(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월21일
(11) 등록번호 10-1359953
(24) 등록일자 2014년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/095 (2006.01) *A61K 39/102* (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7030683
(22) 출원일자(국제) 2006년06월23일
심사청구일자 2011년06월16일
(85) 번역문제출일자 2007년12월28일
(65) 공개번호 10-2008-0030577
(43) 공개일자 2008년04월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/006269
(87) 국제공개번호 WO 2007/000342
국제공개일자 2007년01월04일
(30) 우선권주장
0513069.5 2005년06월27일 영국(GB)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2003080678 A1*
WO2004103400 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89
(72) 발명자
비에맨스, 랄프, 레온
벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
보우트리아우, 도미니크
벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 22 항 심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 **면역원성 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 2개 이상의 상이한 나이세리아 메닌지티디스 (*N. meningitidis*) 캡슐 당류를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 하나 이상의 당류는 링커를 통해 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenA, MenC, MenY 및 MenW로 구성된 첫번째 군으로부터 선택되고, 하나 이상의 상이한 당류는 담체 단백질(들)에 직접적으로 컨쥬게이션된 MenA, MenC, MenY 및 MenW로 구성된 두번째 군으로부터 선택된다.

(72) 발명자

카피아우, 카리네

벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

데노엘, 필립

벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

두비비어, 피에르

벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

풀먼, 얀

벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

(30) 우선권주장

0513071.1 2005년06월27일 영국(GB)
0515556.9 2005년07월28일 영국(GB)
0524204.5 2005년11월28일 영국(GB)
0526040.1 2005년12월21일 영국(GB)
0526041.9 2005년12월21일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

하나 이상의 당류가 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 A 캡슐 다당류(N. meningitidis serogroup A capsular saccharide, MenA) 및 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 캡슐 다당류(N. meningitidis serogroup C capsular saccharide, MenC)로 구성된 첫번째 군으로부터 선택되고, 하나 이상의 상이한 당류가 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 캡슐 다당류(N. meningitidis serogroup C capsular saccharide, MenC), 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 Y 캡슐 다당류(N. meningitidis serogroup Y capsular saccharide, MenY) 및 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 W 캡슐 다당류(N. meningitidis serogroup W capsular saccharide, MenW)로 구성된 두번째 군으로부터 선택되고, 여기서 MenW 또는 MenY 또는 이들 모두는 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션 되는, 2개 이상의 상이한 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenA 캡슐 당류, 및 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된 MenC 캡슐 당류를 포함함을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenC 캡슐 당류, 및 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된 MenY 캡슐 당류를 포함함을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenA 및 MenC 캡슐 당류, 및 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된 MenY 및 MenW 캡슐 당류를 포함함을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenA 캡슐 당류, 및 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된 MenC, MenY 및 MenW 캡슐 당류를 포함함을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류가 파상풍 독소(tetanus toxoid, TT), 디프테리아 독소(diphtheria toxoid, DT), 교차 반응성 물질 (cross-reactive material 197, CRM197), TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 담체 단백질에 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류가 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 선택된 동일한 담체 단백질에 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류가 TT에 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류가 별개의 담체 단백질에 별개로 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상, 두개 또는 세개의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 컨쥬게이트가 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, MenW, MenC, 또는 MenW 및 MenC; MenY, MenC, 또는 MenY 및 MenC; 또는 MenW 및 MenC 및 MenY가 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 하나 이상, 두개 또는 세개의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트가 히드록실기를 아미노기에 연결시키는 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (1-cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate, CDAP) 화학에 의해 직접 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상 또는 두개의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류가 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 링커가 양기능성 (bifunctional) 링커임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 컨쥬게이트를 생성하기 위해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 혈청군 A, C, W135 및 Y중 2개 이상으로부터의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하는 면역원성 조성물로서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류의 평균 크기가 50kDa 내지 1500kDa, 50kDa 내지 500kDa 또는 50kDa 내지 300kDa임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 선택된 담체 단백질에 컨쥬게이션된 헤모필루스 인플루엔자 b 캡슐 당류 (Hib)를 추가로 포함함을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, Hib 당류 컨쥬게이트 및 두개 이상의 추가 세균 당류 컨쥬게이트를 포함하는 면역원성 조성물로서, Hib 컨쥬게이트가 두개 이상의 추가 세균 당류 컨쥬게이트의 평균 용량보다 적은 용량으로 존재함을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 따른 면역원성 조성물 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 백신.

청구항 19

파상풍 독소 (TT), 디프테리아 독소 (DT) 및 전체세포 또는 무세포 백일해 성분을 포함하는 제 1 용기, 및 제1항 또는 제2항에 따른 면역원성 조성물을 포함하는 제 2 용기를 포함하는, 보르데텔라 퍼투시스 (*bordetella pertussis*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 및 나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*)에 의해 야기되는 질병에 대해 숙주에게 보호를 제공하기 위한 두개의 다가 면역원성 조성물을 포함하는 동시 또는 연속 투여용 백신 키트.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 따른 면역원성 조성물과 약학적으로 허용되는 부형제를 혼합시키는 단계를 포함하는 백신의 제조 방법.

청구항 21

제1항 또는 제2항에 있어서, 나이세리아 메닌지티디스 감염에 의해 야기되는 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것임을 특징으로 하는 면역원성 조성물.

청구항 22

나이세리아 메닌지티디스 감염에 의해 야기되는 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 제1항 또는 제2항에 따른 면역원성 조성물.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 담체 분자에 컨쥬게이션된 세균 캡슐 당류, 특히 나이세리아 메닌지티디스 (*N. meningitidis*)의 당류를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 당류 컨쥬게이트를 포함하는 백신 및 백신 키트, 상기 면역원성 조성물 및 백신을 제조하는 방법 및 본 발명의 백신 및 면역원성 조성물의 치료 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 당류 컨쥬게이트를 이용하는 감염에 대한 면역화 방법 및 약제의 제조에 있어서의 상기 당류 컨쥬게이트의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 나이세리아 메닌지티디스는 세균성 수막염을 야기시키는 그람-네거티브 인간 병원체이다. 상기 미생물의 캡슐 다당류에 기초하여, 12개의 혈청군의 나이세리아 메닌지티디스가 확인되었다 (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y 및 Z). 혈청군 A (MenA)는 사하라 남쪽 아프리카에서의 유행병의 가장 흔한 병인이다. 개발도상국에서의 대부분의 환자는 혈청군 B 및 C가 병인이고, 나머지 환자는 W135 및 Y가 병인이다.

[0003] 담체 단백질에 컨쥬게이션된 나이세리아 메닌지티디스 당류를 포함하는 면역원성 조성물은 당 분야에 공지되어 있으며; T-비의존성 다당류 항원을 T-의존성 항원으로 전환시키는 공지된 효과를 지니는 상기 담체 단백질은 면역 기억 반응을 트리거링(triggering)시킬 수 있다. 예를들어, WO 02/58737에는 담체 단백질에 컨쥬게이션된 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 A, C, W135 및 Y로부터의 정제된 캡슐 다당류를 포함하는 백신이 기술되어 있다. 그러나, 이러한 출원에는 모든 다당류가 본질적으로 동일한 방식 (동일한 단백질 담체에 대해 동일한 링커를 통해)으로 컨쥬게이션되어야 한다고 교시되어 있다.

[0004] 나이세리아 메닌지티디스에 대한 개선된 컨쥬게이트 백신을 개발할 필요가 있다. 본 발명은 유효한 조합 백신을 달성하기 위해 각각의 다당류의 컨쥬게이션이 맞춤화 (획일화가 아님)된 수막구균 다당류 컨쥬게이트의 제공에 관한 것이다. 특히, 특정 수막구균 당류를 직접적으로 컨쥬게이션되는 기타물질과 함께 수막구균 당류의 단백질 담체에 컨쥬게이션시키기 위해 링커 분자를 사용하는 것이 유리하다. 이러한 방식으로, 덜 우수한 면역원인 다당류는 링커를 통해 면역계에 제공될 수 있고, 매우 우수한 면역원인 다당류는 직접적으로 컨쥬게이션될 수 있어, 이들은 조합물에 대한 면역 반응의 우위를 점하지 않는다.

[0005] 따라서, 본 발명의 한 양태에서 2개 이상의 상이한 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하는 면역원성 조성물이 제공되고, 여기서 하나 이상은 링커를 통해 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenA, MenC, MenY 및 MenW

로 구성된 첫번째 군으로부터 선택되고, 하나 이상의 상이한 다당류는 직접적으로 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenA, MenC, MenY 및 MenW로 구성된 두번째 군으로부터 선택된다.

[0006] 예를들어, MenAC 백신에서, MenA는 링커를 통해 컨쥬게이션될 수 있고, MenC는 직접 컨쥬게이션될 수 있다. MenCY 백신에서, MenC는 링커를 통해 컨쥬게이션될 수 있고, MenY는 직접 컨쥬게이션될 수 있다. MenACWY 백신에서, MenA는 링커를 통해 컨쥬게이션될 수 있고, MenCWY는 직접 컨쥬게이션될 수 있거나, MenAC는 링커를 통해 컨쥬게이션될 수 있고, MenWY는 직접 컨쥬게이션될 수 있다.

[0007] 동일한 담체에 컨쥬게이션된 다양한 당류를 포함하는 조합 백신에서의 추가 고려사항은 담체 면역 억제의 발생이며; 너무 많은 담체가 사용되면 면역 반응이 감소될 수 있다. 담체에 컨쥬게이션시키는 획일적인 방법의 이용은 면역계에 B-세포 및 T-세포 에피토프의 유사한 블렌드를 제공할 것이다. 그러나, 컨쥬게이션이 하나의 당류 대 또 다른 당류에 대해서 담체 단백질 내에 상이한 화학기에서 발생하는 경우, 담백질 담체는 이들 스스로를 면역계에 대해 제공하는 방법에서 다소의 차이가 존재할 것이다.

[0008] 따라서, 본 발명의 한 별개의 구체예에서 동일한 유형의 담체 단백질 (예를들어, 파상풍 독소)에 별개로 컨쥬게이션된 2개 이상의 상이한 당류를 포함하는 면역원성 조성물을 제공되고, 여기서 하나 이상의 당류(들)은 단백질 담체 상의 첫번째 유형의 화학기를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션되고, 하나 이상의 당류(들)은 담백질 담체 상의 두번째 (상이한) 유형의 화학기를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다.

[0009] 첫번째 및 두번째 유형의 화학기는 단백질 담체의 서로 배타적인 첫번째 및 두번째 세트의 아미노산 (예를들어, 하나의 세트에서는 특정 아스파르트산/글루탐산 잔기 및 두번째 세트에서는 특정 리신 잔기)으로 단백질 담체에 존재할 수 있다. 예를들어, 하나의 당류는 담체 상의 카르복실기에 컨쥬게이션될 수 있고, 또 다른 당류는 아미노기에 컨쥬게이션될 수 있다. 이러한 컨쥬게이션은 각각의 상이한 컨쥬게이트에 대해 별개의 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프 상에서의 컨쥬게이션을 포함할 수 있다.

[0010] 예를들어, MenAC 백신에서, MenA는 담체 단백질 상의 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)에 연결될 수 있고, MenC는 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)에 연결될 수 있다. MenCY 백신에서, MenC는 담체 단백질 상의 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)에 연결될 수 있고, MenY는 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)에 연결될 수 있다. MenACWY 백신에서, MenAC는 담체 단백질 상의 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)에 연결될 수 있고, MenWY는 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)에 연결될 수 있거나, MenA는 담체 단백질 상의 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)에 연결될 수 있고, MenCWY는 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)에 연결될 수 있다.

[0011] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 면역보호량의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신을 나이세리아 메닌지티디스에 의해 감염된 인간 숙주에 투여하는 것을 포함하여, 나이세리아 메닌지티디스에 의해 감염된 질병에 대해 상기 숙주를 면역화시키는 방법이 제공된다.

[0012] 본 발명의 한 추가 양태에 따르면, 나이세리아 메닌지티디스에 의해 야기된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 면역원성 조성물이 제공된다.

[0013] 본 발명의 한 추가 양태에 따르면, 나이세리아 메닌지티디스에 의해 야기된 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신의 용도가 제공된다.

발명의 상세한 설명

[0016] 본 발명의 한 양태에서, 2개 이상의 상이한 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하는 면역원성 조성물이 제공되고, 여기서 하나 이상의 당류는 링커를 통해 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenA, MenC, MenY 및 MenW로 구성된 첫번째 군으로부터 선택되고, 하나 이상의 상이한 당류는 직접적으로 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenA, MenC, MenY 및 MenW로 구성된 두번째 군으로부터 선택된다.

[0017] 더욱 특히, 첫번째 군은 MenA 및 MenC로 구성될 수 있고, 두번째 군은 MenC, MenY 및 MenW로 구성될 수 있다. 본 발명의 특정 구체예는 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenA 캡슐 당류 및 직접적으로 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenC 캡슐 당류; 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenC 캡슐 당류 및 직접적으로 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenY 캡슐 당류; 링커를 통해 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenA 및 MenC 캡슐 당류 및 직접적으로 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenY 및 MenW 캡슐 당류; 및 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenA 캡슐 당류 및 직접적으로 담체 단백질(들)에 컨쥬게이션된 MenC, MenY 및 MenW 캡슐 당류를 포함하는 면역원성 조성물이다. 임의의 이러한 구체예에서, Hib 컨쥬게이트가 또한 포함될 수 있고, 이는 직접적으로

또는 링커를 통해 담체 단백질 (상기 및 하기의 담체 목록 참조, 예를들어 TT)에 연결될 수 있다.

[0018] 본 명세서를 통해 용어 "당류"는 다당류 또는 올리고당류를 의미할 수 있고, 둘 모두를 포함할 수 있다. 다당류는 세균으로부터 분리되고, 공지된 방법 (예를들어, EP497524 및 EP497525 참조), 임의로 미세유동화에 의해 어느 정도의 크기로 만들어진다. 다당류는 다당류 샘플에서 점성을 감소시키고/시키거나 컨쥬게이션된 생성물에 대한 여과성을 개선시키기 위한 크기로 만들어질 수 있다. 올리고당류는 적은 수의 반복 단위 (통상적으로, 5-30개의 반복 단위)를 지니고, 통상적으로 가수분해된 다당류이다.

[0019] 각각의 나이세리아 메닌지티디스 (및/또는 Hib) 캡슐 당류는 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 담체 단백질에 컨쥬게이션될 수 있다. 본 발명의 컨쥬게이트에 사용될 수 있는 단백질 담체의 보다 완전한 목록은 하기 제시된다. 하나 이상의 나이세리아 메닌지티디스 (및/또는 Hib) 캡슐 당류가 다른 나이세리아 메닌지티디스와 상이한 담체 단백질에 컨쥬게이션될 수 있으나, 한 구체예에서 이들은 모두 동일한 담체 단백질에 컨쥬게이션된다. 예를들어, 이들은 모두 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 선택된 동일한 담체 단백질에 컨쥬게이션될 수 있다. 이와 관련하여, CRM197 및 DT는 단지 하나의 아미노산이 차이가 있으므로 동일한 담체 단백질로 간주될 수 있다. 한 구체예에서, 모든 나이세리아 메닌지티디스 (및/또는 Hib) 캡슐 당류는 TT에 컨쥬게이션된다.

[0020] 단백질 담체가 조성물 내의 2개 이상의 당류에 대해 동일한 경우, 상기 당류는 단백질 담체의 동일한 분자 (이에 컨쥬게이션된 2개 이상의 상이한 당류를 지니는 담체 분자)에 컨쥬게이션될 수 있다 [예를들어, WO 04/083251 참조; 예를들어 단일한 담체 단백질은 MenA 및 MenC; MenA 및 MenW; MenA 및 MenY; MenC 및 MenW; MenC 및 MenY; MenW 및 MenY; MenA, MenC 및 MenW; MenA, MenC 및 MenY; MenA, MenW 및 MenY; MenC, MenW 및 MenY; MenA, MenC, MenW 및 MenY; Hib 및 MenA; Hib 및 MenC; Hib 및 MenW; 또는 Hib 및 MenY에 컨쥬게이션될 수 있음]. 대안적으로, 당류는 각각 단백질 담체의 상이한 분자 (이에 컨쥬게이션된 하나의 유형의 당류만을 지니는 담체 분자의 각각의 분자)에 별개로 컨쥬게이션될 수 있다.

[0021] 본 발명의 첫번째 양태의 면역원성 조성물은 또한 본 발명의 두번째 양태의 임의의 추가 특성 및 모든 추가 특성을 지닐 수 있고, 역으로 본 발명의 두번째 양태의 면역원성 조성물은 또한 본 발명의 첫번째 양태의 임의의 추가 특성 및 모든 추가 특성을 지닐 수 있다.

[0022] 본 발명의 두번째 양태에서, 동일한 유형의 담체 단백질에 별개로 컨쥬게이션된 2개 이상의 상이한 당류 컨쥬게이트를 포함하는 면역원성 조성물이 제공되고, 여기서 하나 이상의 당류(들)은 단백질 담체 상의 첫번째 유형의 화학기를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션되고, 하나 이상의 당류(들)은 단백질 담체 상의 두번째 (상이한) 유형의 화학기를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다.

[0023] 한 구체예에서, 2개의 컨쥬게이트는 동일한 담체에 연결되지만 상이한 컨쥬게이션 화학에 의해 연결된 동일한 당류를 포함한다. 대안적 구체예에서, 2개의 상이한 당류는 담체 단백질 상의 상이한 기에 컨쥬게이션된다.

[0024] "동일한 유형의 담체 단백질에 별개로 컨쥬게이션됨"은 당류가 동일한 담체에 개별적으로 컨쥬게이션되는 것을 의미한다 (예를들어, MenA는 파상풍 독소 상의 아미노기를 통해 파상풍 독소로 컨쥬게이션되고, MenC는 파상풍 독소의 상이한 분자 상의 카르복실산기를 통해 파상풍 독소에 컨쥬게이션된다).

