



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월01일

(11) 등록번호 10-2690378

(24) 등록일자 2024년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/116 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/092 (2013.01)

A61K 39/116 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2018-7000352

(22) 출원일자(국제) 2016년06월03일

심사청구일자 2021년04월13일

(85) 번역문제출일자 2018년01월05일

(65) 공개번호 10-2018-0030498

(43) 공개일자 2018년03월23일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2016/053265

(87) 국제공개번호 WO 2016/199003

국제공개일자 2016년12월15일

(30) 우선권주장

2185/MUM/2015 2015년06월08일 인도(IN)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140005892 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

세럼 인스티튜트 오브 인디아 프라이비트 리미티드

인도 411 028 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2

(72) 발명자

데레, 라지브 말라사칸트

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

말비야, 히데쉬 쿠마르

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

(유)한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 최연정

(54) 발명의 명칭 다당류-단백질 접합체의 흡착을 개선시키는 방법 및 그로부터 수득된 다가 백신 제제

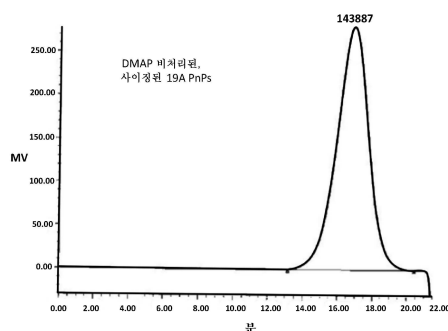
(57) 요약

본 발명은 안정한 다가 페렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 제제의 제조 방법을 제공한다. 본 안정한 제제는 각 접합체에 대하여 최적의 흡착률(%)을 보이며, 여기서 응집은 i) 조합된 흡착에 의해 달리 더 낮은 흡착률(%)을 보이는 접합체에 대한 개별적 또는 별개의 흡착 ii) 중성 pH에서 산성 pH로의 pH 이동을 동반한 히스티딘-숙신산 완충제 시스템 iii) 0.5 내지 약 1.4의 단백질에 대한 다당류의 비 iv) 제제화 용기에서 6날 러쉬톤 유형의 터빈 임펠라의 사용에 의해 방지될 수 있다.

대표도 - 도1

개선된 흡착

피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1 피크 4	16.881	36050010	178357	124375	143887	100.00	1.434025



(52) CPC특허분류

A61P 31/00 (2018.01)

A61K 2039/6037 (2013.01)

(72) 발명자

자나, 스와판 쿠마르

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

피살, 삼바지 산카르

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

말리야, 아샤 디네쉬

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

마호르, 수닐

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

가우탐, 마니쉬 마헤쉬쿠마르

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

조쉬, 체탄 빌라스

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

말레파티, 벤카타 밤시 크리쉬나

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

자다브, 프라샨트 쉬바지

인도 411028 마하라슈트라 푸네 하답사르 오프 솔리 푸나왈라 로드 212/2 세럼 인스티튜트 오브 인디아 엘티디.

명세서

청구범위

청구항 1

안정한 다가 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 조성물의 제조 방법으로서, 하기 단계:

- i. pH 5.2 내지 5.9에서, 캐리어 단백질에 대해 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)에서 유래하는 폐렴구균성 다당류의 비율을 0.5 내지 1.4로 하여 접합시켜 다당류-단백질 접합체를 수득하는 단계;
 - ii. 농도가 1 mM 내지 200 mM이고 pH가 5.6 내지 5.8인 히스티딘-숙신산 완충제 중에서, 혈청형 6A, 9V 및 23F을 포함하는, 단계 (i)에서 수득된 다당류-단백질 접합체를 개별적으로 제1 알루미늄 염 애주번트 상에 흡착시키는 단계로서, 상기 알루미늄 염 애주번트의 양은 최종 백신 조성물의 0.5 ml 용량당 Al+++ 20-375 µg 범위인, 단계;
 - iii. 농도가 1 mM 내지 200 mM이고 pH 6.8에서 5.6 내지 5.8로의 pH 이동을 나타내는 히스티딘-숙신산 완충제 중에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 및 22F로부터 선택되는 혈청형을 포함하는, 단계 (i)에서 수득된 다당류-단백질 접합체를 혼합하고 제2 알루미늄 염 애주번트 상에 흡착시키는 단계로서, 상기 알루미늄 염 애주번트의 양은 최종 백신 조성물의 0.5 ml 용량당 Al+++ 20-375 µg 범위인, 단계; 및
 - iv. 러쉬톤 터빈 평날 임펠라의 도움으로, 계면활성제의 존재 하에, 단계 (ii)에서 수득된 제1의 흡착된 세트를 단계 (iii)에서 수득된 제2의 흡착된 세트와 블렌딩하여 안정한 다가 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 조성물을 수득하는 단계
- 를 포함하고, 상기 캐리어 단백질은 CRM197, 파상풍 독소이드 (TT), 및 디프테리아 독소이드 (DT)로부터 선택되고, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류-단백질 접합체는 시아닐화 접합 화학을 이용하여 제조되며, 흡착이 샌드위치 ELISA에 의해 측정된 것으로 75-99% 범위인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (i)은 하기:

- i. 캐리어 단백질에 공유적으로(covalently) 연결된 반복 단위 사이에 포스포디에스테르 연결을 함유하고 평균 크기가 130 kDa 내지 190 kDa인 폐렴구균성 다당류를 시안화제와 1:0.8 내지 1:1의 비로 22°C 내지 25°C에서 4 min 내지 10 min의 기간 동안 반응시켜, 시아네이트-활성화된 다당류를 생성하는 단계; 및
 - ii. 시아네이트-활성화된 다당류를 단백질과 1:1의 비로 pH 9 내지 9.5에서 3 hr 내지 5 hr의 기간 동안 접촉시킨 후, 글리신으로 켄칭(quenching)시키는 단계;
- 를 포함하고, 상기 접합 공정은 시안화제 부산물 매개의 사이징된 다당류 분해를 최소화하고, 후속되는 다당류-다당류 응집을 방지하여 유리 다당류 함량이 최소인 접합체를 생성하는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 반복 단위 사이에 포스포디에스테르 연결을 함유하는 다당류가 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 19A, 19F, 6A 또는 6B 중 하나로부터 유래된 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 다당류가 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 19A 다당류이고, 시안화제가 1-시아노-4-디메틸-아미노-피리디늄-테트라플루오로보레이트이며, 이들이 1:1의 비로 22°C에서 4분의 기간 동안 혼합되어 시아네이트-활성화된 다당류를 생성하는 것인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 다당류가 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 19F 다당류이고, 시안화제가 1-시아노-4-디메틸-아미노-피리디늄-테트라플루오로보레이트이며, 이들이 1:0.8의 비로 22°C에서 8-10분의 기간 동안 혼합되어 시

아네이트-활성화된 다당류를 생성하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 히스티딘-숙신산 완충제의 농도가 10 mM 내지 40 mM인, 방법.

청구항 7

제1항에 따라 제조된 안정한 다가 폐렴구균성 접합체 백신 조성물로서,

상기 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 10A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F, 및 45로부터 선택되는 다당류를 갖는 적어도 10개의 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류 단백질 접합체를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체는 캐리어 단백질로서 CRM197을 갖고, 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체는 캐리어 단백질로서 TT를 갖고, 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체는 캐리어 단백질로서 DT를 갖는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 혈청형 3은 CRM197에 접합되고, 혈청형 18C는 CRM197에 접합되고, 혈청형 4는 DT에 접합되고, 혈청형 15B는 TT에 접합되고, 혈청형 22F는 TT에 접합된, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 조성물은 혈청형 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F 및 23F로부터의 다당류를 갖는 10개의 상이한 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류 단백질 접합체를 포함하는, 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F 및 23F로부터 선택되는 다당류를 갖는 적어도 16개의 상이한 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류 단백질 접합체를 포함하는, 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F 및 23F로부터의 다당류를 갖는 17개의 상이한 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류 단백질 접합체를 포함하는, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류 단백질 접합체의 유리 다당류 함량이 1.6% 미만인, 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, 인산알루미늄 겔 및 NaCl을 함유하는 희석제를 포함하는 1, 5, 또는 10회분 용량의 제제로서 투여될 때까지 동결건조된 상태로 수득되는, 조성물.

청구항 14

제7항 내지 제11항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 6A-CRM197 접합체는 16가 또는 17가 조성물로 존재할 때 증가된 면역원성을 나타내는, 조성물.

