



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0116652
 (43) 공개일자 2007년12월10일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.
 <i>A61K 39/155</i> (2006.01) <i>A61K 39/39</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2007-7024388</p> <p>(22) 출원일자 2007년10월23일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2007년10월23일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/002836
 국제출원일자 2006년03월21일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2006/100109
 국제공개일자 2006년09월28일</p> <p>(30) 우선권주장
 0505989.4 2005년03월23일 영국(GB)
 (뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89</p> <p>(72) 발명자
 하논, 엠마뉴엘, 줄리스
 벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
 스테파니, 진
 벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.</p> <p>(74) 대리인
 남상선</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) CD4 T-세포 및/또는 개선된 B-메모리 세포 반응을유도하는 인플루엔자 바이러스 및 수중유 에멀전에 주번트의 용도

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 질환을 면역화하는 인플루엔자 백신 제형 및 백신 접종 치료법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 스테롤, 대사 가능한 오일 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 에주번트 및 임의의 3D-MPL을 포함하는 백신 제형, 이들의 의약에서의 용도, 특히, 인플루엔자 항원에 대한 면역 반응을 강화시키는데 있어서의 이들의 용도, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

(30) 우선권주장

0505998.5	2005년03월23일	영국(GB)
0506000.9	2005년03월23일	영국(GB)
0506001.7	2005년03월23일	영국(GB)
0506004.1	2005년03월23일	영국(GB)
0510589.5	2005년05월24일	영국(GB)
0510591.1	2005년05월24일	영국(GB)
0510593.7	2005년05월24일	영국(GB)
0510596.0	2005년05월24일	영국(GB)
0510598.6	2005년05월24일	영국(GB)
0603788.1	2006년02월24일	영국(GB)
0603789.9	2006년02월24일	영국(GB)
0603790.7	2006년02월24일	영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

i) 개선된 CD4 T-세포 면역 반응, ii) 사람에서의 인플루엔자 바이러스 또는 항원 조성물에 대한 개선된 B-메모리 세포 반응 중 한 반응 이상을 유도하는 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 (b) 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도.

청구항 2

인플루엔자에 대한 사람 노인의 백신화를 위한 면역원성 조성물의 제조에서 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제 및 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도.

청구항 3

제 2항에 있어서, 조성물이 사람 노인에서의 바이러스 또는 항원 조성물에 대한 개선된 CD4 T-세포 면역 반응을 유도하는 용도.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전이 70세기% 이상의 직경이 1 μ m 미만인 오일 점적을 함유하는 용도.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전이 70세기% 이상의 직경이 500nm 미만인 오일 점적을 함유하는 용도.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전이 80세기% 이상의 직경이 300nm 미만인 오일 점적을 함유하는 용도.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전이 90세기% 이상의 직경이 120 내지 200nm 미만인 오일 점적을 함유하는 용도.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사 가능한 오일이 알파-토코페롤인 용도.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 알파-토코페롤이 상기 면역원성 조성물의 전체 용적의 1.0% 내지 20%의 양으로 존재하는 용도.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 알파-토코페롤이 상기 면역원성 조성물의 전체 용적의 1.0% 내지 5.0%의 양으로 존재하는 용도.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사 가능한 오일이 스쿠알렌인 용도.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사 가능한 오일이 상기 면역원성 조성물의 전체 용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 존재하는 용도.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 대사 가능한 오일이 상기 면역원성 조성물의 전체 용적의 1.0% 내지 10%의 양으로 존재하는 용도.

청구항 14

제 13항 있어서, 상기 대사 가능한 오일이 상기 면역원성 조성물의 전체 용적의 2.0% 내지 6.0%의 양으로 존재하는 용도.

청구항 15

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서, 수중유 에멀션이 스테롤을 추가로 함유하는 용도.

청구항 16

제 15항에 있어서, 추가의 스테롤이 콜레스테롤인 용도.

청구항 17

제 8항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 스쿠알렌:알파 토코페롤의 비율이 1 이하인 용도.

청구항 18

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에멀전화제가 트윈 80인 용도.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 에멀전화제가 상기 면역원성 조성물의 0.01 내지 5.0중량%(w/w)의 양으로 존재하는 용도.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 에멀전화제가 상기 면역원성 조성물의 0.1 내지 2.0중량%(w/w)의 양으로 존재하는 용도.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 수중유 에멀전 애주번트가 다음 조성: 2 내지 10%의 스쿠알렌, 2 내지 10%의 알파 토코페롤 및 0.3 내지 3%의 트윈 80을 지니는 용도.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 면역원성 조성물이 TLR-4 리간드를 추가로 포함하는 용도.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 TLR-4 리간드가 3D-MPL과 같은 지질 A의 비독성 유도체; 지질 A의 합성 유도체; MDP; 및 RSV F 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 용도.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 지질 A 유도체가 3D-MPL인 용도.

청구항 25

제 24항에 있어서, 3D-MPL이 조성물 투여량 당 10 내지 50 μ g(w/v)의 양으로 존재하는 용도.

청구항 26

제 25항에 있어서, 3D-MPL이 조성물 투여량 당 약 25 μ g(w/v)의 양으로 존재하는 용도.

청구항 27

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 조성물의 투여가 개선된 CD4 T-세포 면역반응 및 개선된 B-메모리 세포 반응 둘 모두를 유도하는 용도.

청구항 28

제 1항 또는 제 3항 내지 제 27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4 T-세포 면역 반응이 교차 반응성 CD4 T 헬퍼 반응의 유도를 포함하는 용도.

청구항 29

제 1항 내지 제 28항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 집단이 50세 초과 연령인 용도.

청구항 30

제 1항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 집단이 65세 초과 의 장년층인 용도.

청구항 31

인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제 및 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트로 이미 백신 접종된 사람을 재백신 접종하기 위한 면역원성 조성물을 제조에서 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제의 용도.

청구항 32

제 31항에 있어서, 재백신접종에 사용되는 조성물이 추가의 애주번트를 함유하는 용도.

청구항 33

제 32항에 있어서, 상기 애주번트가 수중유 에멀전 애주번트, 알루미늄 애주번트, TLR-4 리간드, 및 사포닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용도.

청구항 34

제 31항 내지 제 33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수중유 에멀전 애주번트가 제 1항, 제 2항 및 제 4항 내지 제 21항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같으며, TLR-4 리간드가 제 23항 내지 제 26항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 용도.

청구항 35

제 31항 내지 제 34항 중 어느 한 항에 있어서, 재백신접종을 위한 상기 면역원성 조성물이 i) 공통의 CD4 T-세포 에피토프, ii) 공통의 B 세포 에피토프중 하나 이상을 제 1 백신접종에 사용된 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원성 제제와 공유하는 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 함유하는 용도.

청구항 36

제 31항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 있어서, 재백신접종 후 면역학적 반응이 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제에 대한 개선된 CD4 반응, 또는 개선된 체액 반응 또는 개선된 B 세포 메모리 반응 중 어느 하나, 또는 둘, 또는 모두인 용도.

청구항 37

변이 인플루엔자 균주에 의해서 야기된 인플루엔자 감염증에 대한 보호를 위한 면역원성 조성물의 제조에서 (a) 제 1 인플루엔자 균주로부터의 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 (b) 대사가 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도.

청구항 38

제 37항에 있어서, 상기 수중유 에멀전 애주번트가 제 1항, 제 2항 및 제 4항 내지 제 21항 중 어느 한 항에서

정의된 바와 같으며, TLR-4 리간드가 제 22항 내지 제 26항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 용도.

청구항 39

제 1항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제가 일가, 이가 또는 3가인 용도.

청구항 40

제 1항 내지 제 39항 중 어느 한 항에 있어서, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제가 세 가지의 상이한 인플루엔자 균주로부터 유래되는 용도.

청구항 41

제 40항에 있어서, 균주중 하나 이상이 유행병 발생과 관련있거나, 유행병 발생과 관련있을 가능성이 있는 용도.

청구항 42

제 41항에 있어서, 상기 유행병 균주가 H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 및 H1N1으로 이루어진 균주로부터 선택되는 용도.

청구항 43

제 31항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 백신접종이 유행병 발생을 초래할 가능성이 있는 인플루엔자 균주를 함유하는 스플리트 인플루엔자 조성물로 이루어지고, 재백신접종이 순환하는 유행성 균주로 이루어지는 용도.

청구항 44

제 1항 내지 제 43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 조성물이 낮은 투여량의 HA 항원을 함유하는 용도.

청구항 45

제 1항 내지 제 44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인플루엔자 항원 또는 이의 항원성 제제가 난황-유래되거나 조직 배양-유래되는 용도.

청구항 46

CD4+ T 세포 활성화에 의해서 회복되거나 치료되는 것으로 공지된 질환용 백신을 디자인하는 방법으로서,

- 1) CD4+ 에피토프를 함유하는 항원을 선택하고,
- 2) 항원을 제 1항, 제 2항, 및 제 4항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 정의된 수중유 에멀전 애주번트와 혼합함을 포함하고,

포유동물에게 투여되는 경우 상기 백신이 포유동물에서의 증진된 CD4 반응을 유도할 수 있게 하는 방법.

청구항 47

제 1항 내지 제 46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스가 스플리트 인플루엔자 바이러스, 진 인플루엔자 바이러스, 서브-유닛 인플루엔자 바이러스, 인플루엔자 비로솜, 및 이의 항원성 제제로 이루어진 균주로부터 선택되는 용도.

청구항 48

제 47항에 있어서, 인플루엔자 바이러스가 스플리트 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원 제제인 용도.

명세서

발명의 분야

<1>

<2> 본 발명은 인플루엔자 질환을 면역화하는 인플루엔자 백신 제형 및 백신 접종 치료법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 스테롤, 대사 가능한 오일 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주먼트 및 임의의 3D-MPL을 포함하는 백신 제형, 이들의 의약에서의 용도, 특히, 인플루엔자 항원에 대한 면역 반응을 강화시키는데 있어서의 이들의 용도, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<3> 인플루엔자 바이러스는 사람 및 가축 둘 모두에 영향을 주는, 세계적으로 가장 흔하게 존재하는 바이러스 중 하나이다. 인플루엔자는 경제적 부담, 질병 및 사망을 초래하며, 이는 상당하다.

<4> 인플루엔자 바이러스는 직경이 약 125nm인 입자 크기를 갖는, 외피가 있는 RNA 바이러스이다. 인플루엔자 바이러스는 기본적으로 지질 이중 구조 및 외부 당단백질을 갖는 바이러스 외피에 의해 둘러싸인 핵단백질과 결합된 리보핵산(RNA)의 내부 뉴클레오텐시드 또는 코어로 구성된다. 바이러스 외피의 내층은 주로 지질 단백질로 구성되며, 외층은 대부분 숙주 유래된 지질 물질로 구성된다. 인플루엔자 바이러스는 두개의 표면 항원인 당단백질 뉴라미니다제(NA) 및 헤마글루티닌(HA)를 포함하며, 이들은 입자의 표면에서 10 내지 12nm 길이의 스파이크 (spike)로서 나타난다. 인플루엔자 아형(subtype)의 항원 특이성을 결정하는 것이 바로 이러한 표면 단백질, 특히 헤마글루티닌이다.

<5> 이들 표면 항원은 점진적으로, 때로는 신속하게 항원성의 변화를 유도하는 소정의 변화가 일어난다. 소위 '드리프트(drift)' 및 '시프트(shift)'로 불리우는 이러한 항원성 변화는 예측할 수 없으며, 이것들이 궁극적으로는 새로운 인플루엔자 균주의 출현을 유도하고, 이러한 바이러스가 면역 시스템을 벗어날 수 있게 하여 널리 공지된, 거의 매년 발생하는 유행병을 초래한다는 면역학적 관점에서 볼때 상당한 충격을 가질 수 있다.

<6> 시즌마다 인플루엔자 백신에 도입되어야 하는 인플루엔자 바이러스 균주는 국립 보건 당국과 백신 제조업자가 협력하여 세계 보건 기구에 의해 결정된다.

<7> HA는 상이한 인플루엔자 균주의 혈청학적 특이성을 정의함에 있어서 가장 중요한 항원이다. 상기 75-80 kD 단백질은 수 많은 항원성 결정인자를 함유하며, 이중 몇몇은 상이한 균주에서 서열 변화가 일어난 영역에 존재하며(균주-특이적 결정인자), 다른 것들은 많은 HA 분자에 공통적인 영역에 존재한다(결정인자에 대해 공통적임).

<8> 인플루엔자 바이러스는 6주 이상의 기간에 걸쳐 40% 정도로 높은 타입 A 또는 B 바이러스의 감염율로 거의 매년 겨울마다 유행병을 일으킨다. 인플루엔자 감염은, 경도의 상기도 감염을 통한 잠재성 감염으로부터 심각한 바이러스 폐렴까지 여러 질병 상태를 초래한다. 전형적인 인플루엔자 유행병은 폐렴 발생 및 입원 또는 사망을 증가에 의해 목격되는 바와 같은 하기도 질환(lower respiratory disease)의 증가를 초래한다. 이러한 질환의 중증도는 주로 숙주의 연령, 그의 면역 상태 및 감염 부위에 의해 결정된다.

<9> 선진국에서 모든 인플루엔자 관련 사망의 80 내지 90%에 이르는 65세 이상의 노인들은 특히 취약하다. 만성 질병이 있는 개인들은 또한 이러한 합병증을 경험할 가능성이 높다. 또한, 영아는 심각한 질병을 앓을 수 있다. 그러므로, 특히 이들 그룹은 보호받아야 한다. 이러한 "위험"군 외에도, 보건 당국에서는 노인과 접촉하는 긴장한 성인도 백신접종할 것을 권장하고 있다.

<10> 백신접종은 해마다 일어나는 인플루엔자 유행병을 억제하는 데 중요한 역할을 한다. 최근 입수할 수 있는 인플루엔자 백신은 불활성화된 인플루엔자 백신이거나 약독화된 인플루엔자 생백신이다. 불활성화 flu 백신은 세가지 가능한 항원 제제 형태로 구성된다: 불활성화된 전 바이러스, 정제된 바이러스 입자가 지질 외피를 용해시키는 세정제 또는 그 밖의 시제로 붕괴된 서브-비리온(sub-virion)(소위 "스플리트(split)" 백신), 또는 정제된 HA 및 NA(아단위 백신). 이러한 불활성화된 백신은 근내(i.m.) 또는 비내(i.n.) 제공된다.

<11> 모든 종류의 인플루엔자 백신은 보통 3가 백신이다. 이들 백신은 일반적으로 두개의 인플루엔자 A 바이러스 균주 및 하나의 인플루엔자 B 균주로부터 유래된 항원을 함유한다. 대부분의 경우에 표준 0.5ml 주사가능 투여량은 일원 면역 확산법(SRD)(J.M. Wood et al.: An improved single radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: adaptation for potency determination of inactivated whole virus and subunit vaccines. J. Biol. Stand. 5(1997) 237-247; J.M. Wood et al., International collaborative study of single radial diffusion and immunoelectrophoresis techniques for the assay of haemagglutinin antigen of influenza virus. J. Biol. Stand. 9(1981) 317-330)에 의해 측정하여 각 균주로부터 15µg의 헤마글루티닌 항원 성분을 함유한다.

<12> 최근 입수할 수 있는 인플루엔자 백신은 모든 연령 군에서 안전한 것으로 간주된다[참조: De Donato et al.

1999, Vaccine, 17, 3094-3101]. 그러나, 현 인플루엔자 백신이 2세 미만의 소아에게 효력이 있는 지에 대해서는 입증된 바가 거의 없다. 또한, 전형적인 확인된 인플루엔자 병의 예방에 대해 보고된 백신 효율은 중장년층에 대해 23-72%인데, 이는 청년층에 대해 보고된 60 내지 90% 효율에 비해 상당히 낮은 것이다[참조: Govaert, 1994, J. Am. Med. Assoc, 21, 166-1665; Gross, 1995, Ann Intern. Med. 123, 523-527]. 인플루엔자 백신의 효능은 바이러스 균주에 대한 헤마글루티닌 억제(HI) 항체의 혈청 역가와 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 여러 연구에서 중장년층이 청년층에 비해 인플루엔자 면역화 후 더 낮은 HI 역가를 나타낸 것으로 밝혀졌다[참조: Murasko, 2002, Experimental gerontology, 37, 427- 439].

<13> 그러므로, 개선된 면역원성을 지닌 신규 백신이 여전히 요구되는 실정이다. 효능있는 애주번트와의 백신 항원의 제형은 서브비리온 항원에 대한 면역 반응을 증진시키기 위해 가능한 방법이다.

<14> 수중유 에멀전 형태의, 애주번트 MF59가 보조된 서브유닛(sub-unit) 백신은 통상적으로 입수할 수 있으며, 이러한 백신은 애주번트 비첨가 서브유닛 백신으로 얻어지는 것보다 높은 항체 역가를 유도할 수 있는 것으로 입증되었다[참조: De Donato et al. 1999, Vaccine, 17, 3094-3101]. 그러나, 이후 공개에서, 동일한 백신이 애주번트 비첨가 스플리트 백신과 비교하여 개선된 프로파일입이 입증되지 않았다[참조: Puig-Barbera et al., 2004, Vaccine 23, 283-289].

<15> 개선된 인플루엔자 백신, 특히, 노인 집단에서의 개선된 인플루엔자 백신에 대한 요구가 여전히 있다.

<16> **발명의 설명**

<17> 본 발명의 첫 번째 특징으로, 본 발명은 i) 개선된 CD4 T-세포 면역 반응, ii) 사람에서의 인플루엔자 바이러스 또는 항원 조성물에 대한 개선된 B-메모리 세포 반응중 한 반응 이상을 유도하는 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 (b) 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도를 제공한다.

<18> 적합하게는, 상기 스테롤은 알파-토코페롤이다. 특정의 구체예에서, 상기 수중유 에멀전 애주번트는 총용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 하나 이상의 대사가능한 오일을 포함하고, 70세기% 이상이 1 μ m 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 지닌다.

<19> 특정의 구체예에서, 면역원성 조성물은 비-애주번트 첨가된 항원 또는 항원 조성물로 얻은 반응에 비해서 개선된 CD4 T-세포 면역반응 및 개선된 B-메모리 세포 반응 둘 모두를 유도할 수 있다.

<20> 본 발명의 두 번째 특징으로, 본 발명은 인플루엔자에 대해서 사람 면역 약화된 개체 또는 집단, 예컨대, 고위험 성인, 또는 노인의 백신 접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 (b) 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도를 제공한다.

<21> 바람직한 구체예에서, 상기 수중유 에멀전 애주번트는 총용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 하나 이상의 대사가능한 오일을 포함하고, 70세기% 이상이 1 μ m 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 지닌다.

<22> 본 발명의 세 번째 특징으로, 본 발명은 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트로 제형된 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제로 이미 백신 접종된 사람의 재백신 접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 재백신접종은 인플루엔자에 대해 이전 시점에 백신접종한 피검체에게 이루어진다. 일반적으로, 재백신접종은 일차 백신접종 후 적어도 6개월 후, 바람직하게는 8 내지 14개월 후, 보다 바람직하게는 대략 10 내지 12개월 후에 이루어진다.

<23> 바람직하게는, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원제제 및 대사 가능한 오일, 스테롤(예컨대, 알파-토코페롤), 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트로 이미 백신 접종된 사람의 재백신 접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제, 및 (b) 대사 가능한 오일, 스테롤(예컨대, 알파-토코페롤), 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도로서, 상기 수중유 에멀전 애주번트는 총용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 하나 이상의 대사가능한 오일을 포함하고, 70세기% 이상이 1 μ m 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 지니게 되는 용도를 제공한다.

<24> 또 다른 바람직한 구체예에서, 재백신접종을 위한 면역원성 조성물은 일차 백신접종에 사용된 인플루엔자 바이러스 또는 이의 바이러스 항원성 제제와 공동되는 CD4 T-세포 에피토프 또는 B 세포 에피토프를 공유하는 인플

루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 함유한다.

- <25> 본 발명의 네 번째 특징으로, 본 발명은 1차 인플루엔자 균주의 변이체인 인플루엔자 균주에 의해서 야기된 인플루엔자 감염증에 대한 방지를 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 1차 인플루엔자 균주로부터의 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제, 및 (b) 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 상기 수중유 에멀전 애주번트는 총용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 하나 이상의 대사가능한 오일을 포함하고, 70세기% 이상이 1 μ m 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 지닌다.
- <26> 또 다른 특징으로, 본 발명은 면역약화된 개체 또는 집단, 예컨대, 고위험 성인, 또는 노인을 상기된 바와 같은 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제 및 수중유 에멀전 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물로 접종하는 방법을 제공한다.
- <27> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제 및 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트로 이미 백신 접종된 사람을 재백신 접종하는 방법으로서, 애주번트 첨가된 또는 비첨가된 인플루엔자 바이러스 포함 면역원성 조성물을 사람에게 투여함을 포함하는 방법을 제공한다. 적합하게는 스테롤은 알파-토코페롤이다.
- <28> 추가의 구체 예에서, 본 발명은 한 인플루엔자 바이러스 균주에 대해서 사람 집단 또는 개체를 백신 접종한 다음 변이체 인플루엔자 바이러스 균주에 대해서 사람 또는 집단을 재백신 접종하는 방법으로서, (i) 1차 인플루엔자 균주로부터의 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제, 및 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트를 포함하는 1차 조성물, 및 (ii) 1차 인플루엔자 바이러스 균주의 인플루엔자 바이러스 균주 변이체를 포함하는 2차 면역원성 조성물을 사람에게 투여함을 포함하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 스테롤은 알파-토코페롤이다.
- <29> 또 다른 구체예에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제 및 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도를 제공한다.
- <30> 추가의 특징으로, 본 발명은 인플루엔자 백신을 디자인하는 방법으로서, 1) CD4+ 에피토프를 함유하는 인플루엔자 항원을 선택하고, 2) 인플루엔자 항원을 상기된 수중유 에멀전과 혼합함을 포함하며, 상기 포유동물에게 투여되는 경우 백신이 포유동물에서 증진된 CD4 반응을 유도할 수 있게 하는 방법을 제공한다.
- <31> 본 발명의 그 밖의 양태 및 이점은 하기 상세한 설명의 바람직한 구체예에서 추가로 기술될 것이다.

발명의 상세한 설명

- <60> 본 발명자들은 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 대사가능한 오일, 알파 토코페롤과 같은 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트와 함께 포함하는 인플루엔자 제형이 애주번트 비첨가 바이러스 또는 이의 항원성 제제로 얻어진 것과 비교하여 사람에게서 상기 항원 또는 항원성 조성물에 대해 CD4 T-세포 면역 반응 및/또는 B 세포 기억 반응을 개선시킬 수 있음을 발견하였다. 본원에서 청구된 제형은 MHC 클래스 II 분자에 의해 제공된 인플루엔자 에피토프를 검출할 수 있는 항-인플루엔자 CD4-T 세포 반응을 유도하는데 유리하게 사용될 것이다. 본 출원인은 이것이 동종 및 드리프트 인플루엔자 균주(백신접종 및 감염시)에 대한 반응성을 증가시키기 위해 세포 매개 면역 시스템을 표적하는 데 효과적임을 발견하였다.
- <61> 본 발명에 따른 애주번트 첨가된 인플루엔자 조성물은 여러 이점을 갖는다:
- <62> 1) 개선된 면역원성: 중장년층(50세 이상, 일반적으로 65세 이상)의 약한 면역 반응을 젊은이들에게서 나타나는 수준으로 회복되게 할 것이다(항체 및/또는 T 세포 반응);
- <63> 2) 개선된 교차 방어 프로파일: 변형(드리프트된) 인플루엔자 균주에 대한 증가된 교차 방어;
- <64> 3) 또한, 유사한 반응에 대해 감소된 항원 용량이 사용되게 하고, 이에 따라 비상 상황(예를 들어, 유행병)의 경우에 증가된 능력을 보장할 것이다.
- <65> 특히, 본 발명의 조성물은 방어에 대해 인플루엔자와 관련있는 것에 부합하는 다수의 사람 피검체에 의해 평가되는 바와 같이 재백신접종 후 인플루엔자에 대해 보다 우수한 혈청방어율을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명에 사용하기 위한 조성물은 애주번트 비첨가 조성물과 비교하여 사람 피검체의 일차 백신접종 후 보다 높은 B 세포 기억 반응 및 재백신접종 후 보다 높은 체액 반응의 경향을 유도할 수 있다.

- <66> 또한, 본 발명자들은 청구되는 애주번트 첨가된 조성물이 애주번트 비첨가 조성물로 얻어진 것보다 보다 많은 개체에서, 백신에 존재하는 세가지 모두의 균주에 대해 항체 방어 수준을 유도할 뿐만 아니라 이 수준을 유지할 수 있음을 입증할 수 있었다(예를 들어, 표 43 참조).
- <67> 따라서, 또 다른 구체예에서, 청구되는 조성물은 인플루엔자 관련 질병에 대해 지속적인 면역 반응을 보장할 수 있다. 특히, 지속성은 백신접종 후, 적어도 3개월 후에, 바람직하게는 적어도 6개월 후에 법적 기준에 부합할 수 있는 HI 항체 면역 반응을 의미한다. 특히, 청구되는 조성물은 적어도 3개월 후에 백신내 존재하는 하나 이상의 인플루엔자 균주에 대해, 바람직하게는 모든 균주에 대해 개체의 70% 초과, 적합하게는 개체의 80% 초과, 보다 적합하게는 개체의 90% 초과로 항체의 보호 수준을 유도할 수 있다. 특정 양태에서, 90% 초과와 항체의 보호 수준은 백신 조성물내 존재하는 적어도 하나, 적합하게는 두개, 또는 모든 균주에 대해 백신접종 후 적어도 6개월에 달성된다.
- <68> **인플루엔자 바이러스 균주 및 항원**
- <69> 본 발명에 따라 사용하기 위한 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제는 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원성 제제일 수 있다. 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 제제는 또 다른 유형의 불활성화된 인플루엔자 항원, 예컨대 불활성화된 전 바이러스 또는 정제된 HA 및 NA(서브유닛 백신), 또는 인플루엔자 비로솜(virosome)을 함유할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 약독화된 생인플루엔자 제제일 수 있다.
- <70> 본 발명에 따른 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원성 제제는 적합하게는 바이러스 입자가 지질 외피를 용해시키는 세정제 또는 다른 시제로 붕괴되는 불활성화된 바이러스 제제이다. 스플리트 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원성 제제는 적합하게는 감염성이거나 불활성화된 전 인플루엔자 바이러스를 용해화 농도의 유기 용매 또는 세정제로 단편화시키고, 이어서 상기 용해제 전부 또는 대부분 및 바이러스 지질 물질의 일부 또는 대부분을 제거함으로써 제조된다. 이의 스플리트 바이러스 항원성 제제는 스플리트 바이러스와 비교하여 어느 정도 정제가 진행된 것이나 스플리트 바이러스 성분의 항원성 특성을 대부분 보유할 수 있는 스플리트 바이러스 제제를 의미한다. 예를 들어, 난황에서 생성되는 경우, 스플리트 바이러스는 난황 함유 단백질로부터 소모되거나, 세포 배양물에서 생성될 경우, 스플리트 바이러스는 숙주 세포 오염균으로부터 소모될 수 있다. 스플리트 바이러스 항원성 제제는 하나 초과와 바이러스 균주의 스플리트 바이러스 항원성 성분을 포함할 수 있다. 스플리트 바이러스를 함유하는 백신(소위 '인플루엔자 스플리트 백신') 또는 스플리트 바이러스 항원성 제제는 일반적으로 잔류하는 기질 단백질 및 핵단백질, 및 때때로 지질, 뿐만 아니라 막 외피 단백질을 함유한다. 이러한 스플리트 바이러스 백신은 반드시 전 바이러스에서 발생하는 것과 동일한 비율은 아니지만 일반적으로 바이러스 구조 단백질을 대부분 또는 전부 함유할 것이다.
- <71> 다르게는, 인플루엔자 바이러스는 전 바이러스 백신의 형태로 존재할 수 있다. 이는 스플리트 바이러스 백신이 새로운 인플루엔자 바이러스 균주에 대해 성공적으로 제조될 수 있는 지에 대한 불확실성을 피함으로써 유행성 상황에 대해 스플리트 바이러스 백신에 비해 유리한 것으로 입증할 수 있다. 몇몇 균주에 대해, 스플리트 바이러스를 제조하는 데 사용되는 통상적인 세정제는 바이러스를 손상시켜, 사용할 수 없게 할 수 있다. 스플리트 백신을 제조하기 위해 다른 세정제를 사용하거나/하거나 다른 방법을 개발할 가능성이 항상 존재하지만, 이는 시간을 필요로 하여 유행성 상황에서 이용하지 못할 수 있다. 전 바이러스 방법으로서의 보다 큰 확실성 이외에, 또한 적합한 스플리트 백신을 제조하기 위해 필요한 추가의 정제 단계 동안에 상당량의 항원이 손실되기 때문에, 스플리트 바이러스에 대해서 보다 큰 백신 제조 용량이 있어야 한다.
- <72> 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 제제는 정제된 서브-유닛 인플루엔자 백신의 형태로 존재할 수 있다. 서브-유닛 인플루엔자 백신은 일반적으로 두개의 주요 외피 단백질인 HA 및 NA를 함유하며, 특히 어린 백신접종자에게서 일반적으로 반응생성성이 덜하기 때문에 전 비리온 백신에 비해 추가의 이점을 가질 수 있다. 서브-유닛 백신은 붕괴된 바이러스 입자로부터 정제되거나 재조합에 의해 생성될 수 있다.
- <73> 또 다른 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 제제는 비로솜의 형태로 존재한다. 비로솜은 비로솜의 인지질 이중막에 끼워져 있는 진짜 형태의 기능적 바이러스 외피 당단백질 HA 및 NA를 함유하는 구형의 단일층간 소포체이다.
- <74> 상기 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제는 난황 유도되거나 조직 배양 유도될 수 있다.
- <75> 예를 들어, 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 제제는, 난황에서 인플루엔자 바이러스를 배양하고, 수집한 요막강액을 정제함으로써 통상적인 발육란 방법으로부터 유도될 수 있다. 난황은 금세 대

다수로 축적될 수 있다. 다르게는, 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 제제는 바이러스를 성장시키거나 재조합 인플루엔자 바이러스 표면 항원을 발현시키는 조직 배양을 사용하는 임의의 새로운 생성 방법으로부터 유도될 수 있다. 바이러스를 성장시키기 위한 적합한 세포 기질은 개의 신장 세포, 예컨대, MDCK 또는 MDCK의 클론으로부터의 세포, MDCK 유사 세포, 원숭이 신장 세포, 예컨대 베로(Vero) 세포를 포함하는 AGMK 세포, 적합한 돼지 세포주, 또는 백신 용도에 맞는 인플루엔자 바이러스의 제조에 적합한 임의의 그 밖의 포유동물 세포 타입을 포함한다. 또한, 적합한 세포 기질은 사람 세포, 예컨대 MRC-5 세포를 포함한다. 적합한 세포 기질은 예를 들어, 영장류 세포, 예컨대 계배아 섬유모세포 및 조류 세포주가 또한 포함되나, 이러한 세포주로 제한되는 것은 아니다.

- <76> 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 제제는 예를 들어 본원에 참고문헌으로 인용되는 특허 제 DD 300 833호 및 제 DD 211 444호에 기술된 스플리트 flu 방법과 같은 임의의 다수의 통상적으로 적용할 수 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 전통적으로 스플리트 flu는 용매/세정제 처리, 예컨대 트리-n-부틸 포스페이트 또는 트윈(Tween)TM과 함께 디에틸에테르("트윈-에테르" 스플리트팅으로서 공지되어 있음)를 사용하여 생성되었으며, 이 방법은 일부 제조 설비에서 여전히 사용되고 있다. 현재 사용되는 다른 스플리트팅제로는 세정제 또는 단백질분해 효소 또는 담즙 염, 예를 들어 본원에 참고문헌으로 인용되는 특허 번호 DD 155 875에 기술된 바와 같은 나트륨 테옥시콜레이트가 포함된다. 스플리트팅제로서 사용될 수 있는 세정제는 양이온성 세정제, 예를 들어, 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드(CTAB), 그 밖의 이온성 세정제, 예를 들어, 라우릴설페이트, 다우로데옥시콜레이트, 또는 비이온성 세정제, 예컨대 트리톤(Triton) X-100(예를 들어, Lina et al, 2000, Biologicals 28, 95-103) 및 트리톤 N-101, 또는 임의의 두개 이상의 세정제의 조합을 포함하는 상기 기술된 것들이 포함된다.
- <77> 스플리트 백신을 제조하는 방법은 다수의 상이한 여과 및/또는 다른 분리 단계, 예컨대, 다양한 조합의 초원심 분리, 한외여과, 락톤 원심분리 및 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환) 단계, 및 임의로 스플리트팅 전 또는 후에 수행될 수 있는, 예를 들어 열, 포름알데히드 또는 β-프로피올락톤 또는 U.V.에 의한 불활성화 단계를 포함할 수 있다. 스플리트팅 방법은 배치식, 연속식 또는 반연속식 공정으로서 수행될 수 있다. 스플리트 면역원성 조성물을 위한 바람직한 스플리트팅 및 정제 방법이 WO 02/097072에 기술되어 있다.
- <78> 본 발명에 따른 바람직한 스플리트 flu 백신 항원 제제는 제조 공정으로부터 잔류하는 잔류량의 트윈 80 및/또는 트리톤 X-100을 포함하는 데, 이들은 스플리트 항원의 제조 후에 첨가되거나 농도가 조절될 수 있다. 바람직하게는 트윈 80 및 트리톤 X-100 둘 모두가 존재한다. 백신중 이들 비이온성 계면활성제의 최종 농도에 대한 바람직한 범위는 하기와 같다:
- <79> 트윈 80: 0.01 내지 1%, 보다 바람직하게는 약 0.1%(v/v)
- <80> 트리톤 X-100: 0.001 내지 0.1%(w/v), 보다 바람직하게는 0.005 내지 0.02%(w/v).
- <81> 특정 구체예에서, 트윈 80에 대한 최종 농도는 0.045% 내지 0.09% w/v이다. 또 다른 특정 구체예에서, 항원은 2배 농축된 혼합물로부터 제공되는 데, 이 혼합물은 트윈 80 농도가 0.045%-0.2%(w/v) 범위이고, 애주번트 첨가되는(또는 대조군 제형에서 완충제) 최종 제형시 두배 희석되어야 한다.
- <82> 또 다른 특정 구체예에서, 트리톤 X-100에 대한 최종 농도는 0.005%-0.017% w/v이다. 또 다른 특정 구체예에서, 항원은 2배 농축된 혼합물로부터 제공되는 데, 이 혼합물은 트리톤 X-100 농도가 0.005%-0.034%(w/v) 범위이고, 애주번트 첨가된(또는 대조군 제형에서 완충제) 최종 제형시 두배 희석되어야 한다.
- <83> 바람직하게는, 인플루엔자 제제는 낮은 수준의 티오머살(thiomersal)의 존재 하에서, 또는 바람직하게는 티오머살의 부재 하에서 제조된다. 바람직하게는, 형성되는 인플루엔자 제제는 유기수은 방부제의 부재 하에서 안정하며, 특히 잔류하는 티오모살을 전혀 함유하지 않는다. 특히, 인플루엔자 바이러스 제제는 티오머살의 부재 하에서, 또는 저수준의 티오머살(일반적으로 5µg/ml 이하)에서 안정화된 헤마글루티닌 항원을 포함한다. 특히 적으로, B 인플루엔자 균주의 안정화는 알파 토크페롤의 유도체, 예컨대 알파 토크페롤 석시네이트(또한, 비타민 E 석시네이트, 즉, VES로서 공지되어 있음)에 의해 달성된다. 이러한 제제 및 이의 제조 방법이 WO 02/097072에 개시되어 있다.
- <84> 바람직한 조성물은 적합한 인플루엔자 시준의 WHO 권장된 균주로부터 제조된 3개의 불활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유한다.
- <85> 바람직하게는, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 수중유 에멀전 애주번트가 동일 용기에 함유된다. 이를 '원 바이알법(one vial approach)'이라 한다. 바람직하게는, 바이알은 프리-필드(pre-filled) 주사기이다. 대안적 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제 및 수중유 에멀전 애주

번트는 개별 용기 또는 바이알에 함유되어 피검체에 투여되기 직전 또는 투여시에 혼합된다. 이를 "두 바이알 법(two vial approach)"이라 한다. 예를 들어, 백신이 총 투여 용량 0.7ml에 대해 2 성분 백신인 경우, 농축 항원(예를 들어, 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원)이 한 바이알(335 μ l)(항원 용기)에 제공되고, 프리-필드 주사기는 애주번트(360 μ l)(애주번트 용기)를 함유한다. 주입시, 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유하는 바이알의 내용물은 애주번트를 함유하는 주사기를 사용한 후 주사기를 부드럽게 혼합함으로써 바이알로부터 분리된다. 주입전에, 사용되는 주사기는 근대 주사기로 대체되고, 용량은 530 μ l로 보정된다. 재구성된 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 후보물질의 1회 용량은 530 μ l에 상응한다.

<86> 수중유 에멀전 애주번트

<87> 본 발명의 애주번트 조성물은 수중유 에멀전 애주번트를 함유하고, 바람직하게는 상기 에멀전은 총 용적의 0.5% 내지 20%의 양으로, 그리고 적어도 70세기%의 직경이 1 μ m 미만인 오일 점적을 지닌, 대사가능한 오일을 포함한다.

<88> 임의의 수중유 조성물을 사람 투여에 적합하게 되도록 하기 위해, 에멀전 시스템의 오일상은 대사가능한 오일을 포함해야 한다. 용어 '대사가능한 오일'의 의미는 당해 널리 공지되어 있다. '대사가능한'은 '대사작용에 의해 변형될 수 있는' 것으로서 정의될 수 있다[참조: Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition (1974)]. 상기 오일은 수혜자에게 비독성이고, 대사에 의해 변형될 수 있는, 임의의 식물성유, 어유, 동물성유 또는 합성유일 수 있다. 견과, 종자 및 곡물은 식물성유의 통상적인 공급원이다. 합성유 또한 본 발명의 일부이며, 통상적인 입수할 수 있는 오일, 예컨대 NEOBEE® 등을 포함할 수 있다. 특히 적합한 대사가능한 오일은 스쿠알렌이다. 스쿠알렌(2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥산)은 상어간유에서 대량으로, 그리고 올리브유, 밀배아유, 쌀겨오일, 및 이스트에서 소량으로 발견되는 불포화 오일이며, 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 오일이다. 스쿠알렌은 콜레스테롤 생합성에서 중간체라는 사실에 비추어 대사가능한 오일이다[참조: Merck index, 10th Edition, entry no.8619].

<89> 수중유 에멀전은 그 자체로 당해 널리 공지되어 있으며, 애주번트 조성물로서 유용한 것으로 제안되었다(EP 399843; WO 95/17210).

<90> 적합하게는, 대사가능한 오일은 면역원성 조성물의 총 용적의 0.5% 내지 20%(최종 농도)의 양으로, 바람직하게는 총 용적의 1.0% 내지 10%의 양으로, 바람직하게는 총 용적의 2.0% 내지 6.0%의 양으로 존재한다.

<91> 특정 구체예에서, 대사가능한 오일은 면역원성 조성물의 총 용적의 약 0.5%, 1%, 3.5% 또는 5%의 최종량으로 존재한다. 또 다른 특정 구체예에서, 대사가능한 오일은 면역원성 조성물의 총 용적의 약 0.5%, 1%, 3.57% 또는 5%의 최종량으로 존재한다.

<92> 바람직하게는, 본 발명의 수중유 에멀전 시스템은 작은 오일 점적 크기가 마이크론 미만 범위이다. 적합하게는, 점적 크기는 직경이 120 내지 750nm, 보다 바람직하게는 120 내지 600nm일 것이다. 매우 바람직하게는, 수중유 에멀전은 70세기% 이상의 직경이 500nm 미만이고, 보다 바람직하게는 80세기% 이상의 직경이 300nm 미만이고, 보다 바람직하게는 90세기% 이상의 직경이 120 내지 200nm 범위로 존재하는 오일 점적을 함유한다.

<93> 본 발명에 따른 오일 점적 크기, 즉, 직경은 세기에 의해 주어진다. 세기에 의해 오일 점적 크기의 직경을 측정하는 방법은 여러가지가 있다. 세기는 사이징 기구를 사용함으로써, 적합하게는 동적 광산란법, 예컨대, 맬번 제타사이저(Malvern Zetasizer) 4000 또는 바람직하게는 맬번 제타사이저 3000HS에 의해 측정된다. 자세한 절차는 실시예 II.2에 제시되어 있다. 첫번째 가능한 방법은 동적 광산란법(PCD-광양자상관분광법)에 의해 z 평균 직경 ZAD를 측정하는 것이며, 이 방법은 추가로 다분산성 지수(PDI)를 제공하며, ZAD 및 PDI 둘 모두 누적 평가 알고리즘(cumulants algorithm)으로 계산된다. 이들 값은 입자 굴절 지수를 알 필요가 없다. 두번째 수단은 또 다른 알고리즘인 콘틴(Contin) 또는 NNLS, 또는 자동 "맬번" 알고리즘(사이징 기기에 의해 제공된 디폴트(default) 알고리즘)에 의해 전입자 크기 분포를 측정함으로써 오일 점적의 직경을 계산하는 것이다. 대개의 경우, 복합 조성물의 입자 굴절 지수는 알려져 있기 않기 때문에, 세기 분포만이 고려되며, 필요에 따라 이러한 분포로부터 기원하는 세기 평균이 고려된다.

<94> 본 발명에 따른 수중유 에멀전은 스테롤을 포함한다. 스테롤은 당해 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 콜레스테롤이 널리 공지되어 있고, 이는 문헌(Merck Index, 11th Edn., page 341)에 동물성 지방에서 발견되는 천연 스테롤로서 기술되어 있다. 다른 적합한 스테롤에는 β -시토스테롤, 스티그마스테롤, 에르고스테롤, 알파-토코

폐를 및 에르고칼시페롤이 포함된다. 상기 스테롤은 적합하게는 면역원성 조성물의 총 용적의 0.01% 내지 20%(w/v)의 양으로, 바람직하게는 0.1% 내지 5%(w/v)의 양으로 존재한다. 바람직하게는, 스테롤이 콜레스테롤인 경우, 면역원성 조성물의 총 용적의 0.02% 내지 0.2%(w/v)의 양으로, 보다 바람직하게는 0.5ml 백신 투여 용적의 0.02%(w/v), 또는 0.5ml 백신 투여 용적의 0.07%(w/v) 또는 0.7ml 백신 투여 용적의 0.1%(w/v)의 양으로 존재한다.

<95> 적합하게는, 스테롤은 알파-토코페롤 또는 이의 유도체, 예컨대 알파-토코페롤 석시네이트이다. 바람직하게는, 알파-토코페롤은 면역원성 조성물의 총 용적의 0.2% 내지 5.0%(v/v), 보다 바람직하게는 0.5ml 백신 투여 용적의 2.5%(v/v), 또는 0.5ml 백신 투여 용적의 0.5%(v/v), 바람직하게는 0.7ml 백신 투여 용적의 1.7-1.9%(v/v), 바람직하게는 1.8%(v/v)의 양으로 존재한다. 분명히 하자면, v/v로 주어지던 농도는 하기 전환 인자를 적용시킴으로써 w/v의 농도로 전환될 수 있다: 5%(v/v) 알파-토코페롤 농도는 4.8%(w/v) 알파-토코페롤 농도와 동가이다.

<96> 수중유 에멀전은 추가로 에멀전화제를 포함할 수 있다. 에멀전화제는 면역원성 조성물의 0.01 내지 5.0중량%(w/w)의 양으로 존재할 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 2.0중량%(w/w)의 양으로 존재할 수 있다. 바람직한 농도는 총 조성물의 0.5 내지 1.5중량%(w/w)이다.

<97> 에멀전화제는 적합하게는 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레이트(트윈 80)일 수 있다. 특정 구체예에서, 0.5ml 백신 투여 용적은 1%(w/w) 트윈 80을 함유하고, 0.7ml 백신 투여 용적은 0.7%(w/w) 트윈 80을 함유한다. 다른 특정 구체예에서, 트윈 80의 농도는 0.2%(w/w)이다.

<98> 수중유 에멀전 애주번트는 다른 애주번트 또는 면역자극제와 함께 이용될 수 있으며, 이에 따라 본 발명의 중요한 구체예는 스쿠알렌 또는 다른 대사가 가능한 오일, 알파 토코페롤, 및 트윈 80을 포함하는 수중유 제형이다. 수중유 에멀전은 또한 스팬(span) 85 및/또는 렉시틴을 함유할 수 있다. 일반적으로, 수중유는 면역원성 조성물의 총 용적의 2 내지 10%의 스쿠알렌, 2 내지 10%의 알파 토코페롤 및 0.3 내지 3%의 트윈 80을 포함할 것이며, WO 95/17210에 기술된 절차에 따라 제조될 수 있다. 바람직하게는 알파 토코페롤에 대한 스쿠알렌의 비는 1 이하이며, 이로써 보다 안정한 에멀전을 제공한다. 스팬 85(폴리옥시에틸렌 소르비탄 트리올레이트) 또한 예를 들어, 1%의 수준으로 존재할 수 있다.

<99> **본 발명의 일차 백신접종에 사용되는 면역원성 조성물의 면역원성 특성**

<100> 본 발명에서, 인플루엔자 조성물은 애주번트 첨가되지 않은, 즉 어떠한 외인성 애주번트를 함유하지 않는 상응하는 조성물(본원에서는 또한 '플레인 조성물'이라도 함)로 얻어지는 CD4-T 세포 면역 반응과 비교하여 하나 이상의 항원 성분 또는 항원성 조성물에 대해 개선된 CD4-T 세포 면역 반응을 유도할 수 있다.

<101> '개선된 CD4 T-세포 면역 반응'은 보다 높은 CD4 반응이 사람 환자에게서 애주번트 부재의 동일한 조성물의 투여 후 얻어진 것보다 애주번트 첨가된 면역원성 조성물의 투여 후에 얻어진다는 것을 의미한다. 예를 들어, 보다 높은 CD4 T-세포 면역 반응은 사람 환자에게서 애주번트 첨가되지 않은 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 포함하는 면역원성 조성물을 투여한 후 유도된 반응과 비교하여, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 대사가 가능한 오일, 스테롤, 예컨대, 알파 토코페롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트와 함께 포함하는 면역원성 조성물의 투여시에 얻어진다. 이러한 제형은 유리하게는 MHC 클래스 II 분자에 의해 제공되는 인플루엔자 에피토프를 검출할 수 있는 항-인플루엔자 CD4 T-세포 반응을 유도하는 데 사용될 수 있다.

<102> 바람직하게는, 본 발명에 사용하기 위한 애주번트 첨가된 스플리트 인플루엔자 조성물에 의해 유도된 상기 면역학적 반응은 임의의 다른 통상적인 애주번트 첨가되지 않은 인플루엔자 백신, 예컨대 서브-유닛 인플루엔자 백신 또는 인플루엔자 전 바이러스 백신에 의해 유도된 면역학적 반응보다 높다.

<103> 한정되지는 않아야 하지만, 특히 상기 '개선된 CD4 T-세포 면역 반응'은 면역학적으로 1차투여되지 않은 환자, 즉, 상기 인플루엔자 바이러스 또는 항원에 대해 혈청음성인 환자에게서 달성된다. 이러한 혈청음성은 이러한 바이러스 또는 항원에 전혀 접한 적이 없거나(소위 '나이프' 환자), 또는 다르게는 직면된 경우 상기 항원에 대한 반응이 실패된 환자의 결과일 수 있다. 바람직하게는, 상기 개선된 CD4 T-세포 면역 반응은 노년층, 일반적으로 65세 이상, 또는 고위험 의학적 상태를 갖는 65세 미만의 장년층('고위험' 성인), 또는 2세 미만의 소아와 같은 면역약화된 피검체에서 얻어진다.

