

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 39/295 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년03월06일 10-0557665 2006년02월25일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2002-7003023	(65) 공개번호	10-2002-0027630
(22) 출원일자	2002년03월07일	(43) 공개일자	2002년04월13일
번역문 제출일자	2002년03월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/EP2000/008784	(87) 국제공개번호	WO 2001/17551
국제출원일자	2000년09월07일	국제공개일자	2001년03월15일

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

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

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

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

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

(30) 우선권주장	9921146.8	1999년09월07일	영국(GB)
------------	-----------	-------------	--------

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

(72) 발명자	웨텐도르프, 마틴, 앤, 세실 벨기에비-1330릭센사르트루드린스티튜트89스미스클라인비이참바이오로지칼즈에스.에이.
----------	---

(74) 대리인	남상선
----------	-----

심사관 : 임혜준

(54) 혼합 백신 조성물

요약

본 발명은 단순 포진 바이러스(HSV) 항원 및 HPV 항원 및 임의로 추가로 다음 중 하나 이상을 포함하는 신규한 혼합 백신 조성물을 제공한다: EBV 항원, A형 간염 항원 또는 불활성화된 약독화된 바이러스, B형 간염 바이러스 항원, VZV 항원, HCMV 항원, 톡소플라스마 곤디 항원. 상기 백신 조성물은 3D-MPL 및 QS21과 같은 TH1 세포 반응의 우선적 자극인자인 애듀반트와 함께 포물레이션된다.

명세서

기술분야

본 발명은 신규한 백신 포물레이션, 이들을 제조하는 방법 및 이들의 치료적 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 청소년에게 투여하기 위한 혼합 백신에 관한 것이다.

배경기술

파필로마바이러스는 고도로 종 특이적인 작은 DNA 종양 바이러스이다. 현재까지, 70종의 별개의 사람 파필로마바이러스(HPV) 유전자형이 알려졌다. HPV는 일반적으로 피부에 대해 특이적이거나(예를 들어, HPV-1 및 HPV-2) 점막 표면에 대해 특이적이며(예를 들어, HPV-6 및 HPV-11), 통상적으로 수 개월 또는 수 년간 지속되는 양성 종양(사마귀)을 일으킨다. 이러한 양성 종양은 당사자에게는 고통스러울 수 있지만 생명을 위협할 정도는 아니나 약간의 예외가 있다.

몇몇 HPV는 또한 암과 관련된다. HPV와 사람 암 사이의 가장 강력하고 분명한 관련성은 HPV-16과 HPV-18 및 경부 암 종 사이에 존재하는 관련성이다. 경부암은 개발도상국에서의 가장 흔한 악성종양으로서, 전세계적으로 매년 약 500,000 명의 새로운 환자가 발생한다. 백신을 사용하여 1차 HPV-16 감염증 및 심지어 확립된 HPV-16-함유 암에 능동적으로 대처하는 것이 현재 기술적으로 가능하다. HPV-16에 대한 예방적 및 치료적 백신접종의 전망에 대한 개관에 대해서는 다음 문헌을 참조하라 [Cason J., Clin. Immunother. 1994; 1(4) 293-306 and Hagenessee M.E., Infections in Medicine 1997 14(7) 555-556, 559-564].

특히 관심있는 그 밖의 HPV 혈청형은 31, 33 및 45 이다.

현재, 세균의 클로닝 시스템의 도움으로 및 보다 최근에는 PCR 증폭에 의해 다양한 타입의 HPV가 단리되고 특징규명되었다. HPV 지놈의 분자적 체계는 잘 특징규명된 소(bovine) 파필로마바이러스 타입 1(BPV1)의 체계를 비교의 기초로 하여 규정하였다.

경미한 변화가 일어난다고 하더라도, 알려진 모든 HPV 지놈은 적어도 7개의 초기 유전자 E1 내지 E7 및 2개의 후기 유전자 L1 및 L2를 지닌다. 또한, 업스트림 조절 영역은 HPV 지놈의 대부분의 전사를 조절하는 것으로 여겨지는 조절 서열을 함유한다.

E1 및 E2 유전자는 각각 바이러스 복제 및 전사 조절에 관여하며, 바이러스 삽입에 의해 파괴되는 경향이 있다. E6 및 E7 뿐만 아니라, 최근의 증거는 E5도 바이러스 형질전환에 관여함을 암시한다.

HPV 16 및 18과 같은 경부 암종과 관련된 HPV에 있어서, 종양형성 작용은 바이러스 DNA의 삽입 후에 시작된다. 삽입은 캡시드 단백질 L1 및 L2를 코딩하는 유전자를 비활성화시키고, 정상적 세포 분화를 점차 감소시키고 암종을 발생시키는 2 개의 초기 단백질 E6 및 E7의 연속적 과발현(over expression)이 일어나도록 해준다.

경부 암종은 여성에게서 흔히 나타나며, 전암성 중간 상태를 거쳐 빈번히 사망에 이르게 하는 침습성 암종으로 발전한다. 이러한 질병의 중간 상태는 자궁경부 상피내 신생물로서 알려져 있으며, 심각도가 증가함에 따라 I 내지 III으로 분류된다.

임상적으로, 여성 항문성기관(anogenital tract)의 HPV 감염증은 경부 편평 콘딜로마로서 나타나며, 이의 특징은 경부 편평상피의 표재성 세포 및 중간 세포에 주로 악영향을 미치는 코일로사이토시스(koilocytosis)이다.

바이러스의 세포변성 효과의 결과인 코일로사이트(koilocyte)는 핵주위에 선명한 혼륜(halo)을 지닌 다핵 세포로서 나타난다. 상피는 병변의 사마귀모양의 외양을 초래하는 비정상적 각화에 의해 두꺼워진다.

이러한 편평 콘딜로마는, HPV 16 또는 18 혈청형에 대해 양성인 경우, 그 자체로 침습성 경부 암종의 전구 병변으로서 간주되는 자궁경부 상피내 신생물(CIN) 및 원위치 발생암(CIS)으로 발전되는 고위험 인자이다.

WO 96/19496에는 사람 파필로마바이러스 E6 및 E7 단백질의 변이체, 특히 E6 및 E7 단백질 둘 모두에 결실을 지닌 E6/E7의 융합 단백질이 기재되어 있다. 이러한 결실 융합 단백질은 면역원성인 것으로 여겨진다.

HPV L1 기재 백신은 WO94/00152, WO94/20137, WO93/02184 및 WO94/05792에 기재되어 있다. 이러한 백신은 단량체, 캡소머 또는 바이러스 유사 입자로서 L1 항원을 포함할 수 있다. 이러한 입자는 L2 단백질을 추가로 포함할 수 있다. L2 기재 백신은 예를 들어 WO93/00436에 기재되어 있다. 그 밖의 HPV 백신은 E7과 같은 초기 단백질 또는 L2-E7과 같은 융합 단백질을 기재로 한다.

HSV-2는 음부 포진의 일차적인 병인학적 작용제이다. HSV-2 및 HSV-1(구순 포진의 원인 작용제)은 주로 신경절 세포에서 급성 질환을 유도시키고 잠복성 감염을 확립시키는 이들의 능력에 의해 특징규명된다.

음부 포진은 매년 기록된 500,000건의 임상 기록(일차 및 재발성 감염)을 가지며 미국에서만 약 5 백만명에게서 발생하는 것으로 추정된다. 일차 감염은 전형적으로 사춘기 이후 발생하며 고통스런 피부 손상의 국부화된 출현에 의해 특징규명되고, 이는 2주 내지 3주간 지속된다. 일차 감염 이후 6개월 이내에 환자 중 50%는 상기 질환의 재발을 경험할 것이다. 환자 중 약 25%는 매년 상기 질환의 10 내지 15회 재발 에피소드를 경험할 수 있다. 면역손상된 환자에게서 높은 빈도의 재발의 발생은 통계학적으로 보통의 환자 군집에서 보다 높다.

HSV-1 및 HSV-2 바이러스 둘 모두는 상기 바이러스의 표면상에 위치된 다수의 당단백질 성분을 가지고 있다. 이들은 gB, gC, gD 및 gE 등으로서 알려져 있다.

청소년이 특히 걸리기 쉬운 질병을 예방하기 위한 효과적인 혼합 백신이 필요하다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 TH1 세포 반응의 우선적 자극인자인 애쥬번트와 함께 (a) 단순 포진 바이러스(HSV) 항원; 및 (b) 사람 파필로마바이러스(HPV) 항원을 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

본 발명의 백신 조성물은 특히 HSV 및/또는 HPV 감염증의 위험에 놓일 수 있는 청소년에게 투여하는 경우에 매우 유익하다.

임의로, 본 발명의 백신 조성물은 하기 기술된 그 밖의 다수의 항원 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

본 발명에 따른 백신 조성물은 의외로 간섭을 전혀 나타내지 않는 것으로 밝혀졌는데, 즉, 본 발명의 조성물 중의 각각의 항원에 대한 면역 반응이 TH1 세포 반응의 우선적 자극인자인 애쥬번트와 함께 개별적으로 제공된 각각의 항원에 의해 수득되는 면역 반응과 본질적으로 동일한 것으로 밝혀졌다.

1종 이상의 B형 간염 항원을 포함하는 B형 간염 감염증의 예방용 백신은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 스미스클라인 비이참 바이오로지칼즈의 백신 엔게릭스(Engerix)-B (상표명)는 B형 간염을 예방하기 위해 사용된다. 이러한 백신은 B형 간염 표면 항원(상세하게는 하포드(Harford) 등의 문헌 「Postgraduate Medical Journal, 1987, 63 (Suppl. 2), p65-70」에 기재된 226 아미노산 S-항원)을 포함하며, 애쥬번트로서 알루미늄 하이드록시드를 사용하여 포몰레이션된다.

