



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월01일  
(11) 등록번호 10-1774062  
(24) 등록일자 2017년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/085 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7001730  
(22) 출원일자(국제) 2010년06월22일  
심사청구일자 2012년01월20일  
(85) 번역문제출일자 2012년01월20일  
(65) 공개번호 10-2012-0048568  
(43) 공개일자 2012년05월15일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/039473  
(87) 국제공개번호 WO 2011/041003  
국제공개일자 2011년04월07일  
(30) 우선권주장  
61/219,143 2009년06월22일 미국(US)  
61/219,151 2009년06월22일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02007113223 A2\*  
W02007000322 A1\*  
JP2006511465 A\*  
ALI FATTOM et al., Vol.58, No.7,  
pp.2367-2374, 1990.  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
와이어쓰 엘엘씨  
미국 10017 뉴욕주 뉴욕 이스트 42엔드 스트리트  
235  
(72) 발명자  
프리세 스티븐 존  
미국 노스캐롤라이나주 27502 아펙스 원포스트 레  
인 2218  
앤더슨 애널리사  
미국 뉴저지주 07458 어퍼 새들 리버 힐크레스트  
드라이브 49  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
제일특허법인

전체 청구항 수 : 총 36 항

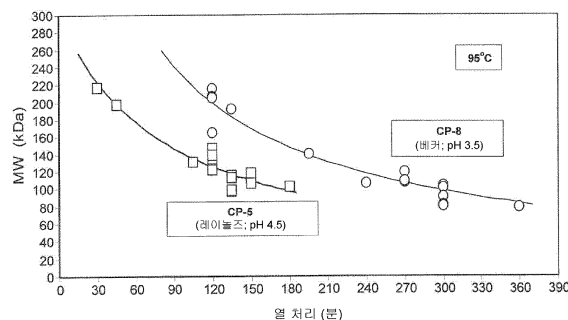
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 황색포도상구균 혈청형 5 및 8 협막 다당류 접합체 면역원성 조성물 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은, 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 및 8 협막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체와, 이의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 면역원성 접합체의 제조 방법은, 1,1-카보일-다이-1,2,4-트라이아졸(CDT) 또는 3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라이드(PDPH)를 포함하는 접합 화학을 사용한 운반 단백질과 협막 다당류의 공유 접합을 포함한다.

대표도



(72) 발명자

**파블리악 빌리엄**

미국 뉴욕주 10901 몬테벨로 케빈 드라이브 17

**안센 카트린 우테**

미국 뉴저지주 07401 알렌데일 헤더 코트 57

**다취 잉그리드 레아**

미국 뉴욕주 12518 콘월 그랜드 스트리트 23

**스캇 트레이시 디**

미국 노스캐롤라이나주 27312 피츠보르 레이몬드  
리취 로드 70

**난라 자스딕 신그**

미국 뉴욕주 10977 체스트넛 리취 올드 나이악 턴  
파이크 195

**프라사드 에이 크리쉬나**

미국 노스캐롤라이나주 27516 채플 힐 워삼 드라이브 105

**그린 브루스 아터**

미국 뉴욕주 10956 뉴 시티 베로나 코트 25

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

CRM<sub>197</sub>에 접합된 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 협막 다당류(capsular polysaccharide)를 포함하되, 다당류의 분자량이 70 kDa 내지 150 kDa인, 면역원성 다당류-단백질 접합체.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

협막 다당류가 혈청형 5 또는 혈청형 8 협막 다당류인, 면역원성 다당류-단백질 접합체.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

다당류의 0-아세틸화도가 10 내지 100%, 50 내지 100% 또는 75 내지 100%인, 면역원성 다당류-단백질 접합체.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

CRM<sub>197</sub>이 카바메이트 결합, 아마이드 결합, 또는 둘다에 의해 다당류에 공유 결합된, 면역원성 다당류-단백질 접합체.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

접합된 리신:CRM<sub>197</sub>의 몰비가 10:1 내지 25:1인, 면역원성 다당류-단백질 접합체.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서,

CRM<sub>197</sub>과 다당류 사이의 하나 이상의 공유 결합이, 적어도 다당류의 매 5개 내지 10개의 당류 반복 단위 마다 또는 매 5개의 당류 반복 단위 마다 발생하는, 면역원성 다당류-단백질 접합체.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서,

CRM<sub>197</sub>이 다당류에 공유 결합된 5 내지 25개, 5 내지 20개 또는 10 내지 25개의 리신을 포함하는, 면역원성 다당류-단백질 접합체.

#### 청구항 10

제 1 항, 제 3 항, 제 4 항 및 제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 접합체, 및 보조제, 희석제 및 담체 중 하나 이상을 포함하는 면역원성 조성물.

#### 청구항 11

제 10 항에 있어서,

혈청형 5 또는 8 다당류의 총량에 대해 30% 미만 또는 20% 미만의 유리 혈청형 5 또는 8 다당류를 포함하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 12

제 10 항에 있어서,

대상 내에서 황색포도상구균에 대한 면역 반응을 유도하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 13

a) 단리된 황색포도상구균 협막 다당류를 유기 용매에서 카보닐 다이트라이아졸(CDT)과 반응시켜 활성화된 다당류를 제조하는 단계;

b) 활성화된 다당류와 CRM<sub>197</sub>을 유기 용매에서 반응시켜 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 제조하는 단계; 및

c) 협막 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 단리하는 단계

를 포함하는, 제 1 항, 제 3 항, 제 4 항 및 제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 접합체의 제조 방법.

#### 청구항 14

제 13 항에 있어서,

단리된 다당류를 동결건조시키고, 동결건조된 다당류를 유기 용매에 재현탁시키는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 15

제 13 항에 있어서,

활성화된 다당류를, CRM<sub>197</sub>과의 반응 전에, 활성화 반응으로부터 단리하는, 제조 방법.

#### 청구항 16

제 15 항에 있어서,

단계 b)가 i) 활성화되고 단리된 다당류를 동결건조시켜 동결건조되고 활성화되고 단리된 다당류를 제조하고, ii) CRM<sub>197</sub>을 동결건조시켜 동결건조된 CRM<sub>197</sub>을 제조하고, iii) 동결건조되고 활성화되고 단리된 다당류 및 동결건조된 CRM<sub>197</sub>을 유기 용매에 재현탁시켜 CRM<sub>197</sub>과 혼합된 활성화되고 단리된 다당류를 제조하는 것을 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 17

제 13 항에 있어서,

단계 b)의 반응 혼합물을 완충제로 희석시키고, 20℃ 내지 26℃에서 4시간 이상 동안 8.8 내지 9.2의 pH를 유지하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 18

제 13 항에 있어서,

다당류를 CDT와 반응시키는 단계가, 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류내에 존재하는 물 함량을 결정하고, 유기 용매 중 CDT:물의 몰비가 1:1, 0.5:1 또는 0.75:1이 될 때까지 CDT 농도를 조정하는 것을 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 19

제 13 항에 있어서,

황색포도상구균 혈청형 5 다당류를 CDT와 반응시키는 단계가, 다당류에 비해 20배 물 과량의 CDT를 제공함을 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 20

제 13 항에 있어서,

유기 용매 혼합물 중 혈청형 5 다당류 CDT의 물 농도를 0.1 내지 0.3%로 조정하는, 제조 방법.

#### 청구항 21

제 13 항에 있어서,

유기 용매에서 CDT와 혼합하기 전에, 단리된 황색포도상구균 혈청형 헵막 다당류를 이미다졸 또는 트라이아졸과 혼합하는, 제조 방법.

#### 청구항 22

제 13 항에 있어서,

혈청형 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 가수분해시켜 미반응된 활성화 기를 제거하는 것을 추가로 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 23

a) 유기 용매에서 황색포도상구균 다당류를 3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라이드(PDPH) 및 카보다이미드와 반응시켜 PDPH-결합된 다당류를 제조하는 단계;

b) PDPH-결합된 다당류를 환원제와 반응시켜 활성화된 다당류를 제조하는 단계;

c) 활성화된 다당류를 단리하여 활성화되고 단리된 다당류를 제조하는 단계;

d) 활성화된 CRM<sub>197</sub>을 제공하는 단계;

e) 활성화되고 단리된 다당류를 활성화된 CRM<sub>197</sub>과 반응시켜 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 제조하는 단계; 및

f) 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 단리하는 단계

를 포함하는, 제 1 항, 제 3 항, 제 4 항 및 제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따른 면역원성 접합체의 제조 방법.

#### 청구항 24

제 23 항에 있어서,

활성화된 CRM<sub>197</sub>을, 활성화된 다당류와 활성화된 CRM<sub>197</sub>을 반응시키기 전에, 단리하는, 제조 방법.

#### 청구항 25

제 23 항에 있어서,

단계 c)가, 활성화되고 단리된 다당류를 동결건조시켜 동결건조되고 활성화된 다당류를 제조함을 추가로 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 26

제 23 항에 있어서,

유기 용매가 극성 비양성자성 용매인, 제조 방법.

#### 청구항 27

제 26 항에 있어서,

극성 비양성자성 용매가 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 다이메틸폼아마이드(DMF), 다이메틸아세트아마이드, N-메틸-2-피롤리돈 및 헥사메틸포스포르아마이드(HMPA)로 구성된 군 중에서 선택되는, 제조 방법.

#### 청구항 28

제 23 항에 있어서,

카보다이이미드가 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드(EDAC)인, 제조 방법.

#### 청구항 29

제 28 항에 있어서,

유기 용매에서 혈청형 헤파 다당류를 PDPH 및 EDAC와 반응시키는 단계가, 1:5:3의 다당류:PDPH:EDAC 중량비를 유지함을 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 30

제 23 항에 있어서,

환원제가 다이티오프레이톨(DTT)인, 제조 방법.

#### 청구항 31

제 23 항에 있어서,

CRM<sub>197</sub>의 활성화가, CRM<sub>197</sub>과 브로모아세트산을 반응시키는 것을 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 32

제 23 항에 있어서,

혈청형 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 가수분해하여 미반응된 활성화 기를 제거하는 단계를 추가로 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 33

제 32 항에 있어서,

혈청형 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 가수분해하는 단계가, 시스테인 하이드로클로라이드를 첨가하는 것을 포함하는, 제조 방법.

#### 청구항 34

제 10 항에 있어서,

대상내 포도상구균(*Staphylococcus*) 박테리아와 관련된 포도상구균성 감염, 질환 또는 증상을 줄이거나 예방하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 35

제 34 항에 있어서,

감염, 질환 또는 증상이 침습성 황색포도상구균 질환, 패혈증 및 보균(carriage)으로 구성된 군 중에서 선택되는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 36

제 13 항에 있어서,

유기 용매가 극성 비양성자성 용매인, 제조 방법.

**청구항 37**

제 36 항에 있어서,

극성 비양성자성 용매가 디메틸 설펍사이드(DMSO), 디메틸폼아마이드(DMF), 디메틸아세트아마이드, N-메틸-2-피롤리돈 및 헥사메틸포스포르아마이드(HMPA)로 구성된 군 중에서 선택되는, 제조 방법.

**청구항 38**

제 17 항에 있어서,

pH가 23℃에서 4시간 이상 동안 9.0으로 유지되는, 제조 방법.

**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

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은, 일반적으로 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 혈청형 5 및 8 협막 다당류 접합체 면역원성 조성물 및 이의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.
- [0002] 관련 출원에 대한 상호 참고
- [0003] 본원은, 각각 본원에서 그 전체를 참고로 인용하는 것으로, 2009년 6월 22일자로 출원한 미국 가출원 제 61/219,143 호 및 제 61/219,151 호에 기초하여 우선권으로 주장한다.

### 배경 기술

- [0004] 인간은, 그램 양성 황색포도상구균의 천연 병원소이다. 예를 들어, 황색포도상구균은 질환을 유발하지 않으면서, 영구적으로 또는 일시적으로 피부, 코구멍 및 목에 서식할 수 있다. 황색포도상구균 감염은 가벼운 피부 감염으로부터 심장 내막염, 골수염, 균혈증 및 패혈증을 포함한다. 또한, 황색포도상구균은 대부분의 병원감염을 야기하고, 지역사회 개시 감염(community-onset infection)에서의 그의 유행이 증가하고 있다. 게다가, 2005년에, 메티실린내성 황색포도상구균(MRSA) 감염이, 2005년에 미국에서의 16,650명의 사망자를 포함하여 100,000명 당 약 31.8명으로 추산되었다(문헌[Klevens et al. (2007) J. Am. Med. Assoc. 298:1763-1771] 참고). 예를 들어, 수술, 유치 도뇨관 또는 다른 장치들의 배치, 트라우마 또는 외상과 같은 면역 방어막의 틈으로 인하여 환자가 면역-약화된 경우, 후속적으로 질환이 발생한다.
- [0005] 황색포도상구균은, 여러 가지의 독소 및 효소를 포함하는, 다수의 세포외 및 세포내 항원을 생성한다. 본원에서 특히 관심을 갖는 것은 황색포도상구균의 협막 다당류 혈청형(문헌[Karakawa & Vann, "Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*,"In: Weinstein & Fields, eds. Seminars in Infectious Disease. IV. Bacterial Vaccines. (NewYork,NY;ThiemeStratton;1982.pp.285-293] 참고), 특히 혈청형 5 및 8 협막 다당류다. 개인으로부터 단리된 황색포도상구균의 다수의 균주에 대한 전염병학적 연구는, 70% 내지 80%가 혈청형 5 또는 8 협막 다당류라는 점이다(문헌[Arbeit et al. (1984) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2:85-91] 참조). 불행하게도, 협막 다당류는 그 자체로 불량한 면역원(poor immunogen)이다.
- [0006] 혈관내 장치 및 외과적 처치를 사용해온 최근 20년 동안 포도상구균성 감염 및 질환은 극적으로 증가하고 있다. 질환 발생 정도의 증가는, 항생제 내성의 평행한 증가로 인하여 보다 문제시되어 왔고, 따라서, 포도상구균성 감염 및 질환을 예방하기 위한 면역원성 조성물에 대한 긴급한 요구가 있어 왔다.

### 발명의 내용

- [0007] 본 발명은, 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 협막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체, 및 이러한 접합체의 제조 방법에 관한 것이다. 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 협막 다당류는, 당업계의 숙련자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 박테리아로부터 직접 수득될 수 있거나, 합성 프로토콜을 사용하여 제조될 수 있거나, 또는 당업계의 숙련자들에게 공지된 유전공학 절차를 사용하여 재조합으로 생성될 수 있다. 추가로, 본 발명은 포도상구균(*Staphylococcus*) 박테리아에 대한 면역 반응을 유발하는 방법, 포도상구균 박테리아에 의해 야기되는 질환의 예방을 위한 방법, 및 포도상구균 박테리아에 의한 감염으로 야기되는 질환의 하나 이상의 증상의 괴로움을 감소시키기 위한 방법을 제공한다.
- [0008] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 운반 단백질에 접합된 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 피막 다당류를 포함하는 면역원성 다당류-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 상기 다당류의 분자량은 20 kDa 내지 1000 kDa이다. 일부 실시양태에서, 면역원성 접합체의 분자량은 200 kDa 내지 5000 kDa이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 다당류 부분의 분자량은 70 kDa 내지 300 kDa이다. 하나의 실시양태에서 면역원성 접합체의 분자량은 500 kDa 내지 2500 kDa이다.
- [0009] 하나의 실시양태에서, 혈청형 5 또는 8 협막 다당류의 탈아세틸화도는 10 내지 100%이다. 하나의 실시양태에서, 탈아세틸화도는 50 내지 100%이다. 하나의 실시양태에서, 탈아세틸화도는 75 내지 100%이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체는, 동물 효능 모델에서 또는 옹소년의 식세포 살해 분석법(opsonophagocytic killing assay)을 통해, 박테리아를 살해함으로써 측정되는, 기능을 갖는 항원을 발생시킨다.
- [0010] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>를 포함한다. 하나의 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>은 카바메이트 결합, 아마이드 결합, 또는 둘다를 통해 다당류에 공유 결합된다. 하나의 실시양태에서, 접합된 리신 대 CRM<sub>197</sub>의 몰비는 약 10:1 내지 약 25:1일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 접합체는 다당류의 적어도 매 5 내지 10개의 다당류 반복 단위 마다 CRM<sub>197</sub>과 다당류의 공유 결합을 하나 포함한다. 하나의 실시양태에서, 운반 단백질과 다당류의 결합은 다당류의 매 5개의 반복 단위 마다 하나로 발생한다.
- [0011] 하나의 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>를 포함하는 면역원성 접합체는 다당류에 공유 결합된 5 내지 22개의 리신 또는 8 내지 15개의 리신을 포함한다. 하나의 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>를 포함하는 면역원성 접합체는 다당류에 공유 결합된 5 내지 23개의 리신 또는 8 내지 12개의 리신을 포함한다.
- [0012] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체는 10 내지 100% 탈아세틸화된 혈청형 5 또는 8의 다당류를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체는 50 내지 100%의 탈아세틸화된 혈청형 5 또는 8 다당류를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체는 75 내지 100% 탈아세틸화된 혈청형 5 또는 8 다당류를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역원성 조성물은, 동물 효능 모델 또는 옹소년의 식세포 살해 분석법에서 기능을 하는 항체를 발생시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0013] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 5 또는 8 다당류의 총량에 대해 약 30% 미만의 유리 혈청형 5 또는 8 다당류를 포함한다.
- [0014] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체는 혈청형 5 또는 8 다당류의 총량에 대해 약 20% 미만의 유리 혈청형 5 또는 8 다당류를 포함한다.
- [0015] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 본원에서 기술한 면역원성 접합체, 및 보조제, 희석제 및 담체 중 하나 이상을 포함하는 면역원성 조성물을 포함한다.
- [0016] 보조제는, 알루미늄계 보조제, 예를 들어 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 실페이트 및 알루미늄 하이드록사이드 중 하나 이상일 수 있다. 하나의 실시양태에서, 보조제는 알루미늄 포스페이트를 포함한다.
- [0017] 하나의 실시양태에서, 면역원성 조성물은, 혈청형 5 또는 8 다당류의 총량에 대해 약 30% 미만의 유리 혈청형 5 또는 8 다당류를 포함한다.
- [0018] 하나의 실시양태에서, 면역원성 조성물은, 혈청형 5 또는 8 다당류의 총량에 대해 약 20% 미만의 유리 혈청형 5 또는 8 다당류를 포함한다.
- [0019] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 본원에서 기술한 바와 같은 면역원성 조성물을 면역효과량으로 대상에게 투여함을 포함하는, 대상내 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 협막 다당류 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법

을 포함한다.

- [0020] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 운반 단백질에 접합된 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 다당류-단백질 접합체의 제조 방법으로서, 상기 방법은, 유기 용매에서 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 1,1-카보닐-다이-(1,2,4-트리아졸)(CDT)과 반응시켜, 활성화된 혈청형 5 또는 8 다당류를 제조하는 단계; 및 유기 용매에서 활성화된 혈청형 5 또는 8 다당류를 운반 단백질과 반응시켜 혈청형 5 또는 8 다당류: 운반 단백질 접합체를 제조하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.
- [0021] 하나의 실시양태에서, 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류의 활성화 방법은, 추가로, 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류를 동결건조시키는 단계 및 유기 용매 중에 동결건조된 다당류를 재현탁시키는 단계를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 재현탁된 다당류는 활성화되고, 그다음 운반 단백질과 직접 반응한다. 하나의 실시양태에서, 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류는 담체 단백질과 반응하기 전에 단리된다. 하나의 실시양태에서, 운반 단백질과 다당류가 반응하기 전에 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류는 동결건조되어 동결건조되고 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류를 제조한다. 하나의 실시양태에서, 단리된 다당류 운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 다당류와 운반 단백질을 반응시키기 전에 운반 단백질을 동결건조시켜, 동결건조된 운반 단백질을 제조하는 단계를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 단리된 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 운반 단백질과 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류의 반응의 일부로서 유기 용매에서 동결건조되고 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류 및 동결건조된 운반 단백질을 재현탁시키는 단계를 포함한다.
- [0022] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 활성화된 다당류 및 운반 단백질의 반응 혼합물을 희석시키는 단계 및 약 20℃ 내지 약 26℃에서 4시간 이상 동안 약 8.8 내지 약 9.2의 pH를 유지하는 단계를 포함한다.
- [0023] 하나의 실시양태에서, 활성화된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류와 운반 단백질의 반응 혼합물은, 약 23℃에서 4시간 이상 동안 약 9.0의 pH로 유지된다.
- [0024] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류-운반 단백질의 제조 방법은, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류-운반 단백질이 제조된 후, 이를 단리하는 단계를 포함한다.
- [0025] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용된 유기 용매는 극성 비양성자성 용매이다. 하나의 실시양태에서, 극성 비양성자성 용매는, 다이메틸 설펍사이드(DMSO)로 구성된 군 중에서 선택된다. 하나의 실시양태에서, 단리된 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용되는 유기 용매는 DMSO이다.
- [0026] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 헵막 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 유기 용매 중 혈청형 5 헵막 다당류 및 CDT를 포함하는 반응 혼합물의 물 농도를 약 0.1 내지 0.3%로 조정하는 단계를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매 중 혈청형 5 헵막 다당류 및 CDT를 포함하는 반응 혼합물의 물 농도를 약 0.2%로 조정한다.
- [0027] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 헵막 다당류의 활성화 단계는, 상기 다당류를, 유기 용매내 혈청형 5 헵막 다당류 및 CDT를 포함하는 반응 혼합물에 존재하는 다당류의 양에 비해 거의 20몰 과량인 양의 CDT와 반응시키는 단계를 포함한다.
- [0028] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 혈청형 8 헵막 다당류를 포함하는 반응 혼합물의 물 농도를 측정하는 단계를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 다당류를 활성화시키기 위해 반응 혼합물에 첨가된 CDT의 양은, 유기 용매내 혈청형 8 헵막 다당류 및 CDT를 포함하는 반응 혼합물에 존재하는 물의 양과 거의 동등한 몰량인 CDT의 양으로 제공된다.
- [0029] 하나의 실시양태에서, 다당류를 활성화시키기 위해 반응 혼합물에 첨가된 CDT의 양은, 유기 용매내 혈청형 8 헵막 다당류 및 CDT를 포함하는 반응 혼합물에 존재하는 물의 양에 비해, 약 0.5:1의 몰비인 CDT의 양으로 제공된다. 하나의 실시양태에서, 다당류를 활성화시키기 위해 반응 혼합물에 첨가된 CDT의 양은, 유기 용매내 혈청형 8 헵막 다당류 및 CDT를 포함하는 반응 혼합물에 존재하는 물의 양에 비해 0.75:1의 몰비인 CDT의 양으로 제공된다.
- [0030] 하나의 실시양태에서, 활성화된 다당류를 단리하는 단계를 포함하는 방법은, 정용여과(diafiltration)의 단계를 포함한다.
- [0031] 하나의 실시양태에서, 운반 단백질의 동결 건조 전에 운반 단백질의 동결건조를 포함하는 방법은, 동결건조 전

에 운반 단백질을 NaCl에 대해 정용여과하되, NaCl/운반 단백질의 w/w 비는 약 0.5 내지 약 1.5로 조정된다. 하나의 실시양태에서, 운반 단백질에 대한 NaCl의 비는 약 1이다.

- [0032] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용되는 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>를 포함한다.
- [0033] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용된 CRM<sub>197</sub>은 약 1:1의 중량비로 활성화된 혈청형 5 또는 8 다당류와 반응한다.
- [0034] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 유기 용매내 CDT와 혼합하기 전에 이미다졸 또는 트라이아졸과 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류를 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0035] 하나의 실시양태에서, 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 혈청형 5 또는 8 다당류-운반 단백질 접합체를 가수분해시켜 미반응된 활성화된 기를 제거하는 단계를 포함한다.
- [0036] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 운반 단백질에 접합된 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류를 포함하는 면역원성 접합체의 제조 방법을 제공하되, 상기 방법은, 유기 용매에서 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류와 3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라지드(PDPH) 및 카보다이어미드를 반응시켜, PDPH-연결 다당류를 제조하는 단계; 상기 PDPH-연결 다당류와 환원제를 반응시켜 활성화된 다당류를 제조하는 단계; 활성화된 혈청형 5 또는 8 다당류를 단리하여 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류를 제조하는 단계; 활성화된 운반 단백질을 제공하는 단계; 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류를 활성화된 운반 단백질과 반응시켜 혈청형 5 또는 8 다당류-운반 단백질 접합체를 제조하는 단계를 포함하며, 이로써 운반 단백질에 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류를 포함하는 면역원성 접합체가 제조된다. 하나의 실시양태에서, 활성화된 운반 단백질은 활성화된 다당류와 활성화된 운반 단백질을 반응시키기 전에 단리된다.
- [0037] 하나의 실시양태에서, 활성화된 단리 운반 단백질을 단리하는 단계는 추가로 활성화된 단리된 혈청형 5 또는 8 다당류를 동결건조시켜 동결건조되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 다당류를 제조하는 단계를 포함한다.
- [0038] 하나의 실시양태에서, 브로모아세트산은, 브로모아세트산의 N-하이드록시숙신이미드 에스터(BAANS)이다.
- [0039] 하나의 실시양태에서, PDPH를 사용하는, 혈청형 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 극성 비양성자성 용매인 유기 용매의 사용을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 극성 비양성자성 용매는, 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 다이메틸폼아마이드(DMF), 다이메틸아세트아마이드, N-메틸-2-피롤리돈, 및 헥사메틸포스포르아마이드(HMPA)로 구성된 군 중에서 선택된다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매는 다이메틸 설펍사이드(DMSO)이다.
- [0040] 하나의 실시양태에서, PDPH를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용되는 카보다이어미드는 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이어미드(EDAC)이다.
- [0041] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 약 1:5:3의 다당류:PDPH:EDAC 비로 유기 용매에서 PDPH 및 EDAC와 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류를 반응시키는 단계를 포함한다.
- [0042] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용된 환원제는 다이티오프로판(DTT)이다.
- [0043] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서의 운반 단백질의 활성화는, 브로모아세트산과 운반 단백질의 반응을 포함한다.
- [0044] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서의 활성화된 혈청형 5 또는 8 다당류의 단리 단계는, 정용여과를 포함한다.
- [0045] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법은, 혈청형 5 또는 8 다당류-운반 단백질 접합체를 가수분해시켜 미반응된 활성화 기를 제거하는 단계를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 혈청형 5 또는 8 다당류-운반 단백질 접합체의 가수분해 단계는, 시스트아민 하이드로클로라이드의 추가를 포함한다.
- [0046] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법



은, 추가로 운반 단백질에 접합된 단리된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류를 포함하는 면역원성 접합체의 단리를 포함한다.

- [0047] 하나의 실시양태에서, 혈청형 5 또는 8 다당류-운반 단백질 접합체의 단리는 정용여과를 포함한다.
- [0048] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용된 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>를 포함한다.
- [0049] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류 CRM<sub>197</sub> 접합체의 제조 방법에서 CRM<sub>197</sub>은 약 1:1의 CRM<sub>197</sub>:헤파 다당류 분자의 중량비로 첨가된다.
- [0050] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 사용되는 활성화된 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류는 약 50 kd 내지 약 500 kd의 크기를 갖는다.
- [0051] 하나의 실시양태에서, PDPH 및 EDAC를 사용하는 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체의 제조 방법에서 제조된 면역원성 접합체는 약 400 kd 내지 약 5000 kd의 크기를 갖는다.
- [0052] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술한 임의의 방법으로 제조된 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0053] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 본원에서 기술한 임의의 방법으로 제조된 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류-운반 단백질 접합체, 및 보조제, 희석제 및 담체 중 하나 이상을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 조성물은, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 셀페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로 구성된 군 중에서 선택될 수 있는 알루미늄계 보조제를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원에서 기술한 면역원성 조성물은 보조제 알루미늄 포스페이트를 포함한다.
- [0054] 본원에서 기술한 면역원성 조성물은 혈청형 5 또는 8 다당류의 총량에 대해 유리 혈청형 5 또는 8 다당류를 30% 미만 및 20% 미만의 양으로 포함할 수 있다. 본원에서 개시한 면역원성 조성물은, 물 또는 낮은 이온 강도의 중성 pH 완충제에 저장될 수 있다.
- [0055] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 대상내 포도상구균 박테리아와 관련된 포도상구균성 감염, 질환 또는 증상을 감소 또는 예방하기 위한 방법을 제공하되, 상기 방법은 상기 대상에 본원에서 기술한 바와 같은 치료량 또는 예방량의 면역 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상내 포도상구균 박테리아와 관련된 포도상구균성 감염, 질환 또는 증상을 줄이거나 예방하는 방법을 제공한다. 하나의 실시양태에서, 감염, 질환 또는 증상은, 침습성 황색포도상구균, 패혈증 및 보균(carriage)으로 구성된 군 중에서 선택된다.
- [0056] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 외과적 처치 전의 대상에게, 본원에서 기술한 바와 같은 면역 조성물을 예방 효과량으로 투여하는 단계를 포함하는, 외과 처치를 경험한 대상의 포도상구균성 감염을 줄이거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0057] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 방법은 CDT를 CDI로 대체하는 것을 포함한다.
- [0058] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 운반 단백질에 공유 결합된, 50 kDa 내지 800 kDa의 분자량을 갖는 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헤파 다당류를 제공하되; 여기서 운반 단백질에 공유 결합된 다당류의 총 분자량은 약 400 kDa 내지 5000 kDa이다.
- [0059] 하나의 실시양태에서, 운반 단백질에 공유 결합된 다당류는 70 kDa 내지 300 kDa의 분자량을 갖는 다당류 부분을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 운반 단백질에 공유 결합된 다당류의 분자량은 500 kDa 내지 2500 kDa이다.
- [0060] 하나의 실시양태에서, 운반 단백질에 공유 결합된 다당류의 운반 단백질 부분은 CRM<sub>197</sub>를 포함한다. 하나의 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>은 카바메이트 결합, 아마이드 결합, 또는 둘다를 통해 다당류에 공유 결합된다. 일부 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>에 대한 접합된 리신의 몰비는 약 10:1 내지 약 25:1이다. 일부 실시양태에서, 운반 단백질에 공유 결합된 다당류는 다당류의 적어도 매 5 내지 10개의 단당류 반복 단위 마다 CRM<sub>197</sub> 사이에서 하나 이상의 공유 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 운반 단백질에 공유 결합된 다당류는 CRM<sub>197</sub>과의 사이에서 하나 이상의 연결을 포함하고, 다당류는 다당류의 매 5개의 단당류 반복 단위 마다 발생한다. 일부 실시양태에서,

CRM<sub>197</sub>에 공유 결합된 다당류의 CRM<sub>197</sub> 부분은 다당류에 대해 공유 결합된 5 내지 22개의 리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>에 공유 결합된 다당류의 CRM<sub>197</sub> 부분은 다당류에 공유 결합된 5 내지 23개의 리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 운반 단백질에 공유 결합된 다당류의 CRM<sub>197</sub> 부분은 다당류에 공유 결합된 8 내지 15개의 리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 운반 단백질에 공유 결합된 다당류의 CRM<sub>197</sub> 부분은, 다당류에 공유 결합된 8 내지 12개의 리신을 포함한다.

- [0061] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 본원에서 기술한 바와 같은 운반 단백질에 공유 결합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 다당류, 및 보조제, 희석제 및 담체 중 하나 이상을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0062] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 기술한 면역 반응을 발생시키도록 대상에게 본원에서 기술한 바와 같은 운반 단백질에 공유 결합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 담체 다당류를 포함하는 면역원성 조성물의 투여 방법을 제공한다.
- [0063] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 20 kDa 내지 1000 kDa의 분자량을 갖는 다당류의 단리 방법을 제공한다.
- [0064] 하나의 실시양태에서, 본 발명은, 본 발명의, 협막 다당류, 면역원성 접합체, 또는 면역원성 조성물에 의해 발생하는 항체를 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0065] 후술하는 상세한 설명을 참고하면, 본 발명이 보다 잘 이해될 것이고, 전술한 것 이외의 특징부, 양태 및 이점이 명백해질 것이다. 이러한 상세한 설명은, 하기 도면을 참고한다:
- 도 1은, 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류의 반복 다당류 구조를 도시한다(N-아세틸 만노사민뉴론산은 ManNAc이고, N-아세틸 L-푸코사민은 L-FucNAc이고, N-아세틸 D-푸코사민은 D-FucNAc이다).
- 도 2a는, 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류(O-아세틸 분석) 및 테이코산(포스페이트 분석)을 위한 이온 교환 크로마토그래피(Q-세파로스)로부터의 분획의 분석을 도시하고; 도 2b는, 이중 면역확산(double immunodiffusion) 분석에 의해 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류에 대한 이온 교환 크로마토그래피(Q-세파로스)로부터의 분획의 분석을 도시한다.
- 도 3a는, 열 처리시 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류 분자량의 감소에 대한 95°C에서의 pH(3.5, 4 또는 5)의 영향을 나타내고; 도 3b는, 열 처리시 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류 분자량의 감소에 대한 pH 3.5에서의 온도(55°C, 75°C 또는 95°C)의 영향을 나타낸다.
- 도 4는, 각각 pH 3.5와 4.5 및 95°C에서 열 처리 동안 시간 경과에 따라 혈청형 5 협막 다당류에 비해 정제된 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류의 분자량을 도시한다.
- 도 5는, AlPO<sub>4</sub> 처리된 대조군(○)에 비해 혈청형 8 협막 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 수용한 마우스의 증가된 생존율(◇)을 도시한다.
- 도 6은, 황색포도상구균 혈청형 5 다당류의 반복 다당류 구조를 도시한다(N-아세틸 만노사민뉴론산은 ManNAc이고, N-아세틸 L-푸코사민은 L-FucNAc이고, N-아세틸 D-푸코사민은 D-FucNAc이다).
- 도 7a는, 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류(O-아세틸 분석) 및 테이코산(포스페이트 분석)을 위한 이온 교환 크로마토그래피(Q-세파로스)로부터의 분획의 분석을 도시하고; 도 7b는, 이중 면역확산 분석에 의해 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류에 대한 이온 교환 크로마토그래피(Q-세파로스)로부터의 분획의 분석을 도시한다.
- 도 8a는, 열 처리시 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류 분자량의 감소에 대한 95°C에서의 pH(3.5, 4 또는 5)의 영향을 나타내고; 도 8b는, 열 처리시 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류 분자량의 감소에 대한 pH 3.5에서의 온도(55°C, 75°C 또는 95°C)의 영향을 나타낸다.
- 도 9는, PBS-처리된 대조군에 비해 혈청형 5 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체를 수용한 마우스의 감소된 깔때기신장염을 나타낸다(진한 영역이 처리된 마우스이다).
- 도 10은, 고분자량(HMW)의 CP5-CRM, 저분자량(LMW)의 CP5-CRM, 또는 PP5-CRM 대조군으로 백신접종된 마우스에



서 황색포도상구균 PFESA0266으로 시험감염한 이후에 신장에서 회수된 군락 형성 단위(colony forming units; CFU)를 도시한다.

