



(52) CPC특허분류

A61K 2039/6037 (2013.01)

A61K 2039/62 (2013.01)

A61K 2039/64 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제1 그룹 접합체와 제2 그룹 접합체를 포함하는 면역원성 조성물로서,

상기 제1 그룹 접합체가 1가 접합체들의 제1 콜렉션을 포함하고, 각각의 1가 접합체가 제1 운반 단백질 (carrier protein) 및 스트렙토코커스 뉴모니에 (*Streptococcus Penumoniae*)의 피막 다당류 (capsular polysaccharide)를 포함하고, 상기 제1 콜렉션이 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 5, 7F, 14, 18C, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 피막 다당류들을 포함하며;

상기 제2 그룹 접합체가 2가 접합체들의 제2 콜렉션을 포함하고, 각각의 2가 접합체가 제2 운반 단백질, 및 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 6A 및 6B, 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 9V 및 9N, 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 15A 및 15B, 및 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 19A 및 19F로 이루어진 군의 하나 이상에서 선택되는 스트렙토코커스 뉴모니에의 2 이상의 피막 다당류들을 포함하고, 상기 피막 다당류 하나 이상이 2 관능성 링커로서 폴리에틸렌글리콜(PEG)를 통해 커플링되고, 상기 2가 접합체가 피막 다당류보다 적은 양으로 운반 단백질을 포함하는,

면역원성 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제2 그룹 접합체가 2가 접합체이거나;

상기 제2 그룹 접합체가 2가 접합체를 포함하고, 2가 접합체의 피막 다당류는 10 kDa 내지 50 kDa, 30 kDa 내지 100 kDa, 또는 100 kDa 내지 300 kDa 의 분자량을 가지거나; 또는

상기 제2 그룹 접합체에서 상기 2 관능성 링커가 9-40 Å의 스페이서 암 (spacer arm)을 더 포함하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 2가 접합체가 식 PS1-운반 단백질-PS2로 표시되는 2개의 면역학적으로 교차-반응성인 혈청형 (immunologically cross-reactive serotype)을 포함하며, 상기 식에서 PS1과 PS2는 서로 다른 다당류이고 운반 단백질이 제2 운반 단백질이거나; 또는

상기 2가 접합체가 동일한 운반 단백질에 연속적으로 또는 동시에 접합된, 면역원성 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1 운반 단백질 및/또는 상기 제2 운반 단백질이 파상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드, CRM197, 파상풍 독소이드 단편 (TTHc), 네이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*) 단백질 PorB, RSV 바이러스 단백질, 보르데텔라 퍼투시스 (*Bordetella Pertussis*) 단백질, 백일해 독소이드 (PT), 아데닐레이트 사이클라제 독소 (ACT), 인간 파필로마 바이러스 단백질 항원, 인간 파필로마 바이러스 69 KDa 단백질, 인간 파필로마 바이러스 VLP 형태, B형 간염 바이러스 코어 항원, B형 간염 바이러스 VLP 형태, HBsAg의 유도체 및/또는 이들의 조합을 포함하거나; 또는

상기 제1 및 제2 운반 단백질의 함량이 상기 접합체의 0.5 중량% 내지 0.8 중량%인, 면역원성 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

1회 투여량 (single dose)이 4  $\mu\text{g}$  미만을 포함하거나; 또는

1회 투여량의 투여가 동일 다당류의 1가 접합체만을 포함하는 비슷한 접합체의 투여와 비교해, 운반 단백질에 대한 면역 반응을 보다 낮은 수준으로 유발하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 1가 접합체 하나 이상이 링커를 포함하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

알루미늄 염, 칼슘 포스페이트, 모노포스포릴 지질 A (MPLA) 리포좀, 사포닌 QS-21 및 강력한 TLR7/8 작용제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 보강제를 더 포함하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 알루미늄 염이 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

헤모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*) 타입 a 및/또는 b; B군 스트렙토코커스 (*Group B Streptococcus*), 모락셀라 카타랄리스 (*Moraxella catarrhalis*) 리포-올리고당 (LOS), 비-피막형 (non-typeable) 헤모필러스 인플루엔자 (NTHi) 및/또는 네이세리아 메닝기티디스 (*N. meningitidis*)의 하나 이상의 혈청형의 피막 다당류를 더 포함하는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 11

제1 그룹의 1가 피막 다당류(capsular polysaccharide) 및 제2 그룹의 2가 피막 다당류를 포함하는 면역원성 조성물로서,

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus Penumoniae*) 혈청형 1, 3, 5, 7F, 14, 18C, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 다당류들을 포함하며;

상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 6A 및 6B, 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 9V 및 9N, 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 15A 및 15B, 및 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 19A 및 19F로 이루어진 군의 하나 이상에서 선택되는 2 이상의 다당류들을 포함하고,

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 각각 제1 PEG 링커 및 제1 운반 단백질에 공유적으로 커플링되고,

상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 각각 제2 PEG 링커 및 제2 운반 단백질에 공유적으로 커플링되는, 면역원성 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에의 2개의 면역학적으로 교차-반응성인 혈청형 (immunologically cross-reactive serotype)을 포함하거나;

상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 다당류-PEG-운반 단백질-PEG-다당류의 구조 또는 6A-PEG-CRM197-PEG-6B의 구조를 포함하거나; 또는

상기 2가 피막 다당류가 상기 제2 운반 단백질에 연속적으로 또는 동시에 공유적으로 커플링된, 면역원성 조성물.

**청구항 13**

제11항에 있어서,

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류 및/또는 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 10 kDa 내지 50 kDa, 30 kDa 내지 100 kDa, 및/또는 100 kDa 내지 300 kDa의 피막 다당류를 포함하거나; 또는

제2 그룹의 2가 피막 다당류와 중량으로 대략 등량의 제1 그룹의 1가 피막 다당류를 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 14**

제11항에 있어서,

상기 제1 운반 단백질 및/또는 제2 운반 단백질이 파상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드, CRM197, 파상풍 독소이드 단편 (TTHc), 네이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*) 단백질 PorB, RSV 바이러스 단백질, 보르데텔라 퍼투스시스 (*Bordetella Pertussis*) 단백질, 백일해 독소이드 (PT), 아데닐레이트 사이클라제 독소 (ACT), B형 간염 바이러스의 69 KDa 단백질, 인간 파필로마 바이러스 단백질 항원, 인간 파필로마 바이러스 바이러스-유사 입자 (VLP) 형태, B형 간염 바이러스 코어 항원, B형 간염 바이러스 VLP 형태, B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg), 및/또는 이들의 조합을 포함하거나; 또는

상기 제1 및 제2 운반 단백질 0.5 중량% 내지 0.8 중량%을 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 15**

제11항에 있어서,

투여량 당 4  $\mu$ g 이하의 총 다당류를 포함하거나;

총 운반 단백질과 중량으로 대략 등량의 피막 다당류를 포함하거나; 또는

총 운반 단백질보다 중량으로 더 많은 함량의 피막 다당류를 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 16**

제11항에 있어서,

하나 이상의 보강제를 더 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서,

상기 보강제가 알루미늄 염, 칼슘 포스페이트, 모노포스포릴 지질 A (MPLA) 리포솜, 사포닌 QS-21, TLR7/8 작용제, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서,

상기 알루미늄 염이 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역원성 조성물.

**청구항 19**

제11항에 있어서,

헤모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*) 타입 a, 헤모필러스 인플루엔자 타입 b, B군 스트렙토코커스

(Group B Streptococcus), 네이세리아 메닝기티디스 (*N. meningitis*) 및/또는 이들의 조합의 하나 이상의 혈청형을 더 포함하거나;

헤모필러스 인플루엔자 혈청형 a/b/c/d/e/f, 비-피막형 (non-typeable) 헤모필러스 인플루엔자 (NTHi) 다당류, 모락셀라 카타랄리스 (*Moraxella catarrhalis*) 리포올리고당 (LOS) 또는 이들의 조합에서 유래한 1가 피막 다당류 및/또는 2가 또는 다가 피막 다당류를 더 포함하거나;

네이세리아 메닝기티디스 (*N. meningitis*) 혈청형 A, B, C, Y, W-135 또는 X 의 피막 다당류를 포함하는 1가 피막 다당류 및/또는 2가 또는 다가 피막 다당류를 더 포함하거나;

B군 스트렙토코커스 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, 또는 N 의 피막 다당류를 포함하는 1가 피막 다당류 및/또는 2가 또는 다가 피막 다당류를 더 포함하거나; 또는

헤모필러스 인플루엔자, 네이세리아 메닝기티디스 (*N. meningitis*), B군 스트렙토코커스 (*Group B Streptococcus*), 및/또는 이들의 조합의 피막 다당류를 더 포함하는, 면역원성 조성물.

### 청구항 20

제11항에 있어서,

개체에게 투여시, 동일 피막 다당류를 포함하는 1가 집합체와 비교해, 운반 단백질에 대한 면역 반응을 보다 낮은 수준으로 유발하거나; 또는

스트렙토코커스 박테리아에 의한 감염에 효과적인 치료를 제공하는, 면역원성 조성물.

### 청구항 21

제11항에 있어서,

1가 피막 다당류 및 2가 피막 다당류를 치료학적 유효량으로 포함하고,

약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는, 면역원성 조성물.

