



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0048208  
(43) 공개일자 2013년05월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)  
A61P 31/16 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-7025971
- (22) 출원일자(국제) 2011년03월10일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2012년10월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/027993
- (87) 국제공개번호 WO 2011/112871  
국제공개일자 2011년09월15일
- (30) 우선권주장  
61/313,101 2010년03월11일 미국(US)
- (71) 출원인  
이문 디자인 코퍼레이션  
미국 98104 워싱턴주 시애틀 스위트 700 콜롬비아 스트리트 1124
- (72) 발명자  
클레그 크리스토퍼 에이치.  
미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트 1124 스위트 700  
리드 스티븐 지  
미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트 1124 스위트 700  
반 호에벤 닐  
미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트 1124 스위트 700
- (74) 대리인  
유미특허법인

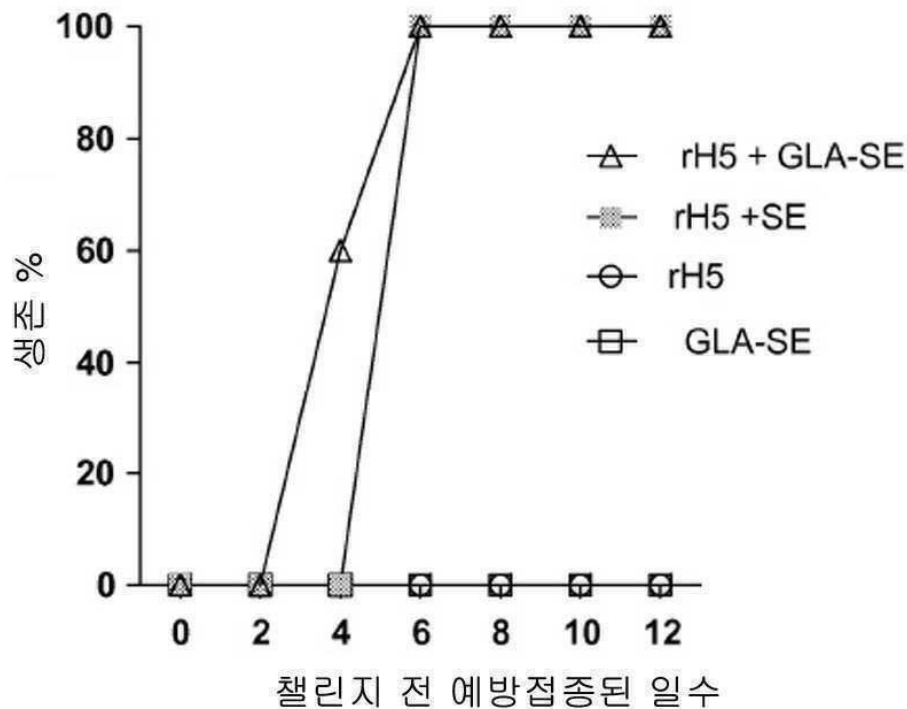
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 인플루엔자 백신

(57) 요약

전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 재조합체 적혈구응집소 및, GLA를 포함하는 보조제를 포함하는 약제학적 조성물 및 백신 조성물이 기재되어 있다. 특히 관련된 전-유행성 인플루엔자 바이러스는 H5N1이다. 당해 조성물을 사용한 키트 및 사용 방법이 또한 제공된다.

대표도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 재조합체 적혈구응집소(rHA) 및  
(b) 보조제를 포함하는 약제학적 조성물로서,

상기 보조제는 글리코실 및 아미노 치환된 글루코실로부터 각각 독립적으로 선택된 환원 말단 및 비-환원 말단을 갖는 이당류를 포함하며, 상기 비-환원 말단의 1 위치에서 탄소는 에테르(-O-) 또는 아미노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6' 위치의 탄소에 연결되어 있고, 상기 이당류는 비-환원 말단의 4' 탄소를 통해 인산염 그룹에 및 아마이드(-NH-C(O)-) 및/또는 에스테르(-O-C(O)-) 연결을 통해 다수의 지질 그룹에 결합되고, 상기 에스테르 또는 아마이드 연결의 카보닐(-C(O)-) 그룹은 지질 그룹에 직접 연결되며, 각각의 지질 그룹은 적어도 8개의 탄소를 포함하며,

약제학적 조성물의 단일 주사에 의해 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 이를 필요로 하는 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 약제학적 조성물의 투여가 단일 주사 후 집단의 적어도 50%에서 혈청전환을 달성하는, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 집단을 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 유액을 포함하지 않는, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 집단을 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 4

청구항 1 내지 3 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 오일을 포함하지 않는, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 집단을 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 보조제가 GLA인 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 집단을 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

### 청구항 6

- (a) 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 재조합체 적혈구응집소(rHA) 및  
(b) 보조제를 포함하는 약제학적 조성물로서,

상기 보조제가 글리코실 및 아미노 치환된 글루코실로부터 각각 독립적으로 선택된 환원 말단 및 비-환원 말단을 갖는 이당류를 포함하며, 상기 비-환원 말단의 1 위치에서 탄소는 에테르(-O-) 또는 아미노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6' 위치의 탄소에 연결되어 있고, 상기 이당류는 비-환원 말단의 4' 탄소를 통해 인산염 그룹에 및 아마이드(-NH-C(O)-) 및/또는 에스테르(-O-C(O)-) 연결을 통해 다수의 지질 그룹에 결합되고, 상기 에스테르 또는 아마이드 연결의 카보닐(-C(O)-) 그룹은 지질 그룹에 직접 연결되며, 각각의 지질 그룹은 적어도 8개의 탄소를 포함하며, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 이를 필요로 하는 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 용량 절약성(dosage sparing) 약제학적 조성물.

### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 rHA가 투여량-절약성인 양으로 존재하는, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

## 청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 rHA가 보조제의 부재하에서 보호 면역성을 제공하지 않는 농도로 존재하는, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

## 청구항 9

청구항 6 내지 8 중의 어느 한 항에 있어서, 단일의 재조합체 단백질을 포함하는, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

## 청구항 10

청구항 6에 있어서, 투여량당 rHA의 양이 약 15 내지 약 1 $\mu$ g의 범위인, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 대상체를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

## 청구항 11

청구항 6에 있어서, 상기 보조제가 GLA이고 상기 rH5가 H5N1 인플루엔자의 병원성 균주로부터 기원하는, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 연방 기금 연구에 관한 설명

[0002] 본 발명은 알레르기 및 감염성 질병의 국가 기관(The National Institute of Allergy and Infectious Diseases)에 의해 승인된 5R43AI081383-02하의 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 있어 특정 권리를 가질 수 있다.

[0003] 본 출원은 일반적으로 조류 독감(예를 들면, H5N1), 돼지 독감(예를 들면, H1N1), H7N7, 및 H9N2와 같은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자용 백신으로 사용하기 위한 조성물에 관한 것이다. 당해 조성물은 일반적으로 후보 인플루엔자 바이러스로부터의 재조합체 적혈구응집소 및 보조제를 포함한다.

### 배경기술

[0004] 유행병은 신규 질병이 출현하여 사람을 감염시킴으로써 심각한 병을 유발하고 사람들 사이에서 쉽게 확산되는 경우 장악하는 감염성 질병의 전 세계적인 유행병이다. 인플루엔자 유행병은, 신규 균주 또는 인플루엔자 바이러스의 아형이 다른 동물 중(예를 들면, 조류 또는 돼지)로부터 관련된 바이러스에 대한 노출 이전으로부터 면역성을 상실한 사람 집단으로 전염(transmitting)되는 경우 발생할 수 있다. 인플루엔자 유행병은 1500년대 말기와 같이 빨리 주목되었으며, 이때 이후로 주기적으로 발생되어, 가장 최근에는 1957년도의 "아시아 독감(Asian Flu)"(H2N2), 1968년도의 "홍콩 독감(Hong Kong Flu)"(H3N2) 및 2009년도의 "돼지 독감(Swine Flu)"(H1N1)이 있다. 1990년도에 출현한 H5N1 "조류 독감(Avian Flu)" 바이러스는 사람을 감염시켰으나 비효율적인 사람 대 사람 전염으로 인하여 유행병을 유발하지는 않았다. 국제 여행 및 도시화가 증가되면서, 신규 바이러스로 인한 인플루엔자 유행병의 확산은 매우 신속하게 유행병이 되는 것으로 예측되고 있다(참조: WHO, "Pandemic preparedness").

[0005] 조류 인플루엔자는 분절화된 RNA 게놈(Segmented RNA genome)을 함유하는 오르토믹소바이러스(Orthomyxovirus)에 의해 유발된다. 감염은 숙주 세포에서 시알산-결합된 당단백질에 대한 바이러스 적혈구응집소(HA) 단백질의 결합에 의해 개시된다. 적혈구응집소 단백질은 항원 및 서열 특성을 기초로 16개 아형으로 나누어질 수 있다. HA 이외에, 인플루엔자 바이러스는 감염 후 세포로부터 바이러스의 방출에 관여하는 추가의 표면 단백질인, 뉴라미니다제(NA)를 함유한다. 뉴라미니다제 단백질은 현재 9가지의 아형으로 분리되어 있다. 16개의 HA와 9개의 NA 아형의 모든 가능한 조합이 천연적으로 존재하는 것으로 고려되며, 여기서 야생 조류(예를 들면, 오리)는 무증상 바이러스 병원소(asymptomatic virus reservoir)로 제공된다. 때때로, 인플루엔자 바이러스는 새로부터 가끔류로 전염되며, 여기서 질병의 2개 형태가 기술되어 있다. 한 가지 형태는 일반적이지만 약하고,

다른 것은 드물지만 고도로 치명적이다. 가금류에서 고도로 병원성인 조류 인플루엔자 바이러스(HPAI) 감염은 일반적으로 H5 및 H7 아형에 의해 유발된다. HPAI 바이러스의 HA 단백질은 HA 분해 부위에서 염기성 아미노산의 세트에 의해 다른 덜 병원성인 H5 및 H7 아형 HA 단백질과 구별된다.

[0006] 특정의 HPAI 바이러스, 및 가금류와 사람의 상대적인 근접성은 조류 인플루엔자의 4개의 아형(H5N1, H7N3, H7N7, 및 H9N2)의 사람으로의 전염을 초래한다. H7 또는 H9 아형 바이러스에 의한 사람의 감염은 일반적으로 약하고, 치명적이지 않은 질병을 초래한다. 대조적으로, H5 아형 바이러스에 의한 사람의 감염은 심각하고, 흔히 치명적인 질병을 초래한다(참조: "Cumulative number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO, 17 February 2010, www.who.int).

[0007] 야생 조류 및 가축 조류에서 바이러스의 지리학적 확산과 결합된, H5N1 바이러스에 의한 사람의 연속된 감염은 H5N1 바이러스의 유전적 진화를 초래하여 왔으며, 이는 현재 명확한 계통분기(clades) 및 아계통분기(subclades)로서 유전적으로 및 항원적으로 분류될 수 있다(참조: WHO Global Influenza Program Surveillance Network, *Emerging Infectious Dis* 11:1515-1521, 2005). 이들 신규 바이러스 중 어느 것도 사람 중에서 용이하게 전파하는 능력을 획득한다면, H5N1 인플루엔자 유행병의 경향성은 높아진다. H5N1 감염과 관련된 사망률이 높아지면, 이러한 유행병과 관련된 강력한 세계적인 충격은 매우 심각할 수 있다. 그 결과, WHO는 유행병 경보 과정을 개시하였다.

[0008] 인플루엔자 유행병을 막기 위한 백신의 개발은 WHO 및 많은 정부의 경우 인플루엔자 유행병 대비 계획의 초석이다. 유행병 백신의 안전하고 효과적인 투여량의 방대한 수가 미국 및 세계의 나머지 지역에서 강력한 요구를 충족시키기 위해 요구되고 있다. 현재 순환하는 전-유행성 균주에 대한 백신의 저장(stockpiling)은 현재 유행병 예방 전략의 중요한 성분이다. 새로이 출현하는 유행성 바이러스와 동일하지 않은 경향이 있을 이들 백신은 충분한 보호를 제공할 것인 한편, 보다 특이하고, 균주와 일치한 백신이 개발중인 것으로 예측된다. 지금까지, 3개의 H5N1 백신(2개의 분할-비리온(split-virion) 및 하나의 전체-비리온(whole-virion))이 규제적인 승인을 받았으며 몇가지 추가의 백신이 말기 단계 개발 중에 있다.

[0009] 많은 국가들에서 현재 이들 백신을 비축하고 있으며 단기 미국 목표는 2천만명의 사람들을 치료하기에 충분한 백신을 축적하는 것이다. 그러나, 다수의 과학적, 기술적, 및 경제적 과제(challenge)들이 세계적인 독감 유행병에 대한 준비를 복잡하게 한다. 중요하게도, 전통적인 계란에 기초한 방법에 의한 전-유행병 또는 유행병 백신의 제조는 시간 소모적이고, 고가이며, 세계적으로 고-위험군 개인을 면역화하기에 충분한 백신 투여량을 제조하기 위해 수십억개의 계란을 필요로 할 것이다. 약화된 바이러스를 생산하기 위한 대안의 세포-기초한 전략이 개발중에 있지만, 이들 잡종(reassortant) 바이러스는 전형적으로 비교적 낮은 수준의 백신 항원을 함유한다. 이러한 낮은 항원 수율은, 조류 H5 적혈구응집소가 다른 아형으로부터의 HA보다 사람에 있어 고유하게 덜 면역원성인 것으로 여겨지므로, H5N1 백신과 관련하여 특히 관심이 되고 있다. 그 결과, 보다 많은 항원 투여량이 계절성 인플루엔자 백신에 대한 항체 반응을 유도하기 위해 요구되고 있다. 더욱이, 사람은 H5 적혈구응집소에 대해 면역학적으로 나이브(naive)하므로, 1회-투여량의 면역화 계획은 보호성이 아닐 수 있다. 이러한 점을 설명하기 위하여, H5 계통 분기 1 바이러스(A/Vietnam/1203/2004)를 기초로 하는 첫번째의 FDA-승인된 백신은 연구 참여자의 단지 54%에서 "보호성" 중화 역가를 유도하였으며 계절성 백신의 HA 함량의 12배인 90 $\mu$ g의 HA에서 2회 투여량을 필요로 하였다(참조: Treanor et al. *New Engl J Med* 354: 1343-1351, 2006).

[0010] 백신 생산능을 유의적으로 증진시킬 수 있으면서, H5N1 면역원성을 동시에 증가시킬 수 있는 추가의 기술이 요구되고 있다. 전-유행병 백신에 대한 이상적인 프로파일(profile)은, 이것이 용이하고 저렴하게 제조되며 긴 저장 수명을 갖는다는 것이다. 중요하게는, 이는 최소의 항원을 사용하여 강건한 보호성 면역 반응을 생성하여야 하며, 유전적으로 명확한 바이러스, 및 이상적으로 상이한 계통 분기로부터의 것들에 대해 교차-보호를 제공하여야 한다. 또한, 백신이 또한 안정하여야만 한다.

## 발명의 내용

### 요약

[0012] 본 발명은 백신으로 사용하기 위한 조성물 및 백신을 사용하여 피험자를 면역화시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 백신은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 재조합체 적혈구응집소 및, 보조제(adjunct)를 포함한다. 하나의 구체예에서, 보조제는 글리코실 및 아미노 치환된 글루코실로부터 각각 독립적으로 선택된 환원 말단 및 비-환원 말단을 갖는 이당류로서 기술된 화합물(DSLP 화합물)이며, 여기서 비-환원 말단의 1번 위치에서 탄소는 에테르(-O-) 또는 아미노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6번 위치의 탄소에 연결되어 있고,

이당류는 비-환원 말단의 4번 탄소를 통해 인산염 그룹에 및 아마이드(-NH-C(O)-) 및/또는 에스테르(-O-C(O)-) 연결을 통해 다수의 지질 그룹에 결합되고, 여기서 에스테르 또는 아마이드 연결의 카보닐(-C(O)-) 그룹은 지질 그룹에 직접 연결되며, 각각의 지질 그룹은 적어도 8개의 탄소를 포함한다. 특수한 조성물 및 방법에서, 보조제는 GLA(참조: 예를 들면, 미국 특허원 공보 제2008/0131466호)이며, 이는 다양한 구체예에서, 오일이 함유되지 않거나, 수중유(oil-in-water) 유제로 제형화되거나 명반, 알루미늄 염과 같은 다른 보조제와 함께 제형화된다. 특수한 목적의 적혈구응집소는 고 병원성 H5N1 바이러스로부터의 H5 및 H1N1("돼지 독감") 유행성 인플루엔자로부터의 H1을 포함한다. 상기 조성물은 용량-절약적(dosage-sparing)일 수 있고/있거나 제조합체 적혈구응집소는 투여량-절약적(dose-sparing)인 양으로 존재할 수 있다. 방법들은 피험자를 단일 주사, 즉, 조성물의 다수 주사가 아닌 주사로 면역화시킴을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 다음 중 하나 이상(즉, 이의 특정 조합)에 의해 정의될 수 있다: rHA는 투여량-절약적인 양으로 존재하며; rHA는 보조제의 부재하에서 보호 면역성을 제공하지 않는 농도로 존재하고; rHA는 조류 인플루엔자의 병원성 균주로부터 기원하며, rHA는 H5N1 인플루엔자의 병원성 균주로부터 기원하고; rHA는 계통 분기 1 또는 계통 분기 2로부터 기원하며; rHA는 유행성 돼지 독감 바이러스 균주로부터 기원하고; rHA는 유행성 H1N1 균주로부터 기원하며; 상기 조성물은 단일의, 즉 1회 이하의 명백한 제조합체 단백질을 포함하며; 투여량당 rHA의 양은 약 15 내지 약 0.1  $\mu\text{g}$ 의 범위이고; rHA는 바람직한 수준의 글리코실화를 달성하기 위하여 곤충 또는 포유동물 세포로부터 발현되고; rHA는 융합 단백질로서 발현되며; 보조제는 단독으로 존재하거나 GLA를 포함하고; 보조제는 단독으로 존재하거나 3D-MPL을 포함하며, 조성물은 오일을 함유하지 않고; 상기 조성물은 약 1% v/v 미만의 오일 또는 약 0.1% v/v 미만의 오일을 포함하고; 보조제는 항원과 결합되기 전에 수용액으로 제형화되며; 보조제는 항원과 결합되지 전에 리포솜-함유 조성물로 제형화되고; 상기 조성물은 알루미늄 염 또는 사포닌을 추가로 포함한다.

[0013] 하나의 구체예에서, 본 발명은 (a) 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 제조합체 적혈구응집소(rHA) 및 (b) 보조제를 포함하는 약제학적 조성물의 단일 주사를 투여함을 포함하여, 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 이를 필요로 하는 피험자를 면역화시키는 방법을 제공하며, 여기서 보조제는 글리코실 및 아마노 치환된 글루코실로부터 각각 독립적으로 선택된 환원 말단 및 비-환원 말단을 갖는 이당류를 포함하며, 여기서 비-환원 말단의 1번 위치에서 탄소는 에테르(-O-) 또는 아마노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6번 위치의 탄소에 연결되어 있고, 이당류는 비-환원 말단의 4번 탄소를 통해 인산염 그룹에 및 아마이드(-NH-C(O)-) 및/또는 에스테르(-O-C(O)-) 연결을 통해 다수의 지질 그룹에 결합되고, 여기서 에스테르 또는 아마이드 연결의 카보닐(-C(O)-) 그룹은 지질 그룹에 직접 연결되며, 각각의 지질 그룹은 적어도 8개의 탄소를 포함하고, 여기서 투여는 단일 주사 후 혈청전환을 달성한다. 개별적으로나 또는 특정 조합으로 본 발명을 추가로 정의할 수 있는 각종 구체예에서, 조성물은 유액을 포함하지 않으며; 상기 보조제는 GLA이고, 상기 보조제는 3D-MPL이다.