도 11은, 다당류 집합체의 상이한 제형(고분자량(HMW)의 CP5-CRM, 저분자량(LMW)의 CP5-CRM)로 백신접종된 마우스로부터 수득된 혈청으로부터의 OPA 역가(기하평균)의 비교를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 개론

[0067] 본 발명은, 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 집합체, 및 이의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 본 발명의 면역원성 집합체의 신규한 특징으로는, 다당류 및 제조된 집합체의 분자량 프로파일, CRM<sub>197</sub> 운반 단백질 당 접합된 리신의 비율과 다당류에 공유 결합된 리신의 개수, 다당류의 반복 단위의 함수로서 다당류 및 운반 단백질 사이의 공유 결합의 개수, 및 총 다당류에 비해 유리 다당류의 상대적인 양을 포함한다. 본원에서 사용된 "유리 다당류"란 용어는, 운반 단백질에 접합되지 않고 그럼에도 불구하고 집합체 구성물에 존재하는 다당류를 의미한다.

[0068] 본 발명의 면역원성 집합체의 제조 방법은, CDI(1,1-카보닐다이이미다졸), CDT(1,1-카보일-다이-1,2,4-트라이아졸) 또는 PDPH(3-(2-피리딜다이티오)-프로피온일 하이드라지드)를 포함하는 접합 화학을 사용하는, 운반 단백질과 헵막 다당류의 공유 접합을 포함한다. CDI는 단지 CP8 접합의 경우에만 독특한 것이다. CDI/CDT를 사용하면, 헵막 다당류와 운반 단백질 사이에 하나의 탄소 또는 0개의 탄소 연결기(linker)를 유발하는 반면, PDPH를 사용하면, 헵막 단백질과 운반 단백질 사이에 공유 티오에터 결합을 유발한다.

[0069] -NH<sub>2</sub> 연결로의, -SH(티올화 CP)를 위한 추가 가교 연결기는, 이로서 한정하는 것은 아니지만, 설포-LC-SMPT; 설포-LC-SMPT(4-설포숙신이미딜-6-메틸-α-(2-피리딜다이티오)톨루아미도]헥사노에이트); 설포-KMUS(N-[k-말레이미도운데카노일옥시]설포숙신이미드 에스터); 설포-LC-SPDP(설포숙신이미딜 6-(3'-[2-피리딜다이티오]-프로피온아미도)헥사노에이트)(이는 티올에 의해 분해됨); 설포-SMPB(설포숙신이미딜 4-[p-말레이미도페닐]부티레이트); 설포-SIAB(N-설포숙신이미딜[4-요오도아세틸]아미노벤조에이트); 설포-EMCS([N-e-말레이미도카프로일옥시]설포숙신이미드 에스터); EMCA(N-e-말레이미도카프로산); 설포-SMCC(설포숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]사이클로헥산-1-카복실레이트); 설포-MBS(m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포숙신이미드 에스터); 설포-GMBS(N-[g-말레이미도부티릴옥시]설포숙신이미드 에스터); BMPA(N-β-말레이미도프로피온산); 2-이뮤노티올란 하이드로클로라이드; 3-(2-피리딜다이티오) 프로피온산 N-숙신이미딜 에스터; 3-말레이미도프로피온산 N-숙신이미딜 에스터; 4-말레이미도부티르산 N-숙신이미딜 에스터; SMPT(4-숙신이미딜옥시카보닐-메틸-α-[2-피리딜다이티오]톨루엔); LC-SMCC(숙신이미딜-4-[N-말레이미도메틸]사이클로헥산-1-카복시-[6-아미도카프로에이트]); KMUA(N-k-말레이미도운데칸산); LC-SPDP(숙신이미딜 6-(3-[2-피리딜다이티오]-프로피온아미도)헥사노에이트); SMPH(숙신이미딜-6-[β-말레이미도프로피온아미도]헥사노에이트); SMPB(숙신이미딜 4-[p-말레이미도페닐]부티레이트); SIAB (N-숙신이미딜[4-요오도-아세틸]아미노벤조에이트); EMCS ([N-e-말레이미도카프로일옥시]숙신이미드 에스터); SMCC(숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸]사이클로헥산-1-카복실레이트); MBS(m-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스터); SBAP(숙신이미딜 3-[브로모아세트아미도]프로피오네이트); BMPS(N-[β-말레이미도프로필옥시]숙신이미드 에스터); AMAS N-(α-말레이미도아세톡시)숙신이미드 에스터); SIA(N-숙신이미딜 요오도아세테이트); 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸)-아미노벤조에이트를 포함한다.

[0070] 상기 시약은, -OH 기로의 -SH를 위한 가교 연결기를 사용하여 가교연결될 수 있다. 이러한 가교 연결기는 이로서 한정하는 것은 아니지만 PMPI(N-[p-말레이미도페닐]아이소시아네이트)를 포함한다.

[0071] 본원에서 기술한 조성물 및 방법은, 다양한 적용례에서 유용하다. 예를 들어, 집합체는 황색포도상구균 감염으로부터의 수용자를 보호하기 위해 집합체 면역원성 조성물의 제조에서 사용될 수 있다. 선택적으로, 다양한 집합체는, 후속적으로, 예를 들어 박테리아 검출 및 혈청형 구분과 같은 연구 및 임상 실험실 분석에서 사용될 수 있는 박테리아 헵막 다당류에 대한 항체의 제조에 사용될 수 있다. 이러한 항체는 또한 대상에 수동 면역을 부여하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 박테리아 다당류에 대항하여 제조된 항체는, 동물 효능 모델 또는 옹소년의 식세포 살해 분석법에서 기능성이다.

[0072] 다르게 언급하지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련자들에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 기술한 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 수행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질들이 본원에서 기술된다.

실시양태의 설명 및 본원발명의 주장에서, 특정 용어들은 하기에서 설명된 정의에 따라 사용될 것이다.

- [0073] 본원에서 사용되는 경우, 문맥상 명백하게 그렇지 않음을 기술하지 않는 한, 모든 단수형은 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "방법"을 지칭하면, 본원에서 기술되고/기술되거나 본원의 명세서 등을 읽었을 때 당 분야의 숙련자들에게 명백할 타입의 하나 이상의 방법 및/또는 단계들을 포함한다.
- [0074] 본원에서 사용되는 경우, "약"은, 언급된 농도 범위, 타임 프레임, 분자량, 온도 또는 pH와 같은 값이 통계학적으로 의미있는 범위에 있음을 의미한다. 이러한 범위는, 소정의 값 또는 범위의 자릿수 이내, 전형적으로 20% 이내, 보다 전형적으로는 10% 이내, 더욱 보다 전형적으로는 5% 이내일 수 있다. "약"이라는 용어에 의해 포함되는 허용가능한 변화는 연구중인 구체적인 시스템에 좌우될 것이며, 당분야의 숙련자들에 의해 쉽게 인식될 것이다. 범위가 이러한 적용에 내에서 언급될 때는 언제든지, 이러한 범위내의 모든 범자연수의 정수가 본 발명의 실시양태로서 고려된다.
- [0075] 본 명세서에서, "포함한다", "포함된", "포함하는", "함유한다", "함유하는" 등과 같은 용어는 미국 특허법에서 이들에게 부여된 의미를 가질 수 있으며, 예를 들어 이는, "내포한다", "내포한", "내포하는" 등을 의미할 수 있다. 이러한 용어는, 임의의 다른 성분들을 배제하지 않으면서 특정 성분들 또는 성분들의 세트를 포함함을 지칭한다. "필수적으로 구성된" 및 "필수적으로 구성된다"와 같은 용어는, 미국 특허법에서 이 용어에게 부여한 의미를 갖는다. 예를 들어, 이 용어는, 본 발명의 신규하거나 기본적인 특징을 손상시키지 않는 추가 성분들 또는 단계들의 도입을 허용한다. 즉, 이는 본 발명의 신규하거나 기본적인 특징으로부터 손상시키는 미언급된 성분들 또는 단계를 배제한다. 또한, 이 용어들은, 본원에서 언급되거나 본원에서 참고로 인용되는 문헌에서와 같이, 종래 분야의 성분 또는 단계를 배제하는데, 특히 이는, 종래 기술, 예를 들어 본원에서 언급하거나 본원에서 참고로 인용된 문헌에 비해, 특허가능한, 예를 들어 신규하고, 명백하지 않고, 진보성을 갖춘 실시양태를 정의하는 것이 이러한 문헌의 목적이기 때문이다. 또한, "으로 구성되다" 및 "으로 구성된"은 미국 특허법에서 이 용어에게 부여한 의미를 갖는다. 즉, 이 용어는 폐쇄형이다. 따라서, 이 용어는, 특정 성분 또는 성분 세트를 포함하되 모든 성분들을 배제함을 지칭한다.
- [0076] 면역원성 접합체
- [0077] 진술한 바와 같이, 본 발명은 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체에 관한 것이다. 본 발명의 하나의 실시양태는, 하기 특징들 중 하나 이상을 갖는 담체 분자 또는 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제공한다: 상기 다당류의 분자량은 50 kDa 내지 700 kDa이고; 상기 면역원성 접합체의 분자량은 500 kDa 내지 2500 kDa이고; 접합체는 총 다당류에 비해 약 30% 미만의 유리 다당류를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다당류의 분자량은 20 kDa 내지 1000 kDa이다. 일부 실시양태에서, 면역원성 접합체의 분자량은 200 kDa 내지 5000 kDa이다. 다른 실시양태에서, 접합체는 총 다당류에 비해 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만의 다당류를 포함한다.
- [0078] 본원에서 사용된 "접합체"는 일반적으로 바람직한 범위의 분자량의 헵막 다당류, 및 운반 단백질을 포함하되, 여기서 헵막 다당류는 운반 단백질에 접합되어 있다. 접합체는 일부 양의 유리 헵막 다당류를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 본원에서 사용된, "유리 헵막 다당류"는, 접합된 헵막 다당류-운반 단백질과 비공유적으로 회합된(즉, 비공유적으로 결합되거나 흡착되거나 그 내부 또는 그에 의해 포획된) 헵막 다당류를 지칭한다. "유리 헵막 다당류," "유리 다당류" 및 "유리 단당류"라는 용어는, 상호교환적으로 사용될 수 있고, 동일한 의미를 전달하는 것을 의도한다.
- [0079] 담체 분자의 특성에도 불구하고, 이는, 직접적으로 또는 연결기를 통해 헵막 다당류에 접합될 수 있다. 본원에서 사용되는 경우, "접합시키기 위해" "접합된" 및 "접합"은, 박테리아 헵막 다당류가 담체 분자에 공유적으로 부착되는 방법을 지칭한다. 접합은 박테리아 헵막 다당류의 면역원성을 증가시킨다. 접합은, 당업계에 공지된 공정에 의해 또는 후술되는 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0080] 황색포도상구균 헵막 다당류의 분자량은 면역원성 조성물에서 사용하기 위한 고려사항이다. 고분자량 헵막 다당류는, 항원의 표면에 존재하는 에피토프의 높은 원자개로 인하여 특정 항체 면역 반응을 유발할 수 있다. "고분자량 헵막 다당류"의 단리는, 본 발명의 조성물 및 방법에서 사용하기 위해 고려된다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류는, 단리되어, 20 kDa 내지 1000 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류는, 단리되어, 50 kDa 내지 700 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헵

막 다당류는 단리되어, 50 kDa 내지 300 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헤팍 다당류는 단리되어, 70 kDa 내지 300 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헤팍 다당류는 단리되어, 90 kDa 내지 250 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헤팍 다당류는 단리되어, 90 kDa 내지 150 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헤팍 다당류는 단리되어, 90 kDa 내지 120 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헤팍 다당류는 단리되어, 80 kDa 내지 120 kDa의 분자량으로 정제될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 단리되고 정제될 수 있는 다른 범위의 고분자량의 혈청형 5 또는 8 헤팍 다당류의 분자량의 범위는, 70 kDa 내지 100 kDa; 70 kDa 내지 110 kDa; 70 kDa 내지 120 kDa; 70 kDa 내지 130 kDa; 70 kDa 내지 140 kDa; 70 kDa 내지 150 kDa; 70 kDa 내지 160 kDa; 80 kDa 내지 110 kDa; 80 kDa 내지 120 kDa; 80 kDa 내지 130 kDa; 80 kDa 내지 140 kDa; 80 kDa 내지 150 kDa; 80 kDa 내지 160 kDa; 90 kDa 내지 110 kDa; 90 kDa 내지 120 kDa; 90 kDa 내지 130 kDa; 90 kDa 내지 140 kDa; 90 kDa 내지 150 kDa; 90 kDa 내지 160 kDa; 100 kDa 내지 120 kDa; 100 kDa 내지 130 kDa; 100 kDa 내지 140 kDa; 100 kDa 내지 150 kDa; 100 kDa 내지 160 kDa; 및 유사한 바람직한 분자량 범위이다. 임의의 전술한 범위 이내의 임의의 범자연수의 정수도 본 발명의 실시양태로서 고려된다.

[0081] 하나의 실시양태에서, 접합체의 분자량은 약 50 kDa 내지 약 5000 kDa이다. 하나의 실시양태에서, 접합체의 분자량은 약 200 kDa 내지 약 5000 kDa이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 분자량은 약 500 kDa 내지 약 2500 kDa이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 분자량은 약 500 kDa 내지 약 2500 kDa이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 분자량은 약 600 kDa 내지 약 2800 kDa이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 분자량은 약 700 kDa 내지 약 2700 kDa이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 분자량은 약 1000 kDa 내지 약 2000 kDa; 약 1800 kDa 내지 약 2500 kDa; 약 1100 kDa 내지 약 2200 kDa; 약 1900 kDa 내지 약 2700 kDa; 약 1200 kDa 내지 약 2400 kDa; 약 1700 kDa 내지 약 2600 kDa; 약 1300 kDa 내지 약 2600 kDa; 약 1600 kDa 내지 약 3000 kDa이다. 임의의 전술한 범위 이내의 임의의 범자연수의 정수도 본 발명의 실시양태로서 고려된다.

[0082] 본원에서 사용되는 "면역원성"이란, 체액 또는 세포, 또는 둘다에 의해 매개되는, 포유동물과 같은 호스트에서의 면역 반응을 끌어내는, 예를 들어 박테리아 헤팍 다당류와 같은 항원(또는 항원의 에피토프), 또는 상기 항원을 포함하는 접합체 면역원성 조성물 또는 박테리아 헤팍 다당류와 같은, 항원(또는 항원의 에피토프)의 능력을 의미한다. 따라서, 본원에서 사용된 "면역원성 접합체" 또는 "접합체"는, 면역 반응을 끌어내기 위해 사용될 수 있는 담체 분자에 접합된 박테리아 헤팍 다당류인, 항원 또는 항원성 결정부위(즉, 에피토프)-함유 임의의 면역원성 접합체를 의미한다. 면역원성 접합체는, 세포 표면에서 MHC 분자와 함께 항원 제시(presentation)에 의해 호스트를 에민하게 할 수 있다. 추가로, 항원 특이적 T세포 또는 항체가, 면역화된 호스트의 미래 보호를 허용하도록 발생될 수 있다. 따라서, 면역원성 접합체는 박테리아에 의한 감염과 관련된 하나 이상의 징후로부터 호스트를 보호할 수 있거나, 헤팍 다당류와 관련된 박테리아에 의한 감염으로 인한 사망으로부터 호스트를 보호할 수 있다. 면역원성 접합체는 또한 다클론성 또는 단일클론성 항체를 발생시키기 위해 사용될 수 있고, 이는 대상에게 수동 면역을 부여하기 위해 사용될 수 있다. 면역원성 접합체는 또한 동물 효능 모델 또는 옹소닌의 식세포 살해 분석법에서 측정되는 기능을 갖는 항체를 발생시키기 위해 사용될 수 있다.

[0083] "항체"란, 다양한 범위의 면역 글로불린 분자에 위치하는, 하나 이상의 항원 인식 부위를 통해, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질, 폴리펩티드 등과 같은 목표물에 특이적으로 결합가능한 면역 글로불린 분자이다. 본원에서 사용되는 경우, 문맥상 다른 언급이 없는 한, 상기 용어는, 온전한 다클론성 또는 단일클론성 항체, 뿐만 아니라 재조합 항체(예를 들어, 반응기(effector)의 기능, 안정성 및 기타 생물학적 활동을 개조하기 위해 가공화, 인간화 및/또는 유도화된 것)와 그의 분절(예를 들어 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), 단일 쇠(ScFv) 및 도메인 항체(상어 및 낙타 항체), 및 항체 부분, 다가 항체, 다중특이성 항체(예를 들어, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 이중특이항체) 및 본원에서 기술한 항체 분절을 포함하는 융합 단백질, 및 항체 인식 부위를 포함하는 임의의 다른 개질된 배열의 면역글로불린 분자를 포함하고자 한다. 항체는, 임의의 부류의 항체, 예를 들어 IgG, IgA, 또는 IgM(또는 그의 하부 부류)를 포함하고, 항체는 임의의 구체적으로 부류로 분류될 필요는 없다. 그의 중질 쇠의 일정한 도메인의 항체 아미노산 서열에 따라, 면역 글로불린 항체는, 상이한 부류로 배정될 수 있다. 면역 글로불린 항체에서 5개의 주요 부류, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM가 있고, 이들 중 몇몇은 하부 부류(아이소타입), 예를 들어 인간의 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 면역 글로불린의 상이한 부류에 해당되는 중질-쇠의 일정한 도메인은, 각각 알파, 델타, 에프실론, 감마 및 뮤로 지칭된다. 상이한 부류의 면역 글로불린의 아단위 구조 및 3차원 배열은 공지되어 있다.



- [0084] "항체 분절"은, 온전한 항체의 일부분만을 포함하되, 여기서 상기 일부분은, 온전한 항체로 존재하는 경우 상기 일부분과 일반적으로 관련된 기능 중 하나 이상, 바람직하게는 대부분 또는 모든 것을 유지한다.
- [0085] "항원"이란 용어는 일반적으로 동물에서 항체 또는 T-세포 반응, 또는 둘다의 생성을 자극할 수 있는 것으로, 동물에 주입되거나, 흡수되는 조성물을 비롯한, 생물학적 분자, 일반적으로 면역원성 조성물내 단백질, 펩티드, 다당류 또는 접합체, 또는 면역원성 물질을 지칭한다. 면역 반응은 전체 분자 또는 상기 분자의 여러가지의 일부분(예를 들어, 에피토프 또는 부작소)에 대해 발생될 수 있다. 상기 용어는, 개별적인 분자 또는 항원 분자의 균일하거나 불균일한 집단을 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 항원은, 특이적 체액 및/또는 세포 면역력의 항체, T-세포 수용체 또는 기타 요소에 의해 인식된다. "항원"은 또한 모든 관련 항원 에피토프를 포함한다. 소정의 항원의 에피토프는 당업계에 공지된 임의의 개수의 에피토프 맵핑(epitope mapping) 기법을 사용하여 확인될 수 있다(예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J] 참조). 예를 들어, 선형 에피토프는, 단백질 분자의 일부분에 해당되는 펩타이드 다수를 고체 지지체 위에서 동시에 합성시키고, 상기 펩타이드를 여전히 지지체에 부착된 채로 항체와 반응시킴으로써 측정될 수 있다. 이러한 기법은 당분야에 공지되어 있고, 예를 들어, 각각 본원에서 그 전체를 참고로 인용하는, 미국특허 제 4,708,871 호; 문헌[Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002]; 문헌[Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715]에 기술되어 있다. 유사하게, 배좌 에피토프는, 예를 들어 x-선 결정학 및 2차원 핵자기 공명에 의해, 아미노산의 공간 구조를 측정함으로써 확인될 수 있다[예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J] 참조]. 추가로, 본 발명의 목적을 위해, "항원"은 또한, 단백질이 면역학적 반응을 끌어내는 능력을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 결핍, 추가 및 치환과 같은 변형(일반적으로, 자연적으로 보존성이지만, 비보존성일 수도 있음)을 포함하는 단백질도 지칭할 수 있다. 이들 변형은, 부위-지향된 돌연변이로서, 또는 특정한 합성 절차, 또는 유전공학적 접근법을 통해 의도될 수 있거나, 또는 항원을 제조하는 호스트의 돌연변이와 같이 우연히 발생할 수 있다. 게다가, 항원은, 예를 들어 박테리아와 같은 미생물로부터 유도, 수득 또는 분리될 수 있거나, 전체 유기체일 수 있다. 유사하게, 핵산 면역조치 적용례에서와 같이 항원을 발현시키는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드도 이러한 정의에 포함된다. 합성 항원, 예를 들어 폴리에피토프, 측방(flanking) 에피토프, 및 기타 재조합 또는 합성 유도된 항원도 포함된다(문헌[Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781]; 문헌[Bergmann et al. (1996) J. Immunol. 157:3242-3249]; 문헌[Suhrbier (1997) Immunol. Cell Biol. 75:402-408]; 문헌[Gardner et al. (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, Jun. 28 to Jul. 3, 1998] 참조).
- [0086] "보호" 면역 반응은, 감염으로부터 대상을 보호하는 작용을 하는 것으로, 체액 또는 세포 또는 둘다에 의해 매개된 면역 반응을 끌어내는 면역원성 조성물의 능력을 지칭한다. 제공된 보호가 절대적일 필요는 없다. 즉, 백신 또는 면역원성 조성물을 투여하지 않은 미감염된 동물과 같은 대상의 대조군 집단에 비해, 통계학적으로 유의한 개선이 존재한다. 감염이 모두 예방되거나 근절될 필요는 없다. 보호는, 감염의 징후의 개시의 괴로움 또는 신속함을 경감시키는 것으로 제한될 수 있다. 일반적으로, "보호 면역 반응"은, 각각의 항원에 대한 일부 수준의 측정가능한 기능성 항체 반응을 포함하는, 대상 중 50% 이상에서 특정 항원에 대한 특이적인 항체 수준 증가를 유도하는 것을 포함한다. 구체적인 상황에서, "보호 면역 반응"은, 각각의 항원에 대한 일부 수준의 측정가능한 기능성 항체 반응을 포함하는, 대상 중 50% 이상에서 특이적인 항체 수준을 2배 또는 4배 증가시킴을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 읍소ניה 항체는 보호 면역 반응과 연관성이 있다. 따라서, 보호 면역 반응은, 예를 들어 본원에서 후술하는 바와 같은 읍소ניה의 식작용 분석에서 박테리아 개수의 감소율을 측정함으로써 분석될 수 있다. 바람직하게는 적어도 10%, 25%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상으로 박테리아 개수가 감소한다. 조성물내 특정 접합체의 "면역원성 양"은, 일반적으로, 접합체에 대해 접합된 다당류 및 접합되지 않은 다당류 전체를 기준으로 투여된다. 예를 들어, 20% 유리 다당류를 갖는 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류 접합체는, 100mcg 투여량 중에 약 80 mcg의 접합된 다당류 및 약 20 mcg의 비접합체된 다당류를 포함할 것이다. 접합체에 대한 단백질 기여도는, 접합체의 투여량을 계산하는 경우에는 고려되지 않는다. 접합체의 양은 포도상구균성 혈청형에 따라 좌우될 수 있다. 일반적으로, 각각의 투여량은, 다당류 0.1 내지 100 mcg, 특히 0.1 내지 10 mcg, 보다 구체적으로 1 내지 10 mcg을 포함할 수 있다.
- [0087] "대상"이라는 용어는, 포유동물, 조류, 어류, 파충류 또는 임의의 기타 동물을 지칭한다. "대상"이라는 용어는 또한 인간을 포함한다. "대상"이라는 용어는 또한 애완동물을 포함한다. 애완동물의 비제한적인 예는, 개, 고양이, 돼지, 토끼, 래트, 마우스, 게르빌루스쥐, 햄스터, 기니아피그, 페렛, 새, 뱀, 도마뱀, 어류, 거북이, 및

개구리를 포함한다. "대상"은 또한 가축을 포함한다. 가축의 비제한적인 예는, 알파카, 들소, 낙타, 소, 사슴, 돼지, 말, 라마, 노새, 원숭이, 양, 염소, 토끼, 순록, 야크, 닭, 거위 및 칠면조를 포함한다.

[0088] 도 6 및 1에서 각각 도시한 바와 같이, 황색포도상구균 혈청형 5 및 8 협막 다당류는 하기 구조를 갖는다: 혈청형 5  $[\rightarrow 4)-\beta\text{-D-ManNAcA}-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-FucNAc}(3\text{-O-Ac})-(1\rightarrow 3)-\beta\text{-D-FucNAc}-(1\rightarrow)]_n$  및 혈청형 8  $[\rightarrow 3)-\beta\text{-D-ManNAcA}(4\text{-O-Ac})-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-FucNAc}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-FucNAc}-(1\rightarrow)]_n$ (문헌[Jones (2005) Carbohydr. Res. 340:1097-1106] 참조). 혈청형 8 협막 다당류는 혈청형 5 협막 다당류와 유사한 3당류 반복 단위를 갖는다. 그러나, 이들은 당 결합 및 O-아세틸화의 부위 측면에서 상이하며, 이는 면역활성의 혈청학적으로 구별되는 패턴을 형성한다(문헌[Fournier et al. (1984) Infect. Immun. 45:87-93]; 및 문헌[Moreau et al. (1990) Carbohydr. Res. 201:285-297] 참조). 따라서, 혈청형 8 및 5 협막 다당류는, 수용성인 비교적 복잡한 탄수화물이고, 일반적으로 산성이고, 이전에는 약 25 KDa의 분자량을 갖는 것으로 고려되었다(문헌[Fattom (1990) Infect. Immun. 58, 2367-2374] 참조).

[0089] 일부 실시양태에서, 본 발명의 혈청형 5 및/또는 8 협막 다당류는 O-아세틸화된다. 일부 실시양태에서, 혈청형 5 협막 다당류 또는 올리고당의 O-아세틸화도는 10 내지 100%, 20 내지 100%, 30 내지 100%, 40 내지 100%, 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 80 내지 100%, 90 내지 100%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 70 내지 90% 또는 80 내지 90%이다. 일부 실시양태에서, 혈청형 8 협막 다당류 또는 올리고당의 O-아세틸화도는 10 내지 100%, 20 내지 100%, 30 내지 100%, 40 내지 100%, 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 80 내지 100%, 90 내지 100%, 50 내지 90%, 60 내지 90% 또는 80 내지 90%이다. 일부 실시양태에서, 혈청형 5 및 8 협막 다당류 또는 올리고당의 O-아세틸화도는 10 내지 100%, 20 내지 100%, 30 내지 100%, 40 내지 100%, 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 80 내지 100%, 90 내지 100%, 50 내지 90%, 60 내지 90%, 70 내지 90% 또는 80 내지 90%이다.

[0090] 다당류 또는 올리고당의 O-아세틸화도는 당분야에 공지된 임의의 방법(예를 들어 양성자 NMR)에 의해, 측정될 수 있다(문헌[Lemercinier and Jones 1996, Carbohydrate Research 296; 83-96, Jones and Lemercinier 2002, J Pharmaceutical and Biomedical analysis 30; 1233-1247], 국제특허 공개공보 제 WO 05/033148 호 또는 국제특허 공개공보 제 WO 00/56357 호 참조). 또 다른 일반적으로 사용된 방법은 문헌[Hestrin (1949) J. Biol. Chem. 180; 249-261]에 기재되어 있다.

[0091] 일부 실시양태에서, 본 발명의 혈청형 5 및/또는 8 협막 다당류는, 항체가 박테리아를 살해함을 입증하는 옅소닌의 식세포 살해 분석법 또는 동물 효능 모델에서 박테리아를 살해함으로써 측정되는 기능을 갖는 항체를 발생시키기 위해서 사용된다. 살해 기능은, 효율 측면에서 O-아세틸화의 중요성을 입증하지 않는, 항체의 발생만을 모니터링하는 분석을 사용하여서는 검증될 수 없다.

[0092] 협막 다당류, 예를 들어 혈청형 5 또는 8은, 당분야의 숙련자들에게 공지된 단리 방법을 사용하여 박테리아로부터 직접 수득될 수 있다(예를 들어, 그 전체가 본원에서 참고문헌으로 인용되는 문헌[Fournier et al. (1984), *supra*]; 문헌[Fournier et al. (1987) Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:561-567]; 미국특허출원 공개공보 제 2007/0141077 호; 국제특허 공개공보 제 WO 00/56357 호). 추가로, 합성 프로토콜을 사용하여 제조될 수 있다. 게다가, 혈청형 5 또는 8 협막 다당류는, 당분야의 숙련자들 중 하나에게 공지된 유전공학 절차를 사용하여 재조합으로 제조될 수 있다(각각 그 전체를 본원에서 참고로 인용하는, 문헌[Sau et al. (1997) Microbiology 143:2395-2405]; 및 미국특허 제 6,027,925 호).

[0093] 단리된 혈청형 8 협막 다당류를 수득하는데 사용될 수 있는 하나의 황색포도상구균 균주는 황색포도상구균 R2 PFESA0286이다. 이러한 균주는 변성 프란츠 배양액(Modified Frantz Broth)에서 황색포도상구균 PFESA0286(미국 미생물 보존 센터; 미국 버지니아 매나사스 소재; ATCC 수탁번호 제 49525 호)을 배양한 후, 토끼 안티-혈청형 5 다당류 항체의 유세포 분석에 의해 수집되었다. 유세포 분석 동안 2개의 군집인 R1 및 R2가 관찰되었다. R1 및 R2를 정제하여 재향온처리하였다. R2에서 혈청형 8 협막 다당류가 수득되었다. 유세포 분석 분석은, 균일한 형광 세기를 나타냈다. 이와 같은, R2는 혈청형 8 협막 다당류 생산을 위해 선택되었다.

[0094] 단리된 혈청형 5 협막 다당류를 수득하기 위해 사용될 수 있는 하나의 황색포도상구균 균주는 황색포도상구균 PFESA0266이다. 이러한 균주는 성장 동안 혈청형 5 협막 다당류를 제조하고, 세포가 정지기에 있는 경우 상기 제조는 절정이다. 다른 황색포도상구균 혈청형 5 또는 혈청형 8 균주는, 확립된 향온처리 수집 또는 임상 검체로부터 수득된 개별적인 다당류를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0095] 본 발명의 면역원성 접합체의 또 다른 성분은, 박테리아 협막 다당류에 접합된 담체 분자 또는 단백질이다. "

단백질 담체" 또는 "운반 단백질"은 면역 반응이 요구되는 항원(예를 들어, 헤파 다당류)에 접합될 수 있는 임의의 단백질 분자를 지칭한다. 담체에 대한 접합은 항원의 면역원성을 개선시킬 수 있다. 접합은 표준 절차에 의해 수행될 수 있다. 항원을 위한 바람직한 단백질 담체는, 독소, 변성 독소, 또는 파상풍, 디프테리아, 백일해, 슈도모나스, 이 콜라이, 포도상구균 및 연쇄구균으로부터의 독소의 임의의 돌연변이 CRM(cross-reactive material)이다. 하나의 실시양태에서, 특히 바람직한 담체는 CRM<sub>197</sub> 단백질을 생산하는, C. 디프테리아 균주 C7( $\beta$ 197)로부터 유도되는 디프테리아 변성 독소 CRM<sub>197</sub>이다. 이 균주의 ATCC 수탁번호는 제 53281 호이다. CRM<sub>197</sub>을 생산하기 위한 방법은, 본원에서 그 전체가 참고로 인용되는 미국특허 제 5,614,382 호에 개시되어 있다. 선택적으로, 단백질 담체 또는 다른 면역원성 단백질의 분절 또는 에피토프가 사용될 수 있다. 예를 들어, 헤파 항원은 박테리아 독소, 변성 독소 또는 CRM의 T세포 에피토프에 결합될 수 있다. 본원에서 그 전체를 인용하고, "Synthetic Peptides Representing a T-Cell Epitope as a Carrier Molecule For Conjugate Vaccines"을 제목으로 하는, 1988년 2월 1일자로 출원된 미국특허 출원 제 150,688 호를 참고한다. 다른 적합한 운반 단백질은 비활성된 박테리아 독소, 예를 들어 콜레라 변성 독소(예를 들어 국제특허 공개공보 제 WO 2004/083251 호에 기술됨), 이 콜라이 LT, 이 콜라이 ST, 및 녹농균으로부터의 외독소 A를 포함한다. 박테리아 외막 단백질, 예를 들어 외막 콤플렉스 c(OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 페렴구균용혈소, 페렴구균 표면 단백질 A(PspA), 페렴구균 접착 단백질(PsaA) 또는 헤모필루스 인플루엔자 단백질 D도 사용될 수 있다. 다른 단백질들, 예를 들어 오브알부민, 키홀-립렛 헤모시아닌(KLH), 소 혈청 알부민(BSA) 또는 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)도 운반 단백질로서 사용될 수 있다.

[0096] 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 접합체 내 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>이고, CRM<sub>197</sub>은 헤파 다당류에 카바메이트 결합, 아마이드 결합, 또는 둘다에 의해 공유-결합된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 접합체 내의 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>이고, CRM<sub>197</sub>은 티오에터 결합에 의해 헤파 다당류에 공유-결합된다. 헤파 다당류와 접합되는 운반 단백질내 리신 잔기의 개수는, 접합된 리신의 범위로서 특징화될 수 있다. 예를 들어, 소정의 면역원성 조성물에서, CRM<sub>197</sub>은 헤파 다당류에 공유 결합된 39개 중 5 내지 15개의 리신을 포함할 수 있다. 이러한 인자를 표현하는 다른 방법은, 12% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 헤파 다당류에 공유 결합된다는 것이다. 예를 들어, 소정의 면역원성 조성물에서, CRM<sub>197</sub>은 헤파 다당류에 공유 결합된 39개 중에서 18 내지 22개의 리신을 포함할 수 있다. 이러한 인자를 표현하는 또 다른 방법은, 40% 내지 60%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 헤파 다당류에 공유-결합되어 있다는 것이다. 일부 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>은 CP8에 공유 결합된 39개 중 5 내지 15개의 리신을 포함한다. 이러한 인자를 표현하는 또 다른 방법은, 12% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 CP8에 공유 결합되어 있다는 것이다. 일부 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>은 CP5에 공유 결합된 39개 중 18개 내지 22개의 리신을 포함한다. 이러한 인자를 표현하는 또 다른 방법은, 40% 내지 60%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 CP5에 공유 결합되어 있다는 것이다.

