(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0116651
(43) 공개일자 2007년12월10일

(51) Int. Cl.
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 39/145* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7024383
(22) 출원일자 2007년10월23일
심사청구일자 없음
번역문제출일자 2007년10월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/002838
국제출원일자 2006년03월21일
(87) 국제공개번호 WO 2006/100111
국제공개일자 2006년09월28일
(30) 우선권주장
0505989.4 2005년03월23일 영국(GB)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89
(72) 발명자
하논, 엠마뉴엘, 쥴리스
벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
스테파니, 진
벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
(74) 대리인
남상선

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 조성물

(57) 요 약

본 발명은 다양한 질환에 대해 면역시키기 위한 인플루엔자 백신 제형 및 백신접종 요법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 수중유 에멀젼 애주번트 및 3D-MPL을 포함하는 백신 제형, 약제에서 이의 용도, 특히 다양한 항원에 대해 면역 반응을 증가시키는 이의 용도, 및 제조방법에 관한 것이며, 여기서 수중유 에멀젼은 스테롤, 대사가능한 오일 및 에멀젼화제를 포함한다.

(30) 우선권주장
0505998.5 2005년03월23일 영국(GB)
0506000.9 2005년03월23일 영국(GB)
0506001.7 2005년03월23일 영국(GB)
0506004.1 2005년03월23일 영국(GB)
0510589.5 2005년05월24일 영국(GB)
0510591.1 2005년05월24일 영국(GB)
0510593.7 2005년05월24일 영국(GB)
0510596.0 2005년05월24일 영국(GB)
0510598.6 2005년05월24일 영국(GB)
0603788.1 2006년02월24일 영국(GB)
0603789.9 2006년02월24일 영국(GB)
0603790.7 2006년02월24일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 항원 또는 항원 조성물,

(b) 수중유 에멀젼 애주번트(adjuvant); 및

(c) 3D MPL을 포함하며,

상기 수중유 에멀젼이 대사가능한 오일, 스테롤 및 에멀젼화제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 대사가능한 오일이 상기 면역원성 조성물의 총부피의 0.5% 내지 20%의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 대사가능한 오일이 상기 면역원성 조성물의 총부피의 1.0% 내지 10%의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사가능한 오일이 상기 면역원성 조성물의 총부피의 2.0% 내지 6.0%의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스테롤이 알파-토코페롤인 면역원성 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스테롤이 상기 면역원성 조성물의 총부피의 1.0% 내지 20%의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스테롤이 상기 면역원성 조성물의 총부피의 1.0% 내지 5.0%의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에멀젼화제가 트윈 80인 면역원성 조성물.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에멀젼화제가 상기 면역원성 조성물의 0.01 중량% 내지 5.0 중량%(w/w)의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 에멀젼화제가 상기 면역원성 조성물의 0.1 중량% 내지 2.0 중량%(w/w)의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 3D-MPL이 조성물 용량 당 10 내지 50 ㎍(w/v)의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 3D-MPL이 조성물 용량 당 25 ㎍(w/v)의 양으로 존재하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 상기 조성물 용량이 약 0.5 ml, 0.5 내지 1 ml, 또는 1 ml인 면역원성 조성물.

청구항 14

항원, 또는 항원 또는 이의 변형체를 포함하는 병원체에 노출과 관련된 감염증 및/또는 질병의 예방을 위한 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 규정된 면역원성 조성물의 제조에서,

(a) 항원 또는 항원 조성물,

(b) 수중유 에멀젼 애주번트(adjuvant); 및

(c) 3D MPL을 포함하는 조성물의 용도.

청구항 15

백신접종을 필요로 하는 개인 또는 집단에 제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 규정된 항원 또는 항원 조성물, 3D MPL 및 수중유 에멀젼 애주번트를 전달함을 포함하는 백신접종 방법.

청구항 16

제 14항 또는 제 15항에 있어서, 상기 항원에 대한 i) 개선된 CD4 T-세포 반응, ii) 개선된 B 세포 메모리 반응, iii) 개선된 항체 반응 중 하나 이상을 유도하기 위한 용도 또는 방법.

청구항 17

제 14항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 면역저하된 사람 개인 또는 집단에서의 용도 또는 방법.

청구항 18

제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물의 항원이 유래된 병원체의 변형체인 병원체에 의해 야기된 감염증 또는 질병에 대해 방어하기 위한 용도 또는 방법.

청구항 19

제 14항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물 중 항원의 변형체인 항원을 포함하는 병원체에 의해 야기되는 감염증 또는 질환에 대해 방어하기 위한 용도 또는 방법.

청구항 20

제 18항 또는 제 19항에 있어서, 방어가 감염된 개인 또는 집단의 체온에 의해 평가되는 용도 또는 방법.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물이 CD4 T 세포 에피토프(epitope)를 포함하는 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물이 B 세포 에피토프를 지닌 항원을 포함하는 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 23

항원 또는 항원 조성물, 또는 이의 단편 또는 변형체, 3D MPL 및 수중유 에멀젼 애주번트로 사전에 백신접종된 개인의 재백신접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서 항원의 용도.

청구항 24

제 23항에 있어서, 재백신접종을 위한 항원이 이전 백신접종을 위해 사용된 항원 또는 항원 조성물을 지닌 통상

적인 CD4 T-세포 에피토프를 공유하는 용도.

청구항 25

제 23항 또는 제 24항에 있어서, 재백신접종을 위한 항원 또는 항원 조성물이 애주번트 첨가된(adjuvanted) 용도.

청구항 26

제 25항에 있어서, 애주번트가 제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 규정된 수중유 에멀젼인 용도.

청구항 27

제 25항 또는 제 26항에 있어서, 상기 애주번트가 3D-MPL을 추가로 포함하는 용도.

청구항 28

본원에 규정된 수중유 에멀젼을 항원 또는 항원 조성물 및 3D-MPL을 조합함을 포함하여 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 29

약제학적으로 허용되는 담체와 조합한 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물.

청구항 30

제약에 사용하기 위한

(a) 항원,

(b) 본원에 규정된 수중유 에멀젼 애주번트; 및

(c) 3D MPL을 포함하는 조성물.

청구항 31

제 1항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 또는 항원 제조물이 인플루엔자 바이러스, HPV로 구성된 군으로부터 선택된 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 32

제 31항에 있어서, 상기 인플루엔자 항원이 스플리트(split) 인플루엔자 바이러스, 전체 인플루엔자 바이러스, 서브유닛 인플루엔자 바이러스, 인플루엔자 비로솜, 및 이의 항원 제조물로 구성된 군으로부터 선택된 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 33

제 31항에 있어서, 상기 HPV 항원이 암 또는 생식기 사마귀와 관련된 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 34

제 33항에 있어서, 상기 암-관련 HPV가 HPV 타입 16 및/또는 HPV 타입 18인 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 35

제 34항에 있어서, 암을 야기시키는 HPV 타입으로부터의 하나 이상의 부가적인 항원이 HPV 16 및/또는 18 항원과 함께 사용되고, 항원이 HPV 31, 45, 33, 58 및 52의 HPV 타입으로부터 선택된 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 36

제 34항 또는 제 35항에 있어서, 항원이 바이러스 유사 입자의 형태인 조성물, 용도 또는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

<1> 본 발명은 다양한 질환에 대해 면역시키기 위한 인플루엔자 백신 제형 및 백신접종 요법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 수중유 에멀젼 애주번트 및 3D-MPL을 포함하는 백신 제형, 약제에서 이의 용도, 특히 다양한 항원에 대해 면역 반응을 증가시키는 이의 용도, 및 제조방법에 관한 것이며, 여기서 수중유 에멀젼은 스테롤, 대사가능한 오일 및 에멀젼화제를 포함한다.

배 경 기 술

<2> 개선된 면역성을 갖는 신규한 조성물 및 백신은 항상 필요로 한다. 일 전략으로서, 애주번트는 임의의 제공된 항원에 대해 이루어진 면역 반응을 시도하고 개선시키기 위해 사용되었다.

<3> 예를 들어, 인플루엔자 백신 및 사람 파필로마 바이러스(HPV)에 대한 백신은 애주번트와 함께 개발되었다.

<4> 인플루엔자 바이러스는 사람 및 가축 둘 모두에 영향을 주는, 세계적으로 가장 흔하게 존재하는 바이러스 중 하나이다. 인플루엔자는 경제적 부담, 질병 및 사망을 초래하며, 이는 상당하다.

<5> 인플루엔자 바이러스는 직경이 약 125nm인 입자 크기를 갖는, 외피가 있는 RNA 바이러스이다. 인플루엔자 바이러스는 기본적으로 지질 이층 구조 및 외부 당단백질을 갖는 바이러스 외피에 의해 둘러싸인 핵단백질과 결합된 리보핵산(RNA)의 내부 누클레오캡시드 또는 코어로 구성된다. 바이러스 외피의 내층은 주로 기질 단백질로 구성되며, 외층은 대부분 숙주 유래된 지질 물질로 구성된다. 인플루엔자 바이러스는 두개의 표면 항원인 당단백질 뉴라미니다제(NA) 및 헤마글루티닌(HA)를 포함하며, 이들은 입자의 표면에서 10 내지 12nm 길이의 스파이크(spike)로서 나타난다. 인플루엔자 아형(subtype)의 항원 특이성을 결정하는 것이 바로 이러한 표면 단백질, 특히 헤마글루티닌이다.

<6> 이들 표면 항원은 점진적으로, 때로는 신속하게 항원성의 변화를 유도하는 소정의 변화가 일어난다. 소위 '드리프트(drift)' 및 '시프트(shift)'로 불리우는 이러한 항원성 변화는 예측할 수 없으며, 이것들이 궁극적으로는 새로운 인플루엔자 균주의 출현을 유도하고, 이러한 바이러스가 면역 시스템을 벗어날 수 있게 하여 널리 공지된, 거의 매년 발생하는 유행병을 초래한다는 면역학적 관점에서 볼때 상당한 충격을 가질 수 있다.

<7> 시즌마다 인플루엔자 백신에 도입되어야 하는 인플루엔자 바이러스 균주는 국립 보건 당국과 백신 제조업자가 협력하여 세계 보건 기구에 의해 결정된다.

<8> HA는 상이한 인플루엔자 균주의 혈청학적 특이성을 정의함에 있어서 가장 중요한 항원이다. 상기 75-80 kD 단백질은 수 많은 항원성 결정인자를 함유하며, 이중 몇몇은 상이한 균주에서 서열 변화가 일어난 영역에 존재하며(균주-특이적 결정인자), 다른 것들은 많은 HA 분자에 공통적인 영역에 존재한다(결정인자에 대해 공통적임).

<9> 인플루엔자 바이러스는 6주 이상의 기간에 걸쳐 40% 정도로 높은 타입 A 또는 B 바이러스의 감염율로 거의 매년 겨울마다 유행병을 일으킨다. 인플루엔자 감염은, 경도의 상기도 감염을 통한 잠재성 감염으로부터 심각한 바이러스 폐렴까지 여러 질병 상태를 초래한다. 전형적인 인플루엔자 유행병은 폐렴 발생 및 입원 또는 사망율 증가에 의해 목격되는 바와 같은 하기도 질환(lower respiratory disease)의 증가를 초래한다. 이러한 질환의 중증도는 주로 숙주의 연령, 그의 면역 상태 및 감염 부위에 의해 결정된다.

<10> 선진국에서 모든 인플루엔자 관련 사망의 80 내지 90%에 이르는 65세 이상의 노인들은 특히 취약하다. 만성 질병이 있는 개인들은 또한 이러한 합병증을 경험할 가능성이 높다. 또한, 영아는 심각한 질병을 앓을 수 있다. 그러므로, 특히 이들 그룹은 보호받아야 한다. 이러한 "위험"군 외에도, 보건 당국에서는 노인과 접촉하는 건강한 성인도 백신접종할 것을 권장하고 있다.

<11> 백신접종은 해마다 일어나는 인플루엔자 유행병을 억제하는 데 중요한 역할을 한다. 최근 입수할 수 있는 인플루엔자 백신은 불활성화된 인플루엔자 백신이거나 약독화된 인플루엔자 생백신이다. 불활성화 flu 백신은 세가지 가능한 항원 제제 형태로 구성된다: 불활성화된 전 바이러스, 정제된 바이러스 입자가 지질 외피를 용해시키는 세정제 또는 그 밖의 시제로 붕괴된 서브-비리온(sub-virion)(소위 "스플릿(split)" 백신), 또는 정제된 HA 및 NA(아단위 백신). 이러한 불활성화된 백신은 근내(i.m.) 또는 비내(i.n.) 제공된다.

<12> 모든 종류의 인플루엔자 백신은 보통 3가 백신이다. 이들 백신은 일반적으로 두개의 인플루엔자 A 바이러스 균주 및 하나의 인플루엔자 B 균주로부터 유래된 항원을 함유한다. 대부분의 경우에 표준 0.5ml 주사가능 투여량은 일원 면역 확산법(SRD)(J.M. Wood et al.: An improved single radial immunodiffusion technique for the

assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5(1997) 237-247; J.M. Wood et al., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of infuenza virus. J. Biol. STand. 9(1981) 317-330)에 의해 측정하여 각 균주로부터 15㎍의 헤마글루티닌 항원 성분을 함유한다.

<13> 최근 입수할 수 있는 인플루엔자 백신은 모든 연령 군에서 안전한 것으로 간주된다[참조: De Donato et al. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101]. 그러나, 현 인플루엔자 백신이 2세 미만의 소아에게 효력이 있는 지에 대해서는 입증된 바가 거의 없다. 또한, 전형적인 확인된 인플루엔자 병의 예방에 대해 보고된 백신 효율은 중장년층에 대해 23-72%인데, 이는 청년층에 대해 보고된 60 내지 90% 효율에 비해 상당히 낮은 것이다[참조: Govaert, 1994, J. Am. Med. Assoc, 21, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med. 123, 523-527]. 인플루엔자 백신의 효능은 바이러스 균주에 대한 헤마글루틴화 억제(HI) 항체의 혈청 역가와 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 여러 연구에서 중장년층이 청년층에 비해 인플루엔자 면역화 후 더 낮은 HI 역가를 나타낸 것으로 밝혀졌다[참조: Murasko, 2002, Experimental gerontology, 37, 427- 439].

<14> 그러므로, 개선된 면역원성을 지닌 신규 백신이 여전히 요구되는 실정이다. 효능있는 애주번트와의 백신 항원의 제형은 서브비리온 항원에 대한 면역 반응을 증진시키기 위해 가능한 방법이다.

<15> 수중유 에멀젼 형태의, 애주번트 MF59가 보조된 서브유닛(sub-unit) 백신은 통상적으로 입수할 수 있으며, 이러한 백신은 애주번트 비첨가 서브유닛 백신으로 얻어지는 것보다 높은 항체 역가를 유도할 수 있는 것으로 입증되었다[참조: De Donato et al. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101]. 그러나, 이후 공개에서, 동일한 백신이 애주번트 비첨가 스플릿 백신과 비교하여 개선된 프로파일이 입증되지 않았다[참조: Puig-Barbera et al., 2004, Vaccine 23, 283-289].

<16> 파필로마바이러스는 작은 DNA 종양 바이러스로서, 매우 종 특이적이다. 지금까지, 100개 초과의 개개 사람 파필로마바이러스(HPV) 유전자형이 기술되었다. HPV는 대개 피부(예를 들어, HPV-1 및 -2) 또는 점막 표면(예를 들어, HPV-6 및 -11)에 대해 특이적이며, 일반적으로 수개월 또는 수년 동안 지속되는 만성 종양(사마귀)을 야기시킨다. 이러한 만성 종양은 관련된 개인에게 괴롭움을 줄 수 있지만 몇가지를 제외하고 생명에 위협을 주지 않는다.

<17> 일부 HPV는 또한 암과 관련된다. HPV와 사람 암 간의 가장 강력한 실제적 관련성은 HPV-16 및 HPV-18 및 자궁경부 암종 사이에 존재한다. 자궁경부암은 개발도상국에서 가장 통상적인 악성 종양이며, 전세계에서 매년 약 500,000명이 새롭게 발생한다. 현재 백신을 사용하여 1차 HPV-16 감염증, 및 심지어 확증된 HPV-16-함유 암과 활성적으로 싸우도록 기술적으로 실행할 수 있다. HPV-16에 대한 예방학적 및 치료학적 백신접종을 위한 가능성을 참조한다[Cason J., Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293-306 및 Hagenesee M.E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556,559-564].

<18> 최소의 변종이 발생하지만, 모든 기술된 HPV 게놈은 적어도 8개의 초기 유전자, E1 내지 E8 및 두개의 말단 유전자 L1 및 L2를 갖는다. 또한, 업스트림 조절 영역은 HPV 게놈의 대부분의 복사를 조절하는 것으로 나타나는 조절 서열을 지니고 있다.

<19> HPV L1 계열 백신은 WO 94/00152, WO 94/20137, WO 93/02184 및 WO 94/05792에 기술되어 있다. 이러한 백신은 단량체로서 L1 항원, 캡소머 또는 바이러스 유사 입자를 포함할 수 있다. VLP의 제조방법은 당업계에서 널리 공지된 것이며, 예를 들어 WO 9913056 및 US 6245568에 기술된 바와 같이 향상된 동질성을 제공하기 위해 VLP 분해-재결합 방법을 포함한다. 이러한 입자는 부가적으로 L2 단백질을 포함할 수 있다. L2 계열 백신은 예를 들어 WO 93/00436에 기술되어 있다. 다른 HPV 백신 방법은 초기 단백질, 예를 들어 E7 또는 융합 단백질, 예를 들어 L2-E7을 기초로 한다.

<20> 개선된 백신, 예를 들어 인플루엔자 또는 HPV 백신에 대한 필요는 아직도 존재한다.

발명의 상세한 설명

<21> **발명의 기술**

<22> 본 발명의 제 1 양태에서, 본 발명은

<23> (a) 항원,

<24> (b) 수중유 에멀젼 애주번트; 및

<25> (c) 3D MPL을 포함하고,

<26> 상기 수중유 에멀젼이 대사가능한 오일, 스테롤 및 에멀젼화제를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.

<27> 본 발명은 또한 감염증 및/또는 질환을 예방하기 위한 면역원성 조성물의 제조에서

<28> (a) 항원,

<29> (b) 수중유 에멀젼 애주번트; 및

<30> (c) 3D MPL을 포함하고,

<31> 상기 수중유 에멀젼이 대사가능한 오일, 스테롤 및 에멀젼화제를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

<32> 본 발명은 또한 항원, 본원에서 규정된 수중유 에멀젼 애주번트 및 3D-MPL의 전달을 포함하는 백신접종 방법에 관한 것이다.

<33> 본 발명은 또한 본원에서 규정된 수중유 에멀젼을 항원 및 3D-MPL과 조합함을 포함하여 면역원성 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<34> 본 발명의 다른 양태 및 장점은 하기 이의 바람직한 구체예의 상세한 설명에서 추가로 기술된다.

<35> **도면에 대한 범례**

<36> 도 1: PCS에 의해 측정되는, SB62 수중유 에멀젼 중의 오일 점적 입자 크기의 분포. 도 1a는 맬번 제타사이저(Malvern Zetasizer) 3000HS으로 SB62 로트(lot) 1023 크기 측정으로 보여준다: A = 1/1000 희석(Rec22 내지 Rec24)(콘틴(Contin) 및 변형 광학 모델에서 분석 1.5/0.01); B = 1/20000 희석(Rec28 내지 Rec30)(콘틴) 및 변형 광학 모델에서 분석 1.5/0.01). 도 1b는 세기에 의한 레코드(22)(상부) 및 레코드(23)(하부)의 개략적으로 도시한 것이다.

<37> 도 2: MPL 벌크의 제조에 대한 개략도.

<38> 도 3: AS03+MPL 애주번트의 제조에 대한 개략도.

<39> 도 4: Explo Flu-001 임상 시험. 스플릿 인플루엔자 항원에 대한 CD4 T 세포 반응(Q1 = 일사분위, Q3 = 삼사분위).

<40> 도 5: Explo Flu-001 임상 시험. 스플릿 인플루엔자 항원에 대한 CD8 T 세포 반응(Q1 = 일사분위, Q3 = 삼사분위).

<41> 도 6: Explo Flu-001 임상 시험. 플루아릭스(Fluarix) + AS03에 의한 백신접종 후 스플릿 인플루엔자 바이러스 항원에 대한 교차 반응성 CD4 T 세포 반응.

<42> 도 7: Explo Flu-001 임상 시험. 백신접종 후 B 세포 기억 반응.

<43> 도 8: Explo Flu-002 임상 시험. 재백신접종 후 스플릿 인플루엔자 항원에 대한 CD4 T 세포 반응.

<44> 도 9: Explo Flu-002 임상 시험. 재백신접종 후 항-HI 역가.

<45> 도 10: 흰족제비 연구 I. 온도 모니터링(1차투여 및 2차투여). 도 10a는 1차 투여이고, 도 10b는 2차투여이다.

<46> 도 11: 흰족제비 연구 I. 바이러스 발산.

<47> 도 12: 흰족제비 연구 II. 온도 모니터링(1차투여 및 2차투여). 도 12a는 1차 투여이고, 도 12b는 2차투여이다.

<48> 도 13: 흰족제비 연구 II. 바이러스 발산.

<49> 도 14: 흰족제비 연구 II. H3N2 A/파나마(백신 균주)에 대한 HI 역가(도 14a) 및 H3N2 A/와이오밍에 대한 HI 역가(2차투여 균주)(도 14b).

<50> 도 15: 마우스 연구. 재자극 항원으로서 불활성화된 전 바이러스를 사용하여 C57BI/6 1차 투여된 마우스에서의

CD4 T 세포의 빈도(면역화후 7일째).

<51> 도 16: 마우스 연구. 재자극 항원으로서 불활성화된 전 바이러스를 사용하여 C57BI/6 1차 투여된 마우스에서의 CD8 T 세포의 빈도(면역화후 7일째).

<52> 도 17: 마우스 연구. 재자극 항원으로서 불활성화된 전 바이러스를 사용하여, 이종 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스에서의 CD4(상부) 및 CD8(하부) T 세포의 빈도(면역화후 7일째).

<53> 도 18: 사람 임상 시험. 플루아릭스, 플루아릭스 + AS03, 플루아릭스 + AS03 + MPL로 중장년층을 백신접종한 후 B 세포 기억 반응(전 및 후의 차이).

<54> 도 19: 흰족제비 연구 III. 2차투여 전 및 후의 온도 모니터링.

<55> 도 20: 흰족제비 연구 III. 2차투여 전 및 후의 바이러스 발산.

<56> 도 21: 흰족제비 연구 III. H3N2 A/와이오밍에 대한 HI 역가(백신 균주).

<57> 도 22: 흰족제비 연구 III. H3N2 A/파나마에 대한 HI 역가(2차투여 균주).

<58> 도 23: 사람 임상 시험. 백신접종후 제 21, 90 및 180일에서의 HI 역가(GMT)(지속성).

<59> 도 24: 사람 임상 시험. CD4 반응 - 모두 이중 시험 - 백신접종후 제 21, 90 및 180일에서의 푸울 항원(지속성).

<60> 도 25: 사람 임상 시험. 플루아릭스와 비교하여 AS03 + MPL에 의한 재백신접종 임상 시험에서의 HI 역가.

<61> 도 26: 사람 임상 시험. CD4 반응에 대한 CMI - 모두 이중 시험 - 0일 및 21일에서의 푸울 항원.

<62> 도 27: 두가지 농도에서의 AS03 + MPL로의 사람 임상 시험. 0일 및 21일에서의 HI 역가.

<63> 도 28: 두가지 농도에서의 AS03 + MPL로의 사람 임상 시험. 반응생성력.

<64> **상세한 설명**

<65> 본 발명의 원리는 서브-유닛 또는 스플리트 인플루엔자 항원과 관련하여 또는 수중유 에멀젼 및 3D-MPL과 조합된 VLP 형태의 다양한 암-관련 HPV 항원과 함께 기술된다.

<66> 본 발명의 일 양태에서, 본 발명자들은 서브-유닛 또는 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제조물을 수중유 에멀젼 애주번트 및 3D-MPL과 함께 포함하는 인플루엔자 제형이 애주번트 비첨가된 서브-유닛 또는 스플리트 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물과 함께 얻어진 것과 비교하여 사람에서 상기 항원 또는 항원 조성물에 대한 CD4 T-세포 면역 반응 및/또는 B 세포 메모리 반응을 개선시킬 수 있음을 발견하였다.

<67> 따라서 상기 조성물은 개선된 인플루엔자 백신을 제공한다.

<68> 청구된 제형은 MHC 부류 II 분자에 의해 표시되는 인플루엔자 에피토프를 검출할 수 있는 항-인플루엔자 CD4-T 세포 반응을 유도하는데 사용될 수 있다. 본 출원인은 (백신접종 및 감염시에) 동종 및 드리프트(drift) 인플루엔자 균주에 대한 반응성을 증가시키기 위해 세포-매개 면역 시스템을 타겟화하기에 효과적임을 발견하였다.

<69> 본 발명자들은 본원에서 규정된 수중유 에멀젼 애주번트 및 3D MPL과 함께 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물을 포함하는 인플루엔자 제형이 애주번트 비첨가된 조성물과 비교하여, 사람 피검체의 제 1 백신접종 후에 적어도 B 세포 메모리 반응을 보다 높게 유도할 수 있음을 발견하였다.

<70> 본 발명에 따른 애주번트 첨가된 인플루엔자 조성물은 여러 이점을 갖는다:

<71> 1) 개선된 면역원성: 중장년층(50세 이상, 일반적으로 65세 이상)의 약한 면역 반응을 젊은이들에게서 나타나는 수준으로 회복되게 할 것이다(항체 및/또는 T 세포 반응);

<72> 2) 개선된 교차 방어 프로파일: 변형(드리프트된) 인플루엔자 균주에 대한 증가된 교차 방어;

<73> 3) 또한, 유사한 반응에 대해 감소된 항원 용량이 사용되게 하고, 이에 따라 비상 상황(예를 들어, 유행병)의 경우에 증가된 능력을 보장할 것이다.

<74> 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명자들은 또한 항체 생산 및 B 세포 메모리 모두가 본원에 규정된 수중유 에멀젼 애주번트 + 3D-MPL이 수중유 에멀젼 성분이 결여된 애주번트와 함께 발생된 것과 균등하거나 때때로 이보다

우수한 면역원성 결과를 기술한다.

<75> 이들 발견은 동일한 항원의 다른 형태, 및 다른 항원에 적용될 수 있다.

<76> **항원**

<77> 본 발명에서 사용될 수 있는 항원은 하기를 포함한다:

<78> 예를 들어 군 A 스트렙토코쿠스, 또는 군 B 스트렙토코쿠스로부터의 스트렙토코칼 항원, 가장 바람직하게는 스트렙토코쿠스 폐렴으로부터의 스트렙토코칼 항원. 단백질 및/또는 사카라이드 항원이 가장 바람직하게 사용된다. 스트렙토코쿠스 폐렴 사카라이드 항원 및/또는 하나 이상의 스트렙토코쿠스 폐렴 단백질 항원(들)은 가장 바람직하게는 폐몰리신(pneumolysin), PspA 또는 이의 막관통 삭제 변형체, PspC 또는 이의 막관통 삭제 변형체, PsaA 또는 이의 막관통 삭제 변형체, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, CbpA 또는 이의 막관통 삭제 변형체, PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, Spsa, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 및 Sp133, 또는 이의 면역학적으로 작용성 균등물로 구성된 군으로부터 선택된다.

<79> 또한, 하나(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10) 이상의 스트렙토코쿠스 폐렴 사카라이드 항원(들) 및/또는 바람직하게는 상술된 단백질 항원의 군으로부터 선택된 스트렙토코쿠스 폐렴 단백질 항원이 바람직하다.

<80> 특정 조성물은 WO 00/56359 및 WO 02/22167 및 WO 02/22168(본원에 참고문헌으로 통합됨)에 기술되어 있다.

<81> 항원은 캡슐형 사카라이드 항원(바람직하게는 캐리어 단백질에 콘쥬게이트됨)를 포함할 수 있으며, 여기서 사카라이드(가장 바람직하게는 다당류)는 적어도 4개의 폐모코쿠스의 혈청타입으로부터 유도된다. 바람직하게는 4개의 혈청타입은 6B, 14, 19F 및 23F를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 적어도 7개의 혈청타입, 예를 들어 혈청타입 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터 유도된 것이 조성물에 포함된다. 더욱 바람직하게는, 적어도 11개의 혈청타입이 조성물에 포함되며, 예를 들어 일 구체예의 조성물은 혈청타입 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터 유래된 캡슐형 사카라이드(바람직하게는 캐리어 단백질에 콘쥬게이트됨)를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 적어도 13개의 사카라이드 항원(바람직하게는 캐리어 단백질에 콘쥬게이트됨)이 포함되지만, 추가 사카라이드 항원, 예를 들어 23 가(예를 들어 혈청타입 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 20, 22F, 23F 및 33F)가 또한 본 발명에서 고려된다. (예를 들어 폐렴의 예방을 위한) 중년층 백신접종에 있어서, 15가 조성물을 형성하기 위해 상술된 11가 항원 조성물에 대한 혈청타입 8 및 12F(및 가장 바람직하게는 15 및 22)를 포함하는 것이 유리한 반면, 갓난 아기 또는 유아(이염 중막이 더욱 관련됨)에 대해, 혈청타입 6A 및 19A는 13가 조성물을 형성시키는데 유리하게는 포함된다.

<82> 상기 사카라이드가 유리하게는 이의 전체 길이, 네가티브 다당류 형태로 존재하지만, 필수적으로 단백질 캐리어에 커플링되는 경우 면역원성인(예를 들어 EP 497524 및 497525 참조) 크기-감소된 다당류가 또한 사용될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

<83> 나이든 (+55 세) 집단에서 폐렴 및 갓난 아기(18개월 이하) 및 유아(통상적으로 18개월 내지 5세)에서 이염 중막의 예방/경감을 위해, 본 발명의 바람직한 구체예는 상술된 단백질의 군으로부터 바람직하게 선택된 스트렙토코쿠스 폐렴 단백질과 본원에 기술된 다가 스트렙토코쿠스 폐렴 사카라이드를 조합한다. 폐렴구균 단백질의 조합은 또한 하기에 기술되는 바와 같이 유리하게 사용될 수 있다.

<84> *폐렴구균 단백질*

<85> 스트렙토코쿠스 폐렴 항원은 바람직하게는 폴리히스티딘 3원소 패밀리(Pht)로부터의 단백질, Lyt 패밀리로부터의 단백질, 콜린 결합 단백질, LPXTG 모티프를 갖는 단백질(X는 임의의 아미노산임), LXXC의 타입 II 시그날 서열 모티프를 갖는 단백질(X는 임의의 아미노산임), 및 타입 I 시그날 서열 모티프를 갖는 단백질로 구성된 군으로부터 선택된다. 이들 부류(또는 모티프)내의 바람직한 예로는 하기 단백질(또는 이의 절단체 또는 면역학적 기능적 균등물)이 있다:

<86> Pht(폴리 히스티딘 3원소) 패밀리는 단백질 PhtA, PhtB, PhtD, 및 PhtE를 포함한다. 패밀리는 지질화 서열인 가능한한 금속 또는 뉴클레오시드 결합 또는 효소적 활성, (3-5) 코일화된-코일 영역, 보존된 N-말단 및 이종기원 C 말단을 수반하는 프롤린-부유 영역 및 수개의 히스티딘 3원소에 의해 분리된 두개의 도메인에 의해 특징된다. 이는 시험된 폐렴구균의 모든 균주에 존재한다. 동종 단백질은 또한 다른 스트렙토코키(*Streptococci*) 및 네이세리아(*Neisseria*)에서 발견되었다. 패밀리의 바람직한 일원은 PhtA, PhtB 및 PhtD를 포함한다. 더욱 바람직하게는, PhtA 또는 PhtD를 포함한다. 그러나, 용어 Pht A, B, D 및 E는 하기 인용문에 기술된 서열을 갖는 단백질 및 참고된 단백질에 대해 적어도 90% 일치하는 서열 상동관계를 갖는 자연발생(및 사람에 의해 제조된)

이의 변형체를 언급하는 것으로 이해된다. 바람직하게는 적어도 95% 일치하고, 가장 바람직하게는 97% 일치한다.

<87> Pht 단백질과 관련하여, PhtA는 WO 98/18930에 기술되어 있고, 또한 Sp36으로 언급된다. 상술된 바와 같이, 이는 폴리히스티딘 3원소 패밀리로부터의 단백질이며, LXXC의 타입 II 시그날 모티프를 갖는다.

<88> PhtD는 WO 00/37105에 기술되어 있고, 또한 Sp036D로 언급된다. 상술된 바와 같이, 이는 폴리히스티딘 3원소 패밀리로부터의 단백질이며, 타입 II LXXC 시그날 모티프를 갖는다. PhtB는 WO 00/37105에 기술되어 있고, 또한 Sp036B로 언급된다. PhtB 패밀리의 다른 일원은 WO 00/17370에 기술된 C3-퇴화 폴리펩티드이다. 이러한 단백질은 또한 폴리히스티딘 3원소 패밀리로부터 얻어지며, 타입 II LXXC 시그날 모티프를 갖는다. 바람직한 면역학적 기능적 균등물은 WO 98/18930에 기술된 단백질이다. PhtB 절단물(대략 79 kD)은 PhtX 패밀리의 일원으로 고려되는 WO 99/15675에 기술된 것이다.

<89> PhtE는 WO 00/30299에 기술되어 있고 BVH-3으로서 언급된다.

<90> SpsA는 WO 98/39450에 기술된 콜린 결합 단백질(Cbp)이다.

<91> Lyt 패밀리는 세포 용해와 관련된 막관련 단백질이다. N-말단 도메인은 콜린 결합 도메인(들)을 포함하지만, Lyt 패밀리는 하기에 기술된 콜린 결합 단백질 패밀리(Cbp) 패밀리에서 발견된 모든 특징을 갖지 않으며, 이에 따라 본 발명에서 Lyt 패밀리는 Cbp 패밀리와 다른 것으로 고려된다. Cbp 패밀리와는 대조적으로, C-말단 도메인은 Lyt 단백질 패밀리의 촉매적 도메인을 함유한다. 패밀리는 LytA, B 및 C를 포함한다. Lyt 패밀리와 관련하여, LytA는 문헌[Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624(1987)]에 기술되었다. LytB는 WO 98/18930에 기술되어 있고, Sp46으로 언급된다. LytC는 또한 WO 98/18930에 기술되어 있고 Sp91로 언급된다. 이러한 패밀리 중 바람직한 일원은 LytC이다.

<92> 다른 바람직한 구체예는 Lyt 패밀리(특히 LytA) 절단물이며, 여기서, "Lyt"는 상기에서 규정된 바와 같으며, "절단물"은 50% 이상의 콜린 결합 영역이 부족한 단백질을 언급한다. 바람직하게는 이러한 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 부족하다.

<93> Sp125는 LPXTG(여기서, X는 임의의 아미노산임)의 세포벽 고정 모티프를 갖는 폐렴구균 표면 단백질의 예이다. 이러한 부류의 이러한 모티프를 갖는 폐렴구균 표면 단백질내의 임의의 단백질은 본 발명의 문맥내에서 유용한 것으로 발혀졌으며, 이에 따라 본 발명의 추가 단백질로 고려된다. Sp125 자체는 WO 98/18930에 기술되어 있고 ZmpB, 즉 아연 금속성 단백질 분해효소로서 공지되어 있다.

<94> Sp101은 WO 98/06734에 기술되어 있으며, 여기서 참고문헌 번호 # y85993를 갖는다. 이는 타입 I 시그날 서열로 특징된다.

<95> Sp133은 WO 98/06734에 기술되어 있으며, 여기서 참고문헌 번호 # y85992를 갖는다. 이는 타입 I 시그날 서열로 특징된다.

<96> Sp128 및 Sp130은 WO 00/76540에 기술되어 있다.

<97> 본 발명에서 사용되는 단백질은 바람직하게는 군 Pht, PhtA 및 PhtE, 또는 이들 단백질 중 2개 또는 3개 모두의 조합(즉, PhtA+D, A+E, D+E 또는 A+D+E)으로부터 선택된다.

<98> 포함될 수 있는 추가 폐렴구균 단백질 항원은 하기 항원으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상이 있다: 페몰리신(또는 Ply로 언급됨; 바람직하게는 화학적 처리 또는 돌연변이에 의해 독제거된)[WO 96/05859, WO 90/06951, WO 99/03884], PsaA 및 이의 막통과 삭제 변형체(Berry & Paton. Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62], PspA 및 이의 막통과 삭제 변형체(US5804193, WO 92/14488, WO 99/53940), PspC 및 이의 막통과 삭제 변형체(WO 97/09994, WO 99/53940), 콜린 결합 단백질(Cpb) 패밀리의 일원[예를 들어, CbpA 및 이의 막통과 삭제 변형체(WO 97/41151; WO 99/51266)], 글리세르알데히드-3-포스페이트-데히드로게나제(Infect. Immun. 1996 64:3544), HSP70(WO 96/40928), PcpA(Sanchez-Beato et al. FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14), M 유사 단백질(SB 특허출원번호 EP 0837130), 및 아드헤신 18627(SB 특허출원번호 EP 0834568). 본 발명은 또한 면역학적으로 기능적 균등물 또는 이러한 단백질의 절단물(상기에서 규정된 바와 같음)을 포함한다.

<99> 콜린 결합 단백질 패밀리와 관련하여, 이러한 패밀리의 일원은 콜린-친화력 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는 폐렴구균 단백질과 본래 동일하다. 모든 콜린-결합 단백질은 세포벽 테이코산 및 막-관련 리포테이코산의 포스포릴콜린 부분에 비공유적으로 결합된다. 구조적으로, 이는 전체 패밀리에 걸쳐 통상적으로 수개의 영역을

갖지만, 단백질의 정확한 특성(아미노산 서열, 길이 등)은 다양할 수 있다. 일반적으로, 콜린 결합 단백질은 N 말단 영역(N), 보존된 반복 영역(R1 및/또는 R2), 프롤린 부유 영역(P) 및 다중 반복으로 이루어진 단백질의 대략 절반을 포함하는 보존된 콜린 결합 영역(C)을 포함한다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "콜린 결합 단백질 패밀리(Cbp)"는 WO 97/41151에서 동정된 콜린 결합 단백질, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, 및 CpbG로 구성된 군으로부터 선택된다. CbpA는 WO 97/41151에 기술되어 있다. CbpD 및 CbpG는 WO 00/29434에 기술되어 있다. PspC는 WO 97/09994에 기술되어 있다. PbcA는 WO 98/21337에 기술되어 있다. 바람직하게는 콜린 결합 단백질은 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 구성된 군으로부터 선택된다.

<100> Cbp가 사용된 추가 단백질인 경우, 이는 Cbp 절단물일 수 있고, 여기서, "Cbp"는 상기에서 규정된 바와 같으며, "절단물"은 50% 이상의 콜린 결합 영역(C)이 결여된 단백질을 언급한다. 바람직하게는 이러한 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 결여된다. 더욱 바람직하게는, 이러한 단백질 절단물은 (i) 콜린 결합 영역 및 (ii) 단백질의 N-말단 절반의 부분이 결여되며, 이는 하나 이상의 반복 영역(R1 또는 R2)를 유지한다. 더욱 바람직하게는, 절단물은 2개 반복 영역(R1 및 R2)를 갖는다. 이러한 바람직한 구체예의 예로는 WO 99/51266 또는 WO 99/51188에 기술된 바와 같이 NR1×R2, R1×R2, NR1×R2P 및 R1×R2P가 있으나, 유사한 콜린 결합 영역이 결여된 다른 콜린 결합 단백질은 본 발명의 범위내로 고려된다.

<101> Cbp 절단물-Lyt 절단물 키메라 단백질(또는 융합물)은 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 바람직하게는 이는 Cbp의 NR1×R2(또는 R1×R2 또는 NR1×R2P 또는 R1×R2P) 및 Lyt(예를 들어, LytCC말단 또는 Sp91C말단)의 C-말단 부분(C말단, 즉 콜린 결합 도메인이 결여됨)를 포함한다. 더욱 바람직하게는 Cbp는 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 구성된 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 이는 CbpA이다. 바람직하게는 Lyt는 LytC(또는 Sp91로 언급됨)이다.

<102> 콜린 결합 도메인(C)가 결여되고 Lyt와 융합 단백질로서 표시되는 PspA 또는 PsaA 또한 사용될 수 있다. 바람직하게는, Lyt는 LytC이다.

<103> 폐렴구균 조성물에서, 본 발명의 상이한 폐렴구균 단백질을 조합할 수 있다.

<104> 바람직하게는, 본 발명의 단백질의 조합은 2개 이상(3개 또는 4개)의 상이한 부류, 예를 들어 LXXC의 타입 II 시그날 서열 모티프를 갖는 단백질(여기서, X는 임의의 아미노산이며, 예를 들어 폴리히스티딘 3원소 패밀리(Pht)), 콜린 결합 단백질(Cbp), 타입 I 시그날 서열 모티프를 갖는 단백질(예를 들어, Sp101), LPXTG 모티프를 갖는 단백질(여기서, X는 임의의 아미노산임, 예를 들어 Sp128, Sp130), 톡신(예를 들어, Ply) 등으로부터 선택된다. 이들 부류(또는 모티프)내의 바람직한 예로는 상기 언급된 단백질, 또는 이의 면역학적으로 기능적 균등물이 있다. 톡신+Pht, 톡신+Cbp, Pht+Cbp, 및 톡신+Pht+Cbp는 바람직한 부류 조합물이다.

<105> 바람직한 유익한 조합물은 PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91 C말단 키메라 또는 융합 단백질, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91C말단 키메라 또는 융합 단백질, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, CbpA 또는 PspC로부터의 NR1xR2 (또는 R1xR2)가 있다. 더욱 바람직하게는 CbpA로부터의 것이다.

<106> 특히 바람직한 폐렴구균 단백질의 조합물은 임의적으로 NR1xR2(또는 R1xR2 또는 NR1xR2P 또는 R1xR2P)를 지닌 Ply(또는 이의 절단물 또는 면역학적으로 기능적 균등물)+PhtD(또는 이의 절단물 또는 면역학적으로 기능적 균등물)를 포함한다. 바람직하게는 CbpA 또는 PspC로부터의 NR1xR2(또는 R1xR2 또는 NR1xR2P 또는 R1xR2P)가 있다. 더욱 바람직하게는 CbpA로부터의 것이다.

<107> 항원은 적어도 4개 혈청타입, 바람직하게는 적어도 7개 혈청타입, 더욱 바람직하게는 적어도 11개 혈청타입으로부터 유도된 다당류 항원, 및 하나 이상, 그러나 바람직하게는 2, 3 또는 4개의 바람직하게는 상술된 단백질의 군으로부터 선택된 스트렙토코쿠스 폐렴 단백질을 포함하는 폐렴구균 사카라이드 콘쥬게이트일 수 있다. 바람직하게는 단백질 중 하나는 PhtD(또는 이의 면역학적으로 기능적 균등물) 및/또는 Ply(또는 이의 면역학적으로 기능적 균등물)이다.

<108> 백신접종에 대한 다당류 방법과 관련된 문제점은 다당류가 불량한 면역원이라는 사실이다. 이를 극복하기 위하여, 사카라이드는 단백질 캐리어에 콘쥬게이트될 수 있으며, 이는 방관자 T-세포 헬퍼를 제공한다. 그러므로, 본 발명에서 사용된 사카라이드는 이러한 단백질 캐리어에 연결되는 것이 바람직하다. 사카라이드 면역원의 생산을 위해 현재 통상적으로 사용되는 이러한 캐리어의 예로는 디프테리아 및 테타누스 톡소이드(DT, DT CRM197

및 TT 각각), 케이홀 림페트 해모시아닌(KLH), N. 메닌기티디스(N. meningitidis)로부터의 OMPC 및 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)를 포함한다.

<109> 폐렴구균 사카라이드 계열 면역원성 조성물(또는 백신)을 위한 바람직한 캐리어는 해모필루스 인플루엔자(EP 594610-B)로부터의 단백질 D, 또는 이의 단편이다. 사용하기에 적절한 단편로 T-헬퍼 에피토프를 포함하는 단편을 포함한다. 특히, 단백질 D 단편은 바람직하게는 단백질의 N-말단 1/3을 함유할 것이다. 단백질 D 캐리어는 다발성 폐렴구균 사카라이드 항원이 콘쥬게이트된 조성물에서 캐리어로서 유용하다. 조합물 중 하나 이상의 폐렴구균 사카라이드는 유리하게는 단백질 D 상에 콘쥬게이트될 수 있다.

<110> 폐렴구균 사카라이드에 대한 추가 바람직한 캐리어로는 (섹션 "본 발명의 폐렴구균 단백질에 기술된 바와 같이) 폐렴구균 단백질이 있다.

<111> 사카라이드는 임의의 방법에 의해 캐리어 단백질에 연결될 수 있다(예를 들어, 미국특허 4,372,945(Likhite) 및 미국특허 4,474,757(Armor et a1.)). 바람직하게는 CDAP 콘쥬게이션이 수행된다(WO 95/08348).

<112> 바람직하게는, 콘쥬게이트의 단백질:사카라이드(중량:중량) 비율은 0.3:1 내지 1:1, 보다 바람직하게는 0.6:1 내지 0.8:1, 및 가장 바람직하게는 약 0.7:1이다.

<113> 본 발명의 특히 바람직한 조성물은 하나 이상의 콘쥬게이트된 폐렴구균 사카라이드, 및 본 발명의 하나 이상의 폐렴구균 단백질을 포함한다. 또한, 폐렴구균 사카라이드 및 단백질은 액체 형태로 알루미늄 포스페이트 상에 흡착된 벌크 성분으로서 안정적으로 저장될 수 있다.

<114> 다른 항원은 HIV-1(예를 들어, gag 또는 이의 단편, 예를 들어 p24, tat, nef, gp120 또는 gp160 또는 이들 중 임의의 단편), 사람 헤르페스 바이러스, 예를 들어 gD 또는 이의 유도체, 또는 초기 단백질, 예를 들어 HSV1 또는 HSV2로부터의 ICP27, 시토메갈로바이러스((esp 사람)(예를 들어 gB 또는 이의 유도체), 로타바이러스(약독화된 바이러스 포함), 에프스테인 Barr 바이러스(예를 들어 gp350 또는 이의 유도체), 바리셀라 조스터 바이러스(예를 들어, gpl, II 및 IE63)로부터, 또는 간염 바이러스, 예를 들어 B형 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 표면 항원 또는 이의 유도체), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스로부터, 도는 다른 바이러스 병원체, 예를 들어 파라믹소바이러스: 호흡기 세포융합 바이러스(예를 들어, F, N, M 및 G 단백질 또는 이의 유도체), 파라인플루엔자 바이러스, 메아슬레스 바이러스, 멈프스 바이러스, 사람 파필로마 바이러스(예를 들어 HPV6, 11, 16, 18), 플라비바이러스(예를 들어, 황색열 바이러스, 뎅구 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스) 또는 인플루엔자 바이러스(전체 살아있거나 비활성화된 바이러스, 난황 또는 MDCK 세포에서 성장된 스플리트 인플루엔자 바이러스, 또는 전체 flu 비로솜(R.Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920에 기술됨) 또는 이의 조합물)로부터, 또는 박테리아 병원체, 예를 들어 네이세리아 spp, N. 고노르헤아(N. gonorrhea) 및 N. 메닌기티디스(예를 들어 캡슐형 사카라이드 및 이의 콘쥬게이트, 트랜스페린-결합 단백질, 락토페린 결합 단백질, PilC, 아드헤신); S. 피오젠(예를 들어, M 단백질 또는 이의 단편, C5A 프로테아제, 리포테이코산), S. 아갈락티아에, S.무탄스; H. 듀크레이; M 카타르할리스를 포함하고 브란하멜라 카타르할리스로서 공지된 모락셀라 spp(예를 들어, 고분자량 및 저분자량 아드헤신 및 인바신); B. 페르투시스를 포함한 보르데텔라 spp(예를 들어 페르탁틴, 페르투시스 톡신 또는 이의 유도체, 섬사상 헤마글루티닌, 아데닐레이트 시클라제, 핌브리아에), B. 파라페르투시스 및 B. 브론키셉티카; M. 투베르쿨로시스를 포함한 미코박테리아 spp.(예를 들어, ESAT6, 항원 85A, -B 또는 -C), M. 보비스, M. 레프라에, M. 아비움, M. 파라투베르쿨로시스, M. 스메그마티스; L. 폐모필라를 포함한 레기오넬라 종; 엔테로톡신 E. 콜라이를 포함한 에스케리치아 종(예를 들어 콜로니화 인자, 열-변성 톡신 또는 이의 유도체, 열안정성 톡신 또는 이의 유도체), 장출혈성 E. 콜라이, 방병원성 E. 콜라이(예를 들어 시가 톡신-유사 톡신 또는 이의 유도체); V. 콜레라를 포함하는 피비리오 종(예를 들어 콜레라 톡신 또는 이의 유도체); S. 손네이, S. 디센테리아에, S. 플렉스네리를 포함하는 시겔라 종(*Shigella spp*); Y. 엔테로콜리티가(예를 들어 Yop 단백질), Y. 페스티스, Y. 슈도투베르쿨로시스를 포함하는 예르시니아 종; C. 제주니(예를 들어 ,톡신, 아드헤신 및 인바신) 및 C. 콜라이를 포함하는 캄필로박테르 종; S. 티파이, ㄴ. 파라티파이, S. 콜레라에수이스, S. 엔테리티디스를 포함하는 살모넬라 종; L. 모노시토겐을 포함하는 리스테리아 종; H. 피롤리(예를 들어, 우레아제, 카탈라제, 바쿠올화 톡신)을 포함하는 헬리코박터 종; P. 아에루기노사를 포함하는 슈도모나스 종; S. 아우레우스, S. 에피데르미디스를 포함하는 스타필로코쿠스 종; E. 파에칼리스, E, 파에시움을 포함하는 엔테로코쿠스 종; C. 테타니(예를 들어 테타누스 톡신 및 이의 유도체), C. 보툴리늄(예를 들어 보튤리늄 톡신 및 이의 유도체), C. 디피실레(예를 들어, 클로스트리디움 톡신 A 또는 B 및 이의 유도체)를 포함하는 클로스트리디움 종;; B. 안트라시스(예를 들어 보튤리움 톡신 및 이의 유도체)를 포함하는 바실러스 종; C. 디프테리아에(예를 들어 디프테리아 톡신 및 이의 유도체)를 포함하는 코리네

박테리아 종; B. 부르그도르페리(예를 들어 OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 가리니(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 아프젤리(예를 들어 OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 안데르소니(예를 들어 OspA, OspC, DbpA, DbpV), B. 헤름시를 포함하는 보렐리아 종; E. 에쿠이 및 사람 과립구 에를리치오시스의 제제를 포함하는 에를리치아 종; R. 리카트시를 포함하는 리케트시아 종; C. 트라코마티스(예를 들어 MOMP, 헤파린-결합 단백질), C. 폐렴(예를 들어, MOMP, 헤파린-결합 단백질), C. 프시타키를 포함하는 크라미디아 종; L. 인테로간스를 포함하는 레프토스피라 종; T. 팔리듐(예를 들어, 드문 외부 막 단백질), T. 덴티콜라, T. 히오디센테리아에를 포함하는 트레포네마 종으로부터 유도되거나; 또는 기생충, 예를 들어 P. 팔시파룸을 포함하는 플라스모디움 종; T. 곤디(예를 들어 SAG2, SAG3, Tg34)를 포함하는 톡소플라스마 종; E. 히스토리티가를 포함하는 엔타모에바 종; B. 미크로티를 포함하는 바베시아 종; T. 크루지를 포함하는 트리파노소마 종; G. 람블리아를 포함하는 기아르디아 종; L. 메이저를 포함하는 레쉬마니아 종; P. 카리니를 포함하는 폐모시스티스 종; T. 바기날리스를 포함하는 트리코모나스 종; S. 만소니를 포함하는 스키소스토마 종으로부터 유도되거나; 효모, 예를 들어 C. 알비칸스를 포함하는 칸디다 종; C. 네오포르만스를 포함하는 크립토코쿠스 종으로부터 유도된다.

<115> M. 튜베르쿨로시스에 대한 다른 바람직한 특정 항원은 예를 들어 Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 및 hTCC1(WO 99/51748)이다. M. 튜베르쿨로시스에 대한 단백질은 또한 융합 단백질 및 이의 변형체를 포함하며, 여기서 두개 이상, 바람직하게는 세개의 M. 튜베르쿨로시스의 폴리펩티드가 보다 큰 단백질에 융합된다. 바람직한 융합물은 Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI(WO 99/51748)를 포함한다.

<116> 클라미디아에 대한 가장 바람직한 항원은 예를 들어 고분자량 단백질(HWMP)(WO 99/17741), ORF3(EP 366 412), 및 추정 막 단백질(Pmps)를 포함한다. 본 조성물의 달느 크라미디아는 WO 99/28475에 기술된 군으로부터 선택될 수 있다.

<117> 바람직한 박테리아 조성물은 해모필루스 종, 예를 들어 H. 인플루엔자 타입 B(예를 들어 PRP 및 이의 콘쥬게이트), 비 타입형 H. 인플루엔자, 예를 들어 OMP26, 고분자량 어드헤신, P5, P6, 단백질 D 및 지질단백질 D, 및 핌브린 및 핌브린 유래 펩티드(US 5,843,464) 또는 다발성 카피 변형체 또는 이의 융합 단백질로부터 유도된 항원을 포함한다.

<118> B형 간염 표면 항원의 유도체는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 유럽특허출원 EP-A-414 374; EP-A-0304 578 및 EP 198-474에 기술된 PreS1, PreS2 S 항원을 포함한다. 바람직한 일 양태에서 본 발명의 백신 제형은 특히 CHO 세포에서 발현될 때 HIV-1 항원, gp120를 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 본원에서 규정된 gD2t를 포함한다.

<119> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 조성물은 생식기 사마귀의 원인으로 여겨지는 사람 파필로마 바이러스(HPV)(HPV 6 또는 HPV 11 등), 및 자궁경부암의 원인인 HPV 바이러스(HPV 16, HPV 18 등)로부터 유도된 항원을 함유한다.

<120> 구체적으로, 바람직한 형태의 생식시 사마귀 예방 또는 치료학적 조성물은 L1 입자 또는 카프소머, 및 HPV 단백질 E1, E2, E5, E6, E7, L1, 및 L2로부터 선택된 하나 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

<121> 가장 바람직한 형태의 융합 단백질은 WO 96/26277에 기술된 L2E7, 및 GB 9717953.5(PCT/EP98/05285)에 기술된 단백질D(1/3)-E7이다.

<122> 바람직한 HPV 자궁경부 감염증 또는 암, 예방 또는 치료학적 조성물은 HPV 16 또는 18 항원을 포함할 수 있다. 예를 들어, L1 또는 L2 항원 단량체, 또는 L1 또는 L2 항원은 바일서ㅡ 유사 입자(VLP)로서 함께 존재하거나, L1 단독 단백질은 단독으로 VLP 또는 카프소머 구조에 존재한다. 이러한 항원, 바이러스 유사 입자 및 카프소머는 공지된 것이다[WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792, 및 WO 93/02184].

<123> 부가적인 초기 단백질은 단독 또는 융합 단백질, 예를들어 E7, E2 또는 바람직하게는 E5로서 포함될 수 있으며: 특히 바람직한 구체예로는 L1E7 융합 단백질을 포함하는 VLP를 포함한다(WO 96/11272).

<124> 특히, 바람직한 HPV 16 항원은 단백질 D 캐리어와 융합하여 조기 단백질 E6 또는 E7을 포함하여 HPV 16으로부터 단백질 D-E6 또는 E7, 또는 이의 조합물, 또는 E6 또는 E7과 L2의 조합물을 형성한다(WO 96/26277).

<125> 대안적으로는 HPV 16 또는 18 초기 단백질 E6 및 E7은 단일 분자, 바람직하게는 단백질 D-E6/E7 융합물에 존재할 수 있다. 이러한 조성물은 임의적으로 HPV 18로부터의 E6 및 E7 모두를, 바람직하게는 단백질 D-E6 또는 단백질 D-E7 융합 단백질 또는 단백질 D E6/E7 융합 단백질의 형태로 함유될 수 있다.

<126> 본 발명의 조성물은 부가적으로 다른 HPV 균주로부터, 바람직하게는 균주 HPV 31 또는 33로부터의 항원을 포함한다.

