



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0053879
 (43) 공개일자 2014년05월08일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 38/21</i> (2006.01) <i>A61K 39/39</i> (2006.01)
 <i>A61P 37/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-7029500</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2012년04월04일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2013년11월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/056238</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2012/136739
 국제공개일자 2012년10월11일</p> <p>(30) 우선권주장
 11188125.6 2011년11월07일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 니오베크스
 프랑스 에프-75014 파리 엠빠쓰 리에트 3-5</p> <p>(72) 발명자
 그로우아르트-보겔, 제랄딘
 프랑스 에프-75014 파리 15 뒤편 썬샤르트
 델린, 올리버
 프랑스 에프-75020 파리 드 샤론 60 블마르
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인필앤은지</p> |
|--|---|

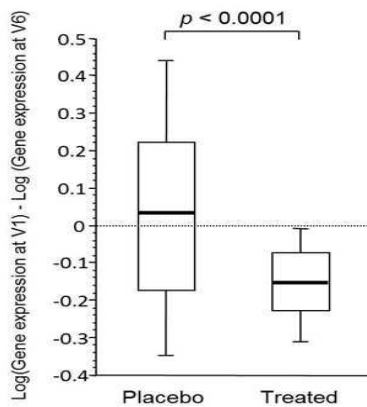
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **IFN 알파 관련 질환을 치료하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 생체내 항-IFN α를 유도할 수 있는 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α를 포함하는 면역원성 산물 및 IFN α 관련 질환 치료를 위한 용도와 관련된 발명이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

평계, 베르나르드

프랑스 에프-42800 샤토네프 루트 드 라 마돈나
288

반데파페리에르, 피에르

벨기에 비-5021 본니네 튀 드 롱 사르트 38

로우카이틀, 까미유

프랑스 에프-75014 파리 45 튀 다게르

(30) 우선권주장

11305408.4 2011년04월07일

유럽특허청(EPO)(EP)

61/472,854 2011년04월07일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

개체에 투여되는 면역원성 산물(immunogenic product)의 치료적으로 유효한 양이 투여당 면역원성 산물 30 mcg 이상인,

IFN α 관련 질환의 치료가 필요한 개체의 치료를 위한, 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여는 IFN α 의 과다 생산과 관련된 질환의 증상이 발생하는 것을 예방하는 면역원성 산물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여는 IFN α 의 과다 생산과 관련된 질환의 플레어(flare)를 예방하는 면역원성 산물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 IFN α 관련 질환은 전신 홍반성 낭창, 류마티스 관절염, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 혈관염, HIV, 타입 I 당뇨병, 자가면역 갑상선염 및 근염을 포함하는 면역원성 산물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 개체에 투여되는 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 투여당 면역원성 산물 35 mcg 내지 1000 mcg인 면역원성 산물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 면역원성 산물은 한 달에 적어도 두 번 개체에 투여되는 면역원성 산물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 면역원성 산물은 적어도 세 달에 한 번 개체에 추가로 투여되는 면역원성 산물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 면역원성 산물은 상기 개체로부터 획득한 혈청 샘플에서, 항-IFN α 항체의 양이 검출되지 않을 때, 상기 개체에 추가로 투여되는 면역원성 산물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 면역원성 산물은 강력하게 불활성화된 것이며, 강력하게 불활성화된 것은 TEST B의 조건에서 항바이러스성 활성이 5% 미만을 나타내는 것을 의미하는, 면역원성 산물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 면역원성 산물은 TEST C의 조건에서 IFN α 의 항바이러스성 활성을 증화할 수 있는 면역원성 산물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 적어도 하나의 IFN α 의 서브타입을 포함하는 면역원성 산물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 IFN α의 서브타입은 IFN α 2b이고 상기 캐리어 단백질 분자는 KLH인 면역원성 산물.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 면역원성 산물은 백신, 바람직하게는 에멀전 형태의 백신인, 면역원성 산물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상을 포함하는 단위 투여 제형(unit dosage form).

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상을 포함하는 의료 장치(medical device).

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 따른 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상을 포함하는 적어도 하나의 바이알(vial);

애주반트를 포함하는 적어도 하나의 바이알; 및

상기 면역원성 산물을 상기 애주반트에 접촉하게 하고 상기 애주반트와의 혼합물을 유화시키기 위한 수단을 포함하는 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 면역원성 백신 및 전신 홍반성 낭창과 같은 IFN α 관련 질환 치료를 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] IFN 타입 I 패밀리(type I family)는 IFN α, IFN β, IFN δ, IFN ε, IFN κ, IFN τ, 및 IFN ω을 포함한다. 우세한 형태는 IFN α 및 단일 IFN β이 있으며, IFN α는 인간에게서 밀접하게 관련된 13개의 단백질이 있다. 다른 종류의 IFN 타입 I은 다른 종류의 생물학적 반응을 촉진할 것이라는 사실에도 불구하고, 모든 IFN 타입 I은 구조적으로 관련되어 있으며(이들 유전자는 인트론(intron)이 부족하고, 9번 염색체의 쇼트 암(short arm)에 위치한다.), 동일한 리셉터 서브유닛을 통하여 신호를 보낸다. (Van Boxel-Dezaire et al., Immunity 2006;25:361-372).

[0003] 소위 인터페론 사인(인터페론 시그니처)이라 불리는, 그것의 유도 사인이 최근 다른 종류의 자가면역 질환을 겪는 환자들 사이에서 보고된 이래로, IFN 타입 I과 자가면역 질환 사이의 관계에 대한 관심이 최근 증가하고 있다. (Baccala et al. Immunol Rev 2005;204:9-26). 사실, 면역-조절 효과(immune-modulator effects)때문에, IFN 타입 I은 다양한 자가면역 질환들의 병원성 경로에 수반되는 것처럼 보인다.

[0004] 자가면역에 관련된 IFN 타입 I 병원성의 전형적인 예는 전신 홍반성 낭창(SLE)이다. SLE는 자기-항원(self-antigens)을 겨냥한 자가항체에 의해 야기되는 조직의 역설적인 손상에 때문에, 다기관 관여로 특징지어지는, 만성적인 질병이다. SLE의 병인은 복잡하며, 유전적인 요인 및 환경적 요인들이 모두 관여한다. SLE에서 IFN α의 혈청 수준은 질병의 극심함과 관계있는 것으로 보여진다(Dall'era et al. Ann Rheum Dis 2005; 64:1692-7).

[0005] 건조 증후군(sicca syndrome)으로 알려진, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome (SS))은 만성적, 전신적, 자가면역성 질환이며, 외분비선(exocrine glands)에 영향을 미치며, 특히, 침샘 및 눈물샘에 영향을 미친다. 증가된 IFN α 활성은 이러한 질병을 겪고 있는 환자들의 혈청에서 또한 관찰되었다. 마지막으로, 당뇨병, 류마티스 관

절염, 피부 경화증, 혈관염 및 자가 면역 갑상선염과 같은 다른 질병들도 또한 IFN α 의 높은 수준과 관련되어 있는 것으로 보인다.

[0006] Sedaghat 등은 또한 최근에, 타입 1 IFN는 오랜시간 생존하는 memory T cells 대신에 짧은 시간 생존하는 Th1 효과기들(effectors)에 대한 균형을 변화시킴으로써 정상 CD4⁺ T 세포 다이내믹(dynamic)의 정상상태에 영향을 미치는 것으로 나타났기 때문에, 타입 1 IFN는 HIV⁺ 환자들에게서 CD4⁺ T 세포 감소에 중요한 역할을 할 것이라고 추측되었다(Sedaghat et al. J. Virol. 2008, 82(4): 1870-1883). 이것은 Mandl 등이 확인하였는데, 여기서 병리학의 면역 활성을 개선하기 위하여 플라스마사이토이드 수지상 세포(plasmacytoid dendritic cells)에 의한 IFN α 의 감소를 제안하였다.(Mandl et al. Nat. Med. 2008).

[0007] 게다가, IFN α 의 투여는 건선, 자가면역 갑상선염 및 다발성 경화증을 겪고 있는 환자의 증세를 더욱 악화시키는 것으로 보고되고 있으며, 자가면역 질환의 전력이 없이 환자들에게서 SLE 유사 증후군을 유도하는 것으로 보고되고 있다.

[0008] 그러므로, IFN α 활성을 억제하는 물질이 필요하다.

[0009] 단일클론성 중화 항체(monoclonal neutralizing antibodies)를 갖는 수동 면역(Passive immunization)은 일반적으로 SLE 치료를 위하여 론탈리주맙(ronalizumab) 및 시팔리무맙(sifalimumab)로 임상실험을 하고 있다. 그러나, 상기 치료법은 13의 IFN α 의 하위 집합에만 오로지 타겟팅되는 단점을 나타내고, 수동적으로 투여된 단일클론성 항체의 용도는 오로지 항약물 항체(anti-drug antibodies)의 유도에 의해 제한될 수 있다. 상기 항약물 항체들은 중화하거나 그렇지 않으면 약물의 임상적 효과를 위태롭게할 수 있고 자가 단백질(autologous proteins)과 교차반응성(cross-reactivity)과 관련된 심각한 유해사례(adverse event)들과 관련될 수 있다 (De Groot et al. Trends. Immunol. 2007, 28(11)).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명은 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 량을 투여함으로써, 생체내에서 IFN α 활성을 억제할 수 있는 방법 및 IFN α 관련 질환을 치료하기 위한 용도를 제공한다. 상기 면역원성 산물은 면역학적 B세포 관용(immunological B cell tolerance)을 중단할 수 있고 IFN α 에 대한 많은 양의 다클론성 중화 항체를 생산할 수 있는 활성화된 면역을 야기할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 한가지 기술적 과제는 IFN α 관련 질환의 치료가 필요한 개체의 치료 또는 예방을 위한, 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물이며, 여기서 개체에 투여되는 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 투여당 면역원성 산물 30 mcg이상, 바람직하게는 적어도 60 mcg이다.

[0012] 본 발명의 하나의 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여는 IFN α 의 과다 생산과 관련된 질병 증상의 발현을 예방한다.

[0013] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여는 IFN α 과다 생산과 관련된 질병의 플레어(flare)를 예방한다.

[0014] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 IFN α 관련 질환은 전신 홍반성 낭창, 류마티스 관절염, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 혈관염, HIV, 타입 I 당뇨병, 자가면역 갑상선염 및 근염을 포함한다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 개체에 투여되는 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 투여당 면역원성 산물 35 mcg 내지 1000 mcg이며, 바람직하게 60 mcg 내지 1000 mcg이다.

[0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물은 적어도 한 달에 적어도 두 번 개체에 투여된다.

[0017] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물은 적어도 세 달에 한번씩 개체에 추가로 투여된다.

[0018] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물은 상기 개체로부터 획득한 혈청 샘플에서, 항-IFN α 항체의 양이 검출되지 않을 때, 상기 개체에 추가로 투여된다.

- [0019] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물은 강력하게 불활성화되며, 이것은 TEST B의 조건에서 상기 산물이 5% 미만의 항바이러스성 활성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0020] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물은 TEST C의 조건에서 IFN α 의 항바이러스성 활성을 증화할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물은 적어도 하나의 IFN α 서브타입을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 IFN α 의 서브타입은 IFN α 2b이고 상기 캐리어 단백질 분자는 KLH이다.
- [0023] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 면역원성 산물은 백신이며, 바람직하게는 에멀전 형태이다.
- [0024] 본 발명의 다른 기술적 과제는 상기 정의되어진 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상을 포함하는 단위 제형이다.
- [0025] 본 발명의 다른 기술적 과제는 상기 정의되어진 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상을 포함하는 의료 장치이다.
- [0026] 본 발명의 다른 기술적 과제는 상기 정의된 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상을, 바람직하게는 60 mcg 이상을 포함하는 적어도 하나의 바이알(vial); 애주반트를 포함하는 적어도 하나의 바이알; 및 상기 면역원성 산물을 상기 애주반트에 접촉하게 하고 상기 애주반트와 수용액 혼합물을 유회시키기 위한 수단을 포함하는 키트이다.
- [0027] 하나의 실시예에서, 본 발명의 키트는 다음을 포함한다.
- [0028] - 본 발명에 따른 캐리어 단백질 분자에 연결된 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상, 바람직하게는 적어도 60 mcg 이상을 포함하는 적어도 하나의 병(vial) 및 상기 면역원성 산물을 용해하는 수단, 바람직하게는 수용액에 용해하는 수단, 또는
- [0029] - 본 발명에 따른 캐리어 단백질 분자에 결합하는 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물 30 mcg 이상, 바람직하게는 적어도 60 mcg 이상을 포함하는 용액 바람직하게는 수용액을 포함하는 적어도 하나의 병, 및
- [0030] - 애주반트를 포함하는 적어도 하나의 병 및 상기 용액을 상기 애주반트에 접촉하게 하고 상기 용액과 애주반트의 혼합물을 유회하는 수단
- [0031] **정의(DEFINITIONS)**
- [0032] 본원에 사용된, 용어, "인터페론 α " 또는 "IFN α " 는 IFN 1과 75% 또는 그 이상의 서열 상동성을 갖는 인터페론 알파 유전자좌(gene locus)의 기능성 유전자에 의해 암호화되는 IFN 알파 단백질을 가리킨다(Genbank number NP_076918 또는 Genbank number NM_024013에 의해 암호화되는 단백질). 인간 IFN알파 서브타입의 예들은 IFN 알파 1 (Genbank number NP_076918), 알파 2a (Genbank number ITF_A), 알파 2b (Genbank number AAP20099), 알파 4 (Genbank number NP_066546), 알파 5 (Genbank number P01569), 알파 6 (P05013), 알파 7 (Genbank number P01567), 알파 8 (Genbank number P32881), 알파 10 (Genbank number P01566), 알파 14 (Genbank number P01570), 알파 16 (Genbank number NP_002164), 알파 17 (Genbank number P01571) 및 알파 21(Genbank number NP_002166)을 포함한다. 비인간 포유류 IFN α 서브타입의 예들로는 해당 분야의 통상의 기술자들에게 잘 알려져 있는 젠뱅크(Genbank)에서도 찾을 수 있다(Pestka et al Immunological reviews 2004, 202:8-32 참고).
- [0033] 본원에서 사용된, 용어 "면역 반응"은 예를 들어, 림포사이트(lymphocytes), 항원제시세포(antigen presenting cells), 식세포(phagocytic cell) 및 상기 세포들 또는 간에서 생산되는 거대세포들(macromolecules)(항체, 사이토카인 및 보체들을 포함하여)의 활동을 가리킨다.
- [0034] 본원에서 사용된, 항체가 IFN α 의 "생물학적 활성을 저지한다" 또는 "생물학적 활성을 증화한다"는 항체가 없을 때 사이토카인의 활성 수준과 비교하여, 예를 들어 실시예에 기술되어진 기능성 연구(functional assay)를 이용하여, 항체가 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80% 또는 그 이상 사이토카인의 활성을 저지하는 것을 의미한다.
- [0035] 본원에서 사용된, 용어 "캐리어 단백질 분자"는 많은 수의 IFN α 항원이 B 림포사이트에 제시되도록 하는, 헤테

로컴플렉스(heterocomplexes)형성을 위하여 IFN α 분자에 부분적으로 공유적으로 결합될 때, 적어도 15 아미노산 길이를 갖는 단백질 또는 펩타이드를 의미한다.

[0036] 본원에서 사용된, 용어 "개체"는 인간 또는 영장류, 개, 고양이, 말, 양 등과 같은 인간이 아닌 포유류를 포함한다.