[0014] 예를 들면, 본 발명은 하나의 구체예에서 하기 약제학적 조성물의 단일 주사의 방식으로 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 이를 필요로 하는 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한, (a) 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 제조합체 적혈구응집소(rHA) 및 (b) 보조제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 보조제는 글리코실 및 아마노 치환된 글루코실로부터 각각 독립적으로 선택된 환원 말단 및 비-환원 말단을 갖는 이당류를 포함하며, 여기서 비-환원 말단의 1번 위치에서 탄소는 에테르(-O-) 또는 아마노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6번 위치의 탄소에 연결되어 있고, 이당류는 비-환원 말단의 4번 탄소를 통해 인산염 그룹에 및 아마이드(-NH-C(O)-) 및/또는 에스테르(-O-C(O)-) 연결을 통해 다수의 지질 그룹에 결합되고, 여기서 에스테르 또는 아마이드 연결의 카보닐(-C(O)-) 그룹은 지질 그룹에 직접 연결되며, 각각의 지질 그룹은 적어도 8개의 탄소를 포함한다. 약제학적 조성물은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 집단을 면역화하는 방법에서 사용될 수 있으며, 여기서 조성물의 투여는 단일 주사 후 집단의 적어도 50%, 또는 적어도 60% 이상에서 혈청전환을 달성한다. 하나의 측면에서, 약제학적 조성물은 어떠한 오일도 포함하지 않는데, 즉, 오일-비함유(oil-free)이거나, 조성물의 혈청전환 효능에 영향을 미치지 않는 오일을 미량 함유하고, 어떠한 오일-함유 유액도 포함하지 않는다. 이들 구체예 중 어느 것과 함께, 본 발명의 하나의 측면은 보조제로서 GLA를 사용하는 것이다. 다른 측면에서, 3D-MPL이 보조제로서 사용될 수 있다.

[0015] 다른 예로서, 본 발명은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 이를 필요로 하는 피험자를 면역화시키는 방법에서 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 상기 조성물은 (a) 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 제조합체 적혈구응집소(rHA) 및 (b) 보조제를 포함하며, 여기서 보조제는 글리코실 및 아마노 치환된 글루코실로부터 각각 독립적으로 선택된 환원 말단 및 비-환원 말단을 갖는 이당류를 포함하며, 여기서 비-환원 말단의 1번 위치에서 탄소는 에테르(-O-) 또는 아마노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6번 위치의 탄소에 연결되어 있고, 이당류는 비-환원 말단의 4번 탄소를 통해 인산염 그룹에 및 아마이드(-NH-



C(O)- 및/또는 에스테르(-O-C(O)-) 연결을 통해 다수의 지질 그룹에 결합되고, 여기서 에스테르 또는 아마이드 연결의 카보닐(-C(O)-) 그룹은 지질 그룹에 직접 연결되며, 각각의 지질 그룹은 적어도 8개의 탄소를 포함하고, 여기서 조성물은 용량 절약(dosage sparing)적이다. 상기 약제학적 조성물은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 피험자를 면역화하는 방법에서 사용될 수 있으며, 여기서 rHA는 투여량-절약적인 양으로 존재한다. 개별적으로나 또는 특정 조합에서 본 발명을 추가로 정의할 수 있는 각종 구체예에서, rHA는 보조제의 부재하에서 보호 면역성을 제공하지 않는 농도로 존재하며; 상기 조성물은 단일의, 즉, 1개 이하의 재조합체 단백질을 포함하고; 투여량당 rHA의 양은 약 15 내지 약 1 $\mu$ g의 범위이며; 상기 보조제는 GLA이고 상기 rH5는 H5N1 인플루엔자의 병원성 균주로부터 기원한다.

[0016] 이들 및 다른 측면은 다음의 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조로 명백해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1a 내지 1c. rH5/GLA-SE 백신의 단일 주사는 H5N1 감염에 대해 마우스를 보호한다. (a) 마우스(5마리/그룹)을 2% v/v SE 유액 또는 GLA-SE 보조제 (20  $\mu$ g GLA) 속에 제형화시킨 50, 150, 450, 900, 또는 2700 ng의 rH5(VN)으로 1회 면역화시킨 후 14일 후에 H5N1 바이러스(1000 $\times$ LD<sub>50</sub>)로 챌린지(IN)하였다. 그룹당 최대 체중 손실 퍼센트의 평균을 2주 기간에 걸쳐 각각의 그룹에 대해 측정하였다. 곡선아래의 영역(시간에 따른 체중 손실 퍼센트)을 각각의 투여량의 rH5에 대해 측정하였다. (b) 바이러스 챌린지 후 연속된 수 일 후에 마우스에서 체중 감소 퍼센트. 마우스를 SE 단독으로 또는 GLA-SE 보조제와 함께, 또는 GLA-SE 또는 SE와 함께 단백질의 부재하에서 제형화된 50 ng의 rH5로 예방접종하였다. 각각의 데이터 점은 그룹당 평균 체중 손실 +/- s.e.m.을 나타낸다. (c) c57Bl/6 마우스에서 보조제-매개된 rH5 보호. 동물(5마리/그룹)을 GLA-SE 단독 또는 2% v/v SE 단독, 5  $\mu$ g GLA 단독, 또는 5 $\mu$ g GLA-SE와 함께 제형화된 50 ng의 rH5(VN)으로 1회 예방접종하였다. 마우스를 14일 후에 H5N1 Viet Nam 1203 바이러스(1000 $\times$ LD<sub>50</sub>)로 챌린지(IN)하고 생존 및 체중 감소에 대해 모니터링하였다. 각각의 데이터 점은 그룹당 평균 체중 감소 +/- s.e.m.을 나타낸다.

도 2. GLA-SE 보조제는 이중 H5N1 바이러스를 사용한 챌린지 후 예방접종된 마우스에서 생존을 증진시킨다. 동물(5마리/그룹)을 GLA-SE 보조제와 함께 제형화된 50ng의 동종 (VN) rH5, GLA-SE 보조제 속에 제형화된 50ng 또는 200ng의 이중(Indo) rH5, 또는 200ng의 이중 rH5 단독 또는 SE 유액과 함께 제형화된 rH5로 예방접종하였다. 마우스를 14일 후에 H5N1 Viet Nam 1203 바이러스 (1000 $\times$  LD<sub>50</sub>)로 챌린지(IN)하고 생존 및 체중 감소에 대해 모니터링하였다. 각각의 데이터 점은 그룹당 평균 체중감소 +/- s.e.m.을 나타낸다.

도 3a 내지 3c. GLA-SE는 항원 특이적인 면역성의 유도를 가속화시키고 질병으로부터 회복시킨다. (a) 챌린지 전 예방접종된 일의 함수로서 마우스에서 생존 퍼센트. 마우스를 50 ng의 rH5 단독 또는 SE 또는 GLA-SE와 함께 제형화된 rH5, 또는 GLA-SE 단독으로 예방접종하고 H5N1 Viet Nam 1203 바이러스 (1000 $\times$ LD<sub>50</sub>)로 예방접종 한후 0, 2, 4, 6, 8, 10, 또는 12일 후에 챌린지(IN)하였다. (b) 바이러스 챌린지 전 6 또는 14일 후에 SE 또는 GLA-SE와 함께 제형화된 rH5 또는 rH5 단독 50ng으로 예방접종된 마우스에서 시간에 걸친 체중 감소 퍼센트. (c) 관찰 점수매김 시스템; 0 = 정상; 1 = 의심스러운 질병; 2 = 약하지만 명확한 질병; 3 = 약한 질병; 4 = 심각, 빈사 상태를 기준으로 (b)로부터의 마우스에서 일반적인 건강에 있어서의 변화.

도 4a 내지 4c. GLA-계 rH5 백신은 동종 및 이중 바이러스 챌린지 후 마우스에서 내구성의 보호성 면역성을 제공한다. (a) 마우스(5마리/그룹)를 50ng의 동종 (VN) rH5 단독 또는 나타낸 바와 같이 제형화된 동종(VN) rH5로 예방접종하고 H5N1 Viet Nam 1203 바이러스 (1000 $\times$ LD<sub>50</sub>)를 사용하여 46일 후 챌린지하였다. 마우스를 챌린지 후 2주 동안 체중 변화에 대해 매일 모니터링하였다. 각각의 데이터 점은 그룹 당 평균 체중 감소 +/- s.e.m.을 나타낸다. (b) 마우스 (5마리/그룹)을 50ng의 이중(Indo) rH5 단독으로 또는 나타낸 바와 같이 제형화된 이중 (Indo) rH5로 예방접종하고 H5N1 Viet Nam 1203 바이러스 (1000 $\times$ LD<sub>50</sub>)로 46일 후에 챌린지하였다. 마우스를 챌린지 후 2주 동안 체중 변화에 대해 매일 모니터링하였다. 각각의 데이터 점은 그룹 당 평균 체중 감소 +/- s.e.m.을 나타낸다. (c) 바이러스 부하(viral load)를 챌린지 후 3일 또는 6일 후에 나타낸 제형의 동종(VN) 또는 이중(Indo) rH5로 예방접종된 동물에서 측정하였다.

도 5a 및 5b. GLA-계 rH5 백신을 사용한 단일 주사는 H5N1 감염으로부터 흰담비를 보호한다. 동물(4마리/그룹)을 단독으로 또는 나타낸 제형의 0.5 $\mu$ g의 rH5 항원으로 1회(IM) 주사한 후 28일 후에 H5N1VN1203 (0.75 $\times$ 10<sup>6</sup> pfu)의 비강내 주입으로 챌린지하였다. (a) 체중의 퍼센트 변화. 각각의 데이터 점은 4마리 동물로부터의 평균 +/- s.e.m.을 나타내고, 1 및 2마리의 생존 동물로부터의 결과를 나타내는 GLA-SE 및 rH5 그룹 각각은

제외한다. (b) 일반적인 건강에 있어서의 변화는 관찰 번호매김 시스템; 0 = 정상; 1 = 의심스런 질병; 2 = 약하지만 명확한 질병; 3 = 약한 질병; 4 = 심각, 빈사상태를 기준으로 한다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### [0018] 상세한 설명

[0019] 본 기재내용은 백신으로서 사용하기 위한 조성물 및 당해 백신을 사용하여 피험자를 면역화하는 방법을 제공하며, 여기서 백신은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 재조합체 적혈구응집소 및 보조제를 포함한다. 백신은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대한 보호를 제공하며, 이는 일반적으로 체액 및 세포 면역성을 유발하고 기억 면역 세포를 생성한다.

[0020] 본원에 기술된 백신 및 약제학적 조성물은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 적혈구응집소(HA) 및 DSLP 보조제, 예를 들면, GLA일 수 있고, 전-유행성 및 유행성 단계 동안 당해 바이러스로부터 사람을 보호하도록 지시된, 화학식 1에 따른 보조제를 포함한다. 또한, 상기 조성물은 보다 적은 양의 예방접종(투여량 절약적) 및/또는 보조제의 부재하에서 요구되는 것보다 보다 적은 용량의 HA(용량 또는 항원 절약적)로 관련된 바이러스에 대한 면역 반응을 증강시키고, 관련된 바이러스에 대한 교차-반응성을 유발하는 이점을 제공한다.

[0021] A. 적혈구응집소 제조

[0022] 1. HA의 공급원

[0023] 적어도 4개의 상이한 인플루엔자 A 바이러스가 현재 전-유행성 또는 유행성 우려와 관련되어 있다: H5N1, H1N1, H7N7, 및 H9N2.

[0024] 인플루엔자 A 바이러스 아형 H5N1은 사람 및 많은 다른 동물 중에서 질병을 유발할 수 있는 인플루엔자 A 바이러스의 아형이다. H5N1의 고 병원성 균주; (HPAI H5N1)은 "조류 인플루엔자" 또는 "조류 독감(bird flu)"의 원인이다. 이는, 이의 대부분 또는 모두가 감염된 조류와 집중적인 물리적 접촉을 한 사람을 감염시킬 수 있다고 해도, 현재는 조류 질병이다. H5N1은 유행성의 모든 조건이 충족되지 않았기 때문에 전-유행성 바이러스로 분류되어 있으며, 가장 특히 상기 바이러스는 사람 중에서 용이하게 및 지속적으로 확산되지 않는다.

[0025] H5N1 유형의 조류 독감(본원에서 "H5N1"으로 명명됨)은 아시아에서 최초로 출현했으며 전세계적으로 확산중이다. H5N1 바이러스는 진화중이며 이들의 HA 분자의 항원 및 서열 특성을 기준으로 하여 현재 명백한 계통 분기 및 아계통 분기로 분류될 수 있다. "계통 분기"는 일반적인 조상으로부터 내려온 관련된 유기체를 말한다. 사람에서 H5N1 감염의 2003년도 재-출현 이래로, 몇가지 상이한 계통 분기가 사람 질병의 300개 이상의 경우로부터 분리되었다. WHO(세계 보건 기구)는 고 병원성 H5N1 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 명명법 시스템을 통합하고 있다(참조: Brown et al., *Influenza Other Respi viruses* 3:59-62, 2009; Donis et al., *Emerg Infect Dis.* 14:e1, 2008; 또한 참조: "Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses" at [www.who.int](http://www.who.int)). 2009년 3월 현재, 바이러스의 10개의 명확한 계통 분기(0 내지 9번)가 확인되었다.

[0026] 동남 아시아 및 아시아에서 주로 분리된 계통 분기 1 및 계통 분기 2 바이러스가 백신 개발의 가장 흔한 대상이다. 최초로 FDA-승인된 H5N1 백신은 H5 계통 분기 1 바이러스에 기초한 통상적인 백신이었으나, 연구 참여자의 대략 절반에서만 보호성 수준에서 중화 역가(titer)를 유도하였고, 더우기, 다량의 HA의 2회 투여량을 필요로 하였다. 시험시 재조합체 백신은 유사한 결과를 제공하였다(참조: Treanor et al., *Vaccine* 19:1732-1737). 개인을 더 보호하는 것 외에, 유행병을 박멸할 수 있는 백신은 투여량-절약 및 용량-절약 개선 둘다를 필요로 한다.

[0027] 대략 1335개의 독특한 전체 길이의 H5 서열이 NCBI의 "인플루엔자 바이러스 자원"(2010년 1월 14일 접근)에 존재한다. 이들 H5 서열 중 어느 것도 사용할 수 있다. HA 서열은 어떠한 계통 분기 또는 아-계통 분기로부터 기원할 수 있다. 가장 흔히, HA는 계통 분기 1 또는 2로부터일 것이다. WHO의 참조 H5 HA 항원은 주로 계통 분기 2에 존재하지만, 또한 계통 분기 1, 4, 및 7에서 HA를 포함한다(참조: "Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate vaccine viruses developed for potential use in human vaccines" Feb 2009, accessed at [www.who.int](http://www.who.int)). 참조 항원은 다음 표(들)에 나타난 항원을 포함한다.

바이러스 명칭	계통 분기	유전자은행 수탁 번호 또는 참조 문헌*
A/VIETNAM/1203/2004	1	ABW90135
A/INDONESIA/5/2005	2.1	ABP51969
A/DUCK/HUNAN/795/2002	2.1	ACA47835
A/WHOOPEER SWAN/MG/244/2005	2.2	ACD68156
A/TURKEY/65-596/2006	2.2	ABQ58925
A/BAR-HEADED GOOSE/QINGHAI/1A/2005XPR8	2.2	Chen et al. J. Virol. 80:5976 (2006)
A/CHICKEN/INDIA/NIV-33487/2006	2.2	ABQ45850
A/EGYPT/321-NAMRU3/2007	2.2	
A/CHICKEN/KOREA/GIMJE/2008	2.3.2	
A/ANHUI/I/2005	2.3.4	ABD28180
A/ANHUI/I/2005XPR8 IBDC RG-6	2.3.4	
A/CHICKEN/MALAYSIA/935/2006	2.3.4	
A/JAPANESE WHITE EYE/HK/1038/2006	2.3.4	ABJ96775
A/GOOSE/GUIYANG/337/2006	4	ABJ96698
A/CHICKEN/VIETNAM/NCVD-016/2008	7	AC007033

[0028]

[0029]

\* 모든 진뱅크 수탁기관 및 참조 문헌에서 서열은, 이의 전문이 혼입된다.

[0030]

유행병 걱정이 있는 다른 아형은 2009년 flu 유행성 및 1918년의 스페인 독감(Spanish flu)에 관여하는 유형인, H1N1 유행성 바이러스("돼지 독감(swine flu)" 바이러스)이다. 2009년 유행병을 유발하는 균주는 유행성 H1N1 2009 바이러스로 불린다. 2010년 2월 18일 현재, HA의 900개 이상의 불필요하지 않은 단백질 서열(non-redundant protein sequence)이 NCBI 및 인플루엔자 조사 데이터베이스(Influenza Research Database(fludb.org))에서 이용가능하다. 미국에서, A/California/4/2009 (수탁번호 ACP41105, 이의 전문이 혼입됨) 및 A/California/7/2009 (수탁번호 ACQ55359, 이의 전문이 혼입됨)이 백신을 제조하기 위해 사용된 균주이다. 다른 균주로부터의 HA 또한 적합하다.

[0031]

다른 강력한 유행성 인플루엔자 바이러스는 네덜란드로부터의 H7N7 및 중국으로부터의 H9N2를 포함한다. 2003년 이래로, 네덜란드는 가금류에서 다른 고 병원성 조류 인플루엔자 A 바이러스(H7N7)의 발생을 보고하였다. 약 90명의 사람의 확인된 감염이 가금류 작업자 및 가족에서 발생하였으며; 바이러스에 대한 항체가 감염된 가금류와 접촉하지는 않았지만 감염된 개인과 근접하게 집안에서 접촉한 사람에서 확산되는 것이 발견되었고, 이는 고 수준의 사람-사람 전염을 제안한다. H9N2는 중국에서 사람에게 질병을 유발하는 것으로 밝혀진 다른 조류 인플루엔자 바이러스이다. 알레르기 및 감염성 질병의 국제 기관(The National Institute of Allergy and Infectious Diseases)은 H9N2를 강력한 유행성 바이러스로 확인하였다. 일부 적합한 균주는 A/HK/1073/99 (H9N2) 및 A/NL/209/07 (H7N7)을 포함한다.

[0032]

약제학적 조성물 및 백신용 적혈구응집소 단백질은 전체 길이일 수 있지만, 또한 전구체 단백질, 단편, 융합 단백질의 일부 또는 펩타이드일 수 있다. 전체 길이의 단백질은 성숙한 단백질을 말하며; 예를 들면, 적혈구응집소 단백질의 경우에, 성숙한 단백질은 비리온(virion)에서 발견된 형태(예를 들면, 선도 펩타이드(leader peptide)를 결여하고, HA0로부터 HA1 및 HA2로 분해될 수 있음)이다. 전구체 단백질(프레-단백질)은 어떠한 프로세싱도 발생하기 전의 초기, 해독된 단백질이거나, 부분적으로-프로세싱된 단백질이다. 융합 단백질의 일부로서, HA 단백질은 전구체 또는 전체 길이의 단백질 또는 단백질 단편 또는 펩타이드로서 존재할 수 있다. 단백질의 단편 또는 펩타이드는 면역 반응을 유발하는 하나 이상의 에피토프를 함유하는, 면역원성이어야 할 필요가 있다.

[0033]

펩타이드는 T 세포 전구체에 대한 결합에 대해 MHC 분자와 복합체화되기 위해 선택되며, 일반적으로, 길이가 약 30개 이하의 아미노산 길이이거나, 약 25개 이하의 아미노산 길이, 또는 약 20개 이하의 아미노산 길이, 또는 약 15개 이하의 아미노산 길이, 약 12개 이하의 아미노산 길이, 약 9개 이하의 아미노산 길이, 약 8개 이하의 아미노산 길이이다. 일반적으로, 보다 짧은 펩타이드가 MHC 제I 부류 분자에 결합하거나 이와 연합하며 보다 긴 펩타이드는 MHC 제II 부류 분자에 결합하거나 이와 연합한다. 적합한 펩타이드를 다수의 생물정보학 프로그램 중 어느 것을 사용하여 예측할 수 있으며 공지된 방법을 사용하여 시험할 수 있다.

[0034]

본원에 기재된 것으로서, 적합한 단백질은 전구체 단백질, 성숙한 단백질, 단편, 융합 단백질 및 펩타이드를 포



함한다. 하나 이상의 HA가 조성물 속에 존재할 수 있다. 다수의 HA 단백질이 사용되는 경우, HA 단백질은 동일한 바이러스로부터 또는 상이한 바이러스로부터 기원할 수 있다. 또한, 다수의 단백질이 동일한 형태로서 또는 이들 형태의 혼합물로서 존재할 수 있다. 예를 들면, HA 단백질은 성숙한 단백질 및 단편 둘다로서 존재할 수 있다.