<127> 본 발명의 조성물은 말라리아를 야기시키는 기생충으로부터 유래된 항원을 추가로 포함한다. 예를 들어, 플라스모디아 팔시파룸(*Plasmodia falciparum*)으로부터의 바람직한 항원은 환상포자소체 단백질(CS 단백질), TRS,S MSP1, MSP3, LSA1, LSA3, AMA1 및 TRAP를 포함한다. RTS는 B형 간염항원의 preS2 부분의 4개의 아미노산을 통해 B형 간염 바이러스의 표면(S) 항원에 연결된 P.팔시파룸의 환상포자소체 (CS) 단백질의 모든 C-말단 부분을 실질적으로 포함하는 혼성 단백질이다. 이의 전체 구조는 국제특허출원번호 PCT/EP92/02591(영국특허출원번호 9124390.7을 우선권으로 한 번호 WO 93/10152로 공개됨)에 기술되어 있다. 효모에서 발현될 때, RTS는 지질단백질 입자로서 생산되며, HBV로부터 S 항원과 함께 동시에 발현될 때, RTS,S로서 공지된 혼합된 입자를 생산한다. TRAP 항원은 국제특허출원번호 PCT/GB89/00895(WO 90/01496으로 공개됨)에 기술되어 있다. 본 발명의 바람직한 구체예는 말라리아 백신으로서, 여기서 항원 제조물은 RTS,S 및 TRAP 항원의 조합물을 포함한다. 후보물질이 다단계 말라리아 백신의 성분인 다른 말라리아 원충 항원은 P. 팔시파룸 MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 세쿠에스트린, PfEMP1, Pf332, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 및 말라리아 원충 종의 유사체이다. 본 발명의 일 양태는 RTS, S 또는 CS 단백질 또는 RTS, S의 CS 부분과 같은 이의 단편을 MSP1, MSP3, AMA1, LSA1 또는 LSA3로 구성된 군으로부터 선택될 수 있는 하나 이상의 다른 말라리아 항원과 조합하여 포함하는 조성물이다.

<128> 조성물은 또한 항종양 항원을 포함할 수 있으며, 암의 면역치료학적 치료에 대해 유용하다. 예를 들어, 항원은 종양 거부 항원, 예를 들어 전립선, 가슴, 결장, 폐, 췌장, 신장, 또는 흑색종 암에 대한 거부 항원일 수 있다. 대표적인 항원은 MAGE 1, 3 및 MAGE 4 또는 WO99/40188에 기술된 다른 MAGE 항원, PRAME, BAGE, Lage(또한 NY Eos 1으로 공지됨) SAGE 및 HAGE(WO 99/53061) 또는 GAGE(Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pps 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (1997 승인); Correale et al. (1997), Journal of the National Cancer Institude 89, p293)을 포함한다. 게다가 이들 항원은 광범위한 종양 타입, 예를 들어, 흑색종, 폐 종양, 육종 및 방광 종양으로 발현된다.

<129> 본원에서 사용되는 MAGE 항원은 발현 개선제 또는 면역학적 융합 파트너와 함께 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 특히, Mage 단백질은 해모필루스 인플루엔자 B로부터의 단백질 D 또는 지질화된 이의 유도체에 융합될 수 있다. 특히, 융합 파트너는 단백질 D의 제 1 1/3을 포함할 수 있다. 이러한 구조는 WO 99/40188에 기술되어 있다.

<130> 다른 종양-특이적 항원은 KSA(GA733) 종양-특이적 갱글리오사이드, 예를 들어 GM2, 및 GM3 또는 캐리어 단백질에 대한 이의 콘쥬게이트를 포함하나 이에 제한되지 않거나; 상기 항원은 수많은 암, 또는 면역삭제화의 치료에 유용한 자체 펩티드 호르몬, 예를 들어 전체 길이 고나도트로핀 호르몬 방출 호르몬(GnRH, WO 95/20600), 짧은 10 아미노산 길이 펩티드 일 수 있다.

<131> 바람직한 구체예에서, 전입선 특이적 항원(PSA), PAP, PSCA(PNAS 95(4) 1735-1740 1998), PSMA 또는 프로스타제로서 공지도니 항원과 같은 전립선 항원이 사용된다.

<132> 프로스타제는 잠재적인 분비 기능을 지시하는, 보존된 프로테아제 촉매 삼원소 H-D-S 및 아미노-말단 사전-프로펩티드 서열을 지닌 254 아미노산-길이의 프로테아제-특이적 세린 프로테아제(트립신-유사)다[P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P.Moss, R. Gelinas, L. Hood & K. Wand. "Molecular cloning and characterisation of prostase and androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression, In Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1999) 96, 3114-3119]. 추정 글리코실화 사이트는 기술되어 있다. 예상된 구조물은 다른 공지된 세린 프로테아제와 매우 유사하며, 성숙한 폴리펩티드가 단일 도메인에 폴딩되는 것으로 나타난다. 성숙한 단백질은 자연적으로 가공되는 것으로 보이는 하나의 A2 에피토프를 지닌 224 아미노산-길이를 갖는다.

<133> 프로테아제 뉴클레오티드 서열 및 유래된 폴리펩티드 서열 및 동족체는 문헌[Ferguson, et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119] 및 국제특허출원번호 WO 98/12302(및 등록된 대응특허 US 5,955,306), WO 98/20117(및 등록된 대응특허 US 5,840,871 및 US 5,786,148)(전립선-특이적 칼리크레인) 및 WO 00/04149(P703P)에 기술되어 있다.

<134> 본 발명은 프로스타제 단백질을 기초로 한 프로스타제 단백질 융합물, 및 이의 단편 및 동족체("유도체")를 포함하는 조성물을 제공한다. 이러한 유도체는 전립선 종양의 치료에 적합한 치료학적 백신 제형에 사용하기에

적절하다. 통상적으로, 단편은 상기 참고된 특허 및 특허출원에 기술된 바와 같이, 적어도 20, 바람직하게는 50, 더욱 바람직하게는 100개 연속 아미노산을 함유할 것이다.

<135> 추가의 바람직한 전립선 항원은 P501S, WO 98/37814의 서열번호 113으로서 공지된다. 적어도 20, 바람직하게는 50, 더욱 바람직하게는 100개 연속 아미노산을 포함하는 면역원성 단편 및 이의 부분은 상기 참고된 특허출원에 기술되어 있다(PS108; WO 98/50567 참조).

<136> 다른 전립선 특이적 항원은 WO 98/37418, 및 WO /004149로부터 공지되어 있다. 다른 것은 STEAP PNAS 96 14523 14528 7-12 1999이다.

<137> 본 발명의 문맥에서 유용한 다른 종양 관련 항원은 Plu-1(J Biol. Chem 274(22) 15633-15645, 1999), HASA-1, HASH-2, 트립토(Salomon et al Bioessays 199, 21 61 -70, 미국특허 5654140) 크립틴(미국특허 5 981 215)를 포함한다. 부가적으로 암의 치료와 특히 관련된 항원은 또한 티로시나제 및 수르비빈을 포함한다.

<138> 무친 유래 펩티드, 예를 들어 Muc1(US 5744,144 US 5827,666 WO 8805054, US 4,963,484). Muc 1 펩티드의 하나 이상의 반복 단위, 바람직하게는 두개 이상의 이러한 반복을 포함하는 Muc 1 유래 펩티드가 상세하게는 구려되며, 이는 SM3 항체에 의해 인식된다(US 6 054 438). 다른 무친 유래 펩티드는 Muc 5로부터의 펩티드를 포함한다.

<139> 본 발명의 항원은 유방암 항원, 예를 들어 her 2/ Neu, 맘마글로빈(미국특허 5668267) 또는 WO/00 52165, WO 99/33869, WO 99/19479, WO 98/45328에 기술된 것일 수 있다. Her 2 neu 항원은 미국특허 5,801,005호에 기술되어 있다. 바람직하게는, Her 2 neu는 전체 세포외 도메인(대략 아미노산 1-645를 포함) 또는 이의 단편 및 면역학적 부분 또는 대략 C 말단 580 아미노산의 전체 세포외 도메인을 포함한다. 특히, 세포내 부분은 포스포릴화 도메인 또는 이의 단편을 포함한다. 이러한 구조는 WO 00/44899에 기술되어 있다. 특히 바람직한 구조는 ECD PD로서 공지되어 있으며, 두번째로 ECD PD로서 공지되어 있다(WO 00/44899). 본원에서 사용된 her 2 neu는 래트, 마우스 또는 사람으로부터 유래될 수 있다.

<140> 조성물은 종양-지지 메카니즘(예를 들어, 신생혈관 작용, 종양 침투)과 관련된 항원, 예를 들어 tie 2, VEGF를 함유할 수 있다.

<141> 본 발명의 조성물은 보렐리아 종으로부터 유래된 항원을 사용할 수 있는 것으로 예상된다. 예를 들어, 항원은 핵산, 병원체 유래 항원 또는 항원 제조물, 재조합으로 생산된 단백질 또는 펩티드, 및 키메라 융합 단백질을 포함할 수 있다. 특히 항원은 OspA이다. OspA는 (Lipo-OspA)로 불리우는 숙주 세포(E.Coli)의 지질하된 형태 효력 또는 비지질화된 유도체에서 전체 성숙 단백질일 수 있다. 이러한 비지질화된 유도체는 비지질화된 NS1-OspA 융합 단백질로서, 이는 인플루엔자 바이러스의 비-구조 단백질(NS1)의 제 1 81 N-말단 아미노산이며, 완전한 OspA 단백질, 및 다른 MDP-OspA는 3개의 추가적인 N-말단 아미노산을 수반하는 OspA의 비지질화된 형태이다.

<142> 본 발명의 조성물은 알레르기의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 이러한 백신은 알레르겐 특이적(예를 들어 Der p1) 및 알레르겐 비특이적 항원(예를 들어, 스탠워스(stanworth) 데카펩티드(EP 0 477 231 B1)을 포함하나 이에 한정되지 않는 사람 IgE로부터 유래된 펩티드를 포함한다.

<143> 본 발명의 조성물은 또한 알레르기, 암 또는 감염성 질환 이외에 만성 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 이러한 만성 질환은 죽상동맥경화 및 알츠하이머와 같은 질환이다.

<144> 본 발명의 조성물은 특히 질환, 예를 들어 만성 질병 또는 암의 면역치료학적 치료, 및 지속성 감염증의 치료르 위해 적절하다. 따라서, 본 발명의 조성물은 감염성 질환, 예를 들어 결핵(TB), AIDS 및 B형 간염(HepB) 바이러스 감염증의 면역치료법을 위해 적절하다.

<145> 또한, AIDS의 문맥에서, AIDS에 걸리기 쉽거나 고통당하는 개인을 치료하는 방법을 제공한다. 방법은 개인에 본 발명의 백신을 투여함을 포함하고, 이에 따라 이후 HIV 감염증에 의해 야기되는 CD4+ T-세포 퇴화의 양을 감소시키거나, 이미 HIV로 감염된 개인에 CD4+ T-세포 퇴화를 저감시키거나 정지시킨다.

<146> 다른 항원은 상술된 폐모코칼 항원 이외에 박테리아(바람직하게는 캡슐형) 사카라이드를 포함한다. 다당류 항원은 알루미늄 포스페이트 상에 흡수된 액체 벌크에 통상적으로 저장되고, 그러므로 임시적으로 본 발명의 오일 에멀젼과 상기 액체 벌크를 혼합하므로써 본 발명의 백신 조성물을 형성시키기 수월하다. 바람직하게는, 다른 박테리아 사카라이드는 하기로 구성된 군으로부터 선택된다: N. 메닌기티디스 혈청군 A 캡슐형 사카라이드(MenA), N. 메닌기티디스 혈청군 C 캡슐형 사카라이드(MenC), N. 메닌기티디스 혈청군 Y 캡슐형 사카라이드(MenY), N. 메닌기티디스 혈청군 W-135 캡슐형 사카라이드(MenW), 군 B 스트렙토코쿠스 군 I 캡슐형

사카라이드, 군 B 스트렙토코쿠스 군 II 캡슐 사카라이드, 군 B 스트렙토코쿠스 군 III 캡슐 사카라이드, 군 B 스트렙토코쿠스 군 IV 캡슐 사카라이드, 군 B 스트렙토코쿠스 군 V 캡슐 사카라이드, 스타필로코쿠스 아우레우스 타입 5 캡슐 사카라이드, 스타필로코쿠스 아우레우스 타입 8 캡슐 사카라이드, 살모넬라 티피로부터의 Vi 사카라이드, N. 메닌기티디스 LPS, M. 카타르할리스 LPS, 및 H. 인플루엔자 LPS. LPS는 본래 지질-다당류(또는 지질-올리고사카라이드), 또는 지질 A 부분이 다수의 공지된 방법 중 임의에 의해 독제거된 지질-다당류(예를 들어, WO 97/18837 또는 WO 98/22923), 또는 상기 LPS로부터 유래된 O-다당류를 포함하는 임의의 분자를 의미한다. N. 메닌기티디스 LPS는 12개의 공지된 면역타입(L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11 또는 L12) 중 하나 이상을 의미한다.

<147> 특히 바람직한 조합물은 1) 콘쥬게이트된 Hib, 콘쥬게이트된 MenA 및 콘쥬게이트된 MenC; 2) 콘쥬게이트된 Hib, 콘쥬게이트된 MenY 및 컨쥬게이트된 MenC; 3) 콘쥬게이트된 Hib, 및 컨쥬게이트된 MenC; 4) 컨쥬게이트된 MenA, 콘쥬게이트된 MenC, 콘쥬게이트된 MenY 및 컨쥬게이트된 MenW-135를 포함하는 조성물이다. 상기 콘쥬게이트 각각에 PS의 양은 0.5 ml 사람 용량 당 각각 5 또는 10 mg일 수 있다. 바람직하게는 Hib, MenA, MenC, MenW-135 및 MenY는 TT 콘쥬게이트이다.

<148> 백신접종을 위한 다당류 방법과 관련된 문제는 다당류가 빈약한 면역원이라는 사실이다. 이를 극복하기 위하여, 본 발며으이 사카라이드는 단백질 캐리어에 콘쥬게이트될 수 있으며, 이는 방관자 T-세포 헬프를 제공한다. 그러므로, 본 발명에서 사용된 사카라이드는 이러한 단백질 캐리어에 연결되는 것이 바람직하다. 사카라이드 면역원의 생산을 위해 통상적으로 사용되는 이러한 캐리어의 예로는 디프테리아 및 테타누스 톡소이드(DT, DT CRM197 및 TT 각각), 케이홀 림페트 해모시아닌(KLH), 해모필루스 인플루엔자 단백질 D(EP 594610-B), N. 메닌기티디스로부터의 OMPC, 및 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)를 포함한다.

<149> 사카라이드는 임의의 공지된 방법에 의해 캐리어 단백질에 연결될 수 있다(예를 들어, Likhite, 미국특허 4,372,945 및 Armor et al. 미국특허 4,474,757). 바람직하게는, CDAP 콘쥬게이션이 수행된다(WO 95/08348).

<150> 바람직하게는 콘쥬게이트의 단백질:사카라이드(중량:중량) 비율은 0.3:1 내지 1:1, 더욱 바람직하게는 0.6:1 내지 0.8:1, 및 가장 바람직하게는 약 0.7:1이다.

<151> 폐모코쿠스 및 상이한 병원체에 대한 방어를 제공하는 항원의 조합물은 본 발명에 포함된다. 수많은 소아과 백신은 현재 아이들이 수용하는 주사의 수를 감소시키기 위해 조합 백신으로서 제공된다. 따라서, 소아과 백신에 대해 다른 병원체로부터의 다른 항원은 본 발명의 폐모코칼 백신과 함께 제형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 백신은 디프테리아 톡소이드(DT), 테타누스 톡소이드(TT), 및 백일해 성분[통상적으로 선택적 패르탁틴(PRN) 및/또는 글루티닌 1+2을 지닌 독소 제거된 백일해 톡소이드(PT) 및 필라멘트 헤마글루티닌(FHA)], 예를 들어 DT, TT, PT, FHA 및 PRN 항원을 함유하는 판매된 백신 INFANRIX-DTPa™(SmithKlineBeecham Biologicals), 또는 Tritanrix™로서 스미스클라인비참 바이올로지칼스 에스.에이.에서 판매되는 전체 세포 백일해 성분을 포함하는 널리 공지된 '3가' 조합 백신과 제형될 수 있다(또는 별도로 또는 동시에 투여될 수 있다). 조합된 백신은 또한 다른 항원, 예를 들어 B형 간염 표면 항원(HBsAg), 폴리오 바이러스 항원(예를 들어 비활성화된 3가 폴리오 바이러스-IPV), 모락셀라 카타르할리스 외부막 단백질, 비-타입형 해모필루스 인플루엔자 단백질, N. 메닌기티디스 B 외부 막 단백질을 포함할 수 있다.

<152> 조합 백신(특히 이염 중막의 예방을 위한)에 포함될 수 있는 바람직한 모락셀라 카타르할리스 단백질의 예는 OMP 106[WO 97/41731(Antex) 및 WO 96/34960(PMC)]; OMP21; LbpA 및/또는 LbpB[WO 98/55606(PMC)]; TbpA 및/또는 TbpB[WO 97/13785 및 WO 97/32980(PMC)]; CopB[Helminen ME, et al.(1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 및/또는 UspA2[WO 93/03761(University of Texas)]; OmpCD; HasR(PCT/EP99/03824); PilQ(PCT/EP99/03823); OMP85(PCT/EP00/01468); lipo06(GB 9917977.2); lipo10(GB 9918208.1); lipo11(GB 9918302.2); lipo18(GB 9918038.2); P6(PCT/EP99/03038); D15(PCT/EP99/03822); OmplA1(PCT/EP99/06781); Hly3(PCT/EP99/03257); 및 OmpE이다. 조합 백신(특히 이염 중막의 예방을 위한)에 포함될 수 있는 비타입형 해모필루스 인플루엔자 항원의 예는 핌브린 단백질[(US 5766608-Ohio State Research Foundation)] 및 이로부터의 펩티드를 포함하는 융합물[LB1(f) 펩티드 융합물; US 5843464(OSU) 또는 WO 99/64067]; OMP26[WO 97/01638(Cortecs)]; P6[EP 281673(State University of New York)]; TbpA 및/도는 TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15(WO 94/12641); 단백질 D(EP 594610); P2; 및 P5(WO 94/26304)를 포함한다.

<153> 다른 고려되는 조합물은 인플루엔자(독소 약화된, 스플리트, 또는 서브유닛[예를 들어, 표면 글리코단백질 뉴라미니다제(NA) 및 헤마글루티닌(HA), "Chaloupka I. et al, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996,

15:121-127], RSV(예를 들어, F 및 G 항원 및/또는 F/G 융합물, "Schmidt A. C. et al, J Virol, May 2001, p4594-4603), PIV3 (예를 들어, HN 및 F 단백질, "Schmidt et al, 문헌"), 바리셀라(예를 들어, 독소 약화된 글리코단백질 I-V 등), 및 MMR(메아슬레스, 멈프스, 루벨라)의 임의의 (또는 모든) 성분으로부터의 바이러스 항원과 함께 조합하여 본 발명의 폐모코칼 사카라이드& 단백질이다.

<154> 이염 중막의 포괄적인 치료 또는 예방을 위한 본 발명의 의해 고려되는 바람직한 소아과 조합 백신은 하나 이상의 스트렙토코쿠스 폐렴 사카라이드 항원(들)(바람직하게는 단백질 D에 콘쥬게이트됨), 하나 이상의 폐모코칼 단백질(바람직하게는 상술된 것), 및 모락셀라 카타르할리스로부터의 하나 이상의 표면-노출된 항원 및/또는 비타입형 해모필루스 인플루엔자를 포함한다. 단백질 D는 유리하게는 폐모코칼 사카라이드(상기 언급됨)에 대한 단백질 캐리어로서 사용될 수 있으며, 이는 비타입형 H. 인플루엔자(ntHi)에 대해 B-세포 매개돈 방어를 생산할 수 있는 면역원이기 때문이다. 모락셀라 카타르할리스 또는 비타입형 매로필루스 인플루엔자 항원은 서브-유닛 형태로 백신에 포함될 수 있거나, 박테리아로부터 제조된 외부 막 소포(수포)의 표면 상에 존재하는 항원으로서 첨가될 수 있다.

<155> **바람직한 항원**

<156> 상술된 바와 같이, 일 양태에서 본 발명은 감염증 및/또는 질환의 예방을 위한 면역원성 조성물의 제조에서,

<157> (a) 항원, 및

<158> (d) 수중유 에멀젼 애주번트; 및

<159> (e) 3D MPL을 포함하고,

<160> 상기 수중유 에멀젼은 대사가능한 오일, 스테롤 및 에멀젼화제를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

<161> 따라서 본 발명의 조성물은 이러한 조성물에 의해 예방되거나 경감될 수 있는 감염증 및/또는 질환에 대해 사용되며, 적절하게는 항원은 질환과 관련된 병원체(예를 들어 박테리아 또는 바이러스)로부터 유도되거나 관련된다.

<162> 인플루엔자 바이러스 A 및 B, HPV 항원, RSV A 및 B, SARS, 스트렙토코쿠스 VZV, 리노바이러스, 파라인플루엔자 바이러스로부터의 항원, 예를 들어 스트렙토코쿠스 폐렴으로부터의 스플리트 인플루엔자, VZV gE, VZV IE63, 및 PhtD는 본 발명에서 사용하기에 바람직하다. 그러나, 임의의 적절한 항원이 사용될 수 있다.

<163> 일 구체예에서, 본 발명에서 사용되는 조성물은 MF59™ 애주번트를 지닌 인플루엔자 서브유닛 항원을 포함하지 않는다.

<164> 본 발명의 모든 양태에 대해, 항원은 CD4 T 세포 에피토프, 또는 B 세포 에피토프 또는 적합하게는 둘모두를 포함하는 것이 바람직하다.

<165> **인플루엔자 바이러스 균주 및 항원**

<166> 본 발명에 따라 사용하기 위한 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제는 스플릿 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플릿 바이러스 항원성 제제일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 제제는 또 다른 유형의 불활성화된 인플루엔자 항원, 예컨대 불활성화된 전 바이러스 또는 정제된 HA 및 NA(서브유닛 백신), 또는 인플루엔자 비로좀(virosome)을 함유할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 약독화된 생인플루엔자 제제일 수 있다.

<167> 본 발명에 따른 스플릿 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플릿 바이러스 항원성 제제는 적합하게는 바이러스 입자가 지질 외피를 용해시키는 세정제 또는 다른 시제로 붕괴되는 불활성화된 바이러스 제제이다. 스플릿 바이러스 또는 이의 스플릿 바이러스 항원성 제제는 적합하게는 감염성이거나 불활성화된 전 인플루엔자 바이러스를 용해화 농도의 유기 용매 또는 세정제로 단편화시키고, 이어서 상기 용해제 전부 또는 대부분 및 바이러스 지질 물질의 일부 또는 대부분을 제거함으로써 제조된다. 이의 스플릿 바이러스 항원성 제제는 스플릿 바이러스와 비교하여 어느 정도 정제가 진행된 것이나 스플릿 바이러스 성분의 항원성 특성을 대부분 보유할 수 있는 스플릿 바이러스 제제를 의미한다. 예를 들어, 난황에서 생성되는 경우, 스플릿 바이러스는 난황 함유 단백질로부터 소모되거나, 세포 배양물에서 생성될 경우, 스플릿 바이러스는 숙주 세포 오염균으로부터 소모될 수 있다. 스플릿 바이러스 항원성 제제는 하나 초과의 바이러스 균주의 스플릿 바이러스 항원성 성분을 포함할 수 있다. 스플릿 바이러스를 함유하는 백신(소위 '인플루엔자 스플릿 백신') 또는 스플릿 바이러스 항원성 제제는 일반적으로 잔류하는 기질 단백질 및 핵단백질, 및 때때로 지질, 뿐만 아니라 막외피 단백질을 함유한다. 이러한 스

플릿 바이러스 백신은 반드시 전 바이러스에서 발생하는 것과 동일한 비율은 아니지만 일반적으로 바이러스 구조 단백질을 대부분 또는 전부 함유할 것이다.

<168> 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 제제는 정제된 서브-유닛 인플루엔자 백신의 형태로 존재할 수 있다. 서브-유닛 인플루엔자 백신은 일반적으로 두개의 주요 외피 단백질인 HA 및 NA를 함유하며, 특히 어린 백신접종자에게서 일반적으로 반응생성성이 덜하기 때문에 전 비리온 백신에 비해 추가의 이점을 가질 수 있다. 서브-유닛 백신은 붕괴된 바이러스 입자로부터 정제되거나 재조합에 의해 생성될 수 있다.

<169> 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 제제는 비로좀의 형태로 존재한다. 비로좀은 비로좀의 인지질 이층막에 끼워져 있는 진짜 형태의 기능적 바이러스 외피 당단백질 HA 및 NA를 함유하는 구형의 단일층간 소포체이다.

<170> 상기 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제는 난황 유도되거나 조직 배양 유도될 수 있다.

<171> 예를 들어, 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 제제는, 난황에서 인플루엔자 바이러스를 배양하고, 수집한 요막강액을 정제함으로써 통상적인 발육란 방법으로부터 유도될 수 있다. 난황은 금새 대다수로 축적될 수 있다. 다르게는, 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 제제는 바이러스를 성장시키거나 재조합 인플루엔자 바이러스 표면 항원을 발현시키는 조직 배양을 사용하는 임의의 새로운 생성 방법으로부터 유도될 수 있다. 바이러스를 성장시키기 위한 적합한 세포 기질은 개의 신장 세포, 예컨대, MDCK 또는 MDCK의 클론으로부터의 세포, MDCK 유사 세포, 원숭이 신장 세포, 예컨대 베로(Vero) 세포를 포함하는 AGMK 세포, 적합한 돼지 세포주, 또는 백신 용도에 맞는 인플루엔자 바이러스의 제조에 적합한 임의의 그 밖의 포유동물 세포 타입을 포함한다. 또한, 적합한 세포 기질은 사람 세포, 예컨대 MRC-5 세포를 포함한다. 적합한 세포 기질은 예를 들어, 영장류 세포, 예컨대 계배아 섬유모세포 및 조류 세포주가 또한 포함되나, 이러한 세포주로 제한되는 것은 아니다.

<172> 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 제제는 예를 들어 본원에 참고문헌으로 인용되는 특허 제 DD 300 833호 및 제 DD 211 444호에 기술된 스플릿 flu 방법과 같은 임의의 다수의 통상적으로 적용할 수 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 전통적으로 스플릿 flu는 용매/세정제 처리, 예컨대 트리-n-부틸 포스페이트 또는 트윈(Tween)™과 함께 디에틸에테르("트윈-에테르" 스플릿팅으로서 공지되어 있음)를 사용하여 생성되었으며, 이 방법은 일부 제조 설비에서 여전히 사용되고 있다. 현재 사용되는 다른 스플릿팅제로는 세정제 또는 단백질분해효소 또는 담즙 염, 예를 들어 본원에 참고문헌으로 인용되는 특허 번호 DD 155 875에 기술된 바와 같은 나트륨 데옥시콜레이트가 포함된다. 스플릿팅제로서 사용될 수 있는 세정제는 양이온성 세정제, 예를 들어, 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB), 그 밖의 이온성 세정제, 예를 들어, 라우릴설페이트, 타우로데옥시콜레이트, 또는 비이온성 세정제, 에컨대 트리톤(Triton) X-100(예를 들어, Lina et al, 2000, Biologicals 28, 95-103) 및 트리톤 N-101, 또는 임의의 두개 이상의 세정제의 조합을 포함하는 상기 기술된 것들이 포함된다.

<173> 스플릿 백신을 제조하는 방법은 다수의 상이한 여과 및/또는 다른 분리 단계, 예컨대, 다양한 조합의 초원심분리, 한외여과, 띠 원심분리 및 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환) 단계, 및 임의로 스플릿팅 전 또는 후에 수행될 수 있는, 예를 들어 열, 포름알데히드 또는 β-프로피올락톤 또는 U.V.에 의한 불활성화 단계를 포함할 수 있다. 스플릿팅 방법은 배치식, 연속식 또는 반연속식 공정으로서 수행될 수 있다. 스플릿 면역원성 조성물을 위한 바람직한 스플리팅 및 정제 방법이 WO 02/097072에 기술되어 있다.

<174> 본 발명에 따른 바람직한 스플릿 flu 백신 항원 제제는 제조 공정으로부터 잔류하는 잔류량의 트윈 80 및/또는 트리톤 X-100를 포함하는 데, 이들은 스플릿 항원의 제조 후에 첨가되거나 농도가 조절될 수 있다. 바람직하게는 트윈 80 및 트리톤 X-100 둘 모두가 존재한다. 백신중 이들 비이온성 계면활성제의 최종 농도에 대한 바람직한 범위는 하기와 같다:

<175> 트윈 80: 0.01 내지 1%, 보다 바람직하게는 약 0.1%(v/v)

<176> 트리톤 X-100: 0.001 내지 0.1(% w/v), 보다 바람직하게는 0.005 내지 0.02%(w/v).

<177> 특정 구체예에서, 트윈 80에 대한 최종 농도는 0.045% 내지 0.09% w/v이다. 또 다른 특정 구체예에서, 항원은 2배 농축된 혼합물로부터 제공되는 데, 이 혼합물은 트윈 80 농도가 0.045%-0.2%(w/v) 범위이고, 애주번트 첨가되는(또는 대조군 제형에서 완충제) 최종 제형시 두배 희석되어야 한다.

<178> 또 다른 특정 구체예에서, 트리톤 X-100에 대한 최종 농도는 0.005%-0.017% w/v이다. 또 다른 특정 구체예에서, 항원은 2배 농축된 혼합물로부터 제공되는 데, 이 혼합물은 트리톤 X-100 농도가 0.005%-

0.034%(w/v) 범위이고, 애주번트 첨가된(또는 대조군 제형에서 완충제) 최종 제형시 두배 희석되어야 한다.

<179> 바람직하게는, 인플루엔자 제제는 낮은 수준의 티오머살(thiomersal)의 존재 하에서, 또는 바람직하게는 티오머살의 부재 하에서 제조된다. 바람직하게는, 형성되는 인플루엔자 제제는 유기수은 방부제의 부재 하에서 안정하며, 특히 잔류하는 티오모살을 전혀 함유하지 않는다. 특히, 인플루엔자 바이러스 제제는 티오머살의 부재하에서, 또는 저수준의 티오머살(일반적으로 5㎍/ml 이하)에서 안정화된 헤마글루티닌 항원을 포함한다. 특이적으로, B 인플루엔자 균주의 안정화는 알파 토코페롤의 유도체, 예컨대 알파 토코페롤 석시네이트(또한, 비타민 E 석시네이트, 즉, VES로서 공지되어 있음)에 의해 달성된다. 이러한 제제 및 이의 제조 방법이 WO 02/097072에 개시되어 있다.

<180> 바람직한 조성물은 적합한 인플루엔자 시즌의 WHO 권장된 균주로부터 제조된 3개의 불활성화된 스플릿 비리온 항원을 함유한다.

<181> 바람직하게는, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 수중유 에멀젼 애주번트가 동일 용기에 함유된다. 이를 '원 바이알법(one vial approach)'이라 한다. 바람직하게는, 바이알은 프리-필드(pre-filled) 주사기이다. 대안적 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 수중유 에멀젼 애주번트는 개별 용기 또는 바이알에 함유되어 피검체에 투여되기 직전 또는 투여시에 혼합된다. 이를 "투 바이알법(two vial approach)"이라 한다. 예를 들어, 백신이 총 투여 용량 0.7ml에 대해 2 성분 백신인 경우, 농축 항원(예를 들어, 농축된 3가 불활성화된 스플릿 비리온 항원)이 한 바이알(335㎕)(항원 용기)에 제공되고, 프리-필드 주사기는 애주번트(360㎕)(애주번트 용기)를 함유한다. 주입시, 농축된 3가 불활성화된 스플릿 비리온 항원을 함유하는 바이알의 내용물은 애주번트를 함유하는 주사기를 사용한 후 주사기를 부드럽게 혼합함으로써 바이알로부터 분리된다. 주입전에, 사용되는 주사기는 근내 주사기로 대체되고, 용량은 530㎕로 보정된다. 재구성된 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 후보물질의 1회 용량은 530㎕에 상응한다.

<182> 본 발명의 바람직한 조성물은 CD4 T 세포 에피토프 및 임의적으로 B 세포 에피토프를 갖는 항원을 포함한다.

<183> **HPV 항원**

<184> 본 발명의 다른 양태에서, 조성물은 사람 파필로마 바이러스(HPV), 예를 들어 생식기 사마귀의 원인이 되는 것으로 여겨지는 바이러스(HPV 6 또는 HPV 11 등), 또는 자궁경부암의 원인이 되는 HPV 바이러스(HPV 16, HPV 18 등)으로부터 유래된 항원을 함유한다. 일 양태에서, 예방학적 또는 치료학적 조성물은 HPV 16 또는 18 항원을 포함한다. HPV 및 HPV 18에 의한 감염증은 암의 발달과 관련이 있다.

<185> 상이한 HPV 유전형으로부터의 항원의 조합물, 예를 들어 적절하게는 VLP 형태의 HPV 및 HPV 18 항원의 조합물이 본 발명에서 사용될 수 있다. 16 및/또는 18이 포함될 수 있는 부가적인 VLP 타입으로부터의 항원은 다른 공지된 암-발생 타입으로부터의 항원, 예를 들어 HPV 31, 45, 33, 58 및 52를 포함한다.

<186> 일 양태에서, HPV 항원은 L1 또는 L2 항원 단량체이다. 일 양태에서 본 발명은 카프소머 또는 바이러스 유사 입자(VLP)로서 함께 존재하는 동일한 유전형으로부터 HPV L1 및 L2 항원의 조합물과 관련된다. 일 양태에서 HPV 항원은 VLP 형태 또는 카프소머 구조의 L1 단백질이다(L2 항원은 부재임). 이러한 항원, 바이러스 유사 입자 및 카프소머는 공지되어 있다[참조, WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792, 및 WO 93/02184].

<187> 일 양태에서, 예를 들어 WO 96/11272에 기술된 절단된 L1 단백질은 본 발명에서 사용될 수 있다. 바람직하게는 L1의 C-말단 절단, 예를 들어 HPV의 34 아미노산 C-말단 절단 또는 다른 HPV 타입으로부터의 균등한 절단물이 사용된다.

<188> 본 발명의 일 양태에서, 조성물은 HPV 31 및/또는 HPV 45와 함께 HPV 16 및 HPV 18로부터의 HPV 바이러스 유사 입자 또는 카프소머의 조합물을 포함한다. 본 발명의 일 양태에서, 조성물은 HPV 33 및/또는 HPV 58과 함께 HPV 16 및 HPV 18로부터의 HPV 바이러스 유사 입자 또는 카프소머의 조합물을 포함한다. 본 발명의 일 양태에서, 조성물은 하나 이상의 암을 야기시키는 HPV 타입, 예를 들어 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 또는 모든 HPV 31, 33, 45, 52 및 58로부터의 VLP 또는 카프소머와 함께 HPV 16 및 HPV 18로부터의 HPV 바이러스 유사 입자 또는 카프소머의 조합물을 포함한다.

<189> 따라서 본 발명은 일 양태에서 3D MPL 및 본원에 기술된 수중유 에멀젼을 포함하는 애주번트와 조합하여 HPV 16, 18, 31 및 45로부터의 바이러스 유사 입자를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

<190> 본 발명의 일 양태에서, 조성물은 HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52, 및 58 L1 바이러스 유사 입자 또는 카프소머의

혼합물을 포함한다. L1 또는 L2 단백질은 융합 단백질의 형태로 제공될 수 있다.

<191> 특히 적절한 생식기 사마귀 예방학적, 또는 치료학적 조성물의 형태는 L1 입자 또는 카프소머, 및 HPV 6 및 HPV 11 단백질, 예를 들어 E6, E7, L1 및 L2로부터 선택된 하나 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

<192> 암 타입으로부터의 HPV 항원은 HPV 6 및/또는 11을 지닌 생식기 사마귀 타입으로부터의 항원, 예를 들어 HPV 16 및/또는 HPV 18과 조합될 수 있다. 예를 들어, HPV 16, 18, 6 및 11을 포함하는 조성물이 고려된다. 본 발명의 일 양태에서, 조성물은 HPV 33 및/또는 HPV 58과 함께 HPV 16 및 HPV 18로부터의 HPV 바이러스 유사 입자 또는 카프소머의 조합물을 포함한다. 본 발명의 일 양태에서 HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52, 및 58 L1 바이러스 유사 입자 또는 카프소머의 조합물은 HPV 6 및/또는 HPV 11로부터의 바이러스 유사 입자 또는 카프소머와 조합하여 사용될 수 있다.

<193> 일 양태에서 초기 단백질, 예를 들어 E7, E2 또는 E5는 단독으로, 조합으로, 또는 융합 단백질로 존재할 수 있으며; 이러한 구체예는 L1E7 융합 단백질을 포함하는 VLP를 포함한다(WO 96/11272).

<194> 일 양태에서, 융합 단백질은 WO 96/26277에 기술된 L2E7, 또는 GB 9717953.5(PCT/EP98/05285)에 기술된 단백질 D(1/3)-E7이다.

<195> 일 양태에서, HPV 16 항원은 단백질 D 케리어와 융합한 조기 단백질 E6 또는 E7을 포함하여 HPV 16 로부터 단백질 D-E6 또는 E7 융합물, 또는 이의 조합물, 또는 L2와 E6 또는 E7의 조합물(WO 96/26277)을 형성한다.

<196> 대안적으로는, HPV 16 또는 18 초기 단백질 E6 및 E7, 예를 들어 단백질 D-E6/E7 융합물은 단일 분자에 존재할 수 있다. 이러한 조성물은 HPV 18로부터의 E6 및 E7 단백질 각각 또는 둘모두를 단백질 D-E6 또는 단백질 D-E7 융합 단백질 또는 단백질 D E6/E7 융합 단백질을 임의적으로 함유할 수 있다.

<197> **수중유 애주번트 성분**

<198> 본 발명의 애주번트 조성물은 수중유 에멀젼 애주번트를 함유하고, 바람직하게는 상기 에멀젼은 총 용적의 0.5% 내지 20%의 양으로, 그리고 적어도 70세기%의 직경이 1㎛ 미만인 오일 점적을 지닌, 대사가능한 오일을 포함한다.

<199> 임의의 수중유 조성물을 사람 투여에 적합하게 되도록 하기 위해, 에멀젼 시스템의 오일상은 대사가능한 오일을 포함해야 한다. 용어 '대사가능한 오일'의 의미는 당해 널리 공지되어 있다. '대사가능한'은 '대사작용에 의해 변형될 수 있는" 것으로서 정의될 수 있다[참조: Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition (1974)]. 상기 오일은 수혜자에게 비독성이고, 대사에 의해 변형될 수 있는, 임의의 식물성유, 어유, 동물성유 또는 합성유일 수 있다. 견과, 종자 및 곡물은 식물성유의 통상적인 공급원이다. 합성유 또한 본 발명의 일부이며, 통상적인 입수할 수 있는 오일, 예컨대 NEOBEE® 등을 포함할 수 있다. 특히 적합한 대사가능한 오일은 스쿠알렌이다. 스쿠알렌(2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥산)은 상어간유에서 대량으로, 그리고 올리브유, 밀배아유, 쌀겨오일, 및 이스트에서 소량으로 발견되는 불포화 오일이며, 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 오일이다. 스쿠알렌은 콜레스테롤 생합성에서 중간체라는 사실에 비추어 대사가능한 오일이다[참조: Merck index, 10th Edition, entry no.8619].

<200> 수중유 에멀젼은 그 자체로 당해 널리 공지되어 있으며, 애주번트 조성물로서 유용한 것으로 제안되었다(EP 399843; WO 95/17210).

<201> 적합하게는, 대사가능한 오일은 면역원성 조성물의 총 용적의 0.5% 내지 20%(최종 농도)의 양으로, 바람직하게는 총 용적의 1.0% 내지 10%의 양으로, 바람직하게는 총 용적의 2.0% 내지 6.0%의 양으로 존재한다.

<202> 특정 구체예에서, 대사가능한 오일은 면역원성 조성물의 총 용적의 약 0.5%, 1%, 3.5% 또는 5%의 최종량으로 존재한다. 또 다른 특정 구체예에서, 대사가능한 오일은 면역원성 조성물의 총 용적의 약 0.5%, 1%, 3.57% 또는 5%의 최종량으로 존재한다.

<203> 바람직하게는, 본 발명의 수중유 에멀젼 시스템은 작은 오일 점적 크기가 마이크론 미만 범위이다. 적합하게는, 점적 크기는 직경이 120 내지 750nm, 보다 바람직하게는 120 내지 600nm일 것이다. 매우 바람직하게는, 수중유 에멀젼은 70세기% 이상의 직경이 500nm 미만이고, 보다 바람직하게는 80세기% 이상의 직경이 300nm 미만이고, 보다 바람직하게는 90세기% 이상의 직경이 120 내지 200nm 범위로 존재하는 오일 점적을 함유한다.

<204> 본 발명에 따른 오일 점적 크기, 즉, 직경은 세기에 의해 주어진다. 세기에 의해 오일 점적 크기의 직경을 측정하는 방법은 여러가지가 있다. 세기는 사이징 기구를 사용함으로써, 적합하게는 동적 광산란법, 예컨대, 맬번 제타사이저(Malvern Zetasizer) 4000 또는 바람직하게는 맬번 제타사이저 3000HS에 의해 측정된다. 자세한 절차는 실시예 II.2에 제시되어 있다. 첫번째 가능한 방법은 동적 광산란법(PCD-광양자상관분광법)에 의해 z 평균 직경 ZAD를 측정하는 것이며, 이 방법은 추가로 다분산성 지수(PDI)를 제공하며, ZAD 및 PDI 둘 모두 누적 평가 알고리즘(cumulants algorithm)으로 계산된다. 이들 값은 입자 굴절 지수를 알 필요가 없다. 두번째 수단은 또 다른 알고리즘인 콘틴(Contin) 또는 NNLS, 또는 자동 "맬번" 알고리즘(사이징 기기에 의해 제공된 디폴트(default) 알고리즘)에 의해 전입자 크기 분포를 측정함으로써 오일 점적의 직경을 계산하는 것이다. 대개의 경우, 복합 조성물의 입자 굴절 지수는 알려져 있기 않기 때문에, 세기 분포만이 고려되며, 필요에 따라 이러한 분포로부터 기원하는 세기 평균이 고려된다.

<205> 수중유 에멀젼은 스테롤을 포함한다. 스테롤은 당해 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 콜레스테롤이 널리 공지되어 있고, 이는 문헌(Merck Index, 11th Edn., page 341)에 동물성 지방에서 발견되는 천연 스테롤로서 기술되어 있다. 다른 적합한 스테롤에는 β-시토스테롤, 스티그마스테롤, 에르고스테롤, 알파-토코페롤 및 에르고칼시페롤이 포함된다. 상기 스테롤은 적합하게는 면역원성 조성물의 총 용적의 0.01% 내지 20%(w/v)의 양으로, 바람직하게는 0.1% 내지 5%(w/v)의 양으로 존재한다. 바람직하게는, 스테롤이 콜레스테롤인 경우, 면역원성 조성물의 총 용적의 0.02% 내지 0.2%(w/v)의 양으로, 보다 바람직하게는 0.5ml 백신 투여 용적의 0.02%(w/v), 또는 0.5ml 백신 투여 용적의 0.07%(w/v) 또는 0.7ml 백신 투여 용적의 0.1%(w/v)의 양으로 존재한다.

<206> 적합하게는, 스테롤은 알파-토코페롤 또는 이의 유도체, 예컨대 알파-토코페롤 석시네이트이다. 바람직하게는, 알파-토코페롤은 면역원성 조성물의 총 용적의 0.2% 내지 5.0%(v/v), 보다 바람직하게는 0.5ml 백신 투여 용적의 2.5%(v/v), 또는 0.5ml 백신 투여 용적의 0.5%(v/v), 바람직하게는 0.7ml 백신 투여 용적의 1.7-1.9%(v/v), 바람직하게는 1.8%(v/v)의 양으로 존재한다. 분명히 하자면, v/v로 주어진 농도는 하기 전환 인자를 적용시킴으로써 w/v의 농도로 전환될 수 있다: 5%(v/v) 알파-토코페롤 농도는 4.8%(w/v) 알파-토코페롤 농도와 등가이다.

<207> 수중유 에멀젼은 추가로 에멀젼화제를 포함할 수 있다. 에멀젼화제는 면역원성 조성물의 0.01 내지 5.0중량%(w/w)의 양으로 존재할 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 2.0중량%(w/w)의 양으로 존재할 수 있다. 바람직한 농도는 총 조성물의 0.5 내지 1.5중량%(w/w)이다.

<208> 에멀젼화제는 적합하게는 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레에이트(트윈 80)일 수 있다. 특정 구체예에서, 0.5ml 백신 투여 용적은 1%(w/w) 트윈 80을 함유하고, 0.7ml 백신 투여 용적은 0.7%(w/w) 트윈 80을 함유한다. 다른 특정 구체예에서, 트윈 80의 농도는 0.2%(w/w)이다.

<209> 수중유 에멀젼 애주번트는 다른 애주번트 또는 면역자극제와 함께 이용될 수 있으며, 이에 따라 본 발명의 중요한 구체예는 스쿠알렌 또는 다른 대사가능한 오일, 알파 토코페롤, 및 트윈 80을 포함하는 수중유 제형이다. 수중유 에멀젼은 또한 스판(span) 85 및/또는 렉시틴을 함유할 수 있다. 일반적으로, 수중유는 면역원성 조성물의 총 용적의 2 내지 10%의 스쿠알렌, 2 내지 10%의 알파 토코페롤 및 0.3 내지 3%의 트윈 80을 포함할 것이며, WO 95/17210에 기술된 절차에 따라 제조될 수 있다. 바람직하게는 알파 토코페롤에 대한 스쿠알렌의 비는 1 이하이며, 이로써 보다 안정한 에멀젼을 제공한다. 스판 85(폴리옥시에틸렌 소르비탄 트리올레에이트) 또한 예를 들어, 1%의 수준으로 존재할 수 있다.

<210> **3D-MPL**

<211> 조성물은 부가적이 애주번트, 3 데-O-아크릴화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)이다. 3D MPL은 TRL-4 리간드 애주번트, 지질 A의 비-독성 유도체이다.

<212> 3D-MPL은 코릭사 코포레이션(Corixa corporation)에 의해 상표 MPL® (본원에서 MPL)로 시판되고 있으며, 주로 IFN-γ(Th1) 표현형과의 CD4+ T 세포 반응을 촉진한다. 3D-MPL은 GB 2 220 211 A에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다. 화학적으로는, 3D-MPL은 3-데아실화 모노포스포릴 지질 A와 3, 4, 5 또는 6 아실화 사슬의 혼합물이다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물에서는 소입자 3D-MPL이 사용된다. 소입자 3D-MPL은 0.22㎛ 필터를 통해 살균 여과될 수 있도록 하는 입자 크기를 갖는다. 이러한 제제는 WO 94/21292 및 실시예 II에 기술된다.

<213> 3D-MPL은 예를 들어, 조성물 투여량 당 1 내지 100μg(w/v), 바람직하게는 조성물 투여량 당 10 내지 50μg(w/v)의 양으로 사용될 수 있다. 3D-MPL의 적합한 양은 예를 들어, 조성물 투여량 당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,

34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50 μg(w/v) 중 어느 하나이다. 보다 바람직하게는, 3D-MPL의 양은 조성물 투여량 당 25 내지 75μg(w/v)의 범위이다. 보통, 조성물 투여량은 약 0.5 ml 내지 약 1 ml의 범위일 것이다. 일반적인 백신 투여량은 0.5 ml, 0.6 ml, 0.7 ml, 0.8 ml, 0.9 ml 또는 1 ml이다. 바람직한 구체예에서, 3D-MPL의 50㎍의 최종 농도가 백신 조성물 ml 당 함유되거나, 0.5ml 백신 투여량 당 25㎍이 함유된다. 다른 바람직한 구체예에서, 3D-MPL의 35.7㎍ 또는 71.4㎍의 최종 농도가 백신 조성물 ml 당 함유된다. 특히, 0.5ml 백신 투여 용적은 투여량 당 25㎍ 또는 50㎍의 3D-MPL을 함유한다.

<214> MPL의 투여량은 적합하게는 사람의 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. 특히, 적합한 MPL 양은 애주번트 비첨가 조성물과 비교하거나, 다른 MPL 양으로 애주번트 첨가된 조성물과 비교하여 반응생성력 프로파일로부터 입수될 수 있으면서 조성물의 면역학적 효능을 개선시키는 양이다.

<215> 3D MPL은 TRL-4 리간드, 지질 A의 비독성 유도체이다. 본 발명은 3D-MPL 대신에 리포폴리사카라이드(LPS) 및 유도체, MDP(무라밀 디펩티드), 및 RSV의 F 단백질을 포함하는 다른 적절한 TLR-4의 사용을 고려한다. 지질 A의 비독성 유도체, 특히 모노포스포릴 지질 A 또한 고려된다.

<216> 지질 A의 합성 유도체는 공지되어 있으며, 일부는 TLR-4로서 기술되어 있으며, 하기를 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.

<217> **OM174** (2-데옥시-6-o-[2-데옥시-2-[(R)-3-도데카노일옥시테트라-데카노일아미노]-4-o-포스포노-β-D-글루코피라노실]-2-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]-α-D-글루코피라노실디히드로겐포스페이트), (WO 95/14026)

<218> **OM 294** DP (3S, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9(R)-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올,1,10-비스(디히드로게노포스페이트)(WO 99/64301 및 WO 00/0462)

<219> **OM 197** MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올,1-디히드로게노포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트)(WO 01/46127)

<220> **본 발명의 제 1 백신접종을 위해 사용되는 면역원성 조성물의 면역원성 성질**

<221> 본 발명의 조성물은 애주번트 비첨가된, 즉 임의의 외인성 애주번트(본원에서 또한 '플레인 조성물'로서 언급됨)를 함유하지 않거나 애주번트 조성물의 두가지 성분 중 하나(3D-MPL 또는 수중유 에멀젼 애주번트)가 적어도 결여된 상응하는 조성물로 수득된 CD4 T 세포 면역 반응과 비교하여 적어도 하나의 성분 항원(들) 또는 항원 조성물에 대한 개선된 CD4 T 세포 면역 반응을 유도한다.

<222> "개선된 CD4 T 세포 면역 반응"은 애주번트가 존재하지 않거나 애주번트 조성물의 두가지 성분 중 하나가 결여된 동일한 조성물의 투여 후 얻어진 것 보다 높은 CD4 반응이 애주번트 첨가된 면역원성 조성물의 투여 후 사람 환자에서 얻어짐을 의미한다. 예를 들어, 보다 높은 CD4 T 세포 반응은 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물을 포함하는 면역원성 조성물의 투여 후 유도된 반응과 비교하여, 본원에 규정된 수중유 에멀젼 애주번트와 함께 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물을 포함하는 면역원성 조성물의 투여시에 사람 환자에게서 얻어진다. 이러한 제형은 유리하게는 MHC 부류 II 분자로 표시되는 인플루엔자 에피토프를 검출할 수 있는 항-인플루엔자 CD4 T 세포 반응을 유도하는데 사용될 것이다.

<223> 인플루엔자에 대해, 바람직하게는 본 발명의 애주번트 첨가된 스플리트 인플루엔자 조성물에 의해 유도된 상기 면역학적 반응은 임의의 다른 애주번트 비첨가된 인플루엔자 통상적인 백신, 예를 들어 서브-유닛 인플루엔자 백신 또는 전체 인플루엔자 바이러스 백신에 의해 유도된 면역학적 반응 보다 높다.

<224> 구체적이지만 배타적이지 않게는, 상기 '개선된 CD4 T 세포 면역 반응'은 적절하게는 면역학적으로 "1차 투여되지 않은(unprimed)" 환자, 즉 항원에 혈청반응음성인 환자에게서 얻어진다. 이러한 혈청반응음성은 이러한 결코 대면하지 않은 이러한 항체를 갖는 상기 환자(예를 들어, 상기 항원을 함유한 바이러스 또는 박테리아로 감염되지 않은 환자, 이른바 '나이브(naive)' 환자), 또는 대안적으로는 마주치자 마자 상기 항원에 대해 반응하지 않는 환자의 결과일 수 있다.

<225> 개선된 CD4 T-세포 면역 반응은 하기 시토카인 중 임의의 것을 생산하는 다수의 세포를 측정하여 평가될 수 있다:

<226> ● 적어도 두 개의 상이한 시토카인을 생산하는 세포(CD40L, IL-2, IFNγ, TNFα)

<227> ● 적어도 CD40L 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, TNFα, IFNγ)

<228> ● 적어도 IL-2 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(CD40L, TNFα, IFNγ)

<229> ● 적어도 IFNγ 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, TNFα, CD40L)

<230> ● 적어도 TNFα 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, CD40L, IFNγ)

<231> 상기 시토카인 중 임의의 것을 생산하는 세포가 애주번트 비첨가된 조성물의 투여와 비교하여 애주번트 첨가된 조성물의 투여 후에 보다 많은 양일 것 경우 CD4 T-세포 면역반응이 개선될 것이다. 통상적으로, 본원에서 언급된 다섯 개의 조건 중 하나 이상, 바람직하게는 두 개가 충족될 것이다. 특정 구체예에서, 모두 네 개의 시토카인을 생산하는 세포는 애주번트 비첨가된 군과 비교하여 애주번트 첨가된 군에서 보다 많은 양으로 존재한다.

<232> 본 발명의 애주번트 첨가된 조성물에 의해 수여된 개선된 CD4 T-세포 면역반응은 이상적으로 일회 단일 투여 후에 얻어진다. 단일 투약 방법은 예를 들어 빠르게 발전하는 발병 상황에서 매우 관련될 것이다. 특정 상황에서, 특히 나이든 집단에 대해, 또는 질환 eg 인플루엔자에 대해 첫 번째로 백신접종된 어린이(9세 미만)의 경우에, 같은 계절에 동일한 조성물의 2회 투약을 투여하는 것이 유익할 수 있다. 상기 동일한 조성물의 두 번째 투약(1차 백신접종을 위한 조성물로서 여겨짐)은 진행하는 1차 면역 반응 동안 적절한 간격으로 투여될 수 있다. 통상적으로 조성물의 2차 투약은 1차 투약 후 수주 또는 약 한달, 예를 들어 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주에 제공되어 비반응적 또는 낮은 반응성의 개체에서 면역 시스템을 프라임(prime)하는데 도움을 준다.

<233> 따라서, 본 발명은 또한 상기 항원에 대해 개선된 CD4 T-세포 반응을 유도하기 위한 면역원성 조성물의 제조에서

<234> (a) 항원, 및

<235> (b) 수중유 에멀젼 애주번트; 및

<236> (c) 3D MPL을 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

<237> 본 발명은 또한

<238> (a) 항원, 및

<239> (b) 수중유 에멀젼 애주번트; 및

<240> (c) 3D MPL을 포함하는 조성물을 전달하는 것을 포함하는 항원에 대해 개선된 CD4 T-세포 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다.

<241> 특정 구체예에서, 상기 면역원성 조성물의 투여는 대안적으로 또는 부가적으로 애주번트 비첨가된 조성물 또는 애주번트 조성물의 두 개의 성분 중 하나가 결여된 조성물로 면역화된 개체에 유도된 B-메모리 세포 반응과 비교하여, 애주번트 첨가된 면역원성 조성물이 투여된 환자에서 개선된 B-메모리 세포 반응을 유도한다. 개선된 B-메모리 세포 반응은 시험관내 분화의 자극에 의해 측정된 항원 충돌시에 항체-분비 혈장 세포로 분화할 수 있는 말초 혈액 B 림프구의 증가된 빈도를 의미하는 것으로 의도된다(실시예 섹션, 예를 들어 엘리스포트 B 세포 메모리의 방법).

<242> 또다른 특정 구체예에서, 애주번트 첨가된 1차 백신접종을 위한 조성물은 CD8 반응에 대해 측정가능한 효과를 갖지 않는다.

<243> 바람직하게는, 상기 개선된 CD4 T-세포 면역 반응은 면역저하된 피검체, 예를 들어 통상적으로 적어도 50, 55, 60 또는 65세 이상의 나이든 개체, 또는 높은 위험의 임상적 병태를 갖는 55세 이하의 성인('높은 위험'의 성인), 또는 2살 이하의 어린이에서 얻어진다.

<244> 본 출원인은 놀랍게도 대사가능한 오일, 스테롤 및 에멀젼화제를 포함하는 수중유 에멀젼 애주번트, 및 3D MPL이 면역저하된 사람 집단에서 T 세포 반응을 증진시키는데 효과적임을 발견하였다. 본 출원인이 인플루엔자에 대해 기술할 때, 본 발명에 기술된 제 1 백신접종을 위한 단일 투약의 면역원성 조성물은 애주번트 비첨가된 스플리트 백신으로 백신접종한 것 보다 나이든 사람 집단에서 인플루엔자에 대해 재백신접종한 후 인플루엔자 백신에 대한 방어의 상관관계에 의해 평가된 바와 같이 보다 양호한 혈청방어율을 제공할 수 있다. 청구된 애주번트 첨가된 제형은 또한 애주번트 비첨가된 제형으로 얻어진 것과 비교하여 인플루엔자 바이러스에 대해 개선된 CD4 T-세포 면역 반응을 유도할 수 있다. 이러한 발견은 인플루엔자 항원 노출에 비하여 백신접종 또는 감염시에 증가된 반응성과 관련될 수 있다. 더욱이, 이는 또한 교차-반응성과 관련될 수 있으며, 즉 변형체 인플

루엔자 균주에 대해 보다 높은 반응 능력과 관련될 수 있다. 이러한 개선된 반응은 특히 면역저하된 사람 집단, 예를 들어 나이든 집단(예를 들어 50, 55, 60, 65세 이상) 및 특히 높은 위험의 나이든 집단에 유익할 수 있다. 이는 사망률 및 폐사율을 감소시키고, 폐렴 및 다른 인플루엔자-유사 병에 대한 병원의 응급 승인을 방지할 수 있다. 이는 또한 유아 집단(5세 미만, 바람직하게는 2세 미만)에 유익할 수 있다. 더욱이, 애주번트 비첨가된 제형으로 유도된 반응과 비교하여, 더욱 지속적인 CD4 T 세포 반응을 유도할 수 있으며, 예를 들어 제 1 백신접종 후 1년 동안 존재할 수 있다.

