



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0080201
(43) 공개일자 2022년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/092 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7018413(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년01월15일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7026127
원출원일자(국제) 2015년01월15일
심사청구일자 2020년09월10일
(85) 번역문제출일자 2022년05월31일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/050315
(87) 국제공개번호 WO 2015/110941
국제공개일자 2015년07월30일

(71) 출원인
화이자 인코포레이티드
미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트 235
(72) 발명자
쿠퍼 데이빗
미국 뉴욕주 10950 몬로 웹 팜 로드 9
에미니 에밀리오 안토니
미국 펜실베이니아주 19025 드레셔 스톤톤 코트 5
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

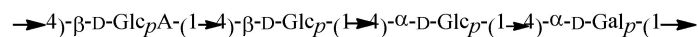
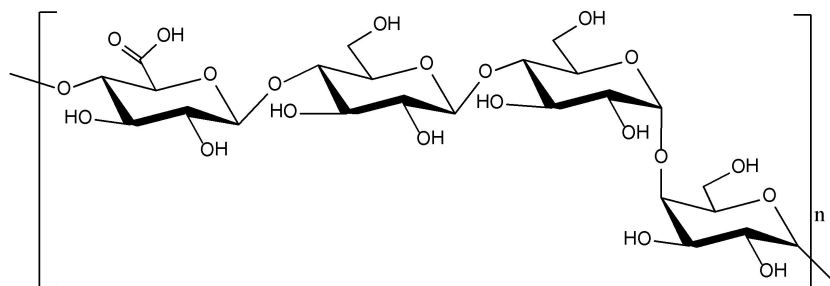
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **접합된 캡슐 사카라이드 항원을 포함하는 면역원성 조성물 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 캡슐 사카라이드 항원(당접합체)을 포함하는 신규의 면역원성 조성물 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 면역원성 조성물은 전형적으로 프레브나르(Prevnar), 신플로릭스(Synflorix) 및/또는 프레브나르 13에서 발견되지 않는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형으로부터의 하나 이상의 당접합체를 포함한다. 본 발명은 또한 상기 신규의 면역원성 조성물을 사용하는, 폐렴구균 감염에 대한 인간 대상, 특히 유아 및 노인의 백신화에 관한 것이다.

대표도



$$\text{MW (H}^+) = 662.553 \text{ C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{21}$$

$$\text{MW (Na}^+) = 684.534 \text{ C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_{21}\text{Na}_1$$

(52) CPC특허분류

A61K 2039/6037 (2013.01)

(72) 발명자

구 지안신

미국 뉴저지주 07652 파라무스 불러드 애비뉴 367

한 밍밍

미국 펜실베이니아주 18064 나자레스 올드 타운 로드 2302

얀센 카트린 우데

미국 뉴욕주 10065 뉴욕 이스트 65번 스트리트 160
아파트먼트 11씨

카인탄 라제쉬 쿠마르

미국 뉴욕주 10983 타판 키 플레이스 15

김 진환

미국 뉴욕주 10901 서퍼튼 소머셋 드라이브 44

프라사드 아바리 크리쉬나

미국 노스캐롤라이나주 27516 채플 힐 워샵 드라이브 105

프라이드 마이클 윌리엄

미국 뉴욕주 10301 스타텐 아일랜드 베이 스트리트
랜딩 80 유닛 8에이

왓슨 웬디 조

미국 펜실베이니아주 19422 블루 벨 베이 힐 드라이브 121

양 유-원

미국 코네티컷주 06905 스탬포드 페퍼 리지 로드
154 유닛 11

명세서

청구범위

청구항 1

면역원성 당접합체의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 접합된 캡슐 사카라이드 항원(당접합체)을 포함하는 신규의 면역원성 조성물 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 면역원성 조성물은 전형적으로 당접합체를 포함할 것이며, 여기에서 상기 사카라이드는 스트렙토코커스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)의 혈청형으로부터 유래된다. 본 발명은 또한 상기 신규의 면역원성 조성물을 사용하는, 폐렴구균 감염에 대한 인간 대상, 특히 유아 및 노인의 백신화에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 폐렴구균에 의해 야기된 감염은 전 세계에 걸친 이환율 및 사망률의 주요 원인이다. 폐렴, 열성 세균혈증 및 뇌수막염은 침습성 폐렴구균 질병의 가장 흔한 발현인 반면, 호흡기내 세균 확산은 중이감염, 부비동염 또는 재발성 기관지염을 발생시킬 수 있다. 침습성 질병에 비해, 비-침습성 발현은 대개 덜 심각하지만 상당히 더 흔하다.

[0003] 유럽 및 미국에서, 폐렴구균 폐렴은 가장 흔한 지역사회 획득 세균성 폐렴이며, 매년 성인 100,000명당 약 100 명이 병에 걸리는 것으로 추정된다. 열성 세균혈증 및 뇌수막염에 대한 상응하는 숫자는 각각 100 000명당 15 내지 19명 및 100,000명당 1 내지 2명이다. 이들 발현 중 하나 이상의 위험성은 유아 및 노인뿐만 아니라 면역력이 약화된 모든 연령층에서 훨씬 더 높다. 경제적으로 발달한 지역에서조차, 침습성 폐렴 질병은 높은 사망률을 수반하며; 폐렴구균 폐렴이 있는 성인의 경우 사망률은 평균 10% 내지 20%인 반면, 고-위험군에서는 50%를 초과할 수도 있다. 폐렴은 단연코 세계적인 폐렴구균 사망의 가장 흔한 원인이다.

[0004] 폐렴구균 질병의 원인 인자인 스트렙토코커스 뉴모니아에(폐렴구균)는 폴리사카라이드 캡슐에 의해 둘러싸인 그람-양성의 캡슐화된 구균이다. 상기 캡슐 조성의 차이는 약 91개 캡슐 유형간의 혈청학적 차이를 허용하며, 상기 유형 중 일부는 폐렴구균 질병과 빈번히 관련되고, 다른 것들은 드물게 관련된다. 침습성 폐렴구균 감염은 폐렴, 뇌수막염 및 열성 세균혈증을 포함하며, 통상적인 비-침습성 발현 중에는 중이염, 부비동염 및 기관지염이 있다.

[0005] 폐렴구균 접합 백신(PCV)은 스트렙토코커스 뉴모니아에(폐렴구균)에 의해 야기된 질병에 대한 보호에 사용되는 폐렴구균 백신이다. 현재 세계 시장에서 3개의 PCV 백신을 입수할 수 있다: 프레브나르(PREVNAR)(등록상표)(일부 국가에서 프레베나르(Prevenar)라 칭한다)(7가 백신), 신플로릭스(SYNFLORIX)(등록상표)(10가 백신) 및 프레브나르 13(등록상표)(13가 백신).

[0006] 최근의 필수 항생제에 대한 만연된 미생물 내성의 발생 및 증가하고 있는 면역저하된 사람들의 수는 훨씬 더 광범위한 보호를 갖는 폐렴구균 백신에 대한 필요성을 강조하고 있다.

[0007] 특히, 프레브나르 13(등록상표)에서 발견되지 않는 혈청형으로 인한 폐렴구균 질병의 유효 적용 범위 및 시간에 따른 혈청형 교체 잠재성에 대해 충족되지 않은 채로 있는 의학적 요구를 다룰 필요가 있다. 상기 프레브나르 13(등록상표)의 13개를 넘는 질병을 야기하는 특이적인 혈청형은 지역, 인구에 따라 다양하며, 항생제 내성의 획득, 폐렴구균 백신 도입 및 기원을 알지 못하는 오랜 성향으로 인해 시간에 따라 변할 수 있다. 인간 및 특히 2세 미만의 아동에서 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형에 대한 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있는 면역원성 조성물이 필요하다.

[0008] 본 발명의 신규 면역원성 조성물의 목적은 프레브나르 13(등록상표)에서 발견되지 않는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형에 대한 적합한 보호를 제공하는 것이다. 하나의 태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물의 목적은 프레브나르(등록상표)(7가 백신), 신플로릭스(등록상표) 및/또는 프레브나르 13(등록상표)에 의해 현재 다루어지는 혈청형에 대한 면역 반응은 유지하면서 상기 백신들에서 발견되지 않는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형

에 대한 적합한 보호를 제공하는 것이다.

발명의 내용

- [0009] 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 당접합체, 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터의 당접합체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 하나의 태양에서, 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 하나 이상의 당접합체, 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 하나 이상의 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0011] 또 다른 태양에서, 본 발명은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 하나 이상의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 하나 이상의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 하나 이상의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 하나 이상의 당접합체, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 하나 이상의 당접합체, 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터의 하나 이상의 당접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0012] 하나의 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0013] 또 다른 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 5 및 7F로부터의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0014] 또 다른 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6A 및 19A로부터의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0015] 또 다른 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0016] 또 다른 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 2, 9N, 17F, 20 및/또는 15C로부터의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0017] 하나의 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9N, 9A 및/또는 9L로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0018] 하나의 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 태양에서, 상기 면역원성 조성물은 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25-가 페렴구균 접합체 조성물이다.
- [0019] 하나의 태양에서, 상기 당접합체는 DT(디프테리아 독소), TT(파상풍 변성독소), CRM₁₉₇, 다른 DT 돌연변이체, PD(하에모필루스 인플루엔자에 단백질 D), 및 이들의 면역학적 기능 등가물로 이루어진 군으로부터 선택된 담체 단백질에 개별적으로 접합된다.
- [0020] 하나의 태양에서, 본 발명은 본 문서에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나로 충전된 용기를 제공한다.
- [0021] 하나의 태양에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한, 특히 백신으로서 사용하기 위한 본 문서에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나를 제공한다.
- [0022] 하나의 태양에서, 본 발명은 대상에게 면역학적 유효량의 본 문서에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나를 투여함을 포함하는, 상기 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에와 관련된 감염, 질병 또는 상태를 예방하거나 치료하거나 개선하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8(Pn-8) 캡슐 폴리사카라이드의 반복된 폴리사카라이드 구조를 도시

한다.

도 2는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A(Pn-10A) 캡슐 폴리사카라이드의 반복된 폴리사카라이드 구조를 도시한다.

도 3은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A(Pn-11A) 캡슐 폴리사카라이드의 반복된 폴리사카라이드 구조를 도시한다.

도 4는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F(Pn-12F) 캡슐 폴리사카라이드의 반복된 폴리사카라이드 구조를 도시한다.

도 5는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B(Pn-15B) 캡슐 폴리사카라이드의 반복된 폴리사카라이드 구조를 도시한다.

도 6은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F(Pn-22F) 캡슐 폴리사카라이드의 반복된 폴리사카라이드 구조를 도시한다.

도 7은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F(Pn-33F) 캡슐 폴리사카라이드의 반복된 폴리사카라이드 구조를 도시한다.

도 8은 Pn-33F 당접합체의 제조에 사용될 수 있는 활성화(A) 및 접합(B) 과정에 대한 전형적인 공정 흐름도를 도시한다.

도 9는 TEMPO/NCS 산화 반응에서 NCS 량의 변화에 의한 DO에 대한 효과를 도시한다.

도 10은 Pn-12F 당접합체 안정성의 평가를 도시한다.

도 11은 교차-기능성 OPA 반응을 도시한다. 13가 폐렴구균 접합 백신(US Study 6115A1-004; ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00427895)으로 백신화된 성인으로부터의 59개 혈청의 부분집합을 혈청형 9V, 9A, 9L 및 9N에 대한 기능성 항체의 존재에 대해서 OPA에서 평가하였다. OPA 양성 역가(즉 $\geq 1:8$)를 갖는 샘플의 퍼센트는 각 그룹 위에 나타낸다. 기하 평균 역가(GMT)를 각 그룹 아래의 x축에 나열한다.

도 12는 66개의 합치된 전/후 혈청의 교차-기능성 OPA 반응을 도시한다. 13가 폐렴구균 접합 백신(study 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00546572)으로 백신화된 성인으로부터의 66개의 합치된 백신화-전 및 -후 혈청 패널의 부분집합을 혈청형 9V, 9A, 9L 및 9N에 대한 기능성 항체의 존재에 대해서 OPA에서 평가하였다. OPA 양성 역가(즉 $\geq 1:8$)를 갖는 샘플의 퍼센트는 각 그룹 위에 나타낸다. 기하 평균 역가(GMT)를 각 그룹 아래의 x축에 나열한다.

도 13은 면역화 전후 - 폐렴구균 혈청형 9V(Pn9V)의 역 누적 분포 곡선(RCDC)을 도시한다.

13가 폐렴구균 접합 백신(study 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00546572)으로 백신화된 합치된 백신화-전 및 후 혈청 패널(N = 66)로부터의 혈청형 9V에 대한 OPA 역가의 역 누적 분포 곡선. 플롯은 OPA 양성 역가(즉 $\geq 1:8$)를 갖는 혈청의 퍼센트를 나타낸다.

도 14는 면역화 전후 - 폐렴구균 혈청형 9A(Pn9A)의 역 누적 분포 곡선(RCDC)을 도시한다.

13가 폐렴구균 접합 백신(study 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00546572)으로 백신화된 합치된 백신화-전 및 후 혈청 패널(N = 66)로부터의 혈청형 9A에 대한 OPA 역가의 역 누적 분포 곡선. 플롯은 OPA 양성 역가(즉 $\geq 1:8$)를 갖는 혈청의 퍼센트를 나타낸다.

도 15는 면역화 전후 - 폐렴구균 혈청형 9L(Pn9L)의 역 누적 분포 곡선(RCDC)을 도시한다.

13가 폐렴구균 접합 백신(study 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00546572)으로 백신화된 합치된 백신화-전 및 후 혈청 패널(N = 66)로부터의 혈청형 9L에 대한 OPA 역가의 역 누적 분포 곡선. 플롯은 OPA 양성 역가(즉 $\geq 1:8$)를 갖는 혈청의 퍼센트를 나타낸다.

도 16은 면역화 전후 - 폐렴구균 혈청형 9N(Pn9N)의 역 누적 분포 곡선(RCDC)을 도시한다.

13가 폐렴구균 접합 백신(study 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00546572)으로 백신화된 합치된 백신화-전 및 후 혈청 패널(N = 66)로부터의 혈청형 9N에 대한 OPA 역가의 역 누적 분포 곡선. 플롯은 OPA 양성 역가(즉 $\geq 1:8$)를 갖는 혈청의 퍼센트를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 1 본 발명의 번역원성 조성물

[0025] 본 발명의 번역원성 조성물은 전형적으로 접합된 캡슐 사카라이드 항원(또한 당접합체라 명명한다)을 포함할 것이며, 여기에서 상기 사카라이드는 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형으로부터 유래된다.

[0026] 바람직하게, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 캡슐 사카라이드의 수는 8개의 상이한 혈청형(또는 "v", 결합가) 내지 20개의 상이한 혈청형(20v)의 범위일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 8개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 9개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 10개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 11개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 12개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 13개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 14개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 15개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 16개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 17개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 18개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 19개의 상이한 혈청형이 존재한다. 하나의 실시태양에서, 20개의 상이한 혈청형이 존재한다. 상기 캡슐 사카라이드를 담체 단백질에 접합시켜 본 발명에서 하기에 개시하는 바와 같은 당접합체를 형성시킨다.

[0027] 상기 단백질 담체가 상기 조성물 중의 2개 이상의 사카라이드에 대해 동일한 경우, 상기 사카라이드를 상기 단백질 담체의 동일한 분자에 접합시킬 수 있다(담체 분자는 상기 분자에 접합된 2개 이상의 상이한 사카라이드를 갖는다)(예를 들어, WO2004/083251을 참조하시오).

[0028] 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 상기 단백질 담체의 상이한 분자들에 각각 개별적으로 접합된다(단백질 담체의 각 분자에 오직 한 가지 유형의 사카라이드가 접합된다). 상기 실시태양에서, 상기 캡슐 사카라이드는 상기 담체 단백질에 개별적으로 접합된다고 한다.

[0029] 본 발명의 목적을 위해서, '당접합체'란 용어는 담체 단백질에 공유 결합된 캡슐 사카라이드를 가리킨다. 하나의 실시태양에서, 캡슐 사카라이드는 담체 단백질에 직접 결합된다. 두 번째 실시태양에서, 세균 사카라이드는 이격자/링커를 통해 단백질에 결합된다.

[0030] 1.1 본 발명의 담체 단백질

[0031] 본 발명의 당접합체의 한 성분은 사카라이드가 접합되는 담체 단백질이다. "단백질 담체" 또는 "담체 단백질" 또는 "담체"란 용어들은 본 발명에서 호환적으로 사용될 수 있다. 담체 단백질은 표준 접합 과정을 받아들일 수 있어야 한다.

[0032] 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체의 담체 단백질은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: DT(디프테리아 독소), TT(파상풍 변성 독소) 또는 TT의 단편 C, CRM₁₉₇(디프테리아 독소의 무독성이지만 항원적으로 동일한 변체), 다른 DT 돌연변이체(예를 들어, CRM176, CRM228, CRM45(문헌[Uchida et al. (1973) J. Biol. Chem. 218:3838-3844]), CRM9, CRM102, CRM103 또는 CRM107; 및 문헌[Nicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc. (1992)]에 개시된 다른 돌연변이; Glu-148에서 Asp, Gln 또는 Ser로의 및/또는 Ala 158에서 Gly로의 돌연변이 또는 결실 및 미국특허 제 4,709,017 호 및 미국특허 제 4,950,740 호에 개시된 다른 돌연변이; 적어도 하나 이상의 잔기 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534의 돌연변이 및 미국특허 제 5,917,017 호 및 미국특허 제 6,455,673 호에 개시된 다른 돌연변이; 또는 미국특허 제 5,843,711 호에 개시된 단편, 페렴구균 뉴모리신(ply)(문헌[Kuo et al. (1995) Infect Immun 63:2706-2713])(일부 방식으로 해독된 ply, 예를 들어 dPLY-GMBS(WO 2004/081515, WO 2006/032499) 또는 dPLY-포물을 포함한다)), PhtX, 예를 들어 PhtA, PhtB, PhtD, PhtE(PhtA, PhtB, PhtD 또는 PhtE의 서열은 WO 00/37105 및 WO 00/39299에 개시되어 있다) 및 Pht 단백질의 융합물, 예를 들어 PhtDE 융합물, PhtBE 융합물, Pht A-E(WO 01/98334, WO 03/054007, WO 2009/000826), OMPC(수막구균 외막 단백질)(상기 단백질은 대개 네이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*) 혈청군 B(EP0372501)로부터 추출된다), PorB(네이세리아 메닝지티디스로부터), PD(하에모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D; 예를 들어 EP0594610 B를 참조하시오), 또는 그의 면역학적 기능성 등가물, 합성 펩타이드(EP0378881, EP0427347), 열충격 단백질(WO 93/17712, WO 94/03208), 백일해 단백질(WO 98/58668, EP0471177), 사이토킨, 림포카인, 성장 인자 또는 호르몬(WO 91/01146), 다양한 병원체 유래된 항원으로부터의 다수의 인간 CD4⁺ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질(문헌[Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31:3816-3824]), 예를 들어 N19 단백질(문헌[Baraldoi et al.

(2004) Infect Immun 72:4884-4887]) 페렴구균 표면 단백질 PspA(WO 02/091998), 철 흡수 단백질(WO 01/72337), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*)의 독소 A 또는 B(WO 00/61761), 트랜스페린 결합 단백질, 페렴구균 부착 단백질(PsaA), 재조합 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A(특히 그의 무독성 돌연변이체(예를 들어, 글루탐산 553에 치환을 갖는 외독소 A(문헌[Douglas et al. (1987) J. Bacteriol. 169(11):4967-4971])). 다른 단백질들, 예를 들어 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 소 혈청 알부민(BSA) 또는 튜베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)를 또한 담체 단백질로서 사용할 수 있다. 다른 적합한 담체 단백질은 불활성화된 세균 독소, 예를 들어 콜레라 변성독소(예를 들어, WO 2004/083251에 개시된 바와 같은), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) LT, 에스케리키아 콜라이 ST, 및 슈도모나스 아에루기노사로부터의 외독소 A를 포함한다.

[0033] 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체의 담체 단백질은 TT, DT, DT 돌연변이체(예를 들어, CRM₁₉₇), 하에모필루스 인플루엔자에 단백질 D, PhtX, PhtD, PhtDE 융합물(특히 WO 01/98334 및 WO 03/054007에 개시된 것들), 해독된 뉴모리신, PorB, N19 단백질, PspA, OMPC, 클로스트리디움 디피실레의 독소 A 또는 B 및 PsaA로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

[0034] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 당접합체의 담체 단백질은 DT(디프테리아 변성독소)이다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 당접합체의 담체 단백질은 TT(파상풍 변성독소)이다.

[0035] 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 당접합체의 담체 단백질은 PD(하에모필루스 인플루엔자에 단백질 D; 예를 들어 EP0594610 B를 참조하시오)이다.

[0036] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드는 CRM₁₉₇ 단백질에 접합된다. 상기 CRM₁₉₇ 단백질은 디프테리아 독소의 무독성 형태이나 상기 디프테리아 독소로부터 면역학적으로 구분될 수 없다. CRM₁₉₇은 독소생산성 코리네파지 베타의 니트로소구아닌 돌연변이유발에 의해 생성된 비독소생산성 파지 $\beta 197^{tox-}$ 에 의해 감염된 코리네파테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*)에 의해 생산된다(문헌[Uchida et al. (1971) Nature New Biology 233:8-11]). 상기 CRM₁₉₇ 단백질은 상기 디프테리아 독소와 동일한 분자량을 갖지만 구조 유전자에서 단일 염기 변화(구아닌에서 아데닌으로)에 의해 상기 독소와 상이하다. 상기 단일 염기 변화는 성숙한 단백질에서 아미노산 치환(글리신 대신 글루탐산)을 야기하며 디프테리아 독소의 독성 성질을 제거한다. 상기 CRM₁₉₇ 단백질은 사카라이드에 대한 안전하고 유효한 T-세포 의존성 담체이다. CRM₁₉₇ 및 그의 생산에 대한 추가의 상세한 내용을 예를 들어 미국특허 제 5,614,382 호에서 찾을 수 있다.

[0037] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드는 CRM₁₉₇ 단백질 또는 CRM₁₉₇의 A쇄(CN103495161을 참조하시오)에 접합된다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드는 유전자 재조합 에스케리키아 콜라이에 의한 발현을 통해 획득된 CRM₁₉₇의 A쇄(CN103495161을 참조하시오)에 접합된다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드들은 모두 CRM₁₉₇에 접합된다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드들은 모두 CRM₁₉₇의 A쇄에 접합된다.

[0038] 따라서, 빈번한 실시태양들에서, 본 발명의 당접합체는 담체 단백질로서 CRM₁₉₇을 포함하며, 여기에서 상기 캡슐 폴리사카라이드는 CRM₁₉₇에 공유 결합된다.

[0039] 1.2 본 발명의 캡슐 사카라이드

[0040] 본 명세서 전체를 통해 "사카라이드"란 용어는 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 가리킬 수 있으며 둘 다를 포함한다. 빈번한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 폴리사카라이드, 특히 스트렙토코커스 뉴모니아에 캡슐 폴리사카라이드이다.

[0041] 캡슐 폴리사카라이드는 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지된 표준 기법에 의해 제조된다.

[0042] 본 발명에서, 캡슐 폴리사카라이드를 예를 들어 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 제조할 수 있다. 전형적으로 캡슐 폴리사카라이드는 각각의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형을 배지(예를 들어, 대두-기재 배지)에서 증식시킴으로써 제조되며, 이어서 상기 폴리사카라이드를 상기 세균 배양물로부터 제조한다. 본 발명의 당접합체에 사용되는 각각의 폴리사카라이드의 제조에 사용된 스트렙토코커스 뉴모니아에의 세균 균주를 확립된 배양 콜렉션 또는

임상 시편으로부터 수득할 수도 있다.

- [0043] 상기 유기체(각각의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형)의 집단을 종종 시드 바이알로부터 시드 병으로 확대하고 생산 규모 발아 부피에 도달할 때까지 증가하는 부피의 하나 이상의 시드 발아기를 통해 계대배양한다. 상기 생육 주기의 끝에서, 세포를 용해시키고 이어서 상기 용해물 브로쓰를 하류(정제) 처리를 위해 수확한다(예를 들어, WO 2006/110381, WO 2008/118752, 및 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 및 2008/0286838을 참조하시오).
- [0044] 개별적인 폴리사카라이드를 전형적으로는 원심분리, 침전, 한외여과, 및/또는 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제한다(예를 들어, WO 2006/110352 및 WO 2008/118752를 참조하시오).
- [0045] 정제된 폴리사카라이드를 반응(예를 들어, eTEC 이격자와)이 가능하도록 활성화시키고(예를 들어, 화학적으로 활성화시키고) 이어서 본 발명에 추가로 개시된 바와 같이 본 발명의 당접합체에 통합시킨다.
- [0046] 스트렙토코커스 뉴모니아에 캡슐 폴리사카라이드는 8개 이하의 당 잔기를 함유할 수 있는 반복되는 올리고사카라이드 단위를 포함한다.
- [0047] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드는 하나의 올리고사카라이드 단위이거나 반복되는 올리고사카라이드 단위의 고유 길이 사카라이드 쇄보다 더 짧을 수도 있다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드는 관련 혈청형의 하나의 반복되는 올리고사카라이드 단위이다.
- [0048] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 캡슐 사카라이드는 올리고사카라이드일 수 있다. 올리고사카라이드는 낮은 수의 반복 단위(전형적으로 5 내지 15의 반복 단위)를 가지며 전형적으로는 합성적으로 또는 폴리사카라이드의 가수분해에 의해 유도된다.
- [0049] 바람직하게, 본 발명의 및 본 발명의 면역원성 조성물 중의 캡슐 사카라이드는 모두 폴리사카라이드이다. 고분자량 캡슐 폴리사카라이드는 항원 표면에 존재하는 에피토프로 인해 몇몇 항체 면역 반응을 유도할 수 있다. 고분자량 캡슐 폴리사카라이드의 단리 및 정제가 바람직하게는 본 발명의 접합체, 조성물 및 방법에 사용하기 위해 고려된다.
- [0050] 일부 실시태양에서, 접합 전 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 4,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 폴리사카라이드는 50 내지 4,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 폴리사카라이드는 50 내지 3,500 kDa; 50 내지 3,000 kDa; 50 내지 2,500 kDa; 50 내지 2,000 kDa; 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 100 내지 4,000 kDa; 100 내지 3,500 kDa; 100 내지 3,000 kDa; 100 내지 2,500 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 200 내지 4,000 kDa; 200 내지 3,500 kDa; 200 내지 3,000 kDa; 200 내지 2,500 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0051] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류(sizing) 기법을 가할 수도 있다. 기계적 또는 화학적 크기분류가 사용될 수 있다. 화학적 가수분해를 아세트산을 사용하여 수행할 수 있다. 기계적 크기분류를 고압 균질화 전단을 사용하여 수행할 수 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전(예를 들어, 활성화 전) 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0052] 바람직한 실시태양에서, 상기 정제된 폴리사카라이드는 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 캡슐 폴리사카라이드이며, 여기에서 상기 캡슐 폴리사카라이드는 본 발명에서 상기에 개시된 바와 같은 분자량 범위 중 하나의 범위내에 있는 분자량을 갖는다.
- [0053] 본 발명에 사용되는 바와 같이, 폴리사카라이드 또는 담체 단백질-폴리사카라이드 접합체의 "분자량"이란 용어는 다각도 레이저 광산란 검출기(MALLS)와 병행된 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 계산된 분자량을 지칭한다.
- [0054] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 9V, 18C, 11A, 15B, 22F 및/또는 33F로부터의 페럼구균 사카라이드는 0-아세틸화된다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 9V, 11A, 15B, 22F 및/또는 33F로부터의 페럼구균 사카라

이드는 0-아세틸화된다.

- [0055] 본 발명에 개시된 정제된 폴리사카라이드를 화학적으로 활성화시켜 상기 사카라이드를 상기 담체 단백질과 반응할 수 있게 만든다. 이들 폐렴구균 접합체를 하기에 개시되는 바와 같이 별도의 과정에 의해 제조하고 단일 투여량 제형으로 제형화한다.
- [0056] **1.2.1 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폐렴구균 폴리사카라이드**
- [0057] 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 캡슐 사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지된 표준 기법에 의해 제조할 수 있다(예를 들어, WO 2006/110381을 참조하시오). 캡슐 폴리사카라이드를, 각각의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형을 배지에서 증식시킴으로써 생성시킬 수 있으며; 상기 생육 주기의 끝에서, 세포를 용해시키고 이어서 상기 용해물 브로쓰를 하류(정제) 처리를 위해 수확한다. 개별적인 폴리사카라이드를 전형적으로는 원심분리, 침전, 한외여과, 및/또는 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제한다(예를 들어, WO 2006/110352 및 WO 2008/118752를 참조하시오). 정제된 폴리사카라이드를 본 발명에 개시된 바와 같이 추가로 처리하여 본 발명의 당접합체를 제조할 수 있다.
- [0058] 일부 실시태양에서, 접합 전에 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및/또는 23F로부터 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 4,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 폴리사카라이드는 50 내지 4,000 kDa; 50 내지 3,000 kDa 또는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 폴리사카라이드는 50 내지 3,500 kDa; 50 내지 3,000 kDa; 50 내지 2,500 kDa; 50 내지 2,000 kDa; 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 100 내지 4,000 kDa; 100 내지 3,500 kDa; 100 내지 3,000 kDa; 100 내지 2,500 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 200 내지 4,000 kDa; 200 내지 3,500 kDa; 200 내지 3,000 kDa; 200 내지 2,500 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0059] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류 기법을 가할 수도 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전(예를 들어, 활성화 전) 최종 크기분류 단계 후의 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0060] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 9V 및/또는 18C로부터의 폐렴구균 사카라이드는 0-아세틸화된다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 9V로부터의 폐렴구균 사카라이드는 0-아세틸화되고, 본 발명의 혈청형 18C로부터의 폐렴구균 사카라이드는 탈-0-아세틸화된다.
- [0061] **1.2.2 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 8**
- [0062] 혈청형 8의 폴리사카라이드 반복 단위는 하나의 글루쿠론산(GlcpA), 2개의 글루코피라노스(Glcp) 및 하나의 갈락토피라노스(Galp)를 갖는 선형 테트라사카라이드 단위로 이루어진다(문헌[Jones et al. (1957) The Journal of the American Chemical Society. 79(11):2787-2793]). 4개의 모노사카라이드는 모두 도 1에 도시된 바와 같이 1,4-결합을 통해 결합된다.
- [0063] 혈청형 8 사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하시오). 또한, 상기 사카라이드를 합성 프로토콜을 사용하여 생성시킬 수 있다.
- [0064] 혈청형 8 스트렙토코커스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 컬렉션(예를 들어, 스트렙토코커스 기준 실험실(미국 조지아주 아틀란타 소재의 질병통제예방 센터)) 또는 임상 시편으로부터 수득할 수 있다.
- [0065] 일부 실시태양에서, 접합 전 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 50 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 70 내지 900 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다.

- [0066] 추가의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 600 kDa; 100 내지 500 kDa; 100 내지 400 kDa; 150 내지 600 kDa; 150 내지 500 kDa; 150 내지 400 kDa; 200 내지 600 kDa; 200 내지 500 kDa; 200 내지 400 kDa; 250 내지 600; 250 내지 500 kDa; 250 내지 400 kDa; 250 내지 350 kDa; 300 내지 600 kDa; 300 내지 500 kDa; 300 내지 400 kDa; 400 내지 600 kDa; 500 내지 600 kDa의 분자량; 및 유사한 목적하는 분자량 범위를 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0067] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류 기법을 가할 수도 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전 (예를 들어, 활성화 전) 최종 크기분류 단계 후의 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0068] **1.2.3 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 10A**
- [0069] 혈청형 10A의 폴리사카라이드 반복 단위는 2개의 갈락토피라노스(Gal_f), 3개의 갈락토피라노스(Gal_p), 하나의 N-아세틸갈락토스아민(Gal_pNAc) 및 주쇄 포스포리비톨을 갖는 분지된 핵사사카라이드 반복 단위로 이루어진다(문헌 [Jones, C. (2005) Carbohydrate Research 269(1):175-181]). 도 2에 도시된 바와 같이 β -Gal_pNAc 부분에 2개의 분지화 모노사카라이드(β -3-Gal_p 및 β -6-Gal_f)가 존재한다.
- [0070] 혈청형 10A 사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하시오). 또한, 상기 사카라이드를 합성 프로토콜을 사용하여 생성시킬 수 있다.
- [0071] 혈청형 10A 스트렙토코커스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 컬렉션(예를 들어, 스트렙토코커스 기준 실험실(미국 조지아주 아틀란타 소재의 질병통제예방 센터)) 또는 임상 시편으로부터 수득할 수 있다.
- [0072] 일부 실시태양에서, 접합 전 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 50 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 70 내지 900 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0073] 추가의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 600 kDa; 100 내지 500 kDa; 100 내지 400 kDa; 150 내지 600 kDa; 150 내지 500 kDa; 150 내지 400 kDa; 200 내지 600 kDa; 200 내지 500 kDa; 200 내지 400 kDa; 250 내지 600; 250 내지 500 kDa; 250 내지 400 kDa; 250 내지 350 kDa; 300 내지 600 kDa; 300 내지 500 kDa; 300 내지 400 kDa; 400 내지 600 kDa; 500 내지 600 kDa의 분자량; 및 유사한 목적하는 분자량 범위를 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0074] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류 기법을 가할 수도 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전 (예를 들어, 활성화 전) 최종 크기분류 단계 후의 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0075] **1.2.4 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 11A**
- [0076] 혈청형 11A의 폴리사카라이드 반복 단위는 도 3에 도시된 바와 같이, 선형 테트라사카라이드 주쇄(2개의 갈락토피라노스(Gal_p) 및 2개의 글루코피라노스(Glc_p)) 및 펜던트 포스포글리세롤로 이루어진다(문헌[Richards et al.(1988) Adv. Exp. Med. Biol. 228:595-597]). 상기 폴리사카라이드는 다수의 위치에서 O-아세틸화되며, 문헌[Calix et al.(2011) J Bacteriol. 193(19):5271-5278]에 보고된 데이터를 근거로, 11A 폴리사카라이드 중의 O-아세틸화의 총량은 폴리사카라이드 반복 단위당 약 2.6 O-아세틸기이다.
- [0077] 혈청형 11A 사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하시오). 또한, 상기 사카라이드를 합성 프로토콜을 사용하여 생성시킬 수 있다.
- [0078] 혈청형 11A 스트렙토코커스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 컬렉션(예를 들어, 스트렙토코커스 기준 실험실(미국 조지아주 아틀란타 소재의 질병통제예방 센터)) 또는 임상 시편으로부터 수득할 수 있다.
- [0079] 스트렙토코커스 뉴모니아에 용해물로부터 혈청형 11A 폴리사카라이드의 정제 및 임의로 상기 정제된 폴리사카라

이드의 크기분류에 의해 수득된 단리된 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드를 상이한 속성, 예를 들어 상기 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드의 분자량(MW) 및 상기 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM에 의해 특성화시킬 수 있다.

- [0080] 일부 실시태양에서, 접합 전 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 50 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 70 내지 900 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0081] 추가의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 600 kDa; 100 내지 500 kDa; 100 내지 400 kDa; 150 내지 600 kDa; 150 내지 500 kDa; 150 내지 400 kDa; 200 내지 600 kDa; 200 내지 500 kDa; 200 내지 400 kDa; 250 내지 600; 250 내지 500 kDa; 250 내지 400 kDa; 250 내지 350 kDa; 300 내지 600 kDa; 300 내지 500 kDa; 300 내지 400 kDa; 400 내지 600 kDa; 500 내지 600 kDa의 분자량; 및 유사한 목적하는 분자량 범위를 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0082] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류 기법을 가할 수도 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전 (예를 들어, 활성화 전) 최종 크기분류 단계 후의 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0083] 하나의 실시태양에서, 상기 정제된 혈청형 11A 폴리사카라이드의 크기를 고압 균질화에 의해 감소시킨다. 고압 균질화는 공정 스트림을 충분히 작은 치수의 유로를 통해 펌핑함으로써 높은 전단속도를 성취한다. 상기 전단속도를 보다 큰 인가된 균질화 압력을 사용함으로써 증가시키며, 노출 시간은 상기 균질화기를 통해 공급물 스트림을 재순환시킴으로써 증가시킬 수 있다.
- [0084] 상기 고압 균질화 공정은 상기 정제된 혈청형 11A 폴리사카라이드의 구조적 특징, 예를 들어 O-아세틸기의 존재를 보존하면서 상기 폴리사카라이드의 크기를 감소시키기에 특히 적합하다.
- [0085] 정제되거나, 단리되거나, 활성화된 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 또는 혈청형 11A 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 중의 O-아세틸의 존재를 상기 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 수로서 또는 폴리사카라이드 반복 단위당 O-아세틸기의 수로서 나타낸다.
- [0086] 바람직한 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터 정제된 폴리사카라이드는 상기 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드의 μmol 당 적어도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 또는 1.6 μmol 의 아세테이트를 갖는다.
- [0087] **1.2.5 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 12F**
- [0088] 혈청형 12F의 폴리사카라이드 반복 단위는 도 4에 도시된 바와 같이 2개의 가지: Fuc_pNAc 의 C3에 결합된 펜던트 α -갈락토피라노스(Gal_p) 및 Man_pNAcA 의 C3에 결합된 α - Glc_p -(1 $\rightarrow$ 2)- α - Glc_p 다이사카라이드 가지와 함께 선형 트라이사카라이드 주쇄(하나의 N-아세틸퓨코사아민(Fuc_pNAc), 하나의 N-아세틸갈락토사아민(Gal_pNAc) 및 하나의 N-아세틸만뉴론산(Man_pNAcA))으로 이루어진다(문헌[Leontein et al.(1983) Carbohydrate Research 114(2):257-266]).
- [0089] 혈청형 12F 스트렙토코커스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 컬렉션(예를 들어, 스트렙토코커스 기준 실험실(미국 조지아주 아틀란타 소재의 질병통제예방 센터)) 또는 임상 시편으로부터 수득할 수 있다.
- [0090] 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 캡슐 사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지된 표준 기법에 의해 제조한다. 전형적으로 캡슐 폴리사카라이드를, 각각의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형을 배지(예를 들어, 대두-기재 배지)에서 증식시킴으로써 생성시키며, 이어서 상기 폴리사카라이드를 상기 세균 배양물로부터 제조한다. 상기 유기체(스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F)의 집단을 종종 시드 바이알로부터 시드 병으로 확대하고 생산 규모 발아 부피에 도달할 때까지 증가하는 부피의 하나 이상의 시드 발아기를 통해 계대배양한다. 상기 생육 주기의 끝에서, 세포를 용해시키고 이어서 상기 용해물 브로쓰를 하류(정제) 처리를 위해 수확한다(예를 들어, WO 2006/110381, WO 2008/118752, 및 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 및 2008/0286838을 참조하시오). 상기 폴리사카라이드를 전형적으로는 원심분리, 침전, 한외여과, 및/또는 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제한다(예를 들어, WO 2006/110352 및 WO 2008/118752를 참조하시오).

- [0091] 정제된 폴리사카라이드를 반응이 가능하도록 활성화시키고(예를 들어, 화학적으로 활성화시키고) 이어서 본 발명에 추가로 개시된 바와 같이 본 발명의 당접합체에 통합시킨다.
- [0092] 일부 실시태양에서, 접합 전 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 50 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 50 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 70 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 90 내지 250 kDa; 90 내지 150 kDa; 90 내지 120 kDa; 80 내지 120 kDa; 70 내지 100 kDa; 70 내지 110 kDa; 70 내지 120 kDa; 70 내지 130 kDa; 70 내지 140 kDa; 70 내지 150 kDa; 70 내지 160 kDa; 80 내지 110 kDa; 80 내지 120 kDa; 80 내지 130 kDa; 80 내지 140 kDa; 80 내지 150 kDa; 80 내지 160 kDa; 90 내지 110 kDa; 90 내지 120 kDa; 90 내지 130 kDa; 90 내지 140 kDa; 90 내지 150 kDa; 90 내지 160 kDa; 100 내지 120 kDa; 100 내지 130 kDa; 100 내지 140 kDa; 100 내지 150 kDa; 100 내지 160 kDa의 분자량; 및 유사한 목적하는 분자량 범위를 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0093] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류 기법을 가할 수도 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전(예를 들어, 활성화 전) 최종 크기분류 단계 후의 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0094] **1.2.6 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 15B**
- [0095] 도 5에 도시된 바와 같이, 혈청형 15B의 폴리사카라이드 반복 단위는 Glc_pNAc의 C4 하이드록실기에 결합된 αGal_p-βGal_p 다이사카라이드 가지와 함께 분지된 트라이사카라이드 주쇄(하나의 N-아세틸글루코사민(Glc_pNAc), 하나의 갈락토피라노스(Gal_p) 및 하나의 글루코피라노스(Glc_p))로 이루어진다. 상기 포스포글리세롤은 상기 다이사카라이드 가지 중의 βGal_p 잔기의 C3 하이드록실기에 결합된다(문헌[Jones et al.(2005) Carbohydrate Research 340(3):403-409]). 혈청형 15C 혈청형으로부터 캡슐 폴리사카라이드는 혈청형 15B와 동일한 주쇄 구조를 갖지만 O-아세틸화는 없다.
- [0096] 혈청형 15B 사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련가에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하시오). 또한, 상기 사카라이드를 당해 분야의 숙련가에게 공지된 합성 프로토콜을 사용하여 생성시킬 수 있다.
- [0097] 혈청형 15B 스트렙토코커스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 컬렉션(예를 들어, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC, 미국 버지니아주 마나사스 소재)(예를 들어, 기탁 균주 ATCC10354번) 또는 스트렙토코커스 기준 실험실(미국 조지아주 아틀란타 소재의 질병통제예방 센터)) 또는 임상 시편으로부터 수득할 수 있다.
- [0098] 상기 세균 세포를 배지 중에서, 바람직하게는 대두 기재 배지에서 증식시킨다. 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 생산하는 세균 세포의 발효에 이어서, 상기 세균 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생성시킨다. 이어서 혈청형 15B 폴리사카라이드를 당해 분야에 공지된 정제 기법을 사용하여, 예를 들어 원심분리, 침출 여과, 침전, 한외여과, 활성탄에 의한 처리, 투석여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 상기 세포 용해물로부터 단리할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하시오). 이어서 정제된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 면역원성 접합체의 제조에 사용할 수 있다.
- [0099] 스트렙토코커스 뉴모니아에 용해물로부터 혈청형 15B 폴리사카라이드의 정제 및 임의로 상기 정제된 폴리사카라이드의 크기분류에 의해 수득된 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 상이한 매개변수, 예를 들어 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 분자량(MW), 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 및 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 글리세롤의 mM에 의해 특성화시킬 수 있다.
- [0100] 바람직하게, 유리한 여과성 특성 및/또는 수율을 갖는 15B 접합체를 생성시키기 위해서, 상기 폴리사카라이드의 표적 분자량 범위로의 크기 분류를 담체 단백질에의 접합 전에 수행한다. 유리하게, 상기 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 크기를, 상기 폴리사카라이드 구조의 중요한 특징, 예를 들어 O-아세틸기의 존재를 보존하면서 감소시킨다. 바람직하게, 상기 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 크기를 기계적 균질화에 의해 감소시킨다.

- [0101] 바람직한 실시태양에서, 상기 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 크기를 고압 균질화에 의해 감소시킨다. 고압 균질화는 공정 스트림을 충분히 작은 치수의 유로를 통해 펌핑함으로써 높은 전단속도를 성취한다. 상기 전단속도를 보다 큰 인가된 균질화 압력을 사용함으로써 증가시키며, 노출 시간은 상기 균질화기를 통해 공급물 스트림을 재순환시킴으로써 증가시킬 수 있다.
- [0102] 상기 고압 균질화 공정은 상기 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 구조적 특징, 예를 들어 0-아세틸기의 존재를 보존하면서 상기 폴리사카라이드의 크기를 감소시키기에 특히 적합하다.
- [0103] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 5 내지 500 kDa, 50 내지 500 kDa, 50 내지 450 kDa, 100 내지 400 kDa, 및 100 kD 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 500 kDa; 100 내지 400 kDa; 100 내지 300 kDa; 100 내지 200 kDa; 150 내지 500 kDa; 150 내지 400 kDa; 150 내지 300 kDa; 150 내지 200 kDa; 200 내지 500 kDa; 200 내지 400 kDa; 250 내지 500 kDa; 250 내지 400 kDa; 250 내지 350 kDa; 300 내지 500 kDa; 300 내지 400 kDa의 분자량; 및 유사한 목적하는 분자량 범위를 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0104] 혈청형 15B 폴리사카라이드는 0-아세틸화되며 0-아세틸화의 총량은 폴리사카라이드 반복 단위당 약 0.8 내지 0.9 0-아세틸기이다. 상기 폴리사카라이드의 0-아세틸화 정도를 당해 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 양성자 NMR(예를 들어, 문헌[Lemercinier et al. (1996) Carbohydrate Research 296:83-96]; 문헌[Jones et al. (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247]; WO 2005/033148 및 WO 00/56357을 참조하시오)에 의해 측정할 수 있다. 또 다른 통상적으로 사용되는 방법은 문헌[Hestrin, S. (1949) J. Biol. Chem. 180:249-261]에 개시되어 있다. 바람직하게, 상기 0-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정된다.
- [0105] 정제되거나, 단리되거나 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 또는 혈청형 15B 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 중의 0-아세틸의 존재를 상기 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 수로서 또는 폴리사카라이드 반복 단위당 0-아세틸기의 수로서 나타낸다.
- [0106] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 아세테이트를 포함한다.
- [0107] 글리세로포스페이트 측쇄의 존재를, 상기 폴리사카라이드를 하이드로플루오르산(HF)으로 처리하여 유리시킨 후 펄스화된 전류측정 검출(HPAEC-PAD)과 함께 고성능 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 글리세롤을 측정함으로써 측정한다. 정제되거나, 단리되거나 활성화된 혈청형 15B 폴리사카라이드 또는 혈청형 15B 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 중의 글리세롤의 존재를 상기 혈청형 15B 폴리사카라이드 1 mM당 글리세롤의 mM 수로서 나타낸다.
- [0108] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 글리세롤을 포함한다.
- [0109] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa의 분자량을 가지며

상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다.

- [0110] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0111] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 300 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다.
- [0112] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 300 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0113] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 350 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다.
- [0114] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 350 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0115] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0116] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0117] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 300 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0118] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 150 내지 350 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0119] **1.2.7 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 22F**
- [0120] 도 6에 도시된 바와 같이, 혈청형 22F의 폴리사카라이드 반복 단위는 β Rha_p의 C3 하이드록실기에 결합된 α Glc_p 가지와 함께 분지된 펜타사카라이드 주쇄(하나의 글루쿠론산(Glc_pA), 하나의 글루코피라노스(Glc_p), 하나의 갈락토피라노스(Gal_f) 및 2개의 람노피라노스(Rha_p))로 이루어진다(문헌[Richards et al. (1989) Canadian Journal of Chemistry 67(6):1038-1050]). 상기 폴리사카라이드 반복 단위 중의 상기 β Rha_p 잔기의 C2 하이드록실기의 약 80%는 O-아세틸화된다.
- [0121] 혈청형 22F 폴리사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하시오). 또한, 상기 사카라이드를 합성 프로토콜을 사용하여 생성시킬 수 있다.
- [0122] 혈청형 22F 스트렙토코커스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 콜렉션(예를 들어, 스트렙토코커스 기준 실험실(미국 조지아주 아틀란타 소재의 질병통제예방 센터)) 또는 임상 시편으로부터 수득할 수 있다.
- [0123] 스트렙토코커스 뉴모니아에 용해물로부터 혈청형 22F 폴리사카라이드의 정제 및 임의로 상기 정제된 폴리사카라이드의 크기분류에 의해 수득된 단리된 혈청형 22F 캡슐 폴리사카라이드를 상이한 속성, 예를 들어 상기 혈청형 22F 캡슐 폴리사카라이드의 분자량(MW) 및 상기 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM에 의해 특성화시킬 수 있다.
- [0124] 바람직하게, 유리한 여과성 특성 및/또는 수율을 갖는 혈청형 22F 집합체를 생성시키기 위해서, 상기 폴리사카라이드의 표적 분자량 범위의 크기 분류를 담체 단백질에의 집합 전에 수행한다. 유리하게, 상기 정제된 혈청형 22F 폴리사카라이드의 크기를, 상기 폴리사카라이드 구조의 중요한 특징, 예를 들어 O-아세틸기의 존재를 보존하면서 감소시킨다. 바람직하게, 상기 정제된 혈청형 22F 폴리사카라이드의 크기를 기계적 균질화에 의해

감소시킨다.

- [0125] 바람직한 실시태양에서, 상기 정제된 폴리사카라이드의 크기를 고압 균질화에 의해 감소시킨다. 고압 균질화는 공정 스트림을 충분히 작은 치수의 유로를 통해 펌핑함으로써 높은 전단속도를 성취한다. 상기 전단속도를 보다 큰 인가된 균질화 압력을 사용함으로써 증가시키며, 노출 시간은 상기 균질화기를 통해 공급물 스트림을 재순환시킴으로써 증가시킬 수 있다.
- [0126] 상기 고압 균질화 공정은 상기 정제된 혈청형 22F 폴리사카라이드의 구조적 특징, 예를 들어 O-아세틸기의 존재를 보존하면서 상기 폴리사카라이드의 크기를 감소시키기에 특히 적합하다.
- [0127] 일부 실시태양에서, 접합 전 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 50 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 70 내지 900 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 200 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 400 내지 700 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0128] 추가의 실시태양에서, 상기 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 900 kDa; 100 내지 800 kDa; 100 내지 700 kDa; 100 내지 600 kDa; 100 내지 500 kDa; 100 내지 400 kDa; 100 내지 300 kDa; 150 내지 1,000 kDa; 150 내지 900 kDa; 150 내지 800 kDa; 150 내지 700 kDa; 150 내지 600 kDa; 150 내지 500 kDa; 150 내지 400 kDa; 150 내지 300 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 900 kDa; 200 내지 800 kDa; 200 내지 700 kDa; 200 내지 600 kDa; 200 내지 500 kDa; 200 내지 400 kDa; 200 내지 300 kDa; 250 내지 1,000 kDa; 250 내지 900 kDa; 250 내지 800 kDa; 250 내지 700 kDa; 250 내지 600 kDa; 250 내지 500 kDa; 250 내지 400 kDa; 250 내지 350 kDa; 300 내지 1,000 kDa; 300 내지 900 kDa; 300 내지 800 kDa; 300 내지 700 kDa; 300 내지 600 kDa; 300 내지 500 kDa; 300 내지 400 kDa; 400 내지 1,000 kDa; 400 내지 900 kDa; 400 내지 800 kDa; 400 내지 700 kDa; 400 내지 600 kDa; 500 내지 600 kDa의 분자량; 및 유사한 목적하는 분자량 범위를 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0129] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 22F 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류 기법을 가할 수도 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전(예를 들어, 활성화 전) 최종적인 크기분류 단계 후 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0130] 상기 폴리사카라이드의 O-아세틸화 정도를 당해 분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 양성자 NMR(예를 들어, 문헌[Lemercinier et al. (1996) Carbohydrate Research 296:83-96]; 문헌[Jones et al. (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233-1247]; WO 2005/033148 및 WO 00/56357을 참조하시오)에 의해 측정할 수 있다. 또 다른 통상적으로 사용되는 방법은 문헌[Hestrin, S. (1949) J. Biol. Chem. 180:249-261]에 개시되어 있다. 바람직하게, 상기 O-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정된다.
- [0131] 정제되거나, 단리되거나 활성화된 혈청형 22F 캡슐 폴리사카라이드 또는 혈청형 22F 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 중의 O-아세틸의 존재를 상기 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 수로서 또는 폴리사카라이드 반복 단위당 O-아세틸기의 수로서 나타낸다.
- [0132] 바람직한 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터 정제된 폴리사카라이드는 상기 혈청형 22F 캡슐 폴리사카라이드의 μmol 당 적어도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 또는 1.6 μmol 의 아세테이트를 갖는다.
- [0133] **1.2.8 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 33F**
- [0134] 도 7에 도시된 바와 같이, 혈청형 33F의 폴리사카라이드 반복 단위는 주쇄내에 αGal_p 잔기의 C2 하이드록실기에 결합된 말단 αGal_p 와 함께 분지된 펜타사카라이드 주쇄(2개의 갈락토피라노스(Gal_p), 2개의 갈락토피라노스(Gal_p) 및 하나의 글루코피라노스(Glc_p))로 이루어진다(문헌[Lemercinier et al.(2006) Carbohydrate Research 341(1):68-74]). 상기 주쇄 3- β - Gal_f 잔기의 C2 하이드록실기가 O-아세틸화됨은 문헌에 보고되었다.
- [0135] 혈청형 33F 폴리사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하시오). 또한, 상기 사카라이드를

합성 프로토콜을 사용하여 생성시킬 수 있다.

