



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0019417
(43) 공개일자 2011년02월25일

(51) Int. Cl.

A61K 39/145 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-7000394

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년06월12일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2011년01월07일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2009/006038

(87) 국제공개번호 WO 2009/150532
국제공개일자 2009년12월17일

(30) 우선권주장
0905570.8 2009년03월31일 영국(GB)
61/131,918 2008년06월12일 미국(US)

(71) 출원인

노파르티스 아게

스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

(72) 발명자

반조프, 안젤리카

독일 35041 마르부르크 에밀-본-베링-스트라쎄 76
노파르티스 백신스 앤 다이나그노스틱스 지엠비에
이치 앤 컴퍼니 케이지.

클레멘스, 랄프

미국 메사추세츠 02139 캠브리지 메사추세츠 애비
뉴 350 노바티스 백신스

(74) 대리인

정삼영, 송봉식

전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 계절 및 유행성 보호를 위한 결합된 인플루엔자 백신

(57) 요약

인플루엔자 백신 접종에 대한 최근의 접근은 계절 균주 또는 유행성 균주 중 어느 하나에 초점을 맞춘다. 최근의 계절 백신은 전형적으로 두 개의 인플루엔자 A 균주(H1N1 및 H3N2) 및 하나의 인플루엔자 B 균주로부터 나온 항원을 포함한다. 최근의 유행성 백신은 H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주에 초점을 맞춘다. 본 발명의 목적은 계절 및 유행성 균주 모두에 대한 면역성을 일으킬 수 있는 백신을 제조하는 나아간 그리고 개선된 방법을 제공하는 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트에 있어서, 제 1 용기에서 H1N1, H3N2 및 B 항원의 각각의 농도가 25-35 $\mu\text{g/ml}$ (헤마글루티닌) 범위인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 제 2 용기에서 H5N1 항원의 농도가 5-20 $\mu\text{g/ml}$ (헤마글루티닌) 범위, 예를 들어, 10-20 $\mu\text{g/ml}$ (헤마글루티닌) 범위인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 3

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트에 있어서, 제 2 용기에서 H5N1 헤마글루티닌 항원의 농도가 5-20 $\mu\text{g/ml}$ 인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 4

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트에 있어서, 제 1 및 제 2 용기에서 수성 백신의 부피가 실질적으로 동일하고, 각각 대략 0.4 ml 내지 대략 0.6 ml의 범위인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트에 있어서, 제 1 용기에서의 수성 백신의 부피가 실질적으로 제 2 용기에서의 수성 백신의 부피의 두 배 부피인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 6

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트에 있어서, 각각의 용기가 봉규산 유리 바이알인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 7

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트에 있어서, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주가 클레이드 1, 2 또는 4에 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 8

제 7항에 있어서, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주가 클레이드 2.1, 2.2 또는 2.3에 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 용기는 어주반트를 포함하지 않지만, 제 2 용기는 어주반트를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 및 제 2 용기는 모두 어주반트를 포함하지 않고, 수중유형 유제 어주반트를 함유하는 제 3 용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 11

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 수중유형 유제 어주반트를 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트.

청구항 12

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 동결 건조된 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 제 2 용기가 수중유형 유제를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 14

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 동결 건조된 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 수중유형 유제 어주반트를 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트.

청구항 15

(i) 제 1 챔버는 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하고; 및 (ii) 제 2 챔버는 H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는, 다중 분리 챔버를 포함하는 주사기.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 인플루엔자 B 바이러스 균주 및 H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주가 모두 난에서 성장한 것을 특징으로 하는 키트 또는 주사기.

청구항 17

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 인플루엔자 B 바이러스 균주 및 H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주가 모두 세포 배양액에서 성장한 것을 특징으로 하는 키트 또는 주사기.

청구항 18

제 17항에 있어서, 용기에 조류 DNA, 오브알부민 및 오보뮤코이드가 부재하는 것을 특징으로 하는 키트 또는 주사기.

청구항 19

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스

균주 및 인플루엔자 B 바이러스 균주는 제 1 기질에서 자라고, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주는 제 2 기질에서 자라며, 기질 중 하나는 난이고, 다른 기질은 세포 배양액인 것을 특징으로 하는 키트 또는 주사기.

청구항 20

(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 제 1 인플루엔자 바이러스 백신을 투여하는 단계; (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스와 같은 H5N1 인플루엔자 A 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 제 2 인플루엔자 바이러스 백신을 투여하는 단계; 및 (iii) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 제 3 인플루엔자 바이러스 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 단계 (i) 및 (ii)는 (a) 동시에 아니면 (b) 어느 순서로도 순차대로 수행되나 단계 (iii) 전에 수행되는 것을 특징으로 하는, 인플루엔자 바이러스(H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주)의 네 가지 균주에 대하여 환자에서 면역 반응을 일으키는 방법.

청구항 21

환자에게 H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신을 투여하는 단계를 포함하고, 환자는 (a) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 3가 인플루엔자 바이러스 백신 및 (b) H5N1 인플루엔자 A 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 1가 인플루엔자 바이러스 백신 모두를 사전에 분리해서 맞는 것을 특징으로 하는, 환자에서 면역 반응을 일으키는 방법.

청구항 22

환자에게 H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신을 투여하는 단계, 그리고 난후 나중에 (a) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 3가 인플루엔자 바이러스 백신 및 (b) H5N1 인플루엔자 A 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 1가 인플루엔자 바이러스 백신을 분리해서 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 면역 반응을 일으키는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 출원은 2008년 6월 12일에 출원된 미국 가출원 61/131,918 및 2009년 5월 31일에 출원된 영국 특허 출원 0905570.8의 이익을 주장하며, 이들의 내용 전체는 본 발명에 참고문헌으로서 포함된다.

[0002] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 보호를 위한 백신, 특히, 최근의 계절 균주 및 유행성 균주로부터 유래한 항원을 포함하는 백신의 분야에 있다.

배경 기술

[0003] 인플루엔자 백신 접종에 대한 최근의 접근은 계절 균주 또는 유행성 균주 중 어느 하나에 집중되어 있다. 최근의 계절 백신은 전형적으로 두 개의 인플루엔자 A 균주(H1N1 및 H3N2) 및 하나의 인플루엔자 B 균주로부터 나온 항원을 포함한다. 최근의 유행성 백신은 H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주에 집중되어 있다.

[0004] 계절 및 유행성 균주 모두에 대하여 면역성을 일으킬 수 있는 백신은 참조 문헌 1에서 개시한다. 본 발명의 목적은 계절 및 유행성 균주 모두에 대한 면역성을 일으킬 수 있는 백신을 제조하는 나아가고 개선된 방법을 제공하는 것이다.

선행기술문헌

[0005] (그 내용이 참고문헌으로서 본 발명에 포함됨)

[0006] [1] WO2008/068631.

[0007] [2] WO2005/089837.

- [0008] [3] US 특허 6,692,468.
- [0009] [4] W000/07647.
- [0010] [5] W099/17820.
- [0011] [6] US 특허 5,971,953.
- [0012] [7] US 특허 4,060,082.
- [0013] [8] EP-A-0520618.
- [0014] [9] W098/01174.
- [0015] [10] W002/28422.
- [0016] [11] W002/067983.
- [0017] [12] W002/074336.
- [0018] [13] W001/21151
- [0019] [14] W002/097072.
- [0020] [15] W02005/113756.
- [0021] [16] Huckriede et al. (2003) Methods Enzymol 373:74-91.
- [0022] [17] Treanor et al. (1996) J Infect Dis 173:1467-70.
- [0023] [18] Keitel et al. (1996) Clin Diagn Lab Immunol 3:507-10.
- [0024] [19] Saito et al. (2004) J Med Virol 74(2):336-43.
- [0025] [20] Kistner et al. (1998) Vaccine 16:960-8.
- [0026] [21] Kistner et al. (1999) DevBiol Stand 98:101-110.
- [0027] [22] Bruhl et al. (2000) Vaccine 19:1149-58.
- [0028] [23] Pau et al. (2001) Vaccine 19:2716-21.
- [0029] [24] <http://www.atcc.org/>
- [0030] [25] <http://locus.umdj.edu/>
- [0031] [26] W003/076601.
- [0032] [27] W02005/042728.
- [0033] [28] W003/043415.
- [0034] [29] W001/85938.
- [0035] [30] W02006/108846.
- [0036] [31] W097/37000.
- [0037] [32] Brands et al. (1999) Dev Biol Stand 98:93-100.
- [0038] [33] Halperin et al. (2002) Vaccine 20:1240-7.
- [0039] [34] Tree et al. (2001) Vaccine 19:3444-50.
- [0040] [35] EP-A-1260581 (W001/64846).
- [0041] [36] W02006/071563.
- [0042] [37] W02005/113758.
- [0043] [38] W097/37001.

- [0044] [39] W02006/027698.
- [0045] [40] EP-B-0870508.
- [0046] [41] US 5948410.
- [0047] [42] Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34:195-197.
- [0048] [43] Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.
- [0049] [44] Ji et al. (2002) Biotechniques. 32:1162-7.
- [0050] [45] Briggs (1991) JParenterSci Technol. 45:7-12.
- [0051] [46] Lahijani et al. (1998) Hum Gene Ther. 9:1173-80.
- [0052] [47] Lokteff et al. (2001) Biologicals. 29:123-32.
- [0053] [48] Rota et al. (1992) J Gen Virol 73:2737-42.
- [0054] [49] GenBank sequence GL325176.
- [0055] [50] Hoffmann et al. (2002) Vaccine 20:3165-3170.
- [0056] [51] Subbarao et al. (2003) Virology 305:192-200.
- [0057] [52] Liu et al. (2003) Virology 314:580-590.
- [0058] [53] Ozskx et al. (2004) J. Virol. 78:1851-1857.
- [0059] [54] Webby et al. (2004) Lancet 363: 1099-1103.
- [0060] [55] W000/60050.
- [0061] [56] W001/04333.
- [0062] [57] US 특허 6649372.
- [0063] [58] Neumann et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:16825-9.
- [0064] [59] W02006/067211.
- [0065] [61] Hoffmann et al. (2000) Virology 267(2):310-7.
- [0066] [62] Herlocher et al. (2004) J Infect Dis 190(9): 1627-30.
- [0067] [63] Le et al. (2005) Nature 437(7062):1 108.
- [0068] [64] Gambaryan & Matrosovich (1992) J Virol Methods 39(1-2):111-23.
- [0069] [65] Mastrosovich et al. (1999) J Virol 73: 1146-55.
- [0070] [66] Stevens et al. (2006) J Mol Biol 355:1143-55.
- [0071] [67] Couceiro & Baum (1994) Mem Inst Oswaldo Cruz 89(4):587-91.
- [0072] [68] Felsenstein (1989) Cladistics 5: 164-166.
- [0073] [69] Emerging Infectious Diseases 11(10):1515-21.
- [0074] [70] Sandbulte et al. (2007) PLoS Med. 4(2):e59.
- [0075] [71] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [0076] [72] Banzha& (2000) Immunology Letters 71:91-96.
- [0077] [73] O'Hagan (2007) Expert Rev Vaccines. 6(5):699-710.

- [0078] [74] Bernstein et al. (2008) J Infect Dis. 197(5):667-75.
- [0079] [75] Stephenson et al. (2005) J Infect Dis. 191(8):1210-5.
- [0080] [76] Han et al. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 June 2005.
- [0081] [77] US-6630161.
- [0082] [78] W090/14837.
- [0083] [79] Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203.
- [0084] [80] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
- [0085] [81] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995(ISBN 0-306-44867-X).
- [0086] [82] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volume 42 of Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [0087] [83] W02008/043774.
- [0088] [84] Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25.
- [0089] [85] Hariharan et al (1995) Cancer Res 55:3486-9.
- [0090] [86] US-2007/0014805.
- [0091] [87] US-2007/0191314.
- [0092] [88] SuLi et al. (2004) Vaccine 22(25-26):3464-9.
- [0093] [89] W095/11700.
- [0094] [90] US 특허 6,080,725.
- [0095] [91] W02005/097181.
- [0096] [92] W02006/113373.
- [0097] [93] Potter & Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75.
- [0098] [94] Greenbaum et al. (2004) Vaccine 22:2566-77 '.
- [0099] [95] Zurbriggen et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:295-304.
- [0100] [96] Piascik (2003) JAm Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.
- [0101] [97] Mann et al. (2004) Vaccine 22:2425-9.
- [0102] [98] Halperin et al. (1979) Am J Public Health 69:1247-50.
- [0103] [99] Herbert et al. (1979) J Infect Dis 140:234-8.
- [0104] [100] Chen et al. (2003) Vaccine 21:2830-6.

발명의 내용

[0105] 발명의 개요

[0106] 본 발명은 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 유행성 균주, H5N1과 같은 H5 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하고, 제 1 용기에서 H1N1, H3N2 및 B 항원의 각각의 농도가 25-35 $\mu\text{g/ml}$ 예를 들어 대략 30 $\mu\text{g/ml}$ (전형적으로 1:1:1 질량비)의 범위에 있는 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다. 제 2 용기에서 유행성 항원의 농도는 이상적으로 5-20 $\mu\text{g/ml}$ 예를 들어 대략 15 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위에 있다. 그 자체로 통상적인 불활성화 인플루엔자 백신

인 이들 항원 농도는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌으로 환산하여 표시한다.

