



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0130564
(43) 공개일자 2014년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/09 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7029398(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년12월10일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2009-7015487
원출원일자(국제) 2007년12월10일
심사청구일자 2012년12월10일
(85) 번역문제출일자 2014년10월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/086976
(87) 국제공개번호 WO 2008/079653
국제공개일자 2008년07월03일
(30) 우선권주장
11/644,207 2006년12월22일 미국(US)

(71) 출원인
와이어쓰 엘엘씨
미국 10017 뉴욕주 뉴욕 이스트 42엔드 스트리트
235
(72) 발명자
호스도르프 윌리엄 피.
벨기에 베-1200 볼루베-생트-람베르트 19 아브뉴
드 라 샤펠
시버 조지 레이너
미국 뉴욕주 10023 뉴욕 웨스트 66번 스트리트
160
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 양영환, 김영

전체 청구항 수 : 총 1 항

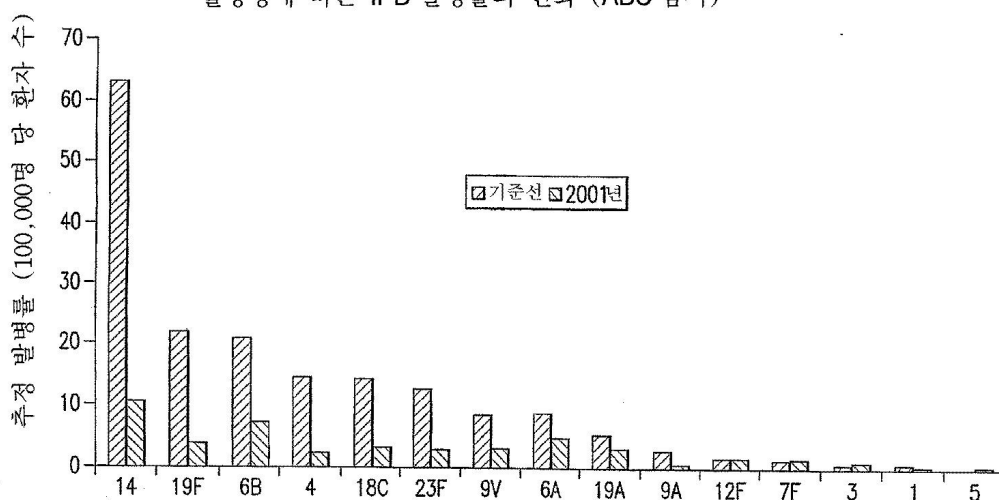
(54) 발명의 명칭 다가 페렴구균 다당류-단백질 집합체 조성물

(57) 요약

본 발명은 13가지의 다른 다당류-단백질 집합체 및 임의로 알루미늄계 애쥬번트를 갖는 면역원성 조성물을 기술한다. 각 집합체는 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 스트렙토코커스 뉴모니아(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F)로부터 제조된 헵막 다당류를 함유한다. 백신으로서 제형화된 면역원성 조성물은 (뒷면에 계속)

대표도

기준선(1998/1999년)부터 2001년까지 2세 미만의 미국 소아에서
혈청형에 따른 IPD 발병률의 변화 (ABC 감시)



전세계적으로 유아 및 소아에서 폐렴구균 질환에 대한 적용범위를 증가시키고, 혈청그룹 교차 보호의 한계에 의존적이지 않는 혈청형 6A 및 19A에 대한 적용범위를 제공한다. 운반체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아 혈청형 1 다당류를 포함하는 면역원성 접합체의 제조 방법이 또한 제공되며, 당해 방법은 알칼리성 pH 완충액 중에서 약한 가수분해에 의한 상기 다당류의 부분적 탈-O-아세틸화를 포함한다.

[색인어]

폐렴구균, 스트렙토코커스 뉴모니아, 다당류-단백질 접합체, 협막 다당류, 다가 백신

(72) 발명자

프라사드, 에이., 크리슈나

파라디소 피터 알.

미국 노스캐롤라이나 27516 채플 힐 위삼 드라이브 105

미국 펜실베이니아 19481 벨리 포지 프리덤뷰 레인 445

특허청구의 범위

청구항 1

스트렙토코커스 뉴모니에로부터 제조된 혈청형 1 다당류를 포함하는 13가지의 다른 다당류-단백질 집합체를 갖는 면역원성 조성물을 인간에게 투여함으로써 폐렴구균 질환을 예방하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 의학 분야, 특히 미생물학, 면역학, 백신 및 면역접종으로 세균 병원체에 의한 감염을 예방하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*)는 전세계에서 유아 및 소아의 뇌막염, 폐렴 및 심각한 침습성 질환의 주요 원인이다. 다가 폐렴구균 다당류 백신은 수년 동안 승인되어 왔고, 노인 및 고위험 환자에서 폐렴구균 질환을 예방하는데 있어서 유용한 것으로 입증되었다. 그러나, 유아 및 소아는 대부분의 폐렴구균 다당류에 대해 불충분하게 반응한다. 7가 폐렴구균 집합체 백신(7vPnC, 프레브나(Prevnar)®)은 유아 및 소아에서 침습성 질환 및 중이염에 대해 면역원성이 높고 효과적인 것으로, 이러한 종류의 백신 중 최초로 증명되었다. 이 백신은 현재 전세계의 여러 국가에서 승인되어 있다. 프레브나는, CRM₁₉₇이라는 운반체 단백질에 각각 집합된, 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F 유래의 협막 다당류(capsular polysaccharide)를 함유한다. 프레브나는 미국, 유럽 및 전세계의 다른 지역에서 침습성 폐렴구균 질환(IPD)의 대략 80 내지 90%, 60 내지 80%, 및 40 내지 80%를 각각 감당한다 [1,2]. 프레브나의 도입 이후에 수년간 축적된 감시(surveillance) 데이터에서는, 예상된 바와 같이, 미국 유아에서의 침습성 폐렴구균 질환의 감소가 명확히 증명되었다 (도 1) [3,4].

[0003] 프레브나의 도입 이전에 미국 유아에서 수행된 IPD의 감시에서는, 혈청그룹 6 및 19로 인한 질병의 상당한 비율이 6A (대략 1/3) 및 19A (대략 1/4) 혈청형 때문인 것으로 증명되었다 [5,6]. 프레브나의 인가 후에 미국에서 수행된 폐렴구균 침습성 질환 감시는, 질병의 큰 부담이 여전히 혈청형 6A 및 19A로 인한 것이라는 것을 시사한다(도 1) [3]. 게다가, 이 두가지 혈청형은 1, 3, 5 및 7F 혈청형을 합한 것보다 침습성 질환의 더 많은 증례를 차지한다(8.2명 대 3.3명의 환자/2세 이하의 소아 100,000명). 또한, 혈청형 6A 및 19A는 높은 항생제 내성률과 관련되어 있다 (도 2) [7,8,9]. 더 많은 소아들이 면역접종을 받을수록 혈청그룹 교차 보호의 결과로서 혈청형 6A 및 19A 질환이 감소할 수 있지만, 감소에 한계가 있을 것이며 이들 혈청형으로 인한 상당한 질병 부담이 여전히 남아 있을 것임을 시사하는 증거가 있다. (하기 참조).

[0004] 혈청형 1, 3, 5, 6A, 7F 및 19A로 인한 침습성 폐렴구균 질환의 상대적인 부담 및 중요성을 고려한다면, 이들 혈청형을 프레브나 제형에 추가하면 침습성 질환에 대한 적용범위가 미국 및 유럽에서는 90% 이상으로, 그리고 아시아 및 라틴 아메리카에서는 70% 내지 80% 정도로 증가할 것이다. 상기 백신은 그 적용범위를 프레브나의 적용범위를 넘어서 상당히 확장시킬 것이고, 혈청그룹 교차 보호의 한계에 의존적이지 않은 6A 및 19A에 대한 적용범위를 제공할 것이다.

발명의 내용

[0005] 따라서, 본 발명은 일반적으로, 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께, 13가지의 개별적 다당류-단백질 집합체를 포함하고, 이때 각각의 집합체가 운반체 단백질에 집합된 상이한 혈청형의 스트렙토코커스 뉴모니에 유래의 협막 다당류를 함유하는, 다가 면역원성 조성물을 제공한다. 임의로, 알루미늄계 애드juv언트와 같은 애드juv언트가 제형에 포함된다. 보다 구체적으로, 본 발명은 7vPnC 백신 중의 7가지의 혈청형(4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F) 및 6가지의 추가적인 혈청형(1, 3, 5, 6A, 7F 및 19A)을 포함하는 13가 폐렴구균 집합체(13vPnC) 조성물

을 제공한다.

- [0006] 본 발명은 또한, 협막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니아의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 유래하고 운반체 단백질이 CRM₁₉₇인, 다가 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0007] 본 발명은 협막 다당류가 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9v, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F의 스트렙토코커스 뉴모니아로부터 유래하고, 운반체 단백질이 CRM₁₉₇이며, 애주번트가 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드와 같은 알루미늄계 애주번트인, 다가 면역원성 조성물을 추가로 제공한다. 본 발명의 특정한 양태에서, 애주번트는 알루미늄 포스페이트이다.
- [0008] 본 발명은 또한, 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 이때 각각의 접합체가 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 협막 다당류를 포함하며 상기 협막 다당류가 혈청형 3 및 하나 이상의 추가적인 혈청형으로부터 제조되는, 다가 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0009] 상기 다가 면역원성 조성물의 하나의 양태에서, 추가적인 혈청형은 혈청형 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 또 다른 양태에서, 상기 조성물은 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로부터 선택되는 알루미늄계 애주번트와 같은 애주번트를 포함한다. 특정 양태에서, 애주번트는 알루미늄 포스페이트이다.
- [0010] 본 발명은 또한, 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 이때 각각의 접합체가 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 스트렙토코커스 뉴모니아 유래의 협막 다당류를 포함하며 상기 협막 다당류가 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F 및 하나 이상의 추가적인 혈청형으로부터 제조되는, 다가 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0011] 상기 다가 면역원성 조성물의 하나의 양태에서, 추가적인 혈청형은 혈청형 1, 3, 5, 6A, 7F 및 19A로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 운반체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 또 다른 양태에서, 상기 조성물은 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로부터 선택되는 알루미늄계 애주번트와 같은 애주번트를 포함한다. 특정 양태에서, 애주번트는 알루미늄 포스페이트이다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 기술된 임의의 면역원성 조성물의 면역학적 유효량을 사람에게 투여함을 포함하여, 스트렙토코커스 뉴모니아 협막 다당류 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은, 투여되는 임의의 면역원성 조성물이, 2 μ g의 각 당류, 단 6B는 4 μ g; 대략 29 μ g CRM₁₉₇ 운반체 단백질; 0.125mg의 알루미늄 원소(0.5mg 알루미늄 포스페이트) 애주번트; 및 부형제로서 염화나트륨 및 나트륨 석시네이트 완충액을 함유하도록 제형화된 단일 0.5mL 용량임을 추가로 제공한다.
- [0014] 운반체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아 혈청형 1(Pn 1) 다당류를 포함하는 면역원성 접합체의 제조 방법이 또한 제공된다. 하나의 양태에서, 당해 방법은 (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 Pn 1 다당류를 알칼리성 pH 완충액과 반응시켜 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; (ii) 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 약산 (mild acid)과 반응시켜 중화된 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; (iii) 중화된 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 산화제와 반응시켜 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; (iv) 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류를 운반체 단백질과 혼합하는 단계; (v) 혼합된 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류와 운반체 단백질을 환원제와 반응시켜 혈청형 Pn 1 다당류:운반체 단백질 접합체를 생성시키는 단계; 및 (vi) 혈청형 Pn 1 다당류:운반체 단백질 접합체 중의 미반응된 알데히드를 캡핑(capping)시켜, 운반체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아 혈청형 Pn 1 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 생성시키는 단계를 포함한다.
- [0015] 추가의 양태에서, 당해 방법은 (i) (a) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니아 혈청형 Pn 1 다당류를 중탄산염/탄산염 완충액과 반응시켜 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; (ii) 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 1 다당류를 아세트산과 반응시켜 중화된 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; (iii) 중화된 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 과요오드산나트륨과 반응시켜 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; (iv) 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류를 정제하는 단계; (v) 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류를 운반체 단백질과 혼합하는 단계; (vi) 혼합된 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류와 운반체 단백질을 공동-동결건조시키는 단계; (vii) 동결건조된 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류와 운반체 단백질을

수소화붕소나트륨과 반응시켜 혈청형 Pn 1 다당류:운반체 단백질 접합체를 생성시키는 단계; 및 (viii) 혈청형 Pn 1 다당류:운반체 단백질 접합체 중의 미반응된 알데히드를 수소화붕소나트륨으로 캡핑시켜, 운반체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아 혈청형 Pn 1 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 생성시키는 단계를 포함한다.

[0016] 또한 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니아 혈청형 Pn 1 다당류의 제조 방법이 제공된다. 당해 방법은 (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니아 혈청형 Pn 1 다당류를 알칼리성 pH 완충액과 반응시켜 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; (ii) 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 약산과 반응시켜 중화된 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계; 및 (iii) 중화된 부분적으로 탈-O-아세틸화된 혈청형 Pn 1 다당류를 산화제와 반응시켜 활성화된 혈청형 Pn 1 다당류를 생성시키는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 기준선(1998/1999년)부터 2001년까지 2세 미만의 미국 소아에서 혈청형에 따른 IPD 발병률의 변화를 나타낸다.

도 2는 5세 미만의 소아에서 폐니실린(PCN)에 대한 내성이 있는 폐렴구균 분리주의 분포를 나타낸다(1998년).

도 3은 D118-P16 프레브나 시험으로부터 얻은 3차 투여 후 OPA의 역 누적 분포 곡선(RCDC)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] **프레브나 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F의 포함**

[0019] 1995년부터 1998년까지 IPD 감시로부터 얻은 데이터에서는, 프레브나 중의 7가지의 혈청형이 2세 미만의 소아에서 IPD의 약 82%의 원인이었던 것으로 추정되었다 [5]. 효능 시험 지역이었던, 북부 캘리포니아에서, 프레브나 혈청형이 유아 및 소아에서 IPD의 모든 증례의 90%를 차지하였다 [10]. 2000년에 프레브나 백신이 도입된 이래, 백신 혈청형으로 인한 질병이 감소함으로써 전체 IPD 발병률이 상당히 감소하였다 [3,4]. 그러므로, 현재는 차세대 폐렴구균 접합체 백신으로부터 어떤 프레브나 혈청형도 제거시킬 이유가 없으며 오히려 혈청형을 추가하여 적용범위를 더 넓혀야 한다.

[0020] **혈청형 1, 3, 5 및 7F의 포함**

[0021] 미국에서, 5세 미만의 소아에서 혈청형 1에 의해서 발생하는 IPD의 발병률은 2% 미만이고, 3 및 7F 형의 각 경우도 거의 동일하다 [1,6]. 혈청형 1 및 5는 침습성 폐렴구균 질환에 대한 고위험 미국 집단에서 더 높은 IPD 발병률을 차지한다. 구체적으로, 혈청형 1은 2세 미만의 알래스카 태생의 소아에서 IPD의 3.5%, 그리고 2 내지 4세의 소아에서 IPD의 18%를 일으킨다 [11]. 혈청형 1 및 혈청형 5는 둘다 전세계의 다른 지역에서 그리고 선진국에 있는 토착 집단에서 질병을 상당히 일으킨다 [12,13,14].

[0022] 혈청형 1은 다른 폐렴구균 혈청형과 비교하여 더 심각한 질환과 관련될 수도 있다 [15]. 이러한 관찰은 미국과 유럽 간의 증례 확인 비율의 차이 및 관련된 의료 관행의 차이에 의한 것이다. 전체적으로, IPD의 발병률은 미국보다 유럽에서 더 낮다. 하지만, 유럽에서 혈청형 1에 의해 발생하는 IPD의 비율은 미국에서보다 불균형적으로 더 높다(각각 6 내지 7% 대 1 내지 2%). 유럽에서는, 혈액 배양물을 입원한 소아로부터 주로 수득한다. 미국에서는, 39℃ 이상의 열을 나타내고 백혈구 수가 증가한 소아로부터 외래 환자 시설에서 혈액 배양물을 수득하는 것이 의료 관행이다. 의료 관행의 차이를 생각하면, 미국에서 혈청형 1에 의해 발생하는 질병의 비율이 더 낮은 것은 보다 약한 질병을 일으키는 다른 혈청형의 비율이 더 높기 때문에 낮아진 것일 수 있으며, 반면에 유럽에서 비율이 더 높은 것은 보다 심각한 질병을 반영하는 것이라고 추정된다. 또한, 복합 폐렴에 걸린 소아를 대상으로 한 혈청역학 연구에서 혈청형 1이 불균형적으로 나타난다는 것이 증명된다 [16,17,18]. 이것은 혈청형 1을 포함시키면 심각한 폐렴구균 질환의 수가 감소할 수 있을 뿐만 아니라, 전체 침습성 폐렴구균 질환의 감소에도 기여할 수 있음을 시사한다.