또한 스미스클라인 비이참 바이오로지칼즈의 백신인 하브릭스(Havrix) (상표명)는 A형 간염 감염증을 예방하기 위해 사용될 수 있는 백신의 예이다. 이것은 애쥬번트로서의 알루미늄 하이드록시드를 사용하여 포플레이션된다. 이 백신은 포르몰 (포름알데히드)로 비활성화되는 HM-175 A형 간염 바이러스의 약독된 균주를 포함한다; 참조: [Andre et al. (Prog. med. Virol., vol. 37, p1-24)].

본원에 사용된 용어 A형 간염 바이러스(HAV) 항원은 A형 간염 바이러스 또는 예를 들어 포르말데히드를 사용하여 임의로 비활성화되는 HAV의 약독된 균주로부터 유래되는 단백질을 의미하기 위해 사용된다. HAV 항원이 A형 간염 바이러스로부터 유래된 단백질인 경우, 이것은 임의로 재조합 단백질일 수 있다.

백신 트윈릭스(Twinrix) (상표명)는 재조합 B형 간염 항원과 상기 비활성화된 약독된 A형 간염 바이러스의 혼합물이다. 이 백신은 A형 간염과 B형 간염을 동시에 방어하기 위해 사용될 수 있다.

유럽 특허 0 339 667 (Chemo Sero)에는 A형 간염 항원과 B형 간염 항원을 혼합하여 혼합 백신을 제조하기 위한 일반적인 개념이 기재되어 있다. 상기 명세서에는, 사용되는 애쥬번트가 중요하지는 않다고 기재되어 있다: 애쥬번트는 면역 활성을 원하는 정도로 향상시킬 수 있고 임의의 부작용을 일으키지 않아야 할 뿐이다. 알루미늄 겔, 특히 알루미늄 하이드록시드 및 알루미늄 포스페이트 겔이 사용될 수 있다고 기재되어 있다.

본 발명에 따른 백신 조성물은 HPV 및 HSV 항원 뿐만 아니라 HAV 항원 또는 HBV 항원 또는 더욱 바람직하게는 HAV와 HBV 항원 둘 모두의 혼합물을 포함할 수 있다.

이러한 백신은 특히 HSV, 및/또는 HPV 감염, 및/또는 HAV 감염, 및/또는 HBV 감염의 위험에 놓일 수 있는 청소년에게 투여하는 경우에 매우 유익하다.

면역 반응은 대체로 두 가지의 극단적인 카테고리인 체액성 면역반응 또는 세포 매개성 면역반응 (전통적으로 각각 방어의 항체 메카니즘 및 세포 이펙터 메카니즘으로 특징구명됨)으로 나뉠 수 있다. 반응의 이러한 카테고리는 TH1-타입 반응 (세포 매개성 반응) 및 TH2-타입 면역 반응(체액성 반응)으로 일컬어져 왔다.

극단적인 TH1-타입 면역 반응은 항원 특이적인 일배체형 한정된 세포독성 T 림프구의 생성 및 천연 킬러 세포 반응에 의해 특징구명될 수 있다. 마우스의 경우, TH1-타입 반응은 IgG2a 서브타입의 항체의 생성에 의해 종종 특징구명되는 반면, 사람의 경우, 이러한 반응은 IgG1 타입 항체에 상응한다. TH2-타입 면역 반응은 마우스 IgG1을 포함하는 다양한 면역글로불린 이소타입의 생성에 의해 특징구명된다.

이러한 두 가지 타입의 면역 반응의 이면에 있는 구동력은 사이토카인인 것으로 간주될 수 있다. 고수준의 TH1-타입 사이토카인은 주어진 항원에 대한 세포 매개성 면역 반응의 유도를 유리하게 해주는 경향이 있으며, 고수준의 TH2-타입 사이토카인은 항원에 대한 체액성 면역 반응의 유도를 유리하게 해주는 경향이 있다.

TH1-타입 및 TH2-타입 면역 반응의 구별은 절대적이지 않다. 실제로 있어서, 개체는 TH1 우세 또는 TH2 우세로 기술되는 면역 반응을 지속시킨다. 그러나, 모스만(Mosmann)과 코프만(Coffman)에 의해 묘된 CD4 + ve T 세포 클론에서 기술된 사항과 관련하여 사이토카인의 패밀리(family)를 고려하는 것이 종종 편리하다 (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology*, 7, p145-173). 전통적으로, TH1-타입 반응은 T-림프구에 의한 INF- γ 사이토카인의 생성과 관련된다. IL-12와 같은 TH1-타입 면역 반응의 유도와 종종 직접 관련된 그 밖의 사이토카인은 T 세포에 의해 생성되지 않는다. 대조적으로, TH2-타입 반응은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 및 중양 피사 인자- β (TNF- β)의 분비와 관련된다.

특정한 백신 애쥬번트가 TH1-타입 또는 TH2-타입 사이토카인 반응의 자극에 특히 적합한 것으로 알려져 있다. 전통적으로, 백신접종 또는 감염 후 면역 반응의 TH1:TH2 균형의 최상의 지표는 항원에 의한 재자극 후 시험관내에서의 T 림프구에 의한 TH1 또는 TH2 사이토카인의 생성의 직접 측정 및/또는 (적어도 마우스에서의) 항원 특이적 항체 반응의 IgG1:IgG2a 비의 측정을 포함한다.

따라서, TH1-타입 애쥬번트는, 시험관내에서 항원에 의해 재자극된 경우, 단리된 T 세포 군집을 자극시켜서 고수준의 TH1-타입 사이토카인을 생성시키는 애쥬번트로서, TH1-타입 이소타입과 관련된 항원 특이적 면역글로불린 반응을 유도시킨다.

TH1 세포 반응을 우선적으로 자극시킬 수 있는 애주번트는 국제 특허 출원 WO 94/00153호 및 WO 95/17209호에 기재되어 있다.

3 De-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)가 하나의 이러한 애주번트이다. 이것은 GB 2220211(Ribi)로부터 알려져 있다. 화학적으로, 이것은 3 De-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A 및 4, 5 또는 6 아실화된 사슬의 혼합물이며, 리비이뮤노캠(Ribi Immunochem, Montana)에 의해 제조된다. 3 De-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A의 한 가지 바람직한 형태는 유럽 특허 0 689 454 B1(SmithKline Beecham Biologicals SA)에 기재되어 있다.

바람직하게는, 3D-MPL의 입자는 0.22 미크론 막을 통해 멸균 여과될 정도로 충분히 작다 (유럽 특허 제 0 689 454호 참조). 3D-MPL은 용량 당 10 μ g 내지 100 μ g, 바람직하게는 25 내지 50 μ g으로 존재하며, 여기서 항원은 전형적으로 용량 당 2 내지 50 μ g으로 존재한다.

또 다른 바람직한 애주번트는 켈라자 사포나리아 몰리나 (Quillaja Saponaria Molina)의 수피로부터 유래된 Hplc 정제된 비독성 분획인 QS21을 포함한다. 임의로, 이것은, 임의로 캐리어와 함께, 3 De-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)와 혼합될 수 있다.

QS21의 제조 방법은 미국 특허 제 5,057,540호에 기재되어 있다.

QS21을 함유하는 비-리액토제닉(non-reactogenic) 애주번트 포물레이션은 이미 공지되었다 (WO 96/33739). QS21과 콜레스테롤을 포함하는 이러한 포물레이션은 항원과 함께 포물레이션되는 경우에 성공적인 TH1 자극성 애주번트인 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 일부를 구성하는 백신 조성물은 QS21과 콜레스테롤의 혼합물을 포함할 수 있다.

TH1 세포 반응의 우선적 자극인자인 추가의 애주번트로는 면역조절 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 WO 96/02555에 기재된 메틸화되지 않은 CpG 서열이 있다.

상기 언급된 애주번트와 같은 다양한 TH1 자극성 애주번트의 혼합물은 TH1 세포 반응의 우선적 자극인자인 애주번트를 제공하는 것으로 또한 예상된다. 예를 들어, QS21은 3D-MPL과 함께 포물레이션될 수 있다. QS21:3D-MPL의 비는 전형적으로 약 1:10 내지 10:1, 바람직하게는 1:5 내지 5:1, 종종 실질적으로는 1:1 이다. 최적의 상승작용을 위한 바람직한 범위는 2.5:1 내지 1:1의 3D-MPL:QS21 이다.

바람직하게는, 캐리어가 본 발명에 따른 백신 조성물에 또한 존재한다. 캐리어는 수중유 에멀션, 또는 알루미늄 포스페이트 또는 알루미늄 하이드록시드와 같은 알루미늄염일 수 있다.

바람직한 수중유 에멀션은 스쿠알렌과 같은 대사가 가능한 오일, 알과 토크페롤 및 트윈 80을 포함한다. 추가로, 수중유 에멀션은 스펠 85 및/또는 레시틴 및/또는 트리카프릴린을 함유할 수 있다.

한 가지 특히 바람직한 일면에 있어서, 본 발명에 따른 백신 조성물 중의 항원은 3D-MPL 및 알루미늄(alum)과 혼합된다.

전형적으로, 사람 투여의 경우, QS21과 3D-MPL은 용량 당 1 μ g 내지 200 μ g, 예를 들어 10 내지 100 μ g, 바람직하게는 10 μ g 내지 50 μ g으로 백신에 존재한다. 전형적으로, 수중유는 2 내지 10%의 스쿠알렌, 2 내지 10%의 알과 토크페롤 및 0.3 내지 3%의 트윈 80을 포함한다. 바람직하게는, 스쿠알렌:알과 토크페롤의 비는 1 이하인데, 이는 이것이 더욱 안정한 에멀션을 제공하기 때문이다. 스펠 85는 1%의 수준으로 또한 존재할 수 있다. 몇몇 경우, 본 발명의 백신이 안정제를 추가로 함유하는 것이 유리할 수 있다.

