



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2013년05월29일  
 (11) 등록번호 10-1268790  
 (24) 등록일자 2013년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 39/09 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-7026231(분할)  
 (22) 출원일자(국제) 2011년09월12일  
 심사청구일자 2011년12월02일  
 (85) 번역문제출일자 2011년11월03일  
 (65) 공개번호 10-2011-0132483  
 (43) 공개일자 2011년12월07일  
 (62) 원출원 특허 10-2010-7014638  
 원출원일자(국제) 2011년09월12일  
 심사청구일자 2010년07월30일  
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2001/010570  
 (87) 국제공개번호 WO 2002/22168  
 국제공개일자 2002년03월21일  
 (30) 우선권주장  
 0022742.1 2000년09월15일 영국(GB)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 W01999003884 A2\*  
 W02000037105 A2\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.  
 벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스터튜트 89  
 (72) 발명자  
 헤르만트, 필립  
 벨기에 베-1330 릭센사르트 루 드 레스띠뛰 89 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스. 에이.  
 래퍼리어, 크레이그, 앤토니, 조우지프  
 벨기에 베-1330 릭센사르트 루 드 레스띠뛰 89 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스. 에이.  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 16 항

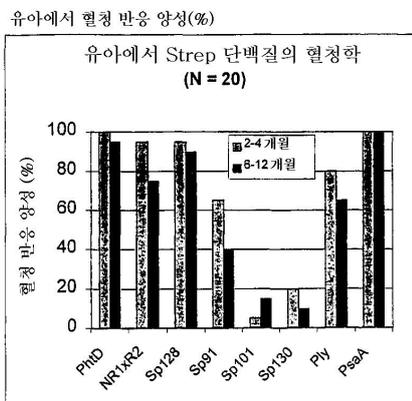
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 **백신**

**(57) 요약**

본 발명은 2 이상의 스트렙토코커스 뉴모니아(Streptococcus pneumoniae) 단백질의 조합물, 그의 제조 방법 및 백신으로서 의약에서의 용도에 관한 것이다. 상기 조합물은 유아 및 노년층의 스트렙토코커스 감염에 대한 보호에 특히 유용하다.

**대표도** - 도1



(72) 발명자

**로베트, 이브스**

벨기에 베-1330 릭센사르 튀 드 레스띠뛰 89 글락  
소스미스클라인 바이올로지칼스 에스. 에이.

**폴맨, 쟈**

벨기에 베-1330 릭센사르 튀 드 레스띠뛰 89 글락  
소스미스클라인 바이올로지칼스 에스. 에이.

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

PhdD 및,

또 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질인 비독화된 뉴몰리신 (Ply)을 선택 및 단리하는 단계; 및

상기 단백질을 제약상 허용되는 담체와 혼합하는 단계

를 포함하는, PhdD 및 또 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질인 비독화된 뉴몰리신을 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 또 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질인 비독화된 뉴몰리신이 화학적으로 비독화된 뉴몰리신인 것인 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 또 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질인 비독화된 뉴몰리신이 유전적으로 비독화된 뉴몰리신인 것인 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, PhdD 및 비독화된 뉴몰리신을 CbpX 패밀리 단백질 CbpA 또는 PspC인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, PhdD 및 비독화된 뉴몰리신을 PspA인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, PhdD 및 비독화된 뉴몰리신을 PsaA인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, PhdD 및 비독화된 뉴몰리신을 Sp128인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 8

제1항에 있어서, PhdD 및 비독화된 뉴몰리신을 Sp101인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 9

제1항에 있어서, PhdD 및 비독화된 뉴몰리신을 Sp130인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 10

제1항에 있어서, PhdD 및 비독화된 뉴몰리신을 Sp125인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

### 청구항 11

제1항에 있어서, PhtD 및 비독화된 뉴몰리신을 Sp133인 추가의 스트렙토코커스 뉴모니에 단백질과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, PhtD 및 비독화된 뉴몰리신을, B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg), 폴리오 바이러스 항원, 모락셀라 카타랄리스 (*Moraxella catarrhalis*) 외부 멤브레인 단백질, 비타입성(non-typeable) 해모필루스 인플루엔자 단백질, 엔. 메닝기티디스 (*N. meningitidis*) B 외부 멤브레인 단백질로 구성되는 군으로부터 선택되는 추가의 항원과 혼합하는 단계를 더 포함하는 면역원 조성물의 제조 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 추가의 항원이 비타입성 해모필루스 인플루엔자 단백질인 면역원 조성물의 제조 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 추가의 항원이 비타입성 해모필루스 인플루엔자의 단백질 D인 면역원 조성물의 제조 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제약상 허용되는 담체가 어쥬번트를 포함하는 것인 면역원 조성물의 제조 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 어쥬번트는 TH1 타입의 반응을 우선적으로 유도하는 인두서인 면역원 조성물의 제조 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 2 이상의 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*) 단백질의 조합물, 그의 제조 방법 및 백신으로서 의약에서의 용도에 관한 것이다. 상기 조합물은 유아 및 노년층의 스트렙토코커스 감염에 대한 보호에 특히 유용하다.

**배경기술**

[0002] 스트렙토코커스 뉴모니에는 침습성 질병, 예를 들어 폐렴, 균혈증 및 뇌막염 및 전이증식 관련 질병, 예를 들어 급성 중이염을 야기하는, 상당한 이환율 및 사망율 (특히 소아 및 노년층에서)의 원인이 되는 그람 양성 세균이다. 미국에서 60세 이상의 사람에 대한 폐렴구균성 폐렴 발생율은 100,000명당 3 내지 8명으로 추정된다. 환자의 20%에서는 균혈증 및 다른 증상, 예를 들어 뇌막염을 야기하고 이에 의한 사망율은 항생제 치료에도 불구하고 30%에 근접한다.

[0003] 폐렴구균은 혈청형 특이성을 부여하는 화학적으로 연결된 폴리사카라이드로 캡슐화된다. 폐렴구균의 90가지의 혈청형이 알려져 있고, 캡슐은 보체(complement)로부터 세균의 내부 표면을 보호할 뿐만 아니라 그 자체의 면역원성이 낮기 때문에 폐렴구균의 주요한 병독성 결정자이다. 폴리사카라이드는 T-독립성 항원이고, 프로세싱되지 않거나 T-세포와 상호작용하는 MHC 분자상에 존재하지 않을 수 있다. 그러나, 이들은 B세포 상의 표면 수용체의 가교결합을 수반하는 교대 메커니즘을 통해 면역계를 자극할 수 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0004] 몇가지의 실험에서 침습성 폐렴구균 질병에 대한 보호는 캡슐 특이적 항체와 가장 큰 관련성이 있고, 상기 보호는 혈청형 특이적이라는 것이 밝혀졌다.

[0005] 스트렙토코커스 뉴모니에는 침습성 세균 질병 및 유아 및 아동의 중이염의 가장 흔한 원인이다. 유사하게, 노

년층도 폐렴구균 백신에 대한 반응이 빈약하고 [Roghmann et al., (1987), J. Gerontol. 42:265-270], 따라서 이들 연령층에서의 세균성 폐렴의 발생율이 증가한다 [Verghese and Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62:271-285].

