



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년10월19일
 (11) 등록번호 10-0922031
 (24) 등록일자 2009년10월08일

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/39* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7027021(분할)

(22) 출원일자 2000년04월04일

심사청구일자 2007년12월18일

(85) 번역문제출일자 2007년11월20일

(65) 공개번호 10-2007-0114854

(43) 공개일자 2007년12월04일

(62) 원출원 특허 10-2001-7013357

원출원일자 2001년10월19일

심사청구일자 2005년04월02일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2000/002920

(87) 국제공개번호 WO 2000/62800

국제공개일자 2000년10월26일

(30) 우선권주장

09/301,829 1999년04월29일 미국(US)

9908885.8 1999년04월19일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

WO199633739 A1

WO199517210 A1

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이수형

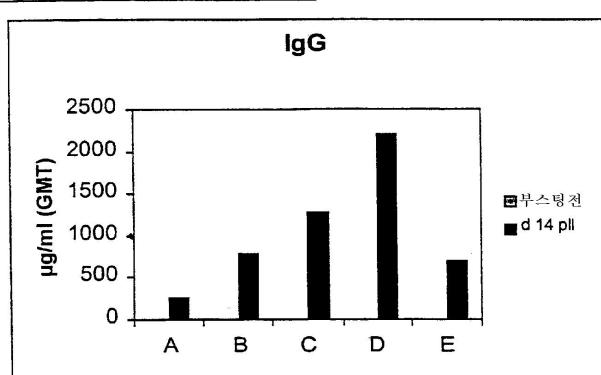
(54) 백신

(57) 요 약

본 발명은 백신에 사용하기에 적합한 애주번트 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 애주번트 조성물은 사포닌 및 면역자극성 올리고누클레오티드와 임의로 담체를 포함한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 애주번트 및 항원을 포함하는 백신을 제공한다. 추가로, 본 발명의 애주번트 및 백신의 제조 방법, 및 이들의 약제로서의 용도가 제공된다. 또한, 본 발명의 백신을 투여하므로써 질병에 걸리기 쉽거나 않고 있는 개인을 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1

마우스에서의 리포-OspA에 대한 혈청 IgG



(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

특허청구의 범위

청구항 1

용혈성 사포닌 및 메틸화되지 않은 CpG 모티프를 포함하는 면역자극성 올리고누클레오티드를 포함하며, 상기 사포닌이 리포솜 또는 수중유 에멀젼 형태로 존재하는 백신 조성물로서, 상기 백신 조성물이 흑색종 항원 E (MAGE), 흑색종에서 우선 발현되는 항원 (PRAME), B 흑색종 항원 (BAGE), G 항원 (GAGE), 종양 특이적 강글리오시드, 전립선 특이적 항원 (PSA), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (Her-2/Neu), 인간 선암종 관련 항원 (KSA (GA733)), 전립선 산성 포스파타아제 (PAP), 맘마글로빈(mammaglobin), 뮤신-1 (MUC-1), 암성배아성 항원, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 전립선 줄기세포 항원 (PSCA), 티로시나아제, 서바이빈(survivin), 뉴욕 에소포길 편평세포암종 (NY-ES01), 프로스타아제(prostase), PS108, 신장 종양 항원 (RAGE), L 항원 (LAGE), 헬리코오스 항원 (HAGE), 자가 웨პ티드 호르몬인 GnRH로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항원을 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 면역자극성 올리고누클레오티드가 푸린, 푸린, C, G, 피리미딘, 피리미딘 서열을 포함하는 백신 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 면역자극성 올리고누클레오티드가 TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT(서열 번호: 1); TCT CCC AGC GTG CGC CAT(서열 번호 2); ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG(서열 번호: 3); TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT(서열 번호: 4); TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT(서열 번호: 5)를 포함하는 군으로부터 선택되는 백신 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서, 사포닌이 Quil A로부터 유래되는 것인 백신 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 사포닌이 QS21인 백신 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1 항에 있어서, 리포솜이 콜레스테롤을 함유하는 백신 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제 1 항에 있어서, 모노포스포릴 지질 A 또는 3-데-0-아실화 모노포스포릴 지질 A를 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

제 1 항에 있어서, 백신이 전신 투여되는 백신 조성물.

청구항 17

제 1 항에 있어서, 백신이 점막 투여되는 백신 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

(i) 리포솜 또는 수중유 에멀젼 형태의 용혈성 사포닌, (ii) 메틸화되지 않은 CpG 모티프를 포함하는 면역자극성 올리고누클레오티드, 및 (iii) 흑색종 항원 E (MAGE), 흑색종에서 우선 발현되는 항원 (PRAME), B 흑색종 항원 (BAGE), G 항원 (GAGE), 종양 특이적 강글리오시드, 전립선 특이적 항원 (PSA), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (Her-2/Neu), 인간 선암종 관련 항원 (KSA (GA733)), 전립선 산성 포스파타아제 (PAP), 맘마글로빈 (mammaglobin), 뮤신-1 (MUC-1), 암성배아성 항원, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 전립선 줄기세포 항원 (PSCA), 티로시나아제, 서바이빈(survivin), 뉴욕 에소포길 편평세포암종 (NY-ES01), 프로스타아제(prostase), PS108, 신장 종양 항원 (RAGE), L 항원 (LAGE), 헬리코오스 항원 (HAGE), 자가 웨პ티드 호르몬인 GnRH로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항원의 배합물을 포함하는, 암을 예방하거나 치료하기 위한 약제.

청구항 20

(i) 리포솜 또는 수중유 에멀젼 형태의 용혈성 사포닌, (ii) 메틸화되지 않은 CpG 모티프를 포함하는 면역자극성 올리고누클레오티드, 및 (iii) 흑색종 항원 E (MAGE), 흑색종에서 우선 발현되는 항원 (PRAME), B 흑색종 항원 (BAGE), G 항원 (GAGE), 종양 특이적 강글리오시드, 전립선 특이적 항원 (PSA), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (Her-2/Neu), 인간 선암종 관련 항원 (KSA (GA733)), 전립선 산성 포스파타아제 (PAP), 맘마글로빈 (mammaglobin), 뮤신-1 (MUC-1), 암성배아성 항원, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 전립선 줄기세포 항원 (PSCA), 티로시나아제, 서바이빈(survivin), 뉴욕 에소포길 편평세포암종 (NY-ES01), 프로스타아제(prostase), PS108, 신장 종양 항원 (RAGE), L 항원 (LAGE), 헬리코오스 항원 (HAGE), 자가 웨პ티드 호르몬인 GnRH로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 항원을 혼합하는 것을 포함하여 제 1 항에 따른 백신 조성물을 제조하는 방법.

청구항 21

제 1항에 있어서, 흑색종 항원 E (MAGE)가 MAGE-1 또는 MAGE-3인 백신 조성물.

청구항 22

제 19항에 있어서, 흑색종 항원 E (MAGE)가 MAGE-1 또는 MAGE-3인 약제.

청구항 23

제 20항에 있어서, 흑색종 항원 E (MAGE)가 MAGE-1 또는 MAGE-3인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 백신에 사용하기 위한 신규한 애쥬번트(adjuvant) 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 애쥬번트 조성물은 사포닌 및 면역자극성 올리고누클레오티드의 조합물을 포함하며, 이러한 조합물은 임의로 담체를 추가로 포함한다. 또한, 본 발명은, 본 발명의 애쥬번트 조성물 및 하나 이상의 항원을 포함하는 백신을 제공한다. 또한, 본 발명의 애쥬번트 조성물 및 백신의 제조 방법, 및 이들의 약제로서의 용도를 제공한다. 추가로, 본 발명은 본 발명의 백신을 비경구적 또는 점막 투여하여, 질병에 걸리기 쉽거나 질병을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

배경 기술

<2> 메틸화되지 않은 CpG 디누클레오티드("CpG")를 함유하는 면역자극성 올리고누클레오티드는 전신 경로 및 점막 경로 양자에 의해 투여되는 경우에 애쥬번트인 것으로서 당 분야에 공지되어 있다[참조: WO 96/02555, EP 468520, Davis et al., *J. Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie and Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6]. CpG는 DNA에 존재하는 시토신-구아노신 디누클레오티드 모티프(motif)에 대한 약어이다. 역사적으로, BCG의 DNA 분획이 항종양 효과를 나타낼 수 있다는 것이 관찰되었다. 이후 연구에서, BCG 유전자 서열로부터 유래한 합성 올리고누클레오티드가 면역자극성 효과(시험관내 및 생체내 둘 모두에서)를 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 이들 연구자들은 중앙에 CG 모티프를 포함하는 특정 회문식 서열(palindromic sequence s)이 이러한 활성을 지닌다는 결론을 내렸다. 면역자극에서 CG 모티프의 주요 역할은 이후 문헌(Krieg, *Nature* 374, p546, 1995)에서 규명되었다. 상세한 분석으로부터, CG 모티프가 특정 서열 컨텍스트(context)로 존재해야 하며, 이러한 서열이 박테리아 DNA에서는 보편적이나 척추동물의 DNA에서는 드문 것으로 나타났다. 면역자극성 서열은 종종 푸린, 푸린, C, G, 피리미딘, 피리미딘이며, 이때 디누클레오티드 CG 모티프는 메틸화되지 않으나 다른 메틸화되지 않은 CpG 서열은 면역자극성인 것으로 알려져 있으며, 이는 본 발명에 사용될 수 있다.

<3> 6개의 누클레오티드의 특정 조합에서, 회문식 서열이 존재한다. 하나의 모티프의 반복으로서 또는 상이한 모티프의 조합으로서, 수개의 이러한 모티프는 동일한 올리고누클레오티드내에 존재할 수 있다. 하나 이상의 이러한 면역자극성 서열 함유 올리고누클레오티드의 존재는 천연 치사 세포(인터페론 γ 를 생성하며, 세포용해 활성을 갖는) 및 마크로파지(Wooldridge et al Vol 89(no. 8), 1977)를 포함하는 여러 면역 서브셋(subset)을 활성화시킬 수 있다. 현재, 다른 메틸화되지 않은 CpG 함유 서열은 이러한 공통(consensus) 서열을 가지지 않음에도 면역조절성인 것으로 밝혀졌다.

<4> 백신으로 제형화되는 경우에 CpG는 일반적으로 유리 항원과 함께 유리 용액으로 투여되거나(WO 96/02555; McCluskie and Davis, 상기 문헌), 항원에 공유적으로 켄쥬게이팅되어 투여되거나(PCT 출원 공개 제 WO 98/16247), 수산화알루미늄과 같은 담체와 함께 제형화된다((간염 표면 항원) Davis et al. 상기 문헌; Brazolot-Millan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1998, 95(26), 15553-8).

<5> 사포닌은 문헌에 설명되어 있다[참조: Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 pp 363-386)]. 사포닌은 식물 및 해양 동물계에서 광범위하게 분포되어 있는 스테로이드 또는 트리테르펜 글리코사이드이다. 사포닌은 진탕시 포말을 일으키는 수중의 콜로이드 용액을 형성시키기 위해, 그리고 콜레스테롤을 침전시키기 위해 주목된다. 사포닌이 세포막 근처에 있는 경우, 사포닌은 막에 포어형 구조를 형성하는데, 이는 막의 파열을 유도한다. 적혈구의 용혈은 이러한 현상의 일례이며, 이는 모든 사포닌이 아닌 특정 사포닌의 성질이다.

<6> 사포닌은 전신 투여용 백신의 애쥬번트로 알려져 있다. 개개의 사포닌의 애쥬번트 및 용혈 활성은 당업계에서 집중적으로 연구되어 왔다[참조: Lacaille-Dubois and Wagner, 상기 문헌]. 예를 들어, Quill A(남미에서 자생하는 Quillaja Saponaria Molina라는 나무의 껍질에서 추출됨) 및 이의 분획은 문헌에 기술되어 있다[참조: US 5,057,540 and "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C.R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1996, 12(1-2): 1-55; and EP 0 362 279 B1].

<7> Quill A의 분획을 포함하는, 면역 자극 복합체(Immune Stimulating Complexes(ISCOMS))로 불리는 미립 구조물은 용혈성이며, 백신을 제조하는데 사용되어 왔다[참조: Morein, B., EP 0 109 942 B1]. 이를 구조는 애쥬번트

활성을 갖는 것으로 보고되었다[참조: EP 0 109 942 B1; WO 96/11711].

<8> 용혈성 사포닌 QS21 및 QS17(Qui1 A의 HPLC 정제된 분획)은 효능있는 전신성 애쥬번트로 기술되었으며, 이들의 제조방법은 미국 특허 제 5,057,540 및 EP 0 362 279 B1에 개시되어 있다. 이들 문헌에는 또한 전신성 백신용의 효능있는 애쥬번트로서 작용하는 QS7(Qui1 A의 비용혈성 분획)의 용도가 기술되어 있다. QS21의 용도는 또한 켄실(Kensi1) 등의 문헌(1991. J. Immunology vol 146, 431-437)에 기술되어 있다. QS21 및 폴리소르베이트 또는 시클로덱스트린의 조합물이 또한 알려져 있다[WO 99/10008]. QS21 및 QS7과 같은 Qui1 A의 분획을 포함하는 미립 애쥬번트 시스템은 WO 96/33739 및 WO 96/11711에 개시되어 있다.

<9> 전신성 백신화 연구에서 사용되어 온 다른 사포닌에는 깁소필라(Gypsophila) 및 사포나리아(Saponaria)와 같은 다른 식물 종으로부터 유래한 것들도 포함된다[참조: Bomford et al., Vaccine, 10(9): 572-577, 1992].

<10> 사포닌은 또한 점막에 적용된 백신 연구에 사용되어 온 것으로 알려져 있으며, 이는 면역 반응의 유도에 가변적 성공을 이루게 하였다. Qui1-A 사포닌은 종래에는, 항원이 비강내 투여되는 경우에 면역 반응의 유도에 어떠한 효과도 미치지 않는 것으로 나타났다[참조: Gizurarson et al. 1994. Vaccine Research 3, 23-29]. 반면에, 다른 저자들은 이러한 애쥬번트를 성공적으로 사용하였다[참조: Maharaj et al., Can. J. Microbiol., 1986, 32(5):414-20; Chavali and Campbell, Immunobiology, 174(3):347-59]. Qui1 A 사포닌을 포함하는 ISCOM은 위내 및 비강내 백신 제형으로 사용되어 왔으며, 애쥬번트 활성을 나타냈다[참조: McI Mowat et al., 1991, Immunology, 72, 317-322; McI Mowat and Donachie, Immunology Today, 12, 383-385].

<11> Qui1 A의 비독성 분획인 QS21 또한 경구 또는 비강내 애쥬번트로서 기술되었다[참조: Sumino et al., J. Virol., 1998, 72(6):4931-9; WO 98/56415].

<12> 비강내 백신화 연구에서 그 밖의 사포닌의 용도는 기술된 바 있다. 예를 들어, 체노포odium 큐노아(*Chenopodium quinoa*) 사포닌은 비강내 백신 및 위내 백신 모두로 사용되었다[참조: Estrada et al., Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1998, 21(3):225-36].

