



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0056727
(43) 공개일자 2023년04월27일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/09 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 39/092 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7009792</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년08월23일
심사청구일자 2023년03월22일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년03월22일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/057714</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/043855
국제공개일자 2022년03월03일</p> <p>(30) 우선권주장
63/070,410 2020년08월26일 미국(US)
63/229,359 2021년08월04일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
화이자 인코포레이티드
미국 뉴욕주 10001-2192 뉴욕 허드슨 블러바드 이스트 66</p> <p>(72) 발명자
앤더슨, 애널리사 시빌
미국 10965 뉴욕 펄 리버 엔. 미들타운 로드 401
화이자 인코포레이티드 내
도널드, 로버트 조지 콘래드
미국 10965 뉴욕 펄 리버 엔. 미들타운 로드 401
화이자 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 김영</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 36 항

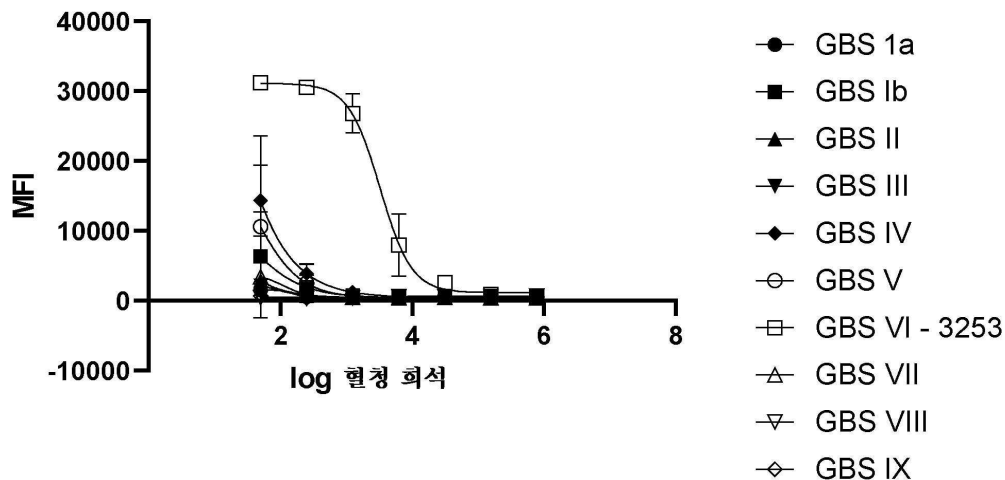
(54) 발명의 명칭 B군 스트렙토코쿠스 폴리사카라이드-단백질 접합체, 접합체를 생산하는 방법, 접합체를 포함하는 면역원성 조성물, 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) (통상적으로 B군 스트렙토코쿠스 (GBS)로 지칭됨)로부터의 피막 폴리사카라이드 (CP), 및 담체 단백질을 포함하는 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체에 관한 것이며, 여기서 CP는 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되고, CP는 약 60% 초과 시알산 수준을 갖는다. 본 발명은 또한 접합체를 제조하는 방법 및 접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 본원에 개시된 조성물을 사용하여 대상체에서 GBS에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 및/또는 대상체에서 침습성 GBS 질환을 감소시키거나 또는 예방하기 위한 방법에 관한 것이다. 생성된 항체는 수동 면역요법을 통해 GBS 감염을 치료하거나 또는 예방하는 데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

GBS 혈청형 VI-CRM197



(52) CPC특허분류

A61K 2039/55577 (2013.01)

A61K 2039/575 (2013.01)

A61K 2039/6037 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

(72) 발명자

호킨스, 홀리오 세사르

미국 10965 뉴욕 펄 리버 엔. 미들타운 로드 401

화이자 인코포레이티드 내

코달리, 스리니바스

미국 10965 뉴욕 펄 리버 엔. 미들타운 로드 401

화이자 인코포레이티드 내

사이먼, 래피얼

미국 10965 뉴욕 펄 리버 엔. 미들타운 로드 401

화이자 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

혈청형 VI, VII, VIII 및 IX로부터 선택되는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, GBS 피막 폴리사카라이드가 혈청형 VI를 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, GBS 피막 폴리사카라이드가 혈청형 VII를 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, GBS 피막 폴리사카라이드가 혈청형 VIII를 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, GBS 피막 폴리사카라이드가 혈청형 IX를 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV 및 V로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체가 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VI, 및 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체가 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VII, 및 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체가 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VIII, 및 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체가 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 IX, 및 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII 및 VIII로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 포함하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 60% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 100%의 시알산 수준을 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 또는 0.95 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 약 25 kDa 내지 약 750 kDa, 약 25 kDa 내지 약 400 kDa, 약 25 kDa 내지 약 200 kDa, 또는 약 100 kDa 내지 약 400 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 접합체의 분자량이 약 300 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 15,000 kDa, 또는 약 1,000 kDa 내지 약 10,000 kDa인 면역원성 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 0% 내지 약 40% O-아세틸화된 것인 면역원성 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만 O-아세틸화된 것인 면역원성 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 사카라이드 반복 단위의 mM당 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.35 또는 약 0.4 mM O-아세테이트를 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 사카라이드 반복 단위의 mM당 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 또는 0.05 mM 미만의 O-아세테이트를 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇, 디프테리아 독소이드 (DT), 과상풍 독소이드 (TT) 및 스트렙토코쿠스 C5a 펩티다제 (SCP)로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제약상 허용되는 부형제, 완충제, 안정화제, 아주반트, 동결보호제, 염, 2가 양이온, 비-이온성 세제, 자유 라디칼 산화의 억제제, 담체 또는 그의 혼합물을 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 완충제가 HEPES, PIPES, MES, 트리스 (트리메타민), 포스페이트, 아세테이트, 보레이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘 및 숙시네이트로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 완충제가 히스티딘인 면역원성 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리소르베이트-80, 폴리소르베이트-60, 폴리소르베이트-40, 폴리소르베이트-20 및 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 부형제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 부형제가 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨, 팔라티니트, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 글리신, 아르기닌, 리신, 염화나트륨 (NaCl), 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물 및 에탄올로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, B군 스트렙토코쿠스가 스트렙토코쿠스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*)인 면역원성 조성물.

청구항 31

대상체에게 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, B군 스트렙토코쿠스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 32

대상체에게 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스와 연관된 질환 또는 상태를 예방하거나, 치료하거나 또는 감소시키는 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, B군 스트렙토코쿠스가 스트렙토코쿠스 아갈락티아에인 방법.

청구항 34

대상체에게 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법.

청구항 35

제34항의 방법에 의해 생산된 항체.

청구항 36

하기 단계를 포함하는, 대상체에게 수동 면역을 부여하는 방법:

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 면역원성 조성물을 사용하여 항체 제제를 생성하는 단계; 및
항체 제제를 대상체에게 투여하여 수동 면역을 부여하는 단계.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) (통상적으로 B군 스트렙토코쿠스 (GBS)로 지칭됨)로부터의 피막(capsular) 폴리사카라이드 (CP), 및 담체 단백질을 포함하는 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체에 관한 것이며, 여기서 CP는 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되고, CP는 약 60% 초과 시알산 수준을 갖는다. 본 발명은 또한 접합체를 제조하는 방법 및 접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이며, 여기서 접합체는 혈청형 VI, VII, VIII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 GBS 혈청형, 및 임의적으로 1종 이상의 추가의 GBS 혈청형(들)로부터의 CP를 포함한다. 본 발명은 추가로 본원에 개시된 조성물을 사용하여 대상체에서 GBS에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 및/또는 대상체에서 침습성 GBS 질환을 감소시키거나 또는 예방하기 위한 방법에 관한 것이다. 생성된 항체는 수동 면역요법을 통해 GBS 감염을 치료하거나 또는 예방하는 데 또는 모계 항체 전달을 통한 자손의 보호를 위해 모체를 면역화시키는 데 사용될 수 있다.

배경기술

[0002] 스트렙토코쿠스 아갈락티아에는 그람 양성 폴리사카라이드 피막화된 유기체이며 이는 또한 B군 스트렙토코쿠스 (GBS)로 공지되어 있다. 이들은 인간 위장 및 생식 관의 흔한 공생자이고 또한 유아 및 노인에서의 심각한 질환의 원인이다 (Baker, C.J., Vaccine, 31(Suppl. 4):D3-D6 (2013)). 유아에서의 GBS 감염에 대한 주요 위험 인자는 모체 콜로니화이다 (Dillon, H.C., et al., J. Pediatr., 110(1):31-36 (1987)). 많게는 4명 중 1명의 여성이 GBS를 직장-질내에 보유하며, 이는 분만 전 또는 그 동안에 양수 또는 아기를 감염시켜 패혈증, 폐렴 및 수막염을 유발할 수 있다 (Baker 2013; Heath, P.T., et al., BMJ Clin. Evid. (Online), pii:0323 (2014)). GBS 수막염으로부터 생존한 유아의 적어도 25퍼센트는 신경학적 손상을 앓고 있으며 19%는 인지 지연, 뇌성 마비, 실명 및 청각 상실을 경험하는 것으로 추정된다 (Libster, R., et al., Pediatrics, 130(1):e8-15(2012) (2012)). GBS는 또한 유산, 조기 분만 및 사산에 연관된다 (McDonald, H.M., et al., Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 8(5-6):220-227 (2000); Randis, T.M., et al., The Journal of Infectious Diseases, 210(2):265-273 (2014); Kessous, R., et al., J. Matern. Fetal Neonatal Med., 25(10):1983-1986 (2012)). 매우 낮은 출생 체중의 유아는 감염의 위험이 훨씬 더 크며, 최대 3%가 감염되고, 즉각적인 항생제 치료에도 불구하고 최대 30%의 사망률을 갖는다 (Heath 2014).

[0003] 1990년대 후반에 미국에서의 GBS 스크리닝 및 분만시 항생제 예방 (IAP)의 도입은 생후 첫 주 내에 발생하는 신생아 질환 (조기 발병 질환 [EOD])의 비율을 감소시켰으나, 그 후에 생후 첫 3개월 내에 나타나는 후기 발병 질환 (LOD)의 비율에는 어떠한 측정가능한 영향도 미치지 않았다. 미국에서의 EOD 및 LOD 사례의 비율은 현재 각각 1,000명 출생당 0.25 및 0.27건이다 (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Active Bacterial Core (ABC) Surveillance Report (2013), <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs13.pdf>에서 이용가능함). 박테리아혈증 및 수막염을 포함한 침습성 폐렴구균성 질환의 예방을 위한 폐렴구균 접합체 백신의 도입 후에, GBS 질환의 예방을 위한 IAP에도 불구하고, GBS는 미국에서 신생아 패혈증 (EOD) 및 유아 (< 2 mo)에서의 수막염의 가장 흔한 단 하나의 원인이 되었다 (Verani, J.R., et al., MMWR, 59(RR10):1-32 (2010); Thigpen, M.C., et al., New England Journal of Medicine, 364(21):2016-2025 (2011)). 미국에서와 달리, 네덜란드 또는 영국에서는 침습성 GBS 질환에 대한 예방 가이드라인 및 IAP의 도입이 EOD의 발생률을 감소시키지는 않았다 (Bekker, V., et al., The Lancet Infectious Diseases, 14(11):1083-1089 (2014); Lamagni, T.L., et al., Clin. Infect. Dis., 57(5):682-688 (2013)). 이러한 효과의 결여는 범용 스크리닝의 결여 및 가장 높은 위험군 (예를 들어, 열, 장기 파열 막)에서 모체에만 IAP를 한정시키는 것으로 인한 것일 수 있다. EOD의 비율은 IAP를 사용하지 않는 국가에서 유의하게 더 높으며, 평균 발생률은 1000명 정상 출생당 0.75건 (95% CI 0.58-0.89)로 보고되었다 (Edmond, K.M., et al., Lancet, 379(9815):547-556 (2012)).

[0004] GBS 질환에 대한 위험이 있는 또 다른 집단은 고령층이다. 위험 인자는 만성 의료 문제 예컨대 당뇨병, 암, 심부전, 신경 및 비뇨기 상태를 포함한다. CDC ABC 감시 데이터에 따르면, 2013년에 미국에서의 침습성 GBS의 연간 발생률은 0.28건/1,000명 성인 또는 ≥ 65세의 성인에서 12,400건 사례/년이었다. 이러한 비율은 고령층에서의 침습성 폐렴구균성 질환의 발생률 (vs. >65세에 대해 0.30건/1,000명)에 근접한다. 이들 비율은 미국 및 유럽 둘 다에서 계속해서 증가할 것으로 예상된다 (CDC 2013; Lamagni 2013).

- [0005] 유아 및 고령층 사이에서 GBS 질환을 예방하기 위한 하나의 접근법은 피막(capsule) 폴리사카라이드-기반 백신의 사용이다. 모체 GBS 예방 백신의 구현은, IAP가 사용되는지 여부와 관계없이 미국에서의 유아 사이에서 GBS 질환을 예방할 잠재력을 갖는다. 폴리사카라이드는 그 자체로 면역원성일 수 있지만, 폴리사카라이드의 단백질 담체에의 접합이, 특히 유아 및 고령층에서 면역원성을 개선시키는 데 사용되었다. 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신은 단백질 담체에 연결된, 일반적으로 박테리아의 표면 외피로부터의, 폴리사카라이드를 사용하여 제조된다. 폴리사카라이드 및 단백질 담체의 화학적 결합은 그의 표면 상에 백신 내에 함유된 폴리사카라이드를 디스플레이하는 박테리아에 대한 면역 반응을 유도하며, 이에 따라 질환을 예방한다. 따라서, 병원성 박테리아로부터의 폴리사카라이드를 사용하는 백신접종은 숙주 면역을 부스팅하기 위한 잠재적 전략이다.
- [0006] 박테리아를 덮고 있는 폴리사카라이드의 구조는, 심지어 박테리아의 단일 종 내에서도 매우 다양하다. 예를 들어, GBS에는 박테리아 폴리사카라이드 피막에서의 차이로 인한 10종의 상이한 혈청형 (즉 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX)이 존재한다. 따라서, 폴리사카라이드-기반 백신은 상이한 순환 균주에 대한 넓은 적용범위를 보장하는 폴리사카라이드 패널로 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0007] 담체 단백질은 표적 병원체에 대한 특이적 면역 반응을 부스팅하는, 표적 병원체로부터의 관련 단백질 항원, 또는 일반적으로 아주반트 또는 일반적인 면역 반응 자극제로서 더 많이 역할을 하는 면역원성 단백질일 수 있다.
- [0008] GBS 혈청형 Ia, Ib, II, III, 및 V의 개별 1가 폴리사카라이드-단백질 접합체는 비-임신 성인에서의 1 및 2상 임상 시험에서 평가되었다 (Brigtsen, A.K., et al., Journal of Infectious Diseases, 185(9):1277-1284 (2002); Baker, C.J., et al., J. Infect. Dis., 188(1):66-73 (2003); Baker, C.J., et al., J. Infect. Dis., 189(6):1103-1112 (2004); Baker, C.J., et al., Vaccine, 25(1):55-63 (2007)). 2가 II-TT 및 III-TT 당접합체 백신 및 Ia-CRM₁₉₇, Ib-CRM₁₉₇ 및 III-CRM₁₉₇ 당접합체를 포함하는 3가 백신이 또한 연구되었다 (Baker JID 2003; Clinicaltrials.gov NCT01193920, NCT01412801, 및 NCT01446289). 그러나, 아직 어떠한 GBS 백신도 승인되지 않았다.
- [0009] 더욱이, 3가 백신은 남아프리카에서 신생아 질환을 유발하는 침습성 균주의 >90%를 커버하는 한편 (Madzivhandila, M., et al., PloS One, 6(3):e17861 (2011)), 이들 동일한 혈청형은 티게시클린 평가 및 감시 시험 (T.E.S.T., <http://www.testsurveillance.com/>)으로부터 2004-2013년 사이에 수집된 901개의 샘플의 전세계적 수집물로부터의 최근 신생아 분리주의 감시에 기초하여, 북미 및 유럽에서 각각 침습성 분리주의 단지 62% 및 66%를 나타낸다.
- [0010] T.E.S.T. 샘플로부터 수득한 균주의 분석은 수집된 균주의 95%가 5종의 기록된 주요 혈청형 (Ia, Ib, II, III, 및 V) 중 1종에 속하고, 추가의 3%가 혈청형 IV였다는 것을 보여주었다. 일련의 공개는 또한 아메리카 및 유럽에서 지난 십년에 걸쳐 혈청형 IV의 출현을 확인하였다 (Diedrick, M.J., et al., J. Clin. Microbiol., 48(9):3100-3104 (2010); Teatero (2014); Meehan, M. et al., European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 33(7):1155-1162 (2014); Florindo, C., et al., Euro Surveillance: Bulletin European sur les Maladies Transmissibles (European Communicable Disease Bulletin), 19(23) (2014); Palmiero, J.K., et al., Journal of Clinical Microbiology, 48(12):4397-4403 (2010)). 유아에의 GBS의 전파에 대한 위험 인자인 성인에서의 직장/질 보유를 조사하는 연구는 또한 분리주의 97%가 이들 6종의 혈청형 중 1종에 속하고, 혈청형 IV가 ~4%의 빈도를 나타내는 것을 발견하였다. 연구는 건강한 미국 성인에서 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 (GBS를 포함함), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 보유를 모니터링하도록 설계되었다 (문헌 [Matson, M.A., et al., ICAAC, Abstract I-306 (Washington, DC, Sep. 5-9, 2014)] 참조).
- [0011] 유사하게, T.E.S.T. 샘플의 분석은 미국에서의 ≥ 65세의 노인으로부터의 혈액 분리주의 98%가 동일한 6종의 우세한 혈청군에 속한다는 것을 보여주었다. 고령의 분리주 및 다른 집단 사이의 가장 주목할만한 차이는 혈청군 분포이다. 고령 환자로부터의 분리주의 경우, 혈청형 V 균주가 가장 큰 군을 구성한다 (34% vs. 신생아의 경우 18% 또는 성인 보유 균주의 경우 18%).
- [0012] GBS 역학의 연구는 혈청형 유병률의 지리적 차이가 존재한다는 것을 발견하였고, 비-GBS6 혈청형의 유병률은 지리학, 환자의 연령, 및 감시가 콜로니화 또는 침습성 질환에 기반하는지를 포함한 다수의 요인에 의존한다는 것을 나타낸다.
- [0013] 예를 들어, 혈청형 VI 및 VIII 분리주는 일본에서 건강한 임신 여성의 우세한 이주종인 것으로 밝혀졌다 (Lachenauer, C.S., et al., JID 179(4):1030-1033 (1999)). 비-GBS6 혈청형 콜로니화의 비율은 서방 국가에

서보다 아시아에서 상당히 더 높다. 일본에서의 73명의 임신 여성 연구에서, 혈청형 VI 및 VIII 보유의 비율은 각각 35.6% 및 24.7%였다. 대조적으로, 이들 혈청형은 미국에서는 임신 여성 사이에서 거의 관찰되지 않는다 [1, 2]. 그러나, 이들 혈청형은 유아에서는 상응하게 높은 비율의 질환을 유발하지 않는다. 신생아-질환-유발 분리주를 2011-2015년에 수집한 (n=132) 일본에서의 GBS 역학의 대규모 연구에서, 비-GBS6 혈청형의 유병률은 무시할만한 정도였다 (오직 EOD에서의 VI의 경우 1.1%; 오직 후기 발병 질환의 경우, 혈청형 IX 1.1%) [3]. 이들 결과는 유사한 혈청형 유병률: III (48.3%), Ia (30.0%), 및 Ib (10.0%)이 발견된 조기 신생아 침습성 분리주 연구 (n=60)와 일치한다 [4]. 비-GBS6 신생아 질환의 낮은 비율에 대한 이러한 경향은 지금까지 공개된 연구에 보다 적은 수의 분리주 (< 50)가 관여하였다 하더라도 중국에서는 유사한 것으로 보인다 [5-7].

[0014] 중요하게는, 비-GBS6 혈청형에 의해 유발된 침습성 질환의 비율은 고령층 환자에서 훨씬 더 높다. 2010-2013년에 수득한 분리주 (n=443)에 기초한 일본에서의 대규모 연구에서, 침습성 혈청형 VI의 유병률은 9.5%였다 [8]. 유사한 경향이 대만에서 관찰되는데, 여기서 침습성 혈청형 VI 질환의 높은 비율이 고령층에서는 보이나 유아에서는 그렇지 않다 [9].

[0015] 이들 감시 연구에 기초하여 혈청형 VI는 제2-세대 백신, 특히 고령층 인구를 목표로 하는 것의 포함이 권장되는 새로 나타난 위협인 것으로 보인다. 혈청형 VII, VIII 및 IX에 의해 유발된 침습성 질환의 발생이 현재에는 드물지만, GBS6 백신의 도입 후에 혈청형 교체가 일어난다면 보다 중요해질 수 있다.

[0016] 따라서, 전세계의 광범위한 인구 사이에서 새로 나타난 혈청형 VI, VII, VIII 및 IX에 의해 유발되는 것을 포함한 GBS 질환을 예방하거나 또는 치료하기 위한 수단으로서 수동 면역을 부여하기 위한 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 또는 모노클로날 항체에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0017] 발명의 개요

[0018] 한 실시양태에서, 본 발명은 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 100%의 시알산 수준을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 혈청형 VI, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0019] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 또는 0.95 mM 시알산을 갖는다.

[0020] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 약 25 kDa 내지 약 750 kDa, 약 25 kDa 내지 약 400 kDa, 약 25 kDa 내지 약 200 kDa, 또는 약 100 kDa 내지 약 400 kDa의 분자량을 갖는다.

[0021] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체의 분자량은 약 300 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 15,000 kDa, 또는 약 1,000 kDa 내지 약 10,000 kDa이다.

[0022] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 또는 약 1% 미만 0-아세틸화된다.

[0023] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 사카라이드 반복 단위의 mM당 적어도 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35 또는 약 0.4 mM 0-아세테이트를 갖는다.

[0024] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 담체 단백질은 CRM₁₉₇, 디프테리아 독소이드 (DT), 파상풍 독소이드 (TT), 및 스트렙토코쿠스 C5a 펩티다제 (SCP)로부터 선택된다.

[0025] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 피막 폴리사카라이드 생성 박테리아를 포함하는 세포 브로쓰와 유기 시약을 반응시키는 것을 포함하는, 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함한다.

- [0026] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함하며, 여기서 박테리아는 용해되지 않고/않거나 박테리아는 열 사멸된다.
- [0027] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함하며, 여기서 방법은 원심분리하여 세포 페이스트를 제공하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0028] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함하며, 여기서 방법은 여과 단계를 추가로 포함하고, 이는 임의적으로 투석여과인 여과 단계를 포함한다.
- [0029] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드 생성 박테리아는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에를 포함한다.
- [0030] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함하며, 여기서 반응의 pH는 약 5.5 내지 약 9.5이다.
- [0031] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함하며, 여기서 반응은 약 20℃ 내지 약 85℃의 온도에서 일어난다.
- [0032] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 기재된 바와 같은 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법을 포함하며, 여기서 반응 시간은 약 10시간 내지 약 90시간이다.
- [0033] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 본원에 기재된 바와 같은 방법에 따라 단리된다.
- [0034] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 제조된 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다.
- [0035] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VI로부터의 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질, 및 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 포함한다.
- [0036] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VI 및 담체 단백질을 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VI를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 추가로 포함한다.
- [0037] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, Ia, Ib, II, III, IV 및 V로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 추가로 포함한다. 추가의 실시양태에서, 본 발명은 GBS 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, VII, VIII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 추가로 포함한다.
- [0038] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VI로부터의 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하고, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 100%의 시알산 수준을 갖는다.
- [0039] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VII 및 담체 단백질을 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VII를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 추가로 포함한다.
- [0040] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드로부터의 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하고, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 100%의 시알산 수준을 갖는다.
- [0041] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VIII 및 담체 단백질을 포함하는 폴리사카라이드

이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VIII를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII 및 IX로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 추가로 포함한다.

[0042] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드로부터의 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하고, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 100%의 시알산 수준을 갖는다.

[0043] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 IX 및 담체 단백질을 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 IX를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII 및 VIII로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형을 추가로 포함한다.

[0044] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드로부터의 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하고, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과, 약 95% 초과, 또는 약 100%의 시알산 수준을 갖는다.

[0045] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VI 및 VII로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0046] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VI 및 VIII로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0047] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VI 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0048] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VII 및 VIII로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0049] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VII 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0050] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VIII 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0051] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VI, VII 및 VIII로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0052] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VI, VII 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0053] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VI, VIII 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

[0054] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 VI, VII, VIII 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.

- [0055] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 1a, 1b, II, III, IV, V, 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0056] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 1a, 1b, II, III, IV, V, VI 및 VII로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0057] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 1a, 1b, II, III, IV, V, VI, VII 및 VIII로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0058] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 1a, 1b, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0059] 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 1a 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0060] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 1b 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0061] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 II 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0062] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 III 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0063] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 IV 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0064] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 접합체는 GBS 혈청형 V 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드, 및 담체 단백질을 포함한다.
- [0065] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 제약 상 허용되는 부형제, 완충제, 안정화제, 아주반트, 동결보호제, 염, 2가 양이온, 비-이온성 세제, 자유 라디칼 산화의 억제제, 담체 또는 그의 혼합물을 추가로 포함한다.
- [0066] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 HEPES, PIPES, MES, 트리스 (트리메타민), 포스페이트, 아세테이트, 보레이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘 및 숙시네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제를 추가로 포함한다.
- [0067] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리소르베이트-80, 폴리소르베이트-60, 폴리소르베이트-40, 폴리소르베이트-20 및 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 계면활성제를 추가로 포함한다.
- [0068] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨, 팔라티니트, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 글리신, 아르기닌, 리신, 염화나트륨 (NaCl), 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 부형제를 추가로 포함한다.
- [0069] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 스트렙토코쿠스 C5a 펩티다제 (SCP), 알루미늄-기반 아주반트, 또는 QS-21로부터 선택되는 아주반트를 추가로 포함

하고, 여기서 알루미늄-기반 아주반트는 인산알루미늄, 알루미늄 히드록실 포스페이트 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0070] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 완충제, 계면활성제, 부형제, 및 임의적으로 아주반트를 포함하고, 여기서 조성물은 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충된다.
- [0071] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 히스티딘, 폴리소르베이트-80, 염화나트륨, 및 임의적으로 인산알루미늄을 포함하고, 여기서 조성물은 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충된다.
- [0072] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 히스티딘 약 10 mM 내지 약 25 mM, 폴리소르베이트-80 약 0.01% 내지 약 0.03% (v/w), 염화나트륨 약 10 mM 내지 약 250 mM, 및 임의적으로 인산알루미늄으로서의 알루미늄 약 0.25 mg/ml 내지 약 0.75 mg/ml를 포함한다.
- [0073] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 약 5 mcg/ml 내지 약 50 mcg/ml의 용량을 포함한다.
- [0074] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은, 임의적으로 적어도 1종의 부형제의 존재 하에, 동결건조되고, 여기서 적어도 1종의 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레티토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨, 팔라티니트, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 글리신, 아르기닌, 리신, 염화나트륨 (NaCl), 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0075] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v)의 적어도 1종의 부형제를 포함한다.
- [0076] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 만니톨 또는 글리신으로부터 선택되는 추가의 부형제를 추가로 포함하며, 여기서 조성물은 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v)의 추가의 부형제를 포함한다.
- [0077] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 조성물은 물, 주사용수 (WFI), 아주반트 현탁액 또는 염수로 재구성된다.
- [0078] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함한다.
- [0079] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에서 GBS에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함한다.
- [0080] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 대상체는 임신 계획 중인 여성 또는 임신한 여성이고, 여기서 여성은 임의적으로 임신 후반기, 적어도 임신 20주, 또는 임신 27주 내지 36주이다.
- [0081] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 대상체는 50세 이상, 65세 이상, 또는 85세 이상의 성인이다.
- [0082] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 대상체는 면역손상되고/거나, 여기서 대상체는 비만, 당뇨병, HIV 감염, 암, 심혈관 질환 또는 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 의학적 상태를 갖는다.
- [0083] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하며, 여기서 B군 스트렙토코쿠스는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에이다.
- [0084] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, B군 스트렙토코쿠스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 포함한다.
- [0085] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스와 연관된 질환 또는 상태를 예방하거나 또는 감소시키는 방법을

포함한다.

