



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월03일

(11) 등록번호 10-2762440

(24) 등록일자 2025년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/015 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
A61P 33/06 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/015 (2013.01)
A61K 39/292 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7017095(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년04월02일

심사청구일자 2023년06월16일

(85) 번역문제출일자 2023년05월19일

(65) 공개번호 10-2023-0075525

(43) 공개일자 2023년05월31일

(62) 원출원 특허 10-2016-7029523

원출원일자(국제) 2015년04월02일

심사청구일자 2020년03월26일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/057424

(87) 국제공개번호 WO 2015/150568

국제공개일자 2015년10월08일

(30) 우선권주장
1405921.6 2014년04월02일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

US20110206758 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

벨기에왕국 릭센사르트(비-1330) 루 드 린스티튜트 89

(72) 발명자

발로우, 윌리엄, 리플레이 주니어

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

디디에로랑, 아노드, 미카엘

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

반 더 모스트, 로버트, 게리트

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

(74) 대리인

특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 17 항

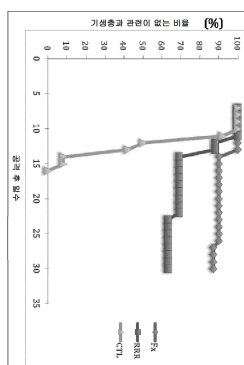
심사관 : 최연정

(54) 발명의 명칭 면역 반응을 유도하기 위한 신규한 방법

(57) 요약

면역원성 조성물의 적어도 2회 투여를 포함하는 면역 반응을 유도하기 위한 방법 및 용도가 제공되고, 이 때 첫 번째 투여에서보다 두 번째 투여에서 적은 용량이 제공되고, 두 번째 투여는 비에슈버트화될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 31/20 (2018.01)

A61P 33/06 (2018.01)

A61P 37/04 (2018.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/55572 (2013.01)

A61K 2039/55572 (2013.01)

A61K 2039/55577 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

RTS,S 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물 및 RTS,S 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 포함하는, 인간 대상체에서 말라리아에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 면역원성 조성물로서, 여기서 제1 면역원성 조성물이 대상체에 투여된 다음 제2 면역원성 조성물이 대상체에 투여되고, 여기서 제1 및 제2 애주번트가 리포솜 제형에 3D-MPL 및 QS21을 포함하고, 이 때

- 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적어도 2배 적은 양의 리포솜 제형에 3D-MPL 및 QS21을 함유하고
- 제2 면역원성 조성물은 제1 면역원성 조성물보다 적어도 2배 적은 양의 RTS,S 항원을 함유하고,

제1 면역원성 조성물의 투여 후 적어도 6개월의 시간 간격을 두고, 제2 면역원성 조성물이 투여되는, 면역원성 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트가 동일한 성분으로 구성되는 면역원성 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트가 동일한 상대 비율의 동일한 성분으로 구성되는 면역원성 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 제2 애주번트에서의 적은 양이 제1 애주번트에서보다 적어도 3배 미만, 적어도 4배 미만, 적어도 5배 미만, 적어도 6배 미만, 적어도 7배 미만, 적어도 8배 미만, 적어도 9배 미만, 적어도 10배 미만, 적어도 15배 미만, 또는 적어도 20배 미만의 양인 면역원성 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 제2 애주번트에서의 적은 양이 제1 애주번트에서보다 2 내지 50배 미만의 양인 면역원성 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 제1 애주번트가 25 내지 75 마이크로그램의 3D-MPL 및 25 내지 75 마이크로그램의 QS21을 포함하고 제2 애주번트가 5 내지 15 마이크로그램의 3D-MPL 및 5 내지 15 마이크로그램의 QS21을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 제1 애주번트가 12.5 내지 37.5 마이크로그램의 3D-MPL 및 12.5 내지 37.5 마이크로그램의 QS21을 포함하고 제2 애주번트가 2.5 내지 7.5 마이크로그램의 3D-MPL 및 2.5 내지 7.5 마이크로그램의 QS21을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 제1 애주번트 및/또는 제2 애주번트가 알루미늄을 포함하지 않는 면역원성 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 제2 면역원성 조성물에서의 적은 양의 공통 항원이 제1 면역원성 조성물에서보다 적어도 3배 미만, 적어도 4배 미만, 적어도 5배 미만, 적어도 6배 미만, 적어도 7배 미만, 적어도 8배 미만, 적어도 9배 미만, 적어도 10배 미만, 적어도 15배 미만, 또는 적어도 20배 미만의 양의 항원인 면역원성 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 제2 면역원성 조성물에서의 적은 양의 공통 항원이 제1 면역원성 조성물에서보다 2 내지 50배 미만의 양의 항원인 면역원성 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 제1 및 제2 면역원성 조성물의 모든 항원이 동일한 것인 면역원성 조성물.

청구항 13

제 1항에 있어서, 제1 면역원성 조성물의 투여와 제2 면역원성 조성물의 투여 사이의 시간 간격이 1 내지 24개월인 면역원성 조성물.

청구항 14

제 1항에 있어서, 제1 면역원성 조성물이 제2 면역원성 조성물의 투여 전에 2회 투여되는 면역원성 조성물.

청구항 15

제 1항에 있어서, 제2 면역원성 조성물의 투여 후 적어도 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 12개월, 적어도 13개월, 적어도 14개월, 적어도 15개월, 적어도 16개월, 적어도 17개월, 적어도 18개월, 적어도 19개월, 또는 적어도 20개월 이상의 시간 간격을 두고, 제2 면역원성 조성물이 1회 이상 추가 투여되는 면역원성 조성물.

청구항 16

제 1항에 있어서, 인간 대상체가 제1 면역원성 조성물이 투여될 때 18세 초과인 면역원성 조성물.

청구항 17

제 1항에 있어서, 인간 대상체가 제1 면역원성 조성물이 투여될 때 5세 미만인 면역원성 조성물.

청구항 18

제 1항에 있어서, 두 번째 투여가 피내 제공되는 면역원성 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 면역 반응을 유도하기 위한 방법, 특히 애주번트화된 면역원성 조성물의 적어도 2회 투여를 포함하는 면역화를 위한 방법으로서, 첫 번째 투여에서보다 두 번째 투여에서 보다 낮은 용량이 제공되는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 백신 접종은 감염성 질환을 예방하는 가장 효과적인 방법 중 하나이다. 그러나, 항원의 단일 투여는 종종 충분한 면역성 및/또는 장기-지속되는 반응을 제공하기에 충분하지 않다. 특정 병원체에 대해 강력하고 지속적인 면역성을 확립하기 위한 접근법은 백신에 애주번트의 첨가 및/또는 반복된 백신접종, 즉 1회 이상의 추가 항원 용량의 투여에 의한 면역 반응의 부스팅(boosting)을 포함한다. 그러한 추가 투여는 동일한 백신 (동종 부스팅) 또는 상이한 백신(이종 부스팅)으로 수행될 수 있다. 동종 부스팅에 가장 일반적인 접근법은 동일한 백신을 투여할 뿐 아니라, 이를 이전 투여와 같은 용량으로 투여하는 것이다.

[0003] 지금까지 다중-용량 백신접종이 요구되어왔던 하나의 질병은 말라리아이다. 말라리아는 세계의 주요 보건 문제 중의 하나이다. 2010년 동안, 세계보건기구는 전세계적으로 219백만 병증으로 추정되는 말라리아를 보고하였다. 말라리아는 플라스모디움(*Plasmodium*) 속의 원생동물 기생충에 의해 초래된다.

[0004] 기생충의 생활 주기는 복잡하며, 완성을 위해 2개의 숙주, 즉 인간 및 모기를 필요로 한다. 인간의 감염은 감염된 모기의 타액을 통한 스포로조이트(sporozoite)의 유입에 의해 개시된다. 스포로조이트 단계는 말라리아 백신의 하나의 잠재적인 표적으로서 확인되었다. 스포로조이트의 주요 표면 단백질은 서큘스스포로조이트 단백질(CS 단백질)로 알려져 있다. 말라리아 CS 단백질 및 B형 간염 바이러스의 바이러스 외피 단백질에 기반한 항원인 RTS,S가 25년 넘게 개발 중에 있고, 현재 연구되는 있는 가장 진보된 말라리아 백신 후보이다. 이의 구조 및 생산은 1999년 7월 27일 등록된 US5928902에 기재되어 있다.

[0005] 초기 연구에서, RTS,S는 수중유 에멀전 애주번트와 연관된 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 애주번트와 함께 소규모 임상 시험으로 시험되었다 (Stoute et al. 1997 NEJM 336:86). 3회의 전체-용량 투여 스케줄이 이 연구를 위해 계획되었으나, 인지된 과도한 반응원성으로 인해, 세 번째 용량은 1/5로 감소되어 원래 계획보다 늦게 투여되었다. 이 연구는 7 대상체 중 6을 보호하였다. 후속 연구에서, 3회의 전체-용량 면역화 스케줄이 이용되었고, 또한 3회의 전체-용량 면역화 스케줄을 이용한 보다 최근의 연구에서, RTS,S는 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 리포솜 제형으로 애주번트화되었다. 이러한 애주번트는 AS01로 명명되며, 예를 들어, WO 96/33739 및 WO2007/068907에 기재되어 있다. 한달 간격으로 RTS,S/AS01이 3회의 동일 용량으로 투여되는 대규모 III상 임상 시험으로부터의 최근 데이터는 18개월의 추적조사 동안, RTS,S/AS01이 어린이(첫 번째 백신접종시 5-17개월)에서 말라리아 병증의 수를 거의 절반으로 줄였고 18개월의 추적조사 기간 동안 유아(첫 번째 백신접종시 6-12주)에서 말라리아 병증을 대략 4분의 1로 감소시킨 것으로 나타났다고 밝혔다.

[0006] 백신 연구 및 개발 분야는 상당히 진보되어 왔지만, 고도로 효과적이고, 안전하며, 비용-효율적이고, 장기-지속되며, 교차-반응성 면역 반응의 광범한 스펙트럼을 유도하는, 말라리아를 포함하는 질병에 대해 면역화하는 신규한 면역원성 조성물 및 방법에 대한 요구가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0007] 발명의 개요

[0008] 이제 놀랍게도, 애주번트화된 말라리아 백신을 이용한 면역화의 다중-용량 방법에서, 면역화는 후속 용량(부스터 용량)이 이전 용량(프라이머 용량)에 비해 감소되었을 때 용량이 동일했을 때보다 더욱 효과적이었음이 발견되었다. 사용된 애주번트는 TLR4 효능제, 3D-MPL, 및 면역학적 활성 사포닌 분획, QS21을 포함하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 첫 번째 양태에서, 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법이 제공되고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때

[0010] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,

- [0011] · 공통 항원은 RTS,S이고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 RTS,S를 함유하고,
- [0012] 단, 제1 및 제2 조성물 둘 모두가 RTS,S 및 수중유 에멀전 제형과 연관된 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 것은 아니다.
- [0013] 추가 양태에서, RTS,S 및 애쥬번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 RTS,S를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법이 제공되고, 여기서 애쥬번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고, 제2 면역원성 조성물은 애쥬번트를 포함하지 않는다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1: 28일 추적조사 기간 동안 공격 후 기생충혈증이 발생하지 않은 백신접종된 대상체의 백분율. Fx는 지연된 분할 용량 그룹을 나타낸다; RRR은 0, 1, 2개월 그룹을 나타낸다; CTL은 대조군을 나타낸다.
- 도 2a-c: 1999년 7월 27일 등록된, US5928902의 RTS,S의 서열.
- 도 3a-b: VZV 항원의 서열.
- 도 4a: RRR 그룹의 4/30 대상체에서 기생충혈증이 발생하였다 (VE = 87% [95% CI: 67, 95]); RRR 그룹의 6/16 대상체에서 기생충혈증이 발생하였다 (VE = 63% [95% CI 20, 80]).
- 도 4b: 현재까지 완료된 5번의 0, 1, 2개월 RTS,S/AS01 임상에서 연구된 95명 대상체에 대해 푸어링된 데이터에 대하여 본 연구의 지연된 분할 용량 아암의 결과를 비교한 분석.
- 도 5a-b: 마지막 용량 6개월 후에 분할 부스트에 이어 한 달 후에 스포로조이트 공격의 연구, 첫 번째 공격 후 보호되지 않았던 대상체에 분할 부스트를 제공하였다. 첫 번째 공격 후 보호된 대상체는 분할 부스트를 수용하거나 수용하지 않고, 이어서 한 달 후에 스포로조이트 공격을 받도록 무작위화하였다.
- 도 5a: 12개월에 부스터 용량이 제공되지 않은 대상체.
- 도 6: 표준 및 지연된 요법에서 M72가 투여된 마우스로부터의 CD4 T 세포 반응.
- 도 7: 표준 및 지연된 요법에서 M72가 투여된 마우스로부터의 CD8 T 세포 반응.
- 도 8: 표준 및 지연된 요법에서 M72가 투여된 마우스로부터의 CD4 T 세포 사이토카인 프로파일.
- 도 9: 표준 및 지연된 요법에서 M72가 투여된 마우스로부터의 CD8 T 세포 사이토카인 프로파일.
- 도 10: 표준 및 지연된 요법에서 M72가 투여된 마우스로부터의 항 M72 혈청학.

서열 식별자의 간단한 설명

- SEQ ID No. 1: 본원의 다른 곳에 기재된 RTS,S의 아미노산 서열.
- SEQ ID No. 2: 본원의 다른 곳에 기재된 VZV의 아미노산 서열.
- SEQ ID No. 3: 본원의 다른 곳에 기재된 M72의 아미노산 서열.
- SEQ ID No. 4: 본원의 다른 곳에 기재된 2개의 N-말단 His 잔기를 지닌 M72 단백질의 아미노산 서열.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 상세한 설명
- [0016] 상기 기재된 대로, 첫 번째 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 항원 및 제1 애쥬번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애쥬번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법으로서, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애쥬번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0017] · 제2 애쥬번트는 제1 애쥬번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,
- [0018] · 공통 항원은 RTS,S이고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 RTS,S를 함유하고,

- [0019] 단, 제1 및 제2 조성물 둘 모두가 RTS,S 및 수중유 에멀전 제형과 연관된 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 것은 아니다.
- [0020] 본원에서 사용되는 제1 조성물을 투여한 "다음" 제2 조성물의 투여는 제1 조성물의 투여 및 제2 조성물 조성물의 투여 사이에 시간 간격이 경과되었음을 나타낸다.
- [0021] 유사하게, 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 사용되는 제1 면역원성 조성물이 제공되고, 여기서 상기 방법은 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0022] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,
- [0023] · 공통 항원은 RTS,S이고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 RTS,S를 함유하고,
- [0024] 단, 제1 및 제2 조성물 둘 모두가 RTS,S 및 수중유 에멀전 제형과 연관된 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 것은 아니다.
- [0025] 유사하게, 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 사용되는 제2 면역원성 조성물이 제공되고, 여기서 상기 방법은 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0026] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,
- [0027] · 공통 항원은 RTS,S이고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 RTS,S를 함유하고,
- [0028] 단, 제1 및 제2 조성물 둘 모두가 RTS,S 및 수중유 에멀전 제형과 연관된 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 것은 아니다.
- [0029] 추가 양태에서, 본 발명은 대상체가 사전에 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 투여받은 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 약제의 제조에서의 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0030] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,
- [0031] · 공통 항원은 RTS,S이고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 RTS,S를 함유하고,
- [0032] 단, 제1 및 제2 조성물 둘 모두가 RTS,S 및 수중유 에멀전 제형과 연관된 QS21 및 3D-MPL을 포함하는 것은 아니다.
- [0033] 추가 양태에서, 본 발명은 RTS,S 및 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 RTS,S를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 관한 것이고, 여기서 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고, 여기서 제2 면역원성 조성물은 애주번트를 포함하지 않는다. 이 방법의 한 구체예에서, 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 RTS,S를 함유한다. 이 방법의 한 구체예에서, 제2 조성물은 제1 및 제2 조성물에 같은 양의 RTS,S를 함유한다. 이 방법의 한 구체예에서, 제1 및 제2 조성물 둘 모두는 25 마이크로그램의 RTS,S를 포함하거나 둘 모두는 50 마이크로그램의 RTS,S를 포함한다.
- [0034] 상기 기재된 대로, 추가 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 관한 것이고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0035] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,

