



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0022897
(43) 공개일자 2019년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/04 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/26 (2017.01)
A61K 9/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/04 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7004934(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2011년12월14일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2013-7018060
원출원일자(국제) 2011년12월14일
심사청구일자 2016년12월02일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/072816
- (87) 국제공개번호 WO 2012/080369
국제공개일자 2012년06월21일
- (30) 우선권주장
61/422,723 2010년12월14일 미국(US)

- (71) 출원인
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 리젠사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89 트 89
- (72) 발명자
고다르트, 스테판 안드레 조지스
벨기에 비-1330 리젠사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
라안안, 아미나
벨기에 비-1330 리젠사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
레모인, 도미니크 인그리트
벨기에 비-1330 리젠사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

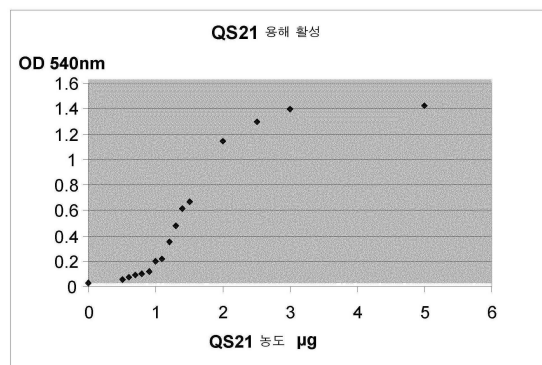
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 **미코박테리움 항원성 조성물**

(57) 요약

본 발명은 조성물의 전도성이 13 mS/cm 또는 그 미만이거나, 조성물의 염의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물, 및 약제에서의 이의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 9/08 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/55572 (2013.01)

A61K 2039/55577 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 조성물의 전도성이 13 mS/cm 또는 그 미만이고/거나;
- (ii) 상기 조성물 중 염의 농도가 130 mM 또는 그 미만이고/거나;
- (iii) 상기 조성물 중 소듐 클로라이드의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 조성물의 전도성이 10 mS/cm 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 조성물의 전도성이 3 mS/cm 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물 중 염의 농도가 100 mM 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 조성물 중 염의 농도가 40 mM 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물 중 소듐 클로라이드의 농도가 100 mM 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 조성물 중 소듐 클로라이드의 농도가 40 mM 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물 중 CaCl_2 의 농도가 30 mM 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물 중 MgSO_4 의 농도가 60 mM 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, NH_4^+ , Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 이온의 총 농도가 40 mM 또는 그 미만인 면역원성 조성물.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 비이온성 긴장제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 비이온성 긴장제가 폴리올인 면역원성 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 폴리올이 소르비톨인 면역원성 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 소르비톨의 농도가 약 4 내지 약 6% (w/v)인 면역원성 조성물.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 수크로스의 농도가 약 4 내지 약 6% (w/v)인 면역원성 조성물.

청구항 16

제 1항 내지 제 15항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 면역자극제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, 면역자극제가 사포닌 및/또는 TLR4 효능제인 면역원성 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, 면역자극제(들)가 리포솜의 형태인 면역원성 조성물.

청구항 19

제 17항 또는 제 18항에 있어서, 사포닌이 QS21인 면역원성 조성물.

청구항 20

제 17항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서, TLR4 효능제가 3-테-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A인 면역원성 조성물.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 삼투질농도가 250 내지 750 mOsm/kg인 면역원성 조성물.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 50 μ l 내지 1 ml의 단위 용량으로 제공되는 면역원성 조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서, 단위 용량이 100 μ l 내지 750 μ l인 면역원성 조성물.

청구항 24

제 22항 또는 제 23항에 있어서, 단위 용량이 1 내지 100 μ g의 M72 관련 단백질을 함유하는 면역원성 조성물.

청구항 25

제 24항에 있어서, 단위 용량이 5 내지 50 μ g의 M72 관련 단백질을 함유하는 면역원성 조성물.

청구항 26

제 1항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 pH가 7.0 내지 9.0의 범위인 면역원성 조성물.

청구항 27

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 1과 70% 이상의 동일성을 지니는 서열을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 28

제 27항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 1과 70% 이상의 동일성을 지니는 서열로 구성되는 면역원성 조성물.

청구항 29

제 28항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 1과 90% 이상의 동일성을 지니는 서열을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 30

제 29항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 1과 90% 이상의 동일성을 지니는 서열로 구성되는 면역원성 조성물.

청구항 31

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 1의 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 32

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 3의 아미노산 서열을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 33

제 31항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 1의 아미노산 서열로 구성되는 면역원성 조성물.

청구항 34

제 32항에 있어서, M72 관련 항원이 SEQ ID No: 3의 아미노산 서열로 구성되는 면역원성 조성물.

청구항 35

제 1항 내지 제 32항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물의 항원성의 80% 이상이 25℃에서 24시간의 기간 동안 저장한 후에 남아 있는 면역원성 조성물.

청구항 36

제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 있어서, 약제에 사용하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 37

약제의 제조에서 제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물의 용도.

청구항 38

안전하고 유효한 양의 제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 미코박테리아에 의한 감염, 예컨대 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의한 감염을 예방, 치료 또는 개선시키는 방법.

청구항 39

- a) M72 관련 항원을 냉동건조시키는 단계; 및
 - b) 상기 단계 a)의 냉동건조된 M72 관련 항원을 수용액으로 재구성하는 단계로서, (i) 용액의 전도성이 13 mS/cm 또는 그 미만이고/거나, (ii) 상기 용액 중 염의 농도가 130 mM 또는 그 미만이고/거나, (iii) 상기 용액 중 소듐 클로라이드의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 단계를 포함하는,
- 제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 40

- a) M72 관련 항원을 냉동건조시키는 단계; 및
- b) 상기 단계 a)의 냉동건조된 M72 관련 항원을 수용액으로 재구성하는 단계로서,
 - (i) 용액의 전도성이 13 mS/cm 또는 그 미만이고/거나,
 - (ii) 상기 용액 중 염의 농도가 130 mM 또는 그 미만이고/거나,
 - (iii) 상기 용액 중 소듐 클로라이드의 농도가 130 mM 또는 그 미만이고,
 면역원성 조성물의 항원성의 80% 이상이 25°C에서 24시간의 기간 동안 저장한 후에 남아 있는 단계를 포함하는, 제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 따른 안정한 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 41

- a) 냉동건조된 M72 관련 항원; 및
- b) (i) 용액의 전도성이 13 mS/cm 또는 그 미만이고/거나,
- (ii) 상기 용액 중 염의 농도가 130 mM 또는 그 미만이고/거나,
- (iii) 상기 용액 중 소듐 클로라이드의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 수용액을 포함하는 키트.

청구항 42

수용액이 면역자극제를 포함하는 제 39항의 방법, 제 40항의 방법 또는 제 41항의 키트.

청구항 43

제 42항에 있어서, 수용액이 리포솜 제형의 사포닌 및 TLR4 효능제, 및 비이온성 긴장제를 포함하는 방법 또는 키트.

청구항 44

제 43항에 있어서, 비이온성 긴장제가 소르비톨인 방법 또는 키트.

청구항 45

제 44항에 있어서, 소르비톨의 농도가 약 2.5 내지 약 15% (w/v)인 방법 또는 키트.

청구항 46

제 43항 내지 제 45항 중 어느 한 항에 있어서, 사포닌이 QS21인 방법 또는 키트.

청구항 47

제 43항 내지 제 46항 중 어느 한 항에 있어서, TLR4 효능제가 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A인 방법 또는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하고 낮은 이온 강도를 지니는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 하나 이상의 면역자극제를 추가로 포함하는 그러한 면역원성 조성물에 관한 것이다. 그러한 면역원성 조성물의 제조 방법 및 관련 키트가 또한 제공된다.

배경 기술

[0002] 결핵(TB)은 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 다른 미코박테리움 종의 감염에 의해 야기되는 만성 감염성 질환이다. 이는 개발 도상국에서의 주요 질병이며, 또한 전세계의 개발 지역에서도 증가

하고 있는 문제이다. 20억명 이상의 사람이 TB 바실러스에 감염되어 있는 것으로 생각되고, 매년 약 940만건의 신규한 TB 증례 및 170만명의 사망자가 발생하고 있다. TB 바실러스에 감염된 사람 중 10%가 활성 TB로 발달할 것이며, 활성 TB 감염을 가진 환자는 제각기 해마다 평균적으로 10 내지 15명의 다른 사람을 감염시킨다. 1년 발병률은 세계적으로 최고도에 이르고 있으며, 인구 성장으로 인해 사망자 및 증례의 수도 여전히 증가하고 있다(World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010).

[0003] 단백질 항원 Mt672f 및 M72 (예를 들어, 국제 특허 출원 W02006/117240에 기재됨) 또는 이의 단편 또는 유도체는 결핵의 치료 또는 예방에 잠재적 이익인 단백질 항원이다.

[0004] 단백질 항원의 제형은 면역원성이 유지되도록 보장하는데 매우 중요하다. 때로 면역자극제를 이용하여 어떠한 주어진 항원에 대해 생성되는 면역 반응을 개선시킨다. 그러나, 면역원성 조성물에 애주번트를 포함시키는 것은 구성요소 준비의 복잡성뿐 아니라 조성물의 분포 및 제형화의 복잡성을 증가시킨다. 각각의 애주번트 구성요소뿐 아니라 항원성 구성요소의 준비는 포물레이터에 의해 고려되어야 한다. 특히, 애주번트 구성요소와 항원성 구성요소의 상용성이 고려되어야 한다. 이것은 특히 냉동건조된 항원 또는 항원성 제조물을 애주번트 제조물로 재구성하고자 하는 경우이다. 그러한 상황에서, 애주번트 제조물의 완충제는 항원에 적합하고 항원의 면역원성 또는 용해성은 애주번트에 의해 영향을 받지 않는 것이 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] **발명의 개요**

[0006] 본 발명자들은 M72 관련 항원이 염의 존재에 특히 민감하다는 것을 처음으로 확인하였다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, M72 관련 항원은 소듐 클로라이드와 같은 염과의 상호작용에 의해 단백질을 그 용액으로부터 침전시키는 것으로 정의될 수 있는 "염석(salting out)"으로 공지된 현상에 의해 불리한 영향을 받는 것으로 여겨진다. 본 발명자들은 이러한 항원이 150 mM만큼 낮은 소듐 클로라이드의 농도에서 응집되고 침전되는 것을 발견하였다. 결과적으로, M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물의 안정성은 놀랍게도 소듐 클로라이드 농도에서의 감소에 의해 향상될 수 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 따라서, 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하고, 이 때 조성물의 전도성은 13 mS/cm 또는 그 미만이다.

[0008] 또한 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물이 제공되며, 여기서 상기 조성물 중 염의 농도는 130 mM 또는 그 미만이다.

[0009] 본 발명은 또한 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 상기 조성물 중 소듐 클로라이드의 농도는 130 mM 또는 그 미만이다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1. QS21 용해 활성 곡선
- 도 2. 상이한 ASA 제형에서 각각의 3D-MPL 동류물(congener)의 백분율
- 도 3. 저장 후 변화된 pH 및 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 DLS
- 도 4. 저장 후 변화된 pH 및 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 비탁법
- 도 5. 저장 이후에 변화된 pH 및 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 항원성 안정성
- 도 6a-6d. 저장 후 변화된 pH 및 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 SEC-HPLC 분석
- 도 7. 저장 후 변화된 pH 및 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 항원성
- 도 8. NaCl 표준 용액의 전도성
- 도 9. 본 발명의 면역원성 조성물을 이용한 마우스에서 CD4 T 세포 반응의 유도

- 도 10. 본 발명의 면역원성 조성물을 이용한 마우스에서 CD8 T 세포 반응의 유도
- 도 11. 저장 후 변화된 pH 및 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 비탁법
- 도 12. 저장 후 변화된 pH 및 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 DLS
- 도 13. 저장 후 변화된 NaCl 농도를 갖는 면역원성 조성물의 항원성

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 서열 식별의 간단한 설명
- [0012] SEQ ID No: 1 M72 단백질에 대한 아미노산 서열
- [0013] SEQ ID No: 2 M72 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0014] SEQ ID No: 3 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 단백질에 대한 아미노산 서열
- [0015] SEQ ID No: 4 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0016] SEQ ID No: 5 Mtb72f 단백질에 대한 아미노산 서열
- [0017] SEQ ID No: 6 Mtb72f 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0018] SEQ ID No: 7 6개의 N-말단 His 잔기를 지니는 Mtb72f 단백질에 대한 아미노산 서열
- [0019] SEQ ID No: 8 6개의 N-말단 His 잔기를 지니는 Mtb72f 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오티드 서열
- [0020] SEQ ID No: 9 CpG 올리고 1 (CpG 1826)에 대한 뉴클레오티드 서열
- [0021] SEQ ID No: 10 CpG 올리고 2 (CpG 1758)에 대한 뉴클레오티드 서열
- [0022] SEQ ID No: 11 CpG 올리고 3에 대한 뉴클레오티드 서열
- [0023] SEQ ID No: 12 CpG 올리고 4 (CpG 2006)에 대한 뉴클레오티드 서열
- [0024] SEQ ID No: 13 CpG 올리고 5 (CpG 1686)에 대한 뉴클레오티드 서열
- [0025] 본 발명의 상세한 설명
- [0026] 첫 번째 양태에서, 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하고, 이 때 조성물의 전도성은 13 mS/cm 또는 그 미만이다. 특히, 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는데, 면역원성 조성물의 전도성은 12 mS/cm 또는 그 미만, 예를 들어 10 mS/cm 또는 그 미만, 8 mS/cm 또는 그 미만, 6 mS/cm 또는 그 미만, 5 mS/cm 또는 그 미만, 4 mS/cm 또는 그 미만, 또는 3 mS/cm 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서, 면역원성 조성물의 전도성은 2.5 mS/cm 또는 그 미만, 예컨대 2.25 mS/cm 또는 그 미만, 또는 2.0 mS/cm 또는 그 미만이다. 추가의 특수한 구체예에서, 면역원성 조성물의 전도성은 1.5 내지 2.5 mS/cm이다.
- [0027] 두 번째 양태에서, 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하고, 이 때 상기 조성물 중 염의 농도는 130 mM 또는 그 미만이다. 특히, 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는데, 상기 조성물 중 염의 농도는 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서, 상기 조성물 중 염의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 또는 25 mM 또는 그 미만이다. 추가의 특수한 구체예에서, 상기 조성물 중 염의 농도는 20 내지 40 mM, 예컨대 25 내지 35 mM이다.
- [0028] 세 번째 양태에서, 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하고, 이 때 소듐 클로라이드의 농도는 130 mM 또는 그 미만이다. 특히, 본 발명은 M72 관련 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는데, 소듐 클로라이드의 농도는 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 40 mM 또는 그 미만, 30 mM 또는 그 미만, 20 mM 또는 그 미만 또는 15 mM 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서, 면역원성 조성물 중 소듐 클로라이드의 농도는 10 mM 또는 그 미만, 예컨대 7.5 mM 또는 그 미만이다. 적합하게는 면역원성 조성물 중 소듐 클로라이드의 농도는 5 mM 또는 그 미만이다. 추가의 특수한 구체예에서, 면역원성 조성물에는 본질적으로 소듐 클로라이드가 없다. 본질적으로 없다는 것은 소듐 클로라이드의 농도가 0 mM이거나 이에 매우 근접함을 의미한다 (예컨대, 3 mM 또는 그 미만, 2 mM 또는 그 미만 또는 1 mM 또는 그 미만).

- [0029] 적합하게는 면역원성 조성물 중 CaCl_2 의 농도는 40 mM 또는 그 미만, 30 mM 또는 그 미만, 20 mM 또는 그 미만, 15 mM 또는 그 미만 또는 10 mM 또는 그 미만일 것이다.
- [0030] 적합하게는 면역원성 조성물 중 MgSO_4 의 농도는 80 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 40 mM 또는 그 미만, 30 mM 또는 그 미만, 20 mM 또는 그 미만 또는 10 mM 또는 그 미만일 것이다.
- [0031] 적합하게는 면역원성 조성물 중 NH_4^+ , Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 이온의 총 농도는 80 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 40 mM 또는 그 미만, 30 mM 또는 그 미만, 20 mM 또는 그 미만 또는 10 mM 또는 그 미만일 것이다.
- [0032] 본 발명의 면역원성 조성물은 수성 제조물일 것이다.
- [0033] 본 발명의 면역원성 조성물의 전도성은 당 분야에 공지된 기법을 이용하여, 예를 들어 전용 전도율계 또는 전도성을 측정하는 능력을 지니는 그 밖의 기계를 이용하여 측정될 수 있다. 한 가지 적합한 기계는 Malvern Instruments (UK)로부터의 Zetasizer Nano ZS이다.
- [0034] 당업자는 공지된 기법 및 키트를 이용하여 소듐 (Na^+) 및 클로라이드 (Cl^-) 이온 둘 모두의 농도를 용이하게 시험할 수 있다. 예를 들어, 소듐은 Biosupply로부터의 Sodium Enzymatic Assay Kit (Catalogue Number: BQ011EAEL)와 같은 키트를 이용하여 측정될 수 있다. 클로라이드는 Biosupply로부터의 Chloride Enzymatic Assay Kit (Catalogue Number: BQ006EAEL)와 같은 키트를 이용하여 측정될 수 있다.
- [0035] 결핵(TB)은 미코박테리움 투베르쿨로시스 및 다른 *미코박테리움* 종의 감염에 의해 야기되는 만성 감염성 질환이다. 이는 개발 도상국에서의 주요 질병이며, 또한 전세계의 개발 지역에서도 증가하고 있는 문제이다. 20억명 이상의 사람이 TB 바실러스에 감염되어 있는 것으로 생각되고, 매년 약 940만건의 신규한 TB 증례 및 170만명의 사망자가 발생하고 있다. TB 바실러스에 감염된 사람 중 10%가 활성 TB로 발달할 것이며, 활성 TB 감염을 가진 환자는 제각기 해마다 평균적으로 10 내지 15명의 다른 사람을 감염시킨다. 1년 발병률은 세계적으로 최고도에 이르고 있으며, 인구 성장으로 인해 사망자 및 증례의 수도 여전히 증가하고 있다(World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010).
- [0036] 미코박테리움 투베르쿨로시스는 호흡기 경로를 통해 개체를 감염시킨다. 폐포 대식세포는 박테리아를 삼켜버리거나, 산성 리소좀과의 포식소체 융합을 억제함으로써 생존하고 증식할 수 있다. CD4^+ 및 CD8^+ T 세포를 수반하는 복합 면역 반응이 계속하여 발생하고, 궁극적으로 육아종을 형성시킨다. 병원체로서의 미코박테리움 투베르쿨로시스의 성공의 중심은, 분리되었으나 근절되지 않은 박테리아가 장기간 동안 지속하여, 활성 TB가 이후에 발달하기 쉬운 개체가 남겨진다는 사실에 있다.
- [0037] 감염된 개체의 5% 미만이 감염 후 첫 해에 활성 TB로 발달한다. 육아종은 수십년간 지속될 수 있고, 산소 및 영양소의 결핍 시에 휴면 상태의 생(生) 미코박테리움 투베르쿨로시스를 함유하는 것으로 생각된다. 그러나, 최근에 휴면 상태의 박테리아 대부분이 신체 전체에 걸쳐 분포하는 비-대식세포 유형에 위치하는 것이 제안되었다 (Locht et al, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007 7(11): 1665-1677). 활성 TB의 발달은, 예를 들어, 면역억제 사건의 결과로서 숙주의 자연면역과 병원체 사이의 균형이 변화하는 경우에 발생한다 (Anderson P *Trends in Microbiology* 2007 15(1):7-13; Ehlers S *Infection* 2009 37(2):87-95).
- [0038] 잠복 TB와 활성 TB 사이의 균형을 기재하는 동태적 가설이 또한 제안되었다 (Cardana P-J *Inflammation & Allergy- Drug Targets* 2006 6:27-39; Cardana P-J *Infection* 2009 37(2):80-86).
- [0039] 감염은 상당한 기간 동안 무증상일 수 있으나, 활성 질병은 가장 흔하게는 폐의 급성 염증으로 나타나며, 이는 피로, 체중 감소, 열 및 지속적인 기침을 발생시킨다. 치료되지 않는 경우, 심각한 합병증 및 사망이 통상적으로 발생한다.
- [0040] 결핵은 일반적으로 연장된 항생제 요법을 이용하여 조절될 수 있으나, 이러한 치료는 질병의 확산을 방지하기에는 충분하지 않다. 활성 감염된 개체는 대체로 무증상일 수 있으나, 일부 기간 동안 전염성이다. 또한, 치료 요법과의 순응이 중요하나, 환자의 거동을 모니터링하기가 어렵다. 일부 환자는 치료 과정을 완료하지 않으며, 이는 비효과적인 치료 및 약물 내성의 발달을 야기할 수 있다.
- [0041] 다약 내성 TB(MDR-TB)는 일차 약물치료에 반응하는데 실패한 형태이다. 모든 TB 증례 중의 3.3%는 MDR-TB이고, 추정건대 440,000건의 새로운 MDR-TB 증례가 매년 발생한다. 이차 약물치료에 대한 내성이 일차 약물 치료에 대한 내성의 최고점에서 발달하는 경우에 광범위 약물 내성 TB(XDR-TB)가 발생한다. 실제적으로 치료불가능한

XDR-TB가 58개국에서 확인되었다 (World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010).