[0025] 캡슐 당류(들)은 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 동일한 담체 단백질에 컨쥬게이션될 수 있다. 본 발명의 컨쥬게이트에 사용될 수 있는 단백질 담체의 더욱 완전한 목록은 하기에 제공된다. 이와 관련하여, CRM197 및 DT는 단지 하나의 아미노산이 차이가 있으므로 동일한 담체 단백질로 간주될 수 있다. 한 구체예에서, 제공된 모든 캡슐 다당류는 TT에 컨쥬게이션된다.

[0026] 한 구체예에서, 단백질 담체 상의 첫번째 및 두번째 유형의 화학기는 담체 단백질 상의 별개의 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프에 존재한다. 즉, 이들은 서로 상이한 세트의 B-세포 및/또는 T-세포 에피토프에 존재한다. 담체의 B-세포 에피토프를 예측하기 위해, 2D-구조 예측 및/또는 항원 지수 예측의 두 방법중 하나 또는 두 방법 모두와 같은 공지된 방법이 사용될 수 있다. 2D-구조 예측은 PSIPRED 프로그램 (David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK)을 이용하여 수행될 수 있다. 항원 지수는 문헌[Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988])]에 기술된 방법을 기초로 하여 계산될 수 있다. 이러한 프로그램에 사용된 파라미터는 항원 지수 및 항원성 펩티드에 대한 최소 길이이다. 최소 5개의 연속적인 아미노산에 대해 0.9의 항원 지수가 상기 프로그램에서 역치로 사용될 수 있다. T 보조세포 에피토프는 HLA 클래스 II 분자에 결합되고 T 보조세포에 의해 인지되는 펩티드이다. 유용한 T 보조세포 에피토프의 예측은 공지된 기술, 예를들어 문헌[Sturniolo at al. (Nature Biotech. 17: 555-561 [1999])]에 기

술된 TEPITOPE 방법을 기초로 할 수 있다.

[0027] 당류는 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 A 캡슐 당류 (MenA), 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 캡슐 당류 (MenC), 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 Y 캡슐 당류 (MenY), 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 W 캡슐 당류 (MenW), 헤모필루스 인플루엔자 타입 b 캡슐 당류 (Hib), 그룹 B 스트렙토코쿠스 그룹 I 캡슐 당류, 그룹 B 스트렙토코쿠스 그룹 II 캡슐 당류, 그룹 B 스트렙토코쿠스 그룹 III 캡슐 당류, 그룹 B 스트렙토코쿠스 그룹 IV 캡슐 당류, 그룹 B 스트렙토코쿠스 그룹 V 캡슐 당류, 스태필로코쿠스 아우레우스 타입 5 캡슐 당류, 스태필로코쿠스 아우레우스 타입 8 캡슐 당류, 살모넬라 티피로부터의 Vi 당류, 나이세리아 메닌지티디스 LPS (예를들어, L3 및/또는 L2), 모락셀라 카타랄리스 LPS, 헤모필루스 인플루엔자 LPS로 구성된 군, 및 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 또는 33F와 같은 캡슐 폐렴구균 당류중 어느 하나로부터 선택될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 동일한 속의 세균 (예를들어, 나이세리아, 스트렙토코쿠스, 스태필로코쿠스, 또는 헤모필루스)으로부터의 2개 이상의 상이한 당류로 구성되거나 이를 포함한다.

[0028] 단백질 담체 상에 존재하는 첫번째 및 두번째 화학기는 서로 상이하고, 이상적으로는 컨쥬게이션 목적상 용이하게 이용될 수 있는 천연 화학기이다. 이들은 카르복실기, 아미노기, 술피드릴기, 히드록실기, 이미다졸릴기, 구아니딜기, 및 인돌릴기로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 한 구체예에서, 첫번째 화학기는 카르복실이고, 두번째 화학기는 아미노이거나, 이의 반대일 수 있다. 이들 기는 하기에 보다 상세하게 설명된다.

[0029] 한 특정 구체예에서, 면역원성 조성물은 2개 이상의 상이한 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하고, 여기서 하나 이상은 단백질 담체 상의 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenA 및 MenC로 구성된 첫번째 기로부터 선택되고, 하나 이상의 상이한 당류는 단백질 담체 상의 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된 MenC, MenY 및 MenW로 구성된 두번째 기로부터 선택된다.

[0030] 한 추가 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)를 통해 컨쥬게이션된 MenA, 및 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)를 통해 컨쥬게이션된 MenC를 포함한다.

[0031] 또 다른 구체예에서, 면역원성 조성물은 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)를 통해 컨쥬게이션된 MenC, 및 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)를 통해 컨쥬게이션된 MenY를 포함한다.

[0032] 또 다른 구체예에서, 면역원성 조성물은 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)을 통해 컨쥬게이션된 MenA, 및 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)를 통해 컨쥬게이션된 MenC, MenY 및 MenW를 포함한다.

[0033] 또 다른 구체예에서, 면역원성 조성물은 첫번째 유형의 화학기 (예를들어, 카르복실)를 통해 컨쥬게이션된 MenA 및 MenC, 및 두번째 유형의 화학기 (예를들어, 아미노)를 통해 컨쥬게이션된 MenY 및 MenW를 포함한다.

[0034] 임의의 상기 구체예에서, Hib가 또한 동일한 유형의 단백질 담체에 컨쥬게이션될 수 있다. Hib은 첫번째 또는 두번째 유형의 화학기에 의해 담체체 컨쥬게이션될 수 있다. 한 구체예에서, 이는 카르복실기를 통해 컨쥬게이션된다.

[0035] **본 발명의 양태에서의 일반적인 고려사항**

[0036] 본 발명의 약학적 (면역원성) 조성물에 포함된 본 발명의 당류 (특히, 나이세리아 메닌지티디스 당류 및/또는 Hib 캡슐 당류)는 담체 단백질, 예를들어 파상풍 독소 (TT), 파상풍 독소 단편 C, 파상풍 독소의 비독성 돌연변이 [모든 이러한 TT의 변이체는 본 발명의 목적상 동일한 유형의 담체 단백질로 간주됨], 디프테리아 독소 (DT), CRM197, 디프테리아 독소의 기타 비독성 돌연변이[예를들어, CRM176, CRM197, CRM228, CRM45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 및 CRM107 및 문헌[Nicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992]에 기술된 기타 돌연변이; Glu-148의 결실 또는 Asp, Gln 또는 Ser으로의 결실 및/또는 Ala 158의 결실 또는 Gly로의 돌연변이 및 US 4709017 또는 US 4950740에 기술된 기타 돌연변이; Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534중 하나 이상의 잔기의 돌연변이 및 US 5917017 또는 US 6455673에 기술된 기타 돌연변이; 또는 US 5843711에 기술된 단편](모든 이러한 DT의 변이체는 본 발명의 목적상 동일한 유형의 담체 단백질로 간주됨), 폐렴구균 뉴몰리신 (Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13), OMPC (수막구균 외막 단백질 - 보통 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 B로부터 추출됨 - EP0372501), 합성 펩티드 EP0378881, EP0427347), 열충격 단백질 (WO 93/17712, WO 94/03208), 백일해 단백질 (WO 98/58668, EP0471177), 사이토카인, 림포카인, 성장인자 또는 호르몬 (WO

91/01146), 다양한 병원체 유래 항원으로부터의 다수의 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질 (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824), 예를들어 N19 단백질 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7), 폐렴구균 표면 단백질 PspA (WO 02/091998), 철 흡수 단백질 (WO 01/72337), 클로스트리듐 디피실레의 독소 A 또는 B (WO 00/61761) 또는 단백질 D (EP594610 및 WO 00/56360)에 컨쥬게이션된다.

[0037] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 최소한 두개, 세개, 네개 또는 각각의 당류 (예를들어, 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 및/또는 Hib)가 (독립적으로) 함유된 동일한 유형의 담체 단백질을 이용한다. 한 구체예에서, Hib 및 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류가 존재하는 경우, Hib는 최소한 두개, 세개, 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류와 동일한 유형의 담체 단백질에 컨쥬게이션될 수 있다. 예를들어, 2, 3 또는 4개의 나이세리아 메닌지티디스 당류 (MenA, C, Y, W)는 2, 3 또는 4개의 컨쥬게이트를 제조하기 위해 파상풍 독소에 독립적으로 컨쥬게이션되고, 임의로 Hib가 또한 TT에 컨쥬게이션된다.

[0038] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 선택된 담체 단백질에 컨쥬게이션된 나이세리아 메닌지티디스 당류를 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 선택된 담체 단백질에 컨쥬게이션된 Hib 당류를 포함한다.

[0039] 본 발명의 면역원성 조성물은 임의로 1:5 내지 5:1, 1:2 내지 5:1, 1:0.5 내지 1:2.5 또는 1:1.25 내지 1:2.5 (w/w)의 Men 당류 대 담체 단백질 비를 지니는 하나 이상의 수막구균 당류 (예를들어, MenA; MenC; MenW; MenY; MenA 및 MenC; MenA 및 MenW; MenA 및 MenY; MenC 및 MenW; MenC 및 MenY; MenW 및 MenY; MenA, MenC 및 MenW; MenA, MenC 및 MenY; MenA, MenW 및 MenY; MenC, MenW 및 MenY 또는 MenA, MenC, MenW 및 MenY) 컨쥬게이트를 포함한다.

[0040] 본 발명의 면역원성 조성물은 임의로 1:5 내지 5:1; 1:2 내지 2:1; 1:1 내지 1:4; 1:2 내지 1:3.5; 또는 대략 또는 정확하게 1:2.5 내지 1:3 (w/w)의 Hib 대 담체 단백질 비를 지니는 Hib 당류 컨쥬게이트를 포함한다.

[0041] 컨쥬게이트의 당류 대 담체 단백질의 비 (w/w)는 멸균된 컨쥬게이트를 이용하여 결정될 수 있다. 단백질의 양은 로우리 분석 (참조: Lowry et al (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275 or Peterson et al Analytical Biochemistry 100, 201-220 (1979))을 이용하여 결정되고, 당류의 양은 MenA에 대해서는 ICP-OES (유도결합플라즈마 원자방출분광법), MenC에 대해서는 DMAP 분석, MenW 및 MenY에 대해서는 레조르시놀 분석을 이용하여 결정된다 (Monsigny et al (1988) Anal. Biochem. 175, 525-530).

[0042] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트(들) 및/또는 Hib 당류 컨쥬게이트를 포함하고, 여기서 나이세리아 메닌지티디스 당류(들) 및/또는 Hib 당류는 링커, 예를들어 양기능성 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다. 임의로, 링커는 예를들어 반응성 아미노기 및 반응성 카르복실산기, 2 반응성 아미노기 또는 2 반응성 카르복실산기를 지니는 이종양기능성 또는 동종양기능성일 수 있다. 링커는, 예를들어 4 내지 20, 4 내지 12, 5 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다. 가능한 링커는 ADH이다. 기타 링커는 B-프로피온아미도 (WO 00/10599), 니트로페닐-에틸아민 (Gever et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), 할로알킬 할라이드 (US4057685), 글리코시드 결합 (US4673574, US4808700), 헥산 디아민 및 6-아미노카프로산 (US4459286)을 포함한다.

[0043] 본 발명의 면역원성 조성물에 존재하는 당류 컨쥬게이트는 임의의 공지된 커플링 기술로 제조될 수 있다. 컨쥬게이션 방법은 시아네이트 에스테르를 형성하기 위해 당류와 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)의 활성화에 의존할 수 있다. 따라서, 활성화된 당류는 담체 단백질 상의 아미노기에 직접적으로 또는 스페이서 (링커) 기를 통해 커플링될 수 있다. 예를들어, 스페이서는 말레이미드 활성화된 담체 단백질 (예를들어, GMBS를 이용함) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질 (예를들어, 요오도아세트이미드 또는 N-숙신이미딜 브로모아세테이트브로모아세테이트를 이용함)과의 반응 후에 수득되는 티오에테르 결합을 통해 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 다당류를 생성시키는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 임의로, 시아네이트 에스테르 (임의로, CDAP 화학에 의해 제조됨)는 헥산 디아민 또는 ADH와 커플링되고, 아미노 유래의 당류는 단백질 담체 상의 카르복실기를 통해 카르보디이미드 (예를들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 이용하여 담체 단백질에 컨쥬게이션된다. 이러한 컨쥬게이트는 PCT 공개 출원 WO 93/15760 국립의과대학 및 WO 95/08348 및 WO 96/29094에 기술되어 있다.

[0044] 기타 적절한 기술은 카르비이니드, 히드라지드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC, TSTU를 이용한다. 많은 기술이 WO 98/42721에 기술되어 있다. 컨쥬게이션은 당류의 자유 히

드록실기와 CDI의 반응 (Bethell et al J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18) 후, 단백질과의 반응으로 카르바메이트 결합을 형성시킴으로써 형성될 수 있는 카르보닐 결합을 포함할 수 있다. 이는 아노머 말단의 일차 히드록실기로의 환원, 임의로 CDI 카르바메이트 중간체를 형성시키는 일차 히드록실기와 CDI의 일차 히드록실기 반응의 보호/탈보호 및 단백질 상에서의 CDI 카르바메이트 중간체와 아미노기의 커플링을 포함할 수 있다.

[0045] 컨쥬게이트는 또한 US 4365170 (Jennings) 및 US 4673574 (Anderson)에 기술된 직접 환원 아민화 방법에 의해 제조될 수 있다. 기타 방법은 EP-0-161-188, EP-208375 및 EP-0-477508에 기술되어 있다.

[0046] 추가 방법은 카르보디이미드 축합 (Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256), 예를들어 EDAC를 이용한 단백질 담체에 대한, 아디프산 히드라지드 (ADH)로 유도된 시아노겐 브로마이드 (또는 CDAP)로 활성화된 당류의 커플링을 포함한다.

[0047] 한 구체예에서, 당류 상의 히드록실기 (임의로, 활성화된 히드록실기, 예를들어 시아네이트 에스테르에 의해 활성화된 히드록실기)는 단백질 상의 아미노기 또는 카르복실기에 직접적 또는 간접적 (링커를 통함)으로 연결된다. 링커가 존재하는 경우, 임의로 당류 상의 히드록실기는, 예를들어 CDAP 컨쥬게이션에 의해 링커 상의 아미노기에 연결된다. 링커 (예를들어, ADH) 내의 추가의 아미노기는, 예를들어 카르보디이미드 화학, 예를들어 EDAC를 이용하여 단백질 상의 카르복실산기에 컨쥬게이션될 수 있다. 한 구체예에서, Hib 또는 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류(들) (또는 일반적으로 당류)는 링커가 담체 단백질에 컨쥬게이션되기 전에 우선 링커에 컨쥬게이션된다. 대안적으로, 링커는 당류에 컨쥬게이션되기 전에 담체에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0048] 일반적으로, 하기 유형의 단백질 담체 상의 화학기가 커플링/컨쥬게이션에 사용될 수 있다:

[0049] A) 카르복실 (예를들어, 아스파르트산 또는 글루탐산을 통함). 한 구체예에서, 이러한 기는 당류 상의 아미노기에 직접 연결되거나, 카르보디이미드 화학, 예를들어 EDAC를 이용하여 링커 상의 아미노기에 연결된다.

[0050] B) 아미노기 (예를들어, 리신을 통함). 한 구체예에서, 이러한 기는 당류 상의 카르복실기에 직접 연결되거나, 카르보디이미드 화학, 예를들어 EDAC를 이용하여 링커 상의 카르복실기에 연결된다. 또 다른 구체예에서, 이러한 기는 당류 상의 CDAP 또는 CNBr로 활성화된 히드록실기에 직접 연결되거나 링커 상의 상기 기에 연결되고; 알데히드기를 지니는 당류 또는 링커에 연결되고; 숙신이미드 에스테르기를 지니는 당류 또는 링커에 연결된다.

[0051] C) 술프히드릴 (예를들어, 시스테인을 통함). 한 구체예에서, 이러한 기는 말레이미드 화학을 이용하여 브로모 또는 클로로 아세틸화된 당류 또는 링커에 연결된다. 한 구체예에서, 이러한 기는 비스 디아조벤지딘을 이용하여 활성화되고/변형된다.

[0052] D) 히드록실기 (예를들어, 티로신을 통함). 한 구체예에서, 이러한 기는 비스 디아조벤지딘을 이용하여 활성화되고/변형된다.

[0053] E) 이미다졸릴기 (예를들어, 히스티딘을 통함). 한 구체예에서, 이러한 기는 비스 디아조벤지딘을 이용하여 활성화되고/변형된다.

[0054] F) 구아니딜기 (예를들어, 아르기닌을 통함).

[0055] G) 인돌릴기 (예를들어, 트립토판을 통함).

[0056] 당류에 대해서는, 일반적으로 커플링을 위해 OH, COOH 또는 NH2와 같은 기가 사용될 수 있다. 알데히드기는 당 분야에 공지된 다양한 처리, 예를들어 페리오데이트, 산 가수분해, 과산화수소 등의 처리 후에 생성될 수 있다.

[0057] *직접 커플링 방법:*

[0058] 당류-OH + CNBr 또는 CDAP -----> 시아네이트 에스테르 + NH2-단백질 ---->컨쥬게이트

[0059] 당류-알데히드 + NH2-단백질 ----> 시프 염기 + NaCNBH3 ----> 컨쥬게이트

[0060] 당류-COOH + NH2-단백질 + EDAC ----> 컨쥬게이트

[0061] 당류-NH2 + COOH-단백질 + EDAC ----> 컨쥬게이트

[0062] *스페이서 (링커)를 통한 간접 커플링 방법:*

[0063] 당류-OH + CNBr 또는 CDAP ---> 시아네이트 에스테르 + NH2----NH2 ----> 당류----NH2 + COOH-단백질 + EDAC -----> 컨쥬게이트

[0064] 당류-OH + CNBr 또는 CDAP ----> 시아네이트 에스테르 + NH2-----SH -----> 당류----SH + SH-단백질 (노출된 시스테인을 지닌 천연 단백질 또는, 예를들어 SPDP에 의한 단백질의 아미노기의 변형 후에 수득된 단백질) ----> 당류-S-S-단백질

[0065] 당류-OH + CNBr 또는 CDAP ---> 시아네이트 에스테르 + NH2----SH -------> 당류----SH + 말레이미드-단백질 (아미노기의 변형) ----> 컨쥬게이트

[0066] 당류-COOH + EDAC + NH2-----NH2 ---> 당류------NH2 + EDAC + COOH-단백질 ----> 컨쥬게이트

[0067] 당류-COOH + EDAC+ NH2----SH -----> 당류----SH + SH-단백질 (노출된 시스테인을 지니는 천연 단백질 또는, 예를들어 SPDP에 의한 단백질의 아미노기의 변형 후에 수득된 단백질) -----> 당류-S-S-단백질

[0068] 당류-COOH + EDAC+ NH2----SH -----> 당류----SH + 말레이미드-단백질 (아미노기의 변형) ----> 컨쥬게이트

[0069] 당류-알데히드 + NH2-----NH2 ----> 당류---NH2 + EDAC + COOH-단백질 ----> 컨쥬게이트

[0070] 주: 상기 EDAC 대신, 임의의 적절한 카르보디이미드가 사용될 수 있다.

