(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월18일
(11) 등록번호 10-2229568
(24) 등록일자 2021년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/09 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/092 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7034425(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년01월15일
심사청구일자 2020년01월06일
(85) 번역문제출일자 2019년11월21일
(65) 공개번호 10-2019-0133066
(43) 공개일자 2019년11월29일
(62) 원출원 특허 10-2016-7022420
원출원일자(국제) 2015년01월15일
심사청구일자 2016년08월17일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/050316
(87) 국제공개번호 WO 2015/110942
국제공개일자 2015년07월30일
(30) 우선권주장
61/929,561 2014년01월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2011110531 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
화이자 인코포레이티드
미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트 235
(72) 발명자
한, 밍밍
미국 18064 펜실베이니아주 나자레스 올드 타운 로드 2302
프라사드, 아바리 크리슈나
미국 27516 노쓰 캐롤라이나주 채플 힐 워샴 드라이브 105
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

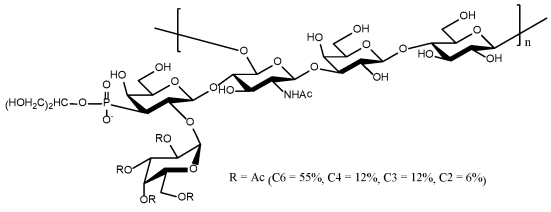
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 이수정

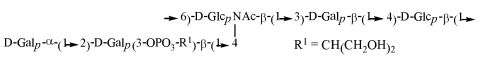
(54) 발명의 명칭 **스트렙토코쿠스 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드 및 그의 접합체**

(57) 요 약

본 발명은 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 및 그의 제조 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체, 그의 제조 방법, 및 그를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1





$C_{37}H_{61}NNaO_{31}P$, MW=1069.8

Ac= 아세틸

(52) CPC특허분류
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2039/55583 (2013.01)
A61K 2039/6037 (2013.01)
(72) 발명자
쿠퍼, 데이비드
미국 10950 뉴욕주 먼로 웹 팜 로드 9
왓슨, 웬디 조
미국 19422 펜실베이니아주 블루 벨 베이 힐 드라이브 121

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 대상체에 투여 시 옵소닌포식작용 검정(OPA)에서 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15B 및 15C를 사멸시킬 수 있는 항체의 형성을 유도하고, 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체를 포함하며, 여기서 상기 담체 단백질은 CRM_{197}이고, 상기 접합체는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하고, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 50 kDa 내지 500 kDa의 분자량을 갖고, 상기 접합체는 3000 내지 20000 kDa의 분자량을 갖고 2 내지 6의 접합도를 갖는 것인, 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 150 kDa 내지 350 kDa의 분자량을 갖는 것인 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 옵소닌포식작용 사멸 검정(OPA)에 의해 결정 시 대상체의 적어도 50%에서 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 및 15C에 대해 적어도 1:8의 역가를 유발할 수 있는 면역원성 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 인간 대상체에 투여 시 ELISA 검정에 의해 결정 시 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 또는 0.5 μg/ml의 농도로 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 및 15C 폴리사카라이드에 결합할 수 있는 IgG 항체를 유발할 수 있는 면역원성 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 면역원성 접합체가,

혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 40% 미만의 유리 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 것;

5000 내지 10000 kDa; 5000 내지 20000 kDa; 8000 내지 20000 kDa; 8000 내지 16000 kDa; 또는 10000 내지 16000 kDa의 분자량을 갖는 것;

접합체 내의 담체 단백질에 대한 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 비가 0.4 내지 2인 것;

면역원성 접합체의 적어도 40%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는 것; 및

접합도가 2 내지 5; 2 내지 4; 3 내지 6; 3 내지 5; 또는 3 내지 4인 것

중 하나 이상을 특징으로 하는 것인 면역원성 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 적어도 1종의 추가의 항원을 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 아주반트를 추가로 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 아주반트가 인산알루미늄인 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간 대상체에서 혈청형 15B 및 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에와 연관된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 따른 면역원성 조성물을 포함하는 백신.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 및 그의 제조 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체, 그의 제조 방법, 및 그를 포함하는 면역원성 조성물 및 백신에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에는 란셋 형상의 그람(Gram)-양성 구균이고, 이는 일반적으로 쌍으로 나타나지만 (쌍구균), 짧은 사슬로 또는 단일 세포로서 나타나기도 한다. 이는 혈액 한천 플레이트에서 광택성 콜로니를 형성하면서 쉽게 성장하고, 혐기적으로 성장되지 않는 한 알파 용혈을 나타내며, 혐기적으로 성장되는 경우에는 베타 용혈을 나타낸다. 대부분의 폐렴구균 혈청형의 세포는 각각의 세포를 둘러싸는 폴리사카라이드 코팅물인 피막이 있다. 이러한 피막은 항체가 박테리아 세포에 부착하는 것을 방지함으로써 포식작용을 방해하기 때문에 인간에서의 병독성의 결정요인이다. 현재, 90가지를 초과하는 공지된 폐렴구균 피막 혈청형이 확인되어 있고, 23가지의 가장 통상적인 혈청형이 세계적으로 침습성 질환의 대략 90%를 차지한다. 백신으로서, 폐렴구균 폴리사카라이드 코팅물이 면역계가 발달되었거나 손상되지 않은 개체에서 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 대한 합당한 정도의 면역을 부여할 수 있지만, 적합한 담체 단백질에 접합된 피막 폴리사카라이드는 마찬가지로 폐렴구균 감염의 위험이 가장 높은 유아 및 노인에서 면역 반응을 허용한다.

[0003] 2000년에 최초의 7가 폐렴구균 접합체 백신 (PCV7 또는 프레브나르(Prevnar))이 도입된 이래로, 이러한 7가지 혈청형 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 및 23F)으로부터의 침습성 질환이 거의 사라졌다. 프레브나르 13 내에 혈청형 1, 3, 5, 6A, 7F 및 19A를 첨가하는 것이 침습성 폐렴구균 질환의 수를 추가로 감소시켰다.

[0004] 그러나, 비-백신 혈청형 예컨대 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15A, 15B 및 15C에 의해 야기되는 침습성 폐렴구균 질환의 발생률이 현재 증가되었다 (예를 들어 문헌 [Beall B. et al., Journal of Clinical Microbiology. 44(3):999-1017, 2006], 또는 [Jacobs et al., Clin Infect Dis. (2008) 47 (11): 1388-1395] 참조). 현재 판매되는 폐렴구균 백신 중 어느 것도 인간, 특히 2세 미만의 소아에서 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 대한 적합한 보호를 제공하지 않는다. 따라서, 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 대한 면역 반응을 유도하는데 사용될 수 있는 면역원성 조성물이 요구된다. 이러한 면역원성 조성물이 혈청형 15C 및/또는 15A 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 대해 대상체를 보호하는데 사용될 수 있다면 또한 추가적으로 이로울 것이다.

발명의 내용

[0005] 한 측면에서, 본 개시내용은 5 kDa 내지 500 kDa의 분자량을 갖는 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 제공한다.

[0006] 추가 측면에서, 본 개시내용은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1,

0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8, 바람직하게는 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하는 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 제공한다.

[0007] 추가 측면에서, 본 개시내용은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8, 바람직하게는 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함하는 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 제공한다.

[0008] 추가 측면에서, 본 개시내용은 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 본원에 개시된 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체를 제공한다. 한 측면에서, 상기 담체 단백질은 CRM_{197}이다.

[0009] 추가 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역원성 접합체 및 생리학상 허용되는 비히클을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 상기 면역원성 조성물은 적어도 1종의 추가의 항원을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 상기 면역원성 조성물은 아주반트를 추가로 포함한다.

[0010] 추가 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 바와 같은 면역원성 조성물을 포함하는 백신을 제공한다.

[0011] 추가 측면에서, 본 개시내용은

[0012] (a) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 박테리아 세포의 발효 배양물을 제조하는 단계;

[0013] (b) 상기 발효 배양물 내의 박테리아 세포를 용해시키는 단계;

[0014] (c) 발효 배양물로부터 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 정제하는 단계; 및

[0015] (d) 정제된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 고압 균질화에 의해 사이징하는 단계

[0016] 를 포함하는, 본원에 개시된 바와 같은 단리된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 제조하는 방법을 제공한다.

[0017] 추가 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 바와 같은 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계를 포함하는, 활성화된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 제조하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 상기 방법에 의해 수득된 또는 수득가능한 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 제공한다.

[0018] 추가 측면에서, 본 개시내용은

[0019] (a) 본원에 개시된 바와 같은 활성화된 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계;

[0020] (b) 배합된, 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜, 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성시키는 단계

[0021] 를 포함하는, 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체의 제조 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 상기 방법에 의해 수득된 또는 수득가능한 면역원성 접합체를 제공한다.

[0022] 추가 측면에서, 본 개시내용은 면역원성 양의 본원에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하는 방법을 제공한다.

[0023] 추가 측면에서, 본 개시내용은 치료적 또는 예방적 유효량의 본원에 개시된 면역원성 조성물 또는 백신을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에와 연관된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1 - 폐렴구균 피막 폴리사카라이드 혈청형 15B 반복 단위의 구조.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 하기의 본 발명의 바람직한 실시양태의 상세한 설명 및 본원에 포함된 실시예를 참조로 더욱 용이하게 이해될 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 통상적인 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 의미가 동일하다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 테스트에서 사용될 수 있지만, 특정한 바람직한 방법 및 물질이

본원에 기재된다. 실시양태를 기술하고 본 발명을 청구하는데 있어서, 특정 용어가 하기에 기재된 정의에 따라 사용될 것이다.

[0026] 정의

[0027] 본원에 사용된 바와 같이, 폴리사카라이드 또는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체의 "분자량"은 다각도 레이저 광 산란 검출기 (MALLS)와 조합된 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 계산된 분자량을 지칭한다.

[0028] 본원에 사용된 바와 같이, "유리 폴리사카라이드"라는 용어는 담체 단백질에 공유결합으로 접합되지 않았지만, 그럼에도 불구하고 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 조성물 내에 존재하는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 의미한다. 유리 폴리사카라이드는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체와 비-공유결합으로 회합될 수 있다 (즉, 비-공유결합으로 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체에 결합되거나, 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체에 흡착되거나, 또는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체의 내부에 또는 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체로 포착될 수 있다).

[0029] 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체의 최종 정제 후에 유리 폴리사카라이드의 백분율을 측정한다. 바람직하게는, 최종 정제 후 4주 이내에 그것을 측정한다. 이는 샘플 내의 총 폴리사카라이드의 백분율로서 표현된다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같이, "혈청형 15B 폴리사카라이드" 또는 "혈청형 15B 피막 폴리사카라이드"라는 용어는 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 지칭한다.

[0031] 본원에 사용된 바와 같이, "혈청형 15B 당접합체" 또는 "혈청형 15B 접합체"라는 용어는 담체 단백질에 공유결합으로 접합된 단리된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 지칭한다.

[0032] 본원에 사용된 바와 같이, "산화도" (DO)라는 용어는 단리된 폴리사카라이드가 산화제로 활성화되었을 때 생성된 알데히드 기당 당 반복 단위의 개수를 지칭한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 일상적인 방법을 사용하여 폴리사카라이드의 산화도를 결정할 수 있다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, "대상체"라는 용어는 인간을 포함하는 포유동물, 또는 조류, 어류, 파충류, 양서류 또는 임의의 기타 동물을 지칭한다. "대상체"라는 용어는 가정용 애완동물 또는 연구용 동물을 또한 포함한다. 가정용 애완동물 및 연구용 동물의 비제한적인 예는 개, 고양이, 돼지, 토끼, 래트, 마우스, 저빌, 햄스터, 기니피그, 페릿, 원숭이, 조류, 뱀, 도마뱀, 어류, 거북이 및 개구리를 포함한다. "대상체"라는 용어는 가축 동물을 또한 포함한다. 가축 동물의 비제한적인 예는 알파카, 들소, 낙타, 소, 사슴, 돼지, 말, 라마, 노새, 당나귀, 양, 염소, 토끼, 순록, 야크, 닭, 거위 및 칠면조를 포함한다.

[0034] 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드

[0035] 도 1에 나타난 바와 같이, 혈청형 15B의 폴리사카라이드 반복 단위는 분지된 트리사카라이드 백본 (1개의 N-아세틸글루코스아민 (Glc_pNAc), 1개의 갈락토피라노스 (Gal_p) 및 1개의 글루코피라노스 (Glc_p))과 Glc_pNAc의 C4 히드록실 기에 연결된 αGal_p-βGal_p 디사카라이드 분지로 이루어진다. 포스포글리세롤이 디사카라이드 분지 내의 βGal_p 잔기의 C3 히드록실 기에 연결된다. 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 O-아세틸화되고, O-아세틸화의 총량은 폴리사카라이드 반복 단위당 대략 0.8 내지 0.9개의 O-아세틸 기이다 (예를 들어 문헌 [C. Jones et al., Carbohydrate Research, 340 (2005) 403-409] 참조). 혈청형 15C 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드는 혈청형 15B와 백본 구조가 동일하지만, O-아세틸화가 결여된다.

[0036] 본 발명의 단리된 혈청형 15B 폴리사카라이드를

[0037] (a) 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 박테리아 세포의 발효 배양물을 제조하는 단계;

[0038] (b) 상기 발효 배양물 내의 박테리아 세포를 용해시키는 단계;

[0039] (c) 발효 배양물로부터 혈청형 15B 폴리사카라이드를 정제하는 단계; 및

[0040] (d) 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 고압 균질화에 의해 사이징하는 단계

[0041] 를 포함하는 방법에 의해 수득할 수 있다.

[0042] 혈청형 15B 폴리사카라이드를 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 박테리아로부터 직접적으로 수득할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20060228380, 20060228381, 20070184071,

20070184072, 20070231340, 및 20080102498 또는 WO2008118752에 개시된 방법을 참조한다). 또한, 합성 프로토콜을 사용하여 그를 생산할 수 있다.

[0043] 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 균주를 확립된 배양 수집물 (예를 들어, 예를 들어 ATCC 기탁 균주 번호 ATCC10354 또는 미국 질병 통제 예방 센터(Center for disease control and prevention) (조지아주 애틀란타)의 스트렙토코쿠스 표준 실험실(Streptococcal Reference Laboratory)로부터 입수가능한 균주) 또는 임상 검체로부터 수득할 수 있다.

