



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0016315
(43) 공개일자 2017년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/12 (2013.01)
A61K 39/145 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7025974
(22) 출원일자(국제) 2014년07월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년09월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/045940
(87) 국제공개번호 WO 2015/147899
국제공개일자 2015년10월01일
(30) 우선권주장
61/969,905 2014년03월25일 미국(US)

(71) 출원인
더 가버먼트 오브 더 유나이티드 스테이츠 오브
아메리카 에즈 리프리젠티드 바이 더 세크리터리
오브 더 아미
미국 매릴랜드 21702-5012 프레드릭 포트 디트릭
에이치큐 유에스에이엠알엠씨 오피스 오브 더 스
태프 저지 애드버케이트
(72) 발명자
알빙, 칼, 알.
미국 20814 메릴랜드주 베테스다 글렌브룩 로드
7118
킴, 제롬, 에이치.
미국 20817 메릴랜드주 베테스다 가필드 스트리트
8622
라오, 망갈라
미국 20902 메릴랜드주 실버 스프링 하이드 로드
607
(74) 대리인
양영준, 김영

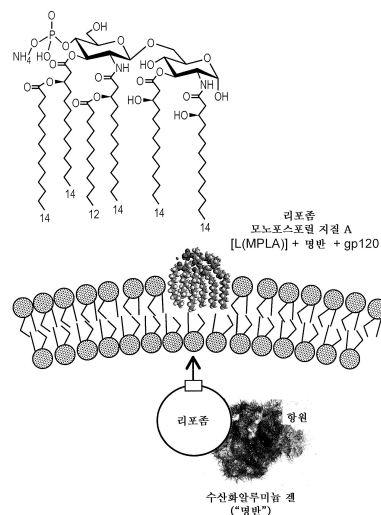
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 알루미늄 염-흡착 백신의 면역자극 효력의 증진 방법

(57) 요약

(1) 알루미늄 염-흡착 면역원과 모노포스포릴 지질 A(MPLA)-함유 리포좀(L(MPLA))의 혼합 방법, 및 (2) 얻어진 면역원성 조성물이 본원에 제공된다. 얻어진 면역원성 조성물은 L(MPLA)와 혼합된 비캡슐화된 면역원을 포함하는 조성물 또는 알루미늄 염-흡착 면역원 단독 중 어느 하나와 비교하여 증진된 면역자극 효력을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 2039/55505 (2013.01)

A61K 2039/55555 (2013.01)

A61K 2039/55572 (2013.01)

C12N 2740/16034 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

알루미늄 염-흡착 면역원과 모노포스포릴 지질 A(MPLA)-함유 리포좀(L(MPLA))을 혼합하여 액체 상의 면역원성 조성물을 얻는 단계를 포함하며, 알루미늄 염-흡착 면역원이 알루미늄 염에 의해 흡착된 면역원을 포함하는, 면역원성 조성물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 혼합 시에, 약 4 °C 내지 약 37 °C 범위의 온도에서 약 30 분 내지 약 24 시간 동안 알루미늄 염-흡착 면역원 및 L(MPLA)를 인큐베이션하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, L(MPLA)가 동결건조된 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, L(MPLA)가 약 50 mM 내지 약 150 mM의 인지질을 포함하며, 면역원성 조성물 내의 알루미늄 및 MPLA 간의 건조 중량비가 약 1:110 내지 약 85:3의 범위인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원 내의 알루미늄 및 면역원 간의 건조 중량비가 약 1:30 내지 약 85:1의 범위인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염이 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 황산칼륨알루미늄, 또는 이들의 임의의 조합인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원이 *헤모필러스 인플루엔자* b형, A형 간염, B형 간염, 인간 파필로마바이러스, 유행성 인플루엔자, 일본 뇌염, 수막구균, 폐렴구균, 광견병, 파상풍 독소, 디프테리아, 파상풍, 백일해, 소아마비, 라임병, 탄저병, 장티푸스, 또는 이들의 조합에 대한 알루미늄 염-흡착 백신인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원이 알루미늄 염-흡착 HIV-1 단백질 gp120을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염이 수산화알루미늄인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원 단독과 비교하여 면역원성 조성물이 증진된 면역자극 효력을 갖는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, L(MPLA)와 혼합된 비캡슐화된 면역원과 비교하여 면역원성 조성물

이 증진된 면역자극 효력을 갖는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되는 면역원성 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 생리학적으로 허용가능한 운반체를 더 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원이 수산화알루미늄-흡착 HIV-1 단백질 gp120이며, 단일 용량의 면역원성 조성물이:

약 10 μg 내지 약 600 μg 의 gp120 단백질;

약 20 μg 내지 약 850 μg 의 알루미늄; 및

약 50 mM 내지 약 150 mM의 인지질을 포함하는 약 30 μg 내지 약 2.2 mg의 L(MPLA)를 더 포함하는, 면역원성 조성물.

