



등록특허 10-2736151



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월28일  
(11) 등록번호 10-2736151  
(24) 등록일자 2024년11월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C08B 37/00* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/09* (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
*C08B 37/006* (2013.01)  
*A61K 39/092* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7009615
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월04일  
심사청구일자 2021년07월09일
- (85) 번역문제출일자 2020년04월02일
- (65) 공개번호 10-2020-0051005
- (43) 공개일자 2020년05월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/049309
- (87) 국제공개번호 WO 2019/050816  
국제공개일자 2019년03월14일
- (30) 우선권주장  
62/555,479 2017년09월07일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현  
JP2014517866 A  
KR1020110091546 A  
US20170021006 A1

(73) 특허권자  
미크 샤프 앤드 더m 엘엘씨  
미국 07065 뉴저지주 라웨이 이스트 링컨 애비뉴  
126

(72) 발명자  
포람보, 리차드, 제이.  
미국 19486 펜실베니아주 웨스트 포인트 섬니타운  
파이크 770  
아베이구나와르다나, 치트라난다  
미국 19454 펜실베니아주 노스 웨일스 노스 섬니  
타운 파이크 351  
(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
장덕순

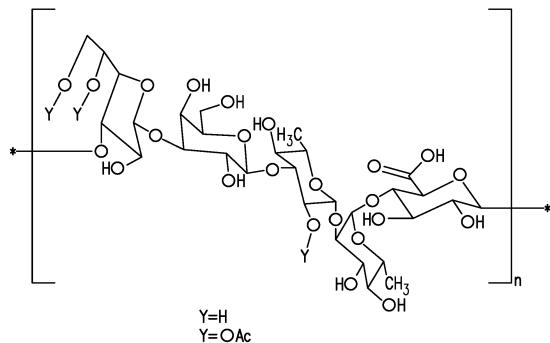
전체 청구항 수 : 총 27 항

심사관 : 박인섭

(54) 발명의 명칭 폐렴구균 폴리사카라이드 및 면역원성 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체에서의 그의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 NMR을 사용하여 확인된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 제공한다. 본 발명은 이들 혈청형 중 1종 이상으로부터의 피막 폴리사카라이드가 담체 단백질, 예컨대 CRM197에 접합된 폴리사카라이드-단백질 접합체를 추가로 제공한다. 이들 혈청형 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 다수의 추가의 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형으로부터의 폴리사카라이드를 갖는 다가 폐렴구균 접합체 백신에 포함될 수 있다.

**대 표 도** - 도1

(52) CPC특허분류

*A61K 47/6415* (2017.08)

*A61K 47/646* (2017.08)

*C08B 37/0003* (2013.01)

*A61K 2039/55505* (2013.01)

*A61K 2039/6037* (2013.01)

*A61K 2039/70* (2013.01)

(72) 발명자

**류세이, 류위 카부카**

미국 19454 펜실베니아주 노스 웨일스 노스 섬니타운  
파이크 351

**코신스키, 마이클, 제이.**

미국 19486 펜실베니아주 웨스트 포인트 섬니타운  
파이크 770

---

**쿠이, 야동 아담**

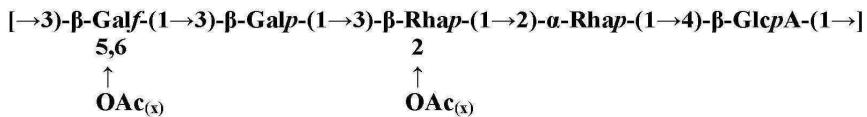
미국 19454 펜실베니아주 노스 웨일스 노스 섬니타운  
파이크 351

## 명세서

## 청구범위

## 청구항 1

폴리사카라이드-담체 단백질 접합체로서, 여기서 폴리사카라이드는 하기 구조의 반복 단위를 포함하고,



여기서 x는 혈청형 31 반복 단위에 대한 0-아세틸 기의 몰비를 나타내는 것으로서 각각 독립적으로 0 내지 1.0이고; 여기서 담체 단백질은 CRM197, 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFB C8, 디프테리아 톡소이드 (DT), 파상풍 톡소이드 (TT), TT의 단편 C, 백일해 톡소이드, 콜레라 톡소이드, 이. 콜라이 (*E. coli*) LT, 이. 콜라이 ST, 또는 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A이고; 추가로 여기서 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체에서 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비는 0.5 내지 2.0인. 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 청구항 2

제1항에 있어서, 담체 단백질이 CRM197인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 접합체의 접합 정도가 2 내지 15인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 청구항 4

제2항에 있어서, 접합체의 접합 정도가 3 내지 13인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 청구항 5

제1항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 1.5인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 청구항 6

제1항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.8 내지 1.2인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 청구항 7

제1항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 50% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 25% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

첨구항 9

제1항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 20% 미만의 비-공유적으로 희합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 10

제1항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 15% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 11

제1항에 있어서, 폴리사카라이드가 25 kDa 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는 것인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 12

제1항에 있어서, 폴리사카라이드가 50 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는 것인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 청구항 13

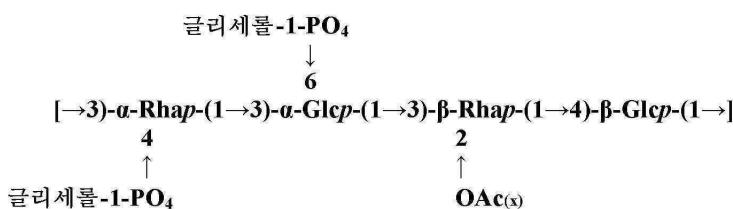
제1항에 있어서, 폴리사카라이드가 100 kDa 내지 300 kDa의 분자량을 갖는 것인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 14

제2항에 있어서, 접합체의 접합 정도가 3 내지 13이고; 폴리사카라이드가 100 kDa 내지 300 kDa의 분자량을 갖고; 접합체 내 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 1.5이고; 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체가 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 15% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하고; 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체가 1,000 kDa 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는, 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 15

폴리사카라이드-단체 단백질 접합체로서, 여기서 폴리사카라이드는 하기 구조의 반복 단위를 포함하고,



여기서  $x$ 는 혈청형 31 반복 단위에 대한 0-아세틸 기의 몰비를 나타내는 것으로서 각각 독립적으로 0 내지 1.0이고; 여기서 담체 단백질은 CRM197이고;

추가로 여기서 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체는 1,000 kDa 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는, 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 접합체의 접합 정도가 2 내지 15인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 17

제15항에 있어서, 접합체의 접합 정도가 3 내지 13이 폴리사카라이드-답체 단백질 접합체.

청구항 18

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 2.0인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

청구항 19

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 1.5인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 20**

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.8 내지 1.2인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 21**

제15항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 50% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 22**

제15항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 25% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 23**

제15항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 20% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 24**

제15항에 있어서, 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 15% 미만의 비-공유적으로 회합된 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 25**

제15항에 있어서, 폴리사카라이드가 25 kDa 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는 것인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 26**

제15항에 있어서, 폴리사카라이드가 50 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는 것인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**청구항 27**

제15항에 있어서, 폴리사카라이드가 100 kDa 내지 300 kDa의 분자량을 갖는 것인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 본 발명은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 31로부터의 정제된 피막 폴리사카라이드 및 이러한 혈청형으로부터의 폴리사카라이드를 갖는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제공한다. 이러한 혈청형으로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 다가 폐렴구균 접합체 백신에 포함될 수 있다.

**배경 기술**

[0002] 피막화된 박테리아의 한 예인 스트렙토코쿠스 뉴모니아에는 전세계적으로 심각한 질환의 유의한 원인이다. 1997년에, 질환 제어 및 예방 센터 (CDC)는 미국에서 매년 3,000건의 폐렴구균성 수막염 사례, 50,000건의 폐렴구균성 박테리아혈증 사례, 7,000,000건의 폐렴구균성 중이염 사례 및 500,000건의 폐렴구균성 폐렴 사례가 존재하는 것으로 추정하였다. 문헌 [Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997, 46(RR-8):1-13]을 참조한다. 추가로, 이를 질환의 합병증은 유의할 수 있으며, 일부 연구는 폐렴구균성 수막염에 의한 최대 8%의 사망률 및 25%의 신경계 후유증을 보고하고 있다. 문헌 [Arditi et al., 1998, Pediatrics 102:1087-97]을 참조한다.

[0003] 수년 동안 허가되어 온 다가 폐렴구균 폴리사카라이드 백신은 성인, 특히 고령자 및 고위험자에서 폐렴구균성

질환을 예방하는데 매우 유용한 것으로 입증되었다. 그러나, 영아 및 소아는 미접합 폐렴구균 폴리사카라이드에 불량하게 반응한다. 박테리아 폴리사카라이드는 T-세포-비의존성 면역원이며, 영아에서 약한 반응을 도출하거나 전혀 반응을 도출하지 않는다. 박테리아 폴리사카라이드 면역원의 담체 단백질에의 화학적 접합은 영아에서의 면역 반응을 T-세포 의존성 면역 반응으로 전환시킨다. 디프테리아 톡소이드 (DTx, DT의 화학적으로 해독된 버전) 및 CRM197은 그의 아미노산 서열 내 T-세포-자극 에피토프의 존재로 인해 박테리아 폴리사카라이드 면역원을 위한 담체 단백질로서 기재되었다.

그 당시 소아 및 영아에서 침습성 폐렴구균성 질환을 야기하는 7종의 가장 빈번하게 단리된 혈청형 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F)을 함유하는 폐렴구균 접합체 백신인 프레브나르(Prevnar)®가 미국에서 2000년 2월에 처음 허가되었다. 미국에서 프레브나르®의 보편적인 사용 후에, 프레브나르®에 존재하는 혈청형으로 인한 아동에서의 침습성 폐렴구균성 질환은 유의하게 감소되었다. 문헌 [Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7]을 참조한다. 그러나, 세계의 특정 지역에서의 프레브나르®에 의한 혈청형 적용범위 및 미국에서의 특정 신생 혈청형 (예를 들어, 19A 등)에 관한 일부 증거에 있어서는 한계가 있다. 문헌 [O'Brien et al., 2004, Am J Epidemiol 159:634-44; Whitney et al., 2003, N Engl J Med 348:1737-46; Kyaw et al., 2006, N Engl J Med 354:1455-63; Hicks et al., 2007, J Infect Dis 196:1346-54; Traore et al., 2009, Clin Infect Dis 48:S181-S189]을 참조한다.

프레브나르 13®은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함하는 13가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신이다. 예를 들어, 미국 특히 출원 공개 번호 US 2006/0228380 A1, 문헌 [Prymula et al., 2006, Lancet 367:740-48 및 Kieninger et al., Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers, presented at the 48<sup>th</sup> Annual ICAAC/ISDA 46<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington DC, October 25-28, 2008]을 참조한다. 또한, 문헌 [Dagan et al., 1998, Infect Immun. 66: 2093-2098 및 Fattom, 1999, Vaccine 17:126]을 참조한다.

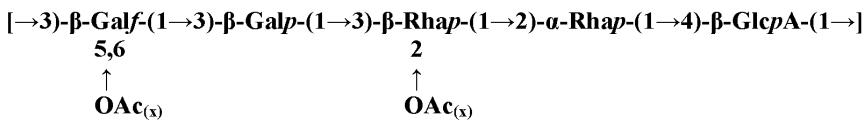
에스. 뉴모니아에는 피막 폴리사카라이드의 구조에 기초하여 90종 초과의 혈청형으로 카테고리화되었다. 공지된 폐렴구균 피막 폴리사카라이드 구조의 목록은 문헌 [Geno, 2015, *Clinical Microbiology Reviews* 28:871-899]에 제공되어 있다. 혈청형 31에 대한 이전에 보고된 구조 (Kamerling, 2000, *Pneumococcal polysaccharides: a chemical view*. In Tomasz A (ed), *Streptococcus pneumoniae molecular biology & mechanisms of disease*. Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, NY. pp. 81-114)는 현재 부정확한 것으로 결정되었다.

현재의 다가 폐렴구균 접합체 백신은 백신에 존재하는 상기 혈청형과 연관된 폐렴구균성 질환의 발생률을 감소시키는데 효과적이었다. 그러나, 백신에 존재하지 않는 혈청형을 발현하는 폐렴구균의 유병률이 증가하고 있다. 따라서, 향후 백신에 포함시키기 위한 신생 폐렴구균 혈청형을 확인하고 특징화하는 것이 필요하다.

## 발명의 내용

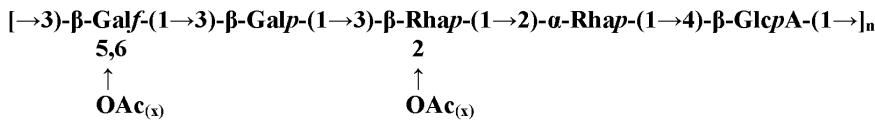
본 발명은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 31로부터의 정제된 피막 폴리사카라이드 및 이러한 혈청형을 갖는 폴리사카라이드 단백질 접합체를 제공한다. 본 발명은 부분적으로 이러한 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드의 구조적 확인에 기초한다.

따라서, 한 실시양태에서, 본 별명은 하기 반복 단위를 갖는 폴리사카라이드를 제공한다:



여기서 각각의 x는 독립적으로 0.0 내지 1.0의 몰비를 나타내고, Galf 상의 OAc기는 5 또는 6 위치 또는 둘 다에 존재할 수 있다

[0012] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 31로부터의 폴리사카라이드는 하기로 나타내어질 수 있다:



[0013] 여기서 n은 반복 단위의 수를 나타낸다.

[0015] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 10 내지 5,000개의 반복 단위를 갖는다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드는 25 내지 3,000개, 100 내지 2,500개, 100 내지 1,000개 및 100 내지 500개의 반복 단위를 갖는다.

[0016] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 4,000 kDa 또는 100 kDa 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 2,000 kDa, 200 kDa 내지 5,000 kDa 또는 100 kDa 내지 250 kDa의 분자량을 갖는다.

[0017] 특정 실시양태에서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드는 혈청형 31 반복 단위에 대한 O-아세틸 기의 몰비 0.0 내지 3.0, 예를 들어 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 또는 2.9 내지 3.0 중 임의의 것을 갖는다. OAc가 결합할 수 있는 3개의 위치의 이용가능성 때문에, 최대 3.0의 몰비가 이용가능하다.

[0018] 본 발명은 추가로 폴리사카라이드가 화학 시약으로 활성화되어 링커 또는 담체 단백질에의 접합을 위한 반응성 기를 생성하는 임의의 상기 실시양태로부터 생성된 활성화된 폴리사카라이드를 제공한다.

[0019] 본 발명은 추가로 상기 제공된 바와 같은 폴리사카라이드 또는 활성화된 폴리사카라이드가 담체 단백질에 접합된 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제공한다. 특정 측면에서, 담체 단백질은 CRM197, 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFB C8, 디프테리아 톡소이드 (DT), 과상풍 톡소이드 (TT), TT의 단편 C, 백일해 톡소이드, 콜레라 톡소이드, 이. 콜라이 (*E. coli*) LT, 이. 콜라이 ST 및 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A로부터 선택된다. 하나의 구체적 측면에서, 담체 단백질은 CRM197이다.

[0020] 특정 측면에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 수성 조건 하에 또는 비양성자성 용매, 예컨대 디메틸 술폴시드 (DMSO) 중에서 환원성 아미노화 화학을 사용하여 제조된다. 구체적 측면에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 DMSO 중에서 환원성 아미노화 화학을 사용하여 제조된다.

[0021] 한 실시양태에서, 본 발명은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 31로부터의 미접합 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-단백질 접합체 및 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18B, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 27, 28A, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 미접합 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 다가 면역원성 조성물을 제공한다. 한 하위실시양태에서, 다가 면역원성 조성물은 미접합 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 포함하나 둘 다를 포함하지는 않는다. 한 하위실시양태에서, 다가 면역원성 조성물은 미접합 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체의 혼합물을 포함한다. 특정 하위실시양태에서, 본 발명의 다가 면역원성 조성물은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 또는 90종 이하의 혈청형을 갖는다.

### 도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드의 반복 단위 구조의 그래프 표현을 도시한다.

도 2는 50°C에서 D<sub>2</sub>O 중 에스. 뉴모니아에 혈청형 31로부터의 피막 폴리사카라이드의 600 MHz 1차원 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼을 도시한다. 내부 표준 (DMSO 및 DSS-d<sub>6</sub>), 잔류 물 (HOD) 및 정제 공정으로부터의 다른 잔류 성분; 에탄올 (EtOH), 이소프로판올 (IPA) 및 아세테이트로부터 발생하는 신호가 표시되어 있다. \*로 표시되는 부차적 신호는 에스. 뉴모니아에 세포벽 잔류물, 예컨대 C-폴리사카라이드 및/또는 펩티도글리칸으로 인한 것이다.

도 3은 에스. 뉴모니아에 혈청형 31의 혈청형 확인에 사용될 1차원 (1D) <sup>1</sup>H NMR 동일성 영역을 도시한다. 각각의 모노사카라이드 잔기로부터의 반복 단위의 각각의 아노머 양성자의 신호 위치가 표시되어 있다.