[0037] 본원에 사용된, 용어 "환자"는 IFN α 관련 질환에 의해 영향을 받은 개체를 의미한다.

[0038] 본원에 사용된, 용어 "유효량"은 유익한 또는 목적인 임상 결과(예를 들어, 임상 상태의 개선)를 이끌기 충분한 양을 의미한다.

[0039] 본원에 사용된, 용어 "치료(treatment)" 또는 "치료하는(treating)"는 치료되는 개체 또는 환자의 질병의 자연 경과(natural course)를 변화시키기 위한 임상개입(clinical intervention)을 의미하며, 예방 또는 임상 병리의 과정 동안 수행될 수 있다. 목표로 하는 효과는 질병의 발생 또는 재발을 막는 것, 증상을 개선하는 것, 질병의 병리상 결과를 직접 또는 간접적으로 억제, 완화 또는 저지하는 것, 병의 진행 속도를 늦추는 것, 질병 상태를 개선 또는 증상을 완화하는 것 그리고 병이 차도가 있고, 차도 있는 상태 및 예후가 나아진 상태가 유지되는 것을 포함하나, 이들에 한정되지 않는다.

[0040] **상세한 설명(DETAILED DESCRIPTION)**

[0041] 비록 IFN α 의 조절장치는 자연적으로 체내에 존재하지만, SLE 및 SS와 같은 질병에서 사이토카인 수준을 조절하는 그들의 능력은 충분하지 않게 나타난다. 본 발명의 항-IFN α 치료 면역법의 목적은 그들의 친화성(affinity) 및 중화 활성을 향상시키면서, 사이토카인에 대항하는 항체 수준을 증가시키는 것이다. 그리하여 다른 물질대사 및 생리적인 과정들과 방해작용없이, 초과하는 사이토카인의 양을 감소시키고 병을 유발하는 결과를 저지시키고자 한다.

[0042] 본 발명의 한가지 기술적 과제는 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하는 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 것을 포함하는 치료가 필요한 개체에서 IFN α 관련 질환을 치료하는 방법이며, 여기서 상기 치료적으로 유효한 양은 투여당 면역원성 산물 30 mcg(μ g)이상이다.

[0043] 본 발명의 한가지 실시예에서, 상기 치료적으로 유효한 양은 적어도 투여당 면역원성 산물 60 mcg(μ g)이다

[0044] 본 발명의 한가지 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 1000 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 750 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 500 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 450 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 400 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 350 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 300 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 250 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 200 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 150 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 30 mcg 이상이며, 바람직하게는 60 mcg 내지 100 mcg이다.

[0045] 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 1000 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 750 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 500 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 450 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 400 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서,

투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 350 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 300 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 250 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 200 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 150 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 35 mcg 내지 100 mcg이다.

- [0046] 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 1000 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 750 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 500 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 450 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 400 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 300 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 250 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 240 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 200 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 150 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 120 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 100 mcg이다.
- [0047] 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 mcg 내지 400 mcg이다.
- [0048] 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 240 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 120 mcg 이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 240 mcg 이다.
- [0049] 일 실시예에서, 치료적으로 유효한 양은 업계에서 잘 알려진 Bradford 단백질 분석을 사용하여 결정된 전체 단백질의 양과 일치한다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서, 치료가 필요한 개체는 상기 서술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 한 달에 적어도 두 번 투여한다.
- [0051] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료가 필요한 개체는 상기 서술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 한 달에 두 번 투여한다. 이 실시예에서, 상기 개체에는 0일에 한 번 투여될 수 있고 7일에서 28일 사이에 두 번째 투여될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 개체는 0일에 한 번 투여될 수 있고 7일과 21일 사이에 두 번째 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 개체는 0일에 한 번 투여할 수 있고 28일에 두 번째 투여한다.
- [0052] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 치료될 개체는 앞서 서술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 1달에 세 번 투여한다. 이 실시예에서, 치료될 개체는 0일에 한 번 투여할 수 있고, 7일과 14일 사이에 두 번째 투여하며 21일과 28일 사이에 세 번째 투여한다. 일 실시예에서, 상기 개체는 0일에 한번 투여하고 7일에 두 번째 투여하고 28일에 세 번째 투여한다.
- [0053] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 치료될 개체는 앞서 서술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 3달에 4 번 투여한다. 이 실시예에서, 치료될 개체는 0일에 한번 한 번 투여할 수 있고, 7일과 14일 사이에 두 번째 투여하며, 21일과 28일 사이에 세 번째 투여하고 그리고 77일과 84일 사이에 네 번째 투여한다. 일 실시예에서, 상기 개체는 0일에 한 번 투여하고 7일에 두 번째 투여하고, 28일에 두 번째 투여하고, 84일에 네 번째 투여한다.
- [0054] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료될 개체는 앞서 서술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 3개월에 한번 추가로 투여할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에서, 치료될 개체는 본원의 상기 기술된 바와 같이 한달에 세 번 투여하며, 그 다음 추가

로 본원의 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 세 달마다 한 번 투여한다.

- [0056] 본 발명의 일 실시예에서, 치료될 개체는 본원의 상기 기술된 바와 같이 세 달에 네 번 투여하며, 그 다음 추가로 본원의 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 세 달마다 투여한다.
- [0057] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료될 개체는 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 6개월 마다 추가로 투여할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 일 실시예에서, 치료될 개체는 상기 기술된 바와 같이 한 달에 세 번 또는 세 달에 네 번 투여할 수 있고 그 다음 추가로 상기 기술된 면역성 산물의 치료적으로 유효한 양을 6개월마다 한 번 투여한다.
- [0059] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료될 개체는 뿐만 아니라 본원에 개시된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 일 년에 한 번 투여할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 일 실시예에서, 치료될 개체는 본원에 정의된바와 같이 한 달에 세 번 또는 세 달에 네 번 투여되며, 더 나아가 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 일 년마다 한 번 투여한다.
- [0061] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료될 개체는 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 5년마다 한 번 투여할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 일 실시예에서, 치료될 개체는 상기 기술된 바와 같이 한 달에 세 번 또는 세 달에 네 번 투여하고 그 다음 더 나아가 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 5년마다 한 번 투여한다.
- [0063] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료될 개체는 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 10년마다 한 번 투여할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에서, 치료될 개체는 상기 기술된 바와 같이 한 달에 세 번씩 또는 세 달에 네 번씩 투여하고 그 다음 더 나아가 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 10년마다 한 번 투여한다.
- [0065] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료될 개체는 IFN α 에 대한 항체가 개체로부터 채집한 혈청 샘플에서 검출되지 않을 때, 상기 기술된 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 추가로 투여할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 실시예에서, 치료될 개체는 상기 기술된 바와 같이 한 달에 세 번 또는 세 달에 4 번 투여하고 그 다음 더 나아가 IFN α 에 대한 항체가 개체로부터 채집한 혈청 샘플에서 검출되지 않을 때 추가로 투여한다.
- [0067] 혈청 샘플내의 IFN α 에 대한 항체의 정량은 ELISA 항-IFN와 같은, 업계에서 잘 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.
- [0068] 수행되는 방법 중 한가지 예는 다음과 같다:
- [0069] - IFN α -2b와 같은, 면역원성 산물을 준비하는데 사용하는 IFN α 서브타입 100 ng 로 96 웰 플레이트를 코팅하고 2°C 내지 8°C에서 밤새 배양하는 과정,
- [0070] - 90분 동안 37°C에서 블러킹 버퍼(blocking buffer)로 상기 플레이트를 블러킹하는 과정,
- [0071] - 혈청 샘플이 있는 플레이트 및 나이브(naive) 샘플 풀을 90분 동안 37°C에서 배양하는 과정: 상기 혈청 샘플은 전형적으로 두 배의 희석도가 되도록 희석된다. 희석 단계는 200x 에서 시작하여 적어도 8 희석도로.
- [0072] - HRP에 콘주게이트된 고트(goat) 항-인간 면역글로블린과 같은 레이블된 이차 항체가 있는 플레이트를 배양하는 과정,
- [0073] - o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(phenylenediamine dihydrochloride(OPD)) 기질 용액과 복합체를 형성하는 과정. 효소 반응을 중단한 후에, 해당 컬러의 정도(intensity)는 492nm에서 분광광도법적 방법으로 측

정한다.

- [0074] 각 샘플의 항-IFN 역가는 평균 OD 값이 절단값(cut-off value)보다 더 높은 최소 희석도로 표현된다.
- [0075] 절단값= 나이브 혈청 풀의 OD x 2.08을 의미한다.
- [0076] 여기서 N 절단값은 2.08과 같다
- [0077] 그 다음 각 샘플의 항-IFN 역가는 평균 OD 값이 절단값(cut-off value)보다 더 높은 최소 희석도로 표현될 것이다. 최초 희석은 200, 환자가 만약 1/200에서 OD값이 절단값보다 떨어지면 효과가 없다 (Mire-Sluis et al. 2004 J. Immunol Meth. 289: 1-16).
- [0078] 본 발명의 일 실시예에서, 치료가 필요한 개체는 IFN α 관련 질환을 겪고 있다.
- [0079] 본 발명의 다른 실시예에서, 치료가 필요한 개체는 혈청에서 검출될 수 없는 양의 항- IFN α 항체를 나타낸다.
- [0080] **[작용 메카니즘(Mechanism of action)]**
- [0081] 본 발명은 또한, 내인성 사이토카인(endogenous cytokine) IFN α 의 면역억제적(immunosuppressive), 세포사멸적(apoptotic) 또는 신생혈관 생성적(angiogenic) 특성을 중화하는 항체의 체액성 면역 반응(humoral immune response)을 포함한, 면역원성 산물이 투여된 포유류에서 면역 반응을 유도하는데 이용될 수 있는 면역원성 산물에 관한 것이다.
- [0082] 본 발명은 또한 이를 필요로 하는 포유류에서 면역 반응을 포함한 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 앞서 기술되어진 면역 산물을 상기 포유류에게 투여하는 것을 포함한다. 일 실시예에서, 상기 면역 반응은 체액성 면역 반응을 포함하며, 여기서 내성 사이토카인(endogenous cytokin)의 면역억제성(immunosuppressive), 세포사멸적(apoptotic), 혈관 생성적(angiogenic) 특성을 중화하는 항체들이 포함된다.
- [0083] 본 발명의 일 실시예에서, 면역원성 산물은 불활성화되어져 있지만 IFN α 의 면역성 사이토카인 유도체는 KLH과 같은 외부 캐리어 단백질을 자극하는 T-helper 에 화학적으로 결합되어 있다. 상기 면역원성 산물은 B 세포에 영향을 줄 수 있으나 IFN α 에 T 세포 면역관용은 없다. 그 자신에 대한 헬퍼 T 세포 면역 관용은 외부 캐리어 단백질에 IFN α 을 연결시킴으로써 피해간다.
- [0084] IFN α 에 특이적인 B 세포는 다음의 항원 결합에 의해 활성화되고 면역원성 산물을 흡수하며, 캐리어 특정 펩타이드는 주요조직적합성복합체(Major Histocompatibility Complex (MHC)) class II 분자를 통하여 제시된다. 이러한 활성화 신호는 T세포 의존적 항원의 경우에는 B 세포 분화를 유도하는데 충분하지 않다. 그러나 B 세포는 그 자체 및 캐리어 항원을 가공처리하기 때문에 T 세포 도움은 그 자체 또는 캐리어 단백질에 특이적인 T 세포에 의해 제공될 수 있다. T 세포 선택은 매우 엄격하고 자기항원에 대한 특이적인 T 세포 활성화는 없다.
- [0085] 수상 돌기 세포(Dendritic cells)는 또한 자기 항원 및 캐리어 분자를 받아들일 수 있고 MHC class II 분자를 통하여 캐리어 특이적 펩타이드를 제시할 수 있다. DCs는 따라서 캐리어에 특이적인 나이브 T 헬퍼 세포를 활성화할 수 있다. 상기 T 헬퍼 세포는 차례로 캐리어-특이적 T 헬퍼 세포에서 자기항원 특이적 B 세포를 제공할 수 있고 그들의 MHC class II 분자에 캐리어 펩타이드를 제시할 수 있다.
- [0086] 캐리어에 특이적인 T 헬퍼 세포는 자기 항원에 특이적인 B 세포와 상호작용하며, 자기항원에 대해 정상적인 항체 반응을 유도한다.
- [0087] 면역원성 산물은 IFN α 과다 생산과 관련된 질병 치료를 위한 백신 조성물에 주로 사용된다.
- [0088] 더욱 구체적으로, 본 발명은 본 발명의 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 IFN α 과다 생산과 관련된 질병 치료를 위한 방법에 관한 것이다.
- [0089] 본 발명은 또한 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 IFN α 의 과다 생산과 관련된 질병의 치료를 위한 방법에 관한 것이며, 여기서 면역원성 산물의 투여는 질병들의 증상이 발현되는 것을 예방한다.
- [0090] 본 발명은 또한 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 IFN α 의 과다 생산과 관련된 질병의

치료를 위한 방법에 관한 것이며, 여기서 면역원성 산물의 투여는 질병들의 플레어(flare)를 예방한다.

