



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0073943
(43) 공개일자 2015년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/05 (2006.01) A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/13 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/0018 (2013.01)
A61K 39/05 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7004873
(22) 출원일자(국제) 2013년10월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년02월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/070656
(87) 국제공개번호 WO 2014/053612
국제공개일자 2014년04월10일

(30) 우선권주장
61/744,880 2012년10월03일 미국(US)
61/799,123 2013년03월15일 미국(US)

(71) 출원인
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에 리젠사르트 루 드 린스티투트 89 (우편번호: 비-1330)

(72) 발명자
그란디 구이도
이탈리아 아이-53100 시에나 비아 피오렌티나 노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 에스알엘 내
마가리트 와이 로스 임마쿨라다
이탈리아 아이-53100 시에나 비아 피오렌티나 노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 에스알엘 내
마리오네 도메니코
이탈리아 아이-53100 시에나 비아 피오렌티나 노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 에스알엘 내

(74) 대리인
송봉식, 정삼영

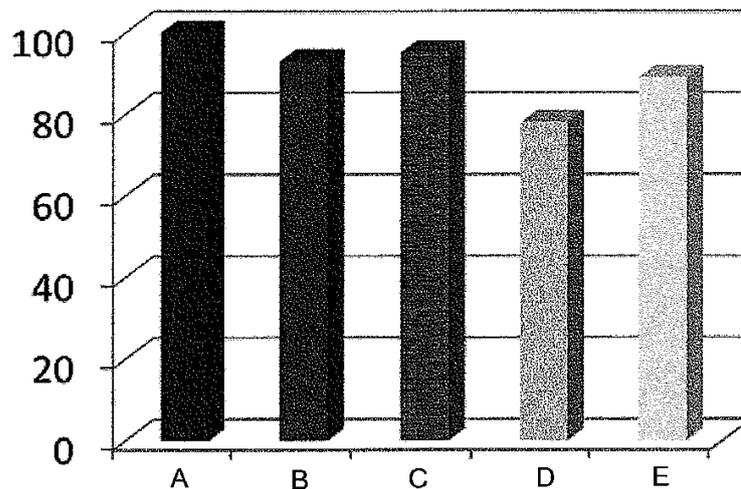
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 면역원성 조성물

(57) 요약

본 발명은 a) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; b) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; c) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; d) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; 및 e) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류인 컨쥬게이트를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/08 (2013.01)

A61K 39/092 (2013.01)

A61K 39/099 (2013.01)

A61K 39/13 (2013.01)

A61K 2039/55505 (2013.01)

A61K 2039/6037 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

C12N 2770/32334 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

a) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; b) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; c) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; d) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류인 컨쥬게이트; 및 e) 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류인 컨쥬게이트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제1 항에 있어서, GBS 캡슐 당류의 총량은 $\leq 70 \mu\text{g}$ 인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 각각의 GBS 캡슐 당류는 단위 용량 당 1 내지 $30 \mu\text{g}$ 의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 4

제3 항에 있어서, 각각의 GBS 캡슐 당류는 단위 용량 당 $5 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ 또는 $20 \mu\text{g}$ 의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 5

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항에 있어서, 단위 용량 당 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, V 및 III 캡슐 당류의 양은 $20 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$, $20 \mu\text{g}$ 및 $20 \mu\text{g}$; $10 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ 및 $10 \mu\text{g}$; 및 $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ 및 $5 \mu\text{g}$ 으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 6

제5 항에 있어서, 단위 용량 당 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, V 및 III 캡슐 당류의 양은 $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ 및 $5 \mu\text{g}$ 인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 7

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 각 GBS 캡슐 당류는 단위 용량 당 0.1 내지 $5 \mu\text{g}$ 의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제7 항에 있어서, 각 GBS 캡슐 당류는 단위 용량 당 0.5, 2.5 또는 $5 \mu\text{g}$ 의 양으로 존재하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제1 항 내지 제8 항 중 어느 한 항에 있어서, GBS 혈청형 Ia, Ib, II, V 및 III 캡슐 당류의 질량의 비는 1:1:1:1:1인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 하나의 단위 용량에 이어서 첫 번째 단위 용량 후 3개월에 투여된 두 번째 단위 용량으로 투여를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 11

제1 항 내지 제10 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 하나의 단위 용량에 이어서 첫 번째 단위 용량 후 1개

월에 투여된 두 번째 단위 용량으로 투여를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제1 항 내지 제9 항 및 제11 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 일회 용량으로 투여를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제1 항 내지 제12 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물은 알루미늄 염 보조제를 함유하지 않는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 14

제1 항 내지 제13 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물은 어떤 보조제도 함유하지 않는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 15

제1 항 내지 제14 항 중 어느 한 항에 있어서, a), b), c), d) 및 e)에서 담체 단백질은 디프테리아 변성 독소, 파상풍 변독소 또는 CRM197인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 16

제15 항에 있어서, a), b), c), d) 및 e)에서 담체 단백질은 CRM197인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 17

제1 항 내지 제16 항 중 어느 한 항에 있어서, GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류는 150-300kDa의 범위의 MW를 갖고; GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류는 150-300kDa의 범위의 MW를 갖고; GBS 혈청형 III의 캡슐 당류는 50-200kDa의 범위의 MW를 갖고; GBS 혈청형 II의 캡슐 당류는 150-300kDa의 범위의 MW를 갖고; GBS 혈청형 V의 캡슐 당류는 150-300kDa의 범위의 MW를 갖는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 18

제1 항 내지 제17 항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류인 컨쥬게이트는 약 1:1 내지 1:2의 당류:단백질 중량비를 갖고; 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류인 컨쥬게이트는 약 1:1 내지 1:2의 당류:단백질 중량비를 갖고; 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류인 컨쥬게이트는 약 1:1 내지 1:2의 당류:단백질 중량비를 갖고; 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류인 컨쥬게이트는 약 1:1 내지 1:2의 당류:단백질 중량비를 갖고; 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류인 컨쥬게이트는 약 3:1 내지 1:1의 당류:단백질 중량비를 갖는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 19

제1 항 내지 제18 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 근육 내 투여를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 20

제1 항 내지 제19 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 주사 가능한 액체 용액 또는 현탁액인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 21

제1 항 내지 제19 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 동결건조되는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 22

제21 항에 있어서, 조성물은 컨쥬게이트(들)를 안정화하기 위해 만니톨을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역원

성 조성물.

청구항 23

제1 항 내지 제22 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 칼륨 디히드로겐 포스페이트 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 24

제1 항 내지 제23 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 나트륨 클로라이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 25

제1 항 내지 제24 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 백신인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 26

제1 항 내지 제25 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 인간에게 투여를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 27

제1 항 내지 제26 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 임신 가능 연령의 여성, 임신한 여성 및 고령의 환자로 부터 선택되는 인간에게 투여를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 28

제27 항에 있어서, 조성물은 임신한 여성에게 투여를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 29

제26 항 내지 제28 항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 전에 인간은 검출 불가능한 수준의 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류, GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류, GBS 혈청형 II의 캡슐 당류, GBS 혈청형 V의 캡슐 당류, 및/또는 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류에 대한 항체를 갖는 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 30

제1 항 내지 제29 항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 의약품으로서 사용을 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 31

제30 항에 있어서, 조성물은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에 의해 유발된 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 32

제31 항에 있어서, 질환은 신생아 패혈증, 균혈증, 신생아 폐렴, 신생아 뇌막염, 자궁내막염, 골수염 또는 화농성 관절염인 것을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스트렙토코쿠스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*) 캡슐 당류의 컨주게이트(conjugate) 및 담체 단백질을 포함하는 면역원성 조성물의 분야에 있다. 조성물은 면역화에 유용하다.

배경 기술

[0002] 박테리아의 캡슐 당류는 수년 동안 캡슐화된 박테리아에 대한 백신에 사용되었다. 하지만, 당류가 T-독립적 항

원이기 때문에, 그것들은 불량한 면역원성이 있다. 담체로의 컨주게이션(Conjugation)은 T-독립적 항원을 T-의존적 항원으로 전환시킬 수 있으며, 이로 인해 기억 반응(memory response)을 향상시키고 보호적 면역력이 발달하게 한다. 그러므로 가장 효과적인 당류 백신은 당컨주게이트(glycoconjugate)를 기반으로 하며, 원형 컨주게이트 백신은 헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenzae) 타입 b ('Hib')에 대한 것이었다 [예를 들어, Vaccines (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0의 14장을 참고하면 된다].

[0003] 컨주게이트 백신이 설명된 또 다른 박테리아는 스트렙토코쿠스 아갈락티에이며, 'B군 스트렙토코쿠스', 또는 간단하게 'GBS'로도 알려져 있다. 많은 이 작업들은 Dennis Kasper와 동료들에 의해 수행되었고 참고문헌 1 내지 9와 같은 문서에서 설명된다. GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III, 및 V 각각에 대한 컨주게이트 백신은 인간에서 안전하고 면역원성인 것으로 나타났다 [10&11]. 하지만, 추가의 및 개선된 GBS 컨주게이트 백신에 대한 필요성이 남아있다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류; ii) 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류; iii) 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류; iv) 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류; 및 v) 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.

[0005] 전형적으로, 면역원성 조성물은 특이적으로 언급된 것들 이외에 어떤 컨주게이트, 특히 특이적으로 언급된 것들 이외에 GBS 혈청형의 캡슐 당류를 포함하는 컨주게이트도 포함하지 않을 것이다. 하지만, 일부 구체예에서, 조성물은 다른 컨주게이트를 포함할 수도 있는데, 다른 GBS 혈청형의 캡슐 당류를 포함하는 컨주게이트를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 VI의 캡슐 당류인 컨주게이트를 포함할 수도 있다. 또 다른 가능성에서, 조성물은 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 VIII의 캡슐 당류인 컨주게이트를 포함할 수도 있다.

[0006] 상기 설명된 면역원성 조성물은 단위 용량 당 캡슐 당류(들)의 어떤 적합한 양도 포함할 수 있다. 캡슐 당류(들)의 적합한 양은 단위 용량 당 0.1 내지 50 µg일 수도 있다. 전형적으로, 각 GBS 캡슐 당류는 1 내지 30 µg, 예를 들어, 2 내지 25 µg, 및 특히 5 내지 20 µg의 양으로 존재한다. 캡슐 당류(들)의 적합한 양은 단위 용량 당 5, 10 및 20 µg을 포함할 수도 있다.

[0007] 단위 용량 당 캡슐 당류(들)의 양을 더 최소화하는 것이 가능할 수도 있다. 특히, 캡슐 당류(들)의 적합한 양은 단위 용량 당 0.1 내지 5 µg일 수도 있다. 그러므로, 전형적으로, 각 GBS 캡슐 당류는 단위 용량 당 0.1 내지 5 µg, 예를 들어, 0.5, 2.5 또는 5 µg의 양으로 존재할 수도 있다. 예를 들어, 각 GBS 캡슐 당류는 단위 용량 당 0.5 내지 5 µg, 1 내지 4 µg, 2 내지 3 µg, 또는 약 2.5 µg의 양으로 존재할 수도 있다.

[0008] 면역원성 조성물이 하나 이상의 컨주게이트를 포함하는 상기 설명된 구체예에서, 특정 캡슐 당류의 질량 대 다른 캡슐 당류(들)의 질량의 비는 다를 수도 있다. 하지만, 전형적으로 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III 및 V 캡슐 당류의 질량의 비는 1:1:1:1이다.

[0009] 본 발명의 면역원성 조성물을 투여하는 방법은 하기 논의된다. 간략히 말하면, 본 발명의 면역원성 조성물은 일회 또는 다 회수 용량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 면역원성 조성물의 일회 용량의 투여가 효과적이다. 그러므로 일회 용량의 투여가 본 발명, 특히 이 구체예들에서 바람직하다.

[0010] 대안으로, 하나의 단위 용량에 이은 제2 단위 용량이 효과적일 수도 있다. 전형적으로, 제2 (또는 제3, 제4, 제5 등) 단위 용량은 제1 단위 용량과 동일하다. 제2 단위 용량은 제1 단위 용량 후 어떤 적합한 시간, 특히 1, 2 또는 3개월 후에도 투여될 수 있다. 예를 들어, 제2 단위 용량은 제1 단위 용량 후 3개월에 투여될 수도 있다. 또 다른 예에서, 제2 단위 용량은 제1 단위 용량 후 1개월에 투여될 수도 있다. 전형적으로, 본 발명의 면역원성 조성물은 근육 내로, 예를 들어, 하기 설명된 바와 같이 허벅지 또는 상부 팔에 근육 내 투여에 의해 투여될 것이다.

[0011] 하기 설명된 바와 같이, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 보조제를 포함할 수도 있다. 하지만, 보조제가 첨가되지 않은 조성물의 사용이 또한 효과적일 수 있다. 잠재적인 독성을 감소시키기 위해 보조제를 제외하는 것이 유리할 수도 있다. 따라서, 어떤 보조제도 함유하지 않은 (특히 어떤 알루미늄 염 보조제도 함유하지 않은) 면역원성 조성물이 본 발명에서의 사용, 특히 이 구체예들에서 바람직하다.