- [0136] 혈청형 33F 스트렙토코커스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 콜렉션(예를 들어, 스트렙토코커스 기준 실험실(미국 조지아주 아틀란타 소재의 질병통제예방 센터)) 또는 임상 시편으로부터 수득할 수 있다.
- [0137] 혈청형 33F로부터 정제된 폴리사카라이드를 활성화시켜(예를 들어, 화학적으로 활성화시켜) 반응할 수 있게 만들고 이어서 본 발명에 추가로 개시되는 바와 같이 본 발명의 당접합체에 통합시킬 수 있다.
- [0138] 스트렙토코커스 뉴모니아에 용해물로부터 혈청형 33F 폴리사카라이드의 정제 및 임의로 상기 정제된 폴리사카라이드의 크기분류에 의해 수득된 단리된 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드를 상이한 매개변수, 예를 들어 상기 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드의 분자량(MW) 및 상기 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM에 의해 특성화시킬 수 있다.
- [0139] 일부 실시태양에서, 접합 전 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터 정제된 폴리사카라이드는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0140] 폴리사카라이드는 통상적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소하게 될 수 있다. 추가로, 본 발명에 개시되는 바와 같이, 폴리사카라이드에 접합 전에 크기분류 기법을 가할 수도 있다. 상기 언급한 분자량 범위는 접합 전(예를 들어, 활성화 전) 최종 크기분류 단계 후 정제된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0141] 정제되거나, 단리되거나 활성화된 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드 또는 혈청형 33F 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 중의 O-아세틸의 존재를 상기 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 수로서 또는 폴리사카라이드 반복 단위당 O-아세틸기의 수로서 나타낸다.
- [0142] 바람직한 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터 정제된 폴리사카라이드는 상기 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드의 μmol 당 적어도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.4 또는 1.6 μmol 의 아세테이트를 갖는다.
- [0143] **1.3 본 발명의 당접합체**
- [0144] 상기 정제된 사카라이드를 화학적으로 활성화시켜 상기 사카라이드(즉 활성화된 사카라이드)를 상기 담체 단백질과 반응할 수 있도록 만든다. 각각의 캡슐 사카라이드를, 일단 활성화되면, 담체 단백질에 별도로 접합시켜 당접합체를 형성시킨다. 하나의 실시태양에서, 각각의 캡슐 사카라이드를 동일한 담체 단백질에 접합시킨다. 상기 사카라이드의 화학적 활성화 및 후속의 상기 담체 단백질에의 접합은 본 발명에 개시된 활성화 및 접합 방법에 의해 성취될 수 있다.
- [0145] **1.3.1 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 당접합체**
- [0146] 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 공지된 표준 기법에 의해 제조한다(예를 들어, WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352, 및 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2008/0102498 및 2008/0286838을 참조하시오).
- [0147] 하나의 실시태양에서, 상기 폴리사카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킨다. 이어서 상기 활성화된 폴리사카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질(바람직하게는 CRM₁₉₇)상의 아미노기에 커플링시킨다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, N-[γ -말레이미도부틸옥시]숙신이미드 에스터(GMBS) 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세틸이미드, N-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA; SIB), N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(SIAB), 설포숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(설포-SIAB), N-숙신이미딜 요오도아세테이트(SIA) 또는 숙신이미딜 3-[브로모아세틸아미도]프로피오네

이트(SBAP) 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 제공하는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 헥산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라지드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇)에 접합시킨다. 상기과 같은 접합체는 예를 들어 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 개시되어 있다.

- [0148] 접합을 위한 다른 적합한 기법은 카보다이이미드, 하이드라지드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 1,1'-카보닐다이이미다졸(CDI)과의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 이어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와 커플링을 수반할 수 있다.
- [0149] 바람직한 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 캡슐 폴리사카라이드 중 적어도 하나를 환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 및 2007/0184072, WO 2006/110381, WO 2008/079653, 및 WO 2008/143709에 개시된 바와 같이). 바람직한 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 모두 환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다.
- [0150] 환원적 아민화는 접합체를 형성시키기 위해서 2개 단계, (1) 상기 폴리사카라이드의 산화, (2) 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원을 수반한다. 산화 전에, 상기 폴리사카라이드를 임의로 가수분해시킨다. 기계적 또는 화학적 가수분해를 사용할 수 있다. 화학적 가수분해를 아세트산을 사용하여 수행할 수 있다. 상기 산화 단계는 퍼요오데이트와의 반응을 수반할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, "퍼요오데이트"란 용어는 퍼요오데이트 및 퍼요오드산 모두를 포함하며; 상기 용어는 또한 메타퍼요오데이트(IO_4^-) 및 오쏘퍼요오데이트(IO_6^{5-}) 및 퍼요오데이트의 다양한 염들(예를 들어, 나트륨 퍼요오데이트 및 칼륨 퍼요오데이트)을 모두 포함한다.
- [0151] 하나의 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 메타퍼요오데이트의 존재하에서, 바람직하게는 나트륨 퍼요오데이트(NaIO_4)의 존재하에서 산화시킨다. 또 다른 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 오쏘퍼요오데이트의 존재하에서, 바람직하게는 퍼요오드산의 존재하에서 산화시킨다.
- [0152] 상기 폴리사카라이드의 산화 단계에 이어서, 상기 폴리사카라이드는 활성화된다고 하며, 본 발명의 하기에서 "활성화된 폴리사카라이드"라 칭한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 독립적으로(별도의 동결 건조) 또는 함께(공-동결 건조) 동결 건조(냉동-건조)시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 공-동결 건조시킨다. 또 다른 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 독립적으로 동결 건조시킨다.
- [0153] 하나의 실시태양에서, 상기 동결 건조는 비-환원당의 존재하에서 발생하며, 가능한 비-환원당은 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트를 포함한다.
- [0154] 상기 접합 과정의 두 번째 단계는 환원제를 사용하여 접합체를 형성시키는(소위 환원적 아민화) 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원이다. 적합한 환원제는 시아노보로하이드라이드, 예를 들어 나트륨 시아노보로하이드라이드, 보란-피리딘, 또는 보로하이드라이드 교환 수지를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드이다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 수성 용매 중에서 수행하며, 또 다른 실시태양에서, 상기 반응을 비양성자성 용매 중에서 수행한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 DMSO(다이메틸설폭사이드) 중에서 또는 DMF(다이메틸폼아미드) 용매 중에서 수행한다. 상기 DMSO 또는 DMF 용매를 사용하여 상기 동결 건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 재조성할 수 있다.

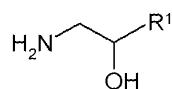
- [0155] 상기 환원 반응의 끝에서, 상기 접합체 중에 반응하지 않은 알데하이드기가 남아있을 수도 있으며, 이들을 적합한 캡핑제를 사용하여 캡핑시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡핑제는 나트륨 보로하이드라이드(NaBH_4)이다. 상기 접합(환원 반응 및 임의로 캡핑)에 이어서, 상기 당접합체를 정제시킬 수 있다. 상기 당접합체를 투석여과 및/또는 이온 교환 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 당접합체를 투석여과 또는 이온 교환 크로마토그래피 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제시킨다. 하나의 실시태양에서, 상기 당접합체를 멸균 여과한다.
- [0156] 일부 실시태양에서, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 9V 및/또는 18C로부터의 당접합체는 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 30% 내지 100%, 40% 내지 100%, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 75% 내지 100%, 80% 내지 100%, 90% 내지 100%, 50% 내지 90%, 60% 내지 90%, 70% 내지 90% 또는 80% 내지 90%의 O-아세틸화 정도를 갖는 사카라이드를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 O-아세틸화의 정도는 $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, 또는 $\geq 90\%$, 또는 약 100%이다.
- [0157] 일부 실시태양에서, 본 발명의 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 9V 및/또는 18C로부터의 당접합체는 O-아세틸화된다. 일부 실시태양에서, 상기 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 9V로부터의 당접합체는 O-아세틸화되고 상기 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 당접합체는 탈-O-아세틸화된다.
- [0158] **1.3.2 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 당접합체**
- [0159] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체를, 폴리사카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킴으로써 수득한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질상의 아미노기에 커플링시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세트이미드, SIB, SIAB, 설포-SIAB, SIA 또는 SBAP 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 제공하는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 핵산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라이드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 상기와 같은 접합체는 예를 들어 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 개시되어 있다.
- [0160] 다른 적합한 기법은 카보다이이미드, 하이드라이드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 CDI와의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 이어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와의 커플링을 수반할 수 있다.
- [0161] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다. 환원적 아민화는 2개 단계, (1) 개별적인 핵사사카라이드 단위 중의 이웃자리 다이올들로부터 알데하이드 작용기를 생성시키는 상기 폴리사카라이드의 산화, (2) 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇)의 환원을 수반한다.
- [0162] 바람직하게, 산화 전에 상기 혈청형 22F 폴리사카라이드의 표적 분자량(MW) 범위로의 크기분류를 수행한다. 유리하게, 상기 정제된 혈청형 22F 폴리사카라이드의 크기를, 예를 들어 O-아세틸기의 존재와 같이 상기 폴리사카라이드 구조의 중요한 특징들을 보존하면서 감소시킨다. 바람직하게, 상기 정제된 혈청형 22F 폴리사카라이드의 크기를 기계적 균질화에 의해 감소시킨다(상기 섹션 1.2.7을 참조하시오).
- [0163] 하나의 실시태양에서, 혈청형 폴리사카라이드를
- [0164] (a) 단리된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키고;
- [0165] (b) 급냉제의 첨가에 의해 상기 산화 반응을 급냉시켜 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 생성시키는
- [0166] 단계를 포함하는 과정에 의해 활성화(산화)시킨다.

[0167] 바람직한 실시태양에서, 상기 산화제는 퍼요오데이트이다. 본 발명의 목적을 위해서 "퍼요오데이트"란 용어는 퍼요오데이트 및 퍼요오드산 모두를 포함하며; 상기 용어는 또한 메타퍼요오데이트(IO_4^-) 및 오쏘퍼요오데이트(IO_6^{5-}) 및 퍼요오데이트의 다양한 염들(예를 들어, 나트륨 퍼요오데이트 및 칼륨 퍼요오데이트)을 모두 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 산화제는 나트륨 퍼요오데이트이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 폴리사카라이드의 산화에 사용되는 퍼요오데이트는 메타퍼요오데이트이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 폴리사카라이드의 산화에 사용되는 퍼요오데이트는 나트륨 메타퍼요오데이트이다.

[0168] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 이웃자리 다이올, 1,2-아미노알콜, 아미노산, 글루타치온, 셀파이트, 바이셀파이트, 다이티오나이트, 메타바이셀파이트, 티오셀페이트, 포스파이트, 하이포포스파이트 및 아인산으로부터 선택된다.

[0169] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 하기 화학식 I의 1,2-아미노알콜이다:

[0170] [화학식 I]



[0171]

[0172] 상기 식에서,

[0173] R^1 은 H, 메틸, 에틸, 프로필 및 아이소프로필로부터 선택된다.

[0174] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 셀파이트, 바이셀파이트, 다이티오나이트, 메타바이셀파이트, 티오셀페이트, 포스파이트, 하이포포스파이트 및 아인산의 나트륨 및 칼륨염으로부터 선택된다.

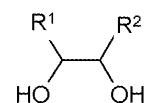
[0175] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 아미노산이다. 상기와 같은 실시태양에서, 상기 아미노산은 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 시스틴, 메티오닌, 프롤린, 하이드록시프롤린, 트립토판, 타이로신 및 히스티딘으로부터 선택될 수 있다.

[0176] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 셀파이트, 예를 들어 바이셀파이트, 다이티오나이트, 메타바이셀파이트, 티오셀페이트이다.

[0177] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 2개의 이웃자리 하이드록실기(이웃자리 다이올), 즉 2개의 인접한 탄소 원자에 공유 결합된 2개의 하이드록실기를 포함하는 화합물이다.

[0178] 바람직하게, 상기 급냉제는 하기 화학식 II의 화합물이다:

[0179] [화학식 II]



[0180]

[0181] 상기 식에서,

[0182] R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 H, 메틸, 에틸, 프로필 및 아이소프로필로부터 선택된다.

[0183] 바람직한 실시태양에서, 상기 급냉제는 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 프로판-1,2-다이올, 부탄-1,2-다이올 또는 부탄-2,3-다이올, 또는 아스코르브산이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 급냉제는 부탄-2,3-다이올이다.

[0184] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 22F 폴리사카라이드를

[0185] (a) 단리된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 퍼요오데이트와 반응시키고;

[0186] (b) 부탄-2,3-다이올의 첨가에 의해 상기 산화 반응을 급냉시켜 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 생성시키는

[0187] 단계를 포함하는 공정에 의해 활성화시킨다.

[0188] 상기 폴리사카라이드의 산화 단계에 이어서, 상기 폴리사카라이드는 활성화된다고 하며, 본 발명에서 하기에 "

활성화된 폴리사카라이드"라 칭한다.

- [0189] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 정제시킨다. 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법들, 예를 들어 겔 투과 크로마토그래피(GPC), 투석 또는 한외여과/투석여과에 따라 정제시킨다. 예를 들어, 상기 활성화된 22F 폴리사카라이드를 농축 및 한외여과 장치를 사용하는 투석여과에 의해 정제시킨다.
- [0190] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 30, 2 내지 25, 2 내지 20, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 5, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 30, 10 내지 25, 10 내지 20, 10 내지 15, 15 내지 30, 15 내지 25, 15 내지 20, 20 내지 30, 또는 20 내지 25이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 10, 4 내지 8, 4 내지 6, 6 내지 8, 6 내지 12, 8 내지 14, 9 내지 11, 10 내지 16, 12 내지 16, 14 내지 18, 16 내지 20, 16 내지 18, 18 내지 22, 또는 18 내지 20이다.
- [0191] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 25 내지 1,000 kDa, 100 내지 1,000 kDa, 300 내지 800 kDa, 300 내지 700 kDa, 300 내지 600 kDa, 400 내지 1,000 kDa, 400 내지 800 kDa, 400 내지 700 kDa 또는 400 내지 600kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 300 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 400 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 400 내지 600 kDa의 분자량 및 10 내지 25, 10 내지 20, 12 내지 20 또는 14 내지 18의 산화도를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 400 내지 600 kDa의 분자량 및 10 내지 20의 산화도를 갖는다.
- [0192] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 또는 0.7 또는 약 0.8 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 아세테이트를 포함한다.
- [0193] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 400 내지 800 kDa의 분자량을 가지며 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다.
- [0194] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드는 400 내지 800 kDa의 분자량, 12 내지 20의 산화도를 가지며 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다.
- [0195] 상기 활성화된 폴리사카라이드 및/또는 담체 단백질을 독립적으로(별도의 동결건조) 또는 함께(공-동결건조) 동결건조(냉동-건조)시킬 수 있다.
- [0196] 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 임의로 사카라이드의 존재하에서 동결건조시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스이다. 이어서 하나의 실시태양에서, 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 상기 담체 단백질을 포함하는 용액과 배합한다.
- [0197] 또 다른 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 공-동결건조시킨다. 상기과 같은 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 상기 담체 단백질과 배합하고 임의로 사카라이드의 존재하에서 동결건조시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스이다. 이어서 상기 공-동결건조된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 용액 중에 재현탁시키고 환원제와 반응시킬 수 있다.
- [0198] 상기 접합 과정의 두 번째 단계는 환원제를 사용하는, 접합체를 형성시키기 위한(환원적 아민화) 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원이다.
- [0199] 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를

- [0200] (c) 상기 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하고;
- [0201] (d) 상기 배합된 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 혈청형 22F 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성시키는
- [0202] 단계를 포함하는 과정에 의해 담체 단백질에 접합시킬 수 있다.
- [0203] 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 수성 용매 중에서 수행하며, 또 다른 실시태양에서, 상기 반응을 비양성자성 용매 중에서 수행한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 DMSO(다이메틸설폭사이드) 중에서 또는 DMF(다이메틸포름아이드) 용매 중에서 수행한다. 상기 DMSO 또는 DMF 용매를 사용하여 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 재조성할 수 있다.
- [0204] 다이메틸설폭사이드(DMSO) 중에서 환원적 아민화에 의한 활성화된 혈청형 22F 폴리사카라이드와 단백질 담체와의 접합은, 예를 들어 상기 폴리사카라이드의 O-아세틸화 수준이 현저하게 감소될 수도 있는 수성 상에서의 환원적 아민화에 비해, 상기 폴리사카라이드의 O-아세틸 함량을 보존하기에 적합하다. 따라서, 바람직한 실시태양에서, 단계 (c) 및 단계 (d)를 DMSO 중에서 수행한다.
- [0205] 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 브론스테드 또는 루이스산 존재하에서의 나트륨 시아노보로하이드라이드, 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드, 나트륨 또는 아연 보로하이드라이드, 아민 보란, 예를 들어 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-다이보란-메탄올, 다이메틸아민-보란, $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$, 벤질아민- BH_3 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란(PEMB)이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드이다.
- [0206] 상기 환원 반응의 끝에서, 상기 접합체 중에 반응하지 않은 알데하이드기가 남아있을 수도 있으며, 이들을 적합한 캡핑제를 사용하여 캡핑시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡핑제는 나트륨 보로하이드라이드(NaBH_4)이다.
- [0207] 혈청 22F 폴리사카라이드의 상기 담체 단백질에의 접합에 이어서, 상기 당접합체를 숙련자에게 공지된 다양한 기법에 의해 정제(폴리사카라이드-단백질 접합체의 양에 관하여 농축)시킬 수 있다. 이러한 기법으로는 투석, 농축/투석여과 공정, 접선류 여과 침전/용리, 컬럼 크로마토그래피(DEAE 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피) 및 심층 여과가 있다.
- [0208] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는 사카라이드를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 70 내지 900 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 100 내지 800 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 200 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 900 kDa; 100 내지 800 kDa; 100 내지 700 kDa; 100 내지 600 kDa; 100 내지 500 kDa; 100 내지 400 kDa; 100 내지 300 kDa; 150 내지 1,000 kDa; 150 내지 900 kDa; 150 내지 800 kDa; 150 내지 700 kDa; 150 내지 600 kDa; 150 내지 500 kDa; 150 내지 400 kDa; 150 내지 300 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 900 kDa; 200 내지 800 kDa; 200 내지 700 kDa; 200 내지 600 kDa; 200 내지 500 kDa; 200 내지 400 kDa; 200 내지 300 kDa; 250 내지 1,000 kDa; 250 내지 900 kDa; 250 내지 800 kDa; 250 내지 700 kDa; 250 내지 600 kDa; 250 내지 500 kDa; 250 내지 400 kDa; 250 내지 350 kDa; 300 내지 1,000 kDa; 300 내지 900 kDa; 300 내지 800 kDa; 300 내지 700 kDa; 300 내지 600 kDa; 300 내지 500 kDa; 300 내지 400 kDa; 400 내지 1,000 kDa; 400 내지 900 kDa; 400 내지 800 kDa; 400 내지 700 kDa; 400 내지 600 kDa; 500 내지 600 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 환원적 아민화를 사용하여 제조된다.
- [0209] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체는 400 내지 15,000 kDa; 500 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 3,000 내지 8,000 kDa; 또는 3,000 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 500 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 1,000 내지 8,000 kDa의 분자량을 갖는다. 더욱 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 2,000 내지 8,000 kDa 또는 3,000 내지 7,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체는 200 내지 20,000 kDa; 200 내지 15,000 kDa; 200 내지 10,000 kDa; 200 내지 7,500 kDa; 200 내지 5,000 kDa; 200 내지 3,000 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 500 내지 20,000 kDa; 500 내지 15,000 kDa; 500 내지 12,500 kDa; 500 내지 10,000 kDa; 500 내지 7,500 kDa; 500 내지 6,000 kDa; 500 내지 5,000 kDa; 500 내지

4,000 kDa; 500 내지 3,000 kDa; 500 내지 2,000 kDa; 500 내지 1,500 kDa; 500 내지 1,000 kDa; 750 내지 20,000 kDa; 750 내지 15,000 kDa; 750 내지 12,500 kDa; 750 내지 10,000 kDa; 750 내지 7,500 kDa; 750 내지 6,000 kDa; 750 내지 5,000 kDa; 750 내지 4,000 kDa; 750 내지 3,000 kDa; 750 내지 2,000 kDa; 750 내지 1,500 kDa; 1,000 내지 15,000 kDa; 1,000 내지 12,500 kDa; 1,000 내지 10,000 kDa; 1,000 내지 7,500 kDa; 1,000 내지 6,000 kDa; 1,000 내지 5,000 kDa; 1,000 내지 4,000 kDa; 1,000 내지 2,500 kDa; 2,000 내지 15,000 kDa; 2,000 내지 12,500 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 7,500 kDa; 2,000 내지 6,000 kDa; 2,000 내지 5,000 kDa; 2,000 내지 4,000 kDa; 또는 2,000 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0210] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체는 3,000 내지 20,000 kDa; 3,000 내지 15,000 kDa; 3,000 내지 10,000 kDa; 3,000 내지 7,500 kDa; 3,000 내지 5,000 kDa; 4,000 내지 20,000 kDa; 4,000 내지 15,000 kDa; 4,000 내지 12,500 kDa; 4,000 내지 10,000 kDa; 4,000 내지 7,500 kDa; 4,000 내지 6,000 kDa; 또는 4,000 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0211] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체는 5,000 내지 20,000 kDa; 5,000 내지 15,000 kDa; 5,000 내지 10,000 kDa; 5,000 내지 7,500 kDa; 6,000 내지 20,000 kDa; 6,000 내지 15,000 kDa; 6,000 내지 12,500 kDa; 6,000 내지 10,000 kDa 또는 6,000 내지 7,500 kDa의 분자량을 갖는다.

[0212] 상기 당접합체의 분자량을 SEC-MALLS에 의해 측정한다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.

[0213] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체를 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 또는 0.7 또는 약 0.8 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 아세테이트를 포함한다.

[0214] 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다.

[0215] 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다.

[0216] 본 발명의 혈청형 22F 당접합체를 특성화하는 또 다른 방식은 일련의 접합된 리신으로서 특성화될 수 있는 상기 사카라이드에 접합하게 되는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇) 중의 리신 잔기의 수(접합도)에 의한다. 상기 폴리사카라이드의 공유 결합으로 인한 상기 담체 단백질의 리신 변형에 대한 증거를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 아미노산 분석에 의해 획득할 수 있다. 접합은 접합체 물질을 생성시키는데 사용되는 CRM₁₉₇ 단백질 출발 물질에 비해 회수되는 리신 잔기의 수를 감소시킨다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체의 접합도는 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체의 접합도는 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14 또는 약 15이다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 22F 당접합체의 접합도는 4 내지 7이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

- [0217] 본 발명의 혈청형 22F 당접합체를 또한 사카라이드 대 담체 단백질의 비(중량/중량)에 의해 특성화할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 22F 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 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 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 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 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.8 내지 1.2이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 22F 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 0.9 내지 1.1이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0218] 본 발명의 혈청형 22F 당접합체 및 면역원성 조성물은, 상기 담체 단백질에 공유적으로 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 상기 당접합체 조성물 중에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 상기 유리 사카라이드는 상기 당접합체와 비공유적으로 회합될 수 있다(즉 상기 당접합체에 비공유적으로 결합되거나, 흡착되거나 상기 당접합체 중에 또는 상기 당접합체에 의해 포획될 수 있다).
- [0219] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% 또는 15% 미만의 유리 혈청형 22F 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 40% 미만의 유리 혈청형 22F 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 25% 미만의 유리 혈청형 22F 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 20% 미만의 유리 혈청형 22F 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체는 혈청형 22F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 15% 미만의 유리 혈청형 22F 폴리사카라이드를 포함한다.
- [0220] 상기 혈청형 22F 당접합체를 또한 그의 분자 크기 분포(K_d)에 의해 특성화할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 상기 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 측정할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 중력 공급 컬럼에 사용하여 접합체의 분자 크기 분포를 프로파일링한다. 상기 매질 중의 기공으로부터 배제되는 큰 분자는 작은 분자보다 더 빨리 용리된다. 분별 수집기를 사용하여 상기 컬럼 용출물을 수집한다. 상기 분획들을 사카라이드 분석에 의해 비색측정으로 시험한다. K_d 의 측정을 위해서, 컬럼을 눈금화하여 분자가 완전히 배제되는 분획(V_0), ($K_d = 0$), 및 최대 유지를 나타내는 분획(V_i), ($K_d = 1$)을 설정한다. 명시된 샘플 특성이 도달된 분획(V_e)을 식 $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$ 에 의해 K_d 와 관련시킨다.
- [0221] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체의 적어도 30%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체의 적어도 40%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체의 적어도 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체의 50% 내지 80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 22F 당접합체의 65% 내지 80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
- [0222] **1.3.3 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 당접합체**
- [0223] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체를, 폴리사카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킴으로써 수득한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질상의 아미노기에 커플링시킨다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세티미드, SIB, SIAB, 설폰-SIAB, SIA 또는 SBAP 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 제공하는 시스테인 또는 시스테인일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 핵산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라이드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 상기

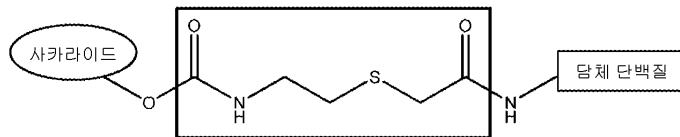
와 같은 접합체는 예를 들어 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 개시되어 있다.

[0224] 다른 적합한 기법은 카보다이이미드, 하이드라지드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 CDI와의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 이어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와 커플링을 수반할 수 있다.

[0225] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다. 상기와 같은 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체를 수성상 중의 환원적 아민화(RAC/수성)를 사용하여 제조할 수 있다. 수성상 중의 환원적 아민화는 페럼구균 접합 백신의 생산에 성공적으로 적용되었다(예를 들어, WO 2006/110381을 참조하시오). 바람직하게, 환원적 아민화를 사용하는 경우에 상기 혈청형 33F 당접합체를 DMSO 중의 환원적 아민화(RAC/DMSO)를 통해 제조한다. RAC/수성 공정을 사용하는 O-아세틸 작용기의 보존과 관련된 도전에 비추어, DMSO 중의 환원적 아민화가 바람직하다. RAC/DMSO는 페럼구균 접합 백신의 생산에 성공적으로 적용되었다(예를 들어, WO 2006/110381을 참조하시오).

[0226] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체를 예를 들어 실시예 1, 2 및 3 및 WO 2014/027302에 개시된 바와 같이, eTEC 접합(본 발명에서 이후에 "혈청형 33F eTEC 결합된 당접합체")을 사용하여 제조한다. 상기 33F 당접합체는 하나 이상의 eTEC 이격자를 통해 담체 단백질에 공유적으로 결합된 사카라이드를 포함하며, 여기에서 상기 사카라이드는 카바메이트 결합을 통해 상기 eTEC 이격자에 공유적으로 결합되고, 상기 담체 단백질은 아마이드 결합을 통해 상기 eTEC 이격자에 공유적으로 결합된다. 본 발명의 eTEC 결합된 당접합체를 하기 화학식 III에 의해 나타낼 수 있다:

[0227] [화학식 III]



[0228]

[0229] 상기 식에서,

[0230] eTEC 이격자를 포함하는 원자는 가운데 상자에 함유된다.

[0231] 상기 eTEC 이격자는 7개의 선형 원자(즉 $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$)를 포함하며 상기 사카라이드와 담체 단백질 사이에 안정한 티오에테르 및 아마이드 결합을 제공한다. 상기 eTEC 결합된 당접합체의 합성은 상기 사카라이드의 활성화된 하이드록실기와 티오알킬아민 시약, 예를 들어 시스타민 또는 시스테인아민 또는 그의 염의 아미노기가 반응하여 상기 사카라이드에 카바메이트 결합을 형성시켜 티올화된 사카라이드를 제공함을 수반한다. 하나 이상의 유리 설프하이드릴기의 생성은 환원제와의 반응에 의해 활성화된 티올화된 사카라이드를 제공함으로써 수행된다. 상기 활성화된 티올화된 사카라이드의 유리 설프하이드릴기와 아민 함유 잔기상의 하나 이상의 α -할로아세트아미드기를 갖는 활성화된 담체 단백질과의 반응은 티오에테르 결합을 생성시켜 접합체를 형성시키며, 여기에서 상기 담체 단백질은 아마이드 결합을 통해 상기 eTEC 이격자에 부착된다.

[0232] 본 발명의 혈청형 33F 당접합체에서, 상기 사카라이드는 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드일 수 있다. 상기 담체 단백질을 본 발명에 개시되거나 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 임의의 적합한 담체로부터 선택할 수 있다. 빈번한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 폴리사카라이드이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 eTEC 결합된 당접합체는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드를 포함한다.

[0233] 특히 바람직한 실시태양에서, 상기 eTEC 결합된 당접합체는 Pn-33F 캡슐 폴리사카라이드를 포함하며, 상기 폴리사카라이드는 eTEC 이격자를 통해 CRM₁₉₇에 공유적으로 결합된다(혈청형 33F eTEC 결합된 당접합체).

[0234] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는 사카라이드를 포함한

다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.

[0235] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체는 50 내지 20,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체는 500 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체는 200 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 더욱 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체는 1,000 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0236] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체는 200 내지 20,000 kDa; 200 내지 15,000 kDa; 200 내지 10,000 kDa; 200 내지 7,500 kDa; 200 내지 5,000 kDa; 200 내지 3,000 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 500 내지 20,000 kDa; 500 내지 15,000 kDa; 500 내지 12,500 kDa; 500 내지 10,000 kDa; 500 내지 7,500 kDa; 500 내지 6,000 kDa; 500 내지 5,000 kDa; 500 내지 4,000 kDa; 500 내지 3,000 kDa; 500 내지 2,000 kDa; 500 내지 1,500 kDa; 500 내지 1,000 kDa; 750 내지 20,000 kDa; 750 내지 15,000 kDa; 750 내지 12,500 kDa; 750 내지 10,000 kDa; 750 내지 7,500 kDa; 750 내지 6,000 kDa; 750 내지 5,000 kDa; 750 내지 4,000 kDa; 750 내지 3,000 kDa; 750 내지 2,000 kDa; 750 내지 1,500 kDa; 1,000 내지 15,000 kDa; 1,000 내지 12,500 kDa; 1,000 내지 10,000 kDa; 1,000 내지 7,500 kDa; 1,000 내지 6,000 kDa; 1,000 내지 5,000 kDa; 1,000 내지 4,000 kDa; 1,000 내지 2,500 kDa; 2,000 내지 15,000 kDa; 2,000 내지 12,500 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 7,500 kDa; 2,000 내지 6,000 kDa; 2,000 내지 5,000 kDa; 2,000 내지 4,000 kDa; 2,000 내지 3,000 kDa; 3,000 내지 20,000 kDa; 3,000 내지 15,000 kDa; 3,000 내지 12,500 kDa; 3,000 내지 10,000 kDa; 3,000 내지 9,000 kDa; 3,000 내지 8,000 kDa; 3,000 내지 7,000 kDa; 3,000 내지 6,000 kDa; 3,000 내지 5,000 kDa 또는 3,000 내지 4,000 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.

[0237] 본 발명의 혈청형 33F 당접합체를 특성화하는 또 다른 방식은 상기 사카라이드에 접합하게 되는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇) 중의 리신 잔기의 수(일련의 접합된 리신(접합도)으로서 특성화될 수 있다)에 의해서이다.

[0238] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체의 접합도는 2 내지 20, 4 내지 16, 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체의 접합도는 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, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19 또는 약 20이다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체의 접합도는 4 내지 16이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0239] 바람직한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 39개의 리신 잔기를 함유하는 CRM₁₉₇을 포함한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 CRM₁₉₇은 상기 사카라이드에 공유 결합된 39개 중 4 내지 16개의 리신 잔기를 포함할 수 있다. 상기 매개변수를 나타내는 또 다른 방식은 CRM₁₉₇ 리신의 약 10% 내지 약 41%가 상기 사카라이드에 공유 결합된다는 것이다. 또 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 CRM₁₉₇은 상기 사카라이드에 공유 결합된 39개 중 2 내지 20개의 리신 잔기를 포함할 수 있다. 상기 매개변수를 나타내는 또 다른 방식은 CRM₁₉₇ 리신의 약 5% 내지 약 50%가 상기 사카라이드에 공유 결합된다는 것이다. 일부 실시태양에서, 상기 CRM₁₉₇은 상기 사카라이드에 공유 결합된 39개 중 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15 또는 약 16개의 리신 잔기를 포함할 수 있다.

[0240] 빈번한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 상기 담체 단백질상의 리신 잔기의 하나 이상의 ε-아미노기에의 아미드 결합을 통해 eTEC 이격자에 공유적으로 접합된다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 상기 사카라이드에 공유적으로 접합된 2 내지 20개의 리신 잔기를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 상기 사카라이드에 공유적으로 접합된 4 내지 16개의 리신 잔기를 포함한다.

- [0241] 본 발명의 혈청형 33F 당접합체를 또한 사카라이드 대 담체 단백질의 비(중량/중량)에 의해 특성화할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.2 내지 4.0(예를 들어, 약 0.2, 약 0.3, 약 0.4, 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, 약 3.0, 약 3.1, 약 3.2, 약 3.3, 약 3.4, 약 3.5, 약 3.6, 약 3.7, 약 3.8, 약 3.9 또는 약 4.0)이다. 추가의 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 1.0 내지 2.5이다. 추가의 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.4 내지 1.7이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0242] 상기 담체 단백질상의 리신에 대한 상기 사카라이드의 부착 빈도는 본 발명의 혈청형 33F 당접합체를 특성화하기 위한 또 다른 매개변수이다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 하나 이상의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 4개의 사카라이드 반복 단위마다 존재한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 10개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 15개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 추가의 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 25개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다.
- [0243] 빈번한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이며 상기 CRM₁₉₇과 상기 폴리사카라이드간의 eTEC 이격자를 통한 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 4, 10, 15 또는 25개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다.
- [0244] 다른 실시태양에서, 상기 접합체는 5 내지 10개의 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 7개의 사카라이드 반복 단위마다; 3 내지 8개의 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 9개의 사카라이드 반복 단위마다; 6 내지 11개의 사카라이드 반복 단위마다; 7 내지 12개의 사카라이드 반복 단위마다; 8 내지 13개의 사카라이드 반복 단위마다; 9 내지 14개의 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 15개의 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 6개의 사카라이드 반복 단위마다; 3 내지 7개의 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 8개의 사카라이드 반복 단위마다; 6 내지 10개의 사카라이드 반복 단위마다; 7 내지 11개의 사카라이드 반복 단위마다; 8 내지 12개의 사카라이드 반복 단위마다; 9 내지 13개의 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 14개의 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 20개의 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 25개의 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 25개의 사카라이드 반복 단위마다 상기 담체 단백질과 사카라이드간에 하나 이상의 공유 결합을 포함한다. 빈번한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0245] 또 다른 실시태양에서, 담체 단백질과 사카라이드간의 적어도 하나의 결합은 상기 폴리사카라이드의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 사카라이드 반복 단위마다 존재한다. 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 상기 범위 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0246] 접합 중 중요한 고려사항은 개별적인 성분들, 예를 들어 상기 사카라이드 에피토프의 부분을 형성할 수 있는 O-아실, 포스페이트 또는 글리세롤 포스페이트 측쇄의 잠재적으로 민감한 비-사카라이드 치환체 작용기의 유지를 허용하는 조건의 발생이다.
- [0247] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체는 10% 내지 100%의 O-아세틸화도를 갖는 사카라이드를 포함한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50% 내지 100%의 O-아세틸화도를 갖는다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 75% 내지 100%의 O-아세틸화도를 갖는다. 추가의 실시태양에서, 상기 사카라이드는 70% 이상($\geq 70\%$)의 O-아세틸화도를 갖는다.
- [0248] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체는 상기 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 상기 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 상기 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 상기 혈청형 33F 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, O-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정

된다.

- [0249] 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다.
- [0250] 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 33F 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다.
- [0251] 본 발명의 혈청형 33F 당접합체 및 면역원성 조성물은, 상기 담체 단백질에 공유적으로 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 상기 당접합체 조성물 중에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 상기 유리 사카라이드는 상기 당접합체와 비공유적으로 회합될 수 있다(즉 상기 당접합체에 비공유적으로 결합되거나, 흡착되거나 상기 당접합체 중에 또는 상기 당접합체에 의해 포획될 수 있다).
- [0252] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체는 혈청형 33F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만의 유리 혈청형 33F 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직하게는, 혈청형 33F 당접합체는 15% 미만의 유리 사카라이드, 보다 바람직하게는 10% 미만의 유리 사카라이드, 및 더욱 더 바람직하게는 5% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체는 혈청형 33F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 25% 미만의 유리 혈청형 33F 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체는 혈청형 33F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 20% 미만의 유리 혈청형 33F 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체는 혈청형 33F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 15% 미만의 유리 혈청형 33F 폴리사카라이드를 포함한다.
- [0253] 몇몇 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 하기의 특징들 중 하나 이상을 단독으로 또는 함께 갖는 혈청형 33F 당접합체를 제공한다: 상기 폴리사카라이드는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다; 상기 당접합체는 500 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다; 상기 담체 단백질은 상기 사카라이드에 공유 결합된 2 내지 20개의 리신 잔기를 포함한다; 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.2 내지 4.0이다; 상기 당접합체는 상기 폴리사카라이드의 4, 10, 15 또는 25개의 사카라이드 반복 단위마다 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드 사이에 하나 이상의 공유 결합을 포함한다; 상기 사카라이드는 75% 내지 100%의 O-아세틸화도를 갖는다; 상기 접합체는 전체 폴리사카라이드에 대해 약 15% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다; 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0254] 상기 혈청형 33F 당접합체를 또한 그의 분자 크기 분포(K_d)에 의해 특성화할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 상기 언급한 바와 같이, 상기 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 측정할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체의 적어도 15%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체의 적어도 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체의 적어도 35%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 33F 당접합체의 적어도 70%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
- [0255] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체의 40% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체의 50% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 33F 당접합체의 65% 내지 80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

[0256] **1.3.4 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 당접합체**

[0257] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체를, 폴리스카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킴으로써 수득한다. 상기 활성화된 폴리스카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질상의 아미노기에 커플링시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세트이미드, SIB, SIAB, 설포-SIAB, SIA 또는 SBAP 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리스카라이드를 제공하는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 헥산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라지드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 상기과 같은 접합체는 예를 들어 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 개시되어 있다.

[0258] 다른 적합한 기법은 카보다이이미드, 하이드라지드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 CDI와의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 이어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와 커플링을 수반할 수 있다.

[0259] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다. 환원적 아민화는 2개 단계, (1) 개별적인 헥사사카라이드 단위 중의 이웃자리 다이올들로부터 알데하이드 작용기를 생성시키는 상기 폴리스카라이드의 산화, (2) 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리스카라이드 및 담체 단백질의 환원을 수반한다.

[0260] 바람직하게, 산화 전에 상기 혈청형 15B 폴리스카라이드의 표적 분자량(MW) 범위의 크기분류를 수행한다. 유리하게, 상기 정제된 혈청형 15B 폴리스카라이드의 크기를, 예를 들어 0-아세틸기의 존재와 같이 상기 폴리스카라이드 구조의 중요한 특징들을 보존하면서 감소시킨다. 바람직하게, 상기 정제된 혈청형 15B 폴리스카라이드의 크기를 기계적 균질화에 의해 감소시킨다(상기 섹션 1.2.6을 참조하시오).

[0261] 상기 산화 단계는 퍼요오데이트와의 반응을 수반할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서 "퍼요오데이트"란 용어는 퍼요오데이트 및 퍼요오드산 모두를 포함하며; 상기 용어는 또한 메타퍼요오데이트(IO_4^-) 및 오쏘퍼요오데이트(IO_6^{5-}) 및 퍼요오데이트의 다양한 염들(예를 들어, 나트륨 퍼요오데이트 및 칼륨 퍼요오데이트)을 모두 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리스카라이드의 산화에 사용되는 퍼요오데이트는 메타퍼요오데이트이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리스카라이드의 산화에 사용되는 퍼요오데이트는 나트륨 메타퍼요오데이트이다.

[0262] 바람직한 실시태양에서, 상기 폴리스카라이드를 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 반응시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 폴리스카라이드를 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 반응시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 폴리스카라이드를 약 0.15 몰 당량의 산화제와 반응시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 폴리스카라이드를 약 0.25 몰 당량의 산화제와 반응시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 폴리스카라이드를 약 0.5 몰 당량의 산화제와 반응시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 폴리스카라이드를 약 0.6 몰 당량의 산화제와 반응시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 폴리스카라이드를 약 0.7 몰 당량의 산화제와 반응시킨다.

[0263] 바람직한 실시태양에서, 상기 반응의 지속시간은 1시간 내지 50시간, 10시간 내지 30시간, 15시간 내지 20시간,

15시간 내지 17시간 또는 약 16시간이다.

- [0264] 바람직한 실시태양에서, 상기 반응의 온도를 15 °C 내지 45 °C, 15 °C 내지 30 °C, 20 °C 내지 25 °C에서 유지시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 반응의 온도를 약 23 °C에서 유지시킨다.
- [0265] 바람직한 실시태양에서, 상기 산화 반응을 나트륨 포스페이트, 칼륨 포스페이트, 2-(N-모폴리노)에탄설폰산(MES) 또는 비스-트리스로부터 선택된 완충제 중에서 수행한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 완충제는 칼륨 포스페이트이다.
- [0266] 바람직한 실시태양에서, 상기 완충제는 1 mM 내지 500 mM, 1 mM 내지 300 mM, 또는 50 mM 내지 200 mM의 농도를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 완충제는 약 100 mM의 농도를 갖는다.
- [0267] 바람직한 실시태양에서, 상기 산화 반응을 4.0 내지 8.0, 5.0 내지 7.0, 또는 5.5 내지 6.5의 pH에서 수행한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 pH는 약 6.0이다.
- [0268] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를, 20 °C 내지 25 °C의 온도에서 0.5 mg/ml 내지 5 mg/ml의 단리된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 0.2 내지 0.3 몰 당량의 피요오데이트와 반응 시킴으로써 수득한다.
- [0269] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 정제시킨다. 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 당해 분야의 숙련가에게 공지된 방법, 예를 들어 젤 투과 크로마토그래피(GPC), 투석 또는 한외여과/투석여과에 따라 정제시킨다. 예를 들어, 상기 활성화된 캡슐 폴리사카라이드를 농축 및 한외여과 장치를 사용하는 투석여과에 의해 정제시킨다.
- [0270] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 20, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 5, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 20, 10 내지 15, 또는 15 내지 20이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 10, 4 내지 8, 4 내지 6, 6 내지 8, 6 내지 12, 8 내지 12, 9 내지 11, 10 내지 16, 12 내지 16, 14 내지 18, 16 내지 20, 16 내지 18, 또는 18 내지 20이다.
- [0271] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 5 내지 500 kDa, 50 내지 500 kDa, 50 내지 450 kDa, 100 내지 400 kDa, 100 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0272] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 아세테이트를 포함한다.
- [0273] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 또는 0.7 또는 약 0.8 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 글리세롤을 포함한다.
- [0274] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다.
- [0275] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.

- [0276] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0277] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 가지며 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다.
- [0278] 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 임의로 사카라이드의 존재하에서 동결건조시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스이다. 이어서 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 상기 담체 단백질을 포함하는 용액과 배합할 수 있다.
- [0279] 또 다른 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 상기 담체 단백질과 배합하고 임의로 사카라이드의 존재하에서 동결건조시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스이다. 이어서 상기 공-동결건조된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 용액 중에 재현탁시키고 환원제와 반응시킬 수 있다.
- [0280] 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를
- [0281] (a) 상기 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하고;
- [0282] (b) 상기 배합된 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성시키는
- [0283] 단계를 포함하는 과정에 의해 담체 단백질에 접합시킬 수 있다.
- [0284] 다이메틸설폭사이드(DMSO) 중에서 환원적 아민화에 의한 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드와 단백질 담체와의 접합은, 예를 들어 상기 폴리사카라이드의 O-아세틸화 수준이 현저하게 감소될 수도 있는 수성 상에서의 환원적 아민화에 비해, 상기 폴리사카라이드의 O-아세틸 함량을 보존하기에 적합하다. 바람직한 실시태양에서, 단계 (a) 및 단계 (b)를 DMSO 중에서 수행한다.
- [0285] 바람직한 실시태양에서, 단계 (a)는 동결건조된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 담체 단백질 및 DMSO를 포함하는 용액 중에 용해시킴을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 단계 (a)는 공-동결건조된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 DMSO 중에 용해시킴을 포함한다.
- [0286] 단계 (a) 및 (b)를 수용액 중에서 수행하는 경우, 단계 (a) 및 (b)를 6.0 내지 8.5, 7.0 내지 8.0 또는 7.0 내지 7.5의 pH에서, 완충제, 바람직하게는 PBS, MES, HEPES, 비스-트리스, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, 비신(Bicine) 또는 HEPB로부터 선택된 완충제 중에서 수행한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 완충제는 PBS이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 pH는 약 7.3이다. 바람직한 실시태양에서, 단계 (b)에서 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 농도는 0.1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 5 mg/ml, 또는 0.5 mg/ml 내지 2 mg/ml이다. 바람직한 실시태양에서, 단계 (b)에서 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0 mg/ml이다.
- [0287] 바람직한 실시태양에서, 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 투입비(중량/중량)는 5:1 내지 0.1:1, 2:1 내지 0.1:1, 2:1 내지 1:1, 1.5:1 내지 1:1, 0.1:1 내지 1:1, 0.3:1 내지 1:1, 또는 0.6:1 내지 1:1이다.
- [0288] 바람직한 실시태양에서, 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 투입비는 약 0.6:1 내지 1:1이다. 또 다른 바람직한 실시태양에서, 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 투입비는 약 0.6:1 내지 1.5:1이다. 상기과 같은 초기 투입비는 상기 당접합체 중에 낮은 수준의 유리 폴리사카라이드를 획득하기에 특히 적합하다.
- [0289] 바람직한 실시태양에서, 활성화된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 투입비는 0.4:1, 0.5:1, 0.6:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1

또는 2:1이다.

- [0290] 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 브론스테드 또는 루이스산 존재하의 나트륨 시아노보로하이드라이드, 나트륨 트리아세톡시보로하이드라이드, 나트륨 또는 아연 보로하이드라이드, 아민 보란, 예를 들어 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-다이보란-메탄올, 다이메틸아민-보란, t-BuMeiPrN-BH₃, 벤질아민-BH₃ 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란(PEMB)이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 2-피콜린 보란이다.
- [0291] 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (b)에 사용된 환원제의 양은 약 0.1 내지 10.0 몰 당량, 0.5 내지 5.0 몰 당량 또는 1.0 내지 2.0 몰 당량이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (b)에 사용된 환원제의 양은 약 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2.0 몰 당량이다.
- [0292] 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (b)의 지속시간은 1시간 내지 60시간, 10시간 내지 50시간, 40시간 내지 50시간, 또는 42시간 내지 46시간이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (b)의 지속시간은 약 44시간이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (b)에서 반응 온도를 10 °C 내지 40 °C, 15 °C 내지 30 °C, 또는 20 °C 내지 26 °C에서 유지시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (b)에서 반응 온도를 약 23 °C에서 유지시킨다.
- [0293] 바람직한 실시태양에서, 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함하는 당접합체의 제조 방법은 NaBH₄의 첨가에 의해 반응하지 않은 알데하이드를 캡핑하는 단계(단계 (c))(급냉)를 추가로 포함한다.
- [0294] 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (c)에 사용되는 NaBH₄의 양은 0.1 내지 10 몰 당량, 0.5 내지 5.0 몰 당량 또는 1.0 내지 3.0 몰 당량이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (c)에 사용되는 NaBH₄의 양은 약 2 몰 당량이다.
- [0295] 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (c)의 지속시간은 0.1시간 내지 10시간, 0.5시간 내지 5시간, 또는 2시간 내지 4시간이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (c)의 지속시간은 약 3시간이다.
- [0296] 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (c)에서 반응 온도를 15 °C 내지 45 °C, 15 °C 내지 30 °C, 또는 20 °C 내지 26 °C에서 유지시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 단계 (c)에서 반응 온도를 약 23 °C에서 유지시킨다.
- [0297] 바람직한 실시태양에서, 상기 접합 단계의 수율은 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 초과이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합 단계(단계 b)의 수율은 60% 초과이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합 단계(단계 b)의 수율은 70% 초과이다. 상기 수율은 접합체 중의 혈청형 15B 폴리사카라이드 x 100)/상기 접합 단계에 사용된 활성화된 폴리사카라이드의 양이다.
- [0298] 바람직한 실시태양에서, 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함하는 당접합체의 제조 방법은
- [0299] (a) 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 고압 균질화에 의해 크기분류하고;
- [0300] (b) 상기 크기분류된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키고;
- [0301] (c) 상기 활성화된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합시키고;
- [0302] (d) 상기 배합된 활성화된 혈청형 15B 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 혈청형 15B 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성시키고;
- [0303] (e) 반응하지 않은 알데하이드를 NaBH₄의 첨가에 의해 캡핑(급냉)하는
- [0304] 단계들을 포함한다.
- [0305] 바람직한 실시태양에서, 상기 방법의 접합 단계(단계 d)의 수율은 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 초과이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합 단계(단계 d)의 수율은 60% 초과이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합 단계(단계 d)의 수율은 70% 초과이다. 상기 수율은 접합체 중의 혈청형 15B 폴리사카라이드 x 100)/상기 접합 단계에 사용된 활성화된 폴리사카라이드의 양이다.
- [0306] 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 상기 담체 단백질에 접합시킨 후에, 상기 폴리사카라이드-단백질 접합체를 숙련자에게 공지된 다양한 기법에 의해 정제(폴리사카라이드-단백질 접합체의 양에 관하여 농축)시킬 수 있다. 상기 기법으로는 투석, 농축/투석여과 공정, 접선류 여과, 침전/용리, 컬럼 크로마토그래피(DEAE 또는

소수성 상호작용 크로마토그래피) 및 심층 여과가 있다.

- [0307] 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 섹션 1.1에 정의된 바와 같다. 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 DT(디프테리아 독소), TT(파상풍 변성독소), CRM₁₉₇, 다른 DT 돌연변이체, PD(하에토피루스 인플루엔자에 단백질 D), 및 이들의 면역학적 기능 등가물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0308] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇)에 접합되며 5 내지 1,500 kDa의 분자량을 갖는 사카라이드를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 10 내지 1,500 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 50 내지 250 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 100 내지 250 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa; 또는 200 내지 400 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위의 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 50 내지 20,000 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 1,000 내지 20,000 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 3,000 내지 20,000 kDa, 5,000 내지 10,000 kDa, 5,000 내지 20,000 kDa, 8,000 내지 20,000 kDa, 8,000 내지 16,000 kDa 또는 10,000 내지 16,000 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0309] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 약 1,000 kDa, 약 1,500 kDa, 약 2,000 kDa, 약 2,500 kDa, 약 3,000 kDa, 약 3,500 kDa, 약 4,000 kDa, 약 4,500 kDa, 약 5,000 kDa, 약 5,500 kDa, 약 6,000 kDa, 약 6,500 kDa, 약 7,000 kDa, 약 7,500 kDa, 약 8,000 kDa, 약 8,500 kDa, 약 9,000 kDa, 약 9,500 kDa 약 10,000 kDa, 약 10,500 kDa, 약 11,000 kDa, 약 11,500 kDa, 약 12,000 kDa, 약 12,500 kDa, 약 13,000 kDa, 약 13,500 kDa, 약 14,000 kDa, 약 14,500 kDa, 약 15,000 kDa, 약 15,500 kDa, 약 16,000 kDa, 약 16,500 kDa, 약 17,000 kDa, 약 17,500 kDa, 약 18,000 kDa, 약 18,500 kDa 약 19,000 kDa, 약 19,500 kDa 또는 약 20,000 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0310] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 1,000 내지 20,000 kDa; 1,000 내지 15,000 kDa; 1,000 내지 10,000 kDa; 1,000 내지 7,500 kDa; 1,000 내지 5,000 kDa; 1,000 내지 4,000 kDa; 1,000 내지 3,000 kDa; 2,000 내지 20,000 kDa; 2,000 내지 15,000 kDa; 2,000 내지 12,500 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 7,500 kDa; 2,000 내지 6,000 kDa; 2,000 내지 5,000 kDa; 2,000 내지 4,000 kDa; 또는 2,000 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0311] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 3,000 내지 20,000 kDa; 3,000 내지 15,000 kDa; 3,000 내지 10,000 kDa; 3,000 내지 7,500 kDa; 3,000 내지 5,000 kDa; 3,000 내지 4,000 kDa; 4,000 내지 20,000 kDa; 4,000 내지 15,000 kDa; 4,000 내지 12,500 kDa; 4,000 내지 10,000 kDa; 4,000 내지 7,500 kDa; 4,000 내지 6,000 kDa 또는 4,000 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 5,000 내지 20,000 kDa; 5,000 내지 15,000 kDa; 5,000 내지 10,000 kDa; 5,000 내지 7,500 kDa; 6,000 내지 20,000 kDa; 6,000 내지 15,000 kDa; 6,000 내지 12,500 kDa; 6,000 내지 10,000 kDa 또는 6,000 내지 7,500 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0312] 상기 당접합체의 분자량을 SEC-MALLS에 의해 측정한다. 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다. 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다.
- [0313] 본 발명의 혈청형 15B 당접합체를 또한 사카라이드 대 담체 단백질의 비(중량/중량)에 의해 특성화할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비(중량/중량)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 3.0이다). 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 0.4 내지 2이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 0.5 내지 2.0, 0.5 내지 1.5, 0.5 내지 1.0, 1.0 내지 1.5, 1.0 내지 2.0이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 0.7 내지 0.9이다.

- [0314] 본 발명의 혈청형 15B 당접합체 및 면역원성 조성물은, 상기 담체 단백질에 공유적으로 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 상기 당접합체 조성물 중에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 상기 유리 사카라이드는 상기 당접합체와 비공유적으로 회합될 수 있다(즉 상기 당접합체에 비공유적으로 결합되거나, 흡착되거나 상기 당접합체 중에 또는 상기 당접합체에 의해 포획될 수 있다).
- [0315] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% 또는 15% 미만의 유리 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 25% 미만의 유리 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 20% 미만의 유리 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 15% 미만의 유리 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함한다.
- [0316] 상기 혈청형 15B 당접합체를 또한 그의 분자 크기 분포(K_d)에 의해 특성화할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 상기 언급한 바와 같이, 상기 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 측정할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 적어도 20%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 면역원성 접합체의 적어도 30%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 적어도 40%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 적어도 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 적어도 70%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
- [0317] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체의 40% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체의 50% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체의 65% 내지 80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
- [0318] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 당접합체는 상기 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 0-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정된다.
- [0319] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다. 바람직한 실시태양에서, 0-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정된다.
- [0320] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 15B 당접합체 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다. 바람직한 실시태양에서, 0-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정된다.

