포함하다(comprise)" 및 "포함하다(comprises)"가, 각각, 용어 "구성되는(consisting of)", "구성되다(consist of)" 및 "구성되다(consists of)"로 임의로 대체할 수 있는 것으로 의도한다.

[0033] 본 발명의 "백신 조성물"과 관련된 본 명세서의 구체예들은 또한 본 발명의 "면역원성 조성물"과 관련된 구체예들에 적용될 수 있으며, 그 역도 가능하다.

[0034] 본 발명의 한 구체예에서, 항원 또는 항원 조성물 및 수중유 에멀전으로 구성된 애주번트 조성물을 포함하는 백신 또는 면역원성 조성물이 제공되며, 여기서 상기 수중유 에멀전은, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가능한 오일, 0.5-11 mg의 토클 및 0.4-4 mg의 유화제를 포함한다.

[0035] 본 발명의 추가 구체예에서, 항원 또는 항원 조성물 및 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물을 포함하는 백신 또는 면역원성 조성물이 제공되며, 여기서 상기 수중유 에멀전은, 인간 용량당, 0.5-10 mg의 대사가능한 오일(예컨대, 스쿠알렌), 0.5-11 mg의 토클(예컨대, 알파-토코페롤) 및 0.4-4 mg의 유화제(예컨대, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트)를 포함한다.

[0036] **수중유 에멀전 성분**

[0037] 본 발명의 애주번트 조성물은 수중유 에멀전 애주번트를 포함하고, 바람직하게는, 상기 에멀전은 0.5-10mg의 양으로 대사가능한 오일, 0.5-11 mg의 양으로 토클 및 0.4-4 mg의 양으로 유화제를 포함하고, 오일 점적의 70% 이상이 1 µm 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 갖는다.

[0038] 임의의 수중유 조성물이 인간 투여에 적합하도록 하기 위해, 에멀전 시스템의 오일 상은 대사가능한 오일을 포함하여야 한다. 용어 대사가능한 오일의 의미는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 대사가능함은 "대사에 의해 변형될 수 있는"으로 정의될 수 있다(Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W. B. Sanders Company, 25th edition (1974)). 오일은 임의의 식물성 오일, 어류 오일, 동물 또는 합성오일일 수 있고, 이는 수령체에 대해 비독성이고, 대사에 의해 변형될 수 있다. 땅콩, 씨 및 곡물이 식물성 오일의 통상적인 공급원이다. 합성 오일이 또한 본 발명의 일부이며, 이는 시판되는 오일, 예를 들어, NEOBEE® 및 다른 오일을 포함할 수 있다. 특히 적합한 대사가능한 오일은 스쿠알렌이다.

[0039] 스쿠알렌(2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥사엔)은 상어-간 오일에서 대량으로 발견되고, 올리브유, 맥아유, 쌀겨유 및 효모에서 소량 발견되는 불포화 오일이며, 이 오일은 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 오일이다. 스쿠알렌은 콜레스테롤의 생합성에서 중간체라는 사실에 의해 대사가능한 오일이다(Merck index, 10th Edition, entry no.8619).

[0040] 적합하게는, 대사가능한 오일은 애주번트 조성물 중에 0.5-10 mg의 양으로, 바람직하게는 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 또는 5-6 mg(예를 들어, 2-3, 5-6, 또는 9-10mg), 특히 5.35 mg 또는 2.14 mg의 양으로 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서, 대사가능한 오일은 백신(또는 면역원성) 조성물 중에서 0.5-10 mg, 바람직하게는 1-10, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 또는 5-6 mg(예를 들어, 2-3, 5-6, 또는 9-10mg), 특히 5.35 mg 또는 2.14 mg의 양으로 존재한다.

[0041] 백신 또는 면역원성 조성물 중의 대사가능한 오일의 양은 총 조성물에 대한 백분율로서 표현될 수 있다. 적합하게는, 대사가능한 오일은 총 조성물 부피에 대하여 0.5% 내지 2%, 바람직하게는 0.25-2, 또는 0.25-1.75, 또는 0.5-1.65, 또는 0.6-1.5, 또는 0.8 -1.4 또는 1-1.25% (v/v)의 오일의 양으로 백신 조성물 중에 존재한다.

- [0042] 또 다른 특정 구체예에서, 대사가가능한 오일은 백신 (또는 면역원성) 조성물 총 부피의 약 1.25%의 최종 양으로 존재한다. 또 다른 특정 구체예에서, 대사가가능한 오일은 총 조성물 부피의 0.25% (v/v)의 최종 양으로 존재한다.
- [0043] 설명을 위해, v/v로 주어진 농도는 하기 전환지수를 적용함으로써 w/v 농도로 전환될 수 있다: 5% (v/v) 스쿠알렌 농도는 4.28% (w/v) 스쿠알렌 농도와 등가이다.
- [0044] 수중유 에멀전은 토클을 포함한다. 토클은 당업계에 널리 공지되어 있고 EP0382271호에 기재되어 있다. 적합하게는, 토클은 알파-토코페롤 또는 이의 유도체, 예컨대, 알파-토코페롤 석시네이트(비타민 E 석시네이트로도 공지되어 있음)이다. 상기 토클은 적합하게는 0.5-11 mg, 바람직하게는 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6(예를 들어, 10-11, 5-6, 2.5-3.5 또는 1-3 mg)의 양으로 애주번트 조성물 중에 존재한다. 특정 구체예에서, 토클은 5.94 mg 또는 2.38 mg의 양으로 존재한다. 추가 구체예에서, 상기 토클은 적합하게는 0.5-11 mg, 바람직하게는 1-11, 2-10, 3-9, 4-8, 5-7, 5-6(예를 들어, 10-11, 5-6, 2.5-3.5 또는 1-3 mg)의 양으로 백신 (또는 면역원성) 조성물 중에 존재한다. 특정 구체예에서, 토클은 5.94 mg 또는 2.38 mg의 양으로 존재한다.
- [0045] 토클의 양은 총 백신 또는 면역원성 조성물 부피의 백분율로 표현될 수 있다. 적합하게는, 토클은 면역원성 조성물의 총 부피의 0.25% 내지 2%(v/v) 양으로 백신 조성물 중에 존재한다. 바람직하게는 총 부피의 0.25-2, 0.25-2, 또는 0.25-1.75, 또는 0.5-1.65, 또는 0.6-1.5, 또는 0.8 -1.4 또는 1-1.25 % (v/v) 토클을 포함한다.
- [0046] 바람직하게는, 토클은 백신 (또는 면역원성) 조성물의 총 부피의 0.2% 내지 2% (v/v)의 양으로, 더 바람직하게는, 0.5 ml 용량 부피 중의 1.25% (v/v)의 양으로 존재한다.
- [0047] 특정 구체예에서, 토클은 백신 또는 면역원성 조성물의 총 부피의 약 1.25%의 최종 양으로 존재한다. 또 다른 특정 구체예에서, 토클은 총 부피의 0.25%(v/v)의 최종 양으로 또는 0.5 ml 용량 부피 중의 1.25%(v/v)로 또는 0.7 ml 용량 부피 중의 0.9%(v/v)로, 또는 0.5ml 용량 중의 0.5%(v/v)로 또는 0.7ml 백신 또는 면역원성 용량 중의 0.35-0.37 %, 바람직하게는 0.36%로 존재한다.
- [0048] 설명을 위해, v/v로 주어진 농도는 하기 전환지수를 적용함으로써 w/v 농도로 전환될 수 있다: 5% (v/v) 알파-토코페롤 농도는 4.8% (w/v) 알파-토코페롤 농도와 등가이다.
- [0049] 수중유 에멀전은 유화제를 추가로 포함한다. 유화제는 적합하게는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트일 수 있다. 특정 구체예에서, 유화제는 Polysorbate® 80 또는 Tween® 80을 포함하는 군에서 선택될 수 있다.
- [0050] 상기 유화제는 적합하게는 0.1-5, 0.2-5, 0.3-4, 0.4-3 또는 2-3 mg(예를 들어, 0.4-1.2, 2-3 또는 4-5 mg) 유화제의 양으로 애주번트 조성물 중에 존재한다. 특정 구체예에서, 유화제는 0.97 mg 또는 2.425 mg의 양으로 존재한다.
- [0051] 추가로, 상기 유화제는 적합하게는 0.1-5, 0.2-5, 0.3-4, 0.4-3 또는 2-3 mg(예를 들어, 0.4-1.2, 2-3 또는 4-5 mg) 유화제의 양으로 백신 또는 면역원성 조성물 중에 존재한다. 특정 구체예에서, 유화제는 0.97 mg 또는 2.425 mg의 양으로 존재한다.
- [0052] 유화제의 양은 총 백신 또는 면역원성 조성물 부피의 백분율로 표현될 수 있다. 적합하게는, 유화제는 조성물 총 부피의 0.125-0.8% (v/v)의 양으로, 바람직하게는, 총 부피의 0.08-.05, 또는 0.1-0.7, 또는 0.2-0.6, 또는 0.25-0.55, 또는 0.3-0.52 또는 0.4-0.5% (v/v)의 양으로 백신 (또는 면역원성) 조성물 중에 존재한다. 특정 구체예에서, 유화제는 총 백신 또는 면역원성 조성물 부피의 1%, 0.5% 또는 0.2% (v/v)의 양으로 존재한다.
- [0053] 설명을 위해, v/v로 주어진 농도는 하기 전환지수를 적용함으로써 w/v 농도로 전환될 수 있다: 1.8% (v/v) 폴리소르베이트 80 농도는 1.91% (w/v) 폴리소르베이트 80 농도와 등가이다.
- [0054] 특정 구체예에서, 0.5 ml 백신 또는 면역원성 용량 부피는 0.45% (v/v) Tween 80을 함유하고, 0.7 ml 용량 부피는 0.315% (v/v) Tween 80을 함유한다. 또 다른 특정 구체예에서, 0.5 ml 용량은 0.18% (v/v) 유화제를 함유하고 0.7 ml 백신 또는 면역원성 조성물 용량은 0.126% (v/v) 유화제를 함유한다.
- [0055] 용어 "인간 용량"은 인간용으로 적합한 부피로 존재하는 용량을 의미한다. 일반적으로, 이것은 0.25 내지 1.5 ml이다. 일 구체예에서, 인간 용량은 0.5 ml이다. 추가 구체예에서, 인간 용량은 0.5 ml를 초과하는데, 예를 들어, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1 ml이다. 추가 구체예에서, 인간 용량은 1 ml 내지 1.5 ml이다. 또 다른 구체예에서, 특히 면역원성 조성물이 소아 집단용인 경우, 인간 용량은 0.5 ml 이하, 예컨대, 0.25 내지 0.5 ml일 수 있다. 본 발명은 면역원성 조성물 내의 애주번트의 개별 성분들 각각 또는 전부가 종래 유용한 것으로 생각

되었던 수준 보다 더 낮은 수준이고 전형적으로 상기에 언급된 것과 같다. 특히 적합한 조성물은 0.5 ml의 인간 용량의 최종 부피 중에 하기 애주번트 성분들을 하기 양으로 포함한다:

표 1

	애주번트 A	애주번트 B	애주번트 E	애주번트 F	애주번트 C	애주번트 G	애주번트 D
o/w 에멀전	125 µl	100 µl	83.33 µl	62.5 µl	50 µl	31.25 µl	25 µl
성분 :							
토코페롤	5.94 mg	4.28 mg	3.57 mg	2.68 mg	2.38 mg	1.34 mg	1.19 mg
스쿠알렌	5.35 mg	4.75 mg	3.96 mg	2.97 mg	2.14 mg	1.49 mg	1.07 mg
폴리소르베이트 80	2.43 mg	1.94 mg	1.62 mg	1.21 mg	0.97 mg	0.61 mg	0.48 mg

[0056]

[0057]

본 발명은 위에서 정의한 것과 같은 개별 성분들을 위에서 정의한 양으로, 예를 들어, 이로만 국한되는 것은 아니지만, 표 1에 예시된 것과 같은 양으로, 포함하는 애주번트 조성물을 추가로 제공한다. 전형적으로, 그러한 애주번트 조성물은 인간 용량으로 적합한 부피로 존재할 것이다. 애주번트가 액체 형태의 항원 조성물과 조합되어 액체 형태로 존재하는 경우, 애주번트 조성물은 인간 용량의 의도된 최종 부피의 분획, 예를 들어, 인간 용량의 의도된 최종 부피의 대략 절반, 예를 들어, 0.7ml의 의도된 인간 용량의 경우 350 µl, 또는 0.5 ml의 의도된 인간 용량의 경우 250 µl 부피인 인간 용량으로 적합한 부피로 존재할 것이다. 애주번트 조성물은 백신의 최종 인간 용량을 제공하기 위하여 항원 조성물과 조합되는 경우 희석된다. 그러한 용량의 최종 부피는 물론 애주번트 조성물의 초기 부피 및 애주번트 조성물에 첨가되는 항원 조성물의 부피에 의존하여 달라질 것이다. 대안적인 구체예에서, 액체 애주번트가 동결건조된(lyophilised) 항원 조성물을 재구성시키기 위해 사용된다. 이 구체예에서, 애주번트 조성물의 인간 용량으로 적합한 부피는 인간 용량의 최종 부피에 대략적으로 동일하다. 액체 애주번트 조성물은 동결건조된 항원 조성물을 함유하는 바이알에 첨가된다. 최종 인간 용량은 0.5과 1.5 ml 사이에서 달라질 수 있다.

[0058]

수중유 에멀전을 생산하는 방법은 당업계의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 공통적으로, 당해 방법은 토클-함유 오일 상과 계면활성제, 예컨대, PBS/TWEEN80™ 용액을 혼합하는 단계, 후속하여 균질화기를 사용하여 균질화하는 단계를 포함하며, 주사기 바늘을 통해 상기 혼합물을 2회 통과시키는 단계를 포함하는 방법이 적은 부피의 액체를 균질화시키는데 적합할 것임은 당업계의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 동일하게, 미세유동화기(M110S Microfluidics 기계, 6바의 최소 압력 인풋(약 850 바의 아웃풋 압력)에서, 2분 동안, 최대 50회 통과)에서의 에멀전화 과정이 더 적거나 더 큰 부피의 에멀전을 생산하기 위해 당업계의 통상의 기술자에 의해 적합화될 수 있다. 적합화는 제조물이 요망되는 직경의 오일 점적으로 얻어질 때까지 결과적으로 생성된 에멀전을 측정하는 단계를 포함하는 정규 실험에 의해 달성될 수 있다.

[0059]

수중유 에멀전에서, 오일 및 유화제는 수성 담체 내에 존재하여야 한다. 수성 담체는, 예를 들어, 인산염 완충 염수일 수 있다.

[0060]

바람직하게는, 본 발명의 수중유 에멀전 시스템은 미크론-이하(sub-micron) 범위의 작은 오일 점적 크기를 지닌다. 적합하게는, 점적 크기는 120 내지 750 nm, 더 바람직하게는, 크기는 직경으로 120 내지 600 nm 범위 이내일 것이다. 가장 바람직하게는, 수중유 에멀전은 70% 이상의 강도(intensity)로 직경 500 nm 이하인 오일 점적을 함유하고, 더 바람직하게는, 80% 이상의 강도로 직경 300 nm 이하의 오일 점적을 함유하고, 더 바람직하게는, 90% 이상의 강도로 직경 120 내지 200 nm의 오일 점적을 함유한다.

[0061]

본 발명에 따른 오일 점적 크기, 즉, 직경은 강도로 주어진다. 농도로 오일 점적 크기의 직경을 측정하는 몇몇 방법이 존재한다. 강도는 사이징 장비를 사용하여, 적합하게는, 동적 광 산란, 예컨대, Malvern Zetasizer 4000 또는 바람직하게는, Malvern Zetasizer 3000HS를 사용하여 측정된다. 상세한 절차는 실시예 II.2에 제시되어 있다. 첫 번째 확율은 동적 광 산란(PCS-Photon 상호관계 분광기)에 의해 z 평균 직경(ZAD)을 측정하는 것이고; 이 방법은 추가적으로 다분산 지수(polydispersity index, PDI)를 제공하며, ZAD와 PDI 둘 모두가 큐물런트(cumulants) 알고리즘으로 계산된다. 이러한 값들은 입자 굴절 지수에 대한 지식을 요하지 않는다. 두 번째 평균은 또 다른 알고리즘, Contin, 또는 NLS, 또는 자동화 "Malvern" 알고리즘(사이징 장비에 DMLO 제공되는 디폴트 알고리즘)에 의해 전체 입자 크기 분포를 측정함으로써 오일 점적의 직경을 계산하기 위한 것이다. 대부분의 경우, 복잡한 조성물의 입자 굴절 지수가 알려져 있지 않기 때문에, 단지 강도 분포만 고려되며, 필요

한 경우, 이 분포로부터 유래된 강도 평균이 고려된다.

[0062] **임의의 면역자극제**

[0063] 본 발명의 추가 구체예에서, 항원 또는 항원 조성물 및 수중유 에멀전을 포함하는 애주번트 조성물 및 임의로 하나 이상의 추가의 면역자극물질을 포함하는 백신 또는 면역원성 조성물이 제공되는데, 상기 수중유 에멀전은 0.5-10 mg의 대사가 가능한 오일, 0.5-11 mg의 톨콜 및 0.4-4 mg의 유화제를 포함한다.

[0064] 일 구체예에서, 애주번트 조성물은 본 명세서에 기재된 것과 같은 오일 및 수 에멀전을 포함한다. 추가 구체예에서, 애주번트 조성물은 하나 이상의 추가의 애주번트 또는 면역자극물질을 추가로 포함할 수 있다. 추가 구체예에서, 애주번트 조성물은 QS21 및/또는 MPL 이외의 하나 이상이 추가의 애주번트 또는 면역자극물질을 임의로 포함한다.

[0065] 임의의 추가 애주번트는 하기 군에서 선택된다: 사포닌, 지질 A 또는 이의 유도체, 면역자극성 올리고뉴클레오티드, 알킬 글루코사미나이드 포스페이트, 금속 염, 톨-유사 수용체 효능제(toll-like receptor agonist) 또는 이들의 조합물. 애주번트가 톨 유사 수용체 효능제, 특히 톨 유사 수용체 2, 3, 4, 7, 8 또는 9의 효능제, 또는 사포닌인 것이 바람직하다. 애주번트 시스템이 상기 목록으로부터 선택된 2개 이상의 애주번트를 포함하는 것이 추가로 바람직하다. 조합물은 바람직하게는 사포닌(특히 QS21) 애주번트 및/또는 톨 유사 수용체 4 효능제, 예컨대, 3D-MPL 또는 톨 유사 수용체 9 효능제, 예컨대, CpG 함유 면역자극성 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 다른 바람직한 조합물은 사포닌(특히 QS21) 및 톨 유사 수용체 4 효능제, 예컨대, 사포닌(특히 QS21) 및 톨 유사 수용체 4 리간드, 예컨대, 3D-MPL 또는 알킬 글루코사미나이드 포스페이트를 포함한다.

[0066] 일 구체예에서, 추가의 애주번트는 톨 유사 수용체(TLR) 4 리간드, 바람직하게는, 효능제, 예컨대, 지질 A 유도체, 특히 모노포스포릴 지질 A 또는 더 바람직하게는, 3-탈아실화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)를 포함한다.

[0067] 3D-MPL은 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 엔.에이.(GlaxoSmithKline Biologicals North America)사에 의해 상표명 MPL[®]로 판매되며, 주로 IFN-g(Th1) 표현형을 지니는 CD4+ T 세포 반응을 촉진한다. 이것은 GB 2 220 211 A호에 개시된 방법에 따라 생산될 수 있다. 화학적으로 3, 4, 5 또는 6 아실화된 쇄와 3-탈아실화된 모노포스포릴 지질 A의 혼합물이다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물에서, 작은 입자 3D-MPL이 사용된다. 작은 입자 3D-MPL은 0.22 μm 필터를 통해 멸균 여과될 수 있는 입자 크기를 지닌다. 그러한 제조물은 국제 특허 출원 제 W094/21292호에 기재되어 있다. 지질 A의 합성 유도체가 공지되어 있고 하기를 포함하나, 이로만 국한되는 것은 아닌 TLR 4 효능제인 것으로 생각된다:

[0068] **OM174** (2-데옥시-6-o-[2-데옥시-2-[(R)-3-도데카노일옥시테트라-데카노일아미노]-4-o-포스포노-β-D-글루코피라노실]-2-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]-α-D-글루코피라노실디히드로겐포스페이트) (W095/14026호)

[0069] **OM294** DP (3S, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9(R)-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올, 1,10-비스(디히드로게노포스페이트) (W099/64301호 및 W000/0462호)

[0070] **OM197** MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올, 1-디히드로게노포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트) (W001/46127호)

[0071] 이용될 수 있는 다른 TLR4 리간드는 W09850399호 또는 US6303347호(AGP의 제조를 위한 방법도 기술되어 있음)에 개시된 것들과 같은 알킬 글루코사미나이드 포스페이트(alkyl Glucosaminide phosphates, AGPs), 또는 US6764840호에 개시된 AGPs의 약제학적으로 허용되는 염이다. 일부 AGP는 TLR4 효능제이고, 일부는 TLR4 길항제이다. 둘 모두는 애주번트로서 유용한 것으로 고려된다.

[0072] TLR-4를 통한 신호전달 반응을 야기할 수 있는 다른 적합한 TLR-4 리간드 (Sabroe et al, JI 2003 p1630-5)는, 예를 들어, 그람-음성 박테리아의 지질다당류 및 이의 유도체 또는 단편, 특히 LPS의 무독성 유도체(예를 들어, 3D-MPL)이다. 다른 적합한 TLR 효능제로는 열 쇼크 단백질(HSP) 10, 60, 65, 70, 75 또는 90; 계면활성제 단백질 A, 히알루론산 올리고당류, 헤파란 설페이트 단편, 피브로넥틴 단편, 피브리노겐 펩티드 및 b-테넨신-2, 무라밀 디펩티드(muramyl dipeptide, MDP) 또는 호흡기세포 융합 바이러스의 F 단백질이 있다. 한 구체예에서, TLR 효능제는 HSP60, 70 또는 90이다.

[0073] Toll-유사 수용체(TLR)는 곤충과 인간 사이에 진화적으로 보존된 타입 I 막횡단(transmembrane) 수용체이다. 지금까지 10개의 TLR이 확립되었다(TLR 1-10)(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). TLR 패밀리의 일원은 유사한 세포외 도메인과 세포내 도메인을 지닌다; 이들의 세포외 도메인은 류신-풍부 반복 서열을 지니고, 이들의 세포

내 도메인은 인터루킨-1 수용체(IL-1R)의 세포내 영역과 유사하다. TLR 세포는 면역 세포 및 다른 세포(혈관 상피 세포, 지방세포, 심장 근육세포 및 창자 상피세포 포함)에서 다르게 발현된다. TLR의 세포내 도메인은 세포질 영역에 IL-1R 도메인을 또한 소유하는 어댑터(adaptor) 단백질 Myd88과 상호작용할 수 있어서, 사이토카인의 NF- κ B 활성화를 초래한다; 이러한 Myd88 경로는 사이토카인 방출이 TLR 활성화에 의해 영향을 받는 한 경로이다. TLR의 주 발현은 항원 제시 세포(예를 들어, 수지상 세포, 매크로파지 등)와 같은 세포 유형에서 나타난다.