도 4는 반복 구조 내의 당 잔기들 사이의 공유 연결을 확립하는 탈-0-아세틸화된 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드의 부분적인 2차원 (2D)  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  다중 결합 상관관계 NMR 스펙트럼을 도시한다. 글리코시드 연결을 확립하는 상관관계가 도면에 표지되어 있다.

도 5는 0-아세테이트 연결을 확립하는 정제된 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드의 부분적인 2D  $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$  다중 결합 상관관계 NMR 스펙트럼을 도시한다.

도 6: CRM197에 접합되고 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 사용하여 제제화된 에스. 뉴모니아에 1가 혈청형으로 면역화된 토끼에 대한 ELISA IgG 항체 역가 (투여 2 후). 오차 막대는 기하 평균 + 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 7: CRM197에 접합되고 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 사용하여 제제화된 에스. 뉴모니아에 1가 혈청형으로 면역화된 토끼에 대한 혈청형 특이적 OPA 역가 (투여 2 후). 오차 막대는 기하 평균 + 95% 신뢰 구간을 나타낸다.

도 8은 다가 폐렴구균 접합체 백신 ( $2 \mu\text{g}/\text{PnPs}$ )으로 면역화된 토끼에 대한 혈청형 특이적 (에스. 뉴모니아에 혈청형 16F, 23A, 23B, 24F, 31) 면역전, PD1 및 PD2 기하 평균 항체 역가를 보여준다. 오차 막대는 각각의 혈청형 (X-축)의 기하 평균 역가의 2 표준 오차를 나타낸다.

도 9는 다가 폐렴구균 접합체 백신 ( $2 \mu\text{g}/\text{PnPs}$ )으로 면역화된 토끼에 대한 혈청형 특이적 (에스. 뉴모니아에 혈청형 16F, 23A, 23B, 24F, 31) 면역전, PD1 및 PD2 OPA 희석률 역가를 보여준다. 기호는 개별 역가를 나타내고, 오차 막대는 기하 평균 역가 (GMT)의 95% 신뢰 구간 (CI)을 나타낸다. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , ns=유의하지 않음.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본 발명은 부분적으로 NMR 기술에 의한 신규 폐렴구균 폴리사카라이드 구조(들)의 확인에 기초한다. 본원에 제공된 구조는 에스. 뉴모니아에 혈청형 31의 최초 확인 또는 최초 정확한 확인인 것으로 여겨진다.

[0024]

에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드를 그의 각각의 균주로부터 생산하고 정제하였다. 생산된 (및 정제된) 폴리사카라이드를 사용하여 개별 Ps-CRM197 접합체를 생성하였다. 에스. 뉴모니아에 혈청형 31은 독특한 폴리사카라이드 구조를 가지며, 이는 독특한 접합체 생산 공정을 가져온다. 생성된 접합체(들)는 동물 연구에서 면역원성인 것으로 입증되었다.

[0025]

본원에 사용된 용어 "폴리사카라이드" (Ps)는 "사카라이드", "올리고사카라이드", "폴리사카라이드", "리포사카라이드", "리포-올리고사카라이드 (LOS)", "리포폴리사카라이드 (LPS)", "글리코실레이트", "당접합체", "유도체화된 또는 활성화된 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 면역학적 및 박테리아 백신 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 항원성 사카라이드 요소 (또는 항원성 단위)를 포함하는 것으로 의도된다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 폴리사카라이드 명명법은 [IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBM) Recommendations 1980]을 따른다. 문헌 [JCBN, 1982, J. Biol. Chem. 257:3352-3354]을 참조한다.

[0026]

본원에 사용된 "면역원성 조성물"은 숙주, 예컨대 포유동물에서 체액으로 또는 세포로 또는 둘 다로 매개되는 면역 반응을 도출하는 능력을 갖는 항원, 예컨대 박테리아 피막 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 함유하는 조성물을 지칭한다. 면역원성 조성물은 세포 표면에서 MHC 분자와 결합하여 항원을 제시함으로써 숙주를 감작화시키는 역할을 할 수 있다. 추가로, 향후 면역화된 숙주를 보호해줄 수 있는 항원-특이적 T-세포 또는 항체를 생성할 수 있다. 따라서 면역원성 조성물은 박테리아에 의한 감염으로부터 숙주를 보호할 수 있거나, 중증도를 감소시킬 수 있거나, 또는 박테리아 감염으로 인한 사멸로부터 숙주를 보호할 수 있다. 면역원성 조성물은 또한 대상체에게 수동 면역을 부여하기 위해 사용될 수 있는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 면역원성 조성물은 또한 동물 효능 모델에서 또는 옵소닌식세포 사멸 검정을 통해 박테리아의 사멸로 즉정시 기능적인 항체를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0027]

본원에 사용된 바와 같이, 폴리사카라이드와 관련하여 용어 "단리된"은 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄으로의 처리, 투석여과 및/또는 칼럼 크로마토그래피의 사용을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 정제된 폴리사카라이드로부터 에스. 뉴모니아에 혈청형 특이적 피막 폴리사카라이드가 단리된 것을 지칭한다. 일반적으로, 단리된 폴리사카라이드는 단백질, 핵산 및 비-특이적 내인성 폴리사카라이드 (C-폴

리사카라이드)의 부분적인 제거를 지칭한다. 단리된 폴리사카라이드는 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만의 단백질 불순물 및/또는 핵산을 함유한다. 단리된 폴리사카라이드는 유형 특이적 폴리사카라이드에 대해 20% 미만의 C-폴리사카라이드를 함유한다.

[0028] 본원에 사용된 바와 같이, 박테리아 피막 폴리사카라이드와 관련하여 용어 "정제된"은 원심분리, 침전 및 한외여과와 같은 수단을 통해 세포 용해물로부터 폴리사카라이드가 정제된 것을 지칭한다. 일반적으로, 정제된 폴리사카라이드는 세포 파편 및 DNA의 제거를 지칭한다.

[0029] 본원에 사용된 용어 "M<sub>w</sub>"는 중량 평균 분자량을 지칭하고, 전형적으로 Da 또는 kDa로 표현된다. M<sub>w</sub>는 보다 큰 분자가 보다 작은 분자보다 중합체 샘플의 총 질량을 더 많이 함유한다는 것을 고려한다. M<sub>w</sub>는 정적 광 산란, 작은 각도 중성자 산란, X선 산란 및 침강 속도와 같은 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0030] 본원에 사용된 용어 "M<sub>n</sub>"은 수 평균 분자량을 지칭하고, 전형적으로 Da 또는 kDa로 표현된다. M<sub>n</sub>은 샘플의 총 중량을 샘플 내 분자의 수로 나눈 것에 의해 계산되고, 겔 투과 크로마토그래피, 마크-하우윙크 식을 통한 점도 측정법, 총괄성 방법, 예컨대 중기압 삼투압측정, 말단-기 결정 또는 양성자 NMR과 같은 기술에 의해 결정될 수 있다. M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>은 다분산도를 반영한다.

[0031] 본원에 사용된 용어 "몰비"는 전형적으로 십분의 몇 또는 백분의 몇 자리까지의 소수로 표현되는 분율이다. 예를 들어, 십분의 몇으로 표현되는 0 또는 0.1 내지 1.0의 몰비는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1.0 중 임의의 것을 포함할 것이다.

[0032] 본원에 사용된 약어 "PnPs"는 폐렴구균 폴리사카라이드를 지칭한다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 면역원성 조성물과 함께 사용된 경우의 용어 "포함하다"는 임의의 다른 성분 (항원 혼합물에 대해 "로 이루어진"이라는 표현의 제한을 받음), 예컨대 아주반트 및 부형제를 포함함을 지칭한다. 본 발명의 다가 폴리사카라이드-단백질 접합체 혼합물과 함께 사용된 경우의 용어 "로 이루어진"은 특정한 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 단백질 접합체를 가지며 상이한 혈청형으로부터의 다른 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 단백질 접합체는 갖지 않는 혼합물을 지칭한다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같이, 당 상의 어구 "활성화 부위"는 부위가 화학적으로 변형되어 반응성 기를 형성할 수 있다는 것을 의미한다. 활성화 부위는 특정 부위에서 반응하는 활성화제의 바람직한 경향을 고려한다.

[0035] 본원에 사용된 어구 "활성화된 폴리사카라이드"는 폴리사카라이드 쇄에 반응성 기를 형성하도록 화학적으로 변형된 폴리사카라이드를 지칭한다. 활성화된 폴리사카라이드는 반드시 모든 이용가능한 활성화 부위가 화학적으로 변형된 것을 의미하지는 않는다.

[0036] 본원에 사용된 어구 "활성화 정도"는 폴리사카라이드 쇄 상의 활성화된 화학적 기의 수 대 반복 단위의 수 사이의 전체 비를 지칭한다.

[0037] 달리 명시되지 않는 한, 본원에 제공된 모든 범위는 언급된 하한 및 상한을 포함한다.

[0038] 공개된 구조와 상이한 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드의 구조가 실시예에서 확인되었다. 문헌 [Kamerling, 2000, Pneumococcal polysaccharides: a chemical view, p. 81-114. In Tomasz (ed), Streptococcus pneumoniae molecular biology & mechanisms of disease. Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, NY]을 참조한다. 모노사카라이드 조성은 두 구조가 2개의 Rha, 2개의 Gal 및 1개의 GlcA를 갖는다는 관점에서 일치한다. 그러나, 공개된 구조 내의 Gal 잔기는 둘 다 푸라노스 고리이지만, 실시예에 제시된 구조 내의 Gal 잔기는 1개의 푸라노스 및 1개의 피라노스이다. 실시예에서의 구조는 또한 이전 개시된 구조에 존재하지 않는 3개의 아세테이트 기를 갖는다. 2가지 상이한 화학 구조 때문에 이것이 혈청군 31 중에 존재하는 추가의 하위 유형일 가능성이 있다.

[0039] 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드 구조는  $\beta$ -Galf 사카라이드 상의 2개의 O-아세틸 기 및  $\beta$ -Rhap 사카라이드 상의 1개의 O-아세틸 기가 각각의 3개 부위에서 대략 90%로 존재한다는 것을 나타낸다.  $\beta$ -Galf는 사카라이드 상의 5 또는 6 위치 둘 다에서 O-아세틸 기를 갖는다. 특정 실시양태에서, 혈청형 31 폴리사카라이드는  $\beta$ -Rhap 사카라이드 또는  $\beta$ -Galf 위치에서, 혈청형 31 폴리사카라이드 mM당 0 mM 아세테이트 (즉, 완전히 O-아세틸화됨) 또는 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 또는 0.9 mM 아세테이트를 갖는다.

[0040] 이들 혈청형(들)에 대한 구조의 확인은 이들이 폐렴구균 백신 내에 미접합된 채로 또는 폴리사카라이드-단백질 접합체로서 혼입되도록 할 수 있다. 연쇄구균 및 폐렴구균 Ps를 포함하는 접합체 백신은 관련 기술분야에 널리

공지되어 있다. 미국 특허 번호 6,248,570; 5,866,135; 및 5,773,007을 참조한다.

[0041] **피막 폴리사카라이드**

본 발명의 혈청형(들)으로부터의 스트렙토코쿠스 뉴모니아에로부터의 피막 폴리사카라이드는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 폴리사카라이드는 박테리아로부터 단리될 수 있고, 공지된 방법 (예를 들어, 유럽 특허 번호 EP497524 및 EP497525 참조); 및 바람직하게는 균질화 기를 사용하여 수행되는 미세유동화에 의해 또는 화학적 가수분해에 의해 어느 정도 크기조정될 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 폴리사카라이드 혈청형에 상응하는 에스. 뉴모니아에 균주는 대두-기재 배지에서 성장된다. 이어서 개별 폴리사카라이드가 원심분리, 침전 및 한외여과를 포함한 표준 단계를 통해 정제된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2008/0286838 및 미국 특허 번호 5,847,112를 참조한다. 폴리사카라이드는 점도를 감소시키고/거나 후속 접합된 생성물의 여과성을 개선시키기 위해 크기조정될 수 있다. 화학적 가수분해는 아세트산을 사용하여 수행될 수 있다. 기계적 크기조정은 고압 균질화 전단을 사용하여 수행될 수 있다.

[0043] 일부 실시양태에서, 접합 전 정제된 폴리사카라이드는 5 kDa 내지 4,000 kDa의 분자량을 갖는다. 분자량은 다중각도 광 산란 검출기 (MALS) 및 굴절률 검출기 (RI)와 조합된 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 계산될 수 있다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 10 kDa 내지 4,000 kDa; 50 kDa 내지 4,000 kDa; 50 kDa 내지 3,000 kDa; 50 kDa 내지 2,000 kDa; 50 kDa 내지 1,500 kDa; 50 kDa 내지 1,000 kDa; 50 kDa 내지 750 kDa; 50 kDa 내지 500 kDa; 100 kDa 내지 4,000 kDa; 100 kDa 내지 3,000 kDa; 100 kDa 내지 2,000 kDa; 100 kDa 내지 1,500 kDa; 100 kDa 내지 1,000 kDa; 100 kDa 내지 750 kDa; 100 kDa 내지 500 kDa; 100 kDa 내지 400 kDa; 200 kDa 내지 4,000 kDa; 200 kDa 내지 3,000 kDa; 200 kDa 내지 2,000 kDa; 200 kDa 내지 1,500 kDa; 200 kDa 내지 1,000 kDa; 또는 200 kDa 내지 500 kDa의 평균 분자량을 갖는다. 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 3,000 kDa의 평균 분자량을 갖는다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 4,000 kDa, 100 kDa 내지 3,000 kDa, 100 kDa 내지 2,000 kDa, 200 kDa 내지 500 kDa 또는 100 kDa 내지 250 kDa의 평균 분자량을 갖는다.

[0044] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 10 내지 5,000개의 반복 단위를 갖는다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드는 25 내지 3,000개, 100 내지 2,500개, 100 내지 1,000개 및 100 내지 500개의 반복 단위를 갖는다.

[0045] 특정 실시양태에서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드는 혈청형 31 반복 단위에 대한 0-아세틸 기의 몰비 0.1-3.0, 예를 들어 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 또는 2.9 내지 3.0 중 임의의 것을 갖는다. OAc가 결합할 수 있는 3개의 위치의 이용가능성 때문에, 최대 3.0의 몰비가 이용가능하다.

[0046] **담체 단백질**

[0047] 혈청형 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드는 소아, 고령자 및/또는 면역손상된 대상체에서 면역원성을 개선시키기 위해 담체 단백질 ("Pr")에 접합될 수 있다. 1종 초과의 혈청형이 다가 조성물에 사용되는 경우, 혈청형은 동일한 담체 단백질 또는 상이한 담체 단백질과 함께 제조될 수 있다. 동일한 혈청형의 각각의 피막 폴리사카라이드는 전형적으로 동일한 담체 단백질에 접합된다.

[0048] 본 발명의 특정한 실시양태에서, CRM197이 담체 단백질로서 사용된다. CRM197은 디프테리아 독소 (DT)의 비-독성 변이체이다. CRM197 담체 단백질은 단편 A 내 잔기 52에서의 단일 아미노산 치환에 의해 비독성이 된 DT의 돌연변이체 형태이다. 한 실시양태에서, CRM197 담체 단백질은 카사미노산 및 효모 추출물-기재 배지에서 성장된 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*) 균주 C7 ( $\beta$  197)의 배양물로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, CRM197은 미국 특허 번호 5,614,382에 기재된 방법에 따라 재조합적으로 제조된다. 전형적으로, CRM197은 한외여과, 황산암모늄 침전 및 이온-교환 크로마토그래피의 조합을 통해 정제된다. 일부 실시양태에서, CRM197은 페넥스 발현 기술(Pfenex Expression Technology)<sup>TM</sup> (페넥스 인크.(Pfenex Inc.), 캘리포니아주 샌디에고)을 사용하여 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)에서 제조된다.

