

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 39/095
A61K 39/102

(11) 공개번호 10-2005-0028051
(43) 공개일자 2005년03월21일

(21) 출원번호	10-2005-7001924	(87) 국제공개번호	WO 2004/014419
(22) 출원일자	2005년02월02일		
번역문 제출일자	2005년02월02일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP2003/008567	국제공개일자	2004년02월19일
국제출원출원일자	2003년07월31일		

(30) 우선권주장	0218035.4	2002년08월02일	영국(GB)
	0218036.2	2002년08월02일	영국(GB)
	0218037.0	2002년08월02일	영국(GB)
	0218051.1	2002년08월02일	영국(GB)
	0220197.8	2002년08월30일	영국(GB)
	0220199.4	2002년08월30일	영국(GB)
	0225524.8	2002년11월01일	영국(GB)
	0225531.3	2002년11월01일	영국(GB)
	0230164.6	2002년12월24일	영국(GB)
	0230168.7	2002년12월24일	영국(GB)
	0230170.3	2002년12월24일	영국(GB)
	0305028.3	2003년03월05일	영국(GB)

(71) 출원인 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89

(72) 발명자 베르테트, 프랑스와-크사비어, 자끄
 벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89 글락소스
 미 스클라인바이오로지칼즈 에스.에이.

비만스, 칼프
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89 글락소스
미 스클라인바이오로지칼즈 에스.에이.

드노엘, 필립
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89 글락소스
미 스클라인바이오로지칼즈 에스.에이.

페론, 크리스티안
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89 글락소스
미 스클라인바이오로지칼즈 에스.에이.

고라즈, 카린
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89 글락소스
미 스클라인바이오로지칼즈 에스.에이.

폴만, 얀
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89 글락소스
미 스클라인바이오로지칼즈 에스.에이.

바이난즈, 빈센트
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89 글락소스
미 스클라인바이오로지칼즈 에스.에이.

(74) 대리인 남상선

심사청구 : 없음

(54) 그램 음성 박테리아로부터 유래된 트랜스페린 결합 단백질 및 H S F 를 포함하는 백신 조성물

명세서

기술분야

본 발명은 그램 음성 박테리아 면역원성 조성물 및 백신, 상기 조성물의 제조 방법 및 상기 조성물의 의약적 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 트랜스페린 결합 단백질과 Hsf 둘 모두를 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다. 상기 둘 모두의 항원이 존재함으로써, 고수준의 살균 항체가 제조된다.

배경기술

그램 음성 박테리아는 여러 가지 인체 병리학상의 원인 물질로서, 이러한 박테리아 중 다수에 대해 유효한 백신을 개발할 필요가 있는 실정이다. 구체적으로, 보르데텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*), 브루셀라 오비스(*Brucella ovís*), 클라미디아 시타시(*Chlamydia psittaci*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 나이세리아 고노로아(*Neisseria gonorrhoeae*), 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 예리시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)가 백신 요법으로 치료할 수 있는 병리학적 상태를 유발하는 그램 음성 박테리아이다.

나이세리아 고노로아는 임질의 병원체로서, 임질은 전 세계적으로 가장 많이 보고되는 성병중 하나로서 매년 발병 사례는 6200만건으로 추정된다(Cerbase 등 1998 Lancet 351; (Suppl 3) 2-4). 임질의 임상학적 징후는 노생식관, 인후 또는 직장의 점막 염증 및 신생아의 눈 감염증을 포함한다. 여성의 임균 감염은 불임, 자궁외 임신, 만성 골반 염증 질환 및 난관난소 농양 형성을 일으킬 수 있다. 패혈증, 관절염, 심내막염 및 수막염은 합병 임질과 관련있다.

항생제에 대해 내성이 있는 다수의 임균 균주로 인해 이환율이 증가하고 임질 관련 합병증이 증가하고 있다. 임질의 항생제 치료법에 대한 유력한 대안은 백신요법에 의해서 임질을 예방하는 것이다. 그러나, 현재 나이세리아 고노로아 감염에 대한 백신은 존재하지 않는 실정이다.

나이세리아 메닝기티디스는 특히 어린이와 청소년에 있어서 중요한 병원체이다. 패혈증과 수막염은 침해성 수막염 질환(invasive meningococcal disease: IMD)중 가장 생명을 위협하는 형태이다. 이러한 질환은 이환율과 치사율이 높기 때문에 전세계적인 건강상의 문제가 되고 있다.

캡슐형 폴리사카라이드에서 항원 차이에 근거하여 13가지의 나이세리아 메닝기티디스 혈청군이 동정된 바 있으며, 가장 흔한 혈청군인 A, B 및 C가 전세계 질병 중 90%를 차지한다. 혈청군 B는 유럽, 미국 및 라틴 아메리카의 여러 나라에서 수막염 질환의 가장 흔한 원인이다.

혈청군 A, C, W 및 Y의 캡슐형 폴리사카라이드계 백신이 개발되어 수막염 질환의 발생을 억제하는 것으로 밝혀진 바 있다(Peltola 등 1985 Pediatrics 76; 91-96). 그러나, 혈청군 B는 면역원성이 불량하여 주로 IgM 이소타입(isotype)의 일시적인 항체 반응만을 유발하는데 불과하다(Ala'Aldeen D 및 Cartwright K 1996, J. Infect. 33; 153-157). 따라서, 대부분의 온대 지역 국가에서 대다수의 질병의 원인이 되고 있는 혈청군 B 수막균에 대하여 현재 이용가능한 광범위 유효 백신이 존재하지 않는 실정이다. 이것이 특히 문제가 되는데, 그 이유는 혈청형 B 질환의 발병이 유럽, 오스트레일리아와 아메리카에서 대부분 5세 이하의 유아에 있어서 증가하고 있기 때문이다. 혈청군 B 수막균에 대한 백신을 개발하는데는 어려움이 있는데, 이는 폴리사카라이드 캡슐이 인간 신경 세포 유착 분자와의 면역학적 유사성에 기인하여 면역원성이 불량하기 때문이다. 그러므로, 백신 제조 방법은 수막구균 외막의 표면 노출 구조에 대해서 집중되고 있지만, 균주들 사이에서의 이러한 항원의 변이에 의해서 방해 받고 있다.

추가 개발은 표준 함량의 박테리아 막을 구성하는 다수의 단백질을 함유하는 외막 소포(outer membrane vesicle)로 이루어진 백신을 도입하게 하였다. 이들중 한가지는 나이세리아 메닝기티디스 혈청군 B 및 C에 대한 VA-MENGOC-BC?? Cuban 백신이다(Rodriguez 등 1999 Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 94; 433-440). 상기 백신은 쿠바에서 캡슐형 폴리사카라이드 AC 백신을 사용한 백신 접종 프로그램에 의해서는 제거되지 않는 침해성 수막염 질환의 발생을 억제하고자 고안된 것이다. 주된 혈청군은 B와 C로서, VA-MENGOC-BC?? 백신은 나이세리아 메닝기티디스의 혈청군 B 균주에 대하여 추정 백신 효율 83%를 나타내며 발병을 억제하는데 성공을 거두었다(Sierra 등, 1990, In Neissera, Walter Gruyter, 베를린, m. Achman 등(편집) p 129-134, Sierra 등 1991, NIPH Ann 14; 195-210). 상기 백신은 특정 발병에 대해서는 효과적이지만, 유도된 면역 반응은 나이세리아 메닝기티디스의 다른 균주에 대해서는 보호 효과가 없다.

동종 또는 이종 혈청군 B 수막염 균주에 의해 유발된 전염병이 유행하는 동안에 라틴 아메리카에서 수행된 효능 연구 결과, 나이많은 어린이와 성인에서는 어느 정도 효능이 있지만 감염의 위험이 가장 큰 나이 어린 어린이에 있어서는 효능이 현저하게 낮은 것으로 밝혀졌다(Milagres 등 1994, Infect. Immun. 62; 4419-4424). 이와 같은 백신이 영국과 같은 다균주 풍토병이 있는 나라에서는 어느 정도 효능이 있을지 의문이다. 이종 균주에 대한 면역원성에 관한 연구 결과, 특히 유아에 있어서는 단지 제한된 교차 반응성 혈청 살균 활성이 있는 것으로 입증되었다(Tappero 등 1999, JAMA 281; 1520-1527).

스칸디나비아에서 주로 나타나는 전형적인 혈청형 B 분리물을 사용하여 노르웨이에서 제 2 의 외막 소포 백신이 개발되었다(Fredriksen 등 1991, NIPH Ann, 14; 67-80). 상기 백신을 임상 시험한 결과 29 개월 이후에 57%라는 보호 효능을 갖는 것으로 밝혀졌다(Bjune 등 1991, Lancet, 338; 1093-1096).

그러나, 백신에 외막 소포(OMV)를 사용하는 것은 몇가지 문제가 수반된다. 예를 들면, OMV는 독성 리포폴리사카라이드를 함유하며, 균주 특이성이 있거나 가변적으로 발현되는 면역유성 항원을 함유할 수 있다. 외막 소포 제제 백신이 갖는 몇가지 문제점을 극복하는데 사용할 수 있는 몇가지 방법이 제안된 바 있다. WO01/09350호는 이러한 몇가지 문제점을 예컨대 독성을 감소시키고 외막 소포상에 존재하는 항원을 변형시킴으로써 해결하는 방법을 개시하고 있다.

현재 이용가능한 항수막구균 백신과 관련된 다양한 문제점이 있다. 단백질을 외막 백신은 단지 몇몇 균주에 대해서만 특이성이 있고 유효한 경향이 있다. 또한, 폴리사카라이드 백신은 최적 수준 이하의 백신인데, 이는 상기 백신이 특히 혈청군 B에 대해서 불량하고 짧은 면역 반응을 나타내는 경향이 있기 때문이다(Lepow 등 1986; Peltola 1998, Pediatrics 76; 91-96).

나이세리아 감염증은 건강 관리상 상당히 중대한 문제점을 나타냄에도 불구하고, 나이세리아 고노로아의 경우에 이용가능한 백신은 존재하지 않거나, 나이세리아 메닌기티디스의 경우에는, 존재한다 할지라도, 이종 균주에 대해서 효능과 보호 능력이 제한된 백신만을 이용할 수 있다. 따라서, 현재 이용가능한 백신의 효능을 향상시키고 보다 광범위한 균주에 대해 보호할 수 있는 나이세리아 감염증에 대한 탁월한 효과를 갖는 백신을 개발할 필요성이 명백하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 상이한 나이세리아 메닌기티디스 균주로부터 유래된 외막 소포 제제에서 Hsf, TbpA 및 NspA의 발현 수준을 보여주는 쿠마시 염색 겔을 도시한 것이다. 레인 1은 분자량 마커(marker)이고; 레인 2는 캡슐형 폴리사카라이드가 하향 조절된 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포이며; 레인 3은 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향 조절된 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포이고; 레인 4는 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향 조절되고 NspA가 상향 조절된 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포이며; 레인 5는 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향 조절되고 Hsf가 상향 조절된 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포이고; 레인 6은 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향 조절되고 TbpA가 상향 조절된 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포이며; 레인 7은 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향 조절되고 TbpA와 Hsf가 상향 조절된 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포이고; 레인 8은 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향 조절되고 TbpA와 NspA가 상향 조절된 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 항원들의 조합에 관한 것으로서, 본 발명에 사용된 항원들은 면역원성 조성물 또는 백신에 조합된 경우 그들을 별도로 투여한 경우에 항원에 의해서 유발되는 것보다 높은 살균 항체 역가를 유발할 수 있다. 항원의 조합은 상승적으로 살균 항체의 역가를 증가시키는 것이 바람직하다. 살균 항체는 백신 후보체의 효능을 밀접하게 반영하기 때문에, Tbp와 Hsf를 백신내에 조합하면 매우 유효한 백신이 생성될 것이다. 본 발명의 또 다른 장점은 2종의 항원, 즉, Tbp와 Hsf의 조합이 보다 광범위한 균주에 대한 보호를 제공할 수 있다는 것이다.

본 발명은 트랜스페린 결합 단백질과 Hsf류 단백질 또는 이들의 항원성 단편을 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 상기 단백질은 분리된 것이거나, 바람직하게는 적어도 30%, 40%, 더욱 바람직하게는 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 순도로 정제된 것이거나, 다른 항원과의 혼합물중에서 부화된다. 트랜스페린 결합 단백질 및 Hsf류 단백질은 동일하거나 상이한 그램 음성 박테리아 균주로부터 분리되거나 유래될 수 있다.

"분리된"이란 용어는 인위적으로 단백질의 천연 환경으로부터 분리됨을 의미한다. "정제된"이란 용어는, 당해 항원을 본 발명의 면역원성 조성물의 다른 성분과 조합하기 전에 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 순도로 정제함을 의미한다.

"유래된"이란 용어는, 당해 단백질을 엔코딩하는 유전자가 특정 박테리아 균주로부터 유래되거나 당해 단백질이 특정 박테리아 균주로부터 정제됨을 의미한다. 그러므로, "유래된"이란 용어는, 당해 단백질을 엔코딩하는 유전자가 지정된 박테리아로부터 유래될 경우, 별도의 발현 시스템에서 생성된 재조합 단백질을 포함한다.

조합되는 경우, Tbp와 Hsf는 유리하고 바람직하게는 상승작용에 의해 상호 작용하여 살균 활성면에서 보다 높은 (예를 들면 혈청 살균 분석법 또는 SBA로 측정함) 면역 반응을 유도하고, 바람직하게는 각각의 항원에 의해 유도되는 부가 반응 보다 높은 면역 반응을 유도하며, 더욱 바람직하게는 적어도 계수 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 배, 가장 바람직하게는 적어도 10배 이상 높은 면역 반응을 나타내는 것으로 밝혀졌다. Tbp와 Hsf 둘 모두를 백신에 첨가하면, 여러가지 균주에 대해서 보호 효과를 제공하고 강력한 살균 면역 반응을 유도한다는 점에서 현재 이용가능한 백신에 비해 현저한 장점을 나타낼 것이다.

본 발명의 한 구체예는 트랜스페린 결합 단백질과 Hsf류 단백질 둘 모두를 포함하는 면역원성 조성물이다. 면역원성 조성물은 숙주에게 투여했을 때 면역 반응을 일으킬 수 있는 1종 이상의 항원을 포함하는 조성물이다. Tbp와 Hsf류 단백질은 모라셀라 카타랄리스, 헤모필러스 인플루엔자, 보르데텔라, 나이세리아(혈청군 A, B, C, W135 또는 Y 일 수 있는 나이세리아 메닌기티디스 및 나이세리아 고노로아를 포함함)를 비롯한 그램 음성 박테리아 중 어느 하나의 균주 또는 전술한 바와 같은 그램 음성 박테리아의 균주 중 어느 하나로부터 유래될 수 있다. 본 발명은 Tbp와 Hsf류 단백질이 동일하거나 상이한 그램 음성 박테리아 균주로부터 유래된 면역원성 조성물을 포함한다.

트랜스페린 결합 단백질

트랜스페린 결합 단백질(Tbp)은 트랜스페린과 결합하는 그램 음성 박테리아의 외막상의 단백질 또는 단백질 복합체이다. 이러한 부류의 몇가지 단백질은 외막에 고정된 베타-배럴(beta-barrel)을 형성할 것이다. 구조적으로, 트랜스페린 결합 단백질은 TonB 박스 및 플러그 도메인을 지닌 세포내 N-말단 도메인, 짧은 세포내 루프(loop)와 긴 세포외 루프에 의해 연결된 다수의 트랜스멤브레인(transmembrane) 베타 스트랜드를 함유할 수 있다. 다른 예로는, 내재성 막 단백질과의 복합체를 형성하도록 상호작용하는 리포단백질이 있다. 이러한 부류의 단백질의 예로서는 TbpA 및 TbpB를 들 수 있다. Tbp라는 용어는 TbpA와 TbpB 각각의 단백질 또는 혼합된 단백질 및 이들로부터 형성된 복합체를 모두 포함하는 의미이다. 본 발명의 면역원성 조성물에는 적어도 TbpA가 존재하는 것이 바람직하다.

2가지 부류의 TbpB가 구분되어 있는데, 이들은 각각 고분자량인 것과 저분자량이 것이다. 고분자량 형태 및 저분자량 형태의 TbpB(WO93/06861; EP586266)는, 상동성 기준으로 구분가능한 다양한 부류의 TbpA(WO93/06861; EP586266; WO92/03467; US5912336)과 회합한다. 분자량이 동일하다 하더라도, TbpA는 고분자량 부류와 저분자량 부류로서 알려져 있는데, 그들이 고분자량 또는 저분자량 형태의 TbpB와 회합하기 때문이다(Rokbi 등 FEMS Microbiol. Lett. 1001 51, 1993). TbpA와 TbpB는 나이세리아 메닌기티디스(WO93/06861; EP586266; WO92/03467; US5912336), 나이세리아 고노로아(WO92/03467; US5912336), 헤모필러스 인플루엔자(Gray-Owen 등 Infect. Immun. 1995; 63: 1201-1210, Schryvers J. Med. Microbiol. 1989; 29: 121-130; WO95/13370; WO96/40929), A. 플레로뉴모니아, M. 카탈리스(Mathers 등 FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1997; 19: 231; Chen 등 Vaccine 1999; 18: 109; WO97/13785; WO99/52947) 및 P. 헤몰리티카(Cornelissen 등 Infection and Immunity 68; 4725, 2000)를 비롯한 다양한 박테리아에서 발견되는 것으로 알려져 있다. 또한, TbpA와 TbpB는 각각 Tbp1(NMB0461) 및 Tbp2(NMB 0460)으로도 알려져 있다(Cornelissen 등 Infection and Immunity 65; 822, 1997).

본 명세서에서, Tbp는 그램 음성 박테리아, 예를 들면 모락셀라 카타칼리스 및 헤모필러스 인플루엔자, 바람직하게는 나이세리아, 더욱 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스 또는 나이세리아 고노로아, 가장 바람직하게는 혈청형 B의 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 트랜스페린 결합 단백질을 가리킨다. Tbp는 TbpA와 TbpB 둘 모두를 포함하며, 고분자량 형태 및 저분자량 형태의 TbpA와 TbpB도 포함한다. Tbp는 전술한 바와 같은 각각의 단백질과 단백질 복합체 및 기타 트랜스페린과 결합할 수 있는 기타 단백질 또는 이들의 복합체도 포함하는 의미이다.

Tbp가 고분자량 또는 저분자량 형태의 TbpA 또는 TbpB를 언급할 수 있다고 할지라도, 고분자량 및 저분자량 형태의 TbpA 및/또는 TbpB가 본 발명의 면역원성 조성물에 존재하는 것이 바람직하다. 고분자량 및 저분자량 TbpA가 존재하는 것이 가장 바람직하다.