<104> 개선된 CD4 T-세포 면역 반응은 임의의 하기 시토카인을 생성하는 다수의 세포를 측정함으로써 평가될 수 있다:

- <105> · 적어도 두개의 상이한 시토카인 (CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)을 생성하는 세포
- <106> · 적어도 CD40L 및 또 다른 시토카인(IL-2, TNF α , IFN γ)을 생성하는 세포
- <107> · 적어도 IL-2 및 또 다른 시토카인(CD40L, TNF α , IFN γ)을 생성하는 세포
- <108> · 적어도 IFN γ 및 또 다른 시토카인(IL-2, TNF α , CD40L)을 생성하는 세포
- <109> · 적어도 TNF α 및 또 다른 시토카인(IL-2, CD40L, IFN γ)을 생성하는 세포
- <110> 임의의 상기 시토카인을 생성하는 세포가 애주번트 첨가되지 않는 조성물의 투여와 비교하여 애주번트 첨가된 조성물의 투여를 수행하는 데 보다 많은 양으로 존재할 경우에 CD4 T-세포 면역 반응이 개선될 것이다. 일반적으로, 상기 본원에 언급된 하나 이상, 바람직하게는 5개 조건 중 두개가 충족될 것이다. 특정 구체예에서, 4개 모두의 시토카인을 생성하는 세포가 애주번트 비첨가 그룹과 비교하여 애주번트 첨가된 그룹에서 보다 많은 양으로 존재할 것이다.
- <111> 본 발명의 애주번트 첨가된 인플루엔자 조성물에 의해 주어질 개선된 CD4 T-세포 면역 반응은 이상적으로는 어느 한 단일 투여 후에 얻어질 수 있다. 단일 투여량 방법은 예를 들어 빠르게 전개되는 발생 상황에서 매우 관련있을 것이다. 특정 상황에서, 특히 중장년층 집단에 대해, 또는 인플루엔자에 대해 최초로 백신접종된 어린이(9세 미만)의 경우에, 그러한 시점에 대해 동일한 조성물을 2회 투여량으로 투여하는 것이 유리할 수 있다. 상기 동일 조성물의 제 2 투여량(여전히 '일차 백신접종을 위한 조성물'로서 간주됨)은 진행중인 1차 면역 반응 동안에 투여될 수 있으며, 충분하게 시간을 둔다. 일반적으로 조성물의 제 2 투여량은 제 1 투여량 이후 수주 일에, 또는 대략 한달에, 예를 들어, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주에 제공되어 비반응성 또는 반응성이 낮은 개체에서의 면역 시스템을 1차 투여되도록 돕는다.
- <112> 특정 구체예에서, 상기 면역원성 조성물의 투여는 다르게는 또는 추가로 애주번트 비첨가 조성물로 면역화된 개체에서 유도된 B-기억 세포 반응과 비교하여 애주번트 첨가된 면역원성 조성물이 투여된 환자에게서 개선된 B-기억 세포 반응을 유도한다. 개선된 B-기억 세포 반응은 시험관내 분화의 촉진에 의해 촉진하여, 항원 직면시 항체 분비 혈장 세포로 분화할 수 있는 말초혈 B 림프구의 증가된 빈도를 의미하는 것으로 의도된다[참조: 실시예 부분, 예를 들어, 엘리스팟(Elispot) B 세포 기억 방법].
- <113> 추가의 특정 구체예에서, 애주번트 첨가된 일차 백신접종을 위한 조성물로의 백신접종은 CD8 반응에 측정가능할 정도의 영향을 주지 않는다.
- <114> 출원인은 놀라게도, 대사가 가능한 오일, 스테롤, 예컨대 알파 토크페롤, 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트로 제형화된 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 포함하는 조성물이 면역-약화된 사람 집단에서 T 세포 반응을 촉진시키는 데 효과적임을 발견하였다. 출원인 입증한 바와 같이, 본원에 기술된 바와 같이, 일차 백신접종을 위한 면역원성 조성물의 단일 투여량의 투여가 애주번트 비첨가 인플루엔자 백신으로 백신접촉하는 것보다 중장년층 사람 집단에서의 인플루엔자에 대한 재백신접종 이후에 인플루엔자 백신에 대한 보호능 상관관계에 의해 평가되는 바와 같이, 보다 우수한 혈청-보호능을 제공할 수 있다. 또한, 청구된 애주번트 첨가된 제형은 또한 애주번트 비첨가 제형으로 얻어지는 것과 비교하여 인플루엔자 바이러스에 대해 개선된 CD4 T-세포 면역 반응을 유도할 수 있다. 이러한 발견은 인플루엔자 항원 노출에 대한 백신접종 또는 감염시 증가된 반응성과 관련될 수 있다.
- <115> 추가로, 이는 또한 교차-반응성, 즉, 변형 인플루엔자 균주에 대한 보다 높은 반응력과 관련될 수 있다. 이러한 개선된 반응은 노인 집단(65세 이상), 및 특히 고위험 중장년층 집단과 같은 면역-약화된 사람 집단에서 특히 유리할 수 있다. 이는 전체적인 질병률 및 사망율을 감소시키고, 폐렴 및 그 밖의 인플루엔자 유사 병에 대한 긴급 입원을 방지할 수 있다. 이는 또한 유아 집단(5세 미만, 특히 2세 미만)에 유리할 수 있다. 추가로, 애주번트 비첨가 제형으로 유도된 반응과 비교하여 일차 백신접종 후 소정 기간, 예를 들어 지속적으로 1년 존재하는 CD4 T-세포 반응을 유도할 수 있다.
- <116> 바람직하게는, CD4 T-세포 반응, 예컨대 1차 투여되지 않은 피검체에서 달성된 개선된 CD4 T-세포 반응은 교차반응성 CD4 T 헬퍼 반응의 유도를 포함한다. 특히, 교차-반응성 CD4 T세포의 양이 증가된다. '교차-반응성' CD4 반응은 인플루엔자 균주 간에 공유된 에피토프를 CD4 T 세포 표적화하는 것을 의미한다.
- <117> 보통, 입수할 수 있는 인플루엔자 백신은 유사한 항원성 특징의 헤마글루티닌을 갖는 인플루엔자 바이러스 균주를 감염시키는 것에 대해서는 효과적인 것이다. 인플루엔자 바이러스 감염(순환)으로 특정 헤마글루티닌에서 표면 당단백질에 약간의 변화(예컨대, 점 돌연변이 또는 예를 들어 아민노산 변화를 초래하는 점 돌연변이)의 축

적)가 진행된 경우, 백신은 새롭게 생긴 변이체가 이전의 인플루엔자 감염 또는 백신접종에 의해 유도된 면역성을 벗어날 수 있음에 따라 단지 제한된 보호능을 제공할 수 있기는 하지만, 백신은 여전히 약간의 보호능을 제공할 수 있다. 항원성 드리프트는 유행기 사이 동안에 일어나는 연례적 유행병의 원인이 된다[참조: Wiley & Skehel, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 365-394]. 교차-반응성 CD4 T 세포의 유도는 또한 교차 반응, 즉, 이중 감염, 즉, 면역원성 조성물에 함유된 인플루엔자 균주의 변형(예를 들어, 드리프트)인 순환하는 인플루엔자 균주에 의해 유도된 감염에 대한 보호능을 제공할 수 있다는 점에서 본 발명의 조성물에 추가의 이점을 제공한다. 이는 드리프트된 균주를 대안 작업에서 사용하게 하는, 순환 균주가 난항에서 전파되거나 조직 배양물에서 생성되기가 어려운 경우에 유리할 수 있다. 이는 또한 피검체가 수개월 또는 일년 간격으로 일차 및 이차 백신 접종을 하고, 제 2 면역화에 사용된 면역원성 조성물내 인플루엔자 균주가 일차 백신접종에 사용된 조성물에 사용된 균주의 드리프트 변형 균주인 경우에 유리할 수 있다.

- <118> 인플루엔자 백신에 의한 백신접종 후 교차-반응성 CD4 T-세포의 검출
- <119> 전통적인 3가 인플루엔자 백신 투여 후(3주), 백신에 존재하는 것과 상동성인 항원성 균주 제제(전 바이러스 또는 스플리트 항원)(H3N2: A/파나마/2007/99, H1N1 : A/뉴 칼레도니아/20/99, B: B/상동/7/97)에 반응하는 말초혈 CD4 T-세포의 빈도가 상당히 증가한다(실시에 III 참조). 빈도에서 필적할 만한 증가가 말초혈 CD4 T-세포가 드리프트된 균주로서 분류된 인플루엔자 균주(H3N2: A/시드니/5/97, H1 N1 : A/베이징/262/95, B: B/야마나시/166/98)로 재자극되는 경우에 보여질 수 있다.
- <120> 대조적으로, 말초혈 CD4 T-세포가 당해 숙련자에 의해 시프트 균주로서 분류된 인플루엔자 균주(H2N2: A/싱가폴/1/57, H9N2: A/홍콩/1073/99)로 재자극되는 경우, 백신접종 후 관찰될 수 있을 정도의 증가가 없다.
- <121> 상동성인 인플루엔자 균주 및 드리프트된 인플루엔자 균주 둘 모두를 인지할 수 있는 CD4 T-세포는 본 명세서에서 "교차-반응성"으로 명명된다. 본 발명에서의 용도를 위해서 청구된 애주번트 첨가된 인플루엔자 조성물은, 드리프트된 인플루엔자 균주에 대해 교차-반응성이 관찰가능한 정도이기 때문에 이형서브타입 교차 반응성을 나타낼 수 있었다.
- <122> 상기 관찰과 일관되게, 상이한 인플루엔자 균주에 의해 공유되는 CD4 T-세포 에피토프가 사람에게서 확인되었다 [참조: Gelder C et al. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM et al. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM et al. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506].
- <123> 특정 구체예에서, 애주번트 첨가된 조성물은 최근 입수할 수 있는 백신이 효능이 전혀 없는 헤마글루티닌(항원성 시프트)에서 약간의 변화(예컨대, 두개의 상이한 종 간의 유전자 재조합)가 일어난 순환 균주에 대해 보다 우수한 보호능을 제공하는 추가의 이점을 제공할 수 있다.
- <124> **기타 애주번트**
- <125> 상기 조성물은 추가의 애주번트, 특히 TRL-4 리간드 애주번트, 적합하게는 지질 A의 비독성 유도체를 포함할 수 있다. 적합한 TRL-4 리간드는 3-데-O-아실화 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)이다. 그 밖의 적합한 TRL-4 리간드는 리포폴리사카라이드(LPS) 및 유도체, MDP(무라밀 디펩티드) 및 RSV의 F 단백질이다.
- <126> 일 구체예에서, 조성물은 통형 수용체(TLR) 4 리간드, 예컨대 지질 A의 비독성 유도체, 특히 모노포스포릴 지질 A, 또는 보다 특히 3-데아실화 모노포스포릴 지질 A(3D-MPL)를 추가로 포함할 수 있다.
- <127> 3D-MPL은 코릭사 코포레이션(Corixa corporation)에 의해 상표 MPL® (본원에서 MPL)로 시판되고 있으며, 주로 IFN- γ (Th1) 표현형과의 CD4+ T 세포 반응을 촉진한다. 3D-MPL은 GB 2 220 211 A에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다. 화학적으로는, 3D-MPL은 3-데아실화 모노포스포릴 지질 A와 3, 4, 5 또는 6 아실화 사슬의 혼합물이다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물에서는 소입자 3D-MPL이 사용된다. 소입자 3D-MPL은 0.22 μ m 필터를 통해 살균 여과될 수 있도록 하는 입자 크기를 갖는다. 이러한 제제는 WO 94/21292 및 실시에 II에 기술된다.
- <128> 3D-MPL은 예를 들어, 조성물 투여량 당 1 내지 100 μ g(w/v), 바람직하게는 조성물 투여량 당 10 내지 50 μ g(w/v)의 양으로 사용될 수 있다. 3D-MPL의 적합한 양은 예를 들어, 조성물 투여량 당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50 μ g(w/v) 중 어느 하나이다. 보다 바람직하게는, 3D-MPL의 양은 조성물 투여량 당 25 내지 75 μ g(w/v)의 범위이다. 보통, 조성물 투여량은 약 0.5 ml 내지 약 1 ml의 범위일 것이다. 일반적인 백신 투여량은 0.5 ml, 0.6 ml, 0.7 ml, 0.8 ml, 0.9 ml 또는 1 ml이다. 바람직한 구체예에서, 3D-MPL의 50 μ g의 최종 농도가 백신 조성물 ml 당 함유되거나, 0.5ml 백신

투여량 당 25 μ g이 함유된다. 다른 바람직한 구체예에서, 3D-MPL의 35.7 μ g 또는 71.4 μ g의 최종 농도가 백신 조성물 ml 당 함유된다. 특히, 0.5ml 백신 투여 용적은 투여량 당 25 μ g 또는 50 μ g의 3D-MPL을 함유한다.

- <129> MPL의 투여량은 적합하게는 사람의 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. 특히, 적합한 MPL 양은 애주번트 비침가 조성물과 비교하거나, 다른 MPL 양으로 애주번트 첨가된 조성물과 비교하여 반응생성력 프로파일로부터 입수될 수 있으면서 조성물의 면역학적 효능을 개선시키는 양이다.
- <130> 지질 A의 합성 유도체는 공지되어 있으며, 일부는 TLR-4로서 기술되어 있으며, 하기를 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.
- <131> **OM174** (2-테옥시-6-o-[2-테옥시-2-[(R)-3-도데카노일옥시테트라-데카노일아미노]-4-o-포스포노- β -D-글루코피라노실]-2-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]- α -D-글루코피라노실디히드로게노포스페이트), (WO 95/14026)
- <132> **OM 294 DP** (3S, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9(R)-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올, 1,10-비스(디히드로게노포스페이트)(WO 99/64301 및 WO 00/0462)
- <133> **OM 197 MP-Ac DP** (3S-, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]데칸-1,10-디올, 1-디히드로게노포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트)(WO 01/46127)
- <134> 다른 적합한 TLR-4 리간드는 예를 들어 리포폴리사카라이드 및 이의 유도체, 무라밀 디펩티드(MEP) 또는 호흡기 합포체 바이러스의 F 단백질이다.
- <135> 본 발명에 사용하기 위한 또 다른 적합한 면역자극제는 쿠일(Quil) A 및 이의 유도체이다. 쿠일 A는 남아메리카에 자생하는 퀴라자 사포나리아 모리나(Quillaja saponaria Molina) 나무로부터 분리된 사포닌 제제이며, 애주번트 활성을 갖는 것으로 1974년 달스가드(Dalsgaard) 등("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)에 의해 처음으로 기술되었다. 쿠일 A와 관련된 독성 없이 애주번트 활성을 보유한 쿠일 A의 정제된 단편(EP 0 362 278), 예를 들어 QS7 및 QS21(또한 QA7 및 QA21로서 공지되어 있음)이 HPLC에 의해 분리되었다. QS-21은 퀴라자 사포나리아 모리나의 껍질로부터 유래된 천연 사포닌이며, 이는 CD8+ 세포독성 T 세포(CTL), Th1 세포 및 현저한 IgG2a 항체 반응을 유도하며, 본 발명의 내용상 바람직한 사포닌이다.
- <136> 특히 바람직한 QS21의 특정 제형이 기술되었으며, 이러한 제형은 추가로 스테롤을 포함한다(WO 96/33739). 본 발명의 사포닌 형성부는 수중유 에멀전의 형태로 존재할 수 있다(WO 95/17210)
- <137> **재백신접종 및 재백신접종에 사용되는 조성물(부스팅 조성물)**
- <138> 본 발명의 일 양태는 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제 또는 대사 가능한 오일, 스테롤, 예컨대, 알파-토코페롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트로 제형된 이의 변이체로 이미 백신접종된 사람을 재백신접종하기 위한 인플루엔자 면역원성 조성물의 제조시 인플루엔자 항원의 용도를 제공한다.
- <139> 일반적으로, 재백신접종은 일차 백신접종 후 적어도 6개월 후, 바람직하게는 8개월 내지 14개월 후, 보다 바람직하게는 대략 10 내지 12개월 후에 이루어진다.
- <140> 재백신접종을 위한 면역원성 조성물(부스팅 조성물)은 불활성화되거나 생 약독화된 임의의 유형의 항원 제제를 함유할 수 있다. 일차 백신접종에 사용된 면역원성 조성물로서, 동일한 유형의 항원 제제, 즉 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 인플루엔자 바이러스 항원성 제제, 전 비리온, 정제된 HA 및 NA(서브-유닛) 백신 또는 비로솜을 함유할 수 있다. 다르게는, 부스팅 조성물은 일차 백신접종에 사용된 것과는 다른 타입의 인플루엔자 항원, 즉, 스플리트 인플루엔자 바이러스, 또는 이의 스플리트 인플루엔자 바이러스 항원성 제제, 전 비리온, 정제된 HA 및 NA(서브-유닛) 백신 또는 비로솜을 함유할 수 있다. 부스팅 조성물은 애주번트 첨가되거나 애주번트 첨가되지 않는다. 애주번트 비침가 부스팅 조성물은 근대 투여되는 플루아릭스(Fluarix)TM/ α -릭스(Rix)[®]/인플루스플리트(Influsplit)[®]일 수 있다. 이러한 제형은 적합한 인플루엔자 시즈의 WHO 권장 균주로부터 제조된 세계의 불활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유한다.
- <141> 따라서, 바람직한 구체예에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제 및 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트로 이미 백신 접종된 사람의 재백신 접종을 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제, 및 (b) 수중유 에멀전 애주번트의 용도를 제공한다. 상기 수중유 에멀전 애주번트는 총용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 하나 이상의 대사가능한 오일을 포함하고, 70세기% 이상이 1 μ m 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 지닌다. 바람직하게는, 스테롤은 알파 토코페

물이다.

- <142> 특정 구체예에서, 재백신접종을 위한 면역원성 조성물(또한, 본원의 이하에서는 '부스팅 조성물'로 일컫어짐)은 일차 백신접종에 사용된 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제와 공통되는 CD4 T-세포 에피토프를 공유하는 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 함유한다. 공통되는 CD4 T 세포 에피토프는 동일한 CD4 세포에 의해 인지될 수 있는 상이한 항원으로부터의 펩티드/서열/에피토프를 의미하는 것으로 의도된다[에피토프가 기술되어 있는 참조예: Gelder C et al. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM et al. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; Gelder CM et al. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506].
- <143> 바람직한 구체예에서, 인플루엔자 균주는 유행병 발생과 관련있거나 유행병 발생과 관련될 가능성이 있다. 특히, 백신이 다가 백신, 예컨대, 이가 또는 삼가 백신인 경우, 하나 이상의 균주는 유행병 발생과 관련있거나 유행병 발생과 관련될 가능성이 있다. 적합한 균주는 H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 및 H1N1이나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- <144> 본 발명의 또 다른 특징으로, 본 발명은 1차 인플루엔자 균주의 변이체인 인플루엔자 균주에 의해서 야기된 인플루엔자 감염증에 대한 방지를 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 1차 인플루엔자 균주로부터의 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제, 및 (b) 대사 가능한 오일, 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트의 용도를 제공한다. 바람직하게는, 상기 수중유 에멀전 애주번트는 총용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 하나 이상의 대사가능한 오일을 포함하고, 70세기% 이상이 1 μ m 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 지닌다. 적합하게는, 스테롤은 알파-토코페롤이다.
- <145> 일반적으로, 사용되는 부스팅 조성물은 다음 인플루엔자 시즌, 예를 들어 제 1 면역원성 조성물 접종 후 대략 1년 경에 제공된다. 또한, 부스팅 조성물은 다음 해 마다(제 3, 제 4, 제 5 백신접종 등) 제공될 수 있다. 부스팅 조성물은 일차 백신접종에 사용되는 조성물과 동일할 수 있다. 적합하게는, 부스팅 조성물은 일차 백신접종에 사용된 인플루엔자 바이러스의 변형 균주인 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제를 함유한다. 특히, 인플루엔자 바이러스 균주 또는 이의 항원성 제제는 재백신접종의 해에 순환하는 인플루엔자 균주에 적합하도록 세계 보건 기구에 의해 분배된 기준 물질에 따라 선택된다.
- <146> 재백신접종에 사용되는 인플루엔자 항원 또는 항원성 조성물은 적합하게는 상기 기술된 바와 같은 애주번트 또는 수중유 에멀전을 포함하는 것이 바람직하다. 애주번트는 임의로 TLR-4 리간드, 예컨대 3D-MPL 또는 사포닌과 같은 추가의 애주번트를 함유하는, 상기 본원에 기술된 바와 같은 수중유 에멀전 애주번트이거나(이것이 바람직하다), 명반(alum) 또는 명반 대안물, 예컨대 폴리포스파젠과 같은 또 다른 적합한 애주번트일 수 있다.
- <147> 바람직하게는, 재백신접종은 하기 중 어느 것들, 바람직하게는 두개 또는 전부를 유도한다; 애주번트 비침가 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제로 일차 백신접종된 후에 유도된 해당 반응과 비교하여, (i) 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제에 대해 개선된 CD4 반응, (ii) 개선된 B 세포 기억 반응, 또는 (iii) 개선된 체액 반응. 바람직하게는, 본원에 정의된 바와 같은 애주번트 첨가된 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제로 재백신접종된 후 유도된 면역학적 반응은 애주번트 비침가 조성물로 재백신접종된 후에 유도된 상응하는 반응에 비해 더 높다. 바람직하게는, 애주번트 비침가된, 바람직하게는 스플리트 인플루엔자 바이러스로 재백신접종된 후 유도된 면역학적 반응은 애주번트 비침가된, 바람직하게는 스플리트 인플루엔자 조성물로 일차 백신접종된 집단에서의 상응하는 반응보다 애주번트 첨가된, 바람직하게는 스플리트 인플루엔자 조성물로 일차 백신접종된 집단에서 더 높다.
- <148> 출원인이 입증한 바와 같이, 상기 정의된 바와 같이, 대사가능한 오일, 알파 토코페롤과 같은 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트 및 인플루엔자 바이러스를 포함하는 부스팅 조성물로의 피검체의 재백신접종은 애주번트 비침가 조성물로 일차 백신접종되고, 애주번트 비침가 조성물로 부스팅된 집단 군에서의 상응하는 값보다 높은 항체 역가를 보여준다. 재백신접종에 대한 항체 반응을 증진시킴에 있어서 애주번트의 효과는 인플루엔자 바이러스에 의한 감염 또는 백신접종에 대해 낮은 반응을 갖는 것으로 알려진 중장년층 집단에서 특히 중요하다. 또한, 애주번트 첨가된 조성물과 관련된 이점은 재백신접종 후 CD4 T-세포 반응을 개선시킨다는 점에서 두드러진다.
- <149> 본 발명의 애주번트 첨가된 조성물은 대조군 백신에 의해 부여된 보호능과 비교하여 드리프트된 균주(다음 인플루엔자 시즌으로부터의 인플루엔자 균주)에 대해 보다 우수한 교차-반응성을 유도할 수 있다. 상기 교차-반응성은 애주번트 비침가 제형으로 얻어지는 것과 비교하여 보다 높은 지속성을 나타내었다.
- <150> 예를 들어, 실시예 3에 제시된 임상전 데이터는 체온도 관독에 의해 평가되는 이형타입 인플루엔자 감염 및 질

병에 대한 본 발명의 조성물의 보호능을 보여준다. 재백신접종 연구에서 얻어진 임상 시험 결과에 대해서는 동일 결과가 그러하다는 것을 지지한다.

<151> **인플루엔자 바이러스 균주 및 이의 항원**

<152> 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제는 적절하게는 1가 또는 다가, 예를 들어 2가 또는 3가 또는 4가이다. 바람직하게는, 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제체는 세 개의 상이한 인플루엔자 균주로부터의 항원을 갖는 3가 또는 4가이다.

<153> 임의적으로, 적어도 하나의 균주는 유행성 발병과 관련되거나 유행성 발병과 관련될 가능성을 갖는다.

<154> 종래배경으로서, 대유행기 사이 기간 동안에, 이전 전염병으로부터의 것과 관련된 인플루엔자 바이러스가 순환한다. 바이러스는 삶에서 보다 이른 감염으로부터 면역성의 다양한 수준을 갖는 사람들 중에 퍼진다. 대개 2 내지 3년의 기간에 걸친 이러한 순환은 일반적인 집단 중에 다시 전염병을 야기시키기에 충분하게 변형된 신규한 균주의 선택을 증진시킨다: 이러한 과정은 '항원 드리프트'라 칭한다. '드리프트 변이체'는 임의의 일년에서 상이한 군집, 영역, 나라 또는 대륙에서 상이한 효과를 갖을 수 있지만, 수년에 걸쳐 이러한 전체 효과는 종종 유사하다. 다시 말해서, 세계적인 인플루엔자는 신규한 인플루엔자 바이러스가 면역성을 갖지 않는 사람 집단에 대해 나타날 때 발생한다. 통상적인 인플루엔자 전염병은 입원 또는 사망률의 증가된 비율에 의해 입증된 바와 같이 폐렴 및 보다 낮은 부분 호흡기 질환의 빈도의 증가를 초래한다. 노인 또는 만성 질환을 겪는 사람은 이러한 합병증을 대부분 경험할 것이지만 젊은 유아는 또한 심각한 질환으로 고통당할 수 있다.

<155> 예측되지 않는 간격에서, 신규한 인플루엔자 바이러스는 이전 계절에 순환하는 균주로부터의 전체적으로 상이한 서브타입의 키 표면 항원, 헤마글루티닌을 나타낸다. 여기에서, 얻어진 항원은 종래에 사람에서 순환하는 균주의 상응하는 부분으로부터 20% 내지 50%로 다양할 수 있다. 이는 '다수 면역성'을 피하고 전염병을 전염시키는 바이러스에 초래할 수 있다. 이러한 현상은 '항원 쉬프트'로 칭한다. 상이한 종으로부터의 인플루엔자 바이러스, 예를 들어 조류 또는 돼지 인플루엔자 바이러스가 종 장벽을 넘는 경우, 적어도 페스트 전염병에서 발생하는 것으로 생각된다. 이러한 바이러스가 사람에서 사람으로 퍼질 가능성을 갖는 경우, 이는 수개월 내지 수년 내로 전세계로 퍼져 전세계적인 병을 초래할 수 있다. 예를 들어, 1957년에(아시안 Flu 전염병), H2N2 서브타입의 바이러스는 바이러스가 먼저 분리될 때 적어도 1918년 이후 사람 집단에 순환하는 H1N1 바이러스를 대신하였다. H2 HA 및 N2 NA는 HA가 H3N2 인플루엔자 서브타입의 출현에 의해 1968년(홍콩 Flu 전염병)에 대체될 까지 1957년에서 1968년 사이에 항원 드리프트를 겪었으며, 이후 N2 NA는 H3 HA에 따라 계속 드리프트된다 [Nakajima et al., 1991, Epidemiol. Infect. 106, 383-395].

<156> 전염병 발병을 야기할 가능성을 제공하는 인플루엔자 바이러스 균주의 특징은 하기와 같다: 현재 순환하는 균주에서 헤마글루티닌과 비교하여 신규한 헤마글루티닌을 함유하며, 이는 뉴라미니다제 서브타입의 변형에 의해 수행되거나 수행되지 않을 수 있다; 사람 집단에서 수평으로 전달될 수 있다; 사람에 대한 병원체이다. 신규한 헤마글루티닌은 연장된 기간, 바람직하게는 수십년, 예를 들어 H2 동안 사람 집단에서 증명되지 않을 수 있다. 또는 세에서 발견된 예를 들어 H5, H9, H7 또는 H6 전에 사람 집단에서 순환되지 않는 헤마글루티닌일 수 있다. 이러한 경우에, 대부분, 또는 적어도 큰 부분, 또는 심지어 전체 집단은 항원을 미리 대항하지 않으며 이에 면역학적으로 투약하지 않는다.

<157> 특정 입자는 일반적으로 전염 상황에서 인플루엔자로 감염되는 위험을 증가시킨다. 노인의, 만성 병 및 어린이는 특히 걸리기 쉬지만, 젊고 건강한 사람 또한 위험하다. H2 인플루엔자에 대해, 1968년 이후에 태어난 집단의 일부는 증가된 위험성을 갖는다. 이들 균은 가능한한 빨리 간단한 방법으로 효과적으로 방어되는 것이 중요하다.

<158> 증가된 위험을 갖는 다른 균의 사람은 여행자이다. 사람들은 오늘날 더욱 많이 여행을 하고, 대부분의 신규한 바이러스가 나타나는 지역, 중국 및 동남아시아가 최근에 인기있는 여행지가 되었다. 여행 패턴의 이러한 변화는 수개월 또는 수년에 비해 수주내에 세계적으로 신규한 바이러스를 도달시킬 수 있다.

<159> 따라서, 이러한 사람의 그룹에 대해, 전염 상황 또는 잠재적 전염 상황에서 인플루엔자에 대한 방어를 위한 백신접종이 특히 필요로 한다. 적절한 균주는 H5N1, H9N2, H7N7, H2N2 및 H1N1이지만, 이에 제한되지 않는다.

<160> 임의적으로 조성물은 세 개 초과와 결합가, 예를 들어 두 개의 비-전염성 균주 + 전염성 균주를 함유할 수 있다. 대안적으로는, 조성물은 세 개의 전염성 균주를 함유할 수 있다.

<161> 추가의 구체예에서, 본 발명은 일차 백신접종이 유행병 발생을 초래할 가능성이 있는 하나 이상의 인플루엔자

균주를 함유하는, 인플루엔자 조성물, 바람직하게는 스플리트 인플루엔자 조성물로 이루어지고, 재백신접종이 순환되는 균주인, 유행성 균주 또는 전통적인 균주로 이루어지는 백신접종 양생법에 관한 것이다.

<162> HA에서의 CD4 에피토프

<163> 본 항원성 드리프트는 주로 바이러스 표면 단백질인 헤마글루티닌(HA) 및 뉴라미디다제(NA)의 에피토프 영역에 주로 존재한다. 숙주 면역 시스템의 적응성 반응을 회피하는 바이러스에 의해 사용되는, 상이한 인플루엔자 균주 간의 CD4 및 B 세포 에피토프에서의 어떠한 차이점도 인플루엔자 백신접종에 중요한 역할을 할 것이다.

<164> 상이한 인플루엔자 균주에 의해 공유되는 CD4 T-세포 에피토프는 사람에게서 확인되었다[참조예: Gelder C et al. 1998, Int Immunol. 10(2):211-22; Gelder CM et al. 1996 J Virol. 70(7):4787-90; and Gelder CM et al. 1995 J Virol. 1995 69(12):7497-506].

<165> 특정 구체예에서, 재백신접종은 일차 백신접종에 사용된 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 항원성 체제와 공통되는 CD4 T-세포 에피토프를 공유하는 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 체제를 함유하는 부스팅 조성물을 사용함으로써 이루어진다. 따라서, 본 발명은 추가로 부스팅 투여량으로서 일차 백신접종에 제공된 투여량의 유행성 인플루엔자 바이러스 항원 또는 이의 바이러스 항원성 체제와 공통되는 CD4 T-세포 에피토프를 공유하는 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 체제를 포함하는 다중투여량 백신의 일차 백신접종-성분의 제조시, 유행성 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 체제 및 수중유 에멀전 애주번트, 특히 대사가 가능한 오일, 알파 토코페롤과 같은 스테롤 및 에멀전화제를 포함하는 수중유 에멀전 애주번트를 포함하는 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다.

<166> 백신접종 수단

<167> 본 발명의 조성물은 피내, 점막, 예를 들어, 비강, 경구, 근내 또는 피하와 같은 임의의 적합한 전달 경로에 의해 투여될 수 있다. 그 밖의 전달 경로가 당해 널리 공지되어 있다.

<168> 근내 전달 경로가 애주번트 첨가된 인플루엔자 조성물에 바람직하다.

<169> 피내 전달이 또 다른 적합한 경로이다. 임의의 적합한 기구, 예를 들어, US 4,886,499, US 5,190,521, US 5,328,483, US 5,527,288, US 4,270,537, US 5,015,235, US 5,141,496, US 5,417,662에 기술된 것과 같은 슛 니들(short needle) 기구가 피내 전달에 사용될 수 있다. 피내 백신은 또한 본원에 참고 문헌으로 인용되는 WO 99/34850 및 EP 1092444에 기술된 것들과 같이, 피부에 침투되는 효과적인 니들 길이를 제한하는 기구에 의해 투여될 수도 있다. 또한, 액체 젯트 주사기를 통해 또는 각질층을 뚫어 피부에 이르는 젯트를 생성하는 니들을 통해 피부에 액체 백신을 전달하는 젯트 주사 기구가 적합하다. 젯트 주사 기구는 예를 들어, US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 및 WO 97/13537에 기술되어 있다. 또한, 분말 형태의 백신을 피부의 외층을 통해 피부로 가속화시키기 위해 압축 기체를 사용하는 탄도 분말/입자 전달 기구가 적합하다. 또한, 통상적인 주사기가 피내 투여의 전통적인 망토우(mantoux) 방법에서 사용될 수 있다.

<170> 또 다른 적합한 투여 경로는 피하 경로이다. 임의의 적합한 기구, 예를 들어, 전통적인 니들이 피하 전달에 사용될 수 있다. 바람직하게는, WO 01/05453, WO 01/05452, WO 01/05451, WO 01/32243, WO 01/41840, WO 01/41839, WO 01/47585, WO 01/56637, WO 01/58512, WO 01/64269, WO 01/78810, WO 01/91835, WO 01/97884, WO 02/09796, 및 WO 02/34317에 개시된 바와 같은 니들 부재 젯트 주입 서비스가 사용된다. 보다 바람직하게는, 이러한 기구는 액체 백신 제형으로 프리필드된다.

<171> 다르게는, 백신은 비강내 투여된다. 일반적으로, 백신은 바람직하게는 폐에 흡입되지 않으면서 비인두 면적(nasopharyngeal area)에 국부적으로 투여된다. 폐에 도입되지 않거나, 실질적으로 도입되지 않으면서 비인두 면적에 백신 제형을 전달하는 비강 전달 기구를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

<172> 본 발명에 따른 백신의 비내 투여를 바람직한 기구는 분무 기구이다. 통상적으로 이용할 수 있는 적합한 비강 분무 기구는 아쿠스프레이(Accuspray)TM(Becton Dickinson)를 포함한다. 분무기(nebuliser)는 폐에 쉽게 흡입될 수 있어 비강 점막에는 효과적으로 도달하지 않는 매우 미세한 분무를 생성한다. 그러므로, 분무기는 바람직하지 않다.

<173> 비내 사용하기에 바람직한 분무 기구는 기구의 성능이 사용자에게 의해 가해지는 압력에 의존하지 않는 기구이다.

이러한 기구는 압력 역치 기구(pressure threshold device)로서 공지되어 있다. 액체는 역치 압력이 가해지는 경우에만 노즐로부터 방출된다. 이러한 기구는 규칙적인 점적 크기를 갖는 분무를 용이하게 달성하도록 한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 압력 역치 기구는 당해 공지되어 있으며, 예를 들어 본원에 참고문헌으로 인용되는 WO 91/13281 및 EP 311 863에 기술되어 있다. 이러한 기구는 파이프 게엠바하(Pfeiffer GmbH)로부터 통상적으로 입수할 수 있으며, 또한 문헌(Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Sept 1999)에 개시되어 있다.

<174> 바람직한 비내 기구는 1 내지 200 μ m, 바람직하게는 10 내지 120 μ m 범위의 점적(액체로서 물을 사용하여 측정함)을 생성한다. 10 μ m 미만의 경우, 흡입 위험이 있으므로, 10 μ m 미만의 점적은 약 5% 이하인 것이 바람직할 수 있다. 120 μ m 초과인 점적 뿐만 아니라 보다 작은 점적은 확산되지 않으므로, 120 μ m를 초과하는 점적은 약 5% 이하인 것이 바람직할 수 있다.

<175> 이중-투여량 전달(Bi-dose delivery)이 본 발명에 따른 백신과 사용하기 위한 비내 전달 시스템의 추가의 바람직한 특징이다. 이중-투여량 기구는 단일 백신 투여량의 두개의 서브-투여량, 즉, 각 콧구멍에 투여하기 위한 하나의 서브-투여량을 함유한다. 일반적으로, 두개의 서브-투여량은 단일 챔버에 존재하며, 기구의 구성이 한번에 단일 서브-투여량의 전달을 효과적이게 한다. 다르게는, 본 발명에 따른 백신을 투여하기 위해 단일투여량 기구가 사용될 수 있다.

<176> 다르게는, 상피 또는 경피 백신 경로 또한 본 발명에 고려될 수 있다.

<177> 본 발명의 특정 양태에서, 제 1 투여를 위한 애주버트 첨가된 면역원성 조성물은 근대 제공될 수 있으며, 애주버트 첨가되거나 비첨가된 부스팅 조성물은 상이한 경로, 예를 들어, 피내, 피하 또는 비내를 통해 투여될 수 있다. 또 다른 특정 구체예에서, 제 1 투여를 위한 조성물은 인플루엔자 균주당 15 μ g의 표준 HA 함량을 함유할 수 있으며, 부스팅 조성물은 낮은 투여량, 즉 15 μ g 미만의 HA를 함유할 수 있으며, 투여 경로에 따라 보다 적은 용량으로 투여될 수 있다.

<178> **백신접종을 위한 집단**

<179> 백신접종을 위한 표적 집단은 면역 약화된 사람일 수 있다. 면역-약화된 사람은 일반적으로 건강한 성인과 비교하여 항원, 특히 인플루엔자 항원에 대해 덜 반응할 수 있다.

<180> 바람직하게는, 표적 집단은 나이브(예를 들어, 유행성 균주에 비해)이거나, 인플루엔자 감염 또는 백신접종에 대해 이전에 반응한 적이 없는, 인플루엔자에 대해 1차 투여되지 않은 집단이다. 바람직하게는, 표적 집단은 65세 이상의 노인, 보건 연구소에서 일하는 사람들과 같은 보다 젊은 고위험 성인(즉, 18세 내지 64세), 또는 심혈관 및 폐 질환, 또는 당뇨병과 같은 위험 인자를 지닌 젊은 성인이다. 또 다른 표적 집단은 6개월 이상의 모든 어린이, 특히 상대적으로 높은 인플루엔자 관련 입원율을 경험한 6-23개월 된 소아이다. 바람직하게는, 표적 집단은 상기 65세 이상의 노인이다.

<181> **백신접종 양생법, 투여법 및 추가의 효능 기준**

<182> 적합하게는, 본 발명에 따른 면역원성 조성물은 대부분의 경우에 표준 0.5ml 주사가 가능한 투여량으로 존재하며, 일원 면역 확산법(SRD)(J.M. Wood et al.: J. Biol. Stand. 5(1997) 237-247; J.M. Wood et al., J. Biol. Stand. 9(1981) 317-330)에 의해 측정하여 각 인플루엔자 균주로부터 15 μ g의 헤마글루티닌 항원 성분을 함유한다. 적합하게는, 백신 투여량 용적은 0.5ml 내지 1ml이며, 특히 표준 백신 투여량 용적은 0.5ml, 또는 0.7ml이다. 투여량 용적의 적은 적용은 원래의 대용량 샘플에서 HA 농도에 의존하여 관례대로 이루어질 수 있다.

<183> 적합하게는, 상기 면역원성 조성물은 낮은 투여량의 HA 항원, 예를 들어, 인플루엔자 균주당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14 μ g중 어느 하나를 함유할 수 있다. 적합한 낮은 투여량의 HA는 인플루엔자 균주당 1 내지 7.5 μ g, 적합하게는 인플루엔자 균주당 3.5 내지 5 μ g, 예컨대, 3.75 μ g, 일반적으로는 인플루엔자 균주당 약 5 μ g이다.

<184> 유리하게는, 본 발명에 따른 백신 투여량, 특히 낮은 백신 투여량이 일반적으로 투여량 당 대략 0.5, 0.7 또는 1ml인 통상적으로 주입되는 스플리트 flu 백신에 비해 적은 용량이다. 본 발명에 따른 낮은 용량의 투여량은 투여량 당 바람직하게는 500 μ l 미만, 보다 바람직하게는 300 μ l 미만, 매우 바람직하게는 약 200 μ l 이하 또는 그 미만이다.

<185> 따라서, 본 발명의 일 양태에 따른 바람직한 저 용량 백신 투여량은 저 용량의 낮은 항원 투여량, 예를 들어,

약 200 μ l의 용적 중에서 약 15 μ g 또는 약 7.5 μ g HA 또는 약 3.0 μ g HA(균주당)을 갖는 투여량이다.

<186> 본 발명의 인플루엔자 약제는 바람직하게는 백신에 대한 정확한 국제 기준에 부합한다.

<187> 표준물질이 국제적으로 인플루엔자 백신의 효능을 측정하기 위해 사용된다. 인플루엔자에 대해 효과적인 백신에 대한 유럽 연합 사무국 기준은 하기 표 1에 기재된다. 이론상, 유럽 연합 요건에 부합하기 위해, 인플루엔자 백신은 백신에 포함된 인플루엔자의 모든 균주에 대해 표내 기준중 어느 하나에만 부합해야 한다. 본 발명의 조성물은 적합하게는 이러한 기준 중 하나 이상에 부합한다.

<188> 그러나, 사실상, 두개 이상 또는 세계 전부의 기준이 모든 균주에 대해, 특히 상이한 경로로 전달하기 위한 새로운 백신과 같은 새로운 백신에 대해 부합되어야 할 필요가 있다. 몇몇 상황에서는, 두개의 기준이 충분할 수 있다. 예를 들어, 세가지 기준 중 두개가 모든 균주에 의해 부합되면서, 세번째 기준이 일부, 그러나 전부는 아닌 균주(예를 들어, 세계의 균주로부터 두개의 균주)에 의해 부합되는 것이 허용될 수 있다. 이러한 요건은 성인 집단(18-60세) 및 노인 집단(60세 초과)에 대해 상이하다.

<189> 표 1

	18-60세	> 60세
혈청전환율*	>40%	>30%
전환 인자**	>2.5	>2.0
보호율***	>70%	>60%

<191> * 혈청전환율은 각 백신 균주에 대해 백신접종 후, 혈청 헤마글루티닌 억제(HI) 역가에서 적어도 4배 이상 증가된 백신의 비율로서 정의된다.

<192> ** 전환 인자는 각 백신 균주에 대해 백신접종 후, 혈청 HI 기하학적 평균 역가(GMT)에서의 증가 배수로서 정의된다.

<193> *** 보호율은 백신접종 후(각 백신 균주에 대해), 1:40 이상의 혈청 HI 역가를 갖는 백신의 비율로서 정의되며, 나타내는 보호능으로서 일반적으로 수용된다.

<194> 추가의 양태에서, 본 발명은 CD4+ T 세포 활성화를 통해 치유되거나 치료되는 것으로 공지된 질병의 백신을 설계하는 방법으로서,

<195> 1) CD4+ T 세포 에피토프를 함유하는 항원을 선택하고,

<196> 2) 상기 항원을 상기 본원에서 정의된 바와 같은 수중유 에멀전 애주번트와 배합시키는 것을 포함하며, 상기 포유 동물에 투여시 상기 백신이 상기 포유동물에서 증진된 CD4 T 세포 반응을 유도할 수 있는 방법을 제공한다.

<197> 특허 출원 및 등록 특허를 포함하는 본 출원의 모든 참고문헌의 교시내용은 본원에서 참고로 인용된다.

<198> 명료하게 하기 위해, 본원에서 용어 '포함하는' 및 '포함한다'는 본 발명자에 의해 모든 경우에서 용어 '구성되는' 및 '구성된다'와 임의로 치환가능될 수 있는 것으로 의도된다.

<199> **대안적인 구체예**

<200> 대안적인 구체예에서, 어떠한 수중유 에멀전 애주번트가 사용될 수 있으며, 특히 스플리트 인플루엔자 항원 또는 이의 항원 제제와 함께 사용되는 경우에 배타적이지 않게 사용될 수 있다. 따라서, 하기 특성의 구체예가 또한 본 발명의 범위내에 있는 것으로 여겨진다.:

<201> 1.- 사람에서의 스플리트 인플루엔자 항원 또는 이의 스플리트 항원 제제에 대해서 i) 개선된 CD4 T-세포 반응, ii) 개선된 B 세포 메모리 반응중 하나 이상의 반응을 유도하는 면역원성 조성물을 제조하는데 있어서, (a) 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원제제 및 및 (b) 수중유 에멀전 애주번트의 용도.

<202> 2.- 사람 면역약화된 개체 또는 집단, 예컨대, 고위험 성인, 또는 노인을 인플루엔자에 대해서 백신 접종하기 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제

및 (b) 수중유 에멀전 애주번트의 용도.

- <203> 3.- 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제 또는 수중유 에멀전 애주번트로 이미 백신접종된 사람을 재백신 접종하기 위한 면역원성 조성물의 제조시 애주번트 첨가되거나 비첨가된 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원 제제의 용도. 바람직하게는, 재백신 접종은 인플루엔자에 대해서 이전 계절에 백신 접종된 대상자에게 이루어진다. 전형적으로는, 재백신접종은 일차 백신접종 후 적어도 6개월 후, 바람직하게는 8개월 내지 14개월 후, 보다 바람직하게는 대략 10 내지 12개월 후에 이루어진다.
- <204> 4.- 바람직하게는 본 발명은 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제 또는 수중유 에멀전 애주번트로 이미 백신접종된 사람을 재백신 접종하기 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원제제 및 및 (b) 수중유 에멀전 애주번트의 용도를 제공한다.
- <205> 5.- 1차 인플루엔자 균주의 변이체인 인플루엔자 균주에 의해서 야기된 인플루엔자 감염증에 대한 방지를 위한 면역원성 조성물의 제조에서, (a) 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제 및 (b) 수중유 에멀전 애주번트의 용도.
- <206> 6.- 또 다른 구체예에서, 재백신 접종을 위한 면역원성 조성물은 공통의 CD4 T-세포 에피토프를 1차 백신접종에 사용된 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제와 공유하는 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 스플리트 바이러스 항원 제제를 함유한다.
- <207> 7.- 면역약화된 사람 개체 또는 집단, 예컨대, 고위험 성인 또는 노인을 상기된 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제 및 수중유 에멀전 애주번트를 포함하는 면역원성 제제로 백신 접종하는 방법.
- <208> 8.- 스플리트 인플루엔자 바이러스 또는 이의 스플리트 바이러스 항원 제제 및 수중유 에멀전 애주번트로 이미 백신 접종된 사람에게 애주번트 첨가되거나 비첨가된 인플루엔자 바이러스를 포함한 면역원성 조성물을 투여함을 포함하여, 그러한 사람을 재백신 접종하는 방법.
- <209> 9.- 하나의 인플루엔자 바이러스 균주에 대해서 사람 집단 또는 개체를 백신접종한 다음, 변이성 인플루엔자 바이러스 균주에 대해서 그 사람 또는 집단을 재백신 접종하는 방법으로서, (i) 1차 인플루엔자 균주로부터의 인플루엔자 바이러스 또는 이의 항원성 제제, 및 수중유 에멀전 애주번트를 포함하는 1차 조성물, 및 (ii) 1차 인플루엔자 바이러스 균주의 인플루엔자 바이러스 균주 변이체를 포함하는 2차 면역원성 조성물을 사람에게 투여함을 포함하는 방법.
- <210> 10.- 인플루엔자 백신을 디자인하는 방법으로서, 1) CD4+ 에피토프를 함유하는 인플루엔자 항원을 선택하고, 2) 인플루엔자 항원을 상기된 수중유 에멀전과 혼합함을 포함하며, 상기 포유동물에게 투여되는 경우 백신이 포유동물에서 증진된 CD4 반응을 유도할 수 있게 하는 방법.
- <211> 특정의 구체예에서, 면역원성 조성물은 애주번트 비첨가 항원 또는 항원 조성물로 얻은 반응에 비해서 개성된 CD4 T-세포 반응 및 개선된 B-메모리 세포 반응 둘 모두를 추가로 유도할 수 있다.
- <212> 상기 모든 구체예에서, 수중유 에멀전 애주번트는 적합하게는 총용적의 0.5% 내지 20%의 양으로 하나 이상의 대상가능한 오일을 포함하고, 70세기% 이상이 1 μ m 미만의 직경을 갖는 오일 점적을 지닌다.
- <213> 본 발명은 하기 비제한적 실시예를 참조로 하여 추가로 기술될 것이다:

실시예

- <214> **실시예 I**는 마우스, 흰족제비 및 사람 연구에 사용된 면역학적 관독 방법을 기술한 것이다.
- <215> **실시예 II**는 예시된 연구에 사용된 수중유 에멀전 및 애주번트 제형의 제조 및 특징화를 기술한 것이다.
- <216> **실시예 III**은 스플리트 인플루엔자 항원 제제 및 AS03 애주번트를 함유하는 백신에 의한 65세 초과 연령의 노인 집단의 임상 시험을 기술한 것이다.
- <217> **실시예 IV**는 스플리트 인플루엔자 항원 제제 및 AS03 애주번트를 함유하는 백신에 의한 65세 초과 연령의 노인 집단의 제 2 임상 시험-재백신접종 시험을 기술한 것이다.
- <218> **실시예 V**는 흰족제비에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 인플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다(연구 I 및 연

구 II). 온도 모니터링, 바이알 발산 및 CD4 T-세포 반응을 측정하였다.

