



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0006307
(43) 공개일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/245 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61P 31/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/245 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7040905(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년09월11일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7010481
원출원일자(국제) 2018년09월11일
심사청구일자 2021년07월27일
(85) 번역문제출일자 2024년12월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/074369
(87) 국제공개번호 WO 2019/052975
국제공개일자 2019년03월21일
(30) 우선권주장
17306179.7 2017년09월13일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
사노피 파스퇴르
프랑스 리옹 에스파세 앙리 발리14 (우편번호:69007)
(72) 발명자
샤옥스, 파스칼
프랑스 에프-69210 볼리 웨민 드 볼로그네 르 코테아우 데 스 알로에테스
두마스, 라파엘라
프랑스 에프-83400 포르크롤 플레이스 다름스 31 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

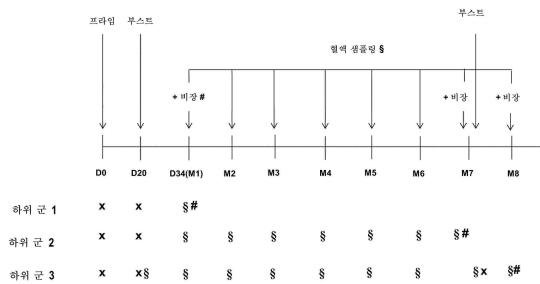
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 인간 시토크갈로바이러스 면역원성 조성물

(57) 요약

본 발명은 HCMV gB 항원, HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원 및 Th1-유도 아주반트를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 HCMV 백신으로서 사용하기 위한 면역원성 조성물에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 31/22 (2018.01)

A61K 2039/55511 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/55566 (2013.01)

A61K 2039/55572 (2013.01)

C12N 2710/16134 (2013.01)

(72) 발명자

헨슬러, 장

프랑스 에프-69290 그레지예유 라 바렌 알리 두 파
르크 15

피송, 실비

프랑스 에프-69126 브린다스 웨민 데스 안드레스
122베

피라스-두스, 파비엔

프랑스 에프-69210 플뢰히유 슈흐 라르브레슬 알리
데 라 사피니에 9

명세서

청구범위

청구항 1

HCMV gB 항원; HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원; 및 Th1-유도 아주반트를 포함하는 면역원성 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HCMV gB 항원, HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체(pentameric complex) 항원 및 Th1-유도 아주반트를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 HCMV 백신으로서 사용하기 위한 면역원성 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 시토크로말바이러스 (HCMV)는 헤르페스 바이러스 패밀리에 속하는 편재하는 바이러스이다. 상기 바이러스는 외피(tegument)에 의해 둘러싸인 캡시드에 함유되고 그의 표면 상에 당단백질 스파이크를 수반하는 지질 이중층에 감싸진 선형 이중-가닥 데옥시리보핵산 (DNA)으로 구성된다. 이 패밀리의 다른 구성원과 마찬가지로, HCMV는 잠복기 및 재활성화의 특성을 보유한다. HCMV는 많은 세포에서 감염되고 잠복하는 능력을 갖는다.

[0003] 면역적숙 속에서, 대부분의 HCMV 감염은 조금의 비특이적 증상 예컨대 피로, 권태감, 중등도의 열, 림프절병증, 간비대 또는 간 효소의 약간의 증가로 무증상이거나 매우 경증이다. 그러나 이중친화성-음성 단핵구증은 이전에 건강한 개인의 대략 10%에서 관찰된다.

[0004] 대조적으로, 임상 징후는 자궁 내에서 감염된 신생아 및 에이즈(AIDS)에 의해 면역억제된 성인 또는 고형 장기 또는 골수 이식의 맥락에서 매우 심각할 수 있다.

[0005] HCMV 감염의 유병률은 연령에 따라 증가하며 사회경제적 요인에 의해 영향을 받는다. 혈청학적 조사는 선진국의 더 낮은 사회경제적 군 및 개발 도상국에서 더 높은 유병률을 나타냈다. 가임기 여성의 경우, HCMV 혈청양성 여성의 비율은 선진국의 상위 및 중간 소득 군에서 대략 50% 내지 저소득 집단에서 80% 초과 범위이다. 상이한 연령-계층, 여성 및 남성을 포함한 일반 집단에 대해 지난 20년 이내에 상이한 서유럽 국가에서 수행된 조사는 전세계적으로 유아(toddler) 및 청소년의 HCMV 혈청유병률이 40 내지 50% 범위이며 한편 연장 대상체(40세 이상)에서는, HCMV 혈청유병률이 80%보다 높음을 나타냈다.

[0006] HCMV는 소변, 타액, 유액, 정액, 생식기 분비물을 포함한 감염된 개인의 분비물에서 장기간 동안 흘러지며; 따라서 HCMV는 수평으로 (아동에서 아동으로, 아동에서 부모로, 그리고 성교 파트너 사이의 친밀한 접촉을 통해) 또는 태반을 통해 또는 출생시 체액 접촉 및 모유 수유를 통해 또는 혈액 생성물 또는 이식된 장기에서의 노출에 의해 모체에서 태아 또는 영아에게 수직으로 전염된다.

[0007] HCMV는 선진국에서 선천성 감염의 가장 흔한 원인이다. 선천성 감염은 신생아의 출생 전에 모체로부터 태아로 전염되는 감염을 지칭한다. 매년 미국에서, 추산된 8000명의 영아가 선천성 HCMV 감염의 결과로서, 정신 지체, 실명 및 감각신경성 난청을 포함한, 장애를 앓고 있다.

[0008] 선천적으로 감염된 신생아 중에서, 5% 내지 10%는 출생시 주요 징후 예컨대 소두증, 맥락막염, 두개내 석회화, 간비장비대, 간염, 황달, 직접 고빌리루빈혈증, 혈소판감소증, 점상출혈, 및 빈혈을 갖는다. 증상이 있는 선천성 HCMV 질환을 가진 이들 신생아 중에서, 사망률은 초기 영아기에서 대략 10%이며 생존자들 중에서, 50-90%는 후유증 예컨대 정신 지체, 뇌성 마비, 감각신경성 청력 소실 또는 시각 장애를 가질 것이다.

[0009] 선천성 HCMV 감염을 가진 많은 영아는 출생시 무증상이다. 추적 연구는 출생시 무증상이고 신생아기에서 바이러스 선별검사에 의해 HCMV 혈청양성으로서 확인된 영아의 대략 15%가 후유증 예컨대 청력 소실 또는 중추 신경계 이상을 가질 것임을 나타냈다.

- [0010] 전체로서, 매년 유럽과 미국에서 태어난 대략 17,000명의 영아는 영구적인 후유증을 가질 것이다.
- [0011] 선천성 HCMV 감염은 임신 후반기에 일차 감염이 발생할 때보다 임신 첫 3개월에 일차 감염이 발생할 때 더 빈번하고 더 심각하다. 전반적으로, 임신 중 일차 HCMV 감염은 태아에게 전염될 40%의 위험과 연관이 있다.
- [0012] 임신 또는 선천성 HCMV 감염 동안에 모체 HCMV 감염을 예방하거나 치료하는 효과적인 수단이 현재 이용가능하지 않다.
- [0013] HCMV는 또한 장기 및 골수 이식 수용자 및 에이즈 환자에서 중요한 바이러스 병원체이다. HCMV 혈청음성 고형 장기 이식 수용자에서 HCMV-연관 이환율은 60%에 근접한다. 고형 장기 이식에서 상기 질환은 혈청음성 환자가 HCMV 양성 공여자로부터 이식편을 받는 경우 가장 심각하다. 대조적으로, 골수 또는 줄기 세포 이식에서, 상기 질환은 혈청음성 공여자로부터 세포를 받는 HCMV 혈청양성 대상체에서 가장 심각한데, 이는 HCMV 감염의 기원이 내인성 감염의 재활성화임을 나타내는 것이다.
- [0014] HCMV는 동종이식 수용자의 대략 15%에서 폐렴, 간염, 위장 질환, 골수 억제, 및 망막염을 야기한다. HCMV는 이들 직접적 종말-기관(end-organ) 질환 이외에, 간접적 영향 예컨대 박테리아 또는 진균 감염을 야기할 수 있는, 이식편 거부반응, 가속화된 죽상동맥경화증 및 면역억제와 연관되어 왔다.
- [0015] 따라서 HCMV 백신의 개발은 의학연구소(Institute of Medicine) 백신 우선 순위 보고서에서 주요 공중 보건 목표로서 간주된다 (Kathleen R, Stratton, Jane S, Durch, Lawrence RS. Editors committee to study priorities for Vaccine Development Division of Health Promotion and Disease Prevention Institute of Medicine. In: Vaccines for the 21st century: A tool for decision making. Washington D.C.: National Academy Press; 2000). 많은 후보 백신이 기재되었으나, 지금까지는 어느 것도 라이선스가 없다 (Plotkin *et al.*, Vaccines, 6th edition, Ed. Elsevier, 2013, Schleiss *et al.*, Cytomegalovirus vaccines, pages 1032-1041).
- [0016] MF59 아주반트를 사용한 시토메갈로바이러스 당단백질-B 백신은 이식 수용자에서 2상 무작위화 위약-대조 시험에서 유망한 결과를 나타냈다 (Griffiths *et al.*, Lancet, 2011, 377(9773):1256-63). 가임기 여성의 2상, 위약-대조, 무작위화, 이중-맹검 시험은, 위약과 비교하여, MF59 아주반트를 사용한 재조합 HCMV 외피(envelope) 당단백질 B로 이루어진 동일한 백신을 평가하였다. 결과는 일차 HCMV의 HCMV 획득을 방지하는데 50% 효능을 나타냈다. 그러나, 면역원성 결과는 gB/MF59 제제에 의해 유도된 중화 항체 (Ab)의 수준이 제3 용량의 투여 후 1개월에 피크 수준에 있고, 이어서 급속히 감소함을 나타냈다 (Pass *et al.*, The New England Journal of Medicine, 2009, 360:1191-9).
- [0017] 결과적으로, 특히 중화 항체 수준을 증가시키고 지속되는 면역 반응을 유도함으로써 오래 지속되는 보호를 유도하는 백신을 밝혀내기 위해, HCMV 백신 효능을 개선할 필요가 있다. 보다 특히 더 광범위한 면역 반응을 유도하는 HCMV 백신을 밝혀낼 필요가 또한 있다.

발명의 내용

- [0018] 예기치 않게, 본 발명의 발명자들은 본 발명에 이르러 이들 요건을 충족시키는 신규한 면역원성 조성물을 밝혀냈다.
- [0019] 따라서 본 발명은 HCMV gB 항원, HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원 및 Th1-유도 아주반트를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 특히, 상기 Th1-유도 아주반트는
- [0021] - TLR-4 효능제; 또는
- [0022] - 350 내지 650 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw를 가진 폴리아크릴산 중합체 염을 포함한다.
- [0023] 한 실시양태에서, 상기 Th1-유도 아주반트는 TLR-4 효능제를 포함한다.
- [0024] 특히, 상기 TLR4 효능제는 전달 시스템 예컨대 수성 나노현탁액, 인산칼슘, 리포솜, 비로솜, ISCOM, 마이크로입자 및 나노입자, 또는 에멀전과 조합된다.
- [0025] 보다 특히, 상기 전달 시스템은 수-중-유 에멀전이다.
- [0026] 특히, 상기 TLR-4 효능제는 E6020 (CAS 번호: 287180-63-6) 및 GLA (CAS 번호 1246298-63-4) TLR-4 효능제로부

터 선택된다.

- [0027] 한 실시양태에서, 상기 Th1-유도 아주반트는 350 내지 650 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw를 가진 선형 또는 분지형 폴리아크릴산 중합체 염, 특히 PAA225000을 포함한다.
- [0028] 특히, 상기 HCMV gB 항원은 내부단백질분해성(endoproteolytic) 절단 부위에서 하나 또는 수개의 돌연변이를 포함한다.
- [0029] 더욱 특히, 상기 HCMV gB 항원은 전장 gB 폴리펩티드, 막횡단 도메인의 적어도 일부가 결핍된 전장 gB 폴리펩티드, 실질적으로 모든 막횡단 도메인이 결핍된 전장 gB 폴리펩티드, 세포내 도메인의 적어도 일부가 결핍된 전장 gB 폴리펩티드, 실질적으로 모든 세포내 도메인이 결핍된 전장 gB 폴리펩티드, 또는 실질적으로 막횡단 도메인 및 세포내 도메인 둘 다가 결핍된 전장 gB 폴리펩티드이다.
- [0030] 보다 특히, 상기 HCMV gB 항원은 gBdTm이다.
- [0031] 특히, 상기 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원에서, gH 항원은 막횡단 도메인의 적어도 일부가 결핍되고, 바람직하게는 gH 항원은 실질적으로 모든 막횡단 도메인이 결핍된다.
- [0032] 보다 특히, 상기 gH는 UL75 유전자에 의해 코딩된 전장 gH의 엑토도메인을 포함한다.
- [0033] 더욱 특히, 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서, HCMV gB 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체는 유일한 HCMV 항원이다.
- [0034] 본 발명은 추가로 HCMV 백신으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 특히, 상기 백신은 중화 항체 수준 및/또는 지속성을 증가시킨다.
- [0036] 면역원성 조성물
- [0037] 이전에 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은
- [0038] - HCMV gB 항원;
- [0039] - HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원; 및
- [0040] - Th1-유도 아주반트
- [0041] 를 포함한다.
- [0042] "HCMV"는 인간 시토크갈로바이러스에 사용되며 인간 시토크갈로바이러스의 임의의 균주이다.
- [0043] 용어 "포함하는(comprising)"/"포함하다"/"포함한다"/"포함하였다"는 각각 "포함한(including)"/"포함하다"/"포함한다"/"포함하였다"뿐만 아니라 "이루어진"/"이루어지다"/"이루어진다"/"이루어졌다"를 망라하며, 예를 들어 X"를 포함하는" 조성물은 X로만 이루어질 수 있거나 추가적인 것, 예를 들어 X + Y를 포함할 수 있다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같은 "항원"은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 의미를 갖는다. 특히, 이는 면역학적 반응을 도출하는, 하나 이상의 에피토프 (선형, 입체형태적 또는 둘 다)를 함유하는 임의의 분자를 지칭한다.
- [0045] 본 발명의 맥락에서, 항원은 단백질이 충분한 면역원성을 유지하는 동안은, 고유 서열에 대한 변형, 예컨대 결실, 첨가 및 치환을 갖는 단백질을 추가로 포함한다. 이들 변형은, 예를 들어 부위-지향 돌연변이유발을 통해 의도적일 수 있거나, 숙주 세포에서 항원의 발현 동안 발생하는 돌연변이와 같이 우발적일 수 있다. 항원은 또한 공통 서열에 의해 코딩된 단백질 또는 그의 단편일 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 항원(들)은 특히 HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원이다.
- [0047] HCMV gB 항원
- [0048] 본 발명에 따른 HCMV gB 항원은 중화 항체를 유도하는 gB-유래 폴리펩티드 또는 전장 gB 폴리펩티드이다.
- [0049] gB는 HCMV 계놈의 UL55 유전자에 의해 코딩된다. gB (또는 gp130)의 고유 형태의 크기는 오픈 리딩 프레임(ORF)의 크기에 따라 달라지며, 이는 균주에 따라 약간 다를 수 있다. 예를 들어, 2717 bp 길이인 AD169 균주의 ORF는 906개의 아미노산의 전장 gB를 코딩하며, 한편 타운(Towne) 균주의 ORF는 907개의 아미노산의 전장 gB

를 코딩한다. 이들 두 균주의 단백질 서열은, 그 전문이 참조로 포함된 US 2002/0102562 (도 2)에 기재되어 있다. gB의 고유 형태는 통상적으로 23 내지 25 개 아미노산 길이인 아미노산 신호 서열을 함유하고, 이어서 잔기 아르기닌 460과 세린 461 사이의 내부단백질분해성 절단 부위를 함유하는 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인을 함유한다. 통상, 전장 gB는 세포에서 발생하는 번역 후 메커니즘의 결과로서 아미노산 신호 서열이 고갈된다. 본 발명의 목적에 적합한 전장 gB는 HCMV 균주 타운 및 AD169의 전장 gB 둘 다, 뿐만 아니라 다른 등가 균주를 망라한다는 것이 잘 이해될 것이다. 중화 항체를 유도하는 수개의 항원성 도메인이 기재되었다. 특히, 이는 gp 130의 아미노산 잔기 461과 680 사이에 위치한 도메인을 포함하며, 이 도메인은 2개의 불연속 도메인, 잔기 461과 619 사이의 도메인 및 잔기 620과 680 사이의 도메인 (US 5,547,834)으로 세분된다. 이는 또한 아미노산 잔기 560과 640 사이에 위치한 항원성 도메인 1 (AD-1) (Schoppel K. *et al.*, Virology, 1996, 216:133-45) 또는 아미노산 잔기 65와 84 사이에 (Axelsson F *et al.*, Vaccine, 2007, 26:41-6) 또는 아미노산 잔기 27과 84 사이에 (Burke HG *et al.*, PLoS pathogens, 2015, 11:e1005227) 위치한 항원성 도메인 2 (AD-2)를 포함한다. 결과적으로, 그의 아미노산 서열에서 상기 인용된 항원성 도메인 중 하나 또는 수개에 상동성인 서열을 포함하는 폴리펩티드가 또한 본 발명의 목적에 적합하다. 용어 "에 상동성인 서열"은 타운 또는 AD169 균주로부터 유래된 고유 gB로 고려되는 항원성 도메인의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일성인 아미노산 서열을 의미하고자 한다 (이는 US 2002/0102562에 기재됨). 전형적으로, 서열 상동성은 적어도 90%의 서열 동일성을 기준으로 하며, 훨씬 보다 구체적으로, 서열 상동성은 완전하다 (100%의 서열 동일성).

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, 제2 서열과 적어도 x% 동일성을 갖는 제1 서열은 x%가 제2 아미노산 서열의 총 길이에 대한, 전체 정렬을 통해 두 서열이 최적으로 정렬될 때 제2 서열의 그의 매칭된 아미노산과 동일한 제1 서열의 아미노산의 수를 나타냄을 의미한다. x가 최대일 때 두 서열 모두 최적으로 정렬된다. 동일성의 백분율의 결정 및 정렬은 전체 정렬 알고리즘, 예를 들어 문헌 [Needleman and Wunsch, J. Mol Biol., 48, 443-453 (1970)]에 기재된 니들만 및 분쉬(Needleman and Wunsch) 알고리즘을 사용하여, 예를 들어 폴리펩티드 서열 비교를 위한 하기 파라미터: 비교 행렬(comparison matrix): 문헌 [Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89, 10915-10919 (1992)]으로부터의 BLOSUM62, 갭 페널티: 8 및 갭 길이 페널티: 2; 및 폴리뉴클레오타이드 서열 비교를 위한 하기 파라미터: 비교 행렬: 일치 = +10, 불일치 = 0; 갭 페널티: 50 및 갭 길이 페널티: 3과 함께 수동 또는 자동으로 수행될 수 있다.

[0051] 상기 파라미터와 함께 사용될 수 있는 프로그램은 지네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group) (위스콘신주 메디슨)으로부터 "갭" 프로그램으로서 공개적으로 이용가능하다. 상기 언급된 파라미터는 각각 펩티드 비교 (말단 갭에 대한 페널티가 없음에 따라) 및 핵산 비교에 대한 디폴트 파라미터이다.

[0052] 본 발명의 목적에 적합한 gB-유래 펩티드 또는 폴리펩티드 중에는 US 5,547,834에 기재된 바와 같은 gp 55가 있다. 이는 내부단백질분해성 절단 부위에서의 gB의 절단으로부터 유래되고; 그의 아미노산 서열은 세린 잔기 461과 C-말단 단부(terminal end) 사이에 있는 것에 상응한다. gp 55의 말단절단된 형태, 예컨대 막횡단 서열의 전부 또는 일부 및 세포내 C-말단 도메인의 전부 또는 일부가 고갈된 gp 55 (예를 들어, 잔기 461과 646 사이의 고유 gB의 서열아미노산에 상동성인 서열을 갖는 펩티드) 또는 세포내 C-말단 도메인의 전부 또는 일부가 고갈된 gp 55 (예를 들어, 잔기 461과 680 사이의 고유 gB의 아미노산 서열에 상동성인 서열을 갖는 펩티드)가 또한 사용될 수 있다. gp 55의 이러한 말단절단된 형태가 그 전문이 참조로 포함된 US 5,547,834에 또한 기재되어 있다.

[0053] 또한, 내부단백질분해성 절단 부위에서 하나 또는 수개의 돌연변이를 수반하는 전장 gB의 돌연변이된 형태를 사용하여 후자를 효과가 없도록 하는 것이 가능하다. 특히, 돌연변이(들)는 gp130의 서열의 잔기 457과 460 사이에 위치하며, 보다 특히, 아르기닌 460 및/또는 리신 459 및/또는 아르기닌 457에 위치한다. 이 측면에서, 전장 gB의 돌연변이된 형태는 항체를 중화시키기 위한 표적인 모든 도메인과 함께 전체 세포외 도메인을 수반한다. 이러한 돌연변이된 형태는 재조합 단백질로서 생산될 때 숙주에서 그의 분비 및 그의 용이한 하류 정제를 허용하기 위해 막횡단 서열의 전부 또는 일부 및/또는 세포내 C-말단 도메인의 전부 또는 일부가 이차적으로 고갈될 수 있다. 이러한 gB-유도체는 중화 항체의 표적인 실질적으로 모든 도메인이 보존되는 한 바람직하다.

[0054] 따라서, 본 발명의 한 측면에서, HCMV gB는 내부단백질분해성 절단 부위에서 하나 또는 수개의 돌연변이를 포함하고, 특히 HCMV gB는 게다가 전장 HCMV gB, 막횡단 도메인의 적어도 일부가 결핍된 전장 HCMV gB, 실질적으로 모든 막횡단 도메인이 결핍된 전장 gB 폴리펩티드, 세포내 도메인의 적어도 일부가 결핍된 전장 gB 폴리펩티드, 실질적으로 모든 세포내 도메인이 결핍된 전장 HCMV gB, 및 실질적으로 막횡단 도메인 및 세포내 도메인 둘 다

가 결핍된 전장 HCMV gB 폴리펩티드의 군 중에서 선택된다.

- [0055] 표현 "실질적으로 모든 세포내 도메인이 결핍된" 또는 "실질적으로 모든 막횡단 도메인이 결핍된"은 상기 도메인에 상응하는 아미노산 서열의 적어도 80%가 결실됨을 의미한다.
- [0056] 본 발명의 맥락에서, "도메인의 적어도 일부가 결핍된"이란, 도메인의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%가 결핍되나, 80% 미만이 결핍됨을 의미한다.
- [0057] 한 실시양태에서, HCMV gB 항원은 gB의 엑토도메인, 즉 모든 막횡단 서열 및 모든 세포내 C-말단 도메인이 고갈된 전장 gB이다. "엑토도메인"은 막을 넘어 세포의 공간으로 연장되는 막횡단 고정 단백질의 부분이다.
- [0058] 본 발명에 따른 HCMV gB 항원은 다른 돌연변이 및/또는 결실 및/또는 첨가를 또한 함유할 수 있다. 예를 들어, HCMV gB 항원은 EP2627352에 기재된 바와 같이 세포외 도메인에 위치한 융합 루프 1 (FL1) 도메인 및 융합 루프 2 (FL2) 도메인 중 적어도 하나에 적어도 하나의 아미노산 결실 또는 치환을 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 이는 EP2627352에 기재된 바와 같이 리더 서열의 적어도 일부의 결실을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 HCMV gB 항원은 W02016092460에 기재된 바와 같이 소수성 표면 1 (아미노산 잔기 154-160 및 236-243) 내에 글리코실화 부위를 결과하는 돌연변이를 또한 포함할 수 있다. 특히, 상기 글리코실화 부위는 N-X-S/T/C 모티프를 포함하는 N-글리코실화 부위이고, 여기서 X는 임의의 아미노산 잔기 (그러나 바람직하게는 프롤린은 아니다)이다. HCMV gB 항원은 W02016092460에 기재된 바와 같이 글리코실화 부위를 결과하는 돌연변이를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 글리코실화 부위는 (1) 소수성 표면 2 (아미노산 잔기 145-167 및 230-252) 내에; 또는 (2) 융합 루프 1 (FL1) (아미노산 잔기 155-157) 및/또는 융합 루프 2 (FL2) (아미노산 잔기 240-242)로부터 20 옹스트롬 내에 있는 잔기에 있다. HCMV gB 항원은 W02016092460에 기재된 바와 같이 C-말단에서 적어도 12 개 잔기인 이종 서열(heterologous sequence)을 포함할 수 있다. 특히, gB 단백질은 이종 서열이 엑토도메인의 C-말단에서 융합된 융합 단백질일 수 있다.
- [0059] 고유 HCMV gB는 관련 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스(Herpes Simplex Virus) 1 (HSV-1) gB 및 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr Virus) (EBV) gB에서 gB 단백질의 3D 결정학 구조에 기초하는 동중삼량체인 것으로 추정되었다 (Heldwein *et al.*, Science, 2006, 313:217-220; Backovic *et al.*, PNAS, 2009, 106(8):2880-2885). 본 발명에 따른 HCMV gB 항원은 삼량체 (고유 형태), 및/또는 육량체 (삼량체 고유 형태의 이량체), 및/또는 십이량체 (육량체의 이량체) 형태일 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 HCMV gB 항원 부분은 실질적으로 단량체 형태가 아니며, 보다 특히 단량체 형태가 아니다. 표현 "실질적으로 단량체 형태가 아닌"은 HCMV gB 항원의 20% 미만, 특히 10% 미만, 특히 5% 미만이 단량체 형태임을 의미한다.
- [0060] 한 실시양태에 따르면, gB 항원은 서열식별번호: 1과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특히, 상기 gB 항원은 서열식별번호: 1과 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% 동일성 또는 심지어 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:
- [0061] SSTRGTSATHSHHSSHTTSAHSRSGSVSQRVTSSTQTVSHGVNETIYNTTLKYGDVVG
VNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEGIMVVYKRNIVAHTFKVRVYQK
VLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIHSHSHSQCYSSYSRVIAAGTVFVAYHRDSY
ENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWLYRETCNLNCMVTTITARSKYPPH
FFATSTGDVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYITIVSDFGRPNSALETHRLVAF
LERADSVISWDIQDEKNVTCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNM
SDSALDCVRDEAINKLQQIFNTSYNQTYEKYGNVSVFETTGGLVFWQGIKQKSLVELER
LANRSSNLNLTHTTQTSTDGNNATHLSNMESVHNLVYAQLQFTYDTLRGYINRALAQIAE
AWCVDQRRRTLEVFKELSKINPSAILSAINKPIAARFMGDVLGLASCVTINQTSVKVLRDM
NVKESPGRCYSRPVVIFNFANSSYVQYQGLGEDNEILLGNHRTEECQLPSLKIFIAGNSA
YEYVDYLFKRMIDLSSISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREF
NSYKQRVKYVEDKRLCMQPLQNLFPYLVSADGTTVTSGNTKDTSLQAPPSYEEVSVNS
GRKGPGPPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALVRLDAEQRAQNGTDSLQGTGTQDK
GQKPNLLDRLRHRKNGYRHLKDSDEEENV.
- [0062]
- [0063] 바람직한 실시양태에서 gB 항원은 서열식별번호: 1과 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0064] 본 발명의 맥락에서 특히 적합한 HCMV gB 항원은 C-말단 도메인의 전부 또는 일부가 고갈되고/거나 막횡단 서열

의 전부 또는 일부가 고갈되고 여기서 절단 부위는 효과가 없는 전장 gB의 말단절단된 형태이다. 특히 바람직한 gB의 말단절단된 형태는 gBdTM로 칭해진, 그 전문이 참조로 포함된 US 6,100,064에 기재된 것과 상응한다. US 6,100,064에서, 신호 서열은 24개 아미노산 길이로 지정되었고 아미노산 위치는 그에 따라 도 10에 표시되어 있다. 본 발명자들은 이 신호 서열이 실제로 25개 아미노산 길이라는 것을 발견하였다. US 6,100,064의 도 10에서, Ser-1의 C-말단 (즉, 신호 서열에 대한 C-말단)을 표시한 모든 아미노산 위치는 따라서 1로부터에서 감소되어야 한다. 따라서, gBdTM은 절단 부위에서 3개의 돌연변이 (아르기닌 432는 트레오닌에 의해 치환되고, 리신 434는 글루타민에 의해 치환되고 아르기닌 435는 트레오닌에 의해 치환된다; 번호가 다시 매겨진 위치를 고려함) 및 아미노산 잔기 발린 676과 아르기닌 751 사이의 막횡단 영역에서의 결실 (번호가 다시 매겨진 위치를 고려함)을 수반하여, 세포의 도메인이 세포질 도메인에 직접 연결되도록 한다. 이러한 gB-유래 폴리펩티드는 분비된 형태 하에 이 생성물을 발현하는 재조합 세포에 의해 생성되기 때문에 정제하기가 더 쉽다. 생성된 형태는 gB 타운 균주로부터 유래되는 경우 그의 신호 서열 및 그의 막횡단 영역이 결실된 806 아미노산 길이의 폴리펩티드이다.