[0049] 다른 적합한 담체 단백질은 추가의 불활성화된 박테리아 독소, 예컨대 DT, 디프테리아 톡소이드 단편 B (DTFB), TT (파상풀 톡소이드) 또는 TT의 단편 C, 백일해 톡소이드, 콜레라 톡소이드 (예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2004/083251에 기재된 바와 같음), 이. 콜라이 LT (열-불안정성 장독소), 이. 콜라이 ST (열-안정성 장독소), 및 슈도모나스 아에루기노사로부터의 외독소 A를 포함한다. 박테리아 외막 단백질, 예컨대 외막 복합체 c (OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 폐렴구균 표면 단백질 A (PspA; 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/091998 참조), 폐렴구균 어드헤신 단백질 (PsaA), A군 또는 B군 스트렙토코쿠스로부터의 C5a 웹티다제, 또는

헤모필루스 인플루엔자에 (*Haemophilus influenzae*) 단백질 D, 폐렴구균 뉴모리신 (Kuo et al., 1995, *Infect Immun* 63; 2706-13), 예를 들어 일부 방식으로 해독된 ply, 예를 들어 dPLY-GMBS (국제 특허 출원 공개 번호 WO 04/081515 참조) 또는 dPLY-포르몰, PhtX, 예를 들어 PhtA, PhtB, PhtD, PhtE 및 Pht 단백질의 융합체, 예를 들어 PhtDE 융합체, PhtBE 융합체 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 01/98334 및 WO 03/54007 참조)가 또한 사용될 수 있다. 다른 단백질, 예컨대 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 투베르큘린의 정제된 단백질 유도체 (PPD), PorB (엔. 메닌기티디스 (*N. meningitidis*)로부터의 것), PD (헤모필루스 인플루엔자에 단백질 D; 예를 들어, 유럽 특허 번호 EP 0 594 610 B 참조), 또는 그의 면역학상 기능적 등가물, 합성 웨티드 (유럽 특허 번호 EP0378881 및 EP0427347 참조), 열 쇼크 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 93/17712 및 WO 94/03208 참조), 백일해 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/58668 및 유럽 특허 번호 EP0471177 참조), 시토카인, 림포카인, 성장 인자 또는 호르몬 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 91/01146 참조), 다양한 병원체 유래 항원으로부터의 다중 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질 (문헌 [Falugi et al., 2001, *Eur J Immunol* 31:3816-3824] 참조), 예컨대 N19 단백질 (문헌 [Baraldoi et al., 2004, *Infect Immun* 72:4884-7] 참조), 철 흡수 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 01/72337 참조), 씨. 디피실레 (*C. difficile*)의 독소 A 또는 B (국제 특허 공개 번호 WO 00/61761 참조), 및 플라젠린 (문헌 [Ben-Yedidia et al., 1998, *Immunol Lett* 64:9] 참조)이 또한 담체 단백질로서 사용될 수 있다.

[0050] 또한, 담체 단백질로서 다른 DT 돌연변이체, 예컨대 CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida et al., 1973, *J Biol Chem* 218:3838-3844); CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 및 CRM107 및 문헌 [Nicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maeceel Dekker Inc, 1992]에 기재된 다른 돌연변이; 결실 또는 Glu-148에서 Asp, Gln 또는 Ser로의 돌연변이 및/또는 Ala 158에서 Gly로의 돌연변이 및 미국 특허 번호 4,709,017 또는 미국 특허 번호 4,950,740에 개시된 다른 돌연변이; 적어도 1개 이상의 잔기 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534의 돌연변이 및 미국 특허 번호 5,917,017 또는 미국 특허 번호 6,455,673에 개시된 다른 돌연변이; 또는 미국 특허 번호 5,843,711에 개시된 단편이 사용될 수 있다.

[0051] 다가 백신이 사용되는 경우, 항원 중 1종 이상에 대해 제2 담체 단백질이 사용될 수 있다. 제2 담체 단백질은 바람직하게는 비-독성 및 비-반응원성이고 충분한 양 및 순도로 수득 가능한 단백질이다. 제2 담체 단백질은 또한 항원, 예를 들어 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드와 접합되거나 연결되어 항원의 면역원성을 증진시킨다. 담체 단백질은 표준 접합 절차를 받을 수 있어야 한다. 한 실시양태에서, 제1 담체 단백질에 접합되지 않은 각각의 피막 폴리사카라이드는 동일한 제2 담체 단백질에 접합된다 (예를 들어, 각각의 피막 폴리사카라이드 분자는 단일 담체 단백질에 접합됨). 또 다른 실시양태에서, 제1 담체 단백질에 접합되지 않은 피막 폴리사카라이드는 2종 이상의 담체 단백질에 접합된다 (각각의 피막 폴리사카라이드 분자는 단일 담체 단백질에 접합됨). 이러한 실시양태에서, 동일한 혈청형의 각각의 피막 폴리사카라이드는 전형적으로 동일한 담체 단백질에 접합된다.

[0052] 접합

[0053] 접합 전에, 정제된 폴리사카라이드는 화학적으로 활성화되어 사카라이드가 담체 단백질과 반응할 수 있게 됨으로써 활성화된 폴리사카라이드를 형성할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "활성화된 폴리사카라이드"는 하기 기재된 바와 같이 화학적으로 변형되어 링커 또는 담체 단백질에 대한 접합을 가능하게 하는 폴리사카라이드를 지칭한다. 정제된 폴리사카라이드는 임의로 링커에 연결될 수 있다. 활성화되거나 링커에 연결되면, 각각의 피막 폴리사카라이드는 담체 단백질에 개별적으로 접합되어 당접합체를 형성한다. 폴리사카라이드 접합체는 공지된 커플링 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0054] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 링커에 커플링되어 폴리사카라이드-링커 중간체를 형성할 수 있으며, 여기서 링커의 유리 말단은 에스테르 기이다. 따라서, 링커는 적어도 1개의 말단이 에스테르 기인 것이다. 다른 말단은 폴리사카라이드와 반응하여 폴리사카라이드-링커 중간체를 형성할 수 있도록 선택된다.

[0055] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 폴리사카라이드 내의 1급 아민 기를 사용하여 링커에 커플링될 수 있다. 이러한 경우에, 링커는 전형적으로 두 말단에 에스테르 기를 갖는다. 이는 에스테르 기 중 하나를 폴리사카라이드 내의 1급 아민 기와 친핵성 아실 치환에 의해 반응시킴으로써 커플링이 일어나게 한다. 반응은 폴리사카라이드-링커 중간체를 생성하며, 여기서 폴리사카라이드는 아미드 연결을 통해 링커에 커플링된다. 따라서, 링커는 폴리사카라이드 내의 1급 아민 기와 반응하기 위한 제1 에스테르 기 및 담체 분자 내의 1급 아민 기와 반응하기 위한 제2 에스테르 기를 제공하는 이관능성 링커이다. 전형적인 링커는 아디프산 N-히드록시숙신이미드 디에스테르 (SIDEA)이다.

[0056]

특정 실시양태에서, 커플링은 또한 간접적으로, 즉 링커에 커플링하기 전에 폴리사카라이드를 유도체화하기 위해 사용되는 추가의 링커를 사용하여 수행될 수 있다. 폴리사카라이드는 폴리사카라이드의 환원 말단에서 카르보닐 기를 사용하여 추가의 링커에 커플링된다. 이러한 커플링은 2개의 단계: (a1) 카르보닐 기를 추가의 링커와 반응시키는 단계; 및 (a2) 추가의 링커의 유리 말단을 링커와 반응시키는 단계를 포함한다. 이들 실시양태에서, 추가의 링커는 전형적으로 두 말단에 1급 아민 기를 갖고, 이에 의해 1급 아민 기 중 하나를 폴리사카라이드 내의 카르보닐 기와 환원성 아미노화에 의해 반응시킴으로써 단계 (a1)이 일어나도록 한다. 폴리사카라이드 내의 카르보닐 기와 반응성인 1급 아민 기가 사용된다. 히드라지드 또는 히드록실아미노 기가 적합하다. 동일한 1급 아민 기가 전형적으로 추가의 링커의 두 말단에 존재한다. 반응은 폴리사카라이드-추가의 링커 중간체를 생성하며, 여기서 폴리사카라이드는 C-N 연결을 통해 추가의 링커에 커플링된다.

[0057]

특정 실시양태에서, 폴리사카라이드는 폴리사카라이드 내의 상이한 기, 특히 카르복실 기를 사용하여 추가의 링커에 커플링될 수 있다. 이러한 커플링은 2개의 단계: (a1) 기를 추가의 링커와 반응시키는 단계; 및 (a2) 추가의 링커의 유리 말단을 링커와 반응시키는 단계를 포함한다. 이 경우에, 추가의 링커는 전형적으로 두 말단에 1급 아민 기를 갖고, 이에 의해 1급 아민 기 중 하나를 폴리사카라이드 내의 카르복실 기와 EDAC 활성화에 의해 반응시킴으로써 단계 (a1)이 일어나도록 한다. 폴리사카라이드 내의 EDAC-활성화된 카르복실 기와 반응성인 1급 아민 기가 사용된다. 히드라지드 기가 적합하다. 동일한 1급 아민 기가 전형적으로 추가의 링커의 두 말단에 존재한다. 반응은 폴리사카라이드-추가의 링커 중간체를 생성하며, 여기서 폴리사카라이드는 아미드 연결을 통해 추가의 링커에 커플링된다.

[0058]

한 실시양태에서, 폴리사카라이드의 화학적 활성화 및 후속 환원성 아미노화에 의한 담체 단백질에의 접합은 미국 특허 번호 4,365,170, 4,673,574 및 4,902,506, 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 및 2007/0184071, 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO2006/110381, WO2008/079653 및 WO2008/143709에 기재된 수단에 의해 달성될 수 있다. 화학은 산화제의 존재 하에 1급 히드록실 기를 알데히드로 만드는 임의의 산화제, 예컨대 TEMPO와 반응시키거나 (WO2104/097099), 또는 2개의 이웃자리 히드록실 기를 알데히드로 만드는 산화제, 예컨대 퍼아이오레이트 (소듐 퍼아이오레이트, 포타슘 퍼아이오레이트 또는 퍼아이오딘산 포함)와 반응시켜, 폐렴구균 폴리사카라이드를 활성화시키는 것을 수반할 수 있다. 반응은 탄수화물의 1급 히드록실 기의 무작위 산화 또는 이웃자리 히드록실 기의 무작위 산화적 절단과 반응성 알데히드 기의 형성을 유도한다.

[0059]

이러한 실시양태에서, 담체 단백질에 대한 커플링은 단백질의 리실 기에 대한 직접적 아미노화를 통한 환원성 아미노화에 의한 것이다. 예를 들어, 접합은 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 혼합물을 니켈의 존재 하에 환원제, 예컨대 소듐 시아노보로히드라이드와 반응시킴으로써 수행된다. 접합 반응은 수용액 하에 또는 디메틸 술폭시드 (DMSO)의 존재 하에 일어날 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0231270 및 US2011/0195086 및 유럽 특허 번호 EP 0471 177 B1을 참조한다. 이어서 미반응 알데히드는 강한 환원제, 예컨대 소듐 보로히드라이드의 첨가에 의해 캡핑된다.

[0060]

환원성 아미노화는 2 단계, (1) 폴리사카라이드를 산화시켜 반응성 알데히드를 형성하는 단계, (2) 활성화된 폴리사카라이드와 담체 단백질 사이에 형성된 이민 (쉬프 염기)을 환원시켜 안정한 아민 접합체 결합을 형성하는 단계를 포함한다. 산화 전에, 폴리사카라이드는 임의로 크기 감소된다. 기계적 방법 (예를 들어 균질화) 또는 화학적 가수분해가 사용될 수 있다. 화학적 가수분해는 아세트산을 사용하여 수행될 수 있다. 산화 단계는 퍼아이오레이트와의 반응을 포함할 수 있다. 본 발명의 목적상, 용어 "퍼아이오레이트"는 퍼아이오레이트 및 퍼아이오딘산을 둘 다 포함하고; 용어는 또한 메타퍼아이오레이트 ( $\text{IO}_4^-$ ) 및 오르토퍼아이오레이트 ( $\text{IO}_6^{5-}$ )를 둘 다 포함하며 퍼아이오레이트의 다양한 염 (예를 들어, 소듐 퍼아이오레이트 및 포타슘 퍼아이오레이트)을 포함한다. 한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 메타퍼아이오레이트의 존재 하에, 바람직하게는 소듐 퍼아이오레이트 ( $\text{NaIO}_4$ )의 존재 하에 산화된다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 오르토퍼아이오레이트의 존재 하에, 바람직하게는 퍼아이오딘산의 존재 하에 산화된다.

[0061]

한 실시양태에서, 산화제는 1급 히드록실을 선택적으로 산화시키기 위한 산화제의 존재 하에 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물, 예컨대 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물이다 (예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2014/097099에 기재된 바와 같음). 상기 반응에서, 실제 산화제는 촉매 사이클에서 N-옥소암모늄 염이다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물이다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 TEMPO (2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시) 또는 PROXYL (2,2,5,5-테트라메틸-1-피롤리디닐옥시) 모이어티를 보유

한다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO 또는 그의 유도체이다. 한 측면에서, 상기 산화제는 N-할로 모이어티를 보유하는 분자이다. 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.

[0062] 특정 측면에서, 산화제는 공산화제로서의 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 자유 라디칼 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)이다 (국제 특허 출원 공개 번호 WO2014/097099에 기재된 바와 같음). 따라서, 한 측면에서, 에스. 뉴모니아에로부터의 당접합체는 a) 수성 용매 중에서 사카라이드를 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 반응시켜 활성화된 사카라이드를 생성하는 단계; 및 b) 활성화된 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 담체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득가능하다 (상기 방법은 이하에서 "TEMPO/NCS-환원성 아미노화"로 지정됨).

[0063] 임의로, 산화 반응물은 켄칭제의 첨가에 의해 켄칭된다. 켄칭제는 이웃자리 디올, 1,2-아미노알콜, 아미노산, 글루타티온, 슬파이트, 비술레이트, 디티오나이트, 메타비슬파이트, 티오슬레이트, 포스파이트, 하이포포스파이트 또는 아인산 (예컨대 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 프로판-1,2-디올, 부탄-1,2-디올 또는 부탄-2,3-디올, 아스코르브산)으로부터 선택될 수 있다.

[0064] 환원성 아미노화를 위한 접합 공정의 제2 단계는 환원제를 사용하여 활성화된 폴리사카라이드와 담체 단백질 사이의 이민 (쉬프 염기) 결합을 환원시켜 안정한 접합체 결합을 형성하는 것이다 (소위 환원성 아미노화). 적합한 환원제는 시아노보로히드라이드 (예컨대 소듐 시아노보로히드라이드) 또는 소듐 보로히드라이드를 포함한다. 한 실시양태에서, 환원제는 소듐 시아노보로히드라이드이다.

[0065] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 환원성 아미노화 반응은 비양성자성 용매 (또는 비양성자성 용매의 혼합물) 중에서 수행된다. 한 실시양태에서, 환원 반응은 DMSO (디메틸 솔푸시드) 또는 DMF (디메틸포름아미드) 용매 중에서 수행된다. DMSO 또는 DMF 용매는 동결건조된 경우의 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 재구성하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 비양성자성 용매는 DMSO이다.

[0066] 환원 반응의 종료시에, 접합체에 미반응 알데히드 기가 남아있을 수 있으며, 이는 적합한 캡핑제 또는 켄칭제를 사용하여 캡핑 또는 켄칭될 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 캡핑제 또는 켄칭제는 소듐 보로히드라이드 ( $\text{NaBH}_4$ )이다. 적합한 대안물은 브뢴스테드 또는 루이스 산의 존재 하에 소듐 트리아세톡시보로히드라이드 또는 소듐 또는 아연 보로히드라이드, 아민 보란, 예컨대 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-디보란-메탄올, 디메틸아민-보란,  $t\text{-BuMe}'\text{PrN-BH}_3$ , 벤질아민- $\text{BH}_3$  또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란 (PEMB) 또는 보로히드라이드 교환 수지를 포함한다.

[0067] 비양성자성 용매 중에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 당접합체가 일반적으로 다가 폐렴구균 접합체 백신에 사용된다. 따라서, 모든 혈청형이 비양성자성 용매 중에서 제조되지는 않은 다가 조성물에 대한 특정 실시양태에서, 남아있는 혈청형에 대한 환원 반응은 수성 용매 (예를 들어, PBS (포스페이트 완충 염수), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술폰산), HEPES, (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산), 비스-트리스, ADA (N-(2-아세트아미도)아미노디아세트산), PIPES (피페라진-N,N'-비스(2-에탄술폰산)), MOPS (3-모르폴리노-2-히드록시프로판술폰산), BES (N,N-비스(2-히드록시에틸)-2-아미노에탄술폰산), MOPS (3-(N-모르폴리노)프로판술폰산), DIPOSO (3-비스(2-히드록시에틸)아미노-2-히드록시프로판-1-술폰산), MOBS (4-(N-모르폴리노)부탄술폰산), HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N-(2-히드록시프로판술폰산)), POPSO (피페라진-1,4-비스(2-히드록시-3-프로판술폰산)), TEA (트리에탄올아민), EPPS (4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-프로판술폰산), 비신 또는 HEPB (pH 6.0 내지 8.5, 7.0 내지 8.0, 또는 7.0 내지 7.5)로부터 선택됨) 중에서 수행된다.

