(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[7]
A61K 39/155

(11) 공개번호 특2001-0040932
(43) 공개일자 2001년05월15일

(21) 출원번호 10-2000-7008845
(22) 출원일자 2000년08월11일
번역문제출일자 2000년08월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US1999/02848
(87) 국제공개번호 WO 1999/40937
(86) 국제출원출원일자 1999년02월10일
(87) 국제공개일자 1999년08월19일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 가나 감비아 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨

EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴 핀랜드 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 기네비쏘

국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀랜드 영국 그루지야 가나 감비아 크로아티아 헝가리 인도네시아 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키스탄 베트남 유고슬라비아 짐바브웨

(30) 우선권주장 60/074,450 1998년02월12일 미국(US)
(71) 출원인 아메리칸사이아나미드컴파니 윌리암 에이취 캘넌, 에곤 이 버그
미합중국뉴저지매디슨파이브지랄다-팜츠
(72) 발명자 핸콕제랄드이.
미국뉴욕14472혼오이폴즈플레인즈로드50
엘드릿지존에이치.
미국뉴욕14450페어포트비어트리스코우브4
(74) 대리인 차윤근

심사청구 : 없음

(54) 인터루킨-12 및 호흡기 합포체 바이러스 항원을 포함하는백신

요약

본 발명은 RSV 항원과 같은 항원, 및 현탁 미네럴에 흡착될 수 있는 인터루킨 IL-12의 혼합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 이러한 백신 조성물은 항원에 대한 보호 면역반응을 보인다.

대표도

도1

색인어

인터루킨-12, 호흡기 합포체 바이러스 항원

명세서

기술분야

면역 시스템은 병원체 공격에 다수의 메커니즘을 사용한다; 그러나, 이들 메커니즘 모두가 면역 후에 늘 활성화되는 것은 아니다. 백신접종에 의해 유도된 보호면역은 병원체에 저항하거나 이를 제거하기 위한 백신의 적정 면역반응 도출능에 좌우된다. 병원체에 따라, 세포 매개성 및/또는 체액성 면역반응을 요구할 수도 있다.

면역반응에서 헬퍼 T 세포의 역할에 대한 현재의 패러다임은 T 세포가 이들이 생성하는 사이토킨을 기초로 하여 서브세트로 분리될 수 있고, 이들 세포에서 관찰된 독특한 사이토킨 프로필이 이들의 기능을 결정한다는 것이다. 이러한 T 세포 모델은 두 가지 주요 서브세트를 포함한다: 세포성 및 체액성 면역반응 모두를 증대시키는 IL-2 및 인터페론 γ(IFN-γ)를 생성하는 Th-1 세포, 및 체액성 면역반응을 증대시키는 IL-4, IL-5 및 IL-10을 생성하는 Th-2 세포(Mosmann et al., J. Immunol. 126:2348(1986)). 면역되는 유기체에서 더 강한 면역반응을 얻고 항원-보유체에 대한 숙주 저항성을 강화하기 위하여 때로는 항원의 면역원능을 증강시키는 것이 바람직하다. 투여되는 항원의 면역원성을 증강시키는 물질은 보조제로 알려져 있다. 예를 들면, 특정의 림포카인은 보조 활성을 지닌 것으로 나타났으며, 따라서 항원에 대한 면역반응을 증강시킨다(Nencioni et al., J. Immunol. 139:800-804(1987); EP285441 to Howard et al.).

발명의 개요

본 발명은 하나 이상의 호흡기 합포체 바이러스(RSV) 항원, 인터루킨 IL-12 및 현탁 미네럴의 혼합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. IL-12는 미네럴 현탁에 흡착되거나 간단히 이와 혼합될 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, IL-12는 알룸(예를 들면, 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄) 같은 미네럴 현탁에 흡착된다. 이러한 백신 조성물은 항원에 대한 보호 면역반응을 조절한다; 즉, 백신 조성물은 백신접종 숙주의 항체반응을 정량적, 정성적으로 향상시킬 수 있고, 병원체에 대한 보호반응을 위한 세포 매개성 면역을 정량적으로 증가시킬 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서, RSV 항원은 RSV F 및/또는 G 단백질 항원이다.

본 발명은 또한, RSV 항원과 IL-12를 현탁 미네럴과 혼합하는 단계를 포함하는 백신 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 특히, IL-12는 미네럴 현탁에 흡착된다. 본 발명은 또한, 생리학적으로 허용되는 용액 중의 RSV 항원, IL-12 및 현탁 미네럴의 혼합물을 포함하는 백신 조성물 유효량을 척추동물 숙주에 투여하는 단계를 포함하는, 보호 면역반응을 위한, 백신접종자의 체액성 및/또는 세포-매개성 면역 도출 또는 증가방법에 관한 것이다. 특히, IL-12는 미네럴 현탁에 흡착된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 F/A1OH + 상승하는 용량의 IL-12로 백신접종한 BALB/c 마우스로부터의 비장 면역세포의 증식반응을 보여주는 그래프이다. 검은색 막대는 천연 F 단백질로 시험관내 자극한 후의 증식을 도시한다.

도 2a 및 2b는 BALB/c 마우스에서 F/A1OH의 IFN-γ(도 2a) 및 IL-5(도 2b) 분비 비장세포 생성능에 미치는 IL-12의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 3은 F/A1OH의 세포-매개성 면역반응 유도 또는 확대능에 미치는 IL-12의 효과, 및 1차 면역 후 F/A1OH의 항원-의존성 킬러 세포 도출능에 미치는 IL-12의 영향을 보여주는 그래프이다. 실선과 대시선은 챌린지 5일 후, 각각 동계 RSV-감염세포 또는 대조 표적세포와 기관지폐포 세척 작동세포를 배양한 후 관찰된 킬러 세포 활성을 나타낸다.

도 4는 사전에 RSV로 감염시킨 혈청 양성 BALB/c 마우스의 세포-매개성 면역반응을 증대시키는 F/A1OH의 능력에 미치는 IL-12의 효과를 보여주는 그래프이다. 실선과 대시선은 챌린지 5일 후 각각 동계 RSV-감염 세포 또는 대조 표적세포와 기관지폐포 세척 작동세포를 배양한 후 관찰된 킬러 세포 활성을 나타낸다.

도 5는 F/A1OH로 백신접종한 BALB/c 마우스에서 유도된 보호 면역반응에 미치는 재조합 IL-12의 효과를 도시하는 그래프이다. 막대는 기하 평균의 1 표준편차이다. 별표는 감염성 바이러스가 검출가능한 수준 이하였음을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

IL-12는 다양한 항원-제공 세포, 주로 대식구 및 단핵구에 의해 생성된다. 이는 순수한(naive) T 세포로부터 Th-1 세포의 유도에서 중요한 요소이다. IL-12의 생성 및 이에 대한 반응능은 예를 들면, 기생충 감염, 특히 레이슈마니아증 동안, 보호성 Th-1-유사 반응의 발생에 중요한 것으로 나타났다(Scott et al., U.S. 특허 No. 5,571,515). IL-12의 효과는 NK 세포 및 T 헬퍼 세포에 의해 생성된 IFN-γ에 의해 매개된다. IFN-γ는 T-의존성 단백질 항원에 대한 IgG2a 항체의 유도(Finkelman and Holmes, Annu. Rev. Immunol. 8:303-33(1990)) 및 T-독립성 항원에 대한 IgG3 반응(Snapper et al., J. Exp. Med. 175:1367-1371(1992))에 중요하다. 본래는 천연 킬러 세포 자극인자로 불렸던 인터루킨-12(IL-12)는 헤테로 이량체 사이토킨이다(Kobayashi et al., J. Exp. Med. 170:827 (1989)). 재조합 숙주세포내 IL-12 단백질의 발현 및 분리는 국제특허출원 WO 90/05147에 설명되어 있다.

본원에 기술된 연구는 호흡기 합포체 바이러스(RSV) 백신에 보조제로서 IL-12의 사용에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 RSV 항원, IL-12 및 현탁 미네럴의 혼합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 특정 양태에서, IL-12는 알룸(예를 들면, 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄) 같은 미네럴 현탁에 흡착된다. 이들 백신 조성물은 항원에 대한 보호 면역반응을 조절한다; 즉, 백신 조성물은 병원성 항원에 대한 보호반응을 위해 백신접종 숙주의 세포 매개성 면역을 도출할 수 있다. 특정 양태에서, 항원은 RSV F 단백질 및/또는 G 단백질이다.

IL-12는 몇몇 적당한 공급원으로부터 수득될 수 있다. IL-12는 재조합 DNA법에 의해 생성될 수 있다; 예를 들면, 인간 IL-12를 암호화하는 유전자를 클로닝하여 숙주 시스템에서 발현시키면, 다량의 순수한 인

간 IL-12가 생성된다. 또한, IL-12의 생물학적 활성 서브유닛 또는 단편도 본 발명에 유용하다. 아울러, 특정의 T 림프구 계통도 고수준의 IL-12를 생성하여, 용이하게 이용할 수 있는 공급원을 제공한다. 재조합 인간 및 쥐 IL-12의 시판원은 Genetics Institute, Inc.(미국 매사추세츠 케임브리지 소재)를 포함한다. 본 발명의 항원, 예를 들면 RSV 항원은 포유동물 숙주와 같은 척추동물에서 항원에 대한 면역반응 도출에 사용될 수 있다. 예를 들면, 항원은 RSV F 단백질(Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7683-7687 (1984)) 또는 G 단백질(Satake et al., Nuc. Acids Res., 13:7795-7812 (1985)) 항원 또는 면역반응 자극능을 보유하는 이의 일부일 수 있다. 이러한 면역원성 부분의 예는 RSV F 단백질의 아미노산 위치 283-315, 289-315 및 294-299를 포함하는 폴리펩타이드이다. 이러한 영역은 중화 및 항-융합 항체 모두를 도출하는 RSV F 단백질의 에피토프를 포함한다(Paradiso et al., U.S. 특허 5,639,853). 이와 달리, 이의 천연 이량체 형태(140 kD)의 RSV F 단백질도 사용될 수 있다(Paradiso et al., U.S. 특허 5,223,254).

본 발명의 방법은 척추동물에 항원, 예를 들면, F 및/또는 G 단백질 같은 RSV 항원, 보조량의 IL-12 및 현탁 미네럴의 혼합물을 포함하는 면역학적 유효량의 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 특히, IL-12는 미네럴 현탁에 흡착된다. 본원에서 사용되는 IL-12의 "보조량"이란 백신 항원, 예를 들면 F 및/또는 G 단백질 같은 RSV 항원에 대한 면역반응을 증강시키거나 변형시키기에 충분한 IL-12의 양을 의미한다. 본원에서 사용되는 백신 조성물의 "면역학적 유효" 용량은 면역반응 도출에 적당한 용량이다. 특정 용량은 치료하고자 하는 척추동물의 연령, 체중 및 의학적 증상과, 투여방법에 좌우된다. 적정 용량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 것이다. 백신 조성물은 생리 식염수 또는 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 같은 에탄올 폴리올 같이 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 비히클로 임의로 투여될 수 있다.