청구항 15

L(MPLA)를 알루미늄 염-흡착 면역원에 혼합하여 액체 상의 면역원성 조성물을 얻는 단계를 포함하며, 알루미늄 염-흡착 면역원이 알루미늄 염에 의해 흡착된 면역원을 포함하는, 알루미늄 염-흡착 면역원의 면역자극 효력의 증진 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 혼합 시에, 약 4 $^{\circ}\text{C}$ 내지 약 37 $^{\circ}\text{C}$ 범위의 온도에서 약 30 분 내지 약 24 시간 동안 알루미늄 염-흡착 면역원 및 L(MPLA)를 인큐베이션하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, L(MPLA)가 동결건조된 것인 방법.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, L(MPLA)가 약 50 mM 내지 약 150 mM의 인지질을 포함하고, 면역원성 조성물 내의 알루미늄 및 MPLA 간의 건조 중량비가 약 1:110 내지 약 85:3의 범위인 방법.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원 내의 알루미늄 및 면역원 간의 건조 중량비가 약 1:30 내지 약 85:1의 범위인 방법.

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염이 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 황산칼륨알루미늄, 또는 이들의 임의의 조합인 방법.

청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원이 헤모필러스 인플루엔자 b형, A형 간염, B형 간염, 인간 파필로마바이러스, 유행성 인플루엔자, 일본 뇌염, 수막구균, 폐렴구균, 광견병, 파상풍 독소, 디프테리아, 파상풍, 백일해, 소아마비, 라임병, 탄저병, 장티푸스, 또는 이들의 조합에 대한 알루미늄 염-흡착 백신인 방법.

청구항 22

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염-흡착 면역원이 알루미늄 염-흡착 HIV-1 단백질 gp120

을 포함하는 방법.

청구항 23

제15항 내지 제20항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 알루미늄 염이 수산화알루미늄인 방법.

청구항 24

알루미늄 염-흡착 면역원의 면역자극 효력을 증진시키기 위한 L(MPLA) 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] <관련 출원에 대한 상호 참조>

[0002] 본 출원은 2014년 3월 25일에 출원된 미국 가출원 제61/969,905호의 이익을 주장한다.

[0003] <미국 정부의 권리>

[0004] 본 발명은 정부 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 갖는다.

[0005] <기술분야>

[0006] 알루미늄 염-흡착 면역원과 모노포스포릴 지질 A(MPLA)를 포함하는 리포솜을 혼합함으로써 알루미늄 염-흡착 면역원의 면역자극 효력을 증진시키는 방법 및 그의 얻어진 조성물이 본원에 기술된다.

배경 기술

[0007] 많은 현대적인 백신의 최적의 유익한 효과는 주사 후 전신적 안전성 및 최소한의 부반응을 유지하면서 면역 반응을 증진시키는 백신 아주반트의 사용을 요구한다. 임상적으로 승인된 가장 흔한 형태의 아주반트는 거의 90년 전에 최초로 시험된 알루미늄 염이다. 알루미늄 염은 현재 많은 백신에서, 예를 들어 자궁경부암(HPV), 간염, 소아마비, 파상풍, 디프테리아, 및 계절 독감에 대한 백신에 사용되고 있다. 예를 들어, 문헌 [Baylor et al., 2002, Vaccine 20: S18-S23]; 또한 문헌 [Kristensen, 2012 Summary of Stability data for licensed vaccines] (인터넷: http://www.path.org/publications/files/TS_vaccine_stability_table.pdf)을 참조한다. 비록 이들의 정확한 작용 기전은 완전히 이해되지 않았지만, 이들 아주반트는 수 십 년 동안 허가된 인간 백신에 널리 사용되어 왔다. 이들은 안전성에 대한 오랜 기록을 가지고 있으며 인간에게 수 십억 용량으로 투여되어 왔다 (상기 동일 문헌).

[0008] 그럼에도 불구하고, 알루미늄 염의 아주반트 효과는, 예를 들어, 이들은 효과적 내지 저조하게 효과적이거나 비-효과적인 것에 걸쳐 다양하다. 예를 들어, 문헌 [Aprile et al., 1966, Can. J. Public Health 57: 343-60]을 참조한다.

발명의 내용

[0009] 따라서, 보다 강력한 백신 제형물 개발의 필요성이 업계에 남아있다. 이를 위해, 새로운 아주반트를 확인하고 특징화할 필요가 있을 수 있다. 대안적으로, 이러한 목적은 이미 존재하는 알루미늄 염-흡착 백신의 면역자극 효력을 증진시킴으로써 달성될 수 있다. 모노포스포릴 지질 A(MPLA)-함유 리포솜(L(MPLA)) 조성물과 알루미늄 염-흡착 면역원을 혼합하여 증진된 면역자극 효력을 갖는 조성물을 얻음으로써 알루미늄 염-흡착 면역원의 면역자극 효력의 증진 방법이 본원에 제공된다. 또한 이러한 방법으로 제조된 조성물이 기술된다. 예를 들어, 증진된 면역반응, 예를 들어, 면역화된 대상체에서 증가된 항체 생산을 나타내는, L(MPLA)와 혼합된 수산화알루미늄 겔-흡착 gp120 단백질을 포함하는 HIV 백신 조성물이 본원에 제공된다.