- [0091] 본 발명은 또한 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 IFN α의 과다 생산과 관련된 질병의 치료를 위한 방법에 관한 것이며, 여기서 면역원성 산물의 투여는 내생적(내생적) IFN α의 활성을 중화하는 항체의 생산을 유도한다.
- [0092] 본 발명은 또한 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 IFN α의 과다 생산과 관련된 질병의 치료를 위한 방법에 관한 것이며, 여기서 면역원성 산물의 투여는 내생적 IFN α의 활성의 중화를 유도한다.
- [0093] IFN α의 과다 생산에 관련된 질병의 예들은 전신 홍반성 낭창, 류마티스 관절염, 피부 경화증, 쇼그렌 증후군, 혈관염, HIV, 타입 I 당뇨병, 자가면역 갑상선염 및 근염을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0094] 본 발명의 다른 기술적 과제는 상기 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양을 상기 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 개체내의 내생적 IFN α의 활성을 중화하는 항체의 생산을 유도하는 방법을 포함한다.
- [0095] **[면역원성 산물]**
- [0096] 본 발명에서 사용된 면역원성 산물은 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α를 포함하며, 여기서 면역원성 산물은 불활성화되어 있다.
- [0097] 본 발명에서 사용된 면역원성 산물은 적어도 하나의 재조합 IFN α 서브타입과 예를 들어 글루타르알데히드와 키투레이션되어지고 포름알데히드로 후속 비활성화하여 얻어진 KLH와 같은 적어도 하나의 캐리어 단백질 분자 사이의 복합체이다.
- [0098] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 캐리어 단백질 분자는 KLH (키홀-림펫 헤모시아닌(Keyhole limpet hemocyanin)), 난백 알부민(ovalbumin), 소혈청알부민(bovine serum albumin (BSA)), 과상풍 변독소(toxoid tetanus), 디프테리아 B 콜레라 독소(toxoid diphtheric B cholera toxin), 돌연변이 비 독성 디프테리아 비변성독소(mutant non toxic diphtheria toxin (CRM197)), 외막 소낭에서 수막염균 외막 단백질(neisseria meningitidis outer membrane protein in outer membrane vesicles), 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 외막 단백질(non-typeable Haemophilus influenza outer membrane protein), 녹농균 독소 A(pseudomonas aeruginosa toxin A), 바이러스 유사 입자(VLP) 등과 같은 면역학에서 관용적으로 사용되어지는 일반적인 캐리어 분자일 수 있다. 바람직한 일 실시예에서, 상기 캐리어는 KLH이다. 바람직하게, 상기 KLH 출발 산물은 해양 복족류동물(gastropod mollusk) 메가쓰라 크레놀라타(*Megathura cremulata*)의 림프(lymph)로부터 추출된 고 순도의 KLH로 이루어진다. 자연적으로 생산된 KLH은 일반적으로 20개 서브유닛의 비공유된 관형 결합체인 이중-십합체(di-decamer) 구조로 이루어져 있다.
- [0099] 본 발명의 다른 실시예에서, 재조합 IFN α 서브타입은 IFN 알파 1, 알파 2a, 알파 2b, 알파 4, 알파 5, 알파 6, 알파 7, 알파 8, 알파 10, 알파 14, 알파 16, 알파 17 및 알파 21 사이의 어떤 서브타입일 수 있다.
- [0100] 재조합 IFN α 서브타입은 상기 기술된 Genbank의 서열을 이용하여 업계에서 알려진 전형적인 방법을 사용하여 얻어질 수 있다. 예를 들어, 재조합 IFN α 서브타입의 생산은 IFN α 서브타입의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 함유하는 세포를 배양하고 그 다음 봉입체(inclusion bodies)를 수확하고(harvesting) 마지막으로 IFN α 서브타입을 정제함으로써 수행될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 일 실시예에서, 재조합 IFN α 서브타입은 IFN α 2b 서브타입이다.
- [0102] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 적어도 하나의 IFN α 2b 서브타입을 포함한다.
- [0103] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 재조합 IFN α 서브타입은 수용액 상태로 있으며, 바람직하게는 pH 3.5, 바람직하게는 6 내지 7.8의 범위를 갖는 버퍼 용액이다.
- [0104] 일 실시예에서, 상기 치료될 개체가 인간일 때, 사용된 상기 재조합 IFN α는 인간의 재조합 IFN α이다.
- [0105] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α를 포함하며, 여기서 상기 면역원성 산물은 항-IFN α 항체에 의해 인식된다.
- [0106] 항-IFN α 항체에 의한 면역원성 산물의 인지는 샌드위치 ELISA 항-IFN α/캐리어 단백질과 같은 업계에서 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다. ELISA (TEST D)는 예를 들어 비오틴, 폴리-스트렙트아비딘 HRP 증폭 시스템 및 o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드 기질 용액과 같은 것으로 레이블된 검출항체를 사용하는 것과 같

은 업계에서 알려져 있는 표색적(colorimetric) 수단으로 수행된다.

- [0107] 상기 방법의 일 실시예는 다음과 같다:
- [0108] - 예를 들어 토끼 다클론성 항-KLH 항체와 같은, 포획 항체(capture antibody)로 플레이트를 코팅하는 단계,
- [0109] - 블러킹 버퍼(예를 들어, casein 2% 함유 PBS)로 상기 플레이트를 90분간 37°C에서 블러킹하는 단계,
- [0110] - 면역원성 산물 250 ng/ml 에서 8 배 희석도의 연속 희석액이 있는 플레이트 또는 KLH 및 IFN α 와 같은 음성 대조군이 있는 플레이트를 37°C에서 90분간 배양하는 단계,
- [0111] - 예를 들어 비오틴 결합 항-IFN α 항체와 같은 검출 항체로 상기 플레이트를 90분간 37°C에서 배양하는 단계,
- [0112] - 30분간 37°C에서 스트렙타비딘-HRP로 상기 플레이트를 배양하는 단계 및 30분 동안 o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드 기질 용액으로 복합체를 형성하는 단계. 효소 반응이 중단된 후에, 상기 해당 컬러의 정도(intensity)는 490nm에서 분광광도법적 방법으로 측정한다.
- [0113] 면역원성 산물을 포함하는 웰의 광학밀도가 음성 대조군을 포함하는 웰의 광학 밀도보다 적어도 10배 더 우수할 때, 해당 분야의 통상의 기술자들은 면역원성 산물이 항-IFN α 항체에 의해 인식되어지고 면역산물내의 IFN α 은 KLH에 결합되었다고 생각한다.
- [0114] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하며, 여기서 상기 면역원성 산물은 강력한 면역 형성을 하며, 이것은 상기 산물은 시험된 테스트 A하의 조건에서 생체 내 항체 항-IFN α 를 유도할 수 있음을 의미한다.
- [0115] 테스트 A는 다음의 방법에 따라 수행된다:
- [0116] 면역원성 산물 전체 단백질의 0.3 내지 10 μ g(Bradford 단백질 분석에 의해 측정된)은 30 일에 두 번 6-8주된 Balb/c 쥐에 주입되며, 바람직하게는 0일에 그리고 21일에 주입된다. 혈청 샘플은 면역화(사전-면역 혈청 샘플)전에 수집하고 30일과 40일 사이에, 바람직하게는 31일에 수집한다. ELISA 항-IFN α 는 본원의 상기 설명되어진 바와 같이 수행된다.
- [0117] 간략하게 말하면, 96 웰 플레이트는 IFN α -2b와 같은, 면역원성 산물 준비에 사용되는 IFN α 서브타입 100 ng 이 코팅되고 2°C-8°C에서 밤새 배양한다. 상기 플레이트는 그 다음 90분간 37°C에서 블러킹 버퍼로 블러킹된다. 희석도 1/2500의 사전-면역 샘플 100 μ l 및 상기 혈청 샘플(사전-면역 및 테스트) 1/2500에서 8 두배 희석도 연속 희석액은 상기 웰에 추가된다. HRP 컨주게이트된 항체와 같은 항-쥐 면역글로불린 표지된 이차 항체는 마지막으로 상기 웰에 추가되고 ELISA는 예를 들어, o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드 기질 용액과 같은 업계에서 잘 알려진 표색적(colorimetric) 수단을 이용하여 수행한다.
- [0118] 상기 테스트 혈청 샘플을 포함하는 웰의 광학 밀도가 사전-면역 혈청 샘플을 포함하는 웰의 광학 밀도보다 최소 2배 우수할 때, 업계에서 통상의 기술자들은 상기 면역원성 산물은 생체내에서 항-IFN α 항체가 유도되는 것을 의미하는, 면역성이라고 간주한다.
- [0119] 본 발명의 다른 실시예에서, 면역원성 산물은 예를 들어, KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 을 포함하며, 여기서, IFN α 는 강력하게 불활성화되어져 있으며, 이는 상기 산물이, 바람직하게는 본원에서 인용된 TEST B 조건에서 IFN α 의 항바이러스성 활성이 5%미만이며, 바람직하게는 1% 미만인 것을 의미한다. 일 실시예에서, 500 ng/mL 또는 그 이상의 농도에서 본 발명의 면역원성 산물은 TEST B 조건에서 500 ng/mL 또는 그 이상의 농도에서 IFN α 의 항바이러스성 활성이 5%미만이며, 바람직하게는 1% 미만을 나타낸다.
- [0120] 본 분석은 마딘-다비 우신장(Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)) 세포의 수포성 구내염 바이러스(Vesicular Stomatitis Virus (VSV))의 세포변성 효과(cytopathic effect (CPE))에서 IFN α 의 예방 효과에 근거한 것이다. 본 분석은 또한 Hep-2C 또는 A549 인간 세포 및 EMCV 바이러스를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0121] Test B는 다음의 방법에 따라 수행된다:
- [0122] 상기 면역원성 산물 및 상기 면역원성 산물을 제조하기 위해 사용된 재조합 IFN α 서브타입(양성 대조군)은 각각 기초배지(2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트, 1 mM HEPES)에서 적어도 500 ng/ml 및 적어도 1000 U/ml로 희석한다. 50 μ l의 면역원성 산물 및 양성 대조군은 96 웰 플레이트에 두고 기초배지에서 두배

로 희석시킨다. 2×10^4 MDBK 세포는 50 μ l 의 Cell 배지 (4% FBS가 공급된 RPMI, 2 mM 글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트 및 1 mM HEPES) 각각의 웰에 추가되며 각 플레이트는 37°C, 5% CO₂ 에서 밤새 배양한다. 상기 바이러스는 그 다음 적어도 10 TCID₅₀ (조직 배양 감염 투여량 50: 감염된 세포 50% 를 사멸시키기 위하여 10배 희석) 기초 배지에서 희석된다. 상기 플레이트를 비우고 희석된 바이러스 100 μ l를 추가한다. 상기 플레이트는 그 다음 37°C, 5% CO₂ 에서 밤새 배양한다.

- [0123] 배양의 최종 단계에서, MDBK 세포의 생존력(viability)은 해당 기술 분야에서 잘 알려진 방법을 이용하여 측정한다. 상기 방법들 중의 하나는 다음과 같다: MTS/PMS(100 μ l MTS/5 μ l PMS; Promega G5430)용액 20 μ l/well을 각 웰에 추가하고 상기 플레이트는 37°C, 5% CO₂ 에서 4시간 동안 배양한다. 상기 플레이트는 그 다음 분광광도계로 490 nm에서 확인한다.
- [0124] 항바이러스 활성의 백분율은 다음과 같이 계산한다:
- [0125] % 항바이러스 활성 = $[(OD_{product} - OD_{virus}) / \text{평균 } OD_{cells} - OD_{virus}] * 100$
- [0126] OD_{product} 은 면역원성 산물 또는 양성 대조군(IFN α subtype)이 있는 웰의 광학 밀도를 나타낸다.
- [0127] OD_{virus} 은 바이러스만 있는 대조군 웰의 광학 밀도를 나타낸다.
- [0128] OD_{cells} 은 IFN α 및 바이러스가 있는 대조군 웰의 광학 밀도를 나타낸다.
- [0129] EC₅₀ 값은 바이러스 매개 폐사율을 50% 억제한 면역원성 산물의 값에 상응하는 것으로, 이는 생존력/농도 그래프에서 x축에 EC₅₀ 값을 넣어서 측정된다.
- [0130] 면역원성 산물의 EC₅₀ 과 양성 대조군(면역원성 산물을 제조하는데 사용되는 제조함 IFN α 서브타입)의 EC₅₀ 비교는 상기 면역원성 산물의 항바이러스성 활성이 5% 미만, 바람직하게는 1% 미만을 나타내는지를 측정할 수 있도록 한다.
- [0131] 불활성화 비율 EC_{50 product} / EC_{50 IFN α} 는 측정될 수 있다: 상기 면역원성 산물이 5% 미만, 바람직하게는 1% 미만의 항바이러스성 활성을 나타낼 때, 상기 불활성화 비율은 20 이상, 바람직하게는 100 이상이다.
- [0132] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 예를 들어, KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 를 포함하며, 여기서, 면역원성 산물은 본원에 인용된 TEST C의 조건에서 IFN α 의 항바이러스성 활성을 중화할 수 있다. 본 발명에 따르면, 본 분석은 상기 면역원성 산물로 면역된 쥐 혈청을 중화하는 능력을 측정하기 위하여 수행된다. 상기 중화 능력은 MDBK 세포에서 복제하는 수포성 구내염바이러스가 있을 때 세포 생존력을 평가하여 측정할 수 있다. 본 분석은 또한 Hep-2C 인간 세포 및 EMCV 바이러스를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0133] Test C 는 다음의 방법에 따라 수행된다:
- [0134] 상기 면역원성 산물 전체 단백질의(브라드포드 단백질 분석에 의해 측정된) 0.3 내지 10 μ l을 6-8주된 Balb/c 쥐에 30일에 두 번 주입하며, 바람직하게는 0일 및 21일에 주입한다. 혈청 샘플은 면역전 채집하고(사전-면역 혈청 샘플), 30일과 40일 사이에 채집하며(테스트 혈청 샘플), 바람직하게 31일에 채집한다.
- [0135] 사전-면역 및 테스트 혈청 샘플 25 μ l를 1/200에서 1/200의 희석도 8가지 희석하여 96-웰 플레이트에 놓는다. 상기 양성 대조군(polyclonal anti-IFN α from PBL, Piscataway, NJ, ref.31100-1)은 일반적으로 기초 배지(2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트 및 1 mM HEPES) 에서 3125 UI/well 내지 100 UI/well 까지 IFN α 활성을 중화할 수 있을 정도까지 희석하며 25 μ l 를 또한 플레이트에 둔다.
- [0136] IFN α 기초배지의 25 μ l에서 25 U/well (최종 농도) 는 각 웰에 추가되고 상기 플레이트는 실온에서 60분 동안 배양된다.
- [0137] 분석 배지내 20000 MDBK 세포들은 각 웰에 추가되며 각 플레이트는 37°C, 5% CO₂ 에서 24시간 동안 배양된다.
- [0138] 상기 바이러스는 virus medium (2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트, 1 mM HEPES)에서 적어도

10 TCID₅₀ (감염된 세포 50% 를 사멸시키기 위하여 10배 희석)로 희석된다. 상기 플레이트는 비워지고 바이러스 100 μl 는 37℃, 5% CO₂ 에서 24시간 동안 배양되기 전에 각 웰에 추가된다.

[0139] 배양의 최종 단계에서, MDBK 세포의 생존력(viability)은 해당 기술 분야에서 잘 알려진 방법을 이용하여 측정한다. 상기 방법들 중의 하나는 다음과 같다: MTS/PMS(100 μl MTS/5 μl PMS; Promega G5430)용액 20 μl/well을 각 웰에 추가하고 상기 플레이트는 37℃, 5% CO₂ 에서 4시간 동안 배양한다. 상기 플레이트는 그 다음 분광광도계로 490 nm에서 확인한다.

[0140] 상대적인 세포 생존력은 다음과 같이 계산한다:

$$[\text{0141}] \quad \% = [(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{virus}}) / OD_{\text{IFN+virus}}] * 100$$

[0142] OD_{sample} 은 면역원성 산물로 면역된 쥐에서 얻은 혈청이 있는 웰 및 양성 대조군(다클론성 항-IFN 항체)이 있는 웰의 광학 밀도를 나타낸다.

[0143] OD_{virus} 은 바이러스만 있는 대조군 웰의 광학 밀도를 나타낸다.

[0144] OD_{IFN+virus} 는 IFN α 및 바이러스가 있는 대조군 웰의 광학 밀도를 나타낸다.

[0145] 상기 NC₅₀ 값은 희석율 또는 중화 단위(unit)/ml로 표현되는 바이러스-매개 폐사율을 50% 중화한 혈청의 희석에 상응하는 것으로, 생존력/농도 그래프에서 x축에 NC₅₀ 값을 넣어서 측정된다.

[0146] TEST C에서, 상기 면역원성 산물로 면역된 쥐의 혈청이 죽을 운명으로부터 MBDK 세포를 보호하지 못함을 보여주었는데, 이러한 결과는 면역원성 산물은 항바이러스성 활성을 중화하는 IFN α 에 대해 직접적으로 항체를 유도할 수 있는 능력을 가진다는 것을 의미한다.

[0147] 일 실시예에서, 면역원성 산물은 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 을 포함하며, 여기서 상기 면역원성 산물은 TEST C의 조건에서 IFN α 의 항바이러스성 활성 적어도 50% 을 중화할 수 있다. 상기 실시예에서, NC₅₀ 은 계산될 수 있다. 혈청의 희석이 TEST C의 조건에서 IFN α 항바이러스성 활성을 적어도 50% 중화할 수 없다면, 상기 산물의 NC₅₀ 은 계산될 수 없다.