- [0036] · 공통 항원은 RTS,S가 아니고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 공통 항원을 함유한다.
- [0037] 한 양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.
- [0038] 유사하게, 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 사용되는 제1 면역원성 조성물이 제공되고, 여기서 상기 방법은 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0039] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,
- [0040] · 공통 항원은 RTS,S가 아니고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 공통 항원을 함유한다.
- [0041] 한 양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.
- [0042] 유사하게, 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 사용되는 제2 면역원성 조성물이 제공되고, 여기서 상기 방법은 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0043] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,
- [0044] · 공통 항원은 RTS,S가 아니고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 공통 항원을 함유한다.
- [0045] 한 양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.
- [0046] 추가 양태에서, 본 발명은 대상체가 사전에 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 투여받은 인간 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 약제의 제조에서의 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이고, 여기서 제1 및 제2 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖고, 여기서 제1 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖고, 이 때
- [0047] · 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분을 함유하고/거나,
- [0048] · 공통 항원은 RTS,S가 아니고 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 공통 항원을 함유한다.
- [0049] 한 양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.
- [0050] 추가 양태에서, 본 발명은 항원 및 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 대상체에 투여한 다음 대상체에 제1 조성물과 공통인 적어도 하나의 항원을 포함하는 제2 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법에 관한 것이고, 여기서 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고, 제2 면역원성 조성물은 애주번트를 포함하지 않는다.
- [0051] 한 양태에서, 대상체는 인간 대상체이다.
- [0052] 전형적으로, 본 발명의 방법의 목적은 보호성 면역 반응을 유도하는 것이고, 즉 항원이 유래된 병원체에 대해 대상체를 면역시키거나 백신화하는 것이다. 한 구체예에서, 본 발명의 방법의 백신 효능은 제1 조성물 및 제2 조성물이 동일한 치료 요법에 비해 개선된다. 예를 들어, 본원의 실시예에 따라 측정시, 백신 효능은 적어도 10%, 예컨대 25% 개선될 수 있다. 한 구체예에서, 본원의 실시예에 따라 측정시, 80% 초과, 예컨대 90% 초과에 백신 효능이 달성된다. 따라서, 상기 방법은 감염성 질환의 예방(즉, 프로필락시스)에 이용될 수 있다. 대안적으로, 상기 방법은 면역 반응을 유도하거나 강화시킴에 의해 면역요법, 즉 암과 같은 질병의 치료에 이용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 방법에 사용되는 애주번트
- [0054] 상기 기재된 대로, 본 발명의 한 양태에서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트는 TLR 효능제 및/또는 면역학적 활성 사포닌을 포함하고 이러한 공통의 두 성분 중 적어도 하나를 갖는다.
- [0055] 따라서, 한 구체예에서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트 둘 모두는 TLR 효능제를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트 둘 모두는 면역학적 활성 사포닌을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 제1 애주번트

및 제2 애주번트 둘 모두는 TLR 효능제 및 면역학적 활성 사포닌을 포함한다.

- [0056] 한 구체예에서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트는 동일한 성분으로 구성된다. 따라서, 그러한 구체예에서, 둘 모두의 애주번트의 성분은, 반드시 동일한 상대 비율일 필요는 없으나, 동일하다. 예를 들어, 제1 애주번트 및 제2 애주번트 둘 모두는 리포솜 제형에서 TLR 효능제 및 사포닌으로 구성될 수 있으나, TLR 효능제 대 사포닌의 비는 제1 애주번트에서 5:1 및 제2 애주번트에서 1:1일 수 있다. 대안적으로, TLR 효능제 대 사포닌의 비는 제1 애주번트에서 4:1 및 제2 애주번트에서 1:1, 제1 애주번트에서 3:1 및 제2 애주번트에서 2:1, 제1 애주번트에서 1:1 및 제2 애주번트에서 1:1일 수 있다.
- [0057] 또 다른 구체예에서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트는 동일한 성분으로 구성되고 이러한 성분들의 상대 비율은 동일하다. 그러나, 그러한 구체예에서, 애주번트 성분들의 상대 비율은 동일하나, 이러한 성분의 절대량은 제1 및 제2 면역원성 조성물 간에 상이할 수 있다. 예를 들어, 제2 애주번트 중 모든 성분의 절대량은, 예컨대 제1 애주번트의 모든 성분의 절대량의 5분의 1일 수 있다.
- [0058] 상기 기재된 대로, 한 구체예에서, 제2 애주번트는 제1 애주번트보다 적은 양의 공통 성분(즉, 적은 양의 TLR 효능제 또는 적은 양의 사포닌 또는 적은 양의 둘 모두)을 함유한다.
- [0059] 한 구체예에서, 제2 애주번트 중 적은 양의 공통 성분은 제1 애주번트에서보다 적어도 10% 미만, 예컨대 적어도 25% 미만, 예컨대 적어도 2배 미만, 예컨대 적어도 3배 미만, 예컨대 적어도 4배 미만, 예컨대 적어도 5배 미만, 예컨대 적어도 6배 미만, 예컨대 적어도 7배 미만, 예컨대 적어도 8배 미만, 예컨대 적어도 9배 미만, 예컨대 적어도 10배 미만, 예컨대 적어도 15배 미만, 예컨대 적어도 20배 미만의 양이다.
- [0060] 또 다른 구체예에서, 제2 애주번트 중 적은 양의 공통 성분은 제1 애주번트에서보다 2 내지 50배 미만, 예컨대 2 내지 20배 미만, 예컨대, 예를 들어, 2 내지 15배 미만, 예컨대 2 내지 10배 미만, 예를 들어, 예컨대 3 내지 7배 미만, 예컨대 4 내지 6배 미만의 양이다.
- [0061] 상기 기재된 대로, 한 구체예에서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트는 TLR (Toll-유사 수용체) 효능제를 포함한다. 애주번트에서 TLR 효능제의 이용은 당 분야에 잘 알려져 있고 예컨대[Lahiri et al. (2008) 백신 26:6777]에서 검토되었다. 애주번트 효과를 달성하기 위해 자극될 수 있는 TLR은 TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 및 TLR9를 포함한다. TLR2, TLR4, TLR7 및 TLR8 효능제, 특히 TLR4 효능제가 바람직하다.
- [0062] 적합한 TLR4 효능제는 리포폴리사카라이드, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPL) 및 3-O-데아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)를 포함한다. US 특허 4,436,727은 MPL 및 이의 제조를 기재한다. US 특허 4,912,094 및 재심사 증명서 B1 4,912,094는 3D-MPL 및 이의 제조 방법을 기재한다. 또 다른 TLR4 효능제는 합성 지질 A-유사 분자인 글루코피라노실 지질 애주번트 (GLA) (예컨대, 문헌[Fox et al. (2012) Clin. Vaccine Immunol 19:1633]을 참조하라)이다. 추가 구체예에서, TLR4 효능제는 MPL 및 3D-MPL과 유사한 구조의 합성 TLR4 효능제, 예컨대 합성 디사카라이드 분자일 수 있거나 합성 모노사카라이드 분자, 예컨대, 예를 들어, WO9850399, WO0134617, WO0212258, WO3065806, WO04062599, WO06016997, WO0612425, WO03066065, 및 WO0190129에 기재된 아미노알킬 글루코사미드 포스페이트(AGE) 화합물일 수 있다. 그러한 분자는 또한 지질 A 모방체로서 과학 및 특허 문헌에 기재되었다. 지질 A 모방체는 적합하게는 일부 기능적 및/또는 구조적 활성을 지질 A와 공유하고, 한 양태에서 TLR4 수용체에 의해 인지된다. 본원에 기재된 바와 같은 AGP는 때로 당 분야에서 지질 A를 모방체로서 언급된다. 바람직한 구체예에서, TLR4 효능제는 3D-MPL이다. TLR4 효능제, 예컨대 3-O-데아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL), 및 이들의 백신에서 애주번트로서의 용도는, 예를 들어, WO 96/33739 및 WO2007/068907에 기재되었고, 문헌[Alving et al. (2012) Curr Opin in Immunol 24:310]에서 검토되었다.
- [0063] 본 발명의 방법의 추가 구체예에서, 제1 애주번트 및 제2 애주번트는 면역학적 활성 사포닌, 예컨대 면역학적 활성 사포닌 분획, 예컨대 QS21을 포함한다.
- [0064] 사포닌을 포함하는 애주번트는 당 분야에 기재되어 있다. 사포닌은 문헌[Lacaille-Dubois and Wagner (1996) A review of the biological and pharmacological activities of saponins, Phytomedicine vol 2:363]에 기재되어 있다. 사포닌은 백신에서 애주번트로서 공지되어 있다. 예를 들어, Quil A (남아메리카 나무 퀴라자 사포나리아 몰리나(Quillaja Saponaria Molina)의 껍질에서 유래됨)는 애주번트 활성을 지닌이 1974년에 Dalsgaard 등에 의해 기재되었다 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, 243). Quil A와 연관된 독성이 없는 애주번트 활성을 보유하는 Quil A의 정제된 분획은 HPLC에 의해 분리되었다 (Kensil et al. (1991) J. Immunol. 146: 431). Quil A 분획은 또한 US 5,057,540 및 문헌["Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R. , Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-

2):1-55]에 기재되어 있다.

- [0065] 본 발명에 사용하기 적합한 2개의 그러한 분획은 QS7 및 QS21 (QA-7 및 QA-21로도 공지됨)이다. QS21은 본 발명에 사용하기 바람직한 면역학적 활성 사포닌 분획이다. QS21은 문헌[Kensil (2000) In O'Hagan: Vaccine Adjuvants: preparation methods and research protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey, Chapter 15]에서 검토되었다. Quil A의 분획, 예컨대 QS21 및 QS7을 포함하는 미립자 애주번트 시스템은, 예를 들어, WO 96/33739, WO 96/11711 및 WO2007/068907에 기재되어 있다.
- [0066] 다른 성분 외에, 애주번트는 바람직하게는 스테롤을 포함한다. 스테롤의 존재는 사포닌을 포함하는 조성물의 반응성을 추가로 감소시킬 수 있으며, 예컨대 EP0822831을 참조하라. 적합한 스테롤은 베타-시토스테롤, 스티그마스테롤, 에르고스테롤, 에르고칼시페롤 및 콜레스테롤을 포함한다. 콜레스테롤이 특히 적합하다. 적합하게는, 면역학적 활성 사포닌 분획은 QS21이고 QS21:스테롤의 비는 1:100 내지 1:1 w/w, 예컨대 1:10 내지 1:1 w/w, 예를 들어, 1:5 내지 1:1 w/w이다.
- [0067] 본 발명의 방법의 바람직한 구체예에서, TLR4 효능제는 3D-MPL이고 면역학적 활성 사포닌은 QS21이다.
- [0068] 일부 구체예에서, 애주번트는, 예컨대 스쿠알렌, 알파-토코페롤 및 계면활성제(예를 들어, W095/17210을 참조하라)를 포함하는 수중유 에멀전의 형태 또는 리포솜의 형태로 제공된다. 리포솜 제공이 바람직하다.
- [0069] 본원에서 사용되는 용어 "리포솜"은 수성 내부를 둘러싸는 단일층 또는 다층(특히, 형성되는 지질막의 수에 따라 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 층) 지질 구조를 나타낸다. 리포솜 및 리포솜 제형은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 리포솜 제공은, 예컨대, WO96/33739 및 WO2007/068907에 기재되어 있다. 리포솜을 형성할 수 있는 지질은 지방 또는 지방-유사 특성을 갖는 모든 물질을 포함한다. 리포솜 내의 지질을 구성할 수 있는 지질은 글리세라이드, 글리세로포스포리피드, 글리세로포스포노리피드, 글리세로포스포노리피드, 셀포리피드, 스펅고리피드, 포스포리피드, 이소프레놀리드, 스테로이드, 스테아린, 스테롤, 아르케오리피드, 합성 양이온성 지질 및 탄수화물 함유 지질을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 리포솜은 포스포리피드를 포함한다. 적합한 포스포리피드는 (비제한적인 예로) 포스파티딜콜린의 합성에서 중간체인 포스포콜린(PC); 천연 포스포리피드 유도체: 난(egg) 포스포콜린, 난 포스포콜린, 콩 포스포콜린, 수소처리된 콩 포스포콜린, 천연 포스포리피드로서의 스펅고미엘린; 및 합성 포스포리피드 유도체: 포스포콜린(디데카노일-L- α -포스파티딜콜린[DDPC], 디라우로일포스파티딜콜린[DLPC], 디미리스토일포스파티딜콜린[DMPC], 디팔미토일 포스파티딜콜린[DPPE], 디스테아로일 포스파티딜콜린[DSPE], 디올레오일 포스파티딜콜린[DOPC], 1-팔미토일, 2-올레오일포스파티딜콜린[POPC], 디엘라이도일 포스파티딜콜린[DEPC]), 포스포글리세롤(1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤[DMPG], 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤[DPPG], 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤[DSPE], 1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤[POPG]), 포스파티드산(1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티드산[DMPA], 디팔미토일 포스파티드산[DPPA], 디스테아로일-포스파티드산[DSPE]), 포스포에탄올아민(1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민[DMPE], 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민[DPPE], 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민[DSPE], 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민[DOPE]), 포스포세린, 폴리에틸렌 글리콜[PEG] 포스포리피드를 포함한다.
- [0070] 리포솜 크기는 포스포리피드 조성 및 이의 제조를 위해 이용되는 방법에 따라 30 nm 내지 수 μ m로 다양할 수 있다. 본 발명의 특정 구체예에서, 리포솜 크기는 50 nm 내지 500 nm의 범위 내일 것이며, 추가 구체예에서, 50 nm 내지 200 nm일 것이다. 동적 레이저 광 산란이 당업자에게 널리 공지된 리포솜의 크기를 측정하기 위해 이용되는 방법이다.
- [0071] 특히 적합한 구체예에서, 본 발명에 사용되는 리포솜은 DOPC 및 스테롤, 특히 콜레스테롤을 포함한다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물은 리포솜의 형태에 본원에 기재된 임의의 양의 QS21을 포함하고, 상기 리포솜은 DOPC 및 스테롤, 특히 콜레스테롤을 포함한다.
- [0072] 바람직하게는, 제1 애주번트 및 제2 애주번트는 리포솜 제형에 3D-MPL 및 QS21을 포함한다.
- [0073] 한 구체예에서, 제1 애주번트는 리포솜 제형에 25 내지 75, 예컨대 50 마이크로그램의 3D-MPL 및 25 내지 75, 예컨대 50 마이크로그램의 QS21을 포함하고 제2 애주번트는 리포솜 제형에 5 내지 15, 예컨대 10 마이크로그램의 3D-MPL 및 5 내지 15, 예컨대 10 마이크로그램의 QS21을 포함한다.
- [0074] 또 다른 구체예에서, 제1 애주번트는 리포솜 제형에 12.5 내지 37.5, 예컨대 25 마이크로그램의 3D-MPL 및 12.5 내지 37.5, 예컨대 25 마이크로그램의 QS21을 포함하고 제2 애주번트는 리포솜 제형에 2.5 내지 7.5, 예컨대 5

마이크로그래프의 3D-MPL 및 2.5 내지 7.5, 예컨대 5 마이크로그래프의 QS21을 포함한다.