[0097] 전술한 바와 같이, 헤파 다당류에 접합된 운반 단백질내 리신 잔기의 개수는, 몰비로 표현될 수 있는 접합된 리신의 범위로서 특징화될 수 있다. 예를 들어, CP8 면역원성 접합체내 접합된 리신 대 CRM<sub>197</sub>의 몰비는 약 18:1 내지 약 22:1일 수 있다. 하나의 실시양태에서, CP8 면역원성 접합체내 접합된 리신 대 CRM<sub>197</sub>의 몰비는 약 15:1 내지 약 25:1일 수 있다. 하나의 실시양태에서, CP8 면역원성 접합체내 접합된 리신 대 CRM<sub>197</sub>의 몰비는 약 14:1 내지 약 20:1; 약 12:1 내지 약 18:1; 약 10:1 내지 약 16:1; 약 8:1 내지 약 14:1; 약 6:1 내지 약 12:1; 약 4:1 내지 약 10:1; 약 20:1 내지 약 26:1; 약 22:1 내지 약 28:1; 약 24:1 내지 약 30:1; 약 26:1 내지 약 32:1; 약 28:1 내지 약 34:1; 약 30:1 내지 약 36:1; 약 5:1 내지 약 10:1; 약 5:1 내지 약 20:1; 약 10:1 내지 약 20:1; 또는 약 10:1 내지 약 30:1일 수 있다. 또한, CP5 면역원성 접합체내 접합된 리신 대 CRM<sub>197</sub>의 몰비는 약 3:1 내지 25:1일 수 있다. 하나의 실시양태에서, CP5 면역원성 접합체내 접합된 리신 대 CRM<sub>197</sub>의 몰비의 범위는 약 5:1 내지 약 20:1일 수 있다. 하나의 실시양태에서, CP5 면역원성 접합체내 접합된 리신 대 CRM<sub>197</sub>의 몰비의 범위는 약 4:1 내지 약 20:1; 약 6:1 내지 약 20:1; 약 7:1 내지 약 20:1; 약 8:1 내지 약 20:1; 약 10:1 내지 약 20:1; 약 11:1 내지 약 20:1; 약 12:1 내지 약 20:1; 약 13:1 내지 약 20:1; 약 14:1 내지 약 20:1; 약 15:1 내지 약 20:1; 약 16:1 내지 약 20:1; 약 17:1 내지 약 20:1; 약 18:1 내지 약 20:1; 약 5:1 내지 약 18:1; 약 7:1 내지 약 16:1; 또는 약 9:1 내지 약 14:1일 수 있다.

[0098] 헤파 다당류에 접합된 운반 단백질내 리신 잔기의 개수를 표현하는 또 다른 방법은 접합된 리신의 범위일 수 있

다. 예를 들어, 소정의 CP8 면역원성 접합체에서, CRM<sub>197</sub>은 협막 다당류에 공유 결합된 39개 중 5 내지 15개 리신을 포함할 수 있다. 다르게는, 이러한 인자는 %로 표현될 수 있다. 예를 들어, 소정의 CP8 면역원성 접합체에서, 접합된 리신의 %는 10% 내지 50%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 20% 내지 50%의 리신이 CP8에 공유 결합될 수 있다. 다르게는, 여전히, 30% 내지 50%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 CP8에 공유 결합될 수 있고; 10% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 10% 내지 30%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 20% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 25% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 30% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 10% 내지 30%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 15% 내지 30%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 20% 내지 30%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 25% 내지 30%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 10% 내지 15%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 또는 10% 내지 12%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 CP8에 공유 결합된다. 또한, 소정의 CP5 면역원성 접합체에서, CRM<sub>197</sub>은 협막 다당류에 공유 결합된 39개 중 18 내지 22개의 리신을 포함할 수 있다. 선택적으로, 이러한 인자는 %로서 표현될 수 있다. 예를 들어, 소정의 CP5 면역원성 접합체에서, 접합된 리신의 %는 40% 내지 60%일 수 있다. 일부 실시양태에서, 40% 내지 60%의 리신이 CP5에 공유 결합될 수 있다. 여전히 다르게는, 30% 내지 50%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 CP5에 공유 결합될 수 있고; 20% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 10% 내지 30%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 50% 내지 70%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 35% 내지 65%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 30% 내지 60%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 25% 내지 55%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 20% 내지 50%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 15% 내지 45%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 10% 내지 40%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 40% 내지 70%의 CRM<sub>197</sub> 리신; 또는 45% 내지 75%의 CRM<sub>197</sub> 리신이 CP5에 공유 결합된다.

[0099] 담체 분자 상의 리신에 대한 협막 다당류 쇄의 부착 빈도는 협막 다당류의 접합체를 특징화하기 위한 또 다른 인자이다. 예를 들어, 하나의 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>과 다당류의 하나 이상의 공유 결합은 협막 다당류의 적어도 매 5 내지 10개의 단당류 반복 단위 마다 발생한다. 또 다른 실시양태에서, 협막 다당류의 매 5 내지 10개 단당류 반복 단위; 매 2 내지 7개 단당류 반복 단위; 매 3 내지 8개 단당류 반복 단위; 매 4 내지 9개 단당류 반복 단위; 매 6 내지 11개 단당류 반복 단위; 매 7 내지 12개 단당류 반복 단위; 매 8 내지 13개 단당류 반복 단위; 매 9 내지 14개 단당류 반복 단위; 매 10 내지 15개 단당류 반복 단위; 매 2 내지 6개 단당류 반복 단위; 매 3 내지 7개 단당류 반복 단위; 매 4 내지 8개 단당류 반복 단위; 매 6 내지 10개 단당류 반복 단위; 매 7 내지 11개 단당류 반복 단위; 매 8 내지 12개 단당류 반복 단위; 매 9 내지 13개 단당류 반복 단위; 매 10 내지 14개 단당류 반복 단위; 매 10 내지 20개 단당류 반복 단위; 또는 매 5 내지 10개 단당류 반복 단위 마다, CRM<sub>197</sub>과 협막 다당류 사이의 하나 이상의 공유 결합이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, CRM<sub>197</sub>과 협막 다당류 사이의 하나 이상의 결합은, 협막 다당류의 매 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 단당류 반복 단위 마다 발생한다.

[0100] 본 발명의 하나의 실시양태는, 전술한 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 협막 다당류를 포함하는 임의의 면역원성 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.

[0101] "면역원성 조성물"은, 대상에서 면역 반응을 끌어내기 위해 사용될 수 있는, 항원(예를 들어, 미생물 또는 그의 성분)을 함유하는 임의의 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 면역원성 조성물은, 전신으로, 피부 또는 점막 경로로 면역원성 조성물을 투여함으로써, 황색포도상구균 감염되기 쉬운 인간을 보호 또는 치료하기 위해 사용될 수 있거나, 다른 대상에 대한 수동 면역을 수행하기 위해서 사용될 수 있는 다클론성 또는 단일클론성 항체 제제를 발생시키기 위해 사용될 수 있다. 그의 투여는, 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로로의 주사; 또는 경구/소화관, 호흡관 또는 비노생식관으로의 점막 투여를 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 비강 투여는, 황색포도상구균의 비인두 보급의 치료 또는 예방을 위해 사용되어, 그의 초기 단계에서는 감염을 약화시킨다. 면역원성 조성물은 또한 동물 효능 모델 또는 옹소인의 식세포 살해 분석법에서 박테리아의 살해에 의해 측정되는 기능을 갖는 항체를 발생시키기 위해 사용될 수도 있다.

[0102] 특정 면역원성 조성물의 성분들의 최적의 양은, 대상내 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 평가될 수 있다. 초기 백신접종 이후에, 대상은 적절하게 간격을 둔 하나 또는 몇몇의 면역화 접종(booster immunization)을 수용할 수 있다.

[0103] 본 발명의 면역원성 조성물은 하기 항원들 중 하나 이상을 포함할 수도 있다: ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE, MntC/SitC/살비바 결합 단백질, IsdB, IsdA, Opp3a, DltA, HtsA, LtaS, SdrH, SrtA, SpA, SBI, 알파-헤몰리신(hla), 베타-헤몰리신, 피브로넥틴-결합 단백질 A(fnbA), 코아글라제, 맵(map), 판톤-발렌타인 류코시딘(pvl), 감마독신(hlg), 이카(ica), 면역우성 ABC 트랜스포터, RAP, 오토리신, 라미닌 수용체, IsaA/PisA, IsaB/PisB, SPOIIIE, SsaA, EbpS, SasF, SasH, EFB (FIB), FnbB, Npase, EBP, 골격 시알로 결합 단백질 II, 아우레오리신



전구체 (AUR)/Sepp1, Cna, TSST-1, mecA, dPNAG, GehD, EhbA, EhbB, SSP-1, SSP-2 HBP, 비트로넥틴 결합 단백질, HarA, 엔테로톡신 A, 엔테로톡신 B, 엔테로톡신 C1, 및 신규한 오토리신.

[0104] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 추가로 보조제, 완충제, 저온보호물질, 염, 이가 양이온, 비이온성 세제, 유리 라디칼 산화의 보조제, 희석제 및 담체 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물내 보조제는 알루미늄계 보조제이다. 하나의 실시양태에서, 보조제는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로 구성된 군 중에서 선택된 알루미늄계 보조제이다. 하나의 실시양태에서, 보조제는 알루미늄 포스페이트이다.

[0105] 보조제는, 면역원 또는 항원과 함께 투여되는 경우, 면역 반응을 강화시키는 물질이다. 다수의 사이토킨 또는 림포카인이 면역 조절 활성을 갖는 것으로 보이며, 이로서 한정하는 것은 아니지만, 인터루킨 1- $\alpha$ , 1- $\beta$ , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12(미국특허 제 5,723,127 호 참조), 13, 14, 15, 16, 17 및 18 ( 및 그의 돌연변이 형태); 인터페론- $\alpha$ ,  $\beta$  및  $\gamma$ ; 과립백혈구 군락 자극 인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor; GM-CSF)(예를 들어, 미국특허 제 5,078,996 호 참조, ATCC 수탁번호 39900); 대식 세포 군락 자극 인자(Macrophage Colony Stimulating; M-CSF); 과립백혈구 군락 자극 인자(GC-SF); 및 종양 괴사 인자  $\alpha$  및  $\beta$  을 포함하는, 보조제와 동일하거나 유사한 방식으로 사용할 수 있다. 본원에서 기술한 면역원성 조성물과 유용한 다른 보조제는, 이로서 한정하는 것은 아니지만, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , 및 RANTES를 포함하는 케모카인; 접착 분자, 예를 들어 셀렉틴, 예컨대 L-셀렉틴, P-셀렉틴 및 E-셀렉틴; 뮤신-유사 분자, 예컨대, CD34, GlyCAM-1 및 MadCAM-1; 인터그린 부류의 구성원, 예를 들어 LFA-1, VLA-1, Mac-1 및 p150.95; 면역 글로불린 상과의 구성원, 예를 들어 PECAM, ICAM류, 예컨대, ICAM-1, ICAM-2 및 ICAM-3, CD2 및 LFA-3; 공동자극 분자 예를 들어 B7-1, B7-2, CD40 및 CD40L; 성장 인자, 예를 들어 관 성장 인자, 신경 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 상피 성장 인자, PDGF, BL-1, 및 혈관 내피 성장 인자; 수용체 분자들, 예를 들어 Fas, TNF 수용체, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, 및 DR6; 및 카스파제(Caspases), 예를 들어 ICE를 포함한다.

[0106] 면역 반응을 개선시키기 위해 사용될 수 있는 적합한 보조제는, 이로서 한정하는 것은 아니지만, 미국특허 제 4,912,094 호에 기술된 MPL™(3-O-탈아세틸화 모노포스포릴 지질 A, 코릭사(Corixa; 미국 메사추세츠주 해밀톤))을 포함한다. 또한, 합성 지질 A 유사체 또는 아미노 알킬 글루코사민 포스페이트 화합물(AGP) 또는 그의 유도체 또는 유사체(이들은 코릭사로부터 시판중임) 및 미국특허 제 6,113,918 호에서 기술된 것도 보조제로서 사용하기에 적합하다. 하나의 이러한 AGP는, 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노] 에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)3-테트라데카노일옥시테트라데카노일-아미노]-b-D-글루코피라노시드(이는 529(이전에는 RC529로서 공지됨)이다. 이러한 529 보조제는 수성 형태(AP) 또는 안정한 유화액(SE)으로서 제형화된다.

[0107] 또 다른 보조제는 무라밀 펩타이드, 예를 들어 N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-아이스글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-2-(1'2'-다이팔미토일-sn-글리세로-3-하이드록시포스포틸옥시)에틸아민(MTP-PE); 수중 유적형 유화액, 예를 들어 MF59(미국특허 제 6,299,884 호)(예를 들어 모델 110Y 고압균질기(마이크로플루이딕스(Microfluidics), 미국 메사추세츠주 뉴턴 소재)와 같은 미세 용액화 장치를 사용하여 마이크로미터만의 입자로 제형화된 것으로 5% 스쿠알렌, 0.5% 폴리소르베이트 80, 및 0.5% 스팬(Span) 85(선택적으로 다양한 양의 MTP-PE 을 함유함), 및 SAF(마이크론 미만의 유화액으로 미세 용액화되거나, 큰 입자 크기의 유화액을 발생시키도록 소용돌이시킨 것으로, 10% 스쿠알렌, 0.4% 폴리소르베이트 80, 5% 플루로닉블록 중합체 L121, 및 thr-MDP를 함유함); 불완전 프렌드(Freund)의 보조제 (IFA); 알루미늄 염(alum), 예를 들어 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트; 암피젠; 아브리딘; L121/스쿠알렌; D-락티드-폴리락티드/글리코시드; 플루로닌 폴리올; 살해된 백일해균; 사포닌, 예를 들어 미국특허 제 5,057,540 호에 기술된 스티물론(Stimulon, 상표) QS-21(안티제닉스(Antigenics), 미국 메사추세츠주 플라밍햄 소재), 미국특허 제 5,254,339에서 기술된 이스코 매트릭스(Iscomatrix, 등록상표)(씨에스엘 리미티드(CSL Limited), 호수 파크빌 소재), 및 면역자극 착체(ISCOMS); 마이크로박테리아 결핵; 박테리아 리포다당류; 합성 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 CpG 모티브를 함유하는 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 미국특허 제 6,207,646 호); 유럽 특허 제 1,296,713 호 및 제 1,326,634 호에서 기술한 IC-31(인터셀 아게(InterCell AG), 오스트리아 비엔나 소재); 백일해 독소(PT) 또는 그의 돌연변이, 콜레라 독소 또는 그의 돌연변이(예컨대, 미국특허 제 7,285,281 호, 제 7,332,174 호, 제 7,361,355 호 및 제 7,384,640 호); 또는 이 콜라이 열-민감성 독소(LT) 또는 그의 돌연변이, 특히 LT-K63, LT-R72(예컨대, 미국특허 제 6,149,919 호, 제 7,115,730 호 및 제 7,291,588 호)를 포함한다.

[0108] 면역원성 조성물은 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. "약학적으로 허용가능한 담체"



란, 연방, 주 정부의 규제 기구에 의해 또는 다른 규제 기구에 의해 승인되거나, 인간 뿐만 아니라 인간 이외의 동물을 포함하는 동물에서의 사용을 위해 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인증된 약전에서 기술한 담체를 의미한다. "담체"란 용어는, 약학 조성물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 물, 염수 및 수성 텍스트로즈 및 글리세롤 용액이 액체 담체, 특히 주사용 용액으로서 사용될 수 있다. 적합한 약학 담체의 예는, 마틴(E. W. Martin)의 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences"]에 기재되어 있다. 상기 제형은 투여 모드에 맞춰야만 한다.

[0109] 본 발명의 면역원성 조성물은 추가로 체액성 및/또는 세포-매개된 면역의 상향조절 또는 하향조절이 관찰되도록 면역 시스템을 개조 또는 동요시키는 시약인 하나 이상의 추가 "면역 조절제"를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 면역 시스템의 체액성 및/또는 세포-매개된 암(arm)의 상향조절이 제공된다. 특정 면역 조절제의 예는, 예컨대 보조제 또는 사이토카인, 또는 그 중에서 미국특허 제 5,254,339 호에 기술된 제 이스코매트릭스(Iscomatrix; 등록상표)(시에스엘 리미티드; 호주 파크빌 소재)를 포함한다. 본 발명의 면역원성 조성물에서 사용될 수 있는 보조제의 비제한적인 예는, RIBI 보조제 시스템(리비 인코포레이티드(Ribi Inc.); 미국 메사추세츠주 해밀톤 소재), 명반, 겔 광물, 예를 들어 알루미늄 하이드록사이드 겔, 수중유적형 유화액, 유중수적형 유화액, 예를 들어, 예컨대, 프렌드의 완전 및 불완전 보조제, 블록 공중합체(CytRx; 미국 조지아주 아틀란타 소재), QS21(캠브리지 바이오테크 인코포레이티드(Cambridge Biotech Inc.); 미국 메사추세츠주 캠브리지), SAF-M(치론(Chiron); 미국 CA 에메리빌 소재), 암피젠(Amphigen, 등록상표) 보조제, 사포닌, 퀴(Quil) A 또는 다른 사포닌 분획, 모노포스포릴 지질 A, 및 아브리딘 지질-아민 보조제를 포함한다. 본 발명의 면역원성 조성물에 유용한 수중유적형 유화액의 비제한적인 예는, 개질된 SEAM62 및 SEAM 1/2 제형을 포함한다. 개질된 SEAM62은, 5%(v/v) 스쿠알렌(시그마(Sigma)), 1%(v/v) 스팬(등록상표) 85 세제(아이씨아이 설파넌트(ICI Surfactants)), 0.7%(v/v) 폴리소르베이트 80 세제(아이씨아이 설파넌트), 2.5%(v/v) 에탄올, 200 mcg/ml 퀴 A, 100 mcg/ml 콜레스테롤, 및 0.5%(v/v) 레시틴을 함유하는 수중유적형 유화액이다. 개질된 SEAM 1/2은, 5%(v/v) 스쿠알렌, 1%(v/v) 스팬(등록상표) 85 세제, 0.7%(v/v) 폴리소르베이트 80 세제, 2.5%(v/v) 에탄올, 100 mcg/ml 퀴 A, 및 50 mcg/ml 콜레스테롤을 함유하는 수중유적형 유화액이다. 면역원성 조성물에 포함될 수 있는 다른 "면역 조절제"는, 예컨대 하나 이상의 인터류킨, 인터페론, 또는 다른 공지된 사이토카인 또는 케모카인을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 보조제는 사이클로덱스트린 유도체 또는 다음이온성 중합체, 예를 들어 각각 미국특허 제 6,165,995 호 및 제6,610,310 호에서 기술한 것일 수 있다. 또한, 사용되는 면역조절제 및/또는 보조제는 면역원성 조성물이 투여되는 대상, 주사 경로 및 제공된 주사 횟수에 좌우될 것이다.

[0110] 본 발명의 면역원성 조성물은 다수의 포도상구균성 협막 다당류-단백질 접합체 이외에 하나 이상의 방부제를 추가로 포함할 수 있다. FDA는, 단지 몇몇의 예외는 있지만, 다수회 투여(다중 투여) 바이알의 생물학적 제품이 방부제를 함유할 것을 요구한다. 방부제를 함유하는 백신 제품은, 벤제토늄 클로라이드(탄저병), 2-페녹시에탄올((DTaP, HepA, 라임(Lyme), 소아마비(비경구)), 페놀(페, 장티푸스(비경구), 우두) 및 티메로살(DTaP, DT, Td, HepB, Hib, 인플루엔자, JE, 메닝(Mening), 페, 광견병)을 함유하는 백신을 포함한다. 주사용 약물에서 사용하는 것으로 승인된 방부제는, 예컨대, 클로로부탄올, m-크레졸, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 2-페녹시에탄올, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 벤질 알콜, 페놀, 티메로살 및 페닐수은 니트레이트를 포함한다.

[0111] 본 발명의 제형은 추가로 완충제, 염, 2가 양이온, 비이온성 세제, 저온 보호물질, 예를 들어 당, 및 산화방지제, 예를 들어 유리 라디칼 스캐빈저 또는 킬레이트화제, 또는 이들의 임의의 다중 조합물 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 임의의 하나의 성분, 예컨대 킬레이트화제의 선택은, 다른 성분(예컨대, 스캐빈저)이 바람직하지 여부를 결정할 수 있다. 투여를 위해 제형화된 최종 조성물은 살균되어야만 하고/하거나 발열원이 없어야만 한다. 당업계의 숙련자라면, 상기 성분들 및 다른 성분들의 어떠한 조합이 다양한 인자들, 예를 들어 요구되는 특정 저장 및 투여 조건에 따라, 본 발명의 방부제-함유 면역원성 조성물에 포함되기에 최적일 수 있는지를 경험적으로 결정할 수 있을 것이다.

[0112] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 발명의 제형은 이로서 한정하는 것은 아니지만, 트리스(트라이메트아민), 포스페이트, 아세테이트, 보레이트, 시트레이트, 글리신, 히스티딘 및 숙시네이트 중에서 선택된 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 완충제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제형은 약 6.0 내지 약 9.0, 바람직하게는 약 6.4 내지 약 7.4의 pH 범위 내에서 완충작용된다.

[0113] 특정 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물 또는 제형의 pH를 조정하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 제형의 pH는, 당업계의 표준 기법을 사용하여 조절될 수 있다. 제형의 pH는 3.0 내지 8.0의 범위로 조절될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형의 pH는 3.0 내지 6.0, 4.0 내지 6.0, 또는 5.0 내지 8.0이거나, 상기 범위로

조절될 수 있다. 다른 실시양태에서, 제형의 pH는 약 3.0, 약 3.5, 약 4.0, 약 4.5, 약 5.0, 약 5.5, 약 5.8, 약 6.0, 약 6.5, 약 7.0, 약 7.5, 또는 약 8.0이거나 이 범위로 조절될 수 있다. 특정 실시양태에서, pH는, 4.5 내지 7.5, 4.5 내지 6.5, 5.5 내지 5.4, 5.4 내지 5.5, 5.5 내지 5.6, 5.6 내지 5.7, 5.7 내지 5.8, 내지 5.8 내지 5.9, 5.9 내지 6.0, 6.0 내지 6.1, 6.1 내지 6.2, 6.2 내지 6.3, 6.3 내지 6.5, 6.5 내지 7.0, 7.0 내지 7.5 또는 7.5 내지 8.0이거나, 상기 범위로 조절될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제형의 pH는 약 5.8이다.

[0114] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 발명의 제형은 약 0.1 mM 내지 약 10 mM, 바람직하게는 약 5 mM 이하의 범위의 농도에서, 이로서 한정되는 것은 아니지만  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  및  $MnCl_2$ 을 포함하는 하나 이상의 2가 양 이온을 포함한다.

[0115] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 발명의 제형은, 비경구 투여시 대상에게 약리학적으로 허용가능한 이온 강도로 존재하고 최종 제형의 선택된 이온 강도 또는 삼투질 농도를 생산하는 최종 농도로 내포된, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 및 황산칼륨을 포함하는 하나 이상의 염을 포함하지만 이로서 한정하는 것은 아니다. 제형의 최종 이온 농도 또는 삼투질 농도는 여러 가지 성분(예컨대, 완충 화합물 및 다른 비-완충 염으로부터의 이온)에 의해 결정된다. 바람직한 염인 NaCl은, 약 250 mM 이하의 양으로 존재하고, 염 농도는, 제형의 최종 총 삼투질 농도가 비경구 투여(예를 들어, 근육내 또는 피하 주사)와 상용성하도록 다른 성분들을 보완할 수 있도록 선택되고, 다양한 온도 범위에서 면역원성 조성 제형의 면역원성 성분의 장기간 안정성을 증가시킬 것이다. 염-유리 제형은, 목적하는 최종 삼투질 농도 수준을 유지하기 위해서 증가된 범위의 하나 이상의 선택된 저온 보호 물질을 용인할 것이다.

[0116] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 발명의 제형은, 이로서 한정하는 것은 아니지만 이당류(예컨대, 락토스, 말토스, 수크로스 또는 트레할로스) 및 폴라하이드록시 탄화수소(예컨대, 돌시톨, 글리세롤, 만니톨 및 소르비톨) 중에서 선택된 하나 이상의 저온 보호 물질을 포함한다.

[0117] 특정 실시양태에서, 제형의 삼투질 농도는 200 mOsm/L 내지 약 800 mOsm/L의 범위이고, 바람직함 범위는 약 250 mOsm/L 내지 약 500 mOsm/L, 또는 약 300 mOsm/L 내지 약 400 mOsm/L이다. 염-부재 제형은, 예를 들어 약 5% 내지 약 25% 수크로스, 바람직하게는 약 7% 내지 약 15%, 또는 약 10% 내지 약 12% 수크로스를 함유할 수 있다. 선택적으로, 염-부재 제형은 예를 들어 약 3% 내지 약 12% 소르비톨, 바람직하게는 약 4% 내지 7%, 또는 약 5% 내지 약 6% 소르비톨을 함유할 수 있다. 염, 예를 들어 염화나트륨이 첨가되면, 효과적인 범위의 수크로스 또는 소르비톨이 비교적 감소된다. 이러한 삼투질 및 삼투질 농도 및 다른 삼투질 및 삼투질 농도에 대해 당분야의 숙련자라면 잘 고려할 것이다.

[0118] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 발명의 제형은 하나 이상의 유리 라디칼 산화 억제제 및/또는 킬레이트화제를 포함한다. 다양한 유리 라디칼 스캐빈저 및 킬레이트화제가 당분야에 공지되어 있고, 본원에서 기술된 사용 방법 및 제형에 적용된다. 그 예로는, 이로서 한정하는 것은 아니지만, 에탄올, EDTA, EDTA/에탄올 조합물, 트라이에탄올아민, 만니톨, 히스티딘, 글리세롤, 나트륨 시트레이트, 이노시톨 헥사포스페이트, 트라이폴리포스페이트, 아스코브산/아스코르베이트, 숙신산/숙시네이트, 말산/말리에이트, 데스페탈, EDDHA 및 DTPA, 및 이들 중 2종 이상의 다양한 조합물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 비-환원 유리 라디칼 스캐빈저는, 제형의 장기간 안정성을 효과적으로 개선시키는 농도로 첨가될 수 있다. 하나 이상의 유리 라디칼 산화 억제제/킬레이트화제는, 다양한 조합으로, 예를 들어 스캐빈저와 이가 양이온으로 첨가될 수도 있다. 킬레이트화제의 선택은, 스캐빈저의 추가가 필요한지 여부를 결정할 것이다.

[0119] 특정 실시양태에서, 비경구 투여와 상용성인 본 발명의 제형은, 이로서 한정하는 것은 아니지만 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스터, 폴리소르베이트-80(트윈 80), 폴리소르베이트-60(트윈 60), 폴리소르베이트-40(트윈 40) 및 폴리소르베이트-20(트윈 20), 폴리옥시에틸렌 알킬 에터, 예를 들어 이로서 한정하는 것은 아니지만, 브리유(Brij) 58, 브리유 35, 뿐만 아니라 기타, 예를 들어 트립톤(Triton) X-100; 트립톤 X-114, NP40, 스팬 85 및 플루로닉(Pluronic) 시리즈의 비-이온성 계면활성제(예컨대, 플루로닉 121)를 포함하는 하나 이상의 비-이온성 계면활성제를 포함하고, 바람직한 성분들은 약 0.001% 내지 약 2%(약 0.25% 이하가 바람직함)의 농도의 폴리소르베이트-80, 또는 약 0.001% 내지 1%의 농도의 폴리소르베이트-40(약 0.5% 이하가 바람직함)이다.

[0120] 특정 실시양태에서, 본 화합물의 제형은 비경구 투여에 적합한 하나 이상의 추가 안정화제를 포함한다. 예컨대, 환원제는 하나 이상의 티올(-SH) 기(예컨대, 시스테인, N-아세틸 시스테인, 환원된 글루타티온, 나트륨 티오글리콜레이트, 티오설페이트, 모노티오글리세롤 또는 그의 혼합물)을 포함한다. 다르게는 또는 선택적으로, 본 발명의 방부제-함유 면역원성 조성물은, 저장 용기로부터 산소를 제거하고, (예컨대, 호박색 유

리 용기를 사용하여) 제형을 광으로부터 보호함으로써 추가로 안정화될 수 있다.

- [0121] 본 발명의 방부제-함유 면역원성 조성물은, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하며, 이는 그 자체는 면역 반응을 유발하지 않는 임의의 부형제이다. 적합한 부형제로는, 이로서 한정하는 것은 아니지만, 거대 분자, 예를 들어 단백질, 단당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 수크로스(문헌[Paoletti et al, 2001, Vaccine, 19:21-18] 참조), 트레할로스, 락토스, 및 지질 응집체(예를 들어 유구(oil droplet) 또는 리포솜)를 포함한다. 이러한 담체는, 당분야의 숙련자들에게 공지되어 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제는, 예컨대 문헌[Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> edition, ISBN:0683306472]에서 논의된다.
- [0122] 본 발명의 조성물은 동결건조되거나 수성 형태, 즉 용액 또는 현탁액일 수 있다. 액체 제형은, 본 발명의 동결건조된 조성물의 경우 요구되는 것인 수성 매질에서의 복원을 필요로 하지 않고, 유리하게는 이들의 포장 형태로부터 바로 투여될 수 있어서, 주사를 위해서는 이상적이다.
- [0123] 대상으로의 본 발명의 면역원성 조성물의 직접 투여는, 비경구 투여(근육내, 복강내, 피내, 피하, 정맥내 또는 조직의 설비충); 또는 직장, 경구, 질, 국소, 경피, 비강, 눈, 귀, 폐 또는 기타 점막 투여에 의해 실행될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 비경구 투여는, 예컨대 대상의 허벅다리 또는 상박으로의 근육내 주사일 수 있다. 주사는 바늘(예를 들어, 피하 주사기)을 사용하지만, 다르게는 바늘-부재 주사도 사용될 수 있다. 전형적인 근육내 투여량은 0.5mL이다. 본 발명의 조성물은 다양한 형태, 예컨대 액체 용액 또는 현탁액의 형태로 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물은, 예를 들어 흡입기와 같은 폐 투여를 위한 분말 또는 스프레이로 제조될 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 좌약 또는 질 좌약으로 제조되거나, 또는 코, 귀 또는 눈 투여를 위해, 예를 들어 스프레이, 점적약, 젤 또는 분말로 제조될 수 있다.
- [0124] 각각의 면역원성 조성물내 접합체의 양은, 상당한 부작용 없이 면역보호 반응을 유발하는 양으로서 선택된다. 이러한 양은 포도상구균성 혈청형에 따라 변할 수 있다. 일반적으로, 각각의 투여량은 0.1 내지 100  $\mu$ g, 특히 0.1 내지 10  $\mu$ g, 보다 구체적으로 1 내지 5  $\mu$ g의 다당류를 포함할 것이다.
- [0125] 특정 면역원성 조성물을 위한 성분들의 최적 양은, 대상에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 평가될 수 있다. 초기 백신접종 이후에, 대상은 적당한 간격을 두고 하나 또는 몇몇의 추가 면역화 접종을 받을 수 있다.
- [0126] 포장 및 투여 형태
- [0127] 본 발명의 면역원성 조성물은 단위 투여 또는 다중-투여(예를 들어, 2회 투여, 4회 투여 또는 그 이상)으로 포장될 수 있다. 다중 투여 형태는, 전형적으로 바이알이지만, 프리필드(pre-filled) 주사기보다 필수적으로 바람직하지는 않다. 적합한 다중-투여 포맷은, 이로서 한정하는 것은 아니지만, 투여당 0.1 내지 2 mL로 용기당 2 내지 10회의 투여분을 포함하는 것을 들 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여량은 0.5 mL 투여량이다(본원에서 참고로 인용하는 국제특허 공개공보 제 W02007/127668를 참고한다).
- [0128] 조성물은 바이알 또는 다른 적합한 저장 용기에 존재하거나, 프리-필드 전달 장치들, 예컨대 바늘이 있거나 없는 단일 또는 다중 성분 주사기로 존재할 수 있다. 다중-투여, 프리-필드 주사기도 구상중이지만, 주사기가 전형적이고 필수적으로 본 발명의 방부제-함유 면역원성 조성물을 단일 투여량으로 함유할 필요는 없다. 유사하게, 바이알은 단일 투여량을 포함할 수 있지만, 다르게는 다중 투여량을 포함할 수 있다.
- [0129] 효과적인 투여 체적은 일상적으로 확립될 수 있지만, 주사를 위한 조성물의 전형적인 투여량의 체적은 0.5 mL이다. 특정 실시양태에서, 투여량은 인간 대상에게 투여하기 위해 제형화된다. 특정 실시양태에서, 투여량은 성인, 10대, 청소년, 유아 또는 영아(즉, 1세 이하)의 인간 대상에게 투여하도록 제형화되고, 바람직한 실시양태에서 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0130] 본 발명의 액체 면역원성 조성물은 또한, 동결건조된 형태로 존재하는 다른 면역원성 조성물을 복원하기에 적합하다. 면역원성 조성물이 이러한 즉석 복원을 위해 사용되는 경우, 본 발명은 2개 이상의 바이알, 2개 이상의 이미-충전된 주사기, 또는 각각을 하나 이상 포함하는 키트를 제공하며, 여기서 주사기의 내용물은 주사 전에 바이알의 내용물을 복원하기 위해서 사용되거나 그 반대일 수 있다.
- [0131] 다르게는, 예컨대, 당분야에 공지된 동결건조를 위한 많은 방법 중 하나를 사용하여 본 발명의 면역원성 조성물은 동결건조되고 복원되어, 건조하고 규칙적인 형태(예컨대, 구형)의 입자(예를 들어, 미세펠렛 또는 미세구)를 형성할 수 있고, 여기서 상기 입자는 이들을 제조하기 위해서 사용되는 정확한 방법을 변화시킴으로서 선택 및

제어될 수 있는 평균 직경 크기와 같은 입자 특성을 갖는다. 면역원성 조성물은 보조제를 추가로 포함할 수 있는데, 상기 보조제는 개별적으로 건조되고, 규칙적 형태(예컨대, 구형)인 입자, 예를 들어 미세펠렛 또는 미세구로 제조되거나 또는 여기에 함유될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 본 발명은, 본 발명의 하나 이상의 방부제를 선택적으로 추가로 포함하는, 안정화된 건조 면역원성 조성물을 포함하는 제 1 성분, 및 상기 제 1 성분의 복원을 위한 살균 수용액을 포함하는 제 2 성분을 포함하는 면역원성 조성물 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 수용액은, 하나 이상의 방부제를 포함하고, 선택적으로 하나 이상의 보조제를 포함할 수 있다(예를 들어, 본원에서 참고로 인용되는 국제특허 공개공보 제 W02009/109550 호를 참고한다).