비독성의 수중유 에멀션은 바람직하게는 수성 캐리어 중에 비독성 오일, 예를 들어 스쿠알렌 또는 스쿠알렌, 에멀션화제, 예를 들어 트윈 80을 함유한다. 수성 캐리어는 예를 들어 포스페이트 완충 식염수일 수 있다.

수중유 에멀션 중에 QS21, 3D-MPL 및 토크페롤을 포함하는 특히 효능있는 애주번트 포물레이션은 WO 95/17210에 기재되어 있다.

본 발명의 조성물내의 HPV 항원은 바람직하게는 HPV 16 및/또는 18, 또는 HPV 6 및/또는 11, 또는 HPV 31, 33 또는 45로부터 유래한다.

하나의 바람직한 구체예에서 본 발명에 따른 백신 조성물내의 HPV 항원은 HPV의 주요 캡시드 단백질 L1 및 임의로 특히 HPV 16 및/또는 HPV 18로부터의 L2 단백질을 포함한다. 본 구체예에서, L1 단백질의 바람직한 형태는 트렁케이팅(truncating)된 L1 단백질이다. 바람직하게는 L1(임의로 L1-L2 융합체 중의)은 바이러스 유사 입자(VLP)의 형태이다. L1 단백질은 또 다른 HPV 단백질, 특히 E7과 융합하여 L1-E7 융합체를 형성할 수 있다. L1-E 또는 L1-L2-E를 포함하는 키메라 VLP가 특히 바람직하다.

또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명의 조성물내의 HPV 항원은 E6 또는 E7 단백질, 특히 T 세포 에피토프를 가진 면역학적 융합 파트너에 연결된 E6 또는 E7으로부터 유래된다.

본 발명의 본 구체예의 바람직한 형태에서, 면역학적 융합 파트너는 헤모필루스 인플루엔자 B의 단백질 D로부터 유래된다. 바람직하게는 단백질 D 유도체는 상기 단백질의 대략적으로 처음 1/3, 특히 대략적으로 처음 N-말단의 100 내지 110개 아미노산을 포함한다.

본 발명의 본 구체예에서 바람직한 융합 단백질은 단백질 D - HPV 16으로부터의 E6, 단백질 D - HPV 16으로부터의 E7, 단백질 D - HPV 18로부터의 E7 및 단백질 D - HPV 18로부터의 E6을 포함한다. 단백질 D 부분은 바람직하게는 단백질 D의 처음 1/3을 포함한다.

본 발명의 또 다른 구체예에서, HPV 항원은 특히 HPV 6 및/또는 HPV 11로부터의 L2-E7 융합체의 형태로 존재한다.

본 발명의 단백질은 바람직하게는 대장균에서 발현된다. 바람직한 구체예에서 상기 단백질은 5개 내지 9개, 바람직하게는 6개의 히스티딘 잔기를 포함하는 히스티딘 테일을 가지면서 발현된다. 이들은 정제를 조력하는데에 유리하다. 이러한 단백질의 제조에 대한 설명은 공동 출원중인 영국 특허 출원 제 GB 9717953.5호에 충분히 기술되어 있다.

백신 조성물내의 HPV 항원은 $Al(OH)_3$ 상에 흡착될 수 있다.

본 발명의 조성물 중의 HSV 항원은 HSV-2, 전형적으로 당단백질 D로부터 유래하는 것이 바람직하다. 당단백질 D는 바이러스 막상에 위치되어 있고, 또한 감염된 세포의 세포질에서 발견된다[참조: Eisenberg R.J. et al; J of Vriol 1980, 35, 428-435]. 이것은 시그널 펩티드를 포함하는 393개 아미노산을 포함하며 약 60 kD의 분자량을 갖는다. 모든 HSV 엔벨로프 당단백질 중에서도 이것이 아마도 가장 잘 특징규명되어 있다[참조: Cohen et al; J. of Virology, 60, 157-166]. 생체내에서 이것은 바이러스가 세포막에 부착하는데에 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있다. 또한, 당단백질 D는 생체내에서 중화 항체를 유도시킬 수 있음이 밝혀졌다[참조: Eing et al J. Med. Virology 127: 59-65]. 그러나, 환자 혈청내의 높은 중화 항체 역가의 존재에도 불구하고 잠복성 HSV-2 바이러스는 여전히 재활성화될 수 있고 상기 질환의 재발을 유도시킬 수 있다.

본 발명의 하나의 구체예에서 HSV 항원은 막 앵커 영역이 없는 트렁케이팅된 단백질의 C 말단에 첨가된 아스파라진 및 글루타민을 지니면서 천연 발생 당단백질의 아미노산 1 내지 306을 포함하는 308개 아미노산의 트렁케이팅된 HSV-2 당단백질 D이다. 상기 단백질의 이러한 형태는 성숙한 283 아미노산 단백질을 생성시키기 위해 절단되는 시그널 펩티드를 포함한다. 차이니즈 햄스터 난소 세포에서의 이러한 단백질의 생성은 진테크(Genetech)의 유럽 특허 EP-B-139 417호에 기술되었다.

재조합 성숙 HSV-2 당단백질 D 트렁케이트는 바람직하게는 본 발명의 백신 포뮬레이션에 사용되며 rgD2t로 표기하였다.

애쉴버트 3D-MPL과 함께 상기 HSV-2 항원의 혼합물은 WO 92/16231에 기술되어 있다.

B형 간염 바이러스(HBV) 항원이 본 발명의 조성물에 포함되는 경우, 이것은 전형적으로 B형 간염 표면 항원이다.

B형 간염 표면 항원(HBsAg)의 제조는 널리 문서화되어 있다. 예를 들어, 문헌[Harford et.al. in Develop. Biol. Standard 54, page 125 (1983), Gregg et.al. in Biotechnology, 5, page 479 (1987), EP-A- 0 226 846, EP-A-0 299 108] 및 상기 문헌에 인용된 참고문헌들을 참조하라.

본원에 사용되는 바와 같이 본원에 'HBsAg' 또는 'HBS'라는 약어로 표기된, 표현 'B형 간염 표면 항원'은 HBV 표면 항원의 항원성을 디스플레이하는 임의의 HBsAg 항원 또는 이의 단편을 포함한다. HBsAg S 항원의 226 아미노산 서열[참조: Tiollais et. al. Nature, 317, 489 (1985) 및 상기 문헌에 인용된 참고문헌]에 추가적으로 본원에 기술된 HBsAg는, 요망되는 경우, 상기 참고문헌 및 Ep-A- 0 278 940호에 기술된 프리(pre)-S 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 본원에 기술한 HBsAg는 또한 변이체, 예컨대 WO 91/14703에 기술된 '이스케이프 돌연변이체(escape mutant)'를 의미할 수 있다. 추가적인 일면에서 HBsAg는 유럽 특허 출원 제 0 414 374호에서 L*로서 기술된 단백질을 포함할 수 있으며, 다시 말하자면, 아미노산 서열이 B형 간염 바이러스 라지(L) 단백질(ad 또는 ay 서브타입)의 아미노산 서열의 일부분으로 구성된 단백질을 포함할 수 있으며, 이의 아미노산 서열은 다음중 어느 하나로 구성됨을 특징으로 한다:

(a) 상기 L 단백질의 잔기 12 - 52, 이어서 잔기 133 - 145, 이어서 잔기 175 - 400; 또는

(b) 상기 L 단백질의 잔기 12, 이어서 잔기 14 - 52, 이어서 잔기 133 - 145, 이어서 잔기 175 - 400.

HBsAg는 또한 EP 0 198 474호 또는 EP 0 304 578호에 기술된 폴리펩티드를 의미할 수 있다.

대개 HBsAg는 입자 형태이다. 이것은 S 단백질을 단독으로 포함하거나 혼합 입자, 예컨대 L*이 상기 정의한 바와 같고 S가 B형 간염 표면 항원의 S-단백질을 나타내는 (L*,S)일 수 있다.

HBsAg는 WO 93/24148호에 기술된 바와 같이 알루미늄 포스페이트상에 흡착될 수 있다.

바람직하게는 본 발명의 포물레이션에서 사용된 B형 간염 바이러스(HBV) 항원은 시판 제품 엔게릭스(Engerix)-B(상표; 스미스클라인 비이참 바이오로지칼즈)에 사용된 HBsAg S-항원이다.

3D-MPL과 함께 B형 간염 표면 항원을 포함하는 백신은 유럽 특허 출원 0 633 784호에 기술되었다.

본 발명에 따른 조성물내에 포함될 수 있는 추가적인 병원균으로부터의 항원의 예를 이제 기술한다.

헤르페스바이러스 군의 구성원인 엡스타인 바르 바이러스(EBV)는 사람에게 일차 질환으로서 감염성 단핵증을 일으킨다. 우세하게 이것은 어린이 또는 젊은 성인에게 영향을 미친다. 평균 성인 군집의 90% 이상이 말초 B-림프구에 일생 동안 남아 있는 EBV에 의해 감염된다. 상기 바이러스는 이하선에서 평생 동안 생성되며 주로 바이러스를 내보내는 개인으로부터의 타액의 교환에 의해 전염된다. EBV에 감염된 어린이는 대개 증상이 없거나 매우 온화한 증상을 가지는 반면, 감염된 청소년 및 성인은 발열, 인두염 및 선명증을 특징으로 하는 전형적인 감염성 단핵증을 발생시킨다. 감염되었던 사람은 여생 동안 안티-EBV 항체를 유지함으로써, 추가 감염에 대해 면역된다.