백신 조성물은 식물성 오일 또는 이의 에멀션, 계면활성제, 예를 들면 헥사데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 옥타데실아민, 라이소레시틴, 디메틸-디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N′ -N 비스(2-하이드록시에틸-프로판 디아민), 메톡시헥사데실글리세롤, 및 플루로닉 폴리올; 폴리아민, 예를 들면, 피란, 덱스트란설페이트, 폴리 IC, 카보폴; 펩타이드, 예를 들면, 뮤라밀 디펩타이드, 디메틸글라이신, 터프트신; 면역 자극 복합체; 오일 에멀션; 리포폴리사카라이드, 예를 들면 MPL®(3-O-탈아실화 모노포스포릴 리피드 A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana); 및 미네럴 겔 같은 부가적인 보조제를 임의로 포함할 수 있다. 본 발명의 항원은 또한 리포솜, 와우상(cochleates), 생분해성 중합체, 예를 들면 폴리-락타이드, 폴리-글리콜라이드 및 폴리-락타이드-코-글리콜라이드, 또는 ISCOMS(면역자극 복합체) 중으로 혼입될 수 있고, 보충성 활성성분이 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 항원은 또한 세균 독소 및 이의 약독화 유도체와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 항원은 또한, IL-2, IL-3, IL-15, IFN-γ 및 GM-CSF(이에 국한되지 않음)를 포함하여 기타 림포카인과 함께 투여될 수 있다.

백신은 비경구, 동맥내, 피내, 경피(서방형 중합체의 사용 등에 의해), 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 경구 및 비내 투여경로(이에 국한되지 않음)를 포함하여 다양한 경로에 의해 인간이나 동물에 투여될 수 있다. 이러한 백신에 사용되는 항원의 양은 항원의 동질성에 따라 변동될 것이다. 본 백신에 적용하기 위한 통상의 캐리어 항원과 함께 사용되는 설정 용량 범위의 조정과 조작은 당업자의 역량 안에 있다. 본 발명의 백신은 미숙 및 성체 온혈동물 모두와, 특히 인간의 치료에 사용하기 위한 것이다. 전형적으로, IL-12와 항원은 동시에 투여될 것이다; 그러나, 일부 경우에, 당업자는 IL-12가 제때에, 그러나 항원으로 백신접종하기 전이나 후에 제때에 가깝게 투여될 수 있음을 인지할 것이다.

본 발명의 RSV 항원은 면역반응을 조절하거나 증강시키기 위하여 다른 분자에 커플링시킬 수 있다. 적당한 캐리어 단백질은 포유동물 투여에 안전하고 캐리어로서 면역학적으로 유효한 세균 독소를 포함한다. 이러한 예로는 백일해, 디프테리아, 및 파상풍 변독소 및 무독성 변이 단백질(교차반응 물질(CRM)), 예를 들면, 디프테리아 변독소 CRM_{197}의 무독성 변이체가 포함된다. 적어도 하나의 T-세포 에피토프를 함유하는 천연 독소 또는 변독소의 단편도 항원에 대한 캐리어로서 유용하다. 항원 및 캐리어 분자의 접합체 제조방법은 당업계에 익히 공지되어 있으며, 예를 들면 Dick and Burret, Contrib Microbial Immunol. 10:48-114 (Cruse JM, Lewis RE Jr, eds; Based, Krager (1989) 및 U.S. 특허 5,360,897(Anderson et al.)에서 찾아볼 수 있다.

IL-12의 보조작용은 다수의 중요한 함축성을 지닌다. IL-12의 보조성은 백신접종 유기체에서 항원에 대해 생성된 보호 항체의 농도를 증가시킬 수 있다. 결과적으로, 유효(즉, 보호) 백신접종은 통상적으로 요구되는 것보다 소량의 항원으로 성취될 수 있다. 항원 필요량의 이러한 감소는 제조하기가 곤란하고 비용이 많이 드는 백신의 좀더 광범위한 사용을 선도할 수 있다. 또한, 보조제로서 IL-12의 사용은 면역반응을 도출하기에 항원성이 약하거나 면역원성이 불충분한 항원의 능력을 증강시킬 수 있다. 이는 또한 항원이 유효 면역에 통상적으로 요구되는 농도에서 유독할 때 좀더 안전한 백신접종을 제공할 수도 있다. 항원의 양을 감소시킴으로써, 유독 반응의 위험이 감소된다. 아울러, 보조작용은 단기간에 다수의 백신으로 면역되는 객체의 항원 로드를 감소시킬 수 있다.

전형적으로, 백신접종 양생법은 "보호" 면역반응을 자극하기 위하여 수주일 또는 수개월에 걸친 항원 투여를 필요로 한다. 보호 면역반응은 백신이 지향하는 특정 병원체에 의해 생기는 질병으로부터 면역 유기체를 보호하기에 충분한 면역반응이다. IL-12는 F 단백질 및 G 단백질(이에 한정되지 않음)을 포함한 RSV 항원과 같은 항원과 투여되고, 현탁 미네럴 알룸과 혼합되거나 이에 흡착될 때, 보호 면역반응의 생성을 가속시킬 수 있다. 이는 유효 백신접종 양생법의 타임코스를 감소시킬 수 있다. 일부 경우에는 단일 용량으로 보호 반응의 생성을 유도할 수도 있다.

본원에서 기술된 작업의 목표는 RSV에 대한 백신을 위한 면역반응 변형제로서 재조합 IL-12의 사용 가능성을 측정하는 것이다. 이에 따라, BALB/c 마우스 그룹을 RSV의 A2 스트레인의 천연 융합 (F) 단백질 및 상승량의 IL-12로 면역시킨다. F 단백질 및 IL-12를 수산화 알루미늄(AlOH, Alu-gel-S™, Serva Fine Biochemicals, Westbury, NY) 보조제에 흡착시킨다. 이어서, 백신의 전신 세포-매개성 및 체액성 면역반응 유도능을 비교한다. 여기에 제시된 결과는 IL-12가 전신 체액성 및 세포-매개성 면역반응 모두의 강

력한 변형자임을 입증한다. 보체-보조 및 안티-F 단백질 IgG2a 항체 역가의 현저한 증가가 1차 및 2차 백신접종 후 관찰된다. 또한, 0.01 및 0.1 ㎍ IL-12는 F/AlOH의 세포-매개성 면역반응 도출능에 심오한 효과가 있었다. RSV의 A2 스트레인으로 챌린지 5일 후에, 혈청 음성 및 혈청 양성 마우스의 폐는 증대된 항원-의존형 킬러 세포 활성을 함유하였다.

AlOH 보조 백신에 의해 생성된 면역반응에 대한 IL-12의 작용모드를 설명하기 위하여, 천연 F 단백질과 배양한 벌크 비장세포로부터의 상등액을 헬퍼 T 세포 서브세트와 연관된 사이토킨에 대해 분석한다. 여기에 제시된 결과는 IL-12가 백신 성분의 1형 헬퍼 T 세포(Th1)에 의해 지배된 면역반응 도출능을 증가시킴을 시사한다. 백신내 IL-12의 존재는 배양 상등액내 IFN-γ의 증가량과 연관된 것으로 보인다. 아울러, 결과는 제형내 IL-12의 증가량이 백신의 2형 헬퍼 T 세포(Th2) 생성능을 감소시킴을 암시한다. 즉, 백신내 IL-12의 양이 증가함에 따라, 배양 상등액은 적은 양의 IL-5를 함유한다. 그러나, 1.0 ㎍ 이상의 IL-12 용량에서, Th1 및 Th2 사이토킨 모두 감소하는 것으로 보인다.

여기에 기재된 작업은 또한, RSV 천연 부착 (G) 단백질 및 포르말린-불활성화 RSV (FI-RSV)의 면역원성에 대한 IL-12의 면역조절 효과를 조사하였다. 두 백신 모두 설치류에서 Th2 헬퍼 T 세포의 유도와 연관된 면역반응을 생성하는 것으로 나타났다. FI-RSV 백신은 Pfizer에 의해 조제된 오리지널 로트-100 백신의 복사물(facsimile)이었다(Fulginiti et al., Am. J. Epidemiol. 89:435-448 (1969) and Chin, et al., Am. J. Epidemiol. 89:449-463 (1969)). 두 백신 모두 AlOH에 흡착시키고 단독으로 또는 10배 상승 용량의 IL-12 존재하에 조제화한다.

몇몇 기준을 평가하여 IL-12의 면역조절 특성을 측정한다. 챌린지 후 수용자자가 부정형 폐 염증 반응을 바이어스하기 위한 G/AlOH 및 FI-RSV의 능력을 변형시키는 IL-12의 능력이 특히 현저하였다. FI-RSV 단독으로 또는 G/AlOH 단독으로 2회 면역시키고, RSV의 A2 스트레인으로 챌린지시킨 마우스는 부정형 폐 염증반응이 발생하였다; 이러한 염증반응은 챌린지 5일 후, 기관지폐포 세척(BAL)액내 호산구의 통계학적으로 유의한 증가된 % 및 IL-5의 양에 의해 특징지워진다. 이와 대조적으로, RSV의 A2 스트레인으로 실험적으로 감염시킨 대조군 마우스에서는 폐 호산구증다증이 관찰되지 않았다.

FI-RSV에 10배 상승 용량의 IL-12 첨가는 챌린지 후 BAL액에서 검출된 호산구의 상대 % 및 IL-5의 양 모두를 현저히 감소시켰다. IL-5 및 호산구의 감소와 동시에 IgG2a 항체로 혈청 안티-F 및 안티-G 단백질-특이성 IgG1의 현저한 변형이 있었다. 즉, IL-12를 함유하는 FI-RSV로 백신접종하면 IgG1의 현저한 감소 및 IgG2a 단백질-특이성 항체 역가의 증가가 일어났다. 따라서, 데이터는 IL-12가 F 및 G 단백질-특이성 Th2 헬퍼 T 세포의 유도 및 이들의 동시적인 IL-5 분비를 제한하고, 대신 IFN-γ-분비 Th1 헬퍼 T 세포를 생성함을 암시한다. 따라서, 결과는 FI-RSV내, 및 궁극적으로 면역반응 부위에서 IL-12의 존재가 독특한 Th1 헬퍼 세포 서브세트의 유도를 지시함을 시사한다. 데이터는 또한, IL-12 주입에 의해 촉진된 Th1 헬퍼 T 세포가 FI-RSV의 Th2 헬퍼 T 세포 도출능을 방해한다는 아이디어를 지지한다.

비록 G/AlOH에 10배 상승 용량의 IL-12의 첨가로 폐 IL-5 농도의 현저한 감소 및 안티-G 및 안티-F 단백질 IgG 서브클래스 항체 비의 변화가 일어나지만, IL-12는 챌린지 후 마우스가 폐 호산구증다증으로 기울게 하는 G/AlOH의 능력을 변경시킬 수 없는 것으로 보인다. 따라서, 데이터는 전신 체액성 면역반응의 조절과 호산구의 이동화 및 복제를 위해 독특한 경로가 존재함을 시사한다. 이와 달리, IL-5 이외의 사이토킨은 폐 호산구증다증 생성에 소정 역할을 할 수 있다. G/AlOH에 IL-12의 첨가는 BAL액내 IL-5의 현저한 감소를 일으키지만, 챌린지 후 폐 조직내 호산구의 상대적인 %에는 별다른 영향이 없다. 그러나, IL-5는 사용되는 분석법에서 검출불가 수준으로 폐에 존재할 수 있다. 호산구쪽으로 기우는 것을 제한하는 IL-12의 무능력이 FI-RSV와 비교하여 G/AlOH내 비교적 다량의 G 단백질에서 연유하거나, 천연 G 단백질이 호산구증다증 바이어스능을 지닌 몇몇 에피토프를 지닐 수 있음이 또한 가능하다. 이들 에피토프 중 일부는 포르말린 처리로 파괴시킬 수 있다. 따라서, 호산구증다증 바이어스능에 대한 FI-RSV와 G/AlOH 간의 불일치는 정량적 현상일 수 있다. 한편, G/AlOH에 의해 일어나기 쉬운 부정형 폐 염증반응을 변형하는 IL-12의 무능력은 다량으로 글리코실화된 단백질의 독특성에 관련될 수 있다.