[0148] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 을 포함하며, 여기서 상기 IFN α /캐리어 중량비는 0.06 내지 0.6이다.

[0149] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 을 포함하며, 여기서 상기 IFN α /캐리어 비는 0.1 내지 0.5이다.

[0150] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 을 포함하며, 여기서 상기 IFN α /캐리어 비는 0.3이다.

[0151] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 면역원성 산물은 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자에 결합된 IFN α 을 포함하며, 여기서 상기 IFN α /캐리어 비는 0.05, 0.1, 0.2, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.3, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.4, 0.5이다.

[0152] 상기 비율은 실시예 10에 개시된 UV 및 형광 검출법 (Test E)에 기초한 방법에 따라 측정될 수 있다.

[0153] **[면역원성 산물 획득 방법]**

[0154] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 IFN α 키노이드(kinoid)는 다음 방법에 따라 얻는다:

[0155] a) 적어도 하나의 재조합 인간 IFN α 서브타입 및 적어도 하나의 캐리어 단백질을 글루타르알데하이드와 함께 혼합하는 단계 및 (i) 환원제 및 (ii) 리신, 글리신 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산으로부터 선택된 키펀칭 화합물(quenching compound)을 추가하여 상기 반응을 중단시키는 단계,

[0156] b) 10 kDa 미만의 분자량을 가지거나, 8 kDa 미만의 분자량을 가지는 화합물을 제거하는 단계,

[0157] c) 포름알데히드를 추가하는 단계;

- [0158] d) (i) 환원제 및 (ii) 리신, 글리신 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산으로부터 선택된 켄칭 화합물을 추가하여 포름알데히드와의 반응을 중단시키는 단계,
- [0159] e) 상기 면역원성 산물을 수집하는 단계.
- [0160] 단계 a)의 일 실시예에서, 우선 글루타르알데히드를 추가하기 전에, IFN α 및 예를 들어 KLH와 같은 캐리어 단백질 분자는 적절한 양으로 혼합된다.
- [0161] 일 실시예에서, IFN α 및 KLH는 단계 a)에서 IFN α :서브유닛 KLH 몰비가 10:1 내지 40:1의 비율로 혼합된다. 다른 실시예에서, IFN α 및 KLH는 단계 a)에서 IFN α :서브유닛 KLH 몰비가 15:1 내지 25:1의 비율로 혼합된다. 다른 실시예에서, IFN α 및 KLH는 단계 a)에서 IFN α :서브유닛 KLH 몰비가 20:1 내지 25:1의 비율로 혼합된다.
- [0162] 단계 a)의 일 실시예에서, 글루타르알데히드는 상기 반응 혼합물에서 최종 농도 1 mM 내지 250 mM, 바람직하게 20 mM 내지 30 mM, 더욱 바람직하게 22.5 mM 내지 25 mM로 사용된다. 단계 a)의 일 실시예에서, 글루타르알데히드는 IFN α 및 KLH와 15 min 내지 120 분, 바람직하게는 약 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 분 동안 배양된다. 일 실시예에서, 글루타르알데히드는 대략 45분 동안 22.5 mM 추가된다. 유리하게, 글루타르알데히드와 배양하는 단계 a)는 18 °C 내지 37 °C, 바람직하게는 18 °C 내지 27 °C에서 수행된다.
- [0163] 실시예에 따르면, 글루타르알데히드와 반응(단계 a)은 10 kDa 미만의 분자량을 갖는 화합물을 제거하기 전에 중단되며(단계 b), 이는 켄칭 화합물을 추가함으로써 중단되며, 바람직하게는 켄칭 화합물은 (i) 환원제 및 (ii) 리신, 글리신 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산으로부터 선택된다.
- [0164] 상기 환원제는 업계에서 잘 알려진 환원제들 중 어느 하나로 이루어질 수 있으며, 그들의 환원 특성때문에, 알데히드 처리 동안 만들어진 잔류하는 이민 그룹먼트(imine groupments)를 환원(reduce)할 수 있는 능력을 가진다. 상기 환원제는 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride), 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride)로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다.
- [0165] 실시예에 따르면, 상기 실시예에서 상기 켄칭 화합물은 아미노산이며, 상기 아미노산은 글리신(glycine)으로 이루어진다. 단계 b)의 몇몇 실시예에서 글리신 및/또는 리신은 글루타르알데히드와 반응을 중단시키는데 이용되며, 선택된 아미노산은 상기 반응 혼합물에서 최종 농도 0.01 M 내지 1 M, 바람직하게는 0.05 M 내지 0.5 M, 및 가장 바람직하게는 0.08 M 내지 0.2 M, 예를 들어 본원의 실시예에서 보여지는 바와 같이 0.1 M 에서 사용된다. 실시예에서, 켄칭 화합물과의 배양은 바람직하게는 1 분 내지 120 분, 바람직하게는 5 분 내지 60분, 예를 들어 본원 실시예에서 보여진 바와 같이 30분의 시간 동안 수행된다. 다른 실시예에서, 이 단계는 온도 범위 18 °C 내지 30 °C, 바람직하게는 18 °C 내지 25 °C에서 수행된다.
- [0166] 단계 b)에서, 상기 반응 혼합물 내의 10 kDa 보다 더 작은 화합물은 제거된다. 이러한 작은 화합물들은 주로 IFN α 와도 반응하지 않고, KLH와도 반응하지 않은, 초과하는 글루타르알데히드 및 초과하는 켄칭 화합물들을 둘러싼다. 단계 b)는 10 kDa 미만의 화합물들을 제거하는 어떤 방법에 의해서든 수행될 수 있으며, 10 kDa의 절단값(cut-off)을 갖는 투석막을 이용한 투석법 또는 10 kDa의 절단값을 갖는 여과막을 갖는 여과법을 포함한다. 실례로 들면, 단계 b)는 본원의 실시예에서 보여지는 바와 같이, 10 kDa의 절단값을 갖는 여과막을 이용한 접선 유동여과(tangential flow filtration) 단계로 이루어질 수 있다. 불필요한 작은 화합물들이 없는, 여과 잔류물(retentate)은 단계 b)의 끝에 수집된다. 만약 원한다면, 단계 b)는 단계 b)의 끝에 얻어진 반응 혼합물에 존재하는 최종적인 화합물 전체를 제거하는 예비적 단계를 포함할 수 있다. 상기 예비적 단계는 수용액 내 현탁액에 최종적으로 존재하는 전체를 제거하는 통상적인 여과 단계로 이루어질 수 있으며, 예를 들면, 적절한 여과막을 이용하는 여과 단계로 이루어질 수 있으며, 예를 들면, 0.2 μ m의 포어(pore) 사이즈를 갖는 여과막을 이용할 수 있다.
- [0167] 상기 방법의 단계 c)의 일 실시예에서, 포름알데히드는 최종농도 6 mM 내지 650 mM, 바람직하게는 25 mM 내지 250 mM에서 추가된다. 상기 방법의 단계 c)의 일 실시예에서, 포름알데히드는 1시간 내지 336 시간 동안 추가되며, 바람직하게는 1시간 내지 144시간 동안 추가된다. 일 실시예에서, 포름알데히드는 20 내지 50 시간 동안, 바람직하게는 40 시간 동안, 최종농도 50 내지 100 mM에서, 바람직하게는 66 mM에서 추가된다.
- [0168] 단계 c)에서, 포름알데히드와의 배양은 바람직하게는 30°C 내지 40°C의 온도에서 수행되며, 예를 들면 본원의 실시예에 나타난 바와 같이 37°C에서 수행된다.
- [0169] 상기 방법의 단계 d)에서, 포름알데히드와의 반응은 켄칭 화합물을 추가함으로써 중단되며, 바람직하게 켄칭 화합물은 (i) 환원제 및 (ii) 리신 및 글리신으로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산으로부터 선택된다.

[0170] 상기 환원제는 업계에서 잘 알려진 환원제들 중 어느 하나로 이루어질 수 있으며, 그들의 환원 특성 때문에, 알데히드 처리 동안 만들어진 잔류하는 이민 그룹먼트(imine groupments)를 환원한다. 상기 환원제는 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride), 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride)로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다. 실시예에 따르면, 상기 케칭 화합물은 아미노산이며, 상기 아미노산은 글리신으로 이루어진다. 글리신 및/또는 리신이 포름알데히드와의 반응을 중단시키는데 사용되는 단계 b)의 몇몇 실시예에서, 상기 선택된 아미노산은 상기 반응 혼합물의 최종 농도가 0.01 M 내지 1.5 M, 바람직하게는 0.05 M 내지 1 M, 및 가장 바람직하게는 0.1 M 내지 0.2 M, 일 때 사용되며, 예를 들면, 본원의 실시예에서 보여지는 바와 같이 0.1 M의 농도에서 사용된다. 실시예에서, 케칭 화합물과의 배양은 5분 내지 120분의 시간동안 수행되며, 바람직하게는 10분 내지 60분, 예를 들어 본원의 실시예에서 보여지는 바와 같이 30분의 시간 동안 수행된다. 다른 실시예에서, 본 단계는 온도 범위 18 °C 내지 30 °C에서 수행되며, 바람직하게는 18°C 내지 25°C에서 수행된다.

[0171] 본 방법의 실시예에 따르면, 단계 e)에서 수집하기 전에, 100 kDa 미만의 분자량을 갖는 물질의 제거는 수용액에서 100 kDa 을 초과하는 분자량을 갖는 물질을 제거하기 위해 해당 분야의 통상의 기술자에 의해 업계에서 알려진 기술에 따라 수행될 수 있다. 첫 번째 실시예에서, 사용된 기술은 적어도 100 kDa의 절단값을 갖는 여과막을 이용하여 수행되는 여과단계이며, 이는 초미세여과(ultrafiltration) 단계 또는 접선여과 단계(tangential filtration step)를 포함한다. 두 번째 실시예에서, 사용된 기술은 적어도 100 kDa의 절단값을 갖는 여과막을 이용한 접선여과 단계로 이루어진다. 다른 실시예에서, 단계 e)에서 수집하기 전에, 300 kDa 미만의 분자량을 갖는 물질의 제거는 적어도 300 kDa의 절단값을 갖는 여과막을 이용하여 수행될 수 있다.

[0172] **[조성물, 에멀전 및 상기 에멀전을 함유하는 백신]**

[0173] 본 발명은 상기 기술된 면역원성 산물을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본 발명의 산물의 제형에 관한 것이며, 여기서 산물은 에멀전 내에 있다. 유리하게, 본 발명의 백신 조성물은 상기 에멀전을 포함하거나 상기 에멀전 조성물로 이루어진다. 상기 에멀전은 본 발명의 면역원성 산물, 오일 및 계면활성제 또는 적어도 하나의 오일 및 적어도 하나의 계면활성제의 혼합물을 포함한다. 바람직하게, 상기 오일 또는 오일/계면활성제 혼합물은 약학적으로 허용가능한 부형제이다. 더욱 바람직하게, 상기 오일 및 계면활성제의 혼합물은 애주반트이며, 더욱 더 바람직하게 면역애주반트(immunoadjuvant)이다. 바람직한 애주반트는 ISA 51이다. 사용될 수 있는 면역애주반트의 다른 예는 SWE(스쿠알렌-베이스 수중유 에멀전(squalene-based oil-in-water emulsion))이다. 사용될 수 있는 면역애주반트의 다른 예는 SWE-a이다. 본 발명의 상기 에멀전은 유중수 에멀전 또는 수중유 에멀전일 수 있다.

[0174] 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 면역원성 산물의 양은 상기 에멀전 전체 중량대비 0.01% (w/w) 이상, 1% (w/w)미만이다.

[0175] **[애주반트]**

[0176] 본 발명의 에멀전 또는 백신 조성물은 애주반트, 특히 면역애주반트를 포함할 수 있다. 실시예에서, 애주반트의 양은 백신 조성물 전체 중량대비 0.00001% (w/w) 내지 1%, 바람직하게 0.0001 내지 0.1%, 더욱 바람직하게는 0.001 내지 0.01% (w/w)의 범위이다.

[0177] 통상의 기술자에게 잘 알려진 어떠한 적절한 애주반트는 상기 백신 조성물에 사용될 수 있으며, 예를 들어, 프로인트 불완전 애주반트(Freund's Incomplete Adjuvant)와 같은 오일-베이스 애주반트, 진균(mycolate)-베이스 애주반트(예를 들어, 트레할로오스 디마이콜레이트(trehalose dimycolate)), 박테리아 리포폴리사카라이드(bacterial lipopolysaccharide (LPS)), 펩티도글리칸(즉, 무레인(mureins), 뮤코펩타이드(mucopeptides) 또는 N-오파카(Opaca), 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide [MDP]), 또는 MDP 유사체와 같은 당단백들), MPL (모노포스포릴 리피드 A(monophosphoryl lipid A)), 프로테오글리칸(예를 들어, 폐렴간균(Klebsiella pneumoniae)으로부터 추출된), 연쇄상구균 표본(streptococcal preparations(예를 들어, OK432)), 바이오스팀(Biostim).TM.(예를 들어, 01 K2), EP 109 942, EP 180 564 및 EP 231 039의 "이스콤(Iscoms)", 알루미늄 하이드록사이드(aluminum hydroxide), 사포닌, DEAE-덱스트란(DEAE-dextran), 중성 오일(미글리올(miglyol)과 같은), 식물성 오일(아라키드 오일(arachid oil)과 같은), 리포솜(liposomes), 플루오닉.RTM.폴리올(Pluronic.RTM. polyols), 리비 애주반트 시스템(Ribi adjuvant system)(참고, 예를 들어, GB-A-2 189 141) 또는 인터루킨, 특히 세포 매개 면역을 촉진하는 인터루킨을 포함한다. 방선균목(Actinomycetales)의 박테리아

속, 아밀콜라타(Amycolata)DML 추출물로 이루어진 다른 애쥬반트는 U.S. Pat. No. 4,877,612에 기술되어 있다. 그 대신에, SWE (squalene 3.9%, span 0.47%, tween 80 0.47% in citrate buffer) 및 SWE-a (squalene 3.9%, span 0.47%, tween 80 0.47% in citrate buffer)는 또한 사용될 수 있다. 추가로, 등록된(proprietary) 애쥬반트 혼합물들이 상업적으로 이용될 수 있다. 상기 이용된 애쥬반트는 부분적으로 받아들이는 유기체에 의존할 것이다. 가장 바람직한 투여량은 일반적인 방법에 따라서 쉽게 결정될 수 있다.

[0178] 유중수 에멀전에 사용하기 적합한 오일 애쥬반트는 미네랄 오일 및/또는 대사 오일(metabolizable oils)을 포함할 수 있다. 미네랄 오일은 Bayol® Marcol.® 및 Drakeol®6VR (SEPPIC, France).®을 포함하는 드라케올(Drakeol)로부터 선택될 수 있다. 대사 오일은 땅콩기름 및 콩기름과 같은 식물성 오일, 생선 기름 스퀴알란 및 스퀴알렌(squalane and squalene)과 같은 동물성 오일 및 토코페롤(tocopherol)과 그 유도체들뿐만 아니라 SP oil(후술함), 에멀시젠(Emulsigen) (MPV Laboratories, Ralston, NZ), 몬타니드(Montanide) 264,266,26 (Seppic SA, Paris, France)로부터 선택될 수 있다.