[0068] 일부 실시양태에서, 본 발명의 당접합체는 10 kDa 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는 폴리사카라이드를 포함한다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 25 kDa 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 50 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 70 kDa 내지 900 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 200 kDa 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 1,000 kDa; 100 kDa 내지 900

kDa; 100 kDa 내지 800 kDa; 100 kDa 내지 700 kDa; 100 kDa 내지 600 kDa; 100 kDa 내지 500 kDa; 100 kDa 내지 400 kDa; 100 kDa 내지 300 kDa; 150 kDa 내지 1,000 kDa; 150 kDa 내지 900 kDa; 150 kDa 내지 800 kDa; 150 kDa 내지 700 kDa; 150 kDa 내지 600 kDa; 150 kDa 내지 500 kDa; 150 kDa 내지 400 kDa; 150 kDa 내지 300 kDa; 200 kDa 내지 1,000 kDa; 200 kDa 내지 900 kDa; 200 kDa 내지 800 kDa; 200 kDa 내지 700 kDa; 200 kDa 내지 600 kDa; 200 kDa 내지 500 kDa; 200 kDa 내지 400 kDa; 200 kDa 내지 300; 250 kDa 내지 1,000 kDa; 250 kDa 내지 900 kDa; 250 kDa 내지 800 kDa; 250 kDa 내지 700 kDa; 250 kDa 내지 600 kDa; 250 kDa 내지 500 kDa; 250 kDa 내지 400 kDa; 250 kDa 내지 350 kDa; 300 kDa 내지 1,000 kDa; 300 kDa 내지 900 kDa; 300 kDa 내지 800 kDa; 300 kDa 내지 700 kDa; 300 kDa 내지 600 kDa; 300 kDa 내지 500 kDa; 300 kDa 내지 400 kDa; 400 kDa 내지 1,000 kDa; 400 kDa 내지 900 kDa; 400 kDa 내지 800 kDa; 400 kDa 내지 700 kDa; 400 kDa 내지 600 kDa; 또는 500 kDa 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다.

[0069] 특정 실시양태에서, 접합 반응은 보다 큰 접합 반응 효율을 위해 및 유리 시아나이드 제거를 보조하는데 니켈이 사용되는 환원성 아미노화에 의해 수행된다. 전이 금속은 시아나이드와 안정한 착물을 형성하는 것으로 공지되어 있고, 소듐 시아노보로히드라이드에 의한 단백질 아미노 기 및 포름알데히드의 환원성 메틸화를 개선시키는 것으로 공지되어 있다 (S Gidley et al., Biochem J. 1982, 203: 331-334; Jentoft et al. Anal Biochem. 1980, 106: 186-190). 니켈의 첨가는, 잔류 억제성 시아나이드와 착물을 형성함으로써, 접합 동안 단백질의 소비를 증가시키고 보다 큰, 잠재적으로 보다 면역원성인 접합체의 형성을 유도한다.

[0070] 적합한 대안적 화학은 사카라이드를 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스테르를 형성하는 것을 포함한다. 따라서, 활성화된 사카라이드는 직접적으로 또는 스페이서 (링커) 기를 통해 담체 단백질 상의 아미노 기에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 스페이서가 시스타민 또는 시스테아민이어서 티올화된 폴리사카라이드를 제공할 수 있으며, 이는 말레이미드-활성화된 담체 단백질 (예를 들어 GMBS를 사용함) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질 (예를 들어 아이오도아세트이미드 [예를 들어, 에틸아이오도아세트이미드 HC1] 또는 N-숙신이미딜 브로모아세테이트 또는 SIAB, 또는 SIA, 또는 SBAP를 사용함)과의 반응 후에 수득된 티오에테르 연결을 통해 담체에 커플링될 수 있다. 바람직하게는, 시아네이트 에스테르 (임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)는 헥산 디아민 또는 아디프산 디히드라지드 (ADH)와 커플링되고, 아미노-유도체화된 사카라이드는 카르보디이미드 (예를 들어 EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 담체 단백질 상의 카르복실기를 통해 담체 단백질에 접합된다. 이러한 접합체는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/29094; 및 문헌 [Chu et al., 1983, Infect. Immunity 40:245-256]에 기재되어 있다.

[0071] 다른 적합한 기술은 카르보디이미드, 히드라지드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/42721에 기재되어 있다. 접합은 사카라이드의 유리 히드록실 기와 CDI의 반응에 의해 형성될 수 있는 카르보닐 링커를 포함할 수 있고 (문헌 [Bethell et al., 1979, J. Biol. Chem. 254:2572-4; Hearn et al., 1981, J. Chromatogr. 218:509-18] 참조), 이는 이어서 단백질과 반응하여 카르바메이트 연결을 형성할 수 있다. 이는 아노머 말단의 1급 히드록실기로의 환원, 1급 히드록실 기의 임의적인 보호/탈보호, 1급 히드록실 기와 CDI와의 반응으로 CDI 카르바메이트 중간체 형성 및 CDI 카르바메이트 중간체와 단백질 상의 아미노 기와의 커플링을 포함할 수 있다.

[0072] 접합 (환원 반응 및 임의로 캡핑 또는 켄칭 반응) 후, 당접합체는 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술에 의해 정제 (폴리사카라이드-단백질 접합체의 양이 풍부화)될 수 있다. 이들 기술은 투석, 농축/투석여과 작업, 접선 흐름 여과, 한외여과, 침전/용리, 칼럼 크로마토그래피 (이온 교환 크로마토그래피, 다중모드 이온 교환 크로마토그래피, DEAE 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피), 및 심층 여과를 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,146,902를 참조한다. 한 실시양태에서, 당접합체는 투석여과 또는 이온 교환 크로마토그래피 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제된다.

[0073] 본 발명의 당접합체를 특징화하기 위한 하나의 방법은 사카라이드에 접합되는 담체 단백질 (예를 들어, CRM197) 내의 리신 잔기의 수에 의하며, 이는 접합된 리신의 범위 (접합 정도)로 특징화될 수 있다. 폴리사카라이드에의 공유 연결로 인한 담체 단백질의 리신 변형에 대한 증거는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 상용 방법을 사용하는 아미노산 분석에 의해 얻어질 수 있다. 접합은 접합체 물질을 생성하는데 사용되는 담체 단백질 출발 물질과 비교하여 회수된 리신 잔기 수의 감소를 일으킨다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 당접합체의 접합 정도는 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 당접합체의 접합 정도는 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14 또는 약 15이다. 바람직한 실시양태에서, 본

발명의 당접합체의 접합 정도는 4 내지 7이다. 일부 이러한 실시양태에서, 담체 단백질은 CRM197이다.

[0074] 본 발명의 당접합체는 또한 사카라이드 대 담체 단백질의 비 (중량/중량)로 특정화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 당접합체 내 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드의 비 (w/w)는 0.5 내지 3.0 (예를 들어, 약 0.5, 약 0.6, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 약 2.0, 약 2.1, 약 2.2, 약 2.3, 약 2.4, 약 2.5, 약 2.6, 약 2.7, 약 2.8, 약 2.9 또는 약 3.0)이다. 다른 실시양태에서, 담체 단백질에 대한 사카라이드 비 (w/w)는 0.5 내지 2.0, 0.5 내지 1.5, 0.8 내지 1.2, 0.5 내지 1.0, 1.0 내지 1.5 또는 1.0 내지 2.0이다. 추가 실시양태에서, 담체 단백질에 대한 사카라이드 비 (w/w)는 0.8 내지 1.2이다. 바람직한 실시양태에서, 접합체 내 담체 단백질에 대한 피막 폴리사카라이드의 비는 0.9 내지 1.1이다. 일부 이러한 실시양태에서, 담체 단백질은 CRM197이다. 본 발명의 당접합체 및 면역원성 조성물은 담체 단백질에 공유 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 당접합체 조성물에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 유리 사카라이드는 당접합체와 비-공유적으로 화합될 수 있다 (즉, 당접합체에 비-공유적으로 결합되거나, 그에 흡착되거나, 또는 그 내에 또는 그에 의해 포획될 수 있음).

[0075] 바람직한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% 또는 15% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 25% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 20% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 15% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다.

[0076] 다가 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신

[0077] 본 발명의 특정 실시양태에서, 다가 폴리사카라이드 백신은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 31로부터의 미접합 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-단백질 접합체 및 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18B, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 27, 28A, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 피막 폴리사카라이드를 유리 폴리사카라이드, 폴리사카라이드-단백질 접합체의 성분 또는 그의 조합으로서 포함하여 다가 폐렴구균 백신을 제공한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 1종 이상의 담체 단백질에 개별적으로 접합된 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 또는 44종의 에스. 뉴모니아에 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어진다. 바람직하게는, 특정한 혈청형으로부터의 사카라이드는 1종 초과의 담체 단백질에 접합되지 않는다.

[0078] 개별 당접합체가 정제된 후에, 이들은 배합되어 본 발명의 면역원성 조성물로 제제화한다. 이들 폐렴구균 접합체는 개별 공정에 의해 제조되고, 단일 투여 제제로 별크 제제화된다.

[0079] 제약/백신 조성물

[0080] 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 아주반트와 함께 상기 기재된 임의의 폴리사카라이드 에스. 뉴모니아에 혈청형 조합물을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 대안적으로 그로 이루어진 제약, 면역원성 및 백신 조성물을 포함한 조성물을 추가로 제공한다.

[0081] 본 발명의 폴리사카라이드-단백질 접합체의 제제화는 관련 기술분야에 인식된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 개별 폐렴구균 접합체는 생리학상 허용되는 비히클과 함께 제제화되어 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 완충 염수, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 텍스트로스 용액을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0082] 바람직한 실시양태에서, 백신 조성물은 염화나트륨을 갖는 L-히스티딘 완충제 중에서 제제화된다.

[0083] 본원에 정의된 바와 같이, "아주반트"는 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성을 증진시키는 역할을 하는 물질이다. 면역 아주반트는 단독으로 투여시 약하게 면역원성인 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있고/거나, 예를 들어 항체 역가 또는 세포-매개 면역 반응을 유도하지 않거나 약하게 유도할 수 있고/거나, 항원에 대한 항체 역가를 증가시킬 수 있고/거나, 개체에서 면역 반응을 달성하는데 효과적인 항원의 용량을 낮출 수 있다. 따라서, 아주반트는 종종 면역 반응을 부스팅하기 위해 제공되고, 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 조성물의 유효성을 증진시키기 위한 적합한 아주반트는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다:

[0084] (1) 알루미늄 염 (명반), 예컨대 알루미늄 히드록시드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 술페이트 등;

- [0085] (2) 수중유 에멀젼 제제 (다른 특정 면역자극제, 예컨대 무라밀 웨პ티드 (하기 정의됨) 또는 박테리아 세포벽 성분이 있거나 없음), 예컨대, 예를 들어, (a) 미세유동화기, 예컨대 모델 110Y 미세유동화기 (마이크로플루이딕스(Microfluidics), 매사추세츠주 뉴턴)를 사용하여 서브마이크로미터 입자로 제제화된, 5% 스쿠알렌, 0.5% 트원 80 및 0.5% 스판 85를 함유 (임의로 다양한 양의 MTP-PE 함유)하는 MF59 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 90/14837), (b) 서브마이크로미터 에멀젼으로 미세유동화되거나 보다 큰 입자 크기 에멀젼을 생성하기 위해 볼텍싱된, 10% 스쿠알렌, 0.4% 트원 80, 5% 플루로닉-차단된 중합체 L121 및 thr-MDP를 함유하는 SAF, (c) 2% 스쿠알렌, 0.2% 트원 80, 및 미국 특허 번호 4,912,094에 기재된 3-0-탈아실화 모노포스포리피드 A (MPL<sup>TM</sup>), 트레할로스 디미콜레이트 (TDM) 및 세포벽 골격 (CWS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 박테리아 세포벽 성분, 바람직하게는 MPL+CWS (디톡스(Detox)<sup>TM</sup>)를 함유하는 리비(Ribi)<sup>TM</sup> 아주반트 시스템 (RAS) (코릭사 (Corixa), 몬타나주 해밀턴); 및 (d) 몬타니드 ISA;
- [0086] (3) 사포닌 아주반트, 예컨대 웰 A 또는 스티뮬론(STIMULON)<sup>TM</sup> QS-21 (안티제닉스(Antigenics), 매사추세츠주 프레이밍햄) (예를 들어, 미국 특허 번호 5,057,540 참조), 또는 그로부터 생성된 입자, 예컨대 ISCOM (콜레스테롤, 사포닌, 인지질 및 양친매성 단백질의 조합에 의해 형성된 면역자극 복합체) 및 이스코매트릭스 (Iscomatrix)<sup>®</sup> (ISCOM과 본질적으로 동일한 구조를 갖지만 단백질이 없는 것)가 사용될 수 있음;
- [0087] (4) 박테리아 리포폴리사카라이드, 합성 지질 A 유사체, 예컨대 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물 (AGP), 또는 그의 유도체 또는 유사체, 이는 코릭사로부터 입수가능하고 미국 특허 번호 6,113,918에 기재됨; 하나의 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코파라노시드이며, 이는 또한 529로 공지되어 있고 (이전에 RC529로서 공지됨), 수성 형태 또는 안정한 에멀젼으로서 제제화됨;
- [0088] (5) 합성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 CpG 모티프(들)를 함유하는 올리고뉴클레오티드 (미국 특허 번호 6,207,646);
- [0089] (6) 시토카인, 예컨대 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 등), 인터페론 (예를 들어, 감마 인터페론), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 종양 괴사 인자 (TNF), 공동자극 분자 B7-1 및 B7-2 등; 및
- [0090] (7) 보체, 예컨대 보체 성분의 삼량체 C3d.
- [0091] 또 다른 실시양태에서, 아주반트는 상기 아주반트 중 2, 3종 또는 그 초과의 혼합물, 예를 들어 SBAS2 (3-탈아실화 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 또한 함유하는 수중유 에멀젼)이다.
- [0092] 무라밀 웨პ티드는 N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0093] 특정 실시양태에서, 아주반트는 알루미늄 염이다. 알루미늄 염 아주반트는 명반-침전된 백신 또는 명반-흡착된 백신일 수 있다. 알루미늄-염 아주반트는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Harlow, E. and D. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) and Nicklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143:489-493)]에 기재되어 있다. 알루미늄 염은 수화 알루미나, 알루미나 수화물, 알루미나 3수화물 (ATH), 알루미늄 수화물, 알루미늄 3수화물, 알히드로겔(Alhydrogel)<sup>®</sup>, 슈퍼포스, 암포겔(Amphogel)<sup>®</sup>, 알루미늄 (III) 히드록시드, 알루미늄 히드록시포스페이트 (알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)), 무정형 알루미나, 3수화 알루미나 또는 트리히드록시알루미늄을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0094] APA는 알루미늄 히드록시포스페이트의 수성 혼탁액이다. APA는 염화알루미늄 및 인산나트륨을 1:1 부피 비로 블렌딩하여 알루미늄 히드록시포스페이트를 침전시킴으로써 제조된다. 블렌딩 공정 후에, 물질은 고-전단 혼합기로 크기-감소되어 단분산 입자 크기 분포를 달성한다. 이어서 생성물은 생리학적 염수에 대해 투석여과되고, 증기 멸균된다.
- [0095] 특정 실시양태에서, 상업적으로 입수가능한 Al(OH)<sub>3</sub> (예를 들어, 뉴욕주 웨스트베리 소재 덴마크/아큐레이트 케미칼 앤 사이언티픽 캄파니(Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co.)의 알히드로겔<sup>®</sup> 또는 슈퍼포스)이 단백질을 흡착시키는데 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 단백질의 흡착은 단백질의 pI (등전 pH) 및 배지의

pH에 좌우된다. 보다 낮은 pI를 갖는 단백질은 보다 높은 pI를 갖는 단백질보다 양으로 하전된 알루미늄 이온에 더 강하게 흡착한다. 알루미늄 염은 2-3주의 기간에 걸쳐 서서히 방출되는 Ag의 데포를 확립할 수 있고/거나, 대식세포의 비특이적 활성화 및 보체 활성화에 관여할 수 있고/거나, 선천성 면역 메카니즘을 자극할 수 있다 (가능하게는 요산의 자극을 통해). 예를 들어, 문헌 [Lambrecht et al., 2009, Curr Opin Immunol 21:23]을 참조한다.

[0096] 1가 벌크 수성 접합체는 전형적으로 함께 블렌딩되고 회석된다. 회석되면, 배치가 멸균 여과된다. 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표적으로 회석되는 혈청형 6B를 제외한 모든 에스. 뉴모니아에 혈청형에 대해 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도, 및 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 알루미늄 농도를 표적으로 알루미늄 포스페이트 아주반트가 무균으로 첨가된다. 아주반트화된 제제화된 배치는 바이알 또는 시린지 내에 충전될 것이다.

[0097] 특정 실시양태에서, 아주반트는 CpG-함유 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 CpG-함유 올리고뉴클레오티드, 특히 CpG-함유 올리고데옥시뉴클레오티드 (CpG ODN)이다. 또 다른 실시양태에서, 아주반트는 ODN 1826이며, 이는 콜리 파마슈티칼 그룹(Coley Pharmaceutical Group)으로부터 획득될 수 있다.

[0098] "CpG-함유 뉴클레오티드", "CpG-함유 올리고뉴클레오티드", "CpG 올리고뉴클레오티드" 및 유사 용어는 비메틸화 CpG 모이어티를 함유하는 6-50개 뉴클레오티드 길이의 뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Wang et al., 2003, Vaccine 21:4297]을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 용어의 임의의 다른 관련 기술분야에서 허용되는 정의가 의도된다. CpG-함유 올리고뉴클레오티드는 임의의 합성 뉴클레오시드간 연결, 변형된 염기 및/또는 변형된 당을 사용하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0099] CpG 올리고뉴클레오티드의 사용 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Sur et al., 1999, J Immunol. 162:6284-93; Verthelyi, 2006, Methods Mol Med. 127:139-58; 및 Yasuda et al., 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 23:89-110]에 기재되어 있다.