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<13> 본 발명은, 면역자극성 올리고누클레오티드(CpG) 및 사포닌의 조합물이 탁월하게 효능있는 애쥬번트라는 놀라운 발견에 관련된 것이다. 따라서, 사포닌과 면역자극성 올리고누클레오티드의 조합물을 포함하는 애쥬번트 조성물이 제공된다. 바람직하게는, 본 발명의 애쥬번트는 추가로 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 형태에서, 애쥬번트와 백신 조성물에서 사포닌과 올리고누클레오티드는 항원 특이적 항체의 유도에 상승적으로 작용하며, Th1 타입의 면역계와 통상적으로 관련된 면역 반응의 유도에 효능이 있다. 따라서, 애쥬번트 조합물은 놀랍게도 질병의 면역예방에 적합할 뿐만 아니라, 지속성 바이러스, 박테리아 또는 기생충 감염과 같은 질병, 및 암과 같은 만성 질환의 면역 치료에 적합하다.

<14> 본 발명의 애쥬번트 또는 백신으로 사용하기에 바람직한 올리고누클레오티드는 바람직하게는 세개 이상, 보다 바람직하게는 6개 이상의 누클레오티드에 의해 분리된 두개 이상의 디누클레오티드 CpG 모티프를 함유한다. 본 발명의 올리고누클레오티드는 일반적으로 데옥시누클레오티드이다. 바람직한 구체예에서, 올리고누클레오티드 내 누클레오티드간 결합은 포스포로디티오에이트, 또는 보다 바람직하게는 포스포로티오에이트 결합이지만, 포스포디에스테르 및 혼합된 누클레오티드간 결합을 갖는 올리고누클레오티드를 포함하는 그 밖의 누클레오티드간 결합이 본 발명의 범주내에 있다. 포스포로티오에이트 올리고누클레오티드 또는 포스포로디티오에이트를 생성시키는 방법은 US 5,666,153, US 5,278,302 및 WO 95/26204에 기술되어 있다.

<15> 바람직한 올리고누클레오티드의 예들은 하기 서열을 갖는다. 하기 서열은 바람직하게는 포스포로티오에이트 변형된 누클레오티드간 결합을 함유한다.

OLIGO 1(서열 번호: 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT(CpG 1826)

OLIGO 2(서열 번호: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT(CpG 1758)

OLIGO 3(서열 번호: 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4(서열 번호: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT(CpG 2006)

- <20> OLIGO 5(서열 번호: 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT(CpG 1668)
- <21> 대안적인 CpG 올리고누클레오티드는 중요하지 않은 결실부 또는 첨가부를 갖는다는 점에서 상기 바람직한 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 이용되는 CpG 올리고누클레오티드는 당 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해서도 합성될 수 있다(예를 들어, EP 468520). 편의상, 이러한 올리고누클레오티드는 자동화 합성기를 이용하여 합성될 수 있다.
- <22> 본 발명에 이용되는 올리고누클레오티드는 일반적으로 테옥시누클레오티드이다. 바람직한 구체예에서, 올리고누클레오티드의 누클레오티드간 결합은 포스포로디티오에이트, 또는 보다 바람직하게는 포스포로티오에이트 결합이지만, 포스포디에스테르도 본 발명의 범주내에 포함된다. 상이한 누클레오티드간 결합을 포함하는 올리고누클레오티드, 예컨대, 혼합된 포스포로티오에이트 포스포디에스테르가 고려된다. 올리고누클레오티드를 안정화시키는 그 밖의 누클레오티드간 결합이 사용될 수 있다.
- <23> 본 발명의 애쥬번트 조합물에 사용될 수 있는 사포닌은 문헌(US 5,057,540 and "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C.R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1996, 12(1-2): 1-55; and EP 0 362 279 B1)에 기재된 Quil A로 불리우는 나무껍질(*Quillaja saponaria Molina*)로부터 유래한 것들 및 이들의 분획을 포함한다. 특히 바람직한 Quil A의 분획은 QS21, QS7 및 QS17이다.
- <24> β-에스킨(Escin)은 본 발명의 애쥬번트 조성물에 사용하기에 바람직한 또 다른 용혈성 사포닌이다. 에스킨은 마로니에 나무(Lat: *Aesculus hippocastanum*)의 종자에서 생성되는 사포닌 혼합물로서 머크 인텍스(Merck index: 12th ed: entry 3737)에 기술되어 있다. 이들의 분리는 크로마토그래피 및 정제(Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213(1953))에 의해, 그리고 이온 교환 수지(Erbring et al., US 3,238,190)에 의해 이루어지는 것으로 기술되어 있다. 에스킨의 분획, α 및 β는 정제되었으며, 생물학적으로 활성인 것으로 나타났다[참조: Yoshikawa M, et al. (*Chem Pharm Bull(Tokyo)* 1996 Aug; 44(8):1454-1464)]. β-에스킨은 또한 아에스킨(aescin)으로도 알려져 있다.
- <25> 본 발명에 사용하기에 바람직한 또 다른 용혈성 사포닌은 디지토닌(Digitonin)이다. 디지토닌은 디지탈리스 푸르풀레아(*Digitalis purpurea*)의 종자로부터 유래하며, 문헌(Gisvold et al., *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1934, 23, 664; and Ruhenstroth-Bauer, *Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621)에 기술된 절차에 따라 정제된 사포닌으로서, 머크 인텍스(12th ed: entry 3204)에 기술되어 있다. 이의 용도는 콜레스테롤 측정을 위한 임상 시약인 것으로 기재되어 있다.
- <26> 본 발명의 애쥬번트 조합물은, 사포닌 또는 CpG, 또는 이들 모두가 조합물의 애쥬번트성을 증강시키기 위한 미립 담체 물질과 결합될 수 있도록 담체를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 특히 바람직한 전신성 백신은 담체 분자를 포함한다.
- <27> 본 발명의 애쥬번트 조합물에 사용되는 CpG는 유리 용액중에 존재하거나, 무기염(예를 들어, 알루미늄 또는 칼슘 염, 그러나, 이로 제한되는 것은 아님), 리포솜, ISCOM, 에멀션(수중유, 유중수, 수중유중수), 중합체(예컨대, 폴리락트계, 폴리글리콜계, 폴리포스파진, 폴리아미노산, 알기네이트, 키토산, 그러나, 이로 제한되는 것은 아님) 또는 마이크로입자와 같은 미립 담체에 복합체화될 수 있다. 바람직하게는, 상기 담체는 양이온성이다. 본 발명의 백신은 추가로, CpG-담체 복합체와 결합되거나 CpG-담체 복합체와 결합되지 않을 수 있는 항원을 포함한다. 이러한 경우에, 항원은 유리 혼탁액일 수 있거나 별도의 담체와 결합될 수 있다.
- <28> 본 발명의 사포닌 형성부는 미셀 형태로 분리되어 있거나, 콜레스테롤 및 지질로 제형화되는 경우에 ISCOM(EP 0 109 942 B1) 또는 리포솜(WO 96/33739)과 같은 크기 순서 구조의 형태로 또는 수중유 에멀션의 형태로(WO 95/17210) 존재할 수 있다. 사포닌은 바람직하게는 금속성 염, 예컨대, 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄(WO 98/15287)과 결합될 수 있다. 다르게는, 사포닌은 키토산과 같은 미립 담체와 결합될 수 있다. 사포닌은 또한 분말과 같은 건조 상태로 존재할 수 있다. 백신의 점막 표면에 투여되는 경우의 최종 제형 형태는 바람직하게는 사실상 용혈성이다. 사포닌은 직접적인 결합을 통하여거나, 동일한 미립 담체 분자와의 상호 작용에 의해 항원과 물리적으로 결합하거나 결합하지 않을 수 있다(GB9822712.7; WO 98/16247). 본 발명의 애쥬번트 또는 백신에서 CpG 및 사포닌은 그들 자체가 분리되거나 결합될 수 있다. 예를 들어, CpG 및 사포닌은 유리 혼탁액에 으로 존재하거나 담체, 보다 바람직하게는 수산화알루미늄과 같은 미립 담체를 통해, 또는 양이온성 리포솜 또는 ISCOM에 의해 결합될 수 있다.
- <29> 본 발명에 따른 바람직한 애쥬번트 조합물은 두개의 인접하는 CG 모티프 사이에 3개 이상, 바람직하게는 6개 이

상의 누클레오티드를 함유하는 하나 이상의 CpG 올리고누클레오티드와 함께, QS21, 및 수중유 에멀션 또는 DQ를 포함하는 군으로부터 선택된 미립 담체로 구성된다. 매우 바람직하게는, 애쥬번트 조합물은 QS21과 혼합된 CpG 2006(서열 번호:4), 또는 CpG 1758(서열 번호:2), 또는 CpG 1826(서열 번호:1), 및 수중유 에멀션 또는 DQ를 포함하는 군으로부터 선택된 미립 담체를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 특히 바람직한 백신은 이러한 애쥬번트 조합물 및 항원을 포함한다. 본 발명의 바람직한 백신은 전신 경로를 통해 개체에게 투여된 후 전신성 면역 반응을 일으키는데 사용된다.

<30> 본 발명의 애쥬번트 조합물은 전신 및 점막 애쥬번트 둘 모두로서 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 형태에서는, 근육내, 피내, 경피, 피하, 복강내 또는 정맥내 투여와 같은 비경구 경로 또는 전신 경로를 통해 투여되는 전신성 백신이 제공된다. 바람직한 투여 경로는 경피 경로를 통해서이며, 예를 들어 피부용 패치(patch)에 의해서이다.

<31> 본 발명의 전신성 백신 제제는 근육내, 복강내, 피내, 경피, 정맥내 또는 피하 투여에 의해 상기 백신을 투여하므로써, 질병에 걸리기 쉽거나 질병에 걸린 포유 동물을 보호하거나 치료하는데 사용될 수 있다. 백신 제제의 전신 투여 방법은 통상의 주사기 및 주사침, 고형 백신의 발사식 전달을 위해 설계된 기구(WO 99/27961), 또는 주사침이 없는 가압 액체 분사 기구(US 4,596,556; US 5,993,412), 또는 경피 패치(WO 97/48440; WO 98/28037)를 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 피부에 적용되는 항원의 면역원성을 증강시키는데 사용될 수 있다(경피 또는 경피성 전달 WO 98/20734; WO 98/28037). 그러므로, 본 발명은 본 발명의 백신 또는 애쥬번트 조성물로 사전 충전된 전신 투여용 전달 기구를 제공한다. 따라서, 항원 및 면역자극성 올리고누클레오티드, 사포닌 및 담체를 포함하는 백신을 개체에게 투여하는 것을 포함하여 개체에게서 면역 반응을 유도하기 위한 방법으로서, 백신이 비경구적 경로 또는 전신 경로를 통해 투여되는 방법이 제공된다. 면역 반응을 유도하는 바람직한 방법은, 서열 번호: 1, 2, 3, 4 또는 5의 올리고누클레오티드; QS21과 같은, Quil A로부터 유래한 사포닌; 및 수중유 에멀션, 콜레스테롤 함유 리포솜 또는 앤럼(alum)과 같은 담체를 포함하는 백신을 투여하는 것을 포함한다.

<32> 다르게는, 본 발명의 백신 제제는 경구/소화 또는 비강 투여와 같은 점막 경로를 통해 백신을 투여하므로써, 질병에 걸리기 쉽거나 질병을 앓고 있는 포유 동물을 보호하거나 치료하는데 사용될 수 있다. 대안적인 점막 경로는 질내 및 직장내이다. 바람직한 점막 투여 경로는 비강 경로를 통해서이며, 비강내 백신화라 하기도 한다. 비강내 백신화 방법은 당엽계에 널리 공지되어 있으며, 이는 면역화시키려는 개체의 비인두(nasopharynx)에 점적, 분무 또는 건조 분말 형태의 백신을 투여하는 것을 포함한다. 분사되거나 에어로졸화된 백신 제형 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 경구 투여의 위 저항성 캡슐 및 과립과 같은 장용 제형, 직장 또는 질내 투여용 좌제 또한 본 발명의 일부를 형성한다.

<33> 본 발명의 애쥬번트 조합물은 전신성 백신화를 점막 백신화로 대체하기 위한, 사람에게 적용하기에 적합한 점막 애쥬번트 류를 나타낸다. 본 발명의 바람직한 형태에서, QS21을 포함하는 Quil A 또는 이의 유도체; 에스킨; 디지토닌; 또는 깁소필라(*Gypsophila*) 또는 체노포듐 퀴노아(*Chenopodium quinoa*) 사포닌과 같은 순수한 사포닌과 함께 면역자극성 올리고누클레오티드가 전신성 면역 반응을 달성하기 위한 항원의 점막 투여용 애쥬번트로서 사용될 수 있다.

<34> 본 발명의 애쥬번트 조합물은 백신의 제형화에 사용되며, 이러한 백신은 전신 또는 점막 경로를 통해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 백신이 점막 투여용으로 사용되는 경우에, 애쥬번트 조합물은 용혈성 사포닌을 포함한다.

<35> 점막 투여를 위해, 본 발명의 조성물은 용혈성 사포닌을 바람직하게 포함한다. 본 발명의 의미내에 포함되는 용혈성 사포닌, 또는 사포닌 제제는 하기 검정을 참조로 하여 측정되어야 한다.

<36> 1. 기니아 피그로부터 채취한 신선한 혈액을 데스크-탑(desk-top) 원심분리기에서 인산염 완충 염수(PBS)로 3회 세척한다. 원래의 부피로 재현탁시킨 후, 혈액을 PBS중에서 10배로 추가 희석시킨다.

<37> 2. 50 μ l의 상기 혈액 혼탁액을, 계면활성제 또는 사포닌의 2배 희석액을 포함하는 800 μ l의 PBS에 첨가한다.

<38> 3. 8시간 후, 용혈 현상을 시각적으로 평가하거나 계면활성제의 광학 밀도를 측정하므로써 평가한다. 570nm에서 빛을 흡수하는 적색 상청액이 존재하면 용혈 현상이 일어난 것으로 간주한다.

<39> 4. 상기 결과는 용혈 현상이 더 이상 일어나지 않는 제 1 사포닌 희석 농도로서 표현된다.

<40> 본 발명의 목적상, 사포닌 애쥬번트 제제는, 그것이 0.1% 미만의 농도에서 적혈구를 용해시킨다면 용혈성이다. 참고로, Quil A, QS21, QS7, 디지토닌 및 β -에스킨의 사실상 순수한 샘플은 상기 검정에서 규정된 바와 같이 모두 용혈성 사포닌이다. 이러한 생물학적 검정의 고유한 실험적 가변성내에서, 본 발명의 사포닌은 바람직하

계는 약 0.5~0.00001%, 보다 바람직하게는 0.05~0.00001%, 훨씬 더 바람직하게는 0.005~0.00001%, 가장 바람직하게는 0.0001~0.0004%의 용혈 활성을 갖는다. 이상적으로, 이러한 사포닌은 QS21의 것과 유사한(즉, 10 배 차이 이내에서) 용혈 활성을 가져야 한다.