- [0107] 유행성 백신을 제질 백신으로부터 키트 내에 함께 두면서 분리된 채로 유지하는 것은, 4가 백신이 제조 중에 형성될지라도, 최종 백신의 균주 프로파일을 더욱 쉽게 변형시키는 것을 허용한다. 이것은 특히 유행성 바이러스 균주의 개체 변이에 중요하다.
- [0108] 또한, 본 발명은 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 유행성 균주, H5N1과 같은 H5 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하고, 제 2 용기에서 유행성 항원의 농도가 5-20 $\mu\text{g/ml}$ 예를 들어 대략 15 $\mu\text{g/ml}$ 의 범위에 있는 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.
- [0109] 또한, 본 발명은 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 유행성 균주, H5N1과 같은 H5 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하고, 제 1 및 제 2 용기에서 수성 백신의 부피가 실질적으로 동일하고, 각각 대략 0.4 ml 내지 대략 0.6 ml 예를 들어 대략 0.5 ml의 범위인 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.
- [0110] 또한, 본 발명 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 유행성 균주, H5N1과 같은 H5 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하고, 제 1 용기에서의 수성 백신의 부피가 실질적으로 제 2 용기에서의 수성 백신의 부피의 두 배 부피인 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.
- [0111] 또한, 본 발명 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 유행성 균주, H5N1과 같은 H5 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하고, 각각의 용기가 봉규산 유리 바이알인 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다. 각각의 바이알은 1회 투여량 또는 다수회(예를 들면 10회)의 투여량을 위한 재료를 함유할 수 있다. 바이알은 부틸 고무로 만들어진 마개를 가질 수 있다.
- [0112] 또한, 본 발명은(i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하고, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주가 클레이드 1, 2 또는 4에 있는 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.
- [0113] 또한, 본 발명은 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하고, H5N1 균주는 A/베트남/1203/2004; A/베트남/1194/2004; A/오리/후난/795/2002; A/인도네시아/5/2005; A/큰고니/몽골/244/2005; A/닭/인도/NIV33487/2006; A/안후이/1/2005; A/인도 기러기/칭하이/1A/2005; A/동박새/홍콩/1038/2006; A/칠면조/터키/1/2005; A/거위/귀양/337/2006; A/오리/라오스/3295/2006; A/캄보디아/R0405050/2007; 및 A/일반 까치/홍콩/5052/2007의 그룹으로부터 선택되는 균주로부터 나온 헤마글루티닌과 교차-반응하는 항-헤마글루티닌 항체를 유도해내는 헤마글루티닌으로 구성되거나, 이를 갖는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나이다.
- [0114] 일부 구체예에서, 제 1 용기는 어주반트를 포함하지만, 제 2 용기는 어주반트를 포함하지 않는다. 다른 구체예에서, 제 1 용기가 어주반트를 포함하고, 제 2 용기도 어주반트를 포함한다. 다른 구체예에서, 제 1 용기는 어주반트를 포함하지 않고, 제 2 용기는 어주반트를 포함한다. 다른 구체예에서, 제 1 및 제 2 용기는 모두 어주반트를 포함하지 않지만, 키트는 항원 없이 수중유형 유제 어주반트를 함유하는 제 3 용기를 포함한다. 다른 구체예에서, 제 1 및 제 2 용기는 모두 어주반트를 포함하지 않지만, 키트는 수중유형 유제 어주반트 및 비-인플루엔자 항원을 함유하는 제 3 용기를 포함한다. 적절한 어주반트의 상세 사항은 하기에서 주어진다.
- [0115] 이들 키트를 사용하여, 용기의 내용물을 사용시에 혼합한 후 환자에게 결합된 백신으로서 편리하게 투여한다. 내용물은 임의의 적절한 순서로 혼합할 수 있다. 예를 들면, 용기가 바이알일 때, 제 2 용기의 내용물은 바늘을

통해 주사기로 회수된 후, 제 1 용기로 삽입될 수 있다. 혼합한 후, 혼합된 내용물을 주사기로 회수한다(이전과 동일하거나 다른). 회수 바늘을 주사에 사용할 수 있고, 아니면 제거한 후 주사에 적절한 것으로 교체할 수 있다(예를 들어 IM 주사).

[0116] 또한 본 발명은 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 유행성 인플루엔자 A 바이러스 균주(예를 들어 H5N1과 같은 H5 균주) 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 수중유형 유제 어주반트를 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트를 제공한다.

[0117] 본 발명 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 동결 건조된 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 유행성 균주, H5N1과 같은 H5 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 제 2 용기는 이상적으로는 수중유형 유제를 포함한다.

[0118] 본 발명은 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 유행성 인플루엔자 A 바이러스 균주(예를 들어 H5N1과 같은 H5 균주) 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 동결 건조된 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는 제 1 용기; 및 (ii) 수중유형 유제 어주반트를 함유하는 제 2 용기를 포함하는 키트를 제공한다.

[0119] 또한 본 발명은 (i) 제 1 챔버는 H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하고; 및 (ii) 제 2 챔버는 유행성 균주 예를 들어 H5N1과 같은 H5 균주로부터 나온 항원을 포함하는 수성 불활성화 인플루엔자 백신을 함유하는, 다중 분리 챔버를 포함하는 주사기를 제공한다. 따라서 두 개의 수성 구성 요소는 동일한 주사기 내에 함께 유지되지만, 분리해서 존재하고, 이것은 가동시 구성 요소의 혼합을 가져온다. 일부 구체예에서 제 1 챔버는 어주반트를 포함한다. 다른 구체예에서 제 2 챔버는 어주반트를 포함한다. 다른 구체예에서 세 번째 챔버는 어주반트를 포함한다. 다중-챔버 주사기는 예를 들어 참고문헌 2-9 등에서 알려져 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0120] **백신 제조**

[0121] 최근에 인플루엔자 바이러스 백신의 다양한 형태가 사용가능하고, 백신은 일반적으로 살아있는 바이러스 또는 불활성화 바이러스 중 하나에 기초한다. 불활성화 백신은 전체 비리온, 쪼개진 비리온, 또는 정제된 표면 항원에 기반을 둘 수 있다. 인플루엔자 항원은 또한 비로솜의 형태로 제시될 수 있다. 본 발명은 백신은 임의의 이들 형태를 사용할 수 있으나, 전형적으로 불활성화 백신으로 사용할 것이다.

[0122] 불활성화 바이러스를 사용할 경우, 백신은 전체 비리온, 쪼개진 비리온, 또는 정제된 표면 항원을 포함할 수 있다(헤마글루티닌을 포함하고, 일반적으로 뉴라미니다아제도 포함하는). 바이러스를 불활성화 시키기 위한 화학적 수단은 하나 이상의 하기 제제의 효과량으로의 처리를 포함한다: 세정제, 포름알데히드, β -프로피오락톤, 메틸렌 블루, 소랄렌, 카르복시폴레렌(C60), 2원 에틸아민, 아세틸 에틸렌아민, 또는 이들의 조합. 바이러스의 비-화학적 방법은 예를 들면 UV 광선 또는 감마선 조사와 같이 당업계에 알려져 있다.

[0123] 비리온은 다양한 방법에 의해 바이러스-함유 체액으로부터 회수할 수 있다. 예를 들면 정제 절차는 비리온을 붕괴시키기 위한 세정제를 포함하는 선행 수크로오스 기울기 용액을 사용한 때 원심분리를 포함할 수 있다. 이후 항원은 선택적인 회석 후에 투석여과에 의해 정제할 수 있다.

[0124] 쪼개진 비리온은 '트윈-에테르' 쪼개짐 절차를 포함하는 서브비리온 제조를 생산하기 위하여 세정제(예를 들어 에틸에테르, 폴리소르베이트 80, 디옥시폴레이트, 트리-N-부틸 인산염, 트리톤 X-100, 트리톤 N101, 세틸트리메틸암모늄 브롬화물, 테르기톨 NP9, 등.)로 정제된 비리온을 처리하는 것에 의해 얻을 수 있다. 인플루엔자 바이러스를 쪼개는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 참고문헌 10-15, 등을 참조하라. 바이러스의 쪼개짐은 전형적으로 쪼개짐 제제의 붕괴 농도로 전염성 또는 비-전염성 중 하나의 전체 바이러스를 붕괴 또는 파편화시키는 것에 의해 수행된다. 붕괴는 바이러스의 완전성을 바꾸는, 바이러스 단백질의 전체 또는 일부의 가용화를 초래한다. 바람직한 쪼개짐 제제는 비-이온성 및 이온성(예를 들어 양이온성) 계면 활성제, 예를 들어 알킬 글리코사이드, 알킬티오글리코사이드, 알킬 당, 설포베타인, 베타인, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, N,N-디알킬-글루카미드, 헤카메그, 알킬페녹시-폴리에톡시에탄올, 제4 암모늄 화합물, 사코실, CTAB(세틸 트리메틸 암모늄 브롬화물), 트리-JV-부틸 인산염, 세타브론, 미리스틸트리메틸암모늄 염, 리포펙틴, 리포펙타민, 및 DOT-MA, 옥틸

-또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올(예를 들어 트리톤 X-100 또는 트리톤 N101과 같은 트리톤 계면 활성제), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(트윈 계면 활성제), 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴리옥시에틸렌 에스테르, 등이다. 하나의 유용한 쪼개짐 절차는 나트륨 디옥시콜레이트 및 포름알데히드의 연속적인 효과를 사용하고, 쪼개짐은 초기 비리온 정제동안 일어날 수 있다(예를 들어 수크로오스 밀도 기울기 용액에서). 따라서 쪼개짐 절차는 비리온-함유 재료의 정화(비-비리온 재료를 제거하기 위해), 회수한 비리온의 농축(예를 들어 CaHPO_4 흡착과 같은 흡착 방법을 사용하여), 비-비리온 재료로부터 전체 비리온의 분리, 밀도 기울기 원심분리 단계에서 쪼개짐 체제를 사용한 비리온의 쪼개짐(예를 들어 나트륨 디옥시콜레이트와 같은 쪼개짐 체제를 함유하는 수크로오스 기울기를 사용하여), 및 이후 원하지 않는 재료를 제거하기 위한 여과(예를 들어 초여과)를 포함할 수 있다. 쪼개진 비리온은 나트륨-퍼퍼 등장 염화 나트륨 용액에서 유용하게 재현탁시킬 수 있다. BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ 및 FLUSHIELD™ 산물은 쪼개진 백신이다.

[0125] 정제된 표면 항원 백신은 인플루엔자 표면 항원 헤마글루티닌 및, 전형적으로, 또한 뉴라미니다아제를 포함한다. 정제된 형태에서 이들 단백질을 제조하기 위한 절차는 당업계에 잘 알려져 있다. FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ 및 INFLUVAC™ 산물이 예시이다.

[0126] 불활성화 인플루엔자 항원의 다른 형태는 비로솜[16](무핵산 바이러스-유사 리포솜 입자)이다. 비로솜은 세정제로 인플루엔자 바이러스의 가용화 이후 뉴클레오캡시드의 제거 및 바이러스 당 단백질을 함유하는 막의 복원에 의해 제조할 수 있다. 비로솜을 제조하기 위한 선택적인 방법은 그들의 막에서 바이러스 단백질이 있는 리포솜을 제공하기 위해, 인지질의 과다량에 바이러스 막단백질을 첨가하는 것을 포함한다. 본 발명은 INFLEXAL V™ 및 INVAVAC™ 산물에서 처럼, 벌크 비로솜을 저장하는데 사용할 수 있다.

[0127] 인플루엔자 바이러스는 약화될 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 온도-민감성일 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 한랭-적응되었을 수 있다. 이들 세 특징은 항원으로서 살아있는 바이러스를 사용할 때 특히 유용하다.

[0128] HA는 최근의 불활성화 인플루엔자 백신에서 주된 면역원이고, 백신 투여량은 전형적으로 SRID에 의해 측정된 HA 수준을 참고하여 표준화된다. 현행의 백신은 비록 예를 들어, 어린이에 대하여, 또는 유행성 상황, 또는 어주반트를 사용할 때 낮은 투여량이 사용될지라도, 군주 당 HA 대략 15 μg 을 전형적으로 함유한다. $\frac{1}{2}$ {즉 군주 당 7.5 μg HA), $\frac{1}{4}$ 및 $\frac{1}{8}$ 과 같은 분수 투여량을 더 높은 투여량(예를 들어 $3\times$ 또는 $9\times$ 투여량[17,18])을 가질 때처럼 사용하였다. 달리 언급할 때를 제외하고, 백신은 인플루엔자 군주 당 HA 0.1 및 150 μg 사이, 바람직하게는 0.1 및 50 μg 사이, 예를 들어 0.1-20 μg , 0.1-15 μg , 0.1-10 μg , 0.1-7.5 μg , 0.5-5 μg , 등을 포함할 수 있다. 특정 투여량은 군주 당 예를 들어 대략 45, 대략 30, 대략 15, 대략 10, 대략 7.5, 대략 5, 대략 3.8, 대략 1.9, 대략 1.5 μg , 등을 포함한다. 예를 들어 각각의 군주에 대한 HA 질량이 군주 당 HA 질량의 평균 10% 내, 바람직하게는 평균 5% 내인 유행성 군주를 제외하고, 백신에 포함된 각각의 군주에 대하여 HA의 실질적으로 동일한 질량을 사용하는 것이 바람직하다. 유행성 군주에 대한 HA의 질량은 바람직하게는 비-유행성 군주에 대하여 $\frac{1}{2}$ 또는 $\frac{1}{4}$ 평균 질량이다.

[0129] 살아있는 백신에 대하여, 투여량은 HA 내용물보다 조직 배양 전염성 투여량의 중앙값(TCID₅₀)에 의해 측정되고, 군주 당 10^6 및 10^8 (바람직하게는 $10^{6.5}$ - $10^{7.5}$ 사이) 사이의 TCID₅₀이 전형적이다.

[0130] 본 발명과 함께 사용된 군주는 야생형 바이러스에서 찾은 것과 같은 천연 HA, 또는 변형 HA를 가질 수 있다. 예를 들면, 조류 종에서 고도로 병원성인 바이러스를 유발하는 결정자(예를 들어 HA1/HA2 절단 부위 주변의 과염기성 영역)를 제거하기 위하여 HA를 변형시키는 것이 알려져 있다. 본 발명과 함께 사용된 인플루엔자 B 바이러스의 헤마글루티닌은 바람직하게는 글루코실화 부위를 제공하는, 아미노산 197에서 Asn을 갖는다[19].

