(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
A61K 39/085
A61K 39/116

(11) 공개번호 10-2004-0070331
(43) 공개일자 2004년08월07일

(21) 출원번호 10-2004-7003967
(22) 출원일자 2004년03월18일
번역문 제출일자 2004년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/029601
(87) 국제공개번호 WO 2003/061558
(86) 국제출원출원일자 2002년09월19일
(87) 국제공개일자 2003년07월31일

(30) 우선권주장 09/955,585 2001년09월19일 미국(US)

(71) 출원인 나비 바이오파마슈티컬즈
미국 메릴랜드 20852 록빌 윌킨스 애비뉴 12280

(72) 발명자 파톰,알리,아이.
미국20852메릴랜드주록빌로리드라이브1710

나소,로버트,비.
미국20882메릴랜드주게이더스버그록해븐드라이브8630

(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 없음

(54) 면역약화된 집단에 사용하기 위한 당결합체 백신

요약

본 발명에는 면역약화된 개체에서의 세균 감염을 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한 포도상구균 및 장구균의 당결합체 (glycoconjugate) 백신이 개시되어 있다. 그러한 백신은 임상적으로 중요한 세균 균주로부터 얻은 다당류 또는 글리코펩티드 표면 항원의 결합체 및 면역운반체를 함유한다. 백신은 카테터법 (catheterization) 또는 수술 진행 상황에서와 같이 세균 감염이 발생될 직접적인 위험에 놓이는 상태가 되기 쉬운 면역약화된 개체를 능동적으로 보호하는데 사용될 수 있다.

색인어

면역약화, 포도상구균, 장구균, 다당류, 글리코펩티드, 면역운반체, 당결합체 백신

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 면역약화된 개체에서 세균 감염을 예방 또는 치료하는데 있어서의 포도상구균 및 장구균의 당결합체 (glycoconjugate) 백신의 용도에 관한 것이다.

배경기술

포도상구균 (*Staphylococci*) 및 장구균 (*Enterococci*)은 건강한 개체에서는 전신 감염을 거의 일으키지 않으므로 기회성 병원균으로 간주된다. 적격 면역계를 가진 정상적인 성인 인간 및 동물은 각종 기전을 통해 이들 세균 감염에 대한 자연 내성을 얻게 된다. 이들은 가능한 면역학적 기전 이외에도 점막 및 표피 장벽을 포함한다. 내재하는 의료 기기를 비롯한 화상, 외상, 또는 수술과 같은 상해의 결과로서의 이들 자연 장벽의 중절은 포도상구균 및 장구균 감염 위험을 증가시킨다. 또한, 화학요법 및 방사선요법을 받고 있는 암 환자, 당뇨병 환자, AIDS 환자, 알코올 중독자, 약물 남용 환자, 장기 이식후 환자 및 유아와 같은 면역 반응이 약화된 개체에서는 포도상구균 및 장구균 감염의 위험이 증가된다.

포도상구균은 인간의 전비공, 피부 및 위장관의 공생 세균이다. 모든 병원 획득성 감염의 >50%가 포도상구균 감염에 의한 것으로 추정된다. 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)는 단독으로 그러한 감염의 15-25% 정도 원인이 되며 이들 감염의 35% 정도 원인이 되는 스타필로코커스 에피더미디스 (*Staphylococcus epidermidis*) 만이 그 정도를 넘는다. 포도상구균 감염, 특히 스타필로코커스 아우레우스에 의한 감염은 높은 이환율 및 사망율과 관련이 있다.

포도상구균 및 장구균은 균혈증, 전이성 농양, 패혈성 관절염, 심내막염, 골수염 및 창상 감염을 포함한, 원내 및 원외 획득성 감염의 주요 원인이다. 예를 들면, 스타필로코커스 아우레우스에 대한 균혈증 관련 총 사망율은 약 25%이다. 1995년 입원 환자의 연구에서 스타필로코커스 아우레우스 관련 입원의 사망율, 재원 일수 및 의료 비용이 다른 입원에 비해 2배 더 높다는 것이 밝혀졌다. 스타필로코커스 아우레우스 균혈증은 3 내지 4%의 년간 발생 빈도로 혈액투석 환자에서 이환율 및 사망율의 두드러진 원인이 된다. 스타필로코커스 아우레우스 감염을 심각하게 만드는 이유는 메티실린에 내성이 있는 분리주 비율 및 반코마이신 내성의 초기 보고가 증가되기 때문이다. 그러므로, 스타필로코커스 아우레우스에 대한 면역예방은 아주 필요하다.

스타필로코커스 아우레우스의 협막 다당류 (CPS; capsular polysaccharide)는 이러한 기회성 병원균에 의해 야기되는 전신 감염의 병독 인자이다. 스타필로코커스 아우레우스 CPS는 폐렴 구균과 같은 다른 캡슐화 세균과 유사하게 다형핵 호중구 (PMN)에 의해 옵소닌식균 사멸을 억제함으로써 침습력을 부여한다. 이는 세균이 혈액 내에서 살아남을 수 있게 하며, 여기서 세균들은 독소 및 세포외 효소를 비롯한 몇가지 다른 병독 인자를 동화시킨다. 공지된 11가지 유형의 스타필로 코커스 아우레우스 중에서, 5형 및 8형은 모든 임상 분리주의 약 85%를 차지한다. 나머지 분리주의 대부분은 336형으로서 알려진 더욱 최근에 확인된 항원을 갖고 있다. 5형, 8형 및 336형 CPS에 대한 항체는 시험관내에서 인간 PMN에 의해 유형 특이적 옵소닌식균 사멸을 유도하며 동물 감염 모델에서 보호 기전을 부여한다.

포도상구균은 세포내 및 세포외 인자를 포함하여 인간에서 질환을 유도하는 매우 복잡한 기전을 형성하였다. 예를 들면, 스타필로코커스 아우레우스는 세균이 숙주 백혈구에 의한 식균 사멸을 벗어나도록 도와서 혈류에서의 그의 생존을 용이하게 하는 다른 표면 항원을 갖고 있다. 이들 표면 항원은 테이코산, 단백질 A 및 협막 다당류 (CPS)와 같은 세포벽 성분을 포함한다. 부분적으로 이들 세균의 다능성, 및 감염성 및 병인을 증강시키는 세포외 생성물의 생산 능력으로 인해, 포도상구균 균혈증 및 그의 합병증, 예를 들면 심내막염, 패혈성 관절염 및 골수염은 심각함이 계속되고 주로 원내 감염이 지속된다.

페니실린과 같은 항생물질은 인간에서의 포도상구균 및 장구균 감염 둘다에 대해 성공적으로 사용되어 왔지만, 더욱 최근에는 그러한 항생물질의 효능이 세균의 내성의 발현 능력에 의해 방해되고 있다. 예를 들면, 더욱 새로운 합성 항생물질인 메티실린의 도입 직후에, 메티실린 내성 스타필로코커스 아우레우스의 균주가 분리되었다. 원내 감염된 포도상구균 분리주 중에서의 항생물질 내성은 빈도수가 계속하여 증가하며, 내성이 있는 스타필로코커스 아우레우스 균주는 개발된 예방법 및 세균 역학 및 항생물질 개발에 대한 집중적인 연구에도 불구하고 병원에서 계속하여 유행병을 일으킨다. 반코마이신에 내성이 있는 장구균은 현재 출현 중이며, 반코마이신에 대한 중간 내성을 가진 메티실린 내성 스타필로코커스 아우레우스 생물은 몇몇 센터에서 동정되었다. 내성의 교차 전달은 결국은 더욱 근절시키기 어려운 생물체의 만연을 유도할 것이다.

포도상구균 감염을 치료하고 회복시키는데 있어서의 항생물질의 초기 효능은 이들 감염을 다루는 면역학적 방법의 관심에서 벗어났다. 스타필로코커스 아우레우스의 다중 항생물질 내성 균주가 나타났지만, 백신과 같은 다른 방법이 개발되지 않았다. 또한, 수동 면역화가 이러한 세균에 감염될 위험성이 높은 신생아와 같은 면역약화된 개체에 사용하기 위해 시험되었다. 데이타는 이러한 집단에서 수동 면역화의 사용을 권장하는 확고한 결론을 지지하지 못했다 [Baker et al., New Engl. J. Med. 35:213-219 (1992); Fanaroff et al., New Engl. J. Med. 330:1107-1113 (1994)]. 면역약화된 집단을 보호하기 위한 효율적인 기술로서 능동 백신 접종을 이용하는 것은 이제까지 어떠한 허가된 백신으로도 실현되지 못하였다. 건강한 백신 접종자에서 면역성이 있는 백신은 종종 면역약화된 환자에서 면역성이 적거나 없어서 보호도가 불충분한 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, B형 간염 백신에 대한 혈액투석 환자의 면역 반응은 건강한 백신 접종자에서 보여지는 것의 50-80%로 감소되는 것으로 알려졌다. 마찬가지로, 이러한 백신에 대한 노인 환자의 면역 반응은 46%로 감소되었다 [Pirofski and Casadevall, Clin, Microbiol. Rev. 11:1-26 (1998)].