- [0074] TLR을 통한 자극에 의한 수지상 세포의 활성화는 수지상 세포의 성숙과, IL-12와 같은 염증 사이토카인의 생성을 야기시킨다. 지금까지 수행된 연구로부터, 일부 효능제가 여러 TLR에 공통되나, TLR이 상이한 유형의 효능제를 인식함이 밝혀졌다. TLR 효능제는 주로 박테리아 또는 바이러스로부터 유래되고, 플라젤린(flagellin) 또는 박테리아 지질다당류(LPS)와 같은 분자를 포함한다.
- [0075] "TLR 효능제"는 직접적인 리간드로서 또는 내인성 또는 외인성 리간드의 생성을 통해 간접적으로, TLR 신호전달 경로를 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 성분을 의미한다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5).
- [0076] 또 다른 구체예에서, TLR 분자의 다른 천연 또는 합성 효능제가 임의의 추가의 면역자극제로서 이용된다. 이들은 TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 및 TLR9에 대한 효능제를 포함할 수 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명의 일 구체예에서, TLR-1을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 이용된다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). 적합하게는, TLR-1을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 하기로부터 선택된다: 트리-아실화된 리포펩티드(LPs); 페놀-가용성 모듈린; 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) LP; S-(2,3-비스(팔미토일옥시)-(2-RS)-프로필)-N-팔미토일-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, 박테리아 지질단백질의 아세틸화 아미노 말단을 모방하는 트리히드로클로라이드(Pam3Cys) LP 및 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*)로부터의 OspA LP.
- [0078] 한 대안적인 구체예에서, TLR-2를 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 이용된다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). 적합하게는, TLR-2를 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 지질단백질, 펩티도글리칸, M. 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*), B. 부르그도르페리(*B. burgdorferi*), T. 팔리둠(*T. pallidum*)으로부터의 박테리아 리포펩티드; 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 포함하는 종으로부터의 펩티도글리칸; 리포테이코산, 만누론산, 네이세리아 포린(*Neisseria porins*), 박테리아 펴브리애(fimbriae), 예르시나(*Yersinia*) 독성 인자, CMV 비리온, 홍역 헤마글루티닌, 및 효모로부터의 지모산(zymosan) 중 하나 이상이다.
- [0079] 한 대안적인 구체예에서, TLR-3을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 이용된다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). 적합하게는, TLR-3을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 이중 가닥 RNA(dsRNA), 또는 바이러스 감염과 관련된 분자 핵산 패턴인 폴리이노시닉-폴리시티딜(polyinosinic-polycytidylic acid, Poly IC)이다.
- [0080] 한 대안적인 구체예에서, TLR-5를 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 이용된다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). 적합하게는, TLR-5를 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 박테리아 플라젤린이다.
- [0081] 한 대안적인 구체예에서, TLR-6을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 이용된다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). 적합하게는, TLR-6을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 미코박테리아 지질단백질, 디-아실화된 LP 및 페놀-가용성 모듈린이다. 추가로, TLR-6 효능제는 WO2003043572호에 개시되어 있다.
- [0082] 대안적인 구체예에서, TLR-7을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 이용된다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). 적합하게는, TLR-7을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 단일 가닥 RNA(ssRNA), 아이옥소리빈(Ioxoribine), 위치 N7 및 C8에서의 구아노신 유사체, 또는 이미다조퀴놀린 화합물 또는 이의 유도체이다. 일 구체예에서, TLR 효능제는 이미퀴모드(imiquimod)이다. 추가로, TLR-7 효능제는 WO2085905호에 개시되어 있다.
- [0083] 한 대안적인 구체예에서, TLR-8을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제가 이용된다(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5). 적합하게는, TLR-8을 통해 신호전달 반응을 야기할 수 있는 TLR 효능제는 단일 가닥 RNA(ssRNA), 항-바이러스 활성을 갖는 이미다조퀴놀린 분자, 예를 들어, 레시퀴모드(resiquimod)(R848)이다; 레시퀴모드는 TLR-7에 의해서도 인식될 수 있다. 이용될 수 있는 다른 TLR-8 효능제는 WO2004071459호에 개시되

어있다.

- [0084] 또한 면역자극성 올리고뉴클레오타이드 또는 임의의 다른 틀 유사 수용체(TLR) 9 효능제가 사용될 수 있다. 본 발명의 애주버트 또는 백신 또는 면역원성 조성물에 사용하기에 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 3개 이상, 적합하게는 6개 이상의 뉴클레오타이드에 의해 분리된 2개 이상의 디뉴클레오타이드 CpG 모티프를 임의로 함유하는 CpG 함유 올리고뉴클레오타이드이다. CpG 모티프는 시토신 뉴클레오타이드에 후속하여 구아닌 뉴클레오타이드가 존재한다. 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오타이드는 통상적으로 데옥시뉴클레오타이드이다. 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오타이드 내의 인터클레오타이드(internucleotide)는 포스포로디티오에이트, 또는 더 바람직하게는 포스포로티오에이트 결합이나, 포스포디에스테르 및 기타 인터클레오타이드 결합이 본 발명의 범위내에 존재한다. 또한 혼합된 인터클레오타이드 결합을 지니는 올리고뉴클레오타이드가 본 발명의 범위내에 포함된다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드 또는 포스포로디티오에이트를 생성하는 방법이 US 5,666,153호, US 5,278,302호 및 W095/26204호에 개시되어 있다.
- [0085] 바람직한 올리고뉴클레오타이드의 예는 하기 서열을 지닌다. 서열은 바람직하게는 포스포로티오에이트 변형된 인터클레오타이드간 결합을 함유할 수 있다.
- [0086] **OLIGO 1** (서열 목록 번호:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
- [0087] **OLIGO 2** (서열 목록 번호:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
- [0088] **OLIGO 3** (서열 목록 번호:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
- [0089] **OLIGO 4** (서열 목록 번호:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006 또는 7909)
- [0090] **OLIGO 5** (서열 목록 번호:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
- [0091] **OLIGO 6** (서열 목록 번호:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)
- [0092] 대안적인 CpG 올리고뉴클레오타이드는 상기한 바람직한 서열을 포함할 수 있고, 여기에 중요하지 않은 결실 또는 첨가를 갖는다. 본 발명에서 이용되는 CpG 올리고뉴클레오타이드는 당 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 합성될 수 있다(예를 들어, EP468520호 참조). 편리하게는, 이러한 올리고뉴클레오타이드가 자동 합성기를 이용하여 합성될 수 있다.
- [0093] 따라서, 또 다른 구체예에서, 애주버트 및 면역원성 조성물은 TLR-1 효능제, TLR-2 효능제, TLR-3 효능제, TLR-4 효능제, TLR-5 효능제, TLR-6 효능제, TLR-7 효능제, TLR-8 효능제, TLR-9 효능제 또는 이들의 조합물로 구성된 군에서 선택된 추가 면역자극제를 추가로 포함한다.
- [0094] 본 발명에 사용하기에 또 다른 바람직한 면역자극물질은 Quil A 및 이의 유도체이다. Quil A는 남아메리카 나무 켈라자 사포나리아 몰리나(*Quillaja Saponaria* Molina)로부터 분리된 사포닌 제조물이고, 이것이 애주버트 활성을 갖는다는 것은 1974년에 달스가르트 등(Dalsgaard et al.)에 의해 처음 개시되었다("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254). Quil A(EPO 362 278호). 예를 들어, QS7 및 QS21(QA7 및 QA21로도 공지되어 있음)과 관련된 독성없이 애주버트 활성을 보유하는 Quil A의 정제된 단편이 HPLC에 의해 분리되었다. QS-21은 켈라자 사포나리아 몰리나의 나무껍질로부터 유래된 천연 사포닌이고, 이는 CD8+ 세포독성 T 세포(CTL), Th1 세포 및 현저한 IgG2a 항체 반응을 유도하고, 이는 본 발명에서 바람직한 사포닌이다.
- [0095] 특히 바람직한 QS21의 특정 제형이 소개되었는데, 이들 제형은 스테롤(W06/33739호)을 추가로 포함한다. 스쿠알렌과 사포닌(임의로 QS21)이 포함되며, 에멀전 중의 오일의 총 수준의 감소를 가져오기 때문에, 제형에 스테롤(임의로 콜레스테롤)을 포함시키는 것이 또한 이롭다. 이것은 제조 비용의 감소, 백신접종의 전반적인 안락함의 개선, 및 또한 결과적인 면역 반응의 질적 및 양적 개선, 예컨대, 개선된 IFN- γ 생산을 야기시킨다. 따라서, 본 발명의 애주버트 시스템은 통상적으로 200:1 내지 300:1의 범위의 대사가능한 오일:사포닌의 비(w/w)를 포함하고, 또한 본 발명은 1:1 내지 200:1, 임의로 20:1 내지 100:1, 또는 실질적으로 48:1의 임의의 범위를 형성하는 "저급 오일(low oil)"에서 사용될 수 있고, 이러한 백신은 크게 감소된 반응성 프로파일과 함께 성분 모두의 이로운 애주버트 특성을 보유한다. 따라서, 몇몇 구체예는 1:1 내지 250:1, 또는 20:1 내지 200:1, 또는 20:1 내지 100:1, 또는 실질적으로 48:1의 범위의 스쿠알렌:QS21의 비(w/w)를 갖는다. 임의로, 또한 포함되는 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤)은 또한 본원에 기재된 사포닌:스테롤의 비로 존재한다.
- [0096] **항원 및 항원 조성물**

- [0097] 백신 또는 면역원성 제형은 인간 또는 동물 병원체에 대하여 면역 반응을 유도할 수 있는 스트렙토코쿠스 뉴모니에 항원을 함유한다. 페렴구균 항원이 단백질인 경우, 단백질은, 예를 들어, 다당류에 컨주게이션되거나 컨주게이션되지 않는다. 임의로, 단백질은 컨주게이션되지 않거나, 면역원성 조성물 중에 유리 단백질로서 존재한다. 컨주게이션되지 않은 단백질은 담체 단백질로서 다당류에 공유적으로 결합되지 아니한다.
- [0098] 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 임의로 폴리히스티딘 트라이어드 패밀리(polyhistidine triad family, Pht) 단백질, 이의 단편 또는 융합 단백질 또는 면역학적 기능적 균등물의 일원인 페렴구균 단백질을 포함한다. PhtA, PhtB, PhtD 또는 PhtE 단백질은 W000/37105호 또는 W000/39299호에 기술된 서열(예를 들어, PhtD에 대해서는 W000/37105호의 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열 1-838 또는 21-838)과 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 지닐 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 PhtA, PhtB, PhtD 및 PhtE 중 2, 3 또는 4개의 전장 단백질 또는 이의 단편으로 구성된다. 융합 단백질의 일례는 PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B 및 PhtE/D이고, 여기서 상기 단백질은 N-말단에서 첫 번째로 언급된 것과 연결된다(참고: W001 /98334호).
- [0099] Pht 단백질의 단편이 사용되는 경우(개별적으로 또는 융합 단백질의 일부로), 각각의 단편은 임의로 상기 폴리펩티드의 하나 이상의 히스티딘 트라이어드 모티프(들) 및/또는 코일드 코일(coiled coil) 영역을 함유한다. 히스티딘 트라이어드 모티프는 서열 HxxHxH를 지니는 폴리펩티드의 일부이고, 여기서 H는 히스티딘이고, x는 히스티딘이 아닌 아미노산이다. 코일드 코일 영역은 "코일스(Coils)" 알고리즘(Lupus, A et al (1991) Science 252; 1162-1164)에 의해 예측된 영역이다. 한 구체예에서, 단편 또는 각각의 단편은 하나 이상의 히스티딘 트라이어드 모티프 뿐만 아니라, 하나 이상의 코일드 코일 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 단편 또는 각각의 단편은 정확히 2, 3, 4 또는 5개 또는 이 이상의 히스티딘 트라이어드 모티프(임의로, 2개 이상의 트라이어드 사이의 천연 Pht 서열, 또는 천연 페렴구균 트라이어드내 Pht 서열(예를 들어, PhtD에 대해서는 W000/37105호의 SEQ ID NO:4에 나타난 바와 같은 트라이어드내 서열)과 50, 60, 70, 80, 90% 이상 또는 100% 동일한 트라이어드내 서열을 지님)를 함유한다. 한 구체예에서, 단편 또는 각각의 단편은 정확히 2, 3 또는 4개 또는 이 이상의 코일드 코일 영역을 함유한다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 Pht 단백질은 신호 서열이 부착된 전장 단백질, 신호 펩티드(예를 들어, N-말단의 20개의 아미노산)가 제거된 성숙한 전장 단백질, Pht 단백질의 천연 발생 변이체 및 Pht 단백질의 면역원성 단편(예를 들어, 위에 기술된 바와 같은 단편, 또는, W000/37105호 또는 W000/39299호에 개시된 아미노산 서열에 특이적인 면역반응을 유도할 수 있는, W000/37105호 또는 W000/39299호에 개시된 상기 아미노산 서열로부터의 15 또는 20개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드)을 포함한다.
- [0100] 특히, 본원에서 사용되는 용어 "PhtD"는 신호 서열이 부착된 전장 단백질, 신호 펩티드(예를 들어, N-말단의 20개의 아미노산)가 제거된 성숙한 전장 단백질, PhtD의 천연 발생 변이체 및 PhtD의 면역원성 단편(예를 들어, 위에 기술된 단편, 또는 W000/37105호 또는 W000/39299호에 개시된 PhtD 아미노산 서열(예를 들어, PhtD에 대해 W000/37105호에 개시된 SEQ ID NO: 4)에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 W000/37105호 또는 W000/39299호에 개시된 PhtD 아미노산 서열로부터의 15 또는 20개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드)을 포함한다.
- [0101] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 폴리 히스티딘 트라이어드 패밀리(PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리(CbpX), CbpX 트렁케이트(truncate), LytX 패밀리, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질(또는 융합체), 뉴몰리신(Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 및 Sp133으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함한다. 추가 구체예에서, 면역원성 조성물은 폴리 히스티딘 트라이어드 패밀리(PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리(CbpX), CbpX 트렁케이트, LytX 패밀리, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질(또는 융합체), 뉴몰리신(Ply), PspA, PsaA, 및 Sp128로 구성된 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단백질을 포함한다. 하나 이상의 구체예에서, 면역원성 조성물은 폴리 히스티딘 트라이어드 패밀리(PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리(CbpX), CbpX 트렁케이트, LytX 패밀리, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질(또는 융합체), 뉴몰리신(Ply), 및 Sp128로 구성된 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단백질을 포함한다.
- [0102] Pht(폴리 히스티딘 트라이어드) 패밀리는 단백질 PhtA, PhtB, PhtD 및 PhtE를 포함한다. 이러한 패밀리는 지질화 서열, 프롤린-풍부 영역에 의해 분리된 2개의 도메인 및 여러 히스티딘 트라이어드를 특징으로 하며, 이는 금속 또는 누클레오타이드 결합 또는 효소 활성, (3-5) 코일드 코일 영역, 보존된 N-말단 및 이중성 C 말단을 포함할 수 있다. 이는 시험된 모든 균주의 페렴구균에 존재한다. 동종성 단백질이 또한 기타 스트렙토코쿠스(*Streptococci*) 및 나이세리아(*Neisseria*)에서 발견되었다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 Pht 단백질은

PhtD이다. 그러나, 용어 Pht A, B, D 및 E는 하기 인용문헌에 기술된 서열을 지니는 단백질뿐만 아니라, 참조 단백질과 90% 이상 동일한 서열 상동성을 지니는 이의 천연 발생(및 인공) 변이체를 의미하는 것으로 이해된다. 임의로, 95% 이상 동일하거나 97% 이상 동일하다.

[0103] PhtX 단백질과 관련하여, PhtA는 W098/18930호에 기술되어 있고, 또한 Sp36으로 지칭된다. 위에서 기술한 바와 같이, 이는 폴리히스티딘 트라이어드 패밀리로부터의 단백질이며, LXXC의 타입 II 신호 모티프를 지닌다. PhtD는 W000/37105호에 기술되어 있고, 이는 또한 Sp036D로 지칭된다. 위에서 기술한 바와 같이, 이는 또한 폴리히스티딘 트라이어드 패밀리로부터의 단백질이고, 타입 II LXXC 신호 모티프를 지닌다. PhtB는 W000/37105호에 기술되어 있고, 이는 또한 Sp036B로 지칭된다. PhtB 패밀리의 또 다른 일원은 W000/17370호에 기술된 바와 같은 C3-분해 폴리펩티드이다. 이러한 단백질은 또한 폴리히스티딘 트라이어드 패밀리로부터의 단백질이고, 타입 II LXXC 신호 모티프를 지닌다. 예를 들어, 면역학적 기능 동등체는 W098/18930호에 기술된 단백질 Sp42이다. PhtB 트렁케이트(대략 79kD)가 W099/15675호에 기술되어 있으며, 이 또한 PhtX 패밀리의 일원으로 간주된다. PhtE가 W000/30299호에 기술되어 있으며, 이는 BVH-3로 언급되어 있다. 임의의 Pht 단백질이 본원에 언급되는 경우, Pht 단백질의 면역원성 단편 또는 이의 융합체가 사용될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, PhtX에 대한 참고는 임의의 Pht 단백질로부터의 면역원성 단편 또는 이의 융합체를 포함한다. PhtD 또는 PhtB에 대한 참고는, 예를 들어, W00198334호에서 발견되는 바와 같은 PhtDE 또는 PhtBE 융합체를 참고로 한다.

[0104] 뉴몰리신은 별개의 세포용해(용혈) 활성 및 보체 활성화 활성을 지니는 다기능성 독소이다(Rubins et al., Am. Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). 이 독소는 폐렴구균에 의해 분비되지 않지만, 자가용해소의 영향하에서 폐렴구균의 용해시에 방출된다. 이의 영향은, 예를 들어, 인간 단핵구에 의한 염증성 사이토카인 생성의 자극, 인간 호흡 상피에서의 섬모의 고동의 억제, 및 호중구의 살균 활성 및 이동의 감소를 포함한다. 뉴몰리신의 가장 명백한 영향은 콜레스테롤에 대한 결합을 포함하는 적혈구 세포의 용해이다. 이것은 독소이기 때문에, 생체내에 투여되기 전에 무독화(즉, 보호에 적합한 투여량으로 제공시 인간에 대해 무독성)되는 것이 필요하다. 야생형 또는 천연 뉴몰리신의 발현 및 클로닝은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Walker et al. (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989)) 및 Mitchell et al (NAR, 18:4010 (1990))]을 참조하라. ply의 무독화는 화학적 수단, 예를 들어, 포르말린 처리 또는 글루타르알데히드 처리 또는 둘 모두의 조합으로의 적용(W004081515호, PCT/EP2005/010258호)에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법은 다양한 독소에 대해 당분야에 널리 공지되어 있다. 대안적으로, ply는 유전적으로 무독화될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 예를 들어, 돌연변이된 단백질일 수 있는 폐렴구균 단백질의 유도체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "돌연변이된"은 위치 지정 돌연변이유발에 관한 잘 알려진 기술 또는 임의의 기타 관용적인 방법을 이용하여 하나 이상의 아미노산을 결실시키거나, 부가하거나, 치환시킨 분자를 의미한다. 예를 들어, 위에서 기술한 바와 같이, 돌연변이 ply 단백질은 여전히 이의 면역원성 에피토프를 유지 하면서 생물학적으로 비활성화되도록 변형될 수 있다. 예를 들어, W090/06951호, 문헌[Berry et al (Infect Immun, 67: 981-985 (1999))] 및 W099/03884호를 참조하라.

[0105] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Ply"는 의약용으로 적합한 돌연변이되거나 무독화된(즉, 비독성) 뉴몰리신을 의미하는 것으로 이해된다.

[0106] 콜린 결합 단백질 패밀리(CbpX)와 관련하여, 이러한 패밀리의 일원은 본래 콜린-친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는 폐렴구균 단백질로 확인되었다. 모든 콜린-결합 단백질은 세포벽 타이코산 및 막-관련 지질타이코산(lipoteichoic acid)의 포스포릴콜린 부분에 비공유적으로 결합되어 있다. 구조적으로, 이들은 전체 패밀리에 걸쳐서 공통적인 여러 영역을 지니지만, 단백질의 정확한 특성(아미노산 서열, 길이 등)은 다양할 수 있다. 일반적으로, 콜린 결합 단백질은 N 말단 영역(N), 보존된 반복 영역(R1 및/또는 R2), 프롤린 풍부 영역(P) 및 단백질의 대략 절반을 포함하는, 다중 반복부로 이루어진, 보존된 콜린 결합 영역(C)을 포함한다. 본원에서 사용된, 용어 "콜린 결합 단백질 패밀리(CbpX)"는 W097/41151호에서 확인된 콜린 결합 단백질, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD 및 CbpG로 구성된 그룹으로부터 선택된다. CbpA는 W097/41151호에 기술되어 있다. CbpD 및 CbpG는 W000/29434호에 기술되어 있다. PspC는 W097/09994호에 기술되어 있다. PbcA는 W098/21337호에 기술되어 있다. SpsA는 W098/39450호에 기술된 콜린 결합 단백질이다. 임의로, 콜린 결합 단백질은 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0107] 본 발명의 일 구체예는 CbpX 트렁케이트이며, 여기서 "CbpX"는 위에 정의되어 있고, "트렁케이트"는 콜린 결합 영역 (C)의 50% 이상이 결여된 CbpX 단백질을 의미한다. 임의로, 이러한 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 결여되어 있다. 임의로, 이러한 단백질 트렁케이트는 (i) 콜린 결합 영역 및 (ii) 단백질의 N-말단의 절반 부분이 결여되어 있으나, 하나 이상의 반복 영역(R1 또는 R2)은 여전히 보유한다. 임의로, 트렁케이트는 2개의 반복

영역(R1 또는 R2)을 지닌다. 이러한 바람직한 구체예의 일예는 W099/51266호 또는 W099/51188호에 예시된 바와 같은 NR1xR2 및 R1xR2이나, 유사한 콜린 결합 영역이 결합된 기타 콜린 결합 단백질이 또한 본 발명의 범위에 고려된다.

[0108] LytX 패밀리는 세포 용해와 관련된 막 관련 단백질이다. N-말단 도메인은 콜린 결합 도메인(들)을 포함하나, LytX 패밀리는 상기 기술된 CbpA 패밀리에서 발견되는 모든 특징을 지니지 않으며, 따라서 본 발명에 있어서 LytX 패밀리는 CbpX 패밀리와는 별개의 것으로 간주된다. CbpX 패밀리와는 대조적으로, C-말단 도메인은 LytX 단백질 패밀리의 촉매 도메인을 함유한다. 이러한 패밀리는 LytA, B 및 C를 포함한다. LytX 패밀리와 관련하여, LytA는 문헌[Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987)]에 기술되어 있다. LytB는 W098/18930호에 기술되어 있고, 또한 Sp46으로 언급되어 있다. LytC는 또한 W098/18930호에 기술되어 있고, 또한 Sp91로 언급되어 있다. 상기 패밀리의 바람직한 일원은 LytC이다.

[0109] 또 다른 구체예는 LytX 트렁케이트를 포함하며, 여기서 "LytX"는 위에 정의된 바와 같고, "트렁케이트"는 콜린 결합 영역의 50% 이상이 결합된 LytX 단백질을 의미한다. 임의로, 이러한 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 결합되어 있다. 본 발명의 또 다른 구체예는 CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질(또는 융합체)이다. 임의로, 이것은 CbpX의 NR1xR2(또는 R1xR2) 및 LytX의 C-말단 부분(Cterm, 즉, 콜린 결합 도메인이 결합됨)(예를 들어, LytCCterm 또는 Sp91 Cterm)을 포함한다. 임의로, CbpX는 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 구성된 군에서 선택된다. 임의로, 이는 CbpA이다. 임의로, LytX는 LytC(또한 Sp91로 언급됨)이다. 본 발명의 또 다른 구체예는 콜린 결합 도메인(C)이 결합되고, LytX와의 융합 단백질로 발현되는 PspA 또는 PsaA 트렁케이트이다. 임의로, LytX는 LytC이다.

[0110] PsaA 및 PspA에 관하여, 둘 모두는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, PsaA 및 이의 막횡단 결실 변이체가 문헌[Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62]에 기술되어 있다. PspA 및 이의 막횡단 결실 변이체는, 예를 들어, US 5804193호, W092/14488호 및 W099/53940호에 기술되어 있다.

[0111] Sp128 및 Sp130은 W000/76540에 기술되어 있다. Sp125는 LPXTG의 세포벽 부착 모티프(여기서, X는 임의의 아미노산임)를 지니는 폐렴구균 표면 단백질의 예이다. 상기 모티프를 지니는 상기 부류의 폐렴구균 표면 단백질에서의 임의의 단백질이 본 발명에서 유용한 것으로 밝혀졌고, 따라서 본 발명의 추가 단백질로 간주된다. Sp125 자체는 W098/18930호에 기술되어 있고, 이는 또한 ZmpB-아연 금속 단백질분해효소로 공지되어 있다. Sp101은 W098/06734호(이 국제공개출원번호는 # y85993의 관리번호를 가짐)에 기술되어 있다. 이는 타입 I 신호 서열을 특징으로 한다. Sp133은 W098/06734호(이 국제공개출원번호는 # y85992의 관리번호를 가짐)에 기술되어 있다. 이 또한 타입 I 신호 서열을 특징으로 한다.