- [0075] 또 다른 구체예에서, 제1 애쥬번트는 리포솜 제형에 12.5 내지 37.5, 예컨대 20 내지 30 마이크로그래프 (예를 들어 약 또는 정확히 25 마이크로그래프)의 3D-MPL 및 12.5 내지 37.5, 예컨대 20 내지 30 마이크로그래프 (예를 들어 약 또는 정확히 25 마이크로그래프)의 QS21을 포함하고 제2 애쥬번트는 감소된 양의 3D-MPL 또는 QS21, 예컨대 2.5 내지 20, 예컨대 2.5 내지 10 마이크로그래프 (예를 들어 약 또는 정확히 5 마이크로그래프)의 3D-MPL 및 예컨대 2.5 내지 20, 예컨대 2.5 내지 10 마이크로그래프 (예를 들어 약 또는 정확히 5 마이크로그래프)의 QS21을 리포솜 제형에 포함한다. 적합하게는, 제1 및 제2 애쥬번트에서 3D-MPL의 양은 QS21의 양과 같다.
- [0076] 비경구 투여 용액의 경우 세포 왜곡 또는 용해를 피하기 위해 생리적으로 등장성(즉, 약학적으로 허용되는 삼투압을 지님)이어야 하는 것이 잘 알려져 있다. 약학적으로 허용되는 삼투압은 일반적으로 용액이 거의 등장성이거나 약간 등장성인 삼투압을 지닐 것임을 의미할 것이다. 적합하게는, 본 발명의 면역원성 조성물은 250 내지 750 mOsm/kg 범위의 삼투압을 지닐 것이고, 예를 들어, 삼투압은 250 내지 550 mOsm/kg의 범위, 예컨대 280 내지 500 mOsm/kg의 범위일 수 있다. 삼투압은 당 분야에 공지된 기법에 따라, 예컨대 시판되는 삼투압계, 예를 들어 Advanced Instruments Inc. (USA)로부터 이용가능한 Advanced® Model 2020의 이용에 의해 측정될 수 있다. "등장성 작용제"는 생리적으로 관용되고 제형(예컨대, 본 발명의 면역원성 조성물)에 적합한 긴장성을 부여하여 제형과 접촉하고 있는 세포막을 가로질러 물의 순 흐름을 방지하는 화합물이다. 100 mM 이상의 소듐 클로라이드를 함유하는 수성 애쥬번트 조성물, 예를 들어 WO 2005/112991 및 WO2008/142133의 애쥬번트 시스템 A (ASA) 또는 WO2007/068907에 기재된 리포솜 애쥬번트가 알려져 있다.
- [0077] 일부 구체예에서, 조성물에 이용되는 등장성 작용제는 염이다. 그러나, 다른 구체예에서, 조성물은 비이온성 등장성 작용제를 포함하고 소듐 클로라이드의 농도 및 조성물에서의 이온 강도는 100 mM 미만, 예컨대 80 mM 미만, 예컨대 30 mM 미만, 예컨대 10 mM 미만 또는 5 mM 미만이다. 바람직한 구체예에서, 비이온성 등장성 작용제는 폴리올, 예컨대 솔비톨이다. 솔비톨의 농도는, 예컨대 약 3% 내지 약 15% (w/v), 예컨대 약 4% 내지 약 10% (w/v)일 수 있다. 면역학적 활성 사포닌 분획 및 TLR4 효능제를 포함하는 애쥬번트로서, 등장성 작용제가 염 또는 폴리올인 애쥬번트가 WO2010142685에 기재되어 있고, 예컨대 WO2010142685의 실시예 1 및 2를 참조하라.
- [0078] 추가 구체예에서, 제1 애쥬번트 및/또는 제2 애쥬번트는 알루미늄을 포함하지 않는다.
- [0079] 본 발명의 방법에 사용되는 항원
- [0080] 본 발명의 방법의 한 구체예에서, 제2 조성물은 제1 조성물보다 적은 양의 공통 항원을 함유한다.
- [0081] 한 구체예에서, 제2 조성물에서의 적은 양의 공통 항원은 제1 조성물에서보다 적어도 10% 미만, 예컨대 적어도 25% 미만, 예컨대, 적어도 2배 미만, 예컨대 적어도 3배 미만, 예컨대 적어도 4배 미만, 예컨대 적어도 5배 미만, 예컨대, 적어도 6배 미만, 예컨대 적어도 7배 미만, 예컨대 적어도 8배 미만, 예컨대 적어도 9배 미만, 예컨대 적어도 10배 미만, 예컨대 적어도 15배 미만, 예컨대 적어도 20배 미만의 양의 항원이다.
- [0082] 또 다른 구체예에서, 제2 조성물에서의 적은 양의 공통 항원은 제1 조성물에서보다 2 내지 50배 미만, 예컨대 2 내지 20배 미만, 예컨대, 예를 들어 2 내지 15배 미만, 예컨대 2 내지 10배 미만, 예컨대, 예를 들어 3 내지 7배 미만, 예컨대 4 내지 6배 미만의 양의 항원이다.
- [0083] 상기 기재된 대로, 제1 면역원성 조성물 및 제2 면역원성 조성물은 적어도 하나의 공통 항원을 갖는다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 조성물의 모든 항원은 동일하다.
- [0084] 한 구체예에서, 공통 항원은 플라스모듐 항원, 예컨대 P. 팔시파룸(*P. falciparum*) 또는 P. 비박스(*P. vivax*) 항원이다. 한 구체예에서, 공통 항원은 서큘스포로조이트 (CS) 단백질 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체, 예컨대 P. 팔시파룸의 CS 단백질 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체 또는 P. 비박스의 CS 단백질 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체이다.
- [0085] 또 다른 구체예에서, 공통 항원은 CelTOS (Genbank 수탁 번호 Q8I5P1: P. 팔시파룸 3D7 CelTOS; 또한 GenBank: AAN36249)), TRAP (Genbank 수탁 번호 CAD52497.1 GI:23615505) 또는 Pfs25 (Genbank 수탁 번호: AAN35500.1 GI:23495169) 또는 CelTOS, TRAP, 및/또는 Pfs25의 면역원성 단편 또는 변이체이다.
- [0086] 추가 구체예에서, 공통 항원은 B형 간염으로부터의 표면 항원 S (HBsAg) 또는 이의 면역원성 단편으로 구성된 면역원성 단백질 또는 HBsAg 또는 이의 면역원성 단편을 포함하는 면역원성 단백질, 예컨대, HBsAg와 상이한 항

원의 융합 단백질이다.

- [0087] 추가 구체예에서, 공통 항원은 VZV (수두대상포진바이러스) 항원이다. VZV 항원의 예는 VZV 당단백질 gE (gp1으로도 공지됨) 또는 이의 면역원성 유도체이다. 야생형 또는 전장 gE 단백질은 신호 펩티드, 단백질의 주요 부분, 소수성 앵커 영역(잔기 546-558) 및 C-말단 꼬리를 포함하는 623개 아미노산으로 구성된다. 한 양태에서, 트렁케이션(truncation)이 카르복시 말단 단부에서 총 아미노산 잔기 중 4 내지 20 퍼센트를 제거하는 gE C-말단 트렁케이이트(트렁케이션된 gE 또는 gE 트렁케이이트로도 지칭됨)가 이용된다. 추가 양태에서, 트렁케이션된 gE에는 카르복시 말단 앵커 영역(적합하게는 야생형 서열의 대략 아미노산 547-623)이 결여되어 있다. 추가 양태에서, gE는 SEQ ID NO. 2의 서열을 갖는 트렁케이션된 gE이다.
- [0088] gE 항원, 앵커 없는 이의 유도체(또한 면역원성 유도체임) 및 이의 생산은 EP0405867 및 그 안의 참고문헌(또한 문헌[Vafai (1994) Vaccine 12:1265]을 참조하라)에 기재되어 있다. EP192902는 또한 gE 및 이의 생산을 기재한다. SEQ ID No. 2에 개시된 서열을 갖는 트렁케이션된 gE는 또한 본원에 전문이 참조로서 포함된 문헌[Haumont et al. Virus Research (1996) 40:199]에 기재되어 있다.
- [0089] 추가 구체예에서, 공통 항원은 거대세포바이러스(CMV) 항원, 예컨대 gB 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체이다. 적합한 gB 유래된 항원은 US에서 US2013216613으로서 공개되고 본 발명에 사용되는 적합한 단백질을 기재할 목적으로 참조로서 포함되는 WO 2012/049317에 기재되었다.
- [0090] 추가 구체예에서, 공통 항원은 호흡기세포융합바이러스(RSV) 항원, 예컨대 RSV의 F 단백질 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체이다. 적합한 F 단백질 유래된 항원은 WO2010149745에 기재되었고, 예컨대, F 단백질 변이체는 WO2010149745의 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 및 SEQ ID NO:22에 개시된다. 다른 적합한 RSV 항원은 WO2011008974 및 WO2012158613에 기재되었다.
- [0091] 추가 구체예에서, 공통 항원은 땡기 바이러스 항원, 예컨대 불활성화 또는 생-약독화 전체 땡기 바이러스이다. 조성물은 다가일 수 있고, 예컨대, 4개 이상의 땡기 균주를 함유할 수 있다.
- [0092] 추가 구체예에서, 공통 항원은 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 항원, 예컨대 단백질 E 및/또는 필린 A 또는 이의 면역원성 단편 또는 변이체, 예컨대, WO2012139225에 기재된 것들이다.
- [0093] 추가 구체예에서, 공통 항원은 M. 투베르쿨로시스(*M. tuberculosis*) 항원, 예컨대 M72 항원, 예컨대, US 특허 제8,470,338로 등록되고 본 발명에 사용되는 적합한 단백질을 기재할 목적으로 참조로서 포함된 WO2006/117240에 기재된 항원이다.
- [0094] 관심 M. 투베르쿨로시스 항원은 하기를 포함하는(또는 구성된) 서열을 포함하거나:
- [0095] - Rv0125, Mtb32a로도 공지되며, 예컨대 WO2010010177의 SEQ ID No. 20 또는 21에 기재됨;
- [0096] - Rv0915, MTCC2 또는 Mtb41로도 공지되며, 예컨대 WO2010010177의 SEQ ID No. 14에 기재됨;
- [0097] - Rv1174, DPV로도 공지되며, 예컨대 WO2010010177의 SEQ ID No. 8에 기재됨;
- [0098] - Rv1196, Mtb39 또는 TbH9로도 공지되며, 예컨대 WO2010010177의 SEQ ID No. 13에 기재됨;
- [0099] - Rv1753, 예컨대 WO2010010180의 SEQ ID No. 1 및 2-7에 기재됨;
- [0100] - Rv1793, MTI 또는 Mtb9.9로도 공지되며, 예컨대 WO2010010177의 SEQ ID No. 10에 기재됨;
- [0101] - Rv2087, MSL 또는 Mtb9.8로도 공지되며, 예컨대 WO2010010177의 SEQ ID No. 9에 기재됨;
- [0102] - Rv2386, 예컨대 WO2010010179의 SEQ ID No. 1 및 2-7에 기재됨;
- [0103] - Rv3616, HTCC1 또는 Mtb40으로도 공지되며, 예컨대 WO2010010177의 SEQ ID No. 1 및 2-7 또는 WO2011092253의 SEQ ID No. 161-169, 179 또는 180에 기재됨;
- [0104] 상기 서열 중 어느 하나의 적어도 20개(예컨대 적어도 50개) 잔기의 면역원성 단편을 포함하거나(또는 구성되거나) 상기 서열 중 어느 하나와 적어도 90%(예컨대 적어도 95% 또는 98%) 동일성을 갖는 변이체를 포함한다(또는 구성된다).
- [0105] 관심 M. 투베르쿨로시스 융합 항원은 WO2010010177의 SEQ ID No. 23에 기재된 Mtb72f; 또는 본원의 SEQ ID No. 3에 기재된 M72로부터 유래된 것들을 포함한다. 특정 관심 M72 항원은 본원의 SEQ ID No. 3과 적어도 90%(예컨대 적어도 95% 또는 98%) 동일성을 갖는 아미노산 서열, 예컨대 SEQ ID No. 3의 잔기 2 내지 723을 포함하는 서

열(예를 들어 본원의 SEQ ID No. 4)을 포함하는(또는 구성된) 것들이다.

- [0106] 다른 관심 M. 투베르쿨로시스 항원은 하기를 포함하는(또는 구성된) 서열을 포함하거나:
- [0107] - ESAT-6 (esxA 및 Rv3875로도 공지됨), 이의 폴리펩티드 서열은 W097/09428의 SEQ ID No: 103(SEQ ID No: 104의 cDNA) 및 문헌[Sorensen et al *Infection and Immunity* 1995 63(5):1710-1717]에 기재됨. ESAT-6에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 W010010180의 SEQ ID No: 16에 제시됨;
- [0108] - Ag85 복합체 항원 (예컨대, Ag85A, fbpA 및 Rv3804c로도 공지됨; 또는 Ag85B, fbpB 및 Rv1886c로도 공지됨), 예를 들어, 문헌[Content et al *Infection and Immunity* 1991 59:3205-3212] 및 문헌[Huygen et al *Nature Medicine* 1996 2(8):893-898]에서 논의됨. Ag85A에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 W010010180의 SEQ ID No: 17에 제시됨 (잔기 43-338의 성숙 단백질, 즉, 신호 펩티드가 결합된 단백질이 특히 흥미롭다). Ag85B에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 W010010180의 SEQ ID No: 18에 제시됨 (잔기 41-325의 성숙 단백질, 즉, 신호 펩티드가 결합된 단백질이 특히 흥미롭다);
- [0109] - 알파-결정질 (hspX 및 Rv2031c로도 공지됨), 문헌[Verbon et al *Journal of Bacteriology* 1992 174:1352-1359] 및 문헌[Friscia et al *Clinical and Experimental Immunology* 1995 102:53-57]에 기재됨 (잔기 71-91, 21-40, 91-110 및 111-130에 상응하는 단편이 특히 흥미롭다). 알파-결정질에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 W010010180의 SEQ ID No: 19에 제시됨;
- [0110] - Mpt64 (Rv1980c로도 공지됨), 문헌[Roche et al *Scandinavian Journal of Immunology* 1996 43:662-670]에 기재됨. Mpt64에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 W010010180의 SEQ ID No: 20에 제시됨 (잔기 24-228의 성숙 단백질, 즉, 신호 펩티드가 결합된 단백질이 특히 흥미롭다);
- [0111] - TB10.4, TB10.4에 대한 전장 폴리펩티드 서열은 W010010180의 SEQ ID No: 23에 제시됨;
- [0112] 상기 서열 중 어느 하나의 적어도 20개(예컨대 적어도 50개) 잔기의 면역원성 단편을 포함하거나(또는 구성되거나) 상기 서열 중 어느 하나와 적어도 90%(예컨대 적어도 95% 또는 98%) 동일성을 갖는 변이체를 포함한다(또는 구성된다).
- [0113] 면역원성 단편은 이것이 면역원성 성질을 보유하는 한 임의의 길이를 지닐 수 있다. 예를 들어, 단편은 관련 단백질의 5개 이상의 연속 아미노산, 예컨대 10개 이상의 연속 아미노산, 예컨대, 20개 이상의 연속 아미노산, 예컨대 50개 이상의 연속 아미노산, 예컨대, 100개 이상의 연속 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0114] 추가 구체예에서, 공통 항원은 관련 단백질의 변이체를 포함하거나 이로 구성된다.
- [0115] 변이체 폴리펩티드는 참조 서열에 비해 다수의 치환, 바람직하게는 보존적 치환(예를 들어, 1-50개, 예컨대 1-25개, 특히 1-10개, 및 특히 1개의 아미노산 잔기(들)가 변경될 수 있다)을 함유할 수 있다. 적합하게는, 그러한 치환은 에피토프의 영역에서 발생하지 않고, 따라서 항원의 면역원성 성질에 현저한 영향을 갖지 않는다.
- [0116] 단백질 변이체는 또한 참조 서열에 비해 추가의 아미노산이 삽입된 것들을 포함할 수 있고, 예를 들어, 그러한 삽입은 1-10개 위치(예컨대 1-5개 위치, 적합하게는 1 또는 2개 위치, 특히 1개 위치)에서 발생할 수 있고, 예를 들어, 각 위치에서 50개 이하의 아미노산의 첨가를 포함할 수 있다(예컨대, 20개 이하, 특히 10개 이하, 특히 5개 이하). 적합하게는, 그러한 삽입은 에피토프의 영역에서 발생하지 않고, 따라서 항원의 면역원성 성질에 현저한 영향을 갖지 않는다. 삽입의 일례는 대상 항원의 발현 및/또는 정제를 돕기 위해 히스티딘 잔기의 짧은 스트레치(예컨대, 2-6개 잔기)를 포함한다.
- [0117] 변이체는 또한 아미노산이 참조 서열에 비해 결실된 것들을 포함하고, 예를 들어, 그러한 결실은 1-10개 위치(예컨대 1-5개 위치, 적합하게는 1 또는 2개 위치, 특히 1개 위치)에서 발생할 수 있고, 예를 들어, 각 위치에서 50개 이하의 아미노산의 결실을 포함할 수 있다(예컨대, 20개 이하, 특히 10개 이하, 특히 5개 이하). 적합하게는, 그러한 결실은 에피토프의 영역에서 발생하지 않고, 따라서 항원의 면역원성 성질에 현저한 영향을 갖지 않는다.
- [0118] 당업자는 특정 단백질 변이체가 치환, 결실 및 첨가(또는 이의 임의의 조합)를 포함할 수 있음을 인지할 것이다.
- [0119] 변이체는 바람직하게는 연관된 참조 서열에 대해 적어도 약 70% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 80% 동일성 및 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 동일성 (예컨대 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%)을 나타낸다.