[0010] 따라서, 알루미늄 염-흡착 면역원과 모노포스포릴 지질 A(MPLA)-함유 리포솜(L(MPLA))을 혼합하여 액체 상의 면역원성 조성물을 얻는 단계를 포함하고, 알루미늄 염-흡착 면역원이 알루미늄 염에 의해 흡착된 면역원을 포함하는, 면역원성 조성물의 제조 방법이 제공된다. 본 방법은 혼합 시에, 약 4 °C 내지 약 37 °C 범위의 온도에서 약 30 분 내지 약 24 시간, 또는 바람직하게는 약 1 시간 내지 약 12 시간 동안 알루미늄 염-흡착 면역원 및 L(MPLA)를 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [0011] 본 방법은 알루미늄 염-흡착 면역원 단독과 비교하여 증진된 면역자극 효력을 갖는 면역원성 조성물을 가져올 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 본 방법은 L(MPLA)와 혼합된 비캡슐화된 면역원과 비교하여 증진된 면역자극 효력을 갖는 면역원성 조성물을 가져올 수 있다.
- [0012] 한 측면에서, L(MPLA)는 동결건조된 것일 수 있다. L(MPLA)는 약 50 mM 내지 약 150 mM의 인지질을 포함하며, 면역원성 조성물 내의 알루미늄 및 MPLA 간의 건조 중량비는 약 1:110 내지 약 85:3의 범위일 수 있다. 알루미늄 염-흡착 면역원 내의 알루미늄 및 면역원 간의 건조 중량비는 약 1:30 내지 약 85:1의 범위일 수 있다.
- [0013] 또 다른 측면에서, 알루미늄염은 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 황산칼륨알루미늄, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 알루미늄 염-흡착 면역원은 *헤모필러스 인플루엔자*(*Haemophilus influenza*) b형, A형 간염, B형 간염, 인간 파필로마바이러스, 유행성 인플루엔자, 일본 뇌염, 수막구균(*meningococcus*), 폐렴구균(*pneumococcus*), 광견병, 과상풍 독소, 디프테리아, 과상풍, 백일해, 소아마비, 라임병, 탄저병, 장티푸스, 또는 이들의 조합에 대한 알루미늄 염-흡착 백신일 수 있다.
- [0014] 추가적인 측면에서, 알루미늄 염-흡착 면역원은 알루미늄 염-흡착 HIV-1 단백질 gp120을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 알루미늄 염-흡착 HIV-1 단백질 gp120의 알루미늄 염은 수산화알루미늄이다.
- [0015] 알루미늄 염-흡착 면역원과 모노포스포릴 지질 A(MPLA)-함유 리포솜(L(MPLA))을 혼합함으로써 제조된 면역원성 조성물이 또한 제공된다. 면역원성 조성물은 생리학적으로 허용가능한 운반체를 더 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 알루미늄 염-흡착 면역원으로서 수산화알루미늄-흡착 HIV-1 단백질 gp120을 포함할 수 있으며, 단일 용량의 면역원성 조성물은: (1) 약 10 μ g 내지 약 600 μ g의 gp120 단백질; (2) 약 20 μ g 내지 약 850 μ g의 알루미늄; 및 (3) 약 50 mM 내지 약 150 mM의 인지질을 포함하는 약 30 μ g 내지 약 2.2 mg의 L(MPLA)를 더 포함할 수 있다.
- [0016] L(MPLA)를 알루미늄 염-흡착 면역원에 혼합하여 액체 상의 면역원성 조성물을 얻는 단계를 포함하며, 알루미늄 염-흡착 면역원이 알루미늄 염에 의해 흡착된 면역원을 포함하는, 알루미늄 염-흡착 면역원의 면역자극 효력의 증진 방법이 또한 제공된다. 본 방법은 혼합 시에, 약 4 $^{\circ}$ C 내지 약 37 $^{\circ}$ C 범위의 온도에서 약 30 분 내지 약 24 시간, 또는 바람직하게는 약 1 시간 내지 약 12 시간 동안 알루미늄 염-흡착 면역원 및 L(MPLA)를 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0017] 한 측면에서, L(MPLA)는 동결건조된 것일 수 있다. L(MPLA)는 약 50 mM 내지 약 150 mM의 인지질을 포함할 수 있으며, 면역원성 조성물 내의 알루미늄 및 MPLA 간의 건조 중량비는 약 1:110 내지 약 85:3의 범위일 수 있다. 알루미늄 염-흡착 면역원 내의 알루미늄 및 면역원 간의 건조 중량비는 약 1:30 내지 약 85:1의 범위일 수 있다.
- [0018] 또 다른 측면에서, 알루미늄 염은 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 황산칼륨알루미늄, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 알루미늄 염-흡착 면역원은 *헤모필러스 인플루엔자* b형, A형 간염, B형 간염, 인간 파필로마바이러스, 유행성 인플루엔자, 일본 뇌염, 수막구균, 폐렴구균, 광견병, 과상풍 독소, 디프테리아, 과상풍, 백일해, 소아마비, 라임병, 탄저병, 장티푸스, 또는 이들의 조합에 대한 알루미늄 염-흡착 백신일 수 있다.
- [0019] 추가적인 측면에서, 알루미늄 염-흡착 면역원은 알루미늄 염-흡착 HIV-1 단백질 gp120을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 알루미늄 염-흡착 HIV-1 단백질 gp120의 알루미늄 염은 수산화알루미늄이다.
- [0020] 알루미늄 염-흡착 면역원의 면역자극 효력을 증진시키기 위한 L(MPLA) 조성물의 용도가 또한 제공된다.
- [0021] [도면의 간단한 설명]
- [0022] 수반된 도면은 명세서에 포함되며 다양한 실시양태의 비-제한적인 예를 제공한다.
- [0023] 도 1은 실시예 1에 기술된 바와 같이 에이즈박스(AIDSVAX)[®] (HIV-1 gp120을 포함하는 실험적 HIV 백신)와 L(MPLA)를 혼합함으로써 생산한 얻어진 복합체를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 1. 정의
- [0025] "면역원"은 체액성 및/또는 세포-매개 면역 반응을 유도할 수 있는 물질이다. 본원에 기술된 바와 같이, 면역원은 항원 또는 불활성화된 병원균일 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 면역원성 조성물은 예를 들어, 백신 제형물일 수 있다.

