



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년10월18일
 (11) 등록번호 10-1787217
 (24) 등록일자 2017년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/107 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C07K 1/1077 (2013.01)
A61K 39/09 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-7016155
 (22) 출원일자(국제) 2013년12월13일
 심사청구일자 2015년06월17일
 (85) 번역문제출일자 2015년06월17일
 (65) 공개번호 10-2015-0085070
 (43) 공개일자 2015년07월22일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2013/060933
 (87) 국제공개번호 WO 2014/097099
 국제공개일자 2014년06월26일
 (30) 우선권주장
 61/740,311 2012년12월20일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02011138636 A1*
 Carbohydrate Research, Vol 346, Pages
 343-347(2011)*
 J. Org. Chem., Vol 61, Pages 7452-7454(1996)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
화이자 인코포레이티드
 미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트
 235
 (72) 발명자
한, 밍밍
 미국 18064 펜실베이니아주 나사렛 올드 타운 로드
 2302
카인튼, 라제쉬 쿠마
 미국 10983 뉴욕주 타판 키 플레이스 15
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 **당접합 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 일반적으로 산화 작용제로서의 안정한 니트록실 라디칼 관련 작용제/산화제를 사용하여 운반체 단 백질에 접합된 사카라이드를 함유하는 당접합체를 제조하는 방법, 이러한 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물, 및 이러한 당접합체 및 면역원성 조성물의 사용을 위한 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/646 (2017.08)

C07H 3/06 (2013.01)

C07K 14/195 (2013.01)

C07K 19/00 (2013.01)

A61K 2039/6037 (2013.01)

(72) 발명자

김, 진-환

미국 10901 뉴욕주 서편 서머셋 드라이브 44

프라사드, 아바리 크리슈나

미국 27516 노스캐롤라이나주 채플힐 워싱턴 드라이브 105

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 박테리아 협막 폴리사카라이드를 안정한 니트록실 라디칼 화합물 및 산화제와 반응시켜 활성화 박테리아 협막 폴리사카라이드를 생산하는 단계; 및
- b) 활성화 박테리아 협막 폴리사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하고,

상기 산화제가 니트록실 라디칼 화합물의 존재 하에 1급 알콜을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는 N-할로 모이어티를 보유하는 분자인, 운반체 단백질에 접합된 박테리아 협막 폴리사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물이 산화제의 존재 하에 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알콜을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물이 산화제의 존재 하에 카르복실 기로의 과잉 산화 없이 1급 알콜을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물이 산화제의 존재 하에 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알콜을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는 TEMPO 또는 PROXYL (2,2,5,5-테트라메틸-1-피롤리딘옥시) 모이어티를 보유하는 분자인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물이 산화제의 존재 하에 카르복실 기로의 과잉 산화 없이 1급 알콜을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는 TEMPO 또는 PROXYL (2,2,5,5-테트라메틸-1-피롤리딘옥시) 모이어티를 보유하는 분자인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 니트록실 라디칼 화합물이 TEMPO, 2,2,6,6-테트라메틸-4-(메틸술폰닐옥시)-1-피페리딘옥시, 4-포스포노옥시-TEMPO, 4-옥소-TEMPO, 4-메톡시-TEMPO, 4-이소티오시아네이트-TEMPO, 4-(2-아이오도아세트아미도)-TEMPO 자유 라디칼, 4-히드록시-TEMPO, 4-시아노-TEMPO, 4-카르복시-TEMPO, 4-(2-브로모아세트아미도)-TEMPO, 4-아미노-TEMPO, 및 4-아세트아미도-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘 1-옥실로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 니트록실 라디칼 화합물이 3β-DOXYL-5α-콜레스탄, 5-DOXYL-스테아르산, 16-DOXYL-스테아르산, 메틸 5-DOXYL-스테아레이트, 3-(아미노메틸)-PROXYL, 3-카르바모일-PROXYL, 3-카르바모일-2,2,5,5-테트라메틸-3-피롤린-1-옥실, 3-카르복시-PROXYL, 및 3-시아노-PROXYL로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 니트록실 라디칼 화합물이 TEMPO 또는 그의 유도체인 방법.

청구항 9

제1항, 제2항, 제4항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 산화제가

- N-클로로숙신이미드, N-브로모숙신이미드, N-아이오도숙신이미드, 디클로로이소시아누르산, 1,3,5-트리클로로-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디브로모이소시아누르산, 1,3,5-트리브로모-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디아이오도이소시아누르산 및 1,3,5-트리아이오도-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는
- N-클로로숙신이미드인

방법.

청구항 10

제1항, 제2항, 제4항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 반응의 단계 a)를

- 수성 용매 중에서 수행하거나; 또는
- 비양성자성 용매 중에서 수행하거나; 또는
- DMSO (디메틸설폭시드) 용매 중에서 수행하는 것인

방법.

청구항 11

제1항, 제2항, 제4항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 협막 폴리사카라이드를 0.1 내지 10 몰 당량의 산화제와 반응시키는 것인 방법.

청구항 12

제1항, 제2항, 제4항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 협막 폴리사카라이드를 0.5 내지 1.5 몰 당량의 산화제와 반응시키는 것인 방법.

청구항 13

제1항, 제2항, 제4항, 및 제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

- 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물이 촉매량으로 존재하거나; 또는
- 박테리아 협막 폴리사카라이드를 0.3 몰 당량 미만의 안정한 니트록실 라디칼 화합물과 반응시키는 것인

방법.

청구항 14

a) 수성 용매 중에서 박테리아 협막 폴리사카라이드를 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 반응시켜 활성화 박테리아 협막 폴리사카라이드를 생산하는 단계; 및

b) 활성화 박테리아 협막 폴리사카라이드를 1개 이상의 아민기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는, 운반체 단백질에 접합된 박테리아 협막 폴리사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법.

청구항 15

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화 박테리아 협막 폴리사카라이드의 산화도가 3 내지 40 범위인 방법.

청구항 16

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화 박테리아 협막 폴리사카라이드의 산화도가 6 내지 14 범위인 방법.

청구항 17

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아 협막 폴리사카라이드가
- 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*)로부터 유래되거나; 또는
- 엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*)로부터 유래되는
방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 박테리아 협막 폴리사카라이드가 에스. 뉴모니아에 혈청형 3, 혈청형 10A, 혈청형 12F, 또는
혈청형 33F로부터 유래되는 방법.

청구항 19

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 운반체 단백질이 과산화물, 디프테
리아, 백일해, 슈도모나스(*Pseudomonas*), 이. 콜라이(*E. coli*), 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*) 또는 스트렙
토코쿠스(*Streptococcus*)로부터의 독소인 방법.

청구항 20

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 운반체 단백질이 CRM₁₉₇인 방법.

청구항 21

제1항, 제2항, 제4항, 제6항 내지 제8항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a) 전에,
- 박테리아 협막 폴리사카라이드가 사이징되거나; 또는
- 박테리아 협막 폴리사카라이드가 100 내지 400 kDa 범위의 분자량으로 가수분해된 것인
방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 산화 작용제로서 TEMPO/NCS를 사용하여 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 함유하는 당접합체를 제조하는 방법, 이러한 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물, 및 이러한 당접합체 및 면역원성 조성물의 사용을 위한 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 사카라이드의 1급 히드록실을 선택적으로 산화시키는 산화제의 존재 하에 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼, 예컨대 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물을 사용하여 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 함유하는 당접합체를 제조하는 방법, 이러한 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물, 및 이러한 당접합체 및 면역원성 조성물의 사용을 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신은 일반적으로 단백질 운반체에 연결된, 박테리아의 표면 코트로부터의 폴리사카라이드를 사용하여 제조된다. 폴리사카라이드 및 단백질 운반체의 화학적 결합은 박테리아의 표면 상의 백신 내에 함유된 폴리사카라이드를 디스플레이하는 박테리아에 대한 면역 반응을 유도하며, 따라서 질환을 예방한다. 따라서, 병원성 박테리아로부터의 폴리사카라이드를 사용하는 백신접종은 숙주 면역을 부스팅시키기 위한 잠재적 전략이다. 박테리아를 커버하는 폴리사카라이드는, 심지어 박테리아의 단일 종 내에서도 매우 다양하다. 예를 들어, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) (전세계에 걸쳐 영아에서 수막염, 폐렴, 및 중증 침습성 질환의 주요 원인인)에서 박테리아 폴리사카라이드 코트에서의 변이로 인해 90종 초과 다양한 혈청형이 존재한다. 따라서, 폴리사카라이드 백신은 종종 보호를 증가시키기 위해 폴리사카라이드의 패널로 이루어진다.

[0003] 폴리사카라이드가 그 자체로 면역원성이더라도, 단백질 운반체에의 폴리사카라이드의 접합은 면역원성을 개선하는데 사용되었다. 운반체 단백질은 표적 병원체에 대한 특이적 면역 반응을 부스팅시키는, 표적 병원체로부터의 관련 단백질 항원, 또는 아주반트 또는 일반적인 면역 반응 자극제로서 보다 더 기능하는 일반적으로 면역원성인 단백질일 수 있다.

[0004] 다가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신은 다년간 허가되었고, 영아에서 폐렴구균성 질환을 예방하는

데 유익한 것으로 증명되었고, 최근에는 성인에 대해 권장되었다.

발명의 내용

- [0005] 한 측면에서, 본 개시내용은 a) 수성 용매 중에서 사카라이드를 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 반응시켜 활성화 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는, 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법을 제공한다. 추가 측면에서, 활성화 사카라이드의 산화도는 1 내지 50, 1 내지 40, 1 내지 30, 1 내지 20, 1 내지 10, 1 내지 5, 3 내지 40, 3 내지 30, 3 내지 20, 3 내지 10, 4 내지 40, 4 내지 30, 4 내지 20, 4 내지 10, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 10, 6 내지 50, 6 내지 40, 6 내지 30, 6 내지 20, 6 내지 15, 6 내지 14, 6 내지 13, 6 내지 12, 6 내지 11, 6 내지 10, 7 내지 40, 7 내지 30, 7 내지 20, 7 내지 15, 7 내지 14, 7 내지 13, 7 내지 12, 7 내지 11, 7 내지 10, 8 내지 40, 8 내지 30, 8 내지 20, 8 내지 15, 8 내지 14, 8 내지 13, 8 내지 13, 8 내지 12, 8 내지 11, 8 내지 10, 9 내지 40, 9 내지 30, 9 내지 20, 9 내지 15, 10 내지 40, 10 내지 30, 10 내지 20, 또는 10 내지 15 범위이다. 추가 측면에서, 활성화 사카라이드의 산화도는 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, 또는 40이다.
- [0006] 추가 측면에서, 본 개시내용은 a) 사카라이드의 1급 히드록실을 선택적으로 산화시키는 산화제의 존재 하에 사카라이드를 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물, 예컨대 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물과 반응시켜 알데히드 기를 함유하는 활성화 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는, 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0007] 상기 반응에서, 실제 산화제는 촉매 사이클에서 N-옥소암모늄 염이다. 바람직하게는 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 산화제의 존재 하에 카르복실산으로의 과잉 산화 없이 1급 알코올을 알데히드로 선택적으로 산화시키는 능력을 갖는다.
- [0008] 한 측면에서, 반응의 단계 a)는 수성 용매 중에서 수행된다. 또 다른 측면에서, 단계 a)는 비양성자성 용매 중에서 수행된다. 한 측면에서, 단계 a)는 DMSO (디메틸설폭사이드), 디메틸아세트아미드 (DMA), 술폴란, N-메틸-2-피롤리돈 (NMP), 헥사메틸포스포르아미드 (HMPA) 중에서 또는 DMF (디메틸포름아미드) 용매 중에서 수행된다.
- [0009] 한 측면에서, 미반응 알데히드 기는 운반체 단백질과의 접합 후에, 보로히드라이드를 사용하는 캡핑 단계 동안 1급 알코올로 다시 전환되고, 따라서 산화에 이어서 접합을 수반하는 변형 단계 동안 사카라이드 에피토프 변형을 최소화한다.
- [0010] 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물이다. 바람직하게는 상기 화합물은 산화제의 존재 하에 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 화합물은 산화제의 존재 하에 카르복실 기로의 과잉 산화 없이 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다.
- [0011] 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 TEMPO 또는 PROXYL (2,2,5,5-테트라메틸-1-피롤리디닐옥시) 모이어티를 보유한다. 바람직하게는 상기 화합물은 산화제의 존재 하에 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 화합물은 산화제의 존재 하에 카르복실 기로의 과잉 산화 없이 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다.
- [0012] 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO 또는 그의 유도체이다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO, 2,2,6,6-테트라메틸-4-(메틸설포닐옥시)-1-피페리디노옥시, 4-포스포노옥시-TEMPO, 4-옥소-TEMPO, 4-메톡시-TEMPO, 4-이소티오시아네이트-TEMPO, 4-(2-아이오도아세트아미도)-TEMPO 자유 라디칼, 4-히드록시-TEMPO, 4-시아노-TEMPO, 4-카르복시-TEMPO, 4-(2-브로모아세트아미도)-TEMPO, 4-아미노-TEMPO, 4-아세트아미도-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘 1-옥실로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO이다.
- [0013] 추가 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 3β-DOXYL-5α-콜레스탄, 5-DOXYL-스테아르산, 16-DOXYL-스테아르산, 메틸 5-DOXYL-스테아레이트, 3-(아미노메틸)-PROXYL, 3-카르바모일-PROXYL, 3-카르바모일-

2,2,5,5-테트라메틸-3-피롤린-1-옥실, 3-카르복시-PROXYL, 3-시아노-PROXYL로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0014] 한 측면에서, 상기 산화제는 N-할로 모이어티를 보유하는 분자이다. 바람직하게는 상기 분자는 니트록실 라디칼 화합물의 존재 하에 1급 알콜을 선택적으로 산화시키는 능력을 갖는다.
- [0015] 한 측면에서, 상기 산화제는 N-클로로숙신이미드, N-브로모숙신이미드, N-아이오도숙신이미드, 디클로로이소시아누르산, 1,3,5-트리클로로-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디브로모이소시아누르산, 1,3,5-트리브로모-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디아이오도이소시아누르산 및 1,3,5-트리아이오도-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 산화제는 N-클로로숙신이미드이다.
- [0016] 한 측면에서, 활성화 사카라이드의 산화도는 1 내지 50, 1 내지 40, 1 내지 30, 1 내지 20, 1 내지 10, 1 내지 5, 3 내지 40, 3 내지 30, 3 내지 20, 3 내지 10, 4 내지 40, 4 내지 30, 4 내지 20, 4 내지 10, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 10, 6 내지 50, 6 내지 40, 6 내지 30, 6 내지 20, 6 내지 15, 6 내지 14, 6 내지 13, 6 내지 12, 6 내지 11, 6 내지 10, 7 내지 40, 7 내지 30, 7 내지 20, 7 내지 15, 7 내지 14, 7 내지 13, 7 내지 12, 7 내지 11, 7 내지 10, 8 내지 40, 8 내지 30, 8 내지 20, 8 내지 15, 8 내지 14, 8 내지 13, 8 내지 12, 8 내지 11, 8 내지 10, 9 내지 40, 9 내지 30, 9 내지 20, 9 내지 15, 10 내지 40, 10 내지 30, 10 내지 20, 또는 10 내지 15 범위이다. 추가 측면에서, 활성화 사카라이드의 산화도는 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, 또는 40이다.
- [0017] 한 측면에서, 사카라이드는 0.1 내지 10 몰 당량의 산화제와 반응한다. 바람직하게는, 사카라이드는 0.2 내지 5, 0.5 내지 2.5 또는 0.5 내지 1.5 몰 당량의 산화제와 반응한다. 한 측면에서, 폴리사카라이드는 약 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8 또는 5 몰 당량의 산화제와 반응한다.
- [0018] 한 측면에서, 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 촉매량으로 존재한다. 한 측면에서, 사카라이드는 약 0.3 몰 당량 미만의 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물과 반응한다. 한 측면에서, 사카라이드는 약 0.005 몰 당량 미만의 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물과 반응한다. 한 측면에서, 사카라이드는 약 0.005, 0.01, 0.05 또는 0.1 몰 당량의 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물과 반응한다.
- [0019] 추가 측면에서, 사카라이드는 박테리아 협막 폴리사카라이드이다. 또 다른 측면에서 사카라이드는 합성적으로 유래된 올리고 또는 폴리사카라이드이다. 한 측면에서, 협막 폴리사카라이드는 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*) (Pn)로부터 유래된다. 추가 측면에서, 협막 폴리사카라이드는 Pn-혈청형 10A, Pn-혈청형 12F, 및 Pn-혈청형 33F 협막 폴리사카라이드로부터 선택된다. 예를 들어, 한 측면에서 협막 폴리사카라이드는 Pn-혈청형 12F 협막 폴리사카라이드이다.
- [0020] 추가 측면에서, 협막 폴리사카라이드는 엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*)로부터 유래된다. 한 측면에서, 협막 폴리사카라이드는 수막구균 (*Mn*)-혈청형 A, C, W135, 및 Y 협막 폴리사카라이드로부터 선택된다.
- [0021] 추가 측면에서, 협막 폴리사카라이드는 수막구균 (*Mn*)-혈청형 X 협막 폴리사카라이드이다.
- [0022] 추가 측면에서, 협막 폴리사카라이드는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS)로부터 유래된다. 한 측면에서, 협막 폴리사카라이드는 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII 및 VIII로부터 선택된다.
- [0023] 한 측면에서, 본 개시내용은 운반체 단백질이 과산화물, 디프테리아, 백일해, 슈도모나스(*Pseudomonas*), 이. 콜라이(*E. coli*), 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*) 또는 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*)로부터의 독소인 본원에 개시된 임의의 방법을 제공한다. 한 측면에서 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0024] 추가 측면에서, 본 개시내용은 단계 a) 전에, 사카라이드를 100 내지 400 kDa 범위의 분자량으로 가수분해하는 것인, 본원에 기재된 바와 같은 방법을 제공한다. 예를 들어, 한 측면에서, 분자량은 100 내지 350 kDa, 100 내지 300 kDa, 100 내지 250 kDa, 100 내지 200 kDa, 100 내지 150 kDa, 200 내지 400 kDa, 200 내지 350 kDa, 200 내지 300 kDa, 200 내지 250 kDa, 300 내지 400 kDa, 또는 300 내지 350 kDa 범위이다.
- [0025] 추가 측면에서, 본 개시내용은 단계 b) 전에 활성화 폴리사카라이드를 정제하는 단계를 추가로 포함하는, 본원에 제공된 임의의 방법을 제공한다. 추가 측면에서, 방법은 단계 b) 후에 환원제를 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 한 측면에서, 환원제는 NaCNBH₃이다. 추가 측면에서, 방법은 NaCNBH₃의 첨가 후에 NaBH₄를 첨가하는

단계를 추가로 포함한다. 추가 측면에서, 방법은 NaBH_4 의 첨가 후에 정제 단계를 포함한다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 생산되거나 또는 수득가능한 당접합체를 제공한다. 예를 들어, 한 측면에서 본 개시내용은 a) 수성 용매 중에서 사카라이드를 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 반응시켜 활성화 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산되거나 또는 수득가능한 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제공한다. 추가 측면에서, 본 개시내용은 a) 사카라이드를 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물 및 산화제와 반응시켜 알데히드 기를 함유하는 활성화 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산되거나 또는 수득가능한 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제공한다. 안정한 니트록실 라디칼 화합물 및 산화제는 원문 페이지 2-4에 정의된 바와 같다.