- [0120] 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하는데 적합한 알고리즘의 예는 각각 문헌[Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977)] 및 문헌[Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 기재된 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다.
- [0121] CS 단백질의 적합한 변이체는 CS 단백질의 일부가 B형 간염으로부터의 표면 항원 S (HBsAg)와 하이브리드 단백질의 형태인 변이체일 수 있다. CS 변이체 항원은, 예컨대, CS 단백질의 실질적으로 모든 C-말단 부분, CS 단백질 면역우세 영역의 4개 이상의 일련 반복부, 및 HBsAg를 포함하는 하이브리드 단백질의 형태일 수 있다. 하이브리드 단백질은 적어도 160개 아미노산을 함유하고 CS 단백질의 C-말단 부분과 실질적으로 상동이지만, 소수성 앵커 서열이 없는 서열을 포함할 수 있다. CS 단백질에는 C-말단으로부터의 마지막 12개 아미노산이 없을 수 있다. 추가로, 이것은 4개 이상, 예컨대 10개 이상의 Asn-Ala-Asn-Pro 테트라펩티드 (NANP) 반복 모티프를 함유할 수 있다.
- [0122] 본 발명에 사용되는 하이브리드 단백질은 선형 링커를 통해 HBsAg의 N-말단에 인 프레임(in frame) 융합된 균주 NF54에서 유래되는, P. 팔시파룸 클론 3D7의 아미노산 207-395에 실질적으로 상응하는 P. 팔시파룸의 CS 단백질의 일부를 포함하는 단백질일 수 있다. 링커는 HBsAg로부터 preS2의 일부를 포함할 수 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 CS 작제물이 US에서 US 특허 제5,928,902 및 6,169,171로서 등록된 WO 93/10152에 개요되어 있고, 상기 US 특허 둘 모두는 본 발명에 사용되는 적합한 단백질을 기재할 목적으로 참조로서 포함된다.
- [0123] 본 발명에 사용되는 특정 하이브리드 단백질은 하기로 구성된 RTS (도 2 및 SEQ ID No. 1)(W093/10152(여기서 RTS*로 표시됨) 및 W098/05355에 기재됨)로서 공지된 하이브리드 단백질이다:
- [0124] - 메티오닌 잔기
- [0125] - 3개의 아미노산 잔기, Met Ala Pro
- [0126] - P. 팔시파룸 균주 3D7의 CS 단백질의 아미노산 207 내지 395를 나타내는 189개 아미노산의 스트레치
- [0127] - 글리신 잔기
- [0128] - 4개의 아미노산 잔기, Pro Val Thr Asn, B형 간염 바이러스 (adw 혈청형) preS2 단백질의 4개 카르복시 말단 잔기를 나타냄, 및
- [0129] - 226개 아미노산의 스트레치, 뉴클레오타이드 1653 내지 2330에 의해 인코딩되고, B형 간염 바이러스 (adw 혈청형)의 S 단백질을 지정함.
- [0130] RTS는 RTS,S 혼합된 입자의 형태일 수 있다. RTS,S 입자는 2개의 폴리펩티드, RTS 및 S를 포함하고, 이들은 동시에 합성되어 자발적으로 복합 미립자 구조를 형성할 수 있다(RTS,S).
- [0131] RTS 단백질은 효모, 예를 들어 S. 세레비지애(*S. cerevisiae*)에서 발현될 수 있다. 그러한 숙주에서, RTS는 지질단백질 입자로서 발현될 것이다. 수용체 효모 균주는 이의 유전체에 B형 간염 S 발현 카세트의 여러 통합된 카피를 이미 지닐 수 있다. 생성된 균주는 따라서 2개의 폴리펩티드, S 및 RTS를 합성하고, 이들은 혼합된 (RTS,S) 지질단백질 입자로 자발적으로 공동-어셈블링된다. 이러한 입자는 그 표면에 하이브리드의 CS 단백질 서열을 제공할 수 있다. 이러한 혼합된 입자 중의 RTS 및 S는 특정 비, 예를 들어 1:4로 존재할 수 있다.
- [0132] RTS,S는 예컨대, 문헌[Vekemans et al. (2009) Vaccine 27:G67 and Regules et al. (2011) Expert Rev. Vaccines 10:589]에서 검토되었다.
- [0133] 한 구체예에서, 제1 면역원성 조성물은 25 내지 75, 예컨대 50 마이크로그램의 RTS,S를 포함하고 제2 면역원성 조성물은 5 내지 15, 예컨대 10 마이크로그램의 RTS,S를 포함한다.
- [0134] 또 다른 구체예에서, 제1 면역원성 조성물은 12.5 내지 37.5, 예컨대 25 마이크로그램의 RTS,S를 포함하고 제2 면역원성 조성물은 2.5 내지 7.5, 예컨대 5 마이크로그램의 RTS,S를 포함한다.
- [0135] 추가 구체예에서, 공통 항원은 P. 비박스의 CS 단백질로부터 유래된다. 적합한 P. 비박스 CS 단백질 변이체가 기재되어 있다. 예를 들어, US에서 US20100150998로서 공개되고 본 발명에 사용되는 적합한 단백질을 기재할 목적으로 참조로서 포함된 W02008009652는 a. P. 비박스의 타입 I 서큘스포로조이트 단백질의 반복 영역으로부터 유래된 적어도 하나의 반복 단위, b. P. 비박스의 타입 II 서큘스포로조이트 단백질의 반복 영역으로부터 유래된 적어도 하나의 반복 단위, 및 c. B형 간염 바이러스로부터 유래된 표면 항원 S, 또는 이의 단편을 포함하는 면역원성 하이브리드 융합 단백질을 기재한다. W02008009652의 SEQ ID NO:17은 CSV-S로 명명된 특수한 하이브리

드 융합 단백질을 기재한다. B형 간염 바이러스로부터 유래된 표면 항원 S와 공동-발현될 때, CSV-S,S 입자가 형성된다 (W02008009652). 그러한 입자가 또한 본 발명에 이용될 수 있다.

[0136] 추가 구체예에서, 공통 항원은 RTS 및 CSV-S를 포함하는 혼합된 입자이다. 그러한 입자는 US에서 US20100062028로서 공개되고 본 발명에 이용되는 적합한 단백질을 기재할 목적으로 참조로서 포함된 W02008009650에 기재되었다.

[0137] 면역화 요법, 표적 집단 및 투여 방식

[0138] 상기 기재된 대로, 본 발명의 방법은 하나 이상의 항원 및 제1 애주번트를 포함하는 제1 면역원성 조성물을 투여한 다음 하나 이상의 항원 및 제2 애주번트를 포함하는 제2 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0139] 한 구체예에서, 제1 조성물의 초기 투여와 제2 조성물의 투여 사이의 시간 간격은 1 내지 24개월, 예컨대, 1 내지 18개월, 예컨대 1 내지 12개월, 예컨대, 2 내지 24개월, 예컨대, 2 내지 18개월, 예컨대 2 내지 14개월, 예컨대 2 내지 12개월, 2 내지 10개월, 예컨대 3 내지 9개월, 예컨대, 4 내지 8개월, 예컨대 7 내지 8개월이다.

[0140] 또 다른 구체예에서, 제1 조성물의 초기 투여와 제2 조성물의 투여 사이의 시간 간격은 앞당겨져서, 제1 조성물의 초기 투여와 제2 조성물의 투여 사이의 시간 간격은 1 내지 28일, 예컨대, 1 내지 21일, 예컨대, 1 내지 14일, 예컨대, 1 내지 7일이다.

[0141] 본 발명의 방법은 제1 조성물의 초기 투여 및 제2 조성물의 투여 외에 면역원성 조성물의 1회 이상의 추가 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, 대상체는 제2 조성물의 투여 전에 제1 조성물의 다중 용량을 수용할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 한 구체예에서, 제1 조성물은 제2 조성물의 투여 전에 2회 투여된다. 대안적으로 또는 추가로, 대상체는 제2 조성물의 초기 투여 후에 제2 조성물의 추가 다중 용량을 수용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법의 한 구체예에서, 제2 조성물은 1회 이상 추가 투여된다. 따라서, 가능한 요법은 비제한적으로 하기를 포함한다:

[0142] a. 제1 조성물 다음 제2 조성물

[0143] b. 제1 조성물 다음 제1 조성물, 그 후 제2 조성물

[0144] c. 제1 조성물 다음 제2 조성물, 그 후 제2 조성물

[0145] d. 제1 조성물 다음 제1 조성물에 이어 제1 조성물, 그 후 제2 조성물

[0146] e. 제1 조성물 다음 제1 조성물에 이어 제2 조성물, 그 후 제2 조성물

[0147] f. 제1 조성물 다음 제2 조성물에 이어 제2 조성물, 그 후 제2 조성물.

[0148] 요법 b의 경우 시간 간격은, 예컨대, 0, 1, 5 (즉, 0개월, 1개월, 5개월) 또는 0, 1, 6 또는 0, 1, 7 또는 0, 1, 8 또는 0, 1, 12일 수 있었다. 유사하게, 요법 c에 대한 시간 간격은, 예컨대, 0, 1, 5 또는 0, 1, 6 또는 0, 1, 7 또는 0, 1, 8 또는 0, 1, 12일 수 있었다. 요법 b 및 c에 대한 앞당겨진 간격은, 예컨대 0일, 7일 14일일 수 있었다.

[0149] 추가 구체예에서, 제2 조성물은, 예컨대, 1-5년 이상 동안, 예컨대 반복되는 연간 부스터로서 제공될 수 있었다. 한 구체예에서, 제2 조성물의 투여 후 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 12개월, 적어도 13개월, 적어도 14개월, 적어도 15개월, 적어도 16개월, 적어도 17개월, 적어도 18개월, 적어도 19개월, 또는 적어도 20개월 이상의 시간 간격을 두고, 제2 조성물이 1회 이상 추가 투여된다. 한 구체예에서, 제2 조성물의 투여 후 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년의 시간 간격을 두고, 제2 조성물이 1회 이상 추가 투여된다.

[0150] 본 발명의 방법을 이용하여 치료되는 대상체는 임의의 연령일 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 대상체는 인간이다. 본 발명의 방법은 근본적으로 전체 집단, 즉, 모든 또는 대부분의 연령대의 면역화가 유용할 수 있는 경우에 말라리아에 대한 제거 프로그램의 일부로서 사용될 수 있었다. 그러나, 한 구체예에서, 인간 대상체는 제1 조성물이 투여될 때 18세 초과이다. 또 다른 구체예에서, 인간 대상체는 제1 조성물이 투여될 때 5세 미만이다. 추가 구체예에서, 대상체는 6-12주 또는 5-17개월이다. 추가로 특히 적합한 표적 집단은 말라리아가 유행하는 지역으로의 여행자를 포함한다.

[0151] 제1 및 제2 조성물은 근내 또는 피하 투여와 같은 비경구를 포함하는 다양한 적합한 경로를 통해 투여될 수 있

다.

- [0152] 한 특정 구체예에서, 제2 조성물은 피내 투여된다. 본원에서 사용되는 피내라는 용어는 인간 피부의 진피 및/또는 표피로의 항원의 적용을 나타내고자 한다. 면역원성 조성물의 피내 적용은, 비제한적으로 짧은 바늘 장치(길이 약 0.2 내지 약 0.6 mm인 미세침을 포함하는 장치)를 이용한 전달 또는 피부 패치를 이용한 전달을 포함하는 당업자에게 공지된 임의의 피부 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 본원에 기재된 피부 백신에 사용하기 적합한 장치는 짧은 바늘 장치, 예컨대 US 4,886,499, US5,190,521, US 5,328,483, US 5,527,288, US 4,270,537, US 5,015,235, US 5,141,496, US 5,417,662 및 EP1092444에 기재된 것들을 포함한다. 피부 백신은 또한 피부로의 바늘의 유효한 침투 깊이를 제한하는 장치, 예컨대 W099/34850에 기재된 것들에 의해 투여될 수 있다. 액체 백신을 액체 제트 주사기를 통해 또는 바늘을 통해 진피에 전달하는 제트 주사 장치가 또한 적합하다. 피부의 외층을 통해 진피로 분말 형태의 백신을 가속시키기 위해 압축 가스를 이용하는 탄도 분말/입자 전달 장치가 또한 적합하다. 피부 패치는 일반적으로 고체 기재를 포함하는 백킹 플레이트를 포함할 것이다. 패치는 본 발명에 사용된 항원 및 애주버트를 진피 또는 표피에 전달한다. 특정 구체예에서, 본 발명에 유용한 패치는 복수의 미세돌기를 포함한다. 미세돌기는 각질층, 표피 및/또는 진피를 뚫고 항원 및 애주버트를 표피 또는 진피에 전달하기 적합한 임의의 형상을 지닐 수 있다. 특정 구체예에서, 미세돌기는 생물분해성이고 생물분해성 폴리머를 포함한다.
- [0153] 본 발명에 사용된 면역원성 조성물은 항원(들) 및 애주버트를 혼합시킴에 의해 제조될 수 있다. 항원(들)은 동결건조된 형태 또는 액체 제형으로 제공될 수 있다. 각 조성물에 대해, 항원을 포함하는 제1 컨테이너 및 애주버트를 포함하는 제2 컨테이너를 포함하는 키트가 제공될 수 있다.
- [0154] 적합하게는, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 0.05 ml 내지 1 ml, 예컨대 0.1 내지 0.5 ml의 인간 용량 부피, 특히 약 0.5 ml, 또는 0.7 ml의 용량 부피를 지닌다. 제2 면역원성 조성물의 부피는 감소될 수 있고, 예컨대, 0.05 ml 내지 0.5 ml, 예컨대 0.1 내지 0.2 ml일 수 있다. 사용된 조성물의 부피는 전달 경로에 의존적일 수 있고 더 적은 용량이 피내 경로에 의해 제공된다.
- [0155] 전형적으로 인간으로의 투여를 위해 제1 및 제2 면역원성 조성물은 1 μ g 내지 100 μ g, 예컨대 1 μ g 내지 50 μ g의 M. 투베르쿨로시스 항원(예컨대, SEQ ID No. 3을 포함하는 폴리펩티드)을 포함할 것이다. 적합하게는, 제1 면역원성 조성물은 1 μ g 내지 50 μ g의 M72 관련 항원(예컨대 5 μ g 내지 50 μ g), 특히 1 μ g 내지 20 μ g (예컨대 5 μ g 내지 20 μ g) 및 특히 약 또는 정확히 10 μ g의 M72 관련 항원을 함유할 것이다.
- [0156] 일부 구체예에서, 제2 면역원성 조성물은 제1 면역원성 조성물과 같은 양의 M72 관련 항원을 함유할 것이다. 예를 들어, 제2 면역원성 조성물은 1 μ g 내지 50 μ g의 M72 관련 항원 (예컨대 5 μ g 내지 50 μ g), 특히 1 μ g 내지 20 μ g (예컨대 5 μ g 내지 20 μ g) 및 특히 약 또는 정확히 10 μ g의 M72 관련 항원을 함유할 것이다.
- [0157] 다른 구체예에서, 제2 면역원성 조성물은 제1 면역원성 조성물에 비해 감소된 양의 M72 관련 항원을 함유할 것이다. 예를 들어, 제2 면역원성 조성물은 1 μ g 내지 40 μ g의 M72 관련 항원 (예컨대 2 μ g 내지 40 μ g), 특히 1 μ g 내지 16 μ g (예컨대 2 μ g 내지 16 μ g) 및 특히 10 μ g 미만 (예컨대 1 내지 8 μ g)의 M72 관련 항원을 함유할 것이다.
- [0158] 특허 출원 및 등록된 특허를 포함하는, 본 출원에서의 모든 참고문헌의 교시는 본원에서 전문이 참조로서 포함된다. 특정 요소를 "포함한다"고 정의된 조성물 또는 방법 또는 공정은 그러한 요소로 구성된 조성물, 방법 또는 공정 (각각)을 포함하는 것으로 이해된다. 본 발명은 하기 비제한적인 실시예를 참조하여 추가로 기재될 것이다:
- [0159] **실시예 1: RTS,S 및 애주버트 AS01을 이용한 백신접종 및 실험적 말라리아 공격**
- [0160] 연구에 이용된 백신
- [0161] RTS,S는 본질적으로 WO 93/10152에 기재된 효모(S. 세레비지애)에서 생성되었다.
- [0162] RTS,S/AS01의 "표준" 용량은 리포솜을 지닌 제형에서 면역자극제 3D-MPL[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, USA) 및 QS21 (각각 50 μ g)을 함유하는 500 μ l의 AS01 애주버트에서 재구성된 50 μ g의 동결건조된 RTS,S 항원을 함유한다.
- [0163] RTS,S/AS01의 "분할" 용량은 100 μ l의 상기 용액이고, 즉 리포솜과 10 μ g의 동결건조된 RTS,S 항원 및 각각 10 μ g의 3D-MPL 및 QS21을 함유한다.