청구항 15

제1항에 따라 제조된 안정한 다가 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류-단백질 접합체 백신 조성물로서, 상기 조성물은 혈청형 1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F, 및 23F로부터의 다당류를 갖는 10개의 상이한 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류 단백질 접합체를 포함하고, 다당류들은 캐리어 단백질로서 CRM197에 접합된, 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)는 아동에서의 박테리아성 폐렴, 뇌수막염, 및 패혈증의 주된 원인이다. 최근 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*)에 의해 유발된 아동 사망은 그 범위가 전세계적으로 매년 70만 내지 100만 건에 달하는 것으로 추정된다. 2000년에는 약 1,450만 건의 중증 폐렴구균성 질환 에피소드(대략적인 범위 1,110만 내지 1,800만 건)가 발생한 것으로 추정되었다. 폐렴구균성 질환은 1-59개월된 아동 중 약 82만 6천 건의 사망(58만 내지 92만 6천 건)을 유발하였고, 그 중 9만 천 건(6만 3천 내지 10만 건)은 HIV 양성에서 일어났고, 73만 5천 건(51만 내지 82만 건)은 HIV 음성 아동에서 일어났다.
- [0002] 수년간 허가를 받아 온 다가 폐렴구균성 다당류 백신은 성인, 특히, 노인, 및 위험이 높은 대상체에서 폐렴구균성 질환을 예방하는 데 가치가 있는 것으로 입증되어 왔다. 그러나, 영아 및 유아는 비접합된 폐렴구균성 다당류에 대해 충분하게 반응하지 못한다. 유아 및 영아 시기에 침습성 폐렴구균성 질환을 유발하는 가장 빈번하게 단리되는 7가지의 혈청형(4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F)을 함유하는 폐렴구균성 접합체 백신인 프레브나르(Prevnar)®가 2000년 2월 미국에서 최초로 허가받았다.
- [0003] 추가의 프레브나르™ 13(와이어스(Wyeth))은 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C 및 23F 이외에도 혈청형 6A, 6B, 19A, 19F로부터의 다당류의 접합체를 함유하는 승인받은 백신이다. 신플로릭스(Synflorix)™(GSK)는 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 및 23F를 보호할 뿐만 아니라, 19A & 6A도 교차 보호하는 것인 승인받은 또 다른 백신이다.
- [0004] 백신 제제는 일반적으로 긴 저장 수명 및 다회 투약용 용기 사용이라는 요구 사항을 충족시키기 위해서는 안정하고, 균일한 일관성을 가져야 한다. 다당류-단백질 접합체를 비롯한, 단백질 기반의 백신은 단백질이 응집 및 침전되기 쉽고, 이로 인해 침전된 단백질 생성물의 이용불가능에 기인하여 백신의 총 유효 농도는 더 낮아질 수 있다. 특히, 다당류-단백질 접합체 백신은 캐리어 단백질 단독인 것보다도 응집 경향이 더 강한 것으로 보인다(문헌[Berti et al, 2004, Biophys J 86:3-9] 참조). 다당류-단백질 접합체 백신을 위한 제제를 선택하는 것이 단백질 응집에 크게 영향을 줄 수 있다. 문헌[Ho et al., 2001, Vaccine 19:716-725]를 참조한다.
- [0005] 전세계적으로 수개의 현존 다가 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 조성물이 개발되었음에도 불구하고, 관련 기술분야에서는 개별 접합체의 높은 흡착을 제공하고, 다당류-단백질 접합체를 갖는 면역원성 조성물의 응집/침전은 이루어지지 않는 백신 제제가 계속해서 요구되고 있다.
- [0006] 이러한 다가 폐렴구균성 백신에서 전통적으로 사용된 애주번트는 알루미늄 염, 예컨대, 수산화알루미늄 및 인산알루미늄이었다. 실험상의 다른 애주번트 다수가 공지되어 있지만, 알루미늄 염에의 흡착은 가장 일반적인 백신 애주번트 제제에서도 계속해서 유지된다. 비록 알루미늄 염이 광범위하게 사용되고는 있지만, 상기 알루미늄 염이 특정 항원과 항상 화합성일 수 있는 것은 아니며, 이로 인해 다당류-단백질 접합체의 알람 상의 흡착률(%) 또는 항원성과 관련하여 유의적으로 변동될 수 있다.
- [0007] 알루미늄 애주번트에 흡착된 접합체 백신 후보의 면역학적 특성 및 안정성은 i) 각 항원의 항원성, ii) 접합에 사용된 캐리어 단백질 유형, 및 iii) 사용된 애주번트 유형과 같은 다양한 파라미터에 의존한다. 가장 중요한

게는, 항원의 애주번트 상의 흡착 정도가 제제화 프로세스의 로트 대 로트의 일관성 및 백신 생성물의 효능에 대하여 미칠 수 있는 그의 영향력을 입증한 중요한 파라미터 중 하나인 것으로 앞서 보고된 바 있다. 추가로, 다당류-단백질 접합체의 흡착률(%)은 제제 보관시, 또는 예컨대, 온도 이탈과 같은 불리한 상황하에서는 추가로 하락할 수 있다. 2003년 11월 17일-21일에 개최된 폐렴구균성 접합체 백신의 제조 & 관리를 위한 생물학적 표준, 권고 사항에 대한 WHO 전문 위원회의 제54차 회의(WHO Expert Committee on Biological Standardization, Recommendations for the production & control of Pneumococcal conjugate vaccines, 17-21 November 2003); 문헌 [Carl E. Frasch, Session IV: Conjugate Vaccines; Vaccine Technology II; Portugal. 2008]을 참조한다.

[0008] 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체에 대한 유럽 규제 기관(European regulatory agency: EMEA)의 가이드라인에 따르면, 흡착 완전성 (비결합 접합체 비율(%))은 알람 함량, 멸균성, 아이덴티티 및 유리 다당류 함량과 함께 중요한 품질 관리 파라미터로서 간주되어야 한다. 신플로릭스 2009, 절차 번호 EMEA/H/C/000973에 대한 사정 보고서를 참조한다. WHO는 이들 백신 중의 적어도 80%의 항원이 흡착되도록 알람 침전된 항원 (예컨대, 디프테리아 및 파상풍 독소이드)에 대한 흡착을 최대화시킬 것을 권고하고 있다.

[0009] 다당류-단백질 접합체 제조 동안, 제제는 다당류-다당류 유형, 단백질-단백질 유형 또는 다당류-단백질 유형의 응집체로 구성될 수 있다. 이러한 응집은 또한 완제품에서도 관찰되며, 이로 인해 다당류-단백질 접합체(들) 백신의 충전된 바이알 중 4% 내지 10%가 불합격이 되는 바, 이는 접합체 백신의 안정성 및 효능에 영향을 준다.

[0010] 다당류 및 그의 접합체의 응집 및 안정성과 관련하여 상기 논의된 한계를 고려하면, 하류 프로세싱에 걸쳐 폐렴구균성 접합체 백신 제조의 최종 제제화 단계까지 응집을 감소시키고, 상기 다당류를 안정화시키는 것이 여전히 분명하게 요구되고 있다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 알루미늄 염을 포함하는 백신의 안정성에서의 개선을 제공하고, 특히, 다가 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 중의 개별 접합체의 응집을 최소화시키고, 상기 접합체의 흡착률(%)을 개선시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 발명자들은 다당류-단백질 접합체의 조합된 흡착, 및 1:1 초과 다당류 대 단백질 비 사용으로 i) 혈청형 6A, 9V 및 23F에 대한 에스. 뉴모니아에 접합체의 경우, 흡착률(%)은 55% 미만이고, ii) 나머지 혈청형 접합체의 경우, 흡착률(%)은 약 80% 내지 90%가 되며, 이로써, 주어진 다가 폐렴구균성 접합체 제제를 위한 개별 혈청형 접합체에 대한 완전한 흡착을 달성하는 데 실패하였다는 것을 관찰하였다. 또한, pH 6.8 내지 7.0 사용으로 제조된 백신 제제는 약 4 내지 10%의 응집을 일으키고, 흡착을 낮춘다는 것도 관찰하게 되었다.

[0012] 본 발명은 각 접합체에 대하여 75 내지 99%의 최적의 흡착을 보이는, 안정한 다가 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 제제의 제조 방법이며, 여기서 응집이

[0013] a. 조합된 흡착에 의해 달리 상대적으로 더 낮은 흡착을 보이는 접합체에 대한 개별적 또는 별개의 흡착;

[0014] b. 중성 pH에서 산성 pH로의 pH 이동을 동반한 히스티딘-숙신산 완충제 시스템;

[0015] c. 0.6 내지 약 1.4의 단백질에 대한 다당류의 비; 및/또는

[0016] d. 제제화 용기에서 6날 러쉬톤(Rushton) 유형의 터빈 임펠라의 사용

[0017] 중 적어도 하나에 의해 방지되는 것인 방법에 관한 것이다.

[0018] 본 발명은 또한 포스포디에스테르 연결을 함유하는 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 다당류, 특히, 19A, 19F, 6A 및 6B의 경우, 면역원성이 개선되고, 유리 다당류 함량이 감소된 다당류-단백질 접합체를 제조하는 방법을 개시한다. 상기 접합 프로세스는 시안화제 부산물 매개의 사이징된 다당류 분해를 최소화하고, 후속되는 다당류-다당류 응집을 막음으로써 불안정한 다당류를 안정화시킨다. 응집 감소 비결은 100 - 200 KDa 범위로 사이징된 다당류 사용, 및 (1):(0.8 - 1) 범위의 다당류 대 CDAP (시안화제) 비 사용에 기인하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명에 따라 제조된 면역원성 조성물은 안정성 및 면역원성을 개선시킴과 동시에 다당류 - 다당류, 및 다당류 - 단백질 접합체 사이의 응집을 감소시킨다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1: DMAP 처리 이전의 사이징된 19A PnPs (178 KDa)의 SEC-HP-RI 프로파일.
- 도 2: DMAP 처리 이후 (A) 24 h째 사이징된 19A PnPs (70 KDa) 및 (B) 72 h째 14.5 KDa의 SEC-HP-RI 프로파일 - 분해 프로파일.
- 도 3: 사이징된 19A PnPs의 SEC-HP-RI 프로파일 (178 KDa; A) 및 CDAP 매개의 활성화된 다당류 (5B, 5C & 5D), 5E (10 KDa DF를 거치지 않은 접합체), 5F (10 KDa DF를 거친 접합체), 10 KDa 투석여과 단계를 사용하지 않은, 5G-사이징된 19A/5H-활성화된 19A(19A에 대한 변형된 Ps:CDAP 비 1:1) 접합 방법의 시간-의존성 응집.
- 도 4: 사이징된 19F PnPs의 SEC-HP-RI 프로파일 (157 KDa; A) 및 CDAP 매개의 활성화된 다당류 (B), 10 KDa 투석여과 단계를 사용하지 않은, 6C/6D (19F에 대한 변형된 Ps:CDAP 비 1:1) 접합 방법의 시간-의존성 응집.
- 도 5: 6날 러쉬톤 유형의 터빈 평날 임펠라.
- 도 6: 흡착 프로토콜.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명의 목적은 알루미늄 염을 포함하는 백신의 안정성에서의 개선을 제공하고, 특히, 다가 페렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 중의 개별 접합체의 응집을 최소화시키고, 상기 접합체의 흡착률(%)을 개선시키는 방법을 제공하고자 하는 것이다. 본 발명의 발명자들은 다당류-단백질 접합체의 조합된 흡착, 및 1:1 초과 다당류 대 단백질 비 사용으로 i) 혈청형 6A, 9V 및 23F에 대한 에스. 뉴모니아에 접합체의 경우, 흡착률(%)은 55% 미만이고, ii) 나머지 혈청형 접합체의 경우, 흡착률(%)은 약 80% 내지 90%가 되며, 이로써, 주어진 다가 페렴구균성 접합체 제제를 위한 개별 혈청형 접합체에 대한 완전한 흡착을 달성하는 데 실패하였다는 것을 관찰하였다. 또한, pH 6.8 내지 7.0 사용으로 제조된 백신 제제는 약 4 내지 10%의 응집을 일으키고, 흡착을 낮춘다는 것도 관찰하게 되었다.
- [0022] (a) CP를 발현하는 박테리아 균주의 접종원을 제공하는 단계; (b) 미리 설정된 pH를 유지하기 위해, 공급 배지의 첨가 속도가 알칼리 혼합물의 첨가 속도와 등가를 이루도록 하면서, pH 7.2에서 발효시켜 균주를 배양하는 단계; (c) 배양물 배지를 0.1-0.5 vvm의 기체 유속으로 50-150 RPM으로 교반하면서 35-38°C에서 발효시키는 단계를 포함하는, 특허 W02013088448A1에 기술된 방법을 사용하여 다당류를 배양하였다.
- [0023] 특허 W02012127485에 기술된 프로세스에 의해 다당류를 정제하였다. 본 프로세스에 의해 제조된 Pn-Ps는 약 60 내지 70%의 회수율을 보이며, 여기서 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC) 이후의, 또는 이온 교환 크로마토그래피 (IEC) 이전의 C-Ps 함량과 비교하여 C-다당류 오염 감소는 1 내지 5배에 달하며, 단백질 오염은 1% 미만이고, 핵산 오염은 1% 미만이다. 상기 프로세스는 연구, 파일럿 및 상업적 규모로 수행되어 왔다.
- [0024] CTAB/알콜 기반 방법과 비교하였을 때 본 프로세스는 80-90% 단축된 소요 시간 & 90% 절감된 비용으로 다당류를 정제할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 한 중요한 실시양태에 따라, i) 약 0.8 내지 1.4인 단백질에 대한 다당류의 비 사용, ii) 에스. 뉴모니아에 접합체를 불충분하게 흡착시키는 경우, 개별적 또는 별개의 흡착 사용, iii) 제제화 동안 더 낮은 pH 유지에 의해 에스. 뉴모니아에 접합체에 대한 흡착률(%)을 75 내지 95%로 개선시킬 수 있다.
- [0026] 제1 실시양태의 한 측면에 따라, 바람직한 다당류 대 단백질의 비는 1:1이다.
- [0027] 제1 실시양태의 제2 측면에 따라, 상기 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F 및 45로부터 선택되는 다당류를 갖는 적어도 2개의 다당류 단백질 접합체로 구성된다.
- [0028] 제1 실시양태의 제3 측면에 따라, 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F 및 45로 이루어진 것으로부터 선택되는 임의의 에스. 뉴모니아에 혈청형, 및 바람직하게는 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 9V, 및 23F에 대하여 개별 흡착 모드가 사용될 수 있다.
- [0029] 제1 실시양태의 바람직한 측면에 따라, 다가 페렴구균성 접합체 백신은 10가이며, 여기서 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 9V, 및 23F는 별개의 블렌드로서 개별적으로 흡착된 후, 이어서, 조합 모드로 흡착된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A 및 19F의 혼합물로 구성된 또 다른 블렌드에 첨가된다.
- [0030] 제1 실시양태의 또 다른 바람직한 측면에 따라, 다가 페렴구균성 접합체 백신은 11, 13, 15, 16가 또는 그 초과이며, 여기서 2, 3, 4, 6A, 8, 9V, 9F, 9N, 12F, 15B, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 33F 및 45로 이루어진 군으로