[0027] 추가 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물, 및 제약상 허용되는 부형제, 담체, 또는 희석제를 제공한다. 추가 측면에서, 면역원성 조성물은 추가의 항원을 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 단백질 항원, 또는 에스. 뉴모니아에로부터 유래된 협막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 예를 들어, 한 측면에서 추가의 항원은 Pn-혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 및 23F 협막 폴리사카라이드로부터 선택된 협막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 단백질 항원, 또는 엔. 메닌기티디스로부터 유래된 협막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 혈청형 A, C, W135 및 Y 협막 폴리사카라이드로부터 선택된 협막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 혈청형 X 협막 폴리사카라이드로부터의 협막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 B군 스트렙토코쿠스 (GBS)로부터 유래된 협막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 한 측면에서, 추가의 항원은 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII 및 VIII로부터 선택된 협막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다.

[0028] 추가 측면에서, 본 개시내용은 아주반트를 추가로 포함하는, 본원에 개시된 임의의 면역원성 조성물을 제공한다. 한 측면에서 아주반트는 알루미늄계 아주반트이다. 추가 측면에서, 알루미늄계 아주반트는 인산알루미늄, 황산알루미늄, 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 면역학적 유효량의 본원에 개시된 임의의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 박테리아 감염, 질환 또는 상태를 예방, 치료 또는 개선하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 감염, 질환 또는 상태는 에스. 뉴모니아에 박테리아와 연관된다. 추가 측면에서, 감염, 질환 또는 상태는 엔. 메닌기티디스 박테리아와 연관된다.

[0030] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 면역학적 유효량의 본원에 개시된 임의의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 보호성 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 접합체가 안정한 것인 운반체 단백질에 접합된 Pn-혈청형 12F를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 예를 들어, 한 측면에서, 본 개시내용은 운반체 단백질에 접합된 Pn-혈청형 12F를 포함하는 면역원성 조성물로서, 조성물 중 유리 Pn-혈청형 12F 폴리사카라이드의 양이 그것이 제조되었을 때로부터 120일 후에 35% 미만인 면역원성 조성물을 제공한다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 12F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 120일 후에 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미만이다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 12F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 90일 후에 35% 미만, 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미만이다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 12F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 60일 후에 35% 미만, 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미만이다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 12F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 30일 후에 35% 미만, 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미만이다. 추가 측면에서, 본 개시내용은 운반체 단백질에 접합된 Pn-혈청형 3, 10A, 또는 33F를 포함하는 조성물로서, 조성물 중 유리 Pn-혈청형 3, 10A, 또는 33F 폴리사카라이드의 각각의 양이 그것이 제조되었을 때로부터 120일 후에 35% 미만인 조성물을 제공한다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 3, 10A, 또는 33F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 120일 후에 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미만이다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 3, 10A, 또는 33F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 90일 후에 35% 미만, 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미만이다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 3, 10A, 또는 33F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 60일 후에 35% 미만, 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미

만이다. 추가 측면에서, 유리 Pn-혈청형 3, 10A, 또는 33F 폴리사카라이드의 양은 그것이 제조되었을 때로부터 30일 후에 35% 미만, 30% 미만, 28% 미만, 27% 미만, 26% 미만, 또는 25% 미만이다. 한 측면에서, 상기 논의된 바와 같은 유리 폴리사카라이드의 양은 25°C에서 측정된다. 한 측면에서, 상기 개시된 조성물 중의 운반체 단백질은 파상풍, 디프테리아, 백일해, 슈도모나스, 이. 콜라이, 스타필로코쿠스 또는 스트렙토코쿠스로부터의 독소이다. 추가 측면에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0032] 본 개시내용은 상기 개시된 임의의 이러한 당접합체, 및 제약상 허용되는 부형제, 담체, 또는 희석제를 포함하는 면역원성 조성물을 추가로 제공한다. 추가 측면에서, 이러한 면역원성 조성물은 추가의 항원을 포함한다. 예를 들어, 한 측면에서 추가의 항원은 단백질 항원, 또는 에스. 뉴모니아에로부터 유래된 헤파막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 Pn-혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 및 23F 헤파막 폴리사카라이드로부터 선택된 헤파막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 단백질 항원, 또는 엔. 메닌기티디스로부터 유래된 헤파막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 혈청형 A, C, W135 및 Y 헤파막 폴리사카라이드로부터 선택된 헤파막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 혈청형 X 헤파막 폴리사카라이드로부터의 헤파막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 추가 측면에서, 추가의 항원은 B군 스트렙토코쿠스 (GBS)로부터의 헤파막 폴리사카라이드의 당접합체를 포함한다. 한 측면에서, 헤파막 폴리사카라이드는 GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII 및 VIII로부터 선택된다.

[0033] 추가 측면에서, 이러한 면역원성 조성물은 아주반트를 추가로 포함한다. 예를 들어, 한 측면에서 아주반트는 알루미늄계 아주반트이다. 추가 측면에서, 알루미늄계 아주반트는 인산알루미늄, 황산알루미늄, 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 Pn-혈청형 12F의 헤파막 폴리사카라이드의 구조를 제시한다.
 도 2는 산화도 (DO)에 대한 Tempo/NCS 산화 반응에서의 N-클로로숙신이미드의 의존도를 제시한다.
 도 3은 Pn-혈청형 10A의 헤파막 폴리사카라이드의 구조를 제시한다.
 도 4는 Pn-혈청형 33F의 헤파막 폴리사카라이드의 구조를 제시한다.
 도 5는 Pn-혈청형 3의 헤파막 폴리사카라이드의 구조를 제시한다.
 도 6은 TEMPO/NCS를 사용하는 Pn-혈청형 12F의 산화/접합의 추정 메커니즘을 제시한다.
 도 7은 퍼아이오데이트 산화 vs. TEMPO/NCS 산화를 사용하여 제조된 Pn-혈청형 12F 접합체의 안정성 비교를 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 개시내용은 하기 개시내용의 다양한 실시양태의 상세한 설명 및 본원에 포함된 실시예를 참조하여 보다 용이하게 이해될 수 있다. 달리 정의되지 않은 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 개시내용이 적용되는 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 바와 유사하거나 등가의 어떠한 방법 및 물질이 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있더라도, 특정의 바람직한 방법 및 물질이 본원에 기재되어 있다. 실시양태 및 청구범위를 기재하는데 있어서, 특정 용어가 하기에 제시된 정의에 따라 사용될 것이다.

[0036] 본원에 사용된 단수 형태는 달리 나타내지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "방법"에 대한 언급은 본원에 기재되고/거나 본 개시내용의 관독 시 통상의 기술자에게 명백해질 유형의 하나 이상의 방법, 및 /또는 단계를 포함한다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "약"은 언급된 농도 범위, 기간, 분자량, 온도 또는 pH와 같은 값의 통계학적으로 유의한 범위 이내를 의미한다. 이러한 범위는 제시된 값 또는 범위의 한자릿수 이내, 전형적으로 20% 이내, 보다 전형적으로 10% 이내, 보다 더 전형적으로 5% 이내 또는 1% 이내일 수 있다. 종종, 이러한 범위는 제시된 값 또는 범위의 측정 및/또는 결정에 사용된 전형적인 표준 방법의 실험적 오차 이내일 수 있다. 용어 "약"에 의해 포괄되는 허용가능한 편차는 연구 중인 특정한 시스템에 따라 좌우될 것이고, 통상의 기술자에 의해 용이하게 인지될 수 있다. 범위가 본 출원 내에서 인용될 때마다, 범위 이내의 모든 정수가 또한 본 개시내용의 실시양태

로서 고려된다.

- [0038] 본 개시내용에서, "포함한다", "포함된다", "포함하는", "함유한다", "함유하는" 등과 같은 용어는 미국 특허법에서 이들에 대해 부여된 의미를 가질 수 있으며; 예를 들어 이들은 "포함한다", "포함된다", "포함하는" 등을 의미할 수 있다. 이러한 용어는 임의의 다른 성분을 배제하지 않으면서 특정한 성분 또는 성분의 세트를 포함하는 것을 지칭한다. "본질적으로 이루어진" 및 "본질적으로 이루어진다"와 같은 용어는 미국 특허법에서 이들에 대해 부여된 의미를 가지며, 예를 들어 이들은 본 개시내용의 신규 또는 기본 특성으로부터 벗어나지 않는 추가의 성분 또는 단계의 포함을 허용하며, 즉 이들은 본 개시내용의 신규 또는 기본 특성으로부터 벗어나지 않는 추가의 미인용된 성분 또는 단계를 배제한다. 용어 "이루어진다" 및 "이루어진"은 미국 특허법에서 이들에 대해 부여된 의미를 가지며; 즉 이들 용어는 폐쇄형이다. 따라서, 이들 용어는 특정한 성분 또는 성분의 세트를 포함하고 모든 다른 성분을 배제하는 것을 지칭한다.
- [0039] 본원에 사용된 용어 "사카라이드"는 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 또는 모노사카라이드를 지칭하는데 사용될 수 있다.
- [0040] 사카라이드와 관련하여 본원에 사용된 용어 "산화도"는 알데히드의 몰당 사카라이드 반복 단위의 몰의 비를 지칭한다. 사카라이드의 산화도는 통상의 기술자에게 공지된 상용 방법을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 "접합체" 또는 "당접합체"는 운반체 단백질에 공유 접합된 사카라이드를 지칭한다. 본 개시내용의 당접합체 및 그를 포함하는 면역원성 조성물은 특정량의 유리 사카라이드를 함유할 수 있다.
- [0042] 본원에 사용된 용어 "유리 사카라이드"는 운반체 단백질에 공유 접합되어 있지 않지만, 그럼에도 불구하고 당접합체 조성물 중에 존재하는 사카라이드를 의미한다. 유리 사카라이드는 접합된 사카라이드-운반체 단백질 당접합체와 비-공유적으로 회합될 수 있다 (즉, 비-공유적으로 결합되거나, 그에 흡착되거나, 또는 그 내에 또는 그와 함께 봉입됨). 용어 "유리 폴리사카라이드" 및 "유리 헵막 폴리사카라이드"는 사카라이드가 각각 폴리사카라이드 또는 헵막 폴리사카라이드인 당접합체와 관련하여 동일한 의미를 전달하기 위해 본원에 사용될 수 있다.
- [0043] 본원에 사용된 "접합하는", "접합된" 및 "접합하는"은 사카라이드, 예를 들어 박테리아 헵막 폴리사카라이드가 운반체 분자 또는 운반체 단백질에 공유적으로 부착되는 공정을 지칭한다. 접합은 하기 기재된 방법에 따라 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 공정에 의해 수행될 수 있다. 접합은 박테리아 헵막 폴리사카라이드의 면역원성을 증진시킨다.
- [0044] 용어 "대상체"는 인간을 비롯한 포유동물, 또는 조류, 어류, 파충류, 양서류 또는 임의의 다른 동물을 지칭한다. 용어 "대상체"는 또한 가정용 애완동물 또는 연구용 동물을 포함한다. 가정용 애완동물 및 연구용 동물의 비제한적 예는 다음을 포함한다: 개, 고양이, 돼지, 토끼, 래트, 마우스, 저빌, 햄스터, 기니아 피그, 페릿, 원숭이, 조류, 뱀, 도마뱀, 어류, 거북이, 및 개구리. 용어 "대상체"는 또한 가축 동물을 포함한다. 가축 동물의 비제한적 예는 다음을 포함한다: 알파카, 들소, 낙타, 소, 사슴, 돼지, 말, 라마, 노새, 당나귀, 양, 염소, 토끼, 순록, 야크, 닭, 거위, 및 칠면조.
- [0045] 당접합체
- [0046] 본 개시내용은, 특히 사카라이드의 1급 알콜을 알데히드로 선택적으로 산화시키기 위해 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물을 사용하고, 추가로 산화제를 사용하여, 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물이다. 바람직하게는 상기 화합물은 산화제의 존재 하에 카르복실산으로의 과잉 산화 없이 및 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알콜을 알데히드로 선택적으로 산화시키는 능력을 갖는다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO 또는 PROXYL (2,2,5,5-테트라메틸-1-피롤리딘닐옥시) 모이어티를 보유하는 분자이다. 바람직하게는 상기 분자는 산화제의 존재 하에 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알콜을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 보다 바람직하게는 상기 분자는 산화제의 존재 하에 카르복실 기로의 과잉 산화 없이 1급 알콜을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO, 2,2,6,6-테트라메틸-4-(메틸술포닐옥시)-1-피페리딘노옥시, 4-포스포노옥시-TEMPO, 4-옥소-TEMPO, 4-메톡시-TEMPO, 4-이소티오시아네이트-TEMPO, 4-(2-아이오도아세트아미도)-TEMPO 자유 라디칼, 4-히드록시-TEMPO, 4-시아노-TEMPO, 4-카르복시-TEMPO, 4-(2-브로모아세트아미도)-TEMPO, 4-아미노-TEMPO, 4-아세트아미도-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘 1-옥실로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO이다. 추가 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 3β-DOXYL-5α-콜레스탄, 5-DOXYL-스테

아르산, 16-DOXYL-스테아르산, 메틸 5-DOXYL-스테아레이트, 3-(아미노메틸)-PROXYL, 3-카르바모일-PROXYL, 3-카르바모일-2,2,5,5-테트라메틸-3-피롤린-1-옥실, 3-카르복시-PROXYL, 3-시아노-PROXYL로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에서, 산화제는 N-할로 모이어티를 보유하는 분자이다. 바람직하게는 상기 분자는 니트록실 라디칼 화합물의 존재 하에 1급 알콜을 선택적으로 산화시키는 능력을 갖는다. 한 측면에서, 상기 산화제는 N-클로로숙신이미드, N-브로모숙신이미드, N-아이오도숙신이미드, 디클로로이소시아누르산, 1,3,5-트리클로로-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디브로모이소시아누르산, 1,3,5-트리브로모-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디아이오도이소시아누르산 및 1,3,5-트리아이오도-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 산화제는 N-클로로숙신이미드이다.

[0047] 한 측면에서, 본 개시내용은, 특히 사카라이드의 1급 알콜을 알데히드로 산화시키기 위해 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 자유 라디칼 (TEMPO)을 사용하고 공산화제로서 N-클로로숙신이미드 (NCS)를 사용하여, 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0048] 본 개시내용의 당접합체에서, 사카라이드는 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 및 모노사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되고, 운반체 단백질은 본원에 추가로 기재되거나 또는 통상의 기술자에게 공지된 바와 같은 임의의 적합한 운반체로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 사카라이드는 폴리사카라이드, 특히 박테리아 협막 폴리사카라이드, 예컨대 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 10A (Pn-혈청형 10A), Pn-혈청형 12F, 또는 Pn-혈청형 33F이다. 일부 이러한 실시양태에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0049] 협막 폴리사카라이드는 통상의 기술자에게 공지된 표준 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 협막 폴리사카라이드는 다양한 혈청형, 예컨대 스트렙토코쿠스 뉴모니아에의 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 제조될 수 있다. 이들 폐렴구균 접합체는 개별 공정에 의해 제조되고, 단일 투여량 제제로 제제화된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형은 대두계 배지 중에서 성장된다. 이어서, 개별의 폴리사카라이드는 원심분리, 침전, 한외여과, 및 칼럼 크로마토그래피를 통해 정제된다. 정제된 폴리사카라이드는 화학적으로 활성화되어 사카라이드 (즉, 활성화 사카라이드)가 운반체 단백질과 반응할 수 있도록 한다. 활성화되면, 각각의 협막 폴리사카라이드는 개별적으로 운반체 단백질에 접합되어 당접합체를 형성한다. 한 실시양태에서, 각각의 협막 폴리사카라이드는 동일한 운반체 단백질에 접합된다. 폴리사카라이드의 화학적 활성화 및 운반체 단백질에의 후속적 접합은 통상의 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,673,574, 4,902,506, 7,709,001, 및 7,955,605를 참조한다.

