

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0121330
(43) 공개일자 2019년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/385 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/116 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/385 (2013.01)
A61K 39/092 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7027396

(22) 출원일자(국제) 2018년02월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2019년09월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/018729

(87) 국제공개번호 WO 2018/156491

국제공개일자 2018년08월30일

(30) 우선권주장

62/463,216 2017년02월24일 미국(US)

62/555,444 2017년09월07일 미국(US)

(71) 출원인

머크 샤프 앤드 돔 코퍼레이션

미국 뉴저지 (우편번호 07065-0907) 라웨이 이스
트 링컨 애비뉴 126

(72) 발명자

허, 지엔

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

맥네어, 존, 이.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장덕순, 심미성

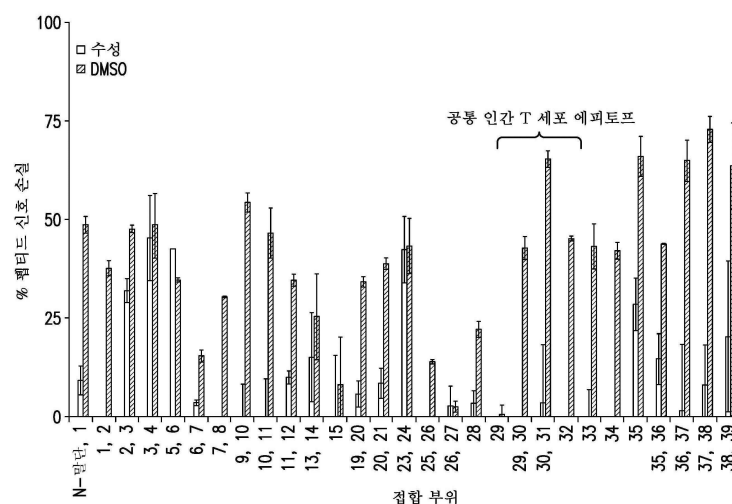
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 폴리사카라이드-단백질 접합체의 면역원성의 증진

(57) 요약

본 발명은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 박테리아 피막으로부의 1종 이상의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매, 예컨대 디메틸설폭시드 (DMSO)에서 담체 단백질에 접합된 것인 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 갖는 면역원성 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 DMSO 조건에서 제조된 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 폐렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신에 대한 증진된 면역 반응을 제공하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/116 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61K 2039/6037 (2013.01)

A61K 2039/62 (2013.01)

(72) 발명자

스미스, 윌리엄, 제이.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

원터스, 마이클, 에이.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

조이스, 조셉, 지.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

아베이구나와르다나, 치트라난다

미국 19454 펜실베이니아주 노스 웨일스 엔. 섬니타운
파이크 351

뮤제이, 루위

미국 19454 펜실베이니아주 노스 웨일스 엔. 섬니타운
파이크 351

푸자르, 하리

미국 19312 펜실베이니아주 버윌 도랄 서클 527

스키너, 줄리, 엠.

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

웬, 에밀리

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

맥휴, 패트릭

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

윌리엄스, 존 마이클

미국 08844 뉴저지주 힐스버러 맥매너스 드라이브
8

란캐스터, 캐서린

미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770

명세서

청구범위

청구항 1

담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*) 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 조성물이며, 여기서 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 비양성자성 용매에서 이루어진 것인 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 11A, 12F 및 14 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된 것인 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 2, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 15A, 15C, 16F, 17F, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된 것인 면역원성 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 3 및 18C 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된 것인 면역원성 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된 것인 면역원성 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된 것인 면역원성 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 접합 반응이 환원성 아미노화인 면역원성 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 비양성자성 용매가 디메틸설폭사이드(DMSO)인 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇인 면역원성 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, DMSO에서 제조된 접합체가 5.0 초과의 리신 손실 값을 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, DMSO에서 제조된 접합체가 7.0 내지 18.0의 리신 손실 값을 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 10A,

15B, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드를 추가로 포함하며, 여기서 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 비양성자성 용매에서 이루어진 것인 면역원성 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 접합 반응이 환원성 아미노화인 면역원성 조성물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 비양성자성 용매가 DMSO인 면역원성 조성물.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇인 면역원성 조성물.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드를 포함하며, 여기서 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 또는 23F로부터의 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 비양성자성 용매에서 이루어진 것인 면역원성 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드를 추가로 포함하며, 여기서 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35B, 35F 또는 38로부터의 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 수성 용매에서 이루어진 것인 면역원성 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 35 내지 100%의 혈청형이 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체가 수성 조건 하에 제조된 것인 면역원성 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, CRM₁₉₇ 폴리사카라이드에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 폴리사카라이드로 본질적으로 이루어지고 약 0.2% w/v의 PS-20을 추가로 포함하며, 여기서 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F에 대한 접합 반응은 비양성자성 용매에서 이루어지고, 비양성자성 용매는 DMSO이고, 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F에 대한 접합 반응은 수성 용매에서 이루어진 것인 면역원성 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 보호 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 대상체가 50세 이상인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 대상체가 면역손상된 대상체인 방법.

청구항 23

1종 이상의 담체 단백질에 접합된 2종 이상의 페렴구균 혈청형의 제1 세트로부터의 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 동물 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 제1 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 2종 이상은 디메틸설폭시드 (DMSO) 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 것인, 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신에 대한 증진된 면역 반응을 제공하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 면역원성 조성물이 1종 이상의 담체 단백질에 접합된 2종 이상의 페렴구균 혈청형의 제2 세트로부터의 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 추가로 포함하며, 여기서 제2 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 2종 이상은 수성 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 제2 세트로부터의 혈청형은 제1 세트에서의 혈청형과 상이한 것인 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 페렴구균 혈청형이 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 33F, 34, 35B, 35F 및 38로부터 선택된 것인 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청형 3 또는 18C로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체가 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 것인 방법.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 페렴구균 혈청형의 제1 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체가 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 선택된 것인 방법.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체가 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 혈청형의 제2 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체가 수성 조건 하에 제조된 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 면역원성 조성물이 CRM₁₉₇ 폴리사카라이드에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 폴리사카라이드로 본질적으로 이루어지며, 여기서 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건 하에 제조된 것인 방법.

청구항 30

제23항에 있어서, 면역원성 조성물 중 35 내지 100%의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체가 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체가 수성 조건 하에 제조된 것인 방법.

청구항 31

제23항에 있어서, 45 내지 60%의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체가 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체가 수성 조건 하에 제조된 것인 방법.

청구항 32

제23항에 있어서, 60 내지 100%의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체가 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체가 수성 조건 하에 제조된 것인 방법.

청구항 33

제23항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질이 외막 단백질 복합체 (OMPC), 과산화물 독소이드, 디프테리아 독소이드, 단백질 D 및 CRM₁₉₇로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇인 방법.

청구항 35

제23항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 접합체가 5.0 초과의 리신 손실 값을 갖는 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 접합체가 7.0 내지 18의 리신 손실 값을 갖는 것인 방법.

청구항 37

제23항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증진된 면역 반응이 기하 평균 역가에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 38

제23항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 혈청형에 대한 증진된 면역 반응이 수성 조건 하에 제조된 동일한 폐렴구균 혈청형으로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체와 비교하여 10% 이상 더 큰 것인 방법.

청구항 39

제23항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 동물 대상체가 50세 이상의 인간 대상체인 방법.

청구항 40

제23항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 동물 대상체가 2세 이하의 인간 대상체인 방법.

청구항 41

제23항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 동물 대상체가 면역손상된 인간인 방법.

청구항 42

제23항에 있어서, 증진된 면역 반응이, 제1 세트로부터의 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체가 수성 조건에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 것인 면역원성 조성물을 투여한 대조군 동물에 비교해 측정되는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 대조군 동물이 마우스인 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, 대조군 동물이 인간인 방법.

청구항 45

a) 혈청형 3, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 폴리사카라이드를 소정량의 산화제와 반응시켜 0.05 내지 0.22의 활성화 수준을 갖는 활성화된 폴리사카라이드를 형성하는 단계; 및

b) 활성화된 폴리사카라이드를 비양성자성 용매에서 담체 단백질과 반응시켜 폴리사카라이드-단백질 접합체를 형성하는 단계

를 포함하며, 여기서 생성된 폴리사카라이드-단백질 접합체는 7.0 내지 18.0의 리신 손실 값을 갖는 것인, 환원성 아미노화에 의해 펩티도구균 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 활성화 수준이 0.09 내지 0.22인 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 단계 b)에서의 반응을 환원제의 존재 하에 수행하는 것인 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 담체 단백질이 과산화물 독소이드, 디프테리아 독소이드 및 CRM₁₉₇로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇인 방법.

청구항 50

a) 활성화된 폴리사카라이드를 완료까지 유도체화제와 반응시킴으로써 유도체화하여 유도체화된 폴리사카라이드를 형성하는 단계;

b) 유도체화된 폴리사카라이드를 고성능 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분리하는 단계;

c) 유도체화된 폴리사카라이드의 UV 흡광도를 정량화하는 단계

를 포함하며, 여기서 유도체화제는 티오세미카르바지드, 티오세미카르바지드 구조 유사체, 히드라지드, 히드라진, 세미카르바지드, 세미카르바지드 구조 유사체, 아미노옥시 화합물 또는 방향족 아민으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인,

활성화된 폴리사카라이드에서 알데히드 수준을 결정하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 유도체화제가 티오세미카르바지드인 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 단계 c)에서의 정량화가 유도체 표준물과의 비교에 의한 것인 방법.

청구항 53

제50항에 있어서, 단계 c)에서의 정량화가 미리 결정된 흡광 계수에 대한 측정에 의한 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 비양성자성 용매, 예컨대 디메틸설폭사이드 (DMSO)에서의 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합된 적어도 1종의 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 수행된 환원성 아미노화를 사용하여 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*) 박테리아 피막으로부터의 1종 이상의 폴리사카라이드가 담체 단백질에 접합된 것인 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 갖는 면역원성 조성물의 면역원성을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에는 그람-양성 박테리아이고, 영유아에서 침습성 박테리아 질환 (예컨대 폐렴, 균혈증 및 수막염 및 중이염)의 가장 흔한 원인이다. 폐렴구균은 혈청형 특이성을 부여하는 화학적으로 연결된 폴리사카라이드로 피막화된다. 폐렴구균의 90종 초과와 공지된 혈청형이 존재하며, 피막은 보체로부터 박테리아의 내부 표면을 보호할 뿐만 아니라 그 자체가 약하게 면역원성이기 때문에, 피막은 폐렴구균에 대한 주요 병독성 결정인자이다. 폴리사카라이드는 T-세포 비의존성 항원이어서, T-세포와 상호작용하기 위해 MHC 분자 상에서 제시되거나 프로세싱되지 않을 수 있다. 그러나, 이들은 B 세포 상의 표면 수용체의 가교를 수반하는 대안적 메카니즘을 통해 면역계를 자극할 수 있다.
- [0003] 2세 미만의 유아는 대부분의 폴리사카라이드 백신에 대한 면역 반응을 탑재하지 않고 있으므로, 폴리사카라이드를 단백질 담체에 대한 화학적 접합에 의해 면역원성으로 만들 필요가 있었다. T-세포 비의존성 항원인 폴리사카라이드를 T-세포 의존성 항원인 단백질에 커플링시키는 것은, 폴리사카라이드에 이소형 스위칭, 친화도 성숙 및 기억 유도를 포함한 T 세포 의존성의 특성을 부여한다.
- [0004] 폴리사카라이드를 단백질에 공유 연결시키기 위해 사용된 다수의 접합 반응이 존재한다. 보다 흔히 사용되는 방법 중 3가지는 다음을 포함한다: 1) 반응의 한 성분 상의 알데히드 또는 케톤 기를 다른 성분 상의 아미노 또는 히드라지드 기와 반응시키고, 형성된 C=N 이중 결합을 후속적으로 환원제에 의해 C-N 단일 결합으로 환원시키는 환원성 아미노화; 2) 폴리사카라이드를 시아노젠 브로마이드 (CNBr)에 의해 또는 1-시아노-4-디메틸암모늄 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)에 의해 활성화시켜 시아네이트 기를 히드록실 기에 도입하여, 단백질 성분의 첨가 시에 아미노 또는 히드라지드 기에 대한 공유 결합을 형성시키는 시아닐화 접합; 및 3) 접합 반응의 한 성분 상의 카르복실 기를 활성화시키고, 활성화된 카르보닐 기가 다른 성분 상의 아미노 또는 히드라지드 기와 반응하는 카르보디이미드 반응. 이들 반응은 또한 접합 반응 전에 접합체의 성분을 활성화시키기 위해 빈번하게 사용된다.
- [0005] 환원성 아미노화는 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드를 접합시키기 위해 이용되어 왔다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,192,746, 미국 특허 출원 공개 번호 20170021006 및 국제 특허 출원 공개 번호 W02011/110381 및 W02015/110941을 참조한다. 환원성 아미노화는 다음 2개의 단계를 수반한다: (1) 항원의 산화, 및 (2) 항원 및 담체 단백질의 환원으로 접합체 형성. 환원 단계는 수성 용매 또는 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 W02016/113644를 참조한다.

발명의 내용

- [0006] 본 발명은 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 비양성자성 용매에서 이루어진다. 한 실시양태에서, 동일한 혈청형을 갖는 조성물의 경우, 비양성자성 용매에서 제조된 혈청형 중 1종 이상은 수성 조건 하에 제조된 동일한 1종 이상의 혈청형과 비교할 때 증가된 면역원성을 갖는다.
- [0007] 본 발명은 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터 제조된 폴리사카라이드 단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 폴리사카라이드 단백질 접합체는 비양성자성 용매에서 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다.
- [0008] 본 발명은 또한 비양성자성 용매에서 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 또는 38로부터의 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 단계를 포함하는, 상기 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 방법을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한 비양성자성 용매에서 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 또는 38로부터의 1종 이상의 폴리사카라이드가 담체 단백질에 접합된 것인, 담체 단백질에 접합된 상기 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 조성물을 사용하여 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

- [0010] 특정 실시양태에서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 11A, 12F 및 14 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된다. 특정 실시양태에서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 2, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 15A, 15C, 16F, 17F, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된다.
- [0011] 특정 실시양태에서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 3 및 18C 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, 에스. 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 폴리사카라이드가 비양성자성 용매에서 담체 단백질에 접합된다.
- [0012] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는데 사용되는 접합 반응은 환원성 아미노화이다.
- [0013] 특정 실시양태에서, 비양성자성 용매는 DMSO이다.
- [0014] 특정 실시양태에서, 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0015] 특정 실시양태에서, DMSO에서 제조된 접합체는 5.0 초과의 리신 손실 값을 갖는다. 한 측면에서, DMSO에서 제조된 접합체는 7.0 내지 18.0 범위의 리신 손실 값을 갖는다.
- [0016] 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 10A, 15B, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드를 추가로 포함하며, 여기서 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 비양성자성 용매에서 이루어진다. 이러한 실시양태의 특정 측면에서, 접합 반응은 환원성 아미노화이다. 특정 측면에서, 비양성자성 용매는 DMSO이다. 특정 측면에서, 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 한 측면에서, 면역원성 조성물은 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드를 포함하며, 여기서 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 또는 23F로부터의 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 비양성자성 용매에서 이루어진다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드는 에스. 뉴모니아에 혈청형 18C, 19A, 19F 또는 23F로부터의 것이다.
- [0017] 특정 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 담체 단백질에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 폴리사카라이드를 추가로 포함하며, 여기서 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 또는 38로부터의 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시키는 접합 반응은 수성 용매에서 이루어진다. 한 측면에서, 면역원성 조성물 중 혈청형의 35 내지 100%는 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건 하에 제조된다.
- [0018] 하나의 구체적 실시양태에서, 본 발명은 CRM₁₉₇ 폴리사카라이드에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 폴리사카라이드로 본질적으로 이루어지고 임의로 약 0.2% w/v PS-20을 추가로 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 에스. 뉴모니아에 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F에 대한 접합 반응은 DMSO 조건에서 이루어지고, 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F에 대한 접합 반응은 수성 용매에서 이루어진다.
- [0019] 본 발명은 또한 본 발명의 면역원성 조성물 중 임의의 것을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 보호 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 50세 이상이고/거나 면역손상된 대상체이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 2세 이하이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 면역손상된 대상체이다.
- [0020] 본 발명은 또한 1종 이상의 담체 단백질에 접합된 2종 이상의 폐렴구균 혈청형의 제1 세트로부터의 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 동물 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 제1 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 2종 이상은 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 것인, 폐렴구균 폴리사카라이드 (PnPs) 단백질 접합체 백신에 대한 증진된 면역 반응을 제공하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 증진된 면역 반응은 제1 세트로부터의 2종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 1종 이상이 수성 조건에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 것인 면역원성 조성물을 투여한 대조군 동물에 비교한 것이다. 한 실시양태에서, 대조군 동물은 마우스이다. 또 다른 실시양태에서, 대조군 동물은 인간이다. 특정 실시양태에서, 방법은 수성 조건 하에 환원성 아미노화

를 사용하여 제조된, 1종 이상의 담체 단백질에 접합된 페렴구균 혈청형의 제2 세트로부터의 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드를 포함하는 추가의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 제2 세트로부터의 혈청형은 제1 세트에서의 혈청형과 상이하다.

- [0021] 특정 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 페렴구균 혈청형은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38로부터 선택된다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 혈청형 3 또는 18C로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 페렴구균 혈청형의 제1 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 선택된다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 페렴구균 혈청형의 제1 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함하고, DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되며, 혈청형의 제2 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 수성 조건 하에 제조된다.
- [0025] 하나의 구체적 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건 하에 제조된다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 35 내지 100%의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건 하에 제조된다. 한 측면에서, 45 내지 80%의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건 하에 제조된다. 또 다른 측면에서, 75 내지 100%의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건 하에 제조된다.
- [0027] 특정 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 담체 단백질은 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*) 외막 단백질 복합체 (OMPC), 과산화물 독소이드, 디프테리아 독소이드, 단백질 D 및 CRM₁₉₇로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에서, 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0028] 특정 실시양태에서, 방법은 페렴구균 폴리사카라이드 단백질 접합체 백신을 사용하며, 여기서 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 접합체는 5.0 초과의 단백질 리신 손실 값에 의해 측정된 바와 같이 더 높은 비율의 글리코펩티드 결합이 형성된다. 이러한 실시양태의 한 측면에서, DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 접합체는 7.0 내지 18의 리신 손실 값을 갖는다. 또 다른 측면에서, DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 접합체는 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5 또는 10.0 초과의 리신 손실 값을 갖는다.
- [0029] 또 다른 구체적 실시양태에서, 본 발명은 CRM₁₉₇ 폴리사카라이드에 접합된 에스. 뉴모니아 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 폴리사카라이드로 본질적으로 이루어진 페렴구균 폴리사카라이드 (PnPs) 단백질 접합체 백신에 대한 증진된 면역 반응을 제공하는 방법을 제공하며, 여기서 방법은 페렴구균 혈청형의 제1 세트 및 제2 세트로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 인간 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 혈청형의 제1 세트는 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어지고 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조되고, 혈청형의 제2 세트는 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로 이루어지고 수성 조건 하에 제조된다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법에 의해 생산된 면역원성 조성물로 백신접종된 동물에서의 증진된 면역 반응은 혈청 IgG 또는 흡소인식세포 항체 기하 평균 역가에 의해 측정된다. 한 측면에서, 페렴구균 혈청형에 대한 증진된 면역 반응은 수성 조건 하에 제조된 동일한 페렴구균 혈청형으로부터의 폴리사카라이드-단백질 접합체와 비교하여 10% 이상 더 크다. 한 실시양태에서, 동물은 마우스이다. 또 다른 실시양태에서, 동물은 인간이다.