부터 선택되는 적어도 하나의 에스. 뉴모니아에 혈청형은 별개의 블렌드로서 개별적으로 흡착되거나, 또는 더 작은 군으로 흡착된 후, 이어서, 조합 모드로 흡착된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A 및 19F의 혼합물로 구성된 또 다른 블렌드에 첨가된다.

- [0031] 제1 실시양태의 추가의 또 다른 바람직한 측면에 따라, 다가 페렴구균성 접합체 백신은 16가이며, 여기서 2, 3, 4, 6A, 9V, 12F, 15B, 18C, 및 23F로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 에스. 뉴모니아에 혈청형은 별개의 블렌드로서 개별적으로 흡착되거나, 또는 더 작은 군으로 흡착된 후, 이어서, 조합 모드로 흡착된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 5, 6B, 7F, 14, 19A 및 19F의 혼합물로 구성된 또 다른 블렌드에 첨가된다.
- [0032] 본 발명의 제2 실시양태는 다가 페렴구균성 다당류-단백질 접합체 제제에서의 응집이 i) 중성 pH에서 산성 pH로의 pH 이동 사용 및 ii) 히스티딘-숙신산 완충제 조합 사용에 의해 완전하게 방지될 수 있다는 것이다.
- [0033] 제2 실시양태의 한 측면에 따라, 상기 pH 이동은 pH 6.8에서, 비제한적으로, pH 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 및 5.9로부터 선택되는 pH로 일어날 수 있다. 보다 바람직하게는, pH 6.8에서 pH 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 및 5.8로부터 선택되는 pH로 일어난다.
- [0034] 제2 실시양태의 또 다른 측면에 따라, 상기 히스티딘-숙신산 완충제 시스템의 농도는 1 mM 내지 200 mM일 수 있다. 농도는 바람직하게는 적어도 1 mM (예컨대, 최대 200 mM, 150 mM, 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM 등)이다. 보다 바람직하게는 조성물 중 히스티딘-숙신산 완충제의 농도는 10 mM 내지 40 mM이다.
- [0035] 본 발명의 제3 실시양태는 페렴구균성 벌크 접합체에서의 엉긴 침전물 또는 응집체 형성이 제제화 용기에서 자기 교반식, 축 방향 및 방사 방향 유형의 임펠라 대신 러쉬톤 터빈 평날 임펠라를 사용함으로써 방지될 수 있다는 것이다.
- [0036] 본 발명의 면역원성 조성물의 안정성은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 통상적인 것인 표준 기술을 사용하여 쉽게 측정된다. 예를 들어, 면역원성 조성물을 ELISA, 광 산란, 광학 밀도, 침강 속도 원심분리, 침강 평형 원심분리, 원편광 이색성 (CD), 로우리(Lowry) 검정법, 비스코닌산 (BCA) 검정법 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는 방법에 의해 접합체의 흡착률(%), 안정성, 응집, 면역원성, 미립자 형성, 단백질 (농도) 손실 등에 대하여 검정한다.
- [0037] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 다가 페렴구균성 접합체 백신 중의 접합체의 항원성에는 어떤 영향도 미치지 않으면서, 접합된/결합된 다당류를 직접적으로 정량화할 수 있는 신규한 ELISA를 제공한다. 상기 신규한 ELISA는 접합체가 70% 초과 흡착을 보이는, 흡착률(%)에 대한 지시 파라미터로서 제제 매트릭스 중의 비흡착된 접합체 함량을 정량화하는 데 사용될 수 있다. 바람직하게는 상기 ELISA는 캐리어 단백질 뿐만 아니라, 접합된 다당류의 항원성에는 어떤 영향도 미치지 않으면서, 접합체를 알람 애주번트로부터 탈착시키는 것을 포함하는 사전 검정 단계에 사용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 수산화나트륨 및 시트르산을 사용하여 알람 흡착된 접합체 샘플의 해리를 달성한다.
- [0038] 캐리어 단백질은 비제한적으로, CRM197, P4, 디프테리아 독소이드, 파상풍 독소이드, 파상풍 독소이드의 단편 C, 백일해 독소이드, 에이치. 인플루엔자(*H. influenzae*)의 단백질 D, 이. 콜라이(*E. coli*) LT, 이. 콜라이 ST, 및 슈도모나스 아에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 외독소 A, 외막 복합체 c (OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 뉴몰리신, 페렴구균성 표면 단백질 A (PspA), 페렴구균성 표면 어드헤신 A (PsaA), 페렴구균성 PhtD, 페렴구균성 표면 단백질 BVH-3 및 BVH-11, 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)의 보호 항원 (PA) 및 바실러스 안트라시스의 해독된 부종 인자 (EF) 및 치사 인자 (LF), 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민 (BSA) 및 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체 (PPD), 특히, CRM197 또는 P4로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0039] 바람직한 실시양태에 따라, 상기 다가 조성물은
- [0040] i) 캐리어 단백질로서 CRM197을 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체, 캐리어 단백질로서 TT를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질; 또는
- [0041] ii) 캐리어 단백질로서 CRM197을 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체, 캐리어 단백질로서 DT를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질; 또는
- [0042] iii) 캐리어 단백질로서 CRM197을 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체, 캐리어 단백질로서 페렴구균성 표