[0065] 본원에 기재된 HCMV gB 단백질 또는 그로부터 유래된 펩티드 또는 폴리펩티드는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 임의의 방법에 의해 합성될 수 있다. 이러한 방법은 고체 상에서의 통상적인 화학 합성 (R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85 (14), 2149-2154 (1963)), 또는 액체 상에서, 효소 합성 (K. Morihara, Trends in Biotechnology, 5(6), 164-170 (1987)) (구성 아미노산 또는 그의 유도체로부터), 무세포 단백질 합성 (Katzen et al., Trends in Biotechnology, 23(3), 150-156 (2005)), 뿐만 아니라 재조합 기술에 의한 생물학적 생산 방법을 포함한다.

[0066] 예를 들어, HCMV gB 항원은 재조합 숙주 세포와의 생물학적 생산 공정을 사용하여 수득할 수 있다. 이러한 공정에서, 본원에 기재된 바와 같은 HCMV gB 항원을 코딩하는 핵산을 함유하는 발현 카세트는 숙주 세포내로 전달되고, 이는 상응하는 단백질의 발현을 가능하게 하는 조건에서 배양된다. 그렇게 함으로써 생성된 단백질은 이어서 회수 및 정제될 수 있다. 단백질 정제 방법은 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 수득된 재조합 단백질은 개별적으로 또는 조합하여 사용되는 방법, 예컨대 분획법, 크로마토그래피 방법, 특이적 모노- 또는 폴리클로날 항체를 사용한 면역친화도 방법 등에 의해 용해물 및 세포 추출물로부터 또는 배양 배지 상청액으로부터 정제될 수 있다. 특히, 수득된 재조합 단백질은 배양 배지 상청액으로부터 정제된다.

[0067] HCMV gB 단백질 또는 그로부터 유래된 펩티드 또는 폴리펩티드는 통상 재조합 DNA 기술에 의해 수득되고 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 방법에 따라 정제된다. 그 전문이 참조로 포함된 US 6,100,064 및 US 2002/0102562에 기재된 방법이 특히 사용될 수 있다.

[0068] 예를 들어, 본 발명에 따른 gB 항원은 재조합 당단백질이며, 이는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포 배양에서 생성된다. HCMV의 타운 균주로부터의 gB 유전자는 US 6,100,064에 기재된 바와 같이 세포 배양에서 분비를 촉진하기 위해 분자의 절단 부위 및 막횡단 부분을 제거하기 위해 돌연변이될 수 있다. 분비된 분자는 19 개의 잠재적인 N-연결된 글리코실화 부위를 보유하는 806개의 아미노산의 폴리펩티드이며, 또한 gBdTM으로 칭해진다. 정제 공정은 친화도 및 이온-교환 크로마토그래피 단계를 수반하였다.

[0069] HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원

[0070] 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 또 다른 부분은 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원이다.

[0071] 상기 오량체 복합체는 5개의 성분 사이의 디설피드 결합 및 비공유 상호작용을 통해 어셈블리되어 입체형태적 에피토프를 제시할 수 있는 기능성 복합체를 형성한다 (Ciferri et al., PNAS, 2015, 112(6):1767 - 1772; Wen et al., Vaccine, 2014, 32(30):3796-3804).

[0072] 상기 복합체는 이미 기재되었으며 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이는 특히 문헌 [Ryckman et al. (Journal of Virology, January 2008, p.60-70)] 및 특허 출원 WO2014/005959에 기재되어 있다. 상기 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체는 특히 변형된 HCMV gH 폴리펩티드를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 폴리펩티드는 막횡단 (TM) 도메인의 적어도 일부가 결핍되어 있다. 일부 실시양태에서, gH 폴리펩티드는 천연 TM 도메인의 일부를 보유할 수 있으나, 단백질이 지질 이중층에 머무르도록 하기에는 충분하지 않다. 바람직한 실시양태에서 gH 폴리펩티드는 실질적으로 모든 막횡단 도메인이 결핍되어 있다. 보다 바람직한 실시양태에서 gH 폴리펩티드는 전장 천연 TM 도메인이 결핍되어 있다.

[0073] 따라서, gH 폴리펩티드는 천연 gH TM 도메인의 최대 10개의 아미노산 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산)을 함유할 수 있다.

[0074] 본 발명의 맥락에서, "도메인의 적어도 일부가 결핍된"이란, 도메인의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%가 결핍되나, 80% 미만이 결핍됨을 의미한다.

[0075] 표현 "실질적으로 모든 세포내 도메인이 결핍된" 또는 "실질적으로 모든 막횡단 도메인이 결핍된"은 상기 도메인에 상응하는 아미노산 서열의 적어도 80%가 결실됨을 의미한다.

[0076] 대안적으로 또는 TM 도메인의 일부 또는 전부가 결핍된 것 이외에, 폴리펩티드는 HCMV gH의 세포내 도메인의 일부 또는 실질적으로 모든 또는 전부가 결핍될 수 있다.

[0077] 바람직한 실시양태에서 gH 폴리펩티드는 실질적으로 모든 세포내 도메인이 결핍된다. 보다 바람직한 실시양태에서 gH 폴리펩티드는 전장 천연 세포내 도메인이 결핍된다.

[0078] 바람직한 실시양태에서, gH 폴리펩티드는 모든 TM 도메인 및 모든 세포내 도메인이 결핍된다.

[0079] 한 실시양태에서, 상기 gH는 UL75 유전자에 의해 코딩된 전장 gH의 엑토도메인을 포함한다.

[0080] UL75 유전자에 의해 코딩되는 HCMV 당단백질 H (gH)는, 감염성에 필수적이며 알파-, 베타- 및 감마-헤르페스 바이러스의 구성원들 사이에서 보존되는 비리온 당단백질이다. 이는 gL과 안정적인 복합체를 형성하고, 이 복합체의 형성은 gH의 세포 표면 발현을 촉진한다. HSV-2 및 EBV gH/gL 복합체의 결정 구조에 기초하여, gH의 gL 서브유닛 및 N-말단 잔기는 구조의 한쪽 말단에서 구형 도메인 ('헤드')을 형성하며, 이는 gB와의 상호작용 및 막 융합의 활성화에 연루된다. 바이러스 막에 근접한, gH의 C-말단 도메인 ('테일')은 막 융합에 또한 연루된다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 오량체 복합체 중 gH 폴리펩티드는 서열식별번호: 2와 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특히, gH 항원은 서열식별번호: 2와 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% 동일성 또는 심지어 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:

```
RYGAEAVSEPLDKAFHLLNTYGRPIRFLRENTTQCTYNNSLRNSTVVRENAISFNF
FQSYNQYVVFHMPRCLFAGPLAEQFLNQVDLTETLERYQQRLNTYALVSKDLASYRSFS
QQLKAQDSLGEQPTTVPPPIDLSIPHVWMPPQTTPHGWTESHTTSGLHRPHFNQTCILF
DGHDLFSTVTPCLHQGFYLIDELRYVKITLTEDFFVVTVSIDDDTPMLLIFGHLPRVLFKA
PYQRDNFILRQTEKHELLVLVKKDQLNRHSYLKDPDFLDAALDFNYLDLSALLRNSFHRY
AVDVLKSGRCQMLDRRTVEMAFAYALALFAAARQEEAGAQVSVPRALDRQAALLQIQEF
MITCLSQTTPRRTLLLYPTAVDLAKRALWTPNQITDITSLVRLVYILSKQNQQHLIPQWALR
QIADFALKLHKHLASFLSAFARQELYLMGSLVHSMVLVHTTERREIFIVETGLCSLAELSHF
TQLLAHPHHEYLSLDLYTPCSSSGRRDHSRLRLTRLPDTPATVPAALSILSTMQ PSTLE
TFPDLFCLPLGESFSALT VSEHVS YVVTNQYLIKGISYPVSTTVVGQSLIITQ TDSQTKCEL
TRNMHTTHSITAALNISLENCAFCQSALLEYDDTQGVINIMYMHDSDDVLFALDPYNEVVV
SSPRTHYLMLLKNGTVLEVTDVVDATDSR.
```

[0081]

[0082] 바람직한 실시양태에서 gH 폴리펩티드는 서열식별번호: 2와 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0083] HCMV 당단백질 L (gL)은 UL115 유전자에 의해 코딩된다. gL은 바이러스 복제에 필수적인 것으로 생각되며, gL의 모든 공지된 기능적 특성은 gH와의 그의 이량체화와 직접 연관이 있다. gL/gH 복합체는 바이러스 및 혈장 막의 융합을 위해 필요하며, 이는 숙주 세포로의 바이러스의 진입을 야기한다.

[0084] 한 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 오량체 복합체 중 gL 폴리펩티드는 서열식별번호: 3과 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특히, gL 항원은 서열식별번호: 3과 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% 동일성 또는 심지어 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:

```
AAVSVAPTAAEKVPAECELTTRRCLLGEVFQGDKEYESWLRPLVNVVTGRDGPLSQLI
RYPVPTPEAANSVLLDEAFDLTALLYNPDQLRALLTLLSSDTAPRWMTVMRGYSECG
DGSPA VYTCVDDLRCGYDLTRLSYERSIFTEHVLGFELVPPSLFNVVVAIRNEATR TNRA
VRLPVSTAAPEGITLFYGLYNVAVKEFCLRHQLDPLLRHLDKYYAGLPPELKQTRVNLP
AHSRYGPQAVDAR.
```

[0085]

- [0086] 바람직한 실시양태에서 gL 폴리펩티드는 서열식별번호: 3과 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0087] 한 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 오량체 복합체 중 UL128 폴리펩티드는 서열식별번호: 4와 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특히, UL128 항원은 서열식별번호: 4와 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% 동일성 또는 심지어 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:
- EECCFEINVNHPPERCYDFKMCNRFTVALRCPDGEVCYSPEKTAEIRGIVTTMTHS
LTRQVVHNKLTSCNYPNPLYLEADGRIRCGKVNDAQYLLGAAGSVPYRWINLEYDKITRI
VGLDQYLESVKHKRLDVCRAKMGYMLQ.
- [0088]
- [0089] 바람직한 실시양태에서 UL128 폴리펩티드는 서열식별번호: 4와 100% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.
- [0090] UL130은 UL131A-128 유전자좌의 중심이며 최대 (214개의 코돈) 유전자이다. 유전자의 개념적 번역은 추정 케모카인 도메인 (아미노산 46 내지 120) 내에 2개의 잠재적인 N-연결 글리코실화 부위 (Asn85 및 Asn118) 및 독특한 C-말단 영역의 단부에 가까운 추가의 N-글리코실화 부위 (Asn201)를 함유하는 친수성 단백질에 선행하는 긴 (25개의 아미노산) N-말단 신호 서열을 예측한다. UL130은 TM 도메인이 결여된 것으로 예측된다.
- [0091] 이는 감염된 세포로부터 비효율적으로 분비되나 골지-성숙 형태로서 비리온 외피에 혼입된 관강내 당단백질인 것으로 보고되었다 (Patrone, *et al.*: "Human Cytomegalovirus UL130 Protein Promotes Endothelial Cell Infection through a Producer Cell Modification of the Virion.", *Journal of Virology* 79 (2005): 8361-8373).
- [0092] 한 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 오량체 복합체 중 UL130 폴리펩티드는 서열식별번호: 5와 적어도 80% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특히, UL130 항원은 서열식별번호: 5와 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% 동일성 또는 심지어 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:
- SPWSTLTANQNPSPLWSKLTYSKPHDAATFYCPFIYSPPPRSLQFSGFQRVLTGP
ECRNETLYLLYNREGQTLVERSSTWVKVIWYLSGRNQTLQRMPRTASKPSDGNVQIS
VEDAKIFGAHMPKQTKLLRFVVDGTRYQMCVMKLESWAHVFRDYSVSFQVRLTFTE
ANNQTYTFCTHPNLIV.
- [0093]
- [0094] 바람직한 실시양태에서 UL130 폴리펩티드는 서열식별번호: 5와 100% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.
- [0095] UL131A라고도 칭해지는 UL131 기능은, 내피 세포에서만 뿐만 아니라 상피 세포에서도 HCMV 복제에 필요하다. 한 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 오량체 복합체 중 UL131A 폴리펩티드는 서열식별번호: 6과 적어도 80% 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다. 특히, UL131A 항원은 서열식별번호: 6과 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% 동일성 또는 심지어 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:
- QCQRETAEKNDYYRVPHYWDACSRLPDQTRYKYVEQLVDLTNLNYHYDASHGLDNFDV
LKRINVTEVSLLISDFRRQNRGGTNKRTTFNAAGSLAPHARSLEFSVRLFAN.
- [0096]
- [0097] 바람직한 실시양태에서 UL131 폴리펩티드는 서열식별번호: 6과 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0098] 서열식별번호: 2 내지 6는 균주 BE/28/2011로부터이다 (진뱅크(Genbank) ID KP745669, Kremkow *et al.*, 2015).
- [0099] 본 발명의 면역원성 조성물의 오량체 복합체 항원 부분에서, gH, gL 및 UL128은 디설파이드 결합으로부터 연결될 수 있으나, UL130 및 UL131A는 비공유결합 상호작용에 의해 오량체 복합체에 혼입될 수 있다. 예를 들어, UL130 단백질 및/또는 UL131A 단백질은 비공유결합 상호작용에 의해 오량체 복합체에 혼입된다. 더욱이, UL130 단백질 및/또는 UL131A 단백질은 비공유결합 상호작용에 의해 상호-연결될 수 있다.
- [0100] 오량체 복합체에 대한 다양한 입체형태적 에피토프가 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Macagno (Macagno *et al.*: "Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize humancytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex." *Journal of Virology* 84 (2010): 1005-13)]은 내피, 상피, 및 골수 세포의 HCMV 감염을 중화시킨 인간 모노클로날 항체의 패넬을 단리하였다. 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물의 오량체 복합체 항원은 문헌 [Macagno (2010)]에 의해 확인된 입체형

태적 에피토프 중 하나 이상을 보유한다.

- [0101] 오량체 복합체 항원의 각각의 단백질은, 이들 돌연변이가 항원으로서 단백질의 사용에 해를 끼치지 않는 한, 돌연변이, 예컨대 삽입, 결실 및 치환을 함유할 수 있다. 게다가, 이러한 돌연변이는 본 발명에 따른 오량체 복합체를 형성하는 단백질의 능력을 방지하지 않아야 한다. 본 발명의 오량체 복합체를 형성하는 능력은 단백질 정제를 수행하고, 비-환원 PAGE, 웨스턴 블롯 및/또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 단백질을 분석함으로써 시험될 수 있다. 단백질이 복합체의 일부를 형성하는 경우, 이들은 모두 고유 PAGE 겔에서 단일 밴드로 존재할 수 있고/있거나 크기 배제 크로마토그램에서 단일 피크로 존재할 수 있다.
- [0102] 상기 오량체 복합체의 발현은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 방법에 따라 실현될 수 있다. 예를 들어 문헌 [Hofmann *et al.* (Biotechnology and Bioengineering, 2015)]에 기재된 방법을 언급할 수 있다.
- [0103] 본 발명의 맥락에서 사용하기에 적합한 발현 시스템은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고 다수가 문헌 [Doyle (Doyle, ed. High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). Humana Press, 2008)]에 상세히 기재되어 있다. 일반적으로, 필요한 숙주에서 폴리펩티드를 생성하기 위해 핵산 분자를 유지, 전파 및 발현시키기에 적합한 임의의 시스템 또는 벡터가 사용될 수 있다. 적절한 뉴클레오타이드 서열은, 여러가지의 널리 공지되고 일상적인 기술, 예컨대, 예를 들어, 문헌 [Sambrook (Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000)]에 기재된 것들 중 어느 하나에 의해 발현 시스템에 삽입될 수 있다. 일반적으로, 코딩 유전자는 원하는 펩티드를 코딩하는 DNA 서열이 형질전환된 숙주 세포에서 RNA로 전사되도록, 제어 요소 예컨대 프로모터, 및, 임의로, 오퍼레이터의 제어 하에 배워질 수 있다. 적합한 발현 시스템의 예는, 예를 들어, 박테리아 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포손, 효모 에피솜, 삽입 요소, 효모 염색체 요소, 바이러스 예컨대 바큘로바이러스 (예컨대 특허 출원 W02015170287에 기재됨), 파포바 바이러스 예컨대 SV40, 천연두 바이러스, 아데노바이러스, 계두 바이러스, 가성광견병 바이러스 및 레트로바이러스, 또는 그의 조합, 예컨대 코스미드 및 파지미드를 포함한 플라스미드 및 박테리오파지 유전자 요소로부터 유래된 것들로부터 유래된, 벡터를 포함한, 염색체, 에피솜 및 바이러스-유래 시스템을 포함한다. 인간 인공 염색체 (HAC)는 또한 플라스미드에 함유되고 발현될 수 있는 것보다 더 큰 DNA의 단편을 전달하기 위해 이용될 수 있다.
- [0104] HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원의 5종의 상이한 재조합 단백질을 동시에 그리고 등물 방식으로 발현시키기 위해, 몇몇 가능성이 있다. 본 발명의 면역원성 조성물의 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원 부분에 대한 첫 번째 가능성 (1)은 동일하거나 유사한 조절 요소 (프로모터, 인핸서, 스플라이스 신호, 종결 신호...)의 제어 하에 모든 5개의 ORF를 함유하는 단일 벡터 및 임의로 세포주 선택을 위한 선택 시스템을 구축하는 것이다. 벡터는 5개의 발현 카세트를 함유할 수 있거나 (예를 들어 문헌 [Albers *et al.*, J. Clin. Invest., 2015, 125(4): 1603-1619]; 또는 [Cheshenko *et al.*, Gene Ther., 2001, 8(11): 846-854]에 기재된 바와 같이), 5종의 성분 (gH, gL, UL128, UL130 및 UL131)을 단일 ORF에 융합하여 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원의 5종의 단백질로 적절한 다단백질 성숙을 촉발하는 요소와 융합시킬 수 있다 (예를 들어 문헌 [Szymczak-Workman *et al.*, Cold Spring Harb. Protoc., 2012, 2012 (2): 199-204]에 기재된 바와 같은 자기-절단 가능한 서열). 상기 두 번째 경우에, 모든 절단이 올바르게 발생한다고 가정하면, 등물농도(equimolarity)가 보장된다. 본 발명의 면역원성 조성물의 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원 부분에 대한 또다른 가능성 (2)은 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원의 하나의 성분을 각각 발현하는 5종의 벡터 및 임의로 세포주 선택을 위한 선택 시스템을 구축하는 것이다. 5종의 벡터는 표적 세포주에서 공동-형질감염된다. 가능성 (1)과 가능성 (2) 사이의 임의의 중간 시스템은 필요한 벡터 수를 최소화하고 각각의 벡터를 합당한 크기 (예를 들어, 12 kb 미만)로 유지하도록 또한 설계할 수 있을 것이다.
- [0105] 적합한 발현 시스템은 미생물 예컨대 재조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 바큘로바이러스 예컨대 특허 출원 W02015170287에 기재된 바큘로바이러스)에 감염되거나 형질감염된 곤충 세포 시스템; 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV) 또는 박테리아 발현 벡터 (예를 들어, Ti 또는 pBR322 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 동물 세포 시스템을 포함한다. 무세포 번역 시스템을 또한 이용하여 단백질을 생성할 수 있다.
- [0106] 적합한 식물 세포 유전자 발현 시스템의 예는 미국 특허 5,693,506; 미국 특허 5,659,122; 미국 특허 5,608,143 및 문헌 [Zenk (1991): "Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of

goal. *Phytochemistry*, 30(12), pp 3861-3863. *Zess NaukUMK Tormu*, 13: 253-256]에 기재된 것들을 포함한다. 특히, 원형질체가 단리 및 배양되어 전체 재생 식물을 제공할 수 있는 모든 식물이 사용될 수 있어, 전이된 유전자를 함유하는 전체 식물이 회수된다. 실제로 모든 식물은 사탕 수수, 사탕무, 목화, 과일 및 기타 나무, 콩류 및 채소의 모든 주요 종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 배양된 세포 또는 조직으로부터 재생될 수 있다.

[0107] HEK293 세포는 인산칼슘 및 폴리에틸렌이민 (PEI) 방법을 포함한, 다양한 기술에 의한 그의 높은 형질감염성으로 인해 본 발명에 따른 오랑체 복합체의 HCMV 단백질의 일시적 발현에 적합하다. HEK293의 유용한 세포주는 293-6E와 같은 EBV의 EBNA1 단백질을 발현하는 것이다 (Loignon, et al.: "Stable high volumetric production of glycosylated human 재조합 IFNalpha2b in HEK293 cells.", *BMC Biotechnology* 8 (2008): 65). 형질전환된 HEK293 세포는 높은 수준의 단백질을 성장 배지로 분비하여, 성장 배지로부터 직접 이러한 단백질 복합체의 정제를 가능하게 하는 것으로 나타났다.

[0108] CHO 세포는 HCMV 단백질의 산업적 생산, 특히 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원 부분의 산업적 생산에 특히 적합한 포유동물 숙주이다.

[0109] 형질감염은 인산칼슘, 전기천공법을 사용하거나, 양이온성 지질을 세포막과 융합하여 그의 화물(cargo)을 내부에 침착시키는 리포솜을 생성하는 물질과 접촉시키는 것을 포함하여 관련 기술분야에 널리 공지된 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0110] 세포 상청액 또는 봉입체로부터 재조합 단백질을 정제하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 특히, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원 부분은 크기-배제 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0111] 특히, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 HCMV 바이러스를 포함하지 않는다.

[0112] 특히, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물이고, 여기서 HCMV gB 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체는 유일한 HCMV 항원이다.

[0113] Th1-유도 아주반트

[0114] 본원에 사용된 바와 같은 "아주반트"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 통상적으로 공지된 의미를 갖는다. 특히, 이는 항원의 면역원성을 조정하는 작용제 또는 물질을 지칭한다. "면역원성을 조정하다"는 항원에 의해 생성된 면역 반응의 크기 및/또는 지속시간을 향상시키는 것을 포함한다. 보다 구체적으로, 아주반트는 항원의 존재 하에 이들이 유도하는 면역 반응의 유형에 따라 또한 분류될 수 있다. 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 아주반트(들)는 Th1-유도 아주반트이다.

[0115] "Th1-유도" 아주반트는 항원 또는 항원의 조합물에 대한 Th1 반응을 향상시키는 아주반트로서 정의될 수 있다.

[0116] 면역 반응은 체액 또는 세포 매개 면역 반응 (전통적으로 각각 항체 및 세포 이펙터 보호 메커니즘에 의해 특성화됨)인, 두 가지 극한 범주로 크게 나뉠 수 있다. 이들 범주의 반응은 Th1-유형 반응 (세포-매개 반응), 및 Th2-유형 면역 반응 (체액 반응)으로 칭해진다. 마우스에서, Th1-유형 반응은 종종 (마우스 균주에 따라) IgG2a 또는 IgG2c 아형의 항체의 생성을 특징으로 하며, 인간에서 이들은 IgG1 및 IgG3 유형 항체에 상응할 수 있다. Th2-유형 면역 반응은 마우스 IgG1, IgA, 및 IgM을 포함하여 광범위한 면역글로불린 이소형의 생성을 특징으로 한다. Th1-유형 및 Th2-유형 면역 반응은 또한 시토카인 분비의 상이한 패턴을 특징으로 한다 (Mosmann et al., *Annual Review of Immunology*, 1989, 7: 145-173; Constant et al., *Annual Review of Immunology*, 1997, 15: 297-322). Th1-유형 면역 반응은 T-림프구에 의한 IFN- γ 및/또는 IL-2 시토카인의 증가된 생성과 연관이 있으며, 한편 Th-2 유형 면역 반응은 IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, 및/또는 IL-10 시토카인의 증가된 생성과 연관이 있다. Th1 및 Th2-유형 면역 반응의 구별은 절대적이지 않다. 실제로, 대상체는 주로 Th1 또는 주로 Th2인 것으로 기재되는 면역 반응을 지지할 것이다. 전통적으로 백신접종 또는 감염 후 면역 반응의 Th1:Th2 균형의 가장 좋은 지표는 항원 자극시 시험관내에서 T 림프구에 의한 Th1 또는 Th2 시토카인의 생산의 직접적인 측정, 및/또는 항원 특이적 항체 반응의 IgG1:IgG2a,c 비의 측정 (적어도 마우스에서)을 포함한다.

[0117] 또한, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 범위에서, 주로 Th1-유형 면역 반응을 유도하는 아주반트는 Th1-유도 아주반트로서 간주된다. 바람직하게는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 아주반트(들)는 주로 Th1-유형 면역 반응을 유도한다.

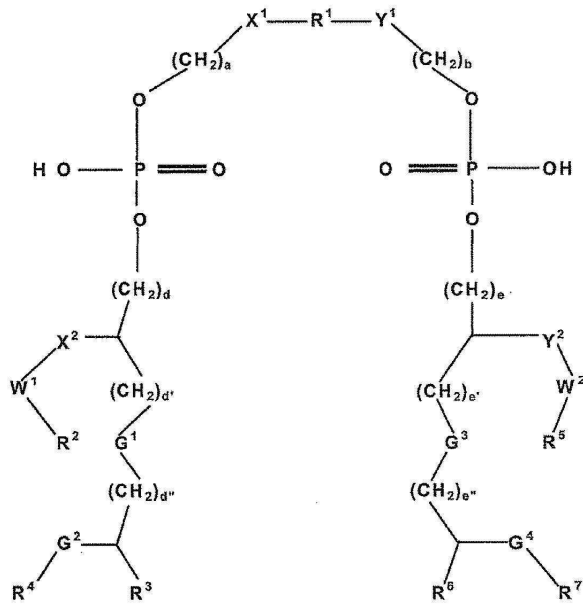
[0118] 이전에 언급된 바와 같이, 이는 마우스에서 IgG1:IgG2a,c 비의 측정에 의해 결정될 수 있다. INF- γ 의 증가는

우세한 Th1 반응의 추가 지표이다. 바람직하게는, IL-5의 감소된 생성이 또한 관찰된다.

