

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. (45) 공고일자 2006년09월26일  
A61K 39/39 (2006.01) (11) 등록번호 10-0629028  
(24) 등록일자 2006년09월20일

(21) 출원번호 10-2001-7004793 (65) 공개번호 10-2001-0075638  
(22) 출원일자 2001년04월16일 (43) 공개일자 2001년08월09일  
번역문 제출일자 2001년04월16일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP1999/007764 (87) 국제공개번호 WO 2000/23105  
국제출원일자 1999년10월08일 국제공개일자 2000년04월27일

(81) 지정국  
국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 코스타리카, 도미니카, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 인도네시아, 인도, 가나, 감비아, 크로아티아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 그라나다,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 9822703.6 1998년10월16일 영국(GB)  
9822709.3 1998년10월16일 영국(GB)  
9822712.7 1998년10월16일 영국(GB)

(73) 특허권자 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.  
벨기에왕국 릭센사르트(비-1330) 루 드 린스티튜트 89

(72) 발명자 가르콩,나탈리에  
벨기에릭센사르트(비-1330)루드린스티튜트89스미스클라인비이참바이오로지칼즈에스.에이.

(74) 대리인 남상선

심사관 : 임혜준

## (54) 애주번트 시스템 및 백신

### 요약

본 발명은 면역자극제 및 금속염을 포함하는 백신 및 애주번트 포물레이션을 제공한다. 상기 면역자극제는 금속염 입자상에 흡착되고 생성된 입자는 사실상 항원을 함유하지 않는다.

### 명세서

#### 기술분야

본 발명은 개선된 백신, 애주번트 시스템, 및 이러한 백신 및 애주번트 시스템을 제조하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 백신 및 애주번트 시스템은 금속염, 및 모노포스포릴 지질 A 또는 이들의 유도체, Quil A 또는 이들의 유도체, 또는 CpG와 같은 면역자극성 올리고뉴클레오티드와 같은 추가의 면역자극제를 포함한다.

#### 배경기술

알루미늄염은 애주번트 활성을 지닌 안전한 부형제를 제공하는 것으로 당해 기술분야에서 널리 공지되어 있다. 이들 애주번트의 작용 메카니즘은 항원이 투여후 3주 이하의 기간 동안 주사 부위에 체류할 수 있는 항원 데포(depot)를 형성시키는 것과, 또한 항원 제시 세포에 의해 보다 용이하게 흡수되는 항원/금속염 복합체를 형성시키는 것을 포함하는 것으로 여겨진다. 알루미늄에 이외에도, 아연염, 칼슘염, 세륨염, 크롬염, 철염 및 베릴륨염을 포함한 그 밖의 다른 금속염이 항원을 흡착시키는데 사용되어 왔다. 알루미늄 히드록시드 및 알루미늄 포스페이트 염이 가장 흔히 사용된다.

알루미늄염, 항원 및 추가의 면역자극제를 함유하는 백신 포물레이션은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 포물레이션은 알루미늄염과 항원에 의해서만 자극된 면역 반응과 비교하여 훨씬 더 큰 면역 반응을 야기시켰다. 이들 백신 제조물의 포물레이션은 이전에는 특정의 제조 공정을 포함하였는데, 그 이유는 최적의 면역 반응이 일어나도록 하기 위해 항원이 면역자극제와 동일한 알루미늄염 입자상에 흡착되어야 하는 것으로 믿어졌기 때문이다. 이러한 방식에서, 항원이 항원 제시 세포에 의해 흡수될 때, 공동 흡착된 면역자극제가 동일한 항원 제시 세포상에 직접 이의 자극 활성을 발휘한다.

항원 및 면역자극제 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)이 동일한 입자상에 흡착되는 알루미늄 기재 백신 포물레이션은 EP 0 576 478B1, EP 0 689 454 B1 및 EP 0 633 784 B1 호에 기술되어 있다. 이들 경우에, 항원이 알루미늄염상에 먼저 흡착된 후, 동일한 알루미늄염 입자상에 면역자극제인 3D-MPL이 흡착된다. 이러한 공정은 먼저 입자가 80 내지 500nm의 크기에 도달할 때까지 수속중에서의 초음파 처리에 의한 3D-MPL의 현탁 과정을 포함한다. 항원은 전형적으로 교반하에 실온에서 1시간 동안 알루미늄염상에 흡착된다. 그런 다음, 3D-MPL 현탁액이 흡착된 항원에 첨가되고, 포물레이션이 1시간 동안 실온에서 인큐베이션되며, 이후, 사용할 때까지 4℃의 온도에서 유지된다.

종래기술의 포물레이션 방법은 면역학적 관점에서 보면 효능성 백신을 제공하지만, 이러한 방법은 수 가지의 상업적인 단점을 갖는다. 백신이 사람 투여에 적합하게 되기 위해, 방법이 일정하게 이루어져야 하며 우수 의약품 제조관리 기준(Good Manufacturing Practice : GMP) 및 품질관리(Quality Control : QC) 기준을 따라야 한다. 일부 경우에, 종래기술의 방법은 모든 항원(들)이 동일한 금속염 입자상에 흡착되는 백신을 제공한다. 이러한 경우에, 방법은 3D-MPL이 동일한 금속염 입자상에 흡착되어야 하기 때문에 복잡해진다. 이러한 방법의 복잡화는 다중 항원을 함유하는 조합 백신(이의 흡착력은 주어진 pH에서 특정의 금속염에 대한 각 항원의 친화력에 의존할 수 있다)의 경우에 특히 문제가 될 수 있다. 종래기술의 방법은 어떠한 항원이 존재하느냐에 따라서 재현성 및 백신 QC에 문제가 될 수 있다. 더욱이, 하나의 특정 항원의 QC와 관련하여 원치않는 어떠한 문제가 발생하거나 백신의 오염을 초래할 수 있는 사건이 발생한다면, 이로 인해 문제를 일으킨 특정 항원만이 아닌 개개의 모든 성분을 폐기시켜야 할 수도 있다. 또한, 어떤 환경에서는, 조합 백신은 시간을 많이 소모시키고 비용이 많이 드는 공정인 순차적인 항원 첨가를 필요로 할 수 있다. 그러므로, 이러한 종래기술의 방법은 복잡하며, 제어가 어려우며, 많은 비용을 들게 할 수 있다.

#### 발명의 상세한 설명

놀랍게도, 본 발명자들은 항원 및 면역자극제를 동일한 입자에 흡착시키는 것이 불필요하다는 것을 밝혀내었다. 종래기술에서 허용되었던 개념과는 대조적으로, 항원이 면역자극제와 결합되어 있는 금속염 입자와는 다른 특성의 금속염 입자에 흡착될 때 우수한 백신이 생성될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

개선된 방법은 면역자극제를 금속염 입자상에 흡착시킨 후, 항원을 또 다른 금속염 입자상에 흡착시키고, 이어서 별개의 금속 입자를 혼합시켜 백신을 형성시키는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 금속염 입자가 다른 항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는, 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제를 포함하는 애쥬번트 조성물을 제공한다. 더욱이, 본 발명에 의해 제공되는 백신은 면역자극제가 다른 항원을 사실상 함유하지 않는 금속염 입자상에 흡착된다는 점과 항원에 흡착되는 금속염의 입자가 다른 면역자극제를 사실상 함유하지 않음을 특징으로 한다.

따라서, 본 발명은 조성물이 다른 항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는, 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제를 포함하는 애쥬번트 포물레이션을 제공한다. 또한, 애쥬번트 포물레이션은 백신을 제조하기 위한 본 발명의 공정중에 요구되는 중간체이다. 따라서, 본 발명은 애쥬번트 조성물을 항원과 혼합시키는 것을 포함하여 백신을 제조하기 위한 방법을 제공한다. 항원이 금속염상에 미리 흡착되는 것이 바람직하다. 상기 금속염은 면역자극제상에 흡착되는 금속염과 동일하거나 유사할 수 있다.

본 발명은 제 1 및 제 2의 금속염 입자가 상이함을 특징으로 하는, 제 1의 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제, 및 금속염상에 흡착된 항원을 포함하는 백신 조성물을 추가로 제공한다.

대안적으로, 본 발명의 일부를 형성하는 백신은 2가지 부류의 주요 복합체 집단을 포함하는데, 제 1 복합체는 상기 금속염 입자가 항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는, 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제(a)를 포함하고, 제 2 복합체는 금속염 입자상에 흡착된 항원(b)을 포함한다. 또한, 백신 조성물은 2가지 부류의 주요 복합체 집단을 포함할 수 있는데, 제 1 복합체는 상기 금속염 입자가 항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는, 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제(a)를 포함하고, 제 2 복합체는 상기 금속염 입자가 면역자극제를 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는, 금속염 입자상에 흡착된 항원(b)을 포함한다.

이들 2가지 부류의 복합체에 존재하는 금속염은 동일하거나 상이할 수 있다. 또한, 다수의 상이한 항원이 존재할 수 있는 조합 백신의 경우에, 제 2 복합체(상기된)는 상이한 금속 입자상에 흡착된 다수의 항원을 포함할 수 있다.

본 발명과 관련하여 '다른 항원을 사실상 함유하지 않는다' 함은 금속염 입자에 흡착될 수 있는 전체 물질중 20중량% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 가장 바람직하게는 5% 이하가 다른 항원인 경우를 의미한다. 또한, 본 발명과 관련하여 '사실상 면역자극제를 함유하지 않는다' 함은 금속염 입자에 흡착될 수 있는 전체 물질의 20% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 가장 바람직하게는 5% 이하가 면역자극제인 경우를 의미한다. 전기장내에서의 포물레이션의 자유 유동에 의한 백신의 별개의 분획으로의 분리, 또는 비미립성 항원에 특히 적합한 침강 속도 분석과 같은 기술을 포함하며 이들에만 국한되지 않은, 당업자에게는 자명한 통상의 검정법을 사용하여 항원 및 면역자극제가 다른 별개의 입자상에 흡착되는지를 결정한 후, 분획내의 면역자극제 또는 항원을 검정할 수 있다.

본 발명은 또한 금속염상에 흡착되어 있는 면역자극제를 가지는 제 1 용기 및 항원을 지닌, 바람직하게는 금속염상에 흡착되어 있는 항원을 가지는 제 2 용기를 포함하는 키트를 제공한다.

본 발명의 방법은 대규모의 조합 백신이 요구될 때 특히 유용하다. 조합 백신은 하나 이상의 병원체로부터의 항원을 하나 이상 함유하는 단일 용량 백신이다. 이러한 백신은 많은 병원체 및 질환으로부터 보호하는데 요구되는 백신접종의 횟수를 감소시킬 수 있다.