- [0006] 23가의 비컨쥬게이트된 폐렴구균 백신은 임상 효능이 0% 내지 81%에 이를 정도로 매우 편차가 심한 것으로 밝혀졌다 (Fedson et al. (1994) Arch Intern Med. 154:2531-2535). 상기 효능은 노년층과 같은 면역처리 위험군, Hodgkin 질병, 비장 제거술, 겸상적혈구병 및 감마글로불린혈증 (Fine et al. (1994) Arch Intern Med. 154:2666-2677) 및 상기 질병 증상에 관련된 것으로 보인다. 상기 23가 백신은 폐렴구균성 폐렴 (노년층과 같은 특정 고위험군) 및 중이염에 대한 보호 효과를 보이지 않는다.
- [0007] 유아의 상기 면역원성의 결여를 극복하기 위해 고안된 전략은 큰 면역원성 단백질에 폴리사카라이드를 연결하여 방관자인 T-세포의 도움을 제공하고 컨쥬게이트되는 폴리사카라이드 항원에 대한 면역학적 기억을 유도하는 것을 포함한다.
- [0008] 그러나, 개선된 폐렴구균 백신 조성물, 특히 노년층 및 아동에서 폐렴구균성 질병 (특히 폐렴)의 예방 또는 치료에 보다 효과적인 조성물에 대한 필요성이 존재한다.
- [0009] 본 발명은 상기와 같은 개선된 백신을 제공한다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] <발명의 개요>
- [0011] 한 특징에서, 본 발명은 폴리히스티딘 트리아드 패밀리 (PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리 (CbpX), CbpX 트린케이트, LytX 패밀리, LytX 트린케이트, CbpX 트린케이트-LytX 트린케이트 키메라 단백질, 뉴몰리신 (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 및 Sp133으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 2 이상의 에스. 뉴모니에 단백질을 포함하는 면역원 조성물을 제공한다. 한 바람직한 실시태양에서, 단백질 중의 하나는 폴리히스티딘 트리아드 패밀리 (PhtX)로부터 선택된다. 다른 바람직한 실시태양에서, 단백질 중의 하나는 콜린 결합 단백질 패밀리 (CbpX) 또는 CbpX 트린케이트, 또는 CbpX 트린케이트-LytX 트린케이트 키메라 단백질이다.
- [0012] 관련 실시태양에서, 본 발명은 유아의 중이염 또는 노년층의 폐렴의 치료 또는 개선용 백신을 제공한다. 임의로, 백신은 바람직하게는 TH1 반응 인두서인 어쥬번트를 추가로 포함한다.
- [0013] 다른 관련 실시태양에서, 2개의 상이한 에스. 뉴모니에 단백질을 선택 및 단리하여 제약상 허용되는 단체와 혼합하여 본 발명의 백신을 제조하는 방법이 제공된다.
- [0014] <발명의 상세한 설명>
- [0015] 본 발명은 폐렴구균 단백질을 기초로 한 방법에 의해 노년층의 폐렴구균성 감염 (예를 들어 폐렴) 및(또는) 유아의 폐렴구균성 감염 (예를 들어 중이염)의 예방 또는 치료를 위한 개선된 백신을 제공한다. 한 바람직한 실시태양에서, 백신은 노년층의 폐렴구균성 감염의 예방 또는 치료에 적합하다. 대부분의 성인은 스트렙토코커스 뉴모니에 노출되어 있기 때문에, 본 발명의 백신은 본 발명에서 확인된 2 이상의 폐렴구균 단백질을 투여함으로써 청년층 및 장년층에서 면역 반응을 보호 수준으로 부스팅하는 기능을 갖는다. 폐렴구균 단백질은 에스. 뉴모니에 폴리사카라이드의 부재하에 투여된다.
- [0016] 본 발명에서 환자는 55세 이상, 일반적으로 60세 이상, 보다 일반적으로는 65세 이상인 경우 노년층으로 간주한다. 따라서, 일 실시태양에서 본 발명은 노년층에서 폐렴 예방을 위한, 폐렴구균 단백질을 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0017] 다른 실시태양에서 본 발명은 본 발명에서 확인된 2 이상의 폐렴구균 단백질을 포함하는, 유아 (일반적으로 0 내지 2세)에 사용하기 적합한 백신 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 폐렴구균 단백질
- [0019] 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니에 단백질은 폐렴구균의 적어도 일부의 생활 주기 동안 표면에 노출되거나 폐렴구균에 의해 분비 또는 방출되는 단백질이다. 바람직하게는, 본 발명의 단백질의 조합물은 LXXC (X는 임의의 아미노산임)의 타입 II 시그널 서열 모티브를 갖는 단백질 (예를 들어 폴리히스티딘 트리아드 패밀리 (PhtX), 콜린 결합 단백질 (CbpX), 타입 I 시그널 서열 모티브를 갖는 단백질 (예를 들어 Sp101), LPXTG 모티브 (X는 임의의 아미노산임)를 갖는 단백질 (예를 들어 Sp128, Sp130), 독신 (예를 들어 Ply) 등과 같은 2개 이상의 상이

한 카테고리로부터 선택된다. 상기 카테고리 (또는 모티브) 내의 바람직한 예는 하기 단백질 또는 그의 면역학적 기능 균등체이다.

[0020] 본 발명의 면역원 조성물은 폴리히스티딘 트리아드 패밀리 (PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리 (CbpX), CbpX 트런케이트, LytX 패밀리, LytX 트런케이트, CbpX 트런케이트-LytX 트런케이트 키메라 단백질 (또는 융합체), 뉴몰리신 (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 및 Sp133으로 이루어지는 군 중에서 선택되는 2 이상의 단백질을 포함한다.

[0021] 그러나, CbpX가 PspC일 경우, 제2 단백질은 PspA 또는 PsaA가 아니다. 바람직하게는, 상기 면역원 조성물은 폴리히스티딘 트리아드 패밀리 (PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리 (CbpX), CbpX 트런케이트, LytX 패밀리, LytX 트런케이트, CbpX 트런케이트-LytX 트런케이트 키메라 단백질 (또는 융합체), 뉴몰리신 (Ply), PspA, PsaA 및 Sp128로 이루어지는 군 중에서 선택되는 2 이상의 단백질을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 면역원 조성물은 폴리히스티딘 트리아드 패밀리 (PhtX), 콜린 결합 단백질 패밀리 (CbpX), CbpX 트런케이트, LytX 패밀리, LytX 트런케이트, CbpX 트런케이트-LytX 트런케이트 키메라 단백질 (또는 융합체), 뉴몰리신 (Ply) 및 Sp128로 이루어지는 군 중에서 선택되는 2 이상의 단백질을 포함한다.

[0022] Pht (폴리히스티딘 트리아드) 패밀리는 단백질 PhtA, PhtB, PhtD 및 PhtE를 포함한다. 상기 패밀리는 지질화 서열, 프롤린 풍부 영역에 의해 분리된 2개의 도메인 및 가능하게는 금속 또는 뉴클레오타이드 결합 또는 효소 활성에 관련된 수개의 히스티딘 트리아드, (3-5) 코일드-코일(coiled-coil) 영역, 보존된 N-말단 및 이중성 C 말단에 의해 특징지어진다. 이 패밀리는 시험된 모든 폐렴구균 균주에 존재한다. 상동성 단백질도 다른 스트렙토코커스 및 네이세리아(Neisseria)에서 발견되었다. 바람직한 상기 패밀리의 멤버는 PhtA, PhtB 및 PhtD를 포함한다. 보다 바람직하게는, PhtA 또는 PhtD를 포함한다. 그러나, 용어 Pht A, B, D, 및 E는 아래에서 인용된 문헌에 개시된 서열을 갖는 단백질 및 언급된 단백질과 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 그의 천연 (및 인공) 변이체를 의미하는 것으로 이해된다. 바람직하게는, 95% 이상, 가장 바람직하게는 97% 이상 동일하다.

[0023] Pht 단백질의 경우, PhtA는 WO 98/18930에 개시되어 있고, Sp36로도 언급된다. 상기한 바와 같이, 이는 폴리히스티딘 트리아드 패밀리의 단백질이고, LXXC의 타입 II 시그널 모티브를 갖는다.

[0024] PhtD는 WO 00/37105에 개시되어 있고, Sp036D로도 언급된다. 상기한 바와 같이, 이는 폴리히스티딘 트리아드 패밀리의 단백질이고, 타입 II LXXC 시그널 모티브를 갖는다.

[0025] PhtB는 WO 00/37105에 개시되어 있고, Sp036B로도 언급된다. PhtB 패밀리의 다른 멤버는 WO 00/17370에 개시된 C3-분해 폴리펩티드이다. 이 단백질도 폴리히스티딘 트리아드 패밀리에 속하고, 타입 II LXXC 시그널 모티브를 갖는다. 바람직한 면역학적 기능 균등체는 WO 98/18930에 개시된 단백질 Sp42이다. PhtB 트런케이트 (약 79kD)는 W099/15675에 개시되어 있고, 이 역시 PhtX 패밀리로 간주된다.

[0026] PhtE는 W000/30299에 개시되어 있고, BVH-3으로 언급된다.

[0027] 콜린 결합 단백질 패밀리 (CbpX)에 있어서, 패밀리의 멤버는 콜린 친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는 폐렴구균 단백질로서 처음 확인되었다. 모든 콜린 결합 단백질은 세포벽 테이코산 및 멤브레인 연관 리포테이코산의 포스포릴콜린 잔기에 비공유결합에 의해 결합된다. 구조적으로, 이들은 전체 패밀리에 걸쳐 공통적인 몇개의 영역을 갖지만, 이 단백질의 특성 (아미노산 서열, 길이 등)은 상이할 수 있다. 일반적으로, 콜린 결합 단백질은 N 말단 영역 (N), 보존 반복 영역 (R1 및(또는) R2), 프롤린 풍부 영역 (P) 및 상기 단백질의 약 1/2을 포함하는, 다중 반복체로 이루어진 보존된 콜린 결합 영역 (C)을 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "콜린 결합 단백질 패밀리 (CbpX)"는 WO 97/41151에서 확인된 콜린 결합 단백질 PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD 및 CbpG로 이루어진 군 중에서 선택된다. CbpA는 WO 97/41151에 개시되어 있다. CbpD 및 CbpG는 WO 00/29434에 개시되어 있다. PspC는 WO 97/09994에 개시되어 있다. PbcA는 WO 98/21337에 개시되어 있다. SpsA는 WO 98/39450에 개시되어 있는 콜린 결합 단백질이다. 바람직하게는, 콜린 결합 단백질은 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 이루어진 군 중에서 선택된다.

