



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0132178
(43) 공개일자 2018년12월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/102 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)
A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/095 (2006.01)
A61K 9/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/102 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7035130(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년09월17일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7012128
원출원일자(국제) 2009년09월17일
심사청구일자 2018년05월28일
- (85) 번역문제출일자 2018년12월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2009/007303
- (87) 국제공개번호 WO 2010/032141
국제공개일자 2010년03월25일
- (30) 우선권주장
61/097,729 2008년09월17일 미국(US)

- (71) 출원인
헌터 이뮤놀로지 리미티드
오스트레일리아 3186 빅토리아주 브라이튼 세인트 앤드류스 플레이스 5/8
- (72) 발명자
던클리 마가렛
오스트레일리아 2287 뉴 사우스 웨일즈 엘러모어 베일 덴저필드 드라이브 80
클랜시 로버트
오스트레일리아 2300 뉴사우스웨일스주 뉴캐슬 헌터 스트리트 4/67
- (74) 대리인
유미특허법인

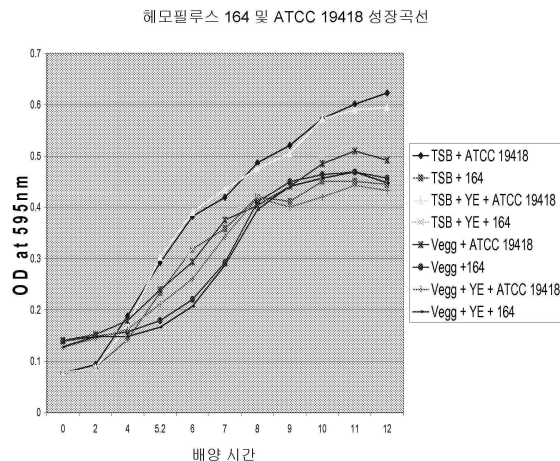
전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 발명의 명칭 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 백신 및 그의 용도

(57) 요약

환자에서 만성 폐쇄성 폐질환 및 천식의 치료에 유용한 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 백신이 제공된다. 특정 예로, 상기 백신은 모노박테리아 백신이다. 본 발명의 백신에 사용되는 박테리아 균주가 또한 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/02 (2013.01)

A61K 39/095 (2013.01)

A61K 9/28 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 사멸된 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 집단 또는 사멸된 헤모필루스 인플루엔자 집단의 막 단편; 및

(b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하며,

상기 헤모필루스 인플루엔자는 하기 특징 중 2개 이상을 조합한 것을 특징으로 하는 백신:

(i) 비피막형(non-typeable);

(ii) 생물형(biotype) I;

(iii) 호기성 조건에서 성장;

(iv) B 캡슐 유전자의 결핍; 및

(v) 베타-락타마아제(β -lactamase) 유전자의 결핍.

청구항 2

제1항에 있어서,

위장 보호 코팅을 가지는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 3

제2항에 있어서,

캡슐제, 정제 또는 장용성 코팅 과립제 형태인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 정제는 상기 집단 또는 상기 막 단편을 포함하는 코어와 상기 코어를 둘러싼 장용성 코팅을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 코어와 상기 장용성 코팅 사이에 서브 장용성(subenteric) 코팅을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 6

제4항에 있어서,

최외층으로서 필름 코팅을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 코어는 락토오스를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 코어는 셀룰로오스 또는 셀룰로오스 유도체를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 셀룰로오스 또는 셀룰로오스 유도체는 크로스카르멜로오스 나트륨(croscarmellose sodium)인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 코어는 충전제를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 충전제는 마그네슘 스테아레이트인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 12

제4항에 있어서,

상기 코어의 중량은 400 mg 내지 500 mg인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 13

제4항에 있어서,

사멸된 헤모필루스 인플루엔자 또는 막 단편은 상기 코어 중량의 7.5% 내지 15%를 구성하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 14

제13항에 있어서,

사멸된 헤모필루스 인플루엔자 또는 막 단편은 상기 코어의 약 10%를 구성하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 15

제5항에 있어서,

상기 서브 장용성 코팅은 코어 중량의 2% 내지 3%가 되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 서브 장용성 코팅은 오파드라이 II 화이트(Opadry II white)를 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 17

제4항에 있어서,

상기 장용성 코팅은 코어 중량의 10% 내지 12%가 되는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 장용성 코팅은 수성 아크릴 코팅인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 수성 아크릴 코팅은 아크릴-EZE 레드(Acryl-EZE Red)인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 20

제6항에 있어서,

상기 필름 코팅은 정제수인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

모노박테리아 백신인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리박테리아 백신인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 헤모필루스 인플루엔자는 국립 측정 연구소(National Measurement Institute) ("NMI")에 수탁 번호 V08/021002로 기탁된 분리주 NTHi-164, 또는 NMI에 수탁 번호 V08/021003로 기탁된 분리주 NTHi-167인 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 백신의 단위 용량은, 상기 헤모필루스 인플루엔자의 약 10^8 내지 약 10^{13} 의 사멸된 콜로니 형성 단위 또는 상기 헤모필루스 인플루엔자의 약 10^8 내지 약 10^{13} 의 사멸된 콜로니 형성 단위의 막 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 백신의 유효량을 만성 점막 질환 환자에 투여하는 것을 포함하는, 만성 점막 질환 환자를 치료하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 유효량은 2일 내지 5일 연속으로 매일 투여된 상기 백신의 1회 내지 3회 단위 용량이며, 상기 단위 용량은 상기 헤모필루스 인플루엔자의 약 10^8 내지 약 10^{13} 의 사멸된 콜로니 형성 단위 또는 상기 헤모필루스 인플루엔자의 약 10^8 내지 약 10^{13} 의 사멸된 콜로니 형성 단위의 막 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

3주 내지 5주 간격으로 상기 투여를 반복하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 투여는 2회 반복되며, 선행 투여 후 3주 내지 5주 기간으로 각 투여를 반복하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제25항에 있어서,

상기 만성 점막 질환이 만성 폐쇄성 폐질환 또는 낭포성 섬유증 관련 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 만성 폐쇄성 폐질환은 만성 기관지염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제29항에 있어서,

상기 만성 폐쇄성 폐질환은 폐기종(emphysema)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제29항에 있어서,

상기 만성 폐쇄성 폐질환은 중등도 내지 중증인 것을 특징으로 하는 방법..

청구항 33

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 따른 백신의 유효량을 환자에 투여하는 것을 포함하는, 천식을 치료하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 유효량은 2일 내지 5일 연속으로 매일 투여된 상기 백신의 1회 내지 3회 단위 용량이며, 상기 단위 용량은 상기 헤모필루스 인플루엔자의 약 10^8 내지 약 10^{13} 의 사멸된 콜로니 형성 단위 또는 상기 헤모필루스 인플루엔자의 약 10^8 내지 약 10^{13} 의 사멸된 콜로니 형성 단위의 막 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서,

3주 내지 5주 간격으로 상기 투여를 반복하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 투여는 2회 반복되며, 선행 투여 후 3주 내지 5주 기간으로 각 투여를 반복하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제33항에 있어서,

상기 천식은 내인성 천식인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

NMI에 수탁 번호 V08/021002로 기탁된 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 분리주 NTHi-164 또는 그의 계대배양물(subculture).

청구항 39

NMI에 수탁 번호 V08/021003로 기탁된 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 분리주 NTHi-167 또는 그의 계대배양물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 백신 및 만성 폐쇄성 폐질환 및 천식과 같은 폐질환을 치료하기 위한 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 만성 폐쇄성 폐질환 및 천식과 같은 폐질환의 치료에 유용한 신규한 헤모필루스 인플루엔자 균주에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 담배 연기의 과도한 흡입으로 인한 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD)은 이환 및 사망의 주된 요인이 되는 질환으로서, 전세계 사망 원인 중 4위를 차지하고 있다 (Lung Disease Data (2008). American Lung Association). 국립 심장, 폐, 혈액 연구소 (National Heart, Lung and Blood Institute (2007))의 평가에 따르면, 미국에서 COPD에 대해 소요되는 연간 비용은 직접 의료 비용 267억 달러를 포함하여 426억 달러에 달한다(Lung Disease Data (2008). American Lung Association). 실질적인 개선 효과를 얻기 위해 확립된 의료 요법에 실패하는 것은 유감이며, 새로운 관리 전략이 필요하다(Global Initiative for COPD (2006). 만성 폐쇄성 폐질환에 대한 글로벌 이니셔티브 웹사이트에서 COPD의 진단, 관리 및 예방에 대한 국제 전략을 확인할 수 있음). COPD의 기본 병리는 소기도의 협소화 및 폐실질의 파괴, 적어도 일부는 염증 과정으로 인한 결과를 포함한다. 재발성 급성 악화(Recurrent acute exacerbation)는 더욱 강력한 기관지내 염증을 반영하므로, 기류 폐쇄(airflow obstruction) 및 건강 상태의 악화와 관련이 있을 수 있다. 이러한 염증 반응의 원인은 복잡하지만, 부분적으로는 독성 물질의 흡입으로 인해 손상된 폐내 기관지 점막의 박테리아 콜로니화를 포함한다(Sethi, 2006, Chest 129:223-224).

[0003] 급성 악화는 COPD의 자연사에 결정적인 사건이며, 심각한 질환에서 더욱 일반적이다. 급성 악화는 삶의 질을 저하시키고, 폐 기능 감퇴를 가속화시키며, 입원과 사망의 주된 요인이다 (Global Initiative for COPD, 2006; Niewoehner, 2006, Am. J. Med. 119(10 Suppl. 1):38- 45; Wedzicha & Seemungal, 2007, Lancet 370(9589):786-96; Sethi, 2006, Chest 129:223-224; Anzueto, 2007, Clin. Chest Med. 28(3):609-16, vii; and Look et al, 2006, Proc. Am. Thorac. Soc. 3(6):482-3). 일단 환자가 악화로 입원하게 되면, 재입원 또는 사망에 이를 위험이 높아진다 (Sin & Tu, 2001, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164(4):580-4).

[0004] 환자의 삶의 질을 높이고 장기간의 질병 임상 코스에서 유리한 효과를 나타내는 등의, 악화 횟수를 저해 또는 경감시키는 것과 함께 (Burge et al, 2000, BMJ 320(7245): 1297-303; Calverley et al, 2003, Chest 124(4): 1350-6; Vincken et al, 2002, Eur. Respir. J. 19(2):209-16; and Casaburi et al, 2002, Eur. Respir J. 19(2):217-24) COPD 악화의 예방이 주된 관리 목적이다 (Global Initiative for COPD Guidelines, 2002; Celli & MacNee, 2004, Eur. Respir. J. 23(6):932-46; O'Donnell et al, 2007, Can. Respir J. 14 Suppl. B:5B-32B),

[0005] 천식은 가역적 기도 폐쇄를 특징으로 하는 기도의 만성 염증 질환으로, 일반적으로는 외인성 천식 (화분 및 집 먼지 진드기 등의 알레르겐 흡입에 따른 알레르기 반응에 원인이 있음) 또는 내인성 천식 (전통적인 알레르기 반응에 원인이 없음)으로 분류되며, 그 기전은 알려져 있지 않다. 외인성 천식은 또한 "알레르기성" 천식"이라고 불리는 반면, 내인성 천식은 "비알레르기성" 또는 "특발성" 천식으로 불린다.

[0006] COPD와는 대조적으로, 천식은, 하나 이상의 자극제에 의해 반응하여 기도가 때로는 수축하고, 충혈되며, 과량의 점액으로 채워져 있는, 호흡계가 연관된 전형적인 만성 질환이다. 이러한 증상들은 알레르겐, 환경 담배 연기, 냉풍 또는 온풍, 향수, 애완동물 비듬, 습한 공기, 운동 또는 활동, 또는 감작적인 스트레스와 같은 환경적인 자극원에 노출됨에 따라 유발될 수 있다. 유아에서, 가장 일반적인 유발원은 감기를 일으키는 바이러스성 질환이다. 기도가 좁아지면서 천명, 호흡곤란, 흉부 압박감 및 기침이 발생한다. 기도 수축은 기관지 확장제에 반응한다. 증상 발현 중에 대부분의 환자들은 호전을 느끼지만, 경미한 증상일 수 있고, 장시간 운동 후에는 비 감염 개체에 비해 호흡 곤란을 느낄 수 있다. 경미한 증상에서부터 생명을 위협하는데 이르기까지 천식의 증상은 약물과 환경적인 변화를 조합함으로써 통상 조절될 수 있다.

[0007] 천식 진단 개체를 대상으로 한 최근 연구에 따르면, 천식은 타액에서의 호산구 및 호중구 개수의 차이를 기준으로 분류되었다 (Simpson et al, 2006, Respirology 11 :54-61). 이 연구에서 개체는 건강한 대조군 개체에 대

한 세포 타입의 존재를 기준으로 상이한 천식 아형으로 분류되었다. 일부 천식 아형은 호중구성 천식 (> 61% 호중구) 및 호산구성 천식 (>1.01% 호산구)을 포함하는 것으로 확인되었다. 호중구성 천식 그룹은 전체 천식 환자의 약 20%를 포함하였다. 또 이 연구에서, 평가 이전 달에 개체에서 호흡기 감염이 보고되지 않았으나, 단 기간 (4주) 및 장기간 (평균 5.3년)의 2가지 타입의 시간 간격으로 샘플링한 결과 지속적인 호중구 증가 (neutrophilia)가 확인되었다. 천식 환자는 건강한 대조군에 비하여 더 높은 수준의 세포내 박테리아 및 마크로파지를 가지는 것으로 나타났지만, 호중구성 천식 환자와 다른 천식 그룹 간에 유의한 차이는 발견되지 않았다. 본 보고서에서는, 실제로 확인된 박테리아 수준은 급성 박테리아 감염의 경우보다 낮은 것으로 확인되었고, 호중구성 천식의 염증 과정을 설명할 수 있는 박테리아 감염의 증거는 없는 것으로 결론내렸다.

[0008] 기관지염은 폐 내 기관지 (중간 크기의 기도)의 염증을 의미한다. 만성 기관지염 (CB)은 반드시 감염에 의해 발생하는 것은 아니며, 일반적으로는 COPD 증상의 일부이다. CB는 임상적으로는 2년 연속 적어도 3개월 동안 가래(담) 및 점액을 생성하는 지속적인 기침으로 정의된다.

[0009] 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 (NTHi)는 만성 기관지염 (CB)과 관련된 가장 일반적인 병원성 박테리아다 (Sethi and Murphy, 2001, Clin. Microbiol. Rev. 14:336-363). NTHi는 건강한 환자와 CB 환자의 상부 기도 (예컨대, 코, 중이, 인후 및 부비동) (Sethi and Murphy, 2001, Clin. Microbiol. Rev. 14:336-363)뿐만 아니라 점막하 간질의 점막 상피 세포에 부착되어, 폐를 포함하는 호흡기의 여러 위치에서 확인할 수 있다 (Moller et al, 1998, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:950-56). 비폐쇄성 및 폐쇄성 CB의 연구에서, 대다수의 환자가 NTHi에 지속적으로 감염된 것으로 확인되었다 (Murphy et al, 2004, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170:266-72).

[0010] NTHi 및 스태필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus)는 CB 환자의 기도의 기관지폐포 세척에 의해 얻어지는 비만 세포로부터의 증가된 IgE-매개 히스타민 유리화 및 비 IgE-매개 히스타민 유리를 일으키는 것으로 확인되었다. NTHi의 경우, IgE 매개 히스타민 유리 증가의 원인이 될 수 있는 것으로 보고되었다 (Clements et al, 1990, Allergy 45: 10-17). 급성 악화 CB 환자로부터 분리해낸 면역 세포는 환자 자신의 박테리아에 대해 민감하며 동시에 과활성인 것으로 확인되었다 (Norn et al, 1994, Agents Actions 41, Special Conference Issue 1994:C22-C23). 또한 진균 (예컨대, 아스퍼질러스(Aspergillus)) 및 바이러스 (예컨대, 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus), 파라인플루엔자 바이러스 (Welliver et al, 1982, J. Pediatrics 101:889-96)) 및 박테리아 (S. 뉴모니에(S. pneumoniae) (Kjaergard et al, 1996, APMIS 104:61-67; Tee and Pepys, 1982, Clin. Allergy 12:439-50; Pauwels et al, 1980, Allergy 157:665-9), S. 아우레우스(S. aureus) (Rhode et al, 2004, Respir. Med. 98:858-64; Tee and Pepys, 1982, Clin. Allergy 12:439-50), 슈도모나스 에루지노사(Pseudomonas aeruginosa) (Shen et al, 1981, Infect. Immun. 32:967-68), 및 마이코플라즈마 뉴모니에(Mycoplasma pneumoniae) (Seggev et al, 1996, Ann. Allergy Asthma Immunol. 77:67-73)에 의한 호흡기 감염으로 인해 생성되는 특정 IgE 항체가 여러 연구에서 보고된 바 있다. NTHi 특이적 IgE 항체가 CB 환자의 혈청(Kjaergard et al, 1996, APMIS 104; 61-67; Tee and Pepys, 1982, Clin. Allergy 12:439-50) 및 낭포성 섬유증(Tee and Pepys, 1982, Clin. Allergy 12:439-50)에서 확인되었다.

[0011] 기관지 천식 환자를 대상으로 한 연구에서, 29%의 환자에서 NTHi에 대한 IgE 항체가 발견되었다. 다른 IgE 매개 과민증이 없는 환자의 22%에서 NTHi 및/또는 스트렙토코커스 뉴모니에(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항체가 존재하였다. 그러나 (알레르기성 표현형을 제시하는) 다양한 흡입 항원에 대한 입증된 IgE 항체를 가진 환자에서 고수준의 IgE 박테리아 항체가 발견되었다 (Pauwels et al, 1980, Allergy 157:665-9). 박테리아 감염이 외인성 천식의 유발과 악화에 주요 역할을 하는 것으로 추측되지만, 천식의 악화는 바이러스 감염에 의해 현저하게 유발되는 것으로 여겨졌다. 실제로 천식 치료를 위한 박테리아 백신의 임상적 효과가 의심되어, 세계 보건 기구(WHO)에서는 박테리아 백신이 최근 천식의 치료에는 역할을 하지 않는 것으로 제안하기에 이르렀다.

[0012] 방대한 양의 연구가 천식의 치료 중재 및 치료에 집중되어 있음에도 불구하고, 현대 서구 사회에서 천식 증상은 고비용의 주요 문제로 남아 있다.

[0013] 본 명세서에서 여러 문헌이 인용 또는 확인되고 있으나, 이것이 이들 문헌을 본 발명의 선행문헌으로서 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

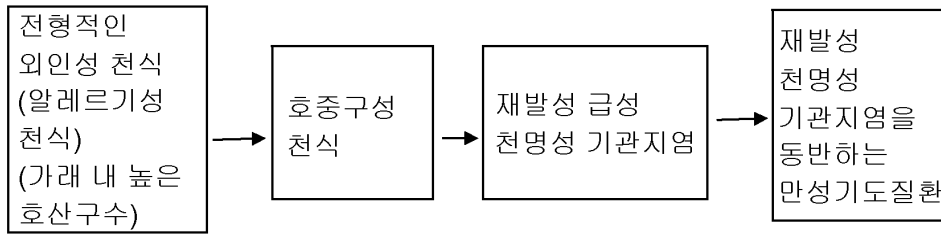
- [0014] 일반적인 점막계를 자극하기 위하여, 불활성 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 (NTHi)의 경구 투여를 포함하는, 신규 형태의 면역치료법이 개발되었다. COPD의 급성 악화에 대한 예방은 가래 내 NTHi의 밀도 감소와 관련되어 있다. 이러한 초기 연구들은 저 특성화된 NTHi 분리주를 사용하였다. 선택 분석법을 조합하여 광역의 교차 방어를 유도하는 하나의 NTHi 분리주(다르게 지정되지 않는 한, NTHi 164, HI-164, 분리주 164 또는 균주 164가 호환성 있게 사용됨)를 확인하는데 사용되었다.
- [0015] 본 출원인은 놀랍게도 HI-164의 백신 접종이 천식을 치료하는데 유용하고, 항천식 치료의 필요성을 감소시킨다는 것을 발견하였다.
- [0016] 따라서 본 발명은 HI-164 및 NTHi의 유사 균주를 포함하는 백신, 및 하부 기도의 점막계와 같은 점막계의 급성 콜로니화 현상과 관련된 질환을 치료하기 위한 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 HI-164 및 NTHi의 유사 균주를 포함하는 백신, 및 천식, COPD, 및 COPD와 무관한 만성 기관지염 등의 폐질환을 치료하기 위한 그의 용도에 관한 것이다. 특정 구현예로서, 백신은 하나 이상의 균주 NTHi 및/또는 상기 NTHi종의 하나 이상의 면역원성 단편을 포함하는 모노박테리아 백신이다. 본 발명의 백신에서 유용한 NTHi 균주는 하기 특징의 임의의 조합(예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 전부의 조합)을 특징으로 한다:
- [0017] (1) B 캡슐 유전자가 결핍됨;
- [0018] (2) 생물형(biotype) I임;
- [0019] (3) 베타-락타마아제(β -lactamase) 유전자가 결핍됨;
- [0020] (4) 호기성 성장;
- [0021] (5) 타액에서 헤모필루스 인플루엔자-특이적 IgA의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 100%, 또는 다른 통계적으로 유의한 증가에 의해 초래되는, 점막 헤모필루스 인플루엔자-특이적 IgA 반응이 유도될 수 있음;
- [0022] (6) 헤모필루스 인플루엔자에 대한 노출에 반응하여 페이에르판(Peyer's patches) 유래 T-세포에 의한 림포카인의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 100%, 또는 다른 통계적으로 유의한 증가에 의해 초래되는, 헤모필루스 인플루엔자-특이적 T 세포가 자극될 수 있음;
- [0023] (7) NTHI-164의 2개의 외막 단백질과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100%의 서열 상동성을 가지는 2개의 외막 단백질을 코딩함;
- [0024] (8) NTHI-164의 26개의 외막 단백질과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100%의 서열 상동성을 가지는 26개의 외막 단백질을 코딩함;
- [0025] (9) 1차원적 폴리악릴아미드 겔 전기영동에서 이중으로 나타나는(runs as a doublet) 2개의 외막 단백질을 발현함;
- [0026] (10) 9.1-9.3 pi, 가장 바람직하게는 9.2 pi를 가지는 2개의 외막 단백질을 발현함;
- [0027] (11) 전세포 추출물의 2차원 겔에서 표 11A에 나타난 적어도 5개, 적어도 10개 또는 적어도 15개의 단백질을 현저히 발현함;
- [0028] (12) 전세포 추출물의 2차원 겔에서 표 11B에 나타난 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 단백질을 현저히 발현함;
- [0029] (13) 전세포 추출물의 2차원 겔에서 표 11A에만 나타나고 표 11C에는 없는 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 7개 또는 적어도 10개의 단백질을 현저히 발현함;
- [0030] (14) 전세포 추출물의 2차원 겔에서 표 11A 및 표 11D에 나타난 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 단백질을 현저히 발현함.
- [0031] 본 명세서에서, "2차원 겔에서 단백질을 현저히 발현한다는 것"은 추출 및 MALDI 분석에 충분할 정도로 단백질이 2차원 겔의 한 지점에 존재한다는 것을 의미한다.
- [0032] 또한 본 발명은 COPD 환자 및 천식 환자에 대한 치료 요법을 제공한다.
- [0033] 특정 구현예에서, 천식의 치료 요법은 (1) 환자, 예를 들어 천식 증상을 나타내는 환자에서 (a) 타액에서 호중구 수준의 증가, (b) 가래 또는 타액에서 미생물의 존재, 및/또는 (c) NTHi에 대한 항체 특이성을 시험하는 단계, 및 (2) 1개, 2개 또는 3개 파라미터에 대해 양성으로 확인된 환자에게 본 발명의 백신을 투여하는 단계를

포함한다. 특정 구현예에서, 투여되는 백신은 본 발명의 1개, 2개 또는 그 이상의 NTHi 균주 및/또는 본 발명의 NTHi 균주의 면역원성 단편을 포함한다.

- [0034] 본 발명의 백신은 다가 백신, 더욱 바람직하게는, 모노박테리아 백신일 수 있다.
- [0035] 특정 구현예에서, 본 발명의 백신은 정제 형태일 수 있으며, 상기 정제는 상기 세포 집단 또는 상기 단편을 포함하는 코어와 상기 코어를 둘러싼 장용성 코팅을 포함한다.
- [0036] 본 발명의 백신에서, 코어의 중량은 400 mg 내지 500 mg이다.
- [0037] 본 발명의 백신에서, 사멸 박테리아 또는 막 단편은 상기 정제 코어 중량의 7.5% 내지 15%를 구성한다.
- [0038] 본 발명의 백신에서, 사멸 박테리아 또는 막 단편은 상기 정제 코어 중량의 약 10%를 구성한다.
- [0039] 본 발명의 백신에서, 상기 서브 장용성 코팅은 코어 중량의 2% 내지 3%이다.
- [0040] 본 발명의 백신에서, 상기 장용성 코팅은 코어 중량의 10% 내지 12%이다.
- [0041] 본 명세서에 포함된 임의의 문서, 법률, 물질, 장치, 문헌 등은 단지 본 발명의 내용을 기술하기 위한 목적으로 언급된다. 임의의 또는 모든 이러한 것들은 본 출원의 우선일 이전에 존재하였다는 이유로 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식이라는 것, 혹은 선행 문헌의 일부를 구성한다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0042] 본 발명의 특징 및 이점은 하기 기술될 상세한 설명에 의해 더욱 분명해질 것이다.