예를 들어, 백신이  $\text{AlOH}_3$ , 3D-MPL 및 항원 V, W, X, Y, Z를 포함하는 경우, 종래기술의 방법은 항원 및 3D-MPL을  $\text{AlOH}_3$ 의 동일 입자상에 포물레이션시키는 것을 포함한다. 이러한 종래기술의 방법은 V, W, X, Y 및 Z가  $\text{AlOH}_3$  상에 흡착되어진 후, 자유 3D-MPL을 미리 흡착된 각각의 항원 복합체상에 부가시킬 것을 필요로 한다.

이와 대조적으로, 본 발명의 포플레이션 방법에서는 항원 V, W, X, Y 및 Z이 별도의 용기에서  $\text{Al}(\text{OH})_3$ 의 별개 입자상에 각각 개별적으로 흡착된다. 3D-MPL도 또한 또 다른 용기에서  $\text{Al}(\text{OH})_3$ 상에 흡착된다. 그런 다음, 각각의 별도의 용기로부터 취해진 물질을 간단하게 혼합시킴으로써 백신이 형성된다. 이러한 경우에, 3D-MPL과 결합되어 있는  $\text{Al}(\text{OH})_3$ 의 입자는 항원과 결합되어 있는  $\text{Al}(\text{OH})_3$  입자와 별개일 수 있다.

대안적으로, 본 발명은 다음 과정을 포함하여, 면역자극제, 항원 및 금속염을 포함하는 백신을 제조하는 방법을 제공한다:

1. 항원을 제 1의 금속염 입자상에 흡착시키는 단계,
2. 면역자극제를 제 2의 금속염 입자상에 흡착시키는 단계, 및
3. 상기 단계 1 및 2의 생성물을 혼합시키는 단계.

본 발명은 종래기술의 문제점을 해소시키는 백신 제조 방법을 제공한다. 각각의 개별적인 항원-금속염 복합체가 GMP 기준에 부합될 수 있으며, 특정의 항원-금속염 제조물이 부적절하게 오염된다면, 다른 항원 및 면역자극제 애주번트의 완전성이 손상되지 않을 것이다. 놀랍게도, 그리고 당해 기술분야에서 허용되었던 개념과는 대조적으로, 본 발명의 방법에 의해 생성된 백신은 종래기술의 방법을 사용하여 제조된 백신 만큼 효능적이다.

본 발명에서 사용되는 용어 "면역자극제"는 공지된 애주번트 활성을 갖는 천연 또는 합성 화합물로서 기술될 수 있으며, 상기 애주번트 활성은 데포(depot) 효과와 같은 그 밖의 비자극성 효과를 통해서가 아닌, 면역 시스템 자체 또는 면역 시스템을 목표로 삼은 세포에 대한 상기 화합물의 직접적인 또는 간접적인 자극 효과로부터 유도된다. 이러한 면역자극제의 예는 문헌[in a chapter in "Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach" (Edited by Powell, M.F. and Newman, M.J.; 1995, Pharmaceutical Biotechnology (Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X) entitled "Compendium of vaccine adjuvants and excipients" by Powell, M.F. and Newman M.]에 기술되어 있다. 본 발명의 범위내에 포함되는 이들 면역자극제는 모노포스포릴 지질 A 또는 이들의 유도체와 같은, 박테리아에 의해 유도된 화합물; 식물에서 유도된 사포닌 또는 이들의 유도체, 예를 들어 Quil A; 또는 CpG, 블록 공중합체, 콜레라 독소와 같은 면역자극성 올리고뉴클레오티드, GM-CSF 및 IL-1, 폴리리보 A 및 폴리리보 U, 및 무라밀 트리펩티드(MTP)와 같은 면역자극성 시토킨을 포함한다.

모노포스포릴 지질 A는 애주번트 활성을 갖는, 박테리아로부터 유도된 화합물이며, 본 발명에서 사용하기에 바람직한 면역자극제이다. 이러한 독성 화합물은 변경되어 독성이 덜한 유도체를 형성하였는데, 이러한 유도체로는 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL 또는 d3-MPL로 명명됨, 여기에서 환원 말단 글루코사민의 위치 3은 데-O-아실화된 부분을 나타낸다)가 있다. 3D-MPL의 제법은 GB 2 220 211 A를 참조하면 된다. 화학적으로 보면, 이것은 3-데아실화된 모노포스포릴 지질 A와 3, 4, 5 또는 6 아실화된 쇠의 혼합물이다. 본 발명의 조성물에서는 작은 입자 MPL이 사용되는 것이 바람직하다. 작은 입자 MPL은 0.22 $\mu\text{m}$  필터를 통해 무균 여과될 수 있게 하는 입자 크기를 갖는다. 이러한 제조는 국제특허 출원 WO 94/21292호에 기술되어 있다. 추가의 개선은 트리 및 테트라 아실 동류물로 구성된 3D-MPL의 안정한 제조가 개시되어 있는 GB 9807933.8호에 기술되어 있다.

GB 2 220 211A호에는 이전에 사용되었던 장내 박테리아 리포폴리사카라이드(LPS)의 내독성은 감소되지만 면역원성 특성은 보존된다고 기술되어 있다. 그러나, GB 2 220 211호는 박테리아(그램 음성) 시스템과 관련해서만 이들 결과를 인용하였다.

본 발명에서 사용하기에 바람직한 또 다른 면역자극제는 Quil A 및 이의 유도체이다. Quil A는 남아메리카산 나무인 퀴라자 사포나리아 몰리나(*Quilaja Saponaria Molina*)로부터 분리된 사포닌 제조물이며 1974년에 달스가드(Dalsgaard) 등에 의해 애주번트 활성을 갖는다고 처음으로 기술되었다[참고문헌: "Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254]. Quil A [EP 0 362 278호], 예를 들어 QS7 및 QS21 (QA7 및 QA21로도 공지되어 있음)와 관련된 독성 없이 애주번트 활성 없이 애주번트 활성을 보유하는 Quil A의 정제된 단편은 HPLC에 의해 분리되었다. 특히 바람직한 QS21의 특정 포플레이션이 기술되었는데, 이러한 포플레이션은 스테롤을 추가로 포함한다[WO96/33739호].

CpG는 공지된 애주번트 특성을 갖는 면역자극성 올리고뉴클레오티드이다[참고문헌: WO 96/02555호]. 본 발명의 범위 내에서 바람직한 CpG 서열은 (TCC ATG AGC TTC CTG ACG TT, Krieg 1826), (TCT CCC AGC GTG CGC CAT, Krieg 1758) 및 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT이다.

본 발명은 애주번트의 특성의 포플레이션 방법 및 이들의 특성에 관한 것이며, 이로써 광범위한 항원과 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 백신은 프라이밍(priming) 및 부스팅(boosting) 투여를 위해 사용될 수 있으며, 광범위한 항원에 대한 면역 반응의 유도 및 광범위한 항원에 의해 매개된 감염증으로부터의 보호를 위해 사용될 수 있다. 또한, 본 발명은 금속염, 면역자극제 및 항원을 포함하는 백신의 사용을 포함하여, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공하며, 여기에서 면역자극제는 항원에 흡착되는 금속염 입자와는 다른 금속염 입자상에 흡착된다. 병원체 및 항원의 일부는 하기에 수록되어 있다.

A, B, C, D 및 E 형 간염 바이러스에 의해 야기되는 바이러스성 간염은 아주 통상적인 바이러스성 질환이다. 또한, 특히 B 및 C형 바이러스에 의해 대부분의 감염이 발생된다. 이와 같이, 효과적인 백신을 개발하는 것은 중요한 문제이기 때문에, 주목될 만큼 성공을 거두었음에도 불구하고 이러한 연구는 계속되고 있다. 현대의 간염 백신에 대한 연구내용은 다수의 중요한 참고문헌을 포함하여, 문헌[the Lancet, May 12th 1990 at page 1142 ff(Prof A.L.W.F. Eddleston)]에서 발견될 수 있다. 또한, 문헌['Viral Hepatitis and Liver Disease'(Vyas, B.N., Dienstag, J.L., and Hoofnagle, J.H., eds, Grune and Stratton, Inc. (1984) and 'Viral Hepatitis and Liver Disease'(Proceedings of the 1990 International Symposium, eds F.B. Hollinger, S.M. Lemon and H. Margolis, published by Williams and Wilkins)]에서도 발견될 수 있다.

본원에서 사용되는 표현 'B형 간염 백신'은 사람에게 바이러스에 대한 면역성을 제공하는데 사용될 수 있는, B 형 간염 바이러스로부터 유도된 모든 항원성 물질을 언급하는데 사용된다.

B 형 간염 바이러스(HBV)에 의한 감염증은 만연된 문제이지만, 대량 면역접종을 위해 사용될 수 있는 백신이 현재 이용되고 있으며, 예를 들어 유전 공학 기술에 의해 수득되는 제품 '엔제릭스(Engerix)-B'(SmithKline Beecham plc)가 이용되고 있다.

B 형 간염 표면 항원(HBsAg)의 제조는 문헌에 기재되어 있다[참조예: Harford et al in Develop. Biol. Standard 54, page 125 (1983), Gregg et al in Biotechnology, 5, page 479 (1987), EP-A-0 226 846, EP-A-0 299 108 및 이 문헌에 인용되어 있는 참고문헌].

본원에서 사용되는 표현 'B 형 간염 표면 항원' 또는 'HBsAg'은 HBV 표면 항원의 항원성을 나타내는 모든 HBsAg 항원 또는 이들의 단편을 포함한다. HBsAg S 항원[참고문헌: Tiollais et al, Nature, 317, 489 (1985) 및 이 문헌에 인용되어 있는 참고문헌]의 226 아미노산 서열 이외에도, 본원에 기술되어 있는 바와 같은 HBsAg가 요망되는 경우 상기 참고문헌 및 EP-A-0 278 940호에 기술되어 있는 바와 같은 pre-S 서열을 전부 또는 일부 함유하는 것으로 이해될 것이다. 특히, HBsAg는 ad 혈청형의 B 형 간염 바이러스상에 오픈 리딩 프레임(open reading frame)과 관련된 HBsAg의 L-단백질의 잔기 12-52, 이어서 잔기 133-145, 이어서 잔기 175-400을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드(이러한 폴리펩티드는 L\*로 언급된다; EP 0 414 374 참조)를 포함할 수 있다. 본 발명의 범위내에 있는 HBsAg는 EP 0 198 474 (Endotronics)에 기술되어 있는 preS1-preS2-S 폴리펩티드 또는 EP 0 304 578(Mc Cormick and Jones)에 기술된 것과 같은 이들의 유사체를 포함할 수도 있다. 본원에 기술되어 있는 바와 같은 HBsAg, 특히 145 위치에서 아미노산 치환부가 글리신으로부터 아르기닌에 이르는 HBsAg는 변이체, 예를 들어 WO 91/14703 또는 유럽특허출원 공개 번호 0 511 855 A1에 기술되어 있는 '이탈 변이체(escape mutant)'로도 언급될 수 있다.