[0044] 바람직하게는 대두 기반 배지에서 박테리아 세포를 성장시킨다. 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 생산하는 박테리아 세포의 발효 후에, 박테리아 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생산한다. 임의의 용해제를 사용하여 박테리아 세포를 용해시킬 수 있다. "용해제"는 세제를 예를 들어 포함하는, 세포벽 파괴를 돕고, 세포 용해를 야기하는 자가용해소의 방출을 돕는 임의의 작용제이다. 본원에 사용된 바와 같이, "세제"라는 용어는 박테리아 세포의 용해를 유도할 수 있는 임의의 음이온성 또는 양이온성 세제를 지칭한다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 이러한 세제의 대표적인 예는 데옥시콜레이트 소듐 (DOC), N-라우로일 사르코신, 케노데옥시콜산 소듐, 및 사포닌을 포함한다.

[0045] 본 발명의 한 실시양태에서, 박테리아 세포를 용해시키는데 사용된 용해제는 DOC이다. DOC는 담즙산 데옥시콜산의 나트륨 염이고, 이는 통상적으로 생물학적 공급원 예컨대 암소 또는 황소로부터 유래된다. DOC는 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에서 세포벽 성장 및 분열에서 수반되는 자가용해소인 LytA 단백질을 활성화시킨다. LytA 단백질은 그의 C-말단 부분에 콜린 결합 도메인이 있고, lytA 유전자의 돌연변이로 DOC로의 용해에 대해 저항성인 LytA 돌연변이체가 생산되는 것으로 공지되어 있다.

[0046] 본 발명의 한 실시양태에서, 박테리아 세포를 용해시키는데 사용된 용해제는 비-동물 유래 용해제이다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위한, 비-동물 유래 용해제는 DOC의 작용 방식과 유사한 작용 방식 (즉, LytA 기능에 영향을 미치고, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 세포의 용해를 생성함)의 비-동물 공급원으로부터의 작용제를 포함한다. 이러한 비-동물 유래 용해제는 DOC 유사체, 계면활성제, 세제, 및 콜린의 구조적 유사체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 비-동물 유래 용해제는 데칸술폰산, tert-옥틸페녹시 폴리(옥시에틸렌)에탄올 (예를 들어, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich) (미주리주 세인트 루인스)로부터 입수가능한 이게팔(Igepal)® CA-630, CAS #: 9002-93-1), 옥틸페놀 에틸렌 옥시드 축합물 (예를 들어, 시그마 알드리치 (미주리주 세인트 루인스)로부터 입수가능한 트리톤(Triton)® X-100), N-라우로일 사르코신, N-라우로일 사르코신 소듐, 라우릴 이미노디프로피오네이트, 소듐 도데실 술페이트, 케노데옥시콜레이트, 히오데옥시콜레이트, 글리코데옥시콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 타우로케노데옥시콜레이트, 및 콜레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 비-동물 유래 용해제는 N-라우로일 사르코신이다. 또 다른 실시양태에서, 용해제는 N-라우로일 사르코신 소듐이다.

[0047] 그 후, 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄 처리, 투석여과 및/또는 칼럼 크로마토그래피를 사용하는 것을 포함하는, 관련 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 혈청형 15B 폴리사카라이드를 세포 용해물로부터 단리할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340, 및 20080102498 또는 WO2008118752 참조). 그 후, 정제된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 면역원성 접합체의 제조에 사용할 수 있다.

[0048] 바람직하게는, 유리한 여과성 특성 및/또는 수율의 접합체를 생성하기 위해, 더 낮은 분자량 (MW) 범위로 폴리사카라이드를 사이징하는 것을 담체 단백질에 접합하기 전에 수행할 수 있다. 유리하게는, 폴리사카라이드 구조의 결정적인 특색, 예를 들어, O-아세틸 기의 존재를 보존하면서, 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 크기가 감소된다. 바람직하게는, 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 크기가 기계적 균질화에 의해 감소된다.

[0049] 바람직한 실시양태에서, 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 크기가 고압 균질화에 의해 감소된다. 고압 균질화는 직경이 충분히 작은 유동 경로를 통해 공정 스트림을 펌핑함으로써 높은 전단율을 달성한다. 더 큰 균질화 압력 인가를 사용함으로써 전단율이 증가되고, 균질화기에 공급 스트림을 재순환시킴으로써 노출 시간이 증가될 수 있다.

[0050] 고압 균질화 공정은 폴리사카라이드의 구조적 특색 예컨대 O-아세틸 기의 존재를 보존하면서, 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드의 크기를 감소시키는데 특히 적합하다.

[0051] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 용해물로부터 혈청형 15B 폴리사카라이드를 정제하고, 임의로 정제된 폴리사카라이드를 사이징함으로써 수득된 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 분자량, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카

라이드 mM당 글리세롤 mM 또는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM을 예를 들어 포함하는 상이한 파라미터에 의해 특성화할 수 있다.

[0052] 폴리사카라이드의 O-아세틸화도를 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 양자 NMR에 의해 결정할 수 있다 (예를 들어 문헌 [Lemercinier and Jones (1996) Carbohydrate Research 296; 83-96], [Jones and Lemercinier (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30; 1233-1247], WO 05/033148 또는 WO00/56357 참조). 또 다른 통상적으로 사용되는 방법이 문헌 [Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261]에 기재되어 있다. 바람직하게는, O-아세틸 기의 존재를 이온-HPLC 분석에 의해 결정한다.

[0053] 정제된, 단리된 또는 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 또는 혈청형 15B 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 내의 O-아세틸의 존재는 상기 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM 수로서 또는 폴리사카라이드 반복 단위당 O-아세틸 기의 수로서 표현된다.

[0054] 폴리사카라이드를 플루오르화수소산 (HF)으로 처리하는 것에 의한 글리세롤의 방출 후에 고성능 음이온 교환 크로마토그래피 & 펄스형 전류측정 검출 (HPAEC-PAD)을 사용하여 글리세롤을 측정함으로써 글리세롤포스페이트 측쇄의 존재를 결정할 수 있다. 정제된, 단리된 또는 활성화된 혈청형 15B 폴리사카라이드 또는 혈청형 15B 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체 내의 글리세롤의 존재는 혈청형 15B 폴리사카라이드 mM당 글리세롤 mM 수로서 표현된다.

[0055] 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 합성에 의해 또한 생산할 수 있다.

[0056] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 5 내지 500 kDa, 50 내지 500 kDa, 50 내지 450 kDa, 100 내지 400 kDa, 100 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 150 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다.

[0057] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.7 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이온-HPLC 분석에 의해 O-아세틸 기의 존재가 결정된다.

[0058] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.7 mM 글리세롤을 포함한다.

[0059] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa, 바람직하게는 150 내지 350 kDa의 분자량을 갖고, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함한다.

[0060] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa, 바람직하게는 150 내지 350 kDa의 분자량을 갖고, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다.

[0061] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다.

[0062] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa, 바람직하게는 150 내지 350 kDa의 분자량을 갖고, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다.

[0063] 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체

[0064] 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시켜 면역원성 접합체를 수득할 수 있다. 단리된 폴리사카라이드를 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 담체 단백질에 접합시킬 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20060228380, 20070184071, 20070184072, 20070231340 또는 WO2011/100151 참조).

[0065] 한 실시양태에서, 폴리사카라이드가 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)로 활성화되어 시아네이트 에스테르가 형성될 수 있다. 활성화된 폴리사카라이드가 담체 단백질 상의 아미노 기에 직접접으로 또는 스페이서 (링커) 기를 통해 커플링될 수 있다. 예를 들어, 스페이서가 시스타민 또는 시스테아민이어서 티올화 폴리사카라이드를 제공할 수 있고, 이는 말레이미드-활성화 담체 단백질 (예를 들어, GMBS를 사용함) 또는 할로아세틸화 담체 단백질 (예를 들어, 아이오도아세트이미드 또는 N-숙신이미딜 브로모아세테이트 또는 SIAB, 또는 SIA, 또는 SBAP를 사용함)과의 반응 후에 수득된 티오에테르 연결을 통해 담체에 커플링될 수 있다. 바람직하게는, 시아네이트 에스테르 (임의로, CDAP 화학에 의해 제조됨)가 헥산 디아민 또는 아디프산 디히드라지드 (ADH)와 커플링되고, 단백질 담체 상의 카르복실 기를 통해 카르보디이미드 (예를 들어 EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 담체 단백질에 아미노-유도체화 사카라이드가 접합된다. 이러한 접합체들이 예를 들어 WO93/15760, WO 95/08348 및 WO 96129094에 기재되어 있다.

[0066] 기타 적합한 기술은 카르보디이미드, 히드라지드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S--NHS, EDC, TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원 공보 번호 WO 98/42721에 기재되어 있다. 접합은 사카라이드의 유리 히드록실 기와 CDI의 반응 (문헌 [Bethell et al., 1979,1. Biol. Chern. 254:2572-4]; [Hearn et al., 1981, J. Chromatogr.218:509-18] 참조)에 이어지는 단백질과의 반응으로 카르바메이트 연결이 형성되는 것에 의해 형성될 수 있는 카르보닐 링커를 수반할 수 있다. 이는 아노머 말단의 1급 히드록실기로의 환원, 1급 히드록실 기의 임의적인 보호/탈보호, 1급 히드록실 기와 CDI의 반응으로 CDI 카르바메이트 중간체가 형성되는 것, 및 CDI 카르바메이트 중간체와 단백질 상의 아미노 기의 커플링을 수반할 수 있다.

[0067] 바람직한 실시양태에서, 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 환원성 아민화에 의해 담체 단백질에 접합된다. 환원성 아민화는 산화에 의해 폴리사카라이드가 활성화되는 것 및 활성화된 폴리사카라이드가 환원에 의해 단백질 담체에 접합되는 것을 수반한다.

[0068] 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 활성화

[0069] 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 산화제와 반응시킴으로써 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 수득된다. 예를 들어, 상기 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 수득할 수 있다:

[0070] (a) 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 박테리아 세포의 발효 배양물을 제조하는 단계;

[0071] (b) 상기 발효 배양물 내의 박테리아 세포를 용해시키는 단계;

[0072] (c) 발효 배양물로부터 혈청형 15B 폴리사카라이드를 정제하는 단계;

[0073] (d) 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 고압 균질화에 의해 사이징하는 단계;

[0074] (e) 사이징된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계.

[0075] 바람직한 실시양태에서, 산화제와 반응되는 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 농도는 0.1 내지 10 mg/mL, 0.5 내지 5 mg/mL, 1 내지 3 mg/mL, 또는 약 2 mg/mL이다.

[0076] 바람직한 실시양태에서, 산화제는 퍼아이오데이트이다. 퍼아이오데이트는 이웃자리 히드록실 기를 산화시켜 카르보닐 또는 알데히드 기를 형성시키고, C-C 결합의 절단을 야기한다. '퍼아이오데이트'라는 용어는 퍼아이오데이트 및 퍼아이오드산 둘 다를 포함한다. 이 용어는 메타퍼아이오데이트 (IO_4^-) 및 오르토퍼아이오데이트 (IO_6^{5-}) 둘 다를 또한 포함한다. '퍼아이오데이트'라는 용어는 소듐 퍼아이오데이트 및 포타슘 퍼아이오데이트를 포함하는 퍼아이오데이트의 다양한 염을 또한 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 산화제는 소듐 퍼아이오데이트이다. 바람직한 실시양태에서, 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 산화에 사용된 퍼아이오데이트는 메타퍼아이오데이트이다. 바람직한 실시양태에서, 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 산화에 사용된 퍼아이오데이트는 소듐 메타퍼아이오데이트이다.

[0077] 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드가 0.01 내지 10, 0.05 내지 5, 0.1 내지 1, 0.5 내지 1, 0.7 내지 0.8, 0.05 내지 0.5, 0.1 내지 0.3 몰 당량의 산화제와 반응된다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드가

약 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95 몰 당량의 산화제와 반응된다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드가 약 0.15 몰 당량의 산화제와 반응된다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드가 약 0.25 몰 당량의 산화제와 반응된다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드가 약 0.5 몰 당량의 산화제와 반응된다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드가 약 0.6 몰 당량의 산화제와 반응된다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드가 약 0.7 몰 당량의 산화제와 반응된다.

[0078] 바람직한 실시양태에서, 반응 기간은 1 내지 50, 10 내지 30, 15 내지 20, 15 내지 17시간 또는 약 16시간이다.

[0079] 바람직한 실시양태에서, 반응 온도는 15 내지 45℃, 15 내지 30℃, 20 내지 25℃에서 유지된다. 바람직한 실시양태에서, 반응 온도는 약 23℃에서 유지된다.

[0080] 바람직한 실시양태에서, 산화 반응은 인산나트륨, 인산칼륨, 2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 (MES) 또는 비스-트리스로부터 선택된 완충제에서 수행된다. 바람직한 실시양태에서, 완충제는 인산칼륨이다.

[0081] 바람직한 실시양태에서, 완충제의 농도는 1 내지 500 mM, 1 내지 300 mM, 50 내지 200 mM이다. 바람직한 실시양태에서, 완충제의 농도는 약 100 mM이다.

[0082] 바람직한 실시양태에서, 산화 반응은 4 내지 8, 5 내지 7, 5.5 내지 6.5의 pH에서 수행된다. 바람직한 실시양태에서, pH는 약 6이다.

[0083] 바람직한 실시양태에서, 20 내지 25℃의 온도에서 0.5 내지 5 mg/mL의 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 0.2 내지 0.3 몰 당량의 퍼아이오데이트와 반응시킴으로써 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 수득된다.

[0084] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 정제된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법 예컨대 겔 투과 크로마토그래피 (GPC), 투석 또는 한외여과/투석여과에 따라 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 정제된다. 예를 들어, 활성화된 피막 폴리사카라이드를 한외여과 장치를 사용하여 농축 및 투석여과에 의해 정제한다.

[0085] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 상기 개시된 방법에 의해 수득된 또는 수득가능한 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드에 관한 것이다.

[0086] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 20, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 5, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 20, 10 내지 15, 15 내지 20이다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 산화도는 2 내지 10, 4 내지 8, 4 내지 6, 6 내지 8, 6 내지 12, 8 내지 12, 9 내지 11, 10 내지 16, 12 내지 16, 14 내지 18, 16 내지 20, 16 내지 18, 또는 18 내지 20이다.

[0087] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 5 내지 500 kDa, 50 내지 500 kDa, 50 내지 450 kDa, 100 내지 400 kDa, 100 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 150 내지 300 kDa의 분자량을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 갖는다.