- [0042] 항생제 치료의 모든 과정이 완료되는 경우에도, M. 투베르쿨로시스 감염은 감염된 개체로부터 근절되지 않을 수 있고, 재활성화될 수 있는 잠복 감염으로 남아 있을 수 있다. 결핵의 확산을 제어하기 위해, 효과적인 백신접종 프로그램 및 질병의 정확한 초기 진단이 가장 중요하다.
- [0043] 현재, 생 박테리아를 이용한 백신접종은 방어 면역을 유도하기 위해 가장 광범하게 이용되는 방법이다. 이러한 목적에 이용되는 가장 일반적인 미코박테리움은 60여년 전에 최초 개발된 M. 보비스(*M. bovis*)의 비병원성 균주인 바실러스 칼메트-게랭 (BCG)이다. 그러나, BCG의 안전성 및 효능은 논란의 근원이며 - BCG는 어린이에서 중증 질병 증후를 보호하지만, 성인에서 잠복 TB의 수립 또는 폐 질환의 재활성화를 막지 못한다. 추가로, 미국과 같은 일부 국가는 일반 대중을 이러한 작용제로 백신접종하지 않는다.
- [0044] 미코박테리움 감염의 초기 단계 동안 강하게 발현되는 단백질 중 몇몇은 동물 백신접종 모델에서 방어 효능을 제공하는 것으로 나타났다. 그러나, 감염의 초기 단계 동안 고도로 발현되는 항원을 이용한 백신접종은 감염의 후기 단계를 다루기 위한 최적 면역 반응을 제공할 수 없다. 잠복 감염 동안의 적당한 제어는 그 때 발현되는 특정 항원에 특이적인 T 세포를 요구할 수 있다. 노출 후(post-exposure) 휴면 지속성 박테리아를 직접 표적화하는 백신은 TB 재활성화를 방어하는데 도움이 될 수 있으므로 TB 제어를 향상시키거나, 심지어 감염을 제거할 수 있다. 따라서 잠복 TB를 표적화하는 백신은 전세계의 TB 감염률을 현저하고 경제적으로 감소시킬 수 있었다.
- [0045] 후기 단계 항원에 기반한 서브유닛 백신은 또한 초기 단계 항원과 함께 활용되어 다중 백신을 제공할 수 있었다. 대안적으로, 초기 및/또는 후기 단계 항원을 이용하여 BCG 백신접종을 보충하고 향상시킬 수 있었다 (BCG 반응을 부스팅하거나 진보된 재조합 BCG 균주의 개발을 통해).
- [0046] 단백질 항원 Mtb72f 및 M72는 결핵의 치료 또는 예방에 잠재적인 이익을 지니는 단백질 항원이다. Mtb72f는 수많은 동물 모델에서 보호를 제공하는 것으로 나타났다 (참조: 예를 들어: Brandt et al *Infect. Immun.* 2004 72(11):6622-6632; Skeiky et al *J. Immunol.* 2004 172:7618-7628; Tsenova et al *Infect. Immun.* 2006 74(4):2392-2401; Reed et al PNAS 2009 106(7):2301-2306). Mtb72f는 또한 임상 연구의 대상이었다 (Von Eschen et al 2009 *Human Vaccines* 5(7):475-482). M72는 향상된 안정성을 제공하도록 Mtb72f에 비해 단일 세린에서 알라닌으로의 돌연변이를 통합시킨 개선된 항원이다. M72 관련 항원은 또는 잠복 TB 모델에서 가치가 있는 것으로 나타났다 (국제 특허 출원 WO2006/117240).
- [0047] 본원에서 사용된 용어 'M72 관련 항원'은 SEQ ID No: 1로 제공된 M72 단백질 또는 이의 면역원성 유도체를 지칭한다. 본원에서 사용된 용어 "유도체"는 기준 서열에 비해 변형된 항원을 지칭한다. 면역원성 유도체는 기준 서열의 면역원성을 보유하고 기준 서열에 대해 일어나는 면역 반응이 여전히 일어날 수 있도록 하기 위해 기준 서열과 상당히 유사하다. 유도체는, 예를 들어, 기준 서열의 변형된 버전을 포함할 수 있거나 대안적으로 기준 서열의 변형된 버전으로 구성될 수 있다.
- [0048] M72 관련 항원은 예를 들어 1500개보다 적은 아미노산 잔기, 예컨대 1200개보다 적은 아미노산 잔기, 특히 1000개 미만의 아미노산 잔기, 특히 800개 미만의 아미노산 잔기를 함유할 수 있다.
- [0049] T 세포 에피토프는 T 세포 (예컨대, CD4+ 또는 CD8+ T 세포)에 의해 인지되는 아미노산의 짧은 연속 스트레치이다. T 세포 에피토프의 동정은 당업자에게 공지된 에피토프 맵핑 실험을 통해 달성될 수 있다 (참조: 예를 들어, Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed., 243-247 (1993); Beiβbarth et al *Bioinformatics* 2005 21(Suppl. 1):i29-i37). 인간과 같은 다양한 비근교계 집단에서, 상이한 HLA 유형은 특정 에피토프가 집단의 모든 구성원에 의해 인지되는 것은 아닐 수 있음을 의미한다. 결핵에서 T 세포 반응의 결정적 관여의 결과로서, 면역 반응의 인지 및 규모의 수준을 최대화하기 위해, M72의 면역원성 유도체는 대다수의 (또는 적합하게는 모든) 무손상 T 세포 에피토프를 함유하는 것이 바람직하다.
- [0050] 당업자는 단일 아미노산 또는 적은 비율의 아미노산을 변경, 첨가 또는 결실시키는 M72 단백질에 대한 개별적인 치환, 결실 또는 첨가가 "면역원성 유도체"임을 인지할 것이고 여기서 변경(들)은 기능적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산 치환 또는 면역원성 기능에 실질적인 영향을 주지 않는 잔기의 치환/결실/첨가를 초래한다.
- [0051] 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당 분야에 널리 알려져 있다. 일반적으로, 그러한 보존적 치환은, 비록 일부 상황에서 다른 치환들이 항원의 면역원성에 실질적으로 영향으로 주지 않으며 가능할 수 있으나, 하기 명시된 아미노산 그룹 중 하나 안에 있을 것이다. 하기 8개의 그룹은 전형적으로 서로에 대해

보존적 치환인 아미노산을 각각 함유한다.

[0052]

1) 알라닌 (A), 글리신 (G);

[0053]

2) 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E);

[0054]

3) 아스파라긴 (N), 글루타민 (Q);

[0055]

4) 아르기닌 (R), 리신 (K);

[0056]

5) 이소류신 (I), 류신 (L), 메티오닌 (M), 발린 (V);

[0057]

6) 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y), 트립토판 (W);

[0058]

7) 세린 (S), 트레오닌 (T); 및

[0059]

8) 시스테인 (C), 메티오닌 (M)

[0060]

(참조: 예컨대, Creighton, *Proteins* 1984).

[0061]

적합하게는 그러한 치환은 에피토프의 영역에서 발생하지 않으므로, 항원의 면역원성에 현저한 영향을 주지 않는다.

[0062]

면역원성 유도체는 또한 기준 서열에 비해 추가의 아미노산이 삽입된 것들을 포함할 수 있다. 적합하게는 그러한 삽입은 에피토프의 영역에서 발생하지 않으므로, 항원의 면역원성에 현저한 영향을 주지 않는다. 삽입의 일례는 해당 항원의 발현 및/또는 정제를 돕기 위한 히스티딘 잔기의 짧은 스트레치 (예컨대, 2-6개 잔기)를 포함한다.

[0063]

면역원성 유도체는 아미노산이 기준 서열에 비해 결실된 것들을 포함한다. 적합하게는 그러한 결실은 에피토프의 영역에서 발생하지 않으므로, 항원의 면역원성에 현저한 영향을 주지 않는다.

[0064]

당업자는 특정 면역원성 유도체가 치환, 결실 및 첨가 (또는 이들의 임의의 조합)를 포함할 수 있음을 인지할 것이다.

[0065]

2개 이상의 폴리펩티드 서열에 관해 용어 "동일한" 또는 "동일성" 비율은 비교 범위 또는 지정된 영역에 걸쳐 최대 일치에 대해 비교 및 정렬시 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 이용하거나 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정하는 경우 동일하거나 동일한 아미노산 잔기의 명시된 비율 (즉, 명시된 영역에 대해 70% 동일성, 임의로 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성)을 지니는 2개 이상의 서열 또는 서브-서열을 지칭한다. 이러한 정의는 또한 시험 서열의 보체를 지칭한다. 임의로, 동일성은 적어도 500개 아미노산 길이, 예컨대 적어도 600개 아미노산 또는 적어도 700개 아미노산의 영역에 걸쳐 존재한다. 적합하게는 기준 서열 (유도체 서열에 반대됨)의 전체 길이에 상응하는 범위에 걸쳐 비교를 수행한다.

[0066]

서열 비교를 위해, 한 서열은 시험 서열을 비교하기 위한 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 이용할 때, 시험 및 기준 서열을 컴퓨터에 넣고, 필요한 경우, 서브시퀀스(subsequence) 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 디폴트 프로그램 파라미터를 이용할 수 있거나 대안적인 파라미터를 지정할 수 있다. 그 후 서열 비교 알고리즘은 프로그램 파라미터에 기반하여 기준 서열에 비해 시험 서열에 대한 서열 동일성 비율을 계산한다.

[0067]

본원에서 사용된 "비교 범위(comparison window)"는 2개의 서열을 최적으로 정렬시킨 후에 서열을 기준 서열의 동일한 수의 연속 위치와 비교할 수 있는 세그먼트를 지칭한다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당 분야에 잘 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예컨대 문헌[Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌[Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)]의 유사성 검색 방법, 이러한 알고리즘의 컴퓨터 구현 (위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지에서 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 수동 정렬 및 육안 검사 (참조: 예컨대 *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1995 supplement))에 의해 수행될 수 있다.

[0068]

유용한 알고리즘의 일례는 PILEUP이다. PILEUP는 관련성 및 서열 동일성 퍼센트를 나타내기 위해 점진적 쌍별 정렬을 이용하여 관련 서열의 군으로부터 다수의 서열 정렬을 발생시킨다. 이것은 또한 정렬을 생성하기 위해 이용된 클러스터링 관계를 나타내는 트리(tree) 또는 덴도그램(dendogram)을 구성한다. PILEUP는 문헌[Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987)]의 점진적 정렬 방법의 단순화를 이용한다. 이용된 방법은 문헌

[Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989)]에 기재된 방법과 유사하다. 프로그램은 300개 이하의 서열을 정렬시킬 수 있고, 이러한 서열 각각은 5,000개 뉴클레오티드 또는 아미노산의 최대 길이를 갖는다. 다수의 정렬 절차는 2개의 정렬된 서열의 클러스터를 생성하는 가장 유사한 2개의 서열의 쌍별 정렬로 시작된다. 그 후 이러한 클러스터는 다음으로 가장 관련된 서열 또는 정렬된 서열의 클러스터와 정렬된다. 서열의 2개의 클러스터는 2개의 개별적 서열의 쌍별 정렬의 단순 확대에 의해 정렬된다. 최종 정렬은 일련의 점진적 쌍별 정렬에 의해 달성된다. 프로그램은 서열 비교의 영역에 대해 특수한 서열 및 이들의 아미노산 좌표를 표시하고 프로그램 파라미터를 지정함에 의해 진행된다. PILEUP를 이용하여 기준 서열을 그 밖의 시험 서열과 비교함으로써 하기 파라미터를 이용하여 서열 동일성 퍼센트 관계를 결정한다: 디폴트 갭 가중치 (3.00), 디폴트 갭 길이 가중치 (0.10), 및 가중된 말단 갭. PILEUP는 GCG 서열 분석 소프트웨어 패키지, 예컨대 버전 7.0으로부터 달성될 수 있다 (Devereaux et al., *Nuc. Acids Res.* 12:387-395 (1984)).

[0069] 서열 동일성 퍼센트 및 서열 유사성을 결정하는데 적합한 알고리즘의 또 다른 예는 문헌[Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977)] 및 문헌[Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)]에 각각 기재되어 있는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 내셔널 센터 포 바이오 테크놀로지 인포메이션 (웹사이트 www.ncbi.nlm.nih.gov/)을 통해 공개적으로 이용가능하다. 이러한 알고리즘은 먼저 대상 서열에서 길이 W의 단어(short word)를 확인함에 의해 높은 점수의 서열 쌍 (HSP)을 동정하는 것을 포함하고, 이는 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어로 정렬할 때 몇몇 양성-값 역치 점수 T와 매칭되거나 이를 충족시킨다. T는 이웃하는 단어 점수 역치로서 지칭된다 (Altschul et al., *supra*). 이러한 초기의 이웃하는 단어 히트(word hit)는 이들을 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 검색을 개시하는 시드(seed)로서 작용한다. 단어 히트는 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한은 각각의 서열을 따라 양 방향으로 연장된다. 누적 점수는 뉴클레오티드 서열의 경우, 파라미터 M (매칭 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 > 0) 및 N (미스매칭 잔기에 대한 페널티 점수; 항상 < 0)을 이용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 점수 매트릭스를 이용하여 누적 점수를 계산한다. 각 방향으로 단어 히트의 연장은, 누적 정렬 점수가 이의 달성된 최대 값으로부터 X의 양만큼 떨어질 때; 누적 점수가 하나 이상의 음성-점수 잔기 정렬의 집적으로 인해 0 또는 그 아래가 될 때; 또는 서열의 말단에 도달할 때 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T, 및 X는 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램 (뉴클레오티드 서열의 경우)은 디폴트로서 11의 단어길이(W), 10의 기대치(E), M=5, N=-4 및 양 가닥의 비교를 이용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 3의 단어길이, 10의 기대치 (E), 및 BLOSUM62 점수 매트릭스 (참조: Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) 50의 정렬(B), 10의 기대치(E), M=5, N=-4, 및 양 가닥의 비교를 이용한다.

[0070] BLAST 알고리즘은 또한 2개의 서열간 유사성의 통계적 분석을 수행한다 (참조: 예컨대, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). BLAST 알고리즘에 의해 제공된 유사성의 한 척도는 최소 확률 합계(P(N))이며, 이는 2개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열들간 매칭이 우연히 발생할 확률의 지표를 제공한다. 예를 들어, 핵산은, 기준 핵산에 대한 시험 핵산의 비교에 있어서 최소 확률 합계가 약 0.2 미만, 보다 바람직하게는 약 0.01 미만, 가장 바람직하게는 약 0.001 미만인 경우, 기준 서열과 유사한 것으로 고려된다.

[0071] 좌우간 폴리펩티드 서열의 면역원성 유도체는 본질적으로 기준 서열과 동일한 활성을 지닐 것이다. 본질적으로 동일한 활성이라 함은 림프계 증식을 통한 세포의 활성화, 배양 상층액에서 사이토카인의 생산 (ELISA, CBA 등에 의해 측정됨) 또는 세포내 및 세포외 염색에 의한 T 및 B 세포 반응의 특성구명 (예컨대, CD3, CD4, CD8, IL2, TNF-알파, IFN-감마, CD40L, CD69 등과 같은 면역 마커에 특이적인 항체 이용) 이후에 유세포분석기를 이용한 분석을 측정하는 PBMC 또는 특이적인 항원을 갖는 전혈의 시험관내 재자극 검정 (예컨대, 수 시간 내지 2 주 이내, 예컨대 하루 이내, 1일 내지 1주 또는 1 내지 2주의 기간 동안 재자극)에서 기준 서열의 50% 이상, 적합하게는 75% 이상, 특히 90% 이상의 활성을 의미한다. 적합하게는 특히 동일한 활성이라 함은 T 세포 증식 및 /또는 IFN-감마 생산 검정에서 기준 서열의 50% 이상, 적합하게는 75% 이상, 특히 90% 이상의 활성을 의미한다.

[0072] M72 단백질의 특정 유도체는 N-말단에 추가의 His 잔기를 지니는 것들을 포함한다 (예컨대, SEQ ID No: 3에 제공된 대로 2개의 His 잔기; 또는 니켈 친화성 정제에 이용될 수 있는 5개 또는 특히 6개의 His 잔기의 폴리히스티딘 태그). M72에서 돌연변이된 원래 세린 잔기를 함유하는 Mtb72f (SEQ ID No: 5)는 N-말단에 추가의 His 잔기를 갖는 Mtb72f 단백질이므로 M72의 추가 유도체이다 (예컨대, 2개의 His 잔기; 또는 니켈 친화성 정제에 이용될 수 있는 5개 또는 특히 6개의 His 잔기의 폴리히스티딘 태그).

[0073] 적합하게는 M72 관련 항원은 M72에 대해 70% 이상의 동일성, 예컨대 80% 이상, 특히 90% 이상, 특히 95% 이상, 예를 들어 99% 이상의 동일성을 지니는 서열을 포함할 것이고, 예컨대 이러한 서열로 구성될 것이다. 임의로,

M72 관련 항원은 M72에 대해 98% 이상의 동일성을 갖는 서열을 포함할 것이고, 예컨대 이러한 서열로 구성될 것이다.

- [0074] 전형적인 M72 관련 항원은 적은 수의 결실, 삽입 및/또는 치환을 갖는 SEQ ID No: 1 또는 3의 면역원성 유도체를 포함할 것이고, 예컨대 이러한 유도체로 구성될 것이다. 그 예는 0-5개의 위치에서 5개 이하의 잔기의 결실, 0-5개의 위치에서 5개 이하의 잔기의 삽입 및 20개 이하의 잔기의 치환을 갖는 것들이다.
- [0075] M72의 그 밖의 면역원성 유도체는 적어도 500개의 아미노산 길이, 예컨대 적어도 600개의 아미노산 길이 또는 적어도 700개의 아미노산 길이인 SEQ ID No: 1 또는 3의 단편을 포함하고, 예컨대 이러한 단편으로 구성되는 것들이다.
- [0076] M72 관련 항원은 이전에 기재된 방법 (WO2006/117240), 실시예에서 제공된 방법, 또는 이와 유사한 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0077] 면역원성 조성물은 하나 이상의 추가의 항원성 구성요소를 포함할 수 있다. 그러한 추가의 항원성 구성요소는 자체가 조성물 중 염의 존재에 민감할 필요는 없다.
- [0078] 추가의 항원성 구성요소는 결핵 예방 및 치료 분야에서 M72 관련 항원에 의해 유도된 면역 반응을 강화시키거나 보충하기 위한 것일 수 있거나 추가 항원은 다른 병원균과 관련될 수 있으며 편의상 M72 관련 항원과 함께 투여되기 위한 것이다. 다수의 항원성 구성요소가 제형내에 존재하는 경우, 이들은 개별적인 폴리펩티드 또는 융합 단백질의 형태로 제공될 수 있다. 일부 상황에서 추가의 항원성 구성요소는 폴리뉴클레오티드 (또는 폴리뉴클레오티드들)로서 제공될 수 있다.
- [0079] 세포 왜곡 또는 용해를 막기 위해 비경구 투여 용액은 약제학적으로 허용되는 삼투질농도를 지님이 잘 알려져 있다. 약제학적으로 허용되는 삼투질농도는 일반적으로 용액이 대략 등장성이거나 약간 고장성인 삼투질농도를 지닐 것임을 의미할 것이다. 적합하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 250 내지 750 mOsm/kg 범위의 삼투질농도를 지닐 것이고, 예를 들어, 삼투질농도는 250 내지 550 mOsm/kg의 범위이거나, 예컨대 280 내지 500 mOsm/kg의 범위일 수 있다.
- [0080] 삼투질농도는 당 분야에 공지된 기법에 따라, 예컨대 시판되는 삼투압계, 예를 들어 Advanced Instruments Inc. (USA)로부터 입수할 수 있는 Advanced® Model 2020을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0081] "등장제"는 제형과 접촉하고 있는 세포막을 가로지르는 물의 순유량을 막기 위해 제형에 적합한 긴장성을 부여하는 생리적으로 관용되는 화합물이다.
- [0082] 일반적으로, 소듐 클로라이드 (NaCl)를 긴장제로서 이용한다. 본 발명자들은 M72 관련 항원이 고농도의 염을 함유하는 용액의 경우 용액 중 단백질을 응집시키거나 응고시키는 과정인 "염석"에 특히 민감하다는 것을 처음으로 제시하였다. 결론적으로, 본 발명의 면역원성 조성물이 약제학적으로 허용되는 삼투질농도를 갖도록 보장하는 대안적인 수단이 제공된다.
- [0083] 특정 구체예에서, 비이온성 긴장제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물이 제공된다. 면역원성 조성물에 사용되는 비이온성 긴장제는 그 자체가 약제학적으로 허용되고, 예컨대 인간에게 사용하기 적합할 뿐 아니라 M72 관련 항원과 상용성이고 게다가 면역자극제(들)와 같은 그 밖의 구성요소와 상용성이어야 할 것이다.
- [0084] 본 발명의 한 구체예에서, 적합한 비이온성 긴장제는 폴리올, 당류 (특히 수크로스, 프럭토스, 텍스트로스 또는 글루코스) 또는 글리신과 같은 아미노산이다. 한 구체예에서, 폴리올은 당 알코올, 특히 C3-6 당 알코올이다. 예시적인 당 알코올은 글리세롤, 에리트리톨, 트레일, 아라비톨, 자일리톨, 리비톨, 소르비톨, 만니톨, 들시톨 및 이디톨을 포함한다. 이러한 구체예의 특수한 예에서, 적합한 비이온성 긴장제는 소르비톨이다. 당업자는 상이한 긴장제의 혼합물의 이용을 통해 적절한 삼투질농도가 달성될 수 있음을 인지할 것이다. 본 발명의 특정 구체예에서 본 발명의 조성물 중 비이온성 긴장제는 수크로스 및/또는 소르비톨을 통합시킨다.
- [0085] 한 구체예에서, 면역원성 조성물내 폴리올의 적합하 농도는 약 2.5 내지 약 15% (w/v), 특히 약 2.5 내지 약 10% (w/v), 예를 들어 약 3 내지 약 7% (w/v), 예컨대 약 4 내지 약 6% (w/v)이다. 이러한 구체예의 특수한 예에서, 폴리올은 소르비톨이다.
- [0086] 또 다른 구체예에서, 면역원성 조성물은 수크로스 및 소르비톨을 포함한다. 그러한 경우에 면역원성 조성물은 적합하게는 약 2.5 내지 약 15% (w/v)의 수크로스 및 약 2.5 내지 약 15% (w/v)의 소르비톨, 특히 약 2.5 내지 약 10% (w/v)의 수크로스 및 약 2.5 내지 약 10% (w/v)의 소르비톨, 예를 들어, 약 3 내지 약 7% (w/v)의 수크

로스 및 약 3 내지 약 7% (w/v)의 소르비톨, 예컨대 약 4 내지 약 6% (w/v)의 수크로스 및 약 4 내지 약 6% (w/v)의 소르비톨을 함유할 수 있다.

- [0087] 면역원성 조성물의 pH는 비경구 투여에 적합하여야 한다. 전형적으로 pH는 6.0 내지 9.0의 범위일 것이다. 적합하게는 pH는 7.0 내지 9.0의 범위, 특히 7.25 내지 8.75, 예컨대 7.5 내지 8.5, 특히 pH 7.75 내지 8.25의 범위일 것이다. 약 8.0의 pH가 특히 흥미롭다.
- [0088] pH는, 예를 들어 Tris 또는 포스페이트 완충제를 포함하는 완충제를 이용하여 조절될 수 있다.
- [0089] 본 발명의 특정 구체예에서, 면역원성 조성물은 하나 이상의 면역자극제를 포함한다.
- [0090] 한 구체예에서, 면역자극제는 사포닌일 수 있다. 본 발명에 사용하기 특히 적합한 사포닌은 Quil A 및 이의 유도체이다. Quil A는 남아메리카 나무 퀴라자 사포나리아 몰리나(*Quillaja saponaria* Molina)에서 분리된 사포닌 제조물이고 애주번트 활성을 지니는 것으로 문헌[Dalsgaard *et al.* in 1974("Saponin adjuvants", *Archiv. fur die gesamte Virusforschung*, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)]에 처음 기재되었다. Quil A와 관련된 독성 없이 애주번트 활성을 보유하는 Quil A의 정제된 분획(W088/09336), 예를 들어 QS7 및 QS21 (QA7 및 QA21로도 알려짐)은 HPLC에 의해 분리되었다. QS21은 CD8+ 세포독성 T 세포 (CTL), Th1 세포 및 우수한 IgG2a 항체 반응을 유도하는, 퀴라자 사포나리아 몰리나의 나무껍질로부터 유래되는 천연 사포닌이다. QS21은 본 발명에서 바람직한 사포닌이다.
- [0091] 본 발명의 적합한 형태에서, 면역원성 조성물내 사포닌 애주번트는 사포나리아 몰리나 Quil A의 유도체이고, 특히 QS17 또는 QS21, 적합하게는 QS21과 같은 Quil A의 면역학적으로 활성인 분획이다.
- [0092] 바람직하게는 QS21은 예를 들어 콜레스테롤과 같은 외인성 스테롤로 켄칭된 덜 반응원성인 조성물로 제공된다. QS21이 콜레스테롤로 켄칭된 덜 반응원성인 조성물의 여러 특정 형태가 존재한다. 특수한 구체예에서, 사포닌/스테롤은 리포솜 구조의 형태이다 (예컨대 W096/33739, 실시예 1에 기재됨). 이러한 구체예에서 리포솜은 적합하게는 중성 지질을 함유하고, 예를 들어 적합하게는 실온에서 비결정질인 포스파티딜콜린, 예를 들어 난황 포스파티딜콜린, 디올레오일 포스파티딜콜린(DOPC) 또는 디라우릴 포스파티딜콜린을 함유한다. 리포솜은 또한 포화 지질을 포함하는 리포솜에 대한 리포솜-QS21 구조의 안정성을 증가시키는 하전된 지질을 함유할 수 있다. 이러한 경우에 하전된 지질의 양은 적합하게는 1-20% w/w, 예컨대 5-10%이다. 인지질에 대한 스테롤의 비율은 1-50% (mol/mol), 적합하게는 20-25%이다.
- [0093] 적합한 스테롤은 β -시토스테롤, 스티그마스테롤, 에르고스테롤, 에르고칼시페롤 및 콜레스테롤을 포함한다. 한 특정 구체예에서, 면역원성 조성물은 스테롤로서 콜레스테롤을 포함한다. 이러한 스테롤은 당 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 콜레스테롤은 동물 지방에서 발견되는 천연 발생 스테롤로서 문헌[Merck Index, 11th Edn., page 341]에 기재되어 있다.
- [0094] 활성 사포닌 분획이 QS21인 경우, QS21:스테롤의 비는 전형적으로 약 1:100 내지 1:1 (w/w), 적합하게는 1:10 내지 1:1 (w/w), 특히 1:5 내지 1:1 (w/w)일 것이다. 적합하게는 과도한 스테롤이 존재하며, QS21:스테롤의 비는 적어도 1:2 (w/w)이다. 한 구체예에서, QS21:스테롤의 비는 1:5 (w/w)이다. 스테롤은 적합하게는 콜레스테롤이다.
- [0095] 또 다른 구체예에서, 면역원성 조성물은 Toll-유사 수용체 4 (TLR4) 효능제인 면역자극제를 포함한다. "TLR 효능제"라 함은 직접적인 리간드로서 또는 내인성 또는 외인성 리간드의 생성을 통해 간접적으로, TLR 신호전달 경로를 통해 신호전달 반응을 발생시킬 수 있는 구성요소를 의미한다 (Sabroe *et al.*, *J Immunol* 2003 p1630-5). TLR4 효능제는 TLR-4 신호전달 경로를 통해 신호전달 반응을 발생시킬 수 있다. TLR4 효능제의 적합한 예는 리포폴리사카라이드, 적합하게는 지질 A의 무독성 유도체, 특히 모노포스포릴 지질 A 또는 더욱 특히 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)이다.
- [0096] 3D-MPL은 GlaxoSmithKline Biologicals N.A.에 의해 상표명 MPL하에 판매되며 문서를 통틀어 MPL 또는 3D-MPL로서 지칭된다. 참조: 예를 들어, US Patent Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 및 4,912,094. 3D-MPL은 주로 IFN-감마 (Th1) 표현형과의 CD4+ T 세포 반응을 촉진시킨다. 3D-MPL은 GB2220211A에 기재된 방법에 따라 생산될 수 있다. 화학적으로 이것은 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A와 3, 4, 5 또는 6개의 아실화된 사슬의 혼합물이다. 본 발명의 조성물에서 소입자 3D-MPL을 이용하여 면역원성 조성물을 제조할 수 있다. 소입자 3D-MPL은 이것이 0.22 μ m 필터를 통해 살균-여과될 수 있게 하는 입자 크기를 지닌다. 그러한 제조물은 W094/21292에 기재되어 있다. 적합하게는 분말화된 3D-MPL을 이용하여 본 발명의 면역원성 조성물을 제조한다.