또한, Tbp 대신에 또는 Tbp 이외에도, 다른 철 획득(acquisition) 단백질을 본 발명의 면역원성 조성물에 포함시킬 수 있는 것으로 사료된다. 모락셀라 카타칼리스의 철 획득 단백질에는 TbpA, TbpB, Ton-B 의존성 수용체, CopB(Sethi 등 Infect. Immun. 1997; 65: 3666-3671), HasR, OmpB1 및 LbpB(Du 등, Infect. Immun. 1998; 66: 3656-3665; Mathers 등 FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1997; 19: 231-236; Chen 등 Vaccine 1999; 18: 109-118)이 포함된다. 헤모필러스 인플루엔자의 철 획득 단백질로서는 TbpB, HasR, TonB 의존성 수용체, 헤모글로빈 결합 단백질, HhuA, HgpA, HgbA, HgbB 및 HgbC를 들 수 있다(Cope 등 Infect. Immun. 2000; 68: 4092-4101; Maciver 등 Infect. Immun. 1996; 64: 3703-3712; Jin 등 Infect. Immun. 1996; 64: 3134-3141; Morton 등 J. Gen. Microbiol. 1990; 136: 927-933; Schryvers J. Med. Microbiol. 1989; 29: 121-130). 나이세리아 메닌기티디스의 철 획득 단백질로서는, Tbp1(NMB 0461), Tbp2(NMB 0460), FbpA(NMB 0634), FbpB, BfrA(NMB 1207), BfrB(NMB 1206), LbpA(NMB 1540), LbpB(NMB 1541), GNA2132(NMB 2132)로도 알려져 있는 Lipo28, Sibp(NMB 1882), Ton B 의존성 수용체(NMB 0964 및 NMB 0293) 및 HmbR(Tettelin 등 Science 287; 1809-1815 2000)을 들 수 있다.

본 발명의 면역원성 조성물에 포함된 Tbp 단백질은 WO93/06861호 및 EP586266호에 기재된 바와 같은 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 TbpA 및 TbpB와 상동성을 공유하는 단백질로서, 바람직하게는 WO93/06861호 및 EP586266호에 기재된 바와 같은 TbpA 및 TbpB의 아미노산 서열과 40%, 45%, 50%, 60%, 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 또는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 단백질이다.

Tbp는 몇개의 독특한 영역들을 함유한다. 예를 들면, 나이세리아 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 유래된 TbpA의 경우에, 아미노 말단 186개 아미노산은 내부 구형 도메인을 형성하고, 22 베타 스트랜드가 막을 스패닝(spanning)하여 베타 배럴 구조를 형성한다. 이들은 짧은 세포내 루프 및 긴 세포외 루프에 의해서 연결된다. 세포외 루프 2, 3 및 5는 최고의 서열 가변성을 가지며 루프 5는 표면에 노출된다. 루프 5 및 4는 리간드 결합에 관여하므로, 본 발명의 면역원성 조성물에 포함시키는데 있어서 바람직한 TbpA 단편이다.

본 명세서에 개시된 유전학적 상향조절(upregulation) 기법 이외에도, 트랜스페린 결합 단백질은 그램 음성 박테리아가 후술하는 바와 같은 철 제한 조건하에서 성장할 경우 그램 음성 박테리아에서 상향조절될 수도 있다. 트랜스페린 결합 단백질이 외막 소포에서 상향조절되는 본 발명의 면역원성 조성물에서, 상향조절은 숙주 균주를 철 제한 조건하에서 성장시킴으로써 수행하는 것이 바람직하다. 이러한 과정에 의하면, 가변적 철 조절된 단백질을 상향조절할 수 있는데, 특히 나이세리아 균주에서의 FrpB 및 헤모필러스 인플루엔자에서의 헴/헤모펙신 활용 단백질 C, HgpA 및 HgpB를 들 수 있으며, 이들은 면역 우성으로 될 수 있다. 따라서, 후술하는 바와 같은 단백질의 발현을 하향조절(downregulation)하여(바람직하게는 당해 단백질을 엔코딩하는 유전자를 결실시킴)하여, 본 발명의 면역원성 조성물이 광범위한 균주에 존재하는 항원에 대해서 면역 반응을 일으키도록 하는 것이 유리하다.

Hsf류 단백질

Hsf류 단백질은 WO99/31132호에 개시된 서열을 갖는 나이세리아 메닌기티디스의 Hsf와 상동성을 공유하고, 바람직하게는 WO99/31132호에 개시된 Hsf 아미노산 서열(바람직하게는 SEQ ID NO 2, 4, 6 또는 8)과 40%, 50%, 60%, 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일성을 공유하는 자가전달체(autransporter) 단백질이다. Hsf류 단백질은 표면 노출된 단백질로서, 부착소(adhesin)로서 작용하는 것으로 생각된다. Hsf류 단백질은 다량체 복합체를 형성하며, 감염 및 콜로니화하는 동안에 발현된다.

Hsf류 단백질은 나이세리아 메닌기티디스, 나이세리아 고노로아, 헤모필러스 인플루엔자, 모락셀라 카타랄리스 및 에스케리치아 콜라이를 비롯한 많은 그램 음성 박테리아에서 발견된다. 나이세리아 메닌기티디스에서 발견되는 Hsf류 단백질의 예로서는 Hsf(NhhA-NMB 0992로도 알려져 있음)(WO99/31132), Aida-1류 단백질(paek 등 2000, FEMS Imm. Med. Microbiol. 28; 329), IgA 프로테아제, Ssh-2, Hap(WO99/55873), NadA(J. Exp. Med. 2002 195; 1445), UspA2 및 Tsh를 들 수 있다. 모락셀라 카타랄리스에서 발견되는 Hsf류 단백질의 예로서는, Hsf, UspA1(WO93/03761), UspA2(WO93/03761), 외막 에스테라제 및 YtfN을 들 수 있다. 헤모필러스 인플루엔자에서 발견되는 Hsf류 단백질의 예로서는, Hia/Hsf(St Geme 등 J. Bacteriol. 2000 182:6005-6013), Hap, IgA1 프로테아제, HMW1, HMW2(Barenkamp 등 Infect. Immun. 1992 60; 1302-1313), YadA, YadAc 및 YtfN(Hendrixson 등 Mol Cell 1998; 2: 941-850; St Geme 등 Mol Microbiol. 1994; 14: 217-233; Grass 및 St Geme Infect. Immunol. 2001; 69; 307-314; St Geme 및 Cutter J. Bacteriology 2000; 182; 6005-6013)을 들 수 있다. 에스케리치아 콜라이에서 발견되는 Hsf류 단백질의 예로서는 Hsf, Hia 및 Hap를 들 수 있다.

Hsf는 자가전달체 단백질에 공통적인 구조를 갖는다. 예를 들면, 나이세리아 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 유래된 Hsf는 단백질(아미노산 52-479)의 아미노말단에 위치한 헤드(head) 영역으로서, 표면 노출되고 가변 영역(아미노산 52-106, 121-124, 191-210 및 230-234)를 함유하는 헤드 영역과, 넥(neck) 영역(아미노산 480-509), 소수성 알파나선 영역(아미노산 518-529) 및 4개의 트랜스멤브레인 스트랜드가 외막을 스캐닝하는 고정 도메인(아미노산 539-591)으로 이루어진다.

Hsf는 아미노산 1-51을 구성하는 신호 서열을 포함하는 전장(full length) 펩티드를 의미할 수 있다. 또한, 본 발명은 폴리펩티드가 Hsf의 성숙한 형태로 구성되도록 신호 서열이 제거되어 있는 Hsf도 포함한다. 기타 바람직한 Hsf의 형태는 WO01/55182호에 개시된 단백질의 가변 영역이 결실되도록 트렁케이팅(truncation)된 것일 수 있다. 바람직한 변이체로서는, WO01/55182호에 정의된 바와 같은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 가변 영역이 결실된 것을 들 수 있다. 바람직한 변이체는 아미노산 서열 52 내지 237 사이에서 잔기들을 결실한 것, 또는 아미노산 54 내지 237에서 결실한 것, 더욱 바람직하게는 아미노산 52 내지 133 사이에서 잔기들을 결실한 것 또는 아미노산 55 내지 133에서 결실한 것이다. 트렁케이팅된 변이체는 Hsf의 아미노산 1 내지 51로부터 신호 서열을 포함하거나 제외한 것일 수 있다. 상기 서열 및 이하에 기재한 서열은 N 말단과 C 말단중 하나 또는 둘 모두에서 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 또는 15개의 아미노산 만큼 트렁케이팅되거나 연장된 것일 수 있다.

Hsf가 서브유닛(subunit) 백신에 사용되는 경우, 가용성 패신저(passenger) 도메인의 일부를 사용하는 것이 바람직하는데, 그 예로는 아미노산 52 내지 479의 완전 도메인, 가장 바람직하게는 이의 보존부, 예컨대 아미노산 134 내지 479를 들 수 있다.

전장 Tbp 및/또는 Hsf류 단백질(특히, TbpA 및 Hsf), 상기 단백질의 천연 변이체 또는 N 및/또는 C 말단으로부터 60개 이하의 아미노산이 없는 전장 서열을 사용하는 것이 바람직하지만, Tbp 및/또는 Hsf류 단백질의 항원성 단편도 본 발명의 면역원성 조성물에 포함된다. 이들은 Tbp 및 Hsf류 단백질, 바람직하게는 Tbp 또는 Hsf의 아미노산으로부터 취한 10개 이상의 아미노산, 바람직하게는 20개 이상의 아미노산, 더욱 바람직하게는 30개 이상의 아미노산, 보다 더 바람직하게는 40개 이상의 아미노산, 가장 바람직하게는 50개 이상의 아미노산을 함유하는 단편이다. 또한, 항원성 단편은 나이세리아 메닌기티디스 Tbp 또는 Hsf류 단백질, 바람직하게는 TbpA 또는 Hsf에 대하여 생성된 항체와 면역학적으로 반응하는 단편, 또는 나이세리아 메닌기티디스로 포유류 숙주를 감염시켜서 생성한 항체와 면역학적으로 반응하는 단편을 가리킨다. 또한, 항원성 단편에는, Tbp 또는 Hsf류 단백질에 대해, 바람직하게는 이들이 유래되는 그램 음성 박테리아의 TbpA 또는 Hsf에 대하여 특이성이 있는 면역 반응을 나타내는 단편도 포함된다. 바람직하게는, 항원성 단편은 그것이 유래되는 박테리아로부터 감염에 대해, 바람직하게는 나이세리아 감염에 대해 보호성이 있는 것이 바람직하고, 나이세리아 메닌기티디스 감염에 대하여 보호성이 있는 것이 더욱 바람직하며, 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B 감염에 대하여 보호성이 있는 것이 가장 바람직하다.

바람직한 TbpA 단편로서는, TbpA의 세포의 루프를 들 수 있다. 나이세리아 메닌기티디스 균주 H44/86으로부터 유래된 TbpA의 서열을 사용할 경우, 상기 루프는 루프 1의 경우 아미노산 200-202에 해당하고, 루프 2의 경우 아미노산 226-303에 해당하며, 루프 3의 경우 아미노산 348-395에 해당하고, 루프 4의 경우 아미노산 438-471에 해당하며, 루프 5의 경우 아미노산 512-576에 해당하고, 루프 6의 경우 아미노산 609-625에 해당하며, 루프 7의 경우 아미노산 661-671에 해당하고, 루프 8의 경우 아미노산 707-723에 해당하며, 루프 9의 경우 아미노산 769-790에 해당하고, 루프 10의 경우 아미노산 814-844에 해당하며, 루프 11의 경우 아미노산 872-903에 해당한다. 서열 정렬 이후에, 다른 Tbp 단백질내의 상응하는 서열도 바람직한 단편을 구성한다. 가장 바람직한 단편로서는, Tbp의 루프 2, 루프 3, 루프 4 또는 루프 5를 포함하는 아미노산 서열을 들 수 있다.

전술한 바와 같은 Tbp 또는 TbpA 단백질의 바람직한 단편은 나이세리아 메닌기티디스에 관한 것이지만, 당업자라면 서열 상동성에 준하여 상기 모든 그램 음성 균주로부터의 Tbp 또는 TbpA에서 동등한 펩티드를 찾아낼 수 있을 것이며, 이들도 역시 본 발명의 단편에 포함된다.

Hsf의 바람직한 단편은 Hsf의 전체 헤드 영역으로서, 바람직하게는 Hsf의 아미노산 52-473을 함유한다. Hsf의 또 다른 바람직한 단편에는 아미노산 52-62, 76-93, 116-134, 147-157, 157-175, 199-211, 230-252, 252-270, 284-306, 328-338, 362-391, 408-418, 430-440 및 469-479를 포함하는 헤드의 표면 노출된 영역을 들 수 있다. 본 발명의 OMV 제제에 사용하는데 가장 바람직한 단편은 134-591이며, 본 발명의 서브유닛 조성물에 사용되는 단편은 134-479이다.

전술한 Hsf류 단백질 또는 Hsf 단백질의 바람직한 단편은 나이세리아 메닌기티디스에 관한 것이지만, 당업자라면 서열 상동성에 준하여 상기 모든 그램 음성 균주로부터의 Hsf류 또는 Hsf 단백질에서 동등한 펩티드를 찾아낼 수 있을 것이며, 이들도 역시 본 발명의 단편에 포함된다.

또한, 본 발명은 Tbp 및 hsf 류 단백질, 바람직하게는 TbpA와 Hsf의 융합 단백질에 관한 것이다. 이들은 Tbp와 Hsf류 단백질, 바람직하게는 TbpA와 Hsf 또는 동일한 폴리펩티드로 조합된 이들의 단편을 조합한 것일 수 있다. 다른 측면에서, 본 발명은 Tbp와 Hsf류 단백질, 바람직하게는 TbpA와 Hsf 둘 모두 또는 이들의 단편이 본 발명의 조성물에 존재한다는 조건하에서, Tbp와 Hsf류 단백질, 바람직하게는 TbpA와 Hsf 또는 이들의 단편의 개개의 융합 단백질에 관한 것이다. TbpA 또는 Hsf는 예컨대 β -갈락토시다제, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 에피토프 태그(epitope tag), 예컨대 FLAG, myc tag, 폴리히스티딘, 또는 바이러스/박테리아 표면 단백질, 예컨대 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌, 과산화 독소, 디프테리아 독소 또는 CRM 197과 융합 단백질을 형성할 수 있다.

면역원성 조성물내로 도입시킬 수 있는 분리된 트랜스페린 결합 단백질은 당분야에 잘 알려져 있다(WO0025811). 이들은 박테리아 숙주에서 발현시키고 세정제(예를 들면 2% Elugent)에 의해 추출하여, 친화 크로마토그래피에 의해서 또는 당업자에게 잘 알려진 표준 컬럼 크로마토그래피 기법(Oakhill 등 Biochem J. 2002 364; 613-6)을 사용하여 정제할 수 있다. 유사하게는, Hsf의 분리도 당업자에게 잘 알려진 기법을 사용하여 달성할 수 있다. 재조합 Hsf는 이. 콜라이 또는 기타 박테리아 균주에서 발현시킬 수 있다. 단백질은 친화 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다. 이것은 태그를 Hsf 서열내로 도입시킨 경우에 통상적인 절차이다.

본 명세서에서, "포함하는", "포함한다" 및 "포함하고"라는 용어는 경우에 따라서 "이루어진", "이루어진다" 및 "이루어지고"라는 용어와 호환적인 것이다.

백신 조합물

본 발명은, 그램 음성 박테리아에 대해서 높은 살균 활성을 유도시키는데 유효한 Tbp와 Hsf류 단백질을 포함하는 항원들의 조합물에 관한 것이다. 본 발명의 항원성 조성물은 Tbp와 Hsf 이외의 항원을 포함할 수 있다. 본 발명의 항원성 조성물은 그램 음성 박테리아로부터, 바람직하게는 나이세리아로부터, 더욱 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 다른 단백질 항원을 포함할 수 있다.

나이세리아 메닌기티디스

나이세리아 메닌기티디스에 대해서, 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는 Hsf 및 TbpA를 포함한다. OMV 제제에 있어서, Hsf와 TbpA는 OMV가 유래되는 나이세리아 메닌기티디스 균주에서 상향조절되는 것이 바람직하다. TbpA는 고분자량 형태 또는 저분자량 형태로 존재할 수 있으며, 고분자량 형태와 저분자량 형태 둘 모두를 나타내는 것이 바람직하다. Hsf는 바람직하게는 OMV에서 막 삽입된 트렁케이트, 바람직하게는 아미노산 134-591로서 존재한다. 또한, Hsf는 서브유닛 백신으로서, 바람직하게는 패신저 도메인(아미노산 52-479)으로서, 가장 바람직하게는 아미노산 134-479의 패신저 도메인 트렁케이트로서 존재할 수 있다.

상기 조성물에 추가의 항원이 첨가될 수 있다(또는 OMV에서 제공되는 경우 상향조절될 수 있다). 이와 같은 항원의 예로서는 NspA(WO96/29412), Hap(PCT/EP99/02766), PorA, PorB, OMP85(D15로도 알려져 있음)(WO00/23595), PilQ(PCT/EP99/03603), PldA(PCT/EP99/06718), FrpB(WO96/31618, SEQ ID NO 38), FrpA(NMB 0585) 또는 FrpC 또는 적어도 30, 50, 100, 500, 750개의 아미노산의 둘 모두 공통된 보존부(WO92/01460), LbpA 및/또는 LbpB(PCT/EP98/05117; Schryvers 등 Med. Microbiol. 1999 32: 1117), FhaB(WO98/02547 SEQ ID NO 38 [누클레오타이드 3083-9025]), HasR(PCT/EP99/05989), lipo02(PCT/EP99/08315), MltA(WO99/57280)(NMB0033) 및 ctrA(PCT/EP00/00135)를 들 수 있다.

본 발명의 면역원성 조성물에서 바람직한 항원의 조합으로서 Tbp와 Hsf류 단백질 및 FhaB를 포함하는 조합; Tbp와 Hsf류 단백질 및 PilQ를 포함하는 조합; Tbp와 Hsf류 단백질 및 NspA를 포함하는 조합; Tbp와 Hsf류 단백질 및 FrpC를 포함하는 조합; 더욱 바람직하게는 Tbp와 Hsf류 단백질 및 Hap를 포함하는 조합; Tbp와 Hsf류 단백질 및 FrpA/C를 포함하는 조합; Tbp와 Hsf류 단백질 및 LpbB를 포함하는 조합; Tbp와 Hsf류 단백질 및 D15를 포함하는 조합을 들 수 있다. D15는 외막 소포제제의 일부분으로서 혼입시키는 것이 가장 바람직하다.

모락셀라 카타랄리스 항원

모락셀라 카타랄리스로부터 유래된 다음과 같은 단백질 중 하나 이상을 본 발명의 면역원성 조성물내로 혼입시키는 것이 바람직하다(TbpA와 Hsf류 단백질이 모락셀라 카타랄리스로부터 유래되는 것이 바람직한 경우): OMP106(WO97/41731 및 WO96/34960), HasR(PCT/EP99/03824), PilQ(PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06(GB9917977.2), lipo10(GB9918208.1), lipo11(GB 9918302.2), lipo18(GB9918038.2), P6(PCT/EP99/03038), ompCD, CopB(Helminen ME 등(1993) Infect. Immun. 61:2003-2010), D15(PCT/EP99/03822), Omp1A1 (PCT/EP99/06781), Hly3(PCT/EP99/03257), LbpA 및 LpbB(WO98/55606), TbpA 및 TbpB(WO97/13785 및 WO97/32980), OmpE, UspA1 및 UspA2(WO93/03761) 및 Omp21.