[0132] 또 다른 실시양태에서, 다중-투여 포맷의 용기는, 이로서 한정하는 것은 아니지만, 일반적인 실험실용 유리제품, 플라스크, 비이커, 눈금매긴 실린더, 발효기, 생물 반응 장치, 배관, 파이프, 백, 단지, 바이알, 바이알 뚜껑(뚜껑)(예컨대, 고무 마개, 나사가 있는 뚜껑(screw on cap)), 앰플, 주사기, 이중 또는 다중 챔버 주사기, 주사기 마개, 주사기 플런저, 고무 뚜껑, 플라스틱 뚜껑, 유리 뚜껑, 카트리지 및 일회용 펜 등으로 구성된 하나 이상의 군중에서 선택된다. 본 발명의 용기는, 제조 재료로 한정되지 않으며, 재료들, 예를 들어 유리, 금속(예컨대, 강, 스테인레스 강, 알루미늄 등) 및 중합체(예컨대, 열가소성물질, 엘라스토머, 열가소성 물질-엘라스토머)를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 포맷의 용기는 부틸 마개가 달린 5ml 들이의 스코트 혈청형 1 유리 바이알이다. 당분야의 숙련자라면, 앞에서 설명한 포맷이 결코 완전한 목록이 아니며, 본 발명에서 유용한 다양한 포맷에 대한 당분야의 숙련자에 대한 지침을 제공할 뿐임을 인식할 것이다. 본 발명에서 사용하기 위한 것으로 고려되는 추가 포맷은, 예를 들어 유니타이드 스테이트 플라스틱 코퍼레이션(United States Plastic Corp., 미국 오하이오주 리마 소재, 브이더블유알(VWR))과 같은 실험실용 장비의 판매자 및 제조자로부터의 출판 카탈로그에서 발견될 수 있다.

[0133] 면역원성 접합체의 제조 방법

[0134] 본 발명은 또한 본원에서 기술한 면역원성 접합체의 제조 방법을 포함한다. 본 발명의 면역원성 접합체의 제조 방법은, CDI(1,1-카보닐다이이미다졸), CDT(1,1-카보일-다이-1,2,4-트리아자올) 또는 PDPH(3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라지드)을 포함하는 접합 화학을 사용하여 운반 단백질과 헵막 다당류의 공유 접합을 포함한다.

[0135] 따라서, 본 발명의 하나의 실시양태는, 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체의 CDT-기반 제조 방법을 제공하되, 상기 방법은, a) 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 이미다졸 또는 트리아자올과 제형화하여 제형화된 다당류를 제조하는 단계; b) 유기 용매 및 약 0.1% 내지 약 0.3% w/v 물에서 CDT와 제형화된 다당류를 반응시켜 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 제조하는 단계; c) 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 정제하여 정제되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 제조하는 단계; d) 유기 용액에서 정제되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 운반 단백질과 반응시켜 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체를 제조하는 단계; e) 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체를 가수분해하여 미반응된 활성화 기를 제거하는 단계를 포함하고, 이로써 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체가 제조된다. 하나의 실시양태에서, (d) 단계 이전에, 정제되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류는 운반 단백질화 제형화된다.

[0136] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체의 또 다른 CDT-기반 제조 방법은, a) 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 이미다졸 또는 트리아자올과 제형화하여 제형화된 다당류를 제조하는 단계; b) 유기 용매 및 약 0.1% 내지 약 0.3% w/v 물과 제형화된 다당류를 반응시켜 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 제조하는 단계; c) 유기 용매에서 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 운반 단백질과 반응시켜 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체를 제조하는 단계; d) 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체를 가수분해하여 미반응된 활성화 기를 제거하는 단계를 포함하고, 이로써 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체가 제조된다.

[0137] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기반 제조 방법에서의 유기 용매는 극성 비양성자성 용매이다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매는, 다이메틸 설펡사이드(DMSO), 다이메틸폼아마이드(DMF), 다이메틸아세트아마이드, N-메틸-2-피롤리돈, 및 헥사메틸포스포르아마이드(HMPA)로 구성된 군 중에서 선택된 극성 비양성자성 용매이다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매는 DMSO이다.

[0138] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기반 제조 방법에서의 CDT와 제형화된 다당류의 반응 단계는, 다당류에 비해 약 20배의 몰 과량의 CDT를 제공함을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기



반 제조 방법에서의 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류의 정제 단계는 정용여과를 포함한다.

- [0139] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기반 제조 방법에서의 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 제조 방법에서의 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류는 약 1:1의 물비로 CRM<sub>197</sub>과 반응한다.
- [0140] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기반 제조 방법에서 미반응된 활성화 기를 제거하기 위해 혈청형 5 또는 8 다당류:운반 단백질 접합체를 가수분해하는 단계는, 완충제로의 희석 및 약 20℃ 내지 약 26℃에서 4 시간 이상 동안 약 8.8 내지 약 9.2의 pH를 유지함을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체의 가수분해 단계는 완충제로의 희석 및 약 23℃에서 4시간 이상 동안 약 9.0의 pH를 유지함을 포함한다.
- [0141] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기반 방법에 따라 제조된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체는, 정제된다. 하나의 실시양태에서, 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체의 정제는 정용여과를 포함한다.
- [0142] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기반 제조 방법에서 CDT와 제형화된 다당류의 반응 이전에, 제형화된 혈청형 5 또는 8 다당류가 동결건조되고 재현탁된다. 하나의 실시양태에서, 제형화된 다당류 및 운반 단백질 둘다, CDT와 제형화된 다당류를 반응시키기 전에, 개별적으로 동결건조되고 재현탁된다. 하나의 실시양태에서, 동결건조되고 제형화된 다당류 및/또는 동결건조된 운반 단백질은 유기 용매에서 재현탁된다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매는 DMSO이다.
- [0143] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 CDT-기반 제조 방법에서 운반 단백질과, 제형화되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 반응시키기 이전에, 정제되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류 및 운반 단백질은 개별적으로 동결건조되고 재현탁된다. 하나의 실시양태에서, 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>이고, 동결건조 이전에, CRM<sub>197</sub>은 NaCl에 대해 정용여과된다. 하나의 실시양태에서, 동결건조 이전에, CRM<sub>197</sub>은 NaCl에 대해 정용여과되고, NaCl/CRM의 w/w 비는 약 0.5 내지 약 1.5로 조절된다.
- [0144] 본 발명의 하나의 실시양태는, 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 a) 유기 용매에서 PDPH 및 카보다이이미드를 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류와 반응시켜 PDPH-연결 다당류를 제조하는 단계; b) PDPH-결합된 다당류를 환원제와 반응시켜 활성화된 다당류를 제조하는 단계; c) 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 정제하여 정제되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 제조하는 단계; d) 유기 용매에서 운반 단백질과 브로모아세트산을 반응시켜 활성화된 운반 단백질을 제조하는 단계; e) 활성화된 운반 단백질을 정제하여 정제되고 활성화된 운반 단백질을 제조하는 단계; f) 정제되고 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류, 정제되고 활성화된 운반 단백질과 반응시켜 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체를 제조하는 단계; 및 g) 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체를 가수분해시켜 미반응된 활성화 기를 제거하는 단계를 포함하고, 이로써 운반 단백질에 접합된 황색포도상구균 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 포함하는 면역원성 접합체가 제조된다.
- [0145] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에서 사용되는 브로모아세트산은 브로모아세트산의 N-하이드록시숙신이미드 에스터(BAANS)이다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 PDPH-기반 제조 방법에서 사용되는 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>이고 BAANS은, 약 1:0.1 내지 약 1:0.5의 CRM<sub>197</sub>:BAANS 비로 첨가된다.
- [0146] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에서의 유기 용매는 극성 비양성자성 용매이다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매는, DMSO, DMF, 다이메틸아세트아마이드, N-메틸-2-피롤리돈, 및 HMPA로 구성된 군 중에서 선택된 극성 비양성자성 용매이다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매는 DMSO이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에서 사용되는 카보다이이미드는 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)-카보다이이미드(EDAC)이다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매에서 PDPH 및 EDAC와 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 반응시키는 단계는, 약 1:5:3의 중량비로 다당류:PDPH:EDAC를 유지함을 포함한다.
- [0147] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에서 사용되는 환원제는 다이티오프레이톨(DTT)이다.

- [0148] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에서 활성화된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류를 정제하는 단계 및 운반 단백질을 정제하는 단계는 각각 정용여과를 포함한다.
- [0149] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에서의 운반 단백질은 CRM<sub>197</sub>이다. 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 제조 방법에서의 활성화된 혈청형 5 또는 8 다당류는, 약 1:1의 중량비로 CRM<sub>197</sub>와 반응한다.
- [0150] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에서 미반응된 활성화 기를 제거하기 위해서 혈청형 5 또는 8 다당류:운반 단백질 접합체를 가수분해하는 단계는, 시스트아민 하이드로클로라이드의 첨가를 포함한다.
- [0151] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 제조 방법에 따라 제조된 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체는 정제된다. 하나의 실시양태에서, 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류:운반 단백질 접합체의 정제는 정용여과를 포함한다.
- [0152] 하나의 실시양태에서, 면역원성 접합체의 PDPH-기반 방법에서 정제되고 활성화된 운반 단백질과 정제되고 활성화된 황원형 5 또는 8 헵막 다당류를 반응시키기 전에, 정제되고 활성화된 다당류 및 정제되고 활성화된 운반 단백질은 개별적으로 동결건조되고 재현탁된다. 하나의 실시양태에서, 동결건조된 활성화된 다당류 및/또는 동결건조된 활성화된 운반 단백질은 유기 용매에서 재현탁된다. 하나의 실시양태에서, 유기 용매는 DMSO이다.
- [0153] 본원에서 사용되는 "동결건조"란, 언 물이, 고체상으로부터 가스상으로 직접 승화되는 것을 허용하는 충분한 열의 존재하에서 주변 압력을 감압시키면서, 박테리아 헵막 다당류를 얼리는 탈수 공정을 의미한다. 다당류의 동결건조를 위해 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다(예컨대, 본원에서 그 전체를 참고로 인용하는, 문헌[Harris & Angal (1989) "단백질 Purification Methods," In: Kennedy & Cabral, eds. "Recovery Processes for Biological Materials" (John Wiley & Sons; 1993); 미국특허 제 4,134,214 호; 국제특허 출원 공개공보 제 WO 2003/086471 호) 참조). 선택적으로, 저온보호물질, 예를 들어 수크로스, 그루코스, 락토스, 트레할로스, 아라비노스, 자일로스, 갈락토스, 소르비톨 또는 만니톨이 동결건조 동안 포함될 수 있다.
- [0154] 본원에서 사용된 "활성화시키다" 및 "활성화"는, 박테리아 헵막 다당류 또는 운반 단백질이, 접합할 수 있는 방식으로 개조됨(즉, 하나 이상의 잔기가 담체 분자에 공유 결합되도록 해야만 함)을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 CDT-기반 접합 방법과 관련하여, 다당류는 낮은 습도 환경(예컨대, DMSO)에서 활성화되어, 유용한 하이드록실을 갖는 트라이아졸 카바메이트 및 카복실산을 갖는 아실트라이아졸 잔기가 형성된다. 그다음, 활성화된 다당류는 CRM<sub>197</sub> 단백질과 반응하며, 이는 CRM<sub>197</sub> 내 리신 잔기에 의한 트라이아졸의 친핵성 치환, 및 카바메이트 결합(활성화된 하이드록실의 경우) 및 아마이드 결합(활성화된 카복실산의 경우)의 형성을 유도한다. 대조적으로, 본 발명의 PDPH-기반 접합 방법과 관련하여, 운반 단백질 및 다당류 둘다, 접합 이전에 활성화된다: 1) CRM<sub>197</sub>의 활성화는, 브로모아세트산의 N-하이드록시숙신이미드 에스터와 아민기를 반응시킴으로써 CRM<sub>197</sub> 단백질에 브로모아세틸기를 도입함을 포함하고; 2) 다당류의 활성화는, 다당류내 N-아세틸만노사미노우론산의 카보다이이미드-활성화된 카복실레이트 기를, 설프하이드릴-반응성 하이드라지드 헤테로이작용성 연결기 PDPH의 하이드라지드 기에 결합시키고, 그 후 DTT로 환원시킴을 포함한다. 그다음, 활성화된 다당류는 활성화된 운반 단백질과 반응하여, PDPH-티올화 다당류의 티올을 활성화된 운반 단백질의 브로모아세틸 기와 반응시켜, 결과적으로 브로마이드 치환에 의해 형성된 공유 티오에터가 생성된다.
- [0155] 본 발명의 방법에 따르면, 헵막 다당류, 운반 단백질, 및/또는 다당류-단백질 접합체는 정제될 수 있다. 다당류 또는 단백질의 정제를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어 농축/정용여과, 침전/용리, 컬럼 크로마토그래피 및 내부 여과(depth filtration)가 사용될 수 있다(예컨대, 본원에서 그 전체를 참고로 인용하는 문헌[Farres et al. (1996) Biotechnol. Tech. 10:375-380]; 문헌[Goncalves et al. In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology (Antonio Mendez Vilas, ed. 1<sup>st</sup> ed. Badajoz, Espanha: Formatex; 2007. pp.450-457)]; 문헌[Tanizaki et al. (1996) J. Microbiol. Methods 27:1923]; 미국특허 제 6,146,902 호; 미국특허 공개공보 제 2008/0286838 호 참고).
- [0156] 본원에서 사용되는 "단리된" 또는 "정제된"이란, 물질이 그의 원래 환경에서 제거됨을 의미한다(예컨대, 이것이 천연물질인 경우라면 자연 환경으로부터, 이것이 재조합 독립체(entity)인 경우라면 그의 호스트 생물체로부터 제거되거나, 하나의 환경으로부터 다른 환경으로 이동함)을 의미한다. 예를 들어, 단리된 다당류, 펩티드 또는 단백질은, 단백질이 유도된 세포 또는 조직 공급원으로부터의 세포 물질 또는 기타 오염 단백질이 실질적으로

없거나, 화학적으로 합성되거나 그렇지 않으면 화학 반응의 일부로서 혼합물에 존재하는 경우에는 화학물질 전구체 또는 기타 화합물질이 없다. 본 발명에서, 단백질 또는 다당류는 박테리아 세포 또는 세포 파편으로부터 단리되어, 면역원성 조성물의 제조에 유용한 형태로 제공될 수 있다. "단리된" 또는 "단리"는, 본원에서 기술한 바와 같이, 예를 들어 헤파 다당류의 정제 방법을 비롯한, 정제함 또는 정제를 포함할 수 있다. "세포 물질이 실질적으로 없는"은, 다당류/폴리펩티드/단백질이 단리 또는 재조합으로 생성된 세포의 세포 성분으로부터 단리된, 다당류/폴리펩티드/단백질의 제조를 포함한다. 따라서, 세포 물질 또는 다른 화합물들이, 실질적으로 없는 폴리펩티드/단백질, 다당류, 또는 접합체는 무수 중량을 기준으로 약 30중량% 미만, 20중량% 미만, 10중량% 미만, 5중량% 미만, 2.5중량% 미만 또는 1중량% 미만의 오염화 단백질, 다당류, 또는 다른 화합물을 포함하는 폴리펩티드/단백질, 다당류, 또는 접합체의 제제를 포함한다. 폴리펩티드/단백질이 재조합적으로 제조되는 경우, 또한 실질적으로 배양 매질이 없는 것이 바람직하다. 즉, 배양 매질은 단백질 제제의 체적의 약 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만을 나타낸다. 폴리펩티드/단백질 또는 다당류가 화학 합성에 의해 제조되는 경우, 화학물질 전구체 또는 다른 화합물질이 실질적으로 없는 것이 바람직하다. 즉, 이것이 단백질 또는 다당류의 합성에 내포되는 화학물질 전구체 또는 다른 화합물질로부터 단리된다. 따라서, 폴리펩티드/단백질 또는 다당류의 이러한 제제는, (건조 중량을 기준으로) 관심있는 폴리펩티드/단백질 또는 다당류 이외의 화학물질 전구체 또는 화합물을 약 30중량% 미만, 20중량% 미만, 10중량% 미만, 5중량% 미만, 4중량% 미만, 3중량% 미만, 2중량% 미만, 또는 1중량% 미만으로 갖는다.

[0157] 본원에서 기술한 임의의 방법에 의해 제조되는 면역원성 접합체는, 물 또는 낮은 이온 강도의 중성 pH 완충제에 저장되거나 건조 분말로 동결건조될 수 있다.

[0158] 황색 포도상구균 감염에 대한 보호 및 면역 반응의 유도 방법

[0159] 본 발명은 또한 본원에서 기술한 면역원성 조성물의 사용 방법을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 하나의 실시양태는, 본원에서 기술한 임의의 면역원성 조성물을 면역원성 양으로 대상에게 투여함을 포함하는, 황색포도상구균에 대한 면역 반응의 유도 방법을 제공한다. 본 발명의 하나의 실시양태는, 황색포도상구균에 의한 감염에 대한 대상의 보호 방법, 또는 황색포도상구균에 의한 감염의 예방 방법, 또는 황색포도상구균에 의해 유발되는 감염과 관련된 하나 이상의 징후의 개시를 지연시키거나 그의 괴로움을 감소시키는 방법을 제공하되, 상기 방법은 본원에서 기술한 임의의 면역원성 조성물을 면역원성 양으로 대상에게 투여함을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시양태는, 대상내 포도상구균과 관련된 포도상구균성 감염 또는 증상의 처치 또는 예방 방법을 제공하되, 상기 방법은, 본원에서 기술한 면역원성 조성물을 치료효과량 또는 예방효과량으로 대상에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포도상구균성 감염, 질환 또는 증상의 처치 또는 예방 방법은, 인간, 가축, 동물 또는 농산물의 처치를 포함한다. 또 다른 실시양태는, 대상의 포도상구균과 관련된 포도상구균성 감염, 질환 또는 증상의 처치 또는 예방 방법을 제공하되, 상기 방법은 본원에서 기술한 면역원성 조성물로부터 다클론성 또는 단일클론성 항체 제제를 발생시키고, 상기 항체 제제를 사용하여 대상에게 수동 면역을 부여함을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시양태는, 외과적 처치를 경험한 대상의 포도상구균성 감염의 예방 방법을 제공하되, 상기 방법은, 외과적 처치 전에 대상에게 본원에서 기술한 면역원성 조성물을 예방효과량으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0160] 항원 또는 면역원성 조성물에 대한 "면역반응"이란, 관심있는 항원 또는 백신 조성물내에 존재하는 화합물에 대한 체액성 및/또는 세포-매개성 면역 반응의 대상내 발달이다. 본 발명의 목적을 위해, "체액성 면역 반응"은, 항체-매개된 면역 반응으로서, 본 발명의 면역원성 조성물내 항원에 대해 일부 친밀도를 가지면서 인식 및 결합하는 항체의 유도 및 발생을 포함하는 반면, "세포-매개성 면역 반응"은 T-세포 및/또는 다른 백혈구에 의해 매개되는 것이다. "세포-매개성 면역 반응"은, 주요 조직 적합성 복합체(MHC), CD1 또는 기타 비-고전적 MHC형 분자의 제 I 부류 또는 제 II 부류와 관련된 항원성 에피토프의 제시에 의해 끌어낸다. 이는 항원 특이성 CD4+ T 헬퍼 세포 또는 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포("CTL")를 활성화시킨다. CTL은, 고전적 또는 비-고전적 MHC에 의해 코딩되고 세포 표면상에서 발현되는 단백질과 관련하여 제시되는 펩티드 항원에 대한 특이성을 갖는다. CTL은 세포내 미생물의 세포내 파괴 또는 이러한 미생물에 의해 감염된 세포의 용해(lysis)를 유발 및 촉진하는 것을 보조한다. 세포 면역원성의 또 다른 양태는, 헬퍼 T-세포에 의해 항원 특이적 반응을 포함한다. 헬퍼 T-세포는, 표면 상에 고전적 또는 비-고전적 MHC 분자와 관련된 펩티드 또는 기타 항원을 보이는 세포에 대한 비특이적 주효 세포(effector cell)의 기능을 자극하고, 상기 주효 세포의 활성화에 초점을 맞추는 것을 보조하는 작용을 한다. "세포-매개성 면역 반응"은 또한, 활성화된 T-세포 및/또는 다른 백혈구(CD4+ 및 CD8+ T-세포로부터 유도된 것을 포함함)에 의해 제조된, 사이토카인, 케모카인 및 기타 이러한 분자의 제조를 지칭한다. 세포-매개성 면역 반응을 자극하는 특정 항원 또는 조성물의 능력은, 다수의 분석법에 의해, 예를

들어 림프구증식(림프구 활성화) 분석에 의해, CTL 세포독성 세포 분석에 의해, 민감 대상의 항원에 대한 특이적 T 림프구의 분석에 의해, 또는, 항원에 의한 제자극에 대한 반응에서 T 세포에 의한 사이토카인 생성의 측정에 의해 측정될 수 있다. 이러한 분석은 당분야에 공지되어 있다(예컨대, 문헌[Erickson et al. (1993) J. Immunol. 151:4189-4199]; 및 문헌[Doe et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24:2369-2376]을 참조한다).

[0161] 본원에서 사용되는 "치치"(예컨대, "치치하다" 또는 "치치된"과 같은 그의 변형을 포함함)는, (i) 전통적인 백신에서와 같은 감염 또는 재감염의 예방, (ii) 증상의 괴로움의 감소 또는 증상의 제거, 및 (iii) 문제가 되는 병원균 또는 질환의 실질적 또는 완전한 제거 중 하나 이상의 의미한다. 따라서, 치치는 예방적으로(감염 전) 또는 치료적으로(감염 후) 수행될 수 있다. 본 발명에서, 예방용 치치가 바람직한 방식이다. 본 발명의 구체적인 실시양태에 따라, 세균 감염(예컨대, 박테리아, 예를 들어 포도상구균)에 대한 호스트 동물을 치치하는(예방용으로 및/또는 치료용으로 면역접종함을 포함함) 조성물 및 방법이 제공된다. 본 발명의 방법은 대상에 예방용 및/또는 치료용 면역원성을 부여하는데 유용하다. 본 발명의 방법은 또한 생화학적 연구 적용례를 위해 대상에 대해 수행될 수 있다.

[0162] 본원에서 사용되는 "포유동물"은 인간 또는 인간 이외의 동물을 의미한다. 보다 구체적으로, 포유동물은, 인간, 가축과 농경용 가축, 및 동물원용, 스포츠용 및 애완용 반려동물, 예를 들어 가정용 애완동물 및 기타 가정용 동물(이로서 한정하는 것은 아니지만, 소, 양, 흰담비, 백조, 말, 토끼, 염소, 개, 고양이 등)을 포함하는 포유동물로서 분류되는 임의의 동물을 지칭한다. 바람직한 반려 동물은 개 및 고양이이다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0163] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "면역원성 양" 및 "면역효과량"은, 당분야의 숙련자들에게 공지된 표준 분석법에 의해 측정시, 세포성(T-세포) 또는 체액성(B 세포 또는 항체) 둘다의 반응인 면역 반응을 끌어내기 위해서 충분한 항원 또는 면역원성 조성물의 양을 지칭한다.

[0164] 조성물내 특정 접합체의 양은, 일반적으로 상기 접합체에 대해 접합된 다당류 및 비-접합된 다당류의 총량에 기초하여 계산된다. 예를 들어, 20% 유리 다당류를 갖는 CP5 접합체는 100 mcg CP5 다당류 투여량 중에 약 80 mcg의 접합된 CP5 다당류 및 약 20 mcg의 비-접합체된 CP5 다당류를 포함할 것이다. 접합체에 대한 단백질 기여도는 일반적으로, 접합체의 투여량을 계산할 때 고려되지 않는다. 접합체의 양은, 포도상구균성 혈청형에 따라 변할 수 있다. 일반적으로, 각각의 투여량은 0.1 내지 100 mcg의 다당류, 구체적으로 0.1 내지 10 mcg, 보다 구체적으로 1 내지 10 mcg의 다당류를 포함할 것이다. 면역원성 조성물내 상이한 다당류 성분들의 "면역원성 양"은 나눌 수 있고, 각각 1 mcg, 2 mcg, 3 mcg, 4 mcg, 5 mcg, 6 mcg, 7 mcg, 8 mcg, 9 mcg, 10 mcg, 15 mcg, 20 mcg, 30 mcg, 40 mcg, 50 mcg, 60 mcg, 70 mcg, 80 mcg, 90 mcg, 또는 약 100 mcg의 임의의 특정 다당류 항원을 포함할 것이다.

[0165] 황색포도상구균 "침습성 질환"은, 상기 질환의 관련된 임상학적 신호/징후가 존재하는, 정상 살균 부위로부터의 박테리아의 단리이다. 정상 살균 신체 부위는, 혈액, CSF, 흉수, 심막액, 복막액, 관절/관절 낭액, 뼈, 내부 신체 부위(림프절, 뇌, 심장, 간, 비장, 유리 체액, 신장, 췌장, 난소) 또는 기타 정상적 살균 부위를 포함한다. 침습성 질환을 특징화하는 임상학적 증상은 균혈증, 패혈, 세포염, 골수염, 심장 내막염, 폐혈 쇼크 등을 포함한다.

[0166] 면역원으로서 항원의 효과는, 증식 분석, 세포 용해 분석, 예를 들어 T 세포의 특이적 목표 세포를 용해하는 T 세포의 능력을 측정하는 크롬 방출 분석, 또는 혈청내 항원에 대해 특이적인 순환 항체의 수준을 측정함으로써 B 세포 활성화의 수준을 측정함으로써, 측정될 수 있다. 면역 반응은, 또한 항원의 투여에 뒤따라 유도된 항원 특이적 항체의 혈청 수준을 측정함으로써, 보다 구체적으로 본원에서 기술한 바와 같이, 특정 백혈구의 옅소닌의 식세포 능력의 개선을 유도하는 항체의 능력을 측정함으로써 검출될 수도 있다. 면역 반응의 보호 수준은, 투여된 항원으로 면역체계가 있는 호스트를 시험감염시킴으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응이 요구되는 항원이 박테리아인 경우, 면역원성 양의 항원에 의해 유도되는 보호 수준은, 박테리아 세포로 동물을 시험 감염시킨 후, 생존률 또는 사망률을 검출함으로써 측정된다. 하나의 실시양태에서, 보호량은, 박테리아 감염과 관련된 하나 이상의 징후, 예컨대 감염과 관련된 열을 측정함으로써 측정될 수 있다. 면역원성 조성물 또는 다 성분 또는 다중항원 백신에서의 각각의 항원은, 각각의 다른 성분들과 관련하여 변할 것이고, 당분야의 숙련자들에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 방법은, 면역원성 및/또는 생체내 효율을 측정하는 절차를 포함한다. 특정 실시양태에서, "약"은, 20% 이내, 바람직하게는 10% 이내, 보다 바람직하게는 5% 이내이다.

[0167] 본 발명은 추가로 본 발명의 면역원성 접합체 또는 혈청형 5 또는 8 헵막 다당류에 대해 특이적이고 선택적으로 결합하는 항체들 및 항체 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는, 본 발명에 따른 면역원성 접합체 또



는 혈청형 5 또는 8 협막 다당류를 대상에게 투여하면 발생한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은, 본 발명의 면역원성 접합체 또는 혈청형 5 또는 8 협막 다당류 중 하나 이상에 대항하는 정제되거나 단리된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 동물 효능 모델에서 또는 옹소닌의 식세포 살해 분석법에 의해 박테리아 살해에 의해 측정되는 바와 같은 기능을 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 대상에 수동 면역을 부여한다. 본 발명은, 당업계의 숙련자들에게 공지된 기법을 사용하여, 추가로 본 발명의 항체 또는 항체 분절을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분자, 및 본 발명의 항체 또는 항체 조성물을 제조하는 세포, 세포주(예를 들어, 항체의 재조합 제조를 위한 혼성 세포주 또는 기타 유전공학 세포) 또는 형질전환 동물을 제공한다.

[0168] 본 발명의 항체 또는 항체 조성물은, 대상내 포도상구균과 관련된 포도상구균성 감염, 질환 또는 증상을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용될 수 있으며, 상기 방법은 다클로성 또는 단일클론성 항체 제제를 발생시키고, 상기 항체 또는 항체 조성물을 사용하여 대상에 수동 면역을 부여함을 포함한다. 본 발명의 항체는, 진단 방법, 예컨대 CP5, CP8 또는 그의 접합체의 존재를 검출하거나 이들의 수준을 정량화하는데 유용할 수도 있다.

[0169] 당분야에 공지된 몇몇의 동물 모델은, 본원에서 기술한 임의의 하나의 면역원성 조성물의 효능을 평가하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들면 하기와 같다:

[0170] 수동 무린(murine) 패혈증 모델: 마우스는, 면역 IgG 또는 단일클론성 항체에 의해 복강내(i.p.)로 수동 면역 화시켰다. 24시간 후에 마우스는 치사량의 황색포도상구균으로 시험감염되었다. 박테리아의 시험감염은 정맥으로(i.v.) 또는 i.p.로 투여되어, 어떠한 생존도 박테리아와 항체의 특이적 생체내 상호작용 덕분임을 보장하였다. 박테리아 시험감염 투여량은, 면역체계가 없는 대조군 마우스의 약 20%가 패혈증으로 사망하게 하는데 요구되는 투여량으로 결정된다. 생존 연구의 통계학적 평가는, 카플란-마이어 분석법(Kaplan-Meier analysis)에 의해 수행될 수 있다.

[0171] 능동 면역 및 시험감염 모델: 이러한 모델에서, 마우스는, 제 0 주, 제 3 주 및 제 6 주에서(또는 당분야의 숙련자들에게 공지된 유사한 스케줄)에서 피하로(s.c.) 능동 면역화시키고, 정맥내 또는 복강내 경로로 제 8 주째(또는 당분야의 숙련자들에게 공지된 기타 유사한 스케줄)에 황색포도상구균으로 시험감염되었다. 박테리아 시험감염 투여량은, 14일 기간 동안 대조군 군에서 약 20%의 생존율을 달성하도록 보장한다. 생존 연구의 통계학적 평가는, 카플란-마이어 분석법에 의해 수행될 수 있다.

[0172] 수동 감염 심장 내막염 모델: 황색포도상구균에 의해 유발되는 감염 심장 내막염(IE)에 대한 수동 면역 모델은, 이전에는 CIfA가 보호성 면역을 유발할 수 있음을 나타내기 위해서 사용되어 왔다(문헌[Vernachio et al. (2006) Antmicro. Agents & Chemo. 50:511-518] 참조). 이러한 IE의 모델에서, 토끼 또는 래트가 중심 정맥 카테테르, 균혈증, 및 말단 기관으로의 혈행성 파종을 포함하는 임상학적 감염을 모의하기 위해서 사용되었다. 살균된 대동맥 판막 증식된 카테테르화 토끼 또는 래트에게 목표 항원에 대해 특이적인 단일클론성 또는 다클론성 항체의 정맥 주사를 1회 투여하였다. 24시간 후, 상기 동물들은 이중조직의 포도상구균성 균주 또는 MRSA 균주로 i.v.로 시험감염되었다. 그다음, 시험감염 후 48시간 경과시, 심장 판막 증식물, 신장 및 혈액을 수확하고 배양하였다. 그다음 심장 판막 증식물, 신장 및 혈액에서의 포도상구균성 감염 빈도를 측정하였다. 하나의 연구에서, 동물이 MRSE ATCC 35984 또는 MRSA PFESA0003 중 하나로 시험감염되는 경우, CIfA에 대한 단일클론성 항체 또는 다클론성 항체 제제 둘다를 사용하면 감염 속도의 유의한 감소가 관찰되었다(베라치오 등의 전술한 문헌을 참고한다)

[0173] 수동 감염 심장 내막염 모델: 감염 심장 내막염 모델은 능동 면역 연구를 위해 개조되기도 한다. 토끼 또는 래트는 목표 항원으로 근육내(i.m.)로 면역화시키고, 2주 후 i.v. 경로에 의해 황색포도상구균으로 시험감염시켰다.

[0174] 깔때기신장염 모델: 깔때기신장염 모델에서, 마우스는 제 0 주, 제 3 주 및 제 6 주에서(또는 당분야의 숙련자들에게 공지된 유사한 스케줄)에서 목표 항원으로 면역화시켰다. 제 8 주에, 예컨대  $1.7 \times 10^8$  cfu 황색포도상구균 PFESA0266의 i.p. 주사로 동물을 시험감염시켰다. 48 시간 후, 신장 및/또는 다른 조직들을 수확하고 배양하였다. 마지막으로, 시험감염 박테리아의 균락 형성 단위는, 신장 및/또는 다른 조직에서 결합되었다. 이러한 모델은 동물내 전신성 살포를 평가한다.

[0175] 옹소닌의 식세포 살해 분석법을 사용한 기능성 항체의 모니터링

[0176] 제조자의 프로토콜에 따라 림포라이트(LYPHOLYTE, 등록상표)-폴리 용액(세다레인 래보러토리즈 리미티드(Cedarlane laboratories limited), 캐나다 온타리오 소재)을 사용하여 도너 인간 혈액으로부터 단리된 세포주

(예를 들어, HL60) 또는 다핵형 세포(PMS)로부터의 분화 주효 세포를, 이 분석을 위해 사용할 수 있다. 주효 세포는 약  $2 \times 10^7$  세포/ml 농도로 분석 완충액(1% 소 혈청 알부민을 함유하는 개질된 이글 배지)에 재현탁하고, 사용을 위해 준비될 때까지 37℃의 배양기에 두었다. 황색포도상구균 균주 PFESA0266은, 트립틱 소이 아가 플레이트 상에서 밤새 성장시켰다. 박테리아 세포를 모아, 2회 세척하고, 약  $5 \times 10^8$  cfu/ml의 농도에 해당하는 OD<sub>600</sub> = 1까지 5% 글리세롤 함유 분석 완충제로 재현탁시켰다. 박테리아 현탁액의 1ml 액적을 얼리고, 사용할 준비가 될 때까지 -40℃에서 저장하였다. 얼린 박테리아 현탁액을 해동하여 분석 완충제에서  $10^6$  cfu/ml의 농도까지 조정하고 얼음 위에 놓았다. 살균 96 딥 웰 1ml 폴리프로필렌 플레이트를 사용하여 분석하였다. 항체 샘플(50μl)의 2배 계대 희석액을 준비하고, 그다음 항체 혼합물에 300μl의 분석 완충제를 첨가하였다. 박테리아(50μl)를 플레이트에 첨가하고, 30분 동안 4℃에서 회전식 셰이커에 놓아두었다. 50μl의 인간 보체(1% 최종 농도)를 첨가한 후, 옵손화 단계를 수행하였다. 마지막으로, 50μl의 주효 세포( $10^7$ 개 세포/ml 농도)를 상기 플레이트에 첨가하고, 반복되는 피펫팅으로 현탁액을 혼합하였다. 50μl 액적의 현탁액을, 살균 1% 사포닌 용액으로 10배 계대 희석시키고, 박테리아의 군집을 최소화하기 위해서 소용돌이형으로 젓고, 2쌍씩 트립틱 소이 아가에 플레이팅하였다. 분석 플레이트는, 로티세리 스타일 셰이커를 사용하여 연속적으로 혼합하면서 1시간 동안 37℃에서 항온처리하였다. 항온처리 끝에, 50μl 액적의 현탁액을 살균 1% 사포닌 용액으로 10배 계대 희석하고, 소용돌이에 의해 혼합하여 박테리아 군집을 최소화하고, 2쌍씩 트립틱 소이 아가에 플레이팅하였다. 살해율은, 항체가 결핍되었지만 박테리아, 보체 및 주효 세포를 함유하는 튜브에서 생존하는 cfu의 개수에 대한, 박테리아, 항체, 보체 및 주효 세포를 갖는 웰에서 60분 경과시 생존하는 cfu의 개수의 비를 측정함으로써 계산하였다. 박테리아, 보체 및 혈청을 함유하는 대조군은, 군집으로 인한 cfu의 임의의 감소를 조정하기 위해서 포함되었다.