<41> 본 발명의 백신은 또한 경구 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 경우에, 약제학적으로 허용되는 부형제는 또한 알칼리성 완충액 또는 장용 캡슐 또는 미세과립을 포함할 수 있다. 본 발명의 백신은 또한 질 경로에 의해 투여될 수 있다. 이러한 경우에, 약제학적으로 허용되는 부형제는 또한 에멀션화제, 카르보폴®(CARBOPOL®)과 같은 중합체, 및 질용 크림 및 좌제의 그 밖의 공지된 안정화제를 포함할 수 있다. 본 발명의 백신은 또한 직장 경로에 의해 투여될 수 있다. 이러한 경우에, 부형제는 또한 직장용 좌제를 형성하기 위한 당 분야에 공지된 왁스 및 중합체를 포함할 수 있다.

<42> 본 발명의 애쥬번트 조합물에서 하나 이상의 사포닌의 제제는 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 예를 들면, QS21, QS7, Quil A, β-에스킨 또는 디지토닌을 포함하는 군으로부터의 2개 이상의 조합물이 있다. 추가로, 본 발명의 조성물은 하나 이상의 면역조절성 올리고누클레오티드의 조합물을 포함할 수 있다.

<43> 본 발명의 유사한 구체예에서, 전신 투여 및 점막 투여 둘 모두를 위한 CpG/사포닌 조합물은 추가로 모노포스포릴 지질 A 및 이의 비독성 유도체인 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A를 포함하는 그 밖의 애쥬번트와 배합될 수 있다. 다르게는, 사포닌 제형은 키토산 또는 그 밖의 다중양이온 중합체, 폴리락타이드 및 폴리락타이드-코-글리콜라이드 입자, 폴리-N-아세틸 글루코스아민 기재 중합체 매트릭스, 폴리사카라이드 또는 화학 변형된 폴리사카라이드로 구성된 입자, 리포솜 및 지질 기재 입자, 글리세롤 모노에스테르로 구성된 입자 등으로 구성된 백신 비허클과 배합될 수 있다. 사포닌은 또한 콜레스테롤의 존재하에서 제형화되어 리포솜 또는 ISCOM과 같은 미립 구조물을 형성할 수 있다. 또한, 사포닌은 비미립 용액 또는 혼탁액으로, 또는 파우시라멜라(paucilamellar) 리포솜 또는 ISCOM과 같은 미립 구조로 폴리옥시에틸렌 에테르 또는 에스테르와 함께 제형화될 수 있다. 사포닌은 또한 점도를 증가시키기 위해 카르보폴®(Carbopol®)과 같은 부형제와 함께 제형화되거나, 락토오스와 같은 분말 부형제와 견조 분말 형태로 제형화될 수 있다.

<44> 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A는 리비 이뮤노켐(Ribi Immunochem, Montana)사에 의해 제조된 널리 공지된 애쥬번트이다. 이는 GB 2122204B에 교시된 방법에 의해 제조될 수 있다. 바람직한 형태의 3-데-0-아실화된 모노포스포릴 지질 A는 직경이 0.2μm 미만인 작은 입자 크기를 갖는 에멀션의 형태이다(EP 0 689 454 B1). 특히 바람직한 애쥬번트는 3D-MPL과 QS21의 조합물(EP 0 671 948 B1), 3D-MPL과 QS21을 포함하는 수중유 에멀션(WO 95/17210, WO 98/56414), 또는 그 밖의 담체로 제형화된 3D-MPL(EP 0 689 454 B1)이다.

<45> 바람직하게는, 본 발명의 백신 제형은 사람 병원체에 대해 면역 반응을 일으킬 수 있는 항원 또는 항원성 조성물을 함유하며, 이러한 항원 또는 항원성 조성물은, HIV-1(예컨대, tat, nef, gp120 또는 gp160), 사람 포진 바이러스, 예컨대 gD 또는 이의 유도체 또는 HSV1 또는 HSV2로부터의 ICP27과 같은 즉시형 초기 단백질(Immediate Early protein), 시토메갈로바이러스(특히, 사람)(예컨대, gB 또는 이의 유도체), 로타바이러스(약독화 생바이러스 포함), 엠스테인 바르 바이러스(Epstein Barr virus)(예컨대, gp350 또는 이의 유도체), 수두 바이러스(예컨대 gpI, II 및 IE63)로부터, 또는 B형 간염 바이러스(예를 들어, B형 간염 표면 항원 또는 이의 유도체), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 E형 간염 바이러스와 같은 간염 바이러스로부터, 또는 파라믹소바이러스와 같은 그 밖의 바이러스 병원체: 호흡기 합포체 바이러스(예컨대, F 및 G 단백질 또는 이들의 유도체), 파라인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, 멘즈 바이러스, 사람 유두종 바이러스(예를 들어, HPV6, 11, 16, 18, ...), 플라비바이러스(예를 들어, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스) 또는 인플루엔자 바이러스(전체 생(whole live) 또는 불활성 바이러스, 난(egg) 또는 MDCK 세포에서 성장된 분할 인플루엔자 바이러스, 전체 플루 바이로좀(R, Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920에서 기술된 바와 같음) 또는 이들의 정제되거나 재조합된 단백질, 예컨대, HA, NP, NA 또는 M 단백질, 또는 이들의 조합물)로부터 유도되거나, N. 고노르레아(*N. gonorrhoea*) 및 N. 메닌기티디스(*N. meningitidis*)(예를 들어, 캡슐형 폴리사카라이드 및 이들의 컨쥬제이트, 트랜스페린 결합 단백질, 락토페린 결합 단백질, PilC, 어드히신)를 포함하는 네이세리아 종(*Neisseria spp.*); S. 표계네스(*S. pyogenes*)(예를 들어, M 단백질 또는 이들의 단편, C5A 프로테아제, 리포테이코산), S. 아갈락티아에(*S. agalactiae*), S. 무탄스(*S. mutans*); H. 두크레이(*H. ducreyi*); 브란하멜라 카타르할리스(*Branhamella catarrhalis*)로 알려져 있는 M. 카타르할리스(*M. catarrhalis*)(예를 들어, 고분자량 및 저분자량 어드히신 및 인바신)를 포함하는 모락셀라 종(*Moraxella spp.*); B. 페르투시스(*B. pertussis*)(예를 들어, 페르탁신, 페르투시스 독소 또는 이들의 유도체, 섬유상 적혈구응집소, 아데닐레이트 시클라제, 펌브리아에), B. 파라페르투시스(*B. parapertussis*) 및 B. 브론키셉티카(*B. bronchiseptica*)를 포함하-

는 보르데렐라 종(*Bordetella spp.*); M. 투베르콜로시스(*M. tuberculosis*)(예를 들어, ESAT6, 항원 85A, -B 또는 -C), M. 보비스(*M. bovis*), M. 레프라에(*M. leprae*), M. 아비움(*M. avium*), M. 파라투베르콜로시스(*M. paratuberculosis*), M. 스메그마티스(*M. smegmatis*)를 포함하는 마이코박테리움 종(*Mycobacterium spp.*); L. 뉴모필라(*L. pneumophila*)를 포함하는 레지오넬라 종(*Legionella spp.*); 장독소 대장균(*E. coli*)(예를 들어, 콜로니화 인자, 열불안정성 독소 또는 이들의 유도체, 열안정성 독소 또는 이들의 유도체), 장관출혈성 대장균, 장병원성 대장균(예를 들어, 시가(shiga) 독소형 독소 또는 이의 유도체)을 포함하는 에스케리키아 종(*Escherichia spp.*); V. 콜레라(*V. cholera*)(예를 들어, 콜레라 독소 또는 이의 유도체)를 포함하는 비브리오 종(*Vibrio spp.*); S. 손네이(*S. sonnei*), S. 다이센테리아에(*S. dysenteriae*), S. 플렉스네리(*S. flexneri*)를 포함하는 쉬겔라 종(*Shigella spp.*); Y. 엔테로콜리티카(*Y. enterocolitica*)(예를 들어, Yop 단백질), Y. 페스티스(*Y. pestis*), Y. 슈도투베르콜로시스(*Y. pseudotuberculosis*)를 포함하는 예르시니아 종(*Yersinia spp.*); 씨. 예주니(*C. jejuni*)(예를 들어, 독소, 어드히신 및 인바신) 및 C. 콜리(*C. coli*)를 포함하는 캄파일로박터 종(*Campylobacter spp.*); S. 타이피(*S. typhi*), S. 파라타이피(*S. paratyphi*), S. 콜레라에수이스(*S. choleraesuis*), S. 엔터리티디스(*S. enteritidis*)를 포함하는 살모넬라 종(*Salmonella spp.*); L. 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*)를 포함하는 리스테리아 종(*Listeria spp.*); H. 파이롤리(*H. pylori*)(예를 들어, 우레아제, 카탈라이제, 소포형성 독소)를 포함하는 헬리코박터 종(*Helicobacter spp.*); P. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)를 포함하는 슈도모나스 종(*Pseudomonas spp.*); S. 아우레우스(*S. aureus*), S. 에피데르미디스(*S. epidermidis*)를 포함하는 스타파일로코쿠스 종(*Staphylococcus spp.*); E. 파에칼리스(*E. faecalis*), E. 파에시움(*E. faecium*)을 포함하는 엔터로코쿠스 종(*Enterococcus spp.*); C. 테타니(*C. tetani*)(예를 들어, 파상풍 독소 및 이의 유도체), C. 보툴리눔(*C. botulinum*)(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이의 유도체), C. 디피실(*C. difficile*)(예를 들어, 클로스트리디움 독소 A 또는 B, 및 이들의 유도체)을 포함하는 클로스트리디움 종(*Clostridium spp.*); B. 안트라시스(*B. anthracis*)(예를 들어, 보툴리눔 독소 및 이의 유도체)를 포함하는 바실러스 종(*Bacillus spp.*); C. 디프테리아에(*C. diphtheriae*)(예를 들어, 디프테리아 독소 및 이의 유도체)를 포함하는 코리네박테리움 종(*Corynebacterium spp.*); B. 부르그도르페리(*B. burgdorferi*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 가리니(*B. garinii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 아프젤리(*B. afzelii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 앤데르소니(*B. andersonii*)(예를 들어, OspA, OspC, DbpA, DbpB), B. 헤름시(*B. hermsii*)를 포함하는 보렐리아 종(*Borrelia spp.*); E. 에쿠이(*E. equi*) 및 사람 과립성백혈구 에이를리히병의 약제(agent)를 포함하는 에이를리키아 종(*Ehrlichia spp.*); R. 릭케트시(*R. rickettsii*)를 포함하는 리케트시아 종(*Richettsia spp.*); C. 트라코마티스(*C. trachomatis*)(예를 들어, MOMP, 혜파린 결합 단백질), C. 뉴모니아에(*C. pneumoniae*)(예를 들어, MOMP, 혜파린 결합 단백질), C. 시타시(*C. psittaci*)를 포함하는 클라미디아 종(*Chlamydia spp.*); L. 인테로간스(*L. interrogans*)를 포함하는 렙토스피라 종(*Leptospira spp.*); T. 팔리듐(*T. pallidum*)(예를 들어, 회귀 외막 단백질), T. 덴티콜라(*T. denticola*), T. 효다이센테리아에(*T. hyodysenteriae*)를 포함하는 트레포네마 종(*Treponema spp.*)과 같은 박테리아 병원체로부터 유도되거나, P. 팔시파룸(*P. falciparum*)을 포함하는 플라스모디움 종(*Plasmodium spp.*); T. 곤디(*T. gondii*)(예를 들어, SAG2, SAG3, Tg34)를 포함하는 톡소플라스마 종(*Toxoplasma spp.*); E. 히스톨라이티카(*E. histolytica*)를 포함하는 엔타모에바 종(*Entamoeba spp.*); B. 미크로티(*B. microti*)를 포함하는 바베시아 종(*Babesia spp.*); T. 크루지(*T. cruzi*)를 포함하는 트라이파노소마 종(*Trypanosoma spp.*); G. 람블리아(*G. lamblia*)를 포함하는 기아르디아 종(*Giardia spp.*); L. 마조르(*L. major*)를 포함하는 레스마니아 종(*Leshmania spp.*); P. 카리니(*P. carinii*)를 포함하는 뉴모사이스티스 종(*Pneumocystis spp.*); T. 바기날리스(*T. vaginalis*)를 포함하는 트리코모나스 종(*Trichomonas spp.*); S. 만소니(*S. mansoni*)를 포함하는 스키소스토마 종(*Schistosoma spp.*)과 같은 기생충으로부터 유도되거나, C. 알비칸스(*C. albicans*)를 포함하는 칸디다 종(*Candida spp.*); C. 네오포르만스(*C. neoformans*)를 포함하는 크립토코쿠스 종(*Cryptococcus spp.*)과 같은 효모로부터 유도된다.

<46>

M. 투베르콜로시스에 대한 그 밖의 바람직한 특이적 항원은 예를 들어, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 및 hTCC1이다(WO 99/51748). M. 투베르콜로시스에 대한 단백질은 또한, 두개 이상, 바람직하게는 세개의 M. 투베르콜로시스의 폴리펩티드가 보다 큰 단백질로 융합된 융합 단백질 및 이의 변이체를 포함한다. 바람직한 융합물에는 Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI가 있다(WO 99/51748).

<47>

클라미디아에 대한 가장 바람직한 항원은, 예를 들어 고분자량 단백질(HWMP)(WO 99/17741), ORF3(EP 366 412), 및 추정 막 단백질(Pmps)을 포함한다. 백신 제형의 다른 클라미디아 항원은 WO 99/28475에 기술된 군으로부터 선택될 수 있다.