- [0097] 이용될 수 있는 그 밖의 TLR4 효능제는 W098/50399 또는 US Patent No. 6,303,347 (AGP의 제조 방법도 기재되어 있다)에 기재된 것들과 같은 알킬 글루코사미니드 포스페이트 (AGP), 적합하게는 RC527 또는 RC529 또는 US Patent No. 6,764,840에 기재된 바와 같은 AGP의 약제학적으로 허용되는 염이다. 일부 AGP는 TLR4 효능제이고, 일부는 TLR4 길항제이다.
- [0098] 그 밖의 적합한 TLR4 효능제는 W02003/011223 및 W02003/099195에 기재된 바와 같고, 예컨대 W02003/011223의 4-5면 또는 W02003/099195의 3-4면에 기재된 화합물 I, 화합물 II 및 화합물 III 및 특허 W02003/011223에 ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057m ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 및 ER804764로서 기재된 화합물이다. 예를 들어, 한 적합한 TLR-4 효능제는 ER804057이다.
- [0099] 특정 구체예에서, 면역원성 조성물은 사포닌 및 TLR4 효능제 둘 모두를 포함한다. 특수한 예에서, 면역원성 조성물은 QS21 및 3D-MPL을 포함한다.
- [0100] TLR-4 효능제, 예컨대 3D-MPL과 같은 리포폴리사카라이드는 면역원성 조성물의 인간 용량당 1 내지 100 μg 의 양으로 사용될 수 있다. 3D-MPL은 약 50 μg 의 수준, 예를 들어 40 내지 60 μg , 적합하게는 45 내지 55 μg 또는 49 내지 51 μg 또는 50 μg 으로 사용될 수 있다. 추가의 구체예에서, 면역원성 조성물의 인간 용량은 약 25 μg 의 수준, 예를 들어 20 내지 30 μg , 적합하게는 21 내지 29 μg 또는 22 내지 28 μg 또는 23 내지 27 μg 또는 24 내지 26 μg , 또는 25 μg 의 3D-MPL을 포함한다.
- [0101] QS21과 같은 사포닌은 면역원성 조성물의 인간 용량당 1 내지 100 μg 의 양으로 사용될 수 있다. QS21은 약 50 μg 의 수준, 예를 들어 40 내지 60 μg , 적합하게는 45 내지 55 μg 또는 49 내지 51 μg 또는 50 μg 으로 사용될 수 있다. 추가의 구체예에서, 면역원성 조성물의 인간 용량은 약 25 μg 의 수준, 예를 들어 20 내지 30 μg , 적합하게는 21 내지 29 μg 또는 22 내지 28 μg 또는 23 내지 27 μg 또는 24 내지 26 μg , 또는 25 μg 의 QS21을 포함한다.
- [0102] TLR4 효능제와 사포닌 둘 모두가 면역원성 조성물에 존재하는 경우, 사포닌에 대한 TLR4 효능제의 중량 비는 적합하게는 1:5 내지 5:1, 적합하게는 1:2 내지 2:1, 예컨대 약 1:1이다. 예를 들어, 3D-MPL이 50 μg 또는 25 μg 의 양으로 존재하는 경우, 적합하게는 QS21도 면역원성 조성물의 인간 용량당 각각 50 μg 또는 25 μg 의 양으로 존재할 수 있다. 본 발명의 특정 면역원성 조성물은 QS21 및 3D-MPL을 각각 인간 용량당 1 내지 100 μg 의 양, 예컨대 인간 용량당 10 내지 75 μg 의 양으로 포함한다. 본 발명의 면역원성 조성물은 적합하게는 QS21 및 3D-MPL을 인간 용량당 각각 15 내지 35 μg 의 양, 예컨대 인간 용량당 각각 20 내지 30 μg 의 양으로 포함할 수 있다.
- [0103] 한 구체예에서, 면역자극제는, 예를 들어 W02008/142133에 개시된 TLR9 효능제이다. 특수한 예에서, 상기 TLR9 효능제는 면역자극성 올리고뉴클레오티드, 특히 메틸화되지 않은 CpG 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오티드이다. 그러한 올리고뉴클레오티드는 널리 공지되어 있고, 예를 들어 W096/02555, W099/33488 및 US5,865,462에 기재되어 있다. 본원에 기재된 면역원성 조성물에 사용하기 적합한 TLR9 효능제는 CpG 함유 올리고뉴클레오티드, 임의로 적어도 3개, 적합하게는 적어도 6개 이상의 뉴클레오티드에 의해 분리된 2개 이상의 디뉴클레오티드 CpG 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오티드이다. CpG 모티프에서 시토신 뉴클레오티드 다음에 구아닌 뉴클레오티드가 온다.
- [0104] 한 구체예에서, 비록 혼합된 뉴클레오티드간 연결을 갖는 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 포스포다이에스테르 및 그 밖의 뉴클레오티드간 결합이 또한 이용될 수 있었으나, 올리고뉴클레오티드에 있는 뉴클레오티드간 결합은 포스포로디티오에이트, 또는 가능하게는 포스포로티오에이트 결합이다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드 또는 포스포로디티오에이트를 생산하는 방법은 US5,666,153, US5,278,302 및 W095/26204에 기재되어 있다. 혼합된 포스포로티오에이트 포스포다이에스테르와 같은 상이한 뉴클레오티드간 연결을 포함하는 올리고뉴클레오티드가 고려된다. 올리고뉴클레오티드를 안정화시키는 그 밖의 뉴클레오티드간 결합을 이용할 수 있다.
- [0105] 본원에 기재된 면역원성 조성물에 포함시키기 적합한 CpG 올리고뉴클레오티드의 예는 하기 서열을 지닌다. 한 구체예에서, 이러한 서열은 포스포로티오에이트 변형된 뉴클레오티드간 연결을 함유한다.

올리고 1 (SEQ ID No: 9): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
 올리고 2 (SEQ ID No: 10): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
 올리고 3 (SEQ ID No: 11): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
 올리고 4 (SEQ ID No: 12): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
 올리고 5 (SEQ ID No: 13): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

- [0106]
- [0107] 대안적인 CpG 올리고뉴클레오티드는 상기 서열에 대한 사소한 결실 또는 첨가를 갖는 상기 서열을 포함할 수 있다.
- [0108] 한 구체예에서 면역자극제는 토클이다. 토클은 당 분야에 잘 알려져 있고 EP0382271에 기재되어 있다. 특정 구체예에서, 토클은 알파-토코페롤 또는 이의 유도체, 예컨대 알파-토코페롤 숙시네이트 (비타민 E 숙시네이트로도 알려짐)이다.
- [0109] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 방법을 제공한다:
- [0110] a. M72 관련 항원을 냉동건조시키는 단계; 및
- [0111] b. 상기 단계 a)의 냉동건조된 M72 관련 항원을 수용액으로 재구성하는 단계로서, 용액의 전도성이 13 mS/cm 또는 그 미만인 단계.
- [0112] 특정 구체예에서, 수용액의 전도성은 12 mS/cm 또는 그 미만, 예를 들어 10 mS/cm 또는 그 미만, 8 mS/cm 또는 그 미만, 6 mS/cm 또는 그 미만, 5 mS/cm 또는 그 미만, 4 mS/cm 또는 그 미만, 또는 3 mS/cm 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서, 수용액의 전도성은 2.5 mS/cm 또는 그 미만, 예컨대 2.25 mS/cm 또는 그 미만, 또는 2.0 mS/cm 또는 그 미만이다.
- [0113] 적합하게는 수용액의 전도성은 냉동건조된 항원이 재구성될 때 생성된 용액이 13 mS/cm 또는 그 미만, 예컨대 12 mS/cm 또는 그 미만, 예를 들어 10 mS/cm 또는 그 미만, 8 mS/cm 또는 그 미만, 6 mS/cm 또는 그 미만, 5 mS/cm 또는 그 미만, 4 mS/cm 또는 그 미만, 또는 3 mS/cm 또는 그 미만의 전도성을 지니도록 한다. 특정 구체예에서 생성된 용액의 전도성은 2.5 mS/cm 또는 그 미만, 예컨대 2.25 mS/cm 또는 그 미만, 또는 2.0 mS/cm 또는 그 미만이다.
- [0114] 하기 단계를 포함하는 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 방법이 추가로 제공된다:
- [0115] a. M72 관련 항원을 냉동건조시키는 단계; 및
- [0116] b. 상기 단계 a)의 냉동건조된 M72 관련 항원을 수용액으로 재구성하는 단계로서, 상기 용액 중 염의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 단계.
- [0117] 특정 구체예에서, 상기 수용액 중 염의 농도는 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서 상기 수용액 중 염의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 또는 25 mM 또는 그 미만이다.
- [0118] 적합하게는 수용액 중 염의 농도는 냉동건조된 항원이 재구성될 때 생성된 용액이 130 mM 또는 그 미만, 예컨대 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만의 염의 농도를 지니도록 한다. 특정 구체예에서, 생성된 용액 중 염의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 또는 25 mM 또는 그 미만이다.
- [0119] 추가로 하기 단계를 포함하는 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 방법이 제공된다:
- [0120] a. M72 관련 항원을 냉동건조시키는 단계; 및
- [0121] b. 상기 단계 a)의 냉동건조된 M72 관련 항원을 수용액으로 재구성하는 단계로서, 상기 용액 중 소듐 클로라이드의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 단계.
- [0122] 특정 구체예에서, 상기 수용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서 상기 수용액 중 염의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 20 mM 또는 그 미만, 또는 15 mM 또는 그 미만이다. 적합하게는 수용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 5 mM 또는

그 미만이다.

- [0123] 적합하게는 수용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 냉동건조된 항원이 재구성될 때 생성된 용액이 130 mM 또는 그 미만, 예컨대 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만의 소듐 클로라이드의 농도를 지니도록 한다. 특정 구체예에서, 생성된 용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 또는 25 mM 또는 그 미만이다.
- [0124] 한 구체예에서, (상기) 단계 b)의 수용액은 사포닌 및/또는 TLR4 효능제, 예를 들어 QS21 및/또는 3D-MPL을 포함한다. 추가의 구체예에서 사포닌 및/또는 TLR4 효능제는 리포솜 제형으로 존재한다. 한 구체예에서, 수용액은 리포솜 제형의 TLR4 효능제 및 사포닌, 그리고 본원에 기재된 바와 같은 비이온성 긴장제, 예컨대 폴리올을 포함한다. 특히 수용액은 소르비톨을 포함할 수 있다.
- [0125] 또한 하기를 포함하는 키트가 제공된다:
- [0126] a. 냉동건조된 M72 관련 항원; 및
- [0127] b. 수용액으로서, 상기 용액의 전도성이 13 mS/cm 또는 그 미만인 수용액.
- [0128] 특정 구체예에서, 수용액의 전도성은 12 mS/cm 또는 그 미만, 예를 들어 10 mS/cm 또는 그 미만, 8 mS/cm 또는 그 미만, 6 mS/cm 또는 그 미만, 5 mS/cm 또는 그 미만, 4 mS/cm 또는 그 미만, 또는 3 mS/cm 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서 수용액의 전도성은 2.5 mS/cm 또는 그 미만, 예컨대 2.25 mS/cm 또는 그 미만, 또는 2.0 mS/cm 또는 그 미만이다.
- [0129] 적합하게는 수용액의 전도성은 냉동건조된 항원이 재구성될 때 생성된 용액이 13 mS/cm 또는 그 미만, 예컨대 12 mS/cm 또는 그 미만, 예를 들어 10 mS/cm 또는 그 미만, 8 mS/cm 또는 그 미만, 6 mS/cm 또는 그 미만, 5 mS/cm 또는 그 미만, 4 mS/cm 또는 그 미만, 또는 3 mS/cm 또는 그 미만의 전도성을 지니도록 한다. 특정 구체예에서 생성된 용액의 전도성은 2.5 mS/cm 또는 그 미만, 예컨대 2.25 mS/cm 또는 그 미만, 또는 2.0 mS/cm 또는 그 미만이다.
- [0130] 또한 하기를 포함하는 키트가 제공된다:
- [0131] a. 냉동건조된 M72 관련 항원; 및
- [0132] b. 수용액으로서, 상기 용액 중 염의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 수용액.
- [0133] 특정 구체예에서 상기 수용액 중 염의 농도는 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서 상기 수용액 중 염의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 또는 25 mM 또는 그 미만이다.
- [0134] 적합하게는 수용액 중 염의 농도는 냉동건조된 항원이 재구성될 때 생성된 용액이 130 mM 또는 그 미만, 예컨대 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만의 염의 농도를 지니도록 한다. 특정 구체예에서 생성된 용액 중 염의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 또는 25 mM 또는 그 미만이다.
- [0135] 추가로, 하기를 포함하는 키트가 제공된다:
- [0136] a. 냉동건조된 M72 관련 항원; 및
- [0137] b. 수용액으로서, 상기 용액 중 소듐 클로라이드의 농도가 130 mM 또는 그 미만인 수용액.
- [0138] 특정 구체예에서 상기 수용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만이다. 특정 구체예에서 상기 수용액 중 염의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 20 mM 또는 그 미만, 또는 15 mM 또는 그 미만이다. 적합하게는 용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 5 mM 또는 그 미만이다.
- [0139] 적합하게는 수용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 냉동건조된 항원이 재구성될 때 생성된 용액이 130 mM 또는 그 미만, 예컨대 100 mM 또는 그 미만, 예를 들어 90 mM 또는 그 미만, 80 mM 또는 그 미만, 70 mM 또는 그 미만, 60 mM 또는 그 미만, 50 mM 또는 그 미만, 또는 40 mM 또는 그 미만의 소듐 클로라이드의 농도를 지니도록

한다. 특정 구체예에서 생성된 용액 중 소듐 클로라이드의 농도는 35 mM 또는 그 미만, 예컨대 30 mM 또는 그 미만, 또는 25 mM 또는 그 미만이다.

- [0140] 키트는 면역원성 조성물의 단일 용량, 예컨대 단일 인간 용량, 또는 면역원성 조성물의 다중 용량을 제공하도록 구성될 수 있다.
- [0141] 본 발명의 키트에 이용된 수용액은 본원에 정의된 어떠한 수용액일 수 있다. 본 발명의 특수한 구체예에서, 수용액은 리포솜 형태의 TLR4 효능제 및/또는 사포닌을 포함한다. 특정 구체예에서, TLR4 효능제는 3D-MPL이고 사포닌은 QS21이다. 본원에 이용된 수용액은 긴장제, 예를 들어 소르비톨과 같은 폴리올을 포함할 수 있다.
- [0142] 상기 언급된 키트 및 본 발명의 면역원성 조성물을 생산하기 위한 방법에 관해, 면역자극제(들) 및 긴장제(들)는 존재하는 경우 항원과 공동 냉동건조될 수 있거나 요망에 따라 수용액에 함유될 수 있음이 주목될 수 있다. 수용액은 단순히 주입용수일 수 있고 면역원성 조성물의 그 밖의 모든 구성요소는 항원과 공동 냉동건조될 수 있다. 전형적으로, 적어도 일부 면역자극제(들) 및 긴장제(들)는 수용액으로 제공되는데, 이는 리포솜과 같은 특정 구성요소가 냉동건조에 충분치않게 상용성인 경우 특히 적합하다. 한 구체예에서 수용액은 면역자극제를 포함한다. 두 번째 구체예에서 수용액은 긴장제, 예컨대 비이온성 긴장제, 예컨대 폴리올, 특히 소르비톨을 포함한다. 세 번째 구체예에서, 수용액은 폴리올, 특히 소르비톨과 같은 긴장제 및 면역자극제를 포함한다.
- [0143] 키트는 냉동건조된 M72 관련 항원을 수용액을 이용하여 재구성할 것을 지시하는 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0144] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은, 특히 미코박테리아에 의한 감염, 예컨대 미코박테리움 투베르쿨로시스에 의한 감염의 예방, 치료 또는 개선을 위한 약제에 이용될 수 있다. 비록 면역원성 조성물이 예컨대 소에게 투여하기 위한 수의용 약제에서도 유용할 수 있으나, 일반적으로 인간에게 투여하기 위해 제공될 것이다.
- [0145] 약제의 제조, 특히 미코박테리아에 의한 감염, 예컨대 미코박테리움 투베르쿨로시스에 의한 감염의 예방, 치료 또는 개선을 위한 약제의 제조에서의 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 용도가 제공된다.
- [0146] 본 발명에 따른 안전하고 유효한 양의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 미코박테리아에 의한 감염, 예컨대 미코박테리움 투베르쿨로시스에 의한 감염을 예방, 치료 또는 개선하는 방법이 또한 제공된다.
- [0147] 면역원성 조성물은,
- [0148] - 활동성 결핵의 치료;
- [0149] - 예컨대 감염되지 않은 피검체, 또는 대안적으로 잠복 감염을 지닌 피검체에게 투여함체 의해, 활동성 결핵의 예방;
- [0150] - 잠복 결핵의 치료;
- [0151] - 예컨대 감염되지 않은 피검체에 투여함에 의해, 잠복 결핵의 예방; 또는
- [0152] - 예를 들어 수 개월, 수 년 또는 심지어 무기한 결핵의 재활성화 예방 또는 지연, 특히 TB 재활성화의 지연을 위해 제공될 수 있다.
- [0153] 용어 "활동성 감염"은 분명한 질병 징후 및/또는 병변, 적합하게는 분명한 질병 징후를 지니는 감염, 예컨대 M. 투베르쿨로시스에 의한 감염을 지칭한다.
- [0154] 용어 "비활성 감염", "휴면 감염" 또는 "잠복 감염"은 분명한 질병 징후 및/또는 병변이 없고, 적합하게는 분명한 질병 징후가 없는 감염, 예컨대 M. 투베르쿨로시스에 의한 감염을 지칭한다. 잠복 감염을 지니는 피검체는 적합하게는, 예컨대 PPD 또는 T 세포 기반 검정에 의해 감염에 양성으로 조사되나 활동성 감염과 관련된 질병 징후 및/또는 병변이 나타나지 않은 피검체일 것이다.
- [0155] 용어 "일차 결핵"은 M. 투베르쿨로시스에 의한 감염과 같은 감염 직후 질병, 예컨대 분명한 질병 징후를 지칭한다. 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005)]을 참조하라.
- [0156] 용어 "이차 결핵" 또는 "일차 후 결핵"은 휴면, 비활성 또는 잠복 감염, 예컨대 M. 투베르쿨로시스에 의한 감염의 재활성화를 지칭한다. 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966 (16th ed., Braunwald, et al., eds., 2005)]을 참조하라.