[0023] 혈청형 3 및 7F를 추가시키면 IPD에 대한 적용범위가 전세계의 대부분 지역에서 대략 3% 내지 7%까지, 그리고 아시아에서 약 9%까지 증가할 것이다. 따라서, 11가 백신은 아시아에서 IPD의 50%를, 그리고 기타 모든 지역에

서 IPD의 약 80%를 감당할 것이다 [1,2]. 이들 혈청형은 중이염 적용범위에 대해서도 중요하다 [19]. 중이염을 일으키는 폐렴구균 혈청형의 다국적 연구에서, 하우스도르프(Hausdorff) 등은 혈청형 3이 전체에서 8번째로 가장 흔한 중이액 분리주라는 것을 밝혔다 [20]. 혈청형 3은 중이염과 관련된 폐렴구균 혈청형의 최대 8.7%까지 차지한다. 따라서, IPD에서 뿐만 아니라 중이염에서도 3 및 7F 형이 중요하므로 이들을 폐렴구균 접합체 백신에 포함시키는 것이 당연하다.

[0024] 그러나, 혈청형 3 다당류에 대해서 상당한 면역원성을 나타내는 다가 폐렴구균 접합체 백신을 제조하려는 시도는 성공적이지 못했다. 예를 들면, 11가 폐렴구균 단백질 D 접합체 백신(11-Pn-PD)의 면역원성 및 안전성 연구에서, 이 백신을 3회 투여받은 후에 동일한 백신 또는 폐렴구균 다당류 백신을 부스터(booster) 투여받은 유아에서 혈청형 3에 대한 초회항원자극 효과(priming effect)가 관찰되지 않았다[참조: Nurkka *et al.* (2004) *Ped. Inf. Dis. J.*, 23:1008-1014]. 다른 연구에서는, 11-Pn-PD를 투여받은 유아로부터 얻은 옴소노파고시토시스 분석(OPA; OpsonoPhagocytic Assay) 결과는, 시험된 다른 혈청형과 비슷한 수준으로 혈청형 3에 대한 항체 반응을 나타내지 못하였다[참조: Gatchalian *et al.*, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID), Poster No. 4, P1A Poster Session 1, Istanbul Turkey, Mar. 27, 2001]. 급성 중이염의 예방에 있어서 11-Pn-PD의 효능을 평가한 또다른 연구에서, 상기 백신은 혈청형 3에 의해서 발생하는 에피소드에 대한 보호를 제공하지 못했다[참조: Prymula *et al.* *Lancet* 2006 Vol. 367:740-748 (March 4, 2006)]. 따라서, 혈청형 3 유래의 헵막 다당류를 포함하고 혈청형 3 다당류에 대한 면역원성 반응을 유도할 수 있는 폐렴구균 접합체 백신은 당업계의 현행 기술 수준 이상으로 상당한 개선을 제공한다.

[0025] 혈청형 6A 및 19A의 포함

[0026] a. 혈청형 6A 및 19A의 역학

[0027] 문헌에 제시된 감시 데이터는 혈청형 6A 및 19A가 혈청형 1, 3, 5 및 7F를 합한 것보다 2세 미만의 미국 소아에서 더 많은 침습성 폐렴구균 질환의 원인이라는 것을 시사한다(도 1) [1,5]. 게다가, 이들 혈청형은 흔히 항생제 내성과 관련되어 있고(도 2), 중이염에서 중요한 역할을 한다 [6,19,20]. 현재의 프레브나 백신이 6A 및 19A로 인한 질병에 대해서 보호하는 능력은 명확하지 않다. 13vPnC 백신에 6A 및 19A 성분을 포함시키는 근거는 하기에 논의되어 있다.

[0028] b. 6B 및 19F 다당류에 의해 유도되는 6A 및 19A에 대한 반응

[0029] 인가된 비접합 폐렴구균 다당류 백신(2세 이상의 소아용)은 6A 또는 6B 헵막 다당류를 함유하지만 둘다 함유하지는 않았다 [21]. 23가 폐렴구균 다당류 백신이 제형화된 시기에 작성된 면역원성 데이터에서, 6B 일가 백신이 6A 및 6B 헵막 둘다에 대해 항체를 유도하였음이 증명되었다. 유리 다당류 및 폐렴구균 접합체 백신을 사용하여 다양한 집단에서 IgG 및 옴소노파고시토시스 분석(OPA) 반응을 평가하는 몇 번의 시험으로부터 얻은 데이터는, 6A에 대한 IgG 반응이 6B 항원에 의해서 유도되지만, 이 반응이 일반적으로 더 낮으며, 6A 유도체와의 OPA 활성이 6B 유도체와의 OPA 활성과 상이하다는 것을 시사하였다 [22,23,24,25]. 또한, 6B 항체와 고수준으로 반응하는 피험자가 6A에 대한 활성이 거의 없거나 전혀 없을 수도 있다.

[0030] 6A 및 6B 헵막 다당류의 화학적 조성이 고도로 유사한 것과는 대조적으로, 19A 다당류에 2개의 추가적인 측쇄의 존재로 인해 19A 및 19F 헵막은 매우 상이하다. 놀랍지 않게도, 19F 다당류 백신으로 면역접종된 사람 지원자에서 측정된 면역 반응에서, 19F에 대한 반응은 피험자의 80%에서 유도되었지만, 피험자의 20%만 19A에 대한 반응이 있었음이 나타났다 [26]. 19F 다당류로 면역접종된 후에 혈청형 19A에 대한 교차-반응성 IgG 및 OPA 반응 수준이 낮다는 것은, 접합체 백신을 이용한 시험에서도 또한 증명되었다 [24,26].

[0031] 미국 유아에서 실시한 7vPnC 가교 시험(D118-P16)으로부터, 6A 및 19A에 대한 교차-반응성 OPA 반응에 관한 내부 데이터가 작성되었다 (도 3). 이 연구는 다른 사람들의 연구결과와 일치하며, 6B 다당류로 면역접종된 후 6A 다당류에 대한 교차-반응성 기능성 항체가 유도되기는 하지만 낮은 수준으로 유도되고, 19F로 면역접종된 후에는 19A에 대한 기능성 항체가 거의 유도되지 않는다는 것이 증명된다.

[0032] 동물 모델에서 6A 및 19A에 대한 6B 및 19F 면역접종의 영향

[0033] 동물 모델을 사용하여 다당류 면역접종을 이용한 교차 보호의 가능성을 평가하였다. 기빙크(Giebink) 등에 의해서 개발된 중이염 모델에서, 4가 다당류 외막 단백질(OMP) 접합체 백신(6B, 14, 19F, 23F 당류를 함유함) 또는 위약으로 친칠라를 면역접종시켰다 [27]. 이 시험에서 6A에 대한 다소의 교차 보호가 있는 것처럼 보였지만, 통계적 유의성에 도달하지 못했으며 보호 수준이 6B 중이염에 대한 보호 수준보다 더 낮았다. 동일한 이 모델에서 19F 중이염에 대해서는 100% 보호되었지만, 19A 중이염에 대해서는 17%만 보호되었다.

[0034] 셀랜드(Saeland) 등은 8가 폐렴구균 파상풍 접합체 백신(6B 및 19F를 함유함)으로 면역접종된 유아로부터 얻은 혈청을 사용하여, 폐 감염 모델에서, 6A 유기체로 비강내 챌린지를 하기 전에 마우스를 수동 면역화시켰다 [28]. 59개의 혈청 샘플 중에, 53%는 6B 균혈증에 대해 마우스를 보호하였고 37%는 6A에 대해서 보호하였다. 11가 폐렴구균 접합체 백신(파상풍 독소이드(toxoid)에 접합된 19F를 함유함) 4회 투여로 면역접종된 유아로부터 얻은 혈청으로 수동 면역화시킨 마우스를 동일한 모델에서 19A 유기체로 비강내 챌린지하였다 [29]. 수동 면역화된 후에 챌린지된 100마리의 마우스 중에, 60마리의 마우스는 폐 조직에서 19A 유기체가 발견되지 않았지만, 식염수 위약을 투여받은 모든 마우스에서는 유기체가 확인되었다. 하지만, 이 모델에서 수동 면역화는 19F 유기체를 이용한 챌린지에 대한 보호를 나타내지 않았다; 그러므로, 혈청그룹 19에 대한 모델의 적절성이 의심된다. 일반적으로 이들 모델은 6A 유기체에 대한 6B 면역접종의 다소의 생물학적 영향의 증거를 제공하지만 이형 혈청형에 대한 효과는 동형 혈청형을 사용하여 관찰된 것만큼 크지 않았다. 19A 유기체에 대한 19F 면역접종의 영향은 이들 모델로부터 잘 이해되지 않는다.

[0035] 효능/유효성 시험에서 6A 및 19A 질환에 대한 6B 및 19F 다당류 접합체 면역접종의 영향

[0036] 7vPnC 및 9vPnC(7vPnC + 혈청형 1 및 5) 효능 시험에서 6B, 6A, 19F 및 19A 혈청형으로 인한 질환의 증례 수는 표 1에 기록되어 있다[30,10,31]. 침습성 질환의 증례 수가 너무 적어서 혈청형 6A 및 19A에 대한 어떤 결론도 이끌어 낼 수 없다. 하지만, 핀란드의 중이염 시험에서 많은 수의 폐렴구균 분리주가 획득되었다 [32]. 계획서 순응 피험자군 분석(per protocol analysis)에서 7vPnC는 혈청형 6B로 인한 중이염에 대해 84% (95% 신뢰구간: 62% 내지 93%) 효능이 있었고 혈청형 6A로 인한 중이염에 대해 57% (95% 신뢰구간: 24% 내지 76%) 효능이 있었다 (표 1). 이와 대조적으로, 7vPnC를 사용한 혈청형-특이적 효능이 19F 또는 19A로 인한 중이염에 대해서는 증명되지 않았다.

표 1

7vPnC 및 9vPnC 백신을 사용한 효능 시험에서 혈청형 6B, 6A, 19F 및 19A로 인한 폐렴구균 질환의 증례

	6B		6A		19F		19A	
	PnC	대조군	PnC	대조군	PnC	대조군	PnC	대조군
카이저(Kaiser) 효능 시험 - 7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
나바호(Navajo) 효능 시험 - 7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
남아프리카 효능 시험 9vPnC HIV (-) (ITT)	-	1	2	1	0	1	3	1
남아프리카 효능 시험 9vPnC HIV (+) (ITT)	-	1	7	3	10	2	3	2
핀란드 중이염 시험 7vPnC (PP)	-	9*	56	19*	45	43	58	17

* 통계적으로 유의한 효능이 증명됨

출처 : 참조 문헌 30, 10, 33 및 개인적 정보교환

ITT = 무작위 배정된 분석 (intention to treat analysis)

PP = 계획서 순응 피험자군 분석(per protocol analysis)

[0037]

[0038] 시판 후 IPD 감시 데이터는 프레브나의 유효성을 평가하기 위하여 기관[Centers for Disease Control]에 의해서 수행된 환자-대조군 시험(case-control trial)으로부터도 입수할 수 있다 [33]. 3 내지 23월령의 소아에서 발생하는 침습성 폐렴구균 질환의 증례가 감시 연구소에서 확인되었고 나이 및 우편 번호에 따라 3개의 대조군과 매치시켰다. 동의를 얻은 후에, 환자 및 대조군의 부모 및 의료 제공자로부터 병력 및 면역접종력(피험자가 프레브나를 1회 이상 투여받은 경우, 면역접종된 것으로 간주하였다)을 입수하였다. 2003 ICAAC 학회에서 예비 결과가 발표되었고 6B, 19F, 19A 및 6A 질환에 대한 연구결과의 요약은 표 2에 제시되어 있다. 이 데이터는,

혈청형 6B 질환보다 다소 낮을 수 있는 수준에서이기는 하지만, 프레브나가 6A로 인한 질환을 예방할 수 있음을 나타낸다. 이 데이터는 또한, 19A로 인한 침습성 질환에 대한 교차 보호에 한계가 있음을 나타낸다.

표 2

CDC에 의해서 수행된 환자 대조군 시험의 예비 결과
(2003년 ICAAC에서 발표됨)

혈청형	정보제공 세트, n	백신 유효성* (95% 신뢰구간)
모든 백신형	115	94 (87, 97)
모든 백신 관련형	36	70 (38, 86)
모든 비백신형	43	-4 (-106, 48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16, 92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)

* 백신 유효성 : 백신 접종(1회 이상) 군과 백신 미접종 군을 비교하고,
기본 상태에 대해 조정함
출처 : 참조 문헌 40 및 개인적/기밀 정보 교환

[0039]

[0040]

프레브나를 사용한 공개된 분석 [3]은 또한, 혈청형 6B 및 19F가 2세 미만의 소아 중에서 혈청형 6A 및 19A에 의해서 발생하는 IPD를 다소 감소시켰다는 것을 나타낸다 ([3]의 표 1). 면역접종받지 않은 성인 중에서 혈청형 6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 18F, 19A, 19B, 19C, 23A 및 23B("모든 백신-관련 혈청형")에 의해서 발생하는 질병률이 다소 감소하였다 ([3]의 표 2). 이 데이터는, 2세 미만의 소아에서 프레브나의 사용으로부터 생긴 집단 면역이 혈청형 6A 및 19A에 대하여 적당하였음을 입증하고, 본 발명의 13vPnC 백신에 혈청형 6A 및 19A를 포함시켜야 하는 근거를 제공한다.

[0041]

6A 및 19A의 추가에 대한 결론

[0042]

도 1 및 표 2에 기록된, 7vPnC 백신을 사용한 시판 후 감시 데이터 및 환자-대조군 연구 결과는, 위에 기술된 동물 모델에서의 면역 반응 및 수행에 관한 다른 정보와 일관되게, 6B 질환에 대한 보호보다는 더 작은 정도이기는 하지만, 6A 질환에 대한 어느 정도의 교차 보호가 있을 수 있음을 시사한다. 게다가, 19A에 대한 보호에 한계가 있는 것 같다. 그러므로, 혈청형 6A 및 19A를 함유하는 13vPnC 백신은, 혈청형 6B 및 19F에 의한 혈청 그룹 교차 보호의 한계에 의존적이지 않는 적용범위를 제공한다.

[0043]

따라서, 본 발명은, 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께, 13가지의 다른 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 이때 각각의 접합체가 운반체 단백질에 접합된 상이한 협막 다당류를 함유하며, 또한 상기 협막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니애의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 제조되는, 다가 면역원성 조성물을 제공한다. 한가지 이러한 운반체 단백질은 CRM₁₉₇로 명명된 디프테리아 독소이드이다. 면역원성 조성물은, 애쉴버트, 예를 들면, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드와 같은 알루미늄계 애쉴버트를 추가로 포함할 수 있다.

[0044]

협막 다당류는 당업자에게 공지된 표준 기술에 의해서 제조된다. 본 발명에서, 협막 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 제조된다. 이 페렴구균 접합체들은 별개의 과정에 의해서 제조되고 단일 투여 제형으로 제형화된다. 예를 들면, 하나의 양태에서, 각 페렴구균 다당류 혈청형을 대두-기반 배지에서 증식시킨다. 이어서, 개개의 다당류를 원심분리, 침전, 한외여과 및 칼럼 크로마토그래피를 통해서 정제한다. 정제된 다당류를 화학적으로 활성화시켜 당류가 운반체 단백질과 반응할 수 있도록 한다.

[0045]

일단 활성화되면, 각 협막 다당류를 운반체 단백질에 하나씩 접합시켜서 당접합체(glycoconjugate)를 형성한다. 하나의 양태에서, 각 협막 다당류를 동일한 운반체 단백질에 접합시킨다. 당해 양태에서, 접합은 환원적 아미

노화에 의해서 이루어진다.