- [0026] 아주반트에 사용되는 "알루미늄 염"은 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 황산칼륨알루미늄 (명반), 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 백신 분야에서, 모든 알루미늄 염 아주반트는, 정확한 화학적 조성과 관계없이, 비공식적으로 흔히 "명반"으로 지칭한다.
- [0027] 본원에 사용되는 "리포좀"은 포획된 수성 용적을 함유하는 폐쇄된 이중층 막을 지칭한다. 리포좀은 또한 단일 막 이중층을 보유한 단일라멜라 소포 또는 각각 수성 층에 의해 인접한 것과 분리된 다중 막 이중층을 가진 다중라멜라 소포일 수 있다. 얻어진 막 이중층의 구조는, 친수성 (극성) 머리가 수성 상을 향하는 반면, 지질의 소수성 (비-극성) 꼬리는 이중층의 중심을 향하게 되어있다. 리포좀은, 이들이 보통 사용되는 바와 같이, 스멕틱(smectic) 중간상으로 구성되며, 인지질 또는 비인지질 스멕틱 중간상 중 어느 하나로 구성될 수 있다. 스멕틱 중간상은 문헌 [Small, HANDBOOK OF LIPID RESEARCH, Vol. 4, Plenum, NY, 1986, pp. 49-50]에 가장 자세하게 기술되어 있다. 스몰(Small)에 따르면, "주어진 분자를 가열하면, 등방성 액체로 직접적으로 녹는 대신, 이것은 일부 방향에서의 질서가 남아있지만 다른 것에 대해서는 질서를 결여한 것을 특징으로 하는, 중간상 또는 액체 결정으로 불리는 중간 상태를 대신 통과할 수 있다 ... 일반적으로, 액체 결정의 분자는 넓다기 보다는 다소 길며 극성 또는 방향족 부분을 분자의 길이를 따라 갖는다. 분자 형태 및 극성-극성, 또는 방향족성, 상호작용은 부분적으로 정렬된 배열로 분자가 배열되도록 허용하며 ... 이들 구조는 한 쪽 말단에 극성 기를 보유하는 분자에서 특징적으로 발생한다. 분자의 장축(long axis) 방향으로 장거리 질서(long-range order)를 갖는 액체 결정을 스멕틱, 층상, 또는 라멜라 액체 결정이라고 한다 ... 스멕틱 상태에서, 분자는 단일 또는 이중층일 수 있고, 층의 면에 대해 수직 또는 기울어 있을 수 있으며, 냉동 또는 용융된 지방족 사슬을 가질 수 있다".
- [0028] 지질 A는 복잡하고, 매우 아실화 및 아미드화된 디글루코사민 디포스페이트 분자의 세트이며 그람-음성 박테리아의 모든 지질다당류 (LPS; 내독소로도 알려짐)에 흔한 지질 모이어티(moiety)이다. LPS는 모든 그람-음성 박테리아의 외부 표면 전체를 거의 덮으며, 지질 A는 LPS를 박테리아의 외부 지질 표면 안에 고정시킨다. 야생형 평활 박테리아(smooth bacteria)에서 LPS의 O-다당류 부분은 거친(rough) 돌연변이체에서 발견되는 상대적으로 보존된 중심 올리고당류에 결합하며, 결과적으로 이것은 박테리아 생존에 요구되고 LPS에서만 발견되는 독특한 화학 구조인, 매우 보존된 2-케토-3-데옥시옥탄산 당을 통해 지질 A에 연결된다. 예를 들어, 문헌 [Alving et al., 2012, Expert Rev. Vaccines 11:733-44]을 참조한다. "모노포스포릴 지질 A"는 극성 머리 기의 글루코사민-1-포스페이트 기가 제거된 지질 A 동류물(congener)이다. 많은 MPLA의 동류물이 또한 존재한다.
- [0029] 본원에 사용된 "생리학적으로 허용가능한 운반체"는 생체 내(in vivo) 투여 (예를 들어, 경구, 경피 또는 비경구적 투여) 또는 시험관 내(in vitro) 사용, 즉, 세포 배양에 적절한 운반체를 지칭한다. 예시적인 생리학적으로 허용가능한 운반체는 미국 특허 번호 제4,186,183호 및 제4,302,459호에 개시된 바와 같은 리포좀의 생리학적으로 허용가능한 구성성분일 수 있다.
- [0030] 본원에 사용된 용어 "약"은 참조된 값의 $\pm 15\%$ 를 지칭한다.
- [0031] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업계의 통상의 기술자에게 흔히 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 사용된, 단수형 "한", "몇", 및 "그" ("a", "and", 및 "the")는 문맥이 명확히 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "항체"에 대한 참조는 복수의 이러한 항체들을 포함하며 "용량"에 대한 참조는 하나 이상의 용량 및 당업자에게 알려진 이들의 균등물 등에 대한 지칭을 포함한다.
- [0032] 본원에 사용된 "바람직한" 및 "바람직하게는"은 유럽 청구항 구조의 목적으로만 해석될 것이다. 이 용어는 이들이 미국 청구항 구조의 목적을 위해 나타나는 문장 및 단락의 구조로부터 생략되거나 배제되어야 한다.
- [0033] **2. 알루미늄 염-흡착 백신**
- [0034] 아주반트에 사용되는 알루미늄 염은 인산알루미늄, 수산화알루미늄, 황산칼륨알루미늄 (명반), 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 알루미늄 염-흡착 백신의 예시적인 목록이 아래에 나타난다:
- [0035] DTaP (디프테리아, 파상풍, 및 백일해 백신용)
- [0036] DTP (디프테리아, 파상풍, 및 백일해 백신용)
- [0037] Hib 접합 (해모필러스 인플루엔자 b형, Hib)
- [0038] 뉴모(Pneumo) 접합 (폐렴구균 백신)
- [0039] DTP-Hib (디프테리아 및 해모필러스 인플루엔자 b형에 대한 조합 백신)