이의 감염 특성에 추가적으로, EBV는 림프구를 신속하게 분열하는 세포로 형질전환시키는 것으로 밝혀졌으며, 따라서 아프리카 버키트 림프종(BL)을 포함하여, 몇 가지 상이한 림프종과 관련되어 왔다. EBV는 또한 비인강 암종(NPC)을 유발시키는 것에 관여할 수 있다. 전세계적으로 80,000건의 비인강 암종이 발생하는 것으로 추정되며 이는 중국 민족 군집에서 더욱 우세하다. 감염성 단핵증은 EBV에 의한 일차 감염의 결과이다. 추가적인 위험 인자가 존재하지 않는 경우 이것은 생명을 위협하는 질환은 아니다.

소위 막 항원 복합체를 구성하는 EBV 바이러스 엔벨로프의 4개의 단백질이 기술되었다. 이들을 보통 gp 220/350 또는 gp 250/350으로서 칭하거나 간단하게 gp 250 또는 350으로서 칭한다[참조: EP-A-151079]. gp 350 및 gp 250이 중화 항체의 생성을 유도하고 gp 350 및 gp 250에 대한 항체가 중화 능력을 가진다는 확실한 증거가 있다. 따라서 이들 단백질은 가능한 EBV 백신의 후보물질이다. EBV-관련 질환의 예방 및 치료를 위한 gp 250/350의 적용에 대한 추가 정보를 위해서는 EP 0 173 254호를 참조하라.

주요 EBV 표면 당단백질 gp350/220은 세포막 단백질인 CD21과의 상호작용을 통해 사람 표적 세포를 감염시킨다. Gp350/220은 사람의 EBV-중화 항체를 위한 일차 표적이고 gp350/220의 일부 형태는 EBV-관련 질환으로부터 보호하는 것으로 밝혀졌다. 바람직하게는 본 발명에 따른 백신 조성물은 EBV의 gp 350을 포함하지만 다른 보호 항원이 사용될 수 있다.

바람직한 일면에서 본 발명의 백신 조성물은 수두대상포진 바이러스 항원(VZV 항원)을 추가로 포함한다. 백신 포물레이션에의 함유시키기에 적합한 VZV의 항원은 문헌[참조: Longnecker et al., Proc Natl Acad Sci USA 84, 4303-4307 (1987)]에 기술된 gpI-V를 포함한다.

바람직한 구체예에서 gpI[참조: Ellis et al., US patent 4,769,239]가 사용된다. 또한 유럽 특허 제 0 405 867 B1호를 참조하라.

또 다른 바람직한 일면에서 본 발명의 백신 조성물은 사람 사이토메갈로바이러스(HCMV) 항원을 추가로 포함한다. HCMV는 헤르페스 바이러스 패밀리에 속하는 사람 DNA 바이러스이다. HCMV는 세계의 많은 지역에서 풍토성이다. 두 군집 사이에, HCMV는 심각한 의학적 질환을 일으킨다. HCMV는 신생아에게서 선천적인 결함의 주요 원인이다. 위험성있는 제 2의 군집은 HIV 감염에 걸린 환자와 같은 면역손상된 환자 및 이식을 경험한 환자이다. 상기 임상적 질환은 발열, 간염, 폐렴 및 감염성 단핵증을 포함하는 다양한 징후를 일으킨다. HCMV에 대한 백신으로 사용하기 위한 바람직한 항원은 WO 95/31555에 기술된 바와 같이 gB685**이다. HCMV 백신으로 사용하기 위한 면역원은 또한 WO 94/00150(City of Hope)에 기술된 바와 같이 HCMV 매트릭스 단백질인 pp65에 의해 제공된다.

하나의 바람직한 일면에서 본 발명의 백신 조성물은 VZV 및 HCMV 항원 둘 모두, 특히 상기 기술한 항원들을 추가로 포함한다.

또 다른 바람직한 일면에서 본 발명의 백신 조성물은 독소플라스마 곤디 항원을 추가로 포함한다. 독소플라스마 곤디는 사람을 포함하는 온혈 동물에게서 독소플라스마증을 일으키는 절대적인 세포내 원생 기생동물이다. 일반적으로 건강한 개체에게서 임상학적으로 증상이 없지만, 독소플라스마증은 임산부 및 면역손상된 환자에게서 심각한 합병증을 일으킬 수 있다. 독소플라스마 곤디에 대한 백신으로 사용하기 위한 바람직한 항원은 WO 96/02654호에 기술된 SAG1(또한 P30으로서 공지됨) 또는 WO 92/11366호에 기술된 Tg34이다.

하나의 바람직한 일면에서 본 발명의 백신 조성물은 독소플라스마 곤디 항원, 특히 상기 기술한 항원과 혼합된 VZV 항원 또는 HCMV 항원을 추가로 포함한다.

바람직한 일면에서 본 발명의 백신 조성물은 다가 백신, 예컨대 4가 또는 5가 백신이다.

본 발명의 포물레이션은 매우 낮은 용량의 항원(예컨대, 5 μ g rgD2t만큼 낮음)으로도 보호 면역을 유도시키는데 매우 효과적이다.

이들은 일차 감염에 대한 우수한 보호를 제공하고 유리하게는 특이적인 체액성(중화 항체) 및 이펙터 세포 매개된 (DTH) 면역 반응 둘 모두를 자극한다.

추가 일면에서 본 발명은 의학적 치료, 특히 사람 파필로마바이러스 감염 및 단순 포진 바이러스 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본원에 기술된 백신 포물레이션을 제공한다.

본 발명의 백신은 면역보호적 양의 항원을 함유할 것이고 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다.

백신 제제는 일반적으로 문헌[참조: Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978]에 기술되어 있다. 리포솜내로의 캡슐화는 예컨대, 문헌[참조: Fullerton, U.S. Patent 4,235,877]에 기술되어 있다. 거대분자에 대한 단백질의 컨쥬게이션은 예컨대, 문헌[참조: Likhite, U.S. Patent 4,372,945 and by Armor et al., U.S. Patent 4,474,757]에 기술되어 있다.

각각의 백신 용량중의 단백질의 양은 전형적인 백신접종자에게서 현저하게 불리한 부작용없이 면역보호 반응을 유도시키는 양으로서 선택된다. 이러한 양은 사용되는 특정 면역원에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 각각의 용량은 1 내지 1000 μ g, 바람직하게는 2 내지 100 μ g, 가장 바람직하게는 4 내지 40 μ g의 단백질을 포함할 것으로 예상된다. 특정 백신을 위한 최적량은 피검자의 항체 역가 및 그 밖의 반응의 관찰과 관련된 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 초기 백신접종 이후, 피검자는 약 4주내에 추가접종될 수 있다.

HPV 또는 HSV 감염에 민감한 사람의 백신접종에 추가적으로, 본 발명의 약제학적 조성물을 상기 바이러스 감염에 걸린 환자를 면역치료학적으로 치료하기 위해 사용할 수 있다.

본 발명의 추가 일면에서 본원에 기술된 제조 방법이 제공되며, 상기 방법은 사람 파필로마 바이러스 항원 및 단순 포진 바이러스 항원을 TH-1 유도성 애주번트, 예컨대 3D-MPL 및 바람직하게는 캐리어, 예컨대 알루미늄(alum)과 함께 혼합시키는 것을 포함한다.

요망되는 경우, 그 밖의 항원들을 임의의 편리한 순서로 첨가하여 본원에 기술된 다가 백신 조성물을 제공할 수 있다.

실시예

하기 실시예는 본 발명을 예증하는 것이며 본 발명을 제한하는 것이 아니다.

실시예 1: AS04를 사용하여 포플레이션시킨 1가 백신 또는 혼합 백신 중의 HPV Ags/HBs/gD의 면역원성 비교

서론

면역원성 실험을, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 또는 AlPO_4 상의 항원 또는 3D-MPL의 예비 흡착된 모노벌크를 사용하여 알루미늄/3D-MPL (AS04)로 포플레이션시킨 하기 4가지 상이한 항원을 사용하여 Balb/C 마우스에서 수행하였다:

1. HPV16 L1 바이러스 유사 입자 (VLP-16)
2. HPV18 L1 바이러스 유사 입자 (VLP-18)
3. HSV-2의 gD 항원
4. HBsAg

3D-MPL/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ 포플레이션은 AS04D라 칭하고, 3D-MPL/ AlPO_4 기재 포플레이션은 AS04C라 칭한다.

하기 백신을 평가하고, 이들 백신을 혼합할 수 있는 가능성을 평가하였다:

1. VLP16 + VLP18 AS04D;
2. gD AS04D;
3. HBs AS04C.

이러한 실험의 목적은 하기 백신으로 구성된 2가지 상이한 AS04 혼합물의 면역원성을 비교하는 데에 있었다:

1. VLP16 + VLP18 및 gD.
2. VLP16 + VLP18 및 gD 및 HBs Ag.

실험 프로토콜은 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명되어 있다.

요약하면, 10마리 마우스로 이루어진 군을 다양한 Ag 기재 포플레이션을 사용하여 3주 간격으로 2회 근내 면역시켰다. VLP, gD 및 HBs Ag에 대한 항체 반응 및 백신접종에 의해 유도된 이소타입 프로파일을 제 2 접종 후(post II) 14일째에 ELISA에 의해 모니터하였다. 동일한 시점에서, 사이토카인 생성($\text{IFN}\gamma/\text{IL5}$)을 VLP, gD 또는 HBs 항원을 사용하여 비장 세포를 시험관내 재자극한 후에 분석하였다.