- [0031] 특정 실시양태에서, 방법은 50세 이상의 인간 대상체에서 사용된다. 특정 실시양태에서, 방법은 2세 이하인 인간 대상체에서 사용된다. 특정 실시양태에서, 방법은 면역손상된 인간 대상체에서 사용된다.
- [0032] 본 발명은 또한
- [0033] a) 혈청형 3, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 폴리스카라이드를 소정량의 산화제 (예를 들어, 퍼아이오데이트)와 반응시켜 0.05 내지 0.22의 활성화 수준을 갖는 활성화된 폴리스카라이드를 형성하는 단계;
- [0034] b) 활성화된 폴리스카라이드를 비양성자성 용매에서, 임의로 환원제의 존재 하에 담체 단백질과 반응시켜 폴리스카라이드-단백질 접합체를 형성하는 단계
- [0035] 를 포함하며, 여기서 접합체는 7.0 내지 18.0의 리신 손실 값을 갖는 것인,
- [0036] 환원성 아미노화에 의해 페렴구균 폴리스카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0037] 특정 실시양태에서, 활성화 수준은 0.09 내지 0.22이다.
- [0038] 특정 실시양태에서, 산화제는 퍼아이오데이트이다.
- [0039] 특정 실시양태에서, 활성화 수준은 폴리스카라이드 상의 알데히드를 티오세미카르바지드로 유도체화함으로써 측정된다.
- [0040] 특정 실시양태에서, 환원제는 시아노보로히드라이드 염, 예컨대 소듐 시아노보로히드라이드이다.
- [0041] 특정 실시양태에서, 담체 단백질은 과산화물 독소이드, 디프테리아 독소이드 및 CRM₁₉₇로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0042] 본 발명은 또한
- [0043] a) 활성화된 폴리스카라이드를 완료 (즉, 반응 플랫폼)까지 유도체화제와 반응시킴으로써 유도체화하여 유도체화된 폴리스카라이드를 형성하는 단계;
- [0044] b) 유도체화된 폴리스카라이드를 고성능 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분리하는 단계 (미반응 유도체화제 및 매트릭스 성분을 제거하기 위함);
- [0045] c) 유도체화된 폴리스카라이드의 UV 흡광도를 정량화하는 단계
- [0046] 를 포함하는, 활성화된 폴리스카라이드에서 알데히드 수준 (즉, 퍼아이오데이트 활성화 수준)을 결정하기 위한 정량적 방법을 제공한다.
- [0047] 유도체화제는 티오세미카르바지드, 티오세미카르바지드 구조 유사체, 히드라지드, 히드라진, 세미카르바지드, 세미카르바지드 구조 유사체, 아미노옥시 화합물 또는 방향족 아민으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0048] 한 실시양태에서, 단계 c)에서의 정량화는 유도체 표준물과의 비교에 의한다. 한 실시양태에서, 단계 c)에서의 정량화는 미리 결정된 흡광 계수에 대한 측정에 의한다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1. 트립신 펩티드 맵핑에 의해 결정된 바와 같은 CRM₁₉₇ 상의 상이한 리신 부위에서의 접합의 정도. 수용액 또는 DMSO에서의 환원성 아미노화에 의해 제조된 혈청형 19A Ps-CRM₁₉₇ 접합체를 트립신에 의해 소화시키고 LC-UV-MS에 의해 분석하였다. CRM₁₉₇ 대조군 샘플과 비교한 펩티드 신호의 손실을 접합 부위에 대해 플롯팅하였다.
- 도 2. 수용액 또는 DMSO에서의 환원성 아미노화에 의해 제조된 혈청형 3 Ps-CRM₁₉₇ 접합체를 비교한 마우스 연구 부분으로부터의 전기화학발광 (ECL) 면역원성 결과. 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 사용하여 제제화된 접합체. 백신접종-전 (Pre) 및 3회 투여-후 (PD3) 결과가 제시된다. APA 단독 대조군에 대한 결과가 또한 제시된다.
- 도 3. 수용액 또는 DMSO에서의 환원성 아미노화에 의해 제조된 혈청형 3 Ps-CRM₁₉₇ 접합체를 비교한 마우스 연구 부분으로부터의 3회 투여-후 오피소닌식세포 활성 (OPA) 결과. 백신접종-전 (면역-전) 및 APA 단독 대조군에

대한 OPA 결과가 또한 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 본 발명은 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하며, 여기서 적어도 1종의 페렴구균 혈청형으로부터의 접합체는 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 본 발명은, 부분적으로, 폴리사카라이드-단백질 접합체의 환원성 아미노화 동안 용매로서 DMSO를 사용하는 것이 수성 조건 하에 제조된 동일한 접합체에 비해 예상밖의 우수한 안정성 및 혈청형에 대한 증진된 면역원성을 가져온다는 발견에 기초한다. 본 발명은 담체 단백질의 표면 상의 리신 잔기의 직접적인 소비를 통해 단백질에 대한 폴리사카라이드의 공유 회합을 증진시키는데 있어서의 DMSO 용매의 이점에 관한 것이다. 시험된 대부분의 혈청형의 경우, 양호한 면역원성을 제공한 "리신 손실" (≥ 7.0)은 수성 완충제에서보다 비양성자성 용매에서의 접합을 통해 더 낮은 폴리사카라이드 활성화 수준 (0.05 내지 0.22)에서 달성될 수 있었다. 증가된 공유 회합은 폴리사카라이드 단백질 접합체의 안정성을 증가시키고 DMSO에서 접합된 특정한 폴리사카라이드 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 직접적인 이익을 갖는다.
- [0051] 임의의 이론에 얽매이지는 않지만, DMSO에서 제조된 당접합체에 의해 관찰된 증진된 면역원성에 대한 하나의 가능한 메카니즘은 탄수화물 (피막 폴리사카라이드)과 담체 단백질의 표면 상의 리신 잔기 사이의 증가된 연결 수를 포함하며, 이는 단백질과 폴리사카라이드 사이에 추가의 부차 지점을 생성하여 펩티드 탄수화물 결합의 안정성을 부여하고 화학적 탈중합 또는 파괴를 상쇄시킨다. 예를 들어, 문헌 [Hsieh, Characterization of Saccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines in Brown F, Corbel M, Griffiths E (eds): Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines. Dev. Biol. Basel, Karger, 2000, vol 103, pp. 93-104]을 참조한다. DMSO 용매에서의 접합 동안 생성되는 증가된 폴리사카라이드-단백질 연결의 추가의 이익은, T-세포에 펩티드-탄수화물을 성공적으로 제시할 추가의 기회가 존재할 수 있다는 것이다. 인간 집단에서의 유전적 가변성이 탄수화물 항원에 접합된 특정 펩티드 서열로의 로딩 또는 그와의 회합의 가변적 능력 및 감수성을 유발함으로써 인해, 담체 단백질 상의 추가의 부차 지점은 APC의 표면에서 성공적인 항원 제시의 가능성을 증가시켜, 달리 T-세포 비의존성 항원에 대한 T-세포 의존성 반응을 가능하게 할 것이다. DMSO 용매에서의 접합에 의해 관찰된 증진된 면역원성의 또 다른 가능한 메카니즘은 유기 용매에서의 CRM₁₉₇의 변성으로 인한 것일 수 있으며, 이는 폴리사카라이드 연결을 위한 추가의 리신을 노출시켜, 상이한 펩티드 에피토프에 대한 T-세포 의존성 반응을 위한 APC의 표면에서의 글리코펩티드 제시의 가능성을 증가시킨다. 문헌 [Avci et al., 2011, Nature Medicine 17: 1602-1610]을 참조한다.
- [0052] 접합체 내의 변성 CRM₁₉₇을 생성하는 유기 용매에서의 접합의 또 다른 이익은 천연 CRM₁₉₇ 에피토프에 대한 항체의 면역학적 간섭이 감소될 수 있다는 것이다. DMSO 용매에서의 접합 동안 생성되는 증가된 폴리사카라이드-단백질 연결의 추가의 이익은 보다 큰 크기의 폴리사카라이드 단백질 접합체가 형성되어 증진된 면역원성을 가져올 수 있다는 것이다. 본 발명의 조성물은 인간 반응을 도출하는데 상당한 이점을 제공하는 것으로 여겨진다.
- [0053] 실시예 5에 제시된 바와 같이, DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 에스. 뉴모니아에 혈청형 3으로부터 제조된 폴리사카라이드 단백질 접합체는 옅소닌식세포 활성화 (OPA)에 의해 측정된 바와 같이 마우스 모델에서 증가된 면역원성 (물에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 동일한 접합체와 비교하여)을 나타냈다. 또한, 실시예 6에 제시된 바와 같이, DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 7종의 혈청형 (및 수성 용매에서 제조된 다른 8종)을 갖는 15가 페렴구균 접합체 백신은, 모든 15종의 혈청형이 수성 용매에서 제조된 상응하는 15가 PCV와 비교하여 DMSO에서 제조된 7종의 혈청형 모두에 대해 인간에서 우수한 면역원성을 나타내는 경향이 있었다 (4종의 혈청형은 통계적 유의성을 가지면서 우수하였다).
- [0054] 실시예 4에 제시된 바와 같이, (CRM₁₉₇ 대조군과 비교하여) 가능한 접합 부위에 대해 혈청형 19A 접합체 내의 CRM₁₉₇ 단백질 상의 리신 위치에 대한 펩티드 신호 감소의 플롯팅은, 이전에 확인된 공통 인간 T-세포 펩티드 에피토프에 위치한 추가의 접합 부위를 드러냈다 (문헌 [Raju et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25:3207-3214, CRM₁₉₇ 서열의 펩티드 411-430 및 펩티드 431-450에 위치함] 참조). 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 또한 1종 이상의 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이며, 여기서 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체 중 적어도 1종은 비양성자성 용매에서 제조되고, 비양성자성 용매에서 제조된 접합체는 수성 용매에서 제조된 동일한 접합체와 비교하여 CRM₁₉₇의 아미노산 411-430 또는 431-450 내의 리신 잔기의 더 큰 접

근성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 또한 1종 이상의 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이며, 여기서 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체 중 적어도 1종은 비양성자성 용매에서 제조되고, 비양성자성 용매에서 제조된 접합체 내의 CRM₁₉₇의 아미노산 411-430 또는 431-450 내의 1개 이상의 리신 잔기는 10% 초과로 접합된다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 비양성자성 용매에서 폴리사카라이드를 CRM₁₉₇에 접합시키는 것을 포함하는, CRM₁₉₇ 내의 리신 잔기, 특히 CRM₁₉₇의 아미노산 411-430 또는 431-450 내의 리신 잔기의 접근성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 실시양태의 특정 측면에서, 비양성자성 용매에서 제조된 접합체 내의 CRM₁₉₇의 아미노산 411-430 또는 431-450 내의 1개 이상의 리신 잔기는 10% 초과로 접합된다. 이들 실시양태에서, 폴리사카라이드는 면역원성 조성물을 제조하는데 적합한 임의의 유기체로부터의 것일 수 있다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드는 엔. 메닌기티데스 또는 에스. 뉴모니아에로부터의 것이다. 폴리사카라이드는 이들 유기체의 임의의 혈청형으로부터의 것일 수 있다.

- [0055] 본원에 사용된 바와 같이, 접합, 예컨대 환원성 아미노화에서 사용된 경우의 용어 "수성 용매" 또는 "수성 조건"은 접합 반응을 위한 용매로서 물을 사용하는 것을 지칭한다. 물은 유기 용매가 존재하지 않는 것을 제외하고 완충제 및 다른 성분을 함유할 수 있다.
- [0056] 본원에 사용된 바와 같이, 접합, 예컨대 환원성 아미노화에서 사용된 경우의 용어 "비양성자성 용매"는 접합 반응을 위한 용매로서 극성 비양성자성 용매 또는 극성 비양성자성 용매의 조합물을 사용하는 것을 지칭한다. 극성 비양성자성 용매의 예는 디메틸설폭사이드 (DMSO), 디메틸포름아미드 (DMF) 및 헥사메틸포스포트리아미드 (HMPA)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비양성자성 용매는, 예를 들어 최대 1%, 2%, 5%, 10% 또는 20%로 존재하는 일부 물을 가질 수 있다.
- [0057] 본원에 사용된 "DMSO 용매" 및 "DMSO 조건"은 상호교환가능하게 사용된다.
- [0058] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 면역원성 조성물과 함께 사용된 경우의 용어 "포함하다"는 임의의 다른 성분 (항원 혼합물에 대해 "로 이루어진"이라는 표현의 제한을 받음), 예컨대 아주반트 및 부형제를 포함함을 지칭한다. 다가 폴리사카라이드-단백질 접합체 혼합물과 함께 사용되는 경우의 용어 "로 이루어진"은 특정한 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 단백질 접합체를 가지며 상이한 혈청형으로부터의 다른 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 단백질 접합체는 갖지 않는 혼합물을 지칭한다.
- [0059] 본원에 사용된 바와 같이, "리신 손실"은 접합 동안 리신 소비를 지칭하고, 접합체 내 리신의 평균 측정량과 출발 단백질 내 리신의 예상량 사이의 차이에 의해 결정된다. 실시예 4는 "리신 손실"을 결정하는 한 방법을 기재한다.
- [0060] 본원에 사용된 용어 "폴리사카라이드"는 "사카라이드", "올리고사카라이드", "폴리사카라이드", "리포사카라이드", "리포-올리고사카라이드 (LOS)", "리포폴리사카라이드 (LPS)", "글리코실레이트", "당접합체" 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 면역학적 및 박테리아 백신 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 항원성 사카라이드 요소 (또는 항원성 단위)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0061] 비양성자성 용매 (예를 들어, DMSO)에서 제조되는 면역원성 조성물 및 수성 조건 하에 제조되는 나머지 폴리사카라이드 단백질 접합체 중 혈청형의 백분율을 지칭하는 경우에, 이는 단순히 비양성자성 용매에서 제조된 혈청형의 수를 조성물 중 혈청형의 총 수로 나눈 것을 지칭하는 것으로 의도된다.
- [0062] 본원에 사용된 모든 범위, 예를 들어 pH, 온도 및 농도는 포괄적인 것으로 의도된다. 예를 들어, 5.0 내지 9.0의 pH 범위는 5.0의 pH 및 9.0의 pH를 포함하는 것으로 의도된다. 유사하게, 4 내지 25℃의 온도 범위는 범위의 외부 한계값, 즉 4℃ 및 25℃를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0063] 폴리사카라이드
- [0064] 본 발명의 방법, 즉 비양성자성 용매에서의 환원성 아미노화에 따라 제조될 수 있는 에스. 뉴모니아 피막 폴리사카라이드는 다음 혈청형을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38. 폴리사카라이드는 올리고사카라이드의 형태로 사용될 수 있다. 이들은 편리하게는 정제된 폴리사카라이드의 단편화 (예를 들어, 가수분해에 의함)에 의해 형성되며, 이후 통상적으로 목적하는 크기의 단편으로의 정제가 이어질 것이다.
- [0065] 특정 실시양태에서, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F,

18C, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상은 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 특정 측면에서, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 11A, 12F 및 14 중 1종 이상으로부터의 페렴구균 폴리사카라이드는 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 특정 측면에서, 혈청형 2, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 15A, 15C, 16F, 17F, 19F, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터의 페렴구균 폴리사카라이드는 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 특정 측면에서, 혈청형 3 또는 18C 중 하나 또는 둘 다로부터의 페렴구균 폴리사카라이드는 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 담체 단백질에 접합된다. 다가 조성물 중 다른 혈청형으로부터의 폴리사카라이드는 비양성자성 용매에서 또는 수성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 접합될 수 있다. 다가 조성물 중 다른 혈청형으로부터의 폴리사카라이드는 비양성자성 용매 또는 수성 용매에서 이루어질 수 있는 다른 화학을 사용하여 또한 접합될 수 있다.

[0066] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에로부터의 피막 폴리사카라이드는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 폴리사카라이드는 박테리아로부터 분리될 수 있고, 공지된 방법 (예를 들어, 유럽 특허 번호 EP497524 및 EP497525 참조); 및 바람직하게는 균질화기를 사용하여 수행되는 미세유동화에 의해 또는 화학적 가수분해에 의해 어느 정도 크기조정될 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 페렴구균 폴리사카라이드 혈청형은 대두-기재 배지에서 성장된다. 이어서, 개별 폴리사카라이드가 원심분리, 침전 및 한외여과를 포함한 표준 단계를 통해 정제된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2008/0286838 및 미국 특허 번호 5,847,112를 참조한다. 폴리사카라이드는 폴리사카라이드 샘플에서의 점도를 감소시키고/거나 접합된 생성물에 대한 여과성을 개선시키기 위해 기계적 또는 화학적 크기조정과 같은 기술을 사용하여 크기조정될 수 있다. 화학적 가수분해는 아세트산을 사용하여 수행될 수 있다. 기계적 크기조정은 고압 균질화 전단을 사용하여 수행될 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 접합 전 정제된 폴리사카라이드는 5 kDa 내지 4,000 kDa의 분자량을 갖는다. 분자량은 다각도 광 산란 검출기 (MALS) 및 굴절률 검출기 (RI)와 조합된 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 계산될 수 있다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 10 kDa 내지 4,000 kDa; 50 kDa 내지 4,000 kDa; 50 kDa 내지 3,000 kDa; 50 kDa 내지 2,000 kDa; 50 kDa 내지 1,500 kDa; 50 kDa 내지 1,000 kDa; 50 kDa 내지 750 kDa; 50 kDa 내지 500 kDa; 100 kDa 내지 4,000 kDa; 100 kDa 내지 3,000 kDa; 100 kDa 내지 2,000 kDa; 100 kDa 내지 1,500 kDa; 100 kDa 내지 1,000 kDa; 100 kDa 내지 750 kDa; 100 kDa 내지 500 kDa; 100 및 400 kDa; 200 kDa 내지 4,000 kDa; 200 kDa 내지 3,000 kDa; 200 kDa 내지 2,000 kDa; 200 kDa 내지 1,500 kDa; 200 kDa 내지 1,000 kDa; 또는 200 kDa 내지 500 kDa의 분자량을 갖는다.