- <48> 바람직한 박테리아 백신은 S. 뉴모니아에(예를 들어, 캡슐형 폴리사카라이드 및 이의 컨쥬케이트, PsaA, PspA, 스트렙토리신, 콜린 결합 단백질)를 포함하는 스트렙토코쿠스 종으로부터 유래한 항원, 및 단백질 항원 뉴몰리신(Pneumolysin)(Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342) 및 이의 돌연변이체인 탈독성화된 유도체(WO 90/06951; WO 99/03884)를 포함한다. 다른 바람직한 박테리아 백신은 H. 인플루엔자에 타입 B(예를 들어, PRP 및 이의 컨쥬케이트), 타입판별불가 H. 인플루엔자에, 예를 들어, OMP26, 고분자량 어드히신, P5, P6, 단백질 D 및 리포단백질 D, 및 펌브린 및 펌브린 유래한 웨티드(US 5,843,464) 또는 이들의 다중 복사 변이체 또는 융합 단백질을 포함하는 해모필루스 종으로부터 유래한 항원을 포함한다.
- <49> B형 간염 표면 항원의 유도체는 당 분야에 널리 공지되어 있으며, 여기에는 특히 유럽 특히 출원 EP-A-414 374; EP-A-0304 578 및 EP 198-474에서 언급된 바와 같은 PreS1, PreS2 S 항원들이 포함된다. 바람직한 일면에서, 본 발명의 백신 제형은 HIV-1 항원, 특히 CHO 세포에서 발현되는 경우에 gp120을 포함한다. 추가의 구체에서, 본 발명의 백신 제형은 상기 정의된 바와 같은 gD2t를 포함한다.
- <50> 본 발명의 바람직한 구체예에서, 청구되는 애쥬번트를 함유하는 백신은, 생식기 사마귀에 원인이 되는 것으로 간주되는 사람 유두종 바이러스(HPV)(HPV 6 또는 HPV 11 및 기타), 및 자궁 경부암에 원인이 되는 HPV 바이러스(HPV16, HPV18 및 기타)로부터 유래한 항원을 포함한다.
- <51> 생식기 사마귀의 예방 또는 치료용 백신의 특히 바람직한 형태는 L1 입자 또는 캡소머(capsomer), 및 HVP 6 및 HPV 11 단백질 E6, E7, L1 및 L2로부터 선택된 하나 이상의 항원을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.
- <52> 융합 단백질의 가장 바람직한 형태는 WO 96/26277에 기술된 바와 같은 L2E7 및 GB 9717953.5(PCT/EP98/05285)에 기술된 바와 같은 단백질D(1/3)-E7이다.
- <53> 바람직한 HPV 경부 감염 또는 암 예방 또는 치료용 백신 조성물은 HPV 16 또는 18 항원을 포함할 수 있다. 예를 들어, L1 또는 L2 항원 단량체, 또는 L1 또는 L2 항원은 함께 바이러스형 입자(VLP)로서 제공되거나, L1 단독 단백질은 VLP 또는 캡소머 구조로 단독으로 제공된다. 이러한 항원, 바이러스형 입자 및 캡소머는 그 자체로 공지되어 있다. 예를 들어, WO 94/00152, WO 94/20137, WO 94/05792 및 WO 93/02184를 참조한다.
- <54> 추가로, 초기형 단백질은 단독으로, 또는 예를 들어, E7, E2 또는 바람직하게는 E5와 같은 융합 단백질로서 포함될 수 있으며, 특히 이의 바람직한 구체에는 L1E7 융합 단백질을 포함하는 VLP를 포함한다(WO 96/11272).
- <55> 특히 바람직한 HPV 16 항원은 단백질 D 탑체와 융합하여 초기형 단백질 E6 또는 E7을 포함함으로써, HPV 16으로부터의 단백질 D-E6 또는 E7 융합물, 또는 이들의 조합물; 또는 E6 또는 E7과 L2의 조합물을 형성한다(WO 96/26277).
- <56> 다르게는, HPV 16 또는 18의 초기형 단백질 E6 및 E7은, 단일 분자, 바람직하게는 단백질 D-E6/E7 융합물로 존재할 수 있다. 이러한 백신은 임의로 HPV 18로부터의 E6 또는 E7 단백질 중 어느 하나, 및 이를 모두를, 바람직하게는 단백질 D-E6 또는 단백질 D-E7 융합 단백질 또는 단백질 D E6/E7 융합 단백질의 형태로 함유할 수 있다.
- <57> 본 발명의 백신은 추가로 그 밖의 HPV 스트레인(strain), 바람직하게는 HPV 31 또는 33 스트레인으로부터 항원을 포함할 수 있다.
- <58> 본 발명의 백신은 추가로, 말라리아를 유발시키는 기생충으로부터 유래한 항원을 포함한다. 예를 들어, 플라스모디아 팔시파룸(*Plasmodia falciparum*)으로부터의 바람직한 항원은 RTS, S 및 TRAP를 포함한다. RTS는 B형 간염 바이러스의 표면(S) 항원에 대해 B형 간염 표면 항원의 pres2 부분의 4개의 아미노산을 통해 연결된 P. 팔시파룸의 포자소체막 단백질(circumsporozoite(CS) protein)의 C-말단을 사실상 전부 포함하는 하이브리드 단백질이다. 이것의 전체 구조는 국제 특허 출원 번호 제 PCT/EP92/02591(공개 번호 WO 93/10152, 우선권 번호 UK 제 9124390.7)에 개시되어 있다. 효모에서 발현되는 경우, RTS는 리포단백질 입자로서 생성되고, HBV로부터의 S 항원과 공동 발현되는 경우에는, RTS,S.로서 공지된 혼합된 입자를 생성한다. TRAP 항원은 국제 특허 출원 제 PCT/GB89/00895(공개 번호 WO 90/01496)에 기술되어 있다. 본 발명의 바람직한 구체에는, 항원성 제제가 RTS, S 및 TRAP 항원의 조합물을 포함하는 말라리아 백신이다. 다단식 말라리아 백신의 성분이 될 후보물질이 되는 그 밖의 플라스모디아 항원은 P. 팔시파룸 MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, 세퀘스트린(Sequestrin), PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 및 플라스모디움 종에서의 이들의 유사체이다.

- <59> 제형은 또한 항종양 항원을 함유하고, 암의 면역요법적 치료에 유용할 수 있다. 예를 들어, 애쥬번트 제형은 전립선, 유방, 결장직장, 폐, 췌장, 신장 또는 흑색종암에 대한 항원과 같은 종양 거부 항원과 관련하여 유용성이 있다. 예시적 항원에는 MAGE1 및 MAGE 3, 또는 그 밖의 MAGE 항원(흑색종의 치료를 위한), PRAME, BAGE 또는 GAGE가 포함된다[참조: Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pp 628-636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research(submitted 1997); Correale et al.(1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p293]. 사실상, 이들 항원은 흑색종, 폐 암종, 육종 및 방광암종과 같은 광범위한 종양 타입에서 발현된다. 그 밖의 종양 특이적 항원은 본 발명의 애쥬번트와 함께 사용하기에 적합하며, 여기에는 종양 특이적 강글리오사이드, 전립선 특이적 항원(PSA) 또는 Her-2/neu, KSA(GA733), PAP, 맘마글로빈(mammaglobin), MUC-1, 암성배아성항원(CEA)이 포함되나 이로 제한되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 일면에서는 본 발명에 따른 애쥬번트 조성물과 종양 거부 항원을 포함하는 백신이 제공된다.
- <60> 본 발명의 특히 바람직한 일면은 백신이 종양 항원을 포함하고, 이러한 백신이 전립선, 유방, 결장직장, 폐, 췌장, 신장, 난소 또는 흑색종암과 같은 암의 치료에 놀라운 효능이 있다는 것이다. 따라서, 본 발명의 제형은 종양 관련 항원 뿐만 아니라 종양 지지 메카니즘(예를 들어, 혈관형성, 종양 침입)과 관련된 항원을 함유할 수 있다. 추가로, 암의 치료에서 백신에 대해 특히 적합한 항원은 또한 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 전립선 간세포 항원(PSCA), 티로시나아제, 서바이빈, NY-ES01, 프로스타아제, PS108(WO 98/50567), RAGE, LAGE, HAGE를 포함한다. 또한, 상기 항원은 10개 아미노산의 짧은 길이 웹티드인 전장(whole length)이 고나도트로핀(Gonadotrophin) 호르몬 방출 호르몬(GnRH, WO 95/20600)과 같은 다양한 암 치료 또는 면역학적거세(immunocastration)에 유용한 자가 웹티드 호르몬일 수 있다.
- <61> 본 발명의 조성물은 보렐리아 종(*Borrelia sp.*)으로부터 유래한 항원을 함유하는 백신을 제형화하는데 사용될 것으로 예상된다. 예를 들어, 항원은 핵산, 병원체 유래한 항원 또는 항원성 제제, 재조합에 의해 생성된 단백질 또는 웹티드, 및 키메라 융합 단백질을 포함할 수 있다. 특히, 항원은 OspA이다. OspA는 Lipo-OspA로 명명되는 숙주 세포(*E. coli*)에 의해 지질화된 형태로, 또는 비지질화된 유도체로 된 완전 성숙 단백질일 수 있다. 이러한 비지질화된 유도체는, 인플루엔자 바이러스의 비구조적 단백질(NS1)의 첫번째 81개의 N 말단 아미노산을 갖는 비지질화된 NS1-OspA 융합 단백질 및 완전 OspA 단백질을 포함하고, 다른 MDP-OspA는 3개의 추가의 N 말단 아미노산을 지닌 OspA의 비지질화된 형태이다.
- <62> 본 발명의 백신은 알러지의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이러한 백신은 알레르겐 특이적(예를 들어, Der p1) 및 알레르겐 비특이적 항원(예를 들어, 스탠워쓰(stanworth) 데카웹티드를 포함하나 이로 제한되는 것은 아닌, 사람 IgE로부터 유래한 웹티드(EP 0 477 231 B1))를 포함할 것이다.
- <63> 본 발명의 백신은 또한 알러지, 암 또는 감염성 질병 이외의 만성 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이러한 만성 질환은 죽상경화증 및 알츠하이머와 같은 질병이다.
- <64> 알츠하이머 신경퇴행성 질병에 걸리기 쉽거나 이를 앓고 있는 환자의 예방 및 치료에 관련있는 항원은 특히, 아밀로이드 전구체 단백질의 N 말단 39-43 아미노산 단편(A β) 및 이보다 작은 단편이다. 이 항원은 국제 특허 출원 제 WO 99/27944(Athena Neurosciences)에 개시되어 있다.
- <65> 각 백신 투여량중 단백질의 양은 전형적인 백신에서 현저한 유해 부작용없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이러한 양은, 어떠한 특이적 면역원이 사용되는 가와 어떻게 제공되는 가에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 각 투여량은 1-1000 μ g, 바람직하게는 1-500 μ g, 보다 바람직하게는 1-100 μ g, 매우 바람직하게는 1-50 μ g의 단백질을 포함할 것이다. 특정 백신의 최적량은 백신접종된 피검체에서 적합한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 초기 백신접종 후, 피검체에 충분한 간격을 두어 1회 또는 수회의 부스터 면역화가 실시될 수 있다. 이러한 백신 제형은 프라이밍 또는 부스팅 백신화 요법으로 포유동물의 점막 표면에 도포되거나, 다르게는, 전신적으로, 예를 들어 경피, 피하 또는 근육내 경로를 통해 투여될 수 있다.
- <66> 본 발명의 애쥬번트 또는 백신중의 CpG 또는 면역자극성 올리고누클레오티드의 양은 일반적으로 적으나, 백신 제형에 따라 투여량당 1-1000 μ g, 바람직하게는 투여량당 1-500 μ g, 매우 바람직하게는 투여량당 1 내지 100 μ g의 범위일 수 있다.
- <67> 본 발명의 애쥬번트에 사용되는 사포닌의 양은 투여량당 1-1000 μ g, 바람직하게는 투여량당 1-500 μ g, 보다 바람직하게는 투여량당 1-250 μ g, 매우 바람직하게는 투여량당 1 내지 100 μ g의 범위일 수 있다. 그러므로, CpG:사포닌의 비(w/w)는 1:1000 내지 1000:1의 범위일 수 있으며, 일반적으로는, 1:100 내지 100:1, 바람직하게는 1:10

내지 1:1 또는 1:1 내지 10:1, 매우 바람직하게는 1:1, 4:1 또는 10:1의 범위일 것이다.

- <68> 본 발명의 제형은 예방 및 치료 둘 모두의 목적으로 사용될 수 있다. 따라서, 바이러스, 박테리아, 기생충 감염, 알러지, 암 및 그 밖의 비만성 질환의 예방 및 치료용 백신의 제조에서의 사포닌과 CpG 분자의 조합물의 용도가 제공된다. 따라서, 본 발명은 감염성 질병 또는 암, 또는 알러지 또는 자가면역 질병에 걸리기 쉽거나 이를 앓고 있는 포유 동물을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 또 다른 일면에서는, 본원에서 약제로서 사용하기 위해 기술된 사포닌 및 CpG를 포함하는 백신 또는 애쥬번트 조합물이 제공된다. 백신 제제는, 일반적으로 문헌(New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978)에 개시되어 있다.
- <69> 본 발명의 조성물은 광범위하게 다양한 공급원으로부터 유래한 항원을 함유하는 백신을 제형화하는데 사용될 것으로 예측된다. 예를 들어, 항원은 IgE의 히스타민 방출 테카펩티드(스텐워쓰 테카펩티드로서 공지됨)와 같은 IgE로부터 유래한 웹티드, 재조합으로 제조된 단백질 또는 웹티드, 및 키메라 융합 단백질을 포함하는, 사람, 박테리아 또는 바이러스 핵산, 병원체 유래한 항원 또는 항원성 제제, 종양 유래한 항원 또는 항원성 제제, 숙주 유래한 항원을 포함할 수 있다.
- <70> 본 발명에 의하면, 항원, 사포닌 및 면역자극성 올리고누클레오티드를 포함하는 전신성 백신 조성물이 제공된다. 따라서, 개체의 전신 경로를 통해 실질적으로 본원에 기술된 조성물을 투여하므로써, 질병에 걸리기 쉽거나 질병을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 또한, 개체의 전신 경로를 통해 사실상 본원에 기술된 조성물을 투여하는 것을 포함하여, 개체가, 감염성 박테리아 및 바이러스 질병, 기생충 질병, 전립선, 유방, 결장직장, 폐, 췌장, 신장, 난소 또는 흑색종암; 비암성(non-cancer) 만성 질환, 알러지, 알츠하이머, 죽상경화증으로 이루어진 군으로부터 선택된 질병에 걸리는 것을 방지하는 방법이 제공된다.
- <71> 다르게는, 본 발명은 항원 및 용혈성 사포닌을 포함하는 점막 백신 조성물을 제공한다. 따라서, 사실상 본원에 기술된 조성물을 개체의 점막 표면에 투여하므로써, 질병이 걸리기 쉽거나 질병을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법이 제공된다.
- <72> 추가로, 항원 및 용혈성 사포닌을 포함하는 조성물을 포유 동물의 점막 표면에 투여하는 것으로 포함하여, 포유 동물에게서의 전신성 항원 특이적 면역 반응을 유도하는 방법이 기술된다. 추가로, 사포닌 및 CpG 분자를 취하고 이들을 항원과 함께 혼합하는 것을 포함하여, 백신 또는 애쥬번트를 제공하는 방법이 또한 제공된다.
- <73> 본 발명의 조합물에 사용하기에 적합한 약제학적으로 허용되는 부형제의 예로는 물, 인산염 완충 염수 및 등장성 완충액이 있다.
- <74> 본 발명은 하기 실시예에 의해 예시되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <75> 실시예 1
- <76> 리포-OspA에 대한 전신성 항체의 비강내 부스팅을 위한 QS21 및 CpG의 용도
- <77> 본 실시예에서, 본 발명자들은 QS21과 같은 용해성 사포닌과 CpG와 같은 면역자극물이 마우스의 비강내 부스팅 백신접종에 대한 전신성 면역학적 반응을 상승적 형태로 증강시킬 수 있는지에 대해 조사하였다. 8주령의 암컷 Bald/c 마우스(그룹 당 5마리)를, 앨럼(50 μ g) 상으로 제형화된 리포-OspA(1 μ g)를 근육내 투여함으로써 면역화시켰다. 3개월 후, 마우스를 A: PBS; B: 20 μ g의 CpG 1001(TCC ATG AGC TTC CTG ACG TT, Krieg 1826); C: 5 μ g QS21(Cambridge Biotech, USA로부터 입수함); D: 20 μ g의 CpG 1001 + 5 μ g의 QS21 중 어느 하나에 5 μ g의 리포-OspA를 함유하는 10 μ l의 용액(비공당 5 μ l, 피펫에 의해 점적으로 전달됨)을 사용하여 비강내(마취하에) 부스팅시키거나, E: 앨럼(50 μ g) 상으로 흡수된 1 μ g의 리포-OspA를 근육내 주입하여 부스팅시켰다. 도 1 및 2는 비강 부스팅 후 14일째의 OspA 특이적 IgG 역가 및 LA2 역가를 나타낸다.
- <78> 방법
- <79> 마우스에서의 OspA 특이적 혈청 IgG를 측정하기 위한 ELISA
- <80> 맥시소르프 눈크(Maxisorp Nunc) 면역플레이트(immunoplate)를, PBS로 희석된 1 μ g/ml의 OspA 50 μ l/웰(플레이트의 B에서 H 열로), 또는 PBS 중의 5 μ g/ml의 정제된 염소 항-마우스 Ig 50 μ l(Boerhinger)(A 열)로 4°C에서 밤새 코팅시켰다. 플레이트 상의 유리 부위는 포화 완충액: 1% BSA, 0.1% 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(TWEEN 20) 및 4% 노르말 보빈 혈청(Normal Bovine Serum: NBS)을 함유하는 PBS를 사용하여 블록킹하였다(1시