- [0321] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 약 0.8 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 0.7 mM 이상의 글리세롤을 포함한다.
- [0322] 본 발명의 혈청형 15B 당접합체를 특성화하는 또 다른 방식은 일련의 접합된 리신으로서 특성화될 수 있는 상기 사카라이드에 접합하게 되는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇) 중의 리신 잔기의 수(접합도)에 의한다. 상기 폴리사카라이드의 공유 결합으로 인한 상기 담체 단백질의 리신 변형에 대한 증거를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 아미노산 분석에 의해 획득할 수 있다. 접합은 접합체 물질을 생성시키는데 사용되는 CRM₁₉₇ 단백질 출발 물질에 비해 회수되는 리신 잔기의 수를 감소시킨다.
- [0323] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 접합도는 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 접합도는 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14 또는 약 15이다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 15B 당접합체의 접합도는 2 내지 5이다.
- [0324] **1.3.5 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체**
- [0325] 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체에서, 사카라이드는 폴리사카라이드 및 올리고사카라이드로 이루어진 군으로부터 선택되고, 담체 단백질은 본 발명에 개시되거나 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 바와 같은 임의의 적합한 담체로부터 선택된다. 일부 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 혈청형 12F 스트렙토코커스 뉴모니아에로부터의 폴리사카라이드이다.
- [0326] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체를 CDAP를 사용하여 제조한다. 상기 폴리사카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킨다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질(바람직하게는 CRM₁₉₇)상의 아미노기에 커플링시킨다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세티미드, SIB, SIAB, 설폰-SIAB, SIA 또는 SBAP 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 제공하는 시스템 또는 시스템아민일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 핵산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라이드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질(CRM₁₉₇)에 접합시킨다.
- [0327] 접합을 위한 다른 기법은 카보다이이미드, 하이드라이드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 CDI와의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 있어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와의 커플링을 수반할 수 있다.
- [0328] 하나의 실시태양에서, 혈청형 12F 스트렙토코커스 뉴모니아에로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 환원적 아민화는 2개 단계, (1) 개별적인 핵사사카라이드 단위 중의 이웃자리 다이올들로부터 알데하이드 작용기를 생성시키는 상기 폴리사카라이드의 산화, (2) 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원을 수반한다.
- [0329] 산화 전에 상기 혈청형 12F 폴리사카라이드를 임의로 가수분해시킨다(크기 분류한다). 기계적 또는 화학적 가수분해가 사용될 수 있다. 화학적 가수분해를 아세트산을 사용하여 수행할 수 있다.

- [0330] 하나의 실시태양에서, 상기 산화제는 퍼요오데이트이다. "퍼요오데이트"란 용어는 퍼요오데이트 및 퍼요오드산 모두를 포함한다(하기를 참조하시오).
- [0331] 바람직한 실시태양에서, 상기 산화제는 공산화제로서 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO) 유리 라디칼 및 N-클로로숙신이미드(NCS)이다. 상기와 같은 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체를 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO) 유리 라디칼을 사용하여, 예를 들어 실시예 7 및 WO 2014/097099에 개시된 바와 같이, 상기 공산화제로서 N-클로로숙신이미드(NCS)를 사용하여 상기 사카라이드의 1차 알콜을 알데하이드로 산화시켜 제조한다(본 발명에서 이후부터 "TEMPO/NCS 산화"라 칭함). 따라서, 하나의 태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체를 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 수득할 수 있다: a) 12F 사카라이드를 수성 용매 중에서 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드(NCS)와 반응시켜 활성화된 사카라이드를 생성시키고; b) 상기 활성화된 사카라이드를 하나 이상의 아민기를 포함하는 담체 단백질과 반응시킨다(본 발명에서 이후부터 "TEMPO/NCS-환원적 아민화"라 칭한다). 하나의 태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체를 상기 방법에 의해 수득한다. 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 12F 사카라이드의 산화도는 1 내지 50, 1 내지 40, 1 내지 30, 1 내지 20, 1 내지 10, 1 내지 5, 3 내지 40, 3 내지 30, 3 내지 20, 3 내지 10, 4 내지 40, 4 내지 30, 4 내지 20, 4 내지 10, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 10, 6 내지 50, 6 내지 40, 6 내지 30, 6 내지 20, 6 내지 15, 6 내지 14, 6 내지 13, 6 내지 12, 6 내지 11, 6 내지 10, 7 내지 40, 7 내지 30, 7 내지 20, 7 내지 15, 7 내지 14, 7 내지 13, 7 내지 12, 7 내지 11, 7 내지 10, 8 내지 40, 8 내지 30, 8 내지 20, 8 내지 15, 8 내지 14, 8 내지 13, 8 내지 12, 8 내지 11, 8 내지 10, 9 내지 40, 9 내지 30, 9 내지 20, 9 내지 15, 10 내지 40, 10 내지 30, 10 내지 20, 또는 10 내지 15의 범위이다. 추가의 태양에서, 상기 활성화된 사카라이드의 산화도는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40이다. 바람직하게, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0332] 하나의 실시태양에서, 단계 a)에 앞서, 상기 12F 사카라이드를 100 내지 400 kDa 범위의 분자량으로 가수분해시킨다. 예를 들어, 하나의 태양에서, 상기 분자량 범위는 100 내지 350 kDa, 100 내지 300 kDa, 100 내지 250 kDa, 100 내지 200 kDa, 100 내지 150 kDa, 200 내지 400 kDa, 200 내지 350 kDa, 200 내지 300 kDa, 200 내지 250 kDa, 300 내지 400 kDa, 또는 300 내지 350 kDa이다.
- [0333] 추가의 태양에서, 상기 방법은 단계 b)에 앞서 상기 활성화된 폴리사카라이드의 정제 단계를 추가로 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 방법은 단계 b)에 이어서 환원제를 가하는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 태양에서, 상기 환원제는 NaCNBH₃이다. 추가의 태양에서, 상기 방법은 NaCNBH₃의 첨가에 이어서 NaBH₄를 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 태양에서, 상기 방법은 NaBH₄의 첨가에 이어서 정제 단계를 포함한다.
- [0334] 또 다른 태양에서, 본 명세는 본 발명에서 상기에 개시된 방법들 중 임의의 방법에 의해 생성되거나 수득될 수 있는 스트렙토코커스 뉴모니아에 12F로부터의 당접합체를 제공한다. 예를 들어, 하나의 태양에서, 본 명세는 a) 사카라이드를 수성 용매 중에서 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시(TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드(NCS)와 반응시켜 활성화된 사카라이드를 생성시키고; b) 상기 활성화된 사카라이드를 하나 이상의 아민기를 포함하는 담체 단백질과 반응시키는 단계들을 포함하는 방법에 의해 생성되거나 수득될 수 있는 담체 단백질에 접합된 사카라이드를 포함하는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체를 제공한다.
- [0335] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체는 약 50 내지 약 20,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 당접합체는 약 200 내지 약 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체는 약 500 내지 약 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체는 약 1,000 내지 약 3,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체는 약 600 내지 약 2,800 kDa; 약 700 내지 약 2,700 kDa; 약 1,000 내지 약 2,000 kDa; 약 1,800 내지 약 2,500 kDa; 약 1,100 내지 약 2,200 kDa; 약 1,900 내지 약 2,700 kDa; 약 1,200 내지 약 2,400 kDa; 약 1,700 내지 약 2,600 kDa; 약 1,300 내지 약 2,600 kDa; 약 1,600 내지 약 3,000 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0336] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체는 1,000 내지 20,000 kDa; 1,000 내지 15,000 kDa; 1,000 내지 10,000 kDa; 1,000 내지 7,500 kDa; 1,000 내지 5,000 kDa; 1,000 내지 4,000 kDa; 1,000 내지

3,000 kDa; 2,000 내지 20,000 kDa; 2,000 내지 15,000 kDa; 2,000 내지 12,500 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 7,500 kDa; 2,000 내지 6,000 kDa; 2,000 내지 5,000 kDa; 2,000 내지 4,000 kDa; 또는 2,000 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다. 상기 범위 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체는 TEMPO/NCS-환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합된다.

[0337] 본 발명의 혈청형 12F 당접합체를 특성화하는 또 다른 방식은 일련의 접합된 리신으로서 특성화될 수 있는 상기 사카라이드에 접합하게 되는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇) 중의 리신 잔기의 수(접합도)에 의한다.

[0338] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체의 접합도는 2 내지 20, 4 내지 16, 4 내지 15, 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체의 접합도는 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, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19 또는 약 20이다.

[0339] 상기 사카라이드에 접합된 담체 단백질 중의 리신 잔기의 수를 또한 물비로서 나타낼 수 있다. 예를 들어 CRM₁₉₇의 4 내지 15개의 리신 잔기가 상기 사카라이드에 공유 결합된 당접합체에서, 상기 당접합체 중의 접합된 리신 대 CRM₁₉₇의 물비는 약 10:1 내지 약 40:1이다. CRM₁₉₇의 2 내지 20개의 리신 잔기가 상기 사카라이드에 공유 결합된 면역원성 조성물에서, 상기 당접합체 중의 접합된 리신 대 CRM₁₉₇의 물비는 약 5:1 내지 약 50:1이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체에서, 접합된 리신 대 담체 단백질의 물비는 약 10:1 내지 약 25:1이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 일부 실시태양에서, 상기 CRM₁₉₇은 상기 사카라이드에 공유 결합된 39개 중 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16개의 리신 잔기를 포함할 수 있다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체를 TEMPO/NCS-환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 하나의 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체에서 0.2 내지 4(예를 들어, 약 0.2, 약 0.3, 약 0.4, 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, 약 3.0, 약 3.1, 약 3.2, 약 3.3, 약 3.4, 약 3.5, 약 3.6, 약 3.7, 약 3.8, 약 3.9 또는 약 4.0)이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체에서 1.1 내지 1.7이다. 다른 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.8 내지 1.8(예를 들어, 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 또는 약 1.8)이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체를 TEMPO/NCS-환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다.

[0340] 상기 담체 단백질상의 리신에 대한 상기 사카라이드 쇄의 부착 빈도는 본 명세의 혈청형 12F 당접합체를 특성화하기 위한 또 다른 매개변수이다. 예를 들어, 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드 간의 하나 이상의 공유 결합이 상기 폴리사카라이드의 100개의 사카라이드 반복 단위마다 존재한다. 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합이 상기 폴리사카라이드의 50개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합이 상기 폴리사카라이드의 25개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 4개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 10개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 추가의 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 15개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 빈번한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이며 상기 CRM₁₉₇과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 4, 10, 15 또는 25개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다.

[0341] 다른 실시태양에서, 상기 접합체는 5 내지 10개의 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 7개의 사카라이드 반복 단위마다; 3 내지 8개의 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 9개의 사카라이드 반복 단위마다; 6 내지 11개의 사카

라이드 반복 단위마다; 7 내지 12개의 사카라이드 반복 단위마다; 8 내지 13개의 사카라이드 반복 단위마다; 9 내지 14개의 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 15개의 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 6개의 사카라이드 반복 단위마다; 3 내지 7개의 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 8개의 사카라이드 반복 단위마다; 6 내지 10개의 사카라이드 반복 단위마다; 7 내지 11개의 사카라이드 반복 단위마다; 8 내지 12개의 사카라이드 반복 단위마다; 9 내지 13개의 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 14개의 사카라이드 반복 단위마다; 10 내지 20개의 사카라이드 반복 단위마다; 4 내지 25개의 사카라이드 반복 단위마다; 2 내지 25개의 사카라이드 반복 단위마다 상기 담체 단백질과 사카라이드간에 하나 이상의 공유 결합을 포함한다. 빈번한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0342] 또 다른 실시태양에서, CRM₁₉₇과 사카라이드간의 적어도 하나의 결합은 상기 폴리사카라이드의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 사카라이드 반복 단위마다 존재한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체를 TEMPO/NCS-환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다.

[0343] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체는 상기 폴리사카라이드의 25개의 사카라이드 반복 단위마다 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 하나 이상의 공유 결합을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 4개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 10개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 추가의 실시태양에서, 상기 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드간의 공유 결합은 상기 폴리사카라이드의 15개의 사카라이드 반복 단위마다 적어도 하나 존재한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체를 TEMPO/NCS-환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다.

[0344] 본 발명의 혈청형 12F 당접합체 및 면역원성 조성물은, 상기 담체 단백질에 공유적으로 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 상기 당접합체 조성물 중에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 상기 유리 사카라이드는 상기 당접합체와 비공유적으로 회합될 수 있다(즉 상기 당접합체에 비공유적으로 결합되거나, 흡착되거나 상기 당접합체 중에 또는 상기 당접합체에 의해 포획될 수 있다).

[0345] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체는 혈청형 12F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만의 유리 혈청형 12F 폴리사카라이드를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 12F로부터의 당접합체는 혈청형 12F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 50% 미만의 유리 혈청형 12F 폴리사카라이드를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 12F로부터의 당접합체는 혈청형 12F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 45% 미만의 유리 혈청형 12F 폴리사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 12F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 30% 미만의 유리 혈청형 12F 폴리사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 12F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 20% 미만의 유리 혈청형 12F 폴리사카라이드를 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 12F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 10% 미만의 유리 혈청형 12F 폴리사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 12F로부터의 당접합체는 혈청형 12F 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 5% 미만의 유리 혈청형 12F 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체를 TEMPO/NCS-환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다.

[0346] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는 사카라이드를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa; 또는 200 내지 400 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체를 TEMPO/NCS-환원적 아민화에 의해 상기 담체 단백질에 접합시킨다.

[0347] 상기 혈청형 12F 당접합체를 또한 그의 분자 크기 분포(K_d)에 의해 특성화할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 상기 언급한 바와 같이, 상기 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 측정할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체의 적어도 35%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 12F 당접합체의 적어도 70%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

- [0348] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체의 40% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체의 50% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 12F 당접합체의 65% 내지 80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

[0349] **1.3.6 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 당접합체**

- [0350] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체를, 폴리사카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킴으로써 수득한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질상의 아미노기에 커플링시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세트이미드, SIB, SIAB, 설포-SIAB, SIA 또는 SBAP 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 제공하는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 핵산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라이드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 상기과 같은 접합체는 예를 들어 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 개시되어 있다.

- [0351] 다른 적합한 기법은 카보다이이미드, 하이드라이드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S-NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 CDI와의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 이어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와의 커플링을 수반할 수 있다.

- [0352] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다. 환원적 아민화는 2개 단계, (1) 개별적인 핵사사카라이드 단위 중의 이웃자리 다이올들로부터 알데하이드 작용기를 생성시키는 상기 폴리사카라이드의 산화, (2) 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원을 수반한다.

- [0353] 산화 전에 상기 혈청형 10A 폴리사카라이드를 임의로 가수분해시킨다(크기 분류한다). 기계적 또는 화학적 가수분해가 사용될 수 있다. 화학적 가수분해를 아세트산을 사용하여 수행할 수 있다.

- [0354] 하나의 실시태양에서, 혈청형 폴리사카라이드를

- [0355] (a) 단리된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키고;

- [0356] (b) 급냉제의 첨가에 의해 상기 산화 반응을 급냉시켜 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 생성시키는

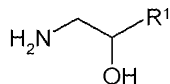
- [0357] 단계를 포함하는 공정에 의해 활성화(산화)시킨다.

- [0358] 바람직한 실시태양에서, 상기 산화제는 퍼요오데이트이다. 본 발명의 목적을 위해서 "퍼요오데이트"란 용어는 퍼요오데이트 및 퍼요오드산 모두를 포함하며; 상기 용어는 또한 메타퍼요오데이트(IO_4^-) 및 오쏘퍼요오데이트(IO_6^{5-}) 및 퍼요오데이트의 다양한 염들(예를 들어, 나트륨 퍼요오데이트 및 칼륨 퍼요오데이트)을 모두 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 산화제는 나트륨 퍼요오데이트이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 폴리사카라이드의 산화에 사용되는 퍼요오데이트는 메타퍼요오데이트이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 폴리사카라이드의 산화에 사용되는 퍼요오데이트는 나트륨 메타퍼요오데이트이다.

[0359] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 이웃자리 다이올, 1,2-아미노알콜, 아미노산, 글루타치온, 설파이트, 바이설파이트, 다이티오나이트, 메타바이설파이트, 티오설파이트, 포스파이트, 하이포포스파이트 및 아인산으로부터 선택된다.

[0360] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 하기 화학식 I의 1,2-아미노알콜이다:

[0361] 화학식 I



[0362]

[0363] 상기 식에서,

[0364] R^1 은 H, 메틸, 에틸, 프로필 및 아이소프로필로부터 선택된다.

[0365] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 설파이트, 바이설파이트, 다이티오나이트, 메타바이설파이트, 티오설파이트, 포스파이트, 하이포포스파이트 및 아인산의 나트륨 및 칼륨염으로부터 선택된다.

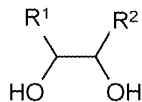
[0366] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 아미노산이다. 상기와 같은 실시태양에서, 상기 아미노산은 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 시스틴, 메티오닌, 프롤린, 하이드록시프롤린, 트립토판, 타이로신 및 히스티딘으로부터 선택될 수 있다.

[0367] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 설파이트, 예를 들어 바이설파이트, 다이티오나이트, 메타바이설파이트, 티오설파이트이다.

[0368] 하나의 실시태양에서, 상기 급냉제는 2개의 이웃자리 하이드록실기(이웃자리 다이올), 즉 2개의 인접한 탄소 원자에 공유 결합된 2개의 하이드록실기를 포함하는 화합물이다.

[0369] 바람직하게, 상기 급냉제는 하기 화학식 II의 화합물이다:

[0370] 화학식 II



[0371]

[0372] 상기 식에서,

[0373] R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 H, 메틸, 에틸, 프로필 및 아이소프로필로부터 선택된다.

[0374] 바람직한 실시태양에서, 상기 급냉제는 글리세롤, 에틸렌 글리콜, 프로판-1,2-다이올, 부탄-1,2-다이올 또는 부탄-2,3-다이올, 또는 아스코르브산이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 급냉제는 부탄-2,3-다이올이다.

[0375] 바람직한 실시태양에서, 상기 단리된 혈청형 10A 폴리사카라이드를

[0376] (a) 단리된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 펄리오테이트와 반응시키고;

[0377] (b) 부탄-2,3-다이올의 첨가에 의해 상기 산화 반응을 급냉시켜 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 생성시키는

[0378] 단계를 포함하는 공정에 의해 활성화시킨다.

[0379] 상기 폴리사카라이드의 산화 단계에 이어서, 상기 폴리사카라이드는 활성화된다고 하며, 본 발명에서 하기에 "활성화된 폴리사카라이드"라 칭한다.

[0380] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 정제시킨다. 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 당해 분야의 숙련자에게 공지된 방법들, 예를 들어 겔 투과 크로마토그래피(GPC), 투석 또는 한외여과/투석여과에 따라 정제시킨다. 예를 들어, 상기 활성화된 10A 폴리사카라이드를 농축 및 한외여과 장치를 사용하는 투석여과에 의해 정제시킨다.

[0381] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 30, 2 내지 25, 2 내지

20, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 5, 5 내지 30, 5 내지 25, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 30, 10 내지 25, 10 내지 20, 10 내지 15, 15 내지 30, 15 내지 25, 15 내지 20, 20 내지 30, 또는 20 내지 25이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 10, 4 내지 8, 4 내지 6, 6 내지 8, 6 내지 12, 8 내지 14, 9 내지 11, 10 내지 16, 12 내지 16, 14 내지 18, 16 내지 20, 16 내지 18, 18 내지 22, 또는 18 내지 20이다.

[0382] 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드는 50 내지 400 kDa, 50 내지 350 kDa, 50 내지 300 kDa, 50 내지 250 kDa, 50 내지 200 kDa, 100 내지 300 kDa, 100 내지 250 kDa 또는 100 내지 200 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드는 50 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드는 100 내지 200 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드는 100 내지 200 kDa의 분자량 및 5 내지 20, 5 내지 15, 8 내지 14, 8 내지 12 또는 9 내지 11의 산화도를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드는 100 내지 200 kDa의 분자량 및 9 내지 11의 산화도를 갖는다.

[0383] 상기 활성화된 폴리사카라이드 및/또는 담체 단백질을 독립적으로(별도의 동결건조) 또는 함께(공-동결건조) 동결건조(냉동-건조)시킬 수 있다.

[0384] 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 임의로 사카라이드의 존재하에서 동결건조시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스이다. 이어서 하나의 실시태양에서, 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 상기 담체 단백질을 포함하는 용액과 배합한다.

[0385] 또 다른 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 공-동결건조시킨다. 상기과 같은 실시태양에서, 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 상기 담체 단백질과 배합하고 임의로 사카라이드의 존재하에서 동결건조시킨다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시태양에서, 상기 사카라이드는 슈크로스이다. 이어서 상기 공-동결건조된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 용액 중에 재현탁시키고 환원제와 반응시킬 수 있다.

[0386] 상기 접합 과정의 두 번째 단계는 환원제를 사용하는, 접합체를 형성시키기 위한 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원(환원적 아민화)이다.

[0387] 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를

[0388] (c) 상기 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하고;

[0389] (d) 상기 배합된 활성화된 혈청형 10A 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 혈청형 10A 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성시키는

[0390] 단계를 포함하는 과정에 의해 담체 단백질에 접합시킬 수 있다.

[0391] 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 수성 용매 중에서 수행하며, 또 다른 실시태양에서, 상기 반응을 비양성자성 용매 중에서 수행한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 DMSO(다이메틸설폭사이드) 중에서 또는 DMF(다이메틸포아미드) 용매 중에서 수행한다. 상기 DMSO 또는 DMF 용매를 사용하여 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 재조성할 수 있다.

[0392] 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 브론스테드 또는 루이스산 존재하의 나트륨 시아노보로하이드라이드, 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드, 나트륨 또는 아연 보로하이드라이드, 아민 보란, 예를 들어 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-다이보란-메탄올, 다이메틸아민-보란, t-BuMeiPrN-BH₃, 벤질아민-BH₃ 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란(PEMB)이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드이다.

[0393] 상기 환원 반응의 끝에서, 상기 접합체 중에 반응하지 않은 알데하이드기가 남아있을 수도 있으며, 이들을 적합한 캡핑제를 사용하여 캡핑시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡핑제는 나트륨 보로하이드라이드(NaBH₄)이다.

[0394] 혈청형 10A 폴리사카라이드의 상기 담체 단백질에의 접합에 이어서, 상기 당접합체를 숙련자에게 공지된 다양한 기법에 의해 정제(폴리사카라이드-단백질 접합체의 양에 관하여 농축)시킬 수 있다. 이러한 기법으로는 투석,

농축/투석여과 공정, 접선류 여과 침전/용리, 컬럼 크로마토그래피(DEAE 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피) 및 침출 여과가 있다.

[0395] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는 사카라이드를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa; 또는 200 내지 400 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다.

[0396] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 50 내지 20,000 Da의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체는 50 내지 15,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체는 500 내지 15,000 kDa; 500 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 또는 3,000 내지 8,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체는 1,000 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체는 1,000 내지 8,000 kDa의 분자량을 갖는다. 더욱 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체는 2000 내지 8,000 kDa 또는 3,000 내지 7,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 200 내지 20,000 kDa; 200 내지 15,000 kDa; 200 내지 10,000 kDa; 200 내지 7,500 kDa; 200 내지 5,000 kDa; 200 내지 3,000 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 500 내지 20,000 kDa; 500 내지 15,000 kDa; 500 내지 12,500 kDa; 500 내지 10,000 kDa; 500 내지 7,500 kDa; 500 내지 6,000 kDa; 500 내지 5,000 kDa; 500 내지 4,000 kDa; 500 내지 3,000 kDa; 500 내지 2,000 kDa; 500 내지 1,500 kDa; 500 내지 1,000 kDa; 750 내지 20,000 kDa; 750 내지 15,000 kDa; 750 내지 12,500 kDa; 750 내지 10,000 kDa; 750 내지 7,500 kDa; 750 내지 6,000 kDa; 750 내지 5,000 kDa; 750 내지 4,000 kDa; 750 내지 3,000 kDa; 750 내지 2,000 kDa; 750 내지 1,500 kDa; 1,000 내지 15,000 kDa; 1,000 내지 12,500 kDa; 1,000 내지 10,000 kDa; 1,000 내지 7,500 kDa; 1,000 내지 6,000 kDa; 1,000 내지 5,000 kDa; 1,000 내지 4,000 kDa; 1,000 내지 2,500 kDa; 2,000 내지 15,000 kDa; 2,000 내지 12,500 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 7,500 kDa; 2,000 내지 6,000 kDa; 2,000 내지 5,000 kDa; 2,000 내지 4,000 kDa; 또는 2,000 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0397] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 3,000 내지 20,000 kDa; 3,000 내지 15,000 kDa; 3,000 내지 10,000 kDa; 3,000 내지 7,500 kDa; 3,000 내지 5,000 kDa; 4,000 내지 20,000 kDa; 4,000 내지 15,000 kDa; 4,000 내지 12,500 kDa; 4,000 내지 10,000 kDa; 4,000 내지 7,500 kDa; 4,000 내지 6,000 kDa; 또는 4,000 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 5,000 내지 20,000 kDa; 5,000 내지 15,000 kDa; 5,000 내지 10,000 kDa 또는 5,000 내지 7,500 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 6,000 내지 20,000 kDa; 6,000 내지 15,000 kDa; 6,000 내지 10,000 kDa 또는 6,000 내지 7,500 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 7,000 내지 20,000 kDa; 7,000 내지 15,000 kDa; 7,000 내지 10,000 kDa 또는 7,000 내지 8,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 8,000 내지 20,000 kDa; 8,000 내지 15,000 kDa 또는 8,000 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0398] 상기 범위들 중 임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다. 상기 당접합체의 분자량을 SEC-MALLS에 의해 측정한다.

[0399] 본 발명의 혈청형 10A 당접합체를 특성화하는 또 다른 방식은 일련의 접합된 리신으로서 특성화될 수 있는 상기 사카라이드에 접합하게 되는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇) 중의 리신 잔기의 수(접합도)에 의한다. 상기 폴리사카라이드의 공유 결합으로 인한 상기 담체 단백질의 리신 변형에 대한 증거를 당해 분야의 숙련자들에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 아미노산 분석에 의해 획득할 수 있다. 접합은 접합체 물질을 생성시키는데 사용되는 CRM₁₉₇ 단백질 출발 물질에 비해 회수되는 리신 잔기의 수를 감소시킨다.

[0400] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체의 접합도는 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 바람직한 실시태양에서,

상기 혈청형 10A 당접합체의 접합도는 6 내지 8이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 담체 접합체는 CRM₁₉₇이다.

[0401] 본 발명의 혈청형 10A 당접합체를 또한 사카라이드 대 담체 단백질의 비(중량/중량)에 의해 특성화할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질의 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. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 10A 사카라이드 대 담체 단백질 비는 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. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 10A 폴리사카라이드 대 담체 단백질 비는 0.8 내지 1.4이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 접합체 중의 혈청형 10A 캡슐 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 0.8 내지 1.2(예를 들어, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 약 1.1, 또는 약 1.2)이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0402] 본 발명의 혈청형 10A 당접합체 및 면역원성 조성물은, 상기 담체 단백질에 공유적으로 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 상기 당접합체 조성물 중에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 상기 유리 사카라이드는 상기 당접합체와 비공유적으로 회합될 수 있다(즉 상기 당접합체에 비공유적으로 결합되거나, 흡착되거나 상기 당접합체 중에 또는 상기 당접합체에 의해 포획될 수 있다).

[0403] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체는 10A 사카라이드의 총량에 대해 약 50% 미만의 유리 사카라이드, 약 45% 미만의 유리 사카라이드, 약 40% 미만의 유리 사카라이드, 약 35% 미만의 유리 사카라이드, 약 30% 미만의 유리 사카라이드, 약 25% 미만의 유리 사카라이드, 약 20% 미만의 유리 사카라이드, 약 15% 미만의 유리 사카라이드, 약 10% 미만의 유리 사카라이드, 또는 약 5% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다. 바람직하게, 혈청형 10A 당접합체는 15% 미만의 유리 사카라이드, 보다 바람직하게는 10% 미만의 유리 사카라이드, 및 더욱 더 바람직하게는 5% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다.

[0404] 상기 혈청형 10A 당접합체를 또한 그의 분자 크기 분포(K_d)에 의해 특성화할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 상기 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 측정할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체의 적어도 30%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체의 적어도 40%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체의 적어도 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 10A 당접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 10A 당접합체의 50% 내지 80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

[0405] 1.3.7 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 당접합체

[0406] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체를, 폴리사카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킴으로써 수득한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질상의 아미노기에 커플링시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세트이미드, SIB, SIAB, 설포-SIAB, SIA 또는 SBAP 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 제공하는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 핵산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라이드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 상기와 같은 접합체는 예를 들어 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 개시되어 있다.

[0407] 다른 적합한 기법은 카보다이이미드, 하이드라이드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 CDI와의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 이어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와 커플링을 수반할

수 있다.

- [0408] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다. 환원적 아민화는 2개 단계, (1) 개별적인 핵사사카라이드 단위 중의 이웃자리 다이올들로부터 알데하이드 작용기를 생성시키는 상기 폴리사카라이드의 산화, (2) 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원을 수반한다.
- [0409] 산화 전에 상기 혈청형 11A 폴리사카라이드를 임의로 가수분해시켜 그의 점도를 감소시킨다. 기계적 또는 화학적 가수분해가 사용될 수 있다. 화학적 가수분해를 아세트산을 사용하여 수행할 수 있다. 기계적 크기분류는 고압 균질화 전단을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0410] 상기 산화 단계는 퍼요오데이트와의 반응을 수반할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, "퍼요오데이트"란 용어는 퍼요오데이트 및 퍼요오드산 모두를 포함하며; 상기 용어는 또한 메타퍼요오데이트(IO_4^-) 및 오쏘퍼요오데이트(IO_6^{5-}) 및 퍼요오데이트의 다양한 염들(예를 들어, 나트륨 퍼요오데이트 및 칼륨 퍼요오데이트)을 모두 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 11A로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 메타퍼요오데이트의 존재하에서, 바람직하게는 나트륨 퍼요오데이트(NaIO_4)의 존재하에서 산화시킨다. 또 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 11A로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 오쏘퍼요오데이트의 존재하에서, 바람직하게는 퍼요오드산의 존재하에서 산화시킨다.
- [0411] 상기 폴리사카라이드의 산화 단계에 이어서, 상기 폴리사카라이드는 활성화된다고 하며, 본 발명의 하기에서 "활성화된 폴리사카라이드"라 칭한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 정제하고 동결건조(냉동-건조)시킬 수 있다.
- [0412] 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 독립적으로(별도의 동결건조) 또는 함께(공-동결건조) 동결건조(냉동-건조)시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 공-동결건조시킨다. 또 다른 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 독립적으로 동결건조시킨다.
- [0413] 하나의 실시태양에서, 상기 동결건조는 비-환원당의 존재하에서 발생하며, 가능한 비-환원당은 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트를 포함한다.
- [0414] 상기 접합 과정의 두 번째 단계는 환원제를 사용하는, 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원(소위 환원적 아민화)이다. 적합한 환원제는 시아노보로하이드라이드, 예를 들어 나트륨 시아노보로하이드라이드, 보란-피리딘, 또는 보로하이드라이드 교환 수지를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드이다.
- [0415] 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 수성 용매 중에서 수행하며, 또 다른 실시태양에서, 상기 반응을 비양성자성 용매 중에서 수행한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 DMSO(다이메틸설폭사이드) 중에서 또는 DMF(다이메틸폼아미드) 용매 중에서 수행한다. 상기 DMSO 또는 DMF 용매를 사용하여 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 제조성할 수 있다.
- [0416] 하나의 실시태양에서, 0.1 내지 3.0, 0.15 내지 2.0, 0.2 내지 2.0, 또는 0.5 내지 1.5 몰 당량의 나트륨 시아노보로하이드라이드를 상기 환원 반응에 사용한다. 하나의 실시태양에서, 약 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.9 또는 3.0 몰 당량의 나트륨 시아노보로하이드라이드를 상기 환원 반응에 사용한다.
- [0417] 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드이며, 추가의 실시태양에서, 1.0 내지 6.0 몰 당량, 2.0 내지 5.0 몰 당량 또는 약 3.0 몰 당량의 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드를 상기 환원 반응에 사용한다.
- [0418] 상기 환원 반응의 끝에서, 상기 접합체 중에 반응하지 않은 알데하이드기가 남아있을 수도 있으며, 이들을 적합한 캡핑제를 사용하여 캡핑시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡핑제는 나트륨 보로하이드라이드(NaBH_4)이다. 하나의 실시태양에서, 캡핑을, 상기 환원 반응물을 0.5 내지 5.0 몰 당량의 NaBH_4 , 예를 들어 약 1, 1.5, 2, 2.5 또는 3 몰 당량의 NaBH_4 와 반응시킴으로써 성취한다.
- [0419] 상기 접합(환원 반응 및 임의로 캡핑)에 이어서, 상기 당접합체를 정제시킬 수 있다. 상기 당접합체를 투석여

과 및/또는 이온 교환 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 당접합체를 투석여과 또는 이온 교환 크로마토그래피 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제시킨다.

[0420] 하나의 실시태양에서, 상기 당접합체를 멸균 여과한다.

[0421] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체를 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇)에 접합시키며 상기 당접합체는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는 사카라이드를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 50 내지 400 kDa; 50 내지 300 kDa; 50 내지 200 kDa; 50 내지 100 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 100 내지 400 kDa; 100 내지 300 kDa; 100 내지 200 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa; 200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa; 200 내지 400 kDa 또는 200 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다.

[0422] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 50 내지 20,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체는 50 내지 15,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체는 500 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체는 200 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 더욱 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체는 1,000 내지 8,000 kDa 또는 2,000 내지 8,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0423] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 200 내지 20,000 kDa; 200 내지 17,500 kDa; 200 내지 15,000 kDa; 200 내지 10,000 kDa; 200 내지 7,500 kDa; 200 내지 5,000 kDa; 200 내지 3,000 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 500 내지 20,000 kDa; 500 내지 17,500 kDa; 500 내지 15,000 kDa; 500 내지 12,500 kDa; 500 내지 10,000 kDa; 500 내지 7,500 kDa; 500 내지 6,000 kDa; 500 내지 5,000 kDa; 500 내지 4,000 kDa; 500 내지 3,000 kDa; 500 내지 2,000 kDa; 500 내지 1,500 kDa; 500 내지 1,000 kDa; 700 내지 20,000 kDa; 700 내지 17,500 kDa; 700 내지 15,000 kDa; 700 내지 12,500 kDa; 700 내지 10,000 kDa; 700 내지 7,500 kDa; 700 내지 6,000 kDa; 700 내지 5,000 kDa; 700 내지 4,500 kDa; 700 내지 4,000 kDa; 700 내지 3,500 kDa; 700 내지 3,000 kDa; 700 내지 2,000 kDa; 700 내지 1,500 kDa; 1,000 내지 20,000 kDa; 1,000 내지 17,500 kDa; 1,000 내지 15,000 kDa; 1,000 내지 12,500 kDa; 1,000 내지 10,000 kDa; 1,000 내지 7,500 kDa; 1,000 내지 6,000 kDa; 1,000 내지 5,000 kDa; 1,000 내지 4,000 kDa; 1,000 내지 2,500 kDa; 2,000 내지 20,000 kDa; 2,000 내지 17,500 kDa; 2,000 내지 15,000 kDa; 2,000 내지 12,500 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 7,500 kDa; 2,000 내지 6,000 kDa; 2,000 내지 5,000 kDa; 2,000 내지 4,000 kDa; 또는 2,000 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0424] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 3,000 내지 20,000 kDa; 3,000 내지 17,500 kDa; 3,000 내지 15,000 kDa; 3,000 내지 10,000 kDa; 3,000 내지 7,500 kDa; 3,000 내지 5,000 kDa; 4,000 내지 20,000 kDa; 4,000 내지 17,500 kDa; 4,000 내지 15,000 kDa; 4,000 내지 12,500 kDa; 4,000 내지 10,000 kDa; 4,000 내지 7,500 kDa; 4,000 내지 6,000 kDa; 또는 4,000 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 5,000 내지 20,000 kDa; 5,000 내지 17,500 kDa; 5,000 내지 15,000 kDa; 5,000 내지 10,000 kDa 또는 5,000 내지 7,500 kDa의 분자량을 갖는다.

[0425] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다.

[0426] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.3, 0.5, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6, 3.0, 3.4, 3.8, 4.2, 4.6 또는 5 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 1.8, 2.2 또는 2.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 또는 3.0 mM의 아세테이트 및 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 약 5 mM 미만의 아세테이트를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 또는 3.0 mM의 아세테이트 및 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 약 3.4 mM 미만의 아세테이트를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2, 2.6 또는 3.0 mM의 아세테이트를 포함한다.

약 3.0 mM의 아세테이트 및 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 약 3.3 mM 미만의 아세테이트를 포함한다. 상기 수 중 임의의 수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.

- [0427] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 단리된 폴리사카라이드 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다. 바람직한 실시태양에서, O-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정된다.
- [0428] 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9 또는 0.95이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM 대 상기 활성화된 폴리사카라이드 중의 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 아세테이트의 mM의 비는 적어도 0.9이다. 바람직한 실시태양에서, O-아세틸기의 존재는 이온-HPLC 분석에 의해 측정된다.
- [0429] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1.0 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.2, 0.3 또는 0.4 mM의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 또는 0.9 mM의 글리세롤 및 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 약 1.0 mM 미만의 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 또는 0.7 mM의 글리세롤 및 혈청형 11A 폴리사카라이드 1 mM당 약 0.8 mM 미만의 글리세롤을 포함한다. 상기 수 중 임의의 수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0430] 본 발명의 혈청형 11A 당접합체를 특성화하는 또 다른 방식은 일련의 접합된 리신으로서 특성화될 수 있는 상기 사카라이드에 접합하게 되는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇) 중의 리신 잔기의 수(접합도)에 의한다.
- [0431] 상기 폴리사카라이드의 공유 결합으로 인한 상기 담체 단백질의 리신 변형에 대한 증거를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 아미노산 분석에 의해 획득할 수 있다. 접합은 접합체 물질을 생성시키는데 사용되는 CRM₁₉₇ 단백질 출발 물질에 비해 회수되는 리신 잔기의 수를 감소시킨다.
- [0432] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체의 접합도는 1 내지 15, 1 내지 13, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체의 접합도는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14 또는 약 15이다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체의 접합도는 1 내지 6 또는 2 내지 5이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0433] 본 발명의 혈청형 11A 당접합체를 또한 사카라이드 대 담체 단백질의 비(중량/중량)에 의해 특성화할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질의 비(w/w)는 0.2 내지 4(예를 들어, 약 0.2, 약 0.3, 약 0.4, 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, 약 3.1, 약 3.2, 약 3.3, 약 3.4, 약 3.5, 약 3.6, 약 3.7, 약 3.8, 약 3.9 또는 약 4.0)이다. 다른 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.7 내지 2.5, 0.8 내지 2.0, 0.7 내지 2.0, 0.8 내지 1.5, 0.7 내지 1.5, 0.7 내지 1.4, 0.8 내지 1.4, 0.7 내지 1.45 또는 0.8 내지 1.45이다. 추가의 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.8 내지 1.6(예를 들어, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5 또는 약 1.6)이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 11A 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다.

- [0434] 본 발명의 혈청형 11A 당접합체 및 면역원성 조성물은, 상기 담체 단백질에 공유적으로 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 상기 당접합체 조성물 중에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 상기 유리 사카라이드는 상기 당접합체와 비공유적으로 회합될 수 있다(즉 상기 당접합체에 비공유적으로 결합되거나, 흡착되거나 상기 당접합체 중에 또는 상기 당접합체에 의해 포획될 수 있다).
- [0435] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체는 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드의 총량에 대해 약 50% 미만의 유리 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드, 약 45% 미만의 유리 사카라이드, 약 40% 미만의 유리 사카라이드, 약 35% 미만의 유리 사카라이드, 약 30% 미만의 유리 사카라이드, 약 25% 미만의 유리 사카라이드, 약 20% 미만의 유리 사카라이드, 약 15% 미만의 유리 사카라이드, 약 10% 미만의 유리 사카라이드, 또는 약 5% 미만의 유리 혈청형 11A 캡슐 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직하게, 혈청형 11A 당접합체는 15% 미만의 유리 사카라이드, 보다 바람직하게는 10% 미만의 유리 사카라이드, 및 더욱 더 바람직하게는 5% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다.
- [0436] 상기 혈청형 11A 당접합체를 또한 그의 분자 크기 분포(K_d)에 의해 특성화할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 상기 언급한 바와 같이 상기 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 측정할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체의 적어도 30%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 11A 당접합체의 적어도 65%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.
- [0437] **1.3.8 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터의 당접합체**
- [0438] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체를, 폴리사카라이드를 1-시아노-4-다이메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스터를 형성시킴으로써 수득한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 직접 또는 이격자(링커) 그룹을 통해서 상기 담체 단백질상의 아미노기에 커플링시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 이격자는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS 사용) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세트이미드, SIB, SIAB, 설폰-SIAB, SIA 또는 SBAP 사용)과의 반응 후에 획득되는 티오에테르 결합을 통해 상기 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 제공하는 시스템인 또는 시스템일 수 있다. 바람직하게, 상기 시아네이트 에스터(임의로 CDAP 화학에 의해 제조됨)를 핵산 다이아민 또는 아디프산 다이하이드라이드(ADH)와 커플링시키고 아미노-유도체화된 사카라이드를 상기 단백질 담체상의 카복실기를 통해 카보다이이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 상기 담체 단백질에 접합시킨다. 상기와 같은 접합체는 예를 들어 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 개시되어 있다.
- [0439] 다른 적합한 기법은 카보다이이미드, 하이드라이드, 활성 에스터, 노르보란, p-나이트로벤조산, N-하이드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원공개 WO 98/42721에 개시되어 있다. 접합은 상기 사카라이드의 유리 하이드록실기와 CDI와의 반응(문헌[Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574]; 문헌[Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518]을 참조하시오)에 이어서 단백질과 반응하여 카바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 1차 하이드록실기에 말단인 아노머의 환원, 상기 1차 하이드록실기의 임의의 보호/탈보호, CDI 카바메이트 중간체를 형성시키는 상기 1차 하이드록실기와 CDI와의 반응 및 상기 CDI 카바메이트 중간체와 단백질상의 아미노기와의 커플링을 수반할 수 있다.
- [0440] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다. 환원적 아민화는 2개 단계, (1) 개별적인 헥사사카라이드 단위 중의 이웃자리 다이올들로부터 알데하이드 작용기를 생성시키는 상기 폴리사카라이드의 산화, (2) 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원을 수반한다.
- [0441] 산화 전에 상기 혈청형 8 폴리사카라이드를 임의로 가수분해시켜 그의 점도를 감소시킨다. 기계적 또는 화학적 가수분해가 사용될 수 있다. 화학적 가수분해를 아세트산을 사용하여 수행할 수 있다.
- [0442] 상기 산화 단계는 펄리오테이트와의 반응을 수반할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, "펄리오테이트"란 용어는 펄리오테이트 및 펄리오드산 모두를 포함하며; 상기 용어는 또한 메타펄리오테이트(IO_4^-) 및 오쏘펄리오테이트

트(IO_6^{5-}) 및 퍼요오데이트의 다양한 염들(예를 들어, 나트륨 퍼요오데이트 및 칼륨 퍼요오데이트)을 모두 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 8로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 메타 퍼요오데이트의 존재하에서, 바람직하게는 나트륨 퍼요오데이트(NaIO_4)의 존재하에서 산화시킨다. 또 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 8로부터의 캡슐 폴리사카라이드를 오소퍼요오데이트의 존재하에서, 바람직하게는 퍼요오드산의 존재하에서 산화시킨다.

- [0443] 상기 폴리사카라이드의 산화 단계에 이어서, 상기 폴리사카라이드는 활성화된다고 하며, 본 발명의 하기에서 "활성화된 폴리사카라이드"라 칭한다. 상기 활성화된 폴리사카라이드를 정제하고 동결건조(냉동-건조)시킬 수 있다.
- [0444] 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 독립적으로(별도의 동결건조) 또는 함께(공-동결건조) 동결건조(냉동-건조)시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 공-동결건조시킨다. 또 다른 실시태양에서, 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 독립적으로 동결건조시킨다.
- [0445] 하나의 실시태양에서, 상기 동결건조는 비-환원당의 존재하에서 발생하며, 가능한 비-환원당은 슈크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트를 포함한다.
- [0446] 상기 접합 과정의 두 번째 단계는 환원제를 사용하는, 접합체를 형성시키는 상기 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원(소위 환원적 아민화)이다. 적합한 환원제는 시아노보로하이드라이드, 예를 들어 나트륨 시아노보로하이드라이드, 보란-피리딘, 또는 보로하이드라이드 교환 수지를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 시아노보로하이드라이드이다.
- [0447] 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 수성 용매 중에서 수행하며, 또 다른 실시태양에서, 상기 반응을 비양성자성 용매 중에서 수행한다. 하나의 실시태양에서, 상기 환원 반응을 DMSO(다이메틸설폭사이드) 중에서 또는 DMF(다이메틸폼아미드) 용매 중에서 수행한다. 상기 DMSO 또는 DMF 용매를 사용하여 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 재조성할 수 있다.
- [0448] 하나의 실시태양에서, 0.1 내지 3.0, 0.15 내지 2.0, 0.2 내지 1.0, 또는 0.25 내지 0.5 몰 당량의 나트륨 시아노보로하이드라이드를 상기 환원 반응에 사용한다. 하나의 실시태양에서, 약 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.9 또는 3.0 몰 당량의 나트륨 시아노보로하이드라이드를 상기 환원 반응에 사용한다.
- [0449] 하나의 실시태양에서, 상기 환원제는 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드이다. 추가의 실시태양에서, 1.0 내지 6.0 몰 당량, 2.0 내지 5.0 몰 당량 또는 약 3.0 몰 당량의 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드를 상기 환원 반응에 사용한다.
- [0450] 상기 환원 반응의 끝에서, 상기 접합체 중에 반응하지 않은 알데하이드기가 남아있을 수도 있으며, 이들을 적합한 캡핑제를 사용하여 캡핑시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 캡핑제는 나트륨 보로하이드라이드(NaBH_4)이다. 하나의 실시태양에서, 캡핑을, 상기 환원 반응물을 0.5 내지 5.0 몰 당량의 NaBH_4 , 예를 들어 약 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 또는 3.0 몰 당량의 NaBH_4 와 혼합함으로써 성취한다.
- [0451] 상기 접합(환원 반응 및 임의로 캡핑)에 이어서, 상기 당접합체를 정제시킬 수 있다. 상기 당접합체를 투석여과 및/또는 이온 교환 크로마토그래피 및/또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 당접합체를 투석여과 또는 이온 교환 크로마토그래피 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제시킬 수 있다.
- [0452] 하나의 실시태양에서, 상기 당접합체를 멸균 여과한다.
- [0453] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체를 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇)에 접합시키며 상기 당접합체는 10 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는 사카라이드를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 2,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 상기와 같은 실시태양에서, 상기 사카라이드는 50 내지 1,750 kDa; 50 내지 1,500 kDa; 50 내지 1,250 kDa; 50 내지 1,000 kDa; 50 내지 750 kDa; 50 내지 500 kDa; 100 내지 2,000 kDa; 100 내지 1,750 kDa; 100 내지 1,500 kDa; 100 내지 1,250 kDa; 100 내지 1,000 kDa; 100 내지 750 kDa; 100 내지 500 kDa; 200 내지 2,000 kDa; 200 내지 1,750 kDa; 200 내지 1,500 kDa;

200 내지 1,250 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 200 내지 750 kDa; 또는 200 내지 500 kDa; 또는 200 내지 400 kDa의 분자량을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다.

[0454] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체는 50 내지 20,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체는 50 내지 15,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체는 500 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체는 200 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다. 더욱 다른 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체는 1,000 내지 8,000 kDa 또는 2,000 내지 8,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0455] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체는 200 내지 20,000 kDa; 200 내지 15,000 kDa; 200 내지 10,000 kDa; 200 내지 7,500 kDa; 200 내지 5,000 kDa; 200 내지 3,000 kDa; 200 내지 1,000 kDa; 500 내지 20,000 kDa; 500 내지 15,000 kDa; 500 내지 12,500 kDa; 500 내지 10,000 kDa; 500 내지 7,500 kDa; 500 내지 6,000 kDa; 500 내지 5,000 kDa; 500 내지 4,000 kDa; 500 내지 3,000 kDa; 500 내지 2,000 kDa; 500 내지 1,500 kDa; 500 내지 1,000 kDa; 750 내지 20,000 kDa; 750 내지 15,000 kDa; 750 내지 12,500 kDa; 750 내지 10,000 kDa; 750 내지 7,500 kDa; 750 내지 6,000 kDa; 750 내지 5,000 kDa; 750 내지 4,000 kDa; 750 내지 3,000 kDa; 750 내지 2,000 kDa; 750 내지 1,500 kDa; 1,000 내지 15,000 kDa; 1,000 내지 12,500 kDa; 1,000 내지 10,000 kDa; 1,000 내지 7,500 kDa; 1,000 내지 6,000 kDa; 1,000 내지 5,000 kDa; 1,000 내지 4,000 kDa; 1,000 내지 2,500 kDa; 2,000 내지 15,000 kDa; 2,000 내지 12,500 kDa; 2,000 내지 10,000 kDa; 2,000 내지 7,500 kDa; 2,000 내지 6,000 kDa; 2,000 내지 5,000 kDa; 2,000 내지 4,000 kDa; 또는 2,000 내지 3,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0456] 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체는 3,000 내지 20,000 kDa; 3,000 내지 15,000 kDa; 3,000 내지 10,000 kDa; 3,000 내지 7,500 kDa; 3,000 내지 5,000 kDa; 4,000 내지 20,000 kDa; 4,000 내지 15,000 kDa; 4,000 내지 12,500 kDa; 4,000 내지 10,000 kDa; 4,000 내지 7,500 kDa; 4,000 내지 6,000 kDa; 또는 4,000 내지 5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체는 5,000 내지 20,000 kDa; 5,000 내지 15,000 kDa; 5,000 내지 10,000 kDa 또는 5,000 내지 7,500 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체는 6,000 내지 20,000 kDa; 6,000 내지 15,000 kDa; 6,000 내지 10,000 kDa 또는 6,000 내지 7,500 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체는 7,000 내지 20,000 kDa; 7,000 내지 15,000 kDa; 7,000 내지 10,000 kDa 또는 7,000 내지 8,000 kDa의 분자량을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 당접합체 8은 8,000 내지 20,000 kDa; 8,000 내지 15,000 kDa; 또는 8,000 내지 10,000 kDa의 분자량을 갖는다.

[0457] 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체를 환원적 아민화를 사용하여 제조한다.

[0458] 본 발명의 혈청형 8 당접합체를 특성화하는 또 다른 방식은 일련의 접합된 리신으로서 특성화될 수 있는 상기 사카라이드에 접합하게 되는 담체 단백질(예를 들어, CRM₁₉₇) 중의 리신 잔기의 수(접합도)에 의한다.

[0459] 상기 폴리사카라이드의 공유 결합으로 인한 상기 담체 단백질의 리신 변형에 대한 증거를 당해 분야의 숙련자들에게 공지된 통상적인 방법을 사용하여 아미노산 분석에 의해 획득할 수 있다. 빈번한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 상기 담체 단백질상의 리신 잔기의 하나 이상의 ε-아미노기에의 아미드 결합을 통해 활성화된 폴리사카라이드에 공유적으로 접합된다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 상기 사카라이드에 공유적으로 접합된 2 내지 20개의 리신 잔기를 포함한다. 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 상기 사카라이드에 공유적으로 접합된 4 내지 16 또는 6 내지 14개의 리신 잔기를 포함한다.

[0460] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 접합도는 2 내지 20, 4 내지 16, 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15 또는 10 내지 12이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 접합도는 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 또는 약 15이다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 접합도는 4 내지 16 또는 6 내지 14이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.

[0461] 바람직한 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 39개의 리신 잔기를 함유하는 CRM₁₉₇을 포함한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 CRM₁₉₇은 상기 사카라이드에 공유 결합된 39개 중 4 내지 16 또는 6 내지 14개의 리신 잔

기를 포함할 수 있다. 상기 매개변수를 나타내는 또 다른 방식은 CRM₁₉₇ 리신의 약 10% 내지 약 41% 또는 약 15% 내지 약 36%가 상기 사카라이드에 공유 결합된다는 것이다. 또 다른 상기와 같은 실시태양에서, 상기 CRM₁₉₇은 상기 사카라이드에 공유 결합된 39개 중 2 내지 20개의 리신 잔기를 포함할 수 있다. 상기 매개변수를 나타내는 또 다른 방식은 CRM₁₉₇ 리신의 약 5% 내지 약 50%가 상기 사카라이드에 공유 결합된다는 것이다. 일부 실시태양에서, 상기 CRM₁₉₇은 상기 사카라이드에 공유 결합된 39개 중 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 리신 잔기를 포함할 수 있다.