#### 투여/투여량

[0101] 본 발명의 조성물 및 제제는 전신 또는 점막 경로를 통해 백신을 투여함으로써 감염, 예를 들어 폐렴구균 감염에 걸리기 쉬운 인간을 보호하거나 치료하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명의 면역원성 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 에스. 뉴모니아에 페막 폴리사카라이드 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명 면역원성 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 감염에 대해 인간을 백신접종하는 방법을 제공한다.

[0102] 특정한 백신에 대한 성분의 최적량은 대상체에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 인간 백신접종을 위한 투여량은 동물 연구로부터 인간 데이터로의 외삽에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 투여량은 경험적으로 결정된다.

[0103] 본 발명의 조성물의 "유효량"은 후속 캘린지 동안 미생물, 예를 들어 에스. 뉴모니아에의 감염성의 가능성 또는 중증도를 유의하게 감소시키는 항체를 도출하는데 요구되는 용량을 지칭한다.

[0104] 본 발명의 방법은 침습성 감염 (수막염, 폐렴 및 박테리아혈증) 및 비침습성 감염 (급성 중이염 및 부비동염)을 둘 다 포함한, 미생물, 예를 들어 에스. 뉴모니아에 의해 야기되는 1차 임상 증후군의 예방 및/또는 감소를 위해 사용될 수 있다.

[0105] 본 발명의 조성물의 투여는 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 또는 구강/소화기, 호흡기도 또는 비뇨생식관에 대한 점막 투여를 통한 것 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 비강내 투여는 폐렴 또는 중이염의 치료를 위해 사용된다 (폐렴구균의 비인두 담지가 보다 효과적으로 예방될 수 있어, 그의 가장 초기 단계에서 감염을 약화시킬 수 있으므로).

[0106] 각각의 백신 용량 내 접합체의 양은 유의한 유해 효과 없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이러한 양은 폐렴구균 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 폴리사카라이드-기재의 접합체의 경우, 각각의 용량은 각각의 폴리사카라이드 0.1 내지 100  $\mu\text{g}$ , 특히 0.1 내지 10  $\mu\text{g}$ , 보다 특히 1 내지 5  $\mu\text{g}$ 을 포함할 것이다. 예를 들어, 각각의 용량은 각각의 폴리사카라이드 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 또는 750 ng, 또는 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100  $\mu\text{g}$ 을 포함할 수 있다.

[0107] 특정한 백신에 대한 성분의 최적량은 대상체에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 확인

될 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 인간 백신접종을 위한 투여량은 동물 연구로부터 인간 데이터로의 외삽에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 투여량은 경험적으로 결정된다.

[0108] 한 실시양태에서, 알루미늄 염의 용량은 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500 또는 700  $\mu\text{g}$ , 또는 1, 1.2, 1.5, 2, 3, 5 mg 또는 그 초과이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 알루미늄 염의 용량은 재조합 단백질  $\mu\text{g}$ 당이다.

[0109] 일반적으로, 각각의 0.5 mL 용량은 2  $\mu\text{g}$ 의 각각의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드, 예외로 4  $\mu\text{g}$ 의 혈청형 6B 폴리사카라이드; 약 32  $\mu\text{g}$  CRM<sub>197</sub> 담체 단백질 (예를 들어, 32  $\mu\text{g}$  ± 5  $\mu\text{g}$ , ± 3  $\mu\text{g}$ , ± 2  $\mu\text{g}$ , 또는 ± 1  $\mu\text{g}$ ); 0.125 mg의 원소 알루미늄 (0.5 mg 알루미늄 포스페이트) 아주반트; 및 염화나트륨 및 L-히스티딘 완충제를 함유하도록 제제화된다. 염화나트륨 농도는 약 150 mM (예를 들어, 150 mM ± 25 mM, ± 20 mM, ± 15 mM, ± 10 mM, 또는 ± 5 mM)이고, L-히스티딘 완충제는 약 20 mM (예를 들어, 20 mM ± 5 mM, ± 2.5 mM, ± 2 mM, ± 1 mM, 또는 ± 0.5 mM)이다.

[0110] 본 발명의 임의의 방법에 따르면, 한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 인간 환자는 영아 (1세 미만), 유아 (대략 12 내지 24개월), 또는 소아 (대략 2 내지 5세)이다. 다른 실시양태에서, 인간 환자는 고령 환자 (> 65세)이다. 본 발명의 조성물은 또한 아동, 청소년 및 성인 (예를 들어, 18 내지 45세 또는 18 내지 65세)에서 사용하기에 적합하다.

[0111] 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 단일 접종으로서 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 적절하게 간격을 두어 2회, 3회 또는 4회 또는 그 초과로 투여된다. 예를 들어, 조성물은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 간격으로 또는 그의 임의의 조합으로 투여될 수 있다. 면역화 스케줄은 폐렴구균 백신에 대해 지정된 것을 따를 수 있다. 예를 들어, 에스. 뉴모니아에 의해 야기된 침습성 질환에 대한 영아 및 유아의 통상적 스케줄은 2, 4, 6 및 12-15개월령이다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, 조성물은 2, 4, 6 및 12-15개월령에서 4-용량 시리즈로서 투여된다.

[0112] 본 발명의 조성물은 또한 에스. 뉴모니아에로부터의 1종 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 포함시키기에 적합한 에스. 뉴모니아에 단백질의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/083855 및 WO 02/053761에서 확인된 것들을 포함한다.

#### 제제

[0114] 본 발명의 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 1종 이상의 방법에 의해, 예컨대 비경구로, 경점막으로, 경피로, 근육내로, 정맥내로, 피부내로, 비강내로, 피하로, 복강내로 대상체에게 투여될 수 있고, 그에 따라 제제화될 수 있다.

[0115] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 액체 제제의 표피 주사, 근육내 주사, 정맥내, 동맥내, 피하 주사, 또는 호흡기내 점막 주사를 통해 투여된다. 주사용 액체 제제는 용액 등을 포함한다.

[0116] 본 발명의 조성물은 단일 용량 바이알, 다중-용량 바이알 또는 사전-충전된 시린지로서 제제화될 수 있다.

[0117] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 경구로 투여되고, 따라서 경구 투여에 적합한 형태로, 즉, 고체 또는 액체 제제로서 제제화된다. 고체 경구 제제는 정제, 캡슐, 환제, 과립, 펠릿 등을 포함한다. 액체 경구 제제는 용액, 혼탁액, 분산액, 에멀젼, 오일 등을 포함한다.

[0118] 액체 제제에 대한 제약상 허용되는 담체는 수성 또는 비-수성 용액, 혼탁액, 에멀젼 또는 오일이다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레아이트이다. 수성 담체는 물, 알콜성/수성 용액, 에멀젼 또는 혼탁액, 예를 들어 염수 및 완충 매질을 포함한다. 오일의 예는 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 해바라기 오일, 어류-간 오일, 또 다른 해양 오일, 또는 우유 또는 난으로부터의 지질이다.

[0119] 제약 조성물은 등장성, 저장성 또는 고장성일 수 있다. 그러나, 주입 또는 주사용 제약 조성물이 투여될 때 이는 본질적으로 등장성인 것이 종종 바람직하다. 따라서, 저장을 위해 제약 조성물은 바람직하게는 등장성 또는 고장성일 수 있다. 제약 조성물이 저장을 위해 고장성인 경우에, 이는 투여 전에 등장성 용액이 되도록 희석될 수 있다.

[0120] 등장화제는 이온성 등장화제, 예컨대 염 또는 비-이온성 등장화제, 예컨대 탄수화물일 수 있다. 이온성 등장화제의 예는 NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl 및 MgCl<sub>2</sub>를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비-이온성 등장화제의 예는 수크로

스, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0121] 적어도 1종의 제약상 허용되는 첨가제는 완충제인 것이 또한 바람직하다. 일부 목적을 위해, 예를 들어, 제약 조성물이 주입 또는 주사를 위해 의도되는 경우에, 조성물은 용액을 4 내지 10, 예컨대 5 내지 9, 예를 들어 6 내지 8 범위의 pH로 완충시킬 수 있는 완충제를 포함하는 것이 종종 바람직하다.

[0122] 완충제는, 예를 들어 트리스, 아세테이트, 글루타메이트, 락테이트, 말레이트, 타르트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 카르보네이트, 글리시네이트, L-히스티딘, 글리신, 숙시네이트 및 트리에탄올아민 완충제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0123] 완충제는 또한, 예를 들어, 특히 제약 제제가 비경구 용도를 위한 것인 경우에, 비경구 용도를 위한 USP 상용성 완충제로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 완충제는 일염기성 산, 예컨대 아세트산, 벤조산, 글루콘산, 글리세르산 및 락트산; 이염기성 산, 예컨대 아코니트산, 아디프산, 아스코르브산, 탄산, 글루탐산, 말산, 숙신산 및 타르타르산, 다염기성 산, 예컨대 시트르산 및 인산; 및 염기, 예컨대 암모니아, 디에탄올아민, 글리신, 트리에탄올아민 및 트리스로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0124] 비경구 비히클 (피하, 정맥내, 동맥내 또는 근육내 주사용)은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거 및 고정 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충제, 전해질 보충제, 예컨대 링거 텍스트로스를 기재로 하는 것 등을 포함한다. 예는 계면활성제 및 다른 제약상 허용되는 아주반트를 첨가하거나 첨가하지 않은 멸균 액체, 예컨대 물 및 오일이다. 일반적으로, 물, 염수, 수성 텍스트로스 및 관련 당 용액, 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리소르베이트 80 (PS-80), 폴리소르베이트 20 (PS-20) 및 폴록사미 188 (P188)이 특히 주사가능한 용액을 위한 바람직한 액체 담체이다. 오일의 예는 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 해바라기 오일, 어류-간 오일, 또 다른 해양 오일, 또는 우유 또는 난으로부터의 지질이다.

[0125] 제제는 또한 계면활성제를 함유할 수 있다. 바람직한 계면활성제는 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제 (통상적으로 트윈으로 지칭됨), 특히 PS-20 및 PS-80; 에틸렌 옥시드 (EO), 프로필렌 옥시드 (PO) 및/또는 부틸렌 옥시드 (BO)의 공중합체, 다우파스(DOWFAX)™ 상표명으로 판매됨, 예컨대 선형 EO/PO 블록 공중합체; 반복 에톡시 (옥시-1,2-에탄디일) 기의 수가 다양할 수 있는 옥톡시놀, 옥톡시놀-9 (트리톤 X-100 또는 t-옥틸페녹시폴리에탄올)가 특히 관심대상임; (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (이게팔 CA-630/NP-40); 인지질, 예컨대 포스파티딜콜린 (레시틴); 노닐페놀 에톡실레이트, 예컨대 테르기톨(Tergitol)™ NP 시리즈; 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알콜로부터 유도된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르 (브리즈 계면활성제로 공지됨), 예컨대 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르 (브리즈 30); 및 소르비탄 에스테르 (통상적으로 스판으로 공지됨), 예컨대 소르비탄 트리올레이트 (스판 85) 및 소르비탄 모노라우레이트. 에멀젼에 포함시키기에 바람직한 계면활성제는 PS-20 또는 PS-80이다.

[0126] 계면활성제의 혼합물, 즉 PS-80/스판 85 혼합물이 사용될 수 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 (PS-80) 및 옥톡시놀, 예컨대 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올 (트리톤 X-100)의 조합물이 또한 적합하다. 또 다른 유용한 조합물은 라우레트 9 플러스 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및/또는 옥톡시놀을 포함한다.

[0127] 계면활성제의 바람직한 양은 다음과 같다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 (예컨대 PS-80) 0.01 내지 1% w/v, 특히 약 0.1% w/v; 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올 (예컨대 트리톤 X-100, 또는 트리톤 시리즈의 다른 세제) 0.001 내지 0.1% w/v, 특히 0.005 내지 0.02% w/v; 폴리옥시에틸렌 에테르 (예컨대 라우레트 9) 0.1 내지 20% w/v, 바람직하게는 0.1 내지 10% w/v, 특히 0.1 내지 1% w/v 또는 약 0.5% w/v.

[0128] 특정 실시양태에서, 조성물은 pH 5.8에서의 L-히스티딘 (20 mM), 염수 (150 mM) 및 0.2% w/v PS-20과 250  $\mu$  g/mL의 APA (알루미늄 포스페이트 아주반트)로 본질적으로 이루어진다. PS-20은 모의 제조 동안 및 1차 포장을 사용하는 적송 동안 응집을 제어하는 제제 내의 PS-20 또는 PS-80의 존재 하에 0.005 내지 0.1% w/v 범위일 수 있다. 공정은 최대 44종의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 혈청형의 블렌드를 L-히스티딘, 염화나트륨 및 PS-20 중에서 합한 다음, 이러한 블렌딩된 물질을 항미생물 보존제와 함께 또는 보존제 없이 APA 및 염화나트륨과 합하는 것으로 이루어진다.

[0129] 계면활성제의 선택은 상이한 약물 제품 및 약물 물질에 대해 최적화될 필요가 있을 수 있다. 15종 이상의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 혈청형을 함유하는 다가 백신의 경우, PS-20 및 P188이 바람직하다. 접합체를 제조하기 위해 사용되는 화학의 선택은 또한 제제의 안정화에 영향을 미칠 수 있다. 특히, 하기 예시된 바

와 같이, 수성 또는 DMSO 용매 중에서 제조되고 다가 조성물로 합해진 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체는 제제에 사용되는 특정한 계면활성제 시스템에 따라 안정성에 있어서 유의한 차이를 나타낸다.

[0130] 본원에 기재된 제제의 경우, 폴록사머는 일반적으로 1,100 Da 내지 17,400 Da, 7,500 Da 내지 15,000 Da, 또는 7,500 Da 내지 10,000 Da 범위의 분자량을 갖는다. 폴록사머는 폴록사머 188 또는 폴록사머 407로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 제제 중 폴록사머의 최종 농도는 0.001 내지 5% w/v, 또는 0.025 내지 1% w/v이다. 폴록사머를 포함하는 계면활성제 시스템은 폴리올을 추가로 포함해야 한다. 특정 측면에서, 폴리올은 프로필렌 글리콜이고, 1 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 폴리올은 폴리에틸렌 글리콜 400이고, 1 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재한다.

[0131] 제제에 적합한 폴리올은 중합체 폴리올, 특히 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나 이에 제한되지는 않는 폴리에테르 디올, 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르이다. 프로필렌 글리콜은 ~425 Da 내지 ~2,700 Da의 단량체의 분자량 범위에서 이용가능하다. 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르는 또한 PEG200, PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 및 PEG MME 4000을 포함하나 이에 제한되지는 않는, ~200 Da 내지 ~35,000 Da 범위의 분자량의 범위에서 이용가능하다. 바람직한 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸린 글리콜 400이다. 제제 중 폴리올의 최종 농도는 1 내지 20% w/v 또는 6 내지 20% w/v일 수 있다.

[0132] 제제는 또한 pH-완충 염수 용액을 함유한다. 완충제는, 예를 들어 트리스, 아세테이트, 글루타메이트, 락테이트, 말레이트, 타르트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 카르보네이트, 글리시네이트, L-히스티딘, 글리신, 숙시네이트, HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산), MOPS (3-(N-모르폴리노)프로판술폰산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술폰산) 및 트리에탄올아민 완충제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 완충제는 용액을 4 내지 10, 5.2 내지 7.5, 또는 5.8 내지 7.0 범위의 pH로 완충시킬 수 있다. 특정 측면에서, 완충제는 포스페이트, 숙시네이트, L-히스티딘, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 또는 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 완충제는 추가로, 예를 들어, 특히 제약 제제가 비경구 용도를 위한 것인 경우에, 비경구 용도를 위한 USP 상용성 완충제로부터 선택될 수 있다. 완충제의 농도는 1 mM 내지 50 mM 또는 5 mM 내지 50 mM 범위일 것이다. 특정 측면에서, 완충제는 5 mM 내지 50 mM의 최종 농도의 L-히스티딘, 또는 1 mM 내지 10 mM의 최종 농도의 숙시네이트이다. 특정 측면에서, L-히스티딘은 20 mM ± 2 mM의 최종 농도로 존재한다.

[0133] 염수 용액 (즉, NaCl을 함유하는 용액)이 바람직하지만, 제제에 적합한 다른 염은 CaCl<sub>2</sub>, KCl 및 MgCl<sub>2</sub> 및 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함하나 이에 제한되지 않는 비-이온성 등장화제가 염 대신에 사용될 수 있다. 적합한 염 범위는 25 mM 내지 500 mM 또는 40 mM 내지 170 mM을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 측면에서, 염수는 임의로 20 mM 내지 170 mM의 농도로 존재하는 NaCl이다.