세균성 협막 다당류는 일반적으로 약한 면역원이다. 인간에서의 그의 면역원성은 그의 분자 크기 및 백신 접종자의 연령과 관련있는 것으로 알려져 있다. 2 세 미만의 유아, 노인 및 기타 면역약화된 환자는 전형적으로 CPS 백신에 대해 반응이 저하되어 있는 사람이다. 정상 개체에서의 급성 질환을 유도하는 몇몇 일차 세균성 병원균, 즉 폐렴 구균 (스트렙토코커스 뉴모니애 (*Staphylococcus pneumoniae*), 수막염균 (니세리아 메닝지티디스 (*Neisseria meningitidis*) 및 헤모필루스 인플루엔자 (*Hemophilus influenzae*)에 대해 다당류 백신이 개발되었지만, 기회성 세균의 치료를 위해 특별하게 언급된 것은 없다. 또한, 이 백신이 면역약화된 개체에서 시험될 때, 면역 반응의 급속한 저하가 관찰되어 효과적인 보호가 이루어지지 않게 된다. 스트렙토코커스 뉴모니애의 경우에, 시험된 백신은 다중 균주를 포함하였으며, 그것은 면역적격 성인에서는 작용하였지만 노인 및 AIDS 환자와 같은 면역 반응이 저하되어 있는 면역약화된 개체에서는 작용하지 않았다. 스타필로코커스 아우레우스 5형 결합체 백신의 경우에, 혈액투석 환자는 건강한 백신 접종자에서 유도된 것에 비해 더 적은 항체 최대량, 각각 180 μg/㎖ 및 318 μg/㎖를 유도하였다. 또한, 항체 수준의 저하는 건강한 백신 접종자에서의 항체 수준 보다 투석 환자에서 훨씬 더 신속하게 일어났다. 6개월 후에, 투석 환자에서의 항체 수준은 39% 저하된 반면 건강한 대상에서는 14% 저하되었다 [Welch et al., J. Am. Soc. Neph. 7:2 47-253 (1996)].

생백신은 일반적으로 더욱 면역성이 있지만, 면역약화된 환자에게 백신 접종할 때에는 주의를 기울여야 한다. 그러한 백신에 사용된 바이러스 및 세균 균주가 약독화되긴 하지만, 일부 균주는 다시 본래 상태로 되어 질병을 일으킬 수 있다. 세균 성분 백신에 의한 면역화는 특히 면역약화된 환자, 예를 들면 화학요법 환자, 혈액투석 환자, 유아, 쇼크 외상 환자, 수술 환자 및 내성이 저하되거나 면역계가 부분적으로 약화된 사람에게 바람직하다.

다당류 항원은 일반적으로 T-세포 비의존성 면역 반응을 발생시키며 그들은 재주입 시에 관찰되는 면역 반응의 부스팅 없이 체액성 항체를 유도한다. 완전 면역 반응을 발생시키기 위해, 다당류를 단백질 운반체에 결합시키면 세균성 CPS 항원이 T-세포 의존성 면역원으로 변화되어 그의 면역원성이 증가되고 유아 및 면역약화된 환자에서의 그의 사용이 가능하게 된다.

면역약화된 개체는 주로 예를 들어 카테터법과 같은 절차로부터의 세균 감염의 위험이 높다. 그들의 약한 면역 반응으로 인해, 감염성 세균 균주에 대한 노출시에 감염도가 높아질 수 있다. 많은 세균 균주가 현재의 많은 또는 모든 항생물질에 대해 내성을 나타내었다는 사실은 면역약화된 개체가 세균 감염될 때 부정적인 결과가 일어날 가능성을 증가시킨다. 그러므로, 일반적인 임상학적으로 중요한 세균 균주에 대해 면역약화된 환자에게 백신 접종하는 것이 아주 필요한 일이다. 그러나, 포도상구균 및 장구균의 다당류 항원과 같은 세균성 항원은 불량한 면역원인 것으로 알려져 있다. 그의 면역원성은 운반체 단백질에 대한 결합에 의해 향상될 수 있지만, 현재 시판되는 결합체 백신은 이제까지 면역약화된 환자에서 효과적이지 않은 것으로 입증되었으며, 이들 백신은 면역약화된 집단에서 효과적인 면역 반응을 나타낼 수 없는 것으로 일반에게 널리 인정되어 있다.

<발명의 요약>

본 발명자들은 본원에서 '당결합체'로서 칭해지는, 특정 포도상구균 및 장구 균의 다당류 및 글리코펩티드 세균 표면 항원의 결합체가 면역약화된 개체에서의 세균 감염을 보호하는데 효과적임을 발견하였다. 예를 들면, 대장균 (*Escherichia coli*)에서 발현된 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 엑소톡신 A의 비독성 변이체인 재조합 엑소프로테인 A (rEPA)에 결합된 스타필로코커스 아우레우스 5형 또는 8형 CPS를 함유하는 2가 백신은 건강한 성인 및 말기 신장 질환 (ESRD) 환자에서 면역성이 있고 잘 허용되며, 더욱 중요하게는 ESRD 혈액투석 환자에서의 균혈증을 예방할 수가 있다. 이는 면역약화된 개체가 일반적으로 면역원성이 낮은 것으로 알려진 다당류 항원과 같은 약한 면역원성 항원에 대해 효과적인 면역 반응을 나타낼 수 없다고 예상되는 결과에 대한 종래의 이론에 비추어 전혀 예상되지 못하였다.

면역학적으로, 혈액 투석을 받는 ESRD 환자는 위험한 상태의 성인 집단 중에서 가장 심각한 상태의 환자이다. 그들은 대부분 노인이며, 많은 사람이 당뇨병 (~50%)이고, 그들은 일상적으로 요독증을 앓고 있다. 요독증 및 고혈당증은 숙주 방어 기전, 특히 옵소닌 식균작용을 약하게 만드는 주요 원인이다. 이러한 상태는 식세포 기능성 또는 손상된 보체를 통한 면역 기능의 중요한 손상을 야기시킨다. ESRD 환자는 일반적으로 저하된 호중구 기능 및 손상된 식균작용, 보체 활성화에 따른 백혈구감소증, 감소된 자연 살해 세포 (natural killer cell) 활성, 저하된 T 및 B 림프구 기능 및 표준 항원에 대한 저하된 T 림프구 반응을 갖는다. 그러한 고도로 면역약화된 표적 집단을 보호하는 본 발명에 따른 백신의 능력은 예측될 수가 없었다.

본 발명은 포도상구균 및 장구균 세균 감염 중 적어도 하나로부터 면역약화된 인간을 보호하는 것에 관한 것이다. 백신은 다당류 또는 글리코펩티드 세균 표면 항원의 당결합체 및 면역운반체를 포함한다. 본 발명의 방법은 정상적인 건강한 대상에서 백신에 반응하여 얻어질 수 있는 것과 동등한 혈청형 특이적 항체 수준을 면역약화된 개체에서 나타내는 양의 백신을 면역약화된 개체에 투여하는 것을 포함한다. 백신은 다음을 포함한다:

(a) 스타필로코커스 아우레우스의 5형 및 8형 다당류 항원 둘다의 당결합체;

(b) 주요 탄수화물 성분으로서 β-결합된 헥소사민을 포함하고 O-아세틸 기를 함유하지 않는 음하전된 포도상구균 다당류 항원의 당결합체;

(c) 아미노산 및 N-아세틸화 헥소사민을 α 배열로 포함하고, O-아세틸 기를 함유하지 않으며 헥소스를 함유하지 않는 포도상구균 글리코펩티드 항원의 당결합체;

(d) ATCC 55254에 대한 항혈청을 응집시키는 스타필로코커스 에피더미디스의 분리주로부터 얻은 산성 포도상구균 다당류 항원의 당결합체;

(e) 2-아세트아미도-2-데옥시-글루코스 및 람노스를 1:2 몰 비로 포함하는 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 항원의 당결합체;

(f) 6-데옥시 당을 포함하는 삼당류 반복을 포함하는 엔테로코커스 패칼리스 항원의 당결합체;

(g) 2-아세트아미도-2-데옥시-갈락토스 및 갈락토스를 2:1 몰 비로 포함하는 엔테로코커스 패슘 (*Enterococcus faecium*) 항원의 당결합체;

(h) ATCC 202016에 대한 항체와 반응하는 엔테로코커스 패슘 항원의 당결합체; 또는

(i) ATCC 202017에 대한 항체와 반응하는 엔테로코커스 패슘 항원의 당결합체.