[0012] **캡슐 당류**

- [0013] 본 발명은 스트렙토코쿠스 아갈락티에의 캡슐 당류를 기반으로 한다. 캡슐 당류는 GBS의 펩티도글리칸 백본 (backbone)에 공유 결합되며, 펩티도글리칸 백본에 부착된 또 다른 당류인 B군 항원과는 별개의 것이다.
- [0014] GBS 캡슐 당류는 화학적으로 관련된 것이지만, 항원의 관점에서는 매우 다르다. 모든 GBS 캡슐 다당류는 다음 삼당류 코어(core)를 공유한다:
- [0015] β -D-GlcpNAC(1→3) β -D-Galp(1→4) β -D-Glcp
- [0016] 다양한 GBS 혈청형은 이 코어가 변형되는 방법에 의해 차이가 난다. 혈청형 Ia와 III 사이의 차이점은, 예를 들어, 연속적인 삼당류 코어를 연결하는 이 코어에서 GlcNAc (Ia) 또는 Gal (III)의 사용으로부터 발생한다. 혈청형s Ia와 Ib 둘 다는 이 코어에서 GlcNAc에 연결된 [α -D-Neu μ Nac(2→3) β -D-Galp-(1→)] 이당류를 갖지만, 연결은 1→4 (Ia) 또는 1→3 (Ib)이다.
- [0017] GBS-관련 질환은 주로 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, 및 VIII로부터 발생하며, 85% 이상은 다섯 개의 혈청형:Ia, Ib, III & V에 의해 유발된다. 본 발명은 바람직하게는 이 네 개의 혈청형 중 하나 이상, 특히 혈청형: Ia, Ib & III 중 하나 이상의 당류를 사용한다. 이 네 개의 혈청형들 각각의 캡슐 당류는 (a) 모든 경우에서, 갈락토스 잔기에 2→3 결합되는 말단 N-아세틸-뉴라민산 (NeuNAc) 잔기 (보통 시알산으로도 불림); 및 (b) 삼당류 코어 내 N-아세틸-글루코사민 잔기 (GlcNAc)를 포함한다.
- [0018] 네 개의 당류 모두는 삼당류 코어 내 갈락토스 잔기를 포함하지만, 혈청형 Ia, Ib, II & III는 또한 각각의 반복 단위에서 추가의 갈락토스 잔기를 함유한다.
- [0019] 당류는 자연에서 발견된 캡슐 당류에 관하여 화학적으로 변형될 수도 있다. 예를 들어, 당류는 데-O-아세틸화 (부분적으로 또는 완전히), 데-N-아세틸화 (부분적으로 또는 완전히), N-프로피온화 (부분적으로 또는 완전히), 등이 될 수도 있다. 탈아세틸화는 컨주게이션 전에, 중에 또는 후에 발생할 수도 있지만, 바람직하게는 컨주게이션 전에 발생한다. 특정 당류에 따라, 탈아세틸화는 면역원성에 영향을 미치거나 그렇지 않을 수도 있다. 다양한 혈청형에서 GBS 당류에 대한 O-아세틸화의 적합성이 참고문헌 12에서 논의되고, 위치 7, 8 및/또는 9에서 시알산 잔기의 O-아세틸화는, 예를 들어, 보호/탈보호, 재아세틸화, 등에 의해 컨주게이션 전에, 중에 및 후에 유지된다. 하지만, 전형적으로 본 발명에서 사용된 GBS 당류는 실질적으로 위치 7, 8 및/또는 9에서 시알산 잔기의 O-아세틸화를 갖지 않는다. 특히, GBS 당류가 하기 설명된 바와 같이 염기 추출에 의해 정제되었을 때, O-아세틸화는 전형적으로 손실된다 (참고문헌 12). 탈아세틸화 등의 효과는 일상적인 검정에 의해 평가될 수 있다. 혈청형 V 캡슐 당류는 참고문헌 13 및 14에서 설명된 바와 같이 변형될 수도 있다. 예를 들어, 참고문헌 13 및 14에서 설명된 바와 같이 실질적으로 탈시알릴화된 혈청형 V 캡슐 당류가 유용할 수 있다. 탈시알릴화된 GBS 혈청형 V 캡슐 당류는 약산성 조건 하에서 정제된 GBS 혈청형 V 캡슐 당류의 처리에 의해 (예를 들어, 80°C에서 60분 동안 0.1M 황산) 또는 뉴라미니다제 처리에 의해 제조될 수도 있으며, 참고문헌 13에서 설명된 바와 같다. 탈시알릴화된 GBS 혈청형 V 캡슐 당류를 제조하는 바람직한 방법은 정제된 당류에 81°C +/- 3°C에서 2시간 동안 1M 아세트산의 처리에 의한 것이다.
- [0020] 특히 GBS 혈청형 V 캡슐 다당류의 시알산 산화의 정도는 40% 이하, 25% 이하, 20% 이하, 17% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 예를 들어, 약 12%, 약 9%, 약 8%, 약 7%이다. 특히 GBS 혈청형 V 캡슐 다당류의 N-아세틸-뉴라민산 (NeuNAc 또는 시알산) 함량은 NeuNAc 함량이 약 100%인 것으로 고려되는 원래의 GBS 혈청형 V 다당류와 비교할 때, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상이다. 특히, GBS 혈청형 V 다당류는 완전히 시알릴화되거나 "원래의 다당류"이다. 예를 들어, 시알산 함량은 원래의 GBS 혈청형 V 다당류와 비교할 때 약 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 약 90% (또는 이 값들 사이의 어떤 범위)이다. 특히, 타입 v 다당류는 3:2:1:1의 분자비로 D-글루코스, D-갈락토스, 2-아세트아미도-2-데옥시-글루코스 및 시알산을 함유한다.
- [0021] 본 발명에 따라 사용된 당류는 자연에서 발견된 바와 같이, 실질적으로 전장 캡슐 다당류일 수도 있거나, 또는 자연의 길이보다 더 짧을 수도 있다. 전장 다당류는, 예를 들어, 약산에서 가수분해, 가열, 사이징 크로마토그래피(sizing chromatography), 등에 의해 탈폴리머화되어 본 발명과 함께 사용되는 더 짧은 단편을 제공할 수도 있다. 사슬 길이는 토끼에서 GBS 당류의 면역원성에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 [4]. 특히, 본 발명에서 사용된 혈청형 II 및/또는 III 캡슐 당류는 참고문헌 15 및 16에서 설명된 바와 같이 탈폴리머화될 수도 있다. 이 문서들은 환원성-말단 2,5-무수-D-만노스 잔기를 갖는 항원성 단편으로의 약한 탈아미노화 분할에 의한 타입 II 및 타입 III 캡슐 당류의 부분적 탈폴리머화를 설명한다. 간략히 말하면, 캡슐 당류는 0.5N NaOH에 용해되고 약 1-4시간 동안 70°C에서 가열된다. 이 배양의 길이는 탈폴리머화의 정도를 제어하는데, 이것은 표준 방법에

의해 (예를 들어, 참고문헌 15에서 설명된 바와 같이 HPLC에 의해) 결정될 수도 있다. 샘플은 pH를 4로 조정하기 위해 빙초산이 추가되기 전에 얼음물에서 냉각된다. 부분적으로 N-탈아실화된 생성물은 그 다음에 4°C에서 2시간 동안 교반하면서 5% (wt/vol) NaNO₂의 첨가에 의해 탈아미노화된다. 새로 형성된 2,5-무수-D-만노스 잔기의 자유 알데히드는 담체 단백질로의 컨쥬게이션에 사용될 수도 있으며, 하기 설명된 바와 같다.

[0022]

엔도-β-갈락토시다제에 의한 혈청형 III 캡슐 당류의 탈폴리머화가 보고되었으며 [참고문헌 1 & 4-6], 파상풍 변독소(tetanus toxoid) 담체로 컨쥬게이트를 형성하기 위해 탈폴리머화된 재료의 사용을 포함한다. GBS 혈청형 III 및 VIII로부터 캡슐 다당류의 오존 분해가 또한 탈폴리머화에 사용되었다 [17]. MW ≥ 30kDa의 당류를 사용하는 것이 바람직하고, 실질적으로는 전장 캡슐 다당류가 사용될 수 있다. 혈청형 Ia에 대하여, 150-300kDa, 특히 175-275kDa의 범위의 MW를 갖는 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. 전형적으로, 약 200kDa 또는 약 260kDa의 MW를 갖는 혈청형 Ia 당류가 사용된다. 혈청형 Ib에 대하여, 150-300kDa, 특히 175-250kDa의 범위의 MW를 갖는 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. 전형적으로, 약 200kDa 또는 약 230kDa의 MW를 갖는 혈청형 Ib 당류가 사용된다. 혈청형 III에 대하여, 50-200kDa, 특히 80-150kDa의 범위에 있는 MW를 갖는 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. 전형적으로, 약 100kDa 또는 약 140kDa의 범위의 MW를 갖는 혈청형 III 당류가 사용된다. 혈청형 V에 대하여, 최대 ~50kDa의 MW를 갖는 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. 전형적으로, 약 100kDa의 MW를 갖는 혈청형 V 당류가 사용된다. 이 분자 질량은, 텍스트란 표준에 관하여, Polymer Standard Service로부터 이용 가능한 것들과 같이 겔 여과에 의해 측정될 수 있다 [18].

[0023]

캡슐 당류는 참고문헌 2 및 19과 같은 본원의 참고문헌에서 설명된 바와 같이, 알려진 기술에 의해 정제될 수 있다. 전형적인 공정은 염기 추출, 원심분리, 여과, RNase/DNase 처리, 프로테아제 처리, 농축, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 한외 여과, 음이온 교환 크로마토그래피, 및 추가의 한외 여과를 수반한다. GBS 세포에 효소 뮤타노리신의 처리가 또한 유용하며, 이것은 박테리아 세포벽을 분할하여 세포벽 구성요소를 자유롭게 한다.

[0024]

대안으로서, 참고문헌 20에서 설명된 정제 공정이 사용될 수 있다. 이것은 염기 추출, 에탄올/CaCl₂ 처리, CTAB 침전, 및 재가용화를 수반한다. 추가의 대체 공정은 참고문헌 21에서 설명된다.

[0025]

본 발명은 자연의 공급원으로부터 정제된 당류에 제한되지 않지만, 당류는 전체 또는 부분적 합성과 같은 다른 방법에 의해 얻어질 수도 있다.

[0026]

컨쥬게이션

[0027]

본 발명은 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III 및 V의 캡슐 당류인 컨쥬게이트를 수반하며, 각각 담체에 컨쥬게이션된다. 일반적으로, 당류의 담체로의 공유 결합에 의한 컨쥬게이션은 당류의 면역원성을 향상시키는데 그것들을 T-독립적 항원에서 T-의존적 항원으로 전환하고, 따라서 면역 기억(immunological memory)에 대한 프라이밍(priming)을 허용하기 때문이다. 컨쥬게이션은 소아 백신에 특히 유용하고 [예를 들어, 참고문헌 22] 잘 알려진 기술이다 [예를 들어, 참고문헌 23 내지 31에서 재검토됨]. 따라서 본 발명의 공정은 정제된 당류를 담체 분자에 컨쥬게이션하는 추가의 단계를 포함할 수도 있다.

[0028]

GBS 당류의 컨쥬게이션은 널리 보고되었고, 예를 들어, 참고문헌 1을 참고하면 된다. 다당류는 면역원성이지만, 다당류의 담체 단백질로의 컨쥬게이션은 면역원성을 개선하거나 향상시킬 수 있다. 그러므로, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "담체"는 항원 (예를 들어, 다당류)에 컨쥬게이션되어 동물에 투여될 때, 동물에서 면역 반응, 특히, 보호적 면역 반응을 유발하거나 향상시키고, 항원, 예를 들어, 상기 설명된 다당류에 특이적으로 결합하는 항체의 생산을 유도하는 면역원성 물질을 나타낸다. GBS 당류 컨쥬게이션에 대한 전형적인 선행 기술 공정은 전형적으로 정제된 당류의 파상풍 변독소 (TT) 또는 CRM197과 같은 담체 단백질로의 환원적 아미노화를 수반한다 [2]. 환원적 아미노화는 담체의 아미노산 측쇄에서 아민 기 및 당류에서 알데히드 기를 수반한다. GBS 캡슐 당류가 알데히드 기를 그것의 자연적인 형태로 포함하지 않기 때문에 이것은 전형적으로 당류의 시알산 잔기 중 일부 (예를 들어, 5 내지 40%, 특히 10 내지 30%, 바람직하게는 약 20%)의 산화 (예를 들어, 페리오데이트 산화)에 의해 컨쥬게이션 전에 생성된다 [2, 32]. 이 방식으로 제조된 컨쥬게이트 백신은 인간에서 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III, 및 V 각각에 대하여 안전하고 면역원성인 것으로 나타났다 [10]. 전형적으로, 본 발명의 면역원성 조성물에서 모든 컨쥬게이트는 이 방식으로 제조되었다. 하지만, 본 발명이 탈시알화된 혈청형 V 캡슐 당류를 사용할 때, 알데히드 기는 이 당류에서 당류의 갈락토스 잔기 중 일부 (예를 들어, 5 내지 40%, 특히 10 내지 30%, 바람직하게는 약 20%)의 산화 (예를 들어, 페리오데이트 산화)에 의해 컨쥬게이션 전에 생성될 수도 있다 [14]. 대체 컨쥬게이션 공정은 이기능적 결합자와 함께 당류 (테-N-아세틸화로부터, 또는 아민의 도입 후

에)에서 -NH₂ 기의 사용을 수반하며, 참고문헌 33에서 설명된 바와 같다. 일부 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물에서 컨주게이트 중 하나 이상은 이 방식으로 제조되었다. 추가의 대체 공정은 참고문헌 15 및 16에서 설명된다. 이 공정에서, 약한 탈아미노화 분할에 의한 타입 II 또는 타입 III 캡슐 당류 탈폴리머화의 말단 2,5-무수-D-만노스 잔기의 자유 알데히드 기는 환원성 아미노화에 의한 컨주게이션에 사용된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물에서 컨주게이트 중 하나 이상이 이 방식으로 제조되었다.

[0029] 본 발명은 담체 분자의 사용을 수반하며, 이것은 전형적으로 단백질이다. 유용한 담체 단백질은 박테리아 독소 또는 디프테리아(diphtheria) 변성 독소 또는 파상풍 변독소와 같은 변성 독소를 포함한다. 독소 또는 변성 독소의 단편, 예를 들어, 파상풍 변독소의 단편 C가 또한 사용될 수 있다 [34].

[0030] 디프테리아 독소의 CRM197 돌연변이 [35-37]는 본 발명과 함께 사용되는 특히 유용한 담체이다. 교차-반응 재료 (CRM197)는 디프테리아 독소의 유전적으로 해독된 조제물이다. CRM197은 단일 아미노산에서만 디프테리아 독소 (DT)와 다르고 그러므로 DT (CRM=교차 반응 재료)와 고도로 교차-반응성이다. 디프테리아 독소의 이 돌연변이는 포름알데히드로의 해독화를 필요로 하지 않고, 정제된 항원의 균질한 조제물은, 예를 들어, 카사미노산 및 이스트(yeast) 추출 배지에서 키워진 코리네박테리아 디프테리아(Corynebacteria diphtheria) 균주 C7 (beta197)의 배양물로부터 쉽게 얻어질 수 있다. 대안으로 CRM197은 제US5,614,382호에 따라 제조함으로써 제조될 수도 있다. CRM197은 여러 캡슐 다당류 항원에 대한 담체 단백질로서 인간 사용에 대하여 허가되며 포름알데히드 처리에 의해 제조된 통상적인 디프테리아 변성 독소에 대한 잠재적 대안이다.

[0031] 다른 적합한 담체 단백질은 네이세리아 메닝기티디스(N. meningitidis) 외막 단백질 [38], 합성 펩티드 [39,40], 열 충격 단백질 [41,42], 백일해(pertussis) 단백질 [43,44], 시토킨 [45], 림포킨 [45], 호르몬 [45], 성장 인자 [45], 인간 혈청 알부민 (바람직하게 재조합), 다양한 병원체-유래 항원의 다중 인간 CD4⁺ T 세포 에피토프를 포함하는 인공적 단백질 [46], 예를 들어, N19 [47], 헤모필루스 인플루엔자(H.인플루엔자e)의 단백질 D [48,49], 폐렴 구균 표면 단백질 PspA [50], 뉴모리신 [51], 철-흡수 단백질 [52], 클로스트리듐 디피실레(C. difficile)의 독소 A 또는 B [53], 재조합 슈도모나스 에루기노사(Pseudomonas aeruginosa) 외부 단백질(exoprotein) A (rEPA) [54], 등을 포함한다. 담체에 부착은 바람직하게, 예를 들어, 담체 단백질의 리신 잔기, 또는 아르기닌 잔기의 측쇄에서, 또는 N-말단에서 -NH₂ 기를 통한 것이다. 부착은 또한, 예를 들어, 시스템인 잔기의 측쇄에서, -SH 기를 통한 것일 수도 있다.

[0032] 예를 들어, 담체 역제의 위험을 감소시키기 위해 하나 이상의 담체 단백질을 사용하는 것이 가능하다. 따라서 상이한 담체 단백질은 상이한 GBS 혈청형에 사용될 수 있다, 예를 들어, 혈청형 Ia 당류는 CRM197에 컨주게이션될 수도 있는 한편, 혈청형 Ib 당류는 파상풍 변독소에 컨주게이션될 수도 있다. 특히, 혈청형 Ia, Ib 및 III 당류는 CRM197과 같은 제1 담체에 컨주게이션될 수도 있는 한편, 혈청형 II 및 V 당류는 파상풍 변독소 (-TT)와 같은 제2 (상이한) 담체에 컨주게이션될 수도 있다. 그러나 더 특히, 혈청형 Ia, Ib, III 및 V 당류는 CRM197과 같은 제1 담체에 컨주게이션될 수도 있는 한편, 혈청형 II 당류는 -TT와 같은 제2 (상이한) 담체에 컨주게이션될 수도 있다.