간, 37°C). 이후, IgG 이소타입 혼합물을 연속 2배 희석물을 포화 완충액(웰당 50μl)중에서 희석시키고, 표준 곡선(200ng/ml에서 출발하여 A 옆에 가해지는, 시그마(Sigma)사로부터의 마우스 단일클론성 항체 IgG1, IgG2a 및 IgG2b의 혼합물)으로서 첨가하고, 혈청 샘플(1/100 희석에서 출발하여 B 내지 H 옆에 가해지는)을 1시간 30분 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 이후, 플레이트를 세척 완충액(PBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(TWEEN 20))으로 3회 세척하였다. 이후, 포화 완충액으로 1/5000 희석된 비오티닐화된 염소 항 마우스 IgG(Amersham)를 37°C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다(50μl/웰). 3회 세척한 후, 이어서 스트렙타비딘-양고추냉이 폐옥시다아제 컨쥬케이트(Amersham)를 첨가하고, 플레이트를 5회 세척하고, 50μl/웰의 발색(revelation) 완충액(50mM pH 4.5 시트레이트 완충액 중의 H₂O₂ 0.03% 및 OPDA 0.4mg/ml(Sigma))을 사용하여 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 50μl/웰의 H₂SO₄ 2N를 첨가하므로써 발색을 중단시켰다. 492 및 630nm에서 바이오라드(Biorad) 3550 면역판독기(immunoreader)를 사용하여 광학 밀도를 판독하였다. 항체 역가를 소프트맥스프로 소프트웨어(SoftMaxPro software)를 사용하여 4 파라미터의 수학적 방법에 의해 계산하였다.

<81> 리포-OspA에 대한 혈청 LA2형 항체를 측정하기 위한 억제 검정

<82> 백신 접종자에서의 항체 역가를 이들의 LA2형 특이성에 대해 연구하였다. LA2는 박테리아의 표면에서 입체적 OspA 애피토프를 인식하고, 시험판내에서 B. 부르그도르페리(burgdorferi)를 치사시킬 수 있을 뿐만 아니라 실험실 성장된 스피로체테(spirochete)로의 시험감염에 대해 마우스를 보호할 수 있는 것으로 밝혀진 뮤린 단일클론성 항체이다[참조: Schable UE et al., 1990. Proc Natl Acad Sci USA 87: 3768-3772]. 또한, LA-2 맵은 살균성 항체와 상관있는 것으로 나타났으며, 사람 혈청에 대한 연구에서는 전체 항 OspA IgG 역가와 LA-2 역가(ELISA에 의해 측정됨) 사이에 우수한 상관성을 나타냈다. 맥시소르프 눈크 면역플레이트를 PBS로 희석된 0.5 μg/ml 리포 OspA의 50μl/웰로 4°C에서 밤새 코팅시켰다. 유리 부위는 포화 완충액으로 1시간 동안 37°C에서 블록킹하였다(100μl/웰의 포화 완충액: PBS/BSA 1%/Tween 20 0.1% / NBS 4%). 4μg/ml에서 시작하는 LA2 단일클론성 Ab(mAb)의 연속 2배 희석물을 포화 완충액(웰당 50μl)으로 희석하여 표준 곡선을 형성시켰다. 백신 접종자로부터의 혈청 샘플 희석액(1/10 희석으로 시작하여)을 또한 첨가하고, 플레이트를 2시간 동안 37°C에서 인큐ベ이션시켰다. 인큐베이션 후, 플레이트를 PBS/TWEEN 20(0.1%)으로 3회 세척하였다. 포화 완충액으로 희석된 LA2 mAb-폐옥시다아제 컨쥬케이트(1/10,000)를 각 웰(웰당 50μl)에 첨가하고, 이것을 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 5회 세척 후, 플레이트를 50μl/웰의 발색 완충액(50mM pH 4.5 시트레이트 완충액 중의 H₂O₂ 0.03% 및 OPDA 0.4mg/ml)으로 실온(암실)에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. H₂SO₄ 2N를 사용하여 반응과 색 형성을 중단시켰다. 492 및 630nm에서 바이오라드 3550 면역판독기를 사용하여 광학 밀도를 판독하였다. LA2형 Ab 역가를 소프트맥스프로 소프트웨어를 사용하여 4 파라미터의 수학적 방법에 의해 계산하였다. LA2형 항체 역가를 표준 곡선과 비교하여 측정하였다.

<83> 결과

<84> CpG 뿐만 아니라 QS21도 리포-OspA에 대한 전신성 항체의 비강내 부스팅을 현저히 향상시킨다. 또한, 2개의 애쥬번트 모두가 결합되는 경우, 이를 반응에 대한 상승 효과가 특히 LA2 항체에 있어서 명확하게 입증되었다. QS21 및 CpG의 존재하에서 일어나는 체액성 반응은 비경구적 부스터에 의해 유도된 반응들보다 현저히 높다. 이러한 것들을 합쳐보면, 이를 결과는 용해 사포닌과 면역자극물을 조합한 비강내 제형의 효능을 명백히 보여준다.

<85> 실시예 2

<86> 인플루엔자 바이러스에 대한 전신성 항체의 비강내 부스팅을 증강시키기 위한 QS21 및 CpG의 상승적 조합

<87> 본 실시예에서, 본 발명자들은 QS21와 같은 용혈성 사포닌(실시예 참조) 및 CpG와 같은 면역자극물이 불활성화된 전체 인플루엔자 바이러스로 비강내 프라이밍된 마우스에서 전신성 항체의 비강내 부스트를 상승작용적 형태로 증강시킬 수 있는지를 조사하였다.

<88> 8주령의 암컷 Bald/c 마우스(그룹 당 10마리)를 사람에게서 발생하는 천연 프라이밍을 모방하기 위해 β-프로피오락톤 비활성화된 3가의 전체 인플루엔자 바이러스(A/메이징/262/95; A/요하네스버그/33/94; B/파나마/45/90; 5μg HA/스트레이인)로 비강내 프라이밍시켰다. 28일 후, 마우스를, A: PBS; B: 50μg의 CpG(TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT, Krieg 2006); C: 4.5μg QS21(Cambridge Biotech, USA로부터 입수함); D: 50μg의 CpG + 4.5μg의 QS21 중 어느 하나에 1.5μg HA/β-프로피오락톤 비활성화된 3가 전체 인플루엔자 바이러스의 스트레이인(프라이밍 면역화에서와 동일한 스트레이인)을 함유하는 20μl 용액((비공당 5μl, 피펫에 의해 점적으로 전달됨)을 사용하

여 비강내(마취하에) 부스팅시키거나, E: 1.5 μ g HA/3가의 분할 인플루엔자 바이러스의 스트레인(프라이밍 면역화에서와 동일한 스트레인)을 근육내 주입하여 부스팅시켰다. 플루 항원은 제조사 에스에스디 게엠바하(SSD GmbH, Dresden, Germany)에서 공급받았다.

<89> 도 3 및 4는 비강 부스팅 후 14일째의 혈청 플루 스트레인 특이적 IgG 역가 및 적혈구응집 억제(HAI) 역가를 나타낸다.

<90> 방법

<91> 마우스에서의 항 인플루엔자 IgG 역가를 측정하기 위한 ELISA

<92> 맥시소르프 눈크 면역플레이트를, PBS로 희석된 1 μ g/ml의 전체 인플루엔자 바이러스 항원 50 μ l/웰(플레이트의 B에서 H 열로), 또는 PBS 중의 5 μ g/ml의 정제된 염소 항-마우스 Ig 50 μ l(Boerhinger)(A 열)로 4°C에서 밤새 코팅시켰다. 플레이트 상의 유리 부위를 포화 완충액: 1% BSA, 0.1% 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(TWEEN 20) 및 4% 노르말 보빈 혈청(NBS)을 함유하는 PBS를 사용하여 블록킹하였다(1시간, 37°C). 이후, IgG 이소타입 혼합물의 연속 2배 희석물을 포화 완충액(웰당 50 μ l)으로 희석시키고, 표준 곡선(200ng/ml에서 출발하여 A 열에 가해지는, 시그마사로부터의 마우스 단일클론성 항체 IgG1, IgG2a 및 IgG2b의 혼합물)으로서 첨가하고, 혈청 샘플(1/100 희석에서 출발하여 B에서 H 열에 가해지는)을 1시간 30분 동안 37°C에서 인큐베이션시켰다. 이후, 플레이트를 세척 완충액(PBS, 0.1% 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트(TWEEN 20)으로 3회 세척하였다. 이후, 포화 완충액으로 1/5000 희석된 비오티닐화된 염소 항 마우스 IgG(Amersham)를 37°C에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다(50 μ l/웰). 3회 세척한 후, 이어서 스트렙타비딘-양고추냉이 퍼옥시다아제 컨쥬케이트(Amersham)를 첨가하고, 플레이트를 5회 세척하고, 50 μ l/웰의 발색 완충액(50mM pH 4.5 시트레이트 완충액 중의 H₂O₂ 0.03% 및 OPDA 0.4mg/ml(Sigma))을 사용하여 실온에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 50 μ l/웰의 H₂SO₄ 2N를 첨가하므로써 발색을 중단시켰다. 492 및 630nm에서 바이오라드 3550 면역판독기를 사용하여 광학 밀도를 판독하였다. 항체 역가를 소프트맥스프로 소프트웨어를 사용하여 4 파라미터의 수학적 방법에 의해 계산하였다. β -프로피오라톤(BPL)으로 불활성화된, 코팅을 위해 사용된 전체 인플루엔자 바이러스(스트레인 A/베이징/262/95)는 제조사 에스에스디 게엠바하(SSD GmbH, Dresden, Germany)에서 공급받았다.

<93> 마우스에서의 플루 특이적 혈청 Abs의 적혈구응집 억제(HAI) 활성

<94> 혈청(25 μ l)을 먼저 100 μ l의 봉산염 0.5M 완충액(pH 9) 및 125 μ l의 데이드 베링(Dade Behring)으로부터 구입한 카울린을 사용하여 실온(RT)에서 20분 동안 처리하였다. 원심분리(30분, 3000RPM 또는 860g) 후, 100 μ l의 상청액(혈청의 1/10 희석에 상응하는)을 취하고, 이것을 0.5% 닦 적혈구와 함께 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 3200RPM(970g)에서 10분 동안 원심분리시킨 후, 상청액을 모았다. 두가지 작업은 모두 혈청에 함유된 천연 적혈구응집 인자를 제거하기 위한 것이다. 이후, 25 μ l의 처리된 혈청을, 96웰 그레이너(Greiner) 플레이트에서 25 μ l PBS(1/20에서 시작하여 연속 2배 희석물)로 희석시켰다. BPL 불활성화된 전체 바이러스를 교반하에서 실온에서 30분 동안 4의 적혈구 응집 단위의 농도(즉, 적혈구의 응집을 자극하는 최종 농도보다 4배 낮은 희석 농도로)로 첨가하였다(25 μ l/웰). 이후, 닦 적혈구를 1시간 동안 실온에서 첨가하였다(25 μ l/웰). 최종적으로, 판독하기 전에 플레이트를 4°C에서 밤새 방치하였다. HAI 역가는 바이러스 유도된 적혈구 응집을 억제하는 최종 혈청 희석율에 상응한다.

<95> 결과

<96> CpG 뿐만 아니라 QS21도 플루 스트레인에 대한 IgG 또는 HAI 항체의 비강내 부스팅을 향상시키지 않는다. 그러나, 2개의 애쥬번트 모두가 결합되는 경우, 이를 반응에 대한 상승 효과는 명백히 입증되었다. QS21 및 CpG의 존재하에서 일어난 HAI 반응은 비경구적 부스터에 의해 유도된 반응보다 훨씬 더 유사하다. 이를 결과는 용혈성 사포닌과 면역자극물을 조합한 비강내 제형의 효능을 확인시켜 준다. 이를 결과는 또한 수개의 CpG 서열이 이러한 맥락(본 실시예에서는 Krieg 2006, 및 실시예 3 및 5에서는 Krieg 1826)에서 효율적일 수 있음을 나타낸다.

<97> 실시예 3

<98> 리포-Ospa에 대한 전신성 항체의 비강내 부스팅을 증진시키기 위한 β -에스킨과 CpG의 상승적 조합

<99> 본 발명자들은 본 실시예에서, QS21과 CpG 사이에서 관찰된 것과 유사한 상승작용이 β -에스킨과 다른 그 밖의 용혈성 사포닌(실시예 참조)을 사용하는 경우에도 관찰될 수 있는지의 가능성을 평가하였다. 비용혈성 사포닌

인 글리시리진산 또한 시험하였다.

<100> 8주령의 암컷 Bald/c 마우스(그룹 당 6마리)를, 엘럼(50 μ g) 상으로 제형화된 리포-OspA(1 μ g)로 근육내 프라이밍 시켰다. 3개월 후, 마우스를 A: PBS; B: 50 μ g의 CpG 1001(TCC ATG AGC TTC CTG ACG TT, Krieg 1826); C: 5 μ g의 β -에스킨(Sigma사로부터 구입); D: 50 μ g의 CpG 1001 + 5 μ g의 β -에스킨; E: 5 μ g의 글리시리진산(Sigma사로부터 구입); F: 50 μ g의 CpG 1001 + 5 μ g의 글리실리진산 중 어느 하나에 5 μ g의 리포-OspA를 함유하는 10 μ l 용액(비공당 5 μ l, 피펫에 의해 점적으로 전달됨)을 사용하여 비강내(마취하에) 부스팅시키거나, G: 엘럼(50 μ g) 상으로 흡수된 1 μ g의 리포-OspA를 근육내 주입하여 부스팅시켰다. 도 5는 비강 부스팅 후 14일째에 OspA 특이적 LA2 역가를 나타낸다.