재료 및 방법

포물레이션

포물레이션 조성

VLP16, VLP18, gD 및 HBs를 알루미늄염상의 3D-MPL을 사용하여 포물레이션시켰다.

사용된 성분

성분	농도	완충액
HPV 16 VLP	560 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Tris 20mM/NaCl 500mM
HPV 18 VLP	550 $\mu\text{g}/\text{ml}$	NaCl 500mM/NaPO ₄ 20mM
Al(OH) ₃	10380 $\mu\text{g}/\text{ml}$	H ₂ O
HBs	1219 $\mu\text{g}/\text{ml}$	PO ₄ 10mM/NaCl 150mM
gD	443 $\mu\text{g}/\text{ml}$	PBS pH 7.4
3D-MPL	1170 $\mu\text{g}/\text{ml}$	주사용 증류수
AlPO ₄	5mg/ml	NaCl 150mM

흡착.

a) VLP 흡착.

VLP 16 및 VLP 18 정제된 벌크를 Al(OH)₃에 첨가하여 2 μg VLP/10 μg Al(OH)₃의 비를 수득하였다. 혼합물을 최종 포물레이션시킬 때까지 2 내지 8℃에서 저장하였다.

b) gD 흡착.

2 μg 의 gD를 10 μg 의 Al(OH)₃와 혼합하였다. 혼합물을 최종 포물레이션시킬 때까지 2 내지 8℃에서 저장하였다.

c) HBs 흡착.

2 μg 의 Hbs를 10 μg 의 AlPO₄와 혼합하였다. 혼합물을 최종 포물레이션시킬 때까지 2 내지 8℃에서 저장하였다.

d) 3D-MPL 흡착.

5 μg 의 3D-MPL을 10 μg 의 Al(OH)₃와 혼합하였다. 혼합물을 최종 포물레이션시킬 때까지 2 내지 8℃에서 저장하였다.

5 μg 의 3D-MPL을 10 μg 의 AlPO₄와 혼합하였다. 혼합물을 최종 포물레이션시킬 때까지 2 내지 8℃에서 저장하였다.

포물레이션.

H₂O 및 NaCl을 혼합시키고(10배 농축), 실온에서 10분간 교반시킨 후, 다양한 성분을 첨가하였다: 흡착된 항원, 흡착된 3D-MPL 및 Al(OH)₃ (하기 표 참조). 이들 성분을 실온에서 10분간 진탕시키고, 주사할 때까지 4℃에서 저장하였다.

군	항원(들)		면역자극인자		비히클	
	타입	μg	타입	μg	타입	μg
A	gD	2	3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
	VLP16	2			Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	10

B	gD	2			Al(OH) ₃	10
	VLP16	2			Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
	HBs	2			Al(OH) ₃	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
C	gD	2			Al(OH) ₃	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	30
D	VLP16	2			Al(OH) ₃	10
	VLP18	2			Al(OH) ₃	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	20
					Al(OH) ₃	
E	HBs	2			Al(OH) ₃	10
			3D-MPL	5	Al(OH) ₃	10
					Al(OH) ₃	30

마우스 혈청학

안티-VLP-16 및 안티-VLP-18 혈청학

안티-VLP16 및 안티-VLP18 항체의 정량화를 코팅 항원으로서 VLP16 503/1 (20/12/99) 및 VLP18 504/2 (25/10/99F)를 사용하여 ELISA에 의해 수행하였다. 항원 및 항체 용액을 웰 당 50 μ l로 사용하였다. 항원을 PBS 중의 0.5 μ g/ml의 최종 농도로 희석시키고, 96 웰 마이크로역가 플레이트 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)의 웰에 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 흡착시켰다. 그 후, 플레이트를 1% 우혈청 알부민을 함유하는 PBS와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액 중의 혈청의 2배 희석물(1/400 희석율에서 출발함)을 VLP 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBS 0.1% 트윈 20으로 4회 세척하고, 포화 완충액 중에 1/1500으로 희석시킨 비오티-컨쥬게이션된 안티-마우스 Ig(Amersham, UK)를 각각의 웰에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후, 포화 완충액 중에 1/1000으로 희석시킨 스트렙타비딘-비오티닐화된 퍼옥시다제 복합체(Amersham, UK)를 37 $^{\circ}$ C에서 추가의 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기와 같이 세척하고, 0.1% 트윈 20 0.05M 시트레이트 완충액(pH 4.5) 중의 o-페닐렌디아민(Sigma) 0.04% H₂O₂ 0.03%의 용액과 함께 20분간 인큐베이션시켰다. 반응을 H₂SO₄ 2N으로 중지시키고, 490/630nm에서 판독하였다. ELISA 역가를 소프트웨어(SoftmaxPro)에 의해 기준값으로부터 계산하고 (매개변수가 4개인 방정식을 사용하여), EU/ml로 표현하였다.

안티-gD 반응:

안티-gD 항체의 정량화를 코팅 항원으로서 gD (gD 43B318)를 사용하여 ELISA에 의해 수행하였다. 항원 및 항체 용액을 웰 당 50 μ l로 사용하였다. 항원을 PBS 중의 1 μ g/ml의 최종 농도로 희석시키고, 96 웰 마이크로역가 플레이트 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)의 웰에 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 흡착시켰다. 그 후, 플레이트를 1% 우혈청 알부민과 0.1% 트윈 20을 함유하는 PBS (포화 완충액; 100 μ l/웰)와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액 중의 혈청의 2배 희석물(1/100 희석율에서 출발함)을 gD 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBS 0.1% 트윈 20으로 4회 세척하고, 포화 완충액 중에 1/1000으로 희석시킨 비오티-컨쥬게이션된 안티-마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b 또는 Ig(Amersham, UK)를 각각의 웰에 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후, 포화 완충액 중에 1/1000으로 희석시킨 스트렙타비딘-비오티닐화된 퍼옥시다제 복합체(Amersham, UK)를 37 $^{\circ}$ C에서 추가의 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기와 같이 세척하고, 0.1% 트윈 20 0.05M 시트레이트 완충액(pH 4.5) 중의 o-페닐렌디아민(Sigma) 0.04% H₂O₂ 0.03%의 용액과 함께 20분간 인큐베이션시켰다. 반응을 H₂SO₄ 2N으로 중지시키고, 490/630nm에서 판독하였다. ELISA 역가를 소프트웨어(SoftmaxPro)에 의해 기준값으로부터 계산하고 (매개변수가 4개인 방정식을 사용하여), EU/ml로 표현하였다.

안티-HBs 혈청학

안티-HBs 항체의 정량화를 코팅 항원으로서 HBs (Hep286)를 사용하여 ELISA에 의해 수행하였다. 항원 및 항체 용액을 웰 당 $50\mu\text{l}$ 로 사용하였다. 항원을 PBS 중의 $1\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 희석시키고, 96 웰 마이크로역가 플레이트 (Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)의 웰에 4°C 에서 밤새 흡착시켰다. 그 후, 플레이트를 1% 우혈청 알부민과 0.1% 트윈 20을 함유하는 PBS (포화 완충액)와 함께 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액 중의 혈청의 2배 희석물 (1/100 희석율에서 출발함)을 HBs 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37°C 에서 1시간 30분간 인큐베이션시켰다. 플레이트를 PBS 0.1% 트윈 20으로 4회 세척하고, 포화 완충액 중에 1/1500으로 희석시킨 비오틴-컨쥬게이션된 안티-마우스 Ig (Amersham, UK) 또는 각각 1/4000, 1/8000, 1/4000으로 희석시킨 IgG1, IgG2a, IgG2b(IMTECH, USA)를 각각의 웰에 첨가하고, 37°C 에서 1시간 30분간 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후, 포화 완충액 중에 1/1000으로 희석시킨 스트렙타 비딘-비오틴닐화된 퍼옥시다제 복합체(Amersham, UK)를 37°C 에서 추가의 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기와 같이 세척하고, 0.1% 트윈 20 0.05M 시트레이트 완충액(pH 4.5) 중의 o-페닐렌디아민(Sigma) 0.04% H_2O_2 0.03%의 용액과 함께 20분간 인큐베이션시켰다. 반응을 H_2SO_4 2N으로 중지시키고, 490/630nm에서 판독하였다. ELISA 역가를 소프트웨어(SoftmaxPro)에 의해 기준값으로부터 계산하고(매개변수가 4개인 방정식을 사용하여), EU/ml로 표현하였다.

사이토카인 생성

2차 면역시킨 지 2주 후에, 마우스를 치사시키고, 비장을 무균적으로 꺼내어 풀링(pooling)시켰다. 세포 현탁액을 2mM L-글루타민, 항생물질, 5×10^{-5} M 2-메르캅토에탄올 및 5% 우태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지 (GIBCO) 중에 준비하였다. 세포를 상이한 농도(10 내지 $1\mu\text{g/ml}$)의 각각의 Ag(VLP, gD 또는 HBs 항원)가 함유된 바닥이 평평한 24 웰-플레이트 당 1ml로 5×10^6 개 세포/ml의 최종 농도로 배양하였다. 상층액을 96시간 후 수집하여, ELISA에 의해 IFN γ 및 IL5의 존재에 대해 시험할 때까지 동결시켰다.