[0071] 요약하면, 당류와의 커플링에 일반적으로 사용될 수 있는 단백질 담체 화학기 유형은 아미노기 (예를들어, 리신 잔기상), COOH기 (예를들어, 아르파르트산 및 글루탐산 잔기상) 및 SH기 (접근가능한 경우) (예를들어, 시스테인 잔기상)이다.

[0072] 한 구체예에서, 존재하는 경우 Hib 당류는 CNBr 또는 CDAP, 또는 CDAP와 카르보디이미드 화학 (예를들어, EDAC)의 조합, 또는 CNBr과 카르보디이미드 화학 (예를들어, EDAC)의 조합을 이용하여 담체 단백질에 컨쥬게이션된다. 임의로, Hib는 CNBr 및 카르보디이미드 화학, 임의로 EDAC를 이용하여 컨쥬게이션된다. 예를들어, CNBr은 당류와 링커를 연결시키기 위해 사용되고, 카르보디이미드 화학은 단백질 담체에 링커를 연결시키기 위해 사용된다.

[0073] 한 구체예에서, 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 (또는 일반적으로 당류)중 하나 이상이 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션되고; 임의로 MenW 및/또는 MenY 및/또는 MenC 당류(들)은 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된다. 예를들어, MenW; MenY; MenC; MenW 및 MenY; MenW 및 MenC; MenY 및 MenC; 또는 MenW, MenY 및 MenC는 담체 단백질에 직접 연결된다. 임의로, 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류중 하나 이상은 CDAP에 의해 직접 컨쥬게이션된다. 예를들어, MenW; MenY; MenC; MenW 및 MenY; MenW 및 MenC; MenY 및 MenC; 또는 MenW, MenY 및 MenC는 CDAP에 의해 담체 단백질에 직접 연결된다 (참조: WO 95/08348 및 WO 96/29094). 한 구체예에서, 모든 나이세리아 메닌지티디스 당류는 파상풍 독소에 컨쥬게이션된다.

[0074] 한 구체예에서, 특히 상기 당류가 임의로 CDAP를 이용하여 단백질에 직접 연결되는 경우, MenW 및/또는 Y 당류 대 담체 단백질의 비는 1:0.5 내지 1:2 (w/w)이고/이거나, MenC 당류 대 담체 단백질의 비는 1:0.5 내지 1:4 또는 1:0.5 내지 1:1.5 (w/w)이다.

[0075] 한 구체예에서, 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류(들) (또는 일반적으로 당류)중 하나 이상은 링커, 예를들어 양기능성 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다. 임의로, 링커는 예를들어 반응성 아민기 및 반응성 카르복실산기, 2 반응성 아민기 또는 2 반응성 카르복실산기를 지니는 이종양기능성이거나 동종양기능성이다. 링커는 예를들어 4 내지 20, 4 내지 12, 5 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다. 가능한 링커는 ADH이다.

[0076] 한 구체예에서, MenA; MenC; 또는 MenA 및 MenC는 링커를 통해 담체 단백질 (예를들어, 파상풍 독소)에 컨쥬게이션된다.

[0077] 한 구체예에서, 하나 이상의 나이세리아 메닌지티디스 당류는 CDAP 및 EDAC를 이용하여 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다. 예를들어, MenA; MenC; 또는 MenA 및 MenC는 상기 기술된 바와 같이 CDAP 및 EDAC를 이용하여 링커 (예를들어, 말단에 ADH와 같은 두개의 히드라지노기를 지니는 링커)를 통해 단백질에 컨쥬게이션된다. 예를들어, CDAP는 당류를 링커에 컨쥬게이션시키기 위해 사용되고, EDAC는 링커를 단백질에 컨쥬게이션시키기 위해 사용된다. 임의로, 링커를 통한 컨쥬게이션은 MenA; MenC; 또는 MenA 및 MenC에 대해 1:0.5 내지 1:6; 1:1 내지 1:5 또는 1:2 내지 1:4의 당류 대 담체 단백질 비를 생성시킨다.

[0078] 한 구체예에서, MenA 캡슐 당류는 존재시 최소한 부분적으로 O-아세틸화되어, 하나 이상의 위치에서 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반복 단위가 O-아세틸화된다. O-아세틸화되는, 예를들어 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반복 단위의 O-3 위치에 존재한다.

[0079] 한 구체예에서, MenC 캡슐 당류는 존재시 최소한 부분적으로 O-아세틸화되어, 하나 또는 두개 이상의 위치에서 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 (α2→9)-연결된 NeuNAc 반복 단위가 O-아세틸화된다. O-아세틸화는, 예를들어 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반복 단위의 O-7 및/또는 O-8 위치에 존재한다.

[0080] 한 구체예에서, MenW 캡슐 당류는 존재시 최소한 부분적으로 O-아세틸화되어, 하나 또는 두개 이상의 위치에서 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반복 단위가 O-아세틸화된다. O-아세틸화는, 예를들어 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반복 단위의 O-7 및/또는 O-9 위치에 존재한다.

[0081] 한 구체예에서, MenY 캡슐 당류는 존재시 최소한 부분적으로 O-아세틸화되어, 하나 또는 두개 이상의 위치에서 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반복 단위가 O-아세틸화된다. O-아세틸화는 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반복 단위의 7 및/또는 9 위치에 존재한다.

[0082] O-아세틸화의 백분율은 O-아세틸화를 함유하는 반복 단위의 백분율을 의미한다. 이는 컨쥬게이션 전 및/또는 컨쥬게이션 후에 당류에서 측정될 수 있다.

[0083] 본 발명의 한 구체예에서, 존재하는 면역원성 조성물, 당류, 또는 존재하는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류는 TT에 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류는 별개의 담체 단백질에 개별적으로 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 컨쥬게이트는 1:5-5:1 또는 1:1-1:4 (w/w)의 당류:담체 비를 지닌다. 한 추가 구체예에서, 하나, 두개 또는 세개 이상의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 컨쥬게이트(들)은 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, MenW 및/또는 MenY, MenW 및/또는 MenC, MenY 및/또는 MenC, 또는 MenW 및 MenC 및 MenY는 담체 단백질에 직접 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, 하나, 두개 또는 세개 이상의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트(들)은 CDAP 화학에 의해 직접 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, MenW 및/또는 Y 당류 대 담체 단백질의 비는 1:0.5 내지 1:2 (w/w)이다. 한 추가 구체예에서, MenC 당류 대 담체 단백질의 비는 1:0.5 내지 1:2 (w/w)이다. 한 추가 구체예에서, 하나, 두개 또는 세개 이상의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류(들)은 링커 (2 반응성 아미노기 (예를들어, ADH) 또는 2 반응성 카르복실기, 또는 하나의 말단에 반응성 아미노기 및 나머지 말단에 반응성 카르복실기를 지니는 양기능성 링커일 수 있음)를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다. 링커는 4 내지 12개의 탄소 원자를 지닐 수 있다. 한 추가 양태에서, 링커를 통해 컨쥬게이션된 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류(들) 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류는 CDAP 화학을 이용하여 링커에 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, 담체 단백질은 카르보디이미드 화학, 예를들어 EDAC를 이용하여 링커에 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류(들) 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류는 담체 단백질이 링커에 컨쥬게이션되기 전에 링커에 컨쥬게이션된다. 한 추가 구체예에서, MenA는 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다 (MenA 당류 대 담체 단백질의 비는 1:2 내지 1:5 (w/w)일 수 있음). 한 추가 구체예에서, MenC는 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션된다 (MenC 당류 대 담체 단백질의 비는 1:2 내지 1:5 (w/w)일 수 있음).

[0084] 본 발명자들은 또한 당 분야의 초점이 컨쥬게이트를 생성하기 쉬운 올리고당류의 사용임을 인지하였다. 본 발명자들은 천연 또는 약간 크기 조절된 다당류 컨쥬게이트를 이용함으로써, 다음과 같은 장점중 하나 이상이 실현될 수 있음을 발견하였다: 1) 0.2 미크론 필터를 통해 여과되는 높은 면역원성을 지니는 컨쥬게이트; 2) 면역기억이 향상될 수 있음 (실시예 3); 3) 컨쥬게이트 내의 다당류 대 단백질의 비의 전환으로, 컨쥬게이트 내의 다당류 대 단백질의 비 (w/w)가 증가될 수 있음 (이는 담체 억제 효과를 감소시킬 수 있음); 4) 가수분해되기 쉬운 면역원성 컨쥬게이트 (예를들어, MenA 컨쥬게이트)가 컨쥬게이션에 대해 보다 큰 다당류의 이용에 의해 안정화될 수 있음. 보다 큰 다당류의 이용은 컨쥬게이트 담체와의 보다 많은 가교를 야기시킬 수 있고, 컨쥬게이트로부터의 유리 당류의 보다 적은 유리를 야기시킬 수 있다. 종래 분야에 기술된 컨쥬게이트 백신은 컨쥬게이션을 개선시키기 위해 컨쥬게이션 전에 다당류를 분해하는 경향이 있다. 본 발명자들은 보다 큰 크기의 당류를 보유하는 수막구균 (또는 당류) 컨쥬게이트 백신이 수막구균 질병에 대해 우수한 면역 반응을 제공할 수 있음을 발견하였다.

[0085] 따라서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 당류 컨쥬게이트를 포함할 수 있고, 컨쥬게이션 전의 각각의 당류의 평균 크기는 50kDa, 75kDa, 100kDa, 110kDa, 120kDa 또는 130kDa 이상이다. 한 구체예에서, 컨쥬게이션 후의 컨쥬게이트는 0.2 미크론 필터를 통해 용이하게 여과가능하여, 여과전 샘플과 비교시 여과 후에 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상의 수율이 수득되어야 한다.

[0086] 특히, 본 발명의 면역원성 조성물은 담체 단백질에 컨쥬게이션된 혈청군 A, C, W 및 Y중 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개로부터의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하고, 여기서 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류의 평균 크기 (중량 평균 분자량; Mw)은 50kDa, 60kDa, 75kDa, 100kDa, 110kDa, 120kDa 또는 130kDa 이상이다.

[0087] 면역원성 조성물은 담체 단백질에 컨쥬게이션된 혈청군 A, C, W 및 Y중 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개로부터의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함할 수 있고, 여기서 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류는 천연 당류이거나, 천연 다당류의 중량 평균 분자량에 비해 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 이하로 크기가 조절된다.

[0088] 본 발명의 목적상, "천연 다당류"는 당류의 크기를 감소시키려는 목적으로 가공되지 않은 당류를 의미한다. 다당류는 일반적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 이러한 당류는 여전히 천연 당류이다. 크기 조절 기술에 적용된 다당류만이 천연으로 간주되지 않는다.

[0089] 본 발명의 목적상, "2배 이하로 크기가 조절됨"은 상기 당류가 당류의 크기를 감소시키나, 천연 다당류의 크기의 반 이상의 크기를 보유하도록 가공되는 것을 의미한다. 3배, 4배 등은 동일한 방식, 즉 당류가 다당류의 크기를 감소시키나, 천연 다당류의 크기의 1/3, 1/4 이상 등의 크기를 보유하도록 가공되는 것으로 해석되어야 한다.

[0090] 본 발명의 한 양태에서, 면역원성 조성물은 담체 단백질에 컨쥬게이션된 혈청군 A, C, W 및 Y중 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개로부터의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하고, 여기서 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류는 천연 다당류이다.

[0091] 본 발명의 한 양태에서, 면역원성 조성물은 담체 단백질에 컨쥬게이션된 혈청군 A, C, W 및 Y중 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개로부터의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함하고, 여기서 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류는 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 이하로 크기가 조절된다.

[0092] 본 발명의 면역원성 조성물은 임의로 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 캡슐 당류 (MenC), 혈청군 A 캡슐 당류 (MenA), 혈청군 W135 캡슐 당류 (MenW), 혈청군 Y 캡슐 당류 (MenY), 혈청군 C 및 Y 캡슐 당류 (MenCY), 혈청군 C 및 A 캡슐 당류 (MenAC), 혈청군 C 및 W 캡슐 당류 (MenCW), 혈청군 A 및 Y 캡슐 당류 (MenAY), 혈청군 A 및 W 캡슐 당류 (MenAW), 혈청군 W 및 Y 캡슐 당류 (Men WY), 혈청군 A, C 및 W 캡슐 당류 (MenACW), 혈청군 A, C 및 Y 캡슐 당류 (MenACY); 혈청군 A, W135 및 Y 캡슐 당류 (MenAWY), 혈청군 C, W135 및 Y 캡슐 당류 (MenCWY); 또는 혈청군 A, C, W135 및 Y 캡슐 당류 (MenACWY)의 컨쥬게이트를 포함한다. 이는 본원에 언급된 혈청군 A, C, W 및 Y중 "하나, 두개, 세개 또는 네개", 또는 "중 최소한 하나", 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류의 정의이다.

[0093] 한 구체예에서, 최소한 하나, 두개, 세개, 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류의 평균 크기는 MALLS에 의해 결정시 50KDa 내지 1500kDa, 50kDa 내지 500kDa, 50kDa 내지 300KDa, 101kDa 내지 1500kDa, 101kDa 내지 500kDa, 101kDa 내지 300kDa이다.

[0094] 한 구체예에서, MenA 당류는 존재시 50-500kDa, 50-100kDa, 100-500kDa, 55-90KDa, 60-70kDa 또는 70-80kDa 또는 60-80kDa의 분자량을 지닌다.

[0095] 한 구체예에서, MenC 당류는 존재시 100-200kDa, 50-100kDa, 100-150kDa, 101-130kDa, 150-210kDa 또는 180-210kDa의 분자량을 지닌다.

[0096] 한 구체예에서, MenY 당류는 존재시 60-190kDa, 70-180kDa, 80-170kDa, 90-160kDa, 100-150kDa 또는 110-140kDa, 50-100kDa, 100-140kDa, 140-170kDa 또는 150-160kDa의 분자량을 지닌다.

[0097] 한 구체예에서, MenW 당류는 존재시 60-190kDa, 70-180kDa, 80-170kDa, 90-160kDa, 100-150kDa, 110-140kDa, 50-100kDa 또는 120-140kDa의 분자량을 지닌다.

[0098] 본원의 당류의 분자량 또는 평균 분자량은 컨쥬게이션 전에 측정되고, MALLS에 의해 측정된 당류의 중량-평균 분자량 (Mw)를 의미한다.

[0099] MALLS 기술은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 통상적으로 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행된다. 수막구균 당류의 MALLS 분석에 대해, 두개의 컬럼 (TSKG6000 및 5000PWx1)이 조합되어 사용될 수 있고, 상기 당류는 물중에

용리된다. 당류는 광산란 검출기 (예를들어, 488nm의 10mW 아르곤 레이저가 장비된 Wyatt Dawn DSP) 및 간섭 굴절계 (예를들어, P100 셀 및 498nm의 적색 필터가 장비된 Wyatt Otilab DSP)를 이용하여 검출된다.

[0100] 한 구체예에서, 나이세리아 메닌지티디스 당류는 천연 다당류 또는 일반적인 추출 과정 동안 크기가 감소된 천연 다당류이다.

[0101] 한 구체예에서, 나이세리아 메닌지티디스 당류는 예를들어 미세유동화 또는 음파처리에 의해 기계적 분해로 크기 조절된다. 미세유동화 및 음파처리는 보다 큰 천연 다당류의 크기를 감소시켜 충분히 여과가능한 (예를들어, 0.2 미크론 필터를 통해) 컨쥬게이트를 제공하는 이점을 지닌다. 20배, 10배, 8배, 6배, 5배, 4배, 3배, 2배 또는 1.5배 이하로 크기 조절된다.

[0102] 한 구체예에서, 면역원성 조성물은 천연 다당류 및 20배 이하로 크기 조절된 당류의 혼합물로부터 제조된 나이세리아 메닌지티디스 당류를 포함한다. 예를들어, MenC 및/또는 MenA로부터의 당류는 천연 당류이다. 예를들어, MenY 및/또는 MenW로부터의 당류는 20배, 10배, 8배, 6배, 5배, 4배, 3배 또는 2배 이하로 크기 조절된다. 예를들어, 면역원성 조성물은 10배 이하로 크기 조절되고/되거나 미세유동화된 MenY 및/또는 MenW 및/또는 MenC 및/또는 MenA로부터 제조된 컨쥬게이트를 함유한다. 예를들어, 면역원성 조성물은 천연 MenA 및/또는 MenC 및/또는 MenW 및/또는 MenY로부터 제조된 컨쥬게이트를 함유한다. 예를들어, 면역원성 조성물은 천연 MenC로부터 제조된 컨쥬게이트를 포함한다. 예를들어, 면역원성 조성물은 천연 MenC 및 10배 이하로 크기 조절되고/되거나 미세유동화된 MenA로부터 제조된 컨쥬게이트를 포함한다. 예를들어, 면역원성 조성물은 천연 MenC 및 10배 이하로 크기 조절되고/되거나 미세유동화된 MenY로부터 제조된 컨쥬게이트를 포함한다.

[0103] 한 구체예에서, 당류의 다분산성은 1-1.5, 1-1.3, 1-1.2, 1-1.1 또는 1-1.05이고, 담체 단백질에 컨쥬게이션된 후, 컨쥬게이트의 다분산성은 1.0-2.5, 1.0-2.0, 1.0-1.5, 1.0-1.2, 1.5-2.5, 1.7-2.2 또는 1.5-2.0이다. 모든 다분산성 측정은 MALLS에 의해 수행된다.