헤모필러스 인플루엔자 항원

헤모필러스 인플루엔자로부터 유래된 다음과 같은 단백질중 하나 이상을 본 발명의 면역원성 조성물에 포함시키는 것이 바람직하다(TbpA와 Hsf류 단백질이 헤모필러스 인플루엔자로부터 유래되는 것이 바람직할 경우에): D15(WO94/12641), P6(EP281673), TbpA, TbpB, P2, P5(WO94/26304), OMP26(WO97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hin47 및 Hif.

본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 항원성 조성물과 바이러스 또는 그램 양성 박테리아와 관련된 질병을 비롯하여 특정한 질병 상태에 대해 유리하게 사용되는 기타 항원을 포함하는 백신 조성물이다.

한 가지 바람직한 조합에 있어서, 본 발명의 Tbp와 Hsf류 단백질을 포함하는 항원성 조성물은 단순한 것이거나 단백질 담체에 컨주게이션된 것일 수 있는, 수막구균 캡슐형 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드 A, C, Y 또는 W-135중 1, 2, 3 또는 바람직하게는 4개 모두를 사용하여 제형화된다. 이와 같이 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 TbpA와 Hsf를 함유하는 백신은 전반적인 수막구균 백신으로서 유리하게 사용될 수 있다. 컨주게이션된 수막구균 캡슐형 폴리사카라이드 C, C 및 Y 또는 A 및 C를 포함시키는 것이 바람직하다.

다른 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 Tbp와 Hsf를 포함하는 항원성 조성물, 바람직하게는 단순한 바와 같은 단순한 또는 컨주게이션된 수막구균 캡슐형 폴리사카라이드(또는 올리고사카라이드) A, C, Y 또는 W-135중 1, 2, 3 또는 4개 모두를 사용하여 제형화된 항원성 조성물은, 컨주게이션된 헤모필러스 인플루엔자 b 캡슐형 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드 및/또는 하나 이상의 단순한 또는 컨주게이션된 폐렴구균 캡슐형 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드와 함께 제형화된다. 경우에 따라서, 상기 백신은 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 감염에 대하여 숙주를 보호할 수 있는 1종 이상의 단백질 항원을 또한 함유할 수 있다. 이와 같은 백신은 메닌기티디스/스트렙토코커스 폐렴 백신으로서 유리하게 사용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 Tbp와 Hsf류 단백질을 포함하는 면역원성 조성물은 1종 이상의 나이세리아 메닌기티디스, 헤모필러스 인플루엔자 b, 스트렙토코커스 뉴모니아, 그룹 A 스트렙토코커스(*Streptococci*), 그룹 B 스트렙토코커스, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)로부터 유래된 캡슐형 폴리사카라이드와 함께 제형화된다. 바람직한 구체예에서, 면역원성 조성물은 나이세리아 메닌기티디스의 혈청군 A, C, W-135 및 Y 중 하나 이상으로부터 유래된 캡슐형 폴리사카라이드를 포함한다. 또 다른 바람직한 구체예는 스트렙토코커스 뉴모니아로부터 유래된 캡슐형 폴리사카라이드를 포함한다. 폐렴구균 캡슐형 폴리사카라이드 항원은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F(가장 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F)중에서 선택되는 것이 바람직하다. 또 다른 바람직한 구체예는 헤모필러스 인플루엔자의 PRP 캡슐형 폴리사카라이드를 함유한다. 또 다른 바람직한 구체예는 스태필로코커스 아우레우스의 타입 5, 타입 8 또는 336 캡슐형 폴리사카라이드를 함유한다. 또 다른 바람직한 구체예는 스태필로코커스 에피더미디스의 타입 I, 타입 II 또는 타입 III 캡슐형 폴리사카라이드를 함유한다. 또 다른 바람직한 구체예는 그룹 B 스트렙토코커스의 타입 Ia, 타입 Ic, 타입 II 또는 타입 III 캡슐형 폴리사카라이드를 함유한다. 또 다른 바람직한 구체예는 그룹 A 스트렙토코커스의 캡슐형 폴리사카라이드를 함유하며, 바람직하게는 하나 이상의 M 단백질, 더욱 바람직하게는 여러가지 유형의 M 단백질을 추가로 포함한다.

바람직한 폐렴구균 단백질 항원은 폐렴구균의 외면상에 노출된 폐렴구균 단백질(폐렴구균의 생존 사이클중 일부 또는 전부에 걸쳐서 숙주의 면역 체계에 의해 인식가능함), 또는 폐렴구균에 의해 분비 또는 방출되는 단백질이다. 상기 단백질은 스태필로코커스 뉴모니아의 독소, 부착소, 2-성분 신호 전달물질 또는 지질단백질, 또는 이들의 단편인 것이 가장 바람직하다. 특히 바람직한 단백질로서는 다음과 같은 것들을 들 수 있으나, 이들에 국한되는 것은 아니다: 뉴모라이신(바람직하게는 화학적 처리 또는 돌연변이에 의해 독소 제거된 것)[Mitchell 등, *Nucleic Acids Res.* 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2", Mitchell 등. *Biochim Biophys Acta* 1989 Jan 23; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties", WO96/05859 (A, Cyanamid), WO90/06951(Paton 등), WO99/03884(NAVA)]; PspA 및 이것의 트랜스멤브레인 결실 변이체(US5804193-Briles 등); PspC 및 이것의 트랜스멤브레인 결실 변이체(WO97/09994-Briles 등); PsaA 및 이것의 트랜스멤브레인 결실 변이체(Berry & Paton, *Infect Immun* 1996 Dec; 64(12): 5252-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); 폐렴구균 콜린 결합 단백질 및 이것의 트랜스멤브레인 결실 변이체; CbpA 및 이것의 트랜스멤브레인 결실 변이체(WO97/41151; WO99/51266); 글리세르알데히드-3-포스페이트-데하이드로게나제(*Infect Immun.* 1996 64:3544); HSP70(WO96/40928); PcpA(Sanchez-Beato 등 *FEMS Microbiol Kett* 1998, 164:207-14); M류 단백질(EP0837130) 및 부착소 18627(EP0834568). 또 다른 바람직한 폐렴구균 단백질 항원은 WO98/18931호에 개시된 것, 특히 WO98/18930호 및 PCT/US99/30390호에 개시된 것이다.

백신은 경우에 따라서, 디프테리아, 파상풍 및 보르데텔라 페르투스(*Bordetella pertussis*) 감염증 하나 이상에 대해 보호 효과를 제공하는 항원을 포함할 수 있다. 페르투스 성분은 사멸된 전세포 보르데텔라 페르투스(Pw) 또는 무세포 페르투스(Pa)성분일 수 있으며, 이들은 PT, FHA 및 69kDa 퍼택틴중에서 하나 이상의 항원(바람직하게는 3개 모두의 항원)을 포함한다. 통상, 디프테리아와 파상풍에 대하여 보호를 제공하는 항원은 디프테리아 독소 및 파상풍 독소이다. 독소들은 화학적으로 불활성화된 독소 또는 점 돌연변이의 도입에 의해서 불활성화된 독소일 수 있다.

또한, 상기 백신은 경우에 따라서 형태 지정이 불가능한 헤모필러스 인플루엔자에 대하여 숙주를 보호할 수 있는 하나 이상의 항원, RSV 및/또는 인플루엔자 바이러스에 대하여 숙주를 보호할 수 있는 하나 이상의 항원을 더 포함할 수 있다. 이와 같은 백신은 전반적인 중이염 백신으로서 유리하게 사용될 수 있다.

바람직한 형태 비지정 헤모필러스 인플루엔자 단백질 항원로서는 핏브린 단백질(US 5766608) 및 이로부터 유래된 펩티드를 포함하는 융합물(예: LB1 융합물)(US5843464-Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, 단백질 D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap 및 D15를 들 수 있다.

바람직한 인플루엔자 바이러스 항원로서는, 전바이러스, 생바이러스 또는 불활성화된 바이러스, 난(egg) 또는 MDCK 세포 또는 Vero 세포에서 성장시킨 스플릿 인플루엔자 바이러스, 또는 전플루 바이로솜(R. Gluck, *Vaccine*, 1992, 10, 915-920 참조) 또는 이들의 정제되거나 재조합된 단백질, 예컨대 HA, NP, NA 또는 M 단백질 또는 이들의 조합물을 들 수 있다.

바람직한 RSV(호흡기 합포체 바이러스) 항원으로서는 F 당단백질, G 당단백질, HN 단백질, M 단백질 또는 이들의 유도체를 들 수 있다.

본 발명의 항원성 조성물은 단일종의 박테리아로부터 유도된 1종 이상의 캡슐형 폴리사카라이드를 포함할 수 있다. 항원성 조성물은 하나 이상의 박테리아종으로부터 유래된 캡슐형 폴리사카라이드를 또한 포함할 수도 있다.

이와 같은 캡슐형 폴리사카라이드는 비컨쥬게이션된 것 또는 과상풍 독소, 과상풍 독소 단편 C, 디프테리아 독소, CRM197, 뉴모라이신, 단백질 D(US634224), TbpA 또는 Hsf와 같은 담체 단백질에 컨쥬게이션된 것일 수 있다. 본 발명의 한 구체예는 TbpA 및 Hsf에 컨쥬게이션된 별도의 캡슐형 폴리사카라이드를 함유한다.

폴리사카라이드 컨쥬게이트는 임의의 공지된 커플링 기법에 의해 제조할 수 있다. 예를 들면, 폴리사카라이드를 티오에테르 결합을 통해 커플링시킬 수 있다. 이러한 컨쥬게이션 방법은 폴리사카라이드가 1-시아노-4-디메틸아미노 피리딘늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)에 의해 활성화되어 시아네이트 에스테르를 형성하는 것에 근거한 것이다. 이와 같이 활성화된 폴리사카라이드는 스페이서(spacer) 기를 통해 또는 직접 담체 단백질상의 아미노기에 커플링시킬 수 있다. 시아네이트 에스테르는 핵산 디아민과 커플링시키는 것이 바람직하고, 상기 아미도 유도체화된 폴리사카라이드는 티오에테르 결합의 형성을 수반하는 헤테로연결 화학 기법을 사용하여 담체에 컨쥬게이션시키는 것이 바람직하다. 이와 같은 컨쥬게이트가 유니폼드 서비스 유니버시티의 PCT 국제 공개 특허 출원 WO93/15760호에 개시되어 있다.

또한, 컨쥬게이트는 US 4365170호(Jennings) 및 US 4673574호(Anderson)에 개시된 바와 같은 직접 환원 아민화 방법에 의해서 제조할 수 있다. 다른 방법들이 EP-0-161-188, EP-208375 및 EP-0477508호에 개시되어 있다.

또 다른 방법은 아디프산 히드라이드(ADH)에 의해서 유도체화된 시아노겐 브로마이드 활성화 폴리사카라이드를 카르보다이미드 축합반응에 의해서 단백질 담체에 커플링시키는 것을 포함한다(Chu C. 등 Infect. Immunity, 1983 245 256).

외막 소포를 포함하는 항원성 조성물

본 발명의 바람직한 양태는 OMV에서 Tbp와 Hsf가 상향조절 또는 과잉발현되는 것이다. 그램 음성 박테리아는 2개의 연속하는 층으로 된 막 구조, 즉, 세포질 막과 외막에 의해 외부 매질로부터 분리된다. 그램 음성 박테리아의 외막은 동적이며 환경 조건에 따라서 급격한 형태학적 전환을 경험할 수 있다. 이러한 징후중에서, 외막 소포 또는 수포(bleb)의 형성이 다수의 그램 음성 박테리아에서 연구되고 문서화되었다(Zhou 등 1998). 이들 중에서, 수포를 생성하는 것으로 보고된 박테리아 병원체의 포괄적 목록을 살펴보면 다음과 같다: 보르데텔라 페르투스스, 보렐리아 부르그도르페리, 브루셀라 펠리텐시스, 브루셀라 오비스, 클라미디아 시타시, 클라미디아 트라코마티스, 에스케리치아 콜라이, 헤모필러스 인플루엔자, 레지오넬라 뉴모필라, 나이세리아 고노로아, 나이세리아 메닝기티디스, 슈도모나스 에루기노사 및 에리시나 엔테로콜리티카. OMV/수포의 생성의 원인이 되는 생화학적 메커니즘이 완전히 파악된 것은 아니지만, 이러한 외막 소포는 그 천연의 입체 형태에서 외막 단백질 제제를 분리시키기 위한 강력한 방법이 되기 때문에 면밀하게 연구되고 있다. 이러한 맥락에서, 외막 제제를 사용하는 방법은 나이세리아, 모락셀라 카탈리스, 헤모필러스 인플루엔자, 슈도모나스 에루기노사 및 클라미디아에 대한 백신을 개발하는데 있어서 중요성을 갖는다. 또한, 외막 수포는 종내 변형체에 대한 확장된 보호 효과를 제공할 가능성이 있는 다수의 단백질성 및 비 단백질성 항원을 조합시킨다.

본 발명의 외막 소포는 상향조절된 Tbp 및 Hsf류 단백질(바람직하게는 TbpA 와 Hsf)를 가질 것이다. 이는 경우에 따라서 단일의 그램 음성 박테리아, 바람직하게는 나이세리아 균주로부터 유래된 외막 소포에서 상향조절된 Hsf류 단백질과 Tbp를 지님으로써 달성된다. Hsf류 단백질과 Tbp는 상이한 그램 음성 박테리아 균주, 바람직하게는 나이세리아 균주로부터 유래된 외막 소포에서 별도로 상향조절될 수 있다. 바람직한 구체예에서, Tbp 와 Hsf류 단백질, 더욱 바람직하게는 TbpA 와 Hsf가 상향조절되는 상이한 나이세리아 균주는, 각각 나이세리아 메닝기티디스의 면역유형 L2와 L3 또는 L3과 L2가 될 것이다.

나이세리아 균주로부터 수포 제제를 제조하는 것은 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해서 수행할 수 있다. 바람직한 방법으로는, EP 301992, US5,597,572, EP 11243 또는 US 4,271,147호, Frederikson 등 (NIPH Annals [1991], 14: 67-80), Zollinger 등 (J. Clin. Invest. [1979], 63: 836-848), Saunders 등 (Infect. Immun. [1999], 67: 113-119), Drabick 등 (Vaccine [2000], 18: 160-172) 또는 WO01/09350(실시예 8)을 사용할 수 있다. 일반적으로, OMV는 세정제, 바람직하게는 데옥시콜레이트를 사용하여 추출하며, 경우에 따라서 핵산을 효소 반응에 의해 제거한다. 정제는 초원심 분리에 의해 수행하고, 경우에 따라서는 후속하여 크기 배제 크로마토그래피를 수행한다. 본 발명의 2종 이상의 수포가 포함되는 경우, 이들을 단일의 용기내에서 배합하여 본 발명의 다가 제제를 제조할 수 있다(그러나, 본 발명의 상이한 수포가 별도의 용기내의 분리된 조성물인 경우에도 숙주에 동시에(시행자로의 동일한 방문) 투여된다면 제제는 다가 제제인 것으로 간주됨). OMV 제제는 통상 0.2 μm 필터를 통해서 여과하여 멸균하며, 수포 제제를 안정화시키는 것으로 알려진 수크로오스 용액(예: 3%)에 보관하는 것이 바람직하다.

외막 소포 제제 내에서의 Tbp와 Hsf류 단백질을 상향조절하는 것은 OMV 제제가 유래되는 그램 음성 박테리아내로 유전자의 엑스트라 카피(extra copy)를 삽입하는 방식으로 달성할 수 있다. 다른 방법으로, 유전자의 프로모터(promotor)가 OMV 제제가 유래되는 박테리아 균주에서의 보다 강력한 프로모터로 교환될 수도 있다. 이와 같은 기법이 WO01/09350호에 개시되어 있다. 단백질을 상향조절하면, 변형시키지 않은 나이세리아 메닝기티디스(예를 들면 균주 H44/76)으로부터 유래된 OMV에 존재하는 단백질의 수준에 비해서 보다 높은 수준의 단백질이 OMV에 존재하게 된다. 수준은 적어도 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10 또는 20배 더 많은 것이 바람직하다.

LPS를 OMV내의 추가의 항원으로 하고자 하는 경우에는, 저농도의 추출 세정제(예를 들면 데옥시콜레이트 또는 DOC)를 OMV 제조 방법에 사용함으로써 고수준의 결합된 LPS를 보존함과 동시에 특히 독성이 있고 결합력이 약한

LPS를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 사용된 DOC의 농도는 바람직하게는 0 내지 0.5% DOC, 더욱 바람직하게는 0.02% 내지 0.4%, 0.03% 내지 0.3%, 0.04% 내지 0.2%, 0.05% 내지 0.15%, 0.05% 내지 0.2% DOC, 가장 바람직하게는 대략 또는 정확히 0.1% DOC이다.

"보다 강력한 프로모터 서열"이라 함은 관심의 항원을 엔코딩하는 유전자에 대한 전사를 증가시키는 조절 요소를 의미한다.

"발현의 상향조절"이라 함은 변형되지 않은(즉, 천연의) 수포의 발현에 비해서, 당해 항원의 발현을 증가시키는 임의의 수단을 의미한다. "상향조절"의 양은 특정한 항원에 좌우되지만, 수포의 막 보전성을 파괴할 정도의 양을 초과하지 않는다. 항원의 상향조절은 변형되지 않은 수포의 발현에 비해서 적어도 10% 이상 더 높은 발현을 의미한다. 발현이 50% 이상 더 높은 것이 바람직하다. 100%(2배) 이상 더 높은 것이 더욱 바람직하다. 3, 4, 5, 7, 10, 20 배 이상 더 높은 것이 가장 바람직하다. 수포가 철 제한 조건에서(예를 들면 철 킬레이터의 존재하에서) 성장된 박테리아로부터 유래되었을 때 발현 수준을 분석하는 것이 바람직하다. 다른 예로서 또는 또 다른 예로서, 발현의 상향조절은 발현이 특히 TbpA, TbpB, LbpA 및 LbpB의 경우에 대사 또는 영양상의 변화에 좌우되지 않도록 만든다는 것을 의미할 수도 있다.

좀 더 명확히 설명하자면, "박테리아 균주를 공학처리하여 상기 항원을 덜 생성한다" 또는 "하향조절한다"는 것은 관심의 항원의 발현(또는 기능성 유전자 생성물의 발현)을, 바람직하게는 결실을 통해서, 변형되지 않은 수포의 발현에 비해서 10% 이상 낮게 감소시키도록 변형되지 않은(즉, 천연의) 수포의 발현에 비해서 감소시키는 임의의 수단을 의미한다. 발현이 50% 이상 더 낮은 것이 바람직하고, 전혀 존재하지 않는 것이 가장 바람직하다. 하향조절된 단백질이 효소 또는 기능성 단백질인 경우에, 하향조절은 하나 이상의 돌연변이를 도입시켜서 효소 또는 기능적 활성을 10%, 20%, 50%, 80% 또는 바람직하게는 100% 감소시킴으로써 달성할 수 있다.