[0462] 본 발명의 혈청형 8 당접합체를 또한 사카라이드 대 담체 단백질의 비(중량/중량)에 의해 특성화할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.2 내지 4.0(예를 들어, 약 0.2, 약 0.3, 약 0.4, 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, 약 3.0, 약 3.1, 약 3.2, 약 3.3, 약 3.4, 약 3.5, 약 3.6, 약 3.7, 약 3.8, 약 3.9 또는 약 4.0)이다. 다른 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질 비(w/w)는 0.7 내지 2.5이다. 추가의 실시태양에서, 상기 사카라이드 대 담체 단백질의 비(w/w)는 0.8 내지 1.5(예를 들어, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4 또는 약 1.5)이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 하나의 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체는 환원적 아민화를 사용하여 제조된다.

[0463] 본 발명의 혈청형 8 당접합체 및 면역원성 조성물은, 상기 담체 단백질에 공유적으로 접합되지 않지만 그럼에도 불구하고 상기 당접합체 조성물 중에 존재하는 유리 사카라이드를 함유할 수 있다. 상기 유리 사카라이드는 상기 당접합체와 비공유적으로 회합될 수 있다(즉 상기 당접합체에 비공유적으로 결합되거나, 흡착되거나 상기 당접합체 중에 또는 상기 당접합체에 의해 포획될 수 있다).

[0464] 일부 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체는 혈청형 8 사카라이드의 총량에 대해 약 50% 미만의 유리 사카라이드, 약 45% 미만의 유리 사카라이드, 약 40% 미만의 유리 사카라이드, 약 35% 미만의 유리 사카라이드, 약 30% 미만의 유리 사카라이드, 약 25% 미만의 유리 사카라이드, 약 20% 미만의 유리 사카라이드, 약 15% 미만의 유리 사카라이드, 약 10% 미만의 유리 사카라이드, 또는 약 5% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다. 바람직하게, 혈청형 8 당접합체는 15% 미만의 유리 사카라이드, 보다 바람직하게는 10% 미만의 유리 사카라이드, 및 더욱 더 바람직하게는 5% 미만의 유리 사카라이드를 포함한다.

[0465] 상기 혈청형 8 당접합체를 또한 그의 분자 크기 분포(K_d)에 의해 특성화할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 매질(CL-4B)을 사용하여 상기 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 측정할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 중력 공급 컬럼에 사용하여 접합체의 분자 크기 분포를 프로파일링한다. 상기 매질 중의 기공으로부터 배제되는 큰 분자는 작은 분자보다 더 빨리 용리된다. 분별 수집기를 사용하여 상기 컬럼 용출물을 수집한다. 상기 분획들을 사카라이드 분석에 의해 비색측정으로 시험한다. K_d 의 측정을 위해서, 컬럼을 눈금화하여 분자가 완전히 배제되는 분획(V_0), ($K_d = 0$), 및 최대 유지를 나타내는 분획(V_i), ($K_d = 1$)을 설정한다. 명시된 샘플 특성이 도달된 분획(V_e)을 식 $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$ 에 의해 K_d 와 관련시킨다.

[0466] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 적어도 40%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 혈청형 8 당접합체의 적어도 70%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

[0467] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 40% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 50% 내지 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 혈청형 8 당접합체의 65% 내지 80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d 를 갖는다.

[0468] 1.4 본 발명의 당접합체의 조합

[0469] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 본 발명에 개시된 당접합체들 중 어느 하나를 포함한다.

- [0470] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체), 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.2의 당접합체), 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.3의 당접합체), 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.5의 당접합체), 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.6의 당접합체), 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.7의 당접합체), 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.8의 당접합체)로 이루어진 군으로부터 선택된 군으로부터 선택된 하나 이상의 당접합체를 포함한다.
- [0471] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.4의 당접합체를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.2에 개시된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.3에 개시된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.5에 개시된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.6에 개시된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.7에 개시된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.8에 개시된 것들을 포함한다.
- [0472] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 2개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 포함한다: 15B 및 22F, 15B 및 33F, 15B 및 12F, 15B 및 10A, 15B 및 11A, 15B 및 8, 22F 및 33F, 22F 및 12F, 22F 및 10A, 22F 및 11A, 22F 및 8, 33F 및 12F, 33F 및 10A, 33F 및 11A, 33F 및 8, 12F 및 10A, 12F 및 11A, 12F 및 8, 10A 및 11A, 10A 및 8, 및 11A 및 8.
- [0473] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하기 3개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 포함한다:
- [0474] 15B 및 22F 및 33F,
- [0475] 15B 및 22F 및 12F,
- [0476] 15B 및 22F 및 10A,
- [0477] 15B 및 22F 및 11A,
- [0478] 15B 및 22F 및 8,
- [0479] 15B 및 33F 및 12F,
- [0480] 15B 및 33F 및 10A,
- [0481] 15B 및 33F 및 11A,
- [0482] 15B 및 33F 및 8,
- [0483] 15B 및 12F 및 10A,
- [0484] 15B 및 12F 및 11A,
- [0485] 15B 및 12F 및 8,
- [0486] 15B 및 10A 및 11A,
- [0487] 15B 및 10A 및 8,
- [0488] 15B 및 11A 및 8,
- [0489] 22F 및 33F 및 12F,

- ul style="list-style-type: none; padding-left: 0;">
- [0490] 22F 및 33F 및 10A,
- [0491] 22F 및 33F 및 11A,
- [0492] 22F 및 33F 및 8,
- [0493] 22F 및 12F 및 10A,
- [0494] 22F 및 12F 및 11A,
- [0495] 22F 및 12F 및 8,
- [0496] 22F 및 10A 및 11A,
- [0497] 22F 및 10A 및 8,
- [0498] 22F 및 11A 및 8,
- [0499] 33F 및 12F 및 10A,
- [0500] 33F 및 12F 및 11A,
- [0501] 33F 및 12F 및 8,
- [0502] 33F 및 10A 및 11A,
- [0503] 33F 및 10A 및 8,
- [0504] 33F 및 11A 및 8,
- [0505] 12F 및 10A 및 11A,
- [0506] 12F 및 10A 및 8,
- [0507] 12F 및 11A 및 8, 또는
- [0508] 10A 및 11A 및 8.
- [0509] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하기 4개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 포함한다:
- [0510] 15B 및 22F 및 33F 및 12F,
- [0511] 15B 및 22F 및 33F 및 10A,
- [0512] 15B 및 22F 및 33F 및 11A,
- [0513] 15B 및 22F 및 33F 및 8,
- [0514] 15B 및 22F 및 12F 및 10A,
- [0515] 15B 및 22F 및 12F 및 11A,
- [0516] 15B 및 22F 및 12F 및 8,
- [0517] 15B 및 22F 및 10A 및 11A,
- [0518] 15B 및 22F 및 10A 및 8,
- [0519] 15B 및 22F 및 11A 및 8,
- [0520] 15B 및 33F 및 12F 및 10A,
- [0521] 15B 및 33F 및 12F 및 11A,
- [0522] 15B 및 33F 및 12F 및 8,
- [0523] 15B 및 33F 및 10A 및 11A,
- [0524] 15B 및 33F 및 10A 및 8,

- [0525] 15B 및 33F 및 11A 및 8,
- [0526] 15B 및 12F 및 10A 및 11A,
- [0527] 15B 및 12F 및 10A 및 8,
- [0528] 15B 및 12F 및 11A 및 8,
- [0529] 15B 및 10A 및 11A 및 8,
- [0530] 22F 및 33F 및 12F 및 10A,
- [0531] 22F 및 33F 및 12F 및 11A,
- [0532] 22F 및 33F 및 12F 및 8,
- [0533] 22F 및 33F 및 10A 및 11A,
- [0534] 22F 및 33F 및 10A 및 8,
- [0535] 22F 및 33F 및 11A 및 8,
- [0536] 22F 및 12F 및 10A 및 11A,
- [0537] 22F 및 12F 및 10A 및 8,
- [0538] 22F 및 12F 및 11A 및 8,
- [0539] 22F 및 10A 및 11A 및 8,
- [0540] 33F 및 12F 및 10A 및 11A,
- [0541] 33F 및 12F 및 10A 및 8,
- [0542] 33F 및 12F 및 11A 및 8,
- [0543] 33F 및 10A 및 11A 및 8, 또는
- [0544] 12F 및 10A 및 11A 및 8.
- [0545] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하기 5개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 포함한다:
- [0546] 15B 및 22F 및 33F 및 12F 및 10A,
- [0547] 15B 및 22F 및 33F 및 12F 및 11A,
- [0548] 15B 및 22F 및 33F 및 12F 및 8,
- [0549] 15B 및 22F 및 33F 및 10A 및 11A,
- [0550] 15B 및 22F 및 33F 및 10A 및 8,
- [0551] 15B 및 22F 및 33F 및 11A 및 8,
- [0552] 15B 및 22F 및 12F 및 10A 및 11A,
- [0553] 15B 및 22F 및 12F 및 10A 및 8,
- [0554] 15B 및 22F 및 12F 및 11A 및 8,
- [0555] 15B 및 22F 및 10A 및 11A 및 8,
- [0556] 15B 및 33F 및 12F 및 10A 및 11A,
- [0557] 15B 및 33F 및 12F 및 10A 및 8,
- [0558] 15B 및 33F 및 12F 및 11A 및 8,
- [0559] 15B 및 33F 및 10A 및 11A 및 8,

- [0560] 15B 및 12F 및 10A 및 11A 및 8,
- [0561] 22F 및 33F 및 12F 및 10A 및 11A,
- [0562] 22F 및 33F 및 12F 및 10A 및 8,
- [0563] 22F 및 33F 및 12F 및 11A 및 8,
- [0564] 22F 및 33F 및 10A 및 11A 및 8,
- [0565] 22F 및 12F 및 10A 및 11A 및 8, 또는
- [0566] 33F 및 12F 및 10A 및 11A 및 8.
- [0567] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하기 6개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 포함한다:
- [0568] 15B 및 22F 및 33F 및 12F 및 10A 및 11A,
- [0569] 15B 및 22F 및 33F 및 12F 및 10A 및 8,
- [0570] 15B 및 22F 및 33F 및 12F 및 11A 및 8,
- [0571] 15B 및 22F 및 33F 및 10A 및 11A 및 8,
- [0572] 15B 및 22F 및 12F 및 10A 및 11A 및 8,
- [0573] 15B 및 33F 및 12F 및 10A 및 11A 및 8, 또는
- [0574] 22F 및 33F 및 12F 및 10A 및 11A 및 8.
- [0575] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하기 7개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 포함한다: 15B 및 22F 및 33F 및 12F 및 10A 및 11A 및 8.
- [0576] 하나의 실시태양에서, 본 섹션에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B, 22F, 33F, 12F, 10A, 11A 및/또는 8로부터의 당접합체는 상기 섹션 1.3.2 내지 1.3.8에 개시된 바와 같다.
- [0577] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.1의 당접합체)를 추가로 포함한다.
- [0578] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 5 및 7F로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.1의 당접합체)를 추가로 포함한다.
- [0579] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6A 및 19A로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.1의 당접합체)를 추가로 포함한다.
- [0580] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.1의 당접합체)를 추가로 포함한다.
- [0581] 바람직하게, 상기 면역원성 조성물의 당접합체들은 모두 담체 단백질에 개별적으로 접합된다.
- [0582] 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에

서, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 5 및 7F로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 6A 및 19A로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 당접합체를 CRM₁₉₇에 접합시킨다.

- [0583] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 당접합체는 모두 CRM₁₉₇에 개별적으로 접합된다.
- [0584] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및/또는 23F로부터의 당접합체는 PD에 개별적으로 접합된다.
- [0585] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 당접합체는 TT에 접합된다.
- [0586] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 19F로부터의 당접합체는 DT에 접합된다.
- [0587] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및/또는 23F로부터의 당접합체는 PD에 개별적으로 접합되고, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 당접합체는 TT에 접합되고, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 19F로부터의 당접합체는 DT에 접합된다.
- [0588] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트랩토코커스 뉴모니아에의 8 내지 20개의 상이한 혈청형을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 상이한 혈청형으로부터의 당접합체를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 16 또는 20개의 상이한 혈청형으로부터의 당접합체를 포함한다.
- [0589] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20-가 페렘구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 14, 15, 16, 17, 18 또는 19-가 페렘구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 16-가 페렘구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 19-가 페렘구균 접합체 조성물이다.
- [0590] 1. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.4의 당접합체를 포함한다.
- [0591] 2. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번 외에, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.2에 개시된 것들을 포함한다.
- [0592] 3. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번 또는 2번 외에, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.3에 개시된 것들을 포함한다.
- [0593] 4. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번 또는 3번 외에, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.5에 개시된 것들을 포함한다.
- [0594] 5. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번, 3번 또는 4번 외에, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.6에 개시된 것들을 포함한다.
- [0595] 6. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번, 3번, 4번 또는 5번 외에, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.7에 개시된 것들을 포함한다.
- [0596] 7. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번, 3번, 4번, 5번 또는 6번 외에, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 8로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.8에 개시된 것들을 포함한다.
- [0597] 8. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번, 3번, 4번, 5번, 6번 또는 7번 외에, 스트랩토코커스 뉴모니아에 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.1에 개시된 것들을 포함한다.

- [0598] 9. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번, 3번, 4번, 5번, 6번, 7번 또는 8번 외에, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 5 및 7F로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.1에 개시된 것들을 포함한다.
- [0599] 10. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번, 3번, 4번, 5번, 6번, 7번, 8번 또는 9번 외에, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6A 및 19A로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.1에 개시된 것들을 포함한다.
- [0600] 11. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 상기 1번, 2번, 3번, 4번, 5번, 6번, 7번, 8번, 9번 또는 10번 외에, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 하나 이상의 당접합체, 예를 들어 상기 섹션 1.3.1에 개시된 것들을 포함한다.
- [0601] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체를 포함한다.
- [0602] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체를 포함한다.
- [0603] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 사카라이드를 포함한다.
- [0604] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 혈청형 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 사카라이드를 포함한다.
- [0605] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물의 당접합체는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체로 이루어진다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물의 당접합체는 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체로 이루어진다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물의 당접합체는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체로 이루어진다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물의 당접합체는 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체로 이루어진다.
- [0606] 바람직하게, 본 발명의(예를 들어, 상기 1번 내지 11번 중 어느 하나의) 면역원성 조성물의 당접합체는 모두 당체 단백질에 개별적으로 접합된다.
- [0607] 하나의 실시태양에서, 상기 8번 내지 11번 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및/또는 23F로부터의 당접합체는 PD에 개별적으로 접합된다.
- [0608] 하나의 실시태양에서, 상기 8번 내지 11번 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 당접합체는 TT에 접합된다.
- [0609] 하나의 실시태양에서, 상기 8번 내지 11번 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 19F로부터의 당접합체는 DT에 접합된다.
- [0610] 상기 8번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및/또는 23F로부터의 당접합체는 PD에 개별적으로 접합되고, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 당접합체는 TT에 접합되고, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 19F로부터의 당접합체는 DT에 접합된다.
- [0611] 상기 1번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 2번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 33F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 3번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 4번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 12F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 5번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 6번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 7번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형

8로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 8번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 9번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 5 및 7F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 10번 내지 11번 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6A 및 19A로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 11번의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다.

[0612] 하나의 실시태양에서, 상기 1번 내지 11번의 면역원성 조성물의 당접합체는 CRM₁₉₇에 개별적으로 접합된다.

[0613] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에의 12 내지 20개의 상이한 혈청형을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 상이한 혈청형으로부터의 당접합체를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 16 또는 20개의 상이한 혈청형으로부터의 당접합체를 포함한다.

[0614] 하나의 실시태양에서, 상기 1번 내지 11번의 면역원성 조성물은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 1번 내지 11번의 면역원성 조성물은 15, 16, 17, 18 또는 19-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 1번 내지 11번의 면역원성 조성물은 16-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 1번 내지 11번의 면역원성 조성물은 19-가 페렴구균 접합체 조성물이다.

[0615] 상기 캡슐 폴리사카라이드의 상기 담체 단백질에의 접합 후에, 상기 당접합체를 다양한 기법들에 의해 정제시킨다(폴리사카라이드-단백질 접합체의 양에 관하여 농축시킨다). 이들 기법은 농축/투석여과 공정, 침전/용리, 컬럼 크로마토그래피, 및 심층 여과(예를 들어, 미국특허 출원공개 2007/0184072 또는 WO 2008/079653을 참조하십시오)를 포함한다. 상기 개별적인 당접합체를 정제한 후에, 이들을 배합하여 본 발명의 면역원성 조성물을 제형화한다.

[0616] 1.5 본 발명의 당접합체의 추가적인 조합

[0617] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9V로부터의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.

[0618] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 9V 및 4, 9V 및 6B, 9V 및 14, 9V 및 18C, 9V 및 19F, 9V 및 23F로 이루어진 군으로부터 선택된 2개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.

[0619] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 9V, 4, 6B, 14, 18C, 19F 및 23F의 7개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.

[0620] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 하기 8개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다:

[0621] 9V 및 1 및 4 및 6B 및 14 및 18C 및 19F 및 23F,

[0622] 9V 및 4 및 5 및 6B 및 14 및 18C 및 19F 및 23F, 또는

[0623] 9V 및 4 및 6B 및 7F 및 14 및 18C 및 19F 및 23F.

[0624] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 하기 10개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다: 9V, 1, 5, 4, 6B, 7F, 14, 18C, 19F 및 23F.

[0625] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 하기 11개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다:

[0626] 9V 및 1 및 4 및 5 및 6A 및 6B 및 7F 및 14 및 18C 및 19F 및 23F, 또는

[0627] 9V 및 1 및 4 및 5 및 6B 및 7F 및 14 및 18C 및 19A 및 19F 및 23F.

[0628] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 하기 12개의 스트렙토코커스 뉴

모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다: 9V, 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F.

- [0629] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 하기 13개의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 각각의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다: 9V, 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F.
- [0630] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 2로부터의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0631] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 17F로부터의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0632] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 20으로부터의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0633] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C로부터의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0634] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9N으로부터의 하나 이상의 당접합체를 추가로 포함한다.
- [0635] 바람직하게는 상기 면역원성 조성물의 당접합체들은 모두 담체 단백질에 개별적으로 접합된다.
- [0636] 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9V로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 4, 6B, 14, 18C, 19F 및 23F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 5 및 7F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6A 및 19A로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 3으로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 2로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 17F로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 20으로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다. 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9N으로부터의 당접합체는 CRM₁₉₇에 접합된다.
- [0637] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 당접합체는 모두 CRM₁₉₇에 개별적으로 접합된다.
- [0638] 또 다른 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9V로부터의 당접합체는 PD에 개별적으로 접합된다.
- [0639] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및/또는 23F로부터의 당접합체는 PD에 개별적으로 접합된다.
- [0640] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 당접합체는 TT에 접합된다.
- [0641] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 19F로부터의 당접합체는 DT에 접합된다.
- [0642] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물 중 어느 하나의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및/또는 23F로부터의 당접합체는 PD에 개별적으로 접합되고, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 18C로부터의 당접합체는 TT에 접합되고, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 19F로부터의 당접합체는 DT에 접합된다.

- [0643] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니아에의 7 내지 25개의 상이한 혈청형을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 상이한 혈청형으로부터의 당접합체를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 16 또는 20개의 상이한 혈청형으로부터의 당접합체를 포함한다.
- [0644] 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 14, 15, 16, 17, 18 또는 19-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 16-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 19-가 페렴구균 접합체 조성물이다. 하나의 실시태양에서, 상기 면역원성 조성물은 20-가 페렴구균 접합체 조성물이다.
- [0645] 상기 캡슐 폴리사카라이드의 상기 담체 단백질에의 접합 후에, 상기 당접합체를 다양한 기법들에 의해 정제시킨다(폴리사카라이드-단백질 접합체의 양에 관하여 농축시킨다). 이들 기법은 농축/투석여과 공정, 침전/용리, 컬럼 크로마토그래피, 및 심층 여과(예를 들어, 미국특허 출원공개 2007/0184072 또는 WO 2008/079653을 참조하십시오)를 포함한다. 상기 개별적인 당접합체를 정제한 후에, 이들을 배합하여 본 발명의 면역원성 조성물을 제형화한다.
- [0646] **1.6 본 발명의 당접합체의 특정한 조합**
- [0647] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4 또는 1.5에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9N으로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0648] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4 또는 1.5에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9A로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0649] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4 또는 1.5에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9L로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0650] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4 또는 1.5에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9N 및 9A로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0651] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4 또는 1.5에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9N 및 9L로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0652] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4 또는 1.5에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9A 및 9L로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0653] 하나의 실시태양에서, 상기 섹션 1.4 또는 1.5에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9N, 9A 및 9L로부터의 캡슐 사카라이드를 포함하지 않는다.
- [0654] **2. 면역원성 조성물의 투여량**
- [0655] 각 용량 중의 당접합체(들)의 양을 전형적인 백신 중에서 현저한 부작용 없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로서 선택한다. 상기와 같은 양은, 특이적인 면역원이 사용되고 어떻게 제공되는가에 따라 변할 것이다.
- [0656] **2.1 당접합체 양**
- [0657] 면역원성 조성물 중의 특정한 당접합체의 양은 상기 접합체에 대한(접합된 및 접합되지 않은) 전체 폴리사카라이드를 기준으로 계산될 수 있다. 예를 들어, 20% 유리 폴리사카라이드를 갖는 당접합체는 100 μg 폴리사카라이드 용량 중에 약 80 μg 의 접합된 폴리사카라이드 및 약 20 μg 의 접합되지 않은 폴리사카라이드를 가질 것이다. 상기 당접합체의 양은 상기 페렴구균 혈청형에 따라 변할 수 있다. 상기 사카라이드 농도는 우론산 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0658] 상기 면역원성 조성물 중의 상이한 폴리사카라이드 성분의 "면역원성 양"은 다양할 수 있으며 각각 약 1 μg , 약 2 μg , 약 3 μg , 약 4 μg , 약 5 μg , 약 6 μg , 약 7 μg , 약 8 μg , 약 9 μg , 약 10 μg , 약 15 μg , 약 20 μg , 약 30 μg , 약 40 μg , 약 50 μg , 약 60 μg , 약 70 μg , 약 80 μg , 약 90 μg , 또는 약 100 μg 의 임의의 특정한 폴리사카라이드 항원을 포함할 수 있다.
- [0659] 일반적으로, 각각의 용량은 주어진 혈청형에 대해 0.1 μg 내지 100 μg , 보다 특히 0.5 μg 내지 20 μg , 보다 특히 1.0 μg 내지 10 μg , 및 훨씬 더 특히 2.0 μg 내지 5.0 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다. 상기 범위 중

임의의 범위내의 모든 정수는 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.

- [0660] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 각각의 특정한 당접합체에 대해서 약 1.0 μg , 약 1.2 μg , 약 1.4 μg , 약 1.6 μg , 약 1.8 μg , 약 2.0 μg , 약 2.2 μg , 약 2.4 μg , 약 2.6 μg , 약 2.8 μg , 약 3.0 μg , 약 3.2 μg , 약 3.4 μg , 약 3.6 μg , 약 3.8 μg , 약 4.0 μg , 약 4.2 μg , 약 4.4 μg , 약 4.6 μg , 약 4.8 μg , 약 5.0 μg , 약 5.2 μg , 약 5.4 μg , 약 5.6 μg , 약 5.8 μg 또는 약 6.0 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0661] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및/또는 33F로부터의 당접합체에 대해서 약 1.1 μg , 약 1.2 μg , 약 1.3 μg , 약 1.4 μg , 약 1.5 μg , 약 1.6 μg , 약 1.7 μg , 약 1.8 μg , 약 1.9 μg , 약 2.0 μg , 약 2.1 μg , 약 2.2 μg , 약 2.3 μg , 약 2.4 μg , 약 2.5 μg , 약 2.6 μg , 약 2.7 μg , 약 2.8 μg , 약 2.9 μg , 또는 약 3.0 μg μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0662] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및/또는 33F로부터의 당접합체에 대해서 약 1.1 μg , 약 1.2 μg , 약 1.3 μg , 약 1.4 μg , 약 1.5 μg , 약 1.6 μg , 약 1.7 μg , 약 1.8 μg , 약 1.9 μg , 약 2.0 μg , 약 2.1 μg , 약 2.2 μg , 약 2.3 μg , 약 2.4 μg , 약 2.5 μg , 약 2.6 μg , 약 2.7 μg , 약 2.8 μg , 약 2.9 μg , 또는 약 3.0 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0663] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 2.0 μg , 약 2.2 μg , 약 2.4 μg , 약 2.6 μg , 약 2.8 μg , 약 3.0 μg , 약 3.2 μg , 약 3.4 μg , 약 3.6 μg , 약 3.8 μg , 약 4.0 μg , 약 4.2 μg , 약 4.4 μg , 약 4.6 μg , 약 4.8 μg , 약 5.0, 약 5.2 μg , 약 5.4 μg , 약 5.6 μg , 약 5.8 μg 또는 약 6.0 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0664] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 1.5 μg 내지 약 3.0 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 3.0 μg 내지 약 6.0 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0665] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.0 μg 내지 약 2.5 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.0 μg 내지 약 4.8 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0666] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.2 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.4 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0667] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 1.5 μg 내지 약 3.0 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 3 μg 내지 약 6 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0668] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.0 μg 내지 약 2.5 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.0 μg 내지 약 4.8 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0669] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.2 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.4 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0670] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 1.5 μg 내지 약 3.0 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 3.0 μg 내지 약 6.0 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.

- [0671] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.0 μg 내지 약 2.5 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.0 μg 내지 약 4.8 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0672] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.2 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.4 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0673] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 1.5 μg 내지 약 3.0 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 3.0 μg 내지 약 6.0 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0674] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.0 μg 내지 약 2.5 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.0 μg 내지 약 4.8 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0675] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체에 대해서 약 2.2 μg 의 폴리사카라이드 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체에 대해서 약 4.4 μg 의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.
- [0676] **2.2 담체 량**
- [0677] 일반적으로, 각각의 용량은 10 μg 내지 150 μg 의 담체 단백질, 특히 15 μg 내지 100 μg 의 담체 단백질, 보다 특히 25 μg 내지 75 μg 의 담체 단백질, 및 훨씬 더 특히 40 μg 내지 60 μg 의 담체 단백질을 포함할 것이다. 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0678] 하나의 실시태양에서, 각각의 용량은 약 25 μg , 약 26 μg , 약 27 μg , 약 28 μg , 약 29 μg , 약 30 μg , 약 31 μg , 약 32 μg , 약 33 μg , 약 34 μg , 약 35 μg , 약 36 μg , 약 37 μg , 약 38 μg , 약 39 μg , 약 40 μg , 약 41 μg , 약 42 μg , 약 43 μg , 약 44 μg , 약 45 μg , 약 46 μg , 약 47 μg , 약 48 μg , 약 49 μg , 약 50 μg , 약 51 μg , 약 52 μg , 약 53 μg , 약 54 μg , 약 55 μg , 약 56 μg , 약 57 μg , 약 58 μg , 약 59 μg , 약 60 μg , 약 61 μg , 약 62 μg , 약 63 μg , 약 64 μg , 약 65 μg , 약 66 μg , 약 67 μg , 약 68 μg , 약 69 μg , 약 70 μg , 약 71 μg , 약 72 μg , 약 73 μg , 약 74 μg 또는 약 75 μg 의 담체 단백질을 포함할 것이다. 하나의 실시태양에서, 상기 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다.
- [0679] **3 추가의 항원들**
- [0680] 본 발명의 면역원성 조성물은 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 사카라이드 항원(당접합체)을 포함한다. 상기 조성물은 또한 다른 병원체들, 특히 세균 및/또는 바이러스로부터의 항원을 추가로 포함할 수 있다. 바람직한 추가의 항원은 디프테리아 변성독소(D), 파상풍 변성독소(T), 백일해 항원(P)(전형적으로는 무세포성(Pa)이다), B형 간염 바이러스(HBV) 표면 항원(HBsAg), A형 간염 바이러스(HAV) 항원, 접합된 하에모필루스 인플루엔자 b형 캡슐 사카라이드(Hib), 불활성화된 폴리오바이러스 백신(IPV)으로부터 선택된다.
- [0681] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 D-T-Pa를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 D-T-Pa-Hib, D-T-Pa-IPV 또는 D-T-Pa-HBsAg를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 D-T-Pa-HBsAg-IPV 또는 D-T-Pa-HBsAg-Hib를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hib를 포함한다.
- [0682] 백일해 항원:
- [0683] 보르데텔라 페르투스(Bordetella pertussis)는 백일해를 일으킨다. 백신 중 백일해 항원은 세포성(완전 세포, 불활성화된 보르데텔라 페르투스 세포의 형태)이거나 무세포성이다. 세포성 백일해 항원의 제조는 충분히 기록되어 있다(예를 들어, 상기 항원을 보르데텔라 페르투스의 I기 배양물의 열 불활성화에 의해 획득할 수 있다). 그러나, 바람직하게는, 본 발명은 무세포성 항원을 사용한다. 무세포성 항원이 사용되는 경우, 하

기의 항원들 중 1, 2 또는 (바람직하게는) 3개를 사용하는 것이 바람직하다: (1) 해독된 백일해 독소(백일해 변성독소, 또는 PT); (2) 섬유성 헤마글루티닌(FHA); (3) 퍼타틴(또한 69 킬로달톤의 외막 단백질로서 공지됨). FHA 및 퍼타틴을 본 발명에 따라 사용하기 전에 폼알데하이드로 처리할 수 있다. PT를 바람직하게는 폼알데하이드 및/또는 글루타르알데하이드에 의한 처리에 의해 해독시킨다. 무세포성 백일해 항원을 바람직하게는 하나 이상의 알루미늄염 항원보강제상에 흡착시킨다. 대안으로서, 상기 항원을 흡착되지 않은 상태로 첨가할 수도 있다. 퍼타틴을 첨가하는 경우 수산화 알루미늄 항원보강제상에 이미 흡착된 것이 바람직하다. PT 및 FHA를 수산화 알루미늄 항원보강제 또는 알루미늄 포스페이트상에 흡착시킬 수도 있다. PT, FHA 및 퍼타틴을 모두 수산화 알루미늄에 흡착시키는 것이 가장 바람직하다.

[0684] 불활성화된 폴리오바이러스 백신:

[0685] 폴리오바이러스는 소아마비를 일으킨다. 경구용 폴리오바이러스 백신의 사용보다는, 본 발명의 바람직한 실시태양은 IPV를 사용한다. 환자에게 투여하기 전에, 폴리오바이러스를 불활성화시켜야 하며, 이는 폼알데하이드에 의한 처리에 의해 성취될 수 있다. 소아마비는 3가지 유형의 폴리오바이러스 중 하나에 의해 유발될 수 있다. 상기 3가지 유형은 유사하며 동일한 증상을 일으키지만, 항원적으로 상이하며 한 가지 유형에 의한 감염이 다른 것들에 의한 감염을 보호하지 않는다. 따라서, 본 발명에서 3개의 폴리오바이러스 항원: 1형 폴리오바이러스(예를 들어, 마호니(Mahoney) 균주), 2형 폴리오바이러스(예를 들어, MEF-1 균주) 및 3형 폴리오바이러스(예를 들어, 소켓(Saukett) 균주)를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 바이러스들을 바람직하게는 개별적으로 증식시키고, 정제하고 불활성화시키며, 이어서 본 발명에 사용하기 전에 합하여 벌크 3가 혼합물을 제공한다.

[0686] 디프테리아 변성독소:

[0687] 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*)는 디프테리아를 일으킨다. 디프테리아 독소를, 주사후 특이적인 항-독소 항체를 유도하는 능력은 유지시키면서 독성이 제거되도록 처리할 수 있다(예를 들어, 포르말린 또는 폼알데하이드를 사용하여). 상기 디프테리아 변성독소를 디프테리아 백신에 사용한다. 바람직한 디프테리아 변성독소는 폼알데하이드 처리에 의해 제조된 것들이다. 상기 디프테리아 변성독소를, 생육 배지에서 코리네박테리움 디프테리아에를 증식시킨 다음 폼알데하이드 처리, 한외여과 및 침전을 수행하여 수득할 수 있다. 이어서 상기 변성독소 물질을 멸균 여과 및/또는 투석을 포함하는 공정에 의해 처리할 수 있다. 상기 디프테리아 변성독소를 바람직하게는 수산화 알루미늄 항원보강제상에 흡착시킨다.

[0688] 파상풍 변성독소:

[0689] 클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*)는 파상풍을 일으킨다. 파상풍 독소를 보호성 변성독소를 제공하도록 처리할 수 있다. 상기 변성독소는 파상풍 백신에 사용된다. 바람직한 파상풍 변성독소는 폼알데하이드 처리에 의해 제조된 것들이다. 상기 파상풍 변성독소를, 생육 배지에서 클로스트리디움 테타니를 증식시킨 다음 폼알데하이드 처리, 한외여과 및 침전을 수행하여 수득할 수 있다. 이어서 상기 물질을 멸균 여과 및/또는 투석을 포함하는 공정에 의해 처리할 수 있다.

[0690] A형 간염 바이러스 항원:

[0691] A형 간염 바이러스(HAV)는 바이러스성 간염을 일으키는 공지된 원인 인자 중 하나이다. 바람직한 HAV 성분은 불활성화된 바이러스를 기본으로 하며, 불활성화는 포르말린 처리에 의해 성취될 수 있다.

[0692] B형 간염 바이러스(HBV)는 바이러스성 간염을 일으키는 공지된 원인 인자 중 하나이다. 캡시드의 주성분은 HBV 표면 항원으로서 공지된 단백질, 또는 보다 통상적으로는 HBsAg(전형적으로 약 24 kDa의 분자량을 갖는 226-아미노산 폴리펩타이드이다)이다. 모든 기존의 B형 간염 백신들은 HBsAg를 함유하며, 상기 항원을 정상적인 백신 접종받는 자에게 투여하는 경우, 상기 항원은 HBV 감염을 보호하는 항-HBsAg 항체의 생산을 자극한다.

[0693] 백신 제조를 위해서, HBsAg는 2가지 방식으로 제조되었다: 만성 B형 간염 보균자의 혈장으로부터의 미립자 형태의 항원의 정제 또는 재조합 DNA 방법(예를 들어, 효모 세포에서 재조합 발현)에 의한 상기 단백질의 발현. 천연 HBsAg(즉 혈장-정제된 산물에서와 같이)와 달리, 효모-발현된 HBsAg는 일반적으로 글리코실화되지 않으며, 이는 본 발명에 사용하기에 가장 바람직한 형태의 HBsAg이다.

[0694] 접합된 하에모필루스 인플루엔자에 b형 항원:

[0695] 하에모필루스 인플루엔자에 b형(Hib)은 세균성 뇌수막염을 일으킨다. Hib 백신은 전형적으로 캡슐 사카라이드 항원을 기본으로 하며, 그의 제조는 충분히 기록되어 있다. 상기 Hib 사카라이드를, 특히 아동에서의 그의 면역원성을 증대시키기 위해서 담체 단백질에 접합시킬 수 있다. 전형적인 담체 단백질은 파상풍 변성독소, 디프

테리아 변성독소, CRM₁₉₇, 하에모필루스 인플루엔자에 단백질 D, 및 혈청군 B 수막염균으로부터의 외막 단백질 복합체이다. 상기 접합체의 사카라이드 부분은 Hib 세균으로부터 제조된 바와 같은 완전길이 폴리리보실리비톨 포스페이트(PRP), 및/또는 완전길이 PRP의 단편을 포함할 수 있다. Hib 접합체를 알루미늄염 항원보강제에 흡착시킬 수도, 흡착시키지 않을 수도 있다.

[0696] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 Y 캡슐 사카라이드(MenY), 및/또는 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 캡슐 사카라이드(MenC)를 추가로 포함한다.

[0697] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 A 캡슐 사카라이드(MenY), 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 W135 캡슐 사카라이드(MenW135), 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 Y 캡슐 사카라이드(MenY), 및/또는 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 캡슐 사카라이드(MenC)를 추가로 포함한다.

[0698] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 W135 캡슐 사카라이드(MenW135), 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 Y 캡슐 사카라이드(MenY) 및/또는 접합된 네이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 캡슐 사카라이드(MenC)를 추가로 포함한다.

[0699] 4 항원보강제

[0700] 일부 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 적어도 1, 2 또는 3개의 항원보강제를 추가로 포함할 수 있다. "항원보강제"란 용어는 항원에 대한 면역반응을 증대시키는 화합물 또는 혼합물을 지칭한다. 항원은 주로 전달 시스템으로서, 주로 면역 조절제로서 작용하거나, 상기 둘 모두의 강한 특징을 가질 수 있다. 적합한 항원보강제는 인간을 포함한 포유동물에 사용하기에 적합한 것들을 포함한다.

[0701] 인간에 사용될 수 있는 공지된 적합한 전달-시스템 유형 항원보강제의 예는 비제한적으로 알루미늄(예를 들어, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 또는 수산화 알루미늄), 칼슘 포스페이트, 리포솜, 수중 유적형 유화액, 예를 들어 MF59(4.3% w/v 스쿠알렌, 0.5% w/v 폴리솔베이트 80(트윈 80), 0.5% w/v 솔비탄 트라이올리레이트(스판(Span) 85)), 유중 수적형 유화액, 예를 들어 몬타나이드(Montanide), 및 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜라이드)(PLG) 미세입자 또는 나노입자를 포함한다.

[0702] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 항원보강제로서 알루미늄(알루미늄)(예를 들어, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 또는 수산화 알루미늄)을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 항원보강제로서 알루미늄 포스페이트 또는 수산화 알루미늄을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 알루미늄 포스페이트 형태의 원소 알루미늄 0.1 mg/ml 내지 1 mg/ml 또는 0.2 mg/ml 내지 0.3 mg/ml을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 알루미늄 포스페이트 형태의 원소 알루미늄 약 0.25 mg/ml을 포함한다. 인간에 사용될 수 있는 공지된 적합한 면역 조절형 항원보강제의 예는 비제한적으로 아퀼라 나무 껍질로부터의 사포닌 추출물(QS21, Quil A), TLR4 작용물질, 예를 들어 MPL(모노포스포릴 리피드 A), 3DMPL(3-O-테아실화된 MPL) 또는 GLA-AQ, LT/CT 돌연변이체, 사이토킨, 예를 들어 다양한 인터류킨(예를 들어, IL-2, IL-12) 또는 GM-CSF 등을 포함한다.

[0703] 인간에 사용될 수 있는 전달 및 면역 조절 특징 모두를 갖는 공지된 적합한 면역 조절형 항원보강제의 예는 비제한적으로 ISCOMS(예를 들어, 문헌[Sjolander et al. (1998) J. Leukocyte Biol. 64:713]; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 00/48630, WO 98/36772, WO 00/41720, WO 2006/134423 및 WO 2007/026190을 참조하시오) 또는 GLA-EM(TLR4 작용물질 및 수중 유적형 유화액의 조합이다)을 포함한다.

[0704] 비제한적으로 동물 실험을 포함한 수의학적 용도를 위해서, 완전 프로인트 항원보강제(CFA), 프로인트 불완전 항원보강제(IFA), 에멀시젠(Emulsigen), N-아세틸-뮤라밀-L-쓰레오닐-D-아이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르뮤라밀-L-알라닐-D-아이소글루타민(CGP 11637, 노르-MDP라 칭함), N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-아이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'-2'-다이팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민(CGP 19835A, MTP-PE라 칭함), 및 RIBI(세균으로부터 추출된 3개의 성분, 2% 스쿠알렌/트윈 80 유화액 중의 모노포스포릴 지질 A, 트레할로스 다이마이콜레이트 및 세포벽 골격(MPL+TDM+CWS)을 함유한다)를 사용할 수 있다.

[0705] 본 발명에 개시된 바와 같은 폐렴구균 백신의 유효성을 증대시키기 위한 추가의 예시적인 항원보강제는 비제한적으로 (1) 수중 유적형 유화액 제형(다른 특이적인 면역자극제, 예를 들어 뮤라밀 펩타이드(하기 참조) 또는 세균 세포벽 성분과 함께 또는 없이), 예를 들어 (a) 마이크론 이하 유화액으로 미세유동화하거나 와동시켜 더 큰 입자크기 유화액을 생성시킨, 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉-차단된 중합체 L121, 및 thr-MDP를

함유하는 SAF, 및 (b) 2% 스쿠알렌, 0.2% 트윈 80, 및 하나 이상의 세균 세포벽 성분, 예를 들어 모노포스포릴 지질 A(MPL), 트레할로스 다이마이콜레이트(TDM) 및 세포벽 골격(CWS), 바람직하게는 MPL + CWS(데톡스(DETOX)(상표))를 함유하는 RIBI(상표) 항원보강제 시스템(RAS)(Ribi 임뮤노캠(Immunochem), 미국 매디슨 카운티 해밀톤 소재); (2) 사포닌 항원보강제, 예를 들어 QS21, 스티물론(STIMULON)(상표)(캠브리지 바이오사이언스(Cambridge Bioscience), 미국 매사추세츠주 우스터 소재), 아비스코(ABISCO)(등록상표)(이스코노바(Isconova), 스웨덴 소재), 또는 아이소코매트릭스(ISCOMATRIX)(등록상표)(커몬웰스 시럼 레보라토리즈(Commonwealth Serum Laboratories), 오스트레일리아 소재)를 사용하거나 이로부터 생성된 입자, 예를 들어 ISCOMs(면역자극 복합체)(상기 ISCOMs는 추가적인 세제가 없을 수도 있다)(예를 들어, WO 00/07621); (3) 완전 프로인트 항원보강제(CFA) 및 불완전 프로인트 항원보강제(IFA); (4)사이토킨, 예를 들어 인터류킨(예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12(예를 들어, WO 99/44636)), 인터페론(예를 들어, 감마 인터페론), 대식세포 콜로니 자극인자(M-CSF), 종양 괴사 인자(TNF) 등; (5) 모노포스포릴 지질 A(MPL) 또는 3-O-데아실화된 MPL(3dMPL)(예를 들어, GB-2220221, EP0689454를 참조하십시오)(임의로, 페렴구균 사카라이드와 함께 사용될 때 알룸의 실질적인 부재하의)(예를 들어, WO 00/56358을 참조하십시오); (6) 3dMPL과 예를 들어 QS21 및/또는 수중 유적형 유화액과의 조합(예를 들어, EP0835318, EP0735898, EP0761231을 참조하십시오); (7) 폴리옥시에틸렌 에테르 또는 폴리옥시에틸렌 에스테르(예를 들어, WO 99/52549를 참조하십시오); (8) 옥톡시놀과 함께 폴리옥시에틸렌 솔비탄 에스테르 계면활성제(예를 들어, WO 01/21207) 또는 적어도 하나의 추가적인 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 옥톡시놀과 함께 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 또는 에스테르 계면활성제(예를 들어, WO 01/21152); (9) 사포닌 및 면역자극성 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, CpG 올리고뉴클레오타이드)(예를 들어, WO 00/62800); (10) 면역자극제 및 금속염의 입자(예를 들어, WO 00/23105를 참조하십시오); (11) 사포닌 및 수중 유적형 유화액(예를 들어, WO 99/11241); (12) 사포닌(예를 들어, QS21) + 3dMPL + IM2(임의로 + 스테롤)(예를 들어, 98/57659); (13) 상기 조성물의 효능을 증대시키는 면역자극제로서 작용하는 다른 물질을 포함한다. 뮤라밀 펩타이드는 N-아세틸-뮤라밀-L-쓰레오닐-D-아이소글루타민(thr-MDP), N-25 아세틸-노르뮤라밀-L-알라닌-D-아이소글루타민(노르-MDP), N-아세틸뮤라밀-L-알라닌-D-아이소글루타르니닐-L-알라닌-2-(1'-2'-다이팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포릴옥시)-에틸아민 MTP-PE) 등을 포함한다.

[0706] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 항원보강제로서 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명에 사용되는 바와 같은 CpG 올리고뉴클레오타이드는 면역자극성 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드(CpG ODN)를 지칭하며, 따라서 상기 용어는 달리 지시되지 않는 한 호환적으로 사용된다. 면역자극성 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드는, 임의로 몇몇 바람직한 염기 환경내에서, 메틸화되지 않은 시토신-구아닌 다이뉴클레오타이드인 하나 이상의 면역자극성 CpG 동기를 함유한다. 상기 CpG 면역자극성 동기의 메틸화 상태는 일반적으로 상기 다이뉴클레오타이드 중의 시토신 잔기를 지칭한다. 적어도 하나의 메틸화되지 않은 CpG 다이뉴클레오타이드를 함유하는 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는, 포스페이트 결합에 의해 3' 구아닌에 결합된 5' 메틸화되지 않은 시토신을 함유하고 톨형 수용체 9(TLR-9)에의 결합을 통해 면역계를 활성화시키는 올리고뉴클레오타이드이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는, TLR9를 통해 면역계를 활성화할 것이지만 상기 CpG 동기(들)가 메틸화되지 않은 경우처럼 강하지는 않은 하나 이상의 메틸화된 CpG 다이뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 차례로 상기 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 하나 이상의 팔린드롬을 포함할 수 있다. CpG 올리고뉴클레오타이드는 다수의 허여된 특허, 공개된 특허 출원 및 다른 간행물들, 예를 들어 미국특허 제 6,194,388 호; 미국특허 제 6,207,646 호; 미국특허 제 6,214,806 호; 미국특허 제 6,218,371 호; 미국특허 제 6,239,116 호; 및 미국특허 제 6,339,068 호에 개시되었다.

[0707] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 WO 2010/125480의 3페이지, 22라인에서부터 12페이지 36라인에 개시된 CpG 올리고뉴클레오타이드 중 어느 하나를 포함한다.

[0708] CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드의 상이한 부류들이 동정되었다. 이들을 A, B, C 및 P 부류라 칭하며, 이들은 WO 2010/125480의 3페이지, 22라인에서부터 12페이지 36라인에 보다 더 상세히 개시되어 있다. 본 발명의 방법은 이들 상이한 부류의 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오타이드의 용도를 포함한다.

[0709] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 A 부류 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 "A 부류" CpG 올리고뉴클레오타이드는 하기의 핵산 서열을 갖는다: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (서열번호 1). A-부류 올리고뉴클레오타이드의 일부 비제한적인 예는 5' G*G*G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G 3' (서열번호 2)를 포함하며; 여기에서 "*"는 포스포로티오에이트 결

합을 지칭하고 "_"는 포스포다이에스터 결합을 지칭한다.

- [0710] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 B 부류 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 사용하기 위한 CpG 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하기 식에 의해 나타내는 B 부류 CpG 올리고뉴클레오타이드이다:
- [0711] 5' $X_1X_2CGX_3X_4$ 3', 여기에서 X_1 , X_2 , X_3 , 및 X_4 는 뉴클레오타이드이다. 하나의 실시태양에서, X_2 는 아데닌, 구아닌, 또는 티민이다. 또 다른 실시태양에서, X_3 은 시토신, 아데닌 또는 티민이다.
- [0712] 본 발명의 B 부류 CpG 올리고뉴클레오타이드 서열은 상기에 광범위하게 개시된 것들뿐만 아니라 WO 96/02555, WO 98/18810 및 미국특허 제 6,194,388 호; 미국특허 제 6,207,646 호; 미국특허 제 6,214,806 호; 미국특허 제 6,218,371 호; 미국특허 제 6,239,116 호 및 미국특허 제 6,339,068 호에 개시된 것들이다. 예시적인 서열은 비제한적으로 이들 후자의 출원들 및 특허들에 개시된 것들을 포함한다.
- [0713] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 "B 부류" CpG 올리고뉴클레오타이드는 하기의 핵산 서열을 갖는다:
- [0714] 5' TCGTCGTTTTTCGGTGTCTTT 3' (서열번호 3), 또는
- [0715] 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (서열번호 4), 또는
- [0716] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (서열번호 5), 또는
- [0717] 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (서열번호 6), 또는
- [0718] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (서열번호 7).
- [0719] 이들 서열 중 임의의 서열에서, 결합들은 모두 포스포로티오에이트 결합일 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 이들 서열 중 임의의 서열에서, 상기 결합들 중 하나 이상은, 바람직하게는 반-연성 CpG 올리고뉴클레오타이드를 만드는 상기 CpG 동기의 "C"와 "G" 사이의 포스포다이에스터일 수 있다. 이들 서열 중 임의의 서열에서, 에틸-유리딘 또는 할로젠이 상기 5' T를 치환할 수 있으며; 할로젠 치환의 예는 비제한적으로 브로모-유리딘 또는 요오도-유리딘 치환을 포함한다.
- [0720] B-부류 올리고뉴클레오타이드의 일부 비제한적인 예는 하기를 포함한다:
- [0721] 5' T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}TTT^{*}T^{*}C^{*}G^{*}G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}TTT^{*}T 3' (서열번호 8), 또는
- [0722] 5' T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}TTT^{*}T^{*}C^{*}G^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}TTT^{*}T 3' (서열번호 9), 또는
- [0723] 5' T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}TTT^{*}T^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}TTT^{*}T^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}TT 3' (서열번호 10), 또는
- [0724] 5' T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}TTT^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}TTT^{*}T^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}TT 3' (서열번호 11), 또는
- [0725] 5' T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}TTT^{*}T^{*}T^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}TTT^{*}TTT^{*}TT^{*}C^{*}G^{*}A 3' (서열번호 12).
- [0726] 상기에서, "^{*}"는 포스포로티오에이트 결합을 지칭한다.
- [0727] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 C 부류 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 "C 부류" CpG 올리고뉴클레오타이드는 하기의 핵산 서열을 갖는다:
- [0728] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGGCCG 3' (서열번호 13), 또는
- [0729] 5' TCGTCGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (서열번호 14), 또는
- [0730] 5' TCGGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (서열번호 15), 또는
- [0731] 5' TCGGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (서열번호 16), 또는
- [0732] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCGGCCG 3' (서열번호 17), 또는
- [0733] 5' TCGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (서열번호 18), 또는
- [0734] 5' TCGACGTTTCGGCGCGGCCG 3' (서열번호 19), 또는

- [0735] 5' TCGCGTCGTTTCGGCGCCG 3' (서열번호 20), 또는
- [0736] 5' TCGCGACGTTTCGGCGCGCCG 3' (서열번호 21), 또는
- [0737] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG 3' (서열번호 22), 또는
- [0738] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCG 3' (서열번호 23), 또는
- [0739] 5' TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG 3' (서열번호 24), 또는
- [0740] 5' TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCGT 3' (서열번호 25).
- [0741] 이들 서열 중 임의의 서열에서, 결합들은 모두 포스포로티오에이트 결합일 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 이들 서열 중 임의의 서열에서, 상기 결합들 중 하나 이상은, 바람직하게는 반-연성 CpG 올리고뉴클레오타이드를 만드는 상기 CpG 동기의 "C"와 "G" 사이의 포스포다이에스터일 수 있다.
- [0742] C-부류 올리고뉴클레오타이드의 일부 비제한적인 예는 하기를 포함한다:
- [0743] 5' T^{*}C₋G^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 26), 또는
- [0744] 5' T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}A^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 27), 또는
- [0745] 5' T^{*}C₋G^{*}A^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 28), 또는
- [0746] 5' T^{*}C₋G^{*}A^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 29), 또는
- [0747] 5' T^{*}C₋G^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 30), 또는
- [0748] 5' T^{*}C₋G^{*}A^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 31), 또는
- [0749] 5' T^{*}C₋G^{*}A^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 32), 또는
- [0750] 5' T^{*}C₋G^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 33), 또는
- [0751] 5' T^{*}C₋G^{*}C₋G^{*}A^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 34), 또는
- [0752] 5' T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 35), 또는
- [0753] 5' T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 36), 또는
- [0754] 5' T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C₋G^{*} 3' (서열번호 37), 또는
- [0755] 5' T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*}T^{*} 3' (서열번호 38)
- [0756] 상기에서, "^{*}"는 포스포로티오에이트 결합을 지칭하고 "-"는 포스포다이에스터 결합을 지칭한다.
- [0757] 이들 서열 중 임의의 서열에서, 에틸-유리딘 또는 할로젠은 5'T를 치환할 수 있으며; 할로젠 치환의 예는 비제한적으로 브로모-유리딘 또는 요오도-유리딘 치환을 포함한다.
- [0758] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 번역원성 조성물은 P 부류 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 사용하기 위한 CpG 올리고뉴클레오타이드는 5' TLR 활성화 도메인 및 적어도 2개의 팔린드롬 영역을 함유하는 P 부류 CpG이며, 이때 하나의 팔린드롬 영역은 적어도 6 뉴클레오타이드 길이의 5' 팔린드롬 영역이고 적어도 8 뉴클레오타이드 길이의 3' 팔린드롬 영역에 직접 또는 이격자를 통해 연결되며, 여기에서 상기 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 YpR 다이뉴클레오타이드를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 T^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}A^{*}C₋G^{*}T^{*}C₋G^{*}G^{*}C₋G^{*}C^{*}C₋G^{*} (서열번호 27)가 아니다. 하나의 실시태양에서, 상기 P 부류 CpG 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 메틸화되지 않은 CpG 다이뉴클레오타이드를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 TLR 활성화 도메인은 TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT, 또는 TTTT이다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 TLR 활성화 도메인

은 5' 팔린드롬 영역 내에 있다. 또 다른 실시태양에서, 상기 TLR 활성화 도메인은 상기 5' 팔린드롬 영역에 바로 5'이다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 "P 부류" CpG 올리고뉴클레오타이드는 하기의 핵산 서열을 갖는다: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGCCG 3' (서열번호 39).

[0759] 상기 서열에서, 결합들은 모두 포스포로티오에이트 결합일 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 상기 결합들 중 하나 이상은, 바람직하게는 반-연성 CpG 올리고뉴클레오타이드를 만드는 상기 CpG 동기의 "C"와 "G" 사이의 포스포다이에스터일 수 있다. 이들 서열 중 임의의 서열에서, 에틸-유리딘 또는 할로젠은 5'T를 치환할 수 있으며; 할로젠 치환의 예는 비제한적으로 브로모-유리딘 또는 요오도-유리딘 치환을 포함한다.