[0104] 당류는 임의로 세균으로부터 분리된 다당류의 크기로부터 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 또는 20배 이하의 크기로 조절된다.

[0105] 한 구체예에서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류는 천연 다당류이거나, 10배 이하로 크기 조절된다. 한 추가 구체예에서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류는 천연 다당류이다. 한 추가 구체예에서, 최소한 하나, 두개, 세개 또는 네개의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류(들)이 미세유동화에 의해 크기 조절된다. 한 추가 구체예에서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류는 10배 이하로 크기 조절된다. 한 추가 구체예에서, 나이세리아 메닌지티디스 컨쥬게이트는 천연 다당류 및 10배 이하로 크기 조절된 당류의 혼합물로부터 제조된다. 한 추가 구체예에서, 혈청군 Y로부터의 캡슐 당류는 10배 이하로 크기 조절된다. 한 추가 구체예에서, 혈청군 A 및 C로부터의 캡슐 당류는 천연 다당류이고, 혈청군 W135 및 Y로부터의 당류는 10배 이하로 크기 조절된다. 한 추가 구체예에서, 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류의 평균 크기는 50 kDa 내지 300 KDa 또는 50kDa 내지 200kDa이다. 한 추가 구체예에서, 면역원성 조성물은 50kDa, 75kDa, 100kDa 이상의 평균 크기 또는 50-100kDa 또는 55-90KDa 또는 60-80kDa의 평균 크기를 지니는 MenA 캡슐 당류를 포함한다. 한 추가 구체예에서, 면역원성 조성물은 50kDa, 75kDa, 100kDa 이상 또는 100-200kDa, 100-150kDa, 80-120kDa, 90-110kDa, 150-200kDa, 120-240kDa, 140-220kDa, 160-200kDa 또는 190-200kDa의 평균 크기를 지니는 MenC 캡슐 당류를 포함한다. 한 추가 구체예에서, 면역원성 조성물은 50kDa, 75kDa, 100kDa 이상 또는 60-190kDa 또는 70-180kDa 또는 80-170kDa 또는 90-160kDa 또는 100-150kDa, 110-145kDa 또는 120-140kDa의 평균 크기를 지니는 MenY 캡슐 당류를 포함한다. 한 추가 구체예에서, 면역원성 조성물은 50kDa, 75kDa, 100kDa 이상 또는 60-190kDa 또는 70-180kDa 또는 80-170kDa 또는 90-160kDa 또는 100-150kDa, 140-180kDa, 150-170kDa 또는 110-140kDa의 평균 크기를 지니는 MenW 캡슐 당류를 포함한다.

[0106] 본 발명의 면역원성 조성물은 담체 단백질에 컨쥬게이션된 헤모필루스 인플루엔자 b 캡슐 당류 (Hib)를 포함할 수 있다. 이는 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 선택된 담체 단백질, 예를들어 TT에 컨쥬게이션될 수 있다. Hib 당류는 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 컨쥬게이트중 최소한 하나, 두개, 세개 또는 모두와 동일한 담체 단백질, 예를들어 TT에 컨쥬게이션될 수 있다. Hib 캡슐 당류 컨쥬게이트에서의 Hib 대 담체 단백질의 비는 1:5 내지 5:1 (w/w), 예를들어 1:1 내지 1:4, 1:2 내지 1:3.5 또는 약 1:3 (w/w)일 수 있다. Hib 캡슐 당류는 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이션될 수 있다 (상기 참조). 링커는 양기능성 (두개의 반응성 아미노기, 예를들어 ADH, 또는 두개의 반응성 카르복실산기, 또는 하나의 말단에 반응성 아미노기 및 다른 말단에 반응성 카르복실산기를 지님)일 수 있다. 이는 4 내지 12개의 탄소 원자를 지닐 수 있다. Hib 당류는 CNBr 또는 CDAP를 이용하여 담체 단백질 또는 링커에 컨쥬게이션될 수 있다. 담체 단백질은 카르보

디이미드 화학, 예를들어 EDAC 화학을 포함하는 방법을 이용하여 링커를 통해 Hib 당류에 컨쥬게이션될 수 있다 (따라서, 담체 상의 카르복실 화학기를 이용함). Hib 당류 컨쥬게이트의 용량은 0.1 내지 9㎍, 1 내지 5㎍ 또는 2 내지 3㎍의 당류일 수 있다.

[0107] 한 추가 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 Hib 당류 컨쥬게이트 및 두개 이상의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트를 포함하고, 여기서 Hib 컨쥬게이트는 두개 이상의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 평균 당류 용량보다 적은 당류 용량으로 존재한다. 대안적으로, Hib 컨쥬게이트는 두개 이상의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 각각의 당류 용량보다 적은 당류 용량으로 존재한다. 예를들어, Hib 컨쥬게이트의 용량은 두개 이상의 추가의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 평균 또는 가장 낮은 당류 용량보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상 낮게 존재할 수 있다.

[0108] 평균 용량은 모든 추가 당류의 용량을 더하고, 추가 당류의 수로 나눔으로써 결정된다. 추가의 당류는 Hib는 별개로 면역원성 조성물 내에 모든 당류가 존재하고, 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 포함할 수 있다. "용량"은 인간에게 투여되는 면역원성 조성물 또는 백신의 양이다.

[0109] Hib 당류는 헤모필루스 인플루엔자 b의 폴리리보실 포스페이트 (PRP) 캡슐 다당류 또는 이로부터 유래된 올리고당류이다.

[0110] 두개 이상의 추가의 세균 당류 컨쥬게이트는 Hib 컨쥬게이트와 함께 두개의 추가 세균 당류 컨쥬게이트의 평균이 취해져야 한다. 두개의 추가 세균 컨쥬게이트는 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 컨쥬게이트를 포함할 수 있다.

[0111] 본 발명의 면역원성 조성물은 나이세리아 메닌지티디스, 스트렙토코쿠스 뉴모니애, 그룹 A 스트렙토코쿠스, 그룹 B 스트렙토코쿠스, S. 티피, 스태필로코쿠스 아우레우스 또는 스태필로코쿠스 에피더미스중 하나 이상으로부터 유래된 추가의 당류 컨쥬게이트를 포함할 수 있다. 한 구체예에서, 면역원성 조성물은 나이세리아 메닌지티디스의 혈청군 A, C, W135 및 Y중 하나 이상으로부터 유래된 캡슐 당류를 포함한다. 하나의 추가의 구체예는 스트렙토코쿠스 뉴모니애로부터 유래된 캡슐 당류를 포함한다. 폐렴구균 캡슐 당류 항원은 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 (임의로, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터)로부터 임의로 선택된다. 한 추가 구체예는 스태필로코쿠스 아우레우스의 타입 5, 타입 8 또는 336 캡슐 당류를 포함한다. 한 추가 구체예는 스태필로코쿠스 에피더미디스의 타입 I, 타입 II 또는 타입 III 캡슐 당류를 포함한다. 한 추가 구체예는 S. 티피로부터의 Vi 당류를 포함한다. 한 추가 구체예는 그룹 B 스트렙토코쿠스의 타입 Ia, 타입 Ic, 타입 II, 타입 III 또는 타입 V 캡슐 당류를 포함한다. 한 추가 구체예는 그룹 A 스트렙토코쿠스의 캡슐 당류를 포함하고, 임의로 하나 이상의 M 단백질, 임의로 여러 유형의 M 단백질을 추가로 포함한다.

[0112] 본 발명의 면역원성 조성물은 또한 DTPa 또는 DTPw 백신 (예를들어, DT 및 TT를 함유하는 백신, 및 전체 세포 백일해 (Pw) 백신 또는 무세포 백일해 (Pa) 백신 (예를들어, 백일해 독소, FHA, 퍼탁틴, 임의로 어글루티노긴 2 및 3을 포함함))을 포함할 수 있다. 이러한 조합물은 또한 B형 간염에 대한 백신을 포함할 수 있다 (예를들어, 이는 임의로 알루미늄 포스페이트 상에 흡착된 B형 간염 표면 항원 [HepB]을 포함할 수 있다). 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 HibMenAC 성분이 상기 기술된 바와 같은 DTPwHepBHibMenAC 백신을 포함한다.

[0113] 본 발명의 면역원성 조성물은 임의로 홍역 및/또는 유행성 이하선염 및/또는 풍진 및/또는 수두에 의해 야기되는 질병에 대한 보호를 수여하는 추가의 바이러스 항원을 포함한다. 예를들어, 본 발명의 면역원성 조성물은 홍역, 유행성 이하선염 및 풍진 (MMR), 또는 홍역, 유행성 이하선염, 풍진 및 수두 (MMRV)로부터의 항원을 함유한다. 한 구체예에서, 이들 바이러스 항원은 임의로 수막구균 및/또는 Hib 당류 컨쥬게이트(들)과 동일한 용기 내에 존재한다. 한 구체예에서, 이들 바이러스 항원은 동결건조된다.

[0114] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 B로부터의 항원을 추가로 포함한다. 항원은 임의로 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 B (MenB)로부터의 캡슐 다당류 또는 이로부터 유래된 크기 조절된 다당류 또는 올리고당류이고, 이들은 단백질 담체에 컨쥬게이션될 수 있다. 항원은 임의로 EP301992, WO 01/09350, WO 04/14417, WO 04/14418 및 WO 04/14419에 기술된 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 B로부터의 외막 소포 제조물이다.

[0115] 일반적으로, 본 발명의 면역원성 조성물은 0.1 내지 20㎍, 2 내지 10㎍, 2 내지 6㎍ 또는 4 내지 7㎍의 당류의 각각의 당류 컨쥬게이트의 용량을 포함할 수 있다.

[0116] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 0.1-20㎍; 1-10㎍; 2-10㎍, 2.5-5㎍, 대략 또는 정확하게 5㎍; 또

는 대략 또는 정확하게 2.5㎍의 용량의 각각의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류를 함유한다. 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 각각 2.5, 2.5, 2.5 및 2.5㎍, 각각 5, 5, 5 및 5㎍ 또는 각각 5, 5, 2.5 및 2.5㎍의 용량의 MenA, MenC, MenW 및 MenY (임의로, 파상풍 독소에 컨쥬게이션됨)를 포함한다.

[0117] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 예를들어 0.1 내지 9㎍; 1 내지 5㎍ 또는 2 내지 3㎍ 또는 대략 또는 정확히 2.5㎍의 당류 용량으로 Hib 당류 컨쥬게이트를 함유한다. 한 추가 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 예를들어 0.1 내지 9㎍; 1 내지 5㎍ 또는 2 내지 3㎍ 또는 대략 또는 정확히 2.5㎍의 당류 용량의 Hib 당류 컨쥬게이트, 및 2 내지 20㎍, 3 내지 10㎍ 또는 4 내지 7㎍ 또는 대략 또는 정확히 5㎍의 당류 용량의 각각의 나이세리아 메닌지티디스 다당류 컨쥬게이트를 함유한다.

[0118] "대략" 및 "약"은 본 발명의 목적상 제공된 수의 10% 이상 또는 이하로 정의된다.

[0119] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 예를들어 최소한 두개, 세개, 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 평균 당류 용량의 90%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10% 미만인 Hib 당류 컨쥬게이트의 당류 용량을 포함할 수 있다. Hib 당류의 당류 용량은 예를들어 최소한 두개, 세개, 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 평균 당류 용량의 20% 내지 60%, 30% 내지 60%, 40% 내지 60% 또는 대략 또는 정확히 50%이다.

[0120] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 예를들어 최소한 두개, 세개, 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 가장 낮은 당류 용량의 90%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10% 미만인 Hib 당류 컨쥬게이트의 당류 용량을 함유한다. Hib 당류의 당류 용량은 예를들어 최소한 두개, 세개, 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 가장 낮은 당류 용량의 20% 내지 60%, 30% 내지 60%, 40% 내지 60% 또는 대략 또는 정확히 50%이다.

[0121] 본 발명의 한 구체예에서, 최소한 두개, 세개, 네개 또는 각각의 나이세리아 메닌지티디스 당류 컨쥬게이트의 각각의 당류 용량은 임의로 동일하거나 대략 동일하다.

[0122] 본 발명의 면역원성 조성물의 예는 하기로 구성되거나 이를 포함하는 조성물이다:

[0123] 임의로 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (w/w)의 당류 용량비의 Hib 컨쥬게이트 및 MenA 컨쥬게이트 및 MenC 컨쥬게이트. 임의로, MenA의 당류 용량은 MenC의 당류 용량을 초과한다.

[0124] 임의로 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8;4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (w/w)의 당류 용량비의 Hib 컨쥬게이트 및 MenC 컨쥬게이트 및 MenY 컨쥬게이트. 임의로, MenC의 당류 용량은 MenY의 당류 용량을 초과한다.

[0125] 임의로 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8;4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (w/w)의 당류 용량비의 Hib 컨쥬게이트 및 MenC 컨쥬게이트 및 MenW 컨쥬게이트. 임의로, MenC의 당류 용량은 MenW의 당류 용량을 초과한다.

[0126] 임의로 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8;4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (w/w)의 당류 용량비의 Hib 컨쥬게이트 및 MenA 컨쥬게이트 및 MenW 컨쥬게이트. 임의로, MenA의 당류 용량은 MenW의 당류 용량을 초과한다.

[0127] 임의로 1:2:2, 1:2:1, 1:4:2, 1:4:1, 1:8:4, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (w/w)의 당류 용량비의 Hib 컨쥬게이트 및 MenA 컨쥬게이트 및 MenY 컨쥬게이트. 임의로, MenA의 당류 용량은 MenY의 당류 용량을 초과한다.

[0128] 임의로 1:2:2, 1:2:1, 1:1:2, 1:4:2, 1:2:4, 1:4:1, 1:1:4, 1:3;6, 1:1:3, 1:6:3, 1:3:3, 1:4:4, 1:5:5, 1:6:6 (w/w)의 당류 용량비의 Hib 컨쥬게이트 및 MenW 컨쥬게이트 및 MenY 컨쥬게이트. 임의로, MenY의 당류 용량은 MenW의 당류 용량을 초과한다.

[0129] 1:1:1:1 또는 2:1:1:1 또는 1:2:1:1 또는 2:2:1:1 또는 1:3:1:1 또는 1:4:1:1 (w/w)의 당류 용량비의 MenA, MenC, MenW 및 MenY.

[0130] 본 발명의 추가 양태는 본 발명의 면역원성 조성물 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 백신이다.

[0131] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 pH 7.0 내지 8.0, pH 7.2 내지 7.6 또는 대략 또는 정확히 pH 7.4로 조정되거나 상기 pH에서 완충되거나, 상기 pH로 조정된다.

[0132] 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신은 임의로 안정제, 예를들어 폴리올, 예를들어 수크로오스 또는 트레할로오스의 존재하에서 동결건조된다.

[0133] 임의로, 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신은 면역원에 대한 면역반응을 향상시키기에 충분한 양의 애쥬번트를 함유한다. 적절한 애쥬번트는 문헌[Takahashi et al. (1990) Nature 344:873-875]에 기술된 것과 같이 알루미늄염 (알루미늄 포스페이트 또는 알루미늄 히드록시드), 스쿠알렌 혼합물 (SAF-1), 무라밀 펩티드, 사포닌 유도체, 미코박테리아 세포벽 제조물, 모노포스포릴 지질 A, 미콜산 유도체, 비이온성 블록 공중합체 계면활성제, Quil A, 콜레라 독소 B 서브유닛, 폴리포스파젠 및 유도체, 및 면역자극 복합체 (ISCOMs)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0134] 상기 논의된 나이세리아 메닌지티디스 또는 HibMen 조합물에 대해서는, 임의의 알루미늄염 애쥬번트 또는 임의의 애쥬번트를 전혀 사용하지 않는 것이 이로울 수 있다.

[0135] 모든 면역원성 조성물 또는 백신과 마찬가지로, 면역학적 유효량의 면역원은 경험적으로 결정되어야 한다. 고려되는 요인은 면역원성, 면역원이 애쥬번트 또는 담체 단백질 또는 기타 담체와 복합되거나 공유적으로 이에 부착되는지의 여부, 투여 경로 및 투여되는 면역 투여 회수를 포함한다.

[0136] 활성제는 본 발명의 약제 조성물 또는 백신 내에 다양한 농도로 존재할 수 있다. 통상적으로, 상기 물질의 최소 농도는 이의 사용 목적을 달성하기 위해 필요한 양인 반면, 최대 농도는 용액 내에 잔류하거나 최초 혼합물 내에 균질하게 현탁된 최대량이다. 예를들어, 치료제의 최소량은 임의로 단일한 치료적 유효량을 제공하는 양이다. 생활성 물질에 대해서는, 최소 농도는 재구성후 생활성에 필요한 양이고, 최대 농도는 균질한 현탁액이 유지될 수 없는 지점의 농도이다. 단일 투여 단위의 경우에서, 상기 량은 단일 치료 적용량이다. 일반적으로, 각각의 용량은 1-100㎍, 임의로 5-50㎍ 또는 5-25㎍의 단백질 항원을 포함할 것으로 예상된다. 예를들어, 세균 당류의 용량은 컨쥬게이트 내의 10-20㎍, 5-10㎍, 2.5-5㎍ 또는 1-2.5㎍의 당류이다.