[0088] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.7 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이온-HPLC 분석에 의해 O-아세틸 기의 존재가 결정된다.

[0089] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청

형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.7 mM 글리세롤을 포함한다.

[0090] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 갖고, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함한다.

[0091] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 갖고, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다.

[0092] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다.

[0093] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 100 내지 250 kDa의 분자량을 갖고, 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트 및 상기 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다.

[0094] 한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가, 임의로 동결보호제/건조보호제의 존재 하에, 동결건조된다. 한 실시양태에서, 상기 동결보호제/건조보호제는 사카라이드이다. 바람직한 실시양태에서, 사카라이드는 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 덱스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 사카라이드는 수크로스이다. 그 후, 동결건조된 활성화된 피막 폴리사카라이드가 담체 단백질을 포함하는 용액과 배합될 수 있다.

[0095] 또 다른 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 담체 단백질과 배합되고, 임의로 동결보호제/건조보호제의 존재 하에, 동결건조된다. 한 실시양태에서, 상기 동결보호제/건조보호제는 사카라이드이다. 바람직한 실시양태에서, 사카라이드는 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 덱스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 사카라이드는 수크로스이다. 그 후, 공동-동결건조된 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 용액 내에 재현탁시키고, 환원제와 반응시킬 수 있다.

[0096] 한 실시양태에서, 본 발명은 동결건조된 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드에 관한 것이다.

[0097] 한 실시양태에서, 본 발명은 공동-동결건조된 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 및 단백질 담체에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 단백질 담체는 CRM_{197}이다.

[0098] 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드와 담체 단백질의 접합

[0099] 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가

[0100] (a) 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계; 및

[0101] (b) 배합된, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜, 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성시키는 단계

[0102] 를 포함하는 방법에 의해 담체 단백질에 접합될 수 있다.

[0103] 디메틸술폭시드 (DMSO)에서의 환원성 아민화에 의한 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드와 단백질 담체의 접합이, 예를 들어, 폴리사카라이드의 O-아세틸화 수준이 유의하게 감소되는 수성 용액에서의 환원성 아민화와 비교하여, 폴리사카라이드의 O-아세틸 함량을 보존하는데 적합하다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (a) 및 단계 (b)가 DMSO에서 수행된다.

[0104] 바람직한 실시양태에서, 단계 (a)는 동결건조된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질 및 DMSO를 포함하는 용액에 용해시키는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (a)는 공동-동결건조된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 DMSO에 용해시키는 것을 포함한다.

[0105] 단계 (a) 및 (b)가 수용액에서 수행되는 경우, 단계 (a) 및 (b)는 pH 6.0 내지 8.5, 7 내지 8 또는 7 내지 7.5의 완충제 (바람직하게는 PBS, MES, HEPES, 비스-트리스, ADA, PIPES, MOPSO, BES, MOPS, DIPSO, MOBS, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, 비신(Bicine) 또는 HEPB로부터 선택됨)에서 수행된다. 바람직한 실시양태에서, 완충제는 PBS이다. 바람직한 실시양태에서, pH는 약 7.3이다.

[0106] 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서의 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 농도는 0.1 내지 10

mg/mL, 0.5 내지 5 mg/mL, 0.5 내지 2 mg/mL이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서의 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 농도는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3 mg/mL이다.

[0107] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 투입비 (중량 기준 중량)는 5:1 내지 0.1:1, 2:1 내지 0.1:1, 2:1 내지 1:1, 1.5:1 내지 1:1, 0.1:1 내지 1:1, 0.3:1 내지 1:1, 0.6:1 내지 1:1이다.

[0108] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 투입비는 약 0.6:1 내지 1.5:1, 바람직하게는 0.6:1 내지 1:1이다. 이러한 초기 투입비는 면역원성 접합체 내의 낮은 수준의 유리 폴리사카라이드를 수득하는데 특히 적합하다.

[0109] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 대 담체 단백질의 초기 투입비는 약 0.4:1, 0.5:1, 0.6:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1:1, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1, 1.6:1, 1.7:1, 1.8:1, 1.9:1 또는 2:1이다.

[0110] 한 실시양태에서, 환원제는 소듐 시아노보로히드리드, 소듐 트리아세톡시보로히드리드, 브론스테드 산 또는 루이스 산의 존재 하의 소듐 또는 징크 보로히드리드, 아민 보란 예컨대 피리딘 보란, 2-피콜린 보란, 2,6-디보란-메탄올, 디메틸아민-보란, t-BuMe^{i}PrN-BH_3, 벤질아민-BH_3 또는 5-에틸-2-메틸피리딘 보란 (PEMB)이다. 바람직한 실시양태에서, 환원제는 소듐 시아노보로히드리드이다. 바람직한 실시양태에서, 환원제는 소듐 2-피콜린 보란이다.

[0111] 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서 사용된 환원제의 양은 약 0.1 내지 10 몰 당량, 0.5 내지 5 몰 당량, 1 내지 2 몰 당량이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서 사용된 환원제의 양은 약 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2 몰 당량이다.

[0112] 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)의 기간은 1 내지 60시간, 10 내지 50시간, 40 내지 50시간; 42 내지 46시간이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)의 기간은 약 44시간이다.

[0113] 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서의 반응 온도는 10 내지 40℃, 15 내지 30℃ 또는 20 내지 26℃에서 유지된다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (b)에서의 반응 온도는 약 23℃에서 유지된다.

[0114] 바람직한 실시양태에서, 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체의 제조 방법은 $NaBH_4$의 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 단계 (켄칭 단계) (단계 (c))를 추가로 포함한다.

[0115] 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)에서 사용된 $NaBH_4$의 양은 0.1 내지 10 몰 당량, 0.5 내지 5 몰 당량, 1 내지 3 몰 당량이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)에서 사용된 $NaBH_4$의 양은 약 2 몰 당량이다.

[0116] 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)의 기간은 0.1 내지 10시간, 0.5 내지 5시간, 2 내지 4시간이다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)의 기간은 약 3시간이다.

[0117] 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)에서의 반응 온도는 15 내지 45℃, 15 내지 30℃ 또는 20 내지 26℃에서 유지된다. 바람직한 실시양태에서, 단계 (c)에서의 반응 온도는 약 23℃에서 유지된다.

[0118] 바람직한 실시양태에서, 접합 단계 (단계 b)의 수율은 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%를 초과한다. 바람직한 실시양태에서, 접합 단계 (단계 b)의 수율은 60%를 초과한다. 바람직한 실시양태에서, 접합 단계 (단계 b)의 수율은 70%를 초과한다. 수율은 접합체 내의 혈청형 15B 폴리사카라이드의 양 x 100 / 접합 단계에서 사용된 활성화된 폴리사카라이드의 양이다.

[0119] 바람직한 실시양태에서, 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체의 제조 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0120] (a) 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 박테리아 세포의 발효 배양물을 제조하는 단계;

[0121] (b) 상기 발효 배양물 내의 박테리아 세포를 용해시키는 단계;

[0122] (c) 발효 배양물로부터 혈청형 15B 폴리사카라이드를 정제하는 단계;

[0123] (d) 정제된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 고압 균질화에 의해 사이징하는 단계;

[0124] (e) 사이징된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 산화제와 반응시키는 단계;

[0125] (f) 활성화된 혈청형 15B 폴리사카라이드를 담체 단백질과 배합하는 단계;

[0126] (g) 배합된, 활성화된 혈청형 15B 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 환원제와 반응시켜, 혈청형 15B 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 형성시키는 단계; 및

[0127] (h) $NaBH_4$ 첨가에 의해 미반응 알데히드를 캡핑하는 (켄칭시키는) 단계.

[0128] 바람직한 실시양태에서, 상기 방법의 접합 단계 (단계 g)의 수율은 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%를 초과한다. 바람직한 실시양태에서, 접합 단계 (단계 g)의 수율은 60%를 초과한다. 바람직한 실시양태에서, 접합 단계 (단계 g)의 수율은 70%를 초과한다. 수율은 접합체 내의 혈청형 15B 폴리사카라이드의 양 x 100 / 접합 단계에서 사용된 활성화된 폴리사카라이드의 양이다.

[0129] 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시킨 후, 폴리사카라이드-단백질 접합체를 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술에 의해 정제할 수 있다 (폴리사카라이드-단백질 접합체의 양에 관하여 강화시킬 수 있다). 이들 기술은 투석, 농축/투석여과 공정, 접선 유동 여과 침전/용출, 칼럼 크로마토그래피 (DEAE 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피), 및 심층 여과를 포함한다.

[0130] 바람직한 실시양태에서, 담체 단백질은 비-독성이고, 비-반응원성이며, 충분한 양 및 순도로 수득가능하다. 담체 단백질은 표준 접합 절차로 다룰 수 있어야 한다.

[0131] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 DT (디프테리아 독소), TT (파상풍 톡소이드) 또는 TT의 단편 C, CRM197 (디프테리아 독소의 비독성이지만 항원적으로 동일한 변이체), 기타 DT 점 돌연변이체, 예컨대 CRM176, CRM228, CRM 45 (Uchida et al. J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); 문헌 [Nicholls and Youle, Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992]에 기재된 CRM 9, CRM102, CRM 103 및 CRM107 및 기타 돌연변이; US 4709017 또는 US 4950740에 개시된, Glu-148의 결실 또는 Asp, Gln 또는 Ser으로의 돌연변이 및/또는 Ala 158의 결실 또는 Gly으로의 돌연변이, 및 기타 돌연변이; US 5917017 또는 US 6455673에 개시된, Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534 중 1개 이상의 잔기의 돌연변이 및 기타 돌연변이; 또는 US 5843711에 개시된 단편, 폐렴구균 뉴모라이신 (Kuo et al. (1995) Infect Immun 63; 2706-13) (일부 방식으로 해독된 ply, 예를 들어 dPLY-GMBS (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) 또는 dPLY-포르몰을 포함함), PhtX (PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (PhtA, PhtB, PhtD 또는 PhtE의 서열이 WO 00/37105 또는 WO 00/39299에 개시되어 있음) 및 Pht 단백질의 융합물 예를 들어 PhtDE 융합물, PhtBE 융합물, Pht A-E (WO 01/98334, WO 03/54007, WO2009/000826)을 포함함), OMPC (수막구균 외막 단백질 - 일반적으로 엔. 메닌기티디스(N. meningitidis) 혈청군 B로부터 추출됨 - EP0372501), PorB (엔. 메닌기티디스 유래), PD (헤모필루스 인플루엔자(Haemophilus influenza) 단백질 D - 예를 들어, EP 0 594 610 B 참조), 또는 그의 면역학적으로 기능성인 등가물, 합성 펩티드 (EP0378881, EP0427347), 열 충격 단백질 (WO 93/17712, WO 94/03208), 백일해 단백질 (WO 98/58668, EP0471 177), 시토카인, 림포카인, 성장 인자 또는 호르몬 (WO10 91/01146), N19 단백질 (Baraldoi et al. (2004) Infect Immun 72; 4884-7), 폐렴구균 표면 단백질 PspA (WO 02/091998), 철 흡수 단백질 (WO 01/72337), 씨. 디피실레(C. difficile)의 독소 A 또는 B (WO 00/61761)와 같은 다양한 병원체-유래 항원으로부터의 다중 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질 (Falugi et al. (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824)로 이루어진 군으로부터 선택된 담체 단백질에 접합된다. 한 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 DT (디프테리아 톡소이드)에 접합된다. 또 다른 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 TT (파상풍 톡소이드)에 접합된다. 또 다른 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 TT의 단편 C에 접합된다. 또 다른 실시양태에서, 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 PD (헤모필루스 인플루엔자 단백질 D - 예를 들어, EP 0 594 610 B 참조)에 접합된다.

[0132] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 활성화된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드가 CRM_{197} 단백질에 접합된다. CRM_{197} 단백질은 비독성 형태의 디프테리아 독소이지만, 면역학적으로는 디프테리아 독소와 구별할 수 없다. CRM_{197}은 독소생산 코리네파지 베타의 니트로소구아디닌 돌연변이유발에 의해 생성된 비-독소생산 파지 $\beta 197^{tox-}$에 감염된 씨. 디프테리아에(C. diphtheriae)에 의해 생산된다 (Uchida, T. et al. 1971, Nature New Biology 233:8-11). 한외여과, 황산암모늄 침전, 및 이온 교환 크로마토그래피를 통해 CRM_{197}이 정제된다. CRM_{197} 단백

질은 디프테리아 독소와 분자량이 동일하지만, 구조 유전자 내의 단일 염기 변화 (구아닌에서 아데닌으로)에 의해 이와 상이하다. 이러한 단일 염기 변화는 성숙 단백질에서 아미노산 치환 (글루탐산이 글리신을 치환함)을 야기하고, 디프테리아 독소의 독성 성질을 제거한다. CRM_{197} 단백질은 사카라이드에 대한 안전하고 효과적인 T-세포 의존적 담체이다. CRM_{197} 및 그의 생산에 관한 추가적인 상세사항을 예를 들어 US 5,614,382에서 확인할 수 있다.

[0133] 한 실시양태에서, 본 발명은 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 환원성 아민화에 의해 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 DMSO에서의 환원성 아민화에 의해 담체 단백질에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 담체 단백질은 CRM_{197}이다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 본원에 정의된 바와 같은 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드이다. 바람직한 실시양태에서, 폴리사카라이드는 고압 균질화에 의해 사이징된 본원에 정의된 바와 같은 단리된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드이다.

[0134] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 또는 15% 미만의 유리 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 25% 미만의 유리 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 20% 미만의 유리 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 총량과 비교하여 약 15% 미만의 유리 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함한다.

[0135] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 3000 내지 20000 kDa; 5000 내지 10000 kDa; 5000 내지 20000 kDa; 8000 내지 20000 kDa; 8000 내지 16000 KDa; 또는 10000 내지 16000 KDa의 분자량을 갖는다. SEC-MALLS에 의해 면역원성 접합체의 분자량이 측정된다.

[0136] 바람직한 실시양태에서, 접합체 내의 담체 단백질에 대한 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 비 (중량 기준 중량)는 0.5 내지 3이다. 바람직한 실시양태에서, 접합체 내의 담체 단백질에 대한 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 비는 0.4 내지 2, 0.5 내지 2, 0.5 내지 1.5, 0.5 내지 1, 1 내지 1.5, 1 내지 2이다. 바람직한 실시양태에서, 접합체 내의 담체 단백질에 대한 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 비는 0.7 내지 0.9이다.