- <219> 실시예 VI는 C57BI/6 나이브 및 1차 투여된 마우스에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 인플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다.
- <220> 실시예 VII는 이형 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 스플리트 및 서브-유닛 인플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다.
- <221> 실시예 VIII는 AS03 애주번트, AS03+MPL 애주번트를 함유하거나, 외인성 애주번트를 함유하지 않는 스플리트 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신에 의한 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상전 평가를 기술한 것이다.
- <222> 실시예 IX는 흰족제비에서의 애주번트 첨가 및 비첨가 인플루엔자 백신의 임상전 평가를 나타낸다(연구 III). 온도 모니터링, 바이알 발산 및 HI 역가를 측정하였다.
- <223> 실시예 X는 MPL 애주번트와 함께 또는 부재하에 AS03을 함유하는 스플리트 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신으로의 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상 시험을 나타낸다: 90일 및 180일에서의 면역원성 지속성 데이터.
- <224> 실시예 XI는 MPL 애주번트와 함께 AS03을 함유하는 스플리트 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신으로의 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상 시험을 나타낸다.
- <225> 실시예 XII는 두가지 농도로 MPL 애주번트와 함께 AS03을 함유하는 스플리트 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신으로의 65세 초과 연령의 장년층 집단에서의 임상 시험을 나타낸다
- <226> **실시예 I - 면역학적 관독 방법**
- <227> I.1. 마우스 방법
- <228> I.1.1. 헤마글루티나 억제 시험
- <229> 시험 절차
- <230> 세가지 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 헤마글루티나 억제 시험(HI)을 사용하여 측정하였다. HI 시험의 이론은 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의한 특이적 항-인플루엔자 항체의 닭 적혈구(RBC)의 헤마글루티나 억제능에 기초한다. 열 불활성화 처리된 혈청을 미리 카울린 및 닭 RBC에 의해 처리하여 비특이적 억제제를 제거하였다. 사전처리 후, 혈청의 2배 희석물을 각 인플루엔자 균주의 4개의 헤마글루티나 유닛과 함께 인큐베이션하였다. 이후, 닭 적혈구를 첨가하고, 응집 억제능을 등급화하였다. 헤마글루티나를 완전히 억제한 혈청의 최고 희석율의 역수로서 역가를 표현하였다. 혈청의 최초 희석율이 1:20이었음에 따라, 검출불가능한 수준은 10과 동등한 역가로서 등급화하였다.
- <231> 통계적 분석
- <232> UNISTAT를 사용하여 백신접종 후 HI 역가에 대해 통계적 분석을 수행하였다. 변동 분석을 위해 사용된 프로토퀴이 하기와 같이 간략하게 기술될 수 있다:
- <233> · 데이터의 log 변환
- <234> · 그룹 분포의 표준화를 입증하기 위한 각 집단(그룹)에 대한 사피로-윌크(Shapiro-Wilk) 시험
- <235> · 상이한 집단(그룹) 간 변동의 균질성을 입증하기 위한 코크란(Cochran) 시험
- <236> · 그룹들에 대해 수행된 변동에 대한 이원(two-way) 분석
- <237> · 다중 비교를 위한 터키(tukey) HSD 시험
- <238> I.1.2. 세포내 사이토킨 염색
- <239> 본 기술은 사이토킨 생성을 기초로 하여 항원 특이적 T 림프구의 정량화를 가능하게 한다: 이펙터 T 세포 및/또는 이펙터-기억 T 세포는 IFN- γ 를 생성하고/하거나 중심 기억 T 세포는 IL-2를 생성한다. PBMC는 면역화후 7 일째에 수거하였다.
- <240> 림프계 세포를 분비 억제제(Brefeldine)의 존재 하에 시험관내에서 재자극하였다.

- <241> 이후, 이들 세포를 형광성 항체(CD4, CD8, IFN- γ 및 IL-2)를 사용하는 통상적인 면역형광 절차에 의해 처리하였다. 결과는 CD4/CD8 T 세포내 사이토킨 양성 세포의 빈도로서 표현된다. T 세포의 사이토킨 세포내 염색을 제 2 면역화 후 7일에 PBMC 에서 수행하였다. 마우스로부터 혈액을 수거하고, 헤파린 처리된 배지 RPMI+ Add 중에서 푸울링시켰다. 혈액에 대해, RPMI + Add - 희석된 PBL 현탁액을 권장된 프로토콜(2500rpm 및 실온에서 20분 원심분리)에 따라 림프구-포유동물 구배로 층화시켰다. 계면에서의 단핵 세포를 제거하고, 2x RPMI + Add 로 세척하고, PBMC 현탁액을 RPMI 5% 우태아 혈청 중의 2×10^6 개의 세포/ml로 조절하였다.
- <242> 시험관내에서, 전 FI(1 μ gHA/균주)를 사용하여 최종 농도 1×10^7 개의 세포/ml(튜브 FACS)로 PBMC의 항원 자극을 수행한 후, 항-CD28 및 항-CD49d(둘 모두에 대해 1 μ g/ml)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 인큐베이팅하였다.
- <243> 항원 재자극 단계 이후, PBMC를 시토카인 분비를 억제하기 위해 37 $^{\circ}$ C의 브레펠딘(Brefeldin)(1 μ g/ml)의 존재 하에서 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 인큐베이팅하였다.
- <244> IFN- γ /IL-2/CD4/CD8 염색을 하기와 같이 수행하였다: 세포 현탁액을 세척하고, 2% Fc 차단제(1/50; 2.4G2)를 함유하는 50 μ l의 PBS 1% FCS 중에 재현탁시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 10분 인큐베이션 후, 50 μ l의 항-CD4-PE(2/50) 및 항-CD8 perCp(3/50)의 혼합물을 첨가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 인큐베이팅하였다. PBS 1% FCS로 세척한 후, 세포를 200 μ l의 사이토폭스-사이토펜(Cytofix-Cytoperm)(Kit BD) 중에 재현탁시킴으로써 투과성화시키고, 4 $^{\circ}$ C에서 20분 인큐베이팅하였다. 이후, 세포를 펄 세척액(Perm Wash)(Kit BD)로 세척하고, 펄 세척액으로 희석된 항-IFN- γ APC(1/50) + 항-IL-2-FITC(1/50)의 50 μ l의 혼합물로 재현탁시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 최소 2시간 최대 밤새 인큐베이션 후, 세포를 펄 세척액으로 세척하고, PBS 1% FCS + 1% 파라포름알데히드 중에 재현탁시켰다. FACS에 의해 샘플 분석을 수행하였다. 살아있는 세포를 통제하여(FSC/SSC), CD4+ T 세포에 대한 대략 20,000이벤트(림프구) 또는 35,000 이벤트에 대해 수집을 수행하였다. IFN- γ + 또는 IL2+의 %를 CD4+ 및 CD8+ 통제된 집단에 대해 계산하였다.
- <245> I.2. 흰죽제비 방법
- <246> I.2.1. 헤마글루티닌화 억제 시험(HI)
- <247> 시험 절차
- <248> 세가지 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 항-헤마글루티닌 항체 역가를 헤마글루티닌화 억제 시험(HI)을 사용하여 측정하였다. HI 시험의 이론은 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의한 특이적 항-인플루엔자 항체의 닭 적혈구(RBC)의 헤마글루티닌화 억제능에 기초한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다제 용액(RDE)로 처리하고, 열 불활성화 처리하여 비특이적 억제제를 제거하였다. 사전처리 후, 혈청의 2배 희석물을 각 인플루엔자 균주의 4개의 헤마글루티닌화 유닛과 함께 인큐베이팅하였다. 이후, 닭 적혈구를 첨가하고, 응집 억제능을 등급화하였다. 헤마글루티닌화를 완전히 억제한 혈청의 최고 희석율의 역수로서 역가를 표현하였다. 혈청의 최초 희석율이 1:10이었음에 따라, 검출불가능한 수준은 5과 동등한 역가로서 등급화하였다.
- <249> 통계적 분석
- <250> UNISTAT를 사용하여 백신접종 후 HI 역가에 대해 통계적 분석을 수행하였다. 변동 분석을 위해 사용된 프로토콜이 하기와 같이 간략하게 기술될 수 있다:
- <251> • 데이터의 log 변환
- <252> • 그룹 분포의 표준화를 입증하기 위한 각 집단(그룹)에 대한 사피로-윌크 시험
- <253> • 상이한 집단(그룹) 간 변동의 균질성을 입증하기 위한 코크란 시험
- <254> • 일원 ANOVA의 상호작용에 대한 시험
- <255> • 다중 비교를 위한 터키-HSD 시험
- <256> I.2.2. 체온도 모니터링
- <257> 전달물질과 함께 2차투여 기간 동안 추적 장비 기록에 의해 개체 온도를 모니터링하였다. 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닦고, 복강에 배치하기 전에 DSI(Data Sciences International, Centaurusweg 123, 5015 TC Tilburg, The Netherlands)에 의해 새롭게 교정하였다. 모든 동물은 이러한 측정 동안에 개별적으로 단일 우리에 수용시켰다.

- <258> 온도는 2차 투여 4일 전부터 2차 투여후 7일까지 15분 마다 기록하였다.
- <259> I.2.3. 비강 세척
- <260> 깨어있는 동물의 양 콧구멍에 5ml의 PBS를 투여하여 비강을 세척하였다. 페트리 접시에서 접종원을 수집하여 드라이 아이스 상의 샘플 용기에 두었다.
- <261> 비강 세척액에서의 바이러스 적정
- <262> 임의의 박테리아 오염을 제거하기 위해 모든 비강 샘플을 스피ن(Spin) X 필터(Coster)를 통해 먼저 살균 여과하였다. 비강 세척액의 50 μ l의 일련의 10배 희석물을 50 μ l의 배지(10웰/희석물)를 함유하는 마이크로역가 플레이트에 옮기었다. 이후, 100 μ l의 MDCK 세포(2.4×10^5 개의 세포/ml)를 각각의 웰에 첨가하고, 5-7일 동안 35 $^{\circ}$ C에서 인큐베이팅하였다.
- <263> 5-7일의 인큐베이션 후, 배지를 서서히 제거하고, 100 μ l의 1/20 WST-1 함유 배지를 첨가하고, 추가의 18시간 동안 인큐베이팅하였다.
- <264> 생존가능한 세포에 의해 WST-1의 감소시에 생성된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정 종료시에 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하며, 적합한 파장(450nm)에서 각 웰의 흡광도를 측정함으로써 정량화하였다. 컷-오프(cut-off)는 비감염 대조군 세포의 OD 평균 - 0.3 OD(0.3OD는 비감염 대조군 세포의 +/-3 StDev에 상응한다)로서 정의된다. OD가 컷-오프보다 작은 경우에 양의 스코어가 되고, 이와 대조적으로 OD가 컷-오프보다 큰 경우에 음의 스코어가 된다. 바이러스 발산 역가는 "리드(Reed)와 뮌크(Muench)" 방법에 의해 측정되었으며, Log TCKD50/ml로서 표현되었다.
- <265> **I.3. 사람의 면역 반응을 평가하기 위한 검정**
- <266> I.3.1. 헤마글루티닌화 억제 검정
- <267> 면역 반응을 문헌(WHO Collaborating Centre for influenza, Centres for Disease Control, Atlanta, USA(1991))에 기술된 방법을 사용하여 HI 항체를 측정함으로써 측정하였다.
- <268> 항체 역가 측정은 4-헤마글루티닌화 억제 유닛(4 HIU)의 적합한 항원 및 0.5% 가금 적혈구 현탁액을 사용하는 표준화되고 포괄적으로 인증된 마이크로방법으로 해동되는 동결 혈청 샘플 상에서 수행하였다. 비특이적 혈청 억제제를 열처리 및 수용체-과과 효소에 의해 제거하였다.
- <269> 수득된 혈청을 HI 항체 수준에 대해 평가하였다. 초기 희석율 1:10으로 시작하여, 일련의 희석물(2배씩)을 최종 희석율 1:20480까지 제조하였다. 적정 종말점이 최고 희석 단계로서 선택되었으며, 헤마글루티닌화의 완전한 억제(100%)를 보여주었다. 모든 검정을 중복하여 수행하였다.
- <270> I.3.2. 뉴라미니다제 억제 검정
- <271> 본 검정은 페투인(fetuin) 코팅된 마이크로역가 플레이트에서 수행하였다. 일련의 2배 희석물의 항혈청을 제조하고, 표준화된 양의 인플루엔자 A H3N2, H1N1 또는 인플루엔자 B 바이러스와 혼합하였다. 이 시험은 페투인으로부터 효소적으로 뉴라민산을 방출하는 뉴라미니다제의 생물학적 활성에 기초한다. 말단 뉴라민산의 분해 후, β -D-갈락토스-N-아세틸-갈락토사민이 드러났다. 갈락토스 구조에 특이적으로 결합하는 땅콩(Arachis hypogaea)으로부터의 호스래디시 퍼옥시다제(HRP)-표지된 땅콩 아글루티닌(peanut agglutinin)을 웰에 첨가하였다. 결합된 아글루티닌의 양을 검출하고, 테트라메틸벤지딘(TMB)와의 기질 반응으로 정량화하였다. 여전히 50% 이상 바이러스 뉴라미니다제 활성을 억제하는 최고 항체 희석율을 표시하였으며, 이는 NI 역가이다.
- <272> I.3.3. 중화 항체 검정
- <273> 중화 항체 측정을 해동되는 동결 혈청 샘플에 대해 수행하였다. 혈청내 함유되는 항체에 의한 바이러스 중화를 마이크로중화 검정으로 측정하였다. 혈청을 추가 처리하지 않고 본 검정에 사용하였다. 각각의 혈청을 삼중으로 시험하였다. 표준화된 양의 바이러스를 일련의 혈청 희석물과 혼합하고, 바이러스에 항체가 결합하도록 인큐베이팅하였다. 이후, 정해진 양의 MDCK 세포를 함유하는 세포 현탁액을 상기 바이러스와 항혈청의 혼합물에 첨가하고, 33 $^{\circ}$ C에서 인큐베이팅하였다. 인큐베이션 기간 후, 바이러스 복제를 닭 적혈구의 헤마글루티닌화에 의해 가시화하였다. 혈청의 50% 중화 역가를 리드와 뮌크의 방법에 의해 계산하였다.
- <274> I.3.4. 시토카인 유세포분류기(CFC)에 의한 세포 매개된 면역원성 평가

- <275> 말초혈 항원 특이적 CD4 및 CD8 T 세포는 시험관내에서 재자극되어 이들의 상응하는 항원과 인큐베이팅될 경우, IL-2, CD40L, TNF-알파 및 IFN을 생성할 수 있다. 결과적으로, 항원 특이적 CD4 및 CD8 T 세포 뿐만 아니라 세포내 시토카인 생성은 세포 표현형의 통상적인 면역형광 표지 후에 유세포분류기에 의해 계수될 수 있다. 본 연구에서, 인플루엔자 백신 항원 뿐만 아니라 특이적 인플루엔자 단백질로부터 유래된 펩티드가 인플루엔자 특이적 T 세포를 재자극하기 위한 항원으로서 사용되었다. 결과는 CD4 또는 CD8 T 세포 아집단내 시토카인-포지티브 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로서 표현되었다.
- <276> I.3.5. 통계적 방법
- <277> I.3.5.1. 1차 종점
- <278> · 백신접종 이후의 7일 기간(즉, 백신접종일과 이후 6일) 동안 및 전 기간 동안 원치않는 국부적 및 전반적 징후 및 증상의 백신접종율, 세기 및 관련성
- <279> · 백신접종 이후의 21일 기간(즉, 백신접종일과 이후 20일) 동안 및 전 기간 동안 원치않는 국부적 및 전반적 징후 및 증상의 백신접종율, 세기 및 관련성
- <280> · 전 연구 동안에 심각한 부작용의 발생
- <281> I.3.5.2. 2차 종점
- <282> **체액 면역 반응의 경우:**
- <283> 관찰된 변수:
- <284> · 0일 및 21일째: 백신(항-H1N1, 항-H3N2 및 항-B-항체)에서 나타난 3개의 인플루엔자 바이러스 균주 각각에 대해서 개별적으로 시험된 혈청 혈구응집-억제 (HI) 및 NI 항체 역가
- <285> · 0일 및 21일째: 백신에서 나타난 3개의 인플루엔자 바이러스 균주 각각에 대해서 개별적으로 시험된 중화 항체 역가.
- <286> 유도 변수(95% 신뢰 구간):
- <287> · 백신 접종 전후의 95% 신뢰 구간(95% CI)에 의한 혈청 HI 항체의 기하 평균 역가(GMT)
- <288> · 21일째 95% CI에 의한 혈청전환율*
- <289> · 21일째 95% CI에 의한 전환인자**
- <290> · 21일째 95% CI에 의한 혈청보호율***
- <291> · 모든 시점에서의 혈청 NI 항체 GMTs'(95% 신뢰 구간에 의한)
- <292> *각각의 백신 균주에 대해서 0일째에 비해 21일째 혈청 HI 역가에서 4-배 이상의 증가를 보인 백신 접종자의 백분율로 정의된 혈청전환율.
- <293> **각각의 백신 균주에 대해서 0일째에 비해 21일째 혈청 HI GMT에서 배수 증가로 정의된 전환 인자.
- <294> ***보호를 나타내는 것으로 일반적으로 받아들여지는 백신 접종(각각의 백신 균주에 대해서) 후의 혈청 HI 역가 =40인 백신 접종자의 백분율로 정의되는 보호율.
- <295> **세포 매개된 면역(CMI) 반응의 경우**
- <296> 관찰된 변수
- <297> 0일 및 21일째: 상이한 시험에서의 10⁶당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도.
- <298> 각각의 시험은 이하 기재된 항원에 대한 CD4/CD8 T 세포의 반응을 정량한다:
- <299> · 펩티드 인플루엔자(pf) 항원(이들 항원의 정확한 특성 및 기원이 기재되고 설명되어야 한다)
- <300> · 스플리트 인플루엔자(Split Influenza, sf) 항원
- <301> · 전체 인플루엔자(wf) 항원.
- <302> 유도변수:

- <303> · 둘 이상의 상이한 시토카인을 생성하는 세포((CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)
- <304> · 적어도 CD40L 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(IL-2, TNF α , IFN γ)
- <305> · 적어도 IL-2 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(CD40L, TNF α , IFN γ)
- <306> · 적어도 IFN γ 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(IL-2, TNF α , CD40L)
- <307> · 적어도 TNF α 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포(IL-2, CD40L, IFN γ)

<308> I.3.5.3. 면역원성 분석

<309> 면역원성 검정은 전체 백신 접종된 코호트(cohort)를 기준으로 하였다. 각각의 처리군에 대해서, 다음 파라미터(95% 신뢰구간)가 계산되었다:

- <310> · 0일 및 21일째에서의 HI 및 NI 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)
- <311> · 0일 및 21일째에서의 중화 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)
- <312> · 21일째에서의 전환인자.
- <313> · 0일째에 비해서 21일째에서 4-배 이상의 혈청 HI 역가 증가를 나타내는 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 혈청전환율(SC).
- <314> · 혈청 HI 역가=1:40인 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 보호율.
- <315> · 반응에서의 CD4/CD8 T-림프구 분비의 빈도가 각각의 백신 접종 그룹에 대해서, 각각의 시점(0일, 21일)에서 및 각각의 항원(팍티드 인플루엔자(pf), 스플리트 인플루엔자(sf) 및 전체 인플루엔자(wf))에 대해 요약(기술통계: descriptive statistics)되었다.
- <316> · 각각 5가지의 상이한 시험에서의 각각의 백신 접종 그룹과 각각의 항원(pf, sf, 및 wf)에 대한 시점(후-전) 반응 사이의 개별적인 차이가 있는 기술통계.
- <317> · 비-파라미터 시험(크루스칼-윌리스 시험: Kruskal-Wallis test)을 이용하여 3 그룹 사이의 위치 차이를 비교하고, 통계학적 p-값을 각각 5 가지의 상이한 시험에서 각각의 항원에 대해서 계산하였다. 모든 유의성 검사(significance test)는 양측검사(two-tailed)로 수행하였다. 0.05 미만 또는 이와 동일한 P-값은 통계적 유의성 값으로 고려하였다.

<318> **실시예 II - 수중유 에멀전 및 애주번트 제형의 제조 및 특성화**

<319> 달리 설명되지 않는 한, 후속되는 실시예에서 사용된 오일/물 에멀전은 2 가지의 오일(알파-토코페롤 및 스쿠알렌)으로 제조된 유기상과 유화제로서 트윈 80(Tween 80)을 함유하는 PBS의 수성상으로 구성된다. 달리 설명되지 않는 한, 후속되는 실시예에서 사용된 수중유 에멀전 애주번트 제형은 다음 수중유 에멀전 성분(최종 농도)을 포함함으로써 제조되었다: 2.5% 스쿠알렌 (v/v), 2.5% 알파-토코페롤 (v/v), 0.9% 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 (v/v) (트윈 80), 참조 WO 95/17210. 후속되는 실시예에서 AS03으로 지칭되는 본 에멀전을 다음과 같이 두배 농축물로서 제조하였다.

<320> **II.1. 에멀전 SB62의 제조**

<321> II.1.1. 실험실 제조

<322> 트윈 80은 인산염 완충된 염수(PBS)에 용해되어 PBS중의 2% 용액을 형성시킨다. 100ml의 2배 농축 에멀전을 생성시키기 위해서, 5g의 DL 알파 토코페롤 및 5ml의 스쿠알렌을 와동시켜 완전히 혼합한다. 90ml의 PBS/트윈 용액을 첨가하고 완전히 혼합한다. 생성되는 에멀전을 이어서 주사기를 통해서 전달하고 M110S 미세유동공학적 장치를 이용함으로써 최종적으로 미세유동화시킨다. 생성되는 오일 점적은 약 120-180nm의 크기를 지닌다(PCS에 의해서 측정된 Z 평균으로 표현됨). 그 밖의 애주번트/항원 성분을 간단한 혼합으로 에멀전에 첨가한다.

<323> II.1.2. 대규모 제조

<324> SB62 에멀전의 제조는 소수성 성분(α -토코페롤 및 스쿠알렌)으로 구성된 오일상과 수용성 성분(트윈 80 및 PBS mod(mod: 변화됨), pH 6.8)을 함유하는 수성상의 강한 진탕하에 혼합함으로써 수행된다. 교반하면서, 오일상(전체 용적의 1/10)을 수성상(전체 용적의 9/10)에 옮기고, 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한다. 생성되는 혼합물을 이어서 미세유동화기(15000 PSI - 8 사이클)의 상호작용 챔버에서 전단, 충격 및 공동화 작용력에 가

하여 마이크론 이하 점적(100 내지 200nm 사이에 분포)을 생성시킨다. 생성되는 pH는 6.8 ± 0.1 이다. SB62 에멀전을 이어서 $0.22\mu\text{m}$ 막을 통해서 여과하여 무균화시키고, 무균 벌크 에멀전을 2 내지 8°C 에서 큐팩(Cupac) 용기에 동결 저장한다. 무균의 불활성 가스(질소 또는 아르곤)을 SB62 에멀전 최종 벌크 용기의 빈 공간에 15 초 이상 동안 주입한다.

<325> SB62 에멀전의 최종 조성은 다음과 같다:

<326> 트윈 80: 1.8 % (v/v) 19.4 mg/ml; 스쿠알렌: 5 % (v/v) 42.8 mg/ml; α -토코페롤: 5 % (v/v) 47.5 mg/ml; PBS-mod: NaCl 121 mM, KCl 2.38 mM, Na_2HPO_4 7.14 mM, KH_2PO_4 1.3 mM; pH 6.8 ± 0.1 .

<327> **II.2. 오일 점적 크기 측정 역학적 광 산란**

<328> II.2.1. 소개

<329> 오일 점적 직경의 크기는 하기 과정 및 하기 실험 조건하에서 측정된다. 점적 크기 측정은 세기 측정으로 주어지며, PCS에 의해서 측정된 z 평균으로 표현된다.

<330> II.2.2. 샘플 제조

<331> 크기 측정은 수중유 에멀전 애주버트: 대량 제조법에 따라 제조된 SB62, AS03 및 AS03+MPL($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)에 대해서 수행되며, 마지막 두 개는 사용 직전에 제조된다. 샘플의 조성은 하기(참조 단락 II.2.4)되어 있다. 샘플은 PBS 7.4중에 4000x 내지 8000x로 희석되었다. 대조로서, PL-나노칼 입자(PL-Nanocal Particle) 크기 표준 100nm(cat n° 6011-1015)을 10mM NaCl에 희석시켰다.

<332> II.2.3. 맬번 제타사이저 3000HS(Malvern Zetasizer 3000HS) 크기 측정

<333> 모든 크기 측정은 맬번 제타사이저 3000HS 둘 모두로 수행되었다. 샘플은 적합한 희석액(일반적으로 샘플 농도에 따라서 4000x 내지 20000x의 희석액으로)으로 맬번 분석을 위한 플라스틱 큐벳대로, 및 두 가지의 광학적 모델: 즉, - 0의 실제 입자 굴절지수 및 0의 이미지 굴절지수, 또는 1.5의 실제 입자 굴절 지수 및 0.01의 이미지 굴절 지수(문헌에서 밝혀진 값에 따라서 에멀전에 대해 적용된 광학적 모델) 중 하나의 광학적 모델로 정량하였다.

<334> 기술적 조건은 다음과 같다:

<335> -레이저 파장: 532 nm (Zeta3000HS),

<336> - 레이저 파워: 50 mW (Zeta3000HS),

<337> - 90° 에서 검출된 산란광 (Zeta3000HS),

<338> - 온도: 25°C ,

<339> - 기간: 소프트웨어 의한 자동 측정,

<340> - 횟수: 3 회 연속 측정,

<341> - z -평균 직경: 누적평가방법(cumulants analysis)에 의해서,

<342> - 크기 분포: 콘틴(Contn) 또는 자동(Automatic) 방법에 의해서.

<343> 자동 맬번 알코리즘은 누적치, 콘틴 및 비음성 최소제곱(NNLS) 알고리즘의 조합을 이용한다.

<344> 세기 분포는 미에(Mie) 이론에 기인한 용적 분포로 전환될 수 있다.

<345> II.2.4. 결과 (표 2 참조)

<346> 누적평가분석(Z 평균 직경):

<347> 표 2

샘플	희석	기록	계수비율	ZAD	다분산성
SB62	5000	1	7987	153	0.06
		2	7520	153	0.06
		3	6586	152	0.07
		평균	7364	153	0.06
SB62 (실시예 IV)	8000	1	8640	151	0.03
		2	8656	151	0.00
		3	8634	150	0.00
		평균	8643	151	0.01
SB62+MPL 25µg (*)	8000	1	8720	154	0.03
		2	8659	151	0.03
		3	8710	152	0.02
		평균	8697	152	0.02

<348>

<349> (*) 다음과 같이 제조됨: 주사용 물, 10x 농축된 PBS, 250µl의 SB62 에멀전 및 25µg의 MPL을 함께 혼합하여 280 µl의 최종 용적이 되게 한다.

<350> z-평균 직경(ZAD) 크기는 샘플에서 각각의 입자 크기에 의해서 산란된 빛의 양에 의해서 측정한다. 이러한 값은 샘플의 모노모달 분석과 관련되어 있으며, 주로 재현 목적으로 사용된다.

<351> 계수 비율(CR)은 산란된 빛의 측정치이며; 이는 초당 수천의 광자에 상응한다.

<352> 다분산성 (Poly) 지수는 분포 폭이다. 이는 분포 폭의 무차원 측정치(dimensionless measure)이다.

<353> 콘턴 및 자동 분석:

<354> 두 가지의 다른 SB62 제제(2 배 농축된 AS03)을 제조하고 하기된 작은 변수를 주면서 상기된 과정에 따라서 검정하였다:

<355> 샘플은 최적 계수비율 값: 제타사이저 3000HS에 대해서 10000x 및 20000x를 얻도록 결정된 두 용액, 즉, 상기 실시예에서 사용된 바와 동일한 광학적 모델로 멜번 분석을 위해서 플라스틱 큐벳에 정량하였다.

<356> 표 3

SB62	희석	IR		콘턴 분석 (nm 평균)		자동분석 (nm 평균)	
		실제	가상	세기	용적	세기	용적
1022	1/10000	0	0	149	167	150	-
		1.5	0.01	158	139	155	143
	1/20000	0	0	159	200	155	196
		1.5	0.01	161	141	147	-
1023	1/10000	0	0	158	198	155	-
		1.5	0.01	161	140	150	144
	1/20000	0	0	154	185	151	182
		1.5	0.01	160	133	154	-

<357>

<358> "-" 얻어진 값이 일관되지 않은 경우

<359> 이들 결과의 도식적인 표현이 제형 1023에 대해서 도 1에 도시되어 있다. 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 입자의 대부분(예, 약 80%)은 300nm 미만의 세기의 직경을 지닌다.

<360> II.2.5. 전체 결론

<361> SB62 제형은 멜번 제타사이저 3000HS 및 두 광학적 모델로 상이한 희석액으로 측정되었다. 상기 검정된 제형의 입자 크기 ZAD(즉, 누적평가분석에 의한 세기 평균)은 약 150 내지 155nm였다.

<362> 누적평가 알고리즘을 사용하는 경우, ZAD 및 다분산성에 대한 희석의 영향은 없음이 관찰되었다.

<363> **II.3. MPL을 포함하는 AS03의 제조**

<364> **II.3.1. MPL 액체 현탁액의 제조**

<365> MPL(본원 전반에 걸쳐서 사용되는 있는 본 용어는 3D-MPL, 즉, 3-O-데아실화된 모노포스포릴 지질 A의 약어이다) 액체 벌크액은 MPL[®] 동결건조된 분말로부터 제조된다. MPL 액체 벌크는 백신 또는 애주버트 제형을 위한 사용 준비된 원료의 안정한 농축(약 1mg/ml) 수성 분산액이다. 제조과정에 대한 도식적인 표현이 도 2에 도시되어 있다.

<366> 12g의 최대 배치 크기를 위해서, MPL 액체 벌크 제제를 무균의 유리 용기에 옮겼다. MPL의 분산은 다음 단계로 구성된다:

- <367> - MPL 분말을 주사용 물에 현탁시키고,
- <368> - 가열(열처리)에 의해서 어떠한 큰 응집체를 분해시키고,
- <369> - 미세유동화에 의해서 입자 크기를 100nm 내지 200nm로 감소시키고,
- <370> - 제제를 스타타클린 프레-필터 유닛(Sartoclean Pre-filter unit), 0.8/0.65 μm 상에서 예비여과하고,
- <371> - 실온에서 제제를 무균 여과(Sartobran P unit, 0.22 μm)한다.

<372> MPL 분말은 미세유동화에 의해서 동결건조되어 안정한 콜로이드성 수성 분산액(200nm 보다 작은 MPL 입자 크기)을 생성시킨다. MPL 동결건조된 분말은 거친 10mg/ml 현탁액을 얻도록 주사용 물에 분산된다. 현탁액은 이어서 교반하에 열처리된다. 실온으로 냉각시킨 후에, 미세유동화 과정이 입자 크기를 감소시키도록 시작된다. 미세유동화는 마이크로플러딕스 장치 M110EH(Microfluidics apparatus M110EH)를 사용하여 최소 통과량(사이클 수: n_{min})을 위한 소정의 압력에서 미세유동화 상호작용 챔버를 통해서 분산액을 연속적으로 순환시킴으로써 수행된다. 사이클 수로 표시된 유동화 기간은 측정된 유속(flow rate) 및 분산 용적을 기초로 하여 계산된다. 주어진 압력에서의 주어진 장치상에 따라서, 유속은 상호작용 챔버 마다 다를 수 있으며 특정의 상호작용 챔버의 라이프사이클(lifecycle) 전체에 걸쳐서 다를 수 있다. 본 실시예에서, 사용된 상호작용 챔버는 타입 F20Y 마이크로플러딕스(F20Y Microfluidics)의 상호작용 챔버이다. 미세유동화 효과가 커플 압력-유속과 연관되어 있어서, 처리시간은 각 배치 마다 다를 수 있다. 1 사이클에 요구되는 시간은 유속을 기초로 하여 계산된다. 고려되는 유속은 MPL을 장치내로 도입하기 직전의 주사용 물로 측정된 유속이다. 1 사이클은 전량의 MPL이 장치를 한번 통과하는데 요구되는 시간(분)으로 정의된다. n 사이클을 얻는데 요구되는 시간은 다음과 같이 계산된다:

<373>
$$n \times \text{처리되는 MPL의 양/유속(ml/min)}$$

<374> 사이클의 수는 따라서 적절히 조정될 수 있다. 수행되는 최소 사이클 양(n_{min})이 바람직한 장치 및 사용된 상호작용 챔버에 대해서 기재되어 있다. 수행되는 전체 사이클 양은 n_{min} 사이클 후에 수행된 입자 크기 측정 결과에 의해서 결정된다. 입자 크기 한계(d_{lim})은 과거기록 데이터에 기초하여 한정된다. 측정은 광자상관분광(PCS) 기술에 의해서 실현되며, d_{lim} 은 유니모달 결과($Z_{평균}$)으로서 표현된다. 이러한 한계 아래에서는, 미세유동화는 n_{min} 사이클 후에 중지될 수 있다. 이러한 한계 위에서, 미세유동화는 크기가 만족할만하게 감소될 때까지, 최대 또 다른 50 사이클 동안 계속된다.

<375> 여과가 미세유동화 직후에 수행되지 않으면, 분산된 MPL은 +2 내지 +8°C에서 저장되어 여과 영역으로의 전달을 대기한다.

<376> 미세유동화 후에, 분산액은 주사용 물로 희석되고, 층류 흐름하에 0.22μm 필터를 통해서 무균 여과된다. 최종 MPL 농도는 1mg/ml(0.80 내지 1.20mg/ml)이다.

<377> **II.3.2. AS03+MPL 애주버트 첨가된 백신의 제조: 1 바이알 방법**

<378> AS03 보조 제형에, MPL을 백신 용량당 10 내지 50μg의 최종 농도로 첨가한다.

<379> 10 배 농축된 PBS(1배 농축될 경우 pH7.4)뿐만 아니라 트윈, 트리트론 X-100 및 VES(비타민 E 석시네이트)를 함유하는 SB62 혼합물을 주사용 물에 첨가한다. 양은 750μg/ml 트윈 80, 110μg/ml 트리트론 X-100 및 100μg/ml VES의 목적 최종 농도에 도달하도록 인플루엔자 균주에 존재하는 세정제를 고려한다. 5분 동안 교반한 후에, 15μg

의 목적하는 각각의 인플루엔자 균주(예를 들어, 통상의 3가 백신에서 균주 H1N1, H3N2 및 B)를 첨가한다. 15분 동안 교반한 후에, 250 μ l의 SB62 에멀전을 첨가하고 이어서 25 μ g 또는 50 μ g의 MPL을 첨가한다.

<380> 제조 과정에 대한 개략적인 표현이 도 3에 도시되어 있다. 사람 용량당 MPL을 포함하는 AS03의 최종 농도는 표 4에 기재되어 있다.

<381> 표 4

성분	성분	농도	사람 용량당	
			양	기타
SB62	스쿠알렌 (용액 43 mg/ml) 토코페롤 (용액 48 mg/ml) 트윈 80 (용액 20 mg/ml)	781 μ l/ml	250 μ l 10.68 mg 11.86 mg 4.85 mg	
MPL**	(용액 1 mg/ml)	78 μ g/ml or 156 μ g/ml	25 μ g or 50 μ g	
PBS mod*	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	137 mM 2.7 mM 8.1 mM 1.47 mM	2.56 mg 0.064 mg 0.368 mg 0.064 mg	
주사용 물				Ad 320 μ l
pH				6.8 +/- 0.1

<382> * 10배 농축된 PBS mod pH6.8 = KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, KCl-HCl

<383> **MPL은 용량당 25 μ g 또는 50 μ g중 하나이다.

<384> II.3.3. AS03+MPL 애주번트 첨가된 백신 제조: 2 바이알 방법

<385> 동일한 제형은 2 배 농축된 항원 또는 항원 제제를 AS03(SB62 250 μ l) 또는 AS03+MPL (SB62 250 μ l + 25 μ g 또는 50 μ g MPL) 애주번트와 혼합함으로써 2 바이알 방법으로 제조될 수 있다. 이러한 예에서, 제조 과정은 다음과 같이 처리된다. AS25-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 제조는 3가지의 주요 단계로 이루어진다:

<387> 1) 애주번트 없는 3가 최종 벌크(2 배 농축된)의 형성 및 항원 용기에의 충전

<388> 2) AS03+MPL 애주번트의 제조

<389> 3) AS03+MPL 애주번트 첨가된 스플리트 바이러스 백신의 즉석 재구성

<390> 1) 애주번트 없는 3가 최종 벌크의 형성 및 항원 용기에의 충전

<391> 3 개의 일가 벌크의 양은 형성 전의 각각의 일가 벌크에서 측정된 HA 함량 및 1100ml의 목적 용량을 기초로 한다. 농축된 인산염 완충된 염수 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 α -토코페릴 히드로진 석시네이트의 예비-혼합물이 주사용 물에 희석된다. 3개의 농축된 일가 벌크(A/뉴칼레도니아, A/뉴욕(New York), B/지양수(Jiangsu))는 이어서, 3가의 최종 벌크(15 μ g HA/A 균주 /380 μ l 3가 최종 벌크)의 ml당 39.47 μ g HA 의 A 균주(H1N1, H3N2) 및 46 μ g HA의 B 균주(17.5 μ g HA/ B 균주 /380 μ l 3가 최종 벌크)의 최종 농도를 지니게 하기 위해서, 생성 인산염 완충된 염수/트윈 80-트리톤 X-100- α -토코페릴 히드로진 석시네이트 용액(pH 7.4, 137 mM NaCl 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 990 μ g/ml 트윈 80, 150 μ g/ml 트리톤 X-100 및 130 μ g/ml α -토코페릴 히드로진 석시네이트)에 연속적으로 희석시킨다. 각각의 일가 벌크의 첨가 사이에, 혼합물을 10 내지 30분 동안 실온에서 교반한다. 최종 일가 벌크를 첨가하고 15 내지 30분 동안 교반한 후에, pH를 검사하고, HCl 또는 NaOH로 7.2 \pm 0.2로 조정한다.

<392> 항원의 3가 최종 벌크는 3-ml 무균 타입 I(Ph. Eur) 유리 바이알내로 무균 충전된다. 각각의 바이알은 470 μ l (전체 380 μ l + 90 μ l)의 용적을 함유한다.

<393> 2) AS03/MPL 애주번트 벌크의 제조 및 애주번트 용기에 충전

- <394> 애주번트 AS03/MPL은 다음 두 성분을 혼합함으로써 제조된다: SB62 에멀전 (단락 II.1.2에서의 방법) 및 MPL (단락 II.3.1에서의 방법). 1 배 농축된 PBS mod는 (주사용 물중의 10 배 농축 PBS mod를 희석시킴으로써 제조되는데) SB62 벌크와 MPL 액체 벌크로 1mg/ml로 희석시킴으로써 제조된다. MPL 농도는 최종 사람 백신 용량당 10 내지 50 μ g, 적합하게는 약 25 μ g의 최종 함량에 도달하도록 결정될 것이다. 혼합은 5 내지 30분 동안 실온에서 교반되며, pH는 NaOH(0.05 또는 0.5M)/HCl(0.03M 또는 0.3M)로 6.8 \pm 0.1로 조정된다. 실온에서 5 내지 30분 동안 추가로 교반한 후에, 혼합물을 0.22 μ m 막을 통해서 여과하여 무균화시킨다. 무균의 불활성 가스 (질소) 플러싱을 수행하여 최소 1분 동안 충전된 용기내에 불활성 헤드 스페이스를 생성시킨다. 무균의 AS03/MPL 애주번트를 1.25-ml 무균 타입 I(Ph. Eur) 유리 주사기 내로 무균 충전될 때까지 +2 내지 8 $^{\circ}$ C에서 저장한다. 각각의 주사기는 80 μ l 용적과량(전체 320 μ l + 80 μ l)을 함유한다.
- <395> 주사 시점에서, 애주번트를 함유하는 미리 충전된 주사기의 함유물이 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유하는 바이알내로 주입된다. 혼합 후에, 함유물은 주사기내로 취해지고 주사 바늘은 근육내 바늘로 대체된다. 재구성된 AS25-애주번트 첨가된 인플루엔자 후보 백신의 일회 용량은 0.7ml에 상응한다.
- <396> **II.4. 수중유 에멀전 제형중에 인플루엔자 항원 및 임의의 MPL을 포함하는 면역원성 조성물의 제조**
- <397> II.1의 SB62 에멀전에 동일한 용적의 2회 농축된 스플리트 인플루엔자 항원(플루아릭스TM: FluarixTM)(균주당 15 μ g HA)을 첨가하고 혼합한다. 이는 적절한 경우 50 μ g/ml의 MPL과 혼합되어 최종 제형을 형성시켰다.
- <398> **실시에 III-65세 초과 노인 집단에서 스플리트 인플루엔자 항원 제제 및 AS03 애주번트를 함유하는 백신에 의한 임상시험(Explo-Flu-001)**
- <399> 애주번트 AS03을 함유하는 스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보 백신의 반응원성 및 면역원성을 평가하기 위해서, 단계 I의 개방 무작위 연구를 2003년에 65세 초과 노인에게서 수행하였다. 체액 면역 반응(즉, 항-적혈구 응집소, 중화 및 항-뉴라미다제 항원 역가) 및 세포 매개된 면역 반응(CD4 및/또는 CD8 T 세포 반응)을 AS03 애주번트 첨가된 백신 또는 WV 백신의 일회 용량의 근육내 투여 후 21일에 측정하였다. 플루아릭스TM은 참조로서 사용되었다.
- <400> **III.1. 연구 디자인**
- <401> 3 대상 그룹에게 하기 백신을 근육내로 균등하게 투여하였다:
- <402> ■ 재구성된 및 애주번트 첨가된 SV 인플루엔자 백신(FluAS03)의 일회 용량이 투여되는 50명의 한 그룹
- <403> ■ 전체 바이러스 인플루엔자 백신(FluWV)의 일회 용량이 투여되는 50명의 한 그룹
- <404> ■ 플루아릭스TM(플루아릭스)=대조 백신 스케줄의 일회용량이 투여되는 50명의 한 그룹: 0일째에 인플루엔자 백신의 일회 주사, 혈액 샘플 수거, 21일째에 정보판독 분석(HI 항체 측정, NI 항체 측정, 중화항체 측정 및 CMI 분석) 및 연구 결론.
- <405> 본 연구에서 사용된 표준 3가 스플리트 인플루엔자 백신-플루아릭스TM은 글락소스미스클라인 바이올로지칼스(GlaxoSmithKline Biologicals)에 의해서 개발되고 제조된 2003년부터 시판되는 백신이다.
- <406> **III.2. 백신 조성 및 투여(표 5)**
- <407> **III.2.1. 백신 제조**
- <408> *AS03 애주번트 첨가된 인플루엔자 백신*
- <409> AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신 후보는 타입 I 유리 바이알(335 μ l)에 존재하는 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원(항원 용기)과 SB62 에멀전(335 μ l)를 함유하는 미리-충전된 타입 I 유리 주사기(애주번트 용기)로 구성되는 2 성분 백신이다. 주사 시에, 항원 용기의 함유물은 SB62 에멀전 미리-충전된 주사기의 도움으로 항원 용기로부터 제거된 다음, 주사기에서 온화하게 혼합된다. SB62 에멀전을 백신 항원과 혼합하여 AS03 애주번트를 재구성시킨다. 주사 전에, 사용된 주사 바늘은 근육내 주사 바늘로 대체되고, 용량은 500 μ l로 보정된다.
- <410> 재구성된 AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 일회 용량은 0.5ml에 상응하며, 등록된 플루아릭스TM/ α -릭스[®] (α -Rix[®]) 백신에서와 같이 15 μ g HA의 각각의 인플루엔자 바이러스 균주를 함유하며, 10.68 mg 스쿠알렌, 11.86 mg DL-알파 토크페롤, 및 4.85 mg 폴리소르베이트 80 (트윈 80)을 함유한다.

- <411> 제조
- <412> AS03-애주번트 첨가된 인플루엔자 백신의 제조는 3 단계의 주된 단계로 이루어진다:
- <413> 1) 애주번트 없이 3가 최종 벌크의 제조 및 항원 용기내의 충전
- <414> 세 개의 일가 벌크의 용량은 제형 전의 각각의 일가 벌크중에서 측정된 HA 함량 및 800ml의 목적 용량을 기초로 한다. 농축된 인산염 완충된 염수 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 α -토코페릴 히드로진 석시네이트의 예비-혼합물을 주사용 물에 희석시킨다. 세 개의 농축된 일가 벌크(균주 A/뉴칼레도니아 -, 균주 A/파나마- 및 균주 B/상동-)는 이어서, 3가 최종 벌크의 ml당 60 μ g HA의 A 균주 (15 μ g HA/ A 균주 /250 μ l 3가 최종 벌크) 및 70 μ g HA B 균주 (17.5 μ g HA/ B 균주 /250 μ l 3가 최종 벌크)의 최종 농도를 얻기 위해서, 생성된 인산염 완충된 염수/ 트윈 80 - 트리톤 X- 100 - α -토코페릴 히드로진 석시네이트 용액(pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 1500 μ g/ml 트윈 80, 220 μ g/ml 트리톤 X-100 및 200 μ g/ml α -토코페릴 히드로진 석시네이트)에 연속적으로 희석된다. 각각의 일가 벌크의 첨가 사이에, 혼합물을 10분 동안 실온에서 교반시킨다. 최종 일가 벌크의 첨가 및 15분 동안의 교반 후에, pH를 검사하고 HCl 또는 NaOH로 7.2 \pm 0.1로 조정한다.
- <415> 항원의 3가 최종 벌크는 3-ml 무균 타입 I 유리 바이알내로 무균 충전된다. 각각의 바이알은 34% 용적과량(전체 용적 335 μ l)을 함유한다.
- <416> 2) SB62 에멀전 무균 벌크의 제조 및 애주번트 용기내의 충전
- <417> · 수성상: 교반하면서, 902ml의 트윈 80을 44105ml의 PBS-mod 완충액(pH=HCl로 처리후 6.8)과 혼합한다.
- <418> · 오일상: 교반하면서, 2550ml의 스쿠알렌을 2550ml의 α -토코페롤에 첨가한다.
- <419> · 수성상과 오일상의 혼합: 교반하면서, 5000ml의 오일상(전체 용적의 1/10)을 45007ml의 수성상(전체 용적의 9/10)으로 옮긴다. 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한다.
- <420> · 에멀전화: 생성된 혼합물을 미세유동화기(15000 PSI-8 사이클)의 상호작용 챔버에서 전단, 충격 및 공동화 처리하여 마이크로 이하 점적(100 내지 200nm의 분포)을 생성시킨다. 생성물의 pH는 6.8 \pm 0.1이다.
- <421> · 무균 여과: SB62 에멀전은 0.22 μ m 막을 통해서 여과하여 무균화되고 무균의 벌크 에멀전은 2 내지 8 $^{\circ}$ C의 큐팩 용기에 냉장 저장된다. 무균의 불활성 개스(질소 또는 아르곤)가 15초 이상 동안 SB62 에멀전 최종 벌크 용기의 빈공간으로 플라싱된다.
- <422> 주어진 성분의 모든 양은 50L의 에멀전의 제조를 위한 것이며, 용적으로 주어지고 있다. 실시상, 양은 성분의 밀도를 고려하여 정량된다. PBS의 밀도는 1과 동일한 것으로 여긴다.
- <423> SB62 에멀전의 최종 조성은 다음과 같다:

<424> 표 5

트윈 80:	1.8 % (v/v)	19.4 mg/ml
스쿠알렌:	5 % (v/v)	42.8 mg/ml
알파-토코페롤:	5 % (v/v)	47.5 mg/ml
PBS-mod:		
NaCl		121 mM
KCl		2.38 mM
Na ₂ HPO ₄		7.14 mM
KH ₂ PO ₄		1.3 mM
pH		6.8 ± 0.1

<425>

<426> 무균의 SB62 벌크 에멀전은 이어서 1.25-ml 무균 타입 I 유리 주사기에 무균 충전된다. 각각의 주사기는 35% 용적 과량(전체 용적 335 μ l)을 함유한다.

<427> 3) AS03 애주번트 첨가된 스플리트 바이러스 백신의 즉석의 재구성

<428> 주사 시에, 농축된 3가 불활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유하는 바이알의 함유물은 SB62 에멀전을 함유하는 주사기의 도움으로 바이알로부터 제거된 다음, 주사기에서 온화하게 혼합된다. SB62 에멀전을 백신 항원과 혼합하여 AS03 애주번트를 재구성시킨다.

<429> III.2.2. 백신 조성물(표 6) 및 투여

<430> 표 6

백신	제형	그룹
플루아릭스™	3 인플루엔자 균주로부터의 HA (전체 HA = 45 µg) <ul style="list-style-type: none"> • A/뉴칼레도니아 /20/99 (IVR-116):15 µg • A/파나마 /2007/99 (RESVIR-17): 15 µg • B/상동 /7/97: 15 µg 티메로살 함량: 5 µg 0.5 ml 의 미리 충전된 주사기에	Fluarix
WVV	3 인플루엔자 균주로부터의 HA (전체 HA = 45 µg) <ul style="list-style-type: none"> • A/뉴칼레도니아 /20/99 (IVR-116):15 µg • A/파나마 /2007/99 (RESVIR-17): 15 µg • B/상동 /7/97: 15 µg 티메로살 함량: 5 µg 0.5ml의 바이알에	FluWVV
플루아릭스 + AS03	3 인플루엔자 균주로부터의 HA (전체 HA = 45 µg) <ul style="list-style-type: none"> • A/뉴칼레도니아 /20/99 (IVR-116):15 µg • A/파나마 /2007/99 (RESVIR-17): 15 µg • B/상동 /7/97: 15 µg 티메로살 함량: 5 µg 수중유 SB62 에멀션(대량 제조)을 함유하는 0.335ml의 바이알(2배 농축됨) + 주사기(0.335ml) 에	Flu-AS03

<431>

<432>

백신을 잘 앓 쓰는 팔(non-dominant arm)의 삼각근부위에 근육내 투여하였다. 백신 접종자는 백신 투여 후의 드문 아나필락시스 반응이 있는 경우에 용이하게 이용 가능한 적절한 의약 처리로 30분 이상 동안 면밀히 관찰되었다.