IFN γ (젠자임(Genzyme))

IFN γ 의 정량화를 젠자임으로부터의 시약을 사용하여 ELISA에 의해 수행하였다. 샘플 및 항체 용액을 웰당 $50\mu\text{l}$ 로 사용하였다. 96-웰 마이크로역가 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)를 카보네이트 완충액 pH 9.5중에 $1.5\mu\text{g/ml}$ 로 희석된 햄스터 항마우스 IFN γ $50\mu\text{l}$ 를 사용하여 4°C 에서 밤새 코팅시켰다. 그런 다음 플레이트를 1% 우혈청 알부민 및 0.1% 트윈 20을 함유하는 PBS(포화 완충액) $100\mu\text{l}$ 와 함께 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액중에 시험관내 자극으로부터의 상층액의 2배 희석물(1/2에서 시작)을 안티-IFN γ -코팅된 플레이트에 첨가하고 37°C 에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 PBS 트윈 0.1%(세척 완충액)로 4회 세척하고 $0.5\mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 포화 완충액중에 희석된 바이오틴-컨쥬게이션된 염소 항마우스 IFN γ 를 각각의 웰에 첨가하고 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후에, 포화 완충액중에 1/10000으로 희석된 AMDEX 컨쥬게이트(Amersham)를 37°C 에서 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기와 같이 세척하고 10분 동안 TMB(Biorad) $50\mu\text{l}$ 와 함께 인큐베이션시켰다. 상기 반응을 H_2SO_4 0.4N으로 중단시키고 450/630nm에서 판독하였다. 농도를 소프트웨어(매개변수가 4개인 방정식)에 의해 표준 곡선(마우스 IFN γ 표준)을 사용하여 계산하고 pg/ml로 표현하였다.

IL5(파민젠(Pharmingen))

IL5의 정량화를 파민젠으로부터의 시약을 사용하여 ELISA에 의해 수행하였다. 샘플 및 항체 용액을 웰당 $50\mu\text{l}$ 로 사용하였다. 96-웰 마이크로역가 플레이트(Maxisorb Immuno-plate, Nunc, Denmark)를 카보네이트 완충액 pH 9.5중에 $1\mu\text{g/ml}$ 로 희석된 래트 항마우스 IL5 $50\mu\text{l}$ 를 사용하여 4°C 에서 밤새 코팅하였다. 그런 다음 플레이트를 1% 우혈청 알부민 및 0.1% 트윈 20을 함유하는 $100\mu\text{l}$ PBS(포화 완충액)과 함께 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 포화 완충액중에 시험관내 자극으로부터 상층액의 2배 희석물(1/2에서 시작)을 안티-IL-5-코팅된 플레이트에 첨가하고 37°C 에서 1시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 상기 플레이트를 PBS 트윈 0.1%(세척 완충액)로 4회 세척하고 포화 완충액중에 최종 농도 $1\mu\text{g/ml}$ 로 희석된 바이오틴-컨쥬게이션된 래트 항마우스 IL5를 각각의 웰에 첨가하고 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 세척 단계 후에, 포화 완충액중에 1/10000으로 희석된 AMDEX 컨쥬게이트(Amersham)를 37°C 에서 30분 동안 첨가하였다. 플레이트를 상기와 같이 세척하고 15분 동안 TMB(Biorad) $50\mu\text{l}$ 와 함께 인큐베이션시켰다. 상기 반응을 H_2SO_4 0.4N으로 중단시키고 450/630 nm에서 판독하였다. 농도를 소프트웨어(매개변수가 4개인 방정식)에 의해 표준 곡선(재조합 마우스 IL-5)을 사용하여 계산하였고 pg/ml로 표현하였다.

교

10마리 Balb/C 마우스 군을 하기 포물레이션을 사용하여 근내 면역시켰다:

표 1: 군 및 포물레이션

군	포물레이션
A	VLP16 2 μ g/VLP18 2 μ g/gD 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 50 μ g
B	VLP16 2 μ g/VLP18 2 μ g/HBs 2 μ g/gD 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 40 μ g/AIPO ₄ 10 μ g
C	gD 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 50 μ g
D	VLP16 2 μ g/VLP18 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/Al(OH) ₃ 50 μ g
E	HBs 2 μ g/3D-MPL 5 μ g/AIPO ₄ 10 μ g/Al(OH) ₃ 40 μ g

포물레이션의 상세한 사항은 상기 재료 및 방법 섹션에 기술하였다.

결과

1. 혈청학

a) 안티-VLP16 반응:

체액성 반응(Ig)을 코팅 항원으로서 VLP16 503-1 (20/12/99)를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 제 2 접종 후 14일째의 혈청을 분석하였다.

도 1은 제 2 접종 후 14일째에 개개의 혈청에 대해 측정한 안티-VLP16 Ig 항체 반응을 도시한다.

VLP, gD 및 HBs Ag의 혼합물(군 B)로 면역시킨 후에 수득된 안티-VLP16 역가는 VLP 및 gD의 혼합물(군 A) 또는 1가 VLP 포물레이션(군 D)에 의해 수득된 역가 보다 약간 낮았다 (GMT는 각각 27578 대 48105 EU/ml 대 44448 EU/ml임). 통계 분석 전에, T-그룹스(Grubbs) 시험을 데이터 배제를 위해 각각의 군집에 적용하였다. 군 A 및 D 중의 2마리의 무응답 마우스를 분석에서 제외시켰다.

군들 사이에서 관찰된 차이점은 스튜던트 뉴만 쿨스 시험(Student Newman Keuls Test)을 이용한 결과 통계적으로 의미 있는 정도는 아닌 것으로 밝혀졌다.

b) 안티-VLP18 반응:

체액성 반응(Ig)을 코팅 항원으로서 VLP18 504-2 (25/10/99)를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다.

도 2는 제 2 접종 후 14일째에 개개의 혈청에 대해 측정한 안티-VLP18 Ig 항체 반응을 도시한다.

VLP, gD 및 HBs Ag의 혼합물(군 B)로 면역시킨 후에 수득된 안티-VLP18 역가는 VLP 및 gD의 혼합물(군 A) 또는 1가 VLP 포물레이션(군 D)에 의해 수득된 역가와 동일한 크기였다 (GMT는 각각 56078 대 88786 EU/ml 대 76991 EU/ml임).

통계 분석 전에, T-그룹스 시험을 데이터 배제를 위해 각각의 군집에 적용하였다. 군 A 및 D 중의 2마리의 무응답 마우스를 분석에서 제외시켰다.

관찰된 차이점은 일원 분산 분석(one-way analysis of variance) 시험을 이용한 결과 통계적으로 의미 있는 정도는 아닌 것으로 밝혀졌다.

c) 안티-gD 반응:

체액성 반응(Ig 및 이소타입)을 코팅 항원으로서 gD를 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 제 2 접종 후 14일째의 혈청을 분석하였다.

도 3은 제 2 접종 후 14일째에 개개의 혈청에 대해 측정한 안티-gD 항체 반응을 도시한다.

안티-gD 반응과 관련하여, VLP/gD/HBs 혼합물(군 B)로 수득된 GMT는 gD 단독(군 C) 또는 VLP/gD 혼합물(군 A)와 비교하여 약간의 감소가 관찰되었다 (GMT는 각각 18631 대 32675 대 27058 EU/ml 임).

통계 분석 전에, T-그룹스 시험을 데이터 배제를 위해 각각의 군집에 적용하였다. 군 A 및 D 중의 2마리의 무응답 마우스를 분석에서 제외시켰다.

일원 분산 분석을 제 2 접종 후 데이터의 로그 변환 후에 안티-gD 역가에 대해 수행하였다. 3가지 포물레이션 사이에서 통계적으로 의미있는 차이는 관찰되지 않았다.

푸어링된 혈청에 대해 분석된 이소타입 재구분은 다음과 같았다:

	이소타입 재구분(%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
군 A	96	3	2
군 B	96	3	2
군 C	97	1	1

3가지 포물레이션에 의해 유도된 이소타입 프로파일에서 차이점은 관찰되지 않았다: 주로 IgG1 반응 (IgG1의 96 내지 97%)이 하기 표에 보고된 바와 같이 3가지 군에서 유도되었다.

d) 안티-HBs 반응:

체액성 반응(Ig 및 이소타입)을 코팅 항원으로서 HBsAg(Hep286)을 사용하여 ELISA에 의해 측정하였다. 제 2 접종 후 14일째의 혈청을 분석하였다.

도 4는 제 2 접종 후 14일째에 개개의 혈청에 대해 측정한 안티-HBs 항체 반응을 도시한다.

약간 낮은 안티-HBs 항체 반응이 VLP, gD 및 HBs 항원을 함유하는 혼합물인 군 B에서 HBs 단독(군 E)과 비교하여 관찰된다 (GMT는 28996 EU/ml 대 20536 EU/ml임).

일원 분산 분석을 제 2 접종 후 데이터의 로그 변환 후에 안티-HBs 역가에 대해 수행하였다. 스튜던트 뉴만 쿨스 시험을 이용한 결과 군 B(VLP/HBs/gD) 대 군 E(HBs AS04) 사이에서 통계적으로 의미있는 차이는 관찰되지 않았다.

푸어링된 혈청에 대해 분석한 이소타입 재구분은 다음과 같았고, 이는 2 군 사이에 차이점을 나타내지 않았으며 IgG2a의 비율은 혼합 백신에서 보존된다.

	이소타입 재구분(%)		
	IgG1	IgG2a	IgG2b
군 B	54	24	21
군 E	56	23	21

2. 세포 매개성 면역 반응

세포 매개성 면역 반응(IFN γ /IL5 생성)을, 비장 세포를 VLP, gD 또는 HBs 항원으로 시험관내 재자극시킨 후에 제 2 접종 후 24일째에 평가하였다. 각각의 마우스 군에 대해, 5개 기관의 푸어를 구성하였다. 실험 과정은 재료 및 방법 섹션에 상세히 기술하였다.

3. 사이토카인 생성

a) VLP16 및 VLP18을 사용한 시험관내 재자극

도 5는 VLP16을 사용하여 시험관내 재자극시킨 지 96시간 후에 비장 세포에서 모니터된 사이토카인 생성을 도시한다.