과제의 해결 수단

- [0043] 본 발명은 천식 및 COPD와 같은 폐질환 치료용 NTHi-기반 백신을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 백신의 효과를 얻기 위하여 환자가 NTHi에 감염될 필요는 없다. 따라서 일 측면에서 본 발명의 백신이 투여되는 환자는 NTHi에 감염되지 않거나, NTHi 감염을 지시하는 마커(예컨대, NTHi-특이적 항체)를 가지고 있지 않다. 다른 측면에서, 환자는 NTHi 감염에 양성이거나, NTHi 감염을 지시하는 마커를 가지고 있다.
- [0045] 특정 구현예에서, 본 발명의 백신은 NTHi 이외의 박테리아에 대해 비특이적 면역 반응을 나타낼 수 있으므로, 환자는 NTHi 이외의 박테리아 감염에 양성이거나, NTHi 이외의 박테리아 감염을 지시하는 마커를 가질 수 있다. 일 구현예로서, 박테리아는 스타필로코커스 아우레우스; 헤모필루스 인플루엔자의 피막형 균주; 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*); 에스케리치아 코로리(*Escherichia coli*); 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*); 마이코플라즈마 뉴모니에(*Mycoplasma pneumoniae*); 헤모필루스 파라인플루엔자; β-헤모라이틱 스트렙토코커스 spp.(β-Haemolytic *Streptococcus* spp.); α-헤모라이틱 스트렙토코커스 spp.(α-Haemolytic *Streptococcus* spp.); 슈도모나스 spp.(*Pseudomonas* spp.); 크렙시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*); 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*); 엔테로박테르 클로아케(*Enterobacter cloacae*); 클라미디아 뉴모니에(*Chlamydia pneumoniae*); 및 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*) 중 하나 이상이다.
- [0046] 본 발명의 백신은 임의의 적절한 포유동물 천식 모델에 투여될 수 있지만, 본 발명에 따라 백신이 투여되는 환자는 일반적으로 인간일 것이다.
- [0047] 본 발명의 백신이 투여되는 환자에 대한 추가적이고 대안적인 파라미터를 하기에 기술한다.
- [0048] 전통적인 천식 연구에서, 분리된 연구 그룹을 관리하며, 일반적으로는 명확히 확인된 천식 개체(예컨대, 전형적인 외인성 천식)는 다른 그룹들(예컨대, 흡연 관련 기도 질환군)로부터 격리되어, 다른 천식 환자군과 분리하여 확정된 천식 환자군에 대한 연구가 진행된다. 그러나 이러한 분리는 인공적인 분류화이므로, 하기 도식 1에 나타난 바와 같이 기도 질환의 스펙트럼으로 천식을 관찰하는 것이 더욱 현실적이다.



[0049]

[0050]

도식 1: 천식 질환의 스펙트럼

[0051]

천식의 상이한 임상 증상에 대한 다양한 관찰을 수행하였다. 간략히 다음과 같이 요약될 수 있다.

[0052]

- 흡입 항원(예컨대, 화분)에 대한 IgE 항체의 유도가 전형적인 알레르기성 천식을 유발함으로써, 알레르겐-특이적 IgE이 비만 세포에 결합하여, 비만 세포의 탈과립화 및 알레르기 증상을 일으키는 히스타민 등의 매개 물질의 유리가 일어난다.

[0053]

- 손상된 기도의 콜로니화와 간헐적인 바이러스 감염이 기관지에 대한 호중구 흐름을 일으킨다 (급성 기관지염) (일반적으로 천명 증상과 관련되며, 기관지의 "염증"을 동반하는 것으로 여겨짐).

[0054]

- 폐 손상을 일으키는 흡연이 개체를 기도 감염성으로 만들 수 있다.

[0055]

그러나 임상적으로 천식 진단을 받은 다수의 천식 환자들은 이러한 요소들이 '혼합'되어 있으며, 상이한 병원성 경로를 통하여 천식이 유발되고 이러한 경로들이 공존할 수 있다는 인식 하에, 상기 천식 질환의 스펙트럼은 조정될 수 있는 것으로 제안된다. 특히 이론에 제안되는 것은 아니나, 명백한 전형적인 알레르겐 과민증(예컨대, 집 먼지, 화분 등에 대한 IgE 항체의 음성 시험 및/또는 호산구 수의 증가)을 나타내지 않는 다수의 천식 환자에서 천명 증상의 주요 원인은, 호중구를 유도 및 활성화시키는 미생물의 능력과 연관되어, 콜로니화 및/또는 재현성 있는 노출 미생물에 대한 IgE 항체 매개 반응으로 인한 것으로 생각된다. 특히 미생물-기반 백신은 소 기도에 대한 미생물의 로딩을 감소시키고, 소위 "내인성 천식"에 대한 효과적인 치료법을 제공한다.

[0056]

다른 측면에서, 이론에 제안되는 것은 아니나, 본 발명의 백신 치료를 받을 수 있는 일부 환자는 박테리아에 대해 알레르기성이며, IgE 항체를 가진 것으로 생각된다. 또한 일부 개체에서, 박테리아와 천식 상태에 기여하는 다른 알레르겐에 대한 알레르기 상태 사이에 상호 작용이 있을 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서 특정 예로서, 본 발명의 백신은 알레르기성 천식 환자를 치료하는데 사용된다.

[0057]

더욱 광범위하게, 본 발명의 백신은, 타액에서 (호산구 수준의 증가를 수반하거나 증가 없이) 호중구 수준의 증가와 같이, 기도를 콜로니화 할 수 있는 미생물에 대한 노출의 지표가 되는 하나 이상의 파라미터, 예를 들어, 가래 또는 타액에서 미생물의 존재에 의해 확인되는 미생물 감염, 및/또는 미생물 특이적 항체를 나타내는 환자와, 흡연으로 인해 발생하는 기관지 손상(만성 폐쇄성 폐질환 (COPD)) 또는 만성 기관지염 (특히 천명성 환자) 환자에서 유익할 수 있다. 예를 들어, 기도가 손상된 환자는 병원성 미생물에 의해 감염/콜로니화되는 경향이 높다. 기도 손상은 통상 흡연의 결과로서 발생하지만, 외인성 천식이 또한 기도를 손상시킬 수 있다 (이후 기도 감염과 관련된 기침 및 가래가 발생함). 또한 본 발명은 조합된 기전을 가진 천식 환자(예컨대, 기도를 콜로니화하는 미생물에 대한 IgE 항체를 가진 아토피성 개체), 및 미생물 표적 백신에 노출됨에 따른 IgE 생성의 유도를 감소 또는 회피함으로써 발생하는 일반적인 천식 증상 및 천식의 치료에 유익할 수 있다.

[0058]

효소 결합 면역측정법 (ELISA) 또는 다른 면역측정법을 포함하는 임의의 공지된 적절한 분석 프로토콜을 사용하여, 혈액, 혈청, 혈장, 가래 또는 타액 시료에서의 항체 수준을 측정할 수 있다. 시험될 항체는 하나 이상의 IgA, IgM, IgG 및 IgE, 및 IgG1 및/또는 IgG3과 같은 이들의 아형으로부터 선택될 수 있다. 기도를 콜로니화하는 미생물에 특이적인 총 IgE 및/또는 IgE 항체는 일반적으로 가래 또는 타액 시료에서 측정될 것이다. 유사하게, 미생물 수/감염 수준을 측정하는데 당해 분야에 공지된 임의의 적절한 방법이 사용될 수 있다. 항체 수준, 호중구 수준 및 NTHi 수는 전형적인 외인성 천식 (예컨대, 호산구성 및/또는 과민성을 보임) 유래의 기준 수준, 또는 예를 들어, 비천식성 대조군 또는 다른 적절한 기준 군과 비교할 수 있다. 천식 군을 구별하기 위한 통계적 방법이 예를 들어, Simpson et al, 2006, Respirology 11:54-61에 기재되어 있다.

[0059]

특정 측면에서, 본 발명의 백신이 투여되는 환자는 COPD 및/또는 만성 기관지염 및 폐기종과 같은 COPD 관련 증상을 보이거나 보이지 않을 수 있다.

[0060]

COPD는 점차적인 폐 기능의 손상을 특징으로 하는 진행성 기도 질환이다. 만성 기관지염 및 폐기종을 동반하는

COPD 환자는 질환의 악화 기간 중에 종종 입원과 응급 처치를 필요로 한다. COPD는, 환자가 숨을 내쉴 때 폐를 통한 공기흐름 속도의 지속적인 감소로 정의되는 만성 기류 폐쇄를 유발한다. 천명 및 호흡 곤란과 같은 증상은, 기관지 평활근 경련, 염증 및 분비 증가를 역전시켜, 기류 폐쇄가 감소되면 경감된다.

- [0061] 따라서 특정 예로서, 본 발명의 백신이 투여될 환자는, 다음 증상 중 하나 이상을 가질 수 있다: 만성 기관지염, 폐기종, 만성 기침, 과도한 가래 생성, 혈액 저산소 농도, 종종 장애성 호흡곤란, 폐를 통한 기류 감소, 기관지 평활근 경련, 기관지 염증, 및 기관지 분비 증가 (점액 플러그(mucus plugs) 포함).
- [0062] 종종 COPD는 일반적으로 2가지 혈청형인 폐기종형(pink puffer)과 만성기관지염형(blue bloater)으로 분류된다. 최대 진전된 COPD 환자는 이 2가지 혈청형을 모두 가진다. 폐기종형은 청색증 또는 부종 없이 입술을 오므로 호흡(pursed-lip breathing)하는 천식성, 원통형 흉곽(barrel-chested)의 폐기종성 환자이다. 통상 그러한 환자는 흉곽 외 근육을 사용하여, 호흡하고 최소한의 가래를 생성하며 매일의 호흡 곤란 정도가 거의 변동되지 않는다. 횡경막 운동(Diaphragmatic excursion)이 감소하고, 숨소리와 심장 소리가 멀어진다. 노인은 통상 폐 합병증이 증가하고 폐의 잔류용적이 커지기 때문에 원통형 흉곽은 비특이적이다. 만성기관지염형은 일반적으로 과체중이며, 청색증을 동반하고, 부종성이며, 만성적인 습성 기침(productive cough)을 가진다. 만성기관지염형은 종종 폐성심(cor pulmonale)을 동반하여 적절히 치료하지 않으면 신속히 사망에 이를 수 있으므로, 노인성 만성기관지염형은 드물다. 특정 예로서, 본 발명의 백신이 투여되는 환자는 폐기종형 및/또는 만성기관지염형의 특성을 나타낸다.
- [0063] 만성 저산소증 (체내 충분한 혈류에도 불구하고 체내 산소 공급이 감소되는 증상), 고혈압 및 좌심실 비대(left ventricular hypertrophy)가 COPD의 전조가 되거나, COPD와 동시에 발생하는 관련 증상들이다. 따라서 특정 예로서, 본 발명의 백신이 투여되는 환자는 만성 저산소증, 고혈압 및/또는 좌심실 비대를 가진다.
- [0064] 낭포성 섬유증(Cystic fibrosis)은 폐용량의 점진적 감소 및 기관지 확장증의 원인이 되는 폐쇄성 폐질환의 일종이다. 따라서 특정 예로서, 본 발명의 백신이 투여되는 환자는 낭포성 섬유증을 가질 수 있다.
- [0065] 특정 예로, 환자는 COPD 관련 유전자 또는 기타 마커에 양성이다(예컨대, 각각 US 20080108079 A1 및 US 20080044843 A1 참조, 본 문헌들은 원용에 의해 그 전문이 본 명세서에 포함됨). 하나 이상의 유전자 또는 마커에 양성인 환자는 COPD 증상을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다; 즉, 본 발명의 백신은 COPD 증상 발현 이전 또는 이후에 투여될 수 있다.
- [0066] 특정 예로서, 본 발명의 백신이 투여되는 환자는 천식을 앓지 않는다. 특이적 구현예에서, 환자는 외인성 천식을 가지지 않는다. 다른 특이적 구현예에서, 환자는 내인성 천식을 가지지 않는다.
- [0067] 본 발명에 따른 천식의 치료는, 임의의 임상 단계에서 임의의 형태의 천식 또는 임상 증상을 가지는 것으로 진단된 환자의 치료; 천식 증상 또는 징후의 개시 또는 진화 또는 심화 또는 악화의 지연; 야간 및/또는 주간 천식 발작의 중증도의 저해 및/또는 완화; 폐용량의 개선; 천식성 환자의 폐용량의 저하 방지; 불리한 악화의 방지 또는 제한; 천식 증상으로 인한 입원의 방지 또는 제한; 및/또는 항생제, 스테로이드제, 기관지 확장제 또는 기타 의약품의 필요성의 경감 또는 제한을 포함한다.
- [0068] 유리하게도, 본 발명의 하나 이상의 구현예에 따라 백신을 투여하면, 환자에서 IgE 항체가 감소되고/되거나 천식 (예컨대, 내인성 또는 호중구성 천식) 증상 또는 중증도가 경감될 수 있다. 본 발명에 따른 COPD 치료는, 임의의 임상 단계에서 임의의 형태의 COPD 또는 임상 증상을 가지는 것으로 진단된 환자의 치료; COPD 증상 또는 징후의 개시 또는 진화 또는 심화 또는 악화의 지연; 천명 및/또는 호흡 곤란 에피소드의 중증도의 저해 및/또는 완화; 폐용량의 개선; 폐용량의 저하 방지; 불리한 악화의 방지 또는 제한; COPD 증상으로 인한 입원의 방지 또는 제한; 및/또는 항생제, 스테로이드제, 기관지 확장제 또는 기타 의약품의 필요성의 경감 또는 제한을 포함한다.
- [0069] 백신은 미생물 감염에 대해 효과적인 면역 반응을 일으키기에 적절한 임의의 치료법에 따라 투여될 수 있다. 본 발명의 백신은 원하거나 필요할 때마다, 단회 용량으로 투여될 수 있으며, 최초 투여 후, 몇 일, 몇 주, 몇 달 또는 몇 년 단위로 추가 접종될 수 있다.
- [0070] 예로서, 백신의 단회 용량은 매년 초겨울에 한번씩 투여될 수 있다. 선택적으로 백신의 "추가 접종(booster)" 이 수주 또는 수개월 간격으로 투여될 수 있다. 대안적으로 NTHi와 같이 기도를 콜로니화할 수 있는 미생물에 의한 감염 및/또는 콜로니화에 대한 효과적인 면역 반응을 일으키기 위하여, 수주에 걸쳐서 수회의 백신 접종이 이루어질 수 있다.

- [0071] 환자에게 투여되는 각 용량은 단위 또는 그 이상 또는 그 이하의 투여량으로 이루어질 수 있다 (하기 기술됨). 치료를 위해 효과적인 특정 투여량은 예컨대, 백신의 면역원성 성분 (하기 기술), 환자의 체중 및 일반적인 건강 상태, 임상상의 판단, 및 백신의 특성 및 제안된 투여 형태 (예컨대, 캡슐, 산제, 액제, 에어로졸, 정제, 장용성 코팅 정제 등)에 따라 달라질 수 있다.
- [0072] 본 발명의 백신은 예컨대, 피하, 정맥내, 근육내 또는 피내를 포함하는 원하는 임의의 투여 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 점막 투여가 바람직하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 점막 투여 경로는 경구, 직장 및 경피 투여를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 점막 투여 제형은 하기 기술된 다양한 형태로 적절히 사용된다. 투여 경로는 치료 기간 중에 달라질 수 있다.
- [0073] 본 발명의 방법에 사용되는 백신은 일반적으로 본 발명에 따른 전세포 사멸 또는 불활성 (예컨대, 약독화된) NTHi 분리주 (예컨대, 포르말린으로 사멸된)를 포함할 수 있다. 그러나 전세포 사멸 NTHi로 F대신하여, 미생물의 세포 외막 및/또는 표면 항원을 포함하거나 이로 구성된 용해성 또는 미립자(particulate) 항원이 또한 사용될 수 있다.
- [0074] 용해성 및/또는 미립자 항원은 선택된 사멸 또는 생존 NTHi 분리주를 파괴하여, 제조될 수 있다. 그 후 백신에 사용되는 단편은 원심분리, 여과 및/또는 당해 분야에 공지된 적절한 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 초음파 또는 적절한 계면활성제와 교반을 이용한 용해, 및 이들 기술의 조합을 포함하는, 적절한 수준으로 세포를 파괴하기 위한 임의의 방법이 이용될 수 있다. 초음파가 이용되는 경우, 특정 크기 또는 범위를 가진 용해성 및/또는 미립자 항원의 생성 또는 세포 파괴를 필요로 하는 정도로 얻기 위하여, 분리주가 다수의 초음파 단계를 거치도록 할 수 있다.
- [0075] 특정 구현예에서, 면역원성 성분은 본 발명의 NTHi 중의 사멸 세포 및/또는 면역원성 단편이다. 베타-락타마아제 유전자의 결핍이 본 발명의 NTHi 균주의 선택적인 특징 중 하나이다. 베타-락타마아제는 일부 박테리아에 의해 생성되는 효소로서, 페니실린, 세팔로스포린, 세파마이신, 에르타페넴 및 카르바페넴과 같은 베타-락탐계 항생 물질에 대한 내성의 원인이 된다. 베타-락탐계 항생 물질은 통상 광범위한 스펙트럼의 그람 양성 및 그람 음성 박테리아를 치료하는데 사용된다. 베타-락타마아제의 발현은 항생제 내성을 일으킬 수 있으므로, 베타-락타마아제 유전자의 존재는 NTHi와 같은 사멸 병원체의 제조 및 투여에 바람직하지 못하다. 베타-락타마아제 유전자가 결핍되면, 환자에서 유해하거나 제조 중에 필요한 경우, 유기체를 베타-락탐계 항생 물질로 조절할 수 있다. 2008년 8월 13일자로 부다페스트 조약에 따라 호주 멜버른 소재의 국립 측정 연구소(National Measurement Institute)에 수탁 번호 V08/021002로 기탁된, 비피막형 H. 인플루엔자 분리주 HI-164가 본 발명의 백신에 사용되기에 특히 적합하다. 다른 적절한 균주로는 2008년 8월 13일자로 부다페스트 조약에 따라 호주 멜버른 소재의 국립 측정 연구소에 수탁 번호 V08/021003로 기탁된, 비피막형 H. 인플루엔자 분리주 Hi- 167가 있다.
- [0076] 하나 이상의 예로, 선택된 NTHi 균주의 세포 외막 단편 또는 막 단백질이 본 발명의 백신의 면역원성 성분으로서 사용될 수 있다.
- [0077] NTHi의 면역원성 단백질 및 펩타이드를 하기 기술한다. 특정 구현예로서, NTHi 외막 단백질 ("OMP") 단편 또는 OMP 단백질이 본 발명의 백신의 면역원성 성분으로 사용된다. NTHi OMP는 OMP P6, 즉, 인간 살균 항체의 표적으로, 인간과 동물 모델 모두에서 방어를 유도하는, 매우 잘 보존된(highly conserved) 16-kDa 리포단백질을 포함한다 (Nelson et al, 1988, Infect. Immun. 56: 128-134). 만성 폐쇄성 폐질환 (COPD)에서, OMP P6는 NTHi 감염으로부터의 상대적인 방어와 관련된 림프구 증식성 반응을 일으키는 것으로 확인되었다 (Abe et al, 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 165: 967-71). 따라서, OMP P6 또는 임의의 다른 적절한 외막 NTHi 단백질, 폴리펩타이드 (예컨대, P2, P4 및 P26) 또는 상기 단백질의 항원성 펩타이드가 분리 형태나 정제 형태 중 하나로, 또는 OMP 단편 등의 세포 분획의 일성분으로서, 본 발명의 백신의 면역원성 성분으로 사용되기에 적절할 수 있다.
- [0078] 특정 측면에서, 면역원성 단백질 또는 펩타이드는 OMP P26 또는 그의 면역원성 단편이다. 다른 측면에서, 면역원성 단백질 또는 펩타이드는 OMP P2 또는 그의 면역원성 단편이다. 특정 예로, 백신은 (1) NTHI-164의 OMP P26 단백질과 적어도 99% 또는 적어도 99.5%의 서열 상동성을 가지는 OMP P26 단백질 또는 면역원성 단편 및/또는 (2) NTHI-164의 OMP P2 단백질과 적어도 99% 또는 적어도 99.5%의 서열 상동성을 가지는 OMP P2 단백질 또는 그의 면역원성 단편을 포함한다.
- [0079] 본 발명의 백신은 통상 선택된 면역원성 성분의 세포를 (즉, NTHi 분리주 및/또는 세포 분획물 및/또는 분리되

거나 정제된 단백질 및/또는 펩타이드) 백신 조성물의 약 0.1% 내지 100% w/w, 더욱 바람직하게는 백신 조성물의 1% 내지 50% 양으로 포함할 수 있다.

- [0080] 전세포 사멸 백신의 경우, 단위 용량은 통상 약 10^9 내지 약 10^{12} 의 사멸 세포, 더욱 바람직하게는 약 10^9 내지 약 10^{11} 의 사멸 세포, 가장 바람직하게는 약 10^{10} 내지 약 10^{11} 의 사멸 세포 범위이다.
- [0081] NTHi의 세포 단편으로 만들어진 백신의 경우, 단위 용량은 약 10^9 내지 약 10^{14} 의 세포, 더욱 바람직하게는 약 10^{10} 내지 약 10^{13} 의 세포, 가장 바람직하게는 약 10^{10} 내지 약 10^{12} 의 세포로 분획화될 수 있다.
- [0082] 분리 또는 정제 단백질 및 펩타이드 단편을 포함하는 백신의 경우, 단위 용량은 통상 50-75 mg, 75-100 mg, 100-125 mg, 125-150 mg, 150-175 mg, 175-200 mg 또는 그 이상이다.
- [0083] 각 그룹의 동물을 미생물로 감염시키기 전에, 상이한 그룹의 시험 포유동물에 대해서 상이한 용량으로 투여하고, 병원체를 만족스러운 정도로 제거하는데 필요로 하는 투여량 수준을 결정하여, 백신의 최적 투여량을 결정할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 백신은 또한 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 보강제를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 보강제의 예를 하기에 기술한다. 반드시 그러한 것은 아니나 일반적으로, 바람직한 경구용 백신 제제는 보강제를 포함하지 않는다.
- [0085] 본 발명의 백신 제제를 제조하기 위한 실제 방법은 공지되어 있거나 당업자에게 자명하며, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.(1980) 등의 문헌에 더욱 상세히 설명되어 있다.
- [0086] 본 발명의 백신은 일반적으로 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 조성물로서 제공된다. 다양한 약제학적으로 허용되는 담체가 당해 분야에 공지되어 있다. 본 명세서에서, "약제학적으로 허용되는 담체"는 조성물의 활성 성분과 조합될 때, 성분이 생물학적 활성을 유지하고, 바람직하게는 개체의 면역계에 파괴적인 반응을 일으키지 않는 임의의 물질을 포함한다.
- [0087] 일반적으로, 백신은 과립제, 정제, 환제, 좌제, 캡슐제 (예컨대, 경구 투여에 적합함), 마이크로비드, 마이크로스페이, 리포솜, 현탁제, 연고제, 로션제 등과 같은 다양한 형태로 제조될 수 있다. 백신 그 자체는 생리적으로 허용되는 버퍼 또는 액체를 사용하여 용시 용해(reconstituted)되는 냉동 건조 또는 동결 건조 백신일 수 있다. 백신은 또한 고결방지제(항-caking agents), 티메로살 등 또는 제안된 투여 제형에 적절한 보존제, 아미노산 및 당 부분 등의 안정화제, 슈크로스, 락토오스 또는 사카린 등의 감미제, 계면활성제, 수산화나트륨, 염산, 제1 인산나트륨 및/또는 제2 인산나트륨 등의 pH 완충제 및 pH 조절제, 생리 식염수, 용매 및 분산매 등의 약제학적으로 허용되는 담체 및 등장성 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0088] 백신은 바람직하게는 예를 들어 동결건조 캡슐 또는 정제 형태로, 경구 투여용으로 제공된다. 본 발명의 백신의 면역원성 성분은 경구 투여시 바람직하게는 소화로부터 보호되는 것으로 여겨진다. 이것은 면역원성 성분을 리포솜 등의 적절한 저항성 담체 내부나, 장용성 코팅 내부에 혼합 또는 패키징함으로써 달성될 수 있다. 본 제제는 방출 제어 제형 또는 서방성 제형으로 제공될 수 있다.
- [0089] 바람직하게는, 경구 제제는 캡슐 또는 정제 형태이다. 상기 캡슐 및 정제는 예를 들어, 유드라게이트(Eudragate) "S" (상품명), 유드라게이트 "L" (상품명), 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 프탈레이트 또는 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스.를 포함하는 장용성 코팅으로 제공될 수 있다. 캡슐 또는 정제를 체제화하기에 적합한 다른 담체는 결합제 (예컨대, 젤라틴화전(pregelatinized) 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스); 충전제 (예컨대, 락토오스, 미세결정 셀룰로오스 또는 칼슘 하이드록젠 포스페이트); 활택제 (예컨대, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 또는 실리카); 붕해제 (예컨대, 감자 전분 또는 소듐 스타치 글리콜레이트); 및 습윤제 (예컨대, 소듐 라우릴 설페이트). 정제는 당해 분야에 공지된 방법에 따라 코팅될 수 있다. 경구 투여용 제제는 면역원성 성분의 방출이 제어되도록 적절히 체제화될 수 있다.
- [0090] 이들 캡슐 및 정제는 그 자체로 또는 교대로 사용될 수 있으며, 예컨대 현탁제로서, 투여 직전에 동결건조 물질을 용해시켜 사용할 수 있다.
- [0091] 캡슐 및 정제의 대안으로서, 경구용 백신은 액제, 예를 들어, 용액제, 시럽제, 또는 현탁제일 수 있거나, 사용 전에 물이나 다른 적절한 비히클로 용시 용해되는 의약품으로서 제공될 수 있다. 상기 액제는 현탁화제 (예컨

대, 소르비톨 시럽, 셀룰로오스 유도체 또는 수소화(hydrogenated) 식용 지방); 유화제 (예컨대, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클 (예컨대, 아몬드유, 오일 에스테르 또는 정제(fractionated) 식물성 오일); 및 보존제 (예컨대, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 같은 약제학적으로 허용되는 첨가제와 함께, 통상의 수단에 의하여 제조될 수 있다.