[0137] 본 발명의 백신 제조물은 전신 또는 점막 경로를 통해 상기 백신을 투여함으로써, 감염에 민감한 포유동물 (예를들어, 인간 환자)를 보호하거나 치료하기 위해 사용될 수 있다. 인간 환자는 임의로 유아 (12개월 미만), 유아 (12-24, 12-16 또는 12-14 개월), 아동 (2-10, 3-8 또는 3-5세), 청년 (12-21, 14-20 또는 15-19세) 또는 성인이다. 이러한 투여는 근내, 복막내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 경구/식사, 호흡기, 비뇨생식관으로의 점막 투여를 포함할 수 있다. 폐렴 또는 중이염의 치료를 위한 백신의 비내 투여가 바람직하다 (폐렴구균의 비강인두 이동은 보다 효과적으로 예방되어, 가장 초기 단계에서 감염을 약화시킬 수 있음). 본 발명의 백신은 단일 용량으로 투여될 수 있으나, 이의 성분은 또한 동시에 또는 상이한 시간에 함께 공동 투여될 수 있다 (예를들어, 당류가 백신에 존재하는 경우, 서로에 대한 면역 반응의 최적 협동을 위해 동시에 또는 세균 단백질 백신이 투여 1-2주 후에 별개로 투여될 수 있음). 단일 경로의 투여 외에, 2개의 상이한 투여 경로가 이용될 수 있다. 예를들어, 바이러스 항원은 ID (피내) 투여될 수 있는 반면, 세균 단백질은 IM (근내) 또는 IN (비내) 투여될 수 있다. 당류가 존재하는 경우, 이들은 IM (또는 ID) 투여될 수 있고, 세균 단백질은 IN (또는 ID) 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 백신은 초회량에 대해 IM 및 부스터 용량에 대해 IN 투여될 수 있다.

[0138] 백신 제조는 일반적으로 문헌[Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York)]에 기술되어 있다. 리포솜 내의 캡슐화는 문헌[Fullerton, US Patent 4,235,877]에 기술되어 있다.

[0139] 본 발명의 한 추가 양태는 보르데텔라 퍼투시스, 클로스트리듐 테타니, 코리네박테리움 디프테리아 및 나이세리아 메닌지티디스, 임의로 헤모필루스 인플루엔자에 의해 야기된 질병에 대해 숙주에 보호를 제공하는 두개의 다가 면역원성 조성물을 동시 또는 연속적으로 투여하기 위한 백신 키트이다. 예를들어, 키트는 임의로 파상풍 독소 (TT), 디프테리아 독소 (DT), 및 전체 세포 또는 무세포 백일해 성분중 하나 이상을 포함하는 제 1 용기, 상기 기술된 본 발명의 면역원성 조성물 (예를들어, Men 또는 HibMen 당류 컨쥬게이트 조합물을 포함하는 조성물)을 포함하는 제 2 용기를 포함한다.

[0140] 본 발명의 한 추가 양태는 스트렙토코쿠스 뉴모니애 및 나이세리아 메닌지티디스, 임의로 헤모필루스 인플루엔자에 의해 야기되는 질병에 대해 숙주에 보호를 제공하는 두개의 다가 면역원성 조성물을 동시 또는 연속적으로 투여하기 위한 백신 키트이다. 예를들어, 키트는 임의로 담체 단백질 및 스트렙토코쿠스 뉴모니애로부터의 캡슐 당류[여기서, 캡슐 당류는 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 구성된 군으로부터 선택된 폐렴구균 혈청형임]의 하나 이상의 컨쥬게이트를 포함하는 제 1 용기, 및 상기 기술된 본 발명의 면역원성 조성물 (예를들어, Men 또는 HibMen 당류 컨쥬게

이트 조합물을 포함하는 조성물)을 포함하는 제 2 용기를 포함한다.

[0141] Hib 컨쥬게이트 및 나이세리아 메닌지티디스 다당류 컨쥬게이트의 예는 상기 기술된 바와 같다.

[0142] 통상적으로, 본 발명의 백신 키트 내의 스트렙토코쿠스 뉴모니애 백신 (또는 상기 기술된 본 발명의 면역원성 조성물중 임의의 것)은 당류 항원 (임의로, 컨쥬게이션됨)을 포함하고, 여기서 당류는 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 구성된 군으로부터 선택된 폐렴구균의 4개 이상의 혈청형으로부터 유래된다. 임의로, 네개의 혈청형은 6B, 14, 19F 및 23F를 포함한다. 임의로, 7개 이상의 혈청형, 예를들어 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터 유래된 혈청형이 조성물에 포함된다. 임의로, 7개 이상의 혈청형, 예를들어 10, 11, 12, 13 또는 14개 이상의 혈청형이 조성물에 포함된다. 예를들어, 한 구체예에서 조성물은 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F, 임의로 3으로부터 유래된 10 또는 11개 (임의로, 모두 컨쥬게이션됨)의 캡슐 당류를 포함한다. 본 발명의 한 구체예에서, 13개 이상의 당류 항원 (임의로, 컨쥬게이션됨)이 포함되나, 추가의 당류 항원, 예를들어 23가 (예를들어, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F)의 항원이 또한 본 발명에서 고려된다.

[0143] 폐렴구균 당류는 독립적으로 임의의 공지된 담체 단백질, 예를들어 CRM197, 파상풍 독소, 디프테리아 독소, 단백질 D 또는 상기 언급된 임의의 기타 담체 단백질에 컨쥬게이션된다.

[0144] 임의로, 본 발명의 백신 키트는 3번째 성분을 포함한다. 예를들어, 키트는 임의로 파상풍 독소 (TT), 디프테리아 독소 (DT), 및 전체 세포 또는 무세포 백일해 성분중 하나 이상을 포함하는 제 1 용기, 및 담체 단백질 및 스트렙토코쿠스 뉴모니애로부터의 캡슐 당류[여기서, 캡슐 당류는 임의로 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 구성된 군으로부터 선택된 폐렴구균 혈청형으로부터의 당류임]의 하나 이상의 컨쥬게이트를 포함하는 제 2 용기, 및 상기 기술된 본 발명의 면역원성 조성물 (예를들어, Men 또는 HibMen 당류 컨쥬게이트 조성물을 포함하는 조성물)을 포함하는 제 3 용기를 포함한다.

[0145] 본 발명의 한 추가 양태는 본 발명의 당류, 예를들어 담체 단백질에 컨쥬게이션된 혈청군 A, C, W 및 Y중 최소 한 하나, 두개, 세개 또는 4개 모두의 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류와 약학적으로 허용되는 부형제를 혼합시키는 단계를 포함하여, 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신을 제조하는 방법이다.

[0146] 본 발명의 한 추가 양태는 임의로 단일 투여를 이용하여 면역보호량의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트를 숙주에게 투여하는 것을 포함하여, 세균, 예를들어 나이세리아 메닌지티디스, 임의로 헤모필루스 인플루엔자 감염에 의해 야기되는 질병 대해 인간 숙주를 면역화시키는 방법이다.

[0147] 본 발명의 한 독립적 양태는 혈청군 A, C, W 및 Y (임의로, MenA, C, W and Y)로 구성된 군으로부터 선택된 2개 이상의 상이한 나이세리아 메닌지티디스 캡슐 당류 컨쥬게이트를 포함하는 면역원성 조성물을 이용하여 인간 숙주를 면역화시키는 방법으로, 여기서 단일 용량 투여 (임의로, 10대, 성인 또는 유아에 투여)는 투여 1개월 후에 수행된 혈액 시험에서 MenA, MenC, MenW 및/또는 MenY에 대한 반응의 SBA 분석 측정 수준에서 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상의 반응자를 발생시킨다. 임의로, SBA 분석은 실시예 9에 기술된 바와 같이 측정된 반응자와 함께 실시예 9에 기술되어 있다.

[0148] 본 발명의 추가의 독립적인 양태는 접종된 인간 피검체 (아동, 10대 또는 성인)의 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 이상이 접종 1개월 후에 채혈된 혈액에 대한 SBA 분석에서 반응자로 분류 (임의로, 실시예 9에 기술된 기준을 이용함)되는, 단일 투여 후에 면역 반응을 유발시킬 수 있는 MenA, MenC, MenW 및/또는 MenY 컨쥬게이트를 포함하는 면역원성 조성물이다.

[0149] 이러한 면역원성 조성물은 임의로 본원에 기술된 추가의 구조적 특성을 지닌다.

[0150] 본 발명의 한 추가 양태는 세균, 예를들어 나이세리아 메닌지티디스, 임의로 헤모필루스 인플루엔자에 의해 야기된 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 면역원성 조성물이다.

[0151] 본 발명의 한 추가 양태는 세균, 예를들어 나이세리아 메닌지티디스, 임의로 헤모필루스 인플루엔자에 의해 야기된 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트의 용도이다.

[0152] 본원의 용어 "포함하는", "포함하다" 및 "들을 포함하다"는 임의로 각각의 예에서 용어 "구성되는", "구성되다"

및 "들로 구성되다"로 각각 대용될 수 있다.

[0153] 본 특허 명세서에 인용된 모든 참고문헌 또는 특허 출원은 참조로서 본원에 포함된다.

[0154] 본 발명은 하기 실시예로 예시된다. 하기 실시예는 달시 상세하게 기술되는 경우를 제외하고는 당업자에게 널리 공지되어 있거나 통상적인 표준 기술을 이용하여 수행된다. 실시예는 단지 예시이며, 본 발명을 제한하고자 하는 바는 아니다.

실 시 예

[0155] 실시예 1 - 다당류 컨쥬게이트의 제조

[0156] 헤모필루스 인플루엔자 (Hib) PRP 다당류의 TT로의 공유 결합을 문헌[Chu et al (Infection and Immunity 1983, 40 (1); 245-256)]에서 개발된 커플링 화학에 의해 수행하였다. CNBr을 첨가하고 6분 동안 pH 10.5에서 인큐베이팅시킴으로써 Hib PRP 다당류를 활성화시켰다. pH를 pH 8.5로 낮추고, 아디프산 디히드라지드 (ADH)를 첨가하고, 추가로 90분 동안 인큐베이션을 지속시켰다. 활성화된 PRP를 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카르보디이미드 (EDAC)를 이용하는 카르보디이미드 축합을 통해 정제된 파상풍 독소에 커플링시켰다. EDAC를 활성화된 PRP에 첨가하여 0.6 mg의 EDAC/활성화된 PRP mg의 최종 비를 생성시켰다. pH를 5.0으로 조정하고, 정제된 파상풍 독소를 첨가하여 2 mg의 TT/활성화된 PRP mg을 생성시켰다. 생성된 용액을 약간의 교반과 함께 3일 동안 방치시켰다. 0.45㎛ 막을 통해 여과시킨 후, 컨쥬게이트를 0.2M NaCl로 평형화된 세파크릴 S500HR (Pharmacia, Sweden) 컬럼 상에서 정제시켰다.

[0157] 천연 다당류 (MALLS로 측정시 150kDa 이상)를 이용하여 MenC-TT 컨쥬게이트를 생성시키거나, 약간 미세유동화시켰다. 천연 다당류 또는 실시예 2의 MALLS 방법으로 측정시 60kDa을 초과하는 약간 미세유동화된 다당류를 이용하여 MenA-TT 컨쥬게이트를 생성시켰다. MALLS로 측정시 약 100-200kDa으로 크기 조절된 다당류를 이용하여 MenW 및 MenY-TT 컨쥬게이트를 생성시켰다 (실시예 2 참조). 크기 조절은 균질화기인 에멀지플렉스 (Emulsiflex) C-50 기기를 이용하는 미세유동화로 수행하였다. 이후, 다당류를 0.2 ㎛ 필터를 통해 여과시켰다.

[0158] WO96/29094 및 WO 00/56360에 기술된 바와 같이 활성화 및 커플링을 수행하였다. 간단하게, 2M NaCl (pH 5.5-6.0) 중 10-20mg/ml의 농도의 다당류를 CDAP 용액 (아세토니트릴/WFI (50/50)으로 새로이 제조된 100mg/ml)과 함께 0.75/1 또는 1.5/1의 최종 CDAP/다당류 비로 혼합시켰다. 1.5분 후, 수산화나트륨을 이용하여 pH를 pH 10.0으로 상승시켰다. 3분 후, 파상풍 독소를 첨가하여 MenW에 대해 1.5/1, MenY에 대해 1.2/1, MenA에 대해 1.5/1 또는 MenC에 대해 1.5/1의 단백질/다당류 비를 생성시켰다. 1 내지 2시간 동안 반응을 지속시켰다.

[0159] 냉각 단계 후, 글리신을 7.5/1의 글리신/PS (w/w)의 최종 비로 첨가하고, pH를 pH 9.0으로 조정하였다. 혼합물을 30분 동안 방치시켰다. 컨쥬게이트를 10㎛ 클린팩(Kleenpak) 필터를 이용하여 정제시킨 후, 150mM NaCl, 10mM 또는 5mM Tris pH7.5의 용리 완충용액을 이용하는 세파크릴 S400HR 컬럼에 로딩시켰다. 임상 로트(lot)를 옵티캡 (Opticap) 4 멸균 막 상에서 여과시켰다. 생성된 컨쥬게이트는 1:1-1:5 (w/w)의 평균 다당류:단백질 비를 지녔다.

[0160] 실시예 1a - 본 발명의 MenA 및 MenC 다당류 컨쥬게이트의 제조

[0161] 천연 다당류 (MALLS로 측정시 150kDa 초과)를 이용하여 MenC-TT 컨쥬게이트를 생성시키거나, 약간 미세유동화시켰다. 천연 다당류 또는 실시예 2의 MALLS 방법으로 측정시 60kDa을 초과하는 약간 미세유동화된 다당류를 이용하여 MenA-TT 컨쥬게이트를 생성시켰다. 균질화기인 에멀지플렉스 C-50 기기를 이용하는 미세유동화로 크기 조절을 수행하였다. 이후, 다당류를 0.2㎛ 필터를 통해 여과시켰다.

[0162] 스페이서를 통해 MenA 캡슐 다당류를 파상풍 독소에 컨쥬게이션시키기 위해, 하기 방법을 이용하였다. 다당류와 스페이서 (ADH)의 공유 결합을 다당류가 시아닐화 작용제인 1-시아노-4-디메틸아미노-피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)에 의해 조절되는 조건하에서 활성화되는 커플링 화학에 의해 수행하였다. 스페이서를 이의 히드라지노기를 통해 시아닐화된 PS와 반응시켜, 스페이서와 다당류 사이에 안정한 이소우레아 연결을 형성시켰다.

[0163] 10mg/ml의 MenA 용액 (pH 6.0) [3.5 g]을 아세토니트릴/물 (50/50 (v/v)) 중에서 새로이 제조된 100mg/ml의 CDAP 용액으로 처리하여, 0.75 (w/w)의 CDAP/MenA 비를 수득하였다. 1.5분 후, pH를 pH 10.0으로 상승시켰다. 3분 후, ADH를 첨가하여 8.9의 ADH/MenA 비를 수득하였다. 용액의 pH를 8.75로 감소시키고, 이러한 pH를 유지

시키면서 (25℃에서 온도 유지) 2시간 동안 상기 반응을 진행시켰다.

[0164] PSAAH 용액을 이의 최초 부피의 1/4로 농축시킨 후, 10kDa의 컷오프를 지니는 필트론 오메가 (Filtron Omega) 막을 이용하여 30 배의 0.2M NaCl과 함께 여과시키고, 보유액을 여과시켰다.

[0165] 컨쥬게이션 (카르보디이미드 축합) 반응 전에, 정제된 TT 용액 및 PSAAH 용액을 희석시켜, PSAAH에 대해서 10 mg/ml 및 TT에 대해서 10mg/ml의 농도를 생성시켰다.

[0166] EDAC (1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필) 카르보디이미드)를 PSAH 용액 (2g의 당류)에 첨가하여, 0.9 mg의 EDAC/PSAAH mg의 최종 비를 생성시켰다. pH를 5.0으로 조정하였다. 정제된 파상풍 독소를 연동 펌프를 이용하여 첨가 (60 분 이내)하여 2 mg의 TT/PSAAH mg을 생성시켰다. 생성된 용액을 교반하에서 +25℃에서 60분 동안 방치시켜, 120분의 최종 커플링 시간을 수득하였다. 1M Tris-Hcl pH 7.5 (최종 부피의 1/10)를 첨가하여 용액을 중화시키고, +25℃에서 30분 동안 방치시킨 후, +2℃ 내지 +8℃에서 밤새 방치시켰다.

[0167] 10㎛ 필터를 이용하여 컨쥬게이트를 정제시키고, 세파크릴 S400HR 컬럼 (Pharmacia, Sweden)을 이용하여 정제시켰다. 컬럼을 10 mM Tris-HCl (pH 7.0)에서 중화시키고, 0.075 M NaCl 및 컨쥬게이트 (약 660 mL)를 컬럼 (+2℃ 내지 +8℃) 상에 로딩시켰다. 용리 풀 (pool)을 280 nm의 광학 밀도의 함수에 따라 선택하였다. 흡광도가 0.05로 증가하는 경우 수거를 시작하였다. Kd가 0.30에 도달할때까지 수거를 지속시켰다. 컨쥬게이트를 +20℃에서 여과 멸균시킨 후, +2℃ 내지 +8℃에서 보관하였다. 생성된 컨쥬게이트는 1:2-1:4 (w/w)의 다당류:단백질 비를 지녔다.

[0168] MenC 캡슐 다당류를 스페이서를 통해 파상풍 독소로 컨쥬게이션시키기 위해, 하기 방법을 이용하였다. 다당류와 스페이서 (ADH)의 공유 결합을 다당류가 시아닐화 작용제인 1-시아노-4-디메틸아미노-피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)에 의해 조절되는 조건하에서 활성화되는 커플링 화학에 의해 수행하였다. 스페이서는 이의 히드라지노기를 통해 시아닐화된 PS와 반응하여, 스페이서와 다당류 사이에 안정한 이소우레아 결합을 형성시킨다.

[0169] 20mg/ml의 MenC 용액 (pH 6.0) (3.5 g)을 아세토니트릴/물 (50/50 (v/v)) 중에서 새로이 제조된 100mg/ml의 CDAP 용액으로 처리하여 1.5 (w/w)의 CDAP/MenC 비를 수득하였다. 1.5분 후, pH를 pH 10.0으로 상승시켰다. 활성화 pH에서 5M NaCl을 첨가하여 2M NaCl의 최종 농도를 생성시켰다. 3분 후, ADH를 첨가하여 8.9의 ADH/MenC 비를 수득하였다. 용액의 pH를 8.75로 감소시키고, 2시간 (25℃에서 유지) 동안 반응을 진행시켰다.

[0170] PSCAH 용액을 최소 150 mL로 농축시킨 후, 10kDa의 컷오프를 지니는 필트론 오메가 막을 이용하여 30 배의 0.2M NaCl과 함께 여과시키고, 보유물을 여과시켰다.