도 6은 VLP18을 사용하여 시험관내 재자극시킨 지 96시간 후에 비장 세포에서 모니터된 사이토카인 생성을 도시한다.

VLP 항원을 사용한 재자극을 위해 10 μ g 및 1 μ g Ag 용량을 사용하는 경우 둘 모두의 사이토카인 생성에 대한 명확한 용량 범위 효과는 관찰되지 않았다

명확한 TH1 프로파일이 모든 포물레이션과 관련하여 관찰되었다.

표 2: VLP16 및 VLP18을 사용한 시험관내 재자극 후의 IFN- γ /IL-5 비

IFN/IL-5 비	군 A	군 B	군 D
VLP16 10 μ g/ml	5.2	8.9	11.8
VLP16 1 μ g/ml	15.1	14.3	16.5

IFN/IL-5 비	군 A	군 B	군 D
VLP18 10 μ g/ml	19.6	11.1	16.1
VLP18 1 μ g/ml	23.2	14.3	18.2

b) gD를 사용한 시험관내 재자극

도 7은 gD 항원을 사용하여 시험관내 재자극시킨 지 96시간 후에 비장 세포에서 모니터된 사이토카인 생성을 도시한다.

재자극을 위한 10 및 1 μ g Ag 용량과 비교하여 명확한 용량 범위 효과는 관찰되지 않았다.

IFN- γ 은 IL-5와 비교하여 훨씬 고농도로 생성되었으며(표 3), 평가된 모든 군(1가 대 혼합물)에서 면역 반응의 명확한 TH-1 프로파일을 나타낸다.

표 3: gD를 사용한 시험관내 재자극 후의 IFN- γ /IL-5 비

IFN/IL-5 비	군 A	군 B	군 C
gD 10 μ g/ml	6.2	7.2	3.1
gD 1 μ g/ml	6.2	11.2	2.3

c) HBs를 사용한 시험관내 재자극

도 8은 HBs를 사용하여 시험관내 재자극시킨 지 96시간 후에 비장 세포에서 모니터된 사이토카인 생성을 도시한다.

군 B와 관련하여 IFN- γ 는 현저한 수준으로 관찰되었지만 IL5 생성은 관찰되지 않았다. 표 2에 도시된 바와 같이, IFN- γ 의 더 높은 생성은 군 B와 비교하여 군 E에서 관찰되었다. 그러나, IFN- γ 의 높은 백그라운드 값이 재자극을 위한 항원이 함유되지 않은 대조표준과 비교하여 군 E(HBs 1가)에서 관찰되었다. 매우 높은 IFN- γ /IL-5 비는 1가 백신에서 관찰되었는데, 이는 강력한 TH1 반응이 유도됨을 나타내준다. 유사하게는, 높은 IFN- γ /IL-5 비가 혼합 백신과 관련하여 측정되었는데, 이는 TH-1 반응을 또한 유도시킬 수 있는 이러한 포물레이션의 능력을 확인시켜준다.

표 4: HBs를 사용한 시험관내 재자극 후의 IFN- γ /IL-5 비

IFN/IL-5 비	군 B	군 E
HBs 10 μ g/ml	15.8	65.3
HBs 1 μ g/ml	7.6	67.6

결론

면역원성에 대한 AS04 중에 포물레이션된 VLP/gD 또는 VLP/gD/HBs Ag의 혼합물의 효과를 Balb/C 마우스에서 평가하였다.

혈청학적 분석과 관련하여, Ag 혼합물의 간섭은 안티-VLP, 안티-gD 및 안티-HBs 혈청학에서 관찰되지 않았다.

VLP 및 gD 또는 VLP, gD 및 HBs 항원의 혼합물은 gD 및 HBs 1가 백신에 의해 나타나는 항체 반응의 이소타입 프로파일을 간섭하지 않았다.

사이토카인 평가에 있어서, 각각의 1가 백신과 관련하여 관찰된 TH-1 프로파일(IFN- γ /IL-5 비)은 혼합 백신 군을 사용하여 확인하였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

TH1 세포 반응의 우선적 자극인자인 애쥬번트와 함께 (a) 단순 포진 바이러스(HSV) 항원; 및 (b) 사람 파필로마바이러스(HPV) 항원을 포함하는 백신 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 캐리어를 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, TH1-세포 반응의 우선적 자극인자가 3D-MPL, 입자 크기가 약 100 nm 이하인 3D-MPL, QS21, QS21과 콜레스테롤의 혼합물, 및 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 애쥬번트의 군으로부터 선택되는 백신 조성물.

청구항 4.

제 3항에 있어서, TH1-세포 반응의 우선적 자극인자가 3D-MPL인 백신 조성물.

청구항 5.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, HSV 항원이 HSV-2 gD 또는 이의 트렁케이트(truncate)인 백신 조성물.

청구항 6.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, L1, L2, E6 및 E7로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 HPV 항원을 포함하는 백신 조성물.

청구항 7.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, EBV 항원이 추가로 존재하는 백신 조성물.

청구항 8.

제 7항에 있어서, EBV 항원이 gp350인 백신 조성물.

청구항 9.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, A형 간염 항원이 추가로 존재하는 백신 조성물.

청구항 10.

제 9항에 있어서, HAV 항원이 HM-175 균주로부터 유래되는 백신 조성물.

청구항 11.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, B형 간염 바이러스(HBV) 항원이 추가로 존재하는 백신 조성물.

청구항 12.

제 11항에 있어서, HBV 항원이 B형 간염 표면 항원인 백신 조성물.

청구항 13.

제 2항에 있어서, 캐리어가 알루미늄 하이드록시드, 알루미늄 포스페이트 및 토코페롤 및 수중유 에멀션을 포함하는 군으로부터 선택되는 백신 조성물.

청구항 14.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, VZV 항원을 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 15.

제 14항에 있어서, VZV 항원이 gpI인 백신 조성물.

청구항 16.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, HCMV 항원을 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 17.

제 16항에 있어서, HCMV 항원이 gB685** 또는 pp65인 백신 조성물.

청구항 18.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*) 항원을 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 19.

제 18항에 있어서, 톡소플라스마 곤디 항원이 SAG1 또는 TG34인 백신 조성물.

청구항 20.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, HSV-2 gD 항원 및 HPV의 L1, L2, E6, E7, 단백질 D-E6, 단백질 D-E7 및 L2-E7로 구성된 군으로부터 선택된 HPV 항원을 포함하거나, 이러한 항원 이외에 HBsAg S 항원; EBVgp 350; VZVgpI; HAV HM-175 불활성화된 균주; HCMV의 gB685** 또는 pp65 및 톡소플라스마 곤디의 SAG1 또는 TG34 항원 중 하나 이상을 추가로 포함하는 백신 조성물.

청구항 21.

제 6항에 있어서, HPV 항원이 융합 단백질, 트렁케이트 또는 이 둘 모두의 형태인 백신 조성물.

청구항 22.

제 1항에 있어서, 사람 파필로마 바이러스 항원이 HPV 6, HPV 11 또는 이 둘 모두로부터 유래되는 백신 조성물.

청구항 23.

제 22항에 있어서, HSV 항원이 HSV 당단백질 D인 백신 조성물.

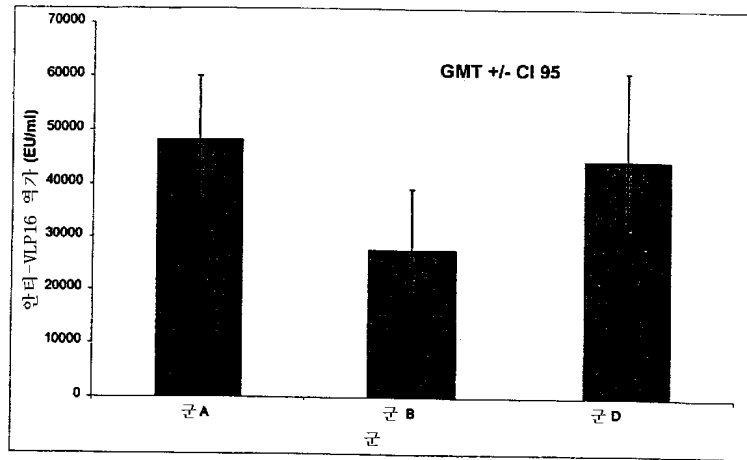
청구항 24.

제 22항 또는 제 23항에 있어서, 애쥘번트가 3D-MPL 및 알루미늄 백신 조성물.