면 어드헤신 A (PsaA)를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질; 또는

- [0043] iv) 캐리어 단백질로서 CRM197을 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체, 캐리어 단백질로서 TT를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질, 캐리어 단백질로서 DT를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질; 또는
- [0044] v) 캐리어 단백질로서 CRM197을 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체, 캐리어 단백질로서 TT를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질, 캐리어 단백질로서 페렴구균성 표면 어드헤신 A (PsaA)를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질; 또는
- [0045] vi) 캐리어 단백질로서 CRM197을 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질 접합체, 캐리어 단백질로서 DT를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질, 캐리어 단백질로서 페렴구균성 표면 어드헤신 A (PsaA)를 갖는 적어도 하나의 다당류 단백질로 구성될 수 있다.
- [0046] 또 다른 실시양태에서, 혈청형 3에 접합된 바람직한 캐리어 단백질은 CRM-197이고, 혈청형 4에 접합된 바람직한 캐리어 단백질은 TT 또는 DT이고, 혈청형 18C에 접합된 바람직한 캐리어 단백질은 CRM197이다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 실시양태는 최종 제제 중에서 캐리어 단백질로서의 PsaA의 사용을 포함한다. PsaA는 또한 최종 제제 중에서 애주번트로서도 사용될 수 있다.
- [0048] 특정 실시양태에서, 본 발명의 다가 제제는 계면활성제, 바람직하게는 폴리소르베이트 20으로 구성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제 중 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 제제의 0.01중량/부피% 내지 10중량/부피%의 폴리소르베이트 20이다. 추가의 다른 실시양태에서, 제제 중 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 제제의 0.01중량/부피%의 폴리소르베이트 20이다. 다른 실시양태에서, 제제 중 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 제제의 0.05중량/부피% 폴리소르베이트 20이다. 추가의 다른 실시양태에서, 제제 중 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 제제의 0.1중량/부피% 폴리소르베이트 20이다. 또 다른 실시양태에서, 제제 중 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 제제의 1.0중량/부피% 폴리소르베이트 20이다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 제제 중 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 제제의 10.0중량/부피% 폴리소르베이트 20이다.
- [0049] 본 다가 백신 제제는 비제한적으로, 수은 함유 보존제 (예컨대, 티메로살), 2-페녹시-에탄올, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤 및 벤질 알콜 (또는 그의 혼합물)로 이루어진 군으로부터 선택되는 보존제로 구성될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 상기 다가 페렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 제제, 바람직하게는 10 또는 16가인 것은 인산알루미늄 흡착된 접합체, 히스티딘, 숙신산, 염화나트륨, 폴리소르베이트 20 및 티오메르살로 구성될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 백신 조성물은 용량 0.5 ml 당 Al+++ 20-375 μ g, 20-300 μ g, 20-200 μ g, 25-150 μ g인 양으로 알루미늄 염 애주번트를 첨가하는 단계로 구성될 수 있다.
- [0052] 전형적으로, 면역원성 조성물은 액상 액체 또는 현탁제로서의 주사제로서 제조되고; 주사 이전에 액상 비히클 중의 액체 또는 그 중의 현탁제로 적합한 고체 형태로서도 또한 제조될 수 있다. 제제는 또한 애주번트 효과를 증강시키기 위해 유화되거나, 또는 리포솜 중에 캡슐화될 수 있다. 조성물의 직접적인 전달은 일반적으로 비경구적 전달이 될 것이다 (예컨대, 피하로, 복강내로, 정맥내로 또는 근육내로의 주사, 또는 조직의 간질 공간으로의 전달). 조성물은 또한 병변 내로 투여될 수 있다. 다른 투여 모드로는 경구 및 폐 투여, 좌제, 및 피부 경유용 또는 경피용 니들, 및 피하주사기를 포함한다. 투여 치료법은 단일 투약 스케줄 또는 다회 투약 스케줄 (예컨대, 부스터 투약 포함)일 수 있다.
- [0053] 바람직하게는 본 발명의 백신은 용액 중에서 또는 동결건조되어 보관될 수 있고, 여기서 본 발명의 동결건조된 백신 조성물은 인산알루미늄 겔 및 NaCl을 함유하는 희석제를 포함하는 1, 5, 또는 10회분 용량의 제제로서 제공될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 실시양태는 제제화 용기에서의 러쉬톤 터빈 평날 임펠라의 용도를 포함한다 (도 5 참조).
- [0055] **실시예:**
- [0056] **실시예 1: 발효**
- [0057] 방법은 (a) CP를 발현하는 박테리아 균주의 접종원을 제공하는 단계; (b) 미리 설정된 pH를 유지하기 위해, 공급 배지의 첨가 속도가 알칼리 혼합물의 첨가 속도와 등가를 이루도록 하면서, pH 7.2에서 발효시켜 균주를 배양하는 단계; (c) 배양물 배지를 0-0.5 vvm의 기체 유속으로 50-150 RPM으로 교반하면서 35-38°C에서 발효시키

는 단계를 포함한다.

[0058] 실시예 2: 협막 다당류 정제

[0059] 에스. 뉴모니아에 협막 다당류 혈청형 19F 정제 (HIC에 이어서, IEC)

[0060] 에스. 뉴모니아에 혈청형 19F의 발효조 배양물로부터의 5 L의 정화된 브로쓰를 농축시키고, 100 kDa MWCO 막을 사용하여 500 ml로 투석여과하였다. 투석여과는 중성 pH의 25 mM 인산나트륨 완충제를 사용한 후, 이어서, 주사용수 (WFI)를 이용하여 투석여과함으로써 달성하였다.

[0061] 뉴클레아제를 다당류 용액에 첨가하여 최종 농도 8 U/ml의 용액을 얻었다. 효소 처리는 교반하면서, 37℃에서 10 ± 2 hr 동안 수행하였다.

[0062] 황산암모늄을 50% 포화시까지 뉴클레아제 처리된 다당류 용액에 첨가하고, 2 - 8℃에서 12 ± 2 hr 동안 인큐베이션시켰다 (단, 혈청형 5 및 4 제외). 혼합물을 원심분리하였다. 펠릿 (침전물)을 폐기하였다. NaCl에 이어서 냉각 WFI를 사용하여 용액 (~500 ml)을 100 kD 투석여과하였다. 완충제 및 고농도의 염과 함께 다당류를 함유하는 상기 투석여과된 용액을 HIC 칼럼 상에 로딩하였다.

[0063] 소수성 상호작용 크로마토그래피 칼럼 (300 ml)을 50% 포화된 황산암모늄 완충제로 평형화시킨 후, 다당류 용액 (500 ml)을 pH 범위 6 내지 8, 바람직하게는 pH 6 내지 pH 7에서 칼럼 상에 로딩하였다. 칼럼을 50% 포화된 황산암모늄을 함유하는 완충제로 추가로 세척하였다. 상기 조건하에서, 칼럼으로부터의 관류 및 평형 세척물세척물서 다당류를 회수하였다.

[0064] 이어서, 100 kDa MWCO 필터를 사용하여 다당류 용액을 농축시킨 후, NaCl 및 주사용수 (WFI)를 이용하여 투석여과하였다.

[0065] 이온 교환 크로마토그래피 칼럼 (300 ml)(강 음이온 교환체)을 20 mM 인산나트륨 완충제로 평형화시킨 후, 다당류 용액 (500 ml)을 pH 범위 6 내지 8, 바람직하게는 pH 6.5 내지 pH 7.5에서 칼럼 상에 로딩하였다. 칼럼을 완충제로 추가로 세척하였다. 흡착된 다당류를 1.0 M NaCl을 사용하여 단계식 구배 용출로 용출시켰다 (상이한 이온 강도의 NaCl에서 각종의 다당류가 용출되었다).

[0066] 이어서, 100 kDa MWCO 필터를 사용하여 다당류 용액을 농축시킨 후, 주사용수 (WFI)를 이용하여 투석여과하였다.

[0067] 투석여과된 다당류 용액을 폴리프로필렌 병 안으로 0.22 μ 막 필터를 통해 여과하였다. 정제된 다당류를 -20 ± 5℃에서 냉동 보관하였다.

[0068] 상기 프로세스를 혈청형 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 14, 18C, 19A, 19F, & 23F에 대해서도 또한 사용하였다.

[0069] 결과:

[0070] HIC 이후 & 이온 교환 크로마토그래피 이후의 C-다당류를 H1/P31 NMR 스펙트럼에 의해 추정하였다. 본 프로세스를 통해 오염 물질의 함량은 2-3배 감소되었다.

[0071] 실시예 3: 다당류의 사이징

[0072] 활성화 단계 이전에 균질기 (마이크로플루이드스(Microfluidics)) 장치를 사용하여 다당류의 크기를 축소시켰다. 19A의 경우, 24-28 KPSI로 크기를 축소시킨 반면, 19F의 경우, 통과 개수가 약 1 내지 3개인 26-30 KPSI로 크기를 축소시켰다. 사이징된 다당류를 투석여과시키고, 농축시킨 후, 0.22 μ 여과하였다. 이어서, 평균 분자량을 추정하기 위해 사이징된 다당류에 대해 HPSEC-RI를 수행하였다.

[0073] 실시예 4: 일반 접합 프로세스

[0074] 리즈(Lees) 등의 CDAP 접합 방법 (Vaccine 26: 190-198, 1996)을 사용하여 다당류의 캐리어 단백질에의 접합을 수행하였다. 기계적으로 크기가 축소된 다당류 (단, 예외적으로, 6A의 경우, 천연 형태로 사용되었거나, 6A 크기에 의존하여 사이징되었다)를 2 M NaCl에 용해시켰다. 100 mg/ml 스톱 용액으로부터의 (아세트니트릴 중) CDAP를 다당류:CDAP 비에 따라 다당류 용액에 첨가하였다. 대략 1분 후, 2 M NaOH를 첨가하여 특정 활성화 pH를 획득하였다. 22℃에서 4-10분 동안 상기 pH에서 다당류의 활성화를 수행하였다. CRM-197 (정량은 초기 Ps/단백질 비에 의존한다)을 활성화된 다당류에 첨가하였고, 혈청형에 의존하여 3-8 hr 동안 특정 pH에서 커플링 반응을 수행하였다. 이어서, 22℃에서 1 hr 동안, 및 12℃에서 밤새도록 글리신을 이용하여 반응을 퀸칭시켰다. 이어서, 접합체를 300 kDa 내지 500 kDa 투석여과, 이어서, 100 kDa 투석여과에 의해 정제하였다.

추가로, 정제된 0.22 um 여과된 접합체의 다당류 및 단백질 함량을 측정하였다.

<표 1>

10개의 혈청형에 대한 혈청형 특이 접합 반응 파라미터 변량

10개의 혈청형에 대한 접합에 관한 상세한 설명										
특징	상이한 혈청형의 프로세스 조건									
	1	5	6A	6B	7F	9V	14	19A	19F	23F
Ps 농도 (mg/ml)	4.5	5	5	11	10	8	10	9.5	9.5	9
Ps 용해	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl
활성화 시간 (min)	4	4	4	4	4	4	4	4	10	4
Ps/CDAP 비	1:1.25	1:1	1:1	1:1.15	1:1.25	1:1.2	1:1.1	1:1	1:0.8	1:1.1
CRM 197 농도 (mg/ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Ps/CRM 비	0.82	0.75	1.05	0.77	0.85	0.87	0.82	0.86	0.96	0.71
pH ^a :pH ^c :pH ^a	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5	09:09:09	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5
유리 Ps (%)	< 1	6.3	2.63	1.57	< 1	ND	2.53	1.5	1.07	2.59
유리 단백질 (%)	ND	1.54	2.2	ND	ND	ND	ND	ND	2.2	ND
분자 크기 분포 (%)	70.56	74.93	67.67	76.52	75.68	72.75	76.59	78.1	74.35	72.91

<표 2>

제제화 프로세스의 1 및 2 블렌드 접근법에서 PCV-10 제제의 개별 혈청형의 흡착률(%) 비교

S. No.	PCV-10 제제의 혈청형	1 블렌드 접근법 (모든 항원) 흡착률(%)			2 블렌드 접근법 (블렌드 A 및 B) 흡착률(%)		
		Exp - 1	Exp - 2	Exp - 3	Exp-4	Exp-5	Exp-6
1	혈청형 1	90	85	92	>99	>99	97
2	혈청형 5	84	82	85	90	88	97
3	혈청형 6A	67	51	61	77	71	93
4	혈청형 6B	82	72	83	84	80	86
5	혈청형 7F	83	77	81	87	86	84
6	혈청형 9V	67	43	74	89	85	85
7	혈청형 14	86	83	88	92	91	90
8	혈청형 19A	95	92	97	95	93	85
9	혈청형 19F	91	87	93	91	88	75
10	혈청형 23F	56	52	58	84	81	81

1 블렌드 접근법에서, 혈청형 6A, 9V, 및 23F는 제제 중에서 불충분하게 흡착된 반면, 2 블렌드 접근법의 경우, 모든 혈청형에 대하여 흡착률(%)은 >70%였다.