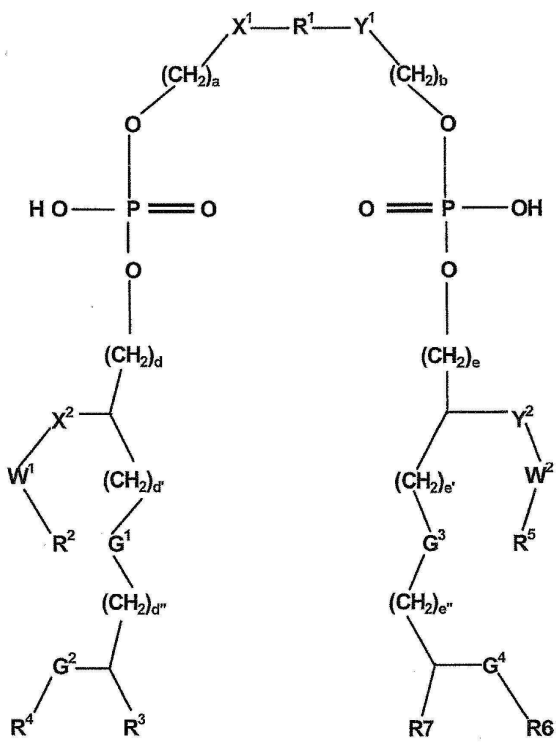
- [0119] 바람직하게는, HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 Th1-유도 아주반트는 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 많은 Th1-편향된 반응 프로파일을 유도한다.
- [0120] MF59는 특허 출원 W090/14837, 미국 특허 번호 6,299,884 및 6,451,325, 및 문헌 [Ott *et al.*, "MF59 -- Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. and Newman, M.J. eds.) Plenum Press, New York, 1995, pp. 277-296)]에 기재된 스쿠알렌-기반 수-중-유 에멀전이다.
- [0121] 특히, HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 Th1-유도 아주반트는 마우스에서 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 낮은 IgG1:IgG2a,c 비를 유도한다.
- [0122] 보다 특히, HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 Th1-유도 아주반트는 마우스에서 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 높은 INF- γ 수준을 유도한다.
- [0123] 훨씬 보다 특히, HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 Th1-유도 아주반트는 마우스에서 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 낮은 IL-5 수준을 유도한다.
- [0124] 더욱 훨씬 보다 특히, HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 Th1-유도 아주반트는 마우스에서 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 낮은 IgG1:IgG2a,c 비 및 더 높은 INF- γ 수준을 유도한다.
- [0125] 특히, HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 Th1-유도 아주반트는 마우스에서 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 낮은 IgG1:IgG2a,c 비 및 더 낮은 IL-5 수준을 유도한다.
- [0126] 보다 특히, HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 본 발명에 따른 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 Th1-유도 아주반트는 마우스에서 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 낮은 IgG1:IgG2a,c 비 및, 더 높은 INF- γ 수준 및 더 낮은 IL-5 수준을 유도한다.
- [0127] 특히, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은
- [0128] - HCMV gB 항원;
- [0129] - HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원; 및
- [0130] - Th1-유도 아주반트
- [0131] 를 포함하는 면역원성 조성물이고,
- [0132] 여기서 상기 Th1-유도 아주반트는 마우스에서 동일한 HCMV gB 항원 및 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 조성물에서 MF59보다 더 낮은 IgG1:IgG2a,c 비, 및/또는 더 높은 INF- γ 수준, 및/또는 더 낮은 IL-5 수준을 유도한다.
- [0133] 특히, 본 발명에 따른 Th1-유도 아주반트는
- [0134] - TLR-4 효능제; 또는
- [0135] - 350 내지 650 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw를 가진 선형 또는 분지형 폴리아크릴산 중합체 염
- [0136] 을 포함한다.

- [0137] 특히, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은
- [0138] - HCMV gB 항원;
- [0139] - HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원; 및
- [0140] - Th1-유도 아주반트
- [0141] 를 포함하는 면역원성 조성물이고,
- [0142] 여기서 상기 Th1-유도 아주반트는
- [0143] - 리포폴리사카라이드, 모노포스포릴 지질 A (MPL), 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL), 글루코피라노실 지질 아주반트 (GLA), 제2 세대 지질 아주반트 (SLA), 비탄수화물 백본 및 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트에 의해 연결된 인지질 이량체, 또는 그의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 TLR-4 효능제; 또는
- [0144] - 350 내지 650 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw를 가진 폴리아크릴산 중합체 염
- [0145] 을 포함한다.
- [0146] 한 실시양태에서, 상기 Th1-유도 아주반트는 TLR-4 효능제를 포함한다.
- [0147] TLR (톨-유사 수용체) 효능제는 천연 TLR 리간드, TLR 리간드 모방체, 합성 또는 화학적 TLR 리간드, 병원체 연관 분자 패턴을 포함하는 세포 또는 입자, 미생물 병원체, 박테리아, 바이러스 및 바이러스-유사 입자를 의미하는 것으로 이해된다.
- [0148] TLR4 (톨-유사 수용체 유형 4)는 면역계의 항원-제시 세포에 의해 발현되는 수용체이며; 그것은 그램-박테리아 감염에 대한 초기 방어 메커니즘에 관여한다. 그램-박테리아의 리포폴리사카라이드 (LPS)는 TLR4에 대한 천연 리간드이며; 그것은 생화학적 사건의 캐스케이드, 특히 Nf-카파 B 전사 인자의 활성화, 및 염증유발성 시토카인의 생성을 촉발하는 수용체를 활성화시킨다. TLR4 경로를 자극하는 화합물의 능력은, 예를 들어 문헌 [Journal of Biological Chemistry, (2001), vol 276(3), page 1873-1880]에 기재된 바와 같이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 평가될 수 있다.
- [0149] TLR4 효능제의 예는 모노포스포릴 지질 A (MPL), 또는 그의 유도체, 특히 GB2211502 또는 US4912094에 기재된 바와 같은 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL), 또는 그의 유도체, 글루코피라노실 지질 아주반트 또는 GLA (CAS 번호 1246298-63-4)로도 칭해지는 인산화 핵사아실 디사카라이드 또는 그의 유도체, 문헌 [Carter *et al.*, Clin. Transl. Immunology, 2016, 5(11):e108] 또는 EP2437753 또는 US9480740에 기재된 바와 같은 제 2 세대 지질 아주반트 (SLA), 또는 그의 유도체, WO 98/50399 또는 WO 01/034617에 기재된 바와 같은 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 (AGP), 또는 그의 유도체, 특히 US 6,113,918에 기재된 RC529, 또는 그의 유도체, 및 US 2003/0153532 또는 US 2005/0164988에 기재된 바와 같은 비탄수화물 백본에 의해 연결된 화학적 화합물 또는 인지질 이량체 (동종이량체 또는 이종이량체), 또는 그의 유도체, 특히 US 2003/0153532에서 하기 명칭으로 확인되고 예시된 화합물: ER803022 (CAS 번호: 287180-56-7), ER803058 (CAS 번호: 287180-57-8), ER803732 (CAS 번호: 287106-29-0), ER803789 (CAS 번호: 287180-61-4), ER804053 (CAS 번호: 287180-62-5), ER804057 (CAS 번호: 287180-63-6), ER804058 (CAS 번호: 287180-65-8), ER804059 (CAS 번호: 287180-64-7), ER 8044442 (CAS 번호: 287180-78-3), ER 804764 (CAS 번호: 287180-87-4), ER111232 (CAS 번호: 287180-48-7), ER112022 (CAS 번호: 287180-46-5), ER112048 (CAS 번호: 287106-02-9), ER112065 (CAS 번호: 287180-49-8), ER112066 (CAS 번호: 287180-50-1), ER113651 (CAS 번호: 287180-51-2), ER118989 (CAS 번호: 287180-52-3), ER119327 (CAS 번호: 287180-54-5) 및 ER119328 (CAS 번호: 287180-55-6), 또는 그의 유도체를 포함한다. 이들 화합물은 일반적으로 하나 또는 수개의 비대칭 탄소를 갖는다. 이들 화합물이 하나 또는 수개의 비대칭 탄소를 갖는 경우, 이들은 광학 이성질체의 혼합물로서 또는 특정 이성질체의 형태 하에 사용될 수 있다.
- [0150] 특히, 상기 TLR-4 효능제는 GLA TLR-4 효능제 및 비탄수화물 백본에 의해 연결된 인지질 이량체로부터 선택된다.
- [0151] 특히, TLR4 효능제는 비탄수화물 백본에 의해 연결된 인지질 이량체이다.
- [0152] 특히, TLR4 효능제는 화학식 I, II, III 또는 IV의 비탄수화물 백본에 의해 연결된 화학적 화합물 또는 인지질 이량체, 또는 화학식 I, II, III 또는 IV의 비탄수화물 백본에 의해 연결된 상기 화합물 또는 인지질 이량체의 제약상 허용되는 염이다:

[0153] 화학식 I의 비탄수화물 백본에 의해 연결된 화합물 또는 인지질 이량체

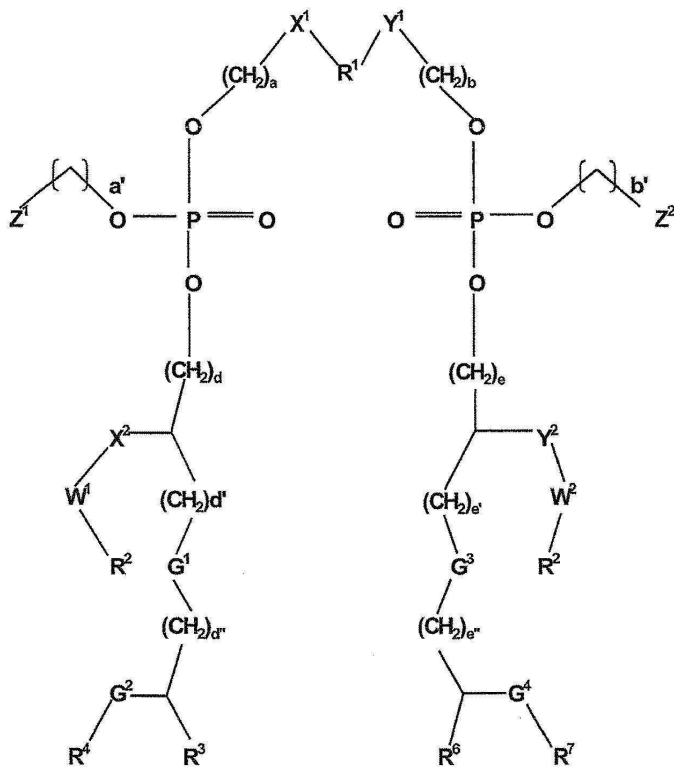


[0154]
[0155] 화학식 II의 비탄수화물 백본에 의해 연결된 화합물 또는 인지질 이량체



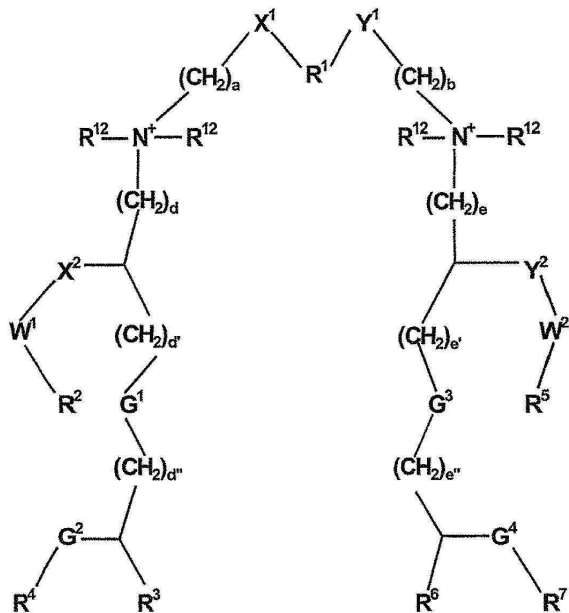
[0156]

[0157] 화학식 III의 비탄수화물 백본에 의해 연결된 화합물 또는 인지질 이량체



[0158]

[0159] 화학식 IV의 비탄수화물 백본에 의해 연결된 화합물 또는 인지질 이량체



[0160]

[0161] 여기서, 화학식 I, II, III 또는 IV 각각에 대해, R¹은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되고:

[0162] a) C(0);

[0163] b) C(0)-(C₁-C₁₄ 알킬)-C(0) (여기서 상기 C₁-C₁₄ 알킬은 히드록실, C₁-C₅ 알콕시, C₁-C₅ 알킬렌디옥시, (C₁-C₅ 알킬)아미노 또는 (C₁-C₅ 알킬)아릴로 임의로 치환되고, 여기서 상기 (C₁-C₅ 알킬)아릴의 상기 아릴 모이어티는 C₁-C₅ 알콕시, (C₁-C₅ 알킬)아미노, (C₁-C₅ 알콕시)아미노, (C₁-C₅ 알킬)아미노(C₁-C₅ 알콕시), -O-(C₁-C₅ 알킬)아미노

(C₁-C₅ 알콕시), -O-(C₁-C₅ 알킬)아미노-C(O)-(C₁-C₅ 알킬)-C(O)OH, 또는 -O-(C₁-C₅ 알킬)아미노-C(O)-(C₁-C₅ 알킬)-C(O)-(C₁-C₅)알킬로 임의로 치환된다);

[0164] c) 히드록실 또는 알콕시로 임의로 치환된, C₂-C₁₅ 선형 또는 분지쇄를 포함하는 알킬; 및

[0165] d) -C(O)-(C₆-C₁₂ 아릴렌)-C(O)- (여기서 상기 아릴렌은 히드록실, 할로젠, 니트로 또는 아미노로 임의로 치환된다);

[0166] a 및 b는 독립적으로 0, 1, 2, 3 또는 4이고;

[0167] d, d', d'', e, e' 및 e''는 독립적으로 0, 1, 2, 3 또는 4이고;

[0168] X¹, X², Y¹ 및 Y²는 널(null), 산소, NH 및 N (C(O)(C₁-C₄ 알킬)), 및 N(C₁-C₄ 알킬)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0169] W¹ 및 W²는 카르보닐, 메틸렌, 술폰 및 술폭시드로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0170] R² 및 R⁵는 다음으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고:

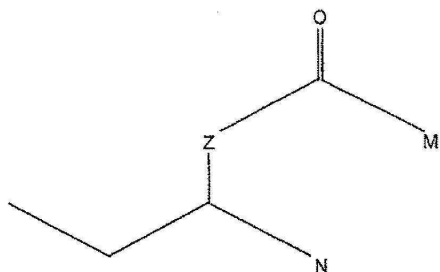
[0171] a) 옥소, 히드록실 또는 알콕시로 임의로 치환된, C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알킬;

[0172] b) 옥소, 히드록실 또는 알콕시로 임의로 치환된, C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알케닐 또는 디알케닐;

[0173] c) 옥소, 히드록실 또는 알콕시로 임의로 치환된, C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알콕시;

[0174] d) NH-(C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알킬) (여기서 상기 알킬 기는 옥소, 히드록실 또는 알콕시로 임의로 치환된다); 및

[0175] e)



[0176]

[0177] (여기서 Z는 O 및 NH로 이루어진 군으로부터 선택되고, M 및 N은 C₂-C₂₀ 선형 또는 분지쇄를 포함하는 알킬, 알케닐, 알콕시, 아실옥시, 알킬아미노 및 아실아미노로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다);

[0178] R³ 및 R⁶은 옥소 또는 플루오로로 임의로 치환된, C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알킬 또는 알케닐로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0179] R⁴ 및 R⁷은 C(O)-(C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알킬 또는 알케닐), C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알킬, C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알콕시, 및 C₂ 내지 C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 알케닐로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 상기 알킬, 알케닐 또는 알콕시 기는 히드록실, 플루오로 또는 C₁-C₅ 알콕시로 독립적으로 그리고 임의로 치환될 수 있고;

[0180] G₁, G₂, G₃ 및 G₄는 산소, 메틸렌, 아미노, 티올, -C(O)NH-, -NHC(O)-, 및 -N(C(O)(C₁-C₄ 알킬))-로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나;

[0181] GR⁴ 또는 GR⁷은 함께 수소 원자 또는 히드록실일 수 있고;

[0182] 여기서, 화학식 III의 경우:

[0183] a' 및 b'는 독립적으로 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8, 바람직하게는 2이고;

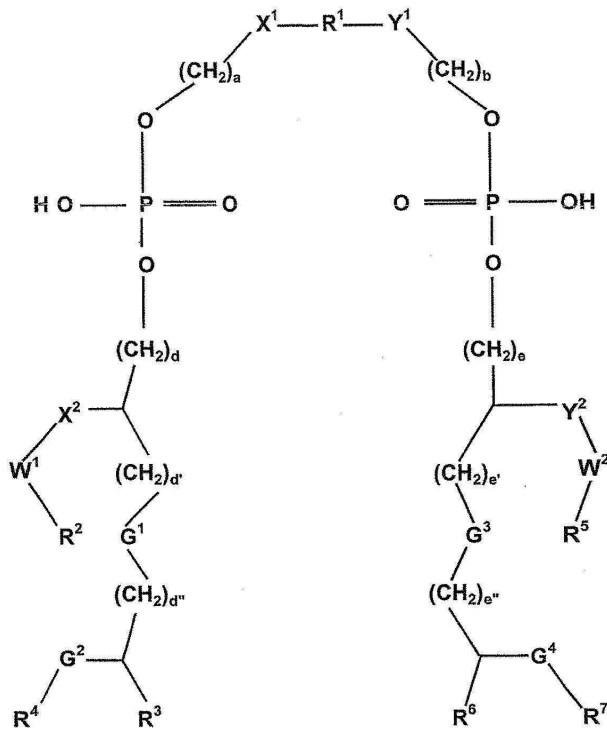
[0184] Z¹은 -OP(O)(OH)₂, -P(O)(OH)₂, -OP(O)(OR⁸)(OH) (여기서 R⁸은 C₁-C₄ 알킬 쉐이다), -OS(O)₂OH, -S(O)₂OH, -CO₂H, -OB(OH)₂, -OH, -CH₃, -NH₂ 및 -NR⁹₃ (여기서 R⁹은 C₁-C₄ 알킬 쉐이다)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0185] Z²는 -OP(O)(OH)₂, -P(O)(OH)₂, -OP(O)(OR¹⁰)(OH) (여기서 R¹⁰은 C₁-C₄ 알킬 쉐이다), -OS(O)₂OH, -S(O)₂OH, -CO₂H, -OB(OH)₂, -OH, -CH₃, -NH₂ 및 -NR¹¹ (여기서 R¹¹은 C₁-C₄ 알킬 쉐이다)로 이루어진 군으로부터 선택되고 ;

[0186] 여기서, 화학식 IV의 경우:

[0187] R¹²는 H 또는 C₁-C₄ 알킬 쉐이다.

[0188] 특히, 본 발명에 따른 TLR4 효능제는 화학식 I의 비탄수화물 백본에 의해 연결된 화학적 화합물 또는 인지질 이량체, 또는 비탄수화물 백본에 의해 연결된 이 화합물 또는 인지질 이량체의 제약상 허용되는 염이다.



[0189] 바람직하게는,

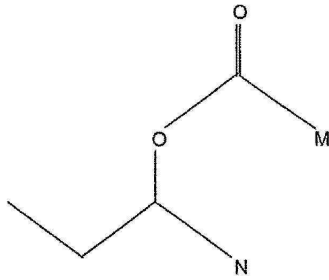
[0191] R¹은 C(O) 또는 C(O)-(CH₂)_n-C(O)이고, n은 1, 2, 3 또는 4이고,

[0192] a, b, d, d', d'', e, e' 및 e''는 독립적으로 1 또는 2이고,

[0193] X¹, X², Y¹ 및 Y²는 NH이고,

[0194] W¹ 및 W²는 C(O)이고,

[0195] R^2 및 R^5 는 옥소로 임의로 치환된 C_{10} - C_{15} 직쇄 알킬, NH -(C_{10} - C_{15} 직쇄 알킬), 및



[0196]

[0197] 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고,

[0198] 여기서 M 및 N은 독립적으로 C_2 내지 C_{20} 직쇄 알킬 또는 알케닐이고,

[0199] R_3 및 R_6 은 C_5 - C_{10} 직쇄 알킬이고,

[0200] R_4 및 R_7 은 수소, $C(0)$ -(C_8 - C_{12} 직쇄 알킬) 또는 $C(0)$ (C_8 C_{12} 직쇄 알케닐)로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0201] G_1 및 G_3 은 산소 또는 $-NH(CO)-$ 이고,

[0202] G_2 및 G_4 는 산소이다.

[0203] 특히, 본 발명에 따른 TLR4 효능제는 비탄수화물 백본에 의해 연결된 대칭성 인지질 이량체 (동종이량체)이다. 보다 특히, 비탄수화물 백본에 의해 연결된 대칭성 인지질 이량체는 트리아실 인지질의 이량체이다. 보다 특히, 상기 TLR-4 효능제는 E6020 (CAS 번호: 287180-63-6)이다.

[0204] 특히, 상기 TLR-4 효능제는 GLA (CAS 번호 1246298-63-4)이다.

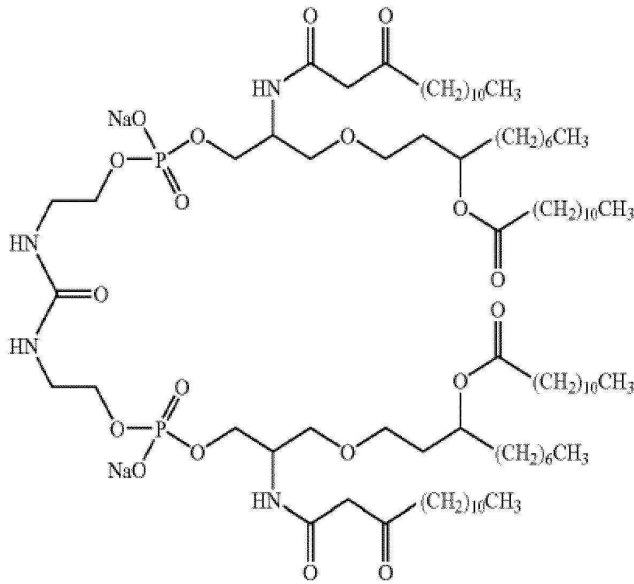
[0205] 이들 TLR4 효능제는 또한 자체가 전달 시스템 예컨대 인산칼슘, 리포솜, 비로솜, ISCOM, 마이크로입자 및 나노입자, 또는 에멀전과 조합될 수 있다.

[0206] 이와 같이, 특히, 본 발명에 따른 TLR4 효능제는 전달 시스템 예컨대 수성 나노현탁액, 인산칼슘, 리포솜, 비로솜, ISCOM, 마이크로입자 및 나노입자, 또는 에멀전과 조합된다.

[0207] 이러한 전달 시스템은 이전에 기재되었으며 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0208] 특히, 상기 TLR-4 효능제는 E6020 (CAS 번호: 287180-63-6) 및 GLA (CAS 번호 1246298-63-4) TLR-4 효능제로부터 선택된다.

[0209] 전달 시스템과 조합된 TLR4 효능제의 적합한 제제의 예로서, TLR4 효능제로서 하기 화학식을 갖는 화합물의 이 나트륨 염인, 화합물 ER 804057 (이제 E6020로 칭해짐) (CAS 번호 : 287180-63-6)을 포함하는 수-중-유 에멀전을 인용할 수 있다:



[0210]

[0211]

E6020의 4개의 비대칭 탄소는 모두 *R* 배위 (*R,R,R,R*)에 있다. 이러한 에멀전은 예를 들어 WO 2004/060396에 기재된 바와 같은 미세유동화(microfluidisation) 기술 또는 WO 2007/080308에 기재된 바와 같은 상 반전 온도 공정 (PIT 공정)에 의해 수득될 수 있다.

[0212]

이와 같이, 특히, 본 발명에 따른 TLR4 효능제는 수-중-유 에멀전, 보다 특히, 스쿠알렌-기반 수-중-유 에멀전과 조합된다.

[0213]

본 발명의 목적에 적합한 수-중-유 에멀전은 대사 가능 오일 (여기서 오일의 부피는 에멀전의 총 부피의 0.5 내지 20% (v/v), 특히 1 내지 10% (v/v), 보다 특히 1 내지 5% (v/v)를 나타낸다), 수용액 (여기서 수용액의 부피는 총 부피의 80 내지 99.5% (v/v), 특히 90 내지 99% (v/v)를 나타낸다) 및 1종 또는 수개의 종의 유화제(들) (여기서 유화제의 총량은 에멀전의 총량의 0.001 내지 5% (w/w), 특히 0.001 내지 2% (w/w), 보다 특히 0.01 내지 2% (w/w)를 나타낸다)를 포함한다. 대사 가능한 오일은 통상적으로 알칸, 알켄, 알킨, 및 그의 상응하는 산 및 알콜, 그의 에테르 및 에스테르, 및 그의 혼합물을 포함하나, 그에 제한되지는 않는, 약 6 내지 약 30개의 탄소 원자를 갖는 것이다. 오일은 본질적으로, 에멀전 조성물이 투여될 인간 대상체의 신체에 의해 대사될 수 있고 대상체에 실질적으로 독성이 없는 임의의 식물성 오일, 어유, 동물성 오일 또는 합성 제조 오일일 수 있다. 대사 가능한 오일은 20 내지 40개의 탄소를 갖는 불포화 탄화수소, 또는 20 내지 40개의 탄소 원자를 갖는 분지형, 다중불포화 탄화수소, 예를 들어 테르페노이드일 수 있다. 스쿠알렌, 2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥센으로서 공지된 불포화 테르페노이드 및 그의 포화 유사체인 스쿠알란이 종종 바람직하다. 스쿠알렌 및 스쿠알란을 포함한 어유는 상업적 공급원으로부터 용이하게 이용가능하거나 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 수득될 수 있다. 통상적으로 사용되는 또 다른 오일은 토코페롤이다. 조성물이 토코페롤을 포함하는 경우, α , β , γ , δ , ϵ 또는 ζ 토코페롤 중 임의의 것이 사용될 수 있으나 α -토코페롤이 바람직하다. 상당수의 적합한 유화제 (계면활성제, 세제 등으로도 지칭됨)가 제약 과학에서 사용되며, 이들 중 다수가, 이들이 충분히 무독성인 한, 본 발명의 에멀전의 조성물에서 유용하다. 생물학적 상황을 위해 특별히 고안되고 통상적으로 사용되는 다수의 유화제가 있다. 예를 들어, 다수의 생물학적 세제 (계면활성제)가 시그마 케미컬(Sigma Chemical)에 의해 그와 같이 열거된다. 이러한 계면활성제는 네 가지 기본 유형: 음이온성, 양이온성, 양쪽성 이온성, 및 비이온성으로 나뉜다.

[0214]

음이온성 세제의 예는 알긴산, 카프릴산, 콜산, 1-데칸술포산, 데옥시콜산, 1-도데칸술포산, N-라우로일사르코신, 및 타우로콜산을 포함한다.

[0215]

양이온성 세제는 도데실트리메틸암모늄 브로마이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤질디메틸헥사데실 암모늄 클로라이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 메틸벤제토늄 클로라이드, 및 4-피콜린 도데실 술페이트를 포함한다.

[0216]

양쪽성 이온성 세제의 예는 3-[(3-콜라미도프로필)-디메틸암모니오]-1-프로판 술포네이트 (통상적으로 CHAPS로 약칭), 3-[(콜라미도프로필)디메틸암모니올-2- 히드록시-1-프로판 술포네이트 (통상적으로 CHAPSO로 약칭), N-도데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판술포네이트, 포스파티딜콜린 및 리소-알파-포스파티딜콜린을 포함한다.