[0028] 또다른 바람직한 실시태양은 "CbpX"가 상기 정의한 바와 같고 "트런케이트"가 콜린 결합 영역(C)의 50% 이상이 결여된 CbpX 단백질을 의미하는 CbpX 트런케이트이다. 바람직하게는, 상기 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 결여된 것이다. 보다 바람직하게는, 상기 단백질 트런케이트에는 (i) 콜린 결합 영역 및 (ii) 상기 단백질의 N-말단 절반의 일부가 결여되어 있지만, 하나 이상의 반복체 영역 (R1 또는 R2)는 존재한다. 보다 더 바람직하게는, 상기 트런케이트는 2개의 반복 영역 (R1 및 R2)를 갖는다. 상기 바람직한 예는 W099/51266 또는 W099/51188에 개시된 NR1xR2 및 R1xR2이지만, 유사한 콜린 결합 영역이 결여된 다른 콜린 결합 단백질도 본 발

명의 범위 내에 포함된다.

- [0029] LytX 패밀리는 세포 용해(lysis)와 관련된 멤브레인 관련 단백질이다. N-말단 도메인은 콜린 결합 도메인(들)을 포함하지만, LytX 패밀리는 상기한 CbpX 패밀리에서 발견되는 모든 특징을 갖는 것은 아니기 때문에, 본 발명에 있어서 LytX 패밀리는 CbpX 패밀리와는 별개의 것으로 간주된다. CbpX 패밀리와는 달리, C-말단 도메인은 LytX 단백질 패밀리의 촉매 활성 도메인을 포함한다. 이 패밀리는 LytA, B 및 C를 포함한다. LytX 패밀리에 있어서, LytA는 문헌 [Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987)]에 개시되어 있다. LytB는 WO 98/18930에 개시되어 있고, Sp46으로도 언급된다. LytC는 WO 98/18930에 개시되어 있고, Sp91로도 언급된다. 상기 패밀리의 바람직한 멤버는 LytC이다.
- [0030] 또다른 바람직한 실시태양은 "LytX"가 상기 정의한 바와 같고 "트런케이트"가 콜린 결합 영역의 50% 이상이 결여된 단백질을 의미하는 LytX 트런케이트이다. 바람직하게는, 상기 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 결여된 것이다. 상기 트런케이트의 예는 본 발명의 실시예에서 확인할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또다른 바람직한 실시태양은 CbpX 트런케이트-LytX 트런케이트 키메라 단백질 (또는 융합체)이다. 바람직하게는, 상기 단백질은 CbpX의 NR1xR2 (또는 R1xR2) 및 LytX의 C-말단 부분 ("Cterm", 즉 콜린 결합 도메인이 결여됨, 예를 들어 LytCCterm 또는 Sp91Cterm)을 포함한다. 보다 바람직하게는, CbpX는 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 이루어진 군 중에서 선택된다. 보다 더 바람직하게는, 상기 단백질은 CbpA이다. 바람직하게는, LytX는 LytC (Sp91로도 언급됨)이다.
- [0032] 본 발명의 또다른 실시태양은 콜린 결합 도메인 (C)가 결여되고 LytX와의 융합 단백질로서 발현되는 PspA 또는 PsaA 트런케이트이다. 바람직하게는 LytX는 LytC이다.
- [0033] 뉴몰리신은 특유의 세포 용해 (용혈) 및 보체 활성화 활성을 갖는 다기능성 독신이다 (Rubins et al., Am . Respi. Cit Care Med, 153:1339-1346 (1996)). 상기 독신은 폐렴구균에 의해 분비되지 않지만, 오토리신의 영향 하에서 폐렴구균의 용해시에 방출된다. 그의 효과는 예를 들어 인간 단핵세포에 의한 염증성 시토킨의 생성 자극, 인간 호흡 상피상의 섬모의 운동 억제 및 호중구의 살균 활성 및 이동 저하를 포함한다. 뉴몰리신의 가장 명백한 효과는 콜레스테롤에 결합하는 것을 수반하는 적혈구의 용해시에 나타난다. 뉴몰리신은 독신이기에 때문에, 체내에 투여되기 전에 비독성화 (즉, 보호에 적합한 투여량으로 제공될 때 인체에 비독성)될 필요가 있다. 야생형 또는 천연 뉴몰리신의 발현 및 클로닝은 당업계에 공지되어 있다 [예를 들어 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) 참조]. Ply의 비독성화는 화학적 수단, 예를 들어 포르말린 또는 글루타르알데히드 처리 또는 이들의 조합 처리에 의해 수행될 수 있다. 상기 방법은 상이한 독신에 대해 당업계에 공지되어 있다. 별법으로, Ply는 유전적으로 비독성화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 예를 들어 돌연변이 단백질일 수 있는 폐렴구균 단백질의 유도체를 포함한다. 용어 "돌연변이"는 부위 지정 돌연변이에 대해 공지된 기술 또는 다른 임의의 종래의 방법을 사용하여 하나 이상의 아미노산이 결실, 부가 또는 치환된 분자를 의미하는 것으로 본원에서 사용된다. 예를 들어, 상기한 바와 같이, 변이체 Ply 단백질은 생물학적으로 불활성이면서 그의 면역원 에피토프를 유지하도록 변형될 수 있다 (예를 들어, WO 90/06951, Berry et al. (Infect Immun, 67:981-985 (1999) 및 W099/03884 참조).
- [0034] 본원에서 사용된 용어 "Ply"는 의료 용도에 적합한 돌연변이되거나 비독성화된 뉴몰리신을 의미하는 것으로 이해된다.
- [0035] PsaA 및 PspA에 있어서, 이들은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, PsaA 및 그의 트랜스멤브레인 결실 변이체는 문헌 (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64(12):5255-62)에 기재되어 있다. PspA 및 그의 트랜스멤브레인 결실 변이체는 US 5804193, WO 92/14488 및 WO 99/53940에 기재되어 있다.
- [0036] Sp128 및 Sp130은 WO 00/76540에 기재되어 있다.
- [0037] Sp125는 LPXTG (X는 임의의 아미노산임)의 세포벽에 앵커링된 모티프를 갖는 폐렴구균 표면 단백질의 예이다. 상기 모티프를 갖는 폐렴구균 표면 단백질의 상기 클래스 내의 임의의 단백질은 본 발명에서 유용한 것으로 밝혀졌고, 따라서 본 발명의 추가의 단백질로 간주된다. Sp125 자체는 WO 98/18930에 개시되어 있고, ZmpB (아연 메탈로프로테이나제)로도 언급된다.
- [0038] Sp101은 WO 98/06734 (#y85993로 언급됨)에 개시되어 있다. 이것은 타입 I 시그널 서열에 의해 특징지워진다.
- [0039] Sp133은 WO 98/06734 (#y85992로 언급됨)에 개시되어 있다. 이도 역시 타입 I 시그널 서열에 의해 특징지워진다.

다.