[0112] 본 발명의 단백질은 또한 유리하게 조합될 수 있다. 조합은 면역원성 조성물이 담체 단백질 또는 유리 단백질 또는 이들 둘 모두의 혼합물로서 하기 조합으로부터의 모든 단백질을 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, 아래에 기술되는 2개의 단백질 조합에서, 단백질 둘 모두가 담체 단백질로 사용될 수 있거나, 단백질 둘 모두는 유리 단백질로 존재할 수 있거나, 단백질 둘 모두가 담체 단백질 및 유리 단백질로 존재할 수 있거나, 한 단백질은 담체 단백질 및 유리 단백질로 존재하고 한편, 나머지 단백질은 단지 담체 단백질 또는 단지 유리 단백질로 존재할 수 있거나, 한 단백질은 담체 단백질로 존재하고 나머지는 유리 단백질로 존재할 수 있다. 3개의 단백질의 조합물이 제공되는 경우, 유사한 가능성이 존재한다. 조합물은 PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91 C 텀(term) 키메라 또는 융합 단백질, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91 C 텀 키메라 또는 융합 단백질, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 임의로, NR1xR2(또는 R1xR2)는 CbpA 또는 PspC로부터 유래된다. 임의로, 이는 CbpA로부터 유래된다. 기타 조합물은 3개의 단백질 조합물, 예를 들어, PhtD + NR1xR2 + Ply, 및 PhtA + NR1xR2 + PhtD를 포함한다. 한 구체예에서, 백신 조성물은 담체 단백질로서 무독화된 뉴몰리신 및 PhtD 또는 PhtDE를 포함한다. 한 추가 구체예에서, 백신 조성물은 유리 단백질로서 무독화된 뉴몰리신 및 PhtD 또는 PhtDE를 포함한다.

[0113] PhtD 또는 이의 융합 단백질에 대한 유효한 면역 반응은, 예를 들어, 실시예15에 기재된 것과 같은 보호 검정으로 측정된다. 유효한 면역 반응은 이중 균주로 공격한지 7일 후에 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 생존율을 제공한다. 공격 균주가 이중성임을 고려할 때, 부여된 보호는 PhtD 또는 이의 융합 단백질에 대한 면역 반응에 기인한다.

[0114] 대안적으로, PhtD에 대한 유효한 면역 반응은 실시예 14에 기재된 것과 같은 ELISA로 측정된다. 유효한 면역

반응은 250, 300, 350, 400, 500, 550 또는 600 µg/ml 이상의 GMC의 항-PhtD IgG 반응을 부여한다.

- [0115] 일 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 뉴몰리신을 포함한다.
- [0116] 일 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 US6699703호에 개시된 페렴구균 단백질, 예를 들어, US6699703호의 SEQ ID NOs 1-5326의 서열 또는 상기 서열에 의해 엔코딩되는 서열을 지니는 페렴구균 단백질을 포함한다.
- [0117] 본 발명의 일 구체예에서, 면역원성 조성물은 PCT/EP2007/060743호에 개시되지 아니한 페렴구균 단백질을 포함한다.
- [0118] 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물과 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 백신을 추가로 제공한다.
- [0119] 일 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, LytB, LytC, LytA, Sp125, SP101, Sp128, Sp130, Sp133 또는 US6699703호의 SEQ ID NOs: 5225, 5200, 3166, 4360, 5137, 4263, 3166, 5226, 3716, 4360, 5243, 3964, 5179, 3850, 4263, 5137, 5226, 5325, 3850, 5179 또는 5325로 제시되거나, 상기 서열에 의해 엔코딩된 S. 뉴모니에 단백질을 포함하는, US6699703호에 개시된 단백질, 또는 이의 면역학적 기능 동등체로 구성된 군에서 선택된 페렴구균 단백질을 포함한다. 면역학적 기능 동등체는 언급된 서열과 80, 90, 95, 98 또는 99% 이상의 동일성을 공유하는 서열을 포함한다. 면역학적 기능 동등체는 또한 언급된 서열로부터의 6, 10, 20, 30, 40 또는 50개 이상의 연속 아미노산을 지니는 단편을 포함한다. 면역학적 기능 동등체는 천연 항원을 인식하는 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0120] **백신접종**

- [0121] 본 발명의 면역원성 조성물을 함유하는 백신 제조물은 전신 또는 점막 경로를 통해 이 백신을 투여함으로써 감염에 걸리기 쉬운 포유동물을 보호 또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 투여는 근내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 또는 경구/식도(alimentary), 호흡기, 비노생식관으로의 점막 투여를 통한 주사를 포함할 수 있다. 본 발명의 백신이 단일 용량으로 투여될 수 있지만, 이의 성분들은 동시 또는 이시에 함께 동시-투여될 수 있다(예를 들어, 페렴구균 다당류 컨주게이트는 동시에 또는 서로에 대한 최적의 면역 반응 협조를 위한 임의의 박테리아 단백질 성분의 투여후 1-2주 후에, 별개로 투여될 수 있다). 또한, 본 발명의 백신은 프라이밍 용량의 경우 IM으로 부스터 용량의 경우 IN으로 투여될 수 있다.
- [0122] 백신 중의 단백질 항원의 함량은 전형적으로 1-100 µg 범위 이내, 바람직하게는, 5-50 µg, 가장 전형적으로는 5-25 µg 범위 이내일 것이다. 초기 백신접종 후, 피검체는 적절한 간격을 두고 하나 또는 다수의 부스터 면역접종을 받을 수 있다.
- [0123] 백신 제조는 일반적으로 Vaccine Design("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York)에 기재되어 있다. 리포좀 내로의 캡슐화는 Fullerton에 의한 미국 특허 제 4,235,877호에 기재되어 있다.
- [0124] 본 발명의 백신은 용액으로 저장되거나 동결건조될 수 있다. 바람직하게는, 용액은 당, 예컨대, 수크로스 또는 락토오스의 존재하에 동결건조된다. 이러한 백신이 동결건조되고 사용하기 전에 즉석에서 재구성되는 것이 훨씬 더 바람직할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 일 양상에서, 동결건조되거나 동결건조되지 않은 형태의, 본 발명의 면역원성 조성물을 함유하는 바이얼을 포함하고, 본원에 기술된 애주번트를 함유하는 바이얼을 추가로 포함하는 백신 키트가 제공된다. 본 발명의 이러한 양상에서, 애주번트는 동결건조된 면역원성 조성물을 재구성시키기 위해 사용될 것이 예견된다.
- [0126] 본 발명의 백신은 임의의 경로에 의해 투여될 수 있으나, 기술된 백신의 피부(ID)로의 투여가 본 발명의 한 구체예를 이룬다. 인간 피부는 표피를 덮고 있는 각질층으로 언급되는 외부 "뿔 모양의(horny)" 외피를 포함한다. 이러한 표피 아래에 진피로 언급되는 층이 존재하고, 차례로 이는 피하 조직을 덮고 있다. 연구자들은 피부, 특히 진피로의 백신의 주사가 면역 반응을 자극할 수 있고, 이는 또한 다수의 추가 장점과 관련이 있다는 것을 발견하였다. 본원에 기술된 백신을 이용한 피내 예방접종은 본 발명의 바람직한 특징을 구성한다.
- [0127] 피내 주사의 통상적인 기술인 "망토우(mantoux) 방법"은 피부의 소독 단계, 그런 다음, 한 손을 이용한 스트레칭 단계, 및 위로 향하는 빗각의 좁은 게이지 바늘(26-31 게이지)을 이용하여 바늘을 10-15°의 각으로 삽입하는 단계를 포함한다. 일단 빗각의 바늘이 삽입되면, 빗각의 바늘을 낮추고, 피부 아래로 바늘을 이동시키기 위해 약간의 압력을 제공하면서 추가로 전진시킨다. 이후, 액체를 매우 천천히 주사하고, 그로 인해 피부 표면 상에 수포 또는 융기가 형성되고, 이후 바늘을 천천히 뺀다.

[0128] 보다 최근에, 피부 내로 또는 피부를 가로질러 액체 작용제를 투여하기 위해 특별히 고안된 장치가 기술되었으며, 이러한 장치는 W099/34850호 및 EP1092444호에 기술되어 있으며, 또한, 예를 들어, 분사(jet) 주사 장치가 W001/13977호; US 5,480,381호, US 5,599,302호, US 5,334,144호, US 5,993,412호, US 5,649,912호, US 5,569,189호, US 5,704,911호, US 5,383,851호, US 5,893,397호, US 5,466,220호, US 5,339,163호, US 5,312,335호, US 5,503,627호, US 5,064,413호, US 5,520,639호, US 4,596,556호, US 4,790,824호, US 4,941,880호, US 4,940,460호, W097/37705호 및 W097/13537호에 기술되어 있다. 백신 제조물의 피내 투여의 대안적 방법은 통상적인 주사기 및 바늘, 또는 고체 백신의 발리스틱(ballistic) 전달을 위해 고안된 장치(W099/27961호), 또는 경피 패치(W097/48440호; W098/28037호)를 포함할 수 있거나; 피부의 표면에 적용될 수 있다(경피 또는 피하 전달 W098/20734호; W098/28037호).

[0129] 본 발명의 백신을 피부, 더욱 특히 진피에 투여하려는 경우, 백신의 양은 적은 액체 부피, 특히 약 0.05 ml 내지 0.2 ml의 부피이다.

[0130] 본 발명의 피부 또는 피내 백신에서의 항원의 함량은 근대 백신(상기 참조)에서 발견되는 통상적인 투여량과 유사할 수 있다. 그러나, 피부 또는 피내 백신의 특징은 제형이 "저 용량"일 수 있다는 점이다. 따라서, "저 용량"의 백신의 단백질 항원은 임의로 용량당 0.1 내지 10 μg , 또는 0.1 내지 5 μg 만큼 적게 존재하고; 당류(바람직하게는, 컨쥬게이션된 당류) 항원은 용량당 0.01 내지 1 μg , 바람직하게는 0.01 내지 0.5 μg 의 당류의 범위로 존재할 수 있다.

[0131] 본원에서 사용되는 용어 "피내 전달"은 피부 내의 진피 영역으로의 백신의 전달을 의미한다. 그러나, 백신은 반드시 진피 내에만 존재할 필요는 없다. 진피는 인간 피부의 표면으로부터 약 1.0 내지 약 2.0 mm에 위치한 피부 내의 층이나, 개체마다 또한 신체의 상이한 부분마다 특정한 수치의 변화가 존재한다. 일반적으로, 피부의 표면 아래로 1.5 mm를 진행하면 진피에 도달하는 것으로 예상될 수 있다. 진피는 각질층 및 피부의 외피와 피하층 사이에 위치하고 있다. 전달 방법에 따라, 백신은 궁극적으로 진피내에만 또는 주로 진피에 위치될 수 있거나, 궁극적으로 외피 및 진피 내에 분배될 수 있다.

[0132] 각 백신 용량 중의 각 항원의 양은 전형적인 백신에서의 유의한, 부작용 없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로써 선택된다. 그러한 양은 사용되는 특정 면역원 및 제공되는 방법에 따라 달라질 것이다.

[0133] 추가 구체예에서, 본원에 실질적으로 기재된 것과 같은 조성물의 투여에 의해 질병에 걸리기 쉽거나 질병을 앓고 있는 개체의 치료 방법이 제공된다.

[0134] 또한 개체에게 본원에 실질적으로 기재된 것과 같은 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 개체가 감염성 박테리아 및 바이러스 질환, 기생충 질환, 특히 세포내 병원성 질환, 증식성 질환, 예컨대, 전립선암, 유방암, 결장직장암, 폐암, 췌장암, 신장암, 난소암 또는 흑색종; 비암성 만성 질환, 알레르기를 포함하는 군에서 선택된 질환에 걸리는 것을 예방하는 방법이 제공된다.

[0135] 추가 구체예에서, 병태 또는 질환의 예방적 치료 또는 치료에 사용하기 위한 백신 조성물이 제공되는데, 여기서 백신 조성물은, 인간 용량당, 항원 또는 항원 조성물 및 0.5-10 mg의 대사가능한 오일, 0.5-11 mg의 토폴 및 0.1-4 mg의 유화제를 포함하는 수중유 에멀전으로 구성된 애주번트 조성물을 포함한다.

[0136] 추가 구체예에서, 병태 또는 질환의 예방적 치료 또는 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 백신 조성물의 용도가 제공되는데, 여기서 백신 조성물은, 인간 용량당, 항원 또는 항원 조성물 및 0.5-10 mg의 대사가능한 오일, 0.5-11 mg의 토폴 및 0.1-4 mg의 유화제를 포함하는 수중유 에멀전으로 구성된 애주번트 조성물을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0137] 본 발명은 하기 비제한적 실시예를 참조로 하여 추가로 기술될 것이다:

[0138] 실시예 I은 마우스, 페렛, 돼지 및 인간 연구에 사용된 면역학적 판독 방법을 기술한다.

[0139] 실시예 II는 예시된 연구에 사용된 수중유 에멀전 및 애주번트 제형의 제조를 기술한다.

[0140] 실시예 III에는 분절형(split) 인플루엔자 항원 제조물 및 2가지 용량의 AS03 애주번트를 함유하는 백신을 이용한 18-59세 연령의 성인 집단에서의 임상 시험을 설명한다.

[0141] 실시예 IV는 프라이밍한 BALB/c 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형(split) 인플루엔

자 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 포함)의 전임상 평가를 설명한다.

- [0142] 실시예 V는 프라이밍한 C57BI/6 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형 인플루엔자 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 포함)의 전임상 평가를 설명한다.
- [0143] 실시예 VI은 프라이밍한 C57BI/6 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형 인플루엔자 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 및 저 용량 항원 포함)의 전임상 평가를 설명한다.
- [0144] 실시예 VII은 무경험 C57BI/6 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형 H5N1 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 및 항원 포함)의 전임상 평가를 설명한다.
- [0145] 실시예 VIII은 프라이밍한 대백돈(Large White pig)에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 인플루엔자 백신의 전임상 평가를 설명한다.
- [0146] 실시예 I-면역학적 판독 방법
- [0147] I.1. 마우스 방법
- [0148] I.1.1. 적혈구응집 억제 시험
- [0149] 시험 원리 (고전적 절차)
- [0150] 3개(계절성)의 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 적혈구응집 억제 시험(HI)을 이용하여 결정하였다. HI 시험의 원리는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의한 적혈구 세포(RBC)의 적혈구응집을 억제하는 특정 항-인플루엔자 항체의 능력에 기초한다. 열에 의해 불활성화된 혈청을 카울린 및 RBC로 처리하여 비특이적 억제제를 제거하였다. 전처리 후, 혈청의 2배 희석액을 4 적혈구응집 단위의 각각의 인플루엔자 균주와 함께 인큐베이션시켰다. 이후, 적혈구 세포를 첨가하고, 응집의 억제를 기록하였다. 적혈구응집을 완전하게 억제한 혈청의 가장 높은 희석액의 역수로 역가를 나타내었다. 혈청의 첫 번째 희석액은 1:20이었으므로, 검출불가능한 수준은 10과 동일한 역가로 기록하였다.
- [0151] H5N1에 대한 적합화(말 적혈구를 이용한 HI의 구체적 기재):
- [0152] 항-HA 항체를 결정하기 위한 고전적인 HI 검정은 H5N1 균주에 잘 적용되도록 문서화되어 있지 않으므로, 말 RBC를 이용하여 적합화시킨 프로토콜을 이용하였다. 말의 적혈구를 H5N1 범유행성 균주에 대하여 이용한다. 0.5% BSA(소 혈청 알부민, 최종 농도)를 함유하는 인산염 완충액 중 0.5%(최종 농도)의 말 적혈구 세포 현탁액. 적혈구를 동일한 인산염 완충액으로 세척하고 후속적인 원심분리 단계(10분, 2000 rpm)에 의해 상기 현탁액을 매일 제조한다. 상기 세척 단계는 1회 반복되어야 한다. 말 적혈구 세포의 낮은 침강율로 인해 말 적혈구를 혈청 및 바이러스 현탁액의 반응 믹스에 첨가시킨 후, 플레이트를 실온(RT, 20℃+/-2℃)에서 2시간 동안 인큐베이션해야 한다.
- [0153] 통계적 분석
- [0154] 백신접종 후의 HI 역가에 대해 UNISTAT을 이용하여 통계적 분석을 수행하였다. 분산 분석에 적용된 프로토콜은 하기와 같이 간단히 기술될 수 있다:
- [0155] ◆ 데이터의 Log 변환.
- [0156] ◆ 그룹 분포의 정상 상태를 입증하기 위한 각각의 집단(그룹)에 대한 샤피로-윌크(Shapiro-Wilk) 시험.
- [0157] ◆ 다양한 집단(그룹) 사이의 분산의 균질성을 확인하기 위한 코크란(Cochran) 시험.
- [0158] ◆ 선택된 데이터에 대한 분산 분석
- [0159] ◆ 2-웨이(Two-way) ANOVA의 상호작용에 대한 시험
- [0160] ◆ 다중 비교를 위한 터키(Tukey)-HSD 시험.
- [0161] I.1.2. 세포내 사이토카인 염색
- [0162] 본 기술은 사이토카인 생성을 기초로 하여 항원 특이적 T 림프구의 정량을 가능케 한다: 이펙터 T 세포 및/또는 이펙터-기억 T 세포는 IFN- γ 를 생성하고/하거나 증추 기억 T 세포는 IL-2를 생성한다. PBMC를 면역화 7일 후에 수거하였다.
- [0163] 림프구 세포를 분비 억제제(브레펠딘(Brefeldine))의 존재하에서 시험관내에서 재자극시켰다. 이후, 이러한 세

포를 형광 항체(CD4, CD8, IFN- γ 및 IL-2)를 이용하는 통상적인 면역형광 방법에 의해 처리하였다. 결과를 CD4/CD8 T 세포 내의 사이토카인 양성 세포의 빈도로 나타내었다. T 세포의 사이토카인의 세포내 염색을 두 번째 면역화 7일 후에 PBMC에서 수행하였다. 마우스로부터 혈액을 수거하고, 헤파린 처리된 배지 RPMI+ Add에서 풀링시켰다. 혈액에 대해서는, RPMI + Add 희석된 PBL 현탁액을 권장 프로토콜(2500 rpm 및 R.T에서 20분 동안 원심분리)에 따라 림포라이트-포유동물(Lympholyte-mammal) 구매 상에 층을 이루게 하였다. 계면의 단핵 세포를 분리시키고, RPMI+ Add로 2회 세척하고, PBMC 현탁액을 RPMI 5% 우태아 혈청 중에 2×10^6 세포/ml로 조정하였다.

[0164] PBMC의 시험관내 항원 자극을 전체 FI($1 \mu\text{g}$ HA/균주)와 함께 1×10^7 세포/ml(튜브 FACS)의 최종 농도에서 수행한 다음, 항-CD28 및 항-CD49d(둘 모두 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가시켜 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.

[0165] 항원 재자극 단계 후, PBMC를 브레펠딘($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)의 존재하에서 37°C에서 밤새 인큐베이션시켜, 사이토카인 분비를 억제시켰다.

[0166] IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 염색을 다음과 같이 수행하였다: 세포 현탁액을 세척하고, 2% Fc 차단 시약(1/50; 2.4G 2)을 함유하는 $50 \mu\text{l}$ 의 PBS 1% FCS에 재현탁시켰다. 4°C에서의 10분의 인큐베이션 후, $50 \mu\text{l}$ 의 항-CD4-PE(2/50) 및 항-CD8 perCp(3/50)의 혼합물을 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. PBS 1% FCS에서 세척한 후, 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 사이토폭스-사이토펜(Cytofix-Cytoperm)(Kit BD)에 재현탁시킴으로써 투과화시키고, 4°C에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 이후, 세포를 펄 워시(Perm Wash)(Kit BD)로 세척하고, 펄워시에 희석된 $50 \mu\text{l}$ 의 항-IFN- γ APC(1/50) + 항-IL-2 FITC(1/50)의 혼합물에 재현탁시켰다. 4°C에서 최소 2시간, 최대 밤새 인큐베이션시킨 후, 세포를 펄 워시로 세척하고, PBS 1% FCS + 1% 파라포름알데히드에 재현탁시켰다. FACS에 의해 샘플 분석을 수행하였다. 살아 있는 세포를 게이팅(gating)(FSC/SSC)시키고, CD4+T 세포 상의 ~ 20,000개의 이벤트(립프구) 또는 35,000개의 이벤트에서 포착(acquisition)을 수행하였다. IFN- γ + 또는 IL2+의 백분율을 CD4+ 및 CD8+ 게이팅된 집단에서 계산하였다.

[0167] I.1.3. 항-H5N1 ELISA.

[0168] 항-H5N1 Ig, IgG1 및 IgG2b 항체 역가의 정량을 코팅으로서 분절형 H5N1을 이용한 ELISA에 의해 수행하였다. 바이러스 및 항체 용액을 웰 당 $100 \mu\text{l}$ 로 사용하였다. 분절형 바이러스 H5N1을 PBS에서 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 희석시키고 96 웰 미세역가 플레이트(Maxisorb Immunoplate Nunc 439454)의 웰에 4°C에서 밤새 흡착시켰다. 이후, 플레이트를 1% BSA 및 0.1% 트윈 20을 함유하는 웰 당 $200 \mu\text{l}$ 의 PBS (포화 완충액)와 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액 중 혈청의 22배 희석액을 H5N1-코팅된 플레이트에 첨가하고 37°C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS 0.1% 트윈 20으로 4회 세척하였다. PBS 1% BSA 0.1% 트윈 20에 1/500 희석된 비오틴닐화-컨주게이션된 항-마우스 Ig(Prozan-E0413) 또는 1/4000 희석된 비오틴닐화-컨주게이션된 항-마우스 IgG1(Imtech 1070-08) 또는 비오틴닐화된 항-마우스 IgG2b(Imtech 1090-08)를 각 웰에 첨가하고 37°C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다; 세척 단계 후, 플레이트를 PBS 1% BSA 트윈 20에 1/10000로 희석된 스트렙타비딘-비오틴-프록시사다아제 컨주게이션(Prozan P0397)과 함께 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0169] 비색 계시를 위해, 플레이트를 0.1M 시트레이트 완충액(pH 4.2) 중 o-페닐디아민(Sigma P4664) 0.04% H₂O₂ 0.03%의 용액과 함께 22°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 2N H₂SO₄로 반응을 중단시키고, 490-630 nm에서 미세플레이트를 판독하였다.

[0170] **I.2. 페렛 방법**

[0171] I.2.1. 적혈구응집 억제 시험(HI)

[0172] 시험 절차

[0173] 3가지 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 적혈구응집 억제 시험(HI)을 이용하여 결정하였다. HI 시험의 원리는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의한 닭 적혈구 세포(RBC)의 적혈구응집을 억제하는 특정 항-인플루엔자 항체의 능력에 기초한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다아제 용액(RDE)으로 처리하고, 열-불활성화시켜 비특이적 억제제를 제거하였다. 전처리 후, 혈청의 두 배의 희석액을 각각의 인플루엔자 균주의 4 적혈구응집 유닛과 함께 인큐베이션시켰다. 이후, 닭 적혈구 세포를 첨가하고, 응집의 억제를 기록하였다. 적혈구응집을 완전하게 억제한 혈청의 가장 높은 희석액의 역수로 역가를 나타내었다. 혈청의 첫 번째 희석액은 1:10이었으므로, 검출불가능한 수준은 5와 동일한 역가로 기록하였다.