- [0217] 비이온성 세제의 예는 데카노일-N-메틸글루카미드, 디에틸렌 글리콜 모노펜틸 에테르, n-도데실 베타-D-글루코 피라노시드, 폴록사머, 지방 알콜의 에틸렌 옥시드 축합물 (예를 들어, 상표명 루브롤(Lubrol)로 판매된 것들), 지방산의 폴리옥시에틸렌 에테르 (특히 C12-C20 지방산), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 (예를 들어, 상표명 트윈(Tween)® 하에 판매), 및 소르비탄 지방산 에스테르 (예를 들어, 상표명 스펠(Span)® 하에 판매)를 포함한다.
- [0218] 계면활성제의 특히 유용한 군은 소르비탄-기반 비이온성 계면활성제이다. 이들 계면활성제는 전형적으로 소르비톨의 탈수에 의해 1,4-소르비탄을 수득한 다음에, 1 당량 이상의 지방산과 반응시킴으로써 제조된다. 지방산-치환된 모이어티는 에틸렌 옥시드와 추가로 반응시켜 제2 군의 계면활성제를 제공할 수 있다.
- [0219] 지방산-치환 소르비탄 계면활성제는 전형적으로 1,4-소르비탄을 지방산 예컨대 라우르산, 팔미트산, 스테아르산, 올레산, 또는 유사한 장쇄 지방산과 반응시켜 1,4-소르비탄 모노-에스테르, 1,4-소르비탄 세스퀴에스테르 또는 1,4-소르비탄 트리에스테르를 제공함으로써 제조된다. 이들 계면활성제 중 일부의 일반명은, 예를 들어, 소르비탄 모노라우레이트, 소르비탄 모노팔미테이트, 소르비탄 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레에이트, 소르비탄 세스퀴올레에이트, 및 소르비탄 트리오레에이트를 포함한다. 이들 계면활성제는 스펠® 또는 알라셀(ARLACEL)® 하에 상업적으로 이용가능하다. 스펠® 및 알라셀® 계면활성제는 친유성이며 일반적으로 오일에 가용성이거나 분산성이다. 이들은 또한 대부분의 유기 용매에 가용성이다. 물에서 이들은 일반적으로 불용성이나 분산성이다. 일반적으로 이들 계면활성제는 1.8 내지 8.6의 친수성-친유성 균형(HLB) 수를 가질 것이다. 이러한 계면활성제는 관련 기술분야에 공지된 수단에 의해 용이하게 제조될 수 있거나 상업적으로 이용가능하다.
- [0220] 계면활성제의 관련된 군은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 트리에스테르를 포함한다. 이들 물질은 전형적으로 1,4-소르비탄 모노에스테르 또는 트리에스테르에 에틸렌 옥시드를 첨가하여 제조된다. 폴리옥시에틸렌의 첨가는 친유성 소르비탄 모노- 또는 트리에스테르 계면활성제를 물에 일반적으로 가용성 또는 분산성이고 유기 액체에서 다양한 정도로 가용성인 친수성 계면활성제로 전환시킨다. 트윈® 계면활성제는, 예를 들어, 관련 소르비탄 모노에스테르 또는 트리에스테르 계면활성제와 조합하여 에멀전 안정성을 촉진할 수 있다. 트윈® 계면활성제는 일반적으로 9.6 내지 16.7인 HLB 값을 갖는다. 트윈® 계면활성제는 다수의 제조업체, 예를 들어 ICI 아메리카즈 인크.(America's Inc.) (미국 델라웨어주 윌밍턴)로부터 등록 상표 아틀라스(ATLAS)® 계면활성제 하에 상업적으로 이용가능하다.
- [0221] 단독으로 또는 스펠®, 알라셀® 및/또는 트윈® 계면활성제와 함께 사용될 수 있는 비이온성 계면활성제의 또 다른 군은 에틸렌 옥시드와 장쇄 지방산의 반응에 의해 제조된 폴리옥시에틸렌 지방산이다. 이 유형의 가장 통상적으로 이용가능한 계면활성제는 MYRJ®라는 명칭 하에 고체이며 스테아르산의 폴리옥시에틸렌 유도체이다. MYRJ® 계면활성제는 트윈® 계면활성제와 같이 친수성이며 물에 가용성이거나 분산성이다. MYRJ® 계면활성제는 예를 들어, 에멀전 형성에서 사용하기 위해 트윈® 계면활성제 또는 트윈®/스판® 또는 알라셀® 계면활성제 혼합물과 블렌딩될 수 있다. MYRJ® 계면활성제는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있거나 ICI 아메리카즈 인크.로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0222] 폴리옥시에틸렌 기반 비이온성 계면활성제의 또 다른 군은 라우릴, 아세틸, 스테아릴 및 올레일 알콜로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방산 에테르이다. 이들 물질은 전형적으로 지방족 알콜에 에틸렌 옥시드를 첨가하여 상기와 같이 제조된다. 이들 계면활성제의 상품명은 BRIJ®이고; BRIJ® 계면활성제는 계면활성제에서 폴리옥시에틸렌 모이어티의 크기에 따라 친수성 또는 친유성일 수 있다. 이들 화합물의 제조는 관련 기술분야에서 이용가능하지만, 이들은 또한 ICI 아메리카즈 인크.로서 이러한 상업적 공급원으로부터 용이하게 이용가능하다.
- [0223] 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는 다른 비이온성 계면활성제는, 예를 들어: 폴리옥시에틸렌, 폴리올 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 에테르, 폴리옥시프로필렌 지방 에테르, 폴리옥시에틸렌을 함유한 밀랍 유도체, 폴리옥시에틸렌 라놀린 유도체, 폴리옥시에틸렌 지방 글리세리드, 글리세롤 지방산 에스테르 또는 12-22개의 탄소 원자의 장쇄 지방산의 다른 폴리옥시에틸렌 산 알콜 또는 에테르 유도체이다. 바람직하게는, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르는 세테아레스(cetareth)-12 (유물진(Eumulgin)® B1의 명칭으로 판매), 세테아레스-20 (유물진® B2), 스테아레스(steareth)-21 (유물진® S21), 세테스(ceteth)-20 (시물솔(Simulsol)® 58 또는 Brij® 58), 세테스-10 (Brij® 56), 스테아레스-10 (Brij® 76), 스테아레스-20 (Brij® 78), 올레스(oleth) 10 (Brij® 96 또는 Brij® 97) 및 올레스-20 (Brij® 98 또는 Brij® 99)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각각의 화학명으로 인한 숫자는 화학식에서 에틸렌 옥시드 단위의 수에 상응한다. 특정한 측면에서, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르는 코그니스(Cognis) 사에 의해 유물진™ B1이라는 명칭으로 제공되는, 폴리옥시에틸렌 (12) 세토스테아

릴 에테르 또는 BRIJ® 56이다. 특히 적합한 9 미만의 HLB를 가진 소르비탄 에스테르 및 만니드 에스테르 기반 계면활성제 중에서, 데히뮬스(Dehymuls) SMOTM 또는 스펠®80이라는 명칭으로 판매되는 소르비탄 모노올레이트가 언급될 수 있다. 만니드 에스테르 기반 계면활성제 중에서, 시그마사에 의해, 또는 몬타니드(Montanide) 80™이라는 명칭으로 세픽(Seppic)사에 의해 판매되는 만니드 모노올레이트가 언급될 수 있다.

[0224] 2종 이상의 계면활성제가 본 발명의 조성물의 에멀전 부분에 조합될 수 있다.

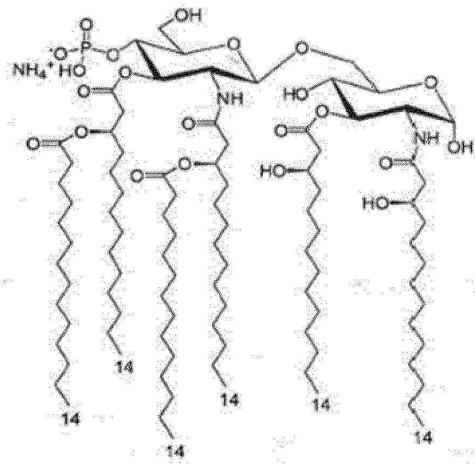
[0225] 본 발명의 조성물의 O/W 에멀전 부분의 수용액은 완충 식염수 또는 순수한 물(unadulterated water)이다. 본 발명의 조성물은 비경구 투여용이기 때문에, 조성물과 생리학적 유체 사이의 차등 이온 농도 때문에 조성물의 급속 흡수 및 투여 후 부종을 예방하기 위해 긴장성, 즉 삼투압이 본질적으로 정상적인 생리학적 유체와 동일하도록 백신으로서 사용되는 최종 완충 용액을 구성하는 것이 바람직하다. 정상적인 생리학적 조건에 적합한 pH를 유지하기 위해 식염수를 완충시키는 것이 또한 바람직하다. 또한, 특정 경우에, gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원이 이들이 O/W 에멀전에 존재하는 경우 이들의 안정성을 보장하기 위해 pH를 특정한 수준으로 유지할 필요가 있을 수 있다.

[0226] 임의의 생리학상 허용되는 완충제가 본원에서 사용될 수 있으나, 인산염 완충제가 바람직하다. 다른 허용되는 완충제 예컨대 아세트산염, 트리스, 중탄산염, 탄산염, 시트르산염 등이 인산염 완충제 대용물로서 사용될 수 있다. 수성 성분의 pH는 바람직하게는 6.0 내지 8.0일 것이다.

[0227] 본 발명의 조성물의 O/W 에멀전 부분은 O/W 에멀전을 제조할 때 첨가되거나 일단 O/W 에멀전이 제조되면 첨가될 수 있는 보충 성분을 포함할 수 있다.

[0228] WO 2007/080308에 기재된 방법에 따라 획득된, E6020을 함유하는 AF04, 스쿠알렌-기반 수-중-유 (O/W) 에멀전을 예로 들 수 있다.

[0229] GLA (CAS 번호 1246298-63-4) TLR-4 효능제는 하기 화학식을 갖는 화합물이다:



[0230]

[0231] GLA는 예를 들어 참조번호 699800 (아반티 폴라 리피즈 인크.(Avanti Polar Lipids Inc.), 미국 엘라베스터)을 가진 아반티 폴라 카탈로그에서 구매할 수 있다.

[0232] 특히, GLA는 전달 시스템 예컨대 인산칼슘, 리포솜, 비로솜, ISCOM, 마이크로입자 및 나노입자, 또는 에멀전과 조합된다. 우선적으로, GLA는 수-중-유 에멀전, 보다 특히, 스쿠알렌-기반 수-중-유 에멀전과 조합된다.

[0233] GLA-SQEM, GLA를 함유하는 스쿠알렌-기반 수-중-유 (O/W) 에멀전을 예로 들 수 있다.

[0234] 하기 표 1에서, 10% 스쿠알렌의 농도를 가진 100 mL의 GLA-SQEM을 획득하기 위해 사용된 상이한 원료의 양이 언급된다. 최종 에멀전은 22.5 mM의 인산암모늄 중, 4% (v/v)의 스쿠알렌 (34 mg/ml) 및 100 µg/mL의 GLA를 함유한다.

[0235] <표 1>

10% 스쿠알렌에서의 제법	질량 % (w/v)	100 mL에 대한 양	참조번호
수성 상 (90%):			
25 mM 인산암모늄 pH 6,1 qsp 90 ml		87.7 mL	
폴록사머 188 (플루로닉 F68)	0.09	90.0 mg	시그마로부터의 P5556
글리세롤	2.25	2.25 g	VWR 프롤라보(Prolabo)로부터의 24388238 노르마푸르(Normapur)
오일 상 (10%)			
스쿠알렌 10% v/v (85,6 mg/ml)	8.56	10.0 mL	과산화물을 제거하기 위해 재증류된, 소핼(SOPHIM)으로부터의 1208076
디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC)	1.9	1.90 g	아반티 폴라 리피즈로부터의 850345P
GLA	0.025	25.0 mg	아반티 폴라 리피즈로부터의 699800P

[0236]

[0237]

오일 상은 55-60℃의 조(bath)에서 초음파처리하여 제조한다. 이어서, 수성 상을 오일 상에 첨가한다 (칭량). 예비-에멀전을 30초의 2 사이클 동안, 9500 r/분에서 울트라 투락스(Ultra Turrax) T25 (IKA) 상에서 균질화 후 수득한다. 이어서, 55 psi의 기압 (1450 내지 1600 bar의 균질화 압력)에서 20 계대 동안 에멀시플렉스 (Emulsiflex) C3 상에서 미세유동화를 수행한다. 이어서, 에멀전을 25 mM 인산암모늄 완충제에 2.5배 희석하여, 4% 스쿠알렌에서 최종 GLA-SQEM 에멀전을 수득한다. 에멀전을 10 ml 시린지 및 아크로디스크 (Acrodisc) 0.8-0.2 μm 수포르(Supor) 막 필터 (폴(PALL) n° PN4187)로 약 40℃에서 멸균 여과한다.

[0238]

TLR4 효능제를 포함하는 다른 적합한 아주반트는 리소좀 제제로 3D-MPL 및 QS21을 포함하는 AS01, 또는 수-중-유 에멀전으로 제제화된 3D-MPL 및 QS21을 포함하는 AS02이다 (Garçon et al., Exp. Rev. of Vaccines, 2007, 6(5):723-739, EP0671948).

[0239]

한 실시양태에서, 상기 Th1-유도 아주반트는 350 내지 650 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw를 가진 선형 또는 분지형 폴리아크릴산 중합체 염을 포함한다.

[0240]

상기 중합체는 선형 또는 분지형 폴리아크릴산 중합체이나, 가교 중합체는 아니다.

[0241]

"폴리아크릴산 중합체"란, 아크릴산 단위로만 구성된 중합체를 의미한다. 따라서, 염의 형태에서, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 아크릴산의 염에 상응하는 단위로만 구성되거나 아크릴산의 유리 산 형태에 상응하는 단위 및 아크릴 산의 염에 상응하는 단위로만 구성된다.

[0242]

선형 또는 분지형 폴리아크릴산 중합체는 단량체로서 아크릴산만을 중합시킴으로써 수득된다. 중합은 대부분 개시제 또는 촉매로서 산화제를 사용하여, 라디칼 중합에 의해 수행된다. 가장 많이 사용되는 산화제는 과황산 염 (퍼옥시디술페이트), 예를 들어 과황산나트륨 또는 과황산칼륨이다. 분지형 폴리아크릴산 중합체는, 예를 들어, 문헌 [Macromolecules 2011, 44, 5928-5936]에 기재되어 있다. 본 발명에 따른 중합체가 선형인 경우, 그의 마크 후윅크(Mark Houwink) 기울기는 0.7 이상이다 (Yan J.K., Pei J.J., Ma H.L., Wang Z.B. 2015. Effects of ultrasound on molecular properties, structure, chain conformation and degradation kinetics of carboxylic curdlan. Carb. Polymers. 121, 64-70).

[0243]

폴리아크릴산 중합체 염은 고체 형태 (침전물 또는 분말) 또는 바람직하게는 액체 제제일 수 있다. 액체 제제는 폴리아크릴산 중합체 염 및 수용액을 포함할 것이다. 바람직하게는, 이러한 제제는 5.5 내지 8.0 범위의 pH

를 갖는다. 이 pH는 수용액에 NaOH와 같은 염기를 혼입함으로써 취득할 수 있다. 수용액은 완충제 예컨대 인산염 완충제, TRIS (2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올), Hepes (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진 에탄 술포산), 히스티딘 또는 시트르산염 완충제로부터 취득한, 완충 수용액일 수 있다. 액체 제제는 또한 NaCl과 같은 1종 또는 수개의 종의 추가 염을 포함할 수 있다.

- [0244] 특히, 상기 선형 또는 분지형 폴리아크릴산 중합체 염은 아크릴산의 염에 상응하는 단위로만 구성되거나 아크릴산의 유리 산 형태에 상응하는 단위 및 아크릴산의 염에 상응하는 단위로만 구성된다.
- [0245] 유리하게는, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 상기 폴리아크릴산 중합체 염의 총 건조 중량을 기준으로 하여, 0.005% w/w 미만, 바람직하게는 0.001% w/w 미만의 산화제를 포함하고/하거나 상기 폴리아크릴산 중합체 염의 총 건조 중량을 기준으로 하여, 0.005% w/w 미만, 바람직하게는 0.001% w/w 미만의 과황산염을 포함한다,
- [0246] 보다 특정한 실시양태에서, 상기 폴리아크릴산 중합체는 Na⁺와의 염이다.
- [0247] 특정 실시양태에서, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 약 4 이하, 바람직하게는 약 2.5 이하의 다분산 지수를 갖는다.
- [0248] 특정 실시양태에서, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 380 내지 620 kDa의 중량 평균 분자량 Mw 및 4 이하의 다분산 지수를 갖거나; 400 내지 600 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw 및 4 이하의 다분산 지수를 갖거나; 380 내지 620 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw 및 2.5 이하의 다분산 지수를 갖거나; 400 내지 600 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw 및 2 이하의 다분산 지수를 갖는다.
- [0249] 유리하게는, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 상기 폴리아크릴산 중합체 염의 총 건조 중량을 기준으로 하여, 유리 산 형태 또는 염 형태의 0.005% w/w 미만의 아크릴산 단량체를 포함한다.
- [0250] 유리한 실시양태에 따르면, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 5.5 내지 8.0 범위의 pH를 갖는 액체 제제 중에 존재한다.
- [0251] 유리한 실시양태에 따르면, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 완충 수용액 중에, 특히 인산염 완충제, 또는 TRIS, Hepes, 히스티딘 또는 시트르산염 완충제와 함께 존재한다.
- [0252] 유리한 실시양태에 따르면, 상기 폴리아크릴산 중합체 염은 정용 여과 및 멸균된다.
- [0253] 폴리아크릴산 중합체 염 또는 폴리아크릴산 중합체 염의 액체 제제가 정용 여과되는 경우, 정용 여과 후에 멸균이 실시된다.
- [0254] 본 발명에 따르면, 중량 평균 분자량 Mw는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 취득된다. 유리하게는, 크기 배제 크로마토그래피 칼럼 후에 3개의 검출기, 즉 직각 광 산란 검출기, 굴절률 검출기 및 4-모세관 차등 점도계가 사용될 것이다. Mw의 결정에 사용된 dn/dc는 바람직하게는 공지된 농도의 폴리아크릴산 중합체의 패널을 가진 굴절률 검출기를 사용하여 결정된다. 유리 산 형태 또는 염 형태 중의 과황산염의 함량 및 아크릴산 단량체의 함량은 전도도 검출을 사용하는 고성능 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 결정될 수 있다.
- [0255] 이러한 중합체의 제조 방법은 예를 들어 하기 연속 단계를 포함한다:
- [0256] a) 폴리아크릴산 중합체의 용액을 갖는 단계,
- [0257] b) 불순물을 제거하기 위해, 폴리아크릴산 중합체의 용액을 정제하는 단계,
- [0258] 및
- [0259] c) 폴리아크릴산 중합체의 정제된 용액을 멸균하는 단계.
- [0260] 이러한 중합체 염의 용액의 저장 방법은 예를 들어 상기 언급된 제조 방법,이어서 용액 중의, 취득된 중합체의 저장 단계를 포함한다.
- [0261] 특히, 350 내지 650 kDa 범위의 중량 평균 분자량 Mw를 가진 상기 선형 또는 분지형 폴리아크릴산 중합체 염은 PAA225000이다.
- [0262] PAA225000이라는 명칭의 제품 (참조번호 18613, 나트륨 염)은 폴리사이언시스 유로페(Polysciences Europe) (독일 에펠하임)로부터 농축 용액의 형태로 입수할 수 있다. 이는 물로 희석하여 20 mg/ml의 농도를 취득하고, 12시간 동안 실온에서 교반 하에 유지할 수 있다. HCl을 사용하여 pH를 7.55로 조정할 수 있고, 2 kDa 컷오프 투석 카세트 (썬코 피셔 사이언티픽(Thermo Fischer Scientific), 프랑스 코르타브)를 사용하여 150 mM NaCl

수용액 (3회 연속 조)에 대해 실온에서 용액을 투석할 수 있다. 이어서 멸균을 위해, 용액을 0.22 μm PVDF 막을 통해 여과할 수 있다. 이어서 중합체 염의 분자량이 측정될 수 있고 488,550 Da일 수 있다. 그의 Mn은 129,070 Da일 수 있고 IP는 3.8일 수 있다.

[0263] 이어서, 중합체를 150 mM NaCl 수용액 중에 20 mg/ml의 중합체를 포함하는 용액으로서, + 4°C에서 저장할 수 있다. 이어서, 이 용액을 멸균 수로 10배 농축된 PBS 1C와 혼합하여, 2 mg/ml의 중합체 염을 포함하는 식염수 용액을 수득할 수 있다.

[0264] 임의의 다른 Th1-유도 아주반트가 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있다. 주로 Th1-유형 면역 반응을 유도하는 것으로 공지된 아주반트의 예로서, 하기 것이 인용될 수 있다: 사포닌 예컨대 W08809336 또는 US5057540에 기재된 것, 특히 QS21 및 그의 합성 또는 반-합성 유사체, TLR3 효능제 예컨대 폴리I:C 및 그의 유도체, TLR5 효능제 예컨대 플라겔린 및 그의 유도체, TLR7 효능제 또는 TLR7/8 효능제 예컨대 이미다조퀴놀린 및 그의 유도체 예컨대 EP1318835에 기재된 것, TLR8 효능제 예컨대 VTX-2337로서 또한 공지된 모토리모드 (문헌 [Lu *et al.*, Clin Cancer Res, 2012, 18(2):499-509]에 기재된 바와 같음) 및 그의 유도체 또는 디나박스(Dynavax)에 의해 개발된 TLR8 효능제, TLR9 효능제 예컨대 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드 및 그의 유도체 (예컨대 문헌 [Vollmer *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther., 2005, 5(5):673-682]에 기재), 특히 ISS1018 또는 CpG 7909, RIG-I-유사 수용체 (RLR) 효능제 예컨대 RIG-I 효능제, 특히 5' 트리포스페이트 RNA 또는 소 분자량 효능제 (키네타 (Kineta)로부터), 또는 인터페론 유전자의 자극제 (STING) 효능제, 특히 시클릭 디뉴클레오타이드 (예를 들어 c-디-AMP, c-디-GMP, c-디-GAMP), 폴리[디(카르복실레이트포스페노)포스파젠] (PCPP) (문헌 [Payne *et al.*, Dev Biol Stand. 1998, 92:79-87]에 기재된 바와 같음), 폴리[디(소듐 카르복실레이트에틸포스페노)]포스파젠 (PECP) (문헌 [Dar A *et al.*, Vet Immunol Immunopathol., 2012, 146(3-4):289-95]에 기재된 바와 같음), 또는 카르보폴.

[0265] 이들 Th1-유도 아주반트는 전달 시스템 예컨대 수성 나노현탁액, 인산칼슘, 리포솜, 비로솜, ISCOM, 마이크로입자 및 나노입자, 에멀전과 조합될 수 있다.

[0266] 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 아주반트 및 항원은 임의의 제약상 허용되는 비히클과 함께 제제화될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 표현 "제약상 허용되는 비히클"은 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 생리학적 활성, 즉 면역 반응을 유도하는 그의 능력을 유지하면서, 인간에게 투여하기에 생리학상 허용되는 비히클을 지칭한다. 하나의 예시적인 제약상 허용되는 비히클은 생리학적 식염수 완충제이다. 다른 생리학상 허용되는 비히클은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (18th edition), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, Pa]에 기재되어 있다. 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물은 생리학적 조건을 근사화하는데 필요한 바와 같은 제약상 허용되는 보조 물질, 예컨대 pH 조정 및 완충제, 긴장성 조정제, 습윤제 등, 예를 들어, 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트, 인간 혈청 알부민, 필수 아미노산, 비필수 아미노산, L-아르기닌 히드로클로라이드, 사카로스, D-트레할로스 탈수제, 소르비톨, 트리스 (히드록시메틸) 아미노메탄 및/또는 우레아를 임의로 함유할 수 있다. 게다가, 백신 조성물은, 예를 들어, 희석제, 결합제, 안정화제, 및 보존제를 포함한, 제약상 허용되는 첨가제를 임의로 포함할 수 있다.

[0267] 면역원성 조성물의 pH는 통상 5.5 내지 8, 보다 바람직하게는 6.5 내지 7.5 (예를 들어, 약 7)이다. 완충제 예를 들어 Tris 완충제, 시트르산염 완충제, 인산염 완충제, Hepes 완충제, 또는 히스티딘 완충제를 사용하여 안정적인 pH를 유지할 수 있다. 따라서, 면역원성 조성물은 일반적으로 완충제를 포함한다. 면역원성 조성물은 인간에 대해 등장성일 수 있다. 면역원성 조성물은 1종 또는 수개의 종의 추가 염, 예컨대 NaCl을 또한 포함할 수 있다.

[0268] 면역원성 조성물은 통상적인 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있거나, 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 액체 형태로 포장 및 저장되거나 동결건조될 수 있으며, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 담체를 사용하여 재구성된다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 W02009109550에 기재된 바와 같이 프릴링 공정을 통해 마이크로펠렛으로 포장되고 저장된다. 각각의 마이크로펠렛은 gB 항원, gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원 및 임의로 수-중-유 에멀전을 가진 Th1-유도 아주반트를 포함할 수 있다. 대안적으로, gB 항원, gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원 및 임의로 수-중-유 에멀전을 가진 Th1-유도 아주반트는 본 발명의 조성물을 수득하기 위해 단독으로 또는 수성 재구성 전 또는 후에 혼합될 수 있는 상이한 마이크로펠렛과 임의의 조합으로 포함될 수 있다.

[0269] 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 아주반트 및 항원 부분은, 생성물 사이에 어떤 부적합성도 없는 경우 통상

함께 혼합되거나 대안적으로 아주반트는 대상체에게 투여 직전에 즉석으로 첨가될 수 있다.