- [0046] 다당류의 화학적 활성화 및 그 후 운반체 단백질에 접합시키는 것은 통상적인 수단에 의해서 이루어진다[참조: 미국특허 제4,673,574호 및 제4,902,506호] [34,35].
- [0047] 운반체 단백질은 바람직하게는 무독성이고 비반응원성이며 충분한 양 및 순도로 수득할 수 있는 단백질이다. 운반체 단백질은 표준 접합 방법에 적절해야 한다. 본 발명의 특정 양태에서, CRM₁₉₇이 운반체 단백질로서 사용된다.
- [0048] CRM₁₉₇[판매원: Wyeth, Sanford, NC]은 카사미노산 및 효모 추출물-기반 배지에서 증식시킨 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*) 균주 C7 (β 197)의 배양물로부터 분리된 디프테리아 독소의 무독성 변이체(즉, 독소이드)이다. CRM₁₉₇은 한외여과, 암모늄 설페이트 침전 및 이온 교환 크로마토그래피를 통해서 정제된다. 대안으로, CRM₁₉₇은 본원에 참조로서 인용된 미국특허 제5,614,382호에 따라 재조합적으로 제조된다. 다른 디프테리아 독소이드도 또한 운반체 단백질로서 사용하기에 적당하다.
- [0049] 다른 적당한 운반체 단백질에는, 과상풍 독소이드, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드(참조: 국제공개공보 제 WO2004/083251 [38]), 이.콜라이(*E. coli*) LT, 이.콜라이 ST, 및 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래의 외독소 A와 같은 불활성화된 세균 독소가 포함된다. 세균 외막 단백질, 예를 들면, 외막 복합체 c (OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 뉴모리신, 폐렴구균 표면 단백질 A(PspA), 폐렴구균 어드헤신(adhesin) 단백질(PsaA), 그룹 A 또는 그룹 B 연쇄구균 유래의 C5a 펩티다제, 또는 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D도 또한 운반체 단백질로서 사용될 수 있다. 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 소 혈청 알부민(BSA) 또는 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)와 같은 다른 단백질도 또한 운반체 단백질로서 사용될 수 있다.
- [0050] 협막 다당류를 운반체 단백질에 접합시킨 후에, 다양한 기술에 의해서 다당류-단백질 접합체를 정제한다(다당류-단백질 접합체의 양에 대해 농축시킨다). 이러한 기술에는 농축/투석여과 작업, 침전/용출, 칼럼 크로마토그래피 및 심층 여과가 포함된다(하기 실시예 참조).
- [0051] 개개의 당접합체를 정제한 후에, 이들을 혼합하여 본 발명의 면역원성 조성물을 제형화하고, 이를 백신으로서 사용할 수 있다. 당업계에서 인정된 방법을 사용하여 본 발명의 면역원성 조성물의 제형화를 수행할 수 있다. 예를 들면, 13가지의 개개의 폐렴구균 접합체를 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께 제형화하여 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예에는, 물, 완충 식염수, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리 에틸렌 글리콜) 및 텍스트로스 용액이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 특정 양태에서, 면역원성 조성물은 하나 이상의 애쥬번트를 포함할 것이다. 본원에서 정의되는 "애쥬번트"는 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성을 증가시키는데 사용되는 물질이다. 따라서, 애쥬번트는 종종 면역 반응을 상승시키기 위하여 제공되고 당업자에게 익히 공지되어 있다. 조성물의 유효성을 증가시키기에 적당한 애쥬번트에는,
- [0053] (1) 알루미늄 염(명반) (예: 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 등);
- [0054] (2) 수중유형 에멀전 제형(무라밀 펩티드(하기에서 정의됨) 또는 세균 세포벽 성분과 같은 다른 특정한 면역 자극제를 함유하거나 함유하지 않음), 예를 들면,
- [0055] (a) MF59 [참조: PCT 국제공개공보 제WO 90/14837호]: 5% 스쿠알렌(Squalene), 0.5% 트윈(Tween) 80 및 0.5% 스팬(Span) 85를 함유하며(임의로 다양한 양의 MTP-PE(필요하지는 않지만, 하기를 참조)를 함유함), Model 110Y 마이크로플루이다이어저(microfluidizer)[판매원: Microfluidics, Newton, MA]와 같은 마이크로플루이다이어저를 사용하여 서브마이크론 입자로 제형화됨,
- [0056] (b) SAF: 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉(pluronic)-블록 중합체 L121 및 thr-MDP(하기 참조)를 함유하며, 서브마이크론 에멀전으로 미세유동화(microfluidization)되거나, 와동시켜 큰 입자 크기의 에멀전을 형성시킴, 및
- [0057] (c) 리비(Ribi™) 애쥬번트 시스템(RAS) [판매원: Corixa, Hamilton, MT]: 2% 스쿠알렌, 0.2% 트윈 80 및, 미국특허 제4,912,094호에 기술된 3-O-탈아실화된 모노포스포릴 지질 A(MPL™)[판매원: Corixa], 트레할로스 디미콜레이트(TDM) 및 세포벽 골격(CWS)으로 이루어진 그룹으로부터의 하나 이상의 세균 세포벽 성분, 바람

직하계는 MPL + CWS (디톡스(Detox™))를 함유함;

- [0058] (3) 퀴일 에이(Quil A) 또는 스티물론(STIMULON™) QS-21[판매원: Antigenics, Framingham, MA][참조: 미국특허 제5,057,540호]과 같은 사포닌 애쥬번트가 사용되거나 이로부터 생성된 입자(예: ISCOM(면역자극 복합체));
- [0059] (4) 세균 지질다당류, 합성 지질 A 동족체 (예: 아미노알킬 글루코스아민 포스페이트 화합물(AGP)), 또는 이의 유도체 또는 동족체 [이는 판매원[Corixa]으로부터 구입할 수 있고, 미국특허 제6,113,918호에 기술되어 있음; 한가지 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코피라노시 드이고, 이는 또한 529로도 알려져 있으며(이전에는 RC529로 알려짐), 이는 수성형 또는 안정적인 에멀전으로서 제형화됨], 합성 폴리뉴클레오타이드 (예: CpG 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오타이드[참조: 미국특허 제 6,207,646호]);
- [0060] (5) 사이토킨, 예를 들어, 인터루킨(예: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 등), 인터페론(예: 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;
- [0061] (6) 야생형 콜레라 독소(CT) 또는, 예를 들면, 국제공개공보 제WO 00/18434호에 따라 아미노산 29번 위치에 있는 글루탐산이 다른 아미노산, 바람직하게는 히스티딘으로 치환된, 돌연변이형 콜레라 독소 [참조: 국제공개공보 제WO 02/098368호 및 제WO 02/098369호], 백일해 독소(PT), 또는 이.콜라이 열-불안정성 독소(LT), 특히 LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 [참조: 국제공개공보 제WO 93/13302호 및 제WO 92/19265호]와 같은 세균 ADP-리보실화 독소의 무독화된 돌연변이체; 및
- [0062] (7) 면역자극제로서 작용하여 조성물의 유효성을 증가시키는 다른 물질
- [0063] 이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 무라밀 펩티드에는 N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE) 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명의 백신 제형은, 전신 또는 점막 경로로 백신을 투여함으로써, 폐렴구균에 감염되기 쉬운 사람을 보호 또는 치료하는데 사용될 수 있다. 투여에는 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 또는 구강/소화관, 기도관 또는 비노생식관으로의 점막 투여가 포함될 수 있다. 하나의 양태에서, 폐렴 또는 중이염의 치료를 위하여 비내 투여가 사용된다 (폐렴구균의 비인두 보균을 보다 효과적으로 예방하여, 초기 단계에서 감염을 약화시킬 수 있기 때문이다).
- [0066] 각 백신 용량에서 접합체의 양은, 상당한 부작용 없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로 선택된다. 이러한 양은 폐렴구균의 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 각 용량은 0.1 내지 100 μ g, 특히 0.1 내지 10 μ g, 그리고 보다 특히 1 내지 5 μ g의 다당류를 포함할 것이다.
- [0067] 특정 백신에 대한 성분의 최적량은 피험자에서 적당한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해서 확인될 수 있다. 최초 백신접종 후에, 피험자는 적당한 간격으로 1회 또는 수회의 추가 면역접종을 받을 수 있다.
- [0068] 본 발명의 특정 양태에서, 13vPnC 백신은 각각 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F의 폐렴구균 협막 다당류의 멸균 액체 제형이다. 각 0.5mL 용량에, 2 μ g의 각 당류, 단 6B는 4 μ g; 대략 29 μ g CRM₁₉₇ 운반체 단백질; 0.125mg의 알루미늄 원소(0.5mg 알루미늄 포스페이트) 애쥬번트; 및 부형제로서 염화나트륨 및 나트륨 석시네이트 완충액이 함유되도록 제형화한다. 상기 액체를 보존제 없이 단일 용량 주사기 속에 충전한다. 진탕하고 나면, 즉시 근육내 투여할 수 있는 균질한 백색 현탁액의 백신이 된다.
- [0069] 13vPnC 백신의 용량 수준은 시판된 7vPnC 백신(프레브나)과 유사하게 선택된다. 모든 혈청형의 경우 2 μ g 당류 용량 수준이 선택되었고, 예외적으로 6B는 용량 당 4 μ g으로 선택되었다. 7vPnC 백신은, 혈청형 4, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F의 경우 2 μ g 당류 용량 수준에서, 그리고 6B의 경우 4 μ g 용량에서, IPD에 대해 바람직한 안전성, 면역원성 및 효능을 나타내었다.
- [0070] 면역접종 계획은 7vPnC 백신에 대해 명시된 것을 따를 수 있다. 예를 들면, 13vPnC 백신에 포함된 혈청형으로 인한 에스. 뉴모니아에 의해서 발생하는 침습성 질환에 대해 유아 및 갓난아이를 대상으로 한 정기접종 계획은 생후 2, 4, 6 및 12 내지 15개월이다. 본 발명의 조성물은 또한 어린이, 청소년 및 성인을 대상으로 사용하기

에도 적당하다.

- [0071] 본 발명의 조성물은 다른 세균에 감염되어 발생하는 중이염에 대해 사용하기 위한 하나 이상의 추가적인 항원을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 세균에는 형별불능(nontypable) 헤모필러스 인플루엔자, 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*)(이전에는 브라나멜라 카타랄리스(*Branhamella catarrhalis*)로 알려짐) 및 알로이오코커스 오티티디스(*Alloiococcus otitidis*)가 포함된다.
- [0072] 포함시키기에 적당한 형별불능 헤모필러스 인플루엔자 항원의 예에는 P4 단백질(단백질 "e"로도 알려져 있음)[참조: 미국특허 제5,601,831호, 국제공개공보 제WO 03/078453호], P6 단백질(PAL 또는 PBOMP-1 단백질로도 알려져 있음)[참조: 미국특허 제5,110,908호, 국제공개공보 제WO 0100790호], P5 단백질[참조: 미국 재발행 특허 제37,741호], 헤모필러스 부착 및 침투 단백질[참조: 미국특허 제6,245,337호 및 제6,676,948호], LKP 틱 어드헤신 단백질[참조: 미국특허 제5,643,725호] 및 NucA 단백질[참조: 미국특허 제6,221,365호]이 포함된다.
- [0073] 포함시키기에 적당한 모락셀라 카타랄리스 항원의 예에는 UspA2 단백질[참조: 미국특허 제5,552,146호, 제6,310,190호], CD 단백질[참조: 미국특허 제5,725,862호], E 단백질[참조: 미국특허 제5,948,412호] 및 74 킬로달톤 외막 단백질[참조: 미국특허 제6,899,885호]이 포함된다.
- [0074] 포함시키기에 적당한 알로이오코커스 오티티디스 항원의 예에는 국제공개공보 제WO 03/048304호에서 동정된 항원이 포함된다.
- [0075] 본 발명의 조성물은 또한 스트렙토코커스 뉴모니에 유래의 하나 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 포함시키기에 적당한 스트렙토코커스 뉴모니에 단백질의 예에는 국제공개공보 제WO 02/053761호에 기술된 단백질 뿐만 아니라, 국제공개공보 제WO 02/083855호에서 동정된 단백질도 포함된다.
- [0076] 본 발명의 조성물은 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*) 타입 B 유래의 하나 이상의 단백질을 추가로 포함할 수 있다. 포함시키기에 적당한 나이세리아 메닝지티디스 타입 B 단백질의 예에는 국제공개공보 제WO 03/063766호, 제WO 2004/094596호, 제WO 01/85772호, 제WO 02/16612호 및 제WO 01/87939호에서 동정된 단백질이 포함된다.
- [0077] **접합을 위한 에스. 뉴모니에 혈청형 1 다당류의 활성화**
- [0078] 다당류 중의 탄수화물의 부분적 산화는, 알데히드 그룹을 생성시키고 이후 이를 운반체 단백질의 라이신 잔기에 커플링시켜 면역원성 접합체(즉, 척추동물에서 특이적 면역반응을 자극하거나 유발시키는데 유용한 백신과 같은 조성물)을 생성시키는데 효과적으로 이용되어 왔다. 알데히드 그룹의 생성을 위한 일반적 필수조건은 인접(근접) 하이드록실 그룹의 존재이다. 일부 다당류에서, 하이드록실 그룹의 일부는 이들이 다른 작용기에 의해 차단되어 있기 때문에 이용할 수 없다. Pn 1의 경우, 0-아세틸 그룹이 효과적 산화에 대한 장애물이며, 이들 그룹의 일부의 선택적 제거(즉, 산화 전의 다당류의 약한 탈-0-아세틸화)의 도입은 산화를 촉진시키고 접합 효율을 개선시킨다.
- [0079] 산화 반응의 지속성을 목적하는 정도로 유지시키기 위해, Pn 1 다당류를 먼저 알칼리성 pH 완충액 중에서 약한 가수분해에 의해 부분적으로 탈-0-아세틸화시킨다. 예시적 알칼리성 pH 완충액에는, 중탄산염/탄산염 완충액(예를 들면, 중탄산나트륨/탄산나트륨), 글리신, 이미다졸 및 TRIS-EDTA가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 탈-0-아세틸화에 이어서, 아세트산, 시트르산 또는 탄산과 같은 약산 또는 낮은 이온강도 무기산(예: 염산)을 사용하여 중화를 실시한다. "활성화된" Pn 1 다당류를 제조하기 위한 부분적 산화는 제어된 양의 산화제를 사용한 가수분해/탈중합 후에 실시한다. 특정 당 옥시다제를 포함하는, 말단 하이드록실 그룹을 알데히드로 산화시키는 임의의 선택적 산화제가 사용될 수 있다(예: 과요오드산나트륨 또는 과요오드산칼륨). 이어서, 활성화된 Pn 1 다당류를 임의로 정제한다(예를 들면, 완충 식염수에 대한 투석여과에 의해).
- [0080] 활성화된 Pn 1 다당류를 운반체 단백질과 혼합할 수 있다. 운반체 단백질은 결합된 Pn 1 다당류의 면역원성을 증가시키고/시키거나 진단학적으로, 분석적으로 및/또는 치료학적으로 유익한 운반체 단백질에 대한 항체를 유발하도록 선택한다. 항원성 분자(예: 다당류)의 운반체로의 공유 연결은 증진된 면역원성 및 T-세포 의존성을 부여한다[참조: Pozsgay et al. (1999) PNAS, 96:5194-97; Lee et al. (1976) J. Immunol., 116:171-18; Dintzis et al. (1976) PNAS, 73:3671-75]. 본원에 기술된 바와 같이, 유용한 운반체 단백질에는, 파상풍 독소이드, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드(예를 들면, 국제 특허권 WO2004/083251에 기술된 바와 같은), 이. 콜라이 LT, 이. 콜라이 ST 및 슈도모나스 에루지노사 유래의 외독소 A와 같은 불활성화된 세균 독소가 포함된다. 세균 외막 단백질, 예를 들면, 외막 복합체 c, 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 뉴모리신, 페렴구균 표면 단백질 A, 페렴구균 어드헤신(adhesin) 단백질, 그룹 A 또는 그룹 B 연쇄구균 유래의 C5a 펩티다제, 또는

헤모필러스 인플루엔자 단백질 D도 또한 사용될 수 있다. 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌, 소 혈청 알부민 또는 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체와 같은 다른 단백질도 또한 운반체 단백질로서 사용될 수 있다. 바람직한 운반체 단백질은 돌연변이된 디프테리아 독소 CRM₁₉₇이다. 운반체 단백질과 혼합한 후에, 활성화된 Pn 1 다당류/운반체 단백질 혼합물을 임의로 냉동시키고(예를 들면, 셸(shell) 냉동) 공동-동결건조시킨다.

[0081] 접합은 활성화된 Pn 1 다당류/운반체 단백질 혼합물을 시안화수소화붕소나트륨과 같은 환원제와 반응시켜 실시한다. 이어서, 미반응된 알데히드를 수소화붕소나트륨 환원을 통해 캡핑시킨다. 접합체를 정제하여(예를 들면, 인산염 완충액 후에 완충 식염수에 대한 투석여과에 의해), 완충 식염수 중의 당접합체(glycoconjugate)의 최종 배치 농축물을 수득한다.

[0082] 앞의 기술사항은 본 발명을 일반적으로 기술하였다. 다음의 구체적인 실시예를 참조함으로써 보다 완전히 이해할 수 있다. 이들 실시예는 설명 목적으로만 기술되어 있으며 본 발명의 범위를 한정하기 위한 것이 아니다.

[0083] [실시예]

[0084] 실시예 1

[0085] 에스. 뉴모니아 혈막 다당류 혈청형 1의 제조

[0086] 마스터 및 제조용 세포 은행의 제조

[0087] 에스. 뉴모니아 혈청형 1을 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, ATCC)](균주 6301)로부터 입수하였다. 균주를 증대시키고 동물성 기원의 성분을 제거하기 위하여 원종균(seed stock)을 여러 세대 배양하였다(F1, F2 및 F3 세대). 원종균을 추가적으로 두 세대 더 배양하였다. 추가적인 제1세대는 F3 바이알로부터 배양하였고, 후속 세대는 추가적인 제1세대의 바이알로부터 배양하였다. 냉동보존제로서 합성 글리세롤과 함께 균주 바이알을 냉동저장하였다(<-70℃). 냉동 바이알 외에도, F4 세대의 경우 동결건조 바이알을 제조하였다. 세포 은행 제조를 위하여, 모든 배양물을 대두-기반 배지에서 증식시켰다. 냉동시키기 전에, 원심분리에 의해서 세포를 농축시키고, 사용된 배지를 제거한 후, 냉동보존제(예: 합성 글리세롤)를 함유하는 새로운 배지에 세포 펠렛을 재현탁시켰다.