### 청구항 22

제1 그룹의 1가 피막 다당류(capsular polysaccharide) 및 제2 그룹의 2가 피막 다당류를 포함하는 면역원성 조성물로서,

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에(*Streptococcus Penumoniae*) 혈청형 1, 3, 5, 7F, 14, 18C, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 다당류들을 포함하고;

상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 6A 및 6B, 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 9V 및 9N, 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 15A 및 15B, 및 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 19A 및 19F로 이루어진 군의 하나 이상에서 선택되는 2 이상의 다당류들을 포함하고;

상기 제2 그룹에 포함되지 않은 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 6A, 6B, 9N, 9V, 15A, 15B, 19A 및 19F가 제1 그룹에 포함되고;

제1 그룹의 1가 피막 다당류가 각각 제1 PEG 링커 및 제1 운반 단백질에 공유적으로 커플링되고, 및

상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 각각, 제2 운반 단백질에 커플링된 제2 PEG 링커에 공유적으로 커플링되는, 면역원성 조성물.

### 청구항 23

제22항에 있어서,

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 5, 7F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B의 다당류를 포함하고, 상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 6A, 6B, 9N 및 9V의 다당류를 포함하거나;

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 5, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 다당류를 포함하고, 상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에

에 혈청형 6A, 6B, 15A, 및 15B의 다당류를 포함하거나;

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 5, 7F, 9N, 9V, 14, 15A, 15B, 18C, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 다당류를 포함하고, 상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 6A, 6B, 19A, 및 19F의 다당류를 포함하거나;

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 다당류를 포함하고, 상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 9N, 9V, 15A, 및 15B의 다당류를 포함하거나;

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 15A, 15B, 18C, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 다당류를 포함하고, 상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 9N, 9V, 19A 및 19F의 다당류를 포함하거나;

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 3, 5, 6A, 6B, 7F, 14, 9N, 9V, 18C, 22F, 23F, 33F, 및 35B의 다당류를 포함하고, 상기 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 15A, 15B, 19A 및 19F의 다당류를 포함하거나; 또는

상기 제1 그룹의 1가 피막 다당류 및/또는 제2 그룹의 2가 피막 다당류가 10 kDa 내지 50 kDa, 30 kDa 내지 100 kDa, 및/또는 100 kDa 내지 300 kDa의 피막 다당류를 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 24**

제22항에 있어서,

투여량 당 4  $\mu$ g 이하의 총 다당류를 포함하거나;

총 운반 단백질과 중량으로 대략 등량의 피막 다당류를 포함하거나; 또는

총 운반 단백질보다 중량으로 더 많은 함량의 피막 다당류를 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 25**

제22항에 있어서,

상기 제1 및 제2 운반 단백질 0.5 중량% 내지 0.7 중량%을 포함하는, 면역원성 조성물.

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원에 대한 언급**

[0002] 본 출원은 2017년 6월 10일자 미국 가출원 번호 62/517,905에 대해 우선권을 주장하며, 상기 미국 가출원은 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] **발명의 기술 분야**

[0004] 본 발명은 박테리아 피막 다당류와 접합된 운반 단백질 (carrier protein)을 포함하는 다가 접합체, 면역원성 조성물 및 백신, 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 1가 및 다가 박테리아 피막 다당류-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 박테리아 피막 다당류와 올리고당은 스트렙토코커스 뉴모니에 (*Streptococcus pneumoniae*)의 혈청형으로부터 유래된다. 운반 단백질은 1 관능성 및 2 관능성 링커, 바람직하게는 지정된 길이의 링커를 통해 박테리아 피막 다당류에 접합되며, 1 관능성 또는 2 관능성 링커는 동형 1 관능성 (homo-mono-functional), 동형 2 관능성 (homo-bi-functional), 이형 1 관능성 (hetero-mono-functional)

또는 이형 2 관능성일 수 있다.

**배경 기술**

- [0005] 스트렙토코커스 뉴모니에는 폐렴, 균혈증, 수막염 및 급성 중이염과 같은 침습적인 폐렴구균성 질환 (IPD)의 원인이 되는 그람 양성 병원체이다. 폐렴은 침습적인 폐렴구균성 질환의 가장 일반적인 증상이지만, 호흡기내 박테리아 전파시 중이 감염, 부비동염 또는 재발성 기관지염도 발생할 수 있다. 폐렴구균은 혈청 특이성을 형성하는 화학적으로 연결된 다당류로 둘러싸여 있다. 적어도 90종의 폐렴구균 혈청형들이 알려져 있는데, 이중 약 23종이 침습성 질환의 90%를 차지하고 있으며, 피막 다당류는 면역원으로는 충분하지 않다.
- [0006] 현재 전세계적으로 PCV 백신 3가지가 유통되고 있다: PREVNAR®, SYNFLORIX® 및 PREVNAR-13®. PREVNAR-13®에는 없는 혈청형과 시간 경과에 따른 혈청형 치환 가능성으로 인해 폐렴구균 질환을 모두 망라하기 위해서는 충족되지 못하고 남아있는 의학적 요구들을 해결할 필요가 있다. 또한, 인간 및 2세 미만의 유아에서 추가적인 스트렙토코커스 뉴모니에에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 사용될 수 있는 면역원성 조성물도 필요한 실정이다.
- [0007] 피막 다당류 (CPS)는 중요한 병독성 결정기이지만, 일반적으로 영유아에서 T 세포-의존적인 면역반응을 유도하기에는 충분하지 않은 면역원이다. CPS에 운반 단백질을 접합하여, 클래스 스위칭 (class switching)되는 면역반응을 유도할 수 있다. 이에, 7가 (PCV-7, Pfizer Inc., USA), 10가 (Synflorox-10, GSK Vaccines) 및 13가 폐렴구균 접합체 백신 (CV-13, Pfizer Inc., USA)들이 IPD 발병을 효과적으로 예방하기 위해 개발되었다. 접합체 백신 제조시 환원성 아민화 화학 반응 및 시아닐화 화학 반응이 널리 사용되었다.
- [0008] 이들 접합체에서, CPS와 운반 단백질 사이에 존재하는 짧은 C-N 연결 (2.1Å)은 운반 단백질 및 낮은 CPS/단백질 비율로 인해 CPS의 에피토프를 입체적으로 숨기게 된다. 현행 백신의 문제점을 최소화하기 위해서는 중요한 파라미터가 필요하다.
- [0009] 미국 특허 9,492,559는 접합된 피막 다당류 항원을 포함하는 면역원성 조성물 및 그 용도를 개시하고 있다. 이 문헌에 개시된 면역원성 조성물은 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20가 폐렴구균 접합체 조성물을 포함한다. 또한, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25가 폐렴구균 접합체 조성물도 개시되어 있다.
- [0010] 국제 출원 공개공보 WO 2014/097099A2는 Preevnar-13가 접합체와 더불어 7종 혈청형에 대한 글리코퀸주게이션 프로세스를 개시하고 있다. 백신의 효능을 높이기 위해 새로운 다당류 접합체를 제형에 첨가한다.
- [0011] 미국 특허 출원 공개공보 2011/023526은 15가 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신 조성물을 개시하고 있다. 이 특허는 현재 이용가능한 백신 1-3종에 2가지 이상의 혈청형을 추가함으로써 제조되는 15가 접합체 백신에 관한 것이다.
- [0012] 국제 출원 공개공보 WO 2016/207905는 폐렴구균성 다가 접합체 백신을 개시하고 있다. 이 출원은 13가 이상의 접합체 백신 및 혈청형 6A 결손에 관한 것이다.
- [0013] 미국 특허 출원 공개공보 2017/007713은 관능성이 강화된 ((2-옥소에틸) 티오) 함유 링커를 개시하고 있다.
- [0014] 국제 출원 공개공보 WO 2014/092377은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F 및 12 또는 9N 중 하나로 이루어진 군으로부터 12종의 혈청형이 선택되는, 13가 조성물을 개시하고 있다.
- [0015] 국제 출원 공개공보 WO 2014/092378은 각 접합체가 혈청형 1,3,4,5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F, 및 혈청형 22F 또는 33F로부터 선택되는, 13종의 서로 다른 다당류-단백질 접합체를 함유한 면역원성 조성물을 개시하고 있다.
- [0016] 중국 출원 공개공보 101590224는 혈청형 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 함유한 14가 폐렴구균성 다당류-단백질 접합체 백신을 개시하고 있다.
- [0017] 중국 출원 공개공보 104069488은 혈청형 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 14가 다당류 단백질 접합체를 개시하고 있다.
- [0018] 국제 출원 공개공보 WO 2016207905는 CRM197과 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 14종 이상의 피막 다당류로 된 접합체를 포함하는 폐렴구균성 다가 접합체 백신을 개시하고 있다. 미국 특허 8,192,746은 CRM197과 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C,

19A, 19F, 22F, 23F 및 33F 유래의 피막 다당류를 포함하는 15가 면역원성 조성물을 개시하고 있다.