- [0040] Hep B-Hib (B형 간염 / 헤모필러스 인플루엔자 B형에 대한 조합 백신)
- [0041] Hep B (Hep B는 B형 간염의 약자이다)
- [0042] DT 흡착 (디프테리아 및 파상풍 독소 흡착)
- [0043] T, 흡착 (파상풍용)
- [0044] Td, 흡착 (Td는 파상풍 및 디프테리아의 약자이다)
- [0045] Hep A (A형 간염용)
- [0046] 라임
- [0047] 탄저병
- [0048] 광견병
- [0049] 문헌 [Baylor et al., 2002, Vaccine 20: S18-S23]을 참조한다. 보다 확장된 목록은 문헌 [Kristensen, 2012, Summary of Stability data for licensed vaccines] (인터넷: [hypertext transfer protocol://www.path.org/publications/files/TS_vaccine_stability_table.pdf](http://www.path.org/publications/files/TS_vaccine_stability_table.pdf))에서 제공된다.
- [0050] 146 개 이상의 허가된 백신이 현재 단일 또는 다수의 병원균에 대해 존재하며 현재 알루미늄 염으로 보강 (adjuvanted)되고 있다. 예시적인 백신은 헤모필러스 인플루엔자 b형, A형 간염, B형 간염, 인간 파필로마바이러스, 유행성 인플루엔자, 일본 뇌염, 수막구균, 폐렴구균, 광견병, 파상풍 독소, 디프테리아, 파상풍, 백일해, 소아마비, 라임병, 탄저병, 장티푸스, 및 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 알루미늄 염-흡착 백신은 수성 현탁액으로서 제공된다.
- [0051] 백신 중 알루미늄 염 아주반트의 실제량은 다수의 요인, 예를 들어, 면역화될 대상체 (동물 대 인간, 성인 대 어린이) 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 면역원성 용량은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 미국에서 허가 받은 백신에서, 알루미늄의 양은 약 0.125 내지 0.85 mg/용량 범위이다. 문헌 [Baylor et al., 2002, Vaccine 20: S18-S23]을 참조한다. 인간 백신접종을 위해서, 알루미늄 양의 바람직한 범위는 백신 용량 당 약 20 µg 내지 약 850 µg에 걸칠 수 있다. 면역원, 가장 흔한 단백질 항원의 양은 백신 용량 당 약 1 µg 내지 약 1 mg, 또는 바람직하게는 백신 용량 당 약 10 µg 내지 약 600 µg 범위일 수 있다.
- [0052] 전형적으로, 알루미늄 염-흡착 백신에 의한 면역 반응은 특정 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체의 존재에 의해 검출될 수 있다. 항체 검출 방법은 당업자에게 알려져 있으며 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA), 효소-결합 면역점(ELISPOT) 분석법, 웨스턴 블롯 분석법, 및 경쟁 분석법과 같은 분석법을 포함한다.
- [0053] **3. 모노포스포릴 지질 A(MPLA)-함유 리포좀(L(MPLA))**
- [0054] 리포좀은 포집된 수성 용적을 함유하는 폐쇄된 이중층 막이다. 리포좀은 또한 단일 막 이중층을 보유한 단일라멜라 소포 또는 각각 수성 층에 의해 인접한 것과 분리된 다중 막 이중층을 가진 다중라멜라 소포일 수 있다. 얻어진 막 이중층의 구조는, 친수성 (극성) 머리가 수성 상을 향하는 반면, 지질의 소수성 (비-극성) 꼬리는 이중층의 중심을 향하게 되어있다. 리포좀을 감싸는 데에 적절한 친수성 중합체는, 제한 없이, PEG, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐메틸에테르, 폴리메틸옥사졸린, 폴리에틸옥사졸린, 폴리히드록시프로필옥사졸린, 폴리히드록시프로필메타크릴아미드, 폴리메타크릴아미드, 폴리디메틸아크릴아미드, 폴리히드록시프로필메타크릴레이트, 폴리히드록시에틸아크릴레이트, 히드록시메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 폴리에틸렌글리콜, 폴리아스파르트아미드 및 미국 특허 번호 제6,316,024호; 제6,126,966호; 제6,056,973호; 및 제6,043,094호에 기술된 바와 같은 친수성 펩티드 서열을 포함한다. 리포좀은 친수성 중합체 없이 만들어질 수 있다. 따라서, 리포좀 제형물은 친수성 중합체를 함유할 수 있거나 함유하지 않을 수 있다.
- [0055] 리포좀은 당업계에 알려진 임의의 지질 또는 지질 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 소포-형성 지질은 미국 특허 번호 제6,056,973호 및 제5,874,104호에 개시된 바와 같이, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티드산, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜이노시톨, 및 스핑고미엘린과 같은 인지질을 포함하는, 천연-발생 또는 합성 지질일 수 있다.
- [0056] 소포-형성 지질은 미국 특허 번호 제6,056,973호에 개시된 바와 같이, 당지질, 세레브로시드, 또는 양이온성 지질, 예컨대 1,2-디올레일옥시-3-(트리메틸아미노)프로판(DOTAP); N-[1-(2,3,-디테트라데실옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-히드록시에틸암모늄 브로마이드(DMRIE); N-[1[(2,3,-디올레일옥시)프로필]-N,N-디메틸-N-히드록시 에틸