- [0092] 위산도로부터 백신의 면역원성 성분을 보호하기 위하여, 바람직하게는 백신의 투여 전에 소듐 비카르보네이트 제제를 투여할 수 있다.
- [0093] 백신은 또한 흡입제 또는 주사제로 제형화될 수 있다.
- [0094] 통상의 매질 또는 제제가 본 발명의 백신의 면역원성 성분 또는 제안된 투여 형태와 양립할 수 없는 경우를 제외하고는, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 백신의 용도가 포함된다.
- [0095] 예를 들어, 프로바이오틱 미생물, 단편 및 그의 생물학적 생성물, 및 적절한 사이토카인을 포함하는, 면역 반응을 부스팅하기 위한 보충적 활성제가 백신에 포함될 수 있다.
- [0096] 본 발명의 백신은 선택적으로 하나 이상의 보강제를 포함한다. 적절한 보강제는 후술한다.
- [0097] 적절한 보강제는 무기염 보강제 또는 무기염 겔 보강제를 포함한다. 상기 무기염 및 무기염 겔 보강제는 알루미늄 하이드록사이드 (ALHYDROGEL, REHYDRAGEL), 알루미늄 포스페이트 겔, 알루미늄 하이드록시포스페이트 (ADJUPHOS), 및 칼슘 포스페이트를 포함하나, 이에 제한하지 않는다. 기타 적절한 보강제로는, 면역자극성 보강제를 포함한다. 그러한 분류의 보강제는 사이토카인 (예컨대, 인터루킨-2, 인터루킨-7, 인터루킨-12, 파립구-마크로파지 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터페론- γ , 인터루킨-1 β (IL-1 β), 및 IL-1 (3 펩타이드 또는 스크라보 (ScIavo) 펩타이드), 사이토카인-함유 리포솜, 트리테르페노이드 글리코사이드 또는 사포닌 (예컨대, 상품명 STIMULON, ISCOPREP로 시판 중인 Qui1A 및 QS-21), 무라밀 디펩티드(MDP) 유도체, 예컨대, N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (상품명 TERMURTIDE로 시판 중인 트레오닐-MDP), GMDP, N-아세틸-노르-무라밀-L-알라닐-D-이소글루타민, N-아세틸무라밀-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민, 무라밀 트리펩타이드 포스페이티딜에탄올아민 (MTP-PE), 비메틸화 (unmethylated) CpG 다이뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드, 예컨대 박테리아 DNA 및 그의 단편, LPS, 모노포스포릴 리피드 A (상품명 MPL의 3D-MLAsold), 및 포스포스파젠을 포함하나, 이에 제한하지 않는다. 또 다른 적절한 보강제로는, 유화제, 예컨대, 프로인트 완전(Freund's Complete) 보강제, 프로인트 불완전 보강제, SAF 및 MF59와 같은 스쿠알렌 또는 스쿠알란 수중유 보강제, 예컨대, L-121 (폴리 옥시프로필렌/폴리옥시 에틸렌) (상품명 PLURONIC L-121)와 같은 블록 코폴리머와 함께 제조된 것, 리포솜, 비로솜(Virosome), 코클리에이트 (cochleate), 및 면역 자극 복합제 (상품명 ISCOM로 시판 중임)를 포함하나 이에 제한되지 않는 미립자 보강제를 포함한다. 또 다른 적절한 보강제는 생분해성 및 생체적합성 폴리에스테르, 락트산(PLA) 및 글리콜산(PGA)의 호모- 및 코폴리머, 폴리(락타이드-코-글리콜라이드) (PLGA) 마이크로미립자, 미립자와 자체 회합된 폴리머 (폴록사머 입자), 용해성 폴리머 (폴리포스파젠) 및 제조할 단백질 미립자와 같은 바이러스 유사 입자 (VLPs), 예컨대, B형 간염 표면 항원 (HbsAg)을 포함하나 이에 제한하지 않는 마이크로미립자 보강제이다.
- [0098] 바람직한 유효의 보강제는 E. coli 유래의 열민감성(heat-labile) 외독소(LT), 콜레라 홀로톡신(holotoxin) (CT) 및 비브리오 콜레라 유래의 콜레라 독신 B 서브유닛 (CTB), 점막 독소 (예컨대, LTK63 및 LTR72), 마이크로입자, 및 중합 리포솜을 포함하나 이에 제한되지 않는 점막 보강제이다.
- [0099] 특정 예로, 보강제는 Th1 면역 반응을 활성화시키는 보강제이다. 비록 Th2 면역 반응을 활성화시키는 보강제가 본 발명의 범위에 포함되지만, 바람직하게는, 보강제는 Th2 면역 반응을 활성화시키지 않는다.
- [0100] 본 발명의 백신은 적절한 형태로 제형화될 수 있다. 통상 본 발명의 백신은 경구, 경비, 비강인두 (nasopharyngeally), 비경구, 장내, 위내, 국소, 경피, 피하, 근육내로, 정제, 고형제, 산제, 액제, 에어로졸제 형태로서, 추가적인 담체와 함께 또는 없이 국소적으로 또는 전신적으로 투여될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 백신은 건조 산제 또는 액제 형태로, 캡슐 또는 정제로서 투여될 수 있다. 예를 들어, 주사로 (예컨대, 피하 또는 정맥내), 단위 투여형태를 경구로 (예컨대, 정제, 캡슐제 또는 액제 형태), 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다.
- [0102] 특정 예로, 본 발명의 백신은 면역원성 성분이 림프조직, 더욱 바람직하게는 2차 림프조직, 가장 바람직하게는 점막-관련 림프조직에 도달할 수 있는 방식으로 투여된다. 특정 구현예에서, 점막-관련 림프조직은 BALT (기관지-관련 림프조직), NALT (코-관련 림프조직), LALT (후두-관련 림프조직), 또는 GALT (소화관-관련 림프조직).

가장 바람직하게는, 백신의 면역원성 성분이, 회장 하부 및 환자의 소화관 내 다른 소화관-관련 림프조직 (GALT)에서 현저히 확인되는 림프조직의 집합체인 페이에르판에 송달되도록 장용성 코팅정 형태로 투여된다.

- [0103] 본 발명의 백신을 사용한 조합 방법이 후술된다. 본 발명의 조합 방법은 적어도 2개의 제제, 즉, 본 발명에 따라 미생물을 표적으로 하는 백신인 제1 제제, 및 치료제인 제2 제제를 환자에 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 조합 치료법에 의하면, 더욱 큰 상승 효과를 발휘하여, 백신이나 제2 치료제가 단독으로는 천식 치료에 효과적이지 않은 양으로 투여되는 경우에도 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0104] 본 발명의 방법에서, 백신 및 제2 치료제는 동시에 또는 연속하여 투여될 수 있다. 본 명세서에서, 백신 및 제2 치료제가 같은 날, 예를 들어 동시에, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 시간 간격으로 환자에 투여되는 경우에 동시에 투여된 것으로 본다. 이와는 대조적으로, 백신 및 제2 치료제가 다른 날, 예를 들어, 1일, 2일 또는 3일, 1주, 2주 간격으로 또는 매달 투여되는 경우에 연속적으로 투여된 것으로 본다. 본 발명의 방법에서, 백신을 제2 치료제의 투여 전 또는 후에 투여할 수 있다.
- [0105] 비제한적인 예로서, 백신 및 제2 치료제는 일정 기간 동시에 투여된 후, 2차 투여 기간 중에 백신 및 제2 치료제를 교대로 투여할 수 있다.
- [0106] 백신 및 제2 치료제를 동시에 투여하면 잠재적인 상승 효과를 나타내기 때문에, 하나 또는 두 제제가 단독으로 투여되는 경우에 천식 또는 COPD의 치료에 유효하지 않은 용량으로 백신 및 제2 치료제가 투여될 수 있다.
- [0107] 지속적으로 천식을 앓고 있는 대부분의 사람들은 휴대용 흡입기로 투여되는, 단기간 진정(quick-relief) 약물 및 장기간 조절 약물의 조합을 이용한다. 대기중 알레르겐, 예컨대, 화분 또는 애완동물 비듬에 의해 촉발되는 천식 증상은 알레르기 약물을 사용하여 치료될 수 있다.
- [0108] 따라서 적절한 제2 치료제는 장기간 조절 약물, 단기간 진정 약물, 및 알레르기 약물을 포함한다. 장기간 조절 약물의 예는, (1) 플루티카손 (예컨대, Flovent Diskus™), 부데소니드(budesonide) (예컨대, Pulmicort™), 트리암시놀론 (예컨대, Azmacort™), 플루니솔리드(flunisolide) (예컨대, Aerobid™), 및 베클로메타손 (예컨대, Qvar™)과 같은 흡입 코르티코스테로이드; (2) 살메테롤(salmeterol) (예컨대, Serevent Diskus™) 및 포르모테롤(formoterol) (예컨대, Foradil Aerolizer™, Oxis™, Performist™ 및 Brovana™)과 같은 지속형 베타-2 작용제 (LABAs); (3) 티오토르피움(tiotropium) (예컨대, Spiriva™) 및 이프라트로피움(ipratropium) (예컨대, Atrovent™)과 같은 지속형 무스카린성 길항제; (4) 몬테루카스트(montelukast) (예컨대, Singulair™), 자필루카스트(zafirlukast) (예컨대, Accolate™) 및 질루톤(zileuton) (예컨대, Zylflo CR™)과 같은 류코트리엔 조절제(leukotriene modifier); (5) 크로몰린(cromolyn) (예컨대, Intal™) 및 네도크로밀(nedocromil) (예컨대, Tilade™)과 같은 비만 세포 저해제; (7) 테오필린을 포함하나 이에 제한하지 않는다.
- [0109] 단기간 진정 약물의 예는 (1) 알부테롤 또는 알부테롤 설페이트 (예컨대, 상품명 Xopenex™ 및 Ventolin™로 시판 중임)와 같은 속효성(short-acting) 베타-2 작용제, (2) 속효성 무스카린성 길항제, 및 (3) 프레드니손(prednisone), 메틸프레드니솔론(methylprednisolone), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate) (예컨대, 상품명 Asmanex™로 시판 중임) 및 시클레소니드(ciclesonide) (예컨대, Aerobid™/Alvesco™)와 같은 경구 및 정맥내 코르티코스테로이드를 포함한다.
- [0110] 알레르기 약물의 예는 (1) 면역치료제, (2) 항히스타민제 (예컨대, Claritin 및 Zyrtec) 및 (3) 오말리주맵(omalizumab) (Xolair™)과 같은 항-IgE 모노클로날 항체를 포함한다. 진해거담제의 예로, Bronchitol™ (만니톨 흡입제) 및 Mucomyst™ (아세틸시스테인 흡입제)를 포함하나, 이에 제한하지 않는다.
- [0111] 특정 예로, 제2 치료제 자체는 조합제, 즉, 하나 이상의 활성 성분을 포함하는 제제이다. 적절한 조합제의 예로는, Symbicort™ (포르모테롤 및 부데소니드의 조합); Combivent™ (아트로벤트 및 알부테롤의 조합); 및 Advair™ 또는 Seretide™ (살메테롤 및 플루티카손의 조합); 모메타손(mometasone)과, 인다카테롤(indacaterol)과 같은 지속형 베타-아드레날린 수용체 작용제의 조합; 및 모메타손과, 포르모테롤(formoterol)과 같은 지속형 베타-2 작용제의 조합을 포함한다.
- [0112] 기관지 확장제 - 기도 개방을 도와주는 약물이 COPD 치료에 중요하다. 기관지 확장제는 통상 정량식(metered dose) 흡입기 (MDI), 건조 파우더 흡입기 (DPI), 또는 분무기를 사용하여, 흡입 형태로 투여된다. 구강보다는 폐로 약물의 정확한 양을 전달하는데 적절한 흡입기를 사용하는 것이 중요하다. COPD 치료를 위해, 전술된 임의의 기관지 확장제가 본 발명의 NTHi 백신과 조합하여 사용될 수 있다.

- [0113] 백신 - 특정 예로, 제2 치료제는 특정 형태의 폐렴의 예방을 도와주는 폐렴(pneumococcal) 백신, 또는 일반적으로 인플루엔자 시즌 전에, 통상 늦가을이나 초겨울에 투여되는 인플루엔자 백신과 같은 백신이다.
- [0114] 항바이러스제 - 인플루엔자에 감염된 COPD 환자의 경우, 항바이러스 약물을 처방할 수 있다. 항바이러스 약물은 인플루엔자 백신을 투여받지 않았고 인플루엔자 감염의 위험이 높은 COPD 환자에서 추천될 수 있다. 따라서 특정 예로, 제2 치료제는 항바이러스제이다.
- [0115] 항생제 - 항생제는 COPD 악화 증상을 보이는 박테리아 호흡기 감염 환자에서 유익하다. 임상의는 가래 (폐 내 가래) 분석을 요청하여 특정 상황에서 항생제가 필요한지 여부를 결정할 수 있다. 따라서 특정 예로 제2 치료제는 항생제이다.
- [0116] 산소 - 진행성(advanced) COPD 환자는 혈중에 산소 농도가 낮을 수 있다. 저산소혈증으로 알려진 이러한 상태는, 환자가 호흡 곤란을 느끼지 않거나 다른 증상을 보이지 않는 경우에도 나타날 수 있다. 산소 농도는 손가락 위에 설치되는 장치(펄스 옥시미터(pulse oximeter)) 또는 혈액 테스트(동맥혈 가스분석)를 이용하여 측정될 수 있다. 저산소혈증 환자는 산소 치료법을 통하여, 혈중 산소 농도가 감소되는 정도에 따라 생존률 및 삶의 질을 향상시킬 수 있다. 따라서 특정 예로 제2 치료제는 산소이다.
- [0117] 중증 알파-1-항트립신 결핍증에 대한 강화요법(AUGMENTATION THERAPY) - COPD에 원인을 제공하는 알파-1-항트립신 결핍증 환자는 기증된 혼주 혈액(pooled blood)으로부터 제조된 정제 알파-1-항트립신을 사용하여 치료될 수 있다. 따라서 특정 예로 제2 치료제는 알파-1-항트립신이다.
- [0118] 다른 치료법 - 어떤 COPD 환자는 비침습적 호흡 보조(ventilatory support) (증상 개선을 위해 특수 마스크와 호흡기를 사용), 항불안제 또는 항우울제, 또는 모르핀 유사 약물을 포함하는 기타 치료법을 이용하여, 호흡 곤란을 경감시킨다. 상기 치료법은 본 발명의 제2 치료제를 구성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0119] 도 1은 다양한 부로스 배지에서 참조 균주 및 NTHI-164의 성장 곡선을 도시한 것이다.
- 도 2는 웅성 Dard Agouti 래트에서 NTHI-164의 다양한 백신 접종으로부터 확인되는 박테리아 제거율 데이터를 도시한 것이다.
- 도 3A 및 3B는 NTHI-164의 용량을 달리하여 백신 접종된 마우스에서 평균 박테리아 수준을 도시한 것이다.
- 도 4는 NTHI-164로 백신 접종된 래트 유래의 장간막 림프절 림프구의 평균 증식 반응을 도시한 것이다.
- 도 5A-5C는 HI-164로 백신 접종된 인간 개체에서 림프구 증식을 도시한 것이다. 도 5A는 1 μg HI-164 항원에 대한 시험관내 말초혈관 림프구 증식을 나타낸 것이다. 도 5B는 10 μg HI-164 항원에 대한 시험관내 말초혈관 림프구 증식을 나타낸 것이다. 도 5C는 PHA에 대한 시험관내 말초혈관 림프구 증식을 나타낸 것이다.
- 도 6은 HI-164로 백신 접종된 인간 개체에서 타액 리소자임(평균 ± SEM)을 도시한 것이다.
- 도 7은 인간 개체에서 혈청 IgG 수준에 대한 HI-164 백신 접종의 효과를 보여준다.
- 도 8은 위약 투여된 인간 시험군의 가글에서 분리된 NTHi의 평균수를 보여주는 그래프이다.
- 도 9는 인간의 위약 군과 경구 NTHi 사백신 접종 치료군에서 혈청 내 NTHi-특이적 IgG 수준을 보여주는 그래프이다.
- 도 10은 인간의 위약 군과 경구 NTHi 사백신 접종 치료군에서 타액 내 NTHi-특이적 IgG 수준을 보여주는 그래프이다.
- 도 11은 위약 접종 군과 비교하여, HI-1640V 접종 후의 가래 내 총 박테리아 분리주의 표이다.
- 도 12는 위약 접종 군과 비교하여, HI-1640V 접종 후의 가래 내 특이적 박테리아 분리주의 표이다.
- 도 13은 제품 Broncostat™(PCT 출원 제W086/05691호에 개시)과 비교하여, HI-1640V의 효능을 비교한 것이다.
- 도 14는 HI-164 및 Hi-166 추출물의 1차원적 겔 전기영동 결과를 나타낸 것이다.
- 도 15는 다양한 헤모필루스 인플루엔자 분리주/균주 추출물의 1차원적 겔 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

도 16A-16D는 다양한 헤모필루스 인플루엔자 분리주/균주의 2차원적 겔 전기영동 결과를 나타낸 것이다. 도 16A. HI-164, 플레이트 성장물(플레이트 grown prep) 2. 도 16B. Hi- 166, 플레이트 성장물 1. 도 16C. Hi- 167, 플레이트 성장물 1. 도 16D. HI-164, 외막 단백질 (OMP) 생성물.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1; 비피막형 H. 인플루엔자 균주 HI-164의 선별

1.1 배경설명

균주 ID 164, 165, 167 및 168를 포함하는 많은 수의 NTHi 분리주를 호주의 주캐슬에 위치한 존 헌터 병원의 호흡기 클리닉을 다니는 20명의 환자로부터 얻었다. 분리주 및 또 다른 연구용 분리주들 (균주 NTHi- 166) 성장 조건, 생물형, 혈청형, B 캡슐 유전자의 존재 및 베타 락타마아제 유전자의 존재에 따라서 구분하였다. 그 결과는 하기 표 1에 나와있다.

표 1: 상이한 NTHi 분리주의 성장 특징

균주 ID	성장 조건	생물형	혈청형	캡슐 유전자	베타락타마아제
NTHi-164	호기성	I	비피막형	음성	음성
NTHi-165	호기성	I	비피막형	음성	양성
NTHi-166	호기성	I	비피막형	양성	음성
NTHi-167	호기성	I	비피막형	음성	음성
NTHi-168	혐기성	I	비피막형	음성	양성

분리주를 급성 호흡기 감염의 설치류 모델에서 경구 백신의 활성 요소로서 유용성을 시험하였다. 분리주를 또한 IFN γ 를 분비하기 위한 시험관 내 인간혈 림프구를 자극하는 능력을 시험하였다. 이러한 시험의 기초하에 분리주 NTHi-164를 헌터 면역 Ltd HI-1640V 경구 백신으로 용도에 대한 NTHi 균주로서 선별하였다. 분리주는 H. 인플루엔자 감염에 대한 예방을 제공하기 위하여 경구 백신용으로 이상적인 선택이 되도록 하게 하는 성질을 가진다. 실시예 및 그 외 명세서에서, 용어 "HI-1640V"은 HI-164를 포함하는 백신 정, 즉, 포르말린 사멸된 동결 건조 NTHi-164 활성 물질을 말한다.

1.2 NTHI-164 성질의 요약

1.2.1 미생물 식별확인

H. 인플루엔자 식별확인: 성장용 X 및 V 요소를 요구한다. 비피막형 식별확인 (즉, 어떤 형태 캡슐이 없음) 및 B 캡슐의 발현 없음 및 B 캡슐에 대한 유전자 없음, β -락타마아제 없음.

1.2.2 성장 특징

헤모필루스 시험 (HTM) 보충액으로 보충시킨 옥소이드™ 트립톤 소야 배양액 (TSB)에서 생육을 잘한다. 또한, HTM 보충액과 함께 옥소이드™ 베지톤 배양액에서 생육을 잘한다. 인플루엔자 NTHI-164 및 ATCC 19418을 성장 시키기 위한 다양한 배지능을 검토하고 그 결과를 비교하였다. H. 인플루엔자 NTHI-164 및 H. 인플루엔자 ATCC19418을 100mL의 하기 성분을 함유하는 250mL 코니카 플라스크에서 배양하였다:

- 트립톤 소야 배양액 (Code CM129. Lot B.:301377)
 - 트립톤 소야 배양액 (Code CM129. Lot B.:301377) 플러스 효모 추출물 (옥소이드 코드 L21, Lot Ch-B.:856108)
 - 베지톤 식물성 펩톤 (옥소이드 코드 VGO 100, Lot 335918)
 - 베지톤 식물성 펩톤 (옥소이드 코드 VGO100, Lot 335918) 플러스 효모 추출물 (옥소이드 코드 L21, Lot Ch-B.:856108)
- 각 배지를 헤모필루스 시험 보충액 (HTM), 옥소이드 코드 SR158E. Lot B.:312141으로 보충하였다. 성장을 초당 약 플라스크 2회전 시키면서 주변 공기에서 37°C에서 배양하였다. 대략 11시간의 배양한 후에 정지상에 다다랐다.
- 사용된 모든 배지가 두 개의 H. 인플루엔자의 성장을 도와주었고, 더욱 많은 영양을 가진 TSB 플러스 효모 추출물 및 HTM 보충액을 바람직한 제형으로 사용하였다. 동물성 배지 (TSB) 및 식물성 배지 (식물성 펩톤)를 대략

2개의 분리주에 대하여 성장 특성에 대략 동등하게 하였다.

[0137] 바람직한 배지 제형(효모 추출물을 가지는 TSB 및 HTM 보충액)을 사용하여 H. 인플루엔자 균주 NTHi-164 및 ATCC 19418에 대한 흡광도를 시간에 대해 그려보면 595nm에서 H. 인플루엔자 NTHi-164 및 ATCC 19418을 1시간 배양한 경우 각각 0.590 및 0.525와 대략 동등하였다. 다른 배양 배지가 유사하거나 보다 나은 성장 결과를 가질 수 있다는 것에 유의한다. NTHi-164 및 ATCC 19418의 성장 곡선은 도 1과 같다.

[0138] 큰 규모로 생산하기 위하여, NTHI-164 30 +/- 0.3 g/L 트립톤 소야 배양액; 5 +/- 0.05 g/L 효모 추출물; 및 0.20 +/- 0.01 g/L 소포제를 함유하고 15 mg/ml의 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드 (NAD) 및 15/mg/ml의 헤마틴으로 보충된 배지에서 성장시킬 수 있다. 보충액을 L 당 4mL까지 부피를 추가하였다.

[0139] **1.3 설치류 모델에서 감염을 방어하도록 유도하는 능력**

[0140] 이 자료는 사멸된 NTHi-164가 방어적 면역 반응을 자극하기 위한 능력을 가지는지를 증명하는 것이다. 출원인은 이러한 능력은 박테리아 항원 및/또는 천연 보강제의 존재 및/또는 페이에르판(입자 크기와 관련이 있을 수 있고, 접착 단백질과 연관된 것임)로 흡수되는 능력과 관련되어 있다고 믿는다.

[0141] **1.4 HI-164은 랫트에서 급성 호흡 감염에 대하여 방어한다.**

[0142] 랫트를 3×10^7 , 3×10^8 , 또는 3×10^9 의 포르말린으로 사멸된 NTHI-164 (이하 HI-164이라 함)을 0일째 단회 투여하고, 직접 장내 루멘으로 전달하거나, 14일째에 경구 투여하거나, 14일 또는 21일째에 2회 경구투여하여 면역화시킬 수 있다(즉, 랫트는 1회, 2회 또는 3회 투여를 받는다). 28일째에 추가 선량(장내 투여를 하는 는 능력을 보유하지만 그 자체의 방어 면역을 제고하는 능력을 가지고 있지 않음)을 폐에 주입하여 기관까지 전달하였다. 각 면역화 요법에 대한 대조군 랫트를 위약(PBS)으로 면역화시켰다. 35일째에 랫트를 내부 기관 주입으로 5×10^8 의 살아있는 NTHI-164을 감염시켰다. 4시간이 경과하고 랫트를 샘플링을 위하여 죽였다. 폐를 브론초-알베올라 세척(BAL) 유체를 제공하여 세척하고 폐를 폐 균질체(LH)를 제공하기 위하여 PBS로 균질화시켰다. BAL 및 LH를 연속적으로 희석하고 각 희석물의 샘플을 초코렛 아가 플레이트상에 도말하였다. 플레이트를 5% CO₂의 분위기에서 37°C에서 밤새 배양하였다. 플레이트 상에 콜로니를 계수하고 BAL 및 LH에서의 NTHI-164 (콜로니 형성 단위, 또는 CFU)의 수를 계수하였다. 폐에서 총 NTHI-164 CFU를 결정하였다. 백신 면역 및 위약 면역 동물에 대한 폐에서 평균 CFU를 계수하고 각 백신화 요법에 의해 제공된 박테리아 제거도를 적합한 대조군과 비교하여 계수하였다. 그 결과는 도 2와 같다. 3×10^8 , 또는 3×10^9 용량으로 투여된 경우 1회 이상 투여한 동물에서 양호한 박테리아 제거율이 얻어졌다. 3×10^7 용량으로 투여된 경우 2회 또는 3회 투여받은 동물에서 양호한 박테리아 제거율이 얻어졌다.