전술한 바와 같이, 여기에서 제시된 결과는 IL-12가 RSV의 정제된 천연 G 및 F 단백질 둘 모두에 대해 생성된 전신 체액성 면역반응의 강력한 조절자임을 증명한다. 그럼에도 불구하고, IL-12의 존재는 모든 RSV 백신과 함께 IgG2a 서브클래스에 기인한 보체 고정 중화항체 역가를 증강시키는 것 같지는 않다. 증대된 혈청 보체-고정 중화항체 역가는 G/AlOH 또는 FI-RSV로 2차 면역 2주 후에 관찰되지 않았다. FI-RSV 백신의 경우, 중화항체 역가에 긍정적인 영향을 주기 위한 IL-12의 실패는 IgG2a 보체 고정 항체의 생성을 담당하는 F 및 G 단백질 에피토프의 포르말린 처리에 의한 파괴를 반영할 수도 있다. IL-12의 양이 백신에서 증가함에 따라, 중화항체 및 IgG1 항체는 감소한다. 이와 반대로, IL-12는 IgG2a를 재현가능하게 증대시키고 보체는 F/AlOH에 반응하여 중화 역가를 증강시킨다(표 1 및 2 참조).

천연 G 및 F 단백질로 백신접종 후 IgG2a 보체-고정 중화항체의 생성에 영향을 주는 IL-12의 무능력에 대한 설명은 더욱 복잡해지는 것으로 보인다. 이론에 구애됨이 없이, 하나의 설명은 IL-12 투여 뒤에 상승되는 단백질-특이성 IgG2a 항체의 대부분이 비-중화 에피토프에 지향된다는 것이다. 다른 가능성은 G/AlOH내 오염성 F 단백질이 G 단백질-특이성 IgG2a 중화항체의 생성에 미치는 IL-12의 효과를 모호하게 하는 보체-고정 중화항체를 도출한다는 것이다.

데이터는 IL-12의 최적용량이 0.01 내지 1.0 ㎍이고; IL-12의 더 높은 용량(10 ㎍)은 역효과를 냄을 시사한다. 이러한 결론은 백신의 보호 체액성 및 세포-매개성 면역반응 생성능에 기초한 것이다. 취합해 보면, 결과는 전신 체액성 및 세포-매개성 면역반응 조절을 위해 백신 제형에 재조합 IL-12의 사용을 지지한다. 더욱이, 수용자의 일반 건강에 대한 다루기 힘든 효과가 IL-12 투여 후에 관찰되었다.

요약하면, 본원에 제시된 결과는 IL-12가 현탁 미네럴을 함유하는 RSV 백신용 면역반응 변형제로서 유용함을 보여준다. 더욱이, 면역반응의 변형이 인간에 사용하기 적당한 IL-12 용량에서 발생한다. 따라서, 알룸 겔 + IL-12로 보조한 단독 또는 다른 바이러스 항원과의 배합물 형태의 RSV F 및 G 단백질은 RSV 백신 제조에 특히 적당함이 명백하다.

하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 제공되며 본 발명의 범위를 제한하지는 않는다. 본원에서 인용된 모든 참조문헌의 교시는 본원에서 참조로 인용된다.

실시예

실시예 1: 수산화 알루미늄 보조제에 흡착된 RSV F 단백질의 면역원성에 미치는 IL-12의 효과

연구 설계

연구목적은 수산화 알루미늄 보조제로 제형된 RSV의 융합 단백질의 면역원성에 미치는 재조합 쥐 IL-12의 효과를 측정하는 것이다. 순수한(naive) 암컷 BALB/c 마우스(8 내지 10주령)를 0주 및 4주째에 정제된 천연 융합 (F) 단백질로 근육내 백신접종한다. F 단백질은 Alu-Gel-S™(2% 수산화 알루미늄, Serva Fine Chemicals, Westbury, NY)에 흡착시킨다.

각각의 마우스가 3.0 ㎍ F 단백질/용량, 100 ㎍ 수산화 알루미늄(AlOH)/용량, 및 0, 0.01, 0.1, 또는 1.0 ㎍ IL-12/용량을 투여받도록 백신을 제조한다. 대조군 마우스는 PBS 중 100 ㎍ Alu-Gel-S™만을 주사한다. 1차 백신접종 4주 후 및 2차 백신접종 2주 후에, 기하 평균 종점 항체 역가의 ELISA 측정을 위해 혈청을 수집한다. 마이크로웰을 고도로 정제된 이온 교환 정제 F 단백질로 코팅한다. 또한, 바이러스의 A2 스트레인에 대해 보체의 존재 및 부재하에 플라크 감소 중화 시험에 의해 중화항체 역가를 측정한다.

백신의 독특한 헬퍼 T 세포 서브세트 생성능에 미치는 IL-12의 효과를 측정하기 위하여, 2차 면역 2주 후에 벌크 비장세포 현탁액을 수득하고 증가하는 농도의 정제된 F 단백질, 정제된 UV-불활성화 RSV A2, CRM_{197}, 콘카나발린 A(Con A, T 림프구 마이토젠), 또는 배지만의 존재하에 6일간 배양한다. 이들 배양액으로부터의 상등액을 모으고 인터페론-γ(IFN--γ) 및 인터루킨-5(IL-5)의 존재에 대해 포획-ELISA로 시험한다.

결과

표 1에 나타낸 결과는 ELISA로 측정한 기하 평균 종점 항체 역가이다. 중화항체 역가는 기하 평균 중화 항체 역가이고 보체 공급을 위한 5% 혈청의 존재(+) 또는 부재(-)하에 플라크 감소 중화 시험으로 측정하였다. 항체 역가는 각각 1차 및 2차 백신접종 4주 및 2주 후에 측정되었다.

IL-12는 각각 1차 및 2차 백신접종 4주(상부 패널, 표 1) 및 2주(하부 패널, 표 1) 후 F/AlOH에 의해 생성된 전신 체액성 면역반응을 증대시켰다. 예를 들면, 용량 당 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12로 제형된 F/AlOH로 1차 면역 4주 후, 전체 IgG 종점 항체 역가는 상당히 상이하였고 F/AlOH만으로 백신접종한 마우스의 혈청내 종점 역가에 비해 각각 10배 및 18배 증강되었다. 이와 유사하게, 2차 백신접종 2주 후 전체 IgG 항체 역가는 각각 3배 및 8배 상승되었다(하부 패널, 표 1). 데이터는 또한, IgG 항체 역가의 증가가 백신내 IL-12의 용량에 의존하였음을 암시한다. 이는 F 단백질-특이성 IgG2a 역가 측정 후에 가장 잘 예시된다. F/AlOH 단독으로 1차 면역 4주 후 도출된 혈청 안티-F 단백질 IgG2a 항체 역가와는 상반되게, F/AlOH + 0.01, 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12로 제형된 백신은 각각 4배, 48배 및 158배로 현저히 상승되었다(상부 패널, 표 1). IgG2a 항체 역가의 상승은 또한 F/AlOH + IL-12로 2차 백신접종 2주 후에도 관찰되었다(하부 패널, 표 1).

가장 중요하게는, 데이터는 IL-12의 첨가가 F/AlOH의 보체 보조 혈청 중화항체 역가 생성능을 증가시킬 수 있음을 시사한다. F/AlOH + 1.0 ㎍ IL-12를 주사한 마우스의 혈청 보체 보조 중화항체 역가는 1차 면역 4주 후 적어도 7배 증가하였다(상부 패널, 표 1). 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12로 제형된 F/AlOH로 2차 백신접종 후, 중화항체 역가는 각각 5배 및 10배 증가되었다(하부 패널, 표 1).

결과는 IL-12를 주사한 마우스의 비장으로부터의 면역세포가 항원이 부여되었을 때 알루미늄 겔 단독으로 백신접종한 마우스의 것들보다 더 복제능이 있음을 암시한다(도 1). 예를 들면, F/AlOH + 0.01 ㎍ IL-12로 2회 면역시킨 마우스로부터의 비장 면역세포의 자극지수는 천연 F 단백질과 시험관내 배양 후 F/AlOH 단독으로 면역시킨 마우스의 것의 거의 2배였다. 결과는 또한, 0.01 ㎍ 보다 많은 IL-12 용량을 사용하면 역효과가 있음을 시사한다. F/AlOH + 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스의 자극지수는 5배 적었다.

알루미늄 보조제의 독특한 항원 의존성 헬퍼 T 세포 서브세트 생성능에 미치는 IL-12의 다양한 용량의 효과를 평가하기 위하여, 벌크 비장세포 현탁액을 제조하고 천연 F 단백질의 존재 또는 부재하에 배양한다. 데이터는 F/AlOH를 IL-12의 부재하에 제형하였을 때, 2형 유사 헬퍼 T 세포 반응이 생성되었음을 시사한다. 천연 F 단백질과 6일간 배양한 비장세포의 상등액에서는 IFN-γ가 거의 검출 불가능하였다(도 2a). 이와 달리, 동일 상등액은 배양 상등액 ml 당 6 ng IL-5를 함유하였다(도 2b).

F/AlOH에 IL-12의 첨가는 비장 면역세포의 IFN-γ 분비능을 증대시키는 것으로 보인다(도 2a). 천연 F 단백질과의 6일 배양 후, F/AlOH 단독 또는 F/AlOH + 0.01, 0.1, 또는 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 비장세포에 의해 상등액 ml당 1, 9, 16 및 16 단위 IFN-γ가 분비되었다(도 2a). 그러나, 데이터는 백신내 0.1 또는 1.0 ㎍의 IL-12 존재가 배양 상등액내 IL-5의 감소량과 연관되어 있음을 보여준다. 달리 말하면, F/AlOH + 10배 상승 용량의 IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 동일 상등액은 상등액 ml 당 각각 6, 13, 2, 및 0.4 ng IL-5를 분비하였다(도 2b).

표 1

F/AlOH로 면역시킨 BALB/c 마우스의 전신 체액성 면역반응을 변형시키는 재조합 쥐 IL-12의 능력

		항체 역가				
		F 단백질 (X1000)*			중화†	
백신	IL-12	IgG	IgG1	IgG2a	(+)	(-)
F/AlOH	1.0 μg	4,621.2	272.9	1,057.4	132[f]	<20
F/AlOH	0.1 μg	2,554.2	263.4	318.9	27	<20
F/AlOH	0.01 μg	586.8[a]	268.9	25.3[e]	22	<20
F/AlOH	없음	358.3[c]	120.3	6.7[d]	<20	<20
PBS/AlOH	없음	<0.05	NT	NT	<20	<20
F/AlOH	1.0 μg	12,862.2[b]	889.4	1,730.0	519[g]	55
F/AlOH	0.1 μg	4,524.9	752.7	521.3	224[h]	32
F/AlOH	0.01 μg	3,052.2	1,247.1	205.4[e]	96	22
F/AlOH	없음	1,521.5[c]	630.4	48.0[d]	49	32
PBS/AlOH	없음	<1.0	NT	NT	<20	<20

BALB/c 마우스는 수산화 알루미늄(AlOH, 100 μg/용량)에 흡착된 천연 F 단백질(3 μg/용량)로 0주 및 4주째에 근육내 백신접종한다. IL-12를 표시된 용량에서 백신에 가한다. 대조군 마우스는 PBS+AlOH를 주사한다. 상부 및 하부 패널은 각각 1차 및 2차 백신접종 4주 및 2주 후 항체 역가를 묘사한다.