백신은 당결합체를 함유하는 백신으로 면역화될 때 정상적인 건강한 대상에서 얻어지는 수준과 동일한 (예상된 실험적 편차 한도 내에서), 백신에 함유된 항원에 대한 혈청형 특이적 항체 수준을 면역약화된 개체에서 생산한다.

발명의 상세한 설명

면역약화된 개체가 면역운반체와 함께, 임상학적으로 중요한 포도상구균 또는 장구균 세균 균주로부터의 다당류 또는 글리코펩티드 표면 항원의 결합체를 함유하는 백신을 투여함으로써 세균 감염에 대해 효과적으로 보호될 수 있음이 발견되었다. 본 발명에서, '임상학적으로 중요한' 세균 균주는 인간에서 병원성이 있는 것이다. 백신은 세균 감염이 발생될 직접적인 위험에 놓이는 상태가 되기 쉬운 면역약화된 개체를 능동적으로 보호하는데 사용될 수 있다. 이 상태는 예를 들면, 카테터법 또는 수술을 포함한다. 그중에서도, 본 발명자는 면역약화된 개체가 본 발명에 따른 백신에 의해 백신 접종될 때 효과적인 면역 반응을 나타냄을 발견하였다.

면역약화된 개체는 면역계의 세포성 부분 및 체액성 부분 중 어느 하나 또는 둘다에 대해 결함을 가질 수 있다. 이러한 부분은 둘다 감염성 질병을 치료한다. 세균 감염은 특히 주로 다음과 같은 두가지 기전, 즉 항체 및 보체 둘다를 필요로 하는 살균 활성, 및 보체 및 항체 이외에 식세포를 필요로 하는 옵소닌 식균작용으로 치유된다. 이 과정에서의 각 단계들은 전체 과정의 기능성에 다른 정도로 나쁜 영향을 주는 결함이 있을 수 있으며, 그러한 임의의 결함들은 숙주의 '면역약화'를 초래하게 된다.

몇가지 면의 면역 반응이 약화되어 있는 ESRD 환자는 면역약화를 보호하는 백신의 효능을 예측하기 위한 우수한 모델을 제공한다. 예를 들면, 이러한 환자 중 많은 수는 보체 고정을 저해하는 당뇨병 또는 고혈당증을 갖고 있다. 보체 고정 능력이 없는 것은 환자에서의 항체의 유용성을 제한한다. 또한, 식세포는 당뇨병의 결과로서 화학주성 이동이 약해지며, 이로써 감염 위치에 도달하는 능력을 갖지 못할 수 있다. 혈액투석 환자는 또한 과립구 및 보체 고정의 기능성에 나쁜 영향을 주는 요독증을 앓고 있어 옵소닌 식균작용이 효과없게 된다. 당뇨병 및 요독증은 또한 B 세포의 기능성에 나쁜 영향을 주어 백신 접종에 대한 최적 면역 반응에 미치지 못하게 된다.

본 발명에서, 다당류 또는 글리코펩티드 표면 항원은 많은 비율의 탄수화물 잔기를 함유하는 것이다. 탄수화물 잔기만을 포함하는 항원은 다당류 항원으로 불리운다. 일부 세균 표면 항원은 더 적은 비율, 일반적으로 항원의 40 중량% 미만의 아미노산 잔기를 추가로 함유하며, 이 경우에 글리코펩티드 항원으로 불리운다. 본 발명에 따른 세균 표면 항원은 협막 다당류이거나, 테이코산을 포함할 수 있다.

각종 포도상구균 및 장구균 세균 표면 항원은 본 발명에 따른 결합체 백신의 제조에 적합한 것으로 확인되었다. 특히, 이에는 스타필로코커스 아우레우스, 스타필로코커스 에피더미디스, 스타필로코커스 해모리티커스 (*Staphylococcus haemolyticus*) 또는 스타필로코커스 호미니스 (*Staphylococcus hominis*), 엔테로코커스 패슘 (*Enterococcus faecium*) 및 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*)의 각종 균주 상에서 발견되는 다당류 및 글리코펩티드 항원이 포함된다.

본 발명에 따른 결합체 백신의 제조를 위한 항원은 스타필로코커스 아우레우스의 5형 및 8형 항원을 포함한다. 조사 결과 분리주의 약 85-90%가 협막 다당류 5형 또는 8형인 것으로 밝혀졌다. 5형 및 8형 협막 다당류 항원을 함유하는 백신으로 접종된 정상 개체는 85-90%의 스타필로코커스 아우레우스 균주에 의한 감염으로부터 보호된다. 5형 및 8형 다당류 항원의 구조는 문헌에 설명되어 있다 [Moreau et al., Carbohydr. Res. 201:285 (1990); and Fournier et al., Infect. Imm. 45:87 (1984)]. 상기 두 유형은 모두 그의 반복 단위 안의 FucNAcp 뿐만 아니라 술프히드릴 기를 도입하는데 사용될 수 있는 ManNAcA를 갖는다. 구조는 다음과 같다:

5형:

->4)-β-D-ManNAcAp(1-->4)-α-L-FucNAcp(1-->3)-β-D-FucNAcp(1-3)Oac

8 형:

->3)-β-D-ManNAcAp(1-->3)-α-L-FucNAcp(1-->3)-β-D-FucNAcp(1-4)Oac

본 발명에 따른 바람직한 백신은 5형 및 8형 항원 둘다의 결합체를 포함한다. 2가 백신이 면역약화된 개체에서 탁월한 보호도를 제공한다는 것은 특히 놀라 운 일이다. 웰치 등의 문헌 (1996) (상기 참조)에는 1가 5형 백신이 ESRD 환자에서 아주 제한된 면역 반응을 나타내는 것으로 개시되어 있다. 본 발명에 따른 2가 5형/8형 스타필로코커스 아우레우스 백신에 의해 이루어지는 보호는 웰치 등의 문헌에 보고된 미약한 결과를 근거로, 특히 백신에 제2 성분 항원을 첨가하면 각개의 성분의 효능이 실제로 저하된다는 당 분야의 교시와 결부시켜 볼 때 예견될 수가 없었던 것이다 [Fattom et al. 17:126-133 (1999)].

본 발명에 따른 결합체의 제조에 사용될 수 있는 또다른 포도상구균 항원은 미국 특허 제5,770,208호 및 제6,194,161호에 기재되어 있다. 이러한 음하전된 항원은 주요 탄수화물 성분으로서 β-결합된 헥소사민을 포함하며, 핵 자기 공명 분광기에 의해 검출가능한 O-아세틸 기를 함유하지 않는다. 이 항원은 ATCC 55804로 기탁된 스타필로코커스 아우레우스 336형에 대한 항체와 특이적으로 결합한다. 이 항원을 갖고 있는 스타필로코커스 아우레우스 균주는 5형 또는 8형 균주가 아닌 스타필로코커스 아우레우스의 임상학적으로 중요한 균주의 거의 모두를 차지한다. 따라서, 스타필로코커스 아우레우스 감염을 거의 100% 보호하기 위해 스타필로코커스 아우레우스 5형 다당류 항원 및 스타필로코커스 아우레우스 8형 다당류 항원과 배합시에 이 항원을 사용하는 것이 특히 유리하다.

또한, 스타필로코커스 에피더미디스의 임상학적으로 중요한 많은 균주가 있다. 이들 균주에 의한 감염에 대해 보호하거나 감염을 치료하기 위해서는, 미국 특허 제5,961,975호 및 제5,866,140호에 개시된 바와 같은 소위 1형 항원으로 제조된 결합체 백신이 바람직하다. 이 항원은 ATCC 55254에 대한 항혈청을 응집시키는 스타필로코커스 에피더미디스의 분리주 (I형 분리주)의 세포를 성장시키고; 다당류 항원을 세포로부터 추출하여 다당류 항원의 조추출물을 생성시키고; 이 조추출물을 정제하여 단백질 함량이 1% 미만인 정제된 항원을 생성시키고; 분리 컬럼 상에 정제된 항원을 충전시키고 그것을 NaCl 구배로 용리하고; I형 분리주에 특이적인 항체를 이용하여 다당류 항원을 함유하는 분획물을 동정하는 것을 포함하는 방법에 의해 얻어지는 산성 다당류 항원이다.