<433>

III.3. 연구 집단 결과

<434>

총 148명이 본 연구에 등록되었는데: FluAS03 그룹에 49명, 플루아릭스 그룹에 49명 및 FluWVV 그룹에 50명이 등록되었다. 백신접종 시점에서의 전체 백신 접종된 코호트(cohort)의 평균 연령은 6.0세의 표준 편차가 있는 71.8세이었다. 세 백신 그룹으로 분포된 대상자의 평균 연령 및 성별 분포는 유사하였다.

<435>

III.4. 안전성 결론

<436>

AS03으로 보조된 인플루엔자 백신의 투여는 안전하였고 연구 집단, 즉, 65 세 초과 노인에서 임상적으로 관용되었다.

<437>

III.5. 면역원성 결과

<438>

면역원성 분석은 전체 백신 접종된 코호트에 대해서 수행되었다.

<439>

III.5.1. 체액 면역반응

<440>

AS03 애주먼트 첨가된 백신에 의해서 유도된 체액 면역 반응을 평가하기 위해서, 다음 파라미터(95% 신뢰구간으로)를 각각의 처리 그룹에 대해서 계산하였다:

<441>

· 0일 및 21일째의 HI 및 NI 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)

<442>

· 0일 및 21일째에서의 중화 항체 역가의 기하평균 역가(GMT)

<443>

· 0일째에 비해서 21일째에서 4-배 이상의 혈청 HI 역가 증가를 나타내는 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 혈청전환율(SC).

<444>

· 각각의 백신 균주에 대해서, 0일째에 비해서 21일째에 혈청 HI GMT에서의 증가 배수로 정의된 21일째에서의 전환 인자

<445>

· 혈청 HI 역가=1:40인 백신접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 보호율.

<446> III.5.1.1 항-적혈구응집소 항체 반응

<447> a) HI 기하평균 역가 (GMT)

<448> 95% 신뢰구간으로의 HI 항체에 대한 GMT를 표 7에 나타내고 있다(항-HI 항체에 대한 GMT). 모든 백신 군주에 대한 항체의 예비-백신 접종 GMT는 세 그룹에서 동일한 범위내에 있었다. 백신접종 후에, 항-적혈구응집소 항체 수준은 현저하게 증가하였다. 백신접종 후에, 플루아릭스 그룹과 FluWVV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 있었지만, FluAS03과 플루아릭스 그룹에서 모든 세 백신 군주에 대해서 HI항체의 더 높은 GMT 경향이 있었다.

<449> 표 7

항체	그룹	시간	N	GMT		
				값		95% CI
						LL
A/뉴칼레 도니아	FluAS03 플루아릭스	Pre	49	25.6	17.3	37.9
		PI (21일)	49	317.7	219.1	460.7
	FluWVV	Pre	49	26.3	18.1	38.4
		PI (21일)	49	358.5	244.2	526.4
		Pre	50	19.7	13.6	28.6
		PI (21일)	50	138.2	90.3	211.7
A/파나마	FluAS03 플루아릭스	Pre	49	52.3	35.4	77.4
		PI (21일)	49	366.1	264.5	506.6
	FluWVV	Pre	49	296.0	28.1	426.6
		PI (21일)	49	25.8	205.4	37.1
		Pre	50	165.6	18.0	236.5
		PI (21일)	50	40.9	116.0	
B/ 상농	FluAS03 플루아릭스	Pre	49	27.5	19.0	39.8
		PI(21일)	49	317.7	226.9	444.9
	FluWVV	Pre	49	26.0	17.2	39.2
		PI (21일)	49	270.0	187.0	389.7
		Pre	50	32.0	20.8	49.3
		PI (21일)	50	195.6	135.2	282.9

<450>

<451> N = 이용 가능한 결과를 나타내는 대상자의 수

<452> 95% CI = 95% 신뢰구간;

<453> LL = 하한;

<454> UL = 상한

<455> MIN/MAX = 최소/최대

<456> PRE = 백신 접종전 0일째

<457> PI(D21) = 백신 접종 후 21일째

<458> b) 항-HI 항체 역가의 전환인자, 혈청보호율 및 혈청전환율(은 사람에서의 보호에 대해서 상호관련되어 있다)

<459> 결과가 표 8에 기재되어 있다.

<460> 전환인자는 0일째에 비해서 21일째에 각각의 백신 군주에 대한 혈청 HI GMT에서의 배수 증가를 나타낸다. 전환 인자는 바이러스 군주 및 백신에 따라서 6.1 내지 13.6으로 다양할 수 있다. 이러한 전환 인자는 유럽 관계당

국에 의해서 요구된 GMT에서의 2.0 배 증가에 비해서 월등히 우수하다.

<461> 혈청보호율은 21일째에서의 혈청 HI 역가 ≥ 40 인 대상의 비율을 나타낸다. 연구 시작에, 모든 그룹에서의 대상자중 절반(34.0% 내지 69.4% 범위)이 모든 균주에 대한 보호 수준을 나타냈으며, 21일째에, 세 그룹에서 혈청 보호율이 상이한 바이러스 균주에 대해서 88.0% 내지 100% 범위를 나타냈다. 보호면에서, 이러한 결과는 88% 이상의 대상자가 백신 접종후에 혈청 HI 역가 ≥ 40 을 나타내며 세 가지 균주에 대해서 보호되는 것으로 간주됨을 의미한다. 이러한 보호율은 유럽 관계당국에 의해서 60세 이상의 노인 집단에서 요구된 60%의 혈청 보호에 비해서 월등히 우수하다.

<462> 혈청전환율은 0일째에 비해서 21일째에 혈청 HI 역가에서의 4배 이상의 증가를 보이는 대상자의 비율을 나타낸다. 세 가지 균주에 대한 전체 반응율은 세 가지 그룹에서 근본적으로 동일하다. 유효한 것으로 여겨지고 유럽 연합에 따르기 위해서는, 백신은 60세 노인 집단에서 30%를 초과하는 혈청전환율을 유도해야 한다. 본 연구에서, 혈청전환율은 세 가지 그룹에 대해서 50%를 초과했다.

<463> 표 8

			혈청보호율	혈청전환율	전환인자
EU 표준 (>60)			> 60%	> 30%	> 2.0
균주	그룹	N	% [95%CI]	% [95%CI]	GMR [95%CI]
A/ 뉴칼레도니아	Flu AS03	49	98.0 [89.1-99.9]	69.4 [54.6-81.7]	12.4 [7.3-21.0]
	플루아릭스	49	98.0 [89.1-99.9]	69.4 [54.6-81.7]	13.6 [8.0-23.2]
	Flu WVV	50	88.0 [75.7-95.5]	52.0 [37.4-66.3]	7.0 [4.0-12.2]
A/ 파나마	Flu AS03	49	100.0 [92.7-100.0]	55.1 [40.2-69.3]	7.0 [4.2-11.6]
	플루아릭스	49	91.8 [80.4-97.7]	65.3 [50.4-78.3]	7.2 [4.7-11.3]
	Flu WVV	50	90.0 [78.2-96.7]	56.0 [41.3-70.0]	6.4 [3.9-10.4]
B/ 상동	Flu AS03	49	100.0 [92.7-100.0]	73.5 [58.9-85.1]	11.6 [7.2-18.6]
	플루아릭스	49	95.9 [86.0-99.5]	69.4 [54.6-81.7]	10.4 [6.5-16.5]
	Flu WVV	50	90.0 [78.2-96.7]	50.0 [35.5-64.5]	6.1 [3.6-10.3]

<464>
<465> N = 전체 대상자 수

<466> 결론:

<467> · 백신 접종 후, 플루아릭스 그룹과 FluWVV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 존재하기는 했지만 FluAS03과 플루아릭스에서 모든 세 가지 백신 균주에 대한 HI 항체의 높은 GMT에 대한 경향이 존재하였다.

<468> · 전환 인자는 바이러스 균주 및 백신에 따라서 6.1 내지 13.6으로 다양하다. 이러한 전환 인자는 유럽 관계당국에 의해서 요구하고 있는 GMT에서의 2.0배 증가에 비해서 월등히 우수하다.

<469> · 21일째에, 세 그룹에서의 혈청보호율은 상이한 바이러스 균주에 대해서 88.0% 내지 100%의 범위였다. 이러한 보호율은 유럽 관계당국에 의해서 60세 이상의 노인 집단에서 요구하고 있는 60% 혈청보호율에 비해서 월등히 우수하다.

<470> · 본 연구에서, 혈청전환율은 세 그룹에 대해서 50% 초과였다. 세 균주에 대한 전체 반응율은 세 그룹에서 근본적으로 동일하였다.

<471> III.5.1.2 중화항체 역가

<472> 노인에서의 인플루엔자 백신 접종에 대한 면역반응을 우수하게 특성화하기 위해서, 중화항원에 대한 혈청 항체 반응을 검정하였다. 결과를 표 9(항-중화 항체 역가에 대한 혈청보호율 및 기하평균 역가(GMT)) 및 표 10(백신 접종 후 21일째에서의 항-중화에 대한 혈청전환율(증가배수=4))에 기재되어 있다.

<473> 세 가지의 인플루엔자 균주에 대한 중화 항체의 역가를 면역화 전후 혈청에서 측정하였다. 다음 파라미터가 측

정되었다:

- <474> · 백신 접종 전후의 95% 신뢰구간(95% CI)으로의 혈청 중화항체의 기하평균 역가(GMT)
- <475> · 각각의 백신 군주에 대해서 0일째에 비해 21일째에서 4배 이상의 HI 역가증가를 나타내는 백신 접종자의 백분율로 정의된 21일째에서의 95% 신뢰구간의 혈청전환율

<476> 표 9

항체	그룹	시간	N	≥ 18 1/DIL				GMT		
				n	%	95% CI		값	95% CI	
						LL	UL		LL	UL
A/ 뉴칼레도니아	1	PRE	49	46	93.9	83.1	98.7	106.6	77.6	146.6
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	870.2	608.5	1244.3
	2	PRE	49	48	98.0	89.1	99.9	115.6	89.4	149.5
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	955.8	649.5	1406.5
	3	PRE	50	46	92.0	80.8	97.8	87.7	63.6	120.8
		PI(D21)	50	50	100.0	92.9	100.0	375.4	271.2	519.6
A/ 파나마	1	PRE	49	49	100.0	92.7	100.0	724.7	558.0	941.1
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	2012.8	1438.4	2816.5
	2	PRE	49	49	100.0	92.7	100.0	727.8	556.1	952.6
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	1597.7	1128.8	2261.5
	3	PRE	50	50	100.0	92.9	100.0	512.0	409.3	640.6
		PI(D21)	50	50	100.0	92.9	100.0	977.8	738.2	1295.0
B/ 상동	1	PRE	49	29	59.2	44.2	73.0	25.6	18.8	35.0
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9	222.5	148.1	334.2
	2	PRE	49	27	55.1	40.2	69.3	29.3	20.1	42.7
		PI(D21)	49	49	100.0	92.7	100.0	190.4	127.6	284.3
B/ 상동	3	PRE	50	31	62.0	47.2	75.3	33.4	23.1	48.4
		PI(D21)	50	46	92.0	80.8	97.8	117.8	82.6	168.0

- <477>
- <478> 그룹 1 : Flu 백신 혼합 애주번트 2x 농축된 Flu 백신
- <479> 그룹 2: Flu 백신 Flu 백신
- <480> 그룹 3: Flu 백신 Flu WVV 백신
- <481> N = 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수
- <482> n/% = 특정된 범위내의 역가를 나타낸 대상자 수/백분율
- <483> 95% CI = 95% 신뢰구간; LL = 하한치; UL = 상한치
- <484> PRE = 백신접종전 0일째
- <485> PI(D21) = 백신 접종후 21일째
- <486> 표 10

항체	그룹	N	반응자			
			n	%	95% CI	LL
A/뉴칼레도니아	1	49	29	59.2	44.2	73.0
	2	49	30	61.2	46.2	74.8
	3	50	21	42.0	28.2	56.8
A/파나마	1	49	12	24.5	13.3	38.9
	2	49	9	18.4	8.8	32.0
	3	50	9	18.0	8.6	31.4
B/상동	1	49	29	59.2	44.2	73.0
	2	49	26	53.1	38.3	67.5
	3	50	19	38.0	24.7	52.8

- <487>
- <488> 그룹 1:Flu 백신(DFLU58A16) 혼합 애주번트(D621024A8) 2x 농축된 Flu 백신

- <489> 그룹 2: Flu 백신 (18854B9) Flu 백신
- <490> 그룹 3: Flu 백신 (DFLU59A2) Flu WVV 백신
- <491> N = 이용 가능한 백신 접종 전후 둘 모두의 결과를 나타낸 대상자의 수
- <492> n = 반응자의 수
- <493> % = 반응자의 비율($n/N \times 100$).
- <494> 95% CI = 정확한 95% 신뢰구간; LL = 하한치, UL = 상한치
- <495> 주요 결과:
- <496> · 세 가지의 백신에 대해서, 21일째에, 100%의 혈청보호율이 A 균주 둘 모두에 대해서 얻어진다. B 균주에 대해서, 세 그룹에서의 혈청보호율은 92% 내지 100%범위였다.
- <497> · 백신 접종 후, 세 그룹에서 모든 균주에 대해서 GMT의 현저한 증가를 나타냈다. 그러나, 플루아릭스 그룹과 FluWVV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 존재하기는 했지만 FluWVV에서 보다 FluAS03과 플루아릭스에서 세 가지 백신 균주 모두에 대해서 중화 항체의 높은 GMT에 대한 경향이 존재하였다.
- <498> · 혈청전환율에 대해서, 세 가지 균주에 대한 전체 반응율은 세 그룹에서 근본적으로 동일하였다.
- <499> 모든 그룹에서, 결과는 항-적혈구응집소 항체에 대해서 수행된 분석으로부터의 결과와 일관되었다.
- <500> III.5.1.3 뉴라미니다제(NA) 항체 역가
- <501> 노인 집단에서의 인플루엔자 백신접종에 대한 면역 반응을 양호하게 특성화하기 위해서, 뉴라미니다제 항원에 대한 혈청 항원 반응을 검정하였다. HI 항체 역가와 유사하게, 다음 인자를 측정하였다:
- <502> · GMT (로그 역가 변환의 평균의 항-로그를 취함)
- <503> · 각각의 백신 균주에 대해서 0일째에 비해서 21일째에서 HI 역가에서의 4배 이상 증가를 나타내는 백신 접종자의 백분율로서 정의된 혈청전환율
- <504> 95% 신뢰구간으로 NI 항체에 대한 GMT 및 혈청전환율을 표 11(항-NA 항체 GMT) 및 표 12(백신 접종후(21일째) NA의 혈청전환율(4배 증가))에 나타낸다.
- <505> 표 11

항체	그룹	시간	N	GMT	95%CI	
					LL	UL
A/뉴칼레도니아	FluAS03	PRE	49	77.8	61.8	97.9
		PI(D21)	48	270.0	212.9	342.3
	플루아릭스	PRE	49	77.8	64.6	93.6
		PI(D21)	49	249.1	190.0	326.5
FluWVV	PRE	50	66.8	53.8	83.0	
	PI(D21)	50	159.2	122.8	206.4	
	A/파나마	PRE	49	33.3	28.5	48.7
	PI(D21)	48	156.8	124.8	196.9	
플루아릭스	PRE	49	34.2	25.6	45.8	
	PI(D21)	49	133.7	100.9	177.3	
	FluWVV	PRE	50	24.6	18.7	32.4
	PI(D21)	49	78.9	59.4	104.7	
B/상봉	FluAS03	PRE	49	46.7	36.5	59.9
		PI(D21)	49	204.2	156.4	266.7
	플루아릭스	PRE	49	46.1	35.3	60.1
	PI(D21)	49	133.7	100.9	177.3	
FluWVV	PRE	50	48.6	36.4	64.7	
	PI(D21)	49	128.2	101.7	161.6	

<506>

- <507> FluAS03: AS03 애주번트 (D621024A8)와의 Flu 백신 (DFLU58A16) 혼합물
- <508> 플루아릭스: Flu 백신 (18854B9)
- <509> FluWV: FluWV 백신 (DFLU59A2)
- <510> PRE= 백신 접종 전, PI(D21)= 백신접종 후 21일
- <511> 95%CI, LL, 및 UL = 95% 신뢰구간, 하한치 및 상한치

<512> 표 12

항체	그룹	N	n	반응자 %	95% CI	
					LL	UL
A/뉴칼레도니아	FluAS03	48	25	52.1	37.2	66.7
	플루아릭스	49	24	49.0	34.4	63.7
	FluWV	49	18	36.7	23.4	51.7
A/파나마	FluAS03	48	27	56.3	41.2	70.5
	플루아릭스	49	23	46.9	32.5	61.7
	FluWV	49	21	42.9	28.8	57.8
B/상동	FluAS03	48	26	54.2	39.2	68.6
	플루아릭스	49	23	46.9	32.5	61.7
	FluWV	49	16	32.7	19.9	47.5

- <513>
- <514> FluAS03: AS03 애주번트 (D621024A8), 플루아릭스: Flu 백신 (18854B9), FluWV: Flu WV 백신 (DFLU59A2)와의 Flu 백신 (DFLU58A16) 혼합물.

<515> N=이용 가능한 백신 접종 전후 결과를 나타낸 대상자의 수, n=반응자 수

<516> % = 반응자의 비율 (n/N x 100).

<517> 95% CI = 정확한 95% 신뢰구간; LL = 하한치, UL = 상한치

<518> 주요 결과:

- <519> · 뉴라미니다제에 비해서 더 높은 값의 GMT 및 혈청전환율이 적혈구응집소에 대해서 관찰되었다.
- <520> · 모든 백신 균주에 대한 항체의 백신 접종전 GMT가 세 가지 그룹에서 동일한 범위 내에 있었다. 백신 접종 후, 항-뉴라미니다제 항체 수준이 현저하게 증가하였다. HI 항체 역가에 대해서, 백신 접종 후, 플루아릭스 그룹과 FluWV 그룹 사이에 95% 신뢰구간의 일부 중첩이 있었지만, FluAS03 및 플루아릭스 그룹에서의 모든 세 가지 백신 균주에 대해서 더 높은 HI 항체 GMT에 대한 경향이 있었다.

<521> · 혈청전환율과 관련하여, 세 균주에 대한 전체 반응율은 세 그룹에서 및 세 균주에 대해서 근본적으로 동일하였다.

<522> 이러한 결과는 인플루엔자에 대해서 본 연구에서 백신 접종된 건강한 노인이 어떠한 인플루엔자 백신이든 간에 뉴라미니다제 항원에 대해 양호한 항체 반응을 나타냈음을 보이고 있다. 그러나, 뉴라미니다제 항원에 대한 반응은 적혈구응집소 항원에 대한 반응보다 낮다.

<523> III.5.2. 세포 면역반응

<524> 말초 혈액 항원-특이적 CD4 및 CD8 T 세포는 시험관 내에서 재자극되어 이들에 상응하는 항원과 함께 인큐베이션되는 경우 IL-2, CD40L, TNF- α 및 IFN γ 를 생성시킬 수 있다. 결론적으로, 항원-특이적 CD4 및 CD8 T 세포 및 세포내 시토카인 생산은 세포 표현형의 통상적 면역형광 표지화 후에 유세포분류기에 의해서 계수될 수 있다. 본 연구에서, 인플루엔자 백신 항원뿐만 아니라 특이적 인플루엔자 단백질로부터 유도된 펩티드가 인플루엔자-특이적 T 세포를 재자극하기 위한 항원으로서 사용되었다. 결과를 표 13 내지 18에 CD4 및 CD8 T-세포 반응에 대해서 나타내고 있다.

<525> 표 13. 둘 이상의 상이한 시토카인을 생성하는 세포 내로 발현된 항원 특이적 CD4 T-세포 반응: CD40L/IL2/TNF- α /IFN- γ (전체 백신 접종된 코호트)에 대한 백신 접종 전후의 기술통계

분비	항원	Gr	시점	N	평균	SD	Min
CD4 중의 CD40L/IL2/IFN γ / TNF α	펩티드 인플루엔자	1	0 일	44	33.50	139.026	1.00
		1	21일	45	58.40	132.664	1.00
		2	0 일	42	92.10	368.790	1.00
		2	21일	44	88.36	272.528	1.00
		3	0 일	45	80.13	284.316	1.00
		3	21일	47	91.40	382.967	1.00
	스플리트 인플루엔자	1	0 일	47	1901.66	1596.203	102.00
		1	21일	48	6163.75	4265.900	773.00
		2	0 일	45	2151.04	2622.594	265.00
		2	21일	49	4150.73	3712.469	328.00
		3	0 일	48	1678.44	916.329	142.00
		3	21일	50	3374.60	1920.194	449.00
	전체 인플루엔자	1	0 일	48	3134.33	2568.369	507.00
		1	21일	47	9332.04	6875.403	1482.00
		2	0 일	47	3050.85	2654.936	486.00
		2	21일	49	6760.31	6788.258	1852.00
		3	0 일	48	2955.33	2019.233	473.00
		3	21일	50	5661.40	4530.321	635.00

<526>

분비	항원	Gr	시점	Q1	중간값	Q3	Max	크러스컬- 윌리스 시험 (p-값)
CD4 중의 CD40L/ IL2/ IFN γ /TNF α	펩티드 인플루엔자	1	0 일	1.00	1.00	4.00	915.00	0.7631
		1	21일	1.00	1.00	56.00	733.00	
		2	0 일	1.00	1.00	54.00	2393.00	
		2	21일	1.00	1.00	69.50	1740.00	
		3	0 일	1.00	1.00	65.00	1908.00	
		3	21일	1.00	1.00	63.00	2615.00	
	스플리트 인플루엔자	1	0 일	957.00	1560.00	2408.00	9514.00	0.0002
		1	21일	3468.00	4908.00	7624.00	21324.00	
		2	0 일	930.00	1381.00	2274.00	16289.00	
		2	21일	2247.00	3036.00	4744.00	21924.00	
		3	0 일	1086.00	1502.00	2189.00	3899.00	
		3	21일	2312.00	3040.00	4437.00	10431.00	
	전체 인플루엔자	1	0 일	1730.00	2298.50	3876.00	15066.00	0.0040
		1	21일	4091.00	6523.00	14045.00	29251.00	
		2	0 일	1190.00	2031.00	4161.00	11994.00	
		2	21일	3573.00	4621.00	7234.00	40173.00	
		3	0 일	1421.50	2668.50	3411.50	10578.00	
		3	21일	2459.00	4315.00	7303.00	22053.00	

<527>

<528> 그룹 1 : FluAS03: AS03 애주번트와 혼합된 Flu 백신 플루아릭스

<529> 그룹 2: 플루아릭스: Flu 백신 플루아릭스™

<530> 그룹 3: FIuWV: Flu WV 백신

<531> SD = 표준 편차; Min, Max = 최고, 최대

<532> Q1 = 일사분위; Q3 = 삼사분위

<533> N= 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수

<534> P-값: 21일째에 3 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 크러스컬-윌리스 시험

(Kruskall-Wallis Test)(비-파라메터 과정).

표 14. 둘 이상의 상이한 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후 (전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4 중의 CD40L/IFN- γ /TNF- α	웹티드 인플루엔자	1	44	9.57	159.363	-860.00
		2	42	-40.98	386.998	-2392.00
		3	45	-50.73	256.596	-1664.00
	스플리트 인플루엔자	1	47	4307.02	4468.828	-8161.00
		2	45	1982.93	3802.332	-14318.0
		3	48	1555.90	1596.216	-526.00
	전체 인플루엔자	1	47	6197.98	7220.765	-11763.0
		2	47	3791.34	5820.894	-2128.00
		3	48	2535.98	3966.345	-4766.00
CD8 중의 CD40L/IFN- γ /TNF- α	웹티드 인플루엔자	1	42	-15.95	215.710	-451.00
		2	41	50.83	264.370	-614.00
		3	44	-52.11	243.811	-684.00
	스플리트 인플루엔자	1	42	134.71	426.699	-603.00
		2	44	-65.05	822.036	-4938.00
		3	45	2.49	330.700	-1094.00
	전체 인플루엔자	1	39	189.38	1394.153	-2641.00
		2	44	-479.75	1790.094	-9455.00
		3	44	-243.73	719.269	-1892.00

	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P-값	
CD4 중의 CD40L/IFN- γ /TNF- α	웹티드 인플루엔자	1	0.00	0.00	37.50	430.00	0.0765
		2	-15.00	0.00	26.00	514.00	
		3	-37.00	0.00	0.00	212.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1888.00	3396.00	6634.00	19555.00	<0.0001
		2	699.00	1490.00	2573.00	15169.00	
		3	466.00	1183.50	2186.50	7851.00	
	전체 인플루엔자	1	2170.00	4009.00	11681.00	25570.00	0.0003
		2	1246.00	2382.00	3992.00	33801.00	
		3	503.00	1382.50	3300.50	19337.00	
CD8 중의 CD40L/IFN- γ /TNF- α	웹티드 인플루엔자	1	-106.00	0.00	81.00	655.00	0.0932
		2	-58.00	13.00	202.00	703.00	
		3	-160.50	0.00	53.00	567.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-122.00	35.50	221.00	1387.00	0.2121
		2	-64.50	0.00	160.50	1252.00	
		3	-99.00	0.00	76.00	1060.00	
	전체 인플루엔자	1	-420.00	49.00	591.00	5045.00	0.0851
		2	-1016.00	-263.50	180.00	3743.00	
		3	-651.00	-86.50	180.00	1011.00	

표 15. 둘 이상의 CD40L 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	44	10.09	153.007	-815.00
		2	42	-29.40	316.983	-1921.00
		3	45	-43.73	251.146	-1629.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	4266.20	4470.807	-8093.00
		2	45	2026.42	3511.508	-11482.0
		3	47	1512.34	1576.133	-494.00
	전체 인플루엔자	1	47	6071.96	7118.132	-11691.0
		2	47	3764.64	5740.762	-2114.00
		3	48	2544.27	3959.879	-4390.00
CD8 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	44	-19.41	81.675	-370.00
		2	41	-3.98	100.998	-399.00
		3	45	-5.56	64.666	-181.00
	스플리트 인플루엔자	1	43	39.53	190.122	-438.00
		2	44	27.61	91.173	-155.00
		3	45	30.18	191.326	-291.00
	전체 인플루엔자	1	41	-91.24	617.077	-1779.00
		2	44	-115.91	588.424	-2583.00
		3	45	-150.89	367.300	-1239.00

<539>

분비	항원	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P- 값
CD4 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	0.00	0.00	36.50	428.00	0.1233
		2	-8.00	0.00	27.00	494.00	
		3	-35.00	0.00	3.00	230.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1799.00	3156.50	6647.00	19480.00	<0.0001
		2	783.00	1485.00	2546.00	15021.00	
		3	469.00	1107.00	2035.00	7687.00	
	전체 인플루엔자	1	2109.00	4048.00	11472.00	25448.00	0.0004
		2	1212.00	2509.00	3957.00	33428.00	
		3	523.00	1392.00	3261.50	19478.00	
CD8 중의 CD40L	펩티드 인플루엔자	1	-2.00	0.00	0.50	100.00	0.9721
		2	-28.00	0.00	24.00	231.00	
		3	-13.00	0.00	3.00	176.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-35.00	0.00	140.00	608.00	0.6175
		2	-18.50	0.00	77.50	326.00	
		3	-9.00	0.00	28.00	1188.00	
	전체 인플루엔자	1	-142.00	-8.00	175.00	2087.00	0.3178
		2	-195.50	-34.50	150.00	1258.00	
		3	-270.00	-103.00	88.00	588.00	

<540>

<541>

표 16. 적어도 IFN γ 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	N 불참인원	평균	SD	Min
CD4중의 IFN γ	펩티드 인플루엔자	1	44	5	7.50	64.539	-171.00
		2	42	7	-30.67	277.984	-1766.00
		3	45	5	-27.91	103.403	-639.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	3	2712.87	2905.629	-4394.00
		2	45	4	1148.56	2526.536	-10586.0
		3	47	3	871.00	1016.251	-764.00
	전체 인플루엔자	1	47	2	4240.09	4811.891	-8272.00
		2	47	2	2445.38	4030.694	-3018.00
		3	48	2	1535.48	2456.915	-3670.00
CD8 중의 IFN γ	펩티드 인플루엔자	1	44	5	7.75	146.412	-226.00
		2	41	8	10.68	176.026	-420.00
		3	44	6	-49.80	217.214	-699.00
	스플리트 인플루엔자	1	43	6	138.58	365.565	-470.00
		2	44	5	-112.82	793.746	-4919.00
		3	44	6	29.91	238.157	-708.00
	전체 인플루엔자	1	41	8	6.66	1642.577	-5610.00
		2	44	5	-471.55	1792.348	-9586.00
		3	44	6	-189.05	685.291	-1879.00

<542>

분비	항원	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P- 값
CD4중의 IFN γ	펩티드 인플루엔자	1	-9.50	0.00	7.50	265.00	0.1541
		2	-5.00	0.00	24.00	222.00	
		3	-20.00	0.00	0.00	51.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1273.00	1644.00	4057.00	13296.00	<0.0001
		2	405.00	931.00	1757.00	9426.00	
		3	283.00	624.00	1114.00	5031.00	
	전체 인플루엔자	1	1610.00	2693.00	7437.00	17489.00	<0.0001
		2	723.00	1487.00	2983.00	21594.00	
		3	232.50	810.00	2218.50	11319.00	
CD8중의 IFN γ	펩티드 인플루엔자	1	-52.50	0.00	40.00	615.00	0.3322
		2	-1.00	0.00	72.00	610.00	
		3	-172.00	0.00	90.50	424.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-46.00	42.00	294.00	1549.00	0.1257
		2	-62.00	0.00	74.00	1028.00	
		3	-59.50	26.50	123.00	643.00	
	전체 인플루엔자	1	-385.00	131.00	450.00	5068.00	0.1179
		2	-955.50	-221.00	177.00	3492.00	
		3	-476.50	-36.50	198.00	1299.00	

<543>

<544>

표 17. 적어도 IL2 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4중의 IL2	캡티드 인플루엔자	1	44	2.82	118.164	-595.00
		2	42	0.90	84.255	-167.00
		3	45	-28.62	191.709	-1222.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	3456.15	3853.960	-7009.00
		2	45	1738.29	2406.045	-451.00
		3	47	1210.02	1361.705	-634.00
	전체 인플루엔자	1	47	4839.02	5978.277	-9178.00
		2	47	2891.00	4493.387	-1370.00
		3	48	2042.50	3123.912	-3179.00
CD8중의 IL2	캡티드 인플루엔자	1	42	-30.60	219.777	-630.00
		2	41	38.85	210.715	-674.00
		3	45	-44.80	197.026	-526.00
	스플리트 인플루엔자	1	41	54.85	250.817	-336.00
		2	44	-2.36	423.957	-2272.00
		3	45	-26.07	244.870	-1004.00
	전체 인플루엔자	1	39	56.21	406.262	-704.00
		2	44	-151.02	822.384	-4304.00
		3	45	-63.56	359.699	-1036.00

<545>

분비	항원	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P- 값
CD4중의 IL2	캡티드 인플루엔자	1	-1.50	0.00	31.50	324.00	0.0806
		2	-34.00	0.00	2.00	362.00	
		3	-19.00	0.00	0.00	253.00	
	스플리트 인플루엔자	1	1309.00	2598.50	5926.00	16988.00	<0.0001
		2	453.00	1113.00	2049.00	12273.00	
		3	331.00	806.00	1596.00	6474.00	
	전체 인플루엔자	1	1516.00	3341.00	8955.00	21032.00	0.0006
		2	995.00	1942.00	3007.00	26358.00	
		3	371.50	1083.50	2624.50	14057.00	
IL2 in CD8	캡티드 인플루엔자	1	-111.00	0.00	103.00	412.00	0.1684
		2	-41.00	0.00	138.00	542.00	
		3	-150.00	-34.00	71.00	447.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-76.00	26.00	133.00	803.00	0.2311
		2	-78.50	0.00	121.50	1064.00	
		3	-93.00	-1.00	30.00	705.00	
	전체 인플루엔자	1	-167.00	63.00	261.00	1302.00	0.4586
		2	-444.50	-4.00	199.00	1398.00	
		3	-198.00	9.00	131.00	838.00	

<546>

<547>

표 18. 적어도 TNF α 및 또 다른 시토카인을 생성하는 세포내로 발현된 항원-특이적 CD4 T-세포 반응: 백신 접종 전후(전체 백신 접종된 코호트) 사이의차이에 대한 기술통계

분비	항원	그룹	N	평균	SD	Min
CD4 중의 TNF- α	펩티드 인플루엔자	1	44	9.48	92.992	-466.00
		2	42	-47.71	367.624	-2333.00
		3	45	-37.38	179.147	-1169.00
	스플리트 인플루엔자	1	46	2343.11	2596.177	-4450.00
		2	45	703.87	2973.241	-14260.0
		3	47	732.00	740.001	-611.00
	전체 인플루엔자	1	47	3103.74	4248.997	-5146.00
		2	47	1658.38	3639.959	-1393.00
		3	48	1010.15	1689.394	-1482.00
CD8 중의 TNF- α	펩티드 인플루엔자	1	42	11.71	201.031	-453.00
		2	41	37.46	245.241	-612.00
		3	44	-42.95	210.185	-645.00
	스플리트 인플루엔자	1	41	138.54	362.601	-329.00
		2	44	-70.27	790.309	-4741.00
		3	44	-39.75	348.803	-1044.00
	전체 인플루엔자	1	39	279.59	1048.352	-1184.00
		2	44	-280.70	1562.095	-9070.00
		3	44	-71.57	492.135	-1574.00

<548>

분비	항원	그룹	Q1	중간값	Q3	Max	P- 값
CD4 중의 TNF- α	펩티드 인플루엔자	1	-1.50	0.00	39.00	239.00	0.1836
		2	-4.00	0.00	12.00	277.00	
		3	-26.00	0.00	5.00	53.00	
	스플리트 인플루엔자	1	862.00	1466.50	3931.00	9267.00	<0.0001
		2	251.00	698.00	1229.00	12275.00	
		3	191.00	540.00	1010.00	3288.00	
	전체 인플루엔자	1	868.00	1607.00	5266.00	17199.00	0.0008
		2	367.00	871.00	1584.00	23540.00	
		3	175.00	592.00	1385.50	8760.00	
CD8 중의 TNF- α	펩티드 인플루엔자	1	-80.00	0.50	70.00	772.00	0.2759
		2	-81.00	0.00	155.00	791.00	
		3	-179.00	0.00	39.50	566.00	
	스플리트 인플루엔자	1	-23.00	60.00	178.00	1468.00	0.0790
		2	-107.00	0.00	158.00	1286.00	
		3	-185.00	0.00	78.50	1021.00	
	전체 인플루엔자	1	-250.00	108.00	399.00	4601.00	0.1482
		2	-392.00	-56.50	205.00	3258.00	
		3	-233.50	-54.00	160.00	1543.00	

<549>

<550>

결과는 CD4 또는 CD8 T 세포 서브-집단내에서의 시토카인(들)-양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로서 표현되며 도 4 및 도 5에 나타났다.

<551>

유사한 분석에서, 교차-반응성 CD T-세포 반응을 드리프트된 균주(drifted strain)(A/H1N1/Beijing/262/95 (H1N1d), A/H3N2/Sydney/5/97 (H3N2d), B/Yamanashi/166/98 (Bd)) 또는 쉬프트 균주(shift strain)(A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Hongkong/1073/99 (H9N2))로부터의 인플루엔자 항원을 사용함으로써 평가하였다. 시토카인(들)-양성 CD4 T 세포의 빈도로 표현된 결과가 도 6에 도시되어 있다.

<552>

주된 발견:

- <553> · 플루아릭스 또는 전체 바이러스에 의한 백신 접종은 CD4 T-세포 반응을 약간 상승시켰다. Flu AS03으로의 백신 접종은 강한 CD4 T-세포 반응을 유도하고(도 4), 이러한 유도는 통계적 유의 수준이다. 동일한 결론이 스플리트 항원 또는 전체 바이러스에 의한 시험관내 자극 후에 유도되며, 모든 시토카인(IL-2, IFN γ , TNF α , 및 CD40L)에 의한 자극이 조사되었다.
- <554> · 대부분의 개체는 전체 flu에 대한 CD8 T-세포 반응을 지니지만, 백신 접종은 연구된 그룹중 어떠한 그룹에서도 CD8 T-세포 반응에 측정 가능한 충격을 주지 않는다(즉, 전=후)(도 5)
- <555> 플루아릭스에 의한 백신 접종만이 낮은 수준의 교차-반응성 CD4 T-세포 반응을 유도한다(도 6). FluAS03에 의한 백신 접종은 드리프팅된 균주에 대해서 강한 CD4 T-세포 반응을 유도하며, 이러한 유도는 통계적 유의수준이다(도 6). 약간의 반응이 쉬프트 균주에 대해서 검출되었다.
- <556> III.5.3. B-세포 ELISPOT 메모리(ELISPOT MEMORY)
- <557> *III.5.3.1 목적*
- <558> AS03-애주버트 첨가된 인플루엔자 백신에 의해서 유도된 CMI 반응을 더 양호하게 특성화하기 위해서, 인플루엔자 백신 균주 또는 항-사람 면역글로불린을 사용한 시험관내 혈장 세포내로 분화되도록 유도된 B-세포 Elispot 메모리 반응을 항-인플루엔자 또는 IgG 분비 혈장을 계수하도록 평가하였다. 결과를 표 19 및 표 20 및 도 7에 기재한다.
- <559> FluAS03 백신의 일회 용량이 투여되는 22명의 제 1 대상자와 플루아릭스 백신의 일회 용량이 투여되는 21명의 제 1 대상자의 서브셋을 선택하여 B-세포 메모리 Elispot 기술을 사용함으로써 인플루엔자-특이적 메모리 B-세포에 대한 백신 접종의 영향을 평가하였다. 다음 중점(end-point)을 측정하였다.
- <560> · 0일째 및 21일째에: 인플루엔자-특이적 메모리 B-세포를 모든 대상자에게서 B-세포 Elispot에 의해서 측정하였다. 결과는 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된다.
- <561> · 백신접종 후(21일) 및 전(0일) 사이의 차이가 또한 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된다.
- <562> *III.5.3.2 통계 방법*
- <563> 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된 0일째 및 21일째에서의 각각의 백신 접종 그룹에 대한 기술통계. 백만(10^6)의 항체 형성 세포 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 21일째와 0일째(백신 접종 후-전) 사이의 개별적인 차이에 대한 기술통계.
- <564> 윌콕슨 시험을 이용하여 두 그룹 사이에서의 차이의 위치를 비교하고 통계적 p-값을 3 가지의 균주(A/뉴칼레도니아, A/파나마 및 B/상동) 각각에 대해서 계산하였다.
- <565> *III.5.3.3 결과*
- <566> 플루아릭스 그룹에 비교된 인플루엔자 애주버트 첨가된 AS03 백신의 우호적 성형이 존재한다. A/뉴칼레도니아 균주의 경우에, 플루아릭스에 비한 FluAS03의 우호성에서의 통계학적 유의수준 차이(p-값=0.021)가 존재한다. 두 그룹 사이의 통계학적 차이는 A/파나마 및 B/상동 균주에 대해서 관찰되지 않았다.
- <567> **표 19. B-세포 메모리: 10^6 의 IgG-생성된 혈장 세포(대상의 서브셋) 내의 항원-혈장의 빈도로서 백신 접종전(0일) 및 접종후(21)일의 기술통계 및 추리통계(inferential statistics)**

군주	그룹	시점	N	평균	SD	Min
A/뉴칼레도니아	1	0 일	22	9751.58	6630.335	0.00
	1	21 일	22	22001.65	11308.261	3981.90
	2	0 일	21	9193.61	4339.421	1300.81
	2	21 일	21	12263.08	7285.698	789.47
A/파나마	1	0 일	22	4329.17	2923.497	0.00
	1	21 일	22	18066.69	14604.842	714.29
	2	0 일	21	4860.41	3392.373	0.00
	2	21 일	21	13872.95	12052.163	0.00
B/산둥	1	0 일	22	3722.80	2347.315	0.00
	1	21 일	22	15949.60	12385.965	0.00
	2	0 일	21	3030.39	2206.589	640.57
	2	21 일	21	9714.03	5656.805	0.00

<568>

군주	Gr	시점	Q1	중간값	Q3	Max	P-값 (시험상의 윌콕슨)
A/뉴칼레도니아	1	0 일	4117.65	9606.46	13430.66	25570.78	0.0056
	1	21 일	11052.63	20450.55	30234.74	40526.32	
	2	0 일	6363.64	9686.41	11698.11	19164.84	
	2	21 일	7741.05	9545.45	17069.60	32000.00	
A/파나마	1	0 일	2275.45	4003.02	5764.55	10842.49	0.1814
	1	21 일	9347.37	13176.41	21471.39	54789.92	
	2	0 일	2222.22	4545.45	7495.74	11698.11	
	2	21 일	6231.88	10147.06	20540.54	52188.84	
B/산둥	1	0 일	2058.82	2956.78	5972.22	7832.17	
	1	21 일	6860.47	12796.90	22947.37	48947.37	

<569>

	2	0 일	1290.32	2113.82	4770.02	7783.25	0.1483
	2	21 일	6590.91	9009.01	12774.87	21201.72	

<570>

<571>

그룹 1 : 수중유 Flu 백신 플루아릭스 + AS03 에멀전 애주번트

<572>

그룹 2: Flu 백신 플루아릭스™

<573>

SD = 표준편차

<574>

Min, Max = 최소, 최대

<575>

Q1 = 일사분위

<576>

Q3 = 삼사분위

<577>

N= 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수

<578>

P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨(비-파라메터 과정).

<579>

표 20

<580>

B 세포 메모리: 10⁶의 IgG-생성된 혈장 세포(대상의 서브셋) 내의 항원-특이적 혈장의 빈도로서 백신 접종후(21 일)과 접종전(0일) 사이의 차이에 대한 기술통계 및 추리통계(inferential statistics)

군주	그룹	N	평균	SD	Min
A/뉴칼레도니아	1	22	12250.07	12875.755	-4365.08
	2	21	3069.46	7309.731	-10043.4
A/파나마	1	22	13737.52	13677.942	-188.29
	2	21	9012.54	11489.012	-1551.05
B/산둥	1	22	12226.81	12243.895	-2222.22
	2	21	6683.64	6240.312	-2113.82

군주	Gr	Q1	중간값	Q3	Max	P-값 (윌콕슨 시험)
A/뉴칼레도니아	1	2418.07	6776.65	26036.01	35059.98	0.0210
	2	-1762.54	1694.51	6850.19	18579.97	
A/파나마	1	4551.30	11039.04	16614.85	49881.94	0.1449
	2	1522.85	6480.96	9214.67	47812.47	
B/산둥	1	1788.75	9322.70	18907.05	42134.18	0.1895
	2	2117.44	5384.41	9897.27	19801.28	

<581>

<582> 그룹 1 : 수중유 Flu 백신 플루아릭스 + AS03 에멀전 애주번트

<583> 그룹 2: Flu 백신 플루아릭스™

<584> SD = 표준편차

<585> Min, Max = 최소, 최대

<586> Q1 = 일사분위

<587> Q3 = 삼사분위

<588> N= 이용 가능한 결과를 나타낸 대상자 수

<589> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨(비-파라메터 과정).

<590> **III.6. 전체 결론**

<591> **III.6.1. 반응원성 및 안전성 결과**

<592> 인플루엔자 면역화는 폐렴 및 그와 관련된 사망 위험을 현저하게 감소시키지만, 노인의 백신접종은 인플루엔자 질환에 대해서 단지 23 내지 72% 보호만을 나타낸다. 효과적인 애주번트와의 백신 항원의 제형은 서브단위 항원에 대한 면역반응을 강화시키는 효과적인 방법이다. 이러한 연구는 (1) 수중유 에멀전, 즉, AS03으로 보조된 인플루엔자 백신의 건강한 노인에서의 안정성 및 반응원성을 평가하고, (2) 항체 및 세포-매개된 면역반응을 평가하도록 디자인되었다. 반응원성 데이터는 AS03으로 보조된 인플루엔자 백신이 두가지의 다른 백신에 비해서 더 국소 및 일반적인 증상을 유도하였음을 나타낸다. 그러나, 원치않는 부작용과 관련하여, 3 가지의 백신 사이에 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터, 후보 백신의 반응원성 및 안전성 특징은 만족할만하고 임상적으로 허용 가능하다고 결론지을 수 있다.

<593> **III.6.2. 면역원성 결과**

<594> 면역 반응과 관련하여, 세 가지의 백신은 스플리트 비리온 인플루엔자 백신의 연례 등록(연례 군주 변화-CPMP/BWP/214/96의 면역학적 검정을 위한 "인플루엔자 백신에 대한 요건의 조화에 관한 안내서(Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for influenza Vaccines)"에 대한 유럽 관계당국의 요건을 초과하였다. 본 연구에서 사용된 세 가지의 인플루엔자 백신은 인플루엔자 적혈구응집소 및 중화항원에 대한 양호한 항체 반응을 보이는 건강한 노인에서 면역원성이었다(표 21).

표 21

변수	항체 반응에 대한 EU 표준	결과
전환인자	>2.0	> 6.1
혈청전환율	>30%	> 50%
보호율	>60%	> 88%

세포-매개된 면역성 (CMI) 반응과 관련하여, AS03으로 보조된 인플루엔자 백신은 두 가지의 다른 백신(플루아릭스 및 전체 인플루엔자 바이러스 백신)에 비해서 현저하게 강한 CD4 반응(드리프팅된 균주를 포함)을 유도하였다. 그러나, 백신접종은 CD8 반응에 대한 측정 가능한 충격이 없다.

B 세포 메모리 반응과 관련하여, 비-애주버트 첨가된 백신에 비해서 인플루엔자 보조된 백신의 양호한 경향이 존재한다.

실시에 IV - AS03 애주버트 및 스플리트 인플루엔자 항원 제제를 함유하는 백신에 의한 65세 초과 노인 집단에서의 임상시험- Explo- Flu-002

단계 I/II, 개방, 조절된 연구가, 애주버트 AS03을 함유하는 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 (GlaxoSmithKline Biologicals) 인플루엔자 후보 백신의 반응원성 및 면역원성을 평가하기 위해서, Explo-Flu-001 임상 시험에서 후보 백신으로 2003년에 미리 백신 접종된 65세 초과 노인 집단에서 수행되었다. 면역원성 및 안정성 평가를 위해서, 플루아릭스™ 백신(벨기에에서 a-rix™으로 공지됨)이 참조로서 사용되었다.

IV.1. 목적

체액성 면역반응(즉, 항-절혈구응집소 항체 역가) 및 세포 매개된 면역 반응(CD4 및/또는 CD8 T 세포 반응) 및 B 메모리 세포 반응을 AS03 애주버트 첨가된 백신의 일회 용량의 근육내 투여 후 21일째에서 측정하였다. 플루아릭스™을 참조로서 사용하였다.

목적은

1) AS03 애주버트 첨가된 Flu(40명) 대 플루아릭스(18명)가 인플루엔자 항원으로 백신 접종된 개체의 CD4- 및/또는 CD8-매개된 면역성에 대해서 가장 강한 면역자극 활성을 나타내는지를 측정하고;

2) 경시적 분석(longitudinal analysis)을 이용하여 예비 백신 접종 2004(2003년 첫 번째 백신 접종 1년 후의 반응을 위해서)에서 면역 반응에 보조된 AS03의 영향을 평가하기 위함이다.

IV.2. 연구 디자인, 백신 조성물 및 종점

■ 2003년(FluAS03)에서 Explo-Flu-001 임상시험 동안 AS03 애주버트 첨가된 인플루엔자 백신 일회 용량이 미리 투여된 65세 초과 노인 40명 대상

■ 2003년(플루아릭스)에 Explo-Flu-001 임상시험 동안 플루아릭스™ 일회 용량이 미리 투여된 65세 초과 노인 약 20명 대상의 한 대조 그룹

IV.2.1. 백신 조성

백신 조성은 백신(2004년 백신)에 포함된 인플루엔자 균주를 제외하고는 연구 Explo-Flu-001에 대해서 사용된 백신 조성 과 유사하다. 균주는 다음과 같다:

- A/뉴칼레도니아/20/99 (IVR-116) (H1N1) = A/뉴칼레도니아/ (H1N1) - 유사 균주
- A/와이오밍/3/2003 (X-147) (H3N2) = A/후지안(Fujian) (H3N2) - 유사 균주
- B/지양수/10/2003 = B/상하이 - 유사 균주

IV.2.2. 면역원성 (HI) 엔드-포인트

- GMTs (로그 역사 변환의 평균의 항-로그를 취함)
- 전환인자(0일째에 비한 21일째에서의 혈청 HI GMT에서의 증가 배수)
- 혈청전환율 (각각의 백신 균주에 대해서, 0일째에 비해서 21일째에서 4 배 이상의 HI 역가 증가를 보이는 백

신 접종자의 백분율)

<618> · 보호율 (21일째에서 혈청 HI $\geq 1:40$ 으로 보이는 백신 접종자의 백분율)

<619> IV.2.3. CMI-종점

<620> 관찰된 변수:

<621> 0일째 및 21일째에서: 4 가지의 상이한 시토카인 내로의 10^6 당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도. 각각의 시험은 하기 항원에 대한 CD4/CD8 T 세포의 반응을 정량한다:

<622> ■ 하기 3가지의 항원 푸울

<623> ■ 뉴칼레도니아 항원(New Calenonia antigen)

<624> ■ 와이오밍 항원(Wyoming antigen)

<625> ■ 지양수 항원(Jiangsu antigen).

