

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2021-0042904
(43) 공개일자 2021년04월20일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/09</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61K 39/02</i> (2006.01) <i>A61K 39/095</i> (2006.01)
 <i>A61K 39/102</i> (2006.01) <i>A61K 39/39</i> (2006.01)
 <i>A61K 47/65</i> (2017.01) <i>A61P 31/04</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 39/092</i> (2013.01)
 <i>A61K 39/0216</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7003324</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2019년07월01일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년02월02일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2019/040131</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/009993
 국제공개일자 2020년01월09일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/693,981 2018년07월04일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 박사이트, 인코포레이티드
 미국 캘리포니아주 94404 포스터 시티 해치 드라이브 353</p> <p>(72) 발명자
 페어맨 제프리
 미국 캘리포니아주 94040 마운틴 뷰 파체터 웨이 114
 하인리히스 존
 미국 펜실베이니아주 18902 도일레스타운 아버 레인 4247
 찬 웨이
 미국 캘리포니아주 94102 샌 프란시스코 #403 프랭클린 스트리트 11</p> <p>(74) 대리인
 장훈</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **면역원성 접합체의 개선****(57) 요약**

본 출원은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원이 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합된 면역원성 접합체에 관한 다양한 개선을 개시한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/095 (2013.01)

A61K 39/102 (2013.01)

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 47/65 (2017.08)

A61P 31/04 (2018.01)

A61K 2039/55505 (2013.01)

A61K 2039/6037 (2013.01)

A61K 2039/627 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

약제학적 조성물을 함유하는 멸균 용기로서, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드(carrier polypeptide) 및 당류 항원(saccharide antigen)을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 멸균 용기.

청구항 2

약제학적 조성물을 함유하는 밀봉 용기로서, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 밀봉 용기.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 바이알과 같은 멸균 유리 용기인, 용기.

청구항 4

약제학적 조성물을 함유하는 전달 장치로서, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 전달 장치.

청구항 5

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 주사기인, 용기 또는 전달 장치.

청구항 6

2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 알루미늄염 보강제를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 알루미늄염 보강제는 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄 보강제인, 약제학적 조성물.

청구항 7

2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 인산알루미늄 보강제를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 조성물 중 알루미늄 이온의 농도는 2.5 mg/ml 이하인, 약제학적 조성물.

청구항 8

2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 약제학적 조성물의 부피가 0.25 내지 1.25ml인, 약제학적 조성물.

청구항 9

2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 보존제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 약제학적 조성물.

청구항 10

2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 보존제 무함유 약제학적 조성물로서, 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 오스몰농도가 200 내지 400 mOsm/kg인, 약제학적 조성물.

청구항 12

2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 적어도 1종의 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산을 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 적어도 1종의 부형제는 염화나트륨, 숙신산 및 폴리소르베이트 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물로서,

(i) 상기 n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고;

(ii) n은 3 내지 50의 정수이고;

(iii) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 운반체 폴리펩타이드의 총량이 용량당 $3n \mu\text{g}$ 이하이고;

(iv) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 운반체 폴리펩타이드의 총 농도가 $6n \mu\text{g/ml}$ 이하이며;

(v) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 당류 항원의 총량이 용량당 $3n \mu\text{g}$ 이하이고;

(vi) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 당류 항원의 총 농도가 $6n \mu\text{g/ml}$ 이하이고;

(vii) 접합체당 운반체 폴리펩타이드의 평균 양이 용량당 1 내지 $4\mu\text{g}$ 이고;

(viii) 접합체당 운반체 폴리펩타이드의 평균 농도가 2 내지 $8 \mu\text{g/ml}$ 이며;

(ix) 접합체당 당류 항원의 평균 양이 용량당 1 내지 $4\mu\text{g}$ 이고;

(x) 접합체당 당류 항원의 평균 농도가 2 내지 $8 \mu\text{g/ml}$ 이고;

(xi) 상기 조성물에는 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)가 없고;

(xii) 상기 조성물은 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)를 함유하며, 상기 조성물 중의 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)의 질량은 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 운반체 폴리펩타이드의 질량의 10% 미만이고;

(xiii) 상기 조성물에는 비접합 형태의 당류 항원이 없으며; 그리고/또는

(xiv) 상기 조성물은 비접합 형태의 적어도 하나의 당류 항원을 함유하되, 상기 조성물 중의 비접합 형태의 당류 항원의 총 질량은 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 당류 항원의 총 질량의 10% 미만인, 약제학적 조성물.

청구항 14

약제학적 조성물의 복수의 단위 용량을 제조하는 방법으로서, (i) 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 운반체 폴리펩타이드에 공유 결합되는 면역원성 접합체를 포함하고, (ii) 상기 방법은 상기 면역원성 접합체를 포함하는 벌크 조성물을 제조하는 단계 및 상기 벌크 조성물로부터의 개별 단위 용량을

복수의 개별 용기 내로 포장하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

약제학적 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 약제학적 조성물은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 알루미늄염 보강제를 포함하되, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, (ii) 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; 상기 방법은 (A) 상기 각 면역원성 접합체를 알루미늄염 보강제에 별개로 흡착시킨 다음, 개별적으로 흡착된 접합체를 함께 혼합하는 단계 또는 (B) 상기 각 면역원성 접합체를 상기 알루미늄염 보강제에 순차적으로 흡착시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

(i) 서열번호 1과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고; (ii) Arg-Arg 다이펩타이드 서열이 없으며; (iii) 적어도 하나의 mnAA 잔기를 포함하는, 아미노산 서열을 포함하는 운반체 폴리펩타이드.

청구항 17

(i) 서열번호 1과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고 (ii) 하기 아미노산 잔기(서열번호 1에 따라 넘버링됨) 중 하나 이상에서 mnAA 치환을 포함하는, 아미노산 서열을 포함하는 운반체 폴리펩타이드: Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp 507; Asp 519; Asn 296; Asn 359; Asn 399; Asn 481; Asn 486; Asn 502; Asn 524; Glu 240; Glu 248; Glu 249; Glu 256; Glu 259; Glu 292; Glu 362; Gln 252; Gln 287; Lys 212; Lys 218; Lys 221; Lys 229; Lys 236; Lys 264; Lys 299; Lys 385; Lys 456; Lys 474; Lys 498; Lys 516; Lys 522; Lys 534; Arg 377; Arg 407; Arg 455; Arg 460; Arg 462; Arg 472; Arg 493; Ser 198; Ser 200; Ser 231; Ser 233; Ser 239; Ser 261; Ser 374; Ser 381; Ser 297; Ser 397; Ser 451; Ser 475; Ser 494; Ser 495; Ser 496; Ser 501; Ser 505; Thr 253; Thr 265; Thr 267; Thr 269; Thr 293; Thr 386; Thr 400; Thr 408; Thr-469; 및/또는 Thr 517.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 서열번호 1의 Arg-193이 Asn과 같은 상이한 아미노산으로 치환된, 운반체 폴리펩타이드.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항의 운반체 폴리펩타이드가 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 mnAA 잔기를 통해 항원에 접합되어 있는, 면역원성 접합체.

청구항 20

운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체로서, (i) 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 상기 당류 항원은 서열번호 4내의 적어도 하나의 mnAA 잔기를 통해 상기 운반체 폴리펩타이드에 공유 결합되는, 면역원성 접합체.

청구항 21

제20항에 따른 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 운반체 폴리펩타이드는 4 내지 9개의 mnAA 잔기를 포함하는, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 mnAA가 상기 운반체 폴리펩타이드의 천연 서열 중에 있는 라이신 대신에 치환되는, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 25

제24항에 있어서, 적어도 하나의 nnAA가 서열번호 1 또는 2 중의 K24, K33, K37, K39, K212, K214, K227, K244, K264, K385, K522 및/또는 K526 대신에 치환되는, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 nnAA가 2-아미노-3-(4-(아지도메틸)페닐)프로판산인, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원이 아지도기를 통해 상기 nnAA에 접합된 알킨기를 갖는, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원이 박테리아 협막 당류(bacterial capsular saccharide); 예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*), 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*) 및 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 박테리아로부터의 협막 당류인, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원이 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택된 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형의 협막 당류인, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체(들) 중의 운반체 폴리펩타이드에 대한 당류의 비율(w/w)이 1보다 큰, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 운반체 폴리펩타이드는 3개 이상의 nnAA 잔기를 포함하고, 상기 접합체는 분자량이 적어도 500kDa인, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합체는 분자량이 900kDa 내지 5MDa인, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

청구항 34

제1항 내지 제15항 및 제21항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 2가지 이상의 상이한 폐렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;

혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 14가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 집합체;

혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 15가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 집합체;

혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 20가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 집합체;

혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 21가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 집합체;

혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 24가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 집합체;

혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 25가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 집합체;

혈청군 A, C, W135, X 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 4개 이상의 상이한 수막구균 혈청군으로부터의 협막 당류의 집합체; 또는

혈청형 K1, K2, K3, K4, K5 및 K6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2가지 이상의 상이한 포르피로모나스 진지 발리스 혈청형으로부터의 협막 당류의 집합체

를 포함하는, 용기, 장치, 조성물 또는 방법.

청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청형 20이 혈청형 20B인, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 집합체.

청구항 36

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청형 20이 혈청형 20A인, 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 집합체.

청구항 37

대상체에서 항원에 대한 면역방어 항체 반응을 유도하는 방법으로서, 비경구 투여에 적합한 부형제 중의 제6항 내지 제13항 및 제21항 내지 제34항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물 또는 제19항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 집합체를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2018년 7월 4일에 출원한 미국 가특허 출원 일련 번호 62/693,981의 우선권을 주장하며, 상기 가출원의 내용은 그 전문이 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

[0003] **함께 제출되는 전자 텍스트 파일**

[0004] 본 발명과 함께 전자 제출된 텍스트 파일의 내용은 본 명세서에 전부 참조에 의해 편입된다: 서열목록의 컴퓨터 판독 가능한 형식 사본[파일명: STRO_005_01W0_SeqList_ST25.txt, 기록 날짜: 2019년 7월 1일, 파일 크기 약

23킬로바이트)].

배경 기술

[0005] "약한" 당류 항원(saccharide antigen)에 대한 면역 반응은 디프테리아 독소이드, 파상풍 독소이드, 헤모필러스 인플루엔자(*H. influenza*) 단백질 D, 또는 CRM197와 같은 공지된 "강한" 운반체 폴리펩타이드(carrier polypeptide) 항원에 접합시킴에 의해 증폭시킬 수 있다. WO 2018/126229(SutroVax, Inc., 캘리포니아주 포스터 시티 소재)는 비천연 아미노산(non-natural amino acid: nnAA)을 포함하는 운반체 폴리펩타이드를 사용한 접합 백신 항원의 생산에 대한 방법, 조성물 및 기술을 개시한다. nnAA를 통한 직교 부착 화학은 운반체 폴리펩타이드에 항원이 접합하도록 하여 면역에 유용한 면역원성 접합체(immunogenic conjugate)를 생성한다.

[0006] 본 발명의 목적은 상기 방법, 조성물 및 기술의 변형 및 개선을 제공하는 것이다. 이하에 기술되는 변형 및 개선은 WO 2018/126229 또는 2018년 7월 4일에 출원된 임시 미국 특허 출원 일련 번호 제62/693,978호 및 제 62/693,981호에 개시된 임의의 방법, 조성물 또는 기술에 적용되거나 조합될 수 있다. 전술한 특허 출원들은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0007] 일 실시형태에서, 본 발명자들은 약제학적 조성물을 함유하는 멸균 용기(예를 들어, 바이알)를 제공하되, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합된다. 상기 용기는 상기 약제학적 조성물의 단위 용량을 함유할 수 있다. 멸균 유리 용기가 바람직하다.

[0008] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 약제학적 조성물을 함유하는 전달 장치(예컨대, 주사기, 분무기(nebulizer), 분사기(sprayer), 흡입기, 피부 패치 등)를 제공하되, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합된다. 상기 전달 장치는 상기 약제학적 조성물의 단위 용량을 함유할 수 있다. 상기 전달 장치는 포유류 대상체에게 상기 약제학적 조성물을 투여하는 데 사용될 수 있다.

[0009] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 약제학적 조성물을 함유하는 밀봉 용기를 제공하되, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합된다. 밀봉에 적합한 용기는, 예컨대, 바이알을 포함한다. 상기 내용물은 밀봉 지점에서 멸균성인 것이 바람직하다.

[0010] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물 0.25 내지 0.75ml(예를 들어, 0.3 내지 0.75ml, 바람직하게는 0.5ml)를 함유하는 주사기를 제공하되, 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합된다.

[0011] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 알루미늄염 보강제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 알루미늄염 보강제는 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄 보강제이며; (iii) 부피가 0.25 내지 0.75ml(예컨대, 0.3 내지 0.75ml, 바람직하게는 0.5ml)이다.

[0012] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 인산알루미늄 보강제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 조성물 중의 알루미늄 이온의 농도는 300 µg/ml 미만(예컨대, 100 내지 300 µg/ml)이다. 이상적으로, 상기 알루미늄 이온의 농도는 1.7 mg/ml 이하이다. 상기 조성물 내의 접합체는 인산알루미늄 보강제에 흡착될 수 있다.

[0013] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 인산알루미늄 보강제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 3을 포함하지 않고; (iii) 상기 조성물 중의 알루미늄

이온의 농도는 2.5 mg/ml 미만이다. 이상적으로, 알루미늄 이온의 농도는 1.7 mg/ml 이하이다. 상기 조성물 내의 접합체는 상기 인산알루미늄 보강제에 흡착될 수 있다.

- [0014] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 약제학적 조성물의 부피는 0.25 내지 1.25ml(예컨대, 0.3 내지 0.7ml, 바람직하게는 0.5ml)이다. 상기 조성물은 인산알루미늄 보강제를 포함할 수 있고, 상기 조성물 내의 접합체는 인산알루미늄 보강제에 흡착될 수 있다.
- [0015] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 보존제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합된다.
- [0016] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 보존제 무함유 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합된다.
- [0017] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 조성물은 오스몰농도(osmolality)가 200 내지 400 mOsm/kg이다.
- [0018] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 적어도 1종의 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 적어도 1종의 부형제는 염화나트륨, 숙신산 및 폴리소르베이트 80으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한, 알루미늄염 보강제를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물은 염화나트륨 및 폴리소르베이트 80 모두를 부형제로서 포함할 수 있다.
- [0019] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) n은 3 내지 50의 정수이며; (iii) 상기 n개의 면역원성 접합체에서 상기 운반체 폴리펩타이드의 총량은 상기 약제학적 조성물의 용량당 3n μ g 이하이다.
- [0020] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) n은 3 내지 50의 정수이고; (iii) 상기 n개의 면역원성 접합체에서 상기 운반체 폴리펩타이드의 총 농도는 상기 약제학적 조성물 중에 6n μ g/ml 이하이다.
- [0021] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) n은 3 내지 50의 정수이고; (iii) 상기 n개의 면역원성 접합체에서 상기 당류 항원의 총량은 상기 약제학적 조성물의 용량당 3n μ g 이하이다.
- [0022] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) n은 3 내지 50의 정수이고; (iii) 상기 n개의 면역원성 접합체에서 상기 당류 항원의 총 농도는 상기 약제학적 조성물 중에 6n μ g/ml 이하이다.
- [0023] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 접합체당 상기

운반체 폴리펩타이드의 평균 양은 상기 약제학적 조성물의 용량당 1 내지 4 μ g인, 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0024] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 접합체당 상기 운반체 폴리펩타이드의 평균 농도는 상기 약제학적 조성물 중에 2 내지 8 μ g/ml이다.
- [0025] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 접합체당 상기 당류 항원의 평균 양은 상기 약제학적 조성물의 용량당 1 내지 4 μ g이다.
- [0026] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 접합체당 상기 당류 항원의 평균 농도는 상기 약제학적 조성물 중에 2 내지 8 μ g/ml이다.
- [0027] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) n은 3 내지 50의 정수이며; 그리고 (iii) 상기 조성물에는 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)가 없거나, 또는 (iv) 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)를 함유하되, 상기 조성물 중에 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)의 질량은 상기 n개의 면역원성 접합체에 존재하는 상기 운반체 폴리펩타이드 질량의 10% 미만이다.
- [0028] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) n은 3 내지 50의 정수이며; 그리고 (iii) 상기 조성물에는 비접합 형태의 당류 항원이 없거나, 또는 (iv) 비접합 형태의 적어도 하나의 당류 항원을 함유하되, 상기 조성물 중에 비접합 형태의 당류 항원의 총 질량은 상기 n개의 면역원성 접합체에 존재하는 상기 당류 항원의 총 질량의 40% 미만(예컨대, 30% 이하, 20% 이하 또는 10% 이하)이다.
- [0029] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 14개 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 용량당 상기 운반체 폴리펩타이드의 총량은 40 μ g 미만이다.
- [0030] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 14개 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 용량당 상기 운반체 폴리펩타이드의 농도는 80 μ g 이하이다.
- [0031] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 약제학적 조성물의 복수의 단위 용량을 제조하는 방법을 제공하되, 여기서 (i) 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고, (ii) 상기 방법은 상기 면역원성 접합체를 포함하는 벌크 조성물을 제조하는 단계 및 상기 벌크 조성물로부터 개별 단위 용량을 복수의 개별 용기 내로 포장하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 무균적으로 수행되는 것이 이상적이다. 상기 개별 용기는 여기에 단일 용량이 포장된 후 밀봉될 수 있다. 상기 개별 용기는 주사기인 것이 이상적이다.
- [0032] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 조성물은 동결건조된다.
- [0033] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 약제학적 조성물을 제조하는 방법을 제공하되, 여기서 상기 약제학적 조성물은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 알루미늄염 보강제를 포함하고, (i) 상기 면역원성 접합체는 각각

운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, (ii) 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; 상기 방법은 (A) 상기 면역원성 접합체를 각각 알루미늄염 보강제에 별개로 흡착시킨 다음, 개별적으로 흡착된 접합체를 함께 혼합하는 단계, (B) 상기 면역원성 접합체를 각각 알루미늄염 보강제에 순차적으로 흡착시키는 단계, 또는 (C) 2개 이상의 상기 면역원성 접합체의 혼합물(예컨대, 상기 접합체들 전부)을 제조하고, 이 혼합물을 알루미늄염 보강제와 조합하는 단계 중 하나를 포함한다.