- [0174] 통계적 분석
- [0175] UNISTAT을 이용하여 HI 역가(공격(challenge) 41일 전)에 대해 통계적 분석을 수행하였다. 분산 분석에 적용된 프로토콜은 하기와 같이 간단히 기술될 수 있다:
- [0176] ◆ 데이터의 Log 변환.
- [0177] ◆ 그룹 분포의 정상 상태를 입증하기 위한 각각의 집단(그룹)에 대한 샤피로-윌크 시험.
- [0178] ◆ 다양한 집단(그룹) 사이의 분산의 균질성을 확인하기 위한 코크란 시험.
- [0179] ◆ 1-웨이 ANOVA의 상호작용에 대한 시험.
- [0180] ◆ 다중 비교를 위한 터키-HSD 시험.
- [0181] I.2.2. 체온 모니터링
- [0182] 개별적 온도를 공격 기간 동안 트랜스미터를 이용하여 원격측정 기록에 의해 모니터링하였다. 모든 이식물을 조사하고, 쇠신시키고, 복강내에 배치시키기 전에 DSI(Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, The Netherlands)에 의해 새로운 교정을 수행하였다. 모든 동물을 상기 측정 동안 하나의 우리에서 개별적으로 사육하였다. 온도를 공격 4일 전부터 공격 7일 후까지 매 15분마다 기록하였다.
- [0183] I.2.3. 비내 세척
- [0184] 의식이 있는 동물의 양 콧구멍에 5 ml의 PBS를 투여함으로써 비내 세척을 수행하였다. 집종물을 페트리 접시에 수거하고, 드라이아이스 상의 샘플 용기에 두었다.
- [0185] 비내 세척액에서의 바이러스 적정
- [0186] 모든 비내 샘플을 먼저 스피ن(Spin) X 필터(Costar)를 통해 여과 멸균시켜, 임의의 박테리아 오염물을 제거하였다. 50 μ l의 비내 세척물의 연속 10배 희석액을 50 μ l의 배지를 함유하는 미세역가 플레이트(10 웰/희석액)로 옮겼다. 이후, 100 μ l의 MDCK 세포(2.4×10^5 세포/ml)를 각각의 웰에 첨가하고, 5-7일 동안 35°C에서 인큐베이션시켰다.
- [0187] 5-7일의 인큐베이션 후, 배양 배지를 천천히 제거하고, 100 μ l의 1/20 WST-1 함유 배지를 첨가하고, 추가로 18 시간 동안 인큐베이션시켰다.
- [0188] 살아 있는 세포에 의한 WST-1의 환원으로 생성된 황색 포르마잔 염료의 강도는 바이러스 적정 분석의 종료시에 웰에 존재하는 살아 있는 세포의 수에 비례하며, 적절한 파장(450 나노미터)에서 각각의 웰의 흡광도를 측정함으로써 정량된다. 컷-오프(cut-off)는 감염되지 않은 대조 세포의 OD 평균인 0.3 OD(0.3 OD는 감염되지 않은 대조 세포의 OD의 ± 3 StDev에 해당함)로 정의된다. OD가 컷-오프 미만인 경우 양성 스코어로 규정되고, 대조적으로 OD가 컷-오프를 초과하는 경우 음성 스코어로 규정된다. 바이러스 shedding(shedding) 역가를 "리드 및 린크(Reed and Muench)" 방법에 의해 결정하였고, Log TCID₅₀/ml로 나타내었다.
- [0189] **I.3. 돼지 방법**
- [0190] I.3.1. 적혈구응집 억제 시험(HI)
- [0191] 시험 절차
- [0192] 세 개의 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 적혈구응집 억제 시험(HI)을 이용하여 결정하였다. HI 시험의 원리는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의한 닭 적혈구 세포(RBC)의 적혈구응집을 억제하는 특정 항-인플루엔자 항체의 능력에 기초한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다아제 용액(RDE)으로 처리하고, 열-불활성화시켜 비특이적 억제제를 제거하였다. 전처리 후, 혈청의 두 배의 희석액을 각각의 인플루엔자 균주의 4 적혈구응집 유닛과 함께 인큐베이션시켰다. 이후, 닭 적혈구 세포를 첨가하고, 응집의 억제를 기록하였다. 적혈구응집을 완전하게 억제한 혈청의 가장 높은 희석액의 역수로 역가를 나타내었다. 혈청의 첫 번째 희석액은 1:10이었으므로, 검출불가능한 수준은 5와 동일한 역가로 기록하였다.
- [0193] 통계적 분석
- [0194] UNISTAT을 이용하여 HI 역가(공격 41일 전)에 대해 통계적 분석을 수행하였다. 분산 분석에 적용된 프로토콜은 하기와 같이 간단히 기술될 수 있다:

- [0195] ◆ 데이터의 Log 변환.
- [0196] ◆ 그룹 분포의 정상 상태를 입증하기 위한 각각의 집단(그룹)에 대한 샤피로-윌크 시험.
- [0197] ◆ 다양한 집단(그룹) 사이의 분산의 균질성을 확인하기 위한 코크란 시험.
- [0198] ◆ 일원 ANOVA의 상호작용에 대한 시험.
- [0199] ◆ 다중 비교를 위한 터키-HSD 시험.
- [0200] **I.4. 인간에서의 면역 반응을 평가하기 위한 분석**
- [0201] I.4.1. 적혈구응집 억제 분석
- [0202] 인플루엔자에 대한 세계보건기구 협력센터, 미국 질병통제센터(Atlanta, USA (1991))에 의해 기술되는 방법을 이용하여 HI 항체를 측정함으로써 면역 반응을 결정하였다.
- [0203] 항체 역가 측정을 4 적혈구응집-억제 유닛(4 HIU)의 적절한 항원 및 0.5% 닭 적혈구 현탁액을 이용하는 표준화되고 광범위하게 인정된 미세법을 이용하여 해동된 동결 혈청 샘플에서 수행하였다. 열 처리 및 수용체-과과 효소에 의해 비특이적 혈청 억제제를 제거하였다.
- [0204] 수득된 혈청을 HI 항체 수준에 대해 평가하였다. 1:10의 최초 희석으로부터 출발하여, 희석액 시리즈(2배)를 1:20480의 최종 희석까지 제조하였다. 적정 중점을 적혈구응집의 완전 억제(100%)를 나타낸 가장 높은 희석 단계로 택하였다. 모든 분석을 이중으로 수행하였다.
- [0205] I.4.2. 뉴라미니다아제 억제 분석
- [0206] 피투인(fetuin)-코팅된 미세역가 플레이트에서 분석을 수행하였다. 항혈청의 2배 희석 시리즈를 제조하고, 표준화된 양의 인플루엔자 A H3N2, H1N1 또는 인플루엔자 B 바이러스와 혼합시켰다. 시험은 피투인으로부터 뉴라민산을 효소적으로 방출시키는 뉴라미니다아제의 생물학적 활성을 기초로 하였다. 말단 뉴라민산의 절단 후, β-D-갈락토오스-N-아세틸-갈락토사민이 언마스킹(unmasking)되었다. 호스라디쉬 퍼옥시다아제(HRP)-표지된, 갈락토오스 구조에 특이적으로 결합하는 아라키스 히포가에아(Arachis hypogaea)로부터의 땅콩 응집소를 웰에 첨가하였다. 결합된 응집소의 양을 검출할 수 있었고, 테트라메틸벤지딘(TMB)과의 기질 반응으로 정량하였다. 바이러스 뉴라미니다아제 활성을 여전히 50% 이상 억제하는 것으로 드러난 가장 높은 항체 희석액이 NI 역가이다.
- [0207] I.4.3. 중화 항체 분석
- [0208] 해동된 동결 혈청 샘플에서 중화 항체 측정을 수행하였다. 혈청 내에 함유된 항체에 의한 바이러스 중화를 미세중화 분석으로 결정하였다. 이러한 분석에서 혈청을 추가 처리 없이 사용하였다. 각각의 혈청을 삼중으로 시험하였다. 표준화된 양의 바이러스를 혈청의 연속 희석액과 함께 혼합하고, 인큐베이션시켜, 바이러스에 항체가 결합하도록 하였다. 이후, 소정량의 MDCK 세포를 함유하는 세포 현탁액을 바이러스 및 항혈청의 혼합물에 첨가하고, 33°C에서 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 기간 후, 바이러스 복제를 닭 적혈구 세포의 적혈구응집에 의해 가시화시켰다. 혈청의 50%의 중화 역가를 리드 및 뮌크(Reed and Muench) 방법에 의해 계산하였다.
- [0209] I.4.4. 세포 매개된 면역성을 사이토카인 유세포분석(CFC)에 의해 평가하였다.
- [0210] 말초 혈액 항원-특이적 CD4 및 CD8 T 세포를 이들의 상응하는 항원과 함께 인큐베이션시켜 IL-2, CD40L, TNF-알파 및 IFN를 생성시키기 위해 시험관내에서 재자극시킬 수 있었다. 이후, 세포 표현형 뿐만 아니라 세포내 사이토카인 생성의 통상적인 면역형광 표지 후에 유세포분석에 의해 항원-특이적 CD4 및 CD8 T 세포를 계수할 수 있었다. 본 연구에서, 인플루엔자 백신 항원 뿐만 아니라 특정 인플루엔자 단백질로부터 유래된 펩티드를 항원으로 사용하여 인플루엔자-특이적 T 세포를 재자극시켰다. 결과를 CD4 또는 CD8 T 세포 아집단 내의 사이토카인(들)-양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로 나타내었다.
- [0211] I.4.5. 통계적 방법
- [0212] I.4.5.1. 일차 종점
- [0213] · 백신접종 후의 7일의 후속 기간(즉, 백신접종일 및 이후의 6일) 및 전체 기간 동안 요망되는 국소적 및 전신적 증후 및 증상의 백분율, 강도 및 백신접종과의 관련성.
- [0214] · 백신접종 후의 21일의 후속 기간(즉, 백신접종일 및 이후의 20일) 및 전체 기간 동안 요망지 않는 국소적 및

전신적 증후 및 증상의 백분율, 강도 및 백신접종과의 관련성.

- [0215] · 전체 연구 동안의 심각한 부작용의 발생.
- [0216] *I.4.5.2. 이차 종점*
- [0217] 체액성 면역 **반응의 경우:**
- [0218] *관찰된 변화:*
- [0219] · 0일 및 21일: 백신 내에 존재하는 3개의 인플루엔자 바이러스 균주의 각각에 대해 별개로 시험된 혈청 적혈 구응집-억제(HI) 및 NI 항체 역가(항-H1N1, 항-H3N2 & 항-B-항체).
- [0220] · 0일 및 21일: 백신 내에 존재하는 3개의 인플루엔자 바이러스 균주의 각각에 대해 별개로 시험된 중화 항체 역가.
- [0221] *유도된 변화(95% 신뢰구간):*
- [0222] · 백신접종 전 및 후의 95% 신뢰구간(95% CI)을 지니는 혈청 HI 항체의 기하 평균 역가(GMTs).
- [0223] · 21일에서 95% CI를 지니는 혈청전환률*
- [0224] · 21일에서 95% CI를 지니는 전환지수**
- [0225] · 21일에서 95% CI를 지니는 혈청방어율***
- [0226] · 모든 시점에서의 혈청 NI 항체 GMT(95% 신뢰구간을 지님).
- [0227] * 혈청전환률은 각각의 백신 균주에 대해, 0일에 비해 21일에서의 혈청 HI 역가가 4배 이상 증가한 백신접종자의 백분율로 정의된다.
- [0228] ** 전환지수는 각각의 백신 균주에 대해, 0일에 비해 21일에서의 혈청 HI GMT의 증가 배수로 정의된다.
- [0229] *** 방어율은 백신접종 (각각의 백신 균주에 대해) 후에, 일반적으로 보호를 나타내는 것으로 인정되는 혈청 HI 역가가 40인 백신접종자의 백분율로 정의된다.
- [0230] 일부 임상 시험의 경우, 반응성/안전성이 이차 종점일 수 있고, 면역원성이 일차 종점일 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0231] **세포 매개 면역(CMI) 반응의 경우**
- [0232] *관찰된 변화*
- [0233] 0일 및 21일: 다양한 시험에서의 10⁶ 개의 세포당 사이토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도. 각각의 시험은 하기 항원에 대한 CD4/CD8 T 세포의 반응을 정량한다:
- [0234] · 켈티드 인플루엔자(pf) 항원(이러한 항원의 정확한 특성 및 기원은 제공되거나/설명되어야 함).
- [0235] · 분절형 인플루엔자(sf) 항원.
- [0236] · 전체 인플루엔자(wf) 항원.
- [0237] *유도된 변화:*
- [0238] · 2개 이상의 상이한 사이토카인(CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)을 생성하는 세포.
- [0239] · 적어도 CD40L 및 또 다른 사이토카인(IL-2, TNF α , IFN γ)을 생성하는 세포.
- [0240] · 적어도 IL-2 및 또 다른 사이토카인(CD40L, TNF α , IFN γ)을 생성하는 세포.
- [0241] · 적어도 IFN γ 및 또 다른 사이토카인(IL-2, TNF α , CD40L)을 생성하는 세포.
- [0242] · 적어도 TNF α 및 또 다른 사이토카인(IL-2, CD40L, IFN γ)을 생성하는 세포.
- [0243] *I.3.5.3. 면역원성의 분석*
- [0244] 면역원성 분석은 전체 백신접종된 코호트를 기초로 하였다. 각각의 처리 그룹에 대해, 하기 파라미터(95% 신뢰

구간을 지나는 것)를 계산하였다:

- [0245] · 0일 및 21일에서의 HI 및 NI 항체 역가의 기하 평균 역가(GMT).
- [0246] · 0일 및 21일에서의 중화 항체 역가의 기하 평균 역가(GMT).
- [0247] · 21일에서의 전환지수.
- [0248] · 0일과 비교하여 21일에서의 혈청 HI 역가가 4배 이상 증가된 백신접종자의 백분율로 정의된 21일에서의 혈청 전환률(SC).
- [0249] · 혈청 HI 역가가 1:40인 백신접종자의 백분율로 정의된 21일에서의 방어율.
- [0250] · 반응에서의 CD4/CD8 T-림프구 분비의 빈도를 각각의 백신접종 그룹, 각각의 시점 (0일, 21일) 및 각각의 항원(캡티드 인플루엔자(pf), 분절형 인플루엔자(sf) 및 전체 인플루엔자(wf))에 대해 요약하였다(기술통계).
- [0251] · 각각의 5개의 상이한 시험에서의 각각의 백신접종 그룹 및 각각의 항원(pf, sf 및 wf)에 대한 시점(후-전).
- [0252] · 3개의 그룹 사이의 위치 차이를 비교하기 위해 비파라미터적(non-parametric) 시험(Kruskall-Wallis test)을 이용하였고, 각각의 5개의 상이한 시험에서의 각각의 항원에 대해 통계적 p-값을 계산하였다. 모든 유의성 시험은 양측-꼬리(two-tailed) 시험이었다. 0.05 이하의 P-값을 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0253] **실시예 II-수중유 에멀전 및 애주번트 제형의 제조**

[0254] 달리 언급되지 않는 한, 후속되는 실시예에서 사용된 오일/물 에멀전은 2 가지의 오일(알파-토코페롤 및 스쿠알렌)으로 제조된 유기상과, 유화제로서 트윈 80™ 또는 폴리소르베이트 80™를 함유하는 PBS의 수상상으로 구성된다. 달리 언급되지 않는 한, 후속되는 실시예에서 사용된 수중유 에멀전 애주번트 제형은 다음 수중유 에멀전 성분(최종 농도가 제공됨)을 포함함으로써 제조되었다: 2.5% 스쿠알렌(v/v), 2.5% 알파-토코페롤(v/v), 0.9% 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트(v/v)(트윈 80), 참조 W095/17210호. 후속되는 실시예에서 AS03으로 지칭되는 본 에멀전을 다음과 같이 2배 농축물로서 제조하였다.

[0255] **II.1. 에멀전 SB62의 제조**

[0256] 임상 및 전임상 실시예 섹션에 보고된 연구에 이 방법을 이용하였다. SB62 에멀전의 제조는 소수성 성분(DL- α -토코페롤 및 스쿠알렌)으로 구성된 오일상과 수용성 성분(음이온 세제 트윈 80 및 PBS mod(개질됨), pH 6.8)을 함유하는 수상상을 강한 진탕하에 혼합함으로써 수행된다. 교반하면서, 오일상(전체 부피의 1/10)을 수상상(전체 부피의 9/10)에 옮기고, 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한다. 생성되는 혼합물을 이어서 마이크로플루이다이저(15000 PSI-8 사이클 또는 실시예 III에 보고된 임상 시험에 사용된 애주번트에서 3 사이클)의 상호작용 챔버에서 진단, 충격 및 공동화 작용력을 가하여 마이크론 이하 점적(100 내지 200nm 사이에 분포)을 생성시킨다. 생성된 pH는 6.8 \pm 0.1이다. SB62 에멀전을 이어서 0.22 μ m 막을 통해서 여과하여 멸균화시키고, 멸균 벌크 에멀전을 2 내지 8°C에서 큐팩(Cupac) 용기에 냉장 저장한다. 멸균의 불활성 가스(질소 또는 아르곤)을 SB62 에멀전 최종 벌크 용기의 빈 공간에 15초 이상 동안 플러싱(flushing)한다.

[0257] SB62 에멀전의 최종 조성은 다음과 같다:

[0258] 트윈 80: 1.8% (v/v) 19.4 mg/ml; 스쿠알렌: 5% (v/v) 42.8 mg/ml; α -토코페롤: 5% (v/v) 47.5 mg/ml; PBSmod: NaCl 121 mM, KCl 2.38 mM, Na₂HPO₄ 7.14 mM, KH₂PO₄ 1.3 mM; pH 6.8 \pm 0.1.

[0259] **실시예 III-분절형 인플루엔자 항원 제조물 및 다양한 용량의 AS03 애주번트를 함유하는 백신(Flu-LD-004)을 이용한 18-59세 연령의 성인 집단에서의 임상시험**

[0260] **III.1. 개요**

[0261] 두 용량의 애주번트 AS03을 지나는 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 저 용량 인플루엔자 후보 백신(즉, 균주당 5 μ g의 HA 함유)의 면역원성, 안전성 및 반응원성을 평가하기 위해 II기의 통제된 무작위 단일 블라인드 연구(A phase II, controlled, randomized, single blind study)를 2006년에 18-59세 연령의 성인 집단에서 수행하였다.

[0262] 체액성 면역 반응(즉, 항-헤마글루티닌)을 AS03 애주번팅된 백신의 일 용량을 근육내 투여 21일 후에 측정하였다. 플루아릭스(Fluarix™)를 기준으로서 이용하였다.

[0263] **III.2. 연구 설계**

[0264] 3개 그룹의 피검체가 하기 백신을 근육내 동시에 투여받았다.

[0265] ■ AS03으로 애주번팅된 5 µg HA를 함유하는 저 용량 분절형 바이러스 인플루엔자 백신을 1회 주사한 100명 피검체의 일 그룹(FluLD1/1).

[0266] ■ 절반 용량의 AS03으로 애주번팅된(AD03 ½) 5 µg HA를 함유하는 저 용량 분절형 바이러스 인플루엔자 백신을 1회 주사한 100명 피검체의 일 그룹(FluLD1/2).

[0267] ■ 일 용량의 플루아릭스™를 투여받은 100명 피검체의 일 그룹(Fluarix).

[0268] 스케줄: 0일에 인플루엔자 백신의 1회 IM 주사, 0일 및 21일에 연구소 방문하여 혈액 샘플 수집(HI 항체 측정) 및 30일에 추가로 전화 연결(연구 결론).

[0269] 본 연구에 이용된 표준 3가 분절형 인플루엔자 백신-플루아릭스™는 글락소스미스클라인 바이올로지칼즈에 의해 2006년에 개발되고 제조된 상업용 백신이다.

[0270] **III.3. 연구 목표**

[0271] III.3.1. 일차 목표

[0272] - 항-헤마글루티닌 항체 역가와 관련하여 연구 백신에 의해 유도된 체액성 면역 반응을 평가하기 위한 것이다.

[0273] 0일 및 21일에 관찰된 변화: 혈청 적혈구응집-억제 항체 역가.

[0274] 유도된 변화(95% 신뢰 구간):

[0275] - 0일 및 21일에서의 혈청 항체의 기하 평균 역가(GMT)

[0276] - 21일에서의 혈청전환률*

[0277] - 21일에서의 혈청전환지수**

[0278] - 0일 및 21일에서의 혈청방어율***

[0279] * 헤마글루티닌 항체 반응에 대한 혈청전환률은 백신접종 전 역가가 <1:10이고 백신접종 후 역가가 ≥1:40이거나, 백신접종 전 역가가 ≥1:10이고 백신접종 후 역가가 적어도 4배의 증가를 나타내는 백신접종자의 백분율로서 정의된다.

[0280] ** 전환지수는 0일째에 비해 백신접종 후 혈청 HI GMT에 있어서의 증가 배수로서 정의된다.

[0281] *** 방어율은 지정된 보호로서 일반적으로 인정된 백신접종 후 혈청 HI 역가가 ≥1:40인 백신접종자의 백분율로서 정의된다.

[0282] III.3.2. 이차 목표

[0283] - 요망되는 국소적 및 전신적인 부작용, 요망되지 않는 부작용 및 심각한 부작용과 관련하여 본 연구 백신의 안전성 및 반응원성을 평가하기 위한 것이다.

[0284] 1. 각 그룹에서 각 백신접종 후 7일의 후속 기간(즉, 백신접종일 및 추후 6일) 동안, 요망되는 국소적 및 전신적 징후 및 증상의 발생 강도 및 백신접종과의 관련성.

[0285] 2. 각 그룹에서 백신접종 후 30일의 후속 기간(즉, 백신접종일 및 추후 29일), 요망되지 않는 국소적 및 전신적 징후 및 증상의 발생, 강도 및 백신접종과의 관련성.

[0286] 3. 각 그룹에서 전체 연구 동안 심각한 부작용의 발생 및 관련성.

[0287] **III.4. 백신 조성물 및 투여**

[0288] III.4.1. 백신 제조

[0289] 애주번트 첨가되지 않은 인플루엔자 백신은 3가지의 1가 바이러스 항원 벌크(각각 인플루엔자 균주 A/H1N1, A/H3N2 및 B로부터 제조됨)로 구성된 불활성화된 인플루엔자 백신인 3가 분절형 비리온이다. 이 백신에 존재하는 항원은 1992년 이래로 판매 중인 플루아릭스™(α-릭스(Rix)®)로서 이용가능한 라이센싱된 플루아릭스™ 백

신과 동일하며 용량 당 15 µg HA/균주를 함유한다. FluD 임상 로트에 포함된 인플루엔자 균주는 2006/2007년 동안 북반구에서 선택되었던 균주들이다.

[0290] · A/뉴 칼레도니아/20/99(H1N1)-유사 균주: A/뉴 칼레도니아/20/99(H1N1) IVR-116.

[0291] · A/위스콘신/67/2005(H3N2)-유사 균주: A/위스콘신/67/2005(H3N2) NYMCX-161

[0292] · B/말레이시아/2506/2004.

[0293] 항원은 란(egg)-성장된 바이러스로부터 유래된다. 스플리팅은 불활성화 단계 이전에 소듐 데옥시콜레이트로 수행되며, 이것은 소듐 데옥시콜레이트 및 포름알데히드의 후속 작용을 통해 수행된다.

[0294] AS03 애주번팅된 저 용량 인플루엔자(FluD) 백신(임상 로트)은 시판되는 플루아릭스™ 백신(각각 인플루엔자 균주 A/H1N1, A/H3N2 및 B로부터 제조됨)에 기초하나, 더 낮은 항원 함량을 갖고 GSK 애주번트 시스템 AS03으로 애주번팅된다. AS03은 두 개의 생분해가능한 오일, 스쿠알렌 및 α-토코페롤(비타민 E), 및 계면활성제, 폴리소르베이트 80(트윈 80)을 함유하는 수중유 에멀전(SB62)으로 구성된다. 인플루엔자 항원은 에멀전과의 단순한 혼합에 의해 애주번트 시스템의 수성상으로 혼입된다. 백신 로트에 인플루엔자 항원과 함께 도입되는 애주번트의 양을 달리하여 두 제형을 시험하였다. 애주번팅된 백신은 애주번트 시스템 AS03의 전체 용량(AS03) 또는 절반의 용량(AS03 ½)과 조합된, 용량 당 각 인플루엔자 바이러스 균주의 5 µg의 헤마글루티닌(HA)을 함유한다. 부형제는 하기와 같다: 폴리소르베이트 80(트윈 80), 옥토시놀 10(트리톤 X-100), 알파-토코페릴 수소 속시네이트, 염화나트륨, 인산수소이나트륨, 인산이수소칼륨, 염화칼륨, 주사용수. AS03 애주번팅된 저 용량 인플루엔자 백신(FluD, 전체 또는 절반 용량의 AS03)은 보존제가 없는 백신이다. 그러나, 이들은 제조 공정의 초기 단계로부터 미량의 티오머살(용량 당 <1.25 µg의 Hg)을 함유한다. 이들 둘 모두는 미리-충전된 유리(타입 I) 주사기 중 단일용량(monodose) 백신으로서 0.5 ml/용량의 부피로 제공된다.

[0295] *III.4.1.1. AS03 애주번팅된 인플루엔자 백신의 조성*

[0296] 일 용량의 FluD(전체 또는 절반 용량의 AS03)는 0.5 ml이다. 조성이 표 3에 제공된다. 용량 당 HA 함량은 두 제형 모두에 대해 5 µg이고, 유일한 차이는 최종 용기에 존재하는 AS03의 양이다.

[0297] **표 3-AS03 애주번팅된 저 용량 인플루엔자 백신의 조성(전체 또는 절반 용량의 AS03)**

성분	용량 당 양 (0.5 ml)
불활성화된 스플리트 비리온	
- A/ 뉴 칼레도니아 /20/99 (H1N1) IVR-116	5 µg HA
- A/ 위스콘신 /67/2005 (H3N2) NYMCX-161	5 µg HA
- B/ 말레이시아 /2506/2004	5 µg HA
애주번트(전체용량 / 절반용량)	
- SB62 에멀전 (총 부피)	0.250 mL
• 스쿠알렌	10.70 mg / 5.35 mg
• DL-α- 토코페롤	11.88 mg / 5.94 mg
• 폴리소르베이트 80 (트윈 80)	4.85 mg / 2.425 mg
폴리소르베이트 80 (트윈 80)	0.122 mg
옥토시놀 10 (트리톤 X-100)	0.0283 mg
α 토코페릴 수소 속시네이트	0.01665 mg
염화나트륨	4 mg
인산이나트륨	0.575 mg
인산이수소칼륨	0.100 mg
염화칼륨	0.101mg
주사용수	ad 0.50 ml

약어: HA = 헤마글루티닌

AS03 전체용량 이용시 폴리소르베이트 80 중 총 함량은 용량 당 4.972 mg이고

AS03 절반용량 이용시 용량 당 2.547 mg이다.