나이세리아 단백질의 발현을 조정하는데 필요한 공학처리 단계는 당업자에게 알려진 다양한 방식으로 수행할 수 있다. 예를 들면, 서열(예: 프로모터 또는 오픈 리딩 프레임)을 삽입하고, 프로모터/유전자를 트랜스포손(transposon) 삽입 기술에 의해 파괴시킬 수 있다. 예컨대, 유전자의 발현을 상향조절하기 위해서, 강력한 프로모터를 유전자 개시 코돈의 2 kb 이하의 업스트림(더욱 바람직하게는 200 내지 600 bp의 업스트림, 가장 바람직하게는 400 bp의 업스트림)에 트랜스포손을 통해서 삽입할 수 있다. 점 돌연변이 또는 결실을 사용할 수도 있다 (특히, 유전자 발현의 하향조절인 경우).

그러나, 이와 같은 방법들은 불안정하거나 불확실할 수 있으므로, 공학처리 단계는 상동 재조합 과정을 통해서 수행하는 것이 바람직하다. 이러한 과정은 박테리아 염색체상의 30개 이상의 뉴클레오티드로 된 서열(재조합원성 영역(recombinogenic region))과 균주내에서 형질전환된 벡터상의 30개 이상의 뉴클레오티드로 된 서열(제 2 재조합원성 영역) 사이에서 일어난다. 영역은 40-1000개의 뉴클레오티드로 되는 것이 바람직하고, 100-800개의 뉴클레오티드로 되는 것이 더욱 바람직하며, 500개의 뉴클레오티드로 되는 것이 가장 바람직하다. 이러한 재조합원성 영역들은 매우 엄격한 조건하에서 서로 하이브리드화될 수 있도록 충분히 유사하여야 한다.

유전자 변형 과정을 실시하는데 사용되는 방법(예를 들면 재조합 과정에 의한 유전자의 상향조절 또는 하향조절 및 나이세리아 게놈내로의 또 다른 유전자 서열의 도입)은 WO01/09350호에 개시되어 있다. 나이세리아에 통합될 수 있는 전형적인 강력한 프로모터로서는 porA, porB, lgtF, Opa, p110, lst 및 hpuAB가 있다. PorA와 PorB가 구성적인 강력한 프로모터로서 바람직한 성분이다. PorB 프로모터 활성은 PorB의 개시 코돈의 업스트림에 있는 뉴클레오티드 -1 내지 -250에 해당하는 단편내에 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

철 제한 조건하의 성장에 의한 철 획득 단백질의 발현의 상향조절

본 발명의 외막 소포 제제에서 트랜스페린 결합 단백질을 상향조절하는 것은, 철 제한 조건하에서 성장된 그램 음성 박테리아의 모체 균주로부터 외막 소포를 분리시킴으로써 수행하는 것이 바람직하다. 배지내에 철의 농도가 낮은 경우에는 TbpA와 TbpB를 비롯한 철 획득에 관련된 단백질의 발현이 증가한다. 따라서, 이러한 단백질의 발현은, 관련된 유전자를 재조합에 의해, 예를 들면 보다 강력한 프로모터를 삽입하거나 유전자의 또 다른 복제물을 삽입함으로써 변형시킬 필요없이, 상향조절된다. 또한, 본 발명은 유전자가 재조합에 의해 변형된 것인 경우, 철 제한 조건하에서 성장에 의해 트랜스페린 결합 단백질을 상향조절하는 것도 포함한다.

철 제한은 철 킬레이터를 배지에 첨가함으로써 수행한다. 적합한 철 킬레이터로서는, 2,2-디피리딜, EDDHA(에틸렌디아민-디(o-히드록시페닐)아세트산) 및 데스페랄(데페톡사민 메실레이트, 시그마)을 들 수 있다. 데스페랄이 철 킬레이터로서 바람직하며, 10 내지 100µM, 바람직하게는 25-75 µM, 더욱 바람직하게는 50-70 µM, 가장 바람직하게는 60 µM의 농도로 배지에 첨가한다. 배지의 철 함량은 주로 효모 추출물과 소이(soy) 펩톤 성분으로부터 유래되며, 그 존재량은 배치(batch)별로 다양하다. 그러므로, 상이한 배치 배치에서 철 획득 단백질의 상향조절을 달성하는데 최적인 데스페랄의 농도는 다양할 것이다. 당업자라면 최적의 농도를 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 기본적으로, 목적하는 철-조절된 단백질의 발현을 상향조절하기 위해서 배지에 충분한 철 킬레이터를 첨가하여야 하지만, 박테리아의 성장에 악영향을 미칠 정도로 많아서 안된다.

철 제한 조건하의 성장에 의한 트랜스페린 결합 단백질의 상향조절을 Hsf류 단백질의 재조합 상향조절과 조합하여, 본 발명의 외막 소포를 얻는 것이 바람직하다.

가변적인 비보호성 면역우성 항원의 하향조절/제거

다수의 표면 항원이 박테리아 균주 사이에서 가변적이며, 그 결과 밀접한 관련이 있는 제한된 세트의 균주에 대해서만 보호성이 있다. 본 발명의 한 양태는 다른 단백질의 발현을 감소되거나, 바람직하게는 가변성 표면 단백질(들)을 엔코딩하는 유전자(들)이 결실되어 있는 Tbp와 Hsf류 단백질, 바람직하게는 TbpA와 Hsf를 포함하는 외막 소포 제제를 포함한다. 이와 같은 결실에 의해서, 소포를 생성하는 박테리아 균주가 얻어지는데, 이러한 균주는 백신으로

투여될 경우 백신 접종을 받은 사람의 면역계에 대한 보존된 단백질(외막상에 유지됨)에 의해 발휘되는 보다 큰 영향에 기인하여 다양한 균주에 대하여 교차 반응성에 대해 보다 높은 잠재성을 지닌다. 이와 같은 가변 항원의 예로서는, 나이세리아의 경우 항원성 변이를 겪는 pili(PilC), PorA, Opa, OpC, PilC, PorB, TbpB, FrpB; 헤모필러스 인플루엔자의 경우 P2, P5, 필린, IgA1-프로테아제, 및 모락셀라의 경우 OMP106을 들 수 있다.

하향조절 또는 스위치 오프(switch off)될 수 있는 다른 유형의 유전자는 생체내에서 박테리아에 의해 용이하게 스위치 온(발현)/오프될 수 있는 유전자이다. 이와 같은 유전자에 의해 엔코딩된 외막 단백질이 항상 박테리아상에 존재하는 것은 아니기 때문에, 이와 같은 단백질이 소포 제제에 존재하는 것은 전술한 바와 같은 이유로 백신의 유효성을 저하시킬 수도 있다. 하향조절 또는 결실에 대한 바람직한 예로서는 나이세리아 Opc 단백질이 있다. Opc 함유 소포 백신에 의해 유도된 항-Opc 면역은 단지 제한된 보호 능력을 지니는데, 이는 감염 유기체가 쉽게 Opc⁻가 될 수 있기 때문이다. 헤모필러스 인플루엔자 HgpA 및 HgpB는 이러한 단백질의 다른 예이다.

예를 들면, 이러한 가변적인 또는 비보호성 유전자는 발현이 하향조절되거나 결국에는 스위치 오프될 수 있다. 이것은 소포의 외막상에 소량으로 존재하는 보다 우수한 항원에 면역계를 집중시킨다는 장점이 있다.

발현을 하향조절하는 방법은 WO01/09350호에 개시되어 있다. 면역우성 외막 단백질의 하향조절이라 함은 발현 수준이 감소되고, 바람직하게는 스위치 오프되거나, 표면 노출된 면역우성 루프의 돌연변이 및/또는 결실로 인해 외막 단백질이 덜 면역우성으로 됨을 의미한다. 효소 작용에 의한 단백질의 하향조절은 단백질의 발현 수준이 감소되거나, 바람직하게는 스위치 오프됨을 의미하거나, 기능성 효소의 발현이 감소 또는 바람직하게는 제거된다는 것을 의미한다.

본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는데 사용하기 위해 바람직한 박테리아의 수막구균 균주는 하향조절, 바람직하게는 PorA, Opa 및 Opc 중 1, 2 또는 3개의 결실을 지닌다. PorA와 Opa; PorA와 OpC; Opa와 OpC; PorA와 Opa 및 OPC가 하향조절되는 것이 바람직하다.

수막구균 게놈(genome)에는 4종의 상이한 Opa 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다(Aho 등, 1991, Mol. Microbiol. 5: 1429-37). 따라서, Opa의 발현이 하향조절되어 있다고 할 경우, 이는 수막구균에 존재하는 1, 2, 3 또는 (바람직하게는) 4개의 모든 유전자가 하향조절됨을 의미한다. 이와 같은 하향조절은 WO01/09350호에 개시된 바와 같이 유전학적으로, 또는 Opa 유전자로부터 발현이 없거나 적은 흔히 발견되는 천연의 안정한 수막구균 균주를 탐색함으로써 수행될 수 있다. 이와 같은 균주는 문헌 [Poolman 등, 1985, J. Med. Micro. 19: 203-209]에 개시된 기법을 사용하여 찾아낼 수 있는데, 여기서 Opa⁻인 세포는 평판상에서 또는 현미경하에서 세포의 외관을 관찰하여 알 수 있는 Opa를 발현하는 세포에 대해 상이한 표현형을 갖는다. 일단 균주가 발견되면, 그 균주는 Opa⁻가 없음을 확인하기 위한 발효 작업을 거친 이후에 세포 내용물에 대한 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행함으로써 안정적으로 Opa⁻라는 것을 밝혀낼 수 있다.

본 발명의 외막 소포에서 트랜스페린 결합 단백질의 상향조절이 철 제한 조건하의 성장에 의해서 달성되는 경우에, 다양한 철-조절된 단백질이 상향조절될 수 있다. 그러한 단백질로서는, 나이세리아 메닌기티디스 및 나이세리아 고노로아에서 FrpB(Microbiology 142; 3269-3274, (1996); J. Bacteriol. 181; 2895-2901(1999)), 및 헤모필러스 인플루엔자에서 헤파/헤모백신 활용 단백질 C(J. Bacteriol. 177; 2644-2653(1995)) 및 HgpA, HgpB 및 HgpC(Infect. Immun. 66; 4733-4741 (1998), Infect. Immun. 67; 2729-2739(1999), Microbiology 145; 905-914(1999))를 들 수 있다. 본 발명자들은 철 제한법을 사용하여 트랜스페린 결합 단백질의 발현을 상향조절할 경우에 상기 단백질들 중 적어도 가변 영역의 발현을 하향조절하는 것이 유리하다는 사실을 밝혀내었다. 이는 WO01/09350호에 개시된 방법을 사용하거나 단백질의 가변 영역(들)을 결실시킴으로써 달성된다. 이는, 면역원성 조성물에 의해 유도되는 면역 반응이 광범위한 균주에 존재하는 항원에 대한 것임을 확인해준다. FrpB의 하향조절은, 그램 음성 박테리아 균주, 바람직하게는 모락셀라 카타랄리스, 헤모필러스 인플루엔자 또는 나이세리아(더욱 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스) 균주로부터 유래된 본 발명의 소포 면역원성 조성물에서 PorA 및 Opa; PorA 및 OpC; Opa 및 OpC; PorA 및 Opa 및 OpC의 하향조절과 조합되는 것이 바람직하다. 본 발명의 다른 실시예에서, FrpB는 그램 음성 박테리아 균주, 바람직하게는 모락셀라 카타랄리스, 헤모필러스 인플루엔자 또는 나이세리아(더욱 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스) 균주 (반드시 철 제한 조건하에서 성장된 것일 필요 없음)로부터 삭제된 외막 소포에서 하향조절된다.

LPS의 독소제거

본 발명의 면역원성 조성물 중의 OMV는 WO01/09350호에 개시되어 있는 LPS의 독소제거 방법을 통해서 독소 제거할 수 있다. 구체적으로, LPS의 독소제거 방법은 하향조절, 바람직하게는 WO01/09350호에 개시된 htrB 및/또는 msbB의 결실을 포함한다. 이러한 유전자의 결실 돌연변이체는 표현형상으로는 야생형에 비해서 하나의 2차 아릴 사슬을 상실한 msbB-변이 LPS 및 2개의(또는 둘 모두) 2차 아릴 사슬을 상실한 htrB-변이 LPS임을 특징으로 한다. 이와 같은 방법은 저수준의 DOC, 바람직하게는 0-0.3% DOC, 더욱 바람직하게는 0.05-0.2% DOC, 가장 바람직하게는 약 0.1% DOC를 포함한 OMV 추출 방법과 조합되는 것이 바람직하다.

또 다른 LPS 독소제거 방법은 소포 제제에 폴리믹신 B[지질 A에 대해 친화도가 높은 분자](바람직하게는 SAEP 2)의 비독성 펩티드 기능상 등가물을 첨가하는 것을 포함한다(폴리믹신 B의 비독성 펩티드 기능상 등가물, 구체적으로 펩티드 SAEP2(2개의 시스테인이 디설파이드 브리지를 형성하는 서열 KTKCKFLKKC)의 사용 방법에 대한 상세한 설명에 관해서는, WO 93/14115, WO95/03327, Velucchi 등 (1997) J Endotoxin Res 4: 1-12, 및 EP 976402 참조).

교차 반응성 폴리사카라이드

캡슐화된 그램 음성 박테리아로부터 박테리아 외막 소포를 분리시킬 경우에는 캡슐형 폴리사카라이드가 동시에 정제되는 경우가 종종 있다. 경우에 따라서는, 이와 같은 "오염" 물질이 유용한 것으로 입증되었는데, 이는 폴리사카라이드가 다른 수포 성분들에 의해 제공된 면역 반응을 증강시킬 수 있기 때문이다. 그러나, 다른 경우에는 오염성 폴리사카라이드 물질이 박테리아 소포 제제에 존재할 경우 백신에 그 수포를 사용하는 것은 유해한 것으로 판명될 수 있다. 예를 들면, 적어도 나이세리아 메닌기티디스의 경우에는, 혈청군 B 캡슐형 폴리사카라이드가 보호 면역성을 제공하지 않고 인체에서 유해한 자가면역 반응을 유도하기 쉬운 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 외막 소포는, 캡슐형 폴리사카라이드가 없도록 유전공학처리된, 수포 제조용 박테리아 균주로부터 분리시킬 수 있다. 이와 같이 하면, 수포는 인체에 사용하는데 적합하게 될 것이다. 이와 같은 소포 제제의 특히 바람직한 일례를 들면, 캡슐형 폴리사카라이드가 없는 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B로부터 유래된 제제이다. 일반적으로, 외막 소포의 분리는 특히 균주가 전술한 바와 같은 msbB-돌연변이체인 경우에 캡슐형 폴리사카라이드를 합성할 수 없는 그램 음성 박테리아 균주로부터 유래되어야 한다.

이는, 캡슐 생합성 및/또는 수송에 필요한 유전자가 손상되어 있는 변형된 소포 생성 균주를 사용함으로써 달성할 수 있다. 캡슐형 폴리사카라이드 생합성 또는 수송을 엔코딩하는 유전자를 불활성화시키는 것은, 제어 영역, 코딩 영역 또는 둘 모두의 영역 (바람직하게는 전술한 바와 같은 상동 재조합 기법을 사용하여) 돌연변이시키거나, 점 돌연변이, 결실 또는 삽입), 상기 유전자의 효소 기능을 감소시키는 다른 방법에 의해서 달성될 수 있다. 또한, 캡슐 생합성 유전자의 불활성화는 안티센스 과잉 발현 또는 트랜스포손 돌연변이에 의해 달성할 수도 있다. 바람직한 방법은, 폴리사카라이드 생합성 및 수송에 필요한 나이세리아 메닌기티디스 캡슐형 폴리사카라이드(cps) 유전자의 일부 또는 전부를 결실시키는 것이다. 이를 위해서, 치환 플라스미드 pMF121(Frosh 등, 1990, Mol. Microbiol. 4: 1215-1218)을 사용하여 cpsCAD(+ galE) 유전자 클러스터를 결실시키는 돌연변이를 전달할 수 있다.

전술한 바와 같은 본 발명의 면역원성 조성물이 수막구균 B 균주로부터 유래된 것일 경우에는, 캡슐형 폴리사카라이드(인간형 사카라이드 구조도 포함)도 제거하는 것이 바람직하다. 이를 달성하고자 많은 유전자를 스위치 오프시킬 수 있지만, 본 발명자들은 수포 생성 균주를 유전공학처리하여 siaD 유전자로부터 유래된 기능성 유전자 생성물의 발현을, 바람직하게는 그 유전자를 스위치 오프함으로써, 가장 바람직하게는 그 유전자의 프로모터 및/또는 오픈 리딩 프레임의 전부 또는 일부를 결실시킴으로써 영구적으로 하향조절하는 것(즉, α-2-8 폴리시알릴트랜스퍼라제 활성을 하향조절하는 것이 바람직하다는 사실을 발견하였다. 이와 같은 불활성화 방법은 WO01/09350호에 개시되어 있다. siaD(synD로도 알려져 있음) 돌연변이는 캡슐형 폴리사카라이드로부터 인간과 유사한 에피토프를 제거할 수 있는 많은 돌연변이 중 가장 유리한 것인데, 이는 LOS의 보호성 에피토프의 생합성에 영향을 미치지 않아서 LOS를 보호성 항원으로 사용하고자 하는 궁극적인 목적을 갖는 방법에 유리하며, 박테리아의 성장에 미치는 효과가 극소하기 때문이다. 따라서, 본 발명의 바람직한 양태는 IgtE⁻ siaD⁻, IgtA⁻ siaD⁻ 또는 바람직하게는 IgtB⁻ siaD⁻ 수막구균 B 돌연변이 균주로부터 유래된 전술한 바와 같은 수포 면역원성 제제이다. 상기 균주 자체도 본 발명의 추가의 양태이다.

전술한 바와 같은 이유에서 siaD⁻ 돌연변이가 바람직하지만, 나이세리아(바람직하게는 수막구균 B) 캡슐형 폴리사카라이드 합성을 스위치 오프하는 다른 돌연변이를 사용할 수도 있다. 따라서, 수포 생성 균주는 다음과 같은 유전자 중 하나 이상으로부터 유래된 기능성 유전자 생성물의 발현을 영구적으로 하향조절하도록 유전공학처리할 수 있다: ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA(synX 및 siaA와 동등함), synB(siaB와 동등함) 또는 synC(siaC와 동등함). 이러한 하향조절은, 유전자를 스위치 오프하거나, 가장 바람직하게는 유전자의 프로모터 및/또는 오픈 리딩 프레임의 전부 또는 일부를 결실함으로써 수행한다. IgtE⁻ 돌연변이를 전술한 돌연변이 중 하나 이상과 조합할 수 있다. IgtB⁻ 돌연변이를 전술한 돌연변이 중 하나 이상과 조합하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 이와 같이 조합된 수막구균 B의 돌연변이 균주로부터 유래된 상기 기재된 수포 면역원성 제제이다. 상기 균주 자체도 본 발명의 또 다른 양태이다.