- [0086] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스와 연관된 질환 또는 상태를 예방하거나 또는 감소시키는 방법을 포함하며, 여기서 대상체는 임신 계획 중인 여성 또는 임신한 여성이고, 임의적으로 여기서 여성은 임신 후반기, 적어도 임신 20주, 또는 임신 27주 내지 36주이다.
- [0087] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스와 연관된 질환 또는 상태를 예방하거나 또는 감소시키는 방법을 포함하며, 여기서 대상체는 50세 이상, 65세 이상, 또는 85세 이상의 성인이고/거나, 여기서 대상체는 면역손상되고, 임의적으로 여기서 대상체는 비만, 당뇨병, HIV 감염, 암, 심혈관 질환 또는 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 의학적 상태를 갖는다.
- [0088] 한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스와 연관된 질환 또는 상태를 예방하거나 또는 감소시키는 방법을 포함하며, 여기서 B군 스트렙토코쿠스는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에이다.
- [0089] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, B군 스트렙토코쿠스 혈청형 V, 또는 혈청형 VI, 또는 혈청형 VII, 또는 혈청형 VIII, 또는 혈청형 IX에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 포함한다.
- [0090] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 접합체 중의 피막 폴리사카라이드에 결합하는 항체를 포함한다.
- [0091] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함하는 조성물, 또는 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는 항체를 생산하는 방법을 포함한다.
- [0092] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 조성물을 사용하여 항체 제제를 생성하는 단계, 및 항체 제제를 대상체에게 투여하여 수동 면역을 부여하는 단계를 포함하는, 대상체에게 수동 면역을 부여하는 방법을 포함한다.
- [0093] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함한다: (a) GBS 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시켜 활성화된 폴리사카라이드를 생성하는 단계, 및 (b) 활성화된 폴리사카라이드를 담체 단백질과 반응시켜 폴리사카라이드-단백질 접합체를 생성하는 단계, 임의적으로 여기서 단계 (b)는 디메틸설폭시드 (DMSO), 술폴란, 디메틸포름아미드 (DMF) 및 헥사메틸포스포트리아미드 (HMPA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 극성 비양성자성 용매 중에서 수행됨.
- [0094] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 폴리사카라이드는 0.01 내지 10.0 몰 당량의 산화제와 반응하고, 여기서 산화제는 퍼아이오테이트이고, 이는 임의적으로 소듐 퍼아이오테이트를 포함한다.
- [0095] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 단계 (a)의 산화 반응은 1시간 내지 50시간이고, 임의적으로 여기서 산화 반응의 온도는 약 2°C 내지 약 25°C로 유지되고, 임의적으로 여기서 산화 반응은 인산나트륨, 인산칼륨, 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES) 및 비스-트리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제 중에서 수행되고, 추가로 임의적으로 여기서 완충제는 약 1 mM 내지 약 500 mM의 농도를 갖는다.
- [0096] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 산화 반응은 pH 약 4.0 내지 약 8.0에서 수행되고, 임의적으로 여기서 산화제는 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO)이고, 임의적으로 여기서 N-클로로숙신이미드 (NCS)는 공산화제이고/거나, 여기서 단계 (a)는 켄칭제의 첨가에 의해 산화 반응을 켄칭하는 것을 추가로 포함한다.
- [0097] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1 mg/mL 내지 약 10.0 mg/mL이고, 임의적으로 여기서 활성화된 폴리사카라이드의 산화도는 5 내지 25이다.
- [0098] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는

방법을 포함하며, 여기서 방법은 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로 이루어진 군으로부터 선택되는 사카라이드의 존재 하에 활성화된 폴리사카라이드를 동결건조시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0099] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 단계 (b)는 활성화된 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하고, 배합된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 GBS 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성하는 것을 포함하고; 임의적으로 여기서 단계 (b)에서의 활성화된 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1 mg/mL 내지 약 10.0 mg/mL이고/거나; 임의적으로 여기서 활성화된 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 비 (중량 대 중량)는 5:1 내지 0.1:1이다.

[0100] 다른 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 환원제는 소듐 시아노보로히드라이드, 소듐 트리아세톡시보로히드라이드, 브룬스 테드 또는 루이스 산의 존재 하의 소듐 및 아연 보로히드라이드, 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-디보란-메탄올, 디메틸아민-보란, $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$, 벤질아민- BH_3 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란 (PEMB)으로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나, 여기서 환원제의 양은 약 0.1 내지 약 10.0 몰 당량이다.

[0101] 한 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 단계 (2)의 환원 반응의 지속시간은 1시간 내지 60시간이고/거나, 여기서 환원 반응의 온도는 10°C 내지 40°C로 유지된다.

[0102] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 방법은 보로히드라이드의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 단계 (단계 (c))를 추가로 포함하고, 임의적으로 여기서 보로히드라이드의 양은 약 0.1 내지 약 10.0 몰 당량이고, 여기서 보로히드라이드는 소듐 보로히드라이드 (NaBH_4), 소듐 시아노보로히드라이드, 리튬 보로히드라이드, 포타슘 보로히드라이드, 테트라부틸암모늄 보로히드라이드, 칼슘 보로히드라이드 및 마그네슘 보로히드라이드로 이루어진 군으로부터 선택되고, 임의적으로 여기서 캡핑 단계의 지속시간은 0.1시간 내지 10시간이고/거나, 여기서 캡핑 단계의 온도는 약 15°C 및 약 45°C로 유지된다.

[0103] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 폴리사카라이드-단백질 접합체는 폴리사카라이드의 총량에 비해 약 40% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다.

[0104] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함하며, 여기서 접합체 중의 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비 (중량 대 중량)는 약 0.5 내지 약 3.0이고/거나, 여기서 접합체의 접합도는 2 내지 15이다.

[0105] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함한다: (a) 단리된 GBS 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계; (b) 켄칭제의 첨가에 의해 단계 (a)의 산화 반응을 켄칭하여 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 생성하는 단계; (c) 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계; (d) 배합된 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 GBS 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성하는 단계; 및 (e) 소듐 보로히드라이드 (NaBH_4)의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 단계, 여기서 단계 (c) 및 (d)는 DMSO 중에서 수행됨.

[0106] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 포함한다: (a) 단리된 GBS 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계; (b) 켄칭제의 첨가에 의해 단계 (a)의 산화 반응을 켄칭하여 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 생성하는 단계; (c) 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계; (d) 배합된 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 GBS 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성하는 단계; (e) 소듐 보로히드라이드 (NaBH_4)의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 단계, 여기서 단계 (c) 및 (d)는 DMSO 중에서 수행됨; 및 (f) 폴리사카라이드-단백질 접합체를 정제하는 단계.

도면의 간단한 설명

- [0107] 도 1은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VI 접합체의 면역원성 및 교차-반응성을 보여준다.
- 도 2a-2c는 a) GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VII 접합체, b) GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VIII 접합체, 및 c) GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 IX 접합체의 면역원성을 보여준다.
- 도 3a-3b는 a) GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VII, 및 b) GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 IX 접합체의 면역원성 및 교차-반응성을 보여준다.
- 도 4는 다가 GBS 접합체 백신의 면역원성을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0108] 본 발명은 특정한 방법 및 기재된 실험 조건으로 제한되지 않으며, 이에 따라 방법 및 조건은 변경될 수 있다. 본원에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 목적으로, 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 또한 이해되어야 한다.
- [0109] 본원에 기재된 것과 유사하거나 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있을지라도, 바람직한 방법 및 물질이 이제 기재된다. 본원에 인용되는 모든 간행물은 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.
- [0110] 본원에 사용된 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 인식되고 공지된 의미를 갖지만, 편의성 및 완전성을 위해 특정한 용어 및 그의 의미가 하기 및 명세서 전반에 걸쳐 제시된다.
- [0111] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "방법"에 대한 언급은 본원에 기재된 및/또는 본 개시내용 등을 읽을 때 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백하게 될 유형 등의 하나 이상의 방법 및/또는 단계를 포함한다.
- [0112] 용어 "약" 또는 "대략"은 값의 통계적으로 의미있는 범위 이내에 있음을 의미한다. 이러한 범위는 주어진 값 또는 범위의 한 자릿수 이내, 전형적으로 20% 이내, 보다 전형적으로 10% 이내, 및 보다 더 전형적으로 5% 이내에 있을 수 있다. 용어 "약" 또는 "대략"에 의해 포괄되는 허용가능한 편차는 연구 하에 있는 특정한 시스템에 좌우되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 인지될 수 있다. 범위가 본 출원 내에서 언급될 때마다, 그 범위 이내의 모든 정수가 또한 본 발명의 실시양태로서 고려된다.
- [0113] 본 개시내용에서, 용어 예컨대 "포함한다(comprise)", "포함되는", "포함하는", "함유한다", "함유하는" 등은 미국 특허법에서 이들에게 부여되는 의미를 가질 수 있고; 예를 들어, 이들은 "포함한다(include)", "포함되는", "포함하는" 등을 의미할 수 있다는 것이 주목된다. 이러한 용어는 임의의 다른 성분을 배제하지 않으면서 특정한 성분 또는 성분의 세트를 포함하는 것을 지칭한다. 용어 예컨대 "로 본질적으로 이루어진" 및 "로 본질적으로 이루어지다"는 미국 특허법에서 이들에게 부여되는 의미를 갖고, 예를 들어 이들은 본 발명의 신규 또는 기본 특징을 손상시키지 않는 추가의 성분 또는 단계의 포함을 허용하며, 즉 이들은 본 발명의 신규 또는 기본 특징을 손상시키는 추가의 언급되지 않은 성분 또는 단계를 배제하고, 이들은 선행 기술, 예컨대 본원에 인용되거나 또는 본원에 참조로 포함된 관련 기술분야의 문헌의 성분 또는 단계를 배제하는데, 이는 특히 선행 기술에 비해, 예를 들어 본원에서 인용되거나 또는 본원에 참조로 포함된 문헌에 비해 특허성, 예를 들어 신규성, 비-자명성, 진보성이 있는 실시양태를 정의하는 것이 본 문헌의 목적이기 때문이다. 그리고, 용어 "이루어지다" 및 "이루어진"은 미국 특허법에서 이들에게 부여되는 의미를 가지며; 즉, 이들 용어는 폐쇄형이다. 따라서, 이들 용어는 특정한 성분 또는 성분의 세트를 포함하고 모든 다른 성분을 배제하는 것을 지칭한다.
- [0114] 용어 "항원"은 일반적으로 생물학적 분자, 통상적으로는 동족 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 적어도 1종의 에피토프를 함유하는 단백질, 펩티드, 폴리사카라이드, 지질 또는 접합체를 지칭하거나; 또는 일부 경우에, 동물 내에 주사되거나 또는 흡수되는 조성물을 포함한, 동물에서 항체의 생산 또는 T-세포 반응 또는 둘 다를 자극할 수 있는 면역원성 물질을 지칭한다. 면역 반응은 온전한 분자 또는 분자의 하나 이상의 다양한 부분 (예를 들어, 에피토프 또는 합텐)에 대해 생성될 수 있다. 용어는 개별 분자 또는 항원 분자의 동중 또는 이종 집단을 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 항원은 항체, T 세포 수용체 또는 특정 체액성 및/또는 세포성 면역의 다른 요소에 의해 인식된다. 용어 "항원"은 모든 관련된 항원 에피토프를 포함한다. 주어진 항원의 에피토프는 관련 기술분야에 널리 공지된 임의의 다수의 에피토프 맵핑 기술을 사용하여 확인될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, NJ] 참조). 예를 들어, 선형 에피토프는, 예를 들어 단백질 분자의 부분에 상응하는 많

은 수의 펩티드를 고체 지지체 상에서 공동으로 합성하고, 펩티드가 지지체에 여전히 부착되어 있는 동안 펩티드를 항체와 반응시킴으로써 결정될 수 있다. 이러한 기술은 관련 기술분야에 공지되고, 예를 들어 미국 특허 번호 4,708,871; 문헌 [Geysen, H.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002 (1984); Geysen, H.M., et al., Molec. Immunol., 23(7):709-715 (1986)] (모두 그의 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 유사하게, 입체형태적 에피토프는, 예를 들어 X선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명에 의해서와 같이 아미노산의 공간 입체형태를 결정함으로써 확인될 수 있다 (예를 들어, [Epitope Mapping Protocols, 상기 문헌] 참조). 추가로, 본 발명의 목적을 위해, "항원"은 또한, 단백질이 면역학적 반응을 도출하는 능력을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 변형, 예컨대 결실, 부가 및 치환 (일반적으로, 자연에서 보존적임, 그러나 이들이 비-보존적일 수 있음)을 포함하는 단백질을 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 이들 변형은, 부위-지정 돌연변이유발을 통한, 또는 특정한 합성 절차를 통한, 또는 유전자 조작 접근법을 통한 것과 같이 의도된 것일 수 있거나, 또는 예컨대 항원을 생산하는 숙주의 돌연변이를 통한 것과 같이 우연한 것일 수 있다. 추가로, 항원은 미생물, 예를 들어 박테리아로부터 유래, 수득 또는 분리될 수 있거나, 또는 온전한 유기체일 수 있다. 유사하게, 예컨대 핵산 번역화 적용에서, 항원을 발현하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 또한 정의에 포함된다. 합성 항원, 예를 들어 폴리페피토프, 플랭킹 에피토프, 및 다른 재조합 또는 합성적으로 유래된 항원이 또한 포함된다 (Bergmann, C., et al., Eur. J. Immunol., 23(11):2777-2781(1993); Bergmann, C.C., et al., J. Immunol., 157(8):3242-3249(1996); Suhrbier, A., Immunol. and Cell Biol., 75(4):402-408 (1997)).

- [0115] 상호교환가능하게 사용되는 용어 "백신" 또는 "백신 조성물"은 동물에서 면역 반응을 유도하는 적어도 1종의 면역원성 조성물을 포함하는 제약 조성물을 지칭한다.
- [0116] 피막 폴리사카라이드
- [0117] 본원에 사용된 용어 "사카라이드"는 단일 당 모이어티 또는 모노사카라이드 단위 뿐만 아니라 공유 연결되어 디사카라이드, 올리고사카라이드 및 폴리사카라이드를 형성하는 2개 이상의 단일 당 모이어티 또는 모노사카라이드 단위의 조합을 지칭한다. 용어 "사카라이드"는 용어 "탄수화물"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 폴리사카라이드는 선형 또는 분지형일 수 있다.
- [0118] 본원에 사용된 "모노사카라이드"는 올리고사카라이드에서의 단일 당 잔기를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "디사카라이드"는 글리코시드 결합에 의해 함께 연결된 2개의 모노사카라이드 단위 또는 모이어티로 구성된 폴리사카라이드를 지칭한다.
- [0119] 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 올리고사카라이드 (OS)이다. 본원에 사용된 "올리고사카라이드"는 2개 이상의 모노사카라이드 단위 또는 모이어티를 함유하는 화합물을 지칭한다. 올리고사카라이드와 관련하여, 개별 단량체 단위 또는 모이어티는 모노사카라이드이며, 이는 히드록실 기를 통해 또 다른 모노사카라이드 단위 또는 모이어티에 결합되거나 또는 결합될 수 있다. 올리고사카라이드는 보호된 단일 잔기 당으로부터의 화학적 합성에 의해 또는 생물학적으로 생산된 폴리사카라이드의 화학적 분해에 의해 제조될 수 있다. 대안적으로, 올리고사카라이드는 시험관내 효소적 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0120] 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 폴리사카라이드 (PS)이며, 이는 적어도 5개의 모노사카라이드 단위 또는 모이어티의 선형 또는 분지형 중합체를 지칭한다. 명확성을 위해, n이 약 5초과, 예컨대 약 10초과인 보다 많은 수의 반복 단위가 본원에서 폴리사카라이드로 지칭될 것이다.
- [0121] 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 세포 표면 폴리사카라이드이다. 세포 표면 폴리사카라이드는 펩티도글리칸 층, 세포벽 및 피막을 포함한, 최외각 박테리아 세포 막 또는 박테리아 세포 표면 상에 위치한 부분을 적어도 갖는 폴리사카라이드를 지칭한다. 전형적으로, 세포 표면 폴리사카라이드는 생체내 면역 반응을 유도하는 것과 연관된다. 세포 표면 폴리사카라이드는 "세포벽 폴리사카라이드" 또는 "피막 폴리사카라이드"일 수 있다. 세포벽 폴리사카라이드는 전형적으로 박테리아 표면 상에 불연속 층을 형성한다.
- [0122] 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 피막 폴리사카라이드이다. 피막 폴리사카라이드는 글리코시드 연결에 의해 연결된 하나 이상의 모노사카라이드의 반복 단위를 포함하는 당중합체를 지칭한다. 피막 폴리사카라이드는 전형적으로 박테리아 세포 주위에 피막-유사 층을 형성한다. "피막 폴리사카라이드" 또는 "피막 폴리사카라이드"는 스트렙토코쿠스의 대부분의 분리주의 세포벽의 외부에 있는 폴리사카라이드 피막을 지칭한다. 예를 들어, 모든 GBS 피막 폴리사카라이드는 박테리아 병독성에 필요한 말단 α 2-3-연결된 시알산을 갖는 분지형 반복 구조를 갖는다. 피막-연관 시알산 (HPLC 검정에 의해 정량함)은 시험관내 배양된 T.E.S.T.로부터의 침습성 신생아 분리주의 > 94%에서 검출되었다.

- [0123] 본 발명자들은 GBS 피막 폴리사카라이드의 시알산 수준이 면역 반응을 생성하는 데 중요한 특징이라는 것을 발견하였다. 탈시알릴화된 혈청형 V가 바람직하고 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/035519), 혈청형 V의 경우 시알산 함량 >50%이 사용될 수 있다는 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 2014/053612) 것을 발견한 이전의 개시내용은 단지 혈청형 V의 경우 시알산 수준에 대해 모순된 정보만을 제공하였다. 그러나, 이들 참고문헌에서 어느 것도 면역원성에 대한 적어도 대부분의 GBS 폴리사카라이드에서의 시알산 수준의 중요성을 기재하지 않는다. 본 발명자들은 놀랍게도 GBS 피막 폴리사카라이드가 천연 시알산 수준 (즉 100% 또는 약 95% 초과)을 갖는 폴리사카라이드와 대등한 면역 반응을 제공하기 위해 접합 전에 약 60% 이상의 시알산을 필요로 한다는 것을 발견하였다. 혈청형 V에 대해 개시된 이전 범위 내에 있는, 심지어 58%의 시알산 수준도 면역원성에 부정적으로 영향을 미쳤다.
- [0124] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 및 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.
- [0125] 100% 시알산 수준이 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산에 상응한다는 것에 주목하여야 한다. 따라서, 피막 폴리사카라이드는 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.
- [0126] 일부 피막 폴리사카라이드 (CP) 혈청형의 말단 시알산 잔기는 부분적으로 O-아세틸화 (OAc)된다 (Lewis, A.L., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 101(30):11123-8 (2004)). 혈청형 Ib, III, IV, V, VI, 및 IX는 부분적으로 O-아세틸화되고 (최대 ~40%), 반면 혈청형 Ia, II 및 VII는 O-아세틸화를 거의 또는 전혀 갖지 않는다 (약 5% 미만) (Lewis 2004). 본 발명의 한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 O-아세틸화 수준 (약 0% 내지 약 40%)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 탈-O-아세틸화 (약 5% 미만)될 수 있다. 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드의 O-아세틸화도는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 양성자 NMR에 의해 결정될 수 있다 (Lemercinier, X., et al., Carbohydrate Research, 296:83-96 (1996); Jones, C., et al., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30:1233-1247 (2002); 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2005/033148 및 WO 00/56357). 통상적으로 사용되는 또 다른 방법은 문헌 [Hestrin, S., J. Biol. Chem., 180:249-261 (1949)]에 의해 기재되어 있다.
- [0127] 또한, 100% O-아세테이트는 사카라이드 반복 단위의 mM당 약 1.0 mM O-아세테이트에 상응한다. 따라서, 부분적으로 O-아세틸화된 폴리사카라이드는 사카라이드 반복 단위의 mM당 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.35 또는 약 0.4 mM O-아세테이트를 포함한다. 탈-O-아세틸화된 폴리사카라이드는 사카라이드 반복 단위의 mM당 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 또는 0.05 mM 미만의 O-아세테이트를 포함한다.
- [0128] 일반적으로 또한 침습성 질환을 유발할 수 있는 스트렙토코쿠스 미생물은, 박테리아를 피막화하고 숙주 선천성 면역계에 의한 클리어런스에 대한 그의 저항성을 증진시키는 CP를 생산할 수 있다. CP는 박테리아를 식세포작용 및 세포내 사멸에 저항성있게 하는 보호 피막 내에 박테리아 세포를 숨기는 역할을 한다. 피막이 결여된 박테리아는 식세포작용에 보다 취약하다. 피막 폴리사카라이드는 빈번하게 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 포함한 많은 박테리아 병원체에 대한 중요한 병독성 인자이다.
- [0129] 피막 폴리사카라이드는 박테리아의 특정한 종을 혈청형 결정하는 데 사용될 수 있다. 유형 결정은 통상적으로 피막 폴리사카라이드에 특징적인 특정 구조 또는 고유 에피토프에 대해 생성된 특정 항혈청 또는 모노클로날 항체와의 반응에 의해 달성된다. 10종의 GBS 혈청형: Ia, Ib, 및 II-IX이 존재한다 (Ferrieri, P., et al., Emerg. Infect. Dis. [Internet], 19(4) (2013), http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/4/12-1572_article에서 이용가능함).

- [0130] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에로부터 분리된다. 폴리사카라이드는 하기로부터 분리될 수 있다: 에스. 아갈락티아에의 임의의 피막 균주, 예컨대 090, A909 (ATCC 수탁 번호 BAA-1138), 515 (ATCC 수탁 번호 BAA-1177), B523, CJB524, MB 4052 (ATCC 수탁 번호 31574), H36B (ATCC 수탁 번호 12401), S40, S42, MB 4053 (ATCC 수탁 번호 31575), M709, 133, 7357, PFEGBST0267, MB 4055 (ATCC 수탁 번호 31576), 18RS21 (ATCC 수탁 번호 BAA-1175), S16, S20, V8 (ATCC 수탁 번호 12973), DK21, DK23, UAB, 5401, PFEGBST0708, MB 4082 (ATCC 수탁 번호 31577), M132, 110, M781 (ATCC 수탁 번호 BAA-22), D136C(3) (ATCC 수탁 번호 12403), M782, S23, 120, MB 4316 (M-732; ATCC 수탁 번호 31475), M132, K79, COH1 (ATCC 수탁 번호 BAA-1176), PFEGBST0563, 3139 (ATCC 수탁 번호 49446), CZ-NI-016, PFEGBST0961, 1169-NT1, CJB111(ATCC 수탁 번호 BAA-23), CJB112, 2603 V/R (ATCC 수탁 번호 BAA-611), NCTC 10/81, CJ11, PFEGBST0837, 118754, 114852, 114862, 114866, 118775, B 4589, B 4645, SS1214, CZ-PW-119, 7271, CZ-PW-045, JM9130013, JM9130672, IT-NI-016, IT-PW-62, 및 IT-PW-64.
- [0131] 본원에 기재된 폴리사카라이드는, 예를 들어 본원에 기재된 방법을 포함한 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 분리될 수 있다. 본원에 사용된 "단리된"은 특정한 공급원으로부터 획득되고 분리된 것을 지칭한다. 용어 "단리된"은 그의 각각의 자연 발생 형태, 상태 및/또는 환경에 있지 않음을 추가로 지칭한다. 예를 들어, "스트렙토코쿠스로부터 단리된"은 스트렙토코쿠스 세포로부터 획득되고 분리된 물질을 지칭한다. 단리된 폴리사카라이드는 자연 발생이 아니다. 용어 "단리된"은 물질이 그의 원래 환경으로부터 제거되는 것 (예를 들어, 그것이 자연 발생인 경우 자연 환경으로부터 또는 그것이 재조합 물질인 경우 그의 숙주 유기체로부터, 또는 하나의 환경으로부터 상이한 환경으로 옮겨짐)을 의미한다. 예를 들어, "단리된" 피막 폴리사카라이드, 단백질 또는 펩티드는 단백질이 유래된 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 다른 오염 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성되거나 또는 달리 화학 반응의 일부로서 혼합물 중에 존재하는 경우에 화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없는 것이다. 본 발명에서, 단백질 또는 폴리사카라이드는 박테리아 세포로부터 또는 세포 파편으로부터 단리되어, 이들이 면역원성 조성물의 제조에 유용한 형태로 제공되도록 할 수 있다. 용어 "단리된" 또는 "단리하는"은 정제하는 것 또는 정제를 포함할 수 있으며, 이는 관련 기술분야에 공지된 단리된 폴리사카라이드를 정제하는 방법 및/또는 본원에 기재된 방법을 포함한다. 어구 "세포 물질이 실질적으로 없는"은 폴리펩티드/단백질이 그것이 단리되거나 재조합적으로 생산된 세포의 세포 성분으로부터 분리된 폴리펩티드/단백질의 제제를 포함한다. 따라서, 세포 물질이 실질적으로 없는 피막 폴리사카라이드, 단백질 또는 펩티드는 약 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5% 또는 1% (건조 중량 기준) 미만의 오염 단백질 또는 폴리사카라이드 또는 다른 세포 물질을 갖는 피막 폴리사카라이드, 단백질 또는 펩티드의 제제를 포함한다. 폴리펩티드/단백질이 재조합적으로 생산되는 경우에, 이는 또한 바람직하게는 배양 배지가 실질적으로 없으며, 즉, 배양 배지는 단백질 제제의 부피의 약 20%, 10% 또는 5% 미만을 나타낸다. 폴리펩티드/단백질 또는 폴리사카라이드가 화학적 합성에 의해 생산되는 경우에, 이는 바람직하게는 화학적 전구체 또는 다른 화합물이 실질적으로 없으며, 즉, 이는 단백질 또는 폴리사카라이드의 합성에 수반되는 화학적 전구체 또는 다른 화합물로부터 분리된다. 따라서, 폴리펩티드/단백질 또는 폴리사카라이드의 이러한 제제는 약 30%, 20%, 10%, 5% (건조 중량 기준) 미만의 관심 폴리펩티드/단백질 또는 폴리사카라이드 단편 이외의 화학적 전구체 또는 화합물을 갖는다.
- [0132] 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 박테리아로부터 분리된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 폴리사카라이드는 재조합적으로 생산된다. 추가 실시양태에서, 폴리사카라이드는 합성이거나 또는 통상적인 방법에 따라 화학적으로 합성된다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 폴리사카라이드는 폴리사카라이드를 생산하기 위한 생합성 경로를 클로닝 및 발현시킨 후 대용 숙주에서의 발현에 의해 제조된다. 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 면역원성이다. 예를 들어, 본 발명자들은 본원에 기재된 각각의 폴리사카라이드가 면역 반응을 유도하거나 도출할 수 있다는 것을 발견하였다. 용어 "면역원성"은 포유동물에서 체액성 및/또는 세포-매개 면역 반응을 개시하고/거나, 촉발하고/거나, 유발하고/거나, 증진시키고/거나, 개선시키고/거나, 증대시키는 능력을 지칭한다. 한 실시양태에서, 포유동물은 인간, 영장류, 토끼, 돼지, 마우스 등이다.
- [0133] 피막 폴리사카라이드의 분자량은 면역원성 조성물에 사용하기 위한 고려사항이다. 고분자량 피막 폴리사카라이드는 항원 표면 상에 존재하는 에피토프의 보다 높은 결합가로 인해 특정 항체 면역 반응을 유도할 수 있다. 고분자량 피막 폴리사카라이드의 단리 및 정제는 본 발명의 접합체, 조성물 및 방법에 사용하기 위해 고려된다.
- [0134] 그러나, 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 담체 단백질에의 접합 전에 천연 피막 폴리사카라이드의 분자량 미만인 분자량 (MW) 범위로 사이징될 수 있다. 정제된 피막 폴리사카라이드의 크기는 유리한 여과성 특징 및/또는 수율을 갖는 접합체를 생성하기 위해 감소된다.
- [0135] 하나의 이러한 실시양태에서, 정제된 피막 폴리사카라이드의 크기는 고압 균질화에 의해 감소된다. 고압 균질

지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 25 kDa 내지 약 200 kDa이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 100 kDa 내지 약 400 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

[0148] 특정한 실시양태에서, 고압 균질화 공정이 폴리사카라이드의 구조적 특색, 예컨대 시알산을 보존시키면서 천연 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 Ia의 크기를 감소시키는 데 사용된다.

[0149] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

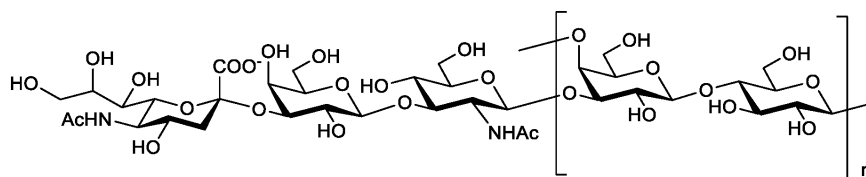
[0150] 또 다른 실시양태에서, 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0151] 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드는 약 5% 미만 O-아세틸화된다. 본 발명의 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 090, A909 (ATCC 수탁 번호 BAA-1138), 515 (ATCC 수탁 번호 BAA-1177), B523, CJB524, 및 MB 4052 (ATCC 수탁 번호 31574)를 포함한다.