<626> 유도된 변수:

<627> 5 가지의 상이한 시험(시토카인)으로 나타낸 항원-특이적 CD4 및 CD8-T-세포 반응:

<628> 1. 둘 이상의 상이한 시토카인(CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)을 생성하는 세포

<629> 2. 적어도 CD40L과 또 다른 시토카인(IL-2, TNF α , IFN γ)을 생성하는 세포

<630> 3. 적어도 IL2와 또 다른 시토카인(CD40L, TNF α , IFN γ)을 생성하는 세포

<631> 4. 적어도 IFN γ 와 또 다른 시토카인(IL-2, TNF α , CD40L)을 생성하는 세포

<632> 5. 적어도 TNF α 와 또 다른 시토카인(IL-2, CD40L, IFN γ)을 생성하는 세포

<633> IV.2.4. CMI 분석

<634> 첫 번째 CMI 분석은 전체 백신 접종된 코호트를 기초로 하였다(N= FluAS03 그룹에 대해서 40명 대상 및 N=플루아릭스 그룹에 대해서 18명 대상).

<635> 경시적 분석은 Explo-Flu-001 (스플리트 단백질) 및 Explo-Flu-002 (flu 항원 푸울) 연구를 기초로 하였다:

<636> ■ 접종전: N=FluAS03 그룹에 대해서 36 명 대상 및 N=플루아릭스 그룹에 대해서 15명 대상.

<637> ■ 접종후-접종전: N=FluAS03 그룹에 대해서 34명 대상 및 플루아릭스 그룹에 대해서 15명 대상.

<638> (a) 반응에서 CD4/CD8 T-림프구 분비의 빈도가 각각의 항원에 대해서, 각각의 시토카인에 대해서, 각각의 백신 그룹에 대해서 및 각각의 시점(백신 접종 전 및 후)에서 기술통계에 의해서 요약되었다.

<639> (b) 시점들(접종후-접종전) 반응 사이의 개별적인 차이에 대한 기술통계는 각각의 항원, 각각의 시토카인, 및 각각의 백신 그룹에 대해서 표로 기재되었다.

<640> (c) 백신 접종후 및 백신 접종 (후-전) 시점에 대해서, 비-파라미터 윌콕슨 시험이 이용되어 두 백신 그룹사이의 위치 차이를 비교하고, 이하에 대한 상이한 4가지의 시토카인과 관련한 통계적 p-값을 계산하였다:

<641> - 뉴칼레도니아, 와이오밍, 지양수 및 3종의 균주의 푸울에 대한 CD4 T-세포 반응

<642> - 뉴칼레도니아, 와이오밍, 지양수 및 3종의 균주의 푸울에 대한 CD8 T-세포 반응

<643> (d) 비-파라미터 시험(윌콕슨-시험)이 또한 이하를 위해서 이용되었다:

<644> - 각각의 백신 그룹에서의 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002사이의 특이적 CD4의 빈도에 관한 접종전(0일째) 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,

<645> - 연구 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002 각각에서의 2 가지 백신 그룹 사이의 특이적 CD4의 빈도에 관한 접종전(0일째) 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,

<646> - 각각의 백신 그룹에서의 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002 사이의 특이적 CD4의 빈도 차이(접종후-접종전)에 관한 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,

- <647> - 연구 Explo-Flu-001과 Explo-Flu-002 각각에서의 2 가지 백신 그룹 사이의 특이적 CD4의 빈도 차이(접종후-접종전)에 관한 면역 반응 운동(kinetic of the immune response)을 조사를 위해서,
- <648> 모든 유의 시험은 양측검사로 수행하였다. 0.05와 동일하거나 그 미만인 p-값이 통계적 유의수준으로 여겨졌다.
- <649> IV.3. 결과
- <650> 결과는 CD4 또는 CD8 T 세포 서브-집단내의 시토카인(들)-양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로서 표현되었다.
- <651> IV.3.1. 항원 특이적 CD4 T-림프구
- <652> 반응에서의 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비 빈도가 각각의 항원, 각각의 시토카인, 각각의 백신 그룹 및 각각의 시점(백신 접종전 및 접종후)에서 기술통계에 의해서 요약되었다.
- <653> 각각의 백신 그룹에 대해서 및 각각의 상이한 5 가지의 시토카인에서의 각각의 항원에 대한 CD4 T-림프구 반응에서의 시점들(접종후-접종전) 사이의 개별적인 차이에 대한 기술 통계가 표 22에 기재되어 있다.
- <654> 표 22. 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(전체 백신 접종 코호트)에 대한 백신접종후(21일째)와 백신접종전(0일째) 사이의 차이에 대한 기술통계

항원	시토카인	백신 그룹	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
푸울 Flu	모두 이중	플루아릭스	18	1268.67	1051.744	197.00	724.00	863.00	1561.00	4676.00
		Flu AS03	36	1781.31	1484.860	-2379.00	929.50	1664.50	2821.00	4669.00
	CD40L	플루아릭스	18	1260.11	1054.487	243.00	721.00	849.00	1602.00	4743.00
		Flu AS03	36	1711.56	1433.113	-2359.00	838.00	1576.00	2759.50	4575.00
	IFN γ	플루아릭스	18	762.94	813.884	-12.00	294.00	496.00	1061.00	3564.00
		Flu AS03	36	1179.92	881.255	-817.00	692.50	1180.50	1865.50	2831.00
	IL2	플루아릭스	18	1019.06	917.905	-258.00	544.00	702.00	1174.00	3850.00
		Flu AS03	36	1423.33	1359.471	-2702.00	651.00	1260.00	2200.50	4342.00
	TNF α	플루아릭스	18	803.39	915.838	32.00	231.00	533.00	936.00	3892.00
		Flu AS03	36	1078.28	1029.122	-1816.00	446.00	983.00	1836.00	3310.00
A/뉴 칼레도니아	모두 이중	플루아릭스	18	481.44	381.534	-241.00	282.00	448.50	598.00	1412.00
		Flu AS03	36	812.78	749.192	-828.00	215.50	911.50	1274.50	3206.00
	CD40L	플루아릭스	18	450.78	360.378	-239.00	291.00	447.00	580.00	1248.00
		Flu AS03	36	783.75	711.608	-760.00	242.00	808.00	1161.00	3050.00
	IFN γ	플루아릭스	18	316.28	279.662	-165.00	175.00	259.00	387.00	1111.00
		Flu AS03	36	438.22	420.770	-685.00	125.00	393.00	733.50	1557.00
IL2	플루아릭스	18	326.06	290.792	-294.00	193.00	330.00	488.00	834.00	
	Flu AS03	36	634.72	616.478	-557.00	179.50	678.50	952.00	2602.00	
TNF α	플루아릭스	18	316.44	372.492	-140.00	50.00	278.00	542.00	1449.00	
	Flu AS03	36	449.17	591.796	-916.00	100.50	343.50	848.00	2452.00	
A/요밍	모두 이중	플루아릭스	18	609.56	559.396	-176.00	257.00	510.50	957.00	1998.00
		Flu AS03	36	766.61	579.191	-568.00	316.00	864.50	1221.00	1662.00
	CD40L	플루아릭스	18	616.33	550.853	-176.00	274.00	488.00	939.00	2017.00
		Flu AS03	36	728.61	570.316	-670.00	260.00	789.50	1216.00	1675.00
IFN γ	플루아릭스	18	407.06	424.758	-311.00	129.00	370.50	723.00	1372.00	

<655>

		Flu AS03	36	526.72	443.938	-770.00	219.00	556.50	776.00	1342.00
	IL2	플루아릭스	18	495.83	503.805	-187.00	88.00	540.50	801.00	1841.00
		Flu AS03	36	572.89	533.728	-789.00	220.00	602.00	882.50	1512.00
	TNFα	플루아릭스	18	424.56	485.591	-260.00	110.00	359.50	461.00	1718.00
		Flu AS03	36	550.58	538.461	-765.00	269.50	543.50	905.50	1678.00
B/지양수	모두 이중	플루아릭스	18	698.44	793.119	-306.00	233.00	433.00	961.00	2822.00
		Flu AS03	36	861.42	688.852	-223.00	339.00	745.00	1325.50	2284.00
	CD40L	플루아릭스	18	678.39	777.259	-206.00	227.00	401.50	962.00	2878.00
		Flu AS03	36	825.89	674.879	-223.00	305.00	722.00	1282.00	2337.00
	IFNγ	플루아릭스	18	431.72	489.912	-95.00	191.00	272.50	382.00	1712.00
		Flu AS03	36	615.94	473.543	-286.00	288.50	501.50	897.50	1740.00
	IL2	플루아릭스	18	552.50	666.853	-234.00	155.00	278.50	833.00	2386.00
		Flu AS03	36	696.19	622.931	-359.00	207.50	540.50	1146.50	2182.00
	TNFα	플루아릭스	18	441.39	695.792	-338.00	97.00	269.50	564.00	2440.00
		Flu AS03	36	500.03	448.636	-166.00	107.50	436.00	745.00	1626.00

<656>

SD = 표준편차

<657>

Min, Max = 최소, 최대

<658>

Q1 = 일사분위

<659>

Q3 = 삼사분위

<660>

N= 이용 가능한 결과로 시험된 대상자 수

<661>

<662> 백신-유도된 CD4 T-세포는 적어도 1년 동안 지속될 수 있는 것으로 밝혀졌으며, 그 이유는 전년도에 플루아릭스/AS03으로 백신 접종된 대상자에 비해서 플루아릭스로 백신 접종된 대상자들 사이에 CD4 T-세포 반응의 백신 접종 전 수준에서 관찰 가능한 차이가 존재하기 때문이다. 결과가 또한 재백신 접종 전후의 스플리트 Flu 항원에 대한 CD4 T-세포 반응을 나타내고 있는 도 8에 도시되어 있다. DO는 첫째 백신 접종 12개월 후에 상응하며, 따라서, 지속성을 나타내고 있다. 백신 접종 후 윌콕슨 시험에 의한 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, 거의 모든 p-값은 0.05 미만이고, FluAS03 그룹에 우호적인 통계적 유의(표 23 참조)수준으로 여겨졌다.

<663>

표 23. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(전체 백신접종된 코호트)에 대한 21일째에서의 두 백신 그룹 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험(Wilcoxon rank-sum test)으로부터의 p-값

시토카인	P- 값			
	푸울	뉴칼레도니아	요빙	지양수
모두 이중	0.0014	0.0023	0.0286	0.0133
CD40L	0.0016	0.0014	0.0427	0.0155
INFγ	0.0006	0.0366	0.0400	0.0041
IL2	0.0037	0.0024	0.0584	0.0162
TNFα	0.0031	0.0103	0.0918	0.0114

<664>

<665> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라미터 과정).

<666> 윌콕슨 시험에 의해서 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD4-T-림프구 반응의 빈도에서의 개별적인 차이(접종후-접종전)의 차이를 비교하면, p-값은 0.05 미만이고 하기 항원-시토카인 조합에 대해서 발생하는 통계적 유의수준으로 여겨졌다: 푸울 flu-모두 이중, 푸울(pool) flu-IFN γ 및 FluAS03 그룹에 선호적인 지양수-IFN γ (표 24).

<667> 표 24. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(전체 백신 접종된 코호트)에 대한 백신 접종후(21일째)와 백신 접종전(0일째) 사이의 차이에 대한 차이그룹 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험에 의해서 계산된 p-값

시토카인	P- 값			
	푸울	뉴칼레도니아	요빙	지양수
모두 이중	0.0435	0.1124	0.2189	0.3085
CD40L	0.0638	0.0781	0.2831	0.2872
INF γ	0.0290	0.3589	0.2553	0.0435
IL2	0.1024	0.0563	0.3986	0.0435
TNF α	0.0693	0.4090	0.1232	0.3129

<668>

<669> P-값: 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라미터 과정).

<670>

IV.3.2. 항원 특이적 CD8 T-림프구

<671> 반응에서 항원 특이적 CD8 T-림프구 분비 빈도가, CD4 T 세포 반응에 관해서 수행된 과정과 유사하게, 각각의 항원, 각각의 시토카인, 각각의 백신 그룹 및 각각의 시점(백신 접종 전후)에서 기술통계에 의해서 요약되었다.

<672> 백신 접종 후에 윌콕슨 시험에 의해서 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD8 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, p-값은 0.05 초과이고 통계적 유의수준으로 여겨지지 않았다. 윌콕슨 시험에 의해서 2 그룹 사이의 항원-특이적 CD8-T-림프구 반응의 빈도에서의 개별적인 차이(접종후-접종전)의 차이를 비교하면, 모든 p-값은 0.05 초과이고 통계적 유의수준으로 여겨지지 않았다.

<673>

IV.3.3. 운동학적 분석 : 백신 접종전(2003년 첫 번째 백신 접종 1년 후)에서의 면역반응

<674> 백신 접종전에서의 반응에서 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비의 빈도를 표 25에서 각각의 사이토가인에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 및 두 연구 각각에 대해서, 표 27에 두 연구 각각에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 기술통계에 의해서 요약되었다. 추리 통계가 표 26 및 표 28에 기재되어 있다.

<675> 표 25. 특이적 CD4 T-림프구 반응 백신접종(운동학적)에 대한 백신 접종전(0일)에 대한 기술 통계

시토카인	그룹	연구	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
모두 이중	Flu AS03	EXPLO 001	36	2000.86	1783.474	102.00	911.50	1461.50	2791.00	9514.00
		EXPLO 002	36	2028.28	1427.000	55.00	1190.50	1647.50	2575.00	7214.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	2152.87	2162.463	747.00	930.00	1354.00	2101.00	7868.00
		EXPLO 002	15	1587.07	2123.841	192.00	468.00	735.00	1578.00	8536.00
CD40L	Flu AS03	EXPLO 001	35	1946.66	1771.102	120.00	837.00	1340.00	2819.00	9462.00
		EXPLO 002	35	1992.20	1440.721	77.00	1125.00	1590.00	2587.00	7286.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	2094.93	2076.632	745.00	902.00	1340.00	2077.00	7385.00
		EXPLO 002	15	1561.73	2097.201	34.00	475.00	672.00	1579.00	8428.00
INF γ	Flu AS03	EXPLO 001	35	1068.63	1030.745	91.00	448.00	790.00	1503.00	5425.00
		EXPLO 002	35	1259.23	890.590	312.00	725.00	984.00	1354.00	4146.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	1248.07	1452.459	320.00	388.00	778.00	1227.00	5431.00
		EXPLO 002	15	974.80	1394.044	52.00	252.00	337.00	1057.00	5576.00
IL2	Flu AS03	EXPLO 001	35	1690.20	1524.689	37.00	688.00	1211.00	2416.00	8235.00
		EXPLO 002	35	1883.60	1361.337	14.00	1068.00	1413.00	2370.00	6891.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	1888.40	2085.857	568.00	715.00	1136.00	1770.00	7403.00
		EXPLO 002	15	1493.93	2037.139	58.00	444.00	755.00	1485.00	8193.00
TNF α	Flu AS03	EXPLO 001	35	1174.74	1119.633	55.00	466.00	795.00	1720.00	5415.00
		EXPLO 002	35	1545.40	1159.490	135.00	831.00	1203.00	1857.00	5354.00
	플루아릭스	EXPLO 001	15	1444.20	1946.211	201.00	520.00	688.00	1254.00	7213.00
		EXPLO 002	15	1304.73	1759.716	144.00	316.00	824.00	1171.00	7056.00

<676> SD = 표준편차
<677>

<678> Min, Max = 최소, 최대

<679> Q1 = 일사분위

<680> Q3 = 삼사분위

<681> N= 이용 가능한 결과로 시험된 대상자 수

<682> 각각의 백신 그룹에 대한 윌콕슨 시험에 의해서 2 연구 사이의 항원-특이적 CD8 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, p-값은 0.05 미만이고 FluAS03 그룹에 대해서 및 TNF α 시토카인(표 26 참조)으로만 발생된 통계적 유의수준(Explo-Flu-002의 신호적)으로 여겨졌다.

<683> 표 26. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(운동학적)에 대한 0일째에서의 상이한 연구 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험으로부터의 p-값

시도카인	그룹	p- 값
모두 이중	FluAS03	0.5209
	플루아릭스	0.0712
CD40L	FluAS03	0.4957
	플루아릭스	0.0744
INF γ	FluAS03	0.0896
	플루아릭스	0.1103
IL2	FluAS03	0.1903
	플루아릭스	0.1647
TNF α	FluAS03	0.0427
	플루아릭스	0.5476

<684>

<685> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메터 과정).

<686> 표 27. 특이적 CD4 T-림프구 반응 백신접종(운동학적)에 대한 백신 접종전(0일)에 대한 기술통계

시도카인	연구	그룹	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
모두 이중	EXPLO 001	Flu AS03	36	2000.86	1783.474	102.00	911.50	1461.50	2791.00	9514.00
		플루아릭스	15	2152.87	2162.463	747.00	930.00	1354.00	2101.00	7868.00
	EXPLO 002	Flu AS03	36	2028.28	1427.000	55.00	1190.50	1647.50	2575.00	7214.00
		플루아릭스	15	1587.07	2123.841	192.00	468.00	735.00	1578.00	8536.00
CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	35	1946.66	1771.102	120.00	837.00	1340.00	2819.00	9462.00
		플루아릭스	15	2094.93	2076.632	745.00	902.00	1340.00	2077.00	7385.00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1992.20	1440.721	77.00	1125.00	1590.00	2587.00	7286.00
		플루아릭스	15	1561.73	2097.201	34.00	475.00	672.00	1579.00	8428.00
INF γ	EXPLO 001	Flu AS03	35	1068.63	1030.745	91.00	448.00	790.00	1503.00	5425.00
		플루아릭스	15	1248.07	1452.459	320.00	388.00	778.00	1227.00	5431.00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1259.23	890.590	312.00	725.00	984.00	1354.00	4146.00
		플루아릭스	15	974.80	1394.044	52.00	252.00	337.00	1057.00	5576.00
IL2	EXPLO 001	Flu AS03	35	1690.20	1524.689	37.00	688.00	1211.00	2416.00	8235.00
		플루아릭스	15	1888.40	2085.857	568.00	715.00	1136.00	1770.00	7403.00
	EXPLO 002	Flu AS03	35	1883.60	1361.337	14.00	1068.00	1413.00	2370.00	6891.00
		플루아릭스	15	1493.93	2037.139	58.00	444.00	755.00	1485.00	8193.00
TNF α	EXPLO 001	Flu AS03	35	1174.74	1119.633	55.00	466.00	795.00	1720.00	5415.00
		플루아릭스	15	1444.20	1946.211	201.00	520.00	688.00	1254.00	7213.00

<687>

	EXPLO 002	Flu AS03	35	1545.40	1159.490	135.00	831.00	1203.00	1857.00	5354.00
		플루아릭스	15	1304.73	1759.716	144.00	316.00	824.00	1171.00	7056.00

<688>

<689> SD = 표준편차

<690> Min, Max = 최소, 최대

- <691> Q1 = 일사분위
- <692> Q3 = 삼사분위
- <693> N= 이용 가능한 결과로 시험된 대상자의 수
- <694> 각각의 연구에 대한 윌콕슨 시험에 의해서 2 백신 그룹 사이의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도에서의 차이를 비교하면, Explo-Flu-002에 대한 모든 p-값은 0.05 미만이고 통계적 유의수준(FluAS03를 선호)으로 여겨졌다(표 28 참조).
- <695> 표 28. 추리 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(운동학적)에 대한 21일째에서의 상이한 그룹 사이의 윌콕슨 랭크-섬 시험으로부터의 p-값

시도카인	연구	p- 값
모부 이중	Explo Flu 001	0.9423
	Explo Flu 002	0.0300
CD40L	Explo Flu 001	0.8989
	Explo Flu 002	0.0361
INF γ	Explo Flu 001	0.8738
	Explo Flu 002	0.0121
IL2	Explo Flu 001	0.9747
	Explo Flu 002	0.0216
TNF α	Explo Flu 001	0.9916
	Explo Flu 002	0.0514

- <696>
- <697> P-값: 21일째에 2 그룹 사이의 위치 차이(Wilcoxon rank-sum test)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메터 과정).
- <698> IV.3.4. 운동학적 분석 : 백신 접종후 마이너스 백신 접종전에서의 면역반응
- <699> (백신 접종후-전) 시점에서의 반응에서 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비의 빈도를 표 29에서 각각의 시도카인에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 및 각각의 연구에 대해서, 표 31에 각각의 연구에 대해서 및 각각의 백신 그룹에 대해서 기술통계에 의해서 요약되었다. 추리 통계가 표 30 및 표 32에 기재되어 있다.

<700> 표 29. 특이적 CD4 T-림프구 반응 백신접종(동적)에 대한 백신접종후(21일)와 백신접종전(0일)의 차이에 대한 기술통계

시도카인	군	연구	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
All double	Flu AS03	EXPLO 001	34	4837.56	4476.129	-609.00	1888.00	3488.50	8148.00	19555.00
		EXPLO 002	34	1737.79	1450.177	-2379.00	936.00	1664.50	2743.00	4669.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	3103.53	3726.645	436.00	800.00	2283.00	3226.00	15169.00
		EXPLO 002	15	1369.00	1127.784	197.00	725.00	869.00	1808.00	4676.00
CD40L	Flu AS03	EXPLO 001	33	4819.06	4489.788	-718.00	1799.00	3479.00	8288.00	19480.00
		EXPLO 002	33	1694.73	1431.082	-2359.00	921.00	1659.00	2662.00	4575.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	3090.00	3684.759	477.00	822.00	2189.00	3208.00	15021.00
		EXPLO 002	15	1360.93	1131.051	243.00	725.00	860.00	1687.00	4743.00
INF γ	Flu AS03	EXPLO 001	33	3127.09	2974.067	-453.00	1325.00	1721.00	5162.00	13296.00
		EXPLO 002	33	1167.85	893.363	-817.00	633.00	1207.00	1803.00	2831.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1660.13	1834.023	-84.00	480.00	1386.00	2284.00	7120.00
		EXPLO 002	15	851.87	859.585	148.00	294.00	501.00	1222.00	3564.00
IL2	Flu AS03	EXPLO 001	33	3950.18	3878.538	-358.00	1309.00	2780.00	6635.00	16988.00
		EXPLO 002	33	1404.67	1355.665	-2702.00	719.00	1341.00	2109.00	4342.00

<701>

	Fluarix	EXPLO 001	15	2413.87	3027.392	263.00	674.00	1672.00	2425.00	12273.00
		EXPLO 002	15	1117.80	975.934	-258.00	575.00	714.00	1618.00	3850.00
TNF α	Flu AS03	EXPLO 001	33	2627.36	2574.458	-825.00	862.00	1475.00	4764.00	9267.00
		EXPLO 002	33	1072.36	1044.140	-1816.00	447.00	1000.00	1752.00	3310.00
	Fluarix	EXPLO 001	15	1460.53	3115.174	-1586.00	251.00	813.00	1314.00	12275.00
		EXPLO 002	15	904.67	974.958	32.00	338.00	752.00	965.00	3892.00

SD = 표준편차
 Min, Max = 최소값, 최대값
 Q1 = 1/4
 Q3 = 3/4
 N= 유효한 결과로 시험된 피검체의 수

<702>

<703>

각 백신 군에 대해 윌콕슨 시험(Wilcoxon test)의 2개의 연구 간의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이를 비교하면, FluAS03 군에 대한 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, (Explo-Flu-001에 대하여) 통계적으로 유의한 것으로 여겨졌다(표 30 참조.)

<704>

표 30. 백신접종후(21일)와 백신접종전(0일)의 차이에 대한 추정 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(동적)에 대한 21일에 상이한 연구 간의 윌콕슨 순위합 검정으로부터의 p-값

시토카인	군	p- 값
모두 더블 (all double)	FluAS03	0.0005
	Fluarix	0.1300
CD40L	FluAS03	0.0007
	Fluarix	0.0890
INF γ	FluAS03	0.0012
	Fluarix	0.1103
IL2	FluAS03	0.0025
	Fluarix	0.1409
TNF α	FluAS03	0.0327
	Fluarix	0.6936

<705>

<706>

p-값: 21일에 2개 군 간의 위치 차이(윌콕슨 순위합 검정)를 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메트릭 과정).

<707>

표 31. 특이적 CD4 T-림프구 반응 백신접종(동적)에 대한 백신접종후(21일)와 백신접종전(0일)의 차이에 대한 기술통계

시토카인	시험	군	N	평균	SD	Min	Q1	중간값	Q3	Max
모두 더블	EXPLO 001	Flu AS03	34	4837.56	4476.129	-609.00	1888.00	3483.50	8148.00	19555.00
		Fluarix	15	3103.53	3726.645	436.00	800.00	2283.00	3226.00	15169.00
	EXPLO 002	Flu AS03	34	1737.79	1450.177	-2379.00	936.00	1664.50	2743.00	4669.00
		Fluarix	15	1369.00	1127.784	197.00	725.00	869.00	1808.00	4676.00
CD40L	EXPLO 001	Flu AS03	33	4819.06	4489.788	-718.00	1799.00	3479.00	8288.00	19480.00
		Fluarix	15	3090.00	3684.759	477.00	822.00	2189.00	3208.00	15021.00

<708>

	EXPLO 002	Flu	33	1694.73	1431.082	-2359.00	921.00	1659.00	2662.00	4575.00
		AS03 Fluarix	15	1360.93	1131.051	243.00	725.00	860.00	1687.00	4743.00
IFN γ	EXPLO 001	Flu	33	3127.09	2974.067	-453.00	1325.00	1721.00	5162.00	13296.00
		AS03 Fluarix	15	1660.13	1834.023	-84.00	480.00	1386.00	2284.00	7120.00
	EXPLO 002	Flu	33	1167.85	893.363	-817.00	633.00	1207.00	1803.00	2831.00
		AS03 Fluarix	15	851.87	859.585	148.00	294.00	501.00	1222.00	3564.00
IL2	EXPLO 001	Flu	33	3950.18	3878.538	-358.00	1309.00	2780.00	6635.00	16988.00
		AS03 Fluarix	15	2413.87	3027.392	263.00	674.00	1672.00	2425.00	12273.00
	EXPLO 002	Flu	33	1404.67	1355.665	-2702.00	719.00	1341.00	2109.00	4342.00
		AS03 Fluarix	15	1117.80	975.934	-258.00	575.00	714.00	1618.00	3850.00
TNF α	EXPLO 001	Flu	33	2627.36	2574.458	-825.00	862.00	1475.00	4764.00	9267.00
		AS03 Fluarix	15	1460.53	3115.174	-1586.00	251.00	813.00	1314.00	12275.00
	EXPLO 002	Flu	33	1072.36	1044.140	-1816.00	447.00	1000.00	1752.00	3310.00
		AS03 Fluarix	15	904.67	974.958	32.00	338.00	752.00	965.00	3892.00

SD = 표준편차
 Min, Max = 최소값, 최대값
 Q1 = 1/4
 Q3 = 3/4
 N= 유효한 결과로 시험된 피검체의 수

<709>

<710>

각 연구에 대해 윌콕슨 시험(Wilcoxon test)의 2개의 연구 간의 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이를 비교하면, Explo-Flu-001에 대한 p-값만이 0.05 미만이었고, (FluAS03에 대하여) 통계적으로 유의한 것으로 여겨졌다(표 32 참조.)

<711>

표 32. 추정 통계: 항원-특이적 CD4 T-림프구 반응(동적)에 대한 21일에 상이한 연구 간의 윌콕슨 순위합 검정으로부터의 p-값

시토카인	연구	p-값
모두 더블	Explo Flu 001	0.0827
	Explo Flu 002	0.0992
CD40L	Explo Flu 001	0.0931
	Explo Flu 002	0.1391
INF γ	Explo Flu 001	0.0543
	Explo Flu 002	0.1068
IL2	Explo Flu 001	0.0847
	Explo Flu 002	0.2254
TNF α	Explo Flu 001	0.0375
	Explo Flu 002	0.2009

<712>

<713>

p-값: 21일에 2개 군 간의 위치 차이(윌콕슨 순위합 검정)을 시험하기 위한 윌콕슨 시험(비-파라메트릭 과정).

<714>

IV.4. HI 역가

<715>

결과를 도 9 및 표 33 내지 36에 나타내었다.

<716> 표 33: 기하평균 역가(GMT) 및 안티-HI 역가의 혈청반응양성율(백신접종된 피검체에 대해 계산된 GMT)

항체	군	시점	N	S+	%	95% CI		GMT	95%CI	
						L.L.	U.L.		L.L.	U.L.
뉴 칼레도니아	Fluarix	PRE	18	17	94.4	72.6	99.9	63.5	38.1	105.9
		PI(D21)	18	18	100	81.5	100	131.9	77.1	225.6
	FluAS03	PRE	40	39	97.5	86.8	99.9	70.3	50.5	97.7
A/후지안	Fluarix	PRE	18	18	100	91.3	100	218.6	158.2	302.0
		PI(D21)	18	18	100	81.5	100	498.3	272.1	912.7
	FluAS03	PRE	40	40	100	91.3	100	94.3	71.4	124.6
B/상하이	Fluarix	PRE	18	16	88.9	65.3	98.6	23.3	15.2	35.8
		PI(D21)	18	17	94.4	72.6	99.9	139.8	64.0	305.0
	FluAS03	PRE	40	38	95.0	83.1	99.4	58.6	43.9	78.1
		PI(D21)	40	40	100	91.3	100	364.4	269.7	492.4

PRE= 백신접종전
 PI(D21)= 백신접종하고 21일 후
 95%CI, LL, 및 UL = 95% 신뢰 구간, 최소치 및 최대치
 S+= 혈청반응 양성 피검체의 수

<717>

<718> 표 34: 안티-HI 역가의 전환 인자(모든 백신접종된 피검체)

군	A/N- 칼레도니아		A/후지안		B/상하이	
	N	GMR [95% CI]	N	GMR [95% CI]	N	GMR [95% CI]
Fluarix	18	2.1 [1.4;3.2]	18	5.2 [3.0;9.3]	18	6.0 [3.5;10.2]
FluAS03	40	3.1 [2.4;4.0]	40	7.8 [5.6;10.9]	40	6.2 [4.7;8.2]

N = 피검체의 전체 수
 GMR = 기하급수적 평균 비(평균 log 21일/0일 역가 비의 역대수)
 95%CI = 95% 신뢰 구간

<719>

<720> 표 35: 안티-HI 역가의 혈청방어율(모든 백신접종된 피검체)

항체	군	시점	N	>=40		
				n	%	95% CI
A/뉴 칼레도니아	Fluarix	PRE	18	14	77.8	52.4 93.6
		PI(D21)	18	16	88.9	65.3 98.6
	FluAS03	PRE	40	32	80	64.4 90.9
		PI(D21)	40	39	97.5	86.8 99.9
A/후지안	Fluarix	PRE	18	14	77.8	52.4 93.6
		PI(D21)	18	18	100	81.5 100
	FluAS03	PRE	40	36	90	76.3 97.2
		PI(D21)	40	40	100	91.2 100
B/상하이	Fluarix	PRE	18	6	33.3	13.3 59.0

<721>

		PI(D21)	18	14	77.8	52.4	93.6
	FluAS03	PRE	40	34	85	70.2	94.3
		PI(D21)	40	40	100	91.2	100

PRE= 백신접종전
 PI(D21)= 백신접종하고 21일 후
 N = 유효한 결과를 갖는 피검체의 수
 n = 특정된 범위내에서 역가를 지닌 피검체의 수
 % = 특정된 범위내에서 역가를 지닌 피검체의 퍼센트

<722>

<723> 표 36: PI 21일에서 혈청전환율(배수증가=4)(모든 백신접종된 피검체)

항체	백신군	N	n	반응군 %	95% CI	
					LL	UL
A/ 뉴 칼레도니아	Fluarix	18	3	16.7	3.6	41.5
	FluAS03	40	19	47.5	31.5	63.9
A/후지양	Fluarix	18	13	72.2	46.5	90.3
	FluAS03	40	34	85.0	70.2	94.3
B/ 상하이	Fluarix	18	12	66.7	41.0	86.7
	FluAS03	40	31	77.5	61.5	89.2

N = 백신접종전 및 백신접종후 모두 유효한 결과를 갖는 피검체의 수
n = 반응군의 수
% = 반응군의 비율(n/N X 100)
95% CI = 95% 정확 신뢰 구간; LL=하한치, UL=상한치

<724>

<725> IV.5. 전체 결론

<726> 이러한 임상 연구로부터, 어쥬번트된 백신 Flu-AS03이 인플루엔자 특이적 CD4 T 세포의 빈도 및 재백신접종 연구의 D0(Explo Flu 002, 즉 +/- 1년 후)까지 제 1의 Flu-AS03 백신접종(Explo Flu 001의 첫번째 백신접종)으로 유도되는 면역반응의 지속성의 측면에서 균등한 비어쥬번트된 백신 Fluarix에 비해 우수함을 확인하였다. 더욱이, 이러한 반응은 신규한 백신에 존재하는 드리프트된 인플루엔자 균주를 인식하고 2004 인플루엔자 백신의 균주를 인식할 수 있다.

<727> 백신접종 첫째와 대비하여, 재백신접종시에 종래 어쥬번트된 Fluarix™으로 백신접종된 개체는 비-어쥬번트된 Fluarix™로 백신접종된 개체와 비교하여 증가된 HI 역가 반응성을 나타내었다. 관찰가능한 경향으로는 H1N1 및 H3N2 균주에 대해 지시된 HI 역가가 1.5배 내지 2배로 증가하는 것으로 나타나며, B 균주에 대해 지시된 HI 역가가 증명된 통계학적 증가를 나타내었다.

<728> 실시예 V - 흰족제비에서 어쥬번트되고 비어쥬번트된 인플루엔자 백신의 임상전 평가

<729> 제 1 연구 - 신규한 포플레이션 AS03 및 AS03+MPL의 효능

<730> V.1. 원리 및 목적

<731> 흰족제비 모델의 인플루엔자 감염은 감염 및 임상 반응에 대한 민감성 모두와 관련하여 인간 인플루엔자와 매우 유사하다.

<732> 흰족제비는 바이러스 균주의 사전개조 없이 인플루엔자 A 및 B 모두로의 감염에 대해 매우 민감하다. 그러므로, 이는 투여된 인플루엔자 백신에 의해 부여되는 방어 연구에 대한 우수한 모델 시스템을 제공한다.

<733> 이러한 연구는 동종 균주로 2차 투여된(challenged) 흰족제비의 비강 분비의 질환 증상(체온) 및 바이러스 발산을 감소시키기 위한 어쥬번트되거나 비-어쥬번트된 다양한 3가 스플리트 백신의 효능을 평가하였다.

<734> 이러한 실험의 목적은 플레인(plain, 비-어쥬번트된) 백신과 비교하여 어쥬번트된 인플루엔자 백신의 효능을 나타내기 위한 것이다.

<735> 종료점은 하기와 같다:

- <736> 1) 제 1 종료점: 동종 2차 투여 후 비강 세척물 중 바이러스 발산의 감소:
- <737> 2) 제 2 종료점: IHA로 체액 반응의 분석 및 1차 투여(priming) 및 2차 투여에서의 온도의 모니터링.

<738> V.2. 실험적 디자인

<739> V.2.1. 처리/군(표 37)

<740> 14주령 내지 20 주령의 암컷 흰족제비(*Mustela putorius furo*)(6 마리 흰족제비/군)를 MISAY 컨설트사(Hampshire, UK)로부터 입수하였다. 0일에 흰족제비에 이중서브타입 균주 H1N1 A/스톡홀름/24/90(4 Log TCID₅₀/ml)로 1차 투여하였다. 21일째에, 흰족제비에 전체 인간 용량(500 µg 백신 용량, 15 µg HA/균주)의 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99 및 B/상동/7/97의 조합물을 근육내로 주사하였다. 이후 41일째에 흰족제비를 동종타입 균주 H3N2 A/파나마/2007/99(4.51 Log TCID₅₀/ml)로 비강내 경로로 2차 투여하였

다.

표 37

군	항원(들)+투약	포물레이션+투약	코멘트 (스케줄/경로/면역성시험)	다른 처리
1	3가	전체 HD: 15 μ g	IM; 21일	H1N1 1차투여

	플레인	HA/ 균주		(A/스톡홀름/24/90) 0일
2	3가 AS03	전체 HD: 15 μ g HA/ 균주	IM; 21일	H1N1 1차투여 (A/스톡홀름/24/90) 0일
3	3가 AS03+MPL	전체 HD: 15 μ g HA/ 균주	IM; 21일	H1N1 1차투여 (A/스톡홀름/24/90) 0일
4	PBS		IM; 21일	H1N1 1차투여 (A/스톡홀름/24/90) 0일

V.2.2. 백신 포물레이션의 제조

포물레이션 1: 3가 플레인(비-어쥬번트된) 포물레이션(500 μ l):

10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4), 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 μ g 트윈 80, 110 μ g 트리톤 X-100 및 100 μ g VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 μ g의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 μ g의 B 균주를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 순서대로 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

포물레이션 2: AS03으로 어쥬번트된 3가 스플리트 인플루엔자(500 μ l):

10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 μ g 트윈 80, 110 μ g 트리톤 X-100 및 100 μ g VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 μ g의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 μ g의 B 균주를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 순서대로 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 μ l의 SB62 에멀전(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

포물레이션 3: AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트 인플루엔자(500 μ l):

10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 μ g 트윈 80, 110 μ g 트리톤 X-100 및 100 μ g VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 μ g의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 μ g의 B 균주를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 순서대로 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 μ g의 SB62 에멀전(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 혼합물을 다시 15분 동안 교반하고, 실시예 II.3.1.에 상세히 기술된 바와 같이 제조된 현탁액으로부터의 25 μ g의 MPL을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

주의: 각 포물레이션에서, 10배 농축된 PBS를 첨가하여 등장도에 도달시키고 최종 부피에서 1배 농축된다. H2O 부피를 타겟화된 부피에 도달하도록 계산한다.

V.2.3. 기록(표 38)

<753> 표 38

기록	시점	샘플-타입	I/P	분석법
바이러스 발산	D-1내지D+7 1차 투여후 D-1내지D+5 2차 투여후	비강 세척물	In	적정
T° 모니터링	D-1내지D+3 1차 투여후 D-2내지D+3 2차 투여후	복막공동에 임플란트	In	원격측정법
IHA	1차투여 전, 후, 면역화 후, 2차 투여후	혈청	In	IHA

In= 개체 / Po= 풀

<754>

<755> V.3. 결과

<756> 결과의 개략적 설명을 도 10 및 도 11에 제공하였다.

<757> V.3.1. 온도 모니터링

<758> 개별적인 온도를 발신키 및 원격측정 기록기로 모니터링하였다(I.2.2에서 상세히 설명된 과정에 따름). 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닫고, 신규한 측정을 복막내 공동에 배치되기 전에 DSI로 수행하였다. 모든 동물들이 이들 측정동안 단일 케이지에 개별적으로 사육하였다.

<759> 온도를 2차 투여 전 3일 부터 2차 투여 후 5일까지 매 15분 마다 모니터링하고, 평균을 정오에 계산하였다. 기준선 체온에 대한 기준선으로부터의 결과는 도 10A(-1 내지 +3일의 결과를 나타냄) 및 10B(-2 내지 +3의 결과를 나타냄)에 나타내었다.

<760> 2차 투여후에, 체온의 피크는 3가 스플리트 플레인 또는 PBS로 면역시킨 후에만 관찰되었다. AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트로 면역시킨 후에는 어떠한 피크도 관찰되지 않았다.

<761> V.3.2. 바이러스 발산(도 11)

<762> 비강 세척물의 바이러스 적정을 군 당 6마리에서 수행하였다. 비강 세척을 깨어있는 동물의 양쪽 콧구멍에 5 ml의 PBS를 투여하여 수행하였다. 접종을 페트리(Petri) 접시에서 수집하고, -80℃(드라이 아이스)에서 샘플 용기에 배치시켰다.

<763> 모든 비강 샘플을 먼저 스피ن X 필터(Costar)를 통해 멸균 여과하여 임의의 박테리아 오염물을 제거하였다. 50 µl의 비강 세척물의 일련의 10배 희석액을 50 µl의 매질을 함유한 마이크로역가 플레이트에 옮겼다(10 웰/희석액). 이후 100 µl의 MDCK 세포(2.4×10⁵ 세포/ml)를 각 웰에 첨가하고, 세포 함유가 예를 들어 5 내지 7일 동안 대조군 세포로 도달될 때까지 35℃에서 인큐베이션하였다. 6 내지 7일의 인큐베이션 후에, 배양 매질을 서서히 제거하고, 100 µl의 매질을 함유한 1/20 WST-1을 첨가하고 추가 18 시간 동안 인큐베이션하였다.

<764> 생존가능한 세포에 의한 WST-1의 감소하에서 생산된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정법의 말단에서 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하고, 적절한 파장(450 나노미터)에서 각 웰의 흡광도를 측정하므로써 정량한다. 컷-오프(cut-off)는 감염되지 않은 대조군 세포의 OD 평균-0.3 OD(0.3 OD는 +/-3 StDev의 비감염된 대조군 세포의 OD에 상응함)으로서 규정된다. 양의 스코어는 OD가 컷-오프 미만인 경우로 규정되며 반대로 음의 스코어는 OD가 컷-오프를 초과한 경우로 규정된다. 바이러스 발산 역가를 "Reed and Muench"로 결정되며 Log TCID₅₀/ml로 표시된다.

<765> 보다 낮은 바이러스 발산을 3가 스플리트 플레인 또는 PBS와 비교하여, AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트로 2차 투여한 후 관찰하였다. 방어 효과는 AS03+MPL과 비교하여 AS03이 보다 약간 양호하였다(2차 투여후 2일째 참조). 통계적 유의성은 군 당 적은 수의 동물로 인해 결정되지 않았다.

<766> V.3.3. 실험의 결론

<767> 보다 높은 체액 반응(HI 역가)은 모든 3개의 군주에 대해 3가 스플리트 플레인에 비해 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트로에서 관찰되었다(3개의 군주 중 2개, 즉 H3N2 및 B 군주에 대해 적어도 2배).

<768> AS03 및 AS03+MPL 포플레이션은 흰족제비에서의 방어 효능의 측면에서 부가된 이익을 나타내었다(보다 낮은 바

이러스 발산 및 온도)(도 10 및 11).

<769> 2차 투여후, 체액 반응이 상승하지 않음은 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트로 면역시킨 후에 관찰되었다.

<770> **제 2 연구 - 흰족제비에서의 이중타입 2차 투여 연구: 시험된 신규한 포플레이션의 효능의 설명**

<771> **V.4. 원리 및 목적**

<772> 본 연구는 질병 증상(체온)을 감소시키기 위한 이의 능력 및 이중기원 2차 투여후에 면역화된 흰족제비의 비강 분비물에서 바이러스 발산에 대한 이의 효과에 의한 어쥬번트되거나 비어쥬번트된 다양한 3가 스플리트 백신의 효능을 조사하였다.

<773> **V.5. 실험 디자인**

<774> 14주령 내지 20주령의 암컷 흰족제비(*Mustela putorius furo*)(6마리 흰족제비/군)를 MISAY 컨설트사(Hampshire, UK)로부터 입수하였다. 하기 4개의 군을 시험하였다:

<775> * 플루아릭스(Fluarix)

<776> * 3가 스플리트 AS03

<777> * 3가 스플리트 AS03+MPL

<778> * PBS

<779> 흰족제비를 0일째에 이중서브타입 균주 H1N1 A/스톡홀름/24/90(4 Log TCID₅₀/ml)으로 1차 투여하였다. 21일 째에, 흰족제비를 전체 인간 용량(500 µg 백신 용량, 15 µg HA/균주)의 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/파나마/2007/99 및 B/상동/7/97의 조합물을 근육내로 주사하였다(17.5 µg HA). 이후 흰족제비를 43일째에 이중서브타입 균주 H3N2 A/와이오밍/3/2003(4.51 Log TCID₈₀/ml)로 비강내 경로로 2차 투여하였다.

<780> **V.6. 결과**

<781> 결과의 개략적인 설명은 도 12 및 도 13에 제공하였다.

<782> **V.6.1. 온도 모니터링**

<783> 개별적인 온도를 발신기 및 원격측정 기록기로 모니터링하였다. 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닦고, 신규한 측정을 복막내 공동에 배치되기 전에 DSI로 수행하였다. 모든 동물을 이들 측정동안 단일 케이지에 개별적으로 사육하였다.

<784> 결과(도 12)는 하기와 같다:

<785> - 한개의 군에서 다른 한 군으로의 높은 변이성은 1차 투여시에 관찰되었다. 기준선은 1차 투여 후에 비해 1차 투여 전에 보다 높은 것으로 보인다.

<786> - 체온의 높은 변이성에도 불구하고, 피크는 PBS(6/6 흰족제비), 3가 스플리트 플레인(5/6 흰족제비) 및 AS03으로 어쥬번트된 3가 스플리트(2/6 흰족제비)로 면역된 흰족제비에서 2차 투여후에만 관찰되었다. AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트로 면역시킨 후에는 어떠한 피크도 관찰되지 않았다(0/6 흰족제비).

<787> - AS03은 열 역제의 측면에서 이중기원 균주에 대해 AS03+MPL 보다 덜 효율적인 것으로 보인다. 본 출원인은 어쥬번트의 차이가 2차 투여전 항체 수준에서의 수준 차이에 기인한다는 가능성으로 결론지을 수 없다.

<788> **V.6.2. 바이러스 발산(도 13)**

<789> 비강 세척을 깨어있는 동물의 양쪽 콧구멍에 5 ml의 PBS를 투여하여 수행하였다. 집종을 페트리(Petri) 접시에서 수집하고, -80°C(드라이 아이스)에서 샘플 용기에 배치시켰다.

<790> 모든 비강 샘플을 먼저 스펀 X 필터(Costar)를 통해 멸균 여과하여 임의의 박테리아 오염물을 제거하였다. 50 µl의 비강 세척물의 일련의 10배 희석액을 50 µl의 매질을 함유한 마이크로역가 플레이트에 옮겼다(10 웰/희석액). 이후 100 µl의 MDCK 세포(2.4×10⁵ 세포/ml)를 각 웰에 첨가하고, 세포 합류가 예를 들어 5 내지 7일 동안 대조군 세포로 도달될 때까지 35°C에서 인큐베이션하였다. 6 내지 7일의 인큐베이션 후에, 배양 매질을 서

서히 제거하고, 100 ml의 매질을 함유한 1/20 WST-1을 첨가하고 추가 18 시간 동안 인큐베이션하였다.

- <791> 생존가능한 세포에 의한 WST-1의 감소하에서 생산된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정법의 말단에서 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하고, 적절한 파장(450 나노미터)에서 각 웰의 흡광도를 측정하므로써 정량한다. 컷-오프(cut-off)는 감염되지 않은 대조군 세포의 OD 평균-0.3 OD(0.3 OD는 +/-3 StDev의 비감염된 대조군 세포의 OD에 상응함)으로서 규정된다. 양의 스코어는 OD가 컷-오프 미만인 경우로 규정되며 반대로 음의 스코어는 OD가 컷-오프를 초과한 경우로 규정된다. 바이러스 발산 역가를 "Reed and Muench"로 결정되며 Log TCID50/ml로 표시된다.
- <792> 1차 투여후 바이러스 발산
- <793> 바이러스 발산을 1차 투여 전 1일에서 1차 투여후 7일까지 12마리의 흰족제비에 대해 측정하였다. 결과를 풀(pool)로 나타내었다.
- <794> 바이러스 세척은 모든 흰족제비에서 1차 투여후 7일째에 관찰되었다.
- <795> 2차 투여후 바이러스 발산
- <796> 바이러스 발산을 1차 투여 전 1일에서 1차 투여후 7일까지 군당 6마리 흰족제비에 대해 측정하였다.
- <797> 2차 투여후 2일째에, 통계학적으로 유의한 보다 낮은 바이러스 역가가 3가 스플리트 플레인 및 PBS로 면역된 흰족제비에 비해 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트로 면역된 흰족제비에서 관찰되었다(플레인 백신에 비해 각각 어쥬번트된 군 AS03/AS03+MPL의 1.25/1.22 log 및 1.67/1.64의 차이).
- <798> 50일째에, 비강 세척물에 어떠한 바이러스도 검출되지 않았다.
- <799> V.6.3. 적혈구응집 억제 시험(HI 역가)(도 14A 및 B)
- <800> 혈청 샘플을 1차 투여 전 1일에 수집하고, 1차 투여후 21일, 면역화후 22일, 및 2차 투여후 14일에 수집하였다.
- <801> H3N2 인플루엔자 바이러스에 대한 항-적혈구응집 항체 역가(백신 및 2차 투여 군주)를 적혈구응집 억제 시험(HI)을 사용하여 결정하였다. HI 시험의 원리는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의해 닭 적혈구(RBC)의 적혈구응집을 억제하기 위한 특이적 항-인플루엔자 항체의 능력을 기초로 한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다제 용액(RDE)으로 처리하고, 비특이적 억제제를 제거하기 위해 열-비활성화시켰다. 사전처리 후에, 혈청 세포의 두배 희석액을 각 인플루엔자 군주의 4개의 적혈구응집 유닛으로 인큐베이션하였다. 닭 적혈구를 이후 첨가하고, 응집화 억제를 계수하였다. 역가를 적혈구응집을 완전하게 억제한 혈청의 가장 높은 희석의 역수로서 나타내었다. 혈청의 제 1 희석액이 1:10이기 때문에, 검출되지 않은 수준을 5와 동일한 역가로서 계수하였다.
- <802> 결과:
- <803> 결과를 도 14A 및 14B에 나타내었다. H3N2 A/파나마로 면역시킨 후에, 비-어쥬번트된(플레인) 3가 스플리트 백신(Fluarix™)으로 흰족제비를 면역시킨 후 관찰된 체액 반응과 비교하여, 보다 높은 체액 반응(HI 역가)을 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트 백신으로 면역시킨 흰족제비에서 관찰하였다.
- <804> 유사한 HI 역가를 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 H3N2 A/파나마로 면역화된 흰족제비에서 관찰하였다.
- <805> 이종기원 군주 A/와이오밍 H3N2에 대한 가교-반응성 HI 역가는 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 백신을 함유한 A/파나마 H3N2 군주로 면역시킨 후에만 관찰되었다(3가 스플리트 플레인으로 면역시킨 후에 관찰되지 않음).
- <806> A/와이오밍-특이적 HI 역가의 상승은 이종기원 군주 A/와이오밍 H3N2로 면역화되고 A/와이오밍 H3N2로 2차 투여된 흰족제비에서 관찰되었다. 동종기원 2차 투여에 대해 반대로 예상된 바와 같이, 이종기원 2차 투여는 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 A/파나마 H3N2로 면역화된 흰족제비에서 A/파나마-특이적 HI 역가의 증가를 초래하였다.
- <807> V.6.4. 본 실험의 결론
- <808> 예상된 바와 같이, 안티-H3N2 HI 역가의 상승은 동종기원 2차 투여후의 상태(상승되지 않음)와 비교하여 이종기원 면역기원 후에 관찰되었다.
- <809> 그러나, 유사한 방어(바이러스 발산)는 이종기원 및 동종기원 2차 투여후에 관찰되었다.