[0137] 크기 배제 크로마토그래피 매질 (CL-4B)을 사용하여 접합체의 상대적인 분자 크기 분포를 결정할 수 있다. 접합체의 분자 크기 분포를 프로파일링하기 위해 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)가 중력 공급식 칼럼에서 사용된다. 매질 내의 세공으로부터 배제된 대형 분자는 소형 분자보다 더 신속하게 용출된다. 분획 수집기를 사용하여 칼럼 용출액을 수집한다. 분획을 사카라이드 검정에 의해 비색계로 테스트한다. Kd 결정을 위해, 칼럼을 검정하여, 분자가 완전히 배제된 분획 (V_0) (Kd=0), 및 최대 체류를 나타내는 분획 (V_i) (Kd=1)을 확립한다. 식 $Kd = (V_e - V_0)/ (V_i - V_0)$에 의해 특정 샘플 물질이 도달되는 분획 ($V_e$)이 Kd에 연관된다.

[0138] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 적어도 20%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 적어도 30%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 적어도 40%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 85%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 적어도 60%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 적어도 70%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다.

[0139] 바람직한 실시양태에서, 혈청형 15B 면역원성 접합체의 40% 내지 90%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 혈청형 15B 면역원성 접합체의 50% 내지 90%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 혈청형 15B 면역원성 접합체의 65% 내지 80%가 CL-4B 칼럼에서 0.3 이하의 Kd를 갖는다.

[0140] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원

성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.7 mM 아세테이트를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 이온-HPLC 분석에 의해 O-아세틸 기의 존재가 결정된다.

[0141] 바람직한 실시양태에서, 단리된 폴리사카라이드 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM에 대한 면역원성 접합체 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 또는 0.95이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 폴리사카라이드 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM에 대한 면역원성 접합체 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 폴리사카라이드 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM에 대한 면역원성 접합체 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM의 비는 적어도 0.9이다. 바람직한 실시양태에서, 이온-HPLC 분석에 의해 O-아세틸 기의 존재가 결정된다.

[0142] 바람직한 실시양태에서, 활성화된 폴리사카라이드 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM에 대한 면역원성 접합체 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM의 비는 적어도 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 또는 0.95이다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 폴리사카라이드 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM에 대한 면역원성 접합체 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM의 비는 적어도 0.7이다. 바람직한 실시양태에서, 활성화된 폴리사카라이드 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM에 대한 면역원성 접합체 내의 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 아세테이트 mM의 비는 적어도 0.9이다. 바람직한 실시양태에서, 이온-HPLC 분석에 의해 O-아세틸 기의 존재가 결정된다.

[0143] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 또는 0.8 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.5, 0.6 또는 0.7 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 글리세롤을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.7 mM 글리세롤을 포함한다.

[0144] 접합도는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드에 접합된 담체 단백질 내의 라이신 잔기의 개수이다. 폴리사카라이드에 공유결합으로 연결되는 것으로 인한 담체 단백질의 라이신 변형에 대한 증거가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 일상적인 방법을 사용하여 아미노산 분석에 의해 수득된다. 접합은 접합체 물질을 생성하는데 사용된 CRM_{197} 단백질 출발 물질과 비교하여 회수된 라이신 잔기의 개수가 감소되는 것을 생성한다.

[0145] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 접합도는 2 내지 15, 2 내지 13, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 15, 3 내지 13, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 5 내지 15, 5 내지 10, 8 내지 15, 8 내지 12, 10 내지 15, 또는 10 내지 12이다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 접합체의 접합도는 2 내지 5이다.

[0146] 면역원성 조성물

[0147] "면역원성 조성물"이라는 용어는 조성물이 대상체에서 면역 반응을 유발하는데 사용될 수 있는, 항원, 예를 들어, 미생물 또는 그의 성분을 함유하는 임의의 제약 조성물에 관한 것이다.

[0148] 본원에 사용된 바와 같이, "면역원성"은 항원 (또는 항원의 에피토프), 예컨대 박테리아 피막 폴리사카라이드, 또는 항원을 포함하는 면역원성 접합체 또는 면역원성 조성물의 체액성으로 또는 세포성으로, 또는 둘 다로 매개되는 면역 반응을 숙주 예컨대 포유동물에서 유발하는 능력을 의미한다.

[0149] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역원성 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드-담체 단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[0150] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 표준 ELISA 검정에 의해 측정 시 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도한다.

[0151] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 혈청형 15B 및 15A 및/또는 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 표준 ELISA 검정에 의해 측정 시 혈청형 15B 및 15A 및/또는

15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도한다.

[0152] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 혈청형 15B 및 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 표준 ELISA 검정에 의해 측정 시 혈청형 15B 및 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 결합할 수 있는 항체의 형성을 유도한다.

[0153] ELISA (효소-결합 면역흡착 검정) 방법에서, 백신이 접종된 대상체의 혈청으로부터의 항체를 고체 지지체에 흡착된 폴리사카라이드와 함께 인큐베이션한다. 결합된 항체를 효소-접합 2차 검출 항체를 사용하여 검출한다.

[0154] 한 실시양태에서, 상기 ELISA 검정은 'Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of Streptococcus pneumoniae serotype specific IgG (Pn PS ELISA)' (http://www.vaccine.uab.edu/ELISA%20protocol.pdf에서 액세스할 수 있고; 2014년 3월 31일에 액세스됨)에서 WHO에 의해 정의된 바와 같은 표준화된 (WHO) ELISA 검정이다.

[0155] ELISA는 인간 혈청 내에 존재하는 유형 특이적 IgG 항-에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*) 피막 폴리사카라이드 (PS) 항체를 측정한다. 인간 혈청의 희석물을 유형-특이적 피막 PS로 코팅된 미량역가 플레이트에 첨가했을 때, 이러한 피막 PS에 대해 특이적인 항체가 미량역가 플레이트에 결합한다. 플레이트에 결합된 항체를 염소 항-인간 IgG 알칼리성 포스파타제-표지 항체에 이어서 p-니트로페닐 포스페이트 기질을 사용하여 검출한다. 유색 최종 생성물의 광학 밀도는 혈청 내에 존재하는 항-피막 PS 항체의 양에 비례한다.

[0156] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 ELISA 검정에 의해 결정 시 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 또는 0.5 μg/ml의 농도로 에스. 뉴모니아에 혈청형 15B 폴리사카라이드에 결합할 수 있는 IgG 항체를 인간에서 유발할 수 있다.

[0157] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 ELISA 검정에 의해 결정 시 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 또는 0.5 μg/ml의 농도로 에스. 뉴모니아에 혈청형 15C 폴리사카라이드에 결합할 수 있는 IgG 항체를 인간에서 유발할 수 있다.

[0158] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 ELISA 검정에 의해 결정 시 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 또는 0.5 μg/ml의 농도로 에스. 뉴모니아에 혈청형 15B 및 15C 폴리사카라이드에 결합할 수 있는 IgG 항체를 인간에서 유발할 수 있다.

[0159] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 본원에 개시된 바와 같은 옵소닌포식작용 검정 (OPA)에서 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에를 사멸할 수 있는 항체의 형성을 유도한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 본원에 개시된 바와 같은 OPA 검정에서 테스트되었을 때, 접합되지 않은 천연 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드로 수득된 OPA 역가보다 OPA 역가가 더 크다.

[0160] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 본원에 개시된 바와 같은 옵소닌포식작용 검정에서 혈청형 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에를 사멸시킬 수 있는 항체의 형성을 유도한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 본원에 개시된 바와 같은 OPA 검정에서 테스트되었을 때, 비접합된 천연 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15C 피막 폴리사카라이드로 수득된 OPA 역가보다 OPA 역가가 더 크다.

[0161] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 본원에 개시된 바와 같은 옵소닌포식작용 검정에서 혈청형 15B 및 15C 및/또는 15A 스트렙토코쿠스 뉴모니아에를 사멸시킬 수 있는 항체의 형성을 유도한다.

[0162] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은, 대상체에게 투여되었을 때, 혈청형 15B 및 15C를 사멸시킬 수 있는 항체의 형성을 유도한다.

[0163] 기능성 항체 및 보체의 존재 하에서의 포식작용 이펙터 세포에 의한 에스. 뉴모니아에 세포의 사멸을 측정하는 폐렴구균 옵소닌포식작용 검정 (OPA)은 폐렴구균 백신의 유효성을 평가하기 위한 중요한 대용물인 것으로 고려된다.

[0164] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 세포, 테스트될 열-불활성화 인간 혈청, 분화된 HL-60 세포 (포식세포) 및 외인성 보체 공급원 (예를 들어, 아기 토끼 보체)의 혼합물을 함께 인큐베이션함으로써 옵소닌포식작용 검정 (OPA)을

수행할 수 있다. 인큐베이션 동안 옵소닌포식작용이 진행되고, 옵소닌포식작용 시 항체 및 보체로 코팅된 박테리아 세포가 사멸하게 된다. 검정 혼합물을 플레이팅함으로써 옵소닌포식작용을 모면한 생존 박테리아의 형성 단위 (cfu)를 결정한다. OPA 역가는 테스트 혈청이 없는 대조군 웰에 비해 박테리아 카운트의 50% 감소를 생성하는 역수 희석도로서 정의된다. OPA 역가는 이러한 50% 사멸 차단값을 포함하는 2개의 희석도로부터 내삽된다.

[0165] 1:8 이상의 종점 역가가 이들 사멸형 OPA에서 양성 결과로서 간주된다.

[0166] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 옵소닌포식작용 사멸 검정 (OPA)에 의해 결정 시 대상체의 적어도 50%에서 에스. 뉴모니아에 혈청형 15B에 대해 적어도 1:8의 역가를 유발할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 옵소닌포식작용 사멸 검정 (OPA)에 의해 결정 시 대상체의 적어도 60%; 70%, 80%, 90%, 또는 적어도 93%에서 에스. 뉴모니아에 혈청형 15B에 대해 적어도 1:8의 역가를 유발할 수 있다.

[0167] 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 옵소닌포식작용 사멸 검정 (OPA)에 의해 결정 시 대상체의 적어도 50%에서 에스. 뉴모니아에 혈청형 15C에 대해 적어도 1:8의 역가를 유발할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 옵소닌포식작용 사멸 검정 (OPA)에 의해 결정 시 대상체의 적어도 60%; 70%, 80%, 90%, 또는 적어도 95%에서 에스. 뉴모니아에 혈청형 15C에 대해 적어도 1:8의 역가를 유발할 수 있다.

[0168] 관련 기술분야에서 인정된 방법을 사용하여 본 발명의 면역원성 조성물을 제제화할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 면역원성 접합체를 생리학상 허용되는 비히클과 함께 제제화하여 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 완충 염수, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 덱스트로스 용액을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0169] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 적어도 1종의 추가의 항원을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 적어도 1종의 추가의 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드를 포함할 수 있다.

[0170] 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 담체 단백질에 접합된 적어도 1종의 추가의 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드를 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 담체 단백질은 CRM_{197}이다.

[0171] 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 1종 이상의 아주반트를 포함한다. 본원에 정의된 바와 같이, "아주반트"는 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성을 강화하는 역할을 하는 물질이다. 따라서, 아주반트는 종종 면역 반응을 부스팅하도록 제공되고, 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 조성물의 유효성을 강화하기 위한 적합한 아주반트는 하기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다:

[0172] (1) 알루미늄 염 (명반), 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄 등;

[0173] (2) 수중유 에멀젼 제제 (다른 특정 면역자극제 예컨대 뮤라밀 펩티드 (하기 정의됨) 또는 박테리아 세포벽 성분을 함유하거나 또는 함유하지 않음), 예를 들어,

[0174] (a) 5% 스쿠알렌, 0.5% 트윈(Tween) 80, 및 0.5% 스판(Span) 85를 함유하고 (임의로, 필수적이지는 않지만 다양한 양의 MTP-PE (하기 참조)를 함유함), 미세유동화기 예컨대 모델 110Y 미세유동화기 (마이크로플루이딕스(Microfluidics), 매사추세츠주 뉴톤)를 사용하여 마이크로미터 미만의 입자로 제제화된, MF59 (PCT 공개 번호 WO 90/14837),

[0175] (b) 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉(pluronic)-차단 중합체 L121, 및 thr-MDP (하기 참조)를 함유하고, 마이크로미터 미만의 에멀젼으로 미세유동화되었거나 또는 더 큰 입자 크기의 에멀젼이 생성되도록 와동된 SAF, 및

[0176] (c) 2% 스쿠알렌, 0.2% 트윈 80, 및 미국 특허 번호 4,912,094 (코릭사(Corixa))에 기재된 3-O-탈아실화 모노포스포릴리피드 A (MPL™), 트레할로스 디미콜레이트 (TDM) 및 세포벽 골격 (CWS)으로 이루어진 군으로부터의 1종 이상의 박테리아 세포벽 성분, 바람직하게는 MPL + CWS (데톡스(Detox)™)를 함유하는 리비(Ribi)™ 아주반트 시스템 (RAS) (코릭사, 몬타나주 해밀턴);

[0177] (3) 사포닌 아주반트, 예컨대 퀼(Quil) A 또는 스티뮬론(STIMULON)™ QS-21 (안티제닉스(Antigenics), 매사추세츠주 프레이밍햄) (미국 특허 번호 5,057,540) 또는 이로부터 생성된 입자 예컨대 ISCOM (면역자극 복합체)가 사용될 수 있다;

[0178] (4) 박테리아 리포폴리사카라이드, 합성 지질 A 유사체 예컨대 아미노알킬 글루코스아민 포스페이트 화합물

(AGP), 또는 그의 유도체 또는 유사체 (코릭사로부터 입수가능하고, 미국 특허 번호 6,113,918에 기재되어 있으며; 한 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코피라노시드이고, 이는 529로 또한 공지되어 있고 (기존에는 RC529로 공지됨), 수성 형태로서 또는 안정적인 에멀젼으로서 제제화된다), 합성 폴리뉴클레오티드 예컨대 CpG 모티프(들)를 함유하는 올리고뉴클레오티드 (미국 특허 번호 6,207,646);

[0179] (5) 시토카인, 예컨대 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 등), 인터페론 (예를 들어, 감마 인터페론), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 종양 괴사 인자 (TNF), 공동자극 분자 87-1 및 87-2 등;

[0180] (6) 박테리아 ADP-리보실화 독소의 해독 돌연변이체 예컨대 야생형 또는 돌연변이체 형태의 콜레라 독소 (CT), 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 00/18434 (WO 02/098368 및 WO 02/098369를 또한 참조한다)에 따른 아미노산 위치 29의 글루탐산이 또 다른 아미노산, 바람직하게는 히스티딘으로 교체된 것, 백일해 독소 (PT), 또는 이. 콜라이(E. coli) 열-불안정 독소 (LT), 특히 LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (예를 들어, WO 93/13302 및 WO 92/19265 참조); 및

[0181] (7) 면역자극제로서 작용하여 조성물의 유효성을 강화하는 기타 물질.