[0035] 전형적으로 약제학적 조성물 또는 백신 조성물 중 HA는, 선도 서열(leader sequence)을 갖는 당단백질의 진핵세포내 발현이 전형적으로, 선도 서열(또한 시그널 펩타이드로 공지됨)을 결여한, 성숙한 단백질을 생성할 것이므로, 전구체 단백질 이외의 것일 수 있다. HA의 소수성 선도 서열의 길이는 분리체들 중에서 어느 정도 변할 수 있지만, 전형적으로, 약 18개의 아미노산 길이이다. 그러나, 재조합체 발현의 경우, 시그널 펩타이드는 전구체 단백질의 일부일 수 있다. 시그널 펩타이드는 HA 천연 서열 또는 당해 분야에 공지된 다른 것을 포함한다.

[0036] 단백질 단편은 면역원성이어야 한다. 일부 경우에, 단편(들)은 면역우세(immunodominant) 펩타이드 서열을 포함한다. 면역원성 펩타이드 서열은 B 또는 T 세포(예를 들면, CD4 또는 CD8 T 세포)에 의해 인식된 것들이다. 펩타이드 서열은 완전한 서열로부터 기원한 펩타이드를 일반적으로 일련의 오버랩핑(overlapping) 펩타이드를 사용하여 스크리닝함으로써 확인할 수 있다. 각종 검정을 사용하여, B 또는 T 세포가 펩타이드를 인식하여 이에 반응하는지를 측정할 수 있다. 예를 들면, 크롬-방출 세포독성 검정(참조: Kim et al., J Immunol 181:6604-6615, 2008, 검정 프로토콜에 대해서 혼입됨), ELISPOT 검정, 세포내 사이토킨 염색 검정 및 MHC 다합체 염색(참조: Novak et al. J Clin Invest 104:R63-R67, 1999; Altman et al., Science 274:94-96, 1996), ELISA 검정, 항체의 다른 유형의 측정에 이은 담체에 커플링된 펩타이드를 사용한 마우스의 면역화가 적합한 검정 중에 있다. 면역원성 펩타이드는 또한 생물정보학 소프트웨어(참조: "Immunoinformatics: Predicting immunogenicity in silico" Methods in Molecular Biology vol. 409, 2007)에 의해 예측될 수 있다. 일부 예시적인 프로그램 및 데이터베이스는 FRED(참조: Feldhahn et al. Bioinformatics 15:2758-9, 2009), SVMHC(참조: Donnes and Kohlbacher, Nucleic Acids Res 34:W1940197, 2006), 항원DB(참조: Ansari et al., Nucleic Acids Res 38:D847-853, 2010), TEPITOPE(참조: Bian and Hammer Methods 34:468-475, 2004)를 포함한다.

[0037] HA는 또한 융합 단백질의 일부로서 혼입될 수 있다. 다른 융합 파트너 또는 파트너들은 다른 HA 단백질 또는 비-HA 단백질, 예를 들면, 인플루엔자 뉴라미니다제일 수 있다. 융합 단백질을 사용하기 위한 일부 일반적인 이유는 수득되는 단백질의 발현을 증진시키거나 정제시 도움을 주는 것이다. 예를 들면, 발현 시스템의 숙주 세포에 대해 조정된 시그널 펩타이드 서열은 HA 단백질에 연결시키거나 단백질 정제에 사용하기 위한 태그 서열(tag sequence)을 연결시킬 수 있으며, 후속적으로, 분해 서열이 또한 혼입되는 경우 분해할 수 있다. 하나 이상의 단백질로부터 다수의 펩타이드 에피토프를 융합시킬 수 있거나 하나 이상의 단백질로부터의 단편을 융합시킬 수 있다. 다수의 펩타이드 에피토프는 임의의 순서일 수 있다.

[0038] 조성물에서 HA에 대한 다른 적합한 공급원은 HA를 함유하는 바이러스-유사 입자(VLP)(참조: 이의 전문이 혼입된 U.S. 2005009008), HA를 암호화하는 핵산(참조: U.S. 2003045492; U.S. 7537768; WO 09092038; Smith et al. Vaccine Jan 29, 2010, 이들 모두는, 전문이 혼입되어 있다), 및 또한 약화되고 불활성화된 바이러스(참조: U.S. 6022726; U.S. 7316813; U.S. 2009010962; WO 99/57284, U.S. 2008254060; 이들 모두는, 이들의 전문이 혼입되어 있다)를 포함한다.

## [0039] 2. 재조합체 합성 - 벡터 작제

[0040] 전구체 단백질, 단편, 융합 단백질 및 펩타이드를 포함하는 HA 단백질은 배양된 세포내에서 생산하거나 화학적으로 합성할 수 있다("HA 단백질"은 본원에서 모든 이들 형태를 포함하도록 본원에서 사용된다). 펩타이드는 특히, 기계(많은 것이 시판되고 있다)를 사용하거나 수동으로 화학적으로 편리하게 합성할 수 있다. 대안적으로, 원핵 및 진핵세포 시스템 둘다의 각종의 적합한 발현 시스템은 잘 공지되어 있으며 사용될 수 있다. 흔히 사용되고 단백질의 생산에 적합한 숙주 세포는 이. 콜라이(*E. coli*), 효모, 곤충 및 포유동물을 포함한다. 발현 벡터 및 숙주 세포는 시판되거나(예를 들면, Invitrogen Corp., 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 작제될 수 있다. 예시적인 벡터는 프로모터 및, 프로모터 및 서열이 작동적으로 연결되도록 하는 목적인 단백질을 암호화하는 서열에 대한 클로닝 부위를 포함한다. 분비 시그널 서열(때때로 선도 서열로 불림), 태그 서열(예를 들면, hexa-His), 전사 종결 시스템, 특히 벡터가 염색체-외적으로 복제되는 경우 복제 기원 및, 선택가능한 생성물을 암호화하는 서열과 같은 다른 성분들이 존재할 수 있다. 임의의 성분들이 이들의 목적에 따라 벡터내에 배열된다. 숙주 세포를 형질감염시키기 위한 방법 및 과정은 또한 잘 공지되어 있다.

[0041] HA는 글리코실화된 단백질이므로, 가장 흔히 선택되는 발현 시스템은 단백질을 글리코실화시키는 진핵 시스템, 예를 들면, 효모(예를 들면, U.S. 5856123; U.S. RE35749; U.S. 4925791; 또한, PichiaPink<sup>TM</sup>, 제조원: 미국 캘

리포니아주 소재의 Invitrogen, 케이. 락티스(*K. lactis*) 단백질 발현 키트, 제조원: 미국 메사추세츠주 소재의 NEB), 포유동물 세포 및 바큘로바이러스(참조: U.S. 4745051; U.S. 5762939; U.S. 5858368; U.S. 6103526; 여기서 본원에 확인된 모든 미국 특허 참조 문헌들은, 이들의 전문이 본원에 혼입되어 있다)이다.

[0042] HA에 대한 암호화 서열을 포함하는 바큘로바이러스가, HA를 발현하는 곤충 세포를 감염시키는 곤충 발현 시스템이 특히 적합한 발현 시스템이다. 곤충 세포에서의 발현은 일반적으로 고 농도 및 양의 단백질을 수득하며, 진핵세포성의 해독후 변형(예를 들면, 글리코실화)을 갖는 단백질을 생산하며 전-유행성 백신에 충분한 단백질을 생성하는 생산 수준으로 규모를 확장시킬 수 있다. 발현 시스템 및 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있으며; 예를 들면, 많은 시판 시스템 및 서비스 제공업자(예: 캘리포니아주 칼스바드 소재의 Invitrogen; 코네티컷주 소재의 Protein Sciences Meriden; 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재의 Clontech; 또한 baculovirus.com 에서 판매회사 및 서비스 제공업자의 목록 참조)가 존재한다.

[0043] 예시적인 곤충 발현 시스템에서, 주요 유전자 생성물, 예를 들면, 전체 길이의 헤마글루티닌은 프로세싱되지 않으며, 분비되지 않지만 감염된 세포의 말초 막과 연합하여 잔류한다(참조: U.S. 5762939). 감염 수일 후, 재조합체 HA(rHA)를 말초 막으로부터 추출할 수 있다(참조: U.S. 5858368, rHA의 추출 및 정제를 위해 혼입된 참조 문헌). 다른 적합한 추출 방법은 비-변성, 비-이온성 세제 또는 다른 잘-공지된 기술을 사용함을 포함한다. 발현된 단백질은 "그대로(as-is)" 사용될 수 있거나, 보다 전형적으로, 분석되어 추가로 정제될 수 있다. 추가의 정제는 예를 들면, 친화성 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 또는 당해 분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 등가의 방법에 의해 수행될 수 있다. rHA는 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 순도로 정제된다.

[0044] 순도 또는 양을 측정하기 위한 대표적인 수법은 겔 전기영동, 웨스턴 블롯팅(western blotting), 질량 분광법, ELISA를 포함한다. 단백질의 활성은 일반적으로 실시예에 기술된 것들과 같은 생물학적 검정으로 평가한다. 필요한 경우 또는 바람직한 경우, 단백질은 추가로 정제될 수 있다. 많은 정제 방법이 잘 공지되어 있으며 크기 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 침전, 면역 침전 등을 포함한다. 단백질의 의도된 용도는 최고 수준의 순도를 요구하는 경향이 있는 사람에서 사용과 함께, 정제의 정도를 전형적으로 결정할 것이다.

[0045] B. 보조제

[0046] 본 발명은 보조제를 포함하고/하거나 이용하는 조성물, 키트, 방법 등을 제공한다. 보조제는 DSLP로 나타낸 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 화합물이다. DSLP 화합물은, 이들이 글루코즈 및 아미노 치환된 글루코즈로부터 선택된 2개의 당당류 그룹을 함께 결합시켜 형성된 이당류(DS) 그룹을 함유하는 특징을 공유하며, 여기서 이당류는 인산염(P) 그룹 및 다수의 지질(L) 그룹 둘다에 화학적으로 결합된다. 보다 상세하게는, 이당류는 각각 6개 탄소 원자를 갖는 2개의 당당류 단위로부터 형성된 것으로서 가시화될 수 있다. 이당류에서, 당당류 중 하나는 환원 말단을 형성할 것이며, 다른 당당류는 비-환원 말단을 형성할 것이다. 편의를 위해, 환원 말단을 형성하는 당당류의 탄소는 1, 2, 3, 4, 5 및 6번 위치에 위치하는 것으로 나타낼 것이나, 비-환원 말단을 형성하는 당당류의 상응하는 탄소는 통상의 탄수화물 번호매김 명명법에 따라 1', 2', 3', 4', 5' 및 6' 위치에 위치하는 것으로 나타낼 것이다. DSLP에서, 비-환원 말단의 1번 위치에서 탄소는 에테르(-O-) 또는 아미노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6' 위치에서 탄소에 연결된다. 인산염 그룹은 바람직하게는 비-환원 말단의 4' 탄소를 통해 이당류에 연결될 것이다. 지질 그룹 각각은 아마이드(-NH-C(O)-) 또는 에스테르(-O-C(O)-) 결합을 통해 이당류에 결합될 것이며, 여기서 카보닐 그룹은 지질 그룹에 결합된다. 이당류는 아마이드 또는 에스테르 그룹에 연결될 수 있는 7개 위치, 즉, 비-환원 말단의 2', 3' 및 6' 위치, 및 환원 말단의 1, 2, 3 및 4 위치를 갖는다.

[0047] 지질 그룹은 적어도 6개의 탄소 원자, 바람직하게는 적어도 8개의 탄소 원자, 및 보다 바람직하게는 적어도 10개의 탄소 원자를 가지며, 여기서 각각의 경우 지질 그룹은 바람직하게는 24개 이하의 탄소 원자, 바람직하게는 22개 이하의 탄소 원자, 및 보다 바람직하게는 20개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 하나의 측면에서, 지질 그룹은, 함께 60 내지 100개의 탄소 원자, 바람직하게는 70 내지 90개의 탄소 원자를 제공한다. 지질 그룹은 탄소원자 및 수소 원자 단독으로 이루어질 수 있는데, 즉, 이는 하이드로카빌 지질 그룹일 수 있거나, 이는 하나의 하이드록실 그룹을 함유할 수 있으며, 즉, 이는 하이드록실-치환된 지질 그룹일 수 있거나, 이는 궁극적으로 에스테르 그룹의 카보닐(-C(O)-)을 통해 하이드록실-치환된 지질 그룹 또는 하이드로카빌 지질에 결합되는 에스테르 그룹, 즉, 에스테르 치환된 지질을 함유할 수 있다. 하이드로카빌 지질 그룹은 포화되거나 불포화될 수 있으며, 여기서 불포화된 하이드로카빌 지질 그룹은 인접한 탄소 원자들 사이에 하나의 이중 결합을 가질 것이다.

[0048] DSLP는 3, 또는 4, 또는 5, 또는 6 또는 7개 지질을 포함한다. 하나의 측면에서, DSLP는 3 내지 7개의 지질을

포함하는 반면, 다른 측면에서 DSLP는 4 내지 6개의 지질을 포함한다. 하나의 측면에서, 지질은 하이드로카빌 지질, 하이드록실-치환된 지질, 및 에스테르 치환된 지질 중에서 독립적으로 선택된다. 하나의 측면에서, 1, 4' 및 6' 위치는 하이드록실로 치환된다. 하나의 측면에서, 단당류 단위는 각각 글루코사민이다. DSLP는 유리 산 형태, 또는 염 형태, 예를 들면, 암모늄 염일 수 있다.

[0049] 하나의 측면에서, DSLP 상의 지질은 다음으로 기술된다: 3' 위치는  $-O-(CO)-CH_2-CH(R_a)(-O-C(O)-R_b)$ 으로 치환되고; 2' 위치는  $-NH-(CO)-CH_2-CH(R_a)(-O-C(O)-R_b)$ 로 치환되며; 3 위치는  $-O-(CO)-CH_2-CH(OH)(R_a)$ 로 치환되고; 2 위치는  $-NH-(CO)-CH_2-CH(OH)(R_a)$ 로 치환되며; 여기서 각각의  $R_a$  및  $R_b$ 는 데실, 운데실, 도데실, 트리데실, 테트라데실 중에서 선택되고, 여기서 이들 용어들 각각은 포화된 하이드로카빌 그룹을 말한다. 하나의 구체예에서,  $R_a$ 는 운데실이고  $R_b$ 는 트리데실이며, 여기서 당해 보조제는 예를 들면, 미국 특허원 공보 제2008/0131466호에 "GLA"로 기술되어 있다.  $R_a$ 가 운데실이고  $R_b$ 가 트리데실인 화합물은 예를 들면, Avanti Polar Lipid로부터 PHAD<sup>TM</sup> 보조제로서 이용가능한, 입체화학적으로 정의된 형태로 사용될 수 있다.

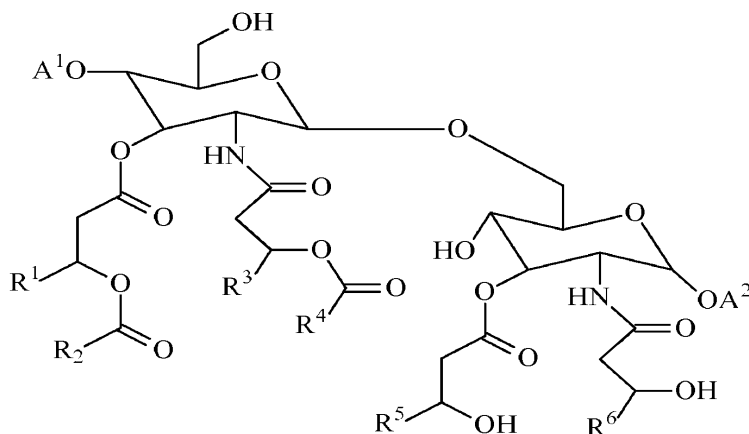
[0050] 다른 측면에서, DSLP는 3D-MPL로 공지된 천연적으로 기원한 화합물들의 혼합물이다. 3D-MPL 보조제는 GlaxoSmithKline Company로부터 이들의 MPL<sup>TM</sup> 보조제로서 약제학적 등급 형태로 상업적으로 생산된다. 3D-MPL은 과학 및 특허 문헌에 집중적으로 기술되어 있다(참조: 예를 들면, *Vaccine Design: the subunit and adjuvant approach*, Powell M.F. and Newman, M.J. eds., Chapter 21 *Monophosphoryl Lipid A as an adjuvant: past experiences and new directions* by Ulrich, J.T. and Myers, K. R., Plenum Press, New York (1995) 및 U.S. Patent 4,912,094).

[0051] 다른 측면에서, DSLP 보조제는 (i) 비-환원 말단 글루코사민의 1 위치와 환원된 말단 글루코사민의 6 위치의 헥소아민들 사이의 에테르 결합을 통해 비-환원 말단 글루코사민에 연결된 환원 말단 글루코사민을 갖는 디글루코사민 골격; (ii) 비-환원 말단 글루코사민의 4 위치의 헥소아민에 부착된 0-포스포릴 그룹; 및 (iii) 6개 이하의 지방 아실 쇄를 포함하는 것으로 기술될 수 있으며, 여기서 지방 아실 쇄 중 하나는 에스테르 결합을 통해 환원 말단 글루코사민의 3-하이드록시에 부착되며, 여기서 지방 아실 쇄 중 하나는 아마이드 결합을 통해 비-환원 말단 글루코사민의 2-아미노에 부착되고 에스테르 결합을 통해 탄소수가 12 이상인 알카노일 쇄에 연결된 테트라데카노일 쇄를 포함하며, 여기서 지방 아실 쇄 중 하나는 에스테르 결합을 통해 비-환원 말단 글루코사민의 3-하이드록시에 부착되며 에스테르 결합을 통해 탄소수가 12 이상인 알카노일 쇄에 연결된 테트라데카노일 쇄를 포함한다(참조: 예를 들면, 미국 특허원 공보 2008/0131466).

[0052] 다른 측면에서, 보조제는 미국 특허원 공보 제2010/0310602호에 기술된 바와 같이 6개의 지질 그룹을 갖는 합성 이당류일 수 있다.

[0053] 다른 측면에서, 본 발명에 사용된 보조제는 화학식 1로 정의될 수 있다:

### 화학식 1



(1).