[0152] 혈청형 Ib

[0153] 한 실시양태는 혈청형 Ib GBS 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 혈청형 Ib의 구조는 하기와 같이 도시될 수 있다:

[0154] a)



[0155]

[0156] 또는

[0157] b)



[0160]

[0161]

[0162]

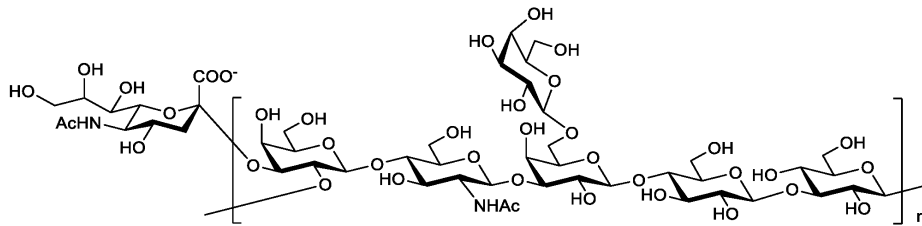
[0163]

[0164]

- 21 -

[0165]

a)

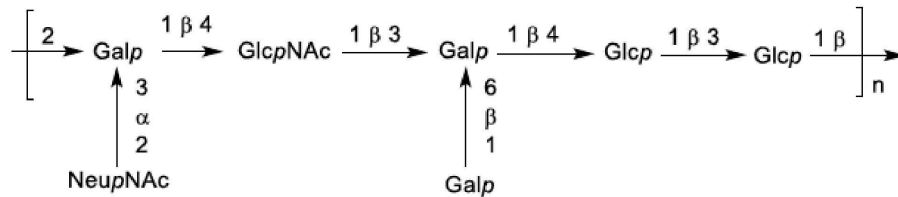


[0166]

또는

[0167]

b)



[0169]

[0170]

혈청형 II 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 25 kDa 내지 약 750 kDa, 약 25 kDa 내지 약 500 kDa, 약 25 kDa 내지 약 450 kDa, 약 25 kDa 내지 약 400 kDa, 약 25 kDa 내지 약 350 kDa, 약 25 kDa 내지 약 300 kDa, 약 25 kDa 내지 약 250 kDa, 약 25 kDa 내지 약 200 kDa, 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 25 kDa 내지 약 400 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

[0171]

본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 II 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

[0172]

또 다른 실시양태에서, 혈청형 II 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0173]

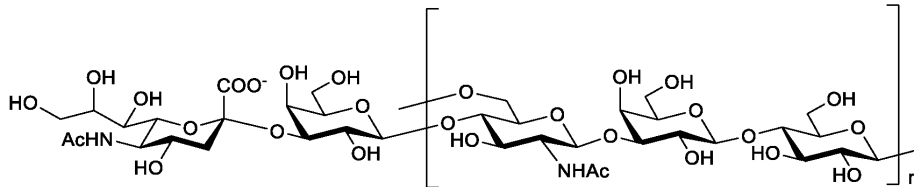
혈청형 II 피막 폴리사카라이드는 약 5% 미만 0-아세틸화된다. 본 발명의 혈청형 II 피막 폴리사카라이드의 일

부 예시적인 균주는 MB 4055 (ATCC 수탁 번호 31576), 18RS21 (ATCC 수탁 번호 BAA-1175), S16, S20, V8 (ATCC 수탁 번호 12973), DK21, DK23, UAB, 5401, 및 PFEGBST0708을 포함한다.

혈청형 III

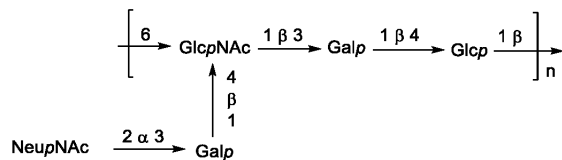
한 실시양태는 혈청형 III GBS 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 혈청형 III의 구조는 하기와 같이 도시될 수 있다:

a)



또는

b)



혈청형 III 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 25 kDa 내지 약 750 kDa, 약 25 kDa 내지 약 500 kDa, 약 25 kDa 내지 약 450 kDa, 약 25 kDa 내지 약 400 kDa, 약 25 kDa 내지 약 350 kDa, 약 25 kDa 내지 약 300 kDa, 약 25 kDa 내지 약 250 kDa, 약 25 kDa 내지 약 200 kDa, 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 25 kDa 내지 약 200 kDa이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 100 kDa 내지 약 400 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

특정한 실시양태에서, 고압 균질화 공정이 폴리사카라이드의 구조적 특색, 예컨대 시알산을 보존시키면서 천연 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 III의 크기를 감소시키는 데 사용된다.

본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 III 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

또 다른 실시양태에서, 혈청형 III 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산,

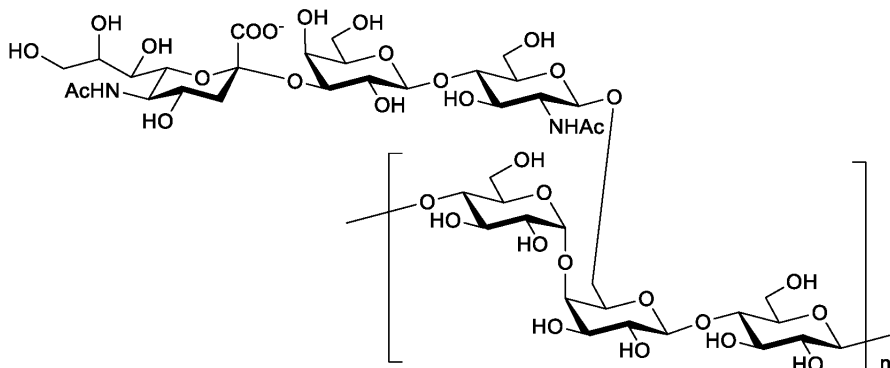
예컨대 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리스카라이드는 접합 전에 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리스카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0185] 혈청형 III 피막 폴리사카라이드는 약 0% 내지 약 40% O-아세틸화된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 탈-O-아세틸화 (즉, 약 5% 미만 O-아세틸화)된다. 본 발명의 혈청형 III 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 MB 4082 (ATCC 수탁 번호 31577), M132, 110, M781 (ATCC 수탁 번호 BAA-22), D136C(3) (ATCC 수탁 번호 12403), M782, S23, 120, MB 4316 (M-732; ATCC 수탁 번호 31475), M132, K79, COH1 (ATCC 수탁 번호 BAA-1176), 및 PFEGBST0563을 포함한다.

[0186] 혈청형 IV

[0187] 한 실시양태는 혈청형 IV GBS 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 혈청형 IV의 구조는 하기와 같이 도시될 수 있다:

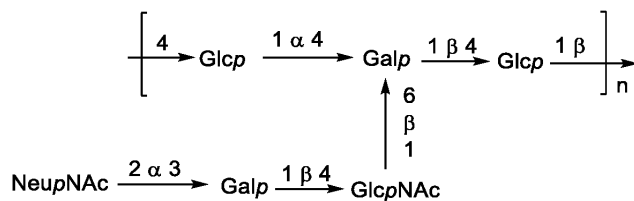
[0188] a)



[0189]

[0190] 또는

[0191] b)



[0192]

[0193] 혈청형 IV 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 25 kDa 내지 약 750 kDa, 약 25 kDa 내지 약 500 kDa, 약 25 kDa 내지 약 450 kDa, 약 25 kDa 내지 약 400 kDa, 약 25 kDa 내지 약 350 kDa, 약 25 kDa 내지 약 300 kDa, 약 25 kDa 내지 약 250 kDa, 약 25 kDa 내지 약 200 kDa, 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600

kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 25 kDa 내지 약 400 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

[0194] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 IV 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

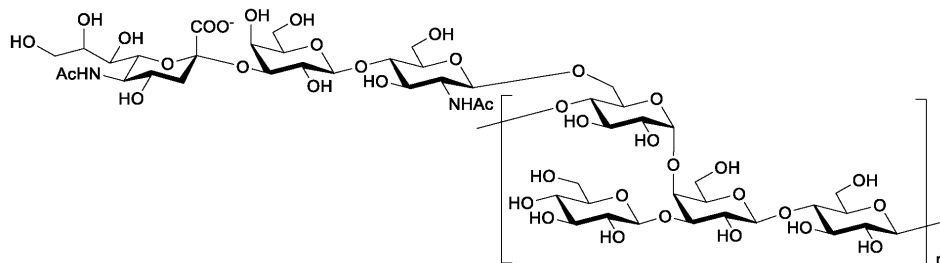
[0195] 또 다른 실시양태에서, 혈청형 IV 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0196] 혈청형 IV 피막 폴리사카라이드는 약 0% 내지 약 40% O-아세틸화된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 탈-O-아세틸화 (즉, 약 5% 미만 O-아세틸화)된다. 본 발명의 혈청형 IV 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 3139 (ATCC 수탁 번호 49446), CZ-NI-016, 및 PFEGBST0961을 포함한다.

[0197] 혈청형 V

[0198] 한 실시양태는 혈청형 V GBS 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 혈청형 V의 구조는 하기와 같이 도시될 수 있다:

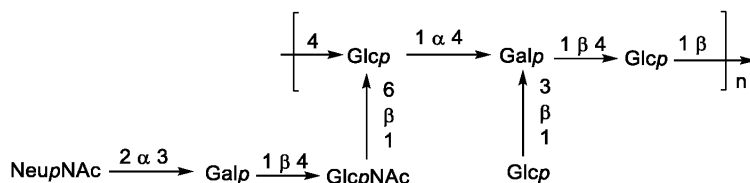
[0199] a)



[0200]

[0201] 또는

[0202] b)



[0203]

[0204] 혈청형 V 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 25 kDa 내지 약 750 kDa, 약 25 kDa 내지 약 500 kDa, 약 25 kDa 내지 약 450 kDa, 약 25 kDa 내지 약 400 kDa, 약 25 kDa 내지 약 350 kDa, 약 25 kDa 내지 약 300 kDa, 약 25 kDa 내지 약 250 kDa, 약 25 kDa 내지 약 200 kDa, 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약

400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 25 kDa 내지 약 400 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

[0205] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 V 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

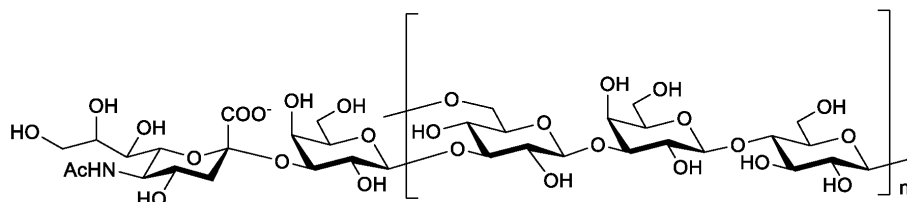
[0206] 또 다른 실시양태에서, 혈청형 V 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0207] 혈청형 V 피막 폴리사카라이드는 약 0% 내지 약 40% O-아세틸화된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 탈-O-아세틸화 (즉, 약 5% 미만 O-아세틸화)된다. 본 발명의 혈청형 V 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 1169-NT1, CJB111 (ATCC 수탁 번호 BAA-23), CJB112, 2603 V/R (ATCC 수탁 번호 BAA-611), NCTC 10/81, CJ11, 및 PFEGBST0837을 포함한다.

[0208] 혈청형 VI

[0209] GBS 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드는 문헌 [von Hunolstein, C., et al., Infection and Immunity, 61(94):1272-1280 (1993)]에 기재되며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 혈청형 VI의 구조는 하기와 같이 도시될 수 있다:

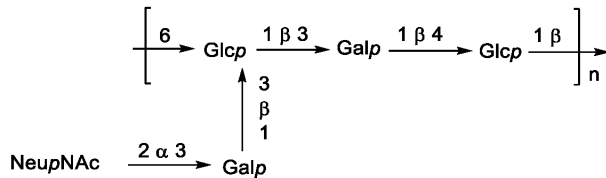
[0210] a)



[0211]

[0212] 또는

[0213] b)



[0214]

[0215]

혈청형 VI 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

[0216]

본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

[0217]

또 다른 실시양태에서, 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0218]

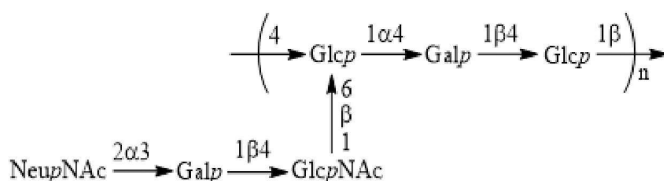
혈청형 VI 피막 폴리사카라이드는 약 0% 내지 약 40% O-아세틸화된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 탈-O-아세틸화 (즉, 약 5% 미만 O-아세틸화)된다. 본 발명의 혈청형 IIII 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 118754, 114852, 114862, 114866, 118775, B 4589, B 4645, SS1214, 및 CZ-PW-119를 포함한다.

[0219]

혈청형 VII

[0220]

GBS 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드는 문헌 [Kogan, G., et al., Carbohydrate Research, 277(1):1-9 (1995)]에 기재되며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 혈청형 VII의 반복 단위는 하기와 같다:



[0221]

[0222]

혈청형 VII 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 50 kDa 내지 약

750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

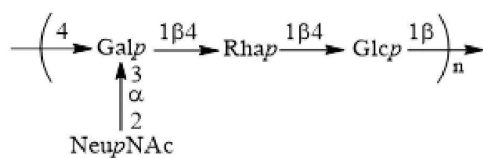
[0223] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

[0224] 또 다른 실시양태에서, 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0225] 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드는 약 5% 미만 0-아세틸화된다. 본 발명의 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 7271 및 CZ-PW-045를 포함한다.

[0226] 혈청형 VIII

[0227] GBS 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드는 문헌 [Kogan, G., et al., The Journal of Biological Chemistry, 271(15):8786-8790 (1996)]에 기재되며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 혈청형 VIII의 반복 단위는 하기와 같다:



[0228]

[0229] 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa

내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

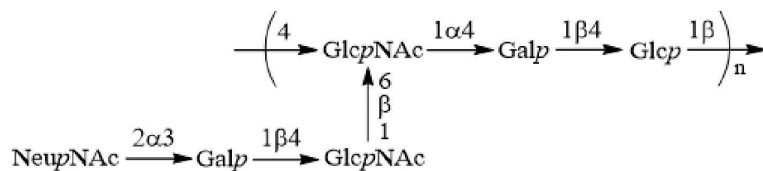
[0230] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

[0231] 또 다른 실시양태에서, 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0232] 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드는 약 0% 내지 약 40% O-아세틸화된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 탈-O-아세틸화 (즉, 약 5% 미만 O-아세틸화)된다. 본 발명의 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 JM9130013 및 JM9130672를 포함한다.

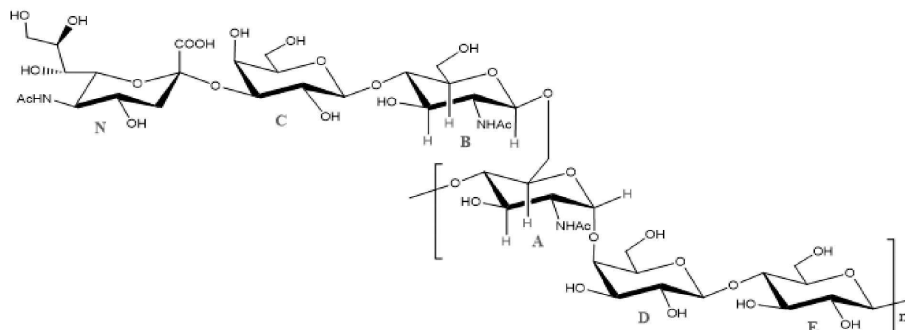
[0233] 혈청형 IX

[0234] GBS 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드는 이전에 문헌 [Berti, F., et al., The Journal of Biological Chemistry, 289(34):23437-23448 (2014)], 및 다른 것에 기재되었다. 그러나, GBS 혈청형 IX 폴리사카라이드의 백본에서의 GlcpNAc의 배위는 알파 (α)이며, 이는 이 연결을 β 배위로 제안한 이전에 공개된 상세 구조와는 상이한 것이다. 혈청형 IX의 구조는 보다 정확하게 하기와 같이 도시될 수 있다:



[0235]

[0236] GBS 혈청형 IX에 대한 이러한 상응하는 구조는 또한 하기와 같이 나타내어질 수 있다:



[0237]

[0238] 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드의 분자량은 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200

kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa이다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

[0239] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드는 그의 천연 시알산 수준, 예컨대 약 100% 또는 약 95% 초과를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 최대 약 40% (시알릴화 수준 약 60% 초과), 예컨대 최대 약 35% (시알릴화 수준 약 65% 초과), 최대 약 30% (시알릴화 수준 약 70% 초과), 최대 약 25% (시알릴화 수준 약 75% 초과), 최대 약 20% (시알릴화 수준 약 80% 초과), 최대 약 15% (시알릴화 수준 약 85% 초과), 최대 약 10% (시알릴화 수준 약 90% 초과), 또는 최대 약 5% (시알릴화 수준 약 95% 초과) 탈시알릴화될 수 있다.

[0240] 또 다른 실시양태에서, 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 약 1.0 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는다. 추가의 실시양태에서, 피막 폴리사카라이드는 접합 전에 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산, 예컨대 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산, 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산, 또는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 가질 수 있다.

[0241] 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드는 약 0% 내지 약 40% O-아세틸화된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 탈-O-아세틸화 (즉, 약 5% 미만 O-아세틸화)된다. 본 발명의 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드의 일부 예시적인 균주는 IT-NI-016, IT-PW-62, 및 IT-PW-64를 포함한다.

[0242] 폴리사카라이드-단백질 접합체

[0243] 본원에 사용된 "접합체"는 통상적으로 원하는 범위의 분자량의 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 담체 단백질에 접합된다. 접합체는 일부 양의 유리 피막 폴리사카라이드를 함유할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 본원에 사용된 "유리 피막 폴리사카라이드"는 접합된 피막 폴리사카라이드-담체 단백질과 비-공유 회합된 (즉, 그에 비-공유 결합되거나, 그에 흡착되거나, 또는 그 내부에 또는 그에 의해 포획된) 피막 폴리사카라이드를 지칭한다. 용어 "유리 피막 폴리사카라이드", "유리 폴리사카라이드" 및 "유리 사카라이드"는 상호교환가능하게 사용될 수 있고 동일한 의미를 전달하도록 의도된다. 담체 분자의 성질에 관계없이, 이는 피막 폴리사카라이드에 직접적으로 또는 링커를 통해 접합될 수 있다. 본원에 사용된 "접합시키기 위한", "접합된" 및 "접합시키는"은 박테리아 피막 폴리사카라이드가 담체 분자에 공유 부착되는 과정을 지칭한다. 접합은 박테리아 피막 폴리사카라이드의 면역원성을 증진시킨다. 접합은 하기 기재되는 방법에 따라 또는 관련 기술분야에 공지된 과정에 의해 수행될 수 있다.

[0244] 본원에 사용된 "접합체 면역원성 조성물"은 면역원성 물질이 담체 단백질에 공유 연결되는 항원 폴리사카라이드를 포함하여 폴리사카라이드-단백질 접합체를 생산하는 것인 면역원성 조성물을 지칭한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 다가 면역원성 조성물로서 제제화될 수 있다.

[0245] 본원에 사용된 용어 폴리사카라이드의 또는 담체 단백질-폴리사카라이드 접합체의 "분자량"은 다중각도 레이저 광 산란 검출기 (MALLS)와 조합된 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 계산된 분자량을 지칭한다.

[0246] 본원에 사용된 "폴리사카라이드-단백질 접합체"는 폴리사카라이드 분자가 단백질 담체 분자에 1개 이상의 공유 결합을 통해 접합된 것을 지칭한다. 폴리사카라이드를 표적 숙주에서 면역원성인 것으로 공지된 또 다른 종으로부터의 단백질에 접합시키는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 담체 분자는 담체 단백질이다. 본원에 정의된 바와 같이, 이러한 외래 단백질은 "담체 단백질"로 지칭된다. 담체 단백질은 폴리사카라이드의 항원성 및 면역원성을 증진시키는 역할을 한다. 본원에 사용된 용어 "담체 효과"는 담체로서 보다 면역원

성인 분자 (예를 들어, 이중 단백질)에 부착됨으로써 약한 면역원성 또는 비-면역원성 분자의 항원성 및 면역성이 증진되는 과정을 지칭한다. 이 경우에, 조합된 폴리사카라이드-단백질 접합체 중의 폴리사카라이드는 그것이 단독으로 제시되었을 경우보다 더 면역원성이 된다. 담체 단백질은 항체 반응을 생성하기 위한 T-세포 도움을 자극하기 위한 T 세포 에피토프를 함유한다.

[0247] 본원에 사용된 "담체 단백질" 또는 "단백질 담체"는 면역 반응이 요구되는 항원 (예컨대 피막 폴리사카라이드)에 접합될 수 있는 임의의 단백질 분자를 지칭한다. 항원, 예컨대 폴리사카라이드의 담체 단백질에의 접합은 항원을 면역원성하도록 할 수 있다. 담체 단백질은 바람직하게는 비-독성이고 비-반응원성이고 충분한 양 및 순도로 수득가능한 단백질이다. 담체 단백질의 예는 과상풍, 디프테리아, 백일해, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 이. 콜라이(*E. coli*), 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*) 종 및 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 종으로부터의 독소, 독소이드 또는 독소의 임의의 돌연변이 교차-반응성 물질 (CRM₁₉₇)이다. 담체 단백질은 표준 접합 절차에 적용가능해야 한다. 한 실시양태에서, 담체 단백질은 스트렙토코쿠스 C5a 펩티다제 (SCP)이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, CRM₁₉₇은 담체 단백질로 사용된다.

[0248] 교차-반응 물질 또는 CRM은 본 발명의 일부 실시양태에 대해 특히 유용하다. 특정 박테리아 독소와 항원적으로 유사하나, 비-독성인 유전자 변경 단백질을 생산할 수 있다. 이들은 "교차 반응 물질" 또는 CRM으로 불린다. CRM₁₉₇ (와이어쓰(Wyeth)/화이자 인크.(Pfizer Inc.), 노스캐롤라이나주 샌포드)은 그것이 천연 디프테리아 독소로부터 단일 아미노산 변화를 갖고 그와 면역학적으로 구별불가능하기 때문에 주목할 만하다. 문헌 [Pappenheimer, A.M., et al., Immunochem., 9(9):891-906 (1972)]; 미국 특허 번호 5,614,382를 참조하며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. CRM₁₉₇은 카사미노산 및 효모 추출물-기반 배지 중에서 성장한 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*) 균주 C7 (β 197)의 배양물로부터 단리된 디프테리아 독소의 비-독성 변이체 (즉, 독소이드)이다. CRM₁₉₇은 한외여과, 황산암모늄 침전 및 이온-교환 크로마토그래피를 통해 정제된다. CRM₁₉₇ 단백질을 생산하는 씨. 디프테리아에 균주 C7 (β 197)의 배양물은 메틸렌드 주 록빌 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션에 기탁되었고, 수탁 번호 ATCC 53281이 할당되었다. 다른 디프테리아 독소이드도 또한 담체 단백질로서 사용하는 데 적합하다. CRM3201은 백일해 독소의 유전자 조작된 변이체이다. 문헌 [Black, W.J., et al., Science, 240(4852):656-659 (1988)]을 참조하며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0249] 스트렙토코쿠스 C5a 펩티다제 (SCP)는 감염 부위에의 다형핵 세포 동원을 담당하는 보체 성분 5 (c5a)의 알파 단편을 단백질가수분해적으로 불활성화시키는 베타 용혈성 스트렙토코쿠스 속의 구성원에 의해 코딩되는 세포벽 앵커링된 병독성 단백질이다 (2005. PNAS. 102(51):18391). 이는 보호 항체의 표면이며, 여기서 SCP에 대해 지시된 IgG 항체는 옅소닌식세포작용을 매개할 수 있다. 추가적으로, SCP는 접합된 GBS CPS 폴리사카라이드 합텐에 대한 면역 반응을 개선하기 위해 담체 단백질로서 제공될 수 있다.

[0250] 디프테리아 독소이드 (DT), CRM₁₉₇, SCP, 및 백일해 독소이드에 더하여, 담체 단백질의 추가의 예는 과상풍 독소이드 (TT), 콜레라 독소이드 (예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2004/083251에 기재된 바와 같음), 이. 콜라이 열 불안정성 독소이드 (LT), 이. 콜라이 열 안정성 독소이드 (ST), 에스. 뉴모니아에로부터의 뉴몰리신 (야생형 또는 감소된 독성을 갖는 돌연변이체), 뉴모코쿠스 표면 단백질 A (PspA), 뉴모코쿠스 어드헤신 단백질 A (PsaA), 스트렙토코쿠스로부터의 C5a 펩티다제, 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcal aureus*)로부터의 헤몰리신, 비피막형 헤모필루스 인플루엔자(Nontypeable *Haemophilus influenzae*) (NTHi) 단백질, 헤모필루스 인플루엔자에 단백질 D, 클로스트리디움 페르프린젠스(*Clostridium perfringens*) 외독소/독소이드, B형 간염 표면 항원, B형 간염 코어 항원, 로타바이러스 VP 7 단백질, 및 호흡기 세포융합 바이러스 F 및 G 단백질, 오브 알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA), 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체 (PPD), 및 재조합적으로-생산된 비-독성 돌연변이체 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 외독소 A를 포함하는 슈도모나스 외독소 또는 그의 유도체를 포함한다. 박테리아 외막 단백질, 예컨대 외막 단백질 복합체 c (OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 또는 씨. 디피실레(*C. difficile*) 장독소 (독소 A) 및 세포독소 (독소 B)가 또한 사용될 수 있다. 다른 단백질, 예컨대 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체 (PPD)가 또한 담체 단백질로서 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 담체 단백질은 디프테리아 독소이드이다. 보다 바람직하게는, 담체 단백질은 CRM₁₉₇이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 담체 단백질은 과상풍 독소이드이다.

[0251] 다가 접합체 면역원성 조성물의 합성을 위해, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 2가지 상이한 종의 박테리아로부

터 정제된 폴리사카라이드의 혼합물을 담체 단백질에 접합시킴으로써 생산될 수 있다. 대안적으로, 다가 접합체 면역원성 조성물은 동일한 박테리아의 2종 이상의 상이한 혈청형을 갖는 박테리아로부터 정제된 폴리사카라이드를 조합하고 이들을 혼합물로서 담체 단백질에 접합시킴으로써 생산될 수 있다. 대안적으로, 상이한 폴리사카라이드를 사용하는 개별 반응에서 단일 유형의 폴리사카라이드를 담체 단백질과 반응시킴으로써 생산된 폴리사카라이드-단백질 접합체가 혼합될 수 있다. 따라서, 다가 면역원성 조성물은 연결된 폴리사카라이드의 동종 또는 이종 집단을 지니는 담체 단백질을 포함할 수 있다.

[0252] 피막 폴리사카라이드의 담체 단백질에의 접합 후에, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 다양한 기술에 의해 정제된다 (폴리사카라이드-단백질 접합체의 양과 관련하여 풍부화됨). 이들 기술은, 예를 들어 농축/투석여과 작업, 침전/용리, 칼럼 크로마토그래피, 및 침출 여과를 포함한다.

[0253] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명은 담체 단백질에 접합된 GBS 피막 폴리사카라이드를 포함하는 접합체에 관한 것이다. 본 발명의 한 실시양태는 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드를 포함하는 접합체 및 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드, 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 Ib 피막 폴리사카라이드, 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 II 피막 폴리사카라이드, 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 III 피막 폴리사카라이드, 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 V 피막 폴리사카라이드, 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드, 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드, 또는 담체 단백질에 접합된 GBS 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드를 포함하는 적어도 1종의 추가의 접합체를 제공한다. 본 발명의 한 측면에서, 폴리사카라이드는 약 5 kDa 내지 1,000 kDa의 분자량을 갖고; 접합체는 약 300 kDa 내지 약 20,000 kDa의 분자량을 갖고; 접합체는 총 폴리사카라이드에 비해 약 40% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다. 한 실시양태에서, 접합체는 총 폴리사카라이드에 비해 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함한다.

[0254] 한 실시양태에서, 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, 및/또는 IX 폴리사카라이드는 접합 전에 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 50 kDa 내지 약 750 kDa, 약 50 kDa 내지 약 500 kDa, 약 50 kDa 내지 약 450 kDa, 약 50 kDa 내지 약 400 kDa, 약 50 kDa 내지 약 350 kDa, 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 50 kDa 내지 약 250 kDa, 약 50 kDa 내지 약 200 kDa, 약 75 kDa 내지 약 750 kDa, 약 75 kDa 내지 약 500 kDa, 약 75 kDa 내지 약 450 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 350 kDa, 약 75 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 250 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 750 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 650 kDa, 약 100 kDa 내지 약 600 kDa, 약 100 kDa 내지 약 550 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 450 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 350 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 및 750 kDa, 약 200 kDa 내지 약 700 kDa, 약 200 kDa 내지 약 650 kDa, 약 200 kDa 내지 약 600 kDa, 약 200 kDa 내지 약 550 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 200 kDa 내지 약 450 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, 약 250 kDa 내지 약 750 kDa, 약 250 kDa 내지 약 700 kDa, 약 250 kDa 내지 약 650 kDa, 약 250 kDa 내지 약 600 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 약 250 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 450 kDa, 약 250 kDa 내지 약 400 kDa, 약 300 kDa 및 750 kDa, 약 300 kDa 내지 약 700 kDa, 약 300 kDa 내지 약 650 kDa, 약 300 kDa 내지 약 600 kDa, 약 300 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 500 kDa의 분자량을 갖는다. 임의의 상기 범위 내의 임의의 정수는 본 개시내용의 실시양태로서 고려된다.