[0050] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 당접합체는 약 50 kDa 내지 약 20,000 kDa 의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 당접합체는 약 200 kDa 내지 약 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 당접합체는 약 500 kDa 내지 약 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 한 실시양태에서, 당접합체는 약 1,000 kDa 내지 약 3,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서 당접합체는 약 600 kDa 내지 약 2800 kDa; 약 700 kDa 내지 약 2700 kDa; 약 1000 kDa 내지 약 2000 kDa; 약 1800 kDa 내지 약 2500 kDa; 약 1100 kDa 내지 약 2200 kDa; 약 1900 kDa 내지 약 2700 kDa; 약 1200 kDa 내지 약 2400 kDa; 약 1700 kDa 내지 약 2600 kDa; 약 1300 kDa 내지 약 2600 kDa; 약 1600 kDa 내지 약 3000 kDa의 분자량을 갖는다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 모든 정수는 본 개시내용의 한 실시양태로서 고려된다.

[0051] 본 개시내용의 당접합체의 신규 특징은 사카라이드 및 생성된 접합체의 분자량 프로파일, 운반체 단백질당 접합된 리신 및 폴리사카라이드에 공유 연결된 리신의 개수의 비, 사카라이드의 반복 단위의 함수로서의 운반체 단백질과 사카라이드 사이의 공유 연결의 개수, 및 총 사카라이드 대비 유리 사카라이드의 상대량을 포함한다.

[0052] 또 다른 실시양태에서, 폴리사카라이드는 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)로부터 유래된 협막 폴리사카라이드이다. 일부 이러한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 엔. 메닝기티디스의 혈청형 A, B, C, W135, X 및 Y 협막 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 이러한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 혈청형 C 협막 폴리사카라이드이다. 또 다른 이러한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 혈청형 W135 협막 폴리사카라이드이다. 또 다른 이러한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 혈청형 Y 협막 폴리사카라이드이다.

[0053] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 당접합체는 협막 폴리사카라이드가 10 kDa 내지 2,000 kDa 또는 50 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는 것인 박테리아 협막 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닝기티디스로부터 유래된다. 일부 이러한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 에스. 뉴모니아에로부터 유래되고, 협막 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8,

9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 이러한 실시양태에서, 헤파막 폴리사카라이드는 엔. 메닌기티디스로부터 유래된 헤파막 폴리사카라이드이고, 혈청형 A, B, C, W135, X 및 Y 헤파막 폴리사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0054] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 특징 중 하나 이상을 갖는, 운반체 단백질에 공유 접합된 헤파막 폴리사카라이드를 포함하는 당접합체를 제공한다: 폴리사카라이드는 50 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖고; 당접합체는 1,000 kDa 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖고; 접합체는 총 폴리사카라이드에 비해 약 45% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리사카라이드는 10 kDa 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서 당접합체는 50 kDa 내지 20,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서 당접합체는 200 kDa 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 접합체는 총 폴리사카라이드에 비해 약 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 유리 폴리사카라이드의 양은, 예를 들어 접합체가 제조된 후, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 120일, 또는 심지어 그 초과 후에, 시간의 함수로서 측정될 수 있다.

[0055] 사카라이드에 접합된 운반체 단백질 내의 리신 잔기의 개수는, 몰비로 표현될 수 있는 접합된 리신의 범위로서 특성화될 수 있다. 예를 들어, CRM₁₉₇의 4 내지 15개의 리신 잔기가 사카라이드에 공유 연결되어 있는 면역원성 조성물에서, 당접합체 내의 접합된 리신 대 CRM₁₉₇의 몰비는 약 10:1 내지 약 40:1이다. CRM₁₉₇의 2 내지 20개의 리신 잔기가 사카라이드에 공유 연결되어 있는 면역원성 조성물에서, 당접합체 내의 접합된 리신 대 CRM₁₉₇의 몰비는 약 5:1 내지 약 50:1이다.

[0056] 한 실시양태에서, 접합된 리신 대 운반체 단백질의 몰비는 약 10:1 내지 약 25:1이다. 일부 이러한 실시양태에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0057] 한 실시양태에서, 사카라이드 : 운반체 단백질 비 (w/w)는 0.2 내지 4이다. 또 다른 실시양태에서, 사카라이드 : 운반체 단백질 비 (w/w)는 1.1 내지 1.7이다. 일부 실시양태에서, 사카라이드는 박테리아 헤파막 폴리사카라이드이고, 사카라이드 : 운반체 단백질 비 (w/w)는 0.2 내지 4이다. 다른 실시양태에서, 사카라이드는 박테리아 헤파막 폴리사카라이드이고, 사카라이드 : 운반체 단백질 비 (w/w)는 1.1 내지 1.7이다. 일부 이러한 실시양태에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0058] 운반체 단백질 상의 리신에의 사카라이드 쇄의 부착 빈도는 본 개시내용의 당접합체를 특성화하기 위한 또 다른 파라미터이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 폴리사카라이드의 100개 사카라이드 반복 단위마다 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 적어도 1개의 공유 연결이 존재한다. 한 실시양태에서, 폴리사카라이드의 50개 사카라이드 반복 단위마다 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 적어도 1개의 공유 연결이 존재한다. 한 실시양태에서, 폴리사카라이드의 25개 사카라이드 반복 단위마다 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 적어도 1개의 공유 연결이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 공유 연결은 폴리사카라이드의 4개 사카라이드 반복 단위마다 적어도 1회 발생한다. 또 다른 실시양태에서, 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 공유 연결은 폴리사카라이드의 10개 사카라이드 반복 단위마다 적어도 1회 발생한다. 추가 실시양태에서, 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 공유 연결은 폴리사카라이드의 15개 사카라이드 반복 단위마다 적어도 1회 발생한다.

[0059] 빈번한 실시양태에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이고, CRM₁₉₇과 폴리사카라이드 사이의 공유 연결은 폴리사카라이드의 4, 10, 15 또는 25개 사카라이드 반복 단위마다 적어도 1회 발생한다. 일부 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 박테리아 헤파막 폴리사카라이드, 예를 들어 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닌기티디스 박테리아로부터 유래된 헤파막 폴리사카라이드이다.

[0060] 다른 실시양태에서, 접합체는 5 내지 10개 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 7개 사카라이드 반복 단위마다; 3 내지 8개 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 9개 사카라이드 반복 단위마다; 6 내지 11개 사카라이드 반복 단위마다; 7 내지 12개 사카라이드 반복 단위마다; 8 내지 13개 사카라이드 반복 단위마다; 9 내지 14개 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 15개 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 6개 사카라이드 반복 단위마다; 3 내지 7개 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 8개 사카라이드 반복 단위마다; 6 내지 10개 사카라이드 반복 단위마다; 7 내지 11개 사카라이드 반복 단위마다; 8 내지 12개 사카라이드 반복 단위마다; 9 내지 13개 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 14개 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 20개 사카라이드 반복 단위마다; 또는 4 내지 25개 사카라이드 반복 단위마다 운반체 단백질과 사카라이드 사이의 적어도 1개의 공유 연결을 포함한다.

- [0061] 또 다른 실시양태에서, 운반체 단백질과 사카라이드 사이의 적어도 1개의 연결은 폴리사카라이드의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개 사카라이드 반복 단위마다 발생한다.
- [0062] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 당접합체는 폴리사카라이드의 25개 사카라이드 반복 단위마다 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 적어도 1개의 공유 연결을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 공유 연결은 폴리사카라이드의 4개 사카라이드 반복 단위마다 적어도 1회 발생한다. 또 다른 실시양태에서, 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 공유 연결은 폴리사카라이드의 10개 사카라이드 반복 단위마다 적어도 1회 발생한다. 추가 실시양태에서, 운반체 단백질과 폴리사카라이드 사이의 공유 연결은 폴리사카라이드의 15개 사카라이드 반복 단위마다 적어도 1회 발생한다.
- [0063] 한 실시양태에서, 당접합체는 사카라이드의 총량에 비해 약 45% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 당접합체는 사카라이드의 총량에 비해 약 30% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 당접합체는 사카라이드의 총량에 비해 약 20% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다. 추가 실시양태에서, 당접합체는 사카라이드의 총량에 비해 약 10% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 당접합체는 사카라이드의 총량에 비해 약 5% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다.
- [0064] 또 다른 실시양태에서, 당접합체는 당접합체의 총량에 비해 약 20 몰% 미만의 운반체 단백질 잔기를 포함한다.
- [0065] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 당접합체, 및 아주반트, 희석제 또는 담체 중 적어도 하나를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0066] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 당접합체, 및 아주반트, 희석제 또는 담체 중 적어도 하나를 포함하며, 여기서 당접합체는 운반체 단백질에 공유 접합된 박테리아 헤팍 폴리사카라이드를 포함하는 것인 면역원성 조성물을 제공한다. 일부 이러한 실시양태에서, 헤팍 폴리사카라이드는 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닌기티디스로부터 유래된다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 면역원성 조성물은 아주반트를 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, 아주반트는 인산알루미늄, 황산알루미늄 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 알루미늄계 아주반트이다. 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 아주반트 인산알루미늄을 포함한다.
- [0068] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 당접합체 또는 면역원성 조성물은 동물 효능 모델에서 또는 옹소닌식세포 사멸 검정을 통해 박테리아를 사멸시킴으로써 측정 시에 기능적인 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0069] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 면역학적 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 본 개시내용의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 면역학적 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 병원성 박테리아에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 면역학적 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 병원성 박테리아로 인한 질환 또는 상태를 예방 또는 개선하는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 면역학적 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 병원성 박테리아에의 감염으로 인한 질환 또는 상태 중 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 병원성 박테리아는 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닌기티디스이다.
- [0070] 또한, 본 개시내용은 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닌기티디스 박테리아에 대한 면역 반응을 유도하는 방법, 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닌기티디스 박테리아로 인한 질환을 예방하는 방법, 및 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닌기티디스 박테리아에의 감염으로 인한 질환 중 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0071] 사카라이드
- [0072] 사카라이드는 폴리사카라이드, 올리고사카라이드 및 모노사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 사카라이드는 폴리사카라이드, 특히 박테리아 헤팍 폴리사카라이드이다.
- [0073] 헤팍 폴리사카라이드의 분자량은 면역원성 조성물에 사용하기 위한 고려사항이다. 고분자량 헤팍 폴리사카라이드는 항원 표면 상에 존재하는 에피토프의 보다 높은 원자가로 인해 특정 항체 면역 반응을 유도할 수 있다. 고분자량 헤팍 폴리사카라이드의 단리 및 정제는 본 개시내용의 접합체, 조성물 및 방법에 사용하기 위해 고려

된다.

- [0074] 한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 10 kDa 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 50 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 50 kDa 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 70 kDa 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 추가 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드는 90 kDa 내지 250 kDa; 90 kDa 내지 150 kDa; 90 kDa 내지 120 kDa; 80 kDa 내지 120 kDa; 70 kDa 내지 100 kDa; 70 kDa 내지 110 kDa; 70 kDa 내지 120 kDa; 70 kDa 내지 130 kDa; 70 kDa 내지 140 kDa; 70 kDa 내지 150 kDa; 70 kDa 내지 160 kDa; 80 kDa 내지 110 kDa; 80 kDa 내지 120 kDa; 80 kDa 내지 130 kDa; 80 kDa 내지 140 kDa; 80 kDa 내지 150 kDa; 80 kDa 내지 160 kDa; 90 kDa 내지 110 kDa; 90 kDa 내지 120 kDa; 90 kDa 내지 130 kDa; 90 kDa 내지 140 kDa; 90 kDa 내지 150 kDa; 90 kDa 내지 160 kDa; 100 kDa 내지 120 kDa; 100 kDa 내지 130 kDa; 100 kDa 내지 140 kDa; 100 kDa 내지 150 kDa; 100 kDa 내지 160 kDa의 분자량; 및 유사한 목적 분자량 범위를 갖는다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 모든 정수는 본 개시내용의 한 실시양태로서 고려된다.
- [0075] 에스. 뉴모니아에, 혈청형 12F (Pn-혈청형 12F)의 협막 폴리사카라이드는 하기 도 1에 제시된 구조를 갖는다. 에스. 뉴모니아에, 혈청형 10A (Pn-혈청형 10A)의 협막 폴리사카라이드는 하기 도 3에 제시된 구조를 갖는다. 에스. 뉴모니아에, 혈청형 33F (Pn-혈청형 33F)의 협막 폴리사카라이드는 하기 도 4에 제시된 구조를 갖는다. 에스. 뉴모니아에, 혈청형 3 (Pn-혈청형 3)의 협막 폴리사카라이드는 하기 도 5에 제시된 구조를 갖는다.
- [0076] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 협막 폴리사카라이드, 당접합체 또는 면역원성 조성물은 항체가 박테리아를 사멸시킨다는 것을 입증하는 동물 효능 모델 또는 옹소닌식세포 사멸 검정에서 박테리아를 사멸시킴으로써 측정 시에 기능적인 항체를 생성하는데 사용된다. 협막 폴리사카라이드는 통상의 기술자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 박테리아로부터 직접 수득될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Fournier et al. (1984), supra; Fournier et al. (1987) Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:561-567]; 미국 특허 출원 공개 번호 2007/0141077; 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 00/56357을 참조하고; 이들 각각은 제시된 바와 같이 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 또한, 이들은 합성 프로토콜을 사용하여 생산될 수 있다. 또한, 협막 폴리사카라이드는 통상의 기술자에게 또한 공지된 유전 공학 절차를 사용하여 재조합적으로 생산될 수 있다 (문헌 [Sau et al. (1997) Microbiology 143:2395-2405]; 및 미국 특허 번호 6,027,925 참조; 이들 각각은 제시된 바와 같이 그의 전문이 본원에 참조로 포함됨). 에스. 뉴모니아에 또는 엔. 메닌기티디스 균주는 확립된 배양 수집물 또는 임상적 시편 중 어느 하나로부터 수득된 각각의 폴리사카라이드를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0077] 운반체 단백질
- [0078] 본 개시내용의 당접합체의 또 다른 성분은 사카라이드가 접합되어 있는 운반체 단백질이다. 용어 "단백질 운반체" 또는 "운반체 단백질" 또는 "운반체"는 면역 반응이 요망되는 것인 항원 (예컨대, 협막 폴리사카라이드)에 접합될 수 있는 임의의 단백질 분자를 지칭한다.
- [0079] 운반체에 대한 접합은 항원의 면역원성을 증진시킬 수 있다. 항원에 대한 단백질 운반체는 과상품, 디프테리아, 백일해, 슈도모나스, 이. 콜라이, 스타필로코쿠스 및 스트렙토코쿠스로부터의 독소, 독소이드 또는 독소의 임의의 돌연변이체 교차-반응성 물질 (CRM)일 수 있다. 한 실시양태에서, 운반체는 CRM₁₉₇ 단백질을 생산하는 씨. 디프테리아(*C. diphtheriae*) 균주 C7 (β 197)로부터 유래된 디프테리아 독소이드 CRM₁₉₇의 운반체이다. 이 균주는 ATCC 수탁 번호 53281을 갖는다. CRM₁₉₇을 생산하는 방법은 기재된 바와 같이 그의 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,614,382에 기재되어 있다. 대안적으로, 단백질 운반체 또는 다른 면역원성 단백질의 단편 또는 에피토프가 사용될 수 있다. 예를 들어, 합텐 항원은 박테리아 독소, 독소이드 또는 CRM의 T-세포 에피토프에 커플링될 수 있다. 다른 적합한 운반체 단백질은 불활성화 박테리아 독소, 예컨대 콜레라 독소이드 (예를 들어, 국제 특허 출원 번호 WO 2004/083251에 기재된 바와 같음), 이. 콜라이 LT, 이. 콜라이 ST, 및 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A를 포함한다. 박테리아 외막 단백질, 예컨대 외막 복합체 c (OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 뉴모리신, 페렴구균 표면 단백질 A (PspA), 페렴구균 부착 단백질 (PsaA) 또는 헤모필루스 인플루엔자에 단백질 D가 또한 사용될 수 있다. 다른 단백질, 예컨대 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체 (PPD)가 또한 운반체 단백질로서 사용될 수 있다.
- [0080] 본원에서 논의된 바와 같이, 사카라이드에 접합될, 운반체 단백질 내의 리신 잔기의 개수는 접합된 리신의 범위로서 특성화될 수 있다. 예를 들어, 제시된 면역원성 조성물에서, CRM₁₉₇은 39개 중 1 내지 15개의 사카라이드

에 공유 연결된 리신 잔기를 포함할 수 있다. 이 파라미터를 표현하는 또 다른 방식은 약 2.5% 내지 약 40%의 CRM₁₉₇ 리신이 사카라이드에 공유 연결된다는 것이다. 예를 들어, 제시된 면역원성 조성물에서, CRM₁₉₇은 39개 중에서 1 내지 20개의 사카라이드에 공유 연결된 리신 잔기를 포함할 수 있다. 이 파라미터를 표현하는 또 다른 방식은 약 2.5% 내지 약 50%의 CRM₁₉₇ 리신이 사카라이드에 공유 연결된다는 것이다.