<245> 본 발명자들은 또한 청구된 애주번트 첨가된 조성물이 애주번트 비첨가된 조성물에서 얻어진 것 보다 더욱 개체 중 백신에 존재하는 세가지 모든 균주에 대한 항체의 방어 수준을 유도하고 유지할 수 있다(표 43 참조).

<246> 따라서, 다른 구체예에서, 청구된 조성물은 인플루엔자 관련 질환에 대해 지속적 면역 반응을 확보할 수 있다. 특히, 지속성은 백신접종후 적어도 3개월후, 바람직하게는 적어도 6개월 후에 관리 기준을 충족시킬 수 있는 HI 항체 면역 반응을 의미한다. 특히, 청구된 조성물은 적어도 3개월 후에 적어도 하나의 인플루엔자 균주, 바람직하게는 백신에 존재하는 모든 균주에 대해 70% 미만의 개체, 적절하게는 80% 미만의 개체, 또는 적절하게는 90% 미만의 개체로 항체의 방어 수준을 유도할 수 있다. 특정 양태에서, 90% 미만의 항체의 방어 수준은 백신 조성물에 존재하는 적어도 하나, 적절하게는 두 개, 또는 모든 균주에 대해 백신접종후 적어도 6개월에 얻어진다.

<247> 인플루엔자를 지닌 이들 발견은 다른 질환 및 또한 HPV 항원에 대해 기술된 항원에 적용가능하다(실시예 XIII 참조).

<248> 따라서, 본 발명은 또한 면역저하된 사람 개체 또는 집단, 예를 들어 높은 위험의 성인 또는 노인에, 및 사람 면역저하된 개체 또는 집단, 예를 들어 높은 위험의 성인 또는 노인 집단의 백신접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서 본 발명의 조성물의 용도에 관한 것이다.

<249> 본 출원인은 본원에 규정된 수중유 에멀젼을 지닌 항원의 사용이 변형체 항원에 대한 가교 반을 발생할 수 있는 것으로 결정하였다.

<250> 바람직하게는 CD4 T-세포 면역 반응, 예를 들어 비프라임된 피검체에서 얻어진 개선된 CD4 T-세포 면역반응은 가교 CD4 T 헬퍼 반응의 유도를 수반한다. 특히, 가교 CD4 T 세포의 양은 증가한다. '가교' CD4 반응은 인플루엔자 균주 간의 CD4 T-세포 타겟 공유된 에피토프를 의미한다.

<251> 인플루엔자에 대해, 예를 들어 인플루엔자 백신은 대개 유사한 항원 특징의 헤마글루티닌을 갖는 인플루엔자 바이러스의 감염 균주에 대해서만 대개 효과적이다. 감염(순환) 인플루엔자 바이러스가 표면 글리코단백질, 특히 헤마글루티닌(항원 드리프트 변형체 바이러스 균주)에서 최소의 변화를 수행하는 경우(예를 들어 포인트 돌연변이 또는 아미노산 변화를 초래하는 포인트 돌연변이의 축적), 백신은 일부 방어를 제공할 수 있지만, 새롭게 생성된 변형체가 인플루엔자 감염 또는 백신접종 전에 유도된 면역성을 모면할 수 있는 경우에 제한된 방어만을 제공할 수 있다. 항원 드리프트는 대유행 기간 동안 발생하는 연간 전염병의 원인이다[Wiley & Skehel, 1997, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394]. 가교 CD4 T 세포의 유도는 본 발명의 조성물에 부가 잇점을 제공하며, 또한 가교방어, 다시말해서 이종기원 감염증, 즉 면역원성 조성물에 함유된 인플루엔자 균주의 변형체(예를 들어, 드리프트)인 순환 인플루엔자 균주에 의해 야기된 감염증에 대한 방어를 제공할 수 있다. 이는 순환 균주가 계란에서 번식시키거나 조직 배양에서 생산하기 어렵게 되는 경우 유리할 수 있으며, 이는 드리프트된 균주의 사용을 작업 대체물로서 제공한다. 이는 또한 피검체가 수개월 또는 1년 후에 제 1 및 제 2 백신접조을 수용하는 경우 유리할 수 있으며, 제 2 면역화를 위해 사용되는 면역원성 조성물의 인플루엔자 균주는 제 1 백신접종을 위해 사용되는 조성물에서 사용된 균주의 드리프트 변형체 균주이다.

<252> 예를 들어 실시예 3에 제공된 임상전 데이터는 체온 기록에 의해 평가된 이종타입 인플루엔자 감염증 및 질환에 대해 방어하기 위한 본 발명의 조성물의 능력을 나타낸 것이다. 동일한 결론은 재백신접종 연구에서 얻어진 임상시험 데이터와 동일하다.

<253> 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 제 1 조성물의 항원으로부터 유도된 병원체의 변형체인 병원체에 의해 야기된 감염증 또는 질환에 대해 방어하기 위한 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다. 또한 본 발명의 조성물의 변형체인 항원을 포함하는 병원체에 의해 야기된 감염증 또는 질환에 대해 방어를 위한 본 발명의 조성물의 결과물을 제공한다.

<254> 변형체 병원체 및/또는 항원은 적절하게는 통상적인 CD4 T 세포 에피토프를 지닌 항원 및/또는 제 1 병원체 또

는 항원을 지닌 B 세포 에피토프를 갖지만, 동일하지는 않다.

<255> *가교 CD4 T-세포의 검출(예를 들어 인플루엔자 백신으로 백신접종후)*

<256> 일반적인 3가 인플루엔자 백신 투여 후(3주), 백신(H3N2: A/파나마/2007/99, H1N1:A/뉴 칼레도니아/20/99, B:B/상동/7/97)에 존재하는 것과 동종인 항원 균주 제조물(전체 바이러스 또는 스플리트 항원)에 대해 반응하는 말초 혈액 CD4 T-세포의 빈도가 실질적으로 증가한다(실시예 III 참조). 빈도의 비교가능한 증가는 말초 혈액 CD4 T-세포가 드리프트된 균주(H3N2:A/시드니/5/97, H1N1:A/베이징/262/95, B:B/야마나시/166/98)로서 분류된 인플루엔자 균주로 재자극되는 경우 나타날 수 있다.

<257> 반대로, 말초 혈액 CD4 T-세포가 당업자에 의해 쉬프트 균주(H2N2:A/싱가포르/1/57, H9N2:A/홍콩/1073/99)로서 분류된 인플루엔자 균주로 재자극된 경우, 백신접종 후 관찰가능한 증가가 나타나지 않았다.

<258> 동종이고 드리프트된 인플루엔자 균주 모두를 인식할 수 있는 CD4 T-세포는 본 발명에서"가교"로 명명된다.

<259> 상이한 인플루엔자 균주에 의해 공유된 CD4 T-세포 에피토프는 사람에서 동정되었다[Gelder C et al. 1998, Int Immunol 10(2):211-22; Gelder CM et al. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM et al. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506].

<260> 특정 구체예에서, 애주번트 첨가된 조성물은 현재 이용가능한 백신이 효능을 갖지 않는 것과는 반대로 헤마글루티닌(항원 쉬프트)에서 중요한 변경(예를 들어 두 개의 상이한 종간에 유전자 제조합)을 수행하는 순환 균주에 대한 보다 양호한 방어를 제공하는 부가적인 이익을 제공할 수 있다.

<261> **기타 애주번트**

<262> 조성물은 추가 애주번트, 적절하게는 예를 들어 TRL-4 리간드 애주번트 또는 지질 A의 비독성 유도체를 포함할 수 있다. 적절한 TLR-4 리간드는 지질다당류(LPS) 및 유도체, MDP(무라밀 디펩티드) 및 RSV의 F 단백질이다.

<263> 지질 A의 합성 유도체는 공지되어 있으며, 일부는 TLR-4로서 기술되어 있으며, 하기를 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.

<264> **OM174** (2-데옥시-6-o-[2-데옥시-2-[(R)-3-도데카노일옥시테트라-데카노일아미노]-4-o-포스포노-β-D-글루코피라노실]-2-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]-α-D-글루코피라노실디히드로겐포스페이트), (WO 95/14026)

<265> **OM 294** DP (3S, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9(R)-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올,1,10-비스(디히드로게노포스페이트)(WO 99/64301 및 WO 00/0462)

<266> **OM 197** MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올,1-디히드로게노포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트)(WO 01/46127)

<267> 다른 적합한 TLR-4 리간드는 예를 들어 리포폴리사카라이드 및 이의 유도체, 무라밀 디펩티드(MEP) 또는 호흡기 합포체 바이러스의 F 단백질이다.

<268> 본 발명에 사용하기 위한 또 다른 적합한 면역자극제는 쿠일(Quil) A 및 이의 유도체이다. 쿠일 A는 남아메리카에 자생하는 퀴라자 사포나리아 모리나(Quillaja saponaria Molina) 나무로부터 분리된 사포닌 제제이며, 애주번트 활성을 갖는 것으로 1974년 달스가드(Dalsgaard) 등("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)에 의해 처음으로 기술되었다. 쿠일 A와 관련된 독성 없이 애주번트 활성을 보유한 쿠일 A의 정제된 단편(EP 0 362 278), 예를 들어 QS7 및 QS21(또한 QA7 및 QA21로서 공지되어 있음)이 HPLC에 의해 단리되었다. QS-21은 퀴라자 사포나리아 모리나의 껍질로부터 유래된 천연 사포닌이며, 이는 CD8+ 세포독성 T 세포(CTL), Th1 세포 및 현저한 IgG2a 항체 반응을 유도하며, 본 발명의 내용상 바람직한 사포닌이다.

<269> 특히 바람직한 QS21의 특정 제형이 기술되었으며, 이러한 제형은 추가로 스테롤을 포함한다(WO 96/33739). 본 발명의 사포닌 형성부는 수중유 에멀젼의 형태로 존재할 수 있다(WO 95/17210)

<270> **재백신접종**

<271> 본 발명의 일 양태는 3D MPL 및 본원에서 규정된 수중유 에멀젼 애주번트를 지닌 항원 또는 분절 또는 이의 변형체로 종래에 백신접종된 사람의 재백신접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서 항원의 용도를 제공한다.

<272> 통상적으로 재백신접종은 1차 백신접종(들) 후 적어도 6개월, 바람직하게는 8개월 내지 14개월, 더욱 바람직하

게는 대략 10 내지 12개월에 이루어진다.

<273> 바람직하게는, 본 발명은 항원, 또는 이의 분절 또는 변형체, 3D MPL 및 본원에서 규정된 수중유 에멀젼 애주번트로 종래에 백신접종된 사람의 재백신접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서

<274> (1) 항원 및

<275> (2) 수중유 에멀젼 애주번트의 용도를 제공한다.

<276> 바람직하게는, 본 발명은 항원, 또는 이의 분절 또는 변형체, 3D MPL 및 본원에서 규정된 수중유 에멀젼 애주번트로 종래에 백신접종된 사람의 재백신접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서

<277> (1) 항원 및

<278> (2) 수중유 에멀젼 애주번트, 및

<279> (3) 3D MPL의 용도를 제공한다.

<280> 바람직한 구체예에서, 본 발명은 상기 항원 또는 이의 분절 또는 변형체로 종래에 백신접종된 사람의 재백신접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서

<281> (a) 항원, 및

<282> (b) 수중유 에멀젼 애주번트, 및

<283> (c) 3D MPL의 용도를 제공한다.

<284> 특정 구체예에서, 재백신접종을 위한 조성물은 통상적인 CD4 T-세포 에피토프를 제 1 백신접종을 위해 사용된 조성물과 공유한다.

<285> 재백신접종을 위한 면역원성 조성물(상승 조성물)은 제 1 백신접종을 위해 사용된 면역원성 조성물과 동일한 타입의 항원 제조물, 예를 들어 서브유닛/스플리트/전체 비활성화된 바이러스를 함유할 수 있다. 대안적으로는 인플루엔자에 대해 제 1 백신접종은 스플리트 제조물을 지닐 수 있으며, 부스터(booster) 백신접종은 다른 비활성화된 인플루엔자 항원, 예를 들어 비활성화된 전체 바이러스 또는 정제된 HA 및 NA(서브유닛 백신)를 지닐 수 있다. 부스터 조성물은 애주번트되거나 비-애주번트될 수 있다.

<286> 인플루엔자에 대해 애주번트 비첨가된 부스터 조성물은 근육내로 제공된 Fluarix™/α-Rix일 수 있다. 제형은 적절한 인플루엔자 시즌의 WHO 제안된 균주로부터 제조된 세 개의 비활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유한다.

<287> 변형체는 제 1 백신접종을 위해 사용되는 항원 조성물을 지닌 CD4 T-세포 에피토프(대개 T-세포 수용체로 인식되고 결합되는 항원 결정인자로서 여겨짐)를 공유하지만 항원 조성물과 동일하지 않은 항원일 수 있다.

<288> 변형체는 제 1 백신접종을 위해 사용되는 항원 조성물을 지닌 B-세포 에피토프(대개 B-세포 수용체로 인식되고 결합되는 항원 결정인자로서 여겨짐)를 공유하지만 항원 조성물과 동일하지 않은 항원일 수 있다.

<289> T 세포 및 B 세포 에피토프는 당업계에 널리 공지된 기술을 사용하여 예상되거나 본원에 기술된 기술을 사용하여 면역 반응으로부터 추정될 수 있다.

<290> 상기 수중유 에멀젼 애주번트는 바람직하게는 총부피의 0.5% 내지 20%의 양의 하나 이상의 대사가능한 오일을 포함하고, 적어도 70% 농도가 1 ㎛ 미만의 직경을 갖는 오일 방울을 갖는다.

<291> 인플루엔자에 대한 특정 구체예에서, 재백신접종을 위한 면역원성 조성물(본원에서 '상승 조성물'이라 칭함)은 제 1 백신접종을 위해 사용되는 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물을 지닌 통상적인 CD4 T-세포 에피토프를 공유하는 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물을 함유한다.

<292> 일반적으로, 모든 항원에 대해, '통상적인 CD4 T 세포 에피토프는 동일한 CD4 세포에 의해 인식될 수 있는 상이한 항원으로부터 펩티드/서열/에피토프를 의미하는 것으로 의도된다[문헌(Gelder C et al. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM et al. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM et al. 1995 J Virol 1995 69(12):7497-506)에 기술된 에피토프 참조].

<293> 인플루엔자의 문맥에서, 바람직한 구체예로, 인플루엔자 균주는 세계적 발병과 관련될 수 있거나 세계적 발병과

관련될 가능성을 갖는다. 특히, 백신은 다가 백신, 예를 들어 2가 또는 3가 백신인 경우, 하나 이상의 균주는 세계적 발병과 관련되거나 세계적 발병과 관련될 가능성을 갖는다. 적절한 균주는 H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 및 H1N1이지만, 이에 제한되지 않는다.

<294> 통상적으로, 사용되는 경우 부스터 조성물은 다음 계절, 예를 들어 제 1 면역원성 조성물은 이후 대략 1년 후에 제공된다. 부스터 조성물은 또한 다음해 마다(3차, 4차, 5차 백신접종 등) 제공될 수 있다. 상승 조성물은 제 1 조성물과 동일할 수 있다. 적절하게는, 상승 조성물은 제 1 백신접종을 위해 사용된 균주 또는 항원의 변형체인 균주 또는 이로부터의 항원 제조물을 함유한다.

<295> 재백신접종에서 사용되는 인플루엔자 항원 또는 항원 조성물은 상술된 바와 같은 애주번트 또는 수중유 에멀젼을 포함한다. 애주번트는 본원에 기술된 수중유 에멀젼 애주번트일 수 있으며, 이는 임의적으로 부가적인 애주번트, 예를 들어 3D-MPL 또는 사포닌과 같은 TLR-4 리간드를 함유하는 것이 바람직하거나, 예를 들어 알룸과 같은 다른 적절한 애주번트일 수 있다.

<296> 본 발명의 모든 항원에 대해, 재백신접종은 적절하게는 하기의 것 중 임의의, 바람직하게는 두 개 또는 모두를 포함한다: 애주번트 비첨가된 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물로 1차 백신접종 후 유도된 균등 반응과 비교하여 (i) 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제조물에 대한 개선된 CD4 반응, 또는 (ii) 개선된 B 세포 메모리 반응 또는 (iii) 개선된 체액 반응. 바람직하게는 본원에서 규정된 애주번트 첨가된 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물로 재백신접종된 후 면역학적 반응은 애주번트 비첨가된 조성물로 재백신접종된 후 유도된 상응하는 반응 보다 높다. 바람직하게는, 애주번트 비첨가된, 바람직하게는 스플리트 인플루엔자 바이러스로 재백신접종한 후 유도된 면역학적 반응은 애주번트 비첨가된 스플리트 인플루엔자 조성물로 1차 백신접종된 집단의 상응하는 반응에 비해 애주번트 첨가된 스플리트 인플루엔자 조성물로 1차 백신접종된 집단에서 보다 높았다.

<297> 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 상기 제 1 균주의 변형체인 바이러스 또는 박테리아 균주에 의해 야기되는 감염증 또는 질환에 대해 방어하기 위한 면역원성 조성물의 제조에서

<298> (a) 제 1 바이러스 또는 박테리아 균주로부터의 항원 및

<299> (b) 수중유 에멀젼 애주번트

<300> (c) 3D MPL의 용도를 제공한다.

<301> 예를 들어, 인플루엔자에 대해, 본 발명의 애주번트 첨가된 조성물은 대조군 백신에 의해 부여된 방어와 비교하여 드리프트된 균주(다음 인플루엔자 계절로부터의 인플루엔자 균주)에 대한 보다 양호한 방어를 유도할 수 있다.

<302> **인플루엔자 바이러스 균주 및 이의 항원**

<303> 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물을 포함하는 조성물에 대해, 조성물은 적절하게는 1가 또는 다가, 예를 들어 2가 또는 3가 또는 4가이다. 바람직하게는, 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제조물이 세 개의 상이한 인플루엔자 균주로부터의 항원을 갖는 3가 또는 4가이다.

<304> 임의적으로, 적어도 하나의 균주는 세계적 발병과 관련되거나 세계적 발병과 관련될 가능성을 갖는다.

<305> 종래배경으로서, 대유행기 사이 기간 동안에, 이전 전염병으로부터의 것과 관련된 인플루엔자 바이러스가 순환한다. 바이러스는 삶에서 보다 이른 감염으로부터 면역성의 다양한 수준을 갖는 사람들 중에 퍼진다. 대개 2 내지 3년의 기간에 걸친 이러한 순환은 일반적인 집단 중에 다시 전염병을 야기시키기에 충분하게 변형된 신규한 균주의 선택을 증진시킨다: 이러한 공정은 '항원 드리프트'라 칭한다. '드리프트 변형체'는 임의의 일년에서 상이한 군집, 영역, 나라 또는 대륙에서 상이한 효과를 갖을 수 있지만, 수년에 걸쳐 이러한 전체 효과는 종종 유사하다. 다시말해서, 세계적인 인플루엔자는 신규한 인플루엔자 바이러스가 면역성을 갖지 않는 사람 집단에 대해 나타날 때 발생한다. 통상적인 인플루엔자 전염병은 입원 또는 사망률의 증가된 비율에 의해 입증된 바와 같이 폐렴 및 보다 낮은 부분 호흡기 질환의 빈도의 증가를 초래한다. 노인 또는 만성 질환을 겪는 사람은 이러한 합병증을 대부분 경험할 것이지만 젊은 유아는 또한 심각한 질환으로 고통당할 수 있다.

<306> 예측되지 않는 간격에서, 신규한 인플루엔자 바이러스는 이전 계절에 순환하는 균주로부터의 전체적으로 상이한 서브타입의 키 표면 항원, 헤마글루티닌을 나타낸다. 여기에서, 얻어진 항원은 종래에 사람에서 순환하는 균주

의 상응하는 부분으로부터 20% 내지 50%로 다양할 수 있다. 이는 '다수 면역성'을 피하고 전염병을 전염시키는 바이러스에 초래할 수 있다. 이러한 현상은 '항원 쉬프트'로 칭한다. 상이한 종으로부터의 인플루엔자 바이러스, 예를 들어 조류 또는 돼지 인플루엔자 바이러스가 종 장벽을 넘는 경우, 적어도 페스트 전염병에서 발생하는 것으로 생각된다. 이러한 바이러스가 사람에서 사람으로 퍼질 가능성을 갖는 경우, 이는 수개월 내지 수년 내로 전세계로 퍼져 전세계적인 병을 초래할 수 있다. 예를 들어, 1957년에(아시안 Flu 전염병), H2N2 서브타입의 바이러스는 바이러스가 먼저 분리될 때 적어도 1918년 이후 사람 집단에 순환하는 H1N1 바이러스를 대신하였다. H2 HA 및 N2 NA는 HA가 H3N2 인플루엔자 서브타입의 출현에 의해 1968년(홍콩 Flu 전염병)에 대체될 까지 1957년에서 1968년 사이에 항원 드리프트를 겪었으며, 이후 N2 NA는 H3 HA에 따라 계속 드리프트된다[Nakajima et al., 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395].

<307> 전염병 발병을 야기할 가능성을 제공하는 인플루엔자 바이러스 균주의 특징은 하기와 같다: 현재 순환하는 균주에서 헤마글루티닌과 비교하여 신규한 헤마글루티닌을 함유하며, 이는 뉴라미니다제 서브타입의 변형에 의해 수행되거나 수행되지 않을 수 있다; 사람 집단에서 수평으로 전달될 수 있다; 사람에 대한 병원체이다. 신규한 헤마글루티닌은 연장된 기간, 바람직하게는 수십년, 예를 들어 H2 동안 사람 집단에서 증명되지 않을 수 있다. 또는 새에서 발견된 예를 들어 H5, H9, H7 또는 H6 전에 사람 집단에서 순환되지 않는 헤마글루티닌일 수 있다. 이러한 경우에, 대부분, 또는 적어도 큰 부분, 또는 심지어 전체 집단은 항원을 미리 대항하지 않으며 이에 면역학적으로 투약하지 않는다.

<308> 특정 입자는 일반적으로 전염 상황에서 인플루엔자로 감염되는 위험을 증가시킨다. 노인의, 만성 병 및 어린이는 특히 걸리기 쉬지만, 젊고 건강한 사람 또한 위험하다. H2 인플루엔자에 대해, 1968년 이후에 태어난 집단의 일부는 증가된 위험성을 갖는다. 이들 군은 가능한한 빨리 간단한 방법으로 효과적으로 방어되는 것이 중요하다.

<309> 증가된 위험을 갖는 다른 군의 사람은 여행자이다. 사람들은 오늘날 더욱 많이 여행을 하고, 대부분의 신규한 바이러스가 나타나는 지역, 중국 및 동남아시아가 최근에 인기있는 여행지가 되었다. 여행 패턴의 이러한 변화는 수개월 또는 수년에 비해 수주내에 세계적으로 신규한 바이러스를 도달시킬 수 있다.

<310> 따라서, 이러한 사람의 그룹에 대해, 전염 상황 또는 잠재적 전염 상황에서 인플루엔자에 대한 방어를 위한 백신접종이 특히 필요로 한다. 적절한 균주는 H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 및 H1N1이지만, 이에 제한되지 않는다.

<311> 임의적으로 조성물은 세 개 초과의 결합가, 예를 들어 두 개의 비-전염성 균주 + 전염성 균주를 함유할 수 있다. 대안적으로는, 조성물은 세 개의 전염성 균주를 함유할 수 있다.

<312> 또다른 구체예에서, 본 발명은 1차 백신접종이 전염병 발병을 잠재적으로 야기시킬 수 있는 하나 이상의 인플루엔자 균주를 함유한 스플리트 인플루엔자 조성물로 이루어지고, 재백신접종이 전염성 균주 또는 통상적인 균주인 순환 균주로 이루어진 백신접종 요법에 관한 것이다.

<313> **HA에서의 CD4 에피토프**

<314> 본 항원성 드리프트는 주로 바이러스 표면 단백질인 헤마글루티닌(HA) 및 뉴라미디다제(NA)의 에피토프 영역에 주로 존재한다. 숙주 면역 시스템의 적응성 반응을 회피하는 바이러스에 의해 사용되는, 상이한 인플루엔자 균주 간의 CD4 및 B 세포 에피토프에서의 어떠한 차이점도 인플루엔자 백신접종에 중요한 역할을 할 것이다.

<315> 상이한 인플루엔자 균주에 의해 공유되는 CD4 T-세포 에피토프는 사람에게서 확인되었다[참조예: Gelder C et al. 1998, lnt Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM et al. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; and Gelder CM et al. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506].

<316> 특정 구체예에서, 재백신접종은 일차 백신접종에 사용된 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 제제와 공통되는 CD4 T-세포 에피토프를 공유하는 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 함유하는 부스팅 조성물을 사용함으로써 이루어진다.

<317> 따라서, 본 발명은 추가로 부스팅 투여량으로서 일차 백신접종에 제공된 투여량의 유행성 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 바이러스 항원성 제제와 공통되는 CD4 T-세포 에피토프를 공유하는 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 포함하는 다중투여량 백신의 일차 백신접종-성분의 제조시, 유행성 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 수중유 에멀젼 애주번트, 특히 대사가능한 오일, 알파 토코페롤과 같은 스테롤 및 에멀젼화제를 포함하는 수중유 에멀젼 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다.

<318> **백신접종 수단**

<319> 본 발명의 조성물은 피내, 점막, 예를 들어, 비강, 경구, 근내 또는 피하와 같은 임의의 적합한 전달 경로에 의해 투여될 수 있다. 그 밖의 전달 경로가 당해 널리 공지되어 있다.

<320> 근내 전달 경로가 애주번트 첨가된 인플루엔자 조성물에 바람직하다.

<321> 피내 전달이 또 다른 적합한 경로이다. 임의의 적합한 기구, 예를 들어, US 4,886,499, US 5,190,521, US 5,328,483, US 5,527,288, US 4,270,537, US 5,015,235, US 5,141,496, US 5,417,662에 기술된 것과 같은 숏 니들(short needle) 기구가 피내 전달에 사용될 수 있다. 피내 백신은 또한 본원에 참고 문헌으로 인용되는 WO 99/34850 및 EP 1092444에 기술된 것들과 같이, 피부에 침투되는 효과적인 니들 길이를 제한하는 기구에 의해 투여될 수도 있다. 또한, 액체 젯트 주사기를 통해 또는 각질층을 뚫어 피부에 이르는 젯트를 생성하는 니들을 통해 피부에 액체 백신을 전달하는 젯트 주사 기구가 적합하다. 젯트 주사 기구는 예를 들어, US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 및 WO 97/13537에 기술되어 있다. 또한, 분말 형태의 백신을 피부의 외층을 통해 피부로 가속화시키기 위해 압축 기체를 사용하는 탄도 분말/입자 전달 기구가 적합하다. 또한, 통상적인 주사기가 피내 투여의 전통적인 망토우(mantoux) 방법에서 사용될 수 있다.

<322> 또 다른 적합한 투여 경로는 피하 경로이다. 임의의 적합한 기구, 예를 들어, 전통적인 니들이 피하 전달에 사용될 수 있다. 바람직하게는, WO 01/05453, WO 01/05452, WO 01/05451, WO 01/32243, WO 01/41840, WO 01/41839, WO 01/47585, WO 01/56637, WO 01/58512, WO 01/64269, WO 01/78810, WO 01/91835, WO 01/97884, WO 02/09796, 및 WO 02/34317에 개시된 바와 같은 니들 부재 젯트 주입 서비스가 사용된다. 보다 바람직하게는, 이러한 기구는 액체 백신 제형으로 프리필드된다.

<323> 다르게는, 백신은 비강내 투여된다. 일반적으로, 백신은 바람직하게는 폐에 흡입되지 않으면서 비인두 면적(nasopharyngeal area)에 국부적으로 투여된다. 폐에 도입되지 않거나, 실질적으로 도입되지 않으면서 비인두 면적에 백신 제형을 전달하는 비강 전달 기구를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

<324> 본 발명에 따른 백신의 비내 투여를 바람직한 기구는 분무 기구이다. 통상적으로 이용할 수 있는 적합한 비강 분무 기구는 아쿠스프레이(Accuspray)™(Becton Dickinson)를 포함한다. 분무기(nebuliser)는 폐에 쉽게 흡입될 수 있어 비강 점막에는 효과적으로 도달하지 않는 매우 미세한 분무를 생성한다. 그러므로, 분무기는 바람직하지 않다.

<325> 비내 사용하기에 바람직한 분무 기구는 기구의 성능이 사용자에 의해 가해지는 압력에 의존하지 않는 기구이다. 이러한 기구는 압력 역치 기구(pressure threshold device)로서 공지되어 있다. 액체는 역치 압력이 가해지는 경우에만 노즐로부터 방출된다. 이러한 기구는 규칙적인 점적 크기를 갖는 분무를 용이하게 달성하도록 한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 압력 역치 기구는 당해 공지되어 있으며, 예를 들어 본원에 참고문헌으로 인용되는 WO 91/13281 및 EP 311 863에 기술되어 있다. 이러한 기구는 파이퍼 게엠바하(Pfeiffer GmbH)로부터 통상적으로 입수할 수 있으며, 또한 문헌(Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Sept 1999)에 개시되어 있다.

<326> 바람직한 비내 기구는 1 내지 200㎛, 바람직하게는 10 내지 120㎛ 범위의 점적(액체로서 물을 사용하여 측정함)을 생성한다. 10㎛ 미만의 경우, 흡입 위험이 있으므로, 10㎛ 미만의 점적은 약 5% 이하인 것이 바람직할 수 있다. 120㎛ 초과의 점적 뿐만 아니라 보다 작은 점적은 확산되지 않으므로, 120㎛를 초과하는 점적은 약 5% 이하인 것이 바람직할 수 있다.

<327> 이중-투여량 전달(Bi-dose delivery)이 본 발명에 따른 백신과 사용하기 위한 비내 전달 시스템의 추가의 바람직한 특징이다. 이중-투여량 기구는 단일 백신 투여량의 두개의 서브-투여량, 즉, 각 콧구멍에 투여하기 위한 하나의 서브-투여량을 함유한다. 일반적으로, 두개의 서브-투여량은 단일 챔버에 존재하며, 기구의 구성이 한 번에 단일 서브-투여량의 전달을 효과적이게 한다. 다르게는, 본 발명에 다른 백신을 투여하기 위해 단일투여량 기구가 사용될 수 있다.

<328> 다르게는, 상피 또는 경피 백신 경로 또한 본 발명에 고려될 수 있다.

<329> 본 발명의 특정 양태에서, 제 1 투여를 위한 애주번트 첨가된 면역원성 조성물은 근내 제공될 수 있으며, 애주

번트 첨가되거나 비첨가된 부스팅 조성물은 상이한 경로, 예를 들어, 피내, 피하 또는 비내를 통해 투여될 수 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 제 1 투여를 위한 조성물은 인플루엔자 균주당 15㎍의 표준 HA 함량을 함유할 수 있으며, 부스팅 조성물은 낮은 투여량, 즉 15㎍ 미만의 HA를 함유할 수 있으며, 투여 경로에 따라 보다 적은 용량으로 투여될 수 있다.

<330> **백신접종을 위한 집단**

<331> 타겟 집단은 바람직하게는 사람 집단 또는 개인이다.

<332> 백신접종을 위한 표적 집단은 면역 약화된 사람일 수 있다. 면역-약화된 사람은 일반적으로 건강한 성인과 비교하여 항원, 특히 인플루엔자 항원에 대해 덜 반응할 수 있다.

<333> 바람직하게는, 표적 집단은 나이브(예를 들어, 유행성 균주에 비해)이거나, 인플루엔자 감염 또는 백신접종에 대해 이전에 반응한 적이 없는, 인플루엔자에 대해 1차 투여되지 않은 집단이다. 바람직하게는, 표적 집단은 50세 이상, 일반적으로 55세 이상, 또는 60세 이상, 또는 65세 이상, 보건 연구소에서 일하는 사람들과 같은 보다 젊은 고위험 성인(즉, 18세 내지 64세), 또는 심혈관 및 폐 질환, 또는 당뇨병과 같은 위험 인자를 지닌 젊은 성인과 같은 적합하게 연령의 중장년층이다. 또 다른 표적 집단은 6개월 이상의 모든 어린이, 특히 상대적으로 높은 인플루엔자 관련 입원율을 경험한 6-23개월 된 소아이다. 바람직하게는, 표적 집단은 상기 65세 이상의 노인이다.

<334> **백신접종 양생법, 투여법 및 추가의 효능 기준**

<335> 각 백신 투약에서 당류(또는 이의 콘쥬게이트) 항원의 양은 통상적인 백신에서 현저한 부작용없이 면역방어 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이러한 양은 특정 면역원이 사용되고 어떻게 존재하는야에 따라 조절될 것이다. 일반적으로, 각 투약은 0.1 내지 100 ㎍의 당류, 바람직하게는 0.1 내지 50 ㎍, 바람직하게는 0.1 내지 10 ㎍를 포함하며, 1 내지 5 ㎍이 가장 바람직한 범위로 예상된다.

<336> 백신 중 단백질 항원의 함량은 통상적으로 1 내지 100 ㎍, 바람직하게는 5 내지 50 ㎍, 가장 통상적으로는 5 내지 25 ㎍의 범위일 것이다.

<337> 특정 백신에 대한 성분들의 최적의 양은 피검체에서 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 초기 백신접종 후에, 피검체는 적절한 간격으로 한번 또는 여러번의 부스터 면역화를 수용할 수 있다.

<338> 백신 제조는 일반적으로 백신 디자인에 기술된다["The subunit and adjuvant approach"(eds Powell M.F. & Newman M.J)(1995) Plenum Press New York]. 리포좀내로의 캡슐화는 문헌에 기술되어 있다[Fullerton, 미국특허 제4,235,877호].

<339> **인플루엔자 항원 투약**

<340> 인플루엔자에 대해, 적절하게는 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 대부분의 경우 표준 0.5 ml 주사가능한 용량을 갖으며, 단일 복사상 면역확산법(SRD)로 측정된 바와 같이 각 인플루엔자 균주로부터의 15 ㎍의 헤마글루티닌 항원 성분을 함유한다[J.M.Wood et al.: J.Biol. Stand. 5(1977) 237-247; J.M.Wood et al., J.Biol. Stand. 9 (1981) 317-330]. 적절하게는 백신 용량 부피는 0.5 ml 내지 1 ml, 특히 표준 0.5 ml, 또는 0.7 ml 일 것이다. 용량 부피의 약간의 개조는 본래 벌크 샘플에서 HA 농도에 따라 개략적으로 이루질 것이다.

<341> 적절하게는 상기 면역원성 조성물은 인플루엔자 균주 당 저용량의 HA 항원, 예를 들어 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14 ㎍의 HA을 함유한다. 적절한 저용량의 HA는 인플루엔자 균주 당 1 내지 7.5 ㎍의 HA, 적절하게는 인플루엔자 균주 당 3.5 내지 5 ㎍, 예를 들어 3.75 ㎍의 HA, 통상적으로 인플루엔자 균주 당 약 5 ㎍의 HA이다.

<342> 유리하게는, 본 발명에 따른 백신 용량, 특히 저용량 백신은 통상적인 주사된 스플리트 flu 백신 보다 적은 부피로 제공될 수 있으며, 이는 일반적으로 용량 당 대략 0.5, 0.7 또는 1 ml이다. 본 발명에 따른 낮은 부피 용량은 용량 당 바람직하게는 500 ㎕ 미만, 바람직하게는 300 ㎕ 미만 및 가장 바람직하게는 약 200 ㎕ 미만이다.

<343> 따라서, 본 발명의 일 양태에 따른 바람직한 낮은 부피 백신 용량은 낮은 부피의 낮은 항원 용량, 예를 들어 약 200 ㎕의 부피 중 약 15 ㎍ 또는 약 7.5 ㎍ HA 또는 약 3.0 ㎍(균주 당)의 용량이다.

<344> 본 발명의 인플루엔자 약제는 바람직하게는 백신에 대한 특정 국제 기준을 충족한다.

<345> 표준은 인플루엔자 백신의 효능을 측정하기 위해 국제적으로 적용된다. 인플루엔자에 대한 효과적인 백신에 대한 유럽연합 기준은 하기 표 1에 기재하였다. 이론적으로, 유럽연합 요구사항을 충족하기 위하여, 인플루엔자 백신은 백신에 포함된 인플루엔자의 모든 균주에 대하여, 표에 기준 중 단지 하나를 충족할 수 있다. 본 발명의 조성물은 하나 이상의 이러한 기준을 적절하게는 충족한다.

<346> 그러나, 실제적으로, 적어도 두 개 또는 세 개 모두의 기준은 상이한 경로를 통해 전달하기 위해 신규한 백신과 같은 신규한 백신에 대한 모든 균주에 대해 충족하는 것이 필요할 것이다. 일부 경우에서, 두 개의 기준은 충족될 것이다. 예를 들어, 세 개의 기준 중 두 개가 모든 균주에 의해 충족되기 용이하지만, 세 번째 기준은 몇몇 균주에 의해 충족되지만 모든 균주에 대해 충족되는 것은 아니다(예를 들어, 세 개의 균주로부터 두 개). 요구사항은 성인 집단(18 내지 60세) 및 나이든 집단(60세 초과)에 대해 상이하다.

<347> 표 1

<348>

	18 내지 60세	60세 초과
혈청전환율*	>40%	>30%
전환 인자**	>2.5	>2.0
방어율***	>70%	>60%

<349> * 혈청전환율은 각 백신 균주에 대해 백신접종 후 혈청 헤마글루티닌 억제(HI) 역가의 적어도 4배 증가를 갖는 백신의 퍼센트로 규정된다.

<350> ** 전환 인자는 각 백신 균주에 대해, 백신접종후 혈청 HI 기하평균 역가의 배 증가로서 규정된다.

<351> *** 방어율은 (각 백신 균주에 대해) 백신접종 후 1:40 이상의 혈청 HI 역가를 갖는 백신의 퍼센트로 규정되며, 대개 방어를 지시하는 것으로 허용된다.

<352> 또다른 양태에서, 본 발명은 CD4+ T 세포 활성을 통해 치료되거나 치유되는 것으로 알려진 질환에 대한 백신을 디자인하는 방법을 제공하는 것으로서,

<353> 1) CD4+ 에피토프를 함유한 항원을 선택하고,

<354> 2) 상기 항원을 3D MPL을 지닌 본원에 규정된 수중유 에멀젼 애주번트와 조합함을 포함하며, 여기서 상기 포유류에 투여시 상기 백신은 상기 포유류에 향상된 CD4 T 세포 반응을 유도할 수 있다.

<355> 특허 출원 및 등록된 특허를 포함하는 본 출원의 모든 참고문헌의 교시는 본원에서 전체적으로 참고문헌으로 통합된다.

<356> 의심을 피하기 위하여, 본원에서 용어 '포함하는', '포함하다'(comprise 및 comprises)는 모든 예에서 용어 '구성하는', '구성하다'(consist of 및 consists of)로 임의적으로 대체될 수 있다.

<357> 본 발명은 하기 비제한적 실시예를 참조로 하여 추가로 기술될 것이다:

실 시 예

<358> **실시예 I**는 마우스, 흰족제비 및 사람 연구에 사용된 면역학적 판독 방법을 기술한 것이다.

<359> **실시예 II**는 예시된 연구에 사용된 수중유 에멀젼 및 애주번트 제형의 제조 및 특징화를 기술한 것이다.

<360> **실시예 III**은 스플릿 인플루엔자 항원 제제 및 AS03 애주번트를 함유하는 백신에 의한 65세 초과 연령의 노인 집단의 임상 시험을 기술한 것이다.

<361> **실시예 IV**는 스플릿 인플루엔자 항원 제제 및 AS03 애주번트를 함유하는 백신에 의한 65세 초과 연령의 노인 집단의 제 2 임상 시험-재백신접종 시험을 기술한 것이다.

<362> **실시예 V**는 흰족제비에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 인플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다(연구 I 및 연구 II). 온도 모니터링, 바이알 발산 및 CD4 T-세포 반응을 측정하였다.

<363> **실시예 VI**는 C57BI/6 나이브 및 1차 투여된 마우스에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 인플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다.

<364> **실시예 VII**는 이형 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 스플릿 및 서브-유닛 인

플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다.

<365> **실시예 VIII**는 AS03 애주번트, AS03+MPL 애주번트를 함유하거나, 외인성 애주번트를 함유하지 않는 스플릿 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신에 의한 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상전 평가를 기술한 것이다.

<366> **실시예 IX**는 흰족제비에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 인플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다(연구 III). 온도 모니터링, 바이알 발산 및 HI 역가를 측정하였다.

<367> **실시예 X**는 MPL 애주번트와 함께 또는 부재하에 AS03을 함유하는 스플릿 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신으로의 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상 시험을 나타낸다: 90일 및 180일에서의 면역원성 지속성 데이타.

<368> **실시예 XI**는 MPL 애주번트와 함께 AS03을 함유하는 스플릿 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신으로의 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상 시험을 나타낸다.

<369> **실시예 XII**는 두가지 농도로 MPL 애주번트와 함께 AS03을 함유하는 스플릿 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신으로의 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상 시험을 나타낸다.

<370> **실시예 XIII**은 마우스에서 두개의 애주번트 첨가된 HPV 백신의 임상전 평가를 나타낸 것이다. 항체 및 B 세포 메모리 반응을 측정하였다.

<371> **실시예 I - 면역학적 판독 방법**

<372> I.1. 마우스 방법

<373> I.1.1. 헤마글루틴화 억제 시험

<374> *시험 절차*

<375> 세가지 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 헤마글루틴화 억제 시험(HI)을 사용하여 측정하였다. HI 시험의 이론은 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의한 특이적 항-인플루엔자 항체의 닭 적혈구(RBC)의 헤마글루틴화 억제능에 기초한다. 열 불활성화 처리된 혈청을 미리 카올린 및 닭 RBC에 의해 처리하여 비특이적 억제제를 제거하였다. 사전처리 후, 혈청의 2배 희석물을 각 인플루엔자 균주의 4개의 헤마글루틴화 유닛과 함께 인큐베이팅하였다. 이후, 닭 적혈구를 첨가하고, 응집 억제능을 등급화하였다. 헤마글루틴화를 완전히 억제한 혈청의 최고 희석율의 역수로서 역가를 표현하였다. 혈청의 최초 희석율이 1:20이었음에 따라, 검출불가능한 수준은 10과 동등한 역가로서 등급화하였다.

<376> *통계적 분석*

<377> UNISTAT를 사용하여 백신접종 후 HI 역가에 대해 통계적 분석을 수행하였다. 변동 분석을 위해 사용된 프로토콜이 하기와 같이 간략하게 기술될 수 있다:

<378> · 데이타의 log 변환

<379> · 그룹 분포의 표준화를 입증하기 위한 각 집단(그룹)에 대한 사피로-윌크(Shapiro-Wilk) 시험

<380> · 상이한 집단(그룹) 간 변동의 균질성을 입증하기 위한 코크란(Cochran) 시험

<381> · 그룹들에 대해 수행된 변동에 대한 이원(two-way) 분석

<382> · 다중 비교를 위한 터키(tukey) HSD 시험

<383> I.1.2. 세포내 사이토킨 염색

<384> 본 기술은 사이토킨 생성을 기초로 하여 항원 특이적 T 림프구의 정량화를 가능하게 한다: 이펙터 T 세포 및/또는 이펙터-기억 T 세포는 IFN-γ를 생성하고/하거나 중심 기억 T 세포는 IL-2를 생성한다. PBMC는 면역화후 7일째에 수거하였다.

<385> 림프계 세포를 분비 억제제(Brefeldine)의 존재 하에 시험관내에서 재자극하였다.

<386> 이후, 이들 세포를 형광성 항체(CD4, CD8, IFN-γ 및 IL-2)를 사용하는 통상적인 면역형광 절차에 의해 처리하였다. 결과는 CD4/CD8 T 세포내 사이토킨 양성 세포의 빈도로서 표현된다. T 세포의 사이토킨 세포내 염색을 제 2 면역화 후 7일에 PBMC 에서 수행하였다. 마우스로부터 혈액을 수거하고, 헵파린 처리된 배지 RPMI+ Add 중에서 푸울링시켰다. 혈액에 대해, RPMI + Add - 희석된 PBL 현탁액을 권장된 프로토콜(2500rpm 및 실온에서

20분 원심분리)에 따라 림프구-포유동물 구배로 층화시켰다. 계면에서의 단핵 세포를 제거하고, 2x RPMI + Add로 세척하고, PBMC 현탁액을 RPMI 5% 우태아 혈청 중의 2 x 10^6개의 세포/ml로 조절하였다.

<387> 시험관내에서, 전 FI(1㎍HA/균주)를 사용하여 최종 농도 1 x 10^7개의 세포/ml(튜브 FACS)로 PBMC의 항원 자극을 수행한 후, 항-CD28 및 항-CD49d(둘 모두에 대해 1㎍/ml)을 첨가하여 37℃에서 2시간 인큐베이팅하였다.

<388> 항원 재자극 단계 이후, PBMC를 시토카인 분비를 억제하기 위해 37℃의 브레펠딘(Brefeldin)(1㎍/ml)의 존재 하에서 37℃에서 밤새 인큐베이팅하였다.

<389> IFN-γ/IL-2/CD4/CD8 염색을 하기와 같이 수행하였다: 세포 현탁액을 세척하고, 2% Fc 차단제(1/50; 2.4G2)를 함유하는 50㎕의 PBS 1% FCS 중에 재현탁시켰다. 4℃에서 10분 인큐베이션 후, 50㎕의 항-CD4-PE(2/50) 및 항-CD8 perCp(3/50)의 혼합물을 첨가하고, 4℃에서 30분 인큐베이팅하였다. PBS 1% FCS로 세척한 후, 세포를 200㎕의 사이토픽스-사이토펌(Cytofix-Cytoperm)(Kit BD) 중에 재현탁시킴으로써 투과성화시키고, 4℃에서 20분 인큐베이팅하였다. 이후, 세포를 펌 세척액(Perm Wash)(Kit BD)로 세척하고, 펌 세척액으로 희석된 항-IFN-γ APC(1/50) + 항-IL-2-FITC(1/50)의 50㎕의 혼합물로 재현탁시켰다. 4℃에서 최소 2시간 최대 밤새 인큐베이션 후, 세포를 펌 세척액으로 세척하고, PBS 1% FCS + 1% 파라포름알데히드 중에 재현탁시켰다. FACS에 의해 샘플 분석을 수행하였다. 살아있는 세포를 통제하여(FSC/SSC), CD4+ T 세포에 대한 대략 20,000이벤트(림프구) 또는 35,000 이벤트에 대해 수집을 수행하였다. IFN-γ + 또는 IL2+의 %를 CD4+ 및 CD8+ 통제된 집단에 대해 계산하였다.

<390> I.2. 흰족제비 방법

<391> I.2.1. 헤마글루틴화 억제 시험(HI)

<392> *시험 절차*

<393> 세가지 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 헤마글루틴화 억제 시험(HI)을 사용하여 측정하였다. HI 시험의 이론은 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의한 특이적 항-인플루엔자 항체의 닭 적혈구(RBC)의 헤마글루틴화 억제능에 기초한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다제 용액(RDE)로 처리하고, 열 불활성화 처리하여 비특이적 억제제를 제거하였다. 사전처리 후, 혈청의 2배 희석물을 각 인플루엔자 균주의 4개의 헤마글루틴화 유닛과 함께 인큐베이팅하였다. 이후, 닭 적혈구를 첨가하고, 응집 억제능을 등급화하였다. 헤마글루틴화를 완전히 억제한 혈청의 최고 희석율의 역수로서 역가를 표현하였다. 혈청의 최초 희석율이 1:10이었음에 따라, 검출불가능한 수준은 5과 동등한 역가로서 등급화하였다.

<394> *통계적 분석*

<395> UNISTAT를 사용하여 백신접종 후 HI 역가에 대해 통계적 분석을 수행하였다. 변동 분석을 위해 사용된 프로토콜이 하기와 같이 간략하게 기술될 수 있다:

<396> · 데이타의 log 변환

<397> · 그룹 분포의 표준화를 입증하기 위한 각 집단(그룹)에 대한 사피로-윌크 시험

<398> · 상이한 집단(그룹) 간 변동의 균질성을 입증하기 위한 코크란 시험

<399> · 일원 ANOVA의 상호작용에 대한 시험

<400> · 다중 비교를 위한 터키-HSD 시험

<401> I.2.2. 체온도 모니터링

<402> 전달물질과 함께 2차투여 기간 동안 추적 장비 기록에 의해 개체 온도를 모니터링하였다. 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닦고, 복강에 배치하기 전에 DSI(Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, The Netherlands)에 의해 새롭게 교정하였다. 모든 동물은 이러한 측정 동안에 개별적으로 단일 우리에 수용시켰다.

<403> 온도는 2차 투여 4일 전부터 2차 투여후 7일까지 15분 마다 기록하였다.

<404> I.2.3. 비강 세척

<405> 깨어있는 동물의 양 콧구멍에 5ml의 PBS를 투여하여 비강을 세척하였다. 페트리 접시에서 접종원을 수집하여

드라이 아이스 상의 샘플 용기에 두었다.

<406> *세척액 중 바이러스 적정*

<407> 임의의 박테리아 오염을 제거하기 위해 모든 비강 샘플을 스핀(Spin) X 필터(Coster)를 통해 먼저 살균 여과하였다. 비강 세척액의 50㎕의 일련의 10배 희석물을 50㎕의 배지(10웰/희석물)를 함유하는 마이크로역가 플레이트에 옮기었다. 이후, 100㎕의 MDCK 세포(2.4×10^5개의 세포/ml)를 각각의 웰에 첨가하고, 5-7일 동안 35℃에서 인큐베이팅하였다.

<408> 5-7일의 인큐베이션 후, 배지를 서서히 제거하고, 100㎕의 1/20 WST-1 함유 배지를 첨가하고, 추가의 18시간 동안 인큐베이팅하였다.

<409> 생존가능한 세포에 의해 WST-1의 감소시에 생성된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정 종료시에 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하며, 적합한 파장(450nm)에서 각 웰의 흡광도를 측정함으로써 정량화하였다. 컷-오프(cut-off)는 비감염 대조군 세포의 OD 평균 - 0.3 OD(0.3OD는 비감염 대조군 세포의 +/-3 StDev에 상응한다)로서 정의된다. OD가 컷-오프보다 작은 경우에 양의 스코어가 되고, 이와 대조적으로 OD가 컷-오프보다 큰 경우에 음의 스코어가 된다. 바이러스 발산 역가는 "리드(Reed)와 뮌크(Muench)" 방법에 의해 측정되었으며, Log TCKD50/ml로서 표현되었다.

<410> **I.3. 사람의 면역 반응을 평가하기 위한 검정**

<411> I.3.1. 헤마글루틴화 억제 검정

<412> 면역 반응을 문헌(WHO Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control, Altanta, USA(1991))에 기술된 방법을 사용하여 HI 항체를 측정함으로써 측정하였다.

<413> 항체 역가 측정은 4-헤마글루틴화 억제 유닛(4 HIU)의 적합한 항원 및 0.5% 가금 적혈구 현탁액을 사용하는 표준화되고 포괄적으로 인증된 마이크로방법으로 해동되는 동결 혈청 샘플 상에서 수행하였다. 비특이적 혈청 억제제를 열처리 및 수용체-파괴 효소에 의해 제거하였다.

<414> 수득된 혈청을 HI 항체 수준에 대해 평가하였다. 초기 희석율 1:10으로 시작하여, 일련의 희석물(2배씩)을 최종 희석율 1:20480까지 제조하였다. 적정 종말점이 최고 희석 단계로서 선택되었으며, 헤모글루틴화의 완전한 억제(100%)를 보여주었다. 모든 검정을 중복하여 수행하였다.

<415> I.3.2. 뉴라미니다제 억제 검정

<416> 본 검정은 페투인(fetuin) 코팅된 마이크로역가 플레이트에서 수행하였다. 일련의 2배 희석물의 항혈청을 제조하고, 표준화된 양의 인플루엔자 A H3N2, H1N1 또는 인플루엔자 B 바이러스와 혼합하였다. 이 시험은 페투인으로부터 효소적으로 뉴라민산을 방출하는 뉴라미니다제의 생물학적 활성에 기초한다. 말단 뉴라민산의 분해 후, β-D-갈락토스-N-아세틸-갈락토사민이 드러났다. 갈락토스 구조에 특이적으로 결합하는 땅콩(Arachis hypogaea)으로부터의 호스래디시 퍼옥시다제(HRP)-표지된 땅콩 아글루티닌(peanut agglutinin)을 웰에 첨가하였다. 결합된 아글루티닌의 양을 검출하고, 테트라메틸벤지딘(TMB)와의 기질 반응으로 정량화하였다. 여전히 50% 이상 바이러스 뉴라미니다제 활성을 억제하는 최고 항체 희석율을 표시하였으며, 이는 NI 역가이다.

<417> I.3.3. 중화 항체 검정

<418> 중화 항체 측정을 해동되는 동결 혈청 샘플에 대해 수행하였다. 혈청내 함유되는 항체에 의한 바이러스 중화를 마이크로중화 검정으로 측정하였다. 혈청을 추가 처리하지 않고 본 검정에 사용하였다. 각각의 혈청을 삼중으로 시험하였다. 표준화된 양의 바이러스를 일련의 혈청 희석물과 혼합하고, 바이러스에 항체가 결합하도록 인큐베이팅하였다. 이후, 정해진 양의 MDCK 세포를 함유하는 세포 현탁액을 상기 바이러스와 항혈청의 혼합물에 첨가하고, 33℃에서 인큐베이팅하였다. 인큐베이션 기간 후, 바이러스 복제를 닭 적혈구의 헤마글루틴화에 의해 가시화하였다. 혈청의 50% 중화 역가를 리드와 뮌크의 방법에 의해 계산하였다.

<419> I.3.4. 시토카인 유세포분류기(CFC)에 의한 세포 매개된 면역원성 평가

<420> 말초혈 항원 특이적 CD4 및 CD8 T 세포는 시험관내에서 재자극되어 이들의 상응하는 항원과 인큐베이팅될 경우, IL-2, CD40L, TNF-알파 및 IFN을 생성할 수 있다. 결과적으로, 항원 특이적 CD4 및 CD8 T 세포 뿐만 아니라 세포내 시토카인 생성은 세포 표현형의 통상적인 면역형광 표지 후에 유세포분류기에 의해 계수될 수 있다. 본 연구에서, 인플루엔자 백신 항원 뿐만 아니라 특이적 인플루엔자 단백질로부터 유래된 펩티드가 인플루엔자 특

이적 T 세포를 재자극하기 위한 항원으로서 사용되었다. 결과는 CD4 또는 CD8 T 세포 아집단내 시토카인-포지티브 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로서 표현되었다.

<421> I.3.5. 통계적 방법

<422> *I.3.5.1. 1차 종점*

<423> · 백신접종 이후의 7일 기간(즉, 백신접종일과 이후 6일) 동안 및 전 기간 동안 원치않는 국부적 및 전반적 징후 및 증상의 백신접종율, 세기 및 관련성

<424> · 백신접종 이후의 21일 기간(즉, 백신접종일과 이후 20일) 동안 및 전 기간 동안 원치않는 국부적 및 전반적 징후 및 증상의 백신접종율, 세기 및 관련성

<425> · 전 연구 동안에 심각한 부작용의 발생

<426> *I.3.5.2. 2차 종점*

<427> **체액 면역 반응의 경우:**

<428> *관찰된 변수:*

<429> ·0일 및 21일째: 백신(항-H1N1, 항-H3N2 및 항-B-항체)에서 나타난 3개의 인플루엔자 바이러스 균주 각각에 대해서 개별적으로 시험된 혈청 혈구응집-억제 (HI) 및 NI 항체 역가

<430> ·0일 및 21일째: 백신에서 나타난 3개의 인플루엔자 바이러스 균주 각각에 대해서 개별적으로 시험된 중화 항체 역가.

<431> *유도 변수(95% 신뢰 구간):*

<432> ·백신 접종 전후의 95% 신뢰 구간(95% CI)에 의한 혈청 HI 항체의 기하 평균 역가(GMT)

<433> ·21일째 95% CI에 의한 혈청전환율*

<434> ·21일째 95% CI에 의한 전환인자**

<435> ·21일째 95% CI에 의한 혈청보호율***

<436> ·모든 시점에서의 혈청 NI 항체 GMTs'(95% 신뢰 구간에 의한)

<437> *각각의 백신 균주에 대해서 0일째에 비해 21일째 혈청 HI 역가에서 4-배 이상의 증가를 보인 백신 접종자의 백분율로 정의된 혈청전환율.

<438> **각각의 백신 균주에 대해서 0일째에 비해 21일째 혈청 HI GMT에서 배수 증가로 정의된 전환 인자.

<439> ***보호를 나타내는 것으로 일반적으로 받아들여지는 백신 접종(각각의 백신 균주에 대해서) 후의 혈청 HI 역가 =40인 백신 접종자의 백분율로 정의되는 보호율.

<440> **세포 매개된 면역(CMI) 반응의 경우**

<441> *관찰된 변수*

<442> 0일 및 21일째: 상이한 시험에서의 10^6당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도.