[0143] **1.5 NTHI-164가 마우스에서 H. 인플루엔자 호흡기 감염에 대하여 방어한다.**

[0144] 이러한 실험은 랫트 뿐만 아니라 마우스를 방어하는 NTHI-164의 능력을 증명한다. 추가로 감염에 가장 감수성이 있는 마우스 종에서 백신이 가장 방어적이라는 것을 증명한다.

[0145] C57BL/6 또는 Balb/c 마우스를 0일 및 14일째에 PBS 또는 PBS상의 사멸된 NTHI-164(투여량 5×10^6 , 5×10^7 , 및 5×10^8)로 면역화시켰다. 마우스를 20일 또는 21일째에 사멸된 NTHI-164 비면역 투여량 (5×10^5)으로 내부 기관적으로 추가 접종하였다. 마우스를 27일 또는 28일째에 1×10^7 의 살아있는 NTHi-164로 내부 기관적으로 감염시키고 4시간 이후에 샘플링을 위하여 죽였다. BAL 유체 및 LH를 연속적으로 희석하고 각 희석물의 샘플을 초코렛 아가 플레이트상에 도말한 후 5% CO₂의 분위기에서 37°C에서 밤새 배양하여, 폐 내 살아있는 Hi-164의 수준을 측정하였다. 콜로니를 계수하고, 원 BAL 및 LH 샘플에서 NTHi-164의 수를 계수하고, 각 마우스 군에서 총 박테리아 수준을 계수하였다. 각 마우스 군(±SEM)에서 평균 박테리아 수준은 도 3A 및 3B와 같다. 비면역화된 C57BL/6 마우스는 비면역화된 Balb/c 마우스보다 높은 감염 수준을 가져서 Balb/c 마우스가 보다 나은 선천적 방어를 가지고 있음을 나타내었다. 하지만, 사멸된 NTHi-164 백신은 C57BL/6 마우스에서 보다 효과적였는데, C57BL/6 마우스는 Th1 표현형을 가져왔고(즉, Th1-형 면역 반응에 보다 쉽게 반응) Balb/c 마우스는 보다 Th2-표현형을 가져왔기 때문에(즉, Th2-형 면역 반응에 보다 쉽게 반응) 이는 특이적 방어 기작이 Th1-형이라는 것을 시사한다.

[0146] **1.6 다른 H. 인플루엔자 분리주에 대한 교차 방어 능력**

[0147] 이 실시예는 포르말린으로 사멸된 NTHI-164으로 면역화되어 제공된 광역의 교차 방어를 증명하고자 한다. 이는 인간에서 교차 방어의 명백한 결핍 때문에 주요한 OMP P2를 보유하지 않는다고 보는 Sethi 및 Murphy (Sethi & Murphy, 2002, Clinical Microbiology Reviews 14(2):336-363)에 의해 예측되지는 않을 것이다.

[0148] 랫트를 0일 및 14일째에 50 µL PBS상에 5x10⁸의 사멸된 NTHi-164를 포함하는 백신으로 내부 기관적으로 면역화시켰다. 랫트를 연속적으로 상이한 생물형 또는 유형 b 균주의 비피막형 균주인 다양한 H. 인플루엔자 균주 중 어느 하나로 21일째에 감염시켰다. 표 2는 비막형 균주의 시험된 모든 생물형에 대하여 방어가 일어났다는 것을 보여준다. 표 3은 방어가 또한 시험된 3개 유형 b 균주 중 2개에 대하여 일어났다는 것을 보여준다.

[0149] 표 2: NTHi의 제거율 %

NTHi 제거율 % : (위약군에서의 CFU - 활성군에서 CFU) x 100/위약군에서의 CFU									
백신균주	감염 균주 (비피막형 H. influenzae 분리주)								
	Hi 289 생물형 I NTHi-166	분리주 1 NTHi- 165	분리주 2 NTHi- 164	분리주 3 NTHi- 168	분리주 4 NTHi- 167	ATCC 43041 생물형 VII	ATCC 43095 생물형 III	ATCC 35092 생물형 VIII	ATCC 51997 생물형 V
Hi-164	87	82	87	91	83	74	85	78	89

[0150]

[0151] 표 3; H. 인플루엔자 유형 B의 제거율 %

NTHi 제거율 % : (위약군에서의 CFU - 활성군에서 CFU) x 100/위약군에서의 CFU				
백신 균주	감염 균주 (H. influenzae type b 분리주)			
	Hib 8719	ATCC 10211	ATCC 9795	
NTHi-164	62%	0%	39%	

[0152]

[0153] 1.7 설치류에서 특이적 면역 반응의 유도

[0154] 이 실시예는 사멸된 NTHI-164으로 백신화한 경우 박테리아 감염에 대한 폐의 방어에서 중요한 NTHi-특이적 T 세포를 유도한다는 것을 증명한다. 5마리의 랫트군을 0일째에 하기 성분 0.5mL를 장내 루멘에 주입하여(개복술에 노출됨) 면역화시켰다:

[0155] - PBS

[0156] - 500 µL PBS상의 5 x 10⁸의 투여량에서 NTHi 164 표본

[0157] - 500 µL PBS상의 5 x 10⁹의 투여량에서 NTHi 164 표본

[0158] 랫트를 14일째에 희생시키고 림프구 현탁물을 제조하기 위하여 장간막 림프절을 수득하고 5일 동안 0.1, 1 및 10µg/mL에서 NTHi 164 항원으로 시험관내 배양(3배)을 수행하였다. 마지막 6시간 동안 배양 웰을 ³H-티미딘으로 펄싱하여 항원 자극에 대한 림프구 증식을 검출하고 필터 매트상에서 배양물을 수거하였다. 매트를 각 웰에 대하여 신틸런트(scintillant) 및 방사성(분당 개수)을 가지는 가방에 넣고 β-카운터에서 측정하였다. 도 4는 각 랫트 군으로부터 림프절에 대한 평균 증식 반응을 보여준다. 이 증명은 NTHi-164-특이적 림프구가 사멸된 NTHi-164으로 면역화된 후에 장간 림프절에서 검출될 수 있다는 것을 증명한다.

[0159] 1.8 설치류에서 사멸된 분리주의 독성 결여

[0160] 이 실시예는 HI-1640V에 대한 독성 데이터를 제공하며, 이는 백신이 남성에서 안정한다는 것을 증명한다.

[0161] 12마리의 Sprague-Dawley 랫트 군에 PBS (위약), PBS에 현탁시킨 HI-164 활성 물질 (배치 번호 VRI0401에서 제조)의 랫트 치료 용량 2.25 mg (5x10⁹의 사멸된 세포에 상당), 또는 인간 수준 용량 45 mg (1x10¹¹의 사멸된 세포에 상당)을 투여하였다. 0일 및 14일째 투여하고, 사후 관찰 및 샘플링을 위하여 21일째 랫트를 안락사시켰다 (과용량의 펜토바르비톤 사용). 하기 파라미터를 측정하였다:

[0162] - 매일 임상 평가

- [0163] - 매주 체중
- [0164] - 사후 관찰 (수의사에 의해 수행됨)
- [0165] - 혈액 생화학
- [0166] - 혈액학(haematology)
- [0167] - 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 위, 췌장, 십이지장, 공장, 회장, 결장, 장간막 림프절에 대한 조직병리학
- [0168] - 생화학, 혈액학, 조직병리학은 Idexx Laboratories (호주)에 의해 수행됨
- [0169] 이들 파라미터 중 어느 것에 대해서도 활성 치료군과 위약군 간에 차이점이 발견되지 않았다.

[0170] **1.9 인간 혈액에서 NTHi-특이적 T 세포를 자극하는 능력**

[0171] 이 실시예는 인간 혈액 중 헤모필루스 인플루엔자-특이적 T 세포가 NTHi-164를 인지하고, 이에 반응하여 IFN- γ 과 같은 사이토카인을 분비할 수 있다는 것을 증명한다. IFN- γ 는 또한 방어 기전과 관련되어 있어, IFN- γ 가 탐식 세포 (마크로파지 및 다형핵 세포)를 활성화시켜 박테리아를 더욱 적극적으로 식균하고 사멸시킨다.

[0172] 초기 시험은 4명의 지원자에 대해 수행되었다. 1일째 천자(venupuncture)를 이용하여 리튬 헤파린 튜브에 혈액을 수집하였다. 말초혈액 단핵 세포 (PBMC)를 Ficoll-Paque 밀도 구배로 원심분리로 분리시켰다. PBMC는 무혈청 배지에서 플랫 보텀(flat-bottom) 96 웰 플레이트의 웰에서 배양하였다. 배양액은 비자극되거나(배지만) 또는 37°C, 5% CO₂로 설정된 인큐베이터에서, 3일간 2 x 10⁶ 및 2 x 10⁸ /mL의 사멸된 HI-164 또는 10 μ g/mL, 1 μ g/mL 및 0.1 μ g/mL의 NTHi 164 초음파 처리 항원으로 자극시켰다. 3일째 각 웰로부터 배양 상청액을 1.5mL 에 펜도프 튜브로 수집하고, 12000 rpm (g)에서 2분간 원심분리에 의해 정화시키고, 점적하고 IFN- γ , IL-10 및 IL-12 수준을 ELISA로 측정할 때까지 -70°C에서 저장하였다.

[0173] NTHi 164 자극 PBL 배양물로부터 수득한 IFN- γ 수준을 하기 표 4에 나타낸다.

[0174] **표 4:** NTHi 164 항원 및 PHA로 자극된 PBL 배양 상청액에서 IFN- γ (pg/mL) 수준

항원	MD	PH	PC	RC	Mean	SD
10ug/ml (초음파 처리 NTHi)	297	58	150	101	152	103
1ug/ml (초음파 처리 NTHi)	54	35	55	35	45	11
0.1ug/ml (초음파 처리 NTHi)	<15	<15	<15	20	20	
PHA(5ug/ml)	<15	30837	9568	8617	16341	12563
2x10 ⁸ (사멸 NTHi)	1738	1193	4533	514	1994	1764
2x10 ⁶ (사멸 NTHi)	207	257	491	72	257	174
세포만	<15	<15	<15	<15		
AIM-V 만	<15	<15	<15	<15		

[0175]

[0176] HI-164 백신의 안정성 및 면역원성 시험을 위해 모집된 7명의 개체를 대상으로 2차 시험을 수행하였다. 시험 약물을 투약하기에 앞서 0일째, 임상 시험 HHI003 개체 001 ESY, 002 SP, 003 MBW, 004 JMW, 005 JDL, 006 RGB 및 007 MA의 1차 방문에서, 10mL의 헤파린 첨가(heparinized) 혈액을 수혈하였다. 말초 혈액 림프구(PBL)를 Ficoll-Paque 밀도 구배로 분리하고, 세척한 후, 암포테리신 B (0.25 μ g/mL), 1M 헤페스 버퍼 및 2-머캅토에탄올 (5x10⁻⁵M)(SOP: IMM027)이 추가된 AIM-V 배양 배지에서 재현탁시켰다.

[0177] 세포를 5일간 플랫 보텀 24 웰 플레이트에서 배지 1mL 중 1 x 10⁶세포/웰로 배양하였다. 세포는 2가지 농도의 NTHi 164 항원 (10 μ g/mL, 1 μ g/mL) 및 PHA (5 μ g/mL) (SOP: IMM011)로 자극시켰다. PHA는 팬 T 세포 자극제이다.

[0178] 5일째, 배양 상청액을 각 웰로부터 수집하고, 원심분리로 정화 후, 점적하고 IFN- γ 수준을 ELISA로 측정할 때까지 -70°C에서 저장하였다. 그 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

[0179] 표 5: NTHi 164 항원 및 PHA로 자극된 PBL 배양 상청액에서 IFN- γ (pg/mL) 수준

배양 자극제	001 ESY	002 SP	003 MBW	004 JMW	005 JDL	006 RGB	007 MA
10 μ g/mL NTHi 164	368	128	101	169	356	565	334
1 μ g/mL NTHi 164	130	287	24	111	156	86	35
0 μ g/mL NTHi 164	0	0	0	61.3	0	0	0
5 μ g/mL PHA	0	9	0	38	9457	626	6
AIM V	0	0	0	0	0	0	0

[0180] NTHi 164 (10 μ g/mL 및 1 μ g/mL)는 모든 개체의 PBL 배양 상청액에서 IFN- γ 생성을 자극하였다.
 [0181]

[0182] **인간에서 특이적 T 림프구 면역 반응을 유도하는 능력**

[0183] 위약-조절 안정성 및 면역원성 시험을 위해 모집된 개체를 대상으로 특이적 면역 반응 유도를 시험하였다. 도 4는 시험기간 동안 백신 및 위약 치료군에서 발생하는 특이적 T 림프구의 유도를 보여준다. 시험기간 동안 위약 환자군의 혈액에서 특이적 T 림프구가 증가하였다 (도 5A, 5B). 이 반응은 이 기간 중에 H. 인플루엔자 박테리아에 노출됨에 따라 유도된 것으로 여겨졌다. 활성 정제 치료 환자에서, 특이적 림프구의 유도가 증가하였는데, 이는 천연적으로 유도된 면역 반응의 증강(boosting)을 의미한다. HI-1640V 군 유래의 혈액 림프구에서 PHA에 대한 시험관내 반응 증가가 또한 관찰되었다(도 5C).

[0184] **1.10 HI-1640V 치료는 타액성 리소자임을 감소시킨다.**

[0185] HI-1640V 치료군에서 타액성 리소자임의 감소가 관찰되었으며, 이는 염증의 감소를 의미한다 (도 6).

[0186] **1.11 박테리아가 하부 기도에 도달하는 것을 저해하는, 사멸된 NTHi-164 경구 백신 (HI-1640V)의 능력**

[0187] 전술한 것과 동일한 개체를 대상으로 이후 가글 시 NTHi가 검출되는 방문 횟수와 혈청 IgG 간의 관계를 시험하였다. 1회 내지 6회 방문 (0-1 방문 또는 2-4 방문으로 분류됨) 사이에 혈청 NTHi-특이적 IgG에서 평균 (\pm SEM) 로그 변화를 가글 시 H. 인플루엔자가 검출되는 방문 횟수에 대하여 플롯팅하였다 (도 7A). 위약군에서 2회 이상 방문 시 고수준의 혈청 NTHi-특이적 IgG는 살아있는 NTHi 검출과 관계가 있다. 그러한 관련성이 활성 HI-1640V 정제를 투여한 개체에서는 분명하지 않았다. 모든 2-7회 방문에서 기준치로부터 혈청 IgG의 중앙값 변화 곡선을 도 7B에 나타내었다. 이것은 위약 치료군에서 혈청 NTHi-특이적 IgG가 증가하고, HI-1640V 치료군에서 혈청 NTHi-특이적 IgG가 감소하였음을 증명한다. 이 데이터는 활성 치료군에서, 상부 기도에 있는 박테리아가 하부 기도로 들어가서 혈청내 H. 인플루엔자-특이적 IgG를 유도하는 것을 방어한 것으로 해석되었다. 가글 시 H. 인플루엔자가 검출되는 0-1 또는 2-6 방문에서 혈청 NTHi-특이적 IgG에 대한 기준치(방문 1)로부터 중앙값 변화를 도 7B에 나타내었다.

[0188] **1.12 경증-중등도 또는 중등도-중증 기도 질환 환자에서 악화의 심각화에 대해 방어를 제공하는 사멸된 NTHi-164 경구 백신 (HI-1640V)의 능력**

[0189] 이중맹검법으로, 경증-중등도 또는 중등도-중증 기도 질환 환자에서 HI-1640V 백신 164의 효능을 시험하기 위한 위약-조절 평행 임상 연구를 위하여, 45 mg (10^{11} 의 사멸된 박테리아에 상당) 함유 18개 정제를 투여하였다. 1, 2, 3, 29, 30, 31, 57, 58, 59일째 매일 2개 정제를 투약하였다. 일반적인 건강, 부작용, 만성 기관지염의 급성 악화 및 상기 악화의 심각도를 모니터링하였다. 활성 치료군에서 위약 조절군에 비하여 (대부분 기관지염의 악화로 인한) 입원이 현저히 감소되었다 (위약군에서 7명의 환자가 10회 입원하였으나, HI-1640V 군에서는 1명의 환자가 1회 입원함). 이들 데이터는 경구 백신을 사용하는 경우 백신 활성 물질의 방어 능력을 증명해준다.

[0190] **실시예 2; HI-1640V의 임상적 효과**

[0191] 지난 2년간 매일 적어도 10개의 담배를 피는 것을 기준으로 64명의 개체를 모집하고, 이중맹검법에 의해 경구 NTHi 치료군 또는 위약 치료군으로 할당하여, 위약-조절 이중맹검 임상 시험을 수행하였다. 개체는 무작위적으로 위약군 및 활성군으로 할당하고, 매달 간격으로 시험 약물의 3회 코스를 투약하였다. 각 코스는 3일간 매일 2개의 정제로 이루어졌다. 각 활성 정제는 45mg의 포르말린-사멸된 NTHi (활성 정제당 10^{11} 의 사멸된 박테리아에 상당)을 포함하였다. 혈액, 타액, 가글, 인후 면봉, 및 비강 면봉 (미생물 평가를 목적으로 함)을 7회의 격주 방문시에 수집하였다.

[0192] **1.13 NTHi 검출 및 NTHi-특이적 IgG의 계측**

[0193] 놀랍게도 겨울 동안 위약 투여군과 백신 투여군에서 NTHi가 검출되었으며, 이는 박테리아에 대한 무작위적 노출

을 의미한다. 도 8은 각 방문 시 위약군의 가글에서 NTHi의 평균 수준을 보여준다.

[0194] NTHi-특이적 IgG를 ELISA 분석에 의해 혈청 및 타액에서 측정하였다. 간략히 말하면, 96-웰 Nunc Maxisorp 플레이트의 웰을 H. 인플루엔자 164 초음파 처리 항원 제제로 코팅하였다. 밤새 2-8°C에서 배양 후, 플레이트를 세척하고, 다양하게 희석된 혈청 또는 타액 샘플을 추가하였다. 60분간 실온에서 배양 후, 플레이트를 세척하고, HRP(horse-radish peroxidase)-결합 항-인간 IgG 항체 (Chemicon 카탈로그 번호 API 12P)를 추가하였다. 추가 60분 동안 실온에서 배양 후, 플레이트를 세척하고 TMB 기질 (Biomediq 카탈로그 번호 50-76.00)을 가하고, 실온에서 10분간 추가로 배양한 다음, 1M 인산을 추가하여 반응을 정지시켰다. 450nm의 1차 필터와 655nm의 참조 필터를 사용하여, 이중 파장 모드로(dual wavelength mode) BioRad 마이크로플레이트 리더상에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선을 사용하여 각 시료당 ELISA 단위를 측정하였다.

[0195] 위약군에서 혈청 및 타액내 NTHi-특이적 IgG의 수준은 백신 치료군에서의 수준보다 높고, 더욱 가변적이었다 (도 9 및 도 10 참조). 본 출원인은 이것이 위약군에서는 NTHi가 하부 기도에 도달하여, 전신적인 IgG 생산을 유도하였으나, 백신 치료군에서는 NTHi가 하부 기도에 도달하는 것이 저해되었기 때문인 것으로 믿는다. 이를 시험하기 위하여, 방문 1 내지 6 사이에 가글 시 NTHi가 검출되는 방문 횟수와 혈청 IgG의 중앙값 변화 간의 관계 곡선을 작성하였다 (도 7). 위약 및 활성 개체는 0-1 방문 또는 가글 시 NTHi가 검출되는 2-6 방문 여부에 따라 그룹화하였다. 위약군에서, 혈청 IgG의 양성 증가가 NTHi 검출수 증가와 관련이 있다. 이것은 활성 치료군에서는 확인되지 않았다. 위약군과 활성군에서의 IgG 변화의 차이는 통계적으로 유의한데 (p=0.0186), 이는 위약군에서 박테리아가 하부 기도에 도달한 결과로서, NTHi에 의해 혈청 IgG가 실제로 생성되었음을 증명한다. 또한 위약군의 세척액에 더 많은 NTHi가 존재할수록, IgG 항체 수준은 더 높아진다. 이것은 또한 위약군에서 타액성 NTHi 특이적 IgG의 출현에도 적용되는 것으로 여겨진다.

[0196] **1.14 고찰**

[0197] 백신 효능 마터로서 혈청 IgG 항체를 측정하였다. 백신 치료군에서 IgG 반응이 명백히 결핍된 것으로 확인된 반면, 위약 치료군에서 혈청 IgG의 증가가 확인되었다. 이론에 제한되는 것은 아니나, 본 출원인은 위약군에서 관찰된 IgG 증가가 하부 기도에 도달하는 박테리아 감염에 대한 면역 반응을 반영하며, 여기서 항원 제시 세포에 의해 박테리아가 포식되고, 림프구를 유리하는 수송이 항-박테리아 IgG 반응을 유도한 것으로 믿는다. 대조적으로, 백신 치료군에서 그러한 반응의 결핍은, 박테리아가 하부 기도에 도달하는 것이 (점막 백신-특이적 면역 반응에 의해) 본질적으로 방지되었음을 입증한다. 낮은 빈도 (0-1 방문 시 검출) 또는 높은 빈도 (2-6 방문 시 검출)로 상부 기도에서 검출된 NTHi를 가지고 있는 개체에서, IgG 반응을 비교하면, 위약군에서는 IgG이 증가하였으나 활성 (백신) 치료군에서는 그렇지 않은 것으로 확인되었다. 이는 NTHi로의 경구 백신 투여 후 혈청 IgG의 측정값이, 감염에 대한 노출과 점막 면역화에 의해 방어된 정도를 반영한다는 점을 시사한다. 타액 IgG 반응은 혈청에서 보여진 것을 반영하였다.

[0198] 전반적으로, 본 실시예는 치료 및 위약군의 상부 호흡관에서 NTHi가 검출되었고, 경구 사멸된 NTHi 백신 치료군 내 혈청 및 타액의 NTHi-특이적 IgG 감소를 이끌었으며, 이는 백신이 NTHi가 하부 기도로 접근하는 것을 성공적으로 제한 또는 방어한다는 점 (즉, 천식을 일으키거나 COPD를 악화시키는 알레르겐이 적음)을 증명한다

[0199] 따라서 IgG 항체 자극에 의해 입증된 바와 같이, 위약군에서만 하부 기도로의 NTHi 접근이 이루어졌고, NTHi 백신으로 경구 '면역화' 시 기도 내 NTHi 알레르겐을 감소시켰다.

[0200] **실시예 3; 경증, 중등도 또는 중증 기도 질환 개체에 경구 투여된 사멸된 NTHI-164 백신 (HI-164OV)는 항-천식 치료제의 사용을 감소시킨다.**

[0201] 경증-중등도 또는 중등도-중증 기도 질환이 있는 140명의 개체를 모집하여, 이중맹검 위약-조절 시험에 의해 천명 가역성 기도 폐쇄의 횟수 및 중증도, 및 병용(concomitant) 약물의 사용, 및 기도 내 NTHi 및 다른 박테리아의 존재에 대한 경구 사멸된 비피막형 헤모필루스 인플루엔자 (NTHi) 백신의 효과를 평가하였다.

[0202] 대조군에 비해 치료군에서 항-천식-형 약물 (기관지 확장제, 스테로이드 등) 사용의 감소와 NTHi에 의한 감염의 감소가 확인되었다. 특히 NTHi에 대한 고수준의 IgE 항체를 가진 개체에 기도에서 NTHi가 특히 감소되고, 천식 약물의 필요성이 감소됨에 따른 천식 증상의 감소가 관찰되었다.

[0203] **1.15 개체 및 임상 시험**

[0204] 이 실시예는 임상 연구기관의 감독하에 4개 장소에서 수행된, 멀티 센터, 이중맹검, 위약 조절 시험이다. 그

장소는 Hollywood Private Hospital, Perth, WA (Dr M.K. Tandon); Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, WA (Dr M. Phillips); Royal Perth Hospital, Perth, WA (Assoc. Prof. G. Waterer) 및 the University of Newcastle, Newcastle, NSW (Prof. R. Clancy)였다. 각 병원의 윤리 위원회에 의해 동일한 프로토콜이 허가되었고, 각 시험은 상기 위원회의 가이드라인에 부합하였다. 주요 승인 기준은 2년 연속으로 매년 2개 이상의 에피소드 병력이었다 ('에피소드'는 '기준 수준에서 기침 및 화농성 가래의 증가'로 정의됨). 개체는 다음의 2개 군으로 나누어졌다: i) FEV₁가 예상 정상치의 50%를 초과하는 환자 (38명의 개체), 및 ii) FEV₁가 예상 정상치의 50% 미만인 환자 (102명의 개체). 이 2번째 군은 COPD 환자, 기관지 확장증의 1차 진단을 받은 환자, 및 '정상' FEV₁ 수준의 환자를 포함하였다. FEV < 80%인 시험군과 기관지 확장증의 1차 진단을 받지 않은 시험군의 환자는 COPD를 가진 것으로 정의되었고, 본 분석의 대상이 되었다. 모든 COPD 환자에서 HI-1640V의 치료 효능을 분석한 후, 특히적으로 중등도 내지 중증 COPD 환자군에서 치료 효능을 분석하였다.