LPS의 올리고사카라이드 부분내의 이종성은 상이한 나이세리아 균주들 사이에서 구조적 및 항원성 다양성을 생성시킨다(Griffiss 등 Inf. Immun. 1987; 55: 1792-1800). 이것을 이용하여 수막구균 균주를 12개의 면역유형으로 분류할 수 있다(Scholtan 등, J Med Microbiol 1994, 41:236-243). 면역유형 L3, L7 및 L9는 면역학적으로 동일하며 구조적으로 유사하다(또는 동일하기도 하다). 따라서, L3,7,9로도 명명된다(또는 본 명세서의 목적상, 포괄적으로 "L3"로도 나타냄). 수막구균 LPS L3,7,9(L3), L2 및 L5는 시알릴화에 의해서, 또는 시티딘 5'-모노포스페이트-N-아세틸뉴라민산을 첨가함으로써 변형시킬 수 있다. L2, L4 및 L6 LPS는 면역학적으로 구분 가능하지만, 구조적으로는 유사하며, 본 명세서에서 L2라 언급할 경우, 본 발명의 범위내에서 이것은 L4 또는 L6로 대체 가능한 것이다. LPS 구조 및 이종성에 관한 상세한 설명을 위해서는, 문헌 [M.P. Jennings 등, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 및 Mol Microbiol 2002, 43: 931-43]을 참조할 수 있다.

L3 또는 L2 LPS에 대해 유발된 항체의 안정성에 대해서는, 인체 글리코스핑고리피드에 존재하는 락토-N-네오테트라오스 올리고사카라이드 그룹(Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-)과 유사한 구조의 존재로 인해 문제가 제기된 바 있다. 많은 사람들이 잔량의 L3 LPS를 함유하는 대옥시콜레이트로 추출된 소포 백신으로 안전하게 백신 접종됨에도 불구하고(G. Bjune 등, Lancet 1991), 338, 1093-1096; GVG. Sierra 등, NIPH ann (1991), 14, 195-210), LOS 사카라이드의 말단부를 결실시키는 것이 인체 조직 표면에 존재하는 구조와의 교차 반응성을 예방하는 측면에서 유리하다. 바람직한 구체예에서, IgtB 유전자의 불활성화에 의해서 중간 LPS 구조가 형성되는데, 여기서 말단 갈락토오스 잔기와 시알린산이 존재하지 않는다(돌연변이 결과 L2 및 L3 LOS에서 4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1- 구조가 남는다). 이와 같은 중간체는 L3 및 L2 LPS 균주에서 얻을 수 있다. LPS의 대안적인 덜 바람직한(짧은) 변형체는 LgtE 유전자의 턴오프(turn off)에 의해 얻을 수 있다. 또 다른 LPS의 대안적이고 덜 바람직한 변형체는 IgtA 유전자의 턴오프에 의해 얻을 수 있다. 이와 같은 IgtA⁻ 돌연변이를 선택할 경우, 비-면역원성 L1 면역유형이 형성되는 것을 방지하기 위해서 IgtC 발현도 턴오프하는 것이 바람직하다.

LgtB⁻ 돌연변이가 가장 바람직한데, 이는 본 발명자들에 의해서 이것이 안정성 문제를 해결하는 동시에 살균 활성 반응을 여전히 유발할 수 있는 LPS 보호성 올리고사카라이드 에피토프를 보호 유지하는 최적의 트렁케이션 방법이 기 때문이다.

그러므로, L2 또는 L3 제제(정제된 것 또는 분리된 수포내에 존재하는 것)를 더 함유하는 본 발명의 면역원성 조성물 또는 수막구균 수포 제제는 일반적으로, lgtB, lgtA 또는 lgtE 유전자로부터 유래된 기능성 유전자 생성물의 발현을, 바람직하게는 상기 유전자를 스위치 오프함으로써, 가장 바람직하게는 상기 유전자의 프로모터 및/또는 오픈 리딩 프레임의 전부 또는 일부를 결실시킴으로써 영구적으로 하향조절하도록 유전공학처리된 나이세리아 균주(바람직하게는 수막구균)로부터 유도되는 것이 유리하다.

다양한 lgt 유전자, 예를 들면 lgtB 및 lgtE를 함유하는 나이세리아 유전자좌 및 그 서열이 당분야에 공지되어 있다 (M. P. Jennings 등, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 및 그 참고 자료, 및 J. Exp. Med. 180: 2181-2190 [1994] 참조).

수포 제제에서, 특히 낮은 DOC 농도로 추출된 제제에서, LPS는 본 발명의 면역원성 조성물에 항원으로서 사용될 수 있다. 그러나, lgtE, lgtA(특히 lgtC와 조합된 형태), 또는 바람직하게는 lgtB 유전자/유전자 생성물의 효소 활성을 하향조절/결실/불활성화하여 인간유사 락토-N-네오테트라오스 구조를 제거하는 것이 유리하다. LPS 올리고사카라이드의 생합성을 위한 lgt 유전자를 포함하는 나이세리아 유전자좌(및 그 서열)이 당분야에 공지되어 있다 (Jennings 등, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 및 그 참고 자료, 및 J. Exp. Med. 180: 2181-2190 [1994] 참조). lgtB(또는 기능성 유전자 생성물)을 하향조절/결실시키는 것이 바람직한데, 이는 이것이 LPS 보호성 에피토프를 그대로 유지시키기 때문이다.

본 발명의 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B 수포 제제에서, siaD 및 lgtB를 하향조절/결실시키는 것이 최적의 안전성을 갖고 LPS 보호성 에피토프를 보유하는 수포 제제를 생성하는데 바람직하다. (그러나, 수막구균 B 수포 생성 균주에서 lgtB⁻와 ctrA⁻, ctrC⁻, ctrD⁻, synA⁻(synX⁻ 및 siaA⁻와 동등함), synB⁻(siaB⁻와 동등함) 또는 synC⁻(siaC⁻와 동등함)중 어느 하나와의 조합을 사용할 수도 있다).

본 발명의 면역원성 조성물은 적어도 1종, 2종, 3종, 4종 또는 5종의 상이한 외막 소포 제제를 포함할 수 있다. 2종 이상의 OMV 제제가 포함될 경우, 본 발명의 항원중 하나 이상은 각 OMV에서 상향조절된다. 이와 같은 OMV 제제는 동일한 종 및 혈청군의 나이세리아 균주로부터, 또는 바람직하게는 상이한 부류, 혈청군, 혈청형, 아혈청형 또는 면역유형의 나이세리아 균주로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 면역원성 조성물은 면역유형 L의 LPS를 함유하는 1종 이상의 외막 소포 제제(들) 및 면역유형 L3의 LPS를 함유하는 1종 이상의 외막 소포 제제(들)을 포함할 수 있다. L2 또는 L3 OMV 제제는 LPS 올리고사카라이드 합성 유전자좌에서 상 가변성이 최소인 안정한 균주로부터 유래되는 것이 바람직하다.

바람직한 나이세리아 수포 제제

Hsf와 Tbp이외에도, 임균 및 수막구균을 비롯한 나이세리아 균주(특히, 나이세리아 메닌기티디스 B)에서 수행할 경우에는, 상향조절하는 데는 다음과 같은 (보호 항원을 엔코딩하는) 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: NspA(WO96/29412), Hap(PCT/EP99/02766), PorA, PorB(NMB2039), OMP85(WO00/23595), PilQ(PCT/EP99/03603), PldA(PCT/EP99/06718), FrpB(WO96/31618), FrpA/FrpC(WO92/01460), LbpA/LbpB(PCT/EP98/05117), FhaB(WO98/02547), HasR(PCT/EP99/05989), lipo02(PCT/EP99/08315), MltA(WO99/57280), MafA(NMB0652), MafB(NMB0643), Omp26(NMB0181), 부착소 NMB0315, 부착소 NMB 0995, 부착소 NMB1119, P2086(NMB0399), Lipo28(NMB 2132), NM-ADPRT(NMB1343), VapD(NMB1753) 및 ctrA(PCT/EP00/00135). 또한, 이들은 다른 그램 음성 박테리아내에 이중적으로 도입될 수 있는 유전자로서 바람직하다.

하향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: PorA, PorB, PilC, LbpA, LbpB, Opa, Opc, htrB, msbB 및 lpxK.

상향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: pmrA, pmrB, pmrE 및 pmrF.

변형시키려는 바람직한 억제성 제어 서열로서는, fur 오퍼레이터(operator) 영역(특히 TbpB 또는 TbpB 유전자 중 어느 하나 또는 둘 모두의 경우), 및 DtxR 오퍼레이터 영역이 있다.

하향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: galE, siaA, siaB, siaC, siaD, ctrA, ctrB, ctrC 및 ctrD.

또한, 본 발명의 면역원성 조성물은 슈도모나스 에루기노사, 모락셀라 카타랄리스 및 헤모필러스 인플루엔자 b를 비롯한 그램 음성 박테리아로부터 유래된 OMV/수포 제제도 포함할 수 있다.

바람직한 슈도모나스 에루기노사 수포 제제

Hsf와 Tbp이외에도, 상향조절하는 데는 다음과 같은 (보호 항원을 엔코딩하는) 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: PcrV, OprF, OprI. 또한, 이들은 다른 그램 음성 박테리아내에 이중적으로 도입시킬 수 있는 유전자로서 바람직하다.

바람직한 모락셀라 카타랄리스 수포 제제

Hsf와 Tbp이외에도, 상향조절하는 데는 다음과 같은 (보호 항원을 엔코딩하는) 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: OMP106(WO97/41731 및 WO96/34960), HasR(PCT/EP99/03824), PilQ(PCT/EP99/03823), OMP85(PCT/EP00/01468), lipo06(GB 9917977.2), lipo10(GB 99182808.1), lipo11(GB9918302.2), lipo18(GB9918038.2), P6(PCT/EP99/03038), ompCD, CopB(Helminen ME 등, (1993) Infect. Immun. 61: 2003-2010), D15(PCT/

EP99/03822), Omp1A1(PCT/EP99/06781), Hly3(PCT/EP99/03257), LbpA 및 LbpB(WO 98/55606), TbpA 및 TbpB(WO97/13785, WO95/13370 및 WO97/32980), OmpE, UspA1 및 UspA2(WO93/03761) 및 Omp21. 또한, 이들은 다른 그램 음성 박테리아내에 이중적으로 도입시킬 수 있는 유전자로서 바람직하다.

하향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: CopB, OMP106, OmpB1, LbpA 및 LbpB.

하향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: htrB, msbB 및 lpxK.

상향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: pmrA, pmrB, pmrE 및 pmrF.

바람직한 헤모필러스 인플루엔자 수포 제제

Hsf와 Tbp 이외에도, 상향조절하는 데는 다음과 같은(보호 항원을 인코딩하는) 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: D15(WO94/12641, WO95/12641), P6(EP281673), P2, P5(WO94/26304), OMP26(WO97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hap, Hin47 및 Hif(필린을 상향조절하기 위해서는 상기 오페론내의 유전자들을 모두 상향조절하여야 한다). 또한, 이들은 다른 그램 음성 박테리아내에 이중적으로 도입시킬 수 있는 유전자로서 바람직하다.

하향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: P2, P5, Hif, IgA1-프로테아제, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, htrB, msbB 및 lpxK.

상향조절하는 데는 다음과 같은 유전자들중 하나 이상이 바람직하다: pmrA, pmrB, pmrE 및 pmrF.

본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신은 WO00/71725호 공보의 제3면 제18행 내지 제52면 제2행에 걸쳐 게재된 표에 열거된 서열 목록의 특정 조합 및/또는 WO 00/71725호의 실시예 1-11에 기재된 개별적인 조합으로 이루어지지 않고/않거나 그것을 포함하지 않는 것이 바람직하다.

본 발명에서는 WO 01/52885호에 개시된 각각의 조합을 추가로 또는 대안적으로 청구하지 않고 있다.

백신 제형

본 발명의 바람직한 구체에는 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 또한 포함할 수 있는 백신으로의 본 발명의 면역원성 조성물의 제형화이다.

전술한 바와 같은 변형된 균주로부터 외막 소포 제제를 제조하는 것은 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 수행할 수 있다. EP301992, US5,597,572, EP11243 또는 US4,271,147호에 개시된 방법을 사용하는 것이 바람직하다. WO01/09350호에 개시된 방법을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

백신 제제는 문헌 [Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (Powell M.F. 및 Newman M.J. 편집)(1995), 플레넘 프레스 뉴욕]에 전반적으로 설명되어 있다.

본 발명의 항원성 조성물은 본 발명의 백신 제형으로 애주번트첨가될 수 있다. 적합한 애주번트로는, 알루미늄염, 예컨대 수산화알루미늄 겔(명반) 또는 인산알루미늄을 들 수 있지만, 칼슘염(특히 탄산칼슘), 철 또는 아연을 사용하거나, 아실화 티로신, 아실화 당, 양이온 또는 음이온 유도체 형태의 폴리사카라이드 또는 폴리포스파제의 불용성 현탁액일 수도 있다.

사용될 수 있는 적합한 Th1 애주번트 시스템으로서, 모노포스포릴 지질 A, 구체적으로 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A, 및 모노포스포릴 지질 A, 바람직하게는 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)과 알루미늄 염과의 혼합물을 들 수 있다. 증가된 시스템은 모노포스포릴 지질 A와 사포닌 유도체의 조합물, 구체적으로 WO94/00153호에 개시된 QS21과 3D-MPL의 조합물, 또는 WO96/33739호에 개시된 바와 같이 QS21이 콜레스테롤로 케칭된 덜 반응원성인 조성물을 포함한다. QS21 3D-MPL과 토크페롤을 수중유 에멀전에 포함하는 특히 효능 있는 애주번트 제형이 WO95/17210호에 개시되어 있으며, 바람직한 제형이다.

백신은 사포닌, 더욱 바람직하게는 QS21을 포함할 수 있다. 또한 수중유 에멀전과 토크페롤을 포함할 수 있다. 메틸화되지 않은 CpG 함유 올리고뉴클레오티드(WO96/02555)도 TH1 반응의 우선적 유도 물질로서 본 발명에 사용하는데 적합하다.

본 발명의 백신 제제는, 상기 백신을 전신 또는 점막 경로를 통해 투여함으로써, 감염되기 쉬운 포유류를 보호 또는 치료하는데 사용할 수 있다. 이러한 투여 방식으로서, 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사 투여; 또는 구강/음식물, 호흡기, 노생식관을 통한 점막 투여를 들 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 그램 음성 박테리아 감염에 의해 유발되는 질병에 대하여 인간 숙주를 면역화시키는 방법이며, 상기 방법은 상기 숙주에게 본 발명의 수포 제제를 면역보호 용량으로 투여하는 것을 포함한다.

각 백신 용량 중의 항원의 양은 통상의 백신 접종자에서 현저하고 나쁜 부작용을 일으키는 일 없이 면역 보호 반응을 유발하는 양으로 선택된다. 이와 같은 양은 특정 면역원의 사용 여부 및 제공 방식에 따라 좌우될 것이다. 일반적으로, 각 용량은 단백질 항원 1-100 μ g, 바람직하게는 5-50 μ g, 가장 보편적으로는 5-25 μ g을 포함하는 것으로 예측된다.

특정 백신에 대한 최적량은 피검체에서의 적절한 면역 반응 관찰을 포함한 표준 연구 방법을 통해서 확정할 수 있다. 초기 백신접종 이후에, 피검체는 적절한 간격을 두고, 1회 또는 수회에 걸쳐 부스터(booster) 면역화시킬 수 있다.

본 발명의 폴리뉴클레오티드

"폴리뉴클레오티드"는 일반적으로 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 말하며, 이들은 변형되지 않은 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있다. "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA에 관한 제한 없이, 단일 가닥 및 이중 가닥 영역들의 혼합물인 DNA, 단일 가닥 및 이중 가닥 RNA, 및 단일 가닥 및 이중 가닥 영역들의 혼합물인 RNA, 단일 가닥 또는 대개는 이중 가닥이거나 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역들의 혼합물인 DNA와 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함한다. 또한, "폴리뉴클레오티드"는 RNA 또는 DNA 또는 RNA 및 DNA 둘 모두를 포함하는 삼중가닥 영역을 의미한다. 또한, 폴리뉴클레오티드라는 용어는 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는 DNA 또는 RNA 및 안정성의 이유로 또는 다른 이유로 변형시킨 골격을 갖는 DNA 또는 RNA도 포함한다. "변형된" 염기의 예로서는, 트리플화된 염기 및 이노신과 같은 특별한 염기를 들 수 있다. DNA와 RNA는 다양하게 변형시킬 수 있으므로, "폴리뉴클레오티드"는 자연에서 전형적으로 발견되는 폴리뉴클레오티드가 화학적으로, 효소 반응에 의해 또는 대사 반응에 의해 변형된 형태, 및 바이러스와 세포의 특징적인 DNA와 RNA의 화학적 형태도 포함한다. 또한, "폴리뉴클레오티드"는 올리고뉴클레오티드으로도 많이 언급되는 비교적 단쇄의 폴리뉴클레오티드도 포함하는 의미이다.

본 발명의 또 다른 양태는 Tbp와 Hsf 류 단백질, 구체적으로 본 발명의 단백질 조합에 대응하는 단백질들을 엔코딩하는 1종 이상의 폴리뉴클레오티드(들)을 포함하는 면역학적/백신 제형에 관한 것이다. 이와 같은 기법이 당분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대 문헌 [Wolff 등, Science, (1990) 247: 1465-8]을 참조할 수 있다. 이와 같은 폴리뉴클레오티드에서 Tbp와 Hsf류 단백질, 바람직하게는 TbpA와 Hsf의 발현은 포유류 세포내에서 발현을 구동시킬 수 있는 진핵 프로모터의 제어하에서 이루어진다. 이와 같은 진핵 프로모터의 예로서는, 아데노바이러스 프로모터, 래트 로마이러스 프로모터를 비롯한 포유류 세포를 숙주로서 사용한 바이러스로부터 유래된 프로모터를 들 수 있다. 다른 예로서, 포유류 프로모터를 사용하여 TbpA와 Hsf류 단백질의 발현을 구동시킬 수도 있다.

항체 및 수동 면역화

본 발명의 다른 양태는 TbpA와 Hsf류 단백질을 포함하는 면역원성 조성물을, 그램 음성 박테리아, 바람직하게는 나이세리아, 더욱 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스, 가장 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B에 의한 감염증을 치료 또는 예방하는데 사용할 수 있는 면역 글로불린을 생성하는데 사용하는 것이다.

폴리클로날 항체 생성에 대한 접종물은 통상 항원성 조성물을 생리학적으로 허용되는 희석제, 예를 들면 염수 또는 인체에 사용하는 데 적합한 기타 애쉴버트에 분산시켜 수성 조성물을 형성시키는 방법으로 제조할 수 있다. 면역을 촉진하는데 유효한 양의 접종물을 포유류에게 투여하고, 접종된 포유류를 상기 항원성 조성물이 보호 항체를 유도하는데 충분한 시간동안 유지시킨다.