- [0270] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 HCMV gB 항원, HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원 및 Th1-유도 아주반트의 즉시 사용 가능한 혼합물로서 제조된다.
- [0271] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 인간 대상체에게 투여 직전에 즉석으로 제조된다. 따라서, 본 발명은 혼합 준비된 다양한 성분을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 HCMV gB 항원, HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원, Th1-유도 아주반트 및 임의로 수-중-유 에멀전이 사용시까지 별도로 유지 가능하게 한다.
- [0272] 이들 성분은 키트 내에서 서로 물리적으로 분리되어 있으며, 이러한 분리는 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 이들은 별도의 용기, 예컨대 바이알에 있을 수 있다. 일부 배열에서, 모든 성분은 사용시까지 개별적으로 유지된다. 바람직하게는, gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원은 동일한 용기 및 Th1-유도 아주반트 및 임의로 수-중-유 에멀전이 또 다른 용기에 있다. 이어서, 바이알의 내용물은, 예를 들어, 하나의 바이알의 내용물을 제거하고 이를 다른 바이알에 첨가함으로써, 또는 모든 바이알의 내용물을 개별적으로 제거하고 이들을 새로운 용기에서 혼합함으로써 혼합될 수 있다. 한 예에서, 키트 성분 중 하나 이상은 주사기(들)에 있고 다른 하나는 바이알과 같은 용기(들)에 있다. 주사기를 사용하여 (예를 들어, 바늘로) 그의 내용물을 혼합을 위해 또 다른 용기에 삽입한 다음에, 혼합물이 주사기 내로 철수될 수 있다. 이어서 주사기의 혼합 내용물은, 전형적으로 새로운 멸균 바늘을 통해, 환자에게 투여될 수 있다. 또 다른 배열에서, 키트 성분은 동일한 주사기에 함께 그러나 개별적으로 유지된다. 이어서 주사기가 작동될 때 (예를 들어, 환자에게 투여하는 동안) 챔버의 내용물이 혼합된다. 이 배열은 사용시 별도의 혼합 단계가 필요하지 않도록 한다. 키트 성분은 일반적으로 수성 형태일 것이다. 일부 배열에서, 1종 이상의 성분(들)은 건조 형태 (예를 들어, 동결건조된 형태 또는 마이크로펠렛으로서)이고, 다른 성분(들)은 수성 형태이다. 건조 성분을 재활성화시키고 환자에게 투여하기 위한 수성 조성물을 제공하기 위해 성분을 혼합할 수 있다. 1종 이상의 동결건조된 성분(들)은 바이알 내에 또는 주사기 내에 배치할 수 있다. 건조된 성분은 안정화제 예컨대 만니톨, 수크로스 또는 도데실 말토시드, 뿐만 아니라 그의 혼합물, 락토스/수크로스 혼합물, 수크로스/만니톨 혼합물 등을 포함할 수 있다. 일부 배열에서, 모든 성분은 건조 형태 (예를 들어, 동결건조된 형태 또는 마이크로펠렛으로서)이며, 동일한 수용자 또는 여러 수용자에서 개별적으로 보유되며, 키트는 백신의 재구성을 위한 수용액을 함유하는 또 다른 수용자를 함유한다.
- [0273] 따라서, 본 발명은, (i) HCMV gB 항원 및 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원을 포함하는 제1 키트 성분 및 (ii) Th1-유도 아주반트를 포함하고 임의로 수-중-유 에멀전을 포함하는 제2 키트 성분을 포함하는 키트; 및 HCMV 감염을 예방하기 위한 이러한 키트의 용도를 제공한다.
- [0274] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 HCMV gB 항원, HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 복합체 항원 및 Th1-유도 아주반트의 즉시 사용 가능한 혼합물로서 하나의 바이알/시린지에서 이용가능하다.
- [0275] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 임의의 적합한 경로, 예컨대 점막 투여 (예를 들어, 비강내 또는 설하), 비경구 투여 (예를 들어, 근육내, 피하, 경피, 또는 피내 경로), 또는 경구 투여를 위해 투여될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 이해되는 바와 같이, 본 발명의 백신은 의도된 투여 경로에 적합하도록 적합하게 제제화된다.
- [0276] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 단독으로 또는 적합한 제약 담체와 함께 투여될 수 있으며, 고체 또는 액체 형태 예컨대, 정제, 캡슐, 분말, 용액, 현탁액, 또는 에멀전일 수 있다.
- [0277] 에어로졸로서 사용하기 위해, 용액 또는 현탁액 중 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 적합한 추진제, 예를 들어, 탄화수소 추진제 예컨대 프로판, 부탄 또는 이소부탄과 통상적인 아주반트와 함께 가압 에어로졸 용기에 포장될 수 있다. 본 발명의 물질은 또한 비-가압 형태로 예컨대 네블라이저 또는 아토마이저로 투여될 수 있다.
- [0278] 용도
- [0279] 이전에 언급된 바와 같이, 본 발명은 또한 HCMV 백신으로서 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0280] 특히, 본 발명에 따른 HCMV 백신은 서브유닛 백신이다.
- [0281] 본 발명은 추가로, 면역학적 유효량의 본 발명에 따른 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, HCMV 감염의

예방을 필요로 하는 환자에서 HCMV 감염의 예방 방법에 관한 것이다.

- [0282] "HCMV"는 이전에 기재된 바와 같이 사용되며, HCMV 감염은 특히 임신 중 모체 HCMV 감염 또는 선천성 감염과 관련될 수 있다.
- [0283] 특히, 상기 백신/면역원성 조성물은 중화 항체 수준 및/또는 지속성을 증가시킨다. 보다 특히, HCMV gB 항원, HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원 및 Th1-유도 아주반트를 포함하는 상기 백신/면역원성 조성물은 동일한 HCMV gB 항원, 동일한 HCMV gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 복합체 항원 및 MF59 아주반트를 포함한 백신/면역원성 조성물보다 더 높은 중화 항체 수준 및/또는 지속성을 유도한다.
- [0284] 본원에 사용된 바와 같은 "백신"이란, 특히 그 작용제로 인해 질병으로부터 대상체를 보호하거나 치료할 면역 반응을 유도하기 위해 투여되는 면역원성 조성물을 의미한다. 본 발명의 백신은 초기 (및/또는 재발) 감염을 예방하려는 의도로, 감염 전에 대상체에게 투여하기 위한, 예방 (예방적) 백신으로서 사용하기 위한 의도이다. 선천성 HCMV 감염의 특정한 경우에, 본 발명은 모체로부터 태아 또는 영아에게 수직 HCMV 전염을 예방하기 위해 임신 전 가임기의 청소년기 소녀 및 여성을 위한 예방 백신으로서 사용하기 위한 의도이다.
- [0285] 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 면역학적 유효량의 본원에 기재된 항원 및 아주반트를 포함한다. "면역학적 유효량"은, 대상체에게 투여될 때, 사용된 항원에 대한 면역 반응을 도출하는데 효과적인 양이다. 이 양은 치료할 대상체의 건강 및 신체 상태, 그의 연령, 대상체 면역계의 항체 생산 능력, 원하는 보호 정도, 백신의 제제, 의료 상황의 치료 의사의 평가에 따라 달라질 수 있다. 이 양은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일상적인 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0286] 본원에서 언급된 "대상체"는 "환자"와 유사한 방식으로 사용되며, 그의 CMV 혈청상태와 상관없이 인간, 특히 가임기 여성 (16-45세) 및 청소년기 소녀 (11-15 세), 뿐만 아니라, 남성, 아동, 또는 고형 장기 또는 줄기 세포 이식을 위한 환자 후보자를 지칭한다. 특히, 상기 환자 또는 대상체는 HCMV에 걸리기 쉽다.
- [0287] 본원에 기재된 바와 같은 "중화 항체"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 의미를 가지며, 예를 들어 숙주 세포로의 바이러스 진입을 차단할뿐만 아니라 세포에서 세포로의 바이러스 파종을 차단함으로써, 그의 표적을 직접 중화시키는 항체를 포함하도록 의도된다. 중화 항체는 그의 표적으로부터 보호할 수 있는 기능성 항체이다. 중화 항체 수준 및/또는 지속성의 증가를 결정하는데 이용가능한 방법의 일부 설명은 본 출원의 실험 부분에서 제공된다.
- [0288] 본 발명에 따른 백신은 백신을 투여하는데 일반적으로 사용되는 임의의 경로로 투여될 수 있다. 예상되는 면역 반응의 유도를 야기하는 요법이 사용될 것이다. 통상, 면역화 일정은 몇몇 투여를 포함한다. 투여된 면역원성 조성물의 양은 원하는 면역 반응을 생성하기에 충분하며 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정된다.
- [0289] 본 발명에 따른 백신은 다중 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 백신은 1회, 2회 또는 3회 용량으로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 백신이 3회 용량으로 투여되는 경우, 제1 용량 및 제3 용량은 바람직하게는 대략 12개월 간격으로 투여된다. 예를 들어, 본 발명의 백신은 제1 용량, 제2 용량 및 제3 용량으로 투여될 수 있으며, 여기서 상기 제2 용량은 상기 제1 용량 후 약 1 내지 3개월에 투여될 것이고 여기서 상기 제3 용량은 상기 제1 용량 후 약 6 내지 12개월에 투여될 것이다. 대안적으로, 3회 용량은 0개월, 약 1 내지 2개월 (예를 들어, 약 1.5개월) 및 약 6개월에 투여될 수 있다.
- [0290] 본 발명에 따른 백신은 2회 용량으로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 제1 용량 및 제2 용량은 대략 약 1, 3, 6, 8 또는 9개월 간격으로 투여된다.
- [0291] 본 발명에 따른 백신은 단일 용량으로 투여될 수 있다.
- [0292] 임의로, 본 발명에 따른 백신의 추가(booster) 투여는, 초기 면역화 후 예를 들어 6개월 내지 10년, 예를 들어 6개월, 1년, 3년, 5년 또는 10년 사이에 (즉, 초기 면역 요법에서 예정된 마지막 용량의 투여 후) 사용될 수 있다.
- [0293] 저널 논문 또는 초록, 공개된 특허 출원, 허여된 특허 또는 임의의 다른 참고문헌을 포함한, 본원에 인용된 모든 참고문헌은, 인용된 참고문헌에 제시된 모든 데이터, 표, 도면 및 텍스트를 포함하여 본원에 전체적으로 참조로 포함된다.
- [0294] 본 발명의 범위에서, "사용하기 위한 면역원성 조성물"은 "면역원성 조성물의 용도"와 동등하고, 특히 "백신으로서 사용하기 위한 면역원성 조성물"은 "백신으로서의 면역원성 조성물의 용도" 및 "백신으로서 사용될 것으로"

의도된 의약의 제조를 위한 면역원성 조성물의 용도"와 동등한 것으로 이해되어야 한다.

[0295] 본 발명은 하기 도면 및 실시예에 의해 추가로 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0296] 도 1: 연구 일정

도 2: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일, 20일 및 227일에 면역화된 마우스로부터 20일 내지 257일에 수집된 혈청 중에서 보체를 사용 (패널 A)하거나 사용하지 않고 (패널 B) 상피 세포 상에서 혈청중화(seroneutralization) 검정에 의해 측정된 HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP 균주에 특이적인 중화 항체 역가의 동역학

도 3: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일 및 20일에 면역화된 마우스로부터 34일에 수집된 혈청 중에서 보체를 사용 (패널 A)하거나 사용하지 않고 (패널 B) 상피 세포 상에서 및 보체를 사용 (패널 C)하거나 사용하지 않고 (패널 D) 섬유모세포 상에서 혈청중화 검정에 의해 측정된 HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP 균주에 특이적인 중화 항체 역가.

도 4: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일 및 20일에 면역화된 마우스로부터 208일에 수집된 혈청 중에서 보체를 사용 (패널 A)하거나 사용하지 않고 (패널 B) 상피 세포 상에서 및 보체를 사용 (패널 C)하거나 사용하지 않고 (패널 D) 섬유모세포 상에서 혈청중화 검정에 의해 측정된 HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP 균주에 특이적인 중화 항체 역가.

도 5: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일, 20일 및 227일에 면역화된 마우스로부터 257일에 수집된 혈청 중에서 보체를 사용 (패널 A)하거나 사용하지 않고 (패널 B) 상피 세포 상에서 및 보체를 사용 (패널 C)하거나 사용하지 않고 (패널 D) 섬유모세포 상에서 혈청중화 검정에 의해 측정된 HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP 균주에 특이적인 중화 항체 역가.

도 6: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일, 21일 및 227일에 면역화된 마우스로부터 34일, 208일 및 257일에 수집된 혈청 중에서 ELISA에 의해 측정된 CMV-gB (패널 A)에 또는 CMV-오량체 (패널 B)에 특이적인 항-gB IgG1 및 IgG2c 항체 역가.

도 7: MF59 또는 상이한 아주반트를 사용하여 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일, 21일 및 227일에 면역화된 마우스로부터 각각의 군에 대해 34일, 208일 및 257일에 계산된 평균 IgG1/IgG2c 항체 비.

도 8: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일, 20일 및 227일에 면역화된 마우스로부터 비장세포 중에서 34일, 208일 및 257일에 모니터링된 재조합 CMV-gB (패널 A) 또는 CMV-오량체 (패널 B)로 생체의 자극시 IL-5 및 IFN- γ 시토카인 분비 세포 빈도 (시토카인 분비 세포/ 10^6 개 비장세포).

도 9: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일, 20일 및 227일에 면역화된 마우스로부터 34일, 208일 및 257일에 CMV-gB (패널 A) 또는 CMV-오량체 (패널 B)에 특이적인 항체 분비 형질모세포의 IgG1 및 IgG2c 백분율.

도 10: 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 2 μ g의 CMV-gB 및 오량체로 0일, 20일 및 227일에 면역화된 마우스로부터 34일, 208일 및 257일에 CMV-gB (패널 A) 또는 CMV-오량체 (패널 B)에 특이적인 항체 분비 B 기억 세포의 IgG1 및 IgG2c 백분율.

도 11: PAA 아주반트로 제제화된 상이한 용량의 CMV-gB 및 CMV- gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체로 D0에 면역화된 마우스로부터 D20에 수집된 혈청 중에서 보체의 존재 하에 상피 세포 ARPE-19 또는 섬유모세포 MRC-5 상에서 혈청중화 검정에 의해 측정된 HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP 균주에 특이적인 중화 항체 역가.

도 12: PAA 아주반트로 제제화된 상이한 용량의 CMV-gB 및 CMV- gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체로 D0 및 D21에 면역화된 마우스로부터 D35에 수집된 혈청 중에서 보체의 존재 (12a) 또는 부재 (12b) 하에 상피 세포 ARPE-19 상에서 혈청중화 검정에 의해 측정된 HCMV BAD-rUL131-Y4 GFP 균주에 특이적인 중화 항체 역가.

도 13: PAA 아주반트로 제제화된 3 μ g의 CMV-gB 및 3 μ g의 CMV- gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체로 D0 및 D21에 면역화된 마우스로부터 D35에 수집된 비장세포에서 ELISPOT 검정에 의해 측정된 CMV-gB, CMV- gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 (패널 A) 또는 CMV-오량체 펩티드 풀 (패널 B)로 생체의 자극시 마우스 비장

세포에서의 IFN- γ 시토카인-생성 세포 정량화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예

<표 2>

약어 목록

두문자어 / 약어	명칭 / 설명
CMV	시토메갈로바이러스
D	일
ELISA	효소 연결 면역 흡착 검정
EU	ELISA 단위
IFN γ	감마 인터페론
Ig	면역글로불린
IL	인터류킨
IM	근육내
IP	복강내
M	월
N/A	해당 사항 없음
SN	혈청중화
W	주

실시예 1

재료 및 방법

재료

실시예에서 시험된 제품(들)

제품은 표 3에 기재되어 있다. 암컷 7 주령 C57BL/6J 마우스를 D0 및 D20 및 D227에 50 μ l의 부피 하에 근육 내 (IM) 경로 (뒷다리, 대퇴사두근)에 의해 면역화시켰다.

[0306] <표 3>

제품명	농도	공급원 또는 조성물
펜타머 (Pentamer) CMV	1 mg/ml	더 네이티브 안티젠 콤파니(The Native Antigen company) (영국 옥스포드)
gB (CMV)	685.5 µg/ml	806 AA 긴 폴리펩티드인, US 6,100,064에 기재된 바와 같이 수득한 gBdTM
PAA225000 (PAA)	8 mg/ml PAA 225000	폴리사이언시스 유로페 게엠베하 (독일 히르슈베르크 안 데어 베르그스트라췌)
MF59	4% 스쿠알렌	mL당 양: 스쿠알렌 39.0 mg 폴리소르베이트 80 4.7 mg 소르반 트리올레에이트 4.7 mg 시트르산나트륨, 탈수제 2.65 mg 시트르산, 1수화물 0.17 mg 주사용수 q.s.p. 1 mL
AF04	5% 스쿠알렌, 0.04 mg/ml E6020	WO 2007/080308에 기재된 방법에 따라 수득.
GLA-SQEM	4% 스쿠알렌, 0.1 mg/ml GLA	아반티 폴라 리피즈 인크. (미국 엘라베스터)로부터의 GLA GLA-SQEM은 본 발명의 설명에서 상기에 기재된 방법에 따라 수득된다

[0307]

[0308] 방법

[0309] 군 정의

[0310] 연구 군은 하기 표 4에 기재되어 있다. 마우스는 하기 7개 군 중 하나에 무작위로 할당되었다. 각각의 군은 도 1의 연구 일정에 요약된 바와 같이, 비장 (34일, 208일 및 257일)을 수집하기 위해 마우스 안락사가 필요한 시점 분석에 따라 3개의 하위 군, 즉 A => A1, A2 및 A3으로 구별된다. 35마리의 마우스/군이 다음과 같이 포함되었다: 8개월 기간에 걸쳐 발생할 수 있는 가능한 병발성 사망을 보상하기 위해 10마리/하위 군 1 및 2에 대한 하위 군, 및 하위 군 3에서 15마리의 마우스. 대조군의 경우, 하위 군 A1, A2 및 A3에는 단지 5마리의 마우스/하위 군이 포함되었고, 군 B의 경우, 단지 5마리의 마우스/하위 군 B1 및 B2이 포함되었고 하위 군 B3의 경우 10마리의 마우스가 포함되었다.

[0311] <표 4>

군	하위 군 (마우스의 수)	시험 중인 제품				
		활성 물질		아주반트		투여 경로
		명칭	용량	명칭	용량	
A (15)	A1 (5)	PBS	-	-	-	IM D0, D21에 50 µl
	A2 (5)					
	A3 (5)					IM D0, D21, M7에 50 µl
B (20)	B1 (5)	gB + 오랑체	2 µg	-	-	IM D0, D21에 50 µl
	B2 (5)		2 µg			
	B3 (10)					IM D0, D21, M7에 50 µl
C (35)	C1 (10)	gB + 오랑체	2 µg	MF59	2% 스쿠알렌	IM D0, D21에 50 µl
	C2 (10)		2 µg			
	C3 (15)		2 µg			IM D0, D21, M7에 50 µl
D (35)	D1 (10)	gB + 오랑체	2 µg	PAA	200 µg	IM D0, D21에 50 µl
	D2 (10)		2 µg			
			2 µg			

[0312]

	D3 (15)					IM D0, D21, M7에
E (35)	E1 (10)	gB + 오랑체	2 µg 2 µg	AF04	1 µg E6020, 2.5% 스쿠알렌	IM D0, D21에 50 µl
	E2 (10)					IM D0, D21, M7에 50 µl
	E3 (15)					
F (35)	F1 (10)	gB + 오랑체	2 µg 2 µg	GLA- SQEM	2.5 µg GLA, 2% 스쿠알렌	IM D0, D21에 50 µl
	F2 (10)					IM D0, D21, M7에 50 µl
	F3(15)					

[0313]

[0314]

생물학적 샘플링 및 분석 시험

[0315]

· 생물학적 샘플링

[0316]

혈액 샘플을 마취하에 모든 동물로부터 수집하였다. 마취는 복강내 경로를 통해 200 µl의 부피로 투여된 이말진(Imalgene)® (1.6 mg의 케타민) 및 롬펀(Rompun) (0.32 mg의 크실라진)에 의해 수행하였다. 응고 활성화제 및 혈청 분리기 (비디 배큐네이터(BD Vacutainer) SST 참조번호 367783)를 함유한 바이알에서 약 1 mL의 혈액을 수집하였다. +4℃에서 하룻밤 후, 혈액을 20분 동안 3000 rpm으로 원심분리하고 혈청을 수집하고 분석 때까지 -20℃에서 저장하였다.

[0317]

세포 반응 검정을 위해, 비장을 멸균 조건에서 수집하고, 비장세포를 비장 샘플링 후 가능한 한 빨리 단리하였다.

[0318]

· 분석 시험

[0319]

혈청중화 검정

[0320]

이 기술은 CMV-gB+오랑체+아주반트 면역화된 동물의 혈청에 존재하는 기능성 중화 항체를 적정하는데 사용된다. 시토메갈로바이러스가 MRC5 섬유모세포 및 ARPE-19 세포 (인간 상피 세포)를 감염시키는 능력에 기초하여, CMV-gB 및/또는 CMV-오랑체에 대한 구체적인 기능성 항체를 함유하는 혈청은 세포의 바이러스 감염을 억제할 수 있다.

[0321]

간단히, 2.5x10⁴ MRC5 섬유모세포 또는 ARPE-19 세포를 미세중화 (MN) 검정 전날 96-웰 다크 플레이트에 분배하였다. D0에, 혈청을 30분 동안 56℃에서 열-불활성화시켰다. 혈청 샘플을 96-깊이-웰 플레이트에서 1/10 내지 1/10240으로 시작하여, DMEM/F12 1% FBS에서 연속적으로 2배 희석하고 4.2log FFU/ml의 BADrUL131-Y4 CMV 바이러스 균주 (문헌 [Wang *et al.*, J. Virol., 2005, 79(16):10330-10338]에 기재된 바와 같이, 토마스 쉥크 (Thomas Shenk)에 의해 제공됨, ARPE-19 또는 MRC5 세포 상에서 각각 4.89 또는 4.71 log FFU/ml를 적정)와, 5% CO₂ 세포 배양 인큐베이터에서 37℃에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 혈청/바이러스 혼합물을 MRC5 또는 ARPE-19 세포 상으로 옮기고 5% CO₂ 세포 배양 인큐베이터에서 37℃에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션은 MRC5 세포의 경우 3일 째에 및 ARPE 세포의 경우 4일 째에 수행하였다.

[0322]

D3 또는 D4에, 배양 상청액을 제거한 후, 세포를 PBS 중 100 µl의 1% 포르몰로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 이어서, 플레이트를 PBS로 3회 세척하고 실온에서 공기-건조하여 마이크로비전(Microvision) 형광 플레이

트 판독기에서 분석하여 각각의 웰에서 감염된 세포를 계수하였다.

- [0323] 대조군으로서, 세포 대조군 (바이러스 없음)의 2개의 웰 및 4.2 log FFU/mL를 함유하는 바이러스 희석액의 절반으로 감염된 세포를 가진 6개의 웰을 각각의 플레이트에 존재시켰다. 이들 6개 웰의 평균은, 구체적-신호 값의 50%로서 결정된, 혈청중화의 역치를 정의하였다. 중화 종말점 역가는 계산된 50% 구체적-신호 값 아래로 떨어진 마지막 희석의 역수로 정의되었다. 중화 역가 (μ PRNT₅₀)는 감염된 세포의 50% 감소를 유도한 마지막 희석, 즉 계산된 50% 구체적-신호 값보다 더 낮은 감염된 세포를 유도한 마지막 희석으로서 각각의 개별 혈청에 대해 정의되었다. 기하 평균 중화 항체 역가는 각각의 군에 대해 계산되었다.
- [0324] ELISA 검정
- [0325] CMV-gB 항원 또는 CMV-오량체 항원에 대항하여 지향하는 혈청 IgG1 및 IgG2c 항체는 하기 절차에 따라 로봇 ELISA 검정에 의해 적정되었다.
- [0326] 디넥스 96-웰 마이크로플레이트를 pH 9.6, 0.05 M 탄산염/중탄산염 완충제 (시그마) 중 1 μ g/CMV-gB 또는 CMV-오량체의 웰로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 이어서, 플레이트를 150 μ L/PBS 트윈-밀크 (PBS pH 7.1, 0.05% 트윈 20, 1% (w/v) 탈지분유 (DIFCO))의 웰로 37°C에서 적어도 1시간 차단시켰다. 모든 다음 인큐베이션을 최종 부피 100 μ L에서 수행한 후에, PBS pH 7.1, 0.05% 트윈 20으로 3회 세척하였다. 혈청 샘플의 연속 2배 희석을 PBS-트윈-밀크에서 수행하고 (1/1000 또는 1/10000으로 시작하여) 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37°C에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 1/2000에서 PBS-트윈-밀크에 희석된 염소 항-마우스 IgG1 또는 IgG2c 퍼옥시다제 접합체 항체 (서던 바이오테크(Southern Biotech))를 웰에 첨가하고 플레이트를 37°C에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 추가로 세척하고 100 μ L/즉시 사용 가능한 테트라 메틸 벤지딘 (TMB) 기질 용액 (TEBU)의 웰로 20°C에서 30분 동안 어두운 곳에서 인큐베이션하였다. 100 μ L/HCl 1M (프롤라보(Prolabo))의 웰로 반응을 중지시켰다.
- [0327] 플레이트 판독기 (베르사맥스(VersaMax) - 몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))를 사용하여 450 nm-650 nm에서 광학 밀도 (OD)를 측정하였다. IgG1 또는 IgG2c 항체 역가는 적정 곡선으로부터 0.2 내지 3.0의 OD 값 범위에 대해, 코드유닛(CodUnit) 소프트웨어를 사용하여 계산하였다 (각각의 플레이트 상에 놓인 참조 마우스 과다면역 혈청). 임의의 ELISA 단위 (EU)로 표시된, 이 참조의 IgG1 또는 IgG2c 역가는 1.0의 OD를 제공하는 역수 희석의 log₁₀에 상응한다. 항체 검출의 역치는 10 ELISA 단위 (1.0 log₁₀)였다. 모든 최종 역가는 log₁₀ (Log)으로 표시되었다.
- [0328] 개별 산술 값을 사용하여 IgG1/IgG2c 비를 계산하고 각각의 군에 대해 개별 IgG1/IgG2c 비의 기하 평균을 계산하였다.
- [0329] FLUOROSPOT
- [0330] 형광-연결 이뮤노스팟(fluorescent-linked immunospot) (FLUOROSPOT)은 IFN- γ 및 IL-5 시토카인을 분비하는 개별 세포를 검출하고 열거하는데 사용된다.
- [0331] D0에, 96-웰 IPFL-바닥 마이크로플레이트 (멀티스크린(Multiscreen))의 막을 25 μ L의 35% 에탄올로 1분 동안 사전-습윤시켰다. 이어서 에탄올을 제거하고 각각의 웰을 200 μ L의 PBS 1X로 2회 세척하였다. 이어서, 마이크로플레이트를 각각 1/100 및 1/50으로 희석된 래트 항-마우스 IFN- γ 또는 래트 항-마우스 IL-5 항체 (10 μ g/ml, 파밍겐(Pharmingen))로 코팅하고 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0332] D1에, 플레이트를 PBS로 세척한 다음에, RPMI 10% FBS로 37°C에서 적어도 2시간 차단하였다. 플레이트 세척 후, 5x10⁵ 개의 새로 분리된 비장세포/웰을 CMV-gB 항원 (0.1 μ g/ml), CMV-오량체 (0.1 μ g/ml) 또는 콘카나발린 A (Con A, 2.5 μ g/mL)와 함께 양성 대조군으로서, 류틴 IL-2 (10 U/ml)의 존재 하에, 밤새 인큐베이션하였다.
- [0333] D2에, 플레이트를 PBS 1X-BSA 0.1% (200 μ L/웰)로 6회 세척하였다. 세척 단계 후, 100 μ L/웰의 비오티닐화된 항-마우스 IFN- γ 또는 항-마우스 IL5 항체를 PBS1X-BSA 0.1% 중 1 μ g/mL에 어두운 곳에서, 실온에서 2시간 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS 1X-BSA 0.1% (200 μ L/웰)로 3회 다시 세척하였다. 이어서, PBS 1X-BSA 0.1% 중 1 μ g/mL에서 100 μ L/스트렙타비딘-PE의 웰을 어두운 곳에서, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0334] 플레이트를 PBS 1X-BSA 0.1% (200 μ L/웰)로 6회 더 세척하였다. 플레이트를 판독할 때까지 어두운 곳에서 5°C

±3℃에서 저장하였다.

[0335] IFN- γ 또는 IL5 분비 세포 (IFN- γ SC 또는 IL5 SC)에 상응하는 각각의 스폿은, 자동 FLUOROSPOT 플레이트 판독기 (마이크로비전)로 열거되었다. 결과는 10⁶개의 비장세포당 IFN- γ 또는 IL-5 분비 세포의 수로서 표시되었다.

[0336] IgG, IgG1 및 IgG2c FLUOROSPOT 검정

[0337] 형광-연결 이뮤노스팟 (FLUOROSPOT)은 항원 특이성 (IgG1, IgG2c 또는 총 IgG)과 관계없이 항체를 분비하는 개별 B 세포를 검출하고 열거하는데 사용된다.