[0760] P-부류 올리고뉴클레오타이드의 비제한적인 예는 하기를 포함한다:

[0761] 5' T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}AC^{*}G^{*}AT^{*}C^{*}G^{*}G^{*}CG^{*}CG^{*}CC^{*}G 3' (서열번호 40)

[0762] 상기에서, "*"는 포스포로티오에이트 결합을 지칭하고 "-"는 포스포다이에스터 결합을 지칭한다.

[0763] 하나의 실시태양에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 올리고뉴클레오타이드의 모든 뉴클레오타이드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 포스포다이에스터-유사 결합을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 포스포다이에스터-유사 결합은 포스포다이에스터 결합이다. 또 다른 실시태양에서, 친치성기가 상기 올리고뉴클레오타이드에 접합된다. 하나의 실시태양에서, 상기 친치성기는 콜레스테롤이다.

[0764] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 CpG 올리고뉴클레오타이드의 모든 뉴클레오타이드간 결합은 포스포다이에스터 결합(WO 2007/026190에 개시된 바와 같은 "연성" 올리고뉴클레오타이드)이다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오타이드는 분해에 내성이 되게 한다(예를 들어, 안정화된다). "안정화된 올리고뉴클레오타이드"는 생체내 분해(예를 들어, 엑소- 또는 엔도-뉴클레아제를 통한)에 비교적 내성인 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 핵산 안정화를 주쇄 변형을 통해 수행할 수 있다. 포스포로티오에이트 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 최대 활성을 제공하며 세포내 엑소- 및 엔도-뉴클레아제에 의한 분해로부터 상기 올리고뉴클레오타이드를 보호한다.

[0765] 상기 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 키메릭 주쇄를 가질 수 있으며, 상기 주쇄는 포스포다이에스터 및 포스포로티오에이트 결합의 조합을 갖는다. 본 발명의 목적을 위해서, 키메릭 주쇄는 부분적으로 안정화된 주쇄를 지칭하며, 여기에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드간 결합은 포스포다이에스터 또는 포스포다이에스터-유사 결합이고, 여기에서 적어도 하나의 다른 뉴클레오타이드간 결합은 안정화된 뉴클레오타이드간 결합이며, 여기에서 상기 적어도 하나의 포스포다이에스터 또는 포스포다이에스터-유사 결합 및 적어도 하나의 안정화된 결합은 상이하다. 상기 포스포다이에스터 결합이 상기 CpG 동기내에 우선적으로 배치되는 경우, 상기과 같은 분자를 WO 2007/026190에 개시된 바와 같이 "반-연성"이라 칭한다.

[0766] 다른 변형된 올리고뉴클레오타이드는 포스포다이에스터, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트, 포스포로다이에티오에이트, 및/또는 p-에폭시 결합의 조합을 포함한다.

[0767] 혼합된 주쇄 변형된 ODN을 WO 2007/026190에 개시된 바와 같이 합성할 수 있다. 상기 CpG 올리고뉴클레오타이드의 크기(즉 상기 올리고뉴클레오타이드의 길이를 따라 있는 뉴클레오타이드 잔기의 수)가 또한 상기 올리고뉴클레오타이드의 자극 활성에 기여할 수 있다. 세포내로의 흡수를 촉진하기 위해서, 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 6 뉴클레오타이드 잔기의 최소 길이를 갖는다. 6 뉴클레오타이드 초과인 임의의 크기(심지어 수 kb 길이)의 올리고뉴클레오타이드는, 보다 큰 올리고뉴클레오타이드는 세포 내부에서 분해되기 때문에, 충분한 면역자극성 동기가 존재하는 한 면역 반응을 유도할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 CpG 올리고뉴클레오타이드는 6 내지 100 뉴클레오타이드 길이, 우선적으로는 8 내지 30 뉴클레오타이드 길이이다. 중요한 실시태양에서, 본 발명의 핵산 및 올리고뉴클레오타이드는 플라스미드 또는 발현 벡터가 아니다.

[0768] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 CpG 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 WO 2007/026190의 134 내지 147 단락에 개시된 바와 같이 염기 및/또는 당에 치환 또는 변형을 포함한다.

[0769] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오타이드를 화학적으로 변형시킨다. 화학적 변형의 예는 숙련자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Uhlmann et al. (1990) Chem. Rev. 90:543]; 문헌[S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, USA 1993]; 문헌[Crooke et al. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-

129]; 및 문헌[Hunziker et al. (1995) Mod. Synth. Methods 7:331-417]에 개시되어 있다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형을 가질 수 있으며, 여기에서 각각의 변형은 특정한 포스포다이에스터 뉴클레오사이드간 가교 및/또는 특정한 β -D-리보스 단위 및/또는 천연 DNA 또는 RNA로 구성된 동일한 서열의 올리고뉴클레오타이드에 비해 특정한 천연 뉴클레오사이드 염기 위치에 위치한다.

[0770] 본 발명의 일부 실시태양에서, CpG-함유 핵산을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법에 따라 면역원성 담체와 간단히 혼합할 수도 있다(예를 들어, WO 03/024480을 참조하시오).

[0771] 본 발명의 특정한 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 중 임의의 조성물은 2 μ g 내지 100 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 0.1 mg 내지 50 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 0.2 mg 내지 10 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 0.3 mg 내지 5 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 0.3 mg 내지 5 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드, 훨씬 바람직하게는 0.5 내지 2 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드, 훨씬 바람직하게는 0.75 내지 1.5 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 중 임의의 조성물은 약 1 mg의 CpG 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0772] 5 제형

[0773] 본 발명의 면역원성 조성물을 액체 형태(즉 용액 또는 현탁액)로 또는 동결건조된 형태로 제형화할 수 있다. 액체 제형을 유리하게는 그의 패키징된 형태로 직접 투여할 수 있으며 따라서 상기 제형은 본 발명의 동결건조된 조성물에 대해 요구되는 바와 같은 수성 매질 중에서의 재조성의 필요 없이 주사에 이상적이다.

[0774] 본 발명의 면역원성 조성물의 제형화를 당해 분야에서 인정된 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 개별적인 페럼구균 집합체를 생리학적으로 허용 가능한 비히클로 제형화하여 상기 조성물을 제조할 수 있다. 상기기와 같은 비히클의 예는 비제한적으로 물, 완충된 염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 텍스트로스 용액을 포함한다.

[0775] 본 명세는 본 발명에 개시된 당접합체들의 조합 중 어느 하나 및 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체 또는 희석제를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.

[0776] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 액체 형태, 바람직하게는 수성 액체 형태이다.

[0777] 본 명세의 면역원성 조성물은 완충제, 염, 2가 양이온, 비-이온성 세제, 저온보호물질, 예를 들어 당, 및 산화방지제, 예를 들어 유리 라디칼 제거제 및 킬레이트제, 및 이들 중 임의의 다수의 조합 중 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0778] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 완충제를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 완충제는 약 3.5 내지 약 7.5의 pKa를 갖는다. 일부 실시태양에서, 상기 완충제는 포스페이트, 숙시네이트, 히스티딘 또는 시트레이트이다. 몇몇 실시태양에서, 상기 완충제는 1 mM 내지 10 mM의 최종 농도의 숙시네이트이다. 하나의 특정한 실시태양에서, 상기 숙시네이트의 최종 농도는 약 5 mM이다.

[0779] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 염을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 염은 염화 마그네슘, 염화 칼륨, 염화 나트륨 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 특정한 실시태양에서, 상기 염은 염화 나트륨이다. 하나의 특정한 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 150 mM의 염화 나트륨을 포함한다.

[0780] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 계면활성제를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 20(트윈(상표) 20), 폴리솔베이트 40(트윈(상표) 40), 폴리솔베이트 60(트윈(상표) 60), 폴리솔베이트 65(트윈(상표) 65), 폴리솔베이트 80(트윈(상표) 80), 폴리솔베이트 85(트윈(상표) 85), 트리톤(TRITON)(상표) N-101, 트리톤(상표) X-100, 옥톡시놀 40, 노녹시놀-9, 트라이에탄올아민, 트라이에탄올아민 폴리펩타이드 올리에이트, 폴리옥시에틸렌-660 하이드록시스테아레이트(PEG-15, 솔루톨(Solutol) H 15), 폴리옥시에틸렌-35-리시놀리에이트(크레모포어(CREMOPHOR)(등록상표) EL), 대두 레시틴 및 폴록사머로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 특정한 실시태양에서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 80이다. 일부 상기 실시태양에서, 제형 중 폴리솔베이트 80의 최종 농도는 적어도 0.0001% 내지 10% 폴리솔베이트 80 중량/중량(w/w)이다. 일부 상기 실시태양에서, 제형 중 폴리솔베이트 80의 최종 농도는 적어도 0.001% 내지 1% 폴리솔베이트 80 중량/중량(w/w)이다. 일부 상기 실시태양에서, 제형 중 폴리솔베이트 80의 최종 농도는 적어도 0.01% 내지 1% 폴리솔베이트 80 중량/중량(w/w)이다. 일부 상기 실시태양에서, 제형 중 폴리솔베이트 80의 최종 농도는 0.01%,

0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09% 또는 0.1% 폴리솔베이트 80(w/w)이다. 또 다른 실시태양에서, 제형 중 폴리솔베이트 80의 최종 농도는 1% 폴리솔베이트 80(w/w)이다.

[0781] 몇몇 실시태양에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 5.5 내지 7.5의 pH, 보다 바람직하게는 5.6 내지 7.0의 pH, 훨씬 더 바람직하게는 5.8 내지 6.0의 pH를 갖는다.

[0782] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 중 어느 하나로 충전된 용기를 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 용기는 바이알, 주사기, 플라스크, 발효기, 생물반응기, 주머니, 단지, 앰플, 카트리지 및 일회용 펜으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 실시태양에서, 상기 용기는 실리콘 처리된다.

[0783] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 용기는 유리, 금속(예를 들어, 강철, 스테인레스 강, 알루미늄 등), 및/또는 중합체(예를 들어, 열가소성 물질, 탄성중합체, 열가소성-탄성중합체)로 제조된다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 용기는 유리로 제조된다.

[0784] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 본 발명에 개시된 면역원성 조성물 중 어느 하나로 충전된 주사기를 제공한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 주사기는 실리콘 처리되고/되거나 유리로 제조된다.

[0785] 본 발명의 면역원성 조성물의 전형적인 주사용 용량은 0.1 ml 내지 2 ml, 보다 바람직하게는 0.2 ml 내지 1 ml의 부피, 훨씬 더 바람직하게는 약 0.5 ml의 부피를 갖는다.

[0786] 따라서, 상기 정의된 바와 같은 용기 또는 주사기는 0.1 ml 내지 2 ml, 보다 바람직하게는 0.2 ml 내지 1 ml의 부피, 훨씬 더 바람직하게는 약 0.5 ml 부피의 본 발명에 정의된 면역원성 조성물 중 어느 하나로 충전된다.

[0787] 6 본 발명의 면역원성 조성물의 용도

[0788] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 약제로서 사용하기 위한 것이다.

[0789] 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 대상에서 세균 감염, 질병 또는 상태의 예방, 치료 또는 개선을 위해 다양한 치료학적 또는 예방학적 방법으로 사용할 수 있다. 특히, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 감염, 질병 또는 상태의 예방, 치료 또는 개선을 위해 사용할 수 있다.

[0790] 따라서, 하나의 태양에서, 본 발명은 대상에게 면역학적 유효량의 본 발명의 면역원성 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 감염, 질병 또는 상태를 예방하거나 치료하거나 개선하는 방법을 제공한다.

[0791] 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 감염, 질병 또는 상태는 폐렴, 부비동염, 중이염, 급성 중이염, 뇌수막염, 세균혈증, 패혈증, 농흉, 결막염, 골수염, 패혈성 관절염, 심내막염, 복막염, 심낭염, 유양돌기염, 봉와직염, 연조직 감염 및 뇌농양으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0792] 하나의 실시태양에서, 본 발명은 대상에게 면역학적 유효량의 본 발명의 면역원성 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 대한 면역반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0793] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 백신으로서 사용하기 위한 것이다. 상기와 같은 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 감염을 예방하기 위해 사용할 수 있다. 따라서, 하나의 태양에서, 본 발명은 대상에게 면역학적 유효량의 본 발명의 면역원성 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 의한 감염을 예방하는 방법을 제공한다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 감염은 폐렴, 부비동염, 중이염, 급성 중이염, 뇌수막염, 세균혈증, 패혈증, 농흉, 결막염, 골수염, 패혈성 관절염, 심내막염, 복막염, 심낭염, 유양돌기염, 봉와직염, 연조직 감염 및 뇌농양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 태양에서, 상기 백신화되는 대상은 포유동물, 예를 들어 인간, 고양이, 양, 돼지, 말, 소 또는 개이다.

[0794] 하나의 태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에와 관련된 감염, 질병 또는 상태의 예방, 치료 또는 개선 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 감염, 질병 또는 상태는 폐렴, 부비동염, 중이염, 급성 중이염, 뇌수막염, 세균혈증, 패혈증, 농흉, 결막염, 골수염, 패혈성 관절염, 심내막염, 복막염, 심낭염, 유양돌기염, 봉와직염, 연조직 감염 및 뇌농양으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0795] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 백신으로서 사용하기 위한 것이다. 상기와 같은 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 감염을 예방하기 위해

사용할 수 있다. 따라서, 하나의 태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 의한 감염의 예방 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 상기와 같은 실시태양에서, 상기 감염은 폐렴, 부비동염, 중이염, 급성 중이염, 뇌수막염, 세균혈증, 패혈증, 농흉, 결막염, 골수염, 패혈성 관절염, 심내막염, 복막염, 심낭염, 유양돌기염, 봉와직염, 연조직 감염 및 뇌농양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 태양에서, 상기 백신화되는 대상은 포유동물, 예를 들어 인간, 고양이, 양, 돼지, 말, 소 또는 개이다.

[0796] 본 발명의 면역원성 조성물을, 전신 또는 점막 경로를 통해 상기 면역원성 조성물을 투여함으로써 폐렴구균 감염에 민감한 인간을 보호하거나 치료하는데 사용할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로에 의해 투여한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 주사에 의해 투여한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여한다.

[0797] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 대상에게 투여시 표준 ELISA 분석에 의해 측정되는 바와 같이 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B, 15A 및/또는 15C에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 대상에게 투여시 표준 ELISA 분석에 의해 측정되는 바와 같이 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B, 및/또는 15C에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도할 수 있다.

[0798] 상기 ELISA(효소-결합된 면역흡수 분석) 방법에서, 백신화된 대상의 혈청으로부터의 항체를 고체 지지체에 흡착된 폴리사카라이드와 함께 배양한다. 상기 결합된 항체를 효소-접합된 2차 검출 항체를 사용하여 검출한다.

[0799] 하나의 실시태양에서, 상기 표준 ELISA 분석은 '스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 특이성 IgG의 정량분석을 위한 효소 결합된 면역흡수 분석(Pn PS ELISA)용 혼련 교본'에서 WHO에 의해 정의된 바와 같은 표준화된(WHO) ELISA 분석이다(<http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf>에서 접근할 수 있음; 2014년 3월 31일에 접근됨).

[0800] 상기 ELISA는 인간 혈청 중에 존재하는 유형 특이성 IgG 항-스트렙토코커스 뉴모니아에 캡슐 폴리사카라이드(PS) 항체를 측정한다. 인간 혈청의 희석물을 유형-특이성 캡슐 PS-코팅된 미세적정 플레이트에 가하는 경우, 상기 캡슐 PS에 특이적인 항체가 상기 미세적정 플레이트에 결합한다. 상기 플레이트에 결합된 항체를 염소 항-인간 IgG 알칼리성 포스파타제-표지된 항체에 이어서 p-나이트로페닐 포스페이트 기질을 사용하여 검출한다. 상기 착색된 최종 생성물의 광학 밀도는 상기 혈청 중에 존재하는 항캡슐 PS 항체의 양에 비례한다.

[0801] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 인간에서 ELISA 분석에 의해 측정되는 바와 같이 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 또는 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 폴리사카라이드에 결합할 수 있는 IgG 항체를 유도할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 인간에서 ELISA 분석에 의해 측정되는 바와 같이 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 또는 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C 폴리사카라이드에 결합할 수 있는 IgG 항체를 유도할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 인간에서 ELISA 분석에 의해 측정되는 바와 같이 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 또는 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 및 15C 폴리사카라이드에 결합할 수 있는 IgG 항체를 유도할 수 있다.

[0802] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 대상에게 투여시 본 발명에 개시된 바와 같은 흡수법에 의해 개시된 식작용 분석(예를 들어, 실시예 12의 OPA 분석)에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B를 살해할 수 있는 항체의 형성을 유도할 수 있다.

[0803] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 본 발명에 개시된 바와 같은 OPA 분석(예를 들어, 실시예 12의 OPA 분석)에서 시험시 접합되지 않은 천연 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드에 대해 획득된 OPA 역가보다 더 큰 OPA 역가를 갖는다.

- [0804] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 대상에게 투여시 본 발명에 개시된 바와 같은 옹소닌에 의해 개시된 식작용 분석(예를 들어, 실시예 12의 OPA 분석)에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C를 살해할 수 있는 항체의 형성을 유도할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 본 발명에 개시된 바와 같은 OPA 분석(예를 들어, 실시예 12의 OPA 분석)에서 시험시 접합되지 않은 천연 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드에 대해 획득된 OPA 역가보다 더 큰 OPA 역가를 갖는다.
- [0805] 기능성 항체 및 보체의 존재하에서 식작용 효과기 세포에 의한 스트렙토코커스 뉴모니아에 세포의 살해를 측정하는 페렴구균 옹소닌 개시된 식작용 분석(OPA)은 페렴구균 백신의 유효성을 평가하는데 중요한 내용물인 것으로 간주된다.
- [0806] 옹소닌 개시된 식작용 분석(OPA)을, 스트렙토코커스 뉴모니아에 세포, 시험하려는 열 불활성화된 인간 혈청, 분화된 HL-60 세포(식세포) 및 외인성 보체 공급원(예를 들어, 아기 토끼 보체)의 혼합물을 함께 배양함으로써 수행할 수 있다. 옹소닌 개시된 식작용은 배양 중에 진행되며 항체 및 보체로 코팅된 세균 세포는 옹소닌 개시된 식작용시 살해된다. 옹소닌 개시된 식작용으로부터 탈출한 생존 세균의 콜로니 형성 단위(cfu)를 상기 분석 혼합물을 도말하여 측정한다. 상기 OPA 역가는 시험 혈청 없이 대조용 웰상에서 50%의 세균수 감소를 생성시키는 상호 희석으로서 정의된다. 상기 OPA 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 희석물로부터 보간한다.
- [0807] 1:8 이상의 종점 역가는 상기 살해 유형 OPA에서 양의 결과로 간주된다.
- [0808] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 옹소닌 개시된 식작용 살해 분석(OPA)에 의해 측정되는 바와 같이 대상의 적어도 50%에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B에 대해 적어도 1:8의 역가를 유도할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 옹소닌 개시된 식작용 살해 분석(OPA)에 의해 측정되는 바와 같이 대상의 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 적어도 93%에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B에 대해 적어도 1:8의 역가를 유도할 수 있다.
- [0809] 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 옹소닌 개시된 식작용 살해 분석(OPA)에 의해 측정되는 바와 같이 대상의 적어도 50%에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C에 대해 적어도 1:8의 역가를 유도할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 옹소닌 개시된 식작용 살해 분석(OPA)에 의해 측정되는 바와 같이 대상의 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 적어도 95%에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C에 대해 적어도 1:8의 역가를 유도할 수 있다.
- [0810] 추가의 태양에서, 본 명세는 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C와 관련된 스트렙토코커스 뉴모니아에 감염, 질병 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 치료학적 또는 예방학적 유효량의, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물 중 어느 하나를 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 대상에게 투여시 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B, 15A 및/또는 15C에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도한다. 하나의 실시태양에서, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물은 대상에게 투여시 본 발명에 개시된 바와 같은 옹소닌 개시된 식작용 분석(예를 들어, 실시예 12의 OPA 분석)에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B, 15C 및/또는 15A를 살해할 수 있는 항체의 형성을 유도한다.
- [0811] 본 명세의 하나의 실시태양은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C에 의한 감염에 대해 대상을 보호하는 방법, 또는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C에 의한 감염을 예방하는 방법, 또는 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15C에 의해 야기된 감염과 관련된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 상기 증상의 개시를 감소시키는 방법을 제공하며, 상기 방법들은 대상에게 면역원량의, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물

중 어느 하나를 투여함을 포함한다. 본 명세의 하나의 실시태양은 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)와 관련된 스트렙토코커스 뉴모니아에 감염, 질병 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 대상에게 치료학적 또는 예방학적 유효량의, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물 중 어느 하나를 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시태양은 대상에서 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)와 관련된 스트렙토코커스 뉴모니아에 감염, 질병 또는 상태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물 중 어느 하나로부터의 다클론 또는 단클론 항체 제제를 생성시키고, 상기 항체 제제를 사용하여 상기 대상에게 수동 면역성을 부여함을 포함한다.

[0812] 하나의 실시태양에서, 본 명세는 스트렙토코커스 뉴모니아에 의한 감염에 대해 대상을 보호하고/하거나, 스트렙토코커스 뉴모니아에 의한 감염을 예방하고/하거나, 스트렙토코커스 뉴모니아에 의해 야기된 감염과 관련된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 상기 증상의 개시를 지연시키고/시키거나, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)에 의한 감염에 대해서 대상을 보호하고/하거나 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)에 의한 감염을 예방하고/하거나 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)에 의해 야기된 감염과 관련된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 상기 증상의 개시를 지연시키기 위한 약제의 제조를 위한 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다.

[0813] 하나의 실시태양에서, 본 명세는 스트렙토코커스 뉴모니아에 의한 감염에 대해 대상을 보호하고/하거나, 스트렙토코커스 뉴모니아에 의한 감염을 예방하고/하거나, 스트렙토코커스 뉴모니아에 의해 야기된 감염과 관련된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 상기 증상의 개시를 지연시키고/시키거나, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)에 의한 감염에 대해서 대상을 보호하고/하거나 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)에 의한 감염을 예방하고/하거나 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C(바람직하게는 15B 및/또는 15C, 보다 바람직하게는 15B)에 의해 야기된 감염과 관련된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 상기 증상의 개시를 지연시키기 위한 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B로부터의 하나 이상의 당접합체(예를 들어, 상기 섹션 1.3.4의 당접합체)를 포함하는 본 명세의 면역원성 조성물 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다.

[0814] 7 본 발명의 면역원성 조성물로 치료되는 대상

[0815] 본 발명에 개시되는 바와 같이, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물을 대상에서 세균 감염, 질병 또는 상태를 예방하거나, 치료하거나 개선시키기 위한 다양한 치료학적 또는 예방학적 방법에 사용할 수 있다.

[0816] 바람직한 실시태양에서, 상기 대상은 인간이다. 가장 바람직한 실시태양에서, 상기 대상은 신생아(즉 3개월 이하), 유아(즉 3개월에서부터 1세까지), 또는 토들러(즉 1세에서부터 4세까지)이다.

[0817] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역원성 조성물은 백신으로서 사용하기 위한 것이다.

[0818] 상기과 같은 실시태양에서, 상기 백신화되는 대상은 1세 미만일 수 있다. 예를 들어 상기 백신화되는 대상은 연령이 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11 또는 약 12개월일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 백신화되는 대상은 연령이 약 2, 약 4 또는 약 6개월이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 백신화되는 대상은 2세 미만이다. 예를 들어, 상기 백신화되는 대상은 연령이 약 12개월 내지 약 15개월일 수 있다. 일부의 경우에, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 1회 용량만큼 적게 필요하지만, 일부 상황에서서는 제2, 제3 또는 제4 용량이 제공될 수도 있다(하기 섹션 8을 참조하시오).

[0819] 본 발명의 실시태양에서, 상기 백신화되는 대상은 50세 이상의 성인, 보다 바람직하게는 55세 이상의 성인이다. 하나의 실시태양에서, 상기 백신화되는 대상은 65세 이상, 70세 이상, 75세 이상 또는 80세 이상의 성인이다.

[0820] 하나의 실시태양에서, 상기 백신화되는 대상은 면역저하된 개인, 특히 인간이다. 면역저하된 개인을 일반적으로는, 감염인자에 의한 공격에 대해 정상적인 체액 또는 세포 방어를 개시하는 능력이 약화되거나 감소된 사람으로서 정의한다.

- [0821] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 면역계를 손상시키는 질병 또는 상태를 앓고 있으며 폐렴구균 질병에 대해 보호하거나 상기 질병을 치료하기에 불충분한 항체 반응을 생성시킨다.
- [0822] 하나의 실시태양에서, 상기 질병은 원발성 면역결핍 질환이다. 바람직하게, 상기 원발성 면역결핍 질환은 복합 T- 및 B-세포 면역결핍, 항체 결핍, 잘 정의된 증후군, 면역 조절장애 질병, 식세포 질환, 선천성 면역 결핍, 자가염증성 질환, 및 보체 결핍으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나의 실시태양에서, 상기 원발성 면역결핍 질환은 WO 2010/125480의 24페이지, 11라인 내지 25페이지, 19라인에 개시된 것으로부터 선택된다.
- [0823] 본 발명의 특정한 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 질병을 앓고 있다: HIV-감염, 후천성 면역결핍 증후군(AIDS), 암, 만성 심장 또는 폐 질환, 울혈성 심부전, 당뇨병, 만성 간 질병, 알콜중독, 경변증, 척수액 누출, 심근병증, 만성 기관지염, 기종, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 비장 기능장애(예를 들어, 낫세포 질병), 비장 기능 결손(무비증), 혈액암, 백혈병, 다발성 골수종, 호지킨병, 림프종, 신부전, 신증후군 및 천식.
- [0824] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 영양실조를 앓고 있다.
- [0825] 본 발명의 특정한 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 감염에 대한 신체의 내성을 저하시키는 약물 또는 치료를 받고 있는 중이다. 하나의 실시태양에서, 상기 약물은 WO 2010/125480의 26페이지, 라인33 내지 26페이지, 라인4에 개시된 것으로부터 선택된다.
- [0826] 본 발명의 특정한 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 흡연자이다.
- [0827] 본 발명의 특정한 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 5×10^9 세포/리터 이하, 또는 4×10^9 세포/리터 이하, 또는 3×10^9 세포/리터 이하, 또는 2×10^9 세포/리터 이하, 또는 1×10^9 세포/리터 이하, 또는 0.5×10^9 세포/리터 이하, 또는 0.3×10^9 세포/리터 이하, 또는 0.1×10^9 세포/리터 이하의 백혈구세포 수(백혈구 수)를 갖는다.
- [0828] 백혈구세포 수(백혈구 수): 혈액 중 백혈구세포(WBC)의 수. 상기 WBC는 대개 CBC(완전 혈구수)의 부분으로서 측정된다. 백혈구 세포는 혈액 중 감염-투쟁 세포이며 적혈구로서 공지된 적(산소-운반)혈구 세포와 다르다. 상이한 유형의 백혈구세포, 예를 들어 호중구(다핵핵 백혈구; PMN), 간상핵 세포(약간 미성숙한 호중구), T-형 림프구(T-세포), B-형 림프구(B-세포), 단핵세포, 호산구 및 호염기구가 존재한다. 상기 유형의 백혈구 세포들은 모두 백혈구세포 수에 반영된다. 상기 백혈구세포의 정상 범위는 대개 4,300 내지 10,800 세포/혈액의 입방 밀리미터이다. 이를 또한 백혈구 수라 칭할 수 있으며 4.3 내지 10.8×10^9 /리터로서 국제 단위로 나타낼 수 있다.
- [0829] 본 발명의 특정한 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 호중구감소증을 앓고 있다. 본 발명의 특정한 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 2×10^9 세포/리터 이하, 또는 1×10^9 세포/리터 이하, 또는 0.5×10^9 세포/리터 이하, 또는 0.1×10^9 세포/리터 이하, 또는 0.05×10^9 세포/리터 이하의 호중구 수를 갖는다.
- [0830] 낮은 백혈구세포 수 또는 "호중구 감소증"은 순환하는 혈액 중 비정상적으로 낮은 수준의 호중구를 특징으로 하는 상태이다. 호중구는 감염을 예방하고 감염과 투쟁하는 것을 돕는 특이한 종류의 백혈구세포이다. 암 환자가 호중구 감소증을 겪는 가장 통상적인 이유는 화학요법의 부작용으로서이다. 화학요법-유발된 호중구 감소증은 환자의 감염 위험성을 증가시키고 암 치료를 중단시킨다.
- [0831] 본 발명의 특정한 실시태양에서, 상기 백신화되는 면역저하된 대상은 $500/\text{mm}^3$ 이하의 CD4+ 세포수, 또는 $300/\text{mm}^3$ 이하의 CD4+ 세포수, 또는 $200/\text{mm}^3$ 이하의 CD4+ 세포수, $100/\text{mm}^3$ 이하의 CD4+ 세포수, $75/\text{mm}^3$ 이하의 CD4+ 세포수, 또는 $50/\text{mm}^3$ 이하의 CD4+ 세포수를 갖는다.
- [0832] CD4 세포 시험은 통상적으로 mm^3 의 세포수로서 보고된다. 정상적인 CD4 수는 500 내지 1,600이며, CD8 수는 375 내지 1,100이다. CD4 수는 HIV가 있는 사람들에서 크게 떨어진다.
- [0833] 본 발명의 하나의 실시태양에서, 본 발명에 개시된 면역저하된 대상 중 임의의 대상은 인간 남성 또는 인간 여성이다.
- [0834] **8 섹션**

- [0835] 일부의 경우에, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 1회 용량만큼 적게 필요하지만, 일부 상황, 예를 들어 보다 큰 면역결핍의 상태 하에서는 제2, 제3 또는 제4 용량이 제공될 수도 있다. 초기 백신화에 이어서, 대상은 1회 또는 수회의 추가 면역화를 적합한 간격으로 수령할 수 있다.
- [0836] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 백신화 스케줄은 단일 용량이다. 특정한 실시태양에서, 상기 단일 용량 스케줄은 적어도 2세의 건강한 사람에게 대해서이다.
- [0837] 하나의 실시태양에서, 본 발명에 따른 면역원성 조성물의 백신화 스케줄은 수회 용량 스케줄이다. 특정한 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 약 1개월 내지 약 2개월의 간격으로 떨어진 일련의 2회 용량으로 이루어진다. 특정한 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 약 1개월의 간격으로 떨어진 일련의 2회 용량, 또는 약 2개월의 간격으로 떨어진 일련의 2회 용량으로 이루어진다.
- [0838] 또 다른 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 약 1개월 내지 약 2개월의 간격으로 떨어진 일련의 3회 용량으로 이루어진다. 또 다른 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 약 1개월의 간격으로 떨어진 일련의 3회 용량, 또는 약 2개월의 간격으로 떨어진 일련의 3회 용량으로 이루어진다.
- [0839] 또 다른 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 약 1개월 내지 약 2개월의 간격으로 떨어진 일련의 3회 용량 및 이어서 상기 첫 번째 용량 후 약 10개월 내지 약 13개월째의 네 번째 용량으로 이루어진다. 또 다른 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 약 1개월의 간격으로 떨어진 일련의 3회 용량 및 이어서 상기 첫 번째 용량 후 약 10개월 내지 약 13개월째의 네 번째 용량, 또는 약 2개월의 간격으로 떨어진 일련의 3회 용량 및 이어서 상기 첫 번째 용량 후 약 10개월 내지 약 13개월째의 네 번째 용량으로 이루어진다.
- [0840] 하나의 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 1세에 적어도 1회 용량(예를 들어, 1, 2 또는 3회 용량)에 이어서 적어도 1회의 토들러 용량으로 이루어진다.
- [0841] 하나의 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 2개월령에 출발하여 약 1개월 내지 약 2개월의 간격으로 떨어진 (예를 들어, 용량 사이에 28 내지 56일) 일련의 2회 또는 3회 용량, 및 이어서 12 내지 18개월령에 토들러 용량으로 이루어진다. 하나의 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 2개월령에 출발하여 약 1개월 내지 약 2개월의 간격으로 떨어진(예를 들어, 용량 사이에 28 내지 56일) 일련의 3회 용량, 및 이어서 12 내지 15개월령에 토들러 용량으로 이루어진다. 또 다른 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 2개월령에 출발하여 약 2개월의 간격으로 떨어진 일련의 2회 용량, 및 이어서 12 내지 18개월령에 토들러 용량으로 이루어진다.
- [0842] 하나의 실시태양에서, 상기 수회 용량 스케줄은 2, 4, 6 및 12 내지 15개월령에 일련의 4회 백신 용량으로 이루어진다.
- [0843] 하나의 실시태양에서, 초회 용량은 0일째에 제공되며 1회 이상의 추가 용량이 약 2 내지 약 24주 범위의 간격으로, 바람직하게는 4 내지 8주의 투여 간격으로 제공된다.
- [0844] 하나의 실시태양에서, 초회 용량은 0일째에 제공되고 추가 용량은 약 3개월 후에 제공된다.
- [0845] 본 발명에 사용되는 바와 같이, "약"이란 용어는 서술된 농도 범위, 시간틀, 분자량, 온도 또는 pH와 같은 값의 통계학적으로 의미있는 범위 이내를 의미한다. 상기와 같은 범위는 주어진 값 또는 범위의 한자릿수 내, 전형적으로 20% 이내, 보다 전형적으로 10% 이내, 및 훨씬 더 전형적으로 5% 이내 또는 1% 이내일 수 있다. 때때로, 상기와 같은 범위는 주어진 값 또는 범위의 측정 및/또는 결정에 사용되는 표준 방법에 전형적인 실험 오차 이내일 수 있다. "약"이란 용어에 의해 포함되는 허용 가능한 변동은 연구중인 특정 시스템에 따라 변할 것이며, 당해 분야의 통상적인 숙련가에 의해 쉽게 이해될 수 있다. 본 출원 내에서 하나의 범위를 인용할 때마다, 상기 범위내의 모든 정수도 또한 본 명세의 실시태양으로서 간주된다.
- [0846] 본 발명에서 "포함하는", "포함하다" 및 "포함하여"란 용어들은 발명자들에 의해 모든 경우에 각각 필수적으로 이루어진, "로 필수적으로 이루어진다", "로 필수적으로 이루어져", "로 이루어진", "로 이루어진다" 및 "로 이루어져"란 용어에 의해 임의로 치환가능한 것으로 해석된다.
- [0847] 본 특허 명세서내에 인용된 모든 참고문헌 또는 특허 출원은 본 발명에 참고로 인용된다.
- [0848] 본 발명을 첨부되는 실시예에 의해 예시한다. 하기의 실시예들을, 달리 상세히 개시되는 경우를 제외하고, 당해 분야의 숙련가들에게 주지되고 통상적인 표준 기법을 사용하여 수행한다. 이들 실시예는 예시적이나, 본 발명을 제한하지 않는다.

- [0849] 실시예
- [0850] 실시예 1. eTEC 결합된 당접합체의 제조를 위한 일반적인 과정
- [0851] 사카라이드의 활성화 및 시스타민 다이하이드로클로라이드에 의한 티올화
- [0852] 사카라이드를 무수 다이메틸설폭사이드(DMSO) 중에서 재조성한다. 상기 용액의 수분 함량을 칼 피셔(KF) 분석에 의해 측정하고 0.1% 내지 0.4%, 전형적으로 0.2%의 수분 함량에 도달하도록 조절한다.
- [0853] 상기 활성화를 개시시키기 위해서, 1,1'-카보닐-다이-1,2,4-트리아졸(CDT) 또는 1,1'-카보닐다이이미다졸(CDI)의 용액을 DMSO 중의 100 mg/mL의 농도로 새로 제조한다. 상기 사카라이드를 다양한 양의 CDT/CDI(1 내지 10 몰 당량)로 활성화시키고 상기 반응을 23 ± 2 °C에서 1시간 동안 진행시킨다. 상기 활성화 수준을 HPLC에 의해 측정할 수 있다. 시스타민 다이하이드로클로라이드를 무수 DMSO 중에서 50 mg/mL의 농도로 새로 제조한다. 상기 활성화된 사카라이드를 1 몰 당량(mol.eq)의 시스타민 다이하이드로클로라이드와 반응시킨다. 한편으로, 상기 활성화된 사카라이드를 1 몰 당량의 시스테아민 하이드로클로라이드와 반응시킨다. 상기 티올화 반응을 21 ± 2 시간 동안 23 ± 2 °C에서 진행시켜 티올화된 사카라이드를 생성시킨다. 상기 티올화 수준을 첨가된 CDT/CDI의 양에 의해 측정한다.
- [0854] 상기 활성화 용액 중의 잔류 CDT/CDI를 100 mM 나트륨 테트라보레이트, pH 9.0 용액의 첨가에 의해 급냉시킨다. 첨가된 테트라보레이트의 양을 측정하고 최종 수분 함량을 전체 수용액의 1 내지 2%가 되도록 조절하기 위한 계산을 수행한다.
- [0855] 활성화된 티올화된 사카라이드의 환원 및 정제
- [0856] 상기 티올화된 사카라이드 반응 혼합물을 0.9% 염수, pH 6.0 중의 예냉된 5 mM 나트륨 숙시네이트에의 첨가에 의해 10배 희석하고 5 μ m 필터를 통해 여과한다. 티올화된 사카라이드의 투석여과를 40배 투석 부피의 WFI에 대해 수행한다. 상기 투석잔사에 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP), 1 내지 5 몰 당량의 용액을 10% 부피의 0.1M 나트륨 포스페이트 완충제, pH 6.0에 의한 희석 후에 가한다. 상기 환원 반응을 5 ± 3 °C에서 20 ± 2 시간 동안 진행시킨다. 상기 활성화된 티올화된 사카라이드의 정제를 바람직하게는 예냉된 10 mM 일염기성 나트륨 포스페이트, pH 4.3에 대한 한외여과/투석여과에 의해 수행한다. 한편으로, 상기 티올화된 사카라이드를 표준 크기 배체 크로마토그래피(SEC) 과정 또는 이온 교환 크로마토그래피 방법에 의해 정제한다. 활성화된 티올화된 사카라이드 투석잔사의 분액을 뽑아내어 상기 사카라이드 농도 및 티올 함량(엘만(Elman)) 분석을 측정한다.
- [0857] 활성화된 티올화된 사카라이드의 또 다른 환원 및 정제
- [0858] 상술한 정제 과정에 대한 대안으로서, 활성화된 티올화된 사카라이드를 또한 하기와 같이 정제하였다.
- [0859] 상기 티올화된 사카라이드 반응 혼합물에 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP), 5 내지 10 몰 당량의 용액을 가하고 23 ± 2 °C에서 3 ± 1 시간 동안 진행시켰다. 이어서 반응 혼합물을 0.9% 염수, pH 6.0 중의 예냉된 5 mM 나트륨 숙시네이트에의 첨가에 의해 5배 희석하고 5 μ m 필터를 통해 여과하였다. 티올화된 사카라이드의 투석여과를 40배 투석부피의 예냉된 10 mM 일염기성 나트륨 포스페이트, pH 4.3을 사용하여 수행하였다. 활성화된 티올화된 사카라이드 투석잔사의 분액을 뽑아내어 상기 사카라이드 농도 및 티올 함량(엘만) 분석을 측정한다.
- [0860] 브로모아세틸화된 담체 단백질의 활성화 및 정제
- [0861] 상기 담체 단백질의 유리 아미노기를 브로모아세틸화제, 예를 들어 브로모아세트산 N-하이드록시숙신이미드 에스터(BAANS), 브로모아세틸브로마이드, 또는 또 다른 적합한 시약과의 반응에 의해 브로모아세틸화시킨다.
- [0862] 상기 담체 단백질(0.1M 나트륨 포스페이트 중의, pH 8.0 ± 0.2)을 먼저 활성화 전에, 8 ± 3 °C, 약 pH 7에서 유지시킨다. 상기 단백질 용액에, 모 다이메틸설폭사이드(DMSO) 용액(20 mg/mL)으로서 브로모아세트산(BAANS)의 N-하이드록시숙신이미드 에스터를 0.25 내지 0.5 BAANS:단백질(w/w)의 비로 가한다. 상기 반응물을 5 ± 3 °C에서 30 내지 60분 동안 서서히 혼합한다. 생성되는 브로모아세틸화된(활성화된) 단백질을, 예를 들어 10 mM 포스페이트(pH 7.0) 완충제를 사용하여 10 kDa MWCO 멤브레인을 사용하는 한외여과/투석여과에 의해 정제한다. 정제에 이어서, 상기 브로모아세틸화된 담체 단백질의 단백질 농도를 로우리 단백질 분석에 의해 평가한다.
- [0863] 상기 활성화의 정도를 억제된 전도도 검출과 커플링된 이온-교환 액체 크로마토그래피(이온 크로마토그래피)에 의한 총 브로마이드 분석에 의해 측정한다. 상기 활성화된 브로모아세틸화된 단백질상에 결합된 브로마이드를 상기 분석 샘플 제제 중의 단백질로부터 절단하고 존재할 수 있는 임의의 유리 브로마이드와 함께

정량분석한다. 상기 단백질상의 임의의 남아있는 공유 결합된 브롬을, 상기 샘플을 알칼리성 2-머캅토에탄올 중에서 가열함으로써 이온 브로마이드로의 전환에 의해 유리시킨다.

[0864] 브로모아세틸화된 CRM₁₉₇의 활성화 및 정제

[0865] CRM₁₉₇을 10 mM 포스페이트 완충된 0.9% NaCl pH 7(PBS)로 5 mg/ml로 희석하고 이어서 1M 모액을 사용하여 0.1M NaHCO₃, pH 7.0을 제조하였다. BAANS를 20 mg/ml DMSO의 BAANS 모액을 사용하여 CRM₁₉₇:BAANS 비 1:0.35(w/w)로 가하였다. 반응 혼합물을 30분 내지 1시간 동안 3 °C 내지 11 °C에서 배양하고, 이어서 10K MWCO 멤브레인 및 10 mM 나트륨 포스페이트/0.9% NaCl, pH 7.0을 사용하여 한외여과/투석여과에 의해 정제시켰다. 상기 정제된 활성화된 CRM₁₉₇을 로우리 분석에 의해 분석하여 단백질 농도를 측정하고 이어서 PBS로 5 mg/ml로 희석하였다. 슈크로스를 저온보호물질로서 5% wt/vol로 가하고 활성화된 단백질을 동결시키고 접합에 필요할 때까지 -25 °C에서 보관하였다.

[0866] CRM₁₉₇의 리신 잔기의 브로모아세틸화는 매우 일관되었으며, 이용 가능한 39개 리신으로부터 15 내지 25개 리신을 활성화시켰다. 상기 반응은 고수율의 활성화된 단백질을 생성시켰다.

[0867] 활성화된 티올화된 사카라이드의 브로모아세틸화된 담체 단백질에의 접합

[0868] 접합 반응의 개시 전에, 반응 용기를 5 °C로 예냉시킨다. 브로모아세틸화된 담체 단백질 및 활성화된 티올화된 사카라이드를 후속으로 가하고 150 내지 200 rpm의 교반 속도로 혼합한다. 상기 사카라이드/단백질 투입비는 0.9±0.1이다. 반응 pH를 1M NaOH 용액으로 8.0±0.1로 조절한다. 접합 반응을 5 °C에서 20±2 시간 동안 진행시킨다.

[0869] 잔류 반응성 작용기의 캡핑

[0870] 담체 단백질상의 반응되지 않은 브로모아세틸화된 잔기를, 캡핑 시약으로서 2 몰 당량의 N-아세틸-L-시스테인과 5 °C에서 3시간 동안 반응시켜 급냉시킨다. 잔류 유리 설프하이드릴기를 5 °C에서 20시간 동안 4몰 당량의 요오도아세트아미드(IAA)로 캡핑시킨다.

[0871] eTEC-결합된 당접합체의 정제

[0872] 접합 반응(IAA-캡핑-후) 혼합물을 0.45 μm 필터를 통해 여과한다. 당접합체의 한외여과/투석여과를 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수, pH 6.0에 대해 수행한다. 이어서 당접합체 투석잔사를 0.2 μm 필터를 통해 여과한다. 당접합체의 분액을 분석을 위해 뽑아낸다. 남은 당접합체는 5 °C에서 보관한다.

[0873] 실시예 2. Pn-33F eTEC 접합체의 제조

[0874] 활성화 과정

[0875] Pn33F 폴리사카라이드의 활성화

[0876] Pn-33F 폴리사카라이드를 500 mM의 1,2,4-트리아아졸(WFI 중의)과 배합하여 10 그램의 트리아아졸/폴리사카라이드 그램을 수득하였다. 혼합물을 드라이 아이스-에탄올 욕에서 쉘-동결시키고 이어서 동결건조시켰다. 동결건조된 33F 폴리사카라이드를 무수 다이메틸설폭사이드(DMSO) 중에서 재조성하였다. 동결건조된 33F/DMSO 용액의 수분 함량을 칼 피셔(KF) 분석에 의해 측정하였다. 수분 함량을 0.2%의 수분 함량에 도달하도록 33F/DMSO 용액에 WFI를 가하여 조절하였다.

[0877] 활성화를 개시시키기 위해서, 1,1'-카보닐-다이-1,2,4-트리아아졸(CDT)을 DMSO 용액 중의 100 mg/ml의 농도로 새로 제조하였다. Pn33F 폴리사카라이드를 티올화 단계 전에 다양한 양의 CDT로 활성화시켰다. CDT 활성화를 23±2 °C에서 1시간 동안 수행하였다. 활성화 수준을 HPLC(A220/A205)에 의해 측정하였다. 나트륨 테트라보레이트, 100 mM, pH 9.0 용액을 가하여 활성화 반응 용액 중의 임의의 잔류 CDT를 급냉시켰다. 첨가된 테트라보레이트 양을 측정하고 최종 수분 함량을 전체 수용액의 1.2%가 되게 하는 계산을 수행하였다. 반응을 23±2 °C에서 1시간 동안 진행시켰다.

[0878] 활성화된 Pn-33F 폴리사카라이드의 티올화

[0879] 시스타민-다이하이드로클로라이드를 무수 DMSO 중에서 새로 제조하고 1 몰 당량의 시스타민 다이하이드로클로라이드를 활성화된 폴리사카라이드 반응 용액에 가하였다. 상기 반응을 23±2 °C에서 21±3 시간 동안 진행시켰다. 티올화된 사카라이드 용액을 0.9% 염수, pH 6.0 중의 예냉된 5 mM 나트륨 숙시네이트에 첨가하여 10배 희

석하였다. 희석된 반응 용액을 5 μm 필터를 통해 여과하였다. 티올화된 Pn-33F 폴리사카라이드의 투석여과를, 주사용수(WFI)를 사용하여 100K MWCO 한외여과 멤브레인 카세트에 수행하였다.

[0880] 활성화된 티올화된 Pn-33F 폴리사카라이드의 환원 및 정제

[0881] 투석잔사에 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP), 5 몰 당량의 용액을, 10% 부피의 1M 나트륨 포스페이트 완충제, pH 6.0에 의한 희석 후에 가하였다. 상기 환원 반응을 23 ± 2 °C에서 2 ± 1 시간 동안 진행시켰다. 티올화된 33F 폴리사카라이드의 투석여과를 100K MWCO 한외여과 멤브레인 카세트에 수행하였다. 한외여과를 예냉된 10 mM 나트륨 포스페이트, pH 4.3에 대해 수행하였다. 티올화된 33F 폴리사카라이드 투석잔사를 사카라이드 농도 및 티올(엘만) 분석 모두를 위해서 뽑아내었다.

[0882] 활성화된 티올화된 Pn-33F 폴리사카라이드의 또 다른 환원 및 정제

[0883] 상술한 정제 과정에 대한 대안으로서, 33F 활성화된 티올화된 사카라이드를 또한 하기와 같이 정제하였다.

[0884] 티올화된 사카라이드 반응 혼합물에 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP), 5 몰 당량의 용액을 가하고 23 ± 2 °C에서 3 ± 1 시간 동안 진행시켰다. 이어서 반응 혼합물을 0.9% 염수, pH 6.0 중의 예냉된 5mM 나트륨 숙시네이트에의 첨가에 의해 5배 희석하고 5 μm 필터를 통해 여과하였다. 티올화된 사카라이드의 투석여과를, 100K MWCO 한외여과 멤브레인 카세트와 함께 40배 투석부피의 예냉된 일염기성 10mM 나트륨 포스페이트, pH 4.3을 사용하여 수행하였다. 티올화된 33F 폴리사카라이드 투석잔사를 사카라이드 농도 및 티올(엘만) 분석 모두를 위해서 뽑아내었다. 활성화 과정의 흐름도를 도 8(A)에 제공한다.

[0885] 접합 과정

[0886] 티올화된 Pn33F 폴리사카라이드의 브로모아세틸화된 CRM₁₉₇에의 접합

[0887] 실시예 1에 개시된 바와 같이, CRM₁₉₇ 담체 단백질을 브로모아세틸화에 의해 별도로 활성화시키고, 이어서 접합 반응을 위해 활성화된 Pn-33F 폴리사카라이드와 반응시켰다. 접합 반응의 개시 전에, 반응 용기를 5 °C로 예냉시켰다. 브로모아세틸화된 CRM₁₉₇ 및 티올화된 33F 폴리사카라이드를 150 내지 200 rpm의 교반 속도로 반응 용기에서 함께 혼합하였다. 상기 사카라이드/단백질 투입비는 0.9 ± 0.1 이었다. 반응 pH를 8.0 내지 9.0으로 조절하였다. 접합 반응을 5 °C에서 20 ± 2 시간 동안 진행시켰다.

[0888] 브로모아세틸화된 CRM₁₉₇ 및 티올화된 Pn33F 폴리사카라이드상의 반응성 작용기의 캡핑

[0889] CRM₁₉₇ 단백질상의 반응되지 않은 브로모아세틸화된 잔기를, 2 몰 당량의 N-아세틸-L-시스테인과 5 °C에서 3시간 동안 반응시킨 다음 티올화된 33F-폴리사카라이드의 임의의 잔류 유리 설프하이드릴기를 5 °C에서 20시간 동안 4몰 당량의 요오도아세트아미드(IAA)로 캡핑시킴으로써 캡핑시켰다.

[0890] eTEC-결합된 Pn-33F 당접합체의 정제

[0891] 접합 용액을 0.45 μm 또는 5 μm 필터를 통해 여과하였다. 33F 당접합체의 투석여과를 300K MWCO 한외여과 멤브레인 카세트에 수행하였다. 투석여과를 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수, pH 6.0에 대해 수행하였다. 이어서 Pn-33F 당접합체 300K 투석잔사를 0.22 μm 필터를 통해 여과하고 5 °C에서 보관하였다. 접합 과정의 흐름도를 도 8(B)에 제공한다.

[0892] 결과

[0893] Pn-33F eTEC 당접합체의 다수의 배치에 대한 반응 매개변수 및 특성화를 표 1에 나타낸다. 시스타민 다이하이드로클로라이드에 의한 CDT 활성화-티올화는 63% 내지 90% 사카라이드 수율 및 <1% 내지 13% 유리 사카라이드를 갖는 당접합체를 생성시켰다.

표 1

[0894]

Pn33F eTEC 접합체의 실험 매개변수 및 특성화 데이터							
접합체 배치	33F-1A	33F-2B	33F-3C	33F-4D	33F-5E	33F-6F	33F-7G
활성화 수준(티올의 몰/폴리사카라이드의 몰)	0.21	0.13	0.164	0.103	0.183	0.22	0.19
활성화 수준(티올%)	21	13	16.4	10.3	18.3	22	19

사카라이드/단백질(투입) 비	0.75	1.0	0.75	1.0	1.0	0.75	0.80
사카라이드 수율 (%)	69%	63%	71%	63%	69%	82%	90%
사카라이드/단백질 비	1.3	1.7	1.2	1.9	1.6	1.1	1.5
유리 사카라이드	12.9%	7.7%	4.4%	7.2%	7.3%	< 4%	< 4 %
SEC-MALLS에 의한 MW (kDa)	2627	2561	4351	2981	3227	3719	5527
CMCA/CMC	14.4/0	13.4/0	6.8/1.9	2.7/0.6	5.9/0.6	8.2/0	11.4/0.6
%K _d (= 0.3)	N/A	85%	88%	75%	68%	67%	76%
아세틸화 수준(아세테이트의 몰/폴리사카라이드의 몰)	0.89	1.16	0.99	0.85	0.81	0.85	1.01
N/A = 입수할 수 없음							

[0895] CRM₁₉₇에 대한 Pn-33F eTEC 당접합체의 OPA 역가마우스에서 Pn-33F OPA 역가를 표준 조건 하에서 측정하였다(하기 10A 및 22F 접합체에 대해 개시되는 OPA 과정과 유사하다). 4 및 7주체의 OPA 역가(95% CI을 갖는 GMT)를 표 2에 나타내며, 상기 표는 혈청형 33F Pn 당접합체가 쥐 면역원성 모델에서 OPA 역가를 유도함을 입증하였다.

표 2

[0896]

Pn-33F OPA 역가(95% CI를 갖는 GMT)			
33F Pn 접합체	0.001 µg	0.01 µg	0.1 µg
4주	4 (4, 5)	37 (17, 82)	414 (234, 734)
7주	8 (5, 13)	131 (54, 314)	17567 (9469, 32593)

[0897] 실시예 3. 추가적인 Pn-33F eTEC 접합체의 제조

[0898] 추가의 Pn-33F eTEC 접합체를 실시예 2에 개시된 과정을 사용하여 생성시켰다. 이들 추가의 Pn-33F eTEC 당접합체의 배치들에 대한 반응 매개변수 및 특성화 데이터를 표 3에 나타낸다.