[0054] 다른 측면에서, 본 발명에 사용된 보조제는 화학식 1로 정의될 수 있다:

- [0055] 화학식 1에서,
- [0056] 잔기  $A^1$  및  $A^2$ 는 수소, 인산염 및 인산염 염들의 그룹 중에서 독립적으로 선택된다. 나트륨 및 칼륨은 인산염 염들에 대한 예시적인 반대이온이다. 바람직하게는 인산염 그룹인  $AO^-$  그룹은 비-환원 말단의 4' 위치에서 이당류에 결합된다. 비-환원 말단은 에테르 그룹에 대해 이의 1 위치를 통해 결합되며, 이는 최종적으로 환원 말단의 6' 위치에 결합된다. 화학식 1의 화합물은 각각 잔기  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , 및  $R^6$  중 하나를 혼입하는 6개의 지질 그룹을 가지며, 여기서 이들 R 그룹은  $C_3$ - $C_{23}$ 으로 나타낸, 탄소수가 3 내지 23개인 하이드로카빌의 그룹 중에서 독립적으로 선택된다. 명확하게 하기 위해, 잔기가 다수의 구성원을 갖는 명시된 그룹 "중에서 독립적으로 선택된" 경우, 이는, 제1 잔기에 대해 선택된 구성원이 어떠한 방식으로든 영향을 미치지 않거나 제2 잔기에 대해 선택된 구성원의 선택을 제한하는 것으로 이해하여야 한다.  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 이 결합된 탄소 원자는 비대칭이므로, R 또는 S 입체화학으로 존재할 수 있다. 하나의 구체예에서, 이들 탄소 원자 모두는 R 입체화학인 반면, 다른 구체예에서, 이들 탄소 원자 모두는 S 입체화학이다.
- [0057] "하이드로카빌"은 수소 및 탄소로부터 전적으로 형성된 화학적 잔기를 말하며, 여기서 탄소 원자들의 배열은 직쇄 또는 측쇄, 비사이클릭 또는 사이클릭이며, 인접한 탄소 원자들 사이의 결합은 전적으로 단일 결합이거나, 즉 포화된 하이드로카빌을 제공하거나, 어떠한 2개의 인접한 탄소 원자들 사이에 이중 결합 또는 3중 결합이 존재할 수 있어서, 즉 불포화된 하이드로카빌을 제공할 수 있고, 하이드로카빌 그룹내 탄소 원자의 수는 3 내지 24개이다. 하이드로카빌은 알킬일 수 있으며, 여기서 대표적인 직쇄 알킬은 메틸, 에틸, n-프로필, n-부틸, n-펜틸, n-헥실 등, 예를 들면, 운데실, 도데실, 트리데실, 테트라데실, 펜타데실, 헥사데실, 헵타데실, 옥타데실 등을 포함하는 반면; 측쇄 알킬은 이소프로필, 2급-부틸, 이소부틸, 3급-부틸, 이소펜틸 등을 포함한다. 대표적인 포화된 사이클릭 하이드로카빌은 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 등을 포함하는 반면; 불포화된 사이클릭 하이드로카빌은 사이클로펜테닐 및 사이클로헥세닐 등을 포함한다. 불포화된 하이드로카빌은 인접한 탄소 원자 사이에 적어도 하나의 이중 또는 3중 결합(하이드로카빌이 각각 비-사이클릭, 사이클로알케닐 및 사이클로알킬닐인 경우, 하이드로카빌이 적어도 부분적으로 사이클릭인 경우, 각각 "알케닐" 또는 "알킬닐"로 언급됨)을 함유한다. 대표적인 직쇄 및 측쇄 알케닐은 에틸레닐, 프로필레닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 이소부틸레닐, 1-펜테닐, 2-펜테닐, 3-메틸-1-부테닐, 2-메틸-2-부테닐, 2,3-디메틸-2-부테닐 등을 포함하는 반면; 대표적인 직쇄 및 측쇄 알킬닐은 아세틸레닐, 프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 1-펜티닐, 2-펜티닐, 3-메틸-1-부티닐 등을 포함한다.
- [0058] DSLP 보조제는 당해 분야에 공지된 합성 방법, 예를 들면, 본원에 참조로 혼입된 PCT 국제 공보 제WO 2009/035528호, 및 또한 각각 본원에 참조로 또한 혼입된 제WO 2009/035528호에 확인된 공보들에 기재된 합성 방법론으로 수득할 수 있다. 화학적으로 합성된 DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제는 존재하는 DSLP 분자, 예를 들면 화학식 1의 화합물과 관련하여 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95% 및 여전히 보다 바람직하게는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99% 순도의 제제를 말하는 실질적으로 균질인 형태로 제조할 수 있다. 제공된 보조제 제제의 순도의 측정은 기체 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 질량 분광법 및/또는 핵 자기 공명 분석과 같은 적절한 분석 화학 방법론에 친숙한 자들에 의해 용이하게 이루어질 수 있다. 천연 공급원으로부터 수득된 DSLP 보조제는 전형적으로 화학적으로 순수한 형태로 용이하게 제조되지 않으므로, 합성적으로 제조된 보조제가 본 발명의 바람직한 보조제이다. 앞서 언급한 바와 같이, 특정의 보조제가 상업적으로 수득될 수 있다. 바람직한 보조제는 알라바마주 알라바스터(Alabaster) 소재의 아반티 폴라 리피즈(Avanti Polar Lipids)의 카탈로그에 확인된 바와 같은 제품 번호 제 699800호이다(참조: 하기 E10과 조합된 E1).
- [0059] 본 발명의 각종 구체예에서, 보조제는 화학식 1의 화학 구조를 가지지만 잔기  $A^1$ ,  $A^2$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ , 및  $R^6$ 는 이들 잔기에 대해 앞서 제공된 선택사항의 소세트로부터 선택되며, 여기서 이들 소세트는 E1, E2 등에 의해 하기 정의된다.
- [0060] E1:  $A_1$ 은 포스페이트 또는 포스페이트 염이고  $A_2$ 는 수소이다.
- [0061] E2:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_3$ - $C_{21}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_5$ - $C_{23}$  하이드로카빌이다.



- [0062] E3:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_5$ - $C_{17}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_7$ - $C_{19}$  하이드로카빌이다.
- [0063] E4:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_7$ - $C_{15}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_9$ - $C_{17}$  하이드로카빌이다.
- [0064] E5:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_9$ - $C_{13}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_{11}$ - $C_{15}$  하이드로카빌이다.
- [0065] E6:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_9$ - $C_{15}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_{11}$ - $C_{17}$  하이드로카빌이다.
- [0066] E7:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_7$ - $C_{13}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_9$ - $C_{15}$  하이드로카빌이다.
- [0067] E8:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_{11}$ - $C_{20}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_{12}$ - $C_{20}$  하이드로카빌이다.
- [0068] E9:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은  $C_{11}$  알킬이고;  $R^2$  및  $R^4$ 는  $C_{13}$  하이드로카빌이다.
- [0069] E10:  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  및  $R^6$ 은 운데실이고  $R^2$  및  $R^4$ 는 트리데실이다.
- [0070] 특정의 선택시, E2 내지 E10 각각은 구체에 E1과 결합되고/되거나 E2 내지 E9의 하이드로카빌 그룹은 알킬 그룹, 바람직하게는 직쇄 알킬 그룹이다.
- [0071] DSLP 보조제, 예를 들어, 화학식 1의 보조제는 임의로 각각 하기 논의된 바와 같이, 공-보조제(co-adjuvant)와 함께 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 이와 관련하여, 참조는 제형, 예를 들면, GLA 보조제에 대한 수성 제형(AF) 및 안정한 유제 제형(SE)을 제공하는 미국 특허 공보 제2008/0131466호에 대해 이루어지며, 여기서 이들 제형은 화학식 1의 보조제를 포함하는 DSLP 보조제 중 어느 것에 대해 이용될 수 있다.
- [0072] 본 발명은, DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제가 공-보조제로서 본원에 언급된 제2 보조제와 함께 이용될 수 있음을 제공한다. 본 발명의 3개의 구체예에서, 공-보조제는 전달 시스템일 수 있거나, 이는 면역강화제일 수 있거나, 이는 전달 시스템 및 면역보강제 둘다로서 기능하는 조성물일 수 있다[참조: 예를 들면, O'Hagan DT and Rappuoli R., Novel approaches to vaccine delivery, *Pharm. Res.* 21(9):1519-30 (2004)]. 공-보조제는 Toll-유사 수용체 계열 생물분자의 구성원을 통해 작동하는 면역보강제일 수 있다. 예를 들면, 공-보조제는 이의 제1 작용 양식, TLR4 효능제, 또는 TLR8 효능제 또는 TLR9 효능제로서 선택될 수 있다. 대안적으로, 또는 보충적으로, 공-보조제는 이의 담체 특성을 위해 선택될 수 있는데, 예를 들면, 이는 유제, 리포솜, 미세입자 또는 백반일 수 있다.
- [0073] 하나의 측면에서, 공-보조제는 백반이고, 여기서 당해 용어는 알루미늄 염, 예를 들면, 인산알루미늄( $AlPO_4$ ) 및 수산화알루미늄( $Al(OH)_3$ )을 말하다. 백반이 공-보조제로서 사용되는 경우, 백반은 백신의 투여량으로, 약 100 내지  $1,000\mu g$ , 또는 200 내지  $800\mu g$ , 또는 300 내지  $700\mu g$  또는 400 내지  $600\mu g$ 의 양으로 존재할 수 있다. DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제는 전형적으로 백반의 양 미만의 양으로 존재하며, 각종 측면에서 DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제는, 중량 기준으로, 백반의 중량에 대해 0.1 내지 1%, 또는 1 내지 5%, 또는 1 내지 10%, 또는 1 내지 100%로 존재한다.
- [0074] 하나의 측면에서, 공-보조제는 백신 보조 특성을 갖는 유제이다. 이러한 유제는 수중유(oil-in-water) 유제를 포함한다. 프루엔드 불완전 보조제[Freund's incomplete adjuvant (IFA)]는 하나의 이러한 보조제이다. 다른 안정한 수중유 유제는 스쿠알렌, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(또한 Tween<sup>TM</sup> 80 표면활성제로 공지됨) 및 소르비탄 트리올레이트를 함유하는 MF-59<sup>TM</sup> 보조제이다. 스쿠알렌은, 비록 이것이 또한 식물 공급원(주로 야채 오일), 예를 들면, 아마란스 종자, 쌀겨, 맥아, 및 올리브로부터 이용가능하다고 해도, 상어 간 오일로부터 원래 수득된 천연의 유기 화합물이다. 다른 적합한 부형제는 Montanide<sup>TM</sup> 보조제(제조원: Seppic Inc., 뉴저지주 페어필드 소재), 예를 들면, 무기 오일계 보조제인 Montanide<sup>TM</sup> ISA 50V, Montanide<sup>TM</sup> ISA 206, 및 Montanide<sup>TM</sup> IMS 1312이다. 무기 오일이 공-보조제로 존재할 수 있지만, 하나의 구체예에서, 본 발명의 백신 조성물의 오일 성분(들)은 모두 대사가 가능한 오일이다.
- [0075] 공-보조제로서 본 발명의 실시예 이용할 수 있는 면역침전제의 예는 3D-MPL 또는 MPL<sup>TM</sup> 보조제, MDP 및 유도제,

올리고뉴클레오타이드, 이본쇄 RNA, 대안의 병원체-관련 분자 양식(PAMPS); 사포닌, 소-분자 면역 강화제(SMIPs), 사이토킨 및 케모킨을 포함한다.

[0076] 하나의 구체예에서, 공-보조제는 3D-MPL 또는 MPL™ 보조제이며, 여기서 후자는, 비록 이것이 몬타나주 해밀톤에 소재하는 리비 임뮤노캠 리서치, 인크.(Ribi ImmunoChem Research, Inc.)에 의해 원래 개발되었지만, 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKline)으로부터 상업적으로 이용가능하다[참조: 예를 들면, Ulrich and Myers, Chapter 21 from Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds. Plenum Press, New York (1995)]. MPL™ 보조제와 관련하여, 및 본 발명에서 공-보조제로서 또한 적합한 것은 AS02™ 보조제 및 AS04™ 보조제이다. AS02™ 보조제는 MPL™ 보조제 및 QS-21™ 보조제(본원에 또한 논의된 사포닌 보조제) 둘다를 포함하는 수중유 에멀전이다. AS04™ 보조제는 MPL™ 보조제 및 백반을 함유한다. MPL™ 보조제는 울리히(Ulrich) 및 마이어스(Myers)에 의한 논문에서 보다 완전히 기술된 바와 같이, LPS를 약한 산 및 염기 가수분해로 처리한 후 변형된 LPS를 정제함으로써 살모넬라 미네소타(Salmonella Minnesota) R595의 지다당류(LPS)로부터 제조된다.

[0077] 하나의 구체예에서, 공-보조제는 켈라자 사포나리아(*Quillaja saponaria*) 나무 종의 나무껍질로부터 기원한 것들과 같은 사포닌, 또는 변형된 사포닌이다(참조: 예를 들면, 미국 특허 제5,057,540호; 제5,273,965호; 제5,352,449호; 제5,443,829호; 및 제5,560,398호). 매사추세츠주 렉싱턴에 소재하는 안티제닉스, 인크.(Antigenics, Inc.)에서 판매하는 제품 QS-21™ 보조제는 DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제와 함께 사용될 수 있는 예시적인 사포닌-함유 공-보조제이다. 사포닌과 관련된 것은 Iscotec(스웨덴 소재)로부터 원래 개발된 ISCOM™ 계열의 보조제이며, 전형적으로 모두 별집-유사 구조로 형성된, 켈라자 사포나리아(*Quillaja saponaria*)로부터 기원한 사포닌 또는 합성 유사체, 콜레스테롤, 및 인지질로부터 형성된다.

[0078] 하나의 구체예에서, 공-보조제는 공-보조제로서 기능하는 사이토킨이다(참조: 예를 들면, Lin R. et al. *Clin. Infect. Dis.* 21(6):1439-1449 (1995); Taylor, C.E., *Infect. Immun.* 63(9):3241-3244 (1995); 및 Egilmez, N.K., Chap. 14 in Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, John Wiley & Sons, Inc. (2007)]. 각종 구체예에서, 사이토킨은 예를 들면, 과립구-대식구 콜로니-자극 인자(GM-CSF)[참조: 예를 들면, Change D.Z. et al. *Hematology* 9(3):207-215 (2004), Dranoff, G. *Immunol. Rev.* 188:147-154 (2002), 및 미국 특허 제5,679,356호]; 또는 인터페론, 예를 들면, 제I형 인터페론, 예를 들면, 인터페론- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 또는 인터페론- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), 또는 제II형 인터페론, 예를 들면, 인터페론- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , 참조: 예를 들면, Boehm, U. et al. *Ann. Rev. Immunol.* 15:749-795 (1997); 및 Theofilopoulos, A.N. et al. *Ann. Rev. Immunol.* 23:307-336 (2005)]; 인터루킨, 예를 들면, 인터루킨-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), 인터루킨-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 인터루킨-2 (IL-2)[참조: 예를 들면, Nelson, B.H., *J. Immunol.* 172(7):3983-3988 (2004)]; 상세하게는 인터루킨-4 (IL-4), 인터루킨-7 (IL-7), 인터루킨-12 (IL-12)[참조: 예를 들면, Portielje, J.E., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 52(3): 133-144 (2003) 및 Trinchieri, G. *Nat. Rev. Immunol.* 3(2):133-146 (2003)]; 인터루킨-15 (IL-15), 인터루킨-18 (IL-18); 태아 간 타이로신 키나제 3 리간드(Flt3L), 또는 종양 괴사 인자  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )일 수 있다. DSLP 보조제, 예를 들어, 화학식 1의 보조제는 백신 항원, 또는 항원, DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제와 조합되기 전에 사이토킨과 함께 공-제형화될 수 있으며 사이토킨 공-보조제는 별도로 제형화한 후 조합할 수 있다.

[0079] 하나의 구체예에서, 공-보조제는 본원에 기술된 독감 항원과 임의로 접합된 메틸화되지 않은 CpG 디뉴클레오타이드이다.

[0080] 공-보조제가 DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제와 함께 사용되는 경우, 2개 보조제의 상대적인 양은 항원 단독과 관련하여 보조제를 함유하는 백신 조성물에 대해 바람직한 수행 특성을 달성하도록 선택될 수 있다. 예를 들면, 보조제 조합을 선택하여 항원의 항체 반응성을 향상시키고/시키거나 피험자 고유의 면역계 반응을 향상시킬 수 있다. 고유의 면역계의 활성화는 케모킨 및 사이토킨의 생산을 초래하며, 이는 궁극적으로 조정된(후천적인) 면역 반응을 활성화시킨다. 조정된 면역 반응의 활성화의 중요한 결과는, 숙주가 항원과 제-직면한 경우, 면역 반응이 보다 빠르게 및 일반적으로 보다 우수한 품질로 발생하도록 하는 기억 면역 세포의 형성이다.

[0081] 백신 보조제의 조합은 전-유행성 및 유행성 독감을 방지하기 위해 요구된 면역 반응의 양 및 품질 둘다를 조절하기 위해 전략적으로 사용할 수 있다. 물 및 오일 유액-계 보조제는 Th2 T 세포 면역성을 유도한다. 이들의 용도는 바이러스 감염에 대해 보호하는 중화 항체의 생산을 구동하는데 중요하지만, 이들 유액은 세포 매개된 면

역성을 자극하는데 효과적이지 않다. 유행병 발생시, Th1 T 세포의 유도는 숙주내에서 질병 진행을 제한하고 집단 내 바이러스 전파를 감소시키는데 중요하다. Th1 T 세포는 사람 인플루엔자 바이러스에 대해 IFN- $\gamma$  및 TNF  $\alpha$ 의 생산을 통해 직접적인 항바이러스 역할을 한다(참조: Kannaganat et al., I81:8468-8476, 2007). 이들은 또한 바이러스 청소(viral clearance)에 중요할 뿐만 아니라, 심지어 고 바이러스-중화 활성의 부재하에서도 인플루엔자에 대해 보호성인 항체의 소부류(마우스에서 IgG2a)의 생산을 자극하기도 하는 항-바이러스 CD8 세포독성 T-림프구의 확장, 유지 및 재현을 조절한다(참조: Huber et al. *Clin Vaccine Immunol* 13:981-990, 2006). Th1 반응을 유도하기 위한 가장 직접적인 방법은 병원체 기원한 당, 단백질, 지질 및 핵산을 인식하여 이에 결합하는 Toll-유사 수용체(TLR)의 활성화를 포함한다. Toll-유사 수용체는 수지 세포 성숙을 자극하며 정상의 고유의 및 조정된 면역성에 필요하다. DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제가 단독으로 이들 각종 목표 각각을 달성할 수 있지만, 본 발명은 하나의 구체예에서, 보조제 조합물이 이들 목표를 달성하기 위한 유행성 독감 항원과 함께 이용될 수 있음을 제공한다. 그러나, 별도의 구체예에서, 백신 속에 존재하는 유일한 보조제는 DSLP 보조제, 예를 들면, 이의 각종 구체예를 포함하는 화학식 1의 보조제이며, 여기서 GLA는 화학식 1의 바람직한 DSLP 보조제이다.

[0082] 또한, 수중유 유액 속에서 GLA는 항원 특이적인 항체 및 HAI 역가, 투여량-절약, 및 인플루엔자의 항원-이동된(antigen-drifted) 균주에 대해 광범위한 교차-반응성에 있어서의 증가에 의해 측정된 것으로서, 마우스에서 플루존 백신의 면역원성을 유의적으로 향상시켰다. 이들 동일한 시험에서, GLA는 항원 특이적인 IgG2a 역가 및 IFN  $\gamma$  생산에 있어서 현저한 증가에 의해 나타난 바와 같이 Th1 T 세포 반응을 유도하였다.

[0083] C. 약제학적 조성물, 백신 및 이들의 용도

[0084] 1. 제형

[0085] 약제학적 조성물은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자로부터의 제조합체 적혈구응집소(HA) 및, DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제, 예를 들면 GLA를 포함한다. DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제는, 수용액으로서, 수중유 유액, 또는 3개의 예로서, 리포솜으로 제형화될 수 있다. 조성물은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자의 뉴라미니다제와 같은 다른 단백질, 알루미늄 염(예를 들면, 백반) 또는 사포닌 및 사포닌 유도체와 같은 다른 보조제, 알파-토코페롤 또는 유도체와 같은 부형제, 담체, 완충제, 안정화제, 결합제, 티메로살과 같은 방부제, 표면활성제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0086] DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제는 2개의 선택사항으로서, 단독으로 사용되거나 부형제가 오일 상 속에 혼입되는 수중유 유액으로 제형화될 수 있다. 단독으로, 즉, 유액과 함께 조합되는 이점이 없이 사용되는 경우, 보조제는 전형적으로 완전히 오일을 함유하지 않거나 약 1% v/v 미만의 오일을 함유하는 조성물 속에 존재한다. 오일을 함유하지 않는 조성물을 제조하기 위하여, 물, 보조제(예를 들면, GLA가 바람직한 보조제이다) 및 표면활성제, 예를 들면, 인지질, 예를 들면, 1-팔미토닐-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(POPC)이 조합될 수 있다. 조성물은 에탄올 및 POPC의 용액을 예비-칭량된 양의 GLA에 가하여 제조할 수 있다. 당해 칭량된 GLA는 10분 동안 초음파처리하여 가능한 한 많은 GLA를 분산시킨다. 이후에, GLA를 질소 가스하에 건조시킨다. 건조된 GLA 및 POPC를 WFI(주사용 수)와 함께 정확한 용적으로 재구성한다. 당해 용액을 60°C에서 15 내지 30분 동안 모든 GLA 및 POPC가 용액 속에 존재할 때까지 초음파처리한다. 장기간 저장을 위해, GLA-AF 제형은 동결건조시켜야 한다. 동결건조 과정은 글리세롤을 이것이 총 용적의 2%가 될 때까지 용액에 가하는 것으로 이루어진다. 이후에, 당해 용액을 바이알 속에 1 내지 10 mL의 양으로 둔다. 바이알은 용액을 동결건조시킨 후 이를 진공하에 두어 승화에 의해 동결된 물이 제거되도록 하는 것으로 이루어진 동결건조 공정을 통해 수행한다.