[0171] 컨쥬게이션 반응 전, 정제된 TT 용액 및 PSCAH 용액 (2g 규모)을 0.2M NaCl 중에 희석시켜, PSCAH에 대해 15 mg/ml 및 TT에 대해 20mg/ml의 농도를 생성시켰다.

[0172] 정제된 파상풍 독소를 PSCAH 용액에 첨가하여 2 mg의 TT/PSCAH mg을 생성시켰다. pH를 5.0으로 조정하였다. EDAC (Tris 0.1M pH 7.5 중 16.7 mg/ml)를 연동 펌프를 이용하여 첨가 (10분 이내)하여 0.5 mg EDAC/PSCAH mg의 최종 비를 생성시켰다. 생성된 용액을 교반 및 pH 조절하에서 +25℃에서 110분 동안 방치시켜, 120분의 최종 커플링 시간을 수득하였다. 이후, 1M Tris-Hcl pH 9.0 (최종 부피의 1/10)을 첨가하여 용액을 중성화시키고, +25℃에서 30분, 이후 +2℃ 내지 +8℃에서 밤새 방치시켰다.

[0173] 10㎛ 필터를 이용하여 컨쥬게이트를 정제하고, 세파크릴 S400HR 컬럼 (Pharmacia, Sweden)을 이용하여 정제하였다. 컬럼을 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) 중에서 평형화시키고, 0.075 M NaCl 및 컨쥬게이트 (약 460 mL)를 컬럼 (+2℃ 내지 +8℃)에 로딩시켰다. 280 nm에서의 광학 밀도의 함수에 따라 용리 풀을 선택하였다. 흡광도가 0.05로 상승하는 경우 수거를 시작하였다. Kd가 0.20에 도달할때까지 수거를 지속시켰다. 컨쥬게이트를 +20℃에서 여과 멸균시킨 후, +2℃ 내지 +8℃에서 보관하였다. 생성된 컨쥬게이트는 1:2-1:4 (w/w)의 다당류:단백질 비를 지녔다.

[0174] 실시예 2 - MALLS를 이용한 분자량의 결정

[0175] 검출기를 샘플이 용리되는 HPLC 크기 배제 컬럼에 커플링시켰다. 한편으로, 레이저광 분산 검출기는 거대분자 용액에 의해 16° 에서 분산된 광 강도를 측정하고, 다른 한편으로 작동중인 간섭 굴절계는 용리되는 샘플의 정량의 결정을 가능케 한다. 이러한 강도로부터, 용액 내의 거대분자의 크기 및 형태가 결정될 수 있다.

[0176] 중량 내의 평균 분자량 (M_w)은 모든 종의 중량의 합계를 이들의 각각의 분자량으로 곱하고, 이를 모든 종의 중량

의 합계로 나눈 것으로 정의된다.

[0177] a) 중량-평균 분자량: -Mw-

[0178] $$M_w = \frac{\sum W_i . M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

[0179] b) 수-평균 분자량: -Mn-

[0180] $$M_n = \frac{\sum N_i . M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

[0181] c) 제곱평균제곱근 반지름: -Rw-, R^2w는 하기와 같이 정의되는 제곱 반지름이다:

[0182] $$R^2w \text{ 또는 } (r^2)w = \frac{\sum m_i . r_i^2}{\sum m_i}$$

[0183] (-m_i-는 분산 중심 i의 질량이고, -r_i-은 분산 중심 i와 거대분자의 중량의 중심 사이의 거리이다)

[0184] d) 다분산성은 -Mw / Mn- 비로 정의된다.

[0185] 수막구균 다당류를 조합되어 사용되는 두개의 HPLC 컬럼 (TSKG6000 및 5000PWxl) 상으로 로딩함으로써 MALLS에 의해 분석하였다. 25㎕의 다당류를 컬럼 상에 로딩시키고, 0.75ml의 여과된 물과 함께 용리시켰다. 광 분산 검출기 (488nm의 10mW 아르곤 레이저가 장비된 Wyatt Dawn DSP) 및 간섭 굴절계 (P100 셀 및 498nm의 적색 필터가 장비된 Wyatt Otilab DSP)를 이용하여 다당류를 검출하였다.

[0186] 분자량 다분산성 및 모든 샘플의 회수를 아스트라 (Astra) 4.72 소프트웨어에서 1의 다항 접합 차수 (polynominal fit order)를 이용하는 데바이 방법 (Debye method)으로 계산하였다.

[0187] 실시예 3 - 메닌지텍 (Meningitec) 또는 보다 큰 크기로 조절된 MenC-TT 컨쥬게이트를 이용한 면역화를 비교하는 임상 시험

[0188] GSK 바이오로지칼스 (Biologicals) 수막구균 혈청군 C 컨쥬게이트 백신 (MenC)과 GSK 바이오로지칼스의 헤모필루스 인플루엔자 b-수막구균 혈청군 C 컨쥬게이트 백신 (Hib-MenC) 또는 메닌지텍®의 비교를 위해 단계 Ⅱ의 공개 대조 연구를 수행하였다. 각각의 용량의 메닌지텍®은 15㎍의 CRM197에 컨쥬게이션된 10㎍의 수막구균 혈청군 C 올리고당류를 함유하고, 와이어스 (Wyeth)사에 의해 생산된다. GSK MenC 컨쥬게이트는 파상풍 독소 (TT)에 컨쥬게이션된 약 200kDa의 천연 다당류를 함유하였다.

[0189] 상기 연구는 하기와 같이 두개의 병렬 암 (arm)으로 배분된, 각각 100명의 피검체를 포함하도록 계획된 5개의 군으로 구성된다:

[0190] 본 연구에서, 둘 모두의 암의 모든 피검체에 멘세백스(Mencevax™) ACWY 용량의 1/5를 투여하고, 12-15개월의 연령에는 인펀릭스 헥사 (Infanrix™ hexa)의 부수적 용량을 투여하였다 (연구 개월 0). 모든 피검체로부터 혈액 샘플을 2회 수득하였다 (연구 개월 0 및 연구 개월 1). 암 1은 3, 4 및 5개월의 연령에서 하기 백신을 이용하여 프라이밍된 1차 예방접종 연구로부터의 4개의 군으로 구성된다:

[0191] · 군 K: MenC (10 ㎍), 비흡착 (non-ads), 파상풍 독소 (TT) 컨쥬게이트 및 인펀릭스™ 헥사 (MenC10-TT + 인펀릭스™ 헥사)

[0192] · 군 L: Hib (10 ㎍)-MenC (10 ㎍), 비흡착, TT 컨쥬게이트 및 인펀릭스™ 펜타 (Hib10-MenC10-TT + 인펀릭스™ 펜타)

[0193] · 군 M: Hib (5 ㎍)-MenC (5 ㎍), 비흡착, TT 컨쥬게이트 및 인펀릭스™ 펜타 (Hib5-MenC5-TT + 인펀릭스™ 펜

타)

[0194] · 군 N: 메닌지텍™ 및 인펀릭스™ 헥사 (메닌지텍™ + 인펀릭스™ 헥사)

[0195] 두개의 Hib-MenC-TT 백신 군 (군 L 및 M)을 후보 백신의 정확한 제형화를 위해 부스터 연구에서 맹검인 채로 두었다.

[0196] 암 2-(군 O)는 기존에 수막구균 혈청군 C 백신 (나이브)으로 예방접종되지 않았으나 면역화에 대해 독일 상임위원회에 따라 통상적인 소아과 백신을 투여받은 연령 매치된 피검체로 구성되었다.

[0197] **평가 기준:**

[0198] *면역원성*: 모든 피검체에서 예방접종전 및 예방접종 약 1개월 후에 수득된 혈액 샘플 중의 수막구균 혈청군 C (분석 컷오프: 0.3㎍/ml), Hib 다당류 PRP (분석 컷오프: 0.15㎍/ml) 및 파상풍 독소 (분석 컷오프: 0.1 IU/ml)에 대한 항체의 살균 시험 (컷오프: 1:8의 희석) 및 ELISA 측정에 의한 수막구균 C (SBA-MenC)에 대한 살균 항체 역가의 결정.

[0199] **통계적 방법:**

[0200] *인구학*: ATP 및 전체 예방접종된 코호트의 개월 수의 평균 연령 (중앙값, 범위 및 표준편차[SD]를 이용함), 인종 및 성별 구성의 결정.

[0201] *면역원성*:

[0202] 면역원성에 대해 ATP 코호트 (면역 기억 및 부스터 반응의 분석) 또는 안정성에 대해 ATP 코호트 (지속성의 분석)에 기초하여 면역원성의 두 분석을 수행하였다. 이는 하기를 포함한다:

[0203] MenC에 대한 면역 기억, 및 Hib 및 파상풍에 대한 부스터 반응의 평가 (플레인 (plain) 다당류 백신 용량의 1/5의 투여 전 및 투여 1개월 후):

[0204] · 95%의 신뢰 구간 (95% CI)를 지닌, 기하 평균 역가 및 기하 평균 농도 (GMT 및 GMC)의 결정

[0205] · 정확한 95% CI를 지닌, 제시된 컷오프를 초과하는 항체 역가/농도를 지닌 피검체의 백분율의 결정 (혈청양성반응성/혈청보호율)

[0206] · 역 누적 곡선을 이용한 예방접종 후의 항체 역가/농도의 연구

[0207] · 프라이밍된 군 (군 K, L, M 및 N)과 프라이밍되지 않은 군 (군 O) 사이의 혈청양성반응/혈청보호율에서의 차이에 대한 표준화된 점근적 95% CI의 계산

[0208] · 95% CI를 지니는, 항-PSC 농도에 대한 SBA-MenC 역가의 개별적 비의 기하 평균의 결정

[0209] · ANOVA 모델을 이용한, 항-PRP 및 항-파상풍에 대한 군 K, L, M과 대조군 N 사이, 및 SBA-MenC 및 항-PSC에 대한 각각의 프라이밍된 군 (군 K, L, M 및 N)과 프라이밍되지 않은 군 (군 O) 사이의 예방접종후 GMT/C 비에 대한 95% CI의 결정

[0210] 결과

[0211] 표 1. 부스터 예방접종 후의 SBA-MenC 역가 및 항-PSC 항체 농도

항체	군	N	GMT/C	95% CL LL	95% CL UL
SBA-MenC	K-MenC-TT	71	3508.9	2580.1	4772.2
	L-HibMenC	79	2530.1	1831.7	3494.7
	M-HibMenC	81	5385.4	4425.0	6554.2
	N-메닌지텍	85	1552.6	1044.4	2307.9
	O-대조군	91	9.3	6.3	13.6
Anti-PSC	K-MenC-TT	70	28.10	22.59	34.95
	L-HibMenC	71	30.01	24.09	37.38
	M-HibMenC	76	34.58	29.10	41.09
	N-메닌지텍	78	16.59	12.98	21.21
	O-대조군	94	3.05	2.36	3.93

[0212]

[0213] 군 K: MenC10-TT + 인펀릭스.헥사로 프라이밍된 피검체; 군 L: Hib10-MenC10-TT + 인펀릭스.펜타로 프라이밍된 피검체; 군 M: Hib5-MenC5-TT + 인펀릭스.펜타로 프라이밍된 피검체; 군 N: 메닌지텍. + 인펀릭스.헥사로 프라이밍된 피검체; 군 O: 대조군 피검체 (즉, MenC 컨쥬게이트 백신으로 프라이밍되지 않은 피검체)

[0214] N: 이용가능한 결과를 지닌 피검체의 수

[0215] 보다 큰 크기로 조절된 MenC 다당류 컨쥬게이트 백신 (군 K, L 및 M)으로 프라이밍시켜 메닌지텍 올리고당류 컨쥬게이트 백신에 비해 MenC에 대한 보다 높은 항체의 역가 및 보다 높은 SBA 역가를 달성하였다.

[0216] 표 2: SBA MenC 역가/항-PSC 농도에 대한 기하 평균비

군	시간	N	GMR	LL	UL
K	전 후	70 66	49.470 126.138	34.939 101.419	70.044 156.882
L	전 후	76 70	36.528 90.200	25.849 70.153	51.621 115.975
M	전 후	77 74	51.298 164.950	36.478 139.304	72.139 195.318
N	전 후	84 76	22.571 90.168	16.521 67.757	30.837 119.991
O	전 후	3 87	91.634 2.708	0.651 1.767	12889.8 4.149

[0217]

[0218] 네개의 모든 프라이밍된 군 (군 K, L, M 및 N)에서, 부스터 예방접종 전으로부터 부스터 예방접종 후에 GMR이 현저하게 증가하였고, 이는 항체 성숙 및 기능의 존재를 나타낸다. 군 M (Hib5-MenC5-TT로 프라이밍됨)에서의 GMR은 군 N (메닌지텍™으로 프라이밍됨)에서의 GMR보다 높았다.

[0219] 표 3: 부스터 백신 접종 직전의 12-15개월의 연령에서의 지속성

종점	군	N	%	군	N	%	차이	값%
SBAMenC ≥ 1:8	K	79	88.6	N	91	80.2	N-K	-8.4
	L	84	93.3	N	91	80.2	N-L	-3.1
	M	85	87.1	N	91	80.2	N-M	-6.8
SBAMenC ≥ 1:128	K	79	65.8	N	91	51.6	N-K	-14.2
	L	84	56.0	N	91	51.6	N-L	-4.3
	M	85	64.7	N	91	51.6	N-M	-13.1
항-PSC ≥0.3μg/ml	K	79	100.0	N	91	100.0	N-K	0.0
	L	84	100.0	N	91	100.0	N-L	0.0
	M	88	98.9	N	91	100.0	N-M	1.1
항-PSC ≥2μg/ml	K	79	72.2	N	91	81.3	N-K	9.2
	L	84	64.3	N	91	81.3	N-L	17.0
	M	88	64.3	N	91	81.3	N-M	8.6
항-PRP ≥0.15μg/ml	K	81	88.9	N	91	85.7	N-K	-3.2
	L	86	96.5	N	91	85.7	N-L	-10.8
	M	90	98.9	N	91	85.7	N-M	-13.2
항-PRP ≥1μg/ml	K	81	33.3	N	91	28.6	N-K	-4.8
	L	86	55.8	N	91	28.6	N-L	-27.2
	M	90	74.4	N	91	28.6	N-M	-45.9
항-파상풍 ≥0.1 IU/ml	K	81	100.0	N	91	96.7	N-K	-3.3
	L	86	100.0	N	91	96.7	N-L	-3.3
	M	90	100.0	N	91	96.7	N-M	-3.3

[0220]

[0221] 군 K: MenC10-TT + 인펀릭스™ 헥사로 프라이밍된 피검체; 군 L: Hib10-MenC10-TT + 인펀릭스™ 펜타로 프라이밍된 피검체; 군 M: Hib5-MenC5-TT + 인펀릭스™ 펜타로 프라이밍된 피검체; 군 N: 메닌지텍™ + 인펀릭스™ 헥사로 프라이밍된 피검체; N: 이용가능한 결과를 지닌 피검체의 수

[0222] MenC-올리고당류 컨쥬게이트 메닌지텍™을 이용하는 프라이밍에 비해, 보다 큰 크기의 MenC (군 K, L 및 M)를 이용하는 프라이밍에 의해 MenC에 대한 보다 높은 SBA 역가를 달성하였다.

[0223] **면역 기억 (면역원성에 대한 ATP 코호트)**

[0224] 플레인 다당류 ACWY 백신의 1/5 용량의 투여는 각각 ≥1:8 및 ≥1:128의 역가를 나타내는 후보 백신 요법으로 프라이밍된 피검체의 98.7-100% 및 97.5-100%으로 네개의 모든 프라이밍된 군에서 매우 높은 SBA-MenC 역가를 유도하였다. 메닌지텍™ 요법으로 프라이밍된 군에서, ≥1:128의 역가를 지닌 피검체의 낮은 백분율(91.8%)의 경향이 있었다. 비교시, 프라이밍되지 않은 피검체의 17.6%가 ≥1:8 및 ≥1:128의 SBA MenC 역가를 지녔다.

[0225] 실시예 4: DTPw-HepB와 혼합된 HibMenAC - TT 컨쥬게이트 백신에 대한 단계 II 임상 시험

[0226] **연구 계획**: 5개의 군을 지닌 공개된 무작위화 (1:1:1:1:1) 단일 중심 연구. 6, 10 및 14주의 연령에서 5개의 군에 하기의 예방접종 요법을 각각 적용시켰다.

[0227] · 트리탄릭스(Tritanrix™)-HepB/Hib-MenAC 2.5/2.5/2.5: 이후, 2.5/2.5/2.5로 언급함

[0228] · 트리탄릭스™-HepB/Hib-MenAC 2.5/5/5: 이후, 2.5/5/5로 언급함

[0229] · 트리탄릭스™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5: 이후, 5/5/5로 언급함

[0230] · 트리탄릭스™-HepB + 히베릭스(Hiberix™): 이후, 히베릭스로 언급함

[0231] · 트리탄릭스.-HepB/히베릭스™ + 메닌지텍™: 이후, 메닌지텍으로 언급함

[0232] 혈액 샘플을 첫번째 백신 투여시 (전) 및 세번째 백신 투여 1개월 후 (3회 투여후)에 수집하였다.

[0233] 트리탄릭스는 글락소스미스클라인 바이오로지칼스 에스.에이. (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.)사에서 시판되는 DTPw 백신이다.

[0234] 본 연구에서 105명의 피검체를 각각의 5개의 군으로 하여 전체 525명의 피검체가 연구되었다.

[0235] 표 4: GSK 백신 제형의 양

[0236]

용량당 성분 (0.5ml)	2.5/2.5/2.5*	2.5/5/5	5/5/5
파상풍 독소 (TT)에 컨쥬게이팅된 Hib 캡슐 다당류 PRP	2.5μg	2.5μg	5μg
TT 에 컨쥬게이팅된 나이세리아 메닌지티디스 A 캡슐 다당류(PSA)	2.5μg	5μg	5μg
TT 에 컨쥬게이팅된 나이세리아 메닌지티디스 C 캡슐 다당류 (PSC)	2.5μg	5μg	5μg

[0237] * 2.5/2.5/2.5 백신은 2.5㎍의 각각의 PRP-TT, MenA-TT 및 MenC-TT를 함유하는 GSK 바이오로지칼스 Hib-MenAC 5/5/5 백신의 투여 희석액이다.