[0164] 용어

[0165] 본원에서, RTS,S/AS01의 표준 용량은 "R"로서 표시되는 반면, 분할 용량(fractional dose)은 "r"로서 표시된다. 세 표준 용량의 표준 요법은 "RRR"로서 표시되는 반면, 세 번째 용량이 분할 용량인 요법은 "RRr"로서 표시된다. 두 번의 표준 용량 다음에 두 번의 분할 용량이 오는 요법은 "RRrr"일 것이다(기타 등등).

[0166] 방법

[0167] 18-50세의 건강한 말라리아-나이프 지원자에 근대 투여된, AS01로 애주버트화된 항원 RTS,S를 함유하는 말라리아 백신의 스포로조이트 공격에 대한 안전성, 반응원성 및 효능을 평가하기 위해 임상 시험을 수행하였다. "지연된 분할 용량" 그룹에 0 및 1개월에 두 번의 표준 용량, 및 7개월에 분할 용량(표준 용량의 5분의 1 (1/5))이 제공되었다. ("0, 1, 2-개월" 그룹)에 1개월 간격으로 세 번의 표준 용량이 제공되었다.

[0168] 46명 대상체는 2개의 코호트로 모집되었고 상기 언급된 "지연된 분할 용량"(30명 대상체) 및 "0, 1, 2-개월" 그룹(16명 대상체)으로 무작위화되었다. 12명 추가 대상체, 즉, 어떤 면역화도 받지 않았으나, 스포로조이트 공격을 받은 지원자는 "감염성" 대조군의 일부였다.

[0169] 각각의 코호트에서, 지원자는 상기 임의의 그룹의 세 번째 용량 약 3주 후에, 일반적으로 "스포로조이트 공격"으로도 알려진, 표준화된 일차 말라리아 공격 (Chulay et al. (1986) Am J Trop Med Hyg. 35:66)을 받도록 요청되었다. 일차 공격은 5분의 기간 동안 각 공격 지원자에게 5마리의 P. 팔시파룸 스포로조이트 감염된 학질모기(*Anopheles stevensi* mosquito)가 공급되게 하는 것을 포함하였다.

[0170] 공격 후 대상체는 이들이 말라리아에 감염되었는 지를 평가하기 위해 적어도 30일의 기간 동안 매일 추적되었다. 감염을 검출하는 주요 방법은 광 현미경에 의해 무성 단계기생충을 검출하기 위한 Giesma-염색된 말초혈 도말표본의 평가였다. 무성 단계 기생충의 존재는 대상체가 증식성 감염을 겪었고, 기생충이 간으로부터 방출되고 적혈구 단계로 진행되어, 공격에 대한 멸균 보호가 달성되지 않았음을 나타낸다.

[0171] 감염의 첫 번째 징후로 대상체는 말라리아에 대해 양성으로 밝혀졌고 치료 용량의 클로로퀸을 수용하였다. 일차 효능 판독은 멸균 보호였고, 다시 말해, 대상체는 절대 무성 단계 기생충혈증을 발생시키지 않았다. 또한, 충분히 보호되지 않은 대상체에서 공격과 기생충혈증의 출현 사이의 시간을 기록하였다. 보호는 스포로조이트 공격 후 P. 팔시파룸 감염 없이 유지된 면역된 참가자의 비율 및 감염으로 이어지는 표식-전(pre-patent) 기간에서의 지연에 의해 평가되었다.

[0172] 백신 효능(VE)은 $100 \times (1 - \text{상대 위험도})$ 로서 정의되었다. Fisher 정확 검정이 "지연된 분할 용량" 및 "0, 1, 2-개월" 백신 그룹 및 "감염성" 대조군의 각각의 사이에 말라리아 발생률의 비교에 이용되었다.

[0173] 결과

[0174] 표 1. 백신 효능

그룹	백신접종된 대상체의 수	공격 후 기생충혈증이 발생한 백신접종된 대상체의 수**	백신 효능 % (VE) 추정*
지연된 분할 용량	30	4	87
0, 1, 2-개월	16	6	63

[0175]

[0176] *로그랭크 분석 (기생충혈증까지의 시간), RRR에 비해 $F_x p=0.0455$.

[0177] **기생충혈증은 공격 28일 후에 측정되었다.

[0178] 상기 연구는 0, 1, 2개월 그룹에 비해 지연된 분할 용량 그룹의 우월성을 검출할 원동력을 제공하지 못하였고, 두 그룹 간의 차이는 통계적으로 매우 유의하지 않았다(RRR에 비해 F_x 의 VE 증가 = 57.0%, [-7.9-88.3], $p=0.0741$, Fisher 정확 검정). 그러나, 지연된 분할 용량 그룹에서 감염까지의 시간의 지연을 고려하는, 0, 1, 2개월 그룹에 비해 지연된 분할 용량 그룹의 생존 시간에서의 차이 분석은 통계적 유의성에 도달한다 ($p=0.0455$, 로그랭크): RRr 그룹의 4/30 대상체가 기생충혈증을 발생시켰고 (VE = 87% [95% CI: 67, 95]); RRR 그룹의 6/16 대상체가 기생충혈증을 발생시켰다 (VE = 63% [95% CI 20, 80]). 도 4a. 더욱이, 현재까지 완료된 5번의 0, 1, 2개월 RTS,S/AS01 임상에서 연구된 95명 대상체에 대해 푸어링된 데이터에 대하여 본 연구의 지연

된 분할 용량 아암의 결과를 비교한 분석은 현재 결과가 우연히 일어나기 매우 어려움을 나타낸다($p=0.0045$, Fisher 정확 검정). 도 4b.

[0179] 연구 확대

[0180] 본 연구를 확대시켜 몇몇 대상체는 마지막 용량 6개월 후에 분할 부스트를 수용한 다음 한 달 후에 스포로조이트 공격을 받았다. 첫 번째 공격 후 보호되지 않았던 대상체에 분할 부스트를 제공하였다. 첫 번째 공격 후 보호된 대상체는 분할 부스트를 수용하거나 수용하지 않고, 이어서 한 달 후에 스포로조이트 공격을 받도록 무작위화하였다. 결과는 표 2 및 도 5a 및 5b에 요약된다. NP는 첫 번째 공격 동안 보호되지 않음을 나타내고, P는 첫 번째 공격 동안 보호됨을 나타낸다. 모든 부스트는 분할 부스트였다(RTS,S/AS01B의 용량의 5분의 1).

[0181] 표 2. 분할 용량 부스터

요법	보호됨
RRr- NP- 부스팅됨	2/2
RRr - P - 부스팅됨	9/10
RRr - P - 부스트 없음	3/7
RRR - NP - 부스팅됨	2/3
RRR - P - 부스팅됨	1/5
RRR - P - 부스트 없음	1/4
감염성 대조군	0/6

[0182]

[0183] Fx 요법($n=2$) 또는 RTS,S의 표준 용량 요법($n=3$) 후에 보호되지 않은 대상체의 대부분은 후속 부스터 용량(1/5 용량)으로 보호될 수 있다(데이터는 도시되지 않음).

[0184] 항-CS 항체 역가

[0185] 항-CS 항체 역가는 GSK Biologicals(Clement *et al.* (2012) *Malar J* 11:384)에 의해 개발된 표준 효소-결합된 면역흡수 검정(ELISA)에 의해 측정되었다. 항체 역가는 기재된 대로 참조 표준 곡선을 이용하여 계산되고 ELISA 단위(EU)로 표시되었다. 결과는 표 3에 요약된다.

[0186] 표 3. 항-CS 항체 역가. Fx, RRR, NP, P, Fx NP, Fx P, RRR NP 및 RRR P는 본원에 달리 기재된 바와 같다.

범주	N	GMT	LL	UL
Fx	30	40545	32979	49847
RRR	16	55148	37072	82037
NP	10	39800	22368	70817
P	36	46725	38432	56808
Fx NP	4	34583	19060	62748
Fx P	26	41549	33231	51944
RRR NP	6	43708	17505	109133
RRR P	10	63403	44880	89570

[0187] 결합활성(avidity) 검정

[0188]

[0189] CSP의 반복 영역에 대한 항-CS 항체의 결합활성 지수(AI)를 평가하였다. IgG의 결합활성 측정을 위해, 샘플을 문헌[Olotu *et al* (2014) *PLoS One* 15:9(12):e115126. doi: 10.1371/journal.pone.0115126]에 기재된 대로 2

개의 상이한 ELISA 플레이트를 이용하여 평가하였다; 하나는 카오토로픽 작용제로 처리되고 하나는 처리되지 않은 플레이트이다. 카오토로픽 작용제로서 암모늄 티오시아네이트(NH_4SCN)의 1M 용액을 처리 플레이트에 첨가한 반면, PBS 중 0.05% Tween-20을 미처리된 플레이트에 첨가하였고, 둘 모두의 ELISA 플레이트를 기재된 대로 추가 세척하고 현상하였다. 결합활성 지수(AI)를, NH_4SCN 으로 처리 후 코팅된 항원에 결합된 채로 남아 있는 항-CSP IgG의 농도 (EU/ml)를 미처리된 플레이트에서 코팅된 항원에 결합한 채로 남아 있는 IgG의 농도 (EU/ml)로 나누는 비로서 계산하였다. 결과는 표 4에 요약된다.

표 4. 결합활성 지수(AI). Fx, RRR, NP, P, Fx NP, Fx P, RRR NP 및 RRR P는 본원에 달리 기재된 바와 같다.

범주	N	GMT	LL	UL
Fx	30	0.68	0.65	0.72
RRR	16	0.55	0.51	0.58
NP	10	0.61	0.55	0.68
P	36	0.64	0.61	0.68
Fx NP	4	0.70	0.63	0.78
Fx P	26	0.68	0.64	0.72
RRR NP	6	0.55	0.50	0.60
RRR P	10	0.54	0.49	0.59

AI는 요법의 비교에 활용될 수 있으나, 개별 수준에서의 보호를 설명하지 않는다.

실시예 2: M72 및 애쥬번트 AS01을 이용한 백신접종

투베르쿨로시스 항원 M72 2-his (SEQ ID No. 4)의 지연된 및 감소된 투여량의 효과가 마우스 모델에서 조사되었다.

물질 및 방법

동물 모델

암컷 마우스 C57BL/6J01aHsd-6주령-그룹 당 12마리 마우스-에 하기 표에 지시된 대로 0-14일 및 28일 또는 98일에 $50\mu\text{l}$ 를 근내 경로에 의해 주사하였다.

그룹	용량 1 D0	용량 2 D14	용량 3 D28	용량 3 D98
G1	0.25ug M72 AS01E	0.25ug M72 AS01E	0.25ug M72 AS01E	
G2			0.05ug M72 1/5 th AS01E	
G3			0.01ug M72 1/25 th AS01E	
G4				0.25ug M72 AS01E
G5				0.05ug M72 1/5 th AS01E
G6				0.01ug M72 1/25 th AS01E
G7				0.25ug M72 alone

- [0199] AS01E 애주번트는 리포솜을 지닌 제형에 면역자극제 3D-MPL[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, USA) 및 QS21 (각각 2.5 μ g)을 함유하였다. 애주번트 완충제를 이용하여 회석을 수행하였다.
- [0200] 관독:
- [0201] 하기 시점에서의 전혈 ICS
- [0202] 21일 - II 7일 후 (G1-7);
- [0203] 35일 - III 7일 후 (G1-3);
- [0204] 105일 - III 77일 후 (G1-3) 및 III 7일 후 (G4-7)
- [0205] 하기 시점에서의 혈청학 항-M72 IgTot
- [0206] 28일 - II 14일 후 (G1-7)
- [0207] 42일 - III 14일 후 (G1-3)
- [0208] 112일 - III 84일 후 (G1-3) 및 III 14일 후 (G4-7)
- [0209] 충분한 부피를 갖도록 하기 위해, 그룹에 대해 3마리의 4개 푸울의 전혈을 21일, 35일 및 105일에 수집하였다. 개개 혈청을 28일, 42일 및 112일에 수집하였다.
- [0210] ICS에 대한 PII 및 PIII 결과 및 혈청학을 연결시키기 위해 마우스를 개별적으로 확인하였다.
- [0211] 관독(들) 설명
- [0212] *세포의 면역 반응-세포내 사이토카인 염색(ICS)*
- [0213] 백혈구 분리
- [0214] 각 시점에, 각각의 마우스로부터 채혈하고 이어서 푸울링시켰다(3마리 마우스의 5개 푸울). 혈액을 헤파린을 함유하는 (1/10) RPMI/첨가제 (RPMI 1640, 글루타민, 페니실린/스트렙토마이신, 소듐 피루베이트, 비필수 아미노산 및 2-머캅토에탄올이 보충됨)를 함유하는 튜브에 수집하였다. 10 부피의 용해 완충제를 전혈에 첨가하고 튜브를 실온(RT)에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 원심분리 (335g, RT에서 10분) 후에, 펠렛을 RPMI/첨가제에 회수하고 여과시켰다(Cell strainer 100 μ m). 세포를 다시 펠렛화하고(335g, RT에서 10분) 완전 배지(RPMI 1640, 글루타민, 페니실린/스트렙토마이신, 소듐 피루베이트, 비필수 아미노산 및 2-머캅토에탄올, 및 5% 열 불활성화 우태아 혈청이 보충됨)에 재현탁시켰다.
- [0215] 신선한 백혈구의 시험관내 자극
- [0216] 백혈구를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 웰 당 약 1백만개 세포로 플레이팅하였다. 그 후 백혈구를, M72 서열을 갖는 1 μ g/ml의 펩티드와 함께 또는 펩티드 없이, 1 μ g/ml의 항-CD28 (클론 9C10 (MFR4.B) 및 항-CD49d (클론 37.51)로 6시간(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 동안 자극시켰다. 2시간-자극 후에, 완전 배지에서 1/200 희석된 Brefeldin A를 추가 4시간 동안 첨가하였다. 그 후 플레이트는 밤새, 4 $^{\circ}$ C로 옮겨졌다.
- [0217] ICS
- [0218] 세포를 5-컬러 ICS 검정을 이용하여 염색하고 분석하였다.
- [0219] 세포를 V-바닥 96-웰 플레이트로 옮기고, 200 μ l의 흐름 완충제(PBS 1X, 1% FCS)로 세척 후 189g에서 5분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리시키고, 세포를 1/50 희석된 항-CD16/32 (클론 2.4G2)를 함유하는 50 μ l의 흐름 완충제에 10분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 재현탁시켰다. 이어서, 항-CD4-V450(클론 RM4-5, 1/50 희석됨) 및 항-CD8-PerCp-Cy5.5(클론 53-6.7, 1/50 희석됨) 항체를 함유하는 50 μ l의 흐름 완충제 및 Live&Death PO (1/500 희석됨)를 30분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 첨가하였다. 세포를 원심분리시키고(5분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 189g) 200 μ l의 흐름 완충제로 세척하였다.
- [0220] 백혈구를 고정시키고 200 μ l의 Cytofix/Cytoperm 용액(Becton Dickinson 상업용 완충제)을 20분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 첨가시킴에 의해 투과시켰다. 세포를 원심분리하고(5분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 189g) 200 μ l의 Perm/세척 완충제(증류수에서 1:10 희석된 Becton Dickinson 상업용 완충제)로 세척하였다. 추가의 원심분리 단계 후에, 세포를 항-IL2-FITC (클론 JES6-5H4, 1/400 희석됨), 항-IFN γ -APC (클론 XMG1.2, 1/50 희석됨) 및 항-TNF α -PE (클론 MP6-XT22, 1/700 희석됨) 항체를 지니는 50 μ l의 Perm/세척 완충제에서 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 염색하였다. 세포를 220

μ l의 BD 안정화 고정액에 재현탁된 Perm/세척 완충제로 2회 세척하였다. 염색된 세포를 LSRII 및 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 유세포 측정법에 의해 분석하였다.