[0068] 정제된 폴리사카라이드는 화학적으로 활성화되어 사카라이드가 담체 단백질과 반응할 수 있도록 만들 수 있다. 정제된 폴리사카라이드는 링커에 연결될 수 있다. 활성화되거나 링커에 연결되면, 각각의 피막 폴리사카라이드는 담체 단백질에 개별적으로 접합되어 당접합체를 형성한다. 폴리사카라이드 접합체는 공지된 커플링 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0069] 폴리사카라이드는 링커에 커플링되어 폴리사카라이드-링커 중간체를 형성할 수 있으며, 여기서 링커의 유리 말단은 에스테르 기이다. 따라서, 링커는 적어도 1개의 말단이 에스테르 기인 것이다. 다른 말단은 폴리사카라이드와 반응하여 폴리사카라이드-링커 중간체를 형성할 수 있도록 선택된다.

[0070] 폴리사카라이드는 폴리사카라이드 내 1급 아민 기를 사용하여 링커에 커플링될 수 있다. 이 경우에, 링커는 전형적으로 두 말단에 에스테르 기를 갖는다. 이는 에스테르 기 중 하나를 폴리사카라이드 내 1급 아민 기와 친핵성 아실 치환에 의해 반응시킴으로써 커플링이 일어나게 한다. 반응은 폴리사카라이드-링커 중간체를 생성하며, 여기서 폴리사카라이드는 아미드 연결을 통해 링커에 커플링된다. 따라서, 링커는 폴리사카라이드 내 1급 아민 기와 반응하기 위한 제1 에스테르 기 및 담체 분자 내 1급 아민 기와 반응하기 위한 제2 에스테르 기를 제공하는 이관능성 링커이다. 전형적인 링커는 아디프산 N-히드록시숙신이미드 디에스테르 (SIDEA)이다.

[0071] 커플링은 또한 간접적으로, 즉 링커에 커플링하기 전에 폴리사카라이드를 유도체화하기 위해 사용되는 추가의 링커와 함께 일어날 수 있다.

[0072] 폴리사카라이드는 폴리사카라이드의 환원 말단에서 카르보닐 기를 사용하여 추가의 링커에 커플링된다. 이 커플링은 다음 2개의 단계를 포함한다: (a1) 카르보닐 기를 추가의 링커와 반응시키는 단계; 및 (a2) 추가의 링커의 유리 말단을 링커와 반응시키는 단계. 이들 실시양태에서, 추가의 링커는 전형적으로 두 말단에 1급 아민 기를 갖고, 이에 의해 1급 아민 기 중 하나를 환원성 아미노화에 의해 폴리사카라이드 내 카르보닐 기와 반응시킴으로써 단계 (a1)이 일어나게 한다. 폴리사카라이드 내 카르보닐 기와 반응성인 1급 아민 기가 사용된다.

히드라지드 또는 히드록실아미노 기가 적합하다. 동일한 1급 아민 기가 전형적으로 추가의 링커의 두 말단에 존재한다. 반응은 폴리스카라이드-추가의 링커 중간체를 생성하며, 여기서 폴리스카라이드는 C-N 연결을 통해 추가의 링커에 커플링된다.

[0073] 폴리스카라이드는 폴리스카라이드 내 상이한 기, 특히 카르복실 기를 사용하여 추가의 링커에 커플링될 수 있다. 이러한 커플링은 다음 2개의 단계를 포함한다: (a1) 기를 추가의 링커와 반응시키는 단계; 및 (a2) 추가의 링커의 유리 말단을 링커와 반응시키는 단계. 이 경우에, 추가의 링커는 전형적으로 두 말단에 1급 아민 기를 갖고, 이에 의해 1급 아민 기 중 하나를 EDAC 활성화에 의해 폴리스카라이드 내 카르복실 기와 반응시킴으로써 단계 (a1)이 일어나게 한다. 폴리스카라이드 내 EDAC-활성화된 카르복실 기와 반응성인 1급 아민 기가 사용된다. 히드라지드 기가 적합하다. 동일한 1급 아민 기가 전형적으로 추가의 링커의 두 말단에 존재한다. 반응은 폴리스카라이드-추가의 링커 중간체를 생성하며, 여기서 폴리스카라이드는 아미드 연결을 통해 추가의 링커에 커플링된다.

[0074] 한 실시양태에서, 폴리스카라이드의 화학적 활성화 및 이후 환원성 아미노화에 의한 담체 단백질에의 접합은 미국 특허 번호 4,365,170, 4,673,574 및 4,902,506, 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0228380, 2007/184072, 2007/0231340 및 2007/0184071, 및 국제 특허 출원 공개 번호 W02006/110381, W02008/079653 및 W02008/143709에 기재된 수단에 의해 달성될 수 있다. 화학은 말단 히드록실 기를 알데히드로 산화시키는 임의의 산화제, 예컨대 퍼아यो데이트 (과아यो딘산나트륨, 과아यो딘산칼륨 또는 과아यो딘산 포함)와의 반응에 의한 페렴구균 폴리스카라이드의 활성화를 수반할 수 있다. 반응은 탄수화물의 이웃자리 히드록실 기의 무작위 산화적 절단과 반응성 알데히드 기의 형성을 유도한다.

[0075] 한 실시양태에서, 폴리스카라이드는 0.01 내지 10.0, 0.05 내지 5.0, 0.1 내지 1.0, 0.5 내지 1.0, 0.7 내지 0.8, 0.05 내지 0.5, 0.1 내지 0.3 몰 당량의 산화제와 반응한다. 한 실시양태에서, 폴리스카라이드는 약 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 몰 당량의 산화제와 반응한다. 제한된 폴리스카라이드 활성화 (예를 들어, 0.05 내지 0.22 또는 0.09 내지 0.22 몰의 알데히드/폴리스카라이드 반복 단위의 몰)를 달성하기 위해서는, 활성화를 위한 퍼아यो데이트의 보다 적은 양, 예를 들어 0.1 내지 0.3 Meq를 사용하는 것이 일반적으로 바람직하다. 본원에 사용된 "활성화 수준"은 알데히드의 몰/폴리스카라이드 반복 단위의 몰을 지칭한다. 보다 적은 폴리스카라이드 활성화는 보다 천연에 유사한 폴리스카라이드를 생성하며, 즉 보다 적은 히드록실 기가 알데히드로 전환된다.

[0076] 또 다른 실시양태에서, 산화 반응의 지속시간은 1시간 내지 50시간, 10시간 내지 30시간, 15시간 내지 20시간, 15시간 내지 17시간 또는 약 16시간이다.

[0077] 또 다른 실시양태에서, 산화 반응의 온도는 15°C 내지 45°C, 15°C 내지 30°C, 20°C 내지 25°C에서 유지된다. 또 다른 실시양태에서, 반응의 온도는 약 23°C에서 유지된다.

[0078] 담체 단백질에 대한 커플링은 단백질의 리실 기에 대한 직접적 아미노화를 통한 환원성 아미노화에 의한다. 예를 들어, 접합은 활성화된 폴리스카라이드 및 담체 단백질의 혼합물을 니켈의 존재 하에 환원제, 예컨대 소듐시아노보로하이드라이드와 반응시킴으로써 수행된다. 접합 반응은 수용액 하에 또는 디메틸설폭시드 (DMSO)의 존재 하에 일어날 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US2015/0231270 및 US2011/0195086 및 유럽 특허 번호 EP 0471 177 B1을 참조한다. 이어서, 미반응 알데히드는 강한 환원제, 예컨대 수소화붕소나트륨의 첨가에 의해 캡핑된다.

[0079] 환원성 아미노화는 2 단계인, (1) 폴리스카라이드를 산화시켜 반응성 알데히드를 형성하는 단계, 및 (2) 활성화된 폴리스카라이드와 담체 단백질 사이에 형성된 이민 (쉬프 염기)의 환원으로 안정한 아민 접합체 결합을 형성하는 단계를 포함한다. 산화 전에, 폴리스카라이드는 임의로 크기 감소된다. 기계적 방법 (예를 들어, 균질화) 또는 화학적 가수분해가 사용될 수 있다. 화학적 가수분해는 아세트산을 사용하여 수행될 수 있다. 산화 단계는 퍼아यो데이트와의 반응을 포함할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 용어 "퍼아यो데이트"는 퍼아यो데이트 및 과아यो딘산을 둘 다 포함하며; 용어는 또한 메타퍼아यो데이트 (IO_4^-) 및 오르토퍼아यो데이트 (IO_6^-)를 둘 다 포함하고, 퍼아यो데이트의 다양한 염 (예를 들어, 과아यो딘산나트륨, 과아यो딘산칼륨)을 포함한다. 한 실시양태에서, 피막 폴리스카라이드는 메타퍼아यो데이트의 존재 하에, 바람직하게는 과아यो딘산나트륨 (NaIO_4)의 존재 하에 산화된다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리스카라이드는 오르토퍼아यो데이트의 존재 하에, 바람직하게는 과아यो딘산의 존재 하에 산화된다.

- [0080] 한 실시양태에서, 산화제는 1급 히드록실을 선택적으로 산화시키기 위한 산화제의 존재 하의 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물, 예컨대 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물이다 (WO 2014/097099에 기재된 바와 같음). 상기 반응에서, 실제 산화제는 촉매 사이클에서의 N-옥소암모늄 염이다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 피페리딘-N-옥시 또는 피롤리딘-N-옥시 화합물이다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 또는 니트록시드 라디칼 화합물은 TEMPO (2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시) 또는 PROXYL (2,2,5,5-테트라메틸-1-피롤리디닐옥시) 모이어티를 포함한다. 한 측면에서, 상기 안정한 니트록실 라디칼 화합물은 TEMPO 또는 그의 유도체이다. 한 측면에서, 상기 산화제는 N-할로 모이어티를 포함하는 분자이다. 한 측면에서, 상기 산화제는 N-클로로숙신이미드, N-브로모숙신이미드, N-아이오도숙신이미드, 디클로로이소시아누르산, 1,3,5-트리클로로-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디브로모이소시아누르산, 1,3,5-트리브로모-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온, 디아이오도이소시아누르산 및 1,3,5-트리아이오도-1,3,5-트리아지난-2,4,6-트리온으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0081] 특정 측면에서, 산화제는 공산화제로서의 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 자유 라디칼 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)이다 (국제 특허 출원 공개 번호 WO2014/097099에 기재된 바와 같음). 따라서, 한 측면에서, 에스. 뉴모니아에로부터의 당접합체는 a) 사카라이드를 수성 용매에서 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 반응시켜 활성화된 사카라이드를 생성하는 단계; 및 b) 활성화된 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 담체 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득된다 (상기 방법은 이하에서 "TEMPO/NCS-환원성 아미노화"로 명명된다).
- [0082] 임의로, 산화 반응물은 켄칭제의 첨가에 의해 켄칭된다. 켄칭제는 이웃자리 디올, 1,2-아미노알콜, 아미노산, 글루타티온, 술파이트, 비술파이트, 디티오나이트, 메타비술파이트, 티오술파이트, 포스파이트, 하이포포스파이트 또는 아인산 (예컨대 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 프로판-1,2-디올, 부탄-1,2-디올 또는 부탄-2,3-디올, 아스코르브산)으로부터 선택될 수 있다.
- [0083] 접합 방법의 제2 단계는 환원제를 사용하여, 활성화된 폴리사카라이드와 담체 단백질 사이의 이민 (슈프 염기) 결합을 환원시켜 안정한 접합체 결합을 형성하는 것 (소위 환원성 아미노화)이다. 적합한 환원제는 시아노보로히드라이드 (예컨대 소듐 시아노보로히드라이드 또는 수소화붕소나트륨)를 포함한다. 한 실시양태에서, 환원제는 소듐 시아노보로히드라이드이다.
- [0084] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 환원성 아미노화 반응은 비양성자성 용매 (또는 비양성자성 용매의 혼합물)에서 수행된다. 한 실시양태에서, 환원 반응은 DMSO 또는 DMF (디메틸포름아미드) 용매에서 수행된다. DMSO 또는 DMF 용매는 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질이 동결건조된 경우 이를 재구성하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 비양성자성 용매는 DMSO이다.
- [0085] 환원 반응의 종료시에, 접합체에 남아있는 미반응 알데히드 기가 존재할 수 있으며, 이는 적합한 캡핑제를 사용하여 캡핑될 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 캡핑제는 수소화붕소나트륨 (NaBH₄)이다. 적합한 대체물은 브뢴스테드 또는 루이스 산의 존재 하의 소듐 트리아세톡시보로히드라이드 또는 수소화붕소나트륨 또는 수소화붕소아연, 아민 보란, 예컨대 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-디보란-메탄올, 디메틸아민-보란, t-BuMe'PrN-BH₃, 벤질아민-BH₃ 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란 (PEMB) 또는 보로히드라이드 교환 수지를 포함한다. 접합 (환원 반응 및 임의로 캡핑) 후에, 당접합체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술에 의해 정제 (폴리사카라이드-단백질 접합체의 양이 풍부화)될 수 있다. 이들 기술은 투석, 농축/투석여과 작업, 점선 흐름 여과, 침전/용리, 칼럼 크로마토그래피 (이온 교환 크로마토그래피, 다중모드 이온 교환 크로마토그래피, DEAE 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피), 및 침출 여과를 포함한다. 한 실시양태에서, 당접합체는 투석여과 또는 이온 교환 크로마토그래피 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제된다.
- [0086] 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 당접합체는 일반적으로 다가 페럼구균 접합체 백신에서 사용된다. 따라서, 모든 혈청형이 비양성자성 용매에서 제조되지는 않는 다가 조성물에 대한 특정 실시양태에서, 남아있는 혈청형에 대한 환원 반응은 수성 용매 (예를 들어, pH 6.0 내지 8.5, 7.0 내지 8.0, 또는 7.0 내지 7.5에서의 PBS (포스페이트 완충 염수), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술포산), HEPES, (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술포산), 비스-트리스, ADA (N-(2-아세트아미도)이미노디아세트산), PIPES (피페라진-N,N'-비스(2-에탄술포산)), MOPSO (3-모르폴리노-2-히드록시프로판술포산), BES (N,N-비스(2-히드록시에틸)-2-아미노에탄술포산), MOPS (3-(N-모르폴리노)프로판술포산), DIPSO (3-비스(2-히드록시에틸)아미노-2-히드록시프로판-1-술포산), MOBS (4-(N-모르폴리노)부탄술포산), HEPPSO (N-(2-히드록시에틸)피페라진-N-(2-히드록시프로판술포산)), POPSO (피페라진-1,4-비스(2-히드록시-3-프로판술포산)), TEA (트리에탄올아민), EPPS (4-(2-히드록시에

틸)피페라진-1-프로판술포산), 비신 또는 HEPB로부터 선택됨)에서 수행된다.

- [0087] 일부 실시양태에서, 본 발명의 당접합체는 10 kDa 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는 폴리사카라이드를 포함한다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 25 kDa 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 50 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 70 kDa 내지 900 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 200 kDa 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다. 이러한 추가의 실시양태에서, 폴리사카라이드는 100 kDa 내지 1000 kDa; 100 kDa 내지 900 kDa; 100 kDa 내지 800 kDa; 100 kDa 내지 700 kDa; 100 kDa 내지 600 kDa; 100 kDa 내지 500 kDa; 100 kDa 내지 400 kDa; 100 kDa 내지 300 kDa; 150 kDa 내지 1,000 kDa; 150 kDa 내지 900 kDa; 150 kDa 내지 800 kDa; 150 kDa 내지 700 kDa; 150 kDa 내지 600 kDa; 150 kDa 내지 500 kDa; 150 kDa 내지 400 kDa; 150 kDa 내지 300 kDa; 200 kDa 내지 1,000 kDa; 200 kDa 내지 900 kDa; 200 kDa 내지 800 kDa; 200 kDa 내지 700 kDa; 200 kDa 내지 600 kDa; 200 kDa 내지 500 kDa; 200 kDa 내지 400 kDa; 200 kDa 내지 300; 250 kDa 내지 1,000 kDa; 250 kDa 내지 900 kDa; 250 kDa 내지 800 kDa; 250 kDa 내지 700 kDa; 250 kDa 내지 600 kDa; 250 kDa 내지 500 kDa; 250 kDa 내지 400 kDa; 250 kDa 내지 350 kDa; 300 kDa 내지 1,000 kDa; 300 kDa 내지 900 kDa; 300 kDa 내지 800 kDa; 300 kDa 내지 700 kDa; 300 kDa 내지 600 kDa; 300 kDa 내지 500 kDa; 300 kDa 내지 400 kDa; 400 kDa 내지 1,000 kDa; 400 kDa 내지 900 kDa; 400 kDa 내지 800 kDa; 400 kDa 내지 700 kDa; 400 kDa 내지 600 kDa; 500 kDa 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 본 발명의 당접합체는 1,000 kDa 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 1,000 kDa 내지 7,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 이러한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 1,000 kDa 내지 6,000 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0089] 특정 실시양태에서, 접합 반응은 보다 큰 접합 반응 효율을 위해 및 유리 시아나이드 제거를 보조하는데 니켈이 사용되는 환원성 아미노화에 의해 수행된다. 전이 금속은 시아나이드와 안정한 착물을 형성하는 것으로 공지되어 있고, 소듐 시아노보로히드라이드에 의한 단백질 아미노 기 및 포름알데히드의 환원성 메틸화를 개선시키는 것으로 공지되어 있다 (S Gidley et al., *Biochem J.* 1982, 203: 331-334; Jentoft et al. *Anal Biochem.* 1980, 106: 186-190). 니켈의 첨가는, 잔류 역제성 시아나이드와 착물을 형성함으로써, 접합 동안 단백질의 소비를 증가시키고 보다 큰, 잠재적으로 보다 면역원성인 접합체의 형성을 유도한다.
- [0090] 소듐 시아노보로히드라이드 시약 로트에서의 출발 시아나이드 수준의 차이는 또한 일관되지 않은 접합 성능을 유도하여, 가변적인 생성물 속성, 예컨대 접합체 크기 및 접합체 Ps-대-CRM₁₉₇ 비를 생성한다. 니켈의 첨가는 시아나이드의 복합체화에 의해 접합 비일관성을 감소시켜, 소듐 시아노보로히드라이드 로트에서의 차이를 제거한다.
- [0091] 적합한 대안적 화학은 사카라이드를 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스테르를 형성하는 것을 포함한다. 이에 따라 활성화된 사카라이드는 직접적으로 또는 스페이서 (링커) 기를 통해 담체 단백질 상의 아미노 기에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 스페이서는 시스타민 또는 시스테아민이어서 티올화된 폴리사카라이드를 제공할 수 있으며, 이는 말레이미드-활성화된 담체 단백질 (예를 들어 GMBS를 사용함) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질 (예를 들어 아이오도아세트이미드 [예를 들어, 에틸 아이오도아세트이미드 HCl] 또는 N-숙신이미딜 브로모아세테이트 또는 SIAB, 또는 SIA, 또는 SBAP를 사용함)과의 반응 후에 수득된 티오에테르 연결을 통해 담체에 커플링될 수 있다. 예를 들어, 시아네이트 에스테르 (임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)는 헥산 디아민 또는 아디프산 디히드라이드 (ADH)와 커플링되고, 아미노-유도체화된 사카라이드는 단백질 담체 상의 카르복실기를 통해 카르보디이미드 (예를 들어 EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 담체 단백질에 접합된다. 이러한 접합체는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/29094; 및 문헌 [Chu et al., 1983, *Infect. Immunity* 40:245-256]에 기재되어 있다.
- [0092] 다른 적합한 기술은 카르보디이미드, 히드라이드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/42721에 기재되어 있다. 접합은 사카라이드의 유리 히드록실 기와 CDI의 반응에 의해 형성될 수 있는 카르보닐 링커를 포함할 수 있고 (문헌 [Bethell et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:2572-4; Hearn et al., 1981, *J. Chromatogr.* 218:509-18] 참조), 이는 이어서 단백질과 반응하여 카르바메이트 연결을 형성할 수 있다. 이는 아노머 말단의 1급 히드록실 기로의 환원, 1급 히드록실 기의 임의적인 보호/탈보호, 1급 히드록실 기와 CDI와의 반응으로 CDI 카르바메이트 중간체 형성, 및 CDI 카르바메이트 중간체와 단백질 상의 아미노 기와 커플링을 포함할 수 있다.