[0034] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 (i) 서열번호 1과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고; (ii) Arg-Arg 다이펩타이드 서열이 없으며; (iii) 적어도 하나의 nnAA 잔기를 포함하는, 아미노산 서열을 포함하는 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드를 제공한다. 따라서, 예를 들어, 서열번호 1의 Arg-192 및/또는 Arg-193은 결실되거나 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 상기 nnAA 잔기(들)는 서열번호 1의 아미노산 잔기의 치환 및/또는 삽입에 의해 도입될 수 있다. 상기 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드는 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA 잔기(들)를 통해 면역원성 접합체(예를 들어, 당류 항원의 면역원성 접합체)를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0035] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 (i) 서열번호 1과 적어도 80% 서열 동일성을 갖고 (ii) 하나 이상의 하기 아미노산 잔기(서열번호 1에 따라 넘버링됨): Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp-507; Asp-519; Asn-296; Asn-359; Asn-399; Asn-481; Asn-486; Asn-502; Asn-524; Glu-240; Glu-248; Glu-249; Glu-256; Glu-259; Glu-292; Glu-362; Gln-252; Gln-287; Lys-212; Lys-218; Lys-221; Lys-229; Lys-236; Lys-264; Lys-299; Lys-385; Lys-456; Lys-474; Lys-498; Lys-516; Lys-522; Lys-534; Arg-377; Arg-407; Arg-455; Arg-460; Arg-462; Arg-472; Arg-493; Ser-198; Ser-200; Ser-231; Ser-233; Ser-239; Ser-261; Ser-374; Ser-381; Ser-297; Ser-397; Ser-451; Ser-475; Ser-494; Ser-495; Ser-496; Ser-501; Ser-505; Thr-253; Thr-265; Thr-267; Thr-269; Thr-293; Thr-386; Thr-400; Thr-408; Thr-469; 및/또는 Thr-517에 nnAA 치환을 포함하는, 아미노산 서열을 포함하는 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드를 제공한다. 상기 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드는 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA 잔기(들)를 통해 면역원성 접합체(예를 들어, 당류 항원의 면역원성 접합체)를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0036] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 (i) 서열번호 1과 적어도 80% 서열 동일성을 갖고; (ii) Arg-Arg 다이펩타이드 서열이 없으며; (iii) 하나 이상의 하기 아미노산 잔기(서열번호 1에 따라 넘버링됨): Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp-507; Asp-519; Asn-296; Asn-359; Asn-399; Asn-481; Asn-486; Asn-502; Asn-524; Glu-240; Glu-248; Glu-249; Glu-256; Glu-259; Glu-292; Glu-362; Gln-252; Gln-287; Lys-212; Lys-218; Lys-221; Lys-229; Lys-236; Lys-264; Lys-299; Lys-385; Lys-456; Lys-474; Lys-498; Lys-516; Lys-522; Lys-534; Arg-377; Arg-407; Arg-455; Arg-460; Arg-462; Arg-472; Arg-493; Ser-198; Ser-200; Ser-231; Ser-233; Ser-239; Ser-261; Ser-374; Ser-381; Ser-297; Ser-397; Ser-451; Ser-475; Ser-494; Ser-495; Ser-496; Ser-501; Ser-505; Thr-253; Thr-265; Thr-267; Thr-269; Thr-293; Thr-386; Thr-400; Thr-408; Thr-469; 및/또는 Thr-517에 nnAA 치환을 포함하는, 아미노산 서열을 포함하는 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드를 제공한다. 상기 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드는 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA 잔기(들)를 통해 면역원성 접합체(예를 들어, 당류 항원의 면역원성 접합체)를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0037] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 제공하되, 여기서 (i) 운반체 폴리펩타이드는 아미노산 서열 서열번호 4를 포함하고; (ii) 당류 항원은 서열번호 4 내의 적어도 하나의 nnAA 잔기를 통해 운반체 폴리펩타이드에 공유 결합된다. 본 발명자들은 또한 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공하되, 여기서 (i) 각 접합체 중의 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 각 접합체 중의 상기 당류 항원은 서열번호 4 내의 적어도 하나의 nnAA 잔기를 통해 상기 운반체 폴리펩타이드에 공유 결합된다.

[0038] 다른 실시형태에서, 본 발명자들은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물을 함유한 주사기를 제공하되, 상기 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 페렴구균 당류 항원을 포함하고, 상기 주사기는 실리코화되지 않은 주사기이다. 상기 실리코화되지 않은 주사기 중의 상기 약제학적 조성물은 이상적으로는 13개 이상의 상이한 페렴구균 접합체를 가지며, 상기 운반체 폴리펩타이드는 선택적으로 nnAA를 포함하지만, 대신에 예를 들어 CRM197일 수 있다. 실리코화되지 않은 주사기에 대한 자세한 설명은 이하에 제시된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 실시예에 기재된 바와 같이 다당류/명반 제형 및 Prevna-13™에 상대적인, 본 발명의 32가 백신 중 32가지의 표시된 혈청형 각각에 대한 기하 평균 역가를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 접합된 항원의 생성을 위한 방법, 조성물 및 기술의 다양한 상세한 설명은 국제 특허 공개 번호 W02018/126229에 개시되어 있으며, 이 공개 문헌의 전체 내용은 본 명세서에 참조에 의해 편입된다.

[0041] 면역원성 접합체

[0042] 본 발명은 일반적으로 면역원성 접합체에 관한 것이다. 상기 접합체는 항원에 공유 결합된 운반체 폴리펩타이드를 포함한다. 상기 결합은 T-세포 독립적 면역원(예컨대, 당류)을 T-세포 의존적 면역원으로 전환시켜 유도되는 면역반응(특히 아동에서)을 향상시킬 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 접합체는 항원과 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산('nnAA') 잔기 사이에 형성되는 공유 결합을 포함한다. 상기 nnAA 잔기는 관심 항원과의 반응성을 촉진하는 작용기를 제공할 수 있다.

[0043] 전형적으로, 단일 운반체 폴리펩타이드는 복수의 항원 분자에 결합될 것이다. 상기 항원은 운반체 폴리펩타이드에 부착하기 위해 분자당 단일 결합기(예컨대, 당류의 환원 말단)를 가질 수 있거나, 또는 복수의 결합기(예컨대, 복수의 알데하이드 또는 사이아네이트 에스터기)를 가질 수 있다. 항원 분자가 복수의 결합기를 갖는 경우, 이것은 일반적으로 항원을 통해 복수의 운반체 폴리펩타이드 간에 결합을 수반하는 고분자량의 가교된 접합체 또는 격자 접합체의 형성을 초래한다. 가교된 접합체가 본 명세서에서 바람직하며(특히 폐렴구균의 경우), 따라서 복수의 결합기를 갖는 항원도 바람직하다.

[0044] 공유 결합은 항원과 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA 잔기 사이에 형성된다. 바람직하게는, 상기 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 라이신 잔기에 접합되지 않으며; 보다 바람직하게는, 상기 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 천연 아미노산 잔기에 접합되지 않는다.

[0045] 유용한 운반체 폴리펩타이드는 T-세포 에피토프를 포함한다. 이러한 다양한 운반체 폴리펩타이드는 본 기술분야에 공지되어 있으며, 승인된 백신내에 디프테리아 독소이드[코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*) 유래의 화학적으로 처리된 독소; 'Dt'], 파상풍 독소이드[클로스트리디움 테타니(*Clostridium tetani*) 유래의 화학적으로 처리된 테타노스파스민 독소; 'Tt'], 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 유래의 단백질 D('PD' 또는 'HiD'), 혈청군 B 수막구균의 외막 단백질 복합체('OMPC') 및 CRM197 돌연변이체 코리네박테리움 디프테리아(*C. diphtheriae*) 독소를 사용하는 것이 알려져 있다.

[0046] 본 발명의 운반체에 기초가 되는 바람직한 운반체 폴리펩타이드는 CRM197이다. CRM197은 본 기술분야에 잘 알려져 있고(예컨대, 문헌[Broker et al. 2011 *Biologicals* 39: 195-204] 참조), 하기 아미노산 서열(서열번호 1)을 가지며, 여기서 밑줄친 잔기(Glu-52)는 천연 디프테리아 독소와 상이하여, Gly→Glu으로의 치환은 단백질의 독성 효소 활성을 상실시킨다:

```
GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQKGIQPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNEN
PLSGKAGGVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDGASRVVLSLPLFAE
GSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKQDAMYEQACAGNRVRRSVGSSLSLSCINLDWDVIRDKT
KTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVN
VAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEVDIGF
AAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTP
LPIAGVLLPTIPGKLDVNSKSTHISVNGRKIRMRCAIDGDVTFRCRPKSPVYVGVNGVHANLHVAFHRSSSE
KIHSNEISSDSIGVGLGYQKTVDHTKVNKLSLFFFEIKS
```

[0047]

[0048] 본 발명은 천연 CRM197을 사용하지 않는다. 서열번호 1을 포함하는 CRM197을 사용하는 대신에, 적어도 하나의 nnAA를 함유하는 변형된 아미노산 서열이 사용된다. 이러한 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드는 이하에 더 상세하게 설명된다.

[0049] CRM197 외에도, 디프테리아 독소의 다른 탈독소화된 돌연변이체 형태가 사용될 수 있다. 예를 들어, 비-독성 K51E/E148K 이중 돌연변이체도 접합체의 운반체 폴리펩타이드로서 사용되기도 하였고(Pecetta et al. 2016 *Vaccine* 34: 1405-11), nnAA 잔기는 상기 이중 돌연변이체의 서열에 CRM197에서와 동일한 방식으로 통합될 수 있다.

내지 약 40 또는 45개의 반복 단위를 갖는다.

- [0056] 면역원성 접합체에 혼입시키기에 유용한 당류는 박테리아에서 발견되는 것을 포함한다. 상기 당류는 비협막 당류(non-capsular saccharide)(예컨대, 엑소다당류, 예를 들어 스타필로코커스 아우레우스 엑소다당류)일 수 있지만, 바람직하게는 박테리아 협막 당류(bacterial capsular saccharide)이다.
- [0057] 박테리아 협막 당류는 그람 양성 박테리아 또는 그람 음성 박테리아의 협막에서 발견되는 고분자량의 당류이며, 백신 항원으로서 사용될 수 있다. 이러한 협막 당류는 일반적으로 해당 박테리아의 전세포 용해물 또는 배양 상청액으로부터 정용여과, 단백질 제거, 에탄올 침전, 핵산 제거 및 동결건조를 수반하는 공정을 통해 제조된다. 본 발명에 사용되는 박테리아 당류는 박테리아에서 발견된 본래 그대로일 수 있거나, 박테리아에서 정제된 당류의 가수분해에 의해 획득되는 것과 같이 본래 그대로의 당류로부터 획득되는 단편일 수 있다.
- [0058] 특별한 관심이 있는 당류 항원은 하기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다:
- [0059] - 스트렙토코커스 뉴모니애(*S. pneumoniae*)의 협막 당류. 본 발명을 수행하는데 있어서 항원으로서 유용한 폐렴 구균 협막 당류의 추가 세부 사항은 하기에 제시된다.
- [0060] - 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)의 당류: 항원은 스트렙토코커스 피오게네스 유래의 당류일 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 항원은 반복 단위가 하기 구조를 갖는 고분자량 중합체인 히알루론산으로 구성된 스트렙토코커스 피오게네스의 협막 당류이다:

$$[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcUA}p\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-(}\rightarrow$$
- [0061] 이는 스트렙토코커스 피오게네스 혈청형 간에 불변인 것으로 나타난다. 다른 실시형태에서, 상기 항원은 스트렙토코커스 피오게네스 유래의 비-협막 당류이며, 예컨대, $\alpha\text{-L-(1}\rightarrow 3)$ 및 $\alpha\text{-L-(1}\rightarrow 2)$ 결합이 교대로 연결된 폴리-L-람노피라노실 단위의 골격을 포함하고 상기 람노스 골격의 3-위치에 N-아세틸- $\beta\text{-D-}$ 글루코사민 잔기가 부착되어 있는 그룹 A-스트렙 세포벽 당류이다.
- [0063] - 스트렙토코커스 아갈락티애(*Streptococcus agalactiae*)의 협막 당류: 항원은 스트렙토코커스 아갈락티애(그룹 B 스트렙토코커스 또는 GBS)의 협막 당류일 수 있다. GBS 혈청형에는 협막 당류의 반복 단위가 독특한 적어도 10가지 혈청형(Ia, Ib, II-IX)이 있지만, 몇몇 혈청형만이 일반적으로 질병에 책임이 있다. 그 예로는 혈청형 Ia, Ib, II, III 및 V를 포함하며, 이러한 혈청형의 협막 당류의 접합체가 제조될 수 있다.
- [0064] - 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)의 협막 당류: 항원은 헤모필러스 인플루엔자의 협막 당류일 수 있다. 독특한 협막 당류의 화학적 구조(a 내지 f형)를 가진 헤모필러스 인플루엔자의 적어도 6가지 혈청형이 있다. 하지만, a형 및 b형만이 "고-독성" 균주로 간주되며, 본 발명에 사용하기에 바람직한 H.인플루엔자 협막 당류의 유형은 b형(Hib)이다.
- [0065] - 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*)의 협막 당류: 항원은 나이세리아 메닝지티디스의 협막 당류일 수 있다. 독특한 협막 당류의 화학적 구조를 가진 나이세리아 메닝지티디스의 적어도 13가지 혈청군(혈청군 A, B, C, E-29, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z 및 Z')이 있지만, 6개(A, B, C, W-135, X, Y)만이 생명에 위협적인 것으로 생각된다. 상기 당류 항원은 혈청군 A, C, W135, X 또는 Y 중 어느 것으로부터 유용하게 유래된다.
- [0066] - 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 협막 당류: 항원은 포르피로모나스 진지발리스의 6가지 혈청형 K1, K2, K3, K4, K5 및 K6 중 하나에서 유래되는 협막 당류일 수 있다.
- [0067] - 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*)의 협막 당류: 항원은 Vi 당류일 수 있다. Vi는 살모넬라 티피(살모넬라 엔테리카(*S. enterica*)의 티피 혈청변종)의 협막 당류이다. Vi 당류는 헥소사민우론산, $\alpha\text{-1,4-N-}$ 아세틸갈락토스아미노우론산의 선형 단독중합체로서, C-3 위치가 60 내지 90% 아세틸화되어 있다.
- [0068] - 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 당류: 항원은 스타필로코커스 아우레우스의 당류일 수 있다. 상기 당류는 폴리-N-아세틸글루코사민(PNAG)인 스타필로코커스 아우레우스의 엑소다당류, 또는 예컨대, 혈청형 5, 혈청형 8 또는 혈청형 336일 수 있는 스타필로코커스 아우레우스의 협막 당류일 수 있다.
- [0069] - 클로스트리디움 디피실(*Clostridium difficile*)의 표면 당류: 항원은 PS-I 또는 PS-II와 같은 클로스트리디움 디피실의 표면 글리칸일 수 있다.
- [0070] - 글루칸: 항원은 $\beta\text{-1,3-}$ 결합 및/또는 $\beta\text{-1,6-}$ 결합을 포함하는 글루칸일 수 있다. 이러한 접합된 글루칸은 예를 들어 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대항하는 것과 같은 항진균성 면역 반응을 상승시키는 데 유용할

수 있다.

[0071] 상기 당류 항원에 대한 추가 세부 사항은 W02018/126229에서 찾아볼 수 있다.

[0072] 항원은 종종 집합에 적합하거나 이상적인 작용기를 본질적으로 포함하지 않는다. 따라서, 항원은 nAA에 집합시키기 전에 작용기화될 필요가 있을 수 있다. 이러한 작용기화에 대한 세부사항은 이하에 제시된다.

[0073] **폐렴구균 헵막 당류**

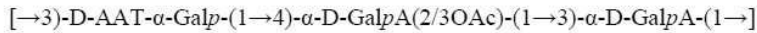
[0074] 본 발명에 사용하기에 바람직한 항원은 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus pneumoniae*) 유래의 헵막 당류이다. 스트렙토코커스 뉴모니에는 폐렴, 균혈증 및 수막염을 유발할 수 있는 캡슐화된 그람 양성 박테리아이다. 혈청형 특이적인 반복 단위 구조를 가진 헵막 당류를 보유하는 스트렙토코커스 뉴모니에의 혈청형은 적어도 90가지의 독특한 문서화된 혈청형이 있다(예컨대, Kalin, M. *Thorax* 1998; 53: 159-162 참조). 본 기술분야의 기술자들이 이해할 수 있는 바와 같이, 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 20은 사실상 밀접하게 관련된 2가지 혈청형으로 구성되며, 이들의 헵막 다당류는 대체로 교차 방어성인 것으로 제안되었다(Calix et al. 2012 *J Biol Chem* 287: 27885-94). 따라서, 본 기술분야의 기술자라면 역시 이해할 수 있는 바와 같이, 혈청형 20은 이전에 본 기술 분야에서 혈청형 20으로 분류되었을 당류를 의미하며, 따라서 Calix 등에 의해 개시된 바와 같이 구조적으로 20A 또는 20B일 수 있다(이전에는 본 기술분야에서 혈청형 20으로 분류되었지만 유전자형적으로 20A 또는 20B일 수 있는 균주 유래). 예를 들어, Pneumovax™(Merck)에서 혈청형 20 다당류를 생산하는 데 사용된 균주는 이제 혈청형 20A인 것으로 여겨진다. 일부 경우에는 20A가 바람직할 수 있다. 다른 경우에는 20B가 바람직할 수 있다. 표적 집단의 우세도는 상기 혈청형 간에 선택의 기준이 될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 20, 20A 및 20B로 분류된 균주는 혈청학적으로 유사하기 때문에 백신에서 대체로 교차 방어적이고, 균주 간의 선택이 중요하지 않을 수 있다.

[0075] 본 발명에 사용되는 항원은 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 7A, 7B, 7C, 8, 9A, 9L, 9N, 9V, 10F, 10A, 10B, 10C, 11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 12F, 12A, 12B, 13, 14, 15F, 15A, 15B, 15C, 16F, 16A, 17F, 17A, 18F, 18A, 18B, 18C, 19F, 19A, 19B, 19C, 20, 21, 22F, 22A, 23F, 23A, 23B, 24F, 24A, 24B, 25F, 25A, 27, 28F, 28A, 29, 31, 32F, 32A, 33F, 33A, 33B, 33C, 33D, 34, 35F, 35A, 35B, 35C, 36, 37, 38, 39, 40, 41F, 41A, 42, 43, 44, 45, 46, 47F, 47A 또는 48(Henrichsen *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2759-2762) 중 임의의 혈청형 유래의 헵막 당류일 수 있다. 그러나, 이러한 혈청형의 부분집합(subset)만이 임상적으로 중요한 박테리아 감염에 일반적으로 책임이 있으므로, 항원은 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F 중 임의의 혈청형 유래의 헵막 당류일 수 있다. 혈청형 6C, 7C, 15A, 15C, 16F, 20A, 20B, 23A, 23B, 24B, 31, 34, 35B, 35F, 37 및 38도 임상적 관심을 받고 있으므로, 항원은 상기 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 중 하나로부터 유래하는 헵막 당류일 수 있다.