[0087] 보조제를 오일과 조합하는 경우, 이후, 사람에서 사용하기 위해, 오일은 바람직하게는 대사가 가능하다. 오일은 임의의 야채 오일, 어류 오일, 동물 오일 또는 합성 오일일 수 있으며; 오일은 복용자에게 독성이 아니어야 하고 대사과정에 의해 전환될 수 있어야 한다. 견과류(땅콩 오일), 종자 및 곡물이 일반적인 야채 오일의 공급원이다. 특히 적합한 대사가 가능한 오일은 스쿠알렌(2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥산), 많은 상이한 오일에서 발견되고, 상어-간 오일에서 다량으로 발견된 불포화된 오일이다. 스쿠알렌은 콜레스테롤의 생합성시 중간체이다. 또한, 수중유 유액은 전형적으로 알파-토코페롤(비타민 E, 미국 특허 제 5,650,155호, 미국 특허 제 6,623,739호)과 같은 항산화제를 포함한다. 트리글리세라이드와 같은 안정화제, 등장성을 부여하는 성분 및 다른 성분들을 가할 수 있다.

[0088] 오일 소적(oil droplet)의 평균 크기는 전형적으로 1 마이크로미터 미만이며, 30 내지 600 nm, 및 일반적으로 약 80 내지 약 120 nm 또는 약 150 nm 미만의 범위일 수 있다. 오일 소적 크기는 양성자 상관관계 분광법으로 측정할 수 있다. 전형적으로, 오일 소적의 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%는 목적하는 범위내

에 있어야 한다. 유액 중 오일의 분획은 일반적으로 2 내지 10%(예를 들면, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9% 및 약 10%)의 범위이고; 항-산화제의 분획, 예를 들면, 알파-토코페롤은 약 2 내지 약 10%의 범위이며, 표면활성제는 약 0.3 내지 3%의 범위이다. 바람직하게는 오일:알파 토코페롤의 비는, 이것이 보다 안정한 유액을 제공하므로 1 이하이다. 소르비탄 트리올레이트(예를 들면, Span®

85)이 또한 약 1%의 수준에서 존재할 수 있다. 일부 경우에, 본 발명의 백신이 안정화제를 추가로 함유할 것이 유리할 수 있다.

[0089] 수중유 유액을 생산하는 방법은 당해 분야의 기술자에게 잘 공지되어 있다. 일반적으로, 당해 방법은 오일 상을 표면활성제, 예를 들면, 포스파티딜콜린, 블록 공-중합체, 또는 TWEEN80®

용액과 혼합한 후, 균질화기를 사용하여 균질화함을 포함한다. 예를 들면, 혼합물을 1회, 2회 이상 주사기 침을 통해 통과시킴을 포함하는 방법은 작은 용적의 액체를 균질화하는데 적합할 수 있다. 동등하게, 미세유동화기(microfluidiser)(M110S microfluidics machine, 6 바아의 최대 도입 압력(약 850 바아의 배출 압력)에서 2분의 기간 동안 최대 50회 통과)을 조절하여 보다 적거나 큰 용적의 유액을 생산할 수 있다. 당해 조정은, 제제가 요구되는 직경의 오일 소적이 달성될 때까지 수득되는 유액의 측정을 포함하는 정규 실험으로 달성할 수 있다. 유액을 생성하기 위한 다른 장치 또는 매개변수가 또한 사용될 수 있다.

[0090] 스쿠알렌을 사용하는 예시적인 수중-오일 유액은 "SE"로서 공지되어 있으며 인산암모늄 완충액 pH 5.1과 알파-토코페롤 속에 표면활성제로서 스쿠알렌, 글리세롤, 포스파티딜콜린 또는 레시틴 또는 다른 블록 공-중합체를 포함한다. GLA가 DSLP로서 사용되는 경우, 수득되는 조성물은 본원에서 GLA-SE로 언급된다. 이러한 조성물을 제조하기 위해서, GLA(100 마이크로그램; 제조원: Avanti Polar Lipids, Inc., 알라바마주 알라바스터 소재; 제품 번호 699800)를 스쿠알렌(34.3 mg) 속에 25 밀리몰 인산암모늄 완충액(pH = 5.1) 중 글리세롤(22.7 mg), 포스파티딜콜린 또는 레시틴(7.64 mg), 플루로닉®

F-68(제조원: BASF Corp., 뉴저지주 마운트 올리브 소재) 또는 유사한 블록 공중합체(0.364 mg)와 함께 임의로 항산화제로서 0.5 mg의 D,L-알파-토코페롤을 사용하여 유하시킨다. 상기 혼합물을 고 압력하에 분리되지 않고 평균 입자 크기가 180nm 미만인 유액이 형성될 때까지 가공한다. 이후에, 유액을 유리 단일투여량 바이알(glass unidose vial)내로 여과하고 장기간 저장을 위해 뚜껑을 덮는다. 당해 제제는 2 내지 8℃에서 저장하는 경우 적어도 3년 동안 사용할 수 있다. 본원에 기술된 것으로서 DSLP 및 단백질을 포함하는 다른 오일-함유 조성물도 미국 특허 제5,650,155호; 제5,667,784호; 제5,718,904호; 제5,961,970호; 제5,976,538호; 제6,630,161호; 및 제6,572,861호에 기술된 바와 같이 제조된 조성물과 유사하게 제조할 수 있다.

[0091] 일부 특수 조성물 및 백신은 전-유형성 H5N1 바이러스로부터의 rH5를 포함한다. 백신에 적합한 rHA의 다양한 형태가 상기 논의되어 있는데; 요약하면, 이들은 전체 길이의 rHA, rHA의 단편, rHA를 포함하는 융합 단백질, 또는 펩타이드를 포함한다. 또한, 하나 이상의 rHA를 함께 사용할 수 있거나 뉴라미니다제와 같은 다른 단백질과 함께 조성물 또는 백신 속에 존재할 수 있다. 하나 이상의 rHA 형태, rHA 서열, 또는 이들 둘다는 본 발명의 조성물 속에 조합될 수 있다.

[0092] 백신 중 rHA 단백질의 양은 전형적으로 낮은 투여량, 예를 들면, 약 0.1μg 내지 약 15μg이다. 적은 양은 rHA 단백질의 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 μg 중 어느 것일 수 있다. 적은 양의 rHA 단백질은, 이것이 하기 설명된 바와 같이, 효능에 관한 국제(예를 들면, EU 또는 FDA) 기준을 충족하는 백신의 제형이 허용되는 한, 실질적으로 실현가능하게 가능한 한 낮을 수 있다. 상기 투여량은 전형적으로 활성, 의도된 투여 횟수, 및 피험자의 체격 및 상태에 의해 결정될 것이다.

[0093] 단백질은 용액으로서 제공될 수 있으나, 또한 무수 형태(예를 들면, 건조된 형태)로 제공될 수 있으며, 이 경우, 사용자는 어떠한 필요한 액체를 가한다. 전형적으로, 완충액, 안정화제, 방부제, 부형제, 담체 및 다른 비-활성 성분과 같은 첨가제가 또한 존재할 수 있다. 첨가제는 전형적으로 약제학적으로 허용되고 생물-적합성이다.

[0094] DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제는 용액으로서 제공되거나, 건조되거나, 유화될 수 있으며, 편리하게는 안정한 수중유 유액으로 제공된다. DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제 외에도, 보조제-함유 조성물은 또한 완충제, 안정화제, 부형제, 방부제, 담체 또는 다른 비-활성 성분을 포함할 수 있다. 첨가제는 전형적으로 약제학적으로 허용되며 생물-적합성이다. 추가의 보조제가 본원에 또한 보다 상세히 기술된 바와 같이 존재할 수 있다. 이들 공-보조제는 2'-5' 올리고 A, 세균 내독소, RNA 이본쇄, 일본쇄 RNA, 지단백질, 펩티도글



리칸, 플라젤린, CpG DNA, 지다당류, MPA(모노포스포릴 지질 A), 3-O-테아실화된 MPL, 지다당류, QS21(사포닌), 수산화알루미늄("백반") 및 다른 무기 염, 오일 유액(예를 들면, MF59<sup>TM</sup>, R848 및 다른 이미다조퀴놀린, 비로숨 및 다른 입상 보조제를 포함한다(참조: Vogel and Powell, "A compendium of vaccine adjuvants and excipients" Pharm Biotechnol 6:141-228, 1995; 이의 전문이 혼입됨).

- [0095] 백신으로서 유용한, 항원을 또한 함유하는 본 발명의 조성물의 투여량 속에 사용되는 DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제의 양, 예를 들면, GLA의 양은 하나의 구체예에서 약 0.5  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 이고, 다른 구체예에서, 약 1.0  $\mu\text{g}$  내지 25  $\mu\text{g}$ 이며, 본 발명의 각종의 다른 구체예에서 약 1 $\mu\text{g}$ , 약 2 $\mu\text{g}$ , 약 2.5 $\mu\text{g}$ , 약 5 $\mu\text{g}$ , 약 7.5 $\mu\text{g}$ , 약 10 $\mu\text{g}$ , 약 15 $\mu\text{g}$ , 약 20 $\mu\text{g}$  또는 약 25 $\mu\text{g}$ 일 수 있다. 투여량 속의 조성물의 총 용적은 전형적으로 0.5 mL 내지 1.0 mL의 범위일 것이다. SE와 같은 유액은 조성물 속에 존재할 수 있으며, 여기서 유액의 오일 성분(들)은 다양한 구체예에서 조성물의 총 용적의 약 0.1%, 약 0.5%, 약 1.0%, 약 1.5%, 약 2%, 약 2.5%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 7.5% 또는 약 10%를 구성한다.
- [0096] DSLP 보조제, 예를 들면, 화학식 1의 보조제, 및 단백질은 별도의 용기 속에 제공되며 현장에서 혼합되거나 예비-혼합될 수 있다. 또한, 단백질은 별도의 용기 속에 존재할 수 있거나 단일 용기 속에서 합할 수 있다. 용기는 바이알, 앰플, 튜브, 또는 다중-웰 장치(multi-well device)의 웰, 저장기, 주사기 또는 어떠한 다른 종류의 용기일 수 있다. 용기 또는 용기들은 키트(kit)로서 제공될 수 있다. 하나 이상의 용기가 건조된 성분을 포함하는 경우, 재구성용 액체가 키트 속에 또한 제공될 수 있거나 사용자에게 의해 제공될 수 있다. 각각의 용기 속의 용액의 양 또는 각각의 용기에 첨가되는 양은 투여 경로 및 각각의 용기 속에 존재하는 투여량의 수와 상응한다. 주사로 제공된 백신은 전형적으로 약 0.1 mL 내지 약 1.0 mL인 반면, 경구적으로 제공된 백신은 보다 큰 용적, 예를 들면, 약 1 mL 내지 약 10 mL일 수 있다. 적합한 용적은 또한 피험자의 신체 및 연령에 따라 변할 수 있다.
- [0097] 조성물은 일반적으로 멸균으로 제공된다. 대표적인 멸균 방법은 여과, 조사(irradiation) 및 가스 처리를 포함한다.
- [0098] 2. 투여
- [0099] 백신은 어떠한 적합한 전달 경로, 예를 들면, 피내, 점막내(예를 들면, 비강, 경구), 근육내, 피하, 설하, 직장, 질로 투여될 수 있다. 다른 전달 경로도 당해 분야에 잘 공지되어 있다.
- [0100] 근육내 경로는 백신 조성물에 대한 하나의 적합한 경로이다. 적합한 근육내 전달 장치는 침 및 주사기, 침이 없는 주사 장치(예를 들면, Biojector, Bioject, OR USA), 또는 펜-주입기 장치, 예를 들면, 집에서 자가-주사시 사용하여 인슐린 또는 에피네프린을 전달하는 것들을 포함한다. 피내 및 피하 전달은 다른 적합한 경로이다. 적합한 장치는 주사기 및 침, 짧은 침이 달린 주사기, 및 제트 주사 장치(jet injection device)를 포함한다.
- [0101] 백신은 점막 경로, 예를 들면, 비강내로 투여할 수 있다. 많은 비강내 전달 장치가 이용가능하며 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 분무 장치는 하나의 이러한 장치이다. 경구 투여는 피험자가 삼키기 위한 용액을 제공하는 것과 같이 단순하다.
- [0102] 백신은 단일 부위 또는 다수 부위에서 투여될 수 있다. 다수 부위인 경우, 투여 경로는 각각의 부위에서 동일할 수 있는데, 예를 들면, 상이한 근육에서 주사될 수 있거나, 상이, 예를 들면, 근육내 주사 및 비강 스프레이일 수 있다. 또한, 백신은 1회 시점 또는 다수 시점에서 투여될 수 있다. 일반적으로 다수 시점에서 투여되는 경우, 투여량들 사이의 시간은 면역 반응을 증진시키기 위해 측정되어졌다.
- [0103] 백신은 질병의 증상들 또는 감염을 방지하거나 약화시키기 위해 유리한 면역 반응을 발휘하기에 충분한 투여량으로 투여된다. 유리한 반응의 한가지 지표는 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대한 항체의 발달, 및 또한 특히 중화 항체의 발달이다. 다른 지표는 바이러스에 대해 반응성인 CD8 또는 CD4 T 세포의 양 또는 기능 또는 횡수의 증가, 및 바이러스 전파의 감소를 포함한다.
- [0104] 많은 잘 공지된 과정이 ELISA 및 바이러스 감염(중화) 검정의 역제를 포함하여, 항체를 검출하고 정량화하는데 이용가능하다. 하나의 실시예 있어서, ELISA 검정은 다중-웰 플레이트의 웰을 HA 단백질로 피복하고, 혈청으로부터 HA 특이적인 항체를 플레이트 위에 포획하고, HA 특이적인 항체를 표지된 항-사람 항체로 검출한 후, 표지의 판독에 의해 수행한다. 표지는 방사활성일 수 있지만, 보다 일반적으로는 비색계적으로 검출될 수 있는 것으로 기질을 전환시키는, 서양 고추냉이 퍼옥시다제와 같은 효소이다.
- [0105] 예시적인 인플루엔자 중화 검정은 플라크 검정을 기초로 하며, 여기서 중화 항체는 감염성의 역제로 검출된다.

바이러스 중화 시험은 동물 및 사람에서 인플루엔자 바이러스 특이적인 항체를 확인하기 위한 고도로 민감하고 특이적인 검정이다. 중화 시험은 2개 단계: (1) 바이러스를 혈청 회석물과 혼합하고 항온처리하여 항체가 바이러스에 결합하도록 하는 바이러스-항체 반응 단계, 및 (2) 혼합물을 적절한 숙주 시스템(예를 들면, MDCK 세포, 부화란 또는 동물과 같은 세포 배양물)내로 접종하는 접종 단계로 수행된다. 세포를 사용할 경우, 바이러스적으로 감염된 세포는 다음날 미세중화 검정으로 검출한다. 세포를 고정시키고 감염된 세포내에서 인플루엔자 A 바이러스 핵단백질 (NP)을 ELISA로 검출한다. NP의 검출은 이러한 혈청 회석물에서 중화 항체의 부재를 나타낸다. 감염성의 부재는 양성 중화 반응을 구성하며 혈청 시료속에서 바이러스 특이적인 항체의 존재를 나타낸다(참조: "Influenza Virus Microneutralization Assay", CDC publication, LP-004, R-2 (K Hancock) Effective October 19, 2009.). 인플루엔자 바이러스에 대한 다른 중화 시험은 MDCK 세포 배양물 속에서 세포병변 효과 (CPE) 형성의 억제를 기초로 한다(참조: Sidwell and Smee, *Antiviral Res.* 48:1-16, 2000).

[0106] 다른 잘-공지된 검정은 적혈구응집-억제 검정이며, 이는 인플루엔자 바이러스 HA에 대한 면역 반응을 평가한다. 바이러스 표면 상에서 HA 단백질은 적혈구(적혈구 세포, RBC)를 응집시킨다. HA에 대한 항체가 HA에 결합하는 경우, 응집이 억제된다. 일반적으로, 표준화된 양의 HA 항원을 일련 회석된 혈청 시료와 혼합하고, 적혈구를 가하고, 응집 정도를 평가한다. 혈청중 응집의 비 특이적인 억제제를 우선 RBC 상에서 혈청의 흡착으로 제거한다(참조: "Serologic Detection of Human Influenza Virus Infections by Hemagglutination-Inhibition Assay Using Turkey RBCs" CDC publication, LP-003, R-1 (K Hancock) Effective October 2, 2009).

[0107] 생산된 항체의 유형 및 아형을 또한 측정할 수 있다. IgM, IgG 및 IgG 아형, 및 IgA를 측정하기 위한 검정은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 한가지 일반적으로 사용된 검정은 ELISA이다. 요약하면, 미세영가 플레이트를 항원, 예를 들면, rHA 또는 불활성화된 전체 바이러스로 피복시킨다. 단백질(예를 들면, 1% 소 혈청 알부민)을 함유하는 용액 속에서 차단시킨 후, 혈청 시료의 일련 회석물을 웰에 가한 후, 면역글로부린 동형 특이적인 제2 항체로 처리한다. 항-동형 항체를 표지하거나 표지된 항체-결합 분자를 가한다. 표지의 양을 측정한다.

[0108] 전-유행성 백신에 대한 FDA에 따른 기준은 교차-반응성인 면역성을 유도하는 능력이며, 이는 백신이 상이한 계통 분기 및 아-계통 분기로부터 유전적으로 명확한 바이러스에 대해 면역성을 유도함을 의미한다. 교차-반응성은 본원에 기술된 항체 검정 중 어느 것에 의해 또는 당해 분야에 공지된 다른 것에 의해 시험할 수 있다. 예시적인 검정에서, 혈청을 면역화 HA를 함유하는 바이러스를 포함하는, 각종 바이러스로부터의 HA에 대한 항체에 대해 시험한다. 이들 검정을 위해, HA 단백질 또는 전체 바이러스(바람직하게는 불활성화됨)를 사용할 수 있다.

[0109] T 세포 기능에 대한 검정은 IFN- $\gamma$  ELISPOT 및 ICS(세포내 사이토킨 염색)를 포함한다. 몇가지 사이토킨에 대한 사이토킨 생산을 측정함으로써 Th1/Th2 프로파일을 달성할 수 있다. 특히, 목적하는 양식은 IFN- $\gamma$  및 IL-2 생산 및 감소된 IL-5 및 IL-4 생산에 있어서의 증가이다. 인터페론-감마를 검출하는 ELISPOT 검정이 후보물 백신에 대한 CD4 및 CD8 T 세포 반응을 정량화하기 위해 광범위하게 사용된다. ELISPOT 검정은 고정된 항체에 의해 트래핑되고 효소-커플링된 제2 항체에 의해 가시화된 사이토킨의 항원-유도된 분비를 검출하는 ELISA의 원리를 기초로 한다. ISC는 사이토킨 발현에 이은 효능제, 예를 들면, T 세포 표면 분자 또는, MHC 부류 분자에 결합하는 펩타이드에 대한 항체를 사용한 자극에 의해 세포독성 T 세포를 정량화하기 위해 통상적으로 사용된 방법이다. ICS 및 ELISPOT의 예시적인 과정은 하기 실시예에 기술되어 있다.

[0110] 항원 특이적인 T 세포 기능을 또한 측정할 수 있다. IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF를 공-발현하는 인플루엔자 특이적인-CD4+T 세포는, 단일 사이토킨을 생산하는 세포와 비교하여 보다 우수한 기능적 활성 및 동시자극적 효능을 가진다. 따라서, 다중 사이토킨-생산 CD4+ T 세포의 유도가 바람직하다. 항원 특이적인 T-세포 자극 검정을 사용하여 IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$  및 이의 조합을 생산하는 CD4 T 세포의 빈도를 유동 세포분석기로 평가할 수 있다. 당해 검정에 대한 IL-5의 첨가는 Th1 대 Th2 CD4+ 세포를 구별하는데 사용될 수 있다. 면역화 후 3, 6, 12, 및 24주째에 시간 경과 실험을 수행하여 장기-지속하는 T 세포 반응을 측정한다. 유동 세포분석을 또한 사용하여 효과기 기억 CD4+ T 세포(TEM: CD4+CD62L-CCR7-IFN $\gamma$ +) 및 중심 기억 CD4 T(TCM:CD4+CD62L+ CCR7+IL2+IFN $\gamma$ +/-) 세포의 생성을 측정하고 구별할 수 있다. IFN $\gamma$ , TNF 및 IL-2의 생산을 유도하고 CD4CM을 증가시키는 백신 제형이 바람직하다. 세포독성 CD8+ T 세포는 또한 바이러스 부하(virus load)를 제거하고 질병 진행을 제한하는데 역할을 담당한다. 항원 특이적인 CD8+ T 세포를 유발하는 백신이 바람직하다.