[0177] 보체 흡착

[0178] 황색포도상구균 균주들인 PFESA0266, PFESA0286 및 PFESA0270에 흡착된 인간 도너로부터의 혈청은, 분석의 보체 공급원으로서 사용될 수 있다. 황색포도상구균 균주를 37℃에서 TSA 플레이트에서 밤새 성장시켰다. 상기 플레이트로부터 세포를 모아 살균 PBS에서 재현탁시켰다. 박테리아 세포를, 4℃에서 10분 동안 10,000 rpm으로 원심분리하고, 세포 펠렛을 흡착을 위한 인간 혈청에 재현탁시켰다. 30분 동안 4℃에서 뉴테이터(nutator) 상에서 혈청을 박테리아와 함께 항온처리하였다. 세포를 원심분리하고, 혈청을 박테리아를 함유하는 다른 튜브로 옮기고, 흡착 단계를 30분 동안 반복하였다. 마지막으로, 세포를 원심분리하고, 혈청을 0.2μm 필터를 통과시킨 후, 액체 질소하에서 0.5ml의 액적을 냉동시켰다.

[0179] 방법 II - HL-60 세포를 사용하는 OPA

[0180] HL-60 세포를, 문헌[S. Romero-Steiner, et al., Clin Diagn Lab Immunol 4 (4) (1997), pp. 415-422]에 따라 분화시켰다. 수확된 HL-60 세포를 약  $10^8$ 개의 세포/ml로 분석 완충제(1% 소 혈청 알부민을 함유하는 개질된 이글스 배지)에 재현탁시키고 사용할 준비가 될 때까지 37℃의 배양기에 두었다. 황색포도상구균 균주는, 트립틱 소이 아가 플레이트 상에서 밤새 성장시켰다. 박테리아 세포를 모아, 2회 세척하고, 약  $5 \times 10^8$  cfu/ml의 농도에 해당하는 OD<sub>600</sub> = 1까지 5% 글리세롤 함유 분석 완충제에 재현탁시켰다. 박테리아 현탁액의 1ml 액적을 얼리고, 사용할 준비가 될 때까지 -40℃에서 저장하였다. 얼린 박테리아 현탁액을 해동하여 분석 완충제에서  $10^6$  cfu/ml의 농도까지 조정하고 얼음 위에 놓았다. 살균 96 딥 웰 1ml 폴리프로필렌 플레이트를 사용하여 분석하였다. 단일클론성 항체 샘플(25μl) 2배 계대 희석액을 준비하고, 그다음 항체 현탁액에 150μl의 분석 완충제를 첨가하였다. 박테리아(25μl)를 플레이트에 첨가하고, 30분 동안 4℃에서 회전식 셰이커에 놓아두고, 그다음 25μl의 인간 보체(1% 최종 농도)를 첨가하였다. 마지막으로, 25μl의 HL-60 세포( $10^7$ 개 세포/ml 농도)를 상기 플레이트에 첨가하고, 반복되는 피펫팅으로 현탁액을 혼합하였다. 25μl 액적의 현탁액을, 살균 1% 사포닌 용액으로 10배 계대 희석시키고, 박테리아의 군집을 최소화하기 위해서 소용돌이형으로 젓고, 2쌍씩 트립틱 소이 아가에 플레이팅하였다. 분석 플레이트는, 로티세리 스타일 셰이커를 사용하여 연속적으로 혼합하면서 1시간 동안 37℃에서 항온처리하였다. 항온처리 끝에, 25μl 액적의 현탁액을 살균 1% 사포닌 용액으로 10배 계대 희석하고, 소용돌이에 의해 혼합하고, 2쌍씩 트립틱 소이 아가에 플레이팅하였다. 살해율은, 항체가 결핍되었지만 박테리아, 보체 및 HL-60 세포를 함유하는 튜브에서 생존하는 cfu의 개수에 대한, 박테리아, 항체, 보체 및 HL-60 세포를 갖는 웰에서 60분 경과시 생존하는 cfu의 개수의 비를 측정함으로써 계산할 수 있다. 박테리

아, 보체 및 mAb를 함유하는 대조군은, 군집으로 인한 cfu의 임의의 감소를 조정하기 위해서 포함되었다.

[0181] 하기 실시예는 설명을 위해 제공된 것으로 한정하기 위한 것은 아니다.

[0182] 실시예

[0183] 실시예 1: 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류의 제조

[0184] 이 실시예에는, 다양한 크기 범위의 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류의 제조가 기술되어 있다. 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류 반복 단위의 구조는 도 1에 도시되어 있다. 본원에서 기술한 방법은, 분자량이 약 20 kDa 내지 700 kDa인 혈청형 8 협막 다당류를 제조하는데 효과적이다. 조건을 적당하게 선택함으로써, 50 kDa 내지 700 kDa의 분자량으로 고분자량의 혈청형 8 협막 다당류를 분리 및 정제하였다. 면역원성 조성물에서의 사용을 위해서는, 70 kDa 내지 300 kDa 및 많은 바람직한 범위의 분자량으로 혈청형 8 협막 다당류를 분리 및 정제시킨다. 제조된 협막의 성장 특징들 및 품질에 기초하여, 혈청형 8 협막 다당류를 제조하기 위해서 균주 PFESA0005 또는 PFESA0286를 사용하였다. 균주 PFESA0005 또는 PFESA0286로부터 분리된 협막은 동일한 것으로 나타났다.

[0185] 혈청형 8 협막 다당류의 제조를 위해, 균주는, 탄소 공급원(락토스 또는 수크로스), 질소 공급원인 가수분해된 콩가루 및 미량의 금속으로 주로 구성된 복합 배지에서 성장시켰다. 균주는 2 내지 5일 동안 바이오리액터(bioreactor)에서 성장시켰다.

[0186] 오토클레이빙 이전에, 샘플을 회수하여 배양액내 포도상구균성 엔테로톡신 B(SEB)의 수준을 시험하였다. 0.05% 폴리소르베이트 80의 존재시, 발효액내 SEB의 농도는 15 내지 20 ng/ml이었다. 이전의 시험은, 1시간 동안의 배양액의 오토클레이빙이 SEB의 수준을 0.1 ng/ml 미만(텍트라(TECRA) 키트에 대한 검출 한계치임)으로 낮추는 것을 나타냈다.

[0187] 정용여과된 에탄올-분획화 다당류를 Q-세파로스(Q-Sepharose) AEC 컬럼에 놓고 앞에서 기술한 바와 같이 NaCl의 선형 구배로 용리시켰다. 분획들은 O-아세틸 분석법, 혈청형 5 다당류의 존재에 대한 이중 면역확산 시험, 및 테이코산(TA)의 존재에 대한 포스페이트 분석에 의해 분석하였다. 혈청형 8 다당류의 존재는, 제 35 내지 제 95의 분획에서 검출되었다(도 2a 및 도 2b 참조).

[0188] 테이코산으로 인한 오염을 줄이기 위해서, 제 35 내지 제 75의 분획을 모아, 나트륨 메타-페리오데이트로 임의의 잔류 테이코산을 산화시켜 증류 H<sub>2</sub>O에 대한 3K 정용여과에 의해 이를 제거하였다.

[0189] 접합체의 제조를 위해 사용되는 혈청형 8 협막 다당류의 정제는, 다당류의 분자량을 줄이고 세포로부터 협막을 방출시키기 위해서 승온된 온도 및 낮은 pH에 좌우되는 2개의 상이한 방법에 의해 수행되었다. 생성된 분자량은, 가수분해 단계의 시간, 온도 및 pH에 좌우된다.

[0190] 혈청형 8 협막 다당류의 특성화는 하기 표 1에서 구체화한 기법을 사용하여 수행하였다.

**표 1**

[0191] 정제된 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류에 대한 특성 분석

특이성	분석
잔류 단백질	로우리(Lowry) 비색 분석
잔류 핵산	260nm 스캔
잔류 테이코산	포스페이트 비색 분석
잔류 펩티도글리칸	HPAEC-PAD
크기	SEC-MALLS
조성	HPAEC-PAD
확인	<sup>1</sup> H-NMR 또는 특이적 mAb와의 반응
O-아세틸화	<sup>1</sup> H-NMR
농도	MALLS-RI 또는 HPAEC-PAD

[0192] 후술하는 방법에 의해 제조된 협막 다당류는, 낮은 수준의 단백질, 핵산, 펩티도글리칸 및 테이코산 오염을 갖는 순수하고 잘 특성화된 다당류를 발생시킨다.

[0193] 제 1 방법에서, 세포로부터의 협막 다당류의 방출 및 분자량 감소 후, 제제를 효소(예컨대, 리보뉴클레아제, 데

옥시리보뉴클레아제, 리보자임 및 프로테아제)의 각테일로 처리하여 불순물을 소화시켰다. 항온처리 후, 잔류 불순물은 에탄올을 첨가하여(최종 농도 약 25%) 침전시켰다. 잔류 에탄올을 제거한 후, 협막 다당류를 함유하는 용액을 음이온 교환 컬럼(Q-세파로스)에 담지하고, 선형 염 구배로 용리시켰다. 협막 다당류를 함유하는 분획을 모아 나트륨 메타-페리오테이트로 처리하였다. 이러한 처리의 결과, 잔류 테이코산 오염물은 산화 가수분해되었지만, 혈청형 8 협막 다당류에는 영향을 미치지 않았다. 에틸렌 글리콜을 첨가하여 반응물을 급랭시켰다. 물질을 농축시키고, dH<sub>2</sub>O에 대해 정용여과하여 임의의 잔류 시약 및 부산물을 제거하였다.

[0194] 제 2 방법은, 다양한 세포 유도된 불순물을 소화시키기 위해 효소를 사용하지 않으면서 협막 다당류를 제조하기 위해서 사용되었다. 이러한 방법에서, 세포로부터의 협막 다당류의 방출 및 분자량 감소 후, 가수분해된 발효즙을 미량 여과에 의해 정제한 후, 한외여과 및 정용여과하였다. 상기 용액을 활성탄으로 처리하여 불순물을 제거하였다. 탄소 처리 후, 상기 물질을 나트륨 메타-페리오레이트로 처리하여 잔류 테이코산을 산화시킨 후, 프로필렌 글리콜로 급랭시켰다. 상기 물질을 농축시키고 dH<sub>2</sub>O에 대해 정용여과시켜 임의의 잔류 시약 및 부산물을 제거하였다.

[0195] 양쪽 방법을 사용한 제조로, 낮은 수준의 단백질, 핵산 및 테이코산 오염을 갖는 순수한 협막 다당류가 수득되었다. 기술된 방법을 사용하여, 가수분해 상태를 변화시킴으로써 특정 범위의 목적하는 고분자량의 다당류를 제조하였다. 본원에서 기술한 방법에 의해 수득가능한 협막 다당류의 예는, 하기 표 2에 나타났다. 정제된 혈청형 8 협막 다당류의 배치는, 테이코산(TA), 펩티도글리칸이 없고 잔류 단백질이 낮다는 점에 의해 입증되는 바와 같이 높은 순도를 가졌다(표 2 참조). 낮은 분자량 범위는 20.4 kDa 내지 65.1 kDa에 걸쳐져 있고, 정제된 다당류는 고도로 0-아세틸화되어 있었다(약 100%). 핵산 오염의 수준은 낮았다(0.12 내지 2.45%).

## 표 2

[0196] 혈청형 8 협막 다당류 제제의 특성

샘플	정제된 총 CP8 mg	MW (kDa) (g/몰)	단백질 (로우리) % (w/w)	핵산 (260 nm 스캔) % (w/w)	0-아세틸 NMR %
1	310	27.0	1.2	0.94	100
2	438	29.0	2.4	2	100
3	179	20.4	0.37	0.12	108

[0197] 협막 다당류의 분자량 선택: 운동학적 분석은, 넓은 범위 분자량의 협막 다당류가 본원에서 기술한 방법에 의해 발생할 수 있음을 입증하였다. 먼저, 보다 큰 다당류는 박테리아 세포에 의해 제조되고, 그다음 목적하는 분자량 범위를 선택하고, 그다음 열 및 가수분해 단계의 pH 및 열 조건의 조작에 의해 정제되었다.

[0198] 황색포도상구균 발효즙의 열 처리는, 발효와 협막 다당류 회수 사이의 공정 단계이다. 이 공정 단계는, 구체화된 기간 동안 pH-조절된 발효즙을 처리하기 위해 열을 사용한다. 낮은 pH에서의 열 처리의 목적은, 세포를 죽이고, 엔테로톡신을 비활성화시키고, 다당류 결합 세포를 방출하고, 분자량을 목적하는 크기까지 줄이는 것이다. 이러한 목적 중에서, 분자량 감소는, 이러한 단계에서 요구되는 가공 시간의 측면에서 가장 느리다. 따라서, 다른 목적들이, 고려되는 처리 시간 내에서 필연적으로 달성되었다.

[0199] 열 처리: 다양한 분자량 범위의 협막 다당류를 선택하기 위한 pH 및 온도 조건을 결정하였다. 이러한 연구를 위해서 15L들의 바이오파이트(Biolafitte) 발효통을 사용하였다. 연동 펌프를 사용하여 발효즙을 발효통으로 옮겼다. 약 200 rpm의 진탕 속도를 사용하여, 농축된 황산을 사용하여 발효즙의 pH를 조절하였다. 그다음, 발효즙의 온도를 설정 값으로 올렸다. 온도가 설정 값에 도달하자마자 열 처리 시간을 개시하였다. 목적하는 처리 시간에 도달하면, 발효즙을 상온으로 냉각시켰다. 공정 중(in-process)의 샘플을 취해서, HPLC 및 SEC-MALLS 시스템에 의해 각각 다당류 농도 및 분자량을 측정하였다. 분자량(MW) 데이터는, 동력학적 분석에서 사용하였다. pH 3.5, 4.0 및 5.0에서 시간 경과에 따라 MW 프로파일을 측정하였다(도 3a 참조)

[0200] 다당류의 약산(mild acid) 가수분해의 동력학은, 상기 방법으로부터 수득된 정제된 혈청형 8 협막 다당류를 사용하여 수행하였다. 정제된 다당류 용액은, 황산-사용 시험을 위해 목적하는 pH까지 조절하였다. 약 1.5 mL의 용액을 각각의 15mL 원심형 튜브에 옮겼다. 정밀 온도 제어 시스템을 갖춘 오일욕에 상기 튜브를 넣었다. 상기 튜브는 예정된 시간 간격 후 꺼내서 얼음통에서 급랭시켰다. 시험 끝에, 1M 트리스 완충제(pH 7.5)의 액적을 이 샘플에 첨가하여 pH를 다시 약 7로 조정하였다. 샘플은 SEC-MALLS 시스템에 의해 분석하였다. 동력학적



분석에서 MW 데이터를 사용하였다. pH 3.5에서의 CP8의 MW 프로파일에 대한 온도 효과를 시간 경과에 따라 측정하였다(도 3b 참조).

[0201] 결과

[0202] 도 3a에서 나타난 바와 같이, 다당류의 분자량을 감소시키기 위해서 낮은 pH가 보다 효과적이다. 15분 내지 120분 동안 95℃에서 pH 5를 사용하면, 300 kDa 내지 600 kDa 사이의 분자량이 발생할 수 있다. 유사하게, 250 kDa 내지 450 kDa의 분자량은, 15분 내지 120분 사이 동안 95℃에서 pH 4를 사용하여 발생할 수 있다. 게다가, 120 kDa 내지 450 kDa의 분자량은, 15분 내지 120분 사이 동안 95℃에서 3.5의 pH를 사용하여 발생할 수 있다.

[0203] 도 3b에서 나타난 바와 같이, 온도가 높을수록, 시간 경과에 따라 보다 빠른 가수분해 속도 및 보다 넓은 다당류의 분자량 범위가 수득된다. 동일한 pH에서 95℃에 비해 낮은 온도인 55℃를 사용하면, 보다 좁은 범위의 다당류 분자량이 형성된다.

[0204] 추가로, 도 4는 약산(95℃에서 pH 3.5) 가수분해를 위한 처리 시간과 정제된 CP8의 분자량 사이의 상관관계를 입증한다. 정제된 다당류는 이전에 기술된 회수 공정으로부터 수득된 최종 생성물이다. 도 4에서 도시한 바와 같이, pH 3.5에서 황색포도상구균 PFESA0005 균주의 열 처리 시간이 증가하면, 결과적으로 분자량이 작아지는 반면, pH 3.5에서의 열 처리 시간이 짧아지면, 결과적으로 CP8의 보다 높은 분자량이 수득된다. 혈청형 8 헤파 다당류의 크기는, pH 3.5에서의 열 처리의 시간 길이에 따라 약 80 kDa 내지 약 220 kDa의 범위이다. 도 4에서 도시한 바와 같이 정제된 CP8의 크기 및 낮은 pH에서의 열 처리 시간 사이의 연관성은 구체적인 범위의 분자량을 갖는 정제된 다당류의 제조에 요구되는 처리 시간을 추정하는 것을 허용한다.

[0205] 앞에서 입증한 바와 같이, 20 kDa 내지 500 kDa 초과의 전범위의 분자량의 혈청형 8 헤파 다당류가 제조되고, 방출되고, 정제될 수 있음에 주목하는 것이 중요하다. 따라서, 상기 방법은, 예를 들어 표 3에서 나타난 바와 같이 특정 범위의 목적하는 고분자량의 헤파 다당류를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. 피크 분자량의 범위가 87 kDa 내지 108 kDa인, 제조된 비교적 좁은 분자량의 다당류는, 본원에서 기술한 방법에 의해 수득될 수 있는, 잘 특성화된 범위의 분자량을 나타낸다. 70 kDa 내지 300 kDa 또는 70 kDa 내지 150 kDa의 범위인 특히 유리한 범위의 고분자량의 다당류는, 담체 분자 또는 단백질에 헤파 다당류를 접합함으로써 면역원성 조성물의 제조에 유용하다(표 3 참조). 약 85 내지 120 kDa의 분자량을 갖는 CP8 헤파 다당류를 발생시키는데 사용되는 조건은, 하기와 같다: 300 분 동안 95℃, pH 3.5.

### 표 3

[0206] 특정 범위의 고분자량의 혈청형 8 헤파 다당류의 제조

수행번호	혈청형 8 헤파 다당류 MW (kDa)
1	98
2	89
3	108
4	108
5	89
6	100
1	99
2	113
3	105
4	100
5	87

[0207] 실시예 2: 혈청형 8 헤파 다당류의 CRM<sub>197</sub>로의 접합

[0208] 본 실시예는, 황색포도상구균 혈청형 8 헤파 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체의 제조에 사용되는 공정 및 특성 분석을 기재한다. 상기 운반 단백질에 황색포도상구균 혈청형 8 헤파 다당류를 접합하기 위한 상이한 접합 화학이 개발되었다. 예를 들어, PDPH(3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라지드)를 사용하는 접합은, 결과적으로 CP와 운반 단백질 사이의 공유 티오에테르를 유발한다. 다르게는, CDI/CDT(1,1-카보일-다이이미다졸/1,1-카보일-다이-1,2,4-트리아졸)를 사용하는 접합은, CP와 운반 단백질 사이의 하나의 탄소 또는 0개의 탄소 연결기를 유

받는다.

[0209] PDPH 접합 화학에 의한 CRM<sub>197</sub>로의 혈청형 8 협막 다당류의 접합

[0210] PDPH 접합 화학은, 다당류의 활성화, 티올 보호기의 제거, 활성화된 다당류 중간체의 정제, CRM<sub>197</sub> 단백질의 활성화와 정제, 및 활성화된 성분의 접합과 정제를 포함하는 다단계 공정이다. 티올기-함유 연결기를 다당류에, 할로아세틸 기를 CRM<sub>197</sub> 단백질 담체에 도입한 후, 티오에터 결합을 통해 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류를 단백질 담체에 결합하였다. 브롬산의 N-하이드록시숙신이미드 에스터와 아민기를 반응시킴으로써 브로모아세틸 기를 CRM<sub>197</sub> 단백질에 도입하였다. 티올화된 다당류를 발생시키기 위해서, 다당류내 N-아세틸만노스아미노 우론산의 카보다이이미드 활성화된 카복실레이트를, 설프하이드릴-반응성 하이드라지드 헤테로이작용성 연결기인 3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라지드(PDPH)의 하이드라지드 기에 결합하였다. DTT에 의해 환원되고 세파텍스 G25 컬럼에 의해 정제된, PDPH-티올화 다당류의 티올은, 활성화된 단백질의 브로모아세틸기와 반응하여, 다당류와 운반 단백질 사이의 브롬 치환에 의해 형성된 티오에터 결합이 생성되었다. 미반응된 브로모아세틸 기는, 시스트아민 하이드로클로라이드(2-아미노에탄티올 하이드로클로라이드)로 "캡핑"되었다. 그다음, 반응 혼합물을 농축시키고 정용여과시켰다. 나머지 미접합된 브로모아세틸기는, 시스트아민 하이드로클로라이드로 캡핑시켜, 접합 후 어떠한 반응성 브로모아세틸기도 잔류하지 않는 것을 보장하였다. 이것은, 브롬의 치환 후, 리신 잔기 상의 아세틸 기와 시스트아민의 티올 말단 사이의 공유 결합을 형성하였다.

[0211] 1. PDPH에 의한 황색포도상구균 혈청형 8 협막 다당류의 티올화: 다당류를, 먼저 PDPH에 의한 티올화로 활성화시켰다. 다당류는, 혈청형 8 협막 다당류의 경우, 1:0.6:1.25의 다당류:PDPH:EDAC 중량비를 유지하면서 새롭게 제조된 PDPH 스택 용액(DMSO내 250 mg/mL), EDAC 스택 용액(증류 H<sub>2</sub>O내 90 mg/mL), 및 MES 완충제 스택 용액(0.5M, pH 4.85)과 혼합하여, 0.1M MES 및 2 µg 및 4 µg의 다당류/ml의 최종 용액을 제조하였다. 상기 혼합물을 상온에서 1시간 동안 항온처리하고 그다음 4℃ 내지 8℃의 사이에서 3500 MWCO 투석 장치를 사용하여 4시간 동안 증류 H<sub>2</sub>O의 1000배 체적에 대해 투석하여 미반응된 PDPH를 제거하였다. PDPH-결합된 다당류는 0.2 M DTT로 제조하고, 4℃ 내지 8℃ 사이에서 밤새 3시간 동안 상온에서 항온처리하였다. 과량의 DTT 뿐만 아니라 반응의 부산물을, 세파텍스 G25 수지 및 이동상으로서 증류수를 사용하는 SEC에 의해 활성화된 다당류로부터 분리하였다. 티올기에 대한 DTDP 분석에 의해 분획물을 분석하고, 컬럼의 허공용적(void volume) 근처에서 용리되는 티올-양성 분획물을 모았다. 모든 분석물을 PAHBAH 및 O-아세틸 분석으로 분석하여, 티올기를 함유하는 반복 단위의 몰%(티올의 몰 농도/반복 단위의 몰 농도)로서 표현된 활성화도를 측정하였다. 활성화된 다당류를 동결건조하고 접합을 위해 요구될 때까지 25℃에서 저장하였다.

[0212] PDPH에 의한 혈청형 8 다당류 티올화의 재현성으로부터의 결과는 표 4에 나타났다. 혈청형 8 다당류의 활성화도는 12% 내지 16%의 범위이고, 이는 약 10개의 협막 다당류 반복 단위 당 부착된 하나의 연결기 분자 내지 5개의 반복 단위당 부착된 하나의 연결기 분자에 해당한다.

#### 표 4

[0213] PDPH에 의한 혈청형 8 협막 다당류의 활성화 - 재현성 연구

혈청형 8 다당류-PDPH	활성화(% M <sub>SH</sub> /M <sub>RU</sub> )	규모 mg	수율 mg (% , w/w)
1	14	36	30 (83)
2	16	30	27 (91)
4	16	38	42 (110)
5	12	40	44 (110)

[0214] 2. 운반 단백질 활성화: 개별적으로, 운반 단백질이 브로모아세틸화에 의해 활성화되었다. 10 mM 포스페이트 완충작용 0.9% NaCl pH 7(PBS)로 CRM<sub>197</sub>를 5 mg/mL까지 희석하고, 그다음 1M 스택 용액을 사용하여 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 7.0를 만들었다. 브로모아세트산의 N-하이드록시숙신이미드 에스터(BAANS)를, 20 mg/mL DMSO의 BAANS 스택 용액을 사용하여 1:0.25(w:w)의 CRM<sub>197</sub>:BAANS 비로 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 1시간 동안 4 내지 8℃에서 항온처리하고, 그다음 세파텍스 G25 상의 SEC를 사용하여 정제하였다. 정제되고 활성화된 CRM<sub>197</sub>은 로우리 분석으로 분석하여 단백질 농도를 측정하고, 그다음 PBS로 5 mg/mL까지 희석하였다. 수크로스를 저온보호물질로서 5% wt/vol로 첨가하고, 활성화된 단백질을 얼리고 접합을 위해 사용될 때까지 -25℃에서

저장하였다.

[0215] CRM<sub>197</sub>의 리신 잔기의 브로모 아세틸화는 매우 일관되어서, 유용한 39개의 리신으로부터 19 내지 25개의 리신의 활성화를 유발하였다(표 5 참조). 이 반응은 활성화된 단백질의 높은 수율을 제조하였다.

표 5

[0216] CRM<sub>197</sub>의 브로모 아세틸화도 및 그의 수율

제제	활성화된 리신 (n=)	규모 (mg)	수율 (% w/w)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

[0217] 3. 커플링 반응: 일단 활성화된 헵막 다당류 및 활성화된 운반 단백질이 제조되면, 이 둘을 접합 반응에서 조합하였다. 동결건조되고 티올화된 다당류를 pH 8.95의 0.16M 보레이트에 용해시키고, 해동된 브로모아세틸화된 CRM<sub>197</sub> 및 증류수와 혼합하여, 0.1M 보레이트, 1:1 wt/wt 비의 CRM<sub>197</sub>:다당류, 및 1 mg/mL 다당류의 최종 용액을 수득하였다. 이 혼합물을 16 내지 24시간 동안 상온에서 항온처리하였다. 단백질 상의 미반응된 브로모아세틸기는, pH 8.95의 0.1M 보레이트에 용해된 시스트아민의 135 mg/mL 스탁 용액을 사용하여 1:2(wt/wt)의 CRM<sub>197</sub>:시스트아민의 비로 시스트아민 하이드로클로라이드를 첨가하여 캡핑되고, 상온에서 4시간 동안 항온처리하였다. 헵막 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체(접합체)는 100K 폴리에터설폰 한외여과기를 사용하여 0.9% NaCl에 대해 50배로 투석함으로써 정제하였다.

[0218] PDPH에 의한 혈청형 8 헵막 다당류 티올화 재현성에 관한 연구로부터의 결과는, 다당류의 활성화도는 12 내지 16 %의 범위이고, 이는 약 10개의 다당류 반복 단위 당 부착된 하나의 연결기 분자 내지 5개의 반복 단위 당 하나의 연결기 분자에 해당한다.

[0219] CDI/CDT 접합 화학에 의한 CRM<sub>197</sub>에 대한 혈청형 8 헵막 다당류의 접합

[0220] CDI 및 CDT는, 무수 환경(DMSO)에서 다당류가 활성화되어 유용한 하이드록실기를 갖는 이미다졸 또는 트라이아졸 카바메이트 잔기 및 카복실산을 갖는 아실이미다졸 또는 아실트라이아졸 잔기를 형성하는 1단계 접합 방법을 제공한다. (DMSO에) 단백질 담체를 첨가하면, 이미다졸 또는 트라이아졸의 리신에 의한 친핵성 치환 및 (활성화된 하이드록실기에 대한) 카바메이트 결합 및 (활성화된 카복실 산에 대한) 아마이드 결합의 형성을 유도한다.

[0221] CDI 및 CDT 접합 화학은, 운반 단백질에 공유 결합된 혈청형 8 헵막 다당류를 제공하는데, 이는, 글리콜알데하이드 캡핑 또는 시스트아민 하이드로클로라이드 캡핑 접합체의 아미노산 분석에 의해 및 크기 배제 크로마토그래피로부터의 분획내 다당류 및 단백질의 존재에 의해 확인되었다.

[0222] 20 kDa 내지 40 kDa의 범위의 다당류 크기를 갖는 헵막 혈청형 8에 대한 PDPH 및 CDI/CDT 화학 둘다에 의해 제조된 여러 묶음의 접합체의 제조로부터의 결과의 요약은 하기 표 6에 나타났다. 유리 헵막 다당류, 다당류:단백질의 비율 및 이러한 2가지의 접합 방법에 의해 발생된 접합체의 수율 사이에는 어떠한 유의적인 차이도 없었다. 접합된 혈청형 8 헵막 다당류의 항원성은, 접합체와 천연 다당류 사이의 확인 침전소 라인으로 나타내는 바와 같이 접합에 의해 변하지 않았다.

표 6

[0223]

2개의 접합 화학에 의해 제조된 혈청형 8 헤파막 다당류-CRM<sub>197</sub>의 특성화

화학	CP 수율(%)	단백질 수율 (%)	출력 비	유리 당 (%)	유리 단백질 (%)	개질된 리신	크기(MW 또는 Kd(% < 0.3), sacc/프룻))
CDI/CDT	46-62	54-55	0.8-0.9	22-25	< 1	7-8	34/57 내지 60/57
PDPH	34-70	61-83	0.6-0.9	15-41	ND	11-16	74-92%

[0224]

앞서 살펴본 바와 같이, 본원에서 기술한 방법은 특정 범위의 목적하는 고분자량의 헤파막 다당류를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. 본 발명자들은 면역원성 조성물에서 사용하기 위한 여과되고 정제된 혈청형 8 헤파막 다당류일 수 있는 미리-선택된 범위의 고분자량의 접합체를 제조하고자 하였다. 표 7은, 약 80 kDa 내지 120 kDa의 분자량 범위의 혈청형 8 헤파막 다당류 및 이미다졸 접합 화학이 사용되는, 혈청형 8 헤파막 다당류 접합체의 분석을 요약하였다. 제조된 접합체의 분자량의 범위는 595 kDa 내지 1708 kDa이다. CRM<sub>197</sub> 당 접합된 리신의 개수는 최대 9, 최소 3의 범위였다. 유리 헤파막 다당류의 범위는 최대 6% 내지 최소 2%였다.

표 7

[0225]

미리-선택된 분자량 범위를 갖는 혈청형 8 헤파막 다당류의 접합체

수행번호	폴리 MW (kDa)	수율 (%)	유리 다당류 (%)	SEC-MALL에 의한 MW(kDa)	개질된 리신
1	99	88	6	943	4
2	113	73	5	841	3
3	105	79	3	719	7
4	100	86	2	630	9
5	87	90	3	595	6

[0226]

두가지 모두의 접합 화학은, 운반 단백질에 공유 결합된 혈청형 8 헤파막 다당류를 형성한다. 이러한 2가지 방법에 의해 발생된 접합체의, 유리 헤파막 다당류, 혈청형 8 헤파막 다당류:단백질의 비, 및 접합체의 수율 사이에는 어떠한 유의한 차이도 없다.

[0227]

실시예 3: 원-포트(one pot) 대 복합 CDI/CDT 방법

[0228]

전술한 바와 같이, 본 발명의 면역원성 접합체의 제조 방법은, CDI(1,1-카보닐다이이미다졸), CDT(1,1-카보닐다이-1,2,4-트리아졸) 또는 PDPH(3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라이드)를 포함하는 접합 화학을 사용하여 운반 단백질과 헤파막 다당류를 공유 접합함을 포함한다. CDI/CDT를 사용하면, 결과적으로 헤파막 다당류와 운반 단백질 사이에 하나의 탄소 또는 0개의 탄소 연결기를 형성하는 반면, PDPH를 사용하면 헤파막 다당류와 운반 단백질 사이에 공유 티오에터 결합을 형성한다.

[0229]

PDPH-기반 방법은 다당류의 활성화, 다당류 상의 티올 보호기의 제거, 활성화된 다당류 중간체의 정제, 단백질 담체의 활성화와 정제, 및 활성화된 성분들의 접합과 그 이후의 정제를 포함하는 다단계 방법이다. 이러한 방법에서, 황색포도상구균 혈청형 8 헤파막 다당류는, 수용액(예를 들어, 0.1M MES)에서 PDPH 및 카보다이이미드와 반응하여 PDPH-결합된 다당류를 제조한다. PDPH-결합된 다당류는 환원제와 반응하여 활성화된 다당류를 제조하고, 이는 그다음 정제된다. 운반 단백질은, 수용액내 브로모아세트산 N-하이드록시숙신이미드 에스터와 반응시켜, 활성화된 운반 단백질을 제조하고, 그다음 이를 정제시킨다. 그다음, 정제되고 활성화된 혈청형 8 다당류를 정제되고 활성화된 운반 단백질과 반응시켜, 혈청형 8 다당류:운반 단백질 접합체를 제조한다.

[0230]

대조적으로, CDI- 및 CDT-기반 방법은, 헤파막 다당류가 무수 환경(즉, DMSO)에서 활성화되어 유용한 하이드록실 및 아실이미다졸을 갖는 이미다졸 또는 트리아졸 카바메이트 잔기, 또는 카복실산을 갖는 아실트리아졸 잔기를 형성하는, 하나 또는 2개의 단계의 접합 방법이다. (DMSO에서) 단백질 담체의 추가는, 리신에 의한 이미다졸 또는 트리아졸의 친핵성 치환 및 카바메이트 결합(활성화된 하이드록실의 경우) 및 아마이드 결합(활성화된 카복실산의 경우)을 형성한다. 따라서, 2개의 CDI- 또는 CDT-기반 방법이 개발되었다: 보다 복잡한 방법 및 보다 간단한 원-포트 방법. 보다 복잡한 방법에서, 황색포도상구균 혈청형 8 헤파막 다당류는 이미다졸 또는 트리아졸과 제형화되고, 동결건조되고, 그다음 유기 용매(예를 들어 DMSO)에서 CDI 또는 CDT와 반응하여 활성화된 혈청형 8 다당류를 제조한다. 활성화된 혈청형 8 다당류는 정제되고, 그다음 유기 용매에서 담체 다당류



와 반응하여 혈청형 8 다당류-운반 단백질 접합체를 제조한다. 원-포트 방법은, 운반 단백질의 반응 이전에 활성화된 혈청형 8 다당류가 정제되지 않는다는 점을 제외하고는 복합 방법과 유사하다.