[0131] 세포주

[0132] 바이러스가 암탉 난의 감염된 요막 유동액으로부터 회수되는 경우 바이러스 성장을 위한 기질로서 SPF 난을 사용하는 것 보다, 인플루엔자 바이러스 복제를 지원하는 세포주를 사용할 수 있다. 세포주는 전형적으로 포유 동물에서 기원할 것이다. 적절한 기원의 포유 동물 세포는 영장류 세포의 사용이 바람직하지 않음에도 불구하고, 햄스터, 소, 영장류(인간 및 원숭이 포함) 및 개 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 신장 세포, 섬유아 세포, 망막 세포, 폐 세포, 등과 같은 다양한 세포 타입을 사용할 수 있다. 적절한 햄스터 세포의 예시는 BHK21 또는 HKCC의 이름을 갖는 세포주이다. 적절한 원숭이 세포는 Vero 세포주와 같은 신장 세포와 같은 아프리카 초록 원숭이 세포이다[20-22]. 적절한 개 세포는 예를 들어 CLDK 및 MDCK 세포주와 같은 신장 세포이다.

[0133] 따라서 적절한 세포주는 MDCK; CHO; CLDK; HKCC; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6[23]; FRhL2; WI-38; 등을 포

함하지만, 이에 제한되지 않는다. 적절한 세포주는 예를 들어 미국 세포주 은행(ATCC)[24]으로부터, Coriell 세포 저장소[25]로부터, 또는 유럽 세포주 은행(ECACC)으로부터 널리 사용가능하다. 예를 들면, ATCC는 카탈로그 번호 CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 및 CRL-1587하에 다양한 다른 Vero 세포를 제공하고, 카탈로그 번호 CCL-34하에 MDCK 세포를 제공한다. PER.C6은 기탁번호 96022940하에 ECACC로부터 사용할 수 있다.

[0134] 가장 바람직한 세포주는 포유 동물-타입 글루코실화를 갖는 것들이다. 포유 동물 세포주에 대한 덜 바람직한 대안으로서, 바이러스는 오리(예를 들어 오리 망막) 또는 암탉에서 유래한 세포주를 포함하는 조류 세포주[예를 들어 참고문헌 26-28]에서 성장할 수 있다. 조류 세포주의 예시는 조류 배아 줄기 세포[26,29] 및 오리 망막 세포[27]를 포함한다. 적절한 조류 배아 줄기 세포는 닭 배아 줄기 세포로부터 유래한 EBx 세포주, EB45, EB 14, 및 EB 14-074[30]를 포함한다. 닭 배아 섬유아세포(CEF)를 또한 사용할 수 있다. 하지만 조류세포를 사용하는 것 보다 포유 동물 세포의 사용이 백신이 조류 DNA 및 난 단백질(오브알부민 및 오보뮤코이드와 같은)로부터 자유롭고, 그것에 의해 알레르기 유발성을 감소시키는 것을 의미한다.

[0135] 인플루엔자 바이러스 성장에 가장 바람직한 세포주는 Madin Darby 개 신장으로부터 유래한 MDCK 세포주이다[31-34]. 원래의 MDCK 세포주는 CCL-34로서 ATCC에서 사용가능하나, 이 세포주의 파생물도 또한 사용할 수 있다. 예를 들면, 참고문헌 31이 부유 배양에서 성장에 적응한 MDCK 세포주를 개시한다('MDCK 33016', DSM ACC 2219로서 기탁됨). 유사하게, 참고문헌 35는 무혈청 배양에서 부유하여 성장하는 MDCK-유도 세포주를 개시한다('B-702', FERM BP-7449로서 기탁됨). 참고문헌 36은 'MDCK-S'(ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101'(ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102'(ATCC PTA-6502) 및 'MDCK-SF10S'(PTA-6503)를 포함하는 비-종양성 MDCK 세포를 개시한다. 참고문헌 37은 'MDCK.5F1' 세포(ATCC CRL-12042)를 포함하는 감염에 대한 감수성이 높은 MDCK 세포주를 개시한다. 임의의 이들 MDCK 세포주를 사용할 수 있다.

[0136] 바이러스는 부착 배양 또는 부유하는 세포에서 성장할 수 있다. 미세담체 배양을 또한 사용할 수 있다. 일부 구체예에서, 따라서 세포는 부유하여 성장하도록 적응할 수 있다.

[0137] 세포주는 바람직하게는 무혈청 배양 배지 및/또는 무 단백질 배지에서 성장한다. 인간 또는 동물 기원의 혈청으로부터 나온 첨가물이 없는 배지를 본 발명의 문맥에서 무혈청 배지라고 지칭한다. 천연적으로 이런 배양액에서 성장하는 세포는 그들 스스로 단백질을 함유하나, 무-단백질 배지는 세포의 증가(예를 들어 감염 전에)가 단백질, 성장 인자, 다른 단백질 첨가물 및 비-혈청 단백질의 제외와 함께 일어나는 하나를 의미하는 것으로 이해되지만, 트립신 또는 바이러스 성장에 필요할 수 있는 다른 프로테아제와 같은 단백질을 선택적으로 포함할 수 있다.

[0138] 인플루엔자 바이러스 복제를 지원하는 세포주는 바이러스 복제 동안 바람직하게는 37°C 이하에서 성장한다[38] (예를 들어 30-36°C, 또는 대략 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C에서).

[0139] 배양된 세포에서 인플루엔자 바이러스를 증식시키는 방법은 일반적으로 성장시킬 균주의 접종원의 배양액을 접종하는 단계, 예를 들면, 바이러스 역가 또는 항원 발현에 의해 결정되는바, 바이러스 증식을 위해 원하는 시간 기간 동안 감염된 세포를 배양하는 단계(예를 들어 접종 후 24 및 168시간 사이) 및 증식된 바이러스를 수득하는 단계를 포함한다. 배양된 세포는 1:500 내지 1:1, 바람직하게는 1:100 내지 1:5, 더욱 바람직하게는 1:50 내지 1:10의 바이러스(PFU 또는 TCID₅₀에 의해 측정됨) 대 세포비로 접종한다. 바이러스는 세포의 부유액에 첨가되거나, 세포의 단층에 적용하고, 바이러스는 적어도 60분 동안, 그러나 일반적으로 300분미만으로, 바람직하게는 90 및 240분 사이로 25°C 내지 40°C, 바람직하게는 28°C 내지 37°C에 흡수된다. 감염된 세포 배양액(예를 들어 단층)은 동결-해동에 의하거나 효소적 작용에 의해 제거하여 수득한 배양 상청액의 바이러스 함량을 증가시킬 수 있다. 회수한 유동액은 이후 불활성화 시키거나 동결하여 보관한다. 배양된 세포는 대략 0.0001 내지 10, 바람직하게는 0.002 내지 5, 더욱 바람직하게는 0.001 내지 2의 감염의 다양성("m.o.i.")으로 감염시킬 수 있다. 한층 더 바람직하게는, 세포는 대략 0.01의 m.o.i로 감염된다. 감염된 세포는 감염 후 30 내지 60시간에 회수할 수 있다. 바람직하게는, 세포는 감염 후 34 내지 48시간에 회수한다. 한층 더 바람직하게는, 세포는 감염 후 38 내지 48시간에 회수한다. 프로테아제(전형적으로 트립신)는 일반적으로 바이러스 분비를 허용하기 위하여 세포 배양 동안에 첨가하고, 프로테아제는 배양 동안 임의의 적절한 단계, 예를 들어, 접종 전, 접종과 동시에, 또는 접종 후에 첨가할 수 있다[38].

[0140] 바람직한 구체예에서, 특히 MDCK 세포에서, 세포주는 임상시험용 줄기세포 은행으로부터 40 개체군-배가 수준을 넘어서 경과하지 않는다.

[0141] 바이러스 접종원 및 바이러스 배양액은 바람직하게는 단순 포진 바이러스, 호흡 융합체 바이러스, 파라인플루엔

자 바이러스 3, SARS 코로나바이러스, 아데노바이러스, 리노바이러스, 레오바이러스, 폴리오마바이러스, 비르나 바이러스, 치르코 바이러스, 및/또는 파보바이러스가 부재하다(즉 이 바이러스에 대한 시험을 수행하여, 이 바이러스에 대한 오염에 대하여 음성인 결과가 주어질 것이다)[39]. 단순 포진 바이러스의 부재가 특히 바람직하다.

[0142] **숙주 세포 DNA**

[0143] 바이러스가 세포주에서 자랐을 때, DNA의 임의의 발암 활성을 최소화하기 위하여 최종 백신에서 세포주 DNA의 잔여량을 최소화하는 것이 표준 실행이다.

[0144] 따라서 본 발명에 따라 제조된 백신 조성물은 숙주 세포 DNA의 극소량이 존재할 수 있지만, 바람직하게는 투여량 당 잔여 숙주 세포 DNA의 10 ng 미만(바람직하게는 1 ng 미만, 그리고 더욱 바람직하게는 100 pg 미만)을 함유한다.

[0145] 0.25 ml 부피 당 숙주 세포 DNA의 <10 ng (예를 들어 <1 ng, <100 pg)을 함유하는 백신과 같이, 헤마글루티닌의 15 µg 당 숙주 세포 DNA의 <10 ng(예를 들어 <1 ng, <100 pg)을 함유하는 백신이 바람직하다. 0.5 ml 부피 당 숙주 세포 DNA의 <10 ng (예를 들어 <1 ng, <100 pg)을 함유하는 백신과 같이, 헤마글루티닌의 50 µg 당 숙주 세포 DNA의 <10 ng(예를 들어 <1 ng, <100 pg)을 함유하는 백신이 더욱 바람직하다.

[0146] 임의의 잔여 숙주 세포 DNA의 평균 길이가 500 bp 미만, 예를 들어 400 bp 미만, 300 bp 미만, 200 bp 미만, 100 bp 미만, 등인 것이 바람직하다.

[0147] DNA의 오염은 예를 들어 크로마토그래피, 등의 표준 정제 절차를 사용한 백신 제조 동안에 제거할 수 있다. 잔여 숙주 세포 DNA의 제거는 예를 들어 DNase를 사용하는 것에 의한 뉴클레아제 처리에 의해 강화시킬 수 있다. 먼저 바이러스 성장 동안에 사용할 수 있는 DNase(예를 들어 벤조나아제) 및, 이후 비리온 붕괴 동안에 사용할 수 있는 양이온 세정제(예를 들어 CTAB)를 사용하는 두 단계 처리를 포함하는, 숙주 세포 DNA 오염을 감소시키기 위한 편리한 방법은 참고문헌 40 & 41에서 개시한다. 또한 β-프로피오락톤 처리에 의한 제거를 사용할 수 있다.

[0148] 잔여 숙주 세포 DNA의 측정은 이제 생물학에서 일상적으로 필수적인 요구이고, 당업자의 일반적인 능력 안에 있다. DNA를 측정하기 위해 사용한 분석은 전형적으로 유효한 분석일 것이다[42,43]. 유효한 분석의 수행 특성은 수학적 및 정량적 용어에서 기술할 수 있으며, 그것의 오류의 가능한 원인이 확인되었을 것이다. 분석은 정확성, 정밀성, 특이성과 같은 특성에 대하여 일반적으로 시험할 것이다. 일단 분석을 조정하고(예를 들어 숙주 세포 DNA의 알려진 표준 정량에 대하여) 실험하면, 이후 정량 DNA 측정을 일상적으로 수행할 수 있다. DNA 정량을 위한 세 가지 주된 기술을 사용할 수 있다: 서던 블롯 또는 슬롯 블롯과 같은 혼성화 방법[44]; Threshold™ 시스템과 같은 면역 측정 방법[45]; 및 정량 PCR[46]. 각각의 방법의 정확한 특성이 예를 들어 혼성화를 위한 탐침의 선택, 증폭을 위한 프라이머 및/또는 탐침의 선택, 등의 문제에서 숙주 세포에 의존적일 수 있지만, 이들 방법은 모두 당업자에게 잘 알려져 있다. *Molecular Devices*로부터 나온 Threshold™ 시스템은 피코그램 수준의 전체 DNA를 위한 정량 분석이고, 생물약학에서 오염 DNA의 수준을 관찰하기 위해 사용하였다[45]. 전형적인 분석은 비오틴화 ssDNA 결합 단백질, 우레아제-접합 항-ssDNA 항체, 및 DNA 사이의 반응 복합체의 비-서열-특이적 형성을 포함한다. 모든 분석 구성 요소는 제조사로부터 사용할 수 있는 완전한 전체 DNA 분석 키트에서 포함한다. 예를 들어 AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, 등의 다양한 상업적인 제조사가 잔여 숙주 세포 DNA를 검출하기 위한 정량 PCR 분석을 제공한다. 인간 바이러스 백신의 숙주 세포 DNA 오염을 측정하기 위한 형광발광 혼성화 분석 및 전체 DNA Threshold™ 시스템의 비교는 참고문헌 47에서 찾을 수 있다.

[0149] **균주 선별**

[0150] 본 발명에 따라 생산된 백신은 적어도 네 개의 인플루엔자 바이러스 균주를 포함한다. 다른 균주는 전형적으로 분리해서 성장할 것이고, 이후 바이러스를 회수한 다음 혼합하여, 항원을 준비하였다. 따라서 본 발명의 절차는 하나 이상의 인플루엔자 균주로부터 항원을 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[0151] 인플루엔자 A 바이러스는 최근에 16개의 HA 서브타입을 나타낸다: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 및 H16. 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 NA 서브타입 N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 또는 N9 중 하나 이상에 대하여 보호할 수 있다. 본 발명의 백신은 적어도 H1 균주, H3 균주 및 유행성 균주를 포함한다. 일부 구체예에서 H3 균주는 A/모스크바/10/99와 교차-반응한다. 다른 구체예에서 H3 균주는 A/푸

저우/411/2002와 교차-반응한다.