- [0157] 용어 "결핵 재활성화"는 감염 (예컨대, 투베르쿨린 피부 시험, 적합하게는 시험관내 T 세포 기반 검정) 시험에 대해 양성으로 조사되었으나 뚜렷한 질병 징후를 나타내지 않는 개체에서의 나중의 질병 징후의 소견을 지칭한다. 적합하게는, 개체는 감염에 재노출되지 않았을 것이다. 양성 진단 조사는, 개체가 감염되었으나, 결핵이 비활성 또는 잠복 상태가 될 정도로 충분히 치료된 개체가 사전에 명백한 활성 질병 징후를 지니거나 지니지 않을 수 있음을 나타낸다.
- [0158] 적합하게는 면역원성 조성물은 감염되지 않았거나 미코박테리아에 의한 잠복 감염, 예컨대 미코박테리움 투베르클로시스에 의한 감염을 지니는 피검체에게 투여된다.
- [0159] 투여되는 면역원성 조성물의 부피는 특수한 전달 경로, 예컨대 근내, 피하 또는 진피내와 같은 다수의 다른 요인에 따라 변화될 수 있다. 전형적으로, 인간에 대해 단일 주입 (단위 용량)으로 투여되는 부피는 50 μl 내지 1 ml의 범위, 예컨대 100 μl 내지 750 μl , 특히 400 내지 600 μl , 예를 들어 약 500 μl 일 것이다.
- [0160] 단일 용량내에 함유된 M72 관련 항원의 양은 임상적 요구에 의존적이나 단일 인간 용량은 전형적으로 1 내지 100 μg 의 범위, 예컨대 5 내지 50 μg , 예를 들어 5 내지 20 μg 일 것이다. 단일 인간 용량은 약 10 μg 의 M72 관련 항원을 함유할 수 있다.
- [0161] 적합하게는 본 발명의 조성물은 안정할 것이며, 이는 25°C에서 24시간의 기간 동안 저장하는 동안 본원에 기재된 기법에 의해 측정된 항원성이 저장 전 항원성의 80% 이상을 유지시킴을 의미한다. 바람직하게는, 항원성은 25°C에서 24시간의 기간 동안 저장시킨 후 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 특히 적어도 95%가 유지될 것이다. 특히 흥미로운 조성물의 경우, 조성물의 항원성의 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 적어도 90%, 특히 적어도 95%가 30°C에서 24시간의 기간 동안 저장시킨 후에 유지된다.
- [0162] 이제 본 발명은 하기 비제한적인 예를 이용하여 추가로 기재될 것이다.
- [0163] **실시예**
- [0164] **실시예 1: 애주번트 조성물 ASA (소르비톨)의 제조**
- [0165] 소르비톨을 긴장제로서 이용한 리포솜 제형의 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 포함하는 애주번트 조성물을 제조하였다. 이것은 다음과 같이 제조되었다.
- [0166] **A. 리포솜의 제조 방법:**
- [0167] 유기 용매 중 지질 (DOPC), 콜레스테롤 및 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A의 혼합물을 진공하에 건조시켰다. 그 후 수용액 (포스페이트 완충된 염수 [100 mM NaCl, 50 mM 포스페이트 pH 6.1])을 첨가하고 모든 지질이 현탁 상태가 될 때까지 용기를 교반시켰다. 이어서 현탁액을 고전단 믹서로 미리 균질화시킨 다음 리포솜 크기가 DLS에 의해 측정시 약 90 nm \pm 10 nm로 감소할 때까지 고압 균질화시켰다. 그 후 리포솜은 살균 여과되었다.
- [0168] **B. ASA 제형:**
- [0169] **단계 1: 농축된 리포솜의 희석**
- [0170] 10배 희석된 Na₂/K 포스페이트 완충제 100 mM pH 6.1을 주사용수에 첨가시켜 최종 제형 중 10 mM의 포스페이트 완충제 농도에 도달하였다. 그 후 주사용수 (WFI) 중 30% (w/v)의 소르비톨 용액을 첨가시켜 최종 제형 중 4.7%의 농도에 도달하였다 - 이것을 실온에서 15 내지 45분간 교반시켰다.
- [0171] 이어서 농축된 리포솜 (각각 40 mg/ml, 10 mg/ml 및 2 mg/ml의 DOPC, 콜레스테롤 및 3D-MPL로 제조됨)을 믹스에 첨가시켜 최종 제형 중 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 3D-MPL의 농도에 도달하였다.
- [0172] 후속하여 혼합물을 실온에서 15 내지 45분간 교반시켰다.
- [0173] **단계 2: QS21 첨가**
- [0174] 연동 펌프를 이용하여, QS21 벌크 스톱을 자기 교반하에 희석된 리포솜에 첨가시켜 최종 제형 중 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에 도달하였다. 믹스를 15 내지 45분간 교반시켰다.
- [0175] 최종 ASA(소르비톨) 제형은 2 mg의 DOPC, 500 μg 의 콜레스테롤, 100 μg 의 3D-MPL/ml 및 100 μg 의 QS21/ml, 4.7%의 소르비톨 및 5 mM의 소듐 클로라이드 및 10 mM의 포스페이트를 함유하였다.

- [0176] 단계 3: pH는 6.1±0.1인 것으로 조사되었다
- [0177] 단계 4: 살균 여과
- [0178] PALL Corporation으로부터의 폴리에테르설폰 (PES) 필터를 이용하여 살균 여과를 수행하였다.
- [0179] 단계 5: +2℃ 내지 +8℃에서 저장
- [0180] 리포솜 제형의 3-데-O-아실화된 MPL 및 QS21을 포함하고 긴장제로서 소르비톨을 함유하는 수득된 애쥬번트 조성물 (ASA(소르비톨)로 명명)을 그 후 4℃에서 저장하였다.
- [0181] **실시예 2: 애쥬번트 조성물 ASA (150 mM NaCl)의 제조**
- [0182] 소듐 클로라이드를 긴장제로서 이용한 리포솜 제형의 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 포함하는 애쥬번트 조성물을 제조하였다.
- [0183] **A. 리포솜의 제조 방법:**
- [0184] 유기 용매 중 지질 (DOPC), 콜레스테롤 및 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)의 혼합물을 진공하에 건조시켰다. 그 후 포스페이트 완충된 염수 (100 mM NaCl, 50 mM 포스페이트 pH 6.1)을 첨가하고 모든 지질이 현탁 상태가 될 때까지 용기를 교반시켰다. 이어서 현탁액을 고전단 믹서로 미리 균질화시킨 다음 리포솜 크기가 DLS에 의해 측정시 약 90 nm ± 10 nm로 감소할 때까지 고압 균질화시켰다. 그 후 리포솜은 0.22 μm PES 막상에서 살균 여과되었다.
- [0185] **B. ASA 제형:**
- [0186] 단계 1: 농축된 리포솜의 회석
- [0187] 10배 회석된 Na₂/K 포스페이트 완충제 100 mM pH 6.45 및 NaCl 1.5 M을 주사용수에 첨가시켜 최종 제형 중 각각 10 mM의 포스페이트 및 NaCl 150 mM 농도에 도달하였다. 이러한 혼합물을 실온에서 5분간 교반시켰다. 이어서 농축된 리포솜 (각각 40 mg/ml, 10 mg/ml 및 2 mg/ml의 DOPC, 콜레스테롤 및 3D-MPL로 제조됨)을 믹스에 첨가시켜 최종 제형 중 100 μg/ml의 3D-MPL의 농도에 도달하였다. 후속하여 혼합물을 실온에서 5 내지 15분간 교반시켰다.
- [0188] 단계 2: QS21 첨가
- [0189] QS21 벌크 스톱을 자기 교반하에 회석된 리포솜에 첨가시켜 최종 제형 중 100 μg/ml의 농도에 도달하였다. 믹스를 실온에서 교반시켰다.
- [0190] 단계 3: pH는 6.1±0.1인 것으로 조사되었다
- [0191] 단계 4: 살균 여과
- [0192] PALL Corporation으로부터의 폴리에테르설폰 (PES) 필터를 이용하여 살균 여과를 수행하였다.
- [0193] 단계 5: +2℃ 내지 +8℃에서 저장
- [0194] ASA(150 mM NaCl)의 최종 조성물은 10 mM의 포스페이트 및 150 mM의 NaCl을 지니며, 1 ml당 2 mg의 DOPC, 500 μg의 콜레스테롤, 100 μg의 3-데-O-아실화된 MPL, 100 μg의 QS21이었다.
- [0195] **실시예 3: QS21 용해 활성**
- [0196] QS21은 적혈구 (RBC)를 용해시키는 것으로 알려져 있다. QS21 용해 활성이 150 mM의 NaCl을 포함하는 동등한 애쥬번트 조성물 (ASA (150 mM NaCl))에서 보여진 것과 동일한 방식으로 켄칭됨을 보장하기 위해 실시예 1에서와 같이 제조된 ASA (소르비톨) 애쥬번트 조성물을 시험하였다.
- [0197] QS21 용해 활성은 닭 적혈구(RBC)를 이용한 용혈 검정에 의해 측정되었다. RBC를 4℃에서 550 g으로 원심분리시켰다. 상층액을 폐기하였다. 펠렛을 신중하게 PBS 완충제에 재현탁시켜 초기 부피에 도달하였고 상층액이 더 이상 붉지 않을 때까지 동일한 작업을 반복하였다 (일반적으로 3회). 바로 이용하지 않는 경우 펠렛을 최대 3 내지 4일간 4℃에 저장하거나 (이것을 사용하는 날 다시 세척함) 같은 날 사용하는 경우 완충제에서 약 10배 회석시켰다.
- [0198] QS21 용량 범위 곡선을 ASA 완충제 (시험되는 ASA 샘플에 따라 염 또는 소르비톨 완충제에서)에서 즉석으로 작

성하였고 애주번트 샘플 (500 μ l 또는 900 μ l ASA의 당량을 의미하는 50 μ g 또는 90 μ g 당량의 QS21 함유)을 제조하였다. 적당한 완충제 (시험되는 샘플의 완충제의 함수로서 소르비톨을 함유하거나 함유하지 않음)를 이용하여 최종 부피를 표준 및 샘플에서 900 μ l로 조정하였다. ASA는 이의 유백광으로 인해 광학 밀도 (OD)를 간접한다. 이에 따라 ASA "블랭크(blanks)"를 제조하였고 이들의 OD를 ASA 시험되는 샘플의 OD로부터 공제하였다. 그러한 블랭크는 샘플에서의 시험된 부피와 동일한 ASA 부피에 상응하나 완충제로 1 ml로 조정되었다. 이러한 블랭크에 RBC는 첨가되지 않았다. 그 후 표준 및 샘플을 RBC (900 μ l의 표준 및 샘플에 첨가된 100 μ l의 희석된 RBC)와 함께 30분간 실온 (RT)에서 인큐베이션하였다. 이어서 샘플을 5분간 900 g에서 원심분리시켰다. 540 nm에서의 광학 밀도를 원심분리 후에 측정하였다.

- [0199] 용해 활성의 측정을 한계 시험에 의해 수행하였다.
- [0200] 1. 검출 한계(LOD)를 OD를 발생시키는 QS21의 가장 낮은 농도로서 정의하였다:
- [0201] - 기저 수준보다 높음 (OD>0.1)
- [0202] - OD의 완충제보다 약 3배 높음 ("0 μ g" QS21)
- [0203] - 곡선의 상승 부분에서
- [0204] - 각 시험에 대해 측정됨.
- [0205] 2. 애주번트 샘플에 대한 OD가 OD_{LOD}보다 큰 경우 QS21 용해 활성은 애주번트 샘플에서 양성인 것으로 평가되었다.
- [0206] 보기 QS21 곡선

ug QS21	OD	QS21 켤칭됨
0	0.029	NA
0.5	0.052	< LOD
0.6	0.073	< LOD
0.7	0.091	< LOD
0.8	0.096	< LOD
0.9	0.12	> 98.2%
1	0.195	> 98%
1.1	0.212	> 97.8%
1.2	0.348	> 97.6%
1.3	0.479	> 97.4%
1.4	0.612	> 97.2%
1.5	0.669	> 97%
2	1.139	> 96%
2.5	1.294	> 95%
3	1.391	> 94%
5	1.416	> 90%
애주번트*	0.03	> 98.2%

*50ug QS21 당량이 시험됨. 150 mM 소듐 클로라이드 완충제

- [0207]
- [0208] 상기 데이터는 도 1에서 그래프에 의해 도시된다.
- [0209] 이러한 검정에서의 검출 한계는 0.9 μ g의 QS21, 및 0.12의 OD에 있다.
- [0210] 150 mM의 소듐 클로라이드를 포함하는 애주번트 조성물에서 QS21 켤칭은 시험되는 50 μ g의 QS21의 당량에 대해서는 98.2%를 초과하는 것으로 추정되었다. 시험되는 90 μ g의 당량의 경우, 결론은 99%를 초과하였다.
- [0211] 그 후 QS21 켤칭을 소르비톨 및 단지 5 mM의 소듐 클로라이드를 포함하는 동등한 애주번트 조성물과 비교하였다. 데이터를 4°C에서 ASA의 저장 후에 또는 가속된 안정화 이후에 (37°C에서 7일) 생성하였다. 소르비톨에서 ASA의 경우, QS21 표준 곡선을 소르비톨 함유 완충제에서 실현시켰다.

샘플	시점	LOD	QS21 케칭됨
애주번트 조성물 (ASA) 150 mM NaCl	T0	< 1.4	> 97.2%
	7일 37°C	< 0.9	> 98.2%
애주번트 조성물 (ASA) 소르비톨, 5 mM NaCl	T0	< 2	> 97.8%
	7일 37°C	< 1	> 96%
	4°C 에서 11 개월	< 2	> 97.8%*

*90 ug QS21의 당량이 시험된 것을 제외하고 50 ug QS21의 당량이 시험됨

[0212]

[0213] QS21은 낮은 소듐 클로라이드 완충제에서 충분히 케칭되는 것으로 결론 내렸다.

[0214]

실시예 4: MPL 동류물

[0215]

화학적으로, 3D-MPL은 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A와 주로 4, 5 또는 6개의 아실화된 사슬의 혼합물이다. 각각의 분리된 3D-MPL 분자를 동류물이라고 부른다. 동류물 조성물은 동류물의 비율간에 변화 없이 일정하게 유지되는 것이 중요하다. 사용된 임의의 완충제는 동류물 조성물이 애주번트 조성물을 제조하는데 이용된 농축된 리포솜에서와 동일해질 수 있게 하는 것이 또한 중요하다.

[0216]

도 2에 도시된 대로, 동류물 조성물을 3D-MPL 농축된 리포솜 (농축 리포솜 LIP07-217, 도 2의 제 1 컬럼), 3D-MPL 리포솜 및 QS21을 150 mM의 NaCl 완충제에 포함하는 애주번트 조성물 (애주번트 150 mM NaCl, 또는 ASA (150 mM NaCl), 제 2 컬럼), 및 3D-MPL 리포솜 및 QS21을 소르비톨 및 5 mM의 NaCl 완충제에서 포함하는 애주번트 조성물 (애주번트 소르비톨, 또는 ASA (소르비톨), 컬럼 3-7)에서 조사하였다.

[0217]

시간 경과에 따라 어떠한 변화도 없음을 확인하기 위해 동류물 조성물을 또한 제조하고 37°C에서 유지시킨 지 0 내지 7일 후에 2개 로트의 ASA (소르비톨) 애주번트에서 조사하였다 (도 2의 최종 4개 컬럼 참조).

[0218]

농축된 리포솜 또는 ASA (소르비톨) 샘플에서 MPL의 테트라-, 펜타- 및 헥사-아실화된 동류물의 상대 분포를 IP-HPLC-Fluo 검출 (ARD)에 의해 측정하였다. 표준 및 샘플 둘 모두를, 디사카라이드 백본 상에서 Fluo-활성 발색단을 도입시키는 단실히드라진으로 유도체화시켰다. 유도체화된 샘플을 C18 역상 컬럼 상에서 테트라부틸 암모늄 하이드록사이드 (TBAOH)를 이온 쌍 시약으로서 이용하여 분석하였다. 동일한 수의 지방산 아실기를 함유하는 동류물을 별개의 그룹 (테트라아실, 펜타아실, 및 헥사아실)에서 용리시켰다. 동류물의 분포는 각 그룹의 피크 면적을 모든 MPL 동류물의 총 피크 면적과 비교함에 의해 추론된다.

[0219]

도 2는 각각의 동류물의 백분율을 도시한다. 애주번트 완충제간에 동류물 조성에 있어서 어떠한 현저한 차이도 관찰되지 않았고, 동류물 조성은 소르비톨 완충제에서 시간 경과에 따라 일정하였다.

[0220]

실시예 5: 애주번트 조성물 ASA (소르비톨 - 2)의 제조

[0221]

실시예 1에 비해 감소된 수준의 리포솜 제형의 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 포함하는 애주번트 조성물을 긴장제로서 소르비톨을 이용하여 제조하였다. 이것을 다음과 같이 제조하였다:

[0222]

pH 6.1로 10 mM 포스페이트, 5 mM NaCl, 4.7% 소르비톨을 함유하는 용액을 이용하여 실시예 1에 따라 제조된 ASA (소르비톨)을 1:1 희석시킴에 의해 애주번트를 제조하였다.

[0223]

최종 ASA(소르비톨 - 2) 제형은 1 mg의 DOPC, 250 µg의 콜레스테롤, 50 µg의 3D-MPL/ml 및 50 µg의 QS21/ml, 4.7% 소르비톨, 5 mM 소듐 클로라이드 및 10 mM 포스페이트를 함유하였다.

[0224]

실시예 6: 애주번트 조성물 ASA (소르비톨 - 3)의 제조

[0225]

실시예 1에 비해 감소된 수준의 리포솜 제형의 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 포함하는 애주번트 조성물을 긴장제로서 소르비톨을 이용하여 제조하였다. 이것을 다음과 같이 제조하였다:

[0226]

A. 리포솜의 제조 방법:

[0227]

유기 용매 중 지질 (DOPC), 콜레스테롤 및 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A의 혼합물을 진공하에 건조시켰다. 그 후 수용액 (포스페이트 완충된 염수 [100 mM NaCl, 50 mM 포스페이트 pH 6.1])을 첨가하고 모든 지질이 현탁 상태가 될 때까지 용기를 교반시켰다. 이어서 현탁액을 고전단 믹서로 미리 균질화시킨 다음 리포솜 크기

가 DLS에 의해 측정시 약 90 nm ± 10 nm로 감소할 때까지 고압 균질화시켰다. 그 후 리포솜은 살균 여과되었다.

[0228] **B. ASA 제형:**

[0229] 단계 1: 농축된 리포솜의 회석

[0230] 10배 희석된 Na₂/K 포스페이트 완충제 100 mM pH 6.1을 주사용수에 첨가시켜 최종 제형 중 10 mM의 포스페이트 완충제 농도에 도달하였다. 이어서 주사용수 (WF1) 중 30% (w/v) 소르비톨 용액을 첨가시켜 최종 제형 중 4.7%의 농도에 도달하였다 - 이것을 실온에서 15 내지 45분간 교반시켰다.

[0231] 이어서 농축된 리포솜 (각각 40 mg/ml, 10 mg/ml 및 2 mg/ml의 DOPC, 콜레스테롤 및 3D-MPL로 제조됨)을 믹스에 첨가시켜 최종 제형 중 50 µg/ml의 3D-MPL의 농도에 도달하였다.

[0232] 혼합물을 후속하여 실온에서 15 내지 45분간 교반시켰다.

[0233] 단계 2: QS21 첨가

[0234] 연동 펌프를 이용하여, QS21 벌크 스톱을 자기 교반하에 희석된 리포솜에 첨가시켜 최종 제형 중 50 µg/ml의 농도에 도달하였다. 믹스를 15분간 교반시켰다.

[0235] 최종 ASA 제형은 1 mg의 DOPC, 250 µg의 콜레스테롤, 50 µg의 3D-MPL/ml 및 50 µg의 QS21/ml, 4.7% 소르비톨 및 2.5 mM 소듐 클로라이드, 10 mM 포스페이트를 함유하였다.

[0236] 단계 3: pH는 6.1±0.1인 것으로 조사되었다

[0237] 단계 4: 살균 여과

[0238] PALL Corporation으로부터의 폴리에테르설폰 (PES) 필터를 이용하여 살균 여과를 수행하였다.

[0239] 단계 5: +2°C 내지 +8°C에서 저장

[0240] 그 후 리포솜 제형의 3-데-0-아실화된 MPL 및 QS21을 포함하고 긴장제로서 소르비톨을 함유하는 수득된 애쥬번트 조성물(ASA(소르비톨-3)으로 명명)을 4°C에서 저장하였다.

[0241] **실시예 7: 애쥬번트 조성물 ASA (150 mM NaCl - 2)의 제조**

[0242] 실시예 2에 비해 감소된 수준의 리포솜 제형의 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 포함하는 애쥬번트 조성물을 긴장제로서 소듐 클로라이드를 이용하여 제조하였다. 이것을 다음과 같이 제조하였다:

[0243] **A. 리포솜의 제조 방법:**

[0244] 유기 용매 중 지질 (DOPC), 콜레스테롤 및 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)의 혼합물을 진공하에 건조시켰다. 그 후 포스페이트 완충된 염수 (100 mM NaCl, 50 mM 포스페이트 pH 6.1)을 첨가하고 모든 지질이 현탁 상태가 될 때까지 용기를 교반시켰다. 이어서 현탁액을 고전단 믹서로 미리 균질화시킨 다음 리포솜 크기가 DLS에 의해 측정시 약 90 nm ± 10 nm로 감소할 때까지 고압 균질화시켰다. 그 후 리포솜은 0.22 µm PES 막상에서 살균 여과되었다.

[0245] **B. ASA 제형:**

[0246] 단계 1: 농축된 리포솜의 회석

[0247] 10배 희석된 Na₂/K 포스페이트 완충제 100 mM pH 6.45 및 NaCl 1.5 M를 주사용수에 첨가시켜 최종 제형 중 10 mM의 포스페이트 및 NaCl 150 mM 농도에 각각 도달하였다. 이러한 혼합물을 실온에서 5분간 교반시켰다. 이어서 농축된 리포솜 (각각 40 mg/ml, 10 mg/ml 및 2 mg/ml의 DOPC, 콜레스테롤 및 3D-MPL로 제조됨)을 믹스에 첨가시켜 최종 제형 중 50 µg/ml의 3D-MPL의 농도에 도달하였다. 혼합물을 후속하여 실온에서 5 내지 15분간 교반시켰다.

[0248] 단계 2: QS21 첨가

[0249] QS21 벌크 스톱을 자기 교반하에 희석된 리포솜에 첨가시켜 최종 제형 중 50 µg/ml의 농도에 도달하였다. 믹스를 실온에서 교반시켰다.

- [0250] 단계 3: pH는 6.1±0.1인 것으로 조사되었다
- [0251] 단계 4: 살균 여과
- [0252] PALL Corporation으로부터의 폴리에테르설폰 (PES) 필터를 이용하여 살균 여과를 수행하였다.
- [0253] 단계 5: +2°C 내지 +8°C에서 저장
- [0254] ASA(150 mM NaCl - 2)의 최종 제형은 1 mg의 DOPC, 250 µg의 콜레스테롤, 50 µg의 3-테-O-아실화된 MPL, 1 ml 당 50 µg의 QS21, 10 mM 포스페이트 및 150 mM NaCl이었다.
- [0255] **실시예 8: 단백질 항원의 제조**
- [0256] **2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 (SEQ ID No: 3)**
- [0257] M72 발현 벡터의 작제
- [0258] Mtb32a의 C 말단 단편을 엔코딩하는 열린해독틀 (ORF)을 C 말단에서 Mtb32a의 N 말단 부분으로 이어지는 Mtb39a의 전장 ORF에 일렬로 순차적 연결시킴에 의해 N-말단에 추가의 6-His 태그를 지니는 Mtb72f의 아미노산 서열을 코딩하는 플라스미드를 생성시켰다. 이것은 M. 투베르쿨로시스 균주 H37Rv로부터의 유전체 DNA의 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 위해 C 말단부에 스톱 코돈이 없고 (Mtb32a 및 Mtb39a의 C 말단 단편의 경우) 독특한 제한 부위 (EcoRI 및 EcoRV)를 함유하는 서열-특이적 올리고뉴클레오티드를 이용함에 의해 달성되었다. 이러한 벡터를 주형으로서 이용하여, Ser706의 A1a로의 돌연변이를 부위-지정 돌연변이유발에 의해 수행하였다. 삽입물의 적절한 배향뿐 아니라 돌연변이 Ser706A1a는 DNA 서열분석에 의해 입증되었다.
- [0259] N 말단에 단지 2개의 His 잔기를 지니는 M72를 코딩하는 벡터를 수득하기 위해, 4개의 His를 상업적인 부위-지정 돌연변이유발 시스템을 이용하여 결실시켰다. 서열 입증 후에, M72 코딩 서열을 효소 반응에 의해 플라스미드로부터 제거하고, 겔 정제시키고, pET 벡터에 라이게이션시켰다. 그 후 재조합 플라스미드의 서열을 입증하였다. 이러한 플라스미드는 T7 프로모터의 조절하에 M72를 코딩한다. T7 RNA 중합효소의 발현은 발현 숙주에서 유전체 인테그란트로부터 유래되고 lac 오페론-기반 시스템 (lacI) 및 IPTG 화학적 유도 신호를 이용하여 유도된다. 발현 플라스미드에는 카나마이신 내성이 제공된다.
- [0260] T7 프로모터의 조절하에 M72 융합 단백질을 코딩하는 플라스미드는 전기천공법에 의해 대장균(*E. coli*)의 HMS174 (DE3) 균주로 형질전환되었다. M72 삽입물 및 플랭킹 영역의 코딩 서열은 양 가닥 모두에서 서열화되었고 원래 플라스미드 작제물로부터 결정된 서열과 동일한 것으로 밝혀졌다.
- [0261] 발효
- [0262] 펠렛화된 워킹 시드의 바이알을 실온에서 해동시켰다. 워킹 시드를 4.9 ml의 예비-배양 배지와 혼합시킴에 의해 예비-희석액을 제조하였다. 1 ml의 예비-희석액을 이용하여 50 mg/l의 카나마이신 설페이트 및 10 g/l의 글루코스가 보충된 400 ml의 예비-배양 배지로 구성된 액체 예비-배양액을 접종시켰다.