[0298]

[0299] *III.4.1.2. 분절형 불활성화된 인플루엔자 항원 제조물의 생성*

[0300] 인플루엔자 항원은 플루아릭스™(인플루엔자 바이러스 백신)에 포함된 것들과 동일하다. 1가 벌크는 발육란

(embryonated hen's eggs)에서 개별적으로 성장한 타입 A(H1N1 및 H3N2) 및 타입 B의 3개 균주의 인플루엔자 바이러스의 제조용 바이러스(working seed)로부터 제조된 정제되고 불활성화된 분절형 바이러스로 구성된다. 이러한 제조용 바이러스는 연간 WHO 권장에 따라 WHO 협력 센터로부터 받은 균주에서 유래된다. 항원을 제조하는 공정에 대해서는 예시로서 W002/097072호를 참조한다. 세 개의 1가 벌크의 부피는 제형화 이전에 각각의 1가 벌크에서 측정된 HA 함량 및 목표 제조 부피에 기초한다.

- [0301] 10배 농축된 인산염 완충된 염수(1배 농축시 pH 7.4), 및 트윈 80 및 α-토코페릴 수소 숙시네이트의 예비-혼합물을 주사용수에 희석시키고, 5-30분 동안 실온에서 교반한다.
- [0302] 이후, 3개의 농축된 1가 벌크를, 생성된 인산염 완충된 염수/트윈 80-α-토코페릴 수소 숙시네이트 용액에서 중간체 3가 벌크 1 ml당,
- [0303] 20 μg HA의 각각의 A 1가 벌크(H1N1, H3N2)
- [0304] 23.32 μg HA의 B 1가 벌크의 농도로 연속하여 희석시킨다 (500 μl의 3가 최종 벌크에 대하여 5 μg HA의 각각의 A 1가 벌크 및 5.83 μg HA의 B).
- [0305] 각각의 1가 벌크의 첨가 사이에, 혼합물을 실온에서 10-30분 동안 교반하고, 마지막 1가 벌크의 첨가 후에 15-30분 동안 교반한다. "예비-풀(pre-pool)"이라고도 불리는 이러한 중간체 3가 벌크를 +2-+8℃에 유지하거나 동일한 날에 최종 제형 단계로 추가로 처리할 수 있다. 예비-풀의 최종 부피는 용량 당 250 μl이다.
- [0306] *III.4.1.3. AS03 애주번팅된 백신 조성물의 제조*
- [0307] 애주번팅된 백신: LD AS03 1/1(표 4)
- [0308] 10배 농축된 PBS mod(1배 농축시 pH 7.4; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세제를 고려한 양)를 함유하는 혼합물을 주사용수에 첨가하였다. 5 내지 30분 교반시킨 후, 각각의 균주 H1N1 및 H3N2의 ml당 20 μg의 HA, 및 B 균주의 ml당 23.32 μg의 HA를 각 첨가 사이에 10 내지 30분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15 내지 30분 동안 교반시킨 후, 적은 부피의 소위 "중간체 벌크"를 분석을 위해 버리고, +2 내지 +8℃에서 저장하였다. 중간체 벌크를 PBS mod에서 1배 농축하였다. 목표 세제 농도는 ml 당 488 μg의 트윈 80, ml 당 73.6 μg의 트리톤 X-100 및 ml 당 66.6 μg의 VES이다.
- [0309] 이후 최종 제형을 제조하였다: 동일한 부피의 SB62(실시예 II의 제조 참조)를 각각의 250 μl의 예비-풀 중간체 벌크에 첨가하고 30 내지 60분 동안 실온에서 혼합하였다. pH가 6.8 내지 7.5의 범위인 것을 확인하였다. 제형을 질소로 플러싱한 다음 충전 전에 +2 내지 8℃로 저장하였다.

[0310] 표 4. AS03 애주번팅된 저 용량 백신

성분	농도	부피 (ml)
단계 1: 예비 풀		
A/ 뉴 칼레도니아 1가 벌크	104μg/ml	302.88
A/ 위스콘신 1가 벌크	85μg/ml	370.59
B/ 말레이시아 1가 벌크	110 μg/ml	333.90
PBS mod(1)	범례 참조	56.76
트윈 80	48000 μg/ml	5.24
트리톤 X-100		H3N2 균주로부터의 잔류물
α- 토코페릴 수소 숙시네이트	26480 μg/ml	1.2
여과된 물		504.43
총 부피 = 1575(mi) 75 ml의 예비 풀 샘플이 시험을 위해 회수됨 남아 있는 예비 풀 부피 = 1500(mi)		
단계 2: 예비 풀에 첨가됨		
에멀전		1500
최종 벌크의 총 부피 = 3000(mi)		

[0311] (1): 완충액 최종 벌크 조성은 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4 이다.

[0312] 애주번팅된 백신: LD AS03 1/2 (표 5)

[0313] 10배 농축된 PBS mod(1배 농축시 pH 7.4; 상기 조성 참조), 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세제를 고려한 양)를 함유하는 혼합물을 주사용수에 첨가하였다. 5 내지 30분 교반시킨 후, 각 균주 H1N1 및 H3N2 ml당 20 μg의 HA, 및 B 균주 ml당 23.32 μg의 HA를 각 첨가 사이에 10 내지 30분 동안 교반하면서 첨가하

였다. 15 내지 30분 동안 교반시킨 후, 적은 부피의 소위 "중간체 벌크"를 분석을 위해 버리고, +2 내지 +8℃에서 저장하였다. 중간체 벌크를 PBS mod에서 1배 농축하였다. 표적 세제 농도는 ml 당 488 µg의 트윈 80, ml 당 73.6 µg의 트리톤 X-100 및 ml 당 66.6 µg의 VES이다.

[0314] 이후, 최종 제형을 제조하였다: SB62를 먼저 PBS mod 완충액으로 희석시키고, 실온에서 15-30분 동안 교반하였다. 이후, 이렇게 희석된 동일한 부피의 SB62를 각각의 250 µl의 예비-풀 중간체 벌크에 첨가하였다. 30 내지 60분 동안 실온에서 교반시킨 후, pH가 6.8 내지 7.5의 범위인 것을 확인하였다. 제형을 질소로 플러싱한 다음, 충전 전에 +2 내지 8℃로 저장하였다.

[0315] 두 제형의 최종 부피는 용량 당 500 µl이고 최종 HA 농도는 3가 최종 벌크 1 ml당 10 µg의 각각의 A 1가 벌크 및 11.66 µg의 B 1가 벌크이다. 최종 트윈 80, 트리톤 X-100(H3N2 1가 벌크 제조로부터의 잔류물) 및 α-토코페릴 수소 숙시네이트(α-토코페릴 수소 숙시네이트는 RRR (D-이성질체)-α-토코페롤의 에스테르 형태임) 목표 농도는 각각 244 µg/ml, 58.6 µg/ml 및 33.3 µg/ml이다.

[0316] 표 5-AS03 애주번팅된 저 용량 백신(절반 용량의 애주번트)

성분	농도	부피 (ml)
단계 1: 예비 풀		
단계 1: 예비 풀		
A/ 뉴 칼레도니아 1가 벌크	104µg/ml	300.96
A/ 위스콘신 1가 벌크	85µg/ml	368.24
B/ 말레이시아 1가 벌크	110 µg/ml	331.78
PBS mod(1)	범례 참조	56.4
트윈 80	48000 µg/ml	5.2
트리톤 X-100		H3N2 균주로부터의 잔류물
α- 토코페릴 수소 숙시네이트	26480 µg/ml	1.2
여과된 물		501.22
총 부피 = 1565(ml) 65ml의 예비 풀 샘플이 시험을 위해 회수됨 남아 있는 예비 풀 부피 = 1500(ml)		
단계 2: 예비 풀에 첨가됨		
에멀전 SB62		750
PBS mod(1)	범례 참조	75
여과된 물		675
최종 벌크의 총 부피 = 3000(ml)		

[0317] (1): 완충액 최종 벌크 조성은 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4 이다.

[0318] III.4.2. 백신 투여

[0319] 백신을 1.25-ml 멸균 타입 I (Ph. Eur.) 유리 주사기에 충전시킨다. 각 주사기에 0.57 ml(범위: 0.54-0.60 ml)의 목표로 채운다. 백신을 비-우성 팔의 어깨세모근 부위에 근육내 주사하였다. 모든 백신은 미리-충전된 주사기(0.5 ml)로 제공되었다. 백신의 적합한 IM 주사를 보장하기 위해, 적어도 25G 및 적어도 2.5 cm 길이의 바늘을 이용하였다.

[0320] III.5. 연구 집단 결과

[0321] 총 300명의 피검체가 본 연구에 등록되었다: 3 그룹 각각에 100명의 피검체. 백신접종시 백신접종된 총 코호트(cohort)의 평균 연령은 36.7세이며 표준 편차가 13.67세였다. 피검체의 평균 연령 및 성별 분포는 3개의 백신 그룹 모두에서 유사하였다.

[0322] III.6. 면역원성 결과

[0323] 면역원성을 위한 ATP 코호트(297명 피검체)에 대하여 면역원성 분석을 수행하였다.

[0324] 체액성 면역 반응

[0325] AS03으로 애주번팅된 저 용량 인플루엔자 후보 백신에 의해 유도된 체액성 면역 반응을 평가하기 위해, 하기 파라미터(95% 신뢰 구간을 지님)를 각 처리 그룹에 대해 계산하였다:

- [0326] · 0일 및 21일에서의 HI 항체 역가의 기하 평균 역가(GMTs);
- [0327] · 21일에서의 혈청전환률(SC);

- [0328] · 21일에서의 전환지수;
- [0329] · 0일 및 21일에서의 방어율.

[0330] III.6.1. HI 기하 평균 역가(GMT)

[0331] 95% CI를 갖는 HI 항체에 대한 GMT를 표 10 및 도 1에 제시하였다. 그룹간 조정된 GMT 비를 표 11에 제시하였다.

[0332] 3개 모두의 백신 군주에 대한 HI 항체의 백신접종전 GMT는 3개의 처리 그룹에서 동일한 범위 내에 있었다. 애주번팅된 그룹에 대해 21일에 관찰된 GMT는, A/위스콘신 백신 군주에 대하여 FluLD1/1 및 플루아릭스 간에 통계적 차이가 있는 3개 모두의 군주에 대하여 플루아릭스 그룹보다 높은 경향이 있다(95% CI의 중복 없이, 조정된 GMT 비는 값 1을 함유하지 않음). 통계적 차이(조정된 GMT 비는 값 1을 함유하지 않음)가 B/말레이시아 백신 군주에 대하여 FluLD1/2 및 플루아릭스 간에도 관찰되었다.

[0333] 표 10-0일 및 21일에서의 항-HA 항체에 대한 혈청양성률 및 기하 평균 역가(GMT)(면역원성에 대한 ATP 코호트)

항체	그룹	시점	N	≥ 10 1/DIL		95% CI		GMT			Min	Max
				n	%	LL	UL	1/DL	95% CI LL	95% CI UL		
A/ 뉴 칼레도니아	FluLD1/1	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	31.9	23.5	43.4	<10.0	2560.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	475.4	352.2	641.6	20.0	7240.0
	FluLD1/2	PRE	99	80	80.8	71.7	88.0	36.1	26.9	48.5	<10.0	3620.0
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100	399.0	294.7	540.2	<10.0	7240.0
Fluarix	PRE	98	85	86.7	78.4	92.7	26.1	20.5	33.2	<10.0	1280.0	
	PI(D21)	98	98	100	96.3	100	380.6	274.2	528.4	10.0	7240.0	
A/ 위스콘신	FluLD1/1	PRE	99	61	61.6	51.3	71.2	16.8	13.1	21.5	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	276.2	223.5	341.3	28.0	5120.0
	FluLD1/2	PRE	99	66	66.7	56.5	75.8	19.9	15.2	25.9	<10.0	640.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	241.9	192.9	303.4	20.0	5120.0
Fluarix	PRE	98	58	59.2	48.8	69.0	14.7	11.6	18.6	<10.0	320.0	
	PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	172.3	136.4	217.6	<10.0	5120.0	
B/ 말레이시아	FluLD1/1	PRE	99	72	72.7	62.9	81.2	20.4	15.9	26.1	<10.0	453.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	268.6	221.3	326.0	28.0	2560.0
	FluLD1/2	PRE	99	76	76.8	67.2	84.7	22.2	17.6	27.9	<10.0	320.0
		PI(D21)	99	99	100	96.3	100	301.5	246.1	369.4	28.0	3620.0
Fluarix	PRE	98	76	77.6	68.0	85.4	26.5	20.9	33.6	<10.0	320.0	
	PI(D21)	98	97	99.0	94.4	100	219.2	171.4	280.2	<10.0	5120.0	

FluLD1/1 = 전체용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)

FluLD1/2 = 절반용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)

Fluarix = 플루아릭스 백신

GMT = 기하 평균 항체 역가

N = 이용가능한 결과를 지닌 피검체의 수

n/% = 혈청양성 피검체의 수/백분율(HI역가>= 1:10)

95% CI = 95% 신뢰 구간, LL = 하한, UL = 상한

MIN/MAX = 최소/최대

PRE = 백신접종 전 0일

PI (D21) = 백신접종 후 21일

[0334]

[0335] 표 11-21일에서의 각각의 백신 군주에 대한 그룹간 조정된 GMT 비(면역원성에 대한 ATP 코호트)

항체	그룹 설명	N	조정된 GMT	그룹 설명	N	조정된 GMT	조정된 GMT 비		
							비 순서	값	95% CI LL UL
A/ 뉴칼레도니아 (1/DIL)	FluLD1/1	99	472.4	FluLD1/2	99	385.0	FluLD1/1 / FluLD1/2	1.23	0.80 1.88
	FluLD1/1	99	472.3	Fluarix	98	396.9	FluLD1/1 / Fluarix	1.19	0.78 1.82
	FluLD1/2	99	385.0	Fluarix	98	397.0	FluLD1/2 / Fluarix	0.97	0.63 1.49
A/ 위스콘신 (1/DIL)	FluLD1/1	99	277.3	FluLD1/2	99	230.0	FluLD1/1 / FluLD1/2	1.21	0.90 1.62
	FluLD1/1	99	277.5	Fluarix	98	180.8	FluLD1/1 / Fluarix	1.54	1.14 2.06
	FluLD1/2	99	230.0	Fluarix	98	180.6	FluLD1/2 / Fluarix	1.27	0.95 1.71
B/ 말레이시아 (1/DIL)	FluLD1/1	99	275.1	FluLD1/2	99	303.4	FluLD1/1 / FluLD1/2	0.91	0.68 1.22
	FluLD1/1	99	275.2	Fluarix	98	212.7	FluLD1/1 / Fluarix	1.29	0.96 1.74
	FluLD1/2	99	303.4	Fluarix	98	212.6	FluLD1/2 / Fluarix	1.43	1.06 1.92

FluLD1/1 = 전체용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/군주)
 FluLD1/2 = 절반용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/군주)
 Fluarix = 플루아릭스 백신
 조정된 GMT = 기준선 역가에 대해 조정된 기하 평균 항체 역가
 N = 이용가능한 백신접종 전 및 백신접종 후 결과 둘 모두를 갖는 피검체의 수
 95% CI = 조정된 GMT 비에 대한 95% 신뢰 구간 (Ancova 모델: 기준선 역가에 대한 조정 - 2 그룹 넘게 이용한 풀링된 변화); LL = 하한, UL = 상한

[0336]

[0337] III.6.2. 항-HI 항체 역가의 혈청전환지수, 혈청방어율 및 혈청전환률(인간에서 인플루엔자 백신에 대해 확립된 보호와 관련됨)

[0338] 결과는 혈청방어율에 대하여 표 6-도 2, 혈청전환률에 대하여 표 7-도 3 및 전환지수에 대하여 표 8-도 4에 제시되어 있다.

[0339] **혈청방어율**에 대하여 유럽 당국에 의해 요구되는 역치(70%)가 모든 그룹에서 도달되었다(94.9% 이상). 각 백신 군주에 대하여, 3 그룹의 21일에서의 혈청방어율은 동일한 범위 내에 있었다.

[0340] **혈청전환률**에 대하여 유럽 당국에 의해 요구되는 역치(40%)가 모든 그룹에서 도달되었다(65% 이상).

[0341] A/뉴 칼레도니아 백신 군주의 경우, 3 그룹의 21일에서의 SCR은 동일한 범위내에 있었다.

[0342] A/위스콘신 백신 군주의 경우, FluLD1/1 그룹에 대한 21일에서의 SCR은 플루아릭스 그룹에 비해 높게 나타나는 경향이 있었다. FluLD1/2 그룹에 대한 21일에서의 SCR은 플루아릭스 그룹과 동일한 범위내에 있었다.

[0343] B/말레이시아 백신 군주의 경우, FluLD1/2 그룹에 대한 21일에서의 SCR은 플루아릭스 그룹에 비해 높게 나타나는 경향이 있었다. FluLD1/1 그룹에 대한 21일에서의 SCR은 플루아릭스 그룹과 동일한 범위내에 있었다.

[0344] **혈청전환지수**에 대하여 유럽 당국에 의해 요구되는 역치(2.5)가 모든 그룹에서 도달되었다(6.2 이상).

[0345] A/뉴 칼레도니아 백신 군주의 경우, 3 그룹에 대한 21일에서의 SCF는 동일한 범위내에 있는 것으로 나타났다. FluLD1/2 그룹에 대해 관찰된 값은 플루아릭스 그룹에 대해 관찰된 값보다 낮았으나, 이는 FluLD1/2 그룹에서의 보다 높은 백신접종전 혈청방어율로 설명될 수 있었다.

[0346] A/위스콘신 백신 군주의 경우, FluLD1/1 그룹에 대한 21일에서의 SCF는 플루아릭스 그룹에 비해 높게 나타나는 경향이 있었다. FluLD1/2 그룹에 대한 21일에서의 SCF는 플루아릭스 그룹과 동일한 범위내에 있었다.

[0347] B/말레이시아 백신 군주의 경우, 두 애주번팅된 그룹의 21일에서의 SCF는 플루아릭스 그룹에 비해 높게 나타나는 경향이 있었다.

[0348] 표 6-0일 및 21일에서의 HI 항체 역가에 대한 혈청방어율(SPR)(면역원성에 대한 ATP 코호트)

백신 군주	그룹	시점	N	SPR		95% CI	
				n	%	LL	UL
A/ 뉴 칼레도니아	FluLD1/1	PRE	99	41	41.4	31.6	51.8
		PI(D21)	99	95	96.0	90.0	98.9
	FluLD1/2	PRE	99	55	55.6	45.2	65.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	35	35.7	26.3	46.0
		PI(D21)	98	93	94.9	88.5	98.3
A/ 위스콘신	FluLD1/1	PRE	99	32	32.3	23.3	42.5
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	37	37.4	27.9	47.7
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	Fluarix	PRE	98	25	25.5	17.2	35.3
		PI(D21)	98	93	94.9	88.5	98.3
B/ 말레이시아	FluLD1/1	PRE	99	31	31.3	22.4	41.4
		PI(D21)	99	97	98.0	92.9	99.8
	FluLD1/2	PRE	99	39	39.4	29.7	49.7
		PI(D21)	99	98	99.0	94.5	100
	Fluarix	PRE	98	44	44.9	34.8	55.3
		PI(D21)	98	94	95.9	89.9	98.9

FluLD1/1 = 전체용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)
 FluLD1/2 = 절반용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)
 Fluarix = 플루아릭스 백신
 N = 이용가능한 결과를 지닌 피검체의 수
 n/% = 혈청보호 피검체의 수/백분율 (HI역가 >= 40 1/DIL)
 95% CI = 95% 신뢰 구간, LL = 하한, UL = 상한
 PRE = 백신접종 전 0일
 PI (D21) = 백신접종 후 21일
 데이터 공급원 = 부록 표 IIIA

[0349]

[0350] 표 7-21일에서의 HI 항체 역가에 대한 혈청전환률(SCR)(면역원성에 대한 ATP 코호트)

백신 군주	그룹	N	SCR		95% CI	
			n	%	LL	UL
A/ 뉴 칼레도니아	FluLD1/1	99	69	69.7	59.6	78.5
	FluLD1/2	99	64	64.6	54.4	74.0
	Fluarix	98	66	67.3	57.1	76.5
A/ 위스콘신	FluLD1/1	99	88	88.9	81.0	94.3
	FluLD1/2	99	79	79.8	70.5	87.2
	Fluarix	98	73	74.5	64.7	82.8
B/ 말레이시아	FluLD1/1	99	76	76.8	67.2	84.7
	FluLD1/2	99	82	82.8	73.9	89.7
	Fluarix	98	65	66.3	56.1	75.6

FluLD1/1 = 전체용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)
 FluLD1/2 = 절반용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)
 Fluarix = 플루아릭스 백신
 혈청전환은 하기로 정의된다:
 초기 혈청음성 피검체의 경우, 백신접종 후 항체 역가 >= 40 1/DIL
 초기 혈청양성 피검체의 경우, 백신접종 후 항체 역가가 백신접종 전 항체 역가의 >= 4 배
 N = 이용가능한 백신접종 전 및 백신접종 후 결과를 갖는 피검체의 수
 n/% = 혈청전환된 피검체의 수/백분율
 95% CI = 95% 신뢰 구간, LL = 하한, UL = 상한

[0351]

[0352] 표 8-21일에서의 HI 항체 역가에 대한 혈청전환지수(SCF)(면역원성에 대한 ATP 코호트)

백신 군주	그룹	N	SCF		
			값	95% CI	
				LL	UL
A/ 뉴 칼레도니아	FluLD1/1	99	14.9	10.4	21.3
	FluLD1/2	99	11.0	7.7	15.9
	Fluarix	98	14.6	9.9	21.6
A/ 위스콘신	FluLD1/1	99	16.5	13.0	20.9
	FluLD1/2	99	12.2	9.2	16.1
	Fluarix	98	11.7	8.8	*
B/ 말레이시아	FluLD1/1	99	13.2	10.0	17.4
	FluLD1/2	99	13.6	10.2	18.0
	Fluarix	98	8.3	6.2	11.0

FluLD1/1 = 전체용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)

FluLD1/2 = 절반용량의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 (5 ug HA/ 군주)

Fluarix = 플루아릭스 백신

N = 이용가능한 백신접종 전 및 백신접종 후 결과를 갖는 피검체의 수

SCF = 혈청전환 인자 또는 기하 평균 비 (평균[log10(PI(D21)/PRE)])

95% CI = 95% 신뢰 구간, LL = 하한, UL = 상한

[0353]

[0354] III.7. 안전성 결론

[0355] 플루아릭스 그룹에 비해 애주번팅된 백신 그룹에서 요망(국소/전신) 및 비요망 증상과 관련된 높은 반응원성은 본 연구에서 관찰된 전체적인 경향이었다.

[0356] 애주번팅된 백신 중 AS03 함량의 감소는 전신적이고 국소적인 3 등급 증상에 현저한 영향을 미쳤다.

[0357] 요망되지 않는 증상의 발생은 플루아릭스 그룹(35%)에 비해, 애주번팅된 백신 그룹(피검체의 55% 및 47%)에서 높게 나타나는 경향이 있었다.

[0358] 이러한 결과로부터, 후보 백신의 반응원성 및 안전성 프로파일이 만족스럽고 임상적으로 허용될 수 있는 것으로 결론내릴 수 있었다.

[0359] III.8. 전체 결론

[0360] III.8.1. 면역원성 결과

[0361] 본 연구의 1차 목적은 두 상이한 농도의 AS03 애주번트를 지니는 저 용량 인플루엔자 백신 및 플루아릭스에 의해 유도된 체액성 면역 반응(항-HI 항체 역가)을 측정하는 것이었다.