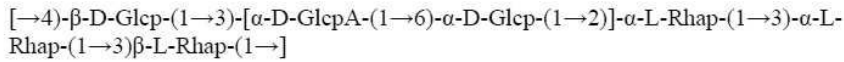
[0076] 본 발명은 상이한 폐렴구균 혈청형 유래의 집합체를 사용하는 경우, 적어도 14개의 상이한 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형(예를 들어, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상) 유래의 당류를 포함하는 것이 바람직하다. 조성물이 14개 이상의 혈청형을 포함하는 경우, 이들은 13가지 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 13개의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 외에도, 조성물은 혈청형 2, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15B, 17F, 20(또는 20A 또는 20B), 22F 및/또는 33F 중 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하다. 대안적으로, 상기 13가지 혈청형 외에도, 조성물은 하나 이상의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 2, 6C, 8, 9N, 10A, 12F, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 20, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 24F, 24B, 31, 33F, 34, 35B, 35F 및 38을 포함하는 것이 바람직하다. 15개 이상(예를 들어, 16개 이상)의 혈청형의 유용한 조합은 각각 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하고, 또한 혈청형 8을 포함할 수 있다. 20개 이상(예컨대, 21개 이상)의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형의 유용한 조합은 각각 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함한다. 24개 이상의 혈청형의 유용한 조합은 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F를 포함한다.

[0077] 일반적인 폐렴구균 혈청형 헵막 당류 반복 단위의 구조는 문헌[Jones C et al. *An Acad Bras Cienc.* 2005 Jun; 77(2): 293-324]에 기술되어 있다:

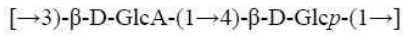
유형 1



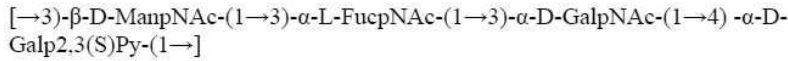
유형 2



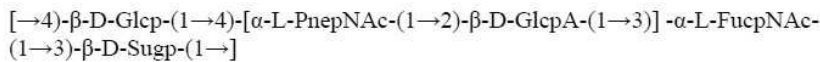
유형 3



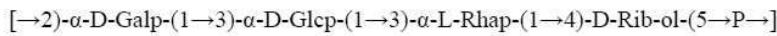
유형 4



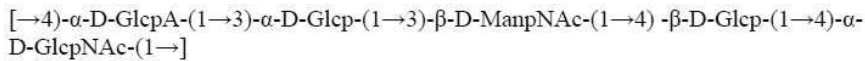
유형 5



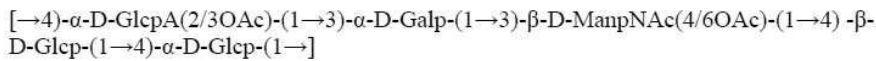
유형 6B



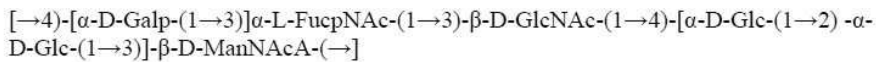
유형 9N



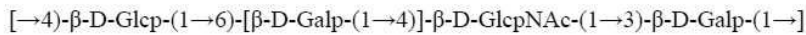
유형 9V



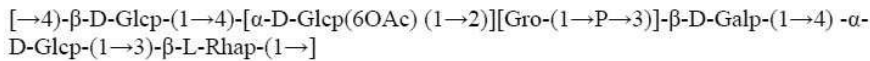
유형 12F



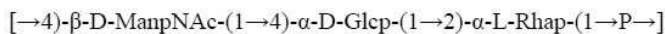
유형 14



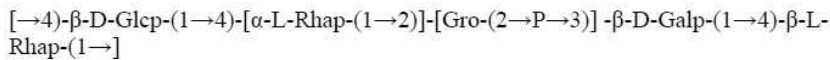
유형 18C



유형 19F



유형 23F



[0078]

[0079]

당류에 대한 보다 광범위한 논의는 문헌[Geno et al. (2015) *Clin. Microbiol. Rev.* 28: 871-99]에서 찾아볼 수 있고, 여기서 표 1은 97개의 공지된 혈청형에 대한 구조를 나타낸다. 이 표는 또한 아세틸화가 완료되지 않았을 때 아세틸화된 당류 잔기의 비율을 개시한다.

[0080]

상기 협막 당류는 0-아세틸화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F 유래의 협막 당류는 0-아세틸화 정도가 10 내지 100%, 20 내지 100%, 30 내지 100%, 40 내지 100%, 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 75 내지 100%, 80 내지 100%, 90 내지 100%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 70 내지 90% 또는 80 내지 90% 사이인 당류를 포함한다. 다른 실시형태에서, 0-아세틸화 정도는 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 90% 초과 또는 약 100%이다. 상기 당류의 0-아세틸화 정도는 양성자 NMR에 의해 결정될 수 있다[예를 들어, Lemercinier & Jones(1996) *Carbohydrate Research* 296: 83-96; Jones et al.(2002) *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30: 1233-1247 참조]. 일반적으로, 접합체를 제조하는 데 사용되는 당류는 박테리아로부터 정제된 출발 협막 당류에서 관찰되는 0-아세틸화 수준의 적어도 50%(예컨대, 75% 또는 심지어 100%)를 유지할 것이다.

[0081]

스트렙토코커스 뉴모니에 협막 당류는 본 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 분리 절차를 사용하여

박테리아로부터 직접 수득할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340 및 2008/0102498 및 WO 2008/118752에 개시된 방법 참조). 대안적으로, 상기 당류는 시판원(예컨대, ATCC)에서 수득할 수 있다.

[0082] 본 발명에 사용되는 페렴구균 협막 당류 항원은 10kDa 내지 4,000kDa, 예컨대, 50kDa 내지 3,000kDa, 또는 100kDa 내지 2,000kDa 사이의 분자량을 갖는 것이 유용할 수 있다. 예를 들어, 상기 분자량은 100kDa 내지 2,000kDa; 100kDa 내지 1,750kDa; 100kDa 내지 1,500kDa; 100kDa 내지 1,250kDa; 100kDa 내지 1,000kDa; 100kDa 내지 750kDa; 100kDa 내지 500kDa; 200kDa 내지 4,000kDa; 200kDa 내지 3,500kDa; 200kDa 내지 3,000kDa; 200kDa 내지 2,500kDa; 200kDa 내지 2,000kDa; 200kDa 내지 2,000kDa; 200kDa 내지 1,750kDa; 200kDa 내지 1,500kDa; 200kDa 내지 1,250kDa; 200kDa 내지 1,000kDa; 200kDa 내지 750kDa; 또는 200kDa 내지 500kDa 사이일 수 있다. 분자량에 관한 추가 세부 사항 및 지침은 앞서 본 명세서에 참조에 의해 편입되는 미국 일련 번호 제62/693,978호에서 이용할 수 있다.

[0083] 협막 당류는 선택적으로 천연에서 발견되는 협막 당류에 비해 화학적으로 변형된 것이다. 예를 들어, 당류는 선택적으로 탈-O-아세틸화(부분적 또는 완전히), 탈-N-아세틸화(부분적 또는 완전히), N-프로피온화(부분적 또는 완전히)된 것 등이다. 탈아세틸화는 선택적으로 활성화, 유도체화 또는 접합 전, 도중 또는 후에 발생하지만, 일반적으로 접합 전에 발생한다.

[0084] 본 발명의 일부 실시형태는 2가지 이상의 상이한 접합체의 사용을 수반한다. 페렴구균 협막 당류 접합체와 관련하여, 이는 각각 '상이한' 접합체가 상이한 페렴구균 혈청형의 당류를 갖고 있음을 의미한다(각 접합체에 대해 단일 유형의 운반체 폴리펩타이드를 사용하는 경우).

[0085] **다가 접합체**

[0086] 본 발명의 바람직한 조성물은 2가지 이상의 상이한 접합체를, 예를 들어 단일 약제학적 조성물 내에 사용하는 것을 수반한다. 이 실시형태는 또한 다가(multivalent)라고도 한다. 임의의 2개의 접합체가 '상이한' 것으로 기술되거나 '다가' 조성물에서 상이한 원자기를 제공하는 경우, 이는 상기 두 접합체 내의 운반체 폴리펩타이드와 항원의 조합 간의 상이함을 의미한다. 예를 들어, 단일 유형의 변형된 CRM197(예컨대, 서열번호 4)이 단일 혈청형의 페렴구균 유래의 협막 당류에 접합될 때, 반응 생성물은 많은 상이한 유형의 분자(상이한 분자량, 각 분자 내에 상이한 결합 패턴 등)를 포함할 것이지만, 본 명세서에서는 단일 접합체로 간주된다. 본 기술분야의 기술자는 분자 수준의 이러한 이질성에 익숙하며, 이와 마찬가지로 백신의 개별 접합체를, 다른 성질(예컨대, 분자량)이 접합체 조성물 내의 평균인 특별한 접합체의 항원-운반체 조합에 의해 정의한다. 2개의 '상이한' 접합체는 상이한 운반체 폴리펩타이드(즉, 상이한 아미노산 서열을 가짐) 및/또는 상이한 항원(즉, 상이한 항원 구조를 가짐)을 갖는다.

[0087] 예를 들어, 협막 당류 항원은 2개의 상이한 혈청형의 페렴구균으로부터 정제될 수 있다. 이러한 2개의 상이한 협막 당류는 2개의 상이한 접합체를 제공하기 위해 운반체 폴리펩타이드(동일하거나 상이할 수 있음)에 별개로 접합될 수 있다. 따라서, 박테리아 협막 당류 접합체와 관련하여, 2개의 '상이한' 접합체 간의 차이는 일반적으로 하나는 박테리아 종의 제1 혈청형 또는 혈청군 유래의 협막 당류를 함유하는 반면, 다른 하나는 상기 박테리아 종의 제2 혈청형 또는 혈청군 유래의 협막 당류, 예컨대, 스트렙토코커스 뉴모니애의 상이한 혈청형 유래의 협막 당류 또는 나이세리아 메닌지티디스의 상이한 혈청군 유래의 협막 당류를 함유하는 것일 것이다. 2개의 접합체는 복수의 박테리아 종 유래의 항원적으로 독특한 협막 당류, 예컨대, Hib 당류 접합체 및 수막구균 당류 접합체를 포함하였다면, 또한 '상이한' 것일 것이다.

[0088] 본 발명의 바람직한 다가 조성물은 n개의 상이한 면역원성 당류 접합체를 포함하며, 여기서 상기 n개의 면역원성 접합체 각각의 당류 항원은 다른 n-1개의 면역원성 접합체의 당류 항원과 구별된다. 예를 들어, 조성물이 단일 박테리아 종의 항원을 포함하는 경우, 상기 종의 n개의 상이한 혈청형 또는 n개의 상이한 혈청군 유래의 협막 당류가 존재할 수 있다.

[0089] '상이한' 접합체와 관련된 상기 명명법은 접합 백신 분야에서 사용된다. 예를 들어, 문헌[Glesby et al. (2015) *J Infect Dis* 212: 18-27]은 Prevnar™ PCV13 백신이 CRM197에 별개로 접합된 13개의 상이한 페렴구균 혈청형 유래의 당류 항원을 포함하기 때문에 '13개의 상이한 접합체'를 포함한다고 언급한다. 유사하게, EP-A-2932979는 '13개의 상이한 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물'을 언급한다.

[0090] 따라서, PCV7 Prevnar™ 백신은 7개의 상이한 접합체를 갖고, PCV13 Prevnar™ 백신은 13개의 상이한 접합체를 가지며, Menveo™ 백신은 4개의 상이한 접합체를 갖고, Menactra™ 백신은 4개의 상이한 접합체를 가지며,

Nimenrix™ 백신은 4개의 상이한 접합체를 갖고, Menitorix™ 백신은 2개의 상이한 접합체가 가지며, Menhibrix™ 백신은 3개의 상이한 접합체를 갖고, Synflorix™ 백신은 10개의 상이한 접합체를 가지며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 페럼구균 접합체의 다가 조성물은 바람직하게는 13개 초과 상이한 접합체, 예컨대, 14, 15, 20, 21, 24, 25개 또는 그 이상을 포함한다. 상기 13개 초과 조성물에 대한 적절한 혈청형의 선택은 상기에 논의되어 있다.

[0092] 고가의 백신(예를 들어, 13개 초과 상이한 접합체를 갖는)과 관련하여, 운반체 억제 가능성은 감소시키기 위해 하나보다 많은 운반체 폴리펩타이드를 사용하는 것이 때로는 바람직할 수 있다(예를 들어, W098/51339 및 W02011/110241 참조). 예를 들어, n개의 상이한 접합체를 포함하는 다가 백신에서, 제1 운반체 폴리펩타이드는 n-y개의 상이한 항원(예를 들어, 상이한 박테리아 혈청형 또는 혈청군 유래의 헤파 당류)에 접합되고, 제2 폴리펩타이드 운반체는 나머지 y 항원에 접합된다. 유사한 방식으로, 3개, 4개 또는 그 이상의 운반체는 이들 간에 분할된 n개의 항원과 함께 사용될 수 있다. 하나보다 많은 운반체가 사용되는 경우, 적어도 제1 운반체는 본 발명에 따른 nnAA-함유 운반체 폴리펩타이드이다. 바람직한 실시형태에서, 적어도 제1 및 제2 운반체는 본 발명에 따른 nnAA-함유 운반체 폴리펩타이드이다.

[0093] **비천연 아미노산**

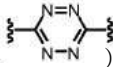
[0094] 앞서 언급한 바와 같이, 본 명세서에 사용된 접합체는 운반체 폴리펩타이드의 nnAA 잔기 내에 있는 작용기와 항원 사이의 공유 결합을 포함한다. nnAA 잔기의 측쇄는 운반체 폴리펩타이드의 별개의 부위에 항원을 접합시키는 데 유용한 반응성 작용기를 제공할 수 있다.

[0095] 일반적으로, 상기 nnAA는 해독 동안 폴리펩타이드에 통합될 수 있지만 20개의 일반 아미노산 중 하나는 아닌 임의의 아미노산일 수 있다. nnAA는 코돈이 천연의 동족 아미노산보다는 nnAA를 통합시키도록 tRNA 분자를 변환시킴으로써 폴리펩타이드 내로 편리하게 통합될 수 있다. 이를 달성하기 위한 한 가지 기술은 "억제 코돈", 즉, 원하는 위치에서 암호 서열에 도입되고 천연 종결 코돈(예컨대, 옴버, 오키 또는 오팔 종결 코돈)을 인식할 수 있지만 해독이 지속되도록 하여(천연 종결 코돈을 억제하여) nnAA를 통합시키는 특정 tRNA에 의해 인식되는 뉴클레오타이드 트리플렛(triplet)을 사용하는 것을 수반한다.

[0096] 상기 nnAA 잔기는 본 명세서에 기재된 임의의 nnAA 잔기일 수 있거나, 세포 기반 또는 무세포 단백질 합성에 적합한 것으로 확인된 임의의 다른 잔기일 수 있다(예를 들어, 문헌[Schultz et al. *Annu Rev Biochem.* 2010; 79: 413-44, 특히 pp.418-420; 및 Chin et al. *Annu Rev Biochem.* 2014; 83: 5.1-5.30] 참조, 이들은 본 명세서에 참조에 의해 편입됨). 이상적으로, 상기 nnAA는 20개의 일반 아미노산 중 하나의 변형에 의해 세포 내에서 자연적으로 발생하는 것이 아니다(예컨대, 피로라이신, 셀레노시스테인, 포스포티로신, 포말-메티오닌 등).

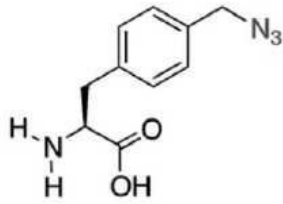
[0097] 본 명세서에서 사용하기에 특히 바람직한 nnAA는 20개의 자연 발생의 아미노산 중 임의의 아미노산의 측쇄에서 발견되지 않는 작용기를 제공하는 측쇄를 가진, (세포 내에서 또는 무세포 시스템에서) 해독 동안 통합될 수 있는 것이다. 이러한 아미노산을 폴리펩타이드에 통합시키는 다양한 기술은 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Young & Schultz(2010) *J Biol Chem* 285: 11039-44, Maza et al.(2015) *Bioconjugate Chem.* 26: 1884-9, 및 Zimmerman et al.(2014) *Bioconjugate Chem.* 25: 351-61]을 참조한다. W02018/126229는 nnAA 잔기가 예를 들어 무세포 발현 혼합물, nnAA에 특이적인 직교성 tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 쌍, 억제 코돈 등을 사용하여 운반체 폴리펩타이드에 통합될 수 있는 방식을 상세하게 개시한다. 또한, 미국 특허 출원 공개 US-2017/0267637도 참조한다.

[0098] 상기 nnAA는 관심있는 항원 상의 상응하는 기와 "클릭(click)" 화학 반응에 적합한 화학기를 포함할 수 있다.

"클릭" 화학에 적합한 화학기는 아지도(-N₃), 알킨(-C≡C-), 알켄(-C=C-) 및 1,2,4,5-테트라진() 및 포스핀(예컨대, -P(Ph)₂)기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0099] 상기 nnAA는 2-아미노-3-(4-아지도페닐)프로판산(파라-아지도-L-페닐알라닌 또는 pAF), 2-아미노-3-(4-(아지도메틸)페닐)프로판산(파라-아지도메틸-L-페닐알라닌 또는 pAMF), 2-아미노-3-(5-(아지도메틸)피리딘-2-일)프로판산, 2-아미노-3-(4-(아지도메틸)피리딘-2-일)프로판산, 2-아미노-3-(6-(아지도메틸)피리딘-3-일)프로판산, 또는 2-아미노-5-아지도펜탄산 중 임의의 것일 수 있다.

[0100] 본 명세서에 사용하기에 가장 바람직한 nnAA는 pAMF이다:

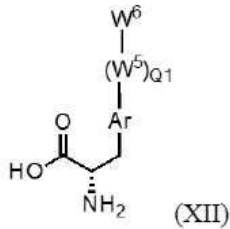


[0101]

[0102] pAMF는 접합체 생산에 매우 유리한 반응 동역학을 제공한다(예컨대, SPAAC 방법에서 알킨-함유 탄수화물 항원과 반응할 때 pAF를 사용하는 것보다 훨씬 빠르다).

[0103] 상기 nnAA는 2번 위치에 아미노 치환체; 및 3번 위치에 아지도-함유 치환체, 1,2,4,5-테트라지닐-함유 치환체, 또는 에티닐-함유 치환체를 보유하는 2,3-이치환된 프로판산일 수 있다. 바람직하게는, 상기 3번 위치의 치환체는 아지도-함유 치환체, 특히 결합기를 통해 3번 위치의 탄소 원자에 결합된 말단 아지도기를 포함하는 아지도-함유 치환체이다. 예를 들어, 상기 결합기는 선택적으로 치환되고 선택적으로 헤테로원자를 함유하는 아릴렌 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 결합기는 0 내지 4개의 헤테로 원자 및 0 내지 4개의 비-수소 고리 치환체를 함유하는 5원 또는 6원의 아릴렌 모이어티를 포함할 수 있다.