[0263] 예비-배양 배지 조성물

성분	농도		
KH ₂ PO ₄	14.83 g/l		
K ₂ HPO ₄	1.65 g/l		
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.82 g/l		
효모 추출물	6.21 g/l		
글리세롤 87% (w/w)	14.54 ml/l		
금속 및 염 용액 (1):	9.7 ml/l		
- FeCl ₃ 6H ₂ O		3.3 g/l	
- MgSO ₄ 7H ₂ O		58 g/l	
- 미량원소 용액 (2):		116 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O			7.65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O			5.28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O			1.1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O			1.1 g/l
- H ₃ BO ₃			0.3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O			2.64 g/l
- HCl 4N			6.2 ml/l
바이오틴 및 CaCl ₂ 용액 (2):	0.97 ml/l		
- 바이오틴		0.05 g/l	
- CaCl ₂ 2 H ₂ O		61.7 g/l	
배지의 pH 는 NaOH (25%) 용액을 이용하여 6.5 로 조정된다			
배지는 0.22 um 를 통해 여과된다			

(1) pH 는 HCl (37%) 용액을 이용하여 1.50 으로 조정된다; 용액은 0.22 um 를 통해 여과된다

(2) 용액은 0.22 um 를 통해 여과된다

[0264]

[0265]

OD_{650nm} 가 2 내지 4의 값에 도달할 때까지 (대략의 인큐베이션 시간: 16시간) 예비-배양액을 2 리터 진탕 플라스크에서 30℃에서 교반(200 RPM)하에 인큐베이션시켰다. 그 단계에서, 34 mg/l의 카나마이신 설페이트가 보충된 45 리터의 배양 배지를 함유하는 72 리터 (총 부피)의 발효기를 52 ml의 액체 예비-배양액으로 접종시켰다.

[0266] 배양 배지 조성물

성분	농도	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.63 g/l	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.056 g/l	
미량원소 용액 (1):	1.91 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O		7.65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O		5.28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O		1.1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O		1.1 g/l
- H ₃ BO ₃		0.3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		2.64 g/l
- HCl 4N		6.2 ml/l
HCl 37%	0.40 mL/L	
효모 추출물	35 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.10 g/l	
KH ₂ PO ₄	18.70 g/l	
소듐 글루타메이트	2.5 g/l	
글리세롤 87%	0.276 ml/l	
글루코스	20 g/l	
바이오틴 용액 (2):	0.22 ml/l	
- 바이오틴		1 g/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.21 g/l	
용액은 0.22 um 를 통해 여과된다		

(1) 용액은 0.22 um 를 통해 여과된다

[0267] (2) pH 는 NaOH (25%) 용액을 이용하여 11.0 으로 조정된다; 용액은 0.22 um 를 통해 여과된다

[0268] 성장기 동안, 25% (v/v)의 NH₄OH 및 25% (v/v)의 H₃PO₄를 주기적으로 첨가시켜 pH를 6.8 ± 0.2로 유지시켰다. 30℃에서 16시간 동안 인큐베이션시킨 후에, 영양 배지(feed medium)를 이용하여 유가식-배치를 개시하였다.

[0269] 영양 배지 조성물

성분	농도	
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.98 g/l	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.178 g/l	
미량원소 용액 (1)	6.02 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O		7.65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O		5.28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O		1.1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O		1.1 g/l
- H ₃ BO ₃		0.3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		2.64 g/l
- HCl 4N		6.2 ml/l
HCl 37%	1.24 ml/l	
소듐 글루타메이트	5 g/l	
효모 추출물	40 g/l	
글리세롤 87%	590 ml/l	
바이오틴 용액 (2)	2 ml/l	
- 바이오틴		1 g/l
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.66 g/l	
용액은 0.22 um 를 통해 여과된다		

(1) 용액은 0.22 um 를 통해 여과된다

[0270] (2) pH 는 NaOH (25%) 용액을 이용하여 11.0 으로 조정된다; 용액은 0.22 um 를 통해 여과된다

[0271] 온도를 추가로 2시간 동안 30°C에서 유지시킨 다음, 발효가 끝날 때까지 37°C로 상승시켰다. 공기 흐름은 일정하게 75 l/분으로 설정되었고 용해된 산소는 교반 및 압력의 피드백 제어에 의해 17% 포화도로 유지되었다. 소량의 거품방지 용액을 요구에 따라 자동으로 첨가시켰다. OD_{650nm}이 50 (±5)의 값에 도달하는 때에, 1 mM의 이소프로필-베타-D-티오갈락토포라노시드 (IPTG)를 첨가시켜 M72의 발현을 유도하였다. 유도가 개시된 시점으로부터 5시간 후에 발효를 종료하였다. 세포 배양액을 약간의 교반하에 15°C로 냉각시키고 원심분리시켜 (4°C에서) 세포 펠렛을 수득하였고, 이것을 그 후에 분취량으로 -20°C에서 저장하였다.

[0272] 봉입체의 분리

[0273] 수거물에서 수집된 세포 펠렛을 실온에서 해동시키고 고압 균질화기를 이용하여 용해 완충제 (10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8.0)에서 붕괴시켰다. 그 후 세포 용해물을 원심분리시키고 생성된 세포 펠렛 (또는 봉입체, IB)을 우레아, Tris 및 NaCl을 함유하는 세척 완충제로 세척하였다. IB를 8 M 우레아를 함유하는 용해 완충제로 용해시키고 0.2 μm 막을 통해 여과시켰다. 이렇게 여과된 용액을 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 Q 세파로스 패스트 플로우 (QSFF) 컬럼을 이용하여 먼저 정제시켰다. M72는 6 M 우레아, 20 mM 비스-Tris 프로판, 90 mM NaCl, pH 7.0 용액으로 용리된다.

[0274] 수집된 M72를 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 (HA)에 의해 추가로 정제시키고, 이로부터 6 M 우레아, 20 mM 비스-Tris 프로판, 250 mM NaCl, pH 7.0 용액으로 용리시켰다. 수집된 분획을 30 kDa 막 카세트로 농축시키고 20 mM Tris, pH 7.5에 대해 정용여과시켰다(diafiltered). 이어서 M72를 0.22 μm 필터를 통해 살균시켰다. 그 후 정제된 벌크를 분취하여 -70°C에서 저장하였다.

[0275] 실시예 9: pH 6.1, 7.5 및 8.5에서 상이한 염 농도를 지니는 M72를 포함하는 조성물에서의 "염석"의 조사.

[0276] 크기 및 항원성에 의해 평가된 대로, M72 항원 안정성에 대한 소듐 클로라이드 농도 및 pH의 영향을 조사하였다.

[0277] 방법

[0278] 정제된 벌크 항원 (실시예 8에서 제조된 대로, 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72, SEQ ID No: 3)을 0, 50, 150, 300 및 450 mM의 최종 소듐 클로라이드 농도를 함유하는 3개의 상이한 완충제 (pH 6.1의 10mM 포스페이트 완충제, pH 7.5의 20 mM Tris 완충제 및 pH 8.5의 20 mM Tris 완충제)에서 100 μg/ml의 농도로 희석시켰다.

- [0279] 분석 전에 4°C에서 밤새 저장되었거나 (T0 0/N) 분석 전에 25°C에서 24시간 동안 저장된 샘플(T24h25°C)을 바로 분석하였다.
- [0280] Malvern Instruments (UK)로부터의 Malvern Zetasizer Nano ZS를 이용하여 DLS를 수행하였다. 633 nm의 레이저 파장 및 4 mW의 전력을 이용하여 기계를 작동시켰다. 산란된 광을 22°C의 온도에서 173°로 검출하였다. Z-평균 직경 (Zav) 및 다분산지수 (pI)를 기계 소프트웨어로부터 계산하였다.
- [0281] Thermo Fischer Scientific으로부터 이용가능한 Nepheloskan® Ascent를 이용하여 비탁법을 수행하였다. Corning Inc (USA)로부터 이용가능한 UV 투과성 Costar® 미세플레이트에서 분석을 수행하였다.
- [0282] 항원을 M72-특이적인 토끼 폴리클로날 항체에 의해 포획하고 후속하여 M72(Mtb39)-특이적 마우스 모노클로날 항체에 의해 나타내는 샌드위치 ELISA에 의해 항원성을 정량하였다. 모든 측정된 값은 시험되는 제형을 제조하기 위해 이용된 정제된 벌크 단백질에 기반하여 예상되는 항원성에 관해 제시된다.
- [0283] **결과**
- [0284] 본 실험의 결과를 도 3 내지 5에 제시한다.
- [0285] 상기 결과는 가장 먼저 M72 관련 항원을 함유하는 용액의 안정성이 pH 및 소듐 클로라이드 농도 둘 모두에 민감함을 입증한다. 항원 크기 및 항원성에 대한 소듐 클로라이드의 영향은 모두 pH가 낮을수록 더욱 현저하였다.
- [0286] 항원 크기 및 항원성은 심지어 소듐 클로라이드의 부재하에도 pH 6.1에서 안정하지 않다. pH 6.1에서 50 mM 소듐 클로라이드의 첨가는 25°C에서 24시간 후에 35 nm (T0에서 0 mM 소듐 클로라이드)에서 58 nm (T0) 또는 79 nm까지의 크기 증가를 발생시켰다.
- [0287] 항원 크기 및 항원성은, 특히 소듐 클로라이드의 부재하에 또는 50 mM의 소듐 클로라이드 농도에서, pH 7.5 또는 8.5에서 25°C에서 24시간 동안 비교적 안정하다. 그럼에도 불구하고, 150 mM 또는 이를 초과하도록 소듐 클로라이드 농도를 증가시키는 것은 항원 크기에서의 뚜렷한 증가 및 항원성에서의 감소를 초래한다.
- [0288] **실시에 10: M72, 면역자극제를 포함하고 긴장제로서 소르비톨을 이용한 조성물에서 "염석"의 방지**
- [0289] 150 mM의 NaCl을 함유하는 면역원성 조성물의 안정성을 긴장제로서 소르비톨을 이용한 조성물과 비교하기 위해, 다수의 샘플을 SEC-HPLC 및 ELISA를 이용하여 모니터하였다.
- [0290] **방법**
- [0291] 실시예 5 및 7로부터의 적절한 애쥬번트 제형과 조합될 때 요망되는 pH가 수득되도록, 3개의 상이한 냉동건조 스케일을 제조하였다:
- [0292] (a) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - 재구성된 백신에서 표적 pH 8.5
- [0293] 15.75% (w/v)의 수크로스 용액 (주사용수에서 제조됨)을 주사용수에 첨가하여 6.3%의 수크로스 농도에 도달하였다. 그 후 3% (w/v)의 Tween80 용액 (주사용수에서 제조됨)을 첨가시켜 0.025%의 농도에 도달하였다. Tris-HCl 완충제 1 M pH 8.8을 이어서 첨가시켜 50 mM의 Tris 완충제 농도에 도달하였다. 혼합물을 실온에서 5분간 자기적으로 교반시켰다. 이어서 정제된 벌크 항원 (실시에 8에서 제조된 대로, 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72, SEQ ID No: 3)을 첨가시켜 25 µg/ml의 단백질 농도에 도달하였다. 혼합물을 실온에서 10분간 자기적으로 교반시켰다. pH를 조사하였고 8.8인 것으로 나타났다.
- [0294] 수득된 0.5 ml의 혼합물을 3 ml의 유리 바이알에 채운 다음 동결 건조시켰다.
- [0295] (b) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - 재구성된 백신에서 표적 pH 8.0
- [0296] 15.75% (w/v)의 수크로스 용액 (주사용수에서 제조됨)을 주사용수에 첨가하여 6.3%의 수크로스 농도에 도달하였다. 그 후 3% (w/v)의 Tween80 용액 (주사용수에서 제조됨)을 첨가시켜 0.025%의 농도에 도달하였다. Tris-HCl 완충제 1 M pH 8.8을 이어서 첨가시켜 20 mM의 Tris 완충제 농도에 도달하였다. 혼합물을 실온에서 5분간 자기적으로 교반시켰다. 이어서 정제된 벌크 항원 (실시에 8에서 제조된 대로, 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72, SEQ ID No: 3)을 첨가시켜 25 µg/ml의 단백질 농도에 도달하였다. 혼합물을 실온에서 10분간 자기적으로 교반시켰다. pH를 조사하였고 8.8인 것으로 나타났다.
- [0297] 수득된 0.5 ml의 혼합물을 3 ml의 유리 바이알에 채운 다음 동결 건조시켰다.

- [0298] (c) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - 재구성된 백신에서 표적 pH 7.5
- [0299] 15.75% (w/v)의 수크로스 용액 (주사용수에서 제조됨)을 주사용수에 첨가하여 6.3%의 수크로스 농도에 도달하였다. 그 후 3% (w/v)의 Tween80 용액 (주사용수에서 제조됨)을 첨가시켜 0.025%의 농도에 도달하였다. Tris-HCl 완충제 1 M pH 8.8을 이어서 첨가시켜 12.5 mM의 Tris 완충제 농도에 도달하였다. 혼합물을 실온에서 5분간 자기적으로 교반시켰다. 이어서 정제된 벌크 항원 (실시예 8에서 제조된 대로, 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72, SEQ ID No: 3)을 첨가시켜 25 µg/ml의 단백질 농도에 도달하였다. 혼합물을 실온에서 10분간 자기적으로 교반시켰다. pH를 조사하였고 8.8인 것으로 나타났다.
- [0300] 수득된 0.5 ml의 혼합물을 3 ml의 유리 바이알에 채운 다음 동결 건조시켰다.
- [0301] 상기 기재된 냉동건조 케익을 실시예 5 및 7에서 제조된 625 µl의 애쥬번트 용액으로 재구성하였다. 애쥬번트 용액으로 재구성시에, 하기 면역원성 조성물을 수득하였다:
- [0302] (i) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(150 mM NaCl - 2) pH 8.5
- [0303] 10 µg 항원 (20 µg/ml)
- [0304] 5% w/v 수크로스
- [0305] 40 mM Tris
- [0306] 0.02% w/v Tween80
- [0307] 500 µg DOPC
- [0308] 125 µg 콜레스테롤
- [0309] 25 µg 3D-MPL
- [0310] 25 µg QS21
- [0311] 150 mM NaCl
- [0312] 10 mM 포스페이트
- [0313] pH 8.5
- [0314] (ii) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(150 mM NaCl - 2) pH 8.0
- [0315] 10 µg 항원 (20 µg/ml)
- [0316] 5% w/v 수크로스
- [0317] 16 mM Tris
- [0318] 0.02% w/v Tween80
- [0319] 500 µg DOPC
- [0320] 125 µg 콜레스테롤
- [0321] 25 µg 3D-MPL
- [0322] 25 µg QS21
- [0323] 150 mM NaCl
- [0324] 10 mM 포스페이트
- [0325] pH 8.0
- [0326] (iii) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(150 mM NaCl - 2) pH 7.5
- [0327] 10 µg 항원 (20 µg/ml)
- [0328] 5% w/v 수크로스

- [0329] 12.5 mM Tris
- [0330] 0.02% w/v Tween80
- [0331] 500 μ g DOPC
- [0332] 125 μ g 콜레스테롤
- [0333] 25 μ g 3D-MPL
- [0334] 25 μ g QS21
- [0335] 150 mM NaCl
- [0336] 10 mM 포스페이트
- [0337] pH 7.5
- [0338] (iv) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(소르비톨 - 2) pH 8.5
- [0339] 10 μ g 항원 (20 μ g/ml)
- [0340] 5% w/v 수크로스
- [0341] 40 mM Tris
- [0342] 0.02% w/v Tween80
- [0343] 500 μ g DOPC
- [0344] 125 μ g 콜레스테롤
- [0345] 25 μ g 3D-MPL
- [0346] 25 μ g QS21
- [0347] 5 mM NaCl
- [0348] 4.7% w/v 소르비톨
- [0349] 10 mM 포스페이트
- [0350] pH 8.5
- [0351] (v) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(소르비톨 - 2) pH 8.0
- [0352] 10 μ g 항원 (20 μ g/ml)
- [0353] 5% w/v 수크로스
- [0354] 16 mM Tris
- [0355] 0.02% w/v Tween80
- [0356] 500 μ g DOPC
- [0357] 125 μ g 콜레스테롤
- [0358] 25 μ g 3D-MPL
- [0359] 25 μ g QS21
- [0360] 5 mM NaCl
- [0361] 4.7% w/v 소르비톨
- [0362] 10 mM 포스페이트
- [0363] pH 8.0
- [0364] (vi) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(소르비톨 - 2) pH 7.5

- [0365] 10 μg 항원 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- [0366] 5% w/v 수크로스
- [0367] 12.5 mM Tris
- [0368] 0.02% w/v Tween80
- [0369] 500 μg DOPC
- [0370] 125 μg 콜레스테롤
- [0371] 25 μg 3D-MPL
- [0372] 25 μg QS21
- [0373] 5 mM NaCl
- [0374] 4.7% w/v 소르비톨
- [0375] 10 mM 포스페이트
- [0376] pH 7.5
- [0377] 샘플 분석
- [0378] 상기 기재된 재구성된 면역원성 조성물을 25 $^{\circ}\text{C}$ 또는 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한 후에 (T0, T6h 및 T24h) 특성규명하였다.
- [0379] SEC-HPLC 분석을 20 mM Tris 완충제 pH 8.5에서 평형화된 TOSOH TSK-Ge15000Pwx1 (ID 7.8 mm x 30 cm) 상에서 주입에 의해 수행하고, 210 nm에서의 UV 및 0.5 ml/분의 유속에 의해 검출하였다.
- [0380] 항원을 M72-특이적인 토끼 폴리클로날 항체에 의해 포획하고 후속하여 M72(Mtb39)-특이적 마우스 모노클로날 항체에 의해 나타내는 샌드위치 ELISA에 의해 항원성을 정량하였다. 모든 측정된 값은 시험되는 제형을 제조하기 위해 이용된 정제된 벌크 단백질에 기반하여 예상되는 항원성에 관해 제시된다.
- [0381] **결과**
- [0382] 상기 결과는 도 6a-6d 및 7에 도시한다.
- [0383] SEC-HPLC 프로파일은 각각의 pH (즉, pH 7.5, 8.0 및 8.5)에서 소르비톨을 긴장제로서 이용한 저염 조성물에서의 재구성 후에 안정하다. 이것은 수득된 초기 프로파일 및 25 $^{\circ}\text{C}$ 또는 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한 이후의 프로파일간에 뚜렷한 변화를 나타내는 150 mM의 NaCl을 함유하는 면역원성 조성물에 대한 SEC-HPLC 프로파일과 대조적일 수 있다. 이러한 변화는 150 mM NaCl 조성물의 pH가 낮아질 때 더욱 강해진다.
- [0384] 항원성에 관해 동일한 결론이 도출되었는데, 회수율은 긴장제로서 소르비톨을 이용한 각각의 pH (즉, pH 7.5, 8.0 및 8.5)의 저염 조성물로 재구성시에 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24h까지 대체로 안정하게 유지된다.
- [0385] **실시예 11: 본 발명의 면역원성 조성물에 대한 전도성 측정**
- [0386] 본 발명에 따른 다수의 면역원성 조성물의 전도성을 측정하고 대조 소듐 클로라이드 용액의 전도성에 대해 통상적인 양의 소듐 클로라이드를 함유하는 면역원성 조성물과 비교하였다.
- [0387] **방법**
- [0388] 0, 75, 100, 150, 250 및 300 mM의 소듐 클로라이드 농도를 갖는 다수의 표준을 1500 mM 소듐 클로라이드의 스톱 용액으로부터 주사용수에서 희석시켜 제조하였다.
- [0389] 실시예 8에서 제공된 절차에 따라 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72를 이용하여 면역원성 조성물을 제조하였다. 정제된 벌크 중 항원 자체 및 어떠한 잔류 물질로부터의 기여도를 조사하기 위해, 항원 성분을 제외시킨 플라세보 냉동건조 케익을 또한 제조하였다.
- [0390] Malvern Zetasizer Nano 및 폴딩된 모세관 셀 중의 1.5 ml의 각각의 샘플을 이용하여, 30 내지 150 V (기계에 의해 자동으로 측정됨)의 전압을 가하고 전도성을 측정하였다.
- [0391] **결과**

[0392] 소듐 클로라이드 표준 용액의 전도성

소듐 클로라이드 농도 mM	전도성 mS/cm
0	0.0
75	8.2
100	10.7
150	15.6
250	23.9
300	30.0

[0393]

[0394] 이러한 데이터에 기반한 표준 곡선을 도 8에 제공한다.

[0395] 시험 용액의 전도성

설명	소듐 클로라이드 농도 mM	전도성 mS/cm	등가의 소듐 클로라이드 농도 mM
	ASA(소르비톨 - 2)	5	1.46
플라세보 pH 8.0 / ASA(소르비톨 - 2)	5	1.95	14
M72 pH 8.0 / ASA(소르비톨 - 2)	5	1.96	14
플라세보 pH 8.5 / ASA(소르비톨 - 2)	5	2.36	18
M72 pH 8.5 / ASA(소르비톨 - 2)	5	2.28	17
ASA(150 mM NaCl - 2)	150	16	159
플라세보 pH 8.5 / ASA(150 mM NaCl - 2)	150	14.8	147
M72 pH 8.5 / ASA(150 mM NaCl - 2)	150	15.3	152

[0396]

[0397] 상기 데이터에서 확인할 수 있는 바와 같이, 150 mM NaCl을 이용한 용액의 전도성은 NaCl을 최소로 이용한 용액보다 현저하게 컸다.

[0398] 정제된 벌크 중 항원 및 임의의 성분의 영향력은 최소화이며, 그 이유는 플라세보 제조물이 그 M72 관련 항원 함유 대응물에 필적하는 전도성을 지니기 때문이다.

[0399] **실시예 12: 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성 시험**

[0400] 본 실시예의 목적은 본 발명의 면역원성 조성물에서 임의의 양을 감소시키기 위한 제형 변화가, 단백질 안정성을 개선시키는 측면에서, 생체내 면역원성에 영향을 주는지 여부를 측정하는 것이었다.

[0401] **방법**

[0402] 4개의 면역원성 조성물을 평가하였다:

[0403] 1. 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 pH 8.5/ASA (150 mM NaCl - 2)

[0404] 2. 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 pH 8.5/ASA (소르비톨 - 2)

[0405] 3. 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 pH 8/ASA (소르비톨 - 2)

[0406] 4. 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 pH 7.5/ASA (소르비톨 - 2)

[0407] 이러한 항원 함유 조성물의 면역원성을 C57BL/6 마우스에서 평가하였다. 4개의 조성물 각각에 대해, 30마리의 C57BL/6 마우스에게 50 μ l의 애췌번트 용액 (실시예 10에서 제공된 절차에 의해 제조됨) 중 1 μ g의 항원을 0일, 14일 및 28일에 3회 근내 주입하였다. 유도된 M72 특이적 T 세포 반응 (CD4 & CD8 둘 모두)을 마지막 면역화 6일 후(6dPIII)에 측정하였다.

[0408] M72-특이적 세포 반응의 측정을 위해, 그룹당 30마리 마우스로부터의 말초혈 림프구를 수집하고 플링시켰다 (그룹당 5마리 마우스의 6개 풀). 세포를 시험관내 플레이팅하기 전에 적혈구 용해를 수행하였다. M72 서열 (N-말단 His 잔기 없음)을 포함하는 중첩 펩티드(펩티드당 1 μ g/ml의, 11개 아미노산 중첩을 지니는 15-mer

펩티드)의 풀을 이용하여 세포를 시험관내에서 재자극하였다. 배지 (펩티드 자극 없음)에 남아 있는 세포를 이용하여 백그라운드 반응을 측정하였다. 펩티드 풀과 공동-배양한 지 2시간 후에, 브레펠딘(brefeldin) A를 웰에 첨가하고 (사이토카인 배출 억제를 위해) 세포를 4°C에서 밤새 저장하였다. 후속하여 세포를 하기 마커에 대해 염색하였다: CD4, CD8, IL-2, IFN-감마 및 TNF-알파.