일반적으로, HBsAg는 입자 형태로 존재할 것이다. 이들 입자는 예를 들어 S 단백질만을 포함할 수 있거나 복합체 입자, 예를 들어 (L\*,S)(여기에서 L\*은 상기 정의한 바와 같고 S는 HBsAg의 S-단백질을 나타낸다)일 수 있다. 상기 입자는 효모에서 발현되는 형태가 유리하다.

A 형 간염 바이러스로부터의 감염을 방지하는 성분은 바람직하게는, HAV의 HM-175 균주로부터 유도된 사멸된 약독화된 백신인 'Havrix'(SmithKline Beecham Biologicals)로서 공지되어 있는 제품이다[참고문헌: 'Inactivated Candidate Vaccines for Hepatitis A' by F.E. Andre, A. Hepburn and E.D' Hondt 91980), Prog. Med. Virol. Vol 37, pages 72-95 and the product monograph 'havrix' published by SmithKline Beecham Biologicals (1991)].

이와 같이, 본 발명의 바람직한 구체예에서, HBsAg 및 A 형 간염 항원을 포함하는 조합 백신이 제공된다. 또한, 본 발명에 의해 A 및 B 형 간염 조합 백신을 생성시키는 방법 및 이러한 방법으로부터 제조된 생성물이 제공된다.

스미스클라인 비참 바이오로지칼즈(SmithKline Beecham Biologicals)에 의해 제조된 인판릭스(상표명: infanrix) 레인지를 포함하는 그 밖의 조합 백신이 시판되고 있다. 이러한 백신은 디프테리아 독소(Diphtheria toxin), 파상풍 독소(Tetanus toxin) 및 백일해균(*B. pertussis*) 항원의 "코어(core)" 조합체를 기초로 한다. 이러한 백신은 백일해 성분(임의로 1개 또는 2개의 응집원 2 또는 응집원 3과 함께 전형적으로 2개의 항원, 즉, PT 및 FHA를 종종 69kDa으로 포함하는 사멸화시킨 전체 세포 백일해균 또는 무세포성 백일해)을 포함한다. 이러한 백신은 종종 DTPw(전체 세포) 또는 DTPa(무세포성)로서 언급된다.

본 발명의 범위내에 속하는 특정의 조합 백신은 다음을 포함한다:

디프테리아-파상풍-백일해-B 형 간염(DTP-HB)

디프테리아-파상풍-B 형 간염(DT-HB)

Hib-B 형 간염

DTP-Hib-B 형 간염

IPV (불활성화된 소아마비 백신) - DTP - Hib - B 형 간염

백일해 성분으로는 전체 세포 백일해 백신 또는 무세포성 백일해 백신 (부분적으로 또는 고도로 정제된 항원 함유)이 적합하다. 상기 조합체는 A 형 간염에 대하여 보호적인 성분을 임의로 포함할 수 있다. A 형 간염 성분으로는 불활성화된 포르말린 HM-175가 바람직하다. 유리하게는, HM-175는 배양된 HM-175를 트립신으로 처리하고, 투과 크로마토그래피에 의해 작은 프로테아제 분해된 단백질로부터 무손상 바이러스를 분리시키고, 포르말린으로 불활성화시킴으로써 정제된다. 유리하게는, B 형 간염 조합 백신은 소아과학 백신이다.

본 발명의 다른 조합 백신은 GB 9805105.5호(SmithKline Beecham Biologicals s.a.)에 기술되어 있는데, 이러한 조합 백신은 청소년용 백신에 특히 이롭다. 바람직한 조합 백신은 B 형 간염 항원(Hep B) 및 단순포진 바이러스(HSV) 항원의 "코어" 조합체를 기초로 한다. 임의로, 이러한 "코어"에 다음 그룹으로부터 유도되는 하나 이상의 항원이 추가될 수 있다: 엡스타인 바 바이러스(EBV) 항원, A형 간염 항원(Hep A), 사람의 유두종 바이러스(HPV) 항원. 이들 조합 백신은 수두 대상포진 바이러스(VZV), 사람 시토크갈로바이러스(HCMV) 또는 독소플라즈마 항원을 추가로 포함할 수 있다.

바람직하게는, 본 발명의 백신 포물레이션은 사람 병원체에 대하여 면역 반응을 유도할 수 있는 항원 또는 항원성 조성물을 함유하며, 상기 항원 또는 항원성 조성물은 HIV-1(tat, nef, gp120 또는 gp 160과 같은), gD 또는 이들의 유도체 또는 HSV1 또는 HSV2로부터의 ICP27과 같은 즉시형 초기 단백질과 같은 사람 포진 바이러스, 시토크갈로바이러스(특히 사람)(gB 또는 이들의 유도체와 같은), 로타바이러스(살아있는 약독화된 바이러스), 엡스타인 바르 바이러스(gp350 또는 이들이 유도체) 수두 대상포진 바이러스(gpI, II 및 IE63과 같은)로부터 유도되거나 B형 간염 바이러스와 같은 간염 바이러스(예, B형 간염 표면 항원 또는 이들의 유도체), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스로부터 유도되거나, 파라믹소바이러스와 같은 다른 바이러스성 병원체: 호흡 신티시움 바이러스(F 및 G 단백질 또는 이들의 유도체와 같은), 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 사람 유두종 바이러스(예를 들어, HPV6, 11, 16 및 18), 플라비바이러스(예를 들어, 황열병 바이러스, 뎅기열 바이러스, 틱-본(Tick-borne) 뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스)로부터 유도되거나, 네이세리아 고노리아(*N. gonorrhoea*) 및 네이세리아 메닝자이티디스(*N. meningitidis*)(예를 들어, 캡슐 모양의 폴리사카라이드 및 이들의 컨주게이트, 트랜스페린 결합 단백질, 락토펜 결합 단백질, PilC, 부착소(adhesins))를 포함한 네이세리아 종; 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*S. pneumoniae*)(예를 들어, 캡슐 모양의 폴리사카라이드 및 이들의 컨주게이트, PsaA, PspA, 스트렙톨리신(streptolysin), 콜린 결합 단백질), 스트렙토코쿠스 파이오게네스(*S. pyogenes*)(예를 들어, M 단백질 또는 이들의 단편, C5A 프로테아제, 리포테이코익산(lipoteichoic acids)), 스트렙토코쿠스 아갈락티아(*S. agalactiae*), 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*S. mutans*)를 포함한 스트렙토코쿠스 종; 헤모필루스 인플루엔제 타입 B(*H. influenzae type B*)(예를 들어, PRP 및 이들의 컨주게이트), 년타이피어블 헤모필루스 인플루엔제(non typeable *H. influenzae*)(예를 들어, OMP26, 고분자량 부착소, P5, P6, 지질단백질 D), 헤모필루스 두크레이(*H. ducreyi*)를 포함한 헤모필루스 종; 브란하멜라 카탈리스(*Branhamella catarrhalis*)로도 공지되어 있는 모락셀라 카탈리스(*M. catarrhalis*)(예를 들어, 고분자량 및 저분자량 부착소 및 인바신(invasins))를 포함한 모락셀라 종(*Moraxella spp*); 보르

테텔라 백일해(*B. pertussis*)(예를 들어, 페르탁틴(*pertactin*), 백일해 독소 또는 이들의 유도체, 필라멘티우스 헤마글루티닌(*filamentous hemagglutinin*), 아테널레이트 시클라아제, 펴브리애(*fimbriae*)), 보르테텔라 파라페르투스시스(*B. parapertussis*) 및 보르테텔라 브론키셉티카(*B. bronchiseptica*)를 포함한 보르테텔라 종(*Bordetella spp.*); 미코박테리움 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*)(예를 들어, ESAT6, 항원 85A, -B 또는 -C), 미코박테리움 보비스(*M. bovis*), 미코박테리움 레프래(*M. leprae*), 미코박테리움 아비움(*M. avium*), 미코박테리움 파라투베르쿨로시스(*M. paratuberculosis*), 미코박테리움 스메그마티스(*M. smegmatis*)를 포함한 미코박테리움 종(*Mycobacterium spp.*); 레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila*)를 포함한 레지오넬라 종(*Legionella spp.*); 에스케리치아 콜리(*E. coli*)(예를 들어, 콜론화 인자, 열에 불안정한 독소 또는 이들의 유도체, 열에 안정한 독소 또는 이들의 유도체), 장출혈성 에스케리치아 콜리, 장병원성 에스케리치아 콜리(예를 들어, 시가(*shiga*) 독소 유사 독소 또는 이들의 유도체)를 포함한 에스케리치아 종(*Escherichia spp.*); 비브리오 콜레라(*V. cholera*)(예를 들어, 콜레라 독소 또는 이들의 유도체)를 포함한 비브리오 종(*Vibrio spp.*); 시겔라 손네이(*S. sonnei*), 시겔라 디센테리아(*S. dysenteriae*), 시겔라 플렉스너리(*S. flexnerii*)를 포함한 시겔라 종(*Shigella spp.*); 예르시니아(*Yersinia*) 엔테로콜리티카(*enterocolitica*)(예를 들어, Yop 단백질), 예르시니아 페스티스(*Y. pestis*), 예르시니아 슈도투베르쿨로시스(*Y. pseudotuberculosis*)를 포함한 예르시니아 종(*Yersinia spp.*); 캄필로박터 제주니(*C. jejuni*)(예를 들어, 독신, 부착소 및 인바신) 및 캄필로박터 콜리(*C. coli*)를 포함한 캄필로박터 종(*Campylobacter spp.*); 살모넬라 티파이(*S. typhi*), 살모넬라 파라티파이(*S. paratyphi*), 살모넬라 콜레라에수이스(*S. choleraesuis*), 살모넬라 엔테리티디스(*S. enteritidis*)를 포함한 살모넬라 종(*Salmonella spp.*); 리스테리아 모노시토게네스(*L. monocytogenes*)를 포함한 리스테리아 종(*Listeria spp.*); 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*)(예를 들어, 우레아제, 카탈라아제, 공포형성 독소)를 포함한 헬리코박터 종(*Helicobacter spp.*); 슈도모나스 아에루기노사(*P. aeruginosa*)를 포함한 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp.*); 스타필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus*), 스타필로코쿠스 에피더미디스(*S. epidermidis*)를 포함한 스타필로코쿠스 종(*Staphylococcus spp.*); 엔테로코쿠스 파에칼리스(*E. faecalis*), 엔테로코쿠스 파에시움(*E. faecium*)을 포함한 엔테로코쿠스 종(*Enterococcus spp.*); 클로스트리움 테타니(*C. tetani*)(예를 들어, 과산화물 독소 및 이들의 유도체), 클로스트리움 보툴리눔(*C. botulinum*)(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이들의 유도체), 클로스트리움 디피실레(*C. difficile*)(예를 들어, 클로스트리움 독소 A 또는 B 및 이들의 유도체)를 포함한 클로스트리움 종(*Clostridium spp.*); 바실러스 안트라시스(*B. anthracis*)(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이들의 유도체)를 포함한 바실러스 종(*Bacillus spp.*); 코리네박테리움 디프테리아(*C. diphtheriae*)(예를 들어 디프테리아 독소 및 이들의 유도체)를 포함한 코리네박테리움 종(*Corynebacterium spp.*); 보렐리아 버그도르페리(*B. burgdorferi*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 보렐리아 가리니(*B. garinii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 보렐리아 아프젤리(*B. afzelii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 보렐리아 안더소니(*B. andersonii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), 보렐리아 헤름시(*B. hermsii*)를 포함한 보렐리아 종(*Borrelia spp.*); 에를리히아 에쿠이(*E. equi*) 및 사람 과립성 에를리히오시스의 체제를 포함한 에를리히아 종(*Ehrlichia spp.*); 리케치아 리케치(*R. rickettsii*)를 포함한 리케치아 종(*Rickettsia spp.*); 클라미디아 트라코마티스(*C. trachomatis*)(예를 들어, MOMP, 헤파린 결합 단백질), 클라미디아 뉴모니아(*C. pneumoniae*)(예를 들어, MOMP, 헤파린 결합 단백질), 클라미디아 프리타시(*C. psittaci*)를 포함한 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*); 렙토스피라 인터로간스(*L. interrogans*)를 포함한 렙토스피라 종(*Leptospira spp.*); 트레포네마 팔리둠(*T. pallidum*)(예를 들어, 회소 외막 단백질), 트레포네마 덴티콜라(*T. denticola*), 트레포네마 히오디센테리아(*T. hyodysenteriae*)를 포함한 트레포네마 종(*Treponema spp.*)과 같은 박테리아 병원체로부터 유도되거나; 플라스모디움 팔시파룸(*P. falciparum*)을 포함한 플라스모디움 종(*Plasmodium spp.*); 톡소플라즈마 곤디(*T. gondii*)(예를 들어, SAG2, SAG3, Tg34)를 포함한 톡소플라즈마 종(*Toxoplasma spp.*); 엔타모에바 히스톨리티카(*E. histolytica*)를 포함한 엔타모에바 종(*Entamoeba spp.*); 바베시아 마이크로티(*B. microti*)를 포함한 바베시아 종(*Babesia spp.*); 트리파노소마 크루지(*T. cruzi*)를 포함한 트리파노소마 종(*Trypanosoma spp.*); 기아르디아 람블리아(*G. lamblia*)를 포함한 기아르디아 종(*Giardia spp.*); 레쉬마니아 마조르(*L. major*)를 포함한 레쉬마니아 종(*Leshmania spp.*); 뉴모시스티스 카리니(*P. carinii*)를 포함한 뉴모시스티스 종(*Pneumocystis spp.*); 트리코모나스 바지날리스(*T. vaginalis*)를 포함한 트리코모나스 종; 스킴소스토마 만소니(*S. mansoni*)를 포함한 스킴소스토마 종(*Schistosoma spp.*)과 같은 기생충으로부터 유도되거나, 칸디다 알비칸스(*C. albicans*)를 포함한 칸디다 종(*Candida spp.*); 크립토코쿠스 네오포르만스(*C. neoformans*)를 포함한 크립토코쿠스 종(*Cryptococcus spp.*)과 같은 효모로부터 유도된다.