[0088] 발효 및 회수

[0089] 제조용 세포 은행 유래의 배양물을 사용하여 대두-기반 배지를 함유하는 종균병에 접종하였다. 성장 조건이 충족될 때까지 교반하지 않으면서 종균병을 36℃±2℃에서 배양하였다. 종균병을 사용하여 대두-기반 배지를 함유하는 종균 발효기에 접종하였다. 멸균 탄산나트륨 용액을 사용하여 약 7.0의 pH를 유지하였다. 목표 흡광도에 도달한 후에, 종균 발효기를 사용하여 대두-기반 배지를 함유하는 생산 발효기에 접종하였다. 멸균 탄산나트륨 용액을 사용하여 pH를 유지하였다. 성장이 중단된 후 또는 발효기의 작업 용량에 도달했을 때 발효를 종결시켰다. 적당한 양의 멸균된 12% 나트륨 데옥시콜레이트를 배양물에 첨가하여 세균 세포를 용해(lysis)시키고 세포-결합된 다당류를 유리시켰다. 용해시킨 후에, 발효기 내용물을 냉각시켰다. 용해된 배양물 브로쓰의 pH를, 아세트산을 사용하여 대략 pH 6.6으로 조절하였다. 연속류 원심분리를 한 후 침출 여과 및 0.45μm 미세여과를 함으로써 용해물을 정화시켰다.

[0090] 대안적 방법에서는, 3N NaOH를 사용하여 약 7.0의 발효 pH를 유지하였다. 목표 흡광도에 도달한 후에, 종균 발효기를 사용하여 대두-기반 배지를 함유하는 생산 발효기에 접종하였다. 3N NaOH를 사용하여 pH를 유지하였다. 성장이 중단된 후 또는 발효기의 작업 용량에 도달했을 때 발효를 종결시켰다. 브로쓰에서 0.12% 농도가 되도록 적당한 양의 멸균된 12% 나트륨 데옥시콜레이트를 배양물에 첨가하여, 세균 세포를 용해시키고 세포-결합된 다당류를 유리시켰다. 용해시킨 후에, 완전한 세포 용해 및 다당류 유리가 확실하게 일어나도록, 7℃ 내지 13℃의 온도에서 8 내지 24시간 동안, 교반하면서, 발효기 내용물을 유지하였다. 이 유지 기간 동안에 교반을 하여 용해 침전물이 발효기 벽 및 pH 탐침에 들러붙지 못하게 함으로써, pH 탐침이 그대로 유지되게 하였다. 그 다음, 용해된 배양물 브로쓰의 pH를, 50% 아세트산을 사용하여 대략 pH 5.0으로 조절하였다. 15℃ 내지 25℃의 온도에서 12 내지 24시간 동안 교반하지 않으면서 유지시킨 후, 용액 중에 남아있는 다당류의 손실 또는 분해가 거의 일어나지 않으면서, 이전에 가용성이었던 단백질의 상당한 부분이 용액으로부터 고체 침전물로 가라앉았다. 이어서, 연속류 원심분리를 한 후 침출 여과 및 0.45μm 미세여과를 함으로써 침전물이 있는 용액

을 정화시켰다.

[0091] 정제

[0092] 페럼구균 다당류의 정제는 수회의 농축/투석여과 작업, 침전/용출, 칼럼 크로마토그래피 및 침출 여과 단계로 이루어졌다. 달리 명시하지 않은 경우, 모든 절차는 실온에서 수행하였다.

[0093] 에스. 뉴모니에 혈청형 1의 발효기 배양물로부터 정화된 브로쓰를, 100 kDa MWCO(킬로달톤 분자량 컷오프) 필터를 사용하여 농축 및 투석여과시켰다. 투석여과는 인산나트륨 완충액을 사용하여 중성 pH에서 수행하였다. 투석여과를 통해서 핵산, 단백질 및 다당류와 같은 고분자량 생중합체로부터 저분자량 배지 성분이 제거되었다.

[0094] 최종 농도가 1% HB (w/v)가 되도록 원액의 헥사데실트리메틸 암모늄 브로마이드(HB)를 첨가함으로써, 다당류를 농축 및 투석여과된 용액으로부터 침전시켰다. 다당류/HB 침전물을 침출 필터 상에 포획하고 여과액을 폐기하였다. 침전물 함유 침출 필터를 통하여 염화나트륨 용액을 재순환시킴으로써 다당류 침전물을 재용해화 및 용출시켰다. 이어서 추가적인 염화나트륨 용액을 사용하여 필터를 행겼다.

[0095] 최종 농도가 0.5%가 되도록 요오드화나트륨(NaI) 원액으로부터의 NaI를 다당류 용액에 첨가하여 HB를 침전시켰다. 침전물을 침출 여과에 의해 제거하였다. 여과액에는 표적 다당류가 함유되었다. NaCl/NaI 용액을 사용하여 침전 용기 및 필터를 행구고 행균물을 부분 정제된 다당류 용액과 배합하였다. 필터를 폐기하였다. 그리고 0.2 μ m 필터를 통해서 다당류를 여과시켰다.

[0096] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고 염화나트륨 용액으로 투석여과시켰다.

[0097] 부분 정제된 다당류 용액을 활성탄이 함침된 침출 필터를 통해 여과시킴으로써 추가로 정제하였다. 여과시킨 후에, 염화나트륨 용액을 사용하여 탄소 필터를 행겼다. 행균물을 다당류 용액과 합하고, 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.

[0098] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고, 최종 농도가 0.025M 인산나트륨이 되도록 1M 인산나트륨 완충액을 사용하여 조절하였다. pH를 체크하고 7.0 \pm 0.2로 조절하였다.

[0099] 염화나트륨을 함유하는 인산나트륨 완충액을 사용하여 수산화인회석(HA) 세라믹 칼럼을 평형화시켜 적당한 전도도(<15 μ S)를 갖게 하였다. 이어서, 다당류 용액을 칼럼 상에 로딩하였다. 이러한 조건 하에서, 불순물은 수지에 결합하고 다당류는 칼럼을 통과하여 흘러나와 회수되었다. 칼럼의 앞뒤에 위치한 0.2 μ m 인라인 필터를 통해서 다당류 용액을 여과시켰다.

[0100] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 필터를 사용하여 농축시켰다. 이어서, 주사용수(WFI)를 사용하여 농축액을 투석여과시켰다.

[0101] 투석여과된 다당류 용액을 0.2 μ m 막필터를 통해서 폴리프로필렌 병 속에 여과시켰다. 방출 시험(release testing)을 위하여 샘플을 채취하고 정제된 다당류를 -25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C에서 냉동 저장하였다.

[0102] 특성규명

[0103] 1H-NMR 데이터는 다당류 분자의 양성자에 부여된 시그널의 배정에 따른 화학 구조와 일치하였다. 1H-NMR 스펙트럼에서, 다당류에 있는 O-아세틸 작용 그룹의 정량화를 위한 일련의 고해상 시그널(메틸 그룹 유래의 양성자)이 나타났다.

[0104] 특이적 항혈청을 사용한 역류 면역전기영동에 의해서 일가 다당류의 동일성을 확인하였다.

[0105] 샘플 농도와 함께, 굴절률 및 다각도 레이저 광 산란(MALLS) 검출기와 결합된 고성능 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 분자량을 계산하였다.

[0106] 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 다당류의 상대적인 분자 크기 분포를 프로파일링하였다.

[0107] 실시예 2

[0108] **혈청형 1 페렴구균 당류 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조**

[0109] 활성화 및 접합

[0110] 정제된 다당류의 용기를 해동시키고 반응 용기 속에서 배합하였다. 반응 용기에 0.2M 탄산나트륨(pH 9.0)을 첨가하여 50℃에서 3시간 동안 부분 탈아세틸화(가수분해)시켰다. 반응을 20℃로 냉각시키고 0.2M 아세트산으로 중화시켰다. 2 내지 8℃에서 항온처리하여 과요오드산나트륨의 존재 하에서 산화시키고, 혼합물을 15 내지 21 시간 동안 교반하였다.

[0111] 활성화된 반응 혼합물을 농축시키고 30K MWCO 막을 사용하여 0.9% NaCl로 10배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2 μm 여과하였다. 활성화된 당류를 100mL 동결건조 유리병 속에 충전하여 -75℃에서 셸-냉동(shell-freezing)하고 동결건조시켰다.

[0112] "셸-냉동"은 동결건조(냉동건조)를 위한 샘플을 제조하는 방법이다. 알콜 또는 임의의 다른 적당한 유체를 함유하는 냉동조에서 모터로 구동되는 롤러에 의해 플라스크가 자동으로 회전한다. 플라스크의 내부 "셸" 주위로 산물의 얇은 코팅이 고르게 냉동되어, 대량의 물질이 각 냉동건조 작업 동안에 안전하게 처리된다. 이러한 자동 냉동 장치는 동시에 많은 플라스크를 예비냉동시키는 간단하고 효율적인 수단을 제공하며, 내부에 목적하는 코팅을 생성시키고, 효율적인 냉동건조를 위한 충분한 표면적을 제공한다.

[0113] 동결건조된 물질의 병을 실온이 되게 하여, 2:1의 당류/단백질 비율로 CRM₁₉₇ 용액에 재현탁시켰다. 최종적으로 0.2M의 이온 농도 및 7.5의 pH가 되도록 1M 인산나트륨 완충액을 당류/단백질 혼합물에 첨가하고, 이어서 시안화수소화붕소나트륨을 첨가하였다. 반응물을 23℃에서 18시간 동안 항온처리하고, 37℃에서 72시간 동안 2차 항온처리하였다. 시안화수소화붕소 항온처리 후에, 냉 식염수를 사용하여 반응 혼합물을 희석시키고 나서, 1M 탄산나트륨을 첨가하여 반응 혼합물을 pH 9.0으로 조절하였다. 수소화붕소나트륨을 첨가하고 23℃에서 3 내지 6시간 동안 항온처리함으로써, 미반응된 알데히드를 소거하였다.

[0114] 식염수를 사용하여 반응 혼합물을 2배 희석시키고 0.45 내지 5 μm 예비필터를 통해서 잔류액 용기 내로 이동시켰다. 반응 혼합물을, 0.15M 인산염 완충액(pH 6)을 사용하여 30배, 그리고 식염수를 사용하여 20배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2 μm 필터를 통해서 여과시켰다.

[0115] 접합체 용액을 0.9% 식염수 중의 0.5mg/mL의 목표 농도로 희석시키고 클래스 100 후드에서 최종 벌크 농축액(FBC) 용기 내로 멸균 여과시켰다. 접합체를 2 내지 8℃에서 저장하였다.

[0116] 특성규명

[0117] 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 프로파일링하였다.

[0118] 특이적 항혈청을 사용한 슬롯-블롯 분석에 의해서 접합체의 동일성을 확인하였다.

[0119] 당류 및 단백질 농도를 각각 우론산 및 로우리(Lowry) 분석법으로 측정하였다. 공유 결합된 접합체 복합체에서 단백질에 대한 당류의 비율을 다음의 계산식에 따라 구하였다:

$$\text{비율} = \frac{\mu\text{g/mL 당류}}{\mu\text{g/mL 단백질}}$$

[0120]

[0121] 0-아세틸 함량을 헤스트린(Hestrin) 방법에 의해서 측정하였다[참조: Hestrin et. al., J. Biol. Chem. 1949, 180, p. 249]. 총 당류 농도에 대한 0-아세틸 농도의 비율은 "마이크로몰 0-아세틸/mg 당류"로 주어졌다.

[0122] **실시예 3**

[0123] **에스. 뉴모니아 협막 다당류 혈청형 3의 제조**

[0124] 마스터 및 제조용 세포 은행의 제조

[0125] 에스. 뉴모니아 혈청형 3을 로버트 오스트리안 박사(Dr. Robert Austrian, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania)로부터 입수하였다. 세포 은행 시스템의 제조에 관해서는 실시예 1을 참조한다.

[0126] 발효 및 회수

[0127] 제조용 세포 은행 유래의 배양물을 사용하여 대두-기반 배지를 함유하는 종균병에 접종하였다. 성장 조건이 충족될 때까지 교반하지 않으면서 종균병을 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 종균병을 사용하여 대두-기반 배지를 함유하는 종균 발효기에 접종하였다. 멸균 탄산나트륨 용액을 사용하여 약 7.0의 pH를 유지하였다. 목표 흡광도에 도달한 후에, 종균 발효기를 사용하여 중간 종균 발효기에 접종하였다. 목표 흡광도에 도달한 후에, 중간 종균 발효기를 사용하여 생산 발효기에 접종하였다. 멸균 탄산나트륨 용액을 사용하여 pH를 유지하였다. 발효기의 작업 용량에 도달한 후, 발효를 종결시켰다. 적당한 양의 멸균된 12% 나트륨 데옥시콜레이트를 배양물에 첨가하여 세균 세포를 용해시키고 세포-결합된 다당류를 유리시켰다. 용해시킨 후에, 발효기 내용물을 냉각시켰다. 용해된 배양물 브로쓰의 pH를, 아세트산을 사용하여 대략 pH 6.6으로 조절하였다. 연속류 원심분리를 한 후 침층 여과 및 $0.45\mu\text{m}$ 미세여과를 함으로써 용해물을 정화시켰다.

[0128] 정제

[0129] 페럼구균 다당류의 정제는 수회의 농축/투석여과 작업, 침전/용출, 칼럼 크로마토그래피 및 침층 여과 단계로 이루어졌다. 달리 명시하지 않은 경우, 모든 절차는 실온에서 수행하였다.

[0130] 에스. 뉴모니에 혈청형 3의 발효기 배양물로부터 정화된 브로쓰를, 100 kDa MWCO 필터를 사용하여 농축 및 투석여과시켰다. 투석여과는 인산나트륨 완충액을 사용하여 중성 pH에서 수행하였다. 투석여과를 통해서 핵산, 단백질 및 다당류와 같은 고분자량 생중합체로부터 저분자량 배지 성분을 제거하였다.

[0131] 헥사테실트리메틸 암모늄 브로마이드(HB)를 첨가하기 전에, 계산된 양의 NaCl 원액을 최종 농도가 0.25M NaCl이 되도록, 농축 및 투석여과된 다당류 용액에 첨가하였다. 이어서, 최종 농도가 1% HB (w/v)가 되도록 원액의 HB를 첨가함으로써 다당류를 침전시켰다. 다당류/HB 침전물을 침층 필터 상에 포획하고 여과액을 폐기하였다. 침전물 함유 침층 필터를 통하여 염화나트륨 용액을 재순환시킴으로써 다당류 침전물을 재용해화 및 용출시켰다. 이어서, 추가적인 염화나트륨 용액을 사용하여 필터를 행겼다.

[0132] 최종 농도가 0.5%가 되도록 요오드화나트륨(NaI) 원액으로부터의 NaI를 다당류 용액에 첨가하여 HB를 침전시켰다. 침전물을 침층 여과에 의해 제거하였다. 여과액에는 표적 다당류가 함유되었다. NaCl/NaI 용액을 사용하여 침전 용기 및 필터를 행구고 행군물을 부분 정제된 다당류 용액과 배합하였다. 필터를 폐기하였다. 이어서, $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 다당류를 여과시켰다.

[0133] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고 염화나트륨 용액으로 투석여과시켰다.

[0134] 부분 정제된 다당류 용액을 활성탄이 함침된 침층 필터를 통해 여과시킴으로써 추가로 정제하였다. 여과시킨 후에, 염화나트륨 용액을 사용하여 탄소 필터를 행겼다. 행군물을 다당류 용액과 합하고, $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 여과시켰다.

[0135] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고, 최종 농도가 0.025M 인산나트륨이 되도록 1M 인산나트륨 완충액을 사용하여 조절하였다. pH를 체크하고 7.0 ± 0.2 로 조절하였다.

[0136] 염화나트륨을 함유하는 인산나트륨 완충액을 사용하여 수산화인회석(HA) 세라믹 칼럼을 평형화시켜 적당한 전도도($15\mu\text{S}$)를 갖게 하였다. 이어서, 다당류 용액을 칼럼 상에 로딩하였다. 이러한 조건 하에서, 불순물은 수지에 결합하고 다당류는 칼럼을 통과하여 흘러나와 회수되었다. 완충액을 사용하여 칼럼을 통해 다당류를 씻어내리고 $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 여과시켰다.

[0137] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 필터를 사용하여 농축시켰다. 이어서, WFI를 사용하여 농축액을 투석여과시켰다.

[0138] 투석여과된 다당류 용액을 $0.2\mu\text{m}$ 막필터를 통해서 스테인리스 강 용기 내로 여과시켰다. 방출 시험을 위하여 샘플을 채취하고 정제된 다당류를 $-25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 저장하였다.

[0139] 특성규명

[0140] $^1\text{H-NMR}$ 데이터는 다당류 분자의 양성자에 부여된 시그날의 배정에 따른 화학 구조와 일치하였다.

- [0141] 특이적 항혈청을 사용한 역류 면역전기영동에 의해서 일가 다당류의 동일성을 확인하였다.
- [0142] 샘플 농도와 함께, 굴절률 및 다각도 레이저 광 산란(MALLS) 검출기와 결합된 고성능 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 분자량을 계산하였다.
- [0143] 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 다당류의 상대적인 분자 크기 분포를 프로파일링하였다.