- [0019] 국제 출원 공개공보 WO 2013/191459는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F의 스트렙토코커스 뉴모니에 피막 다당류를 포함하는 15가 조성물을 개시하고 있다.
- [0020] 중국 출원 공개공보 103656632는 혈청형 6A와, 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 엑스트라 혈청형을 함유한, 24종의 폐렴구균 혈청형에 대해 예방을 제공하는, 폐렴구균성 다가 피막 다당류 조성물을 개시하고 있다.
- [0021] 중국 출원 공개공보 103656631은 24종의 서로 다른 혈청형, 즉 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F 혈청형의 폐렴구균의 피막 다당류를 포함하는 다가 폐렴구균성 피막 다당류-단백질 접합체 조성물을 개시하고 있다.
- [0022] 미국 특허 출원 공개공보 2016/0324950은 그룹 B 스트렙토코커스 (GBS)로도 지칭되는 스트렙토코커스 아갈락티에 (*Streptococcus agalactiae*) 유래 피막 다당류 (CP) 및 운반 단백질을 포함하며, CP가 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 및 IX으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역원성 다당류-단백질 접합체를 개시하고 있다. 이는 만성 진성 당뇨병, 암, 심부전, 신경학적 병태 및 비노기계 병태를 치료하기 위한 것이다. 운반 단백질 피막 다당류 접합체는 다양하다.
- [0023] 미국 특허 5,360,897은 박테리아 병원체 스트렙토코커스 뉴모니에의 온전한 피막 폴리머의 카르보닐 기가 2개 이상인 환원성 아민화 산물 및 박테리아 독소 또는 독소이드를 포함하는 면역원성 접합체를 개시하고 있는데, 이 접합체는 피막 폴리머와 독소 또는 독소이드가 직접 공유 결합된 가교된 접합체를 포함한다.
- [0024] 미국 특허 7,862,823은 서로 다른 2종 이상의 운반 단백질을 가진 다가 접합체 백신을 기술하고 있다.
- [0025] 미국 특허 8,808,708은 혈청형이 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 구성되고 운반 단백질이 CRM197인, 다당류-단백질 접합체로 이루어진 13가 면역원성 조성물을 개시하고 있다.
- [0026] 미국 특허 출원 공개공보 2009/0017059는 혈청형 19A와 19F가 여러가지 박테리아 독소이드와 접합된 면역원성 조성물을 개시하고 있다.
- [0027] 국제 출원 공개공보 WO 2011/110241은 여러가지 접합체 화합물들이 면역원성 조성물 또는 백신의 여러 성분에서 사용되는 폐렴구균성 접합체 면역원성 조성물 또는 백신을 기술하고 있다. 하나 이상의 혈청형 접합에는 환원성 아민화가 사용되었으며, 다른 혈청형의 접합에는 환원성 아민화 이외의 접합이 사용되었다. 여러가지 혈청형에 대해 선택된 접합 방법은 사카라이드 에피토프를 최상으로 제시할 수 있는 접합 방법을 이용해 각 혈청형을 제시할 수 있다. 일부 폐렴구균성 사카라이드는 환원성 아민화를 이용해 접합되고, 다른 폐렴구균성 사카라이드는 고리 구조의 분해없이 유지되어 보다 나은 결과를 제공할 수 있도록 차별적으로 접합된다.
- [0028] 미국 특허 7,955,605는 활성화된 혈청형 19A 다당류와 운반 단백질을 다이메틸 설폭사이드 (DMSO) 내에 재현탁하여 접합체를 제조하는, 혈청형 19A로 구성된 운반 단백질 다당류 접합체의 제조 방법을 개시하고 있다.
- [0029] 미국 특허 출원 공개공보 2010/0074922는 19F 피막 사카라이드에 디프테리아 독소이드 (DT)가 접합되고, 혈청형 18C 피막 사카라이드에 파상풍 독소이드가 접합되고, 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및 23F 피막 사카라이드에 헤모필러스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*) 유래 단백질 D가 접합된, 10종 이상의 혈청형을 함유한 면역원성 조성물을 개시하고 있다.
- [0030] 미국 특허 출원 공개공보 2010/0239604는 혈청형 19A에 제1 박테리아 독소이드가 접합되고, 19F에 제2 박테리아 독소이드가 접합되고, 스트렙토코커스 뉴모니에 피막 사카라이드에 단백질 D가 접합된, 스트렙토코커스 뉴모니에 피막 사카라이드 다가 접합체를 포함하는 조성물을 개시하고 있다. 복수의 혈청형에 대해 예방을 제공하는 백신을 개발함으로써 예방 범위를 넓히는 것 외에도, 새로운 합성 방법을 개발하는데에도 노력이 집중되었다.
- [0031] 미국 특허 7,709,001은, 1) 정제된 다당류와 약산의 반응에 의한 크기 축소; 2) 단계 1의 다당류를 2가 양이온의 존재하에 산화제와 반응시켜 활성화된 다당류 제조; 3) 활성화된 다당류와 운반 단백질의 컴파운딩; 4) 단계 3의 활성화된 다당류 및 운반 단백질을 환원제와 반응시켜 다당류-운반 단백질 접합체의 제조; 및 5) 단계 4의 산물 내 미반응성 알데하이드를 캡핑하여, 면역원성 다당류-운반 단백질 접합체의 제조로 구성되는, 피막 다당류의 운반 단백질 접합체의 합성 방법을 기술하고 있다.
- [0032] 국제 출원 공개공보 WO 2014/097099는, a) 사카라이드를 2,2,6,6-테트라메틸-1-피페리딘올옥시 (TEMPO) 및 N-클로로숙신이미드 (NCS)와 수성 용매 내에서 반응시켜 활성화된 사카라이드를 제조하는 단계; 및 b) 활성화된

사카라이드를 하나 이상의 아민 기를 포함하는 운반 단백질과 반응시키는 단계를 포함하는, 운반 단백질 접합체의 합성 방법을 개시하고 있다.

[0033] 미국 특허 출원 공개공보 2012/321658은 혈청형 1, 3, 19A 및 19F가 직접 또는 환원성 아민화 이외의 화학 반응을 통해 간접적으로 운반 단백질과 연결되고, 하나 이상의 서로 다른 사카라이드는 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C 및 23F로 이루어진 제2 군으로부터 선택되고 이것이 환원성 아민화에 의해 운반 단백질과 연결된, 면역원성 조성물을 개시하고 있다.

[0034] 폐렴구균 백신은, 1) 폐렴구균성 다당류 백신 및 2) 폐렴구균성 접합체 백신을 기본으로 한다. Merck 사에서 판매하는 PNEUMOVAX®는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18e, 19F, 19A, 20, 22F, 23F 및 33F에 속하는 비-접합된 다당류를 포함한다. 영유아는 대부분의 폐렴구균 다당류에 대해 반응성이 좋지 않다. 약한 면역원에 대한 면역원성은 운반 단백질과 접합함으로써 강화된다. 다당류 단백질 접합체 백신은 운반 단백질에 연결된 피막 다당류를 사용해 제조된다. 접합체는 특정 혈청형에 대해 T 세포 의존적인 강화된 면역 반응을 유도한다.

[0035] 접합체는 다양한 길이의 동형 2 관능성, 이형 2 관능성 링커 등의 다양한 시약을 사용해 합성된다. 시판되는 폐렴구균성 접합체 백신으로는 3종, PREVNAR®, SYNFLORIX® 및 PREVNAR-13®이 있다. PREVNAR®은, 혈청형 4, 6B, 9Y, 14, 18C, 19F 및 23F로부터 유래된 피막 다당류를 함유하며 각각 CRM197로 명명된 운반 단백질과 접합된, 7가 백신이다. SYNFLORIX®는, 부가적인 폐렴구균성 균주 3종, 즉 혈청형 1, 5 및 7F에 대한 커버리지 (coverage)를 제공하는, NTHi 유래 단백질 D와 접합된 피막 다당류 10종을 포함하는 GSK Biologicals 사의 10가 백신이다. PREVNAR-13®는, CRM197로 명명된 운반 단백질과 접합된 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 13종 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9Y, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F)으로부터 제조된 피막 다당류 13종을 함유한 트리-10가 백신이다.

[0036] 미생물의 항생제 내성 증가 및 면역약화된 개체 수 증가로, 보다 더 넓은 보호를 제공하는 폐렴구균 백신 개발이 필요해졌으며, 이는 특히 PREVNAR-13®에 없는 혈청형으로 인해 폐렴구균성 질환을 커버하도록 혈청형의 수를 증가시키는데 효과적인 다가 백신의 개발로 이어진다. 특정 혈청형의 필요성은 발생된 지역 및 항생제 내성에 따라 결정된다. 이에, 미국 특허 8192746은 15가지의 개별 다당류-단백질 접합체를 가진 다가 면역원성 조성물을 발표하였다. 각 접합체는 운반 단백질 CRM197이 접합된 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9Y, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 또는 33F)로부터 제조된 피막 다당류로 구성된다. 혈청형 15B, 15C 및 15A에 대해 면역 반응을 유도하는 백신이 요구된다.

[0037] 다가 접합체 백신 제형내 다당류 항원의 수적 증가에 따라, 운반 단백질 함량도 증가한다. 이러한 증가는 운반 단백질에 대한 면역 반응 증가를 유도하며, 이는 전신 과부하 (systemic overload)를 초래할 수 있다.