[0238] Hib-MenAC 백신 제형은 트리탄릭스-HepB와 즉석에서 혼합한다. GSK 바이오로지칼스의 조합된 디프테리아-파상풍-전체 세포 보르데텔라 퍼투시스 - B형 간염 (DTPw-HB) 백신 (트리탄릭스-HepB)은 30 국제 단위 (IU) 이상의 디프테리아 독소, 60 IU 이상의 파상풍 독소, 4 IU 이상의 사멸된 보르데텔라 퍼투시스 및 10 ㎍의 재조합 B형 간염 표면 항원을 함유한다.

[0239] **참고 요법, 용량, 투여 방법, 로트(lot) 번호:**

[0240] *예방접종 스케줄/부위*: 하나의 군에 6, 10 및 14주의 연령에서 좌측 대퇴부에 트리탄릭스.-HepB 백신을 근내 투여하고, 우측 대퇴부에 히베릭스.를 근내 투여하였다. 또 다른 군에 6, 10 및 14주의 연령에서 좌측 대퇴부에 트리탄릭스.-HepB/히베릭스. 백신을 근내 투여하고, 우측 대퇴부에 메닌지텍. 백신을 근내 투여하였다.

[0241] *백신/조성물/용량/로트 수*: 트리탄릭스.-HepB 백신을 상기 기술된 바와 같이 사용하였다.

[0242] GSK 바이오로지칼스 헤모필루스 인플루엔자 타입 b 컨쥬게이트 백신의 하나의 용량 (0.5 ml): 히베릭스™는 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 10㎍의 PRP를 함유하였다. 히베릭스™ 군에서, 이는 멸균 희석제와 혼합하고, 메닌지텍™ 군에서, 이는 트리탄릭스™-HepB와 혼합하였다.

[0243] 와이어스 레덜스 (Wyeth Lederle's) 메닌지텍™ 백신의 하나의 용량 (0.5 ml)은 15㎍의 코리네박테리움 디프테리아 CRM197 단백질에 컨쥬게이션된 10㎍의 수막구균 그룹 C의 캡슐 올리고당류 및 염으로서 알루미늄을 함유하였다.

[0244] 결과 - Hib, MenA 및 MenC에 대해 생성된 면역 반응

[0245] 표 5a - 항-PRP (㎍/ml)

[0246]

군	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	히베릭스 (Hiberix™)	메닌지텍™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥0.15	100 96.5 100	99.0 94.8 100	100 96.5 100	100 96.5 100	100 96.5 100
GMC	20.80 15.96 27.10	22.62 17.72 28.88	19.36 15.33 24.46	38.55 29.93 49.64	10.94 8.62 13.88

[0247] 표 5b - SBA-MenC

[0248]

군	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	히베릭스™	메닌지텍™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥1:8	99 94.7 100	100 96.5 100	100 96.5 100	2.9 0.6 8.4	100 96.5 100
GMT	3132 2497 3930	4206 3409 5189	3697 3118 4384	4.7 3.9 5.6	4501 3904 5180

[0249] 표 5c - SBA MenA

[0250]

군	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	히베릭스™	메닌지텍™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥1:8	99.7 91.9 99.7	100 95.8 100	100 96.2 100	6.8 2.5 14.3	9.1 4.0 17.1
GMT	316.7 251.4 398.9	418.5 358.6 488.5	363 310.5 424.4	5.6 4.3 7.4	5.6 4.4 7.2

[0251] 표 5d - 항-PSC (㎍/ml)

[0252]

군	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	히베릭스™	메닌지텍™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥0.3	100 96.5 100	100 96.4 100	100 96.5 100	8.2 3.6 15.6	100 96.5 100
GMC	49.03 43.24 55.59	71.11 62.49 80.92	61.62 54.88 69.20	0.17 0.15 0.19	58.02 51.42 65.46

[0253] 표 5e - 항-PSA (㎍/ml)

[0254]

군	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	히베릭스™	메닌지텍™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥0.3	100 96.4 100	100 96.5 100	99.0 94.8 100	1.0 0.0 5.4	5.9 2.2 12.5
GMC	18.10 15.34 21.35	26.51 22.93 30.79	23.40 20.05 27.30	0.15 0.15 0.15	0.17 0.15 0.18

[0255] 결론

[0256] 올리고당류 MenC-CRM197 컨쥬게이트 백신, 및 다당류 MenA-TT 및 MenC-TT 컨쥬게이트를 함유하는 3개의 GSK 제형을 이용하여 달성된 면역원성 결과의 비교는 다당류 Men 컨쥬게이트가 올리고당류 컨쥬게이트 백신 메닌지텍을 이용하여 달성된 면역원성 결과와 유사한 우수한 면역원성 반응을 유도할 수 있음을 나타내었다. 모든 시험된 제형은 100%의 환자에서 MenC에 대한 반응을 나타내었다.

[0257] 실시예 5 - 2, 3 및 4개월의 스케줄에 따른 Hib MenCY와 부수적으로 인펀릭스 펜타를 투여하는 단계 Ⅱ 임상 시험

[0258] **연구 계획**: 하기와 같은 백신을 이용하여 3회 투여의 일차 스케줄로 투여하는 5개 군을 이용한 단계 Ⅱ의 공개 (부분적으로 이중-맹검*) 무작위화 대조 다중심 연구:

[0259] 군 Hib-MenCY 2.5/5/5: Hib-MenCY (2.5/5/5) + 인펀릭스™ 펜타

[0260] 군 Hib-MenCY 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + 인펀릭스™ 펜타

[0261] 군 Hib-MenCY 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + 인펀릭스™ 펜타

[0262] 군 Hib-MenC: Hib-MenC (5/5) + 인펀릭스™ 펜타

[0263] 군 멘주게이트: 멘주게이트™** + 인펀릭스™ 헥사 (대조군).

[0264] *Hib-MenCY 2.5/5/5, Hib-MenCY 5/10/10 및 Hib-MenC는 이중 맹검 방식으로 투여한데 반해, Hib-MenCY 5/5/5 군 및 멘주게이트군은 공개 방식으로 투여하였다. Hib-MenCY의 2.5/5/5, 5/10/10 및 5/5/5 제형은 MenC 천연 다당류 및 미세유동화된 MenY 다당류를 함유한다.

[0265] **멘주게이트™은 용량당 12.5-25㎍의 CRM197에 컨쥬게이션된 10㎍의 MenC 올리고당류를 함유하고, 카이론(Chiron)사에 의해 생산된다.

[0266] +/- 2, 3, 4개월의 연령(연구 개월 0, 개월 1 및 개월 2)에서 예방접종하고, 일차 예방접종 전 및 1개월 후 (연구 개월 0 및 개월 3)에 모든 피검체로부터 혈액 샘플 (3.5 ml)을 수득하였다.

[0267] **연구 백신, 용량, 투여 방법, 로트 수**: 하기와 같이 약 2, 3 및 4개월의 연령에서 1개월 간격으로 3회 근내 주사하였다:

[0268] **표 6: 투여된 백신 (연구 및 대조군), 군, 스케줄/부위 및 용량**

군	스케줄 (개월의 연령)	좌상 대퇴부 부위에 투여된 백신 용량	우상 대퇴부 부위에 투여된 부수적 백신
Hib-MenCY 2.5/5/5	2, 3, 및 4	Hib (2.5μg)- MenC-TT (5μg)-MenY-TT (5 μg)	DTPa-HBV-IPV (인펀릭스™ 펜타)
Hib-MenCY 5/10/10	2, 3, 및 4	Hib (5μg)-MenC-TT (10μg)-MenY-TT (10μg)	DTPa-HBV-IPV (인펀릭스™ 펜타)
Hib-MenCY 5/5/5	2, 3, 및 4	Hib (5μg)-MenC-TT (5μg)-MenY-TT (5μg)	DTPa-HBV-IPV (인펀릭스™ 펜타)
Hib-MenC	2, 3, 및 4	Hib (5μg)-Men C (5μg)	DTPa-HBV-IPV (인펀릭스™ 펜타)
멘주게이트(Menjugate™)	2, 3, 및 4	멘주게이트™	DTPa-HBV-IPV/Hib (인펀릭스™헥사)

[0269]

[0270] **면역원성**: 각각의 백신 항원에 대한 항체 역가/농도의 측정:

[0271] 모든 피검체에서의 첫번째 투여 전 (개월 0) 및 세번째 투여 약 1개월 후 (개월 3)에 SBA-MenC 및 SBA-MenY, 항-PSC 및 항-PSY, 항-PRP, 항-T, 항-FHA, 항-PRN 및 항-PT에 대해 측정함. 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 및 Y (SBA-MenC 및 SBA-MenY 컷오프: 1:8 및 1:128)에 대한 혈청 살균 활성을 이용함; ELISA 분석은 다음과 같은 컷오프를 지님: 항-나이세리아 메닌지티디스 혈청군 C 및 Y 다당류 (항-PSC IgG 및 항-PSY IgG)에 대해 ≥0.3 ㎍/ml 및 ≥2㎍/ml; Hib 다당류 폴리리보실-리비톨-포스페이트 (항-PRP IgG)에 대해 ≥0.15㎍/ml 및 ≥1.0 ㎍/ml; 항-FHA, 항-PRN, 항-PT에 대해 5EL.U/ml; 항-파상풍 독소 (항-TT)에 대해 ≥0.1 IU/ml. 모든 피검체에서 세번째 투여 1개월 후 (개월 3)에 항-D, 항-HB 및 항-폴리오 1, 2 및 3에 대해 측정함. ELISA 분석은 다음과 같은 컷오프: 항-디프테리아 (항-D)에 대해 0.1 IU/ml; 항 B형 간염 (항-HB)에 대해 ≥10 mIU/ml; 및 다음과 같은 미세중성화 (microneutralization) 시험 컷오프를 이용함: 항-폴리오 타입 1, 2 및 3 (항-폴리오 1, 2 및 3)에 대해 1:8.

[0272] **통계적 방법:**

[0273] SBA-MenC, 항-PSC, SBA-MenY, 항-PSY, 항-PRP, 항-파상풍, 항-PT, 항-FHA 및 항-PRN에 대해서는 예방접종전 및 예방접종 1개월 후에, 항-디프테리아, 항-HB, 항-폴리오 1, 항-폴리오 2 및 항-폴리오 3에 대해서는 예방접종 1개월 후에, 군마다 95%의 신뢰 구간 (95% CI)을 지니는 혈청보호/혈청양성반응률 및 기하 평균 농도/역가 (GMC/GMT)를 측정하였다. 항-PT, 항-PRN 및 항-FHA에 대해 95% CI를 지니는 백신 반응 (최초에 혈청음성반응이었던 환자에서의 항체의 출현 또는 최초에 혈청양성반응이었던 환자에서의 최소한 항체 농도의 유지)을 또한 예방접종 1개월 후에 측정하였다. 개월 3에서의 각각의 항체에 대한 역 누적 곡선을 또한 제시하였다. 멘주게이트™ 대조군에 비한 Hib-MenCY와 Hib-MenC 군 사이의 차이점을, (1) 상기 특정된 컷오프를 초과하거나, 표준화된 점근 95% CI를 지닌 백신 반응을 지닌 피검체의 백분율에 대한 멘주게이트™군 (마이너스) Hib-MenCY와 Hib-MenC 군 사이의 차이, (2) 95% CI를 지니는 Hib-MenCY 및 Hib-MenC 군을 초과하는 멘주게이트™ 군의 GMC 또는 GMT 비에 의해, SBA-MenY 및 항-PSY를 제외하고는 각각의 항체에 대한 진단 방식으로 평가하였다. 항-PRP, SBA-MenC, 항-PSC, SBA-MenY, 항-PSY 및 항-TT 항체에 대한 각각의 쌍의 Hib-MenCY 제형 사이의 차이점을 평가하기 위해 동일한 비교를 수행하였다.

[0274] 국소적 및 일반적인 원하는 증상의 전체 발생을 증상의 유형, 강도 및 예방접종과의 관계에 따른 군에 의해 측정하였다 (예방접종 8일 이내에 일반적, 국소적 및 임의의 원하는 증상 및 정확한 95% CI를 보고하는 피검체의 백분율에 따름). 원하지 않는 증상의 발생을 군마다 측정하였다. 등급 3의 증상, 48시간 이하의 발병, 임상적 유의, 지속기간, 예방접종과의 관계 및 결과를 제공하였다. 심각한 부작용은 충분히 기술하였다.

[0275] **혈청보호/혈청양성반응률 & GMC/Ts (면역원성에 대한 ATP 코호트)**

[0276] 표 7a - 항-PRP (㎍/ml)

군	N	%≥ 0.15	LL	UL	≥1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	67	100.0	94.6	100.0	98.5	92.0	100.0	9.01	7.25	11.21
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	98.5	92.0	100.0	9.49	7.72	11.65
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	98.6	92.3	100.0	8.08	6.53	9.98
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	98.6	92.7	100.0	10.44	8.49	12.83
멘주게이트™	71	100.0	94.9	100.0	80.3	69.1	88.8	2.60	1.97	3.43

[0277]

[0278] 표 7b - SBA-MenC (역가)

군	N	%≥ 1:8	LL	UL	≥1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	95.7	88.0	99.1	1005.8	773.5	1308.0
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	94.0	85.4	98.3	1029.8	799.7	1326.0
Hib MenCY 5/5/5	71	100.0	94.9	100.0	94.4	86.2	98.4	906.9	691.3	1189.8
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	95.9	88.6	99.2	871.0	677.3	1120.0
멘주게이트™	71	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	3557.6	2978.8	4248.8

[0279]

[0280] 표 7c - 항-PSC (㎍/ml)

군	N	%≥ 0.3	LL	UL	≥2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	100.0	94.8	100.0	100.0	94.8	100.0	21.70	18.36	25.65
Hib MenCY 5/10/10	66	100.0	94.6	100.0	100.0	94.6	100.0	27.26	23.26	31.95
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	19.02	16.49	21.93
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	100.0	95.1	100.0	21.08	18.24	24.35
멘주게이트™	71	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	38.49	33.64	44.05

[0281]

[0282] 표 7d - SBA-MenY (역가)

군	N	%≥ 1:8	LL	UL	≥1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	97.1	89.9	99.6	92.8	83.9	97.6	470.7	351.1	631.2
Hib MenCY 5/10/10	66	97.0	89.5	99.6	86.4	75.7	93.6	437.1	322.0	593.4.8
Hib MenCY 5/5/5	71	98.6	92.4	100.0	95.8	88.1	99.1	635.3	501.5	804.8
Hib MenC	74	21.6	12.9	32.7	13.5	6.7	23.5	9.3	6.3	13.7
멘주게이트™	71	19.7	11.2	30.9	9.9	4.1	19.3	7.5	5.4	10.4

[0283]

[0284] 표 7e - 항-PSY (㎍/ml)

군	N	%≥ 0.3	LL	UL	≥2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	100.0	94.8	100.0	100.0	94.8	100.0	26.86	22.86	31.56
Hib MenCY 5/10/10	66	100.0	94.6	100.0	100.0	94.6	100.0	37.02	31.84	43.04
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	23.57	19.94	27.86
Hib MenC	74	8.1	3.0	16.8	4.1	0.8	11.4	0.19	0.15	0.25
멘주게이트™	71	5.6	1.6	13.8	1.4	0.0	7.6	0.17	0.15	0.19

[0285]

[0286] 표 7f - 항-파상풍 (IU/ml)

군	N	%≥ 0.1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	68	100.0	94.7	100.0	3.06	2.63	3.55
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	3.25	2.88	3.68
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	2.97	2.59	3.41
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	3.15	2.73	3.64
멘주게이트™	71	100.0	94.9	100.0	1.66	1.39	1.97

[0287]

[0288] **군 Hib-MenCY** 2.5/5/5: Hib-MenCY (2.5/5/5) + 인펀릭스™ 펜타

[0289] **군 Hib-MenCY** 5/10/10: Hib-MenCY (5/10/10) + 인펀릭스™ 펜타

[0290] **군 Hib-MenCY** 5/5/5: Hib-MenCY (5/5/5) + 인펀릭스™ 펜타

[0291] **군 Hib-MenC**: Hib-Men (5/5)+ 인펀릭스™ 헥사

[0292] **군 멘주게이트**: 멘주게이트™ + 인펀릭스™ 펜타

[0293] N = 이용가능한 결과를 지니는 피검체의 수; % = 특정 범위 내의 농도/역가를 지니는 피검체의 백분율

[0294] GMC/T: 기하 평균 농도/역가; 95% CI = 95% 신뢰 구간; LL = 하한; UL = 상한

[0295] 결론

[0296] MenC 및 Y 다당류 컨쥬게이트는 모든 피검체에서 우수한 면역 반응을 발생시켰고, 피검체의 100%가 MenC 및 MenY에 대해 0.3 μg/ml를 초과하는 반응을 발생시켰다.

[0297] 실시예 6 - MenACWY-TT의 3개의 제형을 메닌지텍 MenC-CRM197 올리고당류-컨쥬게이트 백신과 비교하는 단계 II의 임상 시험.

[0298] 본 실시예는 12-14개월 연령의 유아에게 1회 투여시 MenC 올리고당류-CRM197 컨쥬게이트 백신 (메닌지텍™)에 비한 글락소스미스클라인 바이오로지칼스 수막구균 혈청군 A, C, W-135, Y 파상풍 독소 컨쥬게이트 (MenACWY-TT) 백신의 3개의 상이한 제형의 면역원성을 평가하기 위한 단계 II의 공개 (부분적으로 맹검) 무작위화 대조 용량 범위 연구를 보고한다.

[0299] 임상 시험은 12-14개월의 적격 피검체가 하기와 같이 1회 방문시 단일한 일차 용량을 투여받는 50명의 피검체의 4개의 병행 군중 하나로 무작위화 (1:1:1:1)되는, 공개 (부분적으로 이중-맹검*) 대조 다중중심 연구였다:

[0300] 형태 1T: 파상풍 독소 (TT)에 컨쥬게이션된 2.5μg의 MenA 다당류, TT에 컨쥬게이션된 2.5μg의 MenC 다당류, TT에 컨쥬게이션된 2.5μg의 MenW 다당류 및 TT에 컨쥬게이션된 2.5μg의 MenY 다당류 용량의 MenACWY-TT.