<101> 방법

<102> 방법은 실시예 1에 상세히 기술된 바와 같다.

<103> 결과

<104> β -에스킨과 CpG는 전신성 LA2 Ab의 비강내 부스팅을 증강시키기 위해 상승적으로 작용한다. 이러한 조합은 비경구 부스터보다 더 상승된 Ab 반응을 일으킨다. 한편, 이러한 상승작용은 CpG를 글리실리진산과 조합시켜서 얻어지는 것이 아니다.

<105> 이들 결과 및 본 발명의 이전 결과에서 보면, CpG와 상이한 용혈성 사포닌의 애쥬번트 면역 반응에 대한 능력이 상승적인 형태로 나타났다.

<106> 실시예 4

CpG 및/또는 DQS21로 제형화된 *P. 팔시파룸* RTS,S 및 HIV-1 gp120을 사용한 면역원성 연구

1. 실험 개요

<108> 두가지 마우스의 면역원성 연구를 수행하여, 효능있는 첨가제 또는 CpG 올리고누클레오티드(CpG) 및 QS21의 상승 효과를 평가하였다. 마우스 그룹을, CpG 및 QS21 단독으로 또는 이들을 조합하여 제형화된 RTS,S 및 gp120으로 면역화시켰다. 이들 애쥬번트 조성물을 또한 담체 Al(OH)₃ 또는 수중유(o/w) 에멀션의 존재하에 시험하였다.

<110> 상기 제형의 면역원성을 두가지 비경구적 면역화 후에 조사하였다. 혈청을 항원 특이적 항체의 존재에 대해, 그리고 항체 이소타입의 분포에 대해 분석하였다. 세포 매개된 면역 반응을 평가하기 위해 비장 세포를 사용하였다. 이들 세포를 T 림프구(CTL) 및 림프구증식성(림프구증식) 세포의 존재에 대해 시험하였다.

표 1: 실험 1의 마우스 그룹

그룹	항원	애쥬번트
1	RTS,S/gp120	CpG/DQS21
2	RTS,S/gp120	DQS21
3	RTS,S/gp120	CpG/DQS21/Al(OH) ₃
4	RTS,S/gp120	CpG/Al(OH) ₃

표 2: 실험 2의 마우스 그룹

그룹	항원	애쥬번트
1	RTS,S/gp120	CpG
2	RTS,S/gp120	CpG/DQS21
3	RTS,S/gp120	CpG/QS21/o/w 에멀션

2. 제형화

2.1. 실험 1

<117> 제형화 과정:

<118> 제형을 각각 주입하기 3일 전에 제조하였다. 필요한 경우, RTS,S ($10\mu\text{g}$) 및 gp120 ($10\mu\text{g}$)을 Al(OH)₃ $100\mu\text{g}$ 상에 흡착시켰다. 필요한 경우, MPL ($5\mu\text{g}$)을 첨가하고, 30분간 인큐베이션시킨 후, 완충액이 PO₄, NaCl 10/150 (pH 6.8)인 DQ가 없는 그룹을 제외하고는 10배 농축된 PBS (pH 7.4)와 H₂O의 혼합물로서 완충액을 첨가하였다. 30분 후, 필요에 따라, 1/5의 QS21/콜레스테롤 중량비로 리포솜과 혼합된 QS21($5\mu\text{g}$) (DQ로서 언급됨)을 상기 제형에 첨가하였다. 30분 후, 올리고가 함유된 제형의 경우, 방부제로서 티오머살(thiomersal) $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가하기 30분 전에 CpG $100\mu\text{g}$ 을 첨가하였다.

Al(OH) ₃ + RTSS + gp120-1시간 - MPL -30분 - 예비혼합 -30분 - DQ -30분 - CpG -30분 - 티오

<119>

<120> 모든 인큐베이션은 실온에서 교반과 함께 수행되었다.

2.2. 실험 2

<122> 제형화 과정:

<123> 둘 모두를 주입하기 위해 제형화를 동시에 수행하였다. 1마리 마우스에 대한 주입 부피는 $100\mu\text{l}$ 였다. 티오머살 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 방부제로서 첨가하였다.

<124> 그룹 1: RTS,S ($10\mu\text{g}$) 및 gp120 ($10\mu\text{g}$)을 등장성을 위해 H₂O와 PBS (pH 6.8)로 희석시켰다. 5분 후, 제형을 CpG 1856 ($100\mu\text{g}$) 상에 흡착시켰다.

<125> 그룹 2: RTS,S ($10\mu\text{g}$) 및 gp120 ($10\mu\text{g}$)을 등장성을 위해 H₂O와 PBS (pH 7.4)로 희석시켰다. 30분 후, RTS,S 및 gp120을 DQ ($5\mu\text{g}$) 상에 흡착시켰다. 흡착시킨 지 30분 후, 제형을 CpG 1856 ($100\mu\text{g}$) 상에 흡착시켰다.

<126> 그룹 3: RTS,S ($10\mu\text{g}$) 및 gp120 ($10\mu\text{g}$)을 등장성을 위해 H₂O와 PBS (pH 6.8)로 희석시켰다. 5분 후, 제형을 o/w 에멀션 상에 흡착시켰다. 흡착시킨 지 5분 후, 제형을 QS21 ($5\mu\text{g}$) 상에 흡착시킨 후 CpG ($100\mu\text{g}$)를 첨가시켰다.

3. 면역학적 방법

<128> 그룹 당 9마리 (Balb/C x C57B1/6)의 F1 마우스의 뒷 족저(footpad)에 2주 간격으로 $2 \times 50\mu\text{l}$ 의 백신을 2회 투여하였다. 2주 후, 혈청을 채취하여 항체 반응을 평가하고, 비장 세포를 수집하여 세포 매개성 면역 반응을 결정하였다.

<129> 럼프구증식을 분석하기 위해, 세포를 96-웰 등근 바닥의 미세역가 플레이트에 mL 당 2×10^6 개의 농도로 4중으로 시딩하였다. 세포를 다양한 농도의 RTS,S 또는 gp120 항원의 존재하에서 항생제, 글루타민 및 1%(v/v) 정상 마우스 혈청이 보충된 RPMI-1640에서 72 또는 96시간 동안 배양하였다. 대조 세포를 항원없이 배양하였다. 그 후, 세포를 $1\mu\text{Ci}/\text{웰}[^3\text{H}]$ -티미딘으로 밤새 펄싱시키고, 수집하고, 혼입된 방사능을 베타-계수기로 측정하였다. 결과는 분당 평균 개수 (cpm)로서 표현되었다.

<130> CTL 분석을 위해, 세포를 HBsAg CTL 에피토프 (Schirmbeck et al., 1995)에 상응하는 합성 웨პ티드 pCMI003 (IPQLSDLSSWWTSL) 또는 gp120 CTL 에피토프 (Casement et al., 1995)를 나타내는 웨პ티드 pCMI007 (GIHIGPGRAYAARK) $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 존재하에 6-웰 플레이트에서 7일간 배양하였다. 배양 기간의 종료시에, 이웨პ티드 세포를 대조표준 및 S-트랜스펙션된 P815 세포를 사용하는 표준 [⁵¹Cr]-방출 검정으로 HBsAg 특이적 세포용해 활성에 대해 2중으로 평가하였다. gp120 특이적 세포독성은 웨პ티드 pCMI007로 1시간 동안 펄싱되거나 처리되지 않고 남겨둔 P815 표적 세포를 사용하여 결정되었다. 최소 및 최대 방출은 각각 이웨პ티드 세포없이 그리고 3% (v/v) 트리톤 X-100을 첨가하면서 표적 세포를 사용하여 결정되었다. 결과는 %[51Cr]-방출 (실험 배양물의 cpm - 자발적 방출의 cpm / 최대 방출의 cpm - 자발적 방출의 cpm)로서 표현되었다.

<131> 풀링된 혈청의 역가측정 및 이소타이핑을 HBsAg로 코팅된 플레이트를 사용하는 표준 효소면역측정법(ELISA) 포맷으로 수행하였다. 혈청을 1:400에서 출발하여 PBS/BAS로 희석시켰다. Ig 또는 이소타입 IgG1, IgG2a 및 IgG2b에 대해 특이적인 비오티닐화된 2차 항체에 이어 양고추냉이 페옥시다제-스트렙타비딘 컨쥬게이트를 사용하여 결합된 항체를 검출하였다. ELISA 역가를 소프트맥스프로에 의해 기준물질로부터 계산하고, ELISA 유닛 (EU/mL)으로 표현하였다. gp120 특이적 항체 역가를, gp120 단백질로 코팅된 플레이트를 사용하여 표준 ELISA로 측정하였다. 혈청을 1:100에서 출발하여 PBS/트윈20/BSA로 희석시켰다. Ig 또는 이소타입 IgG1, IgG2a 및

IgG2b에 대해 특이적인 비오티닐화된 2차 항체에 이어 양고추냉이 페옥시다제-스트렙타비딘 컨쥬케이트를 사용하여 결합된 항체를 검출하였다. 역가를 표준 마우스 Ig에 대해 계산하고, $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 표현하였다.

<132> 4. 결과

<133> 실험 1

림프구증식 반응의 분석은 그룹들 간의 RTS,S에 대한 반응성에서 어떠한 현저한 차이도 나타내지 않았다. 대조적으로, CpG 및 DQS21 둘 모두를 함유하는 그룹 1 및 3은 CpG 또는 DQS21만을 함유하는 그룹들보다 더 우수한 gp120 특이적 림프구증식 반응을 나타내었다 (도 6).

<135> 본 실험에서는, HBsAg 특이적 CTL만이 측정되었다. CpG 및 DQS21이 조합된 형태로 투여된 그룹 1과 3, 및 두 가지 애쥬번트 성분 중 하나만으로 면역된 그룹 2와 4 사이에서의 CTL 유도에서는 현저한 차이가 없었지만, Al(OH)₃의 존재는 그룹 1에서의 CpG 및 DQS21의 조합에 대해 관찰된 CTL 활성을 감소시켰다 (도 7). 그러나, CpG와 DQS21의 사용이 DQS21을 단독으로 사용하는 경우보다 우수하고, 이들의 조합물이 Al(OH)₃의 존재하에서 CpG를 단독으로 사용하는 경우보다 CTL을 더 잘 유도시키는 경향이 존재하였다 (도 7).

<136> 마우스의 체액성 면역 반응을 HBsAg 특이적 항체의 존재에 대해서만 조사하였다. 역가는 약 3배의 증가를 나타낸 그룹 3를 제외한 모든 그룹에서 유사하였으며, 이는 Al(OH)₃의 존재하에서, DQS21과 CpG의 조합물이 CpG를 단독으로 사용한 경우보다 더욱 면역원성이 있음을 입증해준다 (도 8). 이소타입 분포는 Al(OH)₃ 함유 그룹 3 및 4의 경우 유사하였지만, Al(OH)₃의 부재하에서, CpG 및 DQS21의 조합물은 DQS21을 단독으로 사용한 경우보다 강력한 T_{H1} 유사 이소타입 패턴을 유도시켰다 (도 8).

<137> 실험 2

<138> RTS,S 및 gp120에 대해 특이적인 림프구증식 반응은 본 실험에서 매우 유사하였다. 데이터는 DQS21 (단독 또는 o/w 에멀션과 함께 사용한 경우)을 첨가하면 둘 모두의 항원에 대한 림프구증식 반응이 증강됨을 시사하고 있다 (도 9).

<139> CTL 반응은 HBsAg 및 gp120 CTL 에피토프 펩티드 둘 모두를 사용함으로써 평가되었다. 둘 모두의 경우, CTL은 그룹 1을 CpG 단독으로 면역시킨 후에 검출될 수 있었다 (도 10). 그러나, DQS21을 첨가하면 둘 모두의 항원에 대해 CTL이 현저하게 증가되었다 (도 10). o/w 에멀션의 존재는 DQS21의 포지티브 효과를 중화시키거나 (gp120), 시험관내 검정의 백그라운드를 증가시켰다 (HBsAg).

<140> HBsAg 및 gp120에 대한 항체 반응은, DQS21을 CpG 애쥬번트에 첨가시킴으로써 증가하였다 (도 11a). o/w 에멀션이 제형에 포함된 경우에 추가 증가가 관찰되었다 (도 11a). DQS21을 CpG에 첨가하면, 더욱 현저한 T_{H1} 바이어스 쪽으로 gp120 이소타입 프로파일이 이동되었으나, HBsAg 이소타입 프로파일에 대한 효과는 본 실험에서 덜 현저하였다.

<141> 5. 결론

<142> CpG와 DQS21의 조합물로 제형화된 RTS,S 및 gp120으로 면역화시키면, 강력한 항원 특이적 면역 반응이 얻어진다. 애쥬번트 성분 CpG와 DQS21의 조합물은 단일 성분과 비교하여,

<143> - 림프구증식 반응을 증강시키고,

<144> - CTL 활성을 증가시키며,

<145> - 항체 역가 및 T_{H1} 이소타입 패턴을 증대시킨다.

<146> 실시예 5. TC1 종양 모델에서의 CpG 및/또는 DQS21 제형의 치료학적 잠재능

<147> 1. 실험 설계

<148> 10마리의 C57b1/6 마우스로 이루어진 4개의 그룹에 0일째에 마우스의 옆구리에 피하적으로 10e6 (200 μl) TC1 세포 (E7 발현 종양 세포)를 투여하였다.

<149> 그 후, 마우스를, 제형화된 PD1/3E7 HPV16 5 μg 을 족저내 주입함으로써 종양 시험감염시킨 후 14일 및 21일째에 2회 백신접종하였다. 종양 성장을 매주 2회 개별적으로 측정하였다.

<150> 마우스 그룹:

<151> 1. 백신 처리하지 않은 것

<152> 2. PD1/3E7 + CPG (10 μ g ODN 2006)

<153> 3. PD1/3E7 + DQS21 (0.5 μ g)

<154> 4. PD1/3E7 + CPG + DQS21

<155> 종양 성장은 매주 2회 개개의 종양을 측정함으로써 모니터링하였다.

2. 제형화

<157> 제형화를 주입 당일에 수행하였다. 한 마리 마우스에 대한 주입 부피는 100 μ l였다. 필요한 경우, PD1/3E7 (5 μ g)를 등장성을 위해 H₂O 및 PBS (pH 7.4)로 희석시켰다. 5분 후, 필요에 따라, 1/5의 QS21/콜레스테롤 중량비로 리포솜과 혼합된 QS21(0.5 μ g) (DQ로서 언급됨)을 상기 제형에 첨가하였다. 30분 후, 올리고가 함유된 제형의 경우, 방부제로서 티오머살 1 μ g/ml를 첨가하기 30분 전에 CpG (ODN 2006) 10 μ g을 첨가하였다.