[0179] 게다가, 상기 애쥬반트는 상기 애쥬반트 부피 대비 0.1 내지 25%, 더 바람직하게는 약 1 내지 10%, 및 더욱 바람직하게는 약 1 내지 3% 의 적어도 하나 이상의 습윤제(wetting agents) 또는 분산제(dispersing agents)를 포함할 수 있다. 특히 습윤제 또는 분산제로 바람직한 것은 비이온 계면활성제이다. 유용한 비이온 계면활성제는 폴리옥시에틸렌/폴리옥시프로필렌 블럭 공중합체(polyoxyethylene/polyoxypropylene block copolymers)를 포함하며, 특히 상품명 Pluronic®으로 BASF Corporation에서 판매된다(Mt. Olive, N.J.). 다른 유용한 비이온 계면활성제는 상품명 Tween 80®으로 이용되는, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(polyoxyethylene sorbitan monooleate)또는 만니드 모노올레이트(mannide monooleate)같은 폴리옥시에틸렌 에스터(polyoxyethylene esters)를 포함한다. 본 발명의 백신 조성물의 부분으로 상기 애쥬반트 내에 하나 이상의, 예를 들어 적어도 둘의 습윤제 또는 분산제를 포함할 수 있다.

[0180] 적절한 애쥬반트는 헥사데실아민(hexadecylamine), 옥타데실아민(octadecylamine), 리소레스틴(lysolecithin), 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide), N,N-디옥타데실-N'-N-비스(2-하이드록시에틸-프로판 디-아민)(N,N-dioctadecyl-N'-N-bis(2-hydroxyethyl-propane di-amine)), 메톡시헥사데실-글리세롤(methoxyhexadecyl-glycerol) 및 플루로닉 폴리올(pluronic polyols); 예를 들어, 피란(pyran)과 같은 폴라니온(polyanions), 텍스트란 설페이트(dextran sulfate), 폴리 IC, 폴리아크릴산(polyacrylic acid), 카보폴; 예를 들어, 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide)와 같은 펩타이드, 다이메틸글리신(dimethylglycine), 터프신(tuftsine), 오일 에멀전(oil emulsions), 알룸(alum) 및 이들의 혼합물과 같은 해당 분야의 통상의 기술자들에게 알려진 계면활성제들을 포함할 수 있으나 이들에 한정되지 않는다. 다른 가능성이 있는 애쥬반트는 대장균 이열성 독소(E. coli heat labile toxin) 또는 콜레라 독소의 B 펩타이드 서브유닛을 포함한다. McGhee, J. R., et al., "On vaccine development," Sem. Hematol., 30:3-15 (1993).

[0181] **[추가 계면활성제(Further surfactants)]**

[0182] 에멀전을 포함하는 본 발명에 따른 백신 조성물의 실시예에서, 상기 백신 조성물은 바람직하게 면역원성 산물과 하나 또는 그 이상의 오일성 면역애쥬반트 물질의 조합 뿐만아니라, 하나 또는 그 이상의 계면활성 물질(surfactant agents)을 포함한다. 계면활성 물질의 실례가 되는 예는 Montanide®80과 같은 Arlacel (SEPPIC, France)에서 판매되는 만니드 모노올레이트(mannide monooleate)를 포함한다.

[0183] 실시예에서, 계면활성제의 양은 백신 조성물 전체 중량 대비 0.00001% (w/w) 내지 1%, 바람직하게 0.0001 내지 0.1%, 더욱 바람직하게 0.001 내지 0.01% (w/w) 이다.

[0184] **[감압하에 동결건조된 산물(Lyophilized products)]**

[0185] 실시예 및 저장 목적에 따라서, 본 발명의 상기 산물(product) 및 백신 조성물은 감압하에 동결건조(lyophilized)될 수 있다. 백신 조성물은 동결 건조된(freeze-dried (lyophilized)) 형태로 대표될 수 있다. 상기 실시예에서, 본 발명에 따른 면역원성 산물은 하나 또는 그 이상의 동결건조 보조제(lyophilisation auxiliary substance)들과 결합된다. 다양한 동결건조 보조제들이 해당 분야의 통상의 기술자들에게 잘 알려져 있다. 동결건조 보조제들은 락토스(lactose) 및 만니톨(mannitol)과 같은 당류를 포함한다.

[0186] 계면활성제를 포함하는 액상 에멀전으로 사용을 위해서 동결건조된 조성물을 이루는 백신 조성물에 대한 실시예

에서, 상기 백신 조성물은 바람직하게 전체 백신 조성물의 중량 대비 본 발명에 따른 면역원성 산물을 0.1% (w/w)보다는 많이 포함하고, 10% (w/w) 미만을 포함한다.

[안정화제(Stabilizers)]

몇몇 실시예에서, 상기 백신은 안정화제들과 혼합될 수 있으며, 예를 들면 분해로부터 분해-프론(degradation-prone) 단백질을 보호하기 위하여, 백신의 제품수명을 연장시키기 위하여, 또는 냉동건조 효율을 향상시키기 위하여 혼합될 수 있다. 유용한 안정화제들은 SPGA (Bovarnik et al; J. Bacteriology 59: 509 (1950)), 소르비톨, 만니톨, 트레할로스, 전분, 수크로스, 텍스트란 또는 글루코스 같은 탄수화물, 알부민 또는 카세인과 같은 단백질 또는 이들의 분해산물, 리신 또는 글리신과 같은 아미노산 혼합물, 그리고 알칼리 메탈 포스페이트 (alkali metal phosphates)와 같은 버퍼들이다.

[투여 경로(Administration route)]

본 발명에 따른 백신 조성물은 내피의(intradermal), 근육내의(intramuscular), 복강내의(intraperitoneal), 피하의(subcutaneous) 주사와 같은 주사요법(by injectable); 예를 들어 경피전달과 같은 국소적인 방법(by topical)을 포함한 통상적인 방법에 의해 면역화되는 개체에 투여될 수 있다. 치료는 일정시간의 기간 동안 단회 또는 복수회 투여될 수 있다.

[제형(Dosage form)]

주사용도에 적절한 형태는 살균 주사액(sterile injectable solutions) 또는 살균 주사 현탁액(dispersions)의 즉각적인(extemporaneous) 제조를 위한 살균액 또는 현탁액 및 살균 파우더를 포함할 수 있다. 미생물에 의한 오염에 대한 방어는, 예를 들어 파라벤(parabens), 클로로부탄올(chlorobutanol), 페놀(phenol), 소르빈산(sorbic acid), 티메로살(thimerosal) 등과 같은 다양한 항박테리아제 및 항곰팡이제와 같은 보존제를 상기 백신 조성물에 추가함으로써 이를 수 있다. 대다수의 경우에서, 주사하는 동안 고통을 감소시키기 위하여, 당류 또는 염화나트륨과 같은 등장액(isotonic agents)을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주입가능한 조성물들의 장기 흡수(prolonged absorption)는 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트(aluminium monostearate) 및 젤라틴(gelatin)과 같은 흡수를 지체하는 성분을 상기 조성물에 사용함으로써 이를 수 있다.

실시예에 따르면, 본 발명의 동결건조된 백신 조성물은 주입을 위해 물에 용해되며 서서히 혼합된다; 그 다음 면역예주반트, 바람직하게 ISA 51이 추가되며; 상기 혼합물은 서서히 유화를 위해 혼합되고 적절한 주사기(syringe)에 채워진다. 따라서 본 발명은 또한 본 발명의 백신 조성물이 필드(filled) 또는 프리필드된(prefilled) 주사기를 포함하는, 의료장치와 관련된다. 상기 예멸전은 이상적으로는 즉석에서(extemporaneously) 준비된다. 그러나 상기 예멸전을 포함하는 주사기는 2-8°C에서 10시간 미만 보관될 수 있다. 이 경우, 상기 예멸전은 두 손으로 마찰시켜 주입하기 전에 따뜻하게 데운다.

[단위 투여량(Unit dosage range)]

본 발명의 다른 기술적 과제는 30 mcg 내지 1000 mcg의 범위의 면역원성 산물을 포함하는 투여 단위(dosage unit)이다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 5 mcg 내지 1000 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35 mcg 내지 750 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35 mcg 내지 500 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35 mcg 내지 450 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35 mcg 내지 400 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35 mcg 내지 350 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35 mcg 내지 300 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35 mcg 내지 250 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 1000 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 750 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 500 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당

면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 450 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 400 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 350 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 300 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 250 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 240 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 200 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 150 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 120 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 100 mcg이다. 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 내지 400 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다.

[0196] 다른 실시예에서, 상기 투여 단위는 60 mcg 내지 240 mcg의 범위의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여단위는 60 mcg 내지 120 mcg의 범위의 면역원성 산물의 양을 포함한다.

[0197] 다른 실시예에서, 상기 투여단위는 60 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여단위는 120 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 투여단위는 240 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다.

[0198] **[키트 및 의료 장치]**

[0199] 본 발명은 또한 다음을 포함하는 키트와 관련된다:

- [0200] - 본 발명의 면역원성 산물을 포함하는 1 바이알(vial) (Vial Number 1), 일반적으로 3mL;
- [0201] - 에쥬반트, 바람직하게는 ISA51을 포함하는 1 바이알(Vial Number 2); 이 바이알은 에쥬반트 3 mL를 포함할 수 있고 8 mL의 용기(container)일 수 있다;
- [0202] - 1 주사기, 일반적으로 1 mL Braun Injekt-F®;
- [0203] - 에멀전 제조를 위한 1 바늘(needle) (Needle Number 1) ; 이 바늘은 바람직하게는 20G 바늘이다;
- [0204] - 주사를 위한 1 바늘 (Needle Number 2), 바람직하게는 근육내 주사; 본 바늘은 바람직하게는 23G 바늘이다.

[0205] 본 발명은 또한 다음을 포함하는, 상기 키트로부터 백신을 제조하는 방법에 관한 것이다:

[0206] (1) Vial Number 2에서 0.4 ml의 에쥬반트를 뽑는 단계. 이 주사기 내용물을 0.4 ml의 면역원성 산물을 포함하는 Vial Number 1으로 내보낸다.

[0207] (4) 전체 바이알 내용물이 충분히 유화될 수 있도록 여러번 채워넣고 빼고를 반복하며, 일반적으로 30회하고 마지막으로 전체 에멀전을 채워넣는다.

[0208] 주사하기 전에, Needle Number 1은 바람직하게 Needle Number 2와 전환되고 공기는 주사기에서 제거된다.

[0209] 일 실시예에서, 상기 키트는 다음을 포함한다:

- [0210] - 본 발명의 면역원성 산물 0.4 ml를 포함하는 1 바이알(Vial Number 1);
- [0211] - 적어도 0.4ml의 에쥬반트, 바람직하게는 ISA51을 포함하는 1 바이알(Vial Number 2);
- [0212] - 1 주사기, 일반적으로는 1 mL Braun Injekt-F®;
- [0213] - 에멀전 제조를 위한 1 바늘(needle) (Needle Number 1) ; 이 바늘은 바람직하게는 20G 바늘이다;
- [0214] - 주사를 위한 1 바늘 (Needle Number 2), 본 바늘은 바람직하게는 23G 바늘이다.

[0215] 다른 실시예에서, 면역원성 산물은 동결건조된 형태이다. 따라서, 상기 키트는 다음을 포함한다:

- [0216] - 본 발명의 동결건조된 산물을 포함하는 1 바이알 (Vial Number 1), 일반적으로 3mL;

- [0217] - 일반적으로 2mL의 주사를 위한 물을 포함하는 1 바이알 (Vial Number 2);
- [0218] - 에쥬반트, 바람직하게 ISA51를 포함하는 1 바이알 (Vial Number 3); 본 바이알은 3 mL의 에쥬반트를 포함할 수 있고 8 mL의 용기일 수 있다.
- [0219] - 1 주사기, 일반적으로 1 mL Braun Injekt-F®;
- [0220] - 에멀전 제조를 위한 1 바늘(needle) (Needle Number 1) ; 이 바늘은 바람직하게는 20G 바늘이다;
- [0221] - 주사를 위한 1 바늘 (Needle Number 2), 바람직하게는 근육내 주사; 본 바늘은 바람직하게는 23G 바늘이다.
- [0222] 본 발명은 또한 다음을 포함하는, 상기 키트로부터 백신을 준비하는 방법에 관한 것이다:
- [0223] (1) Needle number 1에 연결된 주사기를 이용하여 Vial Number 2에서 Vial Number 1으로 주사를 위한 물을 주입하는 단계;
- [0224] (2) 조제용 물질들의 용해가 완전히 이루어질 때까지 1-5분 동안 Vial Number 1을 서서히 회전시키는 단계;
- [0225] (3) 동일한 주사기 및 바늘을 가지고, Vial Number 3에서 에쥬반트를 뽑는 단계. 본 주사기 내용물을 Vial Number 1으로 옮긴다.
- [0226] (4) 전체 바이알 내용물이 충분히 유화될 수 있도록 여러번 채워넣고 빼고를 반복하며, 일반적으로 30회하고 마지막으로 전체 에멀전을 채워넣는다.
- [0227] 본 발명은 또한 의료 장치에 관한 것이며, 상기 의료 장치는 본 발명의 조성물, 에멀전, 또는 백신이 필드 (filled) 또는 프리필드된(prefilled) 주사기이다.
- [0228] 일 실시예에서, 상기 주사기는 듀얼 챔버(dual chamber syringe) 주사기이며, 여기서 하나의 챔버는 본 발명의 면역원성 산물이 있는 용액을 포함하며 다른 챔버는 에쥬반트를 포함한다.
- [0229] 본 발명은 또한 본 발명의 산물 또는 본 발명의 백신 조성물이 프리필드된 바이알 또는 카플(carpule)을 포함하는 의료 장치에 관한 것이다.
- [0230] 일 실시예에서, 상기 의료 장치는 30 mcg 내지 1000 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 1000 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 750 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 500 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 450 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 400 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 350 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 360 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35 mcg 내지 250 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 1000 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 750 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 500 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 450 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 400 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 350 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 300 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 250 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 240 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 200 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 150 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 120 mcg이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 투여당 면역원성 산물의 치료적으로 유효한 양은 60 mcg 내지 100 mcg이다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390 내지 400 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다.
- [0231] 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 60 mcg 내지 240 mcg의 양의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서,

상기 의료 장치는 60 mcg 내지 120 mcg의 면역원성 산물의 양을 포함한다.

[0232] 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 60 mcg의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치는 120 mcg의 면역원성 산물을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 의료 장치의 면역원성 산물을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0233] 도 1은 중간보고(interim report) 동안 IFN α 중화 활성(neutralizing activity)을 나타낸 면역된 환자 혈청 샘플의 백분율이다.

도 2는 처리된(treated-)환자와 플라시보(placebo) 환자에서 IFN-유도 유전자의 차분진화(Differential evolution)이다. 기준점에서 IFN-유도된 유전자 발현 수준이 증가된 것으로 나타난 11명의 환자 중에서, 8명은 면역원성 산물로 처리하였고 3명은 플라시보 주입을 하였다. SLE 환자에서 가장 높은 수준의 과다 발현을 보여준 250 IFN-유도 유전자 수준은 고-밀도 마이크로어레이(high-density microarrays)를 이용하여 측정하였다. 상기 결과는 평균 $\log_2(V1\text{에서 발현 수준}) - \log_2(V6\text{에서 발현 수준})$ 로 나타났다. 상기 p값은 Student's t-test를 이용하여 측정하였다.

도 3은 기준점에서 양성 또는 음성 IFN-signature로 처리한 환자 대 플라시보 처리한 환자에서 IFN-결합 항체의 역가를 나타낸다. 별표는 p values < 0.05를 가리킨다.