항체는, 친화성 크로마토그래피와 같은 잘 알려진 방법에 의해서 필요한 정도로 분리시킬 수 있다.

항체는 광범위한 통상의 포유류, 예를 들면 염소, 영장류, 당나귀, 돼지, 말, 기니피그, 래트 또는 사람으로부터 유도된 항혈청 제제를 포함할 수 있다. 포유류의 혈액을 취해서 혈청을 회수한다.

본 발명에 의해서 생성된 면역글로불린은 전항체, 항체 단편 또는 하위단편(subfragment)을 포함할 수 있다. 항체는 Tbp와 Hsf에 대하여 이중 특이성을 갖는 임의의 부류, 예를 들면 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE에 속하는 전면역 글로불린, 키메라 항체 또는 하이브리드 항체일 수 있다. 또한, 이들은 하이브리드 단편을 비롯한 단편, 예를 들면 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 등일 수 있다. 또한, 면역글로불린은 항체처럼 작용하여 특이 항체에 결합해서 복합체를 형성하는 천연, 합성 또는 유전공학처리된 단백질을 포함할 수 있다.

본 발명의 백신을 수용자에게 투여하면, 그 수용자는 특이적인 백신에 의한 공격에 반응하여 생성된 면역글로불린의 공급원으로서 작용하게 된다. 이와 같이 처치된 피검체로부터 제공된 혈장으로부터, 통상의 혈청 분류 방법을 통해서 과면역(hyperimmune)글로불린을 얻을 수 있다. 이러한 과면역 글로불린을 또 다른 피검체에게 투여하여 나이세리아 감염에 대한 내성을 부여하거나 나이세리아 감염을 치료할 수 있다. 본 발명의 과면역 글로불린은 유아, 면역감약된 개체에 있어서, 또는 치료가 필요하거나 개체가 백신접종에 반응하여 항체를 생성할 시간이 없을 경우에, 나이세리아 질병을 치료 또는 예방하는데 특히 유용하다. 본 발명의 또 다른 양태는, TbpA와 Hsf에 대하여 반응성이 있는 모노클로날 항체를 포함하는 약제 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 그램 음성 박테리아, 바람직하게는 나이세리아, 더욱 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스, 가장 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B에 의한 감염증을 치료 또는 예방하는데 사용할 수 있다.

이와 같은 약제 조성물은 Tbp와 Hsf에 대하여 이중 특이성을 갖는 임의의 부류, 예를 들면 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE에 속하는 전면역글로불린, 키메라 항체 또는 하이브리드 항체일 수 있는 모노클로날 항체를 포함한다. 또한, 이들은 하이브리드 단편을 비롯한 단편, 예를 들면 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 등일 수 있다.

모노클로날 항체를 제조하는 방법은 당분야에 잘 알려져 있으며, 그 예로서는 비장세포와 골수종 세포의 융합을 들 수 있다(Kohler 및 Milstein 1975 Nature 256: 495; Antibodies - a laboratory manual Harlow and Lane 1988). 다른 방법으로서, 모노클로날 Fv 단편은 적합한 과지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝하여 얻을 수 있다 (Vaughan TJ 등, 1998 nature Biotechnology 16: 535). 또한, 모노클로날 항체는 당업자에게 잘 알려진 기법을 사용하여 인간화시키거나 부분적으로 인간화시킬 수 있다.

혈청 살균 분석

혈청 살균 분석(serum bactericidal assay: SBA)은 면역원성 조성물을 조합한 경우에 항원들 사이의 상승작용 관계를 평가하는데 바람직한 방법이다.

이와 같은 상승 작용에 의한 반응은 항원들의 조합에 의해 나타나는 SBA가 각 항원을 별도로 사용할 경우에 나타나는 SBA보다 2배, 3배, 바람직하게는 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 가장 바람직하게는 10배 이상 더 높다는 것을 특징으로 한다. SBA는 항원이 유래되는 동종 균주에 대하여, 바람직하게는 추가로 동종 균주의 패널(panel)에 대하여 측정하는 것이 바람직하다(각각의 패널에 대해서는 하기 참조: 예컨대 A-4 클러스터에 속하는 BZ10; ET-37 복합체에 속하는 B16B6(B:2a:P1.2); 및 H44/76(B:15:P1.7,16)). SBA는 수막구균 백신의 효능을 추정하는데 있어서 가장 널리 승인된 면역학적 마커(marker)이다(Perkins 등 J Infect Dis. 1998, 177:683-691). 알려진 방법을 사용하여 충분한 SBA를 확인할 수 있다. SBA는 동물 모델 또는 인간 피검체로부터 얻은 혈청을 사용하여 수행할 수 있다(실시에 6-9 참조).

인간 혈청을 사용하여 SBA를 수행하는 또 다른 바람직한 방법은 하기와 같다. 1차 백신 접종에 앞서, 2차 백신 접종한지 2개월후에, 그리고 3차 백신접종한지 1개월후에 혈액 샘플을 취한다(1년에 3회 접종하는 것이 전형적인 인체의 기본 백신 접종 스케줄로서, 예를 들면 0, 2 및 4개월, 또는 0, 1 및 6개월에 투여한다). 이와 같은 인체의 기본 접종 스케줄은 1세 이하의 유아에 대해서(예를 들면, Hib 백신 접종과 동시에 수행함) 수행하거나, 또는 2-4세 또는 청소년에게도 이와 같은 기본 백신접종 스케줄로 백신접종하여 SBA를 테스트할 수 있다. 필요에 따라서, 기본 접종한지 6-12개월 이후에, 그리고 부스터 용량을 투여한지 1개월 이후에 혈액 샘플을 더 취할 수 있다.

동종 살균 활성을 갖는 항원 또는 수포 제제가 3차 백신 투여한지(기본 백신 접종 스케줄중)(2-4세 유아 또는 청소년에서, 바람직하게는 신생아기의 유아에서) 1개월후에, 본 발명의 항원이 유래되는 수막구균 균주에 대하여 SBA(항체 희석) 역가가 (백신접종 이전의 역가와 비교하여) 4배 증가한 피검체의 비율이 피검체의 30% 이상, 바람직하게는 40% 이상, 더욱 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 60% 이상일 경우에, SBA는 성공적이라 할 수 있다.

물론, 동종 살균 활성을 갖는 항원 또는 수포 제제는, 그것이 유래되는 수막구균 균주에 대하여 만족스러운 SBA를 나타낼 경우에도 동종 살균 활성을 갖는 수포 제제를 구성할 수 있다.

이중 살균 활성을 갖는 항원 또는 수포 제제가 3차 백신 투여한지(기본 백신 접종 스케줄중)(2-4세 유아 또는 청소년에서, 바람직하게는 신생아기의 유아에서) 1개월후에, 3종의 이중적 수막구균 균주에 대하여 SBA(항체 희석) 역가가 (백신접종 이전의 역가와 비교하여) 4배 증가한 피검체의 비율이 피검체의 20% 이상, 바람직하게는 30% 이상, 더욱 바람직하게는 35% 이상, 가장 바람직하게는 40% 이상일 경우에도, SBA는 성공적이라 할 수 있다. 이와 같은 테스트는 이중 살균 활성을 갖는 항원 또는 수포 제제가 다양한 수막구균 균주에 대하여 교차 살균성 항체를 유발할 수 있는지 여부를 알려주는 좋은 지표가 된다. 상기 3종의 이중 균주는 서로에 대하여, 바람직하게는 이중적 살균 활성을 갖는 항원 또는 수포 제제를 만들거나 유도해낸 균주에 대하여 상이한 전기영동 유형(ET)-복합체 또는 다좌(multilocus) 서열 타이핑 패턴을 갖는 것이 바람직하다(Maiden 등 PNAS USA 1998, 95:3140-5). 당업자라면 수막구균중에서, 특히 질병의 원인이 되는 것으로 인식되고/되거나 인식된 MenB 과독성 계열(Maiden 등의 문헌 참조)을 대표하는 수막구균 유형 B 균주중에서 관찰되는 유전학적 다양성을 반영하는 상이한 ET-복합체를 갖는 3종의 균주를 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 예를 들면, 사용 가능한 3종의 균주는 다음과 같다: A-4 클러스터에 속하는 BZ10(B:2b:P1.2); ET-37 복합체에 속하는 B16B6(B:2a:P1.2); 및 ET-5 복합체에 속하는 H44/76(B:15:P1.7,16), 또는 동일한 ET/클러스터에 속하는 임의의 다른 균주. 상기 균주들은, 예를 들면 ET-5 복합체에 속하는 수막구균 균주 CU385(B:4:P1.15)로부터 만들어지거나 유도된 이중 살균 활성을 갖는 항원 또는 수포 제제를 테스트하기 위해 사용할 수 있다. 사용 가능한 또 다른 샘플 균주는 계열 3 유행성 클론(예: NZ124[B:4:1.7,4])이다. 또 다른 ET-37 균주는 NGP165(B:2a:P1.2)이다.

SBA 활성을 측정하는 방법은 당분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 사용 가능한 방법이 WO99/09176호의 실시에 10C에 기재되어 있다. 일반적으로, 테스트하고자 하는 균주의 배양물을 성장의 로그기로 성장시킨다(바람직하게는 성장 배지에 EDTA와 같은 철 킬레이터를 첨가하여 철이 결핍된 조건하에서). 이를 BSA(0.3% BSA를 사용한 Hanks 배지 등)를 사용한 배지에 현탁시켜서 약 20000 CFU/ml로 조정된 작업 세포 현탁액을 얻는다. 테스트하고자 하는 혈청의 일련의 2배 희석액(바람직하게는 56°C에서 30분동안 열에 의해 불활성화시킨 것) [예를 들면 50 μ l/웰 용량] 과 테스트하고자 하는 20000 CFU/ml의 임균 균주 현탁액[예를 들면 25 μ l/웰 용량]을 혼합함으로써, 일련의 반응 혼합물을 만들 수 있다. 반응 바이알을 인큐베이션하고(예를 들면, 37°C에서 15분) 진탕시킨다(예를 들면 210 rpm 에서). 최종 반응 혼합물은 [예를 들면 100 μ l 용량내에] 애주먼트 [예를 들면 사전 시험된 어린 토끼 혈청 최종 용량 25%]를 더 함유하며, 이를 전술한 바와 같이 인큐베이션한다[예를 들면 37°C에서 60분]. 멸균 폴리스티렌 U자형 바닥 96-웰 미세액가 평판을 본 분석 시험에 사용할 수 있다. 일정량[예: 10 μ l]을 각 웰로부터 멀티채널 피펫을 사용하여 분취해서, 뮐러-힌턴(Mueller-Hinton) 한천 평판(바람직하게는 1% 이소비탈렉스와 1%의 열에 의해 불활성화된 말 혈청을 함유함)상에 적하하고, 인큐베이션한다(예를 들면 5% CO₂중에서 37°C하에 18시간 동안). 바람직하게는, 각 콜로니를 분취량당 80CFU까지 계수할 수 있다. 다음과 같은 3종의 테스트 샘플을 대조군으로서 사용하였다: 완충제+ 박테리아+ 보체; 완충제+ 박테리아+ 불활성화된 보체; 혈청+ 박테리아+ 불활성화된 보체. SBA 역가는 데이터를 처리하여 회귀 계산법에 의해 세포 사멸 50%에 해당하는 희석율을 측정하는 프로그램을 사용하여 바로 계산할 수 있다.

본 명세서에 언급한 참고 자료와 특허 공보는 모두 본 명세서에 참고 인용하였다.

본 발명의 산업적 적용 방법

실시에

이하의 실시예는, 특별한 언급이 없는한, 당업자에게 잘 알려져 있는 통상적인 표준 기법을 사용하여 수행하였다. 후술하는 실시예는 예시적인 것일뿐, 본 발명의 보호 범위를 한정하는 것은 결코 아니다.

실시예 1: 외막 소포 제제에 사용되는 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B의 균주 작제 방법

WO01/09350호는 외막 소포를 제조하는 방법 및 외막 소포가 유래되는 박테리아 균주를 조작하는 방법을 상세히 설명하고 있다. 외막 소포에 TbpB 또는 리포폴리사카라이드와 같은 리포단백질을 보유시키고자 할 경우, 저수준의 테옥시콜레이트를 사용하거나 전혀 사용하지 않고 분리하는 방법이 바람직하다.

실시예 2: 기능성 cps 유전자가 없으나 PorA를 발현하는 재조합 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B 균주에서 Hsf 단백질 항원을 상향조절하는 방법

WO01/09350호의 실시예에 기재된 바와 같이, 특정 국가에서는, 외막 소포에 PorA가 존재하는 것이 유리할 수 있으며, 개선된 재조합 수포의 백신 효능을 증강시킬 수 있다. 후술하는 실시예에서, 본 발명자들은 기능성 cps 유전자가 없으나 PorA를 발현하는 균주에서 Hsf 단백질 항원의 발현을 상향조절하기 위해 변형된 pCMK(+) 벡터를 사용하였다. 본래의 pCMK(+) 벡터는, lacI^q를 발현하는 E. coli 수주에서 억제되지만 나이세리아 메닌기티디스에서 전사 활성이 있는 키메라 porA/lacO 프로모터를 함유한다. 변형된 pCMK(+)에서, 천연의 porA 프로모터를 사용하여 hsf 유전자의 전사를 구동시켰다. Hsf를 코딩하는 유전자는 하기 표에 기재된 바와 같은 HSF 01-NdeI 및 HSF02-NheI 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시킨 것이다. HSF 01-NdeI 프라이머 서열에 기인하여, 발현된 Hsf 단백질은 5' 말단에 2개의 메티오닌 잔기들을 함유할 것이다. PCR 증폭에 사용된 조건은 공급업체(HiFi DNA 폴리머라제, 비링거 만하임 게엠베하)에서 설명한 바와 같다. 열 처리 사이클은 다음과 같다: 25회(94°C 1분, 48°C 1분, 72°C 3분) 및 1회(72°C 10분, 회수시까지 4°C). 이어서, 상응하는 앰플리콘(amplicon)을 pCMK(+) 전달 벡터의 상응하는 제한 부위에 클로닝하였다. 이와 같이 고안된 pCMK(+)-Hsf 재조합 플라스미드에서, 본 발명자들은 재조합 PCR 기법에 의하여 키메라 porA/lacO에 존재하는 lacO를 결실시켰다. 다음과 같은 2가지 별도의 DNA 단편을 PCR 증폭시키기 위해서 pCMK(+)-Hsf 플라스미드를 템플레이트로 사용하였다.

- 단편 1은 porA 5' 재조합 영역, 카나마이신 내성 유전자 및 porA 프로모터를 함유한다. 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머, RP1(SacII) 및 RP2는 하기 표에 기재하였다. RP1 프라이머는 lac 오퍼레이터 바로 업스트림에 있는 서열에 대하여 상동성이다.

- 단편 2는 porA 유전자, hsf 유전자 및 porA 3' 재조합 영역으로부터 유래된 샤인-달가르노(Shine-Dalgarno) 서열을 함유한다. 사용된 올리고뉴클레오티드 프라이머, RP3 및 Rp4(ApaI)는 하기 표에 기재하였다. RP3 프라이머는 lac 오퍼레이터 바로 다운스트림에 있는 서열에 대하여 상동성이다. 단편 1의 3' 말단과 단편 2의 5' 말단은 중복되는 48개의 염기를 갖는다. 각각의 PCR(1 및 2) 500 ng을 프라이머 RP1과 RP1을 사용한 최종 PCR 반응에 사용하였다. 수득한 최종 앰플리콘을 SacII 및 ApaI로 제한시킨 pSL1180 벡터내로 서브클로닝하였다. 변형된 플라스미드 pCMK(+)-Hsf를 QIAGEN 맥시프랩 키트를 사용하여 대규모로 정제하고, 이 물질 2 µg을 사용하여 기능성 cps 유전자가 없는 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B 균주를 형질전환시켰다. porA의 발현을 보존하기 위해서, 단일의 크로스-오버(crossing-over)로 생성된 통합물을 PCR과 웨스턴 블롯 검색 절차를 병용하여 선별하였다. porA-특이성 PCR 및 웨스턴 블롯에 의해 양성으로 시험한 카나마이신 내성 클론을 -70°C에서 글리세롤 스톡(stock)으로 보관하고 후속 연구를 위해 사용하였다. 박테리아(약 5.10⁸ 박테리아)를 PAGE-SDS 완충액 50µl에 재현탁시키고, 3회 동결(-20°C)/비동(100°C)시킨 다음, 12.5% 겔상에서 PAGE-SDS 전기영동을 통해 분리시켰다. Hsf의 발현을, NmB[Cps-, PorA+] 또는 NmB[Cps-, PorA+, Hsf+]로부터 유래된 전세포 박테리아 용해물(WCBL)에서 조사하였다. 쿠마시 염색 결과, Hsf의 발현이 (내인성 Hsf에 비해) 현저하게 증가한 것으로 검출되었다. 이러한 결과에 의하면, 변형된 pCMK(+)-Hsf 벡터가 기능적이고, 주요한 PorA 외막 단백질 항원의 생성을 저해하는 일 없이, 외막 단백질의 발현을 성공적으로 상향조절하는데 사용할 수 있음을 확인해준다.