[0221] 체액성 반응- Elisa에 의한 항-M72 Ig tot 혈청학

[0222] 96-웰 Elisa 플레이트를 PBS 중 $0.25\mu\text{g/ml}$ 의 재조합 항원 M72로 코팅하고 4°C 에서 밤새 인큐베이션시켰다. II 이후 및 III 이후 백신접종된 마우스로부터의 혈청을 PBS (0.2%)-BSA에서 1/10000으로 희석시킨 다음 웰 1에서 12까지 2배 연속 희석을 수행하고 인큐베이션시켰다. 표준 및 대조 물질의 연속 희석을 이용하여 시험된 혈청의 항-M72 항체 표준 역가를 계산하고 시험의 타당성을 확보하였다. 각 인큐베이션 단계 후 플레이트를 PBS 0.1% tween20 완충제로 세척하였다. 그 후 마우스 Ig에 특이적인 바이오티닐화된 염소 항체를 첨가하고, 스트렙타비딘-퍼옥시다제 복합체 및 퍼옥시다제 기질 오르토-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드/ H_2O_2 와의 인큐베이션에 의해 항원-항체 복합체가 나타난다. 광학 밀도(O.D.)를 490-620 nm에서 기록하였다. 각 개별 마우스 혈청의 항-M72 항체 역가는 ELISA의 표준 곡선으로부터 회귀 모델을 이용하여 결정되며 ELISA 단위(EU)/ml로 표시된다. 그 후 마우스의 각 마우스 그룹에 대한 기하 평균 역가(GMT)가 계산된다.

[0223] 결과

[0224] T 세포 반응

[0225] A. M72-특이적 CD4 T & CD8 T 세포 반응의 동역학

[0226] CD4 T 및 CD8 T 세포 반응에 대한 분할 및/또는 또는 지연된 세 번째 용량의 잠재적 이익을 평가하기 위해, 마우스를 현재 연구에서 $0.25\mu\text{g}$ M72의 최대 용량으로 면역시켜 검출가능한 CD8 T 세포 반응을 유도하는 한편 CD4 T 세포 반응의 동적 범위에 있게 하였다.

[0227] 도 6에 도시된 대로, 표준 스케줄(D0-D14-D28)로 세 번째 분할 용량을 제공하는 것은 개선된 CD4 T 세포 반응을 제공하지 않았는데, 그 이유는 유사한 부스트가 전체 용량, 용량의 1/5 및 용량의 1/25을 수용한 그룹에서 7PII 부터 7PIII까지 관찰되었기 때문이다.

[0228] 그러나, 푸울 간의 M72 특이적 CD4 T 세포 반응의 일부 가변성에도 불구하고, 표준 스케줄에 비해 더 큰 부스트가 $0.25\mu\text{g}$ 의 M72의 지연된 세 번째 용량 7일 후에 관찰되었다. 더욱이, 지연된 및 분할 세 번째 용량 또는 지연된 및 비애쥬번트화된 세 번째 용량을 수용한 마우스에서의 M72 특이적 CD4 T 세포 반응의 수준은 표준 스케줄에서 전체 용량으로 면역된 그룹에서 관찰된 수준과 유사하였다. 이는 CD4 T 세포 반응의 수준과 관련된 지연된 스케줄의 이익을 시사한다.

[0229] 표준 스케줄에서 $0.25\mu\text{g}$ 의 M72 용량을 수용한 마우스에서 낮은 수준의 M72-특이적 CD8 T 세포 반응이 검출되었고 세 번째 면역화 용량은 M72-특이적 CD8 T 세포 반응을 부스팅하지 못했다 (도 8).

[0230] 표준 스케줄에서 분할 세 번째 용량을 수용한 마우스에서 감소된 M72-특이적 CD8 T 세포 반응이 관찰되었다. 이는 CD8 T 세포 반응이 마우스를 면역화하는데 사용된 M72 단백질의 용량 범위에 크게 영향을 받고 더 높은 용량의 M72 ($1\mu\text{g}$ 또는 $8\mu\text{g}$)가 $0.1\mu\text{g}$ 또는 $0.25\mu\text{g}$ 의 M72보다 높은 수준의 반응을 유도한 이전 데이터(도시되지 않음)에 부합한다.

[0231] M72의 $0.25\mu\text{g}$ 의 지연된 세 번째 용량을 수용한 마우스에서, M72 특이적 CD8 T 세포 반응의 부스트가 모든 시험된 푸울에서 7PII부터 7PIII까지 관찰되었다. 그러나, CD8 T 세포 반응의 중간값은, 모든 그룹이 2회 용량의 $0.25\mu\text{g}$ 의 M72/AS01E를 수용한 사실에도 불구하고, 7PII에서 그룹 간에 가변성을 나타내었다(0.231 부터 0.817 까지).

[0232] B. M72-특이적 CD4 & CD8 T 세포 반응의 사이토카인 프로파일

[0233] 유사한 CD4 T 사이토카인 발현 프로파일이 표준 스케줄에서 7PII 및 7PIII 둘 모두에 전체 용량, 용량의 1/5 및 용량의 1/25을 수용한 그룹에서 관찰되었다. M72-특이적 CD4 T 세포 반응은 2회 면역화 후 3중(IL2/IFN γ /TNF α) 및 2중(IFN γ /TNF α)을 포함하였다. 세 번째 면역화 용량은 다기능성 CD4 Th1 세포의 진행을 지지하는데 실패하였고 대신 이중(IL2/IFN γ) 및 단일(IFN γ 단독) 생산 CD4 T 세포를 증가시켰다(도 7).

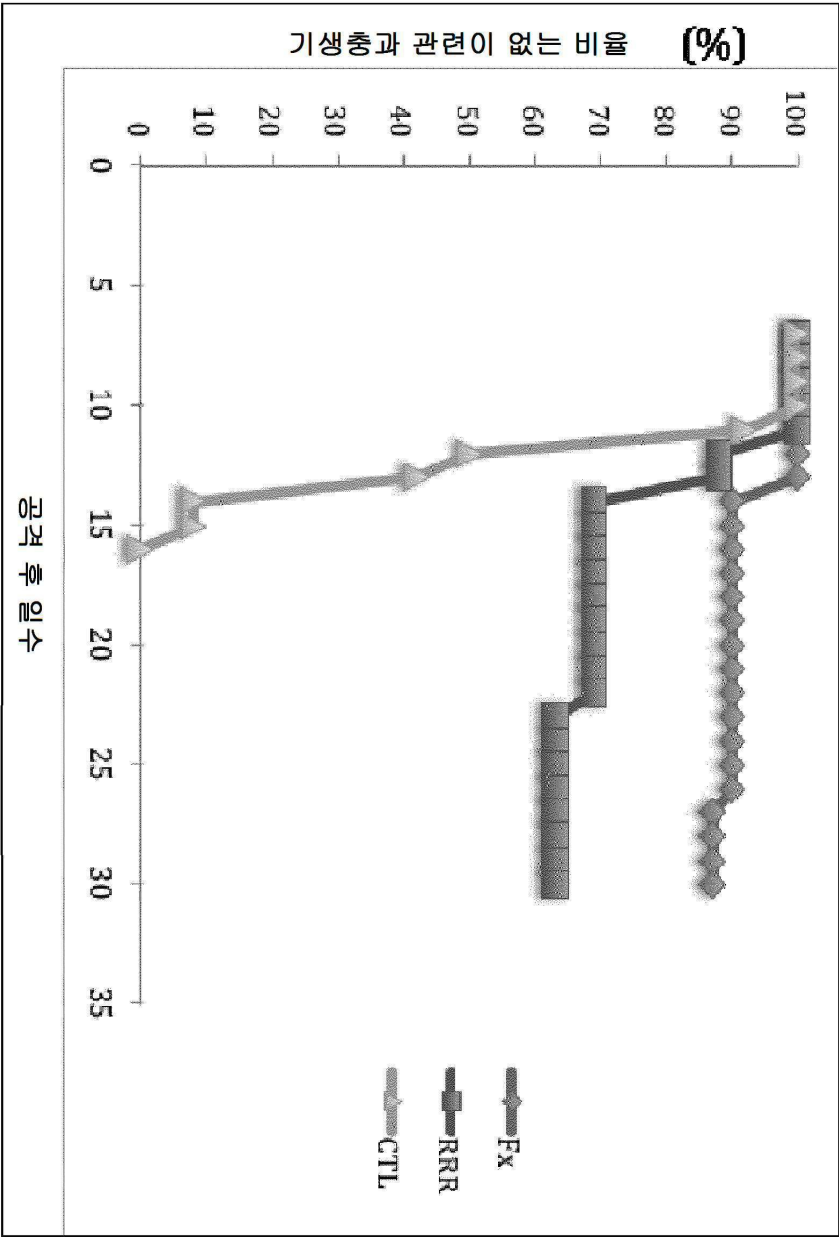
[0234] 지연된 세 번째 용량을 제공하는 것은, M72-특이적 CD4 T 세포 반응이 IL2/IFN γ /TNF α 및 IFN γ /TNF α 생산 CD4 T 세포로 주로 구성되기 때문에 다기능성 CD4 Th1 세포의 진행을 지지하는 것으로 보인다(도 7). AS01은, 감소된 수준의 IL2/IFN γ /TNF α 및 IFN γ /TNF α 및 증가된 수준의 IFN γ 단독 생산 CD4 T 세포가 지연된 및 비애쥬번트화된

세 번째 용량을 수용한 마우스에서 관찰되었기 때문에, 다기능성 T 세포의 진행을 추가로 향상시켰다.

- [0235] 지연된 및 분할 세 번째 용량을 수용한 마우스에서 M72 특이적 CD4 T 세포 반응의 수준이 기준으로서 관찰된 것과 유사하지만, 사이토카인 프로파일은 약간 다르며, 전체적으로 보아, 이러한 데이터는 지연된 면역화 스케줄에서 다기능성 CD4 Th1 세포의 개선된 진행을 시사한다.
- [0236] 다기능성 CD4 T 세포의 크기 및 품질은 마우스에서의 보호와 관련된 것으로 밝혀졌다(Derrick et al 2011 *Vaccine* 29:2902-2909).
- [0237] 유사한 M72-특이적 CD8 T 세포 사이토카인 프로파일이 모든 그룹에 걸쳐 7PII 및 7PIII 둘 모두에서 관찰되었다 (도 8). M72-특이적 CD8 T 세포 반응은 2중(IFNg/TNFa) 및 단일(IFNg 단독) 생산 CD8 T 세포로 주로 구성되었다. 매우 낮은 수준의 IL2/IFNg/TNFa 및 TNFa 생산 CD8 T 세포가 또한 검출되었다.
- [0238] 항체 반응
- [0239] *A. 항-M72 Ig tot 혈청학*
- [0240] 도 10에 도시된 대로, 항 M72 혈청학 반응의 부스트가 표준 스케줄에서 전체 용량, 용량의 1/5 및 1/25를 수용한 그룹에서 14PII 내지 14 PIII에 관찰되었다. 가장 높은 용량이 최고 M72 혈청학 반응을 제공하는 용량-범위 효과의 경향이 관찰되었다. 84PIII에 낮은 혈청학 반응에 의해 도시된 대로 시간에 따라 반응 지속력이 감소하였다.
- [0241] 지연된 세 번째 면역화를 수용한 마우스에서, 더 높은 반응 크기가 관찰되었다. 유사한 수준의 M72 특이적 Ig가 AS01E의 존재 및 부재 하에 관찰되었는데, 이는 M72 단독이 지연된 세 번째 면역화 후 높은 혈청학 반응을 유도하기에 충분함을 시사한다.

도면

도면1



도면2a

```

Met Met Ala Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
1           5           10           15

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
          20           25           30

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
          35           40           45

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
          50           55           60

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys
65           70           75           80

Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn
          85           90           95

Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn
          100          105          110

Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys
          115          120          125

Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys
          130          135          140

Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro
145          150          155          160

Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys
          165          170          175

Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser Ile Gly
          180          185          190

Leu Gly Pro Val Thr Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly

```

도면2b

195	200	205
Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu		
210	215	220
Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu		
225	230	235 240
Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser		
	245	250 255
Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp		
	260	265 270
Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys		
	275	280 285
Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val		
	290	295 300
Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Asn Thr Gly Pro Cys Lys		
305	310	315 320
Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys		
	325	330 335
Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser		
	340	345 350
Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe		
	355	360 365
Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu		
	370	375 380
Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly		
385	390	395 400
Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile		
	405	410 415

도면2c

Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
420

도면3a

<213> VZV gE 트렁케이트

<400> 1

```

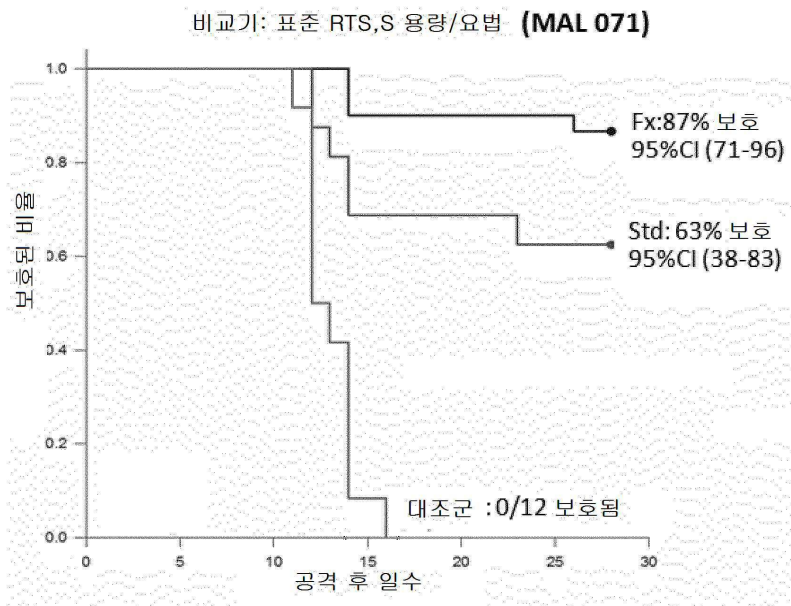
Met Gly Thr Val Asn Lys Pro Val Val Gly Val Leu Met Gly Phe Gly
 1           5           10           15
Ile Ile Thr Gly Thr Leu Arg Ile Thr Asn Pro Val Arg Ala Ser Val
 20           25           30
Leu Arg Tyr Asp Asp Phe His Ile Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Asn
 35           40           45
Ser Val Tyr Glu Pro Tyr Tyr His Ser Asp His Ala Glu Ser Ser Trp
 50           55           60
Val Asn Arg Gly Glu Ser Ser Arg Lys Ala Tyr Asp His Asn Ser Pro
 65           70           75           80
Tyr Ile Trp Pro Arg Asn Asp Tyr Asp Gly Phe Leu Glu Asn Ala His
 85           90           95
Glu His His Gly Val Tyr Asn Gln Gly Arg Gly Ile Asp Ser Gly Glu
100           105           110
Arg Leu Met Gln Pro Thr Gln Met Ser Ala Gln Glu Asp Leu Gly Asp
115           120           125
Asp Thr Gly Ile His Val Ile Pro Thr Leu Asn Gly Asp Asp Arg His
130           135           140
Lys Ile Val Asn Val Asp Gln Arg Gln Tyr Gly Asp Val Phe Lys Gly
145           150           155           160
Asp Leu Asn Pro Lys Pro Gln Gly Gln Arg Leu Ile Glu Val Ser Val
165           170           175
Glu Glu Asn His Pro Phe Thr Leu Arg Ala Pro Ile Gln Arg Ile Tyr
180           185           190
Gly Val Arg Tyr Thr Glu Thr Trp Ser Phe Leu Pro Ser Leu Thr Cys
195           200           205
Thr Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ile Gln His Ile Cys Leu Lys His Thr
210           215           220
Thr Cys Phe Gln Asp Val Val Val Asp Val Asp Cys Ala Glu Asn Thr
225           230           235           240
Lys Glu Asp Gln Leu Ala Glu Ile Ser Tyr Arg Phe Gln Gly Lys Lys
245           250           255
Glu Ala Asp Gln Pro Trp Ile Val Val Asn Thr Ser Thr Leu Phe Asp
260           265           270
Glu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Glu Ile Glu Pro Gly Val Leu Lys Val
275           280           285
Leu Arg Thr Glu Lys Gln Tyr Leu Gly Val Tyr Ile Trp Asn Met Arg
290           295           300