[0038] 따라서, 증가하고 있는 많은 수의 혈청형들에 대해 예방을 제공하는 폐렴구균 백신을 개발할 필요가 있다. 혈청형 수 (valent)가 더 많은 백신은 접합을 이용하는 것이 가장 적합하지만, 바람직하게는 운반 단백질에 대한 면역 반응을 감소시키는 것이다. 부가적인 혈청형에 대한 예방 범위를 확장하는 다가 백신 개발시, 전체에 대한 면역 반응은 손상시키지 않으면서 더 많은 수의 혈청형을 수용하기 위해서는 접합체 백신의 면역원성 및 항원항체 결합성의 개선이 필요하며, 이는 통상적인 접합 방법으로는 불가능하다. 더 많은 수의 혈청형에 대해 예방을 제공하는 것 외에도, 심지어 더 많은 수의 혈청형에 대한 면역 반응을 개선할 뿐 아니라 운반 단백질에 대한 반응성을 낮추기 (그리고, 입체 간섭을 회피하기) 위해 새로운 접합용 링커 개발 또한 필요하다.

[0039] 많은 참조문헌들이 현재 이용가능한 백신의 효능을 언급하고 있지만, 새로운 복수의 혈청형을 추가할 경우, 오리지널 혈청형에 첨가되는 수적 증가에 따라 면역 반응도 감소한다. 그래서 면역 반응의 효과를 높이기 위해서는 부가적인 혈청형이 요구된다. 또한, 더 강력한 효과는 바람직하게는 운반 단백질에 대한 면역 반응의 저하를 포함하여야 한다. 따라서, 전세계적으로 감염에 대한 장벽을 구축하기 위해서는 더 많은 수의 혈청형에 대한 폐렴구균 접합체 백신이 여전히 절실히 요구되고 있다.

**발명의 내용**

[0040] 본 발명은 현행 전략 및 설계와 관련된 문제 및 단점을 해결하고, 접합된 피막 사카라이드를 포함하는 새로운 면역원성 조성물 이의 용도를 제공한다.

[0041] 본 발명의 일 구현예는, 제1 그룹이 1가 박테리아 피막 다당류 접합체를 포함하고; 제2 그룹이 교차-반응성을 가진 2가 박테리아 피막 다당류의 접합체를 포함하는, 접합체 그룹 2종을 포함하는 다가 스트렙토코커스 뉴모니

에 접합체 백신에 관한 것이다. 바람직하게는, 제1 그룹은 하나 이상의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 17F, 18C, 20, 22F, 23F, 24F, 33F 및 35B의 1가 피막 다당류 접합체들로 구성된다. 바람직하게는, 제2 그룹은 교차 반응성 혈청형, 즉 1, 2 또는 그 이상의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 6A/6B/6C/6D, 1, 2 또는 그 이상의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 9V/9N/9A/9B, 1, 2 또는 그 이상의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 15B/15A/15C 또는 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 19A/19F으로 된 2가 또는 다가 피막 다당류 접합체; 및 운반 단백질로 구성된다. 바람직하게는, 다가 스트렙토코커스 뉴모니에 접합체 백신을 구성하는 제2 그룹은, 접합체들이 2가의 단분자 (bivalent unimolecular)이고 박테리아 피막 다당류로부터 유래된, 스트렙토코커스 뉴모니에 교차-반응성 혈청형의 다가 접합체를 포함한다. 바람직하게는, 백신은 동일한 운반 단백질에 연속적으로 또는 동시에 접합된 면역학적으로 교차-반응성인 혈청형 2종의 피막 다당류들을 포함한다. 바람직하게는, 제1 그룹 또는 제2 그룹의 1가 박테리아 피막 다당류 접합체들은 분자량 10 kDa 내지 50 kDa, 30 kDa 내지 100 kDa 및/또는 100 kDa 내지 300 kDa 범위의 천연 박테리아 피막 다당류로부터 합성된다.

[0042] 바람직하게는, 면역학적으로 교차 반응성인 혈청형 2종의 2가 피막 다당류는 식 PS1-운반 단백질-PS2로 표시되며, 또한 바람직하게는, 접합체는 6APS-CRM197-6BPS를 포함한다. 바람직하게는, 운반 단백질은 파상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드, CRM197, 파상풍 독소이드 단편 (TTHc), 네이세리아 메닝기티디스 단백질 PorB, RSV 바이러스 단백질, 보르데텔라 퍼투스스 단백질, 백일해 독소이드 (PT), 아데닐레이트 사이클라제 독소 (ACT), 69 kDa 단백질, 인간 파필로마 바이러스 단백질 항원, 인간 파필로마 바이러스 VLP 형태, B형 간염 바이러스 코어 항원, B형 간염 바이러스 VLP 형태, HBsAg의 유도체, 또는 이들의 조합을 포함한다. 바람직하게는, 2가 교차-반응성 다당류 접합체의 1회 투여량 (single dose)은, 동일한 2종의 다당류로 된 1가 접합체 백신이 4  $\mu$ g 이상인 것과 비교해, 4  $\mu$ g 미만으로 포함한다.

[0043] 바람직하게는, 다가 접합체 백신 내 운반 단백질의 총량은 동일한 교차-반응성 혈청형들의 개개 다당류에 대한 모노 접합체들에 사용되는 양 보다 현저하게 적다. 바람직하게는, 본 발명의 백신에서, 2가 교차-반응성 다당류에 접합되는 운반 단백질의 양은, 동일한 다당류 2종에 대한 1가 접합체들의 것과 비교해 혈청형 당 운반 단백질의 함량이 낮으며, 따라서 백신에 의해 유발되는 운반 단백질에 대한 면역 반응 역시 개별 다당류에 대한 모노 접합체를 함유한 것으로 제조된 백신의 운반 단백질에 대한 반응 보다 낮다. 바람직하게는, 다가 접합체 백신 내 운반 단백질의 총량은 동일한 교차-반응성 혈청형의 개별 다당류에 대한 모노 접합체들 (PS : 운반 단백질의 비가 1:1임)에 대해 0.5 중량% 내지 0.7 중량%이다. 바람직하게는, 접합체 백신은 알루미늄 또는 알루미늄염, 칼슘 포스페이트, 모노포스포릴 지질 A (MPLA)로 된 리포솜, 사포닌 QS-21, 및/또는 강력한 TLR7/8 작용제로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 보강제를 더 포함한다. 바람직하게는, 하나 이상의 보강제는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 실페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로 이루어진 균으로부터 선택되는 알루미늄 보강제를 포함한다. 바람직하게는, 박테리아 다당류는 여러가지 박테리아 피막 다당류로부터 유래된 2종 이상의 혈청형에 교차 반응성인 다당류들로 이루어진 균으로부터 선택되거나, 및/또는 박테리아 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니에 및 헤모필러스 인플루엔자 타입 a, b 혈청형; 스트렙토코커스 뉴모니에 및 B군 스트렙토코커스 혈청형, 헤모필러스 인플루엔자 타입 a, b 혈청형, 또는 네이세리아 메닝기티디스 혈청형을 포함한다. 바람직하게는, 피막 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니에, 헤모필러스 인플루엔자, 네이세리아 메닝기티디스, B군 스트렙토코커스 또는 모락셀라 카타랄리스 리포-올리고당 (LOS)으로부터 유래된 다당류를 포함한다. 또한, 바람직하게는, 스트렙토코커스 뉴모니에 피막 다당류는 6A/6B/6C/6D; 9V/9A/9B.9N; 15A/15B; 19A/19F 및 비슷한 타입의 교차-반응성 다당류로 이루어진 균으로부터 선택되는 혈청형과 면역학적으로 교차-반응성을 나타낸다. 바람직하게는, 피막 다당류는 헤모필러스 인플루엔자 혈청형 a/b/c/d/e/f, 비-피막형 헤모필러스 인플루엔자 (non-typeable Haemophilus influenza, NTHi) 다당류, 또는 모락셀라 카타랄리스 리포올리고당(LOS), 또는 네이세리아 메닝기티디스 혈청형 A, B, C, Y, W-135 또는 X, 또는 B군 스트렙토코커스 혈청형 Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX 및 N, 및 네이세리아 메닝기티디스 혈청형 A, C, Y, X 및 W-135로부터 유래된다.

[0044] 본 발명의 다른 구현에는, 본 발명의 접합체 백신을 치료학적 유효량으로 포함하고, 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 그람 양성 및 그람 음성 병원체에 의한 감염을 치료 또는 예방하기 위한 접합체 백신에 관한 것이다. 바람직하게는, 피막 다당류는 헤모필러스 인플루엔자, 네이세리아 메닝기티디스, B군 스트렙토코커스, 네이세리아 메닝기티디스, 헤모필러스 인플루엔자, 모락셀라 카타랄리스 리포-올리고당 (LOS) 및 이들의 조합으로부터 유래된다.