- [0093] 피막 폴리사카라이드의 담체 단백질에 대한 접합 후, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 다양한 기술 중 1종 이상에 의해 정제 (폴리사카라이드-단백질 접합체의 양이 풍부화)된다. 이들 기술의 예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고, 농축/투석여과 작업, 한외여과, 침전/용리, 칼럼 크로마토그래피, 및 심층 여과를 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,146,902를 참조한다.
- [0094] 본 발명의 당접합체를 특징화하기 위한 또 다른 방식은 사카라이드에 접합되게 된 담체 단백질 (예를 들어, CRM₁₉₇) 내의 리신 잔기의 수에 의하며, 이는 접합된 리신의 범위 (접합 정도)로 특징화될 수 있다. 폴리사카라이드에 대한 공유 연결로 인한 담체 단백질의 리신 변형에 대한 증거는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 상용 방법을 사용하는 아미노산 분석에 의해 수득될 수 있다. 접합은 접합체 물질을 생성하는데 사용된 담체 단백질 출발 물질과 비교하여, 회수된 리신 잔기의 수의 감소를 가져온다. 한 실시양태에서, 본 발명의 당접합체의 접합 정도는 2 내지 18, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 18, 5 내지 13, 7 내지 18, 7, 내지 13, 8 내지 18, 8 내지 13, 10 내지 18 또는 10 내지 13이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 당접합체의 접합 정도는 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14 또는 약 15이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 당접합체의 접합 정도는 7 내지 18이다. 일부 이러한 실시양태에서, 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0095] 본 발명의 당접합체는 또한 담체 단백질에 대한 사카라이드의 비 (중량/중량)에 의해 특징화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 당접합체 내 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드의 비 (w/w)는 0.5 내지 3.0 (예를 들어, 약 0.5, 약 0.6, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 약 2.0, 약 2.1, 약 2.2, 약 2.3, 약 2.4, 약 2.5, 약 2.6, 약 2.7, 약 2.8, 약 2.9, 또는 약 3.0)이다. 다른 실시양태에서, 담체 단백질에 대한 사카라이드 비 (w/w)는 0.5 내지 2.0, 0.5 내지 1.5, 0.8 내지 1.2, 0.5 내지 1.0, 1.0 내지 1.5 또는 1.0 내지 2.0이다. 추가의 실시양태에서, 담체 단백질에 대한 사카라이드 비 (w/w)는 0.8 내지 1.2이다. 한 실시양태에서, 접합체 내 담체 단백질에 대한 피막 폴리사카라이드의 비는 0.9 내지 1.1이다. 일부 이러한 실시양태에서, 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 본 발명의 당접합체 및 면역원성 조성물은 담체 단백질에 공유 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 당접합체 조성물에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 유리 사카라이드는 당접합체와 비-공유 회합될 수 있다 (즉, 그에 비-공유 결합되거나, 그에 흡착되거나, 또는 그 내에 또는 그와 포획될 수 있다).
- [0096] 한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% 또는 15% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 25% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 20% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 한 실시양태에서, 당접합체는 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 15% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다.
- [0097] 다가 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신
- [0098] 다가 페렴구균 면역원성 조성물은 1종 이상의 담체 단백질에 접합된, 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 적어도 1종으로부터 선택된 에스. 뉴모니아에 혈청형으로부터 선택된 피막 폴리사카라이드를 포함할 수 있으며, 여기서 적어도 1종의 혈청형으로부터 선택된 폴리사카라이드는 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 본 발명은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25종의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드를 갖는 다가 페렴구균 면역원성 조성물을 고려한다. 바람직하게는, 특정한 혈청형으로부터의 사카라이드는 1종 초과와 담체 단백질에 접합되지 않는다.
- [0099] 특정 실시양태에서, 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25종의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드는 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다.
- [0100] 특정 실시양태에서, 혈청형 3, 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 또는 23F 중 1종 이상은 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 이러한 실시양태의 특정 측면에서, 혈청형 3 또는 18C 중 하나 또는 둘 다는 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다.

- [0101] 특정 실시양태에서, 다가 조성물 중 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100%의 혈청형은 비양성자성 용매에서 제조된다. 나머지 혈청형은 대안적 화학을 사용하여 및/또는 수성 용매에서 제조된다.
- [0102] 특정 실시양태에서, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 9V, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 16F, 17F, 18C, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상은 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 특정 측면에서, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 11A, 12F 및 14 중 1종 이상은 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 특정 측면에서, 혈청형 2, 6C, 6D, 7B, 7C, 8, 9N, 15A, 15C, 16F, 17F, 19F, 20, 21, 22A, 23A, 23B, 24F, 27, 28A, 31, 34, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상은 비양성자성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다.
- [0103] 한 실시양태에서, 다가 조성물은 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드, 및 수성 용매에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드로 이루어진다.
- [0104] 개별 당접합체가 정제된 후에, 이들은 배합되어 본 발명의 면역원성 조성물로 제제화한다. 이들 페렴구균 접합체는 개별 공정에 의해 제조되고, 단일 투여 제제로 벌크 제제화된다.
- [0105] 담체 단백질
- [0106] 본 발명의 특정한 실시양태에서, CRM₁₉₇은 담체 단백질로서 사용된다. CRM₁₉₇은 디프테리아 독소의 비-독성 변이체 (즉, 독소이드)이다. 한 실시양태에서, 이는 카사미노산 및 효모 추출물-기재 배지에서 성장한 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*) 균주 C7 (β 197)의 배양물로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, CRM₁₉₇은 미국 특허 번호 5,614,382에 기재된 방법에 따라 재조합적으로 제조된다. 전형적으로, CRM₁₉₇은 한외여과, 황산암모늄 침전 및 이온-교환 크로마토그래피의 조합을 통해 정제된다. 일부 실시양태에서, CRM₁₉₇은 페넥스 발현 기술(Pfenex Expression Technology)TM (페넥스 인크.(Pfenex Inc.), 캘리포니아주 샌디에고)을 사용하여 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)에서 제조된다.
- [0107] 다른 적합한 담체 단백질은 추가의 불활성화된 박테리아 독소, 예컨대 DT (디프테리아 독소이드) 또는 DT의 단편 B (DTFB), TT (파상풍 독소이드) 또는 TT의 단편 C, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드 (예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2004/083251에 기재된 바와 같음), 이. 콜라이 LT, 이. 콜이라 ST, 및 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A를 포함한다. 박테리아 외막 단백질, 예컨대 외막 복합체 c (OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 페렴구균 표면 단백질 A (PspA; 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/091998 참조), 페렴구균 어드헤신 단백질 (PsaA), A군 또는 B군 스트렙토코쿠스로부터의 C5a 펩티다제, 또는 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D, 페렴구균 뉴모리신 (Kuo et al., 1995, Infect Immun 63; 2706-13), 예를 들어 일부 방식으로 해독된 ply, 예를 들어 dPLY-GMBS (국제 특허 출원 공개 번호 WO 04/081515 참조) 또는 dPLY-포르몰, PhtX, 예를 들어 PhtA, PhtB, PhtD, PhtE 및 Pht 단백질의 융합체, 예를 들어 PhtDE 융합체, PhtBE 융합체 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 01/98334 및 WO 03/54007 참조)가 또한 사용될 수 있다. 다른 단백질, 예컨대 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 투베르쿨린 (PPD)의 정제된 단백질 유도체, PorB (엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*)로부터의 것), PD (헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D; 예를 들어, 유럽 특허 번호 EP 0 594 610 B 참조), 또는 그의 면역학상 기능적 등가물, 합성 펩티드 (유럽 특허 번호 EP0378881 및 EP0427347 참조), 열 쇼크 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 93/17712 및 WO 94/03208 참조), 백일해 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/58668 및 유럽 특허 번호 EP0471177 참조), 시토카인, 림포카인, 성장 인자 또는 호르몬 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 91/01146 참조), 다양한 병원체 유래 항원으로부터의 다중 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질 (문헌 [Falugi et al., 2001, Eur J Immunol 31:3816-3824] 참조), 예컨대 N19 단백질 (문헌 [Baraldoi et al., 2004, Infect Immun 72:4884-7] 참조), 철 흡수 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 01/72337 참조), 씨. 디피실레(*C. difficile*)의 독소 A 또는 B (국제 특허 공개 번호 WO 00/61761 참조), 및 플라젤린 (문헌 [Ben-Yedidia et al., 1998, Immunol Lett 64:9] 참조)이 또한 담체 단백질로서 사용될 수 있다.
- [0108] 제2 담체 단백질로서 다른 DT 돌연변이체, 예컨대 CRM₁₇₆, CRM₂₂₈, CRM₄₅ (Uchida et al., 1973, J Biol Chem 218:3838-3844); CRM₉, CRM₄₅, CRM₁₀₂, CRM₁₀₃ 및 CRM₁₀₇ 및 문헌 [Nicholls and Youle in Genetically Engineered

Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992]에 기재된 다른 돌연변이; 결실 또는 Glu-148에서 Asp, Gln 또는 Ser로의 돌연변이 및/또는 Ala 158에서 Gly로의 돌연변이 및 미국 특허 번호 4,709,017 또는 미국 특허 번호 4,950,740에 개시된 다른 돌연변이; 적어도 1개 이상의 잔기 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534의 돌연변이 및 미국 특허 번호 5,917,017 또는 미국 특허 번호 6,455,673에 개시된 돌연변이; 또는 미국 특허 번호 5,843,711에 개시된 단편이 사용될 수 있다. 이러한 DT 돌연변이체는 또한 DTFB 변이체를 제조하는데 사용될 수 있으며, 여기서 변이체는 에피토프 영역을 함유하는 B 단편을 포함한다.

[0109] 다가 백신이 사용되는 경우에, 제2 담체는 다가 백신 내 항원 중 1종 이상에 대해 사용될 수 있다. 제2 담체 단백질은 바람직하게는 비-독성 및 비-반응원성이고 충분한 양 및 순도로 수득가능한 단백질이다. 제2 담체 단백질은 또한 항원, 예를 들어 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드와 접합 또는 연결되어 항원의 면역원성을 증진시킨다. 담체 단백질은 표준 접합 절차에 적용가능하여야 한다. 한 실시양태에서, 제1 담체 단백질에 접합되지 않은 각각의 피막 폴리사카라이드는 동일한 제2 담체 단백질에 접합된다 (예를 들어, 각각의 피막 폴리사카라이드 분자는 단일 담체 단백질에 접합된다). 또 다른 실시양태에서, 제1 담체 단백질에 접합되지 않은 피막 폴리사카라이드는 2종 이상의 담체 단백질에 접합된다 (각각의 피막 폴리사카라이드 분자는 단일 담체 단백질에 접합된다). 이러한 실시양태에서, 동일한 혈청형의 각각의 피막 폴리사카라이드는 전형적으로 동일한 담체 단백질에 접합된다.

[0110] 제약/백신 조성물

[0111] 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 아주반트와 함께 상기 기재된 임의의 폴리사카라이드 혈청형 조합물을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 대안적으로 그로 이루어진 제약, 면역원성 및 백신 조성물을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.

[0112] 본 발명의 폴리사카라이드-단백질 접합체의 제제화는 관련 기술분야에 인식된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 개별 페렴구균 접합체는 생리학상 허용되는 비히클과 함께 제제화되어 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 완충 염수, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 텍스트로스 용액을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0113] 한 실시양태에서, 백신 조성물은 염화나트륨을 갖는 L-히스티딘 완충제에서 제제화된다.

[0114] 본원에 정의된 바와 같이, "아주반트"는 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성을 증진시키는 역할을 하는 물질이다. 면역 아주반트는 단독으로 투여시 약하게 면역원성인 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있고/거나, 예를 들어 항체 역가 또는 세포-매개 면역 반응을 유도하지 않거나 약하게 유도할 수 있고/거나, 항원에 대한 항체 역가를 증가시킬 수 있고/거나, 개체에서 면역 반응을 달성하는데 효과적인 항원의 용량을 낮출 수 있다. 따라서, 아주반트는 종종 면역 반응을 부스팅하기 위해 제공되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 조성물의 유효성을 증진시키기 위한 적합한 아주반트는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다:

[0115] (1) 알루미늄 염 (명반), 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄 등;

[0116] (2) 수중유 에멀전 체제 (다른 특정 면역자극제, 예컨대 무라밀 펩티드 (하기 정의됨) 또는 박테리아 세포벽 성분이 있거나 없음), 예컨대, 예를 들어, (a) 미세유동화기, 예컨대 모델 110Y 미세유동화기 (마이크로플루이드스(Microfluidics), 매사추세츠주 뉴턴)를 사용하여 서브마이크로미터 입자로 제제화된, 5% 스쿠알렌, 0.5% 트윈 80 및 0.5% 스펠 85를 함유 (임의로 다양한 양의 MTP-PE 함유)하는 MF59 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 90/14837), (b) 서브마이크로미터 에멀전으로 미세유동화되거나 보다 큰 입자 크기 에멀전을 생성하기 위해 불텍성된, 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉-차단된 중합체 L121 및 thr-MDP를 함유하는 SAF, (c) 2% 스쿠알렌, 0.2% 트윈 80, 및 미국 특허 번호 4,912,094에 기재된 3-O-데아실화 모노포스포리피드 A (MPL™), 트레할로스 디미콜레이트 (TDM) 및 세포벽 골격 (CWS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 박테리아 세포벽 성분, 바람직하게는 MPL+CWS (디톡스(Detox)™)를 함유하는 리비(Ribi)™ 아주반트 시스템 (RAS) (코릭사(Corixa), 몬타나주 해밀턴); 및 (d) 몬타니드 ISA;

[0117] (3) 사포닌 아주반트, 예컨대 퀴(Quil) A 또는 스티몰론(STIMULON)™ QS-21 (안티제닉스(Antigenics), 매사추세츠주 프레이밍햄) (예를 들어, 미국 특허 번호 5,057,540 참조), 또는 그로부터 생성된 입자, 예컨대 ISCOM (콜레스테롤, 사포닌, 인지질 및 양친매성 단백질의 조합에 의해 형성된 면역자극 복합체) 및 이스코매트릭스(Iscomatrix)® (ISCOM과 본질적으로 동일한 구조를 갖지만 단백질이 없는 것)가 사용될 수 있음;

[0118] (4) 박테리아 리포폴리사카라이드, 합성 지질 A 유사체, 예컨대 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물

(AGP), 또는 그의 유도체 또는 유사체, 이는 코릭사로부터 입수가가능하고 미국 특허 번호 6,113,918에 기재됨; 하나의 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코피라노시드이며, 이는 또한 529로 공지되어 있고 (이전에 RC529로서 공지됨), 수성 형태 또는 안정한 에멀전으로서 제제화됨;