[0205] 남부의 겨울에서 초봄에 이르기까지 8-9개월 동안, 모든 개체를 대상으로 다음을 수행하였다: 2006. 3. 7일에 모집을 시작하고 마지막 환자의 모집은 2006. 10. 31일에 완료되었다. HI-1640V 정제는 장용성 코팅제로서 제공된, 포르말린-불활성 HI-164 45mg (CFU 10¹¹ 박테리아에 상당)을 포함하였다; 부형제만을 포함하는 위약 정제는 경구용 장용성 코팅제로 제공되었다. 환자는 3회 코스의 정제를 투약하였다. 각 코스는 3일 연속으로 (식전) 매일 3개 정제로 이루어져 있으며, 28일 및 56일째 코스가 반복되었다. 개체는 0, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36 주째에 대면 인터뷰를 하였다. 4주 및 8주째 다음 정제 코스를 투약하였다. 방문시마다 급성 에피소드와 그 특징을 예시된 구조화된 질문지를 이용하여 문서화하였다; 부작용을 기록하였다; 가래 및 혈액을 수집하여 각각 박테리아 콜로니화 및 안정성 파라미터를 모니터링하였다; 그리고 병용 약물을 평가하였다.

[0206] 이 분석에서 평가된 1차 변수는 (i) 악화 횟수 ('가래의 부피 및 고름의 증가'로 정의됨); (ii) 1회 이상의 악화를 경험한 개체의 비율; (iii) 악화의 평균 지속시간; (iv) 악화에 대해 처방된 항생제 코스의 수였다. 측정된 2차 변수는 부작용(입원을 포함) 및 가래의 세균학이었다.

[0207] 치료 의도(intention-to-treat) 집단에 대한 통계적인 분석은 양측 검정(two-sided)으로 고려된 'P 값'을 사용하였다. 급성 에피소드 (또는 '치료에 의해 정의된 급성 에피소드')의 비율은 (마지막 방문까지의 일수를 확률적으로 산출한) 노출로 나눈 사례(event) 수에 100을 곱하여 계수하였다. 반복 측정 포아송 회귀 분석(Repeated measures Poisson regression)을 사용하여 랫트에서의 치료 차이를 시험하였으며, 이때 노출(일)의 로그값이 오프셋으로 간주되었다. 회귀 분석으로 비율 (위험) 비 및 그들의 관련 95% 신뢰 구간(CI)을 관찰하였다. 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 하나 이상의 에피소드를 가진 개체의 비율을 비교하였다. 에피소드의 지속 시간 (시점부터 종점까지)을 카플란-마이어(Kaplan-Meier)법으로 추산하고, 로그-순위 검정으로 치료차이를 분석하였다. 치료기간 동안, 시점과 종점의 중복과는 무관하게 각 지속 치료기간의 합으로 일수를 산출하였다. 각 개체가 치료받은 일수를 윌콕슨 순위-합계 시험(Wilcoxon's rank-sum test) (student's 't' approximation)을 이용하여 치료군 간에 비교하였다. 0, 1, 2회 등의 항생제 코스를 경험한 개체수를 제공하고, 치료군을 코카란-만텔-헨스젤 시험(Cocharan-Mantel-Haenszel test)으로 비교하였다. 포아송 회귀 분석으로 치료군 간의 입원 비율을 비교하였고, 이때 개체의 로그-변환수를 오프셋으로 사용하였다.

[0208] 목표는 중등도-중증 및 경증-중등도 군 각각에서 124명을 모집하는 것으로, 중도 포기율을 20%로 하여하였다. 시험을 완료한 각 군의 50명에 대해서, (5% 유의 수준, 80% 검정력에서) 37%의 에피소드 수의 상대적인 위험도 감소 (위약군에서 감염율은 2로 추정); 28%의 환자 비율 감소 (적어도 하나의 감염을 가진 위약군은 80%로 추정); 33%의 항생제 처방의 상대적인 위험도 감소 (위약군에서 처방율은 2.4로 추산); 1.2의 평균 지속시간차 (위약군에서 SD는 2일로 추정)를 검출하였다. 2년간 매년 2 이상의 에피소드를 필요로 하는 것이 모집에 큰 장애가 되었으며, 총 73명이 COPD로 등록하였다 (38명은 중등도-중증 질환이고 35명은 경증-중등도 질환임). 기관지 확장증 또는 '정상' FEV₁ 값을 가진 추가적인 67명의 개체를 예상 정상 백분율(즉, ≥ 80%)로서 연구하였으나, 본 분석의 COPD 개체에 포함시키지는 않았다. 통합 분석은 준비단계를 결정하였다.

[0209] **1.15.1 인구통계학적 특성**

[0210] 환자 특성을 하기 표 6에 나타낸다.

[0211] 표 6: 환자 특성

특징	모든 COPD 환자		중등도 - 중증 COPD 환자	
	위약 (37)	HI-164OV (36)	위약 (20)	HI-164OV (18)
나이 (세) (중간값, 범위)	68.8 (41-88)	62.8 (47-87)	67.8 (55-88)	69.5 (47-87)
성 (남성/여성)	25:12	25:11	14:6	15:3
상시-흡연	30	31	15	15
현재 흡연자 (중간값, 범위)	6	7	4	2
FEV ₁ (l/sec) (중간값, 범위)	1.17 (0.4-3.0)	1.32 (0.5-2.6)	0.89 (0.4-2.0)	1.0 (0.5-1.5)

[0212]

[0213]

중등도-중증 COPD 환자를 기준으로, 활성군에서 및 위약군의 13명이 허혈성 심장 질환의 병력을 가졌고, 활성군의 6명과 위약군의 3명이 '천식' 병력이 과거 병력이 있었으며, 활성군의 2명과 위약군의 4명이 관련 기관지 확장증이 있었다. 이 군에서, 기준이 되는 관련 요법은 다음과 같다: 각 군의 12 개체가 살부타몰을 투약받음; 활성군 14명과 위약군 13명이 티오트로피움을 투약함; 활성군 10명과 위약군 9명이 살메테롤/플루티코손 (Seretide®)를 투약받음. 프레드니손을 활성군 6명과 위약군 7명에 투약하였다. 활성군 5명과 위약군 2명에서 산소 요법을 사용하였다. 위약군과 활성군의 대략 절반이 시즌 전 인플루엔자 백신 접종을 하였으며, 3분의 2는 폐렴 백신 접종을 하였다.

[0214]

1.16 결과

[0215]

HI-164OV 투여군 대 위약군의 결과는 하기 표 7에 나타낸다:

[0216]

표 7; 결과 요약

	총 COPD 집단			중등도 - 중증 COPD		
	HI-164OV (36)	위약 (37)	보호 (%) (P value)	HI-164OV (18)	위약 (20)	보호 (%) (P value)
급성 에피소드 수 (개체수)						
총수	36 (24)	50 (25)	24 (0.19)	22 (13)	29 (13)	17 (0.52)
항생제 - 치료	28 (20)	38 (23)	24 (0.26)	15 (11)	23 (13)	27 (0.33)
코르티코스테로이드 - 치료	9 (10)	21 (15)	50 (0.06)	5 (4)	15 (10)	62 (0.05)

[0217]

항생제 치료						
코스	37 (20)	70 (23)	46 (0.03)	19 (11)	48 (13)	56 (0.03)
총 일수 (개체수)	284 (20)	735 (23)	72 (0.01)	136 (11)	543 (13)	60 (0.01)
경구 및 급성 코르티코스테로이드 치료 일수(개체수)	127 (9)	344 (16)	56 (0.26)	61 (4)	289 (11)	75 (0.26)
에피소드의 지속 평균 일수 (범위)	14.7 (3-81)	17.3 (3-74)	24 (0.19)	14.3 (3-84)	22.7 (4-74)	37 (0.01)

[0218]

[0219]

1.16.1 급성 에피소드 수

[0220]

급성 에피소드의 프로토콜을 "가래의 부피 및 고름의 증가"로 정의할 때, 전체 COPD 군에 대하여, HI-164OV 군에서 36번의 에피소드 및 위약군에서 50번의 에피소드가 있었고, 매년 분석 시 0.76의 위험비율 (95% CI 0.50, 1.15; P=0.19)을 가졌다. 3개월간 분석 시, 사례/100일의 속도로, 2번째 3개월간 활성군에서 효과가 증대되었다 (위약군: 사례/100일 - 0.82 (1번째 3개월), 0.74 (2번째 3개월); 활성군: 0.72 및 0.48. P 값. 기간 효과 0.68, 및 치료 효과 0.19). 중등도-중증 COPD군에서 급성 에피소드의 프로토콜 정의("가래의 부피 및 고름의 증가")를 사용할 때, 위약군에서 29번의 에피소드에 대해 활성군에서 22번의 에피소드가 있었고, 위험비율은 0.84로(95% CI: 0.48, 1.49), 유의하지 않았다. 하지만 3개월 기간 분석에서, 사례율/100일은 1번째 3개월간은 활성군과 위약군 모두에서 0.82로 동일하였지만, 2번째 6개월간은 위약군에 비해 활성군에서 (0.85에 대해 0.6)

발병률이 29% 감소하였다(0.6 대 0.85). 중등도-중증 질환 환자에서, 치료군(6 개체)에 비해 2-4회 에피소드를 가진 위약군 환자수(11 개체)가 거의 2배 많았고, 이것은 재발 감소에 대한 치료 효과와 관련이 있다. 전체 COPD군에서 방어율의 차이는 거의 또는 전혀 없었지만, 더 중증 질환 환자에서 방어 수준이 더 높은 것으로 밝혀졌다 (27%).

[0221] 1.16.2 급성 에피소드 환자의 비율

[0222] 더 중증 에피소드를 '코르티코스테로이드-치료된' 에피소드로 정의하여 기록하는 경우를 제외하고는, 급성 에피소드 환자의 비율이 소량 치료에 의해서 감소하였다.

[0223] 1.16.3 에피소드의 지속 기간

[0224] 에피소드의 평균 지속 기간은 위약군에 비해 활성군에서 짧았지만('전체 COPD': 17.3일에 대해 14.7일; 중등도-중증 COPD: 22.7일에 대해 14.3일), 이러한 차이는 중등도-중증 군에서만 통계적으로 유의하였다 (P=0.01).

[0225] 1.16.4 약물 사용

[0226] COPD 개체 및 중등도-중증 COPD 개체의 모든 군에서 치료 후, (악화에 대한) 항생제 요법 횟수와 항생제 치료 일수의 현저한 감소가 일어났다. 2가지 형태를 분석하였더니, '전체 COPD' 및 중등도-중증 COPD 환자군 모두에서 방어율은 통계적으로 유의하였다. 위약군에 비해 활성군에서 3회 이상의 항생제 요법을 투약받은 환자가 더 적었으며('전체 COPD'의 경우, 5 대 14 환자', 중등도-중증 COPD의 경우, 2 대 11 환자), 이는 재발성 에피소드에 대한 방어 능력을 뒷받침하는 것이다.

[0227] 경구 백신으로 치료된 중등도 내지 중증 COPD가 있는 개체는 활성군에서 기관지 확장제 치료제 사용이 50% 감소된 것으로 확인되었다. 경구 NTHi 치료제의 3회 코스를 투여하면, 활성군에서만 호산구수가 유의성 있게 감소된 것으로 나타났다. 결론적으로 경구 NTHi 치료는 급성 에피소드에서 기관지 확장제 치료제의 사용을 줄일 뿐 아니라, NTHi에 특이적인 알레르기 반응과 관련되어 있는 호산구수도 감소시킨다.

[0228] 1.16.5 입원

[0229] 중등도-중증 COPD가 있는 위약군(20명)의 7명의 환자에서 10회 입원하여, COPD 악화로 인한 입원률은 높은 편이었다 (하기 표 8 참조). 덜 중증인 COPD (17명 개체)에서는, 시험기간 내내 단지 2명만이 COPD로 입원하였다. '전체 COPD'에서 COPD 악화로 인한 입원의 예방율은 61%로, 경계역의 유의성이 (P=0.07) 있는 반면, 중등도-중증 COPD에서, 더 높은 예방율이 확인되었고(90%) 유의하였다(P=0.01). 더 중증인 군에서, '전체 원인에 대한 입원'의 유의차를 검출하였으나(P=0.04), 그 수가 너무 작아 비호흡기 증상에 대한 입원에 비의존적인 효과가 확인되었다.

[0230] 1.16.6 가래 세균학

[0231] '급성 사례' 가래 샘플의 분석은 항생제 치료, 수송 지연 및 늦은 통지로 인한 수치의 감소에 관한 정보를 제공해주었다. 시험 시작 이후 정기적인 방문에서 수집된 검사물은, 수집 후 4시간 이내에 배양이 완료된 경우에는 유효한 것으로 보고, (상피 세포의 존재로 검출된) 타액으로 오염된 검사물은 제외시켰다. '전체 COPD' (37 개체)에 대한 위약군의 이러한 '정기적인' 시료에서, 환자의 절반이 (19 개체) 총 88개의 양성 배양물을 가졌다. 활성군(36 개체)에서 이에 상당하는 값은 45개의 양성 배양물을 가지는 13 개체였으며, 즉, HI-1640V 치료 후에, 호흡기 병원체에 대한 양성 가래 배양군을 가진 개체가 (31% 정도) 감소하였고, 양성 가래 배양군의 총수는 위약군의 대략 절반에 해당하였다. 위약군에서 NTHi는 평균 2.8의 경우로, 14 개체가 분리되었다. 다른 병원체의 경우, M. 카타랄리스가 5 개체에서(평균 2.4의 경우); S. 뉴모니에가 6 개체에서(평균 1.7의 경우); P. 에루지노사가 11 개체에서(평균 2.3의 경우) 분리되었다. 활성군에서, NTHi가 8 개체에서 분리되었고(평균 2.9의 경우); M. 카타랄리스가 7 개체에서(평균 1.0의 경우); S. 뉴모니에가 4 개체에서(평균 1.5의 경우); P. 에루지노사가 3 개체에서(평균 3의 경우) 분리되었다. 추가 분석 결과 위약군에서 양성 가래 배양군을 가진 21명의 개체가 34회의 급성 에피소드를 경험한 반면(개체당 1.62), 양성 시료가 없는 16명의 개체가 16회의 급성 에피소드를 경험한 것으로 나타났다(개체당 1.0). 활성군에서는, 양성 배양물을 가진 14명이 20회의 급성 에피소드를 경험했고(개체당 1.42) 양성 가래 배양군을 가진 22명이 16회의 급성 에피소드를 경험했다(개체당 0.73). NTHi 분리주에 대해, 유사한 양상이 나타났다 (위약군: 양성 배양물을 가진 14명이 20회의 급성 에피소드를 경험 (개체당 1.42), 균증식이 없는 23명이 30회의 급성 에피소드를 경험함 (개체당 1.31); 활성군: 양성 배양물을 가진 8명의 개체가 10회 에피소드를 경험함 (개체당 1.25), 균증식이 없는 28명이 26회의 에피소드를 경험함 (개체당 0.93). 결론적으로, (i) 양성 가래 배양군은 급성 임상 에피소드의 더 큰 위험성을 예견하게 하며 (개

체가 위약 또는 활성군인지와는 무관하게), (ii) 활성군의 경우, 배양 양성 및 배양 음성 군 모두에서 명백한 방어 효과가 있으며 (배양 양성 군에서 약 12% - 감염 에피소드로 산출/개체수가 위약군에서 1.62인데 대해 활성군에서 1.42임; '비 배양 양성' 군에서 약 27% - 감염 에피소드로 산출/개체수가 위약군에서 1.0인데 대해 활성군에서 0.73임), (iii) HI-1640V 경구 치료로 양성 배양군이 감소한다. 이러한 '비증식' 배양군은 증세의 약화의 감소와 관련이 있다 (전술함). NTHi 양성 가래에 대한 유사한 분석 결과, 경구 HI-1640V 치료의 방어 효과에 대한 결과가 거의 동일한 것으로 나타났다 (데이터는 나타내지 않음).

[0232] 표 8: 입원

	HI-1640V		위약		P value	
	사례수	환자수	사례수	환자수	1	2
(a) 전체 COPD						
모든 입원 사례	8	8	16	12	0.12	0.50
COPD 악화로 입원	5	5	13	9	0.07	0.48
(b) 중등도 - 중증 COPD						
모든 입원 사례	3	3	12	8	0.04	0.53
COPD 악화로 입원	1	1	10	7	0.01	0.87

[0233] P(1)은 전체 개체에서 입원율을 비교한다.
 [0234] P(2)는 입원 개체에서 입원율을 비교한다.
 [0235]

[0236] 표 9: 가래 음성 개체에서 활성군 대 위약군의 방어능

		가래 시료의	가래 시료의	활성	위약	
		개체수 (급성 에피소드수)	개체수 (급성 에피소드수)			
일상의 가래 시료에서 성장한 임의의 병원체	+	21 (34)	14 (20)	1.42	1.62	12
	-	16 (16)	22 (16)	0.73	1.0	27
일상의 가래 시료에서 증식한 비피막형 헤모필루스 인플루엔자	+	14 (20)	8 (10)	1.25	1.42	12
	-	23 (30)	28 (26)	0.93	1.31	29

[0237] 표 10: 가래 음성 개체에서 활성군 대 위약군의 방어능

가래로부터 분리된 유기체	개체 비율 (%)		임상적 방어 비율 (%)	
	HI-1640V	Placebo	culture +ve	culture -ve
일상의 가래 시료에서 증식한 임의의 병원체	36	51	12	27
일상의 가래 시료에서 증식한 비피막형 헤모필루스 인플루엔자	22	38	12	29

[0239] 표 9 및 10은 개체/환자의 다양한 가래 시료에서 증식되는 박테리아 퍼센트를 나타낸 것이다. 활성군은 HI1640V 제품으로 치료되었다.
 [0240]

[0241] 1.17 고찰

[0242] COPD의 자연사의 중요한 사건으로서 급성 악화는 현형 지침에서 중재 요법의 특별한 타겟으로 인지되고 있다. 새로운 NTHi (NTHI-164) 분리주로부터 제조된 경구 백신(HI-1640V)을 이용하는 면역요법의, 악화 사례 및 중증

도에 대한 영향을 보기 위해, 재발성 악화 경력이 있는 COPD 개체에서 조사하였다. 그러나, 이러한 개체들에서 COPD를 가진 개체는 전체 중 20-25%에 불과하여, 본 연구는 계획된 것보다 적은 수의 등재자를 대상으로 하게 되었다. 이러한 어려움은, '가래의 부피 및 고름의 증가'로 급성 발병을 정의하는 고전적인 표현적 정의를 사용함으로써 더욱 어렵게 되었다. 이러한 정의는 급성 발현의 감염성 오리진을 반영하고는 있지만, COPD에서 기관지내 염증의 가변적인 백그라운드 수준을 부정확하게 제시하여, 분리된 증상 발현의 구별을 어렵게 할 수 있다. 정의에 의한 한계에도 불구하고, 본 실험을 통해 2가지 결론을 취할 수 있다. 첫째로, COPD 및 재발성 악화 특성을 보이는 개체는 HI-1640V를 이용한 경구 면역요법이 도움이 되며, 특히 중증도가 감소된다. 두 번째로, 중등도 내지 중증 COPD인 개체는 질병 수준이 보다 경미한 개체 보다 더 큰 수준으로 도움이 된다.

[0243] 가래 고름 증가를 표현하는 정의 이용시 '전체 COPD'에서의 악화 사례율이 감소되는 경향이 있지만, 몇 가지 관찰 결과들은 임상적인 관련성이 있는 것으로 이러한 결과 지표(outcome measure)를 뒷받침한다. 위약군의 분석에서는 실험 초기에 높은 발생율이 나타났다. 본 연구의 2차 3개월에 35%의 높은 방어 수준은 따라서 면역증강의 지연성 개시와 부합되며, 실험의 후반기에 보다 정확한 방어를 형성한다. 또한, 위약군에는 2-4회 재발된 환자의 수가 2배보다 많이 포함되어 있어, HI-1640V 치료제가 재발 발현을 예방하는데 특히 효과적이라는 것을 시사한다. 설득력있는 데이터는, 방어율이 50%를 넘었을 경우, 치료, 특히 코르티코스테로이드를 이용한 치료 관점에서 정의되는 에피소드 분석에서 나온다. 이러한 데이터 세트는, 보다 중증인 에피소드에 대한 좀 더 분명한 것 방어(cut protection)를 보여주는데, 이는, 면역요법의 주된 가치가 적어도 COPD를 가지고 있으며 빈번하게 발현되는 개체에서, 악화 중증도 파라미터의 감소와 관련 있음을 의미한다.

[0244] 모든 중증도 파라미터에서의 유용성과 일관되게 활성 치료 후 중증도 파라미터 간에는 차이가 있었는데, HI-1640V 치료 후 에피소드는 줄고, 항생제 및 경구 코르티코스테로이드 치료는 감소하며, 입원 확률은 낮아졌다. 규정된 요법 또는 투약 일수의 측면에서의 항생제 사용이, 항생제로 치료된 에피소드를 단순히 분석하는 것보다는 유용한 지수로 활용되었으며, 이는 화농성 가래의 대부분의 에피소드가 심각도와 무관하게 항생제 사용으로 치료되지만, 임상적으로 중증으로 판명된 경우에서만은 반복 요법을 유도한다는 것을 시사한다. 중등도-중증 질환 환자의 입원율의 유의성 있는 감소는 작은 크기의 시료가 주어졌음에도 임상적인 결과이다. 출원인은 유사한 입원율의 감소능을 보이는 임의의 다른 중재적 시술을 알지 못한다. 숫자가 작고, 이러한 결과가 중등도-중증 COPD 군에서만 유의성이 있지만, 중등도-중증 질환 환자에 더 큰 효과를 나타내는 다른 모든 중증도 파라미터의 개선과 일맥상통한다. 이것은 대부분의 손상된 기도를 가진 개체에서, 기도 감염의 감소에 대한 임상적인 유용성이 더 크다는 것을 반영할 수 있다.

[0245] COPD의 급성 악화 충격을 완화시키는 것을 목적으로 하는 비교 치료 표준은 플루티카손/살메테롤 (500/50mcg)이 된다. 이러한 조합 시험은 유량 정체 또는 모든 원인에 의한 사망률을 계측한 1차 결과가 있는 다수의 개체를 포함한다. 이 시험에 포함된 개체는 중등도-중증 COPD를 가지지만, 현 시험에서의 빈번한 급성 에피소드 때문에 선택된 것은 아니다. 각 시험에서 코르티코스테로이드-치료로 정의되는 급성 에피소드의 약 40%에 달하는 방어율이 관찰되었으며, HI-1640V 시험에서보다 낮은 수준이지만, 다수에서 가능한 효능 증대를 반영하는 유의 수준이 확인되었다. HI-1640V 시험에서 확인된 바와 같이, 더 중증 질환 환자에서 특히 유용한 것으로 나타났다. 그러나 플루티카손/살메테롤은, HI-1640V를 사용한 시험에서 얻어진 데이터와는 대조적으로, 입원을 필요로 하는 것으로 정의되는 '중증' 악화를 작게 혹은 전혀 (0% 및 17%) 방어하지 않았다. 이 시험에서 확인된 매년 약 9%의 입원율은 2-3배 정도 더 높은 입원율과 비교되었다. 이러한 높은 입원율은 더 중증 질환의 마커로서 빈번한 악화를 반영한다. 급성 에피소드를 항생제-치료의 관점에서 정의할 때, 활성군에서 에피소드 수의 증가가 있었다. 이것은 HI-1640V 시험에서 항생제 치료로 에피소드가 감소된 것과는 대조적이었다. 항생제로 정의되는 급성 에피소드의 증가는 흡입성 스테로이드와 관련된 감염 경향 (구강인두의 아구창 및 폐렴)과 일관된다.

[0246] COPD 환자에 대한 초기 계통 연구(Early longitudinal studies)는 안정한 질병 상태에서 가래 중의 박테리아의 분리율이 급성 에피소드 상태에서와 유사하였기 때문에, 병인에서 박테리아의 역할을 밝히는데 실패하였다. 최근의 전향적 연구는 분자 형별검사(molecular typing)를 시행하여, 박테리아 병원체의 신규 균주와 COPD 악화 간의 관련성을 검증하였다. 후자의 연구에서 일정한 가래 샘플 내 박테리아의 분리 빈도는 본 연구에서 확인된 것과 매우 유사하였으며, 병원균의 분리가 현재의 악화와 유의성 있게 관련되어 있었다. 안정한 질병 상태에서 얻어진 본 연구의 데이터 경향은 다음과 같은 컨셉과 연결된다: 양성 가래 배양물은 급성 악화의 위험 인자로 보인다 (개체가 위약군인지 활성군인지를 불문함); 위약군에 대해 활성군을 비교하면, 병원균 증식이 있는 배양물과 증식이 없는 배양물 모두에서 활성군의 방어가 증대된 것으로 나타났다. 이러한 결과는, 병발성 바이러스 감염과 같은 전염증성 사례에 대해 저항하는, '신규' 박테리아 균주의 획득, 및/또는 기도의 박테리아 콜로니화

수준의 감소에 대한 점막 저항성의 개선을 반영한다고 할 수 있다. 어떠한 경우에도, NTHi 항원에 의한 폐이에르관-유래 T 세포의 특이적 활성화가 비특이적 효과기 기전으로서 작용하는 포식 세포의 동원과 활성화를 조정한다.