- [0152] 유행성 인플루엔자 군주의 특성은 (a) 최근에-돌고 있는 인간 군주, 즉 10년 동안 인간 개체군에서 분명하게 나타나지 않았거나(예를 들어 H2), 인간 개체군에서 조금도 보이지 않았던(예를 들어 오직 새 개체군에서만 일반적으로 발견된 H5, H6 또는 H9) 것의 헤마글루티닌과 비교하여 새로운 헤마글루티닌을 함유하고, 이 백신의 수여자 및 일반 인간 개체군은 군주의 헤마글루티닌에 대하여 면역학적으로 순진하며; (b) 인간 개체군에서 동종간에 전염되는 것에 능숙하고, 그리고 (c) 인간에게 병원성인 것이다. 유행성 군주는 H2, H5, H7 또는 H9 서브타입 군주 예를 들어 H5N1, H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 및 H7N7 군주를 포함할 수 있다. H5N1 군주가 전형적이다. 본 발명과 함께 사용하기 위한 유행성 군주는 2009년에 돼지로부터 인간에게 전염된 H1N1 군주로부터 유래할 수 있다. 따라서 유행성 군주는 서열번호 15보다 서열번호 14와 더욱 가까이 관련된 헤마글루티닌을 갖는 H1 군주일 수 있다(즉 그것은 동일한 알고리즘 및 매개 변수로 정렬하였을 때, 서열번호 15보다 서열번호 14와 더 높은 정도의 서열 동일성을 가짐).
- [0153] 인플루엔자 B 바이러스는 최근에 다른 HA 서브타입을 나타내지 않았으나, 인플루엔자 B 바이러스 군주는 두 개의 별개의 계통이 되었다. 이들 계통은 1980년대 후반에 드러났고, 서로에 대하여 항원성 및/또는 유전학적으로 구별될 수 있는 HA를 가진다[48]. 최근의 인플루엔자 B 바이러스 군주는 B/빅토리아/2/87-유사 또는 B/야마가타/16/88-유사 중 어느 하나이다. 이들 군주는 일반적으로 항원성이 구별되지만, 아미노산 서열에서의 차이가 두 계통을 구별하는 것, 예를 들어 B/야마가타/16/88-유사 군주가 종종(그러나 항상은 아님) 'Lee40' HA 서열에 대하여 번호를 매긴, 아미노산 잔기 164에서 결실이 있는 HA 단백질을 가지는 것에 대하여 기술하였다[49]. 일부 구체예에서 인플루엔자 B 군주는 B/빅토리아/2/87-유사 이다. 다른 구체예에서 인플루엔자 B 군주는 B/야마가타/16/88-유사이다.
- [0154] 본 발명과 함께 사용한 인플루엔자 바이러스는 재조합체 군주일 수 있고, 역유전학 기술에 의해 얻은 것일 수 있다. 역유전학 기술[예를 들어 50-54]은 플라스미드를 사용하여 시험관 내에서 제조할 수 있는, 원하는 유전체 단편이 있는 인플루엔자 바이러스를 허용한다. 전형적으로, 그것은 (a) 예를 들어 polI 프로모터 또는 박테리오파지 RNA 중합효소 프로모터로부터 나온 원하는 바이러스 RNA 분자를 암호화하는 DNA 분자, 및 (b) 예를 들어 polII 프로모터로부터 나온 바이러스 단백질을 암호화하는 DNA 분자를 발현시키는 단계를 포함하고, 이러한 세포에서의 DNA의 두 가지 타입 모두의 발현은 전체 전염성 비리온의 완전한 조립을 가져온다. DNA는 바람직하게는 모든 바이러스 RNA 및 단백질을 제공하지만, 또한 일부 RNA 및 단백질을 제공하기 위해 헬퍼 바이러스를 사용하는 것이 가능하다. 각각의 바이러스 RNA를 생산하기 위한 분리된 플라스미드를 사용한 플라스미드-기반 방법을 사용할 수 있고[55-57], 이들 방법은 또한 동일한 방법에서 사용할 수 있는 12개까지의 플라스미드로 바이러스 단백질의 전부 또는 일부(예를 들어 단지 PB1, PB2, PA 및 NP 단백질)를 발현시키기 위한 플라스미드의 사용을 포함할 것이다. 필요한 플라스미드의 수를 줄이기 위하여, 최근의 접근[58]은 동일한 플라스미드(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 전부의 인플루엔자 A vRNA 단편을 암호화하는 서열)에 복수의 RNA 중합효소 I 전사 카세트(바이러스 RNA 합성을 위해)를, 그리고 다른 플라스미드(예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 전부의 인플루엔자 A mRNA 전사체를 암호화하는 서열)에 RNA 중합효소 II 프로모터가 있는 복수의 단백질-암호화 영역을 결합시킨다. 참고문헌 58 방법의 바람직한 측면은 (a) 단일 플라스미드에 PB1, PB2 및 PA mRNA-암호화 영역을; 그리고 (b) 단일 플라스미드에 모든 8개 vRNA-암호화 단편을 포함한다. 하나의 플라스미드에 NA 및 HA 단편을, 그리고 다른 플라스미드에 여섯 개의 다른 단편을 포함하는 것도 상황을 촉진시킬 수 있다.
- [0155] 바이러스 RNA 단편을 암호화하기 위해 polI 프로모터를 사용하는 것에 대한 대안으로서, 박테리오파지 중합효소 프로모터를 사용하는 것이 가능하다[59]. 예를 들면, SP6, T3 또는 T7 중합효소에 대한 프로모터를 편리하게 사용할 수 있다. polI 프로모터의 종-특이성 때문에, 박테리오파지 중합효소 프로모터는 세포가 또한 외재적인 중합효소를 암호화하는 플라스미드로 형질전환 되어야만 함에도 불구하고, 많은 세포 타입(예를 들어 MDCK)에서 더욱 편리하게 사용할 수 있다.
- [0156] 다른 기술에서 단일 주형으로부터 바이러스 RNA 및 발현 가능한 mRNA를 동시에 암호화하기 위하여 polI 및 polII 이중 프로모터를 사용하는 것이 가능하다[60,61].
- [0157] 따라서 인플루엔자 A 바이러스는 A/PR/8/34 바이러스로부터 나온 하나 이상의 RNA 단편을 포함할 수 있다(전형적으로 백신 군주로부터 나와 존재하는 HA 및 N 단편이 있는 A/PR/8/34에서 나온 6개 단편, 즉 6:2 재조합체). 또한 A/WSN/33 바이러스, 또는 백신 제조를 위한 재조합체 바이러스를 생성하는데 유용한 임의의 다른 바이러스 군주로부터 나온 하나 이상의 RNA 단편을 포함할 수 있다. 인플루엔자 A 바이러스는 AA/6/60 인플루엔자 바이러스(A/엔아버/6/60)로부터 나온 6개미만(즉 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개)의 바이러스 단편을 포함할 수 있다. 인플루

엔자 B 바이러스는 AA/1/66 인플루엔자 바이러스(B/엔아버/1/66)로부터 나온 6개미만(즉 0, 1, 2, 3, 4 또는 5 개)의 바이러스 단편을 포함할 수 있다. 전형적으로, 본 발명은 인간-대-인간 전염이 가능한 균주에 대하여 보호하고, 그래서 균주의 유전체는 보통 포유 동물(예를 들어 인간에서) 인플루엔자 바이러스에서 기원한 적어도 하나의 RNA 단편을 포함할 것이다. 그것은 조류독감 바이러스에서 기원한 NS 단편을 포함할 수 있다.

[0158] 저항성 유행성 균주를 포함하여, 항원이 조성물에 포함될 수 있는 균주는 항바이러스 치료(예를 들어 오셀타미 비르[62] 및/또는 자나미비르에 대한 저항성)에 대하여 저항할 수 있다[63].

[0159] 특히 유용한 균주는 환자로부터의 분리 및 세포 배양액에서 복제를 포함하여 그 사이의 임의의 단계에서 난을 통과한 세대가 없는 것들이다. MDCK 세포를 분리에서 바이러스 복제까지 모든 단계에서 독점적으로 사용할 수 있다.

[0160] 일부 구체예에서, 본 발명과 함께 사용한 균주는 Sia(α 2,3)Gal 말단 이당을 갖는 올리고당과 비교하여 Sia(α 2,6)Gal 말단 이당을 갖는 올리고당에 대한 결합 선호성을 갖는 헤마글루티닌을 갖는다. 인간 인플루엔자 바이러스는 Sia(α 2,6)Gal 말단 이당(갈락토오스에 대하여 α -2,6에 연결된 시알산)을 갖는 수용체 올리고당에 결합 하지만, 난 및 Vero 세포는 Sia(α 2,3)Gal 말단 이당이 있는 수용체 올리고당을 갖는다. MDCK와 같은 세포에서 인간 인플루엔자 바이러스의 성장은 난을 통과하는 단계와는 달리, 천연 Sia(α 2,6)Gal 결합을 유지하기 위하여 헤마글루티닌에 대한 선별압을 제공한다.

[0161] 바이러스가 Sia(α 2,3)Gal 말단 이당을 갖는 올리고당과 비교하여 Sia(α 2,6)Gal 말단 이당을 갖는 올리고당에 대한 결합 선호성을 갖는지 여부를 결정하기 위하여, 다양한 분석을 사용할 수 있다. 예를 들면, 참고문헌 64는 민감도 및 친화도 상수의 정량 측정을 주는 인플루엔자 바이러스 수용체-결합 활성에 대한 고체-상 효소-결합 분석을 기술한다. 참고문헌 65는 두 가지 다른 시알릴당단백질(Sia(α 2,3)Gal 결정자를 갖는 오보뮤코이드; 및 Sia(α 2,6)Gal 결정자인 돼지 α 2-매크로글로불린)에 대한 바이러스의 결합을 평가한 고체-상 분석을 사용하였고, 또한 바이러스의 결합이 두 개의 수용체 유사체: 자유 시알산(Neu5Ac) 및 3'-시알락토오스(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc)에 대하여 평가한 분석을 기술한다. 참고문헌 66은 α 2,3 또는 α 2,6 연관에 대하여 명백히 분화된 수용체 선호성을 이용한 글리칸 어레이를 사용한 분석을 보고한다. 참고문헌 67은 Sia(α 2,6)Gal 또는 Sia(α 2,3)Gal 중 어느 하나를 함유하기 위해 효소적으로 변형된 인간 적혈구의 응집에 기초한 분석을 보고한다. 분석의 타입에 의존하여, 바이러스 자체로 직접 수행할 수 있고, 또는 바이러스로부터 정제된 헤마글루티닌을 이용하여 간접적으로 수행할 수 있다.

[0162] 일부 구체예에서 본 발명과 같이 사용한 인플루엔자 균주는 난-유래 바이러스와 다른 글루코실화 패턴의 당단백질(헤마글루티닌 포함)을 갖는다. 따라서 당단백질은 계란에서는 보이지 않는 당형태를 포함할 것이다.

[0163] 달리 지시한 경우를 제외하고, 유행성 균주를 사용한 이후, 그것은 H5N1 균주와 같은 H5 헤마글루티닌 서브타입에서 인플루엔자 A 바이러스로부터 나온 것일 것이다. H5 서브타입 내에서, 균주는 클레이드 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9에 있을 수 있다.

[0164] 2003년부터 조류 중에서 유행하는 대다수의 H5N1 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 서열은 2개의 별개의 계통 발생을 클레이드로 분리한다. 캄보디아, 태국 및 베트남에서 유행하는 클레이드 1 바이러스는 2004 및 2005년에 이들 국가에서, 2006년에는 태국에서 인간을 감염시켰다. 클레이드 2 바이러스는 2003년부터 중국 및 인도네시아에서 새에서 유행하였고; 그들은 중동, 유럽 및 아프리카에서 2005 및 2006년에 서쪽으로 퍼졌다. 2005년 후반부터, 클레이드 2 바이러스는 인간을 주로 감염시켜왔다. 클레이드 2의 다중 서브클레이드가 현저했고; 이들 세 개-서브클레이드 1, 2 및 3-는 지리학적 분포에서 달랐고, 여태까지 인간 케이스를 주로 담당해왔다. 또한 나아가 서브부분은 예를 들어 2.3.2 및 2.3.4를 포함하는 네 개의 부분이 있는 클레이드 2.3내로 알려졌다.

[0165] 2006년 8월 및 2007년 5월 사이, 조류 중에서 계속 유행하거나, 재출현한, 그리고 아프리카, 아시아 및 유럽에서의 산발적인 인간 감염과 관련된 H5N1 바이러스의 대다수의 HA 서열은 이미 지정된 계통 발생의 클레이드 및 서브클레이드로 분류되었다. 클레이드 1 바이러스는 태국 및 베트남에서 새에서의 발병 및 태국에서의 인간 감염에 책임이 있었다. 클레이드 2.1 바이러스는 인도네시아에서 가금류에서 계속 유행하였고, 인간 감염을 유발하였다. 클레이드 2.2 바이러스는 아프리카, 아시아 및 유럽의 일부 국가에서 발병을 유발하였고, 이집트, 이라크 및 나이지리아에서 인간 감염과 관계되었다. 클레이드 2.3 바이러스는 아시아에서 산발적으로 분리되었고, 중국 및 라오스에서 인간을 감염시켰다.

[0166] 게다가 이들 분류의 바깥으로 분류된 소수의 바이러스는 아시아에서 국지적으로 발병하는 동안에 가정의 가금류에서 분리되었다. 최근에 생겨난 클레이드로 분류된 이들은 A/거위/귀양/337/2006(클레이드 4) 및 A/닭/산시

/2/2006(클레이드 7)로써 표시하였다. 전체에서, 0 내지 9로 번호를 붙인 10개의 클레이드가 최근에 정의되었다.