<810> 실시예 VI - C57BI/6 1차 투여된 마우스에서 어쥬번트되고비-어쥬번트된 인플루엔자 백신의 임상전 평가

<811> VI.1. 실험 디자인 및 목적

<812> 현저하게 보다 높은 CD4 T 세포 반응은 Explo-Flu-001 임상 연구(실시예 III 참조)에서, Fluarix 플레인(비-어쥬번트된)과 비교하여 3가 Flu 스플리트 AS03에 대해 관찰되었다. 이들 두개의 군 사이의 CD8 T 세포 및 체액 반응 모두에 대한 차이는 관찰되지 않았다.

<813> 목적은 마우스에서 인간에서 관찰된 것과 유사한 CMI 반응을 유도하기 위한 기록을 선택하기 위한 것이다. 특히, 목적은 스플리트 플레인에 비해 스플리트 AS03 또는 스플리트 AS03+MPL을 사용함으로써 마우스에서 보다 높은 CMI 반응을 나타내기 위한 것이다.

<814> VI.1.1. 처리/군

<815> 6주령 내지 8주령의 암컷 C57BI/6 마우스(15 마리 마우스/군)를 Harlan Horst, Netherland로부터 입수하였다. 시험된 군은 하기와 같다:

- <816> - 3가 스플리트 플레인
- <817> - 3가 스플리트 AS03
- <818> - 3가 스플리트 AS03+MPL
- <819> - PBS

<820> 마우스를 0일째에 이중서브타입 균주(5 µg HA 전체 비활성된 H1N1 A/요한스버그/82/96, H3N2 A/시드니/5/97, B/하빈/7/97)로 1차 투여하였다. 28일째에, 마우스에 1.5 µg HA 3가 스플리트(A/뉴 칼레도니아/20/99, A/파나마/2007/99, B/상동/7/97) 플레인 또는 어쥬번트된 것으로 근육내로 주사하였다(하기 군 참조).

<821> VI.1.2. 백신 포물레이션의 제조

<822> 각 포물레이션에서, 10배 농축된 PBS를 등장도에 도달할때까지 첨가하고, 최종 부피로 1 배 농축하였다. H2O 부피를 타겟화된 부피에 도달할 때까지 계산하였다.

<823> 스플리트 3가 플레인(비-어쥬번트된):

<824> 포물레이션 1(500 µl에 대한): 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 µg 트윈 80, 110 µg 트리톤 X-100 및 100 µg VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 µg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4°C에서 저장하였다.

<825> 수중유 에멀전 어쥬번트 AS03로 어쥬번트된 3가 스플리트:

<826> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 µg 트윈 80, 110 µg 트리톤 X-100 및 100 µg VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 µg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 µl의 SB62 에멀전(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4°C에서 저장하였다.

<827> AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트:

<828> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 750 µg 트윈 80, 110 µg 트리톤 X-100 및 110 µg VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 µg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10 분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15 분 동안 교반한 후, 250 µg의 SB62 에멀전(실시예 II.1에 교시된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 혼합물을 다시 15분 동안 교반하고, 25 µg의 MPL을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4°C에서 저장하였다.

<829> VI.1.3. 기록

<830> CMI 분석(ICS:CD4/CD8, IL-2/IFN γ 염색)
 <831> 1차 투여된 마우스로부터 PBMC를 면역화 후 7일 후에 수확하였다. 이를 풀/군에서 시험하였다.

<832> **VI.2. 결과**

<833> CD4 및 CD8+ T 세포의 보다 높은 빈도 및 보다 낮은 백그라운드를 나타낸 조건을 C57BI/6 1차 투여된 마우스 및 제자극 항원으로서 1 μ g/ml 전체 비활성화된 바이러스를 사용하여 결정하였다. 결과는 도 15(CD4 T-세포 반응) 및 도 16(CD8 T-세포 반응)에 나타내었다.

<834> 이들 조건에서, 하기를 유도할 수 있었다:

- <835> ● 인간에서 관찰된 바와 같이, 스플리트 플레인과 비교하여 스플리트 AS03에 대해 보다 높은 CD4 T 세포 반응.
- <836> ● 스플리트 플레인과 비교하여 스플리트 AS03+MPL에 대해 보다 높은 CD4 T 세포 반응.
- <837> ● 인간에서 관찰된 바와 같이, 스플리트 플레인과 스플리트 AS03 간에 유사한 CD4 T 세포 반응.
- <838> ● 스플리트 AS03 또는 스플리트 플레인과 비교하여 AS03+MPL에 대해 보다 높은 CD8 T 세포 반응 경향.

<839> **실시에 VII - 이종기원 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스에서 어쥬번트되고 비-어쥬번트된 스플리트 및 서브유닛 인플루엔자 백신의 임상전 평가**

<840> **VII.1. 실험 디자인 및 목적**

<841> Explo-Flu-001 임상 연구(실시에 III 참조)에서, Fluarix 플레인(비-어쥬번트된)에 비해 3가 Flu 스플리트 AS03에 대해 현저하게 보다 높은 CD4 T 세포 반응이 관찰되었다. 이들 두개의 군 간에 CD8 T 세포 및 체액 반응 모두에 대해 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

<842> 인간에서 관찰된 것과 유사한 면역 프로파일을 재생산하는 동물 모델을 이종기원 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스를 사용하여 개발하였다. ICS(세포내 시토키인 염색)에 대해, 제자극을 비활성화된 전체 바이러스로 수행하였다. 목적은 글락소스미스클라인에서 시판하는 스플리트 백신(FluarixTM) 대 서브유닛 백신(Chiron's vaccine)에 의해 유도된 CMI 반응, 및 AS03, 또는 AS03+MPL 또는 수중유 에멀전 어쥬번트(OW)로 어쥬번트된 이들 백신으로 얻어진 CMI 반응을 비교하기 위한 것이다.

<843> VII.1.1. 처리/군

<844> 6주령 내지 8주령의 암컷 C57BI/6 마우스(24 마우스/군)를 Harlan Horst Netherland로부터 입수하였다. 마우스를 이종서브타입 균주(5 μ g HA 전체 포름알데히드 비활성화된 H1N1 A/요한스버그/82/96, H3N2 A/시드니/5/97, B/하빈/7/94)로 0일에 1차 투여하였다. 29일째에, 마우스에 1.5 μ g HA 3가 플레인 또는 어쥬번트된 스플리트 (A/뉴 칼레도니아/20/99, A/와이오밍/3/2003/, B/지양수/10/2003)으로 근육내 주사하였다(하기 표 39의 군 참조).

<845> 표 39

Gr	항원/포물레이션	다른 처리
1	3가 스플리트 / Plain (비-어쥬번트된) = Fluarix TM	이종기원 1차 투여 D0
2	3가 스플리트* / OW	이종기원 1차 투여 D0
3	3가 스플리트* / AS03	이종기원 1차 투여 D0
4	3가 스플리트* / AS03+MPL (용량 당 2.5 μ g)	이종기원 1차 투여 D0
5	Gripguard (= Fluad TM) = 수중유 에멀전의 서브-유닛	이종기원 1차 투여 D0
6	Aggripal TM (서브유닛) / AS03	이종기원 1차 투여 D0
7	Aggripal TM (서브유닛) / AS03+MPL (용량 당 2.5 μ g)	이종기원 1차 투여 D0
8	Aggripal TM (서브유닛) / OW**	이종기원 1차 투여 D0
9	Aggripal TM (서브유닛)	이종기원 1차 투여 D0
10	PBS	이종기원 1차 투여 D0

* FluarixTM

** 하기 섹션에서 설명된 바와 같이 생산된 OW

<846>

<847> VII.1.2. 백신 포물레이션의 제조

- <848> OW의 제조
- <849> OW로 불리우는 수중유 에멀전을 키론 베링 FluAd(Chiron Behring FluAd) 백신에 포함된 설명서 팜플렛에 공개된 방법에 따라 제조하였다.
- <850> 주사용 물, 36.67 mg의 시트르산 및 627.4 mg의 Na 시트레이트.2H2O를 함께 혼합하고, 용량을 200 ml로 조절하였다. 470 mg의 트윈 80을 94.47 ml의 이러한 완충액과 혼합하고, 이러한 혼합물을 "용액 A"라 칭하였다. 오일 혼합물을 3.9 g의 스쿠알렌 및 470 mg의 스팬 85를 자석 교반하에서 혼합하여 제조하였다. 용액 A를 이후 오일 혼합물에 첨가하고, 얻어진 최종 용량은 100 ml이었다. 이후 혼합물을 먼저 18Gx 1 1/2 니들에 통과시킨 후 두개의 샘플 중 M110S 마이크로유동화제(Microfluidics로부터 입수)에 넣어 오일 방울의 크기를 감소시켰다. 대략 150 nm의 입자 크기가 각각에 대해 얻어질 때, 2개의 샘플을 울혈시키고, 0.2 μm 필터 상에서 필터하였다. 0.10의 다분산도를 갖는 143 nm의 평균치를 T0에서 울혈된 샘플에 대해 수득하였고, 0.06의 다분산도를 갖는 145 nm의 평균치는 4℃에서 4개월 저장한 후 수득하였다. 이러한 크기를 제타사이저(Zetasizer) 3000HS(Malvern으로부터 입수)를 사용하여 하기 기술 조건하에서 수득하였다:
 - <851> - 레이저 파장: 532 nm(Zeta3000HS).
 - <852> - 레이저 파워: 50 mW(Zeta3000HS).
 - <853> - 90° 에서 검출된 산란광(Zeta3000HS).
 - <854> - 온도: 25℃.
 - <855> - 시간: 온화하게 자동 결정,
 - <856> - 횟수: 3회 연속 측정,
 - <857> - z-평균 직경: 누적 분석에 의함
- <858> 군 1에 대한 포물레이션(1 ml에 대해):
- <859> 최종 농도가 375 μg/ml 트윈 80, 55 μg 트리톤 X-100 및 50 μg VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 μg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.
- <860> 군 2에 대한 포물레이션(1 ml에 대해):
- <861> 최종 농도가 375 μg/ml 트윈 80, 55 μg 트리톤 X-100 및 50 μg VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 μg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 μl의 OW 에멀전을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.
- <862> 군 3에 대한 포물레이션(1 ml에 대해):
- <863> 최종 농도가 375 μg/ml 트윈 80, 55 μg 트리톤 X-100 및 50 μg VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 μg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 μl의 SB62 에멀전을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.
- <864> 군 4에 대한 포물레이션(1 ml에 대해):
- <865> 최종 농도가 375 μg/ml 트윈 80, 55 μg 트리톤 X-100 및 50 μg VES에 도달하도록 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 5분 동안 교반한 후에, 15 μg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 μl의 SB62 에멀전을 첨가하였다. 혼합물을 다시 15분 동안 교반한 후 25 μg의 MPL을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우

4℃에서 저장하였다.

<866> 군 5에 대한 포물레이션: 1 ml에 대해:

<867> 동량의 PBS 및 FluAd™/GripGuard™(상업적 백신) 백신을 혼합하였다. 포물레이션을 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<868> 군 6에 대한 포물레이션: 1 ml에 대해:

<869> 250 µl의 PBS mod pH 7.4를 500 µl 용량의 Aggripal™(상업적 백신)에 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 µl의 SB62를 첨가하였다(스케일-업 생산을 위한 상세한 방법론에 따라 제조됨). 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<870> 군 7에 대한 포물레이션: 1 ml에 대해:

<871> PBS mod pH 7.4(최종 용량이 1 ml에 도달하도록)를 500 µl 용량의 Aggripal™(상업적 백신)에 첨가하였다. 15 분 동안 교반한 후, 250 µl의 SB62를 첨가하였다(스케일-업 생산을 위한 상세한 방법론에 따라 제조됨). 25 µg의 MPL을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<872> 군 8에 대한 포물레이션: 1 ml에 대해:

<873> 250 µl의 PBS mod pH 7.4를 500 µl 용량의 Aggripal™에 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 µl의 군 2에 대해 제조된 바와 같은 OW를 첨가하고, 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<874> 군 9에 대한 포물레이션: 1 ml에 대해:

<875> 동량의 PBS mod pH 7.4 및 Aggripal을 혼합하였다. 포물레이션을 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<876> VII.1.3. 기록(표 40)

<877> CMI(ICS): 면역화 후 7일째.

<878> IHA/중화 검정: 면역화 후 21일째.

<879> 표 40

기록	시점	샘플 타입	I/P	분석방법
ICS (CD4, CD8, IL-2, IFN-γ)	D35	PBLs	Po	FACS 분석
체액 반응	D14, D44	혈청	In	IHA, neutra

In= 개체 / Po= 풀(Pool)

<880> CMI 분석(ICS: CD4/CD8; IL-2/IFN-감마 염색)

<881> 24 마리 마우스/군으로부터의 PBMC를 면역화 후 7일째에 수확하고 풀/군에서 시험하였다.

<882> VII.2. 결과

<883> VII.2.1. 체액 면역성

<884> 3개의 백신 군주에 대한 적혈구응집 억제 활성을 비강내 이중기원 1차 투여후 14일 및 면역화 후 16일에 군 당 24마리의 동물로부터의 혈청에서 검출하였다.

<885> 3개 군주 및 모든 군에 대해, HI 역가의 상승을 면역화 후에 관찰하였다.

<886> ● 동일한 어쥬번트 및 3개의 군주에 대해, 유사한 HI 역가를 서브유닛 백신 및 스플리트 백신으로 유도하였다.

<887> ● 3개의 군주에 대해 Aggripal OW과 유사한 HI 역가를 Fluad에 대해 관찰하였다.

- <889> ● H1N1 및 B 균주에 대해 Fluarix와 Aggripal 간에 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.
- <890> ● 3개의 균주에 대해, 통계적으로 유의한 보다 높은 HI 역가가 Flu 백신(스플리트 또는 서브유닛)이 플레인 Flu 백신에 비교하여 MPL을 지니거나 지니지 않은 AS03으로 어쥬번트되는 경우 관찰되었다.
- <891> ● HI 역가는 A/와이오밍 균주에 대해 Flu 백신 플레인과 비교하여 OW로 어쥬번트된 Flu 백신(스플리트 또는 서브유닛)에 대해 통계학적으로 현저하게 보다 높았다.
- <892> VII.2.2. 세포-매개 면역 반응(면역화 후 7일째에 ICS)
- <893> *CD4 T 세포 반응--도 17 윗부분*
- <894> 군 당 24마리 마우스로부터의 PBMC를 면역화 후 7일째에 수확하고 하나의 풀/군에서 시험하였다. 비활성화된 3가 전체 바이러스(1 µg/ml)를 재-자극 항원으로서 사용하였다. 결과를 도 17의 윗부분에 나타내었다.
- <895> Flu 전체 바이러스-특이적 CD4+ T 세포 발현 IL-2, IFN-γ 또는 두개의 시토카인의 측면에서(도 17 윗부분):
- <896> 1. GSK 어쥬번트는 이전에 관찰(실시에 VI)된 것과 동일한 경향을 나타내었다: AS03+MPL은 플레인 백신으로 얻어진 결과에 비해 우수한 AS03에 비해 우수하였다. 이러한 경향은 스플리트 또는 서브유닛 백신 모두에 대해 관찰되었다.
- <897> 2. 어더한 포물레이션에서든(플레인, AS03 또는 AS03+MPL), 스플리트 백신은 서브유닛 백신에 비해 높은 CD4+ T 세포 반응을 유도하였다.
- <898> 3. Fluad(서브유닛+수중유 에멀전 OW-제조 섹션 참조)는 Fluarix Plain과 유사한 빈도를 유도하는 것으로 보였다.
- <899> 4. 포물레이션 3가 스플리스/AS03 또는 3가 스플리트/AS03+MPL은 포물레이션 서브유닛/수중유 에멀전 OW에 비해 높은 CD4+ T 세포 반응을 유도하였다.
- <900> *CD8 T 세포 반응 - 도 17 아랫부분*
- <901> 군 당 24마리 마우스로부터의 PBMC를 면역화 후 7일째에 수확하고 하나의 풀/군에서 시험하였다. 비활성화된 3가 전체 바이러스(1 µg/ml)를 재-자극 항원으로서 사용하였다.
- <902> Flu 전체 바이러스-특이적 CD8+ T 세포 발현 IL-2, IFN-γ 또는 두개의 시토카인의 측면에서(도 17 아랫부분):
- <903> ● 본 실험의 컷-오프는 PBS 음성 대조군에 대해 관찰된 높은 백그라운드로 인해 비교적 높았다.
- <904> ● 그러나 보다 높은 특이적 CD8 T 세포 반응은 다른 백신 포물레이션과 비교하여 3가 스플리트/AS03+MPL로 면역화된 마우스에 대해 관찰되었다.
- <905> **VII.3. 결과 및 결론의 요약**
- <906> 하기 결과를 얻었다:
- <907> 1) 면역화 후 7일 째에 ICS에 의해 얻어진 Flu-특이적 CD4+ T 세포는 하기를 나타내었다:
- <908> 1. Fluarix와 비교하여 유사한 반응은 Fluad에 대해 일어났다.
- <909> 2. 어쥬번트된 포물레이션은 스플리트 인플루엔자 백신(인간에서 관찰됨) 및 서브유닛(Aggripal) 백신(인간에서 평가되지 않음) 모두에 대해 비-어쥬번트된 백신에 비해 높은 면역 반응을 유도하였다. MPL이 보충된 수중유 에멀전 어쥬번트 AS03(군 4 및 9)은 수중유 에멀전 어쥬번트 AS03(군 3 및 8) 보다 높은 반응을 제공하였다.
- <910> 3. 스플리트/AS03에 비해 스플리트/AS03+MPL에 대해 보다 높은 CD4 반응의 경향을 나타내었다.
- <911> 4. 스플리트 백신에 의해 유도된 반응은 서브유닛 백신으로 얻어진 반응에 비해 우수하였다(군 1 내지 4 및 군 5 내지 9를 비교함).
- <912> 5. AS03으로 어쥬번트되거나 MPL로 어쥬번트되거나 비어쥬번트되는지(군 3 및 4) 스플리트 백신은 Fluad(군 5) 또는 Aggripal+OW(군 7)에서 서브-유닛 백신에 비해 보다 높은 CD4+ T 세포 반응을 나타내었다.
- <913> 2) 면역화 후 7일째에 ICS에 의해 얻어진 Flu-특이적 CD8+ T 세포는 스플리트/AS3과 스플리트 플레인 간의 어떠한 차이도 관찰되지 않는 것으로 나타났다(인간에서 관찰된 바와 같음). 스플리트/AS03 또는 스플리트 플레인

과 비교하여 스플리트/AS03+MPL을 사용하므로써 보다 높은 CD8+ T 세포 반응에 대한 경향을 나타내었다.

<914> 3) 동일한 어쥬번트 및 3개의 균주에 대해, 유사한 HI 역가는 서브유닛 백신 및 스플리트 백신에 의해 유도되었다. 3개의 균주에 대해, 통계학적으로 현저한 보다 높은 역가는 Flu 백신(서브유닛 또는 스플리트)이 Flu 백신 플레인과 비교하여 AS03 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 경우에 관찰되었다(A/와이오밍 균주에 대해서만 Flu 백신 OW > Flu 백신 플레인).

<915> 실시예 VIII - 스플리트 인플루엔자 항원 제조물 및 MPL 어쥬번트를 지니거나 지니지 않은 AS03를 함유한 백신을 지닌 65세 이상의 노인 집단에서의 임상 시험

<916> VIII.1. 연구 디자인

<917> Fluarix™ 백신(벨기에에서 α-Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 근육내로 투여된, 어쥬번트 AS03 또는 AS03+MPL을 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 반응성 및 면역성을 평가하기 위한 65세 이상의 노인 집단(≥65세)에서 상 I, 개방, 무작위, 제어된 연구.

<918> 세가지 유사한 군을 평가하였다:

<919> ● 일 용량의 재구성되고 AS03 어쥬번트된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03)

<920> ● 일 용량의 재구성되고 Flu AS03+MPL 어쥬번트된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03+MPL)

<921> ● 일 용량의 Fluarix™를 수용한 50 피검체의 일 대조군(Fluarix)

<922> VIII.2. 백신 조성 및 투여

<923> 세계의 백신에서 사용된 균주는 2004-2005 북반구 시즌에 대해 WHO에 의해 제안된 것, 즉 A/뉴 칼레도니아/20/99(H1N1), A/뉴 캘리포니아/3/2003(H3N2) 및 B/지양수/10/2003이었다. Fluarix™/α-Rix™와 같이, 비교체로서 사용되는 상업적으로 입수가 가능한 백신, 어쥬번트된 백신(AS03 또는 AS03+MPL)은 용량 당 각 인플루엔자 바이러스 균주 중 15 μg 헤마글루티닌(HA)을 함유한다.

<924> 어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신은 투압 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원 및 어쥬번트(AS03 또는 AS03+MPL)를 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기로 구성된 2 성분 백신이다. 이를 실시예 II에 상세히 설명된 바와 같이 제조하였다. 어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신의 포물레이션에서 사용된 세계의 비활성화된 스플리트 비리온 항원(일가 벌크)은 상업적인 Fluarix™/α-Rix의 포물레이션에서 사용된 활성 성분과 정확하게 동일하다.

<925> AS03 어쥬번트된 백신:

<926> AS03-어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신은 타입 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원(335 μl)(항원 용기) 및 SB62 에멀전을 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기(335 μl)(어쥬번트 용기)로 구성된 2 성분 백신이다. AS03 후보물질 백신의 기술 및 조성은 실시예 III에서 설명되었다.

<927> AS03+MPL 어쥬번트된 백신:

<928> 간단하게는, AS03+MPL-어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신은 타입 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원(335 μl)(항원 용기) 및 AS03+MPL 어쥬번트를 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기(어쥬번트 용기)로 구성된 2 성분 백신이다. 주사시에, 항원 용기의 내용물을 AS03+MPL 어쥬번트를 함유한 주사기를 사용하여 바이알로부터 제거한 후, 주사기를 온화하게 혼합하였다. 주사 전에, 사용된 니들을 근육내 니들로 바꾸고, 용량을 530 μl로 보정하였다. 일 용량의 재구성된 AS03+MPL-어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신은 530 μl이었다. 재구성된 AS03+MPL 어쥬번트된 백신에서 각 인플루엔자 균주에 대해 15 μg HA를 수득하기 위해, 비활성화된 스플리트 비리온 항원을 항원 용기에서 Fluarix™(즉, 30 μg HA/ml)에 비해 두배로(즉 60 μg HA/ml) 농축하였다.

<929> 일 용량의 재구성된 어쥬번트된 인플루엔자 백신의 조성물은 인플루엔자 균주를 제외하고 표 45(실시예 XI 참조)에 기재된 것과 동일하다. 두개의 백신은 근육내로 제공되었다.

<930> VIII.3. CMI 목적, 종료점 및 결과

<931> CMI 목적은 AS03, 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 포물레이션 대 임의의 어쥬번트가 없는 조성물 간의 면역원성 조

성물이 인플루엔자 항원으로 백신접종된 개체의 CD4- 및 CD8-매개된 면역성에 대한 가장 강력한 면역자극 활성을 갖음을 결정하기 위한 것이다.

<932> VIII.3.1. CMI 종료점 및 결과

<933> 관찰된 변수

<934> 0일 및 21일에: 5개의 상이한 시토카인에서 10^6 당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도. 각 시험은 하기에 대한 CD4/CD8 T 세포의 반응을 정량화한다:

<935> - 3개의 하기 항원의 풀

<936> - 뉴 칼레도니아 항원

<937> - 와이밍 항원

<938> - 지양수 항원

<939> 유도된 변수:

<940> 항원-특이적 CD4 및 CD8-T-세포 반응은 5개의 상이한 시험으로 표시되었다:

<941> (a) 두개 이상의 상이한 시토카인을 생산하는 세포(CD40L, IL-2, IFN γ , TNF α)

<942> (b) 적어도 CD40L 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, TNF α , IFN γ)

<943> (c) 적어도 IL-2 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(CD40L, TNF α , IFN γ)

<944> (d) 적어도 IFN γ 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, TNF α , CD40L)

<945> (e) 적어도 TNF α 및 다른 시토카인을 생산하는 세포(IL-2, CD40L, IFN γ)

<946> CMI 반응의 분석:

<947> CMI 분석을 총 백신접종된 코호트(cohort)를 기초로 하였다.

<948> (a) 각 처리군에 대하여, 반응 중 CD4/CD8 T-림프구 분비의 빈도를 각 시점(0일, 21일) 및 각 항원(뉴 칼레도니아, 와이오밍 및 지양수) 및 용혈된 3개의 상이한 군주에 대해 결정하였다.

<949> (b) 각 5개의 상이한 시토카인에서 각 백신접종 군 및 각 항원에 대한 시점(후-전) 반응 간에 개개 차이점의 기술 통계.

<950> (c) 하기에 대한 5개의 상이한 시토카인과 관련된 3개 군의 비교:

<951> - 뉴 칼레도니아, 와이오밍, 지양수 및 3개의 군주의 풀에 대한 CD4 T-세포 반응

<952> - 뉴 칼레도니아, 와이오밍, 지양수 및 3개의 군주의 풀에 대한 CD8 T-세포 반응

<953> (d) 비-파라메트릭 시험(Kruskall-Wallis 시험)을 3개의 군과 각 5개의 상이한 시토카인에서 각 항원에 대해 계산된 통계학적 p-값 간의 위치 차이를 비교하기 위해 사용하였다.

<954> (e) 윌콕슨 시험(Wilcoxon test)을 각각의 Flu As03+MPL 대 Fluarix, Flu AS03+MPL 대 Flu AS03 및 Flu AS03 대 Fluarix 간의 2개 군의 쌍비교를 시험하기 위해 사용하였다.

<955> (f) 모든 중요한 시험은 2회 반복하였다. 0.05 이하의 P-값은 통계학적으로 유의한 것으로 여겨진다.

<956> VIII.3.2. CMI 결과

<957> 결과를 CD4 또는 CD8 T 세포 서브-집단내에서 시토카인(들)-양성 CD4 또는 CD8 T 세포의 빈도로써 나타내었다.

<958> 항원 특이적 CD4 T-림프구의 빈도

<959> (a) 반응에서 항원-특이적 CD4 T-림프구 분비 빈도를 실시예 III에서 수행된 것과 유사하게 각 시점(0일, 21일)에서 각 백신접종군에 대해 및 각 항원(풀, 뉴 칼레도니아, 와이오밍 및 지양수)에 대해 결정하였다.

<960> (b) 크루스칼-왈리스(Kruskall-Wallis) 시험에 의해 3개 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여, 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.

- <961> (c) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03+MPL과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여, 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.
- <962> (d) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여, 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.
- <963> (e) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Flu AS03+MPL 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이 비교하여, 모든 p-값은 0.05 초과이었으며, 통계학적으로 무의미한 것으로 여겨졌다.
- <964> *CD4 T-림프구의 시점(후-전) 간에 개개 차이*
- <965> (a) CD4 T-림프구 반응에서 시점(후-전) 간에 개개의 차이의 기술 통계는 실시예 III에서 이루어진 것과 유사하게, 각 백신접종 군에 대해 각각 5개의 상이한 시토카인에서 각 항원에 대해 계산되었다.
- <966> (b) 크루스칼-왈리스(Kruskall-Wallis) 시험에 의해 3개 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.001 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.
- <967> (c) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03+MPL과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.05 미만이었으며, 통계학적으로 유의한 것으로 여겨졌다.
- <968> (d) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Fluarix 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.001 미만이었으며, 통계학적으로 매우 유의한 것으로 여겨졌다.
- <969> (e) 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03과 Flu AS03+MPL 군 간에 항원-특이적 CD4 T-림프구의 개개의 차이(후-전)를 비교하여, 모든 p-값은 0.05 초과이었으며, 통계학적으로 무의미한 것으로 여겨졌다.
- <970> **VIII.4. B 세포 메모리 반응 목적, 종료점 및 결과**
- <971> 연구의 목적은 Flu 항원에 특이적인 메모리 B 세포의 빈도가 노인 집단에서 Fluarix를 비교하여, 어쥬번트 AS03+MPL 또는 AS03을 함유한 Flu 후보물질로 근육내 백신접종시에 현저하게 유도되는지의 여부를 평가하기 위한 것이다. 메모리 B 세포의 빈도는 B 세포 엘리스포트 검정법으로 평가되었다.
- <972> VIII.4.1. B 세포 메모리 반응 종료점
- <973> 종료점은:
- <974> (a) 0, 21일째에: 배양된 메모리 B-세포를 시험관내에서 발생시킨 세포는 혈장 세포를 생산하는 백만(10^6)의 IgG내에 특이적-항원 혈장의 빈도 측면에서 모든 피검체에서 B-세포 ELISPOST로 측정된다.
- <975> (b) 후(21일) 및 전(0일) 백신접종 간의 차이는 또한 항체 형성 세포 백만(10^6) 당 인플루엔자 특이적-항체 형성 세포의 빈도로서 표현된다.
- <976> VIII.4.2. B 세포 메모리 반응 결과
- <977> 항체 형성 세포 백만(10^6) 당 인플루엔자-특이적 항체 형성 세포의 빈도를 결정하였다. 결과는 윌콕슨 시험에 의해 Flu AS03+MPL과 Fluarix 군 간에 Flu 항원에 특이적인 메모리 B 세포의 빈도가 B/지양수 균주에 대해 유의적인($p < 0.05$) 반면 다른 두개의 균주(A 균주 뉴 칼레도니아 및 와이오밍)에 대해서는 무의미적인 것으로 나타났다.
- <978> Flu 항원에 특이적인 메모리 B 세포에서 시점(후-전) 간에 개개의 차이를 또한 결정하였다. 결과는 크루스칼-왈리스 시험에 의해 Flu AS03+MPL과 Fluarix 간에 Flu 항원에 대해 특이적인 메모리 B 세포의 빈도에서 시점(후-전) 간의 개개의 차이가 B/지양수 균주에 대해 유의적으로 보다 높은($p < 0.05$) 반면, 다른 두개의 균주(A 균주 뉴 칼레도니아 및 와이오밍)에 대해서는 무의미적인 것으로 나타났다.
- <979> 결과는 도 18에 나타내었다.
- <980> **실시예 IX - 흰족제비에서 어쥬번트되고 비-어쥬번트된 인플루엔자 백신의 임상전 평가(연구 III)**
- <981> **IX.1. 원리 및 목적**
- <982> 본 연구는 비어쥬번트되고(Fluarix™) 또는 AS03+MPL로 어쥬번트된 GSK 상업적 인플루엔자 3가 스플리트 백신과

두개의 다른 상업적으로 입수가 가능한 서브-유닛 백신을 비교한 것이다:

<983> - Fluvad™, 키론스 어쥬번트된 서브유닛 백신(어쥬번트는 키론스 MF59 어쥬번트임),

<984> - Agrippal™, 키론 비-어쥬번트된 상업적 서브-유닛 백신, 이는 본 발명에서 AS03 어쥬번트로 어쥬번트된 것임.

<985> 본 실험의 목적은 이중기원 균주로 2차 투여된 흰족제비의 비강 분비물에서 질병 증상(체온 및 바이러스 발산)을 감소시키는 이들 백신의 능력을 평가하기 위한 것이다.

<986> 종료점은 하기와 같다:

<987> 1) 1차 종료점: 이중기원 2차 투여후 비강 세척물에서 바이러스 발산의 감소:

<988> 2) 2차 종료점: IHA에 의해 체액 반응의 분석 및 1차 투여 및 이중기원 2차 투여시에 온도를 모니터링.

<989> **IX.2. 실험 디자인**

<990> IX.2.1. 처리/군

<991> 14주령 내지 20주령의 암컷 흰족제비(*Mustela putoris furo*)를 MISAY 컨설트사(Hampshire, UK)로부터 입수하였다. 흰족제비를 0일째에 비강내로 이중서브타입 균주 H1N1 A/스톡홀름/24/90(4 Log TCID₅₀/ml)로 1차 투여하였다. 21일째에, 흰족제비를 근육내로 전체 인간 용량(1 ml 백신 용량, 15 µg HA/균주)의 H1N1 A/뉴 칼레도니아/20/99, H3N2 A/와이오밍/3/2003 및 B/지양수/10/2003의 조합물을 주사하였다. 이후 흰족제비를 42일째에 비강내 경로로 이중타입 균주 H3N2 A/파나마/2007/99(4.51 Log TCID₅₀/ml)로 2차 투여하였다. 군(6마리 흰족제비/군)을 표 41에 나타내었다. 수행된 기록을 표 42에 상세히 나타내었다.

<992> 표 41

군	항원(들)+투약	포물레이션+투약	코멘트 (예: 스케줄/ 경로/자극)	다른 처리
1	3가 플레인 (Fluarix™)	전체 HD: 15µg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24/90) 0일
2	3가 AS03+MPL	전체 HD: 15µg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24/90) 0일
3	Fluvad™	전체 HD: 15µg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24/90) 0일
4	Agrippal™ AS03	전체 HD: 15µg HA/균주	IM; 21일	H1N1 1차 투여 (A/ 스톡홀름 /24/90) 0일

<994> IX.2.2. 백신 포물레이션의 제조

<995> 스플리트 3가 플레인(비-어쥬번트된): 1 ml에 대한 포물레이션:

<996> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 375 µg 트윈 80, 55 µg 트리톤 X-100 및 50 µg VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 µg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 17.5 µg의 B 균주를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4°C에서 저장하였다.

<997> AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트: 1 ml에 대한 포물레이션:

<998> 10배 농축된 PBS(1배 농축되는 경우 pH 7.4) 및 트윈 80, 트리톤 X-100 및 VES(균주에 존재하는 세정제를 고려한 양)를 함유한 혼합물을 주사용 물에 첨가하였다. 도달되는 세정제의 양은 하기와 같다: 1 ml 당 375 µg 트윈 80, 55 µg 트리톤 X-100 및 50 µg VES. 5분 동안 교반한 후에, 15 µg의 각 균주 H1N1, H3N2, 및 B를 각 첨가 사이에 10분 동안 교반하면서 첨가하였다. 15분 동안 교반한 후, 250 µl의 SB62 에멀전(실시예 II.1에 교시

된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 포물레이션을 다시 15 분 동안 교반한 후, 25 µg의 MPL을 첨가하였다. 포물레이션을 실온에서 15 분 동안 교반하고, 직접 투여하지 않을 경우 4℃에서 저장하였다.

<999> FluAd™ 포물레이션: 1 ml에 대한 포물레이션:

<1000> FluAd™ 백신의 두배 희석액을 PBS 완충액 pH 7.4에서 제조하였다.

<1001> Agrippal™ AS03 포물레이션: 1 ml에 대한 포물레이션:

<1002> 250 µl의 PBS 완충액 pH 7.4를 일 용량의 Agrippal™에 첨가하였다. 혼합 후에, 250 µl의 SB62 에멀전(실시에 II.1.에서 상세히 기술된 바와 같이 제조됨)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 교반하였다.

<1003> IX.2.2. 기록

<1004> 표 42

기록	시점	샘플타입	I/Po	분석방법
바이러스 발산	D-3내지D+7 1차 투여후 D+1내지D+5 2차 투여후	비강 세척물	In	적정
T° 모니터링	D-3내지D+4 1차 투여후 D-2내지D+4 2차 투여후	복막 공동의 임플란트	In	원격측정법
IHA	1차 투여전, 후, 면역후, 2차 투여후	혈청	In	IHA

In= 개체 / Po= 풀(Pool)

<1005> IX.3. 결과(도 19 내지 22)

<1006> IX.3.1. 온도 모니터링

<1007> 개별적인 온도를 발신기 및 원격측정 기록기로 모니터링하였다. 모든 임플란트를 체크하고, 다시 닦고, 신규한 측정을 복막내 공동에 배치되기 전에 DSI로 수행하였다. 모든 동물은 이들 측정동안 단일 케이지에 개별적으로 사육하였다. 온도를 2차 투여전 2일에서 2차 투여후 4일까지 15분 마다 모니터링하고, 평균 온도를 정오에 계산하였다. 결과를 도 19에 나타내었다.

<1008> 결과:

<1009> 2차 투여후, 체온의 피크는 비-어쥬번트된(플레인) 3가 스플리트(Fluarix™) 또는 서브-유닛 백신 Fluad™(MF59 수중유 에멀전을 함유함)로 흰족제비를 면역시킨 후에 관찰되었다. AS03+MPL 또는 AS03으로 어쥬번트된 서브 유닛 Agrippal™로 어쥬번트된 3가 스플리트 백신으로 흰족제비를 면역시킨 후에 어떠한 피크도 관찰되지 않았다. 결론적으로, 체온의 억제에서 AS03-함유 백신의 부가된 값은 스플리트 및 서브-유닛 시험된 백신 모두에 대해 나타난 반면 2차 투여후에 흰족제비에서의 온도 증가를 방지하기 위해 MF59-함유 백신은 무능하였다.

<1010> IX.3.2. 바이러스 발산

<1011> 비강 세척물의 바이러스 적정을 군 당 6 마리의 동물에서 수행하였다. 비강 세척물을 깨어있는 동물의 양쪽 콧 구멍에 5 ml의 PBS를 투여하여 수행하였다. 집중을 페트리 접시에 수집하고, 드라이 아이스(-80℃) 상의 샘플 용기에 배치하였다.

<1012> 모든 비강 샘플을 먼저 스핀 X 필터(Costar)를 통해 멸균 필터하여 임의의 박테리아 오염물을 제거하였다. 50 µl의 비강 세척물의 일련의 10배 희석액을 50 µl의 매질을 함유한 마이크로역가 플레이트에 옮겼다(10 웰/희석액). 이후 100 µl의 MDCK 세포(2.4×10⁵ 세포/ml)를 각 웰에 첨가하고, 세포 함유가 예를 들어 5 내지 7일 동안 대조군 세포로 도달될 때까지 35℃에서 인큐베이션하였다. 5 내지 7일의 인큐베이션 후에, 배양 매질을 서서히 제거하고, 100 ml의 매질을 함유한 1/20 WST-1을 첨가하고 추가 18 시간 동안 인큐베이션하였다.

<1013> 생존가능한 세포에 의한 WST-1의 감소하에서 생산된 황색 포르마잔(formazan) 염료의 세기는 바이러스 적정 검정법의 말단에서 웰에 존재하는 생존가능한 세포의 수에 비례하고, 적절한 파장(450 나노미터)에서 각 웰의 흡광도를 측정하므로써 정량한다. 컷-오프(cut-off)는 감염되지 않은 대조군 세포의 OD 평균-0.3 OD(0.3 OD는 +/-3 StDev의 비감염된 대조군 세포의 OD에 상응함)으로서 규정된다. 양의 스코어는 OD가 컷-오프 미만인 경우로 규정되며 반대로 음의 스코어는 OD가 컷-오프를 초과한 경우로 규정된다. 바이러스 발산 역가를 "Reed and

Muench"로 결정되며 Log TCID50/ml로 표시된다.

<1015> **결과:**

<1016> 결과를 도 20에 나타내었다. 보다 낮은 바이러스 발산은 비-어쥬번트된(플레인) 3가 스플리트 백신(Fluarix™) 또는 Fluad™ 서브-유닛 백신으로 흰족제비를 면역시킨 후에 관찰된 매우 낮은 바이러스 발산 감소와 비교하여, AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트 백신, 또는 AS03으로 어쥬번트된 Agrippal™ 서브-유닛 백신으로 2차 투여 시킨 후 관찰되었다. 체온 상승과 관련하여 논의된 바와 유사하게, AS03 함유 백신의 추가된 값을 MF59-함유 백신과 비교 관찰하였다.

<1017> IX.3.3. HI 역가

<1018> H3N2 인플루엔자 바이러스 균주에 대한 안티-헤마글루티닌 항체 역가를 적혈구응집 억제 시험(HI)을 사용하여 결정하였다. HI 시험의 원리는 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌(HA)에 의해 닭 적혈구 세포(RBC)의 적혈구응집을 억제하는 특정 안티-인플루엔자 항체의 능력을 기초로 한다. 혈청을 먼저 25% 뉴라미니다제 용액(RDE)로 처리하고, 열불활성화처리하여 비특이적 억제제를 제거하였다. 사전처리 후에, 혈청의 두배 희석액을 각 인플루엔자 균주의 4개의 적혈구응집 유닛으로 인큐베이션하였다. 닭 적혈구를 이후 첨가하고, 응집의 억제를 계수하였다. 역가를 적혈구응집을 완전히 억제하는 혈청의 가장 큰 희석액의 역수로서 나타내었다. 혈청의 제 1 희석은 1:10이기 때문에, 검출가능하지 않은 수준을 역가 5로서 계수하였다.

<1019> **결과:**

<1020> H3N2 A/와이오밍으로 면역시킨 후, 보다 높은 체액 반응(HI 역가)은 비-어쥬번트된(플레인) 3가 스플리트 백신(Fluarix™) 또는 Fluad™ 서브-유닛 백신으로 흰족제비를 면역시킨 후 관찰된 체액 반응과 비교하여, AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트 백신, 또는 AS03으로 어쥬번트된 Agrippal™ 서브-유닛 백신으로 면역화된 흰족제비에서 관찰되었다(도 21).

<1021> H3N2 A/와이오밍으로 면역시킨 후에, 보다 높은 체액 반응(HI 역가)은 또한 3가 스플리트 플레인 또는 Fluad로 면역화된 흰족제비와 비교하여 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트 또는 AS03으로 어쥬번트된 Agrippal™로 면역화된 흰족제비에서 2차 투여 균주로서 사용된 그리프트 균주 H3N2 A/파나마에 대해 관찰되었다(도 22).

<1022> 이종기원 균주에 대해 본 발명의 어쥬번트(AS03 또는 AS03+MPL)로 관찰된 이러한 가교반응은 AS03+MPL로 어쥬번트된 3가 스플리트 백신 또는 AS03으로 어쥬번트된 Agrippal™ 서브-유닛 백신으로 면역화된 흰족제비에서 관찰된 방어로 보정된 후, 이종기원 균주로 2차 투여되었다. AS03-함유 백신에 의해 유도된 이종기원 균주에 대한 이러한 가교 반응성은 MF59 어쥬번트된 백신(FluAd™)에 의해 유도되지 않았다.

<1023> **실시예 X - 스플리트 항원 제조물 및 MPL 어쥬번트를 지니거나 지니지 않은 AS03을 함유한 백신으로 65세 이상의 노인 집단의 임상 시험: 90일 및 180일에 면역성 지속 데이터**

<1024> **X.1. 연구 디자인**

<1025> Fluarix™ 백신(벨기에에서 α-Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 근육내로 투여된, 어쥬번트 AS03 또는 AS03+MPL을 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 반응성 및 면역성을 평가하기 위한 65세 이상의 노인 집단(≥65세)에서 상 I, 개방, 무작위, 제어된 연구. 이러한 연구는 실시예 VIII에 기술된 바에 따른다.

<1026> 세가지 유사한 군을 평가하였다:

- <1027> ● 일 용량의 재구성되고 AS03 어쥬번트된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03)
- <1028> ● 일 용량의 재구성되고 Flu AS03+MPL 어쥬번트된 SV 인플루엔자 백신을 수용한 50 피검체의 일 군(Flu AS03+MPL)
- <1029> ● 일 용량의 Fluarix™를 수용한 50 피검체의 일 대조군(Fluarix)

<1030> **X.2. 면역성 결과**

<1031> X.2.1. 체액 면역 반응 종료점 및 결과

<1032> AS03 및 AS03+MPL 어쥬번트된 백신에 의해 유도된 체액 면역 반응 및 이의 지속성을 평가하기 위하여, 하기 파라미터를 각 처리 군에 대해 계산하였다.

<1033> 0일, 21일, 90일 및 180일에: 혈청 적혈구응집-억제(HI) 항체 역가는 백신으로 표시되는 세개의 인플루엔자 바이러스 균주(안티-H1N1, 안티-H3N2, 및 안티-B-항체) 각각에 대해 별도로 시험되었다.

<1034> ● 0일, 21일, 90일 및 180일에 95% CI를 갖는 혈청 HI 항체 GMT

<1035> ● 0일, 21일, 90일 및 180일에 95% CI를 갖는 혈청전환율

<1036> ● 21일에 95% CI를 갖는 전환 인자

<1037> ● 0일, 21일, 90일 및 180일에 95% CI를 갖는 혈청방어율

<1038> **결과**

<1039> 95% CI를 갖는 HI 항체에 대한 GMT는 도 23에 나타내었다. 모든 3개 백신-균주에 대한 항체의 백신접종전 GMT는 3개 군에서 동일한 범위내에 존재한다. 백신접종 후, 안티-헤마글루티닌 항체 수준은 유의적으로 증가하였다. 그러나 3개의백신 균주에 대한 항체의 백신접종후 GMT는 모든 백신에 대해 동일한 범위내에 존재하였다. 21일째에, Fluarix와 비교하여 2 어쥬번트된 백신 쪽으로의 약간의 강향은 A/뉴 칼레도니아 및 B/지양수 균주에 대해 기술되었으며, 두개의 어쥬번트된 백신 중에서 보다 높은 GMT는 A/와이오밍 및 B/지양수 균주에 대해 FLU AS03으로 관찰되었다.

<1040> 동일한 경향은 90일에 관찰되었다. 180일에, 3개 백신 균주에 대한 항체의 GMT는 3개의 백신에 대해 동일한 범위내에 존재하였다.

<1041> 모든 인플루엔자 백신은 60세 이상의 피검체에서 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 충족한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)].

<1042> 백신접종 후 세달(90일) 및 6달(180일)에, 혈청방어율은 연구 그룹이 무엇을 고려하든지 간에 유럽 위원회에 의해 요구된 60%의 최소율 보다 높다. 90일째에, 유럽 위원회에 의해 요구된 30%의 최소 혈청전환율은 A/뉴 칼레도니아 균주에 대해 Fluarix를 제외하고 3개의 백신 군에서 모든 백신 균주에 대해 달성되었다. 180일째에, 3개의 백신을 지닌 A/와이오밍 및 B/지양수 균주에 대해 달성되었으나, A/뉴 칼레도니아 균주에 대해서는 달성되지 않았다(표 43 및 표 44).