[0362] 21일에, 3개 백신은 분절형 비리온 인플루엔자 백신의 연간 등록을 위한 유럽 당국의 필요조건을 초과하였다(연간 군주 변화의 면역 분석 평가를 위한 "인플루엔자 백신에 대한 평준화 및 필요조건에 대한 지침을 위한 주"-CPMP/BWP214/96). GMT는 플루아릭스 그룹에 비해 애주번팅된 그룹에서 높은 경향이 있으며, A/위스콘신(FluLD1/1 대 플루아릭스) 및 B/말레이시아 백신 군주(FluLD1/2 대 플루아릭스)에 대하여 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 유사한 혈청방어율이 3개 모두의 백신 그룹에서 관찰되었고, 그 범위는 94.9% 내지 99%였다. 혈청전환률 및 혈청전환지수는 플루아릭스 그룹보다 애주번팅된 그룹에서 높게 관찰되었다. 이 시험으로부터의 데이터는 절반 투여량의 AS03 애주번트가 첨가된 백신에 의해 유도된 면역원성이 전체 용량의 애주번트로 유도된 면역원성에 필적하였음을 또한 나타내었다.

[0363] III.8.2. 반응원성 및 안정성 결과

[0364] AS03으로 애주번팅된 저 용량 인플루엔자 후보 백신의 투여는 본 연구 집단, 즉 18세 내지 59세 연령의 성인에서 안전하고 임상적으로 잘 용인된다. 절반 용량의 애주번팅된 백신은 전체 용량의 애주번팅된 백신에 비해, 요망되는 국소적 및 전신적 증상의 빈도에 있어서 상당한 감소를 나타내었다.

[0365] 실시예 IV-프라이밍된 BALB/c 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형 인플루엔자 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 포함)의 전임상 평가

[0366] IV.1. 실험 설계 및 목적

[0367] 수중유 애주번트로 제형화된 인플루엔자 백신에 의해 유도된 AS03에 의한 체액 반응에서의 증가를 평가하기 위해 인플루엔자-프라이밍된 마우스에서 실험을 수행하였다. 인간 상황을 인간 상황을 흉내내기 위해, 상기 실험

을 이종아형(heterosubtypic) 균주로 프라이밍된 마우스를 이용하여 수행하였다.

IV.1.1. 처리/그룹(표 9)

27마리의 성체 암컷 BALB/c 마우스의 그룹을 0일째에 3가 전체(whole), 포르말린-불활성화된 인플루엔자 바이러스(각 균주에 대해 5 µg의 HA)로 비강내 프라이밍시켰다(20 µl의 부피). 프라이밍 균주는 백신에 포함된 것들에 대한 조기 드리프트(earlier drift) 변이체(5 µg의 HA 전체 불활성화된 H1N1 A/요하네스버그/82/96, H3N2 A/시드니/5/97, B/하얼빈/7/94)로 구성되었다. 28일 후, 마우스를 총 50 µl 부피의 단일 용량의 백신 후보로 근육내 백신접종하였다. 마우스를 분절형 항원만을 함유하는 제형(3가 분절형 플레인) 또는 두 용량의 AS03(전체 또는 1/5)으로 애주번팅된 분절형 항원을 함유하는 제형으로 면역화시켰다. 면역화에 이용된 균주는 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99, B/상동/7/97 바이러스 항원(1.5 µg/균주, 인간 용량의 1/10)을 포함하였다.

표 9

Gr	항원/제형	다른 치료
1	3가 스플리트 / 플레인 (애주번트 첨가되지 않음)	이종성 프라이밍 D0
2	3가 스플리트 / AS03	이종성 프라이밍 D0
3	3가 스플리트 / AS03 1/5	이종성 프라이밍 D0

IV.1.2. 백신 제형의 제조

트윈 80, 트리톤 X100 및 비타민 E 숙시네이트(VES)의 프리믹스(premix)를 제조하여 최종 농도가 750 µg/ml의 트윈 80, 110 µg/ml의 트리톤 X100 및 100 µg/ml의 VES의 백신에 도달하도록 하였다. 프리믹스에 이용된 양들은 균주에 이미 존재하는 세제 및 VES의 양을 고려하여 계산되었다.

1 리터의 10배 농축된 염수 완충액(PBS pH 7.4)의 제조: 0.800 l의 주사용수에, NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄ 11.44 g, KH₂PO₄ 2 g을 첨가한다. 용해시킨 후 주사용수로 1.0L가 되게 한다. 10배 희석시, pH는 7.4일 것이다.

3가 분절형/플레인

다음 순서에 따라서 50 µl의 일 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(10배 농축된 PBS pH 7.4) + 프리믹스, 실온에서 5분 자석 교반, + 1.5 µg HA H1N1 균주, 실온에서 10분 자석 교반, + 1.5 µg HA H3N2 균주, 실온에서 10분 자석 교반, + 1.5 µg HA B 균주, 실온에서 15분 자석 교반. 제조를 완료한 후 1시간 이내에 제형을 주사한다.

3가 분절형/AS03

트윈 80, 트리톤 X100 및 비타민 E 숙시네이트(VES)의 프리믹스를 제조하여 최종 농도가 750 µg/ml의 트윈 80, 110 µg/ml의 트리톤 X100 및 100 µg/ml의 VES의 백신에 도달하게 하였다. 프리믹스에 이용된 양들은 균주에 이미 존재하는 세제 및 VES의 양을 고려하여 계산되었다.

다음 순서에 따라서 50 µl의 일 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(10배 농축된 PBS pH 7.4) + 프리믹스, 실온에서 5분 자석 교반, + 1.5 µg HA H1N1 균주, 실온에서 10분 자석 교반, + 1.5 µg HA H3N2 균주, 실온에서 10분 자석 교반, + 1.5 µg HA B 균주, 실온에서 15분 자석 교반, + 전체 용량 AS03의 경우 25 µl의 SB62 에멀전 또는 1/5 용량 AS03의 경우 5 µl의 SB62 에멀전, 실온에서 15분 자석 교반. 제조를 완료한 후 1시간 이내에 제형을 주사한다.

IV.1.3. 관독(표 10)

백신접종에 대한 체액성 면역 반응을 면역화 전(28일) 및 면역화 14일 후(27마리 마우스/그룹)에 측정하였다. 혈청 샘플을 적혈구응집 억제(HI) 시험에 의해 시험하였다.

표 10

관독	시점	샘플 유형	분석 방법
체액성 반응	D28, D42	혈청	IHA

[0384] **IV.2. 결과**

[0385] **IV.2.1. 체액성 면역성**

[0386] 결과를 도 5에 나타내었다. 이종아형 프라이밍 후 단일 백신접종된 마우스 모델에서, AS03 및 이의 희석액은 플레인 백신에 비해 높은 HI 역가를 유도하는 것으로 나타났다. 모든 인플루엔자 A 균주에 대하여, 통계적으로 유의한 HI 역가의 증가가 관찰되었다($p < 0.05$). H1N1 균주의 경우, HI 역가에서의 현저한 차이도 AS03 및 AS03 1/5간에 관찰되었다($p < 0.05$). 감소된 용량의 AS03은 플레인 백신에 비해 모든 세개의 균주에 대한 HI 역가를 증가시키지 못했다. B 균주에 대해서는 매우 낮은 반응이 관찰되었다(B/상동); 이것은 아마도 프라이밍에 사용된 B 균주 및 백신 간의 현저한 항원성 드리프트 때문일 것이다.

[0387] **IV.3. 결과 및 결론의 요약**

[0388] 결론적으로, HI 역가의 증가가 플레인 백신과 비교하여 AS03 애주번팅된 백신 이용시 이종아형 균주로 프라이밍된 동물에서 관찰되었다. 전체 용량의 AS03이 3개 모두의 인플루엔자 백신 균주에 대해 강한 HI 역가를 수득하는데 최적이었다.

[0389] **실시에 V-프라이밍된 C57BI/6 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형 인플루엔자 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 포함)의 전임상 평가**

[0390] **V.1. 실험 계획 및 목적**

[0391] 인플루엔자-프라이밍된 마우스에서 실험을 수행하여 본 수증유 애주번트와 함께 제형화된 인플루엔자 백신에 의해 유도된 AS03에 의한 체액 및 세포 반응에서의 증가를 평가하였다.

[0392] 인간 상황을 흉내내기 위해, 이종아형 균주로 프라이밍된 마우스를 이용하여 실험을 수행하였다.

[0393] **V.1.1. 치료/그룹(표 11)**

[0394] 25마리의 성체 암컷 C57BI/6 마우스의 그룹을 0일째에 3가 전체, 포르말린-불활성화된 인플루엔자 바이러스(각 균주에 대해 5 μ g의 HA)로 비강내 프라이밍시켰다(20 μ l의 부피). 프라이밍 균주는 백신에 포함된 것들에 대한 조기 드리프트 변이체(5 μ g의 HA 전체 불활성화된 H1N1 A/베이징/262/95, H3N2 A/파나마/2007/99, B/상동/7/97)로 구성되었다. 28일 후, 마우스를 총 100 μ l 부피의 단일 용량의 백신 후보로 근육내 백신접종하였다. 마우스를 분절형 항원만을 함유하는 제형(3가 분절형 플레인) 또는 세 용량의 AS03(전체, 1/2 또는 1/5)으로 애주번팅된 분절형 항원을 함유하는 제형으로 면역화시켰다. 면역화에 이용된 균주는 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/뉴욕/55/2004, B/지양수/10/2003 바이러스 항원(1.5 μ g/균주, 인간 용량의 1/10)을 포함하였다.

[0395] **표 11**

Gr	항원/제형	다른 치료
1	3가 스플리트 / 플레인 (애주번트 첨가되지 않음)	이종성 프라이밍 D0
2	3가 스플리트 / AS03	이종성 프라이밍 D0
3	3가 스플리트 / AS03 1/2	이종성 프라이밍 D0
4	3가 스플리트 / AS03 1/5	이종성 프라이밍 D0
5	PBS	이종성 프라이밍 D0

[0396] **V.1.2. 백신 제형의 제조**

[0398] **3가 분절형/플레인**

[0399] 다음 순서에 따라서 100 μ l의 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(실시에 IV에 교시된 대로 제조된 10배 농축된 PBS pH 7.4) + 플루아릭스 임상 로트 DFLUA014(최종 용량 중 균주 당 1.5 μ g).

[0400] **3가 분절형/AS03**

[0401] 다음 순서에 따라서 100 μ l의 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(실시에 IV에 교시된 대로 제조된 10배 농축된 PBS pH 7.4) + 플루아릭스 임상 로트 DFLUA014(최종 용량 중 균주 당 1.5 μ g) + 전체 용량의 경우 25 μ l의 SB62 에멀전 또는 1/2 용량의 경우 12.5 μ l의 SB62 에멀전 또는 1/5 용량의 경우 5 μ l의 SB62 에멀전. 제조를 완료한 후 1시간 이내에 제형을 주사한다.

[0402] V.1.3. 판독(표 12)

[0403] 백신접종에 대한 체액성 면역 반응을 면역화 21일 후(10마리 마우스/그룹)에 측정하였고, 혈청 샘플을 적혈구응집 억제(HI) 시험에 의해 시험하였다. 세포 면역 반응을 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의해 면역화 7일 후에 시험하였다.

[0404] 표 12

판독	시점	샘플 유형	분석 방법
체액성 반응	D49	혈청	IHA
세포성 반응	D35	PBMCs	ICS

[0405]

[0406] V.2. 결과

[0407] V.2.1. 체액성 면역성(10 마우스/그룹).

[0408] 결과를 도 6에 제공하였다. 이중아형 프라이밍 후 단일 백신접종된 마우스 모델에서, AS03 및 이의 희석액(1/2 및 1/5)은 플레인 백신에 비해 높은 HI 역가를 유도하는 것으로 나타났다. 3개 모두의 군주에 대하여, 전체 용량의 AS03 또는 감소된 용량의 AS03으로 애주번팅된 백신을 투여받은 마우스 간에 HI 역가의 차이는 관찰되지 않았다.

[0409] V.2.2. 세포 면역성(15마리 마우스/그룹)

[0410] 결과를 도 7에 제공하였다. AS03의 희석과 무관하게, 3가 분절형 플레인으로 면역화된 마우스에 비해 AS03-애주번팅된 3가 분절형 백신으로 면역화된 마우스에서 보다 높은 CD4+ T 세포 반응이 관찰되었다. 전체 용량의 AS03으로 애주번팅된 3가 분절형으로 면역화된 마우스에서 유도된 반응에 비해, 마우스를 저 용량의 AS03으로 애주번팅된 3가 분절형으로 면역화시킬 때, 더 낮은 세포 반응의 경향이 관찰되었다.

[0411] V.3. 결과 및 결론의 요약

[0412] 결론적으로, 체액 및 세포 반응의 증가가 플레인 백신에 비해 AS03 애주번팅된 백신 이용시 이중아형 군주로 프라이밍된 동물에서 관찰되었다. 유사한 크기의 체액 반응이 전체 용량 또는 분획 용량의 AS03 애주번트로 면역화된 마우스 간에 관찰되었다. 그러나, 애주번트 용량의 감소는 CD4+ T 세포 반응의 크기를 감소시키는 경향과 관련되었다.

[0413] 실시예 VI-프라이밍된 C57BI/6 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형 인플루엔자 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 및 저 용량 항원 포함)에 의해 유도된 세포 면역 반응의 전임상 평가

[0414] VI.1. 실험 계획 및 목적

[0415] 인플루엔자-프라이밍된 마우스에서 실험을 수행하여 저 용량 항원을 함유(0.5 µg/군주, 인간 용량의 1/30)하고, 본 수증유 애주번트와 함께 제형화된 인플루엔자 백신에 의해 유도된 AS03에 의한 세포 면역 반응에서의 증가를 평가하였다. 인간 상황을 흉내내기 위해, 이중아형 군주로 프라이밍된 마우스를 이용하여 실험을 수행하였다.

[0416] VI.1.1. 처리/그룹(표 13)

[0417] 15마리의 성체 암컷 C57BI/6 마우스의 그룹을 0일째에 3가 전체, 포르말린-불활성화된 인플루엔자 바이러스(각 군주에 대해 5 µg의 HA)로 비강내 프라이밍시켰다(20 µl의 부피). 프라이밍 군주는 백신에 포함된 것들에 대한 조기 드리프트 변이체(5 µg의 HA 전체 불활성화된 H1N1 A/베이징/262/95, H3N2 A/과나마/2007/99, B/산둥/7/97)로 구성되었다. 28일 후, 마우스를 총 50 µl 부피의 단일 용량의 백신 후보로 근육내 백신접종하였다. 마우스를 분절형 항원만을 함유하는 제형(3가 분절형 플레인) 또는 세 용량의 AS03(전체, 1/2 또는 1/5)으로 애주번팅된 분절형 항원을 함유하는 제형으로 면역화시켰다. 면역화에 이용된 군주는 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/뉴욕/55/2004, B/지양수/10/2003 바이러스 항원(0.5 µg/군주, 인간 용량의 1/30)을 포함하였다.

[0418] 표 13

Gr	항원/제형	다른 치료
1	3가 스플리트 / 플레인 (애주번트 첨가되지 않음)	이종성 프라이밍 D0
2	3가 스플리트 / AS03	이종성 프라이밍 D0
3	3가 스플리트 / AS03 1/2	이종성 프라이밍 D0
4	3가 스플리트 / AS03 1/5	이종성 프라이밍 D0
5	PBS	이종성 프라이밍 D0

[0419]

[0420] VI.1.2. 백신 제형의 제조

[0421] 3가 분절형/플레인

[0422] 다음 순서에 따라서 50 μ l의 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(실시에 IV에 교시된 대로 제조된 10배 농축된 PBS pH 7.4) + 플루아릭스 임상 로트 DFLUA014(최종 용량 중 균주 당 0.5 μ g).

[0423] 3가 분절형/AS03

[0424] 다음 순서에 따라서 50 μ l의 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(실시에 IV에 교시된 대로 제조된 10배 농축된 PBS pH 7.4) + 플루아릭스 임상 로트 DFLUA014(최종 용량 중 균주 당 0.5 μ g) + 전체 용량의 경우 25 μ l의 SB62 에멀전 또는 1/2 용량의 경우 12.5 μ l의 SB62 에멀전 또는 1/5 용량의 경우 5 μ l의 SB62 에멀전. 제조를 완료한 후 1시간 이내에 제형을 주사한다.

[0425] VI.1.3. 관독(표 14)

[0426] 세포 면역 반응을 세포내 사이토카인 염색에 의해 면역화 7일 후에 시험하였다.

[0427] 표 14

관독	시점	샘플 유형	분석 방법
세포성 반응	D35	PBMCs	ICS

[0428]

[0429] VI.2. 결과

[0430] VI.2.1. 세포 면역성

[0431] 결과를 도 8에 제공하였다. 약간 더 높은 CD4+ T 세포 반응이 3가 분절형 플레인으로 면역화된 마우스에 비해 AS03(전체 또는 1/2 용량)으로 애주번팅된 3가 분절형 백신으로 면역화된 마우스에서 관찰되었다. 3가 분절형 플레인으로 면역화되거나 전체 용량 또는 절반 용량의 AS03으로 애주번팅된 마우스에서 유도된 반응에 비해, 마우스를 1/5의 AS03 용량으로 애주번팅된 3가 분절형으로 면역화시킬 때 더 높은 세포 반응이 관찰되었다.

[0432] VI.3. 결과 및 결론의 요약

[0433] 결론적으로, CD4+ T 세포 반응에서의 최소 증가가 플레인 백신과 비교하여 AS03 애주번팅된 백신 이용시 이중아형 균주로 프라이밍된 동물에서 관찰되었다. 이 실험에서 어떠한 애주번트 용량 반응도 관찰되지 않았고, 실제로 1/5의 AS03 용량이 더 높은 애주번트 용량에서 나타난 것보다 높은 항원 특이적인 CD4+ T 세포의 빈도를 유도하였다. 전반적인 이러한 데이터는 다른 전임상 실험과 일치하지 않으며, 이 특별한 실험으로 기술적 이슈를 암시할 수 있다.

[0434] 실시예 VII-무경험 C57BI/6 마우스에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 분절형 H5N1 백신(다양한 용량의 AS03 애주번트 및 항원 포함)의 전임상 평가

[0435] VII.1. 실험 계획 및 목적

[0436] H5N1-무경험 마우스에서 실험을 수행하여 본 수증유 애주번트와 함께 제형화된 H5N1 분절형 백신에 의해 유도된 AS03에 의한 체액 및 세포 면역 반응에서의 증가를 평가하였다. 범유행병(pandemic)의 경우, 전세계의 집단은 새롭게 순환되는 범유행성 인플루엔자 균주에 대해 면역학적으로 무경험일 것으로 예상된다. 이러한 무경험 면역 상태로 인해, 범유행성 백신은 개체를 새로운 인플루엔자 균주에 의해 야기된 감염 및 심각한 질병으로부터 보호하기 위해 두 백신 용량을 필요로 할 것이다. 이러한 사전 노출의 결여를 나타내기 위해, 백신 면역원

성을 평가하기 위한 무경험 마우스 모델을 개발하였다

[0437] VII.1.1. 처리/그룹(표 15)

[0438] 15마리의 성체 무경험 암컷 C57BI/6 마우스의 그룹을 0일 및 28일에 총 부피가 50 μ l인 범유행성 H5N1 백신 후보로 근육내 면역화시켰다. 마우스를 분절형 H5N1 항원만을 함유하는 제형(H5N1 분절형 플레인) 또는 상이한 용량의 AS03(이중, 전체, 1/2 또는 1/5)으로 애주번팅된 분절형 항원을 함유하는 제형으로 면역화시켰다. 면역화에 사용된 균주는 H5N1 A/베트남/1194/04 바이러스 항원(인간 용량의 1/10에 해당하는 1.5 또는 0.38 μ g/균주)을 포함하였다.

[0439] 어떠한 제형도 이중 AS03 용량으로 수행되지 않았고, 오히려 하나의 50 μ l H5N1 분절형/AS03 전체 용량 + 하나의 50 μ l 용량 AS03을 동반주사하였다.

[0440] 표 15

Gr	항원/제형	항원 용량
1	H5N1 스플리트 / 플레인 (애주번트 첨가되지 않음)	1.5 μ g
2	H5N1 스플리트 / 이중 용량 AS03	1.5 μ g
3	H5N1 스플리트 / AS03	1.5 μ g
4	H5N1 스플리트 / AS03 1/2	1.5 μ g
5	H5N1 스플리트 / AS03 1/5	1.5 μ g
6	H5N1 스플리트 / 플레인 (애주번트 첨가되지 않음)	0.38 μ g
7	H5N1 스플리트 / 이중 용량 AS03	0.38 μ g
8	H5N1 스플리트 / AS03	0.38 μ g
9	H5N1 스플리트 / AS03 1/2	0.38 μ g
10	H5N1 스플리트 / AS03 1/5	0.38 μ g
11	PBS	

[0441]

[0442] VII.1.2. 백신 제형의 제조

[0443] 1 리터의 최종 벌크 완충액(PBS pH 7.2 \pm 0.2)의 제조: 0.800 l의 주사용수에, NaCl 7.699 g, KCl 0.200 g, MgCl₂ x 6H₂O 0.100 g, Na₂HPO₄ x 12H₂O 2.600 g, KH₂PO₄ 0.373 g을 첨가한다. 용해시킨 후, 주사용수로 1.0L가 되게 한다.

[0444] **H5N1 분절형/플레인**

[0445] 50 μ l 용량의 제조:

[0446] 티오머살(균주에서의 이의 농도를 고려한 양) 및 트리톤 X100을 최종 벌크 완충액에 첨가하였다. 제형 중의 함량 목표가 균주의 트윈 농도에 의해 도달되었으므로 트윈 80을 첨가하지 않았다. 최종 농도는 1.5 μ g의 제형 용량 중 티오머살 10 μ g/ml, 트윈 80 368 μ g/ml 및 트리톤 X100 35 μ g/ml이다. 0.38 μ g의 제형 용량에서 최종 농도는 티오머살 10 μ g/ml, 트윈 80 93 μ g/ml 및 트리톤 X100 8.9 μ g/ml이다. 5-30분간 자석 교반시킨 후, 1.5 또는 0.38 μ g의 HA(H5N1 균주)를 첨가하였다. 제형을 30-60분 동안 교반하였다. pH를 확인하였다. 제형화를 완료한 후 1시간 내에 주사한다.

[0447] **H5N1 분절형/AS03**

[0448] 50 μ l 용량의 제조:

[0449] 티오머살(균주에서의 이의 농도를 고려한 양) 및 트리톤 X100을 최종 벌크 완충액에 첨가하였다. 제형 중의 함량 목표가 균주의 트윈 농도에 의해 도달되었으므로 트윈 80을 첨가하지 않았다. 최종 농도는 1.5 μ g의 제형 용량 중 티오머살 10 μ g/ml, 트윈 80 368 μ g/ml 및 트리톤 X100 35 μ g/ml이다. 0.38 μ g의 제형 용량에서 최종 농도는 티오머살 10 μ g/ml, 트윈 80 93 μ g/ml 및 트리톤 X100 8.9 μ g/ml이다. 5-30분간 자석 교반시킨 후, 1.5 또는 0.38 μ g의 HA(H5N1 균주)를 첨가하였다. 제형을 30-60분 동안 자석 교반시킨 후, 25 또는 12.5 또는 5 μ l의 SB62 에멀전을 첨가하였다. 제형을 30-60분간 교반하였다. pH를 확인하였다. 제형화를 완료한 후 1시간 내에 주사한다.

[0450] VII.1.3. 관독(표 16)

[0451] 체액성 면역 반응을 면역화(10마리의 마우스/그룹) 14일 후에 항-Ig, IgG1 및 IgG2b 항체 역가에 의해 측정하였다(도 9, A-F). 체액성 면역 반응을 또한 면역화(10마리의 마우스/그룹) 21일 후에 항-H5N1 적혈구응집 억제 검정에 의해 측정하였다(도 10, A-B).

[0452] 세포 면역 반응을 면역화 6일 후(그룹 당 3마리 마우스의 5개 풀), 유세포 분석에 의해 계산된 항원-특이적인 CD4+ T 세포의 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의해 시험하였다(도 11, A-B).

[0453] 표 16

판독	시점	샘플 유형	분석 방법
체액성 반응	D39	혈청	ELISA, 이소형 및 HI 역가
세포성 반응	D34	PBMCs	ICS

[0454]

[0455] VII.2. 결과

[0456] VII.2.1. 체액성 면역 반응: ELISA 및 동형

[0457] 결과를 도 9에 제시하였다.

[0458] 각 용량의 H5N1 분절형 백신에서, 모든 애주번팅된 그룹이 애주번트 첨가되지 않은 H5N1 분절형 백신에 비해 높은 항-H5N1 Ig, IgG1 및 IgG2b 항체 역가를 유도하였다 (도 9-A 내지 F).