[0144] **실시예 4**

[0145] **혈청형 3 폐렴구균 당류 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조**

[0146] 활성화 및 접합

- [0147] 정제된 혈청형 3 당류의 용기를 해동시키고 반응 용기에서 배합하였다. 최종 농도가 0.2M 및 2mg/mL 당류가 되도록 반응 용기에 WFI 및 2M 아세트산을 첨가하였다. 용액의 온도를 1시간 동안 85℃로 상승시켜서 다당류를 가수분해시켰다. 반응을 25℃ 이하로 냉각시키고 최종 농도가 0.1M이 되도록 1M 염화마그네슘을 첨가하였다. 23℃에서 16 내지 24시간 동안 항온처리하여 과요오드산나트륨의 존재 하에서 산화시켰다.
- [0148] 활성화된 반응 혼합물을 농축시키고 100K MWCO 막을 사용하여 WFI로 10배 투석여과하였다. 잔류액을 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0149] 혼합을 위하여, 최종적으로 10mM의 농도 및 6.0 내지 6.5의 pH가 되도록 0.2M 인산나트륨(pH 7.0)을 활성화된 당류에 첨가하였다. CRM₁₉₇ 1g 당 당류 2g의 비율로 CRM₁₉₇ 운반체 단백질을 당류 용액과 혼합하였다. 배합된 당류/단백질 용액을 50mL 목표 충전량으로 100mL 동결건조 유리병 속에 충전하여 -75℃에서 셀-냉동하고 동결건조시켰다.
- [0150] 공동-동결건조된 당류/단백질 물질의 병을 실온이 되게 하여, 최종 당류 농도가 20mg/mL이 되도록 0.1M 인산나트륨 완충액(pH 7.0)에 재현탁시켰다. pH를 6.5로 조절하고 0.5 몰당량의 시안화수소화붕소나트륨을 첨가하였다. 반응물을 37℃에서 48시간 동안 항온처리하였다. 시안화수소화붕소 항온처리 후에, 냉 5mM 석시네이트/0.9% 식염수 완충액을 사용하여 반응 혼합물을 희석시켰다. 수소화붕소나트륨을 첨가하고 23℃에서 3 내지 6 시간 동안 항온처리함으로써, 미반응된 알데히드를 소거하였다. 0.45 내지 5 μ m 예비필터를 통해서 반응 혼합물을 잔류액 용기 속으로 이동시켰다.
- [0151] 반응 혼합물을, 0.1M 인산염 완충액(pH 9)을 사용하여 30배, 0.15M 인산염 완충액(pH 6)을 사용하여 20배, 그리고 5mM 석시네이트/0.9% 식염수를 사용하여 20배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0152] 접합체 용액을 0.5mg/mL의 당류 목표 농도로 희석시키고, 클래스 100 후드에서 FBC 용기 내로 멸균 여과시켰다. 접합체를 2 내지 8℃에서 저장하였다.

[0153] 특성규명

- [0154] 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 프로파일링하였다.
- [0155] 특이적 항혈청을 사용한 슬롯-블롯 분석에 의해서 접합체의 동일성을 확인하였다.
- [0156] 당류 및 단백질 농도를 각각 안트론(Anthrone) 및 로우리(Lowry) 분석법으로 측정하였다. 공유 결합된 접합체 복합체에서 단백질에 대한 당류의 비율을 다음의 계산식에 따라 구하였다:

[0157]
$$\text{비율} = \frac{\mu\text{g/mL 당류}}{\mu\text{g/mL 단백질}}$$

[0158] **실시예 5**

[0159] **에스. 뉴모니아 협막 다당류 혈청형 5의 제조**

- [0160] 에스. 뉴모니아 혈청형 5를 게랄트 쉬프만 박사(Dr. Gerald Schiffman, State University of New York,

Brooklyn, New York)로부터 입수하였다. 세포 은행 시스템의 제조에 관해서는 실시예 1을 참조한다. 다당류의 발효, 회수, 정제 및 특성규명에 관해서는 실시예 1을 참조한다.

[0161] 대안적 발효 방법

[0162] 제조용 세포 은행 유래의 배양물을 사용하여 대두-기반 배지 및 10mM 멸균 NaHCO_3 용액을 함유하는 종균병에 접종하였다. 성장 조건이 충족될 때까지 교반하지 않으면서 종균병을 $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다. 종균병을 사용하여 대두-기반 배지 및 10mM 멸균 NaHCO_3 용액을 함유하는 종균 발효기에 접종하였다. 3N NaOH를 사용하여 약 7.0의 pH를 유지하였다. 목표 흡광도에 도달한 후에, 종균 발효기를 사용하여 NaHCO_3 농도가 10mM인 대두-기반 배지를 함유하는 생산 발효기에 접종하였다. 3N NaOH를 사용하여 pH를 유지하였다. 성장이 중단된 후 또는 발효기의 작업 용량에 도달했을 때 발효를 종결시켰다. 브로쓰에서 0.12% 농도가 되도록 적당한 양의 멸균된 12% 나트륨 데옥시콜레이트를 배양물에 첨가하여, 세균 세포를 용해시키고 세포-결합된 다당류를 유리시켰다. 용해시킨 후에, 완전한 세포 용해 및 다당류 유리가 확실하게 일어나도록, 7°C 내지 13°C 의 온도에서 8 내지 24시간 동안, 교반하면서, 발효기 내용물을 유지하였다. 이 유지 기간 동안에 교반을 하여 용해 침전물이 발효기 벽 및 pH 탐침에 들러붙지 못하게 함으로써, pH 탐침이 그대로 유지되게 하였다. 그 다음, 용해된 배양물 브로쓰의 pH를, 50% 아세트산을 사용하여 대략 pH 4.5로 조절하였다. 15°C 내지 25°C 의 온도에서 12 내지 24시간 동안 교반하지 않으면서 유지시킨 후, 용액 중에 남아있는 다당류의 손실 또는 분해가 거의 일어나지 않으면서, 이전에 가용성이었던 단백질의 상당한 부분이 용액으로부터 고체 침전물로 가라앉았다. 이어서, 연속류 원심분리를 한 후 침출 여과 및 $0.45\mu\text{m}$ 미세여과를 함으로써 침전물이 있는 용액을 정화시켰다.

[0163] **실시예 6**

[0164] **혈청형 5 폐렴구균 당류 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조**

[0165] 활성화 및 접합

[0166] 혈청형 5 당류의 용기를 해동시키고 반응 용기에서 배합하였다. 반응 용기에 0.1M 아세트산나트륨(pH 4.7)을 첨가한 후, 23°C 에서 16 내지 22시간 동안 항온처리하여 과요오드산나트륨의 존재 하에서 산화시켰다.

[0167] 활성화된 반응 혼합물을 농축시키고 100K MWCO 막을 사용하여 WFI로 10배 투석여과시켰다. 잔류액을 $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 여과시켰다.

[0168] 0.8:1의 비율로 혈청형 5 활성화된 당류를 CRM₁₉₇과 배합하였다. 배합된 당류/단백질 용액을 100mL 동결건조 유리병 속에 충전하여(50mL 목표 충전량), -75°C 에서 쉘-냉동하고, 공동-동결건조시켰다.

[0169] 공동-동결건조된 물질의 병을 실온이 되게 하여 0.1M 인산나트륨(pH 7.5)에 재현탁시키고, 시안화수소화붕소나트륨을 첨가하였다. 반응물을 30°C 에서 72시간 동안 항온처리한 후, 시안화수소화붕소를 2차 첨가하고 30°C 에서 20 내지 28시간 동안 항온처리하였다.

[0170] 시안화수소화붕소 항온처리 후에, 식염수를 사용하여 반응 혼합물을 2배 희석시키고 0.45 내지 $5\mu\text{m}$ 예비필터를 통해서 잔류액 용기 속으로 이동시켰다. 반응 혼합물을, 0.01M 인산염 완충액(pH 8)을 사용하여 30배, 0.15M 인산염 완충액(pH 6)을 사용하여 20배, 그리고 식염수를 사용하여 20배 투석여과시켰다. 잔류액을 $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 여과시켰다.

[0171] 접합체 용액을 0.5mg/mL의 당류 목표 농도로 희석시키고, 클래스 100 후드에서 FBC 용기 내로 멸균 여과시켰다. 접합체를 2 내지 8°C 에서 저장하였다.

[0172] 접합체의 특성규명에 관해서는 실시예 2를 참조한다.

[0173] **실시예 7**

[0174] **에스. 뉴모니아에 협막 다당류 혈청형 6A의 제조**

[0175] 에스. 뉴모니아 혈청형 6A를 게랄트 쉬프만 박사(Dr. Gerald Schiffman, State University of New York,

Brooklyn, New York)로부터 입수하였다. 세포 은행 시스템의 제조에 관해서는 실시예 1을 참조한다. 다당류의 발효, 회수 및 정제에 관해서는 실시예 1을 참조한다. (예외: 정제 과정에서, 크로마토그래피 단계 전에, 30kDa MWC0 농축 단계를 생략한다)

실시예 8

혈청형 6A 페렴구균 당류 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조

활성화 및 접합

혈청형 6A 다당류는 고분자량 중합체이기 때문에 산화시키기 전에 크기를 감소시켜야 한다. 혈청형 6A 당류의 용기를 해동시키고 반응 용기에서 배합하였다. 최종 농도가 0.1M이 되도록 반응 용기에 2M 아세트산을 첨가하여 60℃에서 1.5시간 동안 가수분해시켰다. 반응을 23℃로 냉각시키고 1M NaOH를 사용하여 pH 6으로 조절함으로써 반응 혼합물을 중화시켰다. 23℃에서 14 내지 22시간 동안 항온처리하여 과요오드산나트륨의 존재 하에서 산화시켰다.

활성화된 반응 혼합물을 농축시키고 100K MWC0 막을 사용하여 WFI로 10배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2μm 필터를 통해서 여과시켰다.

혈청형 6A를 슈크로스와 혼합하고 100mL 동결건조 유리병 속에 충전하여(50mL 목표 충전량) -75℃에서 셀-냉동하고 동결건조시켰다.

동결건조된 물질의 병을 실온이 되게 하여 1:1의 당류/단백질 비율로 디메틸설폭사이드(DMSO)에 재현탁시켰다. 시안화수소화붕소나트륨을 첨가한 후에, 반응 혼합물을 23℃에서 18시간 동안 항온처리하였다. 시안화수소화붕소 항온처리 후에, 냉 식염수를 사용하여 반응 혼합물을 희석시켰다. 수소화붕소나트륨을 첨가하고 23℃에서 3 내지 20시간 동안 항온처리함으로써, 미반응된 알데히드를 소거하였다.

희석된 반응 혼합물을 5μm 예비필터를 통해서 잔류액 용기 속으로 이동시켰다. 반응 혼합물을, 0.9% NaCl을 사용하여 10배, 그리고 석시네이트-완충된 NaCl을 사용하여 30배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2μm 필터를 통해서 여과시켰다.

접합체 용액을 0.5mg/mL의 당류 목표 농도로 희석시키고, 클래스 100 후드에서 FBC 용기 내로 멸균 여과시켰다. 접합체를 2 내지 8℃에서 저장하였다.

접합체의 특성규명에 관해서는 실시예 2를 참조한다.

실시예 9

에스. 뉴모니아에 협막 다당류 혈청형 7F의 제조

에스. 뉴모니아 혈청형 7F를 게랄트 쉬프만 박사(Dr. Gerald Schiffman, State University of New York, Brooklyn, New York)로부터 입수하였다. 세포 은행 시스템의 제조, 및 다당류의 발효 및 회수에 관해서는 실시예 3을 참조한다. 대안적 발효 및 회수 방법에 관해서는 실시예 1에 기술된 대안적 방법을 참조한다.

정제

페렴구균 다당류의 정제는 수회의 농축/투석여과 작업, 침전/용출, 칼럼 크로마토그래피 및 침출 여과 단계로 이루어졌다. 달리 명시하지 않은 경우, 모든 절차는 실온에서 수행하였다.

에스. 뉴모니아 혈청형 7F의 발효기 배양물로부터 정화된 브로쓰를, 100 kDa MWC0 필터를 사용하여 농축 및 투석여과시켰다. 투석여과는 인산나트륨 완충액을 사용하여 중성 pH에서 수행하였다. 투석여과를 통해서 핵산, 단백질 및 다당류와 같은 고분자량 생중합체로부터 저분자량 배지 성분을 제거하였다.

혈청형 7F는 HB와 침전물을 형성하지 않는다. 대신에, 최종 농도가 1% HB가 되도록 원액의 HB를 첨가함으로써 농축 및 투석여과된 용액으로부터 불순물을 침전시켰다. 침전물을 침출 필터 상에 포획하고 필터를 폐기하였다. 여과액에는 다당류가 함유되었다.

- [0193] 최종 농도가 0.5%가 되도록 요오드화나트륨(NaI) 원액으로부터의 NaI를 다당류 용액에 첨가하여 HB를 침전시켰다. 침전물을 침출 여과에 의해 제거하였다. 여과액에는 표적 다당류가 함유되었다. NaCl/NaI 용액을 사용하여 침전 용기 및 필터를 행구고 행군물을 부분 정제된 다당류 용액과 배합하였다. 필터를 폐기하였다. 이어서, 0.2 μ m 필터를 통해서 다당류를 여과시켰다.
- [0194] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고 염화나트륨 용액으로 투석여과시켰다.
- [0195] 부분 정제된 다당류 용액을 활성탄이 함침된 침출 필터를 통해 여과시킴으로써 추가로 정제하였다. 여과시킨 후에, 염화나트륨 용액을 사용하여 탄소 필터를 행겼다. 행군물을 다당류 용액과 배합하고, 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0196] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고, 최종 농도가 0.025M 인산나트륨이 되도록 1M 인산나트륨 완충액을 사용하여 조절하였다. pH를 체크하고 7.0 \pm 0.2로 조절하였다.
- [0197] 염화나트륨을 함유하는 인산나트륨 완충액을 사용하여 수산화인회석(HA) 세라믹 칼럼을 평형화시켜 적당한 전도도(15 μ S)를 갖게 하였다. 이어서, 다당류 용액을 칼럼 상에 로딩하였다. 이러한 조건 하에서, 불순물은 수지에 결합하고 다당류는 칼럼을 통과하여 흘러나와 회수되었다. 완충액을 사용하여 칼럼을 통해 다당류를 씻어내리고 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0198] 30 kDa MWCO 필터를 사용하여 다당류 용액을 농축시켰다. 이어서, 농축액을 WFI로 투석여과시켰다.
- [0199] 투석여과된 다당류 용액을 0.2 μ m 막필터를 통해서 스테인리스 강 용기 내로 여과시켰다. 방출 시험을 위하여 샘플을 채취하고 정제된 다당류를 2 $^{\circ}$ C 내지 8 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.
- [0200] 다당류의 특성규명에 관해서는 실시예 3을 참조한다.
- [0201] **실시예 10**
- [0202] **혈청형 7F 폐렴구균 당류 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조**
- [0203] 활성화 및 접합
- [0204] 23 $^{\circ}$ C에서 16 내지 24시간 동안 항온처리하여 과요오드산나트륨의 존재 하에서 산화시켰다.
- [0205] 활성화된 반응 혼합물을 농축시키고 100K MWCO 막을 사용하여 10mM NaOAc(pH 4.5)로 10배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0206] 혈청형 7F를 100mL 동결건조 유리병 속에 충전하여(50mL 목표 충전량) -75 $^{\circ}$ C에서 셀-냉동하고 동결건조시켰다.
- [0207] 동결건조된 혈청형 7F 및 CRM₁₉₇의 병을 실온이 되게 하여 1.5:1의 당류/단백질 비율로 DMSO에 재현탁시켰다. 시안화수소화붕소나트륨을 첨가한 후에, 반응물을 23 $^{\circ}$ C에서 8 내지 10시간 동안 항온처리하였다. 수소화붕소나트륨을 첨가하고 23 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 항온처리함으로써, 미반응된 알데히드를 소거하였다.
- [0208] 냉 식염수를 사용하여 반응 혼합물을 10배 희석시키고 5 μ m 예비필터를 통해서 잔류액 용기 속으로 이동시켰다. 반응 혼합물을, 0.9% 식염수를 사용하여 10배, 그리고 석시네이트-완충된 식염수를 사용하여 30배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0209] 접합체 용액을 0.5mg/mL 0.9% 식염수의 당류 목표 농도로 희석시키고, 클래스 100 후드에서 FBC 용기 내로 멸균 여과시켰다. 접합체를 2 내지 8 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.
- [0210] 접합체의 특성규명에 관해서는 실시예 4를 참조한다.
- [0211] **실시예 11**
- [0212] **에스. 뉴모니아에 협막 다당류 혈청형 19A의 제조**
- [0213] 에스. 뉴모니아 혈청형 19A를 게랄트 쉬프만 박사(Dr. Gerald Schiffman, State University of New York, Brooklyn, New York)로부터 입수하였다. 세포 은행 시스템의 제조에 관해서는 실시예 1을 참조한다. 다당류의 발효, 회수 및 정제에 관해서는 실시예 7을 참조한다. 특성규명에 관해서는 실시예 3을 참조한다.