[0255] 한 실시양태에서, 접합체는 약 300 kDa 내지 약 20,000 kDa, 예컨대 약 300 kDa 내지 약 15,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 9,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 8,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 7,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 6,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 5,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 4,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 3,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 2,000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 1,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 15,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 9,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 8,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 7,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 6,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 5,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 4,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 3,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 2,000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 1,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 15,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 9,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 8,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 7,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 6,000 kDa, 약 1,000 kDa 내지 약 5,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 15,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 9,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 8,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 7,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 6,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 5,000 kDa, 약 2,000 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 2,000 kDa 내

지 약 15,000 kDa, 약 2,000 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 2,000 kDa 내지 약 9,000 kDa, 약 2,000 kDa 내지 약 8,000 kDa, 약 2,000 kDa 내지 약 7,000 kDa, 약 2,000 kDa 내지 약 6,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 15,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 9,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 8,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 7,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 6,000 kDa, 약 3,000 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 3,000 kDa 내지 약 15,000 kDa, 약 3,000 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 3,000 kDa 내지 약 9,000 kDa, 약 3,000 kDa 내지 약 8,000 kDa, 약 3,000 kDa 내지 약 7,000 kDa, 또는 약 3,000 kDa 내지 약 6,000 kDa의 분자량을 갖는다.

- [0256] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0257] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0258] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 Ib 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0259] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 II 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0260] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 III 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0261] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 V 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0262] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0263] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0264] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 범위의 분자량을 갖는다.
- [0265] 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 0.97 또는 0.98 mM 시알산을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 접합체는 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 또는 0.95 mM 시알산을 갖는다.
- [0266] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0267] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0268] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 Ib 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0269] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 II 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0270] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 III 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0271] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 V 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0272] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0273] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0274] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드 접합체는 적어도 임의의 상기 값의 시알산 함량을 갖는다.
- [0275] 한 실시양태에서, 본 발명의 접합체는 사카라이드 반복 단위의 mM당 약 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 또는 0.05 mM 미만의 O-아세테이트를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 접합체는 사카라이드 반복 단위의 mM당 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.35 또는 약 0.4 mM O-아세테이트를 포함한다.
- [0276] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VI 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 O-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0277] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 Ia 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 O-아세테이트 함량을 갖는다.

- [0278] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 Ib 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 0-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0279] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 II 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 0-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0280] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 III 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 0-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0281] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 V 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 0-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0282] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VII 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 0-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0283] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 VIII 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 0-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0284] 한 실시양태에서, GBS 혈청형 IX 피막 폴리사카라이드 접합체는 임의의 상기 값의 0-아세테이트 함량을 갖는다.
- [0285] 추가의 실시양태에서, 면역원성 접합체는 GBS 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 40% 미만, 약 35% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만의 유리 GBS 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 GBS 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 5% 미만의 미반응 유리 사카라이드를 포함한다.
- [0286] 또 다른 실시양태에서, 접합체 중의 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비 (중량 대 중량)는 약 0.5 내지 약 3.0이다. 한 측면에서, 접합체 중의 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 약 0.5 내지 약 2.0, 약 0.5 내지 약 1.5, 약 0.5 내지 약 1.0, 약 1.0 내지 약 1.5, 또는 약 1.0 내지 약 2.0이다. 바람직한 실시양태에서, 접합체 중의 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 약 0.8 내지 약 1.0이다.
- [0287] 또 다른 실시양태에서, 접합체의 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 실시양태에서, 접합체의 접합도는 2 내지 5이다.
- [0288] 접합
- [0289] 접합은 폴리사카라이드로부터의 원자가 단백질 표면으로부터의 원자에 공유 결합되는 경우, 직접적일 수 있다. 대안적으로, 접합은 폴리사카라이드 및 단백질 둘 다와 반응하고 그 둘을 연결하여 탄수화물을 단백질에 테더링하는 링커 분자를 통한 것일 수 있다.
- [0290] 담체 및 1종 이상의 항원, 예컨대 폴리사카라이드가 접합되는 (즉, 공유 회합되는) 경우, 접합은 관련 기술분야에 공지된 임의의 화학적 방법, 과정 또는 유전자 기술에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 담체 단백질 및 탄수화물, 올리고사카라이드, 지질, 리포올리고사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드-단백질 접합체, 폴리사카라이드-단백질 접합체, 펩티드-단백질 접합체, 올리고사카라이드-펩티드 접합체, 폴리사카라이드-펩티드 접합체, 단백질-단백질 접합체, 리포올리고사카라이드-단백질 접합체, 폴리사카라이드-단백질 접합체, 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항원은 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는 기술에 의해 접합될 수 있다: (1) 단백질 관능기를 통한 직접 커플링 (예를 들어, 티올-티올 연결, 아민-카르복실 연결, 아민-알데히드 연결; 효소 직접 커플링); (2) 아민의 동종이관능성 커플링 (예를 들어, 비스-알데히드 사용); (3) 티올의 동종이관능성 커플링 (예를 들어, 비스-말레이미드 사용); (4) 광활성화된 시약의 동종이관능성 커플링, (5) 티올에의 아민의 이종이관능성 커플링 (예를 들어, 말레이미드 사용); (6) 광활성화된 시약 (예를 들어, β -카르보닐이디아조 페밀리)을 통한 이종이관능성 커플링; (7) 브로민화시아노젠 활성화 또는 카르복시메틸화를 통한 아민-반응성 기의 폴리- 또는 올리고사카라이드로의 도입; (8) 이종이관능성 화합물 예컨대 말레이미도-히드라지드를 통한 티올-반응성 기의 폴리- 또는 올리고사카라이드로의 도입; (9) 소수성 기의 단백질로의 도입을 통한 단백질-지질 접합 및 (10) 반응성 기의 지질로의 혼입을 통한 단백질-지질 접합. 또한, 이종이관능성 "비-공유 커플링" 기술, 예컨대 비오틴-아비딘 상호작용이 고려된다. 올리고사카라이드 및 폴리사카라이드의 면역원성 담체 단백질에의 접합을 실시하기 위한 관련 기술분야에 널리 공지된 다른 방법이 또한 본 발명의 일부 실시양태의 범주 내에 있다.
- [0291] 한 실시양태에서, GBS 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체는 폴리사카라이드를 1-시아노-4-디메틸아미노 피리딘 테트라플루오로보레이트 (CDAP)로 활성화시켜 시아네이트 에스테르를 형성함으로써 취득된다. 활성화된 폴

리사카라이드는 담체 단백질 상의 아미노기에 직접적으로 또는 스페이서(링커)기를 통해 커플링될 수 있다. 예를 들어, 스페이서는 시스타민 또는 시스테아민이어서 티올화 폴리사카라이드를 제공할 수 있고, 이는 말레이미드-활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS를 사용함) 또는 할로아세틸화 담체 단백질(예를 들어, 아이오도아세트이미드, SIB, SIAB, 술폰-SIAB, SIA 또는 SBAP를 사용함)과의 반응 후에 수득된 티오에테르 연결을 통해 담체에 커플링될 수 있다.

[0292] 한 측면에서, 시아네이트 에스테르(임의적으로 CDAP 화학에 의해 제조됨)는 헥산 디아민 또는 아디프산 디히드라지드(ADH)와 커플링되고 아미노-유도체화된 사카라이드는 단백질 담체 상의 카르복실기를 통해 카르보디이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 담체 단백질에 접합된다. 이러한 접합체는 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 93/15760, WO 95/08348, 및 WO 96/29094에 기재되어 있다.

[0293] 다른 적합한 기술은 카르보디이미드, 히드라지드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC 및 TSTU를 사용한다. 다수는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/42721에 기재되어 있다. 접합은 카르보닐 링커를 수반할 수 있으며, 이는 사카라이드의 유리 히드록실기의 1,1 카르보닐디이미다졸(CDI) 또는 1,1 카르보닐 디 1,2,4 트리아졸(CDT)과의 반응(문헌[Bethell, et al., J. Biol. Chem., 254:2572-2574 (1979); Hearn, et al., J. Chromatogr., 218:509-518 (1981)] 참조)에 이어서 카르바메이트 연결을 형성하기 위한 단백질과의 반응에 의해 형성될 수 있다. 이는 아노머 말단의 1급 히드록실기로의 환원, 1급 히드록실기의 임의적인 보호/탈보호, CDI/CDT 카르바메이트 중간체를 형성하기 위한 1급 히드록실기의 CDI/CDT와의 반응, 및 CDI/CDT 카르바메이트 중간체의 단백질 상의 아미노기와 커플링을 수반할 수 있다.

[0294] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 GBS 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체는 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 환원성 아미노화는 하기 2 단계를 수반한다: (1) 개별 헥사사카라이드 단위에서의 이웃자리 디올로부터 알데히드 관능기를 생성하기 위한 폴리사카라이드의 산화 및 (2) 접합체를 형성하기 위한 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 환원.

[0295] 한 실시양태에서, GBS 피막 폴리사카라이드는 하기 단계를 포함하는 과정에 의해 활성화(산화)된다:

[0296] (a) 단리된 GBS 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계; 및

[0297] (b) 켄칭제의 첨가에 의해 산화 반응을 켄칭하여 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 생성하는 단계.

[0298] 본 발명의 한 측면에서, 단리된 피막 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1 mg/mL 내지 약 10.0 mg/mL, 예컨대 약 0.5 mg/mL 내지 약 5.0 mg/mL mg/mL, 약 1.0 mg/mL 내지 약 3.0 mg/mL, 또는 약 2.0 mg/mL이다.

[0299] 특정한 실시양태에서, 산화제는 퍼아이오데이트이다. 퍼아이오데이트는 이웃자리 히드록실기를 산화시켜 카르보닐 또는 알데히드기를 형성하고, C-C 결합의 절단을 유발한다. 용어 '퍼아이오데이트'는 퍼아이오데이트 및 과아이오딘산 둘 다를 포함한다. 이 용어는 또한 메타퍼아이오데이트(IO_4^-) 및 오르토퍼아이오데이트(IO_6^{5-}) 둘 다를 포함한다. 용어 '퍼아이오데이트'는 또한 소듐 퍼아이오데이트 및 포타슘 퍼아이오데이트를 포함한 퍼아이오데이트의 다양한 염을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 산화제는 소듐 퍼아이오데이트이다. 바람직한 실시양태에서, GBS 피막 폴리사카라이드의 산화에 사용되는 퍼아이오데이트는 메타퍼아이오데이트이다. 바람직한 실시양태에서, 혈청형 피막 폴리사카라이드의 산화에 사용되는 퍼아이오데이트는 소듐 메타퍼아이오데이트이다.

[0300] 또 다른 실시양태에서, 폴리사카라이드는 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, 또는 0.1 내지 0.3 몰 당량의 산화제와 반응한다. 특정한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 약 0.05, 약 0.1, 약 0.15, 약 0.2, 약 0.25, 약 0.3, 약 0.35, 약 0.4, 약 0.45, 약 0.5, 약 0.55, 약 0.6, 약 0.65, 약 0.7, 약 0.75, 약 0.8, 약 0.85, 약 0.9, 또는 약 0.95 몰 당량의 산화제와 반응한다. 추가의 실시양태에서, 폴리사카라이드는 약 0.1 몰 당량의 산화제와 반응한다. 추가의 실시양태에서, 폴리사카라이드는 약 0.15 몰 당량의 산화제와 반응한다. 추가의 실시양태에서, 폴리사카라이드는 약 0.25 몰 당량의 산화제와 반응한다. 또 다른 실시양태에서, 폴리사카라이드는 약 0.5 몰 당량의 산화제와 반응한다. 대안적 실시양태에서, 폴리사카라이드는 약 0.6 몰 당량의 산화제와 반응한다. 추가의 실시양태에서, 폴리사카라이드는 약 0.7 몰 당량의 산화제와 반응한다.

[0301] 본 발명의 한 측면에서, 산화 반응의 지속기간은 약 1시간 내지 약 50시간, 약 10시간 내지 약 30시간, 약 15시간 내지 약 20시간, 약 15시간 내지 약 17시간, 또는 약 16시간이다.

[0302] 본 발명의 또 다른 측면에서, 산화 반응의 온도는 약 2°C 내지 약 25°C, 약 2°C 내지 약 8°C, 또는 약 20°C 내

지 약 25℃로 유지된다. 하나의 바람직한 실시양태에서, 반응의 온도는 약 23℃로 유지된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 반응의 온도는 약 5℃로 유지된다.

- [0303] 추가 측면에서, 산화 반응은 인산나트륨, 인산칼륨, 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES) 및 비스-트리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제 중에서 수행된다. 바람직한 실시양태에서, 완충제는 인산칼륨이다.
- [0304] 추가의 측면에서, 완충제는 약 1 mM 내지 약 500 mM, 약 1 mM 내지 약 300 mM, 또는 약 50 mM 내지 약 200 mM의 농도를 갖는다. 바람직한 실시양태에서 완충제는 약 100 mM의 농도를 갖는다.
- [0305] 한 측면에서, 산화 반응은 약 4.0 내지 약 8.0, 약 5.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.5 내지 약 6.5의 pH에서 수행된다. 바람직한 실시양태에서, pH는 약 6.0이다.
- [0306] 한 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는 약 0.5 mg/L 내지 약 5.0 mg/mL의 단리된 피막 폴리사카라이드를 약 0.05 내지 약 0.3 몰 당량의 피아이오테이트와 약 20℃ 내지 25℃에서의 온도에서 반응시킴으로써 취득된다.
- [0307] 또 다른 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는 약 0.5 mg/L 내지 약 5.0 mg/mL의 단리된 피막 폴리사카라이드를 약 0.05 내지 약 0.3 몰 당량의 피아이오테이트와 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 반응시킴으로써 취득된다.
- [0308] 또 다른 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법, 예컨대 겔 투과 크로마토그래피 (GPC), 투석, 또는 한외여과/투석여과에 따라 정제된다. 예를 들어, 활성화된 피막 폴리사카라이드는 한외여과 장치를 사용하여 농축 및 투석여과에 의해 정제된다.
- [0309] 한 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드의 산화도는 5 내지 25, 예컨대 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 25, 10 내지 20, 10 내지 15이다. 바람직한 실시양태에서 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드의 산화도는 10 내지 20, 11 내지 19, 12 내지 18, 13 내지 17, 또는 14 내지 16이다.
- [0310] 또 다른 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa, 예컨대 약 50 kDa 내지 약 300 kDa, 약 75 kDa 내지 약 400 kDa, 약 75 kDa 내지 약 200 kDa, 약 100 kDa 내지 약 700 kDa, 약 100 kDa 내지 약 500 kDa, 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 100 kDa 내지 약 300 kDa, 약 200 kDa 내지 약 400 kDa, an 약 300 kDa 내지 약 700 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는 약 75 kDa 내지 약 400 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0311] 한 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는, 임의적으로 사카라이드의 존재 하에 동결건조된다. 바람직한 실시양태에서, 사카라이드는 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 사카라이드는 수크로스이다. 동결건조된 활성화된 피막 폴리사카라이드는 이어서 담체 단백질을 포함하는 용액과 배합될 수 있다.
- [0312] 또 다른 실시양태에서, 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는 임의적으로 사카라이드의 존재 하에 담체 단백질과 배합되고 동결건조된다. 한 측면에서, 사카라이드는 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 사카라이드는 수크로스이다. 공동-동결건조된 폴리사카라이드 및 담체 단백질은 이어서 용액 중에 재현탁되고 환원제와 반응될 수 있다.
- [0313] 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드는 하기 단계를 포함하는 과정에 의해 담체 단백질에 접합될 수 있다:
- [0314] (a) 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계, 및
- [0315] (b) 배합된 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 GBS 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성하는 단계.
- [0316] 극성 비양성자성 용매 중의 환원성 아미노화에 의한 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드의 단백질 담체와의 접합은, 예를 들어 미반응 (유리) 폴리사카라이드의 수준이 유의하게 상승되는 수용액 중의 환원성 아미노화와 비교하여 유리 폴리사카라이드의 낮은 수준을 유지하는 데 적합하다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (a) 및 단계 (b)는 극성 비양성자성 용매 중에서 수행된다.
- [0317] 한 실시양태에서, 단계 (a)는 동결건조된 GBS 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질 및 극성 비양성자성 용매를 포함하는 용액 중에 용해시키는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 단계 (a)는 공동-동결건조된 GBS 피막

폴리사카라이드 및 담체 단백질을 극성 비양성자성 용매 중에 용해시키는 것을 포함한다.

- [0318] 한 실시양태에서, 극성 비양성자성 용매는 디메틸설폭시드 (DMSO), 설펜란, 디메틸포름아미드 (DMF) 및 헥사메틸포스포르아미드 (HMPA)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 극성 비양성자성 용매는 DMSO이다.
- [0319] 단계 (a) 및 (b)가 수용액 중에서 수행되는 경우, 단계 (a) 및 (b)는 수성 배지 중의, 바람직하게는 PBS, MES, HEPES, 비스-트리스, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, 비신 또는 HEPB로부터 선택되는 완충제 중에서 약 6.0 내지 약 8.5, 약 7.0 내지 약 8.0, 또는 약 7.0 내지 약 7.5의 pH에서 수행된다. 바람직한 실시양태에서 완충제는 PBS이다. 바람직한 실시양태에서 pH는 약 7.3이다.
- [0320] 한 실시양태에서, 단계 (b)에서의 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1 mg/mL 내지 약 10.0 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 약 5.0 mg/mL, 또는 약 0.5 mg/mL 내지 약 2.0 mg/mL이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서의 활성화된 혈청형 GBS 피막 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1 mg/mL, 약 0.2 mg/mL, 약 0.3 mg/mL, 약 0.4 mg/mL, 약 0.5 mg/mL, 약 0.6 mg/mL, 약 0.7 mg/mL, 약 0.8 mg/mL, 약 0.9 mg/mL, 약 1.0 mg/mL, 약 1.1 mg/mL, 약 1.2 mg/mL, 약 1.3 mg/mL, 약 1.4 mg/mL, 약 1.5 mg/mL, 약 1.6 mg/mL, 약 1.7 mg/mL, 약 1.8 mg/mL, 약 1.9 mg/mL, 약 2.0 mg/mL, 약 2.1 mg/mL, 약 2.2, 약 2.3 mg/mL, 약 2.4 mg/mL, 약 2.5 mg/mL, 약 2.6 mg/mL, 약 2.7 mg/mL, 약 2.8 mg/mL, 약 2.9 mg/mL, 또는 약 3.0 mg/mL이다.
- [0321] 또 다른 실시양태에서 활성화된 혈청형 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 비 (중량 대 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, 0.6:1 내지 1:1이다. 바람직한 실시양태에서 활성화된 혈청형 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 비는 약 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, 2:1이다.
- [0322] 한 실시양태에서, 환원제는 소듐 시아노보로히드라이드, 소듐 트리아세톡시보로히드라이드, 브린스테드 또는 루이스 산의 존재 하의 소듐 또는 아연 보로히드라이드, 아민 보란 예컨대 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-디보란-메탄올, 디메틸아민-보란, $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$, 벤질아민- BH_3 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란 (PEMB)이다. 바람직한 실시양태에서, 환원제는 소듐 시아노보로히드라이드이다.
- [0323] 또 다른 실시양태에서, 단계 (b)에 사용되는 환원제의 양은 약 0.1 내지 약 10.0 몰 당량, 약 0.5 내지 약 5.0 몰 당량, 또는 약 1.0 내지 약 2.0 몰 당량이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에 사용되는 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.
- [0324] 또 다른 실시양태에서, 단계 (b)의 지속기간은 1시간 내지 60시간, 10시간 내지 50시간, 40시간 내지 50시간, 또는 42시간 내지 46시간이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)의 지속기간은 약 44시간이다.
- [0325] 추가의 실시양태에서, 단계 (b)에서의 반응의 온도는 10°C 내지 40°C, 15°C 내지 30°C, 또는 20°C 내지 26°C로 유지된다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서의 반응의 온도는 약 23°C에서 유지된다.
- [0326] 추가의 실시양태에서, 담체 단백질에 공유 연결된 GBS 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체의 제조 과정은 보로히드라이드의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 (켄칭하는) 단계 (단계 (c))를 추가로 포함한다.
- [0327] 한 실시양태에서, 캡핑 시약은 소듐 보로히드라이드 (NaBH_4), 소듐 시아노보로히드라이드, 리튬 보로히드라이드, 포타슘 보로히드라이드, 테트라부틸암모늄 보로히드라이드, 칼슘 보로히드라이드 및 마그네슘 보로히드라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 보로히드라이드이다. 바람직한 실시양태에서, 캡핑 시약은 소듐 보로히드라이드이다.
- [0328] 또 다른 실시양태에서, 단계 (c)에 사용되는 보로히드라이드의 양은 약 0.1 내지 약 10.0 몰 당량, 약 0.5 내지 약 5.0 몰 당량, 또는 약 1.0 내지 3.0 몰 당량이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)에 사용되는 보로히드라이드의 양은 약 2.0 몰 당량이다.
- [0329] 한 실시양태에서, 단계 (c)에 사용되는 보로히드라이드는 약 2.0 몰 당량의 농도의 NaBH_4 이다.
- [0330] 한 실시양태에서, 단계 (c)의 지속기간은 0.1시간 내지 10시간, 0.5시간 내지 5시간, 2시간 내지 4시간이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)의 지속기간은 약 3시간이다.

- [0331] 또 다른 실시양태에서, 단계 (c)에서의 반응의 온도는 약 15℃ 내지 약 45℃, 약 15℃ 내지 약 30℃, 또는 약 20℃ 내지 약 26℃로 유지된다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)에서의 반응의 온도는 약 23℃에서 유지된다.
- [0332] GBS 피막 폴리사카라이드의 담체 단백질에의 접합 및 캡핑 후에, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술에 의해 정제될 수 있다 (폴리사카라이드-단백질 접합체의 양과 관련하여 풍부화됨). 이들 기술은 투석, 농축/투석여과 작업, 접선 흐름 여과, 침전/용리, 칼럼 크로마토그래피 (DEAE 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피), 및 심층 여과를 포함한다.
- [0333] 추가의 실시양태에서, 면역원성 접합체는 GBS 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 40% 미만, 약 35% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만의 유리 GBS 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서 면역원성 접합체는 GBS 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 5% 미만의 미반응 유리 사카라이드를 포함한다.
- [0334] 또 다른 실시양태에서, GBS 폴리사카라이드-단백질 접합체는 약 300 kDa 내지 약 20,000 kDa, 예컨대 약 1,000 kDa 내지 약 15,000 kDa 또는 약 1,000 kDa 내지 약 10,000 kDa의 분자량을 갖는다.
- [0335] 또 다른 실시양태에서, 접합체 중의 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비 (중량 대 중량)는 약 0.5 내지 약 3.0이다. 한 측면에서, 접합체 중의 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 약 0.5 내지 약 2.0, 약 0.5 내지 약 1.5, 약 0.5 내지 약 1.0, 약 1.0 내지 약 1.5, 또는 약 1.0 내지 약 2.0이다. 바람직한 실시양태에서, 접합체 중의 GBS 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비는 약 0.8 내지 약 1.0이다.
- [0336] 또 다른 실시양태에서, 접합체의 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 실시양태에서, 접합체의 접합도는 2 내지 5이다.
- [0337] 본 발명의 한 측면에서, GBS 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체는 상기 기재된 환원성 아미노화 방법에 의해 수득된다. 예를 들어, 한 측면에서 본 개시내용은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생산되거나 또는 수득가능한, 담체 단백질에 접합된 폴리사카라이드를 포함하는 GBS 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제공한다:
- [0338] (a) 단리된 GBS 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계;
- [0339] (b) 켄칭제의 첨가에 의해 산화 반응을 켄칭하여 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 생성하는 단계;
- [0340] (c) 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계;
- [0341] (d) 배합된 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 GBS 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성하는 단계; 및 임의적으로
- [0342] (e) 소듐 보로하이드라이드 (NaBH_4)의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 단계.
- [0343] 바람직한 실시양태에서, 단계 (c) 및 (d)는 DMSO 중에서 수행된다.
- [0344] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명의 GBS 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체는 상기 기재된 바와 같이 환원성 아미노화를 사용하여, 그러나 활성화/산화 단계에서 공산화제로서는 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 자유 라디칼 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)를 사용하여 제조된다. 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2014/097099를 참조하며, 이는 그 전문에 본원에 참조로 포함된다. 이러한 실시양태에서, GBS 피막 폴리사카라이드로부터의 당접합체는 NCS를 공산화제로서 사용하여 사카라이드의 1급 알코올을 알데히드로 산화시키기 위해 TEMPO 자유 라디칼을 사용 (이하 "TEMPO/NCS 산화")하여 제조되며, 이는 예컨대 국제 특허 출원 공개 번호 WO2014/097099의 실시예 7에 기재되어 있다. 따라서 한 측면에서, GBS 피막 폴리사카라이드의 접합체는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 수득가능하다: a) 용매 중에서 GBS 피막 폴리사카라이드를 TEMPO 및 NCS와 반응시켜 활성화된 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화된 사카라이드를 1개 이상의 아민기를 포함하는 담체 단백질과 반응시키는 단계 (이하 "TEMPO/NCS-환원성 아미노화"). 한 실시양태에서, 용매는 수성 용매 또는 DMSO일 수 있다.
- [0345] 한 측면에서, GBS 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체는 상기 방법에 의해 수득된다. 예를 들어, 한 측면에서 본 개시내용은 이는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생산되거나 또는 수득가능한, 담체 단백질에 접합된 폴리사카라이드를 포함하는 GBS 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제공한다: a) 용매 중에서 사카라이드를

2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 반응시켜 활성화 사카라이드를 생산하는 단계; 및 b) 활성화된 사카라이드를 1개 이상의 아민 기를 포함하는 담체 단백질과 반응시키는 단계. 한 실시양태에서, 용매는 수성 용매 또는 DMSO일 수 있다.

[0346] 면역원성 조성물

[0347] 개별 접합체가 정제된 후에, 이들은 조합되어, 예를 들어 백신에서 사용될 수 있는 본 발명의 면역원성 조성물로 제제화될 수 있다. 본 발명의 면역원성 조성물의 제제는 관련 기술분야에서 인식되는 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0348] 면역원성 조성물에 대한 "면역 반응"은 대상체에서의 관심 조성물에 존재하는 분자 (예를 들어, 항원, 예컨대 단백질 또는 폴리사카라이드)에 대한 체액성 및/또는 세포-매개 면역 반응의 발생이다. 본 발명의 목적상, "체액성 면역 반응"은 항체-매개 면역 반응이고 본 발명의 면역원성 조성물에 존재하는 항원에 대한 친화도를 갖는 항체의 생성을 수반하는 한편, "세포-매개 면역 반응"은 T-림프구 및/또는 다른 백혈구에 의해 매개되는 면역 반응이다. "세포-매개 면역 반응"은 주요 조직적합성 복합체 (MHC)의 부류 I 또는 부류 II 분자와 회합된 항원에 피토프의 제시에 의해 도출된다. 이는 항원-특이적 CD4+ T 헬퍼 세포 또는 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 (CTL)를 활성화시킨다. CTL은 MHC 또는 CD1에 의해 코딩되고 세포의 표면 상에 발현된 단백질과 회합되어 제시된 펩티드 또는 지질 항원에 대한 특이성을 갖는다. CTL은 세포내 미생물의 세포내 파괴, 또는 이러한 미생물로 감염된 세포의 용해를 유도하고 촉진하는 것을 돕는다. 세포성 면역의 또 다른 측면은 헬퍼 T-세포에 의한 항원-특이적 반응을 수반한다. 헬퍼 T-세포는 상기 기능을 자극하는 것을 돕는 역할을 하고, 그의 표면 상의 전형적 또는 비전형적 MHC 분자와 회합된 펩티드 항원을 디스플레이하는 세포에 대한 비특이적 이펙터 세포의 활성화에 초점을 맞춘다. "세포-매개 면역 반응"은 또한 시토카인, 케모카인, 및 활성화된 T-세포 및/또는 CD4+ 및 CD8+ T-세포로부터 유래된 것들을 포함한 다른 백혈구에 의해 생산된 다른 이러한 분자의 생산을 지칭한다. 세포-매개 면역학적 반응을 자극하는 특정한 항원 또는 조성물의 능력은 다수의 검정, 예컨대 림프증식 (림프구 활성화) 검정, CTL 세포독성 세포 검정에 의해, 감각화된 대상체에서의 항원에 대해 특이적인 T-림프구에 대한 검정에 의해, 또는 항원으로의 재자극에 대한 반응에서의 T 세포에 의한 시토카인 생산의 측정에 의해 결정될 수 있다. 이러한 검정은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Erickson, A.L., et al., J. Immunol., 151(8):4189-4199 (1993); Doe, B., et al., Eur. J. Immunol. 24(10):2369-2376 (1994)]을 참조한다.

[0349] 용어 "면역원성"은 체액성 또는 세포-매개 면역 반응 중 하나, 또는 둘 다를 도출하는 항원 또는 백신의 능력을 지칭한다.

[0350] 각각이 본원에서 상호교환가능하게 사용된 "면역원성 양", 또는 "면역학적 유효량" 또는 "용량"은 일반적으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 검정에 의해 측정된 바와 같은, 세포성 (T 세포) 또는 체액성 (B 세포 또는 항체) 반응 중 하나, 또는 둘 다의 면역 반응을 도출하기에 충분한 항원 또는 면역원성 조성물의 양을 지칭한다.