본 발명에 따른 결합체 백신의 제조를 위한 또다른 포도상구균 항원은 WO 00/56357호에 기재되어 있다. 이 항원은 아미노산 및 N-아세틸화 헥소사민을 α 배열로 포함하고, 핵 자기 공명 분광기에 의해 검출가능한 O-아세틸 기를 함유하지 않으며 헥소스를 함유하지 않는다. 그것은 ATCC 202176으로 기탁된 포도상구균 균주에 대한 항체와 특이적으로 결합한다. 항원의 아미노산 분석 결과는 약 39:25:16:10:7 몰 비의 세린, 알라닌, 아스파르트산/아스파라긴, 발린 및 트레오닌의 존재를 나타낸다. 아미노산은 항원 분자의 약 32 중량%를 구성한다.

이들 포도상구균 항원을 가진 결합체 백신 이외에, WO 99/18996호에 기재된 장구균 항원을 가진 결합체 백신이 본 발명에 따라서 바람직하게 이용된다. 이 출원은 5종의 다른 항원을 개시하고 있으며, 이중 2종은 엔테로코커스 패칼리스 균주로부터 분리되고, 3종은 엔테로코커스 패슘 균주로부터 분리된 것이다. 2종의 엔테로코커스 패칼리스 및 3종의 엔테로코커스 패슘 균주 각각은 부다페스트 조약에 의한 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection)에 기탁되었으며, 각각 수탁 번호 202013 (엔테로코커스 패칼리스 EFS1), 202014 (엔테로코커 스 패칼리스 EFS2), 202015 (엔테로코커스 패슘 EFM3), 202016 (엔테로코커스 패슘 EFM4) 및 202017 (엔테로코커스 패슘 EFM5)을 부여받았다. 본 발명에 사용하기 위한 항원은 기탁된 균주로부터 분리하거나, 또는 기탁된 균주를 사용하여 본 발명에 따른 항원을 발현하는 다른 균주를 동정하고, 그로부터 항원을 추출하고 정제할 수 있다. 엔테로코커스 패칼리스 항원 중의 하나, EFS1은 2-아세트아미도-2-데옥시-글루코스, 람노스, 글루코스 및 2-아세트아미도-2-데옥시-갈락토스를 대략 계산된 1:2:2:2의 몰 비로 포함하며, 또다른 엔테로코커스 패칼리스 항원, EFS2는 6-데옥시 당을 포함하는 삼당류 반복을 포함하며, 엔테로코커스 패슘 항원, EFM3은 2-아세트아미도-2-데옥시-갈락토스 및 갈락토스를 포함한다.

상기한 각각의 항원은 인용된 문헌에 기재된 프로토콜에 준하여 실질적으로 순수한 형태로 배양된 특정 포도상구균

및 장구균 분리주로부터 회수가능한 양으로 수득될 수 있다. 특히, 정제된 항원은 1% 미만의 핵산을 함유한다. 이러한 면에서 '회수가능한' 양이란 항원의 분리량이 면역분석과 같은, 방사성 표지보다 덜 민감한 방법에 의해 검출가능하며, 항원 자체를 용액 내로 전달하는 것을 포함하는 조작을 추가로 실시할 수 있는 것을 의미한다.

본 발명에 따른 면역약화된 집단에 백신으로서 사용하기 위해, 항원을 면역운반체에 결합시킨다. 면역운반체는 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 T 세포와 B 세포 사이의 상호작용을 개선시키고, 따라서 능동 면역화를 위해, 또한 이후의 수동 면역화에 사용하도록 지원자에서 고역가 항혈청을 제조하기 위해 면역원성을 향상시키는 물질, 일반적으로 폴리펩티드 또는 단백질이다. 본 발명에 따른 적합한 면역운반체는 파상풍 톡소이드 및 디프테리아 톡소이드 및 그의 재조합 생산된, 유전적으로 무독화된 변이체, 포도상구균 엑소톡신 또는 톡소이드, 또는 슈도모나스 아에루기노사 엑소톡신 A 또는 그의 유도체, 예를 들면 특히 문헌 [Fattom et al., Inf. and Imm. 61: 1023-1032 (1993)]에 기재된 슈도모나스 아에루기노사 엑소톡신 A의 재조합 생산된 비독성 돌연변이 균주 뿐만 아니라 면역운반체로서 통용되는 기타 단백질을 포함한다.

항원을 운반체 단백질에 결합시키기 위하여, 항원을 먼저 유도체화한다. 항원을 유도체화하고 그것을 면역운반체에 공유 결합시키는데 각종 방법이 이용될 수 있다. 항원의 활성화된 카르복실레이트 기를 ADH, 시스타민 또는 PDPH로 유도체화하고, 그후에 부분적으로 아미드화된 항원을 운반체 단백질 상의 카르복실레이트 기에 카르보디이미드-매개 반응시키거나 또는 티올화 항원을 SPDP-유도체화된 운반체 단백질과 이황화 상호교환시킴으로써 운반체 단백질에 항원을 결합시킬 수 있다.

항원 상의 히드록실 기는 시아노겐 브로마이드 또는 1-시아노-4-디메틸아미노-피리디늄 테트라플루오로보레이트를 사용하여 활성화될 수 있으며, 그후에 항원은 콘 등의 문헌 [Kohn et al. FEBS Lett. 154: 209-210 (1993)]의 방법에 따른, 당업계에 공지된 기술에 따라서 6개의 탄소 이관능성 스페이서 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 유도체화될 수 있다. 이 물질은 그후에 디프테리아 톡소이드 (Dtd), 슈도모나스 아에루기노사로부터의 재조합 엑소프로테인 A (rEPA), 파상풍 톡소이드 (TTd) 또는 기타 적합한 운반체 단백질에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보 디이미드 (EDAC)에 의해 결합된다. 결과의 결합체는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 미반응된 항원으로부터 분리될 수 있다. 항원을 운반체 단백질에 결합시키는데 사용되는 방법에 상관없이, 항원을 운반체 단백질에 공유 결합시키면 항원의 면역원성이 상당히 향상되며, 그 결과 마우스에서 1차 및 2차 부스팅 후에 항원에 대한 항체 수준이 증가된다.

본 발명에 따른 항원-면역운반체 결합체는 활성 성분에 대한 제약학상 허용되는 담체를 더 포함하는 조성물 내의 활성 성분이며, 면역약화된 집단에서 세균 감염, 특히 포도상구균 및(또는) 장구균 감염을 치료하는 세포성 면역 반응 및(또는) 항체의 생체내 생산을 유도하기 위한 백신으로서 사용된다. 이러한 면에서, 제약학상 허용되는 담체는 불활성이거나 의학적으로 허용되고, 백신 투여 시에 활성 약제와 상용성이므로, 의약 투여용 비히클로서 사용될 수 있는 물질이다. 적합한 부형제 이외에, 제약학상 허용되는 담체는 희석제, 보강제 및 기타 면역자극제, 항산화제, 보존제 및 가용화제와 같은 통상적인 백신 첨가제를 함유할 수 있다.

본 발명에 따른 백신은 보강제와 함께 또는 보강제 없이 투여될 수 있다. 보강제가 사용된다면, 그것은 보강제 유도된 독성을 피하도록 선택된다. 본 발명에 따른 백신은 β-글루칸 또는 과립구 콜로니 자극 인자, 특히 1999년 9월 14일자로 출원된 미국 출원 제09/395,360호에 기재된 β-글루칸을 추가로 포함할 수 있다.

바람직하게는, 본 발명에 따른 항원/면역운반체 결합체의 조성물은 결합체로 '본질적으로 이루어진다'. 이 상황에서, '본질적으로 이루어진다'라는 문구는 조 성물이 대상에게 백신으로서 투여될 때 조성물이 항원 (및 존재한다면 다른 항원)에 대한 면역 반응의 유도를 저해하는 어떠한 물질도 함유하지 않는다는 것을 의미한다.