[0231] CDI/CDT 복합 방법

[0232] 다당류의 활성화: 혈청형 8 다당류를 10g의 트라이아졸/혈청형 8(g)과 혼합하고 동결건조시켰다. 제조된 덩어리를, 2.0 mg 혈청형 8 다당류/mL로 DMSO에 용해시켰다. 물 함량을 측정하였다. DMSO내 100 mg/mL로 CDT의 새롭게 제조된 스택 용액을 첨가하여 물과 동등한 CDT의 몰량이 달성되었다. 다르게는, 첨가된 CDT의 양은, 보다 높은 정도 또는 낮은 정도의 활성화를 달성하기 위해서 조절될 수 있다. 이는, 23℃에서 30분 동안 유지하였다.

[0233] 활성화된 혈청형 8 다당류의 정제: 활성화된 혈청형 8(ACP8)의 용액을 25용적의 물에 부어서 과량의 CDT를 파괴하였다. 이것을 약  $1 \text{ mg/cm}^2$ 에서 10 kDa PES 막 위에서 그의 원래 체적으로 농축시키고, 적어도 10체적에 대해 물에 대해 정용여과시켰다. 이 단계는 4 미만의 시간에서 완료되었다. 정용여과된 물질을 10 g 트라이아졸/원 혈청형 8 다당류(g)와 혼합하고 동결건조시켰다.

[0234] 동결건조된 CRM의 제조: CRM은, 적어도 10 체적에 대해 10 kDa PES 막 위에서 일정한 체적으로 0.4% NaCl/5% 수크로스에 대해 정용여과하였다. 단백질을 농도를 측정하고, 충분한 정용여과 완충제를 첨가하여 단백질을 5.0 g/L로 만들고, 0.8인 NaCl/CRM의 w/w 비가 제공된다. CRM가 동결건조되었다.

[0235] 접합: 활성화되고 정용여과된 혈청형 8 다당류를 1 mg/mL로 DMSO에 용해시켰다. 100mM의 보레이트 용액을 첨가하여 2% v/v가 달성되었다.

[0236] CRM을 2 mg/mL로 재현탁시키고, 용해가 완료되는 경우, ACP8 용액과 합쳤다. 이는, 20시간 동안 23℃에서의 반응을 허용한다.

[0237] 접합체 반응물을, 24 용적의 pH 9.0의 5mM 보레이트에 붓고, 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 그다음, pH 6.5의 0.5M 포스페이트 완충제로 pH 7.5까지 조절하였다. 이것을  $5 \mu\text{m}$  여과기를 통해 여과하고, 약  $1 \text{ mg/cm}^2$ 의 담지에서 300 kDa PES 막 위에서 원래 체적으로 농축시키고, 10 체적 이상의 용적의 물에 대해 정용여과하였다. 제조된 농축물을 0.22  $\mu\text{m}$  여과기를 통해 여과하고 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.

[0238] CDI/CDT 원 포트 방법

[0239] CRM<sub>197</sub> 매트릭스 교환: CRM<sub>197</sub>를 정용여과하여 약 10 mM 포스페이트/80 mM NaCl/15% 수크로스(pH 7)의 벌크 매트릭스로부터 5 mM 이미다졸/0.72 % NaCl/15 mM 옥틸-β-D-글루코시드(pH 7)로 교환하였다. 이러한 교환은, 접합에 해롭고 접합부로 옮겨지는 염화 나트륨 함량을 한정하는 포스페이트 및 수크로스의 제거를 허용한다. 옥틸-β-D-글루코피라노시드를 첨가하여 살균 여과 이후의 입자 형성을 예방하였다.

[0240] CRM<sub>179</sub>의 매트릭스는, 약 4mg/mL의 농축물 농도로 10K MWCO PES막을 사용하여 pH 7 내지 10의 다이아볼륨(diavolume)을 통해 5 mM 이미다졸/0.72%/15 mM 옥틸-B-D-글루코피라노시드에 대해 접선 유동 여과(tangential flow filtration)로 교환하였다. 전형적인 막 시험감염은 2 그램/ft<sup>2</sup> 였고, 매트릭스내 목표 최종 CRM<sub>197</sub> 농도는 6 mg/mL였다. CRM<sub>197</sub>를 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.

[0241] 활성화/접합: 황색포도상구균 혈청형 8 헵막 다당류를 위한 활성화/접합 방법은 하기 단계로 구성된다: 1) CRM<sub>197</sub>의 매트릭스 교환; 2) 다당류의 제형화; 3) CRM<sub>197</sub> 및 제형화된 다당류의 셀 냉동 및 동결건조; 4) 동결건조된 다당류 및 CRM<sub>197</sub>의 용해; 5) 다당류의 활성화; 6) CRM<sub>197</sub>로의 활성화된 다당류의 접합; 및 7) 접합체의 정제(희석, 정용여과, 살균 여과).

[0242] 다당류를, 다당류의 그램 당 10그램의 1,2,4-트라이아졸 부형제와 제형화하였다. 부형제를 분말로서 다당류에 첨가하고, 주위 온도에서 혼합 후 15분 이전에 용액이 수득되었다.

[0243] 제형화된 다당류와 CRM<sub>197</sub>은 -75℃ 에탄올 욕을 사용하여 개별적으로 셀 냉동시켰다. 1L 들이의 병 당 용적은 약 500 mL였다.

[0244] 다당류 용해를 위해, DMSO를 다당류의 개별적인 동결건조 병에 첨가하여 현탁액을 수득하고, 그다음 가열을 위해 활성화/접합 반응 용기로 옮겼다. DMSO를 첨가하여 2 g/L 농도를 수득하였다. 혼합하면서 현탁액이 약 45

℃에 도달하자 투명한 용액이 수득되었다. 그다음, 상기 용액을 23℃ ± 2℃로 냉각시켰다.

- [0245] CRM<sub>197</sub>의 용해를 위해, DMSO를, CRM<sub>197</sub>를 함유하는 개별적인 동결건조 병에 첨가하여 현탁액을 수득하고, 그다음 혼합을 위한 제 2 용기로 옮겼다. DMSO를 첨가하여 2 g/L 농도를 수득하였다. 전형적으로 15분 이내에 투명한 용액이 수득되었다.
- [0246] 다당류/DMSO 용액을 카르 피셔 분석(Karl Fischer analysis)을 위해 샘플링하여 습기 함량을 측정하였다. CDT를 DMSO내 100 mg/mL 용액으로서 제조하고 측정된 수분 함량에 기초하여 첨가하였다. CDT 용액의 연속적인 첨가는, 혼합하면서 23℃ ± 2℃에서 약 5분 동안 수행하였다. 반응은, 23℃ ± 2℃에서 최소 30분 동안 진행되는 것이 허용되었다. 반응물을 샘플링하여 활성화 수준(UV 220/205 nm)을 측정하고, 그다음 100 mM 나트륨 보레이트(pH 9)를 첨가하여 1.5% 수용액을 수득하였다. 그다음, 반응 용액을 최소 30분 동안 23℃ ± 2℃에서 교반하였다.
- [0247] CRM<sub>197</sub>에 대한 활성화된 다당류의 접합을 위해, 목적 반응 농도인 0.8 mg/mL까지 DMSO를 첨가하였다. 그다음, 혼합하면서, 용해된 DMSO 내 용해된 CRM<sub>197</sub>를 활성화된 다당류 용액에 첨가하였다. 반응물을 23℃ ± 2℃에서 최소 4시간 동안 교반하였다.
- [0248] 혼합하면서, 반응 용액을 5mM 나트륨 테트라보레이트(pH 9)에 첨가함으로써 10배로 희석하여, 잔류 활성화 기를 가수분해시켰다. 희석된 용액을 5 μm 여과기를 통과시키고 2 g/L인 목표 농축물 농도까지 농축시켰다. 5 mM 숙시네이트(pH 7)를 사용하여 20 다이아볼륨을 통과하는 300K 재생 셀룰로스 막을 사용하여 수행하였다. 전형적인 막 시험감염은 1 그램/ft<sup>2</sup>였다. 정제된 접합체를 0.22 μm 여과기를 통과시키고 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.
- [0249] 실시예 4: 원 포트 및 복합 접합 방법을 사용한 혈청형 8 헤파 다당류의 접합
- [0250] 이 실시예는, 원-포트 또는 복합 방법에서의 접합을 위해 미리 선택된 범위의 분자량의 헤파 다당류가 사용될 수 있음을 입증하였다. 보다 큰 다당류는 초기에 박테리아 세포에 의해 생성되고, 결과물인 정제된 분자량 범위는 실시예 1의 가수분해 방법의 pH 및 열에 의해 제어될 수 있다(표 3에 나타냄).
- [0251] 이러한 실시예에서, 혈청형 8 헤파 다당류의 분자량 범위가 약 80 kDa 내지 약 120 kDa인 8개의 배치를 선택하고, 혈청형 8 헤파 다당류의 경우 1,1-카보닐-다이-(1,2,4-트리아졸)에 의한 활성화를 사용하여 접합하였다(표 8 참조). 제조된 접합체의 분자량은 595 kDa 내지 1708 kDa였다. CRM의 접합된 리신의 개수는 최대 13 내지 최소 3였다. 유리 당은 최대 11% 내지 최소 1%의 범위였다.

## 표 8

80 kDa 내지 120 kDa 피낭 다당류로 제조된 혈청형 8 피낭 다당질 접합체

방법	수행 번호	폴리 MW (kDa)	다당류 수율 (%)	유리 당 (%)	SEC-MALLS 에 의한 MW (kDa)	리신
원 포트	1	98	86	1	751	11
	2	89	80	1	675	13
	3	108	76	4	1073	5.0
	4	108	69	4	819	5.2
	5	89	85.1	8	1708	10
	6	100	94.0	11	1577	5
복합	1	99	88	6	943	4
	2	113	73	5	841	3
	3	105	79	3	719	7
	4	100	86	2	630	9
	5	87	90	3	595	6

[0252]

[0253] 실시예 5: 접합된 천연- 및 염기-처리된 혈청형 8 헤파 다당류의 무린 균혈증 모델에서의 평가

[0254] 헤파 다당류 접합체의 경우, 기능성 항체 반응의 도입을 위한 접합 전에 천연 혈청형 8 헤파 다당류에 존재하는

O-아세틸 기의 중요성을 평가하였다. 혈청형 8 협막 다당류는 약한 염기성 조건하에서 탈-O-아세틸화되고, NMR 및 이온 크로마토그래피(IC)로, 혈청형 8 협막 다당류 탈-O-Ac-CRM에서 O-아세틸화의 부재를 확인하였다. CP8 탈-O-Ac-CRM 접합체는, 실시예 2에서 기술한 PDPH 화학에 의해 CRM에 de-O-Ac CP8 다당류를 접합함으로써 제조되었다.

[0255] 혈청형 8 협막 다당류 접합체는 예상밖으로 IC 방법에 의해 어떠한 측정가능한 아세틸 기도 나타나지 않았다. 이는 다른 황색포도상구균 협막 다당류에 비해 O-아세틸화의 부위 및 구조 상의 차이에 기인하며, 이는 다시 접합 동안 혈청형 8 협막 다당류내 아세틸 기의 제거 또는 개질을 유발할 수 있었다.

[0256] 무균 균혈증 모델은, 천연형에 비해 CRM<sub>197</sub>에 접합된 염기-처리된 혈청형 8 협막 다당류의 효능을 평가하기 위해 사용되었다. 암컷 BALB/c 마우스 군들(군 당 15마리)은 제 0, 제 3 및 제 6주에 1 mcg 혈청형 8 협막 다당류 탈-O-Ac-CRM 또는 1 µg 혈청형 8 협막 다당류 O-Ac-CRM으로 백신접종하였다. 백신은 22 mcg AlPO<sub>4</sub>과 제형화하였다. 동물은 황색포도상구균 PFESA0003으로 시험감염시키고, 3시간 경과 후 혈액으로부터 박테리아를 계수하였다. 이 데이터는, 스튜던트 t-검정에 의해 측정된 바와 같이 미처리된 천연 혈청형 8 협막 다당류 접합체로 면역화시킨 동물의 혈액으로부터 회수된 박테리아 cfu의 통계학적으로 유의한(p=0.0362) 감소가 존재함을 나타냈다(표 9). 염기-처리된 혈청형 8 협막 다당류 접합체로 면역화된 동물에서, 혈액으로부터 회수된 박테리아 cfu는 식염수 대조군과 유사하였다.

### 표 9

[0257] 혈청형 8 협막 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체는, 마우스에서 황색포도상구균 PFESA0003으로 유발되는 균혈증을 감소시킨다

항원	균주/투여량	log CFU/혈액	유의도 (p 값)
염수	PFESA0003 1.14 x 10 <sup>8</sup>	4.35	0.03
CP8 탈-O-Ac-CRM		4.45	
CP8 O-Ac-CRM		3.93	

[0258] 실시예 6: 접합된 천연- 및 염기 처리된 혈청형 8 협막 다당류의 무균 균혈증 모델에서의 평가

[0259] 혈청형 8 협막 다당류 접합체를, 갈때기 신장염 모델에서 마우스를 보호하는 그의 능력에 대해 평가하였다. i.p. 황색포도상구균 시험감염을 수용한 마우스의 혈액내 박테리아 수는, PBS로 면역화시킨 대조군에 비해 상당히 감소하였다.

[0260] 황색포도상구균 PFESA0268(혈청형 8)로 시험감염한 후, 앞에서 기술한 무균 균혈증 모델에서 CP8-CRM<sub>197</sub> 접합체의 효능을 평가하기 위해 두가지 연구를 수행하였다. 제 1 연구(도 5)는, 균혈증의 유의한 감소를 나타냈다(p=0.0308). 연구를 위해, 6 내지 8 주령 스위스 웨스터 마우스의 군(n=30)은, 제 0 주, 제 2 주 및 제 4 주에서 100 µg AlPO<sub>4</sub>과 함께 제형화된 1 µg 혈청형 8 협막 다당류-CRM<sub>197</sub> 및 염수 둘다의 피하 주사로 능동 면역화시키고, 제 6 주에 황색포도상구균 PFESA0268(혈청형 8)로 정맥 경로로 시험감염시켰다. 시험 감염 이전에, 마우스가 3회의 백신접종 후에 시험감염 균주의 투여량을 최적화하기 위해서, 실험이 수행되었다. 생존률 연구의 통계학적 평가는, 카프란-마이어 분석에 의해 수행하였다.

[0261] 실시예 7: 천연- 및 화학적 개질된-혈청형 8 협막 다당류 접합체로 면역화된 마우스로부터의 혈청의 옅소닌의 활성

[0262] 백신접종 연구로부터의 높은 혈청형 8 협막 다당류 역가를 갖는 선택 마우스 혈청(n=5)을, PFESA0005 균주를 사용하여 옅소닌의 활성에 대해 평가하였다. OPA 결과(표 10)는, 단지 천연 혈청형 8 협막 다당류의 접합으로 제조된 접합체만 마우스내 옅소닌의 항체를 끌어냄을 나타냈다. 탈-OAc 혈청형 8 협막 다당류 접합체는 마우스에서 면역원성이지만, 이 분석에서 끌어낸 항체는 옅소닌이 아닌 것임에 주목해야 한다. OPA 역가는, 40%의 살해율이 관찰되는 희석의 역수로서 보고되었다.

## 표 10

천연 혈청형 8 피낭 다당류 대 탈-OAc 혈청형 8 피낭 다당류-CRM 면역화된

마우스 혈청의 옴소닌 활성

탈-OAc 혈청형 8 피낭 다당질CRM		혈청형 8 피낭 다당질CRM	
OP 역가 Wk0 혈청	OP 역가 Wk8 혈청	OP 역가 Wk0 혈청	OP 역가 Wk8 혈청
<50	<50	50	150
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	450
<50	<50	<50	1350
<50	<50	<50	4050

[0263]

[0264]

실시예 8: 혈청형 8 접합체 면역혈청에 의한 황색포도상구균 균주의 살해는, 천연 혈청형 8 헤파크 다당류의 첨가에 의해 억제될 수 있다.

[0265]

살해의 특이성을 확인하게 위해서, 본질적으로 앞에서 기술한 바와 같이 천연 혈청형 8 헤파크 다당류 또는 미관련된 페럼구균 다당류(Pn 14 폴리)의 존재하에 옴소닌 식세포 분석을 수행하였다.

[0266]

결과(표 11)는, 반응 혼합물내 천연 혈청형 8 헤파크 다당류의 존재는 황색포도상구균 PFESA0286(혈청형 8)의 옴소닌 식세포 살해를 억제함을 나타냈다. 이러한 결과로, 면역 혈청에 의한 옴소닌 식세포 살해가 헤파크 특이적 항체에 의해 매개됨이 확인되었다.

## 표 11

혈청형 8 피낭 다당류의 첨가는, 면역 혈청에 의한 황색포도상구균의 옴소닌 식세포 살해를 억제한다

원숭이	혈청 샘플	OPA 역가
02D133	Wk0	<50
	Wk8	4050
	Wk0 + 20 µg CP8 폴리	<50
	Wk8 + 20 µg CP8 폴리	<50
	Wk0 + 20 µg Pn14 폴리	<50
	Wk8 + 20 µg Pn 14 폴리	4050
A4N122	Wk0	<50
	Wk8	4050
	Wk0 + 20 µg CP8 폴리	<50
	Wk8 + 20 µg CP8 폴리	<50
	Wk0 + 20 µg Pn14 폴리	<50
	Wk8 + 20 µg Pn 14 폴리	1350

[0267]

[0268]

요약

[0269]

모든 접합 화학은, 운반 단백질인 CRM<sub>197</sub>에 공유 결합된 혈청형 8 헤파크 다당류를 제조하였다. 이러한 방법들로 제조된 접합체의 유리 단당류, 혈청형 8 헤파크 다당류:단백질의 비 및 수율은 어떠한 유의한 차이도 없었다.

[0270]

실시예 9: 황색포도상구균 혈청형 5 헤파크 다당류의 제조

[0271]

이 실시예에서, 다양한 크기 범위의 황색포도상구균 혈청형 5 헤파크 다당류의 제조가 기술된다. 황색포도상구균 혈청형 5 헤파크 다당류 반복 단위의 구조는 도 6에 나타나 있다. 본원에서 기술한 방법은, 약 20 kDa 내지 800 kDa의 분자량의 혈청형 5 헤파크 다당류를 제조하는데 효과적이다. 조건을 적당하게 선택함으로써, 분자량이 50

kDa 내지 800 kDa인 고분자량의 혈청형 5 협막 다당류가 단리 및 정제될 수 있다. 면역원성 조성물에서 사용하기 위해, 분자량이 70 kDa 내지 300 kDa, 70 kDa 내지 150 kDa 및 많은 다른 목적하는 범위의 혈청형 5 협막 다당류가 단리 및 정제될 수 있다. 균주 PFESA0266은, 성장 특성 및 제조된 협막의 양에 기초하여 혈청형 5 협막 다당류를 위해 선택되었다.

- [0272] 혈청형 5 협막 다당류의 제조를 위해, 주로 탄소 공급원(락토스 또는 수크로스), 질소 공급원인 가수분해된 콩가루, 및 미량의 금속으로 구성된 복합 배지에서 성장시켰다. 균주는 2 내지 5일 동안 생물반응기에서 성장시켰다.
- [0273] PFESA0266 균주의 발효는 앞에서 상세하게 설명한 바와 같이 수행하였다. 수확시, 배양액의 OD<sub>600</sub>는 7.38였다. 배양액을 1시간 동안 오토클레이빙하고, 냉각한 후, 배양액을 앞에서 상세하게 설명한 바와 같이 가공하여 상청액 물질로부터 세포를 단리하였다. 약 1ℓ 각각의 여과 및 농축된 상청액 및 세포를 회수하였다.
- [0274] 오토클레이빙 이전에, 샘플을 제거하여 배양액내 포도상구균성 엔테로톡신 B(SEB)의 수준을 시험하였다. 0.05% 폴리소르베이트 80의 존재하에, 발효액내 SEB의 농도는 15 내지 20 ng/ml였다. 이전의 시험은 1시간 동안 배양액을 오토클레이빙하면, SEB의 수준이 TECRA 키트의 검출 한계보다 낮은 0.1 ng/ml 미만으로 감소되었음을 나타냈다.
- [0275] 정용여과된 에탄올-분획화 다당류를 Q-세파로스 AEC 컬럼에 넣고 앞에서 설명한 바와 같이 선형 구배의 NaCl로 용리시켰다. 혈청형 5 다당류의 존재에 대해 0-아세틸 분석 및 이중 면역 확산 시험으로, 테이코산의 존재에 대한 포스페이트 분석으로 분획들을 분석하였다. 혈청형 5 다당류의 존재는 제 60 내지 제 105의 분석에서 검출하였다(도 7a 내지 도 7b). 테이코산을 갖는 오염물을 줄이기 위해서, 제 60 내지 제 85의 분획을 모아, 임의의 잔류 테이코산을 나트륨-메타-페리오레이트로 산화시켜 증류 H<sub>2</sub>O에 대해 3K 정용여과에 의해 제거하였다.
- [0276] 집합체의 제조를 위해 사용되는 혈청형 5 협막 다당류의 정제는, 다당류의 분자량을 줄이고 세포로부터의 협막을 방출시키기 위해 승온된 온도 및 낮은 pH에 좌우되는 2개의 상이한 방법에 의해 수행하였다. 생성된 분자량은 가수분해 단계의 시간, 온도 및 pH에 좌우되었다.
- [0277] 혈청형 5 협막 다당류의 특성은, 상기 표 1에서 구체화한 기법을 사용하여 수행하였다.
- [0278] 하기에서 기술한 방법에 의해 제조된 협막 다당류는, 낮은 수준의 단백질, 핵산, 펩티도글리칸 및 테이코산 오염물을 갖는 순수한 다당류가다.
- [0279] 제 1 방법에서, 세포로부터의 협막 다당류의 방출 및 분자량 감소 후, 제제를 효소(예컨대, 리보뉴클레아제, 테옥시리보뉴클레아제, 리보자임 및 프로테아제)의 콕테일로 처리하여 불순물을 소화시켰다. 항온처리 후, 잔류 불순물은 에탄올을 첨가하여(최종 농도 약 25%) 침전시켰다. 잔류 에탄올을 제거한 후, 협막 다당류를 함유하는 용액을 음이온 교환 컬럼(Q-세파로스)에 담지하고, 선형 염 구배로 용리시켰다. 협막 다당류를 함유하는 분획을 모아 나트륨 메타-페리오레이트로 처리하였다. 이러한 처리의 결과, 잔류 테이코산 오염물이 산화 가수분해되었지만, 혈청형 5 협막 다당류에는 영향을 미치지 않았다. 에틸렌 글리콜을 첨가하여 반응물을 급랭시켰다. 물질을 농축시키고, 증류수(증류 H<sub>2</sub>O)에 대해 정용여과하여 임의의 잔류 시약 및 부산물을 제거하였다.
- [0280] 다양한 세포 유도된 불순물을 소화시키기 위해 효소를 사용하지 않으면서 제 2 방법이 협막 다당류를 제조하기 위해서 사용되었다. 이러한 방법에서, 세포로부터의 협막 다당류의 방출 및 분자량 감소 후, 가수분해된 발효즙을 미량 여과에 의해 정제한 후, 한외여과 및 정용여과하였다. 상기 용액은 활성탄으로 처리하여 불순물을 제거하였다. 탄소 처리 후, 상기 물질을 나트륨 메타-페리오레이트로 처리하여 잔류 테이코산을 산화시킨 후, 프로필렌 글리콜로 급랭시켰다. 상기 물질을 농축시키고 증류 H<sub>2</sub>O에 대해 정용여과시켜 임의의 잔류 시약 및 부산물을 제거하였다.
- [0281] 양쪽 방법을 사용하여 제조된 제제는, 낮은 수준의 단백질, 핵산 및 테이코산 오염을 갖는 순수한 협막 다당류가 수득되었다. 기술된 방법을 사용하여, 가수분해 상태를 변화시킴으로써 특정 범위의 목적하는 고분자량의 다당류를 제조하였다.
- [0282] 본원에서 기술한 방법에 의해 수득가능한 협막 다당류의 예는, 하기 표 12에 나타났다. 정제된 혈청형 5 협막 다당류의 배치는, 어떠한 테이코산(TA), 펩티도글리칸도 없고 잔류 단백질이 낮다는 점에 의해 입증되는 바와



같이 높은 순도를 가졌다(표 12 및 13 참조). 분자량 범위는 132.7 kDa 내지 800 kDa이고, 정제된 다당류는, 90% 내지 100%로 고도로 O-아세틸화되었고, 100% N-아세틸화되었다. 혈청형 5 헤파 다당류 정제 수율은 39% 내지 63%이고, 정제된 혈청형 5 다당류의 크기는 35 kDa 내지 65 kDa로 변화하였다(표 12 참조). 테이코산(TA) 오염물의 수준은 수용가능하였고, 잔류 단백질 및 핵산의 수준도 또한 허용가능한 범위였다. 혈청형 5 다당류의 NMR 스펙트럼은 문헌에서 보고된 것과 동일하였다.

표 12

[0283] 혈청형 5 헤파 다당류 특성

샘플	총 정제된 CP5 mg	수율 %	MW (kDa) (g/mol)	단백질 % (w/w)	핵산 (260 nm 스캔) % (w/w)	O-아세틸 NMR (%)
1	101	39	47	0	0.5	94
2	91	48	65	1.2	2.5	96
3	578	63	35	2.5	0.7	75

표 13

[0284] 추가 혈청형 5 헤파 다당류 특성

샘플	MW (kDa)	CP5 (mg/ml)	O-아세틸 NMR (%)	확인 NMR	N-아세틸 NMR (%)
1	800.1	3.164	100	통과	100
2	132.7	1.172	90	통과	100
3	335.4	0.975	90	통과	100
4	366.8	0.865	90	통과	검출되지 않음

[0285] 헤파 다당류의 분자량 선택: 동력학적 분석은, 넓은 범위 분자량의 헤파 다당류가 본원에서 기술한 방법에 의해 발생될 수 있음을 입증하였다. 먼저, 보다 큰 다당류는 박테리아 셀에 의해 제조되고, 그다음 목적하는 분자량 범위를 선택하고, 그다음 열 및 가수분해 단계의 pH 및 열 조건의 조작에 의해 정제되었다.

[0286] 황색포도상구균 발효즙의 열 처리는, 발효와 헤파 다당류 회수 사이의 공정 단계이다. 이 공정 단계는, 구체화된 기간 동안 pH-조절된 발효즙을 처리하기 위해 열을 사용한다. 낮은 pH에서의 열 처리의 목적은, 세포를 죽이고, 엔테로톡신을 비활성화시키고, 다당류 결합 세포를 방출하고, 분자량을 목적하는 크기까지 줄였다. 이러한 목적 중에서, 분자량 감소는, 이러한 단계에서 요구되는 가공 시간의 측면에서 가장 느렸다. 따라서, 다른 목적은, 고려되는 처리 시간에서 필연적으로 달성되었다.

[0287] 열 처리: 다양한 분자량 범위의 헤파 다당류를 선택하기 위한 pH 및 온도 조건을 측정하였다. 이러한 연구를 위해서 15L들이의 바이오라피트 발효통을 사용하였다. 연동 펌프를 사용하여 발효즙을 발효통으로 옮겼다. 약 200 rpm의 진탕 속도를 사용하여, 농축된 황산으로 발효즙의 pH를 조절하였다. 그다음, 발효즙의 온도를 설정 값으로 올렸다. 온도가 설정 값에 도달하자마자 열 처리 시간을 개시하였다. 목적하는 처리 시간에 도달하면, 발효즙을 상온으로 냉각시켰다. 공정 중(in-process)의 샘플을 취해서, HPLC 및 SEC-MALLS 시스템에 의해 각각 다당류 농도 및 분자량을 측정하였다. pH 3.5, 4.0 및 5.0에서 시간 경과에 따라 MW 프로파일을 측정하였다(도 8a 참조).

[0288] 다당류의 약산 가수분해의 동력학은, 상기 방법으로부터 수득된 정제된 혈청형 5 헤파 다당류를 사용하여 수행하였다. 정제된 다당류 용액은, 황산-사용 시험을 위해 목적하는 pH까지 조절하였다. 약 1.5 mL의 용액을 각각의 15mL 원심형 튜브에 옮겼다. 정밀 온도 제어 시스템을 갖춘 오일욕에 상기 튜브를 넣었다. 상기 튜브는 예정된 시간 간격 후 꺼내서 얼음통에서 급랭시켰다. 시험 끝에, 1M 트리스 완충제(pH 7.5)의 액적을 이 샘플에 첨가하여 pH를 다시 약 7로 조정하였다. 샘플은 SEC-MALLS 시스템으로 분석하였다. 동력학적 분석에서 MW 데이터를 사용하였다. pH 4.5에서의 CP5의 MW 프로파일에 대한 온도 효과를 시간 경과에 따라 측정하였다(도 8b 참조).

[0289] 결과



- [0290] 도 8a에서 도시한 바와 같이, 낮은 pH는 다당류의 분자량의 감소에 보다 효과적이다. 이러한 실시예에서, 15분 내지 120분 동안 95℃에서 5의 pH를 사용함으로써 약 300 kDa 내지 약 600 kDa 범위의 분자량이 발생할 수 있다 (도 8a 참조). 유사하게, 15분 내지 120분 동안 95℃에서 4.5의 pH를 선택하면, 200 kDa 내지 400 kDa의 분자량 범위의 다당류가 수득될 수 있다. 추가로, 15분 내지 120분 동안 95℃에서 4.0의 pH를 선택하면, 120 kDa 내지 300 kDa의 분자량 범위의 다당류가 수득될 수 있다.
- [0291] 도 8b에서 나타난 바와 같이, 온도가 높을수록, 시간 경과에 따라 보다 빠른 가수분해 속도 및 보다 넓은 다당류의 분자량 범위가 수득된다. 다른 방식으로 표현하면, 동일한 pH에서 95℃에 비해 낮은 온도인 55℃를 사용하면, 보다 좁은 범위의 다당류 분자량이 형성된다.
- [0292] 추가로, 도 4는 약산(95℃에서 pH 4.5) 가수분해를 위한 처리 시간과 정제된 혈청형 5 협막 다당류의 분자량 사이의 상관관계를 입증한다. 정제된 다당류는 이전에 기술된 회수 공정으로부터 수득된 최종 생성물이다. 도 4에서 도시한 바와 같이, pH 4.5에서 황색포도상구균 PFESA0266 균주의 열 처리 시간이 증가하면, 결과적으로 혈청형 8 협막 다당류의 분자량이 작아지는 반면, pH 4.5에서 열 처리 시간이 짧아지면, 결과적으로 혈청형 5 협막 다당류의 보다 높은 분자량이 수득되었다. 혈청형 5 협막 다당류의 크기는, pH 4.5에서 열 처리의 시간 길이에 따라 약 90 kDa 내지 약 220 kDa의 범위였다. 도 4에서 도시한 바와 같이 정제된 혈청형 5 협막 다당류의 크기 및 낮은 pH에서의 열 처리 시간 사이의 연관성은 구체적인 범위의 분자량으로 정제된 다당류의 제조에 요구되는 처리 시간의 추정을 허용한다.
- [0293] 앞에서 입증한 바와 같이, 20 kDa 내지 500 kDa 초과의 전범위의 분자량의 혈청형 5 협막 다당류가 제조되고, 방출되고 정제될 수 있다. 기술된 방법은, 예를 들어 표 14에서 나타난 바와 같이 특정 범위의 목적하는 고분자량의 협막 다당류를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. 피크 분자량의 범위가 63 kDa 내지 142 kDa인, 제조된 비교적 좁은 분자량의 다당류는, 본원에서 기술한 방법에 의해 수득될 수 있는, 잘 특성화된 범위의 분자량을 나타낸다. 70 kDa 내지 300 kDa 또는 70 kDa 내지 150 kDa의 범위의 고분자량의 다당류의 특히 유리한 범위는, 담체 분자 또는 단백질에 협막 다당류를 접합함으로써 면역원성 조성물의 제조에 유용하다. 약 100 내지 140 kDa의 분자량을 갖는 CP5 협막 다당류를 발생시키는데 사용되는 조건은, 하기와 같다: 135 분 동안 95℃, pH 4.5. 그러나, pH, 온도 및 시간의 상이한 조합은 또한 약 100 내지 140 kDa 범위의 분자량을 갖는 CP5 분자를 발생시킬 것이다.

#### 표 14

[0294] 특정 범위의 고분자량의 혈청형 5 협막 다당류의 제조

수행번호	혈청형 5 협막 다당류 MW (kDa)
1	142
2	108
3	142
4	108
5	검출되지 않음
6	검출되지 않음
7	63
8	72
9	74
10	63
11	수행하지 않음

[0295] 실시예 10: 혈청형 5 협막 다당류의 CRM<sub>197</sub>로의 접합

[0296] 본 실시예는, 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체의 제조에 사용되는 방법 및 특성 분석을 기재한다. 상기 운반 단백질에 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류를 접합하기 위한 상이한 접합 화학이 개발되었다. 예를 들어, PDPH(3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라이드)를 사용하는 접합은, 결과적으로 CP와 운반 단백질 사이의 공유 티오에터를 유발하는 반면, CDT(1,1-카보일-다이-1,2,4-트라이아졸)를 사용하는 접합은, 협막 다당류와 운반 단백질 사이의 하나의 탄소 또는 0개의 탄소 연결기를 유발한다.

[0297] PDPH 접합 화학에 의한 CRM<sub>197</sub>로의 혈청형 5 협막 다당류의 접합

[0298] PDPH 접합 화학은, 다당류의 활성화, 티올 보호기의 제거, 활성화된 다당류 중간체의 정제, CRM<sub>197</sub> 단백질의 활성화와 정제, 및 활성화된 성분의 접합과 정제를 포함하는 다단계 방법이다. 티올기-함유 연결기를 다당류에, 할로아세틸 기를 CRM<sub>197</sub> 단백질 담체에 도입한 후, 티오에터 결합을 통해 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류를 단백질 담체에 결합하였다. 브롬산의 N-하이드록시숙신이미드 에스터와 아민기를 반응시킴으로써 브로모아세틸 기를 CRM<sub>197</sub> 단백질에 도입하였다. 티올화된 다당류를 발생시키기 위해서, 다당류내 N-아세틸만노스아미노우론산의 카보다이이미드 활성화된 카복실레이트를, 설프하이드릴-반응성 하이드라지드 헤테로이작용성 연결기인 3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라지드(PDPH)의 하이드라지드 기에 결합하였다. DTT의 황원에 의해 발생하고 세파텍스 G25 컬럼에 의해 정제된 PDPH-티올화 다당류의 티올은, 활성화된 단백질의 브로모아세틸기와 반응하여, 다당류와 운반 단백질 사이의 브롬 치환에 의해 형성된 티오에터 결합이 생성되었다. 미반응된 브로모아세틸 기는, 시스트아민 하이드로클로라이드(2-아미노에탄티올 하이드로클로라이드)로 "캡핑"되었다. 그다음, 반응 혼합물을 농축시키고 정용여과시켰다. 나머지 미접합된 브로모아세틸기는, 시스트아민 하이드로클로라이드로 캡핑시켜, 접합 후 어떠한 반응성 브로모아세틸기도 잔류하지 않는 것을 보장하였다. 이것은, 브롬의 치환 후, 리신 잔기상의 아세틸 기와 시스트아민의 티올 말단 사이의 공유 결합을 형성하였다.