하나의 바람직한 일면에서, 본 발명의 백신 포물레이션은 특히 CHO 세포에서 발견되는 경우 HIV-1 항원, gp120을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 백신 포물레이션은 상기 정의된 바와 같은 gD2t를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구체예에서, 청구된 애쥬번트를 함유하는 백신은 생식기 우종(*genital wart*)의 원인이 되는 HPV 바이러스, 및 자궁경부암의 원인이 되는 HPV 바이러스(HPV16, HPV18 등)를 포함한다. 특히 바람직한 백신 형태는 L1 입자 또는 캡소미어, 및 HPV6 및 HPV11 단백질 E6, E7, L1 및 L2로부터 선택되는 하나 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 가장 바람직한 융합 단백질 형태는 GB 95 15478.7에 기술되어 있는 바와 같은 L2E7 및 GB 9717953.5 (WO99/10375)에 기술되어 있는 바와 같은 단백질 D(1/3)-E7이다.

본 발명의 백신은 말라리아의 원인이 되는 기생충으로부터 유도된 항원을 포함한다. 예를 들어, 플라스모디아 팔시파룸 (*Plasmodia falciparum*)으로부터의 바람직한 항원은 RTS, S 및 TRAP를 포함한다. RTS는 B형 간염 표면 항원의 preS2 부분의 4개 아미노산을 통해 B형 간염 바이러스의 표면(S) 항원에 결합되어 있는 플라스모디아 팔시파룸의 서큘스포르조이트(circumsporozoite)(CS) 단백질의 모든 C-말단 부분을 포함하는 하이브리드 단백질이다. 이의 완전한 구조는 UK 특허출원 제 9124390.7을 우선권으로 주장하는 WO93/10152호로 공개된 국제특허출원 제 PCT/EP92/02591호에 제시되어 있다. 효모 RTS에서 발현될 때 리포단백질 입자로서 생성되고, HBV로부터 S 항원과 공동으로 발현될 때 RTS,S로서 공지된 혼합 입자를 생성시킨다. TRAP 항원은 WO 90/01496으로 공개된 국제특허출원 제 PCT/GB89/00895호에 제시되어 있다. 본 발명의 바람직한 구체에는 항원성 제조물이 RTS,S와 TRAP 항원의 조합체를 포함하는 말라리아 백신이다. 멀티스테이지 (multistage) 말라리아 백신의 성분일 것 같은 그 밖의 플라스모디아 항원은 플라스모디아 팔시파룸 MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 세퀘스트린(Sequestrin), PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 및 플라스모디움종에 속하는 이들의 유사체이다.

본 발명의 포플레이션은 항종양성 항원도 또한 함유할 수 있으며, 암을 면역요법으로 치료하는데 유용할 수 있다. 예를 들어, 애쥬번트 포플레이션은 전립선암, 유방암, 결장직장암, 폐암, 췌장암, 신장암 또는 흑색종양에 대한 항원과 같은 종양 거부 항원으로서의 효용을 갖는다. 예시적인 항원으로는 MAGE 1 및 MAGE 3 또는 흑색종, PRAME, BAGE 또는 GAGE의 치료를 위한 그 밖의 MAGE 항원이 있다[참고문헌: Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (submitted 1997); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p293]. 실제로, 이들 항원은 흑색종, 폐암종, 육종 및 방광 암종과 같은 광범위한 종양 유형에서 발현된다. 그 밖의 종양 특이적 항원은 본 발명의 애쥬번트와 함께 사용하기에 적합하지만, 전립선 특이적 항원(PSA) 또는 Her-2/neu, KSA (GA733), MUC-1 및 암종태아성 항원(CEA)으로 한정되지는 않는다. 그 밖의 항원은 티로시나아제 및 수르비빈(Survivin)을 포함하는 췌장암 치료 항원인 것으로 제시되었다. 따라서, 본 발명의 일면에서, 본 발명에 따른 애쥬번트 조성물 및 종양 거부 항원을 포함하는 백신이 제공된다.

본 발명의 조성물은 보렐리아(*Borrelia*)종으로부터 유도된 항원을 함유하는 백신을 포플레이션시키는데 사용될 것으로 예상된다. 예를 들어, 항원은 핵산, 항원 또는 항원성 제조물로부터 유도된 병원체, 재조합적으로 생성된 단백질 또는 펩티드, 및 키메라 융합 단백질을 포함할 수 있다. 특히, 항원은 OspA이다. OspA는 (Lipo-OspA)라 명명된 숙주 세포(E.Coli)의 지질화된 형태 또는 비지질화된 유도체에서 완전한 성숙 단백질일 수 있다. 이러한 비지질화된 유도체는 인플루엔자 바이러스의 비구조 단백질(NS1)의 최초 81개 N-말단 아미노산을 갖는 비지질화된 NS1-OspA 융합 단백질, 및 완전한 OspA 단백질을 포함하며, MDP-OspA는 3개의 추가 N-말단 아미노산을 함유하는 OspA의 비지질화된 형태이다.

본 발명의 백신은 알레르기의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이러한 백신은 알레르겐 특이적 항원(예, Der p1, 및 폴렌 관련된 항원) 및 알레르겐 비특이적 항원(예, 스타워쓰 데카펩티드)을 포함하고 있을 것이다.

각각의 백신 용량에서 항원의 양은 보편적인 백신접종자에게 심한 부작용을 야기시키지 않으면서 면역보호적 반응을 유도하는 양으로 선택된다. 이러한 양은 어떤 특이적 면역원이 사용되고 어떠한 방식으로 제공되는지에 따라서 달라질 수 있다. 일반적으로, 각각의 용량은 1 내지 1000 $\mu$ g, 바람직하게는 1 내지 500 $\mu$ g, 보다 바람직하게는 1 내지 100 $\mu$ g, 가장 바람직하게는 1 내지 50 $\mu$ g의 항원을 포함할 것으로 예상된다. 특정의 백신에 대한 최적량은 피검자에게서 발생하는 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하여 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 최초의 백신접종 후, 피검자는 적절한 간격으로 1회 또는 수회의 부스터 면역접종을 받을 수 있다. 사람 투여의 경우에 전형적으로, 면역자극제는 단일 용량 당 1 $\mu$ g 내지 1000 $\mu$ g, 바람직하게는 10 $\mu$ g 내지 500 $\mu$ g, 보다 바람직하게는 20 내지 200 $\mu$ g, 보다 바람직하게는 20 내지 100 $\mu$ g, 가장 바람직하게는 10 내지 50 $\mu$ g 범위의 양으로 존재할 것이다.

본 발명은 특히 병원체성 감염증 또는 암 또는 알레르기를 앓고 있거나 이에 민감한 포유동물을 치료하는 방법으로서 약제에서 사용하기 위한 본 발명의 애쥬번트 및 백신을 추가로 제공한다. 또한, 바이러스, 박테리아, 기생충에 의한 감염증, 알레르기 또는 암의 면역학적 예방 및 면역학적 치료제의 제조시에 본 발명의 애쥬번트 및 백신의 용도가 제공된다. 본 발명의 포플레이션은 예방 및 치료 목적 둘 모두로 사용될 수 있다.

백신 제법은 문헌["Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach" Edited by Powell, M.F. and Newman, M.J.; 1995, Pharmaceutical Biotechnology (Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X)]에 일반적으로 기술되어 있다.

본 발명은 비제한적인 하기 실시예로 설명된다.