H ₂ O + PBS pH 7.4 + PD1/3E7 - 5분 + DQ - 30분 + CpG - 30분 - 티오
--

<158>

3. 결과

<160> 10마리의 동물로 이루어진 그룹 당 평균 종양 성장에 따른 진행이 도 12에 도시되어 있다. 10e6 TC1 세포로 종양 시험감염된 동물의 100% 종양 성장을 점차적으로 진행시켰다.

<161> DQS21 중의 E7 단백질로 백신접종된 동물 또는 백신접종되지 않은 동물의 70 내지 80%가 35일째까지 치사되었다.

<162> DQS21로 제형화된 E7 단백질에 의한 2회의 백신접종은 종양 성장에 대해 거의 아무런 효과를 나타내지 않았다. 대조적으로, CPG 애쥬번트 중의 5 μ g의 ProtD 1/3 E7 HPV 16을 사용한 2회의 백신 접종, 즉 IFP (14일, 24일 째)는 이러한 사전 확립된 종양의 퇴행을 유도시켰고, 마우스가 치사되지 않도록 보호해주었다: 마우스의 70 내지 80%가 35일째에도 여전히 생존해 있었다. 2가지 면역자극제 CPG 및 DQS21의 조합물은 단독으로 사용된 CpG에 비해 약간 이로운 효과를 나타내었다.

도면의 간단한 설명

<163> 도 1은 비강 부스팅 후 14일째의 OspA 특이적 IgG 역가를 도시한 것이다.

<164> 도 2는 비강 부스팅 후 14일째의 OspA 특이적 LA2 역가를 도시한 것이다.

<165> 도 3은 비강 부스팅 후 14일째의 혈청 플루(Flu) 스트레이인 특이적 IgG 역가를 도시한 것이다.

<166> 도 4는 비강 부스팅 후 14일째의 혈청 플루 스트레이인 특이적 혈청 적혈구응집 억제(HAI) 역가를 도시한 것이다.

<167> 도 5는 마우스에서의 OspA 특이적 LA2 역가를 도시한 것이다.

<168> 도 6은 면역화된 마우스로부터의 비장 세포의 gp120 특이적 림프구증식(lymphoproliferation) 활성을 도시한 것이다. 항원 특이적 활성을 모든 4개의 실험군에 대해 상이한 항원 농도에 대해 SI로서 표현된다.

<169> 도 7은 면역화된 마우스로부터의 비장 세포의 HBsAg 특이적 CTL 활성을 도시한 것이다. 이펙터 세포 활성은, P815 세포(개방 원) 또는 s-트랜스펙션된 P815 세포(진한 원)의 ⁵¹Cr 방출량을 조사하므로써 평가하였다.

<170> 도 8은 면역화된 마우스에서의 HBsAg 특이적 항체 반응을 도시한 것이다. 특이적 항체 역가(EU/ml로서 표현됨) 및 이소타입 프로파일을 ELISA 시험으로 평가하였다. 풀링된 혈청으로부터의 값이 표에 기재되어 있으며, 이소타입 분포 또한 그래프로 표시되어 있다.

<171> 도 9는 면역화된 마우스로부터의 비장 세포의 HBSAg- 및 gp120 특이적 림프구증식 활성을 도시한 것이다. 항원 특이적 활성을 모든 4개의 실험군에 대해 상이한 항원 농도에 대해 SI로서 표현된다.

<172> 도 10은 면역화된 마우스로부터의 비장 세포의 HBsAg- 및 gp120 특이적 CTL 활성을 도시한 것이다. 이펙터 세포 활성은, 대조군인 P815 세포(개방 부호), 또는 HBsAg 또는 gp120 CTL 에피토프를 나타내는 P815 세포(진한

부호)의 ^{51}Cr 방출량을 조사하므로써 평가하였다.

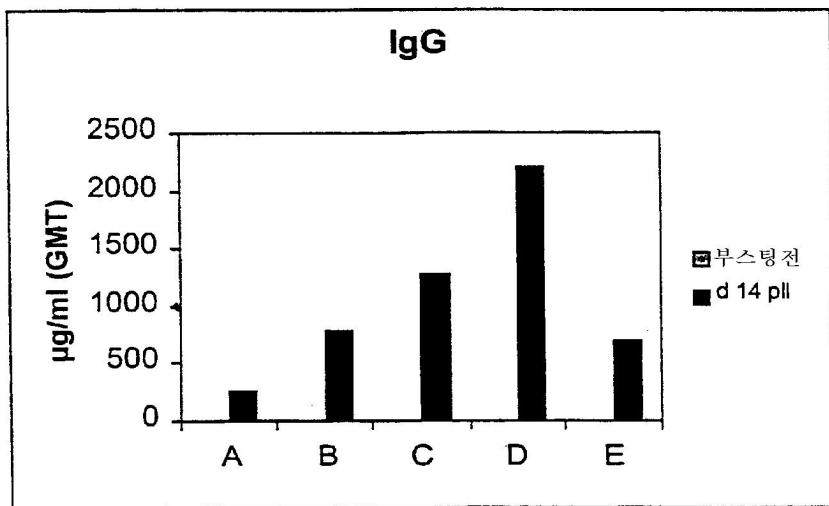
<173> 도 11a는 면역화된 마우스에서의 gp120 특이적 및 HbsAg 특이적 항체 반응을 나타낸 것이다. 특이적 항체 역가 ($\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 표현됨)(도 11a) 및 이소타입 프로파일을 ELISA 시험을 사용하여 평가하였다. 풀링된 혈청으로부터의 값이 표에 기재되어 있으며, 이소타입 분포 또한 그래프로 표시되어 있다. 도 11b는 gp120 특이적 항체의 이소타입 패턴을 나타낸다.

<174> 도 12는 시간 경과에 따른 10마리 동물 그룹 당 평균 종양 성장을 평가한 것이다.