표 3

[0899]

추가의 Pn33F eTEC 접합체의 실험 매개변수 및 특성화 데이터									
접합체 배치	33F-8H	33F-9I	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-15O	33F-16P
활성화 수준(티올의 몰/폴리사카라이드의 몰)	0.22	0.11	0.11	0.13	0.14	0.13	0.06	0.13	0.11
사카라이드/단백질(투입) 비	0.75	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
사카라이드 수율(%)	78%	88%	89%	67%	69%	86%	81%	91%	88%
사카라이드/단백질 비	1.0	2.2	2.1	1.4	1.4	1.4	2.2	1.9	1.9
유리 사카라이드	< 1%	6.8%	5.9%	2.3%	3.6%	LOQ	8.2%	3.6%	6.6%
SEC-MALLS에 의한 MW (kDa)	4729	3293	3295	2246	2498	5539	3070	6009	3789
CMCA/CMC	6.6/ LOQ	14.2/ 2.1	15.4/ 2.1	5.5/ 1	5.4/ 1.1	NA/ LOQ	1.7/ 1.2	4.1/ 2.2	2.2/ 1.2
%K _d (= 0.3)	69%	N/A	N/A	N/A	N/A	88%	87%	87%	85%
아세틸화 수준(아세테이트의 몰/폴리사카라이드의 몰)	0.86	0.93	0.87	1.01	0.99	0.71	0.78	0.8	0.82
LOQ = 정량분석 한계; N/A = 입수할 수 없음									

[0900] 상기 및 표 3에 나타난 바와 같이, 다수의 Pn-33F 접합체를 상기 eTEC 접합을 사용하여 수득하였다. eTEC 화학

은 고수율, 낮은 유리 사카라이드% 및 고도의 접합(접합된 리신)을 갖는 접합체의 제조를 허용하였다. 추가로, eTEC 접합 과정을 사용하여 80% 초과와 아세틸 작용기를 보존할 수 있었다.

실시예 4. Pn-33F eTEC 당접합체 안정성의 평가: 유리 사카라이드% 추세

접합체 배치 33F-2B의 분액들(표 1 참조)을 폴리프로필렌 튜브에 분배하고 각각 4 °C, 25 °C 및 37 °C에서 보관하고 유리 사카라이드% 추세를 모니터링하였다. 데이터(유리 사카라이드%)를 표 4에 나타낸다. 상기 표에 나타낸 바와 같이, 유리 사카라이드%에서 현저한 변화는 없었다.

표 4

4 ℃, 25 ℃ 및 37 ℃에서 Pn-33F eTEC 당접합체의 유리 사카라이드% 안정성							
로트#	유리 사카라이드 (%)						
시간							
33F-2B	0	1wk	3wks	1M	2M	3M	6M
	4℃						
	7.7	N/A	8.3	N/A	9.7	11.2	13
	25℃						
	7.7	N/A	10.8	N/A	11.8	N/A	N/A
	37℃						
	7.7	12.1	N/A	13.4	N/A	N/A	N/A
wk = 주; M = 개월; N/A = 입수할 수 없음							

또 다른 접합체 로트(배치 33F-3C)의 가속화된 안정성을 또한 37 °C에서 1개월까지 수행하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이, 37 °C에서 1개월까지 유리 사카라이드%의 현저한 변화는 없었다.

표 5

37 °C에서 Pn-33F eTEC 당접합체에 대한 유리 사카라이드% 안정성					
로트#	유리 사카라이드 (%)				
시간					
33F-3C	0	1일	1wk	2wks	1M
37 °C					
	4.4	5.9	6.4	7.1	7.2

eTEC 접합체의 안정성을 추가로 확인하기 위해서, 4 °C에서 보관된 추가적인 접합체 배치(33F-3C 및 33F-5E(표 1 참조))를 약 1년까지, 유리 사카라이드%의 잠재적인 추세에 대해서 모니터링하였다. 표 6에 나타낸 바와 같이, 약 1년까지의 연장된 기간 동안 4 °C에서 보관된 접합체에 대해서 유리 사카라이드% 수준의 현저한 변화는 없었다.

표 6

4 °C에서 Pn-33F eTEC 당접합체에 대한 유리 사카라이드% 안정성 결과					
로트#	유리 사카라이드 (%)				
	시간				
	0	3M	4M	12M	14M
4 °C					
33F-3C	4.4	N/A	5.3	N/A	7.6
33F-5E	7.3	6.3	N/A	7.4	N/A
M = 개월; N/A = 입수할 수 없음					

- [0908] 33F eTEC 화학에 의해 생성된 혈청형 33F 접합체는 다양한 온도(실시간 및 가속화된)에서 유리 사카라이드 추세에 의해 모니터시 감지할 수 있는 분해 없이 안정한 것으로 나타났다.
- [0909] 실시예 5. CRM₁₉₇에 대한 Pn-8 접합체의 제조
- [0910] Pn-8 RAC/DMSO 당접합체의 제조
- [0911] 동결된 폴리사카라이드를 해동시키고 반응 용기로 옮겼다. 2M 아세트산 및 WFI(주사용수)를 폴리사카라이드 용액에 가하여 약 2.5 g/L의 최종 폴리사카라이드 농도 및 0.2M의 최종 아세트산 농도를 성취하였다.
- [0912] 폴리사카라이드의 가수분해
- [0913] 고유 폴리사카라이드를 활성화 전에 화학적으로 가수분해시켰다. 희석된 폴리사카라이드 용액을 70 °C로 가열하고, 이어서 상기 온도에서 3.5 시간 동안 유지시켰다.
- [0914] 폴리사카라이드의 산화
- [0915] 폴리사카라이드의 산화를 나트륨 퍼요오데이트 용액의 첨가에 의해 개시시키고 반응을 23 °C에서 20시간 동안 계속 진행시켰다.
- [0916] 활성화된 폴리사카라이드의 정제
- [0917] 상기 활성화된 폴리사카라이드를 한외여과 카세트를 사용하여 농축시켰다. 투석여과를 20배 투석부피의 WFI에 대해서 수행하였다.
- [0918] 동결건조
- [0919] 상기 활성화된 폴리사카라이드를 슈크로스와, 활성화된 폴리사카라이드 그램당 슈크로스 25 그램의 비로 배합한다. 상기 활성화된 사카라이드 및 슈크로스를 함유하는 병을 에탄올 욕에서 셀 동결시키고 동결건조시킨다.
- [0920] 활성화된 폴리사카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합 및 캡핑
- [0921] 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 DMSO 중에서 2 mg/mL로 재조성하였다. DMSO를 재조성을 위해 동결건조된 CRM₁₉₇에 가하였다. 재조성된 CRM₁₉₇을 재조성된 활성화된 폴리사카라이드에 가하였다. 이어서 접합을, 반응 혼합물에 나트륨 시아노보로하이드라이드를 가하여 개시시키고 23 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 접합 반응의 종료를 2 MEq의 나트륨 보로하이드라이드의 첨가에 의해 수행한다. 상기 캡핑 반응은 23 °C에서 3시간 동안 진행되었다.
- [0922] 접합체의 정제
- [0923] 이어서 상기 접합체 용액을 냉각된 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)로 희석하고, 여과하고, 300K 셀룰로스 멤브레인을 사용하여 2 내지 4 g/L로 농축시키고, 제1 단계 투석여과를 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)에 대해 수행하였다. 최종 정제 단계를 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수, pH 6.0 완충제에 의한 투석여과에 의해 수행하였다. 투석여과의 완료 후에, 상기 정제된 접합체를 0.22 µm 필터를 통해 수집 탱크로 옮겼다.
- [0924] 1가 벌크 접합체의 희석
- [0925] 상기 접합체를 5 mM 숙시네이트/0.9% 염수(pH 6)에 의해 0.5 mg/mL의 표적 사카라이드 농도로 추가 희석하였다. 최종 0.22 µm 여과 단계를 완료하여 제형화를 위한 1가 벌크 접합체(MBC) 생성물을 제조하였다.
- [0926] 상이한 매개변수들(예를 들어, 사카라이드-단백질 투입 비, 반응 농도 및 나트륨 시아노보로하이드라이드의 MEq)를 변화시킴으로써 상술한 과정을 사용하여 다수의 접합체를 수득하였다. CRM₁₉₇에의 전형적인 Pn-8 당접합체에 대한 특성화를 표 7에 제공한다.

표 7

[0927]

Pn8-CRM ₁₉₇ 접합체의 특성화									
샘플 번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MALLS에 의한 활성화된 사카라이드 MW(kDa)	267	270	352	65	233	340	113	250	230

사카라이드/단백질 비	0.81	0.84	0.5	2.7	1.15	1.0	0.81	0.64	0.42
SEC-MALLS에 의한 MW(kDa)	12200	8670	3460	3379	4748	4255	5470	9924	6787

[0928]

마우스에서 혈청형 8-CRM₁₉₇ 접합체에 대한 옥소닌 개시된 식작용 활성(OPA) 역가를 마우스에서 표준 조건(하기 10A 및 22F 접합체에 대해 개시되는 OPA 과정과 유사하다) 하에서 측정하였다. 상이한 용량들에서 4주체의 OPA 역가(95% 신뢰도 구간(CI)을 갖는 기하 평균 역가(GMT))를 표 8 및 9(2개의 별도의 실험)에 나타내며, 이들 표는 혈청형 8 접합체(샘플 1 내지 9; 또한 이들 접합체의 특성화 데이터에 대해서 표 7을 참조하십시오)가 쥐 면역원성 모델에서 OPA 역가를 유도하였음을 나타낸다. 표 8에 나타난 바와 같이, 혈청형 8 접합체는, 불량한 항체 역가를 갖는 대조용의 접합되지 않은 폴리사카라이드에 비해, 현저하게 더 높은 항체 역가를 갖는 것으로 나타났다.

표 8

[0929]

혈청형 8-CRM ₁₉₇ 접합체의 면역원성			
	OPA GMT (95% CI)		
샘플 번호	0.001 µg	0.01 µg	0.1 µg
1	17 (10, 30)	88 (47, 165)	1344 (896, 2016)
2	7 (4, 11)	184 (87, 387)	1934 (1313, 2847)
3	4 (4, 4)	17 (9, 30)	779 (345, 1757)
4	5 (4, 7)	74 (41, 136)	558 (311, 1001)
접합되지 않은 PS			13 (3, 55)

표 9

[0930]

혈청형 8-CRM ₁₉₇ 접합체의 면역원성		
	OPA GMT (95% CI)	
샘플 번호	0.001 µg	0.01 µg
5	8 (5, 12)	322 (208, 498)
6	12 (8, 19)	264 (129, 537)
7	12 (7, 21)	521 (366, 743)
8	19 (10, 38)	404 (238, 687)
9	33 (14, 80)	686 (380, 1237)
2	13 (7, 23)	177 (94, 336)

[0931]

상기 환원적 아민화 과정에 의해 제조된 접합체로부터 생성된 전체 데이터는 상기 과정이 양호한 접합 수율, 낮은 유리 사카라이드% 및 양호한 안정성을 갖는 접합체의 제조를 허용함을 입증하였다. 추가로, 상기 제조된 접합체는 쥐 면역원성 모델에서 양호한 OPA 역가를 유도하였다.

[0932]

실시예 6. 혈청형 10A 폴리사카라이드 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조

[0933]

단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A 폴리사카라이드의 제조

[0934]

혈청형 10A 캡슐 폴리사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국특허 출원공개 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법들을 참조하십시오). 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A를 시드 병에서 증식시키고 이어서 시드 배양기로 옮겼다. 일단 표적화된 광학 밀도에 도달했으면, 세포를 생산 발효기로 옮겼다. 발효 브로쓰를 N-라우로일 사르코신의 첨가에 의해 불활성화시키고 한외여과 및 투석여과에 의해 정제하였다.

[0935]

단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A 캡슐 폴리사카라이드의 산화

- [0936] 계산된 부피의 0.1M 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.0) 및 주사용수(WFI)를 폴리스카라이드 용액에 가하여 2.5 g/L의 최종 폴리스카라이드 농도 및 25 mM 칼륨 포스페이트 완충제의 최종 농도를 성취하였으며, 필요한 경우 pH를 약 6.0으로 조절하였다. 이어서 희석된 폴리스카라이드를 5 °C로 냉각시켰다. 산화를 0.25 몰 당량(MEq)의 나트륨 퍼옥소데이트 용액의 첨가에 의해 개시시켰다. 산화 반응 시간은 5 °C에서 약 4시간이었다. 산화 반응을 1 MEq의 2,3-부탄다이올로 연속적인 교반 하에 5 °C에서 1 내지 2시간 동안 급냉시켰다.
- [0937] 표적 반응 시간에 도달한 후에, 상기 활성화된 폴리스카라이드를 30K MWCO 밀리포어 한외여과 카세트를 사용하여 농축시켰다. 이어서 투석여과를 20배 투석부피의 WFI에 대해 수행하였다. 상기 정제된 활성화된 폴리스카라이드를 5 °C에서 보관하였다. 상기 정제된 활성화된 사카라이드를 특히 (i) SEC-MALLS에 의한 분자량 및 (ii) 산화도에 의해 특성화한다.
- [0938] 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A 폴리스카라이드와 CRM₁₉₇과의 접합
- [0939] 접합 과정은 하기의 단계들로 이루어졌다:
- [0940] a. 슈크로스 부형제와의 배합, 및 동결건조;
- [0941] b. 상기 동결건조된 폴리스카라이드 및 CRM₁₉₇의 제조성;
- [0942] c. 활성화된 폴리스카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합 및 캡핑; 및
- [0943] d. 접합체의 정제.
- [0944] a. 슈크로스와의 배합
- [0945] 상기 활성화된 폴리스카라이드를 슈크로스와, 활성화된 폴리스카라이드 그램당 25 g의 슈크로스의 비로 배합한다. 이어서 배합된 혼합물의 병을 동결건조시켰다. 동결건조에 이어서, 동결건조된 활성화된 폴리스카라이드를 함유하는 병을 -20 °C에서 보관하였다.
- [0946] b. 동결건조된 활성화된 폴리스카라이드 및 CRM₁₉₇ 단백질의 제조성
- [0947] 동결건조된 활성화된 폴리스카라이드를 무수 다이메틸 설펍사이드(DMSO) 중에서 제조성하였다. 폴리스카라이드의 용해 완료시, 동일한 양의 DMSO를 제조성을 위해 계산된 CRM₁₉₇에 가하였다.
- [0948] c. 활성화된 폴리스카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합 및 캡핑
- [0949] 제조성된 CRM₁₉₇(DMSO 중의)을 접합 반응기에서 제조성된 활성화된 폴리스카라이드에 가하였다. 최종 폴리스카라이드 농도는 1 g/L이다. 접합을, 1.2 MEq의 나트륨 시아노보로하이드라이드를 반응 혼합물에 가함으로써 수행하였다. 상기 반응물을 23 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 접합 반응의 종료는 2 MEq의 나트륨 보로하이드라이드의 첨가에 의해 수행된다. 캡핑 반응물을 23 °C에서 3시간 동안 배양하였다.
- [0950] 접합 반응의 종료는 2 MEq의 나트륨 보로하이드라이드의 첨가에 의해 수행된다. 상기 캡핑 반응을 23 °C에서 3시간 동안 진행하였다.
- [0951] d. 접합체의 정제
- [0952] 이어서 상기 접합체 용액을 5x(부피 기준)의 냉각된 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)로 희석하고 20X 투석여과를 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)를 사용하여 수행하였다. 초기 투석여과의 완료 후에, 접합체 투석잔사를 0.22 μm 필터를 통해 옮겼다. 상기 접합체를 5 mM 숙시네이트/0.9% 염수(pH 6)로 추가로 희석하고, 최종적인 0.22 μm 여과 단계 후에 2 내지 8 °C에서 보관하였다.
- [0953] 상이한 매개변수들(예를 들어, 사카라이드-단백질 투입 비, 반응 농도 및 나트륨 시아노보로하이드라이드의 MEq)를 변화시킴으로써 상술한 과정을 사용하여 다수의 접합체를 수득하였다. 상기 화학은, 다양한 온도(실시간 및 가속화된)에서 유리 사카라이드 추세에 의해 모니터링 감지할 수 있는 분해 없이 안정한 것으로 나타난 혈청형 10A 접합체를 생성시켰다. CRM₁₉₇에의 전형적인 Pn-10A 당접합체에 대한 특성화를 표 10에 제공한다.

표 10

[0954]

Pn-10A-CRM ₁₉₇ 접합체의 특성화						
접합체 번호	1	2	3	4	5	6
DO	12.2	19.5	5.2	10.3	10.8	10.5
활성화된 사카라이드 MW, kDa	191	240	80	170	170	170
투입 비	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1
수율%	56	28.5	65	82	73	66
유리 사카라이드 %	6.8	10.0	6.7	6.8	6.4	9.7
접합체 MW, kDa	3838	5810	4630	4034	3463	5540
사카라이드/단백질 비	0.82	0.88	0.85	1.1	1.2	1.0
Lys 변형 AAA	7.4	3.7	13.1	6.9	6.7	6.1

[0955]

마우스에서 혈청형 10A-CRM₁₉₇ 접합체에 대한 흡소닌 개시된 식작용 활성(OPA) 역가를 표준 조건 하에서 측정하였다. 30마리의 6 내지 7주된 암컷 스위스 웹스터 마우스 그룹을 0주째에 피하 경로를 통해 0.001 μ g, 0.01 μ g 또는 0.1 μ g의 시험 접합체로 면역시켰다. 상기 마우스를 동일한 용량의 접합체로 3주째에 추가 면역시키고 이어서 4주째에 채혈하였다. 혈청형-특이성 OPA를 4주 혈청 샘플에서 수행하였다. 흡소닌 개시된 식작용 활성(OPA) 분석을 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 10A에 특이적인 쥐 혈청 중 기능성 항체를 측정한다. 시험 혈청을, 세균을 흡소닌화하고, 보체 침착을 촉발하여 식작용을 촉진하고 식세포에 의해 세균을 살해하는 캡슐 폴리사카라이드 특이성 면역글로불린의 능력을 측정하는 분석 반응에 제공한다. OPA 역가는 시험 혈청 없는 대조용에 비해 세균수의 50% 감소를 생성시키는 상호 희석으로서 정의된다. OPA 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 희석물로부터 보간한다. OPA 과정은 하기의 변형과 함께 문헌[Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295]에 개시된 방법에 기초하였다. 시험 혈청을 2.5배 연속 희석하고 미세적정 분석 플레이트에 가하였다. 생 혈청형 10A 표적 세균 균주를 상기 웰에 가하고 플레이트를 37 °C에서 30분 동안 진탕하였다. 분화된 HL-60 세포(식세포) 및 아기 토끼 혈청(3- 내지 4-주 된 것, PEL-프리즈(FREEZ)(등록상표), 12.5% 최종 농도)을 상기 웰에 가하고, 플레이트를 37 °C에서 60분 동안 진탕시켰다. 반응을 종료시키기 위해서, 80 μ l의 0.9% NaCl을 모든 웰에 가하고, 혼합하고 10 μ l의 분액을 200 μ l의 물을 함유하는 멀티스크린(MULTISCREEN)(등록상표) HTS HV 필터 플레이트(밀리포어(등록상표))의 웰로 옮겼다. 액체를 진공하에서 플레이트를 통해 여과하고, 150 μ l의 HYSOY(등록상표) 배지를 각 웰에 가하고 여과하였다. 이어서 상기 필터 플레이트를 37 °C, 5% CO₂에서 밤새 배양하고 이어서 데스테인(Destain) 용액(바이오 래드 레보라토리즈 인코포레이티드(Bio-Rad Laboratories, Inc.), 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재)으로 고정시켰다. 이어서 상기 플레이트를 쿠마씨 블루로 염색하고 1회 탈색하였다. 콜로니를 영상화하고 셀룰라 테크놀로지 리미티드(Cellular Technology Limited)(CTL)(셰이커 하이츠(Shaker Heights), 미국 오하이오주 소재) 임뮤노스팟(IMMUNOSPOT)(등록상표) 분석기상에서 세었다. 원 콜로니수를 사용하여 살해 곡선을 플롯팅하고 OPA 역가를 계산하였다.

[0956]

상기한 용량에서 4주째에 OPA 역가(95% 신뢰도 구간(CI)을 갖는 기하 평균 역가(GMT))를 표 11에 나타내며, 상기 표는 혈청형 10A 접합체(샘플 1 내지 3; 또한 이들 접합체에 대한 특성화 데이터에 대해서 표 10을 참조하십시오)가 쥐 면역원성 모델에서 OPA 역가를 유도하였음을 입증한다. 표 11에 나타난 바와 같이, 혈청형 10A 접합체는, 불량한 OPA 반응을 갖는 대조용의 접합되지 않은 폴리사카라이드에 비해, 현저하게 더 높은 OPA 역가를 갖는 것으로 나타났다.

표 11

[0957]

혈청형 10A-CRM ₁₉₇ 접합체의 면역원성			
	OPA GMT (95% CI)		
샘플 번호	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
1	858 (556, 1324)	1015 (610, 1691)	4461 (3065, 6494)
2	1411 (737, 2703)	796 (460, 1378)	2873 (1768, 4842)
3	322 (180, 574)	1062 (528, 2135)	2618 (1415, 4842)

접합되지 않은 PS		602 (193, 1882)
------------	--	-----------------

[0958]

실시예 7. TEMPO/NCS를 사용하는 Pn 혈청형-12F의 접합

[0959]

혈청형 12F-CRM₁₉₇ 당접합체의 안정성을 개선시키기 위해서, 공산화제로서 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 유리 라디칼(TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드(NCS)를 사용하여 1차 알콜을 알데하이드기로 산화시키는 대안의 화학을 탐구하였다. GC/MS 분석은 산화 부위가 펄로오데이트-매개된 산화의 경우와 상이함을 나타내었다. TEMPO-NCS 산화의 경우에, α-D-Glcp 및 2-Glcp가 산화된 반면, α-D-Galp는 펄로오데이트가 사용된 경우 주요 산화 부위였다(도 4를 참조하시오). 본 발명에 더욱 상세히 개시되는 바와 같이, TEMPO는 촉매량(≤0.1 몰 당량)으로 사용되었으며 목적하는 산화도(DO)를, 사용된 NCS의 양을 변화시켜 성취하였다. 후속으로 다수의 접합체를 합성하고 특성화하였다. 일반적으로, 혈청형 12F 당접합체의 생성을 하기와 같이 다수의 단계로 수행하였다: a) 혈청형 12F 폴리사카라이드의 분자량 50 내지 500 kDa으로의 가수분해

[0960]

b) TEMPO/NCS에 의한 상기 혈청형 12F 폴리사카라이드의 활성화;

[0961]

c) 상기 활성화된 폴리사카라이드의 정제;

[0962]

d) 활성화된 혈청형 12F의 CRM₁₉₇ 단백질에의 접합; 및

[0963]

e) 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체의 정제.

[0964]

혈청형 12F의 가수분해 및 산화

[0965]

상기 폴리사카라이드의 가수분해를 전형적으로는 가열하면서 산성 조건하에서 수행하여 100 내지 350 kDa의 목적하는 범위 중의 평균 분자량을 획득하였다. 전형적인 실험을 하기에 개시한다.

[0966]

가수분해

[0967]

상기 혈청형 12F 폴리사카라이드 용액을 재킷이 있는 반응 용기에 가하였다. 여기에, 필요한 부피의 0.30M 아세트산 및 주사용수(WFI)를 가하여 약 0.1M 아세트산 농도를 유지시켰다. 상기 용액의 pH를 1N NaOH 또는 빙초산을 사용하여 3.2±0.3으로 조절하였다. 상기 반응 혼합물의 온도를 70±5 °C로 증가시켰다. 상기 반응 혼합물을 70±5 °C에서 90 내지 120분 동안 교반하였다. 상기 반응 혼합물을 23±2 °C로 냉각시키고 1M NaOH 용액을 가하여 중화시켰다(pH 7.0). 상기 가수분해된 폴리사카라이드를 30K MWCO 멤브레인을 사용하여 WFI에 대해 한외여과/투석여과에 의해 정제시켰다. 상기 용액을 0.22 μm 필터를 통해 여과하고 산화시까지 2 내지 8 °C에서 보관하였다. 상기 가수분해된 폴리사카라이드의 분자량을 SEC-MALLS에 의해 분석하여 상기 분자량이 100 내지 350 kDa의 표적 범위를 확실히 충족하게 하였다.

[0968]

부분 산화

[0969]

하나의 실험에서, 혈청형 12F 폴리사카라이드를 미세유동화기를 사용하는 가압 균질화를 사용하여 기계적으로 크기분류하여 분자량을 약 100 내지 500 kDa으로 감소시켰다. 상기 크기분류된 폴리사카라이드를 4.0 mg/ml의 농도로 반응 용기에 가하고 바이카보네이트/카보네이트 완충제(0.5M NaHCO₃/0.05M Na₂CO₃ 완충제, pH 8.6)와 1:1 v/v의 비로 혼합하였다. 상기 교반된 혼합물에 ≤0.1 몰 당량의 TEMPO를 가하였다. 0.6 내지 1.0 몰 당량의 NCS를 가하여 반응을 개시시켰다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 그 후에 활성화된 폴리사카라이드를 30K 한외여과 멤브레인을 사용하여 WFI와 함께, 투석여과에 의해 정제시켰다. 상기 정제된 폴리사카라이드를 수집하고 산화도(DO)를 알데하이드(3-메틸-2-벤조티아졸리논 하이드라존(MBTH) 분석 사용) 및 폴리사카라이드(안트론 분석 사용)의 정량적인 측정에 의해 측정하였다.

[0970]

또 다른 실험에서, 상기 혈청형 12F 폴리사카라이드를 가수분해시켜 분자량을 약 100 내지 500 kDa의 분자량으로 감소시켰다. 상기 혈청형 12F 폴리사카라이드를 반응 용기에 가하고 0.5M NaHCO₃/0.05M Na₂CO₃ 완충제(pH 8.6)와 1:1 v/v의 비로 혼합하였다. 상기 교반된 혼합물에 0.6 내지 1.0 몰 당량의, WFI에 용해된 NCS를 가하였다. 상기 활성화를, WFI에 용해된 약 0.1 몰 당량의 TEMPO의 첨가에 의해 개시시켰다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 그 후에 상기 활성화된 폴리사카라이드를 30K 한외여과 멤브레인을 사용하여 WFI와 함께 투석여과에 의해 정제시켰다. 상기 정제된 활성화된 폴리사카라이드를 0.2 μm 필터를 통해 여과하고 사용 전에 4 °C에서 보관하였다.

- [0971] 상기 TEMPO/NCS 매개된 산화를 또한 pH 6.5, 7.0, 7.5 및 8.0의 나트륨 포스페이트 완충제 중에서 연속적으로 수행하였다. 일부 활성화 실험에서 사카라이드의 과도한 산화를 피하기 위해 1차 알콜, 예를 들어 n-프로판올을 사용하여 시약들을 급냉시켰다. 또 다른 세트의 실험에서 상기 화학적으로 가수분해된 폴리사카라이드에, 한외여과/투석여과 정제 단계 없이 바로 산화를 수행하였다.
- [0972] 혈청형 12F 산화된 폴리사카라이드의 접합
- [0973] 하나의 실험에서, 상기 정제된 산화된 혈청형 12F 폴리사카라이드를 반응 용기에 가한 다음 0.5M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 6.5)를 0.1M의 최종 완충제 농도로 가하였다. 상기 용액에, 앞서 동결건조시킨 CRM₁₉₇을 가하고 균질한 용액을 수득하기 위해서 철저히 혼합하였다. pH를 희석된 HCl 또는 1N NaOH 용액을 사용하여 6.8로 조절하였다. 이어서 1.5 몰 당량의 NaCNBH₃를 가하였다. 반응 혼합물을 실온(23 °C)에서 24시간 동안 및 37 °C에서 2.5일 동안 교반하였다. 이어서 상기 반응 혼합물을 1x 0.9% 염수로 희석하고 반응하지 않은 알데하이드기를 2 몰 당량의 나트륨 보로하이드라이드로 "캡핑"하였다. 상기 캡핑 반응 시간은 3시간이었다.
- [0974] 또 다른 실험에서, 상기 정제된 활성화된 혈청형 12F를 반응 용기에 가한 다음 0.5M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 6.5)를 0.1M의 최종 완충제 농도로 가하였다. 상기 용액에, 앞서 동결건조시킨 CRM₁₉₇을 가하고 균질한 용액을 수득하기 위해서 철저히 혼합하였다. pH를 희석된 HCl 또는 1N NaOH 용액을 사용하여 6.8로 조절하였다. 이어서 3 몰 당량의 NaCNBH₃를 가하였다. 반응 혼합물을 23 °C에서 24시간 동안 및 37 °C에서 48시간 동안 교반하였다. 이어서 상기 반응 혼합물을 1x 0.9% 염수로 희석하고 교반하면서, 반응하지 않은 알데하이드기를 1 몰 당량의 나트륨 보로하이드라이드 NaBH₄로 "캡핑"하였다. 상기 캡핑 반응 시간은 3시간이었다.
- [0975] 또 다른 실험에서, 상기 정제된 활성화된 혈청형 12F를 반응 용기에 가하고 CRM₁₉₇ 용액과 혼합하였다. 상기 혼합물을 동결건조시키고 상기 분말을 0.1M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 6.8)에 5 mg/mL의 최종 사카라이드 농도로 용해시켰다. 필요한 경우 pH를 희석된 HCl 또는 1N NaOH 용액을 사용하여 6.8로 조절하였다. 이어서 3 몰 당량의 NaCNBH₃를 가하였다. 반응 혼합물을 23 °C에서 24시간 동안 및 37 °C에서 48시간 동안 교반하였다. 이어서 상기 반응 혼합물을 1x 0.9% 염수로 희석하고, 반응하지 않은 알데하이드기를 1 몰 당량의 나트륨 보로하이드라이드 NaBH₄로 "캡핑"하였다. 상기 캡핑 반응 시간은 3시간이었다.
- [0976] 접합체 정제
- [0977] 상기 캡핑된 반응 혼합물을 5 µm 필터를 사용하여 여과하고 이어서 100K MWCO 한외여과 멤브레인을 사용하여 정제하였다. 상기 접합체를 먼저 10 mM 숙시네이트/0.9% 염수, pH 6.0 완충제를 사용하여 투석여과하였다. 이어서 상기 정제된 접합체를 0.45/0.22 µm 필터를 통해 여과하여 벌크 접합체를 수득하였다.
- [0978] 산화도
- [0979] 상기 혈청형 12F 폴리사카라이드 중의 1차 알콜의 성공적인 산화를 TEMPO/NCS 시스템을 사용하여 성취하였다. 상기 가수분해된 혈청형 12F 폴리사카라이드를, 상기 NCS 공산화제의 양을 조절함으로써 다양한 산화도(DO) 수준으로 산화시켰다. 상이한 폴리사카라이드 배치 및 분자량을 사용하는 가변량의 NCS에 의한 DO에 대한 효과들도 9에 나타낸다. 전형적으로 상기 산화 반응은, 2시간 후에 DO의 현저한 변화가 관찰되지 않았기 때문에, 2시간 후 완료한다.
- [0980] 다수의 혈청형 12F 접합체를 상기 TEMPO/NCS 산화된 폴리사카라이드를 사용하여 생성시키고 특성화하였다. 결과를 표 12에 요약한다.

표 12

폐렴구균 혈청형 12F-CRM ₁₉₇ 접합체						
접합체 배치	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
산화시간 (시간)	2	2	4	2	2	2
산화도 (DO)	12.0	6.0	9.6	12.0	11.5	11.5
활성화된 사카라이드 수율%	80	71	70	89	86	86

MALLS에 의한 활성화된 사카라이드 MW (kDa)	137	155	170	190	240	240
접합 공정	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Co-Lyo
접합체 결과						
사카라이드 수율 (%)	51.6	76.8	53.6	76.3	65.8	40.7
사카라이드/단백질 비	1.2	0.9	1.0	1.1	1.4	0.9
유리 사카라이드%	24	10	17	20	23	14
SEC-MALLS에 의한 MW (kDa)	2050	3000	3600	1500	2400	2100

실시예 8. TEMPO/NCS 산화 방법을 사용하는 Pn-혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체의 면역원성

마우스에서 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체에 대한 옥소닌 개시된 식작용 활성(OPA) 역가를 마우스에서 표준 조건하에서 측정하였다. 4주 및 7주째의 OPA 역가(95% 신뢰도 구간(CI)을 갖는 기하 평균 역가(GMT))를 표 13에 나타내며, 이들 표는 혈청형 12F-CRM₁₉₇ 접합체(배치 12F 내지 97B; 또한 이들 접합체의 특성화 데이터에 대해서 표 12를 참조하시오)가 쥐 면역원성 모델에서 OPA 역가를 유도하였음을 나타낸다. 상기 TEMPO-NCS에 의해 생성된 접합체는 상기 펩티오데이트 산화로부터 생성된 대조용 접합체(171B)보다 더 면역원성이었다.

표 13

혈청형 12F-CRM ₁₉₇ 접합체의 면역원성			
접합체 샘플/용량	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
펩티오데이트 산화 (171B) 대조용	4	16	172
TEMPO/NCS 산화 (12F-97B)	40	417	880

실시예 9. Pn-12F 당접합체 안정성의 평가

펩티오데이트 산화 대 TEMPO/NCS 산화에 의해 생성된 접합체의 안정성(25 °C에서)의 비교(도 10 참조)는 상기 Pn-12F 폴리사카라이드의 산화에 의해 생성된 접합체가 비교적 더 안정성을 입증하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 시간에 따른 유리 사카라이드의 증가가 25 °C에서 상기 Pn-12F 폴리사카라이드의 펩티오데이트 산화에 의해 생성된 당접합체에 대해 관찰되었다. 대조적으로, 상기 Pn-12F 폴리사카라이드의 TEMPO/NCS 산화를 사용하여 제조된 당접합체는 유사한 조건하에서 유리 사카라이드에 대해 그다지 현저한 추세가 관찰되지 않았다.

실시예 10. 혈청형 15B 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체의 제조

단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 폴리사카라이드의 제조

혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 공지된 단리 과정을 사용하여 세균으로부터 직접 수득할 수 있다. 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B를 시드 병에서 증식시키고 이어서 시드 배양기로 옮겼다. 일단 표적화된 광학 밀도에 도달했으면, 세포를 생산 발효기로 옮겼다. 발효 브로스를 N-라우로일 사르코신의 첨가에 의해 불활성화시키고 한외여과 및 투석여과에 의해 정제하였다.

이어서, 상기 정제된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 폴리사카라이드를 판다(PANDA) 2K(등록상표) 균질화기(GEA 니로 소아비(Niro Soavi), 파르마(Pharma), 이탈리아 소재)를 사용하여 고압 균질화에 의해 크기 분류하여 단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 폴리사카라이드를 생성시켰다.

바람직하게, 상기 방법에 의해 수득된 단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하며 50 내지 500 kDa, 바람직하게는 150 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다.

단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드의 산화

계산된 양의 500 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.0) 및 WFI를 연속 첨가하여 2.0 g/L의 최종 폴리사카라이드

농도를 제공함으로써 100 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.0) 중에서 폴리사카라이드 산화를 수행하였다. 필요한 경우 반응 pH를 약 6.0으로 조절하였다. pH 조절 후에, 반응 온도를 23 °C로 조절하였다. 산화를 약 0.25 몰 당량의 나트륨 퍼요오데이트의 첨가에 의해 개시시켰다. 산화 반응 시간은 23 °C에서 약 16시간 동안 수행되었다.

[0994] 상기 활성화된 폴리사카라이드의 농축 및 투석여과를 10K MWCO 한외여과 카세트를 사용하여 수행하였다. 투석여과를 20배 투석부피의 WFI에 대해 수행하였다. 이어서 상기 정제된 활성화된 폴리사카라이드를 5 °C에서 보관하였다. 상기 정제된 활성화된 사카라이드를 특히 (i) 비색측정 분석에 의한 사카라이드 농도; (ii) 비색측정 분석에 의한 알데하이드 농도; (iii) 산화도; (iv) SEC-MALLS에 의한 분자량 및 (v) 0-아세틸 및 글리세롤의 존재에 의해 특성화하였다.

[0995] SEC-MALLS를 폴리사카라이드 및 폴리사카라이드-단백질 접합체의 분자량의 측정에 사용한다. SEC를 사용하여 상기 폴리사카라이드를 유체역학적 부피에 의해 분리시킨다. 굴절률(RI) 및 다각도 레이저 광산란(MALLS) 검출기를 상기 분자량의 측정에 사용한다. 빛이 물질과 상호작용하는 경우, 상기 빛은 산란하며 산란된 빛의 양은 상기 물질의 농도, dn/dc (비 굴절률 증분)의 제품, 및 물 질량과 관련된다. 상기 분자량 측정은 상기 MALLS 검출기로부터의 산란된 광신호 및 상기 RI 검출기로부터의 농도 신호로부터의 판독을 근거로 계산된다.

[0996] 상기 활성화된 폴리사카라이드의 산화도(DO = 당 반복 단위의 물/알데하이드의 물)를 하기와 같이 측정하였다:

[0997] 당 반복 단위의 물을 다양한 비색측정 방법에 의해, 예를 들어 안트론 방법을 사용하여 측정한다. 상기 폴리사카라이드를 먼저 황산 및 열의 작용에 의해 모노사카라이드로 절단한다. 상기 안트론 시약은 헥소스와 반응하여, 625 nm에서 분광광도측정에 의해 판독되는 흡광도를 갖는 황녹색 복합체를 형성시킨다. 상기 분석 범위내에서, 상기 흡광도는 존재하는 헥소스의 양에 직접 비례한다.

[0998] 상기 알데하이드의 물을 또한 동시에, MBTH 비색측정 방법을 사용하여 측정한다. 상기 MBTH 분석은 알데하이드기(주어진 샘플로부터)를 3-메틸-2-벤조티아졸론 하이드라존(MBTH 분석 시약)과 반응시킴에 의한 아진 화합물의 형성을 수반한다. 과잉의 3-메틸-2-벤조티아졸론 하이드라존은 산화하여 반응성 양이온을 형성시킨다. 상기 반응성 양이온과 아진은 반응하여 청색 발색단을 형성한다. 이어서 상기 형성된 발색단은 650 nm에서 분광학적으로 판독된다.

[0999] 바람직하게, 상기 방법에 의해 수득된 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하며 50 내지 500 kDa, 바람직하게는 150 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다.

[1000] 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드와 CRM₁₉₇과의 접합

[1001] 접합 과정은 하기의 단계들이었다:

[1002] a) 슈크로스 부형제와의 배합, 및 동결건조;

[1003] b) 상기 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇의 재조성;

[1004] c) 활성화된 폴리사카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합 및 캡핑; 및

[1005] d) 상기 접합체의 정제.

[1006] a) 슈크로스 부형제와의 배합, 및 동결건조

[1007] 상기 활성화된 폴리사카라이드를 슈크로스와, 활성화된 폴리사카라이드 그램당 25 g의 슈크로스의 비로 배합하였다. 이어서 배합된 혼합물의 병을 동결건조시켰다. 동결건조에 이어서, 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 함유하는 병을 -20 °C에서 보관하였다. 계산된 양의 CRM₁₉₇ 단백질을 별도로 셀-동결시키고 동결건조시켰다. 동결건조된 CRM₁₉₇을 -20 °C에서 보관하였다.

[1008] b) 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇ 단백질의 재조성

[1009] 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 무수 다이메틸 설펍사이드(DMSO) 중에서 재조성하였다. 폴리사카라이드의 용해 완료시, 동일한 양의 무수 DMSO를 재조성을 위해 동결건조된 CRM₁₉₇에 가하였다.

[1010] c) 접합 및 캡핑

[1011] 반응 용기 중에서 제조성된 활성화된 폴리사카라이드를 제조성된 CRM₁₉₇과 배합(투입 비: 0.8:1)한 다음 철저히 혼합하여 등명한 용액을 수득한 후에 나트륨 시아노보로하이드라이드와의 접합을 개시시켰다. 반응 용액 중의 최종 폴리사카라이드 농도는 약 1 g/L이다. 접합을, 1.0 내지 1.5 MEq의 나트륨 시아노보로하이드라이드를 반응 혼합물에 가함으로써 개시시키고 23 °C에서 40 내지 48시간 동안 배양하였다. 접합 반응은 2 MEq의 나트륨 보로하이드라이드(NaBH₄)를 첨가하여 반응하지 않은 알데하이드를 캡핑시킴으로써 종료되었다. 상기 캡핑 반응을 23 °C에서 3시간 동안 수행하였다.

[1012] d) 접합체의 정제

[1013] 상기 접합체 용액을 100-300K MWCO 멤브레인을 사용하는 접선류 여과에 의한 정제를 위해 제조 중에 냉각된 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)로 1:10 희석하였다. 상기 희석된 접합체 용액을 5 µm 필터에 통과시키고 투석여과를 매질로서 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)를 사용하여 수행하였다. 상기 투석여과의 완료 후에, 상기 접합체 투석잔사를 0.22 µm 필터를 통해 이동시켰다.

[1014] 상기 접합체를 약 0.5 mg/mL의 표적 사카라이드 농도로 5 mM 숙시네이트/0.9% 염수(pH 6)로 추가로 희석하였다. 최종 0.22 µm 여과 단계를 완료하여 당접합체를 수득하였다.

[1015] 바람직하게, 상기 방법에 의해 수득된 활성화된 접합체는 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드 1 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하며 3,000 내지 20,000 kDa의 분자량을 갖고, 2 내지 6의 접합도를 갖는다.

[1016] **실시예 11. CRM₁₉₇에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함하는 당접합체의 특성화**

[1017] 접합체 1을 실시예 10의 방법에 의해 제조하였다. 접합체 2 및 3을 상이한 양의 산화제를 사용하여 유사한 방법에 의해 제조하였다. 접합체 4를, 상기 정제된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드가 크기 분류되지 않고 보다 낮은 DO(보다 높은 산화 수준)로 활성화되고 접합을 수성 매질에서 수행함을 제외하고 유사한 방법에 의해 제조하였다. 접합체 5를, 상기 정제된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드가 화학적 가부순해에 의해 크기 분류되고 접합을 수성 매질에서 수행함을 제외하고 유사한 방법에 의해 제조하였다. 접합체 6 및 7을, 상기 정제된 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드가 크기 분류되지 않음을 제외하고 유사한 방법에 의해 제조하였다.

[1018] 상기 수득된 접합체들을 특성화하였으며 결과를 표 14에 요약한다.

표 14

[1019]

스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드-CRM ₁₉₇ 접합체							
접합체	1	2	3	4	5	6	7
폴리사카라이드	크기분류됨	크기분류됨	크기분류됨	고유	가수분해됨	고유	고유
0-아세틸; 활성화된 폴리사카라이드(µmol 아세테이트/µmol 폴리)	0.69	0.69	0.69	1.01	0.66	0.76	N/A
용매 매질	DMSO	DMSO	DMSO	수성	수성	DMSO	DMSO
활성화된 폴리사카라이드 DO	11.4	5.8	9.7	4.8	8.8	5	12
활성화된 폴리사카라이드 MW	196 KDa	218 KDa	235 KDa	435 KDa	270 KDa	431 KDa	460 KDa
수율(%)	87.2	64	63.7	96.2	78.8	24.2	26.2
사카라이드 단백질 비	0.68	0.65	0.71	1.22	1.29	0.9	1.5
유리 사카라이드(%)	<5	<5	6.1	18.1	14.2	8.8	18
접합체 MW, SEC-MALLS(kDa)	6190	7090	7937	1766	1029	6293	4466
0-아세틸화, 접합체(µmol 아세테이트/µmol 폴리)	0.68	0.7	0.68	0.61	0.44	0.85	N/A

<0.3 K _d (%), SEC	N/A	73	N/A	N/A	62	N/A	N/A
접합도(AAA); 변형된 Lys	3.7	3.9	4.1	N/A	3.4	N/A	N/A
접합체 중 유지된 O-아세틸%	99%	100%	99.5%	60%	67%	100%	N/A
N/A = 입수할 수 없음							

[1020] 유리 폴리스카라이드의 비율을 단백질에 결합하는 수산화 알루미늄 젤 및 원심분리에 의한 제거를 위한 공유 결합된 사카라이드를 사용하는 과정에 의해 측정한다. 샘플을 포스페이트 완충된 수산화 알루미늄 젤과 혼합하고 원심분리시킨다. 결합된 사카라이드를 상기 젤과 함께 펠릿화하고 유리 사카라이드가 상등액 중에 남아있다. 생성되는 상등액 및 대조용 샘플을 적합한 비색측정 분석에 의해 정량분석하여 유리 사카라이드의 비율을 측정하고 단백질의 충분한 제거 및 사카라이드의 회수를 확인한다. 상기 아미노산 분석을 위해서 상기 폴리스카라이드-단백질 샘플을 먼저 진공 및 가열하여(160 °C 15분) 6N 염산(HCl) 가수분해를 사용하여 유리 아미노산으로서 그의 개별적인 성분으로 가수분해시킨다. 가수분해 후에, 상기 샘플을 아미노산 분석기를 사용하여 분석한다. 개별적인 아미노산을 온도 및 유량을 변화시키면서 나트륨 시트레이트 완충제의 단계적 구배를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피를 통해 분리시킨다. 분리 후에, 각 아미노산 잔기의 양을 포스트컬럼 닐하이드린 커플링 검출 시스템을 사용하여 정량적으로 측정한다. 상기 시스템에서, 상기 닐하이드린을 상기 포스트컬럼 반응기 시스템의 컬럼 용리물과 혼합하고 상기 혼합물을 광도계에 통과시킨다. 닐하이드린과 용리된 아미노산과의 반응은 보라색 화합물을 생성시키며 상기 화합물은 570 nm에서 최대로 흡수한다. 상기 흡광도는 존재하는 α-아미노기의 양의 1차 반응(함수)이며 상기 반응은 α-아미노기를 갖는 모든 유기 화합물에 대한 정량적인 비색측정 분석을 제공한다. 유리 아미노기를 갖지 않는 프롤린 및 하이드록시프롤린과 같은 이미노산과의 반응에서, 밝은 황색 화합물이 생성되며 440 nm에서 모니터된다. 각 아미노산에 대한 피크 면적을 570 nm 및 440 nm 파장 출력을 모두 사용하여 계산한다. 상기 수율은 하기와 같이 계산된다: (접합체 중의 폴리스카라이드의 양 x 100)/활성화된 폴리스카라이드의 양.

[1021] 수성 매질을 사용하여 생성된 접합체(4 및 5)는 O-아세틸 수준의 현저한 손실을 나타내었다. MW 크기분류 없이 고유 폴리스카라이드를 사용하여, DMSO 용매 중에서 생성시킨 접합체(6 및 7)는 O-아세틸 수준의 손실을 나타내지 않았다. 그러나, 상기 접합체 수율은 불량한 여과성 특성에 더하여 매우 불충분하였다. 고압 균질화에 의해 크기 분류된 폴리스카라이드를 사용하여 DMSO 중에서 생성시킨 접합체(1, 2 및 3)는 O-아세틸 수준의 현저한 보존과 함께 높은 수율 및 보다 양호한 여과성 특성을 가졌다. 이들 접합체는 또한 매우 낮은 수준의 유리 폴리스카라이드를 가졌다.

[1022] **실시예 12. Pn-혈청형 15B-CRM₁₉₇ 접합체를 사용하는 옥소닌 개시된 식작용 활성(OPA) 분석**

[1023] 본 발명의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 접합체의 면역원성을 하기에 개시된 OPA 분석을 사용하여 평가할 수 있다.

[1024] 30마리의 6 내지 7주된 암컷 스위스 웹스터 마우스 그룹을 0주째에 피하 경로를 통해 0.001 μg, 0.01 μg 또는 0.1 μg의 시험 접합체로 면역시켰다. 상기 마우스를 동일한 용량의 접합체로 3주째에 추가 면역시키고 이어서 4주째에 채혈하였다. 혈청형-특이성 OPA를 4주 혈청 샘플에서 수행하였다.

[1025] OPA를 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B에 특이적인 쥐 혈청 중 기능성 항체를 측정한다. 시험 혈청을, 세균을 옥소닌화하고, 보체 침착을 촉발하여 식작용을 촉진하고 식세포에 의해 세균을 살해하는 캡슐 폴리스카라이드 특이성 면역글로불린의 능력을 측정하는 분석 반응에 제공한다. OPA 역가는 시험 혈청 없는 대조용에 비해 세균수의 50% 감소를 생성시키는 상호 희석으로서 정의된다. OPA 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 희석물로부터 보간한다.

[1026] OPA 과정은 하기의 변형과 함께 문헌[Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295]에 개시된 방법에 기초하였다. 시험 혈청을 2.5배 연속 희석하고 미세적정 분석 플레이트에 가하였다. 생 혈청형 15B 표적 세균을 상기 웰에 가하고 플레이트를 37 °C에서 30분 동안 진탕하였다. 분화된 HL-60 세포(식세포) 및 아기 토끼 혈청(3- 내지 4-주 된 것, PEL-프리즈(등록상표), 6.25% 최종 농도)을 상기 웰에 가하고, 상기 플레이트를 37 °C에서 45분 동안 진탕시켰다. 반응을 종료시키기 위해서, 80 μl의 0.9% NaCl을 모든 웰에 가하고, 혼합하고 10 μl의 분액을 200 μl의 물을 함유하는 멀티스크린(등록상표) HTS HV 필터 플레이트(밀리포어(등록상표))의 웰로 옮겼다. 액체를 진공하에서 상기 플레이트를 통해 여과하고, 150 μl의 HYSOY(등록상표) 배지를 각 웰에

가하고 여과하였다. 이어서 상기 필터 플레이트를 37 °C, 5% CO₂에서 밤새 배양하고 이어서 테스테인 용액(바 이오 레드 레보라토리즈 인코포레이티드, 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재)으로 고정시켰다. 이어서 상기 플 레이트를 쿠마쎬 블루로 염색하고 1회 탈색하였다. 콜로니를 영상화하고 셀룰라 테크놀로지 리미티드(CTL)(세 이커 하이츠, 미국 오하이오주 소재) 임뮤노스팟(등록상표) 분석기상에서 세었다. 원 콜로니수를 사용하여 살 해 곡선을 플롯팅하고 OPA 역가를 계산하였다.

[1027] 상기 접합체 1 및 2의 면역원성을 상기 언급한 분석에 따라 시험하였다. 하나의 추가적인 접합체 및 접합되지 않은 고유의 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드(접합되지 않은 PS)를 또한 동일한 분 석에서 시험하였다:

[1028] 접합체 9를 수용액 중에서 환원적 아민화에 의해 고유의(즉 크기 분류되지 않은) 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이 드의 CRM₁₉₇에의 접합에 의해 제조하였다. 결과를 표 15에 나타낸다.

표 15

[1029] 혈청형 15B-CRM₁₉₇ 접합체를 사용하는 동물 시험의 OPA 역가

	OPA GMT (95% CI)		
	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
접합체 1	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
접합체 2	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
접합체 9	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
접합되지 않은 PS	-	-	698 (466, 1045)

[1030] 상기 표 15에 나타낸 바와 같이, 접합체 1 및 2는 마우스에게 투여시 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B를 옅소닌화하고, 보체 침착을 촉발하여 식작용을 촉진하고 식세포에 의해 세균을 살해할 수 있는 항체를 생성시켰 다. 또한, 이들 접합체는 보다 낮은 분자량에도 불구하고, 크기분류되지 않은 접합체 9에 비해 유사한 수준의 면역원성을 나타내었다.

[1031] 실시예 13. 혈청형 22F 폴리사카라이드 - CRM₁₉₇ 접합체의 제조

[1032] 단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F 폴리사카라이드의 제조

[1033] 상기 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F를 시드 병에서 증식시키고 이어서 시드 배양기로 옮겼다. 일단 표 적화된 광학 밀도에 도달했으면, 세포를 생산 발효기로 옮겼다. 발효 브로쓰를 N-라우로일 사르코신의 첨가에 의해 불활성화시키고 한외여과 및 투석여과에 의해 정제하였다.

[1034] 상기 정제된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F 폴리사카라이드를 판다 2K(등록상표) 균질화기(GEA 니로 소 아비, 파르마, 이탈리아 소재)를 사용하여 고압 균질화에 의해 크기 분류하여 단리된 스트렙토코커스 뉴모니아 에 혈청형 22F 폴리사카라이드를 생성시켰다.

[1035] 단리된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F 캡슐 폴리사카라이드의 산화

[1036] 계산된 양의 500 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 5.8) 및 WFI를 연속 첨가하여 2.0 g/L의 최종 폴리사카라이드 농도를 제공함으로써 100 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 5.8) 중에서 폴리사카라이드 산화를 수행하였다. 필요 한 경우 반응 pH를 약 5.8로 조절하였다. pH 조절 후에, 반응 온도를 5 °C로 낮추었다. 산화를 0.10 몰 당량 (MEq)의 나트륨 퍼요오데이트의 첨가에 의해 개시시켰다. 표적 산화 반응 시간은 5 °C에서 16시간이다.

[1037] 상기 산화 반응을 연속 교반하에 5 °C에서 1 내지 2시간 동안 2 MEq의 2,3-부탄다이올로 급냉시켰다.

[1038] 상기 활성화된 폴리사카라이드의 농축 및 투석여과를 100K MWCO 한외여과 카세트를 사용하여 수행하였다. 투석 여과를 35배 투석부피의 WFI에 대해 수행하였다. 상기 정제된 활성화된 폴리사카라이드를 5 °C에서 보관하였다. 상기 정제된 활성화된 사카라이드를 특히 (i) SEC-MALLS에 의한 분자량, (ii) 0-아세틸의 존재 및 (iii) 산화도에 의해 특성화한다.