## 실시예

### 실시예 1 - 물질 및 방법

#### 혈청학

코팅 항원으로서 HBs(Hep 286)을 사용하여 ELISA에 의해 항-HBs 항체를 정량하였다. 항원 및 항체 용액을 웰 당  $50\mu\text{l}$ 의 양으로 사용하였다. 항원을 PBS 중에  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 희석시키고  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 96 웰 마이크로타이더 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)의 웰에 흡착시켰다. 그런 다음, 상기 플레이트를, 1% 우혈청 알부민 및 0.1% TWEEN 20 (포화 완충액:  $100\mu\text{l}/\text{well}$ )이 함유되어 있는 PBS와 함께  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액중에 2배로 희석시킨 혈청 희석액(1/100의 희석비로 출발)을 HBs-코팅된 플레이트에 가하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 0.1% TWEEN 20이 함유되어 있는 PBS로 4회 세척하고, 포화 완충액 중에 1/1000의 비율로 희석된 비오틴-컨쥬게이션된 항-마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 Ig(Amersham, UK)를 각각의 웰에 첨가하고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후에, 포화 완충액중에 1/5000의 비율로 희석된 스트렙타비딘-비오틴화된 페록시다아제 복합체(Amersham, UK)를  $37^\circ\text{C}$ 에서 추가의 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기한 바와 같이 세척하고, o-페닐렌디아민(Sigma) 0.04%, 0.1% TWEEN 20 중의  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.03%, 0.05M 시트레이트 완충액(pH 4.5)을 함유하는 용액과 함께 20분 동안 인큐베이션시켰다. 반응을 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 로 중지시키고 490/630nm에서 판독하였다. ELISA 역가를 소프트맥스프로(Softmax Pro)(4개의 매개변수 방정식을 사용)에 의해 기준으로부터 계산하고 이를 EU/ml 단위로 표현하였다.

#### T 세포 증식

이차 면역접종을 하고 나서 2주일 후에, 마우스를 절명시키고, 푸울(pool)에서 방부 상태로 비장을 제거하였다. 세포 현탁액을 2mM의 L-글루타민, 항생물질,  $5 \times 10^{-5}$  M의 2-메르캅토에탄올 및 1%의 유전적 동계의 정상적인 마우스 혈청이 함유되어 있는 RPMI 1640 배지(GIBCO) 중에서 제조하였다. 비장의 세포를, HBs 항원의 농도( $10\text{-}0.03\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 달리하면서 둥근 바닥의 96웰-플레이트의  $200\mu\text{l}$ 에서  $2 \times 10^6$  세포/ml의 최종 농도로 배양시켰다. 각각의 시험을 4회 반복하여 수행하였다. 5%  $\text{CO}_2$  하에  $37^\circ\text{C}$ 에서 96시간 동안 인큐베이션시킨 후,  $0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$ 로  $^3\text{H}$ -티미딘(Amersham, UK, 5Ci/mmol)을 사용하여 18시간 동안 펄싱(pulsed)시킨 후 세포 수집기로 유니필터(Unifilter) 플레이트(Packard)상에서 수확하였다. 합쳐진 방사성을 신타레이션 계수기(Topcount, Packard)에서 측정하였다. 결과를 cpm (4회 반복 웰에서의 평균 cpm) 또는 자극율(항원이 함유되어 있는 세포 배양액의 평균 cpm/항원이 함유되어 있지 않은 세포 배양액의 평균 cpm)로 표현하였다.

#### 시토킨 제조

이차 면역접종을 하고 나서 2주일 후에, 마우스를 절명시키고, 비장을 푸울(그룹 당 3개의 푸울)에서 방부 상태로 제거하였다. 세포 현탁액을, 2mM L-글루타민, 항생물질,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-메르캅토에탄올 및 5% 우태아 혈청이 함유되어 있는 RPMI 1640 배지(GIBCO) 중에서 제조하였다. HBs 항원의 농도( $10\text{-}0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 달리하면서 평평한 바닥의 24웰-플레이트의 1ml에서  $5 \times 10^6$  세포/ml의 최종 농도로 배양시켰다. 상청액을 96시간 후에 수집하고, ELISA에 의해 IFN $\gamma$  및 IL-5의 존재에 대해 시험할 때까지 동결시켰다.

#### IFN $\gamma$ 제조

젠자임(Genzyme)으로부터 구입한 시약을 사용하여 ELISA에 의해 IFN $\gamma$ 를 정량하였다. 샘플 및 항체 용액은 웰 당  $50\mu\text{l}$ 의 용량으로 사용하였다. 96-웰 마이크로타이더 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)를 탄산염 완충액(pH 9.5) 중에  $1.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석시킨 햄스터 항-마우스 IFN $\gamma$ 로  $4^\circ\text{C}$ 에서 밤새 코팅시켰다. 그런 다음 1%의 우혈청 알부민 및 0.1%의 TWEEN 20 (포화 완충액)을 함유하는 PBS  $100\mu\text{l}$ 와 함께  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. (1/2에서 출발하여) 시험관내 자극으로부터의 상청액을 포화 완충액중에 2배 희석시킨 희석액을 항-IFN $\gamma$  코팅된 플레이트에 첨가하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 PBS TWEEN 0.1% (세척 완충액)으로 4회 세척하고,  $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 포화 완충액중에 희석시킨 비오틴 컨쥬게이션된 염소 항-마우스 IFN $\gamma$ 를 각각의 웰에 첨가한 후,  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계후, 포화 완충액중에 1/10000의 비율로 희석시킨 AMDEX

컨쥬게이트(Amersham)를 37°C에서 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기한 바와 같이 세척하고 10분 동안 TMB (Biorad) 50 $\mu$ l와 함께 인큐베이션시켰다. 반응을 0.4N의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 중지시키고 450/630nm에서 판독하였다. SoftmaxPro (4개의 매개변수 방정식)에 의해 표준 곡선(마우스 IFN $\gamma$  표준)을 사용하여 농도를 계산하여 pg/ml 단위로 표현하였다.

IL-5 제조

IL-5를 파민겐(Pharmingen)으로부터 입수한 시약을 사용하여 ELISA에 의해 정량하였다. 샘플 및 항체 용액을 웰 당 50  $\mu$ l의 용량으로 사용하였다. 96-웰 마이크로타이터 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)를 탄산염 완충액(pH 9.5) 중에 1 $\mu$ g/ml의 농도로 희석시킨 래트 항-마우스 IL-5로 4°C에서 밤새 코팅시켰다. 그런 다음 1%의 우혈청 알부민 및 0.1%의 TWEEN 20 (포화 완충액)을 함유하는 PBS 100 $\mu$ l와 함께 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. (1/2에서 출발하여) 시험관내 자극으로부터의 상청액을 포화 완충액중에 2배 희석시킨 희석액을 항-IFN $\gamma$  코팅된 플레이트에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 PBS TWEEN 0.1% (세척 완충액)으로 4회 세척하고, 1 $\mu$ g/ml의 최종 농도로 포화 완충액중에 희석시킨 비오틴 컨쥬게이션된 래트 항-마우스 IL-5를 각각의 웰에 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계후, 포화 완충액중에 1/10000의 비율로 희석시킨 AMDEX 컨쥬게이트(Amersham)를 37°C에서 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기한 바와 같이 세척하고 15분 동안 TMB(Biorad) 50 $\mu$ l와 함께 인큐베이션시켰다. 반응을 0.4N의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 중지시키고 450/630nm에서 판독하였다. SoftmaxPro(4개의 매개변수 방정식)에 의해 표준 곡선(재조합 마우스 IL-5)을 사용하여 농도를 계산하여 pg/ml 단위로 표현하였다.

실시예 2 - 마우스에서의 면역원성 연구

항원을 함유하지 않은 고형의 미립 담체상에서의 MPL의 개념을 시험하기 위해, 다양한 순서의 HABMPL 백신 포물레이션을 사용하여 Balb/C에서 면역원성 연구를 수행하였다:

**[표 1]**  
백신 포물레이션

그룹	포물레이션
1	(HB-AIPO <sub>4</sub> ) + 3D-MPL + (HA-AI(OH) <sub>3</sub> )
2	(3D-MPL-AI(OH) <sub>3</sub> ) + (HA-AI(OH) <sub>3</sub> ) + (HB-AIPO <sub>4</sub> )
3	(3D-MPL-AIPO <sub>4</sub> ) + (HA-AI(OH) <sub>3</sub> ) + (HB-AIPO <sub>4</sub> )

포물레이션 방법의 설명

그룹 1, 종래 기술의 포물레이션 방법. 먼저 항원을 금속염상에 흡착시킨 후 유리된 상태의 3D-MPL을 첨가하여 항원과 동일한 금속염 입자상에 3D-MPL이 흡착되게 한다.

그룹 2 및 3, 본 발명의 포물레이션 방법. 3D-MPL을 하나의 금속염 입자상에 흡착시키고, 항원을 별도의 금속염 입자상에 흡착시킨 후, 미리 흡착시킨 복합체를 혼합한다.

면역화 방법

10마리의 마우스로 구성된 마우스 그룹들을 HAB 기재 포물레이션(1/10 사람 용량, 즉, HAV 72 ELU, HBs 2 $\mu$ g, MPL 5  $\mu$ g)을 사용하여 4주 간격으로 2회 피하 면역시켰다. 제 2 투여 후 14일 제에, 림프 증식성 반응 및 시토킨 생성(IL/IFN $\gamma$ )을 HBs 및 HAV에 의한 비장 세포의 시험관내 재자극후 분석하였다. 혈액을 35일 제에 레트로오비탈 시누스(retroorbital sinus)로부터 채취하고 유도된 이소타입 프로파일(HBs 만) 뿐만 아니라 HBs 및 HAV에 대한 항체 반응을 ELISA에 의해 모니터링하였다.

결과

체액 반응(Ig 및 이소타입)은 HBV에 대한 코팅 항원으로서 HBs를 사용하여 HAV에 대한 베링(Behring) 키트를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 제 2 투여 후 14일 째에, 채혈하여 분석하였다.

도 1은 개별적인 혈청에서 측정되고 GMT로서 나타내어진 항-HBs Ig 항체 반응을 보여주는 그래프이다.

도 2는 푸울링된 혈청에 대한 분석으로부터 계산된 이소타입 배분(IgG1, IgG2a 및 IgG2b)을 보여주는 그래프이다.

그룹 1과 신규한 포물레이션(그룹 2 및 3) 사이에서 어떠한 항체 역가의 차이도 관찰되지 않았다. 더욱이, 신규한 포물레이션(그룹 2 및 3)은 종래 기술의 포물레이션(그룹 1)에 의해 자극된 것과 유사한 비율의 IgG 및 IgG2a/b 이소타입을 자극한다.