```

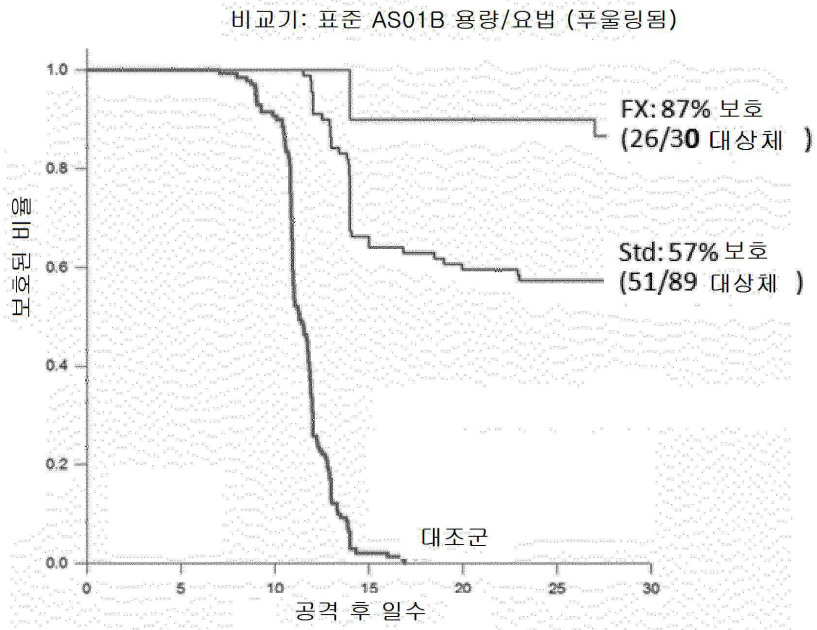
도면3b

Gly Ser Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Phe Leu Val Thr Trp Lys
 305 310 315 320
 Gly Asp Glu Lys Thr Arg Asn Pro Thr Pro Ala Val Thr Pro Gln Pro
 325 330 335
 Arg Gly Ala Glu Phe His Met Trp Asn Tyr His Ser His Val Phe Ser
 340 345 350
 Val Gly Asp Thr Phe Ser Leu Ala Met His Leu Gln Tyr Lys Ile His
 355 360 365
 Glu Ala Pro Phe Asp Leu Leu Glu Trp Leu Tyr Val Pro Ile Asp
 370 375 380
 Pro Thr Cys Gln Pro Met Arg Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Tyr His Pro
 385 390 395 400
 Asn Ala Pro Gln Cys Leu Ser His Met Asn Ser Gly Cys Thr Phe Thr
 405 410 415
 Ser Pro His Leu Ala Gln Arg Val Ala Ser Thr Val Tyr Gln Asn Cys
 420 425 430
 Glu His Ala Asp Asn Tyr Thr Ala Tyr Cys Leu Gly Ile Ser His Met
 435 440 445
 Glu Pro Ser Phe Gly Leu Ile Leu His Asp Gly Gly Thr Thr Leu Lys
 450 455 460
 Phe Val Asp Thr Pro Glu Ser Leu Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Val
 465 470 475 480
 Tyr Phe Asn Gly His Val Glu Ala Val Ala Tyr Thr Val Val Ser Thr
 485 490 495
 Val Asp His Phe Val Asn Ala Ile Glu Glu Arg Gly Phe Pro Pro Thr
 500 505 510
 Ala Gly Gln Pro Pro Ala Thr Thr Lys Pro Lys Glu Ile Thr Pro Val
 515 520 525
 Asn Pro Gly Thr Ser Pro Leu Ile Arg Tyr Ala Ala Trp Thr Gly Gly
 530 535 540
 Leu Ala
 545