[1039] SEC-MALLS를 폴리사카라이드 및 폴리사카라이드-단백질 접합체의 분자량의 측정에 사용한다. SEC를 사용하여 상기 폴리사카라이드를 유체역학적 부피에 의해 분리시킨다. 굴절률(RI) 및 다각도 레이저 광산란(MALLS) 검출

기를 상기 분자량의 측정에 사용한다. 빛이 물질과 상호작용하는 경우, 상기 빛은 산란하며 산란된 빛의 양은 상기 물질의 농도, dn/dc (비 굴절률 증분)의 제곱, 및 물 질량과 관련된다. 상기 분자량 측정은 상기 MALLS 검출기로부터의 산란된 광신호 및 상기 RI 검출기로부터의 농도 신호로부터의 판독을 근거로 계산된다.

[1040] 상기 활성화된 폴리사카라이드의 산화도(DO = 당 반복 단위의 물/알데하이드의 물)를 하기와 같이 측정하였다:

[1041] 당 반복 단위의 물을 다양한 비색측정 방법에 의해, 예를 들어 안트론 방법을 사용하여 측정한다. 상기 폴리사카라이드를 먼저 황산 및 열의 작용에 의해 모노사카라이드로 절단한다. 상기 안트론 시약은 헥소스와 반응하여, 625 nm에서 분광광도측정에 의해 판독되는 흡광도를 갖는 황녹색 복합체를 형성시킨다. 상기 분석 범위내에서, 상기 흡광도는 존재하는 헥소스의 양에 직접 비례한다.

[1042] 상기 알데하이드의 물을 또한 동시에, MBTH 비색측정 방법을 사용하여 측정한다. 상기 MBTH 분석은 알데하이드기(주어진 샘플로부터)를 3-메틸-2-벤조티아졸론 하이드라존(MBTH 분석 시약)과 반응시킴에 의한 아진 화합물의 형성을 수반한다. 과잉의 3-메틸-2-벤조티아졸론 하이드라존은 산화하여 반응성 양이온을 형성시킨다. 상기 반응성 양이온과 아진은 반응하여 청색 발색단을 형성한다. 이어서 상기 형성된 발색단은 650 nm에서 분광학적으로 판독된다.

[1043] 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F 폴리사카라이드와 CRM₁₉₇과의 접합

[1044] 접합 과정은 하기의 단계들이었다:

[1045] a. 슈크로스 부형제와의 배합, 및 동결건조;

[1046] b. 상기 동결건조된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇의 제조성;

[1047] c. 활성화된 폴리사카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합 및 캡핑; 및

[1048] d. 상기 접합체의 정제.

[1049] a. 슈크로스와의 배합, 및 동결건조

[1050] 상기 활성화된 폴리사카라이드를 슈크로스(WFI 중 50% w/v)와, 활성화된 폴리사카라이드 그램당 25 g의 슈크로스의 비로 배합하였다. 이어서 배합된 혼합물의 병을 동결건조시켰다. 동결건조에 이어서, 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 함유하는 병을 -20 °C에서 보관하였다. 계산된 양의 CRM₁₉₇ 단백질(표적 S/P 투입 비 = 1)을 별도로 셀-동결시키고 동결건조시켰다. 동결건조된 CRM₁₉₇을 -20 °C에서 보관하였다.

[1051] b. 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇ 단백질의 제조성

[1052] 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 무수 다이메틸 설펍사이드(DMSO) 중에서 제조성하였다. 폴리사카라이드의 용해 완료시, 동일한 양의 무수 DMSO를 제조성을 위해 동결건조된 CRM₁₉₇에 가하였다.

[1053] c. 활성화된 폴리사카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합 및 캡핑

[1054] 반응 용기 중에서 제조성된 활성화된 폴리사카라이드를 제조성된 CRM₁₉₇(DMSO 중의)과 배합하였다. 반응 용액 중의 최종 폴리사카라이드 농도는 약 1 g/L이다. 접합을, 1.5 MEq의 나트륨 시아노보로하이드라이드를 반응 혼합물에 가함으로써 개시시키고 반응물을 23 °C에서 20시간 동안 배양하였다. 접합 반응의 종료는 2 MEq의 나트륨 보로하이드라이드를 첨가하여 수행된다. 상기 캡핑 반응물을 23 °C에서 3시간 동안 배양하였다.

[1055] d. 접합체의 정제

[1056] 상기 접합체 용액을 100K MWCO 멤브레인을 사용하는 접선류 여과에 의한 정제를 위해 제조 중에 냉각된 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)로 1:5 희석하고 매질로서 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수(pH 6.0)를 사용하여 20X 투석여과를 수행하였다. 상기 투석여과의 완료 후에, 상기 접합체 투석잔사를 추가로 희석하고, 0.22 µm 필터를 통해 여과하고, 2 내지 8 °C에서 보관하였다.

[1057] 상이한 매개변수들(예를 들어, 사카라이드-단백질 투입 비, 반응 농도 및 나트륨 시아노보로하이드라이드의 MEq)를 변화시킴으로써 상술한 과정을 사용하여 다수의 접합체를 수득하였다. CRM₁₉₇에의 전형적인 Pn-22F 당접합체에 대한 특성화를 표 16에 제공한다.

표 16

[1058]

폐렴구균 혈청형 22F-CRM ₁₉₇ 접합체										
배치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
산화도 (D.O)	12.6	19.5	17.2	14.0	12.4	14.9	11.1	14.6	14.4	13.7
MALLS에 의한 활성화된 사카라이드 MW (kDa)	540	697	864	92	866	631	614	639	709	416
접합체 결과										
사카라이드/단백질 비	0.75	0.87	2	0.8	0.8	0.4	1.9	0.8	0.65	1.0
O-Ac (%)	105	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
유리 사카라이드%	<5	2	15.5	35	<5	<5	33	<5	<5	8
SEC-MALLS에 의한 MW (kDa)	2787	1668	2194	1419	5039	10450	1577	3911	3734	4453
N/A = 입수할 수 없음										

[1059]

최종 접합체 중의 O-아세틸(보존된) 수준을 상기 폴리사카라이드의 O-아세틸 함량(혈청형 22F 사카라이드 반복 단위의 μmol 당 O-아세틸의 μmol)에 대한 상기 접합체의 O-아세틸 함량(혈청형 22F 사카라이드 반복 단위의 μmol 당 O-아세틸의 μmol)의 비로부터 계산하였다. 상기 수득된 접합체의 면역원성을 하기에 개시된 옥소닌 개시된 식작용 분석(OPA)을 사용하여 평가하였다. 30마리의 6 내지 7주된 암컷 스위스 웹스터 마우스 그룹을 0주째에 피하 경로를 통해 0.001 μg , 0.005 μg 또는 0.01 μg 의 시험 접합체로 면역시켰다. 상기 마우스를 동일한 용량의 접합체로 3주째에 추가 면역시키고 이어서 4주째에 채혈하였다. 혈청형-특이성 OPA를 4주 혈청 샘플에서 수행하였다.

[1060]

옥소닌 개시된 식작용 활성(OPA)을 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 22F에 특이적인 쥐 혈청 중 기능성 항체를 측정한다. 시험 혈청을, 세균을 옥소닌화하고, 보체 침착을 촉발하여 식작용을 촉진하고 식세포에 의해 세균을 살해하는 캡슐 폴리사카라이드 특이성 면역글로불린의 능력을 측정하는 분석 반응에 제공한다. OPA 역가는 시험 혈청 없는 대조용에 비해 세균수의 50% 감소를 생성시키는 상호 희석으로서 정의된다. OPA 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 희석물로부터 보간한다.

[1061]

OPA 과정은 하기의 변형과 함께 문헌[Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295]에 개시된 방법에 기초하였다. 시험 혈청을 2.5배 연속 희석하고 미세적정 분석 플레이트에 가하였다. 생 혈청형 22F 표적 세균 균주를 상기 웰에 가하고 플레이트를 25 °C에서 30분 동안 진탕하였다. 분화된 HL-60 세포(식세포) 및 아기 토끼 혈청(3- 내지 4-주 된 것, PEL-프리즈(등록상표), 12.5% 최종 농도)을 상기 웰에 가하고, 상기 플레이트를 37 °C에서 45분 동안 진탕시켰다. 반응을 종료시키기 위해서, 80 μl 의 0.9% NaCl을 모든 웰에 가하고, 혼합하고 10 μl 의 분액을 200 μl 의 물을 함유하는 멀티스크린(등록상표) HTS HV 필터 플레이트(밀리포어(등록상표))의 웰로 옮겼다. 액체를 진공하에서 상기 플레이트를 통해 여과하고, 150 μl 의 HYSOY(등록상표) 배지를 각 웰에 가하고 여과하였다. 이어서 상기 필터 플레이트를 37 °C, 5% CO₂에서 밤새 배양하고 이어서 테스테인 용액(바이오 래드 레보라토리즈 인코포레이티드, 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재)으로 고정시켰다. 이어서 상기 플레이트를 쿠마쎄 블루로 염색하고 1회 탈색하였다. 콜로니를 영상화하고 셀룰라 테크놀로지 리미티드(CTL)(세이커 하이즈, 미국 오하이오주 소재) 임뮤노스팟(등록상표) 분석기상에서 세었다. 원 콜로니수를 사용하여 살해 곡선을 플롯팅하고 OPA 역가를 계산하였다.

[1062]

혈청형 22F-CRM₁₉₇ 접합체에 대한 옥소닌 개시된 식작용 활성(OPA) 역가를 상기 언급한 바와 같이 측정하였다. 상이한 용량들에서 4주째의 OPA 역가(95% 신뢰도 구간(CI)을 갖는 기하 평균 역가(GMT))를 표 17 및 18(2개의 별도의 실험)에 나타내며, 이들 표는 혈청형 22F 접합체(배치 1 내지 7; 또한 이들 접합체의 특성화 데이터에 대해서 표 16을 참조하십시오)가 쥐 면역원성 모델에서 OPA 역가를 유도하였음을 나타낸다.

표 17

[1063]

혈청형 22F-CRM ₁₉₇ 접합체의 면역원성	
	OPA GMT (95% CI)

샘플 번호	0.001 μg	0.005 μg	0.01 μg
1	86 (45, 165)	597 (285, 1252)	2519 (1409, 4504)
2	98 (51, 191)	782 (410, 1492)	2236 (1319, 3790)
3	35 (18, 69)	250 (122, 512)	509 (273, 950)

표 18

[1064]

혈청형 22F-CRM ₁₉₇ 접합체의 면역원성		
	OPA GMT (95% CI)	
샘플 번호	0.001 μg	0.01 μg
4	37 (18, 76)	3383 (1911, 5987)
5	45 (20, 103)	1773 (1072, 2931)
6	235 (108, 513)	4335 (3018, 6226)
7	10 (7, 13)	252 (138, 457)

[1065]

실시예 14. CRM₁₉₇에 대한 Pn-11A 접합체의 제조

[1066]

Pn-11A RAC 당접합체의 제조

[1067]

탈이온수 또는 25 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.0) 중에 보관된 동결된 크기분류된 폴리스카라이드를 5 °C에서 해동시켰다.

[1068]

폴리스카라이드의 산화

[1069]

폴리스카라이드 산화를 500 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.0) 및 WFI의 첨가에 의해 100 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.0) 중에서 수행하여 2.0 g/L의 최종 폴리스카라이드 농도를 제공하였다. 산화 반응을 23 °C에서 수행하였다. 산화를 나트륨 퍼요오데이트의 첨가에 의해 개시시켰다. 교반 속도는 100 내지 140 rpm의 범위이다.

[1070]

활성화된 11A 폴리스카라이드의 정제

[1071]

상기 활성화된 폴리스카라이드의 농축 및 투석여과를 한외여과 카세트를 사용하여 수행하였다. 투석여과를 20 배 투석부피의 WFI에 대해 수행하였다. 0.22 μm 여과 후에, 상기 정제된 활성화된 폴리스카라이드를 5 °C에서 보관하였다.

[1072]

접합 과정 설명

[1073]

상기 접합 과정은 하기의 단계들로 이루어졌다:

[1074]

a. CRM₁₉₇ 단백질의 셀 동결 및 동결건조;

[1075]

b. 상기 활성화된 폴리스카라이드 및 CRM₁₉₇의 제조성;

[1076]

c. 활성화된 폴리스카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합; 및

[1077]

d. 상기 접합체의 정제 및 회석.

[1078]

a. CRM₁₉₇ 단백질의 셀 동결 및 동결건조

[1079]

CRM₁₉₇ 단백질을 셀 동결시키고 동결건조시켰다.

[1080]

b. 활성화된 폴리스카라이드 및 CRM₁₉₇ 단백질의 제조성

[1081]

활성화된 폴리스카라이드 용액(약 10 g/L)을 반응기에 충전한 다음 계산된 양의 0.5N 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.2)를 가하였다. 교반 하에서, 동결건조된 CRM₁₉₇을 가하고 반응 혼합물을 CRM₁₉₇의 완전한 용해에 도달하기 위해서 2 내지 4시간 동안 교반하였다.

- [1082] c. 접합 및 캡핑
- [1083] 시아노보로하이드라이드를 가하여 접합을 개시시켰다. 상기 반응 혼합물을 23 °C에서 72 내지 96시간 동안 배양하였다. 접합 반응의 종료를, 0.5X WFI에 이어서 2 MEq의 나트륨 보로하이드라이드를 가하여 수행하였다. 상기 캡핑 반응을 23 °C에서 3 내지 4시간 동안 유지시켰다.
- [1084] d. 접합체의 회석 및 초기 정제
- [1085] 상기 접합체 용액을 접선투 여과(TFF)에 의한 정제를 위해 제조 중에 0.15N 나트륨 포스페이트 완충제(pH 8.0)로 1:5(반응 부피) 희석하였다. 희석된 접합체를 회석 용기에서 혼합하고 이어서 5 µm 필터에 통과시켰다. 이어서 상기 여과된 접합체 용액을 1 내지 2 g/L로 농축시켰다. 2-단계 투석여과 과정을 수행하였다. 첫 번째 단계에서, TFF를 30X(투석여과 부피)의 0.15N 나트륨 포스페이트 완충제(pH 8.0)에 이어서 20X의 5 mM 숙시네이트-0.9% NaCl(pH 6.0)을 사용하여 수행하였다. 초기 투석여과의 완료 후에, 상기 접합체 투석잔사를 0.45 µm 필터를 통해 수집 탱크로 옮겼다.
- [1086] 접합체의 최종 투석여과
- [1087] 최종 정제 단계는 재생 셀룰로스 멤브레인을 사용하는 5 mM 숙시네이트-0.9% NaCl, pH 6.0 매질에 의한 20X 투석여과였다.
- [1088] 1가 벌크 접합체(MBC)의 회석
- [1089] 상기 접합체를 5 mM 숙시네이트/0.9% NaCl(pH 6)로 0.5 mg/mL의 표적 사카라이드 농도로 추가 희석하였다. 최종 0.22 µm 여과 단계를 완료하여 제형화를 위한 1가 벌크 접합체(MBC) 생성물을 제조하였다.
- [1090] 상이한 매개변수들(예를 들어, 사카라이드-단백질 투입 비, 반응 농도 및 나트륨 시아노보로하이드라이드의 Meq)를 변화시킴으로써 상술한 과정을 사용하여 다수의 접합체를 수득하였다. CRM₁₉₇에의 전형적인 Pn-11A 당접합체에 대한 특성화를 표 19(배치 1 내지 5)에 제공한다.
- [1091] RAC/DMSO를 사용하는 Pn-11A 당접합체의 제조
- [1092] 산화된 폴리사카라이드를 상술한 바와 같이 제조하고 정제하였다(Pn-11A RAC 당접합체의 제조를 참조하시오).
- [1093] DMSO 중에서 환원적 아민화를 통한 접합(RAC/DMSO)
- [1094] RAC/DMSO를 통한 11A의 접합은 하기의 단계들로 이루어졌다:
- [1095] a. 슈크로스와의 배합, 셀 동결 및 동결건조;
- [1096] b. 상기 동결건조된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇의 재조성;
- [1097] c. 활성화된 폴리사카라이드의 CRM₁₉₇에의 접합; 및
- [1098] d. 상기 접합체의 정제 및 회석.
- [1099] a. 슈크로스와의 배합, 셀 동결 및 동결건조
- [1100] 크기 분류된 폴리사카라이드로부터 제조된 활성화된 폴리사카라이드를 슈크로스(WFI 중 50% w/v)와, 활성화된 폴리사카라이드 그램당 25 g의 슈크로스의 비로 배합하였다. 상기 성분들을 혼합하고, 이어서 배합된 혼합물의 셀-동결된 병을 동결건조시켰다. CRM₁₉₇ 단백질을 별도로 셀-동결시키고 동결건조시켰다.
- [1101] b. 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇ 단백질의 재조성
- [1102] 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 DMSO 중에서 2 mg/mL 농도로 재조성하였다. 폴리사카라이드의 용해 완료시, DMSO를 재조성을 위해 동결건조된 CRM₁₉₇에 가하였다.
- [1103] c. 접합 및 캡핑
- [1104] 접합 반응 용기 중에서 제조성된 활성화된 폴리사카라이드를 제조성된 CRM₁₉₇(DMSO 중의)과 배합하였다. 반응 용액 중의 최종 폴리사카라이드 농도는 약 1 g/L이다. 접합을, 시아노보로하이드라이드를 상기 반응 혼합물에 가함으로써 개시시키고 23 °C에서 22시간 동안 배양하였다. 접합 반응의 종료는 2 MEq의 나트륨 보로하이드라

이드를 첨가하여 수행된다. 상기 캡핑 반응을 23 °C에서 3 내지 4시간 동안 속행하였다.

[1105] d. 접합체의 정제 및 회석

[1106] 상기 접합체 용액을 상술한 바와 유사한 과정을 사용하여 정제하고 회석하였다.

[1107] 상이한 매개변수들(예를 들어, 사카라이드-단백질 투입 비, 반응 농도 및 나트륨 시아노보로하이드라이드의 Meq)를 변화시킴으로써 상술한 과정을 사용하여 다수의 접합체를 수득하였다. CRM₁₉₇에의 전형적인 Pn-11A 당접합체에 대한 특성화를 표 19(배치 6 내지 8)에 제공한다.

표 19

[1108]

폐렴구균 혈청형 11A-CRM ₁₉₇ 접합체								
배치	1	2	3	4	5	6	7	8
MALLS에 의한 활성화된 사카라이드 MW (kDa)	207	129	103	199	183	232	113	113
접합체 결과								
사카라이드/단백질 비	1.24	1.09	1.32	1.47	1.31	1	0.78	0.68
아세테이트(mol/mol PS)	2.72	2.89	2.72	3.2	3.13	N/A	N/A	N/A
글리세롤 (mol/mol PS)*	0.62	0.68	0.75	0.51	0.41	N/A	N/A	N/A
SEC-MALLS에 의한 MW (kDa)	3224	837	623	827	994	12200	6543	15730
N/A = 입수할 수 없음								
*글리세롤을 하이드로플루오르산(HF)에 의해 폴리사카라이드로부터 유리시킨 후에 펄스화된 전류측정검출과 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC-PAD)에 의해 정량분석하였다.								

[1109] 상기 환원적 아민화 과정에 의해 제조된 접합체로부터 생성된 전체 데이터는 상기 방법이 양호한 접합 수율, 낮은 유리 사카라이드% 및 양호한 안정성을 갖는 접합체를 제조할 수 있게 함을 입증하였다. 상기 수득된 접합체의 면역원성을 하기에 개시되는 읍소닌 개시된 식작용 분석(OPA)을 사용하여 평가하였다. 30마리의 6 내지 7주된 암컷 스위스 웹스터 마우스 그룹을 0주째에 피하 경로를 통해 0.001 µg, 0.005 µg, 0.01 µg 및 0.1 µg의 시험 접합체로 면역시켰다. 상기 마우스를 동일한 용량의 접합체로 3주째에 추가 면역시키고 이어서 4주째에 채혈하였다. 혈청형-특이성 OPA를 4주 혈청 샘플에서 수행하였다.

[1110] 읍소닌 개시된 식작용 활성(OPA)을 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 11A에 특이적인 쥐 혈청 중 기능성 항체를 측정한다. 시험 혈청을, 세균을 읍소닌화하고, 보체 침착을 촉발하여 식작용을 촉진하고 식세포에 의해 세균을 살해하는 캡슐 폴리사카라이드 특이성 면역글로불린의 능력을 측정하는 분석 반응에 제공한다. OPA 역가는 시험 혈청 없는 대조용에 비해 세균수의 50% 감소를 생성시키는 상호 회석으로서 정의된다. OPA 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 회석물로부터 보간한다.

[1111] OPA 과정은 하기의 변형과 함께 문헌[Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295]에 개시된 방법에 기초하였다. 시험 혈청을 2.5배 연속 회석하고 미세적정 분석 플레이트에 가하였다. 생 혈청형 22F 표적 세균 균주를 상기 웰에 가하고 플레이트를 25 °C에서 30분 동안 진탕하였다. 분화된 HL-60 세포(식세포) 및 아기 토끼 혈청(3- 내지 4-주 된 것, PEL-프리즈(등록상표), 12.5% 최종 농도)을 상기 웰에 가하고, 상기 플레이트를 37 °C에서 60분 동안 진탕시켰다. 반응을 종료시키기 위해서, 80 µl의 0.9% NaCl을 모든 웰에 가하고, 혼합하고 10 µl의 분액을 200 µl의 물을 함유하는 멀티스크린(등록상표) HTS HV 필터 플레이트(밀리포어(등록상표))의 웰로 옮겼다. 액체를 진공하에서 상기 플레이트를 통해 여과하고, 150 µl의 HYSOY(등록상표) 배지를 각 웰에 가하고 여과하였다. 이어서 필터 플레이트를 37 °C, 5% CO₂에서 밤새 배양하고 이어서 테스트인 용액(바이오 래드 레보라토리즈 인코포레이티드, 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재)으로 고정시켰다. 이어서 상기 플레이트를 쿠마쎄 블루로 염색하고 1회 탈색하였다. 콜로니를 영상화하고 셀룰라 테크놀로지 리미티드(CTL)(셰이커 하이츠, 미국 오하이오주 소재) 임뮤노스팟(등록상표) 분석기상에서 세었다. 원 콜로니수를 사용하여 살해 곡선을 플롯팅하고 OPA 역가를 계산하였다.

[1112] 혈청형 11A-CRM₁₉₇ 접합체에 대한 읍소닌 개시된 식작용 활성(OPA) 역가를 상기 언급한 바와 같이 측정하였다. 상이한 용량들에서 4주째의 OPA 역가(95% 신뢰도 구간(CI)을 갖는 기하 평균 역가(GMT))를 표 20에 나타내며,

상기 표는 혈청형 11A 접합체(배치 2 내지 4 및 8; 또한 이들 접합체의 특성화 데이터에 대해서 표 19를 참조하시오)가 쥐 면역원성 모델에서 OPA 역가를 유도하였음을 나타낸다.

표 20

혈청형 11A-CRM ₁₉₇ 접합체의 면역원성			
	OPA GMT (95% CI)		
배치 번호	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
2	326 (260, 408)	1391 (794, 2437)	4366 (3063, 6223)
3	389 (316, 478)	1113 (690, 1795)	5527 (3698, 8260)
4	192 (149, 248)	926 (661, 1298)	2800 (1975, 3970)
8	303 (224, 411)	1099 (624, 1935)	3861 (2629, 5669)

실시예 15. 16-가 폐렴구균 접합체 백신의 제형

CRM₁₉₇에 전부 개별적으로 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체를 포함하는 16-가 접합체 조성물(16vPnC)을 제형화하였다. 혈청형 15B, 22F 및 33F로부터의 스트렙토코커스 뉴모니아에로부터의 당접합체를 상기 개시된 바와 같이 생성시키고 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 스트렙토코커스 뉴모니아에 당접합체를 WO 2006/110381에 개시된 바와 같이 생성시켰다.

필요한 부피의 벌크 농축물을 배치 부피 및 벌크 사카라이드 농도를 기준으로 계산하였다. 상기 제형화된 벌크 백신을, 숙시네이트 0.5 mM 및 150 mM NaCl의 최종 표적 완충제 농도를 획득하기 위해 필요한 부피의 NaCl/숙시네이트 완충제(pH 5.8)를 가함으로써 제조하였다. 폴리솔베이트 80을 0.02%의 최종 농도로 가하고 상기 16 폐렴구균 접합체를 가하였다. 상기 제제를 0.2 μ m 밀리포어 PES 멤브레인을 통해 여과한 다음 AlPO₄를 가하였다. 상기 제형을 혼합하여 결합을 허용하고 균질성을 성취하였다.

이어서, 상기 제형을 유리 주사기에 0.5 mL의 용량 부피를 전달하도록 충전하였다.

상기 최종 투여형은 CRM₁₉₇에 개별적으로 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체 2.2 μ g, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체 4.4 μ g, 5 mM 숙시네이트 완충제 pH 5.8, 0.02 PS80, 150 mM NaCl 및 0.5 mL의 용량을 위한 AlPO₄로서 알루미늄 0.25 mg/mL이었다. CRM₁₉₇ 함량은 0.5 mL의 용량에 대해서 약 38 μ g이었다.

실시예 16. 20-가 폐렴구균 접합체 백신의 제형

CRM₁₉₇에 전부 개별적으로 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 당접합체를 포함하는 20가 접합체 조성물(20vPnC)을 제형화하였다.

혈청형 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F 및 33F로부터의 스트렙토코커스 뉴모니아에로부터의 당접합체를 상기 개시된 바와 같이 생성시키고 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 스트렙토코커스 뉴모니아에 당접합체를 WO 2006/110381에 개시된 바와 같이 생성시켰다.

필요한 부피의 벌크 농축물을 배치 부피 및 벌크 사카라이드 농도를 기준으로 계산하였다. 상기 제형화된 벌크 백신을, 숙시네이트 0.5 mM 및 150 mM NaCl의 최종 표적 완충제 농도를 획득하기 위해 필요한 부피의 NaCl/숙시네이트 완충제(pH 5.8)를 가함으로써 제조하였다. 폴리솔베이트 80을 0.02%의 최종 농도로 가하고 상기 20 폐렴구균 접합체를 가하였다. 상기 제제를 0.2 μ m 밀리포어 PES 멤브레인을 통해 여과한 다음 AlPO₄를 가하였다. 상기 제형을 혼합하여 결합을 허용하고 균질성을 성취하였다.

이어서, 상기 제형을 유리 주사기에 0.5 mL의 용량 부피를 전달하도록 충전하였다.

상기 최종 투여형은 CRM₁₉₇에 개별적으로 접합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 각각의 당접합체 2.2 μ g, 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 6B로부터의 당접합체 4.4 μ g, 5 mM 숙시네이트 완충제 pH 5.8, 0.02 PS80, 150 mM NaCl 및

0.5 ml의 용량을 위한 AlPO_4 로서 알루미늄 0.25 mg/ml이었다. CRM₁₉₇ 함량은 0.5 ml의 용량에 대해서 약 46 μg 이었다.

[1125] 실시예 17. 16-가 면역원성 조성물의 면역원성

[1126] 상기 16-가 면역원성 조성물(실시예 15를 참조하십시오)의 면역원성을 복합적인 직접 루미넥스(Luminex) 면역분석(dLIA)을 사용하여 토끼에서 분석하여 혈청 중 혈청형-특이적인 IgG 농도 및 혈청형-특이적인 OPA를 측정하였다.

[1127] 10마리의 2.5 kg 내지 3.5 kg의 암컷 뉴질랜드 백색 토끼 그룹을 제안된 인간 임상 용량(4.4 μg 으로 정해진 혈청형 6B를 제외하고 접합체 2.2 μg ; + AlPO_4 로서 알루미늄 0.1 mg)으로 0주째에 근육내 경로를 통해 면역시켰다. 상기 토끼를 동일한 용량의 접합체 백신으로 2주째에 추가 면역시키고 이어서 4주째에 채혈하였다. 혈청형-특이성 dLIA 및 OPA를 0주 및 4주 혈청 샘플에서 수행하였다.

[1128] 각각의 페렴구균 폴리사카라이드(PnPS)에 특이적인 전체 폴리사카라이드 결합 항체(IgG)를 정량분석하기 위해서, 토끼 혈청을 2개의 직접적인 루미넥스 면역분석(dLIA; 13-플렉스 dLIA, 프레브나르 13(등록상표) 혈청형 및 7-플렉스 dLIA, 추가적인 혈청형)으로 평가하였다. 상기 13-플렉스 분석은 상기 13-가 페렴구균 접합체(PnC) 백신 중에 포함된 13개 혈청형(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 및 23F)에 특이적인 항-PnPS 항체를 측정하고 상기 7-플렉스 분석은 추가의 혈청형(15B, 22F, 33F)에 대한 항-PnPS 항체를 측정한다. 각각의 분석은 PnPS 접합체(PnPS-PLL 접합체: 폴리-L-리신에 접합된 PnPS)에 커플링된 13 또는 7개의 스펙트럼 상이한 자기 미소구의 조합을 함유한다.

[1129] 간단히, 기준 표준, 대조용 및 시험 혈청을 먼저 2개의 Pn 흡수제; CWPS1(C-폴리사카라이드를 함유하는 PnA로부터의 세포벽 폴리사카라이드) 및 CWPS2(무캡슐 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 2로부터의 CWP)로 예비-흡착시켜 비-특이적인 항체가 상기 PnPS 코팅 항원에 결합하는 것을 차단시켰다. 예비흡착에 이어서, 상기 PnPS-커플링된 미소구를 적합하게 희석된 기준 표준 혈청, 대조용 또는 토끼 시험 혈청과 배양하였다. 배양 후에, 각각의 혼합물을 세척하고 R-피코에리쓰린-접합된 염소 항-토끼 IgG 2차 항체를 가하였다. 형광 신호(중간 형광 강도(MFI)로서 나타냄)를 바이오 플렉스(Bio-Plex) 판독기를 사용하여 측정하고 결합된 PnPS-특이성 IgG의 양과 관련시켰다. 시험 혈청에 대한 값을 (단위/ml, U/ml)로서 보고한다.

[1130] 혈청-특이성 OPA를 상술한 바와 같이 수행하였다. 상기 OPA 역가는 혈청이 없는 대조용(배경 CFU로서 정의됨)과 비교시 세균 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 50% 감소시키는 최고 혈청 희석에 반비례한다. 상기 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 희석물로부터 보간한다.

표 21

[1131]

16vPnC 총 IgG 농도 및 OPA 역가								
혈청형	총 IgG (Pn dLIA)				흡수된 개시된 식작용 항체 (OPA)			
	0주 GMC (mg/ml)	4주 GMC (mg/ml)	4주 95% CI (LCI - UCI)	IgG GMC 비 4주: 0주	0주GMT	4주GMT	4주 95% CI (LCI - UCI)	OPA GMT 비 4주: 0주
1	0.08	28	17 - 44	369	4	87	55 - 139	22
3	0.08	88	60 - 128	1062	4	214	151 - 304	54
4	0.08	30	14 - 67	402	4	934	551 - 1583	233
5	0.08	34	18 - 64	449	4	368	232 - 584	87
6A	0.03	46	15 - 142	1835	4	3026	1607 - 5696	756
6B	0.08	89	33 - 241	1182	4	6156	3043 - 12453	1539
7F	0.01	50	31 - 78	3969	6	2917	2013 - 4227	528
9V	0.03	24	15 - 38	881	5	613	426 - 883	112
14	0.08	28	20 - 39	368	19	449	331 - 610	24
18C	0.05	79	45 - 139	1587	4	1847	1003 - 3401	462
19A	0.08	120	71 - 205	1605	4	1410	851 - 2336	352
19F	0.08	156	96 - 255	2083	4	3207	1783 - 5771	802
23F	0.05	33	13 - 84	668	4	997	487 - 2042	249
15B	0.05	54	40 - 71	1073	6	741	514 - 1069	116

22F	0.08	158	95 - 262	2103	5	1078	661 - 1756	211
33F	0.10	11	6 - 20	115	49	1337	829 - 2154	27
약어: GMC, 기하 평균 농도; CI, 신뢰도 구간; LCI, 하위 신뢰도 구간; UCI 상위 신뢰도 구간								

[1132] 결과는 16vPnC에 의한 2개의 면역화에 따른 혈청형-특이성 IgG 및 기능성 OPA 항체 반응의 현저한 증가를 나타내었다(표 21). 혈청 IgG 수준은 기준선보다 2-로그 이상 초과하여 증가하였다. 유사하게, 확고한 기능성 OPA 항체 반응이 OPA GMT에서 최소한 기준선 이상의 22배 증가로 유도되었다. 예비-면역 혈청(0주)은 혈청형 14 및 33F를 제외하고 상기 16v Pn 혈청형 대부분에 대해서 검출할 수 없는 수준의 PnPS-특이성 IgG 및 기능성 OPA 항체를 나타내었다. 낮은 수준의 OPA 역가가 상기 혈청형들에 대해서 존재하였으나, 이러한 기준선 반응은 백신화에 따른 상기 항체 반응에 불리한 영향을 미치지 않았다.

[1133] **실시에 18. 20-가 면역원성 조성물의 면역원성**

[1134] 상기 20-가 면역원성 조성물(실시에 16을 참조하시오)의 면역원성을 복합적인 직접 루미넥스 면역분석(dLIA)을 사용하여 토끼에서 분석하여 혈청 중 혈청형-특이적인 IgG 농도 및 혈청형-특이적인 OPA를 측정하였다.

[1135] 10마리의 2.5 kg 내지 3.5 kg의 암컷 뉴질랜드 백색 토끼 그룹을 제안된 인간 임상 용량(4.4 μ g으로 정해진 혈청형 6B를 제외하고 접합체 2.2 μ g; + AlPO₄로서 알루미늄 0.1 mg)으로 0주째에 근육내 경로를 통해 면역시켰다. 상기 토끼를 동일한 용량의 접합체 백신으로 2주째에 추가 면역시키고 이어서 4주째에 채혈하였다. 혈청형-특이성 dLIA 및 OPA를 0주 및 4주 혈청 샘플에서 수행하였다.

[1136] 각각의 페럼구균 폴리사카라이드(PnPS)에 특이적인 전체 폴리사카라이드 결합 항체(IgG)를 정량분석하기 위해서, 토끼 혈청을 2개의 직접적인 루미넥스 면역분석(dLIA; 13-플렉스 dLIA, 프레브나르 13(등록상표) 혈청형 및 7-플렉스 dLIA, 추가적인 혈청형)으로 평가하였다. 상기 13-플렉스 분석은 상기 13-가 페럼구균 접합체(PnC) 백신 중에 포함된 13개 혈청형(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 및 23F)에 특이적인 항-PnPS 항체를 측정하고 상기 7-플렉스 분석은 추가의 혈청형(15B, 22F, 33F)에 대한 항-PnPS 항체를 측정한다. 각각의 분석은 PnPS 접합체(PnPS-PLL 접합체: 폴리-L-리신에 접합된 PnPS)에 커플링된 13 또는 7개의 스펙트럼 상이한 자기 미소구의 조합을 함유한다.

[1137] 간단히, 기준 표준, 대조용 및 시험 혈청을 먼저 2개의 Pn 흡수제; CWPS1(C-폴리사카라이드를 함유하는 PnA로부터의 세포벽 폴리사카라이드) 및 CWPS2(무캡슐 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 2로부터의 CWP)로 예비-흡착시켜 비-특이적인 항체가 상기 PnPS 코팅 항원에 결합하는 것을 차단시켰다. 예비흡착에 이어서, 상기 PnPS-커플링된 미소구를 적합하게 희석된 기준 표준 혈청, 대조용 또는 토끼 시험 혈청과 배양하였다. 배양 후에, 각각의 혼합물을 세척하고 R-피코에리쓰린-접합된 염소 항-토끼 IgG 2차 항체를 가하였다. 형광 신호(중간 형광강도(MFI)로서 나타냄)를 바이오 플렉스 판독기를 사용하여 측정하고 결합된 PnPS-특이성 IgG의 양과 관련시켰다. 시험 혈청에 대한 값을 (단위/ml, U/ml)로서 보고한다.

[1138] 혈청-특이성 OPA를 상술한 바와 같이 수행하였다. 상기 OPA 역가는 혈청이 없는 대조용(배경 CFU로서 정의됨)과 비교시 세균 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 50% 감소시키는 최고 혈청 희석에 반비례한다. 상기 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 희석물로부터 보간한다.

[1139] 상기 20vPnC로 면역시킨 토끼는 또한 상기 16v 및 20v 제형뿐만 아니라 상기 추가적인 4개의 혈청형(8, 10A, 11A, 및 12F)에 공통인 혈청형들에 대한 총 IgG 및 기능성 OPA 항체 역가의 현저한 증가를 나타내었다(표 22). 상기 20개 혈청형에 걸쳐 혈청 IgG 수준의 2-로그 증가가 2개의 면역화에 따라 유도되었다. 상기 백신으로 유도된 OPA GMT는 기준선의 적어도 27배 이상이었다. 혈청형 14 및 33F에 대한 예비-면역 혈청에서 낮은 수준의 OPA 역가가 20vPnC 백신화에 이어서 유사하게 관찰되었지만, 이는 다시 상기 백신화-후 항체 반응의 확고성을 변경시키지 않았다.

[1140] 상기 16vPnC 및 20vPnC 제형은 페럼구균 폴리사카라이드에 특이적이고 상기 혈청의 기능성 살해와 관련된 확고한 체액 반응을 유도하였다(표 21 및 22 참조). 결론적으로, 실시에 17 및 18에 나타난 연구는 상기 16vPnC 및 20vPnC 제형 모두의 양호한 면역원성을 입증하였다.

표 22

[1141]

20vPnC 총 IgG 농도 및 OPA 역가		
	총 IgG (Pn dLIA)	흡수된 개시된 식작용 항체 (OPA)

혈청형	0주 GMC (mg/ml)	4주 GMC (mg/ml)	4주 95% CI (LCI - UCI)	IgG GMC 비 4주: 0주	0주 GMT	4주 GMT	4주 95% CI (LCI - UCI)	OPA GMT 비 4주: 0주
1	0.08	28	19 - 43	379	4	106	69 - 164	27
3	0.08	116	76 - 176	1542	4	286	193 - 425	72
4	0.08	62	39 - 97	821	4	1477	954 - 2287	369
5	0.08	49	33 - 71	648	4	509	350 - 742	127
6A	0.03	30	14 - 66	1209	4	3682	2743 - 4944	849
6B	0.08	58	36 - 94	775	4	4469	3002 - 6653	1117
7F	0.02	62	39 - 101	3681	6	3226	2226 - 4675	500
9V	0.05	30	19 - 48	644	6	956	634 - 1442	150
14	0.08	34	20 - 60	457	12	506	348 - 736	42
18C	0.05	106	67 - 166	2115	4	1942	1263 - 2986	485
19A	0.08	112	73 - 171	1493	4	1580	1071- 2332	395
19F	0.08	178	119 - 266	2372	4	3392	2085 - 5519	848
23F	0.05	48	23 - 103	960	4	1514	889 - 2577	378
15B	0.05	70	51 - 98	1410	6	1332	949 - 1869	210
22F	0.10	172	118 - 250	1811	5	1304	1000 - 1700	279
33F	0.12	14	10 - 20	120	54	1490	1117 - 1989	28
8	0.13	144	100 - 207	1149	4	1388	988 - 1949	333
10A	0.13	54	31 - 94	433	5	1129	732 - 1741	236
11A	0.13	178	125 - 254	1423	7	10483	6373 - 17241	1434
12F	0.08	31	15 - 63	408	4	828	608 - 1127	191
약어: GMC, 기하 평균 농도; CI, 신뢰도 구간; LCI, 하위 신뢰도 구간; UCI 상위 신뢰도 구간								

실시에 19. 스트렙토코커스 뉴모니아에의 혈청형 9 내에서 교차-반응성 옅소닌 개시된 식작용성 면역 반응의 평가

기능성 항체 및 보체의 존재하에서 식작용 효과기 세포에 의한 스트렙토코커스 뉴모니아에 세포의 살해를 측정하는 폐렴구균 옅소닌 개시된 식작용 분석(OPA)은 폐렴구균 백신의 유효성을 평가하기에 중요한 내용물인 것으로 간주된다.

물질 및 방법

13-가 폐렴구균 접합체 백신(13v PnC)으로 백신화된 성인으로부터의 면역 혈청의 2개의 무작위로 선택된 부분집합들을 혈청형 9V, 9A, 9L 및 9N에 대한 OPA 분석에서 시험하였다. 상기 혈청을 각각 미국 임상 시험 6115A1-004(N=59, 백신화-후) 및 6115A1-3005(N=66, 합치된 백신화-전 및 백신화-후)로부터 수집하였다.

연구 6115A1-3005(ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00546572)는 적어도 연구 등록 5년 전에 1회 용량의 23-가 폐렴구균 폴리사카라이드 백신(23vPS)을 받은 보행가능한 70세 이상의 노인에서 상기 23vPS와 비교된, 프레브나르 13의 안전성, 허용성, 및 면역원성을 평가하는 3기의, 무작위화된, 활성-조절된, 변형된 이중맹검 시험이었다(<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00427895>을 참조하시오; 2014년 3월 31일에 접근되었다).

연구 6115A1-004(ClinicalTrials.gov 식별자: NCT00427895)는 23-가 폐렴구균 폴리사카라이드 백신(23vPS)에 경험이 없는 60세 내지 64세 성인에서 23vPS와 비교된, 13-가 폐렴구균 접합 백신(13vPnC)의 안전성, 허용성, 및 면역원성, 및 23vPS에 경험이 없는 18세 내지 59세 성인에서 13vPnC의 안전성, 허용성 및 면역원성을 평가하는 3기의, 무작위화된, 활성-조절된, 변형된 이중맹검 시험이었다(<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00427895>을 참조하시오; 2014년 3월 31일에 접근되었다).

이들 연구에서 시험된 13-가 폐렴구균 접합 백신(13vPnC)은 디프테리아 교차-반응 물질 197(CRM₁₉₇) 담체 단백질에 개별적으로 접합된 폐렴구균 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 및 23F으로부터의 접합체를 함유하였다.

OPA를 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 9V, 9N, 9A 및/또는 9L에 대한 인간 혈청 중 기능성 항체를 측정한다. 시험 혈청을, 세균을 옅소닌화하고, 보체 침착을 촉발하여 식작용을 촉진하고 식세포에 의해 세균을

살해하는 캡슐 폴리사카라이드 특이성 면역글로불린의 능력을 측정하는 분석 반응에 제공한다. OPA 역가는 시험 혈청 없는 대조용에 비해 세균수의 50% 감소를 생성시키는 상호 희석으로서 정의된다. OPA 역가를 상기 50% 살해 컷오프를 포함하는 2개의 희석물로부터 보간한다.

[1150] OPA 과정은 하기의 변형과 함께 문헌[Hu *et al.* (2005) Clin Diagn Lab Immunol 12 (2):287-295]에 개시된 방법에 기초하였다. 시험 열-불활성화된 혈청을 2.5배 연속 희석하고 분석 플레이트 중에 표적 세균과 함께 가하고 진탕하면서 30분 동안 배양하였다. 이어서 분화된 HL-60 세포(식세포) 및 아기 토끼 혈청(3- 내지 4-주 된 것, PEL-프리즈(등록상표), 알칸사스, 12.5% 최종 농도)을, 200:1의 적합한 효과기 대 표적 비로 상기 웰에 가하고, 37 °C에서 진탕하면서 배양하였다. 반응을 종료시키기 위해서, 80 μ l의 0.9% NaCl을 모든 웰에 가하고, 혼합하고 10 μ l의 분액을 200 μ l의 물을 함유하는 멀티스크린(등록상표) HTS HV 필터 플레이트(밀리포어(등록상표))의 웰로 옮겼다. 액체를 진공하에서 플레이트를 통해 여과하고, 150 μ l의 HYSOY(등록상표) 배지를 각 웰에 가하고 여과하였다. 이어서 필터 플레이트를 37 °C, 5% CO₂에서 밤새 배양하고 이어서 데스테인 용액(바이오 래드 레보라토리즈 인코포레이티드, 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재)으로 고정시켰다. 이어서 상기 플레이트를 쿠마씨 블루로 염색하고 1회 탈색하였다. 콜로니를 영상화하고 셀룰라 테크놀로지 리미티드(CTL)(세이커 하이츠, 미국 오하이오주 소재) 임뮤노스팟(등록상표) 분석기상에서 세었다.

[1151] 통계학적 분석: 피어슨의 양측검정 상관성을 계산하였다.

[1152] 결과 - 9V, 9A, 9L 및 9N에서 OPA 반응

[1153] 혈청형 9A, 9L 및 9N에 대한 13vPnC로 면역된 성인의 면역 혈청으로부터의 교차-기능성 반응을, 혈청형 9V에 대한 동종의 기능성 반응과 함께, 각 미세콜로니 흡소닌 개시된 식작용 분석(mcOPA)에서 평가하였다. 13vPnC로 백신화된 성인으로부터의 면역 혈청의 2개의 무작위로 선택된 부분집합들을 시험하였다. 상기 혈청을 각각 미국 임상 시험 6115A1-004(N=59, 백신화-후) 및 6115A1-3005(N=66, 합치된 백신화-전 및 백신화-후)으로부터 수집하였다.

[1154] 연구 6115A1-004에서 대상들은 어떠한 폐렴구균 백신화에도 선행 경험이 없었으며 상기 연구 프로토콜의 부분에 따라 단일 용량의 13vPnC를 수령하였다. 연구 6115A1-004로부터의 면역 혈청은 9V, 9A, 9L 및 9N에 대해서 각각 98.3%, 98.3%, 100% 및 93.2%의 값(도 11)으로 상기 모든 혈청군들에 대해 유사한 응답자 비율을 보이며, 이는 6115A1-3005로부터의 결과(도 12)를 지지한다. 상대적으로 양호한 OPA 역가 상관성이 혈청형 9V와 9A(피어슨 상관성 $\rho = 0.5456$, $p < 0.0001$) 또는 9L($\rho = 0.7353$, $p < 0.0001$) 사이에서 관찰되었으나, 9N($\rho = 0.1217$, $p < 0.3627$)과는 관찰되지 않았다.

[1155] 연구 6115A1-3005에서 대상은 앞서 적어도 연구 등록 5년 전에 1회 용량의 23vPS를 수령하였고 상기 연구 프로토콜의 부분으로서 단일 용량의 13vPnC를 수령하였다. 13vPnC로 면역된 성인으로부터의 합치된 백신화-전 및 -후 혈청 패널(N=66)(연구 6115A1-3005)을 혈청형 9V에 대한 동종 반응 및 혈청형 9A, 9L 및 9N에 대한 항-9V 항체의 교차-반응성에 대해서 OPA에서 평가하였다. 도 12에 도시된 바와 같이, 9V(84%), 9A(66%), 9L(82%) 및 9N(86%)에 대한 비교적 높은 면역성(응답자 비율)이, 혈청형 9V 및 9N으로부터의 접합되지 않은 폴리사카라이드를 포함하는, 23vPS에 의한 선행 면역화로 인해 유사하게 상기 OPA 분석에서 검출되었다. 그러나, 상기 응답자 비율은 혈청형 9로부터의 혈청형 9V 접합체만을 함유하는 13vPnC에 의한 면역화 후 4개의 혈청형 모두에 대해서 95% 이상으로 증가하였다. 역가 값의 상승배수를 표 23에 나타내며 이는 상기 혈청형들 간에 유사하고, 또한 교차-반응성을 암시한다.

표 23

[1156]

OPA 역가 상승배수 합치된 13vPnC 백신화-전 및 -후								
	OPA 역가							
	9V		9A		9L		9N	
	전	후	전	후	전	후	전	후
GMT	221	1323	41	308	165	706	322	693
상승배수	5.9		7.5		4.2		2.1	

[1157] 상기 OPA 역가 분포의 보다 포괄적인 분석을 도 13 내지 16에 역 누적 분포 곡선(RCDC)에 나타낸다. 상기 RCDC는 혈청형 9V, 9A, 9L에 대한 백신화 후 혈청형-특이적인 면역 반응의 증가(9N에 대해서는 더 적은 정도로)를

나타낸다. 9V, 9A, 9V/9L 및 9V/9N간의 개별적인 합치된/샘플의 역가의 상승배수의 상관성을 또한 피어슨의 상관성을 사용하여 분석하였다. 역가의 상승배수의 비교적 양호한 상관성이 혈청형 9V와 9A(피어슨 상관성 $p = 0.8720$, $p < 0.0001$) 또는 9N($p = 0.5801$, $p < 0.0001$) 사이에서 관찰되었으나, 9L($p = 0.1804$, $p < 0.1640$)과는 더 적은 정도로 관찰되었다. 결론이들 데이터를 근거로, 상기 13 vPnC 백신은 혈청형 9A, 9L 및 9N에 대해 추가적인 보호를 제공함으로써 보다 넓은 혈청형 유효적용범위를 제공하는 듯하다.

실시예 20: 혈청형 15B와 혈청형 15C 간의 교차-기능성 OPA 반응

페렴구균 혈청군 15는 4개의 구조적으로 관련된 혈청형: 15A, 15B, 15C 및 15F를 포함한다. 혈청형 15B 및 15C는 유전자형 분류 기법에 의해 구별할 수 없으며 유사한 캡슐 폴리사카라이드(PS) 조성을 갖지만, 단 15B-PS는 15C-PS의 O-아세틸화된 변체이다. 혈청형 15B에대한 항-캡슐 PS 항체가 혈청형 15C와 기능상 교차-반응하는지를 이해하기 위해서, 10마리의 토끼를 16vPnC(실시예 15 참조) 및 20vPnC(실시예 16 참조) 백신으로 면역시켰으며, 상기 두 백신은 모두 제형화의 부분으로서 본 발명에 개시된 바와 같이 CRM₁₉₇에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니아에 혈청형 15B 캡슐 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체를 함유한다. 백신화-전 및 -후로부터의 혈청을 혈청형 15B 및 15C 표적 페렴구균 균주에 대해서 OPA 분석에서 시험하였다.

각 그룹으로부터의 10마리의 토끼 중에서, 100%가 혈청형 15B 접합체에 의한 면역화에 이어서 혈청형 15B에 OPA 응답을 가졌다. 이들 동일한 샘플 중에서, 100%가 또한 혈청형 15C에 대해 OPA 응답을 가졌다(표 24 및 표 25). 낮은 OPA 역가가 15C OPA에서 백신화전 혈청에서 관찰되었다. 그러나, 상기 백신화 전에 비해 백신화 후 혈청에 의한 10배 이상의 GMP OPA 역가 증가는 본 발명의 면역원성 접합체가 OPA에서 혈청형 15B 및 15C 스트렙토코커스 뉴모니아에를 살해할 수 있는 항체의 형성을 유도함을 입증하였다.