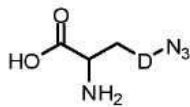
[0104] 상기 nnAA는 하기 화학식 XII의 구조를 가질 수 있다:



[0105]

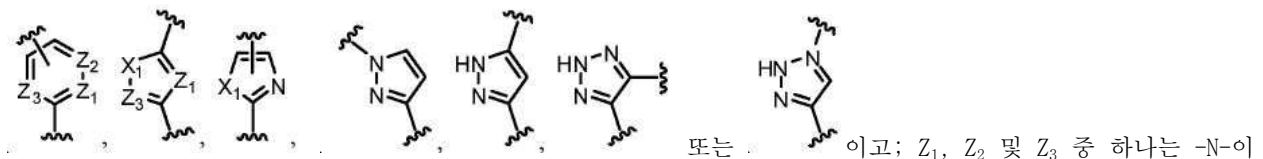
[0106] 여기서, Ar은 적어도 하나의 헤테로원자를 선택적으로 함유하는 5원 또는 6원의 방향족 고리를 포함하고; W⁵는 C₁-C₁₀ 알킬렌, -NH-, -O- 및 -S-로부터 선택되고; Q1은 0 또는 1이고; W⁶은 아지도, 저급 알킬기에 의해 선택적으로 C-치환된 1,2,4,5-테트라지닐 및 에티닐로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, Ar은 임의의 헤테로원자를 함유하지 않으며, 이 경우에 바람직한 링커는 비치환된 페닐렌기(즉, Ar은 -C₆H₄-)이다. 다른 실시형태에서, Ar은 질소 헤테로원자 및 N, O 및 S로부터 선택되는 적어도 하나의 추가 헤테로원자를 함유한다. 예시적인 질소 헤테로고리는 이하에 기술되며, Ar은 예를 들어 피리딘 또는 피리다진일 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, Q1은 1이고, W⁵는 저급 알킬렌이고, W⁶은 아지도이다.

[0107] 상기 nnAA는 화학식 I의 nnAA와 같은 아지도 함유 nnAA일 수 있다:



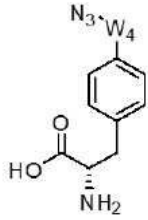
[0108]

[0109] 여기서, D는 -Ar-W3- 또는 -W1-Y1-C(O)-Y2-W2-이고; W1, W2 및 W3은 각각 독립적으로 단일 결합 또는 저급 알킬렌이고; 각 X₁은 독립적으로 -NH-, -O- 또는 -S-이고; 각 Y1은 독립적으로 단일 결합, -NH- 또는 -O-이며; 각 Y2는 독립적으로 단일 결합, -NH-, -O-, 또는 N-결합된 또는 C-결합된 피롤리디닐렌이고; Ar은



고 Z₁, Z₂ 및 Z₃의 다른 것들은 독립적으로 -CH-이다.

[0110] 다른 실시형태에서, 상기 nnAA는 하기 화학식 II를 갖는다:

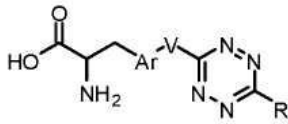


[0111]

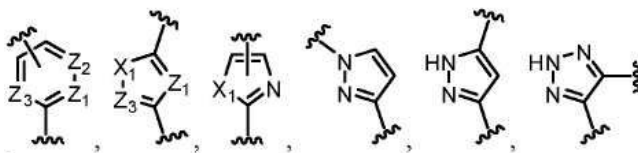
[0112] 여기서, W₄는 C₁-C₁₀ 알킬렌이다.

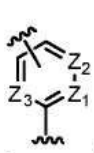
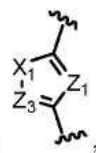
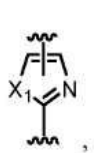
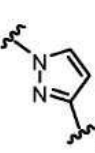
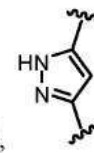
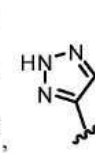
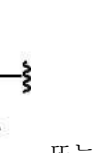
[0113] 화학식 I 및 II에 따른 아지도-함유 아미노산의 제조는 예를 들어 문헌(Stafford et al. US2014-0066598A1, 특허 단락 [0331] 내지 [0333], 참조에 의해 편입됨)에서 찾아볼 수 있다. 상기 공정은 염화티오닐을 사용하여 상응하는 아릴 아미노산의 유도체에서 염화물 대신 하이드록실기로 치환시킨 다음, 아자이드에 의해 염화물을 친핵성 치환하는 것을 포함한다. 적합한 아릴 측쇄 함유 아미노산도 시중에서 획득된다.

[0114] 상기 nnAA는 1,2,4,5-테트라진-함유 nnAA일 수 있다. 예를 들어, 화학식 III은 하기와 같다:



[0115]



[0116] 여기서, Ar은 , , , , , , 또는 이고; V는 단일 결합, 저급 알킬렌, 또는 -W₁-W₂-이고; W₁ 및 W₂ 중 하나는 없거나 저급 알킬렌이고, 다른 하나는 -NH-, -O- 또는 -S-이며; Z₁, Z₂ 및 Z₃ 중 각각 하나는 독립적으로 -CH- 또는 -N-이고; X₁은 독립적으로 -NH-, -O- 또는 -S-이고; R은 저급 알킬이다.

[0117] 화학식 III에 따른 1,2,4,5-테트라진 함유 아미노산의 제조는 예를 들어 문헌(Yang 등의 US2016/0251336, 특허 단락 [0341] 내지 [0377], 참조에 의해 편입됨)에서 찾아볼 수 있다. 상기 공정은 아미노피리딜 브로마이드와 (R)-2-아미노-3-요오도프로판산의 아미노/카복실 보호된 유도체를 Negishi 커플링하고, 그 다음 메틸티오-1,2,4,5-테트라진 유도체와 반응시켜 아미노산에 테트라진 모이어티를 도입시키는 것을 수반한다.

[0118] 상기 nnAA는 알킨-함유 nnAA일 수 있다. 일 실시형태에서, 이것은 프로파길기이다. 다양한 프로파길-함유 아미노산과 이의 합성은 문헌(Beatty et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 7364-7; Beatty et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005(127): 14150-1; Nguyen et al. *JACS* 2009(131): 8720-1)에서 찾아볼 수 있다. 이러한 프로파길-함유 아미노산은 세포 기반 시스템을 사용하여 단백질 내로 통합시키기에 적합하다. 일부 실시형태에서, 프로파길-함유 nnAA는 호모프로파길글리신, 에틸닐페닐알라닌 및 N₆-[(2-프로피닐옥시)카보닐]-L-라이신으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0119] 본 명세서에서 사용된 nnAA는 일반적으로 α-탄소에 카이럴 중심을 갖는 α-아미노산이고, 바람직하게는 L-입체 이성질체이다.

[0120] 본 발명에 사용되는 폴리펩타이드 운반체는 적어도 하나의 nnAA 잔기를 포함한다. 운반체 폴리펩타이드는 복수의 nnAA, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개(또는 때로는 그 이상)의 nnAA 잔기를 포함해야 하는 것이 바람직하다. 10개보다 적은 nnAA 잔기를 갖는 운반체 폴리펩타이드가 바람직하다. 따라서, 상기 폴리펩타이드는 2 내지 9개의 nnAA 잔기를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 4 내지 6개의 nnAA 잔기를 포함한다.

[0121] 운반체 폴리펩타이드가 복수의 nnAA 잔기를 포함하는 경우, 단일 종의 nnAA만을 포함하는 것이 바람직하다(예를 들어, 운반체에 유일한 nnAA는 pAMF이다). 이것은 각 nnAA에 동일한 접합 화학이 동시에 사용될 수 있도록 한다. 단일 운반체 분자에 2개의 상이한 항원을 부착하고자 한다면, 단일 운반체 내에 상이한 nnAA 종을 사용하고 각 항원을 상이한 nnAA에 접합시킴으로써 달성할 수 있지만, 운반체 내의 단일 종의 nnAA에 대한 접합이 바

람직하다. 더욱이, 복수의 상이한 접합체(예를 들어, 상이한 페렴구균 혈청형)가 사용되는 경우, 각 접합체는 동일한 단일 종의 nnAA를 포함하는 것이 때로 바람직하다. 더욱이, 조성물이 복수의 상이한 접합체(예를 들어, 상이한 페렴구균 혈청형)를 포함하는 경우, 각 접합체는 동일한 운반체 폴리펩타이드를 포함하는 것이 때로 바람직하다.

[0122] nnAA는 치환 또는 삽입(또는 C-말단 또는 N-말단 연장)에 의해 운반체 폴리펩타이드에 통합될 수 있다. 일 실시 형태에서, 상기 nnAA 잔기(들)는 치환에 의해 통합된다. 편리하게도, 상기 nnAA는 천연 폴리펩타이드의 라이신 잔기 대신에 치환될 수 있다. 예를 들어, CRM197에서 치환은 서열번호 1 또는 2의 위치 K24, K33, K37, K39, K212, K214, K227, K244, K264, K385, K522 및 K526 중 하나 이상에서 일어날 수 있다. K33, K212, K244, K264, K385 및 K526 각각에서 nnAA(예를 들어, pAMF)의 치환(및 다른 실시형태에서는 다른 위치의 치환 없이)이 바람직하다.

[0123] nnAA를 통합시키기 위한 치환은 라이신 위치에 제한되지 않지만, 다른 아미노산을 nnAA로 치환시키는 것도 가능하며, 그 예는 Phe, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Ser 및/또는 Thr이다.

[0124] 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA는 이상적으로는 표면-접근가능한 잔기이다. 이는 폴리펩타이드의 3D 구조를 사용하거나, 또는 천연 아미노산의 nnAA로의 포괄적인 대체 후 접합 검사를 수행함으로써, 각 부위의 유용성을 평가하여 측정할 수 있다.

[0125] 운반체 폴리펩타이드의 기능을 보존하기 위해, nnAA는 상기 운반체 폴리펩타이드의 T-세포 활성화 에피토프 내에 포함시키지 않는 것이 바람직하다. nnAA의 사용은 접합 부위의 선택적인 배치를 가능하게 하므로, 항원 접합을 위한 부위로서 운반체 폴리펩타이드의 T-세포 활성화 에피토프는 피할 수 있다. 위에서 언급했듯이, 이러한 에피토프는 쉽게 확인할 수 있다. 예를 들어, Raju 등, Bixler 등, Leonard 등 및 Pillai 등(예컨대, 문헌[Eur J Immunol. 1995 Dec; 25(12): 3207-14], WO89/06974)에 의한 CRM197의 연구는 다양한 T-세포 에피토프를, 예컨대, 잔기 P271-D290, V321-G383 및 Q411-I457 내에서 확인하였다. 따라서, 서열번호 1의 상기 영역 내에 nnAA의 도입은 피하는 것이 바람직하다.

[0126] **접합**

[0127] 접합은 nnAA 잔기와 항원 사이에 공유 결합의 형성을 수반한다. 이것은 nnAA와 항원 모두에 반응성 작용기를 필요로 한다. 상기 운반체 폴리펩타이드에 대한 nnAA는 일반적으로 이미 적합한 작용기(예컨대, pAMF의 아지도기)를 갖고 있기 때문에 선택될 것이지만, 항원은 종종 접합에 적합하거나 이상적인 작용기를 본질적으로 함유하지 않기도 한다. 따라서, 항원은 nnAA에 접합되기 전에 작용기화되어야 할 필요가 있을 수 있다.

[0128] 접합에 대한 자세한 기술 정보는 문헌[Bioconjugate Techniques(Greg T Hermanson, 3rd edition, 2013)]에서 찾아볼 수 있다. WO2018/126229는 항원이 어떻게 작용기화되고, 그 다음 nnAA에 접합될 수 있는지를 상세하게 개시한다. 앞서 언급한 바와 같이, 유용한 nnAA는 항원 상의 작용기와 "클릭" 화학 반응을 하기에 적합한 작용기(예컨대, 아지도기)를 포함한다. 따라서, 작용기화된 항원은 이상적으로 상기 "클릭" 반응에 적합한 기를 포함한다.

[0129] 따라서, 일반적으로, 접합은 3 단계를 포함하는 공정에 의해 일어난다: (a) 항원 활성화; (b) 선택적으로, 항원에 정상적으로 존재하지 않는 반응성 작용기를 도입시키기 위한 상기 활성화된 항원의 유도체화(예를 들어, 링커 또는 친핵성기를 이용하여); 및 (c) 단계 (a) 또는 존재한다면 단계 (b)에서 도입된 기를 통한 운반체 폴리펩타이드에 대한 상기 항원의 접합. 일부 실시형태에서, 단계 (a)는 특정 작용기(예를 들어, 하이드록실, 아민, 티올)가 활성화에 더욱 접근할 수 있도록 항원 상의 차단기를 제거하는 제1 단계를 포함한다. 때로, 단계 (a) 내지 (c)는 본질적으로 동시에 일어날 수 있지만(예컨대, 상기 항원에 N-하이드록시숙신이미드와 같은 반응성 모이어티가 첨가되는 경우), 다른 실시형태에서는 단계 (a) 내지 (c) 중 2 이상의 단계가 별개이며, 단계 사이에 선택적인 정제 단계가 있다.

[0130] 앞서 언급한 바와 같이, 가교된 접합체가 바람직하므로, 항원 분자당 복수의 반응성 작용기를 도입시키는 것이 또한 바람직하다. 예를 들어, 당류 분자를 활성화시킬 때에는 복수의 알데하이드 또는 사이아노이드 에스터기를 도입시킬 수 있다. 이러한 기들은 그 다음, 예컨대, nnAA 중의 아지도기와 후속적으로 반응할 수 있는 반응성 사이클로옥탄을 도입시키기 위해 유도체화될 수 있다.

[0131] 항원은 예를 들어 WO2011/110531에 개시된 바와 같은 과요오드산염 산화(예를 들어, 반응성 알데하이드기를 제공하기 위해 인접한 탄소 원자 상의 하이드록실기를 산화시키는 것); 예를 들어, 1-사이아노-4-다이메틸아미노피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)를 사용한 사이아닐화; 1,1'-카보닐다이이미다졸(CDI)에 의한 하이드록

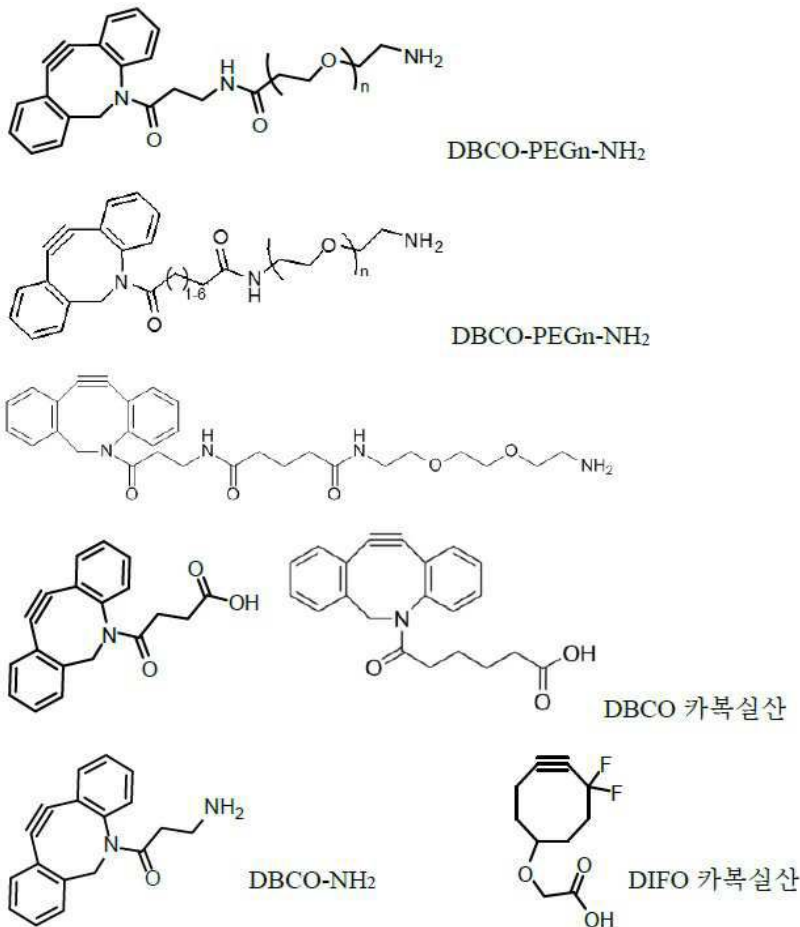
실 활성화에 이어 친핵성 첨가; 또는 내재 알데하이드(예컨대, 당류의 환원 말단)의 탈마스킹을 포함하는 다양한 화학에 의해 활성화될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0132] 과요오드산염 산화 및 CDAP 사이아닐화는 두 가지 바람직한 활성화 기술이다. 과요오드산염 산화는 특히 페렴구균 혈청형 1, 2, 3, 7F, 8, 9N 및 11A를 활성화시키는데 유용한 것으로 밝혀졌다. CDAP 사이아닐화는 특히 페렴구균 혈청형 3, 7F 및 10A를 활성화시키는데 유용한 것으로 밝혀졌다.

[0133] 활성화된 항원은 nnAA에 직접 접합될 수 있지만, 일반적으로 활성화된 기는 nnAA의 작용기에 대해 더 우수한 반응성을 나타내는 작용기를 도입하도록 유도체화된다. 예를 들어, 알킨일기가 도입될 수 있다. 아미노기 및 알킨기를 갖는 이작 용기성 시약은 (예를 들어, 환원성 아민화를 통해) 항원에 도입된 알데하이드기와 반응하여, nnAA와 반응할 수 있는 분지형 알킨을 남길 수 있다. 예를 들어, 아미노 작용기 및 DBCO 작용기를 포함하는 이작용기성 시약을 사용할 수 있다.

[0134] 일 실시형태에서, 상기 nnAA는 항원의 알킨일기(예를 들어, 프로파길기)와 반응한다. 항원의 알킨기는, 예를 들어 구리-촉매화된 아자이드-알킨 고리첨가(CuAAC), 루테튬-촉매화된 아자이드-알킨 고리첨가(RuAAC), 또는 Huisgen 아자이드-알킨 1,3-이극성 고리첨가로서 본 기술분야에 공지된 반응을 사용하여, nnAA의 아지도기와 반응하기에 이상적이다. 상기 알킨일기는 반응성을 증가시키는 분자 상황을 가질 수 있고, 예컨대, 고리 내에 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 알킬렌은 다이아틸-변형된 사이클로옥틴 고리(예컨대, DBCO)와 같은 사이클로옥틴 고리(선택적으로 헤테로원자를 포함함) 내에 있을 수 있다. 이 반응은 변형-촉진된 아자이드-알킨 고리첨가(stain-promoted azide-alkyne cycloaddition: SPAAC)로서 본 기술분야에서 지칭되는 [3+2] 고리첨가일 수 있다. DIFO-기반 및 DBCO-기반 시약은 이러한 반응에 쉽게 이용될 수 있다.