- [0214] **실시예 12**
- [0215] **혈청형 19A 폐렴구균 당류 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조**
- [0216] 활성화 및 접합
- [0217] 혈청형 19A 당류의 용기를 해동시키고 반응 용기에서 배합하였다. 아세트산나트륨을 10mM(pH 5.0)로 첨가하고, 23℃에서 16 내지 24시간 동안 항온처리하여 과요오드산나트륨의 존재 하에서 산화시켰다.
- [0218] 활성화된 반응 혼합물을 농축시키고 100K MWCO 막을 사용하여 10mM 아세트이트(pH 5.0)로 10배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0219] 활성화된 당류를 슈크로스과 혼합한 후 CRM₁₉₇을 첨가하였다. 혈청형 19A 활성화된 당류 및 CRM₁₉₇ 혼합물(0.8:1 비율)을 100mL 동결건조 유리병 속에 충전하여(50mL 목표 충전량) -75℃에서 셀-냉동하고 동결건조시켰다.
- [0220] 동결건조된 물질의 병을 실온이 되게 하여 DMSO에 재현탁시켰다. 당류/단백질 혼합물에 시안화수소화붕소나트륨 (100mg/ml)을 첨가하였다. 반응물을 23℃에서 15시간 동안 항온처리하였다. 시안화수소화붕소 항온처리 후에, 수소화붕소나트륨을 첨가하고 23℃에서 3 내지 20시간 동안 항온처리함으로써, 미반응된 알데히드를 소거하였다.
- [0221] 냉 식염수를 사용하여 반응 혼합물을 10배 희석시키고 5 μ m 예비필터를 통해서 잔류액 용기 속으로 이동시켰다. 0.9% NaCl을 사용하여 반응 혼합물을 10배 투석여과시키고, 0.45 μ m 여과한 후, 5mM 석시네이트/0.9% NaCl 완충액(pH 6)을 사용하여 30배 투석여과시켰다. 잔류액을 0.2 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0222] 5mM 석시네이트/0.9% 식염수를 사용하여 접합체 용액을 0.5mg/mL의 목표 농도로 희석시키고, 이어서 클래스 100 후드에서 FBC 용기 내로 멸균 여과시켰다. 접합체를 2 내지 8℃에서 저장하였다.
- [0223] 접합체의 특성규명에 관해서는 실시예 4를 참조한다.
- [0224] **실시예 13**
- [0225] **에스. 뉴모니아에 협막 다당류 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F의 제조**
- [0226] 에스. 뉴모니아에 종균 배양물의 제조
- [0227] 에스. 뉴모니아 혈청형 4, 6B, 9V, 18C, 19F 및 3F를 게랄트 쉬프만 박사(Dr. Gerald Schiffman, State University of New York, Brooklyn, New York)로부터 입수하였다. 에스. 뉴모니아 혈청형 14를 ATCC(균주 6314)로부터 입수하였다.
- [0228] 개별적으로, 스트렙토코커스 뉴모니아의 각각의 목적하는 혈청형의 1개의 바이알을 사용하여 발효 배치(fermentation batch)를 개시시켰다. 대두-기반 배지 및 페놀 레드를 함유하는 2개의 병을 탄산나트륨을 사용하여 7.4 \pm 0.2 범위의 pH로 조절하고, 이어서 필요한 양의 50% 텍스트로스/1% 황산마그네슘 용액을 병에 첨가하였다. 2개의 병에 상이한 양의 종균을 접종하였다. 배지가 황색으로 변할 때까지 36℃ \pm 2℃에서 병을 항온처리하였다. 항온처리 후에, 각 병으로부터 샘플을 채취하여 흡광도 (OD) (0.3 내지 0.9) 및 pH (4.6 내지 5.5)를 검사하였다. 종균 발효기에 접종하기 위하여 2개의 병 중 1개를 선택하였다.
- [0229] 대두-기반 배지를 종균 발효기로 이동시키고 멸균시켰다. 이어서, 다량의 50% 텍스트로스/1% 황산마그네슘 용액을 발효기에 첨가하였다. 종균 발효기의 pH 및 교반을 모니터하고 제어하였다 (pH 6.7 내지 7.4). 온도를 36℃ \pm 2℃로 유지하였다. 종균 발효기에 종균 접종물(병)을 무균적으로 연결하고 접종물을 이동시켰다. 발효기의 pH 제어를 유지하고 샘플을 주기적으로 채취하여 OD 및 pH를 검사하였다. 목적하는 OD값, 즉 600nm에서 0.5에 도달했을 때, 종균 발효기로부터의 발효 브로쓰를 중간 발효기에 접종하였다.
- [0230] 대두-기반 배지를 중간 발효기로 이동시키고 멸균시켰다. 이어서, 다량의 50% 텍스트로스/1% 황산마그네슘 용액을 발효기에 첨가하였다. 중간 발효기의 pH 및 교반을 모니터하고 제어하였다 (pH 6.7 내지 7.4). 온도를 36℃ \pm 2℃로 유지하였다. 종균 발효기의 내용물을 중간 발효기로 이동시켰다. 발효기의 pH 제어를 유지하고 샘플을 주기적으로 채취하여 OD 및 pH를 검사하였다. 목적하는 OD값, 즉 600nm에서 0.5에 도달했을 때, 중간

발효기로부터의 발효 브로쓰를 생산 발효기에 접종하였다.

- [0231] 대두-기반 배지를 생산 발효기로 이동시키고 멸균시켰다. 이어서, 다량의 50% 텍스트로스/1% 황산마그네슘 용액을 발효기에 첨가하였다. 생산 발효기의 pH 및 교반을 모니터하고 제어하였다 (pH 6.7 내지 7.4). 온도를 $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 발효가 완료될 때까지, 발효기의 pH 제어를 유지하고 샘플을 주기적으로 채취하여 OD 및 pH를 검사하였다.
- [0232] 최종 농도가 대략 0.12% w/v가 되도록 데옥시콜산나트륨을 발효기에 첨가하였다. 배양물을 최소 30분 동안 혼합하고 온도 설정값을 10°C 로 낮추었다. 배양물을 하룻밤 동안 항온처리하고 불활성화를 확인한 후, 필요한 경우, 50% 아세트산을 사용하여 배양물의 pH를 6.4 내지 6.8로 조절하였다. 발효기의 온도를 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 로 상승시키고 내용물을 정화 유지 탱크로 이동시켰다.
- [0233] 시간 당 25 내지 600리터의 유속으로 원심분리기를 통해서 정화 유지 탱크의 내용물(세포 잔해물을 포함함)을 처리하였다 (예외: 혈청형 4의 경우, 세포 잔해물을 폐기하고 유속을 시간 당 25 내지 250리터로 엄격히 하였다). 상청액의 샘플을 채취하고 OD를 검사하였다. 원심분리하는 동안 목적하는 OD값은 0.15 이하였다.
- [0234] 처음에는, OD값이 0.05 ± 0.03 에 도달할 때까지 심층 필터 조립체를 통해서 상청액을 재순환시켰다. 이어서, 심층 필터 조립체 및 $0.45\mu\text{m}$ 막필터를 통해 상청액을 통과시켜 유지 탱크를 여과하였다.
- [0235] 그 다음에, 산물을 처리하기 위하여 폐관을 통해서 정제 구역으로 이동시켰다.
- [0236] 위의 모든 작업(원심분리, 여과 및 이동)은 10°C 내지 30°C 에서 수행하였다.
- [0237] 혈청형 4 및 6B에 대한 대안적 발효 및 회수 방법에 관해서는 실시예 1에 기술된 대안적 방법을 참조한다.
- [0238] 정제
- [0239] 각 페렴구균 다당류의 정제는 수회의 농축/투석여과 작업, 침전/용출, 칼럼 크로마토그래피 및 심층 여과 단계로 이루어졌다. 달리 명시하지 않은 경우, 모든 절차는 실온에서 수행하였다.
- [0240] 목적하는 에스. 뉴모니에 혈청형의 발효기 배양물로부터 정화된 브로쓰를, 100 kDa MWCO 필터를 사용하여 농축 및 투석여과시켰다. 투석여과는 인산나트륨 완충액을 사용하여 9.0 미만의 pH에서 수행하였다. 투석여과를 통해서 핵산, 단백질 및 다당류와 같은 고분자량 생중합체로부터 저분자량 배지 성분을 제거하였다.
- [0241] 최종 농도가 1% HB (w/v)가 되도록 원액의 HB를 첨가함으로써 농축 및 투석여과된 용액으로부터 다당류를 침전시켰다 (예외: 혈청형 23F의 경우, 최종 농도를 2.5%로 하였다). 다당류/HB 침전물을 심층 필터 상에 포획하고 여과액을 폐기하였다. (주의: 혈청형 14는 침전하지 않으므로 여과액이 보존되었다.) 침전물 함유 심층 필터를 통하여 염화나트륨 용액을 재순환시킴으로써 다당류 침전물을 재용해화 및 용출시켰다. 이어서, 추가적인 염화나트륨 용액을 사용하여 필터를 행겼다.
- [0242] 최종 농도가 0.5%가 되도록 요오드화나트륨(NaI) 원액으로부터의 NaI를 다당류 용액에 첨가하여 HB를 침전시켰다 (예외: 혈청형 6B의 경우, 최종 농도를 0.25%로 하였다). 침전물을 심층 여과에 의해 제거하였다. 여과액에는 표적 다당류가 함유되었다. 필터를 폐기하였다. 이어서, $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 다당류를 여과시켰다.
- [0243] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고 염화나트륨 용액으로 투석여과시켰다.
- [0244] 부분 정제된 다당류 용액을 활성탄이 함침된 심층 필터를 통해 여과시킴으로써 추가로 정제하였다. 여과시킨 후에, 염화나트륨 용액을 사용하여 탄소 필터를 행겼다. 행균물을 다당류 용액과 배합하고, $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0245] 다당류 용액을 30 kDa MWCO 한외여과필터에 농축시키고 염화나트륨 용액을 사용하여 필터를 행겼다. pH를 체크하고 7.0 ± 0.3 으로 조절하였다.
- [0246] pH가 7.0 ± 0.3 이 되고 전도도가 $26 \pm 4\mu\text{S}$ 가 될 때까지, 염화나트륨을 함유하는 인산나트륨 완충액을 사용하여 수산화인회석(HA) 세라믹 칼럼을 평형화시켰다. 이어서, 다당류 용액을 칼럼 상에 로딩하였다. 이러한 조건 하에서, 불순물은 수지에 결합하고 다당류는 칼럼을 통과하여 흘러나와 회수되었다. $0.2\mu\text{m}$ 필터를 통해서 다당류 용액을 여과시켰다.
- [0247] 30 kDa MWCO 필터를 사용하여 다당류 용액을 농축시켰다. 이어서, 전도도가 $15\mu\text{S}$ 미만이 될 때까지, 농축액을

WFI로 투석여과시켰다.

[0248] 투석여과된 다당류 용액을 0.2 μ m 막필터를 통해서 벌크 용기 내로 여과시키고 2 내지 8℃에서 저장하였다.

[0249] 실시예 14

[0250] 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F에 대한 페렴구균 당류 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조

[0251] 활성화 방법

[0252] 상이한 혈청형 당류는 이 실시예에 기술된 바와 같이 활성화(활성화시키기 전에 가수분해를 하거나 하지 않음) 및 접합(수성 또는 DMSO 반응)에서 상이한 경로를 따른다.

[0253] 다당류를 벌크 용기로부터 반응기 용기로 이동시켰다. 이어서, 최종 농도 범위가 1.6 내지 2.4mg/mL이 되도록 다당류를 WFI 및 인산나트륨에 희석시켰다.

[0254] 단계 1.

[0255] 혈청형 6B, 9V, 14, 19F 및 23F의 경우, pH를 pH 6.0 \pm 0.3으로 조절하였다.

[0256] 혈청형 4의 경우, 염산(0.01M 최종 산 농도)을 첨가하고 45℃ \pm 2℃에서 25 내지 35분 동안 용액을 항온처리하였다. 21 내지 25℃로 냉각시키고 6.7 \pm 0.2의 목표 pH로 1M 인산나트륨을 첨가함으로써 가수분해를 중지시켰다. 제조과정 중 시험을 실시하여 탈피루빌화의 적당한 수준을 확인하였다.

[0257] 혈청형 18C의 경우, 빙초산(0.2M 최종 산 농도)을 첨가하고 94℃ \pm 2℃에서 205 내지 215분 동안 용액을 항온처리하였다. 이어서, 온도를 21 내지 25℃로 낮추고 6.8 \pm 0.2의 목표 pH가 되도록 1 내지 2M 인산나트륨을 첨가하였다.

[0258] 단계 2: 과요오드산염 반응

[0259] 페렴구균 당류 활성화에 필요한 과요오드산나트륨 몰당량을 총 당류 함량(혈청형 4 제외)을 사용하여 측정하였다. 혈청형 4의 경우, 당류 1몰 당 과요오드산나트륨 0.8 내지 1.2몰의 비율을 사용하였다. 완전히 혼합하면서, 모든 혈청형에 대해 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 산화 반응을 진행시켰다 (예외: 19F의 경우, 온도를 15℃ 이하로 하였음).

[0260] 단계 3: 한외여과

[0261] 산화된 당류를, 100 kDa MWCO 한외여과필터에(18C의 경우, 5 kDa 한외여과필터에) WFI로(혈청형 19F의 경우, 0.01M 인산나트륨 완충액(pH 6.0)으로) 농축 및 투석여과시켰다. 투과액을 폐기하고 잔류액을 0.22 μ m 필터를 통해서 여과시켰다.

[0262] 단계 4: 동결건조

[0263] 혈청형 4, 9V 및 14의 경우, 농축된 당류를 CRM₁₉₇ 운반체 단백질과 혼합하여, 유리병 속에 충전하고, 셀-냉동하여 -65℃ 이하에서 저장하였다. 냉동된 농축 당류-CRM₁₉₇을 동결건조시킨 다음, -25℃ \pm 5℃에서 저장하였다.

[0264] 혈청형 6B, 19F 및 23F의 경우, 접합체 반응 혼합물에서 5% \pm 3% 슈크로스 농도에 도달하도록 계산된 특정량의 슈크로스를 첨가하였다. 혈청형 18C는 슈크로스 첨가를 요구하지 않았다. 농축된 당류를 유리병 속에 충전하고, 셀-냉동하여 -65℃ 이하에서 저장하였다. 냉동된 농축 당류를 동결건조시킨 다음, -25℃ \pm 5℃에서 저장하였다.

[0265] 접합 방법

- [0266] 두가지 집합 방법을 사용하였다: 혈청형 4, 9V, 14 및 18C의 경우 수성 집합을 사용하고, 혈청형 6B, 19F 및 23F의 경우 DMSO 집합을 사용하였다.
- [0267] 수성 집합
- [0268] 단계 1: 용해
- [0269] 혈청형 4, 9V 및 14의 경우, 동결건조된 활성화된 당류-CRM₁₉₇ 혼합물을 해동시키고 실온에서 평형화시켰다. 이어서, 동결건조된 활성화된 당류-CRM₁₉₇을 다음의 일반적인 비율로 0.1M 인산나트륨 완충액에 재구성시켰다:
- [0270] · 혈청형 4 및 9V의 경우, 당류 16 내지 24g 당 완충액 1L
- [0271] · 혈청형 14의 경우, 당류 6 내지 10g 당 완충액 1L
- [0272] 완전히 용해될 때까지, 혈청형 9V의 경우 37°C±2°C에서, 그리고 혈청형 4 및 14의 경우 23°C±2°C에서 반응 혼합물을 항온처리하였다.
- [0273] 혈청형 18C의 경우, 동결건조된 당류를 CRM₁₉₇ 용액 1L 당 인산나트륨 0.11L의 통상적 비율로 1M 2염기성 인산나트륨 중의 CRM₁₉₇ 용액에 재구성시켰다. 완전히 용해될 때까지 반응 혼합물(8 내지 12g/L 당류 농도)을 23°C±2°C에서 항온처리하였다.
- [0274] 이 단계에서 제조과정 중 제어로서 pH를 검사하였다.
- [0275] 단계 2: 집합 반응
- [0276] 혈청형 4 및 9V의 경우, 당류 1몰 당 시안화수소화붕소나트륨 1.0 내지 1.4몰이 되도록 시안화수소화붕소나트륨 용액(100mg/mL)을 첨가함으로써 집합 반응을 개시시켰다. 반응 혼합물을 37°C±2°C에서 44 내지 52시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 온도를 23°C±2°C로 낮추고 염화나트륨 0.9%를 반응기에 첨가하였다. 당류 1몰 당 수소화붕소나트륨 1.8 내지 2.2 몰당량이 되도록 수소화붕소나트륨 용액(100mg/mL)을 첨가하였다. 혼합물을 23°C±2°C에서 3 내지 6시간 동안 항온처리하였다. 염화나트륨 0.9%를 사용하여 혼합물을 희석시키고 반응기를 행렸다. 희석된 집합 혼합물을 1.2μm 예비필터를 사용하여 유지 용기 속으로 여과시켰다.
- [0277] 혈청형 14 및 18C의 경우, 당류 1몰 당 시안화수소화붕소나트륨 1.0 내지 1.4몰이 되도록 시안화수소화붕소 용액(100mg/mL)을 첨가함으로써 집합 반응을 개시시켰다. 반응 혼합물을 23°C±2°C에서 12 내지 24시간 동안 항온처리하였다. 온도를 37°C±2°C로 상승시키고 반응물을 72 내지 96시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 온도를 23°C±2°C로 낮추고 0.9% 염화나트륨을 반응기에 첨가하였다. 당류 1몰 당 수소화붕소나트륨 1.8 내지 2.2 몰당량이 되도록 수소화붕소나트륨 용액(100mg/mL)을 첨가하였다. 혼합물을 23°C±2°C에서 3 내지 6시간 동안 항온처리하였다. 0.9% 염화나트륨을 사용하여 혼합물을 희석시키고 반응기를 행렸다. 희석된 집합 혼합물을 1.2μm 예비필터를 사용하여 유지 용기 속으로 여과시켰다.
- [0278] 단계 3: 한외여과 100 kDa
- [0279] 희석된 집합 혼합물을 최소 15 용적(혈청형 4) 또는 40 용적(혈청형 9V, 14 및 18C)의 0.9% 염화나트륨을 사용하여 100 kDa MWCO 한외여과필터에 농축 및 투석여과시켰다.
- [0280] 투과액을 폐기하였다.
- [0281] 혈청형 4의 경우, 잔류액을 0.45μm 필터를 통해서 여과시켰다.
- [0282] 이 단계에서 제조과정 중 제어(당류 함량)를 실시하였다.
- [0283] 단계 4: HA 칼럼 정제
- [0284] 이 단계는 혈청형 4 집합체의 경우에만 수행하였다.