- [0081] 당접합체를 제조하는 방법
- [0082] 당접합체를 제조하기 위해, 폴리사카라이드는 먼저 그것이 운반체, 예컨대 단백질에 화학적으로 연결될 수 있기 전에 활성화 (즉, 화학적으로 변형됨)되어야 한다. 활성화 단계 전에, 사카라이드는 활성화 및 후속적 접합을 위한 적절한 분자량 (예를 들어, 50 kDa 내지 500 kDa)을 달성하도록 가수분해되거나 또는 압력 균질화에 의해 기계적으로 사이징될 수 있다. 폴리사카라이드 내의 탄수화물의 부분 산화는 알데히드 기를 생성하는데 효과적으로 이용되었으며, 이어서 이는 아민 기, 예컨대 운반체 단백질의 리신 잔기에 커플링되어 면역원성 접합체를 생성한다. 폴리사카라이드를 운반체 단백질에 접합시키는데 사용되는 방법은 안정한 공유 연결을 생성하고, 반응 조건은 개별 성분의 구조적 완전성을 유지하기에 충분히 온화한 것이라는 점이 중요하다. 폴리사카라이드를 활성화시키고 운반체 단백질에 커플링하는데 통상적으로 사용되는 방법은 환원성 아미노화 화학 (RAC), 시아닐화, 및 카르보다이미드의 사용을 포함한다. 환원성 아미노화는 이웃자리 -OH 기를 활성 알데히드 기로 선택적으로 산화시키기 위해 전형적으로 과아이오딘산나트륨 또는 과아이오딘산칼륨 또는 과아이오딘산의 사용을 포함한다. 시아닐화는 -OH 기를 활성 -CN 기로 무작위로 전환시키는데 사용된다. 카르보다이미드는 -OH 기를 카르보다이미드로 대체함으로써 카르복실 기를 활성화시키는데 사용된다.
- [0083] 환원성 아미노화 화학 (RAC)은, 폴리사카라이드의 생성된 카르보닐 기와 운반체 단백질의 아미노 기 사이의 반응이 상응하는 슈프 염기를 형성할 수 있으며, 이는 이어서 소듐 시아노보로히드라이드 (NaCNBH₃)의 존재 하에 매우 안정한 포화 탄소-질소 결합으로 선택적으로 환원될 수 있기 때문에, 폴리사카라이드를 단백질에 커플링하는데 사용되는 가능 통상적인 방법 중 하나이다. 또한, 환원성 아미노화는 사카라이드 및 단백질 성분의 구조적 완전성을 보존하기에 충분히 온화한 조건 하에 수용액 중에서 수행될 수 있다. 접합 후에, 이어서 미반응 알데히드는 소듐 보로히드라이드 (NaBH₄) 환원을 통해 캡핑될 수 있다. 이어서, 접합체는 정제되어 (예를 들어, 한외여과/정용여과에 의해), 숙시네이트 완충 염수 중의 최종 벌크 당접합체를 제공할 수 있다.
- [0084] 그러나, 특정한 폴리사카라이드에 따라, 상기 언급된 통상의 방법의 사용이 항상 충분한 결과를 제공하지는 않는다. 예를 들어, 과아이오딘산나트륨을 사용한 폴리사카라이드의 직접 산화는 폴리사카라이드 백본의 절단을 유발할 수 있다.
- [0085] 예를 들어, 표준 퍼아이오데이트 산화 조건 (환원성 아미노화가 후속됨)을 사용하여 제조된 접합체의 경우에, 대표적인 배치는 25°C 이상에서, 유리 폴리사카라이드의 증가 및 분자량의 감소를 나타내는 것으로 관찰되었다. 본 개시내용은 N-옥소암모늄 염 기반의 산화 방법의 사용이 여러 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 접합체, 특히 혈청형 12F의 개선된 안정성을 발생시킨다는 발견을 제공한다. 특히, 실시예 1 내지 7에 추가로 상세히 제시된 바와 같이, 자유 라디칼 2,2,6,6,-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO)는 생성된 접합체의 안정성을 개선하기 위해 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 조합하여 사용되어 혈청형 12F, 10A, 3 및 33F의 1급 히드록실 기를 효과적으로 산화시켰다. TEMPO/NCS를 사용하는 알데히드로의 1급 알콜의 선택적 산화가 유기 용매 중에서 소분자를 사용하는 유기 화학 반응의 문맥에서 제시되었다(예를 들어, 문헌 [Einhorn et al., J. Org. Chem. 61, pp. 7452-7454 (1996)] 참조), 본 개시내용은 TEMPO/NCS가 안정한 폴리사카라이드 단백질 접합체를 생산하기 위해 수용액 중에서 복합 폴리사카라이드를 선택적으로 산화시키는 산화 작용제로서 사용될 수 있다는 신규 발견을 제공한다.
- [0086] 따라서, 한 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 사카라이드를 안정한 니트록실 라디칼 화합물 및 산화제와 반응시켜 활성화 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는, 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0087] 한 측면에서, 미반응 알데히드 기는 운반체 단백질과의 접합 후에, 보로히드라이드를 사용하는 캡핑 단계 동안 1급 알콜로 다시 전환되고, 따라서 산화에 이어서 접합을 수반하는 변형 단계 동안 사카라이드 에피토프 변형을 최소화한다.
- [0088] 한 측면에서, 반응의 단계 a)는 수성 용매 중에서 수행된다. 또 다른 측면에서, 단계 a)는 비양성자성 용매 중

에서 수행된다. 한 측면에서, 단계 a)는 DMSO (디메틸설폭시드), 디메틸아세트아미드 (DMA), 술폴란, N-메틸-2-피롤리돈 (NMP), 헥사메틸포스포르아미드 (HMPA) 중에서 또는 DMF (디메틸포름아미드) 용매 중에서 수행된다.

- [0089] 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물이다. 바람직하게는 상기 화합물은 산화제의 존재 하에 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 보다 바람직하게는, 상기 화합물은 산화제의 존재 하에 카르복실 기로의 과잉 산화 없이 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO 또는 PROXYL (2,2,5,5-테트라메틸-1-피롤리딘옥시) 모이어티를 보유하는 분자이다. 바람직하게는 상기 분자는 산화제의 존재 하에 2급 히드록실 기에 영향을 미치지 않으면서 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 보다 바람직하게는 상기 분자는 산화제의 존재 하에 카르복실 기로의 과잉 산화 없이 1급 알코올을 선택적으로 산화시켜 알데히드 기를 생성하는 능력을 갖는다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO 또는 그의 유도체이다. 한 실시양태에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO, 2,2,6,6-테트라메틸-4-(메틸설포닐옥시)-1-피페리디노옥시, 4-포스포노옥시-TEMPO, 4-옥소-TEMPO, 4-메톡시-TEMPO, 4-이소티오시아네이트-TEMPO, 4-(2-아이오도아세트아미드)-TEMPO 자유 라디칼, 4-히드록시-TEMPO, 4-시아노-TEMPO, 4-카르복시-TEMPO, 4-(2-브로모아세트아미드)-TEMPO, 4-아미노-TEMPO, 4-아세트아미드-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘 1-옥실로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO이다. 추가 실시양태에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 3β-DOXYL-5α-콜레스탄, 5-DOXYL-스테아르산, 16-DOXYL-스테아르산, 메틸 5-DOXYL-스테아레이트, 3-(아미노메틸)-PROXYL, 3-카르바모일-PROXYL, 3-카르바모일-2,2,5,5-테트라메틸-3-피롤리딘-1-옥실, 3-카르복시-PROXYL, 3-시아노-PROXYL로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 산화제는 N-할로 모이어티를 보유하는 분자이다. 바람직하게는 상기 분자는 니트록실 라디칼 화합물의 존재 하에 1급 알코올을 선택적으로 산화시키는 능력을 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 산화제는 N-클로로숙신이미드, N-브로모숙신이미드, N-아이오도숙신이미드, 디클로로이소시아누르산, 1,3,5-트리클로로-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디브로모이소시아누르산, 1,3,5-트리브로모-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디아이오도이소시아누르산 및 1,3,5-트리아이오도-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 산화제는 N-클로로숙신이미드이다.
- [0090] 한 측면에서, 사카라이드는 0.1 내지 10 몰 당량의 산화제와 반응한다. 바람직하게는, 사카라이드는 0.2 내지 5, 0.5 내지 2.5 또는 0.5 내지 1.5 몰 당량의 산화제와 반응한다. 한 측면에서, 폴리사카라이드는 약 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8 또는 5 몰 당량의 산화제와 반응한다.
- [0091] 한 측면에서, 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 촉매량으로 존재한다. 한 측면에서, 사카라이드는 약 0.3 몰 당량 미만의 안정한 니트록실 라디칼 화합물과 반응한다. 한 측면에서, 사카라이드는 약 0.005 몰 당량 미만의 안정한 니트록실 라디칼 화합물과 반응한다. 한 측면에서, 사카라이드는 약 0.005, 0.01, 0.05 또는 0.1 몰 당량의 안정한 니트록실 라디칼 화합물과 반응한다.
- [0092] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 수성 용매 중에서 사카라이드를 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리딘옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 반응시켜 활성화 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 운반체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는, 운반체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 당접합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0093] 다른 실시양태에서, 방법은, 예를 들어 정용여과에 의해 당접합체를 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0094] 각 경우에, 사카라이드는 폴리사카라이드, 올리고사카라이드 및 모노사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0095] 각 경우에, 상기 사카라이드는 발효 배지로부터 정제되거나 또는 합성적으로 유래될 수 있다.
- [0096] 빈번한 실시양태에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 한 실시양태에서, 박테리아 협막 폴리사카라이드는 에스. 뉴모니아에로부터 유래된 협막 폴리사카라이드이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 박테리아 협막 폴리사카라이드는 엔. 메닌기티디스로부터 유래된 협막 폴리사카라이드이다.
- [0097] 한 실시양태에서 본 개시내용의 당접합체를 생산하는 방법은 그것이 생산된 후에 사카라이드-운반체 단백질 접합체를 분리시키는 단계를 포함한다. 빈번한 실시양태에서, 당접합체는 한외여과에 의해 분리된다.

- [0098] 한 실시양태에서, 단리된 에스. 뉴모니아에 협막 폴리사카라이드-운반체 단백질 접합체를 생산하는 방법에 사용된 운반체 단백질은 CRM₁₉₇을 포함한다. 한 실시양태에서, 단리된 엔. 메닌기티디스 협막 폴리사카라이드-운반체 단백질 접합체를 생산하는 방법에 사용된 운반체 단백질은 CRM₁₉₇을 포함한다.
- [0099] 한 실시양태에서, CRM₁₉₇은 약 1:1의 중량비로 활성화 폴리사카라이드와 반응한다.
- [0100] 한 실시양태에서, 단리된 에스. 뉴모니아에 협막 폴리사카라이드-운반체 단백질 접합체를 생산하는 방법은 폴리사카라이드-운반체 단백질 접합체 반응 혼합물을 캡핑하여 미반응 활성화 기를 제거하는 단계를 포함한다.
- [0101] 한 실시양태에서, 협막 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체를 생산하는 방법에서 CRM₁₉₇은 약 0.4:1 CRM₁₉₇:협막 폴리사카라이드 분자의 중량비로 첨가된다. 다른 실시양태에서, CRM₁₉₇:협막 폴리사카라이드의 중량비는 약 0.5:1, 약 0.6:1, 약 0.7:1, 약 0.8:1, 약 0.9:1, 약 1:1, 약 1.1:1, 약 1.2:1, 약 1.3:1, 약 1.4:1, 또는 약 1.5:1이다.
- [0102] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 당접합체를 생산하는 방법에 사용된 사카라이드는 약 10 kDa 내지 약 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시양태에서, 분자량은 약 50 kDa 내지 약 1,000 kDa, 약 50 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 200 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 3,000 kDa이다.
- [0103] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생산된 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0104] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 수득가능한 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0105] 면역원성 조성물
- [0106] 용어 "면역원성 조성물"은 대상체에서 면역 반응을 유발하는데 사용될 수 있는, 항원, 예를 들어 미생물 또는 그의 성분을 함유하는 임의의 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0107] 본원에 사용된 "면역원성"은 체액성 또는 세포성 중 어느 하나로 매개되거나, 또는 둘 다로 매개된 숙주, 예컨대 포유동물에서 면역 반응을 유발하는, 항원 (또는 항원의 에피토프), 예컨대 박테리아 협막 폴리사카라이드, 또는 당접합체 또는 항원을 포함하는 면역원성 조성물의 능력을 의미한다.
- [0108] 따라서, 본원에 사용된 "당접합체" 또는 "접합체"는 면역 반응을 유발하는데 사용될 수 있는, 운반체 분자에 접합된 박테리아 협막 폴리사카라이드의 항원 또는 항원 결정기 (즉, 에피토프)를 함유하는 임의의 당접합체를 의미한다.
- [0109] 당접합체는 세포 표면에서 MHC 분자와 회합한 항원의 제시에 의해 숙주를 감작시키는 작용을 할 수 있다. 또한, 항원-특이적 T-세포 또는 항체는 면역화 숙주의 추후 보호를 가능하게 하도록 생성될 수 있다. 따라서, 당접합체는 박테리아에 의한 감염과 연관된 하나 이상의 증상으로부터 숙주를 보호할 수 있거나, 또는 협막 폴리사카라이드와 연관된 박테리아에의 감염으로 인한 사망으로부터 숙주를 보호할 수 있다. 당접합체는 또한 대상체에게 수동 면역을 부여하는데 사용될 수 있는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 당접합체는 또한, 동물 효능 모델에서 또는 옹소닌식세포 사멸 검정을 통해 박테리아를 사멸시킴으로써 측정 시에 기능적인 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0110] "항체"는 이뮤노글로불린 분자의 가변 영역에 위치하는 적어도 1개의 항원 인식 부위를 통해, 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적 결합할 수 있는 이뮤노글로불린 분자이다. 문맥에 의해 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 용어는 무손상 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 뿐만 아니라, 조각된 항체 (예를 들어, 키메라, 인간화 및/또는 유도체화되어 이펙터 기능, 안정성 및 다른 생물학적 활성을 변경함) 및 그의 단편 (예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 쇠 (ScFv) 및 도메인 항체 (상어 및 낙타류 항체 포함), 및 항체 일부, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체임) 및 본원에 기재된 바와 같은 항체 단편을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 이뮤노글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 배위를 포괄하는 것으로 의도된다. 항체는 임의의 클래스의 항체, 예컨대 IgG, IgA, 또는 IgM (또는 그의 하위부류)을 포함하고, 항체는 어떠한 특별한 클래스일 필요는 없다. 그의 중쇄의 불변 도메인의 항체 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 클래스로 할당될 수 있다. 이뮤노글로불린의 5개의 주요 클래스가 존재한다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이고, 이들 중 몇몇은 인간에서 추가로 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 나뉘어질 수 있다. 이뮤

노글로불린의 상이한 클래스에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 불린다. 이뮤노글로불린의 상이한 클래스의 서브유닛 구조 및 3차원 배위는 익히 공지되어 있다.

- [0111] "항체 단편"은 단지 무손상 항체의 일부만을 포함하며, 여기서 일부는 바람직하게는, 무손상 항체 내에 존재하는 경우에 그 일부와 통상적으로 연관된 기능들 중 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 모든 기능을 보유한다.
- [0112] 용어 "항원"은 일반적으로, 동물에 주사되거나 흡수되는 조성물을 비롯한, 동물에서 항체 또는 T-세포 반응, 또는 둘 다의 생산을 자극할 수 있는 면역원성 조성물 또는 면역원성 물질 중의 생물학적 분자, 통상적으로 단백질, 펩티드, 폴리사카라이드 또는 접합체를 지칭한다. 면역 반응은 전체 분자, 또는 분자의 다양한 부분 (예를 들어, 에피토프 또는 합텐)에 대해 생성될 수 있다. 상기 용어는 개별 분자, 또는 항원 분자의 동종 또는 이종 집단을 지칭하는데 사용될 수 있다. 항원은 항체, T-세포 수용체 또는 특이적 체액성 및/또는 세포성 면역의 다른 요소에 의해 인식된다. "항원"은 또한 모든 관련된 항원성 에피토프를 포함한다. 제시된 항원의 에피토프는 관련 기술분야에 익히 공지된 임의의 다수의 에피토프 맵핑 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J.]을 참조한다. 예를 들어, 선형 에피토프는, 예를 들어 단백질 분자의 일부에 상응하는 고체 지지체 상의 다수의 펩티드를 동시에 합성하고, 펩티드가 상기 지지체에 부착되어 있는 동안 상기 펩티드를 항체와 반응시킴으로써 결정될 수 있다. 이러한 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 4,708,871; 문헌 [Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715]에 기재되어 있으며, 이들 각각은 제시된 바와 같이 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 유사하게, 입체형태적 에피토프는 아미노산의 공간 입체형태를, 예컨대 예를 들어 X 선 결정학 및 2차원 핵 자기 공명에 의해 결정함으로써 확인될 수 있다. 예를 들어, 상기 문헌 [Epitope Mapping Protocols]을 참조한다.
- [0113] 또한, 본 개시내용의 목적을 위해, "항원"은 또한, 단백질이 면역학적 반응을 유발할 수 있는 능력을 유지하고 있는 한, 천연 서열에 대한 변형, 예컨대 결실, 부가 및 치환 (일반적으로, 자연에서 보존적이지만, 비-보존적일 수 있음)을 포함하는 단백질을 지칭하는데 사용될 수 있다. 이들 변형은, 부위-지시된 돌연변이유발을 통해, 또는 특정한 합성 절차를 통해, 또는 유전 공학 접근을 통해 의도한 것일 수 있거나, 또는, 예컨대 항원을 생산하는 숙주의 돌연변이를 통한 우발적인 것일 수 있다. 또한, 항원은 미생물, 예를 들어 박테리아로부터 유래, 수득, 또는 단리될 수 있거나, 또는 전체 유기체일 수 있다. 유사하게, 핵산 면역화 적용에서와 같이, 항원을 발현하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드가 또한 정의에 포함된다. 합성 항원에는 또한, 예를 들어 폴리에피토프, 플랭킹 에피토프, 및 다른 재조합 또는 합성적으로 유래된 항원이 포함된다 (Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157:3242-3249; Suhrbier (1997) Immunol. Cell Biol. 75:402-408; Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 to Jul. 3, 1998).
- [0114] "보호성" 면역 반응은 대상체를 감염으로부터 보호하기 위해 제공되는, 체액성 또는 세포 중 어느 하나로 매개된, 또는 둘 다로 매개된 면역 반응을 유발하는 면역원성 조성물의 능력을 지칭한다. 제공된 보호가 절대적일 필요는 없으며, 즉 대상체의 대조군 집단, 예를 들어 백신 또는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 감염된 동물과 비교하여 통계학적으로 유의한 개선이 존재하는 경우에, 감염을 전적으로 예방하거나 근절시킬 필요는 없다. 보호는 감염 증상의 중증도 또는 발병 신속도를 경감시키는 것으로 제한될 수 있다. 일반적으로, "보호성 면역 반응"은 대상체의 적어도 50%에서 특정한 항원에 대해 특이적인 항체 수준 (각각의 항원에 대해 측정가능한 기능적 항체 반응의 일부 수준 포함)을 증가하도록 유도하는 것을 포함할 것이다. 특정한 상황에서, "보호성 면역 반응"은 대상체의 적어도 50%에서 특정한 항원에 대해 특이적인 항체 수준 (각각의 항원에 대해 측정가능한 기능적 항체 반응의 일부 수준 포함)을 2배 증가하거나 또는 4배 증가하도록 유도하는 것을 포함할 것이다. 특정 실시양태에서, 흡소닌화 항체는 보호성 면역 반응과 상관관계가 있다. 따라서, 보호성 면역 반응은, 예를 들어 하기 기재된 흡소닌식세포 검정에서 박테리아 계수치의 퍼센트 감소를 측정함으로써 검정될 수 있다. 바람직하게는, 적어도 10%, 25%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과 박테리아 계수치 감소가 존재한다. 조성물 중 특정한 접합체의 "면역원성 양"은 일반적으로 그 접합체에 대해 접합 및 비-접합된 총 폴리사카라이드를 기준으로 하여 투여된다. 예를 들어, 20% 유리 폴리사카라이드를 함유하는 헵막 폴리사카라이드 접합체는 100 mcg 용량 중에 약 80 mcg의 접합된 폴리사카라이드 및 약 20 mcg의 비-접합된 폴리사카라이드를 가질 것이다. 접합체에 대한 단백질 기여도는 접합체의 용량을 계산하는 경우에 통상적으로 고려되지 않는다. 일반적으로, 각 용량은 0.1 내지 100 mcg, 특히 0.1 내지 10 mcg, 보다 특히 1 내지 10 mcg의 폴리사카라이드를

포함할 것이다.