[0135] SPAAC 반응에 유용한 알킨 함유 고리는 이중플루오르화된 사이클로옥틴(DIFO) 및 다이벤조사이클로옥틴을 포함한다. 이들은 예를 들어 하기 시약 중 임의의 시약을 사용하여, 활성화된 항원에 결합시키기 위한 분지형 작용기가 있는 것(예컨대, 알데하이드 또는 사이아네이트 에스터에 결합시키기 위한 분지형 아미노가 있는 것)으로 이용할 수 있다.



[0136]

[0137] 'PEG_n' 중의 'n' 값은 옥시에틸렌 반복 단위의 수를 나타낸다. n의 값은 1 내지 20 범위, 예컨대, 2 내지 18, 3

내지 16 또는 4 내지 14이다. 따라서, n은 예를 들어 4, 5, 11, 12 또는 13 중 임의의 값일 수 있다.

[0138] 항원 및 nnAA의 접합에 사용될 수 있는 다른 클릭 화학 반응은 테트라진-알켄 결합 및 포스핀과 아자이드 사이의 스타우더거(Staudinger) 결합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0139] 본 발명의 접합체는 분자량이 적어도 약 750kDa, 적어도 약 1,000kDa, 또는 적어도 약 1,500kDa 이상일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 접합체는 분자량이 약 750kDa 내지 약 5,000kDa 사이이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합체는 분자량이 약 800kDa 내지 약 2,800kDa 사이이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합체는 분자량이 약 900kDa 내지 약 2,800kDa 사이이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합체는 분자량이 약 950kDa 내지 약 2,800kDa 사이이다. 일부 실시형태에서, 상기 접합체는 분자량이 약 1,000kDa 내지 약 2,800kDa 사이이다. 접합체의 분자량은 다각도 레이저 광 산란(multiangle laser light scattering: MALS)과 조합된 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography: SEC)에 의해 계산된다.

[0140] 본 발명의 접합체는 항원(예를 들어, 당류) 및 운반체 폴리펩타이드를 포함하고, 이들 두 성분의 중량비는 접합체를 정의하는 파라미터로서 사용될 수 있다. 당류-운반체 접합체에 대한 항원:운반체의 더 높은 중량비는 더 많은 당류 항원이 더 적은 양의 운반체 폴리펩타이드에 의해 전달될 수 있게 한다. 폐렴구균 접합 백신의 경우, 상기 비율은 일반적으로 0.3 내지 3.0 범위이지만, 이는 혈청형 및 접합 화학의 측면에 따라 달라질 수 있다 (*Annex 2: Recommendations for the production and control of pneumococcal conjugate vaccines*; WHO Technical Report Series, No. 927, 2005). 시판 백신인 Prevnar-13™의 비율은 0.9이다. 복수의 폐렴구균 혈청형(예컨대, 13개 초과)의 접합체를 포함하는 조성물의 경우, 전체 조성물에 대한 비율은 이상적으로 1.0 이상(즉, 폐렴구균 당류 항원의 중량 초과량)이고, 바람직하게는 1.5 이상(예컨대, 1.5 내지 3.0 범위, 또는 바람직하게는 1.5 내지 2.0)이다.

[0141] **변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드**

[0142] 상기 언급된 바와 같이, 본 명세서에서 주요 관심이 있는 운반체 폴리펩타이드는 CRM197의 변형된 형태이다. 따라서, 본 발명에 사용하기 위한 바람직한 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 1과 적어도 80%의 서열 동일성(예컨대, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상 또는 바람직하게는 98% 이상)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 상기 운반체 폴리펩타이드는 상기 논의된 바와 같이 최대 10개 nnAA의 존재를 제외하고는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0143] 서열번호 1은 위치 192-193에 Arg-Arg 다이펩타이드 서열을 포함한다. 이 서열은 일부 상황에서 단백분해 절단의 대상이 될 수 있다. 원하는 경우, 이 부위는 절단을 방지하고 수율을 개선시키기 위해 변형될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서 본 명세서에 사용된, 변형된 CRM197 운반체 폴리펩타이드는 Arg-Arg 다이펩타이드 서열이 없다. 예를 들어, 서열번호 1의 Arg-192 및/또는 Arg-193은 결실되거나, 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 따라서, 바람직한 운반체 폴리펩타이드는 (i) 서열번호 1과 적어도 80%(예컨대, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상 또는 바람직하게는 98% 이상) 서열 동일성을 갖고; (ii) Arg-Arg 다이펩타이드 서열이 없으며; (iii) 적어도 하나(예를 들어, 상기 논의된 바와 같이 적어도 2개, 바람직하게는 그 이상)의 nnAA 잔기를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0144] 이러한 아미노산 서열 중 하나는 서열번호 2이며, 이는 위치 193에 Arg→Asn 치환을 가짐으로써 서열번호 1과 다르다:

```
GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGY
SVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGDG
ASRVVLSLPAEAGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEYMAQACAGNRVRNSV
GSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSSEPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPPEL
SELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNT
EEIIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFL
HDGYAVSWNTVEDSIIRTFGQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGR
KIRMRCAIDGDVTFRCRPSVPVYVGNVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDH
TKVNSKLSLFFFEIKS
```

[0145] 서열번호 1을 참조하여 본 명세서 또는 W02018/126229에 기재된 임의의 실시형태는 대신 서열 2를 사용하여 실행할 수 있다.

[0146] 따라서, 본 발명자들은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 운반체 폴리펩타이드를 제공하되, 여기서 서열

번호 2는 1 내지 10개(예를 들어, 3 내지 9 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 6, 또는 3 내지 6 또는 4 내지 6개)의 nnAA 잔기를 포함하도록 변형된다. 이러한 nnAA 잔기 변형은 삽입 및/또는 치환으로서 서열번호 2에 통합될 수 있다(예를 들어, 6개의 Lys→nnAA 치환을 포함하는 서열번호 4). 서열번호 2의 잔기 Asn-193은 nnAA에 의해 치환되지 않는 것이 바람직하다. 이 운반체 폴리펩타이드는 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA 잔기(들)를 통해 면역원성 접합체(예컨대, 당류 항원의 면역원성 접합체)를 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0148] 일부 실시형태에서, 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 2의 상류 및/또는 하류에 아미노산 서열을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 2의 N-말단 아미노산 잔기의 상류에 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 상기 메티오닌 잔기는 포밀화될 수 있다. 메티오닌 잔기는 야생형 CRM197에서는 상기 위치에 존재하지 않지만, 본 명세서에서는 전체 천연 리더 서열을 필요로 함이 없이 해독을 개시하기 위해 포함될 수 있다(예를 들어, 무세포 폴리펩타이드 합성 시스템에서). 일부 실시형태에서, 운반체 폴리펩타이드는 (i) 선택적인 메티오닌을 제외한 어떠한 아미노산도 서열번호 1 또는 2의 N-말단 상류에 포함하지 않고, (ii) 서열번호의 1 또는 2의 C-말단 하류에 어떠한 아미노산도 포함하지 않는다.

[0149] 바람직하게는, 서열번호 1 또는 2에서 적어도 하나의 Lys 잔기는 nnAA 잔기에 의해 치환된다. 서열번호 1 또는 2에서 하나보다 많은 잔기가 nnAA에 의해 치환되는 것이 바람직하고, 서열번호 1의 잔기 중 1종만이 nnAA에 의해 치환되고, 예컨대, Lys 잔기만이 치환되는 것이 이상적이다. 서열번호 1에서 하나보다 많은 잔기가 nnAA에 의해 치환되는 경우, 각 위치에서 동일한 nnAA가 사용되는 것, 예컨대, 각 치환 위치에 pAMF가 사용되는 것이 바람직하다. 위에서 언급한 바와 같이, 일부 실시형태에서는 Lys 이외에 다른 잔기가 치환된다.

[0150] 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 포함하고 nnAA 잔기에 의한 2 내지 9개의 치환(예컨대, Lys→nnAA 치환, 바람직하게는 Lys→pAMF)을 갖는 운반체 폴리펩타이드가 바람직하고, 2 내지 8, 2 내지 6, 3 내지 8, 3 내지 6, 4 내지 9, 4 내지 8 또는 4 내지 6개의 nnAA 치환, 예컨대, 4, 5 또는 6개의 nnAA 잔기를 갖는 것이 이상적이다. 이는 단일 nnAA를 사용하는 것보다 운반체에 대한 항원의 더욱 광범위한 부착을 가능하게 하여, 항원:운반체 비율을 증가시키면서, 불용성을 초래할 수 있는 천연 서열 및 구조의 과도한 붕괴를 피할 수 있게 한다.

[0151] CRM197의 구조 연구는 서열번호 1 또는 2 내의 2개의 일반적인 3D 영역을 밝혀내었다: 제1 영역은 N 말단부터 Asn-373까지이고; 제2 영역은 Ser-374부터 C-말단까지이다. 이들 중 첫 번째는 대략 'C' 및 'T'(촉매적 및 막관통)로 알려진 도메인에 해당하고 두 번째는 도메인 'R'(수용체 결합)에 해당한다. 이상적으로, 운반체 폴리펩타이드는 제1 영역에 적어도 하나의 nnAA를 포함하고 제2 영역에 적어도 하나의 nnAA를 포함하며, 예컨대, 각 영역에 적어도 2개의 nnAA, 또는 각 영역에 적어도 3개의 nnAA를 포함한다. 이것은 접합된 항원이 운반체에 부착될 때 공간적으로 분리될 수 있게 한다. 제1 영역에 3개의 nnAA를 갖고 제2 영역에 3개의 nnAA를 갖는 운반체가 유용하다.

[0152] 제1 영역은 27개의 Lys 잔기를 포함하고, 제2 영역은 12개의 Lys 잔기를 포함한다. 따라서, 서열번호 1 또는 2의 N-말단 374개 아미노산 내의 하나 이상(예컨대, 3개)의 Lys 잔기 및 C-말단 162개 아미노산 내의 하나 이상(예컨대, 3개)의 Lys 잔기는 nnAA, 예컨대, pAMF로 치환될 수 있다.

[0153] CRM197에 기초한 nnAA-함유 운반체의 바람직한 실시형태는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지며, 여기서 잔기 K24, K33, K37, K39, K212, K214, K227, K264, K385, K522 및 K526 중 하나 이상은 nnAA(예컨대, pAMF)에 의해 대체된 것이다. 이러한 서열 중 하나는 서열번호 3이며, 여기서 각 X는 nnAA(바람직하게는 pAMF와 같은 동일한 nnAA)를 나타낸다:

```
MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAG
YSVDNENPLSGKAGGVVVKVTYPGLTKVLKALVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGD
GASRVVLSLPPFAEGSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRS
VGSSLSCINLDWDVIRDXTKTKIESLKEHGPIKKNMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPE
LSELXTVTGTNPVFAGANYYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHN
TEEIIVAQSIASLSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPF
LHDGYAVSWNTVEDSIIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNVKSKTHISVNG
RKIRMRCRAIDGDVTFPCRPKSPVYVGNVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVD
```

[0154] HTKVNSXLSLFFFEIKS (서열번호 3)

[0155] 다른 이러한 서열은 서열번호 4이며, 여기서 각 X는 nnAA(바람직하게는 pAMF와 같은 동일한 nnAA)를 나타낸다:

```
MGADDVVDSKSFVMENFSSYHGTPKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYYYYDWDWKEFYSTDNKYDAAG
YSVDNENPLSGKAGGVVVKVYTPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTTEEFIKRFGD
GASRVVLSLPAEAGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFETRGRKRGDAMYEYMAQACAGNRVRNS
VGSSLSCINLDWDVIRDXTKTKIESLKEHGPIKKNMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFHQTALEHPE
LSELXTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHN
TEEIVAQSIALLSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPF
LHDGYAVSWNTVEDSIIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNKSKTHISVNG
RKIRMRCAIDGDVTFRCRPSVYVGNVGHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVD
```

[0156] HTKVNSXLSLFFFEIKS (서열번호 4)

[0157] 서열번호 3 및 4는 무세포 단백질 합성 시스템에서 매우 잘 발현될 수 있는 반면, 폐렴구균 헵막 당류에 접합되었을 때 양호한 용해도를 유지하고 우수한 면역원성 반응을 제공한다. 서열번호 4에는 천연 Arg-Arg 다이펩타이드가 없다.

[0158] 각 X가 pAMF인 서열번호 4로 이루어진 폴리펩타이드는 본 발명에 사용하기에 바람직한 다른 운반체 폴리펩타이드이다.

[0159] WO2018/126229는 nnAA 치환에 적합한 여러 아미노산 잔기(예컨대, 본 명세서의 서열번호 1에 따라 넘버링된, Lys-24, Lys-33, Lys-37, Lys-39, Lys-212, Lys-214, Lys-227, Lys-244, Lys-264, Lys-385, Lys-522, Lys-526, Phe-12, Phe-53, Phe-123, Phe-127, Phe-140, Phe-167, Phe-250, Phe-389, Phe-530, 또는 Phe-531)를 기술한다. 치환될 수 있는 다른 잔기는 하기와 같다: Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp-507; Asp-519; Asn-296; Asn-359; Asn-399; Asn-481; Asn-486; Asn-502; Asn-524; Glu-240; Glu-248; Glu-249; Glu-256; Glu-259; Glu-292; Glu-362; Gln-252; Gln-287; Lys-212; Lys-218; Lys-221; Lys-229; Lys-236; Lys-264; Lys-299; Lys-385; Lys-456; Lys-474; Lys-498; Lys-516; Lys-522; Lys-534; Arg-377; Arg-407; Arg-455; Arg-460; Arg-462; Arg-472; Arg-493; Ser-198; Ser-200; Ser-231; Ser-233; Ser-239; Ser-261; Ser-374; Ser-381; Ser-297; Ser-397; Ser-451; Ser-475; Ser-494; Ser-495; Ser-496; Ser-501; Ser-505; Thr-253; Thr-265; Thr-267; Thr-269; Thr-293; Thr-386; Thr-400; Thr-408; Thr-469; 및/또는 Thr-517.

[0160] 본 발명자들은 (i) 서열번호 1과 적어도 80%(예컨대, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상 또는 바람직하게는 98% 이상)의 서열 동일성을 가지며; (ii) Arg-Arg 다이펩타이드 서열이 없고; (iii) 적어도 하나의 nnAA 잔기를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제공하고; 이때, 상기 폴리펩타이드는 N-말단 메티오닌을 갖고/갖거나 단량체 형태인 것이다.

[0161] 상기 CRM197 유래의 운반체 폴리펩타이드는 CRM197이 종래 기술(예를 들어, 문헌[Broker et al. 2011 상기 참조], WO2015/117093 등 참조)에서 사용했던 것과 동일한 방식으로 접합을 위해 사용될 수 있지만, nnAA 잔기(들)를 통한 부위-특이적 접합을 허용하는 개선을 갖고 있다. 이들은 일반적으로 폴리펩타이드 다량체를 형성하기 위해 다른 CRM197 또는 CRM197 유래 서브유닛과 결합되기보다는, 단량체 형태로 사용될 것이다. 유사하게, 이들은 일반적으로 적어도 하나의 이황화 가교를, 예컨대, Cys-186과 Cys-201 사이(서열번호 1에 따라 넘버링됨) 및 선택적으로 Cys-461과 Cys-471 사이에 포함할 것이다.

[0162] 본 발명자들은 또한 상기 다양한 운반체 폴리펩타이드 중 임의의 폴리펩타이드가 이의 nnAA 중 적어도 하나를 통해 당류 항원에 접합된 면역원성 접합체를 제공한다. 상기 운반체 폴리펩타이드는 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA 잔기(들)를 통해 폐렴구균의 헵막 당류에 접합시키는데 특히 유용하다. 이러한 방식으로 제조된 면역원성 접합체는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 다가 조성물을 형성하도록 조합될 수 있다.

[0163] 따라서, 본 발명자들은 운반체 폴리펩타이드와 당류 항원을 포함하되, (i) 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖고, 예컨대, 각 X는 pAMF이며; (ii) 상기 당류 항원은 서열번호 4 내의 적어도 하나의 nnAA 잔기를 통해 상기 운반체 폴리펩타이드에 공유 결합된, 면역원성 접합체를 제공한다. 또한, 본 발명자들은 2개 이상의 상기 면역원성 접합체를 포함하는 다가의 약제학적 조성물을 제공한다.

[0164] 따라서, 본 발명자들은 각 접합체가 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 운반체 폴리펩타이드를 포함하는 복수의 상이한 접합체(예를 들어, 상이한 폐렴구균 혈청형)를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0165] 본 발명자들은 또한 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, (i) 상기 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖고; (ii) 상기 당류 항원은 서열번호 4 내의 적어도 하나의 nnAA 잔기를 통해 운반체 폴

리펩타이드에 공유 결합되고; (iii) 상기 당류 항원은 페렴구균 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F 중 임의의 협막 당류인, 면역원성 접합체를 제공한다. 상기 개별 접합체들은 조합되어 본 발명의 다가 약제학적 조성물을 제조할 수 있다.

[0166] 본 발명자들은 또한 본 명세서에 기재된 운반체 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0167] **보강제**

[0168] 본 발명의 약제학적 조성물은 알루미늄염 보강제를 포함할 수 있다. 상기 보강제는 약제학적 조성물 내의 접합체의 면역원성을 향상시킬 수 있다. 상기 조성물 내의 접합체는 알루미늄염 보강제에 흡착될 수 있다.

[0169] 유용한 알루미늄염 보강제는 수산화알루미늄 보강제 및 인산알루미늄 보강제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 보강제는 예를 들어 문헌[Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X.Plenum]의 8장 및 9장에 기술되어 있다.

[0170] 일반적으로 "수산화알루미늄"으로 알려진 보강제는 전형적으로 적어도 부분적으로 결정질인 옥시수산화알루미늄 염이다. 화학식 $Al(OH)_3$ 로 표시될 수 있는 옥시수산화알루미늄은 적외선(IR) 분광법, 특히 1070 cm^{-1} 에서의 흡착 밴드 및 3090 내지 3100 cm^{-1} 에서의 강한 숄더(shoulder)의 존재에 의해(Powell & Newman 9장) $Al(OH)_3$ 과 같은 다른 알루미늄 화합물과 구별될 수 있다. 수산화알루미늄 보강제의 결정도는 절반 높이에서 회절 대역의 폭(WHH)에 의해 반영되며, 결정성이 낮은 입자는 더 작은 미세결정 크기로 인해 더 큰 선폭 증가를 나타낸다. WHH가 증가함에 따라 표면적이 증가하고, WHH 값이 높은 보강제는 항원 흡착 능력이 더 큰 것으로 나타났다. 섬유질 형태(예컨대, 투과 전자 현미경사진에서 관찰됨)는 수산화알루미늄 보강제에 전형적인 것으로서, 예컨대, 직경이 약 2nm 인 바늘 모양의 입자이다. 수산화알루미늄 보강제의 pI는 일반적으로 약 11이고, 즉, 보강제 자체는 생리학적 pH에서 양의 표면 전하를 갖는다. 수산화알루미늄 보강제에 대해 pH 7.4에서 Al^{+++} mg당 1.8 내지 2.6mg 사이의 단백질 흡착능이 보고되어 있다.