[0045] 본 발명의 다른 구현에는, 다당류를 활성화하는 단계; 활성화된 다당류에 약 2.0-40Å의 스페이서 암 (spacer arm)을 부착하는 단계; 및 스페이서 암에 부착된 활성화된 다당류를 운반 단백질에 부착하는 단계를 포함하는,

다당류를 운반 단백질과 커플링하는 방법에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 다른 구현에는, 운반 단백질을 활성화하는 단계; 운반 단백질의 다이설파이드를 환원하여 설프하이드릴기를 만드는 단계, 바람직하게는 2-이미노티올란 (2-IT), SMPH와 같은 2 관능성 링커를 이용해 설프하이드릴기를 만드는 단계; 활성화된 운반 단백질에 약 4-40Å의 지정된 길이의 스페이서 암을 부착하는 단계; 및 활성화된 운반 단백질에 부착된 스페이서 암에 다당류를 부착하는 단계를 포함하는, 운반 단백질을 다당류와 커플링하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 활성화된 운반 단백질은 코리네박테리움 디프테리아 (*C. diphtheriae*)로부터 수득 또는 유래되는 교차-반응성 물질 (CRM197), 또는 슈도모나스 플루오레센스 (*P. fluorescens*) 또는 에세리키아 콜라이 (*Escherichia coli*)로부터 수득 또는 유래되는 재조합 CRM197로 이루어진 균으로부터 선택된다.

[0047] 본 발명의 다른 구현에는 동형 2 관능성 및/또는 이형 2 관능성 등의 2 관능성 링커에 관한 것이다.

[0048] 본 발명의 다른 구현에는, 운반 단백질이 코리네박테리움 디프테리아 (*C. diphtheriae*)로부터 수득되는 교차-반응성 물질 (CRM197), 슈도모나스 플루오레센스 (*P. fluorescens*)로부터 수득되는 재조합 CRM197, 또는 에세리키아 콜라이 (*Escherichia coli*)로부터 수득되는 재조합 CRM197인, 다가 스트렙토코커스 뉴모니에 접합체 백신에 관한 것이다.

[0049] 본 발명의 기타 구현예들 및 이점은 후술한 본 발명의 상세 설명에서 일부 설명되며, 적어도 이러한 설명으로부터 명확해지거나 또는 본 발명의 실시를 통해 학습할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0050] 도 1A. 혈청형 6A의 크기 감소된 피막 다당류의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 (500MHz) - NMR 데이터에서 천연 PS 대비 구조 완전성 소실은 관찰되지 않는다.

도 1B. 혈청형 6B의 크기 감소된 피막 다당류의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼 (500MHz) - NMR 데이터에서 천연 PS 대비 구조 완전성 소실은 관찰되지 않는다.

도 2A. 멀티플렉스 비드 기반의 분석 공정을 이용한 피막 다당류 특이 항체 (총 IgG) (이들 접합체에 사용된 다당류는 10 - 50 kDa 범위임).

도 2B. 멀티플렉스 비드 기반의 분석 공정을 이용한 피막 다당류 특이 항체 (총 IgG) (다당류는 200 - 300 kDa 또는 그 이상의 범위임).

도 2C. 멀티플렉스 비드 기반의 분석 공정을 이용한 6A 및 6B 피막 다당류로 된 2가 접합체의 특이 항체 (총 IgG) (다당류는 10-50 kDa 및 200-400 kDa 범위임).

도 3A. 1가 접합체 합성 작업 흐름도.

도 3B. 링커를 이용한 PS1 및 PS2 활성화 흐름도.

도 4A. 2가 단분자 접합체 및 2가 접합체 합성 작업 흐름도.

도 4B. CRM 화학적 커플링.

도 5. CDAP (1-시아노-4-다이메틸아미노피리디늄 테트라플루오로보레이트, 시아누릭 클로라이드 (2,4,6-트리클로로-1,3,5-트리아진), 시아노젠 브로마이드 (CNBr).

도 6. 이미노티올렌을 이용한 CRM 197의 티올화.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 스트렙토코커스 뉴모니에는 폐렴, 균혈증 (bacteraemia), 수막염 및 급성 중이염과 같은 질환을 유발할 수 있는 그람 양성 박테리아이다. 폐렴구균 (Pneumococcus)은 혈청 특이성을 결정하는 화학적으로 연결된 다당류로 둘러싸여 있다. 90종 이상의 폐렴구균 혈청형들이 알려져 있으며, 이 중 약 23%가 침습성 질환의 90%를 차지한다. 침습성 폐렴구균성 질환에 대한 방어는 피막 다당류에 특이적인 항체에 의한 것으로, 따라서 방어는 혈청형 특이적이다.

[0052] 제1 그룹이 1가 박테리아 피막 다당류 접합체를 포함하고 또 다른 그룹이 다가 운반 단백질 접합체를 포함하는,

2가지 그룹의 접합체를 형성하기 위해 운반 단백질과 다당류 사이에 링커를 포함하는 다가 스크렙토코커스 뉴모니에 접합체 백신이, 실질적으로 개선된 결과를 달성한다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 구체적으로, 2가 접합체 및 2가 단분자 접합체는 교차-반응성 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형에 부착된 2 관능성 링커와 운반 단백질 간의 반응에 의해 합성된다. 링커 대신 직접 접합을 이용해 동수의 혈청형을 가진 1가 박테리아 피막 다당류 접합체를 함유한 다가 스트렙토코커스 뉴모니에 접합체 백신을 포함하는 백신과 비교해, 실질적으로 개선된 결과가 달성된다.

[0053] 본 발명의 일 구현예는 면역원성이 강화된 2가 다당류 단백질 접합체들로 구성된 다가 접합체 백신에 관한 것이다. 일반 구조 PS1-운반 단백질-PS2를 가진 2가 접합체는, 비슷한 1가 접합체들과 비교해 더 높은 면역원성을 나타내며, 여기서 PS1 및 PS2는 그람 음성 및 그람 양성 박테리아 병원체로부터 유래되는 서로 다른 2가지 혈청형 다당류이다. 2가 접합체 백신의 개발을 통해, 백신 효능은 강화되고, 운반 단백질의 면역원성은 감소된다. 본원에 개시된 화학 반응은 접합체의 면역원성을 실질적으로 증가시키면서, 동시에 운반 단백질의 하중 (load) 을 줄인다.

[0054] 본 발명의 다른 구현예는 저 분자량의 다당류와 긴 2 관능성 링커를 가진, 바람직하게는 면역원성이 강화된, 백신에 관한 것이다. 본 발명의 다른 구현예는, 면역원성과 항원항체 결합성이 보다 우수하고 운반 단백질의 면역원성이 보다 낮은, 2가 접합체에 관한 것이다.

[0055] 본원에 개시된 바와 같이, 통상적인 백신의 단점을 최소화하기 위해 4가지 파라미터를 도입하였다:

[0056] · 다당류 크기는 바람직하게는 10-50 kDa임.

[0057] · 교차-반응성 다당류는 운반 단백질에 공동 접합 (concurrent conjugation)됨.

[0058] · 2 이상의 교차-반응성 혈청형은 운반 단백질과 공동 접합됨.

[0059] · 긴 이형 또는 동형 2 관능성 스페이서 암 (arm)은 바람직하게는 2-40Å (또는 2-40Å, 4-40Å, 10-40Å, 20-40Å, 9-20Å, 5-20Å, 5-30Å) 크기임.

[0060] 이들 4가지 파라미터는 접합체의 다당류/단백질 비율을 높이고, 운반 단백질 하중을 낮추고, 면역원성과 항원항체 결합성을 수배 높이는데 특히 효과적이다.

[0061] 본 발명은 현저하게 높은 항체 역가를 가진 면역원성이 강화된 다당류-단백질 접합체에 관한 것이다. 운반 단백질은, 예를 들어, 과상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드, CRM197, 과상풍 독소이드 단편 (TThc), 네이세리아 메닝기티디스 단백질 PorB, RSV 바이러스 단백질, 보르데텔라 퍼투시스 단백질과 같은 백일해 독소이드 (PT), 아데닐레이트 사이클라제 독소 (ACT), 69 kDa 단백질 및 인간 파필로마 바이러스 단백질 항원 또는 이의 VLP 형태, 간염 B 코어 항원 또는 이의 VLP 형태 또는 HBsAg의 유도체, 및 기타 통상적인 캐리어로부터 취득된다. 다당류 단편은 그람 양성 박테리아 및 그람 음성 박테리아 균으로부터, 바람직하게는 스트렙토코커스 뉴모니에의 면역학적으로 교차-반응성 다당류로부터 취득된다. 또한, 본 발명은, 운반 단백질을 최적의 체인 길이로 절단 및 탈중합한 (depolymerized) 다당류 단편과 반응시키는, 다당류-단백질 접합체의 제조 방법에 관한 것이다.

[0062] 본 발명의 면역원성 조성물은 PREVNAR-13® 및 SYNFLORIX-10®에 없는 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형에 대해 적절한 수준의 개선된 보호를 제공한다.

[0063] 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 (6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F 및 유사한 교차-반응성 혈청형)의 교차-반응성 다당류를 함유한 단쇄 분자 크기 (10-50 kDa)의 2가 접합체를 사용해, 본 실험에서 16-26가 폐렴구균성 CPS 접합체 백신을 제조하였다. 폐렴구균 타입 6A 및 6B 다당류는 모델 교차-반응성 CPS로서 사용하였다. CRM197은 임상적 허용 (clinical acceptance)을 위한 운반 단백질로서 사용하였다.