표 24

16vPnC에 의한 백신화 전후 토끼 혈청에서 혈청형 15B 및 15C 균주에 대한 OPA 역가				
동물	15B OPA		15C OPA	
	0주	4주	0주	4주
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	4	2222	98	1075

표 25

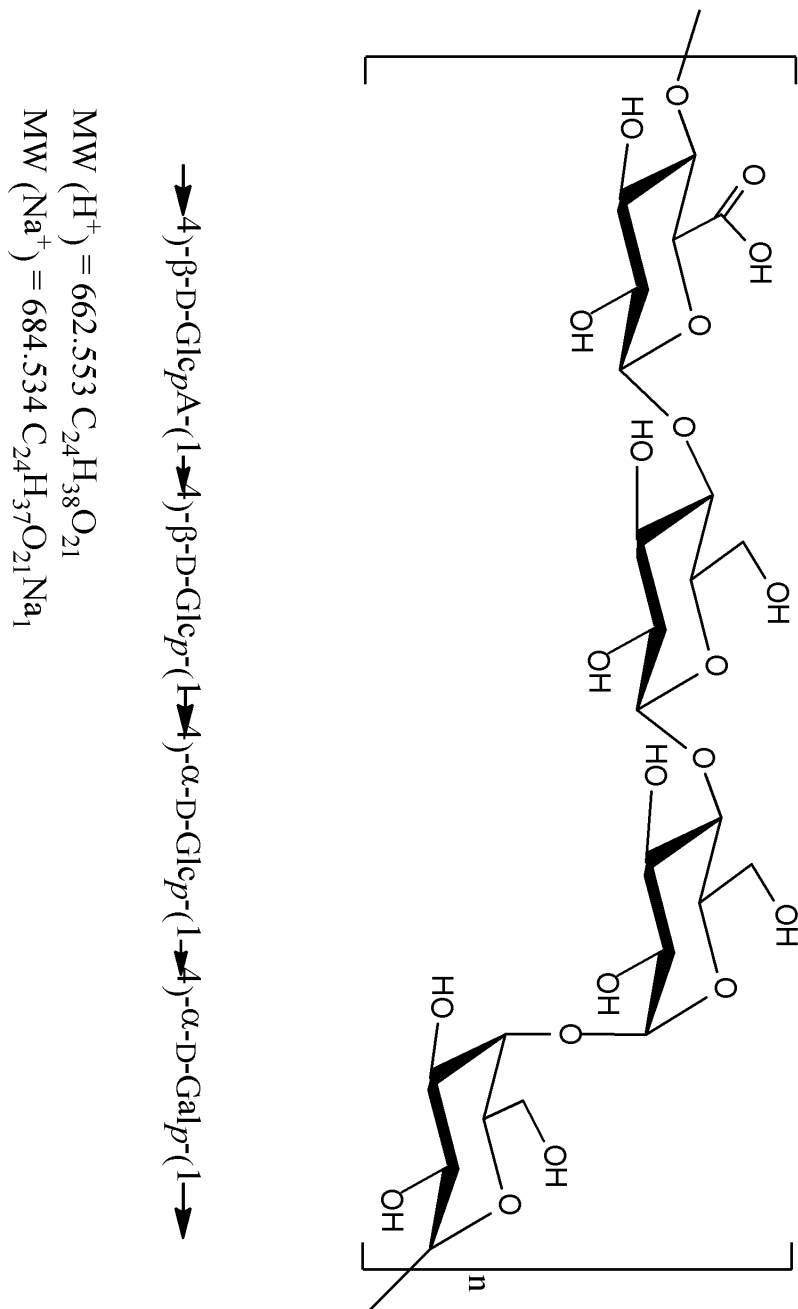
20vPnC에 의한 백신화 전후 토끼 혈청에서 혈청형 15B 및 15C 균주에 대한 OPA 역가				
동물	15B OPA		15C OPA	
	0주	4주	wk0	wk4
1	4	3784	측정할 수 없음*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	측정할 수 없음*	1316
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	측정할 수 없음*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	측정할 수 없음*	527
10	4	616	측정할 수 없음*	545
GMT	4	1917	77	1515

*역가는 불량한 살해 곡선으로 인해 측정될 수 없다

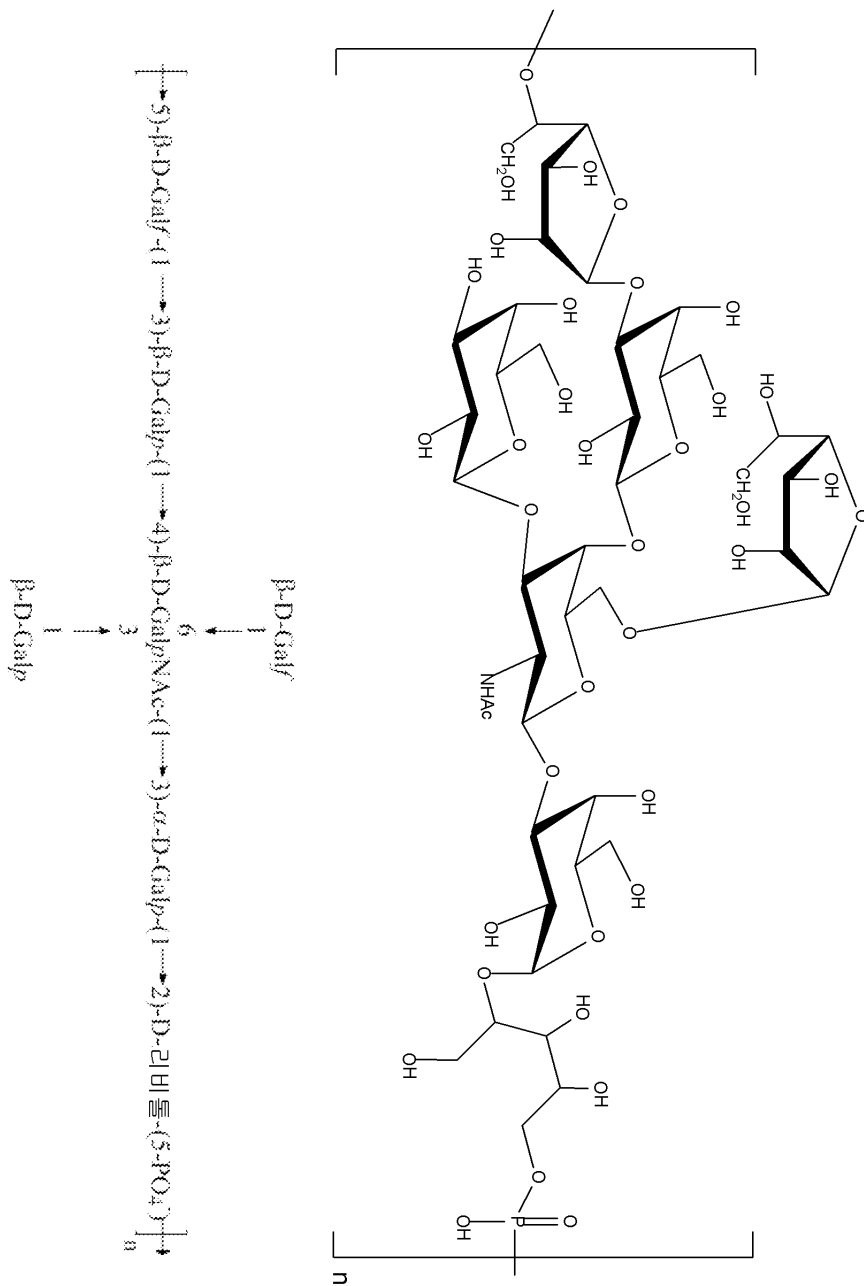
[1163] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 분야의 숙련가들의 수준을 가리킨다. 모든 간행물 및 특허 출원을, 각각의 간행물 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 인용됨을 가리키는 바와 동일한 정도로 본 발명에 참고로 인용된다. 상기 발명을 이해의 명확성을 위해서 예시 및 실시예에 의해 일부 상세히 개시하였지만, 몇몇 변화 및 변형을 첨부된 특허청구범위의 범위 내에서 실시할 수 있다.

도면

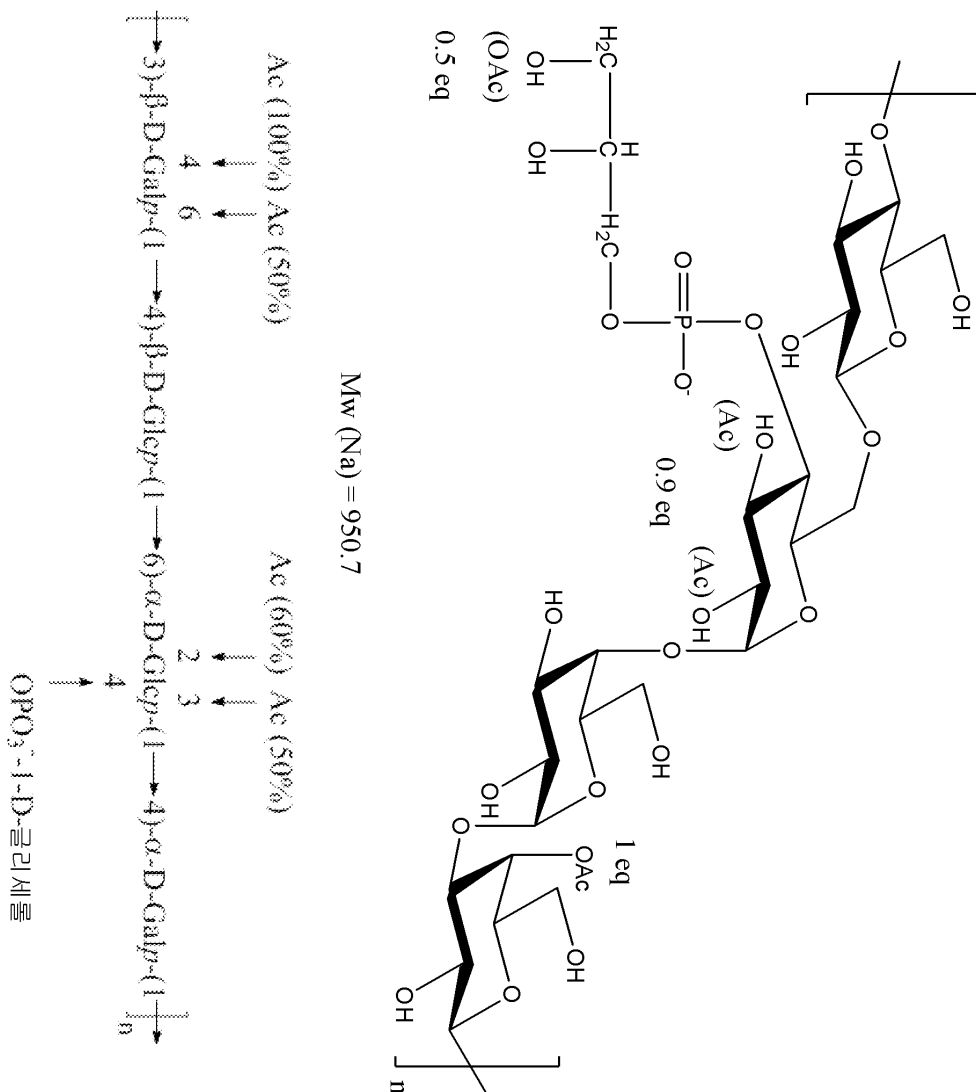
도면1



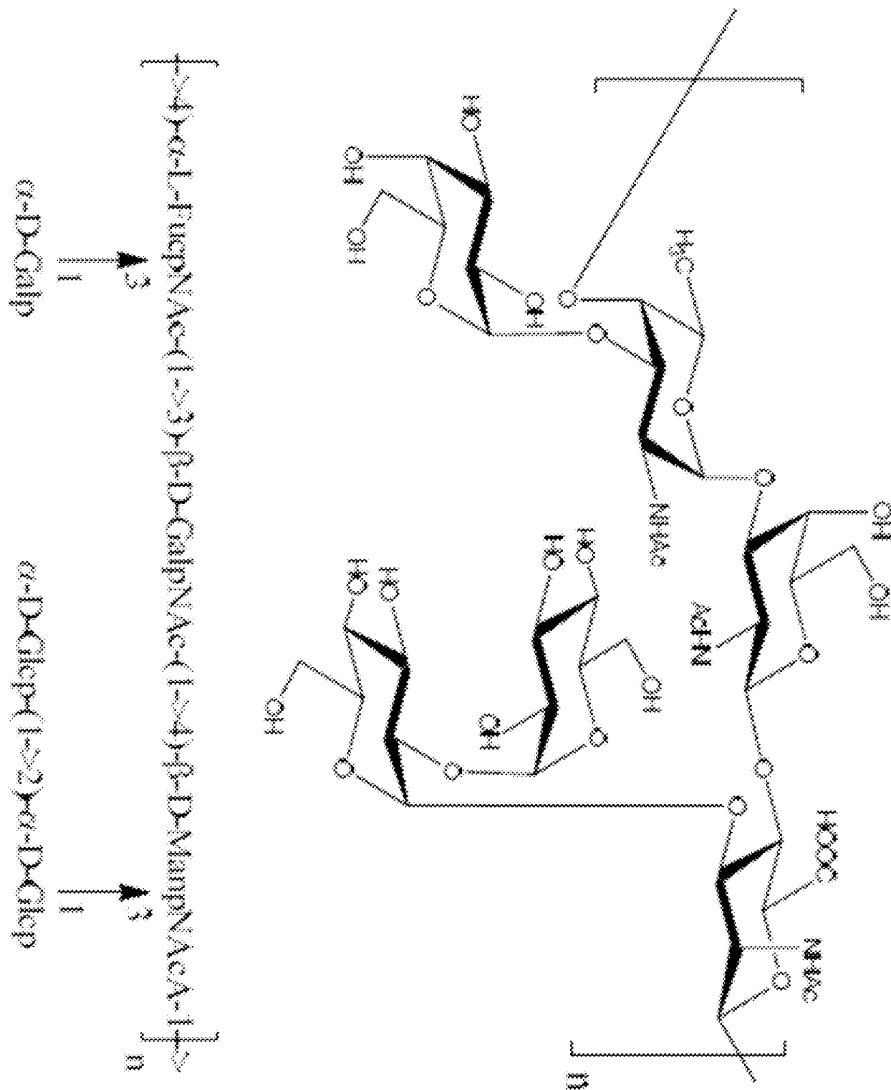
도면2



도면3

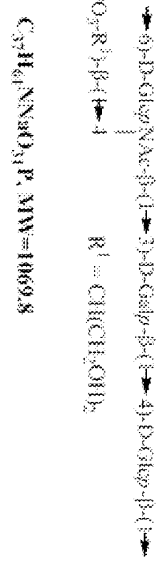
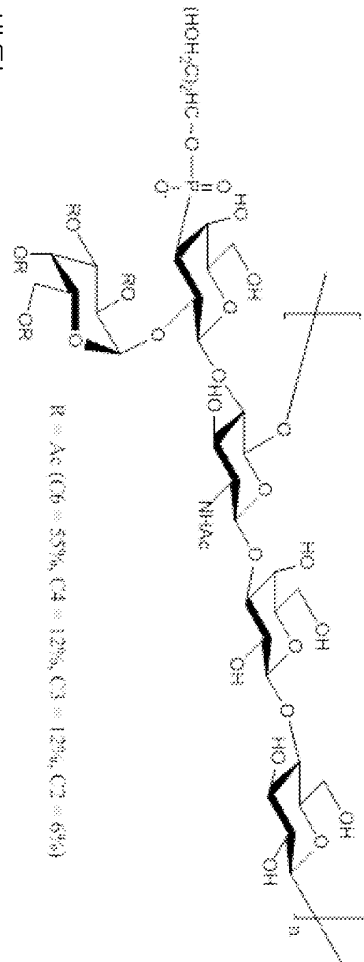


도면4

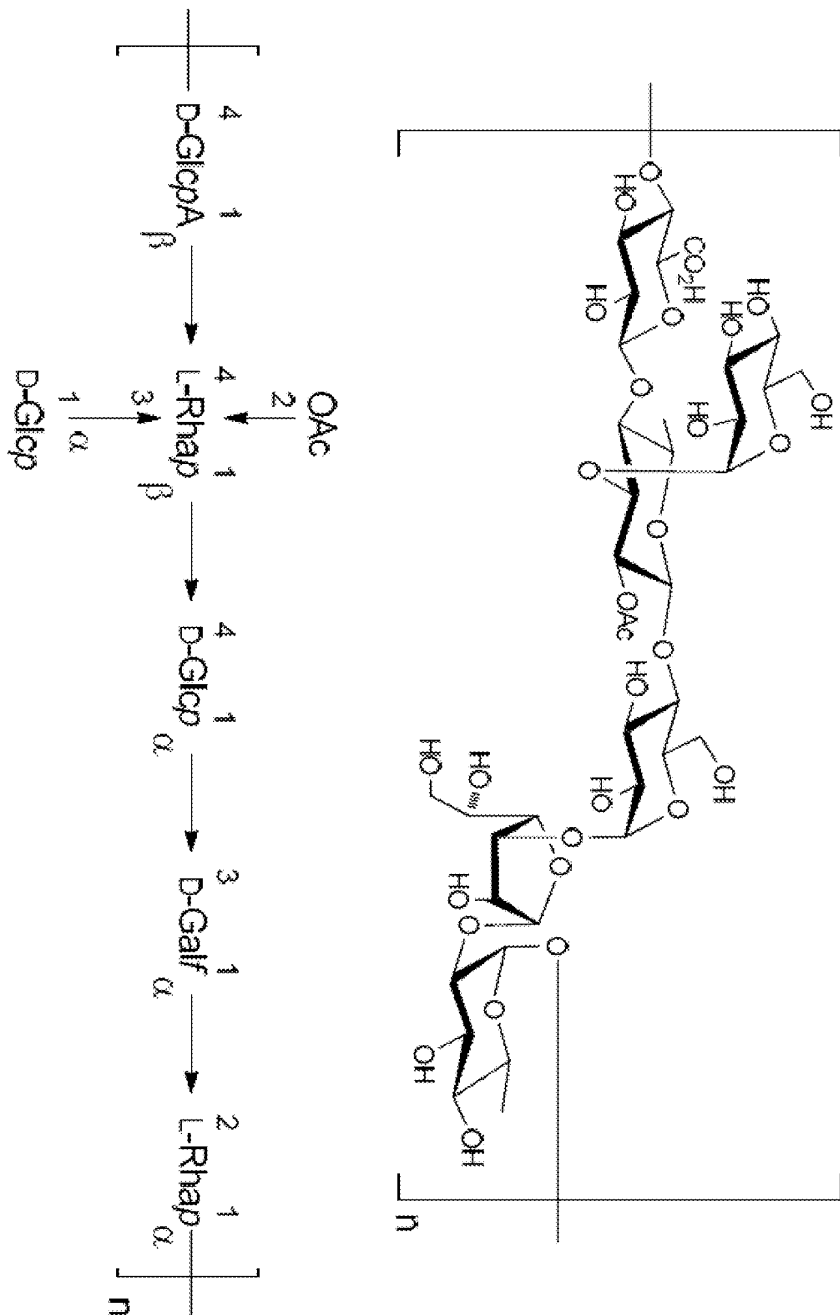


도면5

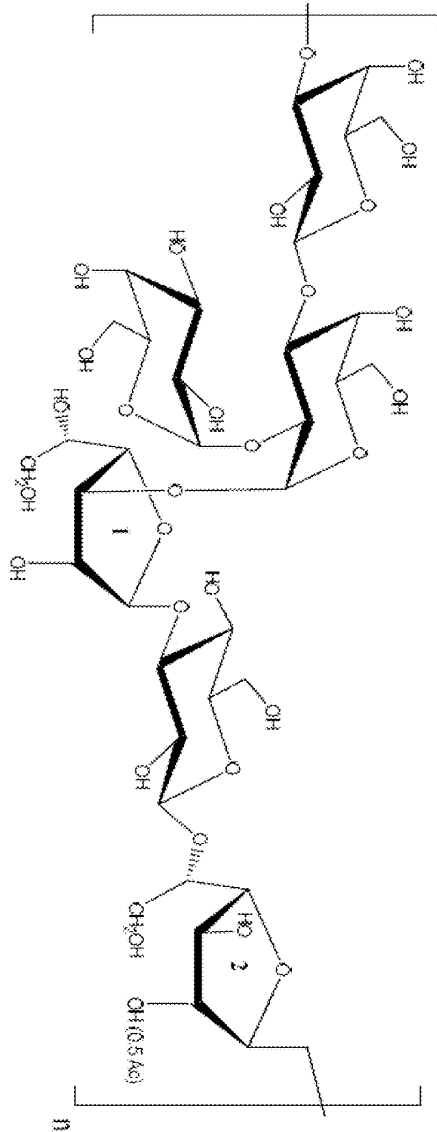
Ac= 아세틸



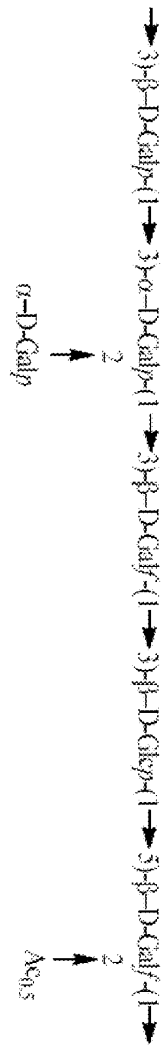
도면6



Pn 33F

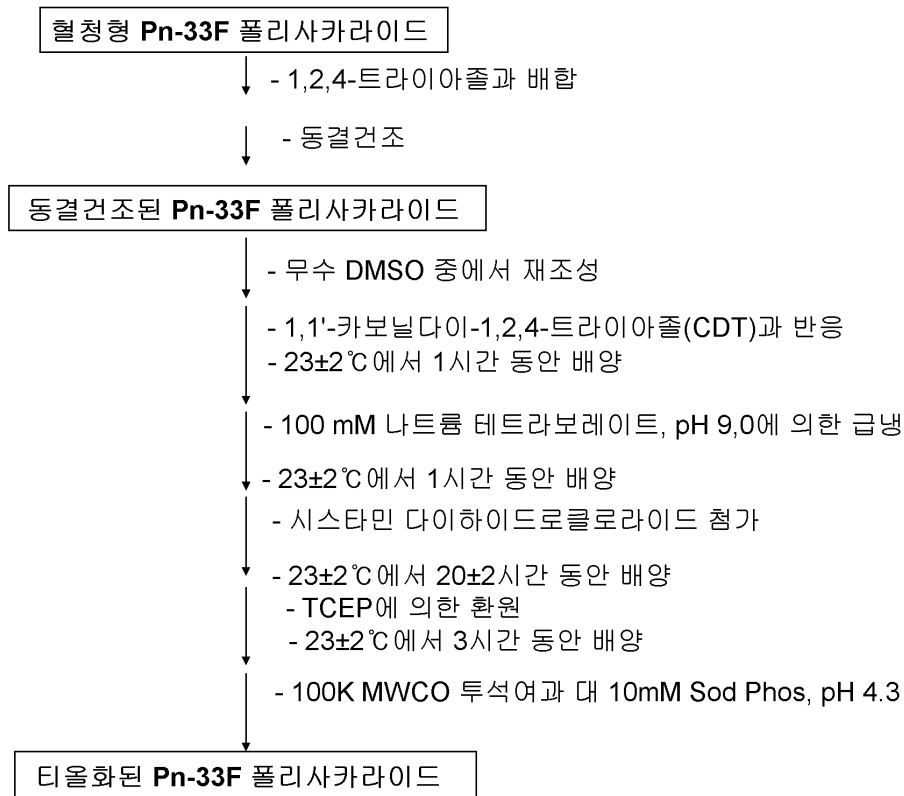


도면7

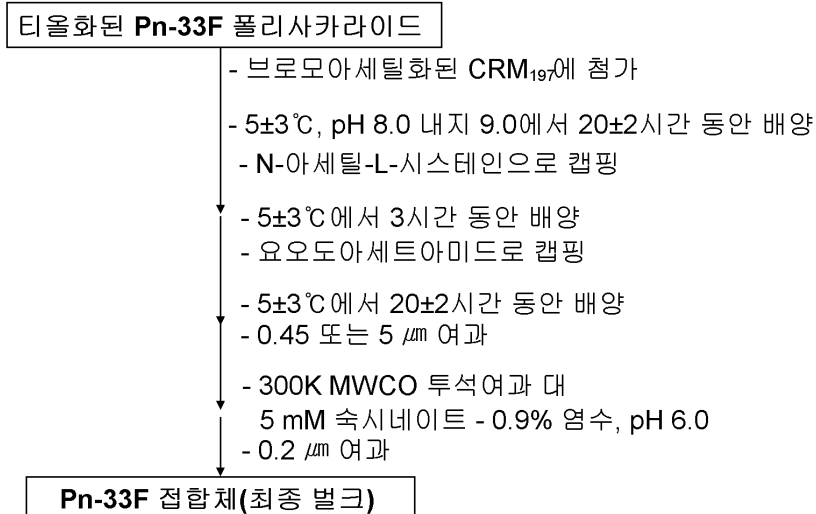


도면8

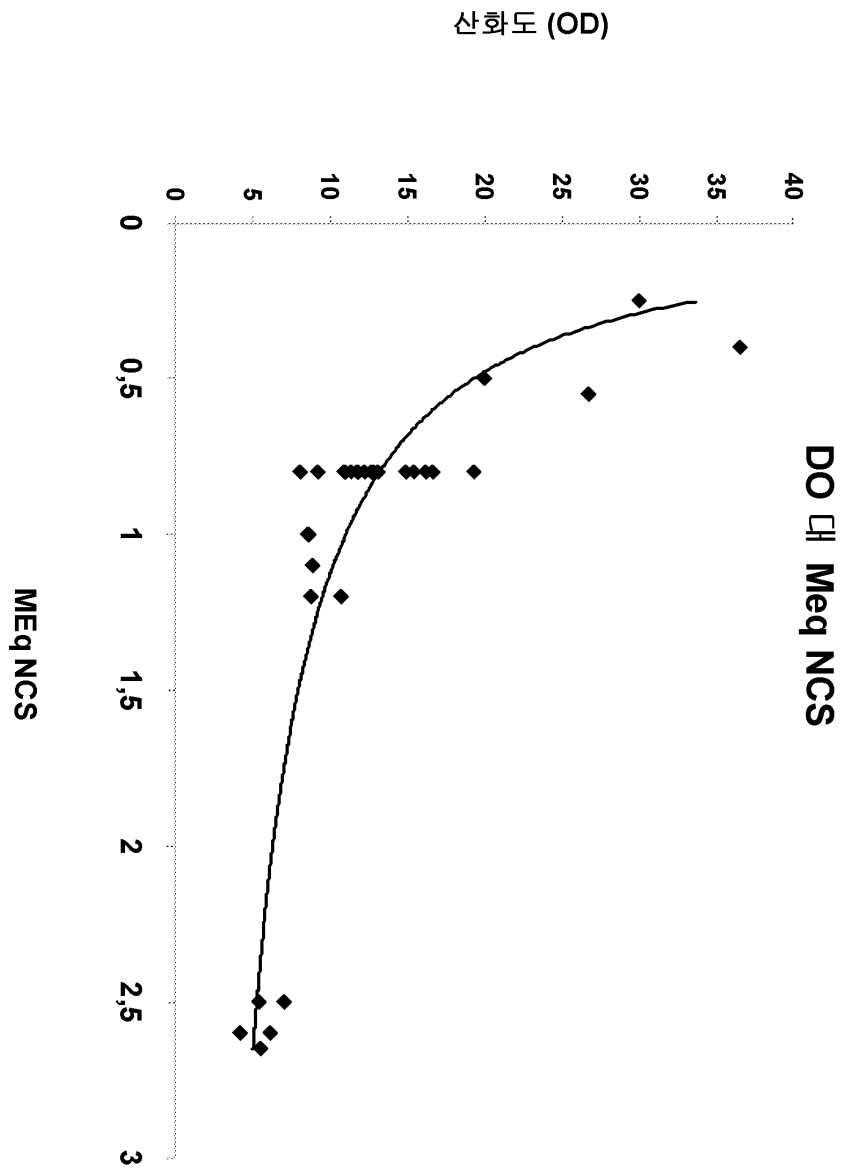
(A)



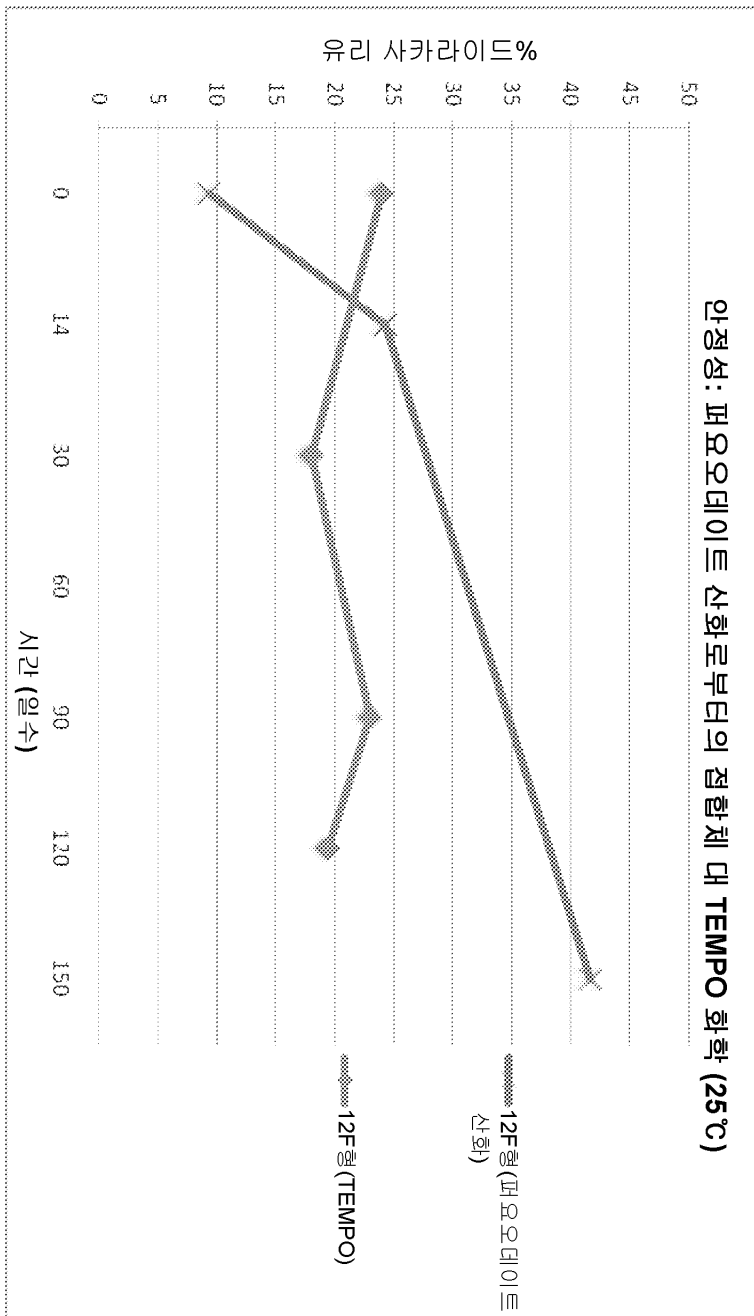
(B)



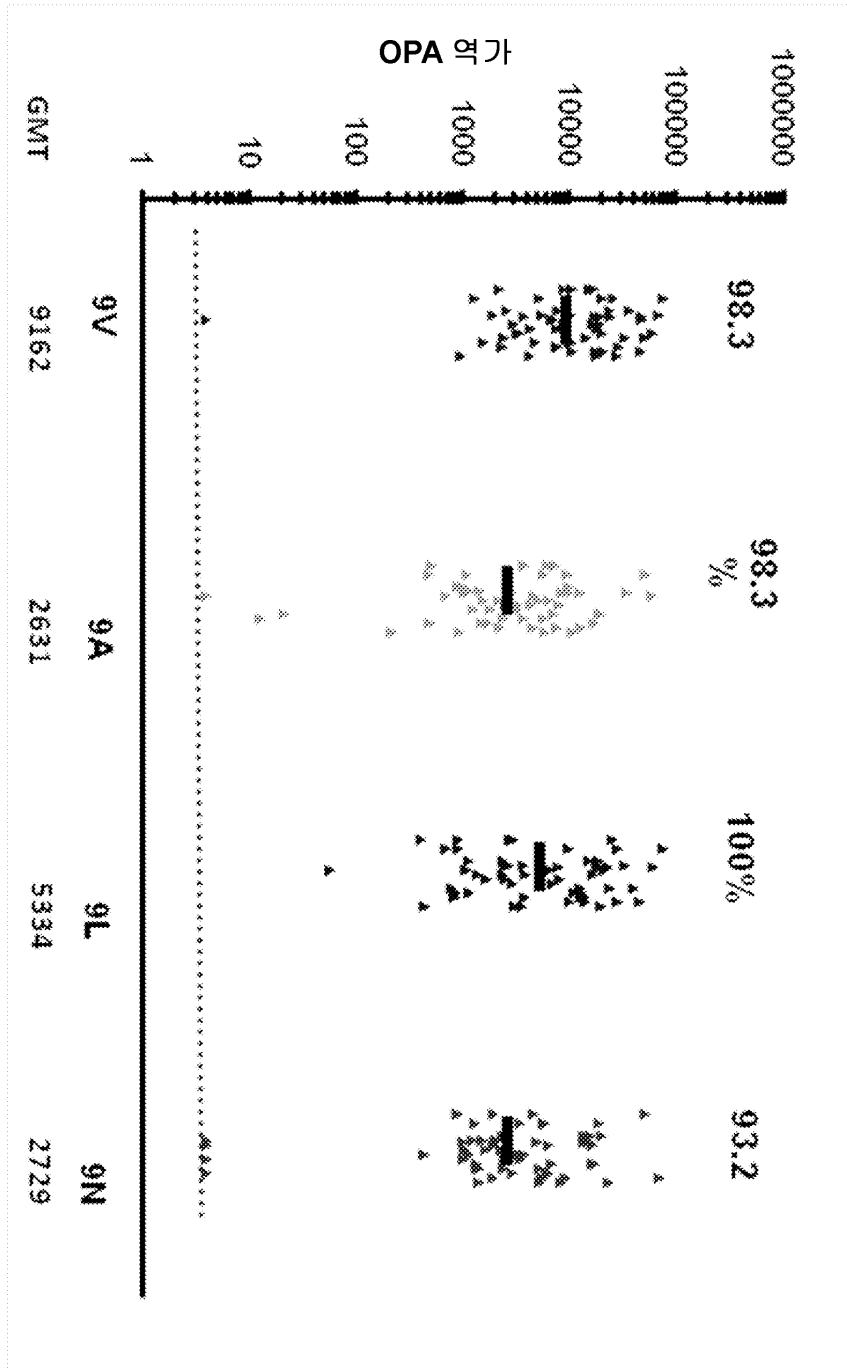
도면9



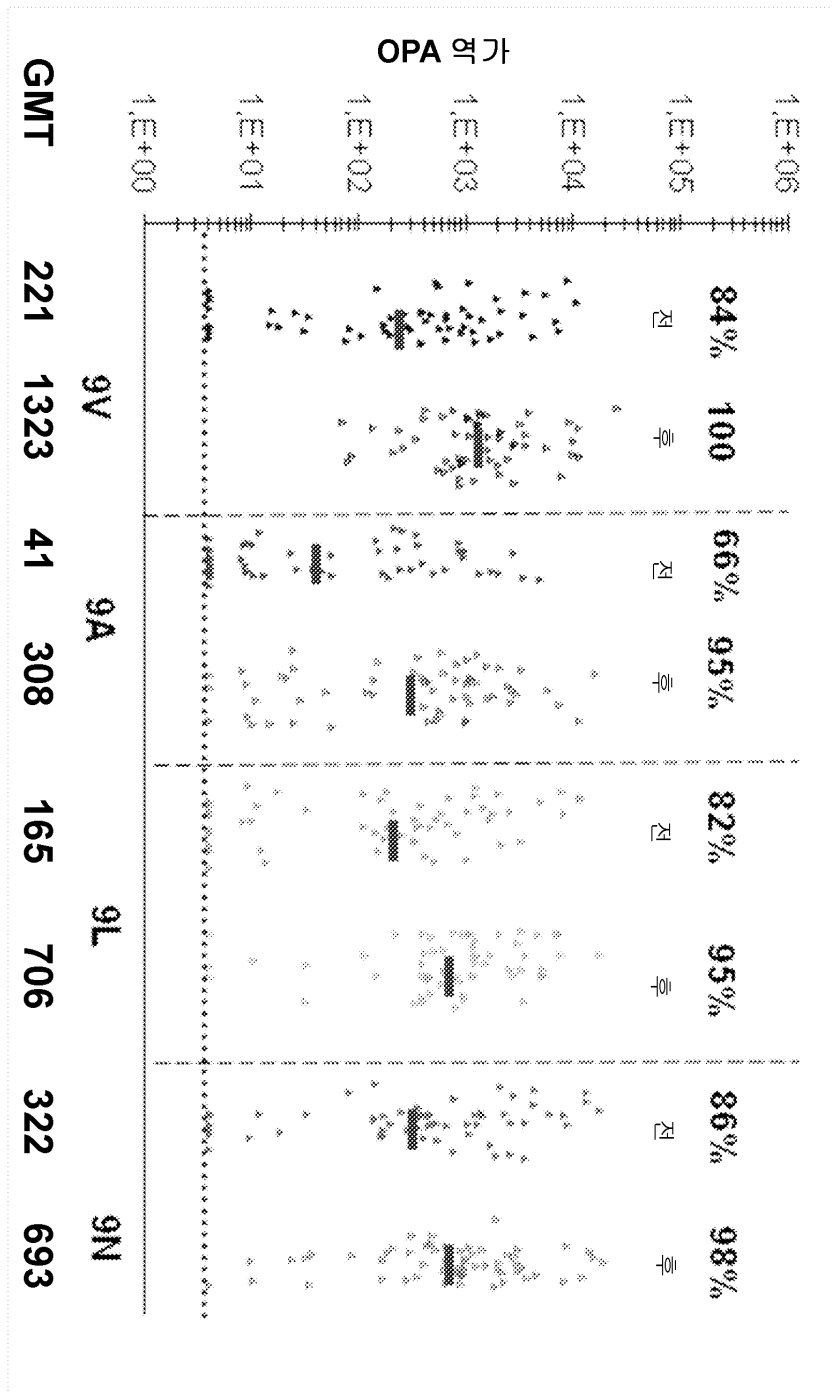
도면10



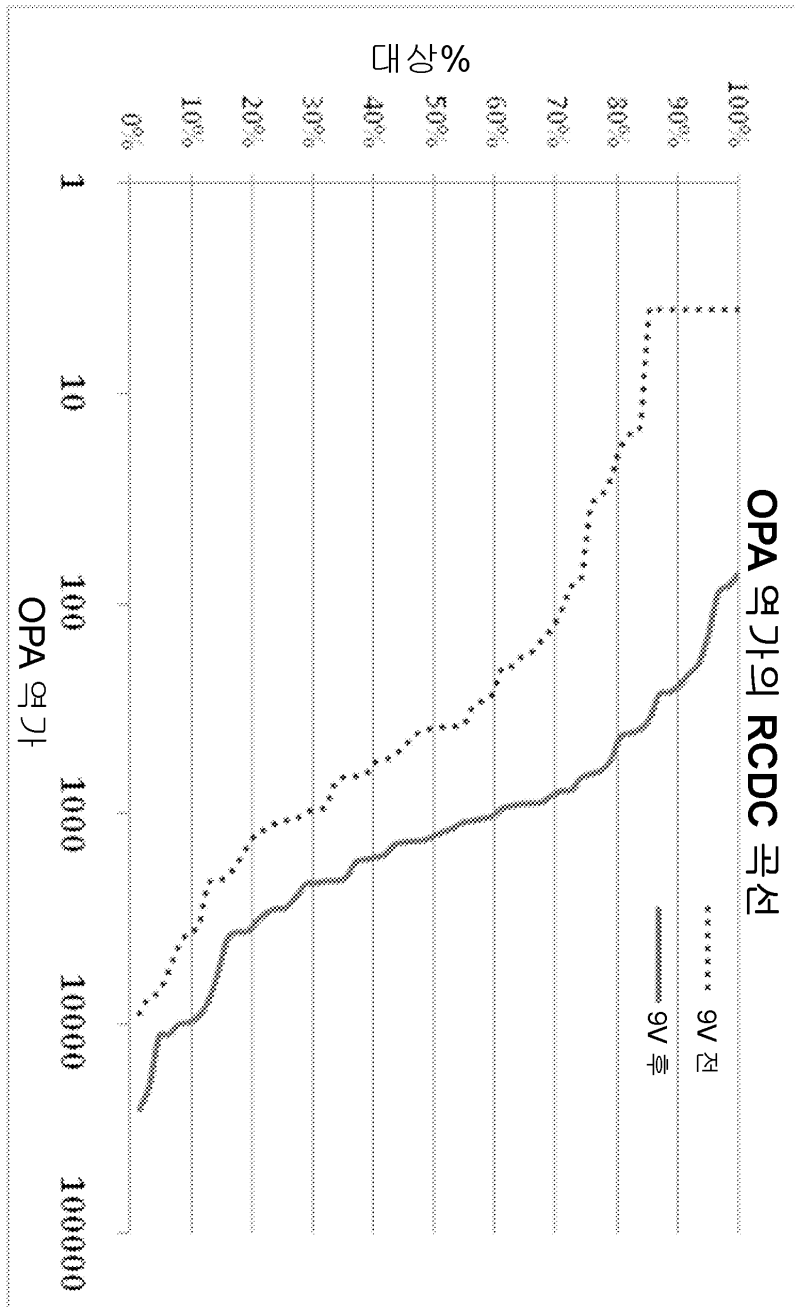
도면11



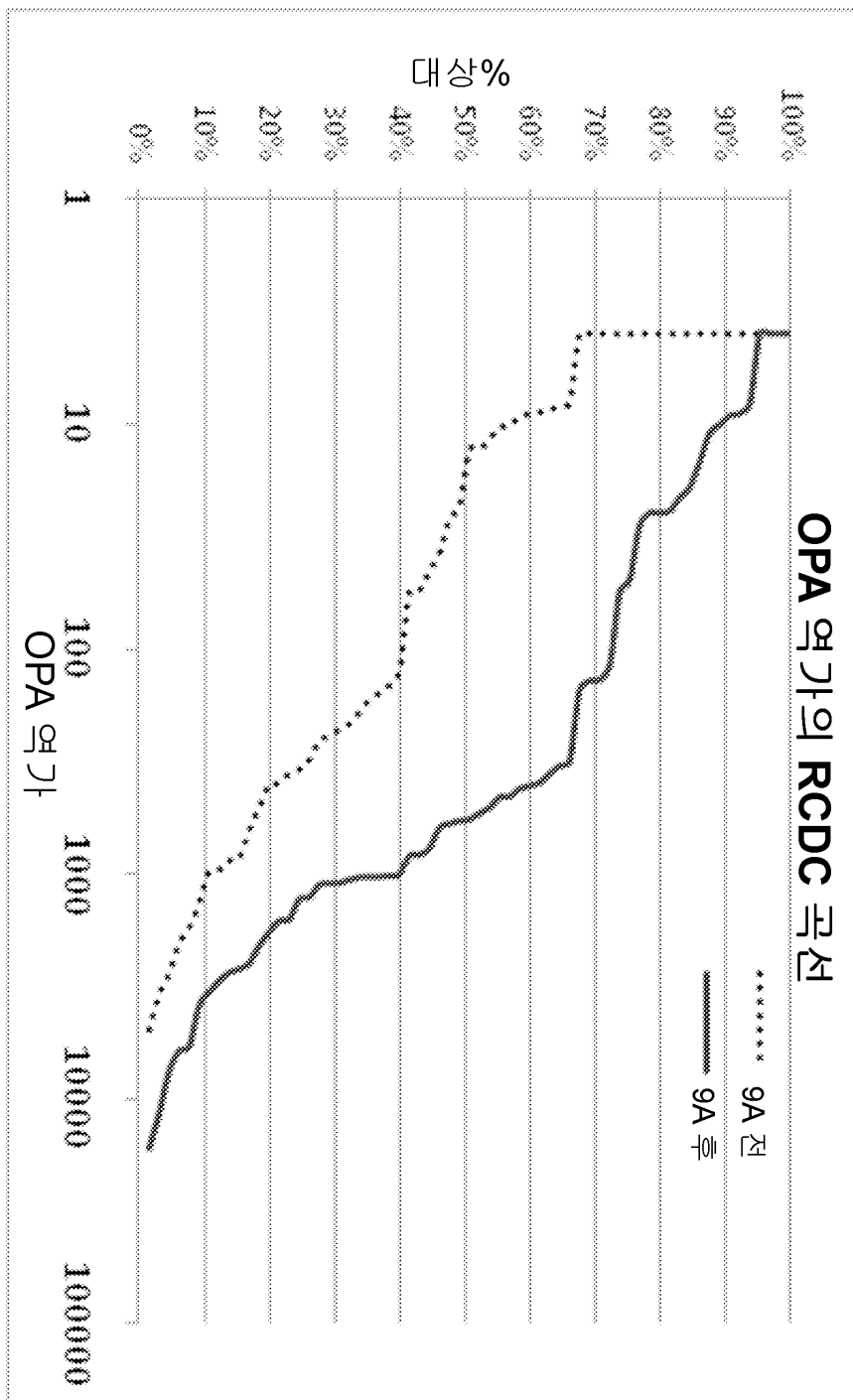
도면12



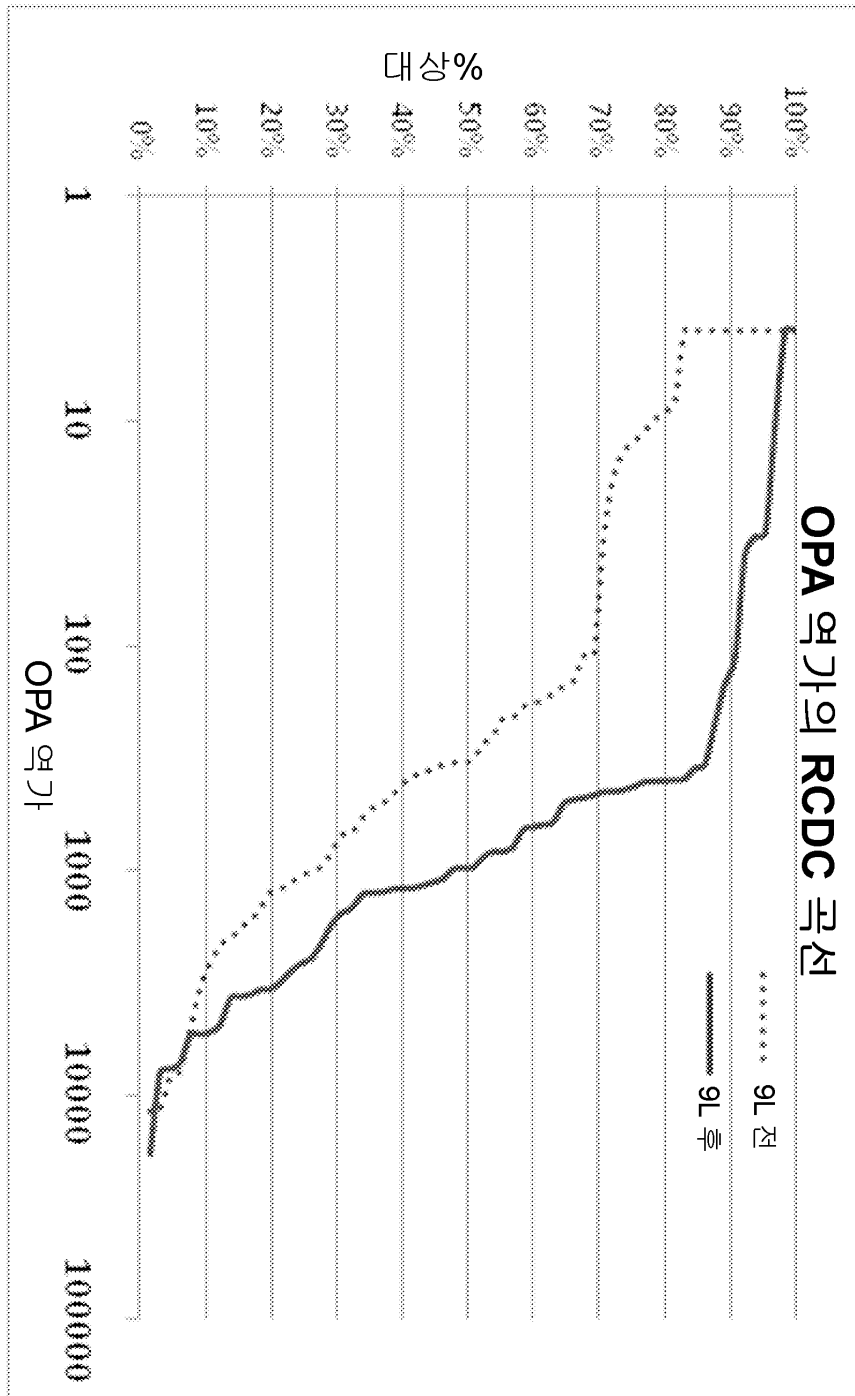
도면13



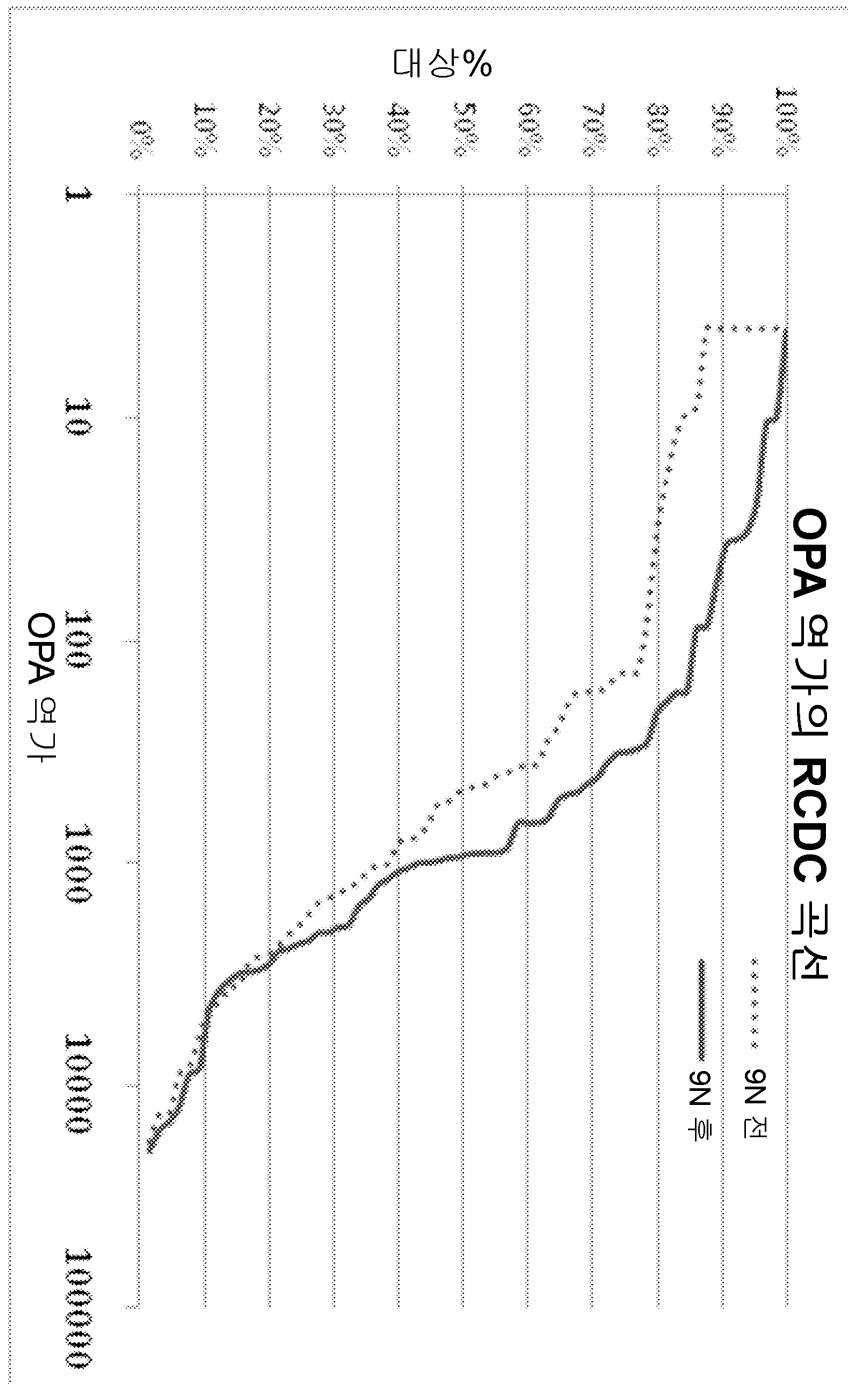
도면14



도면15



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc.

<120> Immunogenic compositions comprising conjugated capsular
saccharide antigens and uses thereof

<130> PC72040A

<140> PCT/IB2015/050315

<141> 2015-01-15

<150> US 61/929,547

<151> 2014-01-21

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> "A class" CpG oligonucleotide

<400> 1

ggggacgacg tcgtgggggg g

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> "A class" CpG oligonucleotide

<400> 2

ggggacgacg tcgtgggggg g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> "B class" CpG oligonucleotide

<400> 3

tcgtcgtttt tcgtgcttt t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> "B class" CpG oligonucleotide

<400> 4

tcgtcgtttt tcggtcgttt t	21
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> "B class" CpG oligonucleotide	
<400> 5	
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt	24
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> "B class" CpG oligonucleotide	
<400> 6	
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt	24
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> "B class" CpG oligonucleotide	
<400> 7	
tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga	24
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> B-Class oligonucleotide	
<400> 8	
tcgtcgtttt tcggtgcttt t	21
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> B-Class oligonucleotide	
<400> 9	
tcgtcggtttt tcggtcggtt t	21
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> B-Class oligonucleotide	
<400> 10	
tcgtcggtttt gtcgttttgt cgtt	24
<210> 11	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> B-Class oligonucleotide	
<400> 11	
tcgtcggtttc gtcgttttgt cgtt	24
<210> 12	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> B-Class oligonucleotide	
<400> 12	
tcgtcggtttt gtcgtttttt tcga	24
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C class CpG Oligonucleotide	
<400> 13	
tcgcgtcggtt cggcgcgcgc cg	22
<210> 14	
<211> 23	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C class CpG Oligonucleotide	
<400> 14	
tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg	23
<210> 15	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C class CpG Oligonucleotide	
<400> 15	
tcggacgttc ggcgcgccc g	21
<210> 16	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C class CpG Oligonucleotide	
<400> 16	
tcggacgttc ggcgcgccg	19
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> C class CpG Oligonucleotide	
<400> 17	
tcgcgtcggtt cgcgcgccg	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213>	
Artificial Sequence	
<220><223> C class CpG Oligonucleotide	
<400> 18	
tcgacgttcg gcgcgcgccc	20

<210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C class CpG Oligonucleotide
 <400> 19
 tcgacgttcg gcgcgccg 18
 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C class CpG Oligonucleotide
 <400> 20
 tcgcgtcgtt cggcgccg 18

 <210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C class CpG Oligonucleotide
 <400> 21
 tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22
 <210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C class CpG Oligonucleotide
 <400> 22
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22
 <210> 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 23

tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 24

tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 25

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgt 23

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotides

<400> 26

tcgcgtcggtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 27

tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 28

tcggacgttc ggcgcgccc g

21

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 29

tcggacgttc ggcgcgccg

19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 30

tcgcgtcggtt cggcgcgccg

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 31

tcgacgttcg gcgcgcgccg

20

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 32

tcgacgttcg gcgcgccg

18

<210> 33

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-Class oligonucleotide
 <400> 33
 tcgctcgtt cgccgcgcg 18
 <210> 34
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-Class oligonucleotide
 <400> 34
 tcgcgacgtt cgccgcgcgc cg 22

 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-Class oligonucleotide
 <400> 35
 tcgtcgtttt cgccgcgcgc cg 22
 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-Class oligonucleotide
 <400> 36
 tcgtcgtttt cgccgcgcgc cg 22
 <210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C-Class oligonucleotide
 <400> 37

tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 38

tcgtcgtttt cggcgcgcg cgt 23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P class CpG oligonucleotide

<400> 39

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P class CpG oligonucleotide

<400> 40

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23