- [0119] (5) 합성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 CpG 모티프(들)를 함유하는 올리고뉴클레오티드 (미국 특허 번호 6,207,646);
- [0120] (6) 시토카인, 예컨대 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 등), 인터페론 (예를 들어, 감마 인터페론), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 종양 괴사 인자 (TNF), 공동자극 분자 B7-1 및 B7-2 등; 및
- [0121] (7) 보체, 예컨대 보체 성분의 삼량체 C3d.
- [0122] 또 다른 실시양태에서, 아주반트는 상기 아주반트 중 2, 3종 또는 그 초과 혼합물, 예를 들어 SBAS2 (3-탈아실화 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 또한 함유하는 수중유 에멀전)이다.
- [0123] 무라밀 펩티드는 N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0124] 특정 실시양태에서, 아주반트는 알루미늄 염이다. 알루미늄 염 아주반트는 명반-침전된 백신 또는 명반-흡착된 백신일 수 있다. 알루미늄-염 아주반트는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Harlow, E. and D. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) and Nicklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143:489-493)]에 기재되어 있다. 알루미늄 염은 수화 알루미늄, 알루미늄 수화물, 알루미늄 3수화물 (ATH), 알루미늄 수화물, 알루미늄 3수화물, 알히드로겔, 슈퍼포스, 암포겔, 알루미늄 (III) 히드록사이드, 알루미늄 히드록시포스페이트 술페이트, 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA), 무정형 알루미늄, 3수화 알루미늄 또는 트리히드록시알루미늄을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0125] APA는 알루미늄 히드록시포스페이트의 수성 현탁액이다. APA는 인산알루미늄 및 인산나트륨을 1:1 부피 비로 블렌딩하여 알루미늄 히드록시포스페이트를 침전시킴으로써 제조된다. 블렌딩 공정 후에, 물질은 고-전단 혼합기로 크기-감소되어 단분산 입자 크기 분포를 달성한다. 이어서, 생성물은 생리학적 염수에 대해 투석여과되고, 증기 멸균된다.
- [0126] 특정 실시양태에서, 상업적으로 입수가가능한 $Al(OH)_3$ (예를 들어, 뉴욕주 웨스트베리 소재 덴마크/아큐레이트 케미칼 앤 사이언티픽 캄파니(Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co.)의 알히드로겔 또는 슈퍼포스)이 단백질을 50 - 200 g 단백질/mg 수산화알루미늄의 비로 흡착시키는데 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 단백질의 흡착은 단백질의 pI (등전 pH) 및 배지의 pH에 좌우된다. 보다 낮은 pI를 갖는 단백질은 보다 높은 pI를 갖는 단백질보다 양으로 하전된 알루미늄 이온에 더 강하게 흡착한다. 알루미늄 염은 2-3주의 기간에 걸쳐 서서히 방출되는 항원의 대포를 확립할 수 있고/거나, 대식세포 및 보체 활성화의 비특이적 활성화에 관여할 수 있고/거나, 선천성 면역 메커니즘을 자극할 수 있다 (가능하게는 요산의 자극을 통해). 예를 들어, 문헌 [Lambrecht et al., 2009, Curr Opin Immunol 21:23]을 참조한다.
- [0127] 1가 벌크 수성 접합체는 전형적으로 함께 블렌딩되고, 16 $\mu g/mL$ 를 표적으로 희석될 6B를 제외한 모든 혈청형에 대해 8 $\mu g/mL$ 를 표적으로 희석될 것이다. 희석되면, 배치가 여과 멸균되고, 동일 부피의 알루미늄 포스페이트 아주반트가 250 $\mu g/mL$ 의 최종 알루미늄 농도를 표적으로 무균으로 첨가될 것이다. 아주반트화된 제제화된 배치는 단일-사용, 0.5 mL/용량 바이알 내에 충전될 것이다.
- [0128] 특정 실시양태에서, 아주반트는 CpG-함유 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 CpG-함유 올리고뉴클레오티드, 특히 CpG-함유 올리고데옥시뉴클레오티드 (CpG ODN)이다. 또 다른 실시양태에서, 아주반트는 ODN 1826이며, 이는 콜리 파마슈티칼 그룹(Coley Pharmaceutical Group)으로부터 획득될 수 있다.
- [0129] "CpG-함유 뉴클레오티드", " CpG-함유 올리고뉴클레오티드", " CpG 올리고뉴클레오티드" 및 유사 용어는 비메틸화 CpG 모이어티를 함유하는 6-50개 뉴클레오티드 길이의 뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Wang et al., 2003, Vaccine 21:4297]을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 용어의 임의의 다른 관련 기술분야에서 허용되는 정의가 의도된다. CpG-함유 올리고뉴클레오티드는 임의의 합성 뉴클레오타이드간 연결, 변형된

염기 및/또는 변형된 당을 사용하는 변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

- [0130] CpG 올리고뉴클레오타이드의 사용 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Sur et al., 1999, J Immunol. 162:6284-93; Verthelyi, 2006, Methods Mol Med. 127:139-58; 및 Yasuda et al., 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 23:89-110]에 기재되어 있다.
- [0131] 투여/투여량
- [0132] 본 발명의 조성물 및 제제는 전신 또는 점막 경로를 통해 백신을 투여함으로써 감염, 예를 들어 폐렴구균 감염에 걸리기 쉬운 인간을 보호하거나 치료하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명의 면역원성 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명 면역원성 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 감염에 대해 인간을 백신접종하는 방법을 제공한다.
- [0133] 특정한 백신에 대한 성분의 최적량은 대상체에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 인간 백신접종을 위한 투여량은 동물 연구로부터 인간 데이터로의 외삽에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 투여량은 경험적으로 결정된다. 본 발명자들은 백신이 새끼 레서스 원숭이 동물 데이터에서 면역원성이라는 것을 입증하였다.
- [0134] 본 발명의 조성물의 "유효량"은 후속 쉐던지 동안 미생물, 예를 들어 에스. 뉴모니아의 감염성의 가능성 또는 중증도를 유의하게 감소시키는 항체를 도출하는데 요구되는 용량을 지칭한다.
- [0135] 본 발명의 방법은 침습성 감염 (수막염, 폐렴 및 박테리아혈증) 및 비침습성 감염 (급성 중이염 및 부비동염)을 둘 다 포함한, 미생물, 예를 들어 에스. 뉴모니아에 의해 야기되는 1차 임상 증후군의 예방 및/또는 감소를 위해 사용될 수 있다.
- [0136] 본 발명의 조성물의 투여는 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 또는 구강/소화기, 호흡기도 또는 비뇨생식관에 대한 점막 투여를 통한 것 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 비강내 투여는 폐렴 또는 중이염의 치료를 위해 사용된다 (폐렴구균의 비인두 담지가 보다 효과적으로 예방될 수 있어, 그의 가장 초기 단계에서 감염을 약화시킬 수 있으므로).
- [0137] 각각의 백신 용량 내 접합체의 양은 유의한 유해 효과 없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이러한 양은 폐렴구균 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 폴리사카라이드-기체의 접합체의 경우, 각각의 용량은 각각의 폴리사카라이드 0.1 내지 100 μg , 특히 0.1 내지 10 μg , 보다 특히 1 내지 5 μg 을 포함할 것이다. 예를 들어, 각각의 용량은 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 또는 750 ng, 또는 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 μg 을 포함할 수 있다.
- [0138] 특정한 백신에 대한 성분의 최적량은 대상체에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 인간 백신접종을 위한 투여량은 동물 연구로부터 인간 데이터로의 외삽에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 투여량은 경험적으로 결정된다.
- [0139] 한 실시양태에서, 알루미늄 염의 용량은 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500 또는 700 μg , 또는 1, 1.2, 1.5, 2, 3, 5 mg 또는 그 초과이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 명반 염의 용량은 재조합 단백질 μg 당이다.
- [0140] 본 발명의 임의의 방법에 따르면, 한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 인간 대상체는 영아 (1세 미만), 유아 (대략 12 내지 24개월), 또는 소아 (대략 2 내지 5세)이다. 다른 실시양태에서, 인간 대상체는 고령 대상체 (예를 들어, > 50세 또는 > 65세)이다. 본 발명의 조성물은 또한 아동, 청소년 및 성인 (예를 들어, 18 내지 45세 또는 18 내지 65세)에서 사용하기에 적합하다.
- [0141] 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 단일 접종으로서 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 백신은 적절하게 간격을 두어 2회, 3회 또는 4회 또는 그 초과로 투여된다. 예를 들어, 조성물은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 간격으로 또는 그의 임의의 조합으로 투여될 수 있다. 면역화 스케줄은 폐렴구균 백신에 대해 지정된 것을 따를 수 있다. 예를 들어, 에스. 뉴모니아에 의해 야기된 침습성 질환에 대한 영아 및 유아의 상용 스케줄은 2, 4, 6 및 12-15개월령이다. 따라서, 한 실시양태에서, 조성물은 2, 4, 6 및 12-15개월령에서 4-용

량 시리즈로서 투여된다.

- [0142] 본 발명의 조성물은 또한 에스. 뉴모니아에로부터의 1종 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 포함시키기에 적합한 에스. 뉴모니아에 단백질의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 W002/083855 및 W002/053761에서 확인된 것들을 포함한다.
- [0143] 제제
- [0144] 본 발명의 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 1종 이상의 방법에 의해, 예컨대 비경구로, 경점막으로, 경피로, 근육내로, 정맥내로, 피부내로, 비강내로, 피하로, 복강내로 대상체에게 투여될 수 있고, 그에 따라 제제화될 수 있다.
- [0145] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 액체 제제의 표피 주사, 근육내 주사, 정맥내, 동맥내, 피하 주사, 또는 호흡기내 점막 주사를 통해 투여된다. 주사용 액체 제제는 용액 등을 포함한다.
- [0146] 본 발명의 조성물은 단일 용량 바이알, 다중-용량 바이알 또는 사전-충전된 시린지로서 제제화될 수 있다.
- [0147] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 경구로 투여되고, 따라서 경구 투여에 적합한 형태로, 즉, 고체 또는 액체 제제로서 제제화된다. 고체 경구 제제는 정제, 캡슐, 환제, 과립, 펠릿 등을 포함한다. 액체 경구 제제는 용액, 현탁액, 분산액, 에멀전, 오일 등을 포함한다.
- [0148] 액체 제제에 대한 제약상 허용되는 담체는 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액, 에멀전 또는 오일이다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 주사가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 물, 알콜성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액, 예를 들어 염수 및 완충 매질을 포함한다. 오일의 예는 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 해바라기 오일, 어류-간 오일, 또 다른 해양 오일, 또는 우유 또는 난으로부터의 지질이다.
- [0149] 제약 조성물은 등장성, 저장성 또는 고장성일 수 있다. 그러나, 주입 또는 주사용 제약 조성물이 투여될 때 본질적으로 등장성인 것이 종종 바람직하다. 따라서, 저장을 위해 제약 조성물은 바람직하게는 등장성 또는 고장성일 수 있다. 제약 조성물이 저장을 위해 고장성인 경우에, 이는 투여 전에 등장성 용액이 되도록 희석될 수 있다.
- [0150] 등장화제는 이온성 등장화제, 예컨대 염 또는 비-이온성 등장화제, 예컨대 탄수화물일 수 있다. 이온성 등장화제의 예는 NaCl, CaCl₂, KCl 및 MgCl₂를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비-이온성 등장화제의 예는 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0151] 적어도 1종의 제약상 허용되는 첨가제는 완충제인 것이 또한 바람직하다. 일부 목적을 위해, 예를 들어, 제약 조성물이 주입 또는 주사를 위해 의도되는 경우에, 조성물은 용액을 4 내지 10, 예컨대 5 내지 9, 예를 들어 6 내지 8 범위의 pH로 완충할 수 있는 완충제를 포함하는 것이 종종 바람직하다.
- [0152] 완충제는, 예를 들어 트리스, 아세테이트, 글루타메이트, 락테이트, 말레에이트, 타르트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 카르보네이트, 글리시네이트, 히스티딘, 글리신, 숙시네이트 및 트리에탄올아민 완충제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0153] 완충제는 또한, 예를 들어, 특히 제약 제제가 비경구 용도를 위한 것인 경우에, 비경구 용도를 위한 USP 상용성 완충제로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 완충제는 일염기성 산, 예컨대 아세트산, 벤조산, 글루콘산, 글리세르산 및 락트산; 이염기성 산, 예컨대 아코니트산, 아디프산, 아스코르브산, 탄산, 글루탐산, 말산, 숙신산 및 타르타르산, 다염기성 산, 예컨대 시트르산 및 인산; 및 염기, 예컨대 암모니아, 디에탄올아민, 글리신, 트리에탄올아민 및 트리스로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0154] 비경구 비히클 (피하, 정맥내, 동맥내 또는 근육내 주사용)은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거 및 고정 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충제, 전해질 보충제, 예컨대 링거 텍스트로스를 기재로 하는 것 등을 포함한다. 예는 계면활성제 및 다른 제약상 허용되는 보조제를 첨가하거나 첨가하지 않은 멸균 액체, 예컨대 물 및 오일이다. 일반적으로, 물, 염수, 수성 텍스트로스 및 관련 당 용액, 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리소르베이트 80 (PS-80), 폴리소르베이트 20 (PS-20) 및 폴록사머 188 (P188)이 특히 주사가능한 용액을 위한 바람직한 액체 담체이다. 오일의 예는 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 해바라기 오일, 어류-간 오일, 또 다른 해양 오일, 또는 우유 또는 난으로부터의 지질이다.

- [0155] 본 발명의 제제는 또한 계면활성제를 함유할 수 있다. 계면활성제는 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제 (통상적으로 트윈으로 지칭됨), 특히 PS-20 및 PS-80; 에틸렌 옥사이드 (EO), 프로필렌 옥사이드 (PO) 및/또는 부틸렌 옥사이드 (BO)의 공중합체, 다우팍스(DOWFAX)TM 상표명으로 판매됨, 예컨대 선형 EO/PO 블록 공중합체; 반복 에톡시 (옥시-1,2-에탄디일) 기의 수가 다양할 수 있는 옥톡시놀, 옥톡시놀-9 (트리톤 X-100 또는 t-옥틸페녹시폴리에탄올)가 특히 관심대상임; (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (이게팔 CA-630/NP-40); 인지질, 예컨대 포스파티딜콜린 (레시틴); 노닐페놀 에톡실레이트, 예컨대 테르기톨(Tergitol)TM NP 시리즈; 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알콜로부터 유도된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르 (브리즈 계면활성제로 공지됨), 예컨대 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르 (브리즈 30); 및 소르비탄 에스테르 (통상적으로 스펠스로 공지됨), 예컨대 소르비탄 트리올레레이트 (스펠 85) 및 소르비탄 모노라우레이트. 에멀전에 포함시키기에 바람직한 계면활성제는 PS-80이다.
- [0156] 계면활성제의 혼합물, 즉 PS-80/스펠 85 혼합물이 사용될 수 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레레이트 (PS-80) 및 옥톡시놀, 예컨대 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올 (트리톤 X-100)의 조합물이 또한 적합하다. 또 다른 유용한 조합물은 라우레트 9 플러스 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및/또는 옥톡시놀을 포함한다.
- [0157] 계면활성제의 바람직한 양 (중량%)은 다음과 같다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 (예컨대 PS-80) 0.01 내지 1%, 특히 약 0.1%; 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올 (예컨대 트리톤 X-100, 또는 트리톤 시리즈의 다른 세제) 0.001 내지 0.1%, 특히 0.005 내지 0.02%; 폴리옥시에틸렌 에테르 (예컨대 라우레트 9) 0.1 내지 20%, 바람직하게는 0.1 내지 10%, 특히 0.1 내지 1% 또는 약 0.5%.
- [0158] 특정 실시양태에서, 조성물은 pH 5.8에서의 히스티딘 (20mM), 염수 (150mM) 및 0.02% PS-20 또는 0.04% PS-80과 250 ug/mL의 APA (알루미늄 포스페이트 아주반트)로 본질적으로 이루어진다. PS-20은 모의 제조 동안 및 1차 포장을 사용하는 적송 동안 응집을 제어하는 제제 내의 PS-20 또는 PS-80의 존재 하에 0.005% 내지 0.1% (w/v) 범위일 수 있다. 공정은 최대 24종의 혈청형의 블렌드를 히스티딘, 염수 및 PS-20 또는 PS-80에서 합한 다음, 이러한 블렌딩된 물질을 항미생물 보존제와 함께 또는 보존제 없이 APA 및 염수와 합하는 것으로 이루어진다.
- [0159] 계면활성제의 선택은 상이한 약물 제품 및 약물 물질에 대해 최적화될 필요가 있을 수 있다. 15종 이상의 혈청형을 갖는 다가 백신의 경우, PS-20 및 P188이 바람직하다. 접합체를 제조하기 위해 사용되는 화학의 선택은 또한 제제의 안정화에서 중요한 역할을 할 수 있다. 특히, 다가 조성물에서 상이한 폴리사카라이드 단백질 접합체를 제조하는데 사용되는 접합 반응이 수성 용매 및 DMSO 용매를 둘 다 포함하는 경우에, 특정한 계면활성제 시스템이 안정성의 유의한 차이를 제공하는 것으로 밝혀졌다. 폴리소르베이트 20 단독 또는 폴리올과 조합된 폴록사머 188을 사용시 폴리사카라이드 단백질 접합체의 개선된 안정성이 관찰되었다.
- [0160] 특정 세제가 생물요법제를 보호하는 방법의 정확한 메카니즘은 잘 이해되지 않고 선형적으로 예측될 수 없다. 가능한 안정화 메카니즘은 우선적 수화, 우선적 배제, 생물요법제와 표면 사이의 공기/액체 계면 경쟁, 표면 장력, 및/또는 세제와 생물요법제와의 직접적 회합으로 응집을 위한 시드로서의 역할을 하는 소수성 패치를 차폐하는 것을 포함한다.
- [0161] 폴록사머가 또한 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 폴록사머는 폴리옥시에틸렌 (폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 쇠가 플랭킹되어 있는 폴리옥시프로필렌 (폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 쇠로 구성된 비이온성 삼블록 공중합체이다. 폴록사머는 또한 상표명 플루로닉(Pluronic)[®]으로 공지되어 있다. 중합체 블록의 길이는 맞춤화될 수 있기 때문에, 약간 상이한 특성을 갖는 다수의 상이한 폴록사머가 존재한다. 일반적 용어 "폴록사머"의 경우, 이들 공중합체는 통상적으로 문자 "P" (폴록사머에 대한 것)에 이어서 3개의 숫자로 명명되고, 처음 2개의 숫자 x 100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략적인 분자 질량을 제공하고, 마지막 숫자 x 10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다 (예를 들어, P407 = 4,000 g/mol의 폴리옥시프로필렌 분자 질량 및 70% 폴리옥시에틸렌 함량을 갖는 폴록사머). 플루로닉[®] 상표명의 경우, 이들 공중합체의 부호화는 실온에서 그의 물리적 형태를 규정하기 위한 문자 (L = 액체, P = 페이스트, F = 박편 (고체))로 시작한 후 2 또는 3개의 숫자가 이어진다. 수치 지정에 있어서 처음 숫자 (3자리 숫자에서 2개의 숫자)에 300을 곱한 것은 소수성물질의 대략적인 분자량을 나타내고; 마지막 숫자 x 10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 나타낸다 (예를 들어, L61 = 1,800 g/mol의 폴리옥시프로필렌 분자 질량 및 10% 폴리옥시에틸렌 함량을 갖는 플루로닉[®]). 미국 특허 번호 3740421을 참조한다.