[0167] 본 발명의 참고문헌에 대하여, 각 클레이드에 대한 원형 균주가 하기와 같이 그들의 헤마글루티닌 유전자의 암호화 서열과 함께 있다.

표 1

[0168]

클레이드	균주	서열번호
1	A/홍콩/213/03	1
2	A/인도네시아/5/05 균주	2
3	A/닭/홍콩/SF219/01	3
4	A/거위/귀양/337/2006	4
5	A/오리/관시/1681/2004	5
6	A/참새/해난/4/2004	6
7	A/닭/산시/2/2006	7
8	A/닭/해난/12/2004	8
9	A/오리/관시/2775/2005	9
0	A/닭/홍콩/156/97	10

[0169] 클레이드 1의 H5 바이러스는 본 발명에서 Phylip 패키지[68]에서의 수단으로서 DNADIST 알고리즘을 사용하여 평가하였을 때(예를 들어 기무라 2-매개 변수 거리 및 정방 행렬을 사용하여), 클레이드 0 및 2 내지 9(서열번호 2 내지 10)의 어느 것으로부터의 임의의 암호화 서열보다 A/홍콩/213/03 균주(서열번호 1)로부터의 암호화 서열에 더욱 가까이 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 인플루엔자 A 바이러스로서의 계통 발생 용어로 정의할 수 있다. 유사하게, 클레이드 2 바이러스는 클레이드 0, 1 및 3 내지 9(서열번호 1 및 3 내지 10)의 어느 것으로부터의 임의의 암호화 서열보다 A/인도네시아/5/05 균주(서열번호 2)로부터의 암호화 서열에 더욱 가까이 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는다. 다른 클레이드는 서열번호 1 내지 10에서의 다른 서열에 비하여 서열번호 1 내지 10의 상응하는 암호화 서열에 더욱 가까이 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열과 유사하게 계통 발생학적으로 정의한다.

[0170] 클레이드 1 바이러스는 본 발명에서 서열번호 2 내지 10 중 어느 것보다 A/홍콩/213/03 균주(서열번호 1)과 큰 서열 동일성이 있는 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 인플루엔자 A 바이러스로 부르는 핵산 서열로 정의할 수 있다. 다른 클레이드는 서열번호 1 내지 10에서의 다른 서열에 비하여 서열번호 1 내지 10으로부터 나온 상응하는 암호화 서열과 더욱 가까이 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열과 유사하게 정의한다.

[0171] H5 바이러스는 본 발명에서 특징지어진 HA 돌연변이에 대한 참고문헌[69]에서 언급된 아미노산 서열에서의 특정 클레이드인 것으로 정의할 수 있다. 예를 들면, 클레이드 3 바이러스는 클레이드 1 및 2로부터 분리된 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상을 가질 수 있다: Asn-45; Ser-84; Asn-94; Asn-124; Leu-138; Ser-144; Glu-212; Ser-223; 및/또는 Arg-325. 클레이드 2 바이러스는 클레이드 1 및 3에서는 보이지 않는 Asp-124를 가질 수 있다. 클레이드 1 바이러스는 클레이드 2 및 3으로부터 분리된 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상을 가질 수 있다: Ser-124; Leu-129.

[0172] 클레이드 2 내에서, 적어도 세 개의 서브클레이드를 인식하였다: 2.1, 2.2 및 2.3. A 클레이드 2.1 H5 바이러스는 본 발명에서 A/안후이/1/2005 균주(서열번호 11) 또는 A/칠면조/터키/1/05(서열번호 12) 중 어느 하나보다 A/인도네시아/5/05 균주(서열번호 2)에 더욱 가까이 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 것으로서 계통 발생 용어로 정의할 수 있다. 유사하게, 클레이드 2.2 H5 바이러스는 본 발명에서 A/안후이/1/2005(서열번호 11) 또는 A/인도네시아/5/05 균주(서열번호 2) 중 어느 하나보다 A/칠면조/터키/1/05 균주(서열번호 12)에 더 가까이 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 것으로서 계통 발생 용어로 정의할 수 있다. 최종적으로, 클레이드 2.3 H5 바이러스는 본 발명에서 A/칠면조/터키/1/05(서열번호 12) 또는 A/인도네시아/5/05 균주(서열번호 2) 중 어느 하나보다 A/안후이/1/05 균주(서열번호 11)에 더 가까이 관련된 헤마글루티닌 암호화 서열을 갖는 것으로서 계통 발생 용어로 정의할 수 있다.

[0173] 일부 구체예에서 서브클레이드 2.2에서의 균주는 하기 서열 중 하나 이상을 포함하는 HA를 가질 수 있다: Ile-223; Ile-230; Ile-517; ΔSer-133; 서열 REGRRRK를 갖는 절단 부위(서열번호 13). HA 유전자는 하기에서 하나 이상의 뉴클레오타드를 포함할 수 있다: A-41; A-142; A-209; A-295; G-433; A-467; A-496; C-610; A-627;

A-643; C-658; T-661; T-689; T-727; G-880; C-937; G-1006; T-1012; A-1019; T-1177; A-1235; T-1402; C-1415; T-1480; C-1510; T-1614; C-1615; A-1672; G-1708(이들 중 어느 것이 상응하는 코돈에 대하여 암호화된 아미노산이 변하거나 변하지 않을 수 있다). NA 유전자는 상응하는 코돈에 대하여 암호화된 아미노산을 변하게 하지 않을 것인 뉴클레오티드 A-743을 포함할 수 있다.

[0174] 쓸모 있게, 4가 혼합물에서, 본 발명은 다른 세 가지 다른 인플루엔자 A 바이러스 헤마글루티닌 서브타입(예를 들어 H1, H3, H5), 그러나 세 가지보다 적은 다른 인플루엔자 A 바이러스 뉴라미니다아제 서브타입(예를 들어 두 개: N1 및 N2)으로부터 나온 항원을 포함한다. 이 배열은 공통의 뉴라미니다아제 서브타입을 공유하는 다중 인플루엔자 A 바이러스 균주, 예를 들어 H1N1 및 H5N1을 사용하는 것으로부터 나온다. 이 공통 N 서브타입은 교차-보호를 증진시킬 수 있다[70].

[0175] 약학적 조성물

[0176] 본 발명의 키트는 면역원성 약학적 조성물(예를 들어 백신)의 즉석 제조에 사용할 수 있다. 이런 조성물은 일반적으로 인플루엔자 항원에 추가로 구성요소를 포함하고, 예를 들면 그들은 전형적으로 하나 이상의 약학적 담체 및/또는 첨가제를 포함한다. 이런 구성 요소의 철저한 논증이 참고문헌 71에서 사용가능하다. 많은 구체예에서 어주반트를 또한 포함할 수 있다.

[0177] 조성물은 일반적으로 투여 시점에서 수성 형태일 것이다.

[0178] 조성물은 티오메르살 또는 2-페녹시에탄올과 같은 방부제를 포함할 수 있다. 수은제 재료가 실질적으로 부재할 것인 백신(예를 들어 <10 µg/ml), 예를 들어 무-티오메르살이 바람직하다[14,72]. 수은을 함유하지 않는 백신이 더욱 바람직하다. 무-방부제 백신이 특히 바람직하고, α-토코페롤 숙신산을 수은제 화합물에 대한 대안으로서 포함할 수 있다[14]. 항원이 키트 내의 하나 이상의 용기에서 존재할 때, 일부 구체예에서 이들 용기의 각각은 방부제를 포함하나, 다른 구체예에서 오직 하나의 항원-함유 용기만 방부제를 포함한다. 어주반트가 항원으로부터 분리된 용기에 있을 때, 어주반트는 이상적으로 무-수은이다. 그러나 혼합 후, 방부제의 기원은 일반적으로 명백하지 않을 것이다.

[0179] 삼투압을 조절하기 위하여, 나트륨 염과 같은 생리학적 염을 포함하는 것이 바람직하다. 1 및 20 mg/ml 사이에서 존재할 수 있는 염화 나트륨(NaCl)이 바람직하다. 존재할 수 있는 다른 염은 염화 칼륨, 칼륨 디하이드로젠 인산염, 디나트륨 인산염, 및/또는 염화마그네슘 등을 포함한다. 어주반트가 항원과 분리된 용기에 있을 때, 염화 나트륨은 모든 용기에 존재할 수 있다.

[0180] 조성물은 200 mOsm/kg 및 400 mOsm/kg 사이, 바람직하게는 240-360 mOsm/kg 사이, 아마도 290-310 mOsm/kg의 범위 내의 몰랄 삼투압을 가질 수 있다.

[0181] 조성물은 하나 이상의 버퍼를 포함할 수 있다. 전형적인 버퍼는 인산염 버퍼; 트리스 버퍼; 붕산염 버퍼; 숙신산 버퍼; 히스티딘 버퍼(특히 수산화알루미늄 어주반트와 함께); 또는 시트르산 버퍼를 포함한다. 버퍼는 전형적으로 5-20 mM 범위로 포함될 것이다. 어주반트가 항원과 분리된 용기에 있을 때, 버퍼는 모든 용기에 존재할 수 있다.

[0182] 조성물의 pH는 5.0 및 8.1 사이, 및 더욱 전형적으로 6.0 및 8.0 사이 예를 들어 6.5 및 7.5, 또는 7.0 및 7.8 사이가 일반적일 것이다. 본 발명의 절차는 따라서 포장 전에 벌크 백신의 pH를 조정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0183] 조성물은 바람직하게는 살균한 것이다. 조성물은 바람직하게는 예를 들어 투여량 당 <1 EU(내독소 단위, 표준 측정), 바람직하게는 투여량 당 <0.1 EU를 함유하는 비-발열성이다. 조성물은 바람직하게는 무 글루틴이다.

[0184] 본 발명의 조성물은 쪼개진 또는 표면 항원 백신을 위하여 세정제 예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면 활성제('Tweens'로 알려진), 옥토시놀(옥토시놀-9(트리톤 X-100) 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올과 같은), 세틸 트리메틸 암모늄 브롬화물('CTAB'), 또는 나트륨 디옥시콜레이트를 포함할 수 있다. 세정제는 오직 극소량으로 존재할 수 있다. 따라서 백신은 옥토시놀-10 및 폴리소르베이트 80 각각을 1 mg/ml 미만으로 포함할 수 있었다. 다른 극소량의 잔여 구성 요소는 항생제(예를 들어 네오마이신, 카나마이신, 폴리믹신 B)일 수 있다. 어주반트가 항원과 분리된 용기에 있을 때, 이 세정제는 일반적으로 항원-함유 용기에 존재할 것이다(예를 들어 폴리소르베이트 80 및 옥토시놀 10과 함께 있는 항원).

[0185] 조성물은 단일 예방 주사를 위한 재료를 포함할 수 있거나, 다중 예방 주사를 위한 재료를 포함할 수 있다(즉, '다중 투약' 키트). 방부제의 함유물은 다중 투약 배열에서 바람직하다. 다중 투약 조성물에서 방부제를 포함하

는 것에 대한 대안으로서(또는 추가적으로), 조성물을 재료의 제거를 위한 방부제 어댑터를 갖는 용기에 함유할 수 있다.

[0186] 인플루엔자 백신은 어린이에 대해서는 절반의 투여량으로 투여되기는 하지만, 전형적으로 대략 0.5 ml의 투여량 부피에서 투여된다. 본 발명의 일부 구체예에서 조성물은 더 높은 투여량, 예를 들어 대략 1 ml, 예를 들어, 두 개의 0.5 ml 부피를 혼합한 다음 투여할 수 있다.

[0187] 조성물 및 키트는 바람직하게는 2°C 및 8°C 사이에서 저장한다. 이들은 동결되어서는 안 된다. 이들은 직사광선을 피해 보관하는 것이 이상적이다.

[0188] 어주반트

[0189] 사용 시점에서, 본 발명의 조성물은 조성물을 받을 환자에서 이끌어낸 면역 반응(체액성 및/또는 세포성)을 강화시키는 기능을 할 수 있는 어주반트를 포함하는 것이 유리할 수 있다. 수중유형 유제 어주반트(특히 스쿠알렌을 포함하는 하나)의 존재는 계절[73] 및 유행성[74,75] 인플루엔자 백신에 대한 면역 반응의 균주 교차-작용성을 강화하는 것을 보여주었다.

[0190] 유제 어주반트는 3가 계절 키트 구성 요소, 1가 유행성 키트 구성 요소와 함께, 또는 분리된 키트 구성 요소로서 포함할 수 있었다.

[0191] 본 발명과 함께 사용하기 위한 수중유형 유제는 전형적으로 오일 및 계면 활성제가 생분해성(대사가 가능한) 및 생체 적합성인, 적어도 하나의 오일 및 적어도 하나의 계면 활성제를 포함한다. 유제 내의 오일 방울은 일반적으로 직경이 5 μm 미만이며, 적합한 유제를 제공하기 위하여 극소 액체화기로 달성된 이들 작은 크기는 심지어 1 마이크로미터 이하의 직경을 가질 수도 있다. 220 nm 미만 크기의 방울이 여과 멸균을 실시할 수 있어 바람직하다.