[0111] 하나의 측면에서, 본 발명은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 사람의 집단을 면역화시키는 방법을 제공하며, 여기서 이들 사람은 바이러스에 잠정적으로 노출될 것이다. 당해 방법은 약제학적 조성물의 단일 주사를 투여함을 포함하며, 여기서 단일 주사는 단일 주사를 제공받은 집단의 적어도 50%에서 혈청전환이 달성된다. 약제학적 조성물은 (a) 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스로부터의 재조합체 적혈구응집소

(rHA) 및 (b) DSLP 보조제를 포함하는데, 예를 들면, 여기서 부형제는 글리코실 및 아미노 치환된 글리코실로부터 각각 독립적으로 선택된 환원 및 비-환원 말단을 갖는 이당류를 포함하고, 여기서 비-환원 말단의 1 위치에 탄소는 에테르(-O-) 또는 아미노(-NH-) 그룹을 통해 환원 말단의 6' 위치의 탄소에 연결되어 있고, 이당류는 비-환원 말단의 4' 탄소를 통해 인산염 그룹에 및 아마이드(-NH-C(O)-) 및/또는 에스테르(-O-C(O)-) 연결을 통해 다수의 지질 그룹에 결합되고, 여기서 에스테르 또는 아마이드 연결의 카보닐(-C(O)-) 그룹은 지질 그룹에 직접 연결되며, 각각의 지질 그룹은 적어도 8개의 탄소를 포함한다. 각종 구체예에서, 조성물은 유액을 포함하지 않거나 어떠한 오일, 예를 들면, 스쿠알렌을 포함하지 않는다. 오일을 포함하지 않는 조성물은 일부 보건 전문가에 의해 부작용을 줄이는 경향이 있는 것으로 고찰되어 있다. 예를 들면, 유액은, 오일이 존재하는 경우, 백신이 주사를 제공받은 피감자에게 따끔거림 및 통증을 유발할 수 있다는 점에서 백신 조성물을 리액토제닉(reactogenic)하도록 하는 경향이 있다는 우려가 증가되고 있다. 유액이 포함되지 않은 조성물의 다른 장점은, 전형적인 사용시, 백신 조성물이 2개 성분들: 항원을 함유하는 조성물 및 보조제를 함유하는 조성물로부터 제조되며, 여기서 이들 2개 조성물은 혼합되어 최종 백신을 제조한다는 것이다. 조성물들 각각의 안전성은 바람직하게는 장 기간에 걸쳐 높다. 보조제 또는 항원에 대한 담체로서 유액을 사용하는 한가지 문제는, 유액이 장기간에 걸쳐 불안정해지는 경향이 있거나 이들의 안전성을 유지하기 위하여 특수한 용기 또는 화학물질을 필요로 한다는 것이다. 하나의 구체예에서, 본 발명은 오일을 함유하지 않는, 예를 들면, 안전성이 우수하고 효능이 높은 유액을 포함하지 않는 조성물을 제공한다. 바람직한 구체예에서, DSLP 보조제는 GLA이고, 보다 바람직하게는 예를 들면, 보조제 및 표면활성제, 예를 들면, 인지질만으로 이루어진 동결건조된 형태로 장기간 저장된 후 담체 및 항원과 혼합되어 유효 백신을 제공할 수 있는, 오일을 함유하지 않는 담체 중 GLA(또는 다른 DSLP 보조제)이다.

[0112] 백신의 다른 목적하는 측면은 투여량- 및 용량-절약 특성을 포함한다. 용량-절약은, 일반적인 것보다 더 적은 투여량을 사람에게 투여하여 목적하거나 효과적인 면역 반응을 여전히 상승시킬 수 있음을 의미한다. 투여량-절약은, 보다 적은 양의 항원이, 기타의 경우 하기 경우일 수 있는, 목적하거나 효과적인 면역 반응을 상승시키는 데 요구됨을 의미한다. 투여량- 및 용량-절약은 전-유행성 또는 유행성 인플루엔자 바이러스에 대해 백신의 개발과 관련된 기술적 문제, 예를 들면, 조류 또는 돼지 바이러스 HA가 사람에서 유발하는 약한 면역 반응을 극복하기 위함을 의미한다. 이전의 유행성 독감 백신의 개발 동안, 대규모 다중심 시도는, 28일 시차로 90 $\mu$ g의 H5의 2회 주사가 사람의 단지 54%에서 보호를 제공하였음을 밝혀냈다(참조: Treanor et al., New England Journal of Medicine 354:1343-1351, 2006). 전세계는 현재 목적하는 시간내에서 90 $\mu$ g의 2회 주사로서 투여된 유행성 독감 백신의 단지 70 밀리온 투여량(million dose)만을 현재 생산할 수 있는 것으로 추정된다(참조: Poland, G.A., New England Journal of Medicine, 354:1411-1413, 2006). 바람직한 백신 제형은 투여량- 및 용량-절약을 통해, 백신화, 즉 혈청전환을 달성하기 위해 요구되는 단백질의 양을 감소시킨다.

[0113] 본원에 기술된 검정 중 어느 것도 투여량- 및/또는 용량-절약을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 투여량 및 용량-절약을 확인하기 위한 예시적인 검정은 예방접종에 대한 혈청 항체 반응을 측정하는 적혈구응집 억제(HAI) 검정이다. FDA는 40 이상의 HAI 역가가 천연 감염으로부터 보호를 예측하기에 적합한 면역학적 매개변수임을 기술하는 유행성 인플루엔자 백신 평가에 대한 가이드라인을 확립하였다(참조: Food and Drug Administration 2007 Guidance for industry: clinical data needed to support the licensure of seasonal inactivated influenza vaccines). 본원에 사용된 것으로서, HAI 역가가 40 이상인 사람은 혈청전환을 달성한 사람으로 고려될 것이다. 항원의 예시적인 투여량은 항원 제형을 사용하여 한번, 즉, 단지 1회 예방접종된 개인의 약 50%에서 약 40의 HAI 역가를 달성하기에 효과적인 백신 제형중 항원의 양이다. 항원의 다른 예시적인 용량은 항원 제형으로 한번 예방접종된 개인의 약 70%에서 약 40의 HAI 역가를 달성하기에 효과적인 백신 제형중 항원의 양이다. 항원의 다른 예시적인 투여량은 항원 제형으로 한번 예방접종된 개인의 약 80%에서 약 40의 HAI 역가를 달성하는데 효과적인 백신 제형 중 항원의 양이다.

[0114] 본원에 기술된 약제학적 조성물, 백신 조성물 및 키트는 개인에게 투여되어 인플루엔자 감염을 예방하거나 보호하거나 감염 후 질병을 치료할 수 있다. 투여는 전-유행성 단계 또는 유행성 동안 수행될 수 있다.

[0115] 조성물을 제공받기 위한 피험자는 고-위험군 개인, 예를 들면, 아프거나 죽은 동물, 예를 들면, 조류(H5N1 바이러스의 경우)와 밀접하게 접촉하거나 접촉할 가능성이 있는 개인들, 유행병에 대해 "준비(prime)"하기 위해 선택된 집단, 어린이, 노인, 가임 여성, 특정의 만성 의학 상태 또는 면역억제 상태인 사람, 및 이상적으로는 전 세계의 집단을 포함한다.

[0116] 인플루엔자는 단일 투여량(예를 들면, 주사)으로서 또는 다중 투여량으로서 조성물의 투여에 의해 피할 수 있다. 다중 투여량을 투여하는 경우, 일반적으로 제2 및 후속적인 투여량은 시간 간격 후에 투여된다. 흔히 초

기 투여량의 투여는 면역 반응의 "준비(priming)"로 불리며, 후속적인 투여량의 투여는 면역 반응의 "부스팅(boosting)"으로 분된다. 전형적으로, 제1 투여와 제2 투여 사이의 시간은, 비록 보다 짧거나 긴 기간이 사용될 수 있다고 해도, 2주 이상이다. 추가의 투여량은 초기 투여 후 적어도 2 내지 4주째 투여될 수 있으며, 일부 경우에 초기 투여량 후 긴(예를 들면, 1년) 기간 동안 투여될 수 있다. 인플루엔자 감염 후 투여량(들)의 투여는 질병을 치료하기 위해 제공된다.

[0117] 유행성 바이러스의 HA 서열은 이동되고 전-유생성 단계에서 이의 잠재적인 바이러스가 유행성이 될 것인지 알지 못하므로, 관련된 바이러스에 대해 광범위한 보호를 제공하는 백신을 투여하는 것이 바람직하다. 본원에 나타낸 바와 같이, 관련된 바이러스에 대한 항체는 하나의 rHA 단백질의 투여로부터 획득되었다. 광범위한 보호를 획득하기 위한 다른 방법은 하나의 rHA를 사용하여 준비하고 상이한 rHA로 부스트할 수 있다.

[0118] 조성물은 다른 항바이러스제와 함께 투여할 수 있다. 항바이러스제는 증식(multiplying)으로부터 이들을 중지시키기 위해 바이러스에 직접 작용하는, 의약, 약물, 허브 등이다. 일부의 잘 공지된 항바이러스제는 Tamiflu®

(오셀타미비르), 아만타딘(Symmetrel®

), 리만타딘(Flumadine®

), 자나미비르(Relenza®

), 페라미비르, 라니나미비르를 포함한다. 다른 뉴라미니다제 억제제 및 M2 억제제 또한 이용가능할 수 있다. 중국 허브도 또한 조성물과 함께 투여될 수 있다. 다른 제제는 기침 시럽, 아스피린과 같이 증상을 치료하는 것들을 포함하며, 이부프로펜과 같은 NSAID 또한 제공될 수 있다.

[0119] 다음 실시예는 설명을 위해 제공되며, 제한하지 않는다.

## [0120] 실시예

### [0121] 실시예 1

#### [0122] 마우스에서 단일 주사 rH5/GLA-SE 독감 백신의 효능

[0123] 본 실시예는, 재조합체 인플루엔자 H5 (rH5) 단백질을 사용한 단일 예방접종이 고 역가의 H5N1 바이러스로 챌린지한 마우스에서 보호성 항-바이러스 면역 반응을 효과적으로 준비할 수 있음을 입증한다. Balb/c 마우스(5마리/그룹)에 증가하는 양(0, 50, 150, 450, 900, 또는 2700 ng)의 rH5 단백질(H5N1 Viet Nam 1203으로부터 기원; 제조원: Protein Sciences, 커넥티컷주 메리덴 소재) 단독 또는 GLA-SE 보조제(2%의 SE 중 20 $\mu$ g의 GLA)와 함께 제형화된 rH5 단백질로 1회 근육내(IM) 주사하였다. 마우스를 H5N1 Viet Nam 1203(1000 $\times$ LD<sub>50</sub>)의 비강내 투여에 의해 14일 후에 챌린지하였다. 마우스를 체중 감소에 대해 매일 모니터링하고 체중 감소가 20 내지 30%를 초과할 경우 안락사시켰다. rH5 단백질 만을 사용한 예방접종은, 보조제의 부재하에서 rH5로 주사한 모든 동물이 바이러스 챌린지 후 자발적으로 사멸하거나(25마리 동물 중 18마리) 유의적인 이환율(morbidity)을 나타내거나 안락사되었으므로(25마리 동물 중 7마리) 보호성 면역성을 제공하지 않았다. 그러나, rH5 + GLA-SE 보조제를 사용하여 예방접종된 모든 마우스는 심지어 투여된 최저 투여량의 rH5 단백질에서조차 생존(25마리 동물 중 25마리)하였다. 이들 결과는, 재조합체 소단위 인플루엔자 백신의 단일 주사가 GLA-SE 보조제와 함께 제형화된 경우 마우스에 대해 보호 면역성을 부여할 수 있음을 나타낸다. 이러한 보호 면역성은 항원 투여량에서 50-배 감소에도 불구하고 관찰되었다.

[0124] rH5 백신에 GLA 보조제를 첨가하는 이점은 바이러스 챌린지 후 예방접종된 동물에서 체중 감소를 시험함으로써 추가로 탐험하였다. Balb/c 마우스(5마리/그룹)에게 증가하는 양의 rH5 단백질을 단독으로(0, 50, 150, 450, 900, 또는 2700 ng) 또는 20 $\mu$ g의 GLA-SE 보조제와 함께 제형화된 rH5 단백질 또는 SE 유액만(100  $\mu$ L의 2% 용액) 1회 주사하였다. 마우스를 H5N1 Viet Nam 1203 (1000 $\times$ LD<sub>50</sub>)으로 14일 후 챌린지하고 체중을 챌린지 후 14일째에 측정하였다. rH5 단백질 만으로 백신화된 마우스는 바이러스 챌린지 후 상당한 체중을 상실하였으며 심지어 투여된 백신의 최고 투여량에서조차, 어떠한 회복을 입증하기 전에 죽었다. 대조적으로, GLA-SE 보조제와 함께 제형화된 rH5 단백질을 사용하여 예방접종한 모든 동물은 바이러스 챌린지로 생존하였고 체중을 획득할 수 있었다. SE 유액만으로 제형화된 rH5 단백질을 예방접종한 마우스는 또한 바이러스 챌린지로부터 회복되고 체중을 획득하였다.



[0125] 이들 2개 그룹 사이에서 회복에 있어서의 차이를 정량화하기 위해, 모든 그룹에 대한 14일 시험 기간에 걸쳐 평균 퍼센트 체중 변화를 2주의 시험 기간에 걸쳐 매일 체중 변화를 나타내는 곡선하 영역을 측정함으로써 계산하였다. 이들 값을 나타내는 막대 그래프는 도 1a에 나타내며, 이는, GLA-SE와 함께 제형화된 rH5를 제공받은 동물들이 SE 유액만으로 제형화된 rH5를 제공받은 동물들보다 상당히 적은 체중을 상실함을 나타낸다. 이들 결과는, GLA 보조제와 함께 제형화된 rH5가 모든 항원 투여량에서 우수한 보호를 유도함을 입증한다. 따라서, rH5 단백질에 GLA 보조제를 첨가하는 것은 마우스에서 단일의 저 투여량 주사로서 투여하는 경우 보호 면역성을 확립하는 크게 개선된 백신을 수득한다. 이들 결과는, GLA 보조제와의 제형은 유행성 독감에 대한 백신을 기초로 재조합체 단백질을 개발하는 것과 관련된 챌린지 중 일부에 대해 강력한 해결법, 즉, 단지 단일의 백신 주사가 보호 면역성을 확립하는데 요구되도록 항원 면역원성의 증강을 제공함을 제안한다. 백신의 용량-절약은 강력한 유행성 독감에 대해 준비하는데 있어서 보건자에게 위급한 우선권이다.

[0126] GLA 보조제로 구성된 rH5 백신의 개선된 특성은 바이러스 챌린지 후 예방접종된 동물에서 역학적 체중 변화를 측정함으로써 추가로 연구하였다. Balb/c 마우스(5마리/그룹)에게 GLA-SE 보조제 또는 SE 유액 단독 속에 제형화된 50ng rH5 단백질로 1회 주사한 후 14일 후에, 상기한 바와 같이, H5N1 Viet Nam 1203 (1000×LD<sub>50</sub>)으로 챌린지하였다. 대조군으로서, 마우스를 rH5 단백질의 부재하에서 GLA-SE 보조제 또는 SE 유액으로 예방접종하였다. 마우스를 바이러스 챌린지 후 각각의 날에 칭량하고 체중 감소 퍼센트를 챌린지 전 동물의 체중과 비교하여 측정하였다. 당해 챌린지 모델에서, 면역화되지 않은, 나이브 마우스(naive, mouse)는 신속한 체중 손실이 관측된 후 사멸에 의해 입증되는 바와 같이, 바이러스 챌린지로부터 회복하지 않는다. 도 1b에 나타낸 바와 같이, 바이러스 챌린지에서 생존하는 모든 마우스는 면역화되지 않은 대조군 그룹에서 관찰된 것과 동일한 비율로 초기에 감소된 이들의 체중으로서 감염의 증상을 나타내었다. 그러나, GLA-SE와 함께 제형화된 rH5를 사용하여 면역화된 마우스는 바이러스 챌린지 후 10 내지 12일째에 예비-예방접종 수준으로 회복한 체중 증가에 의해 나타낸 바와 같이 바이러스 챌린지로부터 회복하였다. SE 유액만으로 제형화된 rH5를 사용하여 면역화된 마우스 또한 회복되었으나, 이들의 회복율은 GLA-SE 부형제와 함께 제형화된 rH5로 예방접종된 동물에서 관찰된 것과 비교하여 유의적으로 지연되었다. 이러한 보호는, GLA-SE 보조제 또는 SE 유액만으로 면역화된 동물이 나이브 마우스의 것과 유사한 방식으로 바이러스 챌린지에 대해 반응하므로, rH5 단백질에 의존적이었다. 중요하게도, 이들 데이터는, 단일 주사, 저 투여량 rH5 백신의 개선된 효능이 rH5 단백질 및 GLA 보조제의 조합된 활성화에 의존적임을 나타낸다.

[0127] GLA 보조제 속에 제형화된 rH5 백신의 개선된 효능에 필수적인 성분들을 추가로 정의하기 위하여, 체중 변화의 역학을 GLA-SE 보조제 단독, rH5 단백질 + SE 단독, rH5 + GLA 단독, 또는 rH5 + GLA-SE로 예방접종한 동물에서 측정하였다. 도 1c에 나타낸 바와 같이, 면역화되지 않은 대조군 마우스 및 rH5 단백질의 부재하에서 GLA-SE로 면역화된 마우스는 체중을 크게 상실하였으며 앞서 관찰된 바와 같이 바이러스 챌린지 후 죽었다. 대조적으로 rH5와 GLA-SE의 조합물로 면역화된 마우스는 바이러스 챌린지로부터 회복되어 완전한 체중을 재-확립하였다. SE 단독 또는 GLA 단독으로 제형화된 rH5로 면역화된 마우스 또한 회복하였으나, 이들 2개 그룹에서 관찰된 회복률은 rH5 + GLA-SE 백신을 제공받은 마우스의 것과 비교하여 상당히 지연되었다. 이들 데이터는, SE 유액 속에서 rH5와 GLA 보조제의 조합물이 어떠한 개인 성분의 것과 비교하여 우수한 특성을 보여줄을 나타낸다.

## [0128] 실시예 2

### [0129] 단일 주사로 투여되는 경우 마우스에서 이중 면역성을 부여하는 rH5/GLA-SE 독감 백신

[0130] 본 실시예에서, 이중 바이러스 챌린지에 대해 GLA 보조제와 함께 제형화된 재조합체 백신의 보호 효능을 입증하였다. 이들 실험을 위해, 마우스를 H5N1 Indonesia(계통 분기 2.3)로부터 분리한 rH5 단백질의 단일 주사로 면역화시킨 후, 위에서 기술한 바와 같이 H5N1VN 바이러스로 챌린지하였다. 양성 대조군으로서, 마우스를 H5N1Vietnam으로부터의 동종 rH5 단백질로 예방접종하는 한편, 음성 대조군으로서, 마우스를 관련되지 않은 HSV-2 바이러스 단백질(rG013)로 예방접종하였다. 표 1에 나타낸 바와 같이, HSV-2 단백질로 예방접종된 마우스는 단백질-보조제 제형과 관계없이 모두 사망하였다. 50 ng의 동종 rH5VN 단백질만으로 예방접종한 모든 마우스가 사망한 반면, GLA-SE 보조제와 함께 제형화한 rH5VN으로 예방접종된 마우스 모두는 앞서의 발견들과 일관되게 생존하였다. 중요하게도, GLA-SE와 함께 제형화된 50 ng 또는 200 ng의 이중 rH5 Indo 단백질을 제공받은 마우스 모두도 또한 생존하였으며, 이는, GLA-SE가 교차-계통 분기 보호 면역성을 효과적으로 확장시킴을 입증한다. 흥미롭게도, 투여된 rH5 Indo (50 ng)의 최저 투여량에서, 단백질과 SE 단독의 제형은 바이러스 챌린지로부터 마우스를 보호하는데 실패한 반면(마우스는 생존하지 않음), SE 유액의 부재하에서 GLA와의 제형은 마우스의 40%에서 보호를 나타내었다(2마리/5마리).