[0162] 폴록사머의 예는 하기 화학식을 갖는다:

[0163] $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$

[0164] 여기서 a 및 b 블록은 하기 값을 갖는다:

폴루로닉®	폴록사머	a	b	분자량
L31		2	16	1100 (평균)
L35				1900 (평균)
L44NF	124	12	20	2090 내지 2360
L64				2900 (평균)
L81				2800 (평균)
L121				4400 (평균)
P123		20	70	5750 (평균)
F68NF	188	80	27	7680 내지 9510
F87NF	237	64	37	6840 내지 8830
F108NF	338	141	44	12700 내지 17400
F127NF	407	101	56	9840 내지 14600

[0165]

[0166] 본원에 사용된 분자량 단위는 달톤 (Da) 또는 g/mol이다.

[0167] 바람직하게는, 폴록사머는 일반적으로 1100 내지 17,400 Da, 7,500 내지 15,000 Da, 또는 7,500 내지 10,000 Da 범위의 분자량을 갖는다. 폴록사머는 폴록사머 188 또는 폴록사머 407로부터 선택될 수 있다. 제제 중 폴록사머의 최종 농도는 0.001% 내지 5% 중량/부피, 또는 0.025% 내지 1% 중량/부피이다. 특정 측면에서, 폴리올은 프로필렌 글리콜이고, 1% 내지 20% 중량/부피의 최종 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 폴리올은 폴리에틸렌 글리콜 400이고, 1% 내지 20% 중량/부피의 최종 농도로 존재한다.

[0168] 본 발명의 제제에 적합한 폴리올은 중합체 폴리올, 특히 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나 이에 제한되지는 않는 폴리에테르 디올, 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르이다. 프로필렌 글리콜은 ~425 내지 ~2700의 단량체의 분자량 범위에서 이용가능하다. 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르는 또한 PEG200, PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 및 PEG MME 4000을 포함하나 이에 제한되지는 않는, ~200 내지 ~35000 범위의 분자량의 범위에서 이용가능하다. 바람직한 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 400이다. 본 발명의 제제 중 폴리올의 최종 농도는 1% 내지 20% 중량/부피 또는 6% 내지 20% 중량/부피일 수 있다.

[0169] 제제는 또한 pH-완충 염수 용액을 함유한다. 완충제는, 예를 들어 트리스, 아세테이트, 글루타메이트, 락테이트, 말레이이트, 타르트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 카르보네이트, 글리시네이트, 히스티딘, 글리신, 숙시네이트, HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술포산), MOPS (3-(N-모르폴리노)프로판술포산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술포산) 및 트리에탄올아민 완충제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 완충제는 용액을 4 내지 10, 5.2 내지 7.5, 또는 5.8 내지 7.0 범위의 pH로 완충시킬 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, 완충제는 포스페이트, 숙시네이트, 히스티딘, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 또는 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 완충제는 또한, 예를 들어, 특히 제약 제제가 비경구 용도를 위한 것인 경우에, 비경구 용도를 위한 USP 상용성 완충제로부터 선택될 수 있다. 완충제의 농도는 1 mM 내지 50 mM 또는 5 mM 내지 50 mM 범위일 것이다. 특정 측면에서, 완충제는 5 mM 내지 50 mM의 최종 농도의 히스티딘, 또는 1 mM 내지 10 mM의 최종 농도의 숙시네이트이다. 특정 측면에서, 히스티딘은 20 mM ± 2 mM의 최종 농도로 존재한다.

[0170] 염수 용액 (즉, NaCl을 함유하는 용액)이 바람직하지만, 제제에 적합한 다른 염은 CaCl₂, KCl 및 MgCl₂ 및 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함하나 이에 제한되지 않는 비-이온성 등장화제가 염 대신에 사용될 수 있다. 적합한 염 범위는 25 mM 내지 500 mM 또는 40 mM 내지 170 mM을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 측면에서, 염수는 임의로 20 mM 내지 170 mM의 농도로 존재하는 NaCl이다.

[0171] 한 실시양태에서, 제제는 염화나트륨을 갖는 L-히스티딘 완충제를 포함한다.

- [0172] 본원에 기재된 제제의 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 담체 단백질에 접합된 1종 이상의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함한다. 담체 단백질은 CRM₁₉₇, 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFBC8, 디프테리아 독소이드 (DT), 과상풍 독소이드 (TT), TT의 단편 C, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드, 이. 콜라이 LT, 이. 콜라이 ST, 슈도모나스 아에루기노사로부터의 외독소 A 및 그의 조합으로부터 선택될 수 있다. 한 측면에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 모두는 수성 화학을 사용하여 제조된다. 또 다른 측면에서, 폴리사카라이드 단백질 접합체 중 1종 이상은 DMSO 용매를 사용하여 제조된다. 예로서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 제제는 15가 페렴구균 접합체 (15vPnC) 제제일 수 있으며, 여기서 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO 용매를 사용하여 제조되고 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 용매를 사용하여 제조된다.
- [0173] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 제어 방출 시스템으로 전달된다. 예를 들어, 작용제는 정맥내 주입, 경피 패치, 리포솜 또는 다른 투여 방식을 사용하여 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 물질이, 예를 들어 마이크로스피어에 또는 이식물에 사용된다.
- [0174] 본 발명의 조성물은 또한 에스. 뉴모니아에로부터의 1종 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 포함시키기에 적합한 에스. 뉴모니아에 단백질의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/083855 및 WO 02/053761에서 확인된 것들을 포함한다.
- [0175] 첨부된 설명 및 도면을 참조하여 본 발명의 다양한 실시양태를 기재하였지만, 본 발명이 그러한 정확한 실시양태에 제한되지 않는다는 것, 및 그 안에서 다양한 변화 및 변형이 첨부된 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 범위 또는 취지를 벗어나지 않으면서 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이루어질 수 있다는 것이 이해되어야 한다.
- [0176] 하기 실시예는 본 발명을 예시하지만, 제한하지는 않는다.
- [0177] 실시예
- [0178] 실시예 1: 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드의 제조
- [0179] 페렴구균을 배양하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Chase, 1967, Methods of Immunology and Immunochemistry 1:52]을 참조한다. 페렴구균 피막 폴리사카라이드를 제조하는 방법도 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 유럽 특허 번호 EP0497524를 참조한다. 페렴구균 하위유형의 단리물은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (버지니아주 마나사스)으로부터 입수가능하다. 박테리아는 혈액-한천 상에서 알파-용혈성인 피막화된, 비-운동성, 그람-양성, 란셋-형상 쌍구균으로서 확인되어 있다. 하위유형은 특정 항혈청을 사용하는 팽화 반응에 기초하여 구별될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,847,112를 참조한다.
- [0180] 존재하는 각각의 에스. 뉴모코쿠스(*S. pneumoniae*) 혈청형을 나타내는 세포 은행을 냉동 바이알 내의 것으로 머크 컬처 콜렉션(Merck Culture Collection) (뉴저지주 라웨이)으로부터 얻었다. 해동된 시드 배양물을 에스. 뉴모니아에에 적절한 사전-멸균된 성장 배지를 함유하는 시드 발효기로 옮겼다. 배양물을 온도 및 pH 제어 하의 시드 발효기에서 성장시켰다. 시드 발효기의 전체 부피를 사전-멸균된 성장 배지를 함유하는 생산 발효기로 옮겼다. 생산 발효는 공정의 최종 세포 성장 단계였다. 온도, pH 및 교반 속도를 제어하였다.
- [0181] 불활성화제의 첨가를 통해 발효 공정을 종결시켰다. 불활성화 후에, 배치를 불활성화 탱크로 옮겨 제어된 온도 및 교반 하에 유지하였다. 원심분리와 여과의 조합을 사용하여 세포 과편을 제거하였다. 배치를 한외여과하고 투석여과하였다. 이어서 배치를 용매-기반 분획화에 적용하여 불순물을 제거하고 폴리사카라이드를 회수하였다.
- [0182] 실시예 2: 수용액에서의 환원성 아미노화를 사용한 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F의 CRM₁₉₇에 대한 접합
- [0183] 공통 공정 흐름을 사용하여 상이한 폴리사카라이드 혈청형을 정제된 CRM₁₉₇ 담체 단백질에 개별적으로 접합시켰다. 폴리사카라이드를 용해시키고, 크기 감소시키고, 화학적으로 활성화시키고, 한외여과에 의해 완충제-교환하였다. 이어서, 정제된 CRM₁₉₇을 활성화된 폴리사카라이드에 반응 혼합물 중 NiCl₂ (2 mM)를 이용하여 접합시키고, 생성된 접합체를 한외여과에 의해 정제한 후 최종 0.2-마이크로미터 여과하였다. 각각의 단계 내의 여러 공정 파라미터, 예컨대 pH, 온도, 농도 및 시간을 하기 섹션에서의 혈청형-특이적 값에 따라 제어하였다.

- [0184] 폴리스카라이드 크기 감소 및 산화
- [0185] 정제된 패렴구균 피막 폴리스카라이드 분말을 물에 용해시키고, 혈청형 19A를 제외한 모든 혈청형을 0.45-마이크로미터 여과하였다. 혈청형 19A를 제외한 모든 혈청형을 균질화하여 폴리스카라이드의 분자 질량을 감소시켰다. 혈청형 19A는 그의 비교적 낮은 출발 크기로 인해 크기 감소시키지 않았다. 균질화 압력 및 균질화기 통과 횟수를 혈청형-특이적 표적에 따라 제어하여 (150-1000 bar; 4-7회 통과) 혈청형-특이적 분자 질량을 달성하였다. 크기-감소된 폴리스카라이드를 0.2-마이크로미터 여과한 다음, 농축시키고, 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 물에 대해 투석여과하였다.
- [0186] 이어서, 폴리스카라이드 용액을 아세트산나트륨 완충제를 사용하여 혈청형-특이적 온도 (4-22℃) 및 pH (4-5)로 조정하여 활성화로 인한 폴리스카라이드 크기 감소를 최소화하였다. 모든 혈청형 (혈청형 4 제외)에 대해, 100 mM 소듐 메타퍼아이오데이트 용액을 첨가하여 폴리스카라이드 활성화를 개시하였다. 첨가된 소듐 메타퍼아이오데이트의 양은 폴리스카라이드 반복 단위 몰당 대략 0.1 내지 0.5 몰의 소듐 메타퍼아이오데이트 범위로, 혈청형-특이적이었다. 소듐 메타퍼아이오데이트의 혈청형-특이적 전하는 폴리스카라이드 활성화의 표적 수준 (폴리스카라이드 반복 단위 몰당 알데히드 몰)을 달성하기 위한 것이었다. 혈청형 4의 경우, 소듐 메타퍼아이오데이트 첨가 전에, 배치를 대략 50℃ 및 pH 4.1에서 인큐베이션하여 폴리스카라이드를 부분적으로 탈케탈화시켰다.
- [0187] 혈청형 5 및 7F를 제외한 모든 혈청형의 경우, 활성화된 생성물을 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 10 mM 인산칼륨, pH 6.4에 대해 투석여과하였다. 혈청형 5 및 7F를 10 mM 아세트산나트륨에 대해 투석여과하였다. 모든 혈청형에 대한 한외여과를 2-8℃에서 수행하였다.
- [0188] CRM₁₉₇에 대한 폴리스카라이드 접합
- [0189] 산화된 폴리스카라이드 용액을 혈청형에 따라 1.5 M 인산칼륨, pH 6.0 또는 pH 7.0 및 물과 혼합하였다. 선택된 완충제 pH는 접합 반응 동안 활성화된 폴리스카라이드의 안정성을 개선시키기 위한 것이었다. 이전에 기재된 바와 같이 (WO 2012/173876 A1) 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된 CRM₁₉₇을 0.2-마이크로미터 여과하고, 완충 폴리스카라이드 용액과, 혈청형에 따라 0.4 내지 1.0 w/w 범위의 CRM₁₉₇에 대한 폴리스카라이드 질량 비로 합하였다. 질량 비는 생성된 접합체에서 CRM₁₉₇에 대한 폴리스카라이드 비를 제어하도록 선택하였다. 폴리스카라이드 및 포스페이트 농도는 혈청형에 따라 각각 3.6 내지 10.0 g/L 및 100 내지 150 mM 범위로, 혈청형-특이적이었다. 혈청형-특이적 폴리스카라이드 농도는 생성된 접합체의 크기를 제어하도록 선택하였다. 이어서, 용액을 0.2-마이크로미터 여과하였다. 100 mM 염화니켈 용액을 사용하여 염화니켈을 대략 2 mM로 첨가하였다. 소듐 시아노보로히드라이드 (폴리스카라이드 반복 단위 몰당 2몰)를 첨가하였다. 폴리스카라이드 및 단백질의 소비를 최대화하기 위해 혈청형-특이적 지속기간 (72 내지 120시간) 동안 접합을 진행시켰다.
- [0190] 수소화붕소나트륨에 의한 환원
- [0191] 접합 반응 후, 배치를 대략 3.5 g/L의 폴리스카라이드 농도로 희석하고, 2-8℃로 냉각시키고, 1.2-마이크로미터 여과하였다. 모든 혈청형 (혈청형 5 제외)을 100 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2-8℃에서 100 mM 인산칼륨, pH 7.0에 대해 투석여과하였다. 이어서, 보유물에 희석된 배치를 대략 2.0 g 폴리스카라이드/L로 희석하고, 1.2 M 중탄산나트륨, pH 9.4의 첨가에 의해 pH-조정하였다. 수소화붕소나트륨 (폴리스카라이드 반복 단위 몰당 1몰)을 첨가하였다. 이후 1.5 M 인산칼륨, pH 6.0을 첨가하였다. 혈청형 5를 100 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 300 mM 인산칼륨에 대해 투석여과하였다.
- [0192] 최종 여과 및 생성물 저장
- [0193] 이어서, 배치를 농축시키고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 4℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM L-히스티딘에 대해 투석여과하였다. 보유물 배치를 0.2 마이크로미터 여과하였다.
- [0194] 혈청형 19F 접합체를 22℃에서 대략 7일 동안 인큐베이션하고, 100 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 4℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM L-히스티딘에 대해 투석여과하고, 0.2-마이크로미터 여과하였다.
- [0195] 배치를 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 추가의 10 mM L-히스티딘에 의해 1.0 g/L의 폴리스카라이드 농도로 조정하였다. 배치를 분취물로 분배하고, ≤ -60℃에서 동결시켰다.
- [0196] 실시예 3: 디메틸술폭시드에서의 환원성 아미노화를 사용한 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F,

22F, 23F 및 33F의 CRM₁₉₇에 대한 접합 방법

- [0197] 공통 공정 흐름을 사용하여 상이한 폴리사카라이드 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 정제된 CRM₁₉₇ 담체 단백질에 개별적으로 접합시켰다. 폴리사카라이드를 용해시키고, 표적 분자 질량으로 크기조정하고, 화학적으로 활성화시키고, 한외여과에 의해 완충제-교환하였다. 활성화된 폴리사카라이드 및 정제된 CRM₁₉₇을 개별적으로 동결건조시키고 디메틸설폭시드 (DMSO)에 재용해시켰다. 이어서, 재용해된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇ 용액을 합하고 하기 기재된 바와 같이 접합시켰다. 생성된 접합체를 한외여과에 의해 정제한 후 최종 0.2-마이크로미터 여과하였다. 각각의 단계 내의 여러 공정 파라미터, 예컨대 pH, 온도, 농도 및 시간을 하기 섹션에서의 혈청형-특이적 값에 따라 제어하였다.
- [0198] 폴리사카라이드 크기 감소 및 산화
- [0199] 정제된 페럼구균 피막 Ps 분말을 물에 용해시키고, 혈청형 19A를 제외한 모든 혈청형을 0.45-마이크로미터 여과하였다. 혈청형 18C 및 19A를 제외한 모든 혈청형을 균질화시켜 Ps의 분자 질량을 감소시켰다. 균질화 압력 및 균질화기 통과 횟수를 혈청형-특이적 표적에 따라 제어하였다 (150-1000 bar; 4-7회 통과). 혈청형 18C를 $\geq 90^{\circ}\text{C}$ 에서 산 가수분해에 의해 크기-감소시켰다.
- [0200] 크기-감소된 폴리사카라이드를 0.2-마이크로미터 여과한 다음, 농축시키고, 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과막을 사용하여 물에 대해 투석여과하였다. 혈청형 18C에 대해서는 5 kDa NMWCO 막을 사용하였다.
- [0201] 이어서, 폴리사카라이드 용액을 아세트산나트륨 완충제를 사용하여 혈청형-특이적 온도 ($4-22^{\circ}\text{C}$) 및 pH (4-5)로 조정하여 활성화로 인한 폴리사카라이드 크기 감소를 최소화하였다. 모든 혈청형 (혈청형 4 제외)에 대해, 100 mM 소듐 메타퍼아이오데이트 용액을 첨가하여 폴리사카라이드 활성화를 개시하였다. 첨가된 소듐 메타퍼아이오데이트의 양은 폴리사카라이드 반복 단위 몰당 대략 0.1 내지 0.5 몰의 소듐 메타퍼아이오데이트 범위로, 혈청형-특이적이었다. 소듐 메타퍼아이오데이트의 혈청형-특이적 전하는 폴리사카라이드 활성화의 표적 수준 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 알데히드 몰)을 달성하기 위한 것이었다. 혈청형 4의 경우, 소듐 메타퍼아이오데이트 첨가 전에, 배치를 대략 50°C 및 pH 4.1에서 인큐베이션하여 폴리사카라이드를 부분적으로 탈케탈화시켰다.
- [0202] 활성화된 생성물을 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 10 mM 인산칼륨, pH 6.4에 대해 투석여과한 다음, 10 kDa NMWCO 막을 사용하여 물에 대해 투석여과하거나 투석하였다. 혈청형 18C에 대해서는 5 kDa NMWCO 막을 사용하였다. 모든 혈청형에 대한 한외여과 또는 투석을 $2-8^{\circ}\text{C}$ 에서 수행하였다.
- [0203] CRM₁₉₇에 대한 폴리사카라이드 접합
- [0204] 이전에 기재된 바와 같이 (WO 2012/173876 A1) 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된 CRM₁₉₇을 5 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2-5 mM 포스페이트, pH 7.0 완충제에 대해 투석여과하고, 0.2-마이크로미터 여과하였다.
- [0205] 혈청형 3 이외의 혈청형의 경우, 산화된 폴리사카라이드를 물 중 6 mg Ps/mL 및 5% w/v 수크로스 (50 mg 수크로스/mL)로 제제화하였다. 혈청형 3의 경우, 산화된 폴리사카라이드를 물 중 2 mg Ps/mL 및 10% w/v 수크로스 (100 mg 수크로스/mL)로 제제화하였다. 단백질 용액을 포스페이트 완충제 중 6 mg Pr/mL와 1% w/v 수크로스 (10 mg 수크로스/mL)로 제제화하였다.
- [0206] 제제화된 Ps 및 CRM₁₉₇ 용액을 개별적으로 동결건조시켰다. 동결건조된 Ps 및 CRM₁₉₇ 물질을 DMSO 중에 재용해시키고, 믹싱 티를 사용하여 합하였다. 소듐 시아노보로하이드라이드 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 1몰)를 첨가하고, 혈청형-특이적 지속기간 (1 내지 48시간) 동안 접합을 진행시켜 표적으로 하는 접합체 크기를 달성하였다.
- [0207] 수소화붕소나트륨에 의한 환원
- [0208] 접합 반응 후에 수소화붕소나트륨 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 2몰)을 첨가하였다. 배치를 대략 4°C 에서 대략 0.025% (w/v) 폴리소르베이트 20의 존재 또는 부재 하에 150 mM 염화나트륨 내로 희석하였다. 이어서 인산칼륨 완충제를 첨가하여 pH를 중화시켰다. 혈청형 3, 6A, 6B, 7F, 9V, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F의 경우, 배치를 농축시키고, 30 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 25 mM 인산칼륨 pH 7의 존재 또는 부재 하에 150 mM 염화나트륨에 대해 대략 4°C 에서 투석여과하였다.