[0064] 또한, 더 짧은 PS 체인 길이 (0-50 kDa), 긴 스페이서 암 (9-40Å)을 사용해 동형 또는 이형 2 관능성 PEG 또는 비-PEG 링커 및 운반 단백질 CRM197을 가진, 다가 단일접합체 (multivalent monoconjugate)를 제조하였다.

[0065] CPS는 산화에 의해 또는 시아닐화 화학 반응에 의해 활성화하고, 과요오드산 나트륨에 의해 산화한 후, 반응성 알데하이드 또는 이소티오시아네이트 (-OCN) 기를 CPS에 도입하였다.

[0066] 2가지 전략 (짧은 링커와 긴 링커, 짧은 CPS와 긴 CPS)을 사용해 각각 도입하였다. 이후, 2가 접합체 백신의 물리화학적 및 면역학적 특징들을 독립적으로 조사하거나, 또는 다가 접합체 제형과 조합하였다.

[0067] 아래 실시예들은 본 발명의 구현예들을 예시하나, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0068] 실시예

[0069] 실시예 1. 복수의 스트렙토코커스 뉴모니에 혈청형 - 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F 및 35B에 대한 다당류 크기 축소, 활성화 및 접합 공정

[0070] 6A 및 6B 다당류

[0071] 스트렙토코커스 뉴모니에 6A 및 6B의 피막 다당류 각각 100 mg을 pH 2.5-3.0에서 10 mM 아세트산 또는 0.1 M HCl 함유 수용액 10 ml에 용해하고, 60-120분 동안 60-85°C의 온도에서 용액을 두어 가수분해를 수행하였다. 이렇게 수득한 올리고당을, 중화한 후, 3-10 kDa TFF 센트리콘 필터를 사용해 정용 여과하였다. <sup>1</sup>H NMR 분석 (도 1A 및 1B)에서, 형성된 올리고당은 구조 완전성 소실 또는 에피토프 또는 반복 유닛 구조의 소실을 나타내지 않았다. 다당류를 안트론 분석 (Anthrone assay)으로 측정하였으며, 측정된 분자 크기 분포 (kDa)는 10-50 kDa, 30-100 kDa 및 100-300 kDa 범위였다.

[0072] CPS (50 mg) 모이어티 (≥200-500 kDa 크기의 천연 다당류 또는 10-50 kDa 범위의 크기-축소된 다당류)를 활성화 공정에서 일반적으로 사용되는 시아닐화 시약으로 활성화하였다 (표 1). 다당류 분자 크기 분포를 SEC-HPLC (Shodex SB-405 및 SB-406 SEC 컬럼)에서 (10-1000 kDa) 폴룰란 혼합물을 기준 표준 물질 (미국 Shodex 사의 폴룰란 표준 물질)로 사용해 분석함으로써 측정하였다.

[0073] pH 5.6-6.0에서, 3-5시간 동안, 5-8배 물 과량의 ADH (Sigma)와 반응시켜, 짧은 스페이서 암을 PS에 도입하였다. pH 5.6-6.0에서 3-5시간 동안 5-10배 물 과량으로 반응시켜, 긴 스페이서 암 (2 관능성 링커 또는 긴 4-암 링커)을 PS에 도입하였다.

[0074] 표 1

[0075] 접합에 사용한 다당류 크기 분포 (kDa)

표 1

PS	다당류 kDa
6A	10-30 kDa
6B	20-50 kDa
15B	20-40 kDa
18C	20-50 kDa
22F	10-30 kDa

[0077] 활성화된 PS에, 2-4Å 내지 8-20Å (600 g/mol - 3.5 g/mole)의 다양한 크기를 가진 하나 이상의 스페이서 암 링커인, 짧은 암 링커 (아디프산 다이-하이드라이드, ADH, 174.2 g/mole)를 부착시켜, 추가적으로 유도체화하였다.

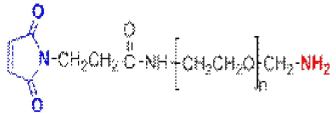
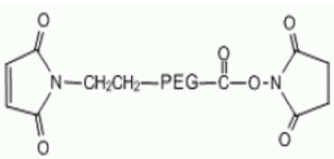
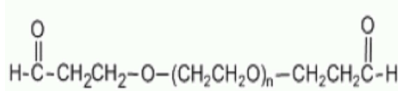
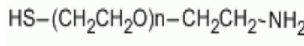
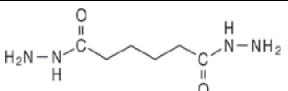
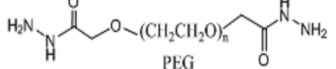
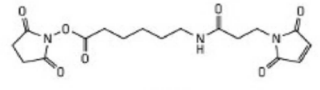
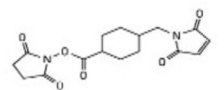
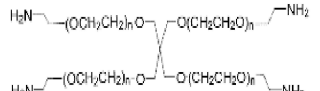
[0078] 부착된 다이아민 관능기를 가진 동형 또는 이형 2 관능성 PEG 링커, 예 NH<sub>2</sub>-PEGO.6K-NH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>-PEG3.5K-COOH (표 2).

[0079] 표 2

[0080] 다당류 또는 운반 단백질의 유도체화에 사용되는 단쇄 링커 및 장쇄 링커 (폐길화된 형태 또는 비-폐길화된 형태의 수종의 다른 링커들도 사용됨)

표 2

링커 번호	링커 구조	화학 구조/ kDa 또는 Å
1	NH <sub>2</sub> -PEG- NH <sub>2</sub> /NHS	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> 1K 및 3.5K
2	NHS/NH <sub>2</sub> -PEG--COOH	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -PEG-C(=O)OH 1K 및 3.5K

3	Mal-PEG- NH <sub>2</sub>	 1K 및 3.5K
4	Mal-PEG-NHS	 1K 및 3.5K
5	CHO-PEG-CHO	 1K 및 3.5K
6	SH-PEG-NH <sub>2</sub>	 1K 및 3.5K
7	ADH	
8	HZ-PEG-HZ	 PEG
9	SMPH	 <b>SMPH</b> Succinimidyl 6-[β-maleimidopropionamido]hexanoate MW 379.36 Spacer Arm 14.2 Å
11	SMCC	 <b>SMCC</b> Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate MW 334.32 Spacer Arm 8.3 Å
12	4-암-PEG-NH <sub>2</sub> 또는 NHS	

[0082] Mal-말레이미드, NHS-숙신이미드, PEG-폴리에틸렌 글리콜 유도체, ADH-아디프산 다이-하이드라지드.

[0083] 유도체화된 CPS (10 mg/ml) 각각 2 ml씩 2개의 분액을 2개의 CRM197 단백질 샘플 (10 mg/ml) 1 ml과 4°C에서 8-12시간 동안 혼합하였다. 단쇄 및 장쇄 스페이서 암을 가진 접합체들을 100-300 kDa 센트리콘 필터 (EMD Millipore)으로 정제하였다 (표 3).

[0084] 표 3

[0085] 1가 접합체들의 물리화학적 특징

표 3

PS	SEC-HPLC에 의한 활성화된 PS kDa	SEC-HPLC에 의한 접합체 kDa	PS: 단백질 비율	유리형 PS%
6A	10-30 kDa, 200-300 kDa	>200-300, >2500	0.5-2, 1-2	<2
6B	20-50 kDa, 200-400 kDa	>300-500, >2500	0.5-2, 1-2	<1

15B	20-40 kDa	>300-500	0.5-2, 1:1	<1
18C	20-50 kDa	>300-500	0.5-2, 1:1	<2
22F	10-30 kDa	>200-300	0.5-2, 1:1	<1