표 1

항원	(ng)	rH5 단독	rH5 + SE	rH5 + GLA	rH5 + GLA-SE
rH5 VN	50	0/5	5/5	5/5	5/5
rH5 Indo	50	0/5	0/5	1/5	5/5
rH5 Indo	200	0/5	2/5	2/5	5/5
rG103	200	0/5	0/5	0/5	0/5

[0131]

[0132]

rH5 Indo 백신의 개선된 효능은 GLA 보조제와 함께 제형화되는 경우 도 2에 나타난 바와 같이, 바이러스 챌린지 후 체중 감소로부터의 회복이 모니터링되었던 경우 관찰되었다. 앞서의 실험들에서 관측된 바와 같이, rH5 단백질 만으로 예방접종된 마우스는 바이러스 챌린지로부터 회복하지 않은 반면, GLA-SE 보조제와 함께 제형화된 rH5를 제공받은 마우스는 신속한 회복을 나타내고 이들의 전-챌린지 수준으로의 체중을 회복하였다. GLA-SE 보조제와 함께 제형화된 이중 rH5 Indo 단백질로 예방접종된 마우스 또한, 재조합체 단백질의 투여량에 의존한 역학과 함께, 신속하게 회복하였다. 따라서, GLA-SE는 동종 및 이중 재조합체 독감 백신 둘 다의 효능을 증진시킨다. 투여량 및 용량 절약 백신을 사용한 교차-계통 분기 보호 면역성의 확립은 후보물 유행성 독감 백신의 특히 유리한 특성이다.

[0133]

실시예 3

[0134]

마우스에서 항원 특이적인 면역성의 확립을 가속화하는 GLA-SE

[0135]

본 실시예는 면역화 후 후속된 수일째에 인플루엔자 바이러스를 사용한 마우스의 챌린지에 의해 마우스 보호 모델에서 면역성을 확립하기 위한 일시적인 요건을 입증한다. 마우스를 앞서 기술한 바와 같이 SE 단독 또는 GLA-SE 보조제 속에 제형화된 저 투여량의 rH5 단백질의 단일 주사로 예방접종하였다. 대조군으로서, 마우스를 rH5 단백질 또는 GLA-SE 만으로 예방접종하였다. 마우스를 예방접종 후 다양한 날(0, 2, 4, 6, 8, 10, 또는 12일)에 챌린지하고 생존 퍼센트를 14일 후 측정하였다. 도 3a에 나타난 바와 같이, GLA 보조제와 함께 제형화된 rH5 단백질을 예방접종 후 4 내지 6일내에 보호 면역성을 확립하였다. 예측한 바와 같이, 당해 효과는, 이들 성분들 중 어느 하나를 결여한 백신을 제공받은 마우스 모두가 사망하였으므로, 재조합체 단백질 및 GLA-SE 둘다에 의존적이었다. SE 만으로 제형화된 rH5를 제공받은 마우스는, 비록 당해 그룹에서 보호 면역성의 획득이 rH5 + GLA-SE 그룹에서 관찰된 것과 비교하여 1일에 걸쳐 지연되었다고 하더라도, 바이러스 챌린지로부터의 보호를 입증하였다.

[0136]

체중 감소의 역학은 앞서 기술한 바와 같이, 예방접종 후 6일 또는 14일 후에 바이로스로 챌린지한 마우스에서 측정하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 마우스를 면역화 후 6일째에 챌린지한 경우, rH5 + SE 유액 단독의 그룹은 rH5 + GLA-SE 보조제를 제공받은 그룹과 비교하여 유의적으로 보다 더 많은 체중을 상실하였다. 그룹들 사이에 관찰된 이러한 차이는 백신화 후 14일까지 챌린지의 지연시 감소되지 않았다(참조: 도 3b). 이들 데이터는, GLA 보조제 속에 제형화된 rH5를 사용한 예방접종이 바이러스 챌린지 후 체중 감소를 줄일 뿐 아니라, 동물이 보다 신속하게 유의적으로 회복하도록 함을 나타낸다. 일반적인 건강에 있어서 유사한 경향이 임상 점수매김 방법을 사용하여 관찰되었다(참조: 도 3c). rH5 + GLA-SE로 치료한 마우스는 덜 아픈 것으로 나타났다며 예방접종의 시간과 관계없이 rH5 +SE 단독 그룹보다 더 빠르게 회복하였다. 따라서, GLA-SE 보조제는 SE 유액 단독과 비교하여 항원 특이적인 면역성의 확립을 가속화한다. 보호 면역성을 신속하게 유도하기 위한 투여량- 및 용량-절약 재조합체 백신의 능력은 유행성 독감 백신의 고도로 바람직한 특성이며, 이는 예측하지 않은 광범위하고 신속한 바이러스 전파에 대해 효과적이어야 한다.

[0137]

실시예 4

[0138]

마우스에서 고도로 지속가능한 보호 면역성을 확립하는 GLA-SE 속에 제형화된 rH5 단백질을 사용한 예방접종

[0139]

본 실시예에서, 보조제-의존성 보호의 지속성은 마우스를 저 투여량의 동종(rH5VN) 또는 이중(rH5Indo) 항원을 사용한 면역화 후 46일 후에 H5N1VN을 사용한 바이러스 챌린지에 의해 평가하였다. 표 2에 나타난 바와 같이, GLA 보조제와 함께 제형화된 재조합체 H5 항원을 사용하여 예방접종된 마우스 모두는, 예방접종이 동종 또는 이중 rH5 단백질을 사용하여 이루어졌는지에 상관없이, 예방접종 후 46일째에 바이러스 챌린지에서 생존하였다. 또한, 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, 당해 그룹에서 동물은 바이러스 챌린지로부터 신속하게 회복하였고 매

우 적은 체중이 감소되었다. 도 4c는, 이들 그룹에서 바이러스 부하가 또한 감소되었음을 나타낸다. 중요하게도, 이들 결과는, 저 투여량의 rH5 단백질 및 GLA 보조제의 조합으로 구성된 백신이 마우스에서 인플루엔자 바이러스에 대해 효과적이고 지속가능한 교차-계통 분기 보호를 부여함을 나타낸다.

표 2

항원	(ng)	rH5	rH5 + SE	rH5 + GLA	rH5 + GLA-SE
rH5 VN	50	3/5	3/5	5/5	5/5
rH5 Indo	50	2/5	4/5	3/5	5/5

[0140]

[0141] 실시예 5

[0142] 흰담비에서 rH5/GLA-SE 독감 백신의 단일 주사의 효능

[0143] 본 실시예에 기술된 실험은, 보호 면역성이 독감 백신 개발용으로 적합한 전임상 숙주인, 흰담비에서 저 투여량의 rH5 백신의 단일 주사로 확립될 수 있는지에 초점을 맞추고 있다. 6 내지 12개월령의 수컷의 긴털 족제비 흰담비(공급원: Triple F Farms, 펜실베이아주 사이레 소재)를 모든 실험에서 사용하였다. 접종하기 전에, 모든 동물은 혈구응집소 억제(HI) 검정에 의해 순환하는 계절성 인플루엔자(인플루엔자 A H1N1, H3N2, 및 인플루엔자 B)에 대해 혈청학적으로 음성인 것으로 확인되었다. 모든 실험을 위해, 흰담비를 Duo-Flo Bioclean 이동 청정실(제조원: Lab Products, 델라웨어주 씨포드 소재)내에 포함된 우리(cage)에 가두었다. 기준 혈청, 온도 및 체중 데이터를 감염 전 약 3일 동안 매일 취하였다. 온도를 피하 이식가능한 온도 응답기(temperature transponder)(제조원: BioMedic Data Systems, 델라웨어주 씨포드 소재)를 사용하여 측정하였다. 흰담비(그룹당 4마리)를 0.5 $\mu$ g의 rH5VN를 단독으로 또는 보조제와 함께 1회 예방접종 한 후, H5N1VN으로 예방접종 후 28일째에 챌린지하였다. 흰담비를 총 1mL의 용적 속에서 7.5 $\times$ 10<sup>5</sup> PFU의 A/VN/1203/05 (H5N1) 바이러스를 사용하여 비강내적으로 접종하였다. 비강 세척액을 모든 흰담비로부터 감염 후 1일째에 시작하여 매 24시간마다 수집하고 7일 동안 지속하였다. 이들의 0일째 체중의 >25%가 감소되거나, 신경학적 증상을 나타내거나, 빈사 상태인 것으로 측정된 어떠한 동물도 인도적으로 안락사시켰다. 표 3에 나타난 바와 같이, rH5와 SE, GLA, 또는 GLA-SE를 주사한 모든 동물들은 바이러스 챌린지에 생존한 반면, 보조제 또는 독감 항원을 결여한 GLA-SE 보조제를 사용한 예방접종은 바이러스로부터 모든 동물들을 보호하는데 실패하였다. 바이러스 챌린지 후 체중 감소의 역학을 측정한 경우, GLA 보조제와 함께 제형화된 rH5 백신으로 예방접종한 동물이 rH5 단독 또는 SE 유액 속에서 제형화된 rH5를 사용하여 예방접종된 동물과는 대조적으로, 매우 적은 체중을 감소한 것으로 관찰되었다(참조: 도 5a). 당해 동물 모델에서, 흰담비에서 rH5 + GLA 백신의 최적 효능은 SE 유액을 필요로 하지 않는 것으로 여겨지지 않았다. 이러한 경향은, 각각의 그룹의 임상 점수가 도 5b에 나타난 바와 같이 측정된 경우 개요되었다. GLA 보조제 속에서 제형화된 rH5를 제공받은 동물은 rH5 만을 제공받은 동물과는 대조적으로, 임상 관찰을 기준으로 정상으로 여겨졌다. 종합적으로, 이들 결과는, GLA 보조제를 함유하는 저 투여량의 rH5 백신의 단일 주사가 H5N1 감염에 대해 흰담비를 효과적으로 보호함을 입증한다. 따라서, 단일 주사의 효능을 실질적으로 증진시키기 위한 GLA 보조제의 능력, 저 투여량의 재조합체 H5 백신은 보호 면역성의 2개의 상이한 동물 모델에서 입증되었다.

표 3

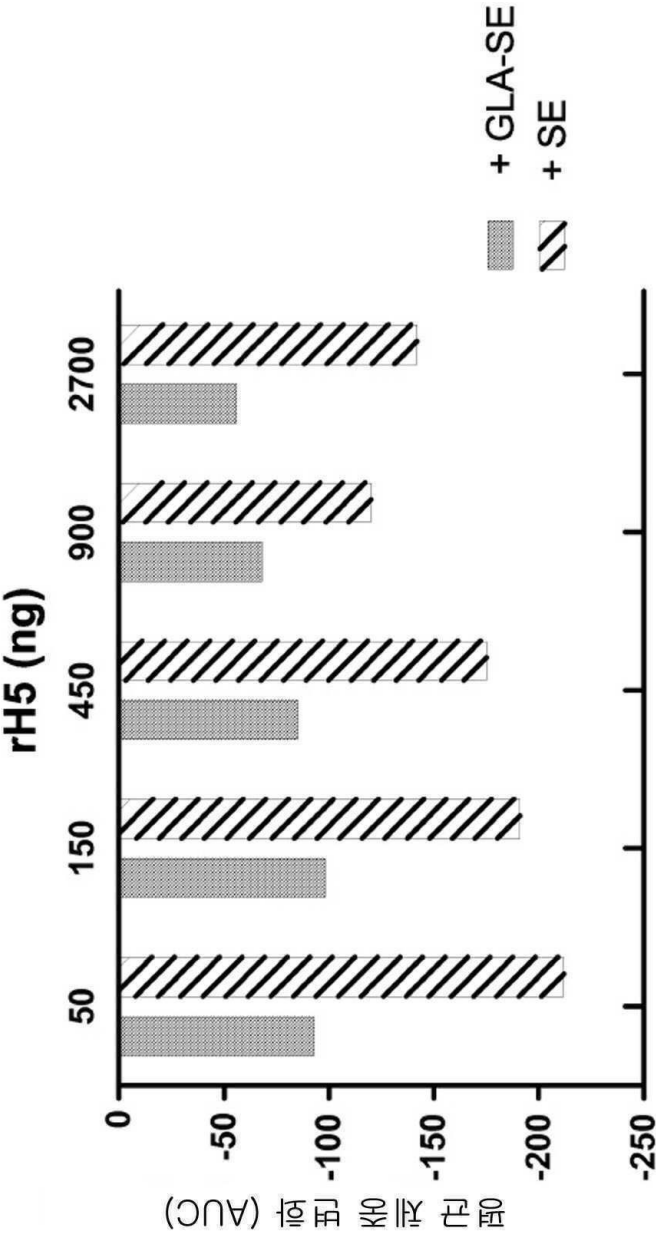
항원	(ng)	나이브	GLA-SE	rH5	rH5 + SE	rH5 + GLA	rH5 + GLA-SE
rH5 VN	50	0/4	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4

[0144]

[0145] 상기로부터, 비록 특수 구체예들이 설명할 목적으로 본원에 기술되었지만, 각종 변형이 본 발명의 취지 및 영역으로부터 벗어남이 없이 이루어질 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 특허청구범위만으로 제한되지는 않는다.