[0409] **결과**

[0410] 도 9 및 10에서 각각의 데이터포인트는 3차 면역화 6일 후 5마리 마우스로부터의 말초혈 림프구의 풀의 백그라운드 공제된 M72-특이적 CD4 또는 CD8 T 세포반응을 각각 나타낸다. 반응은 M72 펩티드 풀을 이용한 자극에 반응하여 IFN-감마 및/또는 IL-2 및/또는 TNF-알파를 생산하는 CD4 T 세포의 백분율로서 표현된다. 바는 각각의 그룹에 대한 반응의 중간을 표시한다.

[0411] 도 9 및 10의 결과는 필적하는 CD4 및 CD8 T 세포 반응이 각각의 시험 제형을 이용한 3회 면역화 후에 유도됨을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 면역원성 조성물에 존재하는 염의 양에서의 감소는 유도되는 T 세포 반응을 손상시키지 않는다고 결론 내릴 수 있다.

[0412] **실시예 13: pH 6.1 및 8.0에서 CaCl₂ 또는 MgSO₄와 함께 M72를 포함하는 조성물 중 "염석"의 조사.**

[0413] M72 항원 안정성에 대한 다른 염의 영향을 조사하기 위해, 상이한 pH 수준에서 여러 농도의 CaCl₂ 또는 MgSO₄를 이용하여 용액을 제조하였다. 육안 검사를 안정성의 판독정보로서 이용하였다.

[0414] **방법**

[0415] 정제된 벌크 항원 (2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72, SEQ ID No: 3)을 명시된 양의 염 (0 mM; 150 mM 또는 300 mM NaCl; 40 mM, 80 mM 또는 160 mM CaCl₂; 87.5 mM, 175 mM 또는 430 mM MgSO₄)을 함유하는 2개의 상이한 완충제 (pH 6.1의 10mM 숙시네이트 완충제 및 pH 8.0의 10 mM Tris 완충제)에서 100 µg/ml의 농도로 희석시켰다.

[0416] 샘플을 제조한 직후에 분석하였다.

[0417] Mettler Toledo 전도계 및 실리콘이 첨가되지 않은 유리 바이알 중 6 ml의 각각의 샘플을 이용하여, 전도성을 측정하였다.

[0418] 결과

그룹	염	완충제	pH (이론치)	전도성 (mS/cm) (측정치)	pH (측정치)	육안 관찰
A	0 mM	숙시네이트 10mM	6.1	1.1	6.3	투명함
B	NaCl 150 mM	숙시네이트 10mM	6.1	13.4	6.1	투명함
C	NaCl 300 mM	숙시네이트 10mM	6.1	20.0	6.1	투명함
D	CaCl ₂ 40 mM	숙시네이트 10mM	6.1	8.0	6.1	유백광
E	CaCl ₂ 80 mM	숙시네이트 10mM	6.1	11.2	5.8	유백광 + 큰 입자
F	CaCl ₂ 160 mM	숙시네이트 10mM	6.1	20.2	5.8	유백광 + 큰 입자
G	MgSO ₄ 87.5 mM	숙시네이트 10mM	6.1	7.7	6.1	유백광
H	MgSO ₄ 175 mM	숙시네이트 10mM	6.1	12.4	5.9	유백광+ 매우 큰 입자
I	MgSO ₄ 430 mM	숙시네이트 10mM	6.1	20.4	5.9	유백광+ 매우 큰 입자
J	0 mM	Tris 10mM	8.0	0.463	8.0	투명함
K	NaCl 150 mM	Tris 10mM	8.0	12.13	8.0	투명함

[0419]

그룹	염	완충제	pH (이론치)	전도성 (mS/cm) (측정치)	pH (측정치)	육안 관찰
L	NaCl 300 mM	Tris 10mM	8.0	21.1	8.0	투명함
M	CaCl ₂ 40 mM	Tris 10mM	8.0	6.7	8.1	큰 입자
N	CaCl ₂ 80 mM	Tris 10mM	8.0	10.8	8.0	유백광+ 큰 입자
O	CaCl ₂ 160 mM	Tris 10mM	8.0	19.7	8.0	유백광+ 큰 입자
P	MgSO ₄ 87.5 mM	Tris 10mM	8.0	7.5	8.0	큰 입자
Q	MgSO ₄ 175 mM	Tris 10mM	8.0	10.9	8.2	유백광+ 매우 큰 입자
R	MgSO ₄ 430 mM	Tris 10mM	8.0	21.7	8.1	유백광+ 매우 큰 입자

[0420]

[0421] 상기 결과는 M72 관련 항원을 함유하는 용액이 소듐 클로라이드 이외의 염에 민감할 수 있음을 입증한다. CaCl₂ 또는 MgSO₄의 영향은 필적하는 농도 또는 전도성에서 소듐 클로라이드에 대한 것보다 훨씬 확연한 것으로 보인다.

[0422] 실시예 14: pH 6.1, 7.5 및 8.5에서 상이한 염 농도와 함께 Mtb72f를 포함하는 조성물 중 "염석"의 조사.

[0423] 크기에 의해 평가되는, Mtb72f 항원 안정성에 대한 소듐 클로라이드 농도 및 pH의 영향을 조사하였다.

[0424] 방법

[0425] 정제된 벌크 항원 (6개의 his 잔기를 지니는 Mtb72f, SEQ ID No: 7)을 0, 150 및 450 mM의 최종 소듐 클로라이드 농도를 함유하는 3개의 상이한 완충제 (pH 6.1의 10mM 포스페이트 완충제, pH 7.5의 20 mM Tris 완충제 및

pH 8.5의 20 mM Tris 완충제)에서 100 µg/ml의 농도로 희석시켰다.

[0426] 샘플을 분석 전에 4°C 또는 25°C에서 24시간 동안 저장하였다.

[0427] Thermo Fischer Scientific으로부터 이용가능한 Nepheloskan® Ascent를 이용하여 비탁법을 수행하였다. Corning Inc (USA)로부터 이용가능한 UV 투과성 Costar® 미세플레이트에서 분석을 수행하였다.

[0428] Wyatt Instruments로부터의 Dynapro Plate Reader를 이용하여 DLS를 수행하였다. 830 nm의 레이저 파장 및 50 mW의 전력을 이용하여 기계를 작동시켰다. 산란된 광을 22°C의 온도에서 150° 로 검출하였다. 평균 유체역학 직경 및 다분산지수 (pI)를 기계 소프트웨어에 의해 계산하였다.

[0429] **결과**

[0430] 이러한 실험의 결과를 도 11 및 12에 제시한다.

[0431] DLS 및 비탁법 둘 모두는 이전 실시예에서 보여진 M72와 유사한 방식으로 Mtb72f가 염 농도 및 pH에 민감하다는 일반적인 경향을 입증한다. 따라서, 본 발명의 이익은 M72 관련 항원에 적용되며 M72 서열 자체에만 적용되는 것은 아니다.

[0432] 다수의 DLS 샘플의 경우, 계측은 특수한 입자 크기를 측정할 수 없다 (도 12에서 NV로서 도시됨).

[0433] **실시예 15: M72, 면역자극제를 포함하고 긴장제로서 소르비톨을 이용한 조성물에서 "염석"의 방지**

[0434] 150 mM NaCl을 함유하는 면역원성 조성물의 안정성을 긴장제로서 소르비톨을 이용한 조성물과 비교하기 위해, 대안적인 ELISA를 이용하여 샘플을 모니터링하였다.

[0435] **방법**

[0436] 실시예 7로부터의 적절한 애쥬번트 제형과 조합시 8.5의 pH가 얻어지도록 실시예 10 (특히 방법 (a))에 기재된 대로 냉동건조 케익을 제조하였다.

[0437] 상기 기재된 냉동건조 케익을 실시예 7에서 제조된 625 µl의 애쥬번트 용액으로 재구성하였다. 애쥬번트 용액으로 재구성했을 때, 하기 면역원성 조성물이 수득되었다:

[0438] (i) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(150 mM NaCl - 2) pH 8.5

[0439] 10 µg 항원 (20 µg/ml)

[0440] 5% w/v 수크로스

[0441] 40 mM Tris

[0442] 0.02% w/v Tween80

[0443] 500 µg DOPC

[0444] 125 µg 콜레스테롤

[0445] 25 µg 3D-MPL

[0446] 25 µg QS21

[0447] 150 mM NaCl

[0448] 10 mM 포스페이트

[0449] pH 8.5

[0450] (ii) 2개의 N-말단 His 잔기를 지니는 M72 - ASA(소르비톨 - 2) pH 8.5

[0451] 10 µg 항원 (20 µg/ml)

[0452] 5% w/v 수크로스

[0453] 40 mM Tris

[0454] 0.02% w/v Tween80

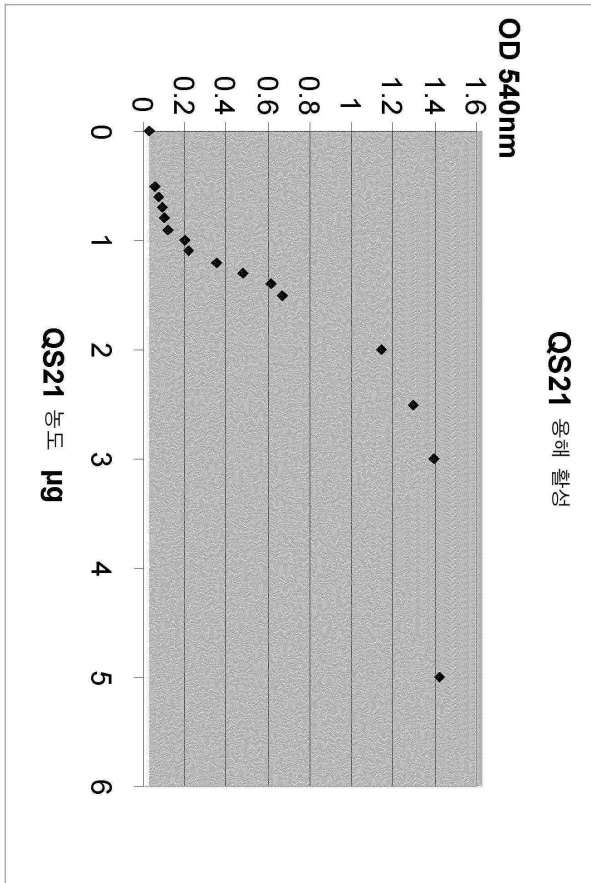
- [0455] 500 μg DOPC
- [0456] 125 μg 콜레스테롤
- [0457] 25 μg 3D-MPL
- [0458] 25 μg QS21
- [0459] 5 mM NaCl
- [0460] 4.7% w/v 소르비톨
- [0461] 10 mM 포스페이트
- [0462] pH 8.5
- [0463] 상기 기재된 재구성된 면역원성 조성물을 30°C에서 저장한 후에 특성구명하고 (T24h) 즉석에서 제조된 샘플 (T0)과 비교하였다.
- [0464] 항원을 M72-특이적인 토끼 폴리클로날 항체에 의해 포획하고 후속하여 M72(Mtb39)-특이적 마우스 모노클로날 항체에 의해 나타내는 간접 샌드위치 ELISA에 의해 항원성을 정량하였다. 간단히 말해, 플레이트를 둘베코 (Dulbecco')의 포스페이트 완충된 염수에서 1/8000의 희석액으로 밤새 4°C에서 항-M72 토끼 폴리클로날 항체로 코팅하고 4회 세척 후에 플레이트를 포화 완충제 (PBS, 0.1% Tween 20, 1% BSA)로 37°C에서 1h 동안 차단시켰다. 세척 단계 후에, 단백질 표준 (M72 정제된 벌크: 1950 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 내부 대조군 (M72: 1768 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 샘플을 약 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 플레이트의 첫 번째 컬럼부터 웰에 로딩시킨 다음 웰 1에서 12까지 포화 완충제 (PBS, 0.025% Tween 20)에서 2배 연속 희석을 수행하고 37°C에서 1h30분 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후에, 면역 복합체를 포화 완충제 (PBS, 0.025% Tween 20)에서 1/1000의 희석액으로 항-M72 마우스 모노클로날 항체와 37°C에서 1h 동안 인큐베이션시켰다. 4회 세척 후에, 바이오티닐화된 토끼 항-마우스 폴리클로날 항체를 포화 완충제 (PBS, 0.025% Tween 20) 중 1/1000의 희석액으로 첨가하였다. 4회 세척 후에, 포화 완충제 (PBS, 0.025% Tween 20)에서 1/4000으로 희석된 스트렙타비딘-호스래디쉬 퍼옥시다제를 첨가시켜 신호를 증폭시켰다. 4회 세척 후에, 오르토 페닐렌 디아민 디하이드로클로라이드 (OPDA)에 의해 RT에서 15분간 신호를 나타내고 HCl 1M을 첨가시켜 반응을 중단시켰다. 착색은 결합된 항-M72 항체의 양에 비례하였고, 이를 490 nm 및 620 nm에서 측정하였다. 모든 세척 단계는 PBS, 0.025% Tween 20을 이용하여 수행되었다.
- [0465] 모든 측정된 값은 시험되는 제형을 제조하기 위해 이용된 정제된 벌크 단백질에 기반하여 예상되는 항원성에 관해 제시된다.
- [0466] **결과**
- [0467] 상기 결과를 도 13에 도시한다. 마름모꼴은 3개의 시험 샘플 각각에 대한 특수한 측정치를 나타내고, 라인은 평균값을 나타낸다.
- [0468] 항원 회수율은 긴장제로서 소르비톨을 이용한 pH 8.5의 저염 조성물로 재구성시에 30°C에서 24h까지 대체로 안정하다. ASA(소르비톨-2)의 회수율은 24시간 후에 83.5%인 반면 (T0 87.1%, 95.9%의 상대 항원성이 유지되었음을 의미함), ASA(NaCl-2)의 회수율은 24시간 후에 54.5%였다 (T0 81.0%, 단지 67.3%의 상대 항원성이 저장 후에 유지되었음을 의미함).
- [0469] 요약해 보면, 실시예 9, 10 및 15는 M72 관련 항원을 함유하는 면역원성 조성물의 안정성에 대한 유해한 효과가 pH 및 NaCl 농도로부터 초래됨을 처음으로 입증한다. 실시예 13은 이러한 연구를 확대시켜 그 밖의 염이 또한 M72 관련 항원을 함유하는 면역원성 조성물의 안정성에 대해 유해한 영향을 지닐 수 있음을 나타내고, 실시예 14는 이러한 효과가 또한 M72 관련 서열에 적용될 수 있음을 입증한다.
- [0470] 비이온성 긴장제로 면역원성 조성물을 재형성하는 것은 항원 안정성 문제를 다룬다. 추가로, 실시예 3, 4 및 12는 면역원성 제형으로부터 실질적으로 모든 NaCl의 제거 및 긴장제로서 소르비톨로의 이의 대체는 T 세포 반응의 자극에 대한 유해한 영향력을 지니지 않았음을 입증한다.
- [0471] 면역원성 조성물의 안정성은 중요하며 특히 냉각이 용이하게 이용될 수 없는 분리된 위치에 있을 때 민감한 사안일 수 있다. 면역원성 조성물에서 염의 존재를 감소시킴에 의해, 본 발명자들은 면역원성 조성물을 저장한 경우에 관찰되는 변화 정도를 감소시킬 수 있었다.

[0472] 명세서 및 이어지는 청구범위를 통틀어, 문맥에서 달리 요구되지 않는 한, '포함'이라는 말과 '포함하다' 및 '포함하는'과 같은 변형은 언급된 정수, 단계, 정수의 그룹 또는 단계의 그룹의 포함을 의미하나 어떠한 다른 정수, 단계, 정수의 그룹 또는 단계의 그룹을 배제시키는 것은 아님이 이해될 것이다.

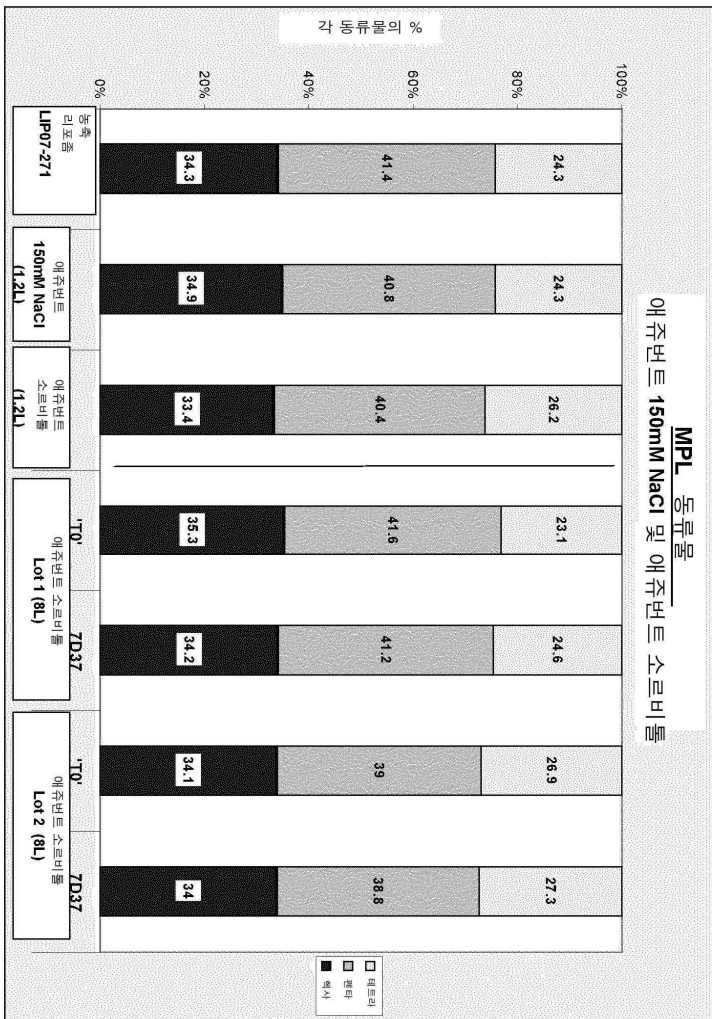
[0473] 특허 및 특허 출원을 포함하는 본원에서 인용된 모든 문서는 그 전문이 참조로서 포함된다.