<1043> 표 43 1:40 이상의 혈청 적혈구응집 억제 역가를 지닌 백신의 퍼센트로서 혈청방어율(면역성에 대한 ATP 코호트)

항체	군	시기	N	≥ 1:40		95% CI	
				n	%	LL	UL
A/뉴 칼레도니아	Flu AS03+ MPL	PRE	50	28	56.0	41.3	70.0
		PI(D21)	50	46	92.0	80.8	97.8
		PI(D90)	50	43	86.0	73.3	94.2
		PI(D180)	50	39	78.0	64.0	88.5
	Fluarix	PRE	50	26	52.0	37.4	66.3
		PI(D21)	50	46	92.0	80.8	97.8
		PI(D90)	50	38	76.0	61.8	86.9
		PI(D180)	50	34	68.0	53.3	80.5
	FluAS03	PRE	49	28	57.1	42.2	71.2
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9
		PI(D90)	49	45	91.8	80.4	97.7
		PI(D180)	49	38	77.6	63.4	88.2
A/와이오밍	Flu AS03+ MPL	PRE	50	33	66.0	51.2	78.8
		PI(D21)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D90)	50	46	92.0	80.8	97.8
		PI(D180)	50	45	90.0	78.2	96.7

<1044>

항체	군	시기	N	≥ 1:40		95% CI	
				n	%	LL	UL
	Fluarix	PRE	50	32	64.0	49.2	77.1
		PI(D21)	50	50	100	92.9	100.0
		PI(D90)	50	49	98.0	89.4	99.9
		PI(D180)	50	50	100	92.9	100.0
	FluAS03	PRE	49	34	69.4	54.6	81.7
		PI(D21)	49	48	98.0	89.1	99.9
		PI(D90)	49	46	93.9	83.1	98.7
		PI(D180)	49	47	95.9	86.0	99.5
B/지양수	Flu AS03+ MPL	PRE	50	19	38.0	24.7	52.8
		PI(D21)	50	50	100	92.9	100.0
		PI(D90)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D180)	50	46	92.0	80.8	97.8
	Fluarix	PRE	50	17	34.0	21.2	48.8
		PI(D21)	50	48	96.0	86.3	99.5
		PI(D90)	50	47	94.0	83.5	98.7
		PI(D180)	50	47	94.0	83.5	98.7
	FluAS03	PRE	49	25	51.0	36.3	65.6
		PI(D21)	49	49	100	92.7	100.0
		PI(D90)	49	47	95.9	86.0	99.5
		PI(D180)	49	46	93.9	83.1	98.7

N = 유효한 결과를 갖는 피검체의 수
n/% = 특정 범위내에서 적정을 갖는 피검체의 수/퍼센트
PRE = 백신접종전 역가
PI (D21) = 21일째에 백신접종후 혈액 샘플링
PI (D90) = 90일째에 백신접종후 혈액 샘플링
PI (D180) = 180일째에 백신접종후 혈액 샘플링

<1045>
<1046>

표 44. 0일과 비교하여 각 백신접종후 시점에서 혈청 HI 역가의 적어도 4배 증가를 갖는 백신의 퍼센트로 규정된 적혈구응집 억제(HI) 항체 역가에 대한 혈청전환율(면역성에 대한 ATP 코호트)

백신 군주	시기	군	N	4-배			
				n	%	95%CI	
						LL	UL
A/뉴 칼레도니아	21일	Flu AS03+ MPL	50	30	60.0	45.2	73.6
		Fluarix	50	25	50.0	35.5	64.5
		Flu AS03	49	31	63.3	48.3	76.6
	90일	Flu AS03+ MPL	50	19	38.0	24.7	52.8
		Fluarix	50	14	28.0	16.2	42.5
		Flu AS03	49	17	34.7	21.7	49.6
	180일	Flu AS03+ MPL	50	12	24.0	13.1	38.2
		Fluarix	50	11	22.0	11.5	36.0
		Flu AS03	49	10	20.4	10.2	34.3
A/와이오밍	21일	Flu AS03+ MPL	50	46	92.0	80.8	97.8
		Fluarix	50	38	76.0	61.8	86.9
		Flu AS03	49	40	81.6	68.0	91.2
	90일	Flu AS03+ MPL	50	33	66.0	51.2	78.8
		Fluarix	50	33	66.0	51.2	78.8
		Flu AS03	49	31	63.3	48.3	76.6
	180일	Flu AS03+ MPL	50	27	54.0	39.3	68.2
		Fluarix	50	23	46.0	31.8	60.7
		Flu AS03	49	26	53.1	38.3	67.5
B/지양수	21일	Flu AS03+ MPL	50	44	88.0	75.7	95.5
		Fluarix	50	38	76.0	61.8	86.9
		Flu AS03	49	43	87.8	75.2	95.4
	90일	Flu AS03+ MPL	50	37	74.0	59.7	85.4
		Fluarix	50	36	72.0	57.5	83.8
		Flu AS03	49	37	75.5	61.1	86.7
	180일	Flu AS03+ MPL	50	32	64.0	49.2	77.1
		Fluarix	50	29	58.0	43.2	71.8
		Flu AS03	49	31	63.3	48.3	76.6

N = 유효한 백신접종전 및 후 결과 모두를 갖는 피검체의 수
n/% = 적어도 4배 증가를 갖는 피검체의 수/퍼센트
95% CI = 정확한 95% 신뢰 구간; LL=하한치, UL=상한치

<1047>

<1048>

X.2.2. CMI 반응 종료점 및 결과

<1049>

어췌번트된 백신으로 유도된 세포 면역 반응 및 이의 지속성을 평가하기 위하여, 하기 파라미터를 각 처리군에 대해 계산하였다:

<1050>

각 시점(0일, 21일, 90일 및 180일)에: 상이한 시험에서 10⁶ 당 시토카인-양성 CD4/CD8 세포의 빈도(뉴 칼레도니아, 와이오밍 및 지양수 항원은 별도로 고려되고 0일 및 21일에 울혈되었고; 뉴 칼레도니아, 와이오밍, 지양수 및 뉴욕 항원은 별도로 고려되고 90일 및 180일에 울혈되었다)

<1051>

● 모두 더블(A11 double): 적어도 두개의 상이한 시토카인(CD40L, IFN γ , IL-2, TNF α)을 생산하는 세포

<1052>

● CD40L: 적어도 CD40L 및 다른 시토카인(IFN γ , IL-2, TNF α)을 생산하는 세포

<1053>

● IFN γ : 적어도 IFN γ 및 다른 시토카인(CD40L, IL-2, TNF α)을 생산하는 세포

<1054>

● IL-2: 적어도 IL-2 및 다른 시토카인(CD40L, IFN γ , TNF α)을 생산하는 세포

<1055>

● TNF α : 적어도 TNF α 및 다른 시토카인(CD40L, IFN γ , IL-2)을 생산하는 세포

<1056>

결과

<1057>

주된 발견은 하기와 같다(도 24):

<1058>

(a) 백신접종 후 21일째에, 시토카인-양성 CD4 T 세포(IL-2, CD40L, TNF α 및 IFN γ)의 빈도는 Fluarix 군과 비교하여 두개의 어췌번트된 백신 군에서 보다 현저하게 높았다. 그러나 두개의 어췌번트 간에는 어떠한 현저한 차이가 검출되지 않았다.

<1059>

(b) 어췌번트된 백신 과 Fluarix 간의 모든 통계학적 차이는 180일에 하기를 제외하고 90일 및 180일까지 유지

되었다:

- <1060> ● 모두 이중, CD40L, IFN γ 및 IL2(와이오밍 균주만)에 대해 및 모두 이중, CD40L, 및 TNF α (뉴욕 균주만)에 대해 FluAS03/MPL과 Fluarix 간에 어떠한 통계학적으로 현저한 차이도 발견되지 않았다.
- <1061> ● IL2(지양수 균주만)에 대해 FluAS03과 Fluarix간에 어떠한 통계학적으로 현저한 차이도 발견되지 않았다.
- <1062> (c) 두개의 어쥬번트된 백신 간에 통계학적으로 현저한 차이의 부재는 90일 및 180일까지 확인되었다.
- <1063> (d) 평가된 모든 시토카인(IL-2, CD40L, TNF α 및 IFN γ)에 대한 CD4 T-림프구 반응에서 백신접종전과 후(21일)의 차이는 Fluarix™와 비교하여 두개의 어쥬번트된 백신으로 보다 현저하게 높았다. 그러나 둘모두의 어쥬번트 간에 현저한 차이는 검출되지 않았다.
- <1064> (e) 백신접종은 무슨 처리군이든지 간에 CD8 반응에 대한 측정가능한 효과를 갖지 않았다.
- <1065> **실시예 XI - 스플리트 인플루엔자 항원 제조물 및 MPL 어쥬번트를 지닌 AS03을 함유한 백신으로 65세 이상의 노인 집단에서 임상 실험**
- <1066> **XI.1. 연구 디자인 및 목적**
- <1067> Fluarix™ 백신(벨기에에서 α -Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 근육내로 투여된, 어쥬번트 AS03+MPL을 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 반응성 및 면역성을 평가하기 위한 65세 이상의 노인 집단(≥ 65 세)에서 상 I/II, 개방, 무작위, 제어된 연구.
- <1068> 두개의 유사한 군을 평가하였다:
- <1069> ● 임상 시험 전 동안 일 용량의 재구성되고 어쥬번트된 인플루엔자 백신을 미리 수용한 약 50 피검체의 일 군
- <1070> ● 임상 시험 전 동안 일 용량의 Fluarix™를 미리 수용한 약 50 피검체의 일 군(Fluarix)
- <1071> 본 연구의 일 목적은 제 1 용량을 투여한 후 약 1년 투여된 어쥬번트된 인플루엔자 백신 Flu AS03+MPL로 재백신 접종의 체액 면역 반응(안티-헤마글루티닌 및 안티-MPL 역가)을 평가하기 위한 것이다. 비교 목적을 위하여, 이전 시험에서 이미 Fluarix™를 수용한 피검체는 일 용량의 통상적인 백신을 수용하고, 이러한 시험의 대조군을 형성하였다.
- <1072> **XI.2. 백신 조성 및 투여**
- <1073> 새개의 백신에서 사용된 균주는 2004-2005 북반구 시즌에 대해 WHO에 의해 제안된 것, 즉 A/뉴 칼레도니아/20/99(H1N1), A/뉴 캘리포니아/3/2003(H3N2) 및 B/지양수/10/2003이었다. Fluarix™/ α -Rix™와 같이, 비교체로서 사용되는 상업적으로 입수가 가능한 백신, (AS03+MPL-어쥬번트된 백신, 이후 "어쥬번트된 백신"이라 칭함)은 용량 당 각 인플루엔자 바이러스 균주 중 15 μ g 헤마글루티닌(HA)을 함유한다.
- <1074> 어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신은 타입 I 유리 바이알에 존재하는 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원 및 AS03+MPL 어쥬번트를 함유한 미리 충전된 타입 I 유리 주사기로 구성된 2 성분 백신이다. 이는 실시예 II에 상세히 기술된 방법에 따라 제조되었다.
- <1075> 주사시에, 어쥬번트를 함유한 미리 충전된 주사기의 내용물을 농축된 3가 비활성화된 스플리트 비리온 항원을 함유한 바이알에 주입하였다. 혼합한 후, 내용물을 주사기로 회수하고, 니들을 근육내 니들로 교체하였다. 일 용량의 재구성되고 어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신은 0.7 ml에 상응한다. 어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신은 방부제-부재 백신이다.
- <1076> 일 용량의 재구성되고 어쥬번트된 인플루엔자 백신의 조성은 표 45에 제공되었다. 둘모두의 백신은 근육내로 제공되었다.

<1077> 표 45. 재구성된 백신 어쥬번트딘(AS03+MPL) 인플루엔자 후보물질 백신의 조성

성분	용량 당 양
비활성화된 스플리트 비리온	
- A/ 뉴 칼레도니아 /20/99 (H1N1)	15 µg HA
- A/ 뉴 캘리포니아 /7/2004 (H3N2)	15 µg HA
- B/ 지양수 /10/2003	15 µg HA
어쥬번트	
SB62 에멀전	
- (스쿠알렌)	10.68 mg
- (DL-알파-토코페롤)	11.86 mg
- (폴리소르베이트 80-트윈 80)	4.85 mg
MPL	25 µg

<1078>

<1079> XI.3. 면역성 결과

<1080> XI.3.1. 안티-HA 체액 면역 반응 종료점 및 결과

<1081> 관찰된 변수:

<1082> 0일 및 21일에: 백신으로 표시되는 세개의 인플루엔자 바이러스 균주(안티-H1N1, 안티-H3N2 및 안티-B-항체) 중 각각에 대해 별도로 시험된 혈청 적혈구응집-억제(HI) 항체 역가.

<1083> 유도된 변수(95% 신뢰 구간):

<1084> (f) 백신접종 전 및 후에 95% 신뢰 구간(95% CI)을 갖는 혈청 HI 항체의 기하급수 평균 역가(GMT)

<1085> (g) 21일째에 95% CI를 갖는 혈청전환율*

<1086> (h) 21일째에 95% CI를 갖는 혈청전환인자**

<1087> (i) 21일째에 95% CI를 갖는 혈청방어율***

<1088> * 혈청전환율은 각 백신 균주에 대해 백신접종전 HI 역가 <1:10 및 백신접종후 역가 ≥1:40, 또는 백신접종전 역가 ≥1:10 및 백신접종후 역가에서 최소 4배 증가를 갖는 백신의 퍼센트로서 규정된다.

<1089> ** 혈청전환 인자는 각 백신 균주에 대해 0일과 비교하여 21일에 혈청 HI GMT로서 배 증가로서 규정된다.

<1090> *** 방어율은 대개 지시하는 방어로서 사용되는 백신접종후(각 백신 균주에 대해) 혈청 HI 역가 ≥40인 백신의 퍼센트로서 규정된다.

<1091> 결과

<1092> 예상된 바와 같이, 대부분의 피검체는 백신접종 전에 모든 균에서 세개의 균주에 대해 이미 혈청반응양성이었다. 모두 3개의 백신 균주에 대해 백신접종전 GMT는 2개 균에서 동일한 범위내에 존재하였다. Fluarix 군과 비교하여 Flu AS03+MPL 군에서 모두 3개의 백신 균주에 대해 백신접종후 보다 높은 GMT의 경향을 나타내었으며, 95% CI는 오버랩핑되었다(도 25).

<1093> 두개의 인플루엔자 백신은 60세 이상의 피검체에서 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 충족한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)](표 46).

<1094> 표 46. 21일째에 혈청방어율 혈청전환을 및 전환 인자(면역성에 대한 ATP 코호트)

군주	군	N	혈청방어율 (HI역가≥40) %	혈청전환율 (4배 이상 증가) [95% CI] %	혈청전환인자 [95% CI] %
EU 표준 (>60)			>60%	>30%	>2.0
A/뉴 칼레도니아	Flu+MPL-AS03	38	89.5 [75.20-97.06]	31.6 [17.5-48.7]	3.1 [2.2-4.4]
	Fluarix	45	82.2 [67.95-92.00]	31.1 [18.2-46.6]	2.5 [1.8-3.5]
A/뉴욕(H3N2)	Flu+MPL-AS03	38	92.1 [78.62-98.34]	78.9 [62.7-90.4]	8.8 [6.1-12.5]
	Fluarix	45	95.6 [84.85-99.46]	68.9 [53.4-81.8]	6.0 [4.4-8.3]
B/지양수(B)	Flu+MPL-AS03	38	100 [90.75-100]	57.9 [40.8-73.7]	5.1 [3.7-7.0]
	Fluarix	45	100 [92.13-100]	37.8 [23.8-53.5]	3.1 [2.4-4.0]

N= 피검체의 총수; %= 특정범위내에 21일째 피검체의 퍼센트
CI = 신뢰 구간

<1095>

<1096> 실시예 XII - 두개의 상이한 농도로 AS03 및 MPL로 어쥬번트된 스플리트 인플루엔자 항원 제조물을 함유한 백신을 지닌 65세 이상의 노인 집단의 임상 시험

<1097> XII.1. 연구 디자인 및 목적

<1098> 성인(18 내지 40세)에 투여된 Fluarix™ 백신(벨기에에서 α-Rix™으로서 공지됨)과 비교하여 노인 집단(65세 이상)에 투여된 다양한 어쥬번트를 함유한 글락소스미스클라인 바이올로지칼스 인플루엔자 후보물질 백신의 세포 매개 면역 반응의 측면에서 비-열등성을 나타내기 위한 상 I/II, 개방, 무작위, 제어된 연구.

<1099> 네개의 유사한 군을 선정하였다:

<1100> (a) 일 용량의 Fluarix™를 수용한 일 대조군의 75명의 성인(18 내지 40세)

<1101> (b) 하기 세개의 군에 3:3:2로 무작위된 200명 노인 피검체(65세 이상)

<1102> - AS03+MPL로 어쥬번트된 인플루엔자 백신을 수용한 75명의 피검체로 이루어진 1군(농도 1 내지 25 μg)

<1103> - AS03+MPL로 어쥬번트된 인플루엔자 백신을 수용한 75명의 피검체로 이루어진 1군(농도 2 내지 50 μg)

<1104> - 일 용량의 Fluarix™를 수용한 50명 피검체로 이루어진 기준 Flu 군

<1105> 제 1 목적

<1106> 제 1 목적은 적어도 두개의 상이한 시토카인(CD40L, IL-2, TNF-α, IFN-γ)을 생산하는 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 빈도 측면에서 성인(18 내지 40세)에게 투여된 Fluarix™와 비교하여 노인 피검체(65세 이상)에게 투여된 인플루엔자 어쥬번트된 백신의 백신접종 후 21일째에 비-열등성을 나타내기 위한 것이다.

<1107> 제 2 목적

<1108> 제 2 목적은

<1109> (a) 노인 피검체(65세 이상)에 백신을 근육내 투여한 후 21일 동안 어쥬번트된 후보물질 인플루엔자 백신으로 백신접종의 안전성 및 반응성을 평가하고(Fluarix™를 기준물질로 사용함),

<1110> (b) 어쥬번트된 인플루엔자 후보물질 백신으로 백신접종한 후 21일, 90일 및 180일에 체액 면역 반응(안티-헤마글루티닌 역가)을 평가하기 위한 것이다(Fluarix™를 기준물질로 사용함).

<1111> 제 3 목적

<1112> 제 3 목적은 어쥬번트된 인플루엔자-백신으로 백신접종한 후 21일, 90일 및 180일에 세포 매개 면역 반응(IFN-γ, IL-2, CD40L, TNF-α의 생산 및 메모리 B-세포 반응)을 평가하기 위한 것이다.

<1113> XII.2. 백신 조성 및 투여

<1114> AS03+MPL로 어쥬번트된 인플루엔자 백신(용량 당 25 μg) 시스템을 실시예 XI에 기술된 연구에서 사용하였다. AS03+MPL로 어쥬번트된 인플루엔자 백신(용량 당 50 μg) 시스템은 MPL의 농도가 2배인 것을 제외하고 동일한 조성이다. 방법은 AS03+MPL로 어쥬번트된 인플루엔자 백신에 대해 실시예 VIII에 기술된 것과 동일하며, MPL의 농도가 2배인 차이만 있다.

<1115> 대조군: IM 투여에 의한 전체 용량의 Fluarix™
 <1116> 피검체 당 4번의 계획된 방문: 0일, 21일, 90일 및 180일에 혈액샘플을 각 방문시에 수집하여 면역성을 평가하였다.

<1117> 백신 스케줄: 0일째에 인플루엔자 백신의 일회 주사

<1118> **XII.3. 면역성 결과**

<1119> XII.3.1. CMI 종료점 및 결과

<1120> 1차 종료점의 평가.

<1121> 21일에: 적어도 두개의 상이한 시토카인(IL-2, IFN- γ , TNF- α , CD40L)을 생산하는 시험에서 10⁶ 당 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 빈도 측면에서 모든 피검체에서 CMI 반응.

<1122> CMI 반응을 평가하기 위하여, 인플루엔자-특이적 CD4의 빈도를 하기와 같이 분석하였다:

<1123> 어쥬번트된 백신으로 백신접종된 군과 Flu YNG로 백신접종된 군 간에 인플루엔자-특이적 CD4 빈도의 측면에서의 GM 비를 로그변환된 역가에 대해 ANCOVA 모델을 사용하여 수득하였다. ANCOVA 모델은 고정 효과로서 백신군을 포함하고, 회귀변수로서 백신접종전 로그-변형된 역가를 포함한다. GM 비 및 이의 98.75% CI는 모델에서 상응하는 군 대비의 지수-변형으로서 유도된다. 어쥬번트된 GM에 대한 98.75% CI는 상기 ANCOVA 모델의 그룹 최소자승 평균에 대한 98.75% CI의 지수-변형에 의해 수득하였다.

<1124> 결과 - 추정 분석(표 47)

<1125> "폴링된 항원 II"로 시험관내에서 재자극시킨 후 21일째에 적어도 두개의 시토카인(IL-2, IFN- γ , TNF- α , CD40L)을 생산하는 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 어쥬번트 GM 및 GM 비(98.75% CI)를 표 47에 나타내었다. 각 어쥬번트된 인플루엔자 백신에 대해, GM 비의 양쪽 98.75% CI의 상한치는 2.0의 임상 한계 미만으로 떨어져 있다. 이는 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종 후 빈도의 측면에서 18세 내지 40세의 성인에 투여된 Fluarix™ 백신과 비교하여 노인 피검체에 투여된 어쥬번트된 인플루엔자 백신 모두의 비-열등성을 나타낸다.

<1126> 표 47. 21일에, 적어도 2개의 시토카인을 생산하는 인플루엔자-특이적 CD4이 어쥬번트된 GM 비(면역성에 대한 ATP 코호트)

Flu YNG		AS03+MPL (conc. 1)		어쥬번트된 GM 비 (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 1)) 98.8% CI		
N	어쥬번트된 GM	N	어쥬번트된 GM	Value	LL	UL
70	1995.3	72	2430.0	0.82	0.65	1.04

Flu YNG		AS03+MPL (conc. 2)		어쥬번트된 GM 비 (Flu YNG / AS03+MPL (conc. 2)) 98.8% CI		
N	어쥬번트된 GM	N	어쥬번트된 GM	Value	LL	UL
70	1979.4	72	2603.8	0.76	0.59	0.98

<1127>
 <1128> 어쥬번트된 GM=기준선 역가에 대해 어쥬번트된 기하평균 항체; N=유효한 백신접종전 및 후 결과 모두를 갖는 피검체의 수; 98.8% CI=어쥬번트된 GM 비에 대한 98.8% 신뢰 구간(Ancova 모델:기준선에 대해 조정); LL=하한치, UL=상한치

<1129> 결과 - 기술분석(도 26)

<1130> 주요한 발견은 하기와 같다:

<1131> ● 백신접종 전에 CMI는 노인 보다 젊은 성인에서 더욱 높았다.

<1132> ● 백신접종 후에,

<1133> ○ 젊은 성인(18 내지 40세)에서의 CMI 반응에 대해 인플루엔자 백신의 상승효과를 나타내고,

<1134> ○ 수용된 어쥬번트된 인플루엔자 백신을 갖는 노인의 CMI 반응은 젊은 성인의 CMI 반응과 유사하다.

<1135> ● 평가된 모든 시토카인(IL-2, CD40L, TNF- α , IFN- γ)에 대한 CD4 T-림프구 반응의 백신접종 전 및 후의 차이는 본 출원인이 Fluarix(18 내지 40세) 및 Flu/AS03+MPL(농축물 1)을 비교하는 경우 IFN- γ 에 대한 것을 제외한 모든 시험에 대해 Fluarix™(18 내지 40세)와 비교하여 어쥬번트된 백신에서 현저하게 높았다.

<1136> 시험관내 자극은 백신에 포함된 A/H1N1/뉴 칼레도니아 대신에 Flu 균주 (i) B/지양수, (ii) A/H3N2/뉴욕 및 (iii) A/H3N2/와이오밍으로 수행되었다. 그러나, 피검체의 서브세트로부터의 A/H1N1/뉴 칼레도니아 백신 균주를 포함하는 사전 데이터는 그 결과가 유사할 것으로 지시된다.

<1137> 결과 - 3차 종료점의 평가(표 48)

<1138> 3차 종료점을 평가하기 위하여, 인플루엔자-특이적 CD4/CD8 T-림프구 및 메모리 B-세포의 빈도를 0일, 21일, 90일 및 180일에 측정하였다.

<1139> 인플루엔자-특이적 시토카인-양성 CD4/CD8 T-림프구의 빈도를 각 항원에 대해, 0일 및 21일에 각 백신접종군에 대해 요약하였다(기술 통계).

<1140> 비-파라메트릭 시험(Wilcoxon test)을 두개의 군(인플루엔자 어쥬번트된 백신 대 Fluarix™)의 차이의 위치를 비교하기 위해 사용하였고 통계학적 p-값을 각 상이한 시험에서 각 항원에 대해 계산하였다.

<1141> 21일/0일(백신접종후/전) 반응의 개개 차이의 기술 통계를 각 상이한 시험에서 각 백신접종군 및 각 항원에 대해 계산하였다.

<1142> 비-파라메트릭 시험(Wilcoxon test)을 개개 차이(백신접종후/전)를 비교하기 위해 사용하였고, 통계학적 p-값은 각 상이한 시험에서 각 항원에 대해 계산할 것이다.

<1143> 인플루엔자-특이적 CD4 T-림프구의 빈도의 차이를 비교하기 위한 윌콕슨 시험으로부터의 p-값을 표 48에 나타내었다.

<1144> 표 48. 추정 통계: 각 시점에서 CD4 T 세포에 대해 크루스칼-왈리스로부터의 p-값(면역성에 대한 ATP 코호트)

	p-값							
	군 1 및 Flu ELD		군2 및 Flu ELD		군 1 및 Flu YNG		군 2 및 Flu YNG	
	0일	21일	0일	21일	0일	21일	0일	21일
모두 더블	0.4380	0.0003	0.4380	0.0003	0.0000	0.9014	0.0005	0.4889
CD40L	0.3194	0.0002	0.3194	0.0002	0.0000	0.9841	0.0003	0.5412
IFN γ	0.5450	0.0004	0.5450	0.0004	0.0000	0.5397	0.0001	0.7895
IL2	0.3701	0.0008	0.3701	0.0008	0.0003	0.8557	0.0022	0.4766
TFN α	0.3716	0.0004	0.3716	0.0004	0.0000	0.8730	0.0013	0.2114

군 1: AS03+MPL로 어쥬번트된 인플루엔자 백신 (conc. 1)
 군 2: AS03+MPL로 어쥬번트된 인플루엔자 백신 (conc. 2)

<1145> <1146> 중요한 결론은 하기와 같다:

<1147> (a) 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종전 GM 빈도는 노인 피검체의 모든 군에서 유사하였지만 18세 내지 40세의 성인에서는 우수하였다.

<1148> (b) 인플루엔자-특이적 CD4 T 림프구의 백신접종후(21일) 빈도는 어쥬번트된 백신으로 백신접종된 노인 피검체 및 Fluarix™로 백신접종된 18세에서 40세의 성인에서 유사하였다.

<1149> (c) 노인 피검체에서, 인플루엔자-특이적 CD4 T 림프구의 백신접종후(21일) 빈도는 Fluarix™ 보다 어쥬번트된 백신으로 백신접종시킨 후 현저하게 높았다.

<1150> (d) 인플루엔자-특이적 CD8 T 세포의 백신접종전 및 백신접종후 GM 빈도는 필수적으로 모든 군에서 유사하였다.

<1151> 결과 - 체액 면역 반응 종료점의 평가

<1152> 관찰된 변수:

<1153> 0일, 21일, 90일 및 180일: 개별적으로 세계의 인플루엔자 바이러스 균주 각각에 대해 시험된 혈청 적혈구 응집-억제(HI) 항체 역가를 백신(안티-H1N1, 안티-H3N2 및 안티-B-항체)에 나타내었다.

- <1154> 모든 백신에 대해 HI 항체에 대한 컷-오프 값을 분석 전 실험에 의해 규정하였다(1:10임). 혈청음성 피검체는 항체 역가가 컷-오프 값 미만인 피검체이다. 혈청반응양성 피검체는 항체 역가가 컷-오프 값 이상인 피검체이다. 검정의 컷-오프 미만의 항체 역가는 컷-오프의 절반의 임의의 값을 제공한다.
- <1155> HI 항체 역가를 기초로 하여, 하기 파라미터를 계산하였다:
- <1156> (j) log 역가 변형의 평균의 안티-log를 수행하여 계산된 0일 및 21일에 HI 항체의 기하평균 역가(GMT).
- <1157> (k) 0일과 비교하여 21일에 혈청 HI GMT의 배 증가로서 규정된 21일에 혈청전환 인자(SF).
- <1158> (l) 백신접종전 HI 역가 <1:10 및 백신접종후 역가 $\geq 1:40$, 또는 백신접종전 역가 $\geq 1:10$ 및 백신접종후 역가에 서 최소 4배 증가를 갖는 백신의 퍼센트로서 규정된 혈청전환율(SC).
- <1159> (m) 혈청 HI 역가 ≥ 40 인 백신의 퍼센트로서 규정된 혈청방어율(SPR).
- <1160> GMI에 대해 95% CI는 별도로 각 군내에서 얻었다. log-변형된 역가의 평균에 대한 95% CI를 먼저 log-변형된 역가가 대개 알려지지 않은 백신으로 분포된 것으로 가정하여 수득하였다. 이후 GM에 대한 95% CI를 log-변형된 역가의 평균에 대해 95% CI의 지수-변형에 의해 수득하였다.
- <1161> 특정 항체 측정에 대한 보이지 않는 혈청학적 결과는 대체되지 않았다. 그러므로, 제공된 시점에서 혈청학적 결과가 없는 피검체는 이러한 시점에 대한 검정의 분석에 기여하지 않는다.
- <1162> 체액 면역 반응 결과(도 27 및 표 49)
- <1163> 모두 3개의 백신 군주에 대한 HI 항체의 백신접종전 GMT는 4개의 처리 군에서 동일한 범위를 나타내었다. 백신 접종 후에, 동일한 집단의 표준 Fluarix와 비교하여 노인 집단의 체액 반응을 증가시키는 2 어쥬번트의 명확한 영향을 나타내었다.
- <1164> GMT는
- <1165> ● AS03+MPL(농축물 2)에 대한 H1N1에 대해 현저하게 높았고,
- <1166> ● 모든 어쥬번트에 대한 H3N2 및 B에 대해 현저하게 높았다.
- <1167> 백신접종후 21일째에, Fluarix의 피검체(18 내지 40세)는 뉴 칼레도니아 및 B/장수 군주에 대해 보다 높은 HI 반응을 갖았다.
- <1168> 표 49에 나타낸 바와 같이, 어쥬번트된 인플루엔자 백신은 60세 이상의 피검체에서 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 초과한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)].
- <1169> 백신접종 후에, Fluarix(≥ 65 세) 군과 ● A/뉴 칼레도니아 군주에 대한 Flu AS03+MPL(농축물 2) 간의 HI 항체의 혈청방어율 측면에서 통계학적 차이를 갖는다.
- <1170> 각 백신 군주에 대해, 2개의 인플루엔자 어쥬번트된 백신 군에 대한 혈청방어율은 Fluarix(18 내지 40세) 군과 비교하여 동일한 범위를 갖는다.
- <1171> 백신접종 후에, Fluarix(≥ 65 세) 군과 ● A/뉴 칼레도니아 군주에 대한 Flu AS03+MPL(농축물 2), ● B/지양수 군주에 대한 Flu AS03+MPL(농축물 1) 간의 HI 항체의 혈청방어율 측면에서 통계학적 차이를 갖는다.
- <1172> 각 백신 군주에 대해, 2개의 인플루엔자 어쥬번트된 백신 군에 대한 혈청방어율은 뉴 칼레도니아 군주를 제외하고 Fluarix(18 내지 40세) 군과 비교하여 동일한 범위를 갖는다.

<1173> 표 49. 21일째에 혈청방어율, 혈청전환율 및 전환인자(면역성에 대한 ATP 코호트)

군주	군	N	혈청방어율 (HI역가 ≥ 40) %	혈청전환율 (4배 이상 증가) [95% CI]	전환인자 [95% CI] %
EU 표준 (>60세)			>60%	>30%	>2.0
EU 표준 (<60세)			>70%	>40%	>2.5
A/뉴 칼레도니아 (H1N1)	Flu 젊은 성인	75	100 [95.20-100]	77.3 [66.2-86.2]	35.1 [21.9-56.4]
	Flu 노인	49	71.4 [56.74-83.42]	30.6 [18.3-45.4]	3.7 [2.4-5.7]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	90.5 [81.48-96.11]	55.4 [43.4-67.0]	6.4 [4.5-9.0]
	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	98.7 [92.79-99.97]	74.7 [63.3-84.0]	9.2 [6.4-13.3]
A/뉴욕 (H3N2)	Flu 젊은 성인	75	93.3 [85.12-97.80]	76.0 [64.7-85.1]	9.2 [7.1-11.8]
	Flu 노인	49	81.6 [67.98-91.24]	69.4 [54.6-81.7]	8.2 [5.7-11.8]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	94.6 [86.73-98.51]	90.5 [81.5-96.1]	19.2 [14.6-25.3]

<1174>

B/지양수 (B)	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	93.3 [85.12-97.80]	82.7 [72.2-90.4]	15.0 [11.2-20.2]
	Flu 젊은 성인	75	100 [95.20-100]	80.0 [69.2-88.4]	13.9 [10.1-19.1]
	Flu 노인	49	93.9 [83.13-98.72]	81.3 [70.7-89.4]	4.3 [3.0-6.1]
	FluAS03+MPL (conc. 1)	75	95.9 [89.61-99.16]	79.0 [61.4-82.6]	8.5 [6.5-11.2]
	FluAS03+MPL (conc. 2)	75	98.7 [92.79-99.97]	66.7 [54.8-77.1]	7.6 [5.6-10.2]

N= 피검체의 총수; %=21일째에 특정범위내의 역가를 갖는 피검체의 퍼센트
CI=신뢰 구간

<1175>

<1176> XII.3.2. 면역성 결론

<1177> (a) 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종전 빈도는 18세 내지 40세의 성인과 비교하여 나이든 성인에서 현저하게 낮았다. Fluarix™로 백신접종한 후, 백신접종후 빈도(21일)는 젊은 성인과 비교하여 나이든 성인에서 열등하게 유지되었다. 반대로, 나이든 피검체의 어쥬번트된 백신으로 백신접종 후 인플루엔자-특이적 CD4의 백신접종 후 빈도의 측면에서 비-열등성은 18세 내지 40세의 성인에 Fluarix™로의 백신접종과 비교하여 나타내었다.

<1178> (b) HI 항체 반응의 측면에서 체액 면역 반응과 관련하여, 모든 인플루엔자 백신은 인플루엔자 비활성화된 백신의 연간 등록을 위한 유럽 위원회의 요구사항을 충족한다["Note for Guidance on Harmonisation of Requirements for Influenza Vaccines for the immunological assessment of the annual strain changes"(CPMP/BWP/214/96)]. 나이든 성인에서, 어쥬번트된 백신은 Fluarix™ 보다 인플루엔자 헤마글루티닌에 대한 보다 높은 체액 면역 반응의 경향을 개재하였다. Fluarix™와 비교하여 어쥬번트된 백신에 의해 나이든 피검체에 매개된 각 백신 군주에 대한 체액 면역 반응 간의 현저한 차이는 표 50에 나타내었다. Fluarix™로 백신접종된 18 내지 40세의 성인과 비교하여, 어쥬번트된 백신으로 백신접종된 나이든 피검체는 A/뉴욕 군주에 대해 21일째에 보다 높은 백신접종후 GMT 및 혈청전환인자에 대한 경향을 나타내었다.

<1179> 표 50. 나이든 피검체에서 어쥬번트된 백신과 Fluarix 간의 체액 면역 반응의 현저한 차이

	백신접종후 GMT	혈청전환 인자	혈청방어율	혈청전환율
Flu AS03+MPL (conc. 1)	A/뉴욕 B/지양수	A/뉴욕	-	B/지양수
Flu AS03+MPL (conc. 2)	A/뉴욕 B/지양수 A/뉴 칼레도니아	A/뉴 칼레도니아	A/뉴 칼레도니아	A/뉴 칼레도니아

<1180>

<1181> XII.4. 반응성 결과

<1182> XII.4.1. 부작용(AE)의 기록

<1183> 7일 기간(백신접종일 이후 6일째) 동안 발생하는 고려되는 증상(참조 표 51)을 기록하였다. 21일 기간(백신접종일 이후 20+3일째) 동안 발생하는 고려되지 않는 증상을 또한 기록하였다. 하기 AE의 세기를 표 52에 기술된 바와 같이 평가하였다.

표 51. 고려되는 국소/일반 부작용

고려되는 국소 AE	고려되는 일반 AE
주사부위의 통증	피로
주사부위의 붉어짐	열
주사부위의 부어오름	두통
혈종	근육통
	오한
	주사한 팔의 관절 통증
	다른 부위에 관절 통증

N.B. 온도는 저녁에 기록하였다. 하루의 다른 시간에 수행된 부가적 온도 측정이 있는 경우, 가장 높은 온도를 기록하였다.

표 52. 성인의 고려되는 증상에 대한 세기 크기

부작용	세기 등급	파라미터
주사부위의 통증	0	부재
	1	가볍게 누름
	2	사지를 움직일 수 있을 경우
	3	정상 활동을 방해
주사부위의 붉어짐		mm의 가장 큰 표면 직경 기록
주사부위의 부어오름		mm의 가장 큰 표면 직경 기록
주사부위의 혈종		mm의 가장 큰 표면 직경 기록
열*		°C/°F의 온도 기록
두통	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
피로	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
주사부위 및 다른 위치의 관절통증	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
근육통	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해
오한	0	부재
	1	쉽게 견뎌냄
	2	정상 활동을 간섭함
	3	정상 활동을 방해

* 열은 37.5°C (99.5°F) 이하의 겨드랑이 온도로서 규정된다.

국소 주사 부위 붉어짐/부어오름의 최대 세기는 하기와 같이 계수한다:

0은 0 mm이며; 1은 0 내지 20 mm 이하이며; 2는 20 미만 내지 50 mm 이하이며; 3은 50 mm미만이다.

- <1192> 열의 최대 세기는 하기와 같이 계수한다:
- <1193> 1은 37.5 미만 내지 38.0°C 이하이며; 2는 38.0 미만 내지 39.0°C 이하이며; 3은 39.0°C 초과이다.
- <1194> 평가자는 연구하는 동안 기록된 SAE를 포함하여, 모든 다른 AE, 즉 고려되지 않은 증상에 대한 세기를 평가하였다. 평가는 평가자의 임상적 판단을 기초로 한다. 기록된 각 AE의 세기는 하기 부류 중 하나로 지정된다:
- <1195> 1 (가벼운 정도) = 최소한의 불편함을 야기시키고 일상활동에 간섭받지 않은, 피검체가 용이하게 견디는 AE;
- <1196> 2 (중간정도) = 정상적인 일상활동에 간섭받기에 충분히 불편한 AE;
- <1197> 3 (심각한 정도) = 정상적인 일상활동을 방해되는 AE(성인/청소년에서, AE는 예를 들어 업무/학업의 수행을 방해하고 조정하는 치료제의 투여를 필요로 함).

<1198> XII.4.2. 부작용의 기록(AE)

- <1199> 국소 및 일반적 증상 모두의 측면에서, 어쥬번트된 백신을 지닌 나이든 피검체에서 관찰된 반응성은 동일한 집단에서 Fluarix™ 보다 높은 것으로 밝혀졌다. 그러나, 성인 집단에서 나타난 수준과 유사한 것으로 보였다. 증상의 발생률 및 세기는 Fluarix™로 백신접종된 나이든 피검체에서 나타난 반응성과 비교하여 어쥬번트된 백신으로 백신접종한 후 증가되었다(도 28). 모든 경우에서, 증상은 빠르게 호전되었다.
- <1200> 등급 3 증상은 MPL이 가장 낮은 농도인 어쥬번트된 백신을 수용한 군과 비교하여 가장 높은 MPL 농도로 어쥬번트된 백신을 수용한 군에서 보다 높은 경향을 나타내었다. 그러나 모든 경우에서, 증상은 빠르게 호전되었다.

도면의 간단한 설명

- <32> 도 1: PCS에 의해 측정되는, SB62 수중유 에멀전 중의 오일 점적 입자 크기의 분포. 도 1a는 맬번 제타사이저 (Malvern Zetasizer) 3000HS로 SB62 로트(lot) 1023 크기 측정으로 보여준다: A = 1/1000 회석(Rec22 내지 Rec24)(콘틴(Contin) 및 변형 광학 모델에서 분석 1.5/0.01); B = 1/20000 회석(Rec28 내지 Rec30)(콘틴) 및 변형 광학 모델에서 분석 1.5/0.01). 도 1b는 세기에 의한 레코드(22)(상부) 및 레코드(23)(하부)의 개략적으로 도시한 것이다.
- <33> 도 2: MPL 벌크의 제조에 대한 개략도.
- <34> 도 3: AS03+MPL 어쥬번트의 제조에 대한 개략도.
- <35> 도 4: Explo Flu-001 임상 시험. 스플리트 인플루엔자 항원에 대한 CD4 T 세포 반응(Q1 = 일사분위, Q3 = 삼사분위).
- <36> 도 5: Explo Flu-001 임상 시험. 스플리트 인플루엔자 항원에 대한 CD8 T 세포 반응(Q1 = 일사분위, Q3 = 삼사분위).
- <37> 도 6: Explo Flu-001 임상 시험. 플루아릭스(Fluarix) + AS03에 의한 백신접종 후 스플리트 인플루엔자 바이러스 항원에 대한 교차 반응성 CD4 T 세포 반응.
- <38> 도 7: Explo Flu-001 임상 시험. 백신접종 후 B 세포 기억 반응.
- <39> 도 8: Explo Flu-002 임상 시험. 재백신접종 후 스플리트 인플루엔자 항원에 대한 CD4 T 세포 반응.
- <40> 도 9: Explo Flu-002 임상 시험. 재백신접종 후 항-HI 역가.
- <41> 도 10: 환족제비 연구 I. 온도 모니터링(1차투여 및 2차투여). 도 10a는 1차 투여이고, 도 10b는 2차투여이다.
- <42> 도 11: 환족제비 연구 I. 바이러스 발산.
- <43> 도 12: 환족제비 연구 II. 온도 모니터링(1차투여 및 2차투여). 도 12a는 1차 투여이고, 도 12b는 2차투여이다.
- <44> 도 13: 환족제비 연구 II. 바이러스 발산.
- <45> 도 14: 환족제비 연구 II. H3N2 A/파나마(백신 균주)에 대한 HI 역가(도 14a) 및 H3N2 A/와이오밍에 대한 HI 역가(2차투여 균주)(도 14b).

- <46> 도 15: 마우스 연구. 재자극 항원으로서 불활성화된 전 바이러스를 사용하여 C57BI/6 1차 투여된 마우스에서의 CD4 T 세포의 빈도(면역화후 7일째).
- <47> 도 16: 마우스 연구. 재자극 항원으로서 불활성화된 전 바이러스를 사용하여 C57BI/6 1차 투여된 마우스에서의 CD8 T 세포의 빈도(면역화후 7일째).
- <48> 도 17: 마우스 연구. 재자극 항원으로서 불활성화된 전 바이러스를 사용하여, 이중 균주로 1차 투여된 C57BI/6 마우스에서의 CD4(상부) 및 CD8(하부) T 세포의 빈도(면역화후 7일째).
- <49> 도 18: 사람 임상 시험. 플루아릭스, 플루아릭스 + AS03, 플루아릭스 + AS03 + MPL로 중장년층을 백신접종한 후 B 세포 기억 반응(전 및 후의 차이).
- <50> 도 19: 흰족제비 연구 III. 2차투여 전 및 후의 온도 모니터링.
- <51> 도 20: 흰족제비 연구 III. 2차투여 전 및 후의 바이러스 발산.
- <52> 도 21: 흰족제비 연구 III. H3N2 A/와이오밍에 대한 HI 역가(백신 균주).
- <53> 도 22: 흰족제비 연구 III. H3N2 A/파나마에 대한 HI 역가(2차투여 균주).
- <54> 도 23: 사람 임상 시험. 백신접종후 제 21, 90 및 180일에서의 HI 역가(GMT)(지속성).
- <55> 도 24: 사람 임상 시험. CD4 반응 - 모두 이중 시험 - 백신접종후 제 21, 90 및 180일에서의 푸울 항원(지속성).
- <56> 도 25: 사람 임상 시험. 플루아릭스와 비교하여 AS03 + MPL에 의한 재백신접종 임상 시험에서의 HI 역가.
- <57> 도 26: 사람 임상 시험. CD4 반응에 대한 CMI - 모두 이중 시험 - 0일 및 21일에서의 푸울 항원.
- <58> 도 27: 두가지 농도에서의 AS03 + MPL로의 사람 임상 시험. 0일 및 21일에서의 HI 역가.
- <59> 도 28: 두가지 농도에서의 AS03 + MPL로의 사람 임상 시험. 반응생성력.