- [0040] 본 발명의 단백질은 유리하게 조합될 수 있다. 바람직한 조합물은 PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm 키메라 또는 융합 단백질, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm 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 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는, NR1xR2 (또는 R1xR2)는 CbpA 또는 PspC로부터 유래한다. 보다 바람직하게는, CbpA로부터 유래한다.
- [0041] 페렴구균 단백질의 특히 바람직한 조합물은 Ply (또는 그의 트런케이트 또는 면역학적 기능 균등체) + PhtD (또는 그의 트런케이트 또는 면역학적 기능 균등체) + NR1xR2 (또는 R1xR2)를 포함한다. 바람직하게는, NR1xR2 (또는 R1xR2)는 CbpA 또는 PspC로부터 유래한다. 보다 바람직하게는, CbpA로부터 유래한다.
- [0042] 또한, 본 발명은 본 발명의 단백질의 "면역학적 기능 균등체(들)"를 포함한다. "면역학적 기능 균등체"는 본 발명의 단백질의 하나 이상의 보호 에피토프를 포함하는 펩티드 또는 단백질로서 정의된다. 상기 에피토프는 표면 노출되고, 보존도가 높고, 숙주에서 멸균 항체 반응을 유도하거나 독성 효과를 억제할 수 있는 특징을 갖는다. 바람직하게는, 기능 균등체는 본 발명의 단백질의 15개 이상, 바람직하게는 30개 이상의 연속하는 아미노산을 갖고, 천연 단백질과 실질적으로 동일한 면역 반응을 유도할 수 있다면 사용될 수 있다. 단백질 서열 내의 효능있는 B-세포 에피토프의 위치는 두가지 방법, 즉 2차원 구조 예측 및 항원 지수 예측을 조합하여 표면 노출되고 항원성인 펩티드를 확인함으로써 용이하게 결정할 수 있다. 2차원 구조 예측은 PSIPRED 프로그램 (David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK)을 사용하여 수행할 수 있다. 항원 지수는 문헌 [Jameson and Wolf, CABIOS 4:181-186 (1988)]에 기재된 방법을 기초로 하여 계산할 수 있다.
- [0043] 본 발명은 다중 에스. 뉴모니에 단백질 (면역원) 조성물이 많은 혈청형 사이의 보다 큰 교차 보호를 제공하고, 부착 및 콜로니 형성을 추가로 억제할 수 있고, 병원체의 독성/효소 활성을 중화시킬 수 있는 항체를 효과적으로 증가시킬 수 있기 때문에 에스. 뉴모니에 폴리사카라이드 백신에 대해 잇점을 갖는다. 또한, 추가의 표면 항원은 흡소노파고사이토시스(opsonophagocytosis)를 자극하는 수단을 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상이한 병원체에 대해 보호 작용을 하는 조합 백신을 포함한다. 많은 소아 백신은 현재 아동에게 주사 횟수를 줄이기 위해 조합 백신으로서 투여되고 있다. 따라서, 소아 백신을 위해 다른 병원체로부터의 다른 항원을 본 발명의 백신과 함께 제제화할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 백신은 디프테리아 독소이드 (DT), 파상풍 독소이드 (TT) 및 백일해 성분 [일반적으로 탈독소화 백일해 독소이드 (PT) 및 필라멘트상 해마글루티닌 (FHA)와 임의의 퍼탁틴 (PRN) 및(또는) 아글루티닌 1+2]을 포함하는 공지의 '3가' 조합 백신, 예를 들어 DT, TT, PT, FHA 및 PRN 항원을 포함하는 시판 백신 INFANRIX-DTPa™ (SmithKline Beecham Biologicals), 또는 전체 세포 백일해 성분, 예를 들어 SmithKline Beecham Biologicals s.a.에서 시판하는 Tritanrix™와 함께 제제화할 수 있다 (또는 별개로 제제화되어 동시에 투여될 수 있다). 또한, 조합 백신은 다른 항원, 예를 들어 B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg), 폴리오 바이러스 항원 (예를 들어 불활성화된 3가 폴리오 바이러스-IPV), 모락셀라 카타랄리스 (Moraxella catarrhalis) 외부 멤브레인 단백질, 비타입성(non-typeable) 해모필루스 인플루엔자 단백질, 엔. 메닝기티디스 (meningitidis) B 외부 멤브레인 단백질을 포함할 수 있다.
- [0045] 조합 백신 (특히 중이염 예방을 위한)에 포함될 수 있는 바람직한 모락셀라 카타랄리스 단백질 항원의 예는 OMP106 [WO 97/41731 (Antex) 및 WO 96/34960 (PMC)], OMP21, LbpA 및(또는) LbpB [WO 98/55606 (PMC)], TbpA 및(또는) TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)], CopB [Helminen ME, et al. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010], UspA1 및(또는) UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)], OmpCD, HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB 9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), D15 (PCT/EP99/03822), Omp1A1 (PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257) 및 OmpE이다. 조합 백신 (특히 중이염 예방을 위한)에 포함될 수 있는 비타입성 해모필루스 인플루엔자 항원의 예는 펄브린(Fimbrin) 단백질 [미국 특허 제5,766,608호 - Ohio State Research Foundation] 및 이로부터 유래한 펩티드를 포함하는 융합체 [예를 들어 LBI(f) 펩티드 융합체, US 5843464 (OSU) 또는 WO 99/64067], OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)], P6 [EP 281673 (State University of New York)], TbpA 및(또는) TbpB, Hia, Hsf, Hin47, Hif, Hmw1, Hmw2, Hmw3, Hmw4, Hap, D15 (WO 94/12641), 단백질 D (EP 594610), P2 및 P5 (WO 94/26304)를 포함한다.

- [0046] 또다른 실시태양에서, 상기 언급된 상이한 항원이 세균에서 유래한 외부 멤브레인 베지클 (blebs) 표면에 존재하는 항원으로서 본 발명의 면역원 조성물에 포함될 수 있다.
- [0047] 다른 조합물은 본 발명의 에스. 뉴모니아 단백질과 예를 들어 인플루엔자로부터의 바이러스 항원 (약독화, 분할 또는 서브유닛 [예를 들어, 표면 당단백질 뉴라미니다제 (NA) 및 헤마글루티닌 (HA), 예를 들어 Chaloupka I. et al, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127 참조]), RSV (예를 들어, F 및 G 항원 또는 F/G 융합체, 예를 들어 Schmidt A. C. et al, J Virol, May 2001, p. 4594-4603 참조), PIV3 (예를 들어 HN 및 F 단백질, Schmidt 등의 상기 문헌 참조), 바리셀라 (예를 들어 약독화 당단백질 I-V 등), 및 임의의 (또는 모든) MMR (홍역, 이하선염, 풍진)의 성분(들)의 조합물이다.
- [0048] 본 발명의 폴리사카라이드 항원
- [0049] 또한, 본 발명은 에스. 뉴모니아 이외의 다른 세균으로부터 유래한 폴리사카라이드와 조합된 2 이상의 에스. 뉴모니아 단백질을 포함하는 조합 백신을 포함한다. 상기 폴리사카라이드는 예를 들어 에이취. 인플루엔자 (*H. influenzae*), 에이취. 인플루엔자 타입 B (Hib), 엔. 메닝기티디스 그룹 A, C, W, Y, 에스. 뉴모니아 이외의 스트렙토코커스 (예를 들어 그룹 B 스트렙토코커스, 에스. 피오게네스 (*pyogenes*) 등), 스태필로코커스 (*Staphylococcus*) (예를 들어, 에스. 아우레우스 (*aureus*), 에스. 에피더미디스 (*epidermidis*)), 이. 콜라이 (*E. coli*), 엔테로코커스 (*Enterococcus*) (예를 들어 이. 패칼리스 (*faecalis*) 및 이. 패쿰 (*faecium*)) 등으로부터 단리할 수 있다. 바람직하게는, 상기 폴리사카라이드는 에이취. 인플루엔자 타입 B (Hib) 및(또는) 엔. 메닝기티디스 그룹 A, C, W135 및(또는) Y이다.
- [0050] 상이한 바와 같이, 백신 처리에 폴리사카라이드를 사용할 경우 발생하는 문제는 폴리사카라이드 자체의 면역원성이 낮다는 것이다. 이를 극복하기 위해, 폴리사카라이드는 단백질 캐리어에 컨쥬게이트되어 방관자 T-세포가 도울 수 있도록 만들 수 있다. 따라서, 본 발명에 이용되는 폴리사카라이드는 상기 단백질 캐리어에 연결되는 것이 바람직하다. 폴리사카라이드 면역원 제조에 통상 사용되는 상기 캐리어의 예는 디프테리아 및 파상풍 독소이드 (각각 DT, DT CRM197, 다른 DT 변이체, 예를 들어 위치 Glu-148 등 [예를 들어 미국 특허 제4,709,017호, W093/25210, W095/33481 등 참조] 및 TT (및 TT 단편 C)), 키홀 림펫 헤모시아닌 (Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH)), 엔. 메닝기티디스 유래의 OMPC 및 튜베르쿨린 (Tuberculin)의 정제된 단백질 유도체 (PPD)를 포함한다.
- [0051] 페럼구균 폴리사카라이드 기재 면역원 조성물 (또는 백신)을 위한 바람직한 캐리어는 해모필루스 인플루엔자 유래의 단백질 D (EP 594610-B) 또는 그의 단편이다. 사용하기 적합한 단편은 T 헬퍼 에피토프를 포함하는 단편을 포함한다. 특히, 단백질 D 단편은 단백질의 N 말단의 1/3을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0052] 상기 폴리사카라이드는 임의의 공지된 방법에 의해 캐리어 단백질에 연결될 수 있다 (예를 들어 Likhite의 미국 특허 제4,372,945호 및 Armor 등의 미국 특허 제4,474,757호). 바람직하게는, CDAP 컨쥬게이션이 수행된다 (WO 95/08348). 면역원성을 증강시키기 위해서, 폴리사카라이드는 사이징 처리 (탈중합), 어쥬먼트 처리, 동결 건조되거나 상이한 캐리어 단백질에 컨쥬게이트될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 TH1 어쥬먼트
- [0054] 본 발명의 백신은 어쥬먼트를 포함하는 것이 바람직하다. 적합한 어쥬먼트는 알루미늄염, 예를 들어 수산화알루미늄 겔 (alum) 또는 인산알루미늄을 포함하고, 칼슘, 마그네슘, 철 또는 아연의 염일 수도 있거나, 아실화 티로신 또는 아실화 당, 폴리사카라이드의 양이온 또는 음이온 유도체 또는 폴리포스파젠의 불용성 현탁액일 수도 있다.
- [0055] 어쥬먼트는 TH1 타입의 반응을 우선적으로 유도하는 인두서인 것을 선택하는 것이 바람직하다. 높은 수준의 TH1 타입 시토킨은 제시된 항원에 대한 세포 매개 면역 반응을 유도하는 경향이 있고, 높은 수준의 TH2 타입 시토킨은 항원에 대한 체액성 면역 반응을 유도하는 경향이 있다.
- [0056] TH1과 TH2 타입 면역반응의 구별이 절대적이지 않다는 것을 유의하는 것이 중요하다. 실제로, 개체는 TH1이 우세하거나 또는 TH2가 우세한 것으로 설명되는 면역 반응을 지지할 것이다. 그러나, 무린 CD4 +ve T 세포 클론에서 설명된 바와 같은 측면에서 시토킨 패밀리로 간주하는 것이 종종 편리하다 [Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173]. 전통적으로, TH1 타입 반응은 T-림프구에 의한 INF- $\gamma$  및 IL-2 시토킨의 생성에 관련된다. 종종 TH1 타입 면역 반응 유도에 직접 관련된 다른