[0134] 바람직한 실시양태에서, 제제는 염화나트륨을 갖는 L-히스티딘 완충제를 포함한다.

[0135] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 제어 방출 시스템으로 전달된다. 예를 들어, 작용제는 정맥내 주입, 경피 패치, 리포솜 또는 다른 투여 방식을 사용하여 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 물질이, 예를 들어 마이크로스피어에 또는 이식물에 사용된다.

[0136] 본 발명의 조성물은 또한 에스. 뉴모니아에로부터의 1종 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 포함시키기에 적합한 에스. 뉴모니아에 단백질의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/083855 및 WO 02/053761에서 확인된 것들을 포함한다.

[0137] 분석 방법

[0138] HPSEC/UV/MALS/RI 검정을 사용하는 접합체의 분자량 및 농도 분석

[0139] 접합체 샘플을 고성능 크기-배제 크로마토그래피 (HPSEC)에 주입하여 그에 의해 분리한다. 자외선 (UV), 다중-각도 광 산란 (MALS) 및 굴절률 (RI) 검출기를 연속으로 사용하여 검출을 수행한다. UV280으로부터 흡광 계수를 사용하여 단백질 농도를 계산한다. mL/g으로 보고된 용질 농도의 변화에 의한 용액의 굴절률의 변화인 dn/dc 인자를 사용하여 RI 신호 (단백질 및 폴리사카라이드 둘 다에 의해 기여됨)로부터 폴리사카라이드 농도를 디컨볼루션한다. 전체 샘플 피크에 걸쳐 측정된 농도 및 광 산란 정보를 사용하여 아스트라 소프트웨어 (와이어트 테크놀로지 코포레이션(Wyatt Technology Corporation), 캘리포니아주 산타 바바라)에 의해 샘플의 평균 분자량을 계산한다. 다분산 분자에 대한 분자량의 평균 값의 다수의 형태가 존재한다. 예를 들어, 수-평균 분

자량 Mn, 중량-평균 분자량 Mw 및 z-평균 분자량 Mz (Molecules, 2015, 20:10313-10341). 달리 명시되지 않는 한, 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "분자량"은 중량-평균 분자량이다.

[0140] 폴리사카라이드와 담체 단백질 사이의 공유 부착의 수의 척도로서 접합된 단백질 내의 리신 소비의 결정

[0141] 워터스 AccQ-태그 아미노산 분석 (AAA)을 사용하여 접합체 샘플에서의 접합 정도를 측정한다. 엘텍스 워크스테이션에서 증기 상 산 가수분해를 사용하여 샘플을 가수분해함으로써 담체 단백질을 그의 성분 아미노산으로 분해한다. 6-아미노퀴놀릴-N-히드록시숙신이미딜 카르바메이트 (AQC)를 사용하여 유리 아미노산을 유도체화한다. 이어서 C18 칼럼 상에서 UV 검출을 동반한 UPLC를 사용하여 유도체화된 샘플을 분석한다. 리신 이외의 대표적인 아미노산을 사용하여 평균 단백질 농도를 수득한다. 접합체 내의 리신의 평균 측정량과 출발 단백질 내의 리신의 예상량 사이의 차이에 의해 접합 동안의 리신 소비 (즉, 리신 손실)를 결정한다.

[0142] 유리 폴리사카라이드 시험

[0143] 접합체 샘플 내의 유리 폴리사카라이드 (즉, CRM197과 접합되지 않은 폴리사카라이드)는 먼저 유리 단백질 및 접합체를 데옥시콜레이트 (DOC) 및 염산으로 침전시킴으로써 측정된다. 이어서 침전물을 여과하고, 여과물을 HPSEC/UV/MALS/RI에 의해 유리 폴리사카라이드 농도에 대해 분석한다. 유리 폴리사카라이드를 HPSEC/UV/MALS/RI에 의해 측정된 총 폴리사카라이드의 백분율로서 계산한다.

[0144] 유리 단백질 시험

[0145] 접합체 샘플 내의 유리 폴리사카라이드, 폴리사카라이드-CRM197 접합체 및 유리 CRM197을 미셀 전기동역학적 크로마토그래피 (MEKC) 방식으로 모세관 전기영동에 의해 분리한다. 간략하게, 샘플을 25 mM 보레이트, 100 mM SDS, pH 9.3을 함유하는 MEKC 전개 완충제와 혼합하고, 예비조건화 무가공-용융 실리카 모세관에서 분리한다. 분리를 200 nm에서 모니터링하고, 유리 CRM197을 CRM197 표준 곡선에 의해 정량화한다. 유리 단백질 결과를 HPSEC/UV/MALS/RI 절차에 의해 결정된 총 단백질 함량의 백분율로서 보고한다.

[0146] 첨부된 설명 및 도면을 참조하여 본 발명의 다양한 실시양태를 기재하였지만, 본 발명이 그러한 정확한 실시양태에 제한되지 않는다는 것, 및 그 안에서 다양한 변화 및 변형이 첨부된 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 범주 또는 축지를 벗어나지 않으면서 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이루어질 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0147] 하기 실시예는 본 발명을 예시하지만, 제한하지는 않는다.

[0148] 실시예

[0149] 실시예 1: 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드의 제조

[0150] 폐렴구균의 배양 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Chase, 1967, Methods of Immunology and Immunochemistry 1:52]을 참조한다. 폐렴구균 피막 폴리사카라이드의 제조 방법 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 유럽 특허 번호 EP 0 497 524 B1을 참조한다. 하기 기재된 공정은 일반적으로 유럽 특허 번호 EP 0 497 524 B1에 기재된 방법을 따르고, 일반적으로 특이적으로 변형된 경우를 제외하고는 모든 폐렴구균 혈청형에 적용가능하다.

[0151] 폐렴구균 혈청형 31에 대한 균주를 질환 제어 및 예방 센터 (조지아주 아틀란타)로부터 입수하였다. 필요한 경우, 하위유형은 특이적 항혈청을 사용하는 팽화 반응에 기초하여 구별될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,847,112를 참조한다. 대두 펩톤, 효모 추출물 및 글루코스를 함유하고 혼민을 함유하지 않는 동물-성분 무함유 배지로 이루어진 한천 플레이트 상에 연속으로 2 단계로 플레이팅함으로써 수득된 단리물을 추가로 클론 단리하였다. 대두 펩톤, 효모 추출물, HEPES, 염화나트륨, 중탄산나트륨, 인산칼륨, 글루코스 및 글리세롤을 함유하는 동물-성분 무함유 배지를 사용한 액체 배양물을 중에서 각각의 혈청형에 대한 클론 단리물을 추가로 확장시켜 프리-마스터 세포 은행을 제조하였다.

[0152] 폐렴구균 폴리사카라이드의 각각의 혈청형의 생산은 세포 확장 및 배치 생산 발효에 이어서 하류 정제 전의 화학적 불활성화로 이루어졌다. 대두 펩톤 또는 대두 펩톤 한외여과물, 효모 추출물 또는 효모 추출물 한외여과물, HEPES, 염화나트륨, 중탄산나트륨, 인산칼륨 및 글루코스를 함유하는 사전-멸균된 동물-성분 무함유 성장 배지를 함유한 진탕 플라스크 또는 배양 용기를 사용하여 각각의 혈청형으로부터의 해동된 세포 은행 바이알을 확장시켰다. 세포 확장 배양물을 온도 및 교반 제어 하에 기체 교환을 최소화하도록 밀봉된 진탕 플라스크 또는 용기에서 성장시켰다. 600 nm에서의 광학 밀도에 의해 측정시 명시된 배양 밀도를 달성한 후, 대두 펩톤 또

는 대두 펩톤 한외여과물, 효모 추출물 또는 효모 추출물 한외여과물, 염화나트륨, 인산칼륨 및 글루코스를 함유하는 사전-멸균된 동물-성분 무함유 성장 배지를 함유한 생산 발효기로 세포 확장 배양물의 일부분을 옮겼다. 온도, pH, 압력 및 교반을 제어하였다. 살포를 사용하지 않았으므로 기류 오버레이를 또한 제어하였다.

[0153] 글루코스가 거의 고갈되었을 때, 화학적 불활성화제인 페놀을 첨가하여 배치 발효를 종결시켰다. 순수한 페놀을 0.8 - 1.2%의 최종 농도로 첨가하여 세포를 불활성화시키고 세포벽으로부터 피막 폴리사카라이드를 유리시켰다. 1차 불활성화는 온도 및 교반이 계속 제어되는 발효기 내에서 명시된 시간 동안 일어난다. 1차 불활성화 후, 배치를 또 다른 용기로 옮기고, 여기서 완전한 불활성화를 위해 제어된 온도 및 교반 하에 추가의 명시된 시간 동안 유지시켰다. 이를 미생물 플레이팅 기술에 의해 또는 페놀 농도 및 명시된 시간의 겸중에 의해 확인하였다. 이어서 불활성화된 브로쓰를 정제하였다.

[0154] Ps의 정제

[0155] 폐렴구균 폴리사카라이드의 정제는 여러 원심분리, 심층 여과, 농축/투석여과 작업 및 침전 단계로 이루어졌다. 달리 명시되지 않는 한 모든 절차를 실온에서 수행하였다.

[0156] 에스. 뉴모니아에의 발효기 배양물로부터 불활성화된 브로쓰를 양이온성 중합체 (예컨대 BPA-1000, 페트롤라이트 "트레톨라이트" 및 "스펙트럼 8160" 및 폴리(에틸렌이민), "밀리포어 pDADMAC")로 응집시켰다. 양이온성 중합체는 불순물 단백질, 핵산 및 세포 과편에 결합하였다. 응집 단계 및 노화 기간 후, 원심분리 및 다중 심층 여과 단계를 통해 응집된 고체를 제거하였다. 정화된 브로쓰를 농축시키고, 100 kDa 내지 500 kDa MWCO (분자량 컷오프) 필터를 사용하여 투석여과하였다. 트리스, MgCl<sub>2</sub> 완충제 및 인산나트륨 완충제를 사용하여 투석여과를 수행하였다. 투석여과는 잔류 핵산 및 단백질을 제거하였다.

[0157] 폴리사카라이드를 아세트산나트륨 및 페놀 중에서 변성 알콜 및/또는 이소프로판올로 재침전시킴으로써 추가 불순물 제거를 수행하였다. 페놀 침전 단계 동안, 인산나트륨 염수 완충제 및 페놀 (액화 페놀 또는 고체 페놀) 중 아세트산나트륨을 투석여과된 보유물에 충전하였다. 이어서 폴리사카라이드의 알콜 분획화를 2 단계로 수행하였다. 제1 단계에서, 낮은 퍼센트 알콜을 제제에 첨가하여 세포 과편 및 다른 원치않는 불순물을 침전시켰으며, 조 폴리사카라이드는 용액 중에 남아있었다. 원심분리에 이어서 심층 여과 단계를 통해 불순물을 제거하였다. 이어서 추가의 이소프로판올 또는 변성 알콜을 배치에 첨가하여 용액으로부터 폴리사카라이드를 회수하였다. 침전된 폴리사카라이드 펠릿을 원심분리에 의해 회수하고, 연화처리하고, 분말로 건조시키고, -70°C에서 동결 저장하였다.

[0158] 실시예 2: 폴리사카라이드의 NMR 구조 분석

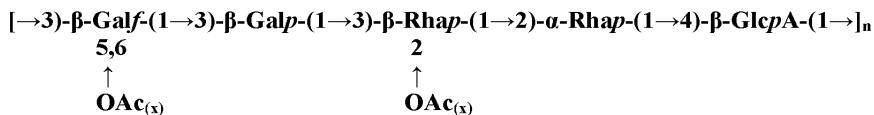
[0159] 폴리사카라이드 구조를 결정하기 위한 전략은 실질적으로 문헌 [Abeygunawardana et al., Determination of the Chemical Structure of Complex Polysaccharides by Heteronuclear NMR Spectroscopy in Advances in Biophysical Chemistry 1993, Vol 3, pages 199-249, JAI Press Inc]에 기재된 바와 같이 수행되는 다단계 공정을 포함하였다. 표준 1D 및 2D NMR 기술을 사용하여 정제된 폴리사카라이드를 조사하였다. 에스. 뉴모니아에 혈청형 31로부터의 폴리사카라이드가 0-아세틸을 함유하는 것으로 확인되었으므로, 탈-0-아세틸화된 폴리사카라이드 (0-아세테이트 기가 염기 가수분해를 사용하여 제거됨)에 대해 상세한 분석을 수행하였다. 최종적으로, 폴리사카라이드를 <sup>31</sup>P NMR을 사용하여 포스페이트의 존재에 대해 조사하였다.

[0160] <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 이중 양자 여과된 동핵 COSY 및 총 상관관계 분광분석법 (TOCSY)을 통해 모노사카라이드 잔기의 할당을 수행하였다. 이핵 단일 양자 간접 분광분석법 (HSQC) 및 조합 HSQC-TOCSY에 의해 <sup>13</sup>C 화학적 이동을 할당하였다. 다중도-편집된 HSQC를 사용하여 메틸렌을 메틴 기와 구별하였다. HMBC 및 NOESY 분광분석법의 조합을 통해 잔기간 연결을 결정하였다. 잔기의 아노머 배위를 아노머 양성자 및 탄소 화학적 이동, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub> 및 <sup>1</sup>J<sub>H1,C1</sub> 값으로부터 결정하였다. 푸라노스 고리의 아노머 배위는 <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub> 및 <sup>1</sup>J<sub>H1,C1</sub> 값으로부터 평가하기가 어려우므로, 이러한 결정에 아노머 탄소로부터의 고리 양성자의 장범위 커플링을 이용하였다.

[0161] 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드에서, 3개의 별개의 0-메틸 공명이 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서 관찰되었으며, 이는 폴리사카라이드가 3개의 별개의 부위에서 0-아실화되었음을 나타낸다. 0-아세틸화의 효과로 인한 화학적 이동 변화를 분석함으로써 정제된 폴리사카라이드 상의 0-아세틸 기의 위치를 결정하였다. 0.8 - 0.5 ppm의 큰 다운필드 <sup>1</sup>H 화학적 이동 변화는 0-아세틸 치환을 나타낸다. 긴 범위 C-H 이핵 다중 결합 상관관계

(HMBC) 및  $^{13}\text{C}$  NMR 분광분석법은 카르보닐을 그의 각각의 잔기로 할당하였다.

[0162] 도 2-5에서의 NMR 데이터에 기초하여, 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드에 대한 구조를 하기와 같은 것으로 결정하였다:



[0163]

[0164] 여기서 n은 폴리사카라이드를 구성하는 반복 단위의 수를 나타낸다. 또한 도 1을 참조한다.

[0165] 당 잔기는 람노스 (Rha), 갈락토스 (Gal), 글루코스 (Glc) 및 GlcpA (글루코론산)을 포함한다. 갈락토스 잔기 중 1개는 푸라노스 형태이다.

[0166]

[0166] 이탤릭체 문자 (p 및 f)는 피라노스 (6개 원자로 이루어진 폐환) 및 푸라노스 (5개 원자로 이루어진 폐환)를 지칭한다.

[0167]

[0167]  $\alpha$  및  $\beta$ 는 당 단위의 아노머 탄소에 부착된 양성자의 배위를 지칭한다. 아노머 탄소는 당 단위 내의 탄소 원자를 표지할 때 (통상적으로 1 내지 6) 항상 번호 1이다.  $\alpha$ 는 아노머 양성자가 3D 구조에서 수평방향 위치에 있다는 것을 의미한다.  $\beta$ 는 아노머 양성자가 축방향 위치에 있다는 것을 의미한다.

[0168]

[0168] 화살표와 연관된 숫자는 개별 당 단위가 서로 연결되는 방법을 지칭한다. 예를 들어, 명명법  $\alpha\text{-Rhap}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-GlcP}$ 는 람노스의 번호 1 탄소가 글루코스의 번호 3 탄소에 연결된다는 것을 의미한다 (p는 이들이 둘 다 피라노스 고리라는 것을 의미함).

[0169]

[0169] 0-아세틸 (OAc)기는 당 잔기 중 2개 상에 존재한다. 0-아세틸은 모든 3개의 위치에서 대략 90%로 발견되었다.

[0170]

[0170] 실시예 3: 디메틸솔풀시드 중 환원성 아미노화를 사용하는 CRM197에 대한 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드의 접합

[0171]

[0171] 폴리사카라이드를 용해시키고, 표적 분자 질량으로 크기조정하고, 화학적으로 활성화시키고, 한외여파에 의해 완충제-교환하였다. 활성화된 폴리사카라이드 및 정제된 CRM197을 개별적으로 동결건조시키고, 디메틸솔풀시드 (DMSO) 중에 재용해시켰다. 이어서 재용해된 폴리사카라이드 및 CRM197 용액을 합하고 하기 기재된 바와 같이 접합시켰다. 생성된 접합체를 한외여파에 의해 정제한 후 최종 0.2-마이크로미터 여파하였다. 각각의 단계 내의 여러 공정 파라미터, 예컨대 pH, 온도, 농도 및 시간을 제어하여 목적하는 속성을 갖는 접합체를 수득하였다.