- [0209] 최종 여과 및 생성물 저장
- [0210] 혈청형 3, 6A, 6B, 7F, 9V, 18C, 19A, 22F, 23F 및 33F를 농축시키고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 4℃에서 0.015% (w/v) 폴리소르베이트 20의 존재 또는 부재 하에 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM 히스티딘에 대해 투석여과하였다. 보유물 배치를 0.2 마이크로미터 여과하였다.
- [0211] 혈청형 19F를 대략 5일 동안 인큐베이션하고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 대략 4℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM 히스티딘에 대해 투석여과하고, 0.2-마이크로미터 여과하였다.
- [0212] 혈청형 3, 6A, 6B, 7F, 9V, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 추가의 10 mM 히스티딘으로 희석하고, 분취물로 분배하고, $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 에서 동결시켰다.
- [0213] 혈청형 4 및 14를 300 kDa NMWCO 막을 사용하여 대략 4℃에서 150 mM 염화나트륨에 대해 투석하고, 0.2-마이크로미터 여과하고, 분취물로 분배하고, $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 에서 동결시켰다.
- [0214] 실시예 4: 접합체의 분석
- [0215] HPSEC/UV/MALS/RI 검정을 사용한 접합체의 분자량 및 농도 분석
- [0216] 접합체 샘플을 주입하고 고성능 크기-배제 크로마토그래피 (HPSEC)에 의해 분리하였다. 자외선 (UV), 다각도 광 산란 (MALS) 및 굴절률 (RI) 검출기를 일련으로 사용하여 검출을 수행하였다. UV280으로부터 흡광 계수를 사용하여 단백질 농도를 계산하였다. mL/g으로 보고된 용질 농도의 변화에 대한 용액의 굴절률의 변화인 dn/dc 인자를 사용하여 폴리사카라이드 농도를 RI 신호 (단백질 및 폴리사카라이드 둘 다에 의해 기여됨)로부터 디컨볼루션하였다. 전체 샘플 피크에 걸쳐 측정된 농도 및 광 산란 정보를 사용하여 아스트라 소프트웨어 (와이어트 테크놀로지 코퍼레이션(Wyatt Technology Corporation), 캘리포니아주 산타 바바라)에 의해 샘플의 평균 분자량을 계산하였다.
- [0217] 폴리사카라이드 활성화 정도 검정
- [0218] 접합은 활성화된 알데히드와 담체 단백질 상의 주로 리신 잔기 사이의 환원성 아미노화를 통해 일어난다. 폴리사카라이드 반복 단위 몰당 알데히드 몰로 나타내어지는 활성화 수준은 접합 반응을 제어하는데 중요하다. 활성화 정도를 측정하기 위한 검정은 미국 특허 출원 공개 번호 2017/0021006에 기재되어 있다.
- [0219] 알데히드 기 (폴리사카라이드의 피어이오데이트 산화 동안 생성됨)와 티오세미카르바지드 (상업적 공급원으로부터 입수가능함)와의 반응에 기초하여 활성화 정도를 측정하기 위한 내부 검정을 개발하였다.
- [0220] 정량화는 NMR (핵 자기 공명)에 의해 또는 유도체화된 폴리사카라이드를 적절한 참조 표준물과 비교하고/거나 유도체의 흡광 계수의 사용을 통해 달성할 수 있다. 이 검정을 위한 흡광 계수의 사용은 HPSEC/UV/MALS/RI 방법에서의 그의 사용과 유사하다.
- [0221] 일반적으로, 검정은 반응 조건에 대해 하기 하에 실행될 수 있다:
- [0222] 시간: 0.5 h - 35 hr (이는 혈청형 특이적이지만, 반응은 완료, 즉 시간 경과에서 플레토까지 이어짐)
- [0223] 온도: 15°C - 37°C , 바람직하게는 대략 21°C - 27°C
- [0224] TSC 농도: 1-5 mg/mL
- [0225] 반응의 pH: pH 3-5.5, 바람직하게는 4.0
- [0226] 실시예 4의 경우, 폴리사카라이드를 pH 4.0에서 1.25 내지 2.5 mg/mL 티오세미카르바지드 (TSC)로 유도체화하여 발색단을 도입하였다 (혈청형 1, 5 및 9V에 대한 활성화된 폴리사카라이드의 유도체화는 1.25 mg/mL TSC를 사용함). 유도체화 반응이 플레토에 도달할 때까지 진행되도록 하였다. 실제 시간은 각각의 혈청형에 대한 반응 속도에 따라 달라졌다. 이어서, TSC-Ps를 TSC 및 다른 저분자량 성분으로부터 고성능 크기 배제 크로마토그래피에 의해 분리하였다. 266 nm에서의 UV 흡광도에 의해 신호를 검출하였다. 활성화된 알데히드의 수준은 모노-TSC의 표준 곡선 주입에 대해 또는 직접 미리 결정된 흡광 계수를 사용하여 계산한다. 모노-TSC는 모노사카라이드의 합성된 티오세미카르바존 유도체이다. 이어서, 알데히드 수준을 HPSEC/UV/MALS/RI 검정에 의해 측정된 Ps 농도를 사용하여 반복 단위 몰당 알데히드 몰 (Ald/RU)로 전환시킨다.
- [0227] 유도체가 유의한 UV 흡광도를 갖는 한, 티오세미카르바지드 구조적 유사체, 히드라지드, 히드라진, 세미카르바지드, 세미카르바지드 구조적 유사체, 아미노옥시 화합물 또는 방향족 아민을 사용하여 유사한 유도체화를 수행

할 수 있다. UV 흡광도는 유도체화제에 부착된 발색단으로부터, 또는 티오세미카르바지드의 경우에 알데히드 유도체화의 결과로서 생성된 발색단으로부터의 것일 수 있다.

[0228] 폴리사카라이드와 담체 단백질 사이의 공유 부착 수의 척도로서의 접합된 단백질 내 리신 소비의 결정

[0229] 워터스 AccQ-태그 아미노산 분석 (AAA)을 사용하여 접합체 샘플에서의 접합 정도를 측정하였다. 엘텍스 워크스 테이션에서 증기 상 산 가수분해를 사용하여 샘플을 가수분해시켜, 담체 단백질을 그의 성분 아미노산으로 분해하였다. 6-아미노퀴놀릴-N-히드록시숙신이미딜 카르바메이트 (AQC)를 사용하여 유리 아미노산을 유도체화하였다. 이어서, C18 칼럼 상에서 UV 검출 동반 UPLC를 사용하여 유도체화된 샘플을 분석하였다. 리신 이외의 대표적인 아미노산을 사용하여 평균 단백질 농도를 얻었다. 접합 동안 리신 소비 (즉, 리신 손실)를 접합체 내 리신의 평균 측정량과 출발 단백질 내 리신의 예상량 사이의 차이에 의해 결정하였다.

[0230] 수용액 및 DMSO 용액에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 접합체의 속성

[0231] 실시예 2 및 3에 기재된 방법을 사용하여 생성된 접합체에 대한 폴리사카라이드 활성화 및 리신 소비 (즉, 리신 손실) 결과는 표 1에 열거되어 있다. DMSO에서 제조된 접합체 (실시예 3)가 수용액에서 제조된 접합체 (실시예 2)보다 더 낮은 폴리사카라이드 활성화와 더 높은 리신 소비를 가졌다는 것이 명백히 구별된다. 이는 DMSO 용액에서 접합체를 제조하는 것이 천연 폴리사카라이드 구조에 대한 더 적은 활성화 또는 파괴를 가지면서 폴리사카라이드가 담체 단백질 상의 더 많은 접합 부위에 부착하도록 한다는 것을 시사한다. 그 결과, 접합체는 수용액에서보다 DMSO 용액에서 제조된 접합체에서의 보다 높은 가교로 인해 폴리사카라이드 반복 단위당 평균적으로 더 많은 글리코펩티드를 함유한다. 글리코펩티드는 면역 반응이 생성되는 항원 도메인인 것으로 여겨진다. 결과적으로, DMSO에서 생성된 접합체는 수용액에서 생성된 접합체보다 더 면역원성일 것으로 예상된다.

[0232] 표 1에서의 접합체의 평균 분자량 (Mw)을 HPSEC UV-MALS-RI 검정에 의해 측정하였다. 수용액에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 접합체는 990 내지 3410 kDa 범위였다. DMSO에서 생성된 접합체는 일반적으로 1300 내지 5822 kDa 범위의 크기로 더 컸다.

[0233] 표 1: 수용액 또는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 페럼구균 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F CRM₁₉₇ 접합체에 대한 리신 손실

접합체	접합체 로트 #	수성 또는 DMSO 용액에서의 접합 반응	폴리사카라이드 활성화 (mol 알데히드/mol 반복 단위)	리신 손실 (mol/mol 단백질)
혈청형 3- CRM ₁₉₇	1	수성	0.10	3.1
	2		0.10	2.5
	3		0.10	3.1
	4	DMSO	0.092	16.3
	5		0.053	9.6
혈청형 4- CRM ₁₉₇	1	수성	0.43	2.7
	2	DMSO	0.25	3.0
혈청형 6A- CRM ₁₉₇	1	수성	0.19	4.5
	2	DMSO	0.11	9.1
혈청형 6B- CRM ₁₉₇	1	수성	0.18	4.6
	2	DMSO	0.11	9.6
혈청형 7F- CRM ₁₉₇	1	수성	0.26	2.0
	2	DMSO	0.22	10.6
혈청형 9V- CRM ₁₉₇	1	수성	0.30	4.7
	2	DMSO	0.15	7.9
혈청형 14- CRM ₁₉₇	1	수성	0.22	6.4
	2	DMSO	0.22	12.7
혈청형 18C- CRM ₁₉₇	1	수성	0.12	3.5
	2	DMSO	0.11	9.2
혈청형 19A- CRM ₁₉₇	1	수성	0.38	4.9
	2	DMSO	0.14	9.5
혈청형 19F- CRM ₁₉₇	1	수성	0.13	2.7
	2	DMSO	0.15	9.6
혈청형 22F- CRM ₁₉₇	1	수성	0.12	1.7
	2	DMSO	0.15	7.2
	3		0.15	7.0
혈청형 23F- CRM ₁₉₇	1	수성	0.39	3.2
	2	DMSO	0.19	10.8
혈청형 33F- CRM ₁₉₇	1	수성	0.23	4.5
	2	DMSO	0.14	7.0

[0234]

[0235]

CRM₁₉₇ 상의 상이한 부위에서의 접합 정도의 정량화

[0236]

폴리사카라이드는 담체 단백질의 N-말단에서의 아민 기 또는 CRM₁₉₇ 내 39개 리신 잔기의 임의의 측쇄에 접합될 수 있다. CRM₁₉₇의 아미노산 서열은 표 2에 제공되며, 여기서 리신 (K로 약칭됨)은 밑줄 및 볼드체이다. CRM₁₉₇ 단백질 상의 상이한 부위에서의 폴리사카라이드 접합의 위치를 찾아내고 접합 정도를 정량화하기 위해, LC/UV/MS 펩티드 맵핑 방법을 사용하였다. 대표적인 접합체 샘플 (DMSO 또는 수용액으로 제조됨)을 트립신으로 이중으로 소화시켜 트립신 펩티드를 생성하였다. 이어서, 혼합물을 역상 C₁₈ 칼럼 상에서 분리하고, UV 및 질량 분광계에 의해 분석하였다. CRM₁₉₇ 단백질 샘플 (폴리사카라이드와 접합되지 않음)을 또한 대조군으로서 동시에 삼중으로 처리하였다. 트립신은 리신 및 아르기닌 잔기의 C-말단 측 상에서 단백질을 절단하기 때문에, 리신 잔기에서의 접합은 그 부위를 프로테아제 저항성 있게 만든다. 특정한 부위에서의 접합 정도는 CRM₁₉₇ 대조군과 비교하여 트립신 펩티드의 피크 강도의 감소를 계산함으로써 결정하였다. 절단 부위 및 서열에 따라, 특정한 펩티드의 신호 감소는 선행 펩티드에서의 리신의 오-절단, 또는 펩티드의 말단에서의 리신의 오-절단, 또는 펩티드 서열의 중간에서의 접합으로 인한 것일 수 있다.

[0237]

도 1에서 CRM₁₉₇ 대조군과 비교하여 혈청형 19A 접합체에 대한 펩티드 신호 감소의 상대 백분율을 가능한 접합 부위에 대해 플롯팅하였다. x-축에 열거된 리신 위치는 CRM₁₉₇ 단백질 서열 상의 그의 순서에 기초하여 넘버링한 것이고 분석된 펩티드의 가능한 접합 부위를 나타낸다. 예를 들어, "33"은 펩티드 신호 감소가 제33 리신에서의 접합으로 인한 것임을 의미하고; "6, 7"은 펩티드 신호 감소가 제6 또는 제7 리신, 또는 두 리신에서의 접합으로 인한 것임을 의미한다. 도 1에서의 데이터는 각각의 부위에서의 접합 정도가 수용액과 비교하여 DMSO에서 제조된 접합체에 대해 일반적으로 더 높았을 뿐만 아니라, DMSO에서의 접합 부위가 더 많이 존재하였다는 것을 시사하였다. 그러한 추가의 접합 부위는 제29, 제30, 제31 및 제32 리신을 포함하며, 이들은 단지 이전에 확인된 공통 인간 T-세포 펩티드 에피토프에 위치한 리신이었던 (CRM₁₉₇ 서열의 펩티드 411-430 및 펩티드 431-450에 위치한, 문헌 [Raju et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25:3207-3214] 참조). 시험된 다른 혈청형에서 유사한

결과가 관찰되었다.

표 2: CRM₁₉₇ 아미노산 서열

아미노산	아미노산 서열
1-535	GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNVDDDW KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFDG ASRVVLSLPF AEGSSSVEYI NNWEQAKALS VELEINFETR GKRQDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS CINLDWDVIR DKTKTKIESL KEHGPIKNKM SESPNTVSE EKAKQYLEEF HQTALHPEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPF HDGYAVSWNT VEDSIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH SNEISSDSIG VLGYQKTVDH TKVNSKLSLF FEIKS (SEQ ID NO: 1)

실시예 5: 수용액 대 DMSO에서 제조된 혈청형 3 Ps-CRM₁₉₇ 접합체를 비교하는 마우스 면역원성 연구

모든 동물 실험을 미국 국립 보건원의 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침에 있는 권장사항에 따라 엄격하게 수행하였다. 프로토콜은 펜실베이니아주 웨스트 포인트 MRL 소재 동물 실험 윤리 위원회 (IACUC)에 의해 승인받았다.

8주령 암컷 CD1 마우스를 펜실베이니아주 웨스트 포인트 MRL의 동물 시설 내 마이크로아이솔레이터 케이지 (n=10/케이지)에 수용시켰다. 음식물 및 물은 자유롭게 이용가능하였다. 마우스 (n=10/군)를 표 3에 기재된 바와 같은 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 사용하여 제제화된 ST3-CRM₁₉₇ 접합체 (0.4 µg ST3 폴리사카라이드)에 의해 근육내로 (IM) 면역화시켰다. 음성 대조군 동물은 APA 단독을 받았다. 면역화를 제0일, 제14일 및 제28일에 수행하였다. 혈액을 제6일 및 제34일에 꼬리 정맥을 통해 혈청 분리기 튜브 (BD, 뉴저지주 프랭클린 레이크스)에 수집하였다.

표 3: 수용액 대 DMSO 용액에서 제조된 혈청형 3 Ps-CRM₁₉₇ 접합체를 비교하는 마우스 연구 부문.

부문 #	부문	접합체의 설명	제제의 설명
1	APA	대조군, 사용된 접합체 부재	0.2% w/v PS-20을 갖는 250 µg/mL APA, 20 mM L-히스티딘, pH 5.8 및 150 mM NaCl
2	ST3-CRM ₁₉₇ (수성)/APA	실시예 2에 기재된 바와 같은 수용액에서의 환원성 아미노화에 의해 제조된 1가 ST3-CRM ₁₉₇ 접합체 (표 1에서의 로트 #1)	0.2% w/v PS-20을 갖는 0.4 µg ST3-CRM ₁₉₇ , 250 µg/mL APA, 20 mM L-히스티딘, pH 5.8 및 150 mM NaCl
3	ST3-CRM ₁₉₇ (DMSO)/APA	실시예 3에 기재된 바와 같은 DMSO에서의 환원성 아미노화에 의해 제조된 1가 ST3-CRM ₁₉₇ 접합체 (표 1에서의 로트 #4)	0.2% w/v PS-20을 갖는 0.4 µg ST3-CRM ₁₉₇ , 250 µg/mL APA, 20 mM L-히스티딘, pH 5.8 및 150 mM NaCl

전기화학발광 (ECL) 면역원성 검정

이전에 기재된 바와 같은 96-웰 멀티플렉스화 전기화학발광 검정에서 약간의 변형을 가하여 마우스 항체 반응을 측정하였다. 문헌 [Marchese et al., 2009, Clin Vaccine Immunol 16(3):387-96; Skinner et al., 2011, Vaccine 29(48):8870-6; 및 Caro-Aguilar et al., 2017 Vaccine 35(6):865-72]을 참조한다. 간략하게, 메소-스케일 디스커버리 플레이트 (메소 스케일 다이아그노스틱스(Meso Scale Diagnostics), 메릴랜드주 록빌) 상에서 1시간 동안 시험 혈청 인큐베이션 및 세척 후에, 25 µl의 2 µg/ml 술포-태그 (메소 스케일 다이아그노스틱스, 메릴랜드주 록빌) 표지된 염소 항-마우스 IgG를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 진탕시키면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 이전에 기재된 바와 같이 처리하고, 메소 섹터 S600 상에서 판독하였다.