[0192] 본 발명은 동물성(예로써, 어류) 또는 식물성원으로부터의 것과 같은 오일과 함께 사용될 수 있다. 식물성 오일은 견과, 종자, 곡물을 포함한다. 가장 흔하게 이용 가능한 땅콩 오일, 대두 오일, 코코넛 오일, 및 올리브 오일은 견과 오일의 예가 된다. 호호바 오일은, 예컨대, 호호바 열매로부터 획득되어 사용될 수 있다. 종자 오일은 홍화 오일, 면실 오일, 해바라기씨오일, 참깨씨 오일 등을 포함한다. 곡물 군에서, 옥수수 오일이 가장 용이하게 이용 가능하지만, 또한 밀, 귀리, 호밀, 쌀, 테프(teff), 라이밀 등과 같은 다른 곡류 곡물의 오일이 사용될 수도 있다. 종자오일에서 자연적으로 발생하지 않는 글리세롤 및 1,2-프로판디올의 6-10개의 탄소 지방산 에스테르는 견과 및 종자 오일로부터 출발하는 적합한 물질의 가수분해, 분리 및 에스테르화에 의해 제조될 수 있다. 포유동물 젖으로부터의 지방 및 오일은 물질대사가 가능하며, 따라서 본 발명의 실시예에 사용될 수 있다. 동물성원으로부터 순수한 오일을 획득하는데 필요한 분리, 정제, 비누화 및 다른 필요한 수단은 당업계에 공지되어 있다. 대부분의 어류는 용이하게 회수될 수 있는 대사가 가능한 오일을 함유한다. 본원에서 사용될 수 있는 몇몇의 어류 오일은, 예를 들어, 대구간 오일, 상어간 오일 및 경뇌와 같은 고래 오일로 예시된다. 많은 분지쇄 오일은 5-탄소 이소프렌 단위에서 생화학적으로 합성되며, 일반적으로 테르펜으로서 언급된다. 상어간 오일은 스쿠알렌, 2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥사엔으로서 알려진 분지, 불포화 테르펜을 함유하고, 이는 본원에서 특히 바람직하다. 또한, 스쿠알렌, 스쿠알란에 대한 포화 유사체는 바람직한 오일이다. 스쿠알렌 및 스쿠알란을 포함하는 어류 오일은 시중의 공급원으로부터 용이하게 이용가능하거나 또는 당업계에 공지된 방법으로 획득될 수 있다.

[0193] 다른 유용한 오일은 노령 환자(예를 들어 60 세 또는 그 이상)에서 사용할 때, 이 환자 그룹에서 면역 반응에서의 긍정적인 효과를 갖는 것으로 보고된 비타민 E 때문에, 백신에 유리하게 포함되는 토크페롤이다[76]. 또한 그들은 유제를 안정화시키는 것을 도울 수 있는 항산화제 성질을 갖는다[77]. 다양한 토크페롤이 존재하지만(α , β , γ , δ , ϵ 또는 ζ) α 를 일반적으로 사용한다. 바람직한 α -토크페롤은 DL- α -토크페롤이다. α -토크페롤 숙신산은 인플루엔자 백신과 함께 양립할 수 있고, 수은제 화합물에 대한 대안으로서 방부제로 유용할 것이 알려져 있다[14].

[0194] 오일의 혼합물, 예를 들어 스쿠알렌 및 α -토크페롤을 사용할 수 있다. 2-20%(부피에서)의 범위의 오일 함량이 전형적이다.

[0195] 계면활성제는 그것의 'HLB' (친수성/친유성 밸런스)에 의해 분류될 수 있다. 본 발명의 바람직한 계면활성제는 적어도 10, 바람직하게는 적어도 15, 및 더 바람직하게는 적어도 16의 HLB를 갖는다. 본 발명은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제(통상적으로 Tweens로서 언급됨), 특히 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; 상표명 DOWFAX™으로 판매되는 선형 EO/PO 블록 공중합체와 같은 에틸렌 옥사이드(EO), 프로필렌옥사이드(PO) 및/또는 부틸렌 옥사이드(BO)의 공중합체; 반복하는 에톡시 (옥시-1,2-에탄디일) 기의 수가 다양한 옥토시놀,

옥토시놀-9 (트리톤 X-100, 또는 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올)가 특히 해당됨; (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (IGEPAL CA-630/NP-40); 인지질, 예로써 포스파티딜콜린(레시틴); 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알코올로부터 유도되는 폴리옥시에틸렌 지방산 에테르(Brij 계면활성제로서 공지됨), 예로써 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르(Brij 30); 및 소르비탄 트리올레이트 (Span 85) 및 소르비탄 모노라우레이트와 같은 소르비탄 에스테르(흔히 Span으로서 알려짐)를 포함하는 계면활성제들을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 비-이온성 계면 활성제가 바람직하다. 유제에서 포함되기 위한 가장 바람직한 계면 활성제는 폴리소르베이트 80이다(폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레산; 트윈 80).

- [0196] 계면 활성제의 혼합물, 예를 들어 트윈 80/Span 85 혼합물을 사용할 수 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및 옥토시놀의 조합이 또한 적절하다. 다른 유용한 조합은 laureth 9에 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및/또는 옥토시놀을 합한 것을 포함한다.
- [0197] 바람직한 계면활성제의 양(중량%)은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(예로써, 트윈 80) 0.01 내지 1%, 특히 약 0.1%; 옥틸 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올(예로써, 트리톤 X-100, 또는 트리톤 시리즈 중 다른 세척제) 0.001 내지 0.1 %, 특히 0.005 내지 0.02%; 폴리옥시에틸렌 에테르(예로써, laureth 9) 0.1 내지 20 %, 바람직하게는 0.1% 내지 10% 및 특히 0.1 내지 1% 또는 약 0.5%이다.
- [0198] 스쿠알렌-함유 수중유형 유제, 폴리소르베이트 80을 함유하는 것들이 바람직하다. 본 발명과 함께 유용한 특정 수중유형 유제 어주반트는 하기를 포함하나 이에 제한되지 않는다:
- [0199] ● 스쿠알렌, 폴리소르베이트 80, 및 소르비탄 트리올레산의 초미세 유제. 부피 기준으로 유제 조성물은 약 5% 스쿠알렌, 약 0.5% 폴리소르베이트 80 및 약 0.5% Span 85일 수 있다. 중량 환산으로, 이들 비율은 4.3% 스쿠알렌, 0.5% 폴리소르베이트 80 및 0.48% Span 85가 된다. 이 어주반트는 'MF59'로 알려져 있으며[78-80], 참고문헌 81의 10장 및 참고문헌 82의 12장에 보다 상세하게 설명되어 있다. MF59 유제는 시트르산 이온, 예를 들어 10 mM 시트르산 나트륨 버퍼를 포함하는 것이 유리하다.
- [0200] ● 스쿠알렌, 토크페롤, 및 폴리소르베이트 80의 초미세 유제. 이들 유제는 2 내지 10% 스쿠알렌, 2 내지 10% 토크페롤 및 0.3 내지 3% 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있으며, 스쿠알렌: 토크페롤의 중량비로 더 안정적인 유제를 제공하기 위하여 바람직하게는 ≤ 1 (예컨대 0.90)이다. 스쿠알렌과 폴리소르베이트 80은 약 5:2의 부피비, 또는 약 11:5의 중량비로 존재할 수 있다. 이러한 하나의 유제는 트윈 80을 PBS에 용해시켜 2% 용액을 제공하고, 그 다음 90 ml의 이 용액을 (5 g의 DL- α -토크페롤 및 5 ml의 스쿠알렌)의 혼합물과 혼합한 뒤, 혼합물을 극소액체화하여 제조할 수 있다. 얻어진 유제는 예컨대 100 내지 250 nm, 바람직하게는 약 180 nm의 평균 직경의 서브마이크론 오일 방울을 가질 수 있다. 또한 유제는 3-디-O-아실화 모노포스포릴 리피드 A(3d-MPL)를 포함할 수 있다. 이 타입의 다른 유용한 유제는 인간 투여량 당 0.5-10 mg 스쿠알렌, 0.5-11 mg 토크페롤, 및 0.1-4 mg 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다[83].
- [0201] ● 스쿠알렌, 토크페롤, 및 트리톤 세정제(예를 들어 트리톤 X-100)의 유제. 이 유제는 또한 3d-MPL를 포함할 수 있다(하기 참조). 유제는 인산염 버퍼를 함유할 수 있다.
- [0202] ● 폴리소르베이트(예를 들어 폴리소르베이트 80), 트리톤 세정제(예를 들어 트리톤 X-100) 및 토크페롤(예를 들어 α -토크페롤 숙신산)을 포함하는 유제. 유제는 이들 세 성분을 약 75:11:10(예를 들어 750 μ g/ml 폴리소르베이트 80, 10 μ g/ml 트리톤 X-100 및 100 μ g/ml α -토크페롤 숙신산)의 질량비로 포함할 수 있으며, 이들 농도는 항원으로부터 이들 성분의 임의의 부담분을 포함하여야 한다. 또한 유제는 스쿠알렌을 포함할 수 있다. 유제는 또한 3d-MPL를 포함할 수 있다. 수성상은 인산염 버퍼를 함유할 수 있다.
- [0203] ● 스쿠알렌, 폴리소르베이트 80 및 플록사머 401("플루로닉™ L121")의 유제. 유제는 인산염 버퍼 살린, pH 7.4에서 제형화될 수 있다. 이 유제는 무라밀 디펩티드를 위한 유용한 전달 수단이고, "SAF-I" 어주반트(0.05-1% Thr-MDP, 5% 스쿠알렌, 2.5% 플루로닉 L121 및 0.2% 폴리소르베이트 80) 내 트레오닐-MDP와 함께 사용되었다[84]. 또한 이는 "AF" 어주반트에서와 같이 Thr-MDP 없이 사용될 수 있다[85](5% 스쿠알렌, 1.25% 플루로닉 L121 및 0.2% 폴리소르베이트 80). 마이크로유동화가 바람직하다.
- [0204] ● 스쿠알렌, 수성 용매, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 친수성 비이온성 계면활성제(예컨대 폴리옥시에틸렌 (12)세토스테아릴 에테르) 및 소수성 비이온성 계면활성제(예컨대 소르비탄 모노레이트 또는 'Span 80'과 같은 소르비탄 에스테르 또는 만니드 에스테르)를 포함하는 유제. 유제는 열가역적인 것이 바람직하고 및/또는 크기가 200 nm 미만인 오일 액적을 적어도 90%(부피)를 갖는다[86]. 유제는 알디톨; 동결억제제 (예컨대 도데실말토사이드 및/또는 수크로스)와 같은 당); 및/또는 알킬폴리글리코사이드 중 하나 이상을 포함할 수도 있다. 유제는

TLR4 작용제를 포함할 수 있다[87]. 이러한 유제는 동결 건조할 수 있다.

- [0205] ● 스쿠알렌, 폴록사머 105 및 Abil-Care의 유제[88]. 어주반트를 넣은 백신에서 이들 구성 요소의 최종 농도(중량)는 5% 스쿠알렌, 4% 폴록사머 105(폴루로닉 폴리올) 및 2% Abil-Care 85(비스-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 디메티콘; 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드)이다.
- [0206] ● 0.5-50%의 오일, 0.1-10%의 인지질, 및 0.05-5%의 비-이온성 계면활성제를 갖는 유제. 참고문헌 138에서 설명되는 바와 같이, 바람직한 인지질 성분은 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아닐린, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딘산, 스펡고미엘린 및 카디올리핀이다. 초미세 방울 크기가 유리하다.
- [0207] ● 비-대사성 오일(예로써, 경광유)의 초미세 수중유형 유제 및 적어도 하나의 계면활성제(예로써, 레시틴, 트윈 80 또는 Span 80). QuilA 사포닌, 콜레스테롤, 사포닌-친유성 접합(참고문헌 90에서 설명되는 GPI-0100과 같은, 글루쿠론산의 카르복실기를 통해 데스아실사포닌에 방향족 아민의 첨가에 의해 제조됨), 디메틸디옥타데실암모늄 브롬화물 및/또는 N,N-디옥타데실-N,N-비스(2-히드록시에틸)프로판디아민과 같은 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0208] ● 사포닌(예를 들어, QuilA 또는 QS21) 및 스테롤(예를 들어, 콜레스테롤)이 나선형 마이셀로 회합된 유제[91].
- [0209] ● 미네랄 오일, 비-이온성 친유성 에톡시화 지방 알콜 및 비-이온성 친수성 계면활성제를 포함하는 유제(예를 들어 에톡시화 지방 알콜 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 차단 공중합체)[92].
- [0210] ● 미네랄 오일, 비-이온성 친수성 에톡시화 지방 알콜 및 비-이온성 친유성 계면활성제를 포함하는 유제(예를 들어 에톡시화 지방 알콜 및/또는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 차단 공중합체)[92].
- [0211] 분리된 형태에 있든지, 적어도 하나의 항원과 이미 혼합되었던지 간에 전달시에 유제를 즉석에서 항원-함유 구성 요소와 혼합한다. 이들 두 가지 구성 요소가 액체일 때, 혼합을 위한 2가지 액체의 부피비는 다양할 수 있지만(예컨대, 5:1 내지 1:5), 일반적으로는 약 1:1이다.
- [0212] 항원 및 어주반트가 혼합된 다음, 헤마글루티닌 항원은 일반적으로 수성 용액에 남아있을 것이지만, 오일/물 경계면 주위에 분포할 것이다. 일반적으로, 임의의 헤마글루티닌이 유제의 오일 상에 들어갈 것이라면, 조금이다.
- [0213] **키트 구성 요소의 포장**
- [0214] 본 발명의 키트 구성 요소를 위한 적절한 용기는 바이알, 주사기(예를 들어 일회용 주사기), 등을 포함한다. 이들 용기는 멸균되어야 한다. 용기는 키트를 형성하기 위하여 함께, 예를 들어 동일한 박스 내에 포장될 수 있다.
- [0215] 구성 요소가 바이알에 위치하는 경우, 바이알은 유리 또는 플라스틱 재료로 만들어질 수 있다. 바이알은 조성물이 그것에 첨가되기 전에 멸균되는 것이 바람직하다. 라텍스-민감성 환자의 문제를 피하기 위하여, 바이알은 라텍스가 없는 마개로 밀봉하는 것이 바람직하며, 모든 포장 재료 내에 라텍스가 부재하는 것이 바람직하다. 바이알은 백신의 단일 투여량을 포함할 수 있거나, 1회 투여량 이상('다중 투약' 바이알), 예를 들어 10회 투여량을 포함할 수 있다. 바람직한 바이알은 무색 유리로 제조된다. 봉규산 유리가 소다 석회 유리에 대하여 바람직하다. 유리는 부틸 고무로 만들어진 마개를 가질 수 있다.
- [0216] 바이알은 적합한 마개(예를 들어 Luer lock)를 가질 수 있고, 이런 주사기는 마개를 통해 안으로 들어올 수 있다. V 바이알 마개는 밀봉부 또는 덮개 내부에 위치할 수 있고, 마개에 접근할 수 있기 전에 제거되어야 한다. 바이알은 그 내용물의 항균 제거를 허용하는 캡, 특히 다중 투약 바이알용 캡을 가질 수 있다.
- [0217] 구성 요소가 주사기 내로 포장되는 경우, 주사기는 이것에 부착된 바늘을 가질 수 있다. 바늘이 부착되지 않았다면, 별도의 바늘이 조립 및 사용을 위하여 주사기와 함께 제공될 수 있다. 이러한 바늘은 내장될 수 있다. 주사기의 플런저(plunger)는 흡인 동안 플런저가 사고로 제거되는 것을 예방하기 위하여 마개가 구비된 것이 바람직하다. 주사기는 라텍스 고무 캡 및/또는 플런저를 구비할 수 있다. 1회용 주사기는 단일 투여량의 백신을 함유한다. 주사기는 바늘 부착 전에 팁을 밀봉하기 위하여 팁 캡(tip cap)을 구비하는 것이 일반적일 것이며, 팁 캡은 부틸 고무로 제조될 수 있다. 주사기 및 바늘이 별도로 포장된다면, 바늘을 부틸 고무 차단재로 막는 것이 바람직하다. 유용한 주사기는 상표 "Tip-Lok"™으로 판매되는 것이다.
- [0218] 용기는 절반-용량 부피를 표시하여 어린이에 대한 전달을 용이하게 할 수 있다. 예를 들면, 0.5 ml 투여량을 함

유하는 주사기는 0.25 ml 부피를 나타내는 표시를 할 수 있다.