[0247] 사멸된 NTHi (HI-1640V 백신)을 이용한 경구 면역치료는 소화관-관련 림프조직 (GALT)을 활성화시켜, 특이적 T 림프구를 기관지 점막으로 유도한다. 최근 연구에 따르면, 기관지 내용물을 소화관으로 흡인(aspiration)하는 것이 GALT에 대한 항원 제시의 생리 기전이며, HI-1640V의 경구 투여가 T 세포 활성화의 주기적인 과정을 최적화하는 역할을 하는 것으로 나타났다. HI-1640V는 유럽에서 '면역 방어'를 위해 광범위하게 사용되는 폴리박테리아 추출물과는 상이한 물질이다. 그것은 폴리박테리아 산물에서 사용되는 것보다 더 높은 농도로 전세포 제형으로서 제형화된, 단일종 박테리아를 포함함으로써, 특이적 폐이에르관 면역 반응을 유도한다. 만성 기도 질환이 있는 개체에서 폴리박테리아 분리주를 이용한 분석 연구는, 폴리박테리아 산물과 경구 NTHi 면역치료 간의 비교 연구에서 확인된 결과인, 악화의 유의성 있는 감소를 보여주는데 실패하였다.

[0248] **실시예 4: NTHi-164는 켈런지 실험에서 보다 강한 NTHi-166 보다 교차-방어 수준을 형성한다**

[0249] NTHi 분리주 패널을 이용한 기관내(IT) 면역화 및 급성 호흡기 감염 켈런지의 랫트 모델에서, 백신으로 테스트한 NTHi-164 및 NTHi-166 (NTHi289)은, 차별적인 방어 수준을 제공하였다. 감염 켈런지에 사용한 분리주는 NTHi-164, NTHi-165, NTHi-166, NTHi-167, NTHi-168, ATCC 3041, ATCC 43095, ATCC 35092 및 ATCC51997이었다.

[0250] 백신 그룹에 의해 제공되는 방어를 확인하기 위해, 8-10주령의 다크 아구티 랫트(그룹 당 랫트 5-6마리)를 50 uL의 PBS, 또는 5×10^8 의 사멸시킨 NTHi-164 또는 NTHi-166이 포함된 PBS 50 uL를 이용하여, 0일 및 14일에 기관내(IT)로 면역화하였다. 21일에, 랫트에 감염 켈런지 NTHi 균주 패널 중 한 가지를 감염시켰다. 감염 4시간 후에 랫트를 희생시키고, 폐를 5 x 2 mL의 PBS로 세척하여, 기관지폐포 세척(BAL) 유액 10 mL을 제공하였다. 그 후, 폐를 10 mL의 PBS에서 균질화하여, 페 호모제네이트(LH) 현탁액을 만들었다. BAL 및 LH의 10배 연속 희석물 중 샘플 20 uL를 초콜릿 아가에 도말하여, 37°C, 5% 이산화탄소 공기에서 밤새 인큐베이션하였다. 콜로니의 수를 세고, BAL 및 LH내 살아있는 NTHi의 수를 각 랫트에서 계수하였다. BAL 및 LH에서의 박테리아 수를 더하여, 각 랫트에 대한 폐내 총 박테리아 수를 정하였다. 평균 박테리아 수치는 각 랫트 그룹에서 계산하고, 박테리아 소거율을 하기와 같이 PBS 대조군과 비교하여 결정하였다:

[0251]
$$[(\text{PBS 그룹에서의 박테리아 평균} - \text{백신 그룹에서의 박테리아 평균}) / \text{PBS 그룹에서의 박테리아 평균}] \times 100$$

[0252] 4시간의 박테리아 소거율은 백신에 의해 제공되는 방어 수준의 척도이다.

[0253] 9종의 켈런지 감염 균주들의 패널에 대한, 각각의 테스트 백신에 의해 제공되는 박테리아 평균 소거율을 계산하였다. NTHi-164 백신의 경우, 패널에 대한 평균 박테리아 소거율은 $84 \pm 4\%$ 이고, NTHi-166 백신의 평균 박테리아 소거율은 $78 \pm 2\%$ 였다. 이는, 사멸된 NTHi-164로부터 제조된 백신이 NTHi-166으로 제조한 백신 보다 감염 균주 패널에 대해 더 높은 수준의 박테리아 소거를 제공하며, 따라서 전세포(whole-cell) 백신으로서 유용하다는 것을 보여준다.

[0254] **실시예 5: HI-164는 비-헤모필루스 종들에 대한 비특이적인 면역 반응을 형성한다**

[0255] 중도 내지 중증도의 기도 질환을 가진 환자의 급성 기관지염의 증상 발현 방어를, 포르말린으로 사멸시킨 NTHi-164가 포함된, 비피막형 헤모필루스 인플루엔자(NTHi)의 전세포 사멸 백신(이하, "HI-1640V")을 경구 투여한 경우의 안전성 및 효능을 평가하기 위한, 복수-기관, 이중 맹검, 위약 대조 임상 연구

[0256] **1.18 대상 & 방법**

[0257] **1.18.1 1차 대상자(활성균 대 위약 그룹):**

- [0258] - 급성 기관지염의 증상 발현 횟수 비교
- [0259] - 급성 기관지염 증상이 발현되는 환자의 비율 비교
- [0260] - 급성 기관지염 증상의 발현 지속 기간 비교

[0261] **1.18.2 방법**

[0262] 중도 내지 중증도($FEV_1 \leq 50\%$ 예상치)의 기도 질환을 가진 환자의 급성 기관지염의 증상 발현 방어를 위한,

NTHi Hi-1640V 전세포 사멸 백신을 경구 투여한 경우의 안전성 및 효능을 평가하기 위한, 다기관, 이중 맹검, 위약 대조, 병행 그룹, 전방 연구.

[0263] 환자를 실험 약물 또는 위약 중 어느 한가지에 대해 1:1로 무작위 할당하였다. 환자에게 연속 3개월 동안 매달 연속 3일간 약물 치료를 실시하였다. 미생물 검사는 Hi의 정량적 검출을 위해 인후 가글액과, Hi의 정량적 검출 및 모락셀라 카타르할리스, 스트렙토코커스 뉴모니아 및 슈도모나스 종의 반-정량적 검출을 위한 가래 시료를 대상으로 수행하였다.

[0264] **1.18.3 환자의 수(계획 및 분석)**

[0265] 실험 샘플 크기는 5% 유의 수준 및 80% 검정력(power)을 토대로 계산하였고, 그룹 당 참가자 50명의 샘플 크기로 하기 검정을 수행할 수 있을 것으로 생각되었다.

[0266] - 상대적인 감염 위험도 약 0.63(즉, 상대위험도 감소(relative risk reduction) 37%), 위약 그룹에서의 감염율 2 예측;

[0267] - 임의의 감염을 경험하는 환자 비율의 절대 감소 28%(임의의 감염에 걸린 위약 그룹의 80% 예측);

[0268] - 상대적인 항생제 처방 위험도 0.67(즉, 상대위험도 감소 33%), 위약 그룹에서 처방율 2.4 예측;

[0269] - 평균 감염 지속일 차이 1.2일(지속일 표준 편차 2일).

[0270] 20%의 참가자들이 실험을 완료하지 못할 것으로 가정하면, 124명을 무작위 할당하여, 각 그룹에 동원되어야 하는 수는 62명이었다. 실제 무작위 배정하여 분석한 수는 38명이었다. 각 처리 그룹에서 2명이 낙오하였는데, 각 그룹에서 1명은 부작용으로 인해 실험을 중단하였다. 환자들은 4곳의 실험 센터에서 모집하였다. 4곳의 참여 센터에서 예전 2년 동안 매해 급성 기관지염 증상이 2번 발현된 포함 기준도 만족시키면서 질환의 요구되는 중증도를 가지고 있는 활용가능한 집단은 제한적이었기 때문에, 환자 모집은 계획한 수를 채우지 못하였다.

[0271] **1.18.4 제품, 용량(dose) 및 배치 번호**

[0272] HI-1640V 장-코팅 정제: 포르말린으로 불활성화한 NTHi-164 45 mg + 부형제가 포함됨. 동결건조한 활성 물질을 HI-164라고 한다. 위약 장-코팅 정제에는 부형제만 함유되어 있다. 위약과 HI-1640V는 2-8℃에 보관하였고, 정제의 무게는 약 450 mg이었다.

[0273] **1.18.5 투여 및 실험 기간**

[0274] 연속 3개월 동안 매달 연이어 3일간(1일-3일, 29일-31일 및 57일-59일), 식전 30분에 빈 위장에, 약물을 물 한잔과 함께 경구 복용하는 실험을, 환자에게 수행하였다. 실험 기간은 약 8개월이다.

[0275] 연속적인 3개월 동안 매달 연이어 3일간(1일-3일, 29일-31일 및 57일-59일) 약물을 복용하는 실험을 환자에게 수행하였다. 실험 기간은 약 8개월이다.

[0276] **1.18.6 평가 기준**

[0277] 1차 효능성 변수(efficacy variable)는 다음과 같다:

[0278] - 급성 기관지염의 증상 발현 횟수

[0279] - 급성 기관지염의 발현을 경험하는 처리 환자의 비율

[0280] - 급성 기관지염 증상 발현의 지속 기간

[0281] - 기관지염의 급작스러운 증상 발현 치료하기 위한 항생제 처방(course) 횟수

[0282] - 가래에서 모락셀라 카타르할리스, 스트렙토코커스 뉴모니아 및 슈도모나스 종의 존재

[0283] - 급성 기관지염의 증상 발현의 중증도

[0284] **1.18.7 통계 방법**

[0285] 통계 분석은 38명의 ITT(intention-to-treat) 집단, 즉 모두가 어떤 실험 약물을 처방 받을지에 상관없이 치료에 대해 무작위 할당된 환자를 대상으로 수행하였다. 모든 관련 데이터는 처리군으로 요약하였다. 분석은 3가지 섹션으로 구성된다:

- [0286] - 실험 종료시의 회복(Recruitment) 및 상태
- [0287] - 베이스라인 특징들
- [0288] - 1차 및 2차 목표에 대한 치료 효과 평가
- [0289] 1차 테스트한 가설은, 급성 기관지염의 증상 발현을 예방하는데 HI-164가 위약보다 우수하다는 것이었다. 급성 기관지염의 증상 발현 횟수를 반복 측정인 GEE Poisson 회귀 및 Cochran-Mantel Haenszel 테스트를 이용하여 그룹달 간에 비교하였다. 시험 추적 기간 동안에 급성 기관지염 증상이 1회 이상 나타난 참가자의 각 처리 군에서의 비율을, 피서의 정확도 검정으로 비교하였다. 급성 기관지염의 증상이 발현되는 지속 기간도 로그-등급 테스트 및 윌콕슨 등급-총합 테스트를 이용하여 비교하였다.
- [0290] 급성 기관지염 증상 발현은 연구자의 보고서와 호흡기 감염 특성의 부작용 발생으로 정하였고, 검증은 필요한 실험으로부터 구하였다. 급성 기관지염의 증상 발현을 치료하기 위해 항생제를 투여한 횟수를 Cochran-Mantel Haenszel 테스트를 이용하여 비교하였다. 급작스러운 증상 발현의 치료를 위한 항생제를 투여한 전체 기간(일수)을 윌콕슨 순위-총합 테스트를 이용하여 비교하였다.
- [0291] **1.18.8 환자 집단 요약**
- [0292] 모집 타겟인 무작위 할당할 환자 124명이 충족되지 않았으며, 실제 스크리닝한 환자의 수는 42명으로, 이중 38명을 무작위 할당하였고, 34명은 실험을 완료하였다. 무작위 할당할 환자들 중, 실험을 완료하지 못한 환자들 각 그룹에서 2명 있었는데, 각 그룹에서 1명은 부작용으로 인해 중지하였다. 베이스라인 환자 실태적 인구 통계는, HI-1640V와 위약 그룹이 일반적으로 비슷하였다. 집단의 평균 연령은 약 70세였다. 여성보다 남성의 수가 더 많았고, 활성 그룹과 위약 그룹 각각에서 남성은 83.3% 및 70.0%이었고, 여성은 각각 16.7% 및 30.0%였다. 전체 환자에서, 평균 FEV₁은 0.95 L/초였으며, 활성 그룹과 위약 그룹이 비슷하였고, 중앙값은 활성 그룹 및 위약 그룹이 각각 1.00 및 0.85였다. 양쪽 그룹에서 높은 비율의 환자들이 비흡연 보다는 흡연 이력을 가진 것으로 보고되었다(흡연 84.2% 대 비흡연 15.8%). 환자의 평균 흡연량은 51.36 pack years이었고, 중앙값은 45.5 pack years였으며, 활성 그룹 및 위약 그룹 각각에서의 중앙값은 각각 45.0 및 46.0 pack years였다. 스크리닝시 환자의 15.8%는 여전히 흡연을 하고 있었다(양 그룹이 비슷한 분포를 보임).
- [0293] 병력은 흡연을 하고 인지된 기도 질환을 가지고 있는 대부분의 이러한 연령대의 환자 집단과 일치되었다. 중요하게도, 위약 그룹이 HI-164V 그룹과 비교하여 더 많은 환자들에서 심장 장애 병력이 보고되었다(13(65%) 대 5(27.8%); p = 0.028). 전신 장기 유형에 따라 그룹들 간의 증상 분포는 통계적으로 유의한 다른 차이는 없었다. 호흡기 장애와 관련하여, COPD는 활성 그룹과 위약 그룹에서 61.1% 및 45.0%로 각각 기록되었으며, 천식은 활성 그룹과 위약 그룹에서 각각 33.3% 및 10.0%로 기록되었으며, 기관지 확장증은 활성 그룹과 위약 그룹에서 각각 11.1% 및 20.0%로 기록되었고, 폐기종은 활성 그룹과 위약 그룹에서 각각 22.2% 및 35.0%로 기록되었다. HI-1640V 그룹에서 8명(44.4%)과 위약 그룹에서 10명(50%)에서 감염과 체내 침입이 보고되었다.
- [0294] **1.18.9 1차 효능 변수**
- [0295] 급성 기관지염의 증상 발현 횟수: HI-1640V 그룹의 환자 18명 중 13명과 위약 그룹의 환자 20명 중 13명에서, 22번의 증상 발현이 있었다. 매달 급성 기관지염 증상 발현의 분석에서, 위험율 0.83 [95% CI 0.47, 1.46]이 확인되었는데, 이는 통계학적 유의성은 없었지만 치료에 유익하다는 것을 의미한다 (p=0.520). 3달 간격의 분석에서, 위험율은 0.84 [95% CI 0.48, 1.49]이었는데, 이 역시 통계학적으로 유의하지 않지만 치료 효과가 있다는 것을 의미한다 (p=0.397). 그러나, 연구 초기 3개월 동안에는 급성 기관지염 발생율이 비슷하였고(각 그룹에서, 1일 당 환자 100명 당 사례수 0.82), 마지막 달에, 발생율은 위약 그룹이 0.85, HI-1640V 그룹이 0.60이었다. 이 결과는, 유의하진 않았지만, 약물 3 사이클을 모두 투여한 이후의, 2차 주기에서의 HI-1640V의 유의성을 시사한다(회귀 p 값: 주기 0.894, 치료 0.397, 상호작용 0.533). 2차 주기 동안, 증상 발현 횟수는 약 30% 감소되었는데, 이는 임상적으로 가을 후기에 시작한 연구와 임상적으로 관련있으며, 유익성이 명백해지기 전 6-8주의 정체기에 이전 연구들에서 추측되었다.
- [0296] 3월-5월 기간 대 나머지 겨울 시즌에 분석하였을 때, 치료 효과(위험도)는 0.92 [95% CI 0.50, 1.67]이었으며, 이 역시 통계학적으로는 유의하진 않지만 HI-1640V를 이용한 치료가 전반적으로 유익함을 시사한다(p=0.262). 이 기간 동안 그룹들에서의 발생율은, 3월-5월에, 위약 그룹이 1일 당 환자 100명에 대해 0.69 건이고, HI-1640V 그룹이 1일 당 환자 100명에 대해 0.85건이었다. 6월-10월의 발생율은 위약 그룹이 1일 당 환자 100명 당 0.90건, HI-1640V 그룹이 1일 당 환자 100명 당 0.59건이었다.

- [0297] 급성 기관지염 증상 발현을 경험하는 치료 중인 환자의 비율: 2가지 그룹에서 급성 기관지염 증상 발현을 경험하는 환자의 비율은 통계적으로 유의하게 차이가 나지 않았다 ($p=0.734$).
- [0298] 급성 기관지염 증상 발현의 지속 기간: HI-1640V 그룹(8.5일)이 급성 기관지염 증상 발현의 지속 기간 중앙값은 위약 그룹(15.0일) 보다 더 짧았지만, 이는 통계적으로 유의하지 않았다($p=0.0879$). 그러나, 증상 발현의 평균 지속 기간은 유의하게 상이하였다: HI-1640V 그룹은 14.32 ± 17.01 (SD) 일, 위약 그룹은 22.72 ± 18.76 (SD) 일 ($p=0.0141$).
- [0299] 급성 기관지염의 최초 증상 발현까지의 시간의 중앙값 분석은 통계학적으로 유의한 차이가 없었다 (HI-1640V 그룹: 81.0일, 위약 그룹: 100.0 일; $p=0.7962$).
- [0300] 급성 기관지염 증상 발현을 치료하기 위한 항생제 처방(course) 횟수: 급성 기관지염에 대해 항생제 처리받은 환자의 수는 HI-1640V 그룹과 위약 그룹 간에 비슷하였다(각각 11명 대 13명). 이들 동일한 환자에서, HI-1640V 그룹의 항생제 처방 건수가 더 적었으며(19 대 위약 48), 이러한 차이는 유의하였다($p=0.031$). (이 계산은 급작스러운 기관지염 증상 발현에 대해 처방된 항생제에 대한 과거 임상 리뷰를 기초로 함). 또한, 활성 그룹(3번 처방받은 환자 1명, 5번 이상 처방받은 환자 1명) 보다 위약 그룹(3번 처방받은 환자 5명, 5번 이상 처방받은 환자 6명)이, 항생제 처방 건 수가 더 많은 환자의 수가 더 많았다. 급성 기관지염 증상 발현에 대해 항생제 치료받은 전체 일 수는 >75% 감소되었다: 위약 그룹 총 543일 및 HI-1640V 그룹 136일 ($p=0.013$). 환자 당 항생제 요법을 투여받은 평균 일 수는, 위약 그룹이 41.77일(범위 5 - 117일)이고, HI-1640V 그룹이 12.36일(범위 1 - 41일)이었다.

[0301] **1.18.10 2차 효능 변수**

[0302] 방어의 서로게이트(surrogate) 점막 면역 마커 측정(혈청내 NTHi-특이적 항체): NTHu 항원에 대한 항체는 본 실험 시에 실험 초기와 말기에 검출되었다. 흡연을 하고 있지만 대부분은 다양한 수준의 기관지내 콜로니 형성 (intrabronchial colonization)으로 나타나는 기도 질환을 자각하지 못했던 HI-H003 연구의 대상자들에서 개체들에서 지적되었던 바와 같이, 평균 수준 또는 편차 크기(큰 SE 막대로 결정)는 위약 그룹과 활성 그룹 간에 유의한 차이가 없었다. 중도 내지 중증도의 COPD(HI-H002 연구)를 앓고 있는 개체의 경우, IgG 항 NTHi 항체의 변화는 소폭이었지만 유의한 차이가 있었으며($\log_{10} 0.15$; $p=0.004$), IgA 항 NTHi 항체 변화와 비슷한 추세 경향을 보였다($\log_{10} 0.09$; $p=0.08$). 이렇듯 유의한 치료 효과는 FEV₁ >50%으로 예측되는 개체에서는 볼 수 없었다. 기전은 불명확하다. 치료에 대한 항체 반응을 더 자주 모니터링하면 변화 기전에 보다 명확한 상황을 파악할 수 있다.

[0303] 가래내 H. 인플루엔자, M. 카타르할리스, S. 뉴모니아 및 슈도모나스 종의 존재: 본 실험의 가래 시료에 대한 박테리아 결과는, 경구 NTHi 요법을 처방받은 개체에서, 더 적은 수의 비-NTHi 병원체(모락셀라 카타할리스, 스트렙토코커스 뉴모니아, 및 슈도모나스 에어루지노사)가 일관되게 분리되는 것으로 나타났다. 예를 들면, HI-1640V 그룹에서의 양성 배양 시료의 총 수는 34였으며, 위약 그룹은 66이었는데, 이중 H 인플루엔자는 각각 17회 및 22회 분리되었다. 활성 그룹과 위약 그룹에서 '다른 병원체' 로드(load)는 각각 17개의 분리주 및 44개의 분리주였으며, 이들 다른 콜로니 형성하고 있는 병원체들은 주로 모락셀라 종과 슈도모나스 종들이었다. HI-1640V 그룹의 환자 4명과 위약 그룹의 8명은, 실험하는 동안에 분리되는 박테리아의 수가 2가지 이상이었다. 이러한 결과는, 이전의 Broncostat™ 연구에서의 정성 데이터와 일치된다. HI-1640V로 치료한 후에 확인된 일반적인 병원체 분리주의 감소는 최종 작용 기전(즉, 식균 작용)의 비-특이적인 특성을 반영하는 것이거나, 또는 위약 그룹에서의 더 많은 항생제 사용을 반영하는 것으로 해석된다.

[0304] 급성 기관지염의 증상 발현의 중증도: 급성 기관지염 증상 발현의 중증도를 측정하기 위한 프로토콜에 명시된 특이 파라미터는 없다. 그러나, 전신 코르티코스테로이드의 사용, 그리고 이러한 증상 발현에 대한 조치로 다른 병행 약물 처방 및 호흡기 질환으로 인한 환자 입원은 중증도를 평가하는 척도이다. HI-1640V 그룹의 환자들은, 급성 기관지염 증상 발현으로 인한 전신 코르티코스테로이드 치료제를 약간 제공받은 것으로 확인되었다 (HI1640V 그룹은 4명, 위약 그룹은 11명). 전신 스테로이드 치료 일 수는 통계적인 유의성은 없었지만, 현저한 차이가 있었다(HI-1640V 그룹: 61일(평균 15.25일); 위약 그룹: 289일(평균 26.27일); $p=0.259$). 또한, 호흡기 부작용을 조치하기 위해 입원한 건 수도 위약 그룹($n=7$, 입원 건수 10건)이 HI1640V 그룹($n=1$, 입원 건수 1건) 보다 3배 많았으며, 통계적으로 유의하였다($p=0.0362$).