* 수치는 ELISA로 측정한 기하 평균 종점 항체 역가이다.

† 수치는 기하 평균 중화항체 역가이고 5% 보체의 존재(+) 또는 부재(-)하에 플라크 감소 중화 시험에 의해 측정된다. 그룹 당 5 마리.

[a] P<0.05 vs. F/AlOH + 0.1 또는 1.0 μg IL-12로 백신접종 후 도출된 IgG 역가

[b] P<0.05 vs. F/AlOH + 0.0, 0.01 또는 0.1 μg IL-12로 백신접종 후 도출된 IgG 역가

[c] P<0.05 vs. F/AlOH + 0.1 μg IL-12로 백신접종 후 도출된 IgG 역가

[d] P<0.05 vs. F/AlOH + 0.01, 0.1 또는 1.0 μg IL-12로 백신접종 후 도출된 IgG 역가

[e] P<0.05 vs. F/AlOH + 1.0 μg IL-12로 백신접종 후 도출된 IgG 역가

[f] P<0.05 vs. F/AlOH + 0.0, 0.01 또는 0.1 μg IL-12로 백신접종 후 도출된 보체 의존형 중화항체 역가

[g] P<0.05 vs. F/AlOH + 0.0 또는 0.01 μg IL-12로 백신접종 후 도출된 보체 의존형 중화항체 역가

[h] P<0.05 vs. IL-12 없이 F/AlOH로 백신접종 후 도출된 보체 의존형 중화항체 역가

실시예 2: F/AlOH의 전신 체액성 면역반응 유도능에 미치는 IL-12의 말초 부위 투여 효과

연구 설계

연구목적은 F/AlOH의 것에 대한 말초 부위에 주사할 때 전신 체액성 면역 반응에 미치는 재조합 쥐 IL-12의 생물학적 효과를 측정하는 것이다. 이에 따라, 이에 따라, 순수한 암컷 BALB/c 마우스(8 내지 10주령)를 RSV의 A2 스트레인으로부터 이온 교환 정제한 천연 융합 (F) 단백질로 근육내(IM) 경로로 프라이밍시킨다. F 단백질(3 μg/용량)을 수산화 알루미늄 보조제(AlOH, 100 μg/용량, Alu-gel-S™)에 흡착시킨다. F/AlOH를 재조합 쥐 IL-12의 10배 상승 용량(1, 10, 100 ng IL-12/용량)과 병행 투여한다. 간단히 말해서, F/AlOH + IL-12를 사용한 면역 프로토콜이 사용된다. 제 1 시나리오에서, 마우스 그룹을 하나의 넓적다리에는 F/AlOH로 근육내 주사하고 반대쪽 넓적다리에는 10배 상승 용량의 IL-12를 투여한다. 두 번째 경우에, 마우스 그룹에 3가지 10배 상승 용량의 IL-12 중 하나로 제형된 F/AlOH로 구성된 백신으로 1회 주사한다. 백신을 AlOH에 IL-12의 흡착을 위한 최대시간을 허용하도록 4℃에서 밤새 배양한다. 추가의 대조군 마우스에 F/AlOH 단독, PBS 중의 F 단백질 단독, 또는 PBS + AlOH 단독으로 백신접종한다. 1차 백신접종 4주 후, ELISA에 의해 기하 평균 종점 안티-F 단백질 전체 및 서브클래스 IgG 항체 역가의 측정을 위해 혈청을 수집한다.

결과

표 2에 묘사된 결과는 F/AlOH로 백신접종 후 유도된 전신 체액성 면역반응을 증대시키는 IL-12의 능력을 확인시켜 주었다. F/AlOH 단독에 비해, F/AlOH + 10 또는 100 ng IL-12에 의해 도출된 안티-F 단백질 전체 IgG 항체 역가는 1차 면역 4주 후 현저히 더 컸다. 더욱 중요하게는, 백신내 10 또는 100 ng IL-12의 존재가 통계학적으로 증강된 단백질 특이성 IgG2a 항체 역가와 연관되었다(표 2). 그러나, 데이터는 또한, 단일 용량 프로토콜에서 IL-12가 주사 국소 부위에 존재하여야 함을 시사한다. 마우스를 F/AlOH 단독으로 프라이밍시키고 IL-12를 말초 부위에 주사하였을 때, 통계학적으로 더 낮은 안티-F 단백질 항체 역가가 수득되었다(표 2). F/AlOH + 100 ng IL-12를 주사한 마우스의 단백질 특이성 IgG2a 항체 역가는 F/AlOH 단독 + 반대쪽 넓적다리에 투여된 100 ng IL-12로 면역시킨 코호트(cohort) 마우스의 것들보다 10배 더 컸다.

표 2

1차 백신접종 4주 후 F/AlOH의 전신 체액성 면역반응 유도능에 미치는 IL-12의 말초 투여 효과†

백신	ng IL-12	#Inj.	# 부위	항체 역가 (Log 10) IgG	IgG1	IgG2a
F/AlOH	100	2	2	5.6±0.2[b]	5.3±0.2[b]	4.7±0.3[b]
F/AlOH	100	1	1	6.9±0.2[a]	6.0±0.1[a]	6.2±0.2[a]
F/AlOH	10	2	2	5.8±0.2[b]	5.5±0.2[b]	5.0±0.3[b]
F/AlOH	10	1	1	6.6±0.3[a]	5.9±0.2[b]	6.0±0.3[a]
F/AlOH	1	2	2	6.0±0.2[b]	5.5±0.2[b]	5.2±0.4[b]
F/AlOH	1	1	1	6.1±0.2[a]	5.6±0.2[b]	5.4±0.3[a]
F/AlOH	없음	1	1	6.1±0.2	5.5±0.2	5.2±0.3
F/PBS	없음	1	1	3.5±0.5	3.3±0.4	<3.0
PBS	없음	1	1	<3.0	NT	NT

† 순수한 암컷 BALB/c 마우스를 수산화 알루미늄 보조제(AlOH)에 흡착된 천연 융합 (F) 단백질(3 ㎍/용량)로 근육내(IM) 경로로 프라이밍시킨다. F/AlOH를 10배 상승 용량의 재조합 쥐 IL-12(100, 10, 1 ng IL-12/용량)과 병행 투여한다. F/AlOH + IL-12에 의한 두 면역전략을 이용한다: 2 inj., 2 부위는 하나의 넓적다리에는 F/AlOH를 IM 주사하고 반대쪽 넓적다리에는 10배 상승 용량의 IL-12를 투여한 마우스를 나타내며; 1 inj., 1 부위는 마우스를 F/AlOH + 세 가지 10배 상승 용량의 IL-12 중 하나로 구성된 백신으로 1회 주사하였음을 나타낸다. 추가의 대조군 마우스를 F/AlOH 단독, PBS 중 F 단백질 단독, 또는 PBS + AlOH 단독으로 백신접종한다. 수치는 그룹 당 5 마리 마우스의 기하학적 종점 역가이다.

[a] $P<0.05$ vs. 말초 부위에서 IL-12로 주사한 마우스로부터의 혈청 안티-F 단백질 항체 역가, 및 F/AlOH 단독으로 면역시킨 마우스의 역가

[b] $P>0.05$ vs. F/AlOH 단독으로 면역시킨 마우스로부터의 혈청 안티-F 단백질 항체 역가

실시예 3: 혈청 음성 수용자에서 세포-매개성 면역반응을 유도하는 F/AlOH의 능력에 미치는 IL-12의 효과

연구 설계

본 실험의 목적은 F/AlOH에 IL-12의 첨가가 세포-매개성 면역반응을 증대시킬 수 있는지를 확인하는 것이다. 순수한 암컷 BALB/c 마우스(8 내지 10주령)를 3 가지 F 단백질 기본 백신 중 하나 + 재조합 쥐 IL-12로 근육내 경로로 프라이밍시킨다. 이온 교환 정제 후 RSV의 A2 스트레인으로부터 천연 F 단백질을 수득한다. 백신은 수산화 알루미늄(AlOH, 100 ㎍/용량)에 흡착된 F 단백질(3 ㎍/용량) + 3 가지 10배 상승 용량의 IL-12(0.01, 0.1 및 1.0 ㎍ IL-12/용량) 중 하나로 구성된다. 수산화 알루미늄은 Wyeth-Lederle Vaccines and Pediatrics, Pearl River, NY에서 제조된다. 대조군 마우스는 F/AlOH 단독으로 백신접종하거나, 모방 감염된 Hep2 세포 용해물을 비내 투여한다. 1차 백신접종 4주 후, 마우스를 RSV A2(약 10^6 PFU)로 비내 경로로 챌린지하고 5일 후에 기관지폐포 세척(BAL)을 수행한다. 동계 RSV-감염 세포 및 대조군 표적세포와 배양 후 표준 4-시간 ^{51}Cr 방출 분석에서 염증 세포의 세포분해능을 직접 측정한다.

결과

도 3에 묘사된 데이터는 IL-12가 F/AlOH의 세포-매개성 면역반응 생성능을 증강시킴을 입증한다. F/AlOH + 0.01 ㎍ IL-12(검은색 삼각형)로 프라이밍한 마우스로부터의 BAL 세포의 세포분해 활성은 챌린지 5일 후 동계 RSV-감염(실선) 표적세포에 대해 39%였다. F/AlOH 단독으로(검은색 원) 프라이밍시킨 마우스로부터의 BAL 세포가 동일한 동계 RSV-감염 표적세포와 배양되었을 때, 세포독성은 검출되지 않았다. 결과는 또한 킬러 세포 활성이 항원 의존성임을 암시하였다. F/AlOH + 0.01 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 BAL 세포는 바이러스로 감염되지 않은 동계 대조군 표적세포(대시선)를 분해하지 않았다.

데이터는 또한, 0.01 ㎍ 이상의 IL-12 용량이 세포-매개성 면역반응 증대에 역효과가 있음을 시사한다(도 3). F/AlOH + 0.1(뒤집힌 검은 삼각형) 또는 1.0(우측 검은색 삼각형) ㎍ IL-12에 의한 1차 면역은 챌린지 5일 후 F/AlOH + 0.01 ㎍ IL-12로 프라이밍시킨 마우스의 것과 비교하여 각각 3배 및 8배 덜 세포분해성인 BAL 세포를 유도하였다.