<443> 각각의 시험은 이하 기재된 항원에 대한 CD4/CD8 T 세포의 반응을 정량한다:

<444> ·펩티드 인플루엔자(pf) 항원(이들 항원의 정확한 특성 및 기원이 기재되고 설명되어야 한다)

<445> · 스플리트 인플루엔자(Split Influenza, sf) 항원

<446> · 전체 인플루엔자(wf) 항원.

<447> *유도변수:*

<448> · 둘 이상의 상이한 시토카인을 생성하는 세포((CD40L, IL-2, IFNγ, TNFα)

<449> · 적어도 CD40L 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(IL-2, TNFα, IFNγ)

<450> · 적어도 IL-2 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(CD40L, TNFα, IFNγ)

<451> · 적어도 IFNγ 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(IL-2, TNFα, CD40L)

<452> · 적어도 TNFα 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(IL-2, CD40L, IFNγ)

<453> *I.3.5.3. 면역원성 분석*

<454> 면역원성 검정은 전체 백신 접종된 코호트(cohort)를 기준으로 하였다. 각각의 처리군에 대해서, 다음 파라메터(95% 신뢰구간)가 계산되었다:

<455> · 0일 및 21일째에서의 HI 및 NI 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)

<456> · 0일 및 21일째에서의 중화 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)

<457> · 21일째에서의 전환인자.

<458> · 0일째에 비해서 21일째에서 4-배 이상의 혈청 HI 역가 증가를 나타내는 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 혈청전환율(SC).

<459> · 혈청 HI 역가=1:40인 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 보호율.

<460> · 반응에서의 CD4/CD8 T-림프구 분비의 빈도가 각각의 백신 접종 그룹에 대해서, 각각의 시점(0일, 21일)에서 및 각각의 항원(펩티드 인플루엔자(pf), 스플리트 인플루엔자(sf) 및 전체 인플루엔자(wf))에 대해 요약(기술통계: descriptive statistics)되었다.

<461> · 각각 5가지의 상이한 시험에서의 각각의 백신 접종 그룹과 각각의 항원(pf, sf, 및 wf)에 대한 시점(후-전) 반응 사이의 개별적인 차이가 있는 기술통계.

<462> · 비-파라메터 시험(크러스컬-월리스 시험: Kruskall-Wallis test)을 이용하여 3 그룹 사이의 위치 차이를 비교하고, 통계학적 p-값을 각각 5 가지의 상이한 시험에서 각각의 항원에 대해서 계산하였다. 모든 유의성 검사(significance test)는 양측검사(two-tailed)로 수행하였다. 0.05 미만 또는 이와 동일한 P-값은 통계적 유의성 값으로 고려하였다.

<463> **실시예 II - 수중유 에멀젼 및 애주번트 제형의 제조 및 특성화**

<464> 달리 설명되지 않는 한, 후속되는 실시예에서 사용된 오일/물 에멀젼은 2 가지의 오일(알파-토코페롤 및 스쿠알렌)으로 제조된 유기상과 유화제로서 트윈 80(Tween 80)을 함유하는 PBS의 수성상으로 구성된다. 달리 설명되지 않는 한, 후속되는 실시예에서 사용된 수중유 에멀젼 애주번트 제형은 다음 수중유 에멀젼 성분(최종 농도)을 포함함으로써 제조되었다: 2.5% 스쿠알렌 (v/v), 2.5% 알파-토코페롤 (v/v), 0.9% 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 (v/v) (트윈 80), 참조 WO 95/17210. 후속되는 실시예에서 AS03으로 지칭되는 본 에멀젼을 다음과 같이 두배 농축물로서 제조하였다.

<465> **II.1. 에멀젼 SB62의 제조**

<466> II.1.1. 실험실 제조

<467> 트윈 80은 인산염 완충된 염수(PBS)에 용해되어 PBS중의 2% 용액을 형성시킨다. 100ml의 2배 농축 에멀젼을 생성시키기 위해서, 5g의 DL 알파 토코페롤 및 5ml의 스쿠알렌을 와동시켜 완전히 혼합한다. 90ml의 PBS/트윈 용액을 첨가하고 완전히 혼합한다. 생성되는 에멀젼을 이어서 주사기를 통해서 전달하고 M110S 미세유동공학적 장치를 이용함으로써 최종적으로 미세유동화시킨다. 생성되는 오일 점적은 약 120-180nm의 크기를 지닌다(PCS에 의해서 측정된 Z 평균으로 표현됨). 그 밖의 애주번트/항원 성분을 간단한 혼합으로 에멀젼에 첨가한다.

<468> II.1.2. 대규모 제조

<469> SB62 에멀젼의 제조는 소수성 성분(α-토코페롤 및 스쿠알렌)으로 구성된 오일상과 수용성 성분(트윈 80 및 PBS mod(mod: 변화됨), pH 6.8)을 함유하는 수성상의 강한 진탕하에 혼합함으로써 수행된다. 교반하면서, 오일상(전체 용적의 1/10)을 수성상(전체 용적의 9/10)에 옮기고, 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한다. 생성되는 혼합물을 이어서 미세유동화기(15000 PSI - 8 사이클)의 상호작용 챔버에서 전단, 충격 및 공동화 작용력에 가하여 마이크론 이하 점적(100 내지 200nm 사이에 분포)을 생성시킨다. 생성되는 pH는 6.8 ± 0.1이다. SB62 에멀젼을 이어서 0.22㎛ 막을 통해서 여과하여 무균화시키고, 무균 벌크 에멀젼을 2 내지 8℃에서 큐팩(Cupac) 용기에 동결 저장한다. 무균의 불활성 가스(질소 또는 아르곤)을 SB62 에멀젼 최종 벌크 용기의 빈 공간에 15

초 이상 동안 주입한다.

<470> SB62 에멀젼의 최종 조성은 다음과 같다:

<471> 트윈 80: 1.8 % (v/v) 19.4 mg/ml; 스쿠알렌: 5 % (v/v) 42.8 mg/ml; α-토코페롤: 5 % (v/v) 47.5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2.38 mM, Na_2HPO_4 7.14 mM, KH_2PO_4 1.3 mM; pH 6.8 ± 0.1.

<472> **II.2. 오일 점적 크기 측정 역학적 광 산란**

<473> II.2.1. 소개

<474> 오일 점적 직경의 크기는 하기 과정 및 하기 실험 조건하에서 측정된다. 점적 크기 측정은 세기 측정으로 주어지며, PCS에 의해서 측정된 z 평균으로 표현된다.

<475> II.2.2. 샘플 제조

<476> 크기 측정은 수중유 에멀젼 애주번트: 대량 제조법에 따라 제조된 SB62, AS03 및 AS03+MPL(50 ㎍/ml)에 대해서 수행되며, 마지막 두 개는 사용 직전에 제조된다. 샘플의 조성은 하기(참조 단락 II.2.4)되어 있다. 샘플은 PBS 7.4중에 4000x 내지 8000x로 희석되었다. 대조로서, PL-나노칼 입자(PL-Nanocal Particle) 크기 표준 100nm(cat n° 6011-1015)을 10mM NaCl에 희석시켰다.

<477> II.2.3. 맬번 제타사이저 3000HS(Malvern Zetasizer 3000HS) 크기 측정

<478> 모든 크기 측정은 맬번 제타사이저 3000HS 둘 모두로 수행되었다. 샘플은 적합한 희석액(일반적으로 샘플 농도에 따라서 4000x 내지 20000x의 희석액으로)으로 맬번 분석을 위한 플라스틱 큐벳내로, 및 두 가지의 광학적 모델: 즉, - 0의 실제 입자 굴절지수 및 0의 이미지 굴절지수, 또는 1.5의 실제 입자 굴절 지수 및 0.01의 이미지 굴절 지수(문헌에서 밝혀진 값에 따라서 에멀젼에 대해 적용된 광학적 모델) 중 하나의 광학적 모델로 정량하였다.

<479> 기술적 조건은 다음과 같다:

<480> -레이저 파장: 532 nm (Zeta3000HS),

<481> - 레이저 파워: 50 mW (Zeta3000HS),

<482> - 90° 에서 검출된 산란광 (Zeta3000HS),

<483> - 온도: 25° C,

<484> - 기간: 소프트에 의한 자동 측정,

<485> - 횟수: 3 회 연속 측정,

<486> - z-평균 직경: 누적평가방법(cumulants analysis)에 의해서,

<487> - 크기 분포: 콘틴(Contin) 또는 자동(Automatic) 방법에 의해서.

<488> 자동 맬번 알고리즘은 누적치, 콘틴 및 비음성 최소제곱(NNLS) 알고리즘의 조합을 이용한다.

<489> 세기 분포는 미에(Mie) 이론에 기인한 용적 분포로 전환될 수 있다.

<490> II.2.4. 결과 (표 2 참조)

<491> *누적평가분석(Z 평균 직경):*

<492> **표 2**

샘플	희석	기록	계수비율	ZAD	다분산성
SB62	5000	1	7987	153	0.06
		2	7520	153	0.06
		3	6586	152	0.07
		평균	**7364**	**153**	**0.06**
SB62 (실시예 IV)	8000	1	8640	151	0.03
		2	8656	151	0.00
		3	8634	150	0.00
		평균	**8643**	**151**	**0.01**
SB62+MPL 25μg (*)	8000	1	8720	154	0.03
		2	8659	151	0.03
		3	8710	152	0.02
		평균	**8697**	**152**	**0.02**

<493>

<494> (*) 다음과 같이 제조됨: 주사용 물, 10x 농축된 PBS, 250㎕의 SB62 에멀젼 및 25㎍의 MPL을 함께 혼합하여 280㎕의 최종 용적이 되게 한다.

<495> z-평균 직경(ZAD) 크기는 샘플에서 각각의 입자 크기에 의해서 산란된 빛의 양에 의해서 칭량한다. 이러한 값은 샘플의 모노모달 분석과 관련되어 있으며, 주로 재현 목적으로 사용된다.

<496> 계수 비율(CR)은 산란된 빛의 측정치이며; 이는 초당 수천의 광자에 상응한다.

<497> 다분산성 (Poly) 지수는 분포 폭이다. 이는 분포 폭의 무차원 측정치(dimensionless measure)이다.

<498> *콘틴 및 자동 분석:*

<499> 두 가지의 다른 SB62 제제(2 배 농축된 AS03)을 제조하고 하기된 작은 변수를 주면서 상기된 과정에 따라서 검정하였다:

<500> 샘플은 최적 계수비율 값: 제타사이저 3000HS에 대해서 10000x 및 20000x를 얻도록 결정된 두 용액, 즉, 상기 실시예에서 사용된 바와 동일한 광학적 모델로 맬번 분석을 위해서 플라스틱 큐벳에 정량하였다.

<501> **표 3**

SB62	희석	IR 실제	IR 가상	콘틴 분석 (nm 평균) 세기	콘틴 분석 (nm 평균) 용적	자동분석 (nm 평균) 세기	자동분석 (nm 평균) 용적
1022	1/10000	0	0	149	167	150	-
		1.5	0.01	158	139	155	143
	1/20000	0	0	159	200	155	196
		1.5	0.01	161	141	147	-
1023	1/10000	0	0	158	198	155	-
		1.5	0.01	161	140	150	144
	1/20000	0	0	154	185	151	182
		1.5	0.01	160	133	154	-

<502>

<503> "-" 얻어진 값이 일관되지 않은 경우

<504> 이들 결과의 도식적인 표현이 제형 1023에 대해서 도 1에 도시되어 있다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 입자의 대부분(예, 약 80%)은 300nm 미만의 세기의 직경을 지닌다.

<505> II.2.5. 전체 결론

<506> SB62 제형은 맬번 제타사이저 3000HS 및 두 광학적 모델로 상이한 희석액으로 측정되었다. 상기 검정된 제형의 입자 크기 ZAD(즉, 누적평가분석에 의한 세기 평균)은 약 150 내지 155nm였다.

<507> 누적평가 알고리즘을 사용하는 경우, ZAD 및 다분산성에 대한 희석의 영향은 없음이 관찰되었다.

<508> **II.3. MPL을 포함하는 AS03의 제조**

<509> II.3.1. MPL 액체 현탁액의 제조

<510> MPL(본원 전반에 걸쳐서 사용되는 있는 본 용어는 3D-MPL, 즉, 3-O-데아실화된 모노포스포릴 지질 A의 약어이다) 액체 벌크액은 MPL® 동결건조된 분말로부터 제조된다. MPL 액체 벌크는 백신 또는 애주번트 제형을 위한 사용 준비된 원료의 안정한 농축 (약 1mg/ml) 수성 분산액이다. 제조과정에 대한 도식적인 표현이 도 2에 도시되어 있다.

<511> 12g의 최대 배치 크기를 위해서, MPL 액체 벌크 제제를 무균의 유리 용기에 옮겼다. MPL의 분산은 다음 단계로 구성된다:

<512> - MPL 분말을 주사용 물에 현탁시키고,

<513> - 가열(열처리)에 의해서 어떠한 큰 응집체를 붕해시키고,

<514> - 미세유동화에 의해서 입자 크기를 100nm 내지200nm로 감소시키고,

<515> - 제제를 스타토클린 프레-필터 유닛(Sartoclean Pre-filter unit), 0.8/0.65μm 상에서 예비여과하고,

<516> - 실온에서 제제를 무균 여과(Sartobran P unit, 0.22 μm)한다.

<517> MPL 분말은 미세유동화에 의해서 동결건조되어 안정한 콜로이드성 수성 분산액(200nm 보다 작은 MPL 입자 크기)을 생성시킨다. MPL 동결건조된 분말은 거친 10mg/ml 현탁액을 얻도록 주사용 물에 분산된다. 현탁액은 이어서 교반하에 열처리된다. 실온으로 냉각시킨 후에, 미세유동화 과정이 입자 크기를 감소시키도록 시작된다. 미세유동화는 마이크로플러딕스 장치 M110EH(Microfluidics apparatus M110EH)를 사용하여 최소 통과량(사이클 수: n_{min})을 위한 소정의 압력에서 미세유동화 상호작용 챔버를 통해서 분산액을 연속적으로 순환시킴으로써 수행된다. 사이클 수로 표시된 유동화 기간은 측정된 유속(flow rate) 및 분산 용적을 기초로 하여 계산된다. 주어진 압력에서의 주어진 장치상에 따라서, 유속은 상호작용 챔버 마다 다를 수 있으며 특정의 상호작용 챔버의 라이프사이클(lifecycle) 전체에 걸쳐서 다를 수 있다. 본 실시예에서, 사용된 상호작용 챔버는 타입 F20Y 마이크로플러딕스(F20Y Microfluidics)의 상호작용 챔버이다. 미세유동화 효과가 커플 압력-유속과 연관되어 있어서, 처리시간은 각 배치 마다 다를 수 있다. 1 사이클에 요구되는 시간은 유속을 기초로 하여 계산된다. 고려되는 유속은 MPL을 장치내로 도입하기 직전의 주사용 물로 측정된 유속이다. 1 사이클은 전량의 MPL이 장치를 한번 통과하는데 요구되는 시간(분)으로 정의된다. n 사이클을 얻는데 요구되는 시간은 다음과 같이 계산된다:

<518> $$\frac{n \times \text{처리되는 MPL의 양}}{\text{유속(ml/min)}}$$

<519> 사이클의 수는 따라서 적절히 조정될 수 있다. 수행되는 최소 사이클 양(n_{min})이 바람직한 장치 및 사용된 상호작용 챔버에 대해서 기재되어 있다. 수행되는 전체 사이클 양은 n_{min} 사이클후에 수행된 입자 크기 측정 결과에 의해서 결정된다. 입자 크기 한계(d_{lim})은 과거기록 데이터에 기초하여 한정된다. 측정은 광자상관분광(PCS) 기술에 의해서 실현되며, d_{lim}은 유니모달 결과($Z_{평균}$)으로서 표현된다. 이러한 한계 아래에서는, 미세유동화는 n_{min} 사이클 후에 중지될 수 있다. 이러한 한계 위에서, 미세유동화는 크기가 만족할만하게 감소될 때까지, 최대 또 다른 50 사이클 동안 계속된다.

<520> 여과가 미세유동화 직후에 수행되지 않으면, 분산된 MPL은 +2 내지 +8℃에서 저장되어 여과 영역으로의 전달을 대기한다.

<521> 미세유동화 후에, 분산액은 주사용 물로 희석되고, 층류 흐름하에 0.22㎛ 필터를 통해서 무균 여과된다. 최종 MPL 농도는 1mg/ml(0.80 내지 1.20mg/ml)이다.

<522> II.3.2. AS03+MPL 애주번트 첨가된 백신의 제조: 1 바이알 방법

<523> AS03 애주번트 제형에, MPL을 백신 용량당 10 내지50㎍의 최종 농도로 첨가한다.

<524> 10 배 농축된 PBS(1배 농축될 경우 pH7.4)뿐만 아니라 트윈, 트리톤 X-100 및 VES(비타민 E 석시네이트)를 함유하는 SB62 혼합물을 주사용 물에 첨가한다. 양은 750㎍/ml 트윈 80, 110㎍/ml 트리톤 X-100 및 100㎍/ml VES의 목적 최종 농도에 도달하도록 인플루엔자 균주에 존재하는 세정제를 고려한다. 5분 동안 교반한 후에, 15㎍

의 목적하는 각각의 인플루엔자 균주(예를 들어, 통상의 3가 백신에서 균주 H1N1, H3N2 및 B)를 첨가한다. 15분 동안 교반한 후에, 250㎕의 SB62 에멀젼을 첨가하고 이어서 25㎍ 또는 50㎍의 MPL을 첨가한다.

<525> 제조 과정에 대한 개략적인 표현이 도 3에 도시되어 있다. 사람 용량당 MPL을 포함하는 AS03의 최종 농도는 표 4에 기재되어 있다.

<526> **표 4**

성분		농도	사람 용량당	
	성분		양	기타
SB62	스쿠알렌 (용액 43 mg/ml) 토코페롤 (용액 48 mg/ml) 트윈 80 (용액 20 mg/ml)	781 µl/ml	250 µl 10.68 mg 11.86 mg 4.85 mg	
MPL**	(용액 1 mg/ml)	78 µg/ml or 156 µg/ml	25 µg or 50 µg	
PBS mod*	NaCl KCl Na2HPO4 KH2PO4	137 mM 2.7 mM 8.1 mM 1.47 mM	2.56 mg 0.064 mg 0.368 mg 0.064 mg	
주사용 물				Ad 320 µl
pH				6.8 +/- 0.1

<527>

<528> * 10배 농축된 PBS mod pH6.8 = KH_2PO_4, Na_2HPO_4, NaCl, KCl-HCl

<529> **MPL은 용량당 25㎍ 또는 50㎍중 하나이다.

<530> II.3.3. AS03+MPL 애주번트 첨가된 백신 제조: 2 바이알 방법

<531> 동일한 제형은 2 배 농축된 항원 또는 항원 제제를 AS03(SB62 250㎕) 또는 AS03+MPL (SB62 250㎕ + 25㎍ 또는 50㎍ MPL) 애주번트와 혼합함으로써 2 바이알 방법으로 제조될 수 있다. 이러한 예에서, 제조 과정은 다음과 같이 처리된다. AS25-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 제조는 3가지의 주요 단계로 이루어진다:

<532> 1) 애주번트 없는 3가 최종 벌크(2 배 농축된)의 형성 및 항원 용기에의 충전

<533> 2) AS03+MPL 애주번트의 제조

<534> 3) AS03+MPL 애주번트 첨가된 스플리트 바이러스 백신의 즉석 재구성

<535> *1) 애주번트 없는 3가 최종 벌크의 형성 및 항원 용기에의 충전*

<536> 3 개의 일가 벌크의 양은 형성 전의 각각의 일가 벌크에서 측정된 HA 함량 및 1100ml의 목적 용량을 기초로 한다. 농축된 인산염 완충된 염수 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 α-토코페릴 하이드로진 석시네이트의 예비-혼합물이 주사용 물에 희석된다. 3개의 농축된 일가 벌크(A/뉴칼레도니아, A/뉴욕(New York), B/지앙수(Jiangsu))는 이어서, 3가의 최종 벌크(15㎍ HA/A 균주 /380 ㎕ 3가 최종 벌크)의 ml당 39.47㎍ HA 의 A 균주(H1N1 , H3N2) 및 46 ㎍ HA의 B 균주(17.5 ㎍ HA/ B 균주 /380 ㎕ 3가 최종 벌크)의 최종 농도를 지니게 하기 위해서, 생성 인산염 완충된 염수/트윈 80-트리톤 X-100-α-토코페릴 히드로진 석시네이트 용액(pH 7.4, 137 mM NaCl 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4, 990 ㎍/ml 트윈 80, 150 ㎍/ml 트리톤 X-100 및 130 ㎍/ml α-토코페릴 히드로진 석시네이트)에 연속적으로 희석시킨다. 각각의 일가 벌크의 첨가 사이에, 혼합물을 10 내지 30분 동안 실온에서 교반한다. 최종 일가 벌크를 첨가하고 15 내지 30분 동안 교반한 후에, pH를 검사하고, HCl 또는 NaOH로 7.2 ± 0.2로 조정한다.

<537> 항원의 3가 최종 벌크는 3-ml 무균 타입 I(Ph. Eur) 유리 바이알내로 무균 충전된다. 각각의 바이알은 470㎕ (전체 380㎕ + 90㎕)의 용적을 함유한다.

<538> *2) AS03/MPL 애주번트 벌크의 제조 및 애주번트 용기에 충전*

<539> 애주번트 AS03/MPL은 다음 두 성분을 혼합함으로써 제조된다: SB62 에멀젼 (단락 II.1.2에서의 방법) 및 MPL (단락 II.3.1에서의 방법). 1 배 농축된 PBS mod는 (주사용 물중의 10 배 농축 PBS mod를 희석시킴으로써 제조되는데) SB62 벌크와 MPL 액체 벌크로 1mg/ml로 희석시킴으로써 제조된다. MPL 농도는 최종 사람 백신 용량당 10 내지 50㎍, 적합하게는 약 25㎍의 최종 함량에 도달하도록 결정될 것이다. 혼합은 5 내지 30분 동안 실온에서 교반되며, pH는 NaOH(0.05 또는 0.5M)/HCl(0.03M 또는 0.3M)로 6.8 ± 0.1로 조정된다. 실온에서 5 내지 30분 동안 추가로 교반한 후에, 혼합물을 0.22㎛ 막을 통해서 여과하여 무균화시킨다. 무균의 불활성 가스 (질소) 플러싱을 수행하여 최소 1분 동안 충전된 용기내에 불활성 헤드 스페이스를 생성시킨다. 무균의 AS03+MPL 애주번트를 1.25-ml 무균 타입 I(Ph. Eur) 유리 주사기 내로 무균 충전될 때까지 +2 내지 8℃에서 저장한다. 각각의 주사기는 80㎕ 용적과량(전체 320㎕ + 80㎕)을 함유한다.

<540> 주사 시점에서, 애주번트를 함유하는 미리 충전된 주사기의 함유물이 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유하는 바이알내로 주입된다. 혼합 후에, 함유물은 주사기내로 취해지고 주사 바늘은 근육내 바늘로 대체된다. 재구성된 AS25-애주번트 첨가된 인플루엔자 후보 백신의 일회 용량은 0.7ml에 상응한다.

<541> **II.4. 수중유 에멀젼 제형중에 인플루엔자 항원 및 임의의 MPL을 포함하는 면역원성 조성물의 제조**

<542> II.1의 SB62 에멀젼에 동일한 용적의 2회 농축된 스플리트 인플루엔자 항원(플루아릭스™: Fluarix™)(균주당 15㎍ HA)을 첨가하고 혼합한다. 이는 적절한 경우 50㎍/ml의 MPL과 혼합되어 최종 제형을 형성시켰다.

<543> **실시예 III-65세 초과의 노인 집단에서 스플리트 인플루엔자 항원 제제 및 AS03 애주번트를 함유하는 백신에 의한 임상시험(Explo-Flu-001)**

<544> 애주번트 AS03을 함유하는 스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보 백신의 반응원성 및 면역원성을 평가하기 위해서, 단계 I의 개방 무작위 연구를 2003년에 65세 초과의 노인에게서 수행하였다. 체액 면역 반응(즉, 항-적혈구 응집소, 중화 및 항-뉴라미다제 항원 역가) 및 세포 매개된 면역 반응(CD4 및/또는 CD8 T 세포 반응)을 AS03 애주번트 첨가된 백신 또는 WV 백신의 일회 용량의 근육내 투여 후 21일에 측정하였다. 플루아릭스™은 참조로서 사용되었다.

<545> **III.1. 연구 디자인**

<546> 3 대상 그룹에게 하기 백신을 근육내로 균등하게 투여하였다:

<547> ■ 재구성된 및 애주번트 첨가된 SV 인플루엔자 백신(FluAS03)의 일회 용량이 투여되는 50명의 한 그룹

<548> ■ 전체 바이러스 인플루엔자 백신(FluWVV)의 일회 용량이 투여되는 50명의 한 그룹

<549> ■ 플루아릭스™(플루아릭스)=대조 백신 스케줄의 일회용량이 투여되는 50명의 한 그룹: 0일째에 인플루엔자 백신의 일회 주사, 혈액 샘플 수거, 21일째에 정보판독 분석(HI 항체 측정, NI 항체 측정, 중화항체 측정 및 CMI 분석) 및 연구 결론.

<550> 본 연구에서 사용된 표준 3가 스플리트 인플루엔자 백신-플루아릭스™은 글락소스미스클라인 바이올로지칼스(GlaxoSmithKline Biologicals)에 의해서 개발되고 제조된 2003년부터 시판되는 백신이다.

<551> **III.2. 백신 조성 및 투여(표 5)**

<552> III.2.1. 백신 제조

<553> *AS03 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신*

<554> AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 후보는 타입 I 유리 바이알(335㎕)에 존재하는 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원(항원 용기)과 SB62 에멀젼(335㎕)를 함유하는 미리-충전된 타입 I 유리 주사기(애주번트 용기)로 구성되는 2 성분 백신이다. 주사 시에, 항원 용기의 함유물은 SB62 에멀젼 미리-충전된 주사기의 도움으로 항원 용기로부터 제거된 다음, 주사기에서 온화하게 혼합된다. SB62 에멀젼을 백신 항원과 혼합하여 AS03 애주번트를 재구성시킨다. 주사 전에, 사용된 주사 바늘은 근육내 주사 바늘로 대체되고, 용량은 500㎕로 보정된다.

<555> 재구성된 AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 일회 용량은 0.5ml에 상응하며, 등록된 플루아릭스™/α-릭스® (α-Rix®) 백신에서와 같이 15㎍ HA의 각각의 인플루엔자 바이러스 균주를 함유하며, 10.68 mg 스쿠알렌, 11.86 mg DL-알파 토코페롤, 및 4.85 mg 폴리소르베이트 80 (트윈 80)을 함유한다.

<556> *제조*

<557> AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 제조는 3 단계의 주된 단계로 이루어진다:

<558> 1) 애주번트 없이 3가 최종 벌크의 제조 및 항원 용기내의 충전

<559> 세 개의 일가 벌크의 용량은 제형 전의 각각의 일가 벌크중에서 측정된 HA 함량 및 800ml의 목적 용량을 기초로 한다. 농축된 인산염 완충된 염수 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 α-토코페릴 히드로진 석시네이트의 예비-혼합물을 주사용 물에 희석시킨다. 세 개의 농축된 일가 벌크(균주 A/뉴칼레도니아 -, 균주 A/파나마- 및 균주 B/샹동-)는 이어서, 3가 최종 벌크의 ml당 60 ㎍ HA의 A 균주 (15 ㎍ HA/ A 균주 /250 ㎕ 3가 최종 벌크) 및 70 ㎍ HA B 균주 (17.5 ㎍ HA/ B 균주 /250 ㎕ 3가 최종 벌크)의 최종 농도를 얻기 위해서, 생성된 인산염 완충된 염수/ 트윈 80 - 트리톤 X- 100 - α-토코페릴 히드로진 석시네이트 용액(pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4, 1500 ㎍/ml 트윈 80, 220 ㎍/ml 트리톤 X-100 및 200 ㎍/ml α-토코페릴 히드로진 석시네이트)에 연속적으로 희석된다. 각각의 일가 벌크의 첨가 사이에, 혼합물을 10분 동안 실온에서 교반시킨다. 최종 일가 벌크의 첨가 및 15분 동안의 교반 후에, pH를 검사하고 HCl 또는 NaOH로 7.2 ± 0.1로 조정한다.

<560> 항원의 3가 최종 벌크는 3-ml 무균 타입 I 유리 바이알내로 무균 충전된다. 각각의 바이알은 34% 용적과량(전체 용적 335 ㎕)을 함유한다.

<561> 2) SB62 에멀젼 무균 벌크의 제조 및 애주번트 용기내의 충전

<562> · 수성상: 교반하면서, 902ml의 트윈 80을 44105ml의 PBS-mod 완충액(pH=HCl로 처리후 6.8)과 혼합한다.

<563> · 오일상: 교반하면서, 2550ml의 스쿠알렌을 2550ml의 α-토코페롤에 첨가한다.

<564> · 수성상과 오일상의 혼합: 교반하면서, 5000ml의 오일상(전체 용적의 1/10)을 45007ml의 수성상(전체 용적의 9/10)으로 옮긴다. 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한다.

<565> · 에멀젼화: 생성된 혼합물을 미세유동화기(15000 PSI-8 사이클)의 상호작용 챔버에서 전단, 충격 및 공동화 처리하여 마이크론 이하 점적(100 내지 200nm의 분포)을 생성시킨다. 생성물의 pH는 6.8 ± 0.1이다.

<566> · 무균 여과: SB62 에멀젼은 0.22㎛ 막을 통해서 여과하여 무균화되고 무균의 벌크 에멀젼은 2 내지 8℃의 큐팩 용기에 냉장 저장된다. 무균의 불활성 개스(질소 또는 아르곤)가 15초 이상 동안 SB62 에멀젼 최종 벌크 용기의 빈공간으로 플러싱된다.

<567> 주어진 성분의 모든 양은 50L의 에멀젼의 제조를 위한 것이며, 용적으로 주어지고 있다. 실시상, 양은 성분의 밀도를 고려하여 정량된다. PBS의 밀도는 1과 동일한 것으로 여긴다.

<568> SB62 에멀젼의 최종 조성은 다음과 같다:

<569> **표 5**

트윈 80:	1.8 % (v/v)	19.4 mg/ml
스쿠알렌:	5 % (v/v)	42.8 mg/ml
알파-토코페롤:	5 % (v/v)	47.5 mg/ml
PBS-mod:		
NaCl		121 mM
KCl		2.38 mM
Na_2HPO_4		7.14 mM
KH_2PO_4		1.3 mM
pH		6.8 ± 0.1

<570>

<571> 무균의 SB62 벌크 에멀젼은 이어서 1.25-ml 무균 타입 I 유리 주사기에 무균 충전된다. 각각의 주사기는 35% 용적 과량(전체 용적 335 ㎕)을 함유한다.

<572> 3) AS03 애주번트 첨가된 스플리트 바이러스 백신의 즉석의 재구성

<573> 주사 시에, 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유하는 바이알의 함유물은 SB62 에멀젼을 함유하는 주사기의 도움으로 바이알로부터 제거된 다음, 주사기에서 온화하게 혼합된다. SB62 에멀젼을 백신 항원과 혼합하여 AS03 애주번트를 재구성시킨다.

<574> III.2.2. 백신 조성물(표 6) 및 투여

<575> **표 6**

백신	제형	그룹
플루아릭스™	3 인플루엔자 균주로부터의 HA (전체 HA = 45 μg) • A/뉴칼레도니아 /20/99 (IVR-116):15 μg • A/파나마 /2007/99 (RESVIR-17): 15 μg • B/샹동 /7/97: 15 μg 티메로살 함량: 5 μg 0.5 ml 의 미리 충전된 주사기에	Fluarix
WVV	3 인플루엔자 균주로부터의 HA (전체 HA = 45 μg) • A/뉴칼레도니아 /20/99 (IVR-116):15 μg • A/파나마 /2007/99 (RESVIR-17): 15 μg • B/샹동 /7/97: 15 μg 티메로살 함량: 5 μg 0.5ml의 바이알에	FluWVV
플루아릭스 + AS03	3 인플루엔자 균주로부터의 HA (전체 HA = 45 μg) • A/뉴칼레도니아 /20/99 (IVR-116):15 μg • A/파나마 /2007/99 (RESVIR-17): 15 μg • B/샹동 /7/97: 15 μg 티메로살 함량: 5 μg 수중유 SB62 에멀션(대량 제조)을 함유하는 0.335ml의 바이알(2배 농축됨) + 주사기(0.335ml)에	Flu-AS03

<576>

<577> 백신을 잘 않 쓰는 팔(non-dominant arm)의 삼각근부위에 근육내 투여하였다. 백신 접종자는 백신 투여 후의 드문 아나필락시스 반응이 있는 경우에 용이하게 이용 가능한 적절한 의약 처리로 30분 이상 동안 면밀히 관찰되었다.

<578> **III.3. 연구 집단 결과**

<579> 총 148명이 본 연구에 등록되었는데: FluAS03 그룹에 49명, 플루아릭스 그룹에 49명 및 FluWVV 그룹에 50명이 등록되었다. 백신접종 시점에서의 전체 백신 접종된 코호트(cohort)의 평균 연령은 6.0세의 표준 편차가 있는 71.8세이었다. 세 백신 그룹으로 분포된 대상자의 평균 연령 및 성별 분포는 유사하였다.

<580> **III.4. 안전성 결론**

<581> AS03로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 투여는 안전하였고 연구 집단, 즉, 65 세 초과의 노인에서 임상적으로 관용되었다.

<582> **III.5. 면역원성 결과**

<583> 면역원성 분석은 전체 백신 접종된 코호트에 대해서 수행되었다.

<584> **III.5.1. 체액 면역반응**

<585> AS03 애주번트 첨가된 백신에 의해서 유도된 체액 면역 반응을 평가하기 위해서, 다음 파라메터(95% 신뢰구간으로)를 각각의 처리 그룹에 대해서 계산하였다:

<586> · 0일 및 21일째의 HI 및 NI 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)

<587> · 0일 및 21일째에서의 중화 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)

<588> · 0일째에 비해서 21일째에서 4-배 이상의 혈청 HI 역가 증가를 나타내는 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 혈청전환율(SC).

<589> · 각각의 백신 균주에 대해서, 0일째에 비해서 21일째에 혈청 HI GMT에서의 증가 배수로 정의된 21일째에서의 전환 인자

<590> · 혈청 HI 역가=1:40인 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 보호율.

<591> *III.5.1.1 항-적혈구응집소 항체 반응*

<592> **a) HI 기하평균 역가 (GMT)**

<593> 95% 신뢰구간으로의 HI 항체에 대한 GMT를 표 7에 나타내고 있다(항-HI 항체에 대한 GMT). 모든 백신 균주에 대한 항체의 예비-백신 접종 GMT는 세 그룹에서 동일한 범위내에 있었다. 백신접종 후에, 항-적혈구응집소 항체 수준은 현저하게 증가하였다. 백신접종 후에, 플루아릭스 그룹과 FluWVV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 있었지만, FluAS03과 플루아릭스 그룹에서 모든 세 백신 균주에 대해서 HI항체의 더 높은 GMT 경향이 있었다.

<594> **표 7**

항체	그룹	시간	N	GMT		
				값	95% CI	
					LL	UL
A/뉴칼레도니아	FluAS03 플루아릭스	Pre	49	25.6	17.3	37.9
		PI (21일)	49	317.7	219.1	460.7
	FluWVV	Pre	49	26.3	18.1	38.4
		PI (21일)	49	358.5	244.2	526.4
		Pre	50	19.7	13.6	28.6
		PI (21일)	50	138.2	90.3	211.7
A/파나마	FluAS03 플루아릭스	Pre	49	52.3	35.4	77.4
		PI (21일)	49	366.1	264.5	506.6
				40.9		59.5
	FluWVV	Pre	49	296.0	28.1	426.6
		PI (21일)	49	25.8	205.4	37.1
		Pre	50	165.6	18.0	236.5
		PI (21일)	50		116.0	
B/ 상동	FluAS03 플루아릭스	Pre	49	27.5	19.0	39.8
		PI(21일)	49	317.7	226.9	444.9
	FluWVV	Pre	49	26.0	17.2	39.2
		PI (21일)	49	270.0	187.0	389.7
		Pre	50	32.0	20.8	49.3
		PI (21일)	50	195.6	135.2	282.9

<595>

<596> N = 이용 가능한 결과를 나타내는 대상자의 수

<597> 95% CI = 95% 신뢰구간;

<598> LL = 하한;

<599> UL = 상항

<600> MIN/MAX = 최소/최대

<601> PRE = 백신 접종전 0일째

<602> PI(D21) = 백신 접종 후 21일째

<603> **b) 항-HI 항체 역가의 전환인자, 혈청보호율 및 혈청전환율(은 사람에서의 보호에 대해서 상호관련되어 있다)**

<604> 결과가 표 8에 기재되어 있다.

<605> *전환인자*는 0일째에 비해서 21일째에 각각의 백신 균주에 대한 혈청 HI GMT에서의 배수 증가를 나타낸다. 전환인자는 바이러스 균주 및 백신에 따라서 6.1 내지 13.6으로 다양할 수 있다. 이러한 전환 인자는 유럽 관계당국에 의해서 요구된 GMT에서의 2.0 배 증가에 비해서 월등히 우수하다.

<606> *혈청보호율*은 21일째에서의 혈청 HI 역가 ≥ 40인 대상의 비율을 나타낸다. 연구 시작에, 모든 그룹에서의 대상자중 절반(34.0% 내지 69.4% 범위)이 모든 균주에 대한 보호 수준을 나타냈으며, 21일째에, 세 그룹에서 혈청보호율이 상이한 바이러스 균주에 대해서 88.0% 내지 100% 범위를 나타냈다. 보호면에서, 이러한 결과는 88% 이상의 대상자가 백신 접종후에 혈청 HI 역가 ≥ 40을 나타내며 세 가지 균주에 대해서 보호되는 것으로 간주됨을 의미한다. 이러한 보호율은 유럽 관계당국에 의해서 60세 이상의 노인 집단에서 요구된 60%의 혈청 보호에 비해서 월등히 우수하다.

<607> *혈청전환율*은 0일째에 비해서 21일째에 혈청 HI 역가에서의 4배 이상의 증가를 보이는 대상자의 비율을 나타낸다. 세 가지 균주에 대한 전체 반응율은 세 가지 그룹에서 근본적으로 동일하다. 유효한 것으로 여겨지고 유럽 연합에 따르기 위해서는, 백신은 60세 노인 집단에서 30%를 초과하는 혈청전환율을 유도해야 한다. 본 연구에서, 혈청전환율은 세 가지 그룹에 대해서 50%를 초과했다.

<608> **표 8**

			혈청보호율	혈청전환율	전환인자
EU 표준	**(>60)**		**> 60%**	**> 30%**	**> 2.0**
균주	그룹	N	% [95%CI]	% [95%CI]	GMR [95%CI]
A/ 뉴칼레도니아	Flu AS03	49	98.0 [89.1-99.9]	69.4 [54.6-81.7]	12.4 [7.3-21.0]
	플루아릭스	49	98.0 [89.1-99.9]	69.4[54.6-81.7]	13.6 [8.0-23.2]
	Flu WVV	50	88.0 [75.7-95.5]	52.0 [37.4-66.3]	7.0 [4.0-12.2]
A/ 파나마	Flu AS03	49	100.0 [92.7-100.0]	55.1 [40.2-69.3]	7.0 [4.2-11.6]
	플루아릭스	49	91.8 [80.4-97.7]	65.3 [50.4-78.3]	7.2 [4.7-11.3]
	Flu WVV	50	90.0 [78.2-96.7]	56.0 [41.3-70.0]	6.4 [3.9-10.4]
B/ 샹동	Flu AS03	49	100.0 [92.7-100.0]	73.5 [58.9-85.1]	11.6 [7.2-18.6]
	플루아릭스	49	95.9 [86.0-99.5]	69.4 [54.6-81.7]	10.4 [6.5-16.5]
	Flu WVV	50	90.0 [78.2-96.7]	50.0 [35.5-64.5]	6.1 [3.6-10.3]

<609>

<610> N = 전체 대상자 수

<611> **결론:**

<612> · 백신 접종 후, 플루아릭스 그룹과 FluWVV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 존재하기는 했지만 FluAS03과 플루아릭스에서의 모든 세 가지 백신 균주에 대한 HI 항체의 높은 GMT에 대한 경향이 존재하였다.

<613> · 전환 인자는 바이러스 균주 및 백신에 따라서 6.1 내지 13.6으로 다양하다. 이러한 전환 인자는 유럽 관계당국에 의해서 요구하고 있는 GMT에서의 2.0배 증가에 비해서 월등히 우수하다.

<614> · 21일째에, 세 그룹에서의 혈청보호율은 상이한 바이러스 균주에 대해서 88.0% 내지 100%의 범위였다. 이러한 보호율은 유럽 관계당국에 의해서 60세 이상의 노인 집단에서 요구하고 있는 60% 혈청보호율에 비해서 월등히 우수하다.

<615> · 본 연구에서, 혈청전환율은 세 그룹에 대해서 50% 초과였다. 세 균주에 대한 전체 반응율은 세 그룹에서 근

본적으로 동일하였다.

<616> *III.5.1.2 중화항체 역가*

<617> 노인에서의 인플루엔자 백신 접종에 대한 면역반응을 우수하게 특성화하기 위해서, 중화항원에 대한 혈청 항체 반응을 검정하였다. 결과를 표 9(항-중화 항체 역가에 대한 혈청보호율 및 기하평균 역가(GMT)) 및 표 10(백신 접종 후 21일째에서의 항-중화에 대한 혈청전환율(증가배수=4))에 기재되어 있다.

<618> 세 가지의 인플루엔자 균주에 대한 중화 항체의 역가를 면역화 전후 혈청에서 측정하였다. 다음 파라메터가 측정되었다:

<619> · 백신 접종 전후의 95% 신뢰구간(95% CI)으로의 혈청 중화항체의 기하평균 역가(GMT)

<620> · 각각의 백신 균주에 대해서 0일째에 비해 21일째에서 4배 이상의 HI 역가증가를 나타내는 백신 접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 95% 신뢰구간의 혈청전환율

<621> **표 9**

항체	그룹	시간	N	>= 18 1/DIL				GMT		
				n	%	95% CI LL	95% CI UL	값	95% CI LL	95% CI UL
A/ 뉴칼레도니아	1	PRE	49	46	93.9	83.1	98.7	106.6	77.6	146.6
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	870.2	608.5	1244.3
	2	PRE	49	48	98.0	89.1	99.9	115.6	89.4	149.5
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	955.8	649.5	1406.5
	3	PRE	50	46	92.0	80.8	97.8	87.7	63.6	120.8
		PI(D21)	50	50	100.0	92.9	100.0	375.4	271.2	519.6
A/ 파나마	1	PRE	49	49	100.0	92.7	100.0	724.7	558.0	941.1
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	2012.8	1438.4	2816.5
	2	PRE	49	49	100.0	92.7	100.0	727.8	556.1	952.6
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	1597.7	1128.8	2261.5
	3	PRE	50	50	100.0	92.9	100.0	512.0	409.3	640.6
		PI(D21)	50	50	100.0	92.9	100.0	977.8	738.2	1295.0
B/ 샹동	1	PRE	49	29	59.2	44.2	73.0	25.6	18.8	35.0
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9	222.5	148.1	334.2
	2	PRE	49	27	55.1	40.2	69.3	29.3	20.1	42.7
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	190.4	127.6	284.3
B/ 샹동	3	PRE	50	31	62.0	47.2	75.3	33.4	23.1	48.4
		PI(D21)	50	46	92.0	80.8	97.8	117.8	82.6	168.0

<622>

<623> 그룹 1 : Flu 백신 혼합 애주번트 2x 농축된 Flu 백신

<624> 그룹 2: Flu 백신 Flu 백신

<625> 그룹 3: Flu 백신 Flu WVV 백신

<626> N = 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수

<627> n/% = 특정된 범위내의 역가를 나타낸 대상자 수/백분율

<628> 95% CI = 95% 신뢰구간; LL = 하한치; UL = 상한치

<629> PRE = 백신접종전 0일째

<630> PI(D21) = 백신 접종후 21일째

<631> **표 10**

항체	그룹	N	반응자			
			n	%	95% CI LL	UL
A/뉴칼레도니아	1	49	29	59.2	44.2	73.0
	2	49	30	61.2	46.2	74.8
	3	50	21	42.0	28.2	56.8
A/파나마	1	49	12	24.5	13.3	38.9
	2	49	9	18.4	8.8	32.0
	3	50	9	18.0	8.6	31.4
B/샹동	1	49	29	59.2	44.2	73.0
	2	49	26	53.1	38.3	67.5
	3	50	19	38.0	24.7	52.8

<632>

<633> 그룹 1:Flu 백신(DFLU58A16) 혼합 애주번트(D621024A8) 2x 농축된 Flu 백신

<634> 그룹 2: Flu 백신 (18854B9) Flu 백신

<635> 그룹 3: Flu 백신 (DFLU59A2) Flu WVV 백신

<636> N = 이용 가능한 백신 접종 전후 둘 모두의 결과를 나타낸 대상자의 수

<637> n = 반응자의 수

<638> % = 반응자의 비율(n/N x 100).

<639> 95% CI = 정확한 95% 신뢰구간; LL = 하한치, UL = 상한치

<640> 주요 결과:

<641> · 세 가지의 백신에 대해서, 21일째에, 100%의 혈청보호율이 A 균주 둘 모두에 대해서 얻어진다. B 균주에 대해서, 세 그룹에서의 혈청보호율은 92% 내지 100%범위였다.

<642> · 백신 접종 후, 세 그룹에서 모든 균주에 대해서 GMT의 현저한 증가를 나타냈다. 그러나, 플루아릭스 그룹과 FluWVV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 존재하기는 했지만 FluWVV에서 보다 FluAS03과 플루아릭스에서 세 가지 백신 균주 모두에 대해서 중화 항체의 높은 GMT에 대한 경향이 존재하였다.

<643> · 혈청전환율에 대해서, 세 가지 균주에 대한 전체 반응율은 세 그룹에서 근본적으로 동일하였다.

<644> 모든 그룹에서, 결과는 항-적혈구응집소 항체에 대해서 수행된 분석으로부터의 결과와 일관되었다.

<645> *III.5.1.3 뉴라미니다제(NA) 항체 역가*

<646> 노인 집단에서의 인플루엔자 백신접종에 대한 면역 반응을 양호하게 특성화하기 위해서, 뉴라미니다제 항원에 대한 혈청 항원 반응을 검정하였다. HI 항체 역가와 유사하게, 다음 인자를 측정하였다:

<647> · GMT (로그 역가 변환의 평균의 항-로그를 취함)

<648> · 각각의 백신 균주에 대해서 0일째에 비해서 21일째에서 HI 역가에서의 4배 이상 증가를 나타내는 백신 접종자의 백분율로서 정의된 혈청전환율

<649> 95% 신뢰구간으로 NI 항체에 대한 GMT 및 혈청전환율을 표 11(항-NA 항체 GMT) 및 표 12(백신 접종후(21일째) NA의 혈청전환율(4배 증가))에 나타낸다.

<650> **표 11**

항체	그룹	시간	N	GMT	95%CI	
					LL	UL
A/뉴칼레도니아	FluAS03	PRE	49	77.8	61.8	97.9
		PI(D21)	48	270.0	212.9	342.3
	플루아릭스	PRE	49	77.8	64.6	93.6
		PI(D21)	49	249.1	190.0	326.5
	FluWVV	PRE	50	66.8	53.8	83.0
		PI(D21)	50	159.2	122.8	206.4
A/파나마	FluAS03	PRE	49	33.3	28.5	48.7
		PI(D21)	48	156.8	124.8	196.9
	플루아릭스	PRE	49	34.2	25.6	45.8
		PI(D21)	49	133.7	100.9	177.3
	FluWVV	PRE	50	24.6	18.7	32.4
		PI(D21)	49	78.9	59.4	104.7
B/샹동	FluAS03	PRE	49	46.7	36.5	59.9
		PI(D21)	49	204.2	156.4	266.7
	플루아릭스	PRE	49	46.1	35.3	60.1
		PI(D21)	49	133.7	100.9	177.3
	FluWVV	PRE	50	48.6	36.4	64.7
		PI(D21)	49	128.2	101.7	161.6

<651>

<652> FluAS03: AS03 애주번트 (D621024A8)와의 Flu 백신 (DFLU58A16) 혼합물

<653> 플루아릭스: Flu 백신 (18854B9)

<654> FluWVV: FluWVV 백신 (DFLU59A2)

<655> PRE= 백신 접종 전, PI(D21)= 백신접종 후 21일

<656> 95%CI, LL, 및 UL = 95% 신뢰구간, 하한치 및 상한치

<657> **표 12**

항체	그룹	N	반응자			
			n	%	95% CI	
					LL	UL
A/뉴칼레도니아	FluAS03	48	25	52.1	37.2	66.7
	플루아릭스	49	24	49.0	34.4	63.7
	FluWVV	49	18	36.7	23.4	51.7
A/파나마	FluAS03	48	27	56.3	41.2	70.5
	플루아릭스	49	23	46.9	32.5	61.7
	FluWVV	49	21	42.9	28.8	57.8
B/샹동	FluAS03	48	26	54.2	39.2	68.6
	플루아릭스	49	23	46.9	32.5	61.7
	FluWVV	49	16	32.7	19.9	47.5

<658>

<659> FluAS03: AS03 애주번트 (D621024A8), 플루아릭스: Flu 백신 (18854B9), FIuWVV: Flu WVV 백신 (DFLU59A2)와의 Flu 백신 (DFLU58A16) 혼합물.

<660> N=이용 가능한 백신 접종 전후 결과를 나타낸 대상자의 수, n=반응자 수

<661> % = 반응자의 비율 (n/N x 100).

<662> 95% CI = 정확한 95% 신뢰구간; LL = 하한치, UL = 상한치

<663> 주요 결과:

<664> · 뉴라미니다제에 비해서 더 높은 값의 GMT 및 혈청전환율이 적혈구응집소에 대해서 관찰되었다.

<665> · 모든 백신 균주에 대한 항체의 백신 접종전 GMT가 세 가지 그룹에서 동일한 범위 내에 있었다. 백신 접종 후, 항-뉴라미니다제 항체 수준이 현저하게 증가하였다. HI 항체 역가에 대해서, 백신 접종 후, 플루아릭스 그룹과 FluWVV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 있었지만, FluAS03 및 플루아릭스 그룹에서의 모든 세 가지 백신 균주에 대해서 더 높은 HI 항체 GMT에 대한 경향이 있었다.

<666> · 혈청전환율과 관련하여, 세 균주에 대한 전체 반응율은 세 그룹에서 및 세 균주에 대해서 근본적으로 동일하였다.

<667> 이러한 결과는 인플루엔자에 대해서 본 연구에서 백신 접종된 건강한 노인이 어떠한 인플루엔자 백신이든지 간에 뉴라미니다제 항원에 대해 양호한 항체 반응을 나타냈음을 보이고 있다. 그러나, 뉴라미니다제 항원에 대한 반응은 적혈구응집소 항원에 대한 반응보다 낮다.

<668> III.5.2. 세포 면역반응

<669> 말초 혈액 항원-특이적 CD4 및 CD8 T 세포는 시험관 내에서 재자극되어 이들에 상응하는 항원과 함께 인큐베이션되는 경우 IL-2, CD40L, TNF-알파 및 IFNγ를 생성시킬 수 있다. 결론적으로, 항원-특이적 CD4 및 CD8 T 세포 및 세포내 시토카인 생산은 세포 표현형의 통상적 면역형광 표지화 후에 유세포분류기에 의해서 계수될 수 있다. 본 연구에서, 인플루엔자 백신 항원뿐만 아니라 특이적 인플루엔자 단백질로부터 유도된 펩티드가 인플루엔자-특이적 T 세포를 재자극하기 위한 항원으로서 사용되었다. 결과를 표 13 내지 18에 CD4 및 CD8 T-세포 반응에 대해서 나타내고 있다.

<670> **표 13. 둘 이상의 상이한 시토카인을 생성하는 세포 내로 발현된 항원 특이적 CD4 T-세포 반응: CD40L/IL2/TNF-α/IFN-γ(전체 백신 접종된 코호트)에 대한 백신 접종 전후의 기술통계**

분비	항원	Gr	시점	N	평균	SD	Min
CD4중의 CD40L/IL2/IFNγ/TNFα	펩티드 인플루엔자	1	0 일	44	33.50	139.026	1.00
		1	21일	45	58.40	132.664	1.00
		2	0 일	42	92.10	368.790	1.00
		2	21일	44	88.36	272.528	1.00
		3	0 일	45	80.13	284.316	1.00
		3	21일	47	91.40	382.967	1.00
	스플리트 인플루엔자	1	0 일	47	1901.66	1596.203	102.00
		1	21일	48	6163.75	4265.900	773.00
		2	0 일	45	2151.04	2622.594	265.00
		2	21일	49	4150.73	3712.469	328.00
		3	0 일	48	1678.44	916.329	142.00
		3	21일	50	3374.60	1920.194	449.00
	전체 인플루엔자	1	0 일	48	3134.33	2568.369	507.00
		1	21일	47	9332.04	6875.403	1482.00
		2	0 일	47	3050.85	2654.936	486.00
		2	21일	49	6760.31	6788.258	1852.00
		3	0 일	48	2955.33	2019.233	473.00
		3	21일	50	5661.40	4530.321	635.00

<671>

분비	항원	Gr	시점	Q1	중간값	Q3	Max	크러스컬-월리스 시험(p-값)
CD4 중의 CD40L/ IL2/ IFNγ/TNFα	쿼티드 인플루엔자	1	0 일	1.00	1.00	4.00	915.00	0.7631
		1	21일	1.00	1.00	56.00	733.00	
		2	0 일	1.00	1.00	54.00	2393.00	
		2	21일	1.00	1.00	69.50	1740.00	
		3	0 일	1.00	1.00	65.00	1908.00	
		3	21일	1.00	1.00	63.00	2615.00	
	스플리트 인플루엔자	1	0 일	957.00	1560.00	2408.00	9514.00	0.0002
		1	21일	3468.00	4908.00	7624.00	21324.00	
		2	0 일	930.00	1381.00	2274.00	16289.00	
		2	21일	2247.00	3036.00	4744.00	21924.00	
		3	0 일	1086.00	1502.00	2189.00	3899.00	
		3	21일	2312.00	3040.00	4437.00	10431.00	
	전체 인플루엔자	1	0 일	1730.00	2298.50	3876.00	15066.00	0.0040
		1	21일	4091.00	6523.00	14045.00	29251.00	
		2	0 일	1190.00	2031.00	4161.00	11994.00	
		2	21일	3573.00	4621.00	7234.00	40173.00	
		3	0 일	1421.50	2668.50	3411.50	10578.00	
		3	21일	2459.00	4315.00	7303.00	22053.00	

<672>

<673> 그룹 1 : FluAS03: AS03 애주번트와 혼합된 Flu 백신 플루아릭스

<674> 그룹 2: 플루아릭스: Flu 백신 플루아릭스™

<675> 그룹 3: FIuWVV: Flu WVV 백신

<676> SD = 표준 편차; Min, Max = 최고, 최대

<677> Q1 = 일사분위; Q3 = 삼사분위

<678> N= 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수

<679> P-값: 21일째에 3 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 크러스컬-월리스 시험(Kruskall-Wallis Test)(비-파라메터 과정).