[0305] **1.19 안전성 결과**

- [0306] 부작용: 임의의 1차 전신 장기 유형에서 AE를 경험하는 환자의 총 비율은 비슷하였다(HI-1640V 그룹 18(100%) 대 위약 그룹 19 (95%)). 보고된 AE의 대부분은 경증 내지는 중간 수준이었으며, 실험 처리와 관련있는 것으로 보이지 않았으며, HI-1640V 그룹은 1명(환자 03으로 중간 수준의 위장염 발현)이고, 위약 그룹은 2명(환자 14는 제1 방문 후 중간 수준의 발진과 홍조가 생겨, 더 이상 실험 약물 처리를 하지 않는 것으로 권고받았으며, 환자 27은 경미한 구역질이 있었음)이었으며, 부작용은 실험 처리와 관련 가능성이 있는 것으로 기술되었다. 부작용은 실험 처리와 명확하게 관련있는 것으로 간주되지 않았다.
- [0307] 위약 그룹의 환자 1명은 실험을 시작한 후 약 2개월째에 슈도모나스 감염으로 인해 만성 기류 제한(airways limitation)이 악화되어 사망하였다. 이 환자는 실험 약물 처방을 2차례의 코스를 완료하였고, 2006년 5월 25일에 실험에서 빠졌으며, 2006년 7월 6일에 사망하였다. 부작용은 실험 처리와 관련된 것으로 보이지 않았다. 총 11명의 환자(HI-1640V 그룹은 3명(16.7%), 위약 그룹은 8명(40.0%))에서 심각한 부작용이 기록되었지만(통계적인 유의성 없음; $p=0.160$), 본 처리와 관련 없었다. 이들 11명의 환자(HI-1640V 그룹 3명 대 위약 그룹 8명)는 총 15번 입원하였다(HI-1640V 그룹의 입원 횟수 3번, 위약 그룹은 12번; $p=0.0472$). HI-1640V 그룹($n=1$, 1회 입원) 보다 위약 그룹($n=7$, 10회 입원)에서, 많은 환자들이 4번 이상 호흡기 관련 증상에 대한 조치로 입원하였으며, 이 결과는 통계적으로 유의하였다($p=0.0362$). 비-호흡기 관련 증상으로 입원한 환자의 수는 양 그룹이 동일하였다(환자 2명).
- [0308] 본 실시예의 실험은, 중도 내지 중증도(FEV_1 약 1.0 L/초, 예상치 <50%로 설명됨)의 기도 질환을 가지고 있으며, 이전 2년 동안 급성 기관지염 증상이 한해에 적어도 2번 이상 나타났던, 환자 각각 18명 및 20명에 대해, 부가적인 치료제로서 HI-1640V와 위약의 효과를 평가하였다. HI-1640V를 이용한 치료 효과는 1차 엔드포인트(primary endpoint)에서 보여졌지만, 소규모 치료 그룹에서 나타났고, 통계적인 유의 수준에 도달하지 않았다. 위약 그룹에서는 심장 질환을 가진 환자의 수가 더 많아 감염에 대해 유해한 작용 반응을 보일 가능성이 있다. 일관된 유의성은 1차 효능 엔드포인트에서 확인되었다. 급성 기관지염 증상 발현 횟수에서, HI-1640V 그룹이 위험도가 16% 감소되었는데, 이는 위약과 비교하여 이러한 증상 발현들의 평균 지속 기간 감소율은 약 35%였다($p=0.0141$). HI-1640V의 효능은 처리를 개시하고 처음 3개월에 나타났으며, 실험하는 동안에 유지되었다. 또한, 기관지염 증상 발현을 치료하기 위해 사용된 항생제 처방 건 수도 60% 감소되었고, 항생제 요법을 실시한 전체 일 수는 75% 감소되었다. 위약 그룹의 환자 11명과 HI-1640V 그룹의 환자 4명은 급성 기관지염 증상 발현에 대한 조치로 전신(경구 또는 정맥내) 코르티코스테로이드를 복용하였다. 이러한 결과는, 호흡기 관련 증상으로 인한 입원 감소에 의해 더욱 뒷받침되었는데, 위약과 비교하여 HI-1640V를 복용한 개체들 중 입원 중인 환자의 수는 80% 감소되었고(7 대 1), 입원 건수는 90% 감소되었다(10 대 1). 다른 이유로 입원한 비율은 양 그룹이 동일하였다. 중요한 점은, HI-1640V가 허용가능한 안전성 프로파일을 보였다는 것이다. HI-1640V 그룹에서 특정한 부작용 패턴은 없었으며, 생명 신호나 실험 데이터 상 명백한 문제는 검출되지 않았다.
- [0309] 박테리아 데이터에 따르면, 위약 그룹에서 H. 인플루엔자와 다른 병원체의 박테리아 콜로니 형성 수가 더 많았다. 이는, HI-1640V의 효능으로 인한 효능과 관련있는 것으로 해석되며, 또한 위약 그룹에서의 더 많은 항생제의 사용으로 인한 것으로 해석되거나 또는 더 많은 항생제의 사용에도 불구하고, 그러한 것으로 해석된다. NTHi 특이적 IgG 및 IgA 수준은 약간 증가하였다.
- [0310] 도 11 및 12에 나타낸 결과 데이터는, HI-1640V에 의한 특이적인 항원 면역 반응의 성공과 비특이적인 면역 시스템 자극을 설명해준다. 도 11은 권고되거나 추천받은 HI-1640V 처방을 투여 받았던 환자 그룹과 비교하여, 대조 그룹이 경험한 감염의 총 횟수를, 모든 환자(가래 오염이 있는 환자는 제외)에 대해 나타낸다. 이러한 결과들은, H. 인플루엔자 뿐만 아니라 환자의 기도(모락셀라 카타할리스, 스트렙토코커스 뉴모니아, 스트렙토코커스 중, 슈도모나스 에어루지노사, 슈도모나스 중, 스타필로코커스 아우레우스 및 미코박테리움 종 등을 포함하나, 이들로 한정되지 않음)나 점막에 감염하는 것으로 알려진 다른 유기체로 인한 감염율이 유의하게 감소됨을 보여준다. 이러한 결과는, 특히, HI-1640V가 면역화된 환자들에서 특이적인 면역반응과 비특이적인 면역반응 모두를 형성한다는 점을 부각시킨다.
- [0311] 또한, 중요한 점은, 도 11 및 12의 결과에서, 특이적인 면역반응 및 비특이적인 면역반응이 대략 등가이거나 균형을 이루고 있는 것으로 나타났다. 특히, Hi에 대한 특이적인 반응은 이차적인 박테리아 감염(예, 모락셀라 카타할리스, 스트렙토코커스 뉴모니아, 슈도모나스 에어루지노사, 슈도모나스 중 및/또는 클렙시엘라 뉴모니아)에 의한 대략 동일한 수준의 감염을 차단 또는 예방한다. 본 명세서에서, "대략 등가"는 0-5배수 범위에 포함되는 것으로 정의됨을 유념해 주시기 바란다.
- [0312] 결과는 또한, 비특이적인 면역 반응 형성을 위해, 환자가 본 구현예에서는 NTHi인 1차 박테리아 항원에 갑작스

렵게 감염되거나 또는 이전에 노출될 필요가 없다는 것을 보여준다는 점에 유념해 주시기 바란다. 따라서, 본 구현예에 기재된 경구 백신은 경구 백신이 성공하기 위해 NTHi 또는 Hi에 이전에 노출되지 않은 환자에서 감염 위험을 방어 또는 차단하는데 효과적일 수 있다.

[0313] 성공적인 결과는, 이 결과들이 COPD와 같은 중증 기도 질환을 앓고 있는 환자의 서브그룹 조사로 제한되었을 때 더욱 부각된다. 이들 서브그룹의 결과들은 도 12에 나타나 있으며, 이들 환자에서의 감염율이 매우 크게 감소됨을 보여준다. 즉, HI-1640V는 Hi에 대한 특이적인 면역 반응과 다른 박테리아 유기체에 대한 비특이적인 면역 반응 둘다를 형성함으로써, 전체 감염율을 낮추기 위한 용도에서의 유용성이 입증되었다. 상기 비특이적인 면역 반응은 점막이나 기도의 다른 박테리아 감염을 예방 또는 제한할 수 있으며, 이는 본 발명의 범위에 포함됨을 유념하여 주시기 바란다.

[0314] 도 13에서, Broncostat™ (PCT 출원 WO 86/05691에 기술됨) 및 HI-1640V 간의 차이가 매우 명확하게 나타나 있다. 표에는 각각의 백신을 투여한 후 혈액 T-세포 증식에 대한 자극 인덱스 증가를 나타내었다. 62주 후, HI-1640V는 T-세포 증식을 자극하지만, Broncostat™은 이를 달성하지 못하였고, 이러한 결과는 통계적으로 유의하였다. 표에 나타난 데이터는 본 발명의 백신에 의한 비특이적인 면역 시스템의 자극을 보여준다.

[0315] **실시예 6; 균주 HI-164의 물리적 특성**

[0316] **1.20 재료 및 방법**

[0317] **1.20.1 전 박테리아 추출물의 제조**

[0318] 방법 I- 초코렛 아가 플레이트상에서 성장한 박테리아

[0319] 초코렛 아가 플레이트를 NTHI-164의 단일 콜로니 또는 다른 헤모필루스 인플루엔자 분리주로 접종하였다. 플레이트를 37°C + 5% CO₂의 분위기에서 밤새 배양하였다. 그 결과 크게 증식하였다. 플레이트 표면으로부터 멸균 10 µl 루프로 박테리아를 제거하고, 마이크로관 내 CelLytic B 세포 용해 시약 0.5mL에 침지시켰다. (박테리아는 손가락 2개 사이의 루프를 비벼서 제거하고, 용해 버퍼에 침지되는 동안 빙빙 돌렸다). 마이크로관을 5분간 정치시켜 박테리아가 완전히 용해되도록 하였다. 그 후 마이크로관을 5분간 11,500g에서 원심분리하여, 임의의 불용성 세포 파편을 펠렛화하였다. 주의깊게 상청액을 멸균 마이크로관으로 옮긴 다음 필요시까지 -70°C에서 저장하였다. 샘플의 단백질 농도는 Pierce BCA 단백질 분석 키트를 사용한 단백질 추정 분석을 수행하여 측정하였다.

[0320] 방법 II- 트립톤 소야 배양액 + HTM 보충액에서 성장한 박테리아

[0321] 트립톤 소야 배양액 베이스와 HTM 보충액은 옥소이드로부터 얻었다.

[0322] HTM 보충액으로 트립톤 소야 배양액을 제조하기 위해, TSB 파우더 12.5gm를 정량하고, IL 쇼트(Schott) 병에 두었다. 그 후, 효모 추출물 2.5g을 정량하고, 병에 가하였다. 증류수 (0.5L)를 가하고, 병을 흔들어 재료들이 용해되도록 하였다. 그 후 배지를 15분간 고압멸균(autoclave)하였다. 배지를 실온으로 밤새 냉각시켰다. 2일째, 멸균 기술을 이용하여, 2mL의 멸균 증류수를 3mL 시린지와 19G 니들을 이용하여 HTM 보충액의 바이알에 가하였다. 이것을 빙빙 돌려 고체가 용해되도록 하고, 30분간 실온에서 정치하였다. 바이알의 내용물을 멸균 시린지와 니들로 배지 병에 가하였다. 쇼트 병의 내용물을 혼합하고, 날자를 기입하였다. 배지를 1달까지 2-8°C에서 저장하였다. 초코렛 아가 플레이트상에 HI-164의 단일 콜로니를 접종하고, 37°C + 5% CO₂의 분위기에서 밤새 배양하였다. (그 결과 크게 증식하였다). 3일째 제조된 TSB + HTM 배지 100mL를 250mL 엘렌메어(Erlenmeyer) 원뿔형 플라스크로 계량하고, 37°C 진탕 배양기에서 전가온하였다. 박테리아를 플레이트로부터 PBS로 수확하고; 이전에 작성된 광학 밀도 대 박테리아 농도 곡선과 비교하여, 광학 밀도를 측정하고, 필요로 하는 농도로 조정하여, 1 x 10¹⁰의 살아있는 NTHI-164 제제를 제조하였다. 배양액을 1 x 10¹⁰의 살아있는 NTHI-164 (10¹⁰/mL 중 1mL)로 접종하여, 초기 농도 1 x 10⁸/mL를 제공하고, 빙빙 돌려서 혼합하였다. 박테리아 현탁액을 11시간 동안 밤새 37°C 진탕 배양기에서 배양하였다. 이 시점에서, 박테리아는 최적 성장기에 있으며, 관심 있는 단백질을 발현하였다. 595nm에서 현탁액의 OD 리딩을 30분마다 측정하였다. OD가 안정화되면, 성장 곡선은 고정상에 도달하였다. 100 µl의 현탁액을 플랫폼 보텀 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 피펫으로 옮기고, 595nm 파장에서 측정하였다. 광학 밀도는 0.5-1.0 범위일 것이 요구되었다. 현탁액의 광학 밀도가 1.0보다 높으면, 여분의 멸균 배양액을 플라스크에 가하여 조정하였다. 조정 시 박테리아 현탁액 1.5mL를 5분간 11,500g에서 원심 분리하였다. 상청액을 제거하고, 펠렛을 0.4mL의 CelLytic B에서 재현탁시켰다. 이것은

짧게 볼텍싱하고, 5-10분간 혼합하여 용해성 단백질 전체가 추출되도록 하고, 다시 11,500g에서 5분간 원심분리하여 임의의 불용성 세포 파편이 펠렛화되도록 하였다. 상청액을 주의 깊게 멸균 마이크로관으로 옮기고, 필요시까지 70℃에서 저장하였다. 샘플의 단백질 농도는 Pierce BCA 단백질 분석 키트를 사용한 단백질 추정 분석을 수행하여 측정하였다.

[0323] 1.20.2 일차원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

[0324] 각 추출물 유래의 단백질 20 μg을 재증류수를 사용하여 20μl로 희석하고, SDS-정지 용액 10μl를 가하였다. 샘플을 BIORAD 정밀 분자량 마커로 12% SDS-PAGE 겔의 웰에 로딩하였다. 상단 염료가 겔 하단에 도달할 때까지 샘플을 200V로 이동시켰다. 그 후 Sigma EZBlue 염료로 겔을 염색시켰다.

[0325] 1.20.3 2차원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

[0326] 각 시료 100 μg을 아세톤 석출하고, 재수화 완충액에 재현탁하였다. 7 cm, 3-10 NL IPG 스트립을 1차원으로 사용하였고, 이때 총 포커싱 시간은 5시간 및 18750 Vhr이었다. IPG 스트립을 1.5 mm 두께의 12% SDS-PAGE 겔에 올리고, 아가로스로 실링하였다. 또한, 겔 상부에 분자량 아가로스 플러그를 주입하였다. 겔은 50A로 10분 전기영동한 다음 200V에서 45분간 전기영동하였다. 겔을 코마시 블루로 염색 후 24시간 동안 행구(destain)였다. 그런 다음 겔을 스캐닝하여, 스팟을 확인하였다.

[0327] 1.20.4 단백질의 MALDI 분석

[0328] 단백질 밴드 또는 스팟을 SDS-PAGE에서 적출하여, 1.5 ml 시험관에 넣었다. 밴드를 50% 메탄올/50 mM 암모늄 바이카보네이트를 3번 교체하면서 탈염하고, 밤새 공기 중에 건조하였다. 그 후, 밴드를 20 mM 암모늄 바이카보네이트에 용해시킨 200 - 400 ng의 트립신을 이용하여 재수화하였다. 밴드를 37도씨에서 3시간 인큐베이션하였다. 그 후, 밴드를 연화한 후 샘플 1 μl를 취하였다. 이 샘플을 CHCA 매트릭스와 1:1 혼합하고, MALDI 슬라이드 상에 스폿팅하였다.

[0329] 이 후, 샘플을 아머삼의 ETTAN MalDI-ToF를 이용하여 분석하여, 펩타이드 중량 핑거프린트를 구하였다. 분석의 일환으로 "nr" 데이터베이스를 이용하여 매치되는 것을 검색하였다. 양호한 매치를 보이지 않은 모든 샘플들은 추가적으로 "Swiss-Prot" 데이터베이스를 이용하여 검색하였다.

[0330] 1.21 결과

[0331] 1.21.1 일차원 겔

[0332] HI-164 및 HI-166 추출물을 일차원 겔에서 전기영동하였다. 겔 사진은 도 14의 좌측 패널에 나타낸다. 밴드의 정체는 도 14의 우측 패널에 나타나 있다. 외막 단백질 2는 NTHI-164 겔에서 밴드 2개로 나타나고, NTHI-166 겔에서는 밴드 1개로 나타난다. 이는, 2종의 박테리아 분리주들 간에 상기 단백질 차이가 있다는 것을 의미하며, 이로 분리주들의 방어력 차이를 설명할 수도 있다. NTHI-164에 존재하는 미확인 단백질 2종(MW 27 및 35)은 NTHI-166에는 존재하지 않았으며, 이들 단백질들은 HI-164에 의해 제공되는 우수한 방어에 기여할 수도 있다.

[0333] 일차원 겔은, 플레이트에서 증식시킨 HI-164와 도 15에 나타낸 다른 박테리아 분리주를 대상으로 전기영동을 수행하였다. 또한, 브로스에서 증식시킨 NTHI-164에 대한 겔 전기영동도 수행하였다. NTHI-164의 겔 패턴은, 플레이트 또는 브로스 증식 여부에 상관없이 동일하였으며, 다른 헤모필러스 인플루엔자 균주/분리주의 패턴과는 상이하였다. NTHI-164와 가장 비슷한 패턴은 NTHI- 167의 것이었다.

[0334] 1.21.2 2차원 겔

[0335] 플레이트에서 증식시킨 박테리아 분리주의 추출물에 대한 2차원 겔을 준비하였다. 2D 겔들은 하기 도 16A-16D에 나타내었다. 2D 겔에서, HI-164 겔에 2개의 스팟이 존재하고 있어, HI-164 (도 16A)와 HI-166 (도 13 B)는 외막 단백질 P2가 다른 것으로 보인다. HI-164 외막 단백질 조제물(즉, 추출한 외막 단백질)의 2D 겔(도 16C)에서, 이 조제물에서 주 단백질은 OMP2와 OMP26인 것으로 보인다.

[0336] 1.21.3 MALDI 단백질 분석

[0337] 1차원 겔로부터 유래된 서열분석한 밴드의 정체는 도 14의 우측 패널에 나타내었다. 2D 겔로부터 유래된 서열 분석한 특정 스팟의 정체는 하기 표 11A - 11D에 제시하였다.

[0338] 표 11A: HI-164 전세포물의 2D 겔상 스팟 정체

시료	ID	MW	pI
spot 39	번역 신장 인자 (GTPase)	77	5
spot 54	분자 샤페론	68.2	4.8
spot 61	5'뉴클레오타이드/2'3'사이클릭 포스포디에스테라제 및 관련 에스테라제	59.9	6.1
spot 69	ABC-타입 올리고펩타이드 수송계, 주변세포질 성분	60.9	6.2
spot 77	포스포에놀피루베이트 카르복시키나제 [ATP]	59	5.4
Spot75	포스포에놀피루베이트 카르복시키나제 [ATP]	59	5.4
spot 95	트립토파나제	53	6.2
spot 107	트립신-유사 세린 프로테아제, 일반적으로 주변세포질, C-말단 PDZ 도메인 함유	49.1	7.7
spot 127	없음		
spot 133	트랜스글루타미나제-유사 효소, 추정 시스테인 프로테아제	41.1	6.5
spot 142	A쇄, 헤모필루스 인플루엔자 철-결합 단백질 Apo 형태	33.7	7.9
spot 159	A쇄, O-아세틸세린 설프하이드릴라제 복합체	33.2	6.2
spot 162			
spot 184	카르보닉 안하이드라제	28.7	6.6
spot 186	포스포리보실트랜스퍼라아제	28.9	11

[0339]

시료	ID	MW	pI
spot 188			
spot 254	없음		
spot 206	수퍼옥사이드 디스무타제 [Mn]	24	6.2
spot 212	없음		
spot 216	리보솜 리사이클링 인자	20.75	6.8
spot 249	촉발 인자	48	5
spot 252	외막 단백질 P2	38	9.2 ⁽¹⁾
spot 256	D-갈락토스-결합 주변세포질 단백질	33	5.3
spot 259	외막 단백질 P2	38	9.1 ⁽¹⁾
spot 261	없음		

(1) pI은 2D 겔 상의 위치와 부합하지 않음

[0340]

[0341] 표 11B: HI-164 OMP prep의 2D 겔상 스팟 정체

시료	ID	MW	pI
spot 126	외막 단백질 P2	38	9.1
spot 137	ABC-타입 Zn ²⁺ 수송계, 주변세포질 성분 표면 부착소	37.1	6.3
spot 160	FKBP-타입 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 1	26	6.8
spot 168	외막 단백질 26	20	7
spot 183			

[0342]

[0343] 표 11C: HI-166 전세포 prep의 2D 겔상 스팟 정체

시료	ID	MW	pI
spot 28	번역 신장 인자 (GTPase)	77	5
spot 38	분자 샤페론	68.2	4.8
spot 43	올리고펩타이드 ABC 수송계, 주변세포질 결합 단백질 (oppA)	60.45	6
spot 98	주요 외막 단백질 P2	39.99	9.2
spot 102	ABC-타입 Zn ²⁺ 수송계, 주변세포질 성분 표면 부착소	37.8	6.4
spot 107	ABC-타입 당 수송계, 주변세포질 성분	35.5	5.6
spot 133	TRAP-타입 C4-디카르복실레이트 수송계 주변세포질 성분	36.4	6.9
spot 140	ABC-타입 아미노산 수송/신호 전달체계, 주변세포질 성분/도메인	26	8.8
spot 164	외막 단백질 26	20.84	7.8

[0344]

시료	ID	MW	pI
spot 199	에놀레이즈	46.2	5
spot 205	FKBP-타입 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 (촉발 인자)	48.3	4.9
spot 212	번역 신장 인자 T's	30.18	5.1

[0345]

[0346] 표 11D: HI-167 전세포 prep의 2D 겔상 스팟 정제

시료	ID	MW	pI
spot 14	없음		
spot 32	번역 신장 인자 (GTPase)	77	5
spot 47	없음		
spot 56	분자 샤페론	68.2	4.8
spot 85	FKBP-타입 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 아이소머라제 (축발 인자)	48.3	4.9
spot 86	GTPase 번역 신장 인자	43.36	5.2
spot 106	시스테인 합성효소	33.4	6.5
spot 117	주변세포질 ABC-타입 포스페이트 수송 성분	36.65	9.2
spot 156	에놀레이즈	46.2	5
spot 190	없음		
spot 191	없음		
spot 192	신장 인자 T's	30	5.1

[0347]

[0348] 다양한 특정 실시예가 기술되고 기재되어 있지만, 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능한 것으로 이해될 것이다.

수탁번호

[0349]

기탁기관명 : 호주 멜버른 소재의 국립 측정 연구소(National Measurement Institute)

수탁번호 : V21002

수탁일자 : 20080903

기탁기관명 : 호주 멜버른 소재의 국립 측정 연구소(National Measurement Institute)

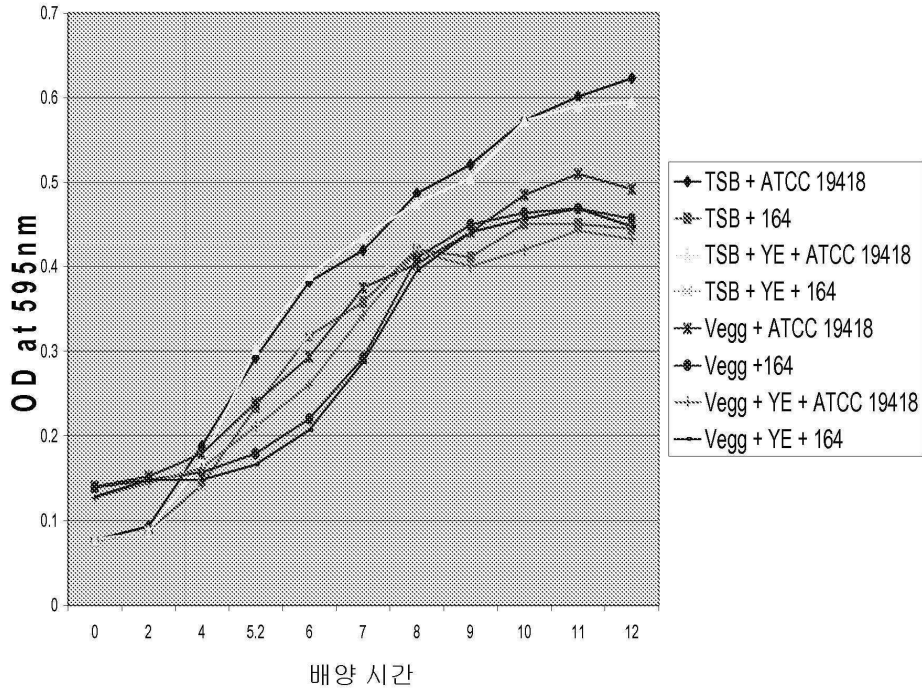
수탁번호 : V21003

수탁일자 : 20080903

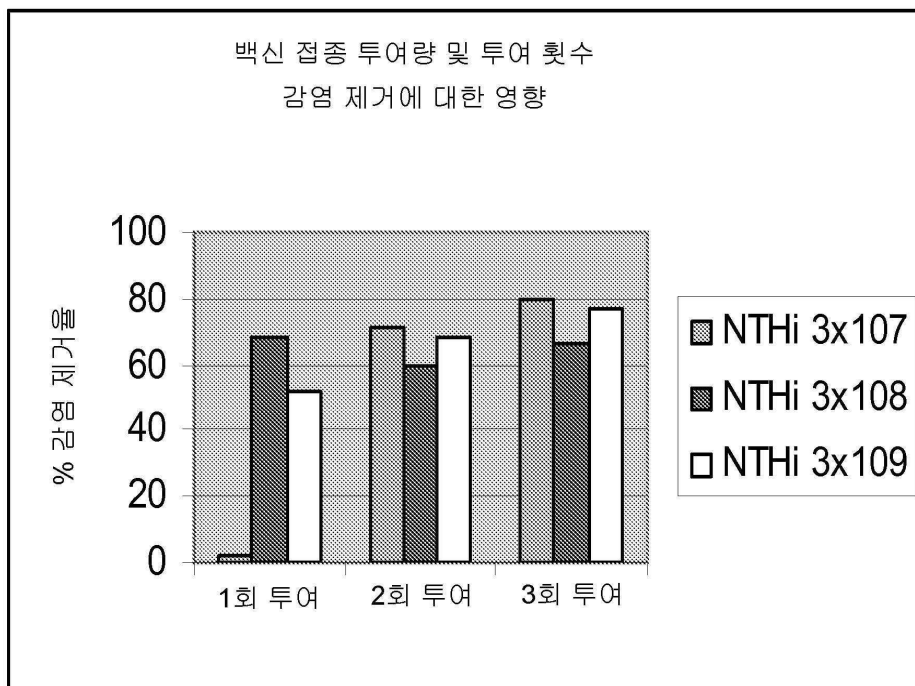
도면

도면1

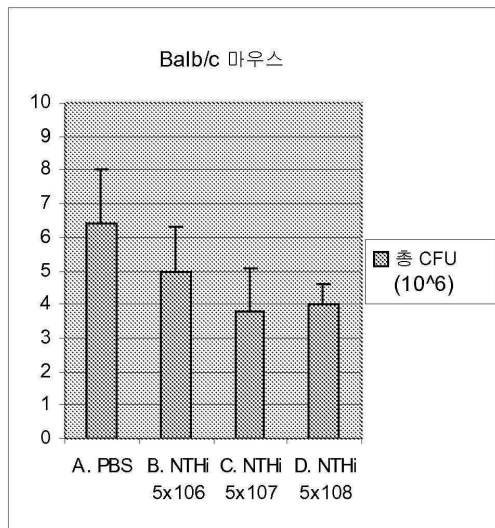
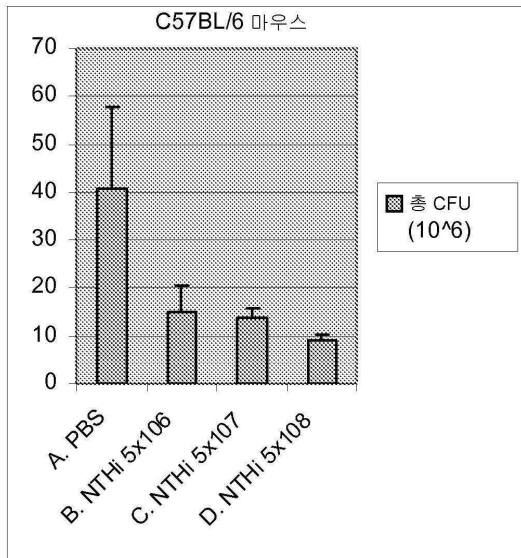
헤모필루스 164 및 ATCC 19418 성장곡선