[0182] 뮤라밀 펩티드는 N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP), N-아세틸-노르뮤라밀-L-알라닌-2-(1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE) 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0183] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 면역원성 조성물은 CpG 올리고뉴클레오티드를 아주반트로서 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 CpG 올리고뉴클레오티드는 면역자극성 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 (CpG ODN)를 지칭하고, 따라서 이들 용어는 달리 지시되지 않는 한 상호교환가능하게 사용된다. 면역자극성 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드는, 임의로 특정한 바람직한 염기 배경 내에, 비-메틸화 시토신-구아닌 디뉴클레오티드인 면역자극성 CpG 모티프를 1개 이상 함유한다. CpG 면역자극성 모티프의 메틸화 상태는 일반적으로 이러한 디뉴클레오티드 내의 시토신 잔기를 지칭한다. 적어도 1개의 비-메틸화 CpG 디뉴클레오티드를 함유하는 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 포스페이트 결합을 통해 3' 구아닌에 연결된 5' 비-메틸화 시토신을 함유하고 톨(Toll)-유사 수용체 9 (TLR-9)에 결합하는 것을 통해 면역계를 활성화시키는 올리고뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 1종 이상의 메틸화 CpG 디뉴클레오티드를 함유할 수 있고, 이는 TLR9를 통해, 그러나 CpG 모티프(들)가 메틸화되지 않은 것만큼 강하지는 않게 면역계를 활성화시킬 것이다. CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 팔린드롬을 포함할 수 있고, 차례로 이러한 팔린드롬이 CpG 디뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 미국 특허 번호 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; 및 6,339,068을 포함하는 다수의 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 및 기타 간행물에 CpG 올리고뉴클레오티드가 기재되어 있다.

[0184] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 면역원성 조성물은 WO2010/125480의 3면 22행 내지 12면 36행에 기재된 CpG 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것을 포함한다.

[0185] CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 여러 클래스가 확인되었다. 이들은 A, B, C 및 P 클래스로 지칭되고, WO2010/125480의 3면 22행 내지 12면 36행에 더욱 상세하게 기재되어 있다. 본 발명의 방법은 이들 다양한 클래스의 CpG 면역자극성 올리고뉴클레오티드의 사용을 포함한다.

[0186] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 면역원성 조성물은 A 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 "A 클래스" CpG 올리고뉴클레오티드는 하기 핵산 서열을 갖는다: 5' GGGGACGACGTCGTGGGGGGG 3' (서열식별번호: 1). A-클래스 올리고뉴클레오티드의 일부 비-제한적 예는 5' G*G*G_G_A_C_G_A_C_G_T_C_G_T_G_G*G*G*G*G*G 3' (서열식별번호: 2) [식 중, *는 포스포로티오에이트 결합을 지칭하고, _는 포스포디에스테르 결합을 지칭한다]를 포함한다.

[0187] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 면역원성 조성물은 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 CpG 올리고뉴클레오티드는 적어도 하기 식으로 표시되는 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드이다:

[0188] 5' $X_1X_2CGX_3X_4$ 3' [식 중, X_1, X_2, X_3, 및 X_4는 뉴클레오티드이다]. 한 실시양태에서, X_2는 아데닌, 구아닌 또는

티민이다. 또 다른 실시양태에서, X_3은 시토신, 아데닌, 또는 티민이다.

[0189] 본 발명의 B 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드 서열은 상기 및 미국 특허 번호 6,194,388, 6,207,646, 6,214,806, 6,218,371, 6,239,116 및 6,339,068에서 광범위하게 기재된 것들이다. 예시적인 서열은 이들 후자의 출원 및 특허에 개시된 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0190] 한 실시양태에서, 본 발명의 "B 클래스" CpG 올리고뉴클레오티드는 하기 핵산 서열을 갖는다:

[0191] 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (서열식별번호: 3), 또는

[0192] 5' TCGTCGTTTTTCGGTCGTTTT 3' (서열식별번호: 4), 또는

[0193] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3' (서열식별번호: 5), 또는

[0194] 5' TCGTCGTTTCGTCGTTTTGTCGTT 3' (서열식별번호: 6), 또는

[0195] 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA 3' (서열식별번호: 7).

[0196] 임의의 이들 서열에서, 모든 연결은 모두 포스포로티오에이트 결합일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 임의의 이들 서열에서, 연결 중 1개 이상이 포스포디에스테르, 바람직하게는 CpG 모티프의 "C"와 "G" 사이의 포스포디에스테르이어서, 세미-소프트(semi-soft) CpG 올리고뉴클레오티드가 제조될 수 있다. 임의의 이들 서열에서, 에틸-우리딘 또는 할로겐이 5' T를 치환할 수 있고, 할로겐 치환의 예는 브로모-우리딘 또는 아이오도-우리딘을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0197] B-클래스 올리고뉴클레오티드의 일부 비-제한적 예는 하기를 포함한다:

[0198] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T 3' (서열식별번호: 8), 또는

[0199] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T 3' (서열식별번호: 9), 또는

[0200] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (서열식별번호: 10), 또는

[0201] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (서열식별번호: 11), 또는

[0202] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A 3' (서열식별번호: 12)

[0203] [식 중, *는 포스포로티오에이트 결합을 지칭한다].

[0204] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 면역원성 조성물은 C 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 "C 클래스" CpG 올리고뉴클레오티드는 하기 핵산 서열을 갖는다:

[0205] 5' TCGCGTCGTTCGGCGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 13), 또는

[0206] 5' TCGTCGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 14), 또는

[0207] 5' TCGGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 15), 또는

[0208] 5' TCGGACGTTCGGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 16), 또는

[0209] 5' TCGCGTCGTTCGGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 17), 또는

[0210] 5' TCGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 18), 또는

[0211] 5' TCGACGTTCGGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 19), 또는

[0212] 5' TCGCGTCGTTCGGCGCCG 3' (서열식별번호: 20), 또는

[0213] 5' TCGCGACGTTCGGCGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 21), 또는

[0214] 5' TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 22), 또는

[0215] 5' TCGTCGTTTTCGGCGGCCGCCG 3' (서열식별번호: 23), 또는

[0216] 5' TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG 3' (서열식별번호: 24), 또는

[0217] 5' TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCCGT 3' (서열식별번호: 25).

[0218] 임의의 이들 서열에서, 모든 연결은 모두 포스포로티오에이트 결합일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 임의의

이들 서열에서, 연결 중 1개 이상이 포스포디에스테르, 바람직하게는 CpG 모티프의 "C"와 "G" 사이의 포스포디에스테르이어서, 세미-소프트 CpG 올리고뉴클레오티드가 제조될 수 있다.

[0219] C-클래스 올리고뉴클레오티드의 일부 비-제한적 예는 하기를 포함한다:

[0220] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 26), 또는

[0221] 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 27), 또는

[0222] 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 28), 또는

[0223] 5' T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 29), 또는

[0224] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 30), 또는

[0225] 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 31), 또는

[0226] 5' T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 32), 또는

[0227] 5' T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 33), 또는

[0228] 5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 34), 또는

[0229] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 35), 또는

[0230] 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 36), 또는

[0231] 5' T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 37), 또는

[0232] 5' T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*C*C*G*T 3' (서열식별번호: 38)

[0233] [식 중, *는 포스포로티오에이트 결합을 지칭하고, _는 포스포디에스테르 결합을 지칭한다].

[0234] 임의의 이들 서열에서, 에틸-우리딘 또는 할로겐이 5' T를 치환할 수 있고, 할로겐 치환의 예는 브로모-우리딘 또는 아이오도-우리딘을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0235] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 면역원성 조성물은 P 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 CpG 올리고뉴클레오티드는 5' TLR 활성화 도메인 및 2개 이상의 팔린드롬 영역 (1개의 팔린드롬 영역이 뉴클레오티드 6개 이상의 길이의 5' 팔린드롬 영역이고, 뉴클레오티드 8개 이상의 길이의 3' 팔린드롬 영역에 직접적으로 또는 스페이서를 통해 연결된다)를 함유하는 P 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드이고, 이러한 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 YpR 디뉴클레오티드를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G (서열식별번호: 27)가 아니다. 한 실시양태에서, P 클래스 CpG 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 비-메틸화 CpG 디뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, TLR 활성화 도메인은 TCG, TTCG, TTTCG, TYpR, TTYpR, TTTYpR, UCG, UUCG, UUUCG, TTT, 또는 TTTT이다. 또 다른 실시양태에서, TLR 활성화 도메인은 5' 팔린드롬 영역 내에 있다. 또 다른 실시양태에서, TLR 활성화 도메인은 5' 팔린드롬 영역에 대해 바로 5'이다.

[0236] 한 실시양태에서, 본 발명의 "P 클래스" CpG 올리고뉴클레오티드는 하기 핵산 서열을 갖는다: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGCGCCG 3' (서열식별번호: 39).

[0237] 상기 서열에서, 모든 연결은 모두 포스포로티오에이트 결합일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 연결 중 1개 이상이 포스포디에스테르, 바람직하게는 CpG 모티프의 "C"와 "G" 사이의 포스포디에스테르이어서, 세미-소프트 CpG 올리고뉴클레오티드가 제조될 수 있다. 임의의 이들 서열에서, 에틸-우리딘 또는 할로겐이 5' T를 치환할 수 있고, 할로겐 치환의 예는 브로모-우리딘 또는 아이오도-우리딘을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0238] P-클래스 올리고뉴클레오티드의 일부 비-제한적 예는 하기를 포함한다:

[0239] 5' T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (서열식별번호: 40)

[0240] [식 중, *는 포스포로티오에이트 결합을 지칭하고, _는 포스포디에스테르 결합을 지칭한다].

[0241] 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드간 연결이 포스포로티오에이트 연결이다. 또 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 포스포디에스테르-유사 연결을 포함한다. 또 다른 실시양태

에서, 포스포디에스테르-유사 연결은 포스포디에스테르 연결이다. 또 다른 실시양태에서, 친지성 기가 올리고뉴클레오티드에 접합된다. 한 실시양태에서, 친지성 기는 콜레스테롤이다.

[0242] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 CpG 올리고뉴클레오티드의 모든 뉴클레오티드간 연결은 포스포디에스테르 결합이다 (PCT 출원 WO2007/026190에 개시된 바와 같은 "소프트" 올리고뉴클레오티드). 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오티드는 분해에 대해 저항성이게 된다 (예를 들어, 안정화된다). "안정화된 올리고뉴클레오티드"는 생체 내에서의 분해 (예를 들어 엑소- 또는 엔도-뉴클레아제를 통한 분해)에 대해 비교적 저항성인 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 백본 변형에 의해 핵산 안정화가 달성될 수 있다. 포스포로티오에이트 연결이 있는 올리고뉴클레오티드는 최대 활성을 제공하고, 세포내 엑소- 및 엔도-뉴클레아제에 의한 분해로부터 올리고뉴클레오티드를 보호한다.

[0243] 면역자극성 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 연결의 조합이 있는 키메라 백본을 가질 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 키메라 백본은 적어도 1개의 뉴클레오티드간 연결이 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사이고, 적어도 1개의 다른 뉴클레오티드간 연결이 안정화된 뉴클레오티드간 연결이며, 적어도 1개의 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르-유사 연결과 적어도 1개의 안정화된 연결이 상이한, 부분적으로 안정화된 백본을 지칭한다. 포스포디에스테르 연결이 CpG 모티프 내에 우선적으로 위치하는 경우에, PCT 출원 WO2007/026190에 기재된 바와 같이 이러한 분자는 "세미-소프트"로 칭해진다.

[0244] CpG 올리고뉴클레오티드의 크기 (즉, 올리고뉴클레오티드의 길이에 걸쳐 있는 뉴클레오티드 잔기의 개수)가 올리고뉴클레오티드의 자극 활성에 또한 기여할 수 있다. 세포 내로의 흡수를 용이하게 하기 위해, 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 최소 길이가 뉴클레오티드 잔기 6개일 수 있다. 충분한 면역자극성 모티프가 존재하면 뉴클레오티드 6개를 초과하는 임의 크기 (심지어 수 kb 길이)의 올리고뉴클레오티드가 면역 반응을 유도할 수 있는데, 이는 더 큰 올리고뉴클레오티드가 세포 내부에서 분해되기 때문이다. 특정 실시양태에서, CpG 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 6개 내지 100개의 길이이고, 바람직하게는 뉴클레오티드 8개 내지 30개의 길이다. 중요한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 및 올리고뉴클레오티드는 플라스미드 또는 발현 벡터가 아니다.

[0245] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 CpG 올리고뉴클레오티드는 WO2007/026190의 134 내지 147 단락에 기재된 바와 같이 치환 또는 변형, 예컨대 염기 및/또는 당 내의 치환 또는 변형을 포함한다.

[0246] 한 실시양태에서, 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오티드는 화학적으로 변형된다. 화학적 변형의 예는 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Uhlmann E. et al. (1990), Chem. Rev. 90:543, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, USA 1993]; [Crooke, S.T. et al. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129]; 및 [Hunziker J. et al., (1995), Mod. Synth. Methods 7:331-417]에 기재되어 있다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드는 1종 이상의 변형이 있을 수 있고, 각각의 변형은 천연 DNA 또는 RNA로 구성된 동일한 서열의 올리고뉴클레오티드와 비교하여 특정한 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 브리지 및/또는 특정한 β-D-리보스 단위 및/또는 특정한 천연 뉴클레오시드 위치에 위치한다.

[0247] 본 발명의 일부 실시양태에서, CpG-함유 핵산은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 따라 간단하게 면역원성 담체와 혼합될 수 있다 (예를 들어 WO03/024480 참조).