- [0115] 본 개시내용의 한 실시양태는 상기 기재된 운반체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 협막 폴리사카라이드를 포함하는 임의의 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0116] 본 개시내용의 면역원성 조성물은 전신, 피부 또는 점막 경로를 통해 면역원성 조성물을 투여함으로써, 예를 들어 에스. 뉴모니아에 박테리아 또는 엔. 메닌기티디스 박테리아에 의한 박테리아 감염에 감수성인 인간을 보호 또는 치료하는데 사용될 수 있거나, 또는 또 다른 대상체에 수동 면역을 부여하는데 사용될 수 있었던 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 제제를 생성하는데 사용될 수 있다. 이들 투여는 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한; 또는 구강/소화관, 기도 또는 비노생식기관으로의 점막 투여를 통한 주사를 포함할 수 있다. 면역원성 조성물은 또한, 동물 효능 모델에서 또는 옹소닌식세포 사멸 검정을 통해 박테리아를 사멸시킴으로써 측정시에 기능적인 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.
- [0117] 특정한 면역원성 조성물에 대한 성분들의 최적량은 대상체에서 적당한 면역 반응을 관찰하는 것을 포함하는 표준 연구에 의해 확인할 수 있다. 초기 백신접종 후, 적절히 간격을 두고 대상체에게 1회 또는 수회 부스터 면역화를 수행할 수 있다.
- [0118] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 면역원성 조성물은 아주반트, 완충제, 동결보호제, 염, 2가 양이온, 비-이온성 세제, 자유 라디칼 산화의 억제제, 희석제 또는 담체 중 적어도 하나를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 면역원성 조성물 내의 아주반트는 알루미늄계 아주반트이다. 한 실시양태에서, 아주반트는 인산알루미늄, 황산알루미늄 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 알루미늄계 아주반트이다. 한 실시양태에서, 아주반트는 인산알루미늄이다.
- [0119] 아주반트는 면역원 또는 항원과 함께 투여되는 경우에 면역 반응을 증진시키는 물질이다. 다수의 시토카인 또는 림포카인이 면역 조절 활성을 갖는 것으로 제시되었고, 따라서 아주반트와 동일하거나 유사한 방식으로 유용할 수 있으며, 이는 인터류킨 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,723,127 참조), 13, 14, 15, 16, 17 및 18 (및 그의 돌연변이체 형태); 인터페론- α , β 및 γ ; 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF) (예를 들어, 미국 특허 번호 5,078,996 및 ATCC 수탁 번호 39900 참조); 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF); 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF); 및 종양 괴사 인자 α 및 β 를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 기재된 면역원성 조성물과 함께 유용한 다른 아주반트는 MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , 및 RANTES를 비제한적으로 포함하는 케모카인; 부착 분자, 예컨대 셀렉틴, 예를 들어 L-셀렉틴, P-셀렉틴 및 E-셀렉틴; 뮤신-유사 분자, 예를 들어 CD34, GlyCAM-1 및 MadCAM-1; 인테그린 패밀리의 구성원, 예컨대 LFA-1, VLA-1, Mac-1 및 p150.95; 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리의 구성원, 예컨대 PECAM, ICAM, 예를 들어 ICAM-1, ICAM-2 및 ICAM-3, CD2 및 LFA-3; 공동-자극 분자, 예컨대 B7-1, B7-2, CD40 및 CD40L; 혈관 성장 인자, 신경 성장 인자, 섬유모세포 성장 인자, 표피 성장 인자, PDGF, BL-1, 및 혈관 내피 성장 인자를 포함하는 성장 인자; Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, 및 DR6을 비롯한 수용체 분자; 및 ICE를 포함하는 카스파제(Caspase)를 포함한다.
- [0120] 면역 반응을 증진시키는데 사용되는 적합한 아주반트는, 비제한적으로, 미국 특허 번호 4,912,094에 기재되어 있는 MPL™ (3-O-탈아실화 모노포스포릴 지질 A, 코릭사(Corixa); 몬타나주 해밀턴)을 추가로 포함할 수 있다. 합성 지질 A 유사체 또는 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물 (AGP), 또는 그의 유도체 또는 유사체가 아주반트로서 사용하기에 또한 적합하고, 이는 코릭사로부터 입수가능하고, 이는 미국 특허 번호 6,113,918에 기재되어 있는 것들이다. 1종의 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노] 에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일-아미노]-b-D-글루코피라노시드이고, 이는 또한 529 (이전에는 RC529로 공지됨)로 공지되어 있다. 이 529 아주반트는 수성 형태 (AF)로서 또는 안정적인 에멀전 (SE)으로서 제제화된다.
- [0121] 다른 아주반트는 뮤라밀 펩티드, 예컨대 N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), N-아세틸-노르뮤라밀-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE); 수중유 에멀전, 예컨대 MF59 (미국 특허 번호 6,299,884) (5% 스쿠알렌, 0.5% 폴리소르베이트 80, 및 0.5% 스펠(Span) 85를 함유 (다양한 양의 MTP-PE를 임의로 함유함)하고, 미세유동화기, 예컨대 모델 110Y 미세유동화기 (마이크로플루이드스(Microfluidics), 매사추세츠주 뉴턴)를 사용하여 서브마이크론 입자로 제제화됨), 및 SAF (10% 스쿠알렌, 0.4% 폴리소르베이트 80, 5% 플루로닉-블록 중합체 L121, 및 thr-MDP를 함유하고, 서브마이크론 에멀전으로 미세유동화되거나, 또는 불택성하여 보다 큰 입자 크기의 에멀전이 생성됨); 불완전 프로이드 아주반트 (IFA); 알루미늄 염 (명반), 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄; 암피겐(Amphigen); 아브리딘

(Avridine); L121/스쿠알렌; D-락티드-폴리락티드/글리코시드; 플루로닉 폴리올; 사멸된 보르데텔라 (Bordetella); 사포닌, 예컨대 미국 특허 번호 5,057,540에 기재된 스티물론(STIMULON)TM QS-21 (안티제닉스 (Antigenics), 매사추세츠주 프라밍햄), 미국 특허 번호 5,254,339에 기재된 이스코매트릭스(ISCOMATRIX)TM (CSL 리미티드(CSL Limited), 오스트레일리아 파크빌), 및 면역자극 복합체 (ISCOMS); 미코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis); 박테리아 리오폴리사카라이드; 합성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 CpG 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,207,646); 유럽 특허 번호 1,296,713 및 1,326,634에 기재된 IC-31 (인터셀 아게(Intercell AG), 오스트리아 비엔나); 백일해 독소 (PT) 또는 그의 돌연변이체, 콜레라 독소 또는 그의 돌연변이체 (예를 들어, 미국 특허 번호 7,285,281, 7,332,174, 7,361,355 및 7,384,640); 또는 이. 콜라이 열-분해성 독소 (LT) 또는 그의 돌연변이체, 특히 LT-K63, LT-R72 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,149,919, 7,115,730 및 7,291,588)를 포함한다.

[0122] 면역원성 조성물은 임의로 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 담체는 연방, 주 정부의 규제 기관, 또는 다른 규제 기관에 의해 승인되거나, 또는 미국 약전, 또는 인간 뿐만 아니라 비-인간 포유동물을 포함하는 동물에서 사용하도록 일반적으로 인식된 다른 약전에 열거된 담체를 포함한다. 용어 담체는 제약 조성물과 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비히클을 지칭하는데 사용될 수 있다. 물, 염수 용액 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은, 특히 주사가 가능한 용액용 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적합한 제약 담체의 예는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기재되어 있다. 제제는 투여 방식에 적합해야 한다.

[0123] 본 개시내용의 면역원성 조성물은, 체액성 및/또는 세포-매개 면역의 상향-조절 또는 하향-조절 중 어느 하나가 관찰되도록, 면역계를 교란시키거나 변경시키는 작용제인 1종 이상의 추가의 면역조절제를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역계의 체액성 및/또는 세포-매개 아암의 상향-조절이 제공된다.

[0124] 특정 면역조절제의 예는, 예를 들어 그 중에서도 미국 특허 번호 5,254,339에 기재된 아주반트 또는 시토카인, 또는 이스코매트릭스TM (CSL 리미티드; 오스트레일리아 파크빌)를 포함한다. 본 개시내용의 면역원성 조성물에 사용될 수 있는 아주반트의 비제한적 예는 리비(RIBI) 아주반트 시스템 (리비 인크.(Ribi Inc.); 몬타나주 해밀턴), 명반, 미네랄 겔, 예컨대 수산화알루미늄 겔, 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 예컨대 프로인트 완전 및 불완전 아주반트, 블록 공중합체 (CytRx; 조지아주 아틀란타), QS-21 (캠브리지 바이오테크 인크.(Cambridge Biotech Inc.); 매사추세츠주 캠브리지), SAF-M (키론(Chiron); 캘리포니아주 에머리빌), 암피겐TM 아주반트, 사포닌, 퀴(Quil) A 또는 다른 사포닌 분획, 모노포스포릴 지질 A, 및 아브리딘 (N,N-디옥타데실-N',N'-비스(2-히드록시에틸)-1,3-디아미노프로판, N,N-디옥타데실-N',N'-비스(2-히드록시에틸)프로판디아민) 지질-아민 아주반트를 포함한다. 본 개시내용의 면역원성 조성물에 유용한 수중유 에멀전의 비제한적 예는 변형된 SEAM62 및 SEAM 1/2 제제를 포함한다. 변형된 SEAM62는 5% (v/v) 스쿠알렌 (시그마(Sigma)), 1% (v/v) 스펜TM 85 세제 (ICI 계면활성제), 0.7% (v/v) 폴리소르베이트 80 세제 (ICI 계면활성제), 2.5% (v/v) 에탄올, 200 mcg/mL 퀴 A, 100 mcg/ml 콜레스테롤, 및 0.5% (v/v) 레시틴을 함유하는 수중유 에멀전이다. 변형된 SEAM 1/2는 5% (v/v) 스쿠알렌, 1% (v/v) 스펜TM 85 세제, 0.7% (v/v) 폴리소르베이트 80 세제, 2.5% (v/v) 에탄올, 100 mcg/ml 퀴 A, 및 50 mcg/ml 콜레스테롤을 포함하는 수중유 에멀전이다. 면역원성 조성물에 포함될 수 있는 다른 면역조절제는, 예를 들어 1종 이상의 인터류킨, 인터페론, 또는 다른 공지된 시토카인 또는 케모카인을 포함한다. 한 실시양태에서, 아주반트는 시클로텍스트린 유도체 또는 다가음이온성 중합체, 예컨대 각각 미국 특허 번호 6,165,995 및 6,610,310에 기재된 것들일 수 있다. 사용될 면역조절제 및/또는 아주반트는 면역원성 조성물이 투여될 대상체, 주사 경로 및 제시될 주사 횟수에 따라 달라질 것으로 이해되어야 한다.

[0125] 본 개시내용의 면역원성 조성물은 복수의 헵막 폴리사카라이드-단백질 접합체에 더하여 1종 이상의 보존제를 추가로 포함할 수 있다. FDA는 다중-용량 (다중-용량) 바이알 내의 생물학적 제품이 몇 가지 예외를 제외하고는 보존제를 함유해야 한다고 요구하고 있다. 보존제를 함유하는 백신 제품은 벤제토늄 클로라이드를 함유하는 백신 (탄저병), 2-페녹시에탄올을 함유하는 백신 (DTaP, HepA, 라임(Lyme), 폴리오(Polio) (비경구)), 페놀을 함유하는 백신 (뉴모(Pneumo), 티포이드(Typhoid) (비경구), 백신니아(Vaccinia)) 및 티메로살을 함유하는 백신 (DTaP, DT, Td, HepB, Hib, 인플루엔자, JE, 메닝(Mening), 뉴모, 라비에스(Rabies))을 포함한다. 주사가 가능한 약물에 사용하도록 승인된 보존제는, 예를 들어 클로로부탄올, m-크레올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 2-페녹시에탄올, 벤제토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 벤질 알콜, 페놀, 티메로살 및 질산페닐제2수은을 포함한다.

[0126] 포장 및 투여 형태

- [0127] 본 개시내용의 제제는 완충제, 염, 2가 양이온, 비-이온성 세제, 동결보호제, 예컨대 당, 및 항산화제, 예컨대 자유 라디칼 스캐빈저 또는 킬레이트화제 중 1종 이상, 또는 그의 임의의 다중 조합물을 추가로 포함할 수 있다. 임의의 1종의 성분의 선택, 예를 들어 킬레이트화제는 또 다른 성분 (예를 들어, 스캐빈저)이 바람직한지 아닌지의 여부를 결정할 수 있다. 투여를 위해 제제화된 최종 조성물은 멸균 및/또는 발열원 무함유여야 한다. 통상의 기술자는 이들 및 다른 성분 중 어떠한 조합이 다양한 인자, 예컨대 요구되는 특정한 저장 및 투여 상태에 따라 본 개시내용의 면역원성 조성물을 함유하는 보존제에서의 포함을 위해 최적화된 것인지를 실험적으로 결정할 수 있다.
- [0128] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 개시내용의 제제는 트리스 (트리메타민), 포스페이트, 아세테이트, 보레이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘 및 숙시네이트로부터 선택되지만, 이에 제한되지 않는 1종 이상의 생리학상 허용되는 완충제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 6.0 내지 약 9.0, 바람직하게는 약 6.4 내지 약 7.4의 pH 범위 내로 완충된다.
- [0129] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 면역원성 조성물 또는 제제의 pH를 조정하는 것이 바람직할 수 있다. 본 개시내용의 제제의 pH는 관련 기술분야에서의 표준 기술을 사용하여 조정될 수 있다. 제제의 pH는 3.0 내지 8.0으로 조정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제의 pH는 3.0 내지 6.0, 4.0 내지 6.0, 또는 5.0 내지 8.0일 수 있거나, 또는 그 범위이도록 조정될 수 있다. 다른 실시양태에서, 제제의 pH는 약 3.0, 약 3.5, 약 4.0, 약 4.5, 약 5.0, 약 5.5, 약 5.8, 약 6.0, 약 6.5, 약 7.0, 약 7.5, 또는 약 8.0일 수 있거나, 또는 그 범위이도록 조정될 수 있다. 특정 실시양태에서, pH는 4.5 내지 7.5, 또는 4.5 내지 6.5, 5.0 내지 5.4, 5.4 내지 5.5, 5.5 내지 5.6, 5.6 내지 5.7, 5.7 내지 5.8, 5.8 내지 5.9, 5.9 내지 6.0, 6.0 내지 6.1, 6.1 내지 6.2, 6.2 내지 6.3, 6.3 내지 6.5, 6.5 내지 7.0, 7.0 내지 7.5, 또는 7.5 내지 8.0일 수 있거나, 또는 그 범위이도록 조정될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 제제의 pH는 약 5.8이다.
- [0130] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 개시내용의 제제는 $MgCl_2$, $CaCl_2$ 및 $MnCl_2$ 를 포함하나 이에 제한되지 않는 1종 이상의 2가 양이온을 약 0.1 mM 내지 약 10 mM 범위의 농도로 포함하며, 약 5 mM 정도가 바람직하다.
- [0131] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 개시내용의 제제는, 선택된 이온 강도 또는 최종 제제 중의 오스몰농도를 생산하기 위해 비경구 투여 시 대상체에 생리학상 허용되는 이온 강도로 존재하고 최종 농도로 포함되는, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 및 황산칼륨을 포함하나 이에 제한되지 않는, 1종 이상의 염을 포함한다. 최종 이온 강도 또는 제제의 오스몰농도는 다중 성분 (예를 들어, 완충 화합물(들) 및 다른 비-완충 염으로부터의 이온)에 의해 결정될 것이다. 바람직한 염, NaCl은 염 농도가 제제의 최종 총 오스몰농도가 비경구 투여 (예를 들어, 근육내 또는 피하 주사)와 상용성이고 다양한 온도 범위에 걸쳐 면역원성 조성물 제제의 면역원성 성분의 장기간 안정성을 촉진하도록 염 농도가 다른 성분 (예를 들어, 당)을 보충하기 위해 선택되면서, 약 250 mM 정도의 범위로부터 존재한다. 염-무함유 제제는 목적하는 최종 오스몰농도 수준을 유지하기 위해 1종 이상의 선택된 동결보호제의 증가된 범위를 허용할 것이다.
- [0132] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 개시내용의 제제는 디사카라이드 (예를 들어, 락토스, 말토스, 수크로스 또는 트레할로스) 및 폴리히드록시 탄화수소 (예를 들어, 들시톨, 글리세롤, 만니톨 및 소르비톨)로부터 선택되나 이에 제한되지 않는 1종 이상의 동결보호제를 포함한다.
- [0133] 특정 실시양태에서, 제제의 오스몰농도는 약 200 mOs/L 내지 약 800 mOs/L 범위 내이고, 바람직한 범위는 약 250 mOs/L 내지 약 500 mOs/L, 또는 약 300 mOs/L - 약 400 mOs/L이다. 염-무함유 제제는, 예를 들어 약 5% 내지 약 25% 수크로스, 바람직하게는 약 7% 내지 약 15%, 또는 약 10% 내지 약 12% 수크로스를 함유할 수 있다. 대안적으로, 염-무함유 제제는, 예를 들어 약 3% 내지 약 12% 소르비톨, 바람직하게는 약 4% 내지 7%, 또는 약 5% 내지 약 6% 소르비톨을 함유할 수 있다. 염화나트륨과 같은 염이 첨가되는 경우에, 이어서 수크로스 또는 소르비톨의 유효 범위는 상대적으로 감소된다. 이들 및 다른 이러한 오스몰농도 및 오스몰농도 고려사항은 충분히 관련 기술분야 내이다.
- [0134] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 개시내용의 제제는 1종 이상의 자유 라디칼 산화 억제제 및/또는 킬레이트화제를 포함한다. 다양한 자유 라디칼 스캐빈저 및 킬레이트화제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본원에 기재된 제제 및 사용 방법에 적용된다. 예는 에탄올, EDTA, EDTA/에탄올 조합물, 트리에탄올아민, 만니톨, 히스티딘, 글리세롤, 시트르산나트륨, 이노시톨 헥사포스페이트, 트리폴리포스페이트, 아스코르브산/아스코르베이트, 숙신산/숙시네이트, 말산/말레에이트, 데스페랄, EDDHA 및 DTPA, 및 상기 중 2종