[0172]

[0172] 폴리사카라이드 크기 감소 및 산화

[0173]

[0173] 정제된 폐렴구균 피막 Ps 분말을 물 중에 용해시키고, 0.45-마이크로미터 여파하였다. 용해된 폴리사카라이드를 산 가수분해에 의해 또는 균질화에 의해 크기-감소시켰다. 아세트산을 200 mM로 첨가하고, 90°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 차가운 인산칼륨 pH 7 완충제를 400 mM로 첨가하여 중화시킴으로써 산 가수분해를 수행하였다. 균질화의 경우, 균질화기 통과 압력 및 횟수를 400 bar/5회 통과로 제어하였다.

[0174]

[0174] 크기-감소된 폴리사카라이드를 농축시키고, 5 NMWCO 접선 흐름 한외여파 막을 사용하여 물에 대해 투석여과하였다.

[0175]

[0175] 이어서 폴리사카라이드 용액을 아세트산나트륨 완충제에 의해 22°C 및 pH 5로 조정하여 활성화로 인한 폴리사카라이드 크기 감소를 최소화하였다. 100 mM 소듐 메타페아이오데이트 용액을 첨가하여 폴리사카라이드 활성화를 개시하였다. 첨가된 소듐 메타페아이오데이트는 폴리사카라이드 활성화의 표적 수준을 달성하기 위한 폴리사카라이드 반복 단위 몰당 소듐 메타페아이오데이트 0.16 몰 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 알데히드 몰)이었다. 산화 반응은 22°C에서 2시간 동안 진행하였다.

[0176]

[0176] 활성화된 생성물을 5 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여파 막을 사용하여 10 mM 인산칼륨, pH 6.4에 대해 투석여과하고, 이어서 물에 대해 투석여과하였다. 한외여파를 2-8°C에서 수행하였다.

[0177]

[0177] CRM197에 대한 폴리사카라이드 접합

[0178]

[0178] 이전에 기재된 바와 같이 (WO 2012/173876 A1) 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된

CRM197을 5 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2 mM 포스페이트, pH 7.0 완충제에 대해 투석여과하고, 0.2-마이크로미터 여과하였다.

[0179] 활성화된 폴리사카라이드를 5% w/v 농도의 수크로스와 함께 6 mg Ps/mL로 동결건조를 위해 제제화하였다. CRM197을 1% w/v 농도의 수크로스와 함께 6 mg Pr/mL로 동결건조를 위해 제제화하였다.

[0180] 제제화된 Ps 및 CRM197 용액을 개별적으로 동결건조시켰다. 동결건조된 Ps 및 CRM197 물질을 동일 부피의 DMSO 중에 개별적으로 재용해시켰다. 폴리사카라이드 및 CRM197 용액을 블렌딩하여 폴리사카라이드 농도 2.8-4.0 g Ps/L (그램 폴리사카라이드/리터) 및 CRM197에 대한 폴리사카라이드 질량비 1.5를 달성하였다. 생성된 접합체 내 CRM197에 대한 폴리사카라이드 비를 제어하도록 질량비를 선택하였다. 소듐 시아노보로히드라이드 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 1 몰)를 첨가하고, 접합을 22°C에서 1시간 동안 진행하였다.

[0181] 소듐 보로히드라이드에 의한 환원

[0182] 소듐 보로히드라이드 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 2 몰)를 접합 반응 후에 첨가하고, 22°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 배치를 대략 4°C에서 대략 0.025% (w/v) 폴리소르베이트 20을 갖는 150 mM 염화나트륨 중으로 희석하였다. 이어서 인산칼륨 완충제를 첨가하여 pH를 중화시켰다. 일부 배치의 경우, 배치를 농축시키고, 30 kD NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 150 mM 염화나트륨, 25 mM 인산칼륨 pH 7에 대해 대략 4°C에서 투석여과하였다.

[0183] 최종 여과 및 생성물 저장

[0184] 이어서 배치를 농축시키고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 4°C에서 0.015% (w/v) 폴리소르베이트 20을 갖는 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM 히스티딘에 대해 투석여과하였다.

[0185] 보유물 배치를 0.2 마이크로미터 여과한 다음, 0.015% (w/v) 폴리소르베이트 20을 갖는 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 추가의 10 mM 히스티딘에 의해 희석하고, 분취물로 분배하고, ≤ -60°C에서 동결시켰다.

[0186] 표 1은 DMSO 중에서 제조된 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드 접합체의 속성을 나타낸다.

[0187] 표 1. DMSO 접합으로부터의 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드 접합체의 속성

산화된 Ps Mw	접합체 Mw	Ps:Pr	리신 소비 (mol/mol CRM197)	유리 Ps / 총 Ps	유리 단백질 / 총 단백질
119 kD	2999 kD	1.15	9.5	0.7%	<1%

[0188]

[0189] 실시예 4: 1가 접합체의 제제

[0190] 폐렴구균 폴리사카라이드-CRM197 접합체를 실시예 3에 기재된 바와 같이 제조하였다. 개별 혈청형의 표적 농도를 수득하는데 필요한 별크 접합체의 요구되는 부피를 배치 부피 및 개별 별크 폴리사카라이드 농축물의 농도에 기초하여 계산하였다. 에스. 뉴모니아에 혈청형 31의 별크 접합체를 부형제와 합하고, 멸균 여과하고, 혼합 조건 하에서 APA에 첨가하였다. 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 1가 접합체 백신의 최종 농도는 20 mM 히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% (w/v) PS-20 및 APA 형태의 0.250 mg/mL (w/v Al)를 갖는 4 μg/mL (w/v PnPs)였다.

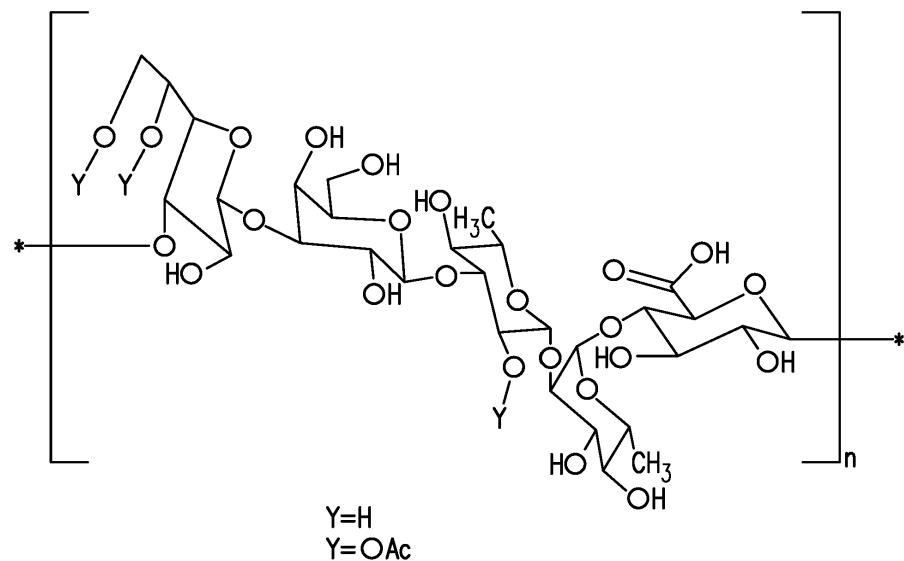
[0191] 실시예 5: 1가 접합체 뉴질랜드 백색 토끼 면역원성 연구

[0192] 뉴질랜드 백색 토끼 (NZWR) 모델에서 1가 접합체의 면역원성을 평가하였다. 성체 뉴질랜드 백색 토끼 (NZWR, n=3/군)에게 제0일 및 제14일에 (교대로) 0.25 mL의 각각의 1가 접합체 백신을 사용하여 근육내로 (IM) 면역화시켰다. 1가 폐렴구균 백신을 면역화당 62.5 μg 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 사용하여 1 μg PnPs (CRM197에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 31 폴리사카라이드)로 투여하였다. 연구 시작 전 (면역전) 및 제14 일 (투여 1 후, PD1) 및 제28일 (투여 2 후, PD2)에 혈청을 수집하였다. 훈련된 동물 관리 스태프가 NZWR을 질병 또는 곤란의 임의의 징후에 대해 적어도 매일 관찰하였다. NZWR에서의 백신 제제는 안전하고 내약성이 우수한 것으로 간주되었다. 모든 동물 실험을 미국 국립 보건원의 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침에서의 권장사항에 따라 엄격하게 수행하였다. NZWR 실험 프로토콜은 머크 앤 캄파니, 인크(Merck & Co., Inc) (뉴저지 주 케닐워스) 및 코반스(Covance) (웬실베니아주 텐버) 둘 다에서 동물 실험 윤리 위원회에 의해 승인되었다.

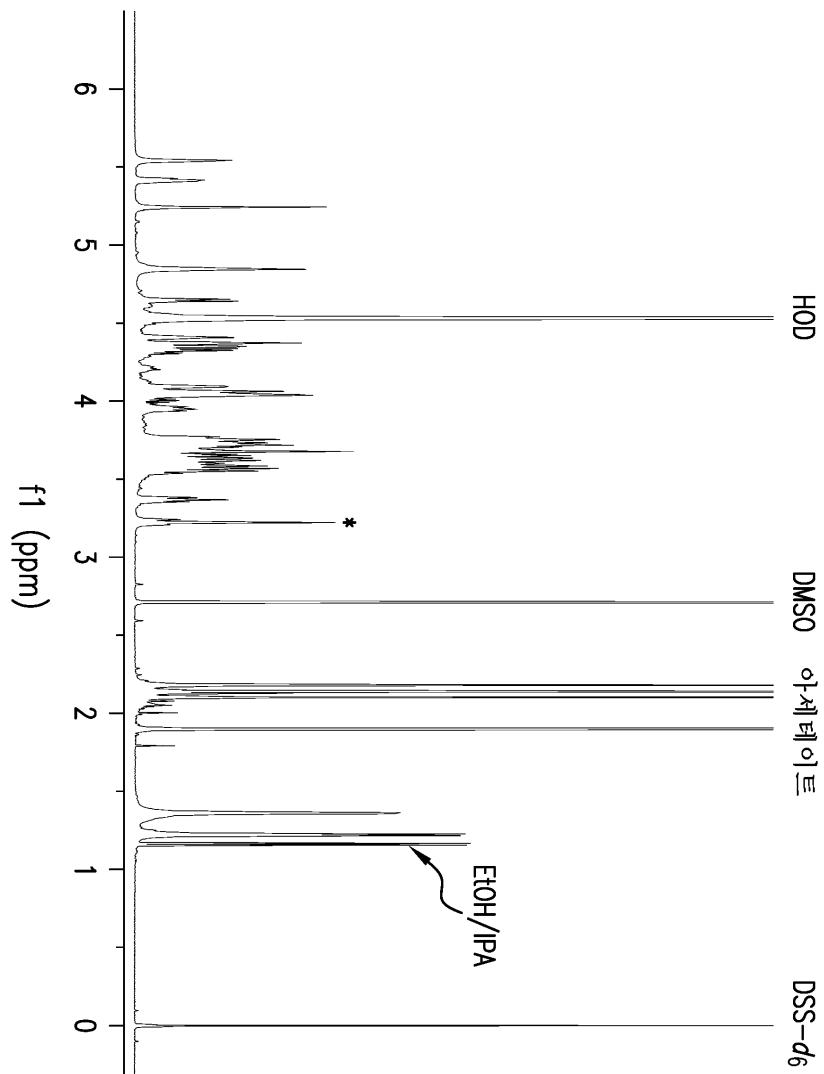
- [0193] ELISA 검정에서 1-2 mg/ml의 각각의 PnPs 코팅 농도를 사용하여 IgG 면역원성을 평가하기 위해 NZWR 혈청을 시험하였다. 이전에 기재된 프로토콜에 기초하여 읍소닌식세포작용 검정 (OPA)을 통해 기능적 항체를 결정하였다. 예를 들어, 문헌 [Caro-Aguilar et al., 2017, Vaccine 35:865-72 및 Burton et al., 2006, Clin Vaccine Immunol 13(9):1004-9]을 참조한다.
- [0194] 예스. 뉴모니아에 혈청형 31로부터의 1가 폐렴구균 접합체 백신은 토끼에서 면역원성인 것으로 밝혀졌고 (도 6), 각각의 박테리아 균주를 사멸시키는 기능적 항체를 생성하였다 (도 7).
- [0195] 실시예 6: 토끼 다가 연구를 위한 폐렴구균 접합체 백신의 제제화
- [0196] 폐렴구균 폴리사카라이드-CRM197 접합체를 사용하여 상이한 접합체 벌크 블렌드 제제 (예스. 뉴모니아에 혈청형 16F, 23A, 23B, 24F 및 31을 포함함)로 이루어진 다가 폐렴구균 접합체 백신을 제조하고, 20 mM 히스티딘 pH 5.8 및 150 mM 염화나트륨 및 0.1% w/v 폴리소르베이트-20 (PS-20) 중에서 총 폴리사카라이드 농도 84  $\mu$ g/mL에 대해 각각의 혈청형 4  $\mu$ g/mL로 제제화하였다. CRM197 단백질을 폐렴구균 폴리사카라이드 (PnPs) 유형 (예스. 뉴모니아에 혈청형 16F, 23A, 23B, 24F 및 31을 포함함)에 개별적으로 접합시켜 접합체를 제조하였다. 개별 혈청형의 표적 농도를 수득하는데 필요한 벌크 접합체의 요구되는 부피를 배치 부피 및 개별 벌크 폴리사카라이드 농축물의 농도에 기초하여 계산하였다. 개별 접합체를 히스티딘, 염화나트륨 및 폴리소르베이트-20 (PS-20)의 용액에 첨가하여 접합체 블렌드를 생성하였다. 접합체 블렌드를 함유하는 제제 용기를 자석 교반 막대를 사용하여 혼합하고, 또 다른 용기 내로 멸균 여과하였다. 이어서 제제를 플라스틱 시린지, 유리 시린지 또는 바이알 내로 충전하고, 2-8°C에서 저장하였다.
- [0197] 실시예 7: 뉴질랜드 백색 토끼에서의 다가 폐렴구균 접합체 백신의 면역원성
- [0198] 성체 뉴질랜드 백색 토끼 (NZWR, n=5/군)에게 제0일 및 제14일에 (교대로) 실시예 8에 기재된 다가 폐렴구균 접합체 백신 0.5 mL를 사용하여 근육내로 (IM) 면역화시켰다. 폐렴구균 백신을 면역화당 2  $\mu$ g의 각각의 접합된 PnPs로 투여하였다. 연구 시작 전 (면역전) 및 제14일 (투여 1 후, PD1) 및 제28일 (투여 2 후, PD2)에 혈청을 수집하였다. 훈련된 동물 관리 스태프가 NZWR을 질병 또는 곤란의 임의의 징후에 대해 적어도 매일 관찰하였다. NZWR에서의 백신 제제는 안전하고 내약성이 우수한 것으로 간주되었다. 모든 동물 실험을 미국 국립 보건원의 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침에서의 권장사항에 따라 엄격하게 수행하였다. NZWR 실험 프로토콜은 머크 앤 캄파니, 인크 및 코반스 (펜실베니아주 덴버) 둘 다에서 동물 실험 윤리 위원회에 의해 승인되었다.
- [0199] 멀티플렉스화 전기화학발광 (ECL) 검정을 사용하여 NZWR 혈청을 IgG 면역원성에 대해 평가하였다. 이 검정은 문헌 [Marchese et al. (Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. Clin Vaccine Immunol. 16(3): 387-96 (2009))]에 기재된 인간 검정에 기초하여, 메조스케일 디스커버리(MesoScale Discovery) (메릴랜드주 게이더스버그 소재 메조스케일 다이아그노스틱스, 엘엘씨 (MesoScale Diagnostics, LLC)의 자회사)에 의해 개발된, 전기화학적 자극시 광을 방출하는 술포-태그 (SULFO-TAG)™ 표지를 이용하는 기술을 사용하여, 토끼 혈청에 사용하기 위한 것으로 개발되었다. 술포-태그™-표지된 항-토끼 IgG를 NZWR 혈청 샘플을 시험하기 위한 2차 항체로서 사용하였다. 기능적 항체는 읍소타이터 (Opsotiter)® 3 소프트웨어를 사용하여 범명염 소재 알라바마 대학의 박테리아 호흡기 병원체 참조 실험실의 온라인으로 이용가능한 이전 기재된 프로토콜 (UAB Research Foundation, Caro-Aguilar et al., 2017, supra, Burton et al., 2006, supra)에 기초하여 멀티플렉스화 읍소닌식세포 검정 (MOPA)을 통해 결정하였다.
- [0200] 다가 폐렴구균 접합체 백신 내의 예스. 뉴모니아에 혈청형 16F, 23A, 23B, 24F 및 31로부터 제조된 폴리사카라이드-단백질 접합체는 토끼에서 투여 1 후 (PD1) 및 투여 2 후 (PD2) 둘 다에 대해 면역원성인 것으로 밝혀졌다 (도 8). 이들은 또한 백신-유형 박테리아 균주를 사멸시키는 기능적 항체를 생성하였다 (도 9). 2  $\mu$ g 용량의 다가 폐렴구균 접합체 백신으로 면역화된 토끼는 면역전 토끼 혈청과 비교하여 4종의 혈청형에 대해 유의하게 더 높은 PD1 MOPA 역가를 가졌다 (도 9). 2  $\mu$ g 용량의 다가 폐렴구균 접합체 백신으로 면역화된 토끼는 면역전 토끼 혈청과 비교하여 모든 5종의 혈청형에 대해 유의하게 더 높은 PD2 MOPA 역가를 가졌다 (도 9). Log 변환된 데이터를 일원 ANOVA와 던넷 검정에 의해 분석하여 유의성을 결정하였다.