실시예에 사용된 올리고뉴클레오티드

올리고뉴클레오타이드	서열	비고
Hsf01-Nde	5'- GGA ATT CCA TAT GAT GAA CAA AAT ATA CCG C-3'	NdeI 클로닝 부위
Hsf02-Nhe	5'-GTA GCT AGC TAG CTT ACC ACT GAT AAC CGA C-3'	NheI 클로닝 부위
GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA ATT AAT ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'	AsnI 클로닝 부위 NdeI와 양립가능
GFP-Spe	5'-GAC ATA CTA GTT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG-3'	SpeI 클로닝 부위 NheI와 양립가능
RP1 (SacII)	5'- TCC CCG CGG GCC GTC TGA ATA CAT CCC GTC-3'	SacII 클로닝 부위
RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCA AAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	
RP4(ApaI)	5'-GGG TAT TCC GGG CCC TTC AGA CGG CGC AGC AGG-3'	ApaI 클로닝 부위

실시예 3: 프로모터 치환에 의한 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B *tbpA* 유전자의 상향조절

본 실험의 목적은, TbpA 항원의 생성을 상향조절하기 위해서 *tbpA* 유전자의 내인성 프로모터 영역을 강력한 *porA* 프로모터로 치환시키는 것이다. 이러한 목적으로, 이. 콜라이 클로닝 방법을 사용해서 프로모터 치환 플라스미드를 작제하였다. *tbpA* 코딩 서열의 업스트림에 위치한 DNA 영역(731 bp)은 나이세리아 메닌기티디스 균주 ATCC 13090의 비공개 Incyte PathoSeq 데이터 베이스에서 발견할 수 있다. 이 DNA는 TbpB 항원에 대한 엔코딩 서열을 함유한다. 이 유전자는 오페론으로 조직되어 있다. *tbpB* 유전자는 결실되고 CmR/*porA* 프로모터 카세트에 치환될 것이다. 이를 위해서, *tbpB* 유전자의 509bp 5' 플랭킹(flanking) 영역에 상응하는 3218 bp의 DNA 단편, 2139bp *tbpB* 코딩 서열, 87bp 인터제닉(intergenic) 서열 및 *tbpA* 코딩 서열의 483개 최초 뉴클레오타이드를, 흡수 서열 및 NheI와 HindIII 제한 부위(밀줄)를 함유하는 BAD16(5'-GGC CTA GCT AGC CGT CTG AAG CGA TTA GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') 및 BAD17(5'-GGC CAA GCT TCA GAC GGC GTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TCC-3')을 사용하여 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B 게놈 DNA로부터 PCR 증폭시켰다. 상기 PCR 단편은 하이 퓨어 키트(High Pure Kit)(뢰링거 만하임, 독일)을 사용하여 세정하고, 직접 pGemT 벡터(프로메가, 미국)에 클로닝하였다. 상기 플라스미드를 서클 PCR 돌연변이생성(Jones & Winistofer (1992))에 적용하여, (i) CmR/PorA 프로모터 카세트의 클로닝을 허용하는 적당한 제한 부위를 삽입하고, (ii) *tbpB* 및 *tbpB* 코딩 서열의 5' 플랭킹 서열의 209 bp를 결실시켰다. 서클 PCR은, 적당한 제한 부위 XmaI, BglII 및 XhoI(밀줄)을 함유하는 BAD18(5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') 및 BAD19(5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3') 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수행하였다. 상기 CmR/PorA 프로모터 카세트는 전술한 바와 같은 pUC D15/Omp85 플라스미드로부터, 적당한 제한 부위 XmaI, SpeI, BglII 및 XhoI(밀줄)을 함유하는 프라이머 BAD21(5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') 및 BAD20(5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3')를 사용해서 증폭시켰다. 상기 PCR 단편은 서클 PCR 플라스미드에 클로닝하였다. 상기 플라스미드를 사용하여 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B [*cps*-] 및 [*cps*- *porA*-] 균주를 형질전환시킨다. *tbpA*의 업스트림 영역에 이중 크로스-오버로 통합한 결과, *porA* 프로모터가 *tbpA* ATG 바로 업스트림에 삽입된다.

실시예 4: 2종의 항원 TbpA와 Hsf의 발현에 대해 상향조절된 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B 균주의 작제

본 실험의 목적은, 동일한 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B 균주에서 TbpA와 Hsf의 발현을 동시에 상향조절하는 것이다. TbpA의 생성은 그것의 내인성 프로모터 영역을 강력한 *porA* 프로모터로 치환시킴으로써 상향조절하였다(프로모터 치환법). 이러한 맥락에서, *tbpA*의 업스트림에 위치한 *tbpB* 유전자는 결실되며, TbpB 단백질은 외막에 더 이상 존재하지 않는다. Hsf의 발현은 *porA* 유전자좌에서 상응하는 유전자의 제 2 복제물을 삽입함으로써(상동 재조합) 상향조절하였다(유전자 전달법). 2종의 균주는 모두 WO01/09350호에 개시되어 있다. 상기 2가지 방법(Cm^R 또는 Kan^R)에 사용된 선별 마커에 의해서, 동일한 염색체내로의 2가지 통합물의 조합이 가능해진다.

전체 게놈 DNA를 Qiagen Genomic tip 500-G 프로토콜에 의해서 재조합 Nm.B *cps*-/TbpA+/PorA+ 균주로부터 추출하였다. 10 µg의 DNA를 DraIII 제한 효소로 제한시키고, 통상의 형질 전환 프로토콜에 의해서 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 B를 형질전환시키는데 사용하였다. 형질전환에 사용된 세포는 재조합 NmB *cps*-/Hsf+/PorA+ (*porA* 유전자좌내로 단일 크로스오버에 의한 대립형질 교환/상동 재조합) 또는 재조합 NmB *cps*-/Hsf+/PorA- (대립형질 교환/*porA* 유전자좌내로 이중 교차에 의한 상동 재조합)이었다. 이들을 밤새 200 µg/ml 카나마이신을 함유하는 GC 한천상에 플레이팅하고, GC 액상 배지 10 mM MgCl₂중에서 DO₆₅₀=0.1로 희석한 다음에, 강력한 교반하에 DraIII 제한된 게놈 DNA 10µg과 함께 37°C에서 6시간동안 인큐베이션하였다. DLWND 크로스오버로부터 얻은 재조합 나이세리아 메닌기티디스(PCR 검색)를 200 µg/ml의 카나마이신과 5 µg/ml의 클로람페니콜을 함유하는 GC 배지상에서 선별하고, OMV 제제내에서 TbpA와 Hsf 발현에 대해 분석하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 대조 NmB *cps*- 균주로부터 제조된 OMV에 비하여, TbpA/Hsf 재조합 NmB 균주로부터 제조된 OMV에서 TbpA와 Hsf 둘 모두의 생성은 현저하게 증가하였다. 이중 재조합체에서의 각 단백질의 과잉 발현 수준은 상응하는 단일 재조합체에서 얻어지는 발현 수준에 필적한다. TbpA와 Hsf의 과잉 발현 수준은 PorA+ 및 PoRA- 균주에서 필적할 만하다(데이터 생략). 결과적으로, 이러한 데이터는, (i) TbpA와 Hsf의 발현을 함께 그리고 동시에 나이세리아 메닌기

티디스내로 상향조절할 수 있으며, (ii) TbpA와 Hsf가 농후한 재조합 수포를 얻어서 면역 요법에 사용할 수 있다는 사실을 입증한다.

외막 소포의 Hsf 및 TbpA 함량 분석

쿠마시 블루 염색된 SDA-PAGE

Hsf 또는 TbpA, 또는 Hsf와 TbpA 둘 모두가 상향조절된 외막 소포 제제중 단백질 15 μ g을 β -머캅토에탄올을 함유하는 샘플 완충액중에 희석시키고, 95 $^{\circ}$ C에서 10분동안 가열하였다. 이어서, 샘플을 SDS-PAGE 폴리아크릴아미드 겔(Novex 4-20% Tris-글리신 1.5 mm 2D웰 SDS PAGE)상에서 러닝(running)시키고, 1시간동안 쿠마시 블루로 염색시키고, 수회 탈색제로 세척하여 탈색시켰다. 그 결과를 도 1에 도시하였으며, 도시된 결과는 Hsf와 TbpA의 수준이, 그들의 발현 수준을 증가시킨 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 외막 소포 제제에서는 상당히 더 높다는 것을 보여준다.

실시예 5: Hsf 및/또는 TbpA가 상향조절된 OMV의 면역원성

20마리의 마우스 군을 0, 21 및 28일째에 근육내 경로를 통해서 OMV로 3회 면역시켰다. 각각의 접종물은 MPL과 ALPO4상에 제형화한 5 μ g(단백질 함량)의 OMV로 이루어졌다. OMV는 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향조절되도록 공학처리된 나이세리아 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 유래된 것이다. Hsf, TbpA, Hsf와 TbpA 둘 모두를 상향조절하였거나, 이들을 전부 상향조절하지 않은 OMV를 비교하였다. 41일째, 혈액 샘플을 취하여 ELISA 또는 혈청 살균 분석법으로 분석하였다.

Hsf에 대한 항체를 검출하기 위한 ELISA

96웰 마이크로평판(Nunc, Maxisorb)을 밤새 4 $^{\circ}$ C에서 PBS중의 1 μ g/ml 농도의 특정 항원 100 μ l로 피복하였다. NaCl 150 mM Tween 20 0.05%로 세척한 후에, 평판을 100 μ l의 PBS-BSA 1% 100 μ l를 사용해서 실온하에 30분동안 진탕시키면서 포화시켰다. 각 단계 사이에(30분동안 실온에서 진탕시키면서 수행되며 희석제 완충액으로서 PBS-BSA2%를 사용함), 과량의 반응 시약은 NaCl-Tween 20을 사용해서 세척함으로써 제거하였다. 100 마이크로리터의 희석된 혈청 샘플을 마이크로웰마다 첨가하였다. 결합된 항체를 바이오티닐화 항-마우스 Ig(Prosan)(1/2000)에 의해 인식하였다. 항원-항체 복합체는 스트렙타비딘-바이오티닐화 퍼옥시다제 컨주게이트(Amersham)(1/4000)로 인큐베이션함으로써 확인하였다. 오르토펜렌디아민/H₂O₂(4 mg/10 ml 시트르산염 완충액 0.1M pH 4.5 + 5 μ l H₂O₂)를 사용하여 분석 결과를 확인하였다. 평판을 실온하에 암실에서 15분동안 인큐베이션한 후에, 50 μ l의 1N HCl을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 흡광도는 490 nm에서 판독하였다.

	역가 중간점 (폴딩된 혈장상의)
g1, 수포 TbpA-HSF, 1M	15471
g2, 수포 TbpA, 1M	15.41
g3, 수포 HSF, 1M	14508
g4, 수포 CPS(-)PorA(-), 1M	-
g5, MPL/AlPO4, 1M	-

상기 표에 나타낸 결과는 Hsf 또는 Hsf와 TbpA 둘 모두를 상향조절한 OMV로 면역시킴으로써 Hsf에 대해서 높고 대등한 항체 역가가 유발된다는 것을 보여준다. 실제로, 애주번트만을 사용하거나 Hsf와 TbpA 둘 모두를 상향조절하지 않은 OMV 또는 TbpA만을 상향조절한 OMV로 접종한 후에 유발된 혈청에서는 Hsf에 대한 항체를 전혀 검출할 수 없었다.

실시예 6: Hsf 및/또는 TbpA를 상향조절한 OMV에 대하여 유발된 항혈청의 혈청 살균 활성

Hsf, TbpA 또는 Hsf와 TbpA 둘 모두를 상향조절한 OMV 또는 상향조절하지 않은 OMV로 접종한 마우스로부터 얻은 항혈청의 혈청 살균 활성을 동종 균주 H44/76 또는 이종 균주 Cu385를 사용하여 분석함으로써 비교하였다. 혈청 살균 분석 결과, 보호 효과와의 양호한 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌으므로, 이는 보호 면역 반응을 유도하는데 있어서 후보 조성물이 얼마나 효과적인지를 시사하는 좋은 증거가 된다.

나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B 야생형 균주(H44/76 균주=B:15 P1.7, 16 L3,7,9 및 CU385 균주=B: 4 P1.19, 15 L3,7,9)를 밤새 MH+ 1% 폴리비텍스+ 1% 말 혈청 페트리 접시상에서 37 $^{\circ}$ C하에 +5% CO₂ 존재하에서 배양하였다. 또한 이들을 3시간동안 50 μ M 데스페랄(철 킬레이터)이 보충된 액상 TSB 배지에서 37 $^{\circ}$ C하에 진탕시키면서 계대배양하여 광학 밀도가 470 nm에서 약 0.5가 되도록 하였다.

폴딩된 또는 개별적 혈청을 40분동안 56 $^{\circ}$ C에서 비활성화시켰다. 혈청 샘플을 HBSS-BSA 0.3% 중에 1/100로 희석시킨 후에, 둥근 바닥 마이크로평판에서 50 μ l 용량으로 2배 연속 희석하였다(8개의 희석액).

적절한 광학 밀도하에서 박테리아를 HBSS-BSA 0.3%로 희석하여 1.3 \times 10⁴ CFU/ml가 되도록 하였다. 상기 희석액 37.5 μ l를 혈청 희석액에 첨가하고, 마이크로평판을 15분동안 37 $^{\circ}$ C에서 진탕하에 인큐베이션하였다. 이어서, 토끼 보체 12.5 μ l를 각 웰에 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 진탕시키면서 인큐베이션한 후에, 마이크로평판을 빙상에 놓아 사멸을 중단시켰다.

경사법을 사용해서, 각 웰 20 μ l를 MH+ 1% 폴리비텍스+ 1% 말 혈청 페트리 접시상에 플레이팅하고, 밤새 37°C에서 CO₂ 존재하에 인큐베이션하였다. CFU를 계수하고, 사멸율%를 계산하였다. 혈청 살균 역가는 사멸율 50% 이상을 제공하는 최종 희석율이다.

	H44/76		CU385	
	GMT	% 반응체	GMT	% 반응체
OMV				
CPS(-) PorA(-)	93	30%	58	5%
CPS(-) PorA(-) Hsf	158	40%	108	20%
CPS(-) PorA(-) TbpA	327	60%	147	30%
CPS(-) PorA(-) Hsf-TbpA	3355	100%	1174	80%

상기 표에 기재된 것과 유사한 결과를 2가지 다른 실험에서도 얻을 수 있다.

Hsf와 TbpA 둘 모두를 상향조절한 OMV로 백신접종한 후에, 동종 균주 및 이종 균주에 대한 살균 역가(GMT)가 급증함을 알 수 있다. 이에 비해서, Hsf 또는 TbpA가 상향조절된 OMV로 백신접종한 마우스에 대하여 측정된 살균 GMT는 대조 OMV로 백신접종한 마우스에서 얻어지는 것과 유사하였다.

이중 상향조절의 장점은, 특히 이종 균주를 사용한 실험에서, 상당한 수준의 살균 항체(역가 1/100 이상)를 생성하는 마우스의 비율면에서 명확하게 확인되었다.

실시예 7: 항-Hsf 혈청과 항-TbpA 혈청의 혼합이 살균 활성에 미치는 영향

20마리의 마우스 군을 0, 21 및 28일째에 근육내 경로를 통해서 OMV로 3회 면역시켰다. 각각의 접종물은 MPL과 ALPO4상에 제형화한 5 μ g(단백질 함량)의 OMV로 이루어졌다. OMV는 캡슐형 폴리사카라이드와 PorA가 하향조절되도록 공학처리된 나이세리아 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 유래된 것이다. 제 1 군의 마우스는 단백질을 상향조절하지 않은 대조 OMV로 면역시켰다. 제 2 군에서는, Hsf 발현을 상향조절하고, 제 3 군에서는 TbpA 발현을 상향조절하였으며, 제 4 군에서는 Hsf와 TbpA를 모두 상향조절하였다.

동일한 군의 마우스로부터 얻은 혈청을 사용하거나, Hsf 또는 TbpA만을 단독으로 상향조절한 군으로부터 분리된 혈청을 합치는 방식으로 혈청을 풀링하였다. 혈청 살균 활성을 각각의 풀링된 혈청에 대하여 측정하였으며, 그 결과를 하기 표에 기재하였다.

하기 물질로 면역된 마우스로부터의 풀링된 혈청에 대하여 수행된 SBA	SBA 역가
TbpA-Hsf 수포	774
TbpA 수포	200
Hsf 수포	50
CPS(-)PorA(-) 수포	50
항-TbpA+ 항-Hsf 혈청의 혼합물	1162

상기 표에 기재된 결과는, 항-Hsf와 항-TbpA 항혈청을 혼합할 경우, 각 항혈청을 단독으로 사용하여 얻을 수 있는 혈청 살균 활성에 비해서 더 높은 혈청 살균 활성을 얻을 수 있음을 보여준다. 이와 같은 상승 효과는 Hsf 및 TbpA 둘 모두에 대한 항체의 존재에 의해서 달성되는 것으로 여겨진다.

실시예 8: TbpA와 상승적으로 조합될 수 있는 트렁케이팅된 Hsf 단백질

표준 분자 생물학적 절차를 사용하여 일련의 트렁케이팅된 Hsf 작제물을 만들었다. 이러한 작제물에는, Hsf의 신호 서열을 함유하는 아미노산 1-54 및 Hsf(Tr1Hsf)의 아미노산 134-592를 엔코딩하는 작제물이 포함된다. 제 2의 트렁케이팅된 Hsf는 Hsf 신호 서열의 아미노산 1-53에 이어서 Hsf(Tr2Hsf)의 아미노산 238-592를 함유하였다. 이러한 2종의 트렁케이팅된 Hsf 작제물 및 전장 Hsf를 나이세리아 메닌기티디스 B 균주 MC58, siaD-, Opc-, PorA-에 도입시켜서, 이들의 발현이 상향조절되도록 하고, 전술한 바와 같은 방법을 사용해서 외막 소포를 생성하였다.

외막 소포 제제를 Al(OH)₃상에 흡착시키고, 0, 21 및 28일째에 마우스에게 주사하였다. 42일째에, 마우스로부터 혈액을 취하고 혈청을 준비하였다. 상기 혈청을 TbpA가 상향조절된 OMV로 백신접종한 마우스로부터 얻은 혈청과 혼합하고, 전술한 바와 같이 혈청 살균 분석을 수행하였다.

결과

군	혈청 살균 역가	
	H44/76	CU385
MC58 PorA+ siaD+	25600	25600
MC58 PorA- siaD- Hsf	1530	800
MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	1015	1360
MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	50	50

음성 대조군	50	50
TbpA+ MC58 PorA+ siaD+	25600	24182
TbpA+ MC58 PorA- siaD- Hsf	2595	1438
TbpA+ MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	4383	2891
TbpA+ MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	1568	742
TbpA+ 음성 대조군	778	532

상기 표에 나타난 결과는, 제 1 트렁케이션(Tr1Hsf)이 TbpA에 대한 항혈청과 조합할 수 있는 면역반응을 나타내어 전장 Hsf를 사용한 경우에 비해서 더 큰 혈청 살균 활성을 생성시킴을 입증한다. 그러나, 트렁케이션 정도가 중요하며, Tr2에서 생성된 트렁케이션은 전장 Hsf에 비해서 유해한 효과를 나타내었다. Tr1Hsf의 증가된 살균 활성은 사용된 2종의 균주 모두에 대해서 나타났다.

실시예 9: TbpA, Hsf 및 제3의 수막구균 단백질에 대한 항체의 혈청 살균 활성

PorA와 캡슐형 폴리사카라이드가 전술한 바와 같이 하향조절된 나이세리아 메닌기티디스 균주 H66/76을, 전술한 바와 같은 절차를 사용하여 TbpA 및 Hsf, LbpB, D15, PilQ 또는 NspA를 상향조절하기 위한 백그라운드 균주로서 사용하였다. 각 균주로부터 전술한 바와 같이 외막 소포 제제를 제조하였다. 재조합 FhaB, FrpC, FrpA/C 및 Hap를 PCT/EP99/02766, WO92/01460 및 WO98/02547에 개시된 바와 같은 당분야에 잘 알려진 기법을 사용하여 제조하였다.

외막 소포 제제 및 재조합 단백질을 Al(OH)₃ 상에 흡착시키고, 0, 21 및 28일째에 마우스에게 주사하였다. 42일째에, 마우스로부터 혈액을 취하고 혈청을 준비하였다. 상기 혈청을 TbpA 및 Hsf가 상향조절된 OMV에 대한 혈청을 LbpB, D15, PilQ 또는 NspA가 상향조절된 OMV 또는 재조합 FhaB, FrpC, FrpA/C 또는 Hap로 백신접종한 마우스로부터 얻은 혈청과 혼합하고, 전술한 바와 같이 혈청 살균 분석을 수행하였다.

결과

상기 실험의 결과는 하기 표에 기재된 바와 같다. 동종 H44/76 균주를 사용한 분석에 있어서는, FrpC를 제외한 3의 수막구균 항원에 대한 항체를 첨가한 결과, TbpA 와 Hsf 단독에 대한 항체를 사용하여 생성한 것보다 더 높은 혈청 살균 역가를 얻지 못했다.