시토킨, 예를 들어 IL-12은 T-세포에 의해 생성되지 않는다. 이와 대조적으로, TH2 타입 반응은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10의 분비와 관련된다. TH1 반응을 우세하게 촉진하는 적합한 어쥬번트 시스템은 모노포스포릴 리피드 A 또는 그의 유도체, 특히 3-테-O-아실화 모노포스포릴 리피드 A (3D-MPL) (이의 제조는 GB 2220211 A 참조), 및 모노포스포릴 리피드 A, 바람직하게는 3-테-O-아실화 모노포스포릴 리피드 A와 알루미늄염 (예를 들어 인산알루미늄 또는 수산화알루미늄)의 조합물 또는 수중유 에멀전을 포함한다. 상기 조합물에서, 항원 및 3D-MPL은 동일한 입자 구조에 포함되어 항원 및 면역 자극 시그널의 보다 효율적인 전달을 가능하게 한다. 여러 연구는 3D-MPL이 alum-흡착 항원의 면역원성을 추가로 증강시킬 수 있음을 보여주었다 [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708-14, EP 689454-B1].

[0057] 증강된 시스템은 모노포스포릴 리피드 A와 사포닌 유도체의 조합물, 특히 WO 94/00153에 개시된 QS21과 3D-MPL의 조합물 또는 WO 96/33739에 개시된 QS21이 콜레스테롤로 켄칭된 반응원성이 낮은 조성물을 포함한다.

[0058] 수중유 에멀전 내의 QS21, 3D-MPL 및 토코페롤을 포함하는 특히 효능있는 어쥬번트 제제는 WO 95/17210에 기재되어 있고, 바람직한 제제이다.

[0059] 바람직하게는, 백신은 사포닌, 보다 바람직하게는 QS21을 추가로 포함한다. 또한, 제제는 수중유 에멀전 및 토코페롤을 포함할 수 있다 (WO 95/17210).

[0060] 또한, 본 발명은 본 발명의 단백질을 제약상 허용되는 부형제, 예를 들어 3D-MPL과 혼합하는 것을 포함하는 백신 제제의 제조 방법을 제공한다.

[0061] 비메틸화 CpG 함유 올리고뉴클레오티드(WO 96/02555)도 TH1 반응의 우선적인 인두서이고, 본 발명에 사용하기 적합하다.

[0062] 본 발명의 한 특징에서, 본원에서 개시된 백신의 의약에서의 용도가 제공된다. 한 실시태양에서, 본 발명의 유효량의 안전한 백신 및 임의로 TH1 어쥬번트를 장년층 환자에게 투여하는 것을 포함하는 상기 장년층의 폐렴 예방 또는 치료 방법이 제공된다.

[0063] 다른 실시태양에서, 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질 및 임의로 TH1 어쥬번트를 포함하는, 유효량의 안전한 백신을 유아 (24개월 이하) 또는 소아 (일반적으로 24개월 내지 5세)에게 투여하는 것을 포함하는 상기 유아 또는 소아의 중이염의 예방 또는 치료 방법이 제공된다.

[0064] **본 발명의 백신 제제**

[0065] 본 발명의 백신 제제는 전신계 또는 점막 경로를 통한 투여에 의해 감염에 취약한 포유동물 (바람직하게는 인간 환자)의 보호 또는 치료에 사용될 수 있다. 상기 투여는 근내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통해 또는 구강/소화, 호흡, 비노생식기로의 점막 투여를 통한 주사를 포함할 수 있다. 폐렴 또는 중이염 치료를 위한 백신의 비내 투여가 바람직하다 (폐렴구균의 비강인두 존재를 보다 효과적으로 억제하여 그의 초기 단계에서 감염을 완화시킴). 본 발명의 백신을 단일 투여로 투여할 수 있지만, 그 성분을 동일한 시간에 또는 상이한 시간에 함께 투여할 수도 있다 (예를 들어 폴리사카라이드가 백신에 존재할 경우 서로에 대해 면역 반응의 최적 협력을 위해 세균 단백질 조합물의 투여와 동시에 또는 상기 성분 투여 1 내지 2주 후에 별개로 투여될 수 있다). 단일 투여 경로 이외에, 2개의 상이한 투여 경로를 사용할 수 있다. 예를 들어, 임의의 바이러스 항원은 ID (피내) 투여될 수 있고, 세균 단백질은 IM (근내) 또는 IN (비내) 투여될 수 있다. 폴리사카라이드는 IM (또는 ID) 투여될 수 있고, 세균 단백질은 IN (또는 ID) 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 백신은 프라이밍(priming) 투여는 IM 투여로, 부스터(booster) 투여는 IN으로 투여할 수 있다.

[0066] 각 백신 투여량 내의 킨주게이트 항원의 양은 일반적인 백신에서 유의한 부작용이 발생하지 않으면서 면역보호 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 상기 양은 사용되는 특정 면역원의 종류 및 이의 제시 방법에 따라 결정될 것이다. 일반적으로, 백신내 단백질 항원의 양은 1 - 100  $\mu$ g, 바람직하게는 5 - 50  $\mu$ g, 가장 일반적으로는 5 - 25  $\mu$ g을 포함할 것으로 예상된다. 폴리사카라이드가 포함될 경우, 각 투여량은 0.1 - 100  $\mu$ g, 바람직하게는 0.1 - 50  $\mu$ g, 보다 바람직하게는 0.1 - 10  $\mu$ g, 가장 바람직하게는 1 - 5  $\mu$ g의 폴리사카라이드를 포함할 것으로 예상된다.

[0067] 특정 백신에서 성분의 최적량은 개체의 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 초기 백신 처리 후에 개체에 대해 1회 또는 적절한 시간 간격으로 수회의 부스터 면역처리를 실시할 수 있다. 일반적으로, 백신은 항원 (단백질), 어쥬번트 및 부형제 또는 제약상 허용되는 담체를 포함할 것이다.

[0068] 백신 제제는 문헌 [Vaccine Design, "The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M.

J.) (1995) Plenum Press New York])에 기재된 바와 같이 일반적으로 제조된다. 리포솜 내 캡슐화는 Fullerton의 미국 특허 제4,235,877호에 기재되어 있다.

[0069] 본 발명의 백신을 임의의 경로로 투여할 수 있지만, 상기 백신의 피부내 (ID) 투여는 본 발명의 한 실시태양이다. 인간 피부는 표피 위에 존재하는 각질층으로 불리는 외부 "각질" 큐티클을 포함한다. 상기 표피 아래와 피하조직 위에 존재하는 진피로 불리는 층이 존재한다. 백신을 피부, 특히 진피내로 주사하면 많은 추가의 잇점과 관련될 수 있는 면역 반응이 자극된다는 것이 밝혀졌다. 본원에 개시된 백신을 사용한 피내 백신 처리는 본 발명의 바람직한 특징이다.

[0070] 통상의 피내 주사 기술인 "망투 (mantoux) 방법"은 피부를 세정한 후 한손으로 신장시키면서 좁은 게이지 바늘 (26-31 게이지) 위쪽에 존재하는 베벨(bevel)을 사용하여 10 내지 15도의 각도로 삽입하는 것을 포함한다. 바늘의 베벨이 삽입된 후에, 바늘의 배럴을 낮게 위치시킨 후 다시 전진시키면서 경미한 압력을 제공하여 피부 아래로부터 상승시킨다. 이어서, 액체를 매우 서서히 주사하여 피부 표면에 수포 또는 혹을 형성시키고, 바늘을 서서히 빼낸다.