[0033] 본 발명의 예시적 면역원성 조성물은 a) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류인 컨주게이트; b) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류인 컨주게이트; c) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류인 컨주게이트; d) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류인 컨주게이트; 및 e) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류인 컨주게이트를 포함한다. 본 발명의 또 다른 예시적 면역원성 조성물은 a) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류인 컨주게이트; b) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류인 컨주게이트; c) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류인 컨주게이트; d) 파상풍 변독소에 컨주게이션된 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류인 컨주게이트; 및 e) 파상풍 변독소에 컨주게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류인 컨주게이트를 포함한다. 그러나 본 발명의 또 다른 예시적 면역원성 조성물은 a) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류인 컨주게이트; b) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류인 컨주게이트; c) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류인 컨주게이트; d) 파상풍 변독소에 컨주게이션된 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류인 컨주게이트; 및 e) CRM197에 컨주게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류인 컨주게이트를 포함한다. 또한 특정 당류 항원에 대하여 하나 이상의 담체 단백질을 사용하는 것이 가능하다, 예를 들어, 혈청형

III 당류는 두 개의 균일 수도 있는데, 일부는 CRM197에 컨주게이션되고 다른 것들은 과상풍 변독소에 컨주게이션된다. 하지만, 일반적으로는, 모든 당류에 대하여 같은 담체 단백질을 사용하는 것이 바람직하다.

[0034] 단일 담체 단백질은 하나 이상의 당류 항원을 갖고 있을 수도 있다 [55,56]. 예를 들어, 단일 담체 단백질은 혈청형 Ia와 Ib의 당류에 컨주게이션될 수도 있다. 이 목적을 달성하기 위해, 상이한 당류는 컨주게이션 반응 전에 혼합될 수 있다. 하지만, 일반적으로는, 각 혈청군에 대하여 별개의 컨주게이트를 갖는 것이 바람직하며, 상이한 당류는 컨주게이션 후에 혼합된다. 별개의 컨주게이트는 같은 담체를 기반으로 할 수도 있다.

[0035] 1:5 (즉, 과도한 단백질) 내지 5:1 (즉, 과도한 당류)의 당류:단백질 중량비, 특히 1:5 내지 2:1의 비를 갖는 컨주게이트가 전형적으로 사용된다. 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류인 컨주게이트에 대하여, 당류:단백질 중량비는 전형적으로 약 1:1 내지 1:2, 특히 약 1:1.3이다. 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류인 컨주게이트에 대하여, 비는 전형적으로 약 1:1 내지 1:2, 특히 약 1:1.3이다. 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류에 대하여, 당류:단백질 중량비는 전형적으로 약 3:1 내지 1:1, 특히 약 2:1이다. 하지만, 약 1:1 내지 1:5, 특히 약 1:3.3의 당류:단백질 중량비를 갖는 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 III가 또한 사용될 수도 있다. 담체 단백질에 컨주게이션된 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류인 컨주게이트에 대하여, 비는 전형적으로 약 2:1 내지 1:1, 특히 약 1.1:1이다. 따라서 당류의 중량 초과가 전형적이며, 특히 당류 사슬이 더 길다.

[0036] 탈시알릴화된 GBS 혈청형 V 다당류가 사용되면, 교차-결합하는 단백질에 대하여 특히 상이한 수준의 다당류가 사용된다. 교차-결합의 수준은, 예를 들어, 단백질-다당류 비를 변화시킴으로써 조절될 수도 있다. 특히, 당류:단백질 중량비는 1:1.5 이하, 1:1 이하, 또는 약 1:0.5이다.

[0037] 조성물은 소량의 자유 담체를 포함할 수도 있다 [57]. 본 발명의 조성물에서 자유 및 컨주게이션된 형태 둘 다로 존재할 때, 컨주게이션되지 않은 형태는 바람직하게 전체로서 담체 단백질의 총량의 5% 이하이고, 더 바람직하게는 2 중량% 이하로 존재한다.

[0038] 컨주게이션 후, 자유 및 컨주게이션된 당류가 분리될 수 있다. 많은 적합한 방법이 있는데, 소수성 크로마토그래피(hydrophobic chromatography), 수직적 한외 여과(tangential ultrafiltration), 디아필트레이션(diafiltration) 등을 포함한다. [또한 참고문헌 58 & 59, 등을 참고하면 된다]. 바람직한 방법은 참고문헌 60에서 설명된다.

[0039] 본 발명의 조성물이 탈폴리머화된 올리고당을 포함하는 경우, 탈폴리머화가 컨주게이션보다 선행하는 것이 바람직하다.

[0040] **약학적 방법 및 사용**

[0041] 본 발명의 면역원성 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수도 있다. 전형적인 '약학적으로 허용 가능한 담체'는 조성물을 받는 개체에 해로운 항체의 생산을 스스로 유발하지 않는 어떤 담체도 포함한다. 적합한 담체는 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리머의 아미노산, 아미노산 코폴리머, 수크로스 [61], 트레할로스 [62], 락토스, 및 지질 응집체 (예를 들어, 오일 방울 또는 리포솜)와 같이 전형적으로 크고, 서서히 대사작용하는 거대분자이다. 이러한 담체는 당업자들에게 잘 알려져 있다. 백신은 또한 물, 식염수, 글리세롤, 등과 같은 희석제를 함유할 수도 있다. 추가적으로, 습윤제 또는 에멀전화제, pH 완충 물질, 등과 같은 보조 물질이 존재할 수도 있다. 멸균 피로겐이 없는, 포스페이트-완충된 생리학적 식염수가 전형적인 담체이다. 약학적으로 허용 가능한 부형제의 철저한 논의는 참고문헌 63에서 이용 가능하다.

[0042] 본 발명의 조성물은 수성 형태 (즉, 용액 또는 현탁액) 또는 건조된 형태 (예를 들어, 동결건조됨)로 있을 수도 있다. 건조된 백신이 사용되면 그것은 주사 전에 액체 배지로 재구성될 것이다. 컨주게이트 백신의 동결건조는 업계에 알려져 있는데, 예를 들어, Menjugate™ 제품은 동결건조된 형태로 제공된다. 본 발명의 면역원성 조성물이 하나 이상의 GBS 혈청형의 캡슐 당류를 포함하는 컨주게이트를 포함할 때, 컨주게이트가 별개로 제조되고, 혼합된 다음에 동결건조되는 것이 전형적이다. 이 방법으로, 본원에서 설명된 바와 같이 두 개, 세 개 또는 네 개 등의 컨주게이트를 포함하는 동결건조된 조성물이 제조될 수도 있다. 동결건조 중에 컨주게이트를 안정화하기 위해서, 조성물에서, 예를 들어, 1mg/ml 내지 30mg/ml (예를 들어, 약 25mg/ml)로 당 알콜 (예를 들어, 만니톨) 및/또는 이당류 (예를 들어, 수크로스 또는 트레할로스)를 포함하는 것이 바람직할 수도 있다. 수크로스의 사용은 GBS 컨주게이트 백신에 대한 안정화제로서 추천되었다 (참고문헌 64). 하지만, 본 발명의 안정화제가 만니톨인 것이 전형적이다. 건조된 백신이 주사 전에 액체 배지로 재구성될 때, 잔여 만니톨의 농도는 전형적으로 약 2-20mg/ml, 예를 들어, 3.75mg/ml, 7.5mg/ml 또는 15mg/ml일 것이다. 만니톨의 사용이 유리한데 만니톨이

GBS 캡슐 당류의 단당류 서브유닛과 화학적으로 다르기 때문이다. 이것은, 예를 들어, 품질 관리 분석을 위한 캡슐 당류의 검출이 만니톨의 간섭 없이 당류의 서브유닛의 존재를 기반으로 할 수도 있다는 것을 의미한다. 반대로, 수크로스과 유사한 안정화제는 클루코스를 포함하는데, 이것은 당류에서 글루코스 서브유닛의 검출을 간섭할 수도 있다.

[0043] 조성물은 바이알로 제공될 수도 있거나, 그것들은 미리 채워진 주사기로 제공될 수도 있다. 주사기는 바늘과 함께 또는 없이 공급될 수도 있다. 주사기는 조성물의 일회 용량을 포함하는 반면에, 바이알은 일회 용량 또는 다회수 용량을 포함할 수도 있다.

[0044] 본 발명의 수성 조성물은 또한 동결건조된 형태의 다른 백신을 재구성하는데 적합하다. 본 발명의 조성물이 이러한 즉석의 재구성에 사용되기 위한 것이면, 본 발명은 두 개의 바이알을 포함할 수도 있거나, 또는 하나의 미리 채워진 주사기 및 하나의 바이알을 포함할 수도 있는 키트를 제공하며, 주사기의 내용물은 주사 전 바이알의 내용물을 재활성화하기 위해 사용된다.

[0045] 본 발명의 조성물은 단위 용량 형태 또는 다회수 용량 형태로 포장될 수도 있다. 다회수 용량 형태에 대하여, 바이알은 미리 채워진 주사기가 바람직하다. 효과적인 투약 부피는 일상적으로 확립될 수 있지만, 조성물의 전형적인 인간 용량은, 예를 들어, 근육 내 주사를 위해 0.5ml의 부피를 갖는다.

[0046] 조성물의 pH는 바람직하게 6 내지 8, 바람직하게 약 7이다. 안정한 pH는 버퍼의 사용에 의해 유지될 수도 있다. 본 발명의 면역원성 조성물은 전형적으로 칼륨 디히드로젠 포스페이트 버퍼를 포함한다. 칼륨 디히드로젠 포스페이트 버퍼는 약 1-10mM, 예를 들어, 1.25mM, 2.5mM 또는 5.0mM 칼륨 디히드로젠 포스페이트를 포함할 수도 있다. 조성물이 알루미늄 히드록시드 염을 포함하면, 히스티딘 버퍼를 사용하는 것이 바람직하다 [65]. 조성물은 멸균되고 및/또는 피로겐이 없을 수도 있다. 본 발명의 조성물은 인간에 대하여 등장성일 수도 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 면역원성이고, 더 바람직하게는 백신 조성물이다. 본 발명에 따르는 백신은 예방적 (즉, 감염을 예방하기 위해) 또는 치료적 (즉, 감염을 치료하기 위해)일 수도 있지만, 전형적으로 예방적일 것이다. 본 발명의 조성물은 면역원성이고, 더 바람직하게는 백신 조성물이다. 본 발명에 따르는 백신은 예방적 (즉, 감염을 예방하기 위해) 또는 치료적 (즉, 감염을 치료하기 위해)일 수도 있지만, 전형적으로 예방적일 것이다. 예방적 백신은 질환으로부터 완벽한 보호를 보장하지 않는데 환자가 항체를 발달시키더라도, 면역 시스템이 감염을 몰아낼 수 있기 전에 시간적 격차 또는 지연이 있을 수도 있기 때문이다. 그러므로, 및 의심할 여지를 없애기 위해, 용어 예방적 백신은 또한, 예를 들어, 이러한 감염의 심각도 또는 기간을 감소시킴으로써 미래의 감염의 효과를 개선하는 백신을 나타낼 수도 있다. 용어 "감염에 대한 보호" 및/또는 "보호적 면역력을 제공한다"는 대상체의 면역 시스템이 면역 반응을 촉발하고 감염을 물리치기 위해 프라이밍되었다 (예를 들어, 백신 접종에 의해)는 것을 의미한다. 특히, 촉발된 면역 반응은 박테리아의 상이한 균주와 같이 많은 병원체에 대한 감염을 물리칠 수 있다. 따라서 백신 접종된 대상체가 감염될 수도 있지만, 대조군 대상체보다 감염을 더 잘 물리칠 수 있다.

[0048] 백신으로서 사용된 면역원성 조성물은, 필요에 따라, 항원(들)의 면역학적 유효량, 뿐만 아니라 어떤 다른 구성요소도 포함한다. '면역학적 유효량'은, 일회 용량으로 또는 일련의 일부로서, 개체에 상기 양의 투여가 치료 또는 예방에 효과적이라는 것을 의미한다. 보통, 원하는 결과는 병원체에 대하여 대상체를 보호할 수 있거나 이에 기여할 수 있는 항원 (예를 들어, 병원체)-특이적 면역 반응의 생산이다. 이 양은 치료되는 개체의 건강 및 육체적인 상태, 나이, 치료되는 개인의 분류군 (예를 들어, 비-인간 영장류, 영장류, 등), 항체를 합성하는 개체 면역 시스템의 능력, 원하는 보호의 정도, 백신의 제형화, 치료하는 의사의 의학적 상황에 대한 평가, 및 다른 관련된 인자에 따라 다르다. 양은 일상적인 시험을 통해 결정될 수 있는 비교적 넓은 범위에 속할 것으로 예상된다.

[0049] 각각의 용량 내에서, 개개의 당류 항원의 양은 일반적으로 일반적으로 0.1-50 µg (당류의 질량으로 측정됨), 특히 1-50 µg 또는 0.5-25 µg, 더 특히 2.5-7 µg, 예를 들어, 약 1 µg, 약 2.5 µg, 약 5 µg, 약 10 µg, 약 15 µg, 약 20 µg 또는 약 25 µg일 것이다. 각각의 용량 내에서, GBS 캡슐 당류의 총량은 일반적으로 ≤ 70 µg (당류의 질량으로 측정됨), 예를 들어, ≤ 60 µg일 것이다. 특히, 총량은 ≤ 40 µg (예를 들어, ≤ 30 µg) 또는 ≤ 20 µg (예를 들어, ≤ 15 µg)일 것이다. 이 총량들이 본 발명에서 사용에 바람직하다. 잠재적 독성을 감소시키기 위해 단위 용량 당 캡슐 당류(들)의 총량을 최소화하는 것이 유리할 것이다. 따라서, ≤ 20 µg의 총량, 예를 들어, ≤ 15 µg, ≤ 7.5 µg 또는 ≤ 1.5 µg이 바람직하다.

[0050] GBS는 신체의 다양한 지역에 영향을 미치며 그래서 본 발명의 조성물은 다양한 형태로 제조될 수도 있다. 예를

들어, 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서, 주사 가능 물질로 제조될 수도 있다. 조성물은, 예를 들어, 흡입제로서, 폐 투여를 위해 제조될 수도 있으며, 미세한 분말 또는 스프레이를 사용한다. 조성물은 좌약 또는 페서리(pessary)로서 제조될 수도 있다. 조성물은, 예를 들어, 스프레이, 방울, 겔 또는 분말로써 비강, 귀 또는 안구 투여를 위해 제조될 수도 있다 [예를 들어, 참고문헌 66 & 67]. 페럼 구균 당류 [68,69], Hib 당류 [70], MenC 당류 [71], 및 Hib 및 MenC 당류 컨주게이트의 혼합물 [72]의 비강 투여의 성공이 보고되었다.

[0051] 본 발명의 조성물은 aP/wP, TT, DT 및/또는 IPV 항원, 즉, 무세포성 백일해 항원, 예를 들어, 백일해 사상 헤마글루티닌 (FHA), 퍼락틴 (PRN, 69K-OMP), 백일해 필브리아 (fimbriae; FIM), 또는 세포성 백일해 항원, 전체 세포 백일해 항원, 백일해 변성 독소 또는 백일해 독소 (PT), 과상풍 변독소, 디프테리아 변성 독소 및/또는 불활성화된 폴리오바이러스(poliovirus) 항원과 조합될 수도 있다. 예를 들어, 이것은 본 발명의 조성물을 ANATETALL®, DIFTETALL®, PENTACEL® 또는 DAPTACEL®을 포함하는 이미 상업적으로 이용 가능한 제형과 조합함으로써 수행될 수 있다.

[0052] 본 발명의 조성물은, 특히 다회수 용량 포맷으로 포장될 때, 항균제를 포함할 수도 있다.

[0053] 본 발명의 조성물은 세제, 예를 들어, Tween 80과 같은 Tween (폴리소르베이트)을 포함할 수도 있다. 세제는 일반적으로 낮은 수준, 예를 들어, ≤ 0.01%로 존재한다.