도면

도면1aa

회석액 A

Rec22

크기 (nm)	세기	부피
27.9	0.0	0.0
32.2	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.1	0.0	0.0
49.8	0.0	0.0
57.6	0.0	0.0
66.6	0.0	1.1
77.0	1.0	4.8
89.1	4.0	10.3
103.0	8.4	14.7
119.1	13.3	16.6
137.7	17.3	15.9
159.3	18.8	13.4
184.2	17.1	10.2
212.9	12.3	7.0
246.2	6.2	4.0
284.7	1.5	1.7
329.2	0.0	0.4
380.6	0.0	0.0
440.1	0.0	0.0
508.9	0.0	0.0
588.5	0.0	0.0
680.4	0.0	0.0
786.8	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	160.0	122.3

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	141.3	116.6

수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	109.8	62.5

Rec23

크기 (nm)	세기	부피
23.0	0.0	0.0
27.0	0.0	0.0
31.7	0.0	0.0
37.3	0.0	0.0
43.9	0.0	0.0
51.5	0.0	0.0
60.6	0.0	1.2
71.2	1.1	5.3
83.7	3.8	10.9
98.4	8.0	15.0
115.6	13.0	16.4
135.9	17.2	15.4
159.7	19.2	12.9
187.7	17.7	9.9
220.7	12.8	6.9
269.4	6.1	4.1
304.8	1.2	1.8
358.3	0.0	0.4
421.1	0.0	0.0
495.0	0.0	0.0
581.8	0.0	0.0
683.8	0.0	0.0
803.7	0.0	0.0
944.6	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	161.7	135.3

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	139.8	128.6

수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	102.0	59.8

도면1ab

Rec24

크기 (nm)	세기	부피
20.2	0.0	0.0
24.0	0.0	0.0
28.6	0.0	0.0
34.0	0.0	0.0
40.4	0.0	0.0
48.0	0.0	0.0
57.1	0.0	0.5
67.9	0.4	3.5
80.7	2.9	9.5
95.9	7.6	15.4
114.0	13.7	18.1
135.6	19.2	17.4
161.2	21.3	14.4
191.7	18.9	10.6
227.9	12.0	6.7
271.0	3.9	3.2
322.2	0.0	0.8
383.1	0.0	0.0
465.5	0.0	0.0
541.5	0.0	0.0
643.9	0.0	0.0
765.5	0.0	0.0
910.2	0.0	0.0
1082.2	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	160.2	130.1

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	139.1	126.2

수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	104.2	63.0

도 1A

회색액 B

Rec28

크기 (nm)	세기	부피
22.2	0.0	4.1
26.2	0.2	9.7
30.9	0.1	7.1
36.4	0.0	1.5
42.9	0.0	0.0
50.5	0.0	0.0
59.6	0.0	0.0
70.2	0.0	1.2
82.7	1.8	5.1
97.5	6.2	10.4
114.9	13.1	14.3
135.5	20.1	15.3
159.7	23.5	13.4
188.2	20.9	9.9
221.8	12.0	5.6
261.4	2.1	2.0
308.1	0.0	0.3
363.2	0.0	0.0
428.1	0.0	0.0
504.5	0.0	0.0
594.6	0.0	0.0
700.9	0.0	0.0
826.1	0.0	0.0
973.6	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	99.7	159.3	111.5

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	22.5	27.6	10.3
2	77.5	143.3	116.1

수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	96.4	27.2	9.8
2	3.6	115.4	68.8

도면1ac

Rec29

크기 (nm)	세기	부피
28.1	0.0	0.0
32.5	0.0	0.0
37.6	0.0	0.0
43.4	0.0	0.0
50.2	0.0	0.0
58.1	0.0	0.3
67.1	0.2	2.1
77.6	1.5	5.9
89.7	4.2	10.6
103.7	8.3	14.2
119.9	12.8	15.6
138.6	16.6	14.9
160.2	18.3	12.8
185.2	17.0	10.0
214.1	12.6	7.0
247.6	6.7	4.3
286.2	1.9	2.0
330.9	0.0	0.5
382.5	0.0	0.0
442.2	0.0	0.0
511.2	0.0	0.0
591.0	0.0	0.0
683.2	0.0	0.0
789.8	0.0	0.0

세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	161.7	127.0

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	141.4	124.5

수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	105.8	62.6

Rec30

크기 (nm)	세기	부피
29.1	0.0	0.0
33.5	0.0	0.0
38.6	0.0	0.0
44.4	0.0	0.0
51.2	0.0	0.0
58.9	0.0	0.3
67.9	0.2	2.1
78.2	1.5	6.0
90.1	4.3	10.7
103.7	8.3	14.2
119.5	12.8	15.6
137.6	16.5	14.9
158.5	18.1	12.8
182.6	16.9	10.0
210.3	12.6	7.0
242.3	6.8	4.2
279.1	2.0	1.9
321.5	0.0	0.4
370.3	0.0	0.0
426.5	0.0	0.0
491.3	0.0	0.0
565.9	0.0	0.0
651.8	0.0	0.0
750.8	0.0	0.0

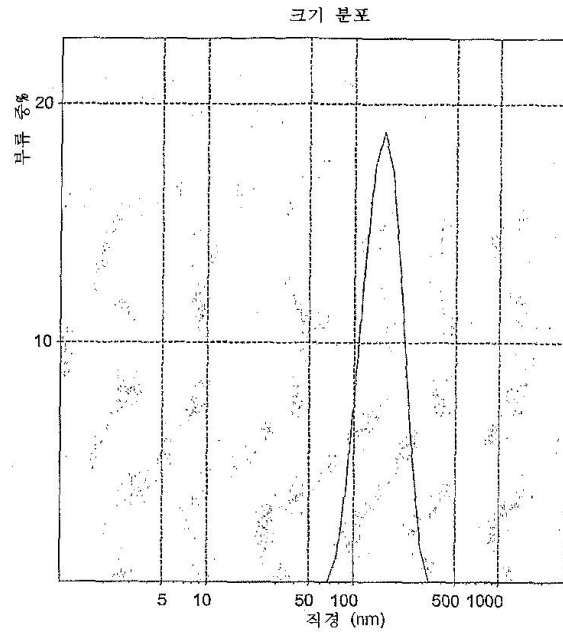
세기에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	159.8	123.3

부피에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	139.6	119.8

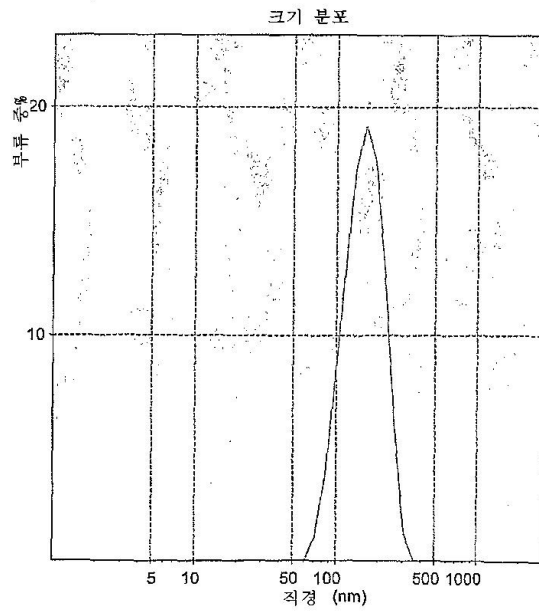
수에 의한 피크 분석			
피크	면적	평균	폭
1	100.0	106.0	62.1

도면1b

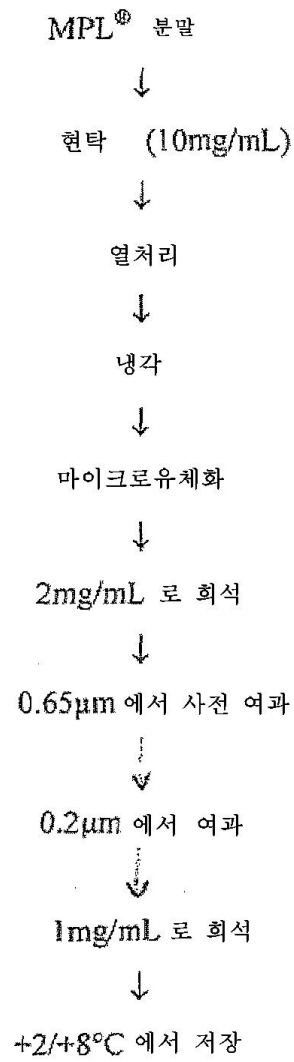
기록 22, 세기



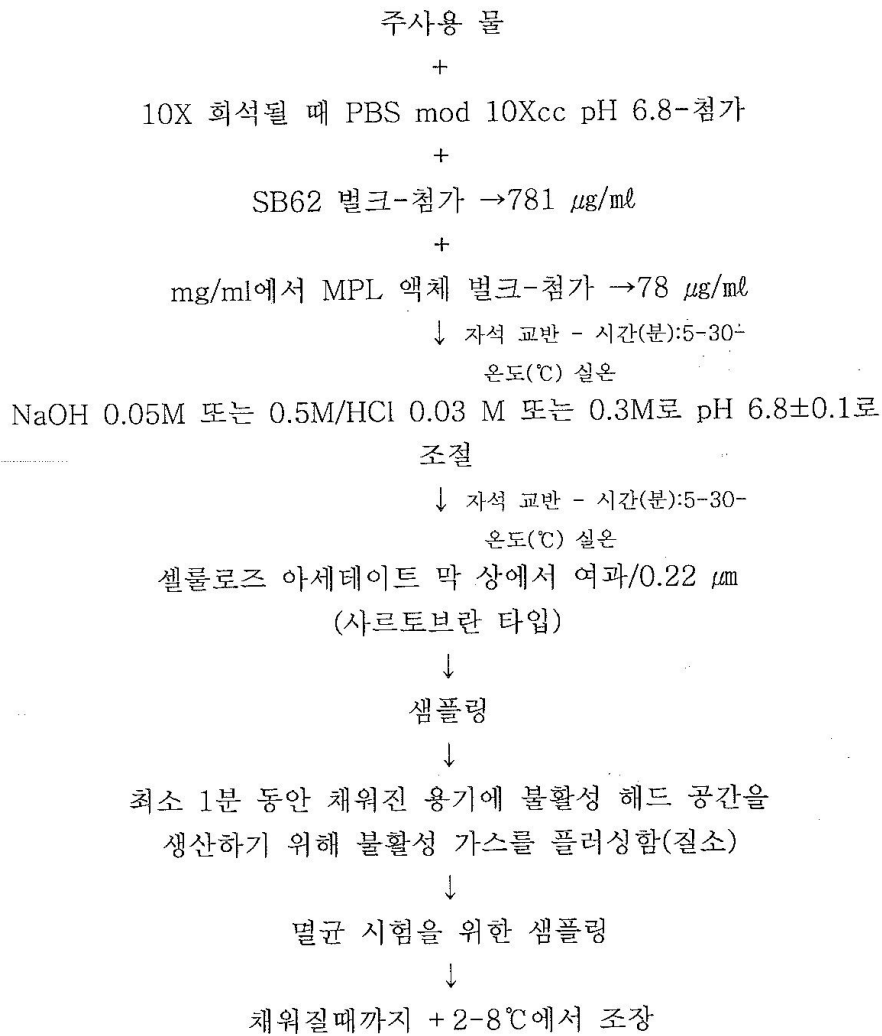
기록 23, 세기



도면2

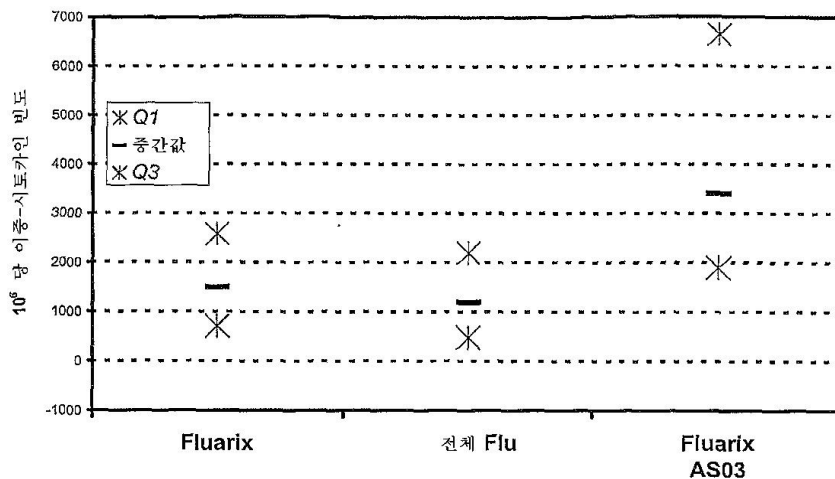


도면3

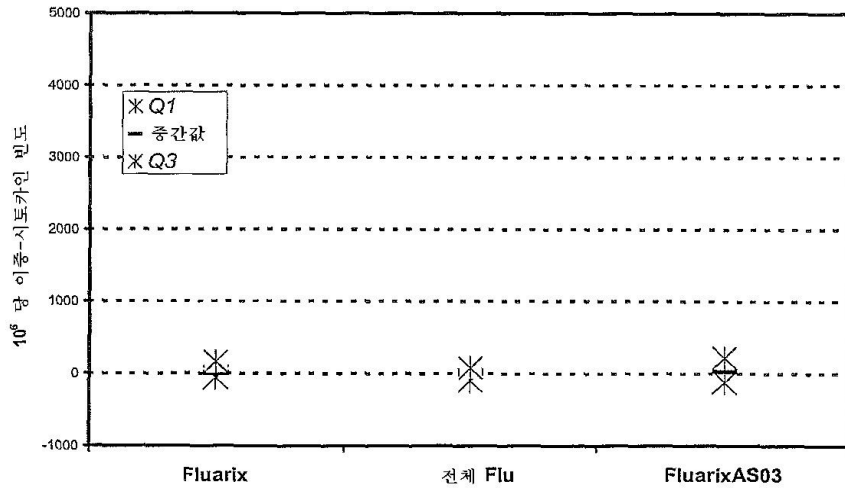


참조: 백신 벌크는 전체 포물레이션 공정 동안 교반하에서 유지됨

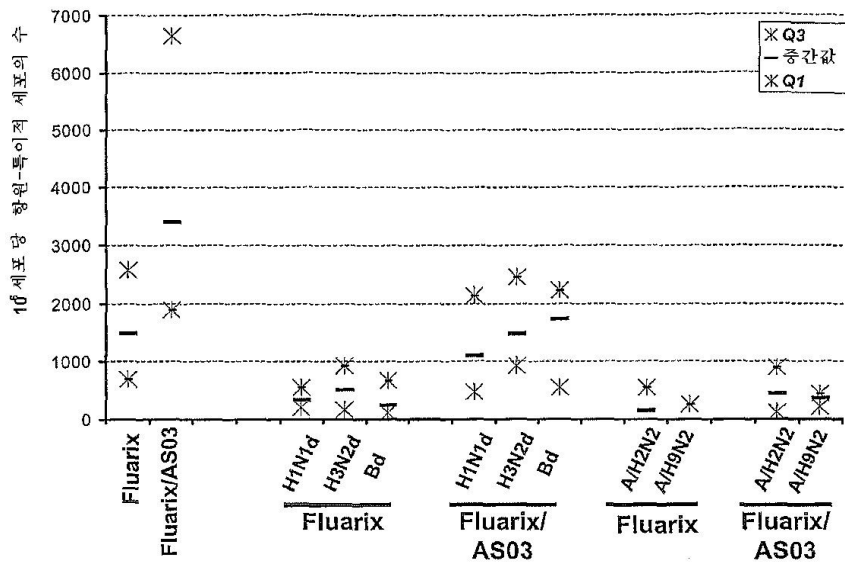
도면4



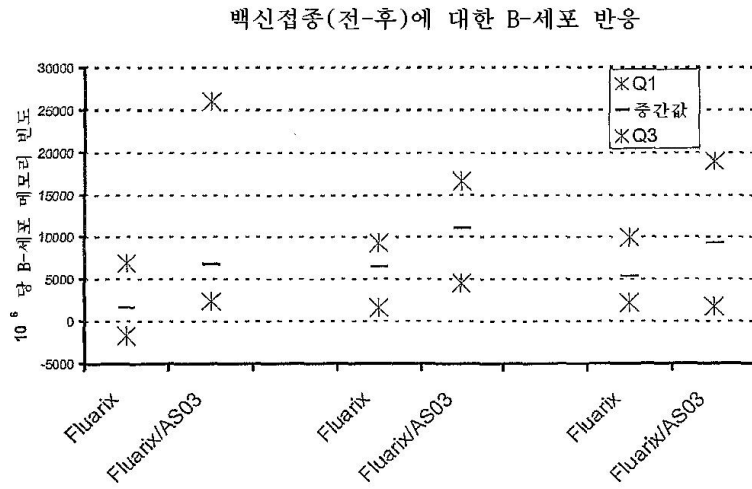
도면5



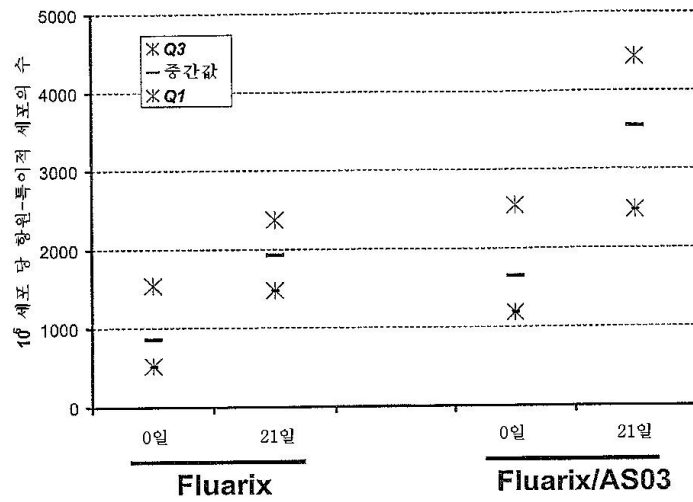
도면6



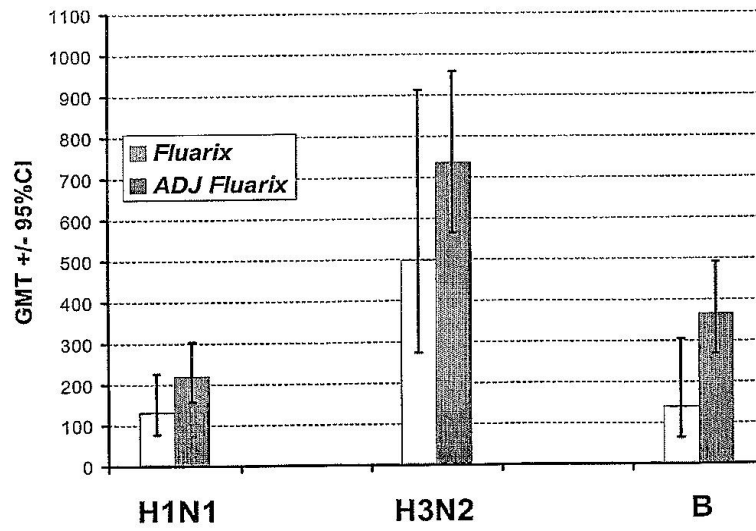
도면7



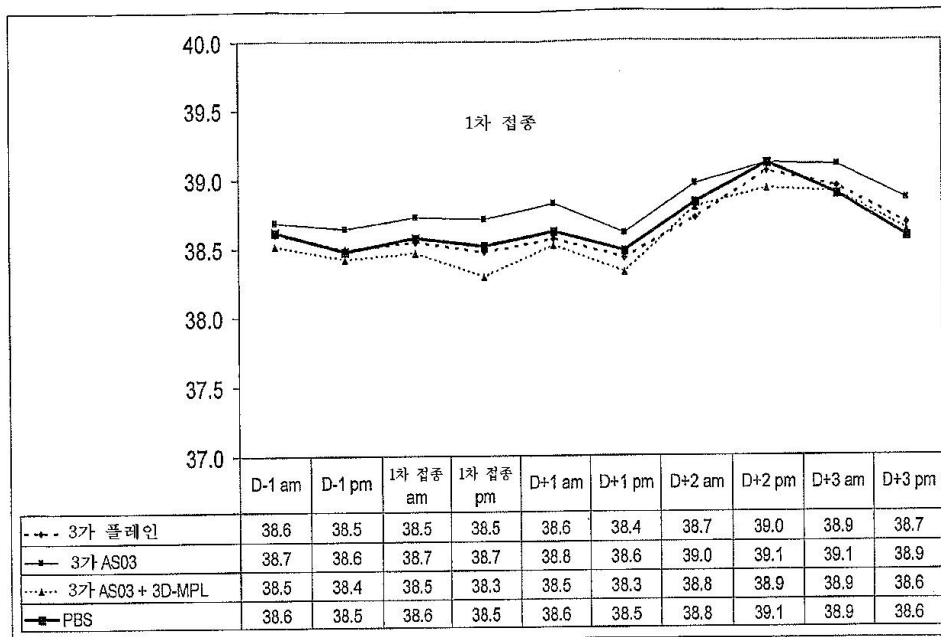
도면8



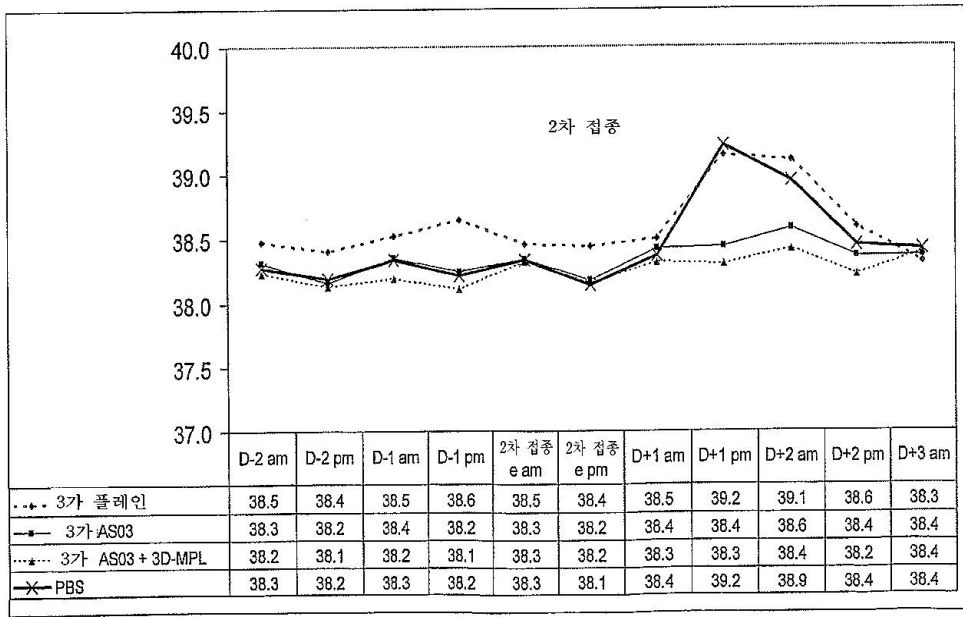
도면9



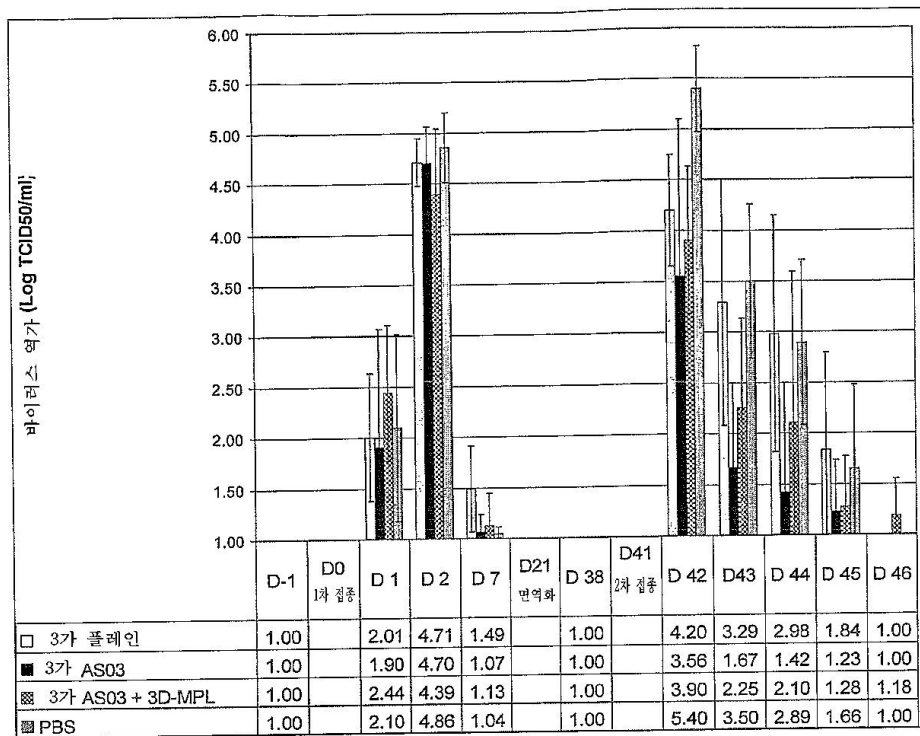
도면10a



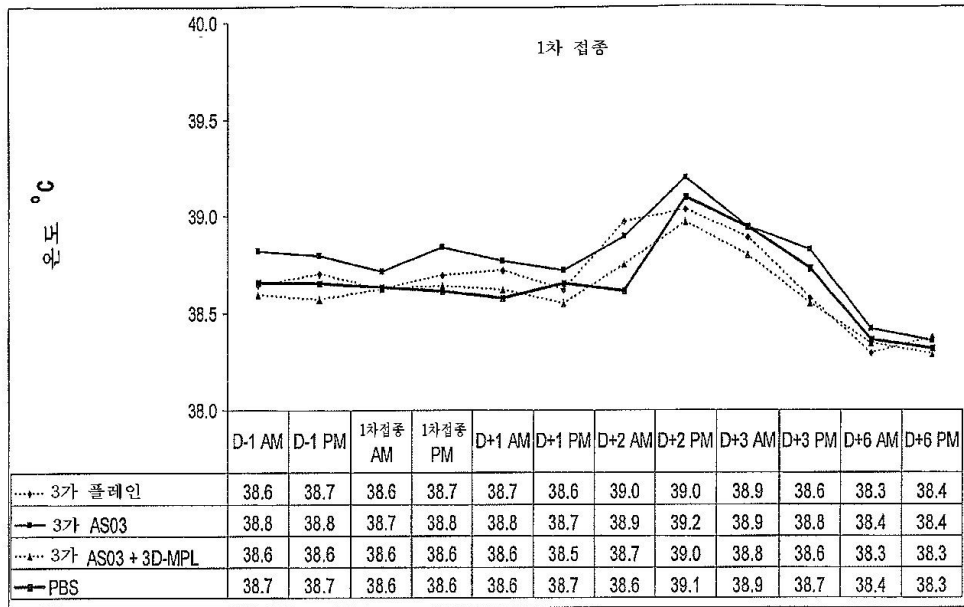
도면10b



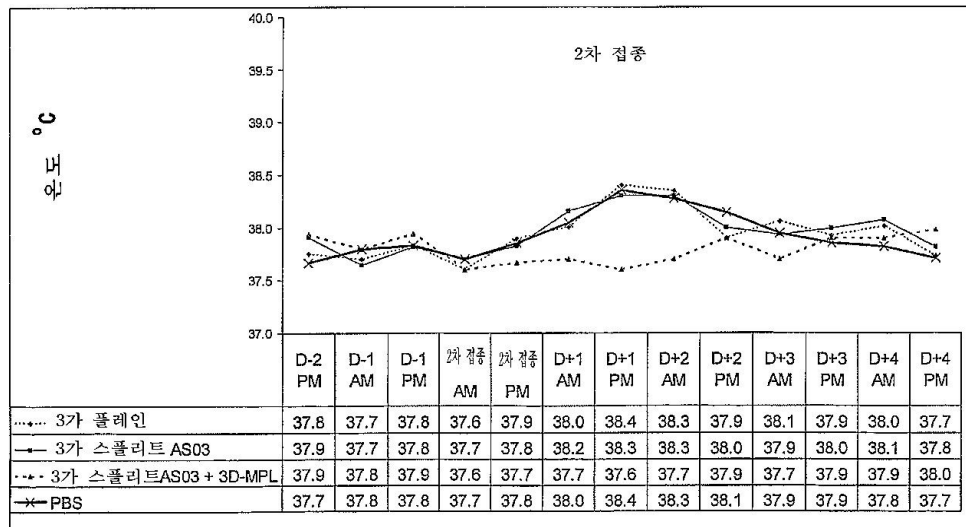
도면11



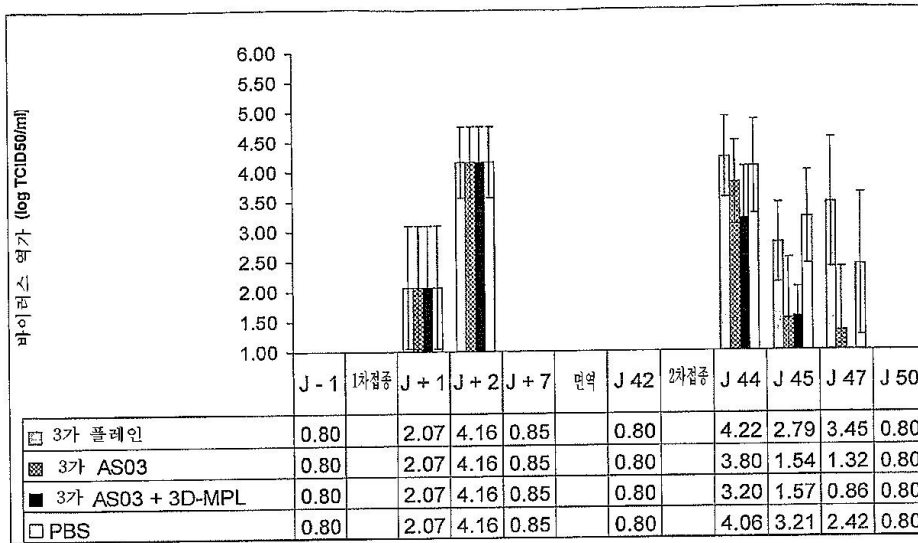
도면12a



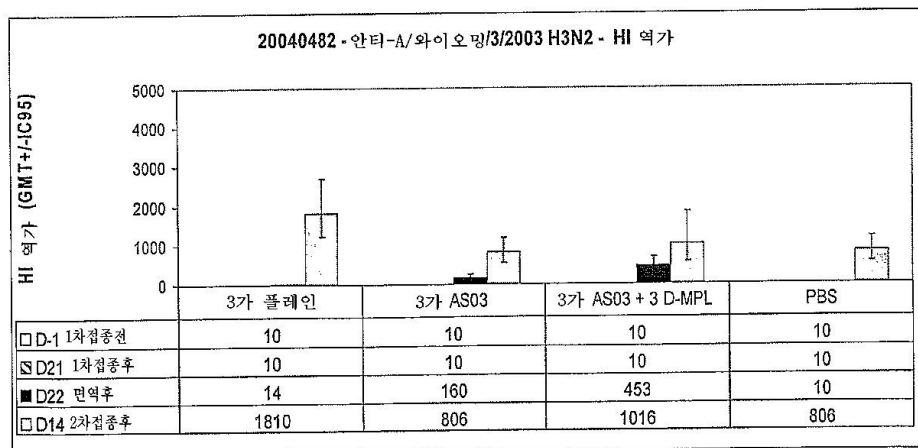
도면12b



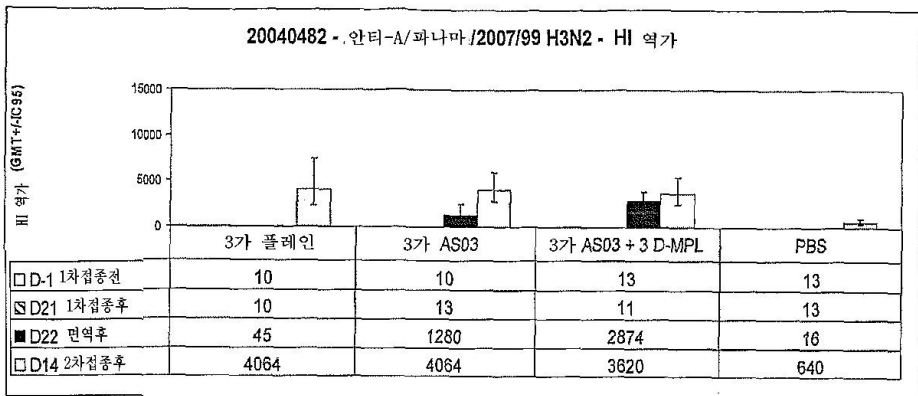
도면13



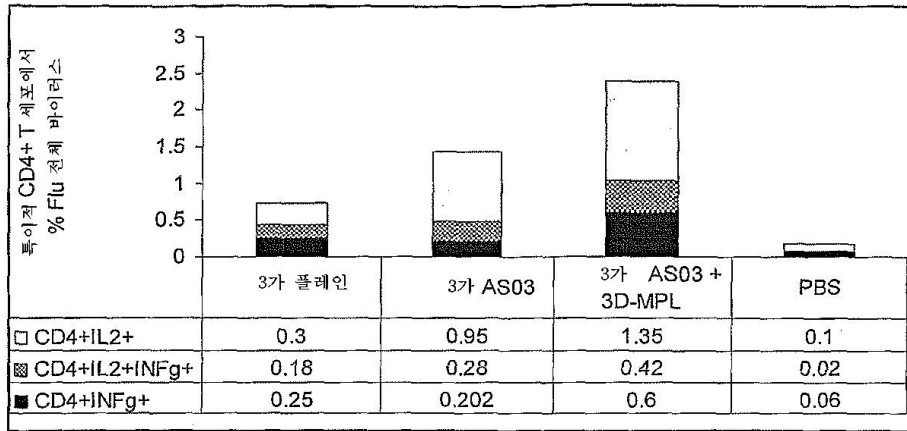
도면14a



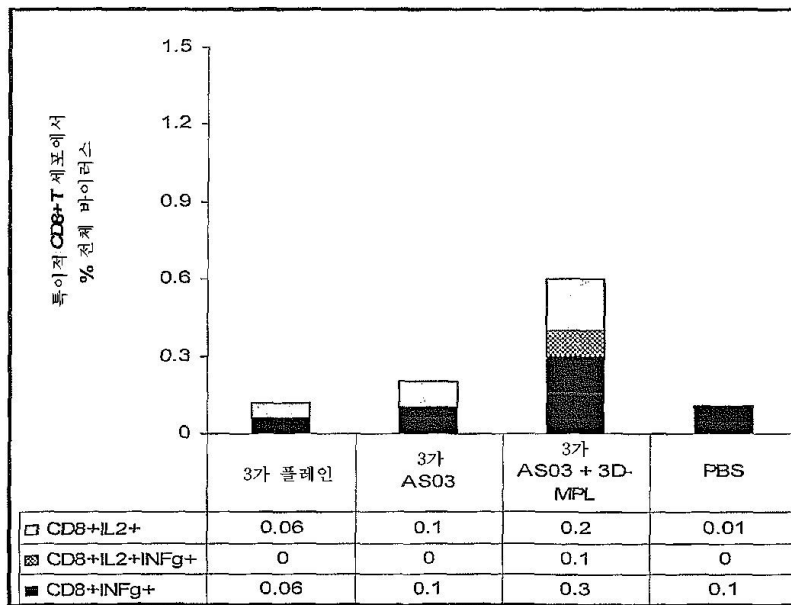
도면14b



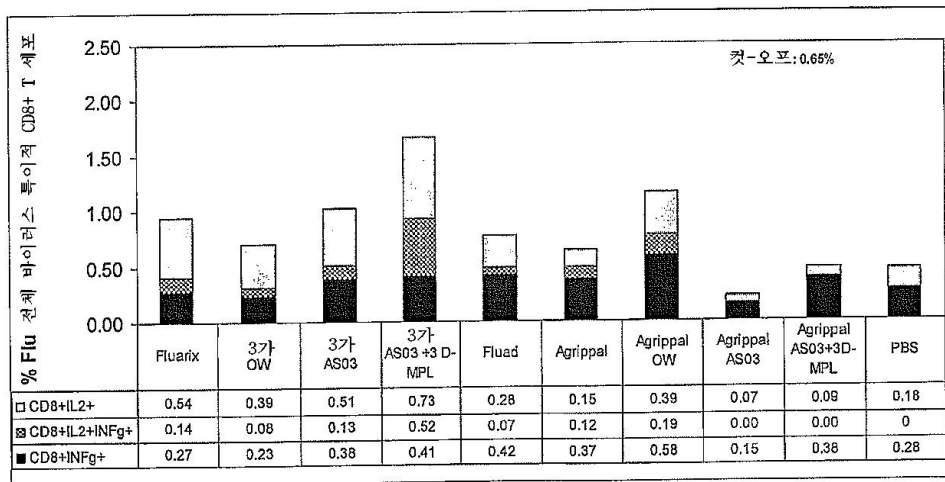
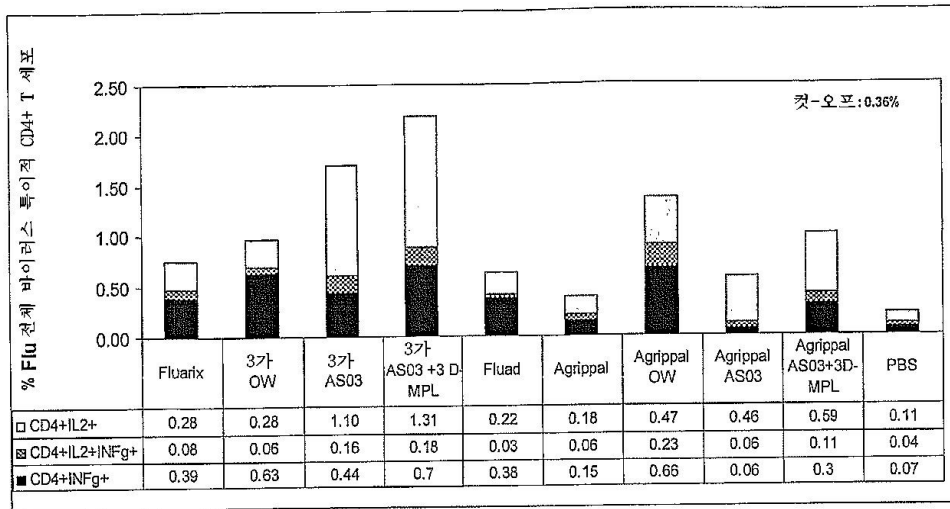
도면15



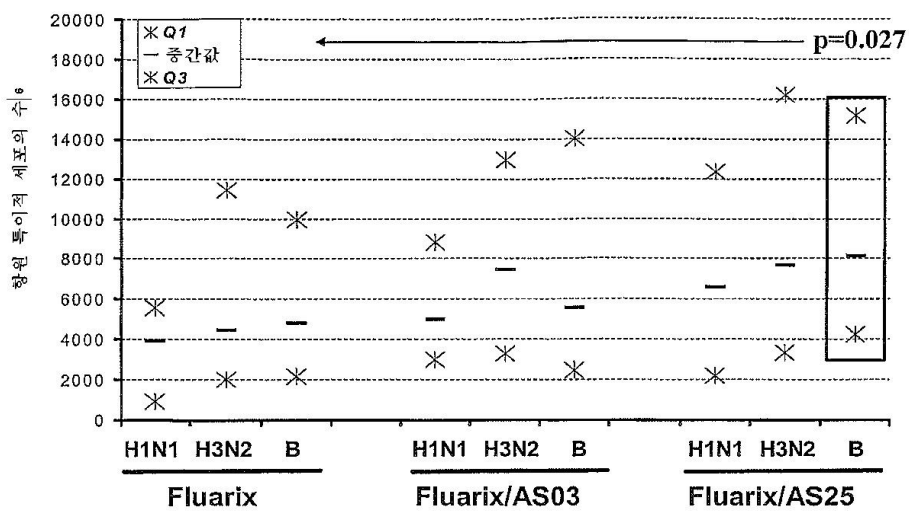
도면16



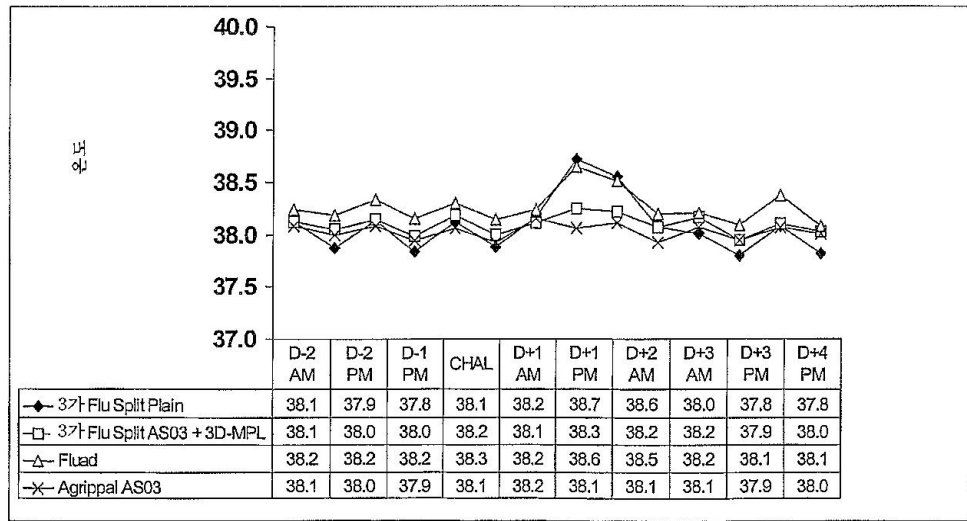
도면17



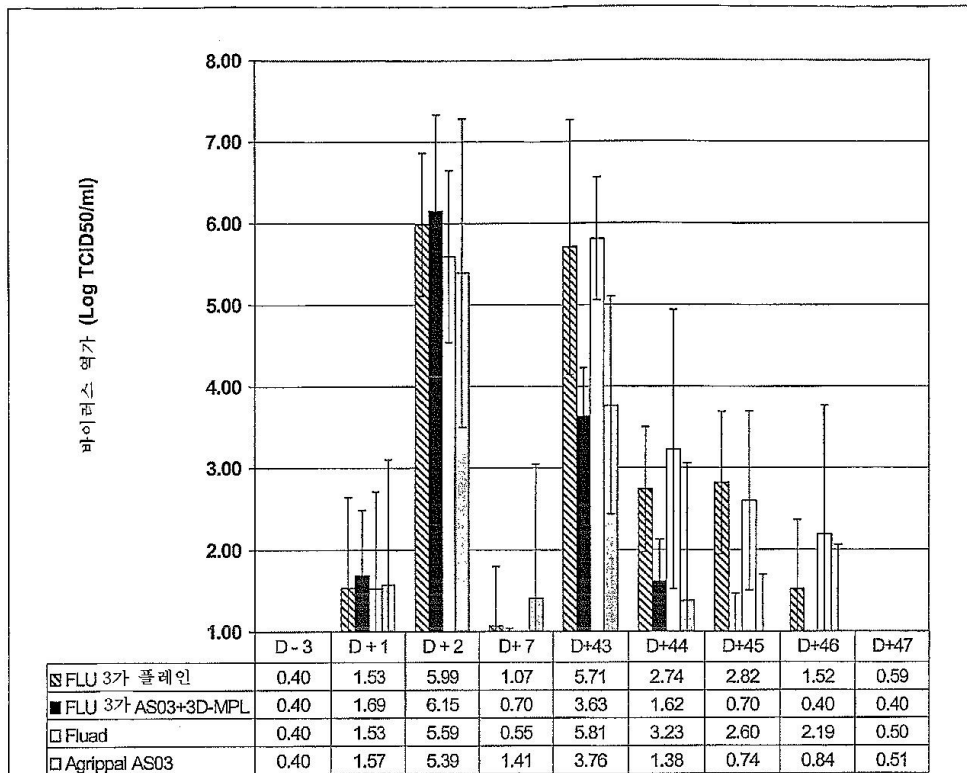
도면18



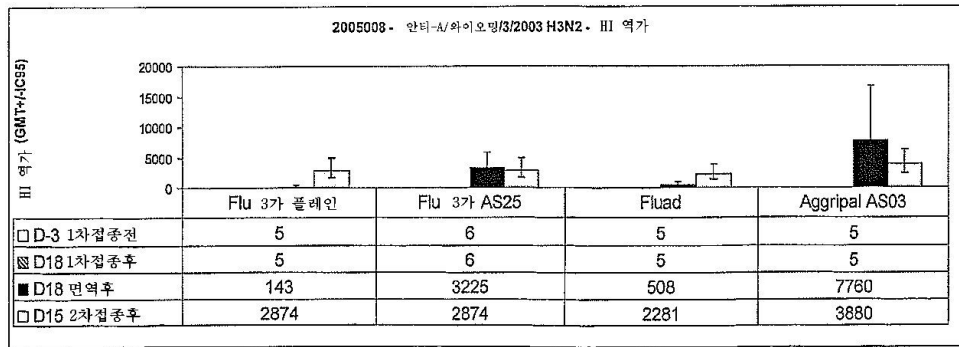
도면19



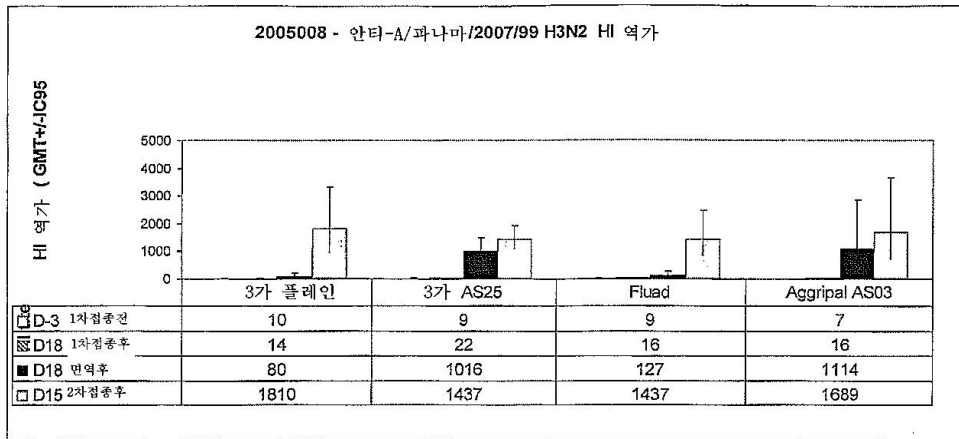
도면20



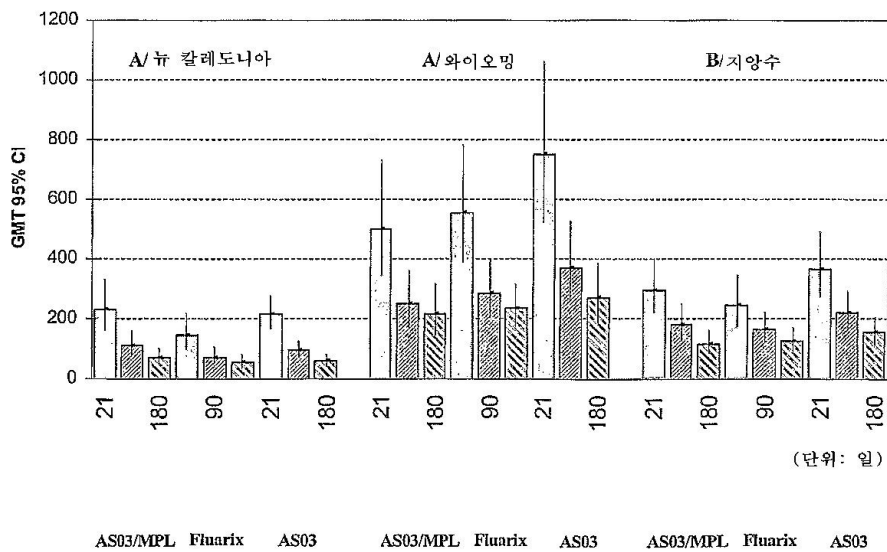
도면21



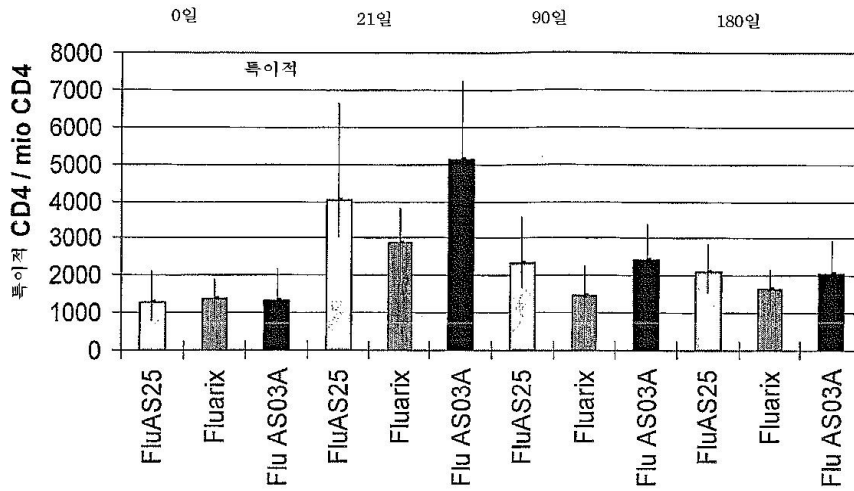
도면22



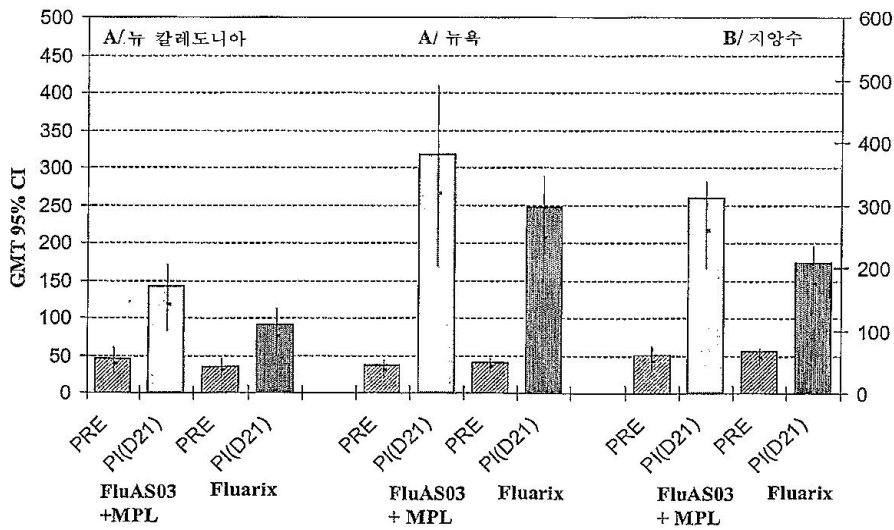
도면23



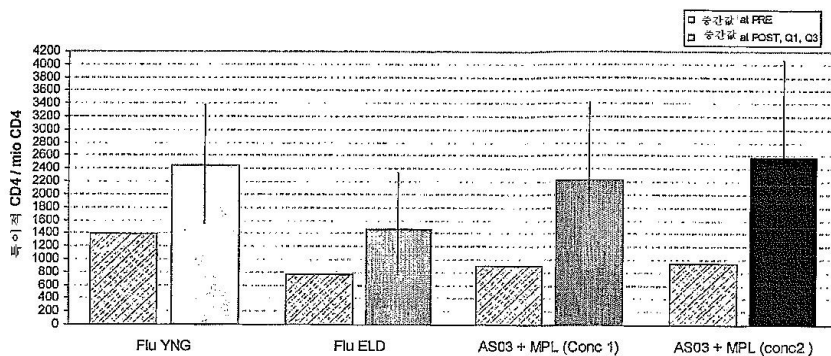
도면24



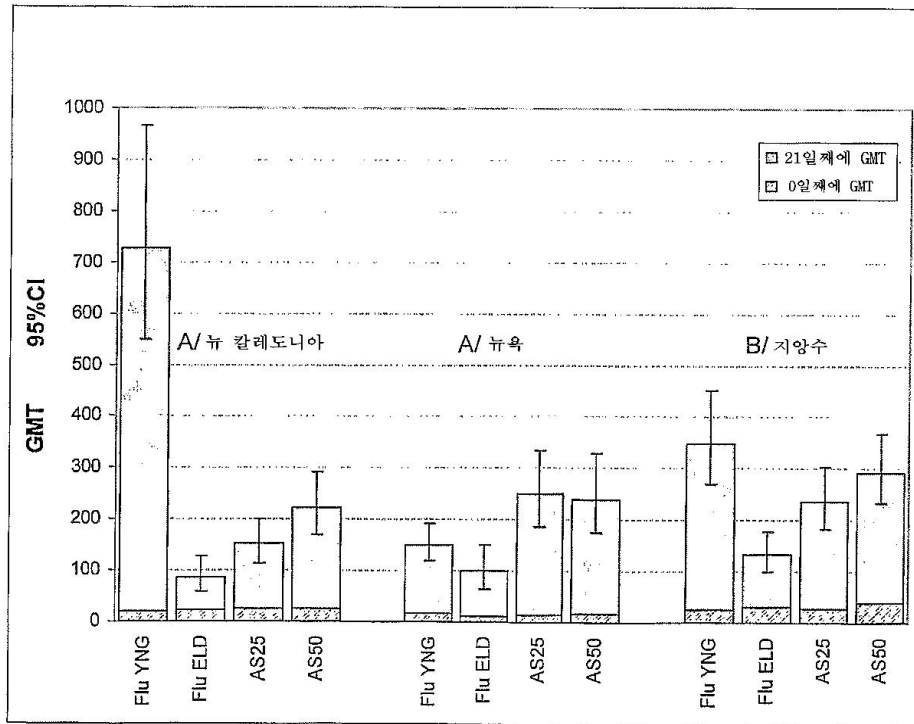
도면25



도면26



도면27



도면28

보고된 증상% (95%CI)