[0351] 본원에 사용된 "면역 간섭" 또는 "유의한 면역 간섭"은 1가 백신으로 투여되는 경우에 동일한 항원에 대한 면역 반응과 비교하여 다가 또는 다중-성분 백신 중의 개별 항원에 대한 면역 반응에서의 통계적으로 유의한 감소를 지칭한다.

[0352] "보호성" 면역 반응은, 대상체를 감염으로부터 보호하는 역할을 하는, 체액성 또는 세포 매개 면역 반응을 도출하는 면역원성 조성물의 능력을 지칭한다. 제공된 보호는 절대적일 필요는 없으며, 즉 대상체의 대조군 집단, 예를 들어 백신 또는 면역원성 조성물이 투여되지 않은 감염된 동물과 비교하여 통계적으로 유의한 개선이 존재하는 경우에, 감염이 전적으로 예방되거나 또는 근절될 필요는 없다. 보호는 감염의 증상의 중증도 또는 발병 급속도를 완화시키는 것으로 제한될 수 있다. 면역 반응이 "보호성 면역 반응"을 나타내는지 여부를 결정하기 위한 여러 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 항체 수준의 증가는 결합 검정, 예컨대 하기에 추가로 기재되는 전세포 ELISA 검정에 의해 측정될 수 있다. 다른 검정은 기능적 항체 반응, 예컨대 하기에 기재된 바와 같이 옥소닌식세포작용 검정 (OPA)으로 시험될 수 있는 박테리아 사멸의 촉진을 측정하는 것을 포함한다. 특정한 상황에서, "보호성 면역 반응"은 대상체의 적어도 50%에서 특정한 항원에 특이적인 항체 수준의 2-배 증가 또는 항체 수준의 4-배 증가를 유도하는 것을 포함할 수 있다. 또 다른 상황에서, "보호성 면역 반응"은 적어도 10%, 25%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과 박테리아 수의 감소를 포함할 수 있다.

- [0353] 조성물 중의 특정한 접합체의 양은 일반적으로 그 접합체에 대해, 접합된 및 비-접합된 총 폴리사카라이드에 기초하여 계산된다. 예를 들어, 20% 유리 폴리사카라이드를 갖는 GBS 피막 폴리사카라이드 접합체는 100 mcg/ml GBS 피막 폴리사카라이드 용량 중 약 80 mcg/ml의 접합된 GBS 피막 폴리사카라이드 및 약 20 mcg/ml의 비-접합된 GBS 피막 폴리사카라이드를 가질 것이다. 접합체에 대한 단백질 담체의 기여도는 통상적으로 접합체의 용량을 계산하는 경우에 고려되지 않는다. 접합체의 양은 스트렙토코쿠스 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 각각의 용량은 약 0.01 mg/ml 내지 약 100 mcg/ml, 특히 약 1 mcg/ml 내지 약 70 mcg/ml, 및 보다 특히 약 5 mcg/ml 내지 약 50 mcg/ml의 각각의 폴리사카라이드를 포함할 것이다. 면역원성 조성물 중 상이한 폴리사카라이드 성분의 "면역원성 양"은 나뉘어질 수 있고, 각각은 약 0.01 mcg/ml, 약 0.1 mcg/ml, 약 0.25 mcg/ml, 약 0.5 mcg/ml, 약 1 mcg/ml, 약 2 mcg/ml, 약 3 mcg/ml, 약 4 mcg/ml, 약 5 mcg/ml, 약 6 mcg/ml, 약 7 mcg/ml, 약 8 mcg/ml, 약 9 mcg/ml, 약 10 mcg/ml, 약 15 mcg/ml, 약 20 mcg/ml, 약 25 mcg/ml, 약 30 mcg/ml, 약 40 mcg/ml, 약 50 mcg/ml, 약 60 mcg/ml, 약 70 mcg/ml, 약 80 mcg/ml, 약 90 mcg/ml, 또는 약 100 mcg/ml의 임의의 특정한 폴리사카라이드 항원을 포함할 수 있다. 다가 면역원성 조성물의 용량 또는 면역원성 양은 달리 나타내지 않는 한 각각의 폴리사카라이드의 용량을 나타낼 것이다. 예를 들어, 10 mcg/ml 용량의 6가 면역원성 조성물은 10 mcg/ml의 각각의 6종의 폴리사카라이드를 함유할 것이다.
- [0354] 면역원으로서의 항원의 유효성은 면역검정, 면역침전 검정, 기능적 항체 검정, 예컨대 시험관내 흡소닌 검정 및 관련 기술분야에 공지된 많은 다른 검정을 사용하여 혈청 중의 항원에 대해 특이적인 순환 항체의 수준을 측정함으로써 B 세포 활성의 수준을 측정하여 측정될 수 있다. T-세포 면역원으로서의 항원의 유효성의 또 다른 척도는 증식 검정에 의해, 세포용해 검정, 예컨대 T 세포의 그의 특이적 표적 세포를 용해시키는 능력을 측정하기 위한 크로믹 방출 검정에 의해 측정될 수 있다. 추가로, 본 발명에서, "면역원성 양"은 또한 항원의 투여 후에 유도된 항원 특이적 항체의 혈청 수준을 측정함으로써 또는 그렇게 유도된 항체가 본원에 기재된 바와 같은 특정한 백혈구의 흡소닌식세포 능력을 증진시키는 능력을 측정함으로써 규정될 수 있다. 면역 반응의 보호 수준은 면역화된 숙주를 주사된 항원으로 시험감염시킴으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응이 요구되는 항원이 박테리아인 경우에, "면역원성 양"의 항원에 의해 유도된 보호 수준은, 동물을 박테리아 세포로 시험감염시킨 후의 생존율 또는 사망율을 검출함으로써 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 보호 양은 박테리아 감염과 연관된 적어도 1종의 증상, 예를 들어 감염과 연관된 열을 측정함으로써 측정될 수 있다. 다중-항원 또는 다중-성분 백신 또는 면역원성 조성물 중의 각각의 항원의 양은 각각의 다른 성분에 대하여 달라질 것이고, 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 면역원성 및/또는 생체내 효능을 측정하는 절차를 포함할 것이다.
- [0355] 용어 "면역원성 조성물"은 항원, 예를 들어 미생물 또는 그의 성분을 함유하는 임의의 제약 조성물에 관한 것이며, 이 조성물은 대상체에서 면역 반응을 도출하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 면역원성 조성물은 면역원성 조성물을 전신 경피 또는 점막 경로를 통해 투여함으로써 GBS에 감염되기 쉬운 인간을 치료하는 데 사용될 수 있다. 이들 투여는 근육내 (i.m.), 복강내 (i.p.), 피내 (i.d.) 또는 피하 경로를 통한 주사; 패치 또는 다른 경피 전달 장치에 의한 적용; 또는 구강/소화관, 기도 또는 비뇨생식관으로의 점막 투여를 통한 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 백신의 제조 또는 동물을 수동적으로 보호하거나 치료하는 데 사용될 수 있는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체의 도출에 사용될 수 있다.
- [0356] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은, 유효량의 적어도 1종의 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드-단백질 접합체 또는 그의 생물학적 등가물을 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 B군 스트렙토코쿠스 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되고, 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과 시알산 수준을 갖는다. 또 다른 예에서, 면역원성 조성물은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 혈청형 VI, 및 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 혈청형 VI, 및 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 혈청형 VI, 및 혈청형 Ia, Ib,

II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 4종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 혈청형 VI, VII, VIII 및 IX로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 혈청형 VI, 및 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 5종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 6종의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV 및 VI로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다.

[0357] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 에스. 아갈락티아에의 1 내지 10종의 상이한 혈청형을 포함한다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10-가 GBS 접합체 조성물이다. 하나의 이러한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 1가 GBS 접합체 조성물이다. 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 2-, 3-, 4-, 5-, 또는 6-가 GBS 접합체 조성물이다. 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 7-가 GBS 접합체 조성물이다. 추가의 실시양태에서, 면역원성 조성물은 8-가 GBS 접합체 조성물이다.

[0358] 따라서, 본 발명은 적어도 1, 2, 3, 또는 4종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형, 예컨대 적어도 5종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형, 적어도 6종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형, 적어도 7종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형, 적어도 8종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형, 또는 적어도 9종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 1가 및/또는 다가 면역원성 조성물에 관한 것이다. 특정한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형 VI를 포함한다.

[0359] 폴리사카라이드-단백질 접합체는 동일한 또는 상이한 단백질 담체를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 접합체는 동일한 단백질 담체를 포함하고 사카라이드는 단백질 담체의 동일한 분자에 접합된다 (담체 분자는 그에 접합된 2종 이상의 상이한 폴리사카라이드를 가짐). 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 W02004/083251을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 1종 이상의 폴리사카라이드는 단백질 담체의 상이한 분자에 각각 개별적으로 접합된다 (단백질 담체의 각각의 분자가 오직 그에 접합된 1종의 유형의 폴리사카라이드만을 가짐). 이러한 하나의 실시양태에서, 피막 사카라이드(들)는 담체 단백질에 개별적으로 접합된 것으로 언급된다.

[0360] 특정한 면역원성 조성물에 대한 성분의 최적량은 대상체에서 적절한 면역 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 초기 백신접종 후, 대상체는 1회 또는 수회의 적절한 간격의 부스터 면역화를 받을 수 있다.

[0361] 본 발명의 면역원성 조성물은 복수의 피막 폴리사카라이드 단백질 접합체 이외에도 1종 이상의 보존제를 추가로 포함할 수 있다. FDA는 다중-용량 (다회-용량) 바이알 내의 생물학적 제품이 단지 몇 가지를 제외하고는 보존제를 함유할 것을 요구하고 있다. 본 발명은 이러한 다회-용량 바이알의 사용을 고려한다. 보존제를 함유하는 백신 제품은 벤제토늄 클로라이드 (안트락스), 2-페녹시에탄올 (DTaP, HepA, 라임, 폴리오 (비경구)), 및 페놀 (뉴모, 티포이드 (비경구))을 함유하는 백신을 포함한다. 주사가 가능한 약물에 사용하도록 승인된 보존제는, 예를 들어 클로로부탄올, m 크레졸, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 2-페녹시에탄올, 벤제토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 벤질 알콜, 페놀, 및 질산페닐제2수을 포함한다.

[0362] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 폴리사카라이드 중 적어도 1종 및 제약상 허용되는 부형제, 완충제, 안정화제, 아주반트, 동결보호제, 염, 2가 양이온, 비-이온성 세제, 자유 라디칼 산화의 억제제, 희석제 또는 담체, 또는 그의 혼합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0363] 면역원성 조성물은 임의적으로 HEPES, PIPES, MES, 트리스 (트리메타민), 포스페이트, 아세테이트, 보레이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘 및 숙시네이트로부터 선택되나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 생리학상 허용되는 완충제를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 완충제는 히스티딘이다.

[0364] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 5 mM 내지 약 50 mM, 약 5 mM 내지 약 40 mM, 약 5 mM 내지 약 30 mM, 약 5 mM 내지 약 20 mM, 약 5 mM 내지 약 10 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 10 mM 내지 약 35 mM, 약 10 mM 내지 약 30 mM, 약 10 mM 내지 약 25 mM, 약 10 mM 내지 약 20 mM, 약 10 mM 내지 약 15 mM, 약 15 mM 내지 약 50 mM, 약 15 mM 내지 약 40 mM, 약 15 mM 내지 약 35 mM, 약 15 mM 내지 약 30 mM,

약 15 mM 내지 약 25 mM, 또는 약 15 mM 내지 약 20 mM의 농도의 완충제를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 10 mM 내지 약 25 mM, 가장 바람직하게는 약 20 mM의 농도의 완충제를 포함한다.

[0365] 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 20 mM의 농도의 히스티딘을 포함한다.

[0366] 특정 실시양태에서, 제제는 약 5.0 내지 약 7.1, 예컨대 약 5.3 내지 약 7.1, 약 5.5 내지 약 7.0, 약 6.0 내지 약 7.0, 약 6.0 내지 약 6.5, 약 6.3 내지 약 7.0, 또는 약 6.5 내지 약 7.0의 pH 범위 내로 완충된다. 또 다른 실시양태에서, 제제는 약 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 또는 7.0의 pH로 완충된다. 바람직한 실시양태에서, 제제는 약 6.0 내지 약 7.0, 가장 바람직하게는 약 6.5의 pH 범위로 완충된다.

[0367] 면역원성 조성물은 임의적으로 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리소르베이트-80 (트윈 80), 폴리소르베이트-60 (트윈 60), 폴리소르베이트-40 (트윈 40), 폴리소르베이트-20 (트윈 20), 및 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 (브리즈 58, 브리즈 35를 포함하나 이에 제한되지는 않음), 뿐만 아니라 기타 예컨대 트리톤 X-100; 트리톤 X-114, NP40, 스펠 85 및 비-이온성 계면활성제의 플루로닉 시리즈 (예를 들어, 플루로닉 121)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 비-이온성 계면활성제를 포함한다. 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 폴리소르베이트-80 또는 폴리소르베이트-40, 바람직하게는 폴리소르베이트-80 (PS80)을 포함한다.

[0368] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 0.001% 내지 약 2% (v/w), 약 0.001% 내지 약 1%, 약 0.001% 내지 약 0.5%, 약 0.001% 내지 약 0.1%, 약 0.001% 내지 약 0.05%, 약 0.001% 내지 약 0.01%, 약 0.001% to 0.005%, 약 0.005% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 1%, 약 0.005% 내지 약 0.5%, 약 0.005% 내지 약 0.1%, 약 0.005% 내지 약 0.05%, 약 0.005% 내지 약 0.01%, 약 0.01% 내지 약 2%, 약 0.01% 내지 약 1%, 약 0.01% 내지 약 0.5%, 약 0.01% 내지 약 0.1%, 약 0.01% 내지 약 0.05%, 약 0.01% 내지 약 0.04%, 약 0.01% 내지 약 0.03%, 약 0.015% 내지 약 2%, 약 0.015% 내지 약 1%, 약 0.015% 내지 약 0.5%, 약 0.015% 내지 약 0.1%, 약 0.015% 내지 약 0.05%, 약 0.015% 내지 약 0.04%, 약 0.015% 내지 약 0.03%, 약 0.02% 내지 약 2%, 약 0.02% 내지 약 1%, 약 0.02% 내지 약 0.5%, 약 0.02% 내지 약 0.1%, 약 0.02% 내지 약 0.05%, 약 0.02% 내지 약 0.04%, 약 0.02% 내지 약 0.03%, 약 0.05% 내지 약 2%, 약 0.05% 내지 약 1%, 약 0.05% 내지 약 0.5%, 약 0.05% 내지 약 0.1%, 약 0.1% 내지 약 2%, 약 0.1% 내지 약 1%, 약 0.1% 내지 약 0.5% 또는 약 0.1% 내지 약 0.25%의 농도의 계면활성제를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 0.01% 내지 약 0.03%, 가장 바람직하게는 약 0.02%의 농도의 계면활성제를 포함한다.

[0369] 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 0.001% 내지 약 2% (최대 약 0.25%가 바람직함) 농도의 폴리소르베이트-80 (PS80) 또는 약 0.001% 내지 약 1% (최대 약 0.5%가 바람직함) 농도의 폴리소르베이트-40을 포함한다.

[0370] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 0.02%의 농도의 PS80을 포함한다.

[0371] 제약상 허용되는 담체는, 본 발명의 탄수화물을 단백질에 부착하는 데 사용되고 그 탄수화물에 대한 면역 반응을 변형시키는 "담체 단백질"과 혼동되어서는 안 된다. 본원에 기재된 단백질 담체와의 혼동을 피하기 위해, 용어 제약상 허용되는 희석제가 제약상 허용되는 담체보다 바람직할 것이나, 이들 용어는 때때로 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 용어 "제약상 허용되는 담체"는 연방 정부의 규제 기관, 주 정부, 또는 다른 규제 기관의 승인을 받았거나, 미국 약전 또는 인간 뿐만 아니라 비-인간 포유동물을 포함한 동물에서의 사용에 대해 일반적으로 인정되는 다른 약전에 열거된 담체를 의미한다. 용어 "담체"는 제약 조성물과 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 적합한 제약상 허용되는 희석제는 임의의 및 모든 통상적인 용매, 분산 매질, 충전제, 고형 담체, 수용액, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 이러한 제약상 허용되는 희석제는 멸균 액체, 예컨대 물, 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일을 포함한 오일일 수 있다. 물, 주사용수 (WFI), 멸균 등장성 염수 용액, 포스페이트 완충 염수, 아주반트 현탁액, 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액, 및 그의 조합은, 특히 주사액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 제약상 허용되는 희석제는 미량의 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 보관 수명 또는 체내 유효성을 증진시킨다. 제약상 허용되는 희석제의 제조 및 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 적합한 제약 담체의 예는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기재되어 있다. 한 실시양태에서, 희석제는 물, 주사용수 (WFI), 아주반트 현탁액, 또는 염수이다. 특정한 실시양태에서, 희석제는 본원에 기재된 임의의 아주반트의 현탁액이다. 바람직한 실시양태에서, 희석제는 알루미늄-기반 아주반트 현탁액, 예컨대 인산알루미늄 현탁액이다.

[0372] 적합한 제약 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍

스트란, 만니톨, 락티톨, 팔라티니트, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 글리신, 아르기닌, 리신, 염화나트륨 (NaCl), 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 부형제는 NaCl이다.

[0373] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 10 mM 내지 약 500 mM, 약 10 mM 내지 약 450 mM, 약 10 mM 내지 약 400 mM, 약 10 mM 내지 약 350 mM, 약 10 mM 내지 약 300 mM, 약 10 mM 내지 약 250 mM, 약 10 mM 내지 약 200 mM, 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 10 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 10 mM 내지 약 30 mM, 약 10 mM 내지 약 20 mM, 20 mM 내지 약 500 mM, 약 20 mM 내지 약 450 mM, 약 20 mM 내지 약 400 mM, 약 20 mM 내지 약 350 mM, 약 20 mM 내지 약 300 mM, 약 20 mM 내지 약 250 mM, 약 20 mM 내지 약 200 mM, 약 20 mM 내지 약 150 mM, 약 20 mM 내지 약 100 mM, 약 20 mM 내지 약 50 mM, 약 20 mM 내지 약 30 mM, 50 mM 내지 약 500 mM, 약 50 mM 내지 약 450 mM, 약 50 mM 내지 약 400 mM, 약 50 mM 내지 약 350 mM, 약 50 mM 내지 약 300 mM, 약 50 mM 내지 약 250 mM, 약 50 mM 내지 약 200 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 약 50 mM 내지 약 100 mM, 약 100 mM 내지 약 500 mM, 약 100 mM 내지 약 450 mM, 약 100 mM 내지 약 400 mM, 약 100 mM 내지 약 350 mM, 약 100 mM 내지 약 300 mM, 약 100 mM 내지 약 250 mM, 약 100 mM 내지 약 200 mM, 약 100 mM 내지 약 150 mM, 약 150 mM 내지 약 500 mM, 약 150 mM 내지 약 450 mM, 약 150 mM 내지 약 400 mM, 약 150 mM 내지 약 350 mM, 약 150 mM 내지 약 300 mM, 약 150 mM 내지 약 250 mM, 약 150 mM 내지 약 200 mM, 약 200 mM 내지 약 500 mM, 약 200 mM 내지 약 450 mM, 약 200 mM 내지 약 400 mM, 약 200 mM 내지 약 350 mM, 약 200 mM 내지 약 300 mM, 약 200 mM 내지 약 250 mM, 약 250 mM 내지 약 500 mM, 약 250 mM 내지 약 450 mM, 약 250 mM 내지 약 400 mM, 약 250 mM 내지 약 350 mM, 약 250 mM 내지 약 300 mM, 약 300 mM 내지 약 500 mM, 약 300 mM 내지 약 450 mM, 약 300 mM 내지 약 400 mM, 약 300 mM 내지 약 350 mM, 약 350 mM 내지 약 500 mM, 약 350 mM 내지 약 450 mM, 약 350 mM 내지 약 400 mM, 약 400 mM 내지 약 500 mM, 약 400 mM 내지 약 450 mM, 또는 약 450 mM 내지 약 500 mM의 농도의 부형제를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 10 mM 내지 약 250 mM, 가장 바람직하게는 약 150 mM의 농도의 부형제를 포함한다.

[0374] 또 다른 실시양태에서, 부형제는 약 150 mM의 농도의 NaCl이다.

[0375] 원하는 경우에, 조성물은 또한 미량의 습윤제, 벌크화제, 유화제, 또는 pH 완충 작용제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀전, 동결건조 분말 또는 케이크 등의 형태를 취할 수 있다. 제제는 투여 방식에 맞춰야 한다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 성분과 비상용성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 면역원성 조성물에서의 그의 사용이 고려된다.

[0376] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은, 임의적으로 적어도 1종의 부형제의 존재 하에 동결건조된다. 바람직한 실시양태에서, 적어도 1종의 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨, 팔라티니트, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 글리신, 아르기닌, 리신, 염화나트륨 (NaCl), 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 적어도 1종의 부형제는 수크로스, 만니톨 및 글리신으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정한 실시양태에서, 적어도 1종의 부형제는 수크로스이다. 또 다른 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 추가의 부형제를 포함한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 추가의 부형제는 만니톨 또는 글리신이다.

[0377] 또 다른 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v), 예컨대 약 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5% 또는 10.0%의 적어도 1종의 사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 약 5.5% (w/v) 초과, 예컨대 약 7.0% (w/v) 초과와 적어도 1종의 부형제를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v), 예컨대 약 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5% 또는 10.0%의 추가의 부형제를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v)의 적어도 1종의 부형제 및 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v)의 추가의 부형제를 포함한다.

[0378] 또 다른 실시양태에서, 동결건조된 조성물은 물, 주사용수 (WFI), 아주반트 현탁액 또는 염수로 재구성된다. 바람직한 실시양태에서, 희석제는 알루미늄-기반 아주반트 현탁액, 예컨대 인산알루미늄 현탁액이다.

[0379] 한 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 단리된 폴리사카라이드 및 담체 분자를 포함한다. 적합한 담체 분자는 단백질, 폴리사카라이드, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집체 (예컨대 오일 액적 또는 리포솜), 및 불활성 바이러스 입자를 포함할 수 있다. 미립자 담체의 예는 폴리메틸 메타

크릴레이트 중합체로부터 유래된 것, 뿐만 아니라 폴리(락티드) 및 PLG로서 공지된 폴리(락티드-코-글리콜리드)로부터 유래된 마이크로입자를 포함한다.

[0380] 본 발명의 면역원성 조성물은, 면역계를 교란시키거나 또는 변경하여 체액성 및/또는 세포-매개 면역의 상향-조절 또는 하향-조절이 관찰되도록 하는 작용제인 1종 이상의 추가의 "면역조정제"를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 특정한 실시양태에서, 면역계의 체액성 및/또는 세포-매개 부문의 상향-조절이 바람직하다. 특정 면역조정제의 예는, 예를 들어 아주반트 또는 시토카인, 또는 그 중에서도 미국 특허 번호 5,254,339에 기재된 이스코 매트릭스 (씨에스엘 리미티드(CSL Limited), 오스트레일리아 파크빌)를 포함한다. 용어 "아주반트"는 본원에 추가로 기재된 바와 같은 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 화합물 또는 혼합물을 지칭한다.

[0381] 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 아주반트의 비제한적 예는 리비 아주반트 시스템 (리비 인크.(Ribi Inc.), 몬타나주 해밀턴); 미네랄 겔, 예컨대 수산화알루미늄 겔; 유중수 에멀전, 예컨대 완전 및 불완전 프로틴트 아주반트; 블록 공중합체 (CytRx, 조지아주 애틀랜타); SAF-M (키론(Chiron), 캘리포니아주 에머리빌); 암피겐 (AMPHIGEN)® 아주반트; 사포닌; 켈 A 또는 다른 사포닌 분획; 모노포스포릴 지질 A; 및 아브리딘 지질-아민 아주반트를 포함한다. 본 발명의 백신에서의 아주반트로서 유용한 수중유 에멀전의 비제한적 예는 MF59 (미국 특허 번호 6,299,884) (5% 스쿠알렌, 0.5% 폴리소르베이트 80, 및 0.5% 스펠 85 (임의적으로 다양한 양의 MTP-PE 함유) 함유, 미세유동화기 예컨대 모델 110Y 미세유동화기 (마이크로플루이드스(Microfluidics), 매사추세츠주 뉴턴)를 사용하여 서브마이크로미터 입자로 제제화), 및 SAF (10% 스쿠알렌, 0.4% 폴리소르베이트 80, 5% 플루로닉-차단된 중합체 L121, 및 thr-MDP 함유, 서브마이크로미터 에멀전으로 미세유동화되거나 또는 볼텍싱되어 더 큰 입자 크기의 에멀전이 생성됨); 변형된 SEAM62 (5% (v/v) 스쿠알렌 (시그마(Sigma)), 1% (v/v) 스펠® 85 세제 (아이씨아이 서팩턴츠(ICI Surfactants)), 0.7% (v/v) 폴리소르베이트 80 세제 (아이씨아이 서팩턴츠), 2.5% (v/v) 에탄올, 200 µg/ml 켈 A, 100 µg/ml 콜레스테롤, 및 0.5% (v/v) 레시틴 함유); 및 변형된 SEAM 1/2 (5% (v/v) 스쿠알렌, 1% (v/v) 스펠® 85 세제, 0.7% (v/v) 폴리소르베이트 80 세제, 2.5% (v/v) 에탄올, 100 µg/ml 켈 A, 및 50 µg/ml 콜레스테롤 함유)를 포함한다.

[0382] 면역 반응을 증진시키는 데 사용되는 적합한 아주반트는, 비제한적으로, 미국 특허 번호 4,912,094에 기재된 MPL™ (3-O-탈아실화된 모노포스포릴 지질 A, 코릭사(Corixa) (몬타나주 해밀턴))을 추가로 포함한다. 또한, 아주반트로서 사용하기에 적합한 것은 합성 지질 A 유사체 또는 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물 (AGP), 또는 그의 유도체 또는 유사체이며, 이는 코릭사 (몬타나주 해밀턴)로부터 입수가능하고, 미국 특허 번호 6,113,918에 기재되어 있다. 1종의 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노] 에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일-아미노]-b-D-글루코피라노시드이며, 이는 또한 529로 공지되어 있다 (이전에는 RC529로 공지됨). 이러한 529 아주반트는 수성 형태 (AF)로서 또는 안정한 에멀전 (SE)으로서 제제화된다.

[0383] 또 다른 아주반트는 시클로덱스트린 유도체 (미국 특허 번호 6,165,995); 다가음이온성 중합체 (미국 특허 번호 6,610,310); 뮤라일 펩티드, 예컨대 N-아세틸-뮤라일-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), 및 N-아세틸-노르 뮤라일-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE); 암피겐; 아브리딘; L121/스쿠알렌; D-락티드-폴리락티드/글리코시드; 플루로닉 폴리올; 사멸된 보르테텔라; 사포닌, 예컨대 미국 특허 번호 5,057,540에 기재된 스티물론(Stimulon)™ QS-21 (안티제닉스(Antigenics), 매사추세츠주 프레밍햄); 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*); 박테리아 리오폴리사카라이드; 합성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 CpG 모티프를 함유하는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,207,646); 유럽 특허 1,296,713 및 1,326,634에 기재된 IC-31 (인터셀 아게(Intercell AG), 오스트리아 비엔나); 백일해 독소 (PT) 또는 그의 돌연변이체, 콜레라 독소 또는 그의 돌연변이체 (예를 들어, 미국 특허 번호 7,285,281, 7,332,174, 7,361,355 및 7,384,640); 또는 이. 콜라이 열-불안정성 독소 (LT) 또는 그의 돌연변이체, 특히 LT-K63, LT-R72 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,149,919, 7,115,730 및 7,291,588)를 포함한다.

[0384] 백신에 포함될 수 있는 다른 "면역조정제"는, 예를 들어 인터류킨 1-α, 1-β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (예를 들어, 미국 특허 출원 5,723,127 참조), 13, 14, 15, 16, 17 및 18 (및 그의 돌연변이체 형태); 인터페론-α, β 및 γ; 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF) (예를 들어, 미국 특허 번호 5,078,996 및 ATCC 수탁 번호 39900 참조); 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF); 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF); 또는 종양 괴사 인자 α 및 β 중 1종 이상을 포함한다. 본원에 기재된 면역원성 조성물에 유용한 또 다른 아주반트는, 비제한적으로 MCP-1, MIP-1α, MIP-1β 및 RANTES를 포함한 케모카인; 부착 분자, 예컨대 셀렉틴, 예를 들어 L-셀렉틴, P-셀렉틴 및 E-셀렉틴; 뮤신-유사 분자, 예를 들어 CD34, GlyCAM-1 및 MadCAM-1; 인테그린 패밀리의 구성원, 예컨대 LFA-1, VLA-1, Mac-1 및 p150.95; 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리의 구성원, 예컨대 PECAM, ICAM,

예를 들어 ICAM-1, ICAM-2 및 ICAM-3, CD2 및 LFA-3; 공동-자극 분자, 예컨대 B7-1, B7-2, CD40 및 CD40L; 혈관 성장 인자, 신경 성장 인자, 섬유모세포 성장 인자, 표피 성장 인자, PDGF, BL-1 및 혈관 내피 성장 인자를 포함한 성장 인자; Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 및 DR6을 포함한 수용체 분자; 및 카스파제 (ICE)를 포함한다.