도면1

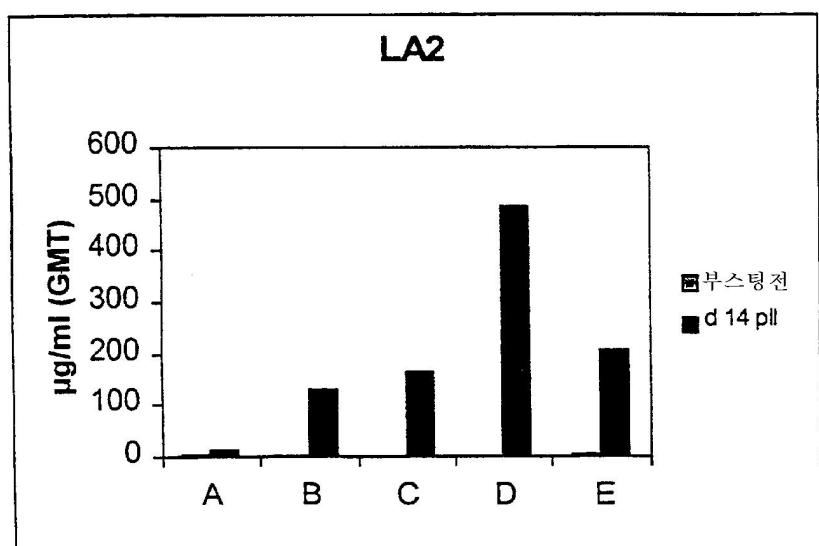
도면1

마우스에서의 리포-OspA에 대한 혈청 IgG



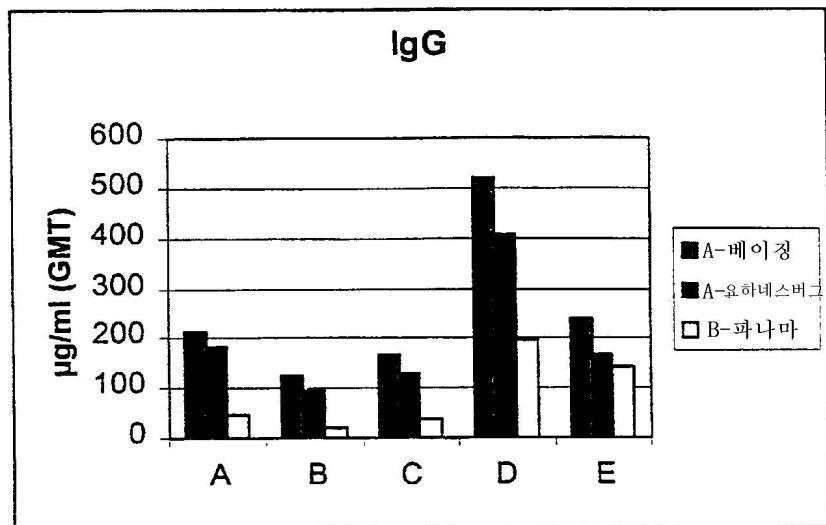
도면2

마우스에서의 LA2 역가



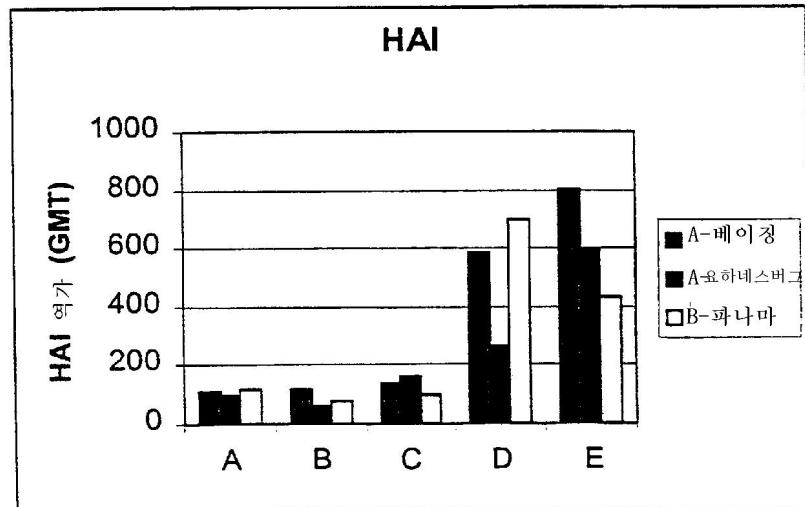
도면3

플루 스트레인에 대한 헬청 IgG 역가



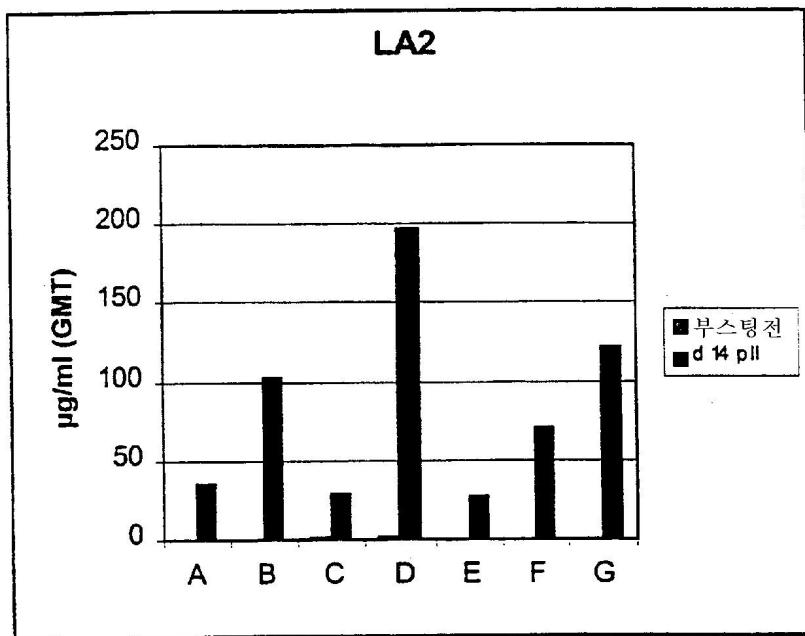
도면4

헬청 HAI 역가



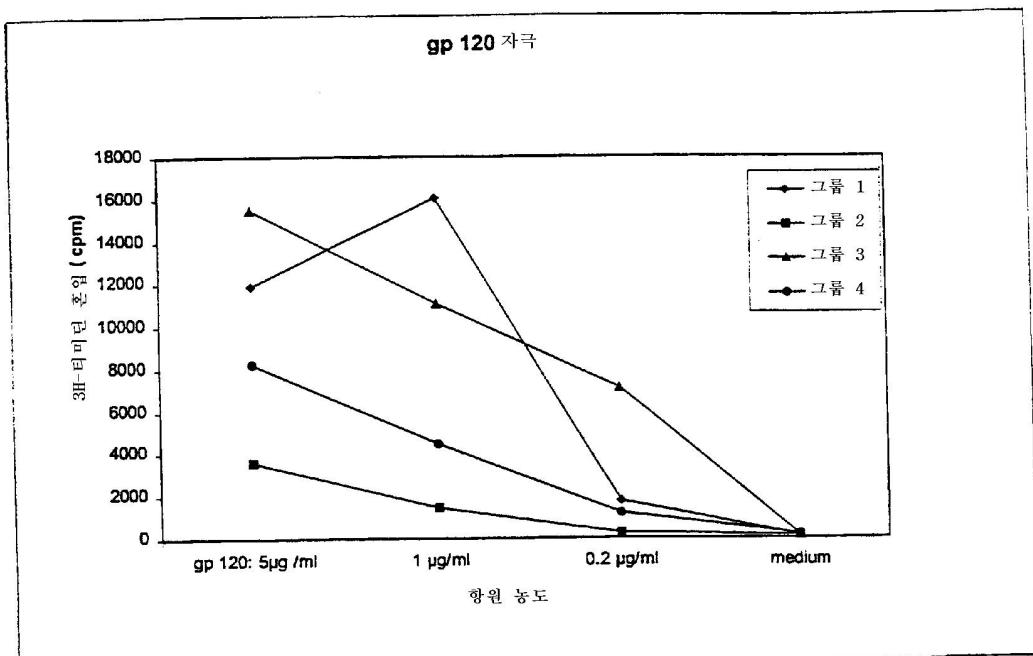
도면5

마우스에서의 LA2 역가



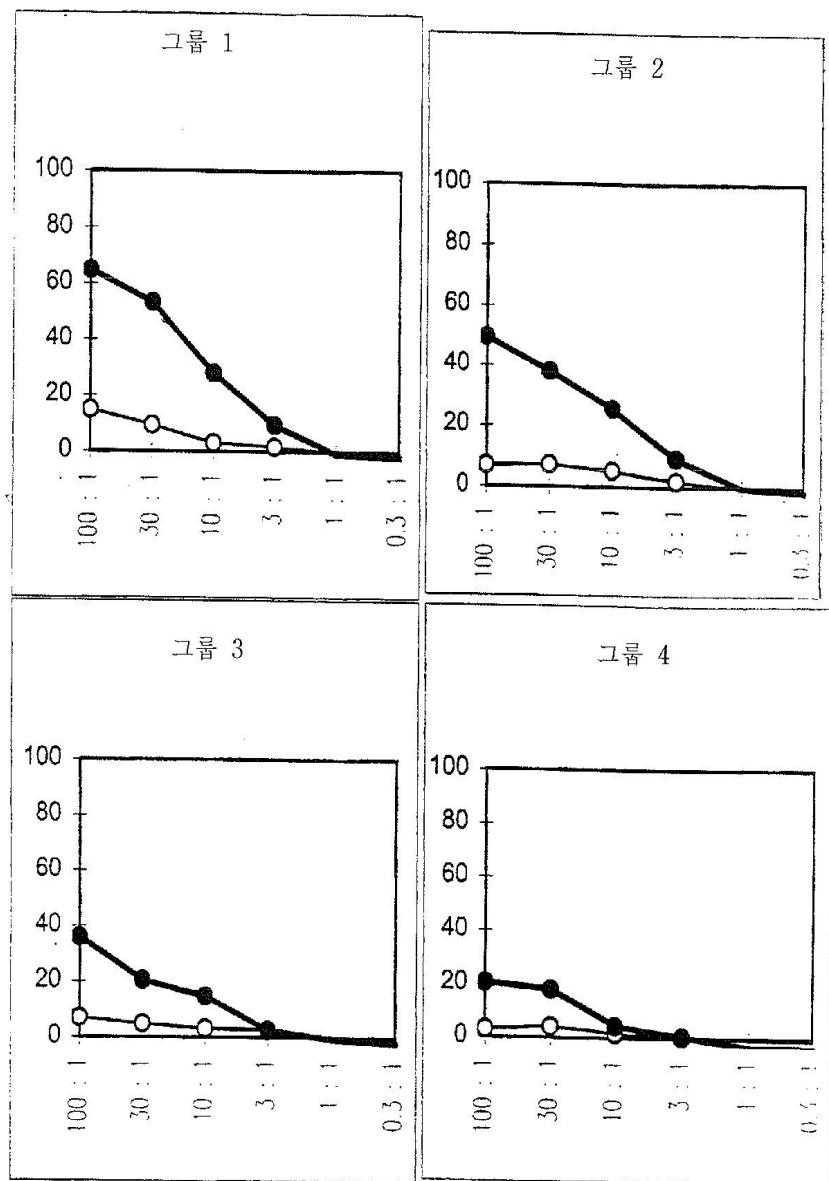
도면6

면역화된 마우스로부터의 비장 세포의 gp120 특이적 램프구증식 활성



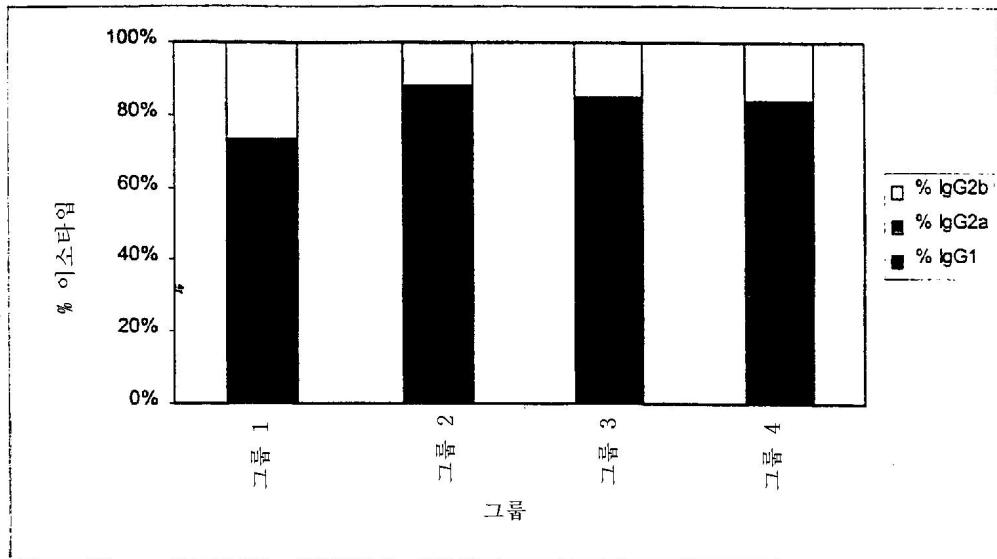
도면7

펩티드 HbsAg에 의한 자극 -비장세포의 CTL 활성



도면8

HbsAg 특이적 항체의 이소타입 패턴

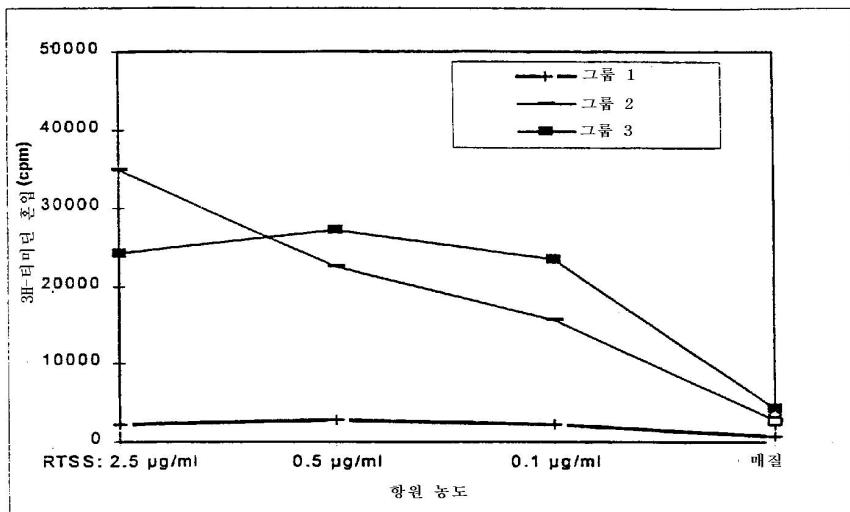


HbsAg-특이적 항체 역가

제형	Igtot UE/ml
그룹 1	31162
그룹 2	33689
그룹 3	95089
그룹 4	35690

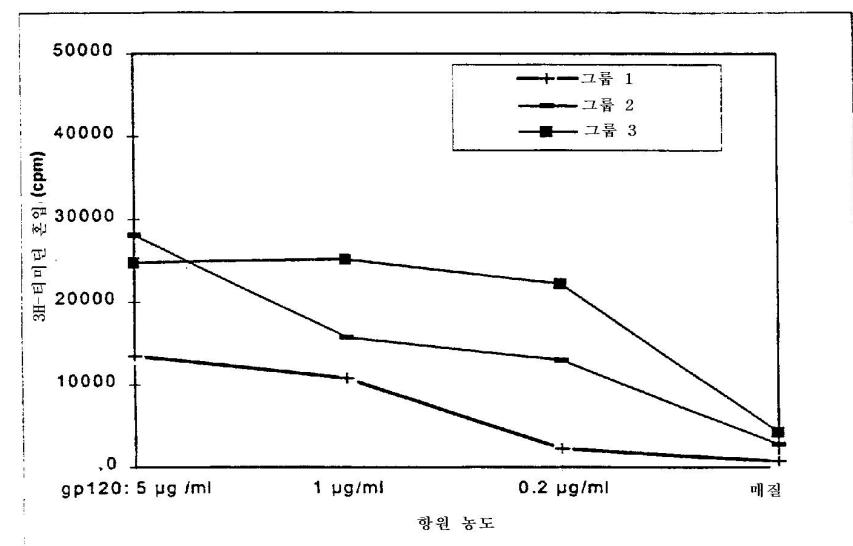
도면9a

RTS,S 차곡



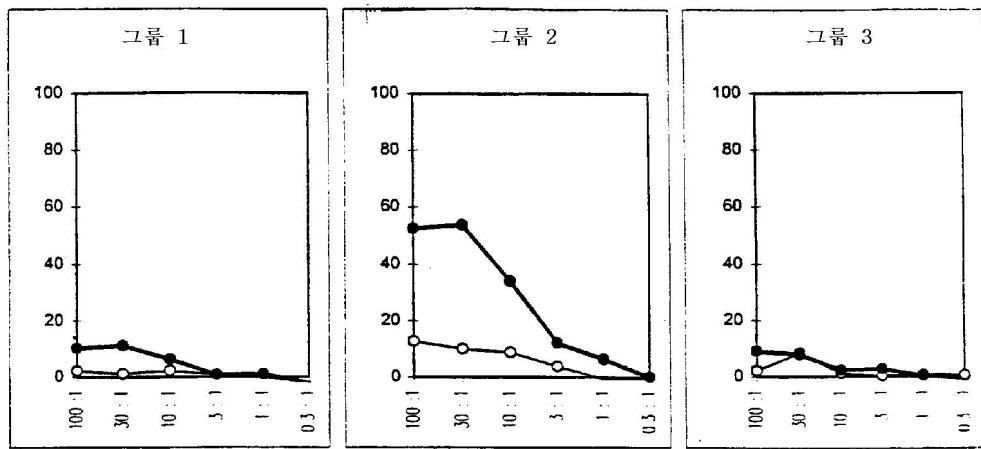
도면9b

gp120 차곡



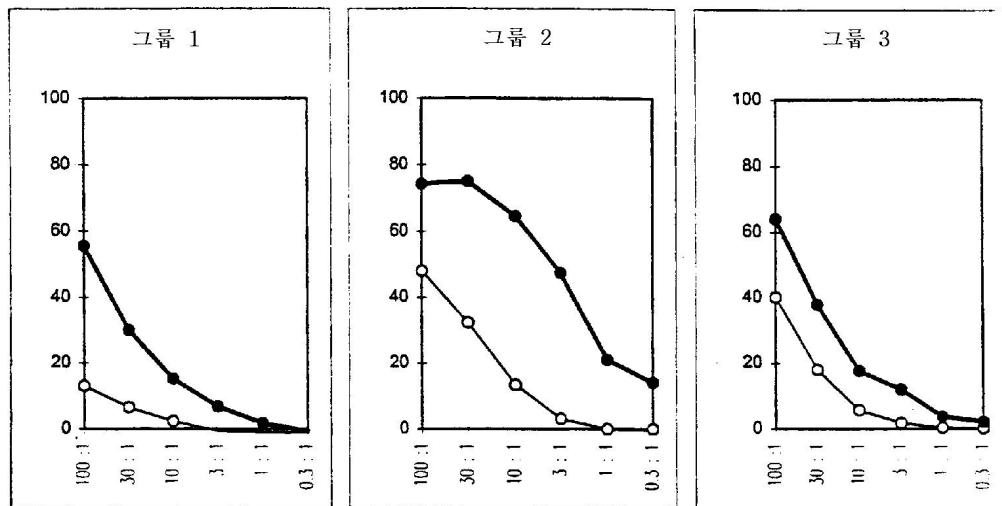
도면10a

펩티드 gp 120 에 의한 자극



도면10b

펩티드 HbsAg 에 의한 자극

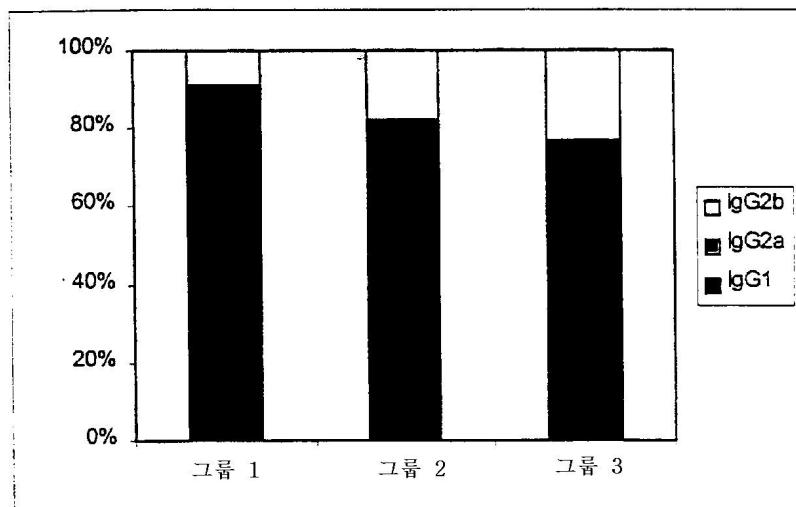


도면11aHbsAg 특이적 및 gp120 특이적 항체 역가HBsAg-특이적 항체 역가

제형	Igtot UE/ml
그룹 1	11536
그룹 2	30629
그룹 3	50540

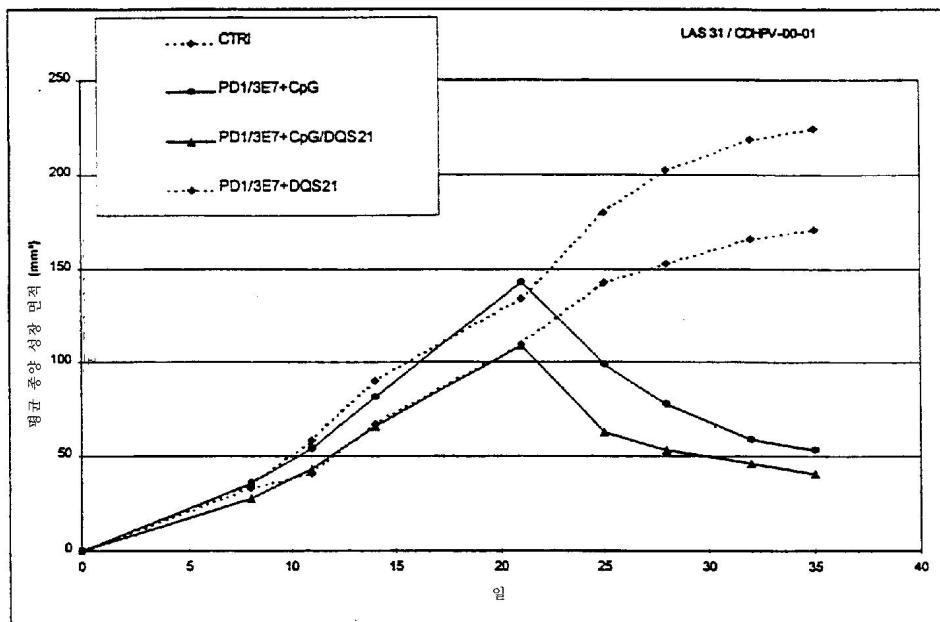
gp120-특이적 항체 역가

제형	Igtot μ g/ml
그룹 1	24
그룹 2	62
그룹 3	92

도면11bgp120 특이적 항체의 이소타입 패턴

도면12

시간 경과에 따른 10마리 동물 그룹당 종양 성장



서 열 목 륙

<110> FRIEDE, Martin
GARCON, Nathalie
HERMAND, Philippe
<120> Adjuvant formulation

<130> B45181

<160> 5

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Human

<400> 1
tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 2
<211> 18

<212> DNA
 <213> Human

<400> 2
 tctcccagcg tgccat 18

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 3
 accgatgacg tcgcgggtga cggcaccacg 30

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 4
 tcgtcgttt gtcgttgt cgtt 24

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Human

<400> 5
 tccatgacgt tcctgatgct 20