이상의 다양한 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 비-환원 자유 라디칼 스캐빈저가 제제의 장기간 안정성을 효과적으로 증진시키는 농도로 첨가될 수 있다. 1종 이상의 자유 라디칼 산화 억제제/킬레이트화제는 또한 다양한 조합, 예컨대 스캐빈저 및 2가 양이온으로 첨가될 수 있다. 킬레이트화제의 선택은 스캐빈저의 첨가가 필요한지 아닌지의 여부를 결정할 것이다.

[0135] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 개시내용의 제제는 1종 이상의 비-이온성 계면활성제, 예컨대 비제한적으로 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리소르베이트-80 (트윈(TWEEN)TM 80), 폴리소르베이트-60 (트윈TM 60), 폴리소르베이트-40 (트윈TM 40) 및 폴리소르베이트-20 (트윈TM 20), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 예컨대 비제한적으로 브리즈 58, 브리즈 35 뿐만 아니라 기타, 예컨대 트리톤(TRITON)TM X-100; 트리톤TM X-114, NP40 (노닐 페녹시폴리에톡시에탄올), 스펠TM 85 및 비-이온성 계면활성제의 플루로닉(PLURONIC)TM 시리즈 (예를 들어, 플루로닉TM 121)이며, 바람직한 성분은 약 0.001% 내지 약 2% 농도 (약 0.25% 정도가 바람직함)의 폴리소르베이트-80 또는 약 0.001% 내지 1% 농도 (약 0.5% 정도가 바람직함)의 폴리소르베이트-40이다.

[0136] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 제제는 비경구 투여에 적합한 1종 이상의 추가의 안정화제, 예를 들어 적어도 1개의 티올 (-SH) 기를 포함하는 환원제 (예를 들어, 시스테인, N-아세틸 시스테인, 환원된 글루타티온, 소듐 티오글리콜레이트, 티오술페이트, 모노티오글리세롤, 또는 그의 혼합물)를 포함한다. 대안적으로 또는 임의로, 본 개시내용의 보존제-함유 면역원성 조성물 제제는 제제를 광으로부터 보호하면서 (예를 들어, 호박색 유리 용기를 사용하여) 저장 용기로부터 산소를 제거함으로써 추가로 안정화될 수 있다.

[0137] 본 개시내용의 보존제-함유 면역원성 조성물 제제는 1종 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함할 수 있으며, 이는 그 자체로 면역 반응을 유도하지 않은 임의의 부형제를 포함한다. 적합한 부형제는 거대분자, 예컨대 단백질, 사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 수크로스 (Paoletti et al., 2001, Vaccine, 19:2118), 트레할로스, 락토스 및 지질 응집체 (예컨대, 오일 액적 또는 리포솜)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 담체는 통상의 기술자에게 익히 공지되어 있다. 제약상 허용되는 부형제는, 예를 들어 문헌 [Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN:0683306472]에 논의되어 있다.

[0138] 본 개시내용의 조성물은 동결건조되거나 또는 수성 형태, 즉 용액 또는 현탁액일 수 있다. 액체 제제는 유리하게는 그의 포장된 형태로부터 직접 투여될 수 있으며, 따라서 본 개시내용의 동결건조된 조성물에 달리 요구되는 바와 같이 수성 매질 중에서의 재구성에 대한 필요 없이 주사하기에 이상적이다.

[0139] 본 개시내용의 면역원성 조성물의 대상체에의 직접 전달은 비경구 투여에 의해 (근육내로, 복강내로, 피내로, 피하로, 정맥내로, 또는 조직의 간질 공간으로); 또는 직장, 경구, 질, 국소, 경피, 비강내, 눈, 귀, 폐 또는 다른 점막 투여에 의해 성취될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 비경구 투여는, 예를 들어 대상체의 넓적다리 또는 상완으로 근육내 주사한다. 주사는 바늘 (예를 들어, 피하 바늘)을 통할 수 있지만, 무바늘 주사가 대안적으로 사용될 수 있다. 전형적인 근육내 용량은 0.5 mL이다. 본 개시내용의 조성물은, 예를 들어 액체 용액 또는 현탁액으로서의 주사를 위한 다양한 형태로 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은, 예를 들어 흡입기에서 폐 투여를 위한 분말 또는 스프레이로서 제조될 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물은 좌제 또는 폐사리로서, 또는 비강, 내이 또는 안구 투여를 위해, 예를 들어 스프레이, 점적제, 겔 또는 분말로서 제조될 수 있다. 특정한 면역원성 조성물을 위한 성분의 최적량은 대상체에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 초기 백신접종 후, 적절히 간격을 두고 대상체에게 1회 또는 수회 부스터 면역화를 수행할 수 있다.

[0140] 본 개시내용의 면역원성 조성물은 단위 용량 또는 다중-용량 형태 (예를 들어, 2회 용량, 4회 용량, 또는 그 초과)로 포장될 수 있다. 다중-용량 형태를 위해, 사전-충전된 시린지보다 바이알이 필수적이진 않지만 전형적으로 바람직하다. 적합한 다중-용량 형태는 다음을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 용량당 0.1 내지 2 mL에서의 용기당 2 내지 10회 용량. 특정 실시양태에서, 용량은 0.5 mL 용량이다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 국제 특허 출원 W02007/127668을 참조한다.

[0141] 조성물은 바이알 또는 다른 적합한 저장 용기로 제시될 수 있거나, 또는 사전-충전된 전달 장치, 예를 들어 바늘이 공급되거나 공급되지 않을 수 있는 단일 또는 다중 성분 시린지로 제시될 수 있다. 시린지는 필수적이진 않지만 전형적으로 본 개시내용의 보존제-함유 면역원성 조성물의 단일 용량을 함유할지라도, 다중-용량, 사전-충전된 시린지가 또한 고려된다. 마찬가지로, 바이알은 단일 용량을 포함할 수 있지만, 대안적으로 다중 용량을 포함할 수 있다.

- [0142] 유효 투여량 부피는 통상적으로 확립될 수 있지만, 주사를 위한 조성물의 전형적인 용량은 0.5 mL의 부피를 갖는다. 특정 실시양태에서, 용량은 인간 대상체에게 투여하도록 제제화된다. 특정 실시양태에서, 용량은 성인, 10대, 청소년, 유아 또는 영아 (즉, 1세 이하) 인간 대상체에게 투여하도록 제제화되고, 바람직한 실시양태에서 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0143] 본 개시내용의 액체 면역원성 조성물은 또한 동결건조 형태로 제시된 다른 면역원성 조성물을 재구성하는데 적합하다. 면역원성 조성물이 이러한 즉석 재구성에 사용되는 경우에, 본 개시내용은 2개 이상의 바이알, 2개 이상의 즉시-충전된 시린지, 또는 이들 각각 중 하나 이상을 갖는 키트를 제공하며, 시린지의 내용물은 바이알의 내용물을 주사 이전에 재구성하는데 사용되거나 또는 그 반대이다.
- [0144] 대안적으로, 본 개시내용의 면역원성 조성물은, 예를 들어 이들을 제조하는데 사용된 정확한 방법을 변형시킴으로써 선택되고 제어될 수 있는 평균 직경 크기와 같은 입자 특성을 갖는 건조, 표준 형상 (예를 들어, 구형) 입자, 예컨대 마이크로펠릿 또는 마이크로구체를 형성하기 위해 관련 기술분야에 익히 공지된 다수의 동결 건조 방법 중 하나를 사용하여 동결건조되고 재구성된다. 면역원성 조성물은 임의로 함께 제조될 수 있거나, 또는 개별 건조, 표준 형상 (예를 들어, 구형) 입자, 예컨대 마이크로펠릿 또는 마이크로구체에 함유되는 아주반트를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 본 개시내용은 안정화된, 건조 면역원성 조성물을 포함하는 제1성분을 포함하고, 임의로 본 개시내용의 1종 이상의 보존제, 및 제1성분의 재구성을 위한 멸균, 수용액을 포함하는 제2성분을 추가로 포함하는 면역원성 조성물 키트를 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 수용액은 1종 이상의 보존제를 포함하고, 임의로 적어도 1종의 아주반트 (예를 들어, W02009/109550 (본원에 참조로 포함됨) 참조)를 포함할 수 있다.
- [0145] 또 다른 실시양태에서, 다중-용량 포맷의 용기는 일반 실험실 유리제품, 플라스크, 비커, 눈금 실린더, 발효기, 생물반응기, 튜빙, 파이프, 가방, 병, 바이알, 바이알 마개 (예를 들어, 고무 마개, 캡 상의 스크류), 앰플, 시린지, 이중 또는 다중-챔버 시린지, 시린지 마개, 시린지 플런저, 고무 마개, 플라스틱 마개, 유리 마개, 카트리지가 및 일회용 펜 등으로 이루어지나, 이에 제한되지 않는 군 중 하나 이상으로부터 선택된다. 본 개시내용의 용기는 제조의 재료에 의해 제한되지 않고, 유리, 금속 (예를 들어, 스텝, 스테인레스 스텝, 알루미늄 등) 및 중합체 (예를 들어, 열가소성, 엘라스토머, 열가소성-엘라스토머)와 같은 재료를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 포맷의 용기는 부틸 마개를 갖는 5 mL 쇼트 유형 1 유리 바이알이다. 통상의 기술자는 상기 제시된 포맷이 완전한 목록은 아니지만, 단지 본 개시내용에 이용가능한 다양한 포맷과 관련하여 통상의 기술자에게 지침으로서 제공된다는 것을 인지할 것이다. 본 개시내용에 사용하기 위해 고려된 추가의 포맷은 실험실 장비 판매업체 및 제조업체, 예컨대 미국 플라스틱 코퍼레이션(United States Plastic Corp.) (오하이오주 리마), VWR로부터의 공개된 카탈로그에서 찾아볼 수 있다.
- [0146] 면역 반응을 유도하고 감염에 대해 보호하는 방법
- [0147] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 면역원성 조성물을 위한 사용 방법을 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용의 한 실시양태는 대상체에게 박테리아 항원, 예컨대 병원성 박테리아로부터 유래된 박테리아 혈막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 양의 본원에 기재된 임의의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 병원성 박테리아, 예를 들어 에스. 뉴모니아에에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 본 개시내용의 한 실시양태는 에스. 뉴모니아에에의 감염에 대해 대상체를 보호하는 방법, 또는 에스. 뉴모니아에에의 감염을 예방하는 방법, 또는 박테리아 항원, 예컨대 에스. 뉴모니아에로부터 유래된 박테리아 혈막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 양의 본원에 기재된 임의의 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 에스. 뉴모니아에에 의한 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키는 방법을 제공한다. 본 개시내용의 한 실시양태는 대상체에게 치료 또는 예방 유효량의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 스트렙토코쿠스 종과 연관된 스트렙토코쿠스 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 스트렙토코쿠스 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법은 인간, 수의학, 동물, 또는 농업 치료를 포함한다. 또 다른 실시양태는 본원에 기재된 면역원성 조성물로부터 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 제제를 생성하고, 대상체에게 수동 면역을 부여하는 상기 항체 제제를 사용하는 것을 포함하는, 대상체에서 스트렙토코쿠스 종과 연관된 스트렙토코쿠스 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본 개시내용의 한 실시양태는 외과적 절차 전에 대상체에게 예방 유효량의 양의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 외과적 절차를 받는 대상체에서 스트렙토코쿠스 감염을 예방하는 방법을 제공한다.
- [0148] 항원 또는 면역원성 조성물에 대한 "면역 반응"은 관심 항원 또는 백신 조성물에 존재하는 분자에 대한 체액성

및/또는 세포-매개 면역 반응의 대상체에서의 발생이다. 본 개시내용의 목적을 위해, "체액성 면역 반응"은 항체-매개 면역 반응이고, 본 개시내용의 면역원성 조성물 중의 항원에 대한 약간의 친화도를 인지하고 이와 결합하는 항체의 유도 및 생성을 수반하고, 이때 "세포-매개 면역 반응"은 T-세포 및/또는 다른 백혈구에 의해 매개되는 것이다. "세포-매개 면역 반응"은 주요 조직적합성 복합체 (MHC)의 클래스 I 또는 클래스 II 분자, CD1 또는 다른 비-전통적 MHC-유사 분자와 회합하는 항원성 에피토프의 제시에 의해 유발된다. 이는 항원-특이적 CD4+ T 헬퍼 세포 또는 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 ("CTL")를 활성화시킨다. CTL은 전통적 또는 비-전통적 MHC에 의해 코딩되고 세포의 표면 상에 발현된 단백질과 회합하여 제시되는 펩티드 항원에 대한 특이성을 갖는다. CTL은 세포내 미생물의 세포내 파괴, 또는 이러한 미생물로 감염된 세포의 용해를 유도하고 촉진하는 것을 돕는다. 세포성 면역의 또 다른 측면은 헬퍼 T-세포에 의한 항원-특이적 반응을 수반한다. 헬퍼 T-세포는 상기 기능을 자극하는 것을 돕는 작용을 하고, 그의 표면 상의 전통적 또는 비-전통적 MHC 분자와 회합하여 펩티드 또는 다른 항원을 디스플레이하는 세포에 대해 비특이적인 이펙터 세포의 활성화에 초점을 맞춘다. "세포-매개 면역 반응"은 또한 시토카인, 케모카인 및 활성화 T-세포 및/또는 다른 백혈구, 예컨대 CD4+ 및 CD8+ T-세포로부터 유래된 것들에 의해 생산된 다른 이러한 분자의 생산을 지칭한다. 세포-매개 면역학적 반응을 자극하는 특정한 항원 또는 조성물의 능력은 다수의 검정, 예컨대 림프증식 (림프구 활성화) 검정, CTL 세포독성 세포 검정에 의해, 감각된 대상체에서의 항원에 대해 특이적인 T-림프구에 대한 검정에 의해, 또는 항원으로 재자극하는 것에 대한 반응에서의 T 세포에 의한 시토카인 생산의 측정에 의해 결정될 수 있다. 이러한 검정은 관련 기술분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Erickson et al. (1993) J. Immunol. 151:4189-4199; 및 Doe et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376]을 참조한다.

[0149] 본원에 사용된 "치료" (그의 변형, 예를 들어 "치료한다" 또는 "치료된" 포함)는 다음 중 임의의 하나 이상을 의미한다: (i) 전통적인 백신에서와 같은, 감염 또는 재감염의 예방, (ii) 증상의 중증도의 감소, 또는 그의 제거, 및 (iii) 해당 병원체 또는 장애의 실질적인 또는 완전한 제거. 따라서, 치료는 예방적으로 (감염 전에) 또는 치료적으로 (감염 후에) 수행될 수 있다. 본 개시내용에서, 예방적 치료가 바람직한 방식이다. 본 개시내용의 특정한 실시양태에 따르면, 미생물 감염 (예를 들어, 박테리아, 예컨대 스트렙토코쿠스)에 대해 숙주 동물을, 예방적으로 및/또는 치료적으로 최소화하는 것을 포함하여 치료하는 조성물 및 방법이 제공된다. 본 개시내용의 방법은 대상체에게 예방적 및/또는 치료적 면역을 부여하는데 유용하다. 본 개시내용의 방법은 또한 생의학 연구 적용을 위해 대상체 상에서 실시될 수 있다.