- [0087] 주석: SEC-HPLC에서 PS의 kDa를 측정하기 위한 내부 표준 물질; 폴룰란 표준 물질 혼합물 (2 kDa-2500 kDa).
- [0088] 실시예 2. 여러가지 분자량의 크기 축소된 다당류의 활성화
- [0089] 실시예 1에 기술된 바와 같이 합성한 여러가지 분자량의 올리고당을 활성화하였다. 활성화 공정에 시아닐화 시약을 통상적으로 사용하였다.
- [0090] CDAP (1-시아노-4-다이메틸아미노피리디늄 테트라플루오로보레이트 (Sigma Aldrich, USA)) 시아누릭 클로라이드 (2,4,6-트리클로로-1,3,5-트리아진) 또는 시아노젠 브로마이드 (CNBr) 및 운반 단백질 커플링 (도 5 및 6 참조).
- [0091] 다당류 용액 (10 mg/ml)을 2M NaCl 또는 200-300 mM 바이카보네이트 완충제 내에서 10 mg/ml CDAP (아세트니트릴 내 100 mg/ml)와 RT에서 4-6분간 인큐베이션하였다. pH를 1N NaOH 또는 1N HCl을 사용해 10-10.5로 유지시켰다. 그런 후, pH를 8.1-8.2로 조정하고, 폐길화된 링커 (Hz-PEG-HZ)를 CDAP 처리된 PS와 RT에서 8-12시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 침출 여과한 다음 150 mM NaCl을 이용하여 100-300 kDa 컷-오프 센트리콘 필터로 5-8회 여과하였다.
- [0092] 활성화된 크기 축소된 다당류의 유도체화
- [0093] 활성화된 올리고당을 단쇄 동형 2 관능성 하이드라지드 링커로 추가적으로 유도체화하였다. 전형적인 시약은 아디프산 다이-하이드라지드 (ADH, 분자량 174.2 g/mole)이다. 다이-아민, 다이-하이드라지드 또는 아민 또는 하이드라지드-카르복시산/알데하이드 관능기를 가진 동형 또는 이중 2 관능성 PEG 링커, 예 NH<sub>2</sub>-PEG(1K-3.5K)-NH<sub>2</sub>, HZ-PEG(1-3.5K)-HZ, NH<sub>2</sub>-PEG3.5K-COOH를 사용하였다 (표 2). 그외 여러가지 동형 또는 이형 2관능성 스페이서 암도 유도체화에 사용할 수 있다 (표 2). pH 5.8-6.0에서 3-5시간 동안 아디프산 다이-하이드라지드 (Sigma)를 5-8배 몰 과량으로 반응시켜, 짧은 스페이서 암을 올리고당에 도입하였다. RT에서 3-5시간 동안 pH 5.8-6.0에서 5-10배 몰 과량으로 링커와 반응시켜, 장쇄 링커 (2 관능성 링커 또는 긴 4 관능성 링커 (표 2), 12번 4암 링커)를 다당류에 도입하였다.
- [0094] 긴 또는 짧은 링커를 이용한 운반 단백질의 유도체화
- [0095] 운반 단백질 CRM197을 단쇄 동형 2 관능성 하이드라지드 링커로 추가적으로 유도체화하였다. 전형적인 시약은 아디프산 다이-하이드라지드 (ADH, 분자량 174.2 g/mole)이다. 다이-아민, 다이-하이드라지드 또는 아민 또는 하이드라지드-카르복시산/알데하이드 관능기를 가진 동형 또는 이형 2관능성 PEG 링커, 예를 들어, NH<sub>2</sub>-PEG(1K-3.5K)-NH<sub>2</sub>, HZ-PEG(1-3.5K)-HZ, NH<sub>2</sub>-PEG3.5K-COOH를 사용하였다 (표 2). 그외 여러가지 동형 또는 이형 2관능성 스페이서 암도 표 2에 열거된 바와 같이 유도체화에 사용할 수 있다. RT에서 3-5시간 동안 300-600 mM MES 완충제 중의 아디프산 다이-하이드라지드 (Sigma) (pH 5.8-6.0)를 5-8배 몰 과량으로 반응시켜, 짧은 스페이서 암을 운반 단백질 CRM197에 도입하였다. RT (실온)에서 3-5시간 동안 300-600 mM MES 완충제 중의 올리고당 (pH 5.8-6.2)에 링커를 5-10배 몰 과량으로 반응시켜, 장쇄 링커 (2 관능성 링커 또는 긴 4 관능성 링커 (표 2), 12번 4암 링커)를 운반 단백질에 도입하였다.
- [0096] 실시예 3. 교차-반응성 다당류 혈청형의 활성화 및 짧은 또는 긴 스페이서 암 링커의 부착 (대상 혈청형은 6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F 및 임의의 기타 교차-반응성 혈청형임).
- [0097] 동시적인, 스트렙토코커스 뉴모니에 타입 6A 및 6B의 피막 다당류로부터 유래된 올리고당의 활성화, CRM197의 접합 및 올리고당에 1차 아미노 기 도입
- [0098] 혈청형 6A 및 6B의 천연 또는 크기 축소된 다당류 (>200-400 kDa)를 실시예 1 및 2에 기술된 바와 동일한 공정으로 접합하였다.
- [0099] 실시예 1에 기술된 바와 같이 수득된 올리고당 혼합물을 WFI에 최종 농도 10 mg/ml로 용해하였다. 반응 후, 올리고당을 3-10 kDa 센트리콘 필터를 이용한 정용여과에 의해 정제하였다.
- [0100] 올리고당에 도입된 아미노 기에 대해 각각 몰 과량으로 (통상적으로 5-10:1) ADH 단쇄 또는 장쇄 스페이서 암 링커를 함유한 DMSO에, 아미노 기가 도입된 올리고당을, DMSO 수용액 (20-30% v/v) 10 mg/ml 농도로

회석하였다. RT에서 4-12시간 동안 용액을 유지시켜 반응을 수행하였다. 반응이 끝나면, 올리고당을 다시 3-10 kDa 센트리콘 필터를 사용해 정제하였다.

[0101] **실시예 4. 폐렴구균성 다당류 1가 접합체 합성**

[0102] 실시예 3에서와 같이 합성한, 크기 축소된 또는 차별적으로 크기 축소된, 유도체화된 동일 다당류 (짧은 스페이서 암 ADH 및 긴 스페이서 암 HZ-PEG-HZ) 분액 2개 (10 mg/ml)를 CRM197 단백질 샘플 (10 mg/ml) 1 ml과 4°C에서 8-12시간 동안 혼합하였다. 장쇄 링커 및 단쇄 링커를 모두 함유한 접합체를 100-300 kDa 센트리콘 필터 (EMD Millipore)로 정제하였다. 각각의 1가 접합체에서 안트론 또는 유론산 분석에 의해 총 다당류 함량을 분석하고, BCA 또는 라우리 분석으로 총 단백질을 측정하였다 (표 4).

[0103] 그외 모든 교차-반응성 다당류 접합체들은 상기와 동일한 공정을 사용해 제조하였다.

[0104] **표 4**

[0105] **일반 구조 6A-CRM197-6B의 2가 접합체의 물리화학적 특징**

**표 4**

PS	활성화된 올리고당 kDa	접합체 kDa	올리고당 : 단백질 비율 (중량비)	유리형 중량%	올리고당
6A	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<2	
6B	>200-400 kDa	>300-500 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<1	
6C	>200-400 kDa	>300-500 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<1	
15B	>100-300 kDa	>300-500 kDa, >1500 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
15A	>100-300 kDa	>300-500 kDa, >1500 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
18C	>100-300 kDa	>300-500 kDa, >1500 kDa	0.5-2, 1:1	<2	
22F	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >1000 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
1	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<2	
3	>200-400 kDa	>300-500 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<1	
4	>100-300 kDa	>300-500 kDa, >1500 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
7F	>100-300 kDa	>300-500 kDa, >1500 kDa	0.5-2, 1:1	<2	
9V	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >1000 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
9N	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >1000 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
14	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<2	
18C	>200-400 kDa	>800 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<1	
19A	>100-300 kDa	>300-500 kDa, >1500 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
19F	>100-300 kDa	>300-500 kDa, >1500 kDa	0.5-2, 1:1	<2	
23F	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >1000 kDa	0.5-2, 1:1	<1	
33F	>100-300 kDa	>200-300 kDa, >2500 kDa	0.5-2, 1-2	<2	

[0107] 주석: SEC-HPLC의 내부 표준 물질 (kDa); 폴룰란 표준 물질 혼합물 (2 kDa-1200 kDa).

[0108] **실시예 4. 16가 이상의 폐렴구균성 접합체 백신의 시험 제형**

[0109] 1, 3, 5, 7F, 14, 15B, 18C, 22F, 23F, 33F, 35B를 포함하는 혈청형에 대한 폐렴구균 다당류-CRM197 접합체를, 교차-반응성 다당류 접합체 6A, 6B, 9V, 9N, 15A, 15B, 19A 및 19F와 조합하여, 최종 항원 농도 4.0 µg PS/ml로 수득하였다. 염화나트륨 (150 mM) 용액, 10-20 mM 히스티딘, 숙신산 및 0.001% Tween-20을 제형화 공정에 희석제로서 사용하였으며, 알루미늄 포스페이트 (Adju-Phos, Brenntag, USA)를 시험 보강제로 사용하였다. 16-V 접합체는 2 mL 무균 바이알에 무균적으로 충전하였다. PNEUMOVAX® (Merck, USA) 또는 PREVNAR-13® (Pfizer, USA)을 대조군 시판 백신 제형 2종으로 사용하였다.

[0110] **실시예 5. 접합체의 면역원성 실험**

[0111] Pneumo PS-CRM197 접합체의 면역원성을 비교하기 위해 본 실험에서는 뉴질랜드 화이트 토끼 모델 (NZW)을 선택하였다. 모든 그룹 (16-V {valent}, PREVNAR-13® 및 PNEUMOVAX®)의 토끼들에서 면역화 기간 전과 기간 후 임상 신호를 조사하였다. 모든 그룹들은, 면역화 전, 부스터 투여 (7일 및 14일)하고, 말단 채혈 (terminal bleed)(28일)한 후, 이를 분액하여 -80°C에서 사용전까지 보관하였다. 총 IgG 측정을 위한 멀티플렉스 면역원성 분석을 표준 프로토콜에 따라 기준 표준 혈청 007 (CBER, FDA, USA)을 사용해 수행하였다. 기준 혈청 및 토끼

혈청을 희석하고, 폐렴구균 CWPS 및 22F PS 또는 25PS를 처리하여 교차-반응성 항체를 사전-흡착시켰다. 인간 단일클론 항-다당류 항체 (Pamlico Biopharma, USA)를 총 IgG 측정에 사용하였다. Bio-Plex 200 (Bio-Rad) 멀티플렉스 리더를 제조사의 지침에 따라 사용하였다 (도 2A, 2B 및 2C).