[0171] 일반적으로 "인산알루미늄"으로 알려진 보강제는 전형적으로 알루미늄 하이드록시포스페이트이며, 종종 소량의 황산염(즉, 알루미늄 하이드록시포스페이트 황산염)을 추가로 함유한다. 이들은 침전에 의해 수득할 수 있으며, 침전 동안의 반응 조건 및 농도는 염의 하이드록실에 대한 인산염의 치환 정도에 영향을 미친다. 하이드록시포스페이트는 일반적으로 PO_4/Al 몰비가 0.3 내지 1.2 사이이다. 하이드록시포스페이트는 하이드록실기의 존재에 의해 엄밀히 $AlPO_4$ 와 구별될 수 있다. 예를 들어, 3164 cm^{-1} 에서의 IR 스펙트럼 대역(예컨대, 200°C 로 가열했을 때)은 구조적 하이드록실의 존재를 나타낸다(Powell & Newman 9장).

[0172] 인산알루미늄 보강제의 PO_4/Al^{3+} 몰비는 일반적으로 0.3 내지 1.2, 바람직하게는 0.8 내지 1.2, 더욱 바람직하게는 0.95 ± 0.1 일 것이다. 인산알루미늄은 일반적으로 무정형일 것이고, 특히 하이드록시포스페이트 염의 경우 무정형이다. 전형적인 보강제는 $0.6\text{mg Al}^{3+}/\text{ml}$ 가 포함된 0.84 내지 0.92 사이의 PO_4/Al 몰비를 가진 무정형 알루미늄 하이드록시포스페이트이다. 인산알루미늄은 일반적으로 미립자일 것이다(예컨대, 주요 입자가 50nm 범위인, 투과 전자 현미경사진에서 관찰되는 관형 형태). 입자의 전형적인 직경은 임의의 항원 흡착 후 0.5 내지 $20\mu\text{m}$ (예컨대, 약 5 내지 $10\mu\text{m}$) 범위이다. 인산알루미늄 보강제에 대해 pH 7.4에서 Al^{+++} mg당 0.7 내지 1.5mg 단백질 사이의 흡착능이 보고되어 있다.

[0173] 인산알루미늄의 영전하점(point of zero charge: PZC)은 하이드록실 대신 인산염의 치환도에 반비례하며, 이 치환도는 침전에 의해 염을 제조하는데 사용된 반응물의 농도 및 반응 조건에 따라 달라질 수 있다. PZC는 또한 용액 내의 유리 인산염 이온의 농도를 변화시키거나(더 많은 인산염 = 더욱 산성인 PZC), 또는 히스티딘 완충액과 같은 완충액을 첨가(PZC를 더 염기성으로 만들)함으로써 변경된다. 본 발명에 따라 사용된 인산알루미늄은 일반적으로 PZC가 4.0 내지 7.0 사이, 보다 바람직하게는 5.0 내지 6.5 사이, 예를 들어 약 5.7이다.

[0174] 환자에게 투여하기 위한 조성물 내의 알루미늄 이온의 농도는 바람직하게는 2.5 mg/ml 미만이고, 예컨대, 2 mg/ml 이하, 1 mg/ml 이하 등이다. 바람직한 최대 농도는 1.7 mg/ml 이하이다. 본 발명의 조성물에서 Al^{+++} 의 범위

는 0.3-1 mg/ml 또는 0.3 내지 0.5 mg/ml일 수 있다. 최대 0.85 mg/용량이 바람직하다.

- [0175] 용액에서 인산알루미늄 및 수산화알루미늄 보강제는 둘 다 직경이 1 내지 10 μ m인 안정한 다공성 응집체를 형성하는 경향이 있다. 조성물은 수산화알루미늄 보강제 및 인산알루미늄 보강제 모두의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [0176] 조성물이 복수의 집합체를 포함하고, 이들 각각이 알루미늄염 보강제에 흡착되는 경우, 각 집합체는 개별적으로 알루미늄염에 흡착된 후 혼합될 수 있거나, 또는 각각 알루미늄염에 순차적으로 첨가되어 혼합된 집합체 조성물을 형성할 수 있다. 두 가지 접근 방식을 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [0177] **약제학적 조성물용 부형제**
- [0178] 본 발명의 약제학적 조성물은 일반적으로 하나 이상의 약제학적 허용성 부형제(들)를 포함할 것이다. 이러한 부형제에 대한 포괄적인 논의는 문헌[*Handbook of Pharmaceutical Excipients*(ed. Rowe et al.), 6th edition 2009]에서 찾아볼 수 있다.
- [0179] 약제학적 조성물은 바람직하게는 수성 형태, 특히 투여 시점에서 수성 형태이지만, 투여를 위해 수성 형태로 전환될 수 있는 건조 형태(예를 들어, 동결건조물 등)로 존재할 수도 있다.
- [0180] 약제학적 조성물은 완충액 또는 pH 조절제를 포함할 수 있다. 상기 완충액은 인산염 완충액, 아세트산염 완충액, 히스티딘 완충액, 구연산염 완충액, 숙신산염 완충액, Tris 완충액, HEPES 완충액 등으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 완충액 염은 전형적으로 5 내지 20mM 범위에 포함될 것이다.
- [0181] 약제학적 조성물은 예를 들어 장성(tonicity)을 조절하기 위해, 나트륨 염과 같은 생리학적 염을 포함할 수 있다. 염화나트륨(NaCl)이 전형적이고, 1 내지 20 mg/ml, 예컨대, 10 \pm 2 mg/ml 또는 9 mg/ml로 존재할 수 있다. 존재할 수 있는 다른 염은 염화칼륨, 인산이수소 칼륨, 디소듐 포스페이트 무수물, 염화마그네슘, 염화칼슘 등을 포함한다. 다른 유용한 염은 나트륨, 칼륨 또는 암모늄 양이온 및 염화물, 구연산염, 아스코르브산염, 붕산염, 인산염, 중탄산염, 황산염, 티오셀레이트 또는 중아황산염 음이온을 갖는 것일 수 있다.
- [0182] 약제학적 조성물은 아세트산 또는 숙신산과 같은 유기산을 포함할 수 있다. 이것은 완충액 시스템의 일부일 수 있다.
- [0183] 약제학적 조성물은 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알코올을 포함할 수 있다. 약제학적 조성물은 수크로스 또는 글루코스와 같은 당을 포함할 수 있다.
- [0184] 약제학적 조성물은 계면활성제를 포함할 수 있다. 적합한 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80 및 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 표면 활성제는 0.0003% 내지 0.3%(w/w)의 농도, 예컨대, 0.01 내지 0.03%의 농도로 존재한다. 폴리소르베이트 80이 바람직한 계면활성제이다.
- [0185] 약제학적 조성물은 티오머살 또는 2-페녹시에탄올과 같은 보존제를 포함할 수 있다. 조성물은 수은 물질이 실질적으로 없어야 하고(예컨대, 10 μ g/ml 미만), 예컨대, 티오머살 무함유인 것이 바람직하다. 수은을 전혀 포함하지 않는 조성물이 더 바람직하다. 보존제의 내포는 조성물이 알루미늄염 보강제를 포함할 때 특히 유용할 수 있는데, 그 이유는 이들의 불용성은 조성물이 일반적으로 오염된 박테리아 성장을 가릴 수 있는 탁한 외관을 갖는 현탁액임을 의미하기 때문이다. 보존제는 또한 조성물이 1회 이상 사용되어야 하는 경우, 예컨대, 다회용량 바이알에 있는 경우에, 특히 유용하다. 그러나, 종종 약제학적 조성물은 보존제 무함유일 수 있다.
- [0186] 약제학적 조성물은 오스몰농도가 200 mOsm/kg 내지 400 mOsm/kg, 예컨대, 240 내지 360 mOsm/kg 또는 290 내지 310 mOsm/kg일 수 있다.
- [0187] 약제학적 조성물은 전형적으로 pH가 5.0 내지 9.5이고, 예컨대, 5.0 내지 8.0 또는 6.0 내지 8.0이다.
- [0188] 약제학적 조성물은 바람직하게는 비발열성이고, 예컨대, 용량당 1 EU(내독소 단위, 표준 척도) 미만, 바람직하게는 용량당 0.1 EU 미만을 함유한다.
- [0189] 약제학적 조성물은 오스몰농도가 200 내지 400 mOsm/kg, 예컨대, 240 내지 360 mOsm/kg 또는 280 내지 320 mOsm/kg일 수 있다.
- [0190] 약제학적 조성물은 바람직하게는 글루텐이 없는 것이다.
- [0191] 약제학적 조성물은 동물(특히, 인간) 환자에게 투여하기에 적합하며, 따라서 인간 및 수의학적 용도를 모두 포

함한다.

- [0192] 약제학적 조성물은 단위 투여 형태로 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단위 용량은 0.1 내지 1.0ml, 예컨대, 약 0.25ml 또는 바람직하게는 약 0.5ml일 수 있다. 이러한 부피는 인간에게 주사하기에 이상적이다.
- [0193] **접합체 수준**
- [0194] 약제학적 조성물은 복수의 면역원성 접합체를 포함할 수 있다. 현재 허가된 수막구균 접합 백신에는 4개의 상이한 혈청군의 협막 당류가 포함되며, 허가된 폐렴구균 접합 백신에는 7, 10 또는 13개의 상이한 혈청형의 협막 당류가 포함된다. 따라서, 본 발명의 조성물은 예를 들어 3 내지 50개의 상이한 접합체(예를 들어, 14, 15, 20, 21, 24, 25개 또는 그 이상)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 각각의 상기 접합체는 동일한 박테리아 종의 상이한 혈청형 또는 혈청군(예를 들어, 복수의 수막구균 혈청군 또는 복수의 폐렴구균 혈청형)으로부터의 협막 당류를 포함할 수 있다.
- [0195] 약제학적 조성물이 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 경우, 상기 n개의 접합체 내의 운반체 폴리펩타이드의 총량은 용량당 $3n \mu\text{g}$ 이하일 수 있다. 즉, 접합체당 운반체 폴리펩타이드의 평균 양은 $3\mu\text{g}$ 미만이다. 상기 총량은 예를 들어 용량당 $n-2.5n \mu\text{g}$ 일 수 있다.
- [0196] 약제학적 조성물이 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 경우, 상기 n개의 접합체 내의 당류 항원의 총량은 용량당 $4.4n \mu\text{g}$ 이하일 수 있다. 즉, 접합체당 당류의 평균 양은 $4.4\mu\text{g}$ 미만이다. 예를 들어, 총량은 용량당 $0.4n-4.4n \mu\text{g}$, 예컨대, $1.1n-2.2n$ 일 수 있다.
- [0197] 약제학적 조성물이 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 경우, 상기 n개의 접합체를 위한 운반체 폴리펩타이드의 총 농도는 $6n \mu\text{g/ml}$ 이하일 수 있다. 즉, 접합체당 운반체 폴리펩타이드의 평균 농도는 $6 \mu\text{g/ml}$ 미만이다. 예를 들어, 총 농도는 $n-4n \mu\text{g/ml}$ 일 수 있다.
- [0198] 약제학적 조성물이 n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 경우, 상기 n개의 접합체에 대한 당류 항원의 총 농도는 $8.8n \mu\text{g/ml}$ 이하일 수 있다. 즉, 접합체당 당류의 평균 농도는 $8.8 \mu\text{g/ml}$ 미만이다. 총 농도는 예를 들어, $0.8n-8.8n \mu\text{g/ml}$, 예컨대, $2.2n-4.4n \mu\text{g/ml}$ 일 수 있다.
- [0199] 일부 실시형태에서, 본 발명의 다가 약제학적 조성물의 단위 용량에서 접합된 운반체 폴리펩타이드의 총량은 예를 들어 $4-128\mu\text{g}$, 예컨대, $8-64\mu\text{g}$ 또는 $16-48\mu\text{g}$ 일 수 있다. 본 발명의 다가 약제학적 조성물에서 접합된 운반체 폴리펩타이드의 농도는 예를 들어 $8-256 \mu\text{g/ml}$, $16-128 \mu\text{g/ml}$ 또는 $32-96 \mu\text{g/ml}$ 일 수 있다.
- [0200] 일부 실시형태에서, 본 발명의 다가 약제학적 조성물의 단위 용량에서 접합된 당류 항원의 총량은 10 내지 $120 \mu\text{g}$, 예컨대, $20-90\mu\text{g}$, 또는 $30-60\mu\text{g}$ 일 수 있다. 본 발명의 다가 약제학적 조성물에서 접합된 당류 항원의 농도는 $20-240 \mu\text{g/ml}$, 예컨대, $40-180 \mu\text{g/ml}$, 또는 $60-120 \mu\text{g/ml}$ 일 수 있다.
- [0201] **비접합 성분**
- [0202] 진술한 바와 같이, 약제학적 조성물은 복수의 면역원성 접합체, 예컨대, 3 내지 50개의 상이한 접합체(예컨대, 14, 15, 20, 21, 24, 25개 또는 그 이상)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 각각의 상기 접합체는 동일한 박테리아 종의 상이한 혈청형 또는 혈청군으로부터의 협막 당류를 포함할 수 있다.
- [0203] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 비접합 형태의 접합체의 운반체 폴리펩타이드(들)가 없는 것이다. 다른 실시형태에서, 낮은 수준의 비접합된 운반체 폴리펩타이드(들)가 존재하며, 단, 조성물 중 비접합된 운반체 폴리펩타이드(들)의 질량은 조성물 전체의 n개의 면역원성 접합체 내의 운반체 폴리펩타이드(들)의 질량의 10% 미만(예를 들어 5% 미만 또는 2% 미만)이어야 한다.
- [0204] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 비접합 형태의 접합체의 당류가 없는 것이다. 다른 실시형태에서는 낮은 수준의 비접합 당류가 존재하며, 단, 조성물 내 비접합 당류의 질량은 n개 면역원성 접합체가 있는 조성물 내의 당류의 총 질량의 10% 미만(예컨대, 5% 미만 또는 2% 미만)이어야 한다.
- [0205] **용기, 전달 장치 등**
- [0206] 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물은 멸균 용기, 전달 장치 등에 포장될 수 있다. 멸균성은 용기를 기밀성이 되도록 밀봉함으로써 유지할 수 있다. 적합한 용기는 바이알, 주사기, 분무기, 분사기, 흡입기, 피부 패치 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 바이알 및 주사기가 바람직하다.
- [0207] 면역원성 조성물은 종종 바이알 내에 함유된다. 바이알은 바람직하게는 플라스틱 재료 또는 바람직하게는 유리

로 만들어진다. 바이알은 충전된 후 밀봉되고, 밀봉은 사용 시점에 파괴될 수 있다. 바이알은 여기에 조성물이 첨가되기 전에 바람직하게는 멸균되고, 그 다음 밀봉된다. 라텍스 감수성 환자의 문제를 방지하기 위해, 바이알은 라텍스가 없는 마개로 밀봉할 수 있으며 모든 포장재에 라텍스가 없는 것이 바람직하다. 바이알은 이상적으로는 단일 단위 용량의 조성물을 포함하지만, 때로는 1회 이상의 용량('다회용량' 바이알), 예컨대, 10회 용량을 포함할 수 있다. 바람직한 바이알은 무색 유리로 제조된 것이다.

- [0208] 바이알은 주사기와 바이알 사이에 물질의 이동(양방향으로)을 촉진하기 위해 주사기가 캡 내로 삽입될 수 있도록 개조된 캡(예컨대, Luer lock)을 가질 수 있다. 바이알에서 주사기를 제거한 후, 바늘을 부착하고 조성물을 대상체에게 투여할 수 있다. 상기 캡은 씰(seal) 또는 커버(cover) 내에 위치하여, 씰 또는 커버를 제거한 후 캡에 접근할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 바이알에는 특히 다회용량 바이알의 경우, 내용물을 무균 제거할 수 있게 하는 캡을 가질 수 있다.
- [0209] 조성물은 대상체에게 투여할 준비가 된 전달 장치 내에 함유될 수 있다. 조성물은 사용 지점에서(예컨대, 바이알로부터) 전달 장치로 전달될 수 있거나, 또는 제조 단계에서 전달 장치에 투입될 수 있다(예컨대, 예비충전된 주사기 형태).
- [0210] 본 발명에 사용되는 주사기는 유리 또는 플라스틱(예를 들어, 사이클로올레핀 중합체 또는 사이클로올레핀 공중합체로 제조됨)으로 제조될 수 있다. 주사기(특히 유리 주사기)는 실리코화된 주사기일 수 있다. 실리코화되지 않은 주사기도 사용될 수 있으며, 예컨대, PLAJEX™ 주사기에서 이용할 수 있는 Terumo의 i-Coating™ 시스템을 사용하거나, 또는 에틸렌-테트라플루오로에틸렌(ETFE) 공중합체를 가진 Daikyo CZ™ 주사기를 사용하거나, 또는 퍼플루오로폴리에테르(PFPE)를 가진 TriboGlide™ 주사기를 사용할 수 있다. 실리코화 대신 탄소 필름을 사용할 수 있다(예컨대, JP2001190665 참조). 실리코이 없는 주사기는 또한 JP2011212183에 개시되어 있다. EP-A-0375778에 개시된 바와 같은 플런저 스톱퍼를 포함하는 실리코화되지 않은 주사기가 사용될 수 있는데, 즉, 스톱퍼가 낮은 동적 마찰 계수의 열가소성 수지 층에 의해 적어도 부분적으로 덮인 열가소성 탄성중합체 층을 갖는 경우에 사용될 수 있다.
- [0211] 조성물이 주사기 내에 함유된 경우, 주사기는 주사기의 내용물을 대상체 또는 용기에 주입하기 위해 주사기에 부착된 바늘을 가질 수 있다. 주사기는 바늘이 이미 부착된 채로 공급될 수 있다. 바늘이 부착되지 않은 경우에는, 조립 및 사용을 위해 주사기와 함께 별도의 바늘이 공급되거나 바늘이 별개로 공급될 수 있다. 이러한 바늘은 사용 시 멸균되어야 하며 덮개가 씌워져 있을 수 있다. 안전 바늘이 사용될 수 있다. 1인치 23게이지, 1인치 25게이지 및 5/8인치 25게이지 바늘이 전형적이다. 1/2 내지 1 1/2인치 22 내지 25게이지 바늘이 사용될 수 있다. 주사기와 바늘이 별도로 포장된 경우, 바늘에는 부틸 고무 실드가 장착된 것이 바람직하다.
- [0212] 기록 보관을 용이하게 하기 위해 주사기에는 내용물의 로트 번호 및 유통기한이 인쇄될 수 있는 박리 라벨이 제공될 수 있다. 주사기의 플런저에는 스톱퍼가 있어 흡인 중에 플런저가 실수로 제거되는 것을 방지할 수 있다. 주사기는 라텍스 고무 캡 및/또는 플런저를 가질 수 있지만, 예를 들어 라텍스가 없는 고무, 예컨대, 라텍스가 없는 클로로부틸 고무 또는 라텍스가 없는 아이소프렌 브로모부틸 고무가 사용될 수 있다. 주사기는 일반적으로 바늘을 부착하기 전에 팁(tip)을 밀봉하기 위한 팁 캡을 가지며, 팁 캡은 부틸 고무, 예컨대, 라텍스가 없는 아이소프렌 브로모부틸 고무로 제조되는 것이 바람직하다. 유용한 주사기는, 예컨대, 상표명 "Tip-Lok"™으로 판매되는 주사기이다.
- [0213] 용기는 예를 들어 아동에게 용이하게 전달하기 위해, 절반 용량 부피를 나타내도록 표시될 수 있다. 예를 들어, 0.5ml 용량이 들어있는 주사기에는 0.25ml 부피를 나타내는 표시가 있을 수 있다. 주사기 자체는 용량보다 더 큰 부피를 가질 수 있고, 예컨대, 0.5ml 용량의 약제학적 조성물을 함유하기 위해 1ml 주사기가 사용될 수 있다. 일회용 또는 사전충전된 주사기는 일반적으로 단회 용량의 백신을 함유한다.
- [0214] 유리 용기(예를 들어, 주사기 또는 바이알)가 사용되는 경우, 소다 석회 유리보다는 붕규산 유리로 제조되는 것이 바람직하다.
- [0215] 용기는 백신의 세부 사항, 예컨대, 투여 지침, 백신 내의 항원에 대한 세부 정보 등을 포함하는 인쇄물과 함께 포장될 수 있다(예컨대, 동일한 상자 내에). 지침서는 또한 경고, 예컨대, 백신 접종 후 아나필락시스 반응의 경우 쉽게 사용할 수 있는 아드레날린 용액을 비치하도록 하는 경고를 담고 있을 수 있다. 여러 용기가, 예컨대, 동일한 박스 내에 함께 포장될 수 있다.
- [0216] 약제학적 조성물은 용기당(예를 들어, 주사기당 또는 바이알당) 단회 용량을 갖는, 단위 용량 형태로 제공될 수 있다. 각 단위 용량을 개별적으로 제조하기 보다는 벌크 조성물을 제조하고 단위 용량을 추출하여 용기 내에 개