실시예 4: F/AlOH의 혈청 양성 수용자에서 세포-매개성 면역반응 유도능에 미치는 IL-12의 효과

연구 설계

연구목적은 사전에 RSV로 감염된 수용자에서 F/AlOH의 세포-매개성 면역반응 확대능에 미치는 IL-12의 효과를 측정하는 것이다. 순수한 암컷 BALB/c 마우스(8 내지 10주령)를 RSV의 A2 스트레인으로 실험적인 감염에 의해 프라이밍시킨다. 4주 후에, 마우스에 3 가지 F 단백질 기본 백신 중 하나 + 재조합 쥐 IL-12로 근육내 주사한다. 백신은 수산화 알루미늄(AlOH, 100 ㎍/용량)에 흡착된 F 단백질(3 ㎍/용량) + 3 가지 10배 상승 용량의 IL-12(0.01, 0.1 및 1.0 ㎍ IL-12/용량) 중 하나로 구성된다. 수산화 알루미늄은 Weyth-Lederle Vaccines and Pedatrics에서 제조된다. 대조군 마우스를 RSV로 감염시켜 프라이밍시키고 F/AlOH 단독으로 2차 백신접종하거나, 모방 감염된 Hep2 세포 용해물을 비내 투여한다. 2차 백신접종 2

주 후 마우스를 RSV A2(약 10^6 PFU)로 비내 경로로 챌린지하고 5일 후에 기관지폐포 세척(BAL)을 수행한다. 동계 RSV-감염 및 대조군 표적세포와 배양 후 표준 4-시간 ^{51}Cr 방출분석에서 염증 세포의 세포분해 능을 직접 측정한다.

결과

도 4에 묘사된 데이터는 IL-12의 3 가지 용량 모두가 F/AlOH의 RSV로 사전에 감염된 마우스의 세포 매개성 면역반응 확대능을 증폭시킴을 입증한다. F/AlOH + 0.1 ㎍ IL-12(뒤집힌 검은 삼각형)로 2차 백신접종한 마우스로부터의 BAL 세포의 세포분해 활성은 챌린지 5일 후 동계 RSV-감염된(실선) 표적세포에 대해 58%였다(작동세포:표적세포 비 = 54:1). 감염에 의해 프라이밍되고 F/AlOH 단독으로 2차 백신접종한 마우스로부터의 BAL 세포(검은색 원)를 동일한 동계 RSV-감염 표적세포와 배양하였을 때, 세포분해 활성은 35%였다. 킬러 세포 활성을 18:1 작동세포:표적세포비에서 검사하였을 때, 세포분해 활성은 각각 52% 및 27%였다. 결과는 또한 킬러 세포 활성이 항원 의존성이었음을 암시한다. RSV로 프라이밍시키고 F/AlOH + IL-12로 2차 백신접종한 마우스로부터의 BAL 세포는 바이러스로 감염되지 않은 대조군 표적세포(대시선)를 분해하지 않았다.

데이터는 또한, F/AlOH의 세포-매개성 면역반응 확대능이 백신내 IL-12의 용량에 의존함을 시사한다(도 4). 혈청 양성 동물에서, 최대 수준의 항원-의존성 킬러 세포 활성은 챌린지 5일 후 F/AlOH + 0.1 ㎍ IL-12로 2차 면역시킨 마우스의 폐에서 나타나는 것으로 보인다(뒤집힌 검은색 삼각형, 도 4).

실시예 5: 부정형 폐 염증반응 경향에 미치는 IL-12의 효과

연구 설계

본 연구의 목적은 챌린지 후 BALB/c 마우스가 부정형 폐 염증반응으로 기울도록 하는 고순도 천연 G 단백질 또는 화이자 로트 100 포르말린 불활성화 백신의 복사물의 능력에 미치는 IL-12의 효과를 측정하는 것이다. 두 백신 모두 수산화 알루미늄 보조제에 흡착시킨다.

순수한 암컷 BALB/c 마우스(8 내지 10주령)를 수산화 알루미늄(AlOH, Alu-gel-S™, Serva, 100 ㎍/용량) 보조제에 흡착시킨 1 ㎍ 정제된 천연 부착 당단백질 (G) 또는 0.1 ml 포르말린-불활성화 RSV(FI-RSV)로 0주 및 4주째에 근육내(IM) 경로로 백신접종한다. FI-RSV 백신은 화이자에 의해 조제된 오리지널 로트-100 백신의 복사물이고 AlOH(1600 ㎍ 용량)에 흡착된다. 이 백신은 서브유닛 백신에 대한 원치않는 면역반응인 부정형 폐 염증반응에 대한 기준으로 사용된다.

IL-12를 G/AlOH 및 FI-RSV에 10배 상승 용량으로(0.1 내지 10.0 ㎍ IL-12/용량) 가한다. 마우스의 추가의 동반그룹을 RSV의 A2 스트레인으로 감염시키고(0.05 ml, 비내), AlOH(1600 ㎍/용량)에 흡착된 0.1 ml 포르말린-불활성 파라인플루엔자 바이러스 3형(FI-PIV3) 백신을 근육내 주사하거나, 모방-감염된 Hep2 세포 용해물(MOCK) 50 ㎕를 비내 투여한다. 2차 백신접종 2주 후, 친화성-정제 G 단백질 또는 이온 교환 정제 F 단백질로 코팅된 마이크로웰에서 ELISA에 의해 기하 평균 종점 항체 역가의 측정을 위해 혈청을 수집한다. 기하 평균 중화항체 역가는 또한, 바이러스의 A2 스트레인에 대해 보체의 존재 및 부재하에 플라크 감소 중화 시험에 의해 측정된다.

국소 폐 염증반응에 미치는 IL-12의 효과를 특징규명하기 위하여, 감염성 바이러스(RSV A2, 약 10^6 PFU)로 챌린지 5일 후 기관지폐포 세척(BRL)을 수행한다. DIF-QIK®(백혈구 염색 시약; Baxter International, Inc., Deerfield, Illinois)로 cytoprep를 염색하고 적어도 400 세포를 계수한 후 염증세포 형태를 측정한다. BAL액을 또한 IFN-γ 및 IL-5의 존재에 대하여 포획-ELISA로 검사한다. IL-5 및 IFN-γ 분비에서 그룹 간의 통계학적 차이는 ANOVA(JMP Software에 의한 변량 분석; SAS Institute, Cary, North Carolina)에 의해 OD_{490}을 비교한 후 측정된다.

결과

데이터는 로트-100 FI-RSV 백신 복사물의 비경구 면역이 BALB/c 마우스로 하여금 2형(Th2) 표현형이 우세한 F 및 G 단백질-의존성 헬퍼 T 세포 반응을 생성하는 쪽으로 기울게 함을 시사한다. 2차 면역 2주 후 혈청 안티-G(표 3) 및 혈청 안티-F(표 4) 단백질 IgG1 : IgG2a 항체비는 이러한 결론을 지지하였다. FI-RSV로 2차 백신접종 후 관찰된 혈청 안티-F 단백질 IgG1 : IgG2a 항체 역가의 비는 75.3이었다(표 4). 이와 마찬가지로, 2차 백신접종 2주 후에 관찰된 혈청 안티-G 단백질 IgG1 : IgG2a 항체 역가의 비는 184.2 이상이었다(표 3).

또한, FI-RSV에 의한 면역은 챌린지 5일 후 BAL액에서 IL-5 생성의 상승 및 부정형 폐 염증 면역반응의 유도와 연관되었다(표 6).

표 6에서, "% EOS" 칼럼내 결과는 바이러스로 챌린지 5일 후 BAL액에서 계수된 호산구(EOS)의 기하 평균 상대 %이다. "ND"는 측정되지 않았음을 의미한다. IL-5는 포획 ELISA에 의해 검출되고 표준곡선으로부터 정량된다. "IL-5 (OD)"에서의 결과는 기하 평균 광학밀도(OD_{490})이다.

챌린지 5일 후 FI-RSV로 백신접종한 마우스의 폐에서 관찰된 호산구(38.5%)의 기하 평균 상대 %는 FI-PIV3(6.5%)로 백신접종하고 1차 감염을 겪는 대조군 마우스, 또는 실험 감염(<1.0%)에 의해 면역된 마우스의 것에 비해 상당히 상승되었다(표 6). 또한, FI-RSV(106 pg/ml)로 백신접종한 마우스의 세척액 중으로 분비된 IL-5의 양은 감염 5일 후 FI-PIV3(<8 pg/ml) 또는 감염성 바이러스(<35 pg/ml)의 수용자로부터의 유체와는 상반되게 현저히 상승되었다(표 6).

결과는 본 연구에 사용된 G 단백질이 BALB/c 마우스에 대해 면역원성인 농도의 F 단백질을 함유함을 표시한다. 주목할 만한 것은 G/AlOH로 2차 백신접종 2주 후 관찰된 혈청 안티-F 단백질 총 IgG 항체 역가

였다(표 4).

데이터는 G 및 G/AlOH내 오염성 F 단백질 둘 모두가 FI-RSV 백신처럼, 주로 Th2 헬퍼 T 세포 서브세트를 유도하였음을 암시한다. 2차 백신접종 후 혈청 안티-F 단백질 IgG1 : IgG2a 항체 비는 617 이상이었다(표 4). 이와 유사하게, G/AlOH로 2차 백신접종 후 혈청 G 단백질-특이성 IgG1 : IgG2a 항체 비는 1251 이상이었다(표 3). 또한, G/AlOH에 의한 면역은 챌린지 5일 후 부정형 폐 염증 면역반응의 유도 및 BAL 액내 IL-5의 존재와 연관되었다(표 6). 챌린지 5일 후 G/AlOH로 2회 백신접종한 마우스의 폐에서 관찰된 호산구의 기하 평균 상대 %(35.0%)는 FI-PIV3(6.5%)로 백신접종하고 1차 감염을 겪는 대조군 마우스의 것에 비해 현저히 상승되었다. 더욱이, G/AlOH(167 pg/ml)로 백신접종한 마우스의 세척액 중으로 분비된 IL-5의 양은 감염 5일 후 모방 감염된 Hep-2 세포 용해물(<35 pg/ml), 감염성 바이러스(<35 pg/ml), 또는 FI-PIV3(<8 pg/ml)의 수용자로부터의 유체와 대조적으로 현저히 상승되었다(표 6).

FI-RSV 또는 G/AlOH에 의한 백신접종과는 대조적으로, RSV의 야생형 A2 스트레인에 의한 감염은 F 단백질 의존성 1형(Th1) 헬퍼 T 세포 반응을 도출하였다. 감염성 바이러스에 함유된 F 단백질에 의해 도출된 전신 체액성 면역반응은 1.0 이하의 2차 혈청 안티-F 단백질 IgG1 : IgG2a 항체비를 특징으로 한다(표 4). 가장 중요하게는, 부정형 폐 염증반응은 선행 RSV 감염과 연관되지 않았다(표 6). 폐 호산구증다증은 1차 감염을 겪는 순수한 마우스에서는 관찰되지 않는다(표 6).

결과는 IL-12가 복사물 백신 또는 G/AlOH로 백신접종 후 생성된 체액성 면역반응에 심오한 영향을 주었음을 시사한다. 결과는 IL-12의 용량이 중요함을 암시한다. 예를 들면, 데이터는 F 단백질 오염된 G/AlOH에 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12의 첨가가 G/AlOH 단독으로 백신접종한 마우스로부터의 역가에 비해 각각 4 및 1,300배 증대된 2차 면역 2주 후 혈청 안티-F 단백질 IgG2a 항체 역가를 이끌어냈음을 시사한다(표 4).