[0054] 본 발명의 조성물은 긴장성을 제공하기 위해 나트륨 염 (예를 들어, 나트륨 클로라이드)을 포함할 수도 있다. 10 ± 2mg/ml NaCl의 농도가 전형적이다. 일부 구체예에서, 4-10mg/ml NaCl의 농도, 예를 들어, 9.0, 7.0, 6.75 또는 4.5mg/ml이 사용될 수도 있다.

[0055] 본 발명의 조성물은 일반적으로 버퍼를 포함할 것이다. 포스페이트 버퍼가 전형적이다.

[0056] 본 발명의 조성물은 다른 면역조절제와 함께 투여될 수도 있다. 특히, 조성물은 하나 이상의 보조제를 포함할 수도 있다. 이러한 보조제는 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다:

[0057] A. 미네랄-함유 조성물

[0058] 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 미네랄 함유 조성물은 알루미늄 염 및 칼슘 염 (또는 이것의 혼합물)과 같은 미네랄 염을 포함한다. 칼슘 염은 칼슘 포스페이트 (예를 들어, 참고문헌 73에 개시된 "CAP" 입자)를 포함한다. 알루미늄 염은 히드록시드, 포스페이트, 술페이트, 등을 포함하며, 염은 어떤 적합한 형태 (예를 들어, 겔, 결정, 무정형, 등)를 취한다. 이 염들의 흡착이 바람직하다. 미네랄 함유 조성물은 또한 금속 염의 입자로서 제형화될 수도 있다 [74].

[0059] 알루미늄 히드록시드 및 알루미늄 포스페이트로서 알려져 있는 보조제가 사용될 수도 있다. 이 이름들은 통상적이지만, 존재하는 실제의 화합물의 정확한 설명이 없기 때문에, 단지 편의상으로만 사용된다 (예를 들어, 참고문헌 75의 9장 참조). 본 발명은 보조제로서 일반적으로 사용되는 "히드록시드" 또는 "포스페이트" 보조제 중 어떤 것도 사용할 수 있다. "알루미늄 히드록시드"로서 알려져 있는 보조제는 전형적으로 알루미늄 옥시히드록시드 염인데, 이것은 보통 적어도 부분적으로는 결정형이다. "알루미늄 포스페이트"로서 알려져 있는 보조제는 전형적으로 알루미늄 히드록시포스페이트이며, 종종 소량의 술페이트 (즉, 알루미늄 히드록시포스페이트 술페이트)를 또한 함유한다. 그것들은 침전에 의해 얻어질 수도 있고, 침전 중에 반응 조건 및 농도는 염에서 히드록실에 대한 포스페이트 치환의 정도에 영향을 미친다.

[0060] 섬유상 형태 (예를 들어, 투과 전자 현미경에서 보이는 바와 같음)가 알루미늄 히드록시드 보조제에 대하여 전형적이다. 알루미늄 히드록시드 보조제의 pI는 전형적으로 약 11이다, 즉, 보조제 자체는 생리학적 pH에서 양의 표면 전하를 갖는다. 1.8-2.6mg 알루미늄 포스페이트 보조제의 흡착 능력은 일반적으로 0.3 내지 1.2, 바람직하게 0.8 내지 1.2, 및 더 바람직하게 0.95 ± 0.1의 PO₄/Al 물비를 갖는다. 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 특히 히드록시포스페이트 염에 대하여 무정형일 것이다. 전형적인 보조제는 0.84 내지 0.92의 PO₄/Al 물비를 갖는 무정형 알루미늄 히드록시포스페이트이며, 0.6mg Al³⁺/ml로 포함된다. 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 미립자 (예를 들어, 투과 전자 현미경 사진에서 보이는 평판-유사 형태)일 것이다. 입자의 전형적인 지름은 어떤 항원에 흡착 후에 0.5-20 μm (예를 들어, 약 5-10 μm)의 범위에 있다. pH 7.4에서 mg Al⁺⁺⁺ 당 0.7-1.5mg 단백질의 흡착 능력이 알루미늄 포스페이트 보조제에 대하여 보고되었다.

[0061] 알루미늄 포스페이트의 영 전위점 (PZC)은 히드록실에 대한 포스페이트 치환의 정도에 역으로 관련되고, 이 치환의 정도는 침전에 의해 염을 제조하는데 사용된 반응 조건 및 반응물의 농도에 따라 다를 수도 있다. PZC는

또한 용액에서 자유 포스페이트 이온의 농도를 변화시킴으로써 (더 많은 포스페이트 = 더 산성인 PZC) 또는 히스티딘 버퍼와 같은 버퍼를 추가함으로써 (PZC를 더 염기성으로 만든다) 달라진다. 본 발명에 따라 사용된 알루미늄 포스페이트는 일반적으로 4.0 내지 7.0, 더 바람직하게 5.0 내지 6.5 예를 들어, 약 5.7의 PZC를 가질 것이다.

[0062] 본 발명의 조성물을 제조하기 위해 사용된 알루미늄 염의 현탁액은 버퍼 (예를 들어, 포스페이트 또는 히스티딘 또는 트리스 버퍼)를 함유할 수도 있지만, 이것이 항상 필수적인 것은 아니다. 현탁액은 바람직하게 멸균되고 피로겐이 없다. 현탁액은, 예를 들어, 1.0 내지 20mM, 바람직하게 5 내지 15mM, 및 더 바람직하게 약 10mM의 농도로 존재하는 자유 수성 포스페이트 이온을 포함할 수도 있다. 현탁액은 또한 나트륨 클로라이드를 포함할 수도 있다.

[0063] 본 발명은 알루미늄 히드록시드 및 알루미늄 포스페이트 둘 다의 혼합물을 사용할 수 있다. 이 경우에 히드록시드보다 더 많은 알루미늄 포스페이트가 있을 수도 있는데 중량비는, 예를 들어, 적어도 2:1 예를 들어, $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, 등이다.

[0064] 환자에게 투여되는 조성물에서 Al^{+++} 의 농도는 바람직하게는 10mg/ml 이하, 예를 들어, $\leq 5mg/ml$, $\leq 4mg/ml$, $\leq 3mg/ml$, $\leq 2mg/ml$, $\leq 1mg/ml$, 등이다. 바람직한 범위는 0.3 내지 1mg/ml이다. 최대 0.85mg/용량이 바람직하다.

[0065] 전형적인 보조제 알루미늄 포스페이트 보조제는 0.84 내지 0.92의 PO_4/Al 물비를 갖는 무정형 알루미늄 히드록시포스페이트이며, 0.6mg Al^{3+}/ml 로 포함된다. 저용량의 알루미늄 포스페이트로의 흡착이 사용될 수도 있는데, 예를 들어, 용량 당 컨주게이트 당 50 내지 100 $\mu g Al^{3+}$ 이다.

[0066] B. 오일 에멀전

[0067] 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 오일 에멀전 조성물은 스쿠알렌-물 에멀전, 예를 들어, MF59 (5% 스쿠알렌, 0.5% Tween 80, 및 0.5% Span 85, 미세유동화기를 사용하여 1 마이크론 미만의 입자로 제형화됨)를 포함한다 [참고문헌 75의 10장 참조; 또한 참고문헌 76-78 참조]. MF59는 FLUAD™ 인플루엔자(influenza) 바이러스 3가 서브유닛 백신에서 보조제로서 사용된다.

[0068] 특히 조성물에서 사용되는 바람직한 보조제는 1 마이크론 미만의 수중유 에멀전이다. 본원에서 사용되는 바람직한 1 마이크론 미만의 수중유 에멀전은 다양한 양의 MTP-PE, 예를 들어, 4-5% w/v 스쿠알렌, 0.25-1.0% w/v Tween 80 (폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레에이트), 및/또는 0.25-1.0% Span 85 (소르비탄 트리올레에이트), 및, 선택적으로, N-아세틸뮤라밀-L-알라닌-D-이소글루타미드-L-알라닌-2-(2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포포틸옥시)-에틸아민 (MTP-PE)을 함유하는 1 마이크론 미만의 수중유 에멀전을 선택적으로 함유하는 스쿠알렌/물 에멀전이다. 본원에서 사용되는 1 마이크론 미만의 수중유 에멀전, 같은 것을 만드는 방법 및 면역 자극제, 예를 들어, 뮤라밀 펩티드는 참고문헌 76 & 79-80에서 상세히 설명된다.

[0069] 완전 프로인트 보조제 (Complete Freund's Adjuvant; CFA) 및 불완전 프로인트 보조제 (incomplete Freund's Adjuvant; IFA)는 또한 본 발명에서 보조제로서 사용될 수도 있다.

[0070] C. 사포닌 제형 [참고문헌 75의 22장]

[0071] 사포닌 제형은 또한 본 발명에서 보조제로서 사용될 수도 있다. 사포닌은 광범위한 식물 종의 껍질, 잎, 줄기, 뿌리 및 심지어 꽃에서도 발견되는 스테롤 글리코사이드 및 트리테페노이드 글리코사이드의 이종기원 균이다. 켈라리아 사포나리아 몰리나 나무(Quilliaia saponaria Molina tree)의 껍질로부터 분리된 사포닌은 보조제로서 널리 연구되었다. 사포닌은 또한 스밀락스 오르나타(Smilax ornata) (사르사프릴라(sarsapilla)), 김소필라 파니쿨라타(Gypsophilla paniculata) (브리데스 베일(brides veil)), 및 사포나리아 오피시아날리스(Saponaria officianalis) (석회패랭이꽃(soap root))로부터 상업적으로 얻을 수 있다. 사포닌 보조제 제형은 QS21과 같은 정제된 제형, 뿐만 아니라 ISCOM과 같은 지질 제형을 포함한다.

[0072] 사포닌 조성물은 HPLC 및 RP-HPLC를 사용하여 정제되었다. 이 기술들을 사용하는 특이적 정제된 분획이 확인되었으며, QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B 및 QH-C를 포함한다. 바람직하게, 사포닌은 QS21이다. QS21의 생산 방법은 참고문헌 81에서 개시된다. 사포닌 제형은 또한 콜레스테롤과 같은 스테롤을 포함할 수도 있다 [82].

[0073] 사포닌과 콜레스테롤의 조합은 면역 자극 복합체 (ISCOM)로 불리는 독특한 입자를 형성하기 위해 사용될 수 있

다 [참고문헌 75의 23장]. ISCOM은 전형적으로 포스포티딜에탄올아민 또는 포스포티딜콜린과 같은 인지질을 또한 포함한다. 어떤 알려져 있는 사포닌도 ISCOM에서 사용될 수 있다. 바람직하게, ISCOM은 QuilA, QHA 및 QHC 중 하나 이상을 포함한다. ISCOM은 참고문헌 82-84에서 더 설명된다. 선택적으로, ISCOM은 추가의 세제(들)가 전혀 없다 [85].

[0074] 사포닌 기반 보조제의 개발의 재검토는 참고문헌 86 & 87에서 발견될 수 있다.

[0075] D. 비로솜 및 바이러스-유사 입자

[0076] 비로솜 및 바이러스-유사 입자 (VLP)는 본 발명에서 보조제로서 사용될 수 있다. 이 구조들은 일반적으로 원래의 바이러스 계통과 선택적으로 조합되거나 이것으로 제형화된 바이러스의 하나 이상의 단백질을 함유한다. 바이러스 단백질은 재조합에 의해 생산되거나 전체 바이러스로부터 분리될 수도 있다. 비로솜 또는 VLP에서 사용에 적합한 이 바이러스 단백질들은 인플루엔자 바이러스 (예를 들어, HA 또는 NA), B형 간염 바이러스 (Hepatitis B virus) (예를 들어, 코어(core) 또는 캡시드(capsid) 단백질), E형 간염 바이러스(Hepatitis E virus), 홍역 바이러스(measles virus), 신드비스 바이러스(Sindbis virus), 로타바이러스(Rotavirus), 구제역 바이러스(Foot-and-Mouth Disease virus), 레트로바이러스(Retrovirus), 노르워크 바이러스(Norwalk virus), 인간 파필로마 바이러스(Papilloma virus), HIV, RNA-과지, Q β -과지 (예를 들어, 코팅 단백질), GA-과지, fr-과지, AP205 과지, 및 Ty (예를 들어, 레트로트랜스포손(retrotransposon) Ty 단백질 p1)로부터 유래된 단백질을 포함한다. VLP는 참고문헌 88-93에서 더 논의된다. 비로솜은 예를 들어, 참고문헌 94에서 더 논의된다.

[0077] E. 박테리아 또는 미생물 유도체

[0078] 본 발명에서 사용에 적합한 보조제는 박테리아 또는 미생물 유도체, 예를 들어, 엔테로박테리아 (enterobacteria) 지질다당류 (LPS)의 비-독성 유도체, 지질 A 유도체, 면역 자극 올리고뉴클레오티드 및 ADP-리보실화 독소 및 이것의 해독된 유도체를 포함한다.

[0079] LPS의 비-독성 유도체는 모노포스포릴 지질 A (MPL) 및 3-O-탈아실화된 MPL (3dMPL)을 포함한다. 3dMPL은 3 데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A와 4, 5 또는 6 아실화된 사슬의 혼합물이다. 3 데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A의 바람직한 "작은 입자" 형태는 참고문헌 95에서 개시된다. 3dMPL의 이러한 "작은 입자"는 0.22 μ m 막을 통해 멸균 여과될 정도로 작다 [95]. 다른 비-독성 LPS 유도체는 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 유도체, 예를 들어, RC-529와 같은 모노포스포릴 지질 A 모방체를 포함한다 [96,97].

[0080] 지질 A 유도체는 OM-174와 같이 에스체리키아 콜리(Escherichia coli)의 지질 A의 유도체를 포함한다. OM-174는, 예를 들어, 참고문헌 98 & 99에서 설명된다.

[0081] 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 면역 자극 올리고뉴클레오티드는 CpG 모티프(motif)를 함유하는 뉴클레오티드 서열 (구아노신에 결합된 포스페이트에 의해 연결된 메틸화되지 않은 시토신을 함유하는 디뉴클레오티드 서열)을 포함한다. 회귀성 또는 poly(dG) 서열을 함유하는 이중-가닥 RNA 및 올리고뉴클레오티드는 또한 면역 자극인 것으로 나타났다.

[0082] CpG's는 뉴클레오티드 변형/유사체, 예를 들어, 포스포로티오에이트 변형을 포함할 수 있고 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있다. 참고문헌 100, 101 및 102는 가능한 유사체 치환, 예를 들어, 구아노신의 2'-데옥시-7-데아자구아노신으로 대체를 개시한다. CpG 올리고뉴클레오티드의 보조 효과는 참고문헌 103-108에서 더 논의된다.

[0083] CpG 서열은 TLR9, 예를 들어, 모티프 GTCGTT 또는 TTCGTT와 관련된 것일 수도 있다 [109]. CpG 서열은 Th1 면역 반응, 예를 들어, CpG-A ODN을 유발하는데 특이적일 수도 있거나, 또는 B 세포 반응, 예를 들어, CpG-B ODN에 더 특이적일 수도 있다. CpG-A 및 CpG-B ODN은 참고문헌 110-112에서 논의된다. 바람직하게, CpG는 CpG-A ODN이다.

[0084] 바람직하게, CpG 올리고뉴클레오티드는 5' 끝이 수용체 인식에 접근할 수 있도록 구성된다. 선택적으로, 두 개의 CpG 올리고뉴클레오티드 서열은 그것들의 3'에서 부착되어 "이뮤노머(immunomer)"를 형성할 수도 있다. 예를 들어, 109 & 1[1] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.-23을 참고하면 된다.