세포 매개된 면역 반응

세포 매개된 면역 반응(림프구증식 및 IFN $\gamma$ /IL-5 생성)을 HBs 또는 HA 항원에 의한 비장 세포의 시험관내 재자극후 제 2 투여 후 14일 째에 측정하였다. 각 그룹의 마우스에 대해, 5마리의 마우스를 절명시키고 시험관내 시험을 위해 비장을 푸울링시켰다.

도 3은 HBs에 의해 재자극된 비장 세포에서 모니터링된 림프구증식 반응을 나타내는 그래프이다.

도 4는 HBs에 의해 재자극된 비장 세포에서 모니터링된 시토킨 생성율을 나타내는 그래프이다.

포물레이션 사이에서 림프 증식성 반응에서 어떠한 차이도 관찰할 수 없었다.

강한 IFN- $\gamma$  (+/- 1000pg/ml) 반응은 모든 그룹에서 관찰되었지만, 그룹 사이에서 IL-5 생성(60pg/ml)의 어떠한 차이도 발견되지 않았다.

결론

HABMPL 포물레이션 순서 사이에서 HBsAg에 대한 체액성 및 세포 매개된 면역 반응에서 어떠한 현저한 차이도 관찰되지 않았다.

실시예 3 - 기니 피그의 HSV 백신접종

이전 실시예는 감염 항원과 관련한 신규한 포물레이션 및 방법의 효능을 입증하였다. 이 실시예는 본 발명의 방법과 비교되는 고전적인 방법의 알루미늄(alum) 및 3D-MPL로 포물레이션된 단순포진 바이러스 gD 백신의 면역원성 및 보호 효능을 조사하였다. HSV 기니 피그 질내 보호 모델에서 2개의 백신을 비교하였다.

그룹	포물레이션	
4	gD2t(20 $\mu$ g) + 3D-MPL(50 $\mu$ g) + AlOH(500 $\mu$ g)	
5	gD2t(20 $\mu$ g) + AlOH(400 $\mu$ g)	3D-MPL(50 $\mu$ g) + AlOH(100 $\mu$ g)
6	비처리	

실험 프로토콜

하나의 그룹이 12 마리의 하틀리(Hartely) 기니 피그 암컷으로 구성된 기니 피크 그룹들을 0일 및 28일에 2회 면역접종시켰다. 57일째에, 105pfu의 HSV2 MS 균주(100 $\mu$ l)를 상기 동물의 질내에 투여하였다. 투여후, 동물을 4일부터 12일까지 일차 질환의 임상적 징후에 대하여 매일 모니터링하였다. 두 번째 면역접종을 하고 나서 14일 및 28일 후에 레트로-오비탈 시누스로부터 혈액을 채취하고 항-gD 항체 반응(IgG)을 ELISA에 의해 모니터링하였다.

포물레이션 방법

WO 92/16231호에 기술되어 있는 기술에 따라서 HSV2로부터의 gD2t를 생성시켰다. 3D-MPL은 미국 몬타나에 소재하는 리비 이뮤노켄 인코포레이티드(Ribi ImmunoChem Inc.)로부터 입수하였다. Al(OH)<sub>3</sub>는 수퍼포스(Superfos)로부터 입수하였다. 포물레이션은 첫 번째 주사가 있기 15일 전에 제조하였다. 모든 인큐베이션은 교반하에 실온에서 수행하였다.

그룹 4 Al(OH)<sub>3</sub> 기재 포물레이션 (250 $\mu$ l/1회용량) : 고전적인 방식

MPL(12.5 $\mu$ g) 첨가 전에 15분간 gD2t(5 $\mu$ g)를 125 $\mu$ g의 Al(OH)<sub>3</sub> 상에 흡착시켰다. 30분 후, 포물레이션을 10배 농축된 PBS pH 7.4 용액으로 완충시켰다. 15분 후, 500 $\mu$ g/ml의 페녹시에탄올을 방부제로서 첨가하였다.

H<sub>2</sub>O + Al(OH)<sub>3</sub> + Ag-15m-MPL-30m-10xPBSPH7.4-15m-2 페녹시

그룹 5 Al(OH)<sub>3</sub> 기재 포물레이션(250 $\mu$ l/1회용량): 신규한 방식

gD2t(5 $\mu$ g)를 15분 동안 100 $\mu$ g의 Al(OH)<sub>3</sub> 상에 흡착시키고 농축된 모노벌크(monobulk)로서 저장하였다. 한편, MPL(12.5 $\mu$ g)을 30분 동안 25 $\mu$ g의 Al(OH)<sub>3</sub> 상에 흡착시키고 다른 농축된 모노벌크로서 저장하였다. 최종적인 포물레이션을 위해, 흡착된 gD2t를 H<sub>2</sub>O 및 10배 농축된 PBS (pH 7.4)중에 희석시켰다. 15분 후, 방부제로서 페녹시에탄올을 첨가하기 전에 흡착된 MPL을 첨가하였다.

Al(OH)<sub>3</sub> + Ag

Al(OH)<sub>3</sub> + MPL

H<sub>2</sub>O + 10xPBS pH 7.4 + Ads gD2t-15m-Ads MPL-15m-2 페녹시

샘플 정량

코팅 항원으로서 gD 43B318을 사용하여 ELISA에 의해 항-gD 항체를 정량하였다. 항원 및 항체 용액을 웰 당 50 $\mu$ l의 양으로 사용하였다. 항원을 PBS 중에 1 $\mu$ g/ml의 최종 농도로 희석시키고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 96 웰 마이크로타이터 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)의 웰에 흡착시켰다. 그런 다음, 상기 플레이트를, 1% 우혈청 알부민 및 0.1% TWEEN 20 (포화 완충액)이 함유되어 있는 PBS와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액중에 2배로 희석시킨 혈청 희석액을 gD 코팅된 플레이트에 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 0.1% TWEEN 20이 함유되어 있는 PBS로 4회 세척하고, 포화 완충액 중에 1/1000의 비율로 희석된 비오틴-컨쥬게이션된 항-기니 피그 IgG(Amersham, UK)를 각각의 웰에 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후에, 포화 완충액중에 1/1000의 비율로 희석된 스트렙타비딘-비오틴화된 페록시다아제 복합체(Amersham, UK)를 37 $^{\circ}$ C에서 추가의 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기한 바와 같이 세척하고, 0.1% TWEEN 20 0.05M 시트레이트 완충액(pH 4.5) 중의 0.04%의 o-페닐렌디아민(Sigma) 0.03%의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 함유하는 용액과 함께 20분 동안 인큐베이션시켰다. 반응을 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 중지시키고 490/630nm에서 판독하였다. ELISA 역가를 소프트맥스프로(Softmax Pro)(4개의 매개변수 방정식을 사용)에 의해 기준으로부터 계산하고 이를 EU/ml 단위로 표현하였다.

통계학적 분석

UNISTAT를 사용하여 혈청학 데이터에 대해 통계학적 분석을 수행하였다.

다양한 분석 중의 한가지 분석을 위해 적용된 프로토콜은 다음과 같이 간략하게 기재될 수 있다:

1) 데이터의 로그(Log) 변환

2) 정상도를 입증하기 위한, 각 개체(그룹)에의 콜모고로브 스미르노브(Kolmogorov Smirnov) 시험

- 3) 여러 개체(그룹)들간의 다양한 균일성을 입증하기 위한 하틀리 및 코크란(Cochran) 시험
- 4) 선택된 데이터에 대한 다양한 분석 : 제 2 투여 후 14일째 또는 제 2 투여 후 28일째의 데이터.

결과

혈청학

도 5는 개별적인 혈청에 대하여 제 2 투여 후에 측정된 항-gD IgG 항체 반응을 나타내는 그래프이다.

제 2 투여 후 14일(GMP에 대하여 17090-18508 EU/ml) 또는 제 2 투여 후 28일(GMT에 대하여 10227-11965 EU/ml) 째에 포물레이션들간에 항체 역가에 있어서 어떠한 현저한 차이도 관찰되지 않았다. 다양한 분석 방법중 하나의 방법을 사용하여 데이터의 로그 변환 후의 시점으로부터 백신 포물레이션에 의해 상승된 항-gD IgG 역가에 대하여 별도로 분석하였다. 포물레이션들간의 어떠한 통계학적으로 중요한 차이도 발견되지 않았다(제 2 투여 후 14일 및 제 2 투여 후 28일에 대하여 각각 p 값 = 0.7397 및 0.5078).

질환으로부터의 보호

백신접종된 동물과 비처리된 동물에서 수가지 파라미터를 비교함으로써, 투여 후 4 내지 12일 사이에 일차 질환으로부터의 보호를 평가하였다.

- 병변(질 또는 외부)을 지닌 동물과 지니고 있지 않는 동물의 비율.
- 하기와 같이 각각의 그룹에 대하여 계산된 일차 감염율(PI):

$$\Sigma(\text{최고 스코어} \times \text{발생율}(\%))$$

- 중간치로서 표현된 병변 스코어(4일 내지 12일)와 병변을 나타내는 동물의 수(N)의 합.
- 4 내지 12일 사이에서 각각의 그룹에 대하여 계산된 평균 누적 스코어.

**[표 2]**  
병변 파라미터의 요약

그룹	병변이 없는 동물 (%)	질 병변(%)	외부 병변(%)	일차 감염율*	병변 중증도(n)**
4	66.7	25	8.3	29.2 -97%	1 (4)
5	83.3	16.7	0	8.3 -99%	0.5 (2)
6	11.1	0	88.9	844.4	28.3 (8)

\* 감염 후 4 내지 12일 동안 병변 스코어의 합(병변을 지니지 않은 동물은 고려되지 않았다). 병변 스코어 : 어떠한 병변도 없는 경우(0), 질 병변(0.5 또는 1), 외부 피부 소포(2, 4, 8 또는 16)  
 \*\* 일차 감염율 = (최대 스코어 1) × (발병율 %); 여기서, 1=0, 0.5, 1, 2, 4, 8 또는 16

도 6은 HSV 투여후에 누적된 병변 스코어 곡선을 나타내는 그래프이다.

대부분의 백신접종된 동물은 어떠한 병변도 발생시키지 않았거나(66% 내지 88%) 질 병변을 발생시켰다. 비교로서, 대조군 동물의 89%는 외부 병변을 나타냈다.

일차 감염율의 현저한 감소가 백신 접종된 동물에게서 관찰되었다(97% 내지 99%). 이것은 매우 낮은 병변 중증도를 수반하였고, 비처리된 그룹(중간치 = 28)과 비교하여 백신접종된 그룹(중간치 = 0.5 또는 1)에 대하여 기록되었다.

누적 스코어의 곡선으로 도시된 바와 같이, 그룹들(4 및 5) 둘 모두는 일차 질환에 대하여 매우 우수하며 필적할 만한 수준의 보호를 나타냈다.