암모늄(DORIE); N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA); 3 [N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일] 콜레스테롤(DCChol); 또는 디메틸디옥타데실암모늄(DDAB)을 또한 포함할 수 있다. 콜레스테롤은 미국 특허 번호 제5,916,588호 및 제5,874,104호에 개시된 바와 같이, 리포솜 소포에 안정성을 부여하도록 적절한 범위로 또한 존재할 수 있다. 추가적인 리포솜 기술이 미국 특허 번호 제6,759,057호; 제6,406,713호; 제6,352,716호; 제6,316,024호; 제6,294,191호; 제6,126,966호; 제6,056,973호; 제6,043,094호; 제5,965,156호; 제5,916,588호; 제5,874,104호; 제5,215,680호; 및 제4,684,479호에 기술되어 있다. 이들은 리포솜 및 지질-코팅된 마이크로버블(microbubble), 및 이들의 제조 방법을 기술한다. 따라서, 당업자는 본 개시내용 및 이들 다른 특허의 개시내용 모두를 고려하여 본 실시양태의 목적을 위한 리포솜을 제조할 수 있다. 본 실시양태를 위해서, 리포솜은 바람직하게는 50 내지 150 mM의 인지질을 함유한다.

[0057] 임의의 상기 예시적인 리포솜은 모노포스포릴 지질 A(MPLA)를 포함할 수 있거나, 다른 리포솜 및 지질 A(MPLA)와 합쳐질 수 있다. MPLA 단독은 인간 및 동물에 독성일 수 있다. 그러나, 리포솜 안에 존재할 경우, 독성은 검출되지 않는다. 예를 들어 문헌 [Alving et al., 2012, Expert Rev. Vaccines 11: 733-744]을 참조한다. 본원에 기술된 바와 같이 MPLA를 갖는 리포솜의 예시적인 제조 방법은 적어도 문헌 [Alving et al., 2012, Expert Rev. Vaccines 11: 733-744]에 교시되어 있다. MPLA는 강력한 아조반트로 작용하며 리포솜 및 리포솜과 연관된 펩티드, 단백질, 또는 합텐(hapten)의 면역원성을 올리도록 작용한다. 본원의 실시양태를 위하여, MPLA의 양은 백신의 용량 당 바람직하게는 약 30 µg 내지 약 2.2 mg 범위일 수 있다.

[0058] <실시예>

[0059] 특정 대표적인 실시양태 및 본 개시내용의 측면을 설명하고 더 예시하기 위해 다음의 실시예가 제공되며 본 명세서 또는 청구항의 범위를 제한하는 것으로 해석되어선 안 된다.

[0060] <재료 및 방법>

[0061] 면역화

[0062] 에이즈박스® (미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재, 박스젠(VaxGen))은 문헌 [Adis International Ltd., 2003, Drugs R.D. 4: 249-53]에 기술된 바와 같이, HIV 표면 당단백질 gp120을 포함하는 실험적 HIV 백신이다. L(MPLA)는 문헌 [Wassef et al., 1994, ImmunoMethods 4: 217-22]에 기술된 바와 같이 제조하였다.

[0063] 에이즈박스® B/E는 수산화알루미늄에 흡착된 클레이드 B 및 E HIV gp120 단백질의 혼합물 (미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재, GSID)을 포함한다. 변화하는 양의 에이즈박스® B/E를 L(MPLA)의 동결건조된 바이알에 첨가하였으며, 혼합물을 4 °C에서 1 시간 동안 또는 4 °C에서 밤새 놓아두었다. 육안으로 관찰할 때 동결건조된 재료의 찌꺼기가 남지 않음을 보장하도록 각 바이알을 선회(swirl)시켰다. 시험 제품 (50 µl/생쥐)을 근육내로 바늘 및 시린지로 아래 표 1에 나타난 것과 같이 9 개 군의 암컷 BALB/c 생쥐 (군 당 6 마리)에 주사하였다.