[0085] 박테리아 ADP-리보실화 독소 및 이것의 해독된 유도체는 본 발명에서 보조제로서 사용될 수도 있다. 바람직하게, 단백질은 에스체리키아 콜리(E.coli) (에스체리키아 콜리 열 불안정 장독소 "LT"), 콜레라(cholera) ("CT"), 또는 백일해 ("PT")로부터 유래된다. 점막 보조제로서 해독된 ADP-리보실화 독소의 사용은 참고문헌 116에서 설명되고 비경구 보조제로서는 참고문헌 117에서 설명된다. 독소 또는 변성 독소는 바람직하게 완전독소(holotoxin)의 형태이며, A 및 B 서브유닛 둘 다를 포함한다. 바람직하게, A 서브유닛은 해독 돌연

변이를 함유한다; 바람직하게 B 서브유닛은 돌연변이되지 않는다. 바람직하게, 보조제는 LT-K63, LT-R72, 및 LT-G192와 같이 해독된 LT 돌연변이이다. 보조제로서, ADP-리보실화 독소 및 이것의 해독된 유도체, 특히 LT-K63 및 LT-R72의 사용은 참고문헌 118-125에서 발견될 수 있다. 아미노산 치환에 대한 수치적 참조는 바람직하게 참고문헌 126에서 제시된 ADP-리보실화 독소의 A 및 B 서브유닛 정렬을 기반으로 하며, 특별히 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0086] F. 인간 면역조절기

[0087] 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 인간 면역조절기는 시토킨, 예를 들어, 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [127], 등) [128], 인터페론 (예를 들어, 인터페론- γ), 대식세포 콜로니 자극 인자(macrophage colony stimulating factor), 및 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor)를 포함한다.

[0088] G. 생체 접착제(Bioadhesive) 및 점막 접착제(Mucoadhesive)

[0089] 생체 접착제 및 점막 접착제는 또한 본 발명에서 보조제로서 사용될 수도 있다. 적합한 생체 접착제는 에스테르화된 히알루론산 미소구체 [129] 또는 폴리(아크릴산), 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 다당류 및 카르복시 메틸셀룰로스의 교차-결합된 유도체와 같은 점막 접착제를 포함한다. 키토산 및 이것의 유도체가 또한 본 발명에서 보조제로서 사용될 수도 있다 [130].

[0090] H. 미세입자

[0091] 미세입자는 또한 본 발명에서 보조제로서 사용될 수도 있다. 폴리(락티드-코-글리콜리드)와 함께, 생분해성 및 비-독성 (예를 들어, 폴리(α -히드록시산), 폴리히드록시부티르산, 폴리오르토에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리카프로락톤, 등)인 재료로 형성된 미세입자 (즉, 지름이 ~100nm 내지 ~150 μ m, 더 바람직하게 지름이 ~200nm 내지 ~30 μ m, 및 가장 바람직하게는 지름이 ~500nm 내지 ~10 μ m인 입자)가 바람직하고, 음전하를 띤 표면 (예를 들어, SDS로) 또는 양전하를 띤 표면 (예를 들어, 양이온 세제, 예를 들어, CTAB로)을 갖도록 선택적으로 처리된다.

[0092] I. 리포솜 (참고문헌 75의 13 & 14장)

[0093] 보조제로서 사용에 적합한 리포솜 제형의 예는 참고문헌 131-133에서 설명된다.

[0094] J. 폴리옥시에틸렌 에테르 및 폴리옥시에틸렌 에스테르 제형

[0095] 본 발명에서 사용에 적합한 보조제는 폴리옥시에틸렌 에테르 및 폴리옥시에틸렌 에스테르를 포함한다 [134]. 이러한 제형은 옥톡시놀과 조합된 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제 [135], 뿐만 아니라 옥톡시놀과 같은 적어도 하나의 추가적인 비-이온성 계면활성제와 조합된 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 또는 에스테르 계면활성제를 더 포함한다 [148]. 바람직한 폴리옥시에틸렌 에테르는 다음 군들로부터 선택된다: 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르 (라우레스(laureth) 9), 폴리옥시에틸렌-9-스테로일 에테르, 폴리옥시에틸렌-8-스테로일 에테르, 폴리옥시에틸렌-4-라우릴 에테르, 폴리옥시에틸렌-35-라우릴 에테르, 및 폴리옥시에틸렌-23-라우릴 에테르.

[0096] K. 폴리포스파젠 (PCPP)

[0097] PCPP 제형은, 예를 들어, 참고문헌 137 및 138에서 설명된다.

[0098] L. 뮤라밀 펩티드

[0099] 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 뮤라밀 펩티드의 예는 N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), N-아세틸-노르뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타민 (nor-MDP), 및 N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 MTP-PE)를 포함한다.

[0100] M. 이미다조퀴놀론 화합물.

[0101] 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 이미다조퀴놀론 화합물의 예는 이미콰모드(Imiquamod) 및 그것의 상동체 (예를 들어, "레스퀴모드(Resiquimod) 3M")를 포함하며, 참고문헌 139 및 140에서 더 설명된다.

[0102] N. 티오세미카르바존 화합물.

[0103] 티오세미카르바존 화합물의 예, 뿐만 아니라 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 모든 화합물을 제형화하고, 제조하고, 스크리닝하는 방법은 참고문헌 141에서 설명된 것들을 포함한다. 티오세미카르바존은 시토킨, 예를 들어, TNF- α 의 생산을 위한 인간 말초 혈액 단핵 세포의 자극에 있어서 특히 효과적이다.

[0104]

0. 트립탄트린 화합물.

[0105]

트립탄트린 화합물의 예, 뿐만 아니라 본 발명에서 보조제로서 사용에 적합한 모든 화합물을 제형화하고, 제조하고, 스크리닝하는 방법은 참고문헌 142에서 설명된 것들을 포함한다. 트립탄트린 화합물은 시토킨, 예를 들어, TNF- α 의 생산을 위한 인간 말초 혈액 단핵 세포의 자극에 있어서 특히 효과적이다.

[0106]

본 발명은 또한 상기 확인된 보조제 중 하나 이상의 양태의 조합을 포함할 수도 있다. 예를 들어, 다음 조합은 본 발명에서 보조제 조성물로서 사용될 수도 있다: (1) 사포닌 및 수중유 에멀전 [143]; (2) 사포닌 (예를 들어, QS21) + 비-독성 LPS 유도체 (예를 들어, 3dMPL) [144]; (3) 사포닌 (예를 들어, QS21) + 비-독성 LPS 유도체 (예를 들어, 3dMPL) + 콜레스테롤; (4) 사포닌 (예를 들어, QS21) + 3dMPL + IL-12 (선택적으로 + 스테롤) [145]; (5) 3dMPL과 예를 들어, QS21 및/또는 수중유 에멀전의 조합 [146]; (6) 10% 스쿠알렌, 0.4% Tween 80™, 5% 플루로닉(pluronic)-차단 폴리머 L121, 및 thr-MDP를 함유하고, 1 마이크론 미만의 에멀전으로 유동화되거나 더 큰 입자 크기 에멀전을 생성하기 위해 보텍스(vortex)된 SAF, (7) 2% 스쿠알렌, 0.2% Tween 80, 및 모노포스포릴리피드 A (MPL), 트레할로스 디미콜레이트 (TDM), 및 세포벽 골격 (CWS)으로 구성된 군의 하나 이상의 박테리아 세포벽 구성요소를 함유하는 Ribit™ 보조제 시스템 (RAS), (Ribi Immunochem), 바람직하게 MPL + CWS (Detox™); 및 (8) 하나 이상의 미네랄 염 (예를 들어, 알루미늄 염) + LPS의 비-독성 유도체 (예를 들어, 3dMPL).

[0107]

면역자극제로서 작용하는 다른 물질은 참고문헌 75의 7장에서 개시된다.

[0108]

알루미늄 염 보조제의 사용이 특히 바람직하며, 항원은 일반적으로 이러한 염에 흡착된다. 본 발명의 조성물에서 일부 항원이 알루미늄 히드록시드에 흡착하지만 알루미늄 포스페이트에 관련된 다른 항원을 갖는 것이 가능하다. 하지만, 일반적으로는, 단일 염, 예를 들어, 히드록시드 또는 포스페이트만을 사용하는 것이 바람직하지만, 둘 다는 아니다. 모든 컨주게이트가 흡착되어야 하는 것은 아니다, 즉, 일부 또는 모두가 용액에서 유리될 수 있다.

[0109]

치료 방법

[0110]

본 발명은 또한 포유동물에서 면역 반응을 일으키는 방법을 제공하며, 포유동물에 본 발명의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 면역 반응은 바람직하게 보호적이고 바람직하게 항체를 수반한다. 방법은 촉진 반응을 일으킬 수도 있다.

[0111]

포유동물은 바람직하게는 인간이다. 백신이 예방적 사용을 위한 것이면, 인간은 바람직하게는 어린이 (예를 들어, 영유아) 또는 청소년이다; 백신이 치료적 사용을 위한 것이면, 인간은 바람직하게는 성인이다. 어린이를 위해 의도된 백신은, 예를 들어, 안전성, 투약량, 면역원성, 등을 평가하기 위해 성인에게도 투여될 수 있다. 치료되는 인간의 바람직한 등급은 임신 가능 연령의 여성 (예를 들어, 청소년 이상)이다. 또 다른 바람직한 등급은 임신한 여성이다. 고령의 환자 (예를 들어, 50살, 60살, 70살, 80살 또는 90살 이상, 특히 65살 이상인 환자들), 특히 GBS 감염의 위험이 증가될 수도 있는 양로원에 사는 환자들 ([147])은 치료되는 인간의 또 다른 바람직한 등급이다. 일부 구체예에서, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가진다. 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가진다. 다른 구체예에서, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가진다. 다른 구체예에서, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가진다. 다른 구체예에서, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가진다. 다른 구체예에서, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가진다. 특히, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 Ia의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체 및 GBS 혈청형 Ib의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가질 수도 있다. 대안으로 또는 덧붙여, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 III의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가질 수도 있다. 대안으로 또는 덧붙여, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 II의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가질 수도 있다. 대안으로 또는 덧붙여, 인간은 약학적 조성물의 투여 전에 GBS 혈청형 V의 캡슐 당류에 대하여 검출 불가능한 수준의 항체를 가질 수도 있다. 캡슐 당류(들)에 대한 항체의 수준(들)은 업계에 알려져 있는 기술, 예를 들어, ELISA를 사용하여 결정될 수도 있다. 항체의 수준(들)은 투여 전 한 달, 특히 투여 전 한 달 내 (예를 들어, 투여의 2주 내, 1주 내 또는 투여일)의 것과 같을 수도 있다. 캡슐 당류(들)에 대한 검출 불가능한 수준(들)의 항체를 가진 여성들은 그들의 신생아에서 더 높은 속도의 GBS 감염을 가질 수도 있다. 이것은 GBS 캡슐 당류에 대한 더 높은 수준의 모체 항체가 신생아에서 질환의 감소된 위험과 연관성이 있

기 때문이다 [참고문헌 148 및 149]. 따라서, 이 여성들에게 투여가 본 발명에서 특별히 예상된다.

[0112] 본 발명은 또한 의약품으로 사용되는 본 발명의 조성물을 제공한다. 의약품은 바람직하게 포유동물에서 면역 반응을 일으킬 수 있고 (즉, 그것은 면역원성 조성물이다) 더 바람직하게는 백신이다.

[0113] 본 발명은 또한 포유동물에서 면역 반응을 일으키는 의약품의 제조에 있어서 본 발명의 조성물의 사용을 제공한다.

[0114] 이 사용 및 방법은 바람직하게는 스트렙토코쿠스 아갈락티에(S.agalactiae)에 의해 유발된 질환, 예를 들어, 신생아 패혈증(neonatal sepsis) 또는 균혈증(bacteremia), 신생아 폐렴(neonatal pneumonia), 신생아 뇌막염(neonatal meningitis), 자궁내막염(endometritis), 골수염(osteomyelitis), 화농성 관절염(septic arthritis), 등의 예방 및/또는 치료를 위한 것이다.

[0115] 질환이 예방되는 대상체는 본 발명의 컨쥬게이트를 받는 대상체와 같지 않을 수도 있다. 예를 들어, 컨쥬게이트는 자손을 보호하기 위해서 여성에게 투여될 수도 있다 (임신 전에 또는 중에) (소위 '모체 면역화' [150-152]). 임신한 여성의 면역화는 수동적 모체 면역을 통해 유아에게 항체-매개 면역력을 제공한다. 수동 면역은 모체 항체가 태반을 통해 태아에게 이동될 때 자연적으로 발생한다. 수동 면역은 유아에게 특히 중요한데 그들이 어떤 능동적 획득 면역도 없이 태어나기 때문이다. 임신한 여성에게 본 발명의 조성물의 투여는 여성의 면역력을 향상시키고, 항체는 태반을 통해 신생아에게 전달되며, 유아에게 수동적 모체 면역을 부여한다. 하지만, 유아의 수동 면역은 단지 일시적이고 태어나 처음 몇 주, 또는 몇 달 후에 감소하기 시작한다. 수동 면역이 단지 일시적이기 때문에, 수동 면역이 줄어들기 전에, 유아의 능동 면역을 유발하기 위해, 유아가 본 발명의 조성물의 투여를 받는 것이 중요할 수도 있다. 태어난 후 유아에게 두 번째 면역원성 조성물의 투여는 유아의 능동 면역을 유발하고, 임신 중에 모체로부터 전달된 면역력을 연장한다.

[0116] 본원에서 사용된 바와 같이, 유아는 1살 이하 (예를 들어, 1일령, 1주령, 2주령, 3주령, 4주령, 2개월령, 3개월령, 4개월령, 5개월령, 6개월령, 7개월령, 8개월령, 9개월령, 10개월령, 11개월령 이하, 12개월령 이하)의 개체이다.

[0117] 임신한 여성은 임신 중 어떤 기간에도 본 발명의 조성물이 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 임신 1삼분기, 2삼분기 또는 3삼분기 동안 여성에게 투여될 수도 있다. 일부 구체예에서, 조성물은 임신 마지막 6-12주 (예를 들어, 임신 28주, 임신 29주, 임신 30주, 임신 31주, 임신 32주, 임신 33주, 임신 34주, 임신 35주, 임신 36주, 임신 37주, 임신 38주, 임신 39주) 동안 여성에게 투여된다. 특히, 본 발명의 조성물은 유아의 전달 전 적어도 4주에 임신한 여성에게 투여된다. 일부 구체예에서, 1회-투여 요법은 임신 32주 내지 36주에 임신한 여성에게 투여된다. 다른 구체예에서, 2회-투여 요법이 임신한 여성에게 투여되는데, 제1 용량은 대략 임신 32주에 투여되고 제2 용량은 대략 임신 36주에 투여된다.

[0118] 유아는 태어난 첫 해 중의 어떤 기간에도, 및 원하면 그 후에도 조성물이 투여될 수 있고다. 일반적으로 조성물은 태어난 첫 해 중에 한 번, 두 번, 세 번, 네 번 이상 유아에게 투여될 것이다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 태어났을 때, 2주령, 4주령, 6주령, 2개월령, 3개월령, 4개월령, 6개월령, 9개월령, 및 12개월령으로부터 선택된 하나 이상의 기간에 유아에게 투여될 수도 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 모체 항체가 비-보호 역가로 감소하기 전에 유아에게 투여된다. 이후의 투여는 어떤 원하는 일정에 따라 일어날 수 있다.