도 4는 V10 과 V0 사이 또는 V11 과 V0사이, 기준점에서 양성 또는 음성 IFN-signature로 처리한 환자 대 플라시보 처리한 환자의 차분진화를 나타낸다. 상기 결과는 평균 델타 Log(Gene Expression)으로 나타낸다. 별표는 p values < 0.05를 가리킨다.

도 5는 기준점에서 양성 IFN-signature로 처리한 환자 및 플라시보 처리한 환자에서 혈청 C3 값의 변화를 나타낸다. 별표는 p values < 0.04를 가리킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0234] **실시예 1: 면역원성 산물의 제조**

[0235] 키홀-림펫 헤모시아닌(Keyhole Limpet Hemocyanin(KLH))는 해양 복족연체동물(gastropod mollusk) 메가쓰라 크레눌라타(Megathura crenulata)의 림프로부터 추출하였고 그 다음 GMP 조건하에서 정제하였다. 2-8 $^{\circ}$ C 온도의 저장 조건에서 안정성 분석(stability assays)을 한 결과 정제된 KLH의 품질 수명은 2-8 $^{\circ}$ C 온도에서 36개월이다.

[0236] 제조함 인간 IFN-2b는 GMP 조건에서 *E. coli* 에서 생산하였다.

[0237] 350 mg IFN α 스케일에서 본 발명의 산물의 1회분(Batches)은 아래 제조과정을 통하여 생산하였다.

[0238] a) 글루타르알데히드 컨쥬게이션(Conjugation)

[0239] 여과된 KLH는 UV 농도에 기초하여, IFN α 2b 용액 (pH 7,8의 70 mM 디-소듐 하이드로젠 포스페이트 내에 IFN α 2b 포함)에 IFN α :KLH이 20:1의 비율로(KLH 1 서브유닛에 IFN α 20 모노머의 몰비로) 추가되었다.

[0240] 상기 컨쥬게이트는 pH 8.5를 얻기 위하여, pH 9 글루타르알데히드(glutaraldehyde)(반응 배지에서 최종 농도 22.5 mM에 도달하도록 추가하였다) 및 보레이트(borate)(반응 배지에서 최종 농도 22.5 mM에 도달하도록 추가하였다)로 수행하였다.

[0241] 그 다음 pH 8.5에서 상기 용액은 23 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 혼합하였다.

[0242] b) 글리신으로 켄칭(Quenching)

[0243] 상기 반응은 0.1M 글리신으로 30분 동안 켄칭하였다.

[0244] c) 첫 번째 접선유동여과(tangential flow filtration (TFF 1))

- [0245] 최초 TFF는 Pall Minim II TFF system으로 수행하였고 0.5 M NaOH로 10 kDa 분자량을 걸러내는 0.02 m의 폴리에테르술폰 막을 깨끗이하고 워킹 버퍼(70 mM di-sodium hydrogen phosphate pH 7,8)로 균형을 맞추었다.
- [0246] 켄칭 용액은 그 다음 0.22 μm -여과를 이용하여 정제된다. 중간 생성물은 워킹 버퍼로 두 번 희석되고 그 다음 접선유동여과(TFF) 및 워킹 버퍼 12 볼륨으로 철저하게 여과된다. 잔류물을 수확하고 20 시간 미만 동안 저장한다.
- [0247] **d) 포름알데히드로 불활성화**
- [0248] 포름알데히드는 연동펌프를 이용하여 최종 농도 66.6 mM에 도달하도록 잔류물에 추가된다. 불활성화 반응은 매일 마그네틱 교반기로 용액을 혼합하면서 $37\pm 2^\circ\text{C}$ 로 맞춰진 배양기에서 40시간 동안 수행하였다.
- [0249] **e) 글리신으로 켄칭**
- [0250] 본 발명은 그 다음 30분 동안 0.1 M 글리신으로 켄칭하였다.
- [0251] **f) 두 번째 접선유동여과(tangential flow filtration (TFF 2))**
- [0252] 두 번째 TFF는 Pall Minim II TFF system으로 수행하고 0.5 M NaOH로 100 kDa 분자량을 걸러내는 0.02 m²의 폴리에테르술폰 막을 깨끗이하고 포물레이션 버퍼(70 mM di-sodium hydrogen phosphate pH 7,8)로 균형을 맞추었다.
- [0253] 켄칭 용액은 그 다음 0.2 μm -여과를 이용하여 정제된다. 중간산물은 접선 볼륨 900 mL 를 가지기 위해 농축되고 다음에 작은 분자량을 갖는 IFN α 호모폴리머들과 비 반응물들을 제거하기 위하여 12 볼륨의 포물레이션 버퍼(70 mM phosphate buffer)로 TFF하여 여과하였다. 상기 잔류물은 수확하고 그 다음 브라드포드 단백질 분석에 따른 농도 측정에 근거해 이론상 농도 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 희석하고 그 다음 본 발명의 면역원성 산물을 얻기 위하여 0.2 μm -여과하였다.
- [0254] **실시예 2: 산물의 항원성**
- [0255] 샌드위치 ELISA 항 IFN α /KLH 은 다음과 같이 수행하였다. 간단히, 96 웰 플레이트는 포획 항체(capture antibody): 토끼 다클론성 항-KLH 항체로 덮고 블러킹 버퍼(예를 들어, 카세인 2% 포함 PBS)로 37 $^\circ\text{C}$ 에서 90분간 블러킹하였다. 상기 플레이트는 250 ng/ml에서 8 두배 희석도로 희석한 면역원성 산물의 연속 희석액 또는 KLH 및 IFN α 과 같은 음성 대조군을 포함하여 37 $^\circ\text{C}$ 에서 90분간 배양하였다. 예를 들어 비오티닌부착된 항-IFN α 항체와 같은 검출 항체(detection antibody)는 그 다음 90분 동안 추가되었다. 최종적으로, 상기 플레이트는 37 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 스트렙트아비딘-HRP과 배양되고 상기 복합체는 o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(OPD) 기질 용액과 30분 동안 진행하였다. 효소 반응을 중단한 후에, 해당 컬러의 정도는 490 nm에서 분광광도법으로 측정하였다.
- [0256] 이 테스트는 상기 산물이 예를 들어, 항-IFN α 항체에 의해 인지되는 항원성인 IFN α 및 상기 IFN α 이 KLH에 연결된 IFN α 를 포함하는 산물을 확인하였다.
- [0257] **실시예 3: 산물의 면역원성(Immunogenicity) (TEST A)**
- [0258] 브라드포드 단백질 분석에 의해 결정된 전체 단백질 산물 4 μg 이 6-8 주된 7 Balb/c 쥐에 0일 및 21일에 주입되었다.
- [0259] 31일에, 쥐로부터 채혈하였고 혈청을 거뒀었다.
- [0260] 항-IFN α ELISA는 전면역(preimmune)에서 수행하였고 다음과 같이 혈청을 거뒀었다:
- [0261] - 96 웰 플레이트는 IFN α -2b 100 ng으로 코팅하였고 2 $^\circ\text{C}$ -8 $^\circ\text{C}$ 에서 밤새 배양하였다.

- [0262] - 블러킹 버퍼는 37℃ 에서 90분 동안 추가하였다,
- [0263] - 면역원성 산물은 1/2500의 희석비율로 적어도 8번 2배 희석하여 추가하고 상기 플레이트는 37℃에서 90분 동안 배양하였다,
- [0264] - 상기 ELISA는 o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드(OPD) 기질 용액으로 진행하였다. 효소 반응을 중단한 후에, 해당 컬러의 정도는 490 nm에서 분광광도법으로 측정하였다.
- [0265] 상기 테스트는 7마리 쥐에서, 면역원성 산물은 항-IFN α 항체 역가가 존재하도록 한다는 것을 증명하였다.

[0266] **실시예 4: 산물의 잔효성(Residual activity of the product (TEST B))**

- [0267] 본 분석은 마딘-다비 우 신장(MDBK) 세포에서 수포성 구내염바이러스(VSV)의 세포변성 효과 (CPE)에서 IFN α 의 예방 효과(protective effect)에 근거하였다.
- [0268] 면역원성 산물 및 면역원성 산물 제조를 위해 사용된 재조합 IFN α 2b(양성 대조군)은 각각 기초 배지(2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트, 1 mM HEPES)에서 적어도 500 ng/ml 및 적어도 1000 U/ml 로 희석된다. 상기 면역원성 산물 및 양성 대조군 50 μ l는 96 웰 플레이트에 놓여지고 기초 배지에서 2배 희석도로 희석된다. 2 \times 10⁴ MDBK 세포들은 50 μ l 세포 배지(4% FBS가 공급된 RPMI, 2 mM 글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트 및 1 mM HEPES)의 각 웰에 추가되고 상기 플레이트는 37 °C, 5% CO₂ 에서 밤새 배양된다. 상기 바이러스는 그 다음 기초 배지에서 적어도 10 TCID₅₀ (조직 배양 감염 투여량 50: 감염된 세포 50% 를 사멸시키기 위하여 10배 희석)으로 희석된다.
- [0269] 배양의 끝에, MTS/PMS 용액 20 μ l/웰(100 μ l MTS/5 μ l PMS; Promega G5430)이 상기 웰에 추가되고 그 다음 플레이트를 37 °C, 5% CO₂ 에서 밤새 배양하였다. 상기 플레이트는 그 다음 분광광도측정기에서 490nm에서 확인하였다.
- [0270] 상기 면역원성 산물의 항바이러스성 활성 백분율은 테스트된 산물의 2회 분량을 측정하였고 상기 항바이러스성 활성은 IFN α 의 항바이러스성의 1% 미만이었다.

[0271] **실시예 5: 산물의 중화 능력(Neutralization capacity of the product (TEST C))**

- [0272] 산물의 중화 능력은 MDBK 세포에서 복제하는 구내수포염 바이러스가 있을 때 세포 생존력을 측정하여 평가하였다.
- [0273] 면역원성 산물 전체 단백질의 4 μ g (브라드포드 단백질 분석으로 측정되어진)은 0일 및 21일에 6-8주차 Balb/c 쥐에 투여되었다. 혈청 샘플은 면역전에 획득하였고(사전-면역 혈청 샘플) 31일에 얻었다(테스트 혈청 샘플).
- [0274] 사전-면역 및 테스트 혈청 샘플 25 μ l는 96-웰 플레이트에 1/200 희석비율로 8 희석도로 희석하여 놓았다. 양성 대조군(polyclonal anti-IFN α from PBL, Piscataway, NJ, ref.31100-1)은 기초 배지(2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트 및 1 mM HEPES)에서 3125 UI/well 에서 100 UI/well로 희석하였고 상기 플레이트에 25 μ l를 배양하였다.
- [0275] IFN α 기초 배지 25 μ l 내에 25 U/웰 (최종농도)는 각 웰에 추가되고 상기 플레이트는 실온에서 60분간 배양하였다.
- [0276] 분석 배지(Assay medium (4% FBS가 공급된 RPMI, 2 mM 글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트, 1 mM HEPES))에서 20000 MDBK 세포는 각 웰에 추가되었고 상기 플레이트는 37°C, 5% CO₂ 에서 밤새 배양하였다.
- [0277] 상기 바이러스는 바이러스 배지(2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트, 1 mM HEPES)에서 적어도 10 TCID₅₀ (감염된 세포 50% 를 사멸시키기 위하여 10배 희석)으로 희석하였다. 상기 플레이트는 비우고 바이러스 100 μ l을 37°C, 5% CO₂ 에서 24시간 동안 배양하기 전에 각 웰에 추가하였다.
- [0278] 배양의 끝에, MTS/PMS 용액 20 μ l/웰(100 μ l MTS/5 μ l PMS; Promega G5430)이 상기 웰에 추가되고 그 다음 플레이트를 37 °C, 5% CO₂ 에서 4시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트는 그 다음 분광광도측정기에서 490nm에서 확

인하였다.

[0279] NC는 7 테스트 샘플 모두를 측정하였다: 평균 NC= 253789 IU/ml (SEM = 172526),

[0280] 이를 통하여 모든 혈청은 IFN α 의 항바이러스 활성을 중화할 수 있는 항체 anti-IFN α 가 포함되었다는 것이 증명되었다.

[0281] **실시예 6: 면역원성 산물을 포함하는 조성물 및 백신의 실시예들**

[0282] 상기 면역원성 산물을 포함하는 실례가 되는 조성물은 표1에 나타냈다.

표 1

구성성분	합량
본 발명의 산물	160 μ g
디-소듐 포스페이트	8.95 mg
디소듐 디하이드로젠 포스페이트	805 μ g
전체 부피	0.4 ml

[0284] 상기 면역원성 산물을 포함하는 실례가 되는 백신은 표 2에 나타냈다.

표 2

에멀전	
구성성분	합량
본 발명의 산물	160 μ g
디-소듐 포스페이트	8.95 mg
디소듐 디하이드로젠 포스페이트	805 μ g
드라케놀 6VR (중성오일)	0.30 g
몬타니드 80 (만니드 모노올레이트)	0.04 g
전체 부피	0.8 ml

[0286] **실시예 7: 임상시험**

[0287] 상기 표 2에 나타난 백신 조성물을 이용하여 임상시험을 실시하였다.

[0288] *연구설계(Study design):*

[0289] SLE를 겪는 성인 개체에 상기 산물을 3 또는 4회 투여하였으며, 0일, 7일, 및 28일 또는 0일, 7일, 28일 및 84일에 투여하였다. 다음의 투여량으로 시험하였다: 30 mcg, 60 mcg, 120 mcg 및 240 mcg.

[0290] *연구집단(Study population):*

[0291] 경도 및 중등도 SLE(SLEDAI 4-10), 치료를 받고 있음에도 불구하고 급성기(active disease)인 18세에서 50세 사이의 성인남녀 28명. 정상 대조군 인터페론 유전자 시그니처(gene signature)는 48명의 건강한 지원자를 대상으로 확립하였다. 48명의 건강한 지원자 중에서 18명의 PBMC는 고밀도 어레이(high-density arrays)에서 인터페론 시그니처를 동정하기 위하여 타입 I 인터페론으로 시험관내에서 자극하였다. SLE 시그니처는 베이스라인에서 건강한 지원자들과 SLE 환자들 사이의 시그니처를 비교하여 완성하였다.

[0292] 중간분석은 처음 세 개 그룹에 해당되는, 즉, 30, 60 또는 120 mcg 투여량을 받은 환자 또는 플라시보 환자들에서 수행하였다.

표 3

	30 mcg (N = 3)	60 mcg (N = 6)	120 mcg (N = 6)	Placebo (N = 5)	Total (N = 20)
Summary Statistics					
Age (years)					
Mean (SD)	36.0 (9.85)	39.3 (3.98)	34.2 (12.12)	38.6 (11.52)	37.1 (9.28)
Median	33.0	38.0	32.5	43.0	37.5
Sex, n(%)					
Male	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Female	3(100.0)	6(100.0)	6(100.0)	5(100.0)	20(100.0)
Race, n(%)					
White-Caucasian	3(100.0)	6(100.0)	6(100.0)	5(100.0)	20(100.0)
SLEDAI-2000					
Mean	8.67 (1.15)	7.50 (2.81)	6.00 (2.19)	8.80 (1.09)	
Median	8.00	8.50	6.00	8.00	
Anti-ds DNA ab					
Mean (SD)	53.93 (58.22)	61.25 (113.46)	140.55 (242.63)	88.70 (113.62)	
Median	33.10	15.45	23.60	40.90	
DURATION OF DISEASE (YEARS)					
Mean (SD)	10.0 (2.18)	8.9 (8.82)	7.3 (5.99)	5.9 (4.75)	7.9 (6.11)
Median	11.0	6.1	6.1	3.6	6.4
CONCOMMITANT CORTICOSTEROIDS					
	100%	66.7%	83.3%	100%	

[0293]

[0294] 상기 표 3은 기록된 환자들의 통계(중간분석)를 나타낸 표이다.