[0071] 보다 최근에는, 피부 내로 또는 피부를 통하여 액체 약물을 투여하도록 고안된 장치가 문헌에 기재되어 있고, 예를 들어 WO 99/34850 및 EP 1092444에 기재된 장치, WO 01/13977, 미국 특허 제5,480,381호, 제5,599,302호, 제5,334,144호, 제5,993,412호, 제5,649,912호, 제5,569,189호, 제5,704,911호, 제5,383,851호, 제5,893,397호, 제5,466,220호, 제5,339,163호, 제5,312,335호, 제5,503,627호, 제5,064,413호, 제5,520,639호, 제4,596,556호, 제4,790,824호, 제4,941,880호, 제4,940,460호, WO 97/37705 및 WO 97/13537에 기재된 제트 주사 장치가 사용된다. 백신 제제의 다른 피내 투여 방법은 통상의 주사기 및 바늘, 또는 고체 백신의 발사체성 전달 (ballistic delivery)을 위해 고안된 장치 (WO 99/27961), 또는 경피 패치 (WO 97/48440, WO 98/28037)를 포함할 수 있거나 또는 피부 표면에 사용될 수 있다 (경내 전달, WO 98/20734, WO 98/28037).

[0072] 본 발명의 백신이 피부에, 보다 구체적으로는 진피에 투여될 경우, 백신은 낮은 액체 부피, 특히 약 0.05 ml 내지 0.2 ml로 사용된다.

[0073] 본 발명의 피부 또는 피내 백신내 항원의 함량은 근내 백신의 통상의 투여량과 유사할 수 있다. 따라서, 피내 백신에 존재하는 단백질 항원은 1 내지 100  $\mu\text{g}$ , 바람직하게는 5 내지 50  $\mu\text{g}$ 이다. 유사하게, 존재할 경우 각 백신 투여량 내의 폴리사카라이드 컨주게이트 항원의 양은 0.01 - 100  $\mu\text{g}$ , 바람직하게는 0.1 내지 50  $\mu\text{g}$ , 보다 바람직하게는 0.1 내지 10  $\mu\text{g}$ 을 일반적으로 포함하고, 1 내지 5  $\mu\text{g}$ 의 양으로 존재할 수 있다. 그러나, 피부 또는 피내 백신의 특징은 그 제제가 "저투여량"일 수 있다는 것이다. 따라서, "저투여량" 백신내 단백질 항원은 투여량당 0.1 내지 10  $\mu\text{g}$ , 바람직하게는 0.1 내지 5  $\mu\text{g}$ 의 소량으로 존재하고, 존재할 경우 폴리사카라이드 컨주게이트 항원은 투여량당 0.01 - 1  $\mu\text{g}$ , 보다 바람직하게는 0.01 내지 0.5  $\mu\text{g}$ 의 폴리사카라이드로 존재할 수 있다.

[0074] 본원에서 사용된 용어 "피내 전달"은 피부의 진피 영역에 백신의 전달을 의미한다. 그러나, 백신은 반드시 진피에만 존재하는 것은 아니다. 진피는 인간 피부 표면으로부터 약 1.0 내지 약 2.0 mm 내부에 위치한 피부내 층이지만, 개인차에 따라, 신체 부분에 따라 상이한 양으로 존재한다. 일반적으로, 진피는 피부 표면의 1.5 mm 내부에 위치하는 것으로 생각할 수 있다. 진피는 표면의 각질층 및 표피와 아래의 피하층 사이에 존재한다. 전달 방식에 따라, 백신은 최종적으로 진피 내에 단독으로 또는 주요 성분으로 존재할 수 있거나 또는 표피 및 진피 내에 최종적으로 분배될 수 있다.

[0075] 본 발명의 또다른 특징에서, 계내에서 생성되는 방식으로 하나 이상의 에스. 뉴모니아 단백질을 코딩하는 DNA를 포함할 수 있다. 상기 DNA는 핵산 발현 시스템, 세균 및 바이러스 발현 시스템을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 전달 시스템 내에 존재할 수 있다. 많은 유전자 전달 기술이 당업계에 공지되어 있다 [예를 들어 Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998] 및 본원에 인용된 문헌들]. 적합한 핵산 발현 시스템은 환자에서 발현을 위해 필요한 DNA 서열 (예를 들어 적합한 프로모터 및 종결 시그널)을 포함한다. 발현 시스템이 살아있는 재조합 미생물, 예를 들어 바이러스 또는 세균일 경우, 목적 유전자는 살아있는 재조합 바이러스 또는 세균의 게놈에 삽입될 수 있다. 상기 살아있는 벡터를 사용한 접종 및 감염은 항원의 체내 발현 및 면역 반응의 유도를 야기할 것이다. 상기 목적을 위해 사용되는 바이러스 및 세균은 폭스 바이러스 (예를 들어 박시니아, 계두(fowlpox), 카나리아 발진병(canarypox)), 알파 바이러스 (신드비스 바이러스, 쉘리키 포레스트 바이러스(Semliki Forest virus), 베네주엘라 말 열 뇌척수염 바이러스), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 피코르나 바이러스 (폴리오 바이러스, 리노바이러스), 헤르페스 바이러스 (바리셀라 조스터 바이러스 등), 리스테리아, 살모넬라, 시겔라, 니세리아, BCG이다. 이들 바이러스 및 세균은 유독성이거나 생백신을 얻기 위해 다양한 방법으로 약독화시킬 수 있다. 또한, 상기 생백신은 본 발명의 일부를 형성한다.

- [0076] 본 발명의 다른 특징에서, 본 발명에 따른 단백질의 조합물을 혼합하는 것을 포함하는, 본 발명의 백신 제제의 제조 방법이 제공된다.
- [0077] 바람직하게는, 본 발명의 폴리사카라이드를 포함하는 항원 조성물 (및 백신)은 사용될 때까지 동결건조되고, 희석제로 즉석에서 재구성하여 사용된다. 보다 바람직하게는, 3D-MPL의 존재 하에 동결건조되고, 염수 용액으로 즉석에서 재구성된다.
- [0078] 백신의 동결건조는 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 액체 백신은 케이킹 방지제, 예를 들어 당, 예를 들어 수크로스 또는 락토스 (10 - 200 mg/mL의 초기 농도로 존재)의 존재 하에 동결건조된다. 동결건조는 일반적으로 일련의 단계, 예를 들어 -69 °C에서 출발하여 점진적으로 3시간에 걸쳐 -24 °C로 조정된 후 이 온도에서 18시간 동안 유지시키고 1시간에 걸쳐 점진적으로 -16 °C로 조정하고, 이 온도에서 6시간 동안 유지시킨 후 3시간에 걸쳐서 점진적으로 +34 °C로 조정하고, 최종적으로 이 온도에서 9시간 동안 유지시키는 사이클로 수행한다.
- [0079] 본 발명의 면역원 조성물 및 백신은 상이한 동물 모델 또는 인간 혈청을 사용하여 평가할 수 있다. 예로서, 다음 동물 모델을 사용하여 폐렴구균 감염을 평가할 수 있다. C3H/HeJ 마우스 (6 내지 8주령)를 50 μl CFA로 어쥬번트 처리된 15 μg 단백질의 피하투여로 면역처리한 후, 3-4주 후에 IFA와 함께 15 μg 단백질로 부스터 처리할 수 있다. 전신계 감염으로부터 수동 및 능동 보호를 위해 마우스에 대해 8 내지 10주차에 LD50이 15 내지 90인 폐렴구균의 복강내 주사에 의한 시험 전에 면역 혈청 또는 단백질을 복강내 투여할 수 있다. 추가로, 단백질은 마우스 비인두 균집 모델 (Wu et al Microbial Pathogenesis 1997; 23:127-137)에서 시험할 수 있다.
- [0080] 마우스 이외에, 유아 래트는 에스. 뉴모니아의 균집화 및 감염에 취약하다. 수동 보호 연구에서, 마우스 면역 혈청 (100 μl i.p. 또는 10 μl i.n.)을 2 내지 5일령의 유아 래트에게 에스. 뉴모니아 (10 μl) 비내 투여에 의한 시험 전에 투여할 수 있다. 균집화는 비내 세척물 (20-40 μl 점적, 10 μl 회수)을 도말하여 결정할 수 있다.
- [0081] 조합 백신의 단백질 성분 사이의 유리한 상호작용은 1가 백신에서는 그 보호 효과가 일정 수준 미만인 각 단백질의 일정 투여량을 투여하여 입증할 수 있다. 1가 백신보다 증가한 조합 백신의 보호 효능은 각 성분간의 유리한 상호작용에 의한 것일 수 있다.
- [0082] 본 발명은 하기 실시예에서 예시된다. 실시예는 다른 설명이 없으면 당업계에 공지된 통상의 표준 기술을 사용하여 수행된다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하고자 한 것으로서 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

**발명의 효과**

- [0083] 본 발명은 폐렴구균 단백질을 기초로 한 방법에 의해 노년층의 폐렴구균성 감염 (예를 들어 폐렴) 및(또는) 유아의 폐렴구균성 감염 (예를 들어 중이염)의 예방 또는 치료를 위한 개선된 백신을 제공한다. 한 바람직한 실시태양에서, 백신은 노년층의 폐렴구균성 감염의 예방 또는 치료에 적합하다.