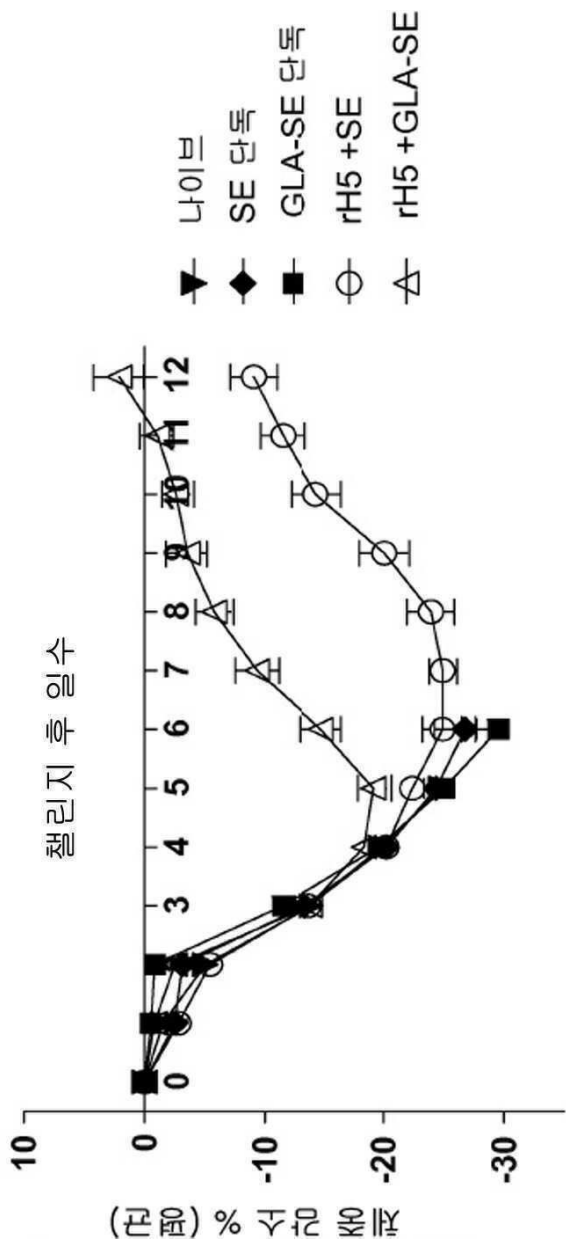
도면

도면1a

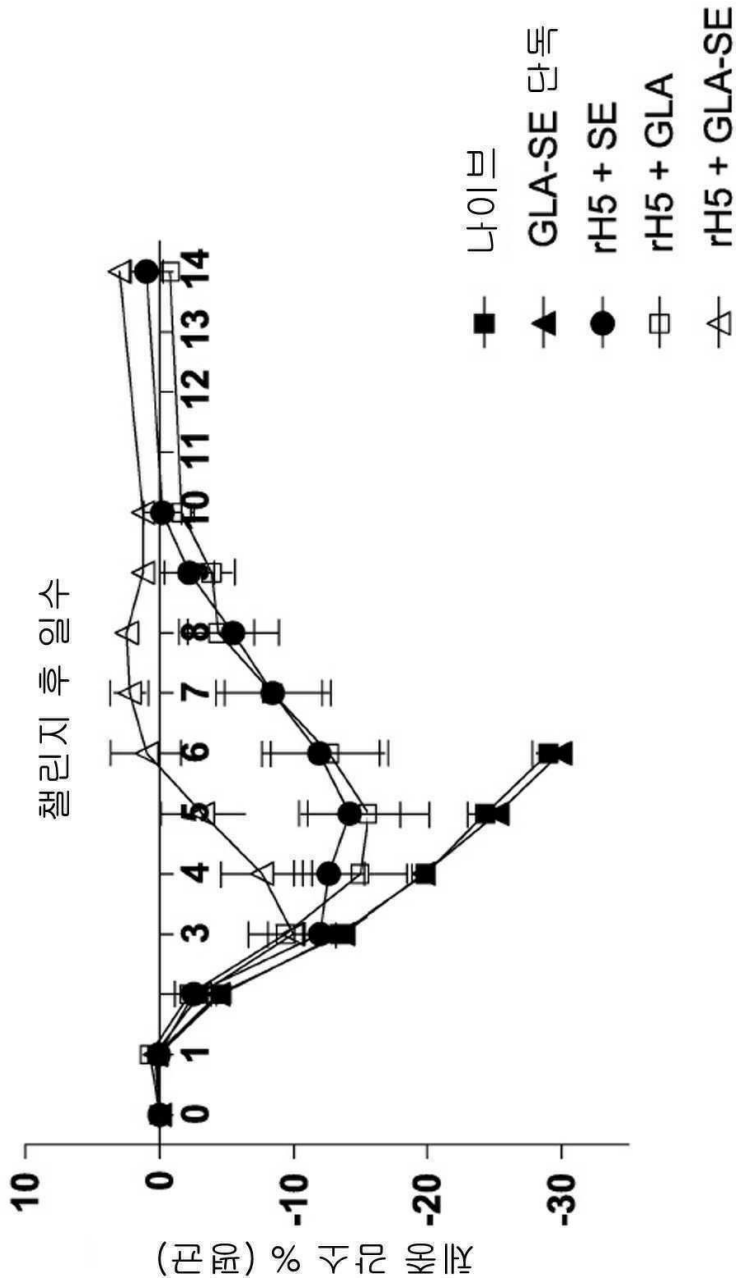




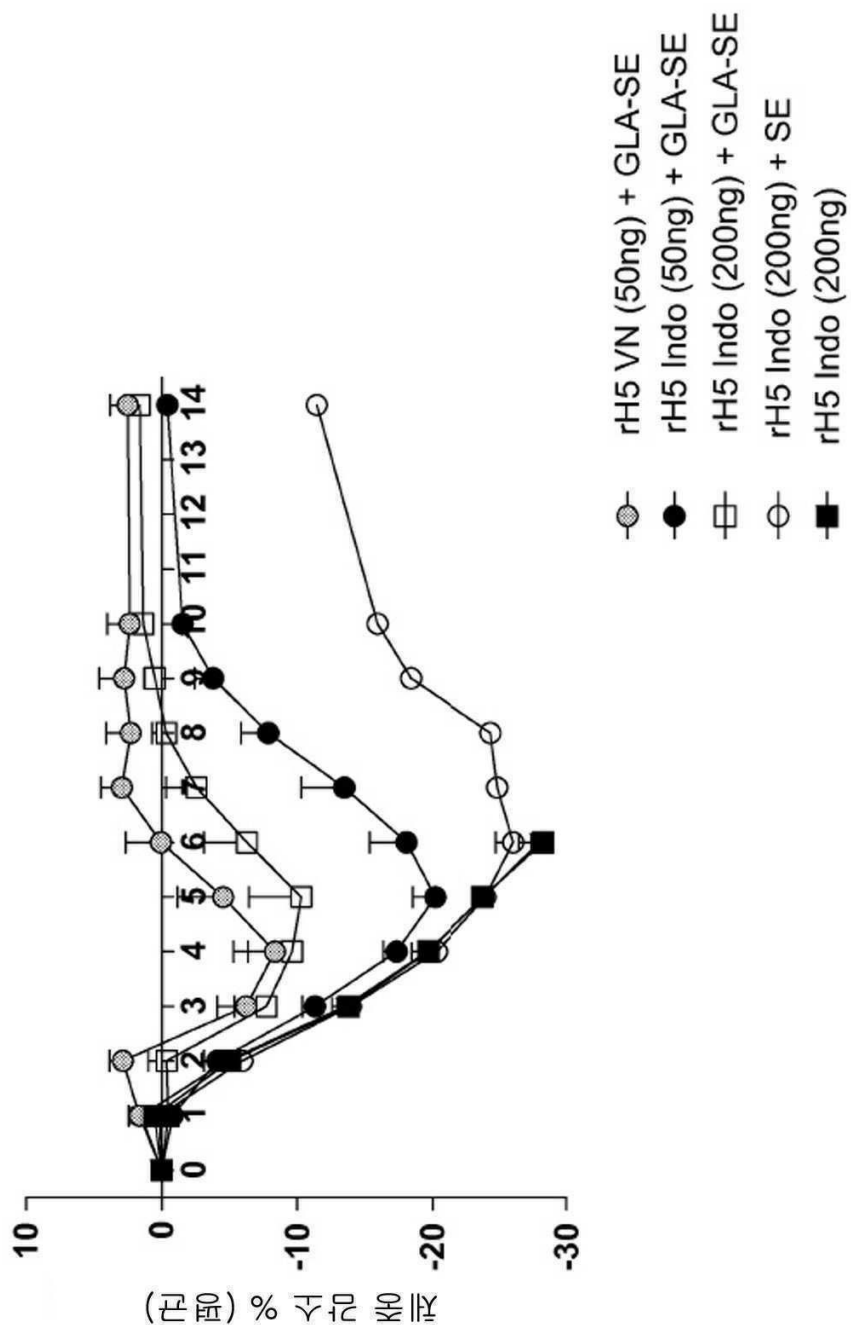
도면1b



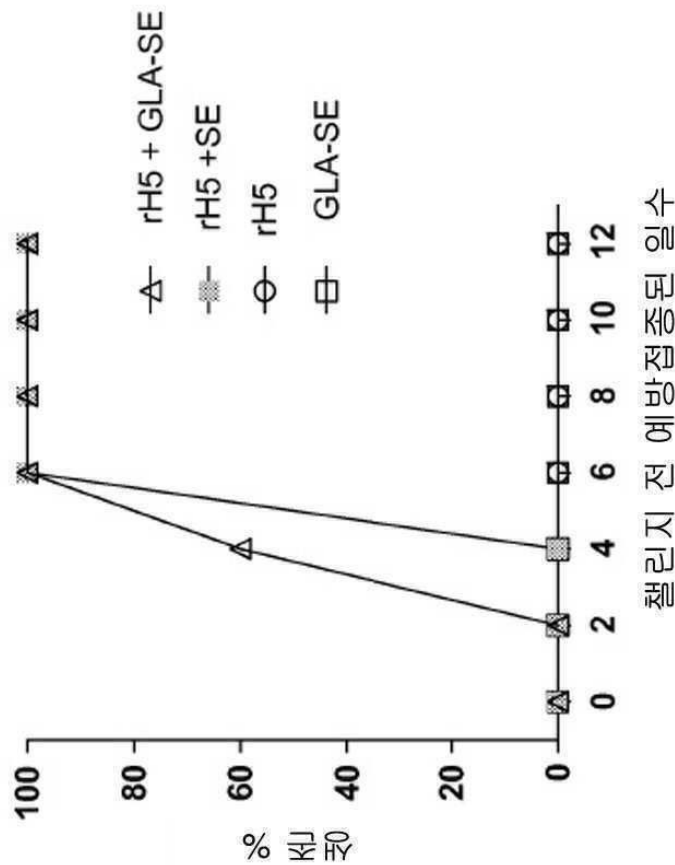
도면1c



도면2

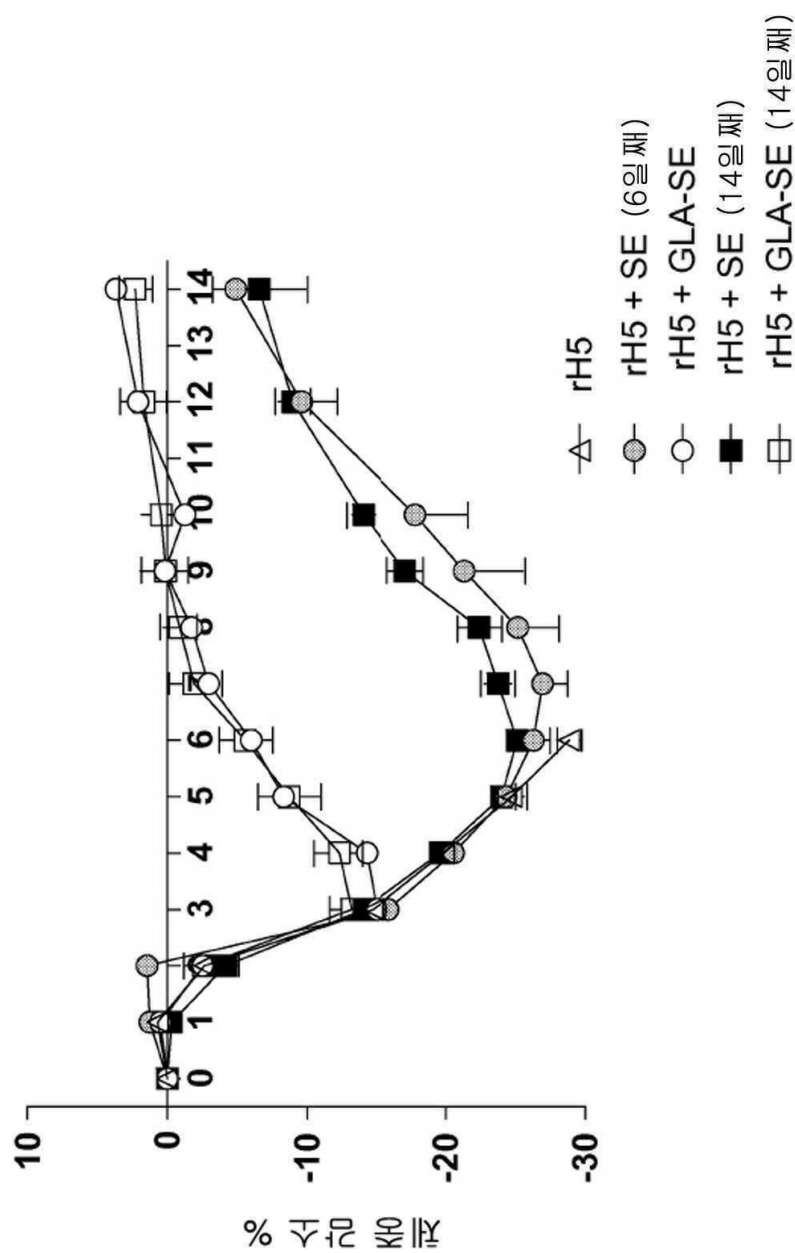


도면3a

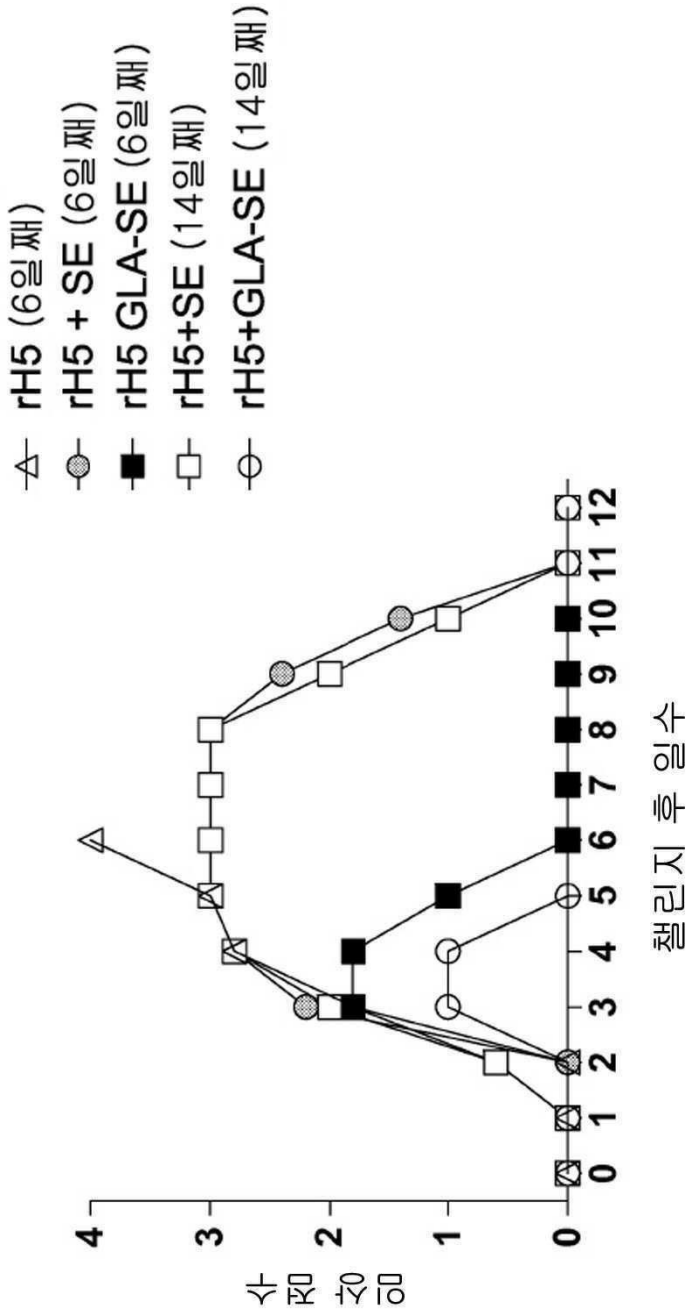




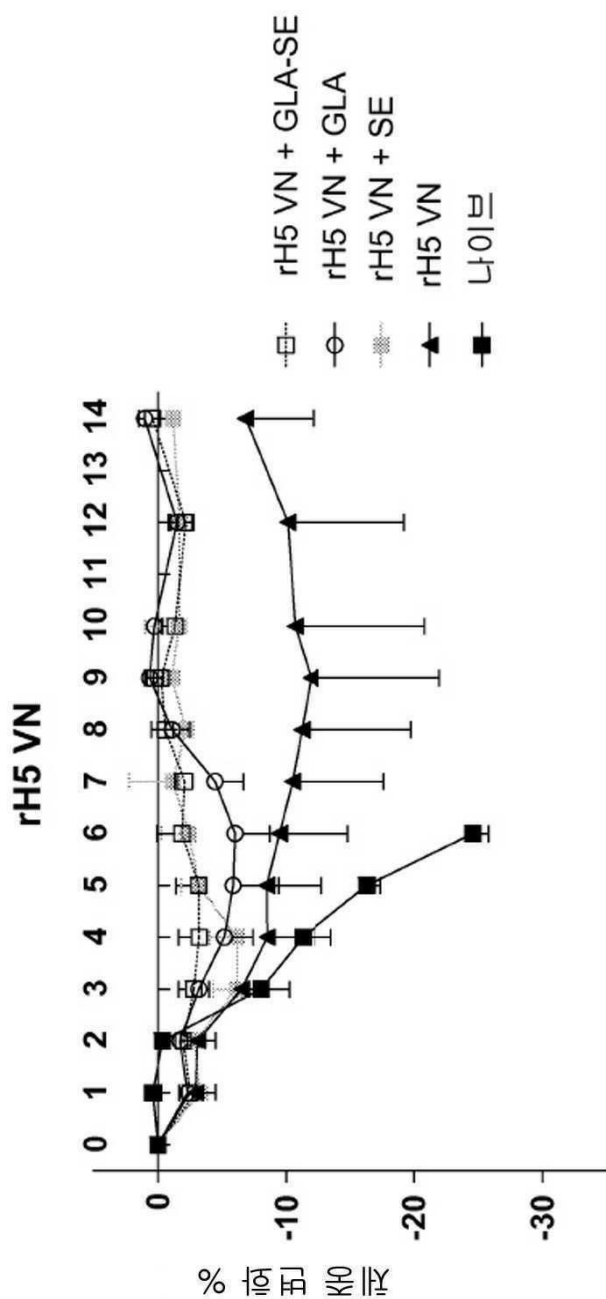
도면3b



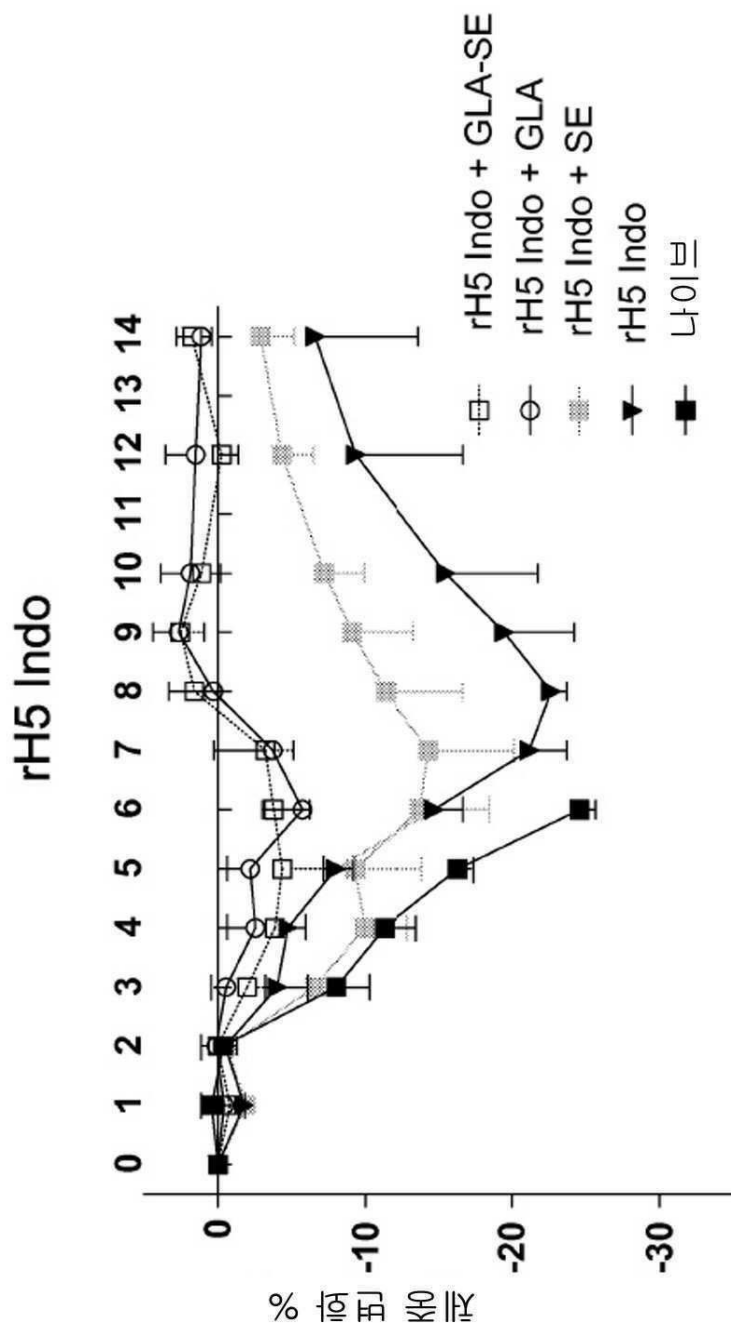
도면3c



도면4a

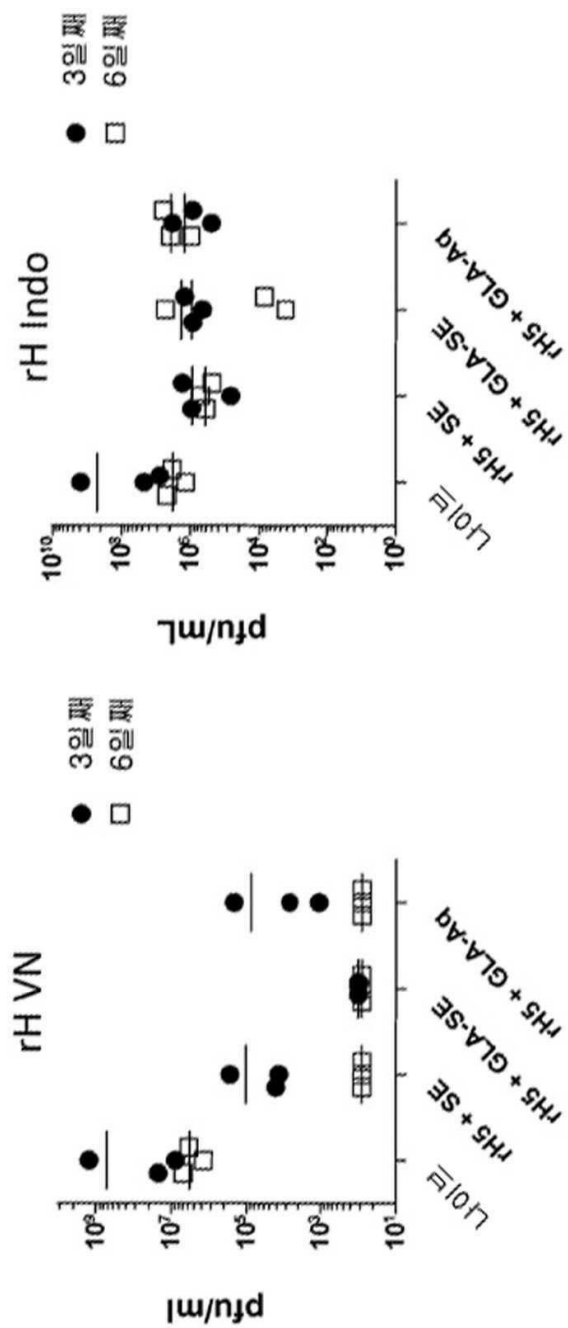


도면4b

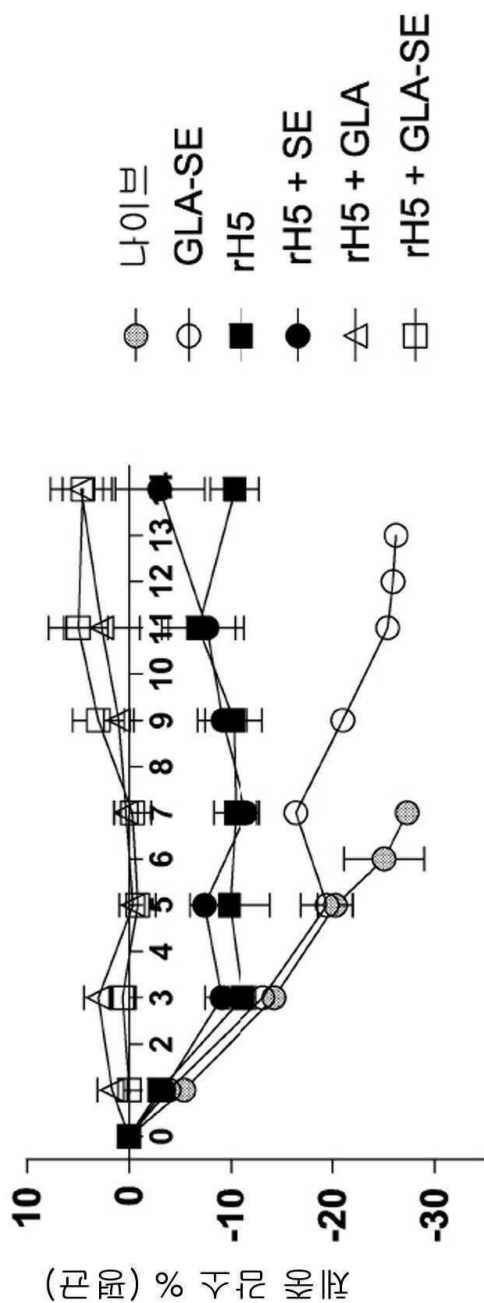




도면4c



도면5a



도면5b