[0459] 각 용량의 H5N1 분절형 백신; 항-H5N1 IgG1 항체 반응은 항-H5N1 IgG2b 항체 반응보다 4-5배 더 높았다(도 9-C 내지 F). 1.5 μ g HA의 H5N1 분절형 백신의 용량 및 각 용량의 애주번트 조합시에, 항-H5N1 Ig, IgG1 및 IgG2b 항체 반응의 어떠한 차이도 관찰되지 않았다(도 9-A, C 및 E).

[0460] 0.38 μ g HA의 H5N1 분절형 백신의 용량에서, AS03/2(p=0.7315) 및 AS03 1/5 (p=0.9744)로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신에 의해 유도된 반응에 비해 2x-전체 용량으로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화시킨 후에 더 높은 항-H5N1 Ig 역가의 경향이 관찰되었다(도 9-B). 이러한 경향은 항-H5N1 IgG1 항체 반응에서도 관찰되었다(도 9-D). 그러나, 통계적으로 유의한 차이가 관찰될 정도로 세기가 충분하지 않았다(1.7배 차이에 대해 25% 세기, 또는 2배 차이에 대해 47%).

[0461] VII.2.2. 체액성 면역 반응: HI 역가

[0462] 1.5 μ g HA/마우스의 용량에 관해서:

[0463] 각 애주번트 용량에서, AS03-애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 모든 마우스가 애주번트 첨가되지 않은 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스에서 수득된 반응에 비해 높은 HI 역가를 유도하였다(도 10-A). H5N1 분절형 백신에 용량 범위의 AS03을 애주번트 첨가했을 때 HI 역가의 차이가 관찰되지 않았다(도 10-A).

[0464] 용량당 0.38 μ g HA의 용량에 관해서:

[0465] 각 애주번트 용량에서, AS03-애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 모든 마우스가 애주번트 첨가되지 않은 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스에서 수득된 반응에 비해 높은 HI 역가를 유도하였다(도 10B).

[0466] AS03/2로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신에서 수득된 반응에 비해 현저하게 더 높은 HI 역가가 2x 전체 용량의 AS03으로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신에서 관찰되었다(4배 차이의 경우 p=0.032)(도 10B).

[0467] 2x 전체 용량의 AS03 또는 전체 용량의 AS03으로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스, 또는 AS03/2 또는 AS03/5로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스 간에 HI 역가의 차이가 관찰되지 않았다(도 10B).

[0468] 항원 용량간 비교(1.5 μ g 또는 0.38 μ g):

[0469] 2x 전체 용량의 AS03으로 애주번팅된 0.38 μ g HA의 분절형 H5N1로 면역화된 마우스와 AS03/5로 애주번팅된 1.5 μ g HA의 분절형 H5N1로 면역화된 마우스 간을 제외하고는, AS03, AS03/2 또는 AS03/5로 애주번팅된 각 HA 용량의 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스간에 HI 역가의 차이가 관찰되지 않았다(도 10). 저 애주번트 용량과 결합된 고 항원 용량에 비해, 2x 전체 용량의 AS03으로 애주번팅된 0.38 μ g HA의 분절형 H5N1로 면역화시킨 후, 현저하게 더 높은 HI 역가가 관찰되었다.

- [0470] VII.2.3. 세포 면역 반응
- [0471] 결과를 도 11에 제시하였다.
- [0472] 각 용량의 H5N1 분절형 백신(1.5 또는 0.38 μg)에서, 애주번트 첨가되지 않은 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스에 비해 다양한 용량의 AS03으로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스에서 더 높은 CD4+ T 세포 반응이 관찰되었다(도 11).
- [0473] 1.5 μg H5N1 분절형 백신의 용량에서, AS03 용량의 감소는 CD4+ T 세포 빈도의 감소에 상응하였다(도 11A). 그러나, 0.38 μg H5N1 분절형 백신의 용량에서, AS03-애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스에서 상이한 애주번트 용량 간에 CD4+ T 세포 반응의 어떠한 차이도 관찰되지 않았다(도 11B).
- [0474] **VII.3. 결과 및 결론의 요약**
- [0475] 마우스에서의 면역원성 연구는, 애주번팅된 H5N1 분절형 백신이 애주번트 첨가되지 않은 H5N1 분절형 백신에 의해 유도된 반응들에 비해 현저하게 더 높은 체액(항-H5N1 ELISA 및 HI 역가) 및 세포(CD4+ T 세포) 반응을 유도하였음을 나타내었다.
- [0476] 1.5 μg 및 0.38 μg 애주번팅된 H5N1 분절형 백신으로 면역화된 마우스 간에 체액성 면역 반응에 있어서의 어떠한 항원 용량 반응 효과가 관찰되지 않았는데, 이는 상기 모델에서 용량 반응 효과를 관찰하기 위해서는 애주번트의 존재하에 심지어 더 낮은 용량의 HA가 요구될 수 있음을 시사한다.
- [0477] CD4+ T 세포 반응에서의 강한 증가가 플레인 H5N1 백신에 비해 AS03 애주번팅된 H5N1 범유행성 백신 이용시 무경험 마우스에서 관찰되었다. 0.38 μg 의 H5N1 분절형 백신의 용량을 백신 후보로 이용할 때 AS03 희석의 영향은 관찰되지 않았으나, 1.5 μg 의 H5N1 분절형 백신을 감소된 용량의 AS03으로 애주번트 첨가했을 때 CD4 T 세포 반응의 감소가 관찰되었다.
- [0478] 이전에 관찰된 대로, 전체 용량의 AS03 또는 AS03/2로 애주번팅된 H5N1 분절형 백신(어떠한 항원 용량에서)으로 면역화된 마우스간에, 체액 및 세포 면역 반응에서의 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 2x 전체 용량 AS03을 백신 제형에 이용한 경우에 면역 반응에서의 일부 향상이 검출되었고, 따라서 AS03/5를 백신 제형에 이용했을 때 면역 반응에서의 감소가 검출되었다.
- [0479] 전체적으로, 여기에 보고된 데이터는 상기 백신 제형에서의 본 신규한 애주번트 시스템의 효능을 지지한다.
- [0480] **실시에 VIII-프라이밍된 돼지돈(Large White pig)에서 애주번트 첨가 및 애주번트 첨가되지 않은 인플루엔자 백신의 전임상 평가**
- [0481] **VIII.1. 실험 계획 및 목적**
- [0482] 인플루엔자-프라이밍된 돼지에서의 실험을 수행하여 본 수증유 애주번트와 함께 제형화된 인플루엔자 백신에 의해 유도된 AS03에 의한 체액 반응에서의 증가를 평가하였다.
- [0483] 돼지를 이용하여 인간에 근접한 동물 모델에서 용량 범위의 AS03을 평가하였다. 돼지는 긴 목록의 생물학적 유사성을 나타내며, 이것은 돼지가 예외가 극히 적은 생리학적으로 인간에 가장 근접한 동물임을 확인시켜 준다(Douglas R., 1972). 더욱이, 돼지에서 인플루엔자 감염의 표시가 상례로 관찰된다.
- [0484] VIII.1.1. 처리/그룹(표 17)
- [0485] 10마리의 성체 암컷 돼지의 그룹을 0일째에 총 부피가 200 μl 인 3가 전체, 포르말린-불활성화된 인플루엔자 바이러스(각 균주에 대해 25 μg 의 HA)로 비강내 프라이밍시켰다. 프라이밍 균주는 백신 균주와 상동인 균주로 구성되었다(25 μg 의 HA 전체 불활성화된 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99 및 B/상동/7/97)로 구성되었다. 28일 후, 돼지를 총 500 μl 부피의 단일 용량의 백신 후보로 근육내 백신접종하였다. 돼지를 분절형 항원만을 함유하는 제형(3가 분절형 플레인) 또는 용량 범위의 AS03(전체, 1/2 또는 1/5)으로 애주번팅된 분절형 항원을 함유하는 제형으로 면역화시켰다. 면역화에 이용된 균주는 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99 및 B/상동/7/97 바이러스 항원(일 인간 용량으로서 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99 균주에 대해 15 μg HA, 및 B/상동/7/97 균주 17.5 μg)을 포함하였다.
- [0486] 그룹(10 마리 돼지/그룹):

[0487] 표 17

Gr	항원/제형	다른 치료
1	3가 스플리트 / 플레인 (애주번트 첨가되지 않음)	동종성 프라이밍 D0
2	3가 스플리트 / AS03	동종성 프라이밍 D0
3	3가 스플리트 / AS03 1/2	동종성 프라이밍 D0
4	3가 스플리트 / AS03 1/5	동종성 프라이밍 D0

[0488]

[0489] VIII.1.2. 백신 제형의 제조

[0490] 3가 분절형/플레인

[0491] 트윈 80, 트리톤 X100 및 비타민 E 숙시네이트(VES)의 프리믹스를 제조하여 최종 농도가 750 µg/ml의 트윈 80, 110 µg/ml의 트리톤 X100 및 100 µg/ml의 VES의 백신에 도달하도록 하였다. 프리믹스에 이용된 양들은 균주에 대한 이들의 함량을 고려한 것이다.

[0492] 다음 순서에 따라서 500 µl의 일 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(실시에 IV에 교시된 대로 제조된 10배 농축된 PBS pH 7.4) + 프리믹스, 실온에서 5분간 자석 교반, + 15 µg HA H1N1 균주, 실온에서 10분간 자석 교반, + 15 µg HA H3N2 균주, 실온에서 10분간 자석 교반, + 17.5 µg HA B 균주, 실온에서 15분간 자석 교반. 제조를 완료한 후 1시간 이내에 제형을 주사한다.

[0493] 3가 분절형/AS03

[0494] 트윈 80, 트리톤 X100 및 비타민 E 숙시네이트(VES)의 프리믹스를 제조하여 최종 농도가 750 µg/ml의 트윈 80, 110 µg/ml의 트리톤 X100 및 100 µg/ml의 VES의 백신에 도달하도록 하였다. 프리믹스에 이용된 양들은 균주에 대한 이들의 함량을 고려한 것이다.

[0495] 다음 순서에 따라서 500 µl의 일 용량 제형을 즉석에서 제조한다: 주사용수 + 염수 완충액(실시에 IV에 교시된 대로 제조된 10배 농축된 PBS pH 7.4) + 프리믹스, 실온에서 5분간 자석 교반, + 15 µg HA H1N1 균주, 실온에서 10분간 자석 교반, + 15 µg HA H3N2 균주, 실온에서 10분간 자석 교반, + 17.5 µg HA B 균주, 실온에서 15분간 자석 교반, + 전체 용량의 AS03의 경우 250 µl SB62 에멀전, 또는 1/2 용량의 AS03의 경우 125 µl SB62 에멀전, 또는 1/5 용량의 AS03의 경우 50 µl SB62 에멀전, 실온에서 15분간 자석 교반. 제조를 완료한 후 1시간 이내에 제형을 주사한다.

[0496] VII.1.3. 판독(표 18)

[0497] 백신접종에 대한 체액성 면역 반응을 비강내 프라이밍 전(0일), 면역화 전(28일) 및 면역화 14일 후에 측정하였다(10마리 돼지/그룹). 혈청 샘플을 적혈구응집 억제(HI) 시험에 의해 시험하였다.

[0498] 표 18

판독	시점	샘플 유형	분석 방법
체액성 반응	D0, D28, D42	혈청	IHA

[0499]

[0500] VIII.2 결과 및 결론

[0501] VIII.2.1. 체액성 면역성

[0502] 결과를 도 12에 제공하였다. 애주번트의 희석과 무관하게, AS03 애주번팅된 3가 분절형 제형은, 비록 3개 모두의 균주에서 항상 통계적 유의성에 도달하지는 않았으나, 동종성 프라이밍의 모델에서 플레인 3가 제형에 비하여 모든 균주에 대해 더 강한 HI 반응을 유도하였다. 애주번트 용량 효과가 균주마다 다소 상이하게 관찰되었다. B/상동과 같이 덜 면역원적인 균주의 경우, 전체 용량의 AS03으로 애주번팅된 3가 분절형 백신만이 플레인 백신과 현저하게 상이하였다. 전체 용량의 AS03으로 애주번팅된 3가 분절형 백신과 대조적으로, 감소된 용량의 AS03은 3개 모두의 균주에 대하여 플레인 백신에서 보여진 것들을 초과하여 HI 역가를 증가시키지 못했다.

[0503] 실시예 IX

[0504] 상이한 희석액에서 AS03으로 애주번팅된 dPly-PhtD-PD 항원의 면역원성.

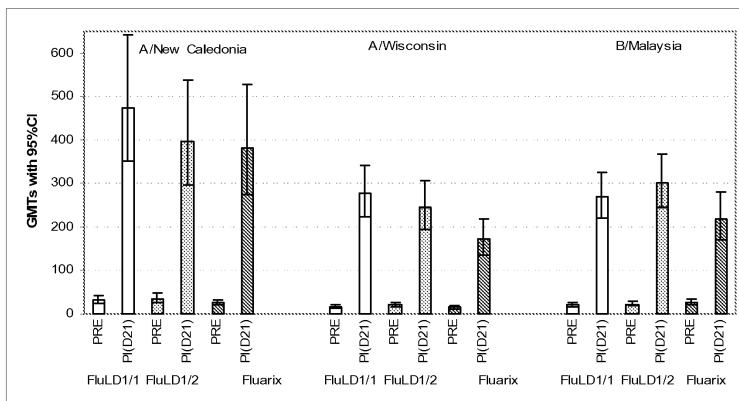
[0505] IX.1 20080257 립(Lims) 실험

- [0506] dPly(무독성화된 뉴몰리신) 및 PhtD(폴리히스티딘 트라이어드 단백질 D)은 스트렙토코쿠스 뉴모니에에서 유래된 단백질로, PD는 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)에서 유래된 단백질 D이다. C57b1 마우스를 AS03A(250 µg SB62)으로 애주번팅된 인간 용량의 1/10의 두개의 동결건조된 임상 로트 dPly-PhtD-PD(DSPEA005A 및 006A)로 3차례(0, 14 및 28일) 근육내 면역화시켰다(그룹 1 및 2). AS03A 중 액체 전임상 로트 dPly-PhtD-PD를 기준 백신으로 이용하였다(그룹 3). AS03B(125 µg SB62) 및 AS03C(62.5 µg SB62)로 재구성된 임상 로트 DSPEA005도 평가하였다(그룹 4 및 5). 최종적으로, 염수로 재구성된 두개의 동결건조된 임상 로트를 비교기(comparators)로서 주사하여, dPly, PhtD 및 PD 항원에 대해 유도된 면역 반응 상에서 애주번트의 효력을 측정하였다(그룹 6 및 7).
- [0507] 마우스를 42일에 방혈시키고, 각 항원에 대해 유도된 항체 반응을 ELISA로 측정하였다. 데이터는 도 13에 µg/ml 중 GMC로 나타내었다.
- [0508] 두개의 dPly-PhtD-PD 임상 로트의 일관성(consistency)을 증명하였다(DSPEA005A 및 006A). 동결건조의 충격이 나타나지 않았다(그룹 1 및 2 대 그룹 3). 애주번트가 없는 제형에 비해(그룹 6 및 7) 모든 항원에 대하여 현저하게 높은 항체 역가가 AS03 제형에 의해 유도되었다(그룹 1 내지 5). AS03C 제형 내 PD를 제외하고는(그룹 5), 상이한 농도의 애주번트를 함유한 제형에 의해 각 항원에 대하여 유도된 항체 역가에서 유의한 차이점이 관찰되지 않았다(그룹 1, 4, 및 5).
- [0509] IX.2 20080334-20080340 럽 실험
- [0510] C57b1 마우스를 상이한 농도(15-15-15; 30-30-30 및 60-60-60 µg)로 인간 용량의 1/10의 dPly-PhtD-PD 동결건조된 임상 로트(DSPEA006A)로 3차례(0, 14 및 28일) 근육내 면역화시키고, 염수 내에서 재구성하거나, AS03A(250 µg SB62), AS03B (125 µg SB62) 및 AS03C (62.5 µg SB62)으로 애주번트 첨가하였다. 마우스를 42일에 방혈시키고, 각 항원에 대해 유도된 항체 반응을 ELISA로 측정하였다. 데이터는 도 14에 µg/ml 중 GMC로 나타내었다.
- [0511] 염수만을 함유한 제형에 비해(그룹 10 내지 12), AS03를 함유한 제형에서(그룹 1 내지 9) 모든 항원에 대해 유도된 항체 역가의 유의한 증가가 나타났다. 각 항원에 대해 유도된 면역반응에서 항원 용량의 영향은 명백하게 관찰되지 않았다. dPly 및 PhtD에 대해 유도된 항체 반응 상에서 애주번트 희석액의 유의한 영향은 관찰되지 않았다. PD의 경우, 항원 농도 3 및 6 µg에서, AS03A 와 C간의 유의한 차이점이 관찰되었다.

도면

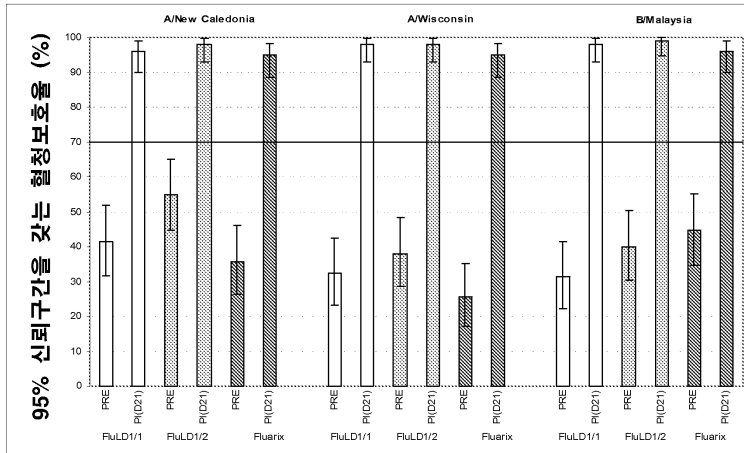
도면1

상이한 시점에서의 항-HA 항체의 기하 평균 역가(GMTs)(면역원성에 대한 ATP 코호트)



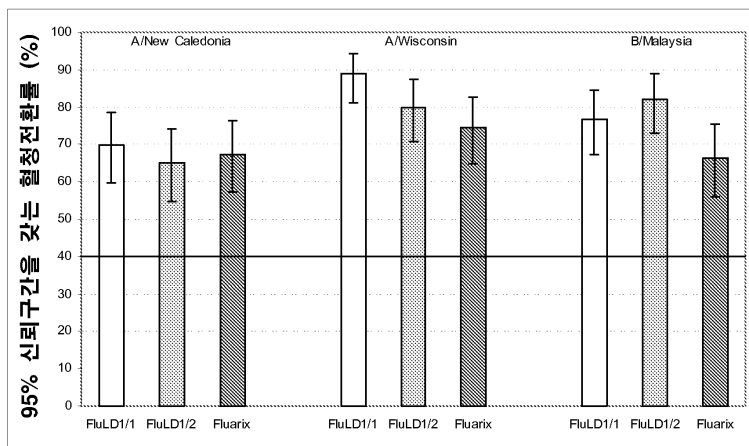
도면2

0일째 및 21일째에 95% 신뢰 구간을 갖는 HI 항체 역가에 관한 SPR(면역원성에 대한 ATP 코호트)



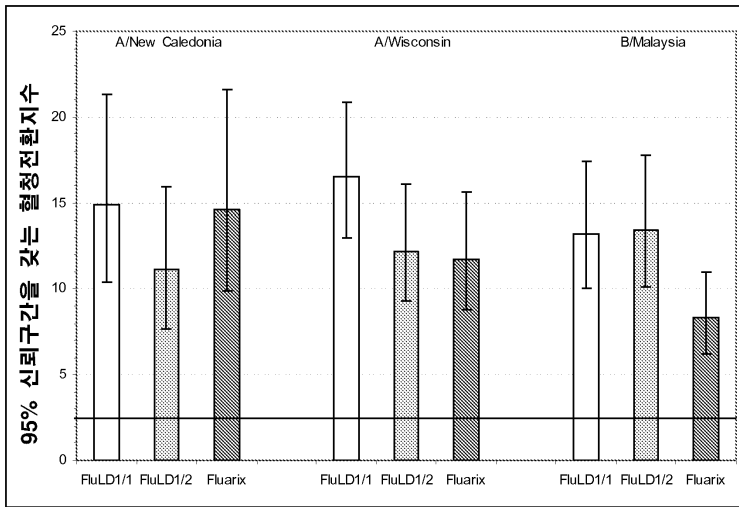
도면3

21일째에 95% 신뢰 구간을 갖는 HI 항체 역가에 관한 SCR(면역원성에 대한 ATP 코호트)



도면4

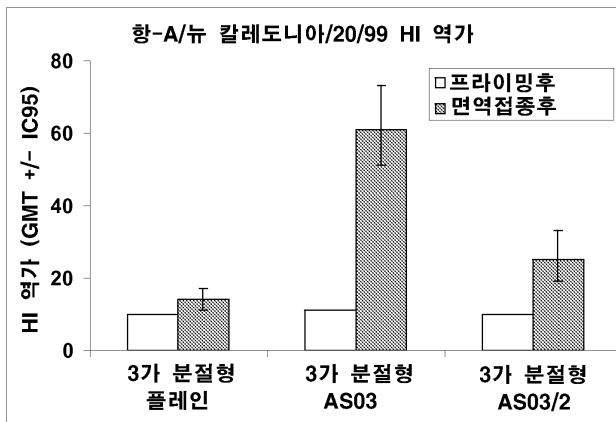
21일째에 95% 신뢰 구간을 갖는 HI 항체 역가에 관한 SCF(면역원성에 대한 ATP 코호트)



도면5a

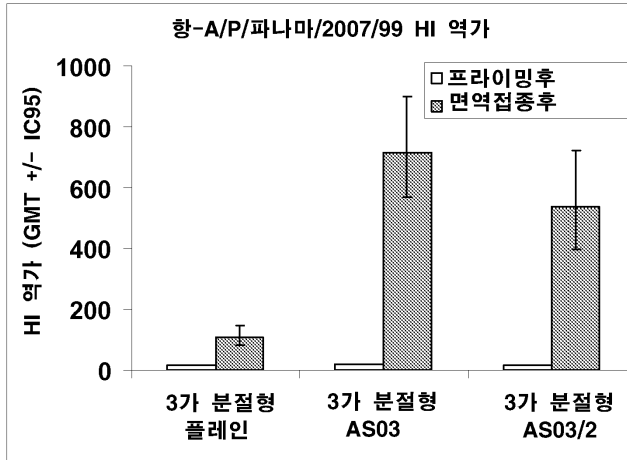
이종아형 균주로 프라이밍한(용량 범위 AS03) BALB/c 마우스에서의 헤마 글루티닌 억제 시험 (GMT +/- IC95)