본 발명에 따른 백신의 투여로부터 이득을 얻는 다수의 면역약화 집단이 있다. 이에는 말기 신장 질환 (ESRD) 환자, 면역억제 요법을 받는 암 환자, AIDS 환자, 당뇨병 환자, 장기 요양 시설에 있는 노인, 면역억제 요법을 받는 자가면역 질환 환자, 이식 환자 및 화상 환자가 포함된다. 면역계는 세포성 및 체액성인 두 부분으로 구성된다. 이러한 부분 둘 다는 감염성 질환을 치료한다. 세균 감염은 특히 주로 다음과 같은 두가지 기전으로 치유된다. 항체 및 보체 둘다를 포함하는 살균 활성, 및 보체 및 항체 이외에 식세포를 필요로 하는 옵소닌 식균작용이 필수적이다. 이 과정에서의 각 단계들은 전체 과정의 기능성에 다른 정도로 나쁜 영향을 주는 결함이 있을 수 있다. 그러한 임의의 결함들은 숙주를 면역약화된 개체로 만들게 된다. 그러한 비기능적 또는 약화된 기전에 대한 예는 당뇨병의 결과로서 일어날 수 있다. 당뇨병 또는 고혈당증은 보체 고정을 저해한다. 충분한 항체를 가진 사람이라 하더라도, 보체 고정 능력이 없는 것은 항체의 용도를 제한하게 된다. 또한, 식세포는 당뇨병의 결과로서 화학주성 이동이 약해지며, 이로써 감염 위치에 도달하는 능력을 갖지 못하게 된다. 혈액투석 환자는 또한 과립구 및 보체 고정의 기능성에 나쁜 영향을 주는 요독증을 앓고 있어 옵소닌 식균작용이 효과없게 된다. 당뇨병 및 요독증은 또한 B 세포의 기능성에 나쁜 영향을 주어 백신 접종에 대한 최적 면역 반응에 미치지 못하게 한다.

본 발명은 다음 예시적 실시예를 참조하여 더 설명된다.

실시예

실시예 1: ESRD 환자에서의 스타필로코커스 아우레우스 5형/8형 다당류 백신의 투약 연구

지속성 외래 복막 투석 또는 혈액 투석에 의해 지탱되는 20명의 성인 남성 말기 신장 질환 (ESRD) 환자 각각에게 재조합 슈도모나스 엑소프로테인 (rEPA) 단백질 결합체로서 제조된 각각 목표 용량 25 μg의 5형 및 8형 스타필로코커스 아우레우스 CPS를 함유하도록 조제된 백신을 1회 근육내 주사하였다. 이러한 25 μg의 용량은 건강한 대상에게 사용된 양과 동일한 것이다. 만성 질환 집단에서 예상된 더 약한 면역 반응 때문에 1차 용량 투여한 지 6주 후에 2가 백신의 2차 0.5 mL 용량을 제공하였다. 5명의 추가의 건강한 성인 남성에게 동일 용량의 염수 위약을 투여하였다. 주사 전 및 주사 후 2주 및 6주째에 항-5형 및 8형 CPS IgG 농도를 측정하였다.

표 1에 나타낸 바와 같이, 정상적인 건강한 대상에서 보다 약하긴 하지만, 실질적인 면역 반응이 ESRD 환자에서 나타났다. 6주째의 2차 투여량은 어느 혈청형에 대해서도 특이적인 항체 수준에 실제로 나쁜 영향을 주지 않았다.

[표 1]

		기하 평균 5형 특이적 IgG (μg/mL)				기하 평균 8형 특이적 IgG (μg/mL)			
	N	0일	6주	12주	6,12주에서의 반응자 %	0일	6주	12주	6,12주에서의 반응자 %
백신군	15	5.4	61.9	52.6	80,80	10.4	30.8	31.0	47,40
위약군	5	6.0	5.4	5.9	0,0	18.6	17.2	18.1	0,0

다음에, 혈액투석을 받는 ESRD 환자에서의 투약 연구를 표 1의 결과를 기초로 실시하였다. 1.0 mL 용량 중에 5형 CPS 75 μg 및 8형 CPS 55 μg을 함유하는 제제 (각각 동량의 rEPA에 결합됨)를 사용하였다. 혈액 투석을 받고 있는 33명의 성인 남녀 ESRD 환자를 1회 IM 용량의 스타필로코커스 아우레우스 5형/8형 CPS 결합체 백신/IA로 면역화하였다. 초기 군의 16명의 대상에게 1.0 mL 용량 (5형 75 μg 및 8형 55 μg)을 투여하였다. 이 군을 1주 동안 안전성에 대해 관찰한 후에, 추가의 17명의 대상에게 1.5 mL 용량 (5형 118 μg 및 8형 83 μg)을 투여하였다. 두 용량 모두 잘 허용되었다. 혈청형 특이적 IgG 수준을 주사한 지 2 및 6주, 및 3, 6, 9 및 12개월 후에 모니터링하였다.

표 1과 비교해 보면, 두가지 투약 수준 모두 주사후 6주째에 개선된 피크 혈청형 특이적 항체 수준을 나타내었으며, 중요하게는 훨씬 더 많은 비율의 항-8형 반응자를 모집하였다 (표 2). 양쪽 CPS 유형에 대한 혈청형 특이적 항체는 1.5 mL 용량을 수용할 수 있는 건강한 정상인 대상에서 얻을 수 있는 수준에 가까우며, 1년째에 기준선 값 보다 6.03배 (8형) 내지 10.28배 (5형) 상승된 기하 평균을 유지하였다 (양쪽 혈청형에 대해 $p < 0.0001$).

[표 2]

용량 (5형 μg/8형 μg)	N	기하 평균 5형 특이적 IgG (μg/mL)		5형 반응자 %	기하 평균 8형 특이적 IgG (μg/mL)		8형 반응자 %
		0일	6주		0일	6주	
25 / 25	15	5.6	61.9	80.0	10.2	30.8	47.0
75 / 55	16	4.0	81.8	75.0	3.3	50.1	75.0
118 / 83	17	3.8	176.4	88.2	6.1	142.9	88.2

실시예 2: 스타필로코커스 아우레우스 5형/8형 다당류 백신에 의한 ESRD 환자의 보호

대상을 캘리포니아의 73 곳의 혈액투석 센터에서 모집하였다. 선정 기준은 다음과 같다: 18세 이상, 등록 전에 8주

이상 동안 자연 혈관 누관 또는 인공/이종 이식체 투석로를 이용하여 혈액 투석을 받는 ESRD 환자, 참가시에 카르노프스키 (Karnofsky) 점수가 50 이상, 필요한 추적 검사를 완결한 것으로 예상되는 사람. 배제 기준은 다음과 같다: 백신 접종 전 2주 내에 감염 증상 또는 감염과 일치하는 신호, HIV 감염 병력, 다당류 또는 다당류-결합체 백신에 의해 야기되는 과감작성 또는 이전의 과민증, 과거의 약물 남용, 면역억제제 또는 면역조절제의 사용, 및 백신 접종 전 6개월 내에 악성종양이 있거나 악성종양 치료를 받은 사람.

적당한 대상을 무작위로 지정하여 백신 또는 위약을 1회 주사하였다. 무작위화는 (1) 혈관 투석로 (자연 혈관 누관 또는 인공/이종 이식체) 및 (2) 지속적인 스타필로코커스 아우레우스 비강 전달체의 존재 또는 부재에 의해 계층화하였다.

백신 (StaphVAX ?, Nabi (Rockville, MD 소재)에 의해 공급됨)은 0.01%의 폴리소르베이트 80 및 인산 나트륨-완충 염수, pH 7.4 중의, 동량의 재조합 슈도모 나스 아에루기노사 비독성 엑소톡신 A (rEPA)에 결합된 스타필로코커스 아우레우스 5형 및 8형 CPS (100 μg/유형/mL)로 구성되었다. 이 용량은 ESRD 환자에서의 연구를 기초로 하여 선택되었다 (Nabi, 미공개 데이타). 백신 및 위약 (인산 나트륨-완충 염수)은 각각 특정 코드를 갖고 있는, 동일한 바이알 내의 1 mL의 맑은 액체로서 공급되었다.

대상에 대해 약 1주 간격으로 2회 선별 심사하여 환자 적격성을 평가하고, 전비공을 스타필로코커스 아우레우스에 대해 배양 검사하였다. 비강 전달체는 2가지 양성 배양물로 정의되었다. 백신 또는 위약을 삼각근 또는 대퇴 전면에 근육내 주사하였다.