[0150] 본원에 사용된 "포유동물"은 인간 또는 비-인간 동물을 의미한다. 보다 특히, 포유동물은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 연구, 동물원, 스포츠 및 애완 반려 동물, 예컨대 가정용 애완동물, 및 소, 양, 페릿, 돼지, 말, 토끼, 염소, 개, 고양이 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 가축용 동물을 비롯한 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 바람직한 반려 동물은 개 및 고양이이다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0151] 본원에서 둘 다 상호교환적으로 사용된 "면역원성 양" 및 "면역학적 유효량"은 통상의 기술자에게 공지된 표준 검정에 의해 측정된 바와 같은, 세포성 (T-세포) 또는 체액성 (B-세포 또는 항체) 반응 중 하나, 또는 둘 다의 면역 반응을 유발하기에 충분한 항원 또는 면역원성 조성물의 양을 지칭한다.

[0152] 조성물 중 특정한 접합체의 양은 일반적으로 그 접합체에 대해 접합 및 비-접합된 총 폴리사카라이드를 기준으로 하여 계산된다. 예를 들어, 20% 유리 폴리사카라이드를 함유하는 접합체는 100 mcg 폴리사카라이드 용량 중에 약 80 mcg의 접합된 폴리사카라이드 및 약 20 mcg의 비-접합된 폴리사카라이드를 가질 것이다. 접합체에 대한 단백질 기여도는 접합체의 용량을 계산하는 경우에 통상적으로 고려되지 않는다. 접합체의 양은 스트렙토코쿠스 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 각 용량은 0.1 내지 100 mcg, 특히 0.1 내지 10 mcg, 보다 특히 1 내지 10 mcg의 폴리사카라이드를 포함할 것이다. 면역원성 조성물 중 상이한 폴리사카라이드 성분의 "면역원성 양"은 분기될 수 있고, 각각은 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, 또는 약 100 mcg의 임의의 특정한 폴리사카라이드 항원을 포함할 수 있다.

[0153] 에스. 뉴모니아에 "침습성 질환"은 정상적 멸균 부위로부터의 박테리아의 단리이며, 여기서 질환의 연관된 임상 신호/증상이 존재한다. 정상적 멸균 신체 부위는 혈액, CSF, 흉막액, 심막액, 복막액, 관절액/활액, 뼈, 내부 신체 부위 (림프절, 뇌, 심장, 간, 비장, 유리체액, 신장, 췌장, 난소) 또는 다른 정상적 멸균 부위를 포함한다. 침습성 질환을 특징으로 하는 임상 상태는 균혈증, 폐렴, 연조직염, 골수염, 심내막염, 패혈성 쇼크 등을 포함한다.

[0154] 면역원으로서의 항원의 유효성은, 증식 검정에 의해, 세포용해 검정, 예컨대 그의 특이적 표적 세포를 용해시키

는 T-세포의 능력을 측정하는 크로뎀 방출 검정에 의해, 또는 혈청 내의 항원에 대해 특이적인 순환 항체의 수준을 측정하여 B-세포 활성화의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 면역 반응은 또한 항원의 투여 후에 유도된 항원 특이적 항체의 혈청 수준을 측정함으로써, 보다 구체적으로는, 본원에 기재된 바와 같이, 특정한 백혈구의 옵소닌식세포 능력을 증진시키도록 유도된 항체의 능력을 측정함으로써 검출될 수 있다. 반응의 보호 수준은 면역화 숙주를, 투여된 항원으로 시험감염시킴으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응이 요망되는 항원이 박테리아인 경우에, 항원의 면역원성 양에 의해 유도된 보호 수준은, 동물을 상기 박테리아 세포로 시험 감염시킨 후의 생존률 또는 사망률을 검출함으로써 측정된다. 한 실시양태에서, 보호 양은 박테리아 감염과 연관된 적어도 하나의 증상, 예를 들어 감염과 연관된 발열을 측정함으로써 측정될 수 있다. 다중-항원 또는 다중-성분 백신 또는 면역원성 조성물 중의 각각의 항원의 양은 각각의 다른 성분과 관련하여 다양할 것이고, 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은 면역원성 및/또는 생체내 효능을 측정하는 절차를 포함할 것이다. 특정 실시양태에서, 용어 "약"은 제시된 값 또는 범위의 20% 이내, 바람직하게는 10% 이내, 보다 바람직하게는 5% 이내를 의미한다.

[0155] 본 개시내용은 본 개시내용의 헵막 폴리사카라이드 또는 당접합체에 특이적으로 및 선택적으로 결합하는 항체 및 항체 조성물을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 대상체에의 본 개시내용의 헵막 폴리사카라이드 또는 당접합체의 투여 시에 생성된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 헵막 폴리사카라이드 또는 당접합체 중 하나 이상에 대해 직접 정제되거나 단리된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 동물 효능 모델에서 또는 옵소닌식세포 사멸 검정을 통해 박테리아를 사멸시킴으로써 측정 시에 기능적이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 대상체에 수동 면역을 부여한다. 본 개시내용은 통상의 기술자에게 익히 공지된 기술을 사용하여, 본 개시내용의 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자, 및 본 개시내용의 항체 또는 항체 조성물을 생산하는 세포, 세포주 (예컨대, 하이브리도마 세포 또는 항체의 재조합 생산을 위한 다른 조작된 세포주) 또는 트랜스제닉 동물을 추가로 제공한다.

[0156] 본 개시내용의 항체 또는 항체 조성물은 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 제제를 생성하고, 상기 항체 또는 항체 조성물을 사용하여 대상체에게 수동 면역을 부여하는 것을 포함하는, 대상체에서 스트렙토코쿠스 종과 연관된 스타필로코쿠스 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 사용될 수 있다. 본 개시내용의 항체는 또한 진단 방법, 예를 들어 헵막 폴리사카라이드 또는 그의 당접합체의 존재를 검출하거나 또는 그의 수준을 정량화하는데 유용할 수 있다.

[0157] 하기 실시예는 제한하고자 하는 것이 아니라, 예시로서 제공된다. 약어: MW = 분자량; WFI = 주사용수; TEMPO = 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 자유 라디칼; NCS = N-클로로숙신이미드.

[0158] 실시예

[0159] 실시예 1: TEMPO/NCS를 사용하는 Pn 혈청형-12F의 접합

[0160] 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 당접합체의 안정성을 개선하기 위해, 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 자유 라디칼 (TEMPO) 및 공산화제로서 N-클로로숙신이미드 (NCS)를 사용하여 1급 알콜을 알데히드 기로 산화시키는 대안적 화학을 연구하였다. GC/MS 분석은 산화의 부위가 피아이오테이트 매개된 산화의 그것과 상이하다는 것을 제시하였다. TEMPO-NCS 산화의 경우에 α-D-Glcp 및 2-Glcp를 산화시키는 반면에, 피아이오테이트가 사용되는 경우에 α-D-Galp가 산화의 주요 부위였다 (도 1 참조). 본원에서 추가로 상세히 기재된 바와 같이, TEMPO를 촉매량 (≤ 0.1 몰 당량)으로 사용하였고, 목적 산화도 (DO)를 사용된 NCS의 양을 변화시킴으로써 달성하였다. 후속적으로 여러 접합체를 합성하고 특성화하였다. 일반적으로, 혈청형 12F 당접합체의 생산을 하기와 같이 여러 단계로 수행하였다:

[0161] 1) 분자량 50 내지 500 kDa로의 혈청형 12 폴리사카라이드의 가수분해

[0162] 2) TEMPO/NCS를 사용한 혈청형 12F 폴리사카라이드의 활성화

[0163] 3) 활성화 폴리사카라이드의 정제

[0164] 4) 활성화 혈청형 12F의 CRM₁₉₇ 단백질에의 접합

[0165] 5) 혈청형 12F - CRM 접합체의 정제.

[0166] 실시예 2: 혈청형 12F의 가수분해 및 산화

[0167] 폴리사카라이드의 가수분해를 전형적으로 산성 조건 하에 가열하면서 수행하여 평균 분자량을 100 내지 350 kDa

의 목적 범위로 수득하였다. 전형적인 실험은 하기에 기재되어 있다.

- [0168] 가수분해
- [0169] 혈청형 12F 폴리사카라이드 용액을 재킷 반응 용기에 첨가하였다. 여기에, 요구되는 부피의 0.30 M 아세트산 및 주사용수 (WFI)를 첨가하여 ~ 0.1 M 아세트산 농도를 유지하였다. 용액의 pH를 1 N NaOH 또는 빙초산을 사용하여 3.2 ± 0.3 으로 조정하였다. 반응 혼합물의 온도를 $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 로 증가시켰다. 반응 혼합물을 $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 90 -120분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 냉각시키고, 1 M NaOH 용액을 첨가하여 중화시켰다 (pH 7.0). 가수분해된 폴리사카라이드를 30K MWC0 막을 사용하여 WFI에 대해 한외여과/정용여과하여 정제하였다. 용액을 0.22 μm 필터를 통해 여과하고, 산화될 때까지 2 내지 8 $^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다. 가수분해된 폴리사카라이드의 분자량은 분자량이 100 내지 350 kDa의 표적 범위이도록 보장하기 위해 SEC-MALLS에 의해 분석하였다.
- [0170] 부분 산화
- [0171] 한 실험에서, 혈청형 12F 폴리사카라이드를 압력 균질화를 사용하여 기계적으로 사이징시키고 미세유동화기를 사용하여 분자량을 대략 100 내지 500 kDa로 감소시켰다. 사이징된 폴리사카라이드를 4.0 mg/mL의 농도로 반응 용기에 첨가하고, 비카르보네이트/카르보네이트 완충제 (0.5 M NaHCO_3 /0.05 M Na_2CO_3 완충제, pH 8.6)와 1:1 v/v의 비로 혼합하였다. 교반 혼합물에 ≤ 0.1 몰 당량의 TEMPO를 첨가하였다. 반응을 0.6 내지 1.0 몰 당량의 NCS의 첨가에 의해 시작하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후에, 활성화 폴리사카라이드를 30K 한외여과 막을 사용하여 WFI로 정용여과하여 정제하였다. 정제된 폴리사카라이드를 수집하고, 산화도 (D O)를 알데히드 (3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존 (MBTH) 검정 사용) 및 폴리사카라이드 (안트론 검정 사용)의 정량적 측정에 의해 결정하였다.
- [0172] 또 다른 실험에서, 혈청형 12F 폴리사카라이드를 가수분해하여 분자량을 대략 100 내지 500 kDa의 분자량으로 감소시켰다. 혈청형 12F 폴리사카라이드를 반응 용기에 첨가하고, 0.5 M NaHCO_3 /0.05 M Na_2CO_3 완충제 (pH 8.6)와 1:1 v/v의 비로 혼합하였다. 교반된 혼합물에 WFI 중에 용해된 0.6 내지 1.0 몰 당량의 NCS를 첨가하였다. 활성화는 WFI 중에 용해된 대략 0.1 몰 당량의 TEMPO의 첨가에 의해 개시하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후, 활성화 폴리사카라이드를 30K 한외여과 막을 사용하여 WFI로 정용여과하여 정제하였다. 정제된 활성화 폴리사카라이드를 0.2 μm 필터를 통해 여과하고, 사용 전에 4°C 에서 보관하였다.
- [0173] TEMPO/NCS 매개된 산화를 또한 pH 6.5, 7.0, 7.5 및 8.0의 인산나트륨 완충제 중에서 성공적으로 수행하였다. 일부 활성화 실험에서 사카라이드의 과잉산화를 회피하기 위해 1급 알콜, 예컨대 n-프로판올을 사용하여 시약을 쉐킷하였다. 실험의 또 다른 세트에서, 화학적으로 가수분해된 폴리사카라이드를 한외여과/정용여과 정제 단계 없이 직접 산화시켰다.
- [0174] 실시예 3: 혈청형 12F 산화된 폴리사카라이드의 접합
- [0175] 한 실험에서, 정제된 산화된 혈청형 12F 폴리사카라이드를 반응 용기에 첨가하고, 이어서 0.5 M 인산나트륨 완충제 (pH 6.5)를 0.1 M의 최종 완충제 농도로 첨가하였다. 이 용액에, 이전에 동결건조된 CRM₁₉₇을 첨가하고, 균질 용액을 수득하기 위해 철저히 혼합하였다. pH를 묽은 HCl 또는 1N NaOH 용액을 사용하여 6.8로 조정하였다. 이어서, 1.5 몰 당량의 NaCNBH_3 을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온 (23°C)에서 24시간 동안 및 37°C 에서 2.5일 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 1X 0.9% 염수로 희석하고, 미반응 알데히드 기를 2 몰 당량의 소듐 보로히드라이드로 "캡핑"하였다. 캡핑 반응 시간은 3시간이었다.
- [0176] 또 다른 실험에서, 정제된 활성화 혈청형 12F를 반응 용기에 첨가하고, 이어서 0.5 M 인산나트륨 완충제 (pH 6.5)를 0.1 M의 최종 완충제 농도로 첨가하였다. 이 용액에, 이전에 동결건조된 CRM₁₉₇을 첨가하고, 균질 용액을 수득하기 위해 철저히 혼합하였다. pH를 묽은 HCl 또는 1N NaOH 용액을 사용하여 6.8로 조정하였다. 이어서, 3 몰 당량의 NaCNBH_3 을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23°C 에서 24시간 동안 및 37°C 에서 48시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 교반하면서 1X 0.9% 염수로 희석하고, 미반응 알데히드 기를 1 몰 당량의 소듐 보로히드라이드 NaBH_4 로 "캡핑"하였다. 캡핑 반응 시간은 3시간이었다.
- [0177] 또 다른 실험에서, 정제된 활성화 혈청형 12F를 반응 용기에 첨가하고, CRM₁₉₇ 용액과 혼합하였다. 혼합물을 동결건조시키고, 분말을 5 mg/mL의 최종 사카라이드 농도로 0.1 M 인산나트륨 완충제 (pH 6.8) 중에 용해시켰다.

필요한 경우에, pH를 묽은 HCl 또는 1N NaOH 용액을 사용하여 6.8로 조정하였다. 이어서, 3 몰 당량의 NaCNBH₃을 첨가하였다. 반응 혼합물을 23°C에서 24시간 동안 및 37°C에서 48시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 1X 0.9% 염수로 희석하고, 미반응 알데히드 기를 1 몰 당량의 소듐 보로히드라이드 NaBH₄로 "캡핑"하였다. 캡핑 반응 시간은 3시간이었다.

[0178] 실시예 4: 접합체 정제

[0179] 캡핑된 반응 혼합물을 5 μm 필터를 사용하여 여과한 다음, 100K MWCO 한외 여과 막을 사용하여 정제하였다. 접합체를 먼저 10 mM 숙시네이트/0.9% 염수, pH 6.0 완충제를 사용하여 정용여과하였다. 이어서, 정제된 접합체를 0.45/0.22 μm 필터를 통해 여과하여 벌크 접합체를 수득하였다.

[0180] 실시예 5: 산화도

[0181] 혈청형 12F 폴리사카라이드에서의 1급 알코올의 성공적 산화는 TEMPO/NCS 시스템을 사용하여 달성하였다. 가수분해된 혈청형 12F 폴리사카라이드를 NCS 공산화제의 양을 조정하여 산화시킴으로써 산화도 (DO) 수준을 변화시켰다. 상이한 폴리사카라이드 배치 및 분자량을 사용하여 NCS의 양을 변화시키는 것에 의한 DO에 대한 영향은 하기 도 2에 제시되어 있다. 전형적으로 0.5 - 2.5 몰 당량의 NCS를 사용하여 표적 산화도를 달성하였다. 2시간 이후로는 DO에서의 어떠한 유의한 변화도 관찰되지 않기 때문에, 전형적으로 산화 반응은 2시간 이내에 완결된다.

[0182] 여러 혈청형 12F 접합체를 TEMPO/NCS 산화된 폴리사카라이드를 사용하여 생성하고 특성화하였다. 결과를 하기 표 1에 요약하였다. 일부 대표 접합체를 또한 TEMPO/NCS 시스템으로 활성화된 다른 폐렴구균 혈청형을 사용하여 성공적으로 생성하였다. 다른 폐렴구균 혈청형에 대한 접합체의 생성을 위한 절차는 혈청형 12F에 사용된 방법과 동일하였다. 결과는 하기 표 2 내지 4에 기재되어 있다.

[0183] <표 1> 폐렴구균 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체

접합체 배치	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
산화 시간 (hr)	2	2	4	2	2	2
산화도 (D.O)	12.0	6.0	9.6	12.0	11.5	11.5
%활성화 사카라이드 수율	80	71	70	89	86	86
MALLS 에 의한 활성화 사카라이드 MW (kDa)	137	155	170	190	240	240
접합 공정	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Co-Lyo
접합체 결과						
사카라이드 수율 (%)	51.6	76.8	53.6	76.3	65.8	40.7
사카라이드/단백질 비	1.2	0.9	1.0	1.1	1.4	0.9
% 유리 사카라이드	24	10	17	20	23	14
SEC-MALLS 에 의한 Mw (kDa)	2050	3000	3600	1500	2400	2100

[0184]

[0185] <표 2> 폐렴구균 혈청형 3-CRM₁₉₇ 접합체

접합체 배치	Pn3-106-1	Pn3-106-4
폴리사카라이드 MALLS (Mw) kDa	430	430
산화		
산화 시간 (hr)	2	2
D.O.	9.4	15
%활성화 사카라이드 수율	55	65
SEC-MALLS 에 의한 활성화 사카라이드 MW (kDa)	340	360
접합		
접합체 결과		
사카라이드 수율 (%)	29.9	55.0
사카라이드-단백질 비	0.7	1.6
%유리 사카라이드	21.0	30.0
SEC-MALLS 에 의한 MW (kDa)	2100	2600

[0186]

[0187] <표 3> 폐렴구균 혈청형 33F-CRM₁₉₇ 접합체

접합체 배치	33F-#55	33F-#63
폴리사카라이드 MALLS (Mw)	128 kDa	150 kDa
D.O.	20	5
수율	92%	97%
사카라이드 수율	44%	68%
사카라이드-단백질 비	0.54	0.68
유리 사카라이드	<1%	1.10%
유리 단백질	<1%	<1%
SEC-MALLS에 의한 Mw (kDa)	11160 kDa	2730 kDa

[0188]

[0189] <표 4> 페렴구균 혈청형 10A 접합체

접합체 배치	10A-#77	10A-#78	10A-#85	10A-#88	10A-#89	10A-#103	10A-#104
폴리사카라이드 MALLS (MW)	538 Kda	509 Kda	509 Kda				
D.O.	7.9	24	12	6.9	10	11.3	5.7
수율	82%	90%	94%	88%	94%	94%	86%
사카라이드 수율 (%)	35	20	42	35	41	43	36
사카라이드-단백질 비	0.53	0.33	0.73	0.7	0.95	0.6	0.45
유리 사카라이드	<1	20	4.6	1.6	5.7	<1	<1
유리 단백질	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%
SEC-MALLS에 의한 MW	3168	16390	4117	3137	2855	4380	3772

[0190] 실시예 6: TEMPO/NCS 산화 방법을 사용하는 Pn-혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체의 면역원성

[0191] 마우스에서의 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체를 위한 옥소닌식세포 활성 (OPA) 적정을 표준 조건 하에 마우스에서 결정하였다. 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체 (배치 12F-97B; 이 접합체의 특성화 데이터에 대해 또한 상기 표 1 참조) 가 무린 면역원성 모델에서 OPA 적정을 유발한다는 것을 입증하는, 4 및 7주에서의 OPA 적정 (95% 신뢰 구간 (CI)을 갖는 기하 평균 적정 (GMT))은 하기 표 5에 제시되어 있다. TEMPO-NCS에 의해 생성된 접합체는 퍼아이오데이트 산화로부터 생성된 대조군 접합체 (171B)보다 더 면역원성이었다.