[0064] <표 1>: 면역화 설계

군	에이즈박스® B/E 양 μg/용량/50 μl	AI 양 μg/용량/50 μl	L(MPLA) 양 μg/용량/50 μl	혼합 및 면역화 방법
1	30	30	0	n/a (적용불가능)
2	30	30	9.25	동결건조된 L(MPLA) 바이알에 에이즈박스® B/E의 첨가 후 12 hr 뒤 주사
3	30	30	9.25	동결건조된 L(MPLA) 바이알에 에이즈박스® B/E의 첨가 후 24 내지 26 hr 뒤 주사
4	10	10	0	n/a (적용불가능)
5	1	1	0	n/a (적용불가능)
6	0.1	0.1	0	n/a (적용불가능)
7	10	10	9.25	동결건조된 L(MPLA) 바이알에 에이즈박스® B/E의 첨가 후 24 내지 26 hr 뒤 주사
8	1	1	9.25	동결건조된 L(MPLA) 바이알에 에이즈박스® B/E의 첨가 후 24 내지 26 hr 뒤 주사
9	0.1	0.1	9.25	동결건조된 L(MPLA) 바이알에 에이즈박스® B/E의 첨가 후 24 내지 26 hr 뒤 주사

[0065]

[0066]

gp120 단백질 및 알루미늄 염의 양은, 표 1에 표현된 바와 같이, 건조 중량을 지칭한다. 얻어진 혼합물은 액체 상이며, 동결건조된 L(MPLA)는, 알루미늄 염-흡착 gp120이 수성 현탁액으로 제공된다는 것을 고려하면, 자발적으로 수화된다.

[0067]

생쥐를 근육내 경로를 통해 0, 3, 6 주차에 면역화하였으며, 0, 2, 4, 6, 8, 및 10 주차에 채혈하였다. 개별 혈청 샘플을 지시된 시간 지점에서 ELISA에 의해 A244 gp120 및 MN gp120 단백질 (에이즈박스® B/E에 존재하는 단백질)에 대한 IgG 결합 항체에 대해 시험하였다.

[0068]

백신접종 후 ELISA에 의한 항체 반응의 검출

[0069]

96 웰 U자형-바닥(U-bottom) ELISA 플레이트를 문헌 [Karasavvas et al., 2012, AIDS Res. Hum. Retroviruses 28: 1444-57]에 기술된 바와 같이, 감염성 질병에 대한 글로벌 솔루션즈 (미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재)에서 제공한 100 μl/웰의 정제된 A244 또는 MN 단백질로 4 °C에서 밤새 코팅하였다. 단백질을 제거하였으며 각 웰을 250 μl의 블로킹 완충액 (0.5 % 카제인 및 0.5 % 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는, pH 7.4의 인산 완충 염수(PBS))로 4 °C에서 밤새 블로킹하였다. 플레이트를 0.1 % 트윈(Tween)-20을 함유하는 pH 7.4의 PBS(PBS-T)로 두 번 세척하였으며, 100 μl의 혈청 (1:200 희석)을 웰에 3중 첨가하고 이후 블로킹 완충액에서 두 배로 순차적으로 희석하였다. 플레이트를 2 시간 동안 실온에서 인큐베이션 하였으며 PBS-T로 네 번 세척하였다. 플레이트를 세척하고 블로킹 완충액에 1:1000으로 희석된 100 μl의 호스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제-접합된 양 항-생쥐 IgG (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재, 바인딩사이트(BindingSite))를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 1 시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 세척하였으며, 100 μl의 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 기질 (미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재, KPL)을 각 웰에 첨가하였다. 이후 플레이트를 1 시간 동안 어둠 속에서 실온에서 인큐베이션하였다. 흡광도는 ELISA 플레이트 판독기에서 405 nm로 판독하였다.

[0070]

실시에 1 - 수산화알루미늄-흡착 HIV-1 gp120 (에이즈박스® B/E)에 L(MPLA)의 첨가가 증가된 항체 역가 (antibody titer)를 가져왔다

[0071]

아주반트 분야는 여러 아주반트 후보를 발달시켜왔으며, 이들 중 가장 효과적인 것은 하나 초과와 아주반트 또는 담체 분자를 포함하는 아주반트 제형물로서 부여된다. 후천성 면역결핍증(AIDS) 백신 평가 그룹 연구 015(AVEG015)에서, 7 가지의 아주반트("명반"으로 확인되는 수산화알루미늄을 포함함)를 안전성 및 HIV-1 외피

단백질 gp120에 대한 인간의 면역 반응을 유도하는 능력에 대해 비교하였다. 문헌 [McElrath, 1995, Semin. Cancer Biol. 6: 375-85]. AVEG015 도중 맥엘라스(McElrath)는 캡슐화된 gp120 및 모노포스포릴 지질 A를 함유하는 명반-흡착 리포솜이 명반-흡착 gp120을 능가하고 gp120에 대한 면역 반응 유도에 있어 다른 각 아주반트 만큼, 또는 더 잘 수행하며, 이들 동일한 명반-흡착 리포솜이 낮은 수준의 명반-흡착 gp120 단독과 동등한 낮은 수준의 국부적 및 전신적 독성을 나타낸다는 것을 관찰했다.

[0072] 맥엘라스의 결과를 고려하여, 명반-흡착 gp120과 MPLA를 함유하는 리포솜을 직접적으로 혼합하는 것의 효과를 평가하기 위해 다음의 실험을 수행하였으며, 즉, 맥엘라스에서 기술된 것과 달리 gp120은 리포솜 내에 캡슐화되지 않았다 (도 1). 이를 위하여, 6 내지 8 주령의 암컷 BALB/c 생쥐를 표 1에 설명된 바와 같이 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 면역화하였다. 혈액 샘플을 각 생쥐에 대해 0, 2, 4, 6, 8, 및 10 주차에 채취하였다. ELISA를 상기 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 혈청 중의 항체의 역가를 결정하기 위해 수행하였다. 각 군의 각 시간 지점에서의 산술 평균 및 평균의 표준 오차(SEM)를 계산하였으며, 그 데이터는 아래 표 2에 집계되어 있다.