도면

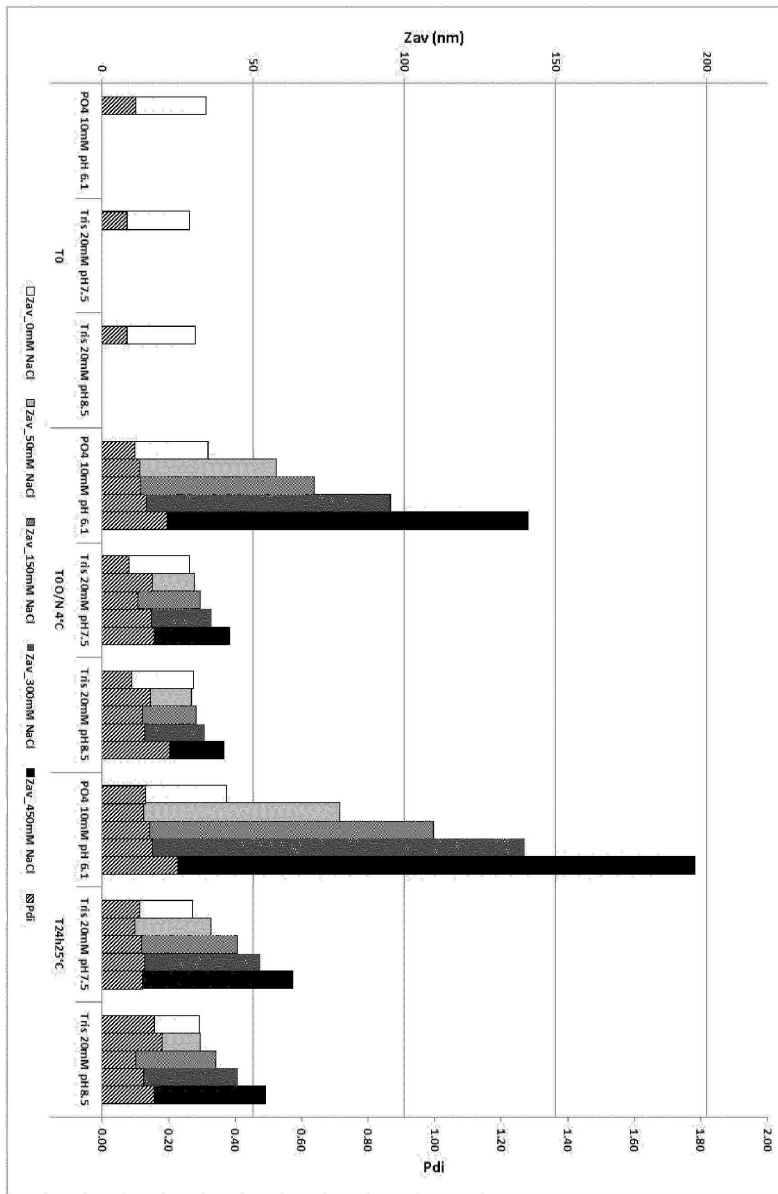
도면1



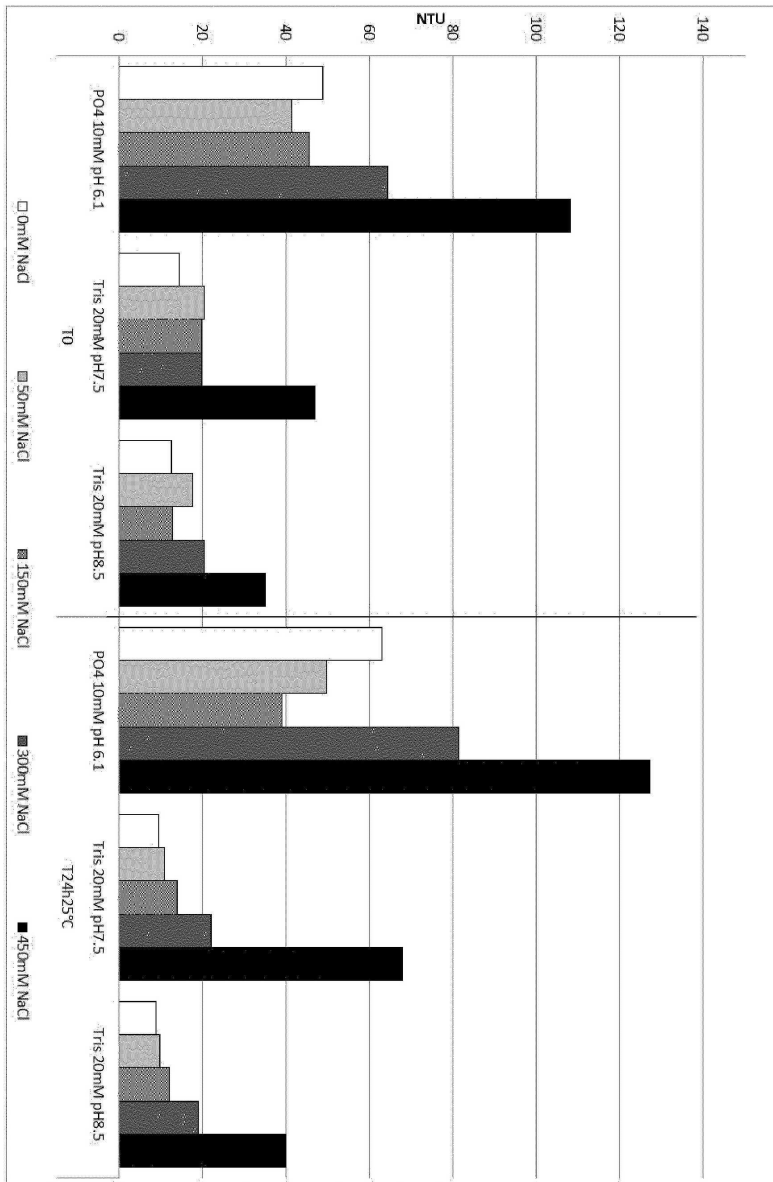
도면2



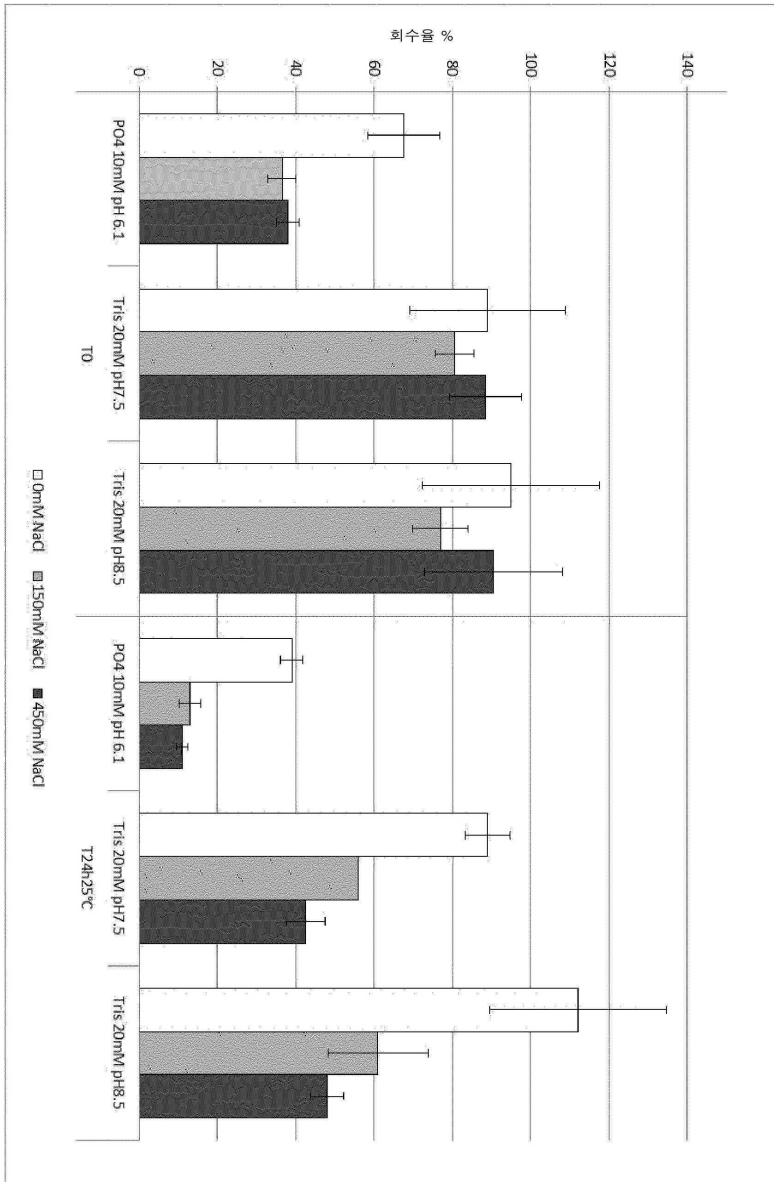
도면3



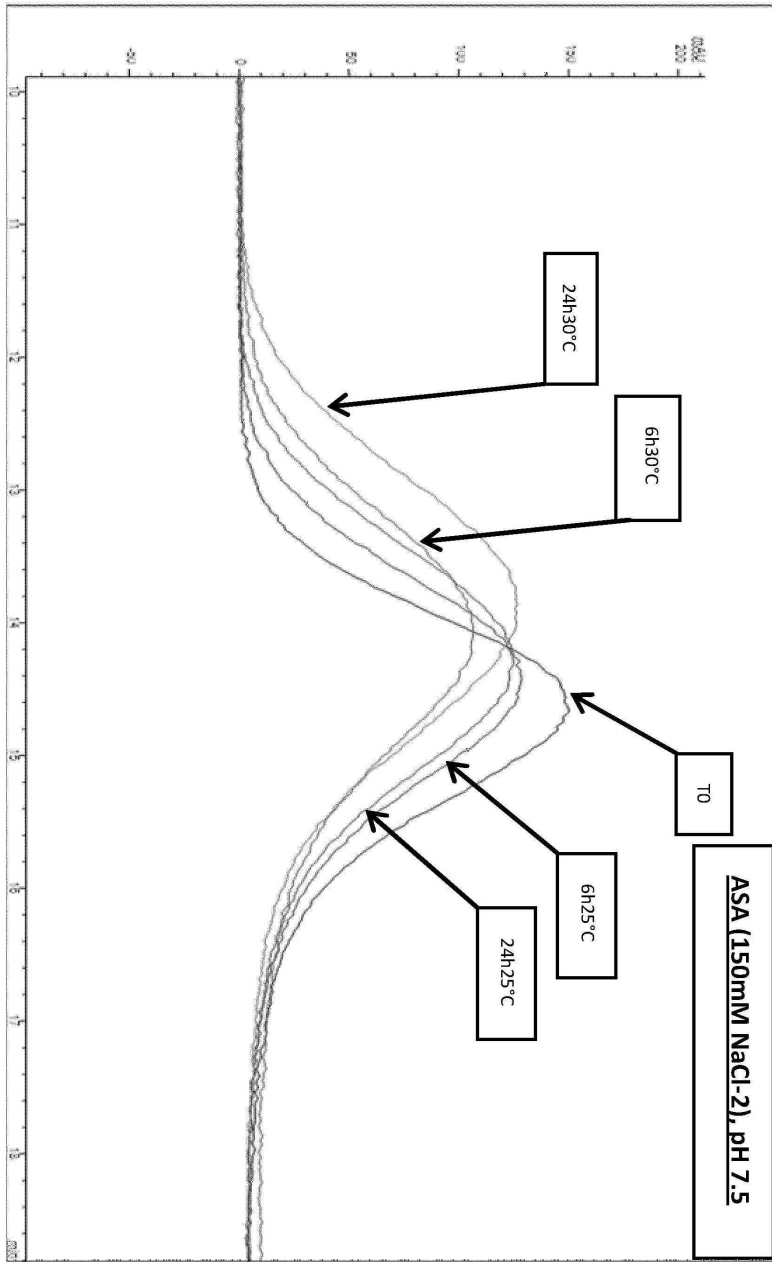
도면4



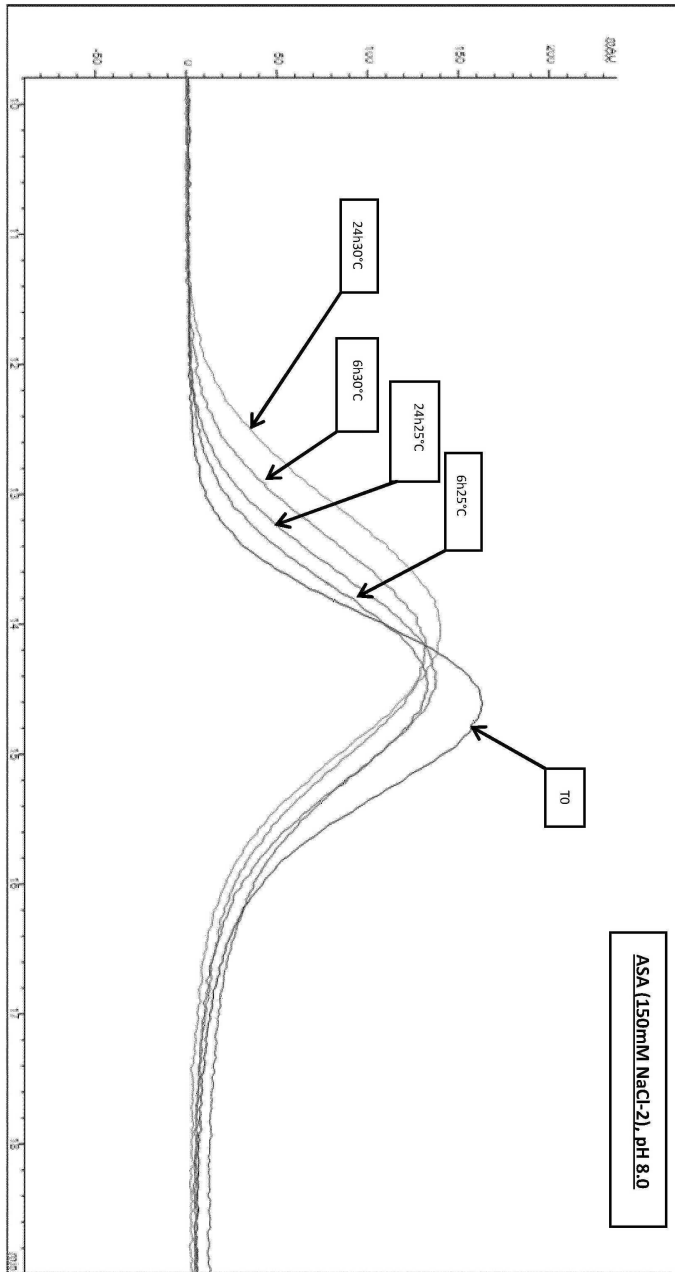
도면5



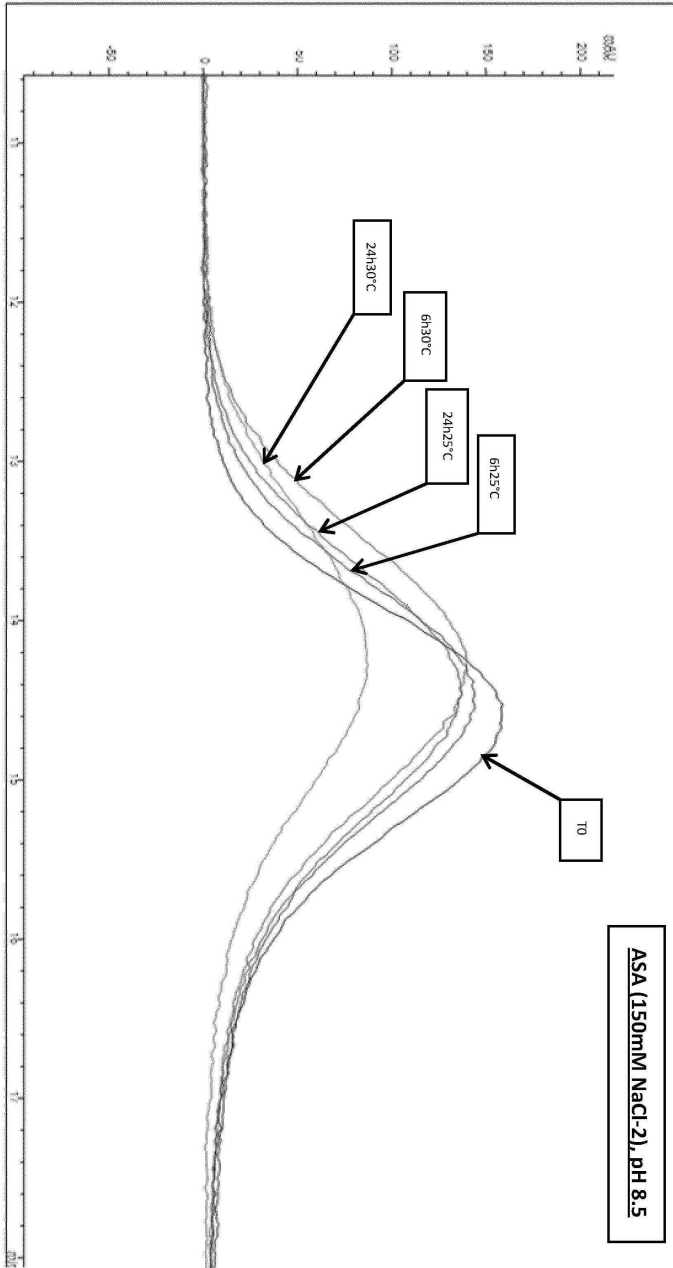
도면6a



도면6b



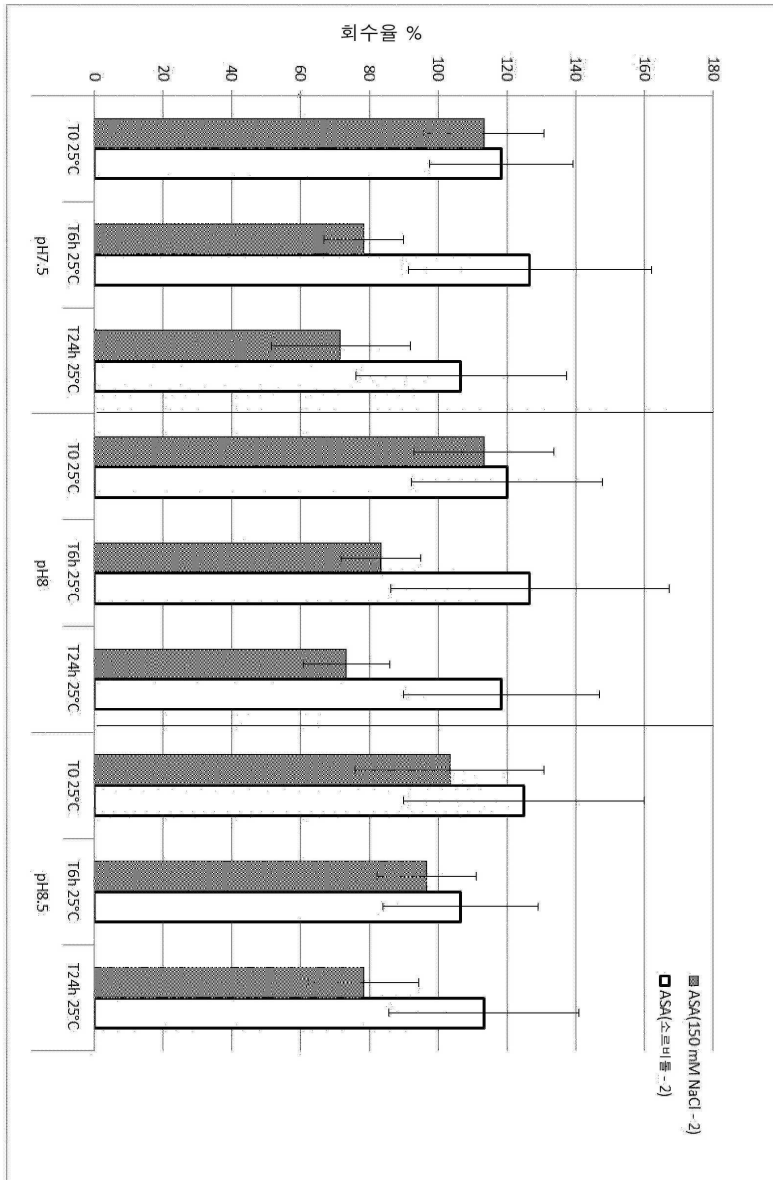
도면6c



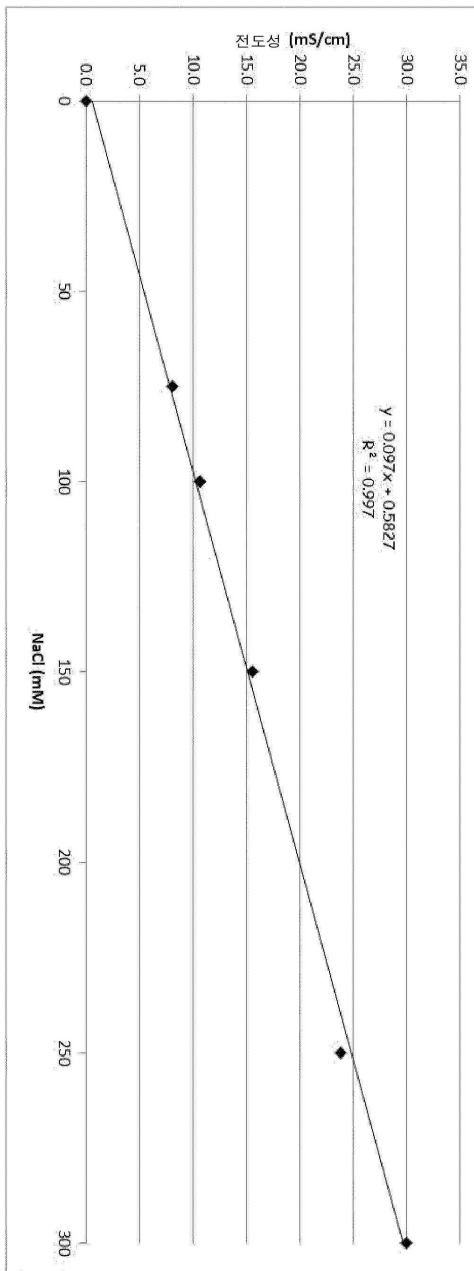
도면6d



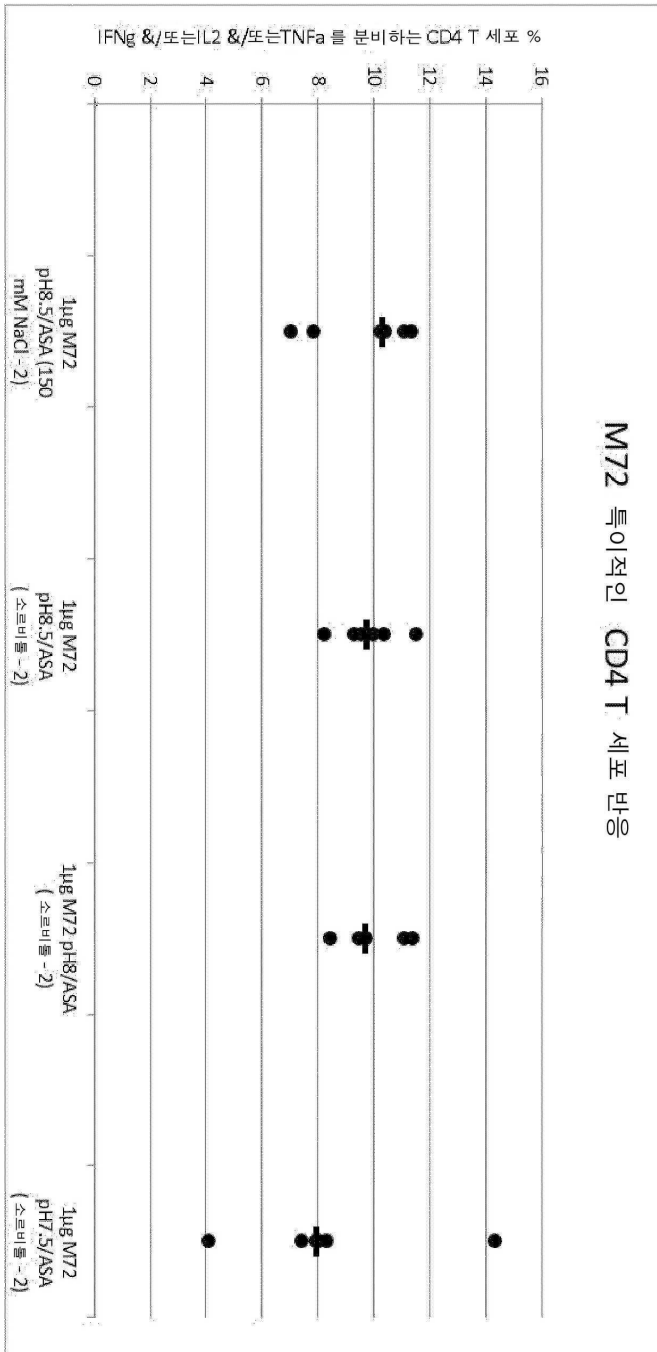
도면7



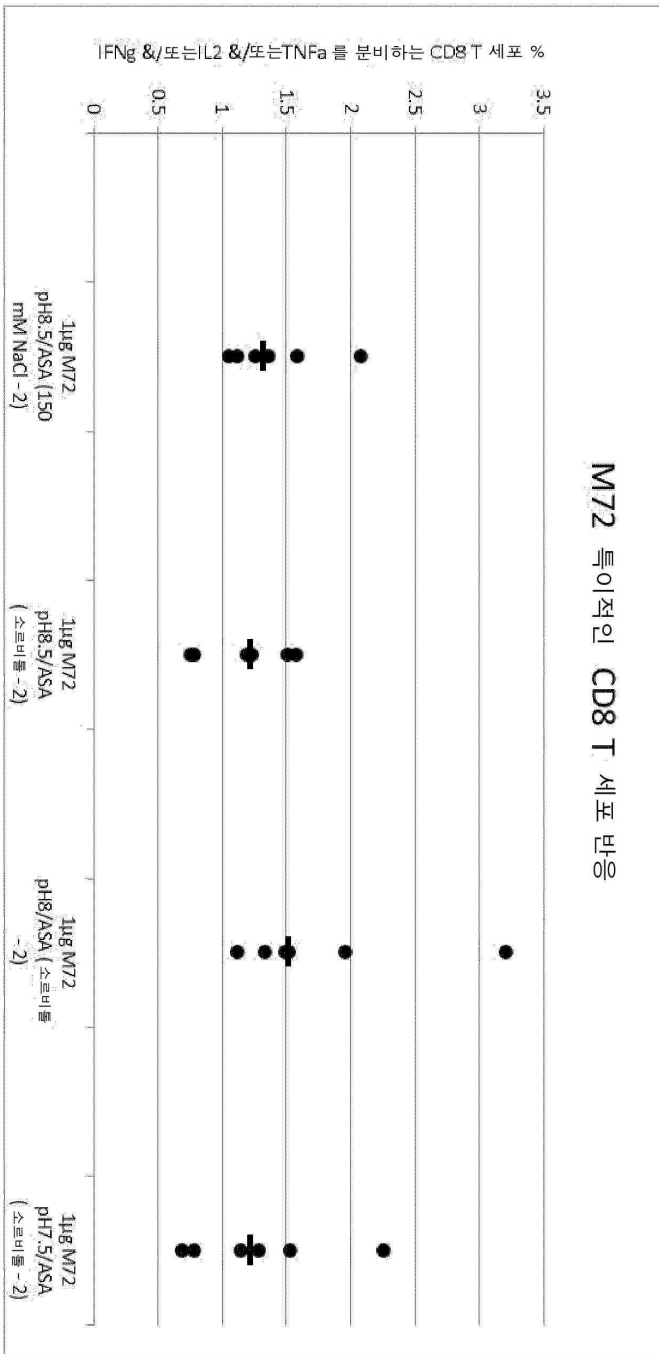
도면8



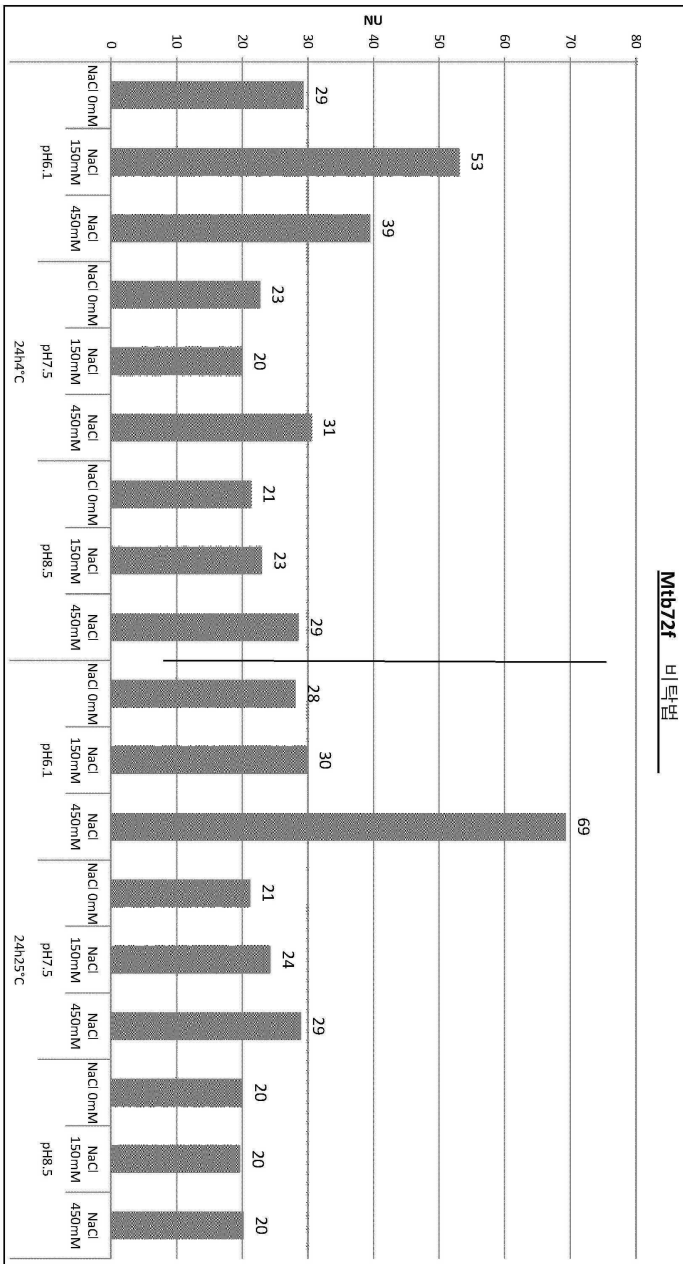
도면9



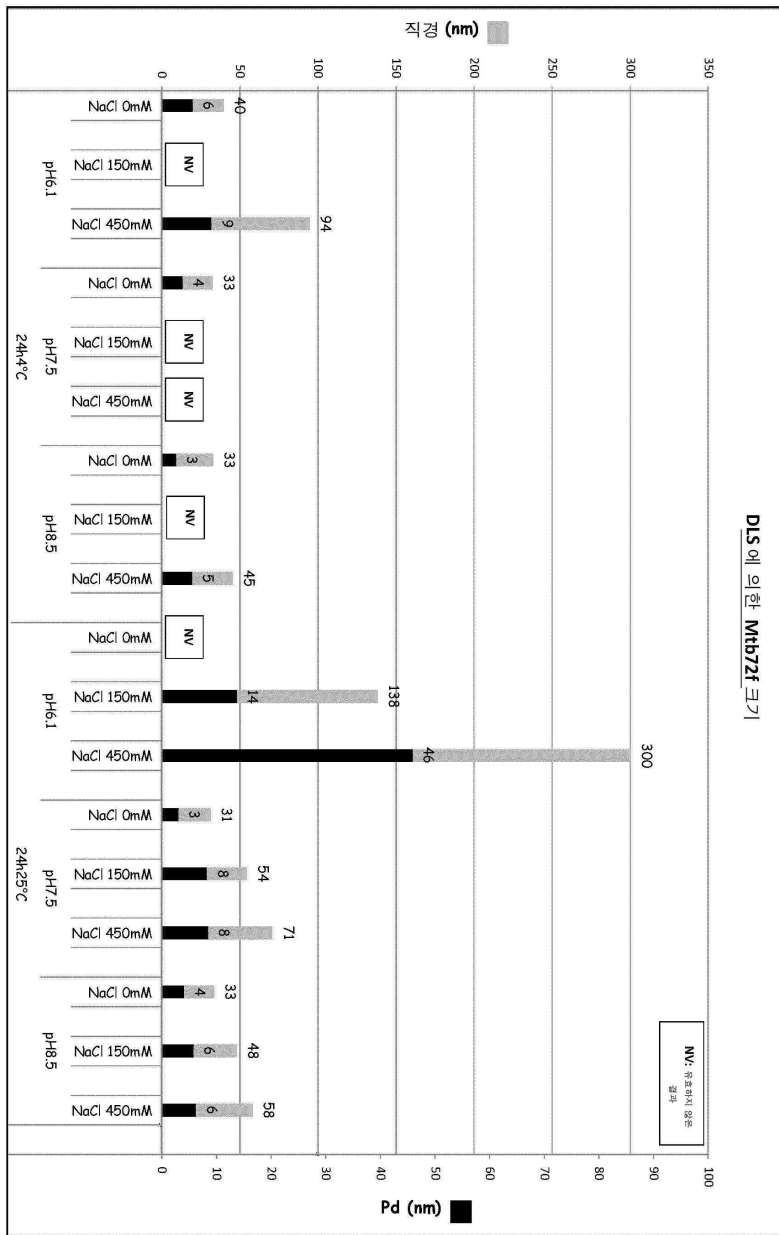
도면10



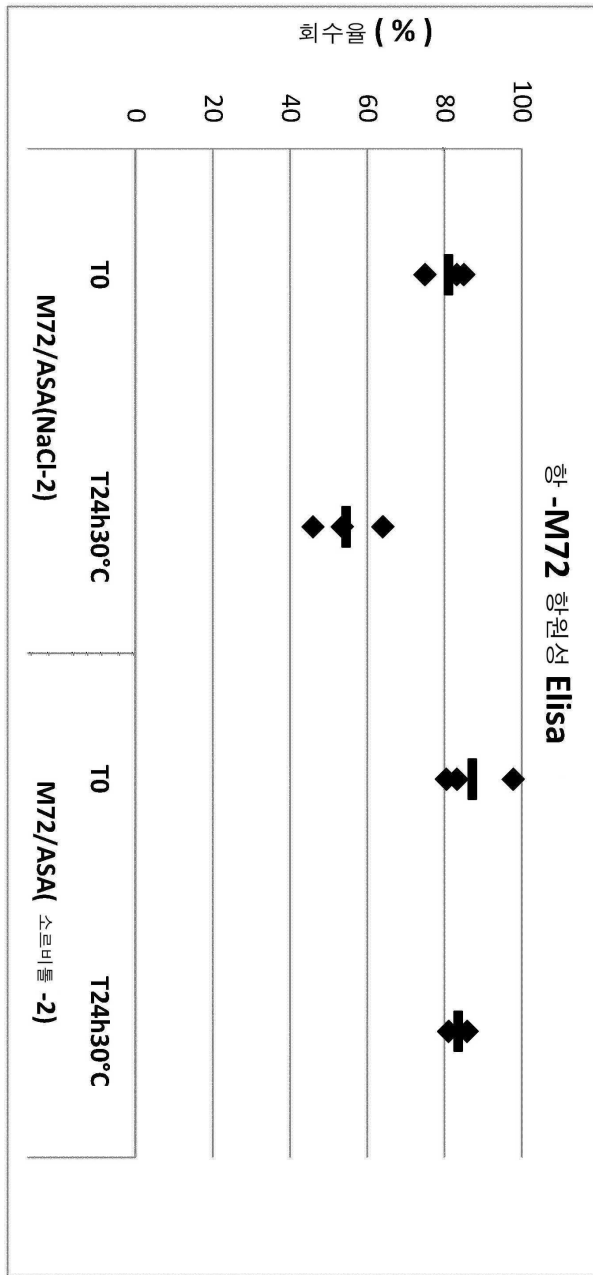
도면11



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa
 Godart, Stephane
 Laanan, Amina
 Lemoine, Dominique

<120> Novel compositions

<130> VB64442

<150> US61/422723
 <151> 2010-12-14
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> M72 fusion protein

<400> 1
 Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
 35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
 50 55 60

Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
 65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
 85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
 115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
 130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255

Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270

Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285

Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300

Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350

Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365

His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380

Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415

Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly

ggcctgtgga agacggtctc gccgcatcgg tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140

aacaaccaca tgtcgaatgac caactcgggt gtgtcgaatga ccaacacctt gagctcgaatg 1200

ttgaagggtt ttgctccggc ggcggccggc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaaacggg 1260

gtccgggcca tgagctcgtt gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtggggtg 1320

gccgccaact tgggtcgggc gccctcggtc ggttcgttgt cgggtcccga gccctgggcc 1380

gcggccaacc aggcagtcac cccggcggcg cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc 1440

gccgcggaaa gagggcccgg gcagatgctg ggcgggctgc cgggtgggca gatgggcgcc 1500

agggccggtg gtgggctcag tgggtgtgctg cgtgttcgc cgcgacccta tgtgatgccg 1560

cattctccgg cagccggcga tatcggcccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcggcgac 1620

ttccccgcgc tggccctcga cccgtccgcg atggtcggcc aagtggggcc acaggtggtc 1680

aacatcaaca ccaaactggg ctacaacaac gccgtgggcg ccgggaccgg catcgtcatc 1740

gatccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cgggcgccac cgacatcaat 1800

gcgttcagcg tgggtccgg ccaaacctac ggcgtcgaatg tgggtcgggta tgaccgcacc 1860

caggatgctg cgggtcgtca gctgcgcggt gccggtggcc tggcgtcggc ggcgatcgg 1920

ggcggcgtcg cggttgggta gcccgctcgtc gcgatgggca acagcgggtg gcagggcgga 1980

acgccccgtg cggtgccctgg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca gccgtcggat 2040

tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgaatc cgcgatccag 2100

cccgtgatg cgggcgggcc cgtcgtcaac gccctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160

gccgcgtcct ag 2172

<210> 3

<211> 725

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M72 fusion with 2 additional his residues

<400> 3

Met His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly

1 5 10 15

Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln

20 25 30

Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala

35 40 45

Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val
 50 55 60
 Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr
 65 70 75 80

 Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr
 85 90 95
 Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser
 100 105 110
 Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu
 130 135 140

 Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala
 145 150 155 160
 Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val
 180 185 190
 Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser
 195 200 205

 Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr
 210 215 220
 Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met
 245 250 255
 Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala
 260 265 270

 Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala
 275 280 285
 Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu

Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln
 545 550 555 560
 Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala
 565 570 575
 Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn
 580 585 590

His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser
 595 600 605
 Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp
 610 615 620
 Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala
 625 630 635 640
 Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn
 645 650 655

Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val
 660 665 670
 Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu
 675 680 685
 Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly
 690 695 700
 Asp Ala Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met
 705 710 715 720

Asn Thr Ala Ala Ser
 725

<210> 4

<211> 2178

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding sequence for M72 fusion with 2 additional his residues

<400> 4

atgcatcaca cggccgcgctc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60

attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcgggtgg ggggtcaccc 120

accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttgggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180
 ggcgacagag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc 240
 ggcgacgtga tcaccgcggt cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcggac 300

gcgcttaacg ggcatcatcc cggtgacgtc atctcggatga cctggcaaac caagtctggc 360
 ggcacgcgta caggaacgt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420
 ttcggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc gggttcggcc 480
 tcgctggtgg ccgcggtca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttcggccgcg 540
 tcggcgtttc agtcggtggt ctggggtctg acggtggggt cgtggatagg ttcgtcggcg 600
 ggtctgatgg tggcggcggc ctcccgctat gtggcgtgga tgagcgtcac cgcggggcag 660
 gccgagctga ccgccccca ggtccgggtt gctgcggcgg cctacgagac ggcgtatggg 720

ctgacggtgc ccccgccggt gatcggcag aaccgtgctg aactgatgat tctgatagcg 780
 accaacctct tggggcaaaa caccgcggcg atcgcggtca acgaggcca atacggcgag 840
 atgtgggccc aagacgccgc cgcgatgttt ggctacgcc cggcgacggc gacggcgacg 900
 gcgacgttgc tgcggttca ggaggcggc gagatgacca gcgcgggtgg gtcctcagag 960
 caggccgccg cggtcgagga ggcctccgac accgccggc cgaaccagtt gatgaacaat 1020
 gtgccccagg cgtgcaaca gctggcccag cccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag 1080
 ctgggtggcc tigtgaagac ggtctcggc catcggtcgc cgatcagcaa catggtgtcg 1140

atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa caccttgagc 1200
 tcgatgttga agggctttgc tccggcggcg gccgccagg ccgtgcaaac cgcggcgcaa 1260
 aacggggtcc gggcgtatgag ctcgctgggc agctcgtgg gttcttcggg tctggcgggt 1320
 ggggtggccc ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcggtt cgttctcggg gccgcaggcc 1380
 tgggcgcggg ccaaccaggc agtcaccccg gcggcggcgg cgctgccgct gaccagcctg 1440
 accagcggc cggaaagagg gcccggcag atgctgggcg ggctgccggt ggggcagatg 1500
 ggcgccaggg ccggtggtgg gctcagtggt gtgctcgtg ttccgccgag acctatgtg 1560

atgccgatt ctccggcagc cggcgatata gccccggc cttgtcgca ggaccggttc 1620
 gccgacttcc ccgctgcc cctcgaccg tccgcatgg tcgccaagt ggggccacag 1680
 gtggtcaaca teaacaccaa actgggctac aacaacgcc tgggcgccgg gaccggcatc 1740
 gtcacgac ccaacggtgt cgtgtgacc aacaaccag tgatcgcggg gccaccgac 1800
 atcaatgctg tcagcgtcgg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggt cgggtatgac 1860
 cgaccccagg atgtcgggt gctgcagctg cgcggtgccg gtggcctgcc gtcggcggcg 1920

atcgggtggcg gcgtcgcggt tggtagagccc gtcgtcgcga tgggcaacag cggtagggcag 1980
 ggcggaacgc cccgtgcggt gcctggcagg gtggtcgcgc tcggccaaac cgtgcaggcg 2040
 tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgccgcg 2100
 atccagcccc gtgatgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt ggtcggtatg 2160
 aacacggccg cgtcctag 2178

<210> 5

<211> 723

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mtb72f fusion

<400> 5

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
 1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
 20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
 35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
 50 55 60

Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
 65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
 85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
 115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
 130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255

Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270

Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285

Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300

Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320

Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350

Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365

His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380

Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400

Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
 675 680 685
 Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
 690 695 700
 Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
 705 710 715 720

Ala Ala Ser

<210> 6

<211> 2172

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding sequence for Mtb72f fusion

<400> 6

atgacggcgg cgtccgataa cttccagctg tcccagggtg ggcagggatt cgccattccg 60
 atcgggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgatcgg gtggggggtc acccacggtt 120
 catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgttgcg acaacaacgg caacggcgca 180
 cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgcctcg gcggaagtc tcggcatctc caccggcgac 240
 gtgatcaccg cggtcgacgg cgctccgatc aactcgcca ccgcgatggc ggacgcgctt 300

 aacgggcatt atcccgtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg 360
 cgtacaggga acgtgacatt ggccgaggga cccccgccg aattcatggt ggatttcggg 420
 gcgttaccac cggagatcaa ctcccgagg atgtacgcc gcccggttc gcctcgtcgt 480
 gtggccggcg ctcatatgtg ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg 540
 tttcagtcgg tggctcgggg tctgacgggt gggtcgtgga taggttcgic ggcgggtctg 600
 atggtggcgg cggcctcgcc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgcccg gcaggccgag 660
 ctgaccgccc cccaggtccg ggttctgctg gcgccctacg agacggcgta tgggctgacg 720

 gtgccccgcg cggatgatcg cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac 780
 ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg 840
 gcccaagacg ccgcccgcat gtttggttac gcccgggcga cggcgacggc gacggcgacg 900
 ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgcgg gtgggctcct cgagcaggcc 960

gccgcggtcg aggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgcc 1020
 caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgccttcttc caagctgggt 1080
 ggctgtgga agacggtctc gccgcatcgg tcccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140

aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg 1200
 ttgaagggt ttgctccggc ggccggccgc caggccgtgc aaaccgcgcc gcaaacggg 1260
 gtccggcgca tgagctcgtc gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cgggtggggtg 1320
 gccgccaact tgggtcgggc gccctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca gcctggggc 1380
 gcggccaacc aggcagtcac cccggcggcg cgggcgctgc cgtgaccag cctgaccagc 1440
 gccgcggaaa gagggcccg gcagatgctg gcgggctgc cggtgggca gatgggcgcc 1500
 agggccggtg gtgggctcag tgggtgtctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg 1560

catttccgg cagccggcga tateccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcggcgc 1620
 ttccccgcgc tgcccctga cccgtccgc atggtcggc aagtggggcc acaggtggtc 1680
 aacatcaaca ccaactggg ctacaacaac gccgtggcg cgggaccgg catcgtcacc 1740
 gatccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cggcgccac cgacatcaat 1800
 gcgttcagcg tcggctccg ccaaacctac ggcgtcgatg tggtcgggta tgaccgacc 1860
 caggatgctg cgggtctgca gctgcgctg gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcgg 1920
 ggccgctcgc cggttggtga gcccgctgc gcgatggca acagcggggc gcagggcgga 1980

acgccccgtg cggtgccctg cagggtggtc gcgctcggcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040
 tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
 cccggtgatt cgggcgggcc cgtcgtcaac ggctaggac aggtggctcg tatgaacacg 2160
 gccgcgtcct ag 2172

<210> 7

<211> 729

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mtb72f fusion with 6 additional his residues

<400> 7

Met His His His His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala
 20 25 30

Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile
 35 40 45
 Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn
 50 55 60
 Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu
 65 70 75 80

 Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile
 85 90 95
 Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly
 100 105 110
 Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr
 115 120 125
 Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp
 130 135 140

 Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly
 145 150 155 160
 Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val
 165 170 175
 Ala Ser Asp Leu Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp
 180 185 190
 Gly Leu Thr Val Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val
 195 200 205

 Ala Ala Ala Ser Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln
 210 215 220
 Ala Glu Leu Thr Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu
 225 230 235 240
 Thr Ala Tyr Gly Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg
 245 250 255
 Ala Glu Leu Met Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr
 260 265 270

 Pro Ala Ile Ala Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln

275	280	285
Asp Ala Ala Ala Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr		
290	295	300
Ala Thr Leu Leu Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly		
305	310	315
Gly Leu Leu Glu Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala		
325	330	335
Ala Ala Asn Gln Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu		
340	345	350
Ala Gln Pro Thr Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu		
355	360	365
Trp Lys Thr Val Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser		
370	375	380
Met Ala Asn Asn His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr		
385	390	395
Asn Thr Leu Ser Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala		
405	410	415
Gln Ala Val Gln Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser		
420	425	430
Leu Gly Ser Ser Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala		
435	440	445
Asn Leu Gly Arg Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala		
450	455	460
Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro		
465	470	475
Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu		
485	490	495
Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu		
500	505	510
Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser		
515	520	525

Pro Ala Ala Gly Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe
 530 535 540
 Ala Asp Phe Pro Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln
 545 550 555 560
 Val Gly Pro Gln Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn
 565 570 575
 Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val
 580 585 590

Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe
 595 600 605
 Ser Val Gly Ser Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp
 610 615 620
 Arg Thr Gln Asp Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu
 625 630 635 640
 Pro Ser Ala Ala Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val
 645 650 655

Ala Met Gly Asn Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro
 660 665 670
 Gly Arg Val Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu
 675 680 685
 Thr Gly Ala Glu Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala
 690 695 700
 Ile Gln Pro Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln
 705 710 715 720

Val Val Gly Met Asn Thr Ala Ala Ser
 725

<210> 8

<211> 2190

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding sequence for M72 fusion with 6 additional his residues

<400> 8

atgcatcacc atcaccatca cacggccgcg tccgataact tccagctgtc ccagggtggg 60
 cagggatctc ccattccgat cgggcaggcg atggcgatcg cgggccagat ccgatcgggt 120
 ggggggtcac ccaccgttca tatcgggcct accgccttcc tcggcttggg tgttgtcgac 180
 aacaacggca acggcgcacg agtccaacgc gtggtcggga gcgctccggc ggcaagtctc 240

 ggcatctcca cggcgcagct gatcaccgcg gtcgacggcg ctccgatcaa ctcgccacc 300
 gcgatggcgg acgcgcttaa cgggcatcat cccggtgacg tcatctcggg gacctggcaa 360
 accaagtcgg gcggcacgcg tacagggaac gtgacattgg ccgagggacc cccggccgaa 420
 ttcattggtg atttcggggc gttaccaccg gagatcaact ccgagggat gtacgccggc 480
 ccgggttcgg cctcgtcgtt ggcccgggct cagatgtggg acagcgtggc gagtgacctg 540
 ttttcggccg cgtcggcgtt tcagtcggtg gtcctggggtc tgacggtggg gtcgtggata 600
 ggttcgtcgg cgggtctgat ggtggcggcg gcctcgcctt atgtggcgtg gatgagcgtc 660

 accgcggggc aggccgagct gaccgccgc caggtccggg ttgctgcggc ggcctacgag 720
 acggcgtatg ggctgacggt gccccgcggt gtgatcggcg agaaccgtgc tgaactgatg 780
 attctgatag cgaccaacct cttggggcaa aacaccccg cgatcgcggt caacgagcc 840
 gaatacggcg agatgtgggc ccaagacgcc gccgcgatgt ttggctacgc cgcggcgacg 900
 gcgacggcga cggcgacgtt gctgccgttc gaggaggcgc cggagatgac cagcgcgggt 960
 gggctcctcg agcaggccgc cgcggtcgag gaggcctccg acaccgccgc ggcgaaccag 1020
 ttgatgaaca atgtgcccc ggcgctgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg 1080

 ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acggtctcgc cgcacggtc gccgatcagc 1140
 aacatggtgt cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc 1200
 aacacctga gctcgatgtt gaagggttt gctccggcgg cggccgcca ggcctgcaa 1260
 accgcggcgc aaaacggggt ccgggcgatg agctcgtcgg gcagctcgtt gggttctctg 1320
 ggtctgggcg gtggggtggc cgccaacttg ggtcgggcgg cctcggtcgg ttcgttctcg 1380
 gtgccgagg cctgggccc ggccaaccag gcagtcacc cggcggcgcg ggcgctgccg 1440
 ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggccccggc agatgctggg cgggctgccg 1500

 gtggggcaga tgggcgccag ggccggtgtt gggctcagtg gtgtgctgcg tgttccgccg 1560
 cgacctatg tgatgccga ttctcggca gccggcgata tcgccccgc ggccttctcg 1620
 caggaccgtt tcgccactt ccccgcgtg ccctcagc cgctccgat ggtcgcctca 1680
 gtggggccac aggtggtcaa catcaacacc aaactgggct acaacaacgc cgtgggcgcc 1740
 gggaccggca tcgtcatcga tccaacggt gtcgtgctga ccaacaacca cgtgatcgcg 1800
 ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggctccggcc aaacctacgg cgtcgatgtg 1860

gtcgggatg accgcaccca ggatgtcgcg gtgctgcagc tgcgcggtgc cggtagcctg 1920

ccgtcggcgg cgatcggtag cggcgtcgcg gttggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac 1980

agcggtagggc agggcgggaac gccccgtgcg gtgcctggca gggtaggtcgc getcggccaa 2040

accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag 2100

ttcgatgccg cgatccagcc cggtaggtcg ggcggggcccg tcgtcaacgg cctaggacag 2160

gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag 2190

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG Oligo 1 - CpG 1826

<400> 9

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG Oligo 2 - CpG 1758

<400> 10

tctcccagcg tgcgcat 18

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG Oligo 3

<400> 11

accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG Oligo 4 - CpG 2006

<400> 12

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CpG Oligo 5 - CpG 1686

<400> 13

tccatgacgt tcctgatgct

20