<표 3>

[0083] pH 이동이 PCV-10 제제의 응집 거동에 미치는 효과

S. No.	제제 설명	응집체 (백색 입자/ 영건 침전물)에 기인한 바이알 불합격률(%)		
		실험 -7	실험-8	실험-9
1	‘pH 이동’이 이루어지지 않은 PCV-10 제제	10%	4%	6%
2	pH 6.8에서 pH 5.6-5.8로의 ‘pH 이동’이 이루어진 PCV-10 제제	실험-10	실험-11	실험-12
		응집체 없음(스크리닝 불합격 없음)	응집체 없음(스크리닝 불합격 없음)	응집체 없음(스크리닝 불합격 없음)

[0084]

[0085] pH 6.8의 것과 비교하였을 때, pH 5.6-5.8의 경우, PCV10 제제에 대해서는 어떤 응집체도 발견되지 않았다.

[0086] 다당류 대 단백질 비 (1:1)가 제제 중 페렴구균성 접합체의 흡착 정도에 유의한 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다.

[0087] <표 4>

[0088] Ps 대 CRM₁₉₇ 비가 제제 중 페렴구균성 접합체 (혈청형 6A)의 흡착에 미치는 효과

S.No.	페렴구균성 접합체 혈청형 6A 벌크	단백질에 대한 Ps의 비	흡착률(%)
1	ZPN6ACP1201	1.95	34
2	ZPN6ACP1203	1.51	42
3	ZPN6ACP1204-A	1.32	87
4	ZPN6ACP1204-B	1.15	95
5	ZPN6ACP1205	1.09	86

[0089]

[0090] 다당류 대 단백질 비가 접합체의 흡착에 미치는 효과가 관찰되었다. 단백질에 대한 Ps 비가 >1.5인 6A 접합체는 불량한 흡착을 보였다. PCV-10 제제에 사용된 대부분의 혈청형들은 0.6-1.3 범위의 Ps: Pr 비를 함유하였고, 그 결과, 혈청형 6A를 비롯한 다양한 혈청형에 대해 최적의 흡착을 보였다. 6A 혈청형에 대하여 달성된 흡착 데이터 및 PCV-10 제제 경험 내용에 기초하여, 16가를 제제화하는 동안, 유사 범위의 Ps: Pr 비의 남은 6개의 접합체가 16개의 혈청형 접합체 모두의 일관된 흡착을 보장할 수 있을 것으로 추정되었다.

[0091] <표 5>

[0092] 상이한 용기를 위한 러쉬톤 터빈 평날 임펠라의 사양

기하학적 부피 (L)	14
작업 부피 (L)	10.0
날 직경 (mm)	74.7
날 높이 (mm)	17.3
날 개수	6
교반 제어 (rpm)	50-500
팁 속도 (m/s)	0.19-1.95

[0093]

[0094] 실시예 6: ELISA 프로토콜

- [0095] 변형된 샌드위치 ELISA를 사용하여 항원 함량 및 흡착률(%)을 측정하였다.
- [0096] 종래 샌드위치 ELISA는 시험 조건/검정 조건과 관련하여 변형되었고, 이로써, 하기와 같은 유익한 특성을 갖는다:
- [0097] i. 10가 백신 중의 9개의 다른 접합된 항원의 존재하에서 접합된 다당류를 정량화하기 위함
- [0098] ii. 흡착이 80% 초과인, 인산알루미늄 겔로부터 10개의 접합체 모두를 용출시키기 위함
- [0099] iii. 접합체의 포획이 심지어 pH 9에서도 접합체 항원성은 손상시키지 않으면서 일어나도록 함.
- [0100] 하기 제시된 프로토콜에 따라 ELISA를 사용하여 항원 함량 및 흡착률(%)을 측정하였다:
- [0101] 1일째
- [0102] 1. 플레이트를 포획 항체 (항-캐리어 단백질 항체)로 코팅한 후, $35 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 0.5 - 2 hr 동안 인큐베이션시켰다.
- [0103] 2. 플레이트를 ELISA 플레이트 와서를 사용하여 3-6회 세척하였다.
- [0104] 3. 플레이트를 차단 완충제 (혈청형 14 및 9V의 경우, 1X PBS 및 트리스 완충제 중 3% BSA)로 차단한 후, $30 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 1.5 - 2.5 hr 동안 인큐베이션시켰다.
- [0105] 4. 플레이트를 ELISA 플레이트 와서를 사용하여 3회 세척하였다.
- [0106] 5. 샘플을 플레이트 상에 첨가하였다.
- [0107] 6. 플레이트를 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 밤새도록 인큐베이션시켰다.
- [0108] 2일째
- [0109] 1. 플레이트가 실온에 도달하도록 하였다.
- [0110] 2. 플레이트를 3회 세척한 후, 1차 항체를 첨가하고, 이어서, RT에서 25 ± 2 동안 30 min 동안 인큐베이션시킨 후, 세척하였다.
- [0111] 3. 2차 항체를 첨가한 후, 이어서, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다.
- [0112] 4. 기질 TMB를 첨가한 후, 이어서, 암실에서 RT하에 15-20 min 동안 인큐베이션시켰다.
- [0113] 5. 정지 용액을 첨가하였다.
- [0114] 6. 플레이트를 450 nm에서 판독하였다.
- [0115] 캐리어 단백질의 에피토프를 손상시키지 않으면서, 샘플을 용해시키는 방법
- [0116] 적절한 양의 0.5 M - 2 M NaOH를 2 ml의 백신 샘플에 첨가하였다. 용액이 투명해질 때까지, 상기 샘플을 온화하게 와동시켰다. 용액이 투명해질 때까지, 용액의 pH를 9-12로 조정하였다. 0.5 M 내지 2 M 시트르산을 사용하여 용액의 pH를 다시 6-7.4이 되도록 만들었다. 상기 용액을 5 min 동안 3000 내지 6000 x g로 원심분리하고 (샘플을 용해시키고), 시험을 위해 상청액을 수집하였다.

[0117] <표 6>

혈청형	배치 1		배치 2	
	함량 (μg/ml)	흡착률(%)	함량 (μg/ml)	흡착률(%)
혈청형 1	3.87	89	4.66	99.4
혈청형 5	3.57	83	4.03	90.8
혈청형 6A	3.39	83	4.6	68.3
혈청형 6B	8.01	80	6.8	85
혈청형 7F	4.72	97	4.18	84.4
혈청형 9V	4.61	80	3.95	70.4
혈청형 14	5.11	94	5.06	92.5
혈청형 19A	4.42	94	3.65	91.8
혈청형 19F	4.35	82	4.14	81.4
혈청형 23F	3.66	72	4.03	75

[0118]

[0119] 실시예 7: 폐렴구균성 접합체 백신 - 10가 (PCV10)

[0120] <표 7>

[0121] PCV10 조성물:

Sr. No	성분 명칭	정량/용량(0.5 ml)
1	다당류 혈청형 1, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 19A, 19F 및 23F*	각각 2 μg씩
2	다당류 혈청형 6B*	4 μg
3	어드저-포스(Adju-Phos) [®] 인산알루미늄	Al ⁺⁺⁺ 로서 0.125 mg
4	염화나트륨	4.5 mg
5	숙신산	1.18 mg
6	폴리소르베이트-20	50 μg
7	티오메르살 (오직 다회 투약으로 제공하는 경우에만)	25 μg
8	L-히스티딘	1.55 mg

[0122]

[0123] * 활성 성분은 캐리어 단백질 CRM197과 접합된다.

[0124] 실시예 8: 제제 1 (PCV16)

[0125] 폐렴구균성 접합체 백신 - 16가 (PCV16)

[0126] <표 8>

[0127] PCV16 조성물 "I"

S. No.	조성	정량/용량
활성 성분*		
1	혈청형 1	2.0 µg
2	혈청형 2	2.0 µg
3	혈청형 3	2.0 µg
4	혈청형 4	2.0 µg
5	혈청형 5	2.0 µg
6	혈청형 6A	2.0 µg
7	혈청형 6B	4.0 µg
8	혈청형 7F	2.0 µg
9	혈청형 9V	2.0 µg
10	혈청형 12F	2.0 µg
11	혈청형 14	2.0 µg
12	혈청형 15B	2.0 µg
13	혈청형 18C	2.0 µg
14	혈청형 19A	2.0 µg
15	혈청형 19F	2.0 µg
16	혈청형 23F	2.0 µg
불활성 성분		
17	인산알루미늄	NMT 1.25 mg의 Al^{3+}
18	히스티딘	1.55 mg
19	캐리어 단백질	11.3 - 113.3 µg
20	숙신산	1.18 mg
21	염화나트륨	4.5 mg
22	폴리소르베이트 20	50 µg
23	티오메르살 **	25 µg
24	WFI	q.s.

[0128]

[0129] * 백신의 활성 성분은 CRM197, TT 및 DT로부터 선택되는 적어도 하나의 캐리어 단백질에 접합된다.

[0130] ** 오직 다회 투약으로 제공하는 경우에만 첨가된다.

[0131] 실시예 9: 제제 1 (PCV16)

[0132] <표 9>

[0133] PCV16 조성물 "II"

S. No.	조성	정량/용량
활성 성분*		
1	혈청형 1	2.0 µg
2	혈청형 2	2.0 µg
3	혈청형 3	2.0 µg
4	혈청형 4	2.0 µg
5	혈청형 5	2.0 µg
6	혈청형 6A	2.0 µg
7	혈청형 6B	4.0 µg
8	혈청형 7F	2.0 µg
9	혈청형 9V	2.0 µg
10	혈청형 12F	2.0 µg
11	혈청형 14	2.0 µg
12	혈청형 15B	2.0 µg
13	혈청형 18C	2.0 µg
14	혈청형 19A	2.0 µg
15	혈청형 19F	2.0 µg
16	혈청형 23F	2.0 µg
불활성 성분		
17	인산알루미늄	NMT 1.25 mg의 Al^{3+}
18	히스티딘	1.55 mg
19	캐리어 단백질	11.3 - 113.3 µg
20	숙신산	1.18 mg
21	염화나트륨	4.5 mg
22	폴리소르베이트 20	50 µg
23	2-페녹시 에탄올**	10 mg
24	WFI	q.s.