[0338] D0에, 96-웰 IPFL-바닥 마이크로플레이트 (멀티스크린)의 막을 25 μ L의 35% 에탄올로 1분 동안 사전-습윤시켰다. 이어서 에탄올을 제거하고 각각의 웰을 200 μ L의 PBS 1X로 2회 세척하였다. 이어서, 마이크로플레이트를 각각 1/68, 1/100 및 1/100으로 희석된 CMV-gB 항원 (10 μ g/ml, 사노피(Sanofi)), CMV-오랑체 (10 μ g/ml, NAC) 또는 총 IgG 항체 (10 μ g/ml, KPL)로 코팅하고 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0339] D1에, 플레이트를 PBS로 세척한 다음에, RPMI 10% FBS로 37℃에서 적어도 2시간 차단하였다.

[0340] 플레이트 세척 후, CMV-gB 항원 또는 CMV-오랑체에 대해 5x10⁵개의 새로 단리된 비장세포/웰 및 총 IgG 항체에 대해 2.5x10⁵개의 새로 단리된 비장세포/웰을 5시간 동안 인큐베이션하였다.

[0341] 5시간 후, 플레이트를 PBS 1X로 3회 세척하고 밤새 4℃에서 저장하였다.

[0342] D2에, 플레이트를 PBS 1X-BSA 0.1% (200 μ L/웰)로 6회 세척하였다. 세척 단계 후, 100 μ L/항-마우스 IgG1 PE 또는 항-마우스 IgG2c FITC 또는 항-마우스 총 IgG 항체의 웰을 PBS1X-BSA 0.1% 중 각각 4, 2 또는 0.5 μ g/mL에서 어두운 곳에서, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS 1X-BSA 0.1% (200 μ L/웰)로 6회 다시 세척하였다. 플레이트를 관독할 때까지 어두운 곳에서 5℃±3℃에서 저장하였다.

[0343] 항체 분비 세포 (ASC) (IgG1 ASC, IgG2c ASC 또는 총 IgG ACS)에 상응하는 각각의 스폿은, 자동 FLUOROSPOT 플레이트 판독기 (마이크로비전)로 열거되었다. 결과는 10⁶개의 비장세포당 항체 분비 세포의 수로서 표시되었다.

[0344] 결과

[0345] 체액 반응

[0346] 20일 내지 257일에 ARPE-19 상피 세포 상에서 중화 항체 반응의 종방향 분석

[0347] 상피 세포 (ARPE-19) 상에서 BADrUL131-Y4 CMV 바이러스 균주에 대한 중화 활성은 20일 내지 257일에 (즉 20, 34, 62, 90, 118, 153, 187, 226 및 257일에) 하위 군 3으로부터 모든 동물로부터 매달 수집된 개별 중간 혈청 샘플에서 혈청중화 검정에 의해 모니터링하였다. 혈청중화 기술은 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명되어 있고 미가공 데이터는 표 5a-b에 제시되어 있다.

[0348] <표 5 a-b>

군	혈청	ARPE D20 +C	ARPE M1 +C	ARPE M2 +C	ARPE M3 +C	ARPE M4 +C	ARPE M5 +C	ARPE M6 +C	ARPE M7 +C	ARPE M8 +C
A PBS	GMT	24	16	25	29	23	21	17	22	16
B 오랑체: 2 μ g gB : 2 μ g	GMT	33	133	212	183	191	136	164	90	1026
C 오랑체: 2 μ g gB : 2 μ g MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	220	3625	3516	3748	3562	2034	2973	1058	6792
D 오랑체: 2 μ g gB : 2 μ g PAA : 200 μ g	GMT	879	15990	11598	10962	10724	10266	8681	5792	37166
E 오랑체: 2 μ g gB : 2 μ g AF04 : 1 μ g E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	383	12648	9288	7833	9048	5653	4494	3559	17936
F 오랑체: 2 μ g gB : 2 μ g GLA-SQEM : 2.5 μ g GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	976	30755	20844	15957	17068	11231	11156	8505	35897

[0349]

[0350] a- 하위 군 3- 중간 - 보체 사용 혈청중화 ARPE

군	혈청	ARPE D20 - C	ARPE M1 - C	ARPE M2 - C	ARPE M3 - C	ARPE M4 - C	ARPE M5 - C	ARPE M6 - C	ARPE M7 +C	ARPE M8 +C	
A	PBS	GMT	30	16	18	13	71	22	12	12	13
B	오량체: 2 μg gB : 2 μg	GMT	32	94	138	170	109	122	92	65	815
C	오량체: 2 μg gB : 2 μg MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	74	2020	1973	1928	1264	1174	1028	655	5449
D	오량체: 2 μg gB : 2 μg PAA : 200 μg	GMT	83	3297	4890	3768	3589	3289	3580	2201	28657
E	오량체: 2 μg gB : 2 μg AF04 : 1 μg E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	91	3734	3354	3918	2728	2344	2359	1274	11910
F	오량체: 2 μg gB : 2 μg GLA- SQEM : 2.5 μg GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	106	8048	7446	7774	5392	4812	3459	2883	9150

[0351]

[0352] b- 하위 군 3- 중간 - 보체 없이 혈청중화 ARPE

[0353] 기하 평균 역가 (GMT)뿐만 아니라 개별 중화 역가는 도 2에 도시되어 있다.

[0354] M1=D34, M2=D62, M3=D90, M4=D118, M5=D153, M6=D187, M7=D226, M8=D257.

[0355] 유사한 동역학 중화 항체 역가 프로파일을 각각 도 2 패널 A 및 B에 도시된 바와 같이 상피-기반 중화 검정에서 보체의 존재 및 부재 하에 검출하였다.

[0356] 비아주반트화(unadjuvanted) CMV-gB 및 오량체로 투여된 군의 경우, 낮은 중화 항체 반응이 20일에 검출되었고 (각각 보체를 사용하거나 사용하지 않은, GMT=33 및 32), 이어서 62일까지 증가하여, 62일 내지 226일에, 보체의 존재 또는 부재 하에, 90 내지 212 또는 65 내지 170의 범위의 GMT를 가진 안정기에 도달하였다. 226일에 3차 주사는, 각각 보체의 존재 또는 부재 하에, GMT= 1026 또는 815로 257일에 검출된 바와 같이 중화 항체 역가를 고양시켰다

[0357] 모든 아주반트화 군 (MF59, PAA, AF04 및 GLA-SQEM)의 경우, 중화 항체 역가는 각각 220 또는 74에서 GMT로 20일 (즉, 첫 주사 후 20일)에 보체의 존재 또는 부재 하에 검출되었고, MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오량체로 투여된 군 C3의 경우 GMT \geq 383이고 다른 아주반트 제제로 투여된 군 D3 내지 F3에 대해 \geq 83이다. 34일에 (즉 2차 주사 후 14일), 모든 아주반트화 군은, 보체의 존재 또는 부재 하에, 각각 3,625 내지 30,755 또는 2,020 내지 8,048 범위의 GMT로 2회 주사 후 반응의 피크를 나타냈다.

[0358] 6개월 기간에 걸쳐 (34일 내지 226일), 상피-기반 중화 항체 역가는 보체의 존재 또는 부재 하에, 각각 1,058 내지 8,505 또는 655 내지 2883 범위의 역가로 약간 감소하였다. 유사하게, 226일에 3차 주사는, 보체의 존재 또는 부재 하에, 각각 6,792 (즉 MF59-의 경우) 내지 37,166 (즉 PAA-의 경우) 또는 5,449 (즉 MF59-의 경우) 내지 28,657 (즉 -PAA 아주반트화 군의 경우)의 범위의 GMT로 257일에 검출된 바와 같이 중화 항체 역가를 고양시켰다.

[0359] 상이한 아주반트화 군 즉 SPA09, AF04 및 GLA-SQEM을 MF59 참조와 비교하기 위해, 34일 내지 226일에 반복된 중화 항체 역가에 대해 2개의 고정 인자 (군 및 시간)를 가진 통계적 혼합 모델을 수행하였다.

[0360] 표 6에 제시된 바와 같은 군 비교와 관련하여, 보체의 존재 하에, MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오량체로 투여된 마우스에서 획득된 중화 항체 역가는 비아주반트화 CMV-gB 및 오량체로 투여된 마우스에서 획득된 중화 항체 역가보다 유의하게 우수하지 않았으며, 한편 모든 다른 아주반트화 군 (즉, PAA, AF04 및 GLA-SQEM)은 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오량체로 투여된 마우스에서 획득된 중화 항체 역가보다 유의하게 우수하였다 (모든 p -값 < 0.001).

[0361] 보체의 부재 하에, MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체로 투여된 마우스에서 수득된 중화 항체 역가는 비아주반트화 CMV-gB 및 오랑체로 투여된 마우스에서 수득된 중화 항체 역가보다 유의하게 우수하지 않았다. AF04로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체로 투여된 마우스에서 수득된 중화 항체 역가는 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체로 투여된 마우스에서 수득된 중화 항체 역가보다 유의하게 우수하지 않았으며, 한편 모든 다른 아주반트화 군 (즉 PAA 및 GLA-SQEM)은 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체로 투여된 마우스에서 수득된 중화 항체 역가보다 유의하게 우수하였다 (모든 $p\text{-값} \leq 0.009$). AF04로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체로 투여된 마우스에서 수득된 중화 항체 역가는 비아주반트화 CMV-gB 및 오랑체로 투여된 마우스에서 수득된 중화 항체 역가보다 유의하게 우수하였다 (모든 $p\text{-값} < 0.001$).

[0362] <표 6>

ARPE-19 중화 검정	보체의 존재 하에	보체의 부재 하에
비교	P-값*	P-값*
(B3) 비아주반트 대 (C3) MF59	1.000 (NS)	1.000 (NS)
(D3) PAA 대 (C3) MF59	<0.001 (S) x4.2	0.009 (S) x2.4
(E3) AF04 대 (C3) MF59	<0.001 (S) x2.8	0.077 (NS)
(F3) GLA-SQEM 대 (C3) MF59	<0.001 (S) x6.6	<0.001 (S) x4.0

[0363]

[0364] 34일 내지 226일에 추산된 반복된 중화 항체 역가 내에서 상이한 군의 통계적 비교 (우월성 시험(Superiority test), 두넷(Dunnett) 조정을 사용한 *p-값, NS: 유의하지 않음 또는 S: 유의한 우월성, 유의한 배수 증가가 이탤릭체로 표시되는 경우).

[0365] 34일 (M1), 208일 (M7) 및 257일 (M8)에 상피 세포 (ARPE-19) 및 섬유모세포 (MRC-5)에 대한 상세한 중화 항체 반응

[0366] 상피 세포 (ARPE-19) 및 섬유모세포 (MRC-5) 상에 BADrUL131-Y4 CMV 바이러스 군주에 대한 중화 활성은 각각 34일 (2차 면역화 후 2주), 208일 (1차 백신접종 시리즈 후 7개월) 및 257일 (M7에 추가 접종(booster injection) 후 1개월)에, 하위 군 1, 2 및 3의 모든 동물로부터 수집된 개별 혈청 샘플에서 혈청중화 검정에 의해 모니터링하였다. 혈청중화 기술은 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명되어 있고 미가공 데이터는 표 7a-f에 나타났다.

[0367] <표 7 a-f>

	군	혈청	ARPE J34 +C	ARPE J34 -C
A	PBS	GMT	12	12
B	오랑체 : 2 μ g gB : 2 μ g	GMT	46	43
C	오랑체 : 2 μ g gB : 2 μ g MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	4168	1934
D	오랑체 : 2 μ g gB : 2 μ g PAA : 200 μ g	GMT	14698	3862
E	오랑체 : 2 μ g gB : 2 μ g AF04 : 1 μ g E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	7179	2919
F	오랑체 : 2 μ g gB : 2 μ g GLA-SQEM : 2.5 μ g GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	13302	3146

[0368]

[0369] a.- 하위 군 2- 혈청중화 ARPE D234 (D208)

	군	혈청	ARPE M7 +C	ARPE M7 -C
A	PBS	GMT	14	17
B	오량체: 2 µg gB : 2 µg	GMT	46	51
C	오량체: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	3739	1834
D	오량체: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	4484	2230
E	오량체: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1 µg E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	6101	2718
F	오량체: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2.5 µg GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	7719	1758

[0370]

[0371] b- 하위 군 2- 혈청중화 ARPE M7 (D208)

	군	혈청	ARPE M8 +C	ARPE M8 -C
A	PBS	GMT	16	13
B	오량체: 2 µg gB : 2 µg	GMT	1026	815
C	오량체: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	6792	5449
D	오량체: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	37166	28657
E	오량체: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1 µg E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	17936	11910
F	오량체: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2.5 µg GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	8505	9150

[0372]

[0373] c- 하위 군 3- 혈청중화 ARPE M8 (D257)

	군	혈청	MRC5 D34 +C	MRC5D34 -C
A	PBS	GMT	5	5
B	오량체: 2 µg gB : 2 µg	GMT	8	5
C	오량체: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	636	71
D	오량체: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	2699	84
E	오량체: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1 µg E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	1477	153
F	오량체: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2.5 µg GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	3131	146

[0374]

[0375] d- 하위 군 1- 혈청중화 MRC5 - D34

	군	혈청	MRC5 M7 +C	MRC5 M7 -C
A	PBS	GMT	5	5
B	오량체: 2 µg gB : 2 µg	GMT	5	5
C	오량체: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	147	27
D	오량체: 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	500	39
E	오량체: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1 µg E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	451	48
F	오량체: 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2.5 µg GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	913	14

[0376]

[0377] e- 하위 군 2- 혈청중화 MRC5 M7 (D208)

	군	혈청	MRC5 M8 +C	MRC5 M8 -C
A	PBS	GMT	5	5
B	오량체 : 2 µg gB : 2 µg	GMT	29	15
C	오량체: 2 µg gB : 2 µg MF59 : 2.3% 스쿠알렌	GMT	695	151
D	오량체 : 2 µg gB : 2 µg PAA : 200 µg	GMT	6645	536
E	오량체: 2 µg gB : 2 µg AF04 : 1 µg E6020, 2.5% 스쿠알렌	GMT	1977	438
F	오량체 : 2 µg gB : 2 µg GLA-SQEM : 2.5 µg GLA, 2% 스쿠알렌	GMT	6152	427

[0378]

[0379] f- 하위 군 3- 혈청중화 MRC5 M8 (D257)

[0380] 기하 평균 역가 (GMT)뿐만 아니라 개별 중화 역가는 도 3, 도 4 및 도 5에 도시되어 있다.

[0381] 상피- 및 섬유모세포-기반 중화 검정 둘 다에서 유사한 중화 항체 프로파일이 관찰되었으며, 보체의 존재 또는 부재 하에 각각 적어도 5배 또는 11배 더 높은 GMT를 가진 상피-기반 중화 검정에서 더 높은 중화 역가가 모니터링되었다.

[0382] 34일, 즉 2차 주사 후 14일에, 비아주반트화 CMV-gB 및 오량체로 면역화된 마우스에서 중화 항체 역가가 없거나 낮게 검출되었다 (각각 MRC-5 상에서 GMT ≤ 8 및 ARPE-19 세포 상에서 ≤ 46). 모든 CMV-gB 및 오량체 아주 반트화 군의 경우, 비아주반트화 군과 비교하여, 보체의 존재 또는 부재와 관계없이, MRC-5 상에서 SN 역가의 14배 내지 337배 증가 및 ARPE-19 세포 상에서 44배 내지 319배 증가로 현저한 아주반트 효과가 관찰되었다.

[0383] 보체의 존재 하에 ARPE-19 상피 세포상의 중화 항체 역가와 관련하여 (도 3, 패널 A), PAA 및 GLA-SQEM을 사용하여 MF59보다 유의하게 더 높은 중화 항체 역가를 가진 아주반트 효과 (적어도 3배 내지 4.2배 더 높음, 우월성 시험, 일측성 둔넷 조정(unilateral Dunnet adjustment), 모든 p_값 < 0.001)가 관찰되었으며, AF04를 사용한 경우는 아니다 (단지 1.7배 더 높음, p_값=0.08)).

[0384] 반대로, 보체의 부재 하에 ARPE-19 세포 상에서 중화 항체 역가와 관련하여 (도 3, 패널 B), PAA, AF04 및 GLA-

SQEM 아주반트는 MF59와 비교하여 중화 항체 역가를 약간 증가시켰으나 (MF59에 의해 유도된 것들과 비교하여 중화 항체 역가의 1.5배 내지 2배 증가), 관찰된 차이는 통계적으로 유의하지 않았다 (모든 $p_값 > 0.091$).

- [0385] 보체의 존재 하에 MRC-5 섬유모세포 상에 중화 항체 역가와 관련하여 (도 3, 패널 C), MF59보다 유의하게 더 높은 중화 항체 역가를 가진 아주반트 효과가 모든 시험된 아주반트 PAA, AF04 및 GLA-SQEM에서 관찰되었다 (적어도 2.3배 내지 6배 더 높음, 우월성 시험, 일측성 둔넛 조정, 모든 $p_값 \leq 0.002$).
- [0386] 마지막으로, 보체의 부재 하에 MRC-5 섬유모세포 상에 중화 항체 역가와 관련하여 (도 3, 패널 D), PAA, AF04 및 GLA-SQEM에 의해 유도된 중화 항체 역가는 MF59로 획득된 것들보다 유의하게 더 높지 않은 것으로 나타났다 ($p_값 > 0.093$). 208일 (도 4)에, 즉 2차 주사 후 7개월에, 비아주반트화 CMV-gB 및 오랑체로 면역화된 마우스에서 중화 항체 역가가 없거나 낮게 검출되었다 (각각 MRC-5 상에서 $GMT \leq 5$ 및 ARPE-19 세포 상에서 ≤ 50). 아주반트화 하위 군 2에서, 보체의 존재 또는 부재와 상관없이, ARPE-19 상피 세포 상에 중화 역가의 어떤 유의한 감소도 (하위 군 1로부터의 마우스에서) 34일에 검출된 역가와 비교하여 나타나지 않았으며, 한편 유의한 감소가 MRC-5 섬유모세포 상에 중화 항체 역가에서 입증되었다 (보체의 존재 하에 2.3배 내지 5.4배 감소, 모든 $p_값 \leq 0.016$; 보체의 부재 하에 3배 내지 10배 감소, 모든 $p_값 < 0.001$).
- [0387] 보체의 존재 또는 부재 하에 ARPE-19 상피 세포 상에 중화 항체 역가와 관련하여 (도 4, 패널 A 및 B), 시험된 아주반트 및 MF59 벤치마크 간에 어떤 유의한 차이도 검출되지 않았다. 보체의 존재 하에 MRC-5 섬유모세포 상에 중화 항체 역가와 관련하여 (도 4, 패널 C), PAA 및 GLA-SQEM에 의해 유도된 중화 항체 역가는 MF59에 의해 유도된 것들보다 유의하게 더 높았다 (적어도 3.4배 내지 11.9배 더 높음, 우월성 시험, 일측성 둔넛 조정, 모든 $p_값 \leq 0.015$).
- [0388] 마지막으로, 보체의 부재 하에 MRC-5 섬유모세포 상에 중화 항체 역가와 관련하여 (도 4, 패널 D), PAA 및 AF04에 의해 유도된 중화 항체 역가는 MF59에 의해 유도된 것들보다 유의하게 더 높았다 (2배 내지 4.4배 증가, 우월성 시험, 일측성 둔넛 조정, 모든 $p_값 \leq 0.019$).
- [0389] 257일 (도 5), 즉 3차 주사 후 30일에, 비아주반트화 CMV-gB 및 오랑체로 면역화된 마우스에서 중화 항체 역가는 ARPE-19 세포 상에서 34일에 검출된 역가와 비교하여 유의하게 증가하였다 (각각 보체를 사용하고 사용하지 않은 ARPE-19 세포 상에서, $GMT = 1062$ 또는 815). 반대로, 비아주반트화 CMV-gB 및 오랑체로 면역화된 마우스에서 중화 항체 역가는 MRC-5 섬유모세포에서 낮게 유지되었다 (각각 보체를 사용하고 사용하지 않은 MRC-5 섬유모세포 상에서 $GMT = 29$ 또는 15).
- [0390] MF59를 제외한 모든 아주반트화 하위 군 3에서, 세포 유형과 상관없이 그리고 보체의 존재 또는 부재와 상관없이, 3차 주사 후 257일에 검출된 중화 항체 역가는 2차 주사 후 34일에 검출된 것들보다 유의하게 더 높았다 (모든 $p_값 \leq 0.002$).
- [0391] 257일에, MF59 참조와 아주반트 비교와 관련하여, GLA-SQEM을 제외한 모든 아주반트 (즉, PAA 및 AF04)는 세포 유형과 상관없이 그리고 보체의 존재 또는 부재와 상관없이, MF59보다 더 높은 중화 항체 역가를 유도하였다 (우월성 시험, 일측성 둔넛 조정, 모든 $p_값 \leq 0.05$). GLA-SQEM과 관련하여, 유도된 보체 의존성 중화 항체 역가는 MF59에 의해 유도된 것들보다 유의하게 더 높았으며 (ARPE-19 또는 MRC-5 세포에서 각각 5.3배 또는 8.9배 더 높음, 우월성 시험, 일측성 둔넛 조정, 모든 $p_값 < 0.001$), 한편 보체의 부재 하에, 유도된 중화는 세포 유형과 상관없이, 유의하게 상의하지 않았다.
- [0392] D208에, 즉 2차 주사 후 최대 7개월까지 gB + 오랑체 + AF04 또는 PAA 또는 GLA-SQEM을 포함하는 조성물은 gB + 오랑체 + MF59를 포함하는 조성물보다 더 높은 중화 항체 수준을 제공하며, 이는 항체의 기능성에 대한 더 우수한 지속성을 나타내는 것이다. D257에, 부스트 후 1개월, 측정된 중화 항체 증가는 기억 반응을 반영하고 gB + 오랑체 + MF59를 포함하는 조성물보다 gB + 오랑체 + AF04 또는 PAA 또는 GLA-SQEM을 포함하는 조성물에 대한 더 높은 역가를 나타낸다.
- [0393] 이들 모든 결과는 gB + 오랑체 + AF04 또는 PAA 또는 GLA-SQEM을 포함하는 면역원성 조성물이 gB + 오랑체 + MF59를 포함하는 조성물보다 더 높은 중화 항체 수준 및 지속성을 제공함을 나타낸다.
- [0394] IgG1 및 IgG2c 항체 반응
- [0395] 상이한 아주반트를 사용하지 않거나 사용하고 투여된 CMV gB 및 오랑체 항원에 의해 도출된 CMV gB-특이적 및 오랑체-특이적 IgG1 및 IgG2c 항체 반응은 각각 34일 (2차 면역화 후 2주), 208일 (1차 백신접종 시리즈 후 7개월) 및 257일 (M7에 추가 접종 후 1개월)에, 하위 군 1, 2 및 3으로부터의 모든 동물로부터 수집된 개별 혈청

샘플에서 ELISA에 의해 측정되었다. 평균 ELISA 항체 역가 ($\log 10$ EU)가 도 6에 도시되어 있다. ELISA 기술은 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명되어 있다.

- [0396] IgG1 및 IgG2c 항체 반응과 관련하여, 분석 시점과 상관없이, CMV-항원 특이성 gB 또는 오랑체와 관계없이 유사한 프로파일을 획득하였다.
- [0397] IgG1 항체 역가와 관련하여, 모든 시험된 아주반트는 비아주반트화 군과 비교하여 IgG1 항체 역가를 유의하게 증가시켰다. 항원 및 시점과 상관없이, MF59와 비교할 때 AF04에 대해 어떤 유의한 차이도 나타나지 않았다. MF59보다 유의하게 더 낮은 IgG1 역가를 가진 아주반트 효과가 34일 및 208일에 PAA에 대해 관찰되었으나 (적어도 2.4배 감소, 모든 p -값 ≤ 0.045 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정), 3차 추가 접종 후 257일에는 관찰되지 않았다. MF59 참조와 비교하여, GLA-SQEM은 모든 시험 시점에서 유의하게 더 낮은 항-gB IgG1 역가 (적어도 2.5배 감소, 모든 p -값 ≤ 0.033 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정) 및 208일 및 257일에 더 낮은 항-오랑체 IgG1 역가 (적어도 2.7배 감소, 모든 p -값 ≤ 0.005 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정)를 유도하였다. IgG2c 항체 역가와 관련하여, 모든 시험된 아주반트는 비아주반트화 군과 비교하여 IgG2c 항체 역가를 유의하게 증가시켰다. 모든 시험된 아주반트, 즉 PAA, AF04 및 GLA-SQEM에 대해 MF59보다 유의하게 더 높은 IgG2c 역가를 가진 아주반트 효과 (적어도 11배 더 높음; 모든 p -값 < 0.001 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정)가 시점과 상관없이 gB 또는 오랑체에 특이적인 IgG2c에 대해 관찰되었다.
- [0398] ELISA IgG1/IgG2c 비
- [0399] Th2/Th1 배향을 평가하기 위해, 모든 아주반트화 군에 대해 IgG1/IgG2c 비를 계산하였고, 도 7에 상세히 설명되어 있다.
- [0400] 도 7에 나타난 바와 같이, CMV-오랑체에 대해 계산된 IgG1/IgG2c 비는 CMV-gB에 대해 계산된 것들보다 더 낮았으며 시점과 상관없이 일정하게 텐트되었다. 스쿠알렌 에멀전 MF59는 시점과 상관없이, CMV-gB에 대해 ≥ 85 또는 CMV-오랑체에 대해 ≥ 18 인 IgG1/IgG2c 비를 가진 Th2-편향된 반응 프로파일을 나타냈다. 모든 다른 시험된 아주반트의 경우, MF59보다 낮은 IgG1/IgG2c 비를 획득하였으며, IgG1/IgG2c 비는 AF04의 경우 $gB \geq 7.1$ 에 특이적이고 오랑체 ≥ 2.1 에 특이적이고 PAA 및 GLA-SQEM의 경우 2.4 또는 0.8 이하 (각각 gB 및 오랑체에 특이적)인데, 이는 MF59보다 더 많은 Th1-편향된 반응 프로파일을 나타내고 AF04, PAA 및 GLA-SQEM은 Th1-유도 아주반트임을 나타내는 것이다.
- [0401] 세포 반응
- [0402] · *FLUOROSPOT에 의해 모니터링된 IL5 및 IFN- γ 시토카인 분비 세포*
- [0403] IL5 및 IFN- γ 분비 세포 빈도는 각각 34일 (2차 면역화 후 2주), 208일 (1차 백신접종 시리즈 후 7개월) 및 257일 (M7에 추가 접종 후 1개월)에, 하위 군 1, 2 및 3으로부터의 모든 동물로부터 수집된 비장세포 상에서 FLUOROSPOT에 의해 측정되었다. FLUOROSPOT 검정 동안, 각각의 비장세포 현탁액을 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 재조합 CMV-gB 또는 CMV-오랑체로 밤새 생체의 자극시켰다.
- [0404] FLUOROSPOT 기술은 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명되어 있다.
- [0405] 도 8에 나타난 바와 같이, 34일에 CMV-gB 자극 (패널 A)시, MF59 아주반트화 CMV-gB 및 오랑체 군 (기하 평균 60 IL-5 분비 세포/ 10^6 개 비장세포)을 제외하고는 모든 군에서 검출된 IL-5 분비 세포 (SC) 빈도가 없거나 매우 낮았다 (기하 평균 < 22 IL-5 분비 세포/ 10^6 개 비장세포). 유사하게, 모든 군에서 IFN- γ 분비 세포 빈도가 없거나 거의 검출되지 않았다 (기하 평균 < 20 IFN- γ 분비 세포/ 10^6 개 비장세포).
- [0406] 반대로, CMV-오랑체 자극시 높은 시토카인 분비 세포 빈도가 검출되었다 (도 8, 패널 B). IL-5 분비 세포와 관련하여, MF59로 투여된 마우스에서 높은 IL-5 SC 빈도가 검출되었다 (444 IL-5 SC/ 10^6 개 비장세포). PAA 및 GLA-SQEM으로 투여된 군에서 검출된 IL-5 분비는 MF59로 획득한 것들보다 유의하게 낮았으며 (p -값 ≤ 0.002 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정), 한편 AF04로 어떤 유의한 차이도 기록되지 않았다.
- [0407] IFN- γ 분비 세포 빈도와 관련하여, 모든 시험된 아주반트, 즉 PAA, AF04 및 GLA-SQEM은 MF59와 비교하여 IFN- γ 생성의 유의한 8배 내지 29배 증가가 기록되었다 (모든 p -값 ≤ 0.001 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).
- [0408] 208일에, 도 8에 나타난 바와 같이, IL-5 및 IFN- γ 분비 세포 빈도 둘 다 자극 항원과 상관없이 낮았다.