<680> **표 14. 둘 이상의 상이한 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후 (전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계**

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4 중의 CD40L/IFN-γ/TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	44	9.57	159.363	-860.00
		2	42	-40.98	386.998	-2392.00
		3	45	-50.73	256.596	-1664.00
	스플리트 인플루엔자	1	47	4307.02	4468.828	-8161.00
		2	45	1982.93	3802.332	-14318.0
		3	48	1555.90	1596.216	-526.00
	전체 인플루엔자	1	47	6197.98	7220.765	-11763.0
		2	47	3791.34	5820.894	-2128.00
		3	48	2535.98	3966.345	-4766.00
CD8중의 CD40L/IFN-γ/TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	42	-15.95	215.710	-451.00
		2	41	50.83	264.370	-614.00
		3	44	-52.11	243.811	-684.00
	스플리트 인플루엔자	1	42	134.71	426.699	-603.00
		2	44	-65.05	822.036	-4938.00
		3	45	2.49	330.700	-1094.00
	전체 인플루엔자	1	39	189.38	1394.153	-2641.00
		2	44	-479.75	1790.094	-9455.00
		3	44	-243.73	719.269	-1892.00

<681>

		그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P-값
CD4중의 CD40L/IFN-γ/TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	0.00	0.00	37.50	430.00	0.0765
		2	-15.00	0.00	26.00	514.00	
		3	-37.00	0.00	0.00	212.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1888.00	3396.00	6634.00	19555.00	**<0.0001**
		2	699.00	1490.00	2573.00	15169.00	
		3	466.00	1183.50	2186.50	7851.00	
	전체 인플루엔자	1	2170.00	4009.00	11681.00	25570.00	**0.0003**
		2	1246.00	2382.00	3992.00	33801.00	
		3	503.00	1382.50	3300.50	19337.00	
CD8중의 CD40L/IFN-γ/TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	-106.00	0.00	81.00	655.00	0.0932
		2	-58.00	13.00	202.00	703.00	
		3	-160.50	0.00	53.00	567.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-122.00	35.50	221.00	1387.00	0.2121
		2	-64.50	0.00	160.50	1252.00	
		3	-99.00	0.00	76.00	1060.00	
	전체 인플루엔자	1	-420.00	49.00	591.00	5045.00	0.0851
		2	-1016.00	-263.50	180.00	3743.00	
		3	-651.00	-86.50	180.00	1011.00	

<682>

<683> 표 15. 둘 이상의 CD40L 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	44	10.09	153.007	-815.00
		2	42	-29.40	316.983	-1921.00
		3	45	-43.73	251.146	-1629.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	4266.20	4470.807	-8093.00
		2	45	2026.42	3511.508	-11482.0
		3	47	1512.34	1576.133	-494.00
	전체 인플루엔자	1	47	6071.96	7118.132	-11691.0
		2	47	3764.64	5740.762	-2114.00
		3	48	2544.27	3959.879	-4390.00
CD8 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	44	-19.41	81.675	-370.00
		2	41	-3.98	100.998	-399.00
		3	45	-5.56	64.666	-181.00
	스플리트 인플루엔자	1	43	39.53	190.122	-438.00
		2	44	27.61	91.173	-155.00
		3	45	30.18	191.326	-291.00
	전체 인플루엔자	1	41	-91.24	617.077	-1779.00
		2	44	-115.91	588.424	-2583.00
		3	45	-150.89	367.300	-1239.00

<684>

분비	항원	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P- 값
CD4 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	0.00	0.00	36.50	428.00	0.1233
		2	-8.00	0.00	27.00	494.00	
		3	-35.00	0.00	3.00	230.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1799.00	3156.50	6647.00	19480.00	**<0.0001**
		2	783.00	1485.00	2546.00	15021.00	
		3	469.00	1107.00	2035.00	7687.00	
	전체 인플루엔자	1	2109.00	4048.00	11472.00	25448.00	**0.0004**
		2	1212.00	2509.00	3957.00	33428.00	
		3	523.00	1392.00	3261.50	19478.00	
CD8 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	-2.00	0.00	0.50	100.00	0.9721
		2	-28.00	0.00	24.00	231.00	
		3	-13.00	0.00	3.00	176.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-35.00	0.00	140.00	608.00	0.6175
		2	-18.50	0.00	77.50	326.00	
		3	-9.00	0.00	28.00	1188.00	
	전체 인플루엔자	1	-142.00	-8.00	175.00	2087.00	0.3178
		2	-195.50	-34.50	150.00	1258.00	
		3	-270.00	-103.00	88.00	588.00	

<685>

<686> 표 16. 적어도 IFNγ 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	N 불참인원	평균	SD	Min
CD4중의 IFNγ	펩티드 인플루엔자	1	44	5	7.50	64.539	-171.00
		2	42	7	-30.67	277.984	-1766.00
		3	45	5	-27.91	103.403	-639.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	3	2712.87	2905.629	-4394.00
		2	45	4	1148.56	2526.536	-10586.0
		3	47	3	871.00	1016.251	-764.00
	전체 인플루엔자	1	47	2	4240.09	4811.891	-8272.00
		2	47	2	2445.38	4030.694	-3018.00
		3	48	2	1535.48	2456.915	-3670.00
CD8 중의 IFNγ	펩티드 인플루엔자	1	44	5	7.75	146.412	-226.00
		2	41	8	10.68	176.026	-420.00
		3	44	6	-49.80	217.214	-699.00
	스플리트 인플루엔자	1	43	6	138.58	365.565	-470.00
		2	44	5	-112.82	793.746	-4919.00
		3	44	6	29.91	238.157	-708.00
	전체 인플루엔자	1	41	8	6.66	1642.577	-5610.00
		2	44	5	-471.55	1792.348	-9586.00
		3	44	6	-189.05	685.291	-1879.00

<687>

분비	항원	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P- 값
CD4중의 IFNγ	펩티드 인플루엔자	1	-9.50	0.00	7.50	265.00	0.1541
		2	-5.00	0.00	24.00	222.00	
		3	-20.00	0.00	0.00	51.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1273.00	1644.00	4057.00	13296.00	**<0.0001**
		2	405.00	931.00	1757.00	9426.00	
		3	283.00	624.00	1114.00	5031.00	
	전체 인플루엔자	1	1610.00	2693.00	7437.00	17489.00	**<0.0001**
		2	723.00	1487.00	2983.00	21594.00	
		3	232.50	810.00	2218.50	11319.00	
CD8중의 IFNγ	펩티드 인플루엔자	1	-52.50	0.00	40.00	615.00	0.3322
		2	-1.00	0.00	72.00	610.00	
		3	-172.00	0.00	90.50	424.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-46.00	42.00	294.00	1549.00	0.1257
		2	-62.00	0.00	74.00	1028.00	
		3	-59.50	26.50	123.00	643.00	
	전체 인플루엔자	1	-385.00	131.00	450.00	5068.00	0.1179
		2	-955.50	-221.00	177.00	3492.00	
		3	-476.50	-36.50	198.00	1299.00	

<688>

<689> 표 17. 적어도 IL2 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4중의 IL2	펩티드 인플루엔자	1	44	2.82	118.164	-595.00
		2	42	0.90	84.255	-167.00
		3	45	-28.62	191.709	-1222.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	3456.15	3853.960	-7009.00
		2	45	1738.29	2406.045	-451.00
		3	47	1210.02	1361.705	-634.00
	전체 인플루엔자	1	47	4839.02	5978.277	-9178.00
		2	47	2891.00	4493.387	-1370.00
		3	48	2042.50	3123.912	-3179.00
CD8중의 IL2	펩티드 인플루엔자	1	42	-30.60	219.777	-630.00
		2	41	38.85	210.715	-674.00
		3	45	-44.80	197.026	-526.00
	스플리트 인플루엔자	1	41	54.85	250.817	-336.00
		2	44	-2.36	423.957	-2272.00
		3	45	-26.07	244.870	-1004.00
	전체 인플루엔자	1	39	56.21	406.262	-704.00
		2	44	-151.02	822.384	-4304.00
		3	45	-63.56	359.699	-1036.00

<690>

분비	항원		Q1	중간값	Q3	Max	P-값
CD4중의 IL2	펩티드 인플루엔자	1	-1.50	0.00	31.50	324.00	0.0806
		2	-34.00	0.00	2.00	362.00	
		3	-19.00	0.00	0.00	253.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1309.00	2598.50	5926.00	16988.00	**<0.0001**
		2	453.00	1113.00	2049.00	12273.00	
		3	331.00	806.00	1596.00	6474.00	
	전체 인플루엔자	1	1516.00	3341.00	8955.00	21032.00	**0.0006**
		2	995.00	1942.00	3007.00	26358.00	
		3	371.50	1083.50	2624.50	14057.00	
IL2 in CD8	펩티드 인플루엔자	1	-111.00	0.00	103.00	412.00	0.1684
		2	-41.00	0.00	138.00	542.00	
		3	-150.00	-34.00	71.00	447.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-76.00	26.00	133.00	803.00	0.2311
		2	-78.50	0.00	121.50	1064.00	
		3	-93.00	-1.00	30.00	705.00	
	전체 인플루엔자	1	-167.00	63.00	261.00	1302.00	0.4586
		2	-444.50	-4.00	199.00	1398.00	
		3	-198.00	9.00	131.00	838.00	

<691>

<692> 표 18. 적어도 TNFα 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4중의 TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	44	9.48	92.992	-466.00
		2	42	-47.71	367.624	-2333.00
		3	45	-37.38	179.147	-1169.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	2343.11	2596.177	-4450.00
		2	45	703.87	2973.241	-14260.0
		3	47	732.00	740.001	-611.00
	전체 인플루엔자	1	47	3103.74	4248.997	-5146.00
		2	47	1658.38	3639.959	-1393.00
		3	48	1010.15	1689.394	-1482.00
CD8중의 TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	42	11.71	201.031	-453.00
		2	41	37.46	245.241	-612.00
		3	44	-42.95	210.185	-645.00
	스플리트 인플루엔자	1	41	138.54	362.601	-329.00
		2	44	-70.27	790.309	-4741.00
		3	44	-39.75	348.803	-1044.00
	전체 인플루엔자	1	39	279.59	1048.352	-1184.00
		2	44	-280.70	1562.095	-9070.00
		3	44	-71.57	492.135	-1574.00

<693>

분비	항원	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P-값
CD4중의 TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	-1.50	0.00	39.00	239.00	0.1836
		2	-4.00	0.00	12.00	277.00	
		3	-26.00	0.00	5.00	53.00	
	스플리트 인플루엔자	1	862.00	1466.50	3931.00	9267.00	**<0.0001**
		2	251.00	698.00	1229.00	12275.00	
		3	191.00	540.00	1010.00	3288.00	
	전체 인플루엔자	1	868.00	1607.00	5266.00	17199.00	**0.0008**
		2	367.00	871.00	1584.00	23540.00	
		3	175.00	592.00	1385.50	8760.00	
CD8중의 TNF-α	펩티드 인플루엔자	1	-80.00	0.50	70.00	772.00	0.2759
		2	-81.00	0.00	155.00	791.00	
		3	-179.00	0.00	39.50	566.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-23.00	60.00	178.00	1468.00	0.0790
		2	-107.00	0.00	158.00	1286.00	
		3	-185.00	0.00	78.50	1021.00	
	전체 인플루엔자	1	-250.00	108.00	399.00	4601.00	0.1482
		2	-392.00	-56.50	205.00	3258.00	
		3	-233.50	-54.00	160.00	1543.00	

<694>

<695> 결과는 CD4 또는 CD8 T 세포 서브-집단내에서의 시토카인(들)-양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로서 표현되며 도 4 및 도 5에 나타냈다.

<696> 유사한 분석에서, 교차-반응성 CD T-세포 반응을 드리프팅된 균주(drifted strain)(A/H1N1/Beijing/262/95 (H1N1d), A/H3N2/Sydney/5/97 (H3N2d), B/Yamanashi/166/98 (Bd)) 또는 쉬프트 균주(shift strain)(A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Hongkong/1073/99 (H9N2))로부터의 인플루엔자 항원을 사용함으로써 평가하였다. 시토카인(들)-양성 CD4 T 세포의 빈도로 표현된 결과가 도 6에 도시되어 있다.

<697> 주된 발견:

<698> · 플루아릭스 또는 전체 바이러스에 의한 백신 접종은 CD4 T-세포 반응을 약간 상승시켰다. Flu AS03으로의 백신 접종은 강한 CD4 T-세포 반응을 유도하고(도 4), 이러한 유도는 통계적 유의 수준이다. 동일한 결론이 스플리트 항원 또는 전체 바이러스에 의한 시험관내 자극 후에 유도되며, 모든 시토카인(IL-2, IFNγ, TNFα, 및 CD40L)에 의한 자극이 조사되었다.

<699> · 대부분의 개체는 전체 flu에 대한 CD8 T-세포 반응을 지니지만, 백신 접종은 연구된 그룹중 어떠한 그룹에서도 CD8 T-세포 반응에 측정 가능한 충격을 주지 않는다(즉, 전=후)(도 5)

<700> 플루아릭스에 의한 백신 접종만이 낮은 수준의 교차-반응성 CD4 T-세포 반응을 유도한다(도 6). FluAS03에 의한 백신 접종은 드리프팅된 균주에 대해서 강한 CD4 T-세포 반응을 유도하며, 이러한 유도는 통계적 유의수준이다(도 6). 약간의 반응이 쉬프트 균주에 대해서 검출되었다.

<701> III.5.3. B-세포 ELISPOT 메모리(ELISPOT MEMORY)

<702> *III.5.3.1 목적*

<703> AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신에 의해서 유도된 CMI 반응을 더 양호하게 특성화하기 위해서, 인플루엔자 백신 균주 또는 항-사람 면역글루불린을 사용한 시험관내 혈장 세포내로 분화되도록 유도된 B-세포 Elispot 메모리 반응을 항-인플루엔자 또는 IgG 분비 혈장을 계수하도록 평가하였다. 결과를 표 19 및 표 20 및 도 7에 기재한다.

<704> FluAS03 백신의 일회 용량이 투여되는 22명의 제 1 대상자와 플루아릭스 백신의 일회 용량이 투여되는 21명의 제 1 대상자의 서브셋을 선택하여 B-세포 메모리 Elispot 기술을 사용함으로써 인플루엔자-특이적 메모리 B-세포에 대한 백신 접종의 영향을 평가하였다. 다음 종점(end-point)을 측정하였다.

<705> · 0일째 및 21일째에: 인플루엔자-특이적 메모리 B-세포를 모든 대상자에게서 B-세포 Elispot에 의해서 측정하였다. 결과는 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된다.

<706> · 백신접종 후(21일) 및 전(0일) 사이의 차이가 또한 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된다.

<707> *III.5.3.2 통계 방법*

<708> 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된 0일째 및 21일째에서의 각각의 백신 접종 그룹에 대한 기술통계. 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 21일째와 0일째(백신 접종 후-전) 사이의 개별적인 차이에 대한 기술통계.

<709> 윌콕슨 시험을 이용하여 두 그룹 사이에서의 차이의 위치를 비교하고 통계적 p-값을 3 가지의 균주(A/뉴칼레도니아, A/파나마 및 B/샹동) 각각에 대해서 계산하였다.

<710> *III.5.3.3 결과*

<711> 플루아릭스 그룹에 비교된 인플루엔자 애주번트 첨가된 AS03 백신의 우호적 성형이 존재한다. A/뉴칼레도니아 균주의 경우에, 플루아릭스에 비한 FluAS03의 우호성에서의 통계학적 유의수준 차이(p-값=0.021)가 존재한다. 두 그룹 사이의 통계학적 차이는 A/파나마 및 B/샹동 균주에 대해서 관찰되지 않았다.

<712> **표 19. B-세포 메모리: 10^6의 IgG-생성된 혈장 세포(대상의 서브셋) 내의 항원-혈장의 빈도로서 백신 접종전(0일) 및 접종후(21)째의 기술통계 및 추리통계(inferential statistics)**

균주	그룹	시점	N	평균	SD	Min
A/뉴칼레도니아	1	0 일	22	9751.58	6630.335	0.00
	1	21 일	22	22001.65	11308.261	3981.90
	2	0 일	21	9193.61	4339.421	1300.81
	2	21 일	21	12263.08	7285.698	789.47
A/파나마	1	0 일	22	4329.17	2923.497	0.00
	1	21 일	22	18066.69	14604.842	714.29
	2	0 일	21	4860.41	3392.373	0.00
	2	21 일	21	13872.95	12052.163	0.00
B/산동	1	0 일	22	3722.80	2347.315	0.00
	1	21 일	22	15949.60	12385.965	0.00
	2	0 일	21	3030.39	2206.589	640.57
	2	21 일	21	9714.03	5656.805	0.00

<713>

균주	Gr	시점	Q1	중간값	Q3	Max	P-값 (시험상의 윌콕슨)
A/뉴칼레도니아	1	0 일	4117.65	9606.46	13430.66	25570.78	
	1	21 일	11052.63	20450.55	30234.74	40526.32	
	2	0 일	6363.64	9686.41	11698.11	19164.84	**0.0056**
	2	21 일	7741.05	9545.45	17069.60	32000.00	
A/파나마	1	0 일	2275.45	4003.02	5764.55	10842.49	
	1	21 일	9347.37	13176.41	21471.39	54789.92	
	2	0 일	2222.22	4545.45	7495.74	11698.11	0.1814
	2	21 일	6231.88	10147.06	20540.54	52188.84	
B/산동	1	0 일	2058.82	2956.78	5972.22	7832.17	
	1	21 일	6860.47	12796.90	22947.37	48947.37	

<714>

	2	0 일	1290.32	2113.82	4770.02	7783.25	0.1483
	2	21 일	6590.91	9009.01	12774.87	21201.72	

<715>

<716> 그룹 1 : 수중유 Flu 백신 플루아릭스 + AS03 에멀젼 애주번트

<717> 그룹 2: Flu 백신 플루아릭스™

<718> SD = 표준편차

<719> Min, Max = 최소, 최대

<720> Q1 = 일사분위

<721> Q3 = 삼사분위

<722> N= 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수

<723> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨(비-파라메터 과정).

<724> **표 20**

<725> **B 세포 메모리: 10^6의 IgG-생성된 혈장 세포(대상의 서브셋) 내의 항원-특이적 혈장의 빈도로서 백신 접종후(21일)과 접종전(0일) 사이의 차이에 대한 기술통계 및 추리통계(inferential statistics)**

균주	그룹	N	평균	SD	Min
A/뉴칼레도니아	1	22	12250.07	12875.755	-4365.08
	2	21	3069.46	7309.731	-10043.4
A/파나마	1	22	13737.52	13677.942	-188.29
	2	21	9012.54	11489.012	-1551.05
B/산동	1	22	12226.81	12243.895	-2222.22
	2	21	6683.64	6240.312	-2113.82

균주	Gr	Q1	중간값	Q3	Max	P-값 (윌콕슨 시험)
A/뉴칼레도니아	1	2418.07	6776.65	26036.01	35059.98	**0.0210**
	2	-1762.54	1694.51	6850.19	18579.97	
A/파나마	1	4551.30	11039.04	16614.85	49881.94	0.1449
	2	1522.85	6480.96	9214.67	47812.47	
B/산동	1	1788.75	9322.70	18907.05	42134.18	0.1895
	2	2117.44	5384.41	9897.27	19801.28	

<726>

<727> 그룹 1 : 수중유 Flu 백신 플루아릭스 + AS03 에멀젼 애주번트

<728> 그룹 2: Flu 백신 플루아릭스™

<729> SD = 표준편차

<730> Min, Max = 최소, 최대

<731> Q1 = 일사분위

<732> Q3 = 삼사분위

<733> N= 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수

<734> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨(비-파라메터 과정).

<735> **III.6. 전체 결론**

<736> III.6.1. 반응원성 및 안전성 결과

<737> 인플루엔자 면역화는 폐렴 및 그와 관련된 사망 위함을 현저하게 감소시키지만, 노인의 백신접종은 인플루엔자 질환에 대해서 단지 23 내지 72% 보호만을 나타낸다. 효능적인 애주번트와의 백신 항원의 제형은 서브단위 항원에 대한 면역반응을 강화시키는 효과적인 방법이다. 이러한 연구는 (1) 수중유 에멀젼, 즉, AS03으로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 건강한 노인에서의 안정성 및 반응원성을 평가하고, (2) 항체 및 세포-매개된 면역반응을 평가하도록 디자인되었다. 반응원성 데이터는 AS03으로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신이 두가지의 다른 백신에 비해서 더 국소 및 일반적인 증상을 유도였음을 나타낸다. 그러나, 원치않는 부작용과 관련하여, 3 가지의 백신 사이에 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터, 후보 백신의 반응원성 및 안전성 특징은 만족할만하고 임상적으로 허용 가능하다고 결론지을 수 있다.

<738> III.6.2. 면역원성 결과

<739> 면역 반응과 관련하여, 세 가지의 백신은 스플리트 비리온 인플루엔자 백신의 연례 등록(연례 균주 변화-CPMP/BWP/214/96의 면역학적 검정을 위한 "인플루엔자 백신에 대한 요건의 조화에 관한 안내서(Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for influenza Vaccines)"에 대한 유럽 관계당국의 요건을 초과하였다. 본 연구에서 사용된 세 가지의 인플루엔자 백신은 인플루엔자 적혈구응집소 및 중화항원에 대한 양호한 항체 반응을 보이는 건강한 노인에서 면역원성이었다(표 21).

<740> **표 21**

<741>

변수	항체 반응에 대한 EU 표준	결과
전환인자	>2.0	> 6.1
혈청전환율	>30%	> 50%
보호율	>60%	> 88%

<742> 세포-매개된 면역성 (CMI) 반응과 관련하여, AS03으로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신은 두 가지의 다른 백신 (플루아릭스 및 전체 인플루엔자 바이러스 백신)에 비해서 현저하게 강한 CD4 반응(드리프팅된 균주를 포함)을 유도하였다. 그러나, 백신접종은 CD8 반응에 대한 측정 가능한 충격이 없다.

<743> B 세포 메모리 반응과 관련하여, 애주번트 비첨가된 백신에 비해서 인플루엔자 애주번트 첨가된 백신의 양호한 경향이 존재한다.

<744> **실시예 IV - AS03 애주번트 및 스플리트 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신에 의한 65세 초과의 노인 집단에서의 임상시험- Explo- Flu-002**

<745> 단계 I/II, 개방, 조절된 연구가, 애주번트 AS03을 함유하는 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 (GlaxoSmithKline Biologicals) 인플루엔자 후보 백신의 반응원성 및 면역원성을 평가하기 위해서, Explo-Flu-001 임상 시험에서 후보 백신으로 2003년에 미리 백신 접종된 65세 초과의 노인 집단에서 수행되었다. 면역원성 및 안정성 평가를 위해서, 플루아릭스™ 백신(벨기에에서 α-rix™으로 공지됨)이 참조로서 사용되었다.

<746> **IV.1. 목적**

<747> 체액성 면역반응(즉, 항-절혈구응집소 항체 역가) 및 세포 매개된 면역 반응(CD4 및/또는 CD8 T 세포 반응) 및 B 메모리 세포 반응을 AS03 애주번트 첨가된 백신의 일회 용량의 근육내 투여 후 21일째에서 측정하였다. 플루아릭스™을 참조로서 사용하였다.

<748> 목적은

<749> 1) AS03 애주번트 첨가된 Flu(40명) 대 플루아릭스(18명)가 인플루엔자 항원으로 백신 접종된 개체의 CD4- 및/또는 CD8-매개된 면역성에 대해서 가장 강한 면역자극 활성을 나타내는지를 측정하고;

<750> 2) 경시적 분석(longitudinal analysis)을 이용하여 예비 백신 접종 2004(2003년 첫 번째 백신 접종 1년 후의 반응을 위해서)에서 면역 반응에 애주번트 첨가된 AS03의 영향을 평가하기 위함이다.

<751> **IV.2. 연구 디자인, 백신 조성물 및 종점**

<752> ■ 2003년(FluAS03)에서 Explo-Flu-001 임상시험 동안 AS03 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 일회 용량이 미리 투여된 65세 초과의 40명 대상

<753> ■ 2003년(플루아릭스)에 Explo-Flu-001 임상시험 동안 플루아릭스™ 일회 용량이 미리 투여된 65세 초과의 약 20명 대상의 한 대조 그룹

<754> IV.2.1. 백신 조성

<755> 백신 조성은 백신(2004년 백신)에 포함된 일플루엔자 균주를 제외하고는 연구 Explo-Flu-001에 대해서 사용된 백신 조성과 유사하다. 균주는 다음과 같다:

<756> · A/뉴칼레도니아/20/99 (IVR-116) (H1N1) = A/뉴칼레도니아/ (HINI) - 유사 균주

<757> · A/와이오밍/3/2003 (X-147) (H3N2) = A/후지안(Fujian) (H3N2) - 유사 균주

<758> · B/지앙수/10/2003 = B/상하이 - 유사 균주

<759> IV.2.2. 면역원성 (HI) 엔드-포인트

<760> · GMTs (로그 역사 변환의 평균의 항-로그를 취함)

<761> · 전환인자(0일째에 비한 21일 째에서의 혈청 HI GMT에서의 증가 배수)

<762> · 혈청전환율 (각각의 백신 균주에 대해서, 0일째에 비해서 21일째에서 4 배 이상의 HI 역가 증가를 보이는 백

신 접종자의 백분율)

<763> · 보호율 (21일째에서 혈청 HI ≥1:40으로 보이는 백신 접종자의 백분율)

<764> IV.2.3. CMI-종점

<765> *관찰된 변수:*

<766> 0일째 및 21일째에서: 4 가지의 상이한 시토카인 내로의 10^6 당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도. 각각의 시험은 하기 항원에 대한 CD4/CD8 T 세포의 반응을 정량한다:

<767> ■ 하기 3가지의 항원 푸울

<768> ■ 뉴칼레도니아 항원(New Calenonia antigen)

<769> ■ 와이오밍 항원(Wyoming antigen)

<770> ■ 지앙수 항원(Jiangsu antigen).

<771> *유도된 변수:*

<772> 5 가지의 상이한 시험(시토카인)으로 나타낸 항원-특이적 CD4 및 CD8-T-세포 반응:

<773> 1. 둘 이상의 상이한 시토카인(CD40L, IL-2, IFNγ, TNFα)을 생성하는 세포

<774> 2. 적어도 CD40L과 또 다른 시토카인(IL-2, TNFα, IFNγ)을 생성하는 세포

<775> 3. 적어도 IL2와 또 다른 시토카인(CD40L, TNFα, IFNγ)을 생성하는 세포

<776> 4. 적어도 IFNγ와 또 다른 시토카인(IL-2, TNFα, CD40L)을 생성하는 세포

<777> 5. 적어도 TNFα와 또 다른 시토카인(IL-2, CD40L, IFNγ)을 생성하는 세포

<778> IV.2.4. CMI 분석

<779> 첫 번째 CMI 분석은 전체 백신 접종된 코호트를 기초로 하였다(N= FluAS03 그룹에 대해서 40명 대상 및 N=플루아릭스 그룹에 대해서 18명 대상).

<780> 경시적 분석은 Explo-Flu-001 (스플리트 단백질) 및 Explo-Flu-002 (flu 항원 푸울) 연구를 기초로 하였다:

<781> ■ 접종전: N=FluAS03 그룹에 대해서 36 명 대상 및 N=플루아릭스 그룹에 대해서 15명 대상.

<782> ■ 접종후-접종전: N=FluAS03 그룹에 대해서 34명 대상 및 플루아릭스 그룹에 대해서 15명 대상.

<783> (a) 반응에서 CD4/CD8 T-림프구 분비의 빈도가 각각의 항원에 대해서, 각각의 시토카인에 대해서, 각각의 백신 그룹에 대해서 및 각각의 시점(백신 접종 전 및 후)에서 기술통계에 의해서 요약되었다.

<784> (b) 시점들(접종후-접종전) 반응 사이의 개별적인 차이에 대한 기술통계는 각각의 항원, 각각의 시토카인, 및 각각의 백신 그룹에 대해서 표로 기재되었다.

<785> (c) 백신 접종후 및 백신 접종 (후-전) 시점에 대해서, 비-파라메터 윌콕슨 시험이 이용되어 두 백신 그룹사이의 위치 차이를 비교하고, 이하에 대한 상이한 4가지의 시토카인과 관련한 통계적 p-값을 계산하였다:

<786> - 뉴칼레도니아, 와이오밍, 지앙수 및 3종의 균주의 푸울에 대한 CD4 T-세포 반응

<787> - 뉴칼레도니아, 와이오밍, 지앙수 및 3종의 균주의 푸울에 대한 CD8 T-세포 반응

<788> (d) 비-파라메터 시험(윌콕슨-시험)이 또한 이하를 위해서 이용되었다:

<789> - 각각의 백신 그룹에서의 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002사이의 특이적 CD4의 빈도에 관한 접종전(0일째) 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,

<790> - 연구 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002 각각에서의 2 가지 백신 그룹 사이의 특이적 CD4의 빈도에 관한 접종전(0일째) 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,

<791> - 각각의 백신 그룹에서의 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002 사이의 특이적 CD4의 빈도 차이(접종후-접종전)에 관한 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,

<792> - 연구 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002 각각에서의 2 가지 백신 그룹 사이의 특이적 CD4의 빈도 차이(접종후-접종전)에 관한 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,

<793> 모든 유의 시험은 양측검사로 수행하였다. 0.05와 동일하거나 그 미만인 p-값이 통계적 유의수준으로 여겨졌다.

<794> IV.3. 결과

<795> 결과는 CD4 또는 CD8 T 세포 서브-집단내의 시토카인(들)-양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로서 표현되었다.

<796> IV.3.1. 항원 특이적 CD4 T-림프구

<797> 반응에서의 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비 빈도가 각각의 항원, 각각의 시토카인, 각각의 백신 그룹 및 각각의 시점(백신 접종전 및 접종후)에서 기술통계에 의해서 요약되었다.

<798> 각각의 백신 그룹에 대해서 및 각각의 상이한 5 가지의 시토카인에서의 각각의 항원에 대한 CD4 T-림프구 반응에서의 시점들(접종후-접종전) 사이의 개별적인 차이에 대한 기술 통계가 표 22에 기재되어 있다.

<799> **표 22. 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(전체 백신 접종 코호트)에 대한 백신접종후(21일째에)와 백신접종전(0일째에) 사이의 차이에 대한 기술통계**

항원	시토카인	백신 그룹	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
푸울 Flu	모두 이중	플루아릭스	18	1268.67	1051.744	197.00	724.00	863.00	1561.00	4676.00
		Flu AS03	36	1781.31	1484.860	-2379.00	929.50	1664.50	2821.00	4669.00
	CD40L	플루아릭스	18	1260.11	1054.487	243.00	721.00	849.00	1602.00	4743.00
		Flu AS03	36	1711.56	1433.113	-2359.00	838.00	1576.00	2759.50	4575.00
	IFNγ	플루아릭스	18	762.94	813.884	-12.00	294.00	496.00	1061.00	3564.00
		Flu AS03	36	1179.92	881.255	-817.00	692.50	1180.50	1865.50	2831.00
	IL2	플루아릭스	18	1019.06	917.905	-258.00	544.00	702.00	1174.00	3850.00
		Flu AS03	36	1423.33	1359.471	-2702.00	651.00	1260.00	2200.50	4342.00
	TNFα	플루아릭스	18	803.39	915.838	32.00	231.00	533.00	936.00	3892.00
		Flu AS03	36	1078.28	1029.122	-1816.00	446.00	983.00	1836.00	3310.00
A/뉴 칼레도니아	모두 이중	플루아릭스	18	481.44	381.534	-241.00	282.00	448.50	598.00	1412.00
		Flu AS03	36	812.78	749.192	-828.00	215.50	911.50	1274.50	3206.00
	CD40L	플루아릭스	18	450.78	360.378	-239.00	291.00	447.00	580.00	1248.00
		Flu AS03	36	783.75	711.608	-760.00	242.00	808.00	1161.00	3050.00
	IFNγ	플루아릭스	18	316.28	279.662	-165.00	175.00	259.00	387.00	1111.00
		Flu AS03	36	438.22	420.770	-685.00	125.00	393.00	733.50	1557.00
	IL2	플루아릭스	18	326.06	290.792	-294.00	193.00	330.00	488.00	834.00
		Flu AS03	36	634.72	616.478	-557.00	179.50	678.50	952.00	2602.00
	TNFα	플루아릭스	18	316.44	372.492	-140.00	50.00	278.00	542.00	1449.00
		Flu AS03	36	449.17	591.796	-916.00	100.50	343.50	848.00	2452.00
A/ 와이오밍	모두 이중	플루아릭스	18	609.56	559.396	-176.00	257.00	510.50	957.00	1998.00
		Flu AS03	36	766.61	579.191	-568.00	316.00	864.50	1221.00	1662.00
	CD40L	플루아릭스	18	616.33	550.853	-176.00	274.00	488.00	939.00	2017.00
		Flu AS03	36	728.61	570.316	-670.00	260.00	789.50	1216.00	1675.00
	IFNγ	플루아릭스	18	407.06	424.758	-311.00	129.00	370.50	723.00	1372.00

<800>

		Flu AS03	36	526.72	443.938	-770.00	219.00	556.50	776.00	1342.00
	IL2	플루아릭스	18	495.83	503.805	-187.00	88.00	540.50	801.00	1841.00
		Flu AS03	36	572.89	533.728	-789.00	220.00	602.00	882.50	1512.00
	TNFα	플루아릭스	18	424.56	485.591	-260.00	110.00	359.50	461.00	1718.00
		Flu AS03	36	550.58	538.461	-765.00	269.50	543.50	905.50	1678.00
B/지앙수	모두 이중	플루아릭스	18	698.44	793.119	-306.00	233.00	433.00	961.00	2822.00
		Flu AS03	36	861.42	688.852	-223.00	339.00	745.00	1325.50	2284.00
	CD40L	플루아릭스	18	678.39	777.259	-206.00	227.00	401.50	962.00	2878.00
		Flu AS03	36	825.89	674.879	-223.00	305.00	722.00	1282.00	2337.00
	IFNγ	플루아릭스	18	431.72	489.912	-95.00	191.00	272.50	382.00	1712.00
		Flu AS03	36	615.94	473.543	-286.00	288.50	501.50	897.50	1740.00
	IL2	플루아릭스	18	552.50	666.853	-234.00	155.00	278.50	833.00	2386.00
		Flu AS03	36	696.19	622.931	-359.00	207.50	540.50	1146.50	2182.00
	TNFα	플루아릭스	18	441.39	695.792	-338.00	97.00	269.50	564.00	2440.00
		Flu AS03	36	500.03	448.636	-166.00	107.50	436.00	745.00	1626.00

<801>

<802> SD = 표준편차

<803> Min, Max = 최소, 최대

<804> Q1 = 일사분위

<805> Q3 = 삼사분위

<806> N= 이용 가능한 결과로 시험된 대상자 수

<807> 백신-유도된 CD4 T-세포는 적어도 1년 동안 지속될 수 있는 것으로 밝혀졌으며, 그 이유는 전년도에 플루아릭스/AS03으로 백신 접종된 대상자에 비해서 플루아릭스로 백신 접종된 대상자들 사이에 CD4 T-세포 반응의 백신 접종전 수준에서 관찰 가능한 차이가 존재하기 때문이다. 결과가 또한 재백신 접종 전후의 스플리트 Flu 항원에 대한 CD4 T-세포 반응을 나타내고 있는 도 8에 도시되어 있다. D0는 첫해 백신 접종 12개월 후에 상응하며, 따라서, 지속성을 나타내고 있다. 백신 접종 후 윌콕슨 시험에 의한 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, 거의 모든 p-값은 0.05 미만이고, FluAS03 그룹에 우호적인 통계적 유의(표 23 참조)수준으로 여겨졌다.

<808> **표 23. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(전체 백신접종된 코호트)에 대한 21일째에서의 두 백신 그룹 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험(Wilcoxon rank-sum test)으로부터의 p-값**

시토카인	P-값			
	푸울	뉴칼레도니아	와이오밍	지앙수
모두 이중	0.0014	0.0023	0.0286	0.0133
CD40L	0.0016	0.0014	0.0427	0.0155
INFγ	0.0006	0.0366	0.0400	0.0041
IL2	0.0037	0.0024	0.0584	0.0162
TNFα	0.0031	0.0103	0.0918	0.0114

<809>

<810> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메터 과정).

<811> 윌콕슨 시험에 의해서 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD4-T-림프구 반응의 빈도에서의 개별적인 차이(접종후-접종전)의 차이를 비교하면, p-값은 0.05 미만이고 하기 항원-시토카인 조합에 대해서 발생되는 통계적 유의수준으로 여겨졌다: 푸울 flu-모두 이중, 푸울(pool) flu-IFNγ 및 FluAS03 그룹에 선호적인 지앙수-IFNγ (표 24).

<812> **표 24. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(전체 백신 접종된 코호트)에 대한 백신 접종후(21일째)와 백신 접종전(0일째) 사이의 차이에 대한 차이그룹 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험에 의해서 계산된 p-값**

시토카인	P-값			
	푸울	뉴칼레도니아	와이오밍	지앙수
모두 이중	0.0435	0.1124	0.2189	0.3085
CD40L	0.0638	0.0781	0.2831	0.2872
INFγ	0.0290	0.3589	0.2553	0.0435
IL2	0.1024	0.0563	0.3986	0.0435
TNFα	0.0693	0.4090	0.1232	0.3129

<813>

<814> P-값: 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메터 과정).

<815> IV.3.2. 항원 특이적 CD8 T-림프구

<816> 반응에서 항원 특이적 CD8 T-림프구 분비 빈도가, CD4 T 세포 반응에 관해서 수행된 과정과 유사하게, 각각의 항원, 각각의 시토카인, 각각의 백신 그룹 및 각각의 시점(백신 접종 전후)에서 기술통계에 의해서 요약되었다.

<817> 백신 접종 후에 윌콕슨 시험에 의해서 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD8 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, p-값은 0.05 초과이고 통계적 유의수준으로 여겨지지 않았다. 윌콕슨 시험에 의해서 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD8-T-림프구 반응의 빈도에서의 개별적인 차이(접종후-접종전)의 차이를 비교하면, 모든 p-값은 0.05 초과이고 통계적 유의수준으로 여겨지지 않았다.

<818> IV.3.3. 운동학적 분석 : 백신 접종전(2003년 첫 번째 백신 접종 1년 후)에서의 면역반응

<819> 백신 접종전에서의 반응에서 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비의 빈도를 표 25에서 각각의 사이토가인에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 및 두 연구 각각에 대해서, 표 27에 두 연구 각각에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 기술통계에 의해서 요약되었다. 추리 통계가 표 26 및 표 28에 기재되어 있다.

<820> **표 25. 특이적 CD4 T-림프루 반응 백신접종(운동학적)에 대한 백신 접종전(0일)에 대한 기술 통계**

시토카인	그룹	연구	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
모두 이중	Flu AS03	EXPLO 001	36	2000.86	1783.474	102.00	911.50	1461.50	2791.00	9514.00
		EXPLO 002	36	2028.28	1427.000	55.00	1190.50	1647.50	2575.00	7214.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	2152.87	2162.463	747.00	930.00	1354.00	2101.00	7868.00
		EXPLO 002	15	1587.07	2123.841	192.00	468.00	735.00	1578.00	8536.00
CD40L	Flu AS03	EXPLO 001	35	1946.66	1771.102	120.00	837.00	1340.00	2819.00	9462.00
		EXPLO 002	35	1992.20	1440.721	77.00	1125.00	1590.00	2587.00	7286.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	2094.93	2076.632	745.00	902.00	1340.00	2077.00	7385.00
		EXPLO 002	15	1561.73	2097.201	34.00	475.00	672.00	1579.00	8428.00
INFγ	Flu AS03	EXPLO 001	35	1068.63	1030.745	91.00	448.00	790.00	1503.00	5425.00
		EXPLO 002	35	1259.23	890.590	312.00	725.00	984.00	1354.00	4146.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	1248.07	1452.459	320.00	388.00	778.00	1227.00	5431.00
		EXPLO 002	15	974.80	1394.044	52.00	252.00	337.00	1057.00	5576.00
IL2	Flu AS03	EXPLO 001	35	1690.20	1524.689	37.00	688.00	1211.00	2416.00	8235.00
		EXPLO 002	35	1883.60	1361.337	14.00	1068.00	1413.00	2370.00	6891.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	1888.40	2085.857	568.00	715.00	1136.00	1770.00	7403.00
		EXPLO 002	15	1493.93	2037.139	58.00	444.00	755.00	1485.00	8193.00
TNFα	Flu AS03	EXPLO 001	35	1174.74	1119.633	55.00	466.00	795.00	1720.00	5415.00
		EXPLO 002	35	1545.40	1159.490	135.00	831.00	1203.00	1857.00	5354.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	1444.20	1946.211	201.00	520.00	688.00	1254.00	7213.00
		EXPLO 002	15	1304.73	1759.716	144.00	316.00	824.00	1171.00	7056.00

<821>

<822> SD = 표준편차

<823> Min, Max = 최소, 최대

<824> Q1 = 일사분위

<825> Q3 = 삼사분위

<826> N= 이용 가능한 결과로 시험된 대상자 수

<827> 각각의 백신 그룹에 대한 윌콕슨 시험에 의해서 2 연구 사이의 항원-특이적 CD8 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, p-값은 0.05 미만이고 FluAS03 그룹에 대해서 및 TNFα 시토카인(표 26 참조)으로만 발생된 통계적 유의수준(Explo-Flu-002의 선호적)으로 여겨졌다.

<828> **표 26. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(운동학적)에 대한 0일째에서의 상이한 연구 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험으로부터의 p-값**

시토카인	그룹	p-값
모두 이중	FluAS03	0.5209
	플루아릭스	0.0712
CD40L	FluAS03	0.4957
	플루아릭스	0.0744
INFγ	FluAS03	0.0896
	플루아릭스	0.1103
IL2	FluAS03	0.1903
	플루아릭스	0.1647
TNFα	FluAS03	0.0427
	플루아릭스	0.5476

<829>

<830> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메터 과정).

<831> **표 27. 특이적 CD4 T-림프구 반응 백신접종(운동학적)에 대한 백신 접종전(0일)에 대한 기술통계**

시토카인	연구	그룹	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
모두 이중	EXPLO 001	Flu AS03	36	2000.86	1783.474	102.00	911.50	1461.50	2791.00	9514.00
		플루아릭스	15	2152.87	2162.463	747.00	930.00	1354.00	2101.00	7868.00
	EXPLO 002	Flu AS03	36	2028.28	1427.000	55.00	1190.50	1647.50	2575.00	7214.00
		플루아릭스	15	1587.07	2123.841	192.00	468.00	735.00	1578.00	8536.00
CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	35	1946.66	1771.102	120.00	837.00	1340.00	2819.00	9462.00
		플루아릭스	15	2094.93	2076.632	745.00	902.00	1340.00	2077.00	7385.00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1992.20	1440.721	77.00	1125.00	1590.00	2587.00	7286.00
		플루아릭스	15	1561.73	2097.201	34.00	475.00	672.00	1579.00	8428.00
INFγ	EXPLO 001	Flu AS03	35	1068.63	1030.745	91.00	448.00	790.00	1503.00	5425.00
		플루아릭스	15	1248.07	1452.459	320.00	388.00	778.00	1227.00	5431.00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1259.23	890.590	312.00	725.00	984.00	1354.00	4146.00
		플루아릭스	15	974.80	1394.044	52.00	252.00	337.00	1057.00	5576.00
IL2	EXPLO 001	Flu AS03	35	1690.20	1524.689	37.00	688.00	1211.00	2416.00	8235.00
		플루아릭스	15	1888.40	2085.857	568.00	715.00	1136.00	1770.00	7403.00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1883.60	1361.337	14.00	1068.00	1413.00	2370.00	6891.00
		플루아릭스	15	1493.93	2037.139	58.00	444.00	755.00	1485.00	8193.00
TNFα	EXPLO 001	Flu AS03	35	1174.74	1119.633	55.00	466.00	795.00	1720.00	5415.00
		플루아릭스	15	1444.20	1946.211	201.00	520.00	688.00	1254.00	7213.00

<832>

	EXPLO 002	Flu AS03	35	1545.40	1159.490	135.00	831.00	1203.00	1857.00	5354.00
		플루아릭스	15	1304.73	1759.716	144.00	316.00	824.00	1171.00	7056.00

<833>

<834> SD = 표준편차

<835> Min, Max = 최소, 최대

<836> Q1 = 일사분위

<837> Q3 = 삼사분위

<838> N= 이용 가능한 결과로 시험된 대상자의 수

<839> 각각의 연구에 대한 윌콕슨 시험에 의해서 2 백신 그룹 사이의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, Explo-Flu-002에 대한 모든 p-값은 0.05 미만이고 통계적 유의수준(FluAS03를 선호)으로 여겨졌다(표 28 참조).

<840> **표 28. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(운동학적)에 대한 21일째에서의 상이한 그룹 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험으로부터의 p-값**

시토카인	연구	p-값
모두 이중	Explo Flu 001	0.9423
	Explo Flu 002	0.0300
CD40L	Explo Flu 001	0.8989
	Explo Flu 002	0.0361
INFγ	Explo Flu 001	0.8738
	Explo Flu 002	0.0121
IL2	Explo Flu 001	0.9747
	Explo Flu 002	0.0216
TNFα	Explo Flu 001	0.9916
	Explo Flu 002	0.0514

<841>

<842> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메터 과정).

<843> IV.3.4. 운동학적 분석 : 백신 접종후 마이너스 백신 접종전에서의 면역반응

<844> (백신 접종후-전) 시점에서의 반응에서 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비의 빈도를 표 29에서 각각의 시토카인에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 및 각각의 연구에 대해서, 표 31에 각각의 연구에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 기술통계에 의해서 요약되었다. 추리 통계가 표 30 및 표 32에 기재되어 있다.

<845> 표 29. 특이적 CD4 T-림프구 반응 백신접종(동적)에 대한 백신접종후(21일)와 백신접종전(0일)의 차이에 대한 기술통계

시토카인	군	연구	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
All double	Flu AS03	EXPLO 001	34	4837.56	4476.129	-609.00	1888.00	3483.50	8148.00	19555.00
		EXPLO 002	34	1737.79	1450.177	-2379.00	936.00	1664.50	2743.00	4669.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	3103.53	3726.645	436.00	800.00	2283.00	3226.00	15169.00
		EXPLO 002	15	1369.00	1127.784	197.00	725.00	869.00	1808.00	4676.00
CD40L	Flu AS03	EXPLO 001	33	4819.06	4489.788	-718.00	1799.00	3479.00	8288.00	19480.00
		EXPLO 002	33	1694.73	1431.082	-2359.00	921.00	1659.00	2662.00	4575.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	3090.00	3684.759	477.00	822.00	2189.00	3208.00	15021.00
		EXPLO 002	15	1360.93	1131.051	243.00	725.00	860.00	1687.00	4743.00
IFNγ	Flu AS03	EXPLO 001	33	3127.09	2974.067	-453.00	1325.00	1721.00	5162.00	13296.00
		EXPLO 002	33	1167.85	893.363	-817.00	633.00	1207.00	1803.00	2831.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1660.13	1834.023	-84.00	480.00	1386.00	2284.00	7120.00
		EXPLO 002	15	851.87	859.585	148.00	294.00	501.00	1222.00	3564.00
IL2	Flu AS03	EXPLO 001	33	3950.18	3878.538	-358.00	1309.00	2780.00	6635.00	16988.00
		EXPLO 002	33	1404.67	1355.665	-2702.00	719.00	1341.00	2109.00	4342.00

<846>

	Fluarix	EXPLO 001	15	2413.87	3027.392	263.00	674.00	1672.00	2425.00	12273.00
		EXPLO 002	15	1117.80	975.934	-258.00	575.00	714.00	1618.00	3850.00
TNFα	Flu AS03	EXPLO 001	33	2627.36	2574.458	-825.00	862.00	1475.00	4764.00	9267.00
		EXPLO 002	33	1072.36	1044.140	-1816.00	447.00	1000.00	1752.00	3310.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1460.53	3115.174	-1586.00	251.00	813.00	1314.00	12275.00
		EXPLO 002	15	904.67	974.958	32.00	338.00	752.00	965.00	3892.00

SD = 표준편차
Min, Max = 최소값, 최대값
Q1 = 1/4
Q3 = 3/4
N= 유효한 결과로 시험된 피검체의 수

<847>

<848> 각 백신 군에 대해 윌콕슨 시험(Wilcoxon test)의 2개의 연구 간의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이를 비교하면, FluAS03 군에 대한 모든 p-값은 0.05 미만이었고, (Explo-Flu-001에 대하여) 통계적으로 유의한 것으로 여겨졌다(표 30 참조.)

<849> 표 30. 백신접종후(21일)와 백신접종전(0일)의 차이에 대한 추정 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(동적)에 대한 21일에 상이한 연구 간의 윌콕슨 순위합 검정으로부터의 p-값

시토카인	군	p-값
모두 더블 (all double)	FluAS03	0.0005
	Fluarix	0.1300
CD40L	FluAS03	0.0007
	Fluarix	0.0890
INFγ	FluAS03	0.0012
	Fluarix	0.1103
IL2	FluAS03	0.0025
	Fluarix	0.1409
TNFα	FluAS03	0.0327
	Fluarix	0.6936

<850>

<851> p-값: 21일에 2개 군 간의 위치 차이(윌콕슨 순위합 검정)을 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메터 과정).

<852> 표 31. 특이적 CD4 T-림프구 반응 백신접종(동적)에 대한 백신접종후(21일)와 백신접종전(0일)의 차이에 대한 기술통계

시토카인	시험	군	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
모두 더블	EXPLO 001	Flu AS03	34	4837.56	4476.129	-609.00	1888.00	3483.50	8148.00	19555.00
		Fluarix	15	3103.53	3726.645	436.00	800.00	2283.00	3226.00	15169.00
	EXPLO 002	Flu AS03	34	1737.79	1450.177	-2379.00	936.00	1664.50	2743.00	4669.00
		Fluarix	15	1369.00	1127.784	197.00	725.00	869.00	1808.00	4676.00
CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	33	4819.06	4489.788	-718.00	1799.00	3479.00	8288.00	19480.00
		Fluarix	15	3090.00	3684.759	477.00	822.00	2189.00	3208.00	15021.00

<853>

	EXPLO 002	Flu AS03	33	1694.73	1431.082	-2359.00	921.00	1659.00	2662.00	4575.00
		Fluarix	15	1360.93	1131.051	243.00	725.00	860.00	1687.00	4743.00
IFNγ	EXPLO 001	Flu AS03	33	3127.09	2974.067	-453.00	1325.00	1721.00	5162.00	13296.00
		Fluarix	15	1660.13	1834.023	-84.00	480.00	1386.00	2284.00	7120.00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1167.85	893.363	-817.00	633.00	1207.00	1803.00	2831.00
		Fluarix	15	851.87	859.585	148.00	294.00	501.00	1222.00	3564.00
IL2	EXPLO 001	Flu AS03	33	3950.18	3878.538	-358.00	1309.00	2780.00	6635.00	16988.00
		Fluarix	15	2413.87	3027.392	263.00	674.00	1672.00	2425.00	12273.00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1404.67	1355.665	-2702.00	719.00	1341.00	2109.00	4342.00
		Fluarix	15	1117.80	975.934	-258.00	575.00	714.00	1618.00	3850.00
TFNα	EXPLO 001	Flu AS03	33	2627.36	2574.458	-825.00	862.00	1475.00	4764.00	9267.00
		Fluarix	15	1460.53	3115.174	-1586.00	251.00	813.00	1314.00	12275.00
	EXPLO 002	Flu AS03	33	1072.36	1044.140	-1816.00	447.00	1000.00	1752.00	3310.00
		Fluarix	15	904.67	974.958	32.00	338.00	752.00	965.00	3892.00

SD = 표준편차
Min, Max = 최소값, 최대값
Q1 = 1/4
Q3 = 3/4
N= 유효한 결과로 시험된 피검체의 수

<854>

<855> 각 연구에 대해 윌콕슨 시험(Wilcoxon test)의 2개의 연구 간의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이를 비교하면, Explo-Flu-001에 대한 p-값만이 0.05 미만이었고, (FluAS03에 대하여) 통계적으로 유의한 것으로 여겨졌다(표 32 참조.)

<856> 표 32. 추정 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(동적)에 대한 21일에 상이한 연구 간의 윌콕슨 순위합 검정으로부터의 p-값

시토카인	연구	p-값
모두 더블	Explo Flu 001	0.0827
	Explo Flu 002	0.0992
CD40L	Explo Flu 001	0.0931
	Explo Flu 002	0.1391
INFγ	Explo Flu 001	0.0543
	Explo Flu 002	0.1068
IL2	Explo Flu 001	0.0847
	Explo Flu 002	0.2254
TNFα	Explo Flu 001	0.0375
	Explo Flu 002	0.2009

<857>

<858> p-값: 21일에 2개 군 간의 위치 차이(윌콕슨 순위합 검정)을 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메타 과정).

<859> **IV.4. HI 역가**

<860> 결과를 도 9 및 표 33 내지 36에 나타내었다.

<861> 표 33: 기하평균 역가(GMT) 및 항-HI 역가의 혈청반응양성율(백신접종된 피검체에 대해 계산된 GMT)

항체	군	시점	N	S+	%	95% CI		GMT	95%CI	
						L.L.	U.L.		L.L.	U.L.
뉴 칼레도니아	Fluarix	PRE	18	17	94.4	72.6	99.9	63.5	38.1	105.9
		PI(D21)	18	18	100	81.5	100	131.9	77.1	225.6
	FluAS03	PRE	40	39	97.5	86.8	99.9	70.3	50.5	97.7
		PI(D21)	40	40	100	91.3	100	218.6	158.2	302.0
A/후지안	Fluarix	PRE	18	18	100	81.5	100	95.0	51.0	176.9
		PI(D21)	18	18	100	81.5	100	498.3	272.1	912.7
	FluAS03	PRE	40	40	100	91.3	100	94.3	71.4	124.6
		PI(D21)	40	40	100	91.3	100	735.1	564.4	957.5
B/상하이	Fluarix	PRE	18	16	88.9	65.3	98.6	23.3	15.2	35.8
		PI(D21)	18	17	94.4	72.6	99.9	139.8	64.0	305.0
	FluAS03	PRE	40	38	95.0	83.1	99.4	58.6	43.9	78.1
		PI(D21)	40	40	100	91.3	100	364.4	269.7	492.4

PRE= 백신접종전
PI(D21)= 백신접종하고 21일 후
95%CI, LL, 및 UL = 95% 신뢰 구간, 최소치 및 최대치
S+= 혈청반응 양성 피검체의 수

<862>

<863> 표 34: 항-HI 역가의 전환 인자(모든 백신접종된 피검체)

군	A/N- 칼레도니아		A/후지안		B/상하이	
	N	GMR [95 % CI]	N	GMR [95 % CI]	N	GMR [95 % CI]
Fluarix	18	2.1 [1.4;3.2]	18	5.2 [3.0;9.3]	18	6.0 [3.5;10.2]
FluAS03	40	3.1 [2.4;4.0]	40	7.8 [5.6;10.9]	40	6.2 [4.7;8.2]

N = 피검체의 전체 수
GMR = 기하급수적 평균 비(평균 log 21일/0일 역가 비의 역대수)
95%CI = 95% 신뢰 구간

<864>

<865> 표 35: 항-HI 역가의 혈청방어율(모든 백신접종된 피검체)

항체	군	시점	N	>=40			
				n	%	95 % CI	
A/뉴 칼레도니아	Fluarix	PRE	18	14	77.8	52.4	93.6
		PI(D21)	18	16	88.9	65.3	98.6
	FluAS03	PRE	40	32	80	64.4	90.9
		PI(D21)	40	39	97.5	86.8	99.9
A/후지안	Fluarix	PRE	18	14	77.8	52.4	93.6
		PI(D21)	18	18	100	81.5	100
	FluAS03	PRE	40	36	90	76.3	97.2
		PI(D21)	40	40	100	91.2	100
B/상하이	Fluarix	PRE	18	6	33.3	13.3	59.0

<866>

		PI(D21)	18	14	77.8	52.4	93.6
	FluAS03	PRE	40	34	85	70.2	94.3
		PI(D21)	40	40	100	91.2	100

PRE= 백신접종전
PI(D21)= 백신접종하고 21일 후
N = 유효한 결과를 갖는 피검체의 수
n = 특정된 범위내에서 역가를 지닌 피검체의 수
% = 특정된 범위내에서 역가를 지닌 피검체의 퍼센트

<867>

<868> 표 36: PI 21일에서 혈청전환율(배수증가=4)(모든 백신접종된 피검체)

항체	백신군	N	반응군			
			n	%	95% CI	
					LL	UL
A/뉴 칼레도니아	Fluarix	18	3	16.7	3.6	41.5
	FluAS03	40	19	47.5	31.5	63.9
A/후지앙	Fluarix	18	13	72.2	46.5	90.3
	FluAS03	40	34	85.0	70.2	94.3
B/상하이	Fluarix	18	12	66.7	41.0	86.7
	FluAS03	40	31	77.5	61.5	89.2

N = 백신접종전 및 백신접종후 모두 유효한 결과를 갖는 피검체의 수
n = 반응군의 수
% = 반응군의 비율(n/N X 100)
95% CI = 95% 정확 신뢰 구간; LL=하한치, UL=상한치

<869>

<870> **IV.5. 전체 결론**

<871> 이러한 임상 연구로부터, 애주번트 첨가된 백신 Flu-AS03이 인플루엔자 특이적 CD4 T 세포의 빈도 및 재백신접종 연구의 D0(Explo Flu 002, 즉 +/- 1년 후)까지 일차 Flu-AS03 백신접종(Explo Flu 001의 일차 백신접종)으로 유도되는 면역반응의 지속성의 측면에서 균등한 애주번트 비첨가된 백신 Fluarix에 비해 우수함을 확인하였다. 더욱이, 이러한 반응은 신규한 백신에 존재하는 드리프팅된 인플루엔자 균주를 인식하고 2004 인플루엔자 백신의 균주를 인식할 수 있다.

<872> 백신접종 첫해와 대비하여, 재백신접종시에 종래 애주번트 첨가된 Fluarix™으로 백신접종된 개체는 애주번트 비첨가된 Fluarix™로 백신접종된 개체와 비교하여 증가된 HI 역가 반응성을 나타내었다. 관찰가능한 경향으로는 H1N1 및 H3N2 균주에 대해 지시된 HI 역가가 1.5배 내지 2배로 증가하는 것으로 나타나며, B 균주에 대해 지시된 HI 역가가 증명된 통계학적 증가를 나타내었다.

<873> **실시예 V - 흰족제비에서 애주번트 첨가되고 애주번트 비첨가된 인플루엔자 백신의 임상전 평가**

<874> **제 1 연구 - 신규한 제형 AS03 및 AS03+MPL의 효능**

<875> V.1. 원리 및 목적

<876> 흰족제비 모델의 인플루엔자 감염은 감염 및 임상 반응에 대한 민감성 모두와 관련하여 사람 인플루엔자와 매우 유사하다.

<877> 흰족제비는 바이러스 균주의 사전개조 없이 인플루엔자 A 및 B 모두로의 감염에 대해 매우 민감하다. 그러므로, 이는 투여된 인플루엔자 백신에 의해 부여되는 방어 연구에 대한 우수한 모델 시스템을 제공한다.