항-A/뉴 칼레도니아/20/99 HI 역가



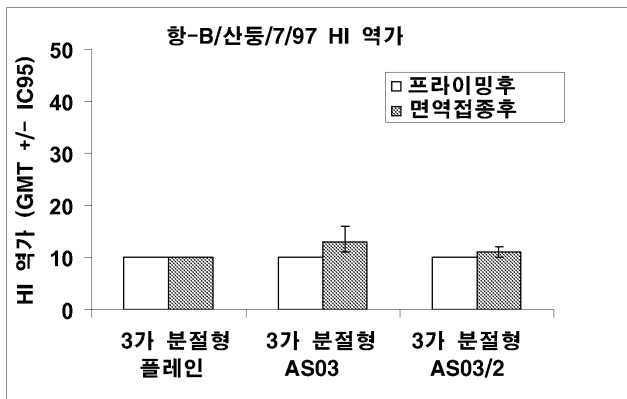
도면5b

항-A/P/파나마/2007/99 HI 역가



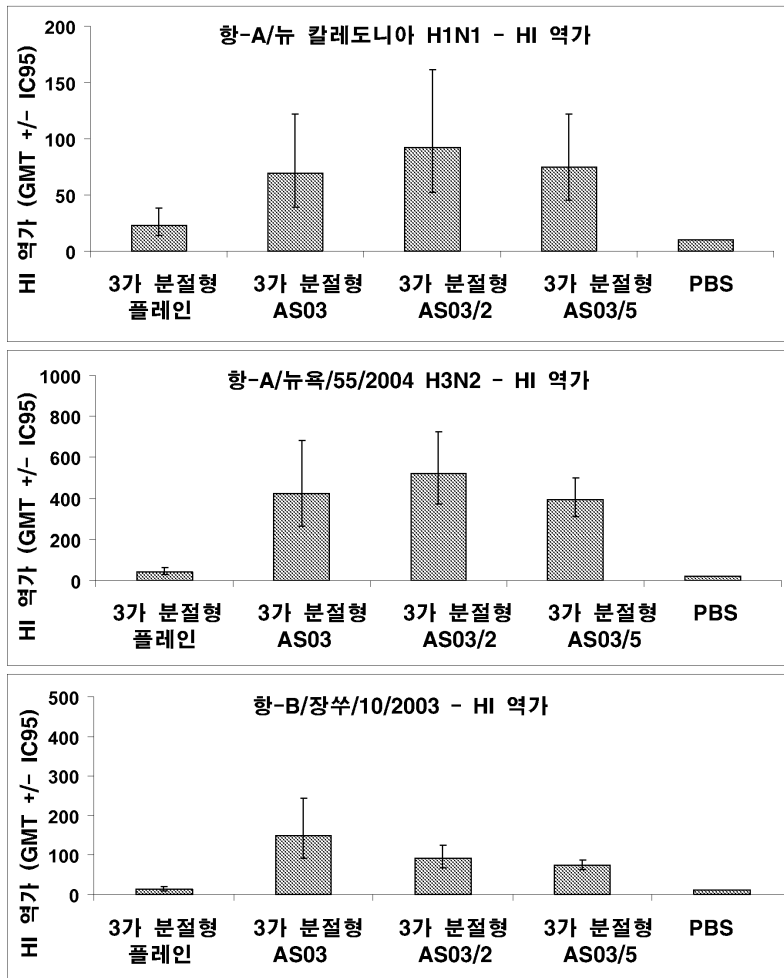
도면5c

항-B/산둥/7/97 HI 역가



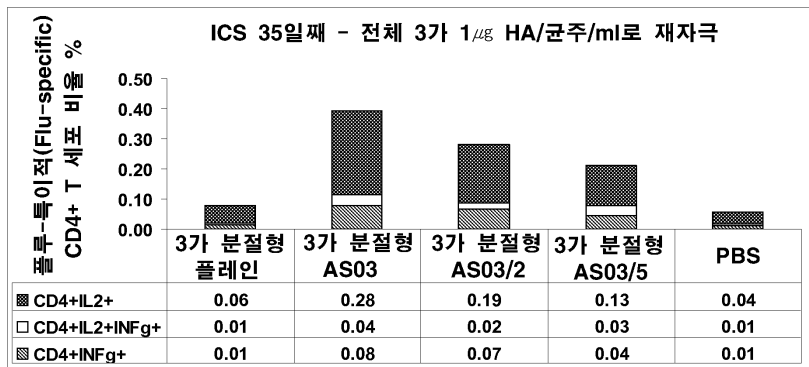
도면6

이종아형 균주로 프라이밍한(용량 범위 AS03) C57Bl/6 마우스에서의 헤마글루티닌 억제 시험 (GMT +/- IC95)



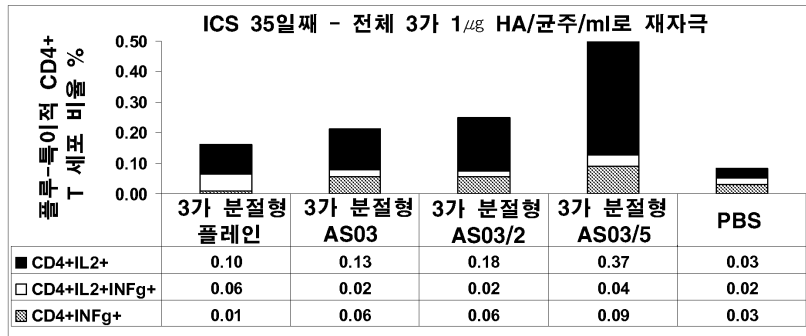
도면7

이종아형 균주로 프라이밍한(용량 범위 AS03) C57Bl/6 마우스에서의 세포 면역 반응 (CD4+ T 세포)



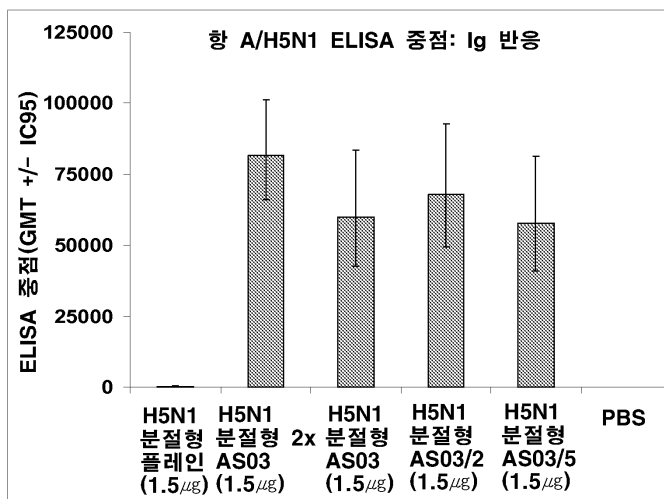
도면8

이종아형 균주로 프라이밍시키고 용량 범위 AS03으로 애주번팅된 저 용량 항원(0.5 μ g)으로 면역접종한 C57Bl/6 마우스로부터의 PBMC에서의 세포 면역 반응 (CD4+ T 세포)

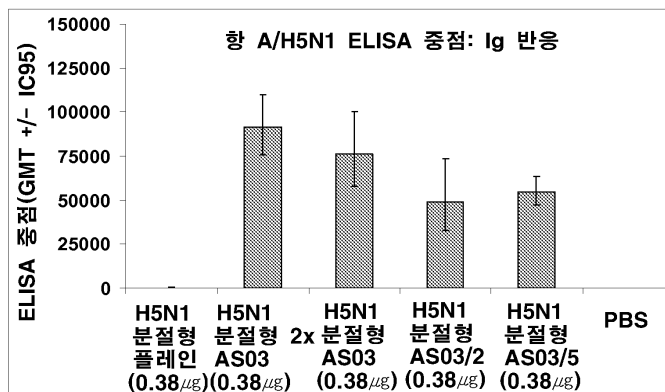


도면9a

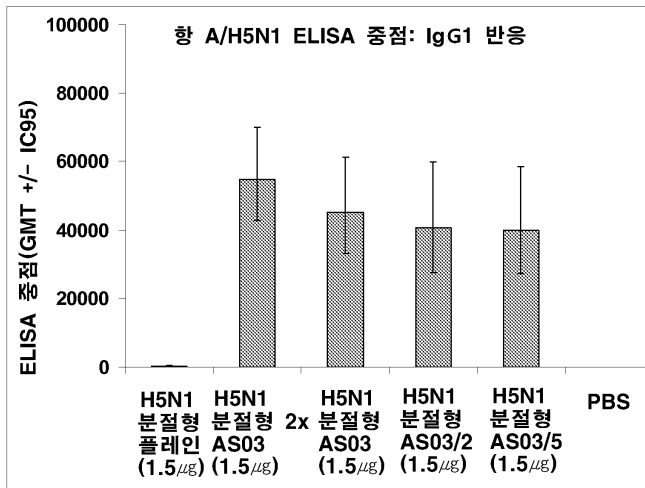
면역접종후(post-immunization) 14일째에 (GMT +/- IC95) 2개의 상이한 항원 용량(1.5 μ g(A, C 및 E) 또는 0.38 μ g(B, D 및 F)에 관한 H5N1-특이적 혈청 Ig ELISA 역가(A 및 B) 및 항-H5N1 IgG1(C 및 D) 및 IgG2b(E 및 F) 이소형 반응.



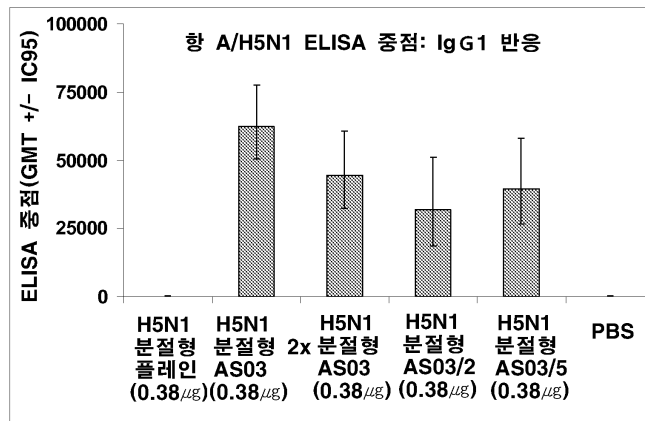
도면9b



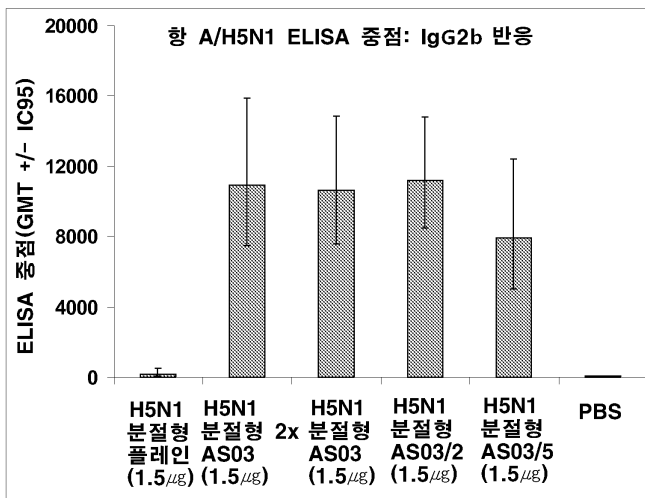
도면9c



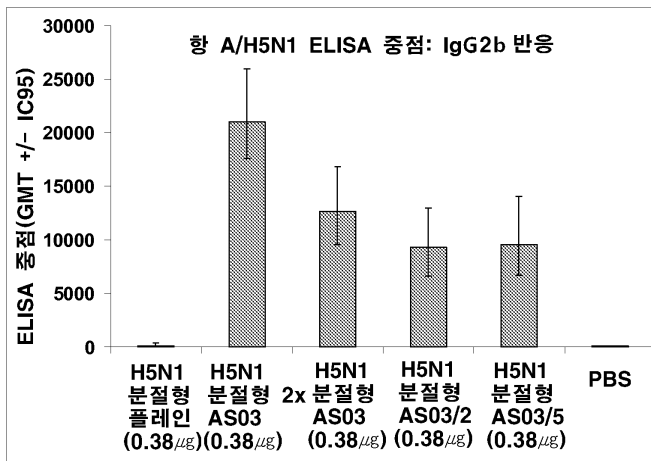
도면9d



도면9e

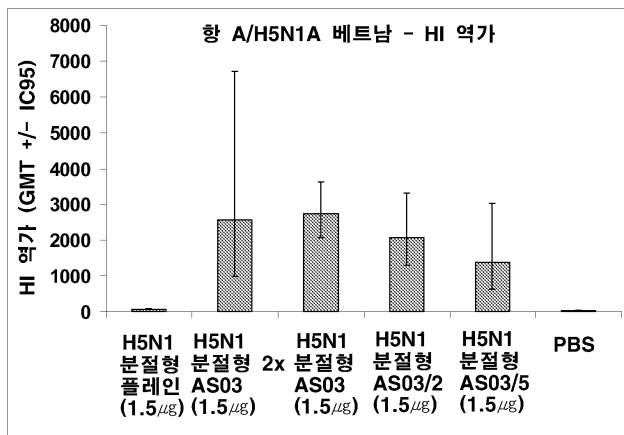


도면9f

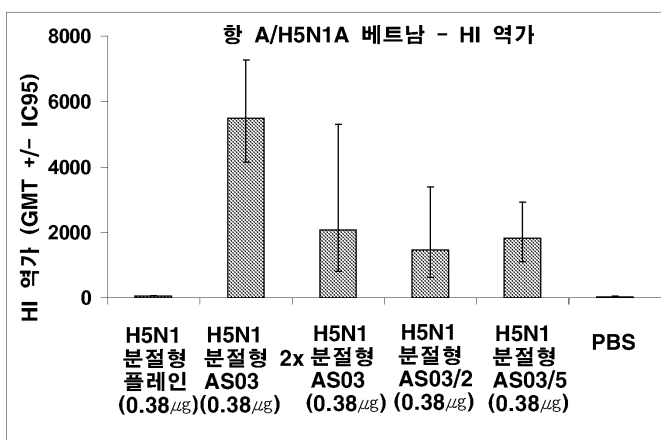


도면10a

2가지 상이한 용량(1.5 μg (A) 또는 0.38 μg (B))에 관한 면역접종후 21일째의 헤마글루티닌 억제 시험 (GMT +/- IC95)

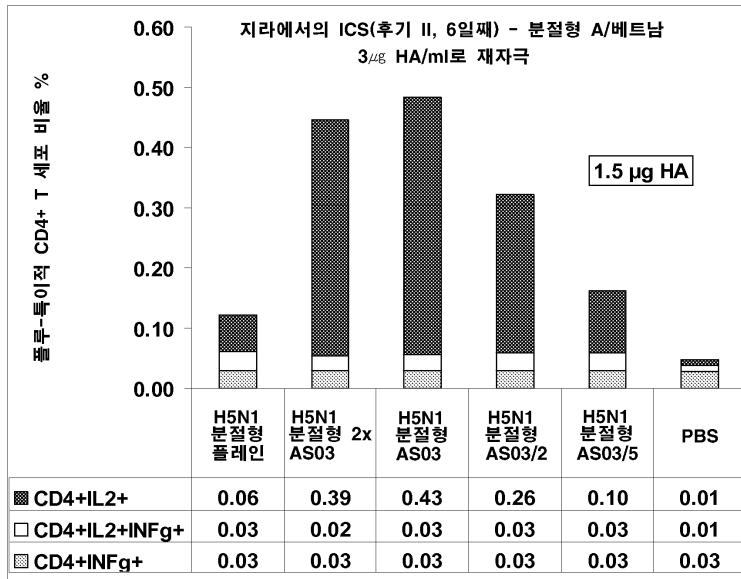


도면10b

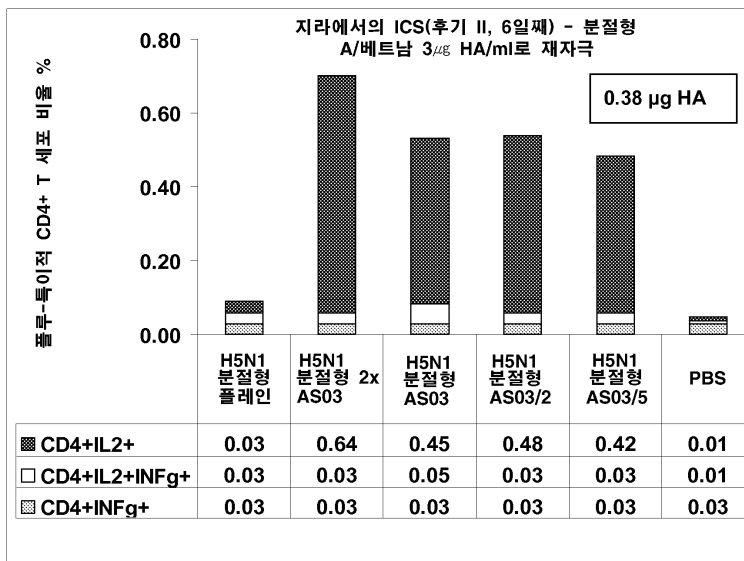


도면11a

표양 범위 AS03로 애주변형한 상이한 용량의 H5N1 백신(1.5 또는 0.38 µg)으로 면역억제된 무처리 C57Bl/6 마우스에서의 세포 면역 반응(CD4+ T 세포): (A) 1.5µg HA Ag (항원) 또는 (B) 0.38µg HA Ag (항원).

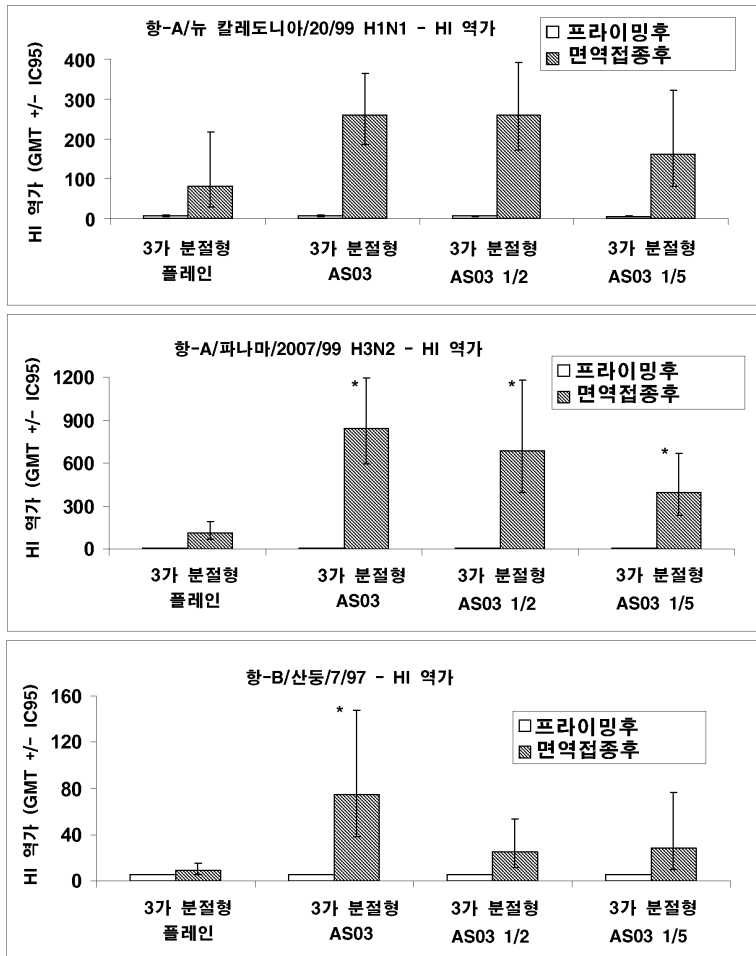


도면11b



도면12

동종 균주로 프라이밍한(용량 범위 AS03) 돼지에서에서의 헤마글루티닌 억제 시험 (GMT +/- IC95).

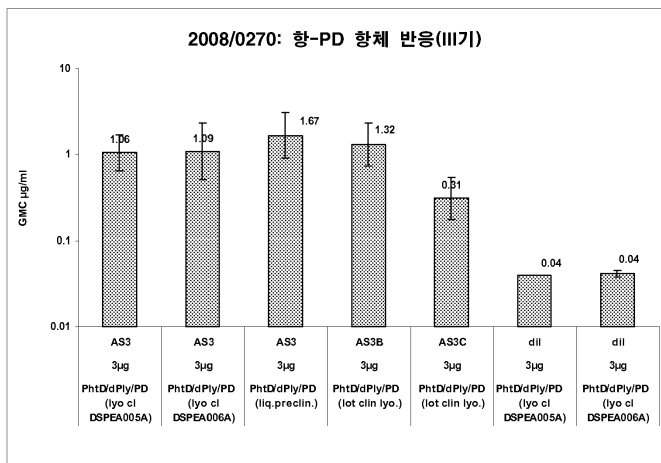


* 플레인과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 지니는 그룹

도면13a

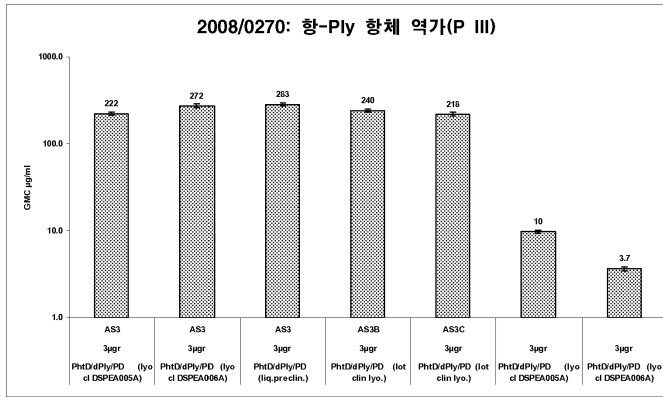
AS03의 상이한 희석액 중의 S. 뉴모니에 단백질에 대한 면역 반응을 보여주는 ELISA 결과

H. 인플루엔자로부터의 단백질 D에 대한 면역 반응



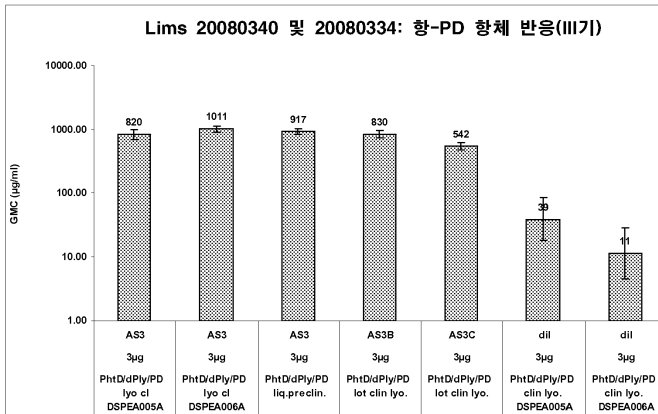
도면13b

H. 인플루엔자에 대한 면역 반응



도면13c

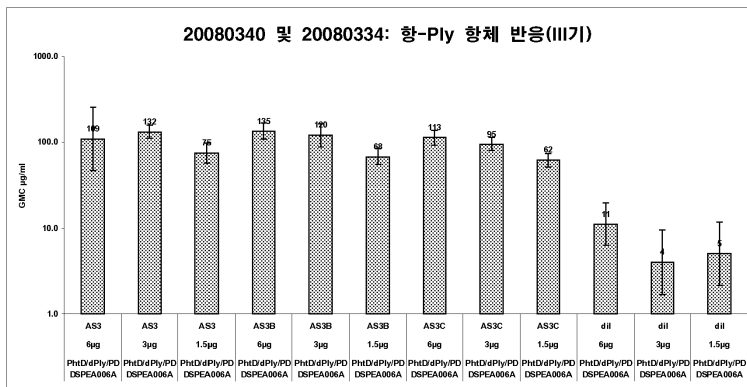
단백질 D에 대한 면역 반응



도면14a

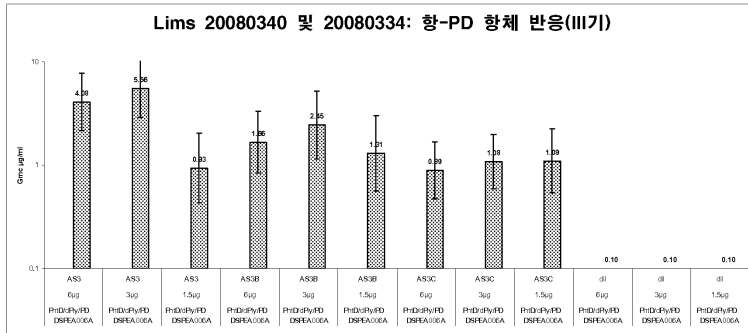
AS03의 상이한 희석액 중의 S. 뉴모니에 단백질에 대한 면역 반응을 보여주는 ELISA 결과

뉴몰리신에 대한 면역 반응



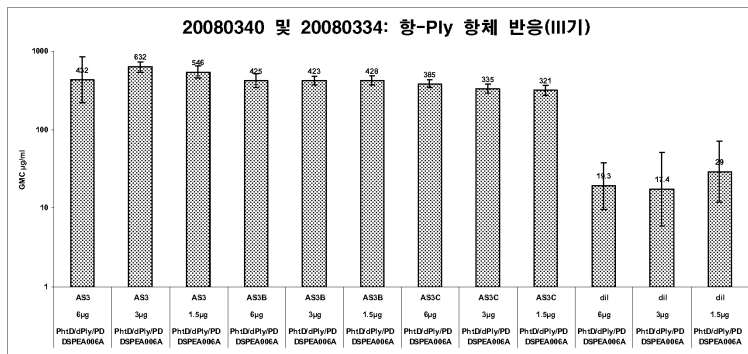
도면14b

H. 인플루엔자에 대한 면역 반응



도면14c

Ph1D에 대한 면역 반응



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A.

<120> Vaccine

<130> VB62920

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Adjuvant

<400> 1

dtccatgacg ttctgacgt t

<210> 2

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Adjuvant
 <400> 2
 dtctcccagc gtgcgcat 19

<210> 3
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Adjuvant
 <400> 3
 daccgatgac gtcgccgtg acggcaccac g 31

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Adjuvant
 <400> 4
 dtcgtcgttt tgcgttttg tcggt 25

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Adjuvant
 <400> 5
 dtccatgacg ttctgatgc t 21

<210> 6
 <211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Adjuvant

<400> 6

dtcgacgttt tcggcgcgcg ccg

23