[0193] <표 5> 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체의 면역원성

접합체 샘플/용량	0.001 ug	0.01 ug	0.1 ug
퍼아이오데이트 산화 (171B) 대조군	4	16	172
TEMPO/NCS 산화 (12F-97B)	40	417	880

[0194]

[0195] 실시예 7: TEMPO/NCS와 같은 산화제의 존재 하에서의 니트록실 라디칼을 사용한 Pn-혈청형 12F 접합체에 대한 추정 메카니즘

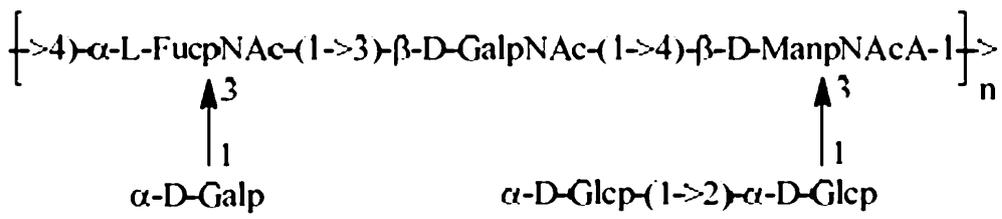
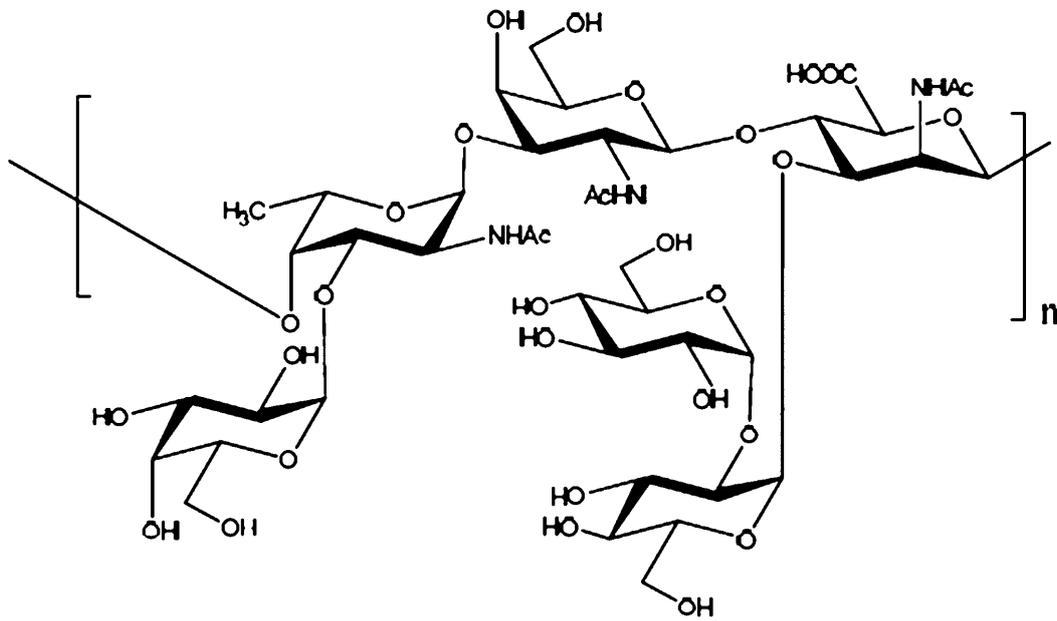
[0196] Pn-혈청형 12F의 산화/접합의 추정 메카니즘이 하기 도 6에 제시되어 있다. 폴리사카라이드의 1급 히드록실 기를 화학량론적 산화제로서의 산화제, 예컨대 NCS와 함께, 니트록실 라디칼, 예컨대 TEMPO의 촉매량에 의해 산화시켰다. 실제 산화제는 촉매 사이클에서 N-옥소암모늄 염이다. C-6 1급 히드록실 기의 산화는 알데히드 기를 생성하였으며, 이는 후속적으로 운반체 단백질 (CRM₁₉₇)의 리신의 1급 아미노 기와 반응하여 당접합체를 생성하였다.

[0197] 실시예 8: 안정성 비교

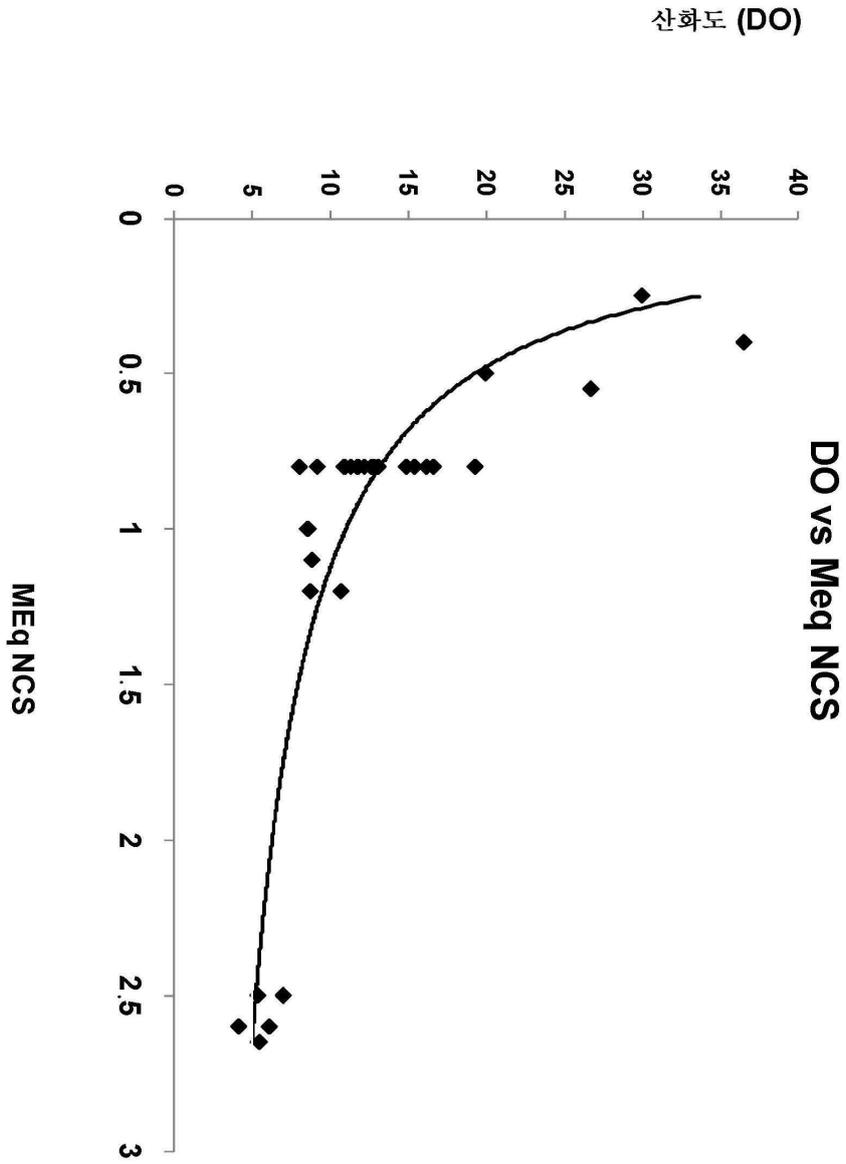
[0198] 퍼아이오데이트 산화 vs TEMPO/NCS 산화에 의해 생성된 접합체의 안정성 (25°C에서)의 비교 (하기 도 7 참조)는 Pn-12F 폴리사카라이드의 산화에 의해 생성된 접합체가 상대적으로 보다 더 안정하다는 것을 입증하였다. 도 7에 제시된 바와 같이, 시간에 따른 유리 사카라이드의 증가는 25°C에서의 Pn-12F 폴리사카라이드의 퍼아이오데이트 산화에 의해 생성된 당접합체의 경우에 관찰되었다. 대조적으로, Pn-12F 폴리사카라이드의 TEMPO/NCS 산화를 사용하여 제조된 당접합체는 유사 조건 하에 유리 사카라이드에 대해서 어떠한 유의한 경향도 나타내지 않았다.

도면

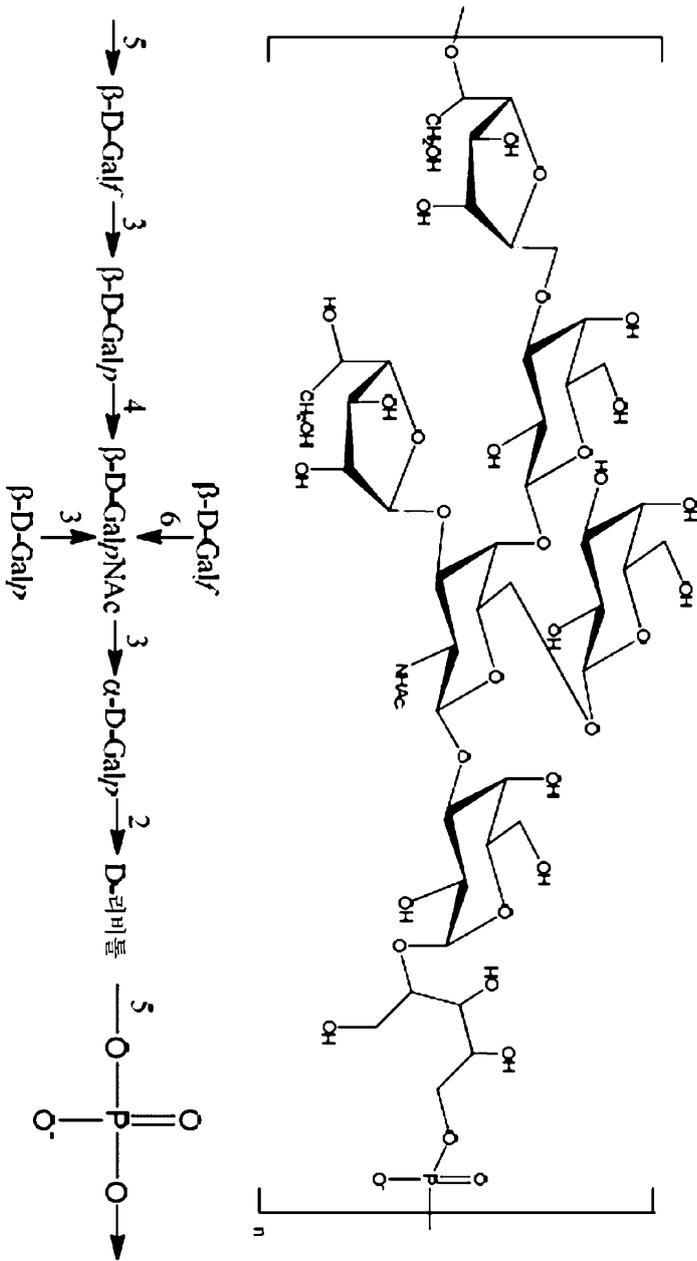
도면1



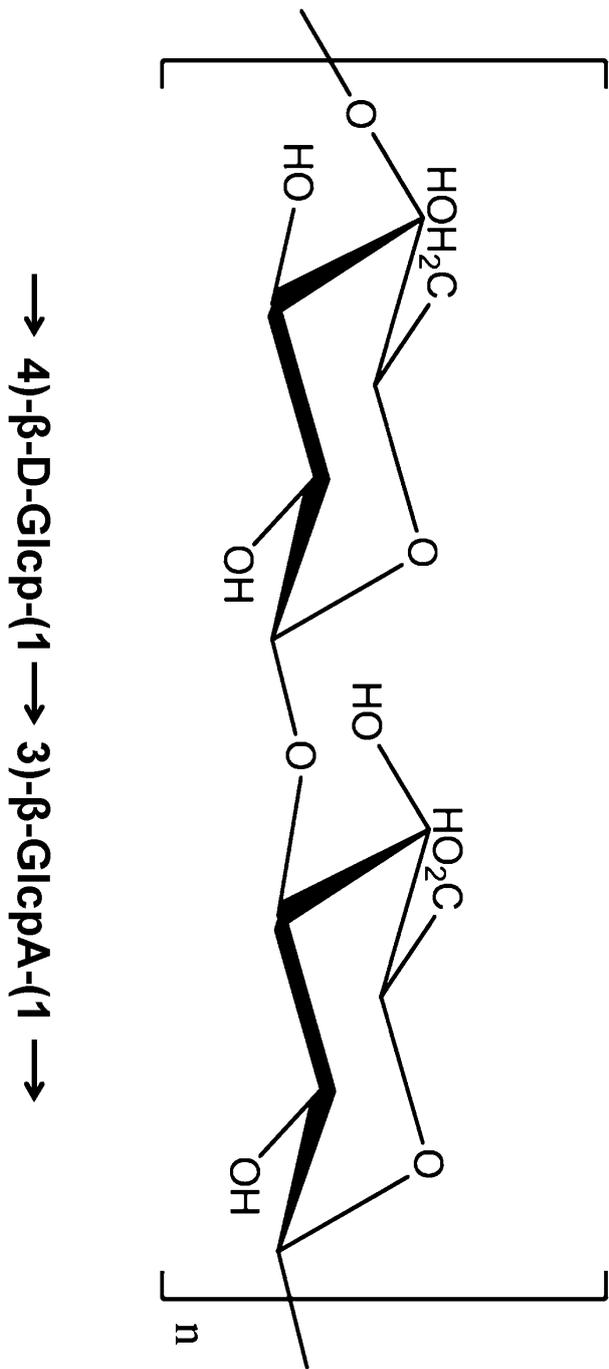
도면2



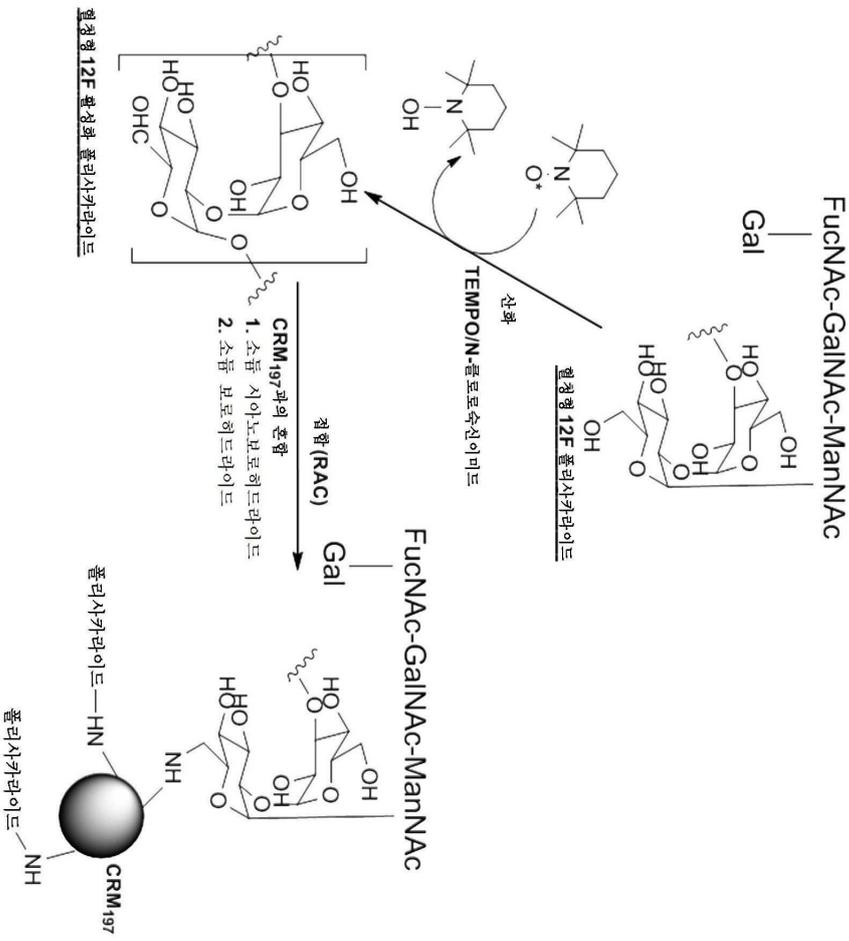
도면3



도면5



도면6



결합체 폴리사카라이드-CRM197-결합체

도면7