[0119] 한 구체예에서, 스트렙토코쿠스 아갈락티에에 의해 유발된 질환에 대하여 유아를 보호하는 방법이 제공되는데, (a) 상기 유아의 임신 중에 본 발명의 조성물을 여성에게 투여하는 단계; 및 (b) 선택적으로 본 발명의 조성물을 임신으로부터 태어난 유아에게 투여하는 단계를 포함한다. 특히, 스트렙토코쿠스 아갈락티에 혈청형 Ia, Ib, III, II 및 V에 의해 유발된 조기 발현 질환에 대하여 유아를 보호하는 방법이다. 특히 질환은 태어난지 0 내지 168시간, 더 특히 태어난지 0 내지 72시간, 더 특히 태어난지 24 내지 72시간, 및 더 특히 태어난지 48 내지 72시간 내에 일어나는 패혈증(sepsis)이다.

[0120] 또한 스트렙토코쿠스 아갈락티에 혈청형 Ia, Ib, III, II 및 V에 의해 유발된 후기 발현 질환에 대하여 유아를 보호하는 방법이 제공된다. 특히 질환은 태어난지 7일 내지 90일 내 또는 그 이후에 발생한다.

[0121] 치료적 처리의 효능을 체크하는 한 가지 방법은 본 발명의 조성물의 투여 후 GBS 감염을 관찰하는 단계를 수반한다. 예방적 처리의 효능을 체크하는 한 가지 방법은 조성물의 투여 후 GBS 항원에 대한 면역 반응을 관찰하는 단계를 수반한다.

[0122] 본 발명의 바람직한 조성물은 인간 대상체의 허용 가능한 퍼센트에 대하여 각각의 항원 구성요소에 대한 혈청

방어의 기준보다 우수한 환자에서 항체 역가를 부여할 수 있다. 숙주가 항원에 대하여 혈청전환되는 것으로 고려되는 상기 관련 항체를 갖는 항원이 잘 알려져 있고, 이러한 역가는 WHO와 같은 기구에 의해 공표된다. 바람직하게는, 대상체의 통계적으로 유의한 샘플 중 80% 이상, 더 바람직하게 90% 이상, 더 바람직하게 93% 이상 및 가장 바람직하게 96-100%가 혈청전환된다.

[0123] 본 발명의 조성물은 일반적으로 환자에게 직접 투여될 것이다. 직접적인 전달은 비경구 주사에 의해 (예를 들어, 피하, 복강 내, 정맥 내, 근육 내로, 또는 조직의 사이 공간으로), 또는 직장, 구강, 질, 국부적, 경피성, 비강 내, 안구, 귀, 폐 또는 다른 점막 투여에 의해 달성될 수도 있다. 허벅지 또는 상부 팔에 근육 내 투여가 바람직하다. 주사는 바늘 (예를 들어, 피하 주사침)을 통한 것일 수도 있지만, 대안으로 바늘이 없는 주사가 사용될 수도 있다. 전형적인 근육 내 용량은 0.5 ml이다. 임신한 여성 및 유아에게 투여는 같은 루트 또는 다른 루트를 통한 것일 수도 있다.

[0124] 본 발명은 전신 및/또는 점막 면역력을 유도하기 위해 사용될 수도 있다.

[0125] 투약 치료는 일회 용량 일정 또는 다회수 용량 일정일 수 있다. 다회수 용량은 주요 면역화 일정 및/또는 촉진 면역화 일정에서 사용될 수도 있다. 주요 용량 일정이 촉진 용량 일정으로 이어질 수도 있다. 프라이밍 용량 사이 (예를 들어, 4-16주), 및 프라이밍 및 촉진 사이의 적합한 시기는 일상적으로 결정될 수 있다.

[0126] **일반**

[0127] 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함하는(including)", 뿐만 아니라 "구성되는(consisting)"을 포함하는데, 예를 들어, X를 "포함하는" 조성물은 X로 독점적으로 구성될 수도 있거나 추가적인 어떤 것, 예를 들어, X + Y를 포함할 수도 있다.

[0128] 용어 "~로 구성되는"은 "~로만 구성되는"을 의미한다. "X로 구성된" 조성물은 어떤 다른 구성요소를 포함하지 않을 수도 있다. "본질적으로 X로 구성되는" 조성물은 어떤 다른 활성 구성요소를 포함하지 않을 수도 있다. 용어 "본질적으로 ~로 구성되는"은 추가적인 성분, 단계 및/또는 일부가 청구된 조성물, 방법 또는 구조의 기본적인 및 새로운 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 때만 조성물, 방법 또는 구조가 추가적인 성분, 단계 및/또는 부품을 포함할 수도 있다는 것을 의미한다.

[0129] 수치값 x에 관하여 용어 "약"은, 예를 들어, $x \pm 10\%$ 를 의미한다.

[0130] 단어 "실질적으로"는 "완전히"를 제외하지 않는다, 예를 들어, Y로부터 "실질적으로 자유로운" 조성물은 Y로부터 완전히 자유로울 수도 있다. 필요하다면, 단어 "실질적으로"는 본 발명의 정의로부터 제외될 수도 있다.

[0131] 당 고리는 개방형 및 폐쇄형으로 존재할 수 있으며, 폐쇄형은 본원에서 구조식으로 나타나는 한편, 개방형 또한 본 발명에 포함되는 것으로 인정될 것이다. 유사하게, 당은 피라노스 및 푸라노스 형태로 존재할 수 있으며, 피라노스 형태가 본원에서 구조식으로 나타나는 한편, 푸라노스 형태 또한 포함된다. 당의 다른 아노머 형태가 또한 포함된다.

[0132] 달리 진술되지 않으면, 둘 이상의 구성요소를 혼합하는 단계를 포함하는 공정에 혼합의 어떤 특정 순서가 필요하지 않다. 따라서 구성요소는 어떤 순서로도 혼합될 수 있다. 세 개의 구성요소가 있는 경우 두 개의 구성요소가 서로 결합될 수 있고, 그 후 조합은 제3 구성요소, 등과 결합될 수도 있다.

[0133] 항체는 일반적으로 그것들의 표적에 특이적일 것이다. 따라서 그것들은 소 혈청 알부민과 같이 무관한 대조군 단백질보다 표적에 대하여 더 높은 친화도를 가질 것이다.

[0134] 달리 진술되지 않으면, 폴리펩티드 서열 사이의 동일성은, 바람직하게 MPSRCH 프로그램 (Oxford Molecular)에서 시행된 바와 같은 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 상동성 검색 알고리즘에 의해 결정되며, 파라미터 갭 오픈 패널티(gap open penalty)=12 및 갭 연장 패널티(gap extension penalty)=1로 아핀 갭(affine gap) 검색을 사용한다.

도면의 간단한 설명

[0135] 도 1은 신생아 도전 모델에서 마우스의 생존율 (% 보호)을 나타낸다. 모체 면역화는 (A) GBS Ia, (B) GBS Ib, (C) GBS III, (D) GBS II 및 (E) GBS V로 수행되었으며, 각각 CRM197에 컨주게이션되었다. 마우스는 해당 항원으로 시도하였다.

도 2는 (A) GBS Ia, (B) GBS Ib, (C) GBS III, (D) GBS II 및 (E) GBS에 대한 OPK 역가를 나타내며, 각각

CRM197에 컨쥬게이션되었다. 마우스는 해당 항원으로 면역화되었다.

도 3은 GBS V에 대한 IgG 역가 (도 3A) 및 OPK 역가 (도 3B)를 나타낸다. 마우스는 (A) Alum, (B) CRM 컨쥬게이션된 GBS V, (C) CRM 컨쥬게이션된 GBS V + 3가 백신 (CRM 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III), 및 (D) CRM 컨쥬게이션된 GBS V + CRM 컨쥬게이션된 GBS II + 3가 백신 (CRM 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib, 및 III)으로 면역화되었다.

도 4는 GBS II에 대한 IgG 역가 (도 4A) 및 OPK 역가 (도 4B)를 나타낸다. 마우스는 (A) Alum, (B) CRM 컨쥬게이션된 GBS II, (C) CRM 컨쥬게이션된 GBS II + 3가 백신 (CRM 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III), 및 (D) CRM 컨쥬게이션된 GBS II + CRM 컨쥬게이션된 GBS V + 3가 백신 (CRM 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III)으로 면역화되었다.

도 5A 및 5B는 GBS Ia, Ib, II, III 및 V에 대한 IgG 역가 (5A) 및 균주 515 Ia, H36B, COH1, 5401, CJB111에 대한 OPK 역가 (5B)를 나타낸다. 마우스는 (A) 3가 백신:CRM 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III 및 (B) 5가 백신:CRM 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib, II, III 및 V로 면역화되었다.

도 6은 GBS V에 대한 IgG 역가를 나타낸다. 마우스는 (A) PBS/Alum, (B) CRM 컨쥬게이션된 GBS V, (C) CRM 컨쥬게이션된 GBS V + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III), (D) CRM 컨쥬게이션된 GBS II 및 V + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 Ia, Ib, III), (E) TT 컨쥬게이션된 GBS V, (F) TT 컨쥬게이션된 GBS V + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III), (G) TT 컨쥬게이션된 GBS II 및 V + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 Ia, Ib, III)으로 면역화되었다.

도 7은 GBS II에 대한 IgG 역가를 나타낸다. 마우스는 (A) PBS/Alum, (B) CRM 컨쥬게이션된 GBS II, (C) CRM 컨쥬게이션된 GBS II + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III), (D) CRM 컨쥬게이션된 GBS II 및 V + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 Ia, Ib, III), (E) TT 컨쥬게이션된 GBS II, (F) TT 컨쥬게이션된 GBS II + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III), (G) TT 컨쥬게이션된 GBS II 및 V + 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 Ia, Ib, III)으로 면역화되었다.

도 8은 CRM-Ia의 상이한 시알산 함량을 가진 샘플의 성능 분석, 컨쥬게이트/마우스의 1 µg의 2회 용량으로 면역화의 결과를 나타낸다. A) OPKA 역가, 세 개의 프로토콜의 평균값은 수평 막대로 나타난다. B): 세 개의 프로토콜의 도전한 새끼들의 누적 퍼센트 생존율 %. C): 투여된 로트(lot)의 IVRP 성능 값.

도 9는 탈시알릴화된 CRM-1b 샘플의 성능 분석 (컨쥬게이트/마우스의 1 µg로 면역화의 결과)를 나타낸다. 패널 A는 Alum과 함께 제형화된 탈시알릴화된 Ia-CRM197 샘플의 2회 용량으로 면역화된 마우스에서 OPKA 역가 (폴딩된(pooled) 혈청)를 나타낸다. 조제물 #1의 데이터는 삼각형으로 나타나고 조제물 #2의 것은 원으로 나타난다; 두 개의 조제물에서 퍼센트 SA는 X 축에서 표시된다. 수평 막대는 ELISA GMT 및 OPKA 역가의 평균을 나타낸다. B): 시도된 새끼들의 퍼센트 생존율 (세 개의 프로토콜의 평균). C) 조제물의 IVRP 성능 값.

도 10은 탈시알릴화된 CRM-III 샘플의 성능 분석 (컨쥬게이트/마우스의 0.2 µg로 면역화의 결과)을 나타낸다. 패널 A는 Alum에서 제형화된 조제물 #1의 Ia-CRM197 탈시알릴화된 샘플의 2회 0.2 µg 용량으로 면역화된 마우스의 혈청에서 OPKA 역가를 나타낸다. (A) 원은 각각의 단일 마우스의 IgG 역가를 나타내며, 수평 막대는 ELISA GMT의 평균을 나타낸다. (B) 원은 같은 프로토콜의 폴딩된 혈청의 OPKA 역가를 나타낸다. 패널 B는 면역화된 여성 마우스의 시도된 새끼들의 퍼센트 생존율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0136]

백신

[0137]

연구에서 사용된 GBS 1가 백신은 모두 CRM197에 컨쥬게이션된다.

[0138]

모든 연구에 사용된 GBS 3가 백신은 혈청형: Ia, Ib 및 III로부터 유래된 캡슐 다당류로 구성되며, 각각 CRM197에 컨쥬게이션된다.

[0139]

연구 1

[0140]

신생아 도전 모델에서 마우스 보호의 수준 (Maione et al., Science 1 July 2005: vol. 309 no. 5731 pp. 148-150)을 조사하였다. 알루미늄 염 (400 µg)으로 보조된 GBS 1가 백신 (1 µg 항원)의 3회 용량을 모체에 제공하였다. 테스트된 GBS 1가 백신은 GBS Ia, Ib, II, III 및 V였으며, 각각 CRM197에 컨쥬게이션되었다. 결과는 도 1

에서 나타난다.

[0141] OPK 검정을 또한 수행하였고, 결과는 도 2에서 나타난다. 백신의 효능을 평가하기 위한 실행 가능한 접근법은 GBS의 경우에 혈청 항체의 옵소닌화(opsonizing) 활성인 보호의 대용물을 사용하는 것이다.

[0142] 옵소닌에 의한 식균 작용(opsonophagocytosis) 살해 검정은 보체의 존재시 작용기 세포에 의한 살해를 위해 GBS를 옵소닌화하는 혈청 항체의 능력을 측정한다. 일반적으로, ELISA IgG Ab와 OPK 역가 사이에 양호한 연관성이 있다. GBS II 및 GBS V에 의한 보호 및 OPA 수준은 GBS Ia, Ib 및 III에 의한 것과 비슷한 것으로 볼 수 있다.

[0143] 연구 2

[0144] 마우스를 알루미늄 염 (400 µg)으로 보조된 1가 또는 다가 백신 (각 항원의 1 µg)의 3회 용량으로 면역화하였다. 테스트된 백신은 (1) GBS V, (2) GBS V 및 GBS 3가 백신을 함유하는 4가 백신, 및 (3) GBS II, GBV 및 GBS 3가를 함유하는 5가 백신이었다. 마우스를 음성 대조군으로서 알루미늄 염 단독으로 면역화하였다. ELISA 및 OPK 검정 (타입 V CJB 111 균주 사용)을 수행하였다 (2번 반복됨).

[0145] 이 실험들의 결과는 도 3에서 나타난다. GBS V와 다른 항원들 사이에서 유의한 면역 간섭이 관찰되지 않았다.

[0146] 면역화된 마우스는 GBS V로 도전하였고, 결과는 표 1에서 제공된다.

표 1

[0147] GBS 타입 V 균주 (타입 V CJB111)에 대한 도전의 결과

항원	GBS V로 도전	
	보호됨 \ 치료됨	% 보호
PBS	39/100	39
CRM-V	108/119	91
CRM-Ia/Ib/III	32/102	31
CRM-Ia/Ib/III + CRM-V	60/70	86
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRMV-V	89/95	94

[0148] 연구 3

[0149] 마우스는 알루미늄 염 (400 µg)로 보조된 1가 또는 다가 백신 (각 항원의 1 µg)의 3회 용량으로 면역화되었다. 테스트된 백신은 (1) GBS II, (2) GBS II 및 GBS 3가 백신을 함유하는 4가 백신, 및 (3) GBS II, GBV 및 GBS 3가 백신을 함유하는 5가 백신이었다. 마우스는 음성 대조군으로서 알루미늄 염 단독으로 면역화되었다. ELISA 및 OPK 검정 (타입 II 5401 균주 사용)이 수행되었다 (2회 반복됨).

[0150] 결과들은 도 4에서 나타난다. GBS II와 다른 항원들 사이에서 유의한 면역 간섭이 관찰되지 않았다.

[0151] 면역화된 마우스는 GBS II로 도전하였고, 결과는 표 2에서 제공된다.