[0299] PDPH에 의한 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류의 티올화: 먼저, 다당류를 PDPH에 의한 티올화로 활성화시켰다. 다당류는, 혈청형 5 협막 다당류의 경우 1:5:3의 다당류:PDPH:EDAC 중량비를 유지하면서, 새롭게 제조된 PDPH 스택 용액(DMSO내 250 mg/mL), EDAC 스택 용액(증류 H<sub>2</sub>O내 90 mg/mL), 및 MES 완충제 스택 용액(0.5M, pH 4.85)과 혼합하였다. 상기 혼합물을 상온에서 1시간 동안 항온처리하고 그다음 4℃ 내지 8℃의 사이에서 3500 MWCO 투석 장치를 사용하여 4시간 동안 증류 H<sub>2</sub>O의 1000배 체적에 대해 투석하여 미반응된 PDPH를 제거하였다. PDPH-결합된 다당류는 0.2 M DTT로 제조하고, 4℃ 내지 8℃ 사이에서 밤새 3시간 동안 상온에서 항온처리하였다. 과량의 DTT 뿐만 아니라 반응 부산물을, 세파텍스 G25수지 및 이동상인 증류수를 사용하는 SEC에 의해 활성화된 다당류로부터 분리하였다. 티올기에 대한 DTDP 분석에 의해 분획물을 분석하고, 컬럼의 허공용적 근처에서 용리되는 티올-양성 분획물을 모았다. 분석물을 모은 것을 PAHBAH 및 O-아세틸 분석에 의해 분석하여, 티올기를 함유하는 반복 단위의 몰%(티올의 몰 농도/반복 단위의 몰 농도)로서 표현된 활성화도를 측정하였다. 활성화된 다당류는 동결건조하고 접합을 위해 요구될 때까지 -25℃에서 저장하였다.

[0300] PDPH에 의한 혈청형 5 다당류 티올화의 재현성으로부터의 결과는 표 15에 나타났다. 혈청형 5 다당류의 활성화도는 11% 내지 19%의 범위이고, 이는 약 10개의 협막 다당류 반복 단위 당 부착된 하나의 연결기 분자 내지 5개의 반복 단위당 부착된 하나의 연결기 분자에 해당한다.

### 표 15

[0301] PDPH에 의한 혈청형 5 협막 다당류의 활성화 - 재현성 연구

혈청형 5 다당류-PDPH	활성화 (% M <sub>SH</sub> /M <sub>RU</sub> )	규모 mg	수율 mg (% , w/w)
1	11	23	19.6 (85)
2	13	30	28 (93)
3	19	30	23 (77)
4	15	32	29 (90)

[0302] 2. 운반 단백질 활성화: 개별적으로, 캐러이 단백질이 브로모 아세틸화에 의해 활성화되었다. 10 mM 포스페이트 완충작용 0.9% NaCl pH 7(PBS)로 CRM<sub>197</sub>를 5 mg/mL까지 희석하고, 그다음 1M 스택 용액을 사용하여 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 7.0를 만들었다. 브로모아세탄산의 N-하이드록시숙신이미드 에스터(BAANS)를, 20 mg/mL DMSO의 BAANS 스택 용액을 사용하여 1:0.25 (w:w)의 CRM<sub>197</sub>:BAANS 비로 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 1시간 동안 4 내지 8℃ 항온처리하고, 그다음 세파텍스 G25 상의 SEC를 사용하여 정제하였다. 정제되고 활성화된 CRM<sub>197</sub>은 로우리 분석으로 분석하여 단백질 농도를 측정하고, 그다음 PBS로 5 mg/mL까지 희석하였다. 슈크로스를 저온보호물질로서 5% wt/vol로 첨가하고, 활성화된 단백질을 얼리고 접합을 위해 사용될 때까지 -25℃에서 저장하였다.

[0303] CRM<sub>197</sub>의 리신 잔기의 브로모 아세틸화는 매우 일관되어서, 유용한 39개의 리신으로부터 19 내지 25개의 리신의 활성화를 유발하였다(표 16 참조). 이 반응은 활성화된 단백질의 높은 수율을 제조하였다.

표 16

[0304] CRM<sub>197</sub>의 브로모아세틸화도 및 그의 수율

제제	활성화된 리신 (n=)	규모 (mg)	수율 (% w/w)
1	24	23	85
2	20	38	87
3	19	35	77
4	22	35	94
5	23	35	87
6	25	48	104

[0305] 3. 커플링 반응: 일단 활성화된 헵막 다당류 및 활성화된 운반 단백질이 제조되면, 이 둘을 접합 반응에서 조합하였다. 동결건조되고 티올화된 다당류를 pH 8.95의 0.16M 보레이트에 용해시키고, 해동된 브로모아세틸화된 CRM<sub>197</sub> 및 증류수와 혼합하여, 0.1M 보레이트, 1:1 wt/wt 비의 CRM<sub>197</sub>:다당류, 및 2 mg/mL 혈청형 5 헵막 다당류의 최종 용액을 수득하였다. 이 혼합물을 16 내지 24시간 동안 상온에서 항온처리하였다. 단백질 상의 미반응된 브로모아세틸 기는, pH 8.95의 0.1M 보레이트에 용해된 시스트아민의 135 mg/mL 스택 용액을 사용하여 1:2(wt/wt)의 CRM<sub>197</sub>:시스트아민의 비로 시스트아민 하이드로클로라이드를 첨가함으로써 캡핑되고, 상온에서 4시간 동안 항온처리하였다. 헵막 다당류-CRM<sub>197</sub> 접합체(접합체)는 100K 폴리에터설폰 한외여과기를 사용하여 0.9% NaCl에 대해 50배로 투석함으로써 정제하였다.

[0306] PDPH에 의한 혈청형 5 헵막 다당류 티올화 재현성에 관한 연구 결과는, 활성화도는 12 내지 19%의 범위이고, 이는 약 10개의 CP 반복 단위 당 부착된 하나의 연결기 분자 내지 약 5개의 반복 단위 당 하나의 연결기 분자에 해당한다.

[0307] CDT 접합 화학에 의한 CRM<sub>197</sub>에 대한 혈청형 5 헵막 다당류의 접합

[0308] CDT는, 무수 환경(DMSO)에서 다당류가 활성화되어 유용한 하이드록실기를 갖는 트라이아졸 카바메이트 잔기 및 카복실산을 갖는 아실이미다졸 또는 아실트라이아졸 잔기를 형성하는 1단계 접합 방법을 제공한다. (DMSO에) 단백질 담체를 첨가하면, 트라이아졸의 리신에 의한 친핵성 치환 및 (활성화된 하이드록실기에 대한) 카바메이트 결합 및 (활성화된 카복실 산에 대한) 아마이드 결합의 형성을 유도한다. 접선 유동 여과에 의한 정제를 위한 제조에서, 반응 용액은 수용액에서 10배로 희석된다.

[0309] CDT 접합 화학은, 운반 단백질에 공유 결합된 혈청형 5 헵막 다당류를 제공하는데, 이는, 글리콜알데하이드 캡핑 또는 시스트아민 하이드로클로라이드 캡핑 접합체의 아미노산 분석에 의해 및 크기 배제 크로마토그래피로부터의 분획내 다당류 및 단백질의 존재에 의해 확인되었다.

[0310] 20 kDa 내지 40 kDa의 범위의 혈청형 5 헵막 다당류 크기에 대한 PDPH 및 CDT 화학 둘다에 의해 제조된 여러 묶음의 접합체의 제조로부터의 결과의 요약은 하기 표 6에 나타났다. 유리 헵막 다당류, 다당류:단백질의 비율 및 이러한 2가지의 접합 방법에 의해 발생된 접합체의 수율 사이에는 어떠한 유의적인 차이도 없었다. 접합된 혈청형 5 헵막 다당류의 항원성은, 접합체와 천연 다당류 사이의 확인 침전소 라인으로 나타내는 바와 같이 접합에 의해 변하지 않았다.

표 17

[0311] 2개의 접합 화학에 의해 제조된 혈청형 5 헵막 다당류-CRM<sub>197</sub>의 특성화

화학	CP 수율 (%)	단백질 수율 (%)	출력비	유리당 (%)	유리 단백질 (%)	개질된 리신	크기(MW 또는 Kd (% < 0.3), 다당류/단백질))
CDT	19-27	35	0.5-0.8	10-40	<1	18-22	38/61 내지 76/74

PDPH	26-52	40-99	0.4-1.0	23-50	검출되지 않음	검출되지 않음	$7.5 \times 10^5$ 내지 $2.3 \times 10^6$
------	-------	-------	---------	-------	---------	---------	--

[0312] 앞서 살펴본 바와 같이, 본원에서 기술한 방법은 특정 범위의 목적하는 고분자량의 협막 다당류를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. 본 발명자들은, 면역원성 조성물에서 사용하기 위한 여과되고 정제된 혈청형 5 협막 다당류일 수 있는 미리-선택된 범위의 고분자량의 집합체를 제조하고자 하였다. 표 18은, 혈청형 5 협막 다당류가 약 92 kDa 내지 119 kDa의 분자량 범위를 갖는, 트라이아졸(CDT)로 활성화된 혈청형 5 협막 다당류 집합체의 분석을 요약하였다. 제조된 집합체의 분자량의 범위는 1533 kDa 내지 2656 kDa이다. CRM<sub>197</sub> 당 접합된 리신의 개수는 최대 22, 최소 15의 범위였다. 유리 협막 다당류의 범위는 최대 18% 내지 최소 11%였다.

표 18

[0313] 미리-선택된 분자량 범위를 갖는 혈청형 5 협막 다당류의 집합체

수행	폴리MW (kDa)	수율 (%)	유리 다당류 (%)	SEC-MALLS에 의한 MW (kDa)	개질된 리신
1	121	63	11	2130	19
2	92	72	16	1533	22
3	119	74	14	2656	15
4	115	63	18	1911	15

[0314] 두가지 모두의 집합 화학은, 운반 단백질에 공유 결합된 혈청형 5 협막 다당류를 형성한다. 이러한 2가지 방법에 의해 발생된 집합체의, 유리 협막 다당류, 혈청형 5 협막 다당류:단백질의 비 및 집합체의 수율 사이에는 어떠한 유의한 차이도 없다.

[0315] 실시예 11: 복합 대 원-포트 CDT 방법

[0316] 전술한 바와 같이, 본 발명의 면역원성 집합체의 제조 방법은, CDT(1,1-카보일-다이-1,2,4-트라이아졸) 또는 PDPH(3-(2-피리딜다이티오)-프로피오닐 하이드라지드)를 포함하는 집합 화학을 사용하여 운반 단백질과 협막 다당류를 공유 집합체를 포함한다. CDT를 사용하면, 결과적으로 협막 다당류와 운반 단백질 사이에 하나의 탄소 또는 0개의 탄소 연결기를 형성하는 반면, PDPH를 사용하면 협막 다당류와 운반 단백질 사이에 공유 티오에터 결합을 함유하는 5개의 탄소 연결기가 형성된다.

[0317] PDPH-기반 방법은 다당류의 활성화, 다당류 상의 티올 보호기의 제거, 활성화된 다당류 중간체의 정제, 단백질 담체의 활성화와 정제, 및 활성화된 성분들의 집합과 그 이후의 정제를 포함하는 다단계 방법이다. 이러한 방법에서, 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류는, 유기 용매(예를 들어, DMSO)에서 PDPH 및 카보다이미드와 반응하여 PDPH-결합된 다당류를 제조한다. PDPH-결합된 다당류는 환원제와 반응하여 활성화된 다당류를 제조하고, 이는 그다음 정제된다. 운반 단백질은, 유기 용매에서 브로모아세트산과 반응시켜, 활성화된 운반 단백질을 제조하고, 그다음 이를 정제한다. 그다음, 정제되고 활성화된 혈청형 5 다당류를 정제되고 활성화된 운반 단백질과 반응시켜 혈청형 5 다당류:운반 단백질 집합체를 제조한다.

[0318] 대조적으로, CDT-기반 방법은, 협막 다당류가 무수 환경(즉, DMSO)에서 활성화되어 유용한 하이드록실 및 아실 이미다졸을 갖는 트라이아졸 카바메이트 잔기, 또는 카복실산을 갖는 아실트라이아졸 잔기를 형성하는, 1 단계의 집합 방법이다. (DMSO에서) 단백질 담체의 추가는 리신에 의한 이미다졸 또는 트라이아졸의 친핵성 치환 및 카바메이트 결합(활성화된 하이드록실의 경우) 및 아마이드 결합(활성화된 카복실산의 경우)을 형성하며, 이로써 집합이 "원-포트"로 진행되도록 하였다. 따라서, 2개의 CDT-기반 방법이 개발되었다: 보다 복잡한 방법 및 보다 간단한 원-포트 방법. 보다 복잡한 방법에서, 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류는 이미다졸 또는 트라이아졸과 제형화되고, 그다음 유기 용매(예를 들어 DMSO) 및 약 0.2% w/v 물에서 CDT와 반응하여 활성화된 혈청형 5 다당류를 제조하였다. 활성화된 혈청형 5 협막 다당류를 정제하고 그다음 유기 용매에서 운반 단백질과 반응하여 혈청형 5 다당류:담체 단백질 집합체를 제조하였다. 원-포트 방법은, 운반 단백질의 반응 이전에 활성화된 혈청형 5 다당류가 정제되지 않는다는 점을 제외하고는 복합 방법과 유사하였다.

[0319] CDT 복합 방법

- [0320] 혈청형 5 협막 다당류의 활성화: 혈청형 5 협막 다당류를 10g의 트라이아졸/g 혈청형 5 협막 다당류와 혼합하고 동결건조시켰다. 제조된 덩어리를, 2.0 mg 혈청형 5 협막 다당류/mL로 DMSO에 용해시켰다. 물 함량을 측정하고 0.2%까지 조정하였다. DMSO내 100 mg/mL로 CDT의 새롭게 제조된 스택 용액을 첨가하여, CP5의 양에 비해 물 기준으로 20배 과량의 CDT를 수득하였다. 다르게는, 첨가된 CDT의 양은, 보다 높은 정도 또는 낮은 정도의 활성화를 달성하기 위해서 조절될 수 있다. 이는, 23℃에서 30분 동안 유지하였다.
- [0321] 활성화된 혈청형 5 다당류의 정제: 활성화된 혈청형 5 협막 다당류(ACP5)의 용액을 25용적의 물에 부어서 과량의 CDT를 과과하였다. 이것을 약 1 mg/cm<sup>2</sup>에서 10 kDa PES 막 위에서 그의 원래 체적으로 농축시키고, 적어도 10체적에 대해 물에 대해 정용여과시켰다. 이 단계는 4시간 미만에서 완료되었다. 정용여과된 물질을 10 g의 트라이아졸/원 혈청형 5 다당류(g)와 혼합하고 동결건조시켰다.
- [0322] 동결건조된 CRM의 제조: CRM은, 적어도 10 체적에 대해 10 kDa PES 막 위에서 일정한 체적으로 0.4% NaCl/5% 수크로스에 대해 정용여과하였다. 단백질 농도를 측정하고, 충분한 정용여과 완충제를 첨가하여, 단백질 농도를 5.0 g/L로 만들고, 이로써 0.8인 NaCl/CRM의 w/w 비가 제공된다. CRM가 동결건조되었다.
- [0323] 접합: 활성화되고 정용여과된 혈청형 5 다당류를 1 mg/mL로 DMSO에 용해시켰다. 100mM의 보레이트 용액을 첨가하여 2% v/v가 달성되었다.
- [0324] CRM을 2 mg/mL로 재현탁시키고, 용해가 완료되는 경우, ACP5 용액과 합쳤다. 이는, 20시간 동안 4℃에서의 반응을 허용하였다.
- [0325] 접합체 반응물을, 24 용적의 pH 9.0의 5mM 보레이트에 붓고, 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 그다음, pH 6.5의 0.5M 포스페이트 완충제로 pH 7.5까지 조절하였다. 이것을 5μm 여과기를 통해 여과하고, 약 1 mg/cm<sup>2</sup>의 담지에서 300 kDa PES 막 위에서 원래 체적으로 농축시키고, 10 체적 이상의 용적의 물에 대해 정용여과하였다. 생성된 농축물을 0.22 μm 여과기를 통해 여과하고 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.
- [0326] CDT 원 포트 방법
- [0327] CRM<sub>197</sub> 매트릭스 교환: CRM<sub>197</sub>를 정용여과하여 약 10 mM 포스페이트/80 mM NaCl/15% 수크로스(pH 7)의 벌크 매트릭스로부터 5 mM 이미다졸/0.72% NaCl/15 mM 옥틸-β-D-글루코시드(pH 7)로 교환하였다. 이러한 교환은, 접합에 해롭고 접합부로 옮겨지는 염화 나트륨 함량을 한정하는 포스페이트 및 수크로스의 제거를 허용한다. 옥틸-β-D-글루코피라노시드를 첨가하여 살균 여과 이후의 입자 형성을 예방하였다.
- [0328] CRM<sub>179</sub>의 매트릭스는, 약 4mg/mL의 농축물 농도로 10K MWCO PES막을 사용하여 pH 7 내지 10의 다이아볼륨(diavolume)을 통해 5 mM 이미다졸/0.72% NaCl/15 mM 옥틸-B-D-글루코피라노시드에 대해 접선 유동 여과로 교환하였다. 전형적인 막 시험감염은 2 그램/ft<sup>2</sup>였고, 목표 최종 CRM<sub>197</sub> 농도는 6 mg/mL였다. CRM<sub>197</sub>를 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.
- [0329] 활성화/접합: 황색포도상구균 혈청형 5 협막 다당류를 위한 활성화/접합 방법은 하기 단계로 구성된다: 1) 다당류의 제형화; 2) CRM<sub>197</sub> 및 제형화된 다당류의 셀 냉동 및 동결건조; 3) 동결건조된 다당류 및 CRM<sub>197</sub>의 용해; 4) 다당류의 활성화; 5) CRM<sub>197</sub>로의 활성화된 다당류의 접합; 및 6) 접합체의 정제(희석, 정용여과, 살균 여과).
- [0330] 다당류를, 다당류의 그램 당 10그램의 1,2,4-트라이아졸 부형제와 제형화하였다. 부형제를 분말로서 다당류에 첨가하고, 주위 온도에서 혼합 후 15분 이전에 용액이 수득되었다.
- [0331] 화합된 다당류와 CRM<sub>197</sub>은 -75℃ 에탄올 욕을 사용하여 개별적으로 셀 냉동시켰다. 1L 들이의 병 당 용적은 약 500 mL였다.
- [0332] 다당류 용해를 위해, DMSO를 다당류의 개별적인 동결건조 병에 첨가하여 현탁액을 수득하고, 그다음 가열을 위해 활성화/접합 반응 용기로 옮겼다. DMSO를 첨가하여 2 g/L 농도를 수득하였다. 5 내지 10분 동안 혼합한 후, 투명한 용액이 수득되었다.
- [0333] CRM<sub>197</sub>의 용해를 위해, CRM<sub>197</sub>를 함유하는 개별적인 동결건조 병에 DMSO를 첨가하여 현탁액을 수득하고, 그다음 혼합을 위한 제 1 용기로 옮겼다. DMSO를 첨가하여 2 g/L 농도를 수득하였다. 전형적으로 15분 이내에 투명한 용액이 수득되었다.



[0334] 다당류/DMSO 용액을 카르 피서 분석을 위해 샘플링하여 수분 함량을 측정하였다. CDT를 DMSO내 100 mg/mL 용액 으로서 제조하고 혈청형 5 다당류에 대해 5몰 과량으로 첨가하였다(복합 방법은 CDT의 20몰 당량으로 사용한 반 면, 원-포트 방법은 CDT:CP5의 5몰 당량으로 사용하였다). CDT 용액의 연속적인 첨가는 혼합하면서 23℃ ± 2 ℃에서 약 5분 동안 수행하였다. 반응은 23℃ ± 2℃에서 최소 30분 동안 진행되는 것이 허용되었다. 반응물 을 샘플링하여 활성화 수준(UV 220/205 nm)을 측정하고, 그다음 100 mM 나트륨 보레이트(pH 9)를 첨가하여 1.5% 수용액을 수득하였다. 그다음, 반응 용액을 최소 30분 동안 23℃ ± 2℃에서 교반하였다.

[0335] CRM<sub>197</sub>에 대한 활성화된 다당류의 접합을 위해, 목적 반응 농도인 0.55 mg/mL까지 DMSO를 첨가하였다. 그다음, 혼합하면서, DMSO 내 용해된 CRM<sub>197</sub>를 활성화된 다당류 용액에 첨가하였다. 반응물을 23℃ ± 2℃에서 최소 16 시간 동안 교반하였다.

[0336] 반응 용액을 5mM 나트륨 테트라보레이트(pH 8.6)로 10배로 희석하여 9 ± 0.2의 최종 희석된 pH가 수득되었다. 용액은 최소 4시간 동안 23 ± 3℃에서 교반하였다. 희석된 용액을 5 μm 여과기를 통과시키고 2 g/L인 목표 농 축물 농도까지 농축시켰다. 5 mM 숙시네이트(pH 7)를 사용하여 20다이하불륨을 통과하는 300K 재생 셀룰로스 막을 사용하여 접선 유동 여과를 수행하였다. 전형적인 막 시험감염은 1 그램/ft<sup>2</sup>이었다. 정제된 접합체를 0.22 μm 여과기를 통과시키고 2℃ 내지 8℃에서 저장하였다.

[0337] 실시예 12: 원-포트 및 복합 접합 방법을 사용한 혈청형 5 협막 다당류의 접합

[0338] 이 실시예는, 원-포트 또는 복합 방법에서의 접합을 위해 미리 선택된 범위의 분자량의 협막 다당류가 접합을 위해 사용될 수 있음을 입증하였다. 보다 큰 다당류는 초기에 박테리아 세포에 의해 생성되고, 결과물의 정제 된 분자량 범위는 실시예 9의 가수분해 방법의 pH 및 열에 의해 제어될 수 있다. 이러한 실시예에서, 혈청형 5 협막 다당류의 분자량 범위가 약 90 kDa 내지 약 140 kDa인 8개의 배치를 선택하고, 접합체는 전술한 원-포트 또는 복합 방법에서 트라이아졸(CDT)에 의한 활성화를 사용하여 수행되었다(표 19 참조). 제조된 접합체의 분 자량은 1125 kDa 내지 2656 kDa였다. CRM의 접합된 리신의 개수는 최대 22 내지 최소 15이다. 유리 당은 최대 23% 내지 최소 11%의 범위이다.

### 표 19

90 kDa 내지 140 kDa 피낭 다당류로 제조된 혈청형 5 피낭 다당류 접합체

방법	수행	폴리 MW (kDa)	다당류 수율 (%)	유리 당 (%)	SEC-MALLS 에 의한 MW(kDa)	리신
원 포트	1	142	93	11	1932	19
	2	108	93	14	1117	20
	3	142	85	17	1609	15
	4	108	86	23	1125	15
복합	1	121	63	11	2130	19
	2	92	72	16	1533	22
	3	119	74	14	2656	15
	4	115	63	18	1911	15

[0339]

[0340] 실시예 13: 혈청형 5 협막 다당류 접합체는 무린 깔때기 신장염 모델에서의 보호를 일관되게 나타낸다.

[0341] 혈청형 5 협막 다당류 접합체를, 깔때기 신장염 모델에서 마우스를 보호하는 그의 능력에 대해 평가하였다. i.p. 황색포도상구균 시험감염을 수용한 마우스의 혈액내 박테리아 수는, PBS로 면역화시킨 대조군에 비해 상 당히 감소하였다.

[0342] 모든 6개의 개별적인 연구는, 면역화된 동물내 신장의 cfu/ml의 유의한 감소를 나타냈다(도 9 참조). 메타 분 석을 위해 이러한 연구들을 모으면, 전체적으로 연구들의 총 유의도가 0.0001 미만까지 증가되었다. 상기 데이 타는, 협막 다당류 접합체에 의한 능동 백신접종 후 신장 균체의 일관된 감소를 나타냈다.

[0343] 실시예 14: 상이한 접합 화학에 의해 제조된 혈청형 5 협막 다당류 접합체는 시험 감염에 대해 마우스를 보호한다.

[0344] 뮤린 깔때기신장염 모델에서의 능동 면역 연구는, PDPH 또는 CDT 화학에 의해 제조되는 혈청형 5 협막 다당류 접합체에 의해 수행되었다. CRM<sub>197</sub>에 협막 다당류를 접합하는 방법은 전술한 바와 같다. 결과는, 가짜 면역화된 동물에 비해 마우스에서 둘다의 접합체가 균체를 감소시킴을 나타낸다(표 20 참조).

표 20

깔때기 신장염 모델에서 황색포도상구균 시험감염에 대한 보호와 관련된

PDPH 대 CDT 접합의 효과

연구 번호	항원	균주/투여량	logCFU/신장	유의도
연구 1	염수+A1PO <sub>4</sub>	PFESA0266 2 x 10 <sup>8</sup>	5.53 ±1.90	---
	1 mcg CP5-CRM (PDPH) +A1PO <sub>4</sub>		3.01 ±1.83	p < 0.001
	1 mcg CP5-CRM (CDT) +A1PO <sub>4</sub>		1.67 ±0.23	p < 0.0001
	염수+A1PO <sub>4</sub>		6.17 ±1.76	---
연구 2	염수+A1PO <sub>4</sub>	PFESA0266 2.7 x 10 <sup>8</sup>	3.06 ±1.69	p < 0.0001
	1 mcg CP5-CRM (PDPH) +A1PO <sub>4</sub>		1.87 ±0.69	p < 0.0001
	1 mcg CP5-CRM (CDT) +A1PO <sub>4</sub>			
	염수+A1PO <sub>4</sub>			

[0345]

[0346] 실시예 15: 혈청형 5 협막 다당류 접합체의 능동 면역은 래트 심장 내막염 모델에서 래트를 보호한다.

[0347] CP5-CRM<sub>197</sub> PDPH 접합체를 사용하여 4가지의 연구가 수행되었다. 혈청형 5 협막 다당류 접합체는, 3회의 시험 중 2개에서 심장 및 신장 둘다에서 황색포도상구균 PFESA0266으로 시험감염한 이후의 회수된 CFU를 상당히 감소시켰다(표 21 참조). 제 3의 연구에서, 3회 시험 중 가장 낮은 기하 평균 역가(GMT) 항-CP5 역가이지만, 이는 이전의 시험에 비해 약간 작았다.

표 21

항원형 5 피낭 다당류-CRM<sub>197</sub> 면역화는 래트 심장 내막염 모델에서 CFU를 감소시켰다

면역원성 조성물	시험감염 균주 /투여량	회수된 Log CFU		유의도		GMT CP 역가
		심장	신장	심장	신장	
1 mcg CP5-CRM	PFESA0266 2.21 x 10 <sup>8</sup> cfu	4.34± 1.78	3.92± 1.73			103,000
1 mcg PP5-CRM		7.94± 0.78	6.77± 0.79	p<0.001	p<0.05	
1 mcg CP5-CRM	PFESA0266 6.5 x 10 <sup>7</sup> cfu	4.43± 2.30	3.11± 2.33			51,000
염수		5.63± 2.48	4.19± 2.05	없음	없음	
1 mcg CP5-CRM	PFESA0266 4.0 x 10 <sup>8</sup> cfu	4.01± 2.49	3.90± 1.92			67,000
염수		7.52± 1.38	6.52± 1.17	p<0.0002	p<0.0002	

[0348]

[0349] 실시예 16: LMW CP5 접합체 백신에 비해 마우스에서 HMW CP5 접합체 백신의 강화된 면역원성

[0350] 상이한 CP5 접합체 제형의 면역원성 및 효과를 평가하기 위해서 뮤린 깔때기 신장염 연구를 수행하였다. 두 개의 제형을 시험하였다: 제 1 제형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 고분자량의(HMW) CP5(약 300 kDa)로 구성된다. 제 2 제형

은, CRM<sub>197</sub>에 접합된 낮은 분자량(LMW) CP5(약 25 kDa)를 함유한다. 이러한 투여량 수준을 HMW 백신(1, 0.1 및 0.01 mcg)에 대해 시험하였다. LMW 백신은 1 mcg에서 시험하였다. CRM197(PP5)에 접합된 연쇄구균 페럼으로부터 유도된 다당류 접합체 백신으로 구성된 음성 대조군이 유도되었다. 다당류는, 제 0 주, 제 3 주 및 제 6 주에 22mcg AIP04와 제형화되고, 제 8 주에 황색포도상구균 PFESA0226으로 시험감염되었다. 신장을 수확하여 시험감염 후 48시간에서 박테리아의 균락을 계수하였다. 둘다의 백신은 면역 반응의 발생에 유효하였고, 황색포도상구균 PFESA0266의 CFU의 감소는 HMW 및 LMW 백신의 1ug 군으로 백신접종된 마우스의 신장으로부터 관찰되었다. 이는, 낮은 백신 투여량으로부터 감소된 효과에 의해 검증되는 바와 같이 투여량 의존적이었다(도 10 참조). CFU 판독은, HMW 및 LMW 백신에 대한 효능의 차이를 검출할 정도로 민감하지 않았다. 따라서, 마우스로부터의 혈청을 OPA로 시험하였다. OPA 역가는, OPA 분석에서 황색포도상구균 군주 PFESA0266 중 40%를 살해하는 것이 요구되는 혈청 희석으로서 정의되었다. 개선된 OPA 역가는, LMW 제형에 비해 HMW 백신의 경우 관찰되었다(도 11 참조).

[0351] 실시예 17: 고분자량의 다당류를 포함하는 피당 다당류 접합체는, 저분자량 다당류를 포함하는 접합체에 비해 개선된 면역원성을 나타낸다.

[0352] 상이한 헤파스 접합체 제형의 면역원성을 평가하기 위해서, 인간 이외의 영장류(Non human primate; NHP) 연구를 수행하였다. 2종의 제형을 2개의 상이한 투여 수준(2 및 20ug)에서 시험하였다. 제 1 제형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 고분자량의(HMW) 다당류(약 130 kDa)를 함유하였다. 제 2 제형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 저분자량(LMW) 다당류(약 25 kDa)를 함유하였다. 5종의 영장류의 군은, 1회 투여의 백신으로 백신접종되었고, 백신접종 전 및 백신접종 2주 후에 면역 역가를 모니터링하였다. OPA 역가는, OPA 분석에서 황색포도상구균 군주 PFESA0266 중 40%를 살해하기 위해 요구되는 혈청의 희석으로서 정의되었다. 항체 역가는 또한 ELISA에 의해 모니터링되었다. 개선된 활성은 LMW 제형에 비해 HMW 백신에 대해 시험하였고(표 22 참조), LMW 백신에 비해 HMW 백신의 항체 역가의 10배 상승에 의해 입증되었다. HMW 백신을 수용한 NHP에 대한 OPA 반응자 비율(responder rate)도 높았다(40%에 비해 80%).

표 22

LMW 다당질 접합체 백신에 비해 HMW 다당류 접합체 백신의 경우 개선된 면역성이 관찰되었다.

	동물당 CP5-CRM197 투여량 수준(mcg)	PDI*의 기하 평균	OPA 반응자 비율 (%) ±
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40
* 예비-백신 역가에 비해 백신접종 2주 후의 CP5 ELISA 역가로부터 배 증가율(fold rise)을 계산하였다. ± 반응자 비율은, 백신접종 2주 후의 단일 투여 이후의 OPA 역가의 상승을 발생시킨 원숭이로부터 계산하였다. 각각의 군은 5마리의 붉은 털 원숭이를 포함하고, 백신은 AIP04(250 mcg/투여)와 제형화되었다.			

[0353]

[0354] 실시예 18: 다당류 O-아세틸화는 혈청형 5 헤파스 다당류 접합체에 대한 보호 항체 반응의 유도를 위해 중요하다.

[0355] 혈청형 5 헤파스 다당류의 O-아세틸화의 중요성을 평가하기 위해서, 천연 헤파스 다당류는, 앞에서 논의한 바와 같이, 탈-O-아세틸화(dOAc)시키고 PDPH 접합 화학을 사용하여 CRM<sub>197</sub>에 접합시켰다(dOAc-CRM<sub>197</sub>). dOAcCP-CRM<sub>197</sub> 접합체의 효능은 무린 깔때기신장염 모델에서 CP5-CRM<sub>197</sub>과 나란히 비교하였다.

[0356] O-아세틸 기 결핍 접합체(dOAc CP5-CRM)를 갖는 면역화는, 신장에서의 회수된 박테리아 CFU를 감소시키는 것을 실패하였다. 이러한 데이터(표 23 참조)는, O-아세틸화가 CP5에 비해 기능성 항체를 끌어냄에 중요함을 나타낸다.

다.

표 23

탈-O-아세틸화된 혈청형 5 피낭 다당류 접합체에 의한 면역화는, 신장 균체로부터 마우스를 보호하지 않는다.

연구 번호	항원	균주/투여량	LogCFU/신장	유의도
연구 1	1 mcg PP5-CRM	PFESA0266 7 x 10 <sup>8</sup>	3.89 ± 2.24	p-값 < 0.008
	1 mcg dOAc CP5-CRM		4.20 ± 1.75	
	1 mcg CP5-CRM		1.75 ± 0.39	
연구 2	염수	PFESA0266 2.4 x 10 <sup>8</sup>	5.08 ± 1.96	p-값 < 0.02
	1 mcg dOAc CP5-CRM		5.89 ± 1.29	
	1 mcg CP5-CRM		2.93 ± 2.11	

[0357]

[0358] 실시예 19: 공지된 특이성을 갖는 단일클론성 항체를 사용하는 OPA에 의해 혈청형 5 협막 다당류의 기능성 에피토프로서 O-아세틸화의 중요성의 확인

[0359] OAc+ (CP5-7-1), OAc+/- (CP5-5-1) 및 OAc- (CP5-6-1)에 대해 특이성을 갖는 혈청형 5 협막 다당류 단일클론성을, 혈청형 5 균주 PFESA0266에 대해 OP 살해 활성에 대해 평가하였다(표 24 참조). 혈청형 8 협막 다당류에 대한 단일클론성 항체(CP8 OAc+에 대해 특이성인 CP8-3-1)를, 대조군으로서 사용하였다.