결론

백신 HSV 백신 포물레이션에 대한 고전적인 방법과 신규한 방법을 비교하였다. IgG 역가 또는 일차 질환에 대한 보호에 있어 상기된 두 방법 사이에는 어떠한 통계학적으로 중요한 차이도 관찰되지 않았다.

실시에 4 - 마우스의 HPV 백신접종

사람 유두종 바이러스(Human Papiloma Virus) E7 항원 및 3D-MPL의 다양한 순서의 포물레이션(AIOH 또는 AIPO<sub>4</sub> 기재의)을 항원 특이적 체액성 반응을 야기시키는 이들의 능력에 대하여 비교하였다. 동일한 담체상에 3D-MPL 및 단백질 D1/3-E7이 혼합되어 흡착된 포물레이션(방식 1) 및 3D-MPL이 항원을 함유하지 않은 담체상에 별도로 흡착되는 포물레이션(방식 2)을 사용한 경우 필적할 만한 수준의 Ig 역가를 획득하였다. 단백질 D 1/3 E7을 WO 99/10375호의 방법에 따라 제조하였다. 항원 및 MPL 포물레이션의 기재 물질로는 AIOH 또는 AIPO<sub>4</sub>를 사용하였다. 항원 및 3D-MPL을 동일한 알루미늄염 입자에 순차적으로 흡착시키거나(방식 1) 혼합전에 별도로 흡착시켰다(방식 2). 10마리의 마우스로 이루어진 그룹들을 하기의 포물레이션(물질 및 방법에서 기술됨)을 사용하여 면역화시켰다 :

그룹	설명	포물레이션
7	ProtD1/3 E7-AIOH	AIOH상에 흡착된 5µg의 ProtD 1/3 E7
8	ProtD1/3 E7-AIOH/MPL	MPL과 함께 AIOH상에 흡착된 5µg의 ProtD 1/3 E7 (방식 1)
9	ProD1/3 E7-AIOH/ (AIPO <sub>4</sub> /MPL)	AIPO <sub>4</sub> 상에 흡착된 MPL과 조합된 AIOH상에 흡착된 5µg의 ProtD 1/3 E7
10	ProtD1/3 E7-AIPO <sub>4</sub>	AIPO <sub>4</sub> 상에 흡착된 5µg의 ProtD 1/3 E7
11	ProtD1/3 E7-AIPO <sub>4</sub> /MPL	MPL과 함께 AIPO <sub>4</sub> 상에 흡착된 5µg의 ProtD 1/3 E7 (방식 1)
12	ProtD1/3 E7-AIPO <sub>4</sub> (AIOH/MPL)	AIOH상에 흡착된 MPL과 조합된 AIPO <sub>4</sub> 상에 흡착된 5µg의 ProtD 1/3 E7 (방식 2)
13	ProtD1/3 E7 o/w	수중유 에멀션 3D-MPL/QS21에서 포물레이션된 5µg의 ProtD 1/3 E7

마우스를 근대 경로에 의해 21일 간격으로 2회 면역시켰다. 혈청을 35일째(제 2 투여 후 14일)에 수집하고 E7 특이적 항체의 존재에 대하여 분석하였다(물질 및 방법 참조). 포물레이션을 첫 번째 주사 5일 전에 제조하였다. 모든 인큐베이션은 교반하면서 실온에서 수행하였다.

I. Al 기재 포물레이션 (50µl/1회용량) : 고전적인 방식(방식 1)

PD1/3E7(5µg)을 MPL의 첨가(5µg)전에 30분 동안 50µg의 Al(OH)<sub>3</sub> 또는 AIPO<sub>4</sub> 상에 흡착시켰다. 30분 후, 상기 포물레이션을 10배 농축된 PO<sub>4</sub>, NaCl (pH 6.8) 용액으로 완충시켰다. 15분 후, 50µg/ml의 티오머살을 방부제로서 첨가하였다.

H<sub>2</sub>O+ Al+ Ag-30m-MPL-30m-10xPNpH6.8-15m-Thio

II. Al 기재 포물레이션(50µl/1회용량) : 신규한 방식(방식 2)

PD1/3E7(5µg)을 30분 동안 10µg의 Al(OH)<sub>3</sub> 또는 AIPO<sub>4</sub>상에 흡착시키고 농축된 모노벌크로서 저장하였다. 한편, MPL (5µg)을 20µg의 Al(OH)<sub>3</sub> 또는 AIPO<sub>4</sub>상에 흡착시키고 다른 농축된 모노벌크로서 저장하였다. 최종 포물레이션을 위해, 흡착된 MPL 및 나머지 Al(20µg)의 첨가전에 흡착된 항원을 H<sub>2</sub>O 및 10배 농축된 PO<sub>4</sub>, NaCl (pH 6.8) 용액에 희석시켰다. 13분 후, 50µg/ml의 티오머살을 방부제로서 첨가하였다.

Al + Ag

Al + MPL

H<sub>2</sub>O + 10xPN pH 6.8 + Ads PD1/3E7 + Ads MPL + Al-30m-Thio

혈청학

코팅 항원으로서 E7 (Bollen)을 사용하여 ELISA에 의해 항-E7 항체를 정량하였다. 항원 및 항체 용액을 웰 당 50 $\mu$ l의 양으로 사용하였다. 항원을 탄산염 완충액(pH 9.5) 중에 3 $\mu$ g/ml의 최종 농도로 희석시키고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 96 웰 마이크로타이터 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)의 웰에 흡착시켰다. 그런 다음, 상기 플레이트를, 1% 우혈청 알부민 및 0.1% TWEEN 20 (포화 완충액)이 함유되어 있는 PBS와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액중에 2배로 희석시킨 혈청 희석액(1/100의 희석비로 출발)을 E7 코팅된 플레이트에 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 0.1% TWEEN 20이 함유되어 있는 PBS로 4회 세척하고, 포화 완충액 중에 1/5000의 비율로 희석된 비오틴-컨쥬게이션된 항-마우스 (IgG1, IgG2a, IgG2b 또는) IgGtot(Amersham, UK)를 각각의 웰에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후에, 포화 완충액중에 1/5000의 비율로 희석된 스트렙타비딘-비오틴화된 페록시다아제 복합체(Amersham, UK)를 37 $^{\circ}$ C에서 추가의 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기한 바와 같이 세척하고, TMB(테트라-메틸-벤지딘)과 함께 10분 동안 인큐베이션시켰다. 반응을 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 중지시키고 450nm에서 판독하였다. 중심점 희석을 소프트맥스프로(Softmax Pro)(4개의 매개변수 방정식을 사용)에 의해 계산하였다.

결과

ELISA에 의해 푸올링된 혈청상에서 측정된 항-E7 Ig 역가(Eu/ml)는 다음과 같다 :

	E7-AIOH 기재 포물레이션	E7 AIPO <sub>4</sub> 기재 포물레이션
알룸	4434	1651
알룸/MPL	10780	12666
알룸/(알룸/MPL)	13390	15495

AIOH 기재 포물레이션 또는 AIPO<sub>4</sub> 기재 포물레이션과 비교할 때 필적할 만한 수준의 역가가 수득되었다. MPL이 AIOH 또는 AIPO<sub>4</sub> 포물레이션에 가해질 때, 도달된 역가는 Al 포물레이션에 대하여 5,000EU/ml 미만인 것과 비교하여 10,000EU/ml를 초과하였다. 포물레이션 순서 둘 모두에 대하여 필적할 만한 수준의 역가가 수득되었다.

항원 및 MPL의 다양한 순서의 포물레이션(AIOH 또는 AIPO<sub>4</sub> 기재)을 항원 특이적 항체를 생성시키는 이들의 능력에 관하여 비교하였다:

MPL을 함유하는 모든 포물레이션은 알룸 포물레이션 보다 더 높은 수준의 E7 특이적 Ig를 야기하였다. 동일한 담체상에 MPL 및 pD1/3-E7이 혼합되어 흡착된 포물레이션(방식 1) 및 MPL이 항원이 없는 담체상에 별도로 흡착되어 있는 포물레이션(방식 2)과 필적할 만한 수준의 Ig 역가가 수득되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

금속염 입자상에 흡착된 면역자극제를 포함하는 애쥬번트 조성물로서, 금속염 입자가 다른 항원을 사실상 함유하지 않으며, 면역자극제가 모노포스포릴 지질 A 또는 이들의 유도체 및/또는 CpG 함유 올리고뉴클레오티드임을 특징으로 하는 애쥬번트 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 금속염 입자가 알루미늄염, 아연염, 칼슘염, 세륨염, 크롬염, 철염 또는 베릴륨염임을 특징으로 하는 애쥬번트 조성물.

**청구항 3.**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 금속염이 포스페이트 또는 히드록시드임을 특징으로 하는 애주번트 조성물.

**청구항 4.**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 금속염이 알루미늄 히드록시드 또는 알루미늄 포스페이트임을 특징으로 하는 애주번트 조성물.

**청구항 5.**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 면역자극제가 모노포스포릴 지질 A 또는 이의 유도체임을 특징으로 하는 애주번트 조성물.

**청구항 6.**

제 5항에 있어서, 모노포스포릴 지질 A의 유도체가 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A임을 특징으로 하는 애주번트 조성물.

**청구항 7.**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 면역자극제가 CpG 함유 올리고뉴클레오티드임을 특징으로 하는 애주번트 조성물.

**청구항 8.**

(a)금속염 입자가 다른 항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제를 포함하는 애주번트 조성물과 (b)항원을 혼합하는 것을 포함하여 백신 조성물을 제조하는 방법.

**청구항 9.**

제 8항에 있어서, 항원이 금속염 입자상에 흡착됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10.**

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 항원이 사람 면역결핍 바이러스, 수두대상포진 바이러스, 단순포진 바이러스 유형 1, 단순포진 바이러스 유형 2, 사람 시토크롬알로 바이러스, 뎅기 바이러스, A, B, C 또는 E형 간염 바이러스, 호흡기 신시티움바이러스, 사람 유두종 바이러스, 인플루엔자 바이러스, Hib, 수막염 바이러스, 살모넬라(Salmonella), 네이세리아(Neisseria), 보렐리아(Borrelia), 클라미디아(Chlamydia), 보르데텔라(Bordetella), 플라스모디움(Plasmodium) 또는 톡소플라즈마(Toxoplasma)로부터 유도된 항원, IgE 펩티드, Der p1, 화분 관련 항원; 또는 종양 관련 항원(TAA), MAGE, BAGE, GAGE, MUC-1, Her-2 neu, LnRH(GnRH), CEA, PSA, KSA 또는 PRAME를 포함하는 균으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11.**



제 1항 또는 제 2항에 따른 에주번트 조성물을 포함하며 항원을 추가로 포함하는 백신 조성물.

#### 청구항 12.

제 8항 또는 제 9항에 따른 방법에 따라 제조된 백신.

#### 청구항 13.

금속염 입자상에 흡착된 사포닌, 및 항원을 포함하는 백신으로서, 금속염 입자가 다른 항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는 백신.