대상을 주사한 지 30분 후에 평가하고 1주일 동안 매일 국소 (발적, 종창, 욱신욱신 쑤심, 화끈거림, 압통, 열) 및 전신 (발열, 일반적인 불쾌감, 근육통, 두통, 오심, 구토) 반응을 기록하도록 지시하였다. 주사한 지 1주일 후에, 대상을 투석 센터로 복귀시키고 백신 반응을 기록하였다. 대상을 주사 후 6주까지 부작용에 대해 평가하였다. 연구가 종결되거나 대상이 포기할 때 까지 사망 및 모든 균혈증을 기록하였다. 일차 결과 측정은 대상의 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 첫번째 증상 발현이었다. 항생물질 요법을 시작하기 전에 혈액 배양물을 얻었다.

백신 접종 전 및 백신 접종한 지 6주, 26주, 54주 및 67주 후에 혈청을 얻었다. 스타필로코커스 아우레우스 5형 및 8형 CPS에 대한 항체를 문헌 [Fattom et al., Infect Immun 1990; 58:67-74] 및 [Fattom et al., Infect Immun 1993; 61: 1023-32]에 기재된 바와 같이 ELISA로 측정하였다. 백신 반응은 25 μg/mL 이상 및 백신 접종 전 수준 보다 2배 이상 더 높은 항체 농도로서 정의되었다.

미국 및 유럽에서의 연구는 1년에 혈액투석 환자 1명 당 0.03-0.04의 스타필로코커스 아우레우스 균혈증 발생율을 제시하였다 [예를 들면, Kessler et al., Nephron 1992; 64:95-100; Quarles et al., Am J Kidney Dis 1985; 6:412-9; Roubicek et al., Nephrologie 1995; 16:229-32; and Bloembergen and Port, Adv Ren Replace Ther 1996; 3:201-7 참조]. 조정된 I형 오차가 0.042인 경우 (Fleming-O'Brien method, Biometrics 1979; 35:549-56), 군 당 900 대상의 샘플 크기가 검출하기에 충분한 것으로 확인되었고, 80% 효력으로, 백신 접종 이후 3-54 주의 관찰 시간대 중에 백신군에서 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 발생율이 60% 감소되었다. 그러나, 보호와 항체의 상관관계가 이 연구 전에 알려지지 않았고 항체 수준이 ESRD 환자에서 신속하게 저하되므로, 다른 시간대를 평가하였다.

효능의 평가는 백신 접종 2주 후로부터의 데이타를 기초로 하였다. 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 비율을 StatXact 소프트웨어를 사용하여 정확한, 계층화된 개체-시간 (person-time) 발생율 산출에 의해 백신군 및 대조군을 비교하였다 [Software Manual for StatXact-4. Cambridge, Massachusetts: Cytel, Inc; 1998, and Breslow and Day, Statistical methods in cancer research. Vol. II: The design and analysis of cohort studies. New York: Oxford University Press; 1987 참조]. 기준선 비강 전달체 및 혈관 투석로 양식에 의해 정의된 두 계층으로 4종 세포를 발생시켰다. 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 첫번째 증상 발현까지의 시간을 카플란-마이어 (Kaplan-Meier) 방법으로 설명하고 계층화 로그 순위 검정으로 비교하였다. 반복 측정 로지스틱 회귀 모델 (SAS PROC GENMOD)을 이용하여 감염 기회의 시간 의존성을 설명하고, 이로부터 효능의 시간 추세를 평가하였다 [Zeger and Liang, Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. Biometrics 1986; 42: 121-30]. 모델은 계층, 연령 및 성별에 대해 조정되었다.

두 샘플 순열 검정을 기초로 한 추가의 분석을 이용하여 추적 3-54주 동안 임의의 인접 기간에 대해 가장 높은 백신 효능을 결정하였다 [Edington ES. Randomization Tests. New York: Marcel Dekker; 1980]. 총 10,000 세트의 자극 데이타를 모두 1798 대상으로부터 발생시켜 백신 접종 후 54주 동안 6개월 이상의 모든 가능한 주사후 기간을 조사하였다. 인접 간격의 개체-시간 효능의 검정에 대한 P 값을 연구에서 얻어진 값 보다 큰 자극 효능의 비율로서 계산하였다.

백신 및 위약군에서 백신 반응과 사망을 경험한 대상의 수를 피셔의 정확 검정 (Fisher's exact test)으로 비교하였다. 안전성 시험의 다중성에 대해 조정하지 않았다.

73 곳의 혈액투석 센터에서 모집된 1991명 선별 대상 중에서 총 1804명에게 무작위로 백신 (n = 894) 또는 위약 (n = 910)을 투여하였다. 면역화되지 않은 187 선별 대상에 대해서, 그 이유는 자격 기준에 맞지 않거나 절차에 따르지 않음 (n=81), 동의를 취소함 (n=71), 건강 상태의 변화 (n=22) 및 다른 이유 (n=13)이었 다. 백신 접종자 및 대조군은 각각 75주 및 74주, 각 군에서 대상의 76%는 54주 이상의 평균 연구 시간을 제공하였다. 6명의 대상은 효능 분석에서 배제되었다: 대조군 3명은 처음 2주 내에 죽었고, 2명의 백신 접종자 및 1명의 대조군은 주사 전 2주 내에 감염되었다. 안전성 평가로부터 배제된 대상은 없었다. 두 군은 처리 전의 인구학 및 임상적 특성이 유사하였으며, 이는 캘리포니아의 다양성을 대표하는 것이다. 대상은 카프카스인 33%, 히스패닉계인 31%, 흑인 23%, 아시아인 13%였다. 894명의 백신 접종자 및 910명의 대조군 중에서, 각각 46% 및 44%는 여성 대상이고, 52% 및 51%는 당뇨병 환자였다. 백신 접종 시에, 양쪽 군에서 대상의 69%는 이식체 투석로를 지니고 있었으며 22%는 비강 보균자였다. 양쪽 군에서 평균 연령은 58.3세였다.

백신군 및 대조군 사이의 사망자의 수에는 통계적으로 유의한 차이가 없었으며 백신과 관련이 없는 것으로 간주되었다. 백신 접종자 중에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의한 국소 반응, 무력증 및 근육통의 증가가 있었다 (표 1).

[표 3]

반응	백신군 (N = 893)	위약군 (N = 907)	P 값
국소			
경화	121 (13.5)	40 (4.4)	< 0.001
홍반	93 (10.4)	44 (4.9)	< 0.001
주사 부위 통증	290 (32.5)	128 (14.1)	< 0.001
열	85 (9.5)	33 (3.6)	< 0.001
임의의 국소 반응	338 (37.8)	179 (19.7)	< 0.001
전신			
두통	243 (27.2)	227 (25.0)	0.31
근육통	253 (28.3)	199 (21.9)	0.002
무력증	226 (25.3)	188 (20.7)	0.02
오심	168 (18.8)	141 (15.5)	0.07
구토	64 (7.2)	73 (8.0)	0.53
발열	41 (4.6)	42 (4.6)	1.00
임의의 전신 반응	431 (48.3)	393 (43.3)	0.04
* 백신군에서 1명의 환자 및 위약군에서 3명의 환자에 대해 데이타가 기록되지 않음. 괄호 안의 수치는 군의 %이다. 주사 부위 통증은 욱신욱신 쑤시고, 화끈거리며 압통이 복합된 것이다. P 값은 백신 및 위약군을 비교하는 피셔의 정확 검정으로부터 얻은 것이다.			

국소 반응은 일반적으로 온화하거나 또는 적당하였으며 2일 이내에 종결되었다. 스타필로코커스 아우레우스 균혈증과 사망간의 인과 관계 또는 시간적 선후 관계가 백신군에서는 152 사망건 중 9건 (5.9%) 및 대조군에서는 146 사망건 중 11건 (7.5%)에 대해 규명되었다 [피셔의 정확 검정, P=0.65].

백신 접종 후 1-2주 내, 단 백신 효능 추적 검사 개시 전, 백신군에는 1명의 균혈증 환자가 있었으며 위약군에서는 없었다. 3 내지 40주 안에, 백신 접종자의 경우 1년에 618.9 개체 중 11 건의 결과가 있었으며 대조군에서는 1년에 627.0 개체 중 26건의 결과가 있었다. 백신은 균혈증을 57% 감소시켰다 (95% 신뢰 구간 10.2 내지 80.9, P=0.02). 효능은 40주 후에 저하되었는데, 54주째에는 26%로 감소하였다 (95% 신뢰 구간 24.1 내지 56.9, P=0.23; 표 2).