[0248] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 임의의 본원에 개시된 면역원성 조성물은 2 μg 내지 100 mg의 CpG 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 0.1 mg 내지 50 mg의 CpG 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 0.2 mg 내지 10 mg의 CpG 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 0.3 mg 내지 5 mg의 CpG 올리고뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 2 mg CpG 올리고뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 0.75 내지 1.5 mg의 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은 대략 1mg의 CpG 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0249] 바람직한 실시양태에서, 아주반트는 인산알루미늄, 황산알루미늄 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 알루미늄-기반 아주반트이다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 면역원성 조성물은 인산알루미늄 아주반트를 포함한다.

[0250] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 완충제, 동결보호제, 염, 2가 양이온, 비이온성 세제, 유리 라디칼 산화 억제제, 희석제 또는 담체 중 적어도 1개를 추가로 포함한다.

[0251] 면역원성 조성물은 트리스 (트리메타민), 포스페이트, 아세테이트, 보레이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘 및 숙시네이트로부터 선택된, 그러나 이에 제한되지 않는 1종 이상의 생리학상 허용되는 완충제를 임의로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 5.0 내지 약 7.0, 바람직하게는 약 5.5 내지 약 6.5의 pH 범위 내로

완충된다.

[0252] 면역원성 조성물은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리소르베이트-80 (트윈 80), 폴리소르베이트-60 (트윈 60), 폴리소르베이트-40 (트윈 40) 및 폴리소르베이트-20 (트윈 20), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 (브리지(Brij) 58, 브리지 35을 포함하지만 이에 제한되지 않음), 뿐만 아니라 기타 물질 예컨대 트리톤 X-100; 트리톤 X- 114, NP40, 스판 85 및 플루로닉 시리즈의 비-이온성 계면활성제 (예를 들어, 플루로닉 121)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 1종 이상의 비-이온성 계면활성제를 임의로 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 폴리소르베이트-80 또는 폴리소르베이트-40, 바람직하게는 폴리소르베이트-80을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 면역원성 조성물은 약 0.001% 내지 약 2% (약 0.25% 이하가 바람직함) 농도의 폴리소르베이트-80, 또는 약 0.001% 내지 1% (약 0.5% 이하가 바람직함) 농도의 폴리소르베이트-40을 포함한다.

[0253] 추가로, 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물을 포함하는 백신에 관한 것이다.

[0254] 면역 반응을 유도하고 감염에 대해 보호하는 방법

[0255] 본 개시내용은 본원에 기재된 면역원성 조성물의 사용 방법을 또한 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용의 한 실시양태는 면역원성 양의 임의의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0256] 본 개시내용의 한 실시양태는 면역원성 양의 임의의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하는 방법, 또는 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하는 방법, 또는 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키는 방법을 제공한다.

[0257] 본 개시내용의 한 실시양태는 면역원성 양의 임의의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하는 방법, 또는 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하는 방법, 또는 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키는 방법을 제공한다.

[0258] 본 개시내용의 한 실시양태는 면역원성 양의 임의의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 혈청형 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하는 방법, 또는 혈청형 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하는 방법, 또는 혈청형 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키는 방법을 제공한다.

[0259] 본 개시내용의 한 실시양태는 면역원성 양의 임의의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 혈청형 15A 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하는 방법, 또는 혈청형 15A 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하는 방법, 또는 혈청형 15A 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키는 방법을 제공한다.

[0260] 본 개시내용의 한 실시양태는 치료적 또는 예방적 유효량의 본원에 기재된 면역원성 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에와 연관된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태는 본원에 기재된 면역원성 조성물로부터 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 제제를 생성하고, 상기 항체 제제를 사용하여 대상체에게 수동 면역을 부여하는 것을 포함하는, 대상체에서 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에와 연관된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0261] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하고/하거나, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하고/하거나, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키고/시키거나, 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하고/하거나, 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하고/하거나, 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키기 위한 의약의 제작을 위한 본원에 개시된 면역원성 접합체 또는

면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0262] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하고/하거나, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하고/하거나, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키고/시키거나, 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 대상체를 보호하고/하거나, 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염을 예방하고/하거나, 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 야기되는 감염과 연관된 적어도 하나의 증상의 중증도를 감소시키거나 또는 그의 발병을 지연시키기 위한 본원에 개시된 면역원성 접합체 또는 면역원성 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0263] 면역원성 조성물에 대한 "면역 반응"은 관심 면역원성 조성물 또는 백신 조성물 내에 존재하는 분자에 대한 체액성 및/또는 세포 매개 면역 반응이 대상체에서 발달되는 것이다. 본 개시내용의 목적을 위해, "체액성 면역 반응"은 항체 매개 면역 반응이고, 본 개시내용의 면역원성 조성물 또는 백신 내의 항원을 인식하고 이에 대한 약간의 친화력으로 이와 결합하는 항체의 유도 및 생성을 수반하는 한편, "세포 매개 면역 반응"은 T-세포 및/또는 기타 백색 혈액 세포에 의해 매개되는 것이다. "세포 매개 면역 반응"은 주요 조직적합성 복합체 (MHC)의 클래스 I 또는 클래스 II 분자, CD1 또는 기타 비-고전적 MHC-유사 분자와 회합된 항원성 에피토프의 제시에 의해 유발된다. 이는 항원 특이적 CD4+ T 헬퍼 세포 또는 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 ("CTL")를 활성화시킨다. CTL은 고전적 또는 비-고전적 MHC에 의해 코딩되고 세포 표면 상에서 발현되는 단백질과 회합되어 제시되는 펩티드 항원에 대한 특이성이 있다. CTL은 세포내 미생물의 세포내 파괴, 또는 이러한 미생물로 감염된 세포의 용해를 유도 및 촉진하는 것을 돕는다. 세포성 면역의 또 다른 측면은 헬퍼 T-세포에 의한 항원 특이적 반응을 수반한다. 헬퍼 T-세포는 비-특이적 이펙터 세포의 기능을 자극하고 그의 활성을 고전적 또는 비-고전적 MHC 분자와 회합된 펩티드 또는 기타 항원을 자신의 표면 상에 디스플레이하는 세포에 대해 집중시키는 것을 돕는 작용을 한다. "세포 매개 면역 반응"은 활성화된 T-세포 및/또는 기타 백색 혈액 세포 (CD4+ 및 CD8+ T-세포로부터 유래된 것을 포함함)에 의해 생산된 시토카인, 케모카인 및 기타 이러한 분자의 생산을 또한 지칭한다. 세포 매개 면역학적 반응을 자극하는 특정한 항원 또는 조성물의 능력을 다수의 검정, 예컨대 림프구증식 (림프구 활성화) 검정, CTL 세포독성 세포 검정, 민감화된 대상체에서 항원에 대해 특이적인 T 림프구에 대해 검정하는 것, 또는 항원으로의 재자극에 대한 반응으로 T 세포에 의해 시토카인이 생산되는 것을 측정하는 것에 의해 결정할 수 있다. 이러한 검정은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Erickson et al. (1993) J. Immunol. 151:4189-4199]; 및 [Doe et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376]을 참조한다.

[0264] 본원에 사용된 바와 같이, "치료" (그의 변형, 예를 들어, "치료하다" 또는 "치료된" 포함)는 하기 중 임의의 1종 이상을 의미한다: (i) 전통적인 백신에서와 같은, 감염 또는 재감염 예방, (ii) 증상 중증도의 감소 또는 증상 제거, 및 (iii) 해당 병원체 또는 장애의 실질적인 또는 완전한 제거. 따라서, 예방적으로 (감염 전에), 또는 치료적으로 (감염 후에), 치료가 실행될 수 있다. 본 개시내용에서, 예방적 치료가 바람직한 방식이다. 본 개시내용의 특정한 실시양태에 따르면, 혈청형 15A, 15B 및/또는 15C (바람직하게는 15B 및/또는 15C, 더욱 바람직하게는 15B) 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 감염에 대해 숙주 동물을 치료 (예방적 및/또는 치료적으로 면역화하는 것을 포함함)하는 조성물 및 방법이 제공된다. 본 개시내용의 방법은 대상체에게 예방적 및/또는 치료적 면역을 부여하는데 유용하다. 본 개시내용의 방법은 또한 생물의학 연구 용도를 위해 대상체에서 실행될 수 있다.

[0265] 본원에 둘 다 상호교환가능하게 사용된 "면역원성 양" 및 "면역학적 유효량"은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 검정에 의해 측정 시 면역 반응 (세포성 (T-세포) 또는 체액성 (B-세포 또는 항체) 반응 중 하나 또는 둘 다)를 유발하는데 충분한 항원 또는 면역원성 조성물의 양을 지칭한다.

[0266] 바람직한 실시양태에서, 상기 대상체는 인간이다. 가장 바람직한 실시양태에서, 상기 대상체는 신생아 (즉, 3개월령 미만), 영아 (3개월령 내지 1세), 또는 유아 (즉, 1세 내지 4세)이다.

[0267] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 면역원성 조성물은 백신으로서 사용하기 위한 것이다.

[0268] 이러한 실시양태에서, 백신이 접종될 대상체는 1세 미만일 수 있다. 예를 들어, 백신이 접종될 대상체는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월령일 수 있다. 한 실시양태에서, 백신이 접종될 대상체는 약 2, 4 또는 6개월령이다. 또 다른 실시양태에서, 백신이 접종될 대상체는 2세 미만이다. 예를 들어 백신이 접종될 대상체는 약 12-15개월령일 수 있다. 일부 경우에는, 적게는 1회 용량의 본 발명에 따른 면역원성 조성물이 필

요하지만, 일부 경우에는 제2, 제3 또는 제4 용량이 제공될 수 있다 (처방 체계 섹션 참조).

[0269] 본 발명의 한 실시양태에서, 백신이 접종될 대상체는 50세 이상의 성인, 더욱 바람직하게는 55세 이상의 성인이다. 한 실시양태에서, 백신이 접종될 대상체는 65세 이상, 70세 이상, 75세 이상, 또는 80세 이상의 성인이다.

[0270] 한 실시양태에서, 백신이 접종될 대상체는 면역손상 개체, 특히 인간이다. 일반적으로 면역손상 개체는 감염체에 의한 챌린지에 대한 일반적인 체액성 또는 세포성 방어를 개시하는 능력의 약화 또는 감소를 나타내는 사람으로 정의된다.

[0271] 본 발명의 한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 면역계를 손상시키고 폐렴구균 질환에 대해 보호하거나 그를 치료하는데 불출분한 항체 반응을 생성하는 질환 또는 상태를 앓고 있다.

[0272] 한 실시양태에서, 상기 질환은 1차 면역결핍 장애이다. 바람직하게는, 상기 1차 면역결핍 장애는 복합 T- 및 B-세포 면역결핍, 항체 결핍, 명확하게 정의된 증후군, 면역 조절장애 질환, 식세포 장애, 선천성 면역 결핍, 자가염증성 장애, 및 보체 결핍으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 1차 면역결핍 장애는 PCT 출원 WO2010/125480의 24면 11행 내지 25면 19행에 개시된 것으로부터 선택된다.

[0273] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 HIV-감염, 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 암, 만성 심장 또는 폐 장애, 울혈성 심부전, 당뇨병, 만성 간 질환, 알콜 중독, 간경변, 척수액 누출, 심근증, 만성 기관지염, 폐기종, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 비장 기능부전 (예컨대 겸상적혈구 질환), 비장 기능의 결여 (무비증), 혈액 악성 종양, 백혈병, 다발성 골수종, 호지킨병, 림프종, 신부전, 신 증후군 및 천식으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환을 앓고 있다.

[0274] 본 발명의 한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 영양실조를 앓고 있다.

[0275] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 감염에 대한 신체 저항을 저하시키는 약물 또는 치료를 받고 있다. 한 실시양태에서, 상기 약물은 PCT 출원 WO2010/125480의 26면 33행 내지 26면 40행에 개시된 것으로부터 선택된다.

[0276] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 흡연자이다.

[0277] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 백색 혈액 세포 카운트 (백혈구 카운트)가 리터당 5 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 4 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 3 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 2 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 1 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 0.5 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 0.3 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 0.1 x 10^9개 미만의 세포이다.

[0278] 백색 혈액 세포 카운트 (백혈구 카운트): 혈액 내의 백색 혈액 세포 (WBC)의 개수. WBC는 일반적으로 CBC (온혈구 카운트)의 일부로서 측정된다. 백색 혈액 세포는 혈액 내의 감염과 싸우는 세포이고, 적혈구로 공지된 적색 (산소-운반) 혈액 세포와 구별된다. 호중구 (다형핵 백혈구, PMN), 띠 세포 (약간 미성숙된 호중구), T형 림프구 (T 세포), B형 림프구 (B 세포), 단핵구, 호산구 및 호염기구를 포함하여 여러 유형의 백색 혈액 세포가 있다. 모든 유형의 백색 혈액 세포가 백색 혈액 세포 카운트에서 반영된다. 백색 혈액 세포 카운트에 대한 정상 범위는 일반적으로 혈액 세제곱 밀리미터당 4,300 내지 10,800개의 세포이다. 이는 백혈구 카운트로서 또한 지칭될 수 있고, 리터당 4.3 - 10.8 x 10^9개의 세포로서 국제 단위로 표현될 수 있다.

[0279] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 호중구감소증을 앓고 있다. 본 발명의 특정한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 호중구 카운트가 리터당 2 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 1 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 0.5 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 0.1 x 10^9개 미만의 세포, 또는 리터당 0.05 x 10^9개 미만의 세포이다.

[0280] 낮은 백색 혈액 세포 카운트 또는 "호중구감소증"은 순환 혈액 내의 비정상적으로 낮은 수준의 호중구를 특징으로 하는 상태이다. 호중구는 감염을 예방하고 이와 싸우는 것을 돕는 특정 종류의 백색 혈액 세포이다. 암 환자가 호중구감소증을 겪는 가장 통상적인 원인은 화학요법의 부작용으로서 겪는 것이다. 화학요법에 의해 유도된 호중구감소증은 환자의 감염 위험을 증가시키고, 암 치료를 방해한다.

[0281] 본 발명의 특정한 실시양태에서, 백신이 접종될 면역손상 대상체는 CD4+ 세포 카운트가 500/mm^3 미만이거나, 또

는 CD4+ 세포 카운트가 300/㎣ 미만이거나, 또는 CD4+ 세포 카운트가 200/㎣ 미만이거나, CD4+ 세포 카운트가 100/㎣ 미만이거나, CD4+ 세포 카운트가 75/㎣ 미만이거나, 또는 CD4+ 세포 카운트가 50/㎣ 미만이다.