[0385] 면역조정제 및/또는 아주반트를 사용할 지에 대한 결정 또는 사용될 면역조정제 및/또는 아주반트의 선택은 백신 또는 면역원성 조성물이 투여될 대상체, 주사 경로, 및 제공될 주사 횟수에 따라 좌우될 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 대상체가 자연적으로 병원체에 노출된 경우, 아주반트는 백신 항원이 기억 반응을 효과적으로 유도할 수 있으므로 요구되지 않을 수 있다. 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 1종 이상의 아주반트를 포함할 것이다. 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 스트렙토코쿠스 C5a 펩티다제 (SCP)를 포함한다. 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 알루미늄-기반 아주반트를 포함한다. 하나의 이러한 실시양태에서, 알루미늄 아주반트는 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 또는 알루미늄 히드록실 포스페이트이다. 특정한 실시양태에서, 아주반트는 인산알루미늄이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 QS-21을 아주반트로서 포함한다.

[0386] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.9 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.8 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.7 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.6 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.4 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml, 0.25 mg/ml 내지 약 0.95 mg/ml, 0.25 mg/ml 내지 약 0.85 mg/ml, 0.25 mg/ml 내지 약 0.75 mg/ml, 0.25 mg/ml 내지 약 0.65 mg/ml, 0.25 mg/ml 내지 약 0.55 mg/ml, 0.25 mg/ml 내지 약 0.45 mg/ml, 0.25 mg/ml 내지 약 0.35 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 약 0.9 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 약 0.8 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 약 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 약 0.7 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 약 0.65 mg/ml, 0.5 mg/ml 내지 약 0.6 mg/ml, 0.75 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 0.75 mg/ml 내지 약 0.95 mg/ml, 0.75 mg/ml 내지 약 0.9 mg/ml, 및 0.75 mg/ml 내지 약 0.85 mg/ml의 농도의 아주반트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 0.25 mg/ml 내지 약 0.75 mg/ml, 가장 바람직하게는 약 0.5 mg/ml의 농도의 아주반트를 포함한다.

[0387] 또 다른 실시양태에서, 아주반트는 약 0.5 mg/ml의 농도의 알루미늄-기반 아주반트이다. 하나의 이러한 실시양태에서, 알루미늄-기반 아주반트는 인산알루미늄 또는 알루미늄 히드록실 포스페이트이다.

[0388] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 본원에 기재된 바와 같이 폴리사카라이드-단백질 접합체, 완충제, 계면활성제, 부형제, 및 임의적으로 아주반트를 포함하며, 여기서 조성물은 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충된다.

[0389] 하나의 이러한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 GBS 폴리사카라이드-단백질 접합체, 완충제, 계면활성제, 부형제, 및 임의적으로 아주반트를 포함하며, 여기서 조성물은 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충되고, 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과 시알산 수준을 갖는다.

[0390] 한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 GBS 폴리사카라이드-단백질 접합체, 히스티딘, 폴리소르베이트-80, 염화나트륨 및 임의적으로 인산알루미늄을 포함하며, 여기서 조성물은 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충되고, 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과 시알산 수준을 갖는다.

[0391] 또 다른 실시양태에서, 면역원성 조성물은 GBS 폴리사카라이드-단백질 접합체 약 5 mcg/ml 내지 약 50 mcg/ml, 히스티딘 약 10 mM 내지 약 25 mM, 폴리소르베이트-80 약 0.01% 내지 약 0.03% (v/w), 염화나트륨 약 10 mM 내지 약 250 mM, 및 임의적으로 인산알루미늄으로서의 알루미늄 약 0.25 mg/ml 내지 약 0.75 mg/ml를 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과 시알산 수준을 갖는다.

[0392] 하나의 이러한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 적어도 1종의 GBS 폴리사카라이드-단백질 접합체, 완충제, 계면활성제, 부형제, 및 임의적으로 아주반트를 포함하며, 여기서 조성물은 약 6.0 내지 약 7의 pH로 완충된다.

[0393] 하나의 이러한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 적어도 2종의 GBS 폴리사카라이드-단백질 접합체, 완충제, 계면활성제, 부형제, 및 임의적으로 아주반트를 포함하며, 여기서 조성물은 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충되고, 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VI, 및 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다.

[0394] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 적어도 2종의 GBS 폴리사카라이드-단백질 접합체 각각 약 5 mcg/ml 내지 약 50 mcg/ml, 히스티딘 약 10 mM 내지 약 25 mM, 폴리소르베이트-80 약 0.01% 내지 약 0.03% (v/w), 염화나트륨 약 10 mM 내지 약 250 mM, 및 임의적으로 인산알루미늄으로서의 알루미늄 약 0.25 mg/ml 내지 약 0.75 mg/ml를 포함하며, 여기서 접합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VI, 및 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII,

VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함한다.

[0395] 면역원성 조성물의 평가

[0396] 다양한 시험관내 시험을 사용하여 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성을 평가한다. 예를 들어, 시험관내 옥소닌 검정은 스트렙토코쿠스 세포, 해당 항원에 대한 특이적 항체를 함유하는 열 불활성화된 혈청, 및 외인성 보체 공급원의 혼합물을 함께 인큐베이션함으로써 수행된다. 새로 단리된 다형핵 세포 (PMN의 것) 또는 분화된 이펙터 세포, 예컨대 HL60 및 항체/보체/스트렙토코쿠스 세포 혼합물의 인큐베이션 동안 옥소닌식세포작용이 진행된다. 항체 및 보체로 코팅된 박테리아 세포는 옥소닌식세포작용시 사멸된다. 옥소닌식세포작용으로부터 회수된 생존 박테리아의 콜로니 형성 단위 (cfu)를 검정 혼합물을 플레이트팅함으로써 결정한다. 역가는 검정 대조군과의 비교에 의해 결정된 바와 같이, 50% 박테리아 사멸을 제공하는 최고 희석의 역수로서 보고된다.

[0397] 전세포 ELISA 검정은 또한 시험관내 면역원성 및 항원의 표면 노출을 평가하는 데 사용될 수 있으며, 여기서 관심 박테리아 균주 (예스. 아갈락티아에)를 플레이트, 예컨대 96 웰 플레이트 상에 코팅하고, 면역화된 동물로부터의 시험 혈청을 박테리아 세포와 반응시킨다. 시험 항원에 대해 특이적인 항체가 항원의 표면 노출된 에피토프와 반응성인 경우, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법에 의해 검출될 수 있다. 대안적으로, 유동 세포측정법이 피막 폴리사카라이드 항원의 표면 노출 및 모노클로날 항체를 포함한 항체의 특이성을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0398] 원하는 시험관내 활성을 나타내는 항원은 이어서 생체내 동물 시험감염 모델에서 시험될 수 있다. 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 면역화 방법 및 경로 (예를 들어, 비강내, 비경구, 경구, 직장, 질, 경피, 복강내, 정맥내, 피하 등)에 의해 동물 (예를 들어, 마우스)의 면역화에 사용된다. GBS 면역원성 조성물을 사용한 동물의 면역화 후에, 동물은 스트렙토코쿠스 아갈락티아에 균주로 시험감염되고 스트렙토코쿠스 감염에 대한 내성에 대해 검정된다.

[0399] 한 실시양태에서, 병원체-무함유 마우스는 예스. 아갈락티아에로 면역화되고 시험감염된다. 예를 들어, 마우스는 면역원성 조성물 중 1회 이상의 용량의 목적하는 항원으로 면역화된다. 후속적으로, 마우스는 예스. 아갈락티아에로 시험감염되고, 시험감염 후 시간 경과에 따라 생존이 모니터링된다.

[0400] 사용 방법

[0401] 본원에 사용된 "면역손상된"은 면역계의 세포성 및/또는 체액성 아암(들)에 대한 결핍을 앓고 있는 대상체를 지칭한다. 따라서, 면역 과정에서의 약간의 손상에서부터 완전한 면역 억제까지 다양한 면역 기능 결핍의 정도가 고려된다.

[0402] 용어 "대상체"는 포유동물, 조류, 어류, 파충류 또는 임의의 다른 동물을 지칭한다. 용어 "대상체"는 또한 인간을 포함한다. 용어 "대상체"는 또한 가정용 애완동물을 포함한다. 가정용 애완동물의 비제한적 예는 개, 고양이, 돼지, 토끼, 래트, 마우스, 저빌, 햄스터, 기니 피그, 페릿, 조류, 뱀, 도마뱀, 어류, 거북이 및 개구리를 포함한다. 용어 "대상체"는 또한 가축 동물을 포함한다. 가축 동물의 비제한적 예는 알파카, 들소, 낙타, 소, 사슴, 돼지, 말, 라마, 물, 당나귀, 양, 염소, 토끼, 순록, 야크, 닭, 거위 및 칠면조를 포함한다.

[0403] 본원에 사용된 "치료" (그의 변형, 예를 들어 "치료하다" 또는 "치료된" 포함)는 하기 중 어느 하나 이상을 지칭한다: (i) 전통적인 백신에서와 같은 감염 또는 재감염의 예방, (ii) 증상의 중증도의 감소 또는 증상의 제거, 및 (iii) 해당 병원체 또는 장애의 실질적 또는 완전한 제거. 따라서, 치료는 예방적으로 (감염 전에) 또는 치료적으로 (감염 후에) 수행될 수 있다. 본 발명에서, 예방적 또는 치유적 치료가 사용될 수 있다. 본 발명의 특정한 실시양태에 따르면, 미생물 감염 (예를 들어, 박테리아, 예컨대 예스. 아갈락티아에)에 대해 숙주 동물을 치료 (예방적 및/또는 치료적 면역화 포함)하는 조성물 및 방법이 제공된다. 본 발명의 방법은 대상체에게 예방적 및/또는 치료적 면역을 부여하는 데 유용하다. 본 발명의 방법은 또한 생의학 연구 적용을 위해 대상체 상에서 실시될 수 있다.

[0404] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 투여함으로써 대상체에서 GBS에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 투여함으로써 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스와 연관된 질환 또는 상태를 예방하거나 또는 감소시키는 방법에 관한 것이다. 한 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에 기재된 면역원성 조성물에 관한 것이다. 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 GBS에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 면역원성 조성물에 관한 것이다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 임신 계획 중인

여성 또는 임신한 여성이다. 하나의 이러한 실시양태에서, 임신한 여성은 임신의 제3 삼분기 또는 후반기, 예컨대 임신 적어도 20주 또는 적어도 27주이다. 바람직한 실시양태에서, 임신한 여성은 임신 27주 내지 36주이다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 노인, 예컨대 50세 이상, 65세 이상, 및 85세 이상의 성인이다. 추가 실시양태에서, 대상체는 면역손상된 대상체이다. 한 측면에서, 대상체는 비만, 당뇨병, HIV 감염, 암, 심혈관 질환 또는 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 의학적 상태를 가질 수 있다. 바람직한 실시양태에서, B군 스트렙토코쿠스는 에스. 아갈락티아에이다.

[0405] 면역원성 조성물의 면역원성 양 또는 유효량은 대상체가 점진적으로 증가하는 양의 면역원성 조성물로 면역화되고 면역 반응이 분석되어 최적 투여량이 결정되는 것인 용량 반응 연구를 수행함으로써 결정될 수 있다. 연구를 위한 출발점은 동물 모델에서의 면역화 데이터로부터 추론될 수 있다. 투여량은 개체의 특정 상태에 따라 달라질 수 있다. 양은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 수단에 의해 상용 시험에서 결정될 수 있다.

[0406] 면역학적 유효량의 면역원성 조성물을 적절한 수의 용량으로 대상체에게 투여하여 면역 반응을 도출한다. 투여량은 개체의 특정 상태, 예컨대 연령 및 체중에 따라 달라질 수 있다. 이 양은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 수단에 의해 상용 시험에서 결정될 수 있다.

[0407] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물이 투여된 환자는 에스. 아갈락티아에 보유 비율에서의 감소를 나타낸다. 면역원성 조성물의 투여 후 이러한 보유의 감소 또는 비-보유자로서 보낸 연장된 시간 간격은 의료 필요 관점에서 유의하다. 예를 들어, 보유자에서의 전체 에스. 아갈락티아에 보유의 감소는 본 발명의 면역원성 조성물의 1회 용량 후에 평가될 수 있다. 예를 들어, 면역원성 조성물의 투여 1일 전에, 18-50세 성인의 군은 비강, 인후, 액과, 직장, 회음부, 및 질 스왑 후에 배양하여 그들의 보유 상태를 결정함으로써 보유에 대해 스크리닝될 수 있다. 이어서, 군에게 본 발명의 면역원성 조성물이 투여될 수 있고, 군에게 대조군이 투여될 수 있다. 비강, 인후, 액과, 직장, 회음부 및 질 스왑은 면역원성 조성물의 투여가 수행된 후 12주 기간에 걸쳐 매주 및 최대 6개월간 매월 수행되고 위약과 비교된다. 하나의 1차 종점은 면역화 후 3개월 간격으로 면역원성 조성물의 투여 후 환자에서의 보유 비율을 위약과 비교하는 것이다.

[0408] 항체

[0409] "항체"는 이뮤노글로불린 분자의 가변 영역에 위치한 적어도 1개의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩티드 등에 특이적으로 결합할 수 있는 이뮤노글로불린 분자이다. 문맥에 의해 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 용어는 무손상 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 뿐만 아니라, 조작된 항체 (예를 들어, 키메라, 인간화 및/또는 유도체화되어 이펙터 기능, 안정성 및 다른 생물학적 활성이 변경됨) 및 그의 단편 (예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 체 (ScFv) 및 도메인 항체 (상어 및 낙타류 항체 포함), 및 항체 부분, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체임) 및 본원에 기재된 바와 같은 항체 단편을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위를 포함하는 이뮤노글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 형상을 포괄하는 것으로 의도된다. 항체는 임의의 부류, 예컨대 IgG, IgA 또는 IgM (또는 그의 하위부류)의 항체를 포함하고, 항체는 임의의 특정한 부류일 필요는 없다. 그의 중쇄의 불변 도메인의 항체 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 부류로 할당될 수 있다. 이뮤노글로불린의 5가지 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 인간에서 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 반응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 불린다. 다양한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형상은 널리 공지되어 있다.

[0410] "항체 단편"은 무손상 항체의 부분만을 포함하며, 여기서 상기 부분은 바람직하게는, 무손상 항체 내에 존재하는 경우에 그 일부와 정상적으로 연관된 기능 중 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 전부를 보유한다.

[0411] 본원에 사용된 "기능적 활성"의 항체 또는 "기능적 항체"는 최소한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 추가의 기능은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예컨대 옵소닌화, ADCC 또는 보체-매개 세포독성을 통해 병원체의 클리어런스 또는 사멸을 일으키는 면역계의 추가의 성분을 포함할 수 있다. 항원 결합 후에, 임의의 후속 항체 기능은 항체의 Fc 영역을 통해 매개될 수 있다. 항체 옵소닌식세포작용 검정 (OPA)은 이펙터 세포 (백혈구)에 의한 박테리아의 시험관내 Ig 보체-보조 사멸을 측정하기 위해 설계된, 따라서 생물학적 과정을 모방하는 시험관내 검정이다. 항체 결합은 또한 그것이 결합하는 항원의 생물학적 기능을 직접적으로 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, "기능적 항체"는 항체가 박테리아를 사멸시킨다는 것을 입증하는 동물 효능 모델 또는 옵소닌식세포 사멸 검정에서의 박테리아의 사멸에 의해 측정된 바와 같이 기능적인 항체를 지칭한다.

- [0412] 한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리사카라이드에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 그의 단편에 관한 것이다. 본원에 사용된 "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체를 지칭한다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정시에 항체의 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 서열 분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 획득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원성 또는 비환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0413] 특정한 폴리사카라이드 또는 특정한 폴리사카라이드 상의 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인" 항체는 임의의 다른 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 그 특정한 폴리사카라이드 또는 특정한 폴리사카라이드 상의 에피토프에 결합하는 것이다.
- [0414] 본원에 사용된 용어 "표지"는 "표지된" 항체를 생성하기 위해 항체에 직접 또는 간접적으로 접합된 검출가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 표지는 그 자체로 검출가능하거나 (예를 들어 방사선동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.
- [0415] 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물의 1종 이상의 항원에 특이적으로 및 선택적으로 결합하는 항체 및 항체 조성물을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 대상체에게 본 발명의 면역원성 조성물의 투여시에 생성된다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물의 1종 이상의 항원에 대해 지시된 정제 또는 단리된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 동물 효능 모델에서 또는 옹소단식세포 사멸 검정을 통해 박테리아 사멸에 의해 측정된 바와 같이 기능적이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 대상체에게 수동 면역을 부여한다. 본 발명은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 기술을 사용하여, 본 발명의 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분자, 및 본 발명의 항체 또는 항체 조성물을 생산하는 세포 또는 세포주 (예컨대 하이브리도마 세포 또는 항체의 재조합 생산을 위한 다른 조작된 세포주) 및 트랜스제닉 동물을 추가로 제공한다.
- [0416] 본 발명의 항체 또는 항체 조성물은 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 제제를 생성하고, 상기 항체 또는 항체 조성물을 사용하여 대상체에게 수동 면역을 부여하는 것을 포함하는, 대상체에서 에스. 아갈락티아에와 연관된 스트렙토코쿠스 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 사용될 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 진단 방법, 예를 들어 본 발명의 면역원성 조성물의 1종 이상의 항원의 존재를 검출하거나 그의 수준을 정량화하는 데 유용할 수 있다.
- [0417] 반복 구조, 예컨대 본 발명의 폴리사카라이드에 대한 항체 반응은 일부 고유 특색을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 반복 단위의 규칙성은 매우 상이한 분자량의 항원 분자가 폴리사카라이드에 특이적인 항체에 결합할 수 있음을 의미할 수 있다. 둘째로, 보다 큰 길이의 폴리사카라이드의 반복 구조는 T-세포 비의존성 항체 반응을 유도할 수 있다. 따라서, T-세포 헬퍼 에피토프를 갖는 단백질 담체에 접합된 폴리사카라이드를 사용하는 경우에, T-세포 비의존성 및 T-세포 의존성 항체 반응 둘 다 자극될 수 있다. 따라서, 면역 반응은 폴리사카라이드 크기의 적절한 선택 및 담체 단백질이 사용되는지 여부에 의해 조절될 수 있다.
- [0418] 폴리클로날 항체
- [0419] 특정 실시양태에서, 항-폴리사카라이드 항체는 폴리클로날 항체이다. 본원에 정의된 폴리클로날 항체는 혈청의 제제로부터 유도된 상이한 특이성을 갖고 상이한 B-세포 클론으로부터 유래한 항체의 혼합물을 지칭한다. 폴리클로날 항체의 제조 및 특징화는 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0420] 폴리클로날 항체는 본원에 기재된 면역원 또는 면역원성 조성물, 및 원하는 경우에 아주반트, 완충제 및/또는 희석제의 1회 이상의 주사를 투여함으로써 대상체, 예를 들어 포유동물에서 생성된다. 다양한 동물 종이 특정 항혈청의 생산에 사용될 수 있다. 전형적으로, 항-사카라이드 폴리클로날 항혈청의 생산에 사용되는 동물은 비인간 영장류, 염소, 양, 토끼, 마우스, 래트, 햄스터 또는 기니 피그이다. 전형적으로, 면역원 또는 면역원성 조성물은 아주반트의 존재 또는 부재 하에 다중 주사에 의해 포유동물에게 주사된다. 면역원성 물질은 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 본원에 기재된 폴리사카라이드, 폴리사카라이드-단백질 접합체, 또는 보다 큰 어셈블리의 면역원을 포함할 수 있다. 전형적으로, 제1 면역화 2-6주 후에 시작하여, 면역화된 동물로부터 혈액

을 수집하고, 응고시키고, 혈청을 수거한다. 혈청은 면역화된 동물로부터의 항-사카라이드 폴리클로날 항체를 함유하고, 종종 항혈청으로 지칭된다.

[0421] 모노클로날 항체

[0422] 항-사카라이드 모노클로날 항체는 공지된 하이브리도마 기술의 사용을 통해 제조될 수 있다. 전형적으로, 모노클로날 항체를 제조하는 것은 먼저 적합한 표적 동물 숙주를 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 본 발명의 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 선택된 면역원으로 면역화시키는 것을 수반한다. 원하는 경우에, 아주반트, 완충제 및/또는 희석제가 포함될 수 있다. 면역화는 B 림프구가 폴리사카라이드 또는 그의 접합체에 특이적으로 결합하는 항체를 생산 또는 발현하도록 유도하기에 충분한 방식으로 수행된다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화된다.

[0423] 이어서, 림프구를 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 불멸화 세포주와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다. 림프구의 공급원은 모노클로날 항체가 인간 또는 동물 기원의 것인지 여부를 결정한다. 일반적으로, 인간 기원의 항체 및 세포가 요구되는 경우에 말초 혈액 림프구 ("PBL")가 사용되고, 비-인간 포유동물 공급원이 요구되는 경우에 비장 세포 또는 림프절 세포가 사용된다.

[0424] 불멸화 세포주는 전형적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합된 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양된다. 예를 들어, 모 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여된 경우에, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 ("HAT 배지"), 이 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0425] 불멸화 세포주는 기원 종, 융합 및 성장 특성과 같은 실제 고려사항에 대해 선택된다. 예를 들어, 적합한 불멸화 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 발현을 지지하고, 배지, 예컨대 HAT 배지에 감수성인 것이다. 불멸화 세포주의 예는 뮤린 골수종 세포주를 포함한다. 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되었다.

[0426] 모노클로날 항체는 하이브리도마 세포에 의해 배양 배지 내로 분비된다. 배양 배지는 이어서 폴리사카라이드를 인식하고 그에 결합하는 모노클로날 항체의 존재에 대해 검정된다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 특정한 모노클로날 항체의 항-폴리사카라이드 결합 특이성은 관련 기술분야에 널리 공지된 수많은 절차 중 하나에 의해 결정된다. 예를 들어, 항체 결합 특이성은 면역침전, 방사선면역검정 (RIA), 웨스턴 블롯, 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 표면 플라즈몬 공명 (예를 들어, 비아코어)에 의해 결정될 수 있다. 모노클로날 항체에 의해 인식되는 정확한 에피토프는 에피토프 매핑에 의해 결정된다. 이러한 기술 및 검정은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다.

[0427] 목적하는 특이성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론은 한계 희석에 의해 서브클로닝되고, 표준 방법을 사용하여 배양된다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어 돌베코 변형 이글 배지 및 RPMI-1640 배지를 포함한다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 포유동물에서 생체내에서 복수로서 성장된다. 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 분리 또는 정제된다.

[0428] 대안적으로, 목적하는 특이성을 갖고 목적하는 기원 종으로부터의 항체는 파지 디스플레이 라이브러리의 사용을 통해 획득될 수 있다. 추가로, 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는 데 사용하기에 특히 적용 가능한 방법 및 시약의 예는 관련 기술분야에서 찾아볼 수 있다.

[0429] 항체의 용도

[0430] 한 측면에서, 본 발명은 GBS 항체 및/또는 항체 단편을 생산하기 위한 본원에 기재된 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다. 본원에 기재된 폴리사카라이드-단백질 접합체 및/또는 그로부터 생성된 항체는 ELISA- 및 마이크로어레이-관련 기술을 포함한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 면역진단 기술에 사용될 수 있다. 또한, 이들 시약은, 예를 들어 면역원성 폴리사카라이드 접합체에 대한 혈청 항체 수준을 포함한 항체 반응을 평가하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 검정 방법론은 표지 예컨대 형광, 화학발광, 방사성, 효소적 표지 또는 염료 분자, 및/또는 생물학적 샘플 중 항원 또는 항체 및 고체 지지체에 결합된 상응하는 항체 또는

항원 사이의 복합체의 직접 또는 간접 검출을 위한 2차 면역학적 시약의 사용을 수반할 수 있다.

[0431] 생산된 항체 또는 항체 단편은 또한 수동 면역요법에 또는 스트렙토코쿠스 감염에 대한 예방에 유용할 수 있다.

[0432] 폴리사카라이드를 생산하는 방법

[0433] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 폴리사카라이드를 생산하는 방법에 관한 것이다. 방법은 GBS를 배양하고, 박테리아에 의해 생산된 폴리사카라이드를 수집하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, GBS는 에스. 아갈락티아에를 포함한다. 박테리아는 에스. 아갈락티아에의 임의의 균주일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 박테리아는 에스. 아갈락티아에의 피막화된 균주이다. 본 발명에 사용하기 위한 에스. 아갈락티아에 균주는 090, A909 (ATCC 수탁 번호 BAA-1138), 515 (ATCC 수탁 번호 BAA-1177), B523, CJB524, MB 4052 (ATCC 수탁 번호 31574), H36B (ATCC 수탁 번호 12401), S40, S42, MB 4053 (ATCC 수탁 번호 31575), M709, 133, 7357, PFEGBST0267, MB 4055 (ATCC 수탁 번호 31576), 18RS21 (ATCC 수탁 번호 BAA-1175), S16, S20, V8 (ATCC 수탁 번호 12973), DK21, DK23, UAB, 5401, PFEGBST0708, MB 4082 (ATCC 수탁 번호 31577), M132, 110, M781 (ATCC 수탁 번호 BAA-22), D136C(3) (ATCC 수탁 번호 12403), M782, S23, 120, MB 4316 (M-732; ATCC 수탁 번호 31475), M132, K79, COH1 (ATCC 수탁 번호 BAA-1176), PFEGBST0563, 3139 (ATCC 수탁 번호 49446), CZ-NI-016, PFEGBST0961, 1169-NT1, CJB111 (ATCC 수탁 번호 BAA-23), CJB112, 2603 V/R (ATCC 수탁 번호 BAA-611), NCTC 10/81, CJ11, PFEGBST0837, 118754, 114852, 114862, 114866, 118775, B 4589, B 4645, SS1214, CZ-PW-119, 7271, CZ-PW-045, JM9130013, JM9130672, IT-NI-016, IT-PW-62, 및 IT-PW-64를 포함한다.

[0434] 본원에 기재된 폴리사카라이드는 적절한 배지 중에서 GBS를 배양함으로써 생산될 수 있다. 적절한 배지는 콜럼비아 브로쓰를 포함할 수 있다. 배지는 텍스트로스, 헤민 및/또는 글루코스를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 배지는 콜럼비아 브로쓰 및 텍스트로스를 포함한다. 에스. 아갈락티아에가 콜럼비아 브로쓰 및 텍스트로스를 사용하여 배양되는 경우에, 바람직하게는 배양 온도는 20 내지 40℃, 바람직하게는 37℃이다. 바람직한 실시양태에서, 박테리아는 호기성 조건 하에 배양된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 박테리아는 12 내지 60 시간 동안 배양된다.

[0435] 폴리사카라이드는 배양물로부터 표적 물질을 수집하기 위한 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대, 예를 들어 가열, 효소 처리, 원심분리, 침전, 활성탄으로의 처리, 및/또는 여과를 사용함으로써 수득된 배양물로부터 수집될 수 있다. (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 및 2008/0102498; 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2008/118752 참조). 한 실시양태에서, 박테리아 및 폴리사카라이드를 함유하는 배양물은 원심분리되고, 효소, 예컨대 예를 들어 리소자임, RNase, DNase, 프로나제, 뮤타놀리신 및 그의 조합으로 처리된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 적절한 유기 용매는 수득된 상청액에 첨가되어 단백질을 침전시키고, 침전물은 원심분리에 의해 제거된다. 이어서 폴리사카라이드는 적절한 유기 용매를 상청액에 추가로 첨가함으로써 침전될 수 있고, 폴리사카라이드는 원심분리에 의해 수집될 수 있다. 보다 구체적으로, 본원에 기재된 폴리사카라이드는 박테리아가 제거된 상청액에 에탄올을 약 25 부피%의 최종 농도로 첨가하고, 단백질을 함유하는 침전물을 원심분리에 의해 제거하고, 에탄올을 그에 약 75 부피%의 최종 농도로 추가로 첨가한 다음, 침전물을 원심분리에 의해 수집함으로써 수득될 수 있다. 생성된 침전물을 질소로 건조시킬 수 있다. 생성된 침전물을 트리스 및 0.05% Na 아지드 중에 재현탁시킬 수 있다.

[0436] 본 발명의 추가 측면은 N- 및 O-아세틸 기를 보존하면서 대체로 무손상인 고분자량 CP의 단리를 위해 유기 시약, 예컨대 유도체화된 히드록실 아민 화합물을 사용하는 신규 방법을 제공한다. 이 방법은 세포를 용해시키지 않기 때문에, 원심분리에 의해 단리된 CP는 세포내 성분으로 최소로 오염되고, 보다 높은 전체 수율로 이어질 수 있다. 더욱이, 이들 시약은 B군 항원 불순물을 그의 다중 포스포디에스테르 연결로 인해 매우 작은 단편으로 절단하며 이는 투석여과에 의해 용이하게 제거될 수 있다.

[0437] 한 실시양태에서, CP는 히드록실 아민을 피막 폴리사카라이드 생산 박테리아를 포함하는 세포 페이스트와 반응시킴으로써 단리된다. 한 실시양태에서, 방법은 원심분리 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 여과 단계를 추가로 포함한다.