[0134]

[0135] * 백신의 활성 성분은 CRM197, TT 및 DT로부터 선택되는 적어도 하나의 캐리어 단백질에 접합된다.

[0136] ** 오직 다회 투약으로 제공하는 경우에만 첨가된다.

[0137] 실시예 10:

[0138] I) DMAP 존재하의 사이징된 PnPs (19A, 19F, 6A 및 6B)의 분해:

[0139] 반응 용액 중 사이징된 PnPs를 1:1.5의 비로 DMAP를 이용하여 처리하고, SEC-HP-RI에 의해 그의 분해 프로파일에 대하여 체크하였다.

[0140] 결과:

[0141] DMAP의 존재하에서는 오직 19A PnPs만이 분해된 반면, 다른 포스포디에스테르 함유 PnPs (19F, 6A & 6B)는 무손상 상태 그대로 유지된 것으로 관찰되었다. DMAP 매개의 PnPs 분해를 보여주는 도 1 (DMAP 비처리) & 2를 참조한다.

[0142] 19A의 상기와 같은 분해를 최소화하기 위해 2 M NaCl을 사용하여 활성화된 PnPs를 10 KDa 투석여과함으로써 CRM197과의 접합 이전에 반응 용액으로부터 형성된 DMAP를 제거하였다.

[0143] II) CDAP 존재하의 사이징된 PnPs (19A, 19F, 6A 및 6B)의 분해 및 응집:

[0144] 활성화 동안 반응 용액 중의 사이징된 PnPs를 1:1.5의 비로 CDAP를 이용하여 처리하였다. (RP-HPLC로 측정된 바) 50% DMAP가 부산물로서 생성되었고, 이는 PnPs의 분해 뿐만 아니라, 활성화 후 특정 시간 경과 후, 활성화된 PnPs 사이의 응집을 유도한 것으로 관찰되었다 (표 2 참조). SEC-HP-RI 프로파일에 의해 분해 및 응집을 체크하였다. CDAP 매개의 PnPs의 응집 & 분해를 보여주는 도 3A (CDAP 비처리), 3B, 3C & 3D (19A에 대한 것), 4A (CDAP 비처리), 4B (19F에 대한 것)를 참조한다.

[0145] <표 10>

[0146] 다당류-다당류 가교 결합 & 응집의 원인 요인

[0147] "CDAP 활성화 지속 기간"이 다당류-다당류 응집체 형성에 미치는 효과

혈청형	사이징된/변형된 PnPs (KDa) [SEC-HP-RI]의 Mw	활성화된 변형된 PnPs (KDa) [SEC-HP-RI]	효과
6A	432	435	활성화된 다당류 사이에 응집 없음
6B	131	131	활성화된 다당류 사이에 응집 없음
19A	178	254 (20 min 후)	활성화된 다당류 사이의 응집
		487 (60 min 후)	활성화된 다당류 사이의 응집
		1173 (120 min 후)	활성화된 다당류 사이의 응집
19F	157	205 (30 min 후)	활성화된 다당류 사이의 응집

[0148]

[0149] III) 투석여과 단계 사용에 의한 PnPs:CDAP가 1:1.5인 사이징된 PnPs (19A 및 19F)의 분해 및 응집 방지:

[0150] 19A의 상기와 같은 분해 및 응집을 최소화하기 위해 2 M NaCl을 사용하여 활성화된 PnPs를 10 KDa 투석여과함으로써 CRM₁₉₇과의 접합 이전에 반응 용액으로부터 형성된 DMAP를 제거하였다. 10 KDa 투석여과된 활성화된 PnPs 및 CRM₁₉₇을 사용하여 접합체의 SEC-HP-RI 프로파일을 보여주는 도 3E (10 KDa DF를 거치지 않은 접합체) & 3F (10 KDa DF를 거친 접합체)를 참조한다. 그러나, 투석여과는 접합체 수율에는 불리한 영향을 미쳤으며, 이로써, 총 수율은 30%-40% 감소되었다.

[0151] IV) 투석여과 단계를 사용하지 않은, PnPs:CDAP의 비의 1:1 (19A) 및 1:0.8 (19F)로의 감소에 의한 사이징된 PnPs (19A 및 19F)의 분해 및 응집 방지:

[0152] 반응 용액 중 사이징된 PnPs를 19A 및 19F에 대하여 각각 1:1 및 1:0.8의 비로 CDAP를 이용하여 처리하고, SEC-HP-RI에 의해 그의 분해 및 응집 프로파일에 대하여 체크하였다.

[0153] 결과:

[0154] 변형된 Ps:CDAP 비 (19A의 경우, 1:1, 및 19F의 경우, 1:0.8)가 19A 및 19F PnPs, 둘 모두에 대한 분해 및 응집을 방지하는 것으로 나타났다는 것을 관찰할 수 있었다. 도 3 (19A의 경우, G & H) & 4 (19F의 경우, C & D)를 참조한다. 변형된 비를 사용하였을 때의 추가의 이점은 10 KDa 투석여과 단계는 없었고, 이로써 총 수율은 확실하게 최소로 손실되었다는 점이였다.

[0155] 혈청형 19A의 경우, "CDAP 활성화의 지속 기간"이 10 min 초과일 때, 활성화된 다당류 대 활성화된 다당류의 가교 결합이 일어났고, 최종적으로는 "다당류-다당류 응집체"의 형성이 유도된 것으로 관찰되었다.

[0156] 추가로, 혈청형 19F의 경우, "CDAP 활성화의 지속 기간"이 20 min 초과일 때, 활성화된 다당류 대 활성화된 다당류의 가교 결합이 일어났고, 최종적으로는 "다당류-다당류 응집체"의 형성이 유도된 것으로 관찰되었다. 추가로, 접합 반응 지속 기간이 활성화된 다당류 대 활성화된 다당류의 가교 결합을 위해 소요되는 지속 시간보다 더 장시간이며, 이로 인해 응집체가 형성되는 것으로 나타났다. 도 3 & 4를 참조한다.

[0157] 그러나, 6APnPs 및 6BPnPs와 같은 다른 혈청형의 경우, 상기와 같은 가교 결합은 관찰되지 않았다.

[0158] 실시예 11:

[0159] **접합체: PnPs19A & PnPs19F의 제조**

[0160] 하기와 같이 변형하여 리즈 등의 CDAP 접합 방법 (Vaccine 26: 190-198, 1996)을 사용하여 다당류의 캐리어 단백질에의 접합을 수행하였다:

[0161] i) 19A 접합체의 제조를 위해, 22℃에서 4 min의 활성화 기간으로 1:1의 다당류 대 CDAP 비를 사용하고, 1:1의 다당류 대 단백질 비를 사용

[0162] ii) 19F 접합체의 제조를 위해, 22℃에서 9 내지 10 min의 활성화 기간으로 1:0.8의 다당류 대 CDAP 비를 사용하고, 19F에 대하여 1:1의 다당류 대 단백질 비를 사용.

[0163] <표 10>

[0164] "전통적인 CDAP 접합 방법" (로트 1) 및 "개선된 접합 방법" (로트 2)을 이용하였을 때의 19A 및 19F에 대한 접합체 결과 비교

I) 접합 반응에 관한 상세한 설명				
접합체	19A 접합체		19F 접합체	
배치 번호	로트 1	로트 2	로트 1	로트 2
PnPs 농도 (mg/ml)	9.5	9.5	9.5	9.5
PnPs 용해	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl	2M NaCl
활성화 시간 (min)	4	4	4	9 내지 10
PnPs/CDAP 비	1.0:1.5	1.0:1.0	1.0:1.5	1.0:0.8
CRM 농도 (mg/ml)	20	20	20	20
초기 Ps/CRM ₁₉₇ 비	1.0:1.5	1.0:1.0	1.0:1.5	1.0:1.0
pH ^a :pH ^c :pH ^q	9.0:9.0:9.0	9.0:9.0:9.0	9.5:9.5:9.5	9.5:9.5:9.5

[0165]

II) 최종 접합체 특징				
접합체	19A 접합체		19F 접합체	
배치 번호	로트 1	로트 2	로트 1	로트 2
최종 PnPs/CRM ₁₉₇ 비	0.53	0.86	0.52	0.96
CRM ₁₉₇ /PnPs	1.88	1.16	1.92	1.04
유리 PnPs (%)	1.9	1.5	1.7	1.07
유리 CRM ₁₉₇ (%)	ND	ND	ND	2.2
평균 분자 크기 SEC-HP-I)(KDa)	1081	853	994	847
평균 분자 크기 (UV/RI/MALS) (KDa)	8212	6012	6393	4773

[0166]

[0167]

결과:

[0168]

변형된 다당류:CDAP 비, CDAP 활성화 시간 및 초기 다당류:단백질 비가 활성화 동안 4-디메틸아미노-피리딘 매개의 사이징된 다당류의 분해를 최소화시켰고, 이는 또한 후속된 다당류-다당류 응집을 방지하였으며, 이로써, 유리 다당류 함량과 관련된 최종 접합체 특징을 개선시킨 것으로 나타났다.

[0169]

19A & 19F 접합체를 제조하는 데 사용된 개선된 접합 방법을 통해 각 접합체 프로파일 (^{31}P 양성자 NMR)에서 어떤 포스포모노에스테르 신호도 보이지 않은 접합체를 수득하게 되었고, 이는 변형된 접합 방법이 접합 반응 동안의 다당류 가수분해를 방지하는 데 효과적인 것으로 나타났다는 것을 시사하였다.