[0282] CD4 세포 테스트는 일반적으로 1 ㎣ 내의 세포의 개수로서 보고된다. 정상적인 CD4 카운트는 500 내지 1600이고, CD8 카운트는 375 내지 1100이다. HIV에 걸린 사람들에서 CD4 카운트가 극적으로 하락한다.

[0283] 본 발명의 한 실시양태에서, 임의의 본원에 개시된 면역손상 대상체는 남성 인간 또는 여성 인간이다.

[0284] 조성물 내의 접합체의 양은 일반적으로 이러한 접합체에 접합된 폴리사카라이드 및 비접합된 폴리사카라이드의 총량을 기초로 계산된다. 예를 들어, 20%의 유리 폴리사카라이드가 있는 접합체는 100 μg 폴리사카라이드 용량 내에 약 80 μg의 접합된 폴리사카라이드 및 약 20 μg의 비접합된 폴리사카라이드가 있을 것이다. 접합체에 대한 단백질의 기여분은 접합체의 용량을 계산할 때 일반적으로 고려되지 않는다. 일반적으로, 각각의 용량은 0.1 내지 100 μg의 폴리사카라이드, 특히 0.1 내지 10 μg, 더욱 특히 1 내지 10 μg, 더욱 특히 1 내지 5 μg을 포함할 것이다. 바람직하게는, 각각의 용량은 약 1.1, 2, 2.2, 3, 3.3, 4, 4.4 μg의 폴리사카라이드를 포함할 것이다.

[0285] 특정한 면역원성 조성물 또는 백신에 대한 성분의 최적량은 대상체에서의 적합한 면역 반응을 관찰하는 것을 수반하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 최초의 백신 접종 후, 대상체에게 적당한 간격의 1회 또는 수회의 부스터 면역화를 제공할 수 있다.

[0286] 증식 검정에 의해, 세포용해 검정, 예컨대 자신의 특이적 표적 세포를 용해시키는 T-세포의 능력을 측정하는 크롬 방출 검정에 의해, 또는 혈청 내의 항원에 대해 특이적인 순환 항체의 수준을 측정함으로써 B-세포 활성 수준을 측정하는 것에 의해, 면역원으로서의 항원의 유효성을 측정할 수 있다. 항원 투여 후에 유도된 항원 특이적 항체의 혈청 수준을 측정하는 것에 의해, 더욱 구체적으로는, 본원에 기재된 바와 같이, 이렇게 유도된 항체의 특정한 백색 혈액 세포의 옵소닌포식작용 능력을 강화하는 능력을 측정하는 것에 의해 면역 반응을 또한 검출할 수 있다. 투여된 항원을 면역화된 숙주에 챌린지하는 것에 의해 면역 반응의 보호 수준을 측정할 수 있다. 예를 들어, 이에 대한 면역 반응이 요망되는 항원이 박테리아인 경우에, 동물에 이러한 박테리아 세포를 챌린지한 후의 생존 백분율 또는 사멸 백분율을 검출하는 것에 의해 면역원성 양의 항원에 의해 유도된 보호 수준이 측정된다. 한 실시양태에서, 박테리아 감염과 연관된 적어도 하나의 증상, 예를 들어, 감염과 연관된 발열을 측정하는 것에 의해 보호량이 측정될 수 있다. 다중 항원 또는 다중 성분 백신 또는 면역원성 조성물 내의 각각의 항원의 양은 각각의 다른 성분과 관련하여 변할 것이고, 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은 면역원성 및/또는 생체내 효능을 측정하는 절차를 포함할 것이다.

[0287] 본 개시내용은 본 개시내용의 피막 폴리사카라이드 또는 면역원성 접합체에 특이적으로, 그리고 선택적으로 결합하는 항체 및 항체 조성물을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 본 개시내용의 피막 폴리사카라이드 또는 면역원성 접합체를 투여했을 때 항체가 생성된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1종 이상의 본 개시내용의 피막 폴리사카라이드 또는 면역원성 접합체에 대해 지시된 정제 또는 단리된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 동물 효능 모델에서 또는 옵소닌포식작용 사멸 검정을 통해 박테리아를 사멸시키는 것에 의해 측정 시 기능성이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 대상체에게 수동 면역을 부여한다. 본 개시내용은, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 기술을 사용하여, 본 개시내용의 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자, 및 본 개시내용의 항체 또는 항체 조성물을 생산하는 세포, 세포주 (예컨대 항체의 재조합 생산을 위한 하이브리도마 세포 또는 기타 조작된 세포주) 또는 트랜스제닉 동물을 추가로 제공한다.

[0288] 실시예

[0289] 실시예 1: 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 제조

[0290] 1.1 발효 및 정제

[0291] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 박테리아로부터 직접적으로 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 수득할 수 있다 (예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 20060228380, 20060228381, 20070184071, 20070184072, 20070231340, 및 20080102498 또는 WO2008118752에 개시된 방법을 참조한다). 혈청형 15B 스트렙토코쿠스 뉴모니아에를 시드 병에서 성장시킨 후, 시드 발효기로 옮겼다. 표적화된 광학 밀도에 도달하였으면, 세포를 생산 발효기로 옮겼다. N-라우로일 사르코신을 첨가하여 발효 브로쓰를 불활성화시키

고, 한외여과 및 투석여과로 정제하였다.

[0292] 그 후, 정제된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 폴리사카라이드를 PANDA 2K 균질화기® (GEA 니로 소아비(GEA Niro Soavi))를 사용하여 고압 균질화로 사이징하여, 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 폴리사카라이드를 생산하였다.

[0293] 바람직하게는, 상기 방법에 의해 수득된 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하고, 50 kDa 내지 500 kDa, 바람직하게는 150 내지 350 kDa의 분자량을 갖는다.

[0294] 1.2 단리된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드의 산화

[0295] 계산된 양의 500 mM 인산칼륨 완충제 (pH 6.0) 및 WFI를 순차적으로 첨가함으로써 100 mM 인산칼륨 완충제 (pH 6.0 ± 0.2)에서 폴리사카라이드 산화를 수행하여, 2.0 g/L의 최종 폴리사카라이드 농도를 제공하였다. 필요하다면, 반응 pH를 대략 6.0으로 조정하였다. pH 조정 후, 반응 온도를 23 ± 2℃로 조정하였다. 대략 0.25 몰 당량의 소듐 퍼아이오데이트를 첨가함으로써 산화가 개시되었다. 대략 16시간 동안 23 ± 2℃에서 산화 반응을 수행하였다.

[0296] 활성화된 폴리사카라이드의 농축 및 투석여과를 10K MWCO 한외여과 카세트를 사용하여 수행하였다. 20배 투석여과부피의 WFI에 대해 투석여과를 수행하였다. 그 후, 정제된 활성화된 폴리사카라이드를 5 ± 3℃에서 보관하였다. 정제된 활성화된 사카라이드를 특히 (i) 비색 검정에 의한 사카라이드 농도, (ii) 비색 검정에 의한 알데히드 농도, (iii) 산화도, (iv) SEC-MALLS에 의한 분자량, 및 (v) O-아세틸 및 글리세롤의 존재에 의해 특성화하였다.

[0297] SEC-MALLS가 폴리사카라이드 및 폴리사카라이드-단백질 접합체의 분자량을 결정하는데 사용된다. SEC가 폴리사카라이드를 유체역학적 부피에 의해 분리하는데 사용된다. 굴절 지수 (RI) 및 다각도 레이저 광 산란 검출기 (MALLS)가 분자량 결정에 사용된다. 빛이 물질과 상호작용할 때, 빛이 산란되고, 산란된 빛의 양이 농도, dn/dc의 제곱 (특이 굴절 지수 증가), 및 물질의 몰질량과 관련된다. MALLS 검출기로부터의 산란된 빛 신호 및 RI 검출기로부터의 농도 신호로부터의 판독값을 기초로 분자량 측정치가 계산된다.

[0298] 활성화된 폴리사카라이드의 산화도 (DO = 당 반복 단위의 몰 / 알데히드의 몰)를 하기와 같이 결정하였다:

[0299] 다양한 비색 방법에 의해, 예를 들어, 안트론(Anthrone) 방법을 사용함으로써 당 반복 단위의 몰을 결정한다. 안트론 방법에 의해, 먼저 폴리사카라이드를 황산 및 열의 작용에 의해 모노사카라이드로 분해한다. 안트론 시약이 헥소스와 반응하여 황녹색 복합체를 형성하고, 그의 흡광도를 625 nm에서 분광광도법으로 판독한다. 검정의 범위 내에서, 흡광도는 존재하는 헥소스의 양에 직접적으로 비례한다.

[0300] 또한 동시에 MBTH 비색 방법을 사용하여 알데히드의 몰을 결정한다. MBTH 검정은 알데히드 기 (소정의 샘플로부터의 것)를 3-메틸-2-벤조티아졸론 히드라존 (MBTH 검정 시약)과 반응시키는 것에 의한 아진 화합물의 형성을 수반한다. 과량의 3-메틸-2-벤조티아졸론 히드라존이 산화되어 반응성 양이온을 형성한다. 반응성 양이온 및 아진이 반응하여 청색 발색단을 형성한다. 그 후, 형성된 발색단을 650 nm에서 분광기로 판독한다.

[0301] 바람직하게는, 상기 방법에 의해 수득된 활성화된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하고, 50 kDa 내지 500 kDa, 바람직하게는 100 내지 250 kDa의 분자량을 갖는다.

[0302] 1.3 활성화된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드와 CRM_{197}의 접합

[0303] 접합 공정은 하기 단계로 이루어진다:

[0304] a) 수크로스 부형제와의 배합, 및 동결건조

[0305] b) 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 CRM_{197}의 재구성

[0306] c) 활성화된 폴리사카라이드의 CRM_{197}으로의 접합, 및 캡핑

[0307] d) 접합체 정제

[0308] a) 수크로스 부형제와의 배합 및 동결건조

[0309] 활성화된 폴리사카라이드를 활성화된 폴리사카라이드 그램당 25 그램의 수크로스의 비로 수크로스와 배합하였다. 그 후, 배합된 혼합물의 병을 동결건조시켰다. 동결건조 후, 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 함유하는 병을 -20 ± 5℃에서 보관하였다. 계산된 양의 CRM_{197} 단백질을 별도로 쉘-냉동하고 동결건조시켰다. 동결건조된 CRM_{197}을 -20 ± 5℃에서 보관하였다.

[0310] b) 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드 및 CRM_{197} 단백질의 재구성

[0311] 동결건조된 활성화된 폴리사카라이드를 무수 디메틸 술폭시드 (DMSO)에서 재구성시켰다. 폴리사카라이드가 완전히 용해되었을 때, 동일한 양의 무수 DMSO를 동결건조된 CRM_{197}에 첨가하여 재구성시켰다.

[0312] c) 접합 및 캡핑

[0313] 재구성된 활성화된 폴리사카라이드를 반응 용기 내의 재구성된 CRM_{197}과 배합한 후 (투입비: 0.8:1), 소듐 시아노보로히드리드로 접합을 개시시키기 전에 철저하게 혼합하여 투명한 용액을 수득하였다. 반응 용액 내의 최종 폴리사카라이드 농도는 대략 1 g/L였다. 1.0 - 1.5 MEq의 소듐 시아노보로히드리드를 반응 혼합물에 첨가함으로써 접합이 개시되었고, 23 ± 2℃에서 40-48시간 동안 인큐베이션하였다. 2 MEq의 소듐 보로히드리드 ($NaBH_4$)를 첨가하여 미반응 알데히드를 캡핑함으로서 접합 반응이 종결되었다. 이러한 캡핑 반응이 23 ± 2℃에서 3 ± 1시간 동안 계속되었다.

[0314] d) 접합체 정제

[0315] 100-300K MWCO 막을 사용하는 접선 유동 여과에 의한 정제를 위한 준비로 접합체 용액을 냉각된 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수 (pH 6.0)로 1:10 희석하였다. 희석된 접합체 용액을 5 μm 필터에 통과시키고, 5 mM 숙시네이트-0.9% 염수 (pH 6.0)를 매질로 사용하여 투석여과를 수행하였다. 투석여과가 완료된 후, 접합체 잔류물을 0.22 μm 필터를 통해 옮겼다.

[0316] 접합체를 5 mM 숙시네이트 / 0.9% 염수 (pH 6)로 대략 0.5 mg/mL의 표적 사카라이드 농도로 추가로 희석하였다. 최종 0.22 μm 여과 단계를 완료하여 면역원성 접합체를 수득하였다.

[0317] 바람직하게는, 상기 방법에 의해 수득된 접합체는 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 mM당 적어도 0.6 mM 아세테이트를 포함하고, 3000 내지 20000 kDa의 분자량을 갖고, 2 내지 6의 접합도를 갖는다.

[0318] 실시예 2: CRM_{197}에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체의 특성화

[0319] 실시예 1에 개시된 방법에 의해 접합체 1을 제조하였다. 상이한 양의 산화제를 사용하여 유사한 방법에 의해 접합체 2 및 3을 제조하였다. 정제된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 사이징하지 않았고, 더 낮은 DO (더 높은 산화 수준)로 활성화하였으며, 수성 매질에서 접합을 수행한 것을 제외하고는 유사한 방법에 의해 접합체 4를 제조하였다. 정제된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 화학적 가수분해에 의해 사이징하였고, 수성 매질에서 접합을 수행한 것을 제외하고는 유사한 방법에 의해 접합체 5를 제조하였다. 정제된 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 사이징하지 않은 것을 제외하고는 유사한 방법에 의해 접합체 6 및 7을 제조하였다.

[0320] 수득된 접합체들을 특성화하였고, 결과가 표 1에서 요약된다.