- [0219] 키트 또는 조성물은 백신의 상세 사항, 예를 들어 투여를 위한 지침서, 백신 내의 항원의 상세 사항 등을 포함하는 인쇄물과 (예를 들어, 동일 박스에) 포장될 수 있다.
- [0220] 다중-구성 요소 산물에서 환자 투여에 필요한 그보다 더 많은 재료를 포함하는 것이 일반적이고, 이러한 가득한 최종 투여량 부피는 재료 이동에서 임의의 비효율성에도 불구하고 행해진다. 따라서 개별 용기가 예를 들어 5-20%의 부피를 넘어서 채우는 것을 포함한다.
- [0221] **치료 방법 및 백신의 투여**
- [0222] 혼합한 후, 본 발명의 조성물은 인간 환자에게 투여하기에 적절하고, 본 발명은 환자에게 본 발명의 혼합된 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 면역 반응을 일으키는 방법을 제공한다.
- [0223] 또한 본 발명은 본 발명의 키트의 용기의 내용물(또는 주사기의 챔버)을 혼합하는 단계 및 환자에게 혼합된 내용물을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 면역 반응을 일으키는 방법을 제공한다
- [0224] 또한 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 키트를 제공한다.
- [0225] 또한 본 발명은 A가 제 1 용기의 내용물이고, B가 제 2 용기의 내용물일 때, 상술한바와 같은, 환자에서 면역 반응을 일으키기 위한 약제의 제조에서 A 및 B의 용도를 제공한다. 또한, 용도는 C가 세 번째 용기의 내용물일 때, 상술한바와 같은, C의 용도를 포함할 수 있다.
- [0226] 이들 방법 및 용도는 일반적으로 항체 반응, 바람직하게는 보호 항체 반응을 생성하기 위하여 사용될 것이다. 인플루엔자 바이러스 백신 접종 후의 항체 반응, 중화 능력 및 보호를 평가하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 인간 연구는 인간 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌에 대한 항체 역가가 보호와 연관되어 있음을 보여주었다(대략 30-40의 혈청 시료 헤마글루티닌화-억제 역가는 동종의 바이러스에 의한 감염으로부터 약 50% 보호를 제공함)[93]. 항체 반응은 일반적으로 적혈구응집 억제, 미세중화법, 일원 방사 면역확산(SRID), 및/또는 일원 방사 용혈(SRH)에 의하여 측정된다. 이들 분석 기술은 당업계에 공지되어 있다.
- [0227] 본 발명의 조성물은 다양한 방식으로 투여될 수 있다. 가장 바람직한 예방 주사 루트는 근육내 주입(예를 들어 팔 또는 다리)에 의한 것이나, 다른 이용 가능한 경로는 피하조직 주입, 비강내[94-96], 구강[97], 입, 설하선, 진피내[98,99], 경피, 피부[100] 등을 포함한다.
- [0228] 본 발명에 따라 제조된 백신은 성인 및 어린이 모두의 치료에 사용될 수 있다. 인플루엔자 백신은 현재 6개월령부터 소아 및 성인 예방 주사에 사용되도록 제안되고 있다. 따라서 환자는 1세 미만, 1 내지 5세, 5 내지 15세, 15 내지 55세, 또는 적어도 55세일 수 있다. 백신 투여에 바람직한 환자는 고령(예컨대 50세 이상, 60세 이상, 및 바람직하게는 65세 이상), 유아(예컨대 5세 이하), 입원 환자, 건강관리 종사자, 군인 및 군사 요원, 임산부, 만성 환자, 면역결핍 환자, 백신 투여 전 7일 이내에 항바이러스 화합물 (예컨대 오셀타미비르 또는 자나미비르 화합물; 하기 참조)을 투여한 환자, 난 알레르기가 있는 사람 및 해외여행자이다. 백신은 이들 그룹에 단독으로 적합하지는 않지만, 그러나 집단에서 보다 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0229] 바람직한 본 발명의 조성물은 효능에 대한 CPMP 기준 중 1, 2 또는 3을 만족시킨다. 성인의 경우(18-60세), 이들 기준은: (1) $\geq 70\%$ 혈청방어율; (2) $\geq 40\%$ 혈청 전환율; 및/또는 (3) GMT의 ≥ 2.5 배 증가이다. 고령자의 경우 (>60세), 이들 기준은: (1) $\geq 60\%$ 혈청방어율; (2) $\geq 30\%$ 혈청전환; 및/또는 (3) GMT의 ≥ 2 배 증가이다. 이들 기준은 적어도 50명의 환자를 대상으로 한 공개 표식 연구에 기초한다.
- [0230] 처치는 단일 투여 스케줄 또는 다중 투여 스케줄에 의할 수 있다. 다중 투여는 일차 예방 주사 스케줄에서 및/또는 부스터 예방 주사 스케줄에서 사용할 수 있다. 다중 투여 스케줄에서 다양한 투여량을 동일하거나 다른 루트, 예를 들어 비경구 프라임 및 점막 부스트, 점막 프라임 및 비경구 부스트 등으로 주어질 수 있다. 하나 이상의 투여량의 투여(전형적으로 2회 투여량)는 특히 면역학적으로 미경험 환자, 예를 들어 인플루엔자 백신을 사전에 투여 받은 경험이 없는 사람, 또는 신규한 HA 서브타입을 포함하는 백신에 유용하다. 다중 투여는 전형적으로 1주 간격(예를 들어 대략 2주, 대략 3주, 대략 4주, 대략 6주, 대략 8주, 대략 12주, 대략 16주 등)으로 투여될 것이다.
- [0231] 전형적인 예방 주사 스케줄에서, 본 발명의 조성물을 받기 전에(A-H3, A-H1, A-H5 및 B를 포함하는 적어도 4개의 인플루엔자 균주를 포함하는 것) 환자는 적어도 하나의 3가 계절 인플루엔자 백신(A-H3, A-H1 및 B 항원을 포함) 및, 적어도 하나의 유행성 인플루엔자 백신(전형적으로 1가 A-H5 백신)을 분리해서 맞았을 것이다. 4가

백신은 이들 면역 반응의 모두를 부스트 시키는데 사용할 수 있다. 따라서 환자는 A-H3, A-H1, B 및 A-H5 헤마글루티닌의 각각에 대한 항체를 분비하는 원형질 세포에 대하여 구별할 수 있는 B 세포를 이미 소유할 수 있다. 전형적으로 적어도 두개의 사전의 A-H5 백신 투여가 있었을 것이다.

[0232] 본 발명은 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 제 1 인플루엔자 바이러스 백신을 투여하는 단계; (ii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스와 같은 유행성 인플루엔자 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 백신을 두 번째로 투여하는 단계; 및 (iii) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 유행성 인플루엔자 바이러스 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신을 세 번째로 투여하는 단계를 포함하고, 단계 (i) 및 (ii)는 (a) 동시에 아니면 (b) 어느 순서로도 순차대로 수행되나 단계 (iii) 전에 수행되는, 인플루엔자 바이러스의 4개의 균주(H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주, 인플루엔자 B 바이러스 균주, H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주와 같은 유행성 인플루엔자 바이러스, 및 인플루엔자 B 바이러스 균주)에 대하여 환자에서 면역 반응을 일으키는 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 이 방법에서 사용하기 위한 제 1 백신 및 제 2 백신을 제공한다. 제 1 백신은 전형적으로 3가일 것이고, 제 2 백신은 1가일 것이고, 세 번째는 4가 일 것이다.

[0233] 또한 본 발명은 H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 유행성 인플루엔자 바이러스(예를 들어 H5N1과 같은 H5 인플루엔자 A 바이러스) 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 백신을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 환자는 사전에 (a) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신(예를 들어 3가) 및 (b) 유행성 인플루엔자 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신(예를 들어 1가)을 모두 분리해서 접종받은, 환자에서 면역 반응을 일으키는(예를 들어 부스팅) 방법을 제공한다.

[0234] 또한 본 발명은 H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 유행성 인플루엔자 바이러스(예를 들어 H5N1과 같은 H5 인플루엔자 A 바이러스) 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 백신을 환자에게 투여하는 단계, 그리고 난 후 분리해서 (a) H1N1 인플루엔자 A 바이러스, H3N2 인플루엔자 A 바이러스, 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신(예를 들어 3가) 및 (b) 유행성 인플루엔자 바이러스로부터 나온 항원을 포함하는 인플루엔자 바이러스 백신(예를 들어 1가)을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 면역 반응을 일으키는(예를 들어 부스팅) 방법을 제공한다.

[0235] 본 발명에 의해 생산된 백신은 다른 백신과 실질적으로 동시에, 예를 들어 홍역 백신, 볼거리 백신, 풍진 백신, MMR 백신, 수두 백신, MMRV 백신, 디프테리아 백신, 과상풍 백신, 백일해 백신, DTP 백신, 접합된 H.인플루엔자 타입 b 백신, 불활성화 폴리오바이러스 백신, B형 간염 바이러스 백신, 수막구균 접합 백신 (예컨대 4가 A-CW135-Y 백신), 호흡기 세포융합 바이러스 백신, 폐렴구균 접합 백신 등과 실질적으로 동시에(예컨대 동일한 의학 자문 또는 의료 전문가나 예방접종 센터에 방문 시에) 환자에게 투여할 수 있다. 폐렴구균 백신 및/또는 수막구균 백신을 실질적으로 동시에 투여하는 것이 노령의 환자에서 특히 유용하다.

[0236] 유사하게, 본 발명의 백신은 항바이러스 화합물, 특히 인플루엔자 바이러스에 대하여 활성인 항바이러스 화합물(예를 들어, 오셀타미비르 및/또는 자나미비르)이 실질적으로 동시에(예를 들어 동일한 의학적 자문 또는 의료 전문가 방문 시에) 환자에게 투여할 수 있다. 이들 항바이러스 제는 뉴라미니다아제 억제제, 예컨대 (3R,4R,5S)-4-아세틸아미노-5-아미노-3(1-에틸프로폭시)-1-시클로헥센-1-카르복시산 또는 5-(아세틸아미노)-4-[(아미노이미노메틸)-아미노]-2,6-무수-3,4,5-트리데옥시-D-글리세로-D-갈락토노-2-에논산 및 이들의 에스테르(예컨대 에틸 에스테르) 및 이들의 염(예를 들어 인산 염)을 포함한다. 바람직한 항바이러스제는 (3R,4R,5S)-4-아세틸아미노-5-아미노-3(1-에틸프로폭시)-1-시클로헥센-1-카르복시산, 에틸 에스테르, 인산(1:1)이며, 이는 오셀타미비르 인산염(TAMIFLU™)으로도 알려져 있다.

[0237] 제 1 및 제 2 용기의 특정 구체예

[0238] 일부 경우에서, 제 1 용기(또는 주사기 챔버)는 인플루엔자 A 바이러스의 H1N1 및 H3N2 균주 및 인플루엔자 B 바이러스로부터 나온 항원이 있는 3가 인플루엔자 백신을 포함하고, 제 2 용기(또는 주사기 챔버)는 예를 들어 NIBRG-14와 같은 A/베트남/ 1194/2004 균주, 또는 NIBRG-23과 같은 A/칠면조/터키/1/05 균주의 인플루엔자 A 바이러스의 H5N1 균주로부터 나온 항원이 있는 1가 인플루엔자 백신을 포함한다. 하나의 구체예에서, 3가 백신은 난 또는 MDCK 세포에서 자란 바이러스로부터 제조된 정제된 표면 항원 백신이고, 또한 1가 백신은 난 또는 MDCK 세포에서 자란 바이러스로부터 제조된 정제된 표면 항원 백신이다. 3가 백신은 어주반트를 포함하지 않지만, 1가 백신은 수증스쿠알렌 유제인 어주반트를 포함한다. 3가 백신은 균주 당 15 µg HA를 포함하지만, 1가

백신은 7.5 μg HA를 포함한다. 인간 투여량은 3가 및 1가 백신의 투여량을 예를 들어 1 ml의 투여량 부피로 제공하기 위하여 1:1 부피 비율로 혼합함으로써 만들어진다.