<878> 이러한 연구는 동종 균주로 2차 투여된(challenged) 흰족제비의 비강 분비의 질환 증상(체온) 및 바이러스 발산을 감소시키기 위한 애주번트 첨가되거나 애주번트 비첨가된 다양한 3가 스플리트 백신의 효능을 평가하였다.

<879> 이러한 실험의 목적은 플레인(plain, 애주번트 비첨가된) 백신과 비교하여 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 효능을 나타내기 위한 것이다.

<880> 종점은 하기와 같다:

<881> 1) 제 1 종점: 동종 2차 투여 후 세척액 중 바이러스 발산의 감소:

<882> 2) 제 2 종점: IHA로 체액 반응의 분석 및 1차 투여(priming) 및 2차 투여에서의 온도의 모니터링.

<883> **V.2. 실험적 디자인**

<884> V.2.1. 처리/군(표 37)

<885> 14주령 내지 20 주령의 암컷 흰족제비(*Mustela putorius furo*)(6 마리 흰족제비/군)를 MISAY 컨설트사(Hampshire, UK)로부터 입수하였다. 0일에 흰족제비에 이종서브타입 균주 H1N1 A/스톡홀름/24/90(4 Log $TCID_{50}$/ml)로 1차 투여하였다. 21일째에, 흰족제비에 전체 사람 용량(500 ㎍ 백신 용량, 15 ㎍ HA/균주)의 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99 및 B/상동/7/97의 조합물을 근육내로 주사하였다. 이후 41일째에 흰족제비를 동종타입 균주 H3N2 A/파나마/2007/99(4.51 Log $TCID_{50}$/ml)로 비강내 경로로 2차 투여하였

다.

<886> 표 37

<887>

군	항원(들)+투약	포뮬레이션+ 투약	코멘트 (스케쥴/경로 /면역성시험)	다른 처리
1	3가	전체 HD: 15μg	IM; 21일	H1N1 1차투여
	플레인	HA/ 균주		(A/ 스톡홀름/24 /90) 0일
2	3가 AS03	전체 HD: 15μg HA/ 균주	IM; 21일	H1N1 1차투여 (A/스톡홀름/24/90) 0일
3	3가 AS03+MPL	전체 HD: 15μg HA/ 균주	IM; 21일	H1N1 1차투여 (A/스톡홀름/24/90) 0일
4	PBS		IM; 21일	H1N1 1차투여 (A/스톡홀름/24/90) 0일

<888>

<889> V.2.2. 백신 제형의 제조

<890> *제형 1: 3가 플레인(애주번트 비첨가된) 제형(500 ㎕):*

<891> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4), 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 ㎍ 트윈 80, 110 ㎍ 트리톤 X-100 및 100 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 ㎍의 B 균주를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 순서대로 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<892> *제형 2: AS03으로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 인플루엔자(500 ㎕):*

<893> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 ㎍ 트윈 80, 110 ㎍ 트리톤 X-100 및 100 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 ㎍의 B 균주를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 순서대로 첨가하였다. 15 분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 SB62 에멀젼(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<894> *제형 3: AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 인플루엔자(500 ㎕):*

<895> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 ㎍ 트윈 80, 110 ㎍ 트리톤 X-100 및 100 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 ㎍의 B 균주를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 순서대로 첨가하였다. 15 분 동안 교반한 후, 250 ㎍의 SB62 에멀젼(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 혼합물을 다시 15분 동안 교반하고, 실시예 II.3.1.에 상세히 기술된 바와 같이 제조된 현탁액으로부터의 25 ㎍의 MPL을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<896> 주의: 각 제형에서, 10배 농축된 PBS를 첨가하여 등장도에 도달시키고 최종 부피에서 1배 농축된다. H2O 부피를 타겟화된 부피에 도달하도록 계산한다.

<897> V.2.3. 기록(표 38)

<898> 표 38

기록	시점	샘플-타입	I/P	분석법
바이러스 발산	D-1내지D+7 1차 투여후 D-1내지D+5 2차 투여후	비강 세척물	In	적정
T° 모니터링	D-1내지D+3 1차 투여후 D-2내지D+3 2차 투여후	복막공동에 임플란트	In	원격측정법
IHA	1차투여 전, 후, 면역화 후, 2차 투여후	혈청	In	IHA

In= 개체 / Po= 풀

<899>

<900> **V.3. 결과**

<901> 결과의 개략적 설명을 도 10 및 도 11에 제공하였다.

<902> V.3.1. 온도 모니터링

<903> 개별적인 온도를 발신기 및 원격측정 기록기로 모니터링하였다(I.2.2에서 상세히 설명된 과정에 따름). 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닦고, 신규한 측정을 복막내 공동에 배치되기 전에 DSI로 수행하였다. 모든 동물을 이들 측정동안 단일 케이지에 개별적으로 사육하였다.

<904> 온도를 2차 투여 전 3일 부터 2차 투여 후 5일까지 매 15분 마다 모니터링하고, 평균을 정오에 계산하였다. 기준선 체온에 대한 기준선으로부터의 결과는 도 10A(-1 내지 +3일의 결과를 나타냄) 및 10B(-2 내지 +3의 결과를 나타냄)에 나타내었다.

<905> 2차 투여후에, 체온의 피크는 3가 스플리트 플레인 또는 PBS로 면역시킨 후에만 관찰되었다. AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트로 면역시킨 후에는 어떠한 피크도 관찰되지 않았다.

<906> V.3.2. 바이러스 발산(도 11)

<907> 세척액의 바이러스 적정을 군 당 6마리에서 수행하였다. 비강 세척을 깨어있는 동물의 양쪽 콧구멍에 5 ml의 PBS를 투여하여 수행하였다. 접종을 페트리(Petri) 접시에서 수집하고, -80℃(드라이 아이스)에서 샘플 용기에 배치시켰다.

<908> 모든 비강 샘플을 먼저 스핀 X 필터(Costar)를 통해 멸균 여과하여 임의의 박테리아 오염물을 제거하였다. 50 ㎕의 세척액의 일련의 10배 희석액을 50 ㎕의 매질을 함유한 마이크로역가 플레이트에 옮겼다(10 웰/희석액). 이후 100 ㎕의 MDCK 세포(2.4×10^5 세포/ml)를 각 웰에 첨가하고, 세포 합류가 예를 들어 5 내지 7일 동안 대조군 세포로 도달될 때까지 35℃에서 인큐베이션하였다. 6 내지 7일의 인큐베이션 후에, 배양 매질을 서서히 제거하고, 100 ㎕의 매질을 함유한 1/20 WST-1을 첨가하고 추가 18 시간 동안 인큐베이션하였다.

<909> 생존가능한 세포에 의한 WST-1의 감소하에서 생산된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정법의 말단에서 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하고, 적절한 파장(450 나노미터)에서 각 웰의 흡광도를 측정하므로써 정량한다. 컷-오프(cut-off)는 감염되지 않은 대조군 세포의 OD 평균-0.3 OD(0.3 OD는 +/-3 StDev의 비감염된 대조군 세포의 OD에 상응함)으로서 규정된다. 양의 스코어는 OD가 컷-오프 미만인 경우로 규정되며 반대로 음의 스코어는 OD가 컷-오프를 초과한 경우로 규정된다. 바이러스 발산 역가를 "Reed and Muench"로 결정되며 Log TCID50/ml로 표시된다.

<910> 보다 낮은 바이러스 발산을 3가 스플리트 플레인 또는 PBS와 비교하여, AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트로 2차 투여한 후 관찰하였다. 방어 효과는 AS03+MPL과 비교하여 AS03이 보다 약간 양호하였다(2차 투여후 2일째 참조). 통계적 유의성은 군 당 적은 수의 동물로 인해 결정되지 않았다.

<911> V.3.3. 실험의 결론

<912> 보다 높은 체액 반응(HI 역가)은 모든 3개의 균주에 대해 3가 스플리트 플레인에 비해 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플릿에서 관찰되었다(3개의 균주 중 2개, 즉 H3N2 및 B 균주에 대해 적어도 2배).

<913> AS03 및 AS03+MPL 제형은 흰족제비에서의 방어 효능의 측면에서 부가된 이익을 나타내었다(보다 낮은 바이러스

발산 및 온도)(도 10 및 11).

<914> 2차 투여후, 체역 반응이 상승하지 않음은 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트로 면역시킨 후에 관찰되었다.

<915> **제 2 연구 - 흰족제비에서의 이종타입 2차 투여 연구: 시험된 신규한 제형의 효능의 설명**

<916> **V.4. 원리 및 목적**

<917> 본 연구는 질병 증상(체온)을 감소시키기 위한 이의 능력 및 이종기원 2차 투여후에 면역화된 흰족제비의 비강 분비물에서 바이러스 발산에 대한 이의 효과에 의한 애주번트 첨가되거나 애주번트 비첨가된 다양한 3가 스플리트 백신의 효능을 조사하였다.

<918> **V.5. 실험 디자인**

<919> 14주령 내지 20주령의 암컷 흰족제비(*Mustela putorius furo*)(6마리 흰족제비/군)를 MISAY 컨설트사(Hampshire, UK)로부터 입수하였다. 하기 4개의 군을 시험하였다:

<920> * 플루아릭스(Fluarix)

<921> * 3가 스플리트 AS03

<922> * 3가 스플리트 AS03+MPL

<923> * PBS

<924> 흰족제비를 0일째에 이종서브타입 균주 H1N1 A/스톡홀름/24/90(4 Log $TCID_{50}$/ml)으로 1차 투여하였다. 21일 째에, 흰족제비를 전체 사람 용량(500 ㎍ 백신 용량, 15 ㎍ HA/균주)의 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99 및 B/상동/7/97의 조합물을 근육내로 주사하였다(17.5 ㎍ HA). 이후 흰족제비를 43일째에 이종서브타입 균주 H3N2 A/와이오밍/3/2003(4.51 Log $TCID_{50}$/ml)로 비강내 경로로 2차 투여하였다.

<925> **V.6. 결과**

<926> 결과의 개략적인 설명은 도 12 및 도 13에 제공하였다.

<927> V.6.1. 온도 모니터링

<928> 개별적인 온도를 발신기 및 원격측정 기록기로 모니터링하였다. 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닦고, 신규한 측정을 복막내 공동에 배치되기 전에 DSI로 수행하였다. 모든 동물을 이들 측정동안 단일 케이지에 개별적으로 사육하였다.

<929> 결과(도 12)는 하기와 같다:

<930> - 한개의 군에서 다른 한 군으로의 높은 변이성은 1차 투여시에 관찰되었다. 기준선은 1차 투여 후에 비해 1차 투여 전에 보다 높은 것으로 보인다.

<931> - 체온의 높은 변이성에도 불구하고, 피크는 PBS(6/6 흰족제비), 3가 스플리트 플레인(5/6 흰족제비) 및 AS03으로 애주번트 첨가된 3가 스플리트(2/6 흰족제비)로 면역된 흰족제비에서 2차 투여후에만 관찰되었다. AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트로 면역시킨 후에는 어떠한 피크도 관찰되지 않았다(0/6 흰족제비).

<932> - AS03은 열 억제의 측면에서 이종기원 균주에 대해 AS03+MPL 보다 덜 효율적인 것으로 보인다. 본 출원인은 애주번트의 차이가 2차 투여전 항체 수준에서의 수준 차이에 기인한다는 가능성으로 결론지을 수 없다.

<933> V.6.2. 바이러스 발산(도 13)

<934> 비강 세척을 깨어있는 동물의 양쪽 콧구멍에 5 ml의 PBS를 투여하여 수행하였다. 접종을 페트리(Petri) 접시에서 수집하고, -80℃(드라이 아이스)에서 샘플 용기에 배치시켰다.

<935> 모든 비강 샘플을 먼저 스핀 X 필터(Costar)를 통해 멸균 여과하여 임의의 박테리아 오염물을 제거하였다. 50 ㎕의 세척액의 일련의 10배 희석액을 50 ㎕의 매질을 함유한 마이크로역가 플레이트에 옮겼다(10 웰/희석액). 이후 100 ㎕의 MDCK 세포(2.4×10^5 세포/ml)를 각 웰에 첨가하고, 세포 합류가 예를 들어 5 내지 7일 동안 대조군 세포로 도달될 때까지 35℃에서 인큐베이션하였다. 6 내지 7일의 인큐베이션 후에, 배양 매질을 서서히 제

거하고, 100 ml의 매질을 함유한 1/20 WST-1을 첨가하고 추가 18 시간 동안 인큐베이션하였다.

<936> 생존가능한 세포에 의한 WST-1의 감소하에서 생산된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정법의 말단에서 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하고, 적절한 파장(450 나노미터)에서 각 웰의 흡광도를 측정하므로써 정량한다. 컷-오프(cut-off)는 감염되지 않은 대조군 세포의 OD 평균-0.3 OD(0.3 OD는 +/-3 StDev의 비감염된 대조군 세포의 OD에 상응함)으로서 규정된다. 양의 스코어는 OD가 컷-오프 미만인 경우로 규정되며 반대로 음의 스코어는 OD가 컷-오프를 초과한 경우로 규정된다. 바이러스 발산 역가를 "Reed and Muench"로 결정되며 Log TCID50/ml로 표시된다.

<937> *1차 투여후 바이러스 발산*

<938> 바이러스 발산을 1차 투여 전 1일에서 1차 투여후 7일까지 12마리의 흰족제비에 대해 측정하였다. 결과를 푸울(pool)로 나타내었다.

<939> 바이러스 세척은 모든 흰족제비에서 1차 투여후 7일째에 관찰되었다.

<940> *2차 투여후 바이러스 발산*

<941> 바이러스 발산을 1차 투여 전 1일에서 1차 투여후 7일까지 군당 6마리 흰족제비에 대해 측정하였다.

<942> 2차 투여후 2일째에, 통계학적으로 유의한 보다 낮은 바이러스 역가가 3가 스플리트 플레인 및 PBS로 면역된 흰족제비에 비해 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트로 면역된 흰족제비에서 관찰되었다(플레인 백신에 비해 각각 애주번트 첨가된 군 AS03/AS03+MPL의 1.25/1.22 log 및 1.67/1.64의 차이).

<943> 50일째에, 세척액에 어떠한 바이러스도 검출되지 않았다.

<944> V.6.3. 적혈구응집 억제 시험(HI 역가)(도 14A 및 B)

<945> 혈청 샘플을 1차 투여 전 1일에 수집하고, 1차 투여후 21일, 면역화후 22일, 및 2차 투여후 14일에 수집하였다.

<946> H3N2 인플루엔자 바이러스에 대한 항-적혈구응집 항체 역가(백신 및 2차 투여 균주)를 적혈구응집 억제 시험(HI)을 사용하여 결정하였다. HI 시험의 원리는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의해 닭 적혈구(RBC)의 적혈구응집을 억제하기 위한 특이적 항-인플루엔자 항체의 능력을 기초로 한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다제 용액(RDE)으로 처리하고, 비특이적 억제제를 제거하기 위해 열-비활성화시켰다. 사전처리 후에, 혈청 세포의 두배 희석액을 각 인플루엔자 균주의 4개의 적혈구응집 유닛으로 인큐베이션하였다. 닭 적혈구를 이후 첨가하고, 응집화 억제를 계수하였다. 역가를 적혈구응집을 완전하게 억제한 혈청의 가장 높은 희석의 역수로서 나타내었다. 혈청의 제 1 희석액이 1:10이기 때문에, 검출되지 않은 수준을 5와 동일한 역가로서 계수하였다.

<947> 결과:

<948> 결과를 도 14A 및 14B에 나타내었다. H3N2 A/파나마로 면역시킨 후에, 애주번트 비첨가된(플레인) 3가 스플리트 백신(Fluarix™)으로 흰족제비를 면역시킨 후 관찰된 체액 반응과 비교하여, 보다 높은 체액 반응(HI 역가)을 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 백신으로 면역시킨 흰족제비에서 관찰하였다.

<949> 유사한 HI 역가를 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 H3N2 A/파나마로 면역화된 흰족제비에서 관찰하였다.

<950> 이종기원 균주 A/와이오밍 H3N2에 대한 가교-반응성 HI 역가는 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 백신을 함유한 A/파나마 H3N2 균주로 면역시킨 후에만 관찰되었다(3가 스플리트 플레인으로 면역시킨 후에 관찰되지 않음).

<951> A/와이오밍-특이적 HI 역가의 상승은 이종기원 균주 A/와이오밍 H3N2로 면역화되고 A/와이오밍 H3N2로 2차 투여된 흰족제비에서 관찰되었다. 동종기원 2차 투여에 대해 반대로 예상된 바와 같이, 이종기원 2차 투여는 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 A/파나마 H3N2로 면역화된 흰족제비에서 A/파나마-특이적 HI 역가의 증가를 초래하였다.

<952> V.6.4. 본 실험의 결론

<953> 예상된 바와 같이, 항-H3N2 HI 역가의 상승은 동종기원 2차 투여후의 상태(상승되지 않음)와 비교하여 이종기원 면역기원 후에 관찰되었다.

<954> 그러나, 유사한 방어(바이러스 발산)는 이종기원 및 동종기원 2차 투여후에 관찰되었다.

<955> **실시예 VI - C57BI/6 1차 투여된 마우스에서 애주번트 첨가되고 애주번트 비첨가된 인플루엔자 백신의 임상전 평가**

<956> **VI.1. 실험 디자인 및 목적**

<957> 현저하게 보다 높은 CD4 T 세포 반응은 Explo-Flu-001 임상 연구(실시예 III 참조)에서, Fluarix 플레인(애주번트 비첨가된)과 비교하여 3가 Flu 스플리트 AS03에 대해 관찰되었다. 이들 두개의 군 사이의 CD8 T 세포 및 체액 반응 모두에 대한 차이는 관찰되지 않았다.

<958> 목적은 마우스에서 사람에서 관찰된 것과 유사한 CMI 반응을 유도하기 위한 기록을 선택하기 위한 것이다. 특히, 목적은 스플리트 플레인에 비해 스플리트 AS03 또는 스플리트 AS03+MPL을 사용하므로써 마우스에서 보다 높은 CMI 반응을 나타내기 위한 것이다.

<959> VI.1.1. 처리/군

<960> 6주령 내지 8주령의 암컷 C57BI/6 마우스(15 마리 마우스/군)를 Harlan Horst, Netherland로부터 입수하였다. 시험된 군은 하기와 같다:

<961> - 3가 스플리트 플레인

<962> - 3가 스플리트 AS03

<963> - 3가 스플리트 AS03+MPL

<964> - PBS

<965> 마우스를 0일째에 이종서브타입 균주(5 ㎍ HA 전체 비활성된 H1N1 A/요한스버그/82/96, H3N2 A/시드니/5/97, B/하빈/7/97)로 1차 투여하였다. 28일째에, 마우스에 1.5 ㎍ HA 3가 스플리트(A/뉴 칼레도니아/20/99, A/파나마/2007/99, B/상동/7/97) 플레인 또는 애주번트 첨가된 것으로 근육내로 주사하였다(하기 군 참조).

<966> VI.1.2. 백신 제형의 제조

<967> 각 제형에서, 10배 농축된 PBS를 등장도에 도달할때까지 첨가하고, 최종 부피로 1 배 농축하였다. H2O 부피를 타겟화된 부피에 도달할 때까지 계산하였다.

<968> *스플리트 3가 플레인(애주번트 비첨가된):*

<969> 제형 1(500 ㎕에 대한): 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 ㎍ 트윈 80, 110 ㎍ 트리톤 X-100 및 100 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<970> *수중유 에멀젼 애주번트 AS03로 애주번트 첨가된 3가 스플리트:*

<971> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 ㎍ 트윈 80, 110 ㎍ 트리톤 X-100 및 100 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 SB62 에멀젼(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<972> *AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트:*

<973> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 ㎍ 트윈 80, 110 ㎍ 트리톤 X-100 및 110 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15 분 동안 교반한 후, 250 ㎍의 SB62 에멀젼(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 혼합물을 다시 15분 동안 교반하고, 25 ㎍의 MPL을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<974> VI.I.3. 기록

<975> CMI 분석(ICS:CD4/CD8, IL-2/IFNg 염색)

<976> 1차 투여된 마우스로부터 PBMC를 면역화 후 7일 후에 수확하였다. 이를 푸울/군에서 시험하였다.

<977> **VI.2. 결과**

<978> CD4 및 CD8+ T 세포의 보다 높은 빈도 및 보다 낮은 백그라운드를 나타낸 조건을 C57BI/6 1차 투여된 마우스 및 재자극 항원으로서 1 ㎍/ml 전체 비활성화된 바이러스를 사용하여 결정하였다. 결과는 도 15(CD4 T-세포 반응) 및 도 16(CD8 T-세포 반응)에 나타내었다.

<979> 이들 조건에서, 하기를 유도할 수 있었다:

<980> ● 사람에서 관찰된 바와 같이, 스플리트 플레인과 비교하여 스플리트 AS03에 대해 보다 높은 CD4 T 세포 반응.

<981> ● 스플리트 플레인과 비교하여 스플리트 AS03+MPL에 대해 보다 높은 CD4 T 세포 반응.

<982> ● 사람에서 관찰된 바와 같이, 스플리트 플레인과 스플리트 AS03 간에 유사한 CD4 T 세포 반응.

<983> ● 스플리트 AS03 또는 스플리트 플레인과 비교하여 AS03+MPL에 대해 보다 높은 CD8 T 세포 반응 경향.

<984> **실시예 VII - 이종기원 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스에서 애주번트 첨가되고 애주번트 비첨가된 스플리트 및 서브유닛 인플루엔자 백신의 임상전 평가**

<985> **VII.1. 실험 디자인 및 목적**

<986> Explo-Flu-001 임상 연구(실시예 III 참조)에서, Fluarix 플레인(애주번트 비첨가된)에 비해 3가 Flu 스플리트 AS03에 대해 현저하게 보다 높은 CD4 T 세포 반응이 관찰되었다. 이들 두개의 군 간에 CD8 T 세포 및 체액 반응 모두에 대해 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

<987> 사람에서 관찰된 것과 유사한 면역 프로파일을 재생산하는 동물 모델을 이종기원 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스를 사용하여 개발하였다. ICS(세포내 시토카인 염색)에 대해, 재자극을 비활성화된 전체 바이러스로 수행하였다. 목적은 글락소스미스클라인에서 시판하는 스플리트 백신(Fluarix™) 대 서브유닛 백신(Chiron's vaccine)에 의해 유도된 CMI 반응, 및 AS03, 또는 AS03+MPL 또는 수중유 에멀젼 애주번트(OW)로 애주번트 첨가된 이들 백신으로 얻어진 CMI 반응을 비교하기 위한 것이다.

<988> VII.1.1. 처리/군

<989> 6주령 내지 8주령의 암컷 C57BI/6 마우스(24 마우스/군)를 Harlan Horst Netherland로부터 입수하였다. 마우스를 이종서브타입 균주(5 ㎍ HA 전체 포름알데히드 비활성화된 H1N1 A/요한스버그/82/96, H3N2 A/시드니/5/97, B/하빈/7/94)로 0일에 1차 투여하였다. 29일째에, 마우스에 1.5 ㎍ HA 3가 플레인 또는 애주번트 첨가된 스플리트(A/뉴 칼레도니아/20/99, A/와이오밍/3/2003/, B/지앙수/10/2003)으로 근육내 주사하였다(하기 표 39의 군 참조).

<990> 표 39

Gr	항원/ 제형	다른 처리
1	3가 스플리트 / Plain (애주번트 비첨가) = Fluarix™	이종기원 1차 투여 D0
2	3가 스플리트* / OW	이종기원 1차 투여 D0
3	3가 스플리트* / AS03	이종기원 1차 투여 D0
4	3가 스플리트* / AS03+MPL (용량 당2.5 µg)	이종기원 1차 투여 D0
5	Gripguard (= Fluad ™) = 수중유 에멀젼의 서브-유닛	이종기원 1차 투여 D0
6	Aggripal ™ (서브유닛) / AS03	이종기원 1차 투여 D0
7	Aggripal ™ (서브유닛) / AS03+MPL (용량 당2.5 µg)	이종기원 1차 투여 D0
8	Aggripal ™ (서브유닛) / OW**	이종기원 1차 투여 D0
9	Aggripal ™ (서브유닛)	이종기원 1차 투여 D0
10	PBS	이종기원 1차 투여 D0

* Fluarix ™

** 하기 섹션에서 설명된 바와 같이 생산된 OW

<991>

<992> VII.1.2. 백신 제형의 제조

<993> OW의 제조

<994> OW로 불리우는 수중유 에멀젼을 키론 베링 FluAd(Chiron Behring FluAd) 백신에 포함된 설명서 팜플렛에 공개된 방법에 따라 제조하였다.

<995> 주사용 물, 36.67 mg의 시트르산 및 627.4 mg의 Na 시트레이트.2H2O를 함께 혼합하고, 용량을 200 ml로 조절하였다. 470 mg의 트윈 80을 94.47 ml의 이러한 완충액과 혼합하고, 이러한 혼합물을 "용액 A"라 칭하였다. 오일 혼합물을 3.9 g의 스쿠알렌 및 470 mg의 스판 85를 자석 교반하에서 혼합하여 제조하였다. 용액 A를 이후 오일 혼합물에 첨가하고, 얻어진 최종 용량은 100 ml이었다. 이후 혼합물을 먼저 18Gx 1 1/2 니들에 통과시킨 후 두개의 샘플 중 M110S 마이크로유동화제(Microfluidics로부터 입수)에 넣어 오일 방울의 크기를 감소시켰다. 대략 150 nm의 입자 크기가 각각에 대해 얻어질 때, 2개의 샘플을 울혈시키고, 0.2 ㎛ 필터 상에서 필터하였다. 0.10의 다분산도를 갖는 143 nm의 평균치를 T0에서 울혈된 샘플에 대해 수득하였고, 0.06의 다분산도를 갖는 145 nm의 평균치는 4℃에서 4개월 저장한 후 수득하였다. 이러한 크기를 제타사이저(Zetasizer) 3000HS(Malvern으로부터 입수)를 사용하여 하기 기술 조건하에서 수득하였다:

<996> - 레이저 파장: 532 nm(Zeta3000HS).

<997> - 레이저 파워: 50 mW(Zeta3000HS).

<998> - 90° 에서 검출된 산란광(Zeta3000HS).

<999> - 온도: 25℃.

<1000> - 시간: 온화하게 자동 결정,

<1001> - 횟수: 3회 연속 측정,

<1002> - z-평균 직경: 누적 분석에 의함

<1003> *군 1에 대한 제형(1 ml에 대해):*

<1004> 최종 농도가 375 ㎍/ml 트윈 80, 55 ㎍ 트리톤 X-100 및 50 ㎍ VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1005> *군 2에 대한 제형(1 ml에 대해):*

<1006> 최종 농도가 375 ㎍/ml 트윈 80, 55 ㎍ 트리톤 X-100 및 50 ㎍ VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 OW 에멀젼을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1007> *군 3에 대한 제형(1 ml에 대해):*

<1008> 최종 농도가 375 ㎍/ml 트윈 80, 55 ㎍ 트리톤 X-100 및 50 ㎍ VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 SB62 에멀젼을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1009> *군 4에 대한 제형(1 ml에 대해):*

<1010> 최종 농도가 375 ㎍/ml 트윈 80, 55 ㎍ 트리톤 X-100 및 50 ㎍ VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 SB62 에멀젼을 첨가하였다. 혼합물을 다시 15분 동안 교반한 후 25 ㎍의 MPL을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1011> *군 5에 대한 제형: 1 ml에 대해:*

<1012> 동량의 PBS 및 FluAd™/Gripguard™(상업적 백신) 백신을 혼합하였다. 제형을 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1013> *군 6에 대한 제형: 1 ml에 대해:*

<1014> 250 ㎕의 PBS mod pH 7.4를 500 ㎕ 용량의 Aggripal™(상업적 백신)에 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 SB62를 첨가하였다(스케일-업 생산을 위한 상세한 방법론에 따라 제조됨). 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1015> *군 7에 대한 제형: 1 ml에 대해:*

<1016> PBS mod pH 7.4(최종 용량이 1 ml에 도달하도록)를 500 ㎕ 용량의 Aggripal™(상업적 백신)에 첨가하였다. 15 분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 SB62를 첨가하였다(스케일-업 생산을 위한 상세한 방법론에 따라 제조됨). 25 ㎍의 MPL을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1017> *군 8에 대한 제형: 1 ml에 대해:*

<1018> 250 ㎕의 PBS mod pH 7.4를 500 ㎕ 용량의 Aggripal™에 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 군 2에 대해 제조된 바와 같은 OW를 첨가하고, 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1019> *군 9에 대한 제형: 1 ml에 대해:*

<1020> 동량의 PBS mod pH 7.4 및 Aggripal을 혼합하였다. 제형을 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1021> VII.1.3. 기록(표 40)

<1022> CMI(ICS): 면역화 후 7일째.

<1023> IHA/중화 검정: 면역화 후 21일째.

<1024> 표 40

기록	시점	샘플 타입	I/P	분석방법
ICS (CD4,CD8, IL-2, IFN-γ)	D35	PBLs	Po	FACS 분석
체액 반응	D14, D44	혈청	In	IHA, neutra

In= 개체 / Po= 풀(Pool)

<1025>

<1026> CMI 분석(ICS: CD4/CD8; IL-2/IFN-감마 염색)

<1027> 24 마리 마우스/군으로부터의 PBMC를 면역화 후 7일째에 수확하고 푸울/군에서 시험하였다.

<1028> **VII.2. 결과**

<1029> VII.2.1. 체액 면역성

<1030> 3개의 백신 균주에 대한 적혈구응집 억제 활성을 비강내 이종기원 1차 투여후 14일 및 면역화 후 16일에 군 당 24마리의 동물로부터의 혈청에서 검출하였다.

<1031> 3개 균주 및 모든 군에 대해, HI 역가의 상승을 면역화 후에 관찰하였다.

<1032> ● 동일한 애주번트 및 3개의 균주에 대해, 유사한 HI 역가를 서브유닛 백신 및 스플리트 백신으로 유도하였다.

<1033> ● 3개의 균주에 대해 Aggripal OW과 유사한 HI 역가를 Fluad에 대해 관찰하였다.

<1034> ● H1N1 및 B 균주에 대해 Fluarix와 Aggripal 간에 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

<1035> ● 3개의 균주에 대해, 통계적으로 유의한 보다 높은 HI 역가가 Flu 백신(스플리트 또는 서브유닛)이 플레인

Flu 백신에 비교하여 MPL을 지니거나 지니지 않은 AS03으로 애주번트 첨가되는 경우 관찰되었다.

<1036> ● HI 역가는 A/와이오밍 균주에 대해 Flu 백신 플레인과 비교하여 OW로 애주번트 첨가된 Flu 백신(스플리트 또는 서브유닛)에 대해 통계학적으로 현저하게 보다 높았다.

<1037> VII.2.2. 세포-매개 면역 반응(면역화 후 7일째에 ICS)

<1038> *CD4 T 세포 반응-도 17 윗부분*

<1039> 군 당 24마리 마우스로부터의 PBMC를 면역화 후 7일째에 수확하고 하나의 푸울/군에서 시험하였다. 비활성화된 3가 전체 바이러스(1 ㎍/ml)를 재-자극 항원으로서 사용하였다. 결과를 도 17의 윗부분에 나타내었다.

<1040> Flu 전체 바이러스-특이적 CD4+ T 세포 발현 IL-2, IFN-γ 또는 두개의 시토카인의 측면에서(도 17 윗부분):

<1041> 1. GSK 애주번트는 이전에 관찰(실시예 VI)된 것과 동일한 경향을 나타내었다: AS03+MPL은 플레인 백신으로 얻어진 결과에 비해 우수한 AS03에 비해 우수하였다. 이러한 경향은 스플리트 또는 서브유닛 백신 모두에 대해 관찰되었다.

<1042> 2. 어더한 제형에서든(플레인, AS03 또는 AS03+MPL), 스플리트 백신은 서브유닛 백신에 비해 높은 CD4+ T 세포 반응을 유도하였다.

<1043> 3. Fluad(서브유닛+수중유 에멀젼 OW-제조 섹션 참조)는 Fluarix Plain과 유사한 빈도를 유도하는 것으로 보였다.

<1044> 4. 제형 3가 스플리스/AS03 또는 3가 스플리트/AS03+MPL은 제형 서브유닛/수중유 에멀젼 OW에 비해 높은 CD4+ T 세포 반응을 유도하였다.

<1045> *CD8 T 세포 반응 - 도 17 아랫부분*

<1046> 군 당 24마리 마우스로부터의 PBMC를 면역화 후 7일째에 수확하고 하나의 푸울/군에서 시험하였다. 비활성화된 3가 전체 바이러스(1 ㎍/ml)를 재-자극 항원으로서 사용하였다.

<1047> Flu 전체 바이러스-특이적 CD8+ T 세포 발현 IL-2, IFN-γ 또는 두개의 시토카인의 측면에서(도 17 아랫부분):

<1048> ● 본 실험의 컷-오프는 PBS 음성 대조군에 대해 관찰된 높은 백그라운드로 인해 비교적 높았다.

<1049> ● 그러나 보다 높은 특이적 CD8 T 세포 반응은 다른 백신 제형과 비교하여 3가 스플리트/AS03+MPL로 면역화된 마우스에 대해 관찰되었다.

<1050> **VII.3. 결과 및 결론의 요약**

<1051> 하기 결과를 얻었다:

<1052> 1) 면역화 후 7일 째에 ICS에 의해 얻어진 Flu-특이적 CD4+ T 세포는 하기를 나타내었다:

<1053> 1. Fluarix와 비교하여 유사한 반응은 Fluad에 대해 얻어졌다.

<1054> 2. 애주번트 첨가된 제형은 스플리트 인플루엔자 백신(사람에서 관찰됨) 및 서브유닛(Aggripal) 백신(사람에서 평가되지 않음) 모두에 대해 애주번트 비첨가된 백신에 비해 높은 면역 반응을 유도하였다. MPL이 보충된 수중유 에멀젼 애주번트 AS03(군 4 및 9)은 수중유 에멀젼 애주번트 AS03(군 3 및 8) 보다 높은 반응을 제공하였다.

<1055> 3. 스플리트/AS03에 비해 스플리트/AS03+MPL에 대해 보다 높은 CD4 반응의 경향을 나타내었다.

<1056> 4. 스플리트 백신에 의해 유도된 반응은 서브유닛 백신으로 얻어진 반응에 비해 우수하였다(군 1 내지 4 및 군 5 내지 9를 비교함).

<1057> 5. AS03으로 애주번트 첨가되거나 MPL로 애주번트 첨가되거나 비첨가되는지(군 3 및 4) 스플리트 백신은 Fluad(군 5) 또는 Aggripal+OW(군 7)에서 서브-유닛 백신에 비해 보다 높은 CD4+ T 세포 반응을 나타내었다.

<1058> 2) 면역화 후 7일째에 ICS에 의해 얻어진 Flu-특이적 CD8+ T 세포는 스플리트/AS3과 스플리트 플레인 간의 어떠한 차이도 관찰되지 않는 것으로 나타났다(사람에서 관찰된 바와 같음). 스플리트/AS03 또는 스플리트 플레인과 비교하여 스플리트/AS03+MPL을 사용하므로써 보다 높은 CD8+ T 세포 반응에 대한 경향을 나타내었다.

<1059> 3) 동일한 애주번트 및 3개의 균주에 대해, 유사한 HI 역가는 서브유닛 백신 및 스플리트 백신에 의해 유도되었

다. 3개의 균주에 대해, 통계학적으로 현저한 보다 높은 역가는 Flu 백신(서브유닛 또는 스플리트)이 Flu 백신 플레인과 비교하여 AS03 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 경우에 관찰되었다(A/와이오밍 균주에 대해서만 Flu 백신 OW > Flu 백신 플레인).

<1060> **실시예 VIII - 스플리트 인플루엔자 항원 제조물 및 MPL 애주번트를 지니거나 지니지 않은 AS03를 함유한 백신을 지닌 65세 이상의 노인 집단에서의 임상 시험**

<1061> **VIII.1. 연구 디자인**

<1062> Fluarix™ 백신(벨기에에서 α-Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 근육내로 투여된, 애주번트 AS03 또는 AS03+MPL을 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 반응성 및 면역성을 평가하기 위한 65세 이상의 노인 집단(≥65세)에서 상 I, 개방, 무작위, 제어된 연구.

<1063> 세가지 유사한 군을 평가하였다:

<1064> ● 일 용량의 재구성되고 AS03 애주번트 첨가된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03)

<1065> ● 일 용량의 재구성되고 Flu AS03+MPL 애주번트 첨가된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03+MPL)

<1066> ● 일 용량의 Fluarix™를 수용한 50 피검체의 일 대조군(Fluarix)

<1067> **VIII.2. 백신 조성 및 투여**

<1068> 세개의 백신에서 사용된 균주는 2004-2005 북반구 시즌에 대해 WHO에 의해 제안된 것, 즉 A/뉴 칼레도니아/20/99(H1N1), A/뉴 캘리포니아/3/2003(H3N2) 및 B/지앙수/10/2003이었다. Fluarix™/α-Rix™와 같이, 비교체로서 사용되는 상업적으로 입수가능한 백신, 애주번트 첨가된 백신(AS03 또는 AS03+MPL)은 용량 당 각 인플루엔자 바이러스 균주 중 15 ㎍ 헤마글루티닌(HA)을 함유한다.

<1069> 애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신은 투압 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원 및 애주번트(AS03 또는 AS03+MPL)를 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기로 구성된 2 성분 백신이다. 이를 실시예 II에 상세히 설명된 바와 같이 제조하였다. 애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신의 제형에서 사용된 세개의 비활성화된 스플리트 비리온 항원(일가 벌크)은 상업적인 Fluarix™/α-Rix의 제형에서 사용된 활성 성분과 정확하게 동일하다.

<1070> *AS03 애주번트 첨가된 백신:*

<1071> AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신은 타입 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원(335 ㎕)(항원 용기) 및 SB62 에멀젼을 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기(335 ㎕)(애주번트 용기)로 구성된 2 성분 백신이다. AS03 후보물질 백신의 기술 및 조성은 실시예 III에서 설명되었다.

<1072> *AS03+MPL 애주번트 첨가된 백신:*

<1073> 간단하게는, AS03+MPL-애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신은 타입 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원(335 ㎕)(항원 용기) 및 AS03+MPL 애주번트를 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기(애주번트 용기)로 구성된 2 성분 백신이다. 주사시에, 항원 용기의 내용물을 AS03+MPL 애주번트를 함유한 주사기를 사용하여 바이알로부터 제거한 후, 주사기를 온화하게 혼합하였다. 주사 전에, 사용된 니들을 근육내 니들로 바꾸고, 용량을 530 ㎕로 보정하였다. 일 용량의 재구성된 AS03+MPL-애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신은 530 ㎕이었다. 재구성된 AS03+MPL 애주번트 첨가된 백신에서 각 인플루엔자 균주에 대해 15 ㎍ HA를 수득하기 위해, 비활성화된 스플리트 비리온 항원을 항원 용기에서 Fluarix™(즉, 30 ㎍ HA/ml)에 비해 두배로(즉 60 ㎍ HA/ml) 농축하였다.

<1074> 일 용량의 재구성된 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 조성물은 인플루엔자 균주를 제외하고 표 45(실시예 XI 참조)에 기재된 것과 동일하다. 두개의 백신은 근육내로 제공되었다.

<1075> **VIII.3. CMI 목적, 종점 및 결과**

<1076> CMI 목적은 AS03, 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 제형 대 임의의 애주번트가 없는 조성물 간의 면역원성 조성물이 인플루엔자 항원으로 백신접종된 개체의 CD4- 및 CD8-매개된 면역성에 대한 가장 강력한 면역자극 활성을 갖음을 결정하기 위한 것이다.

<1077> VIII.3.1. CMI 종점 및 결과

<1078> *관찰된 변수*

<1079> 0일 및 21일에: 5개의 상이한 시토카인에서 10^6 당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도. 각 시험은 하기에 대한 CD4/CD8 T 세포의 반응을 정량화한다:

<1080> - 3개의 하기 항원의 푸울

<1081> - 뉴 칼레도니아 항원

<1082> - 와이밍 항원

<1083> - 지앙수 항원

<1084> *유도된 변수:*

<1085> 항원-특이적 CD4 및 CD8-T-세포 반응은 5개의 상이한 시험으로 표시되었다:

<1086> (a) 두개 이상의 상이한 시토카인을 생산하는 세포(CD40L, IL-2, IFNγ, TNFα)

<1087> (b) 적어도 CD40L 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, TNFα, IFNγ)

<1088> (c) 적어도 IL-2 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(CD40L, TNFα, IFNγ)

<1089> (d) 적어도 IFNγ 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, TNFα, CD40L)

<1090> (e) 적어도 TNFα 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, CD40L, IFNγ)

<1091> *CMI 반응의 분석:*

<1092> CMI 분석을 총 백식접종된 코호트(cohort)를 기초로 하였다.

<1093> (a) 각 처리군에 대하여, 반응 중 CD4/CD8 T-림프구 분비의 빈도를 각 시점(0일, 21일) 및 각 항원(뉴 칼레도니아, 와이오밍 및 지앙수) 및 용혈된 3개의 상이한 균주에 대해 결정하였다.

<1094> (b) 각 5개의 상이한 시토카인에서 각 백신접종 군 및 각 항원에 대한 시점(후-전) 반응 간에 개개 차이점의 기술 통계.

<1095> (c) 하기에 대한 5개의 상이한 시토카인과 간련한 3개 군의 비교:

<1096> - 뉴 칼레도니아, 와이오밍, 지앙수 및 3개의 균주의 푸울에 대한 CD4 T-세포 반응

<1097> - 뉴 칼레도니아, 와이오밍, 지앙수 및 3개의 균주의 푸울에 대한 CD8 T-세포 반응

<1098> (d) 비-파라메터 시험(Kruskall-Wallis 시험)을 3개의 군과 각 5개의 상이한 시토카인에서 각 항원에 대해 계산된 통계학적 p-값 간의 위치 차이를 비교하기 위해 사용하였다.

<1099> (e) 윌콕슨 시험(Wilcoxon test)을 각각의 Flu AsO3+MPL 대 Fluarix, Flu ASO3+MPL 대 Flu ASO3 및 Flu ASO3 대 Fluarix 간의 2개 군의 쌍비교를 시험하기 위해 사용하였다.

<1100> (f) 모든 중요한 시험은 2회 반복하였다. 0.05 이하의 P-값은 통계학적으로 유의한 것으로 여겨진다.

<1101> VIII.3.2. CMI 결과

<1102> 결과를 CD4 또는 CD8 T 세포 서브-집단내에서 시토카인(들)-양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로써 나타내었다.

<1103> *항원 특이적 CD4 T-림프구의 빈도*

<1104> (a) 반응에서 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비 빈도를 실시예 III에서 수행된 것과 유사하게 각 시점(0일, 21일)에서 각 백신접종군에 대해 및 각 항원(푸울, 뉴 칼레도니아, 와이오밍 및 지앙수)에 대해 결정하였다.

<1105> (b) 크루스칼-왈리스(Kruskall-Wallis) 시험에 의해 3개 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여, 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.

<1106> (c) 윌콕슨 시험에 의해 Flu ASO3+MPL과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여,

모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.

<1107> (d) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여, 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.

<1108> (e) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Flu AS03+MPL 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여, 모든 p-값은 0.05 초과이었으며, 통계학적으로 무의미한 것으로 여겨졌다.

<1109> *CD4 T-림프구의 시점(후-전) 간에 개개 차이*

<1110> (a) CD4 T-림프구 반응에서 시점(후-전) 간에 개개의 차이의 기술 통계는 실시예 III에서 이루어진 것과 유사하게, 각 백신접종 군에 대해 각각 5개의 상이한 시토카인에서 각 항원에 대해 계산되었다.

<1111> (b) 크루스칼-왈리스(Kruskall-Wallis) 시험에 의해 3개 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.001 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.

<1112> (c) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03+MPL과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.

<1113> (d) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.001 미만이었으며, 통계학적으로 매우 유의한 것으로 여겨졌다.

<1114> (e) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Flu AS03+MPL 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.05 초과이었으며, 통계학적으로 무의미한 것으로 여겨졌다.

<1115> **VIII.4. B 세포 메모리 반응 목적, 종점 및 결과**

<1116> 연구의 목적은 Flu 항원에 특이적인 메모리 B 세포의 빈도가 노인 집단에서 Fluarix를 비교하여, 애주번트 AS03+MPL 또는 AS03을 함유한 Flu 후보물질로 근육내 백신접종시에 현저하게 유도되는지의 여부를 평가하기 위한 것이다. 메모리 B 세포의 빈도는 B 세포 엘리스포트 검정법으로 평가되었다.

<1117> VIII.4.1. B 세포 메모리 반응 종점

<1118> 종점은:

<1119> (a) 0, 21일째에: 배양된 메모리 B-세포를 시험관내에서 발생시킨 세포는 혈장 세포를 생산하는 백만(10^6)의 IgG내에 특이적-항원 혈장의 빈도 측면에서 모든 피검체에서 B-세포 ELISPOST로 측정된다.

<1120> (b) 후(21일) 및 전(0일) 백신접종 간의 차이는 또한 항체 형성 세포 백만(10^6) 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된다.

<1121> VIII.4.2. B 세포 메모리 반응 결과

<1122> 항체 형성 세포 백만(10^6) 당 인플루엔자-특이적 항체 형성 세포의 빈도를 결정하였다. 결과는 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03+MPL과 Fluarix 군 간에 Flu 항원에 특이적인 메모리 B 세포의 빈도가 B/지앙수 균주에 대해 유의적인($p<0.05$) 반면 다른 두개의 균주(A 균주 뉴 칼레도니아 및 와이오밍)에 대해서는 무의미적인 것으로 나타났다.

<1123> Flu 항원에 특이적인 메모리 B 세포에서 시점(후-전) 간에 개개의 차이를 또한 결정하였다. 결과는 크루스칼-왈리스 시험에 의해 Flu AS03+MPL과 Fluarix 간에 Flu 항원에 대해 특이적인 메모리 B 세포의 빈도에서 시점(후-전) 간의 개개의 차이가 B/지앙수 균주에 대해 유의적으로 보다 높은($p<0.05$) 반면, 다른 두개의 균주(A 균주 뉴 칼레도니아 및 와이오밍)에 대해서는 무의미적인 것으로 나타났다.

<1124> 결과는 도 18에 나타내었다.

<1125> **실시예 IX - 흰족제비에서 애주번트 첨가되고 애주번트 비첨가된 인플루엔자 백신의 임상전 평가(연구 III)**

<1126> **IX.1. 원리 및 목적**

<1127> 본 연구는 애주번트 비첨가되고(Fluarix™) 또는 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 GSK 상업적 인플루엔자 3가 스플리트 백신과 두개의 다른 상업적으로 입수가능한서브-유닛 백신을 비교한 것이다:

<1128> - Fluad™, 키론스 애주번트 첨가된 서브유닛 백신(애주번트는 키론스 MF59 애주번트임),

<1129> - Agrippal™, 키론 애주번트 비첨가된 상업적 서브-유닛 백신, 이는 본 발명에서 AS03 애주번트로 애주번트 첨가된 것임.

<1130> 본 실험의 목적은 이종기원 균주로 2차 투여된 흰족제비의 비강 분비물에서 질병 증상(체온 및 바이러스 발산)을 감소시키는 이들 백신의 능력을 평가하기 위한 것이다.

<1131> 종점은 하기와 같다:

<1132> 1) 1차 종점: 이종기원 2차 투여후 세척액에서 바이러스 발산의 감소:

<1133> 2) 2차 종점: IHA에 의해 체액 반응의 분석 및 1차 투여 및 이종기원 2차 투여시에 온도를 모니터링.

<1134> **IX.2. 실험 디자인**

<1135> IX.2.1. 처리/군

<1136> 14주령 내지 20주령의 암컷 흰족제비(*Mustela putoris furo*)를 MISAY 컨설트사(Hampshire, UK)로부터 입수하였다. 흰족제비를 0일째에 비강내로 이종서브타입 균주 H1N1 A/스톡홀름/24/90(4 Log $TCID_{50}$/ml)로 1차 투여하였다. 21일째에, 흰족제비를 근육내로 전체 사람 용량(1 ml 백신 용량, 15 ㎍ HA/균주)의 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/와이오밍/3/2003 및 B/지앙수/10/2003의 조합물을 주사하였다. 이후 흰족제비를 42일째에 비강내 경로로 이종타입 균주 H3N2 A/파나마/2007/99(4.51 Log $TCID_{50}$/ml)로 2차 투여하였다. 군(6마리 흰족제비/군)을 표 41에 나타내었다. 수행된 기록을 표 42에 상세히 나타내었다.

<1137> 표 41

군	항원(들)+투약	제형 + 투약	코멘트 (예:스케쥴/ 경로/자극)	다른 처리
1	3가 플레인 (Fluarix™)	전체HD: 15μg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24 /90) 0일
2	3가 AS03+MPL	전체HD: 15μg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24 /90) 0일
3	Fluad™	전체HD: 15μg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24 /90) 0일
4	Agrippal™ AS03	전체HD: 15μg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24 /90) 0일

<1138>

<1139> IX.2.2. 백신 제형의 제조

<1140> *스플리트 3가 플레인(애주번트 비첨가된): 1 ml에 대한 제형:*

<1141> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 375 ㎍ 트윈 80, 55 ㎍ 트리톤 X-100 및 50 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 ㎍의 B 균주를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1142> *AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트: 1 ml에 대한 제형:*

<1143> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 375 ㎍ 트윈 80, 55 ㎍ 트리톤 X-100 및 50 ㎍ VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 ㎍의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 ㎕의 SB62 에멀젼(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 제형을 다시 15 분 동안 교반한 후, 25 ㎍의 MPL을 첨가하였다. 제형을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<1144> *FluAd™ 제형: 1 ml에 대한 제형:*

<1145> FluAd™ 백신의 두배 희석액을 PBS 완충액 pH 7.4에서 제조하였다.

<1146> *Agrippal™ AS03 제형: 1 ml에 대한 제형:*

<1147> 250 ㎕의 PBS 완충액 pH 7.4를 일 용량의 Aggripal™에 첨가하였다. 혼합 후에, 250 ㎕의 SB62 에멀젼(실시예 II.1.에서 상세히 기술된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 교반하였다.

<1148> IX.2.2. 기록

<1149> 표 42

기록	시점	샘플타입	I/Po	분석방법
바이러스 발산	D-3내지D+7 1차 투여후 D+1내지D+5 2차 투여후	비강 세척물	In	적정
T° 모니터링	D-3내지D+4 1차 투여후 D-2내지D+4 2차 투여후	복막 공동의 임플란트	In	원격측정법
IHA	1차 투여전, 후, 면역후, 2차 투여후	혈청	In	IHA

In= 개체 / Po= 풀(Pool)

<1150>

<1151> **IX.3. 결과(도 19 내지 22)**

<1152> IX.3.1. 온도 모니터링

<1153> 개별적인 온도를 발신기 및 원격측정 기록기로 모니터링하였다. 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닦고, 신규한 측정을 복막내 공동에 배치되기 전에 DSI로 수행하였다. 모든 동물을 이들 측정동안 단일 케이지에 개별적으로 사육하였다. 온도를 2차 투여전 2일에서 2차 투여후 4일까지 15분 마다 모니터링하고, 평균 온도를 정오에 계산하였다. 결과를 도 19에 나타내었다.

<1154> 결과:

<1155> 2차 투여후, 체온의 피크는 애주번트 비첨가된(플레인) 3가 스플리트(Fluarix™) 또는 서브-유닛 백신 Fluad™(MF59 수중유 에멀젼을 함유함)로 흰족제비를 면역시킨 후에 관찰되었다. AS03+MPL 또는 AS03으로 애주번트 첨가된 서브 유닛 Agrippal™로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 백신으로 흰족제비를 면역시킨 후에 어떠한 피크도 관찰되지 않았다. 결론적으로, 체온의 억제에서 AS03-함유 백신의 부가된 값은 스플리트 및 서브-유닛 시험된 백신 모두에 대해 나타난 반면 2차 투여후에 흰족제비에서의 온도 증가를 방지하기 위해 MF59-함유 백신은 무능하였다.

<1156> IX.3.2. 바이러스 발산

<1157> 세척액의 바이러스 적정을 군 당 6 마리의 동물에서 수행하였다. 세척액을 깨어있는 동물의 양쪽 콧구멍에 5 ml의 PBS를 투여하여 수행하였다. 접종을 페트리 접시에 수집하고, 드라이 아이스(-80℃) 상의 샘플 용기에 배치하였다.

<1158> 모든 비강 샘플을 먼저 스핀 X 필터(Costar)를 통해 멸균 필터하여 임의의 박테리아 오염물을 제거하였다. 50 ㎕의 세척액의 일련의 10배 희석액을 50 ㎕의 매질을 함유한 마이크로역가 플레이트에 옮겼다(10 웰/희석액). 이후 100 ㎕의 MDCK 세포(2.4×10^5 세포/ml)를 각 웰에 첨가하고, 세포 합류가 예를 들어 5 내지 7일 동안 대조군 세포로 도달될 때까지 35℃에서 인큐베이션하였다. 5 내지 7일의 인큐베이션 후에, 배양 매질을 서서히 제거하고, 100 ml의 매질을 함유한 1/20 WST-1을 첨가하고 추가 18 시간 동안 인큐베이션하였다.

<1159> 생존가능한 세포에 의한 WST-1의 감소하에서 생산된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정법의 말단에서 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하고, 적절한 파장(450 나노미터)에서 각 웰의 흡광도를 측정하므로써 정량한다. 컷-오프(cut-off)는 감염되지 않은 대조군 세포의 OD 평균-0.3 OD(0.3 OD는 +/-3 StDev의 비감염된 대조군 세포의 OD에 상응함)으로서 규정된다. 양의 스코어는 OD가 컷-오프 미만인 경우로 규정되며 반대로 음의 스코어는 OD가 컷-오프를 초과한 경우로 규정된다. 바이러스 발산 역가를 "Reed and Muench"로 결정되며 Log TCID50/ml로 표시된다.

<1160> 결과:

<1161> 결과를 도 20에 나타내었다. 보다 낮은 바이러스 발산은 애주번트 비첨가된(플레인) 3가 스플리트 백신(Fluarix™) 또는 Fluad™ 서브-유닛 백신으로 흰족제비를 면역시킨 후에 관찰된 매우 낮은 바이러스 발산 감소와 비교하여, AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 백신, 또는 AS03으로 애주번트 첨가된 Agrippal™ 서브-유닛 백신으로 2차 투여시킨 후 관찰되었다. 체온상승과 관련하여 논의된 바와 유사하게, AS03 함유 백신의 추가된 값이 MF59 함유 백신과 비교되어 관찰되었다.

<1162> IX.3.3. HI 역가

<1163> H3N2 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 적혈구응집 억제 시험(HI)을 사용하여 결정하였다. HI 시험의 원리는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의해 닭 적혈구 세포(RBC)의 적혈구응집을 억제하는 특정 항-인플루엔자 항체의 능력을 기초로 한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다제 용액(RDE)로 처리하고, 열불활성화처리하여 비특이적 억제제를 제거하였다. 사전처리 후에, 혈청의 두배 희석액을 각 인플루엔자 균주의 4개의 적혈구응집 유닛으로 인큐베이션하였다. 닭 적혈구를 이후 첨가하고, 응집의 억제를 계수하였다. 역가를 적혈구응집을 완전히 억제하는 혈청의 가장 큰 희석액의 역수로서 나타내었다. 혈청의 제 1 희석은 1:10이기 때문에, 검출가능하지 않은 수준을 역가 5로서 계수하였다.

<1164> 결과:

<1165> H3N2 A/와이오밍으로 면역시킨 후, 보다 높은 체액 반응(HI 역가)은 애주번트 비첨가된(플레인) 3가 스플리트 백신(Fluarix™) 또는 Fluad™ 서브-유닛 백신으로 흰족제비를 면역시킨 후 관찰된 체액 반응과 비교하여, AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 백신, 또는 AS03으로 애주번트 첨가된 Agrippal™ 서브-유닛 백신으로 면역화된 흰족제비에서 관찰되었다(도 21).

<1166> H3N2 A/와이밍으로 면역시킨 후에, 보다 높은 체액 반응(HI 역가)은 또한 3가 스플리트 플레인 또는 Fluad로 면역화된 흰족제비와 비교하여 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 또는 AS03으로 애주번트 첨가된 Agrippal™로 면역화된 흰족제비에서 2차 투여 균주로서 사용된 그리프트 균주 H3N2 A/파나마에 대해 관찰되었다(도 22).

<1167> 이종기원 균주에 대해 본 발명의 애주번트(AS03 또는 AS03+MPL)로 관찰된 이러한 가교반응은 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 3가 스플리트 백신 또는 AS03으로 애주번트 첨가된 Agrippal™ 서브-유닛 백신으로 면역화된 흰족제비에서 관찰된 방어로 보정된 후, 이종기원 균주로 2차 투여되었다. AS03-함유 백신에 의해 유도된 이종기원 균주에 대한 이러한 가교 반응성은 MF59 애주번트 첨가된 백신(FluAd™)에 의해 유도되지 않았다.