표 2

[0152] GBS 타입 II 균주 (타입 II 5401)에 대한 도전의 결과

항원	GBS II로 도전	
	보호됨/치료됨	% 보호
PBS	37/120	31
CRM-II	55/80	69
CRM-Ia/Ib/III	15/100	15
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II	72/99	73
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	62/129	48

[0153] 연구 4

[0154] 마우스는 알루미늄 염 (400 µg)으로 보조된 3가 또는 5가 백신 (각 항원의 1 µg)의 3회 용량으로 면역화되었다. 테스트된 백신은 (1) GBS II, (2) GBS 3가 백신 (CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib 및 III), (3) GBS 4가 백신

(CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib, II 및 III 또는 CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib, 및 III + TT 컨쥬게이션된 GBS II) 및 (4) (CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib, II, III 및 V 또는 CRM197 컨쥬게이션된 GBS Ia, Ib, 및 III + TT 컨쥬게이션된 GBS II 및 V) 함유하는 5가 백신이었다. 마우스는 음성 대조군으로서 알루미늄 염 단독으로 면역화되었다. ELISA 및 OPK 검정 (타입 II 5401 균주 사용)을 수행하였다 (2회 반복됨).

[0155] 면역화된 마우스는 GBS II로 도전하였고, 결과는 표 3에서 제공된다.

표 3

[0156] GBS 타입 II 균주 (타입 II 5401)에 대한 도전의 결과

항원	GBS II로 도전	
	보호됨/치료됨	% 보호
PBS	19/60	31%
CRM-II	23/30	77%
CRM-Ia/Ib/III	8/30	26%
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II	40/50	80%
CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V	32/77	41%
CRM-Ia/Ib/III + TT-II	62/77	80%
CRM-Ia/Ib/III + TT-II + TT-V	75/77	97%

[0157] 연구 5

[0158] 마우스를 알루미늄 염 (400 µg)으로 보조된 3가 또는 5가 백신 (각 항원의 1 µg)의 3회 용량으로 면역화하였다. ELISA 및 OPK 검정 (타입 II 5401 균주 사용)을 수행하였다 (2회 반복됨).

[0159] 결과는 도 5A 및 5B에서 나타난다. 3가 및 5가 백신 사이에서 유의한 간섭이 관찰되지 않았다.

[0160] 컨쥬게이트 Ia, Ib 및 III의 면역원성 및 보호는 PS-II 및 V의 추가에 의해 영향을 받지 않는다. 5가 제형에서 각 PS에 대하여 비슷한 ELISA 및 OPK 역가.

[0161] 연구 6

[0162] 상이한 담체 단백질에 컨쥬게이션된 GBS 당류의 면역원성을 조사하였다.

[0163] 마우스를 CRM197 ("CRM") 또는 파상풍 변독소 ("TT")에 컨쥬게이션된 GBS II 및/또는 V를 함유하는 조성물로 면역화하였다. GBS V에 대한 항체 역가를 ELISA로 분석하였다. 결과는 도 6 및 7에서 나타난다. 마우스를 음성 대조군으로서 PBS/알루미늄 염 단독으로 면역화하였다.

[0164] CRM 및 TT 컨쥬게이트 둘 다가 해당 항원에 대하여 유의한 면역 반응을 제공한다고 볼 수 있다. GBS II에 대하여, 다가 백신에서 GBS II 및 다른 항원들 사이에서 유의한 면역 간섭이 관찰되지 않았으며, 그것이 CRM 또는 TT에 컨쥬게이션되는지와 상관 없다. GBS V와 유사하게, 다가 백신에서 GBS V 및 다른 항원들 사이에서 유의한 면역 간섭이 관찰되지 않았으며, 그것이 CRM 또는 TT에 컨쥬게이션되는지와 상관 없다.

[0165] 연구 7

[0166] 시알산 구성요소의 기여를 조사하기 위해, CRM197에 컨쥬게이션된 스트렙토코쿠스 아갈락티에 캡슐 다당류 항원 Ia, Ib 및 II를 테스트하였다. 상이한 시알산 함량을 가진 백신 로트를 제조하여 마우스를 면역화하고 마우스 모체 면역화/신생아 도전 모델에서 GBS에 대하여 IgG 역가, 유발된 항체의 기능적 활성 및 유도된 보호를 결정하기 위해 사용하였다. 100% 내지 < 5%의 상이한 시알산 함량을 가진 다당류-CRM197 컨쥬게이트의 1가 로트를 약산성 조건 (예를 들어, pH 4.75 80°C에서 상이한 배양 시간 동안)에서 원래의 컨쥬게이트의 처리에 의해 생산하였다. 성능을 IVRP로 평가하였다. 탈시알릴화된 로트로 면역화된 마우스의 혈청을 각각 백신 면역원성 및 유도된 항체의 기능적 활성을 테스트하기 위해 ELISA 및 옵소닌에 의한 식균 작용 검정 (OPKA)으로 분석하였다. 백신을 받는 여성 마우스에서 태어난 새끼들의 보호를 연구하기 위해 생존율 실험을 또한 실행하였다.

[0167] 간략히 말하면, GBS 컨쥬게이트를 중수소화된 나트륨 아세테이트의 처리로 탈시알릴화하였다. 시알산 함량을 NMR 기술로 관찰하였다. 모든 조제물에 대하여, 3mg의 컨쥬게이트 (총 당류 함량에 의해 결정됨)를 진공 조건 (Genevac mod. EZ-2 Plus) 하에서 건조하였고 pH 4.75에서 중수소화된 (D20 - Aldrich 151882-100G 로트 번호 STBC04462V) 50mM 나트륨 아세테이트 (Sigma S80750-500G 로트 번호 050M0213V) 3 mL에서 용해시켰다; 혼합물

을 80°C에서 상이한 시간에 배양하였고 획득한 조제물의 엘리퀀트(aliquot)를 다음과 같이 특성화하였다: (1) 결합된/자유 시알산 함량의 비율을 측정하기 위한 1H NMR 분석, (2) 갈락토스 (Gal) 결정에 기초한 당류 함량의 추정, (3) 단백질 함량의 결정, (4) SDS-PAGE 분석 및 (5) 모세관 전기영동(Capillary Electrophoresis) (데이터 미도시).

[0168] 100% (원래의 untreated material) 내지 0%의 상이한 SA를 갖는 다당류-CRM197 컨쥬게이트의 1가 로트를 Alumd에서 제형화하였고 제1 일 및 제21 일에 복강 내 (i.p.) 주사로 5주령 CD1 여성 마우스의 군에 투여하였다. 제 21 일에 두 번째 면역화 후, 여성을 교미시켰고 새끼들에게 같은 혈청형의 GBS (혈청형 Ia에 대하여 GBS 090, Ib에 대하여 GBS H36b 및 혈청형 III에 대하여 GBS M781)의 LD90 용량으로 도전하였다. 치사율을 도전 후 3일 동안 매일 기록하였다. 백신 면역원성을 혈청형 특이적 항원 (Ia, Ib 및 III) 각각에 대한 항체의 존재에 대하여 최종 백신 주사 후 2주에 수거된 혈청을 분석함으로써 테스트하였다. 각 다당류에 대한 특이적 IgG 항체 역가를 ELISA로 정량하였다. 기능적 항체 활성을 옵소닌에 의한 식균 작용 검정 (OPKA)을 사용하여 및 신생아 도전에 의해 같은 백신을 받는 동물의 혈청의 풀(pool)에 대하여 평가하였다.

[0169] 다당류 Ia-CRM197에 대하여, 1µg 백신 용량으로 면역화된 동물의 IgG 역가는 < 5%를 제외하고 모든 샘플과 유사하였는데, 이것은 원래의 다당류와 비교하여 약 4배의 통계적으로 유의한 감소를 일으켰다 (P=0.0067, 만 휘트니 테스트(Mann Whitney test)). 항체 기능 활성의 감소는 19% 및 < 5% (OPKA 실패) 및 < 5% 시알산 함량 (생존)에서 인정될 수 있다. IVRP 결과에 관하여, 33% 이하의 시알산 함량을 가진 샘플의 성능 값은 10배 이상 감소하였다 (도 8).

[0170] 다당류 Ib-CRM197에 대하여, 5% 미만의 SA를 함유하는 샘플은 더 높은 시알산 함량을 가진 샘플과 비교하여 더 낮은 ELISA 역가, OPKA 역가 및 생존율을 유발하였다 (도 9).

[0171] 다당류 III-CRM197에 대하여, IgG GMT 대 PS III는 더 높은 SA 함량을 가진 샘플로 면역화된 것들과 비교하여 66% 미만의 SA를 함유하는 샘플을 받는 동물에서 유의하게 더 높다 (P ≤ 0.01 만-휘트니 테스트). 기능적 항체의 수준은 1µg 용량의 원래의 및 탈시알릴화된 샘플을 받는 동물에서 유사하였다. 하지만, 차이는 0.2 ug 용량의 컨쥬게이트를 받는 동물에서 인식 가능하였는데, OPKA 역가는 39% SA의 샘플을 받는 동물에서 크게 감소하였고 24% SA 하에서는 생존율이 더 낮았다 (도 10).

[0172] 연구 8

[0173] 시알산 함량의 기여를 조사하기 위해, CRM197에 컨쥬게이션된 스트렙토코쿠스 아갈락티에 캡슐 다당류 항원 V를 테스트하였다. 다른 시알산 함량을 가진 백신 로트를 제조하여 마우스를 면역화하기 위해 사용하였다. 100% 내지 25%의 상이한 시알산 함량을 가진 다당류-CRM197 컨쥬게이트의 1가 로트를 약산성 조건에서 원래의 컨쥬게이트의 처리에 의해 생산하였다 (예를 들어, pH 4.75 80°C에서 상이한 배양 시간 동안).

PSV-CRM197 백신	%NeuNAc	%보호 (CJB111)
Lot 1 + Alum	100	66
Lot 2 + Alum	100	81
Lot 3 + Alum	100	69
Lot 4 + Alum	100	73
Lot 5 + Alum	75	45
Lot 6 + Alum	50	22
Lot 7 + Alum	50	36
Lot 8 + Alum	50	46
Lot 9 + Alum	25	38
Lot 10 + Alum	25	17
Lot 11 + Alum	25	10
대조군 (Alum 단독)	-	11
대조군 2 (Alum 단독)	-	2

[0174]

[0175] NeuNAc의 제거는 마우스에서 백신 접종에 이은 보호에 영향을 주는 것으로 나타난다. 이 실험들은 NeuNAc의 함량이 75% 이상인 다당류 타입 V 컨쥬게이트가 유용하다고 제안한다.

CRM197:PSV	%NeuNAc	%보호 (CJB111)	교차결합 수준
0.25:1.0	0	100	낮음 ↓ 높음
0.5:1.0	0	79	
0.5:1.0	0	48	
1.0:1.0	0	32	
1.0:1.0	0	46	
1.5:1.0	0	42	
1.5:1.0	0	43	
2.0:1.0	0	13	
3.0:1.0	0	37	
4.0:1.0	0	31	
대조군 (Alum 단독)	0	5	

[0176]

[0177] 다당류 V-CRM197 탈시알릴화된 다당류 컨쥬게이트의 면역원성은 반대로 그것의 교차-결합 수준에 비례한다. 따라서, 면역원성 조성물이 다당류 타입 V, 특히 탈시알릴화된 다당류를 포함할때, 더 낮은 단백질:다당류 교차결합 수준을 가진 컨쥬게이트가 유익할 수도 있다.

[0178] 본 발명이 실시예의 방법으로만 설명되었고 변형이 이루어질 수도 있지만 본 발명의 범위 및 사상 내에 유지된다.

[0179] **참고문헌**

[0180] [1] Paoletti *et al.* (1990) *J Biol Chem* 265:18278-83.

[0181] [2] Wessels *et al.* (1990) *J Clin Invest* 86:1428-33.

[0182] [3] Paoletti *et al.* (1992) *Infect Immun* 60:4009-14.

[0183] [4] Paoletti *et al.* (1992) *J Clin Invest* 89:203-9.

[0184] [5] Wessels *et al.* (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9170-4.

[0185] [6] Wang *et al.* (2003) *Vaccine* 21:1112-7.

[0186] [7] Wessels *et al.* (1993) *Infect Immun* 61:4760-6

[0187] [8] Wessels *et al.* (1995) *J Infect Dis* 171:879-84.

[0188] [9] Baker *et al.* (2004) *J Infect Dis* 189:1103-12.

[0189] [10] Paoletti & Kasper (2003) *Expert Opin Biol Ther* 3:975-84.

[0190] [11] 제W02012/035519호.

[0191] [12] Lewis *et al.* (2004) *PNAS USA* 101:11123-8.

[0192] [13] 제W02006/050341호.

[0193] [14] Guttormsen *et al.* (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(15):5903-8. Epub 2008 Mar 31.

[0194] [15] 제W096/40795호.

[0195] [16] Michon *et al.* (2006) *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Aug;13(8):936-43.

[0196] [17] 미국 특허 제6027733호 & 제6274144호.

- [0197] [18] www.polymer.de
- [0198] [19] Wessels *et al.* (1989) *Infect Immun* 57:1089-94.
- [0199] [20] 제W02006/082527호.
- [0200] [21] "FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM"의 명칭으로 2007년 12월 20일에 출원된 미국 특허 출원 제US 61/008,941호 및 국제 특허 출원 제WO 2009/081276호.
- [0201] [22] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [0202] [23] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [0203] [24] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-68.
- [0204] [25] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [0205] [26] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-7.
- [0206] [27] 유럽 특허 제0477508호.
- [0207] [28] 미국 특허 제5,306,492.
- [0208] [29] 제W098/42721호.
- [0209] [30] Dick *et al.* in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [0210] [31] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [0211] [32] 미국 특허 제4356170호.
- [0212] [33] 제W02006/082530호.
- [0213] [34] 제W02005/000346호.
- [0214] [35] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [0215] [36] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [0216] [37] Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [0217] [38] 제EP-A-0372501호.
- [0218] [39] 제EP-A-0378881호.
- [0219] [40] 제EP-A-0427347호.
- [0220] [41] 제W093/17712호.
- [0221] [42] 제W094/03208호.
- [0222] [43] 제W098/58668호.
- [0223] [44] 제EP-A-0471177호.
- [0224] [45] 제W091/01146호.
- [0225] [46] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-24.
- [0226] [47] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:4884-87.
- [0227] [48] 제EP-A-0594610호.
- [0228] [49] 제W000/56360호.
- [0229] [50] 제W002/091998호.
- [0230] [51] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.

[0231] [52] 제W001/72337호.

[0232] [53] 제W000/61761호.

[0233] [54] 제W000/33882호.

[0234] [55] 제W099/42130호.

[0235] [56] 제W02004/011027호.

[0236] [57] 제W096/40242호.

[0237] [58] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.

[0238] [59] 제W000/38711호; 미국 특허 제6,146,902호.

[0239] [60] GB-0713880.3 (NOVARTIS AG)의 우선권을 주장하고, 제WO 2009/010877호로 공개된 국제 특허 출원 제 PCT/IB2008/02690호, 'CONJUGATE PURIFICATION'.

[0240] [61] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.

[0241] [62] 제W000/56365호.

[0242] [63] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.

[0243] [64] Paoletti (2001) *Vaccine* 19(15-16):2118-26.

[0244] [65] 제W003/009869호.

[0245] [66] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.

[0246] [67] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.

[0247] [68] 제W000/53221호.

[0248] [69] Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.

[0249] [70] Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106:800-806.

[0250] [71] Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.

[0251] [72] Ugozzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.

[0252] [73] 미국 특허 제6355271호.

[0253] [74] 제W000/23105호.

[0254] [75] *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.

[0255] [76] 제W090/14837호.

[0256] [77] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80.

[0257] [78] Frey *et al.* (2003) *Vaccine* 21:4234-7.

[0258] [79] 미국 특허 제6,299,884호.

[0259] [80] 미국 특허 제6,451,325호.

[0260] [81] 미국 특허 제5,057,540호.

[0261] [82] 제W096/33739호.

[0262] [83] 제EP-A-0109942호.

[0263] [84] 제W096/11711호.

[0264] [85] 제W000/07621호.