도면

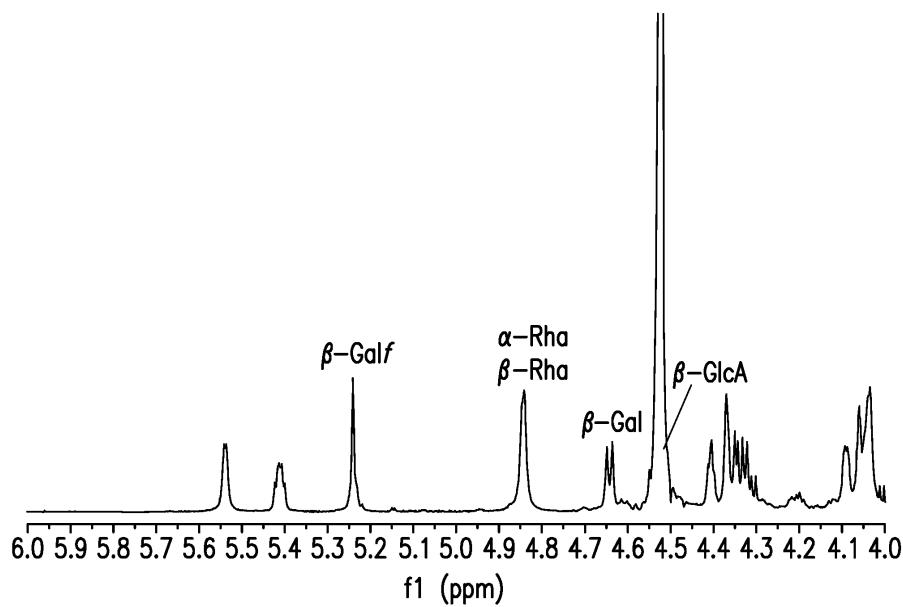
도면1



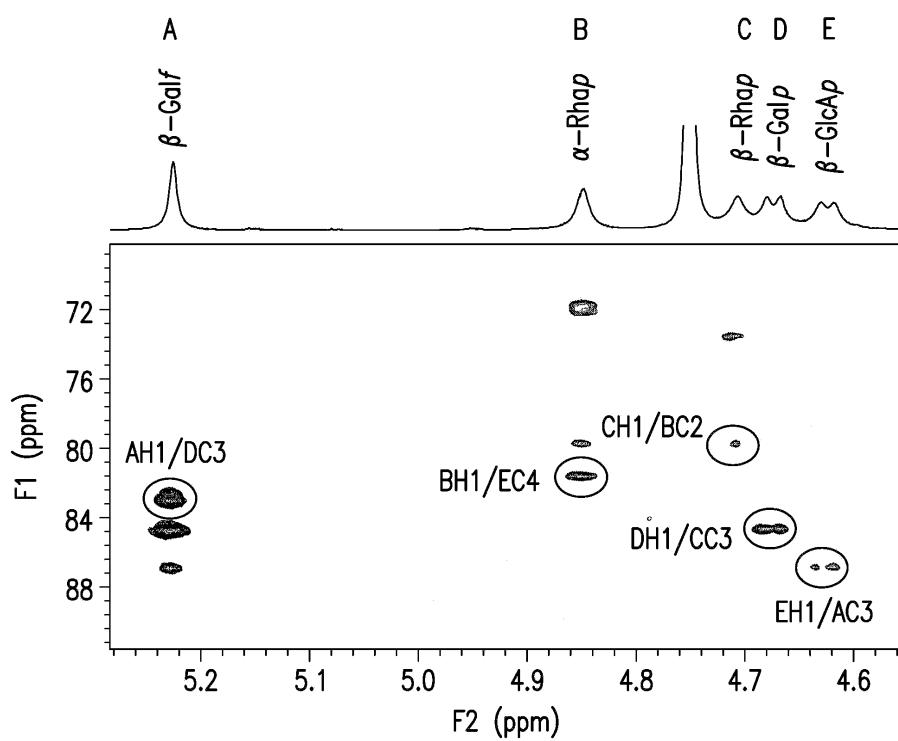
도면2



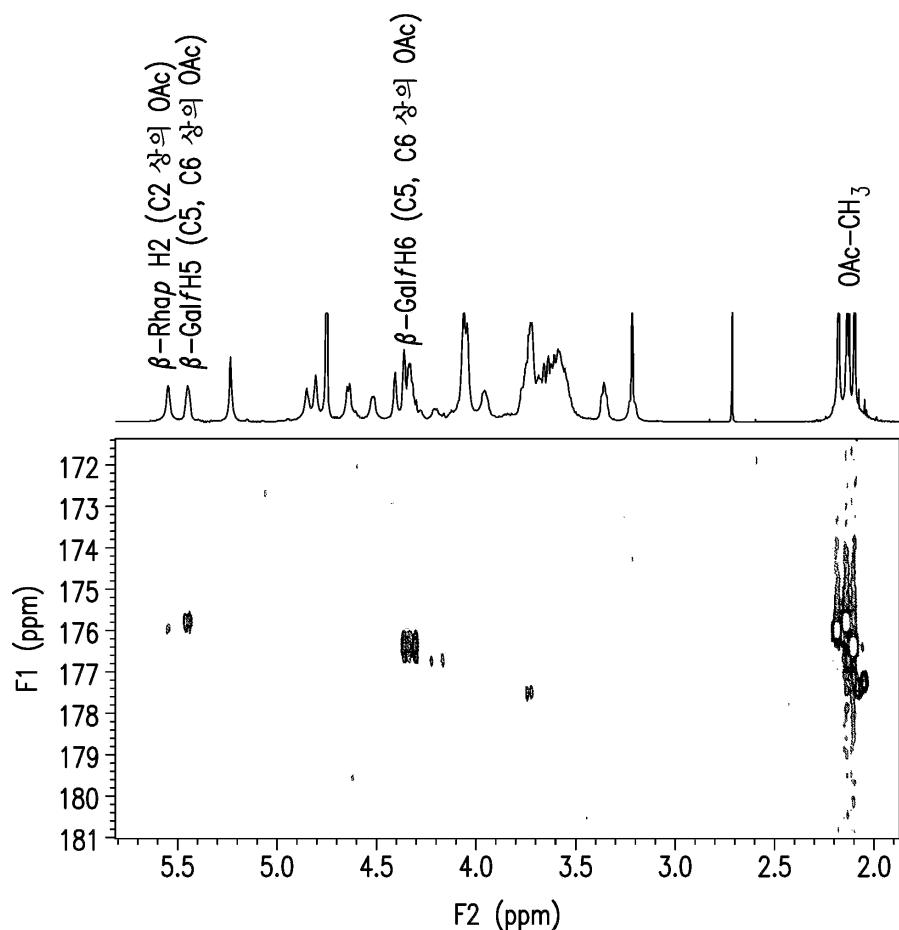
도면3



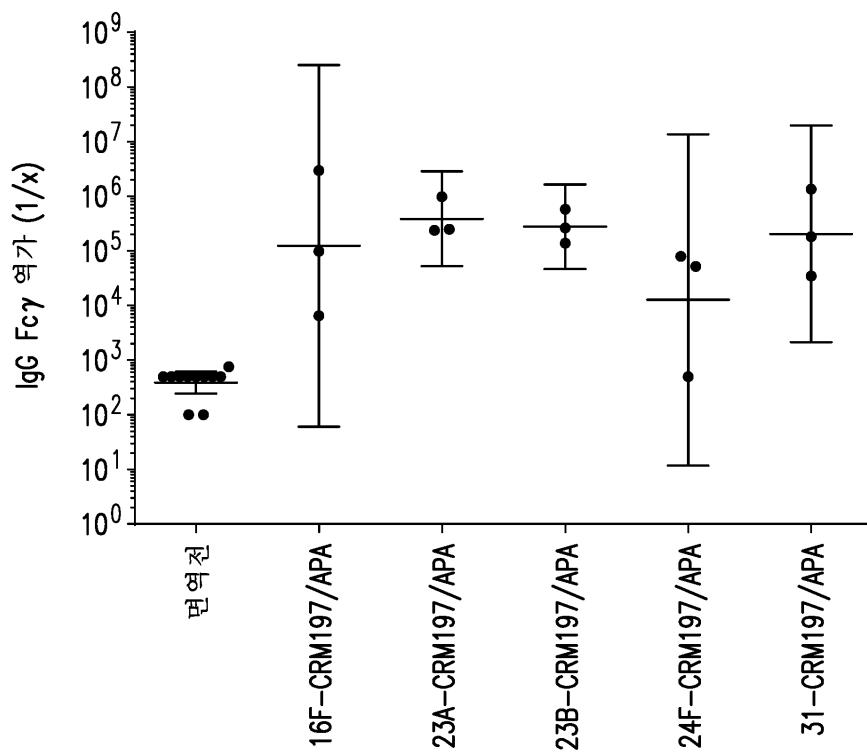
도면4



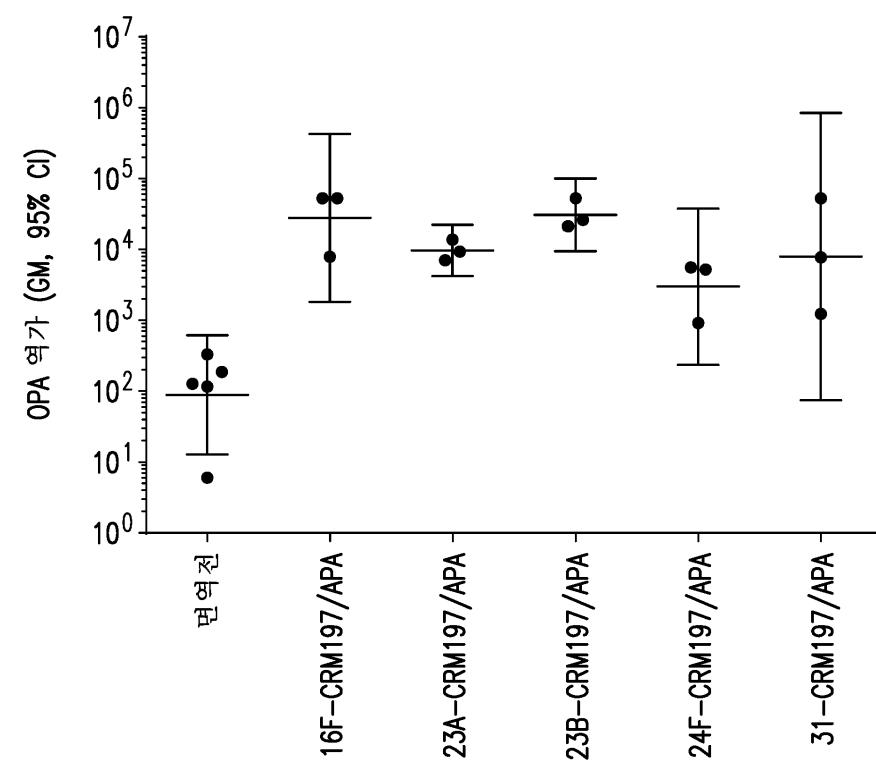
도면5



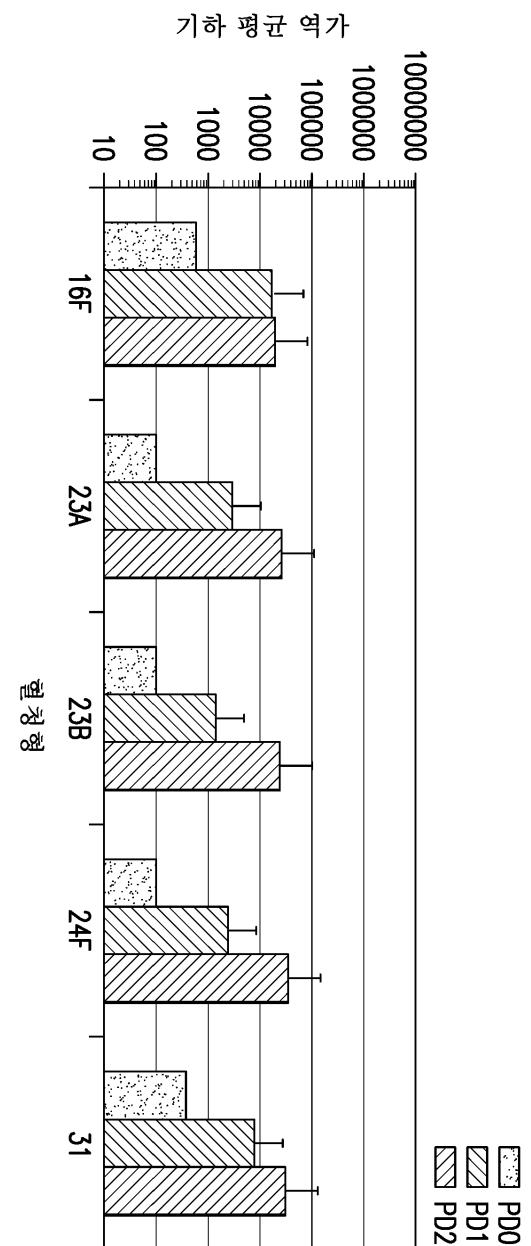
도면6



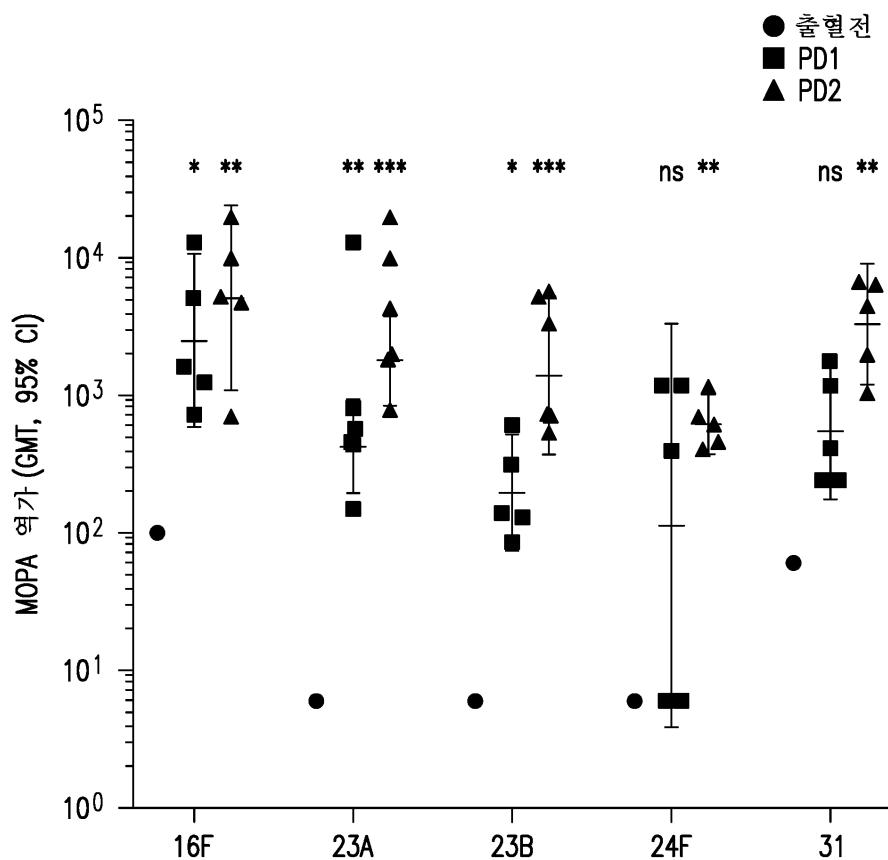
도면7



도면8



## 도면9



## 【심사관 직권보정사항】

## 【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5

## 【변경전】

제1항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 1.5인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 【변경후】

제1항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 1.5인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

## 【변경전】

제1항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.8 내지 1.2인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 【변경후】

제1항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.8 내지 1.2인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

## 【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 18

【변경전】

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 2.0인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

【변경후】

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 2.0인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

【직권보정 4】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 19

【변경전】

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 1.5인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

【변경후】

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.5 내지 1.5인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

【직권보정 5】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 20

【변경전】

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.8 내지 1.2인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.

【변경후】

제15항에 있어서, 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드 질량비가 0.8 내지 1.2인 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체.