- [0285] 0.5M 인산나트륨 완충액(pH 7.0±0.3)을 사용하여 HA 칼럼을 먼저 중화시키고 나서 0.9% 염화나트륨으로 평형화시켰다. 여과시킨 잔류액(혈청형 4)을 1.0L/분의 유속으로 칼럼 상에 로딩하였다. 0.9% 염화나트륨을 사용하여 2.0L/분 이하의 유속으로 칼럼을 세척하였다. 이어서, 0.5M 인산나트륨 완충액을 사용하여 2.0L/분 이하의 유속으로 산물을 용출시켰다.
- [0286] 이어서, HA 분획물을 최소 20 용적의 0.9% 염화나트륨을 사용하여 100 kDa MWCO 막에 농축 및 투석여과시켰다. 투과액을 폐기하였다.
- [0287] 단계 5: 멸균 여과
- [0288] 100 kDa MWCO 투석여과 후의 잔류액을 0.22 μ m 필터를 통해서 여과시켰다. 여과된 산물에 대해 제조과정 중 제어(당류 함량, 유리 단백질, 유리 당류 및 시아나이드)를 실시하였다. 여과시킨 잔류액에 대해 제조과정 중 제어를 실시하여, FBC 목표를 충족시키기 위한 추가적인 농축, 투석여과 및/또는 희석이 필요한지의 여부를 결정하였다. FBC 샘플에서 상기 시험 및 추가적인 시험을 반복하였다.
- [0289] 필요한 경우, 여과된 접합체를 최종 농도가 0.55g/L 미만이 되도록 0.9% 염화나트륨을 사용하여 희석시켰다. 이 단계에서 당류 함량, 단백질 함량 및 당류:단백질 비율에 대한 방출 시험을 실시하였다.
- [0290] 마지막으로, 접합체를 여과시키고(0.22 μ m) 2.64g/통의 통상적인 양으로 10L 스테인리스 강 통 속에 충전하였다. 이 단계에서, 제조과정 중 제어로서 수율, 당류 함량, 단백질 함량, pH, 당류:단백질 비율 및 리신 함량 시험을 실시하였다. 이 단계에서 방출 시험(외관, 유리 단백질, 유리 당류, 내독소, 분자 크기 결정, 잔여 시아나이드, 당류 동일성, CRM₁₉₇ 동일성)을 실시하였다.
- [0291] DMSO 접합
- [0292] 단계 I: 용해
- [0293] 동결건조된 활성화된 당류 혈청형 6B, 19F, 23F 및 동결건조된 CRM₁₉₇ 운반체 단백질을 실온에서 평형화시키고 DMSO에 재구성시켰다. 용해 농도는 통상적으로 DMSO 1L 당 당류 2 내지 3g (단백질 2 내지 2.5g)의 범위였다.
- [0294] 단계 II: 접합 반응
- [0295] 활성화된 당류 및 CRM₁₉₇ 운반체 단백질을, 혈청형 6B 및 19F의 경우, 0.6 내지 1.0g 당류/g CRM₁₉₇, 또는 혈청형 23F의 경우, 1.2 내지 1.8g 당류/g CRM₁₉₇ 범위의 비로 23°C±2°C에서 60 내지 75분 동안 혼합하였다.
- [0296] 활성화된 당류 1몰에 대해 시안화수소화붕소나트륨 0.8 내지 1.2 몰당량의 비로 시안화수소화붕소나트륨 용액(100mg/mL)을 첨가함으로써 접합 반응을 개시시켰다. 1%(v/v)의 목표 농도로 WFI를 반응 혼합물에 첨가하고 혼합물을 23°C±2°C에서 40시간 이상 항온처리하였다.
- [0297] 100mg/mL의 수소화붕소나트륨 용액(활성화된 당류 1몰 당 통상적으로 수소화붕소나트륨 1.8 내지 2.2 몰당량) 및 WFI(목표 농도 5% v/v)를 반응물에 첨가하고 혼합물을 23°C±2°C에서 3 내지 6시간 동안 항온처리하였다. 이 과정을 통해서, 당류에 존재하는 반응하지 않은 임의의 알데히드를 환원시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 15°C 미만에서 0.9% 염화나트륨을 함유하는 희석 탱크로 이동시켰다.
- [0298] 단계 III: 100 kDa 한외여과
- [0299] 희석된 접합체 혼합물을 1.2 μ m 필터를 통해서 여과시키고 최소 15 용적의 0.9% 염화나트륨을 사용하여 100 kDa MWCO 막에 농축 및 투석여과시켰다(혈청형 23F의 경우, 0.01M 인산나트륨/0.05M NaCl 완충액을 사용하였다). 투과액을 폐기하였다. 잔류액을 0.45 μ m 필터를 통해서 여과시켰다. 이 단계에서 제조과정 중 당류 함량 샘플을 채취하였다.

[0300] 단계 IV: DEAE 칼럼 정제

[0301] 이 단계는 혈청형 23F의 경우에만 수행하였다.

[0302] 0.01M 인산나트륨/0.05M 염화나트륨 완충액을 사용하여 DEAE 칼럼을 평형화시켰다. 여과시킨 잔류액(혈청형 23F)을 칼럼 상에 로딩하고 0.01M 인산나트륨/0.05M 염화나트륨 완충액을 사용하여 세척하였다. 이어서, 0.01M 인산나트륨/0.9% NaCl 완충액을 사용하여 칼럼을 세척하였다. 이어서, 0.01M 인산나트륨/0.5M 염화나트륨 완충액을 사용하여 산물을 용출시켰다.

[0303] 단계 V: 100 kDa 한외여과

[0304] 30 용적 이상의 0.9% 염화나트륨을 사용하여 6B 및 19F 유래의 잔류액을 농축 및 투석여과시켰다. 투과액을 폐기하였다.

[0305] 최소 20 용적의 0.9% 염화나트륨을 사용하여 혈청형 23F 유래의 용출액을 농축 및 투석여과시켰다. 투과액을 폐기하였다.

[0306] 단계 VI: 멸균 여과

[0307] 100 kDa MWCO 투석여과 후의 잔류액을 0.22 μ m 필터를 통해서 여과시켰다. 여과된 산물에 대해 제조과정 중 제어(당류 함량, 유리 단백질, 유리 당류, 잔여 DMSO 및 잔여 시아나이드)를 실시하였다. 여과시킨 잔류액에 대해 제조과정 중 제어를 실시하여, FBC 목표를 충족시키기 위한 추가적인 농축, 투석여과 및/또는 희석이 필요한지의 여부를 결정하였다. FBC 샘플에서 상기 시험 및 추가적인 시험을 반복하였다.

[0308] 필요한 경우, 여과된 접합체를 최종 농도가 0.55g/L 미만이 되도록 0.9% 염화나트륨을 사용하여 희석시켰다. 이 단계에서 당류 함량, 단백질 함량 및 당류:단백질 비율에 대한 방출 시험을 실시하였다.

[0309] 마지막으로, 접합체를 여과시키고(0.22 μ m) 2.64g/통의 양으로 10L 스테인리스 강 통 속에 충전하였다. 이 단계에서, 제조과정 중 제어로서 수율, 당류 함량, 단백질 함량, pH, 당류:단백질 비율 및 리신 함량 시험을 실시하였다. 이 단계에서 방출 시험(외관, 유리 단백질, 유리 당류, 내독소, 분자 크기 결정, 잔여 시아나이드, 잔여 DMSO, 당류 동일성 및 CRM₁₉₇ 동일성)을 실시하였다.

[0310] 실시예 15

[0311] 다가 폐렴구균 접합체 백신의 제형화

[0312] 13가지 접합체의 최종 벌크 농축액은 0.85% 염화나트륨을 함유한다. 3, 6A, 7F 및 19A형 벌크 농축액은 또한 5mM 나트륨 석시네이트 완충액(pH 5.8)을 함유한다. 배치 용적(batch volume) 및 벌크 당류 농도를 기준으로 하여 벌크 농축액의 필요량을 계산하였다. 0.85% 염화나트륨(생리 식염수)의 80% 및 필요량의 석시네이트 완충액을 미리 라벨링한 제형화 용기에 첨가한 후에, 벌크 농축액을 첨가하였다. 이어서, 밀리포어 듀라포어(Millipore Durapore) 막필터 장치를 사용함으로써 상기 제제를 0.22 μ m 막을 통해서 두번째 용기 내로 멸균 여과시켰다. 남아있는 20%의 0.85% 염화나트륨을 사용하여 첫번째 용기를 세척하고 동일한 필터를 통해서 용액을 통과시켜 두번째 용기 속에 수집하였다. 벌크 알루미늄 포스페이트의 첨가 중 및 후에 제형화된 벌크액을 서서히 혼합하였다. pH를 체크하고 필요한 경우에 조절하였다. 제형화된 벌크 제품을 2 내지 8℃에서 저장하였다.

[0313] 제형화된 벌크 제품을 판매원[Becton Dickinson]으로부터 구입한 1형 보로실리케이트 유리 주사기 속에 충전하였다. 일정한 간격으로 백신의 탁도를 모니터링하여 충전 작업의 균일성을 확실하게 하였다. 충전된 백신(최종 제품)을 2 내지 8℃에서 저장하였다.

[0314] 실시예 16

[0315] 13가 접합체 백신의 면역원성

[0316] 현재까지, 래빗에서 13vPnC 백신에 대한 전임상 연구가 수행되었다. 연구 #HT01-0021 및 #HT01-0036은, 에스.

뉴모니아 유래의 협막 다당류(PS)를 CRM₁₉₇에 화학적으로 접합시키는 것의 효과 및 알루미늄 포스페이트(AlPO₄) 애쥬번트가 래빗에서 13vPnC 백신에 대한 면역 반응에 미치는 효과를, 독립적으로 조사하기 위하여 계획되었다. 이러한 효과를, 혈청 IgG 농도의 경우 항원-특이적 ELISA에 의해서, 그리고 항체 기능의 경우 오프소노파고시토시스 분석(OPA)에 의해서 특성화시켰다.

[0317] 연구 #HT01-0021

[0318] 연구 #HT01-0021에서는 AlPO₄ 애쥬번트를 함유하는 13vPnC 백신이 백신 혈청형-특이적 면역 반응을 유도하는 능력을 조사하였다. 13vPnC 백신에 나타난 페렴구균 혈청형에는 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F 형이 포함된다. 2차 목적에는 항체 반응의 반응속도론(kinetics) 및 지속기간의 평가가 포함되었다. AlPO₄ (100 μ g/용량)의 존재 또는 부재하에 제형화된 각 다당류의 계획된 사람 임상 용량(각 PS 2 μ g, 예외: 6B 4 μ g)을 사용하여 0주차 및 2주차에 뉴질랜드 화이트(New Zealand White) 래빗의 근육내로 면역접종시켰다. 여러 시점에 혈청을 채취하였다. ELISA에 의해서 혈청형 특이적 IgG를 측정하고 OPA에 의해서 기능 활성을 평가하였다.

[0319] 표 3에는, 13vPnC 백신을 2회 투여한 후, 풀링된(pooled) 혈청 샘플에서 측정된 기하 평균 역가(GMT; Geometric Mean Titer)가 제시되어 있다. IgG GMT의 비를 사용하여 4주차 때의 반응을 0주차에 대하여 비교하였다. 이 데이터는, AlPO₄를 13vPnC 제형에 포함시키면 애쥬번트를 함유하지 않는 동일한 백신과 비교하여 더 높은 수준의 IgG 항체가 유도된다는 것을 증명한다. 제형에 AlPO₄가 포함된 경우에 항체 반응이 더 컸지만, 통계적으로 유의하게 증가하지는 않았다.

[0320] 두가지 13vPnC 제형을 사용하여 면역접종시킨 후에, 기능적 항체 반응을 또한 래빗에서 평가하였다(표 4). 애쥬번트가 존재 또는 부재하는 백신 제형을 비교하였을 때, 13vPnC + AlPO₄ 백신 처리 그룹에서 더 높은 OPA GMT가 관찰되었다. 두 그룹에서 모든 백신 혈청형에 대해 4주차 혈청 풀(serum pool)에서 OPA 역가가 검출되었다. 대부분의 혈청형의 경우, 4주차 때 측정된 OPA 역가가 0주차(기저선)보다 적어도 4배 더 높았다.

[0321] 각각의 13vPnC 백신 혈청형에 대한 속도론적 반응을 두 처리 그룹의 혈청 풀로부터 평가하였다. 0주차 및 1, 2, 3, 4, 8, 12, 26 및 39주차에 채취된 혈액으로부터 각 혈청형에 대한 IgG 역가를 측정한 다음, 비교하였다. 혈청형 1을 제외하고, 애쥬번트가 함유된 백신을 투여받은 동물에서의 항체 반응은, 애쥬번트가 함유되지 않은 백신을 투여받은 동물에서보다 더 높았고, 면역접종 계획의 2주차에 피크에 도달했다(데이터는 제시하지 않음).

[0322] 전체적으로, 상기 데이터는, 알루미늄 포스페이트와 함께 제형화된 13vPnC 백신이 래빗에서 면역원성이고, 백신에 함유된 페렴구균 협막 다당류에 대해 실질적인 항체 반응을 유도하며, 이러한 반응이 기능 활성과 관련되어 있음을 나타낸다. 13vPnC + AlPO₄를 사용하여 면역접종시킨 후 7개의 핵심 혈청형에 대해 관찰된 반응은, 7가 제형에 대한 래빗의 과거 반응과 일치한다.