[0301] 형태 2T: TT에 컨쥬게이션된 5μg의 MenA 다당류, TT에 컨쥬게이션된 5μg의 MenC 다당류, TT에 컨쥬게이션된 5μg의 MenW 다당류 및 TT에 컨쥬게이션된 5μg의 MenY 다당류 용량의 MenACWY-TT.

[0302] 형태 3T: TT에 컨쥬게이션된 2.5μg의 MenA 다당류, TT에 컨쥬게이션된 10μg의 MenC 다당류, TT에 컨쥬게이션된 2.5μg의 MenW 다당류 및 TT에 컨쥬게이션된 2.5μg의 MenY 다당류 용량의 MenACWY-TT.

[0303] Ctrl T: 12.5-25μg의 CRM197 (메닌지텍)에 컨쥬게이션된 10μg의 MenC 올리고당류.

[0304] * 세개의 상이한 MenACWY-TT 제형을 이중-맹검 방식으로 투여하였다.

[0305] *면역접종 스케줄/부위*: 단일 백신 용량을 무작위 할당에 따라 1회 방문 (연구 개월 0)시에 좌측 삼각근에 근내 투여하였다. 모든 후보 백신을 단일용량 바이얼 내의 동결건조된 펠렛 (제공된 염수 희석제를 이용하여 재구성 후 0.5 ml)으로 제공하였다.

[0306] *면역원성*: 모든 피검체에서 연구 백신 투여 전 (개월 0) 및 연구 백신 투여 약 1개월 후 (개월 1)에 수득된 혈액 샘플 내의 수막구균 백신 항원 성분에 대한 항체 역가/농도의 측정. 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 A, C, W-135 및 Y (항-PSA, 항-PSC, 항-PSW 및 항-PSY, 검정 컷오프 ≥0.3μg/ml 및 ≥2μg/ml), 및 파상풍 독소 (항-파상풍, 검정 컷오프 0.1 IU/ml)에 대한 항체의 살균 시험 (검정 컷오프: 1:8 및 1:128의 희석) 및 ELISA 측정

에 의한 나이세리아 메닌지티디스 혈청군 A, C, W-135 및 Y (SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW 및 SBA-MenY)에 대한 살균 항체 역가의 결정.

[0307] 결과

[0308] 면역접종 1개월 후 (일차 종점)의 SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW 및 SBA-MenY 반응자의 백분율에 의한 항체 반응을 표 8에 나타내었다. 반응은 면역접종 전의 혈청양성반응 피검체에 대해 4배 이상이거나 이와 동등한 것으로 정의하고, 면역접종 전의 혈청음성반응 피검체에 대해 혈청전환으로 정의한다.

[0309] 표 8: 면역접종 1개월 후의 SBA 항체에 대한 백신 반응

항체	군	N	%	LL	UL
SBA-MenA	형태 1T	42	61.9	45.6	76.4
	형태 2T	39	82.1	66.5	92.5
	형태 3T	40	62.5	45.8	77.3
	메닌지텍™	36	11.1	3.1	26.1
SBA-MenC	형태 1T	46	97.8	88.5	99.9
	형태 2T	43	100.0	91.8	100.0
	형태 3T	44	95.5	84.5	99.4
	메닌지텍™	49	91.8	80.4	97.7
SBA-MenW	형태 1T	45	100.0	92.1	100.0
	형태 2T	43	97.7	87.7	99.9
	형태 3T	45	100.0	92.1	100.0
	메닌지텍™	46	15.2	6.3	28.9
SBA-MenY	형태 1T	47	97.9	88.7	99.9
	형태 2T	44	88.6	75.4	96.2
	형태 3T	45	93.3	81.7	98.6
	메닌지텍™	49	4.1	0.5	14.0

[0310]

[0311] 표 9는 1:8 및 1:128의 컷오프 포인트를 초과하는 SBA 역가 뿐만 아니라 GMT를 달성하는 피검체의 수를 나타낸다.

[0312] 표 9: 면역접종 1개월 후의 SBA 항체에 대한 혈청양성반응률 및 GMT

	군	N	%	≥1:8 LL	UL	%	≥1:128 LL	UL	GMT
SBA-MenA	형태 1T	46	100	92.3	100	100	92.3	100	1457.3
	형태 2T	45	100	92.1	100	97.8	88.2	99.9	1776.9
	형태 3T	48	97.9	88.9	99.9	97.9	88.9	99.9	1339.5
	메닌지텍™	41	51.2	35.1	67.1	43.9	28.5	60.3	42.8
SBA-MenC	형태 1T	47	97.9	88.7	99.9	78.7	64.3	89.3	281.3
	형태 2T	45	100	92.1	100	84.4	70.5	93.5	428.6
	형태 3T	47	95.7	85.5	99.5	85.1	71.7	93.8	478.4
	메닌지텍™	50	94.0	83.5	98.7	62.0	47.2	75.3	200.1
SBA-MenW	형태 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	2529.1
	형태 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	2501.6
	형태 3T	48	100	92.6	100	97.9	88.9	99.9	2300.2
	메닌지텍™	48	27.1	15.3	41.8	6.3	1.3	17.2	9.4
SBA-MenY	형태 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	1987.4
	형태 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	2464.8
	형태 3T	48	100	92.6	100	97.9	88.9	99.9	2033.7
	메닌지텍™	49	49.0	34.4	63.7	28.6	16.6	43.3	25.0

[0313]

[0314] ACWY-TT 다당류 컨쥬게이트의 3개의 모든 제형을 이용한 예방접종은 MenA, MenC, MenW 및 MenY에 대해 우수한 SBA 반응을 발생시켰고, 피검체의 95-100%가 1:8을 초과하는 역가를 지녔다. 특히, 다당류 컨쥬게이트의 5/5/5/5 및 2.5/10/2.5/2.5 제형은 1:128을 초과하는 역가 및 GMT 판독을 지닌 보다 높은 비율의 피검체에 의해 관찰되는 바와 같이 올리고당류 메닌지텍™ 백신보다 MenC에 대해 높은 반응을 생성시켰다.

[0315] 표 10: 면역접종 1개월 후의 항 다당류 항체에 대한 혈청양성반응률 및 GMC

	군	N	%	≥0.3μg/ml LL	UL	%	≥2μg/ml LL	UL	GMC μg/ml
항-MenA	형태 1T	47	93.6	82.5	98.7	68.1	52.9	80.9	2.35
	형태 2T	45	100	92.1	100	64.4	48.8	78.1	3.11
	형태 3T	48	95.8	85.7	99.5	37.5	24.0	52.6	1.65
	메닌지텍™	50	10.0	3.3	21.8	2.0	0.1	10.6	0.18
항-MenC	형태 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	9.57
	형태 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	12.53
	형태 3T	47	100	92.5	100	97.9	88.7	99.9	19.29
	메닌지텍™	49	98.0	89.1	99.9	93.9	83.1	98.7	7.95
항-MenW	형태 1T	47	100	92.5	100	80.9	66.7	90.9	4.56
	형태 2T	45	100	92.1	100	93.3	81.7	98.6	6.83
	형태 3T	48	93.8	82.8	98.7	72.9	58.2	84.7	2.88
	메닌지텍™	50	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	7.1	0.15
항-MenY	형태 1T	47	100	92.5	100	97.9	88.7	99.9	8.90
	형태 2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	12.78
	형태 3T	47	97.9	88.7	99.9	87.2	74.3	95.2	5.67
	메닌지텍™	50	2.0	0.1	10.6	0.0	0.0	7.1	0.15

[0316]

[0317] ACWY-TT 다당류 컨쥬게이트 백신의 3개 모든 제형은 MenA, MenC, MenW 및 MenY에 대해 우수한 면역 반응을 생성시켰고, 피검체의 93% 내지 100%가 0.3μg/ml를 초과하는 역가를 달성하였다. 메닌지텍™과 비교시 ACWY-TT 다당류 컨쥬게이트 백신의 5/5/5/5 및 2/5/10/2.5/2.5 제형을 이용하여 보다 높은 GMC 판독을 달성하였다.

[0318] 실시예 7 - 천연 및 크기 조절된 MenY 다당류 컨쥬게이트의 면역원성의 비교

[0319] 마우스 (6-8주령의 암컷 DBA/2)에 피하 경로로 PSY-TT를 2주 간격으로 2회 주사하였다. S1975 menY 계통을 이용하여 항-PSY ELISA 및 SBA를 수행하기 위해 두번째 투여 14일 후에 혈액 샘플을 수득하였다. 마우스에 주사당 1μg의 PSY-TT (동결된 비흡착된 제형)를 투여하였다.

[0320] 표 11에 기술된 컨쥬게이트를 사용하였다.

[0321] 표 11

컨쥬게이트	ENYTT012	ENYTT014	ENYTT015 bis
PSY 미세유동화	없음	있음 (40 주기)	있음 (20 주기)
TT/PS 비	1/1	1/1	1/1

[0322]

[0323] 결과

[0324] 결과 (도 1)는 크기 조절된 PSY를 이용하여 제조된 컨쥬게이트에 대한 보다 높은 면역원성의 경향을 나타낸다. 도 1A는 천연 MenY (ENYTT012), 미세유동화된 MenY - 40 주기 (ENYTT014) 및 미세유동화된 MenY - 20 주기 (ENYTT015 bis)로부터 제조된 컨쥬게이트에 대해 상승된 항혈청에 대한 ELISA에서 수득된 GMC 결과를 나타낸다. MenY-TT가 미세유동화된 MenY로부터 제조되는 경우 보다 높은 GMC 값이 수득되었다.

[0325] 항혈청이 SBA 분석으로 측정되는 경우 유사한 결과가 수득되었다 (도 1B). 또한, 미세유동화된 MenY로부터 제조된 컨쥬게이트를 이용하여 보다 높은 GMT가 달성되었다.

[0326] 실시예 8 - MenACWY 컨쥬게이트 백신에서 MenA 내의 링커의 효과를 평가하는 임상 시험

[0327] MenACWY 백신의 상이한 제형의 단일 용량을 1:1:1:1:1의 무작위화 시험으로 25명의 피검체의 5개의 군의 15-19세의 10대에 투여하였다. 시험된 제형은 다음과 같다:

[0328] F1 - AH 스페이서를 함유하는 MenA 컨쥬게이트를 지닌 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 5/5/5/5μg

[0329] F2 - AH 스페이서를 함유하는 MenA 컨쥬게이트를 지닌 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 2.5/5/2.5/2.5μg

[0330] F3 - AH 스페이서를 함유하는 MenA 컨쥬게이트를 지닌 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 5/5/2.5/2.5μg

[0331] F4 - 임의의 컨쥬게이트에 스페이서를 지니지 않는 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 5/5/5/5μg

[0332] 대조군 - 멘세백스™ ACWY

[0333] 접종 30일 후에, 환자로부터 혈액 샘플을 수득하였다.

[0334] 혈액 샘플을 백신 투여 1개월 후에 SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 및 SBA-MenY 반응자의 백분율을 평가하기 위해 사용하였다. 백신 반응자를, 1) 최초에 혈청음성반응인 피검체에 대해서는 예방접종 1개월 후에 ≥1/32의 항체 역가, 또는 2) 최초에 혈청양성반응인 피검체에 대해서는 예방접종전 항체 역가의 4배의 항체 역가로 정의하였다.

[0335] 결과

[0336] 표 13에 나타낸 바와 같이, MenA 컨쥬게이트에서의 스페이서의 이용은 MenA에 대해 면역 반응을 증가시켰다. AH 스페이서가 첨가되는 경우 반응자의 백분율이 66%에서 90-95%로 상승하였다. 이는 SBA GMT에서 4335로부터 10000으로의 증가 및 GMC에서 5로부터 20-40으로의 증가로 반영되었다. 놀랍게도, AH 스페이서의 사용은 또한 반응자의 백분율의 증가 및 SBA GMT에서의 증가로 관찰되는 바와 같이 MenC에 대한 면역 반응을 증가시켰다. 증가는 또한 스페이서가 도입되는 경우 MenY (6742-7122) 및 MenW (4621-5418)에 대해, SBA-GMT에서 관찰할 수 있었다.

[0337] 표 12

[0338]

제형	% SBA MenA 반응자	SBA-MenA GMT	항-PSA GMC μg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	90.9	9805	20.38
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	75	8517	29.5
F3 5AH/5/2.5/2.5	95.5	10290	47.83
F4 5/5/5/5	66.7	4335	5.46
멘세백스(Mencevax™)	85.7	8022	27.39
제형	% SBA MenC 반응자	SBA-MenC GMT	항-PSC GMC μg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	69.6	3989	12.11
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	81.8	3524	12.78
F3 5AH/5/2.5/2.5	81.8	3608	8.4
F4 5/5/5/5	73.9	2391	8.84
멘세백스™	90.0	5447	38.71
제형	% SBA MenW 반응자	SBA-MenW GMT	항-PSW GMC μg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	95	5418	9.65
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	85	4469	14.55
F3 5AH/5/2.5/2.5	95.5	4257	6.39
F4 5/5/5/5	95.5	4621	10.7
멘세백스™	86.4	2714	13.57
제형	% SBY MenY 반응자	SBA-MenY GMT	항-PSY GMC μg/ml ELISA
F 1 5AH/5/5/5	91.3	7122	16.3
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	87.5	5755	12.52
F3 5AH/5/2.5/2.5	80	5928	8.88
F4 5/5/5/5	91.3	6742	13.88
멘세백스™	91.7	4854	21.02

[0339] 실시예 9 - MenACWY 컨쥬게이트 백신에서의 MenA 및 MenC 컨쥬게이트 내의 링커의 효과를 평가하는 임상 시험

[0340] MenACWY 백신의 상이한 제형의 단일 용량을 1:1:1:1:1 무작위화 시험으로 25명의 피검체의 5개의 군의 15-19세의 10대에게 투여하였다. 시험된 제형은 다음과 같다:

[0341] F1 - AH 스페이서를 함유하는 MenA 및 MenC 컨쥬게이트를 지니는 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 2.5/2.5/2.5/2.5μg

[0342] F2 - AH 스페이서를 함유하는 MenA 및 MenC 컨쥬게이트를 지니는 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 5/5/2.5/2.5μg

[0343] F3 - AH 스페이서를 함유하는 MenA 및 MenC 컨쥬게이트를 지니는 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 5/5/5/5㎍

[0344] F4 - AH 스페이서를 함유하는 MenA 컨쥬게이트를 지니는 파상풍 독소에 컨쥬게이션된 MenACWY - 5/5/5/5㎍

[0345] 대조군 - 멘세백스™ ACWY

[0346] 접종 30일 후에, 환자로부터 혈액 샘플을 수득하였다.

[0347] 혈액 샘플을 백신 투여 1개월 후에 SBA-MenA, SBA-MenC, SBA-MenW135 및 SBA-MenY 반응자의 백분율을 평가하기 위해 사용하였다. 백신 반응자를, 1) 최초에 혈청음성반응인 피검체에 대해서는 예방접종 1개월 후에 ≥1/32의 항체 역가, 또는 2) 최초에 혈청양성반응인 피검체에 대해서는 예방접종전 항체 역가의 4배의 항체 역가로 정의하였다.

[0348] 결과

[0349] MenC 컨쥬게이트로의 AH 스페이서의 도입은 표 14에 나타낸 바와 같이 MenC에 대한 면역 반응을 증가시켰다. 이는 SBA GMT에서 1943으로부터 4329로의 증가 및 항-PSC GMC에서 7.65로부터 13.13으로의 증가에 의해 입증된다. MenA, MenW 및 MenY에 대한 우수한 면역 반응이 유지되었다.

[0350] 표 13

[0351]

제형	% SBA MenA 반응자	SBA-MenA GMT	항-PSA GMC μg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	75	8417	20.23
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	72	6299	16.07
F3 5AH/5AH/5/5	87	9264	27.26
F4 5AH/5/5/5	77.3	9632	20.39
멘세백스™	78.3	8284	12.93
제형	% SBA MenC 반응자	SBA-MenC GMT	항-PSC GMC μg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	88	3619	12.82
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	88	2833	13.32
F3 5AH/5AH/5/5	95.8	4329	13.13
F4 5AH/5/5/5	95.8	1943	7.65
멘세백스™	91.7	1567	16.55
제형	% SBA MenW 반응자	SBA-MenW GMT	항-PSW GMC μg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	100	5656	7
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	96	4679	5.4
F3 5AH/5AH/5/5	91.3	4422	4.45
F45AH/5/5/5	88	4947	7.67
멘세백스™	96	3486	11.93
제형	% SBY MenY 반응자	SBA-MenY GMT	항-PSY GMC μg/ml ELISA
F 1 2.5AH/2.5AH/2.5/2.5	75	3891	17.81
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	92	3968	11.96
F3 5AH/5AH/5/5	79.2	2756	9.51
F4 5AH/5/5/5	80	3914	16.76
멘세백스™	88	3056	21.41

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1: A - 항-MenY ELISA에서 GMC 반응을 나타내는 막대 차트. ENYTT012는 천연 MenY 다당류로부터 제조된 MenY-TT 컨쥬게이트이다. ENYTT014는 40주기의 미세유동화를 겪은 미세유동화된 MenY 다당류로부터 제조된 MenY-TT 컨쥬게이트이다. ENYTT015bis는 20 주기의 미세유동화를 겪은 미세유동화된 MenY 다당류로부터 제조된 MenY-TT 컨쥬게이트이다.

[0015] - B - 항-MenY SBA 분석에서 GMT 반응을 나타내는 막대 차트. ENYTT012는 천연 MenY 다당류로부터 제조된 MenY-TT 컨쥬게이트이다. ENYTT014는 40주기의 미세유동화를 겪은 미세유동화된 MenY 다당류로부터 제조된

MenY-TT 컨쥬게이트이다. ENYTT015bis는 20 주기의 미세유동화를 겪은 미세유동화된 MenY 다당류로부터 제조된 MenY-TT 컨쥬게이트이다.

도면

도면1