[0170]

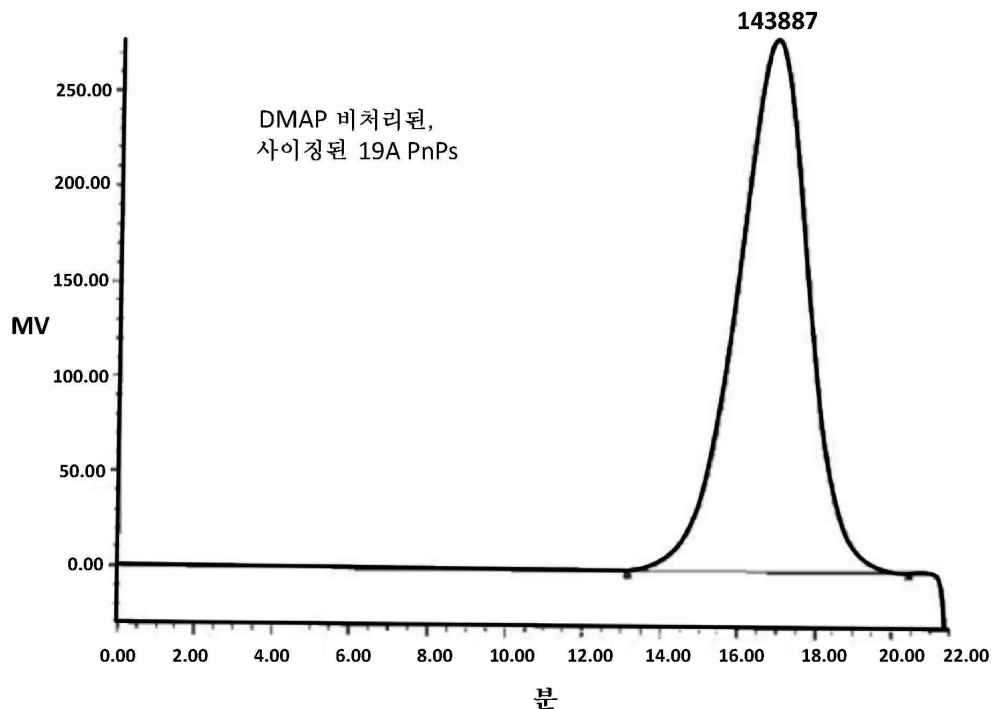
개시된 본 발명의 원리가 적용될 수 있는 다수의 가능한 실시양태를 비추어 볼 때, 예시된 실시양태는 단지 본 발명의 바람직한 예일 뿐이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 간주되지 않아야 함을 이해하여야 한다. 본 발명의 범주는 오히려 하기 특허청구범위에 의해 정의된다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명자들의 발명으로서 본 특허청구범위의 범주 및 취지 내에 포함되는 모든 것을 주장한다.

도면

도면1

개선된 흡착

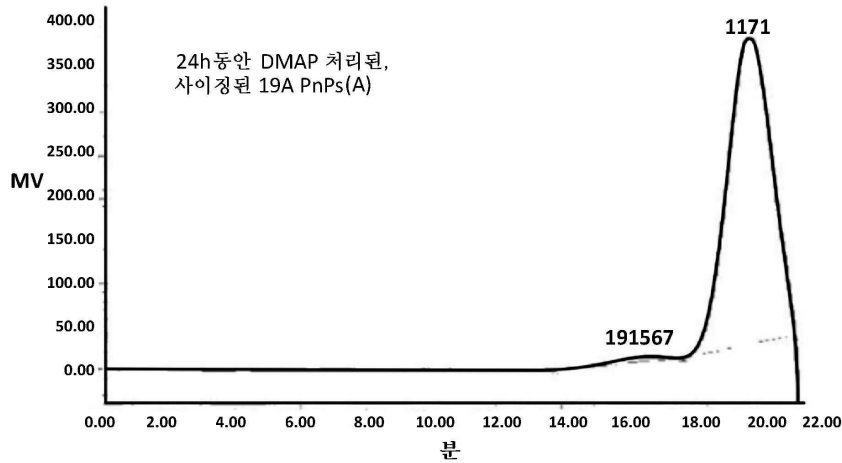
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	16.881	36050010	178357	124375	143887	100.00	1.434025



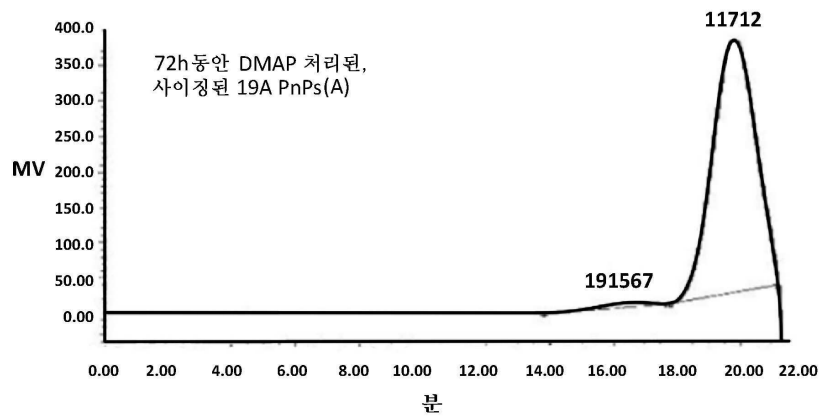
도면2

도 2A & 2B

	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 8	18,120	16821344	69941	37105	61650	100.00	1.884959



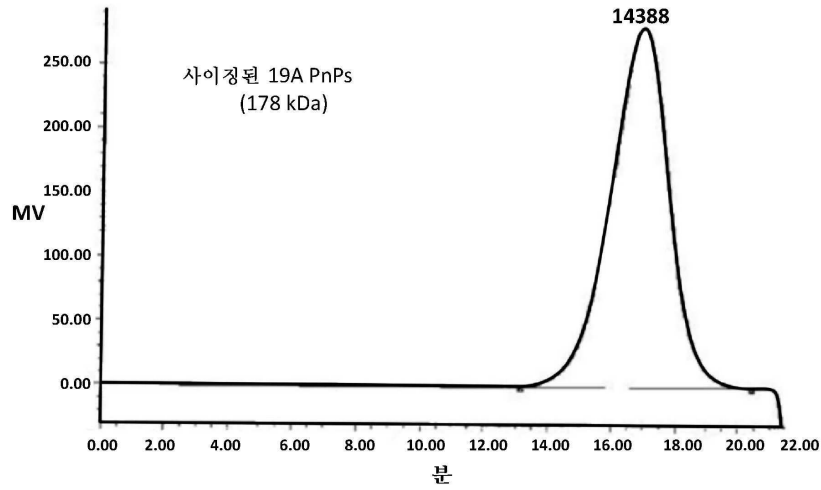
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	광범위	16,417	561317	224030	194108	191587	1.62	1.154181
2	피크 9	19,875	34140780	14487	9007	11712	98.38	1.606378



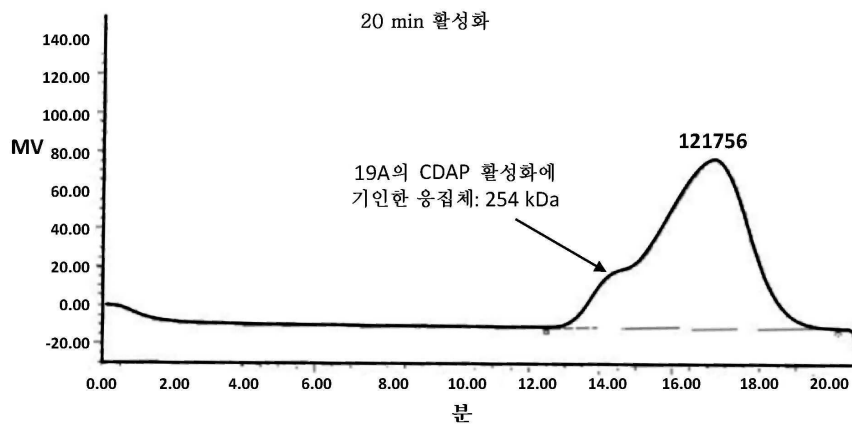
도면3i

도 3A & 3B

	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	16,881	36050010	178357	124375	143887	100.00	1.434025



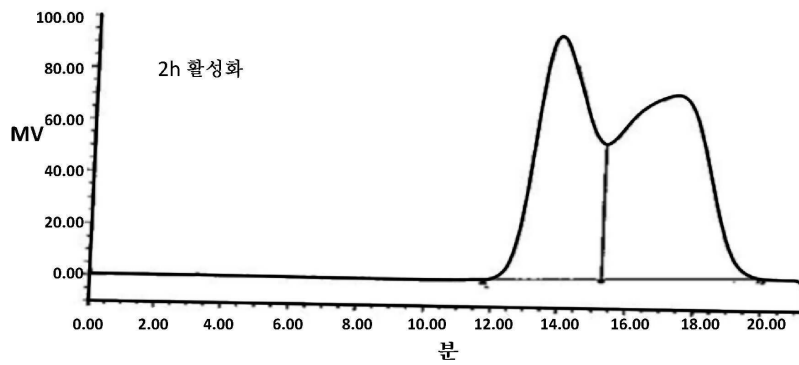
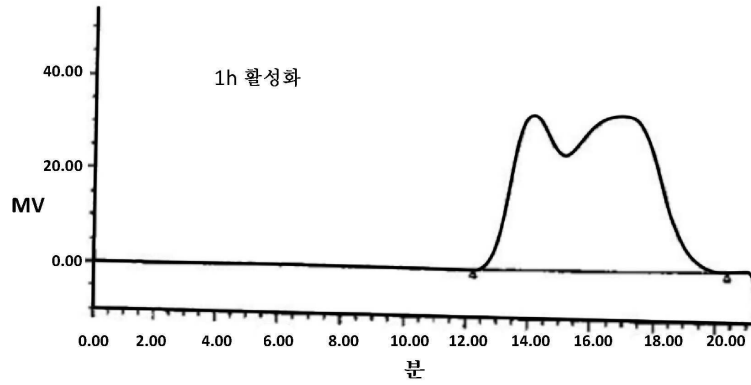
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	17,144	16882446	254221	114791	121766	100.00	2.214838



도면3ii

도 3C & 3D

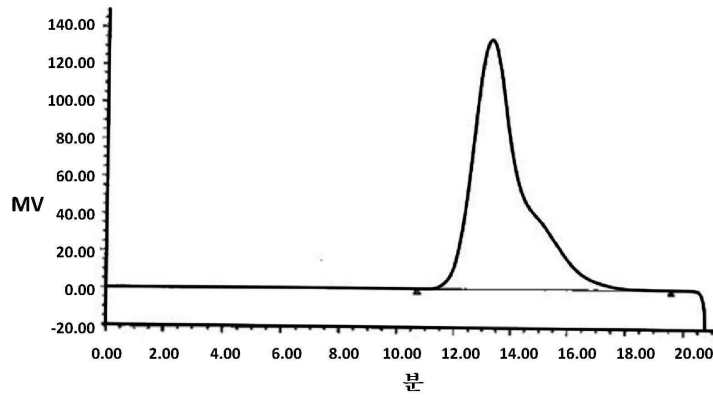
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	광범위	14,123	9442789	487267	172206	941445	100.00	2.829559