[0360] OAc-특이성 항-CP5 mAb CP5-7-1은 황색포도상구균 PFESA0266의 살해를 매개하였다(표 24 참조). 또한, CP5 OAc+ 및 CP5 OAc- 둘다에 의해 공유된 에피토프를 인식하는 단일클론성 항체 CP5-5-1은, PFESA0266 균주의 살해를 매개하였다. 혈청형 5 OAc-협막 다당류 상에 존재하는 에피토프에 특이성인 단일클론성 항체는, PFESA0266 균주의 살해를 매개하지 않는다. 이러한 결과는, 혈청형 5 협막 다당류에 대한 O-아세틸 에피토프가 혈청형 5-특이성 항체의 기능성 활성을 끌어내기 위해 필요함을 나타낸다.

[0361] 항체들은, 항체가 박테리아를 살해함을 입증하는 동물 효능 모델 또는 옴소닌의 식세포 살해 분석법에서 박테리아의 살해에 의해 측정되는 바와 같이 기능성일 필요가 있다. 기능성 살해는, 효능 측면에서 O-아세틸화의 중요도를 나타내지 못하는, 항체 단독의 발생을 모니터링하는 분석을 사용하여서는 입증할 수 없다.

표 24

O-아세틸화된 (+) 혈청형 5 피낭 다당류 및 O- 및 탈-O-아세틸화된 (+/-)

항원형 5 피낭 다당류에 특이성인 단일클론성 항체는, 황색포도상구균

PFESA0266(유형 5)에 대한 옴소닌이다.

CP5-5-1 (O-Ac +/-) (mcg)				CP5-6-1 (O-Ac -) (mcg)				CP5-7-1 (O-Ac +) (mcg)				CP8-3-1 (-대조군) (mcg)			
20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5	20	10	5	2.5
28	33	30	21	-12	-5	-12	-5	31	46	49	55	-18	-3	-13	-5

데이터는 살해율에 대해 보고하였고, 박테리아, 보체 및 HL-60 세포를 함유하지만 항체가 결핍된 웰에서 생존하는 CFU 개수에 비해, 박테리아, 항체, 보체 및 HL-60 세포를 갖는 웰에서 60분에서 생존하는 CFU의 개수의 비를 측정함으로써 계산되었다.

[0362]

[0363] 실시예 20: 개선된 면역원성이, 인간 이외의 영장류(NHP)에서 저분자량 다당류에 비해 고분자량의 다당류로 구

성된 CP5 접합체에 대해 관찰되었다.

[0364] 상이한 협막 접합체 제형의 면역원성을 평가하기 위해서, 인간 이외의 영장류(NHP) 연구를 수행하였다. 2종의 제형이 2개의 상이한 투여 수준(2 및 20ug)에서 시험하였다. 제 1 제형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 고분자량의(HMW) 다당류(약 130 kDa)를 함유하였다. 제 2 제형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 저분자량(LMW) 다당류(약 25 kDa)를 함유하였다. 5종의 영장류의 군은, 1회 투여의 백신으로 백신접종되었고, 백신접종 전 및 백신접종 2주 후에 면역 역가를 모니터링하였다. OPA 역가는, OPA 분석에서 황색포도상구균 균주 PFESA0266 중 40%를 살해하기 위해 요구되는 혈청의 희석으로서 정의되었다. 항체 역가는 ELISA에 의해 모니터링되었다. 개선된 활성은 LMW 제형에 비해 HMW 백신의 경우 관찰되었다(표 25 참조). LMW 백신에 비해 HMW 백신의 경우 항체 역가가 3 내지 10배 상승하였다. HMW 백신을 수용한 NHP에 대한 OPA 반응자 비율도 높았다(40%에 비해 80%).

## 표 25

LMW 다당류 접합체 백신에 비해 HMW 다당류 접합체 백신에 대한 개선된 면역성이 관찰되었다.

	동물당 CP5-CRM197 투여량 수준(mcg)	PDI*의 기하 평균	OPA 반응자 비율 (%)±
HMW (125 kDa)	20	32	80
	2	21	80
LMW (25 kDa)	20	3	40
	2	8	40

\* 예비-백신 역가에 비해 백신접종 2주 후의 CP5 ELISA 역가로부터 배 증가율(fold rise)을 계산하였다. ±반응자 비율은, 백신접종 2주 후의 단일 투여 이후의 OPA 역가의 상승을 발생시킨 원숭이로부터 계산하였다. 각각의 군은 5 마리의 붉은 털 원숭이를 포함하고, 백신은 AIP04(250 mcg/투여)로 제형화되었다.

[0365]

## 요약

[0366]

[0367] 본원에서 기술한 접합 화학 둘다는, 운반 단백질 CRM<sub>197</sub>에 비해 공유 결합된 혈청형 5 협막 다당류를 제조하였다. 이러한 2가지의 방법에 의해 발생된 접합체의 수율, 혈청형 5 다당류:단백질의 비율, 유리 단당류에서 어떠한 상당한 차이도 없었다.

[0368]

본 명세서에서 언급된 모든 공개공보 및 특허 출원서는, 본 발명이 속하는 당분야의 숙련자의 수준을 나타낸다. 모든 공개공보 및 특허 출원은, 각각의 개별적인 공개공보 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 인용되는 것으로 나타내는 것과 동일한 정도로 참고문헌으로 본원에서 인용된다.

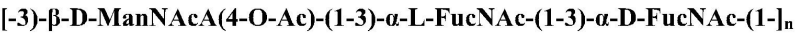
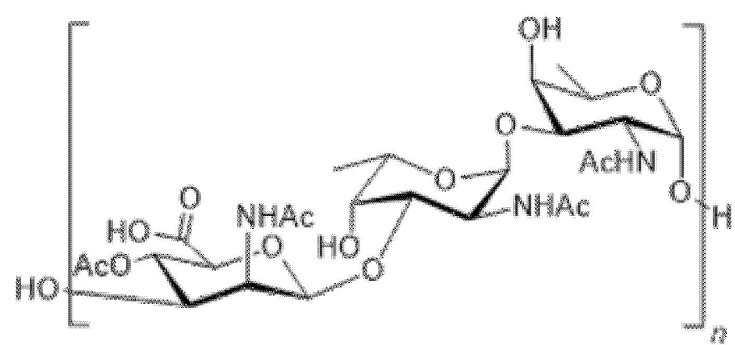
[0369]

전술한 특허는, 명확한 이해를 위해 설명 및 예를 사용하여 보다 상세하게 기술되고 있지만, 특정 변형 및 개조는 첨부된 특허청구범위의 범주에서 수행될 수 있다.

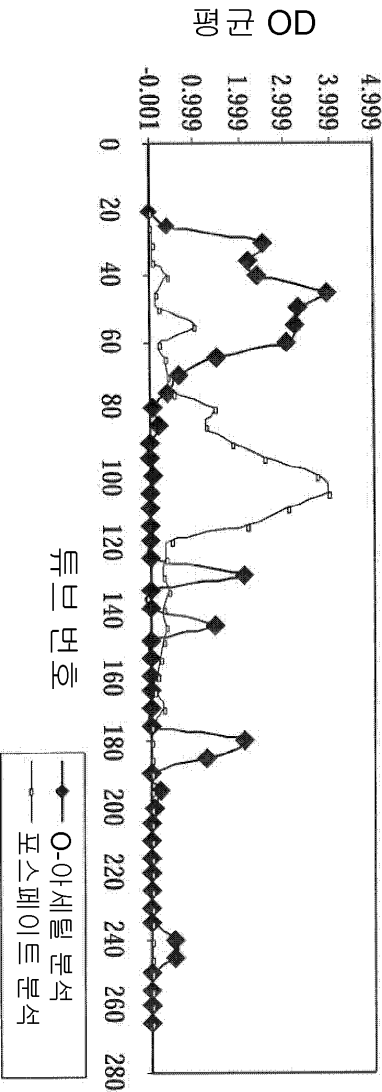


도면

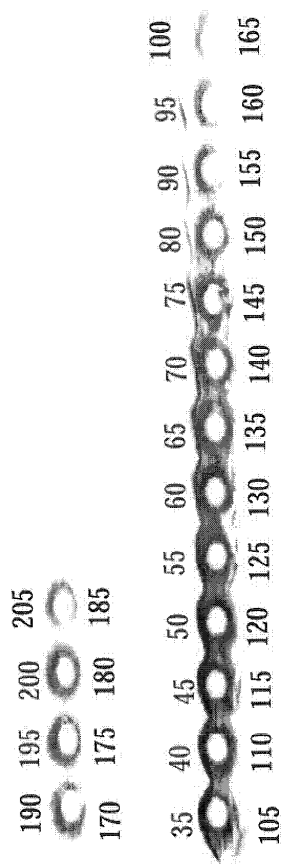
도면1



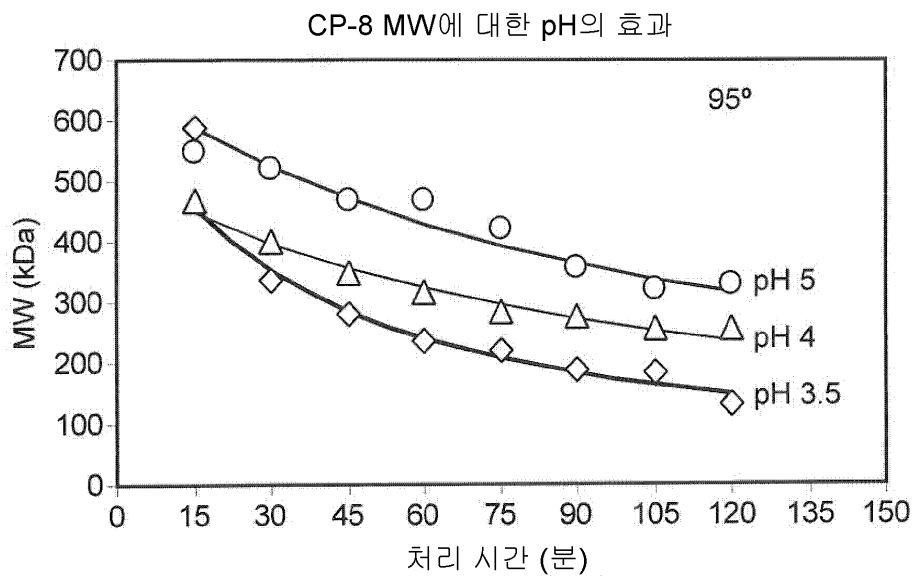
도면2a



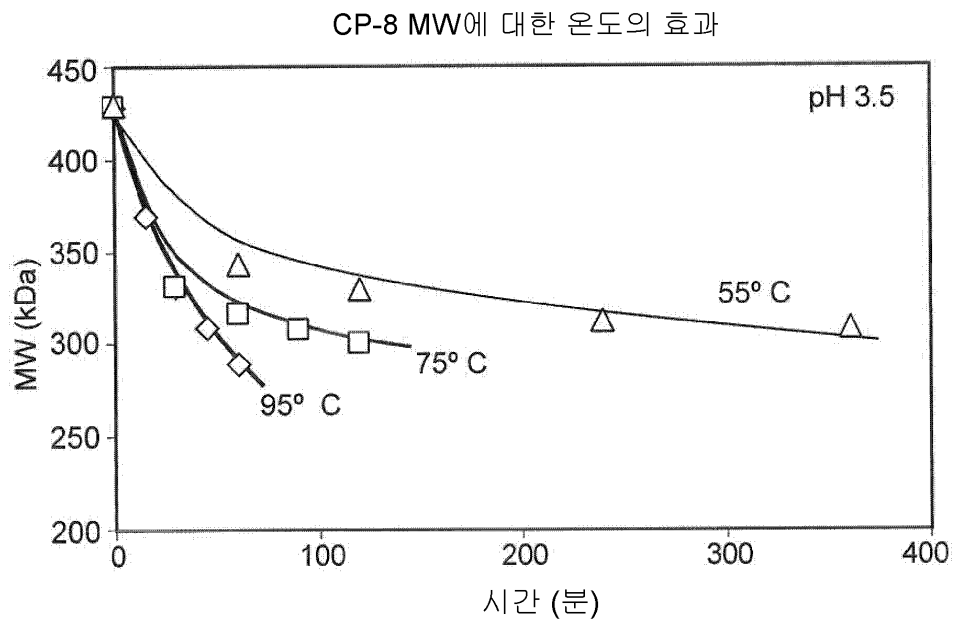
도면2b



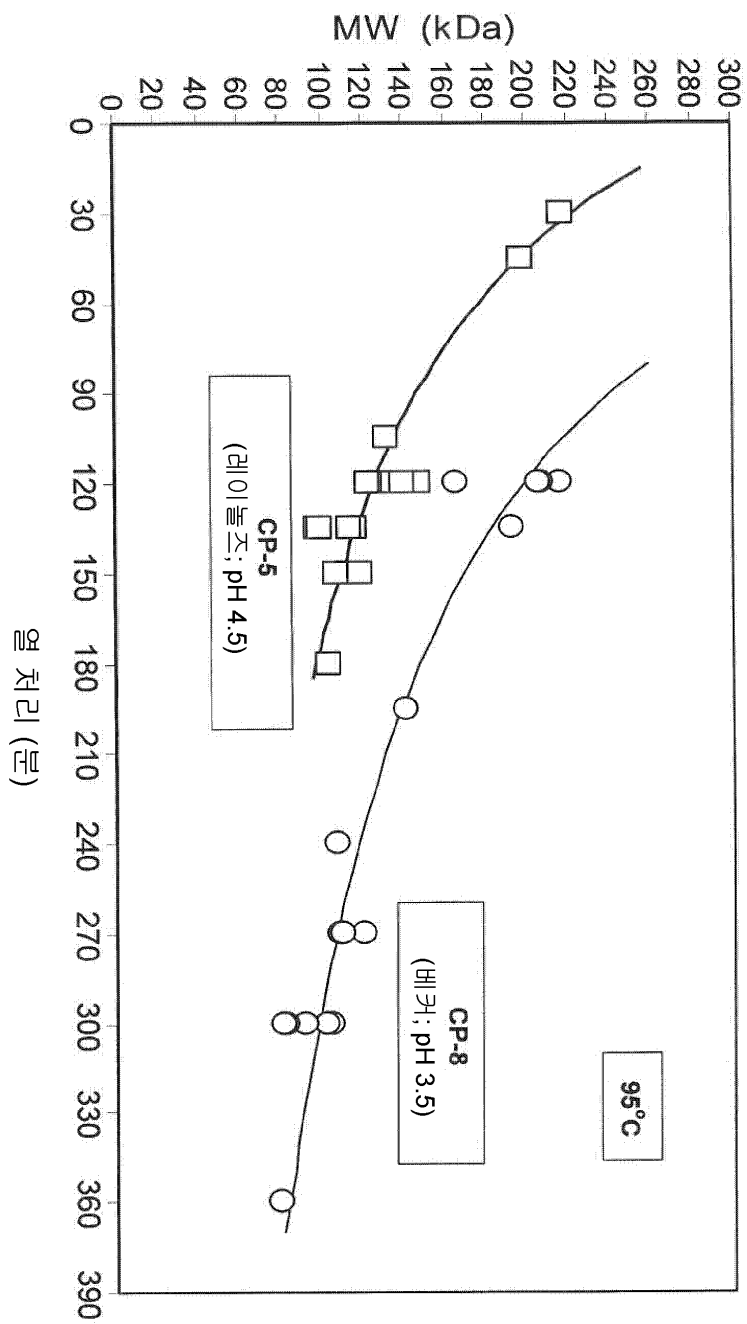
도면3a



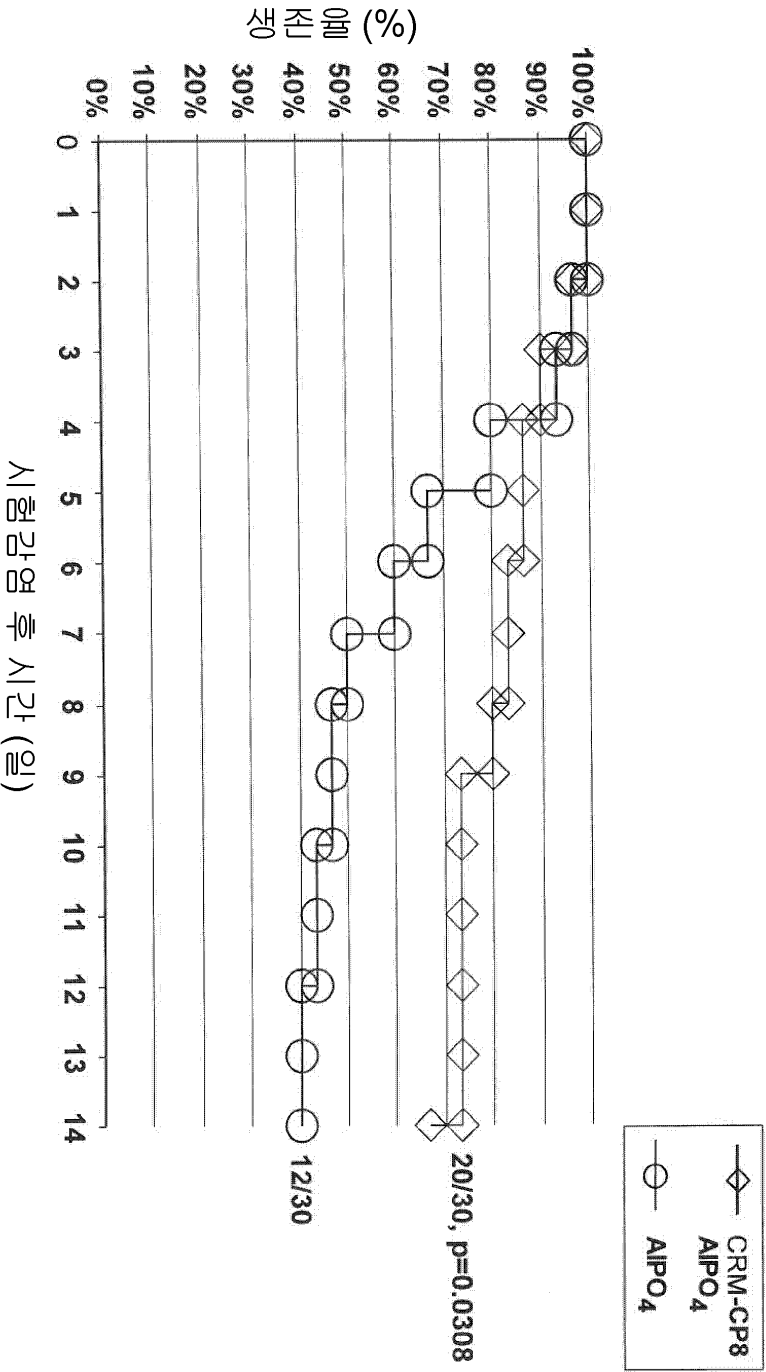
도면3b



도면4

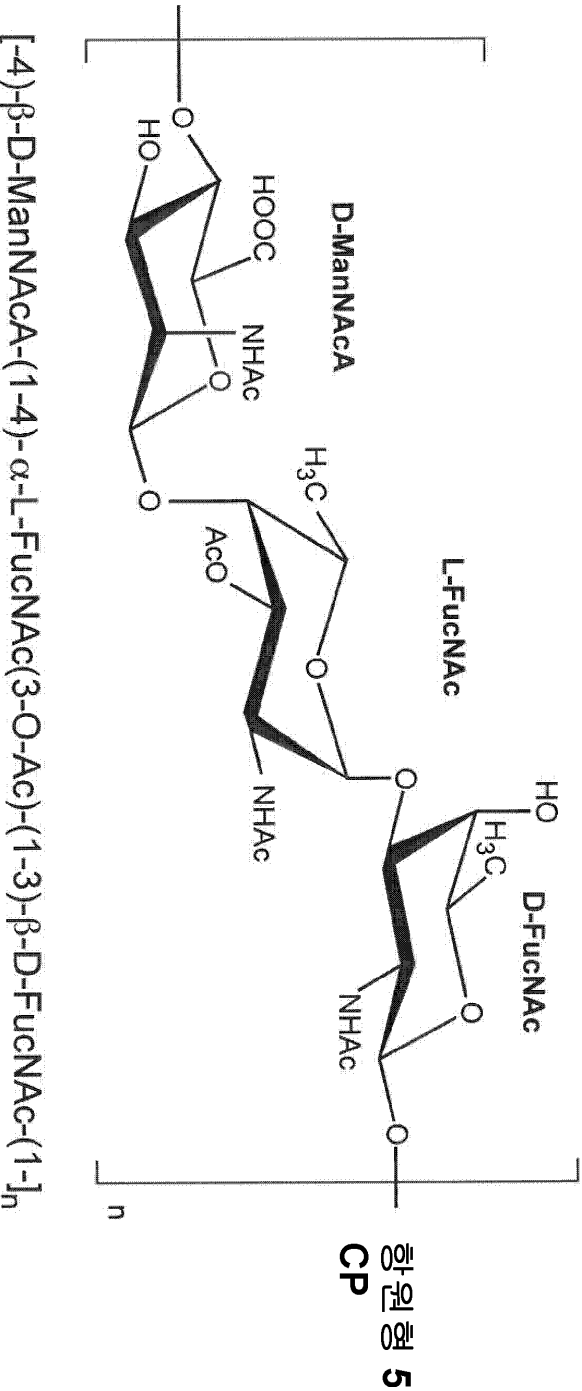


도면5

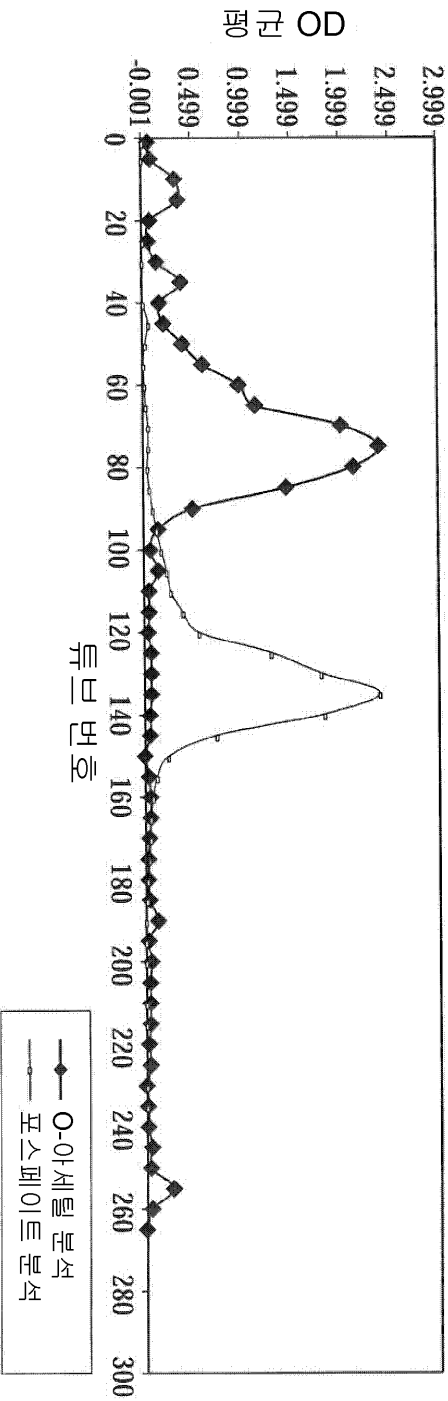




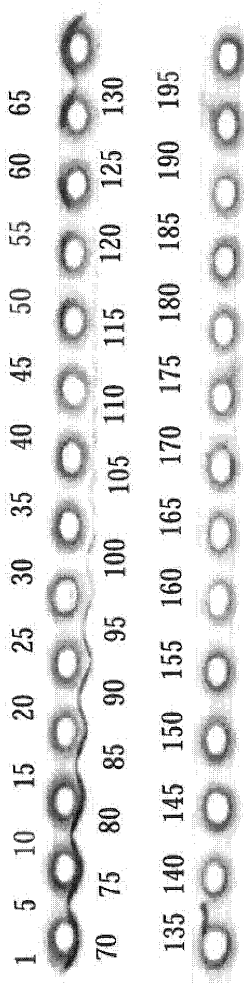
도면6



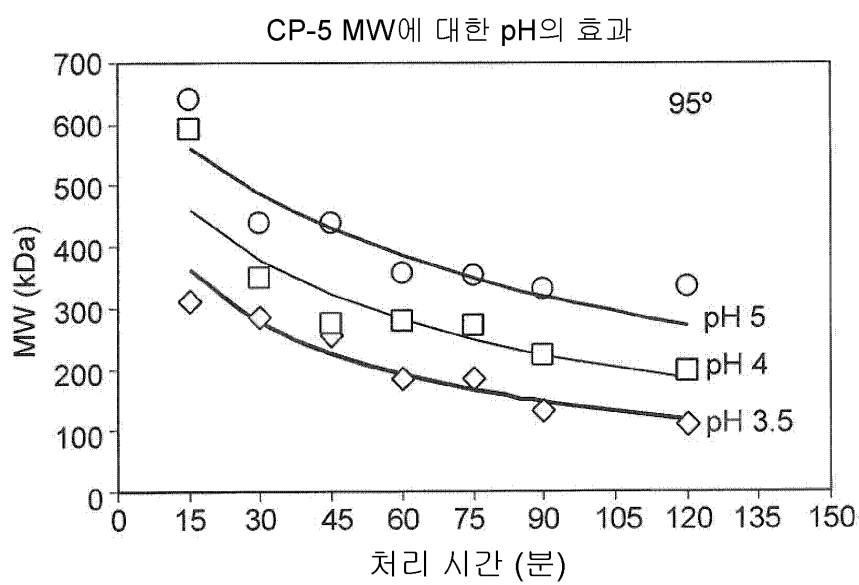
도면7a



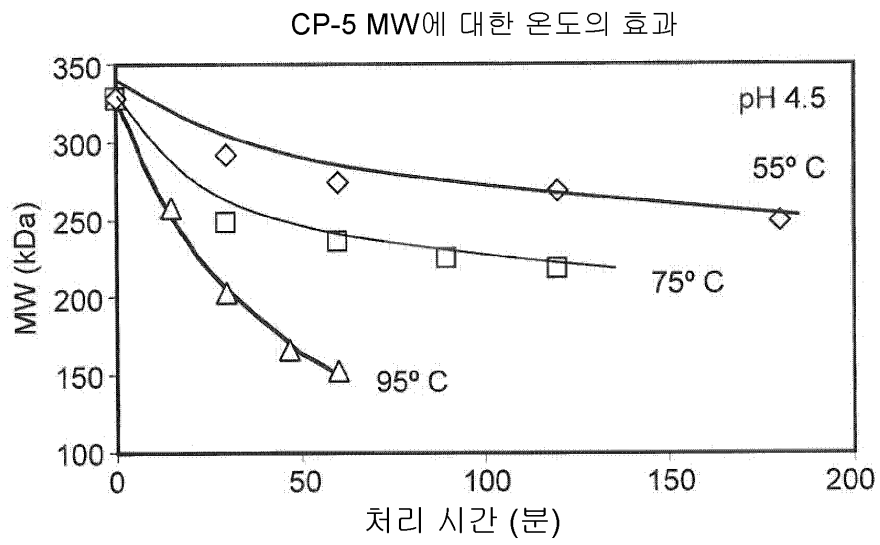
도면7b



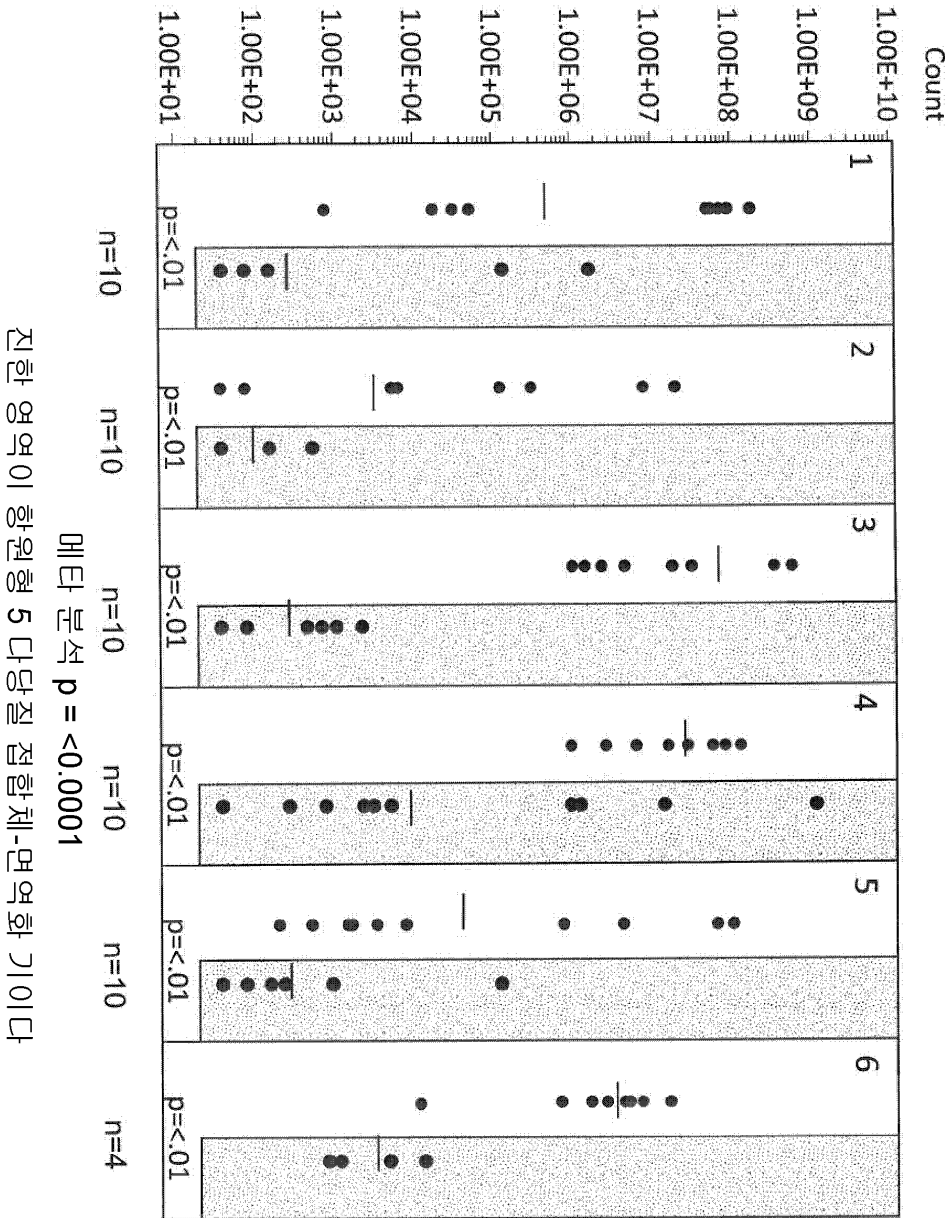
도면8a



도면8b

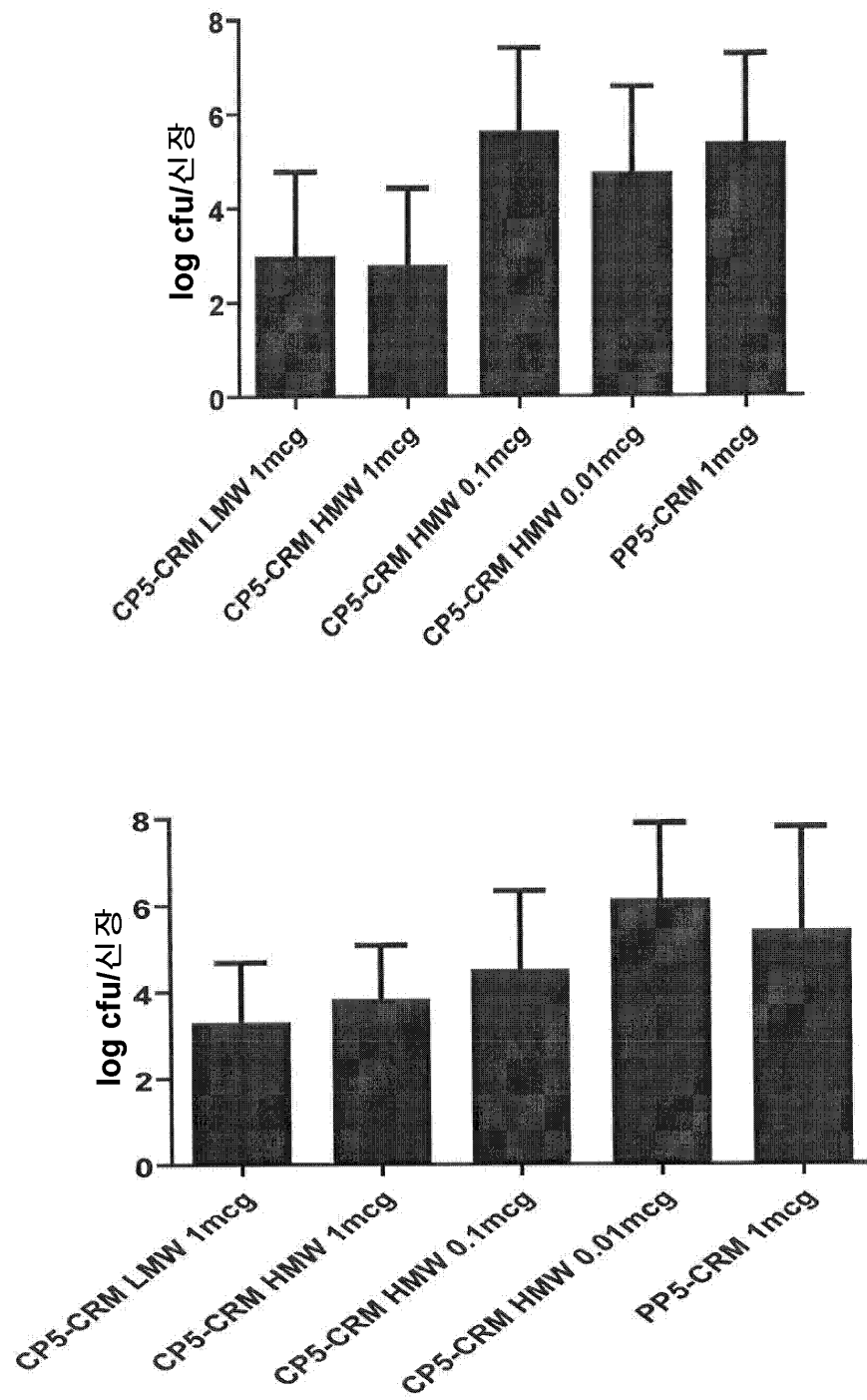


도면9





도면10



도면11