별적으로 포장한다. 따라서, 예를 들어, 복수의 단위 용량이 벌크로부터 추출되고 각 단위 용량이 별도의 용기, 예컨대, 주사기 또는 바이알 내에 배치된다.

[0217] **면역 반응 상승**

[0218] 면역원성 접합체는 포유동물 대상체에게 투여되어 그 접합체 내의 항원에 대한 방어 면역 반응을 유도해낼 수 있다. 상기 접합체는 약제학적 조성물의 형태로 투여될 것이다. 상기 조성물은 본 명세서의 다른 곳에 설명된 복수의 면역원성 접합체를 포함할 수 있으므로, 방어 면역 반응은 많은 항원에 대해 동시에 유도될 수 있다.

[0219] 따라서, 본 발명자들은 항원(들)의 접합체를 대상체에게 투여함으로써 포유 동물 대상체에서 하나 이상의 항원(들)에 대한 방어 항체 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0220] 본 발명자들은 또한 방어 항체 반응을 유도하는데 사용하기 위한, 본 명세서에 개시된 접합체를 제공한다.

[0221] 본 발명자들은 또한 방어 항체 반응을 유도하기 위한 약제의 제조에 사용되는 본 명세서에 개시된 바와 같은 접합체의 용도를 제공한다.

[0222] 본 발명자들은 또한 (i) 본 발명의 다가 조성물을 대상체에게 투여함으로써 포유동물 대상체에서 복수의 항원(들)에 대한 방어 항체 반응을 유도하는 방법, (ii) 방어 항체 반응을 유도하는데 사용하기 위한 본 발명의 다가 조성물, 및 (iii) 복수의 항원에 대한 방어 항체 반응을 유도하기 위한 다가 약제학적 조성물의 제조에 사용되는, 본 명세서에 개시된 바와 같은 다가 접합체의 용도를 제공한다.

[0223] 방어 면역 반응을 유도하는 능력은 상기 접합체를, 예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니에에 의해 유발된 침습적 질환을 예방하고, 스트렙토코커스 뉴모니에에 의해 유발된 중이염을 예방하며, 스트렙토코커스 뉴모니에에 의해 유발된 폐렴을 예방하기 위한 능동 면역을 제공하고, 침습적 질환을 예방하기 위해 나이세리아 메닌지티디스에 대한 노출 위험이 있는 대상체를 능동 면역화하는 등에 사용될 수 있다.

[0224] 약제학적 조성물은 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 주사제, 예컨대, 액체 용액 또는 현탁액으로 제조될 수 있다. 근육내 투여를 위한 주사제가 전형적이다. 약 0.5ml의 주사 부피가 인간에게 바람직하다. 따라서, 바람직한 단위 용량 부피는 약 0.5ml이다. 근육내 주사에 의한 투여는, 예컨대, 영아의 경우 허벅지의 전외측 측면, 또는 유아, 아동 및 성인의 경우 상완 삼각근에 수행되는 것이 전형적이다.

[0225] 접합체는 전형적으로 다회 용량 일정에 따라 투여될 것이다. 다회 용량은 1차 예방접종 일정 및/또는 추가 예방접종 일정으로 사용될 수 있다. 1회 용량 이상(일반적으로 2회 용량)의 투여가 면역학적으로 순수한 환자에게 특히 유용하다. 다회 용량은 전형적으로 적어도 1주 간격(예를 들어, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 6주, 약 8주, 약 10주, 약 12주 등)으로 투여될 것이다.

[0226] **일반**

[0227] 용어 "포함하는(comprising)"은 "포함하는(including)" 뿐만 아니라 "이루어지는"을 포괄하며, 예컨대, X를 "포함하는" 조성물은 X로만 이루어질 수 있거나, 예를 들어 어떤 추가 성분, 예컨대, X + Y를 포함할 수 있다.

[0228] 수치 값 x와 관련된 용어 "약"은 선택적이며, 예를 들어 $x \pm 10\%$ 를 의미한다.

[0229] "실질적으로"라는 단어는 예를 들어 "완전히"를 배제하지 않으며, 예컨대, Y가 "실질적으로 없는" 조성물은 Y가 완전히 없을 수 있다. 필요한 경우 "실질적으로"라는 단어는 본 발명의 정의에서 생략될 수 있다.

[0230] 2개의 아미노산 서열의 정황에서 용어 "서열 동일성"은 비교 창을 통해 최대 대응을 위해 정렬되고 비교될 때, 서열 비교 알고리즘(예컨대, BLASTP)을 사용하여 측정된 경우 동일하거나 동일한 아미노산 잔기의 특정 백분율을 갖는 2개의 서열을 의미한다. 동일성 백분율은 서열번호 1 또는 2에 제시된 참조 서열과 같은 본 명세서에 개시된 전체 길이의 참조 서열에 대해 결정된다. 본 명세서에 제공된 서열 동일성을 계산하는 방법은 단어 길이 (W) 3, 기대값(E) 10으로 설정된 디폴트, 및 BLOSUM62 점수 행렬을 갖는 BLASTP 프로그램이다(예를 들어, 문헌 [Henikoff & Henikoff, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10915] 참조). 예를 들어, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi의 WWW 또는 다른 곳에서 입수할 수 있는 BLAST 정렬 도구를 참조한다.

[0231] 본 명세서에 사용된 용어 "저급 알킬"은 달리 명시되지 않는 한, 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 포화 직쇄형 또는 분지형 탄화수소, 즉, C₁ 내지 C₆ 알킬을 의미한다. 특정 실시형태에서, 저급 알킬기는 1차, 2차 또는 3차 탄화수소이다. 이 용어는 치환된 모이어티 및 비치환된 모이어티를 모두 포함한다. 또한, US-2014/0066598 참조. 용어 "저급 알킬렌"은 저급 알킬의 알킬렌 라디칼을 의미한다.

- [0232] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 실무자들은 특히 문헌[Green & Sambrook(eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2012) 및 Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*(Supplement 99), John Wiley & Sons, New York(2012) 및 Plotkin, S.A., Orenstein, W.A. & Offit, P.A., *Vaccines*, 6th ed, Elsevier, London(2013)]의 지시를 따른다.
- [0233] 무세포 합성 방법은 문헌[Spirin & Swartz(2008) *Cell-free Protein Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany]에 기술되어 있다. 무세포 합성을 사용하여 비천연 아미노산을 단백질에 통합시키는 방법은 문헌 [Shimizu et al.(2006) *FEBS Journal*, 273, 4133-4140 및 Chong(2014) *Curr Protoc Mol Biol*. 108: 16.30.1-11]에 기술되어 있다.
- [0234] 일부 실시형태에서, 본 발명은 24개의 페렘구균 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F(WO2018/126229에 예시됨) 각각으로부터의 접합체에 대한 운반체 폴리펩타이드로서 서열번호 3이 사용되는 조성물을 포함하지 않는다. 보다 일반적으로, 일부 실시형태에서, 본 발명은 다가 조성물에서 각 접합체에 대한 운반체 폴리펩타이드로서 서열번호 3이 사용되는 조성물을 포함하지 않는다.
- [0235] **열거된 실시형태**
- [0236] 실시형태 I-1. 약제학적 조성물을 함유하는 멸균 용기로서, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 멸균 용기.
- [0237] 실시형태 I-2. 약제학적 조성물을 함유하는 밀봉 용기로서, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 밀봉 용기. 밀봉에 적합한 용기는 예를 들어 바이알을 포함한다. 내용물은 밀봉 지점에서 멸균성인 것이 바람직하다.
- [0238] 실시형태 I-3. 바이알과 같은 멸균 유리 용기인, 실시형태 I-1 또는 I-2의 용기.
- [0239] 실시형태 I-4. 약제학적 조성물을 함유하는 전달 장치로서, 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 전달 장치.
- [0240] 실시형태 I-5. 주사기인, 실시형태 I-1 또는 I-2의 용기 또는 실시형태 I-4의 전달 장치.
- [0241] 실시형태 I-6. 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 알루미늄염 보강제를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 알루미늄염 보강제는 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄 보강제인, 약제학적 조성물.
- [0242] 실시형태 I-7. 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 인산알루미늄 보강제를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 조성물 중 알루미늄 이온의 농도는 2.5 mg/ml 이하인, 약제학적 조성물.
- [0243] 실시형태 I-8. 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 약제학적 조성물의 부피가 0.25 내지 1.25ml인, 약제학적 조성물.
- [0244] 실시형태 I-9. 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 보존제를 포함하는 약제학적 조성물로서, 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 약제학적 조성물.
- [0245] 실시형태 I-10. 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 보존제 무함유 약제학적 조성물로서, 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되는, 보존제 무함유 약제학적 조성물.

- [0246] 실시형태 I-11. 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 오스몰농도가 200 내지 400 mOsm/kg인, 약제학적 조성물.
- [0247] 실시형태 I-12. 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 적어도 1종의 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; (ii) 상기 적어도 1종의 부형제는 염화나트륨, 숙신산 및 폴리소르베이트 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.
- [0248] 실시형태 I-13. n개의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는, 약제학적 조성물로서,
- [0249] (i) n개의 면역원성 접합체는 각각 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고;
- [0250] (ii) n은 3 내지 50의 정수이고;
- [0251] (iii) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 운반체 폴리펩타이드의 총량은 용량당 $3n \mu\text{g}$ 이하이고;
- [0252] (iv) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 운반체 폴리펩타이드의 총 농도는 $6n \mu\text{g/ml}$ 이하이며;
- [0253] (v) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 당류 항원의 총량은 용량당 $3n \mu\text{g}$ 이하이고;
- [0254] (vi) 상기 n개의 면역원성 접합체 중의 당류 항원의 총 농도는 $6n \mu\text{g/ml}$ 이하이고;
- [0255] (vii) 접합체당 운반체 폴리펩타이드의 평균 양은 용량당 1 내지 $4\mu\text{g}$ 이고;
- [0256] (viii) 접합체당 운반체 폴리펩타이드의 평균 농도는 2 내지 $8 \mu\text{g/ml}$ 이며;
- [0257] (ix) 접합체당 당류 항원의 평균 양은 용량당 1 내지 $4\mu\text{g}$ 이고;
- [0258] (x) 접합체당 당류 항원의 평균 농도는 2 내지 $8 \mu\text{g/ml}$ 이고;
- [0259] (xi) 상기 조성물에는 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)가 없고;
- [0260] (xii) 상기 조성물은 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)를 함유하되, 상기 조성물 중의 비접합 형태의 운반체 폴리펩타이드(들)의 질량은 상기 n개의 면역원성 접합체에 존재하는 상기 운반체 폴리펩타이드의 질량의 10% 미만이고;
- [0261] (xiii) 상기 조성물에는 비접합 형태의 당류 항원이 없으며; 그리고/또는
- [0262] (xiv) 상기 조성물은 비접합 형태의 당류 항원 중 적어도 하나를 함유하되, 상기 조성물 중의 비접합 형태의 당류 항원의 총 질량은 상기 n개의 면역원성 접합체에 존재하는 상기 당류 항원의 총 질량의 10% 미만인, 약제학적 조성물.
- [0263] 실시형태 I-14. 약제학적 조성물의 복수의 단위 용량을 제조하는 방법으로서, (i) 상기 약제학적 조성물은 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체를 포함하되, 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고, (ii) 상기 방법은 상기 면역원성 접합체를 포함하는 벌크 조성물을 제조하는 단계 및 상기 벌크 조성물로부터의 개별 단위 용량을 복수의 개별 용기 내로 포장하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0264] 실시형태 I-15. 약제학적 조성물을 제조하는 방법으로서, 상기 약제학적 조성물은 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체 및 알루미늄염 보강제를 포함하되, (i) 각 면역원성 접합체는 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하고, (ii) 상기 당류 항원은 상기 운반체 폴리펩타이드에 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 비천연 아미노산 잔기를 통해 공유 결합되고; 상기 방법은 (A) 상기 각 면역원성 접합체를 알루미늄염 보강제에 별개로 흡착시킨 다음, 개별적으로 흡착된 접합체를 함께 혼합하는 단계 또는 (B) 상기 각 면역원성 접합체를 상기 알루미늄염 보강제에 순차적으로 흡착시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0265] 실시형태 I-16. (i) 서열번호 1과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고; (ii) Arg-Arg 다이펩타이드 서열이 없으며; (iii) 적어도 하나의 mAA 잔기를 포함하는, 아미노산 서열을 포함하는 운반체 폴리펩타이드.

- [0266] 실시형태 I-17. (i) 서열번호 1과 적어도 80%의 서열 동일성을 갖고 (ii) 하기 아미노산 잔기 중 하나 이상에서 nnAA 치환을 포함하는 아미노산 서열(서열번호 1에 따라 넘버링됨)을 포함하는 운반체 폴리펩타이드: Asp-211; Asp-295; Asp-352; Asp-392; Asp-465; Asp-467; Asp 507; Asp 519; Asn 296; Asn 359; Asn 399; Asn 481; Asn 486; Asn 502; Asn 524; Glu 240; Glu 248; Glu 249; Glu 256; Glu 259; Glu 292; Glu 362; Gln 252; Gln 287; Lys 212; Lys 218; Lys 221; Lys 229; Lys 236; Lys 264; Lys 299; Lys 385; Lys 456; Lys 474; Lys 498; Lys 516; Lys 522; Lys 534; Arg 377; Arg 407; Arg 455; Arg 460; Arg 462; Arg 472; Arg 493; Ser 198; Ser 200; Ser 231; Ser 233; Ser 239; Ser 261; Ser 374; Ser 381; Ser 297; Ser 397; Ser 451; Ser 475; Ser 494; Ser 495; Ser 496; Ser 501; Ser 505; Thr 253; Thr 265; Thr 267; Thr 269; Thr 293; Thr 386; Thr 400; Thr 408; Thr-469; 및/또는 Thr 517.
- [0267] 실시형태 I-18. 실시형태 I-16 또는 I-17에 있어서, 서열번호 1의 Arg-193이 Asn과 같은 상이한 아미노산으로 치환된, 운반체 폴리펩타이드.
- [0268] 실시형태 I-19. 실시형태 I-16 또는 I-17 또는 I-18의 운반체 폴리펩타이드가 상기 운반체 폴리펩타이드 내의 nnAA 잔기를 통해 항원에 접합되어 있는, 면역원성 접합체.
- [0269] 실시형태 I-20. 운반체 폴리펩타이드 및 당류 항원을 포함하는 면역원성 접합체로서, (i) 운반체 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 상기 당류 항원은 서열번호 4 내의 적어도 하나의 nnAA 잔기를 통해 상기 운반체 폴리펩타이드에 공유 결합되는, 면역원성 접합체.
- [0270] 실시형태 I-21. 실시형태 I-20에 따른 2가지 이상의 상이한 면역원성 접합체를 포함하는, 억제학적 조성물.
- [0271] 실시형태 I-22. 운반체 폴리펩타이드가 4 내지 9개의 nnAA 잔기를 포함하는, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0272] 실시형태 I-23. 적어도 하나의 nnAA가 상기 운반체 폴리펩타이드의 천연 서열 중의 라이신 대신에 치환되는, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0273] 실시형태 I-24. 상기 운반체 폴리펩타이드가 서열번호 1과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0274] 실시형태 I-25. 적어도 하나의 nnAA가 서열번호 1 또는 2의 K24, K33, K37, K39, K212, K214, K227, K244, K264, K385, K522 및/또는 K526 대신에 치환되는, 실시형태 I-24의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0275] 실시형태 I-26. 상기 운반체 폴리펩타이드가 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0276] 실시형태 I-27. 상기 nnAA가 2-아미노-3-(4-(아지도메틸)페닐)프로판산인, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0277] 실시형태 I-28. 상기 항원이 아지도기를 통해 상기 nnAA에 접합된 알킨기를 갖는, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0278] 실시형태 I-29. 상기 항원이 박테리아 혐막 당류; 예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*), 나이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*) 및 포르피로모나스 진지발리스로 이루어진 균으로부터 선택되는 박테리아로부터의 혐막 당류인, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0279] 실시형태 I-30. 상기 항원이 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 균으로부터 선택된 스트렙토코커스 뉴모니애 혈청형의 혐막 당류인, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0280] 실시형태 I-31. 상기 접합체(들) 중의 운반체 폴리펩타이드에 대한 당류의 비율(w/w)이 1보다 큰, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0281] 실시형태 I-32. 상기 운반체 폴리펩타이드가 3개 이상의 nnAA 잔기를 포함하고, 상기 접합체가 분자량이 적어도 500kDa인, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.