[0073] <표 2>: 집계된 항체 역가

군	1차 면역화 후 2 주		2차 면역화 후 1 주		2차 면역화 후 3주		3차 면역화 후 2 주		3차 면역화 후 4 주	
	A244	MN	A244	MN	A244	MN	A244	MN	A244	MN
1	833	1,467	34,133	115,200	20,267	68,267	78,933	955,733	119,467	750,933
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	182	382	7,867	30,826	3,473	27,782	27,733	136,533	28,558	195,486
2	2,267	4,267	68,267	136,533	59,733	115,200	315,733	887,467	256,000	887,467
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	434	675	10,794	21,588	8,533	59,764	110,933	164,408	51,200	164,408
3	2,800	4,533	59,733	71,680	64,000	59,733	163,840	1,058,133	187,733	614,400
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	820	868	8,533	12,541	12,800	29,313	25,083	271,784	48,871	91,589
4	480	750	16,533	34,880	12,267	9,067	42,667	290,133	46,933	375,467
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	136	309	7,681	19,015	4,538	1,736	5,397	116,504	4,267	107,939
5	ND	ND	3,633	2,467	3,867	3,333	14,933	104,533	19,200	113,067
			±	±	±	±	±	±	±	±
			1,900	1,266	2,004	1,982	3,570	33,771	2,862	32,113
6	200	800	200	ND	867	267	1,840	9,067	4,467	11,233
	±	±	±	ND	±	±	±	±	±	±
	0	0	0		405	123	588	2,397	1,883	3,652
7	2,200	3,067	59,733	145,100	55,467	98,133	N/A	324,267	N/A	324,267
	±	±	±	±	±	±		±		±
	482	784	8,533	58,282	10,275	33,972		107,126		55,565
8	467	1,100	41,600	55,467	10,933	20,267	N/A	256,000	N/A	375,467
	±	±	±	±	±	±		±		±
	111	300	14,382	10,275	3,417	3,473		51,200		97,742
9	800	200	1,800	960	10,680	17,933	N/A	27,733	N/A	38,400
	±	±	±	±	±	±		±		±
	0	0	503	299	10,133	16,901		7,692		8,095

N/A: 입수 불가능 ; ND: ELISA로 검출 불가능

[0074]

[0075] 표 2의 결과에 따르면, 에이즈박스® B/E에 L(MPLA)을 첨가하는 것은 A244 및 MN에 특이적인 IgG 항체의 급격한 증가를 가져왔다. 이 수 배의 증가는 면역화 후 주 수 및 면역화 동안 사용된 항원의 양에 따라 2.7 내지 12 배 증가로 변화한다. L(MPLA)를 함유하는 1 µg의 에이즈박스® B/E로 생쥐를 면역화하는 것은 L(MPLA)를 결여한 10 µg의 에이즈박스® B/E로 생쥐를 면역화한 뒤 유도된 항체 반응과 동등한 항체 반응을 유도하였다. 따라서, L(MPLA)가 또한 존재할 때, 더 적은 용량의 항원(소량 항원의 용량)이 유사한 반응을 유도하였다. 모든 경우에서, L(MPLA)를 함유하는 에이즈박스® B/E로 생쥐를 면역화하는 것은, 에이즈박스® B/E 단독과 비교할 때, A244 및 MN 단백질 모두에 대해 더 높은 항체 역가를 보여주었다. 추가적으로, 항체 역가가 유사하게 나타났으므로, 동결건조된 L(MPLA)에 에이즈박스® B/E를 첨가하는 것을 1 시간 동안이던 또는 밤새 수행하던 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0076] 본원에 기술된 L(MPLA)와 문헌 [Baylor et al., 2002] 및 문헌 [Kristensen, 2012]에 교시된 것 중 임의의 것과 같은 알루미늄 염-흡착 백신의 혼합 방법은 예시된 백신 조성물뿐만 아니라, 각 백신 조성물의 면역자극 효력을 증진시킨다고 여겨진다. 본원에 기술된 방법은 사전제작된 알루미늄 염-흡착 단백질 백신에 대한 아주반트로서 리포솜 MPLA를 사용하는 것을 훨씬 쉽게 할 수 있다.

[0077] 본원의 발견, 즉, 알루미늄 염-흡착 백신과 L(MPLA)의 혼합에 의한 증진된 면역자극 효력은 놀랍다. 알루미늄 염 아주반트의 존재가 리포솜을 파괴시킬 수 있고 리포솜 막에 구조적 변형을 야기할 수 있어, 궁극적으로 감소된 면역 반응을 가져온다는 것이 알려져 있었다. 미국 특허 번호 제5,820,880호를 참조한다. 추가적으로, 알루미늄 염에 의한 리포솜 파괴의 이유는 명백하지 않은 채로 남아있다. 따라서, 당업자는 임의의 알루미늄 염-흡착 백신을 L(MPLA)와 혼합하는 것을 꺼려하는 경향이 있었을 것이다.

도면

도면1