표 4

Measure		30 µg N=3	60 µg N=6	120 µg N=6	240 µg N=6	Placebo N=7
Age (y)	Mean ± SD	36.0 ± 9.8	39.3 ± 4.0	34.2 ± 12.1	34.8 ± 10.8	40.1 ± 10.2
	Median	33	38	33	36	43
	Range	28 – 47	35 – 46	19 – 50	21 – 46	20 – 50
Sex						
Female	n (%)	3 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	7 (100)
Ethnicity						
White-Caucasian	n (%)	3 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	6 (85.7)
Asian	n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.3)
Weight (kg)	Mean ± SD	69.7 ± 11.9	67.8 ± 10.0	59.2 ± 7.4	70.0 ± 15.9	57.4 ± 14.8
	Median	75	63	59	65	55
	Range	56 – 78	58 – 81	51 – 71	54 – 97	46 – 90
Height (cm)	Mean ± SD	162.3 ± 6.4	165.0 ± 5.1	164.0 ± 5.5	162.8 ± 8.6	162.7 ± 5.8
	Median	165	166	165	163	163
	Range	155 – 167	159 – 170	156 – 172	152 – 172	153 – 170
Body mass index (kg/m ²)	Mean ± SD	26.6 ± 6.0	25.0 ± 4.3	22.1 ± 3.5	26.7 ± 7.2	21.7 ± 5.2
	Median	27	24	21	25	20
	Range	21 – 32	21 – 32	18 – 28	20 – 40	17 – 33
Disease duration (y)	Mean ± SD	9.9 ± 2.2	8.9 ± 8.8	7.2 ± 6.0	11.8 ± 8.4	6.5 ± 4.0
	Range	7 – 11	1 – 23	0 – 18	2 – 21	1 – 11
SLEDAI 2000 index	Mean ± SD	8.7 ± 1.2	7.5 ± 2.8	6.0 ± 2.2	6.0 ± 1.8	8.4 ± 1.1
	Range	8 – 10	4 – 10	4 – 10	4 – 8	7 – 10
Medications at baseline, n (%)						
Glucocorticoids	n (%)	3 (100.0)	4 (66.7)	5 (83.3)	3 (50.0)	6 (85.7)
Aminoquinolines	n (%)	0 (0.0)	4 (66.7)	3 (50.0)	5 (83.3)	5 (71.4)
Methotrexate	n (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	1 (16.7)	1 (16.7)	1 (14.3)
Azathiopine	n (%)	0 (0.0)	1 (16.7)	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0.0)

[0295]

[0296] 상기 표 4는 기록된 환자들의 통계(최종분석)를 나타낸 표이다.

[0297] 결과

[0298] 백신의 안전성 및 내인성(Safety and tolerability)

[0299] 두 낭창 플레어(lupus flares)가 SAEs와 관련된 것으로 보고되고 있다. 하나는 플라시보 그룹에서이다. 다른 하나는 주사 후 코르티코스테로이드 요법(corticosteroid therapy)을 자발적으로 멈춘 환자에서 IFN-K 240 mcg을 처음 주사한 후에 발생되었다. 이러한 코르티코스테로이드 치료의 갑작스러운 중단은 아마도 플레어를 발생시켰을 것으로 생각된다. 정기적인 중간 안전성 분석이 독립된 안전 위원회에서 수행되었다. 실험지표에서 어떠한 임상적 변화도 관찰되지 않았다(hematology, biochemistry, urine).

[0300] 백신의 면역원성(Immunogenicity of the vaccine)

[0301] 항-IFN α 항체 역가는 환자에게서 얻은 혈청 샘플을 ELISA분석하여 측정하였다.

- [0302] 항-IFN α ELISA는 상기 기술된 바와 같이 수행하였다.
- [0303] 항-IFN α 항체 역가는 28일 부터 면역원성 산물을 처리한 모든 그룹에서 검출되는 결과가 나타났다.
- [0304] *백신의 중화 활성(Neutralization activity)*
- [0305] 중화 활성은 다음의 방법을 이용하여 시험관 내에서 측정하였다:
- [0306] 환자 혈청에서 획득한 혈청 샘플 50 μl를 96-웰 플레이트에서 배양하였으며, 1/200의 희석비율을 8번 희석하였다.
- [0307] 양성 대조군(polyclonal anti-IFN from PBL Piscataway, NJ, 31100-1)은 100 ng/well 에서 3.125 ng/well 으로 희석하였고 50μl 를 상기 플레이트에 추가하였다. 희석은 기초배지 (2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트 및 1 mM hepes)에서 수행하였다.
- [0308] IFN α 2b 10 U/well (최종 농도) 을 각 웰에 추가하였고 상기 플레이트를 실온에서 60분간 배양하였다.
- [0309] Assay medium (4% FBS가 공급된 RPMI, 2 mM 글루타민, 1 mM 소듐 피루베이트, 1 mM hepes) 내 30000 MDBK 세포는 각 웰에 추가하였고 상기 플레이트는 37°C, 5% CO₂ 에서 밤새 배양하였다.
- [0310] 상기 바이러스는 바이러스 배지(2 mM 글루타민이 공급된 RPMI, 1 mM 소듐 피루베이트, 1 mM hepes)에서 적어도 10 TCID₅₀ (감염된 세포 50% 를 사멸시키기 위하여 10배 희석)로 희석하였다. 상기 플레이트를 비우고 바이러스 100 μl를 37°C, 5% CO₂ 에서 24시간 동안 배양하기 전에 각 웰에 추가하였다.
- [0311] 배양의 마지막에, MTS/PMS (100 μl MTS/5 μl PMS; Promega G5430) 용액 20 μl/well 을 웰에 추가하였고 상기 플레이트는 37°C, 5% CO₂ 에서 4시간 동안 배양하였다. 상기 플레이트는 그 다음 분광광도분석기로 490 nm에서 확인하였다.
- [0312] 중간 보고 결과 면역원성 산물 30 mcg으로 처리한 환자에서 얻은 혈청 중에서는 어디에서도 면역후 168일 뒤에 중화 능력을 가지는 항-IFN α 항체가 나타나지 않았으나, 반면 면역원성 산물 60 mcg으로 처리한 환자에게서 얻은 혈청은 168일에 중화 활성을 갖는 항-IFN α 항체가 나타났다(도 1 참조).
- [0313] 게다가, 최종 결과 면역원성 산물 60 μg 또는 120 μg 으로 처리한 개체의 50%에서는 중화 활성을 보였고, 면역원성 산물 240 μg으로 처리한 개체의 80% 에서 중화 활성을 보였다(표 5 참조).

표 5

Dose (mcg)	Number of responder (%)	NC50 median at peak (Dil-1)
30	0	0
60	50	390
120	50	733
240	80	316

[0315] 이러한 결과는, IFN α 가 생체내에서 중화를 나타내기 위해서는 상기 면역원성 산물을 30 mcg 이상을 처리해야 한다는 것을 증명하였다.

[0316] 실시예 8: 트랜스크립톰 분석(Transcriptomic analysis)

[0317] PBMC는 면역원성 산물의 주사 전후로 몇몇의 시점에서 수확하였다. 이러한 중간 분석을 위해서, 전체 RNA를 V1 (day 0) 및 V6 (첫 번째 주사 후 38일) 샘플에서 추출하고, 표준 에피메트릭스 프로토콜(Affymetrix protocol)에 따라서 표지하고, Genechip HGU133 Plus 2.0 arrays에 혼성화하였다. 상기 샘플들의 RMA (Robust Microarray Analysis) 정규화 이후에 GeneSpring에서 통계분석을 실시하였다.

[0318] Unsupervised clustering algorithms이 베이스라인(baseline) 샘플에서 수행되었고 두 개의 카테고리 환자들은

을 그룹화하였다: 베이스라인에서 '인터페론-시그니처'가 있는 사람(n=11)과 없는 사람(n=7), 즉 타입 I 인터페론에 의해 유도되는 유전자의 자발적인 과다-발현(IFN-유도 유전자는 IFN-자극 control PBMC의 마이크로어레이 분석에 기초하여 실험적으로 확인되었다.). dsDNA 역가가 시그니처가 없는 환자에 비해서(mean +/- SEM: 44.7 +/- 33.3, p = 0.006 by Mann-Whitney test), 시그니처가 있는 환자에서(mean +/- SEM: 131.1 +/- 50.1 UI/ml) 현저히 더 높다는 것은 놀라운 것이 아니다. 주목할만한 항-IFN α 항체들은 면역원성 산물을 받은 베이스라인에 IFN 시그니처를 갖는 8명의 환자들의 8개의 추적 샘플(follow-up samples)에서 발견되었다. 이것은 면역원성 산물을 처리한 IFN 시그니처가 없는 6명의 환자중에 2명의 경우만이고, 4명의 플라시보 처리한 사람들은 그러하지 않았다.(p = 0.002 by Chi-squared test). 베이스라인 IFN-시그니처를 갖는 11명의 환자 중에서, 2명은 30 mcg을 받고, 1명은 60 mcg을 받고, 5명은 120 mcg을 받고, 3명은 플라시보처리를 하였다. V1 과 V6 사이에서 IFN-유도 유전자의 발현에서 관찰되는 변화들은 플라시보처리한 환자들과 비교해서, 면역원성 산물을 처리한 환자들에서 상당히 차이가 있었다.(도 2).

[0319] 이러한 결과는 생체내에서 IFN-유도 유전자들의 발현에 면역원성 산물들이 작용을 한다는 것을 시사한다.

[0320] **실시예 9: IFN 시그니처 및 면역원성 산물-처리에 대한 반응**

[0321] 베이스라인에서 "인터페론-시그니처"는 실시예 7의 경도 및 중등도 SLE환자 28명에서 측정하였다. 21 IFN-유도 유전자를 이용하여 측정된 수치에 따른 상기 인터페론-시그니처(IFN-시그니처)는 Yao 등, Arthritis & Rheumatism, 2009, 60 (6): 1785-1796에 개시되어 있다. 인터페론-시그니처의 측정은 실시예에 기술된 바대로 하였다.

[0322] 실시예 7의 28명의 SLE 환자에서, 19명은 양성 인터페론-시그니처를 보였고, 9명은 베이스라인에서 음성 인터페론 시그니처를 보였다.

[0323] 인터페론 시그니처 및 SLE 질환 활성화도

[0324] C3 의 dsDNA 항체 역가 및 혈청 수준은 두 그룹의 환자들의 질병 활성화도 지표로 측정하였다.

[0325] dsDNA 항체 역가는 Diagnostic Products Corporation의 DPC Anti-DNA kit (PIKADD-4)를 이용하여 측정하였다.

[0326] C3 혈청 수준은 Beckman Coulter의 Complement C3 kit (Kit # 446450) 를 이용하여 측정하였다.

표 6

SLE 질병 활성화도 지표

	IFN 시그니처 양성 SLE	IFN 시그니처 음성 SLE	p value
dsDNA Ab	147 ±57	44 ±93	< 0.05
C3	834 ±55	1199 ±114	< 0.005

[0328] 상기 표 6에 보여지는 바와 같이, 베이스라인에서 양성 인터페론-시그니처를 갖는 SLE 환자들은 더 높은 질병 활성화도의 생물학적 지표를 갖는다.

[0329] 본 발명의 면역원성 산물 처리에 대한 인터페론-시그니처 및 반응

[0330] 실시예 7에 개시된 본 발명의 면역원성 산물의 처리 효과를 베이스라인에서 양성 IFN-시그니처를 갖는 SLE환자 및 음성 IFN-시그니처를 갖는 SLE환자를 비교하여 나타냈다.

[0331] 항-IFN-알파 반응

[0332] IFN-결합 항체 역가는 실시예 7에 기술된 바대로 V6 (면역 후 38일), V10 (112일) 및 V11 (168일)에 측정하였다.

[0333] 이러한 결과는 양성 인터페론-시그니처를 갖는 SLE 환자들이 베이스 라인에서 음성 인터페론-시그니처를 갖는

SLE 환자들보다 본 발명의 면역원성 산물에 대한 반응으로 10 배 이상의 IFN-결합 항체들을 생산한다는 것을 보여준다(도 3).

[0334] IFN-유도 유전자

[0335] V0 과 V10 또는 V11 사이 IFN-유도 유전자들의 발현 변화는 베이스라인에서 양성 또는 음성 IFN 시그니처를 갖는 처리된(treated) 환자들 및 플라시보 처리한 환자들에게서 측정하였다. 이러한 결과는 플라시보 및 IFN-시그니처 음성 환자들과 비교하여, IFN-유도 유전자들에서 본 발명의 면역원성 산물의 치료효과가 IFN-시그니처 양성 SLE 환자들의 V10 및 V11 에서 강력하고 분명하게 차이가 있다는 것을 보여준다(도 4).

[0336] 보체 C3

[0337] 혈청 C3 값은 본원에서 앞서 기술되어진 바와 같이, V-1 (면역 30일 전), V0 (면역일), V7 (면역 후 56일), V10 (112일) 및 V11 (138일)에서 처리한 환자 및 플라시보를 받은 환자들에게서 측정하였다.

[0338] 처리한 환자와 플라시보 환자들에서 분명하게 C3 수준이 증가하는 것으로 결과가 나타났다. 게다가, 본 발명의 면역원성 산물로 처리한 IFN-시그니처 양성 SLE 환자들에게서 C3 수준이 분명하게 증가하였다. (도 5).

[0339] 실시예 10: 본 발명의 산물에서 IFN α / KLH 비율의 결정

[0340] 본 발명의 산물에서 IFN α 및 KLH의 양을 결정하기 위하여, UV 및 형광 측정에 근거한 정량법을 이용하였다. 본 발명의 산물은 두 개의 형광 라벨로 제조하였으며, 각각 IFN α 또는 KLH에 특이적이다. Size Exclusion Chromatography (SEC)에 의해 분석한 후에, IFN α 및 KLH의 양은 220nm에서 UV 신호 및 IFN α 라벨 또는 KLH 라벨에 특이적인 형광 신호(FLD)의 통합(integration)에 의해서 측정된다. 이 방법은 IFN α/KLH의 질량비를 측정할 수 있다.

[0341] a) 원재료 레이블링(labeling):

[0342] 본 발명의 산물을 제조하는 동안에 형광 태그는 사용된 아미노기를 보존하기 위하여 설프하이드릴기(sulfhydryl groups)에 결합되었다.

[0343] 레이블링은 3시간 동안 실온에서 pH7 인산나트륨 버퍼 70mM 에서 처리하였다. KLH는 Atto565-maleimide (18507, Sigma) 200 당량으로 레이블하였고 IFN α는 플루오레세인 말레이미드(fluorescein maleimide (46130, Pierce)) 100 당량으로 레이블하였다. 상기 레이블된 단백질들은(KLH-atto565 및 IFN-플루오레세인) 그 다음, 반응하지 않은 태그들을 제거하기 위하여 pH 7.8 인산염 버퍼 70 mM 조건으로 Zeba 컬럼 (cut off 7kDa, Thermo Scientific, 89893)에서 여과하였다.