G/AlOH에 10 ㎍ 첨가 뒤에도 IL-12의 억제효과가 관찰되었다. 데이터는 IL-12가 G/AlOH의 안티-F 단백질 IgG1 항체 역가 생성능을 제한하였음을 암시한다. G/AlOH 단독에 의해 생성된 역가에 비해, G/AlOH + 10 ㎍ IL-12로 2차 면역시키면 5배였고 상당히 더 적은 IgG1 항체 역가를 생성하였다(표 4). 데이터는 10 ㎍ IL-12가 로트-100 복사물 백신의 자신의 특징적인 안티-F 단백질 전체 IgG 항체 역가 도출능을 억제하였음을 나타낸다. 혈청 항체 역가는 FI-RSV + 0.1 ㎍ IL-12로 2회 면역시킨 마우스의 것들보다 17배 적었다(표 4).

표 3과 4에 나타낸 결과는 ELISA에 의해 측정된 기하 평균 종점 항체 역가이다. 1/2a는 기하 평균 IgG1 : IgG2a 서브클래스 항체 역가의 비이다. "NT"는 시험되지 않았음을 나타내고; "ND"는 측정되지 않았음을 나타낸다.

IL-12의 첨가는 FI-RSV 또는 G/AlOH로 2차 백신접종 후 생성된 안티-G 단백질 전체 IgG 항체 역가의 크기를 현저하게 변화시키는 것으로 보이지는 않는다(표 3). 그러나, 백신에 IL-12의 존재는 IgG1 항체 역가를 현저히 감소시킨 반면에, IgG2a 단백질 특이성 항체 역가는 현저히 상승되었다(표 3).

결과는 IL-12가 백신의 Th2 및 Th1 헬퍼 T 세포 반응 유도능을 변형시켰음을 암시한다. 혈청 G 및 F 단백질 특이성 IgG1 및 IgG2a 항체 역가의 변형(표 3과 4)은 이러한 가설을 지지한다. 예를 들면, 2차 면역 2주 후, F 단백질-특이성 항체 서브클래스 비는 G/AlOH에 0.1 ㎍ IL-12의 첨가로 617.1에서 92.1로 감소하였다(표 4). 더욱이, 용량 당 0.1에서 1.0 ㎍으로 IL-12의 10배 증가는 F 단백질-특이성 항체 서브클래스 비를 0.1로 감소시켰다. 그러나, 데이터는 1.0 ㎍ 이상의 IL-12의 용량은 역효과가 있음을 시사한다. 예를 들면, G/AlOH + 1.0 ㎍ IL-12로 2차 백신접종 후 도출된 F 단백질-특이성 IgG2a 항체 서브클래스 역가는 G/AlOH 단독에 의해 생성된 것에 비해 1,300배 더 컸다(표 4). 그러나, G/AlOH + 10 ㎍ IL-12에 의한 면역은 G/AlOH + 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종 후 생성된 것에 필적한 F 단백질-특이성 IgG2a 서브클래스 항체 역가를 생성하였다.

데이터는 IL-12가 독특한 헬퍼 T 세포 서브세트의 유도를 통해, 챌린지 후 폐 조직에서 호산구의 침윤 및/또는 복제 변형능을 지니고 있음을 암시한다. 이러한 점은 챌린지 5일 후 마우스가 폐내 IL-5 및 상대적인 % 호산구의 증가된 양쪽으로 기울도록 하는 백신의 능력에 미치는 IL-12의 효과에 의해 예시된다(표 6). FI-RSV 단독으로 백신접종한 마우스로부터의 BAL액에 비해, FI-RSV 백신에 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12의 첨가는 각각 IL-5의 양 및 호산구의 상대수를 현저히 감소시켰다(표 6). G/AlOH에 용량 당 1.0 ㎍ IL-12의 첨가는 또한 챌린지 후 BAL액내 IL-5의 감소를 초래하였다. 그러나, IL-12는 챌린지 후 BALB/c 마우스가 폐 호산구증다증으로 기울도록 하는 G/AlOH의 능력에 어떠한 변형효과도 있는 것으로 보이지는 않았다(표 6). 부정형 폐 염증반응이 바이러스의 A2 스트레인으로 감염시켜 면역시킨 마우스에서는 관찰되지 않았음이 주목할 만하다. 또한, IL-5 및 호산구증다증은 1차 감염 5일 후 대조군 마우스의 폐에서 관찰되지 않았다(표 6). IFN-γ는 조사된 모든 그룹에 대해 기저선 또는 그 근처에 있었다(데이터 나타내지 않았음).

표 5에 나타낸 결과는 기하 평균 중화항체 역가이다. 역가는 플라크 감소 중화 시험에 의해 및 보체 공급원으로서 5% 혈청의 존재(+) 또는 부재(-) 하에 각각 1차 및 2차 백신접종 4주 및 2주 후에 측정된다.

비록 IL-12가 F 및 G 단백질-특이성 IgG1 : IgG2a 항체 서브클래스의 비를 변형시켰지만, 각각 1차 및 2차 백신접종 4주 및 2주 후 보체-보조된 중화항체 역가에는 통계학적 증대가 없었다(표 5).

사실, 결과는 IL-12가 2차 백신접종 2주 후 혈청 중화항체 역가를 감소시켰음을 암시한다. FI-RSV 단독으로 백신접종한 마우스의 기하 평균 혈청 중화항체 역가는 FI-RSV + 10 ㎍ IL-12의 수용자의 것보다 적어도 4배 더 컸다. G/AlOH내 10 ㎍ IL-12의 존재는 2차 백신접종 2주 후 보체-의존성 중화항체의 통계학적으로 유의한 10배 감소와 연관되었다. 그러나, F 단백질 오염된 G/AlOH에 의해 도출된 보체-의존성 중화항체 역가의 크기는 실험적인 감염에 의해 백신접종된 마우스의 것과 동등하였다(표 5).

표 3

FI-RSV로 2차 백신접종 2주 후 혈청 G 단백질 특이성 IgG 서브클래스 항체 역가에 미치는 IL-12의 효과[a]

안티-G 단백질 항체 역가					
백신	IL-12(μg)	IgG	IgG1	IgG2A	1/2a
FI-RSV	10	8,359[b]	<100	200[e]	<0.5
FI-RSV	1	33,136	162	2,013	0.1
FI-RSV	0.1	67,621	2,774	2,942	0.9
FI-RSV	0	19,568[c]	9,209[d]	<50[f]	>184.2
FI-PIV3	0	592	NT	NT	ND
G/AlOH	10	629,245	32,470	113,378	0.3
G/AlOH	1	846,753	73,028	304,257	0.2
G/AlOH	0.1	575,613	108,976	113,700	1.0
G/AlOH	0	1,183,142	614,243[g]	491[h]	1,251.0
RSV	0	557,743	72,432	106,366	0.7
MOCK	0	<50	NT	NT	ND

표 3 해설

[a] 수치는 기하 평균 종점 항체 역가이다. 역가는 2차 백신접종 2주 후에 수집한 혈청에 대해 ELISA로 측정하였다. NT 및 ND는 각각 시험되지 않음 및 측정되지 않음을 나타낸다. 그룹 당 5 마리.

[b] $P<0.05$ vs. FI-RSV 단독 또는 FI-RSV + 0.1 또는 1.0 μg IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 전체 혈청 IgG 항체 역가

[c] $P<0.05$ vs. FI-RSV + 0.1 μg IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 전체 혈청 IgG 항체 역가

[d] $P<0.05$ vs. FI-RSV + 1.0 또는 10.0 μg IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG1 항체 역가

[e] $P<0.05$ vs. FI-RSV + 0.1 μg IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG2a 항체 역가

[f] $P<0.05$ vs. FI-RSV + 0.1 또는 1.0 μg IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG2a 항체 역가

[g] $P<0.05$ vs. G/AlOH + 10.0 μg IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG1 항체 역가

[h] $P<0.05$ vs. G/AlOH + 0.1, 1.0, 또는 10.0 μg IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG2a 항체 역가

표 4

FI-RSV로 2차 면역 2주 후 생성된 혈청 안티-F 단백질 항체 역가에 미치는 IL-12의 효과[a]

안티-F 단백질 항체 역가					
백신	IL-12(μg)	IgG	IgG1	IgG2a	1/2a
FI-RSV	10	58,884[b]	376[d]	21,698[e]	0.2
FI-RSV	1	501,243	33,274	92,944	0.4
FI-RSV	0.1	980,212	36,188	201,813	0.2
FI-RSV	0	250,576[c]	74,814	993[f]	75.3
FI-PIV-3	0	148	<50	<50	ND
G/AlOH	10	479,623	37,404[g]	136,748[h]	0.3
G/AlOH	1	819,426	38,925[g]	410,869[h]	0.1
G/AlOH	0.1	989,555	106,930	1,161	92.1
G/AlOH	0	450,308	193,754	314	617.1
RSV	0	1,808,423	103,954	389,162	0.3
MOCK	0	<50	NT	NT	ND

표 4에 대한 해설

[a] 수치는 기하 평균 종점 항체 역가이다. 역가는 2차 백신접종 2주 후에 수집한 혈청에 대해 ELISA로 측

정하였다. NT 및 ND는 각각 시험되지 않음 및 측정되지 않음을 나타낸다. 그룹 당 5 마리.

[b] P<0.05 vs. FI-RSV + 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 전체 혈청 IgG 항체

[c] P<0.05 vs. FI-RSV + 0.1, 1.0, 또는 10.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 전체 혈청 IgG 항체

[d] P<0.05 vs. FI-RSV 단독 또는 FI-RSV + 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG1 항체

[e] P<0.05 vs. FI-RSV 단독 또는 FI-RSV + 0.1 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG2a 항체

[f] P<0.05 vs. FI-RSV + 0.1 또는 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG2a 항체

[g] P<0.05 vs. G/AlOH 단독으로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG1 항체

[h] P<0.05 vs. G/AlOH 단독 또는 G/AlOH + 0.1 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 IgG2a 항체

표 5

AlOH에 흡착된 천연 G 단백질 및 FI-RSV의 혈청 중화항체 유도능에 미치는 IL-12의 효과

		중화 항체 역가 [a]			
		1차		2차	
백신[b]	IL-12(pg)	(+)	(-)	(+)	(-)
FI-RSV	10.0	<10	<10	<20	<20
FI-RSV	1.0	13	<10	34	<20
FI-RSV	0.1	27	<10	90[c]	<20
FI-RSV	없음	11	<10	85[c]	<20
FI-PIV3	없음	<10	<10	<20	<20
G/AlOH	10.0	38	<10	1,116	35[d]
G/AlOH	1.0	150	13	2,155	67[d]
G/AlOH	0.1	99	22	1,935	117
G/AlOH	없음	41	12	3,276	382
RSV	없음	194	14	2,794	113
MOCK	없음	<10	<10	<20	<20

[a] 수치는 기하 평균 중화항체 역가이다. 역가는 플라크 감소 중화 시험에 의해 및 5% 보체의 존재(+) 또는 부재(-) 하에 각각 1차 및 2차 백신접종 4주 및 2주 후에 측정하였다. 그룹 당 5 마리.

[b] BALB/c 마우스는 FI-RSV 또는 G/AlOH 단독으로, 또는 + 10배 상승 용량의 재조합 쥐 IL-12로 근육내 경로로 면역시킨다.