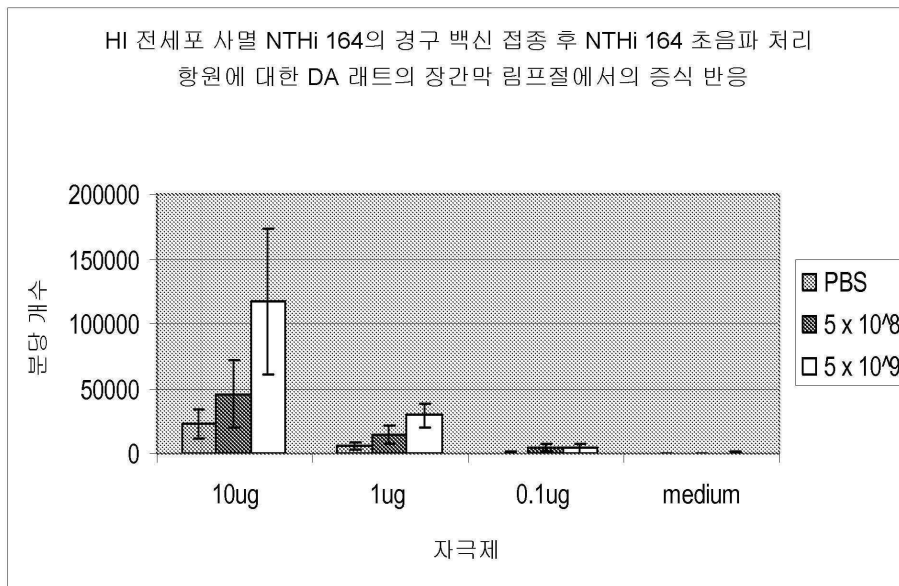
도면2



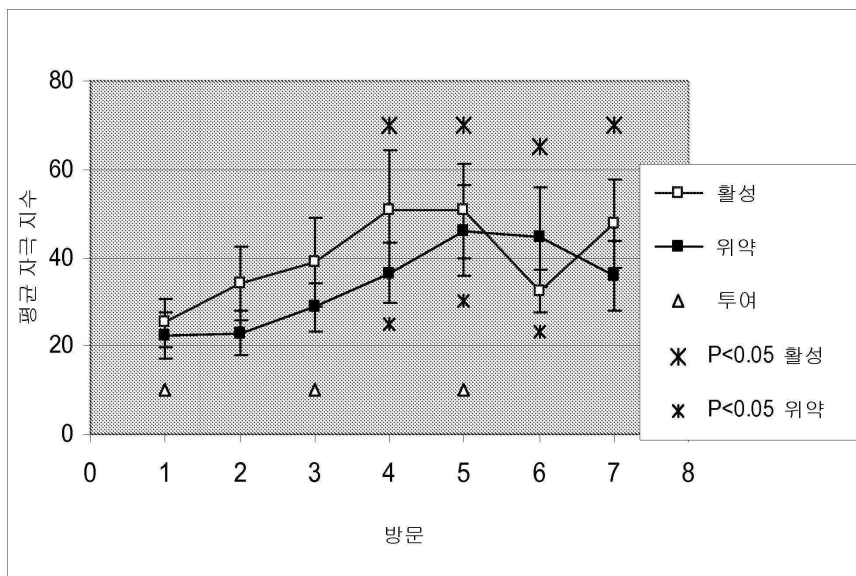
도면3



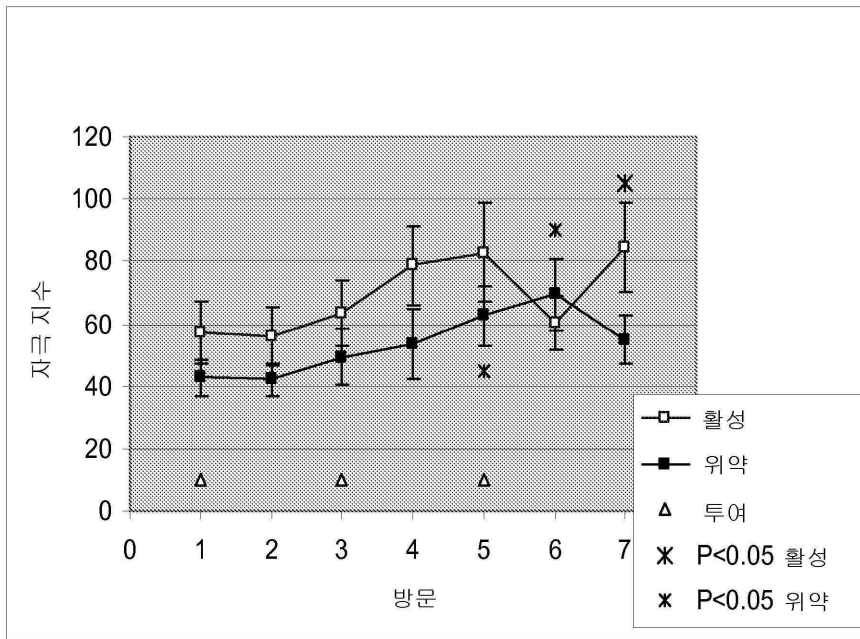
도면4



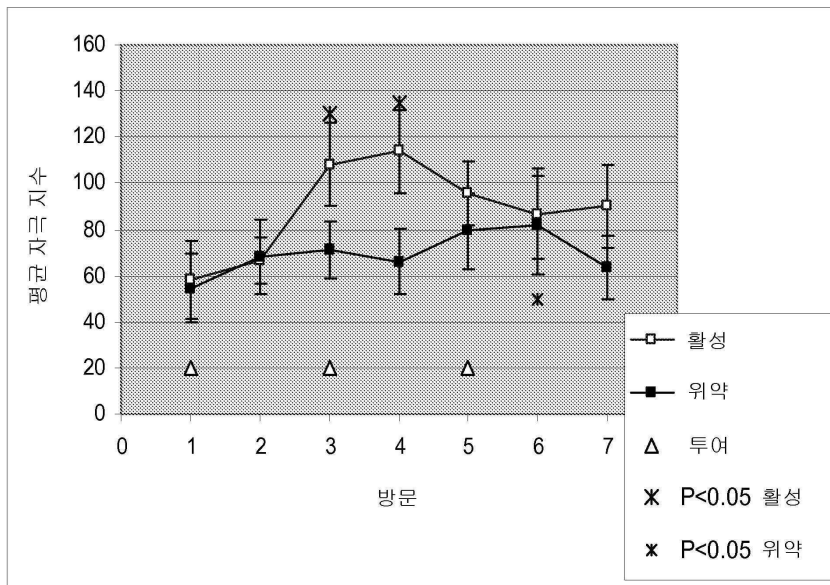
도면5a



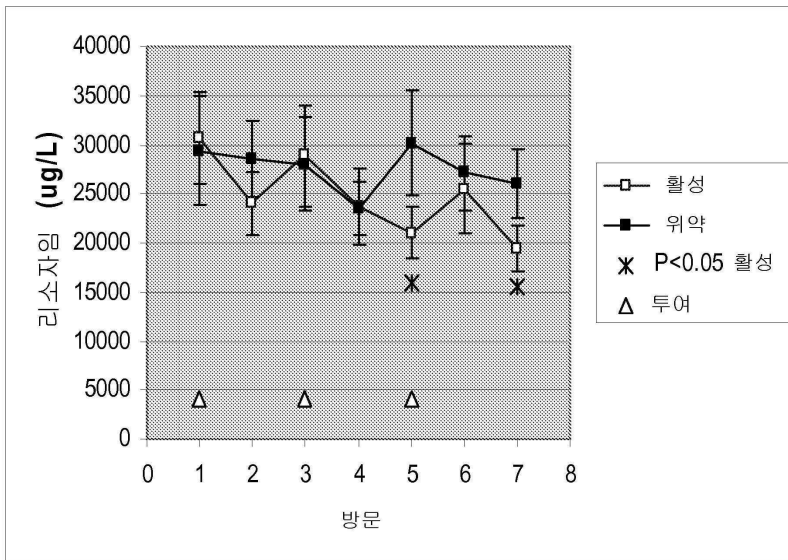
도면5b



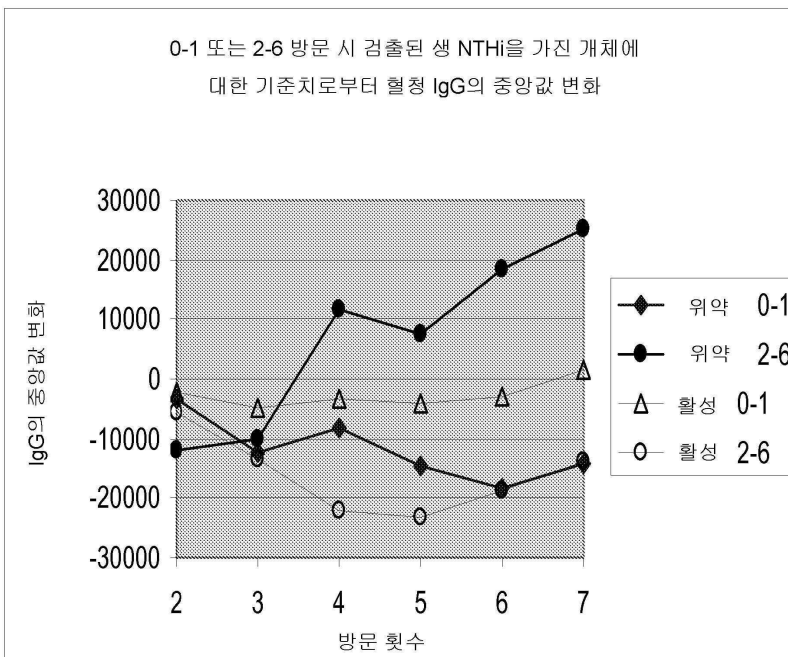
도면5c



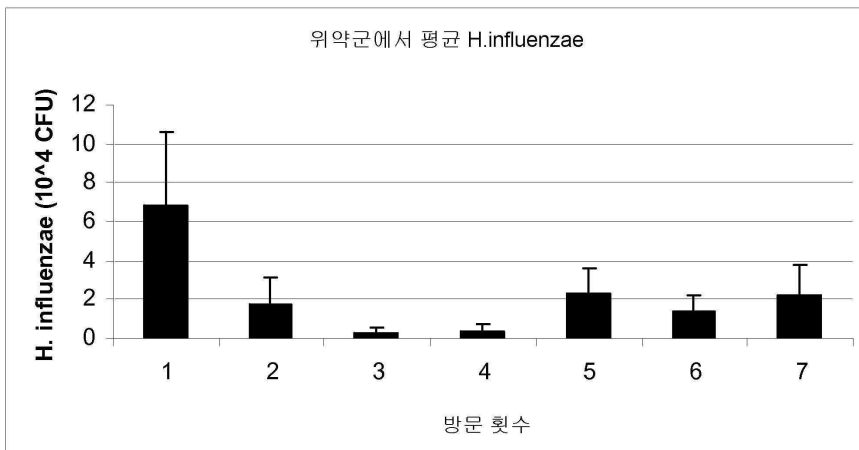
도면6



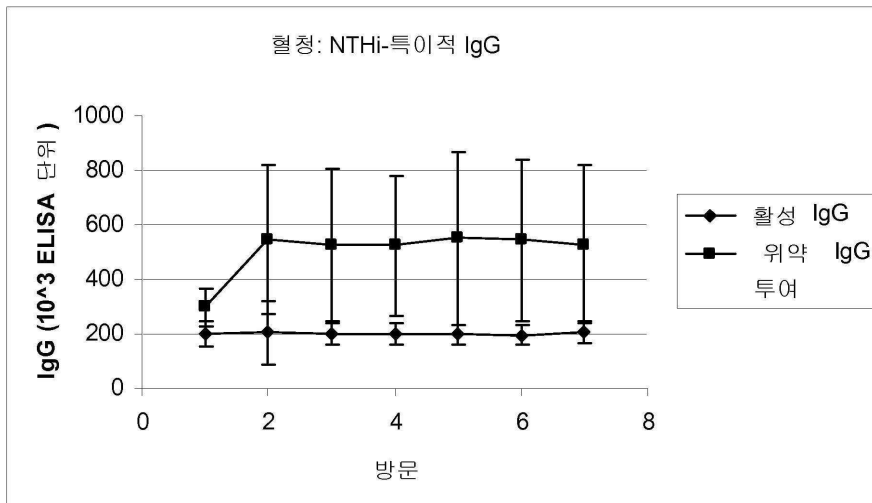
도면7



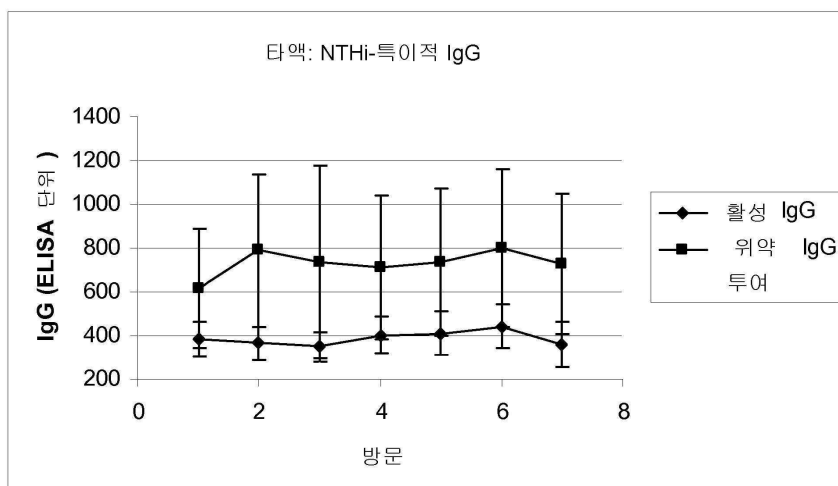
도면8



도면9



도면10



도면11

가래에서 박테리아 분리주의 분포

시험 약물	배양 양성 환자수 및 상이한 분리주를 가진 환자수	양성 시료의 총수	양성 박테리아 가래 시료수 / 1회 방문 후 양성 박테리아 분리주를 가진 환자수				
			<i>H influenzae</i>	<i>M catarrhalis</i>	<i>S pneumoniae</i>	<i>P aeruginosa</i>	<i>P species</i>
HI-164OV	27 1P-15 2P-7 3P-5	110	64/20	11/11	11/7	24/7	0/0
위약	33 1P-18 2P-9 3P-3 4P-3	144	72/23	16/8	13/9	42/16	1/1

도면12

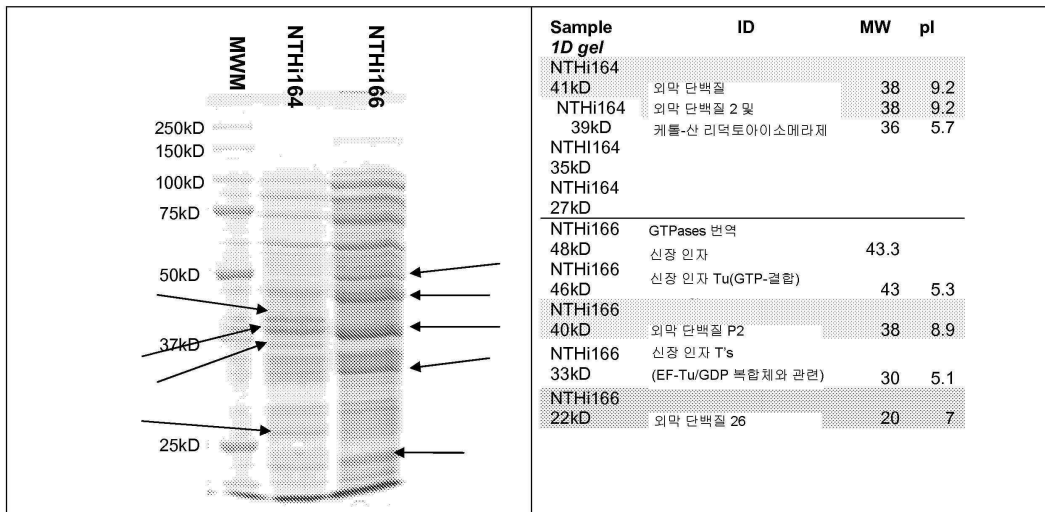
가래에서 박테리아 분리주의 분포 (COPD 아형)

시험 약물	배양 양성 환자수 및 상이한 분리주를 가진 환자수	양성 시료의 총수	양성 박테리아 가래 시료수 / 1회 방문 후 양성 박테리아 분리주를 가진 환자수				
			<i>H influenzae</i>	<i>M catarrhalis</i>	<i>S pneumoniae</i>	<i>P aeruginosa</i>	<i>P species</i>
HI-164OV	13 1P-7 2P-4 3P-2	45	23/8	7/7	6/4	9/3	0/0
위약	19 1P-9 2P-6 3P-2 4P-2	88	39/14	12/5	10/6	26/11	1/1

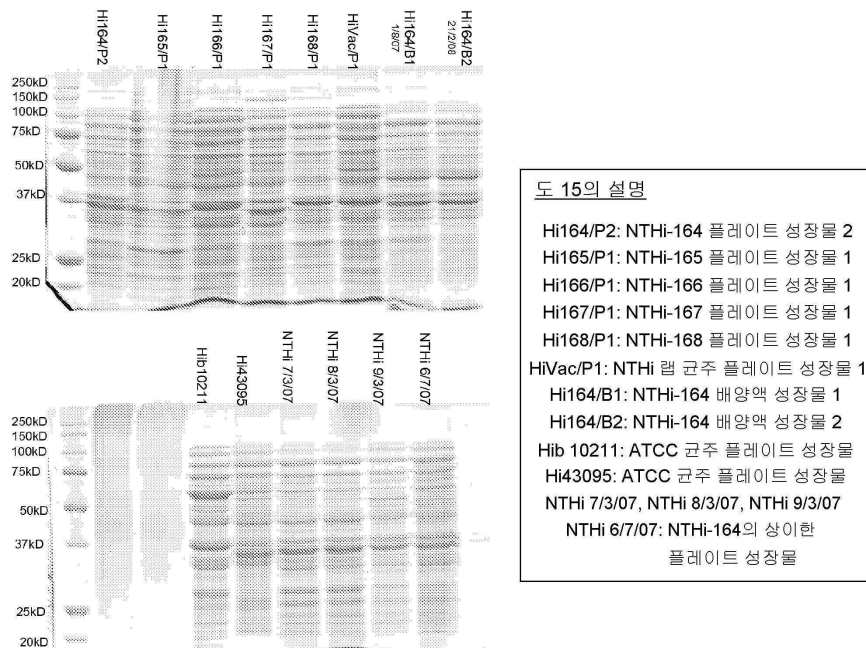
도면13

백신 투여 후 혈액 T-세포 증식에 대한 자극 지수의 증가		
	28-34 주	56-62 주
Broncostat™ 백신 (WO86/05691에 개시됨)	10% (통계적으로 유의한 결과가 아님)	40% (통계적으로 유의한 결과가 아님)
HI-164OV 백신	100% (P=0.001 통계적으로 유의한 결과임)	110% (P=0.002 통계적으로 유의한 결과임)

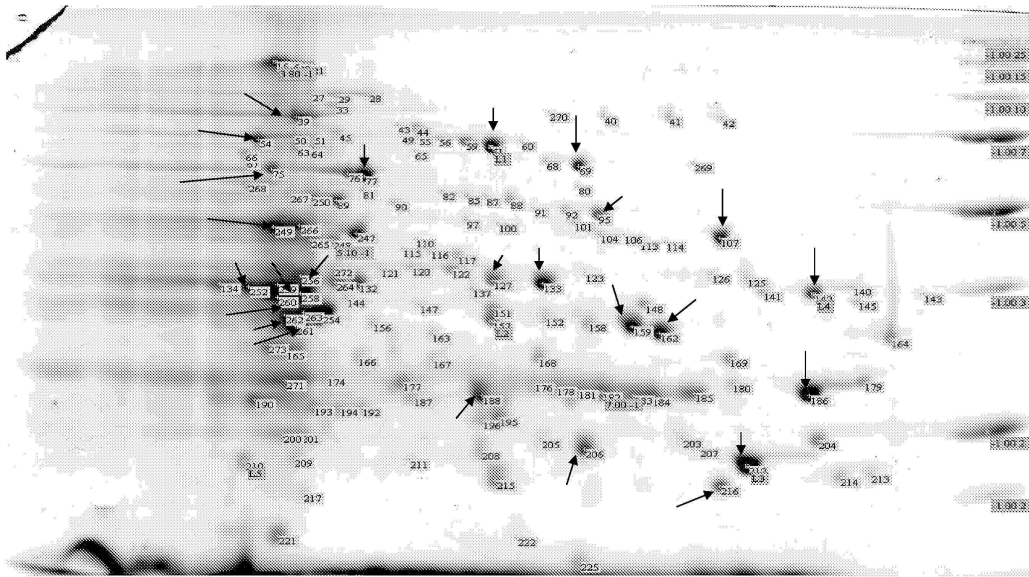
도면14



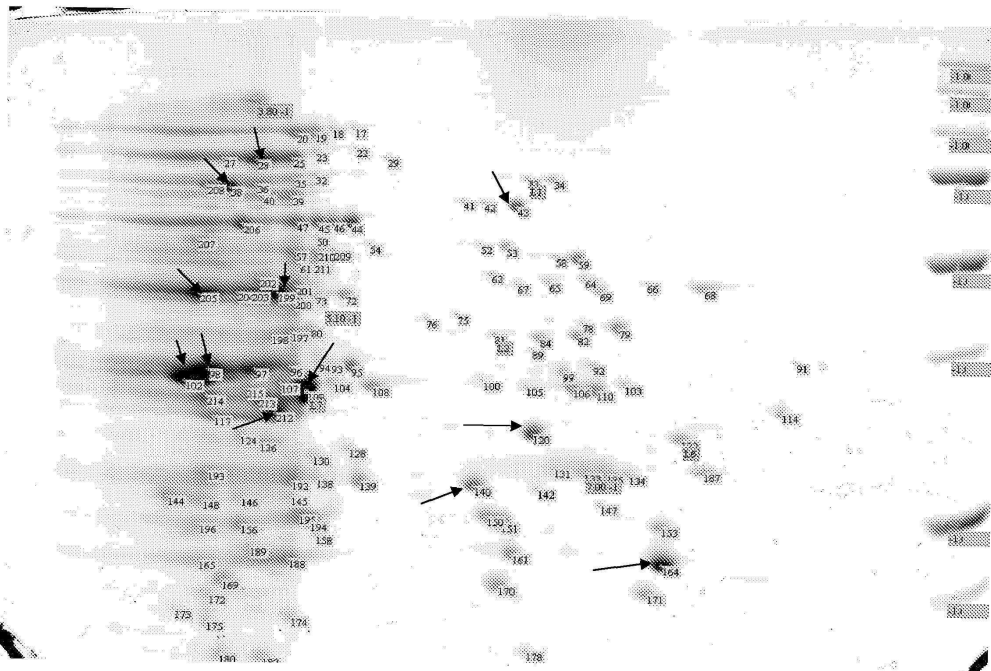
도면15



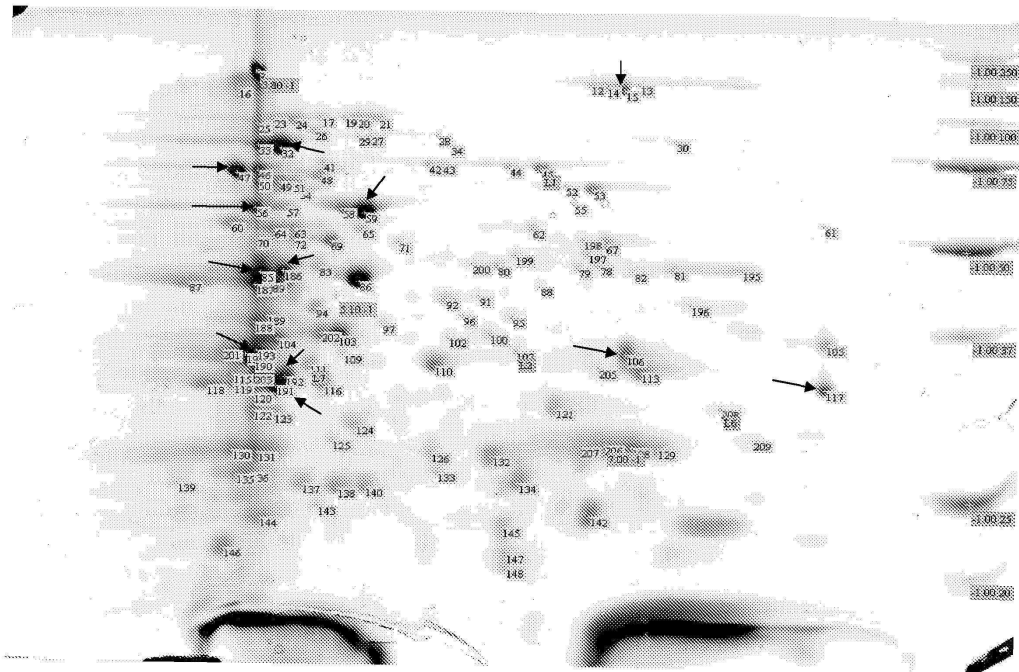
도면16a



도면16b



도면16c



도면16d