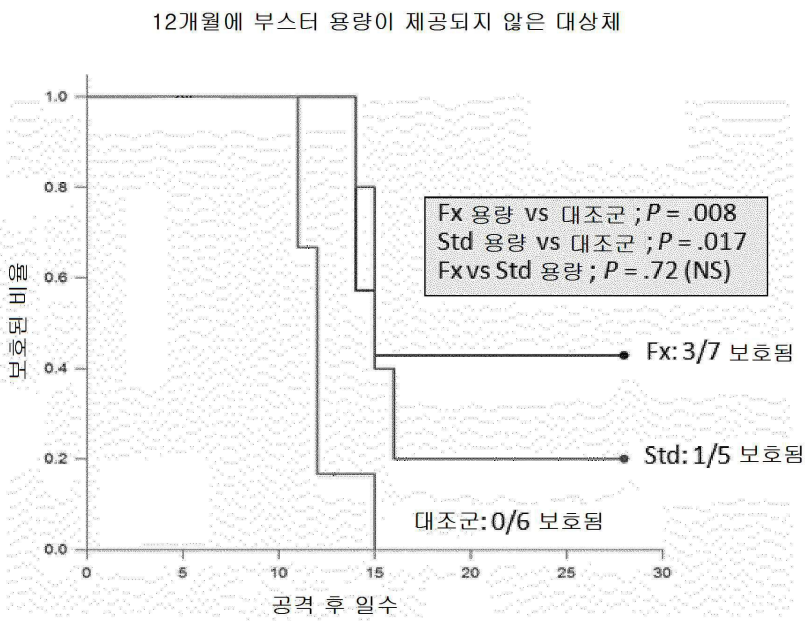
도면4a



도면4b

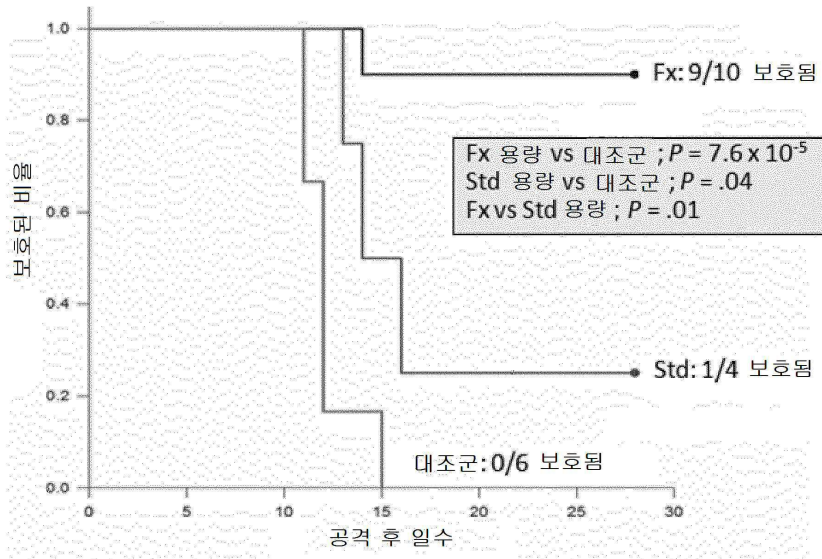


도면5a

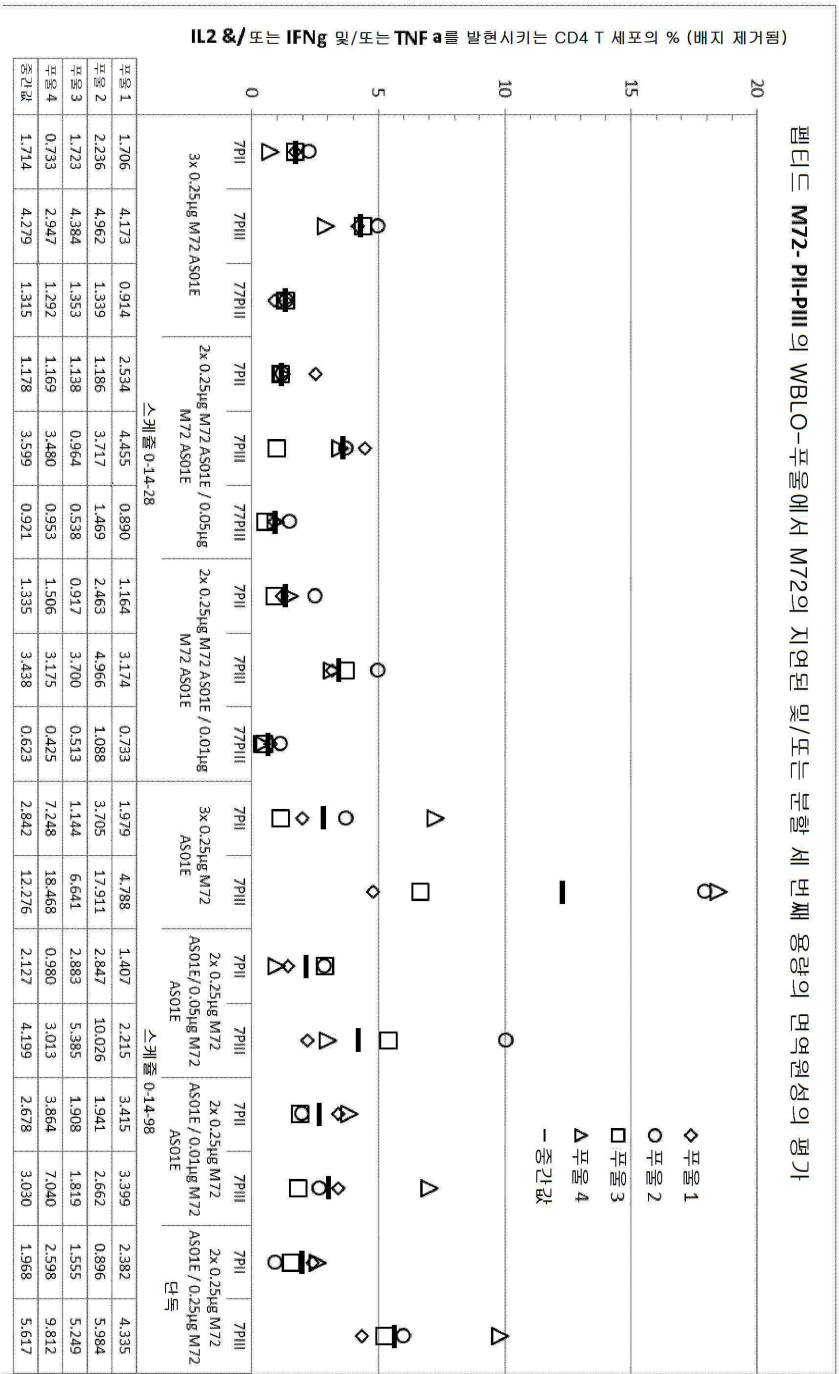


도면5b

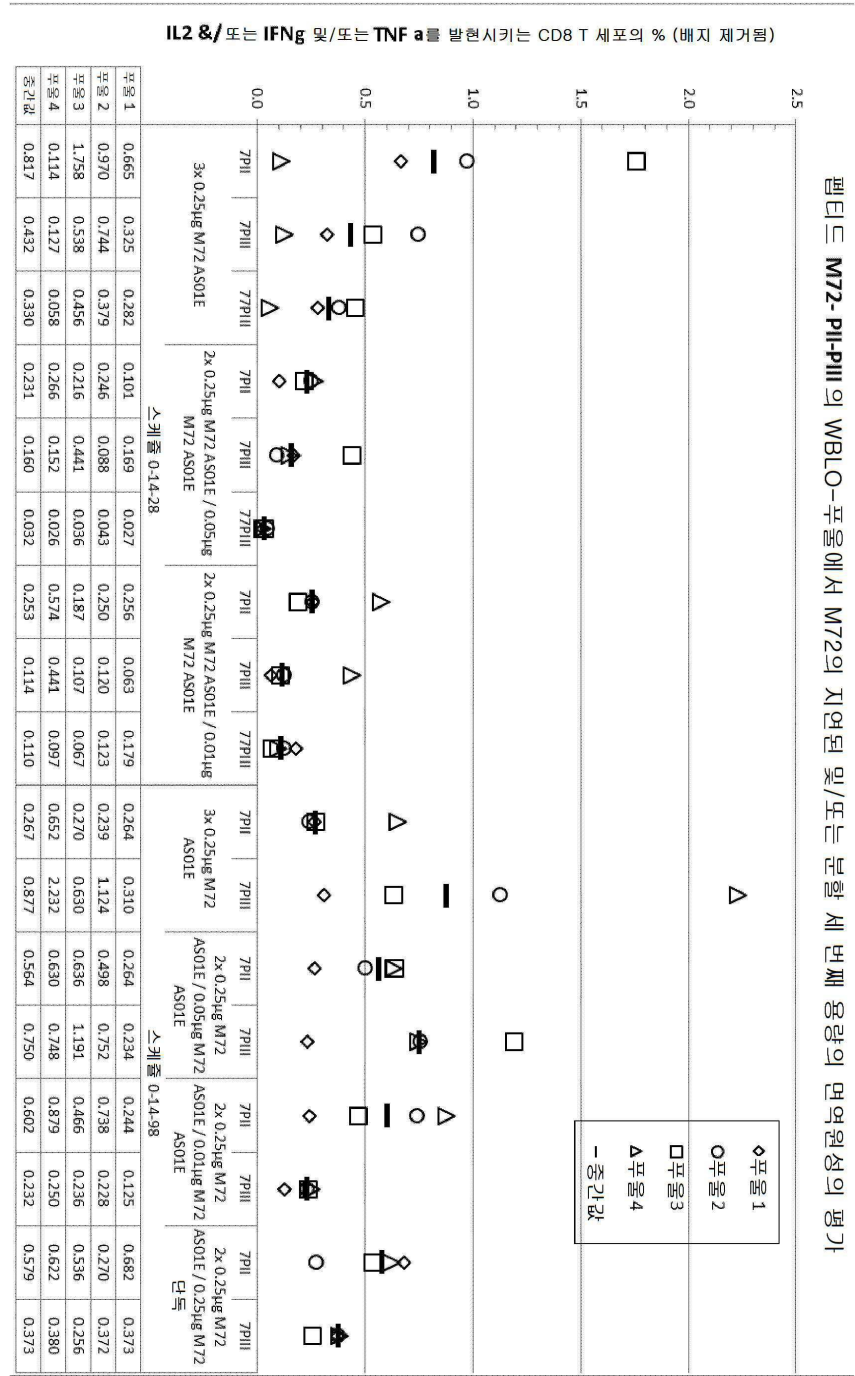
12개월에 RTS,S (1/5 용량)로 부스팅된 대상체



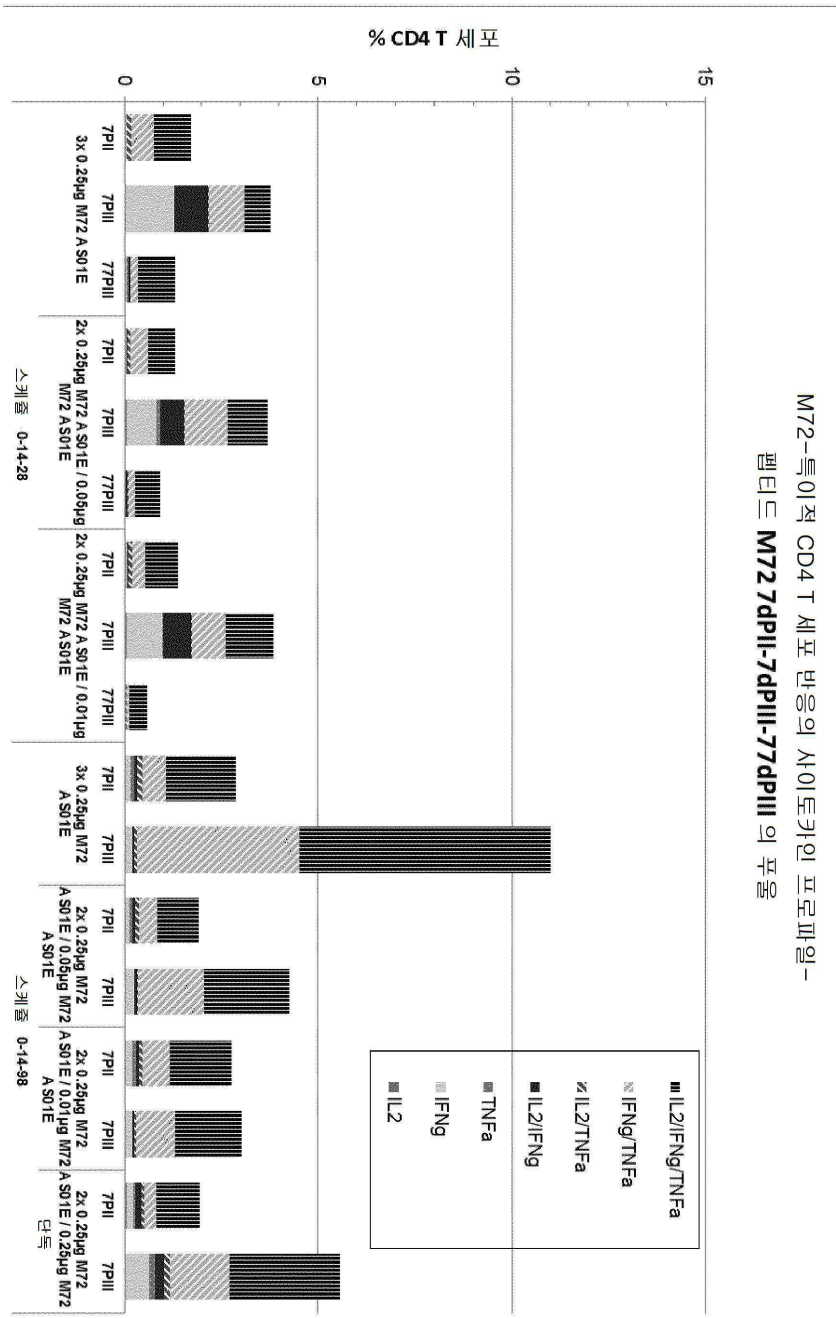
도면6



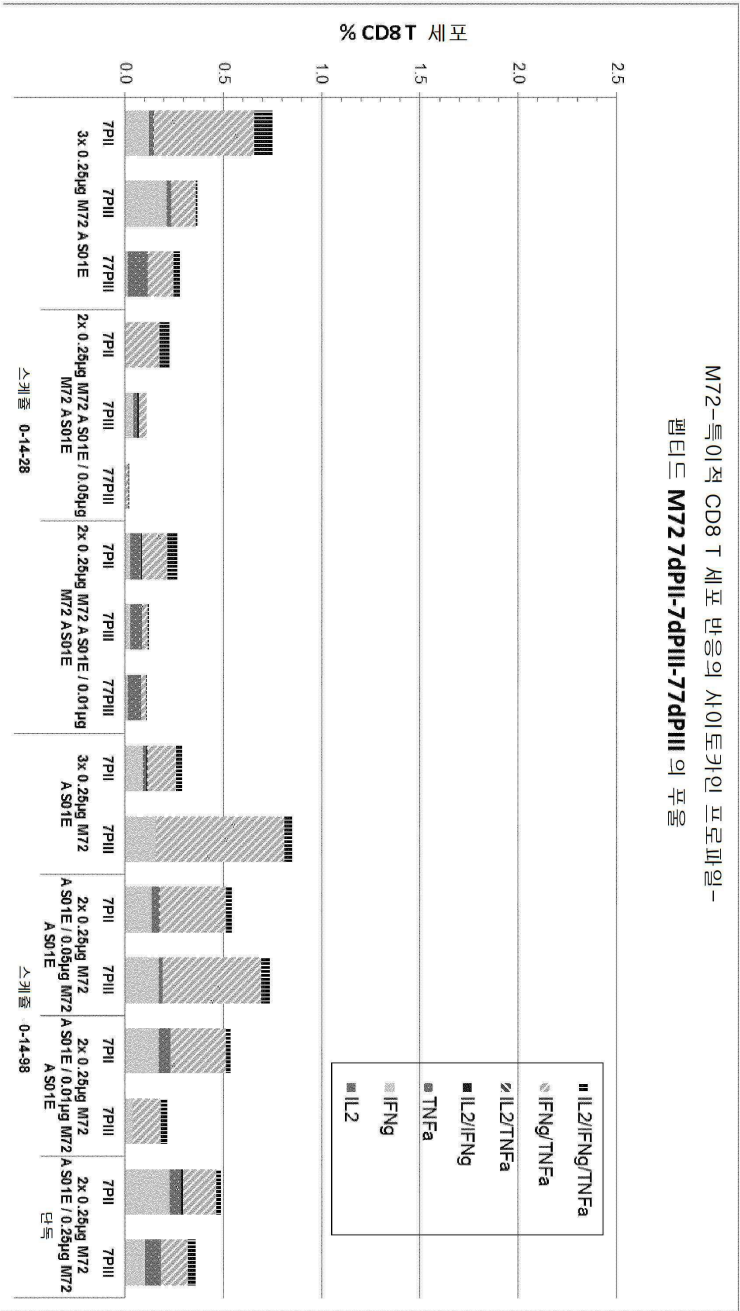
도면 7



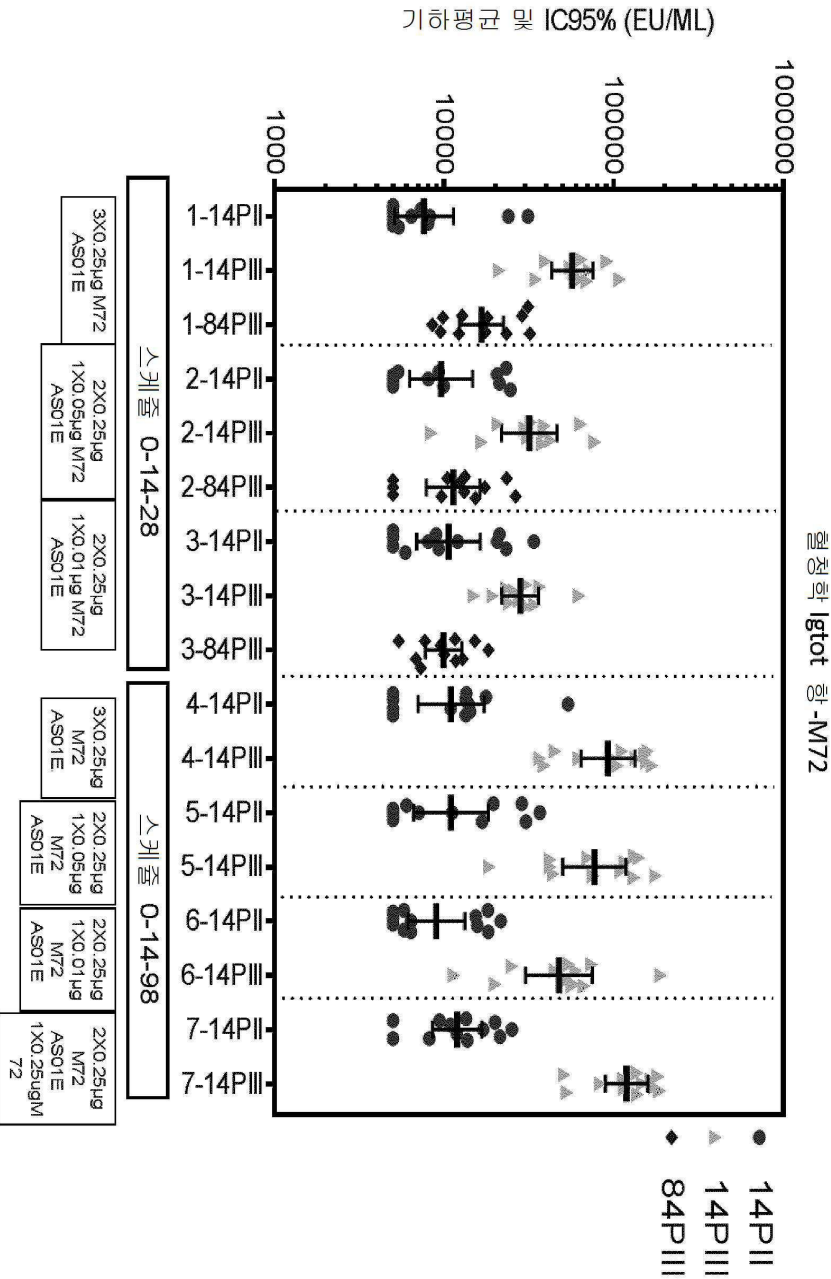
도면8



도면9



도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals sa
- <120> NOVEL METHODS FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE
- <130> VB65685 PCT
- <150> GB1405921.6
- <151> 2014-04-02
- <160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 424

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RTS,S

<400> 1

Met Met Ala Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala

1 5 10 15

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala

20 25 30

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala

35 40 45

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala

50 55 60

Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Lys

65 70 75 80

Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn

85 90 95

Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn

100 105 110

Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys

115 120 125

Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys

130 135 140

Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro

145 150 155 160

Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys

165 170 175

Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser Ile Gly

180 185 190

Leu Gly Pro Val Thr Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly

195 200 205
Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu

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

275 280 285
Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val
290 295 300
Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Asn Thr Gly Pro Cys Lys
305 310 315 320
Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys
325 330 335
Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser

340 345 350
Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe
355 360 365
Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu
370 375 380
Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly
385 390 395 400
Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile

405 410 415
Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile

420

<210> 2

<211> 546

<212> PRT

<213> Varicella zoster

<400> 2

Met Gly Thr Val Asn Lys Pro Val Val Gly Val Leu Met Gly Phe Gly

1 5 10 15

Ile Ile Thr Gly Thr Leu Arg Ile Thr Asn Pro Val Arg Ala Ser Val

20 25 30

Leu Arg Tyr Asp Asp Phe His Ile Asp Glu Asp Lys Leu Asp Thr Asn

35 40 45

Ser Val Tyr Glu Pro Tyr Tyr His Ser Asp His Ala Glu Ser Ser Trp

50 55 60

Val Asn Arg Gly Glu Ser Ser Arg Lys Ala Tyr Asp His Asn Ser Pro

65 70 75 80

Tyr Ile Trp Pro Arg Asn Asp Tyr Asp Gly Phe Leu Glu Asn Ala His

85 90 95

Glu His His Gly Val Tyr Asn Gln Gly Arg Gly Ile Asp Ser Gly Glu

100 105 110

Arg Leu Met Gln Pro Thr Gln Met Ser Ala Gln Glu Asp Leu Gly Asp

115 120 125

Asp Thr Gly Ile His Val Ile Pro Thr Leu Asn Gly Asp Asp Arg His

130 135 140

Lys Ile Val Asn Val Asp Gln Arg Gln Tyr Gly Asp Val Phe Lys Gly

145 150 155 160

Asp Leu Asn Pro Lys Pro Gln Gly Gln Arg Leu Ile Glu Val Ser Val

165 170 175

Glu Glu Asn His Pro Phe Thr Leu Arg Ala Pro Ile Gln Arg Ile Tyr

180 185 190

Gly Val Arg Tyr Thr Glu Thr Trp Ser Phe Leu Pro Ser Leu Thr Cys

195 200 205

Thr Gly Asp Ala Ala Pro Ala Ile Gln His Ile Cys Leu Lys His Thr

210 215 220

Thr Cys Phe Gln Asp Val Val Val Asp Val Asp Cys Ala Glu Asn Thr

225 230 235 240

Lys Glu Asp Gln Leu Ala Glu Ile Ser Tyr Arg Phe Gln Gly Lys Lys

245 250 255

Glu Ala Asp Gln Pro Trp Ile Val Val Asn Thr Ser Thr Leu Phe Asp

260 265 270

Glu Leu Glu Leu Asp Pro Pro Glu Ile Glu Pro Gly Val Leu Lys Val

275 280 285

Leu Arg Thr Glu Lys Gln Tyr Leu Gly Val Tyr Ile Trp Asn Met Arg

290 295 300

Gly Ser Asp Gly Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Phe Leu Val Thr Trp Lys

305 310 315 320

Gly Asp Glu Lys Thr Arg Asn Pro Thr Pro Ala Val Thr Pro Gln Pro

325 330 335

Arg Gly Ala Glu Phe His Met Trp Asn Tyr His Ser His Val Phe Ser

340 345 350

Val Gly Asp Thr Phe Ser Leu Ala Met His Leu Gln Tyr Lys Ile His

355 360 365

Glu Ala Pro Phe Asp Leu Leu Leu Glu Trp Leu Tyr Val Pro Ile Asp

370 375 380

Pro Thr Cys Gln Pro Met Arg Leu Tyr Ser Thr Cys Leu Tyr His Pro

385 390 395 400

Asn Ala Pro Gln Cys Leu Ser His Met Asn Ser Gly Cys Thr Phe Thr

405 410 415

Ser Pro His Leu Ala Gln Arg Val Ala Ser Thr Val Tyr Gln Asn Cys

420 425 430

Glu His Ala Asp Asn Tyr Thr Ala Tyr Cys Leu Gly Ile Ser His Met

435 440 445

Glu Pro Ser Phe Gly Leu Ile Leu His Asp Gly Gly Thr Thr Leu Lys

450 455 460

Phe Val Asp Thr Pro Glu Ser Leu Ser Gly Leu Tyr Val Phe Val Val

465						470						475						480
Tyr	Phe	Asn	Gly	His	Val	Glu	Ala	Val	Ala	Tyr	Thr	Val	Val	Ser	Thr			
					485						490						495	
Val	Asp	His	Phe	Val	Asn	Ala	Ile	Glu	Glu	Arg	Gly	Phe	Pro	Pro	Thr			
					500						505						510	
Ala	Gly	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Lys	Glu	Ile	Thr	Pro	Val			
					515						520						525	
Asn	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Leu	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ala	Trp	Thr	Gly	Gly			
					530						535						540	
Leu	Ala																	
545																		
<210>	3																	
<211>	723																	
<212																		
>	PRT																	
<213>	Artificial Sequence																	
<220><223>	M72 fusion protein																	
<400>	3																	
Met	Thr	Ala	Ala	Ser	Asp	Asn	Phe	Gln	Leu	Ser	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly			
1	5				10				15									
Phe	Ala	Ile	Pro	Ile	Gly	Gln	Ala	Met	Ala	Ile	Ala	Gly	Gln	Ile	Arg			
20				25				30										
Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Pro	Thr	Val	His	Ile	Gly	Pro	Thr	Ala	Phe	Leu			
35				40				45										
Gly	Leu	Gly	Val	Val	Asp	Asn	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Arg	Val	Gln	Arg			
50				55				60										
Val	Val	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Ala	Ser	Leu	Gly	Ile	Ser	Thr	Gly	Asp			
65	70				75				80									
Val	Ile	Thr	Ala	Val	Asp	Gly	Ala	Pro	Ile	Asn	Ser	Ala	Thr	Ala	Met			
85				90				95										
Ala	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	His	His	Pro	Gly	Asp	Val	Ile	Ser	Val	Thr			
100				105				110										

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala

115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro

130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu

145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser

165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser

180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr

195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala

210 215 220

Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr

225 230 235 240

Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu

245 250 255

Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn

260 265 270

Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe

275 280 285

Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe

290 295 300

Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala

305 310 315 320

Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met

325 330 335

Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly

340 345 350

Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro

355 360 365
His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met

370 375 380
Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
385 390 395 400
Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
405 410 415
Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
420 425 430
Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala

435 440 445
Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
450 455 460
Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
465 470 475 480
Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
485 490 495
Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val

500 505 510
Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
515 520 525
Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
530 535 540
Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
545 550 555 560
Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr

565 570 575
Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
580 585 590
Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
595 600 605

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly

625 630 635 640

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly

645 650 655

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu

660 665 670

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr

675 680 685

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala

690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr

705 710 715 720

Ala Ala Ser

<210> 4

<211> 725

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M72 fusion protein (2-his)

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val

50 55 60

Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr

65 70 75 80

Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr

85 90 95

Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser

100 105 110

Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr

115 120 125

Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu

130 135 140

Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala

145 150 155 160

Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu

165 170 175

Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val

180 185 190

Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser

195 200 205

Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr

210 215 220

Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly

225 230 235 240

Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met

245 250 255

Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala

260 265 270

Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala

275 280 285

Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu

290 295 300

Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu

305 310 315 320

Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln

325 330 335
 Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr

 340 345 350
 Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val
 355 360 365
 Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn
 370 375 380
 His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser
 385 390 395 400
 Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln

 405 410 415
 Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser
 420 425 430
 Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg
 435 440 445
 Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala
 450 455 460
 Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu

 465 470 475 480
 Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro
 485 490 495
 Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu
 500 505 510
 Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
 515 520 525
 Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro

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

Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn
 580 585 590
 His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser
 595 600 605
 Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp
 610 615 620
 Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala
 625 630 635 640
 Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn
 645 650 655
 Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val
 660 665 670
 Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu
 675 680 685
 Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly
 690 695 700
 Asp Ala Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met
 705 710 715 720
 Asn Thr Ala Ala Ser
 725