[0344] b) 산물 제조:

[0345] 레이블된 원재료는 그 다음 접선유동여과 대신에 투석 여과방법으로 실시예 1과 같은 과정으로 레이블된 산물들을 제조하는데 이용되었다.

[0346] c) KLH 및 IFN α 동종중합체 표준 제조

[0347] 양적 분석법을 위해, 동종중합체 표준을 제조하였다.

[0348] 레이블된 IFN α 동종중합체 표준은 실시예 1과 동일한 과정으로 제조하였으나 KLH 대신에 pH 7.8 인산염 버퍼 70 mM로, 그리고 접선유동여과 대신에 투석 여과로 제조하였다.

[0349] 레이블된 KLH 동종중합체 표준은 실시예 1과 동일한 과정으로 제조하였으나 IFN α 대신에 pH 7.8 인산염 버퍼 70 mM로, 그리고 접선유동여과 대신에 투석 여과로 제조하였다.

[0350] d) 사이즈 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography)에 의한 분석방법

[0351] 그 다음 1회 분(Batches)은 UV 및 특정 형광 검출로 SEC에 의해 분석되었다.

[0352] 60 μ l의 샘플을 순차적으로 연결된 컬럼 SEC5 (1000Å) SEC3 (300Å) 에 주입하였고, 용리(elution)는 220nm 에서 UV 검출 및 특정 형광 검출로(IFN α -플루오레세인 또는 KLH-Atto565을) 35분 동안 PBS로 수행하였으며, 표 7에 이를 나타냈다.

표 7

[0353] IFN α -플루오레세인 또는 KLH-Atto-565을 위해 사용된 흥분 및 방출 파장

형광 특이적 검출	파장 nm	
	흥분	방출
IFN α -Fluorescein	490	520
KLH-Atto565	570	600

[0354] UV 및 형광 (FLD) 신호는 0 및 20분 사이의 크로마토그램 피크아래 영역을 합하여 계산하였다.

[0355] 이 방법을 증명하기 위하여, 예비실험을 하였다:

[0356] - 형광 신호 특이성(두 개의 레이블된 단백질들 사이에서 겹치는 신호가 없다는 것이 관찰되었다)

[0357] - 각각 제조된 1회 분(본 발명의 산물, 레이블된 KLH 및 IFN α 의 동종 중합체)에서 SE-HPLC에 의한 유사한 UV 프로파일이 얻어졌다,

[0358] - 제조가 관찰되었기 때문에 형광 신호가 꺼지지 않았다,

[0359] - FLD 신호는 UV 신호에 선형비례하였다.

[0360] 제조된 레이블된 키노이드에서 레이블된 UV 컨트리뷰션은 레이블된 IFN α 동종중합체 표준의 FLD_{IFN α -Fluorescein} = f(Area by UV)에 의한 곡선 영역에 따라 측정하였다.

[0361] 제조된 레이블된 키노이드에서 레이블된 KLH UV 컨트리뷰션은 레이블된 KLH 동종중합체 표준의 FLD_{KLH-Atto565} = f(Area by UV)에 의한 곡선 영역에 따라 측정하였다.

[0362] UV영역은 단백질 농도의 1차 함수로 체크되기 때문에, 이러한 방법은 제조된 전체 레이블된 키노이드에서 레이블된 IFN α 의 중량 백분율로 평가할 수 있게 되었다.

[0363] e) 분량 분석(Batches analysis)

[0364] 레이블된 키노이드의 3회 분량을 본 방법을 통하여 제조하고 분석하였다.

[0365] UV 신호와 농도의 비례성 및 FLD와 UV 신호의 비례성에 근거하여, IFN α 및 KLH의 함량 사이 비율(mIFN α /mKLH)을 3회 측정하였다(표 8)

표 8

[0366] 3개의 레이블된 키노이드에서 IFN α /KLH의 질량 비

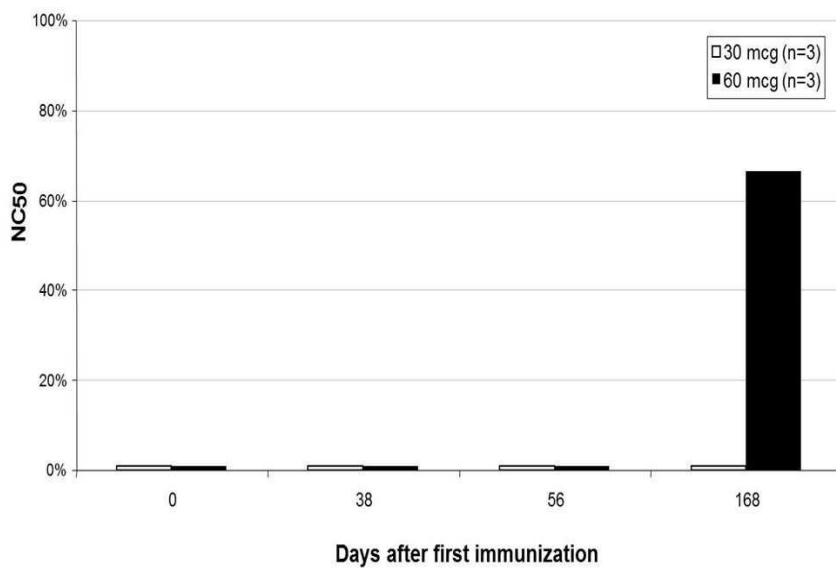
	Ratio m _{IFN} /m _{KLH}	Mean	RSD%
Batch 1	0.29	0.28	12
Batch 2	0.31		
Batch 3	0.25		

- [0367] 0.28의 mIFN α /mKLH 평균 비율은 상대 표준편차 <15%으로 관찰되었다.
- [0368] 실시예 11:본 발명의 면역원성 산물이 SWE 또는 SWE-a를 갖는 에멀전으로 투여될 때 생산된 항- mIFN α 항체 역가 및 중화 능력
- [0369] *muIFN-K*^o 제조:
- [0370] 간단히 말해, 쥐의 IFN α A (PBL Biomedical Laboratories) 및 본래의 (native) KLH를 50:1의 비율로 혼합하고 45분 동안 22.5 mM 글루타르알데하이드로 처리하였다. 과다한 글루타르알데하이드를 제거하기 위하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 대해 투석한 후에, 상기 용액은 37°C에서 48시간 동안 66 mM 포름알데하이드로 배양하였다. 글리신(0.1 M final)으로 켄칭한 후에 뒤이어 10-kDa cutoff 막을 이용하여 PBS에 대해 투석하고, 조제용 물질은 0.22- μ m 막을 이용하여 여과-살균하고 4°C에서 저장하였다.
- [0371] 면역 프로토콜:
- [0372] 쥐는 0일과 21일에 두 번 SE 또는 SE-a 애주반트를 1 대 1로 에멀전 형태로(최종 부피 100 μ l) mIFN-K (투여당 10 μ g)와 0일 및 21일에 두 번 근육 내 면역하였다.
- [0373] ELISA에 의한 항-*muIFN* α 및 항-KLH 항체 역가 측정
- [0374] 혈청은 ELISA를 이용하여 muIFN α 또는 KLH에 대한 항체를 위해 분석하였다.
- [0375] 간단히 말해, 96-웰 Maxisorp 플레이트(Nunc)는 항-muIFN α 항체를 검출하기 위하여 100 ng/well의 muIFN α (PBL Biomedical Laboratories) 또는 항-KLH 항체를 검출하기 위하여 native KLH (Sigma)로 코팅하였다.
- [0376] 2배 단계 혈청 샘플 희석액(1:100 내지 1:51,200)은 상기 웰에 추가되었다. 블랭크 웰(Blank wells)은 100 μ l의 희석 버퍼를 두었다. 37°C에서 1.5 시간 후에, 항체들은 호스래디쉬 퍼옥시다아제-접합된 항-쥐 면역글로블린 G (IgG) 및 호스래디쉬 퍼옥시다아제 색측정 물질, O-페닐렌디아민으로 검출하였다. muIFN-K 면역된 Balb/c 쥐로부터 얻은 혈청 풀은 양성 대조군으로 사용하였다. 광학밀도(OD)는 490 nm 파장에서 측정하였다. ELISA 분석은 2배수 실시하였다. 각 플레이트에서, 두 웰은 블랭크(blanks)를 위해 따로 두었고; 그들의 평균값은 모든 웰에서 뺐다.
- [0377] 항체 역가는 x- 축에 최대 OD (ODmax)/2를 인터폴레이트(interpolating)하여 측정하였다. 사용된 방정식은 ODmax/2 주변 두 지점을 통과하는 직선에 대한 $y = ax + b$ 이다.
- [0378] IFN-K 면역후에 유도된 항-*muIFN* α 항체의 중화 능력 측정
- [0379] 중화 능력(Neutralizing capacity)은 전통적인 항바이러스성 세포변성 에세이(antiviral cytopathic assay (EMCV/L929))를 이용하여 측정하였다. 이 에세이에서, muIFN α 의 항바이러스성 역가는 쥐의 L-929 세포 (ATCC)에서 뇌심근염 바이러스(encephalomyocarditis virus (EMCV))의 치사 효과를 억제할 수 있는 능력에 대해 측정한다.
- [0380] 간단하게 말해, 희석된 혈청 샘플(또는 대조군 항체) 25 μ l는 2배 단계 희석액(1:200 에서 1:6400)으로 96-웰 배양 플레이트(Nunc)에 추가하였다. 시판되는 토끼 다클론성 항체 항-muIFN α (PBL, ref: 32100-1)는 양성 대조군으로 사용되었다. 실온에서 1시간 동안 25 IU/well의 muIFN α 을 배양한 후에, 웰당 20x10³ L-929 세포들을 접종하였고 37°C에서 배양하였다. 밤새 배양한 후에, 플레이트는 PBS로 세척하였고 EMCV 용액 (세포의 50%를 사멸시키는 데 필요한 투여량 100배)100 μ l /well을 각 웰에 추가하였다. 플레이트는 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 마지막으로, MTS/PMS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt/ phenazine methosulfate) 용액 각 웰당 20 μ l이 추가되고 플레이트는 가습화된 배양기(빛으로부터 보호된)에서 37°C, 5% CO₂로 4시간 동안 배양하였다. 다음으로, 각 웰은 490 nm 에서 OD를 측정하였다.
- [0381] 블랭크(배양 배지 100 μ l 만 포함된 웰)의 OD는 샘플 OD에서 뺐다.

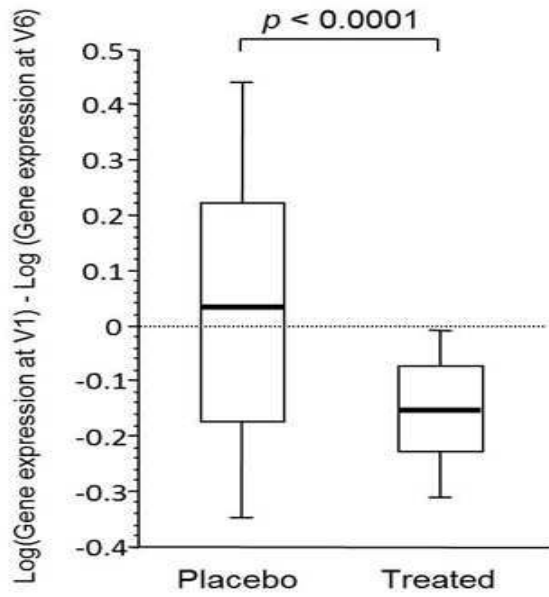
- [0382] 각 샘플의 중화 능력은 다음과 같이 계산하였다:
- [0383] 중화 능력 (%) = 100 x [(OD test -OD virus)/(OD cells)], 여기서
- [0384] ODtest 는 테스트된 샘플의 OD (세포 + IFN α+ 혈청 + 바이러스)
- [0385] ODvirus 는 바이러스 대조군 OD (세포 + 바이러스)
- [0386] ODcells 는 20,000 cells/well OD (세포 + IFN α+ 바이러스).
- [0387] 중화 능력은 혈청 희석액의 함수로 그래프로 나타내었다. IFN α 활성값의 50%를 중화하는 역가(혈청 희석 수)는 해당 곡선의 직선 부분 상에서 인터폴레이션하여 측정되었다.
- [0388] 항-muIFN α 역가 및 항-KLH 역가는 SWE 또는 SWE-a에서 유화된 muIFN-K의 최초 주입후 31일에 수집된 쥐 혈청에서 나타나고; 이것은 항-muIFN α 항체는 중화능력을 가지고 있다는 것을 보여주는 결과이다(NC50 > 200).

도면

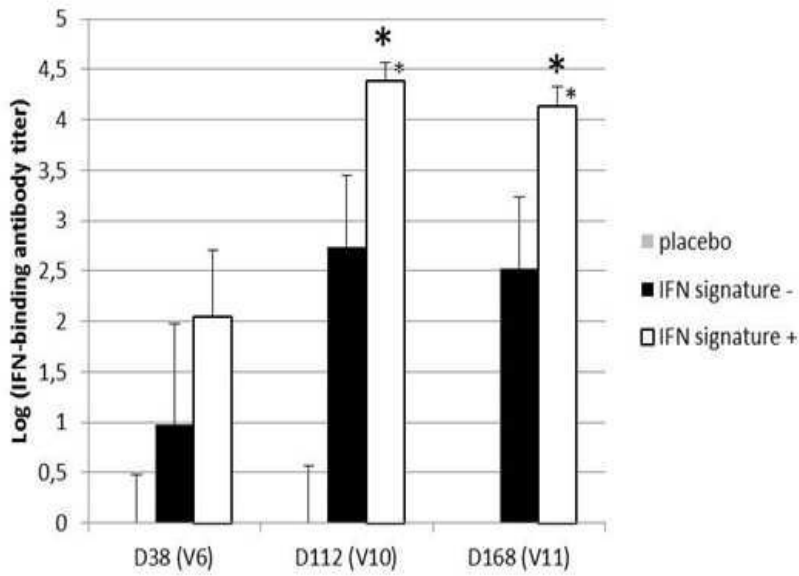
도면1



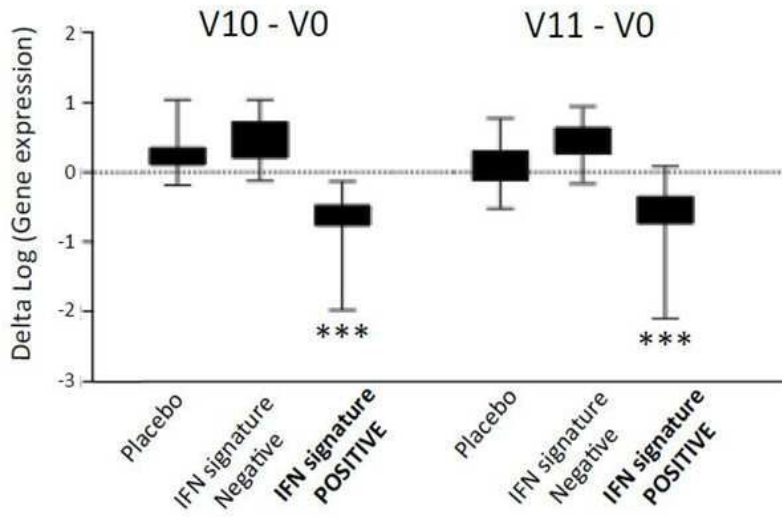
도면2



도면3



도면4



도면5