<1168> **실시예 X - 스플리트 항원 제조물 및 MPL 애주번트를 지니거나 지니지 않은 AS03을 함유한 백신으로 65세 이상의 노인 집단의 임상 시험: 90일 및 180일에 면역성 지속 데이타**

<1169> **X.1. 연구 디자인**

<1170> Fluarix™ 백신(벨기에에서 α-Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 근육내로 투여된, 애주번트 AS03 또는 AS03+MPL을 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 반응성 및 면역성을 평가하기 위한 65세 이상의 노인 집단(≥65세)에서 상 I, 개방, 무작위, 제어된 연구. 이러한 연구는 실시예 VIII에 기술된 바에 따른다.

<1171> 세가지 유사한 군을 평가하였다:

<1172> ● 일 용량의 재구성되고 AS03 애주번트 첨가된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03)

<1173> ● 일 용량의 재구성되고 Flu AS03+MPL 애주번트 첨가된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03+MPL)

<1174> ● 일 용량의 Fluarix™를 수용한 50 피검체의 일 대조군(Fluarix)

<1175> **X.2. 면역성 결과**

<1176> X.2.1. 체액 면역 반응 종점 및 결과

<1177> AS03 및 AS03+MPL 애주번트 첨가된 백신에 의해 유도된 체액 면역 반응 및 이의 지속성을 평가하기 위하여, 하기 파라메터를 각 처리 군에 대해 계산하였다.

<1178> 0일, 21일, 90일 및 180일에: 혈청 적혈구응집-억제(HI) 항체 역가는 백신으로 표시되는 세개의 인플루엔자 바이러스 균주(항-H1N1, 항-H3N2, 및 항-B-항체) 각각에 대해 별도로 시험되었다.

<1179> ● 0일, 21일, 90일 및 180일에 95% CI를 갖는 혈청 HI 항체 GMT

<1180> ● 0일, 21일, 90일 및 180일에 95% CI를 갖는 혈청전환율

<1181> ● 21일에 95% CI를 갖는 전환 인자

<1182> ● 0일, 21일, 90일 및 180일에 95% CI를 갖는 혈청방어율

<1183> *결과*

<1184> 95% CI를 갖는 HI 항체에 대한 GMT는 도 23에 나타내었다. 모든 3개 백신-균주에 대한 항체의 백신접종전 GMT는 3개 군에서 동일한 범위내에 존재한다. 백신접종 후, 항-헤마글루티닌 항체 수준은 유의적으로 증가하였다. 그러나 3개의백신 균주에 대한 항체의 백신접종후 GMT는 모든 백신에 대해 동일한 범위내에 존재하였다. 21일째에, Fluarix와 비교하여 2개의 애주번트 첨가된 백신 쪽으로의 약간의 경향은 A/뉴 칼레도니아 및 B/지앙수 균주에 대해 기술되었으며, 두개의 애주번트 첨가된 백신 중에서 보다 높은 GMT는 A/와이오밍 및 B/지앙수 균주에 대해 FLU AS03으로 관찰되었다.

<1185> 동일한 경향은 90일에 관찰되었다. 180일에, 3개 백신 균주에 대한 항체의 GMT는 3개의 백신에 대해 동일한 범위내에 존재하였다.

<1186> 모든 인플루엔자 백신은 60세 이상의 피검체에서 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 충족한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)].

<1187> 백신접종 후 세달(90일) 및 6달(180일)에, 혈청방어율은 연구 그룹이 무엇을 고려하든지 간에 유럽 위원회에 의해 요구된 60%의 최소율 보다 높다. 90일째에, 유럽 위원회에 의해 요구된 30%의 최소 혈청전환율은 A/뉴 칼레도니아 균주에 대해 Fluarix를 제외하고 3개의 백신 군에서 모든 백신 균주에 대해 달성되었다. 180일째에, 3개의 백신을 지닌 A/와이오밍 및 B/지앙수 균주에 대해 달성되었으나, A/뉴 칼레도니아 균주에 대해서는 달성되지 않았다(표 43 및 표 44).

<1188> 표 43 1:40 이상의 혈청 적혈구응집 억제 역가를 지닌 백신의 퍼센트로서 혈청방어율(면역성에 대한 ATP 코호트)

				≥1:40		95% CI	
항체	군	시기	N	n	%	LL	UL
A/뉴 칼레도니아	Flu AS03+ MPL	PRE	50	28	56.0	41.3	70.0
		PI(D21)	50	46	92.0	80.8	97.8
		PI(D90)	50	43	86.0	73.3	94.2
		PI(D180)	50	39	78.0	64.0	88.5
	Fluarix	PRE	50	26	52.0	37.4	66.3
		PI(D21)	50	46	92.0	80.8	97.8
		PI(D90)	50	38	76.0	61.8	86.9
		PI(D180)	50	34	68.0	53.3	80.5
	FluAS03	PRE	49	28	57.1	42.2	71.2
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9
		PI(D90)	49	45	91.8	80.4	97.7
		PI(D180)	49	38	77.6	63.4	88.2
A/와이오밍	Flu AS03+ MPL	PRE	50	33	66.0	51.2	78.8
		PI(D21)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D90)	50	46	92.0	80.8	97.8
		PI(D180)	50	45	90.0	78.2	96.7

<1189>

				≥ 1:40		95% CI	
항체	군	시기	N	n	%	LL	UL
	Fluarix	PRE	50	32	64.0	49.2	77.1
		PI(D21)	50	50	100	92.9	100.0
		PI(D90)	50	49	98.0	89.4	99.9
		PI(D180)	50	50	100	92.9	100.0
	FluAS03	PRE	49	34	69.4	54.6	81.7
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9
		PI(D90)	49	46	93.9	83.1	98.7
		PI(D180)	49	47	95.9	86.0	99.5
B/지앙수	Flu AS03+ MPL	PRE	50	19	38.0	24.7	52.8
		PI(D21)	50	50	100	92.9	100.0
		PI(D90)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D180)	50	46	92.0	80.8	97.8
	Fluarix	PRE	50	17	34.0	21.2	48.8
		PI(D21)	50	48	96.0	86.3	99.5
		PI(D90)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D180)	50	47	94.0	83.5	98.7
	FluAS03	PRE	49	25	51.0	36.3	65.6
		PI(D21)	49	49	100	92.7	100.0
		PI(D90)	49	47	95.9	86.0	99.5
		PI(D180)	49	46	93.9	83.1	98.7

N = 유효한 결과를 갖는 피검체의 수
n/% = 특정 범위내에서 적정을 갖는 피검체의 수/퍼센트
PRE = 백신접종전 역가
PI (D21) = 21일째에 백신접종후 혈액 샘플링
PI (D90) = 90일째에 백신접종후 혈액 샘플링
PI (D180) = 180일째에 백신접종후 혈액 샘플링

<1190>

<1191> 표 44. 0일과 비교하여 각 백신접종후 시점에서 혈청 HI 역가의 적어도 4배 증가를 갖는 백신의 퍼센트로 규정된 적혈구응집 억제(HI) 항체 역가에 대한 혈청전환율(면역성에 대한 ATP 코호트)

백신 균주	시기	군	N	4-배			
				n	%	95%CI	
						LL	UL
A/뉴 칼레도니아	21일	Flu AS03+ MPL	50	30	60.0	45.2	73.6
		Fluarix	50	25	50.0	35.5	64.5
		Flu AS03	49	31	63.3	48.3	76.6
	90일	Flu AS03+ MPL	50	19	38.0	24.7	52.8
		Fluarix	50	14	28.0	16.2	42.5
		Flu AS03	49	17	34.7	21.7	49.6
	180일	Flu AS03+ MPL	50	12	24.0	13.1	38.2
		Fluarix	50	11	22.0	11.5	36.0
		Flu AS03	49	10	20.4	10.2	34.3
A/와이오밍	21일	Flu AS03+ MPL	50	46	92.0	80.8	97.8
		Fluarix	50	38	76.0	61.8	86.9
		Flu AS03	49	40	81.6	68.0	91.2
	90일	Flu AS03+ MPL	50	33	66.0	51.2	78.8
		Fluarix	50	33	66.0	51.2	78.8
		Flu AS03	49	31	63.3	48.3	76.6
	180일	Flu AS03+ MPL	50	27	54.0	39.3	68.2
		Fluarix	50	23	46.0	31.8	60.7
		Flu AS03	49	26	53.1	38.3	67.5
B/지앙수	21일	Flu AS03+ MPL	50	44	88.0	75.7	95.5
		Fluarix	50	38	76.0	61.8	86.9
		Flu AS03	49	43	87.8	75.2	95.4
	90일	Flu AS03+ MPL	50	37	74.0	59.7	85.4
		Fluarix	50	36	72.0	57.5	83.8
		Flu AS03	49	37	75.5	61.1	86.7
	180일	Flu AS03+ MPL	50	32	64.0	49.2	77.1
		Fluarix	50	29	58.0	43.2	71.8
		Flu AS03	49	31	63.3	48.3	76.6

N = 유효한 백신접종전 및 후 결과 모두를 갖는 피검체의 수
n/% = 적어도 4배 증가를 갖는 피검체의 수/퍼센트
95% CI = 정확한 95% 신뢰 구간; LL=하한치, UL=상한치

<1192>

<1193> X.2.2. CMI 반응 종점 및 결과

<1194> 애주번트 첨가된 백신으로 유도된 세포 면역 반응 및 이의 지속성을 평가하기 위하여, 하기 파라메터를 각 처리군에 대해 계산하였다:

<1195> 각 시점(0일, 21일, 90일 및 180일)에: 상이한 시험에서 10^6 당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도(뉴 칼레도니아, 와이오밍 및 지앙수 항원은 별도로 고려되고 0일 및 21일에 울혈되었고; 뉴 칼레도니아, 와이오밍, 지앙수 및 뉴욕 항원은 별도로 고려되고 90일 및 180일에 울혈되었다)

<1196> ● 모두 더블(All double): 적어도 두개의 상이한 시토카인을 생산하는 세포(CD40L, IFNγ, IL-2, TNFα)

<1197> ● CD40L: 적어도 CD40L 및 다른 시토카인(IFNγ, IL-2, TNFα)을 생산하는 세포

<1198> ● IFNγ: 적어도 IFNγ 및 다른 시토카인(CD40L, IL-2, TNFα)을 생산하는 세포

<1199> ● IL-2: 적어도 IL-2 및 다른 시토카인(CD40L, IFNγ, TNFα)을 생산하는 세포

<1200> ● TNFα: 적어도 TNFα 및 다른 시토카인(CD40L, IFNγ, IL-2)을 생산하는 세포

<1201> *결과*

<1202> 주된 발견은 하기와 같다(도 24):

<1203> (a) 백신접종 후 21일째에, 시토카인-양성 CD4 T 세포(IL-2, CD40L, TNFα 및 IFNγ)의 빈도는 Fluarix 군과 비교하여 두개의 애주번트 첨가된 백신 군에서 보다 현저하게 높았다. 그러나 두개의 애주번트 간에는 어떠한 현저한 차이가 검출되지 않았다.

<1204> (b) 애주번트 첨가된 백신 과 Fluarix 간의 모든 통계학적 차이는 180일에 하기를 제외하고 90일 및 180일까지

유지되었다:

<1205> ● 모두 이중, CD40L, IFNγ 및 IL2(와이오밍 균주만)에 대해 및 모두 이중, CD40L, 및 TNFα(뉴욕 균주만)에 대해 FluAS03/MPL과 Fluarix 간에 어떠한 통계학적으로 현저한 차이도 발견되지 않았다.

<1206> ● IL2(지앙수 균주만)에 대해 FluAS03과 Fluarix간에 어떠한 통계학적으로 현저한 차이도 발견되지 않았다.

<1207> (c) 두개의 애주번트 첨가된 백신 간에 통계학적으로 현저한 차이의 부재는 90일 및 180일까지 확인되었다.

<1208> (d) 평가된 모든 시토카인(IL-2, CD40L, TNFα 및 IFNγ)에 대한 CD4 T-림프구 반응에서 백신접종전과 후(21일)의 차이는 Fluarix™와 비교하여 두개의 애주번트 첨가된 백신으로 보다 현저하게 높았다. 그러나 둘모두의 애주번트 간에 현저한 차이는 검출되지 않았다.

<1209> (e) 백신접종은 무슨 처리군이든지 간에 CD8 반응에 대한 측정가능한 효과를 갖지 않았다.

<1210> **실시예 XI - 스플리트 인플루엔자 항원 제조물 및 MPL 애주번트를 지닌 AS03을 함유한 백신으로 65세 이상의 노인 집단에서 임상 실험**

<1211> **XI.1. 연구 디자인 및 목적**

<1212> Fluarix™ 백신(벨기에에서 α-Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 근육내로 투여된, 애주번트 AS03+MPL을 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 반응성 및 면역성을 평가하기 위한 65세 이상의 노인 집단(≥65세)에서 상 I/II, 개방, 무작위, 제어된 연구.

<1213> 두개의 유사한 군을 평가하였다:

<1214> ● 임상 시험 전 동안 일 용량의 재구성되고 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신을 미리 수용한 약 50 피검체의 일 군

<1215> ● 임상 시험 전 동안 일 용량의 Fluarix™를 미리 수용한 약 50 피검체의 일 군(Fluarix)

<1216> 본 연구의 일 목적은 제 1 용량을 투여한 후 약 1년 투여된 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 Flu AS03+MPL로 재백신접종의 체액 면역 반응(항-헤마글루티닌 및 항-MPL 역가)을 평가하기 위한 것이다. 비교 목적을 위하여, 이전 시험에서 이미 Fluarix™를 수용한 피검체는 일 용량의 통상적인 백신을 수용하고, 이러한 시험의 대조군을 형성하였다.

<1217> **XI.2. 백신 조성 및 투여**

<1218> 세개의 백신에서 사용된 균주는 2004-2005 북반구 시즌에 대해 WHO에 의해 제안된 것, 즉 A/뉴 칼레도니아/20/99(H1N1), A/뉴 캘리포니아/3/2003(H3N2) 및 B/지앙수/10/2003이었다. Fluarix™/α-Rix™와 같이, 비교체로서 사용되는 상업적으로 입수가능한 백신, (AS03+MPL-애주번트 첨가된 백신, 이후 "애주번트 첨가된 백신"이라 칭함)은 용량 당 각 인플루엔자 바이러스 균주 중 15 ㎍ 헤마글루티닌(HA)을 함유한다.

<1219> 애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신은 타입 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원 및 AS03+MPL 애주번트를 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기로 구성된 2 성분 백신이다. 이는 실시예 II에 상세히 기술된 방법에 따라 제조되었다.

<1220> 주사시에, 애주번트를 함유한 미리 충전된 주사기의 내용물을 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유한 바이알에 주입하였다. 혼합한 후, 내용물을 주사기로 회수하고, 니들을 근육내 니들로 교체하였다. 일 용량의 재구성되고 애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신은 0.7 ml에 상응한다. 애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신은 방부제-부재 백신이다.

<1221> 일 용량의 재구성되고 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 조성은 표 45에 제공되었다. 둘모두의 백신은 근육내로 제공되었다.

<1222> 표 45. 재구성된 백신 애주번트 첨가된(AS03+MPL) 인플루엔자 후보물질 백신의 조성

성분	용량 당 양
비활성화된 스플리트 비리온 - A/ 뉴 칼레도니아 /20/99 (H1N1) - A/ 뉴 캘리포니아 /7/2004 (H3N2) - B/ 지앙수 /10/2003	 15 µg HA 15 µg HA 15 µg HA
애주번트 SB62 에멀젼 - (스쿠알렌) - (DL-알파-토코페롤) - (폴리소르베이트 80-트윈 80) MPL	 10.68 mg 11.86 mg 4.85 mg 25 µg

<1223>

<1224> **XI.3. 면역성 결과**

<1225> XI.3.1. 항-HA 체액 면역 반응 종점 및 결과

<1226> *관찰된 변수:*

<1227> 0일 및 21일에: 백신으로 표시되는 세개의 인플루엔자 바이러스 균주(항-H1N1, 항-H3N2 및 항-B-항체) 중 각각에 대해 별도로 시험된 혈청 적혈구응집-억제(HI) 항체 역가.

<1228> *유도된 변수(95% 신뢰 구간):*

<1229> (f) 백신접종 전 및 후에 95% 신뢰 구간(95% CI)을 갖는 혈청 HI 항체의 기하급수 평균 역가(GMT)

<1230> (g) 21일째에 95% CI를 갖는 혈청전환율*

<1231> (h) 21일째에 95% CI를 갖는 혈청전환인자**

<1232> (i) 21일째에 95% CI를 갖는 혈청방어율***

<1233> * 혈청전환율은 각 백신 균주에 대해 백신접종전 HI 역가 <1:10 및 백신접종후 역가 ≥1:40, 또는 백신접종전 역가 ≥1:10 및 백신접종후 역가에서 최소 4배 증가를 갖는 백신의 퍼센트로서 규정된다.

<1234> ** 혈청전환 인자는 각 백신 균주에 대해 0일과 비교하여 21일에 혈청 HI GMT로서 배 증가로서 규정된다.

<1235> *** 방어율은 대개 지시하는 방어로서 서용되는 백신접종후(각 백신 균주에 대해) 혈청 HI 역가 ≥40인 백신의 퍼센트로서 규정된다.

<1236> *결과*

<1237> 예상된 바와 같이, 대부분의 피검체는 백신접종 전에 모든 군에서 세개의 균주에 대해 이미 혈청반응양성이었다. 모두 3개의 백신 균주에 대해 백신접종전 GMT는 2개 군에서 동일한 범위내에 존재하였다. Fluarix 군과 비교하여 Flu AS03+MPL 군에서 모두 3개의 백신 균주에 대해 백신접종후 보다 높은 GMT의 경향을 나타내었으며, 95% CI는 오버랩핑되었다(도 25).

<1238> 두개의 인플루엔자 백신은 60세 이상의 피검체에서 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 충족한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)](표 46).

<1239> 표 46. 21일째에 혈청방어율 혈청전환율 및 전환 인자(면역성에 대한 ATP 코호트)

균주	군	N	혈청방어율 (HI역가≥40) %	혈청전환율 (4배 이상 증가) [95% CI] %	혈청전환인자 [95% CI] %
EU 표준 (>60			>60%	>30%	>2.0
A/뉴 칼레도니아	Flu+MPL-AS03	38	89.5 [75.20-97.06]	31.6 [17.5-48.7]	3.1[2.2-4.4]
	Fluarix	45	82.2 [67.95-92.00]	31.1 [18.2-46.6]	2.5 [1.8-3.5]
A/뉴욕(H3N2)	Flu+MPL-AS03	38	92.1 [78.62-98.34]	78.9 [62.7-90.4]	8.8 [6.1-12.5]
	Fluarix	45	95.6 [84.85-99.46]	68.9 [53.4-818]	6.0 [4.4-8.3]
B/지앙수(B)	Flu+MPL-AS03	38	100 [90.75-100]	57.9 [40.8-73.7]	5.1 [3.7-7.0]
	Fluarix	45	100 [92.13-100]	37.8 [23.8-53.5]	3.1 [2.4-4.0]

N= 피검체의 총수; %= 특정범위내에 21일째 피검체의 퍼센트
CI = 신뢰 구간

<1240>

<1241> **실시예 XII - 두개의 상이한 농도로 AS03 및 MPL로 애주번트 첨가된 스플리트 인플루엔자 항원 제조물을 함유한 백신을 지닌 65세 이상의 노인 집단의 임상 시험**

<1242> **XII.1. 연구 디자인 및 목적**

<1243> 성인(18 내지 40세)에 투여된 Fluarix™ 백신(벨기에에서 α-Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 노인 집단(65세 이상)에 투여된 다양한 애주번트를 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 세포 매개 면역 반응의 측면에서 비-열등성을 나타내기 위한 상 I/II, 개방, 무작위, 제어된 연구.

<1244> 네개의 유사한 군을 선정하였다:

<1245> (a) 일 용량의 Fluarix™를 수용한 일 대조군의 75명의 성인(18 내지 40세)

<1246> (b) 하기 세개의 군에 3:3:2로 무작위된 200명 노인 피검체(65세 이상)

<1247> - AS03+MPL로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신을 수용한 75명의 피검체로 이루어진 1군(농도 1 내지 25 ㎍)

<1248> - AS03+MPL로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신을 수용한 75명의 피검체로 이루어진 1군(농도 2 내지 50 ㎍)

<1249> - 일 용량의 Fluarix™를 수용한 50명 피검체로 이루어진 기준 Flu 군

<1250> *제 1 목적*

<1251> 제 1 목적은 적어도 두개의 상이한 시토카인(CD40L, IL-2, TNF-α, IFN-γ)을 생산하는 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 빈도 측면에서 성인(18 내지 40세)에게 투여된 Fluarix™와 비교하여 노인 피검체(65세 이상)에게 투여된 인플루엔자 애주번트 첨가된 백신의 백신접종 후 21일째에 비-열등성을 나타내기 위한 것이다.

<1252> *제 2 목적*

<1253> 제 2 목적은

<1254> (a) 노인 피검체(65세 이상)에 백신을 근육내 투여한 후 21일 동안 애주번트 첨가된 후보물질 인플루엔자 백신으로 백신접종의 안전성 및 반응성을 평가하고(Fluarix™를 기준물질로 사용함),

<1255> (b) 애주번트 첨가된 인플루엔자 후보물질 백신으로 백신접종한 후 21일, 90일 및 180일에 체액 면역 반응(항-헤마글루티닌 역가)을 평가하기 위한 것이다(Fluarix™를 기준물질로 사용함).

<1256> *제 3 목적*

<1257> 제 3 목적은 애주번트 첨가된 인플루엔자-백신으로 백신접종한 후 21일, 90일 및 180일에 세포 매개 면역 반응(IFN-γ, IL-2, CD40L, TNF-α의 생산 및 메모리 B-세포 반응)을 평가하기 위한 것이다.

<1258> **XII.2. 백신 조성 및 투여**

<1259> AS03+MPL로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신(용량 당 25 ㎍) 시스템을 실시예 XI에 기술된 연구에서 사용하였다. AS03+MPL로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신(용량 당 50 ㎍) 시스템은 MPL의 농도가 2배인 것을 제외하고 동일한 조성이다. 방법은 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신에 대해 실시예 VIII에 기술된 것과 동일하며, MPL의 농도가 2배인 차이만 있다.

<1260> 대조군: IM 투여에 의한 전체 용량의 Fluarix™

<1261> 피검체 당 4번의 계획된 방문: 0일, 21일, 90일 및 180일에 혈액샘플을 각 방문시에 수집하여 면역성을 평가하였다.

<1262> 백신 스케쥴: 0일째에 인플루엔자 백신의 일회 주사

<1263> **XII.3. 면역성 결과**

<1264> XII.3.1. CMI 종점 및 결과

<1265> *1차 종점의 평가.*

<1266> 21일에: 적어도 두개의 상이한 시토카인(IL-2, IFN-γ, TNF-α, CD40L)을 생산하는 시험에서 10^6 당 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 빈도 측면에서 모든 피검체에서 CMI 반응.

<1267> CMI 반응을 평가하기 위하여, 인플루엔자-특이적 CD4의 빈도를 하기와 같이 분석하였다:

<1268> 애주번트 첨가된 백신으로 백신접종된 군과 Flu YNG로 백신접종된 군 간에 인플루엔자-특이적 CD4 빈도의 측면에서의 GM 비를 로그변환된 역가에 대해 ANCOVA 모델을 사용하여 수득하였다. ANCOVA 모델은 고정 효과로서 백신군을 포함하고, 회귀변수로서 백신접종전 로그-변형된 역가를 포함한다. GM 비 및 이의 98.75% CI는 모델에서 상응하는 군 대비의 지수-변형으로서 유도된다. 애주번트 첨가된 GM에 대한 98.75% CI는 상기 ANCOVA 모델의 그룹 최소자승 평균에 대한 98.75% CI의 지수-변형에 의해 수득하였다.

<1269> *결과 - 추정 분석(표 47)*

<1270> "푸울링된 항원 II"로 시험관내에서 재자극시킨 후 21일째에 적어도 두개의 시토카인(IL-2, IFN-γ, TNF-α, CD40L)을 생산하는 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 애주번트 GM 및 GM 비(98.75% CI)를 표 47에 나타내었다. 각 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신에 대해, GM 비의 양쪽 98.75% CI의 상한치는 2.0의 임상 한계 미만으로 떨어져 있다. 이는 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종 후 빈도의 측면에서 18세 내지 40세의 성인에 투여된 Fluarix™ 백신과 비교하여 노인 피검체에 투여된 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 모두의 비-열등성을 나타낸다.

<1271> 표 47. 21일에, 적어도 2개의 시토카인을 생산하는 인플루엔자-특이적 CD4이 애주번트 첨가된 GM 비(면역성에 대한 ATP 코호트)

				애주번트 첨가된 GM 비 (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 1)		
Flu YNG		AS03+MPL (conc. 1)			98.8% CI	
N	애주번트 첨가된 GM	N	애주번트 첨가된 GM	Value	LL	UL
70	1995.3	72	2430.0	0.82	0.65	1.04

				애주번트 첨가된 GM 비 (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 2)		
Flu YNG		AS03+MPL (conc. 2)			98.8% CI	
N	애주번트 첨가된 GM	N	애주번트 첨가된 GM	Value	LL	UL
70	1979.4	72	2603.8	0.76	0.59	0.98

<1272>

<1273> 애주번트 첨가된 GM=기준선 역가에 대해 애주번트 첨가된 기하평균 항체; N=유효한 백신접종전 및 후 결과 모두를 갖는 피검체의 수; 98.8% CI=애주번트 첨가된 GM 비에 대한 98.8% 신뢰 구간(Ancova 모델:기준선에 대해 조정); LL=하한치, UL=상한치

<1274> *결과 - 기술분석(도 26)*

<1275> 주요한 발견은 하기와 같다:

<1276> ● 백신접종 전에 CMI는 노인 보다 젊은 성인에서 더욱 높았다.

<1277> ● 백신접종 후에,

<1278> ○ 젊은 성인(18 내지 40세)에서의 CMI 반응에 대해 인플루엔자 백신의 상승효과를 나타내고,

<1279> ○ 수용된 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신을 갖는 노인의 CMI 반응은 젊은 성인의 CMI 반응과 유사하다.

<1280> ● 평가된 모든 시토카인(IL-2, CD40L, TNF-α, IFN-γ)에 대한 CD4 T-림프구 반응의 백신접종 전 및 후의 차이는 본 출원인이 Fluarix(18 내지 40세) 및 Flu/AS03+MPL(농축물 1)을 비교하는 경우 IFNγ에 대한 것을 제외한 모든 시험에 대해 Fluarix™(18 내지 40세)와 비교하여 애주번트 첨가된 백신에서 현저하게 높았다.

<1281> 시험관내 자극은 백신에 포함된 A/H1N1/뉴 칼레도니아 대신에 Flu 균주 (i) B/지앙수, (ii) A/H3N2/뉴욕 및 (iii) A/H3N2/와이오밍으로 수행되었다. 그러나, 피검체의 서브세트로부터의 A/H1N1/뉴 칼레도니아 백신 균주를 포함하는 사전 데이타는 그 결과가 유사할 것으로 지시된다.

<1282> *결과 - 3차 종점의 평가(표 48)*

<1283> 3차 종점을 평가하기 위하여, 인플루엔자-특이적 CD4/CD8 T-림프구 및 메모리 B-세포의 빈도를 0일, 21일, 90일 및 180일에 측정하였다.

<1284> 인플루엔자-특이적 시토카인-양성 CD4/CD8 T-림프구의 빈도를 각 항원에 대해, 0일 및 21일에 각 백신접종군에 대해 요약하였다(기술 통계).

<1285> 비-파라메터 시험(Wilcoxon test)을 두개의 군(인플루엔자 애주번트 첨가된 백신 대 Fluarix™)의 차이의 위치를 비교하기 위해 사용하였고 통계학적 p-값을 각 상이한 시험에서 각 항원에 대해 계산하였다.

<1286> 21일/0일(백신접종후/전) 반응의 개개 차이의 기술 통계를 각 상이한 시험에서 각 백신접종군 및 각 항원에 대해 계산하였다.

<1287> 비-파라메터 시험(Wilcoxon test)을 개개 차이(백신접종후/전)를 비교하기 위해 사용하였고, 통계학적 p-값은 각 상이한 시험에서 각 항원에 대해 계산할 것이다.

<1288> 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이를 비교하기 위한 윌콕슨 시험으로부터의 p-값을 표 48에 나타내었다.

<1289> 표 48. 추정 통계: 각 시점에서 CD4 T 세포에 대해 크루스칼-왈리스로부터의 p-값(면역성에 대한 ATP 코호트)

	p-값							
	군 1 및 Flu ELD		군2 및 Flu ELD		군 1 및 Flu YNG		군 2 및 Flu YNG	
	0일	21일	0일	21일	0일	21일	0일	21일
모두 더블	0.4380	0.0003	0.4380	0.0003	0.0000	0.9014	0.0005	0.4889
CD4OL	0.3194	0.0002	0.3194	0.0002	0.0000	0.9841	0.0003	0.5412
IFNγ	0.5450	0.0004	0.5450	0.0004	0.0000	0.5397	0.0001	0.7895
IL2	0.3701	0.0008	0.3701	0.0008	0.0003	0.8557	0.0022	0.4766
TFNα	0.3716	0.0004	0.3716	0.0004	0.0000	0.8730	0.0013	0.2114

군 1: AS03+MPL로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 (conc. 1)
군 2: AS03+MPL로 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 (conc. 2)

<1290>

<1291> 중요한 결론은 하기와 같다:

<1292> (a) 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종전 GM 빈도는 노인 피검체의 모든 군에서 유사하였지만 18세 내지 40세의 성인에서는 우수하였다.

<1293> (b) 인플루엔자-특이적 CD4 T 림프구의 백신접종후(21일) 빈도는 애주번트 첨가된 백신으로 백신접종된 노인 피검체 및 Fluarix™로 백신접종된 18세에서 40세의 성인에서 유사하였다.

<1294> (c) 노인 피검체에서, 인플루엔자-특이적 CD4 T 림프구의 백신접종후(21일) 빈도는 Fluarix™ 보다 애주번트 첨가된 백신으로 백신접종시킨 후 현저하게 높았다.

<1295> (d) 인플루엔자-특이적 CD8 T 세포의 백신접종전 및 백신접종후 GM 빈도는 필수적으로 모든 군에서 유사하였다.

<1296> *결과 - 체액 면역 반응 종점의 평가*

<1297> 관찰된 변수:

<1298> 0일, 21일, 90일 및 180일에: 개별적으로 세개의 인플루엔자 바이러스 균주 각각에 대해 시험된 혈청 적혈구응

집-억제(HI) 항체 역가를 백신(항-H1N1, 항-H3N2 및 항-B-항체)에 나타내었다.

<1299> 모든 백신에 대해 HI 항체에 대한 컷-오프 값을 분석 전 실험에 의해 규정하였다(1:10임). 혈청음성 피검체는 항체 역가가 컷-오프 값 미만인 피검체이다. 혈청반응양성 피검체는 항체 역가가 컷-오프 값 이상인 피검체이다. 검정의 컷-오프 미만의 항체 역가는 컷-오프의 절반의 임의의 값을 제공한다.

<1300> HI 항체 역가를 기초로 하여, 하기 파라메터를 계산하였다:

<1301> (j) log 역가 변형의 평균의 항-log를 수행하여 계산된 0일 및 21일에 HI 항체의 기하평균 역가(GMT).

<1302> (k) 0일과 비교하여 21일에 혈청 HI GMT의 배 증가로서 규정된 21일에 혈청전환 인자(SF).

<1303> (l) 백신접종전 HI 역가 <1:10 및 백신접종후 역가 ≥1:40, 또는 백신접종전 역가 ≥1:10 및 백신접종후 역가에서 최소 4배 증가를 갖는 백신의 퍼센트로서 규정된 혈청전환율(SC).

<1304> (m) 혈청 HI 역가 ≥40인 백신의 퍼센트로서 규정된 혈청방어율(SPR).

<1305> GMI에 대해 95% CI는 별도로 각 군내에서 얻었다. log-변형된 역가의 평균에 대한 95% CI를 먼저 log-변형된 역가가 대개 알려지지 않은 백신으로 분포된 것으로 가정하여 수득하였다. 이후 GM에 대한 95% CI를 log-변형된 역가의 평균에 대해 95% CI의 지수-변형에 의해 수득하였다.

<1306> 특정 항체 측정에 대한 보이지 않는 혈청학적 결과는 대체되지 않았다. 그러므로, 제공된 시점에서 혈청학적 결과가 없는 피검체는 이러한 시점에 대한 검정의 분석에 기여하지 않는다.

<1307> *체액 면역 반응 결과(도 27 및 표 49)*

<1308> 모두 3개의 백신 균주에 대한 HI 항체의 백신접종전 GMT는 4개의 처리 군에서 동일한 범위를 나타내었다. 백신접종 후에, 동일한 집단의 표준 Fluarix와 비교하여 노인 집단의 체액 반응을 증가시키는 2개의 애주번트의 명확한 영향을 나타내었다.

<1309> GMT는

<1310> ● AS03+MPL(농축물 2)에 대한 H1N1에 대해 현저하게 높았고,

<1311> ● 모든 애주번트에 대한 H3N2 및 B에 대해 현저하게 높았다.

<1312> 백신접종후 21일째에, Fluarix의 피검체(18 내지 40세)는 뉴 칼레도니아 및 B/장수 균주에 대해 보다 높은 HI 반응을 갖았다.

<1313> 표 49에 나타낸 바와 같이, 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신은 60세 이상의 피검체에서 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 초과한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)].

<1314> 백신접종 후에, Fluarix(≥65 세) 군과 ● A/뉴 칼레도니아 균주에 대한 Flu AS03+MPL(농축물 2) 간의 HI 항체의 혈청방어율 측면에서 통계학적 차이를 갖는다.

<1315> 각 백신 균주에 대해, 2개의 인플루엔자 애주번트 첨가된 백신 군에 대한 혈청방어율은 Fluarix(18 내지 40세) 군과 비교하여 동일한 범위를 갖는다.

<1316> 백신접종 후에, Fluarix(≥65 세) 군과 ● A/뉴 칼레도니아 균주에 대한 Flu AS03+MPL(농축물 2), ● B/지앙수 균주에 대한 Flu AS03+MPL(농축물 1) 간의 HI 항체의 혈청방어율 측면에서 통계학적 차이를 갖는다.

<1317> 각 백신 균주에 대해, 2개의 인플루엔자 애주번트 첨가된 백신 군에 대한 혈청방어율은 뉴 칼레도니아 균주를 제외하고 Fluarix(18 내지 40세) 군과 비교하여 동일한 범위를 갖는다.

<1318> 표 49. 21일째에 혈청방어율, 혈청전환율 및 전환인자(면역성에 대한 ATP 코호트)

균주	군	N	혈청방어율 (HI역가≥40) %	혈청전환율 (4배 이상 증가) [95% CI]	전환인자 [95% CI] %
EU 표준(>60세)			>60%	>30%	>2.0
EU 표준(<60세)			> 70%	> 40%	> 2.5
A/뉴 칼레도니아 (H1N1)	Flu 젊은 성인	75	100 [95.20-100]	77.3 [66.2-86.2]	35.1 ^21.9-56.4]
	Flu 노인	49	71.4 [56.74-83.42]	30.6 [18.3-45.4]	3.7 [2.4-5.7]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	90.5 [81.48-96.11]	55.4 [43.4-67.0]	6.4 [4.5-9.0]
	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	98.7 [92.79-99.97]	74.7 [63.3-84.0]	9.2 [6.4-13.3]
A/뉴욕 (H3N2)	Flu 젊은 성인	75	93.3 [85.12-97.80]	76.0 [64.7-85.1]	9.2 [7.1-11.8]
	Flu 노인	49	81.6 [67.98-91.24]	69.4 [54.6-81.7]	8.2 [5.7-11.8]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	94.6 [86.73-98.51]	90.5 [81.5-96.1]	19.2 [14.6-25.3]

<1319>

	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	93.3 [85.12-97.80]	82.7 [72.2-90.4]	15.0 [11.2-20.2]
B/ 지앙수 (B)	Flu 젊은 성인	75	100 [95.20-100]	80.0 [69.2-88.4]	13.9 [10.1-19.1]
	Flu 노인	49	93.9 [83.13-98.72]	81.3 [70.7-89.4]	4.3 [3.0-6.1]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	95.9 [88.61-99.16]	73.0 [61.4-82.6]	8.5 [6.5-11.2]
	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	98.7 [92.79-99.97]	66.7 [54.8-77.1]	7.6 [5.6-10.2]

N= 피검체의 총수; %=21일째에 특정범위내의 역가를 갖는 피검체의 퍼센트
CI=신뢰 구간

<1320>

<1321> XII.3.2. 면역성 결론

<1322> (a) 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종전 빈도는 18세 내지 40세의 성인과 비교하여 나이든 성인에서 현저하게 낮았다. Fluarix™로 백신접종한 후, 백신접종후 빈도(21일)는 젊은 성인과 비교하여 나이든 성인에서 열등하게 유지되었다. 반대로, 나이든 피검체의 애주번트 첨가된 백신으로 백신접종 후 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종후 빈도의 측면에서 비-열등성은 18세 내지 40세의 성인에 Fluarix™로의 백신접종과 비교하여 나타내었다.

<1323> (b) HI 항체 반응의 측면에서 체액 면역 반응과 관련하여, 모든 인플루엔자 백신은 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 충족한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)]. 나이든 성인에서, 애주번트 첨가된 백신은 Fluarix™ 보다 인플루엔자 헤마글루티닌에 대한 보다 높은 체액 면역 반응의 경향을 개재하였다. Fluarix™와 비교하여 애주번트 첨가된 백신에 의해 나이든 피검체에 매개된 각 백신 균주에 대한 체액 면역 반응 간의 현저한 차이는 표 50에 나타내었다. Fluarix™로 백신접종된 18 내지 40세의 성인과 비교하여, 애주번트 첨가된 백신으로 백신접종된 나이든 피검체는 A/뉴욕 균주에 대해 21일째에 보다 높은 백신접종후 GMT 및 혈청전환인자에 대한 경향을 나타내었다.

<1324> 표 50. 나이든 피검체에서 애주번트 첨가된 백신과 Fluarix 간의 체액 면역 반응의 현저한 차이

	백신접종후 GMT	혈청전환 인자	혈청방어율	혈청전환율
Flu AS03+MPL (conc. 1)	A/뉴욕 B/지앙수	A/뉴욕	-	B/ 지앙수
Flu AS03+MPL (conc. 2)	A/뉴욕 B/지앙수 A/뉴 칼레도니아	A/뉴 칼레도니아	A/뉴 칼레도니아	A/뉴 칼레도니아

<1325>

<1326> **XII.4. 반응성 결과**

<1327> XII.4.1. 부작용(AE)의 기록

<1328> 7일 기간(백신접종일 이후 6일째) 동안 발생하는 고려되는 증상(참조 표 51)을 기록하였다. 21일 기간(백신접종일 이후 20+3일째) 동안 발생하는 고려되지 않는 증상을 또한 기록하였다. 하기 AE의 세기를 표 52에 기술된 바와 같이 평가하였다.

<1329> 표 51. 고려되는 국소/일반 부작용

<1330>

고려되는 국소 AE	고려되는 일반 AE
주사부위의 통증 주사부위의 붉어짐 주사부위의 부어오름 혈종	피로 열 두통 근육통 오한 주사한 팔의 관절 통증 다른 부위에 관절 통증

<1331> N.B. 온도는 저녁에 기록하였다. 하루의 다른 시간에 수행된 부가적 온도 측정이 있는 경우, 가장 높은 온도를 기록하였다.

<1332> 표 52. 성인의 고려되는 증상에 대한 세기 크기

<1333>

부작용	세기 등급	파라메터
주사부위의 통증	0	부재
	1	가볍게 누름
	2	사지를 움직일 수 있을 경우
	3	정상 활성을 방해
주사부위의 붉어짐		mm의 가장 큰 표면 직경 기록
주사부위의 부어오름		mm의 가장 큰 표면 직경 기록
주사부위의 혈종		mm의 가장 큰 표면 직경 기록
열*		℃/°F의 온도 기록
두통	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
피로	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
주사부위 및 다른 위치의 관절통증	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
근육통	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
오한	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해

<1334> * 열은 37.5℃(99.5°F) 이하의 겨드랑이 온도로서 규정된다.

<1335> 국소 주사 부위 붉어짐/부어오름의 최대 세기는 하기와 같이 계수한다:

<1336> 0은 0 mm이며; 1은 0 내지 20 mm 이하이며; 2는 20 미만 내지 50 mm 이하이며; 3은 50 mm미만이다.

<1337> 열의 최대 세기는 하기와 같이 계수한다:

<1338> 1은 37.5 미만 내지 38.0℃이하이며; 2는 38.0 미만 내지 39.0℃이하이며; 3은 39.0℃ 초과이다.

<1339> 평가자는 연구하는 동안 기록된 SAE를 포함하여, 모든 다른 AE, 즉 고려되지 않은 증상에 대한 세기를 평가하였다. 평가는 평가자의 임상적 판단을 기초로 한다. 기록된 각 AE의 세기는 하기 부류 중 하나로 지정된다:

<1340> 1 (가벼운 정도) = 최소한의 불편함을 야기시키고 일상활동에 간섭받지 않은, 피검체가 용이하게 견디는 AE;

<1341> 2 (중간정도) = 정상적인 일상활동에 간섭받기에 충분히 불편한 AE;

<1342> 3 (심각한 정도) = 정상적인 일상활동을 방해되는 AE(성인/청소년에서, AE는 예를 들어 업무/학업의 수행을 방해하고 조정하는 치료제의 투여를 필수로 함).

<1343> XII.4.2. 부작용의 기록(AE)

<1344> 국소 및 일반적 증상 모두의 측면에서, 애주번트 첨가된 백신을 지닌 나이든 피검체에서 관찰된 반응성은 동일한 집단에서 Fluarix™ 보다 높은 것으로 밝혀졌다. 그러나, 성인 집단에서 나타난 수준과 유사한 것으로 보였다. 증상의 발생률 및 세기는 Fluarix™로 백신접종된 나이든 피검체에서 나타난 반응성과 비교하여 애주번트 첨가된 백신으로 백신접종한 후 증가되었다(도 28). 모든 경우에서, 증상은 빠르게 호전되었다.

<1345> 등급 3 증상은 MPL이 가장 낮은 농도인 애주번트 첨가된 백신을 수용한 군과 비교하여 가장 높은 MPL 농도로 애주번트 첨가된 백신을 수용한 군에서 보다 높은 경향을 나타내었다. 그러나 모든 경우에서, 증상은 빠르게 호전되었다.

<1346> **실시예 XIII - 마우스에 AS03+MPL로 애주번트 첨가된 HPV 백신을 사용한 임상전 연구**

<1347> **XIII.1. 도입**

<1348> BALB/C 마우스를 2.5 ㎍의 4개의 상이한 항원 각각, HPV 16 L1, HPV 18 L1, HPV 31 L1 및 HPV 45 L1을 함유한 바이러스 유사 입자의 형태의 애주번트 첨가된 혼합물을 주사하였다. 각 L1 단백질은 HPV 16의 경우에 34 아미노산(또는 다른 서열에서 균등한 구역)을 제거한 C 말단 절단된 것이다.

<1349> 예를 들어 WO 03/077942에 기술된 바와 같이, HPV 단백질을 발현시키고, 바큘로바이러스 발현 시스템에서 정제하였다.

<1350> 4가 VLP 조합물을 2개의 상이한 애주번트 중 하나와 조합하였다.

<1351> 시험된 애주번트는 하기와 같다:

<1352> 1 알루미늄 히드록사이드 및 3-D MPL(AS04로 칭함)의 혼합물

<1353> 2 필수적으로 실시예 2와 같이 제조된 AS03+3D-MPL의 혼합물

<1354> 애주번트 AS04를 HPV 16 및 HPV 18 L1-바이러스 유사 입자를 포함한 백신에 사용하고, 문헌[The Lancet, vol 364, issue 947, 13 November 2004, 1757-1765]에 기술된 바와 같이 상 II 임상 시험에서 시험하였다. 따라서 AS03+3D MPL과 비교하기 위해 양호한 기준을 제공한다. 이러한 애주번트는 예를 들어 WO 01/17751 및 WO 00/23105에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

<1355> 항체 역가의 분석을 백신의 각 성분에 대해 수행하였다. 또한, HPV 16 및 HPV 18에 대해 특이적인 B 메모리 세포의 분석을 IgG 분자의 전체 집단내에서 수행하였다.

<1356> **XIII.2. 재료 및 방법**

<1357> XIII.2.1. 동물 모델

<1358> BALB/c 마우스의 두개의 군(n=10)을 AS04(Al(OH)$_3$ 50 ㎍+MPL 5 ㎍) 또는 필수적으로 실시예 2와 같이 제조된 50 ㎕ 에멀젼+MPL 5 ㎍을 함유한 AS03+3D-MPL의 혼합물로 제형된 2.5 ㎍의 HPV-16/18/31/45 L1으로 한쪽 다리의 근육내로 면역시켰다(0일 및 28일).

<1359> XIII.2.2. 항-HPV-16/18/31/45 L1 혈청테스트: lg

<1360> 항-HPV-16/18/31/45 L1의 정량화를 코팅 항원으로서 HPV-16 L1(lot E16L1P093), HPV-18 L1(lot E18L1P079), HPV-31 L1(lot E31L1P329) 및 HPV-45 L1(lot E45L1P328)을 사용한 ELISA로 수행하였다. HPV-16/18/31/45 L1

및 항체 용액을 웰 당 50 ㎕로 사용하였다; 포화용액만은 웰 당 100 ㎕로 사용하였다. HPV-16/18/31/45 L1을 PBS 중에 0.5 ㎍/ml의 최종농도로 희석시키고, 4℃에서 하룻밤 동안 96 웰 마이크로적정 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)의 웰로 흡수시켰다. 코팅 용액을 제거한 후, 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 1% 소혈청 알부민을 함유한 PBS(포화 완충액)와 함께 인큐베이션하였다. 포화 용액을 제거한 후에 희석 완충액(포화 완충액 +0.1% 트윈20) 중 마우스 혈청의 두배 희석액을 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37℃에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS 0.1%, 트윈 20 및 포화 완충액에 희석된 바이오틴-콘쥬게이트된 항-마우스 lg 1/1000(Dako)로 4회 세척하고, 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다. 세척 단계 후에, 포화 완충액에 1/3000으로 희석된 아비딘-양고추냉이 퍼옥시다제 착물(Dako, UK)를 37℃에서 추가 30 분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상술된 바와 같이 4차례 세척하고, 실온에서 20 분 동안 o-페닐렌디아민(Sigma MO, USA) 0.04% 0.1% 트윈 20 중 H_2O_2 0.03% 0.05 M 시트레이트 완충액 pH 4.5의 용액과 함께 인큐베이션하였다. 반응을 H_2SO_4를 첨가하면서 정지시키고, 플레이트를 490/630 nm에서 측정하였다.

<1361> *ELISA 역가 계산*

<1362> 광학적 밀도(OD)를 컴퓨터가 연결된 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 측정하였다. 데이타를 SoftMaxPro 소프트웨어로 기록하였다. 각 샘플을 적정하기 위하여, 표준물질은 각 플레이트 상에 포함되었다. 4개의 파라메터 기호 log 함수를 표준 곡선을 계산하기 위해 사용하였다. 항체 농도를 표준 곡선의 내삽법ㅇ로 시험 샘플의 각 희석액에서 계산하였다.

<1363> 항체 역가를 표준 곡선의 작업 범위(20 내지 80% OD)내에 있는 모든 희석액으로부터 값을 평균화하여 획득하였다. ELISA 역가를 EU/ml로 표시하였다.

<1364> XIII.2.3. B 메모리 세포 ELISPOT

<1365> 제 2 면역화 후에 23일 또는 75일째에, 마우스를 희생시키고, 비장 세포를 림프제조 구배로 분리하였다. 이후 PBMC를 첨가제(나트륨 피루베이트 1mM, MEM 비-필수 아미노산, Pen/Strep, 글루타민 및 β-2 메르캅토에탄올), 5% 우태아 혈청, 50 U/ml rhIL-2(eBioscience) 및 3 ㎍/ml CpG(포스포티오화된 CpG ODN-7909-5'-TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT-3'-서열번호 1)을 함유한 RPMI 1640 매질(Gibco)에 재현탁하였다. 다른 CpG 서열은 또한 이러한 B 메모리 평가 방법에 사용하기에 적절하다. 세포를 평평한 바닥 6 웰 당 5 ml 중 10^6 세포/ml의 최종 농도로 5일 동안 배양하였다. 에탄올로 활성화시키는 단계 후에, 니트로셀룰로즈 플레이트(Multiscreen-IP; Millipore)를 PBS 중 1/200으로 희석된 HPV-16/18 L1 또는 염소 항-마우스 Ig(GAM; Sigma) 10 ㎍/ml로 코팅하였다. 완전 매질로 포화 시키는 단계 후에, 100 ㎕의 2×10^6 세포/ml를 HPV16/18 L1 코팅된 플레이트에 첨가하고, 100 ㎕의 5×10^5 세포/ml를 GAM 플레이트에 첨가하였다. 37℃에서 2 시간 동안 인큐베이션한 후에, 플레이트를 4℃에서 하룻밤 동안 보관하였다. 플레이트를 PBS 0.1% 트윈 20으로 4차례 세척하고, PBS 1% BSA 5% FCS(희석 완충액) 중 1/200으로 희석된 항-마우스 Ig Biot를 플레이트에 분포시키고 37℃에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 세척단계 후에, 희석 완충액 중 1/550으로 희석된 엑스트라비딘(Extravidin) HRP(Sigma)을 37℃에서 추가 1 시간 동안 첨가하였다. 플레이트를 상술된 바와 같이 세척하고, AEC(Sigma)의 용액과 함께 실온에서 10 분 동안 인큐베이션하였다. 반응을 수돗물로 서서히 플레이트를 린싱하여 정지시켰다. 건조 후에, 플레이트를 자동화된 ELISPOT 이미지 분석 시스템(Zeiss KS400)으로 분석하였다.

<1366> HPV-16/18 L1에 대해 특이적인 B 메모리 세포의 퍼센트는 총 IgG 스폿과 비교하여 HPV-16/18 L1 양성 스폿의 비에 상응한다.

<1367> **XIII.3. 혈청학상 결과(표 53 내지 55)**

<1368> 표 53

<1369>

	II 후 14일에 안티-VLPs 역가 (EU/ml)			
	HPV16	HPV18	HPV31*	HPV45
VLPs 2.5μg / AS04	528441	512290	28671	42224
VLPs 2.5μg / AS03+ 3D MPL	824773	460800	77232	65716

<1370> 표 54

	II 후 75일에 안티-VLPs 역가 (EU/ml)			
	HPV16	HPV18	HPV31	HPV45*
VLPs 2.5μg / AS04	230425	241983	15846	9812
VLPs 2.5μg / AS03+ 3D MPL	415657	292199	29054	32230

<1371> * 군들 간에 통계학적 차이

<1372> 표 55 - B 세포 메모리

	II 후 33일에 총 IgG 메모리 B 세포에서 HPV 특이적 메모리 B 세포의 빈도	
	HPV16	HPV18
VLPs 2.5μg / AS04	0.4%	0.2%

<1373>

VLPs 2.5μg / AS03+ 3D MPL	0.7%	0.4%
	II 후 75일에 총 IgG 메모리 B 세포에서 HPV 특이적 메모리 B 세포의 빈도	
	HPV16	HPV18
VLPs 2.5μg / AS04	2.0%	0.6%
VLPs 2.5μg / AS03+ 3D MPL	3.8%	0.5%

<1374>

<1375> XIII.4. 결론

<1376> 시험된 동물 모델 시스템에서 AS03+3D-MPL 애주번트는 평가된 HPV 타입에 따라 AS04와 발생되는 것과 동등한, 또는 때때로 이보다 큰 항체 생산 및 B 세포 메모리 모두 대해 면역원성 결과를 나타내었다.