[c] P<0.05 vs. FI-RSV + 1.0 또는 10.0 ㎍ IL-12, 또는 FI-PIV3로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 중화항체 역가

[d] P<0.05 vs. G/AlOH 단독, 1 ㎍ IL-12 또는 10 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 중화항체 역가

표 6

RSV의 A2 스트레인으로 챌린지 5일 후 AlOH에 흡착된 천연 G 단백질 또는 포르말린-불활성화 RSV로 백신

접종한 BALB/c 마우스의 폐 염증반응에 미치는 IL-12의 효과

백신[a]	IL-12	%EOS[b]	IL-5 (pg/ml)	IL-5 (OD)[c]
FI-RSV	10	ND	<7	0.029
FI-RSV	1	10.9	<7	0.035
FI-RSV	0.1	17.8	<10	0.044
FI-RSV	0	38.5[d]	106	0.160[f]
FI-PIV3	0	6.5	<8	0.036
G/AlOH	10	31.1	50	0.115
G/AlOH	1	24.7	24	0.074
G/AlOH	0.1	32.8	37	0.096
G/AlOH	0	35.0	167	0.191[g]
RSV	0	<1.0[e]	<35	0.028
MOCK	0	ND	<35	0.035

[a] BALB/c 마우스는 포르말린-불활성화 RSV (FI-RSV) + 10배 상승 용량의 재조합 쥐 IL-12로 0주 및 4주째에 근육내 경로로 면역시킨다. 대조군 마우스는 포르말린-불활성화 파라인플루엔자 바이러스 3형(FI-PIV3), QS-21과 혼합된 천연 융합 단백질(F/QS-21)로 백신접종하거나 RSV의 A2 스트레인으로 감염시킨다. 추가의 대조군 마우스는 모방-감염 Hep2 세포 용해물(MOCK)를 비내 투여하거나 PBS/QS-21로 근육내 주사하였다.

[b] 수치는 바이러스로 챌린지 5일 후 BAL액에서 계수된 호산구(EOS)의 기하 평균 상대 %이다. ND는 측정되지 않았음을 의미한다.

[c] IL-5는 포획 ELISA로 검출되고 표준곡선으로부터 정량된다. 수치는 기하 평균 광학밀도(OD_{490})이다.

[d] $P<0.05$ vs. FI-PIV3 또는 FI-RSV + 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스에서 검출된 호산구

[e] $P<0.05$ vs. G/AlOH 또는 FI-RSV 단독으로 백신접종한 마우스에서 검출된 호산구

[f] $P<0.05$ vs. FI-RSV + 0.1, 1.0, 또는 10.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스에서 검출된 IL-5(OD_{490})

[g] $P<0.05$ vs. FI-RSV + 1.0 ㎍ IL-12로 백신접종한 마우스에서 검출된 IL-5(OD_{490})

실시예 6: F/AlOH의 BALB/c 마우스에서 보호 면역반응 생성능에 미치는 IL-12의 효과

연구 설계

연구목적은 F/AlOH의 폐에서 보호 면역반응 생성능을 향상시키기 위한 IL-12의 능력을 조사하는 것이다. 순수한 암컷 BALB/c 마우스(8 내지 10주령)를 RSV의 A2 스트레인으로부터의 이온 교환 정제 천연 융합(F) 단백질로 근육내(IM) 경로로 프라이밍시킨다. F 단백질(30 ng/용량)을 PBS와만, 또는 두 용량의 재조합 쥐 IL-12(10 또는 100 ng IL-12/용량) 중 하나와 병행 투여한다. F 단백질 및 IL-12를 4℃에서 밤새 수산화 알루미늄 보조제(AlOH, 100 ㎍/용량)에 흡착시킨다. 추가의 대조군 마우스를 RSV의 A2 스트레인으로 실험적인 감염에 의해 면역시킨다. 1차 면역 4주 후, 모든 마우스를 RSV A2(50 ㎕, 약 5×10^6 PFU)로 챌린지시킨다. 폐 조직에서의 바이러스 복제 수준을 4일 후에 평가한다. 간단히 말해서, 폐 및 기관 조직을 일괄적으로 적출하여 균질화하고 청징화하여 급속 동결시킨 다음 감염성 바이러스에 대해 분석할 때까지 -70℃에서 보관한다. 호흡관 조직에서의 바이러스 복제 수준은 Hep-2 세포 단일층을 이용하여 플라크 분석으로 평가한다. ELISA에 의해 기하 평균 종점 안티-F 단백질 전체 및 서브클래스 IgG 항체 역가의 측정을 위해 1차 백신접종 4주 후에 또한 혈청을 수집한다. 또한 기하 평균 혈청 중화항체 역가는 5% 보체의 존재 또는 부재하에 바이러스의 A2 스트레인에 대해 플라크 감소 중화 시험에 의해 알아낸다.

결과

도 5에 나타낸 결과는 챌린지 4일 후에 측정한 폐 조직의 그램 당 바이러스의 기하 평균 플라크 형성 단위(PFU)이다. 표 7에 묘사된 데이터는 ELISA에 의해 측정된 기하 평균 종점 안티-F 단백질 IgG 항체 역가이다. 중화항체 역가는 기하 평균 중화항체 역가이고 5% 보체의 존재(+) 또는 부재(-) 하에 플라크 감소 중화 시험에 의해 측정된다. 항체 역가는 1차 백신접종 4주 후에 측정되었다.

F/AlOH에 10 또는 100 ng IL-12의 첨가는 PBS내 F/AlOH만으로 1차 면역 4주 후에 생성된 것들보다 한층 더 효능이 있는 면역반응을 도출하였다. 감염성 바이러스는 F/AlOH + 10 또는 100 ng IL-12로 프라이밍시키고 RSV A2로 챌린지시킨 마우스의 폐 조직에서 검출되지 않았다(도 5). 이와 반대로, PBS 중의 F/AlOH 단독으로, 또는 PBS/AlOH 단독으로 프라이밍시킨 마우스의 폐는 3 $\log_{10}$ 이상의 PFU 바이러스를 함유하였다.

F 단백질-특이성 종점 IgG 및 보체-보조된 중화항체 역가에 대한 혈청 검사는 IL-12 제형된 백신의 증가

된 효능이 증가된 전신 체액성 면역반응과 관계있음을 시사한다(표 7). F/AlOH + 100 ng IL-12로 면역 후 생성된 평균 보체-보조된 중화항체 역가는 PBS 중의 F/AlOH 단독으로 프라이밍시킨 마우스의 것 보다 한층 더 컸다. 그럼에도 불구하고, F/AlOH + 10 ng IL-12에 의한 면역은 상승된 F 단백질-특이성 종점 IgG 및 보체-보조된 중화항체 역가를 생성하지 못하였다(표 7). 그러나, 이들 마우스의 폐는 바이러스 복제를 억제하였다(도 5). 따라서, IL-12, 증가된 전신 체액성 면역반응, 및 향상된 효능 간의 상관관계는 확립될 수 없다. 모든 가능성에서, 연관의 부족은 백신내 F 단백질의 더 적은 최적 30 ng 용량에 관계되었다. 이와 무관하게, 10 ng 정도의 적은 IL-12 첨가는 PBS 중의 F/AlOH 단독으로 백신접종 후에 생성된 것보다 한층 더 효능적인 BALB/c 마우스내 전신 면역 반응을 도출하는 F/AlOH의 능력을 증강시켰다.

표 7

수산화 알루미늄(AlOH) 보조제에 흡착된 융합 (F) 단백질의 BALB/c 마우스내 보호 체액성 면역반응 생성능에 미치는 재조합 쥐 인터루킨-12의 효과

		혈청 항체 역가 (Log_{10})‡				
		안티-F 단백질			중화	
항원	IL-12 (ng)	IgG	IgG1	IgG2a	+	-
F/AlOH	없음	5.7±0.1	5.3±0.2	3.2±1.1	1.5±0.2	<1.3
F/AlOH	10	6.2±0.2[b]	5.7±0.3[b]	4.7±1.3[b]	2.2±0.9[b]	1.3
F/AlOH	100	6.3±0.8[b]	5.7±0.7[b]	5.0±1.7[a]	2.5±0.8[a]	1.3
PBS	없음	<3.0	<3.0	<3.0	<1.3	<1.3
RSV	없음	5.6±0.1	4.6±0.2	5.9±0.9	2.3±0.3	1.4

‡BALB/c 마우스는 수산화 알루미늄 보조제(AlOH, 100 ㎍/용량)에 흡착된 이온 교환 정제 F 단백질(30 ng/용량)로 근육내(IM) 경로로 프라이밍시킨다. F/ALOH는 PBS 단독으로, 또는 100 또는 10 ng 재조합 쥐 IL-12/용량과 병행 투여한다. 추가의 대조군 마우스는 RSV의 A2 스트레인으로 실험적인 감염에 의해 면역시킨다. 수치는 기하 종점 IgG 및 중화항체 역가(log_{10}) ± 그룹 당 5 마리 마우스의 평균 표준편차이다. 중화항체 역가(log_{10})는 5% 보체의 존재(+) 또는 부재(-) 하에 측정되었다.

[a] $P<0.05$ vs. PBS 중의 F/AlOH 단독으로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 항체 역가

[b] $P>0.05$ vs. PBS 중의 F/AlOH 단독으로 백신접종한 마우스로부터의 혈청 항체 역가

균등물

당업자는 단지 일상적인 실험을 이용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있다. 이러한 균등물 또한 본 발명의 범위내에 포함된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

호흡기 합포체 바이러스 항원, 보조량의 인터루킨-12 및 현탁 미네럴의 혼합물을 포함하고, 임의로 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 백신 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 인터루킨-12가 미네럴 현탁에 흡착되는 백신 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 인터루킨-12가 인간 인터루킨-12인 백신 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 현탁 미네럴이 알룸의 수성 현탁인 백신 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 알룸이 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄인 백신 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 호흡기 합포체 바이러스 항원이 RSV F 단백질, RSV G 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 백신 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 호흡기 합포체 바이러스 항원이 캐리어 분자에 접합되는 백신 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 캐리어 분자가 파상풍 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소 및 이들의 무독성 변이체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 백신 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 보조량의 인터루킨-12가 약 0.01 내지 약 1.0 마이크로그램인 백신 조성물.

청구항 10

호흡기 합포체 바이러스 항원, 보조량의 인터루킨-12 및 현탁 미네럴의 혼합물을 포함하고, 임의로 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 유효량의 백신 조성물을 척추동물 숙주에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 합포체 바이러스 항원에 대한 면역반응 도출방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 인터루킨-12가 미네럴 현탁에 흡착되는 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 인터루킨-12가 인간 인터루킨-12인 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 현탁 미네럴이 알룸의 수성 현탁인 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 알룸이 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄인 방법.

청구항 15

제 10 항에 있어서, 보조량의 인터루킨-12가 약 0.01 내지 약 1.0 마이크로그램인 방법.

청구항 16

제 10 항에 있어서, 호흡기 합포체 바이러스 항원이 캐리어 분자에 접합되는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 캐리어 분자가 파상풍 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소 및 이들의 무독성 변이체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 18

제 10 항에 있어서, 호흡기 합포체 바이러스 항원이 RSV F 단백질, RSV G 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법.

청구항 19

호흡기 합포체 바이러스 항원, 보조량의 인터루킨-12 및 현탁 미네럴의 혼합물을 포함하고, 임의로 생리학적으로 허용되는 비히클을 포함하는 면역원 조성물.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 인터루킨-12가 미네럴 현탁에 흡착되는 면역원 조성물.