#### 청구항 14.

제 13항에 있어서, 사포닌이 QS21임을 특징으로 하는 백신.

#### 청구항 15.

(a)항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제를 포함하는 제 1 복합체, 및 (b)금속염 입자상에 흡착된 항원을 포함하는 제 2 복합체의 두 가지 주요 복합체 집단을 포함하는 백신 조성물.

#### 청구항 16.

(a)항원을 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는 금속염 입자상에 흡착된 면역자극제를 포함하는 제 1 복합체, 및 (b)모노포스포릴 지질 A 또는 이들의 유도체를 사실상 함유하지 않음을 특징으로 하는 금속염 입자상에 흡착된 항원을 포함하는 제 2 복합체의 두 가지 주요 복합체 집단을 포함하는 백신 조성물.

#### 청구항 17.

제 15항 또는 제 16항에 있어서, 제 1 및 제 2 복합체에 존재하는 금속염이 동일함을 특징으로 하는 백신 조성물.

#### 청구항 18.

제 15항 또는 제 16항에 있어서, 제 2 복합체가 다수의 서브(sub)-복합체를 포함하며, 각각의 서브-복합체가 금속 입자상에 흡착된 상이한 항원을 포함함을 특징으로 하는 백신 조성물.

#### 청구항 19.

제 13항 내지 제 16항 중의 어느 한 항에 있어서, 금속염이 알루미늄염, 아연염, 칼슘염, 세륨염, 크롬염, 철염 또는 베릴륨염임을 특징으로 하는 백신 조성물.

#### 청구항 20.

제 19항에 있어서, 금속염이 포스페이트 또는 히드록시드임을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 21.**

제 20항에 있어서, 금속염이 알루미늄 히드록시드 또는 알루미늄 포스페이트임을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 22.**

제 11항에 있어서, 면역자극제가 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A임을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 23.**

제 11항에 있어서, 면역자극제가 CpG임을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 24.**

제 11항에 있어서, 항원이 사람 면역결핍 바이러스, 수두대상포진 바이러스, 단순포진 바이러스 유형 1, 단순포진 바이러스 유형 2, 사람 시토크갈로 바이러스, 탱기 바이러스, A, B, C 또는 E형 간염, 호흡기 신시티움 바이러스, 사람 유두종 바이러스, 인플루엔자 바이러스, Hib, 수막염 바이러스, 살모넬라, 네이세리아, 보렐리아, 클라미디아, 보르데텔라, 플라스모디움 또는 톡소플라즈마, 스탠워쓰 데카펩티드(stanworth decapeptide), Der p1, 화분 관련 항원; 또는 암 관련 항원, MAGE, BAGE, GAGE, MUC-1, Her-2 neu, LnRH(GnRH), CEA, PSA, 티로시나아제, 수르비빈(Survivin), KSA 또는 PRAME를 포함하는 균으로부터 선택됨을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 25.**

제 24항에 있어서, 항원이 A형 간염 항원과 B형 간염 항원의 조합 항원임을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 26.**

제 24항에 있어서, 플라스모디움 항원이 RTS,S 및 TRAP의 균으로부터 선택되는 하나 이상의 항원임을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 27.**

제 24항에 있어서, 약제에 사용됨을 특징으로 하는 백신 조성물.

**청구항 28.**

제 24항에 따른 백신 조성물을 포함하는, 바이러스, 세균, 기생충 감염증, 알레르기, 또는 암의 예방 또는 치료에 적합한 약제.

**청구항 29.**

삭제

**청구항 30.**

금속염상에 흡착되어 있는 모노포스포릴 지질 A 또는 이의 유도체를 지닌 제 1 용기 및 금속염상에 흡착되어 있는 항원을 지닌 제 2 용기를 포함하는 키트.

**청구항 31.**

제 10항에 있어서, 항원이 HPV 6, 11, 16 또는 18로부터 유도됨을 특징으로 하는 방법.

**청구항 32.**

제 31항에 있어서, 항원이 L1 입자 또는 캡소머임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 33.**

제 24항에 있어서, 항원이 HIV 6, 11, 16 또는 18로부터 유도됨을 특징으로 하는 백신 조성물.

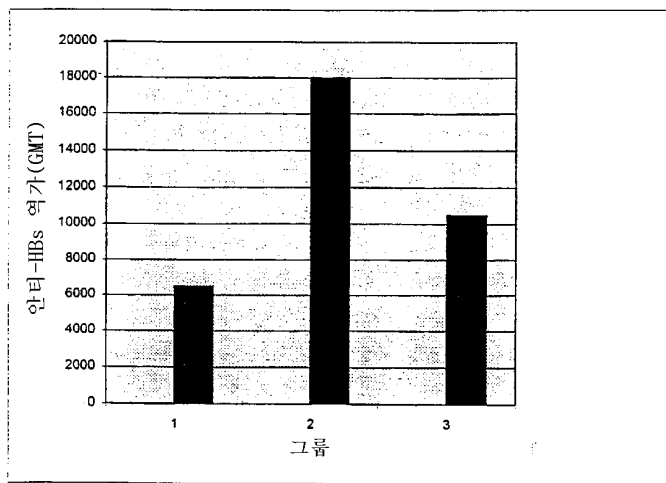
**청구항 34.**

제 33항에 있어서, 항원이 L1 입자 또는 캡소머임을 특징으로 하는 백신 조성물.

도면

도면1

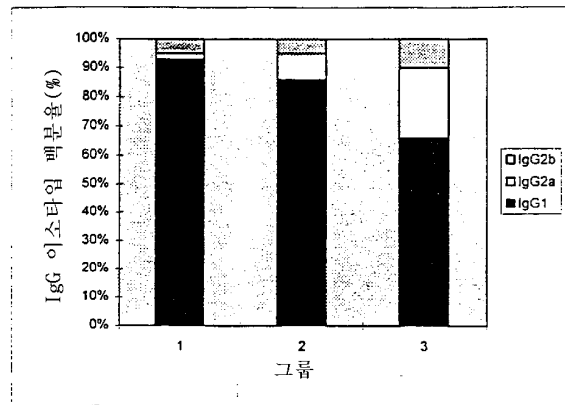
각각의 혈청상에서 측정하고 GMT로서 나타낸 안티-HBs 항체 반응



그룹	ELISA 역가 (GMT)
1	6495
2	18006
3	10496

도면2

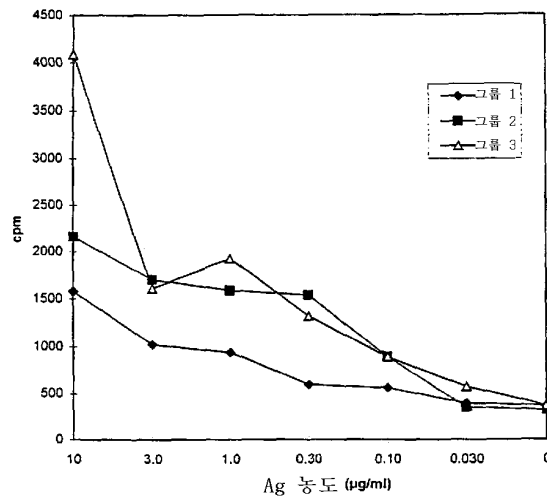
푸울링된 혈청상에서의 분석으로부터 계산한 이소타입 배분(IgG1, IgG2a 및 IgG2b)



그룹	IgG1 %	IgG2a %	IgG2b %
1	93	2	5
2	86	9	5
3	66	24	10

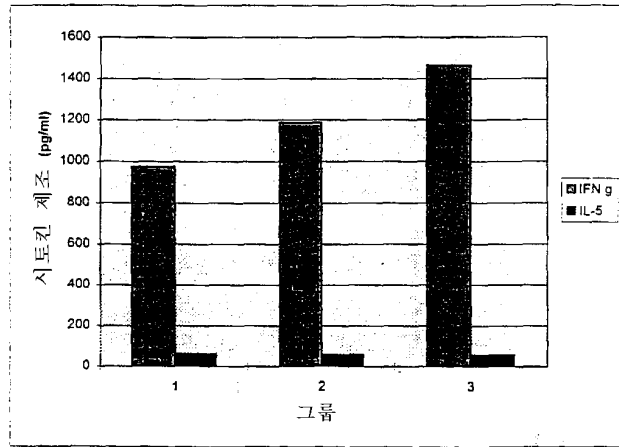
도면3

HBs로 제자극한 비장 세포에서 모니터링된 림프 증식



도면4

HBs로 재자극한 비장 세포에서 모니터링된 시토킨 제조

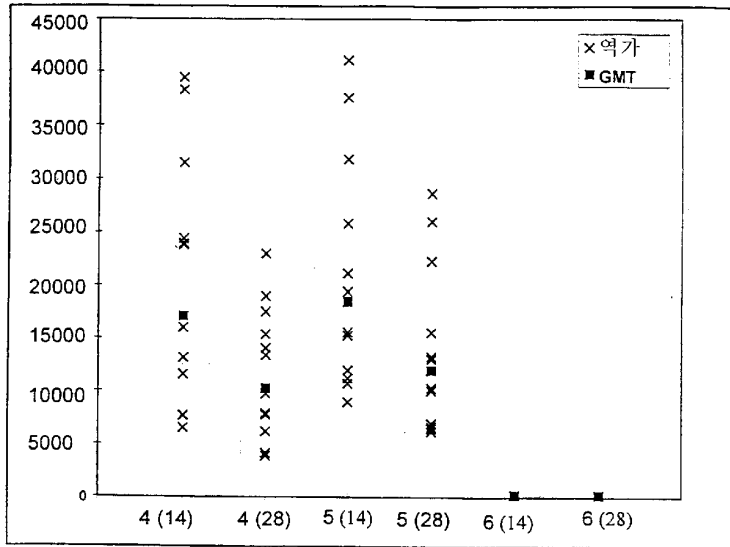


시토킨 (pg/ml)		Gp 1	Gp 2	Gp 3
IFN g	HBsAg 10 $\mu$ g/ml	975	1187	1465
	블랭크	157*	173*	173*
IL-5	HBsAg 10 $\mu$ g/ml	64*	59*	59*
	블랭크	64*	59*	59*
IFNg/IL-5의 비율		15.2	20.1	24.8

\* 정량 한계

도면5

안티 HSV gD 역가(실시에 3 참조)



그룹(채혈 일정)	ELISA 역가	
	GMT	평균
4 (포스트 II 14일)	17090	20336
4 (포스트 II 28일)	10227	11825
5 (포스트 II 14일)	18508	20903
5 (포스트 II 28일)	11965	13796
6 (포스트 II 14일)	200	200
6 (포스트 II 28일)	200	200

도면6

평균 누적 HSV 병변 스코어(실시에 3 참조)