도면

도면1aa

희석액 A

Rec22

크기 (nm)	세기	부피
27.9	0.0	0.0
32.2	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.1	0.0	0.0
49.8	0.0	0.0
57.6	0.0	0.0
66.6	0.0	1.1
77.0	1.0	4.8
89.1	4.0	10.3
103.0	8.4	14.7
119.1	13.3	16.6
137.7	17.3	15.9
159.3	18.8	13.4
184.2	17.1	10.2
212.9	12.3	7.0
246.2	6.2	4.0
284.7	1.5	1.7
329.2	0.0	0.4
380.6	0.0	0.0
440.1	0.0	0.0
508.9	0.0	0.0
588.5	0.0	0.0
680.4	0.0	0.0
786.8	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	160.0	122.3

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	141.3	116.6

수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	109.8	62.5

Rec23

크기 (nm)	세기	부피
23.0	0.0	0.0
27.0	0.0	0.0
31.7	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.9	0.0	0.0
51.5	0.0	0.0
60.6	0.0	1.2
71.2	1.1	5.3
83.7	3.8	10.9
98.4	8.0	15.0
115.6	13.0	16.4
135.9	17.2	15.4
159.7	19.2	12.9
187.7	17.7	9.9
220.7	12.8	6.9
259.4	6.1	4.1
304.8	1.2	1.8
358.3	0.0	0.4
421.1	0.0	0.0
495.0	0.0	0.0
581.8	0.0	0.0
683.8	0.0	0.0
803.7	0.0	0.0
944.6	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	161.7	135.3

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	139.8	128.6

수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	102.0	59.8

도면1ab

Rec24

크기 (nm)	세기	부피
20.2	0.0	0.0
24.0	0.0	0.0
28.6	0.0	0.0
34.0	0.0	0.0
40.4	0.0	0.0
48.0	0.0	0.0
57.1	0.0	0.5
67.9	0.4	3.5
80.7	2.9	9.5
95.9	7.6	15.4
114.0	13.7	18.1
135.6	19.2	17.4
161.2	21.3	14.4
191.7	18.9	10.6
227.9	12.0	6.7
271.0	3.9	3.2
322.2	0.0	0.8
383.1	0.0	0.0
455.5	0.0	0.0
541.5	0.0	0.0
643.9	0.0	0.0
765.5	0.0	0.0
910.2	0.0	0.0
1082.2	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	100.0	160.2	130.1

부피에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	100.0	139.1	126.2

수에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	100.0	104.2	63.0

도 1A

회석액 B

Rec28

크기 (nm)	세기	부피
22.2	0.0	4.1
26.2	0.2	9.7
30.9	0.1	7.1
36.4	0.0	1.5
42.9	0.0	0.0
50.5	0.0	0.0
59.6	0.0	0.0
70.2	0.0	1.2
82.7	1.8	5.1
97.5	6.2	10.4
114.9	13.1	14.3
135.5	20.1	15.3
159.7	23.5	13.4
188.2	20.9	9.9
221.8	12.0	5.6
261.4	2.1	2.0
308.1	0.0	0.3
363.2	0.0	0.0
428.1	0.0	0.0
504.5	0.0	0.0
594.6	0.0	0.0
700.9	0.0	0.0
826.1	0.0	0.0
973.6	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	99.7	159.3	111.5

부피에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	22.5	27.6	10.3
2	77.5	143.3	116.1

수에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	96.4	27.2	9.8
2	3.6	115.4	68.8

도면1ac

Rec29

크기 (nm)	세기	부피
28.1	0.0	0.0
32.5	0.0	0.0
37.6	0.0	0.0
43.4	0.0	0.0
50.2	0.0	0.0
58.1	0.0	0.3
67.1	0.2	2.1
77.6	1.5	5.9
89.7	4.2	10.6
103.7	8.3	14.2
119.9	12.8	15.6
138.6	16.6	14.9
160.2	18.3	12.8
185.2	17.0	10.0
214.1	12.6	7.0
247.6	6.7	4.3
286.2	1.9	2.0
330.9	0.0	0.5
382.5	0.0	0.0
442.2	0.0	0.0
511.2	0.0	0.0
591.0	0.0	0.0
683.2	0.0	0.0
789.8	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	100.0	161.7	127.0

부피에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	100.0	141.4	124.5

수에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	100.0	105.8	62.6

Rec30

크기 (nm)	세기	부피
29.1	0.0	0.0
33.5	0.0	0.0
38.6	0.0	0.0
44.4	0.0	0.0
51.2	0.0	0.0
58.9	0.0	0.3
67.9	0.2	2.1
78.2	1.5	6.0
90.1	4.3	10.7
103.7	8.3	14.2
119.5	12.8	15.6
137.6	16.5	14.9
158.5	18.1	12.8
182.6	16.9	10.0
210.3	12.6	7.0
242.3	6.8	4.2
279.1	2.0	1.9
321.5	0.0	0.4
370.3	0.0	0.0
426.5	0.0	0.0
491.3	0.0	0.0
565.9	0.0	0.0
651.8	0.0	0.0
750.8	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석

피크	면적	평균	폭
1	100.0	159.8	123.3

부피에 의한 피크 분석

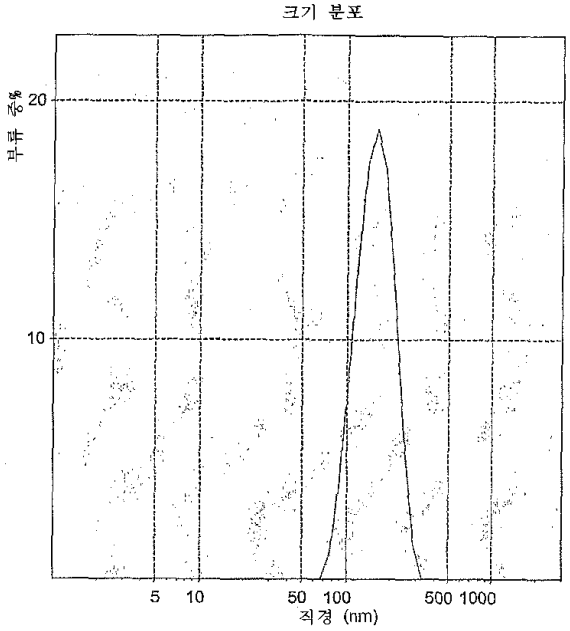
피크	면적	평균	폭
1	100.0	139.6	119.8

수에 의한 피크 분석

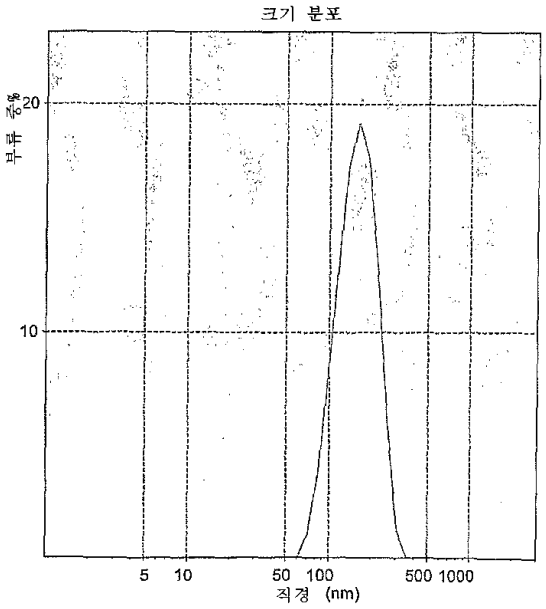
피크	면적	평균	폭
1	100.0	106.0	62.1

도면1b

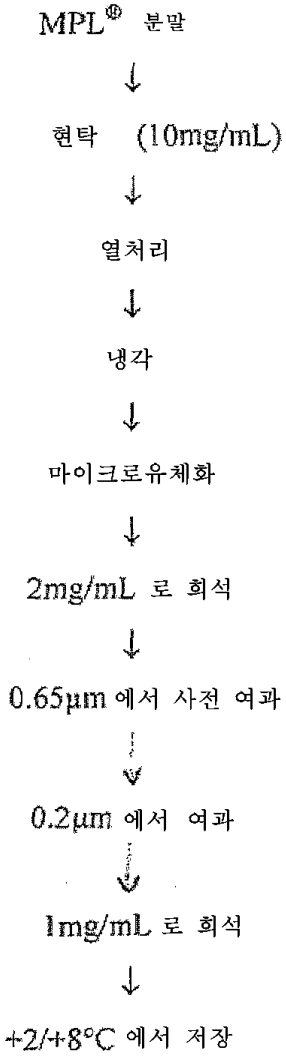
기록 22, 세기



기록 23, 세기



도면2


MPL® 분말
현탁 (10mg/mL)
열처리
냉각
마이크로유체화
2mg/mL 로 희석
0.65μm 에서 사전 여과
0.2μm 에서 여과
1mg/mL 로 희석
+2/+8°C 에서 저장

도면3

주사용 물

+

10X 희석될 때 PBS mod 10Xcc pH 6.8-첨가

+

SB62 벌크-첨가 →781 ㎍/㎖

+

mg/ml에서 MPL 액체 벌크-첨가 →78 ㎍/㎖

↓ 자석 교반 - 시간(분):5-30-

온도(℃) 실온

NaOH 0.05M 또는 0.5M/HCl 0.03 M 또는 0.3M로 pH 6.8±0.1로 조절

↓ 자석 교반 - 시간(분):5-30-

온도(℃) 실온

셀룰로즈 아세테이트 막 상에서 여과/0.22 ㎛

(사르토브란 타입)

↓

샘플링

↓

최소 1분 동안 채워진 용기에 불활성 헤드 공간을 생산하기 위해 불활성 가스를 플러싱함(질소)

↓

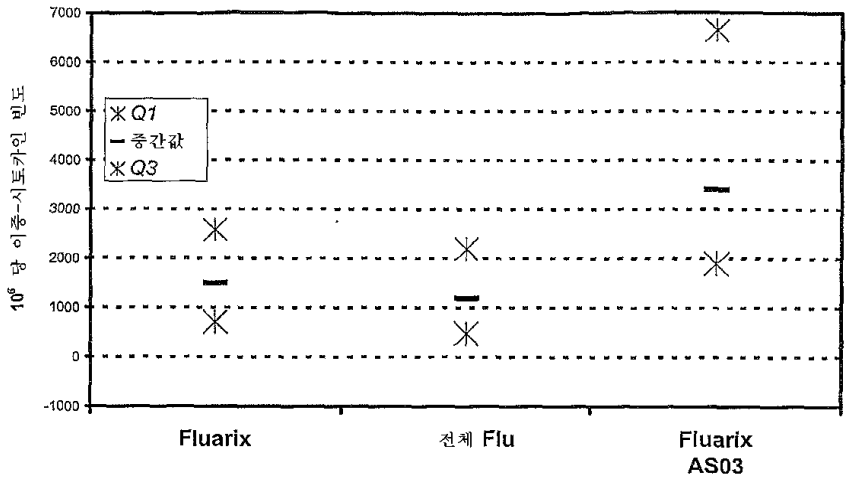
멸균 시험을 위한 샘플링

↓

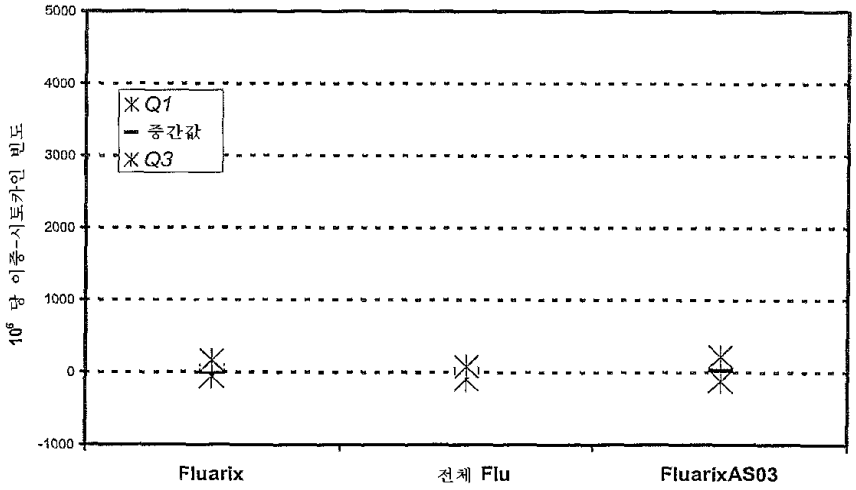
채워질때까지 +2-8℃에서 저장

참조: 백신 벌크는 전체 포뮬레이션 공정 동안 교반하에서 유지됨

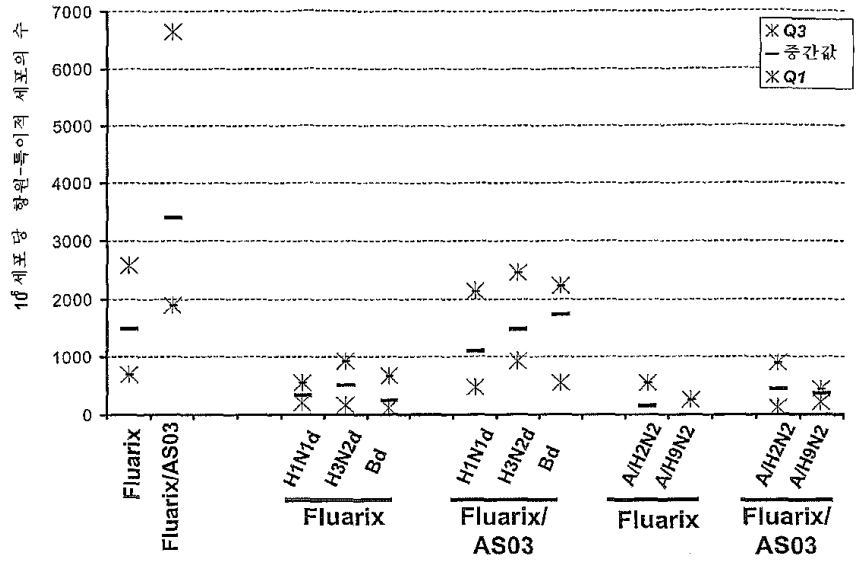
도면4


7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
10⁶ 당 이중-시토카인 빈도
Q1
중간값
Q3
Fluarix
전체 Flu
Fluarix AS03

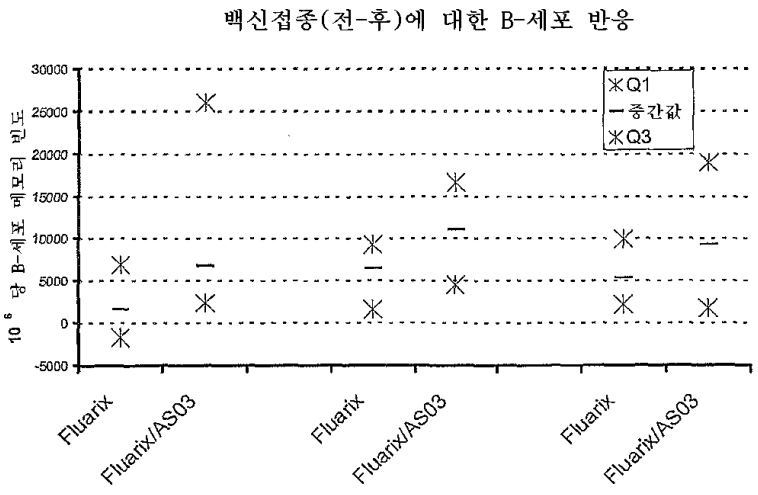
도면5


5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
10⁶ 당 이중-시토카인 빈도
Q1
중간값
Q3
Fluarix
전체 Flu
FluarixAS03

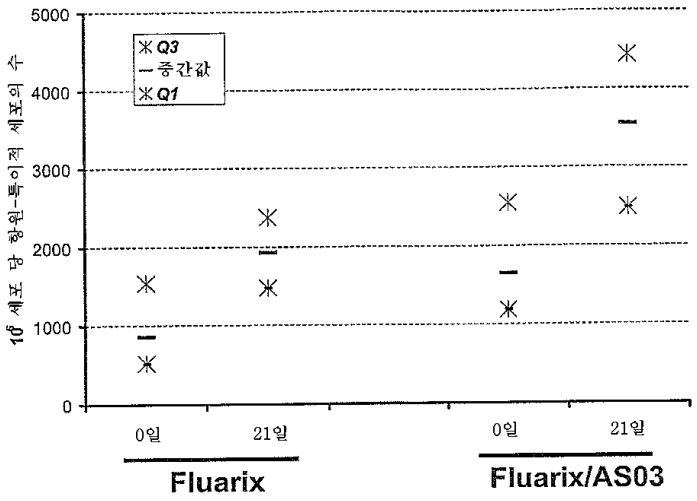
도면6


10⁶세포 당 항원-특이적 세포의 수
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Q3
중간값
Q1
Fluarix
Fluarix/AS03
H1N1d
H3N2d
Bd
Fluarix
Fluarix/AS03
A/H2N2
A/H9N2
Fluarix
Fluarix/AS03

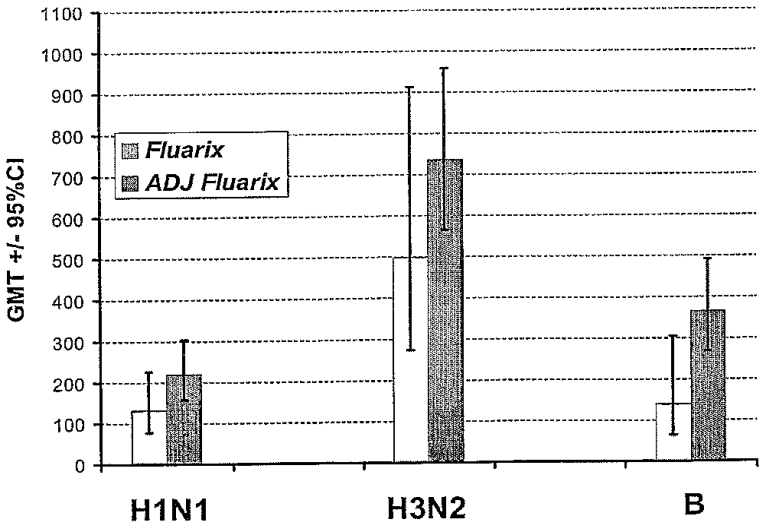
도면7


백신접종(전-후)에 대한 B-세포 반응
10⁶ 당 B-세포 메모리 빈도
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
Q1
중간값
Q3
Fluarix
Fluarix/AS03
Fluarix
Fluarix/AS03
Fluarix
Fluarix/AS03

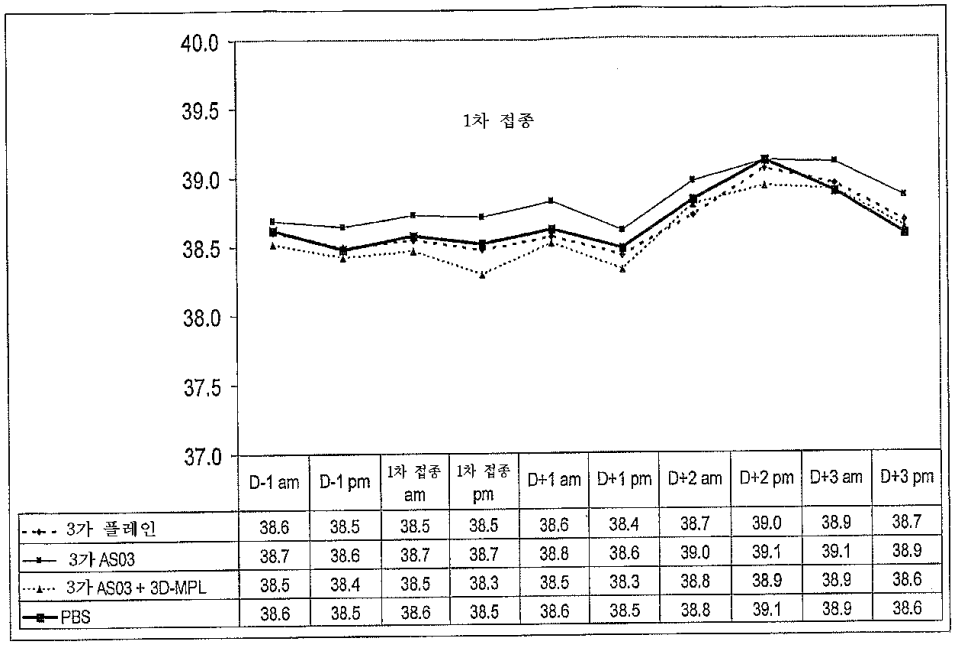
도면8


5000
4000
3000
2000
1000
0
Q3
중간값
Q1
0일
21일
0일
21일
Fluarix
Fluarix/AS03

도면9

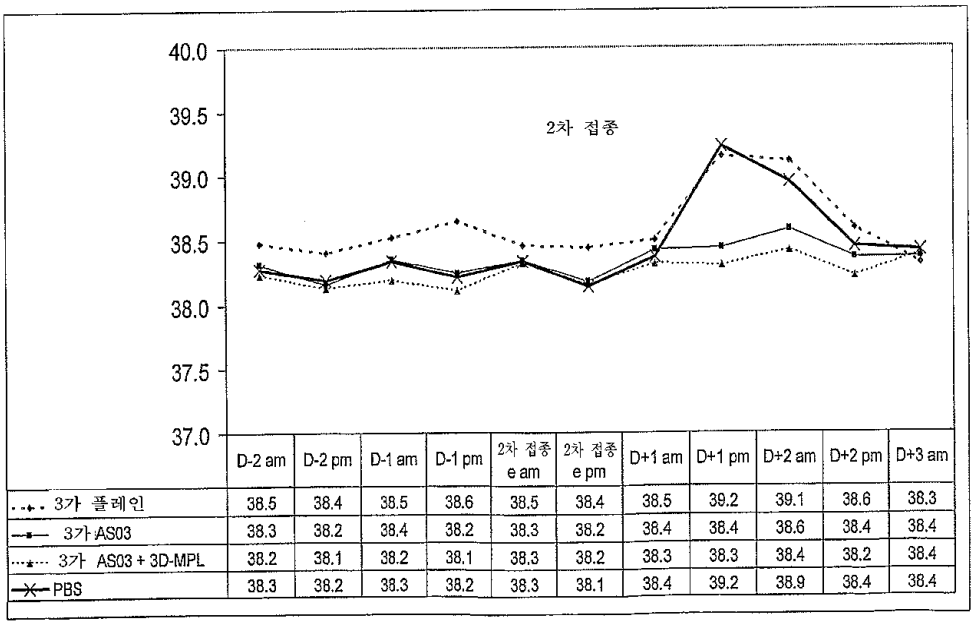

1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
GMT +/- 95%CI
Fluarix
ADJ Fluarix
H1N1
H3N2
B

도면10a



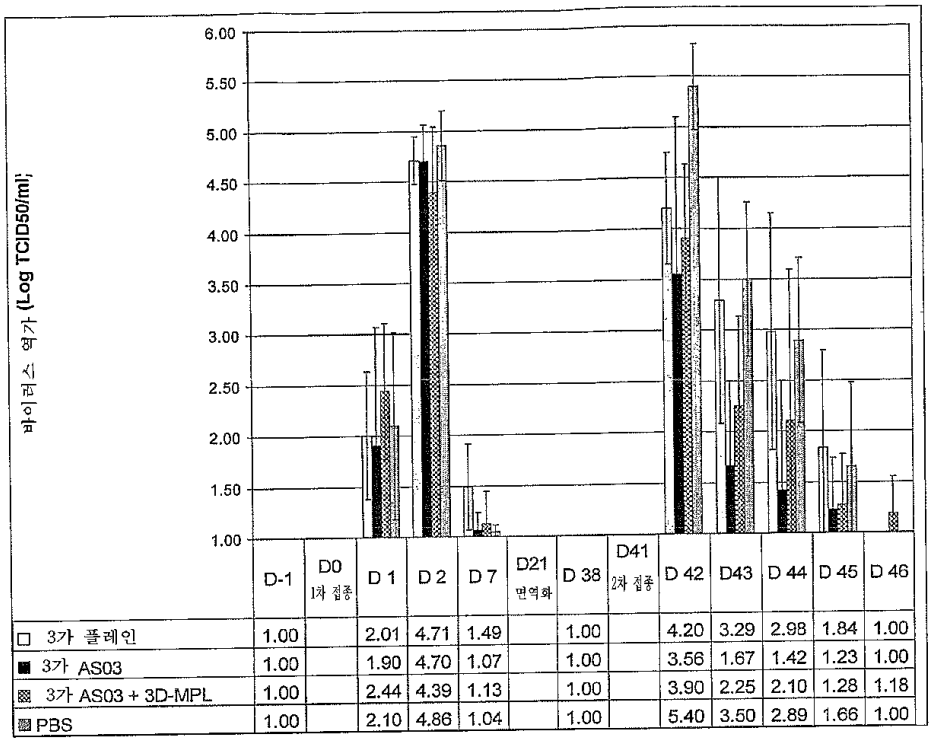
	D-1 am	D-1 pm	1차 접종 am	1차 접종 pm	D+1 am	D+1 pm	D+2 am	D+2 pm	D+3 am	D+3 pm
3가 플레인	38.6	38.5	38.5	38.5	38.6	38.4	38.7	39.0	38.9	38.7
3가 AS03	38.7	38.6	38.7	38.7	38.8	38.6	39.0	39.1	39.1	38.9
3가 AS03 + 3D-MPL	38.5	38.4	38.5	38.3	38.5	38.3	38.8	38.9	38.9	38.6
PBS	38.6	38.5	38.6	38.5	38.6	38.5	38.8	39.1	38.9	38.6

도면10b



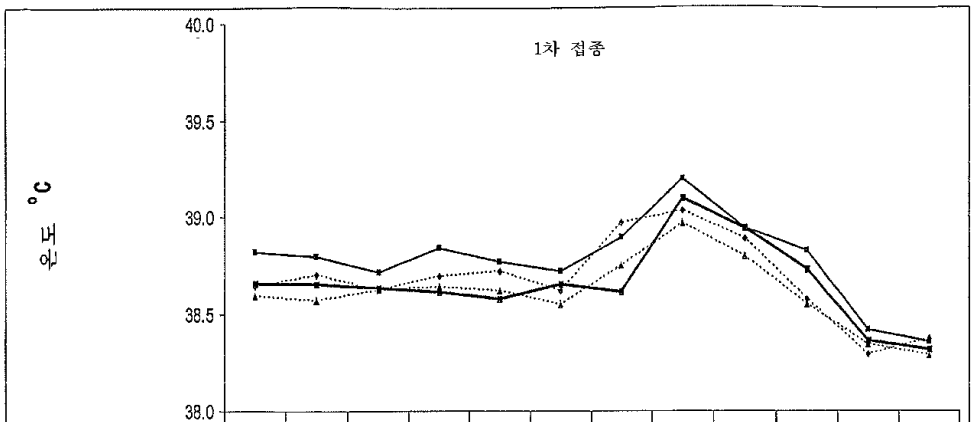
	D-2 am	D-2 pm	D-1 am	D-1 pm	2차 접종 e am	2차 접종 e pm	D+1 am	D+1 pm	D+2 am	D+2 pm	D+3 am
3가 플레인	38.5	38.4	38.5	38.6	38.5	38.4	38.5	39.2	39.1	38.6	38.3
3가 AS03	38.3	38.2	38.4	38.2	38.3	38.2	38.4	38.4	38.6	38.4	38.4
3가 AS03 + 3D-MPL	38.2	38.1	38.2	38.1	38.3	38.2	38.3	38.3	38.4	38.2	38.4
PBS	38.3	38.2	38.3	38.2	38.3	38.1	38.4	39.2	38.9	38.4	38.4

도면11



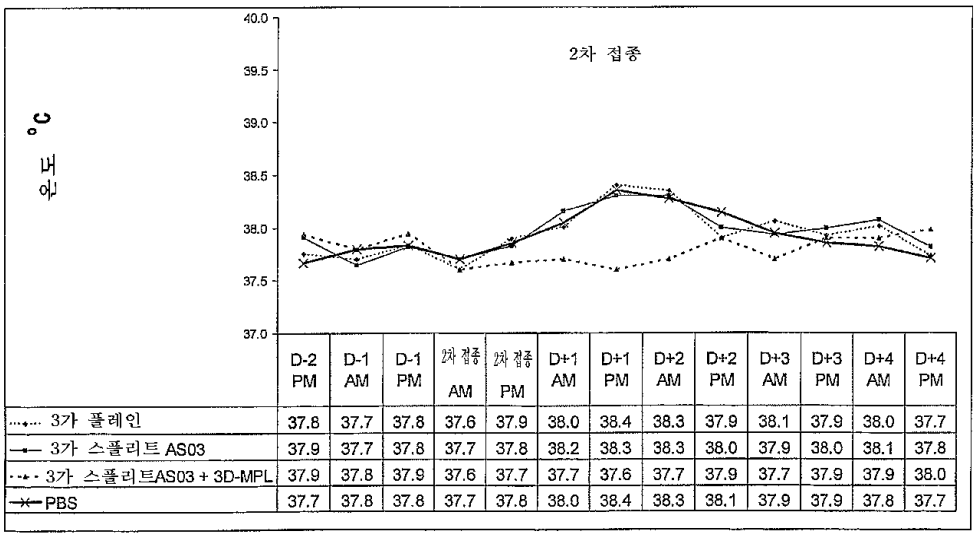
	D-1	D0 1차 접종	D 1	D 2	D 7	D21 면역화	D 38	D41 2차 접종	D 42	D43	D 44	D 45	D 46
□ 3가 플레인	1.00		2.01	4.71	1.49		1.00		4.20	3.29	2.98	1.84	1.00
■ 3가 AS03	1.00		1.90	4.70	1.07		1.00		3.56	1.67	1.42	1.23	1.00
▩ 3가 AS03 + 3D-MPL	1.00		2.44	4.39	1.13		1.00		3.90	2.25	2.10	1.28	1.18
▨ PBS	1.00		2.10	4.86	1.04		1.00		5.40	3.50	2.89	1.66	1.00

도면12a



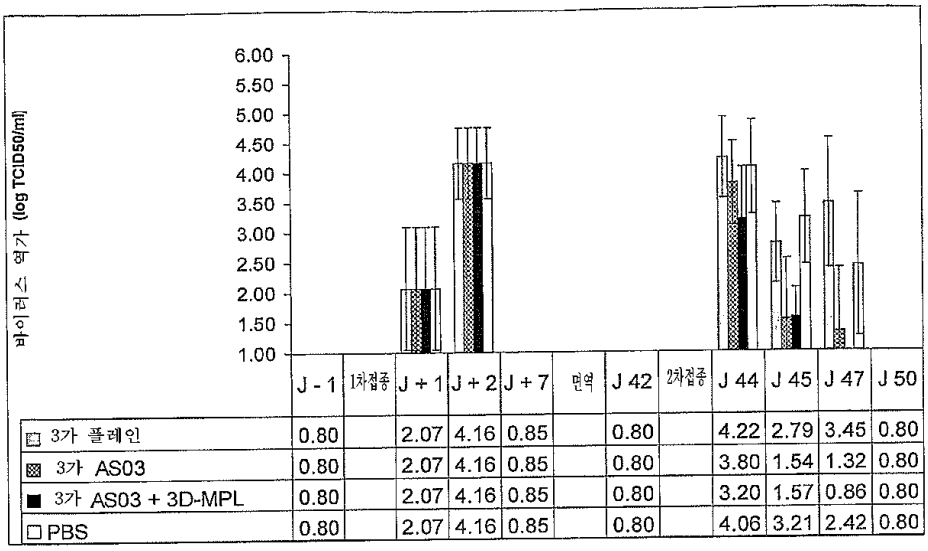
	D-1 AM	D-1 PM	1차접종 AM	1차접종 PM	D+1 AM	D+1 PM	D+2 AM	D+2 PM	D+3 AM	D+3 PM	D+6 AM	D+6 PM
···+··· 3가 플레인	38.6	38.7	38.6	38.7	38.7	38.6	39.0	39.0	38.9	38.6	38.3	38.4
—■— 3가 AS03	38.8	38.8	38.7	38.8	38.8	38.7	38.9	39.2	38.9	38.8	38.4	38.4
···▲··· 3가 AS03 + 3D-MPL	38.6	38.6	38.6	38.6	38.6	38.5	38.7	39.0	38.8	38.6	38.3	38.3
—●— PBS	38.7	38.7	38.6	38.6	38.6	38.7	38.6	39.1	38.9	38.7	38.4	38.3

도면12b



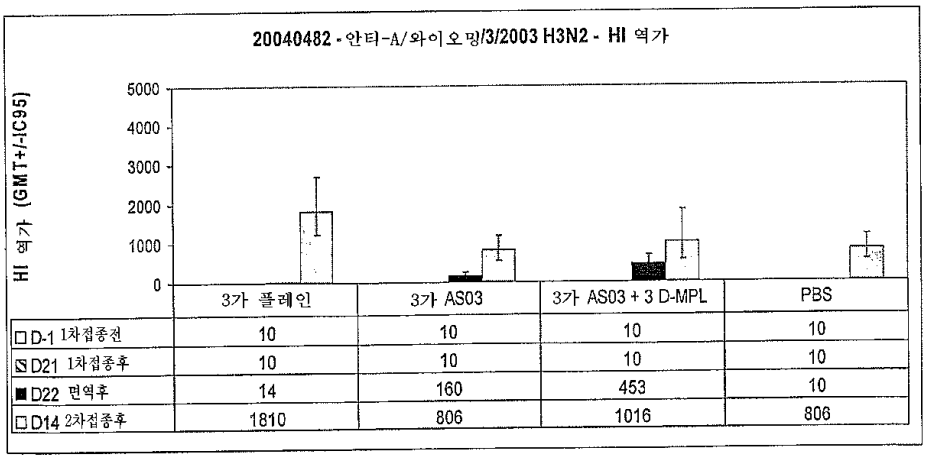
	D-2 PM	D-1 AM	D-1 PM	2차 접종 AM	2차 접종 PM	D+1 AM	D+1 PM	D+2 AM	D+2 PM	D+3 AM	D+3 PM	D+4 AM	D+4 PM
3가 플레인	37.8	37.7	37.8	37.6	37.9	38.0	38.4	38.3	37.9	38.1	37.9	38.0	37.7
3가 스플리트 AS03	37.9	37.7	37.8	37.7	37.8	38.2	38.3	38.3	38.0	37.9	38.0	38.1	37.8
3가 스플리트AS03 + 3D-MPL	37.9	37.8	37.9	37.6	37.7	37.7	37.6	37.7	37.9	37.7	37.9	37.9	38.0
PBS	37.7	37.8	37.8	37.7	37.8	38.0	38.4	38.3	38.1	37.9	37.9	37.8	37.7

도면13



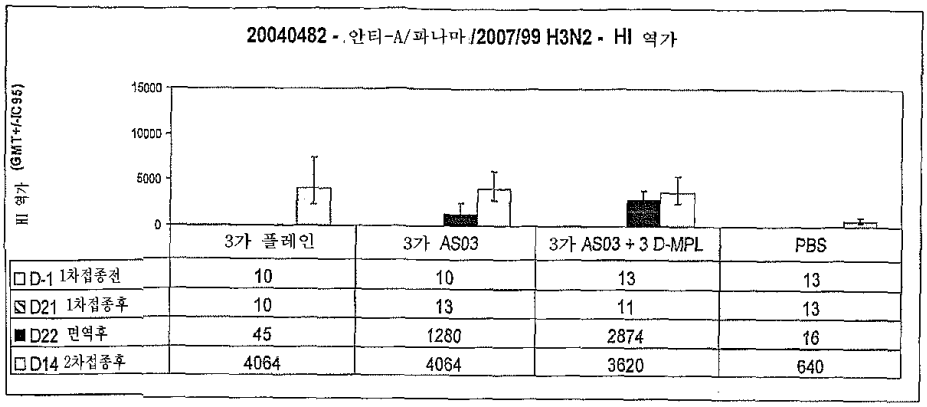
	J - 1	1차접종	J + 1	J + 2	J + 7	면역	J 42	2차접종	J 44	J 45	J 47	J 50
3가 플레인	0.80		2.07	4.16	0.85		0.80		4.22	2.79	3.45	0.80
3가 AS03	0.80		2.07	4.16	0.85		0.80		3.80	1.54	1.32	0.80
3가 AS03 + 3D-MPL	0.80		2.07	4.16	0.85		0.80		3.20	1.57	0.86	0.80
PBS	0.80		2.07	4.16	0.85		0.80		4.06	3.21	2.42	0.80

도면14a



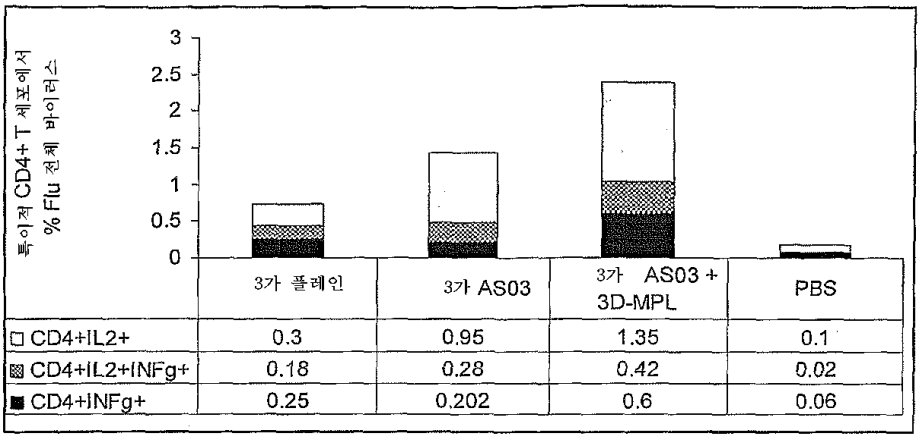
	3가 플레인	3가 AS03	3가 AS03 + 3 D-MPL	PBS
□ D-1 1차접종전	10	10	10	10
▨ D21 1차접종후	10	10	10	10
■ D22 면역후	14	160	453	10
□ D14 2차접종후	1810	806	1016	806

도면14b



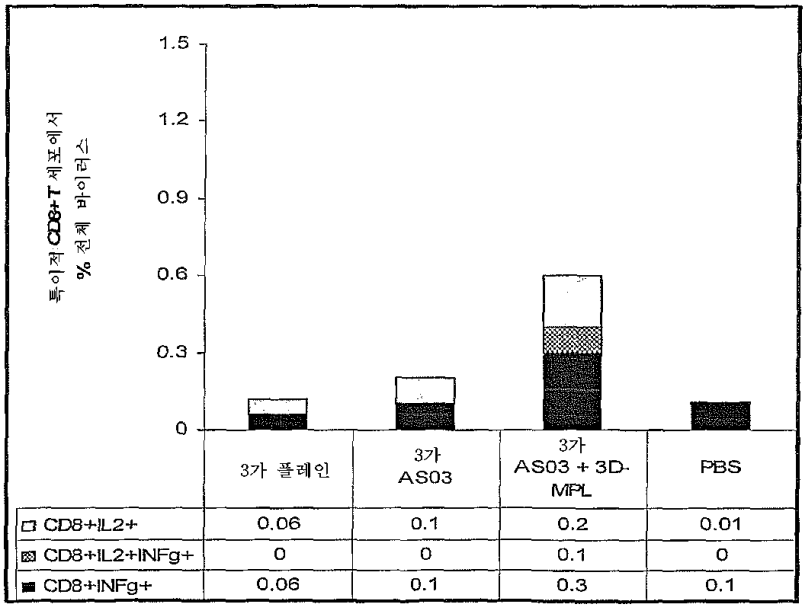
	3가 플레인	3가 AS03	3가 AS03 + 3 D-MPL	PBS
□ D-1 1차접종전	10	10	13	13
▨ D21 1차접종후	10	13	11	13
■ D22 면역후	45	1280	2874	16
□ D14 2차접종후	4064	4064	3620	640

도면15



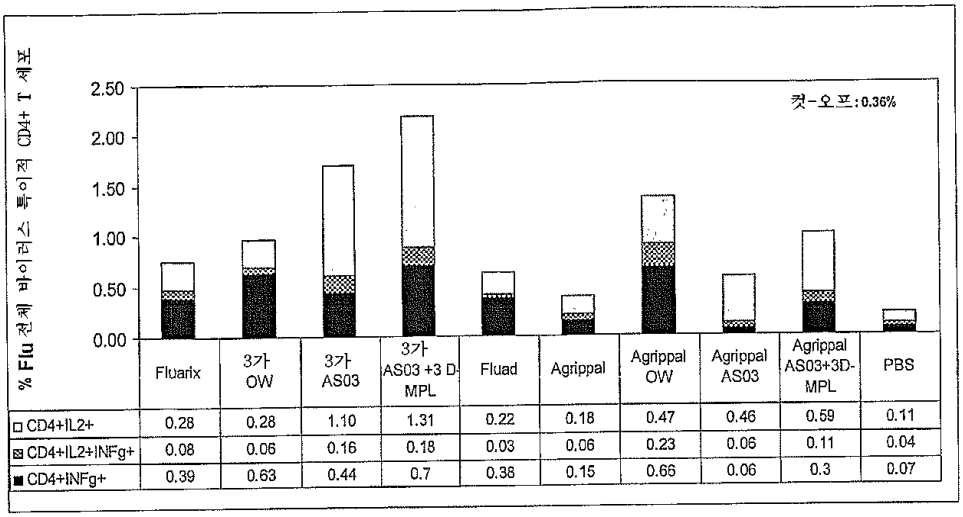
	3가 플레인	3가 AS03	3가 AS03 + 3D-MPL	PBS
□ CD4+IL2+	0.3	0.95	1.35	0.1
▨ CD4+IL2+INFg+	0.18	0.28	0.42	0.02
■ CD4+INFg+	0.25	0.202	0.6	0.06

도면16

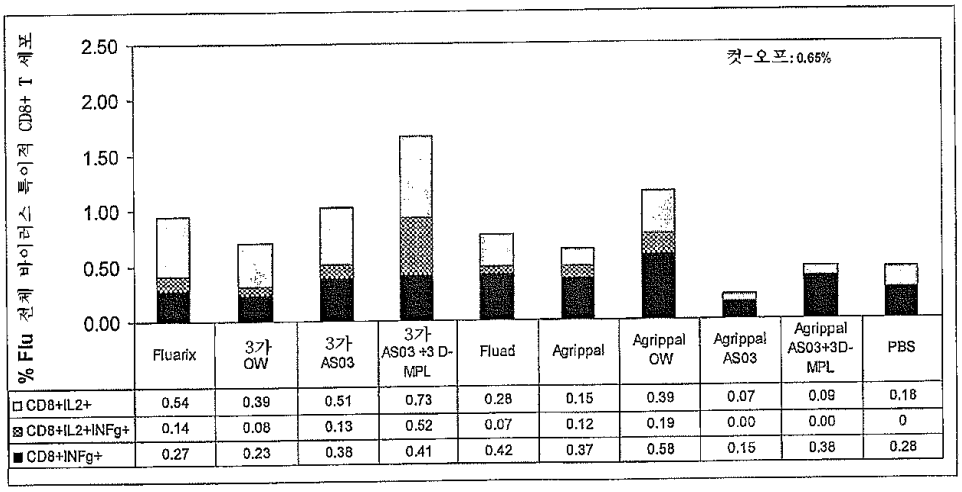


	3가 플레인	3가 AS03	3가 AS03 + 3D-MPL	PBS
CD8+IL2+	0.06	0.1	0.2	0.01
CD8+IL2+INFg+	0	0	0.1	0
CD8+INFg+	0.06	0.1	0.3	0.1

도면17

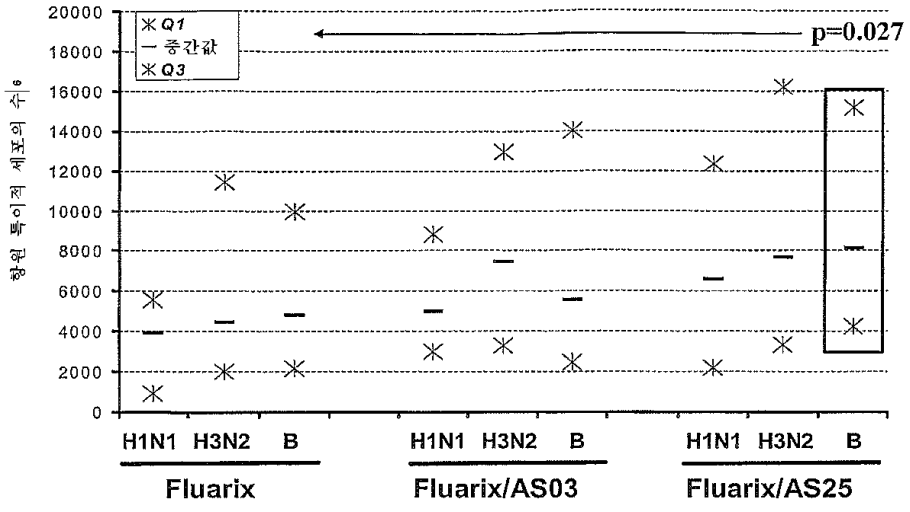


	Fluarix	3가 OW	3가 AS03	3가 AS03 +3 D-MPL	Fluad	Agrippal	Agrippal OW	Agrippal AS03	Agrippal AS03+3D-MPL	PBS
□ CD4+IL2+	0.28	0.28	1.10	1.31	0.22	0.18	0.47	0.46	0.59	0.11
⊠ CD4+IL2+INFg+	0.08	0.06	0.16	0.18	0.03	0.06	0.23	0.06	0.11	0.04
■ CD4+INFg+	0.39	0.63	0.44	0.7	0.38	0.15	0.66	0.06	0.3	0.07

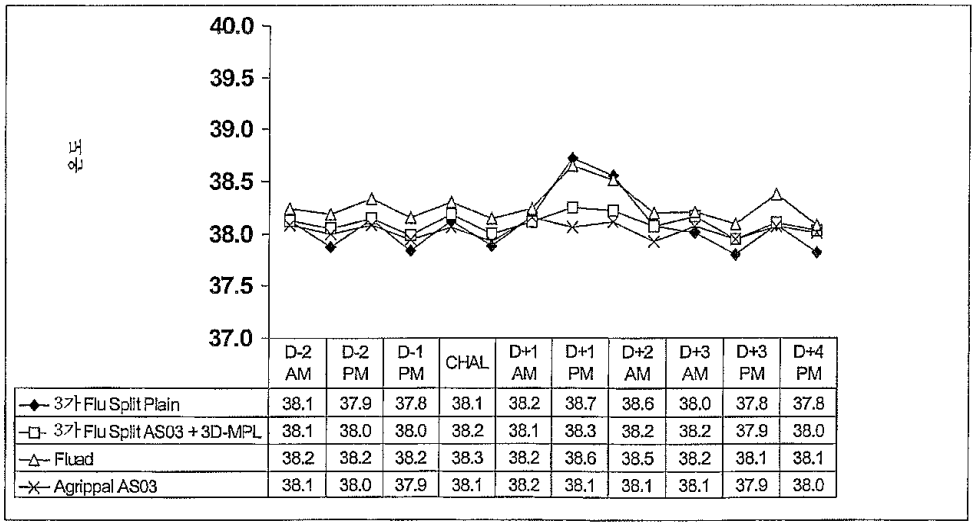


	Fluarix	3가 OW	3가 AS03	3가 AS03 +3 D-MPL	Fluad	Agrippal	Agrippal OW	Agrippal AS03	Agrippal AS03+3D-MPL	PBS
□ CD8+IL2+	0.54	0.39	0.51	0.73	0.28	0.15	0.39	0.07	0.09	0.18
⊠ CD8+IL2+INFg+	0.14	0.08	0.13	0.52	0.07	0.12	0.19	0.00	0.00	0
■ CD8+INFg+	0.27	0.23	0.38	0.41	0.42	0.37	0.58	0.15	0.38	0.28

도면18

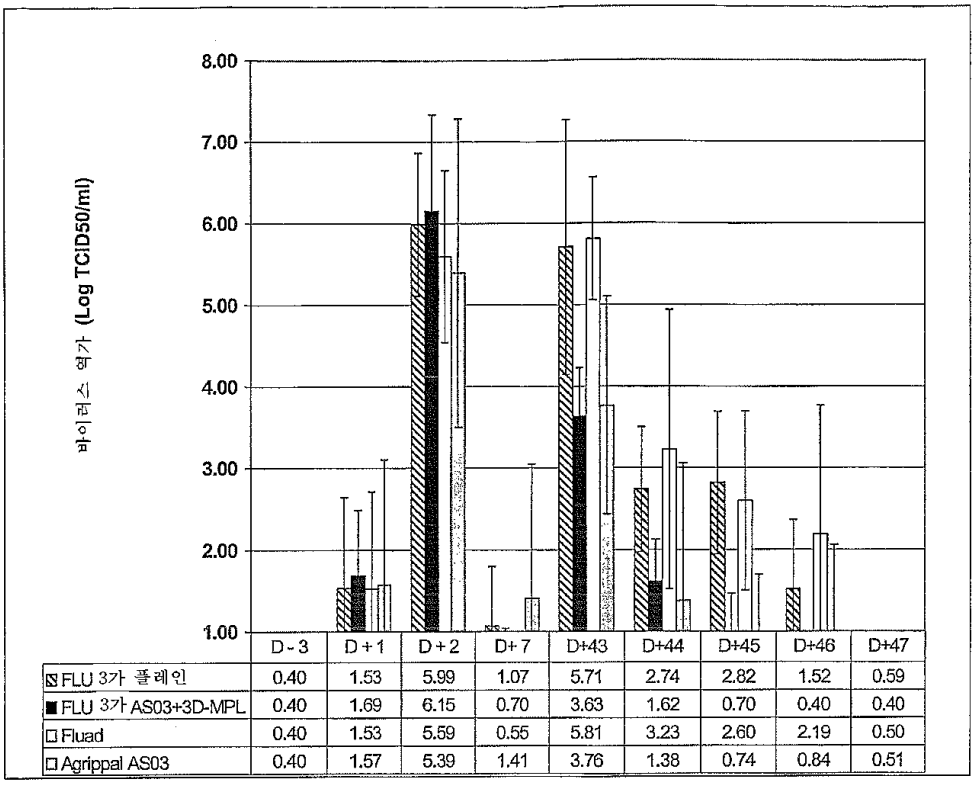


도면19



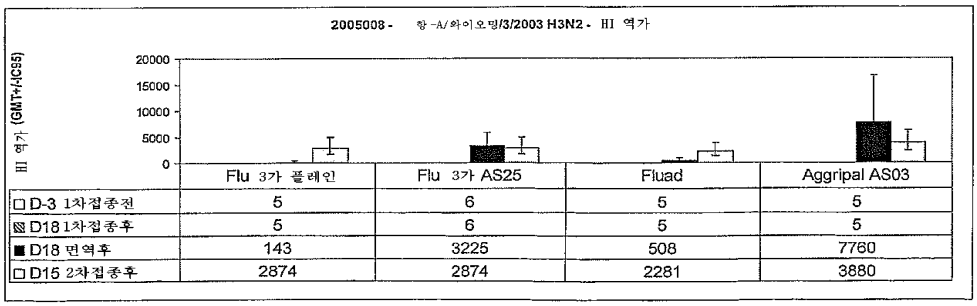
	D-2 AM	D-2 PM	D-1 PM	CHAL	D+1 AM	D+1 PM	D+2 AM	D+3 AM	D+3 PM	D+4 PM
3가 Flu Split Plain	38.1	37.9	37.8	38.1	38.2	38.7	38.6	38.0	37.8	37.8
3가 Flu Split AS03 + 3D-MPL	38.1	38.0	38.0	38.2	38.1	38.3	38.2	38.2	37.9	38.0
Fluad	38.2	38.2	38.2	38.3	38.2	38.6	38.5	38.2	38.1	38.1
Agrippal AS03	38.1	38.0	37.9	38.1	38.2	38.1	38.1	38.1	37.9	38.0

도면20



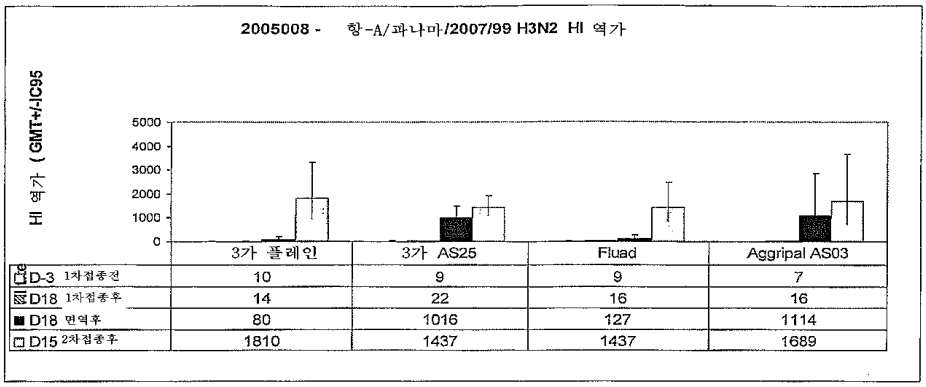
	D-3	D+1	D+2	D+7	D+43	D+44	D+45	D+46	D+47
FLU 3가 플레인	0.40	1.53	5.99	1.07	5.71	2.74	2.82	1.52	0.59
FLU 3가 AS03+3D-MPL	0.40	1.69	6.15	0.70	3.63	1.62	0.70	0.40	0.40
Fluad	0.40	1.53	5.59	0.55	5.81	3.23	2.60	2.19	0.50
Agrippal AS03	0.40	1.57	5.39	1.41	3.76	1.38	0.74	0.84	0.51

도면21



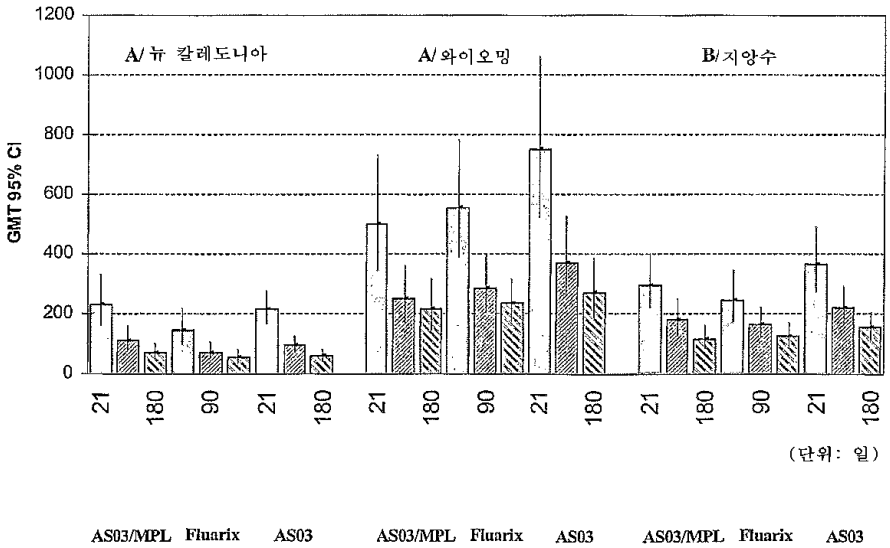
	Flu 3가 플레인	Flu 3가 AS25	Fluad	Aggripal AS03
D-3 1차접종전	5	6	5	5
D18 1차접종후	5	6	5	5
D18 면역후	143	3225	508	7760
D15 2차접종후	2874	2874	2281	3880

도면22

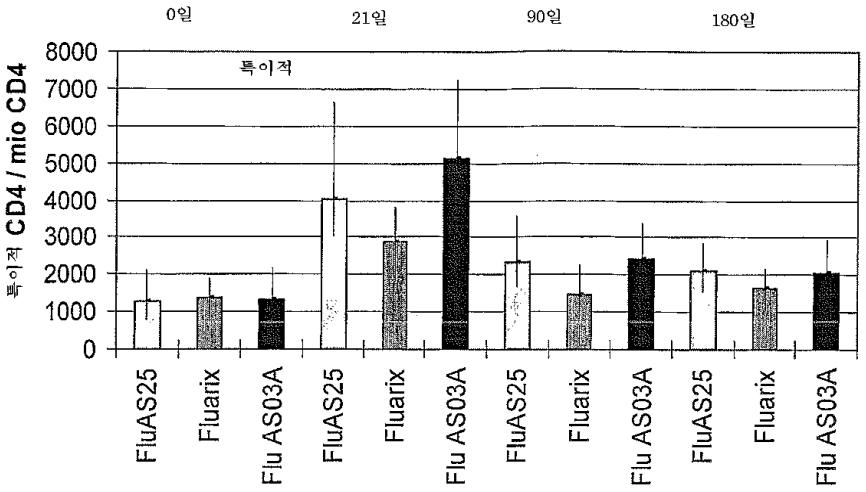


	3가 플레인	3가 AS25	Fluad	Aggripal AS03
D-3 1차접종전	10	9	9	7
D18 1차접종후	14	22	16	16
D18 면역후	80	1016	127	1114
D15 2차접종후	1810	1437	1437	1689

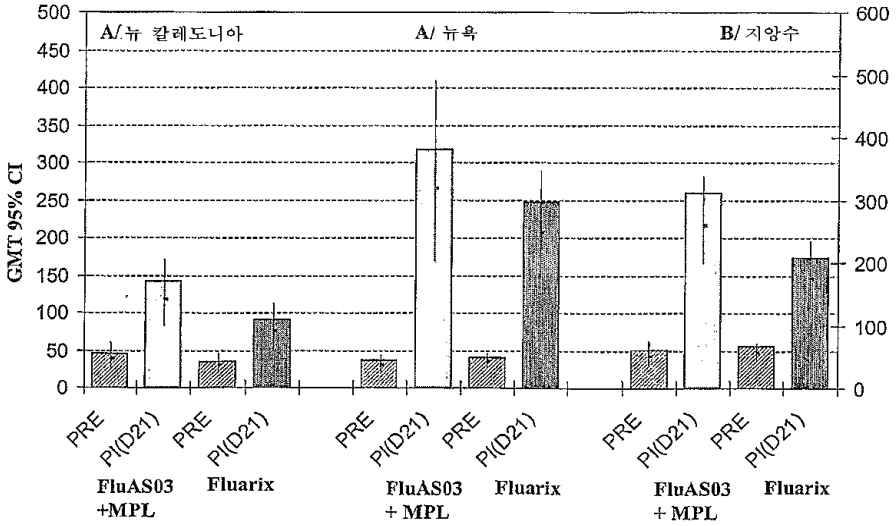
도면23



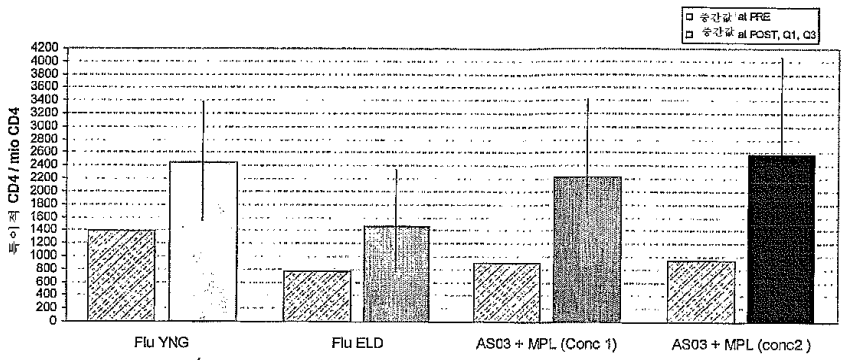
도면24



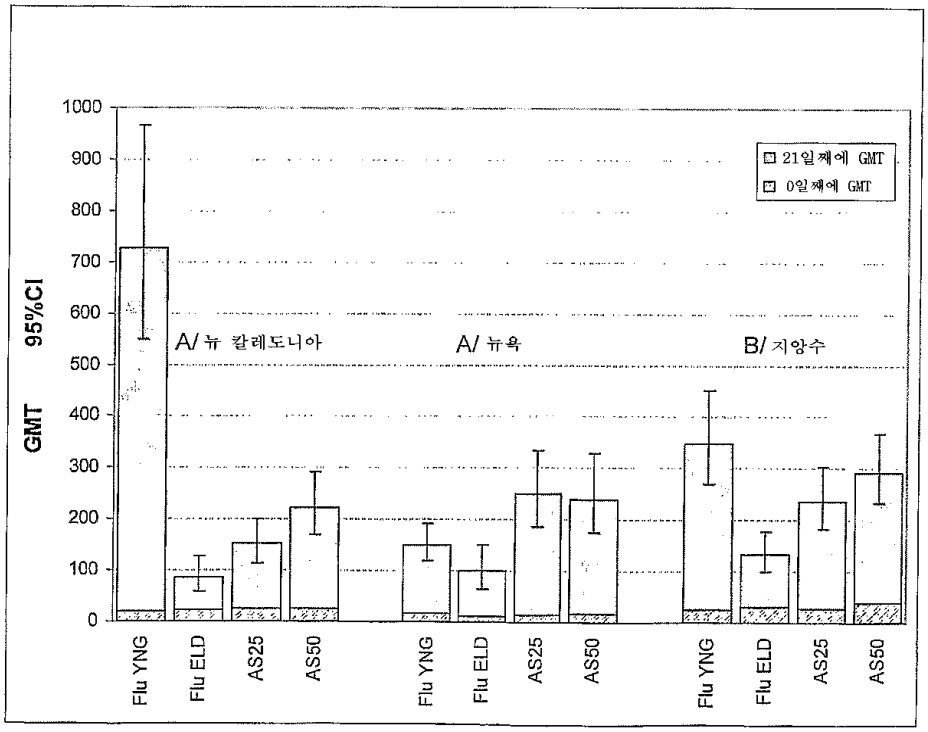
도면25



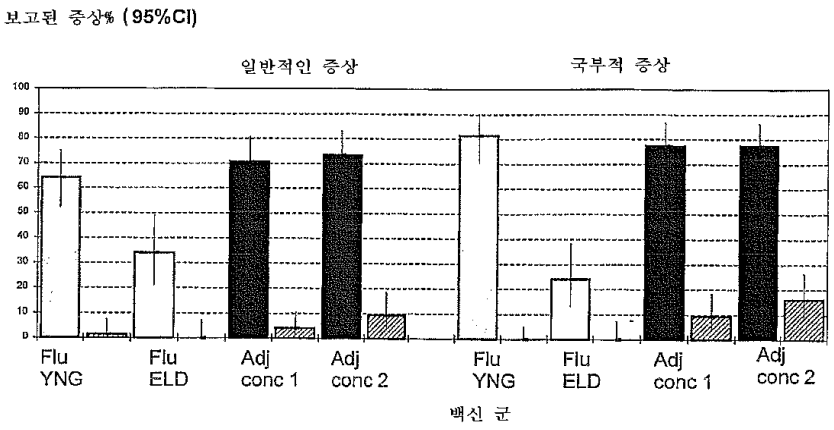
도면26



도면27



도면28



서열목록

<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa

<120> Composition

<130> VB61319

<160> 1

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence

<400> 1
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24