[표 4]

주사한 후 주	백신군		위약군		효능 백분율 (95% CI)	P 값
	감염 수	1년 당 개체	감염 수	1년 당 개체		
10	4	135.2	5	138.0	18% (-279., 83.8)	1.0
20	6	300.6	13	306.6	53% (-32.8, 85.3)	0.17
30	8	461.9	22	469.7	63% (13.8, 85.8)	0.02
40	11	618.9	26	627.0	57% (10.2, 80.9)	0.02
50	25	766.5	34	775.3	26% (-28.4, 57.5)	0.30
54	27	818.4	37	827.4	26% (-24.5, 56.8)	0.23
91	37	1165.0	49	1161.6	25% (-17.8, 52.2)	0.24
* 데이타는 유효 집단의 1798 환자 중에서 균혈증의 첫번째 증상 발현에 대한 것이다. 주사 후 1주 및 2주로부터의 결과는 배제된다. 백신의 효능은 100 x (1- [백신군에서 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 개체-시간 발생율/ 위약군에서 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 개체-시간 발생율])으로서 산출된다. P 값은 백신군 및 위약군 사이의 비교에서 발생율 비 = 1의 정확 검정에 대한 것이다.						

인접 간격에서 가장 높은 효능을 결정하는 두 샘플 순열 검정을 이용하여, 주사 후 54 일째를 시작으로 하여 187일 (27주)의 기간에 걸쳐 75%의 효능이 관찰되었다 (대조군에서 1년에 444.2 개체 중 20명의 감염과 비교하여 백신군에서는 1년에 437.4 개체 중 5명의 감염이 있었음, P=0.01).

3 내지 91주 동안 개체-시간 효능의 동일성에 대한 검정에 의해 효능이 2개의 계층에 의해 형성된 4종 세포에서 서로 유의적으로 상이하지 않다는 점이 입증되었다 (동일성의 정확 검정에 대해 P=0.15임). 그런데, 이 상호작용을 평가하기 위한 능력에 제한이 있었다. 양쪽 군에서, 연구 착수 시점에서 누관 보다는 이식체를 통한 혈관 투석로를 지닌 환자들은 균혈증에 걸릴 위험이 높아지는 경향이 있었다 (표 3 참조). 또한 스타필로코커스 아우레우스의 비강 전달체는 백신 접종자가 아닌 대조군에서 균혈증에 걸릴 위험의 증가와 관련이 있는 경향이 있었다 (개 체-시간 비율은 1년에 100 개체 당 7.6 대 3.1임, P=0.06, 개체-시간 비율의 정확한 비교).

[표 5]

혈관 투석로 유형 및 비강 보균 상태	백신군		위약군	
	총	감염	총	감염
이식, 비강 보균 음성	493	18 (3.7)	496	20 (4.0)
이식, 비강 보균 양성	123	6 (4.9)	129	10 (7.8)
누관, 비강 보균 음성	209	3 (1.4)	214	2 (0.9)
누관, 비강 보균 양성	67	0 (0)	67	5 (7.5)
* 괄호 안의 값은 계층의 백분율이다.				

백신군 및 대조군은 균혈증 환자들 중에서 스타필로코커스 아우레우스 형의 유사 분포를 갖는다. 유형을 정하기 위해 백신군에서 37 분리주 중 13 분리주를, 위약군에서 49 분리주 중 12 분리주를 회수하지 못하였다. 백신군에서, 8 분리주 (33%)는 5형이었으며, 11 분리주 (46%)는 8형이었다. 5 분리주 (21%)는 336형이었다. 위약군에서, 10 분리주 (27%)는 5형이었으며, 20 분리주 (54%)는 8형이었으며, 7 분리주 (19%)는 336형이었다. 본 연구에서 균혈증 환자로부터 스타필로코커스 아우레우스 분리주의 유형 분포는 다른 이들에 의해 기록된 결과와 일치하였다. 메티실린 내성은 백신군에서는 스타필로코커스 아우레우스의 37 분리주 중 7 분리주에서 발견되었고 위약군에서는 48 분리주 중 12 분리주에서 발견되었다 (대조군 중 한 격리자는 시험되지 않았음). 백신군 및 위약군 양쪽에서의 분리주 중 메티실린 내성의 유사한 분포는 항생물질 내성 및 항생물질 감수성 스타필로코 커스 아우레우스 모두가 항체 매개된 옵소닌 식균작용에 의해 사멸됨을 입증하는 실험실 내 데이타와 일치한다.

3주 내지 40주 사이에서, 37명의 스타필로코커스 아우레우스 균혈증 환자 (백신군에서 11명 및 위약군에서 26명)가 있었다. 백신군에서 11 분리주 중 2 분리주 및 위약군에서 26 분리주 중 6 분리주를 유형을 정하기 위해 회수하지 못하였다. 백신군에서, 5 분리주가 5형, 3 분리주가 8형, 그리고 1 분리주가 336형이었다. 위약군에서, 6 분리주가 5형, 11 분리주가 8형, 그리고 3 분리주가 336형이었다 [P = 0.50, 정확한 카이 제곱 검증 (chi-square)]. 3주와 54주 사이에서, 2명의 백신 접종자 및 6명의 위약 투여 환자가 한가지를 넘는 균혈증을 갖고 있었다 [P= 0.11, 정확한 코크란-맨텔-핸첼 (Cochran-Mantel-Haenszel) 검정].

백신군 및 위약군 간에 면역화 전 항체 농도에서의 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 위약군에서 항체 농도는 면역화 전 수치 그대로였다. 백신군에서, 기하 평균 항체 농도는 약 6주째 (제1 평가 시점)에 5형 CPS의 경우에는 230 μg/mL이고 8형 CPS의 경우에는 206 μg/mL였으며, 그 이후에는 감소하였다 (표 4 참조). 최고 항체 농도가 80 μg/mL (예측 보호 수준) 이상인 대상의 백분율은 5형의 경우 80%이고 8형의 경우 75%였다. 비 반응자 중에는 데이타를 얻을 수 없는 27명의 환자 (3%)가 포함되어 있다.

[표 6]

평가 시간	백신군			위약군		
	N	5형 (μg/mL)	8형 (μg/mL)	N	5형 (μg/mL)	8형 (μg/mL)
처리 전	892	5.9	8.6	910	5.7	8.6
6주	884	230	206	900	5.6	8.6
26주	838	120	100	859	5.8	8.9
54주	763	74.2	64.5	776	5.7	8.9
67주	507	78.1	65.8	512	6.2	9.4
* 처리 전 값은 백신군 내의 2 환자에 대해서는 빠져있다. 양쪽 군에서 환자의 수는 시간 경과에 따른 인원 감소로 인해 감소된다.						

백신의 효능은 기하 평균 항체 농도가 약 80 μg/mL 아래로 떨어졌을 때 더 이상 통계적으로 유의적이지 않았다. 이 보호 수준의 예측치는 면역화 전과 면역화 후 6주, 26주 및 54주째에 형성된 데이타의 내삽 (interpolation)으로부터 추정되었다. 백신군 및 위약군의 경우, 5형 및 8형 CPS에 대한 기하 평균 항체 최고 농도는 균혈증을 갖고 있는 개체와 갖고 있지 않은 개체간에 유의적으로 상이하지 않았다.

결과는 스타필로코커스 아우레우스 5형 및 8형 결합체의 1회 주사가 안전하며, 면역성이 있으며 ESRD를 앓고 있는 면역약화 집단에서 스타필로코커스 아우레우스 균혈증을 약 40주 동안 보호한다는 사실을 입증하였다. 상기 집단은 특히 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 고위험군이다. 거의 90%의 균혈증 환자가 백신에 반응하였으며 75% 이상의 환자들은 80 μg/mL 이상 (예측 보호 수준)의 항체 농도를 얻었다. 40주 이후의 백신 효능의 감소는 대상 집단에서의 특정 항체의 농도 감소와 병행되었다. 건강한 대상보다는 균혈증 환자에게서 항체 농도가 보다 급속히 떨어진다. ESRD 환자의 항체 수준의 급속한 감소는 백신을 부스팅함으로써 막을 수 있다.

ESRD 환자의 항체의 최소 보호 수준은 약 80 μg/mL인 것으로 계산되었으며, 이는 헤모필루스 인플루엔자 b 형 및 스트렙토코커스 뉴모니애의 CPS 항체 보호 수준 (각각 0.15 및 1 μg/mL) 보다 2-3 log 더 높은 것이다.

보호 항체 수준에서의 차이는 ESRD 환자의 손상된 식세포 기능 및 근원 질병에서 기인한 것일 수 있다. 그러므로, 상기 환자 집단에 대한 보호 수준을 규명하면 기타 위험군 환자에 있어서 상기 백신의 임상 효능의 대용이 마련된다.