**도면의 간단한 설명**

- [0084] 도 1은 유아에서 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질의 혈청 반응 양성을 나타낸 것이다.
- 도 2는 유아의 연령에 따른 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질의 혈청 전환을 나타낸 것이다.
- 도 3은 청년층에서의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질의 중심점 역가를 나타낸 것이다.
- 도 4는 청년층에서의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질의 혈청 반응 양성을 나타낸 것이다.
- 도 5는 장년층에서의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질의 중심점 역가를 나타낸 것이다.
- 도 6은 장년층에서의 스트렙토코커스 뉴모니아 단백질의 혈청 반응 양성을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0085] 실시예
- [0086] 실시예 1. 항원의 제조 및 발현
- [0087] NR1xR2

- [0088] CbpA는 수개의 도메인으로 구성된 75 kDa의 표면 노출 단백질이다. N-말단 도메인은 2개의 고보존 반복체 (R1 및 R2)를 포함하고, C-말단 도메인은 10개의 탠덤(tandem)한 20개 아미노산의 직접 반복 서열을 포함한다. CbpA 트린케이트는 콜린 결합 도메인이 없는 NR1xR2를 제조하기 위해 제조하였다.
- [0089] NR1xR2 유전자는 에스. 뉴모니에의 혈청형 4의 균주 (예를 들어 W097/41157 또는 W099/51266 참조)로부터 입수한 DNA로부터 PCR에 의해 증폭하였다. PCR은 Expand High Fidelity PCR System 또는 Hi-Fi (Roche)를 사용하여 수행하였다. 이것은 Taq 폴리머라제 및 프루프리딩(proofreading) 폴리머라제의 혼합물을 포함한다. 고유의 3'-5' 엑스뉴클레아제 프루프리딩 활성 때문에, Hi-Fi를 사용하면 Taq 폴리머라제에 비해 DNA 합성 신뢰도가 3배 증가한다.
- [0090] PCR 단편을 pGEM-T Vector Systems (Promega)의 pGEM-T 벡터에 클로닝하였다. 상기 단계는 추후 라이게이션을 위한 PCR 단편의 제한 효소에 의한 분해를 촉진시키기 위해 필요하다. pGEM-T 벡터는 선형으로 제공되고, 3'-T 오버행(overhang)을 포함한다. 이들 오버행은 증폭된 단편의 3' 말단에 주형 독립적인 방식으로 단일 데옥시 아데노신을 부가하는 열안정성 폴리머라제에 의해 생성되는 PCR 산물의 삽입을 촉진시킨다.
- [0091] 단편 및 벡터는 문헌 [Benore-Parsons et al, Nucleic Acids research, 23, 4926-4927, 1995]에 따라 효소에 의한 절단 (NdeI 및 XbaI 분해) 후에 정제하였다. 아가로스 부분은 3 내지 4시간 동안 완전히 동결건조시켰다. 1:1 에탄올-TE 용액을 동결건조된 겔에 첨가하였다. 시료를 1시간 동안 부드럽게 혼합하고, 아가로스를 압축한 후 원심분리에 의해 완전히 제거하였다. DNA는 에탄올 침전에 의해 용출액으로부터 회수하였다.
- [0092] NR1xR2를 코딩하는 DNA를 파지  $\lambda$ 로부터의 긴 프로모터 L을 포함하는 벡터에 클로닝하였다. 목적 단백질은 AR58 이. 콜라이 균주에 존재할 경우에는 열에 의해, AR120 이. 콜라이 균주 내에서는 날리딕산에 의해 유도될 수 있다.
- [0093] 세균의 예비 배양은 30 °C에서 철야 수행하였다. 상기 예비 배양액을 총 20 ml의 부피로 약 40배 희석하여 O.D.가 0.4 내지 0.6이 될 때까지 30 °C에서 정치시켰다. 42 °C에서 열 유도시켰다. 시료를 상이한 시점에서 채취하였다. 1 ml의 배양액을 7000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 배양 상등액을 -20 °C에서 보관하고, 펠렛 (전체 추출물)을 500  $\mu$ l의 시료 완충액 (웨스턴 블롯 또는 SDS-PAGE 분석) 또는 500  $\mu$ l의 용해 완충액에 현탁시켜 37 °C에서 30분간 인큐베이션시켰다 (ELISA). 용해 완충액의 조성은 SDS 0.1%, 데옥시콜레이트 0.1%, Na 시트레이트 0.015 M이다.
- [0094] 시료를 4-20% 겔 상에 로딩하여 SDS-PAGE (Novex, Invitrogen)에서 이동시켰다. 200 V에서 이동시켰다. 쿠마시 블루 (Coomassie blue) 염색을 수행하였다. 시료를 웨스턴 블로팅을 위해 4-20% 겔 (Novex, Invitrogen)에 로딩하였다. 200 V에서 이동시켰다. 겔을 니트로셀룰로스에 이송하고, 토끼  $\alpha$ -NR1xR2 폴리클로날 항체 (제1 항체) 및 알칼린-포스파타제에 커플링된  $\alpha$ -토끼 항체 (2차 항체)를 사용하여 반점을 가시화시켰다.
- [0095] 약 55 kDa의 밴드가 SDS-PAGE 분석에서 관찰되었다. SDS-PAGE 분석을 기초로 하여 클론 28B2를 선택하고 발효를 위해 이송하였다. 상기 클론의 서열을 결정하고, 그 서열(아미노산 39 (즉, 시그널 서열 이후) 내지 446 = 406개 아미노산)을 확인하였다.
- [0096] 철야 유도된 세균의 용해 및 원심분리 후에 NR1xR2의 용해도를 연구하였다. SDS-PAGE 분석 및 ELISA 시험을 수행하였다. NR1xR2는 주로 가용성 분획으로 회수되는 것으로 나타났다 (> 95%).
- [0097] **R1xR2, PhtD, Sp91, (N)R1xR2-Sp91 [C-말단 도메인] 및 P1y**
- [0098] 또한, 상기 유전자를 클로닝하고, 서열을 결정하여 NR1xR2와 유사한 방법으로 발현시켰다. R1xR2는 CbpA (에스. 뉴모니에 혈청형 4N의)의 아미노산 177 내지 443를 포함하고, PhtD는 아미노산 21 (즉, 시그널 서열 다음의) 내지 최종 아미노산 (에스. 뉴모니에 혈청형 4N의 아미노산 839)를 포함하고, Sp91은 아미노산 20 (VAA) 내지 최종 아미노산을 포함한다. 융합 단백질의 경우, R1xR2-Sp91 Cterm은 CbpA의 아미노산 177-446를 포함하고, 번역이 정지될 때까지 271개의 아미노산을 포함하고, NR1xR2-Sp91Cterm은 CbpA의 아미노산 39-446를 포함하고, 번역이 정지될 때까지 271개의 아미노산을 포함한다. 두 융합 단백질의 경우, 2개의 추가의 아미노산 (GS)가 (N)R1xR2과 Sp91Cterm 서열 사이에서 발견된다. 모든 구조체에서, ATG는 전사 및 번역을 가능하게 하기 위해 유전자의 5'에 도입되고, 이것은 상기 언급한 각 서열의 앞에 추가의 N-말단 메티오닌이 존재함을 의미한다.
- [0099] 실시예 2. 혈청학
- [0100] 임상 연구에서 사용된 혈청을 사용하여, 에스. 뉴모니에 단백질에 대해 자연발생한 항체 반응을 ELISA로 평가하

였다.

[0101] 2.1 실험 방법

[0102] · 혈청 시료

[0103] - 각각 2 내지 4개월 및 6 내지 12개월의 유아로부터 수거한 1쌍의 혈청 (N = 20, DTPa HBV 연구).

[0104] - 20세 이하의 성인 혈청 (N = 50).

[0105] - 65세 이상의 성인 혈청 (N = 140).