- [0282] 실시형태 I-33. 상기 접합체가 분자량이 900kDa 내지 5MDa인, 상기 임의의 실시형태의 용기, 장치, 조성물, 방법, 폴리펩타이드 또는 접합체.
- [0283] 실시형태 I-34. 상기 억제학적 조성물이,
- [0284] 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 2가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;
- [0285] 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 14가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;
- [0286] 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 15가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;
- [0287] 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 20가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;
- [0288] 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 21가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;
- [0289] 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 24가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;
- [0290] 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 13, 14, 15B, 16, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 31 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 25가지 이상의 상이한 페렴구균 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체;
- [0291] 혈청군 A, C, W135, X 및 Y로 이루어진 군으로부터 선택되는 4개 이상의 상이한 수막구균 혈청군으로부터의 협막 당류의 접합체; 또는
- [0292] 혈청형 K1, K2, K3, K4, K5 및 K6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 2가지 이상의 상이한 포르피로모나스 진지발리스 혈청형으로부터의 협막 당류의 접합체
- [0293] 를 포함하는, 실시형태 I-1 내지 I-15 또는 실시형태 I-21 내지 I-33 중 어느 하나의 용기, 장치, 조성물 또는 방법.
- [0294] 실시형태 I-35. 대상체에서 항원에 대한 면역방어 항체 반응을 유도하는 방법으로서, 비경구 투여에 적합한 부형제에서 실시형태 I-6 내지 I-13 또는 실시형태 I-21 내지 I-34 중 어느 하나의 억제학적 조성물, 또는 실시형태 I-19 내지 I-33 중 어느 하나에 따른 면역원성 접합체를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0295] **실시예**
- [0296] 본 발명은 하기 실시예에 설명된다. 재료, 방법 및 실시예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도는 없다. 수많은 변형, 변화, 및 치환이 본 발명을 벗어남이 없이 본 기술분야의 기술자에 의해 일어날 것이다. 실시예는 달리 상세하게 기술된 경우를 제외하고는 본 기술분야의 기술자에게 잘 알려진 통상적인 기술을 사용하여 수행된다.
- [0297] **W02018/126229의 실시예**
- [0298] W02018/126229의 실시예는 단일 부위 eCRM 모이어티(예컨대, K11TAG)의 합성을 아주 상세하게 설명한다. 이들은 무세포 단백질 합성(CFPS) 추출물에서 발현되었고, 천연 Lys 대신 pAMF가 통합되었다.
- [0299] 폴리펩타이드당 복수의 nnAA를 함유하는 CRM의 변이체가 또한 단백질당 다양한 다른 수의 Lys→pAMF 치환을 가지면서 발현되었다. 일반적으로 더 많은 수의 치환은 더 높은 MW의 접합체를 초래하는 운반체를 제공하였지만, 상기 운반체는 용해도가 더 낮은 것으로 발견되었다. 6개의 pAMF 잔기를 가진 운반체는 일반적으로 양호한 용해

도(>>50 mg/ml) 및 면역원성을 모두 제공하였다. 상기 높은 용해도는 천연 서열 내의 하전된 Lys 잔기의 소수성 pAMF 잔기로의 대체가, 소수성이 이미 용해도에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있는 단백질인 CRM197의 소수성을 증가시켰기 때문에 놀라운 것이었다. 따라서, 하전성 잔기가 상실된 경우 불용성을 유발함이 없이 공지된 CRM197 접합체에 사용되었던 동일한 부착 부위(즉, Lys 잔기)를 유지하는 것이 가능한 것으로 밝혀졌다.

[0300] 특히 유용한 6개의 Lys→pAMF 치환 세트는 K34, K213, K245, K265, K386 및 K527(서열번호 3에 따라 넘버링됨)을 사용함으로써 관찰되었다. pAMF 치환 부위의 상기 조합은 특히 위치 K245 및 K527에서의 개별 치환이 비교적 불량한 발현 수준을 유도하였기 때문에 놀라운 정도로 효과적인 것이다.

[0301] 이러한 6개 치환 세트는 서열번호 1의 잔기 192-193에서 Arg-Arg 다이펩타이드의 붕괴(RR→RN)와 조합되어, 각 X가 pAMF인 서열번호 4를 제공할 수 있다.

[0302] W02018/126229의 실시예는 메타-과요오드산 나트륨을 사용한 당류 활성화, DBCO를 사용한 과요오드산-산화된 다당류 유도체화, CDAP를 사용한 당류 활성화 및 eCRM과 당류-DBCO의 접합에 대한 일반적인 프로토콜을 추가로 설명한다. 또한, 앞서 참조에 의해 편집된 미국 일련 번호 제62/693,978호를 참조한다.

[0303] **다가 면역원성 조성물**

[0304] 24가지 폐렴구균 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F 각각에 대한 접합체의 조합은 각 접합체의 운반체 폴리펩타이드로서 서열번호 4의 CRM197 유도체(X=pAMF)를 사용하여 제조하였다. 이러한 다가 조성물의 면역원성은 7 마리 토끼 그룹에서 3 회 용량 일정을 사용하여 0.25ml 백신을 근육내 주사하여 확인하였다. 각 용량에는 24µg의 당류(혈청형당 1µg)가 포함되어, 96 µg/ml의 농도를 제공하였다.

[0305] 그 다음, 32가지 폐렴구균 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23A, 23B, 23F, 31, 33F, 35B 각각에 대한 접합체의 조합을 제조하였고, 면역원성은 유사한 방식으로 확인하였다.

[0306] 비교 목적을 위해, 비접합 혈청형 6A 다당류가 보충된 23가 Pneumovax™ 백신으로 제조된 24가 비접합 백신과 함께 13가 Prevnar™ 접합 백신도 검사하였다. 상기 3 가지 조성물은 혈청형당 동등한 다당류 용량을 가졌고 (Prevnar™이 이중 투여량을 포함한 6B는 제외함), 즉, Prevnar™ 및 Pneumovax™은 희석 단계를 수반하였다. 3 가지 조성물 모두 인산알루미늄 보강제(용량당 60µg Al⁺⁺⁺)를 포함했으며, 즉, 상기 보강제를 Pneumovax™에 첨가하는 것을 수반하였다. 상기 조성물은 보존제를 포함하지 않았다.

[0307] 24가 접합체 조성물은 11개의 추가 혈청형 유래의 헵막 당류를 더 포함할지라도, 승인된 Prevnar-13™ 백신보다 적은 양의 운반체 폴리펩타이드를 포함하였다. 24가 접합체 조성물에서 헵막 당류 대 운반체 폴리펩타이드의 총 중량비는 Prevnar™에서 관찰되는 것의 약 2배였다.

[0308] IgG 및 OPA 반응은 토끼에서 측정하였다. 3차 투여 후, 상기 두 반응은 모두 비접합 백신을 투여받은 토끼보다 상기 두 접합 백신을 투여받은 토끼에서 훨씬 더 컸다. 또한, 24가 조성물을 사용한 IgG 및 OPA 반응은 승인된 백신에 포함된 13가지 혈청형에서 Prevnar™를 사용하여 달성한 반응과 비슷했지만, Prevnar™에 포함되지 않은 11가지 혈청형에 대해서는 더 우수했다. 놀랍게도, 24가 조성물을 사용하는 경우 에피토프 억제제를 유도한 운반체에 대한 증거는 전혀 없었다.

[0309] 도 1은 다당류/명반 제형 및 Prevnar-13™에 상대적인, 32가 접합체 조성물에서 32개 혈청형 각각에 대한 기하 평균 역가를 제공한다.

[0310] 다가 접합체 조성물은 단위 용량 형태로 쉽게 분배될 수 있도록 예비충진된 멸균 주사기에 유용하게 포장될 수 있으며, 그 다음 바이알의 내용물을 주사용 주사기 등에 옮길 필요없이 사용 지점에서 투여될 수 있다.

[0311] **CRM197에서 치환가능한 위치**

[0312] W02018/126229에 개시된 작업을 기반으로, 천연 CRM197 서열(서열번호 1) 내의 다양한 Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Ser 및 Thr 잔기를 이들의 코돈을 TAG로 돌연변이시키고 이 코돈이 nnAA를 통합시킨 tRNA에 의해 인식되는 무세포 시스템에서 25°C 하에 상기 단백질을 발현시킴으로써 pAMF에 의해 개별적으로 대체시켰다. 돌연변이 폴리펩타이드는 N-말단 메티오닌 및 Gly-Ser-Gly 트라이펩타이드 링커를 통해 부착된 하류 헥사히스티딘 태그와 함께 발현되었다. Asn270-Ile289, Ala320-Glu349 및 Phe410-His449 내의 잔기는 이들 영역에서 인식된 T 세포 에피토프 때문에 피했다(상기 참조).

[0313] 발현 효율은 총 단백질 및 가용성 단백질 둘 다를 조사하면서 돌연변이 단백질 내로 ¹⁴C-Leu의 통합을 점검하여 평가하였다. 일반적으로, CRM197의 촉매 도메인 내의 돌연변이는 미변형 CRM197 서열에 비해 발현 수준을 감소시켰고, 최상의 발현 수준을 가진 돌연변이는 일반적으로 촉매 도메인의 말단을 묘사하는 데 사용될 수 있는 Arg-193의 하류 치환을 수반하였다.

[0314] 최상의 72개의 돌연변이체가 총 단백질 및 가용성 단백질 모두에서 증가된 발현 수준을 나타내었고, 서열번호 1에 따라 넘버링된 하기 잔기들에서 치환을 갖고 있었다: Ser-198, Ser-200, Asp-211, Lys-212, Lys-218, Lys-221, Lys-229, Ser-231, Ser-233, Lys-236, Ser-239, Glu-240, Glu-248, Glu-249, Gln-252, Thr-253, Glu-256, Glu-259, Ser-261, Lys-264, Thr-265, Thr-267, Thr-269, Gln-287, Glu-292, Thr-293, Asp-295, Asn-296, Ser-297, Lys-299, Asp-352, Asn-359, Glu-362, Ser-374, Arg-377, Ser-381, Lys-385, Thr-386, Asp-392, Ser-397, Asn-399, Thr- 400, Arg-407, Thr-408, Ser-451, Arg-455, Lys-456, Arg-460, Arg-462, Asp-465, Asp-467, Thr-469, Arg-472, Lys-474, Ser-475, Asn-481, Asn-486, Arg-493, Ser-494, Ser-495, Ser-496, Lys-498, Ser-501, Asn-502, Ser-505, Asp-507, Lys- 516, Thr-517, Asp-519, Lys-522, Asn-524 및 Lys-534.

[0315] 본 명세서에 기술된 실시형태는 단지 예시로서 제공되며, 실시형태에 대한 다양한 대안은 본 명세서에 기술된 실시형태를 실행하는 데 있어서 배제되지 않는다.

[0316] [서열목록]

서열번호 1 (천연 CRM197)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVT
YPLGTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFE
TRGKRQGDAMYEMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQ
TALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALS
SLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKI
TAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKSTHISVNGRKRIRMCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSSEKIHSNEI
SSDSIGVLGYQKTVDHKVNKSLSLFFFEIKS

서열번호 2 (Arg-Asn 치환을 갖는 CRM197)

GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVT
YPLGTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINFE
TRGKRQGDAMYEMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGP IKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQ
TALEHPELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALS
SLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKI
TAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKSTHISVNGRKRIRMCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSSEKIHSNEI
SSDSIGVLGYQKTVDHKVNKSLSLFFFEIKS

서열번호 3 (6개의 바람직한 nnAA 부위 및 N-말단 Met 을 갖는 CRM197)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV
TYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINF
ETRKRQGDAMYEMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDXTKTKIESLKEHGP IKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFH
QTALEHPELSELXTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIAL
SSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKI
ITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKSTHISVNGRKRIRMCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSSEKIHSNEI
ISSDSIGVLGYQKTVDHKVNKSLSLFFFEIKS

서열번호 4 (Arg-Asn 치환^a, 6개의 바람직한 nnAA 부위, 및 N-말단 Met 을 갖는 CRM197)

MGADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQXGIQKPKSGTQGNYYDDWKEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV
TYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPPAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEINF
ETRKRQGDAMYEMAQACAGNRVRRSVGSSLSCINLDWDVIRDXTKTKIESLKEHGP IKNKMSESPNKTVSEEKAXQYLEEFH
QTALEHPELSELXTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIAL
SSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHXTQPFLHDGYAVSWNTVEDSIIRTFQGESGHDIKI
ITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKSTHISVNGRKRIRMCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVGHANLHVAFHRSSSEKIHSNEI
ISSDSIGVLGYQKTVDHKVNKSLSLFFFEIKS

[0317]

서열번호 5 (헤모필루스 인플루엔자 단백질 D)

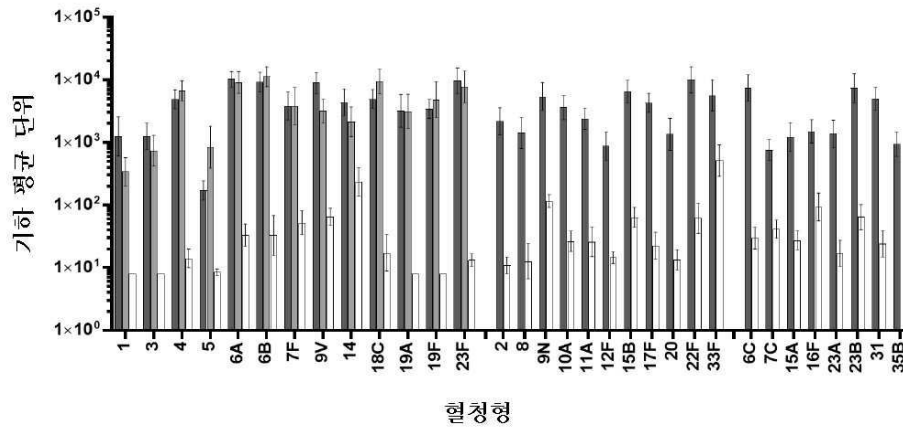
CSSHSSNMANTQMKSDKI I I AHRGASGYLPEHTLESKALAFQAQQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRK
 DGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSHPRIHTFEDEIEFIQGLEKSTGKKVGIYPEIKAPWFHHQNG
 KDI A AETLKVLLKKYGYDKKTDVMVYLQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQIAITDVKETQEKDPKGYWVNNYDWMFKPGA
 MAEYVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIVYTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSGATGVFTDFPD
 TGVEFLKGIK

[0318]

도면

도면1

32-가 데이터



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SUTROVAX, INC.

<120> IMPROVEMENTS IN IMMUNOGENIC CONJUGATES

<130> WO/2020/009993

<150> PCT/US2019/040131

<151> 2019-07-01

<150> US 62/693,981

<151> 2018-07-04

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 535

<212> PRT

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 1

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

1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln

 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45
 Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val

 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110
 Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
 115 120 125
 Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
 130 135 140
 Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser

 145 150 155 160
 Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175
 Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190
 Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly

 210 215 220
 Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285
 Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320
 Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335
 Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350
 Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365
 Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380
 Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400
 Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His
 405 410 415
 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430
 Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445
 His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460
 Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495
 Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu

500 505 510
 Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525
 Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

<210> 2

<211> 535

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CRM197 with Arg-Asn substitution

<400> 2

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
 20 25 30
 Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
 50 55 60
 Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
 65 70 75 80
 Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
 85 90 95
 Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
 100 105 110

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

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
 180 185 190

Asn Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 210 215 220

Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu
 245 250 255

His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val
 260 265 270

Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val
 275 280 285

Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu
 290 295 300

Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala
 305 310 315 320

Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser
 325 330 335

Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp
 340 345 350

Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe
 355 360 365

Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His
 370 375 380

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr
 385 390 395 400

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

405 410 415
 Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
 420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
 435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
 450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
 485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

<210> 3

<211> 536

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CRM197 with 6 preferred mAA sites and N-terminus Met

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<

223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (213)..(213)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (245)..(245)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature
 <222> (265)..(265)
 <223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (386)..(386)
 <223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid
 <220><221> misc_feature

<222> (527)..(527)
 <223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid
 <400> 3

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
 1 5 10 15
 Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
 20 25 30
 Gln Xaa Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
 35 40 45
 Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala

 50 55 60
 Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
 85 90 95
 Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
 100 105 110
 Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe

 115 120 125
 Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
 130 135 140
 Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
 145 150 155 160
 Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
 165 170 175

Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
 180 185 190
 Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
 195 200 205
 Val Ile Arg Asp Xaa Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
 210 215 220
 Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
 225 230 235 240
 Glu Glu Lys Ala Xaa Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
 245 250 255
 Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Xaa Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
 260 265 270
 Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
 275 280 285
 Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
 290 295 300
 Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
 305 310 315 320
 Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
 325 330 335
 Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
 340 345 350
 Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
 355 360 365
 Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
 370 375 380
 His Xaa Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
 385 390 395 400
 Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly
 405 410 415
 His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly

420 425 430
 Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys

435 440 445
 Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala

450 455 460
 Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val
 465 470 475 480

Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser
 485 490 495
 Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val

500 505 510
 Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Xaa Leu

515 520 525
 Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

<210> 4

<211> 536

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CRM197 with Arg-Asn substitution, 6 preferred nAA sites, and N-terminus Met

<220><221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (213)..(213)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (245)..(245)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (265)..(265)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (386)..(386)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (527)..(527)

<223> Xaa can be any non-naturally occurring amino acid

<400> 4

Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
 20 25 30

Gln Xaa Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
 35 40 45

Asp Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
 50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
 85 90 95

Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
 100 105 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
 115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
 130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
 165 170 175

Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val

Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys
 435 440 445

Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala
 450 455 460

Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val
 465 470 475 480

Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser
 485 490 495

Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val
 500 505 510

Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Xaa Leu
 515 520 525

Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
 530 535

<210> 5

<211> 346

<212> PRT

<213> Haemophilus influenzae

<400> 5

Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys Ser Asp
 1 5 10 15

Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro Glu His
 20 25 30

Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp Tyr Leu
 35 40 45

Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val Ile His
 50 55 60

Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe Pro His
 65 70 75 80

Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr Leu Lys
 85 90 95

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

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

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

 Glu Leu Ala Gln Tyr Asn Val Glu Val His Pro Tyr Thr Val Arg Lys
 290 295 300
 Asp Ala Leu Pro Glu Phe Phe Thr Asp Val Asn Gln Met Tyr Asp Ala
 305 310 315 320
 Leu Leu Asn Lys Ser Gly Ala Thr Gly Val Phe Thr Asp Phe Pro Asp
 325 330 335
 Thr Gly Val Glu Phe Leu Lys Gly Ile Lys
 340 345