[0239] 1가 백신은 원하는 최종 농도로 제공하기 위하여, 예를 들어 FLUAD™과 비슷하지만 H5N1 균주의 1A 항원 투여량과 함께 유제의 0.25 ml을 벌크 항원의 0.25 ml과 혼합함으로써 만들어진다.

[0240] 다른 구체예에서, 3가 백신은 난으로부터 성장한 바이러스로부터 제조된 불활성화 백신(전형적으로 쪼개진)이고, 1가 백신은 난으로부터 성장한 바이러스로부터 제조된 쪼개진 백신이다. 3가 백신은 어주반트를 포함하지 않고, 1가 백신은 어주반트를 또한 포함하지만, 그들은 분리된 수중스쿠알렌형 유제로 공급된다. 3가 백신은 투여량 당 균주 당 15 μg HA를 포함하지만, 1가 백신은 투여량 당 3.75 μg HA를 포함한다. 따라서 4가 혼합된 산물은 투여량 당 H1N1, H3N2 및 B 바이러스 각각의 15 μg HA 및 H5N1 바이러스에 대하여 3.75 μg HA를 포함한다. 1가 용기 내의 항원 농도는 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 수 있다. 1가 백신은 티메로살을 포함할 수 있다(예를 들어 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 유제는 스쿠알렌, DL- α -토코페롤 및 폴리소르베이트 80을 각각 2.2:2.45:1의 질량 비율, 예를 들어 1068:1186:485로 포함한다. 인간 투여량은 3가 및 1가 백신 및 유제의 투여량, 예를 들어 0.5 ml 3가, 0.25 ml 1가 및 0.25 ml 유제를 혼합하는 것에 의해 만들어진다.

[0241] **요법**

[0242] 또한 본 발명은 환자가 6달 및 18달 사이에서 분리된 4가 백신의 두 번의 투여를 받는, 4가 인플루엔자 백신의 투여 요법을 제공한다. 4가 백신은 상술한바와 같이 즉석에서 제조될 수도 있고, 미리 혼합될 수도 있다(예를 들어 제조사에 의해 4가 혼합 백신으로서 배포된).

[0243] 따라서 본 발명은 (a)제 1의 4가 인플루엔자 백신을 인간에게 투여하는 단계; 및 이후 180 및 540일 사이 이후에, (b) 동일한 인간에게 제 2의 4가 인플루엔자 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 예방 접종하는 방법을 제공한다.

[0244] 또한 본 발명은 이 방법에 의해 인간을 예방 접종하는 것에서 사용하기 위한 제 1 및 제 2의 4가 인플루엔자 백신을 제공한다.

[0245] 또한 본 발명은 제 1 및 제 2 백신이 180 및 540일 사이에서 떨어져 동일한 인간에게 투여되는, 인간을 예방 접종하는데 사용하기 위한 약제의 제조에서 제 1 및 제 2의 4가 인플루엔자 백신의 용도를 제공한다.

[0246] 또한 본 발명은 180 및 540일 사이 이후에 제 2의 4가 인플루엔자 백신을 맞을 인간을 전-예방 접종하기 위한 약제의 제조에서 제 1의 4가 인플루엔자 백신의 용도를 제공한다.

[0247] 또한 본 발명은 인간이 제 1 백신을 맞기 180 및 540일 전에 제 1의 4가 인플루엔자 백신을 맞았던, 인간을 예방 접종하기 위한 약제의 제조에서 제 2의 4가 인플루엔자 백신의 용도를 제공한다.

[0248] 제 1의 4가 백신은 전형적으로 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주; (ii) H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주; (iii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주; 및 (iv) 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 면역원을 포함할 것이다. 또한 제 2의 4가 백신은 (i) H1N1 인플루엔자 A 바이러스 균주; (ii) H3N2 인플루엔자 A 바이러스 균주; (iii) H5N1 인플루엔자 A 바이러스 균주; 및 (iv) 인플루엔자 B 바이러스 균주로부터 나온 면역원을 전형적으로 포함할 것이다. 제 1 및 제 2 백신은 동일할 수 있지만, 전형적으로 그들은 적어도 하나의 균주에 의해 다를 것이고, 예를 들어 그들은 다른 A/H1N1 균주 및/또는 다른 A/H3N2 균주 및/또는 다른 A/H5N1 균주 및/또는 다른 B 균주로부터 나온 헤마글루티닌을 포함할 수 있다. 따라서 일부 구체예에서 오직 하나의 헤마글루티닌이 제 1의 4가 백신 및 제 2의 4가 백신에서 동일하다. 일부 구체예에서 제 1의 4가 백신 및 제 2의 4가 백신에서 오직 두 개의 헤마글루티닌이 동일하다. 일부 구체예에서 제 1의 4가 백신 및 제 2의 4가 백신에서 오직 세 개의 헤마글루티닌이 동일하다. 덜 전형적인 구체예에서 모든 네 개의 헤마글루티닌이 제 1의 4가 백신 및 제 2의 4가 백신에서 동일하다.

[0249] H5N1 인플루엔자 A 바이러스로부터 나온 면역원을 포함하는 것 대신에, 제 1 및 제 2 백신은 다른 비-H1 및 비-H3 인플루엔자 A 서브타입 예를 들면 H2, H5(하지만 H5N1은 아님), H7 또는 H9 인플루엔자 A 바이러스로부터 나온, 예를 들어 H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 또는 H7N7 균주로부터 나온 면역원을 포함할 수 있다.

[0250] 제 1 및 제 2의 4가 백신은 보통 동일한 타입 즉 둘 다 살아 있는 바이러스 백신, 둘 다 전체 비리온 백신이거나 쪼개진 비리온 백신, 둘 다 정제된 표면 항원 백신, 또는 둘 다 비리온 백신이다. 일반적으로 제 1 및 제 2는 둘 다 불활성화일 것이다.

- [0251] 제 1 및 제 2의 4가 백신은 어주반트를 모두 포함할 것이다. 적절한 어주반트는 상술하였다. 일부 구체예에서, 그러나, 오직 제 1 백신만 어주반트를 포함한다. 다른 덜 전형적인 구체예에서 둘 중 어느 것도 암호화되지 않는다.
- [0252] 두 백신은 전형적으로 연속적인 인플루엔자 계절에서, 예를 들어 11, 12 또는 13달 떨어진 것과 같이 10-14달 사이로 떨어져 제공된다.
- [0253] **일반**
- [0254] 용어 "포함하는"은 "포함하는"뿐만 아니라 "구성되는", 예를 들어 X를 "포함하는" 조성물은 X를 제외하고 구성될 수 있거나, 추가적인 무엇, 예를 들어 X + Y를 포함할 수 있음을 포괄한다.
- [0255] 단어 "실질적으로"는 "완전히"를 배제하지 않고, 예를 들어 Y로부터 "실질적으로" 자유로운 조성물은 Y가 완전히 없을 수 있다. 필요하다면, 단어 "실질적으로"는 본 발명의 정의로부터 생략될 수 있다.
- [0256] 수치와 관련하여 용어 "대략"은 선택적이고 평균값, 예를 들면, $x \pm 10\%$ 이다. 특별히 언급하지 않는 한, 두 개 이상의 구성 요소를 혼합하는 단계를 포함하는 절차는 혼합하는 것의 임의의 특정 순서를 요구하지 않는다. 따라서 구성 요소는 임의의 순서로 혼합할 수 있다. 세 개의 구성요소가 있을 때, 두 개의 구성 요소를 서로 결합시킬 수 있고, 그 다음 조합은 세 번째 구성 요소 등과 결합할 수 있다.
- [0257] 동물(및 특히 소) 재료를 세포의 배양에 사용하였을 때, 그들은 전염 가능한 스펜지폼 뇌질환(TSE)으로부터 자유로운, 특히 소 스펜지폼 뇌질환(BSE)으로부터 자유로운 근원으로부터 얻어야 한다. 전체에서, 동물-유래 재료의 전체적 부재가 배양 세포에서 바람직하다.
- [0258] 화합물이 조성물의 일부로서 신체에 투여될 때, 그 화합물은 선택적으로 적절한 프로드러그에 의해 교체될 수 있다.
- [0259] 세포 기질이 재분류 또는 역유전학 절차, 또는 바이러스 성장에 사용되었을 때, 예를 들어 Ph Eur general chapter 5.2.3에서와 같이, 인간 백신 생산에서 사용하기 위해 인가된 하나가 바람직하다.
- [0260] **본 발명을 실시하기 위한 방법**
- [0261] 계절 인플루엔자 백신을 A/H1N1, A/H3N2 및 B 균주로부터 나온 정제된 표면 당단백질을 포함하여 제조하였다. 15 μg /균주/투여량으로 주어지는 항원 농도는 ml당 균주 당 30 μg HA이었다.
- [0262] 전-유행성 백신을 인플루엔자 A 바이러스의 H5N1 균주(클레이드 1)으로부터 나온 정제된 표면 당단백질에 기초하여 제조하였다. 7.5 μg /투여량으로 주어지는 최종 항원 농도는 ml당 15 μg HA이었다. $2 \times$ 강도에서 벌크 항원은 최종 백신($1 \times$ 강도)을 제공하기 위해 MF59 수중유형 유제 어주반트($2 \times$ 강도)와 1:1 부피 비율로 혼합하였다.
- [0263] 이들 두 백신의 각각의 0.5 ml을 사용 시 혼합하고, 환자에게 1 ml의 전체 부피로 조합으로서 투여하였다. 비교를 위해, 다른 환자는 두 개의 백신을 분리해서 다른 팔에 주사 맞았다. 두 대조군 그룹은 계절 또는 전-유행성 백신 중 어느 하나를 주사 맞았다.
- [0264] 405명의 건강한 성인 전체(18-40세)를 8개의 그룹(49-52 피험체/그룹)으로 동등하게 임의로 추출하였다. 1일째에, 세 그룹은 한 팔에 전-유행성 백신, 그리고 동시에 다른 팔에 계절 백신을 맞았다('cone'그룹), 그리고 다른 세 그룹은 전-유행성 및 계절 백신의 즉석 혼합물을 맞았다('mix'그룹). 22일째에 'cone' 및 'mix'그룹으로부터 나온 22개 그룹은 전-유행성 백신 단독, 혼합된 백신을 맞거나, 또는 아무것도 맞지 않았다. 두 개의 교차 대조군 그룹은 전-유행성 또는 계절 백신 중 어느 하나를 1일 째에 맞았으나, 22일 째에는 다른 백신을 바꾸어 맞았다.
- [0265] 항체는 1, 22 및 43일 째에 헤마글루티닌화(HI), 미세중화(MN) 및 단일-방사 용혈작용(SRH)에 의해 평가하였다. 결과는 계절 백신의 평가를 위해 CHMP 기준의 맥락에서 해석하였다.
- [0266] 베이스라인 특성은 과거에 인플루엔자 백신 접종을 맞은 피험체의 부분을 제외하고, 일반적으로 실험 그룹 간에 유사하였다(전체적 평균: 15%). HI 분석에서, 백신의 면역학적 효능의 모든 세 가지 CHMP 기준은 계절 백신을 맞은 7개 그룹에서 모든 세 개의 계절 균주에 대하여 제 1 백신 접종 후에 생겼다. H5N1 균주에 대한 SRH 분석 결과는 계절 백신의 공동-투여를 사용한 방법에 개의치 않고, 전-유행성 백신의 두 개의 투여량을 맞은 4 개의 실험 그룹에서 제 2 백신 접종 후에 모든 CHMP 기준을 만족하였다. 비슷한 결과를 MN H5N1 분석에서

관찰하였다.

- [0267] 어주반트를 넣은 H5N1 전-유행성 백신은 면역원성이고, 계절 인플루엔자 백신과 조합하여 투여하였을 때, 잘 건넜다. 계절 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 역 반응은 계절 백신을 단독으로, 전-유행성 백신과 동시에 또는 혼합하여 투여하였을 때에 관계없이 유사하였다. 개별적인 연구에서, 18 내지 40세의 99명의 건강한 성인이 대량 연구의 일부로서, 전-유행성 백신의 하나의 투여량을 계절 백신의 하나의 투여량의 3주 전 또는 3주 후에 맞았다(2007 계절). 계절 백신(2008 계절)과 혼합한 다른 균주(클레이드 2)로부터 나온 항원을 사용한 부스터 H5N1 투여량은 1년 늦게 주어졌다. H5 균주 모두에 대한 항체를 혈청전환(SC) 및 혈청보호(> 40, SP)를 평가하기 위해 HI, MN 및 SRH에 의한 교차반응성을 평가하기 위해 1, 2 및 3 주 후에 측정하였다.
- [0268] 단일-투여량 프라이밍 후에, 전-유행성 백신을 동종 및 이종의 바이러스에 대하여 유사한 SC(>40%) 및 SP(>40%)로 백신 접종 3 주 후에 제공하였다. 이종의 부스터는 1 주 내로 동종 프라이밍의 충분한 두 개의 투여 후의 것과 동등한 전체 SC 및 SP 속도를 야기하는, 피험체의 90% 이상에서 면역 기억을 가리키는, 분명한 기왕성 반응을 생성하였다. SC 및 SP에 대한 CHMP 기준은 동종 및 이종의 균주 모두에 대하여 충족시키고, 넘어섰다.
- [0269] 따라서 전-유행성 백신의 단일 주사는 적어도 1년은 지속되는 면역 기억을 프라이밍하는데 충분하다. 게다가, 이종의 부스터는 허가에 대한 CHMP 기준을 넘는 기왕성 면역-반응을 초래하였다. 따라서 H5N1의 이종의 균주는 단일 전-유행성 프라이밍 투여 1년 후의 부스터로서, 계절 백신과 함께 조합하여 사용할 수 있다.
- [0270] 본 발명은 오직 예시의 수단으로써 기술되었음을 이해할 것이고, 변형은 본 발명의 범주 및 정신이 남아있는 한 가능할 것이다.