[0438] 본 발명의 한 측면에서, 히드록실 아민은 실시예 2의 표 2에 열거된 것들일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 히드록실 아민은 디벤질 히드록실아민; 디에틸 히드록실아민; 히드록실아민; 에틸렌디아민; 트리에틸렌테트라민; 1,1,4,7,10,10 헥사메틸 트리에틸렌 테트라민; 및 2,6,10 트리메틸 2,6,10 트리아자운데칸으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0439] 본 발명의 한 측면에서, 히드록실 아민의 농도는 약 5 mM 내지 약 200 mM, 예컨대 약 5 mM 내지 약 150 mM, 약 5 mM 내지 약 100 mM, 약 5 mM 내지 약 75 mM, 약 5 mM 내지 약 50 mM, 약 5 mM 내지 약 25 mM, 약 5 mM 내지 약 10 mM, 10 mM 내지 약 200 mM, 예컨대 약 10 mM 내지 약 150 mM, 약 10 mM 내지 약 100 mM, 약 10 mM 내지 약 75 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 10 mM 내지 약 25 mM, 약 25 mM 내지 약 200 mM, 약 25 mM 내지 약 150 mM, 약 25 mM 내지 약 100 mM, 약 25 mM 내지 약 75 mM, 약 25 mM 내지 약 50 mM, 약 50 mM 내지 약 200 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 50 mM 내지 약 100 mM, 및 약 50 mM 내지 약 75 mM이다.
- [0440] 또 다른 측면에서, 반응의 pH는 약 5.5 내지 약 9.5, 예컨대 약 5.5 내지 약 9.0, 약 5.5 내지 약 8.5, 약 5.5 내지 약 8.0, 약 5.5 내지 약 7.5, 약 5.5 내지 약 7.0, 약 5.5 내지 약 6.5, 약 6.0 내지 약 9.5, 약 6.0 내지 약 9.0, 약 6.0 내지 약 8.5, 약 6.0 내지 약 8.0, 약 6.0 내지 약 7.5, 약 6.0 내지 약 7.0, 약 6.5 내지 약 9.5, 약 6.5 내지 약 8.5, 약 6.5 내지 약 8.0, 약 6.5 내지 약 7.5, 약 7.0 내지 약 9.5, 약 7.0 내지 약 9.0, 7.0 내지 약 8.5, 및 약 7.0 내지 약 8.0으로 유지된다.
- [0441] 본 발명의 추가 측면에서, 반응은 약 20℃ 내지 약 85℃, 예컨대 약 20℃ 내지 약 80℃, 약 20℃ 내지 약 75℃, 약 20℃ 내지 약 70℃, 약 20℃ 내지 약 65℃, 약 20℃ 내지 약 60℃, 약 20℃ 내지 약 55℃, 약 20℃ 내지 약 50℃, 약 25℃ 내지 약 85℃, 약 25℃ 내지 약 80℃, 약 25℃ 내지 약 75℃, 약 25℃ 내지 약 70℃, 약 25℃ 내지 약 65℃, 약 25℃ 내지 약 60℃, 약 25℃ 내지 약 55℃, 약 25℃ 내지 약 50℃, 약 30℃ 내지 약 85℃, 약 30℃ 내지 약 80℃, 약 30℃ 내지 약 75℃, 약 30℃ 내지 약 70℃, 약 30℃ 내지 약 65℃, 약 30℃ 내지 약 60℃, 약 30℃ 내지 약 55℃, 약 30℃ 내지 약 50℃, 약 35℃ 내지 약 85℃, 약 35℃ 내지 약 80℃, 약 35℃ 내지 약 75℃, 약 35℃ 내지 약 70℃, 약 35℃ 내지 약 65℃, 약 35℃ 내지 약 60℃, 약 35℃ 내지 약 55℃, 약 40℃ 내지 약 85℃, 약 40℃ 내지 약 80℃, 약 40℃ 내지 약 75℃, 약 40℃ 내지 약 70℃, 약 40℃ 내지 약 65℃, 약 40℃ 내지 약 60℃, 약 45℃ 내지 약 85℃, 약 45℃ 내지 약 80℃, 약 45℃ 내지 약 75℃, 약 45℃ 내지 약 70℃, 약 45℃ 내지 약 65℃, 약 50℃ 내지 약 85℃, 약 50℃ 내지 약 80℃, 약 50℃ 내지 약 75℃, 약 50℃ 내지 약 70℃, 약 55℃ 내지 약 85℃, 약 55℃ 내지 약 80℃, 약 55℃ 내지 약 75℃, 약 60℃ 내지 약 85℃, 및 약 65℃ 내지 약 85℃의 온도에서 일어난다.
- [0442] 또 다른 측면에서, 반응 시간은 약 10시간 내지 약 90시간, 예컨대 약 10시간 내지 약 85시간, 약 10시간 내지 약 80시간, 약 10시간 내지 약 75시간, 약 10시간 내지 약 70시간, 약 10시간 내지 약 60시간, 약 10시간 내지 약 50시간, 약 10시간 내지 약 40시간, 약 10시간 내지 약 30시간, 약 10시간 내지 약 25시간, 약 10시간 내지 약 20시간, 약 10시간 내지 약 15시간, 약 15시간 내지 약 90시간, 약 15시간 내지 약 85시간, 약 15시간 내지 약 80시간, 약 15시간 내지 약 75시간, 약 15시간 내지 약 70시간, 약 15시간 내지 약 60시간, 약 15시간 내지 약 50시간, 약 15시간 내지 약 40시간, 약 15시간 내지 약 30시간, 15시간 내지 약 20시간, 예컨대 약 20시간 내지 약 90시간, 약 20시간 내지 약 85시간, 약 20시간 내지 약 80시간, 약 20시간 내지 약 75시간, 약 20시간 내지 약 70시간, 약 20시간 내지 약 60시간, 약 20시간 내지 약 50시간, 약 20시간 내지 약 40시간, 약 20시간 내지 약 30시간, 및 약 20시간 내지 약 25시간이다.
- [0443] 대안적으로, 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 폴리사카라이드는 화학적으로 합성된다. 폴리사카라이드는 통상적인 방법에 따라 화학적으로 합성될 수 있다.
- [0444] 본 발명의 또 다른 실시양태에서 폴리사카라이드는 폴리사카라이드를 생산하기 위한 생합성 경로를 클로닝 및 발현시킨 후 대용 숙주에서의 발현에 의해 제조된다. 예를 들어, 숙주 세포는 본원에 기재된 폴리사카라이드와 구조적 유사성을 갖는 폴리사카라이드를 생산하도록 변형될 수 있으며, 여기서 숙주 세포에서 생산된 폴리사카라이드의 반복 단위는 본원에 기재된 폴리사카라이드의 반복 단위와 부분적으로 동일하다. 폴리사카라이드는, 예를 들어 본원에 기재된 폴리사카라이드의 반복 단위와 비교하여, 폴리사카라이드의 반복 단위가 상실된 분지를 갖고/거나, 크기가 불균질하고/거나, 분지 배열이 불균질한 경우에 본원에 기재된 폴리사카라이드와 구조적으로 유사하다. 바람직하게는, 숙주 세포는 박테리아 숙주 세포이다.
- [0445] 실시예
- [0446] 하기 실시예는 본 발명의 일부 실시양태를 입증한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것이며, 본 발명의 조건 및 범주에 대해 완전히 확정적인 것으로 여겨지지 않는 것으로 이해되어야 한다. 전형적인 반응 조건 (예를 들어, 온도, 반응 시간 등)이 주어진 경우, 일반적으로 덜 편리하기는 하지만, 명시된 범위 초과 및 미만 둘 다의 조건이 또한 사용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 언급된 모든 부 및 퍼센트는 중량 기준이고 모든 온도는 섭씨 온도로 표현된다.

- [0447] 또한, 달리 상세히 기재된 경우를 제외하고는, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되고 상용적인 표준 기술을 사용하여 하기 실시예를 수행하였다. 상기 언급된 바와 같이, 하기 실시예는 예시적 목적을 위해 제시되며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0448] 실시예 1. 탈-0-아세틸화된 폴리사카라이드를 갖는 폴리사카라이드-단백질 접합체의 제조
- [0449] 각각의 혈청형에 대한 에스. 아갈락티아에 균주를 규정된 배지에서 pH-제어 하에 침지 배양물 중에서 발효시켰다. 사용된 절차 및 배지는 실험을 통해 최적화되었고, 문헌 [von Hunolstein, C. et al., Appl. Micro. Biotech. 38(4):458-462 (1993)]에 이전에 기재된 기본 기술의 확장이었다. 피막 폴리사카라이드를 NaOH 처리에 의해 세포로부터 분리하였다. 정화 후에, 일련의 UF/DF, 침전 및 탄소 여과 단계로 정제된 폴리사카라이드를 수득하였다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,652,480을 참조한다. 환원성 아미노화 화학을 사용하여 활성화된 폴리사카라이드를 CRM₁₉₇에 접합시켰다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,360,897을 참조한다.
- [0450] 실시예 2. 환원성 아미노화 활성화 다당류에 의한 GBS 피막 폴리사카라이드의 접합
- [0451] 계산된 양의 500 mM 인산칼륨 완충제 (pH 6.0) 및 주사용수 (WFI)를 순차적으로 첨가하여 폴리사카라이드 산화를 100 mM 인산칼륨 완충제 (pH 6.0 ± 0.5) 중에서 수행하여 2.0 g/L의 최종 폴리사카라이드 농도를 제공하였다. 필요한 경우에, 반응 pH를 대략 pH 6.0으로 조정하였다. pH 조정 후, 반응 온도를 23°C로 조정하였다. 대략 0.25 몰 당량의 소듐 퍼아यो데이트를 첨가하여 산화를 개시하였다. 산화 반응을 대략 5 ± 3°C에서 16 시간 동안 수행하였다.
- [0452] 활성화된 폴리사카라이드의 농축 및 투석여과를 5K MWCO 한외여과 카세트를 사용하여 수행하였다. 투석여과를 20배 정용부피의 WFI에 대해 수행하였다. 이어서, 정제된 활성화된 폴리사카라이드를 5 ± 3°C에서 저장하였다. 정제된 활성화된 사카라이드를, 특히, (i) 비색 검정에 의한 사카라이드 농도; (ii) 비색 검정에 의한 알데히드 농도; (iii) 산화도; 및 (iv) SEC-MALLS에 의한 분자량에 의해 특징화하였다.
- [0453] 활성화된 폴리사카라이드의 산화도 (DO = 당 반복 단위의 몰 / 알데히드의 몰)를 하기와 같이 결정하였다:
- [0454] 다양한 비색 방법에 의해, 예를 들어 안트론 방법을 사용하여 당 반복 단위의 몰을 결정한다. 안트론 방법에 의해, 먼저 폴리사카라이드를 황산 및 열의 작용에 의해 모노사카라이드로 분해한다. 안트론 시약은 헥소스와 반응하여 황록색 복합체를 형성하고, 그의 흡광도를 625 nm에서 분광광도계로 판독한다. 검정의 범위 내에서, 흡광도는 존재하는 헥소스의 양에 정비례한다.
- [0455] 또한, MBTH 비색 방법을 사용하여 알데히드의 몰수를 동시에 결정하였다. MBTH 검정은 알데히드 기 (주어진 샘플로부터의 것)를 3-메틸-2-벤조티아졸론 히드라존 (MBTH 검정 시약)과 반응시킴으로써 아진 화합물을 형성하는 것을 수반한다. 과량의 3-메틸-2-벤조티아졸론 히드라존은 산화되어 반응성 양이온을 형성한다. 반응성 양이온 및 아진은 반응하여 청색 발색단을 형성한다. 이어서, 형성된 발색단을 650 nm에서 분광학적으로 판독한다.
- [0456] 활성화된 폴리사카라이드의 수크로스 부형제와의 배합, 및 동결건조
- [0457] 활성화된 폴리사카라이드를 수크로스와, 활성화된 폴리사카라이드 그램당 25 그램의 수크로스의 비로 배합하였다. 이어서, 배합된 혼합물의 병을 동결건조시켰다. 동결건조 후, 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 함유하는 병을 -20 ± 5°C에서 저장하였다. 계산된 양의 CRM₁₉₇ 단백질을 개별적으로 셀-동결시키고 동결건조시켰다. 동결건조된 CRM₁₉₇을 -20 ± 5°C에서 저장하였다.
- [0458] 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 재구성
- [0459] 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 무수 디메틸 술폭시드 (DMSO) 중에 재구성하였다. 폴리사카라이드가 완전히 용해되면, 동량의 무수 DMSO를 재구성을 위해 동결건조된 CRM₁₉₇에 첨가하였다.
- [0460] 접합 및 캡핑
- [0461] 재구성된 활성화된 폴리사카라이드를 반응 용기에서 재구성된 CRM₁₉₇과 혼합 다음, 완전히 혼합하여 투명한 용액을 수득한 후, 소듐 시아노보로하이드라이드로 접합을 개시하였다. 반응 용액 중 최종 폴리사카라이드 농도는 대략 1 g/L였다. 1.0 - 1.5 MEq의 소듐 시아노보로하이드라이드를 반응 혼합물에 첨가하고, 23 ± 2°C에서 20-48 시간 동안 인큐베이션함으로써 접합을 개시하였다. 2 MEq의 소듐 보로하이드라이드 (NaBH₄)를 첨가하여 미반응 알데히드를 캡핑함으로써 접합 반응을 종결시켰다. 이 캡핑 반응을 23 ± 2°C에서 3 ± 1시간 동안 계속하였다.

- [0462] 접합체의 정제
- [0463] 접합체 용액을 100-300K MWCO 막을 사용한 접선 흐름 여과에 의한 정제를 위한 준비에서 냉각된 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수 (pH 6.0)를 사용하여 1:10 희석하였다.
- [0464] 희석된 접합체 용액을 5 μ m 필터에 통과시키고, 매질로서 5 mM 숙시네이트 / 0.9% 염수 (pH 6.0)를 사용하여 투석여과를 수행하였다. 투석여과가 완료된 후, 접합체 잔류물을 0.22 μ m 필터를 통해 옮겼다. 접합체를 5 mM 숙시네이트 / 0.9% 염수 (pH 6)를 사용하여 대략 0.5 mg/mL의 표적 사카라이드 농도로 추가로 희석하였다. 대안적으로, 접합체를 100-300K MWCO 막을 사용한 접선 흐름 여과에 의해 20 mM 히스티딘-0.9% 염수 (pH 6.5)를 사용하여 정제하였다. 최종 0.22 μ m 여과 단계를 완료하여 면역원성 접합체를 획득하였다.
- [0465] 실시예 3. CDAP (1-시아노-4-디메틸아미노피리디늄 테트라플루오로보레이트)에 의한 GBS 피막 폴리사카라이드의 접합
- [0466] GBS 폴리사카라이드를 WFI에 대해 투석하여 완충제 염을 제거하고, 동결건조시켰다. 동결건조된 폴리사카라이드 (100 mg)를 WFI (4-5 mg/mL) 중에 용해시키고, CDAP (100 mg; 아세토니트릴:물, 9:1 중 100 mg/mL)로 약 30 초 동안 활성화시켰다. 활성화 후, 0.2 M 트리에틸아민 (4 mL)을 첨가하고, 약 2.5분 동안 교반하고, 이어서 과산화물 독소이드 (TT) (150 mg, 염수 중 3 mg/mL)를 첨가하였다. 반응물의 pH를 8.8로 조정하고, 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 접합 반응을 2 M 글리신으로 켄칭하고, 접합체를 5 μ m 필터에 통과시키고, 100K MWCO 막을 사용한 접선 흐름 여과에 의해 염수를 사용하여 정제하였다. 최종 0.22 μ m 여과 단계를 완료하여 면역원성 접합체를 획득하였다.
- [0467] 실시예 4: GBS 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체에 대한 다양한 접합 조건의 효과
- [0468] GBS 혈청형 VI, VII, VIII 및 IX 접합체는 시약에 대한 용매 (수성 매질 대 DMSO)를 포함한 피아이오테이트 산화/환원성 아미노화 화학 (PO/RAC) 조건을 의도적으로 변화시키고, 초기 폴리사카라이드 중 시알산의 수준을 변화시키고, 산화도/사카라이드 에피토프 변형을 변화시킴으로써 생성될 수 있다. 일반적으로, 용매로서 DMSO를 사용하여 생산된 접합체는 수성 매질을 사용하여 생산된 접합체보다 더 낮은 수준의 미반응 (유리) 폴리사카라이드, 더 높은 접합체 분자량, 및 더 높은 사카라이드/단백질 비를 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0469] 보다 낮은 수준의 미반응 (유리) 폴리사카라이드를 갖는 접합체를 생산하는 접합 공정이 유리하고 바람직하다. 높은 수준의 미반응 (유리) 폴리사카라이드는 폴리사카라이드-단백질 접합체에 의해 생성된 T-세포 의존성 반응을 희석하고 그로 인해 접합체에 의해 생성된 면역원성 반응을 낮추는 잠재력을 갖는 과도한 T-세포 비의존성 면역 반응을 유발할 수 있다는 것이 널리 공지되어 있다.
- [0470] GBS 폴리사카라이드는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 화학적으로 탈시알틸화되어 (문헌 [Chaffin, D.O., et al., J Bacteriol 187(13):4615-4626 (2005)] 참조) 면역원성에 대한 % 탈시알틸화의 영향을 결정하기 위한 접합체 변이체를 생성할 수 있다. 일반적으로, 약 40% 초과 탈시알틸화 (즉, 약 60% 미만의 시알산 수준)는 면역원성에 부정적인 영향을 미친다.
- [0471] 유사하게, 대부분의 경우에, 약 5 미만의 산화도, 또는 약 20% 초과 사카라이드 에피토프 변형은 면역원성에 부정적인 영향을 미친다. 산화는 피막 폴리사카라이드 상의 시알산을 통해 발생하기 때문에, 약 20% 초과 사카라이드 에피토프 변형은 시알산 함량을 감소시키며, 이는 감소된 면역원성을 유발하는 것으로 밝혀졌다.
- [0472] 반대로, 다양한 사카라이드/단백질 비 또는 폴리사카라이드 분자량을 갖는 접합체는 마우스에서 면역원성 반응을 생성하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 이들 속성과 관련하여 비교적 광범위한 허용 기준을 나타낸다.
- [0473] 추가의 접합체 변이체는 대안적 화학 경로를 사용하여 생성될 수 있다. 하나의 대안적 화학은 폴리사카라이드를 카르보닐디트리아졸 (CDT)과 반응시키고 DMSO 중에서 접합 반응을 수행함으로써 접합체를 생성하는 것을 포함한다. 또 다른 대안적 화학에서, 접합체는 상기 실시예에 상술된 바와 같이, (소듐 피아이오테이트 대신에) TEMPO [(2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-일)옥실] 시약을 사용한 폴리사카라이드의 산화에 이어서 DMSO 중 환원성 아미노화 화학 (TEMPO/RAC)을 사용한 접합에 의해 생성될 수 있다. 이들 대안적 화학에 의해 생성된 접합체는 마우스에서 면역원성인 것으로 밝혀졌으며, 이는 PO/RAC 이외의 대안적 화학 경로의 적합성을 나타낸다. 그러나, 일부 접합 화학은 다른 것보다 일부 혈청형에서 더 잘 수행될 수 있다.
- [0474] OPA는 문헌 [Buurman, E.T., et al., J. Infect. Dis., Jun 5;220(1):105-115 (2019)]에 따라 수행하였다.
- [0475] 실시예 5: 1가 접합체 백신은 토끼에서 기능적 및 결합 항체 반응을 생성하였다

[0476] 토끼 (군당 4-5마리)를 접합체 용량당 20 mcg의 QS21로 제제화된 상이한 담체 단백질 (CRM197, 과산화물 특소이드 (TT), SCP)에 접합된 GBS CPS 혈청형 VI, VII, VIII 또는 IX의 1가 접합체의 폴리사카라이드 중량을 기준으로 하여 20 mcg으로 0, 3, 및 6주에 백신접종하였다. 기준선 및 제10주에 CPS 코팅된 마이크로구체와의 직접 결합 루미넥스 면역검정 (dLIA)에 의해 항-CPS IgG 역가에 대해 혈청을 평가하였다.

[0477] 도 1은 GBS CPS 혈청형 VI-CRM197 접합체를 투여한 2마리의 토끼로부터의 연속 희석된 혈청의 평균 결합 활성 프로파일을 보여준다. 도 1에 제시된 GBS CPS VI에 대한 내삽된 EC50 혈청 희석 역가를 S자형 용량 반응 곡선 피트 (가변 기울기) (그래프패드 프리즘)를 사용하여 결정하였다. 표 1은 CRM197, SCP 및 TT에 접합된 GBS CPS 혈청형 VI에 대해 생성된 항체 역가를 보여준다. CRM197에 접합된 GBS CPS 혈청형 VI으로의 면역화는 혈청형 VI에 특이적인 측정가능한 항체 역가를 생성하였고; 직접 결합 루미넥스 면역검정에 의해 평가하였을 때 다른 혈청형에 대한 혈청형 VI 유도된 혈청에 대해 무시할만한 결합이 관찰되었다.

[0478] 표 1. 투여 2 후 (제10주) IgG 직접 결합 루미넥스 역가

접합체	토끼	GMT (EC ₅₀) ¹	반응자 ²
GBS-VI CRM	5	1517	5/5
GBS-VI SCP	5	711	4/5
GBS-VI TT	4	148	3/4

[0479]

[0480] ¹기하 평균 EC50 혈청 희석 역가 (비-반응자는 포함되지 않음)

[0481] ²≤50의 혈청 역가를 갖는 토끼를 비-반응자로서 계수함

[0482] 도 2a-2c 및 표 2에 제시된 바와 같이, TT에 접합된 GBS CPS 혈청형 VII, VIII 또는 IX의 접합체는 면역화 후에 동종 폴리사카라이드에 대한 강력한 IgG 항체 역가를 유사하게 유도하였다.

[0483] 표 2. 혈청형 VII, VIII 및 IX 접합체 면역원성

접합체	토끼	GMT (EC ₅₀) ¹	반응자 ²
GBS-VII TT	4	831	4/4
GBS-VIII TT	4	63	2/4
GBS-IX TT	4	941	4/4

[0484]

[0485] ¹기하 평균 EC50 혈청 희석 역가 (비-반응자는 포함되지 않음)

[0486] ²≤50의 혈청 역가를 갖는 토끼를 비-반응자로서 계수함

[0487] 도 3a 및 3b는 각각 GBS CPS VII-TT 접합체 및 GBS CPS IX-TT 접합체를 투여한 2마리의 토끼로부터의 연속 희석된 혈청의 평균 결합 활성 프로파일을 보여준다. 교차-반응성은 GBS CPS 혈청형 V 및 IX 항원에 대한 GBS CPS VII-TT 접합체 유도된 항체, 및 GBS CPS VI 및 VII 항원에 대한 GBS CPS IX-TT 접합체 유도된 항체에 대해 관찰되었다. 도 3a (GBS CPS V, VII 및 IX) 및 3b (GBS CPS VI, VII 및 IX)에 나타난 내삽된 EC50 혈청 희석 역가를 S자형 용량 반응 곡선 피트 (가변 기울기) (그래프패드 프리즘)를 사용하여 결정하였다.

[0488] 담체 단백질로서 CRM197 또는 C5a 펩티다제 (SCP)를 갖는 GBS CPS 혈청형 VI 접합체를 옥소닌식세포 흡수 (OPA)에 의해 사멸될 수 있는 기능적 살박테리아 항체의 유도에 대해 추가로 평가하였다. 토끼를 0, 3 및 6주에 CRM197에 접합된 GBS CPS VI으로, 또는 0, 3, 6, 13주에 SCP에 접합된 CPS VI으로 면역화시켰다. 각각 제13주 및 제16주에 취한 GBS VI-CRM197 또는 GBS VI-SCP로 면역화된 토끼로부터의 혈청을 HL-60 식세포를 사용하여 OPA 역가에 대해 평가하였다 (표 3).

[0489] 표 3. 이중 혈청형에 대한 GBS VI-CRM197 및 GBS VI-SCP의 교차-보호 OPA 사멸

	GBS VI-CRM197 항혈청			GBS VI-SCP 항혈청		
혈청형	제0주	제13주	제13주+SCP	제0주	제16주	제16주+SCP
III	NA	131	249	5	522	5
VIII	26	38	25	8	213	5
IX	NA	33	123	12	494	5
VI	5	10075	8510	5	1771	1533

[0490]

[0491]

GBS VI-CRM197 또는 VI:SCP로 면역화된 토끼로부터의 혈청은 혈청형 VI 피막을 발현하는 표적 균주를 사용한 OPA에 의한 사멸 활성을 입증하였다. OPA 분석 전에 가용성 SCP 단백질을 사용한 GBS VI-SCP-유도된 혈청의 예 비흡착은 관찰된 역가를 미미하게 감소시켰으며, 이는 특이성을 입증한다. 이중 혈청형 III, VIII 또는 IX를 발현하는 표적 균주에 대해 GBS VI-CRM197-유도된 혈청에 의한 무시할만한 교차-반응성 사멸이 관찰되었다. 비교하면, 혈청형 GBS VI-SCP 면역화된 토끼로부터의 혈청은 이중 혈청형 III, VIII 또는 IX를 발현하는 균주에 대해 측정가능한 역가를 입증하였다. 가용성 SCP에 의한 SCP-특이적 항체의 흡착은 관찰된 역가를 효과적으로 저하시켰으며, 이는 항-SCP 항체가 다양한 피막 유형과 관련하여 분리주에 걸쳐 기능적 활성을 달성하는 능력을 뒷받침한다.

[0492]

이들 결과는 항-CPS 항체에 의한 기능적 활성이 주로 상동성 혈청형에 국한되고, 항-SCP 담체 항체가 상이한 CPS 유형을 발현하는 다양한 분리주 사이에서 중간 정도이지만 넓은 수준의 CPS-비의존성 교차-기능적 활성을 부여할 수 있음을 나타낸다.

[0493]

실시예 6: 다가 접합체 백신은 토끼에서 결합 항체 반응을 생성하였다

[0494]

단일 토끼에 제0주, 제3주, 제6주 및 제9주에 투여되는 각각의 항원 20 mcg 및 QS21 아주반트 20 mcg의 용량을 사용하여 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V 및 VI의 CRM197 접합체로 백신접종하였다. 혈청에서의 IgG 역가를 제11주에 실시예 5에 기재된 루미렉스 검정을 사용하여 평가하였다. 혈청의 3배 연속 희석물을 1:15에서 시작하여 시험하였다.

[0495]

도 4는 제제로부터 투여된 7종의 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V 및 VI-CRM197 접합체 (백색 기호) 및 제제에 부재하는 3종의 혈청형 (VII, VIII, IX) (흑색 기호)에 대한 혈청 반응을 보여준다. 결과는 신생 혈청형 VI를 포함하는 7가 GBS 당접합체 백신이 모든 7종의 피막 폴리사카라이드 성분에 대한 항원-특이적 IgG 항체를 유도할 수 있음을 입증한다. 혈청형 VII 및 IX 폴리사카라이드에 대한 반응은 반복 단위의 분지형 시알릴화 측쇄 내의 공통 에피토프를 공유하는 혈청형 V 항원에 대한 항체의 교차-반응성에 기인할 수 있다 (Berti, F., et al. (2014) JBC 289:34 23437-23448).

[0496]

본 발명의 측면

[0497]

하기 항목은 본 발명의 추가의 실시양태를 기재한다.

[0498]

C1. B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하며, 여기서 피막 폴리사카라이드는 약 60% 초과와 시알산 수준을 갖는 것인 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체.

[0499]

C2. C1에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 접합체.

[0500]

C3. C2에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 혈청형 VI인 면역원성 접합체.

[0501]

C4. C2에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 혈청형 VII인 면역원성 접합체.

[0502]

C5. C2에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 혈청형 VIII인 면역원성 접합체.

[0503]

C6. C2에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 혈청형 IX인 면역원성 접합체.

[0504]

C7. C1 내지 C6 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 95% 초과와 시알산 수준을 갖는 것인 면역원성 접합체.

[0505]

C8. C1 내지 C7 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 100%의 시알산 수준을 갖는 것인 면역원성

접합체.