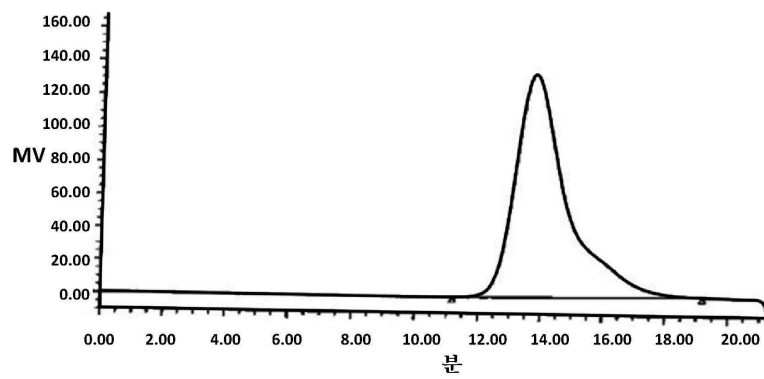
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	광범위	13,860	10289208	1173521	911209	1150119	44.70	1.287873
2	피크 4	17,373	12731305	173846	114964	117250	55.30	1.612173

도면3iii

도 3E & 3F



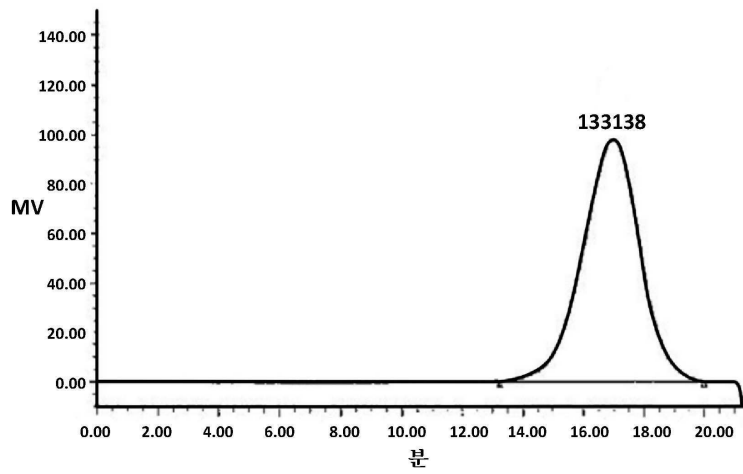
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	광범위	13,243	16128396	898464	499923	1008801	100.00	1.797203



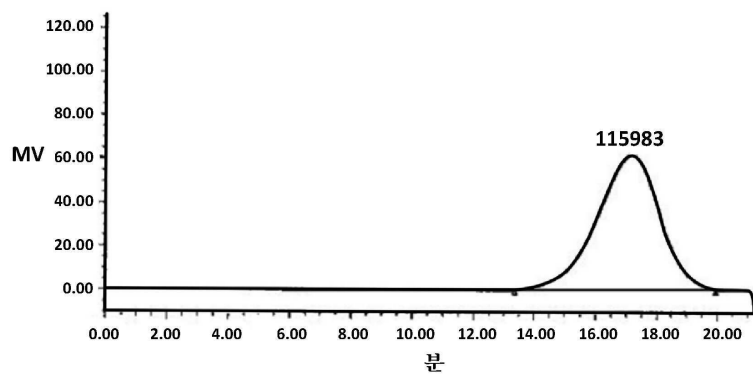
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)
1	광범위	13,729	15487260	1098757	619271	1189617	100.00

도면3iv

도 3G & 3H



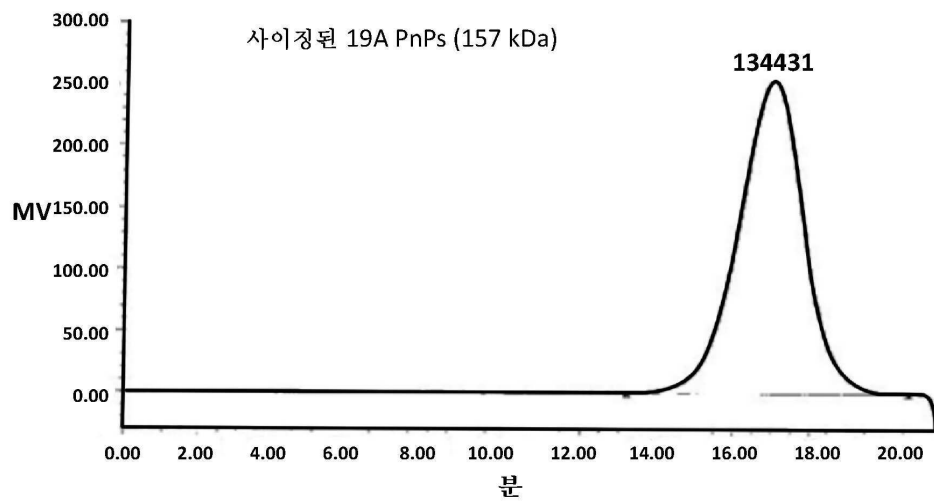
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	16,980	12939746	166907	113770	133136	100.00	1.467050



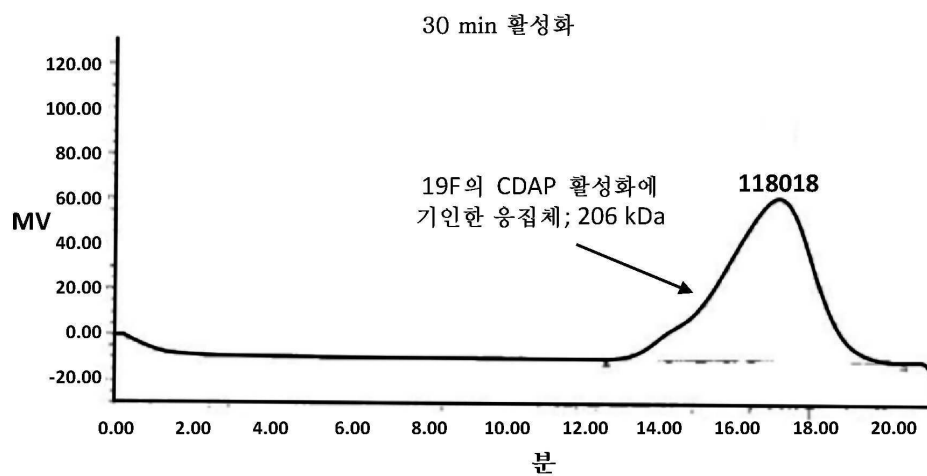
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	17,192	8884468	156239	99497	115983	100.00	1.570293

도면4i

도 4A & 4B

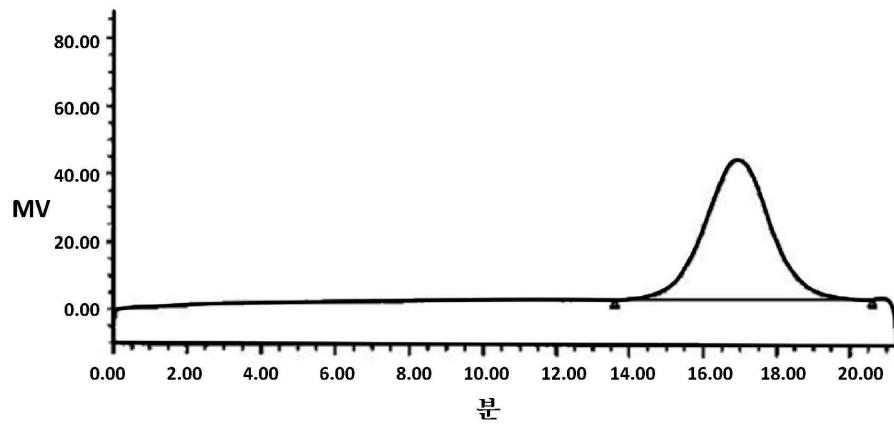


	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	16,989	30256211	157553	114413	134431	100.00	1.377054

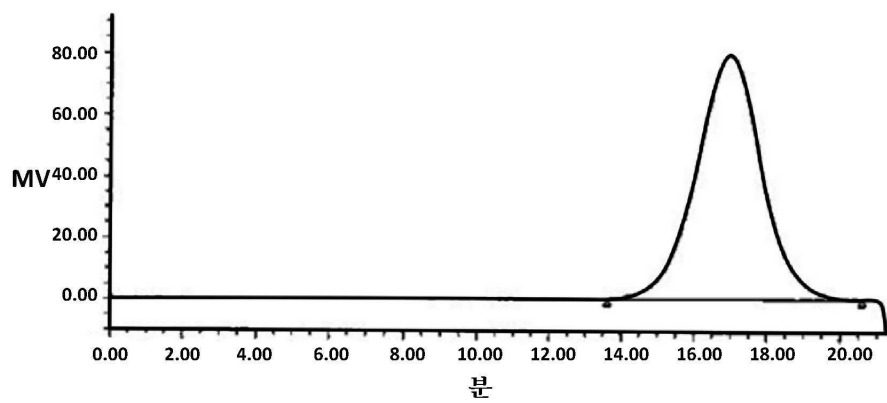


도면4ii

도 4C & 4D



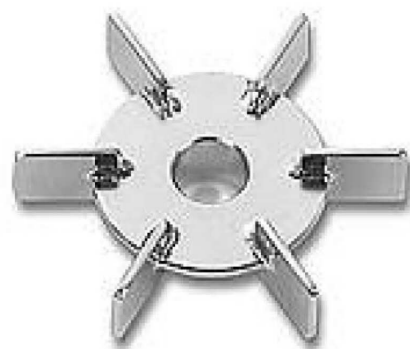
	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	16,940	5091525	161255	116007	141922	100.00	1.390010



	피크 명칭	RT	면적	Mw (Da)	Mn (Da)	MP (Da)	면적률 (%)	다분산성
1	피크 4	16,952	9921138	161360	114430	140847	100.00	1.410112

도면5

6 평날 러쉬톤 터빈 임펠라



도면6