- [0409] 257일에, CMV-gB 및 CMV-오랑체 자극시 IL-5 및 IFN- γ 반응 둘 다 34일과 비교하여 증가하였으나, Th1/Th2 프로파일은 보존되었다. IL-5 분비 세포와 관련하여, MF59로 투여된 마우스에서 높은 IL-5 SC 빈도가 검출되었다 (CMV-gB 또는 오랑체 자극시 각각 268 및 2284 IL-5 SC/ 10^6 개 비장세포).
- [0410] PAA, AF04 및 GLA-SQEM으로 투여된 군에서 검출된 IL-5 분비는 MF59로 수득된 것들보다 유의하게 더 낮았다 (p -값 ≤ 0.003 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).
- [0411] IFN- γ 분비 세포 빈도와 관련하여, 모든 시험된 아주반트 즉 PAA, AF04 및 GLA-SQEM은 MF59와 비교하여 IFN- γ SC 빈도의 유의한 증가가 기록되었다 (모든 p -값 ≤ 0.001 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).
- [0412] 종합한다면, 모든 시험된 아주반트는 IgG1/IgG2c 비로 나타낸 경향과 일치하는 MF59보다 더 많은 Th-1 편향된 전반적인 반응 프로파일을 유도하였다.
- [0413] IgG1/IgG2c 비로 나타낸 경향과 일치하여, 종합한다면, 모든 시험된 아주반트는 Th-1 편향된 전반적인 세포 반응 프로파일을 유도하였으며, 한편, MF59는 Th2-편향된 전반적인 세포 반응 프로파일을 유도하였다.
- [0414] · *ELISPOT에 의해 모니터링된 IgG1 및 IgG2c 항체 분비 형질모세포*
- [0415] IgG1 및 IgG2c 항체 분비 형질모세포 빈도는 각각 34일 (2차 면역화 후 2주), 208일 (1차 백신접종 시리즈 후 7개월) 및 257일 (M7에 추가 접종 후 1개월)에, 하위 군 1, 2 및 3으로부터의 모든 동물로부터 수집된 비장세포 상에서 생체의 FLUOROSPOT에 의해 측정되었다. ELISPOT 검정 동안, 각각의 비장세포 현탁액을 재조합 CMV-gB 또는 CMV-오랑체로 코팅된 웰에 침착시켜 형질모세포 표면에 제시된 IgG1 또는 IgG2c 특이적 항체를 포획하였다. IgG1 및 IgG2c CMV-gB 및 오랑체-특이적 항체 분비 세포가 총 IgG 분비 세포에 따라 열거되고 보고되어 있고; 총 IgG에서 IgG1 또는 IgG2c의 백분율이 계산된다. FLUOROSPOT 기술은 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명되어 있다.
- [0416] 도 9에 제시된 바와 같이, 34일에 IgG1 항체 분비 세포 (ASC) 빈도의 평균은 모든 시험된 아주반트간에 유의한 차이없이 3.8% 내지 20.12%의 범위였다. IgG2c ASC 빈도와 관련하여, 마우스에 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체를 투여하였을 때 낮은 %가 검출되었다. 반대로, PAA, AF04 및 GLA-SQEM으로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체는, 항원 특이성 CMV-gB 또는 CMV-오랑체와 상관없이, MF59보다 IgG2c ASC의 유의하게 더 높은 %를 유도하였다 (모든 p -값 <0.001 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).
- [0417] 예상한 바와 같이, 208일에 검출된 ASC와 관련하여, 반응은 낮았는데, 이는 1차 백신접종 시리즈 후 6개월, 마우스 비장에서 낮은 비율의 순환 형질모세포가 검출되었음을 나타내는 것이다.
- [0418] 3차 주사 후 30 (257일에), CMV-gB 또는 CMV-오랑체에 특이적인 IgG1 또는 IgG2c인 ASC 빈도는 208일과 비교하여 증가하였다. 다시, 257일에, IgG1 ASC 빈도의 평균은 모든 시험된 아주반트 간에 유의한 차이없이 3.1% 내지 9%의 범위였다. IgG2c ASC 빈도와 관련하여, 마우스에 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체를 투여하였을 때 낮은 %가 검출되었다. 반대로, PAA, AF04 및 GLA-SQEM으로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체는, 항원 특이성 CMV-gB 또는 CMV-오랑체와 상관없이, MF59보다 IgG2c ASC의 유의하게 더 높은 %를 유도하였다 (모든 p -값 <0.001 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).
- [0419] · *FLUOROSPOT에 의해 모니터링된 IgG1 및 IgG2c 항체 분비 B 기억 세포*
- [0420] IgG1 및 IgG2c 항체 분비 세포 빈도는 IL-2 및 R848에 의한 시험관내 자극시 4일 동안 배양된 활성화되고 풍부화된 B 세포 비장세포 상에서 34일, 208일 및 257일에 FLUOSPOT에 의해 측정하였다. FLUOROSPOT 기술은 재료 및 방법 섹션에 상세히 설명되어 있다.
- [0421] 도 10에 제시된 바와 같이, 34일에 IgG1 항체 분비 세포 (ASC) 빈도의 평균은 모든 시험된 아주반트간에 유의한 차이없이 그리고 항원 특이성 CMV-gB 또는 CMV-오랑체에 관한 유사한 프로파일로 1.24% 내지 4.68%의 범위였다. IgG2c ASC 빈도와 관련하여, 마우스에 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체를 투여하였을 때 낮은 %가 검출되었다. 반대로, PAA, AF04 및 GLA-SQEM으로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체는, 항원 특이성 CMV-gB 또는 CMV-오랑체와 상관없이, MF59보다 IgG2c ASC의 유의하게 더 높은 %를 유도하였다 (모든 p -값 <0.001 , 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).
- [0422] 208일에 검출된 ASC와 관련하여, B 기억 세포는 시험된 아주반트와 독립적으로 1.6% 내지 3.24% 범위의 %를 가진 CMV-오랑체에 특이적인 IgG1 ASC에 대해 주로 검출되었다. IgG2c ASC 빈도와 관련하여, 마우스에 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체를 투여하였을 때 낮은 %가 검출되었다. 반대로, PAA, AF04 및 GLA-SQEM으로 아주

반트화된 CMV-gB 및 오랑체는 MF59보다 IgG2c ASC의 유의하게 더 높은 %를 유도하였다 (모든 p-값 <0.001, 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).

[0423] 3차 주사 후 30일 (257일에), IgG1 ASC 빈도의 평균은 모든 시험된 아주반트간에 유의한 차이없이 1.1% 내지 3.75%의 범위였다.

[0424] IgG2c ASC 빈도와 관련하여, 마우스에 MF59로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체를 투여하였을 때 낮은 %가 검출되었다. 반대로, PAA 및 GLA-SQEM으로 아주반트화된 CMV-gB 및 오랑체는, 항원 특이성 CMV-gB 또는 CMV-오랑체와 상관없이, MF59보다 IgG2c ASC의 유의하게 더 높은 %를 유도하였다 (모든 p-값 <0.001, 차이 시험, 일측성 둔넛 조정).

[0425] 이들 결과는 gB + 오랑체 + MF59를 포함하는 조성물보다 gB + 오랑체 + PAA 또는 AF04 또는 GLA-SQEM을 포함하는 조성물을 사용하여 더 높은 기억 반응 수준을 나타낸다. 또한 보호 지속성의 매체로 공지된, 이 더 높은 기억 세포 빈도가 우세한 Th1-유형 반응 프로파일을 유지한다는 것이 분명하다.

[0426] **실시예 2**

[0427] **두 항원의 상보 효과**

[0428] 실험 연구의 설계에서, 본 발명자들은 PAA 아주반트의 존재 하에 두 항원의 조합된 용량-범위 효과를 연구하였다. 그 목적으로, 10마리 암컷 C57/B16J 마우스의 11개 군은 PAA 아주반트의 존재 하에 1.2 내지 5 µg 범위의 CMV-gB의 용량을 갖거나 갖지 않는 0 내지 5 µg 범위의 CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체의 용량을 0일 및 22일에 근육내 경로로 받았다. 항체 반응은 gB 및 gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 (IgG1/IgG2c 하위부류)에 특이적인 ELISA 및 D22 (보체 사용, ARPE-19 상피 세포 상에) 및 D35 (보체를 사용하고 사용하지 않음, MRC5 섬유모세포 및 ARPE-19 상피 세포 상에)에 중화 검정에 의해 평가하였다. 세포 반응은 gB 및 오랑체 재조합 단백질 및 오랑체 펩티드 폴로 시험관내 자극시 IFN-γ ELISPOT에 의해 D35에 평가하였다.

[0429] 상피 세포 ARPE-19 상에서 또는 섬유모세포 MRC-5 상에서 모니터링된 중화 활성은 유사한 프로파일을 제시하였고, 섬유모세포보다 상피 세포에서 더 높은 중화 역가가 기록되었다 (MRC-5 세포보다 ARPE-19에서 2배 내지 5배 더 높은 역가).

[0430] 20일 (도 11), 즉 1차 투여 후 20일에, 아기 토끼 보체의 존재 하에 상피 세포 및 섬유모세포 감염 둘 다를 억제하는 중화 항체 역가는 gB 및 gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체의 투여된 양에 따라 증가하였다. gB 농도가 증가하였을 때 더 높은 중화 역가 증가가 입증되었다. 도 11에 도시된 바와 같이, 레이더 플롯은 오랑체 투여량보다는 gB 투여량에 따라 배향된다. 따라서, gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체의 상부에 gB 첨가의 유의한 선형 효과는 상피 세포 및 섬유모세포 상에서 모니터링된 중화 활성에 대해 관찰되었다 (상피 세포 상에서 p=0.014 및 섬유모세포 상에서 p=0.006).

[0431] 결론적으로, 보체의 존재 하에, 오랑체의 상부에 gB의 첨가는 상피 세포 및 섬유모세포 둘 다에서 SN 역가의 증가를 가능하게 한다.

[0432] 35일, 즉 2차 투여 후 14일에, 아기 토끼 보체의 존재 하에 상피 세포 및 섬유모세포 감염 둘 다를 억제하는 고 중화 항체 역가가 gB 또는 gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체의 투여된 양과 상관없이 검출되었다. 검출된 중화 활성은 오랑체에 대해서도 또는 gB에 대해서도 어떤 유의한 용량 효과도 없는 안정기에 있었다 (모든 p-값 ≥ 0.240) (도 12a).

[0433] 35일에, 아기 토끼 보체의 부재 하에 상피 세포 및 섬유모세포 감염 둘 다를 억제하는 보체 독립 중화 활성을 또한 모니터링하였다.

[0434] 도 12b에 도시된 바와 같이, 보체의 부재 하에 레이더 플롯은 gB 투여량보다는 오랑체 투여량에 따라 배향되므로, gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 용량이 증가하였을 때 보체 독립적 중화 항체 역가가 매우 증가하였다. gB의 어떤 유의한 용량 효과도 입증되지 않았으며, 한편 gH/gL/UL128/UL130/UL131 오랑체 증가 용량에 대해 유의한 선형 및 제곱 효과가 입증되었다 (ARPE-19 및 MRC-5 세포 상에 중화 역가 둘 다에 대해 p ≤ 0.009).

[0435] 결론적으로, 보체의 부재 하에, gB의 상부에 오랑체의 첨가는 상피 세포 및 섬유모세포 둘 다에서 SN 역가의 증가를 가능하게 한다

[0436] 따라서, 두 항원의 상보 효과는 중화 항체 반응 품질에 대한 그의 각각의 효과에 의해 입증되었다. 기능적 체액 반응, 즉 보체 의존적이고 독립적인 중화 항체의 분석과 관련하여, 두 항원의 조합이 바이러스 중화를 위한

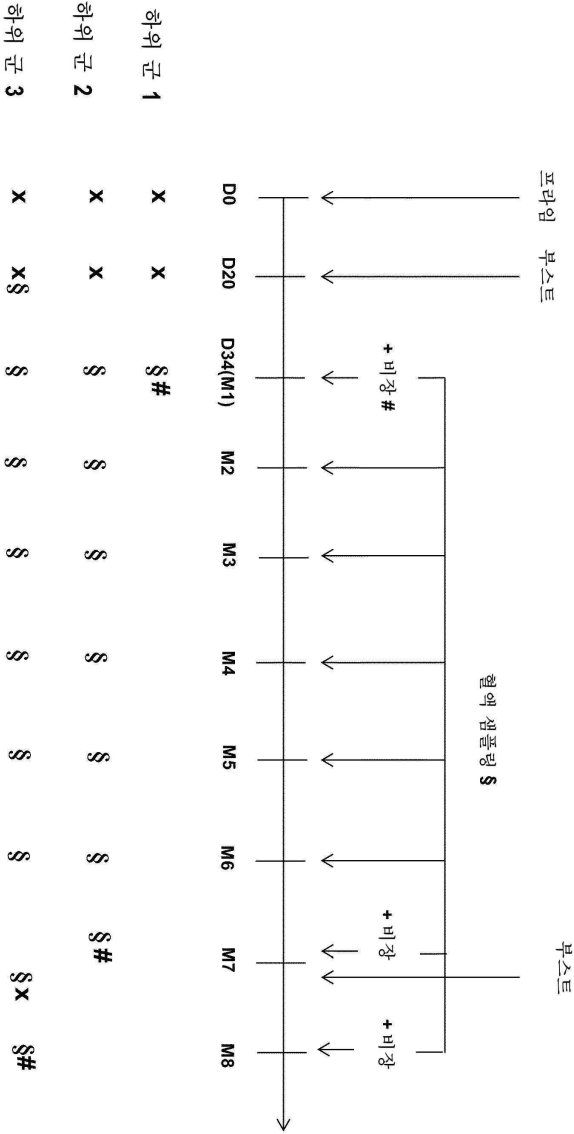
확장된 작용 방식을 제공한다는 것이 입증되었다. CMV-gB는 보체의 존재 하에 상피 세포 및 섬유모세포 상에서 중화 항체 역가의 증가를 가능하게 하고 CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체는 상피 세포 및 섬유모세포 상에서 보체 독립적인 중화 항체의 달성을 가능하게 한다.

[0437] 게다가, CMV-gB 및 CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 조합의 이러한 확장 특성은 또한 유도된 세포 반응에서 주목되었다. 도 13 패널 A에 도시된 바와 같이, PAA 아주반트로 제제화된 CMV-gB 및 CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체로 투여된 마우스로부터 특이적 IFN- γ 세포 반응이 비장세포에서 검출되었다. CMV-gB 재조합 단백질보다 CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 재조합 오량체로 생체의 자극시 보다 높은 특이적 IFN- γ 세포 반응이 검출되었다. CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체 내에서 세포 에피토프를 정의하기 위해, PAA 아주반트로 제제화된 CMV-gB 및 CMV-gH/gL/UL128/UL130/UL131 오량체로 투여된 마우스로부터의 비장세포를 또한 오량체를 구성하는 각각의 개별 단백질, 즉 gH, gL, UL128, UL130 및 UL131의 서열을 커버하는 15-량체 펩티드 풀로 생체의 자극시켰다. 도 13 패널 B에 도시된 바와 같이, 검출된 IFN- γ 세포 반응이 시험된 마우스의 대부분의 경우 낮은 UL128을 제외하고, 오량체를 구성하는 각각의 개별 단백질의 서열을 커버하는 모든 펩티드 풀에 대해 지속된 특이적 IFN- γ 세포 반응이 검출되었다.

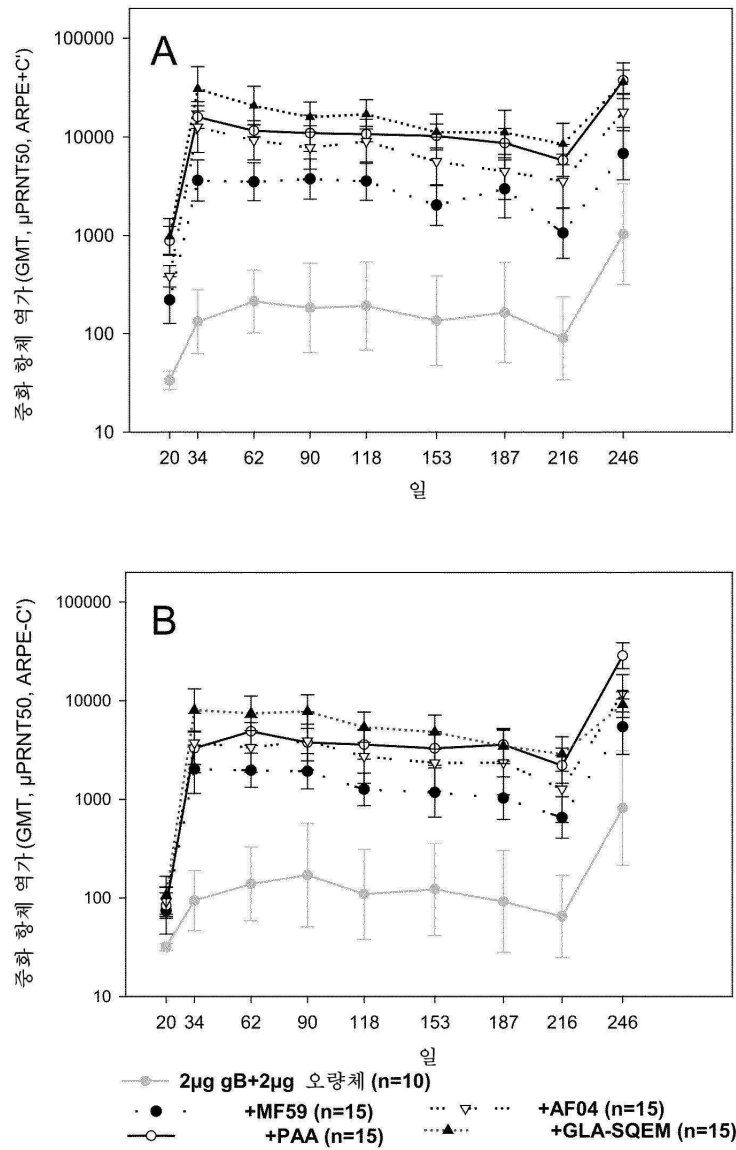
[0438] 결론적으로, gB의 상부에 오량체의 첨가는 세포 에피토프의 수를 확장시킴으로써 IFN- γ 세포 반응의 증가를 가능하게 한다.

도면

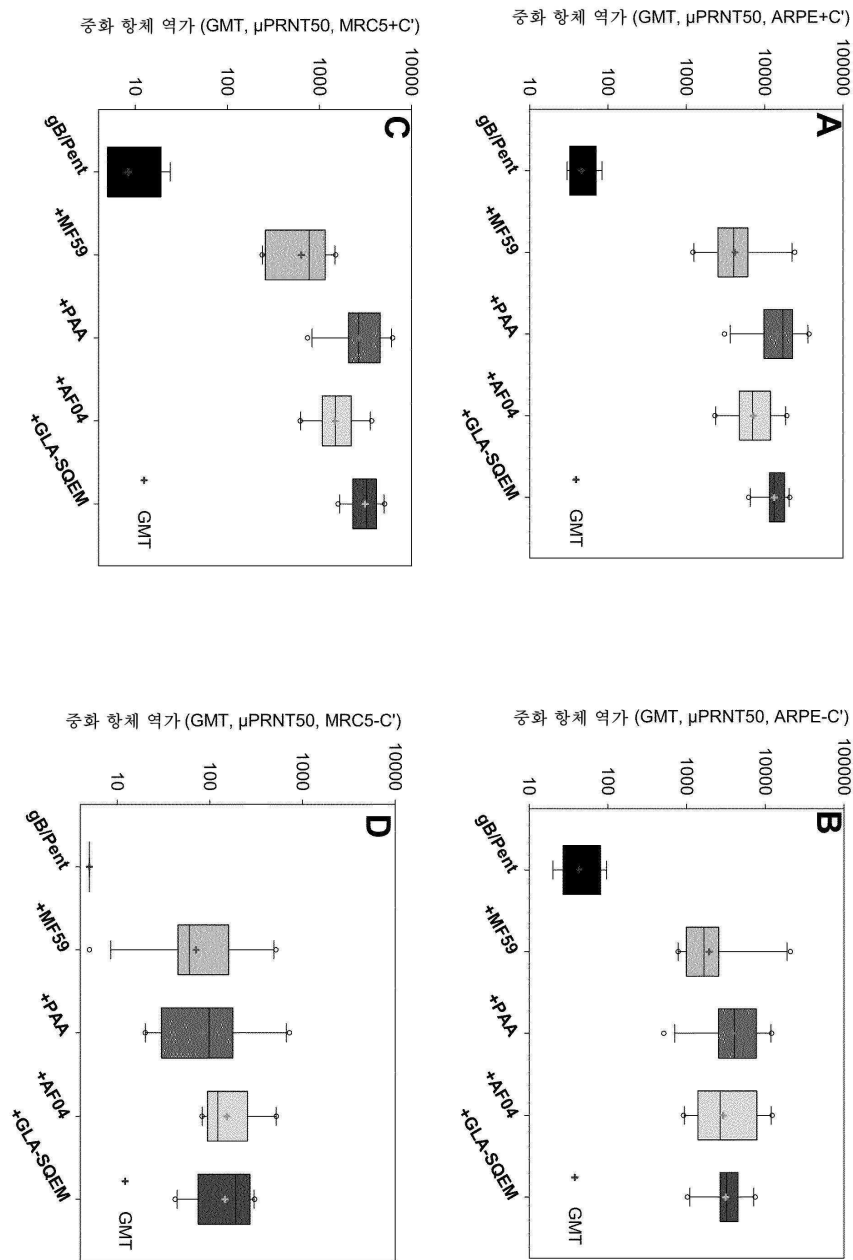
도면1



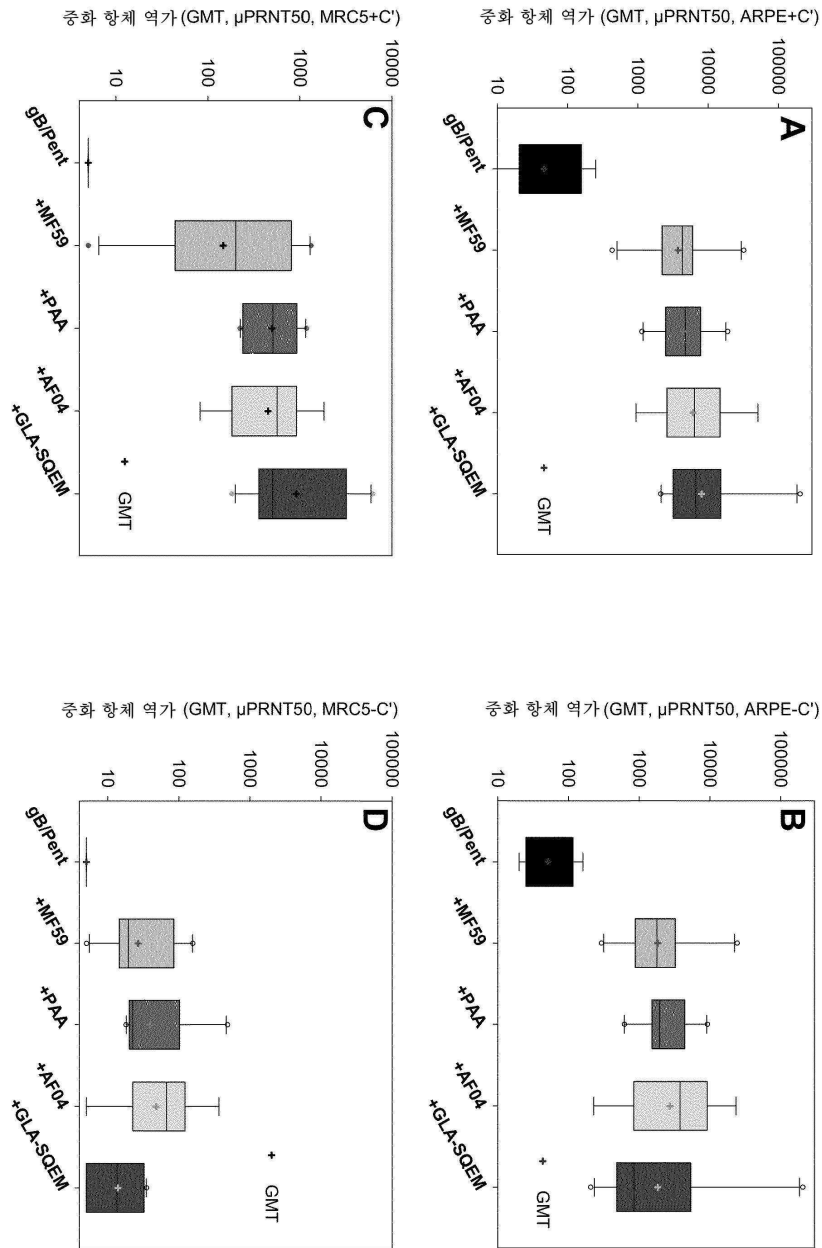
도면2



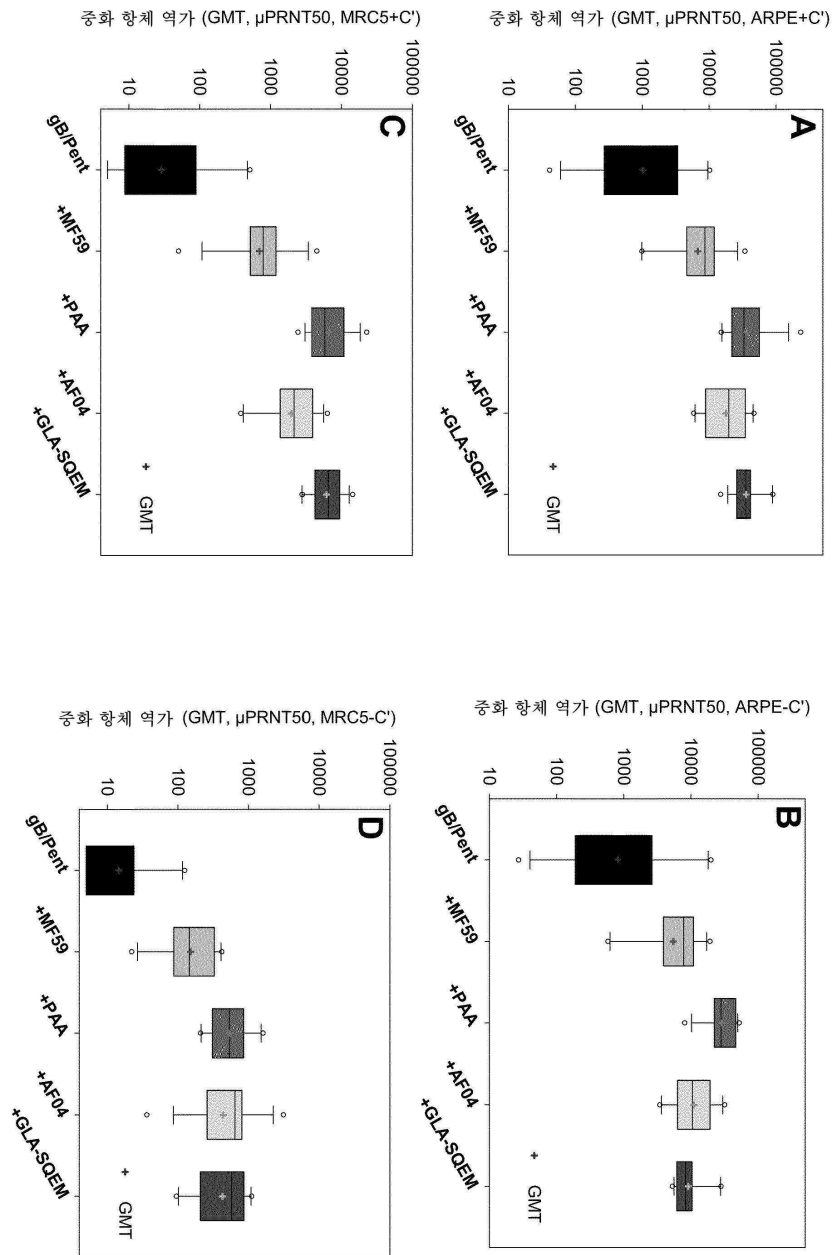
도면3



도면4



도면5



도면6

A	34 일		208 일		257 일	
	IgG1 역가 (log10 EU)	IgG2c 역가 (log10 EU)	IgG1 역가 (log10 EU)	IgG2c 역가 (log10 EU)	IgG1 역가 (log10 EU)	IgG2c 역가 (log10 EU)
PBS	1.00	1.00	1.00	1.39	1.11	1.27
gB 및 오랑체	4.48	1.83	4.24	1.51	5.49	2.75
+MF59	6.10	4.00	5.45	3.52	6.18	4.13
+PAA	5.50	5.55	4.87	4.81	6.14	5.92
+AF04	6.00	5.14	5.48	4.49	6.17	5.29
+GLA-SQEM	5.70	5.32	4.93	4.76	5.74	5.57