- [0506] C9. C1 내지 C8 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.6 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0507] C10. C1 내지 C9 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.65 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0508] C11. C1 내지 C10 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.7 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0509] C12. C1 내지 C11 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.75 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0510] C13. C1 내지 C12 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.8 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0511] C14. C1 내지 C13 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.85 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0512] C15. C1 내지 C14 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.9 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0513] C16. C1 내지 C15 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 폴리사카라이드의 mM당 적어도 약 0.95 mM 시알산을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0514] C17. C1 내지 C16 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 5 kDa 내지 약 1,000 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0515] C18. C1 내지 C17 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 25 kDa 내지 약 750 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0516] C19. C1 내지 C18 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 25 kDa 내지 약 400 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0517] C20. C1 내지 C19 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 25 kDa 내지 약 200 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0518] C21. C1 내지 C20 중 어느 하나에 있어서, 피막 폴리사카라이드가 약 100 kDa 내지 약 400 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 접합체.
- [0519] C22. C1 내지 C21 중 어느 하나에 있어서, 접합체의 분자량이 약 300 kDa 내지 약 20,000 kDa인 면역원성 접합체.
- [0520] C23. C1 내지 C22 중 어느 하나에 있어서, 접합체의 분자량이 약 1,000 kDa 내지 약 15,000 kDa인 면역원성 접합체.
- [0521] C24. C1 내지 C23 중 어느 하나에 있어서, 접합체의 분자량이 약 1,000 kDa 내지 약 10,000 kDa인 면역원성 접합체.
- [0522] C25. C1 내지 C24 중 어느 하나에 있어서, 폴리사카라이드가 각각 개별적으로 담체 단백질에 접합된 것인 면역원성 접합체.
- [0523] C26. C1 내지 C25 중 어느 하나에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇ 또는 파상풍 독소이드인 면역원성 접합체.
- [0524] C27. C1 내지 C26 중 어느 하나에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇인 면역원성 접합체.
- [0525] C28. 피막 폴리사카라이드 생성 박테리아를 포함하는 세포 브로츠와 유기 시약을 반응시키는 것을 포함하는, 피막 폴리사카라이드를 단리하는 방법.
- [0526] C29. C28에 있어서, 박테리아가 용해되지 않는 것인 방법.
- [0527] C30. C28 또는 C29에 있어서, 박테리아가 열 사멸되는 것인 방법.

- [0528] C31. C28 내지 C30 중 어느 하나에 있어서, 원심분리하여 세포 페이스트를 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0529] C32. C28 내지 C31 중 어느 하나에 있어서, 여과 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0530] C33. C32에 있어서, 상기 여과 단계가 투석여과인 방법.
- [0531] C34. C28에 있어서, 박테리아가 스트렙토코쿠스 아갈락티아에인 방법.
- [0532] C35. C1 내지 C27 중 어느 하나의 면역원성 폴리사카라이드-단백질 집합체를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0533] C36. 폴리사카라이드-단백질 집합체를 포함하며, 여기서 집합체는 담체 단백질에 결합된 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VI로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 것인 면역원성 조성물.
- [0534] C37. 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 집합체를 포함하며, 여기서 집합체는 B군 스트렙토코쿠스 (GBS) 혈청형 VI, 및 Ia, Ib, II, III, IV, V, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 것인 면역원성 조성물.
- [0535] C38. C37에 있어서, 적어도 1종의 추가의 혈청형이 Ia인 면역원성 조성물.
- [0536] C39. C38에 있어서, GBS 혈청형 Ib로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0537] C40. C38 또는 C39에 있어서, GBS 혈청형 II로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0538] C41. C38 내지 C40 중 어느 하나에 있어서, GBS 혈청형 III로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0539] C42. C38 내지 C41 중 어느 하나에 있어서, GBS 혈청형 IV로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0540] C43. C38 내지 C42 중 어느 하나에 있어서, GBS 혈청형 V로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0541] C44. C38 내지 C43 중 어느 하나에 있어서, GBS 혈청형 VII로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0542] C45. C38 내지 C44 중 어느 하나에 있어서, GBS 혈청형 VIII로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0543] C46. C38 내지 C45 중 어느 하나에 있어서, GBS 혈청형 IX로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0544] C47. C36에 있어서, GBS 혈청형 VII로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0545] C48. C36 또는 C47에 있어서, GBS 혈청형 VIII로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0546] C49. C46 내지 C48 중 어느 하나에 있어서, GBS 혈청형 IX로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0547] C50. C37에 있어서, 적어도 1종의 추가의 혈청형이 VII인 면역원성 조성물.
- [0548] C51. C50에 있어서, GBS 혈청형 VIII로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0549] C52. C50 또는 C51에 있어서, GBS 혈청형 IX로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0550] C53. C38에 있어서, 적어도 1종의 추가의 혈청형이 VIII인 면역원성 조성물.
- [0551] C54. C53에 있어서, GBS 혈청형 IX로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 집합체를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

성 조성물.

- [0552] C55. C54에 있어서, 적어도 1종의 추가의 혈청형이 IX인 면역원성 조성물.
- [0553] C56. Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 4종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0554] C57. C56에 있어서, 적어도 2종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0555] C58. C56에 있어서, 적어도 3종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0556] C59. C56에 있어서, 적어도 4종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0557] C60. C56에 있어서, 적어도 5종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0558] C61. C56에 있어서, 적어도 6종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0559] C62. C56에 있어서, 적어도 7종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0560] C63. C56에 있어서, 적어도 8종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0561] C64. C56에 있어서, 적어도 9종의 GBS 피막 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0562] C65. C35 내지 C64 중 어느 하나에 있어서, 제약상 허용되는 부형제, 완충제, 안정화제, 아주반트, 동결보호제, 염, 2가 양이온, 비-이온성 세제, 자유 라디칼 산화의 억제제, 담체 또는 그의 혼합물을 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0563] C66. C35 내지 C65 중 어느 하나에 있어서, 완충제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0564] C67. C66에 있어서, 완충제가 HEPES, PIPES, MES, 트리스 (트리메타민), 포스페이트, 아세테이트, 보레이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘 및 숙시네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.
- [0565] C68. C67에 있어서, 완충제가 히스티딘인 면역원성 조성물.
- [0566] C69. C35 내지 C95 중 어느 하나에 있어서, 계면활성제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0567] C70. C96에 있어서, 계면활성제가 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리소르베이트-80, 폴리소르베이트-60, 폴리소르베이트-40, 폴리소르베이트-20 및 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.
- [0568] C71. C70에 있어서, 계면활성제가 폴리소르베이트-80인 면역원성 조성물.
- [0569] C72. C35 내지 C71 중 어느 하나에 있어서, 부형제를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0570] C73. C72에 있어서, 부형제가 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨, 팔라티니트, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 글리신, 아르기닌, 리신, 염화나트륨 (NaCl), 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물, 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.
- [0571] C74. C73에 있어서, 부형제가 염화나트륨인 면역원성 조성물.
- [0572] C75. C35 내지 C74 중 어느 하나에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.
- [0573] C76. C75에 있어서, 아주반트가 알루미늄-기반 아주반트 또는 QS-21인 면역원성 조성물.
- [0574] C77. C76에 있어서, 알루미늄-기반 아주반트가 인산알루미늄, 알루미늄 히드록실 포스페이트 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.
- [0575] C78. C77에 있어서, 아주반트가 인산알루미늄인 면역원성 조성물.
- [0576] C79. C78에 있어서, 아주반트가 알루미늄 히드록실 포스페이트인 면역원성 조성물.
- [0577] C80. C35 내지 C79 중 어느 하나에 있어서, 완충제, 계면활성제, 부형제, 및 임의적으로 아주반트를 포함하며, 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충되는 면역원성 조성물.
- [0578] C81. C35 내지 C80 중 어느 하나에 있어서, 히스티딘, 폴리소르베이트-80, 염화나트륨, 및 임의적으로 인산알

루미늄을 포함하며, 약 6.0 내지 약 7.0의 pH로 완충되는 면역원성 조성물.

- [0579] C82. C35 내지 C81 중 어느 하나에 있어서, 히스티딘 약 10 mM 내지 약 25 mM, 폴리소르베이트-80 약 0.01% 내지 약 0.03% (v/w), 염화나트륨 약 10 mM 내지 약 250 mM, 및 임의적으로 인산알루미늄으로서의 알루미늄 약 0.25 mg/ml 내지 약 0.75 mg/ml를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0580] C83. C35 내지 C82 중 어느 하나에 있어서, 약 5 mcg/ml 내지 약 50 mcg/ml의 용량을 포함하는 면역원성 조성물.
- [0581] C84. C35 내지 C83 중 어느 하나에 있어서, 임의적으로 적어도 1종의 부형제의 존재 하에 동결건조되는 면역원성 조성물.
- [0582] C85. C84에 있어서, 적어도 1종의 부형제가 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨, 팔라티니트, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 글리신, 아르기닌, 리신, 염화나트륨 (NaCl), 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 물 및 에탄올로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물.
- [0583] C86. C85에 있어서, 적어도 1종의 부형제가 수크로스인 면역원성 조성물.
- [0584] C87. C84 내지 C86 중 어느 하나에 있어서, 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v)의 적어도 1종의 부형제를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0585] C88. C84 내지 C87 중 어느 하나에 있어서, 추가의 부형제를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0586] C89. C88에 있어서, 추가의 부형제가 만니톨 또는 글리신인 면역원성 조성물.
- [0587] C90. C88 또는 C89에 있어서, 약 1% (w/v) 내지 약 10% (w/v)의 추가의 부형제를 포함하는 면역원성 조성물.
- [0588] C91. C84 내지 C90 중 어느 하나에 있어서, 물, 주사용수 (WFI), 아주반트 현탁액 또는 염수로 재구성되는 면역원성 조성물.
- [0589] C92. C44 내지 C91 중 어느 하나에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 면역원성 조성물.
- [0590] C93. C35 내지 C92 중 어느 하나에 있어서, 대상체에서 GBS에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 사용하기 위한 면역원성 조성물.
- [0591] C94. C93에 있어서, 대상체가 임신 계획 중인 여성 또는 임신한 여성인 면역원성 조성물.
- [0592] C95. C94에 있어서, 여성이 임신 후반기인 면역원성 조성물.
- [0593] C96. C95에 있어서, 임신한 여성이 적어도 임신 20주인 면역원성 조성물.
- [0594] C97. C96에 있어서, 임신한 여성이 임신 27주 내지 36주인 면역원성 조성물.
- [0595] C98. C97에 있어서, 대상체가 50세 이상의 성인인 면역원성 조성물.
- [0596] C99. C98에 있어서, 대상체가 65세 이상의 성인인 면역원성 조성물.
- [0597] C100. C99에 있어서, 대상체가 85세 이상의 성인인 면역원성 조성물.
- [0598] C101. C90 내지 C100 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 면역손상된 것인 면역원성 조성물.
- [0599] C102. C101에 있어서, 대상체가 비만, 당뇨병, HIV 감염, 암, 심혈관 질환 또는 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 의학적 상태를 갖는 것인 면역원성 조성물.
- [0600] C103. C93 내지 102 중 어느 하나에 있어서, B군 스트렙토코쿠스가 스트렙토코쿠스 아갈락티아에인 면역원성 조성물.
- [0601] C104. 대상체에게 유효량의 C35 내지 C103 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, B군 스트렙토코쿠스에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.
- [0602] C105. 대상체에게 유효량의 C35 내지 C104 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 B군 스트렙토코쿠스와 연관된 질환 또는 상태를 예방하거나 또는 감소시키는 방법.
- [0603] C106. C104 또는 C105에 있어서, 대상체가 임신 계획 중인 여성 또는 임신한 여성인 방법.

- [0604] C107. C106에 있어서, 여성이 임신 후반기인 방법.
- [0605] C108. C106 또는 C107에 있어서, 임신한 여성이 적어도 임신 20주인 방법.
- [0606] C109. C106 내지 C108 중 어느 하나에 있어서, 임신한 여성이 임신 27주 내지 36주인 방법.
- [0607] C110. C104 또는 C105에 있어서, 대상체가 50세 이상의 성인인 방법.
- [0608] C111. C110에 있어서, 대상체가 65세 이상의 성인인 방법.
- [0609] C112. C110 또는 C111에 있어서, 대상체가 85세 이상의 성인인 방법.
- [0610] C113. C104 내지 C112 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 면역손상된 것인 방법.
- [0611] C114. C113에 있어서, 대상체가 비만, 당뇨병, HIV 감염, 암, 심혈관 질환 또는 간 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 의학적 상태를 갖는 것인 방법.
- [0612] C115. 상기 단락 중 어느 하나에 있어서, B군 스트렙토코쿠스가 스트렙토코쿠스 아갈락티아에인 방법.
- [0613] C116. C1 내지 C27 중 어느 하나의 면역원성 접합체 중의 피막 폴리사카라이드에 결합하는 항체.
- [0614] C117. C116의 항체를 포함하는 조성물.
- [0615] C118. 하기 단계를 포함하는, 대상체에게 수동 면역을 부여하는 방법:
 - [0616] (a) 상기 단락 중 어느 하나의 면역원성 조성물을 사용하여 항체 제제를 생성하는 단계; 및
 - [0617] (b) 항체 제제를 대상체에게 투여하여 수동 면역을 부여하는 단계.
- [0618] C119. 하기 단계를 포함하는, C1 내지 C27 중 어느 하나의 면역원성 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법:
 - [0619] (a) GBS 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시켜 활성화된 폴리사카라이드를 생성하는 단계; 및
 - [0620] (b) 활성화된 폴리사카라이드를 담체 단백질과 반응시켜 폴리사카라이드-단백질 접합체를 생성하는 단계.
- [0621] C120. C119에 있어서, 단계 (b)가 극성 비양성자성 용매 중에서 수행되는 것인 방법.
- [0622] C121. C120에 있어서, 용매가 디메틸설폭시드 (DMSO), 술폴란, 디메틸포름아미드 (DMF) 및 헥사메틸포스포르아미드 (HMPA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0623] C122. C121에 있어서, 용매가 디메틸설폭시드 (DMSO)인 방법.
- [0624] C123. C119 내지 C122 중 어느 하나에 있어서, 폴리사카라이드가 0.01 내지 10.0 몰 당량의 산화제와 반응하는 것인 방법.
- [0625] C124. C119 내지 C123 중 어느 하나에 있어서, 산화제가 퍼아이오데이트인 방법.
- [0626] C125. C124에 있어서, 퍼아이오데이트가 소듐 퍼아이오데이트인 방법.
- [0627] C126. C119 내지 C125 중 어느 하나에 있어서, 단계 (a)의 산화 반응이 1시간 내지 50시간인 방법.
- [0628] C127. C119 내지 C126 중 어느 하나에 있어서, 산화 반응의 온도가 약 2℃ 내지 약 25℃로 유지되는 것인 방법.
- [0629] C128. C119 내지 C127 중 어느 하나에 있어서, 산화 반응이 인산나트륨, 인산칼륨, 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES) 및 비스-트리스로 이루어진 군으로부터 선택되는 완충제 중에서 수행되는 것인 방법.
- [0630] C129. C128에 있어서, 완충제가 약 1 mM 내지 약 500 mM의 농도를 갖는 것인 방법.
- [0631] C130. C119 내지 C129 중 어느 하나에 있어서, 산화 반응이 약 4.0 내지 약 8.0의 pH에서 수행되는 것인 방법.
- [0632] C131. C119에 있어서, 산화제가 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리디닐옥시 (TEMPO)인 방법.
- [0633] C132. C131에 있어서, N-클로로숙신이미드 (NCS)가 공산화제인 방법.
- [0634] C133. C119 내지 C132 중 어느 하나에 있어서, 단계 (a)가 켄칭제의 첨가에 의해 산화 반응을 켄칭하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

- [0635] C134. C119 내지 C133 중 어느 하나에 있어서, 폴리사카라이드의 농도가 약 0.1 mg/mL 내지 약 10.0 mg/mL인 방법.
- [0636] C135. C119 내지 C161 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 폴리사카라이드의 산화도가 5 내지 25인 방법.
- [0637] C136. C119 내지 C135 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 폴리사카라이드를 동결건조시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0638] C137. C136에 있어서, 활성화된 폴리사카라이드가 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로 이루어진 군으로부터 선택되는 사카라이드의 존재 하에 동결건조되는 것인 방법.
- [0639] C138. C119 내지 C137 중 어느 하나에 있어서, 단계 (b)가 하기를 포함하는 것인 방법:
- [0640] (1) 활성화된 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계, 및
- [0641] (2) 배합된 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 GBS 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성하는 단계.
- [0642] C139. C138에 있어서, 단계 (2)의 활성화된 폴리사카라이드의 농도가 약 0.1 mg/mL 내지 약 10.0 mg/mL인 방법.
- [0643] C140. C137 또는 C138에 있어서, 활성화된 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 비 (중량 대 중량)가 5:1 내지 0.1:1인 방법.
- [0644] C141. C138 내지 C139 중 어느 하나에 있어서, 환원제가 소듐 시아노보로히드라이드, 소듐 트리아세톡시보로히드라이드, 브린스테드 또는 루이스 산의 존재 하의 소듐 또는 아연 보로히드라이드, 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-디보란-메탄올, 디메틸아민-보란, $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$, 벤질아민- BH_3 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란 (PEMB)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0645] C142. C141에 있어서, 환원제가 소듐 시아노보로히드라이드인 방법.
- [0646] C143. C138 내지 C142 중 어느 하나에 있어서, 환원제의 양이 약 0.1 내지 약 10.0 몰 당량인 방법.
- [0647] C144. C138 내지 C143 중 어느 하나에 있어서, 단계 (2)의 환원 반응의 지속시간이 1시간 내지 60시간인 방법.
- [0648] C145. C138 내지 C144 중 어느 하나에 있어서, 환원 반응의 온도가 10°C 내지 40°C로 유지되는 것인 방법.
- [0649] C146. C119 내지 C145 중 어느 하나에 있어서, 보로히드라이드의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 단계 (단계 (c))를 추가로 포함하는 방법.
- [0650] C147. C146에 있어서, 보로히드라이드의 양이 약 0.1 내지 약 10.0 몰 당량인 방법.
- [0651] C148. C146에 있어서, 보로히드라이드가 소듐 보로히드라이드 (NaBH_4), 소듐 시아노보로히드라이드, 리튬 보로히드라이드, 포타슘 보로히드라이드, 테트라부틸암모늄 보로히드라이드, 칼슘 보로히드라이드 및 마그네슘 보로히드라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0652] C149. C146에 있어서, 보로히드라이드가 소듐 보로히드라이드 (NaBH_4)인 방법.
- [0653] C150. C146에 있어서, 캡핑 단계의 지속시간이 0.1시간 내지 10시간인 방법.
- [0654] C151. C146 내지 C149 중 어느 하나에 있어서, 캡핑 단계의 온도가 약 15°C 내지 약 45°C로 유지되는 것인 방법.
- [0655] C152. C119 내지 C151 중 어느 하나에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체를 정제하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0656] C153. C119 내지 C152 중 어느 하나에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체가 폴리사카라이드의 총량에 비해 약 40% 미만의 유리 폴리사카라이드를 포함하는 것인 방법.
- [0657] C154. C119 내지 C153 중 어느 하나에 있어서, 접합체 중의 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 비 (중량 대 중량)가 약 0.5 내지 약 3.0인 방법.

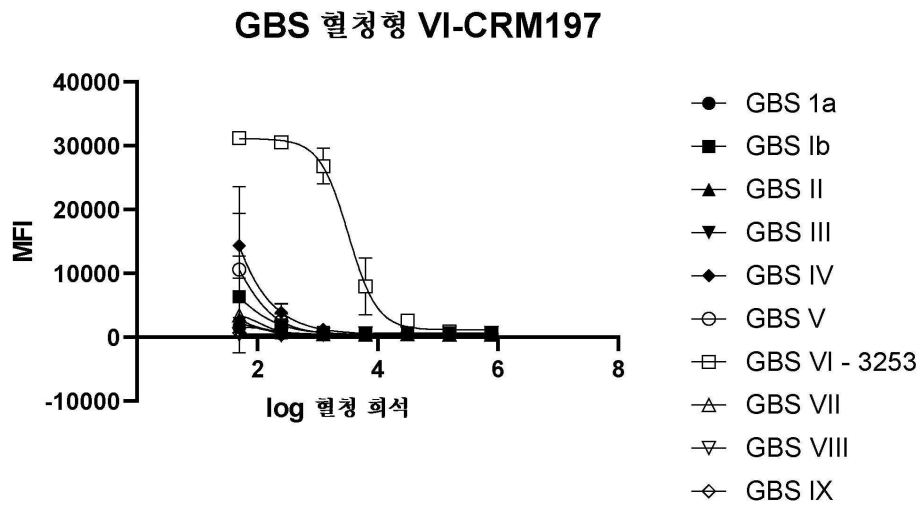
- [0658] C155. C119 내지 C154 중 어느 하나에 있어서, 접합체의 접합도가 2 내지 15인 방법.
- [0659] C156. 하기 단계를 포함하는, 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법:
- [0660] (a) 단리된 GBS 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계;
- [0661] (b) 켄칭제의 첨가에 의해 단계 (a)의 산화 반응을 켄칭하여 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 생성하는 단계;
- [0662] (c) 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계;
- [0663] (d) 배합된 활성화된 GBS 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 GBS 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성하는 단계; 및
- [0664] (e) 소듐 보로하이드라이드 (NaBH_4)의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 단계,
- [0665] 여기서 단계 (c) 및 (d)는 DMSO 중에서 수행됨.
- [0666] 참고문헌

1. Paoletti, L.J., J. Bradford, and L.C. Paoletti, *A Serotype VIII Strain among Colonizing Group B Streptococcal Isolates in Boston, Massachusetts*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. **37**(11): p. 3759-3760.
2. Lachenauer, C.S., et al., *Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women*. J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 1030-3.
3. Matsubara, K., et al., *Group B streptococcal disease in infants in the first year of life: a nationwide surveillance study in Japan, 2011-2015*. Infection, 2017. **25**: p. 25.
4. Chang, B., et al., *Characteristics of group B Streptococcus isolated from infants with invasive infections: a population-based study in Japan*. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2014. **67**(5): p. 356-60.
5. Lu, B., et al., *Molecular characteristics and antimicrobial resistance in invasive and noninvasive Group B Streptococcus between 2008 and 2015 in China*. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 2016. **86**(4): p. 351-357.
6. Campisi, E., et al., *Genomic Analysis Reveals Multi-Drug Resistance Clusters in Group B Streptococcus CC17 Hypervirulent Isolates Causing Neonatal Invasive Disease in Southern Mainland China*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**: p. 1265.
7. Liu, H., et al., *Estimating the burden of invasive Group B Streptococcal disease in young infants in southern mainland China: An observational study*. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015. **8**(8): p. 13699-13707.
8. Morozumi, M., et al., *Molecular characteristics of Group B streptococci isolated from adults with invasive infections in Japan*. Journal of Clinical Microbiology, 2016. **24**: p. 24.
9. Tsai, M.-H., et al., *Molecular Characteristics and Antimicrobial Resistance of Group B Streptococcus Strains Causing Invasive Disease in Neonates and Adults*. Frontiers in microbiology, 2019. **10**: p. 264-264.

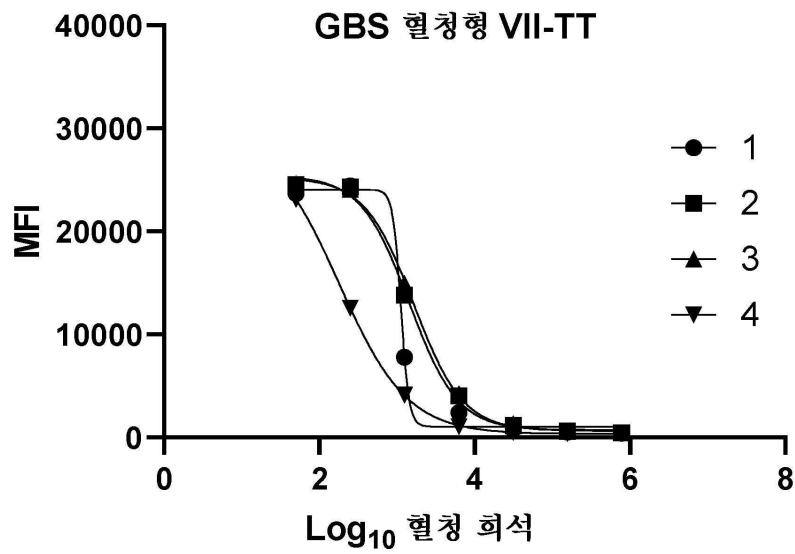
[0667]

도면

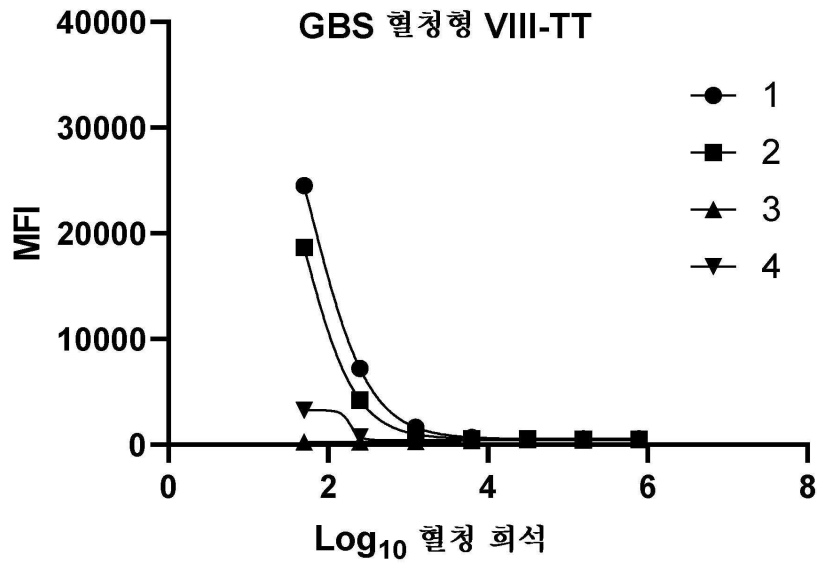
도면1



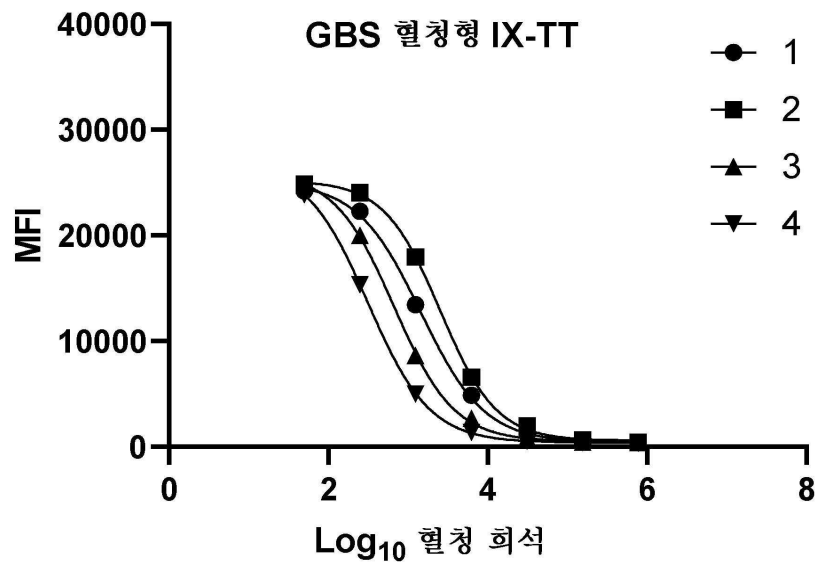
도면2a



도면2b

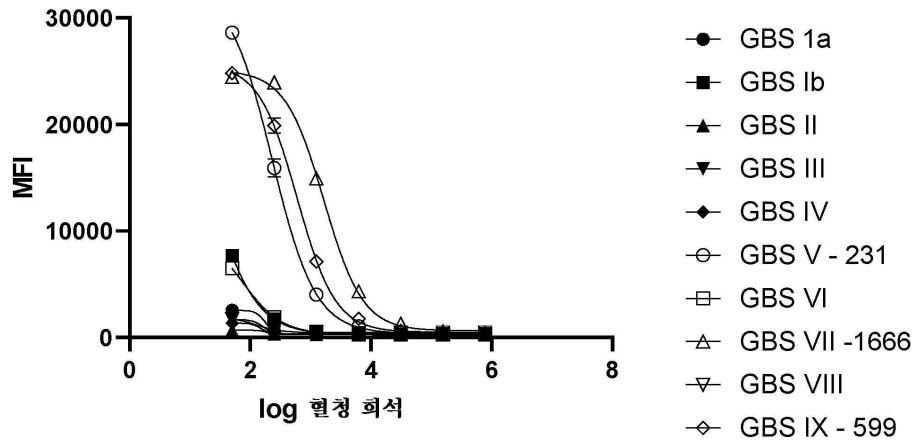


도면2c



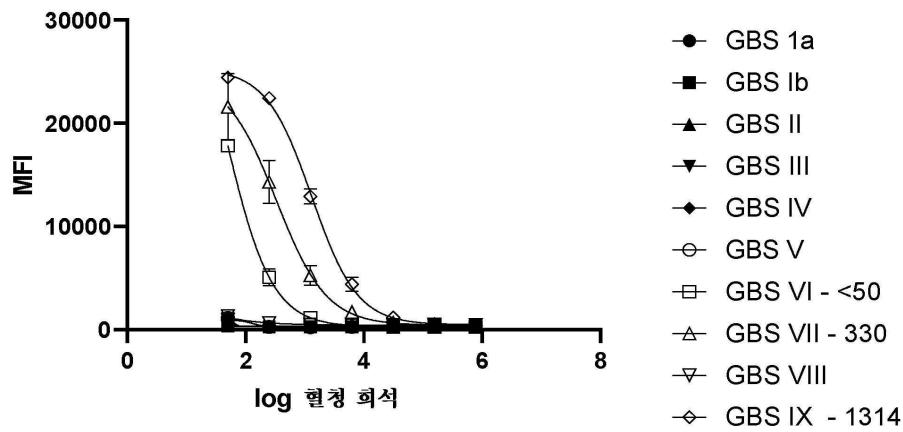
도면3a

GBS 혈청형 VII-TT



도면3b

GBS 혈청형 IX-TT



도면4