그러나, 이종 균주를 사용한 혈청 살균 분석에 있어서는 제 3의 항원에 대한 항체를 첨가하는 것이 유리하였다. D15(OMP85), Hap, FrpA/C 및 LbpB에 대한 항체들은 특히 CU385 균주에 대하여 혈청 살균 역가를 증가시키는 데 효과적이었다.

항혈청 혼합물	혈청 살균 역가	
	H44/76	CU385
항-TbpA-Hsf와 비면역 혈청	5378	2141
항-TbpA-Hsf와 항-FhaB	5260	2563
항-TbpA-Hsf와 항-Hap	4577	5150
항-TbpA-Hsf와 항-FrpA/C	5034	4358
항-TbpA-Hsf와 항-LbpB	5400	4834
항-TbpA-Hsf와 항-D15	4823	4657
항-TbpA-Hsf와 항-PilQ	4708	2242
항-TbpA-Hsf와 항-NspA	4738	2518
항-TbpA-Hsf와 항-FrpC	6082	2300

실시예 10: 외막 소포 제제내의 FrpB KO가 동종 및 이종 균주에서 살균 면역 반응을 유도시키는 능력에 미치는 영향

H44/76 나이세리아 메닌기티디스의 2개의 균주를 사용하고, 0.1% DOC 추출물을 사용해서 LOS 함량이 약 20%가 되도록 하여 WO01/09350호에 기재된 외막 소포 제제를 제조하였다. 균주 B1733은 siaD(-), PorA(-)이고, Tr1Hsf(실시예 8)이 상향조절된 것이며, lgtB는 녹아웃시켰다. 균주 B1820 B1733은 siaD(-), PorA(-)이고, Tr1Hsf이 상향조절된 것이며, lgtB는 녹아웃시키고, FrpB도 녹아웃시켰다. 둘 모두의 균주를 60µM 데스페탈이 보충된 배지에서 배양하여, LbpA/B 및 TbpA/B와 같은 철 조절된 단백질이 상향조절되도록 하였다.

수포 제제를 Al(OH)₃ 상에 흡착시키고, 5µg을 30마리의 마우스 군에게 근육내로 0일 및 21일째에 주사하였다. 28 일째에 혈액 샘플을 취하였다.

3가지 L3 균주(동종 야생형 균주 H44/76 및 2가지 이종 L3 균주, NZ124 및 M97250687)에 대하여 실시예 6에 기재된 바와 같이 혈청 살균 분석을 수행하였다.

결과

접종에 사용한 수포	H44/76 GMT SC	M97250687 GMT SC	NZ124 GMT SC
B1733	1518 30/30	151 11/30	70 4/29
B1820	781 19/30	1316 24/30	276 19/30

GMT는 SBA에 있어서 혈청의 기하 평균 역가를 말한다.

SC는 혈청전환하는 마우스의 수를 의미한다(SBA 역가>1/100).

상기 결과는 FrpB KO(B1820) 수포가 FrpB(+) 수포(B1733)에 비해서 보다 우수한 이중 교차 살균 반응이 더욱 우수하다는 사실을 입증한다. SBA 역가가 더 높고, 보다 높은 분율의 마우스가 균주 M97250687 및 NZ124에서 혈청 전환되었다. 그러나, 동종 균주에서 얻어진 결과는 FrpB가 결실된 경우만큼 우수하지는 않았다.

이와 같은 데이터는, FrpB가 면역 반응을 구동시키지만, 상기 외막 단백질은 매우 가변적이기 때문에 당해 단백질에 대한 항체는 동종 균주의 사멸을 유발할 수 있을 뿐임을 시사한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

동일하거나 상이한 그람 음성 박테리아로부터 유래된, 분리된 트랜스페린 결합 단백질(Tbp) 또는 이것의 항원성 단편 및 분리된 Hsf류 단백질 또는 이것의 항원성 단편을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질 또는 이것의 단편 및 Hsf류 단백질 또는 이것의 단편이 나이세리아로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질 또는 이것의 단편이 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 4.

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 있어서, Hsf류 단백질 또는 이것의 단편이 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 5.

제 1 항 내지 제 4 항중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질 또는 이것의 단편이 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 6.

제 1 항 내지 제 5 항중 어느 한 항에 있어서, Hsf류 단백질 또는 이것의 단편이 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 6 항중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질 또는 이것의 단편이 나이세리아 고노로아로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 8.

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에 있어서, Hsf류 단백질 또는 이것의 항원성 단편이 나이세리아 고노로아로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 9.

제 1 항 내지 제 8 항중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질 또는 이것의 항원성 단편이 모락셀라 카타랄리스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 10.

제 1 항 내지 제 9 항중 어느 한 항에 있어서, Hsf류 단백질 또는 이것의 항원성 단편이 모락셀라 카타랄리스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 11.

제 1 항 내지 제 10 항중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질 또는 이것의 항원성 단편이 헤모필러스 인플루엔자로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 12.

제 1 항 내지 제 11 항중 어느 한 항에 있어서, Hsf류 단백질 또는 이것의 항원성 단편이 헤모필러스 인플루엔자로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 13.

제 1 항 내지 제 12 항중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질이 TbpA 또는 이것의 항원성 단편인 면역원성 조성물.

청구항 14.

제 13 항에 있어서, 고분자량 형태의 TbpA, 저분자량 형태의 TbpA, 또는 고분자량 형태의 TbpA와 저분자량 형태의 TbpA 둘 모두를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 15.

제 1 항 내지 제 14 항중 어느 한 항에 있어서, Hsf류 단백질이 Hsf 또는 이것의 항원성 단편인 면역원성 조성물.

청구항 16.

제 1 항 내지 제 15 항중 어느 한 항에 있어서, 나이세리아, 모락셀라 카타랄리스 또는 헤모필러스 인플루엔자 감염에 대하여 보호 반응을 일으킬 수 있는 Tbp 및/또는 Hsf류 단백질의 항원성 단편을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 17.

제 16 항에 있어서, TbpA 및/또는 Hsf의 항원성 단편을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 18.

제 1 항 내지 제 17 항중 어느 한 항에 있어서, Tbp와 Hsf류 단백질의 융합 단백질 또는 이것의 항원성 단편을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 19.

제 18 항에 있어서, TbpA와 Hsf 단백질을 포함하는 융합 단백질 또는 나이세리아 감염에 대하여 보호 반응을 일으킬 수 있는 이것의 항원성 단편을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 20.

그램 음성 박테리아로부터 유래된 외막 소포 제제를 포함하는 분리된 면역원성 조성물로서, 트랜스페린 결합 단백질과 Hsf류 단백질의 발현이 변형되지 않은 그램 음성 박테리아에서 천연적으로 발생하는 발현 보다 1.5배 이상 높은 면역원성 조성물.

청구항 21.

제 20 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질의 발현이 철 제한 조건하에서 성장시킴으로써 상향조절되는 면역원성 조성물.

청구항 22.

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서, 외막 소포 제제의 일부 또는 전부가 나이세리아로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 23.

제 20 항 내지 제 22 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제의 일부 또는 전부가 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 24.

제 20 항 내지 제 23 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제의 일부 또는 전부가 나이세리아 메닌기티디스 혈청 균 B로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 25.

제 20 항 내지 제 22 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제의 일부 또는 전부가 나이세리아 고노로아로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 26.

제 20 항 내지 제 25 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제가 유래되는 숙주 세포가 LgtB 및 LgtE중 하나 이상, 바람직하게는 LgtB의 발현을 하향조절하도록 공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 27.

제 20 항 내지 제 26 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제가 유래되는 숙주 세포가 캡슐형 폴리사카라이드를 합성할 수 없고, 바람직하게는 이러한 숙주 세포가 siaD, ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA(synX 및 siaA와 동등함), synB(siaB 및 synC(siaC와 동등함)와 동등함)중 하나 이상, 가장 바람직하게는 siaD의 발현을 하향조절하도록, 바람직하게는 결실시키도록 공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 28.

제 20 항 내지 제 27 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제가 유래되는 숙주 세포가 OpC, OpA 및 PorA중 하나 이상, 바람직하게는 PorA의 발현을 하향조절하도록, 바람직하게는 결실시키도록 공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 29.

제 20 항 내지 제 28 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제가 유래되는 숙주 세포가 FrpB의 발현을 하향조절하도록, 바람직하게는 결실시키도록 공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 30.

제 20 항 내지 제 29 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제가 유래되는 숙주 세포가 msbB 및/또는 HtrB, 바람직하게는 msbB의 발현을 하향조절하도록, 바람직하게는 결실시키도록 공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 31.

제 20 항 내지 제 30 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제가 외막 단백질(OMP)에 컨쥬게이션된 LPS를 함유하는 면역원성 조성물.

청구항 32.

제 31 항에 있어서, LPS가 외막 소포 제제내에 동일계에서(in situ) 컨쥬게이션(바람직하게는 수포내(intra-bleb))되어 있는 면역원성 조성물.

청구항 33.

제 20 항 내지 제 32 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제의 일부 또는 전부가 모락셀라 카타랄리스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 34.

제 20 항 내지 제 33 항중 어느 한 항에 있어서, 외막 소포 제제의 일부 또는 전부가 헤모필러스 인플루엔자로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 35.

제 20 항 내지 제 34 항중 어느 한 항에 있어서, 2종 이상의 그램 음성 박테리아 균주로부터 분리된 외막 소포 제제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 36.

제 35 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질과 Hsf류 단백질이 상이한 박테리아 균주로부터 유래되는 상이한 소포 상에서 상향조절되거나, 동일한 박테리아 균주로부터 유래되는 동일한 소포상에서 상향조절되는 면역원성 조성물.

청구항 37.

제 20 항 내지 제 36 항중 어느 한 항에 있어서, 향상된 트랜스페린 결합 단백질 발현이 그램 음성 박테리아내로 도입된 폴리핵산으로부터 유래되는 외막 소포 제제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 38.

제 20 항 내지 제 37 항중 어느 한 항에 있어서, 향상된 Hsf류 단백질 발현이 그램 음성 박테리아내로 도입된 폴리핵산으로부터 유래되는 것인 외막 소포 제제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 39.

제 20 항 내지 제 38 항중 어느 한 항에 있어서, 향상된 트랜스페린 결합 단백질 및 Hsf류 단백질 발현이 그램 음성 박테리아내로 도입된 둘 모두의 단백질을 엔코딩하는 폴리핵산으로부터 유래되는 외막 소포 제제를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 40.

제 20 항 내지 제 39 항중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 균주가 트랜스페린 결합 단백질을 엔코딩하는 유전자의 상류에 보다 강력한 프로모터 서열을 도입시키도록 유전공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 41.

제 20 항 내지 제 40 항중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 균주가 Hsf류 단백질을 엔코딩하는 유전자의 상류에 보다 강력한 프로모터 서열을 도입시키도록 유전공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 42.

제 20 항 내지 제 41 항중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 균주가 트랜스페린 결합 단백질 및 Hsf류 단백질을 엔코딩하는 유전자의 상류에 보다 강력한 프로모터 서열을 도입시키도록 유전공학처리된 것인 면역원성 조성물.

청구항 43.

제 20 항 내지 제 42 항중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질이 TbpA, 바람직하게는 고분자량 TbpA, 저분자량 TbpA 또는 고분자량 TbpA와 저분자량 TbpA 둘 모두, 가장 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 44.

제 20 항 내지 제 43 항중 어느 한 항에 있어서, Hsf류 단백질이 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 Hsf인 면역원성 조성물.

청구항 45.

제 1 항 내지 제 44 항중 어느 한 항에 있어서, 단순한(plain) 또는 컨쥬게이션된 박테리아 캡슐형 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 46.

제 1 항 내지 제 45 항중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 결합 단백질, Hsf류 결합 단백질 또는 둘 모두에 컨쥬게이션된 2개 이상의 박테리아 캡슐형 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 47.

제 45 항 또는 제 46 항에 있어서, 캡슐형 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드가 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 A, 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 C, 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 Y, 나이세리아 메닌기티디스 혈청균 W-135, 헤모필러스 인플루엔자 b, 스트렙토코커스 뉴모니아, 그룹 A 스트렙토코키, 그룹 B 스트렙토코키, 스태필로코커스 아우레우스 및 스태필로코커스 에피테르미디스로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 박테리아로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 48.

발현이 진행 프로모터에 의해 구동되는 트랜스페린 결합 단백질 또는 이것의 항원성 단편 및 Hsf류 단백질 또는 이것의 항원성 단편을 엔코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(들)을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 49.

제 48 항에 있어서, 나이세리아의 TbpA 및 Hsf가 엔코딩되는 면역원성 조성물.

청구항 50.

제 48 항 또는 제 49 항에 있어서, 나이세리아 메닌기티디스의 TbpA 및 Hsf가 엔코딩되는 면역원성 조성물.

청구항 51.

제 1 항 내지 제 50 항중 어느 한 항에 있어서, 애쥬번트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 52.

제 51 항에 있어서, 알루미늄 염을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 53.

제 51 항 또는 제 52 항에 있어서, 3D-MPL을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 54.

제 51 항에 있어서, CpG를 함유하는 애쥬번트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 55.

제 1 항 내지 제 54 항중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물과 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 백신.

청구항 56.

보호 용량 또는 유효량의 제 55 항의 백신을 투여하는 것을 포함하여, 그램 음성 박테리아 질병을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 57.

제 56 항에 있어서, 나이세리아 감염증이 예방되거나 치료되는 방법.

청구항 58.

그램 음성 박테리아 감염을 치료하거나 예방하기 위한 약제를 제조하는데 사용되는 제 55 항의 백신의 용도.

청구항 59.

제 58 항에 있어서, 나이세리아 감염증을 치료하거나 예방하기 위한 약제를 제조하는데 사용되는 용도.

청구항 60.

제 20 항 내지 제 44 항중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물에 포함된 외막 소포가 유래될 수 있는, 유전공학처리된 그램 음성 박테리아 균주.

청구항 61.

분리된 트랜스페린 결합 단백질 및 분리된 Hsf류 단백질 또는 이들의 항원성 단편을 함께 혼합하는 단계를 포함하여, 제 1 항 내지 제 17 항중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 62.

그람 음성 박테리아 배양물로부터 외막 소포 제제를 분리하는 단계를 포함하여, 제 20 항 내지 제 44 항중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 63.

제 62 항에 있어서, 외막 소포 제제를 분리시키는 단계가 0 내지 0.5%, 0.02 내지 4%, 0.04 내지 3%, 0.06 내지 0.2%, 0.08 내지 0.15%, 또는 바람직하게는 0.1%의 세정제, 바람직하게는 DOC로 추출하는 것을 포함하는 방법.

청구항 64.

박테리아 캡슐형 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 트랜스페린 결합 단백질 및/또는 Hsf류 단백질에 컨주게이션시키는 단계를 포함하여, 제 47 항의 면역원성 조성물을 제조하는 방법.

청구항 65.

제 1 항 내지 제 54 항중 어느 한 항에 따른 면역원성 조성물을 약학적으로 허용되는 부형제를 배합시키는 단계를 포함하여, 제 55 항의 백신을 제조하는 방법.

청구항 66.

제 55 항의 백신으로 수용자를 면역화시키는 단계 및 수용자로부터 면역글로불린을 분리하는 단계를 포함하여, 나이세리아 감염을 예방하거나 치료하는데 사용되는 면역글로불린을 제조하는 방법.

청구항 67.

제 66 항의 방법으로부터 수득될 수 있는 면역글로불린 제제.

청구항 68.

제 67 항의 면역글로불린 제제 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 제제.

청구항 69.

나이세리아 메닌기티디스의 TbpA와 Hsf에 대한 모노클로날 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 제제.

청구항 70.

환자에게 유효량의 제 68 항 또는 제 69 항에 따른 약학적 제제를 투여하는 단계를 포함하여, 그람 음성 박테리아 감염을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 71.

그람 음성 박테리아 질병을 치료하거나 예방하기 위한 약제를 제조하는데 사용되는, 제 68 항 또는 제 69 항에 따른 약학적 제제의 용도.

요약

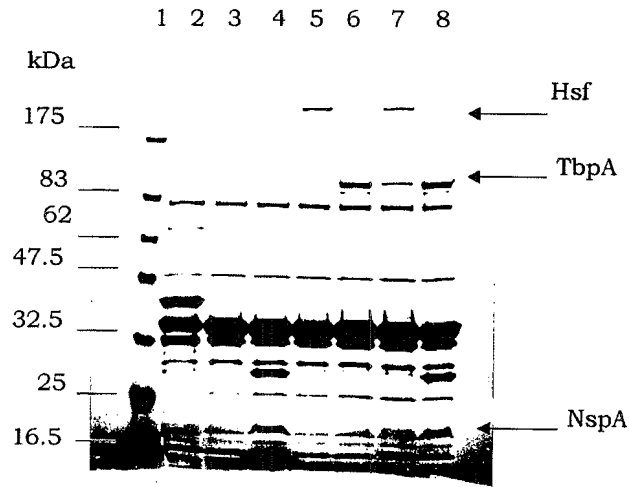
본 발명은 그람 음성 박테리아 감염을 예방하거나 치료하기 위한 면역원성 조성물 및 백신에 관한 것이다. 본 발명의 면역원성 조성물은 트랜스페린 결합 단백질 및 Hsf를 포함하며, 이들 두 항원의 조합은 혈청 살균 분석에서 고활성을 지닌 항체를 생성하도록 상승적으로 작용하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 항원의 조합은 나이세리아 메닌기티디스, 나이세리아 고노로아, 모락셀라 카타랄리스 및 헤모필러스 인플루엔자에 대한 백신에 사용하기에 유용하다.

대표도

도 1

도면

도면1



SEQUENCE LISTING

<110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

<120> Vaccine composition

<130> B45314

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

ggaattccat atgatgaaca aatataccg c

31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

gtagctagct agcttaccac tgataaccga c

31

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 3
 aactgcagaa ttaatatgaa aggagaagaa cttttc 36

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 4
 gacatactag tttatttgta gagctcatcc atg 33

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 5
 tccccgcggg ccgtctgaat acatcccgtc 30

<210> 6
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 6
 catatgggct tccttttgta aatttgaggg caaacacccg atacgtcttc a 51

<210> 7
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 7
 agacgtatcg ggtgtttgcc ctcaaattta caaaaggaag cccatatg 48

<210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 8

gggtattccg ggccttcag acggcgcagc agg 33

<210> 9
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 9
 ggcctagcta gccgtctgaa gcgattagag tttcaaaatt tattc 45

<210> 10
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 10
 ggccaagctt cagacggcgt tcgaccgagt ttgagccttt gc 42

<210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 11
 tccccggga agatctggac gaaaaatctc aagaaaccg 39

<210> 12
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 12
 ggaagatctc cgctcgagca aatttcaaaa aggaagccga tatgcaacag caacatttgt 60
 tccg 64

<210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 13
 ggaagatctc cgctcgagac atcgggcaaa caccgc 36

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 14

tccccggga gatctcacta gtattaccct gttatccc

38