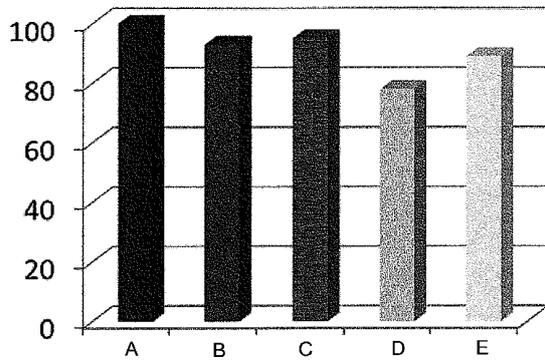
[0265] [86] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.

- [0266] [87] Sjolander *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [0267] [88] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
- [0268] [89] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [0269] [90] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [0270] [91] Gerber *et al.* (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [0271] [92] 제W003/024480호.
- [0272] [93] 제W003/024481호.
- [0273] [94] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [0274] [95] 제EP-A-0689454호.
- [0275] [96] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [0276] [97] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [0277] [98] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [0278] [99] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [0279] [100] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [0280] [101] 제W002/26757호.
- [0281] [102] 제W099/62923호.
- [0282] [103] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [0283] [104] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [0284] [105] 제W098/40100호.
- [0285] [106] 미국 특허 제6,207,646호.
- [0286] [107] 미국 특허 제6,239,116호.
- [0287] [108] 미국 특허 제6,429,199호.
- [0288] [109] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [0289] [110] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [0290] [111] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [0291] [112] 제W001/95935호.
- [0292] [113] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [0293] [114] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [0294] [115] 제W003/035836호.
- [0295] [116] 제W095/17211호.
- [0296] [117] 제W098/42375호.
- [0297] [118] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [0298] [119] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [0299] [120] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [0300] [121] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [0301] [122] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.

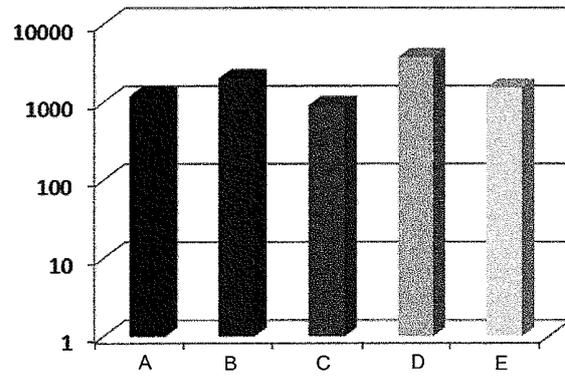
- [0302] [123] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [0303] [124] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [0304] [125] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [0305] [126] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [0306] [127] 제W099/40936.
- [0307] [128] 제W099/44636.
- [0308] [129] Singh *et al*] (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [0309] [130] 제W099/27960호.
- [0310] [131] US patent 제6,090,406호.
- [0311] [132] US patent 제5,916,588호.
- [0312] [133] 제EP-A-0626169호.
- [0313] [134] 제W099/52549호.
- [0314] [135] 제W001/21207호.
- [0315] [136] 제W001/21152호.
- [0316] [137] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [0317] [138] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [0318] [139] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [0319] [140] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [0320] [141] 제W004/60308호.
- [0321] [142] 제W004/64759호.
- [0322] [143] 제W099/11241호.
- [0323] [144] 제W094/00153호.
- [0324] [145] 제W098/57659호.
- [0325] [146] 유럽 특허 출원 제0835318호, 제0735898호 및 제0761231호.
- [0326] [147] Hennings *et al.* (2001) *J Infect Dis.* 183(7):1138-42. Epub 2001 Mar 1.
- [0327] [148] Lin *et al.* (2001) *J Infect Dis.* 184(8):1022-8.
- [0328] [149] Lin *et al.* (2004) *J Infect Dis.* 190(5):928-34
- [0329] [150] Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224
- [0330] [151] Madoff *et al.* (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.
- [0331] [152] Paoletti *et al.* (1994) *Infect Immun* 62:3236-43.

도면

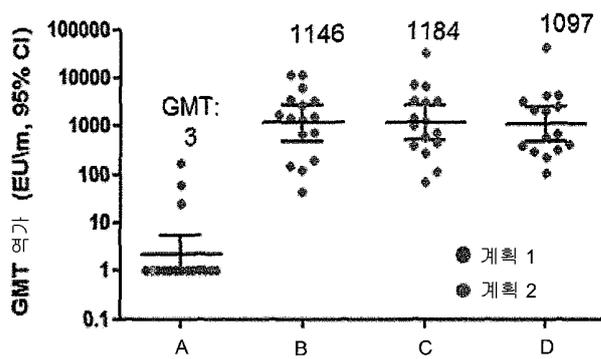
도면1



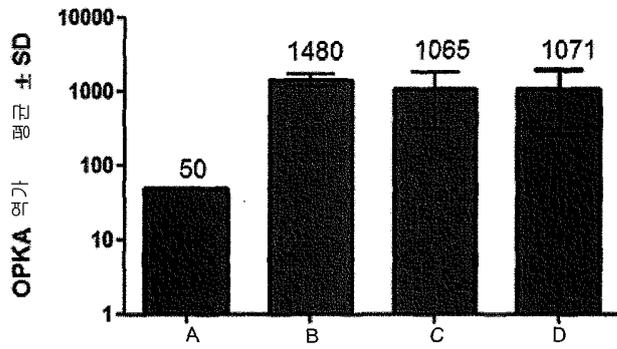
도면2



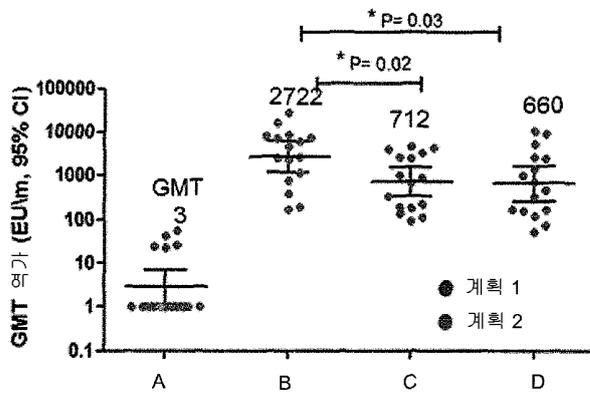
도면3a



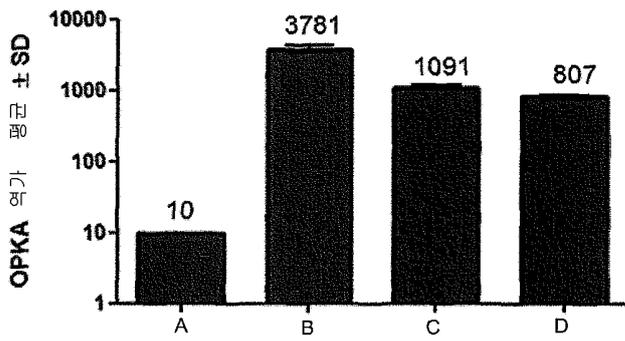
도면3b



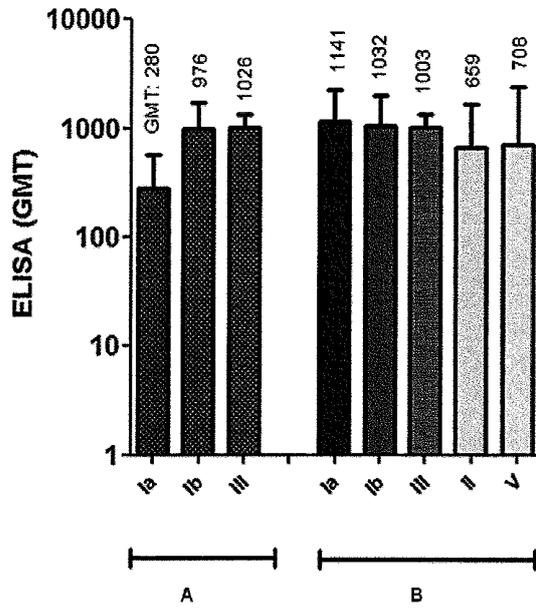
도면4a



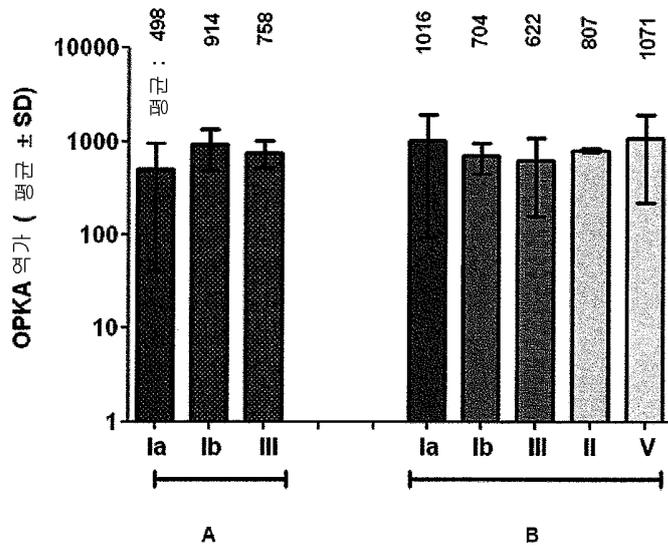
도면4b



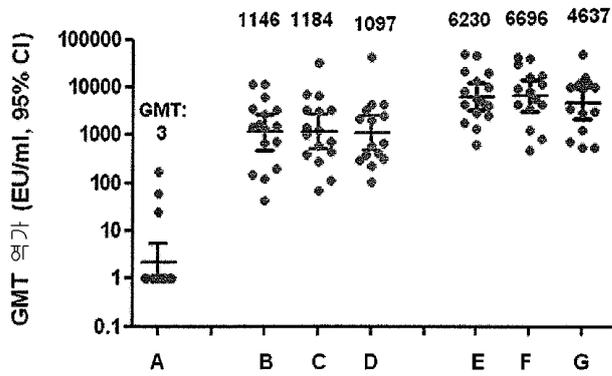
도면5a



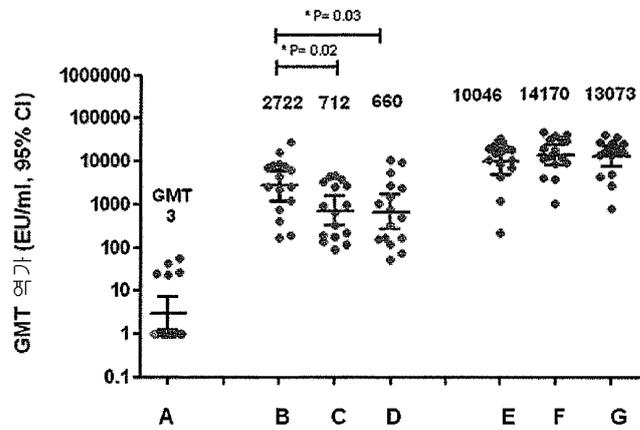
도면5b



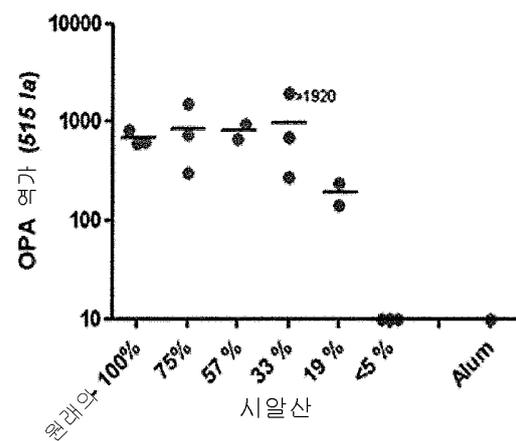
도면6



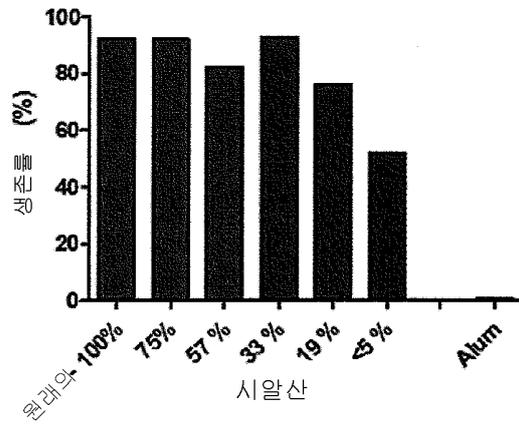
도면7



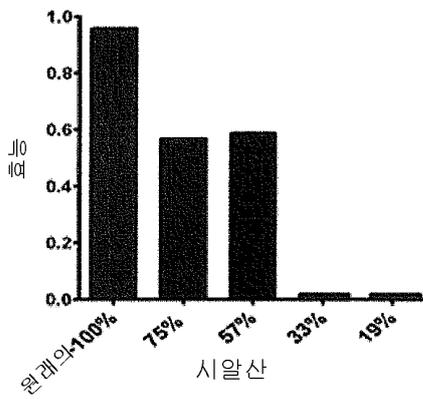
도면8a



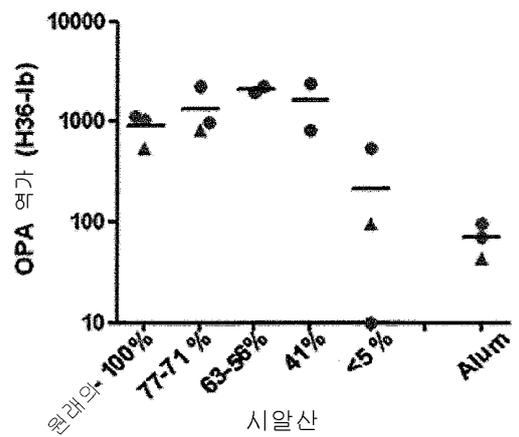
도면8b



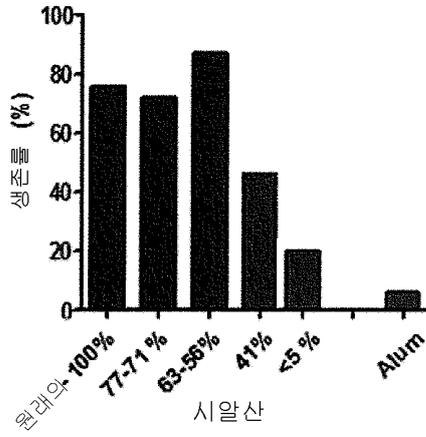
도면8c



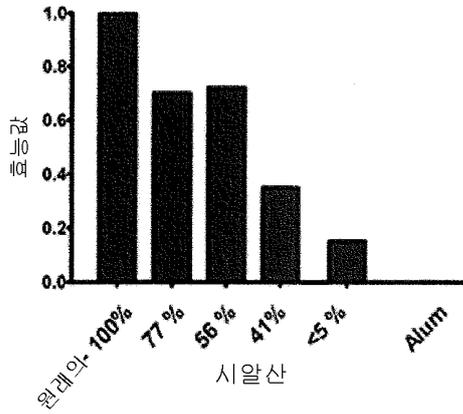
도면9a



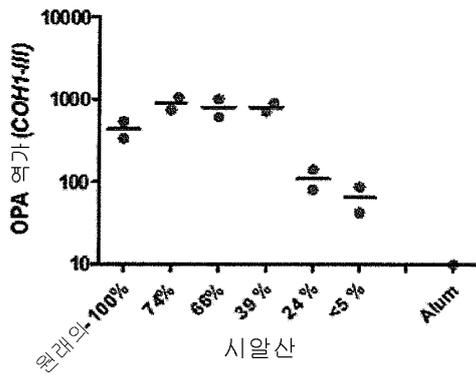
도면9b



도면9c



도면10a



도면10b