[0106] · ELISA 과정

[0107] 면역-플레이트를 1 µg/ml의 각 단백질로 4 °C에서 철야 코팅하였다. 혈청의 연속적인 2배 희석액 (1/10 희석액으로 출발)을 교반 하에 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 면역-검출은 4000배 희석된 퍼옥시다제-커플링된 항-인간 IgG 모노클로날 항체 (Strateck, HP6043)을 사용하여 수행하고, 교반 하에 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 가시화 후에, 중앙 역가를 SoftMaxPro로 계산하였다. 역가가 10 이상인 혈청은 양성인 것으로 간주하였다. 기하 평균 계산을 위해, 역가 5 (컷 오프의 1/2)를 임의로 음성 혈청으로 분류하였다.

[0108] µg/ml로 표시한 IgG 농도는 폴리클로날 항-인간 IgG 염소 항체에 의해 플레이트에 포획되고 상기한 바와 동일한 퍼옥시다제 표지된 항체에 의해 가시화된 chromopure IgG (Jackson)의 광학 밀도 (OD) 곡선에 시료 OD를 비교하여 확립하였다.

[0109] **2.2 결과**

[0110] 2.2.1 유아의 스트렙토코커스 단백질 혈청학

[0111] 2 내지 4개월의 유아의 혈청에서 측정된 가장 높은 항체 역가 및 혈청 반응 양성 비율은 PhtD, PsaA, Sp128, NR1xR2에서 얻어졌고, 이보다 약간 낮은 수치가 Sp91 및 Ply에서 얻어졌다. Sp101 및 Sp130에 대한 반응은 없거나 낮게 검출되었다. Sp46 및 PhtA는 시험되지 않았다 (물질 입수 문제).

[0112] 항체 반응은 6 내지 12개월의 동일한 대상에서 수집한 혈청에서 일반적으로 감소하고, 이것은 높은 역가가 주로 수동 전달된 모계 항체에 의한 것이었다.

[0113] 그러나, 특정 유아에서는 아마도 폐렴구균에 대한 자연 노출의 결과로서 일부 단백질에 대한 면역 반응이 성장하면서 증가하였다. 이러한 혈청 전환에 주로 관련되는 항원은 명백하게 PsaA이었다. PhtD, NR1xR2, Sp128, Sp91 및 Ply에 대한 항체 수준의 증가도 밝혀졌다. 단지 Sp101 및 Sp130에 대한 체액성 반응의 일부 변화만이 관찰되었다 (도 1 및 2 참조).

[0114] 2.2.2 청년층의 스트렙토코커스 단백질 혈청학

[0115] 기하 평균 역가에 따르면, PhtD, PhtA 및 NR1xR2는 평가된 청년층 집단에서 가장 면역원성이 높은 단백질이고, 그 다음으로 Sp128, Ply 및 Sp91의 면역원성이 높았다. 모든 대상은 상기 단백질에 대한 검출 가능한 항체를 보유하였다. 보다 낮은 반응이 Sp46, 특히 Sp130 및 Sp101에서 나타났다. PsaA는 시험되지 않았다 (충분한 혈청을 입수할 수 없음) (도 3 및 4 참조).

[0116] 2.2.3 장년층의 스트렙토코커스 단백질 혈청학

[0117] 청년층에 비해 장년층의 스트렙토코커스 단백질에 대한 항체 수준이 분명하게 감소하였다. 장년층에서, 가장 면역원성이 높은 단백질은 PhtD이고, 그 다음으로 Sp128, NR1xR2, Sp91, Ply 및 PsaA의 면역원성이 높았다. Sp101 및 Sp130에 대해서는 미약한 반응만이 측정되었다. Sp46 및 PhtA는 시험되지 않았다 (물질 입수 문제) (도 5 및 6 참조).

**표 1**

[0118]

장년층의 µg/ml로 표현된 기하 평균 IgG 농도 (GMC)	
단백질	IgG (GMC, µg/ml)
PhtD	19
NR1xR2	3.5
SP91	2.5
Ply	2.3

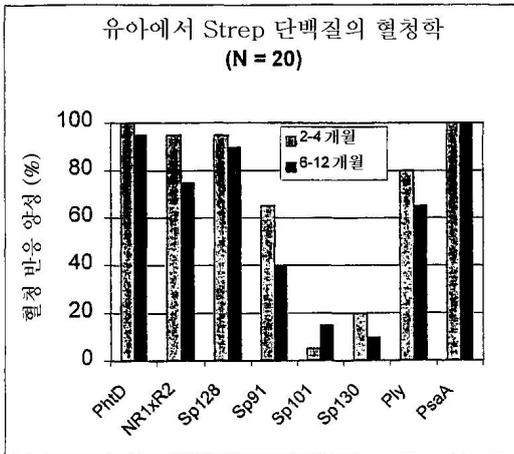
[0119] 특허 및 특허출원을 포함하여 본원에 인용된 모든 문헌은 그 전체가 본원에 참고로 포함되었다고 구체적으로 표시된 바와 같이 본원에 참고로 포함된다.

[0120] 본 발명의 바람직한 실시태양은 상기한 바와 같이 예시되었지만, 본 발명이 본 발명의 예시 내용에 의해 제한되지 않고, 하기 특허 청구 범위 내에 포함되는 모든 변형체에 대한 권리도 본 발명에 포함된다.

**도면**

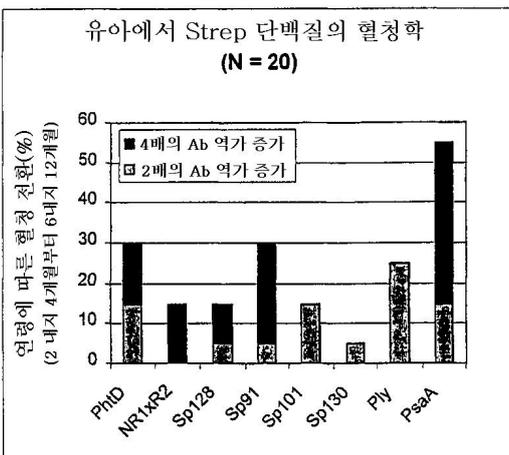
**도면1**

유아에서 혈청 반응 양성(%)



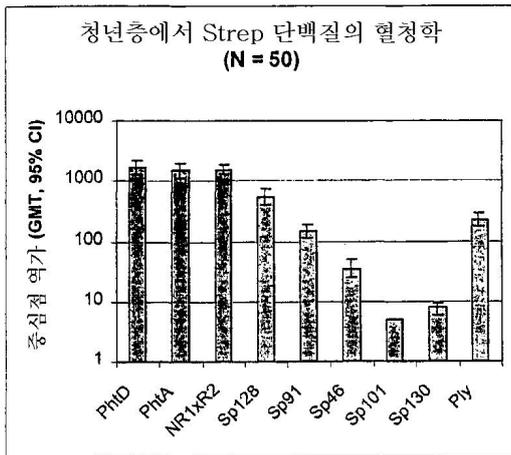
**도면2**

유아의 연령에 따른 혈청 전환



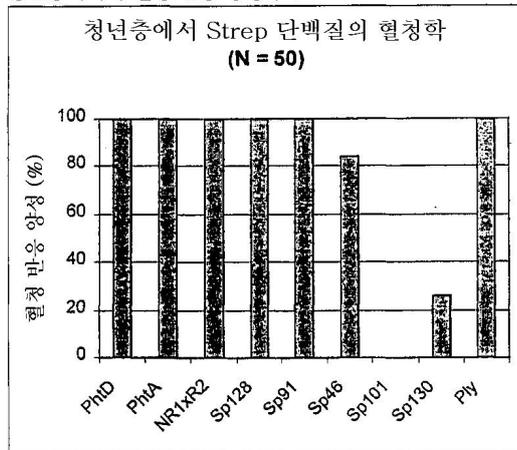
도면3

청년층에서의 중심점 역가



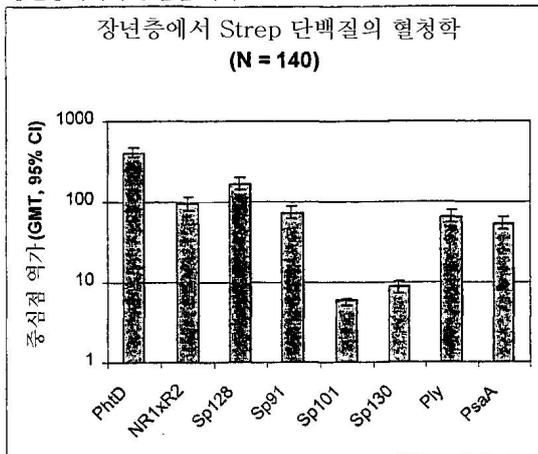
도면4

청년층에서의 혈청 반응 양성 (%)



도면5

장년층에서의 중심점 역가



도면6

장년층에서의 혈청 반응 양성 (%)