ECL 역가를 컷오프 값 (미리 결정된 양성 대조군 풀링 마우스 혈청의 폐렴구균 폴리사카라이드 ECL 기하 평균

신호)에 상응하는 선형으로 내삽된 회석률의 역수로서 계산하였다. ECL 및 회석률에 대한 로그 스케일링을 사용하여 내삽을 수행하였다. 이어서, 선형으로 내삽된 회석률을 역 변환시켜 역가를 얻었다. 완전히 컷오프 선 위의 샘플 곡선에 대한 마지막 3개의 ECL 데이터 포인트의 절편 및 기울기를 사용하거나 또는 완전히 컷오프 선 아래의 샘플 곡선에 대한 처음 2개의 ECL 데이터 포인트의 절편 및 기울기를 사용하여 선형 외삽 (로그-로그 스케일링)을 기초로 100 내지 1,562,500의 연구 회석률 범위 밖에 속하는 샘플에 대해 역가를 외삽하였다. 이어서, 선형으로 외삽된 회석률을 역 변환시켜 역가를 얻었다.

[0248] 읍소닌식세포 사멸 검정 (OPA)

[0249] 폐렴구균 혈청형 3 읍소닌식세포 사멸 검정 (OPA)을 이전에 기재된 바와 같되 약간의 변형을 가하여 수행하였다 (Caro-Aguilar et al., 2017 Vaccine 35(6):865-72; 및 Burton et al., 2006, Clin Vaccine Immunol 13(9):1004-9). 혈청, 박테리아, 보체 및 HL-60 세포의 인큐베이션 후에, 10 μ l의 읍소닌식세포 반응물을 200 μ l/웰의 멸균수를 함유하는 밀리포어 96-웰 필터 플레이트 상의 개별 웰로 옮겼다. 플레이트를 진공 여과하고, 100 μ l의 토드 휴에트 효모 추출물 (THYE, 테크노바(Teknova)) 브로쓰를 첨가하였다. 배지를 여과하고, 습윤 플레이트를 밀봉된 플라스틱 백 내에 27°C에서 밤새 놓아두었다. 이어서 플레이트 필터를 100 μ l/웰의 0.1% 쿠마시 블루 용액 (바이오-라드(Bio-Rad), 캘리포니아주 허큘레스)으로 염색하였다. 염색제를 플레이트를 통해 여과하고, 콜로니를 쿠마시 탈염색 용액 (바이오-라드)으로 탈염색하고, 건조될 때까지 다시 진공 여과하였다. 염색된 박테리아 콜로니를 CTL 이뮤노스팟 판독기 (셰이커 하이츠(Shaker Heights), 오하이오주) 상에서 계수하였다. OPK 역가는 보체 대조군 (무혈청 대조군) 웰에서의 평균 성장과 비교하여 적어도 50% 사멸을 갖는 혈청 회석률의 역수로 규정하였으며, 신호가 50% 사멸을 아우르는 연속 회석률 사이에 선형으로 내삽함으로써 계산하였다.

[0250] 및 3회 투여 후의 결과가 도 2에 예시되어 있으며, ECL 면역원성에 대해서는 표 4에 및 OPA에 대해서는 도 3에 예시된다. 수용액 및 DMSO 용액을 사용한 방법에 의해 제조된 접합체 둘 다는 면역원성이고, 박테리아에 대한 기능적 사멸 활성을 제공한다. 흥미롭게도, DMSO 용액을 사용한 방법에 의해 제조된 접합체는 수용액을 사용하여 제조된 접합체보다 더 높은 ECL 면역원성 및 OPA 반응 둘 다를 제공하였다. ECL 면역원성 차이는 통계적으로 유의하다. 부문 2 대비 부문 3의 GMT 비는 3.41이다 (하위 및 상위 95% 신뢰 구간은 1.26 및 9.26임).

[0251] 표 4: 수용액 대 DMSO 용액에서 제조된 혈청형 3 Ps-CRM₁₉₇ 접합체를 비교하는 마우스 연구 부문의 3회 투여-후 ECL 면역원성 결과.

부문 #	부문	기하 평균 역가, GMT	하위 95% 신뢰 구간	상위 95% 신뢰 구간
1	APA	368	227	596
2	ST3-CRM ₁₉₇ (수정)/APA	355,207	187,905	671,466
3	ST3-CRM ₁₉₇ (DMSO)/APA	1,211,654	719,297	2,041,028

[0252]

[0253] 실시예 6: 수용액 대 DMSO에서 환원성 아미노화에 의해 제조된 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체를 비교하는 성인 인간 면역원성 연구

[0254] 50세 이상의 건강한 폐렴구균 백신-나이프 성인에서의 2종의 15가 폐렴구균 접합체 백신 (PCV15)의 면역원성 및 안전성이 본 실시예에 기재된다.

[0255] 시험 설계

[0256] 우수 임상 관리기준에 따라 수행되는, 양호한 건강 (임의의 기저 만성 질병은 안정한 상태에 있는 것으로 기록되어 있어야 함)을 갖는 50세 이상의 성인 대상체에서 2종의 상이한 PCV15 제제 (PCV15-A 및 PCV15-B) 및 프레브나르 13(Prevnar 13)TM (폐렴구균 13가 접합체 백신 [디프테리아 CRM₁₉₇ 단백질], 미국 펜실베이니아주 필라델피아 소재 화이자 인크.(Pfizer Inc.)의 자회사인 와이어스 파마슈티칼스 인크.(Wyeth Pharmaceuticals Inc.))의 단일 용량의 안전성, 내약성 및 면역원성을 비교하기 위해 무작위화, 다중-장소, 이중-맹검 시험을 수행하였다.

[0257] 총 690명의 50세 이상의 건강한 폐렴구균 백신-나이프 개체를 등록시키고, 다음 3가지 상이한 백신접종 군: 프

레브나르 13TM, PCV15-A 및 PCV15-B에 1:1:1 비로 무작위화하였다. 무작위화를 연구 참가자의 연령별로 (50 내지 64세, 65 내지 74세 및 ≥ 75 세) 계층화하였다.

[0258] PCV15는 CRM₁₉₇에 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 각각의 하기 혈청형 (1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F) 2 μ g/0.5mL 용량, 및 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 6B 폐렴구균 폴리사카라이드 4 μ g/0.5mL 용량, 알루미늄 포스페이트 아주반트 125 μ g/0.5mL 용량, 20 mM L-히스티딘, 150 mM 염화나트륨, pH 5.8을 함유하였다. PCV15-A를 0.2% w/v P188와 함께 제제화하였다. PCV15-B를 0.1% w/v PS-20과 함께 제제화하였다.

[0259] PCV15-A의 경우, 실시예 2에 기재된 바와 같이 수용액에서의 환원성 아미노화를 사용하여 모든 15종의 폴리사카라이드 혈청형 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F)을 CRM₁₉₇에 접합시켰다. 이들 접합체 중 일부 (접합체 로트# 1 물질)에 대한 속성은 표 1에 열거된다.

[0260] PCV15-B의 경우, 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F를 실시예 3에 기재된 DMSO에서의 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합시켰다. 이들 접합체 (접합체 로트# 2 물질)에 대한 속성은 표 1에 열거된다. 나머지 혈청형 (1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F)에 대한 접합체는 PCV15-A에서 사용된 것과 동일한 접합체이다.

[0261] 두 PCV15 제제는 누적 안전성 평가에 기초하여 일반적으로 프레브나르 13TM과 대등한 안전성 프로파일을 가졌다 (데이터는 제시되지 않음). 혈청형-특이적 IgG GMC 및 OPA GMT를 제30일에 측정하였다. (OPA 결과는 포함되지 않음).

[0262] 결과

[0263] IgG 기하 평균 농도 (GMC) 및 신뢰 구간 (CI)은 표 6에 요약된다. PCV15-A 및 PCV15-B에서의 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F 접합체는 상기 기재된 바와 같은 상이한 접합 방법을 사용하여 제조하였다. 표 4에 제시된 결과와 일치하게, 표 6에 제시된 각각의 혈청형에 대한 면역원성 반응은 DMSO에서 폴리사카라이드 혈청형이 CRM₁₉₇에 접합되었을 때 개선되었다. PCV15-B에서 혈청형 18C, 19A, 19F 및 23F에 대한 GMC는 PCV15-A에서의 것보다 유의하게 더 높았다 (양측 알파=0.05). 이들 데이터는 면역원성을 개선시키는 DMSO에서의 접합의 이점을 강하게 입증한다. 이러한 발견은 폐렴구균 또는 다른 접합체 백신에 대해 이전에 입증된 바 없다.

[0264] 표 6: 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F에 대한 PCV15-A 및 PCV15-B 제제의 IgG 항체 반응의 요약. 이들 혈청형의 접합체를 수용액에서의 환원성 아미노화를 사용하여 제조하거나 (PCV15-A) 또는 DMSO에서의 환원성 아미노화를 사용하여 제조하였다 (PCV15-B).

혈청형	PCV15-A (N = 231), GMC [†] (제30일)		PCV15-B (N = 231), GMC [†] (제30일)		추정된 GMC 비 [†] [PCV15-B / PCV15-A] (95% CI) [†]
	n	추정된 반응	n	추정된 반응	
6A	217	3.74	217	4.93	1.32 (0.96, 1.81)
6B	217	3.69	217	4.95	1.34 (0.98, 1.85)
7F	217	4.09	217	4.53	1.11 (0.86, 1.43)
18C	217	6.61	217	10.99	1.66 (1.27, 2.18)
19A	217	8.77	217	13.83	1.58 (1.23, 2.02)
19F	217	4.11	217	6.80	1.66 (1.26, 2.17)
23F	217	3.92	217	5.53	1.41 (1.04, 1.91)

[0265] [†] 추정된 GMC, GMC 비 및 95% CI는 cLDA 모델로부터 얻은 것이다.

[0266] N = 무작위화되고 백신접종된 대상체의 수.

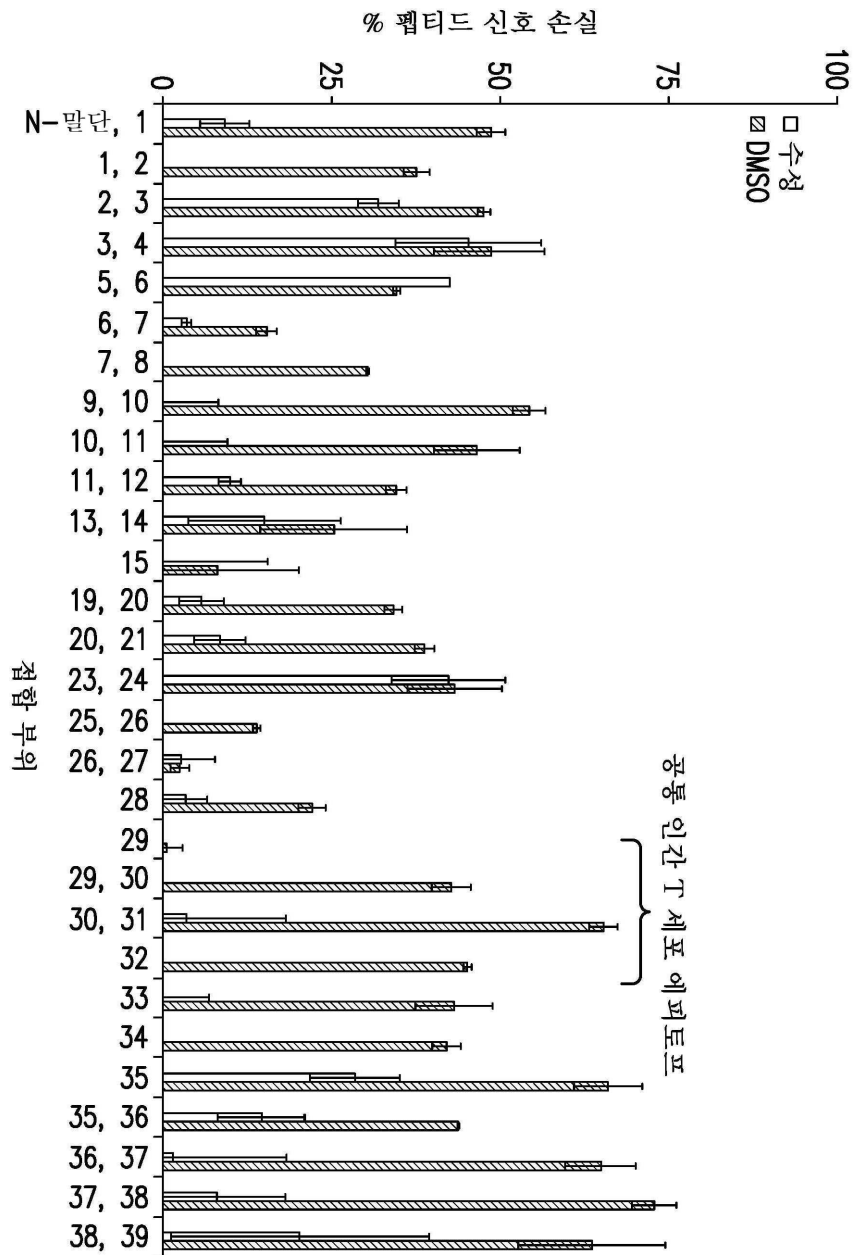
[0267] n = 분석에 기여하는 제30일 백신접종후 혈청학 결과를 갖는 대상체의 수.

[0268] GMC = 기하 평균 농도.

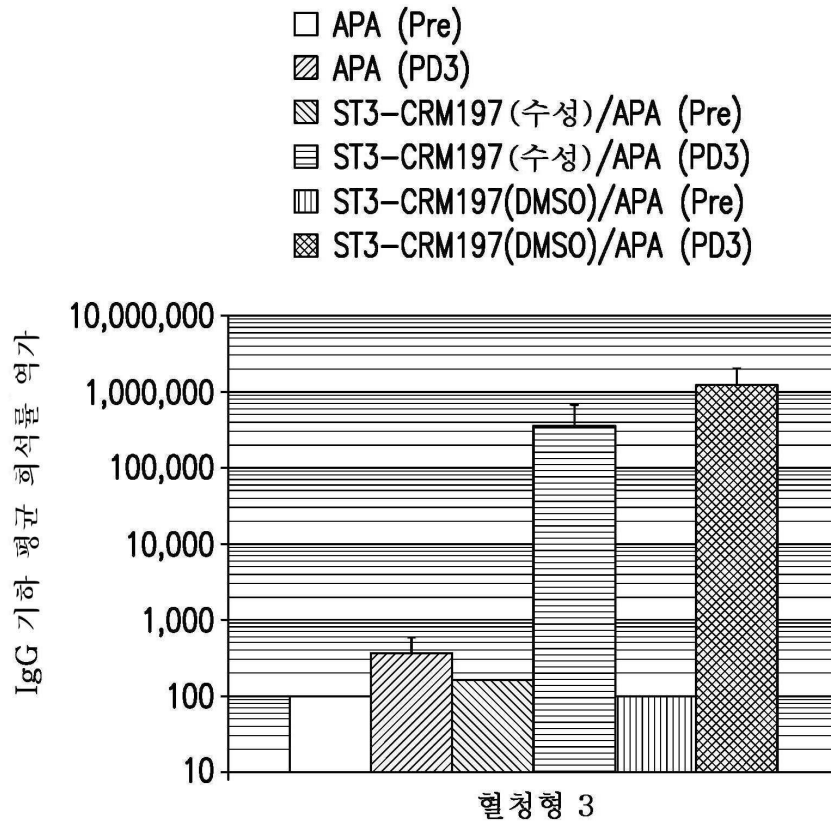
[0269] CI = 신뢰 구간

도면

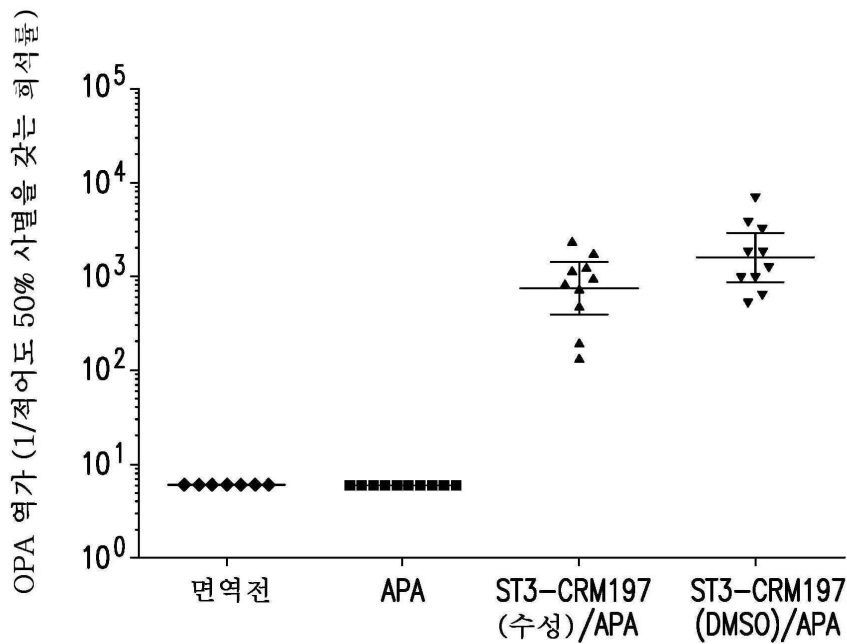
도면1



도면2



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> He, Jian

MacNair, John E.
 Smith, William J.
 Winters, Michael A.
 Joyce, Joseph G.
 Abeygunawardana, Chitrananda
 Musey, Luwy
 Pujar, Hari
 Skinner, Julie
 Wen, Emily
 McHugh, Patrick
 Williams, John Michael
 Lancaster, Catherine

<120> ENHANCING IMMUNOGENICITY OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
 POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATES

<130> 24424

<150> 62/555,444

<151> 2017-09-07

<150> 62/463,216

<151> 2017-02-24

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 535

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CRM197 (detoxified variant of diphtheria toxin)

<400> 1

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn

1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln

20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp

35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu

 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp

 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu

 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255
 His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu

290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala

305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser

325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp

340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe

355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His

370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr

385 390 395 400

Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His

405 410 415

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val

420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr

435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile

450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly

465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser

485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu

500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser

515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser

530

535