B	34 일		208 일		257 일	
	IgG1 역가 (log10 EU)	IgG2c 역가 (log10 EU)	IgG1 역가 (log10 EU)	IgG2c 역가 (log10 EU)	IgG1 역가 (log10 EU)	IgG2c 역가 (log10 EU)
PBS	1.00	1.00	1.00	1.14	1.00	1.08
gB 및 오랑체	3.89	1.39	3.39	1.67	4.76	2.50
+MF59	5.48	4.22	4.75	3.45	5.62	4.04
+PAA	4.88	5.34	4.36	4.68	5.58	5.73
+AF04	5.64	5.30	4.84	4.32	5.53	5.22
+GLA-SQEM	5.44	5.55	4.14	4.65	5.18	5.62

도면7

아주반트	시점	MF59	PAA	AF04	GLA-SQEM
gB의 경우 IgG1/IgG2c 비	D34	124	0.9	7.1	2.4
	D208	85	1.2	9.7	1.5
	D257	110	1.7	7.7	1.5
오랑체의 경우 IgG1/IgG2c 비	D34	18	0.3	2.2	0.8
	D208	20	0.5	3.2	0.3
	D257	30	0.7	2.1	0.4

도면8

A	34 일		208 일		257 일	
	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ
PBS	1.00	2.00	1.00	1.00	5.00	2.00
gB 및 오랑체	22.00	5.00	2.00	2.00	125.00	6.00
+MF59	60.00	10.00	21.00	1.00	268.00	3.00
+PAA	5.00	15.00	9.00	1.00	38.00	11.00
+AF04	13.00	9.00	7.00	1.00	15.00	7.00
+GLA-SQEM	13.00	12.00	2.00	1.00	3.00	63.00

B	34 일		208 일		257 일	
	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ	IL-5	IFN- γ
PBS	1.00	2.00	1.00	2.00	6.00	4.00
gB 및 오랑체	251.00	7.00	140.00	1.00	3077.00	66.00
+MF59	444.00	26.00	277.00	1.00	2284.00	52.00
+PAA	82.00	462.00	108.00	16.00	330.00	848.00
+AF04	170.00	722.00	38.00	117.00	546.00	645.00
+GLA-SQEM	40.00	299.00	23.00	45.00	38.00	1405.00

도면9

A	34 일		208 일		257 일	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
아주반트						
gB+ 오랑체	0.46	0.00	0.00	0.00	0.71	0.04
+MF59	12.37	0.63	0.58	0.09	3.95	0.42
+PAA	6.63	14.76	0.40	2.59	6.88	9.87
+AF04	20.12	12.24	0.57	0.30	7.42	2.87
+GLA-SQEM	4.03	3.26	0.35	1.11	2.44	4.62

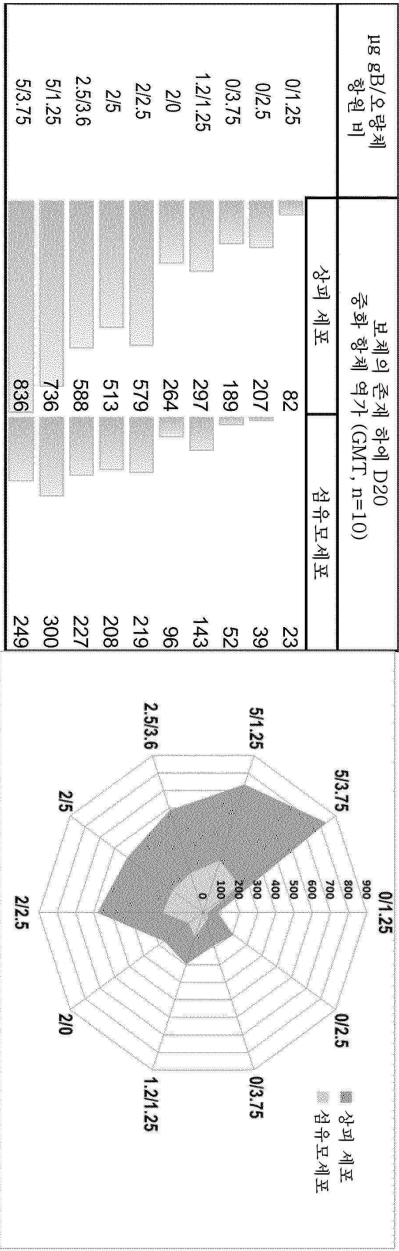
B	34 일		208 일		257 일	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
아주반트						
gB+ 오랑체	0.08	0.08	0.00	0.00	0.41	0.04
+MF59	7.02	0.95	0.34	0.11	3.54	0.32
+PAA	3.80	5.00	0.24	0.81	4.58	5.25
+AF04	12.03	15.00	0.64	0.55	9.00	3.81
+GLA-SQEM	7.15	4.00	0.08	1.67	3.11	5.59

도면10

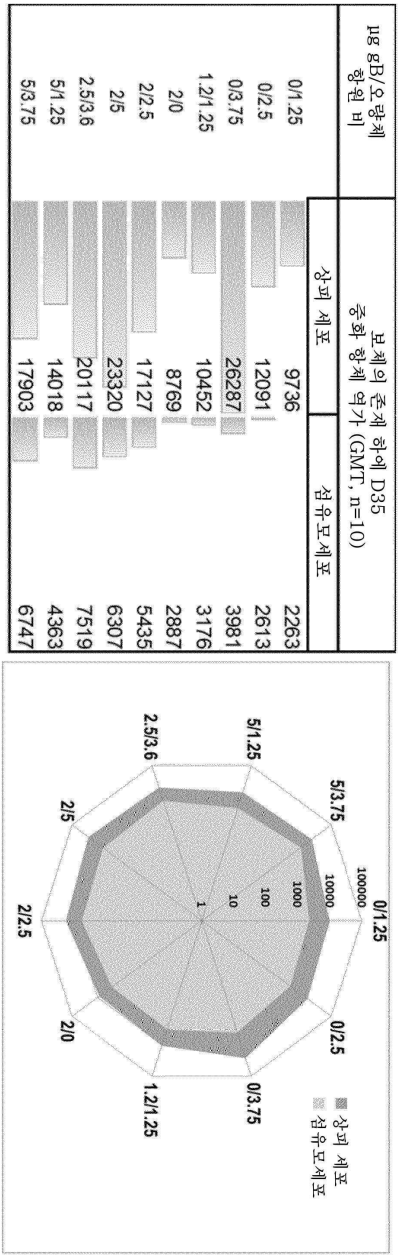
A	34 일		208 일		257 일	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
아주반트						
gB+ 오랑체	0.03	0.00	0.10	0.05	0.43	0.03
+MF59	4.29	0.34	0.99	0.09	1.33	0.12
+PAA	1.64	3.66	0.83	1.24	2.43	3.38
+AF04	2.62	1.53	0.78	0.50	1.79	0.65
+GLA-SQEM	1.54	3.81	0.58	0.57	1.24	2.17

B	34 일		208 일		257 일	
	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c	%IgG1	%IgG2c
아주반트						
gB+ 오랑체	0.04	0.00	0.33	0.03	0.55	0.06
+MF59	4.68	0.75	1.88	0.08	1.91	0.18
+PAA	1.83	2.04	3.24	0.71	3.69	3.45
+AF04	2.57	1.69	1.62	0.55	3.75	1.15
+GLA-SQEM	1.99	3.63	1.36	1.79	2.42	2.58

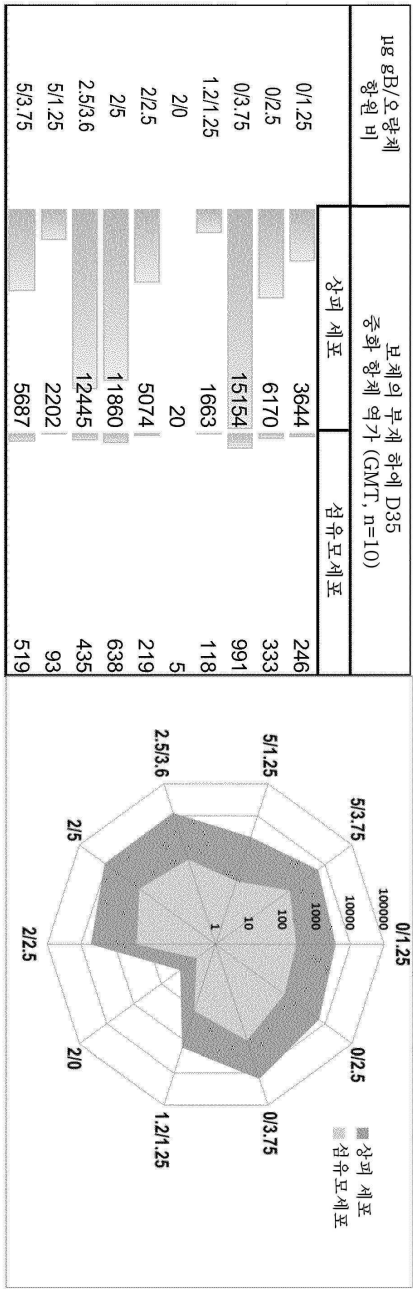
도면11



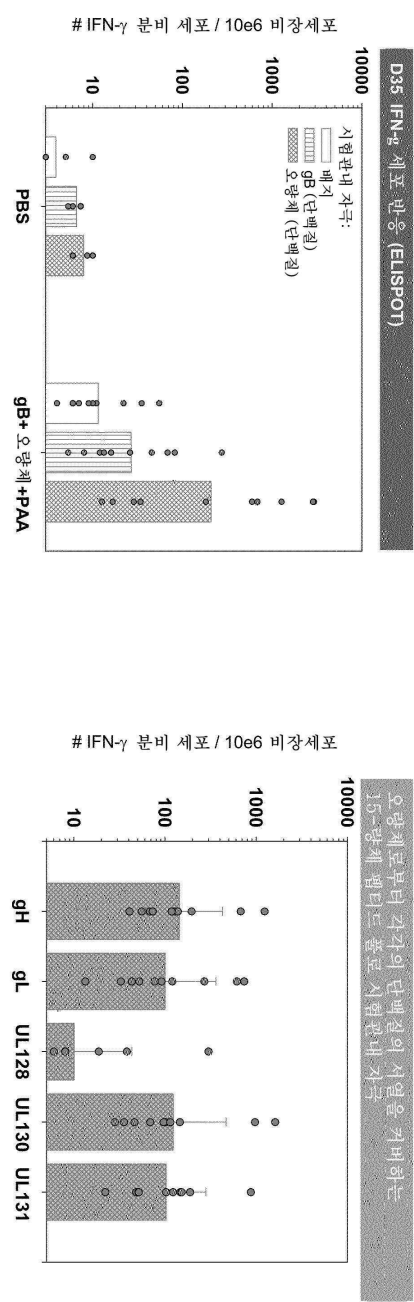
도면12a



도면12b



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Sanofi Pasteur
- <120> Human cytomegalovirus immunogenic composition
- <130> BET17L3240
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

<211> 806

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gB antigen

<400> 1

Ser Ser Thr Arg Gly Thr Ser Ala Thr His Ser His His Ser Ser His
1 5 10 15

Thr Thr Ser Ala Ala His Ser Arg Ser Gly Ser Val Ser Gln Arg Val
20 25 30

Thr Ser Ser Gln Thr Val Ser His Gly Val Asn Glu Thr Ile Tyr Asn
35 40 45

Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr
50 55 60

Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe
65 70 75 80

Glu Arg Asn Ile Val Cys Thr Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu
85 90 95

Asp Glu Gly Ile Met Val Val Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr
100 105 110

Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr
115 120 125

Ala Tyr Ile His Thr Thr Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val
130 135 140

Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile His His Ile Asn Ser His Ser Gln Cys
145 150 155 160

Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val Ile Ala Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr
165 170 175

His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn Lys Thr Met Gln Leu Met Pro Asp Asp
180 185 190

Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp
195 200 205

His Ser Arg Gly Ser Thr Trp Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn

210				215				220							
Cys	Met	Val	Thr	Ile	Thr	Thr	Ala	Arg	Ser	Lys	Tyr	Pro	Tyr	His	Phe
225				230				235				240			
Phe	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn
245				250				255							
Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser	Tyr	Phe	Gly	Glu	Asn	Ala	Asp	Lys	Phe
260				265				270							
Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Tyr	Thr	Ile	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Arg	Pro	Asn
275				280				285							
Ser	Ala	Leu	Glu	Thr	His	Arg	Leu	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Ala	Asp
290				295				300							
Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile	Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln
305				310				315				320			
Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Ser	Glu	Ala	Glu
325				330				335							
Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser	Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Phe	Leu	Ser
340				345				350							
Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Cys	Val	Arg
355				360				365							
Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn
370				375				380							
Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Thr	Gly
385				390				395				400			
Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu
405				410				415							
Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg	Ser	Ser	Leu	Asn	Leu	Thr	His	Asn	Thr
420				425				430							
Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Asn	Asn	Ala	Thr	His	Leu	Ser	Asn	Met
435				440				445							
Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp
450				455				460							

Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala
465 470 475 480

Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser
485 490 495

Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile
500 505 510

Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr
515 520 525

Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu
530 535 540

Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala
545 550 555 560

Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile
565 570 575

Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys
580 585 590

Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe
595 600 605

Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile
610 615 620

Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu
625 630 635 640

Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu
645 650 655

Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val
660 665 670

Glu Asp Lys Arg Leu Cys Met Gln Pro Leu Gln Asn Leu Phe Pro Tyr
675 680 685

Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser Gly Asn Thr Lys Asp
690 695 700

Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser

705 710 715 720
 Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp Ala Ser Thr Ala Ala
 725 730 735

 Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu Leu Ala Leu Val
 740 745 750
 Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly Thr Asp Ser Leu
 755 760 765
 Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln Lys Pro Asn Leu Leu
 770 775 780
 Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His Leu Lys Asp Ser
 785 790 795 800

Asp Glu Glu Glu Asn Val
 805

<210> 2

<211> 694

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gH polypeptide

<400> 2

Arg Tyr Gly Ala Glu Ala Val Ser Glu Pro Leu Asp Lys Ala Phe His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asn Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Arg Phe Leu Arg Glu Asn
 20 25 30
 Thr Thr Gln Cys Thr Tyr Asn Asn Ser Leu Arg Asn Ser Thr Val Val
 35 40 45

 Arg Glu Asn Ala Ile Ser Phe Asn Phe Phe Gln Ser Tyr Asn Gln Tyr
 50 55 60
 Tyr Val Phe His Met Pro Arg Cys Leu Phe Ala Gly Pro Leu Ala Glu
 65 70 75 80
 Gln Phe Leu Asn Gln Val Asp Leu Thr Glu Thr Leu Glu Arg Tyr Gln
 85 90 95
 Gln Arg Leu Asn Thr Tyr Ala Leu Val Ser Lys Asp Leu Ala Ser Tyr

100	105	110	
Arg Ser Phe Ser Gln Gln Leu Lys Ala Gln Asp Ser Leu Gly Glu Gln			
115	120	125	
Pro Thr Thr Val Pro Pro Pro Ile Asp Leu Ser Ile Pro His Val Trp			
130	135	140	
Met Pro Pro Gln Thr Thr Pro His Gly Trp Thr Glu Ser His Thr Thr			
145	150	155	160
Ser Gly Leu His Arg Pro His Phe Asn Gln Thr Cys Ile Leu Phe Asp			
165	170	175	
Gly His Asp Leu Leu Phe Ser Thr Val Thr Pro Cys Leu His Gln Gly			
180	185	190	
Phe Tyr Leu Ile Asp Glu Leu Arg Tyr Val Lys Ile Thr Leu Thr Glu			
195	200	205	
Asp Phe Phe Val Val Thr Val Ser Ile Asp Asp Asp Thr Pro Met Leu			
210	215	220	
Leu Ile Phe Gly His Leu Pro Arg Val Leu Phe Lys Ala Pro Tyr Gln			
225	230	235	240
Arg Asp Asn Phe Ile Leu Arg Gln Thr Glu Lys His Glu Leu Leu Val			
245	250	255	
Leu Val Lys Lys Asp Gln Leu Asn Arg His Ser Tyr Leu Lys Asp Pro			
260	265	270	
Asp Phe Leu Asp Ala Ala Leu Asp Phe Asn Tyr Leu Asp Leu Ser Ala			
275	280	285	
Leu Leu Arg Asn Ser Phe His Arg Tyr Ala Val Asp Val Leu Lys Ser			
290	295	300	
Gly Arg Cys Gln Met Leu Asp Arg Arg Thr Val Glu Met Ala Phe Ala			
305	310	315	320
Tyr Ala Leu Ala Leu Phe Ala Ala Ala Arg Gln Glu Glu Ala Gly Ala			
325	330	335	
Gln Val Ser Val Pro Arg Ala Leu Asp Arg Gln Ala Ala Leu Leu Gln			
340	345	350	

Ile Gln Glu Phe Met Ile Thr Cys Leu Ser Gln Thr Pro Pro Arg Thr
355 360 365

Thr Leu Leu Leu Tyr Pro Thr Ala Val Asp Leu Ala Lys Arg Ala Leu
370 375 380

Trp Thr Pro Asn Gln Ile Thr Asp Ile Thr Ser Leu Val Arg Leu Val
385 390 395 400

Tyr Ile Leu Ser Lys Gln Asn Gln Gln His Leu Ile Pro Gln Trp Ala
405 410 415

Leu Arg Gln Ile Ala Asp Phe Ala Leu Lys Leu His Lys Thr His Leu
420 425 430

Ala Ser Phe Leu Ser Ala Phe Ala Arg Gln Glu Leu Tyr Leu Met Gly
435 440 445

Ser Leu Val His Ser Met Leu Val His Thr Thr Glu Arg Arg Glu Ile
450 455 460

Phe Ile Val Glu Thr Gly Leu Cys Ser Leu Ala Glu Leu Ser His Phe
465 470 475 480

Thr Gln Leu Leu Ala His Pro His His Glu Tyr Leu Ser Asp Leu Tyr
485 490 495

Thr Pro Cys Ser Ser Ser Gly Arg Arg Asp His Ser Leu Glu Arg Leu
500 505 510

Thr Arg Leu Phe Pro Asp Ala Thr Val Pro Ala Thr Val Pro Ala Ala
515 520 525

Leu Ser Ile Leu Ser Thr Met Gln Pro Ser Thr Leu Glu Thr Phe Pro
530 535 540

Asp Leu Phe Cys Leu Pro Leu Gly Glu Ser Phe Ser Ala Leu Thr Val
545 550 555 560

Ser Glu His Val Ser Tyr Val Val Thr Asn Gln Tyr Leu Ile Lys Gly
565 570 575

Ile Ser Tyr Pro Val Ser Thr Thr Val Val Gly Gln Ser Leu Ile Ile
580 585 590

Thr Gln Thr Asp Ser Gln Thr Lys Cys Glu Leu Thr Arg Asn Met His

595 600 605
 Thr Thr His Ser Ile Thr Ala Ala Leu Asn Ile Ser Leu Glu Asn Cys
 610 615 620

Ala Phe Cys Gln Ser Ala Leu Leu Glu Tyr Asp Asp Thr Gln Gly Val
 625 630 635 640
 Ile Asn Ile Met Tyr Met His Asp Ser Asp Asp Val Leu Phe Ala Leu
 645 650 655
 Asp Pro Tyr Asn Glu Val Val Val Ser Ser Pro Arg Thr His Tyr Leu
 660 665 670
 Met Leu Leu Lys Asn Gly Thr Val Leu Glu Val Thr Asp Val Val Val
 675 680 685

Asp Ala Thr Asp Ser Arg
 690

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gL polypeptide

<400> 3

Ala Ala Val Ser Val Ala Pro Thr Ala Ala Glu Lys Val Pro Ala Glu
 1 5 10 15
 Cys Pro Glu Leu Thr Arg Arg Cys Leu Leu Gly Glu Val Phe Gln Gly
 20 25 30
 Asp Lys Tyr Glu Ser Trp Leu Arg Pro Leu Val Asn Val Thr Gly Arg
 35 40 45

Asp Gly Pro Leu Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Arg Pro Val Thr Pro Glu
 50 55 60
 Ala Ala Asn Ser Val Leu Leu Asp Glu Ala Phe Leu Asp Thr Leu Ala
 65 70 75 80
 Leu Leu Tyr Asn Asn Pro Asp Gln Leu Arg Ala Leu Leu Thr Leu Leu
 85 90 95
 Ser Ser Asp Thr Ala Pro Arg Trp Met Thr Val Met Arg Gly Tyr Ser

100 105 110

Glu Cys Gly Asp Gly Ser Pro Ala Val Tyr Thr Cys Val Asp Asp Leu

115 120 125

Cys Arg Gly Tyr Asp Leu Thr Arg Leu Ser Tyr Glu Arg Ser Ile Phe

130 135 140

Thr Glu His Val Leu Gly Phe Glu Leu Val Pro Pro Ser Leu Phe Asn

145 150 155 160

Val Val Val Ala Ile Arg Asn Glu Ala Thr Arg Thr Asn Arg Ala Val

165 170 175

Arg Leu Pro Val Ser Thr Ala Ala Ala Pro Glu Gly Ile Thr Leu Phe

180 185 190

Tyr Gly Leu Tyr Asn Ala Val Lys Glu Phe Cys Leu Arg His Gln Leu

195 200 205

Asp Pro Pro Leu Leu Arg His Leu Asp Lys Tyr Tyr Ala Gly Leu Pro

210 215 220

Pro Glu Leu Lys Gln Thr Arg Val Asn Leu Pro Ala His Ser Arg Tyr

225 230 235 240

Gly Pro Gln Ala Val Asp Ala Arg

245

<210> 4

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL128 polypeptide

<400> 4

Glu Glu Cys Cys Glu Phe Ile Asn Val Asn His Pro Pro Glu Arg Cys

1 5 10 15

Tyr Asp Phe Lys Met Cys Asn Arg Phe Thr Val Ala Leu Arg Cys Pro

20 25 30

Asp Gly Glu Val Cys Tyr Ser Pro Glu Lys Thr Ala Glu Ile Arg Gly

35 40 45

Ile Val Thr Thr Met Thr His Ser Leu Thr Arg Gln Val Val His Asn
50 55 60
Lys Leu Thr Ser Cys Asn Tyr Asn Pro Leu Tyr Leu Glu Ala Asp Gly
65 70 75 80
Arg Ile Arg Cys Gly Lys Val Asn Asp Lys Ala Gln Tyr Leu Leu Gly
85 90 95
Ala Ala Gly Ser Val Pro Tyr Arg Trp Ile Asn Leu Glu Tyr Asp Lys
100 105 110

Ile Thr Arg Ile Val Gly Leu Asp Gln Tyr Leu Glu Ser Val Lys Lys
115 120 125
His Lys Arg Leu Asp Val Cys Arg Ala Lys Met Gly Tyr Met Leu Gln
130 135 140

<210> 5

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL130 polypeptide

<400> 5

Ser Pro Trp Ser Thr Leu Thr Ala Asn Gln Asn Pro Ser Pro Leu Trp
1 5 10 15
Ser Lys Leu Thr Tyr Ser Lys Pro His Asp Ala Ala Thr Phe Tyr Cys

20 25 30
Pro Phe Ile Tyr Pro Ser Pro Pro Arg Ser Pro Leu Gln Phe Ser Gly
35 40 45
Phe Gln Arg Val Leu Thr Gly Pro Glu Cys Arg Asn Glu Thr Leu Tyr
50 55 60
Leu Leu Tyr Asn Arg Glu Gly Gln Thr Leu Val Glu Arg Ser Ser Thr
65 70 75 80
Trp Val Lys Lys Val Ile Trp Tyr Leu Ser Gly Arg Asn Gln Thr Ile
85 90 95
Leu Gln Arg Met Pro Arg Thr Ala Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Val
100 105 110

Gln Ile Ser Val Glu Asp Ala Lys Ile Phe Gly Ala His Met Val Pro
115 120 125

Lys Gln Thr Lys Leu Leu Arg Phe Val Val Asn Asp Gly Thr Arg Tyr
130 135 140

Gln Met Cys Val Met Lys Leu Glu Ser Trp Ala His Val Phe Arg Asp

145 150 155 160

Tyr Ser Val Ser Phe Gln Val Arg Leu Thr Phe Thr Glu Ala Asn Asn
165 170 175

Gln Thr Tyr Thr Phe Cys Thr His Pro Asn Leu Ile Val
180 185

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UL131A polypeptide

<400> 6

Gln Cys Gln Arg Glu Thr Ala Glu Lys Asn Asp Tyr Tyr Arg Val Pro
1 5 10 15

His Tyr Trp Asp Ala Cys Ser Arg Ala Leu Pro Asp Gln Thr Arg Tyr
20 25 30

Lys Tyr Val Glu Gln Leu Val Asp Leu Thr Leu Asn Tyr His Tyr Asp
35 40 45

Ala Ser His Gly Leu Asp Asn Phe Asp Val Leu Lys Arg Ile Asn Val
50 55 60

Thr Glu Val Ser Leu Leu Ile Ser Asp Phe Arg Arg Gln Asn Arg Arg
65 70 75 80

Gly Gly Thr Asn Lys Arg Thr Thr Phe Asn Ala Ala Gly Ser Leu Ala
85 90 95

Pro His Ala Arg Ser Leu Glu Phe Ser Val Arg Leu Phe Ala Asn
100 105 110