표 3

13가 페렴구 당접합체를 2회 투여하여 면역화시킨 후 래빗 IgG 면역 반응 (GMT)

혈청형	ALPO ₄ 가 있는 회색액 ^a				13vPnC ^a				13vPnC + ALPO ₄ ^a			
	0주차	4주차	비 4주차:0주차	0주차	4주차 (95% 신뢰구간)	비 4주차:0주차	0주차	4주차 (95% 신뢰구간)	4주차 (95% 신뢰구간)	비 4주차:0주차	0주차	4주차
1	<100	<100	1.0	50	5,928 (2,758-12,733)	119	50	11,091 (5,327-23,093)		222		
3	<100	<100	1.0	50	6,647 (2,773-15,932)	133	58	16,443 (7,096-38,106)		284		
4	<100	<100	1.0	50	13,554 (8,031-22,875)	271	50	29,183 (15,342-55,508)		584		
5	134	<100	0.4	50	5,859 (2,450-14,009)	117	50	16,714 (6,959-40,140)		334		
6A	141	<100	0.4	74	22,415 (11,987-41,914)	303	83	63,734 (21,141-192,146)		768		
6B	<100	<100	1.0	57	8,108 (3,564-18,444)	142	54	23,505 (11,286-48,955)		435		
7F	3,859	579	0.2	171	43,591 (26,931-70,557)	444	143	84,888 (46,445-155,151)		496		
9V	289	995	3.4	205	15,780 (7,193-34,616)	125	208	43,331 ^b (23,256-71,510)		217		
14	437	177	0.4	61	6,906 (3,416-13,962)	113	70	16,076 (9,649-26,785)		322		
18C	<100	<100	1.0	50	21,283 (15,770-28,725)	426	50	35,040 (24,708-49,892)		701		
19A	<100	<100	1.0	121	113,599 (54,518-236,707)	939	144	280,976 (119,587-660,167)		1,951		
19F	<100	<100	1.0	50	14,365 (7,346-28,090)	287	50	24,912 (9,243-67,141)		498		
23F	<100	<100	1.0	50	5,323 (1,894-14,962)	106	50	15,041 (4,711-48,018)		301		

a: 그룹 내의 각 개개의 래빗으로부터 얻은 동량의 혈청으로 이루어진 풀링된 혈청의 GMT
b: ALPO₄가 없는 처리 그룹과 통계적으로 차이가 있음 (p=0.222)

표 4

13가 페렴구 당접합체를 2회 투여하여 면역화시킨 후
NZW 래빗 혈청 풀에 대한 에스.뉴모니에 OPA GMT

혈청형	13vPnC ^a			13vPnC + ALPO ₄ ^a		
	0주차	비 4주차:0주차	4주차	0주차	비 4주차:0주차	4주차
1	>8	64	16	>8	64	16
3	>8	8	2	>8	16	4
4	>8	16	4	>8	32	8
5	>8	128	32	>8	512	128
6A	8	128	16	8	512	64
6B	>8	256	64	8	1,024	128
7F	8	64	8	8	128	16
9V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18C	8	256	32	>8	256	64
19A	>8	256	64	>8	1,024	256
19F	>8	128	32	>8	512	128
23F	8	64	8	>8	256	64

A: 처리 그룹 내의 각 개개의 래빗으로부터 얻은 동량의 혈청으로 이루어진 풀 (n=12)

- [0326] 연구 #HT01-0036에서는, CRM₁₉₇ 단백질에 접합시키거나 접합시키지 않은 13vPnC 백신을 사용하여 면역접종시킨 후에, 백신에 함유된 다당류(PS)에 대한 래빗의 면역 반응을 비교하였다. 2.2 μ g의 각 PS의 용량(예외: 4.4 μ g의 6B)을 사용하여 0주차 및 2주차에 뉴질랜드 화이트 래빗의 근육내로 면역접종시켰다. 다음의 세가지 백신 제제 중 하나를 동물에 투여하였다: (a) 13vPnC (PS가 CRM₁₉₇에 직접 접합됨), (b) 13vPnP (유리 PS) 또는 (c) 13vPnP + CRM₁₉₇ (유리 PS를 CRM₁₉₇과 혼합함). 모든 백신 제제에는 애췌번트로서 AlPO₄가 125 μ g/용량으로 함유되었다.
- [0327] 모든 백신 제제에 대한 혈청형 특이적 면역 반응을 IgG ELISA 및 기능적 항체를 측정하는 보체-매개 OPA로 평가하였다. 처리 그룹 간에 면역 반응을 비교하였다.
- [0328] 표 5는 4주차 혈액을 항원 특이적 IgG ELISA로 분석하여 얻은 GMT 데이터를 나타낸다. 추가적인 분석은 0주차에 대한 4주차에서의 GMT 값의 비를 보여준다. 상기 데이터는, 접합체 백신 제제가 유리 PS 또는 유리 PS + CRM₁₉₇ 백신보다 더 높은 혈청 IgG 역가를 유도하였음을 나타낸다. 에스. 뉴모니아 14형을 제외하고, 13vPnC 백신은 OPA에서 에스. 뉴모니아의 대표적인 균주에 대해 기능적 항체를 유도할 수 있었다 (표 6). 13vPnP 또는 13vPnP + CRM₁₉₇ 백신을 사용하여 2회 면역접종시킨 후, 측정된 13가지 혈청형 중 10가지 혈청형의 경우, 어느 것도 0주차와 비교하여 4주차 때 8배 이상의 OPA 역가를 유도하지 못했다 (표 6).
- [0329] 결론적으로, 이러한 결과는, 13가 폐렴구균 백신 다당류를 접합시키면, 유리 다당류를 단독으로 사용하거나 비접합 CRM₁₉₇과 혼합시켰을 때보다 혈청 IgG 역가가 더 높아지고 전반적으로 기능적 항체 활성이 더 커진다는 것을 나타낸다.

표 5

혈청형	0주차	13vPnPS (유리 PS)		비	0주차	13vPnPS + CRM ₁₉₇ (PS를 CRM ₁₉₇ 과 혼합함)		비	0주차	13vPnC		비
		4주차	(95% 신뢰구간)			4주차	(95% 신뢰구간)			4주차	(95% 신뢰구간)	
		4주차:0주차				4주차:0주차				4주차:0주차		
1	378	2,290	(843-5,790)	5.8	395	1,959	(809-4,739)	5.0	472	35,970	(29,130-44,417)	76.2
3	57	240	(84-908)	4.2	89	163	(74-358)	1.8	50	10,414	(10,414-16,676)	208.3
4	50	379	(150-959)	7.6	50	607	(313-1,178)	12.1	50	12,890	(9,117-18,224)	257.8
5	343	226	(113-450)	4.5	50	321	(147-701)	6.4	50	35,264	(24,467-50,824)	705.3
6A	154	486	(316-688)	3.0	98	210	(95-464)	2.1	163	234,245	(167,152-328,283)	1,437.1
6B	63	727	(384-1,375)	11.6	62	745	(384-1,440)	12.0	131	33,599	(22,934-49,222)	256.5
7F	50	61	(39-95)	1.2	50	72	(47-111)	1.4	50	35,702	(24,350-52,347)	714.0
9V	50	104	(48-195)	2.1	55	169	(74-390)	3.0	50	50,033	(34,765-72,007)	1,000.7
14	66	298	(117-757)	4.5	50	195	(71-535)	3.9	50	20,121	(12,087-32,138)	402.4
18C	89	1,555	(655-3,886)	17.5	66	761	(300-1,935)	11.5	101	71,451	(32,745-124,641)	707.4
19A	50	89	(44-179)	1.8	50	80	(39-163)	1.6	50	23,485	(12,857-42,723)	469.7
19F	61	1,362	(559-3,317)	22.3	61	991	(370-2,654)	16.3	67	19,358	(12,553-33,173)	288.9
23F	73	1,085	(487-2,420)	14.9	121	638	(311-1,311)	5.3	68	45,972	(25,134-84,089)	676.1

13가 폐렴구균 당접합체를 2회 투여하여 면역화시킨 후 ELISA에 의해 측정된 PnPS에 대한 래빗 IgG 반응 (GMT)

표 6

13가 폐렴구균 백신을 2회 투여하여 면역화시킨 후 래빗 혈청 풀에 대한 에스.뉴모니에 OPA 역가

혈청형	OPA 역가					
	미처리군		13vPnPS (유리 PS)		13vPnPS + CRM ₁₉₇ (유리 PS를 CRM ₁₉₇ 과 혼합함)	
	0주차	4주차	비	4주차	비	4주차
1	4	16	4	16	4	8
3	4	4	1	4	1	8
4	4	4	1	4	1	64
5	4	32	8	16	4	64
6A	8	64	8	32	4	664
6B	8	64	8	32	4	32
7F	16	32	2	16	1	16
9V	16	16	1	32	2	8
14	16	16	1	16	1	2
18C	4	16	4	16	4	64
19A	8	8	1	8	1	64
19F	4	4	1	4	1	64
23F	16	32	2	16	1	32

a: 모든 그룹에 대한 0주차 값으로서 사용됨

- [0332] 실시예 17
- [0333] **혈청형 1 폐렴구균 당류- CRM₁₉₇ 접합체에 대한 대안적 방법**
- [0334] 정제된 다당류의 용기를 해동시키고 반응 용기 중에서 배합하였다. 상기 용기에 50℃에서 3시간 동안 부분적 탈-O-아세틸화(가수분해)를 위해 30M 중탄산나트륨/탄산나트륨 완충액(pH 9.0)을 첨가하였다. 약 40몰%까지 탈-O-아세틸화시켰다. 반응물을 20℃까지 냉각시키고, 0.2 M 아세트산을 이용하여 pH 5.0 내지 7.0까지 중화시켰다. 과요오드산나트륨의 존재하에 2 내지 8℃에서 항온처리하여 부분적 산화를 수행하고, 혼합물을 15 내지 21 시간 동안 교반하였다.
- [0335] 반응 혼합물을 30K MWCO 재생 셀룰로오즈 막을 사용하여 10 x 용적의 WFI에 대해 투석여과하여 정제하였다. 정제된 활성화된 다당류를 2:1의 다당류/단백질 비율에서 CRM₁₉₇과 혼합하고, -75℃에서 셀-냉동시키고 공동-동결 건조시켰다. 공동-동결건조 후에, 다당류/CRM₁₉₇ 혼합물을 접합시킬 때까지 -25℃ ±5℃에서 저장하였다. 상기 공동-동결건조된 다당류/CRM₁₉₇ 혼합물에 1 M 나트륨 인산염 완충액을 최종 0.2M 이온강도 및 pH 7.5까지 첨가한 다음, 시안화수소화붕소나트륨을 첨가하였다. 반응물을 23℃에서 15 내지 21시간 동안 항온처리한 다음, 37℃에서 66 내지 78시간 동안 2차 항온처리하였다. 시안화수소화붕소 항온처리 후에, 반응 혼합물을 차가운 식염수로 희석시킨 다음, 1M 탄산나트륨을 첨가하여 반응 혼합물을 pH 9.0까지 조정하였다. 수소화붕소나트륨을 첨가하여 23℃에서 3 내지 6시간 동안 항온처리함으로써 미반응된 알데히드를 소거시켰다.
- [0336] 반응 혼합물을 식염수로 2배 희석시키고 0.45 내지 5 μ m 예비필터를 통해 잔류액 용기로 옮긴 다음, 0.15 M 인산염 완충액(pH 6.0)으로 30배 투석여과하고 0.9% 식염수로 20배 투석여과하였다. 보유물을 0.2 μ m 필터를 통해 여과하였다. 접합체 용액을 식염수에 0.5 mg/mL의 목표치까지 희석시키고, 클래스 100 후드에서 최종 벌크 농축물 용기 내로 멸균 여과하였다. 접합체를 2 내지 8℃에서 저장하였다.
- [0337] 접합체의 특성규명에 대해서는 실시예 2를 참조.
- [0338] 전술한 논의 및 실시예는 단지 특정 양태의 상세한 설명을 나타낸다는 것을 이해해야 한다. 그러므로, 본 발명의 취지 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변형물 및 균등물이 가능하다는 것이 당업자에게는 명백할 것이다.
- [0339] 본 특허 출원에서 확인한 모든 저널 논문, 다른 참조문헌, 특허 및 특허 출원은 그 전문이 참조로서 인용된다.

[0340]

참조문헌

1. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:100-21.
2. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:122-40.
3. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *New Engl J Med* 2003; 348(18):1737-46.
4. Black S, Shinefield H, Hansen J, et al. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:1105-7.
5. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001; 285:1729-35.
6. Butler J, Breiman R, Lipman H, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994. *J Infect Dis* 1995; 171:885-9.
7. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.
8. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* 1995; 333:481-6.

[0341]

9. Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Hausdorff WP, Jacobs MR. Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis media. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1489-94.
10. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:187-95.
11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. *J Infect Dis* 2000; 182:490-6.
12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: implications for vaccine strategies. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:503-10.
13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland. *J. Paediatr Child Health* 2001; 37:571-5.
14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. *Clin Infect Dis* 1998; 26:1355-61.
15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001; 357:950-52.
16. Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:499-504.

[0342]

17. Byington C, Spencer L, Johnson T, et al. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. *Clin Infect Dis* 2002; 34:434-40.
18. Tan T, Mason E, Wald E, et al. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* 2002; 110:1-6.
19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, et al. Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:859-65.
20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, et al. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:1008-16.
21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis* 1983; 148:1136-59.
22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaci M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1997; 176:698-703.
23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. *J Infect Dis* 1999; 180:1569-76.
24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines, in infants. *J Infect Dis* 2001; 184:789-93.
25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty H. Immune response to cross-reacting pneumococcal serotypes 6A/6B and 19A/19F in the FinOM vaccine trial, Third World of Congress of Pediatric Infectious Diseases, Santiago, Chile, November 19-23, 2003.

[0343]

26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB. Antibody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 19A administered singly and in combination. *Infect Immun* 1982; 36:1261-2.
27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27.
28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfsson G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60.
29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003; 71:2956-9.
30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349:1341-8.
31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, et al. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362:355-61.
32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344:403-9.
33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Abst G-1079, ICAAC, Chicago, IL, 2003.

[0344]

[0345]

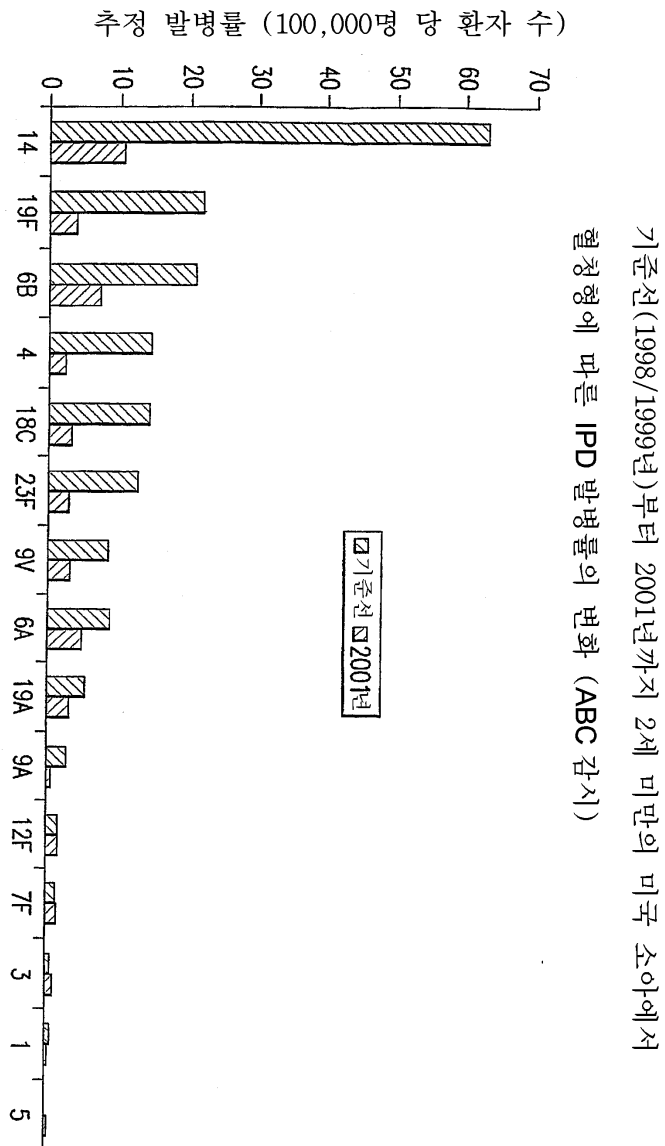
34. 미국특허 제4,673,574호

[0346]

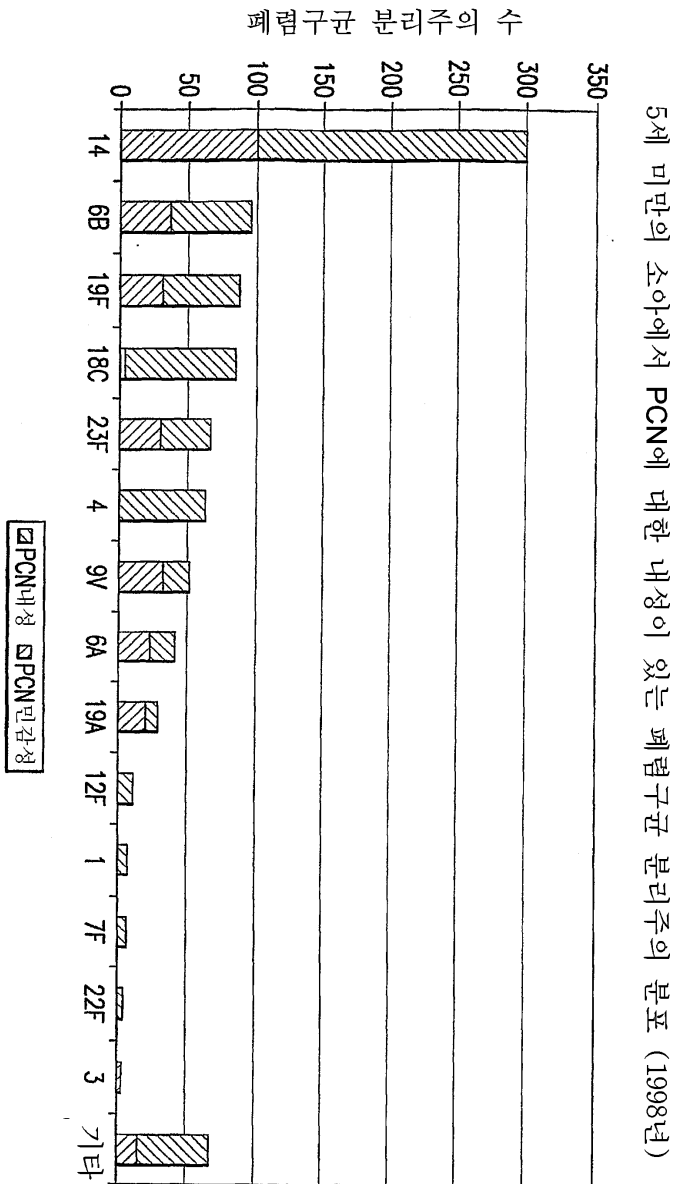
35. 미국특허 제4,902,506호

도면

도면1



도면2



도면3

제조 규모량의 프레브나®를 투여받은 D118-P16 프레브나 시험
코호트로부터 얻은 3차 투여 후 OPA의 RCDC (n=98)