청구항 21

제 19 항에 있어서, 인터루킨-12가 인간 인터루킨-12인 면역원 조성물.

청구항 22

제 19 항에 있어서, 현탁 미네럴이 알룸의 수성 현탁인 면역원 조성물.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 알룸이 수산화 알루미늄 또는 인산 알루미늄인 면역원 조성물.

청구항 24

제 19 항에 있어서, 호흡기 합포체 바이러스 항원이 RSV F 단백질, RSV G 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 면역원 조성물.

청구항 25

제 19 항에 있어서, 호흡기 합포체 바이러스 항원이 캐리어 분자에 접합되는 면역원 조성물.

청구항 26

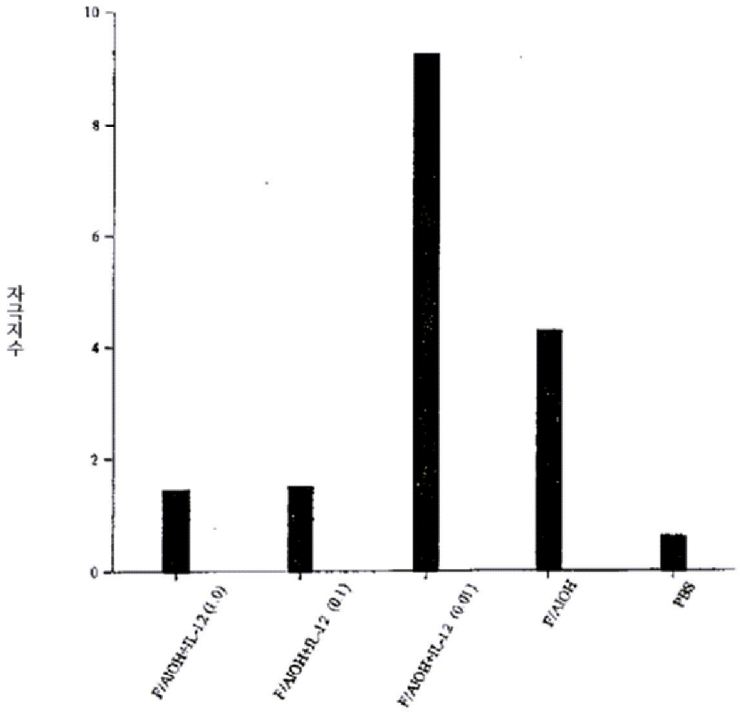
제 25 항에 있어서, 캐리어 분자가 파상풍 독소, 디프테리아 독소, 백일해 독소 및 이들의 무독성 변이체로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 면역원 조성물.

청구항 27

제 19 항에 있어서, 보조량의 인터루킨-12가 약 0.01 내지 약 1.0 마이크로그램인 면역원 조성물.

도면

도면1



도면2

Figure 1/2

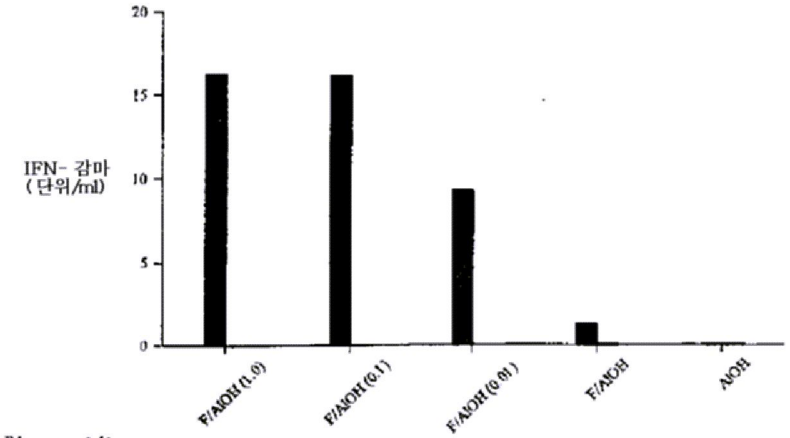
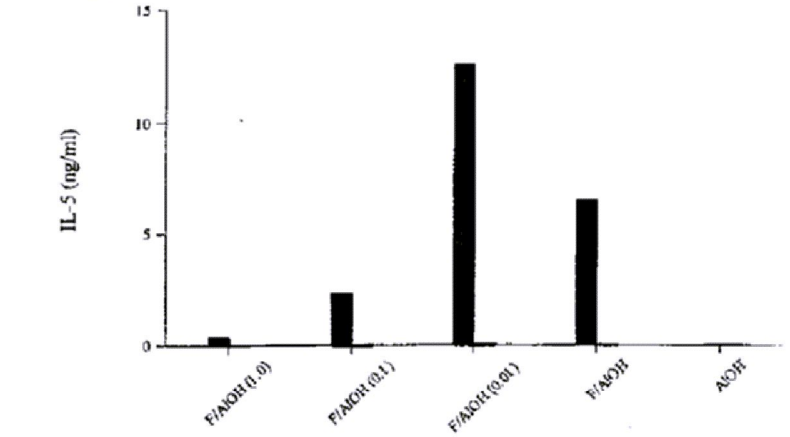
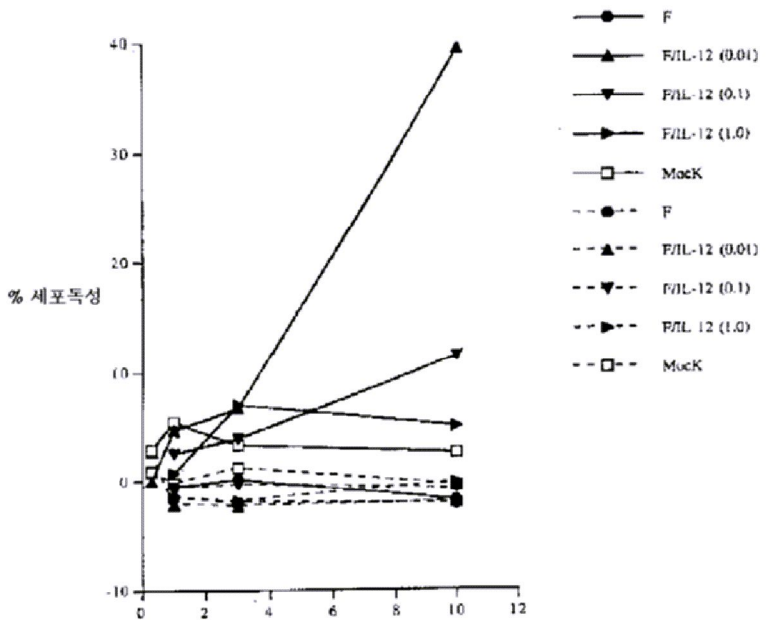


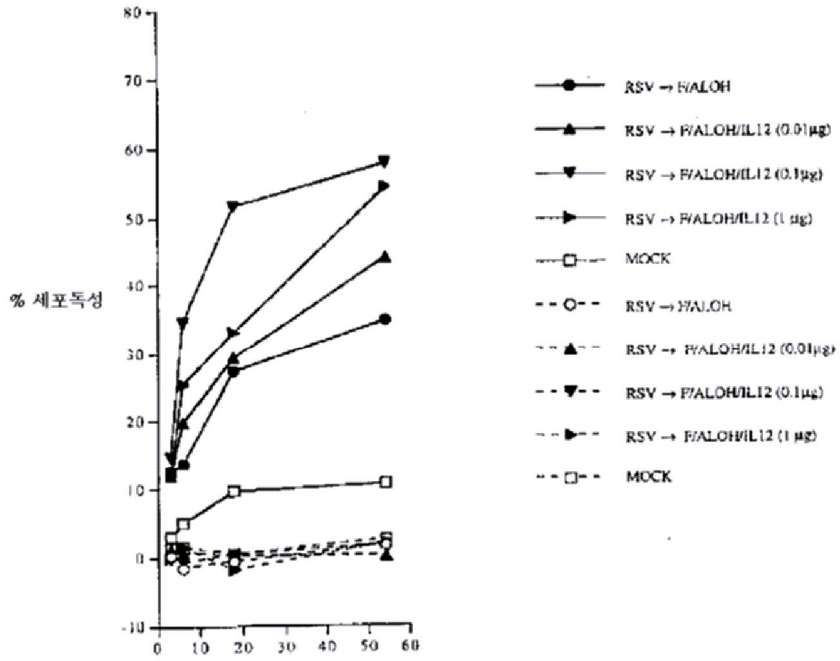
Figure 2/2



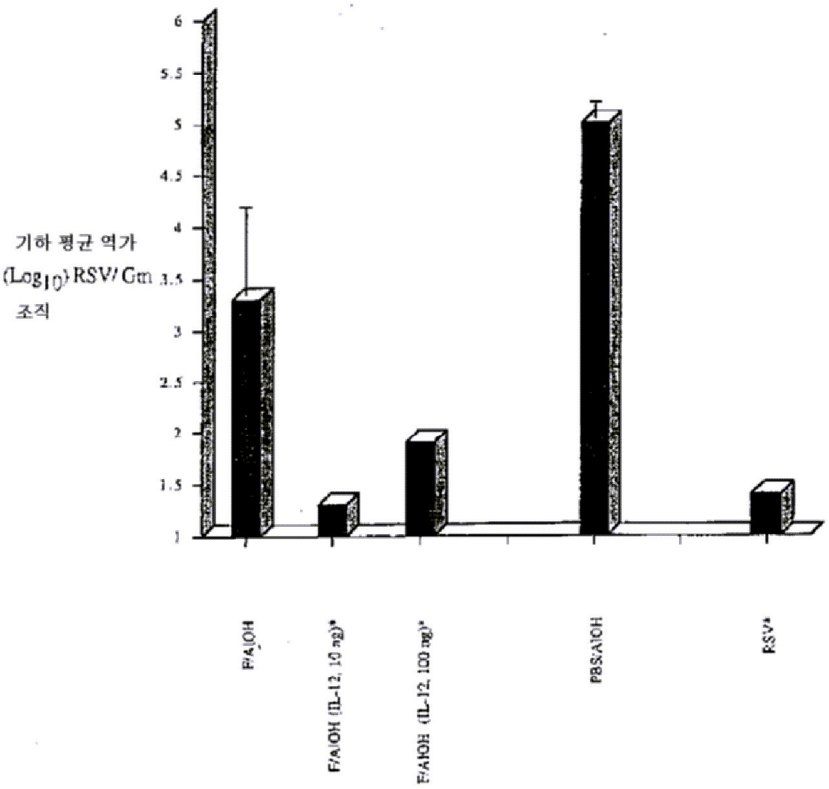
도면3



도면4


% 세포독성
RSV → F/ALOH
RSV → F/ALOH/IL12 (0.01μg)
RSV → F/ALOH/IL12 (0.1μg)
RSV → F/ALOH/IL12 (1 μg)
MOCK
RSV → F/ALOH
RSV → F/ALOH/IL12 (0.01μg)
RSV → F/ALOH/IL12 (0.1μg)
RSV → F/ALOH/IL12 (1 μg)
MOCK

도면5


기하 평균 역가
(Log10) RSV/ Gm
조직
F/ALOH
F/ALOH (IL-12, 10 ng)*
F/ALOH (IL-12, 100 ng)*
PBS/ALOH
RSV*