도면

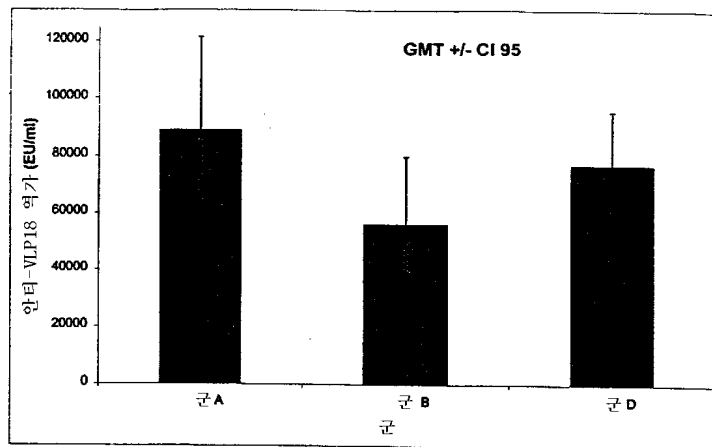
도면1

제 2 접종 후 14일째의 안티-VLP16 반응
개개의 혈청에 대한 결과 (EU/ml)



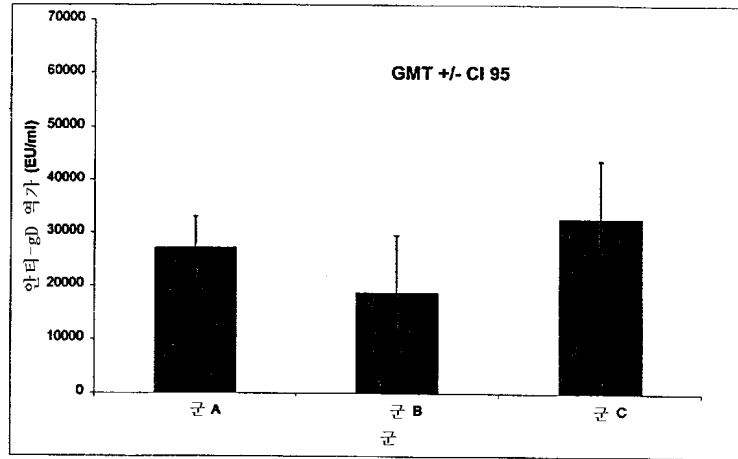
도면2

제 2 접종 후 14일째의 안티-VLP18 반응
개개의 혈청에 대한 결과 (EU/ml)



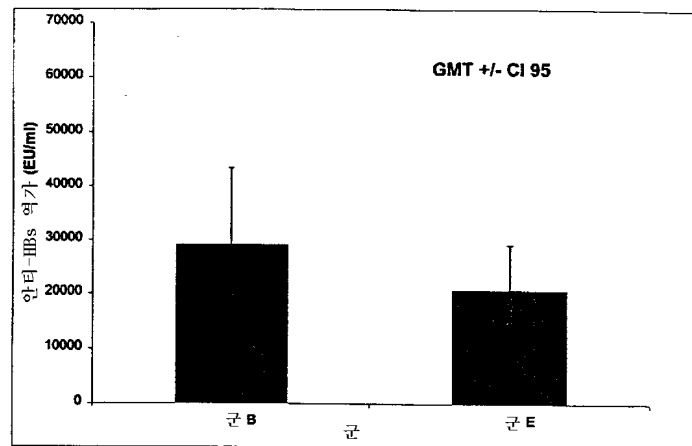
도면3

제 2 접종 후 14일째의 안티-gD 반응
개개의 혈청에 대한 결과 (EU/ml)



도면4

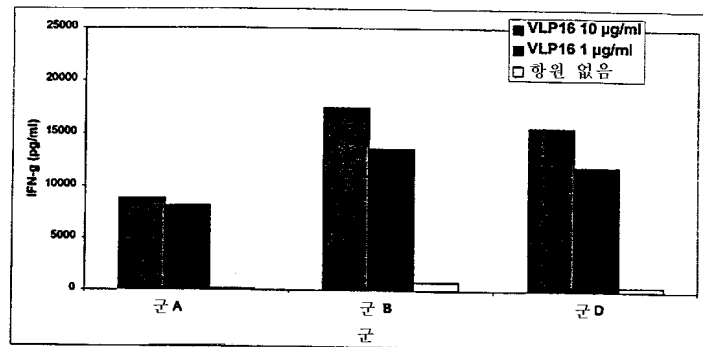
제 2 접종 후 14일째의 안티-HBs 반응
개개의 혈청에 대한 결과 (EU/ml)



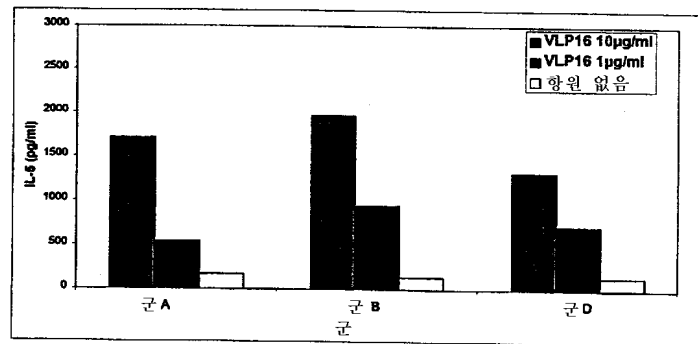
도면5

사이토카인 결과 - 제 2 접종 후 14일째

VLP16을 사용한 시험관내 자극 후의 IFN-g 생성



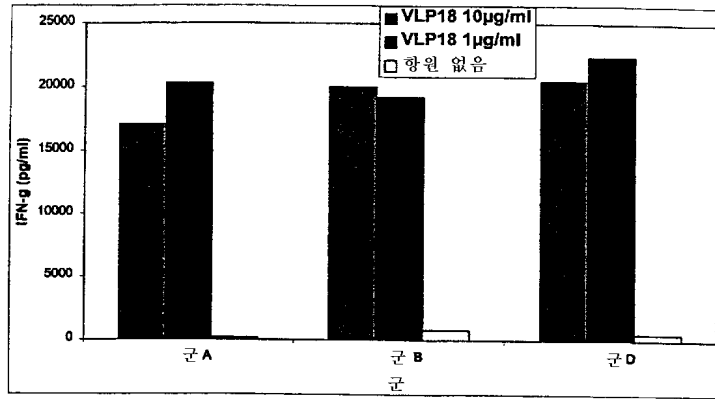
VLP16을 사용한 시험관내 자극 후의 IL-5 생성



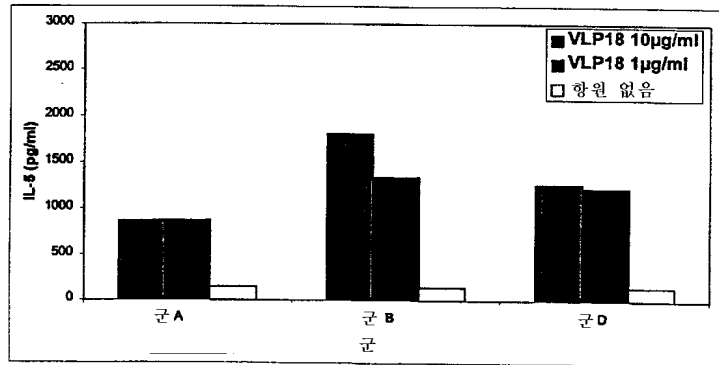
도면6

사이토카인 결과 - 제 2 접종 후 14일째

VLP18을 사용한 시험관내 자극 후의 IFN-g 생성



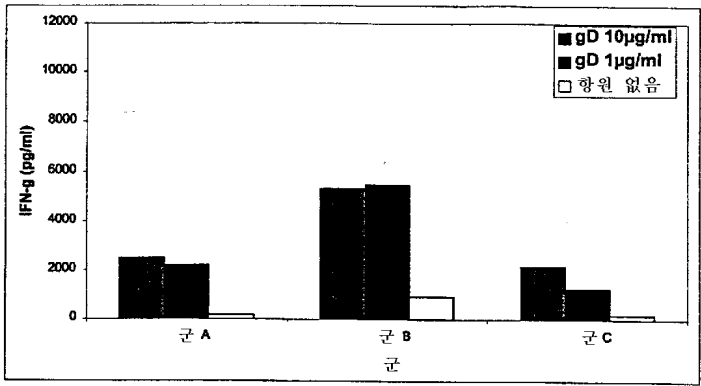
VLP18을 사용한 시험관내 자극 후의 IL-5 생성



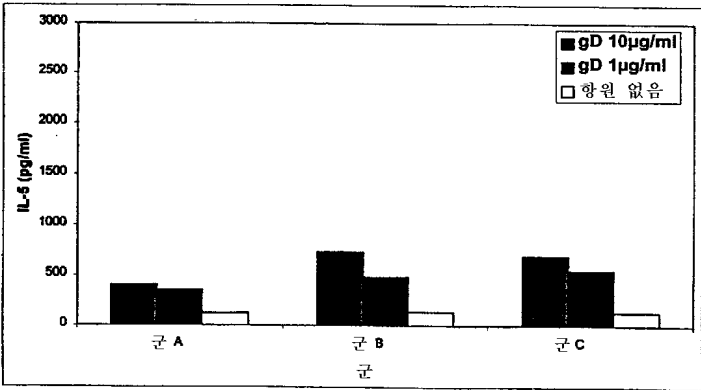
도면7

사이토카인 결과 - 제 2 접종 후 14일째

gD를 사용한 시험관내 자극 후의 IFN-g 생성



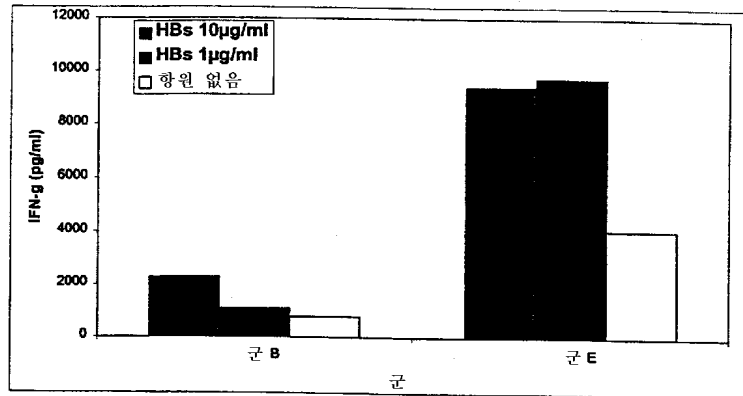
gD를 사용한 시험관내 자극 후의 IL-5 생성



도면8

사이토카인 결과 - 제 2 접종 후 14일째

HBs를 사용한 시험관내 자극 후의 IFN-g 생성



HBs를 사용한 시험관내 자극 후의 IL-5 생성