비강 전달체는 혈액투석 환자들 중에 스타필로코커스 아우레우스 균혈증에 걸릴 위험 증가와 연관이 있다. 스타필로코커스 아우레우스는 가장 일반적인 혈관 투석로 부위 감염 병원균으로서 혈관 투석로와 관련된 균혈증의 가장 흔한 원인이다. 수가 적긴 하지만, 비강 전달체는 균혈증에 걸릴 위험이 높은 상태에서 백신 접종자가 아닌 대조군에 영향을 미치는 것으로 보인다. 이는 백신 접종이 비강 전달체와 관련된 스타필로코커스 아우레우스 감염 위험의 증가를 방어한다는 사실을 제시하고 있다.

백신 접종으로부터 40주에 걸쳐 2가 백신은 모든 스타필로코커스 아우레우스 균혈증에 대해 통계적으로 유의적인 보호를 유발하였다. 효능은 다른 항원, 특히 336형 항원의 첨가후에 증가하였다.

스타필로코커스 아우레우스 5형 및 8형 CPS-재조합 슈도모나스 아에루기노사 비독성 엑소톡신 A (rEPA) 결합체 백신 (StaphVAX ?)을 혈액투석에 의해 지탱되는 말기 신장 질환 (ESRD) 환자의 이중 맹검 (double-blinded) 무작위 위약-관리 연구를 통해 그의 안정성, 면역성 및 효능을 평가하였다. 73 곳의 혈액투석 센터에서 성인 환자들에게 백신 (n = 894) 또는 염수 (n = 910)를 1회 근육내 주사하였다. 5형 및 8형 CPS에 대한 IgG 항체를 2년까지 일정 간격으로 측정하였으며 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 증상 발현을 기록하였다. 백신군 중 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 발병 비율을 대조군의 것과 비교하여 효능을 측정하였다.

백신 반응은 일반적으로 온화한 정도에서 적당한 정도이며 대부분 2일 내에 종결되었다. CPS의 각 유형은 86%의 환자에게서 현저한 항체 반응을 이끌어 내었다. 백신 접종 후 40주째, 스타필로코커스 아우레우스 균혈증의 발생율은 백신군에서 11/892이었으며, 대조군에서는 26/906이었다 (효능의 개체-시간 예측치 57%, P=0.02, 95%의 신뢰 구간, 10 내지 81). 보다 긴 구간에 대한 백신 효능은 의미상 0과 다름이 없었다. CPS-특이적 IgG의 예측 보호 수준은 약 80 μg/mL이다. 결합체 백신은 약 40주 동안 혈액투석 환자의 스타필로코커스 아우레우스 균혈증에 대해 면역원성을 부여하였으며, 이후 그 효능은 항체 수준 감소에 병행하여 감퇴하였다.

본원에 언급된 모든 참조 문헌의 내용은 그 전체가 참고로 인용된 것이다.

다수의 변형 및 변화가 본 발명의 취지 및 영역에서 벗어남이 없이 본원에 기재되고 예시된 기술 및 구성에 대해 행해질 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)의 5형 및 8형 다당류 항원 둘다의 당결합체 (glycoconjugate);

(b) 주요 탄수화물 성분으로서 β-결합된 헥소사민을 포함하고 O-아세틸 기를 함유하지 않는 음하전된 포도상구균 다당류 항원의 당결합체;

(c) 아미노산 및 N-아세틸화 헥소사민을 α 배열로 포함하고, O-아세틸 기를 함유하지 않으며 헥소스를 함유하지 않는 포도상구균 글리코펩티드 항원의 당결합체;

(d) ATCC 55254에 대한 항혈청을 응집시키는 스타필로코커스 에피더미디스 (*Staphylococcus epidermidis*)의 분리주로부터 얻은 산성 포도상구균 다당류 항원의 당결합체;

(e) 2-아세트아미도-2-데옥시-글루코스 및 람노스를 1:2 몰 비로 포함하는 엔테로코커스 패칼리스 (*Enterococcus faecalis*) 항원의 당결합체;

(f) 6-데옥시 당을 포함하는 삼당류 반복을 포함하는 엔테로코커스 패칼리스 항원의 당결합체;

(g) 2-아세트아미도-2-데옥시-갈락토스 및 갈락토스를 2:1 몰 비로 포함하는 엔테로코커스 패슘 (*Enterococcus faecium*) 항원의 당결합체;

(h) ATCC 202016에 대한 항체와 반응하는 엔테로코커스 패슘 항원의 당결합체; 또는

(i) ATCC 202017에 대한 항체와 반응하는 엔테로코커스 패슘 항원의 당결합체

를 포함하는, 다당류 또는 글리코펩티드 세균 표면 항원의 당결합체 및 면역운반체를 포함하는 백신을 면역약화된 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 포도상구균 및 장구균 세균 감염 중 적어도 하나로부터 면역약화된 인간을 보호하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 백신이 스타필로코커스 아우레우스의 5형 및 8형 다당류 항원 중 하나 이상의 결합체를 포함하는 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 백신이 스타필로코커스 아우레우스의 5형 및 8형 다당류 항원 둘다의 결합체를 포함하는 방법.

청구항 4.
제1항에 있어서, 상기 백신이 β-결합된 헥소사민을 포함하고 O-아세틸 기를 함유하지 않으며, ATCC 55804로 기탁된 스타필로코커스 아우레우스 336형에 대한 항체와 특이적으로 결합하는 다당류 항원을 포함하는 방법.

청구항 5.
제4항에 있어서, 상기 백신이 스타필로코커스 아우레우스의 5형 및 8형 다당류 항원의 결합체를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6.
제1항에 있어서, 상기 백신이 ATCC 55254에 대한 항혈청을 응집시키는 스타 필로코커스 에피더미디스의 분리주로부터 얻은 산성 다당류 항원을 포함하는 방법.

청구항 7.
제1항에 있어서, 상기 백신이 아미노산 및 N-아세틸화 헥소사민을 α 배열로 포함하고, O-아세틸 기를 함유하지 않으며 헥소스를 함유하지 않는 포도상구균 글리코펩티드 항원을 포함하는 방법.

청구항 8.
제1항에 있어서, 상기 다당류 결합체 백신이 2-아세트아미도-2-데옥시-글루코스 및 람노스를 1:2 몰 비로 포함하는 엔테로코커스 패칼리스 항원을 포함하는 방법.

청구항 9.
제1항에 있어서, 상기 다당류 결합체 백신이 6-데옥시 당을 포함하는 삼당류 반복을 포함하는 엔테로코커스 패칼리스 항원을 포함하는 방법.

청구항 10.
제1항에 있어서, 상기 다당류 결합체 백신이 2-아세트아미도-2-데옥시-갈락토스 및 갈락토스를 2:1 몰 비로 포함하는 엔테로코커스 패슘 항원을 포함하는 방법.

청구항 11.
제1항에 있어서, 상기 세균 표면 항원이 협막 다당류 (capsular polysaccharide) 항원인 방법.

청구항 12.
제1항에 있어서, 상기 세균 표면 항원이 테이코산 항원인 방법.

청구항 13.
제1항에 있어서, 상기 세균 표면 항원이 글리코펩티드 항원인 방법.

청구항 14.
제1항에 있어서, 상기 면역약화된 인간이 말기 신장 질환 (ESRD) 환자, 면역억제 요법을 받는 암 환자, AIDS 환자, 당뇨병 환자, 신생아, 장기 요양 시설에 있는 노인, 면역억제 요법을 받는 자가면역 질환 환자, 이식 환자, 침습 수술을 받는 환자, 화상 환자 및 급성 진료 시설에 있는 다른 환자로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 15.
제1항에 있어서, 상기 면역약화된 인간이 말기 신장 질환을 앓는 환자인 방법.

청구항 16.
제1항에 있어서, 상기 면역약화된 인간이 신생아인 방법.

청구항 17.
제1항에 있어서, 상기 면역운반체가 디프테리아 톡소이드, 파상풍 톡소이드, 그의 재조합 생산된, 유전적으로 무독화된 변이체, 또는 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 엑소톡신 A 또는 포도상구균 엑소톡신 또는 톡소이드의 재조합 생산된 비독성 돌연변이체인 방법.

청구항 18.
제1항에 있어서, 상기 백신이 보강제 또는 면역자극제를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19.
제1항에 있어서, 상기 백신이 β-글루칸 또는 과립구 콜로니 자극 인자를 추가로 포함하는 방법.