[0321] 표 1: 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드-CRM_{197} 접합체

접합체	1	2	3	4	5	6	7
폴리사카라이드	사이징됨	사이징됨	사이징됨	천연	가수분해됨	천연	천연
O-아세틸화; 폴리사카라이드 (μmol 아세테이트/ μmol 폴리사카라이드)	0.69	0.69	0.69	1.01	0.66	0.76	NA
용매 매질	DMSO	DMSO	DMSO	수성	수성	DMSO	DMSO
활성화된 폴리사카라이드 DO	11.4	5.8	9.7	4.8	8.8	5	12
활성화된 폴리사카라이드 MW	196KDa	218KDa	235KDa	435 KDa	270KDa	431KDa	460KDa
수율 (%)	87.2	64	63.7	96.2	78.8	24.2	26.2
사카라이드 단백질 비	0.68	0.65	0.71	1.22	1.29	0.9	1.5
유리 사카라이드 (%)	< 5	< 5	6.1	18.1	14.2	8.8	18
접합체 MW, SEC-MALLS	6190KDa	7090KDa	7937KDa	1766KDa	1029KDa	6293KDa	4466KDa
O-아세틸화, 접합체 (μmol 아세테이트/ μmol 폴리사카라이드)	0.68	0.7	0.68	0.61	0.44	0.85	NA
< 0.3 Kd (%), SEC	NA	73	NA	NA	62	NA	NA
접합도 (AAA); 변형된 Lys	3.7	3.9	4.1	NA	3.4	NA	NA
접합체 내의 유지된 O-아세틸 %	99%	100%	99.5%	60%	67%	100%	NA

[0322]

[0323] 원심분리에 의한 제거를 위해 단백질 및 공유결합으로 결합된 사카라이드에 결합하는 수산화알루미늄 겔을 사용하는 절차에 의해 유리 폴리사카라이드의 백분율을 측정한다. 샘플을 포스페이트 완충 수산화알루미늄 겔과 혼합하고, 원심분리한다. 결합된 사카라이드는 겔과 함께 펠릿화되고, 유리 사카라이드는 상청액 내에 남는다. 생성된 상청액 및 대조군 샘플을 적합한 비색 검정에 의해 정량하여, 유리 사카라이드의 백분율을 결정하고, 충분한 단백질 제거 및 사카라이드 회수를 입증한다.

[0324] 아미노산 분석을 위해, 먼저 진공 및 열 (15분 동안 160℃) 하에서의 6N 염산 (HCl) 가수분해를 사용하여 폴리사카라이드-단백질 샘플을 유리 아미노산으로서의 그의 개별적인 성분들로 가수분해한다. 가수분해 후, 샘플을 아미노산 분석기를 사용하여 분석한다. 개별적인 아미노산들을 온도 및 유속 변화와 함께 시트르산나트륨 완충제의 단계 구배를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피를 통해 분리한다. 분리 후, 각각의 아미노산 잔기의 양을 칼럼-후 닌히드린 커플링 검출 시스템을 사용하여 정량적으로 결정한다. 이러한 시스템에서, 닌히드린을 칼럼-후 반응기 시스템에서 칼럼 용출액과 혼합하고, 혼합물을 광도계 내로 통과시킨다. 닌히드린과 용출된 아미노산의 반응으로 570 nm에서 최대로 흡수하는 자색 화합물이 산출된다. 이러한 흡광도는 존재하는 α-아미노기의 양의 선형 반응 (함수)이고, 이러한 반응은 α-아미노기가 있는 모든 유기 화합물에 대한 정량적 비색 검정을 제공한다. 유리 아미노기가 없는 이미노산 예컨대 프롤린 및 히드록시프롤린과의 반응에서는, 밝은 황색 화합물이 생성되고, 440 nm에서 모니터링된다. 570 및 440 nm 파장 출력 둘 다를 사용하여 각각의 아미노산에 대한 피크 면적을 계산한다.

[0325] 하기와 같이 수율을 계산한다: (접합체 내의 폴리사카라이드의 양 x 100) / 활성화된 폴리사카라이드의 양.

[0326] 수성 매질을 사용하여 생성된 접합체 (4 및 5)는 O-아세틸 수준의 유의한 손실을 나타냈다. MW 사이징 없이 천연 폴리사카라이드를 사용하여 DMSO 용매에서 생성된 접합체 (6 및 7)는 O-아세틸 수준의 손실을 나타내지 않았다. 그러나, 불량한 여과성 특성에 더하여 접합체 수율이 매우 불량하였다. 고압 균질화에 의해 사이징된 폴리사카라이드를 사용하여 DMSO에서 생성된 접합체 (1, 2 및 3)는 O-아세틸 수준이 유의하게 보존되면서 수율이 높았고 여과성 특성이 더욱 양호하였다. 또한 이들 접합체는 유리 폴리사카라이드 수준이 매우 낮았다.

[0327] 실시예 3: 옵소닌포식작용 활성 (OPA) 검정

[0328] 본 발명의 접합체의 면역원성을 하기에 기재된 옵소닌포식작용 검정 (OPA)을 사용하여 평가할 수 있다.

[0329] 30마리의 6-7주령 암컷 스위스 웹스터(Swiss Webster) 마우스의 군을 제0주에 피하 경로를 통해 0.001 μg, 0.01 μg, 또는 0.1 μg의 테스트 접합체로 면역화시켰다. 제3주에 동일한 용량의 접합체로 마우스를 부스팅시킨 후, 제4주에 채혈하였다. 제4주의 혈청 샘플에서 혈청형-특이적 OPA를 수행하였다.

[0330] OPA를 사용하여 에스. 뉴모니아에 혈청형 15B에 대해 특이적인 뮤린 혈청 내의 기능성 항체를 측정하였다. 박테리아를 옵소닌화하고, 보체 침착을 유발하며, 이에 의해 포식세포에 의한 포식작용 및 박테리아 사멸을 용이하게 하는 피막 폴리사카라이드 특이적 면역글로불린의 능력을 측정하는 검정 반응에 테스트 혈청을 설정하였다. OPA 역가는 테스트 혈청이 없는 대조군 웰에 비해 박테리아 카운트의 50% 감소를 생성하는 역수 희석도로서 정의된다. OPA 역가는 이러한 50% 사멸 차단값을 포함하는 2개의 희석도로부터 내삽된다.

[0331] OPA 절차는 하기 변형과 함께 문헌 [Hu et al., Clin Diagn Lab Immunol 2005;12(February (2)):287-95]에 기재된 방법을 기초로 하였다. 테스트 혈청을 2.5배로 단계적으로 희석하고, 미량역가 검정 플레이트에 첨가하였다. 생(live) 혈청형 15B 표적 박테리아를 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 30분 동안 진탕시켰다. 분화된 HL-60 세포 (포식세포) 및 아기 토끼 혈청 (3- 내지 4-주령, 펠-프리즈(Pel-Freez)®, 6.25% 최종 농도)을 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 45분 동안 진탕시켰다. 반응을 종결시키기 위해, 80 μl의 0.9% NaCl을 모든 웰에 첨가하고, 혼합하고, 10 μl 분취량을 200 μl의 물을 함유하는 멀티스크린(MultiScreen) HTS HV 필터 플레이트 (밀리포어(Millipore)®)로 옮겼다. 진공 하에서 플레이트를 통해 액체를 여과하고, 150 μl의 하이소이(HySoy) 배지를 각각의 웰에 첨가하고, 여과시켰다. 그 후, 필터 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 철야로 인큐베이션하고, 이어서 디스테인 솔루션(Destain Solution) (바이오-래드(Bio-Rad))로 고정하였다. 그 후, 플레이트를 쿠마시 블루(Coomassie Blue)로 염색하고, 1회 탈염시켰다. 콜로니를 영상화하고, 셀룰러 테크놀러지 리미티드(Cellular Technology Limited) (CTL)의 이뮤노스팟 애널라이저(ImmunoSpot Analyzer)®에서 계수하였다. 미가공 콜로니 카운트를 사용하여 사멸 곡선을 플롯팅하고 OPA 역가를 계산하였다.

[0332] 접합체 1 및 2의 면역원성을 상기 언급된 검정에 따라 테스트하였다. 1종의 추가의 접합체 및 비접합된 천연 에스. 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드 (비접합된 PS)를 동일한 검정에서 또한 테스트하였다:

[0333] 접합체 9는 수용액에서 환원성 아민화에 의해 천연 (즉, 사이징되지 않은) 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 CRM_{197}에 접합시킴으로써 제조되었다.

[0334] 결과가 표 2에서 제시된다.

[0335] 표 2: 동물 테스트의 OPA 역가

[0336]

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

[0337] 상기 표에서 나타난 바와 같이, 접합체 1 및 2는, 마우스에 투여되었을 때, 혈청형 15B 에스. 뉴모니아에를 옵소닌화할 수 있고, 보체 침착을 유발할 수 있으며, 이에 의해 포식세포에 의한 포식작용 및 박테리아 사멸을 용이하게 할 수 있는 항체를 생성한다. 추가적으로, 더 낮은 분자량에도 불구하고, 이들은 사이징되지 않은 접합체 9와 비교하여 유사한 수준의 면역원성을 또한 나타냈다.

[0338] 실시예 4: 혈청형 15B와 혈청형 15C 사이의 교차-기능성 OPA 반응

[0339] 폐렴구균 혈청군 15는 4개의 구조적으로 관련된 혈청형을 포함한다: 15A, 15B, 15C, 및 15F. 혈청형 15B 및 15C는 유전학적 유형 결정 기술에 의해 구별할 수 없고, 15B-PS가 15C-PS의 O-아세틸화 변이체인 것을 제외하고는 피막 폴리사카라이드 (PS) 조성이 유사하다. 혈청형 15B에 대한 항-피막 PS 항체가 혈청형 15C와 기능적으로 교차-반응성인지를 이해하기 위해, 10마리의 토끼를 PCV16v 및 PCV20v 백신으로 면역화시켰고, 이들은 둘 다

이들의 제제의 일부로서 본원에 개시된 바와 같은 CRM_{197}에 공유결합으로 연결된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 15B 피막 폴리사카라이드를 포함하는 면역원성 접합체를 함유하였다. 백신접종-전 및 백신접종-후로부터의 혈청을 혈청형 15B 및 15C 표적 폐렴구균 균주에 대해 OPA 검정에서 테스트하였다.

[0340] 각각의 군으로부터의 10마리의 토끼 중에서, 100%가 혈청형 15B 접합체로의 면역화 후에 혈청형 15B에 대한 OPA 반응이 있었다. 이들 동일한 샘플 중에서, 100%가 또한 혈청형 15C에 대한 OPA 반응이 있었다 (표 1 및 표 2). 15C OPA에서 백신접종-전 혈청에서 낮은 OPA 역가가 관찰되엇다. 그러나, 백신접종-전과 비교하여 백신접종-후 혈청으로의 10배를 초과하는 GMT OPA 역가 증가가 본 발명의 면역원성 접합체가 OPA에서 혈청형 15B 및 15C 스트렙토코쿠스 뉴모니아에를 사멸시킬 수 있는 항체의 형성을 유도한다는 것을 실연하였다.

[0341] PCV16v는 모두 개별적으로 CRM_{197}에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F (16vPnC)로부터의 당접합체를 포함하는 16가 접합체 조성물이다.

[0342] PCV20v는 모두 개별적으로 CRM_{197}에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F (20vPnC)로부터의 당접합체를 포함하는 20가 접합체 조성물이다.

[0343] 표 1. PCV16v로의 백신접종 전 및 후의 토끼 혈청에서의 혈청형 15B 및 15C 균주에 대한 OPA 역가

[0344]

동물	15B OPA		15C OPA	
	제 0 주	제 4 주	제 0 주	제 4 주
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	**4**	**2222**	**98**	**1075**

[0345] 표 2. PCV20v로의 백신접종 전 및 후의 토끼 혈청에서의 혈청형 15B 및 15C 균주에 대한 OPA 역가

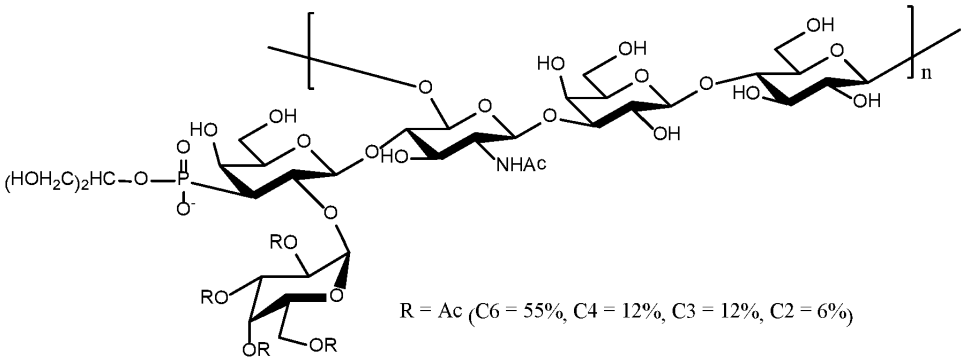
동물	15B OPA		15C OPA	
	제 0 주	제 4 주	제 0 주	제 4 주
1	4	3784	결정불가능*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	결정불가능*	1316
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	결정불가능*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	결정불가능*	527
10	4	616	결정불가능*	545
GMT	**4**	**1917**	**77**	**1515**

* 역가는 불량한 사멸 곡선으로 인해 결정될 수 없음

[0346]

도면

도면1



→6)-D-Glc*p*NAc-β-(1→3)-D-Gal*p*-β-(1→4)-D-Glc*p*-β-(1→

D-Gal*p*-α-(1→2)-D-Gal*p*(3-OPO$_3$-R^1)-β-(1→4

R^1 = CH(CH$_2$OH)$_2$

$C_{37}H_{61}NNaO_{31}P$, MW=1069.8

Ac= 아세틸

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc.

<120> Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides and conjugates thereof

<130> PC72026A

<150> US 61/929,561

<151> 2014-01-21

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

ggggacgacg tcgtgggggg g 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt 24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga 24

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B-Class oligonucleotide

<400> 8

tcgtcgtttt tcggtgcttt t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B-Class oligonucleotide

<400> 9

tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B-Class oligonucleotide

<400> 10

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B-Class oligonucleotide

<400> 11

tcgtcgtttc gtcgttttgt cgtt 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B-Class oligonucleotide

<400> 12

tcgtcgtttt gtcgtttttt tcga 24

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 13

tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 14

tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 15

tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 16

tcggacgttc ggcgcgccg 19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 17

tcgcgtcgtt cggcgcgccg 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 18

tcgacgttcg gcgcgcgccg 20

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 19

tcgacgttcg gcgcgccg 18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 20

tcgcgtcgtt cggcgccg 18

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 21

tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 22

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 23

tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 24

tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C class CpG Oligonucleotide

<400> 25

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgt 23

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotides

<400> 26

tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 27

tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 28

tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 29

tcggacgttc ggcgcgccg 19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 30

tcgcgtcgtt cggcgcgccg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 31

tcgacgttcg gcgcgcgccg 20

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 32

tcgacgttcg gcgcgccg 18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 33

tcgcgtcgtt cggcgccg 18

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 34

tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 35

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 36

tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 37

tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-Class oligonucleotide

<400> 38

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgt 23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P class CpG oligonucleotide

<400> 39

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P class CpG oligonucleotide

<400> 40

tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23