[0112] 실시예 5. 스트렙토코커스 뉴모니에 교차-반응성 피막 다당류 혈청형의 활성화 및 긴 및 짧은 스페이서 링커의 부착

[0113] 교차-반응성 혈청형인, 혈청형 6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F를, 피막 다당류 및 운반 단백질을 함유한 2가 접합체를 합성하는데 사용하였다. 정의에 따른 2가 접합체는 CRM 197에 동시에 또는 공동 부착되는 2개의 피막 다당류를 포함한다.

[0114] 동시적인, 스트렙토코커스 뉴모니에 타입 6A 및 6B의 피막 다당류로부터 유래된 크기 축소된 다당류의 활성화, CRM197과의 접합, 및 올리고당에 1차 아미노 또는 하이드라지드 기의 도입.

[0115] 혈청형 6A 및 6B의 천연 다당류 또는 크기 축소된 올리고당 (>200-500 kDa)을 실시예 1-4에 기술된 공정과 동일한 공정을 사용해 접합하였다.

[0116] 이렇게 수득한 크기 축소된 다당류를 주사용수에 최종 농도 10 mg/ml로 용해하였다. 아미노 또는 하이드라지드 기가 도입된 크기 축소된 다당류를, DMSO의 %가 20-30% (v/v) 범위가 되도록, 다이메틸 설펝사이드 (DMSO) 수용액에 10 mg/ml 농도로 희석하였다. 이를 표 2에 나타낸 바와 같이 ADH와 같은 단쇄 링커 또는 장쇄 링커가 함유된 DMSO에, 크기 축소된 다당류에 도입된 아미노/하이드라지드 기에 대해 물 과량으로 (통상적으로 5:1 또는 10:1), 특히 8:1로 첨가하였다.

[0117] 반응을 실온에서 4-12시간 동안 수행하였다. 반응 종료 후, 반응 산물을 다시 3-10 kDa 센트리콘 필터로 정제하였다.

[0118] 실시예 6. 2가 접합체 제조로서, 스트렙토코커스 뉴모니에 올리고당 타입 6A 및 타입 6B와 CRM197 운반 단백질의 동시적인 또는 공동 접합.

[0119] 15 mg/ml CRM197 함유 수용액을, 스트렙토코커스 뉴모니에 타입 6A의 피막 다당류로부터 유래된 올리고당 (수중 20-30%)이 부착된 링커가 함유된 DMSO에 첨가하였다. 올리고당이 부착된 링커 : CRM197의 비율은 1:1, 2:1, 1:2로 선택하였다. 수득된 혼합물은 천천히 교반하면서 실온에서 8-12시간 두었다. 그 후, 스트렙토코커스 뉴모니에 6B의 피막 다당류로부터 유래된 유도체화된 올리고당을 함유한 용액을 첨가하였다. 스트렙토코커스 뉴모니에 6B의 피막 다당류 : CRM197의 몰비는 1:1, 2:1, 1:2로 선택하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 8-12시간 두었다 (표 5). 접합 반응은 또한, CRM197-함유 용액에 스트렙토코커스 뉴모니에 타입 6A의 피막 다당류 및 스트렙토코커스 뉴모니에 타입 6B의 피막 다당류로부터 각각 유래된 2종의 활성화된 올리고당을 동시에 (공동) 첨가함으로써, 수행할 수 있다. 이렇게 수득된 올리고당-단백질 접합체는 0.2M NaCl (pH=6.6-7.0)이 함유된 0.01 M 포스페이트 완충제로 컨디셔닝화된 100-300 kDa 투석 막 (Spectrum lab, USA)을 사용해 투석하고, 마지막으로 0.22 μm 필터로 여과하였다.

[0120] 그외 교차-반응성 다당류 접합체들 모두 전술한 공정과 동일한 공정을 사용해 제조하였다. 반응 순서는 도 3A, 3B, 4A 및 4B에 기술된다.

[0121] 표 5

[0122] PS 함량 비교

표 5

2가 올리고당	활성화된 올리고당 kDa	접합체 kDa	총 다당류 단백질 중량비	유리형 올리고당, 중량%
6A-6B	>100-300	2.0:1.5	2-1.5 (1:0.75)	<2
6A-6B	>100-300, >300	>1200-2500 kDa	2-1.4 (1: 0.7)	<3
19A-19F	>100-300	>500-800 kDa	2-1.6 (1:0.8)	<2
15A-15B	>100-300, >300	>500-1000 kDa	2-1.3 (1: 0.65)	<3
9V-9N	>100-300, >300	>500-1000 kDa	2-1.3 (1: 0.65)	<3

[0124] 실시예 7. 18가 이상의 폐렴구균 접합체 백신의 시험 제형.

[0125] 1, 3, 5, 7F, 14, 18C, 22F, 23F, 33F, 35B (혈청형 다당류 10종)를 포함하는 혈청형에 대한 폐렴구균 다당류-CRM197 접합체를, 교차-반응성 다당류 접합체 (6A, 6B), (9V, 9N), (15A, 15B) 및 (19A, 19F) (8 혈청형)와 조합하여, 최종 다당류 농도 2.2-4.4  $\mu\text{g}$  PS/mL (1.1-2.2  $\mu\text{g}$ /인간 투여, 0.5 mL)으로 수득하였다. 염화나트륨 (150 mM) 용액, 10-20 mM 히스티딘, 20 mM HEPES 또는 MOPS 완충제 및 0.001% Tween-20을 제형화 공정에 희석제로서 사용하였으며, 알루미늄 포스페이트 (Adju-Phos, Brenntag, USA)를 시험 보강제로 사용하였다.

[0126] 18-V 이상 (>20V-24V)의 접합체를 2 mL 무균 바이얼에 무균적으로 충전하였다. PNEUMOVAX® (Merck, USA) 및/또는 PREVNAR-13® (Pfizer, USA)은 대조군으로 사용하였다.

[0127] **실시예 9. 접합체의 면역원성 실험.**

[0128] 폐렴구균 PS-CRM197 접합체의 면역원성을 비교하기 위해 본 실험에서는 뉴질랜드 화이트 토끼 모델 (NZW)을 선택하였다. 모든 그룹 (18가 이상 접합체, PREVNAR-13®, Pfizer 및 PNEUMOVAX®-23 (Merck USA))의 토끼들에서 면역화 기간 전과 기간 후 혈청 역가 (serological titer)를 조사하였다. 모든 그룹들은, 면역화 전, 부스터 투여 (7일 및 14일)하고, 말단 채혈 (terminal bleed) (28일)한 후, 이를 분액하여 -80°C에서 사용전까지 보관하였다. 총 IgG 측정을 위한 멀티플렉스 분석을 표준 프로토콜에 따라 기준 표준 혈청 007 (CBER, FDA, USA)을 사용해 수행하였다. 기준 혈청 및 토끼 혈청을 희석하고, 폐렴구균 CWPS 및 비-백신 혈청형 25PS를 처리하여 교차-반응성 항체를 사전-흡착시켰다. 인간/토끼/마우스 단일클론 항-다당류 항체를 총 IgG 측정에 사용하였다. Bio-Plex 200 (Bio-Rad) 리더를 제조사의 지침에 따라 사용하였다.

[0129] 접합체의 면역원성, 즉 피막 다당류 특이 항체 (총 IgG)를 표 6에 제시된 비드를 이용한 ELISA 분석으로 측정하였다. 총 IgG 값을 토끼 면역원성 데이터에서 PREVNAR-13®와 헤드 투 헤드로 비교하였다. 14일 데이터는 IVT-18V-1 백신에서 역가가 PREVNAR-13® 백신과 비교해 현저하게 증가함을 보여준다. 마찬가지로, IVT-18V-1 데이터는 PREVNAR-13®과 비교해 IgG 값을 현저하게 부스팅하였다 (표 6).

[0130] **표 6**

[0131] 18V 1가 접합체 백신에 대한 멀티플렉스 비드 기반의 ELISA 분석을 이용한 피막 다당류 특이 항체 (총 IgG,  $\mu\text{g}$ /mL).

**표 6**

[0132]

PREVNAR-13® 2.2 $\mu\text{g}$ /용량	(IgG) 14일/0일	(IgG) 28일/0일	IVT-18V-1 2.2 $\mu\text{g}$ /용량	(IgG) 14일/0일	(IgG) 28일/0일
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	48	480
6A	188	560	6A	775	3775
6B	165	780	6B	662	3662
18C	50	280	18C	306	3560
19A	45	235	19A	233	2500
19F	29	290	19F	72	720
4	49	230	4	150	750
5	186	700	5	550	3550
7F	180	680	7F	332	3860
9V	52	520	9V	212	2400
9N	-	-	9N	200	2200
14	85	400	14	272	2890
15A	-	-	15A	672	3900
15B	-	-	15B	750	4000
18C	175	800	18C	550	5500
22F	-	-	22F	1000	8000
23F	53	450	23F	212	2420

[0133] 주석: IVT-18V = 18-V 접합체 백신 (1가 접합체들로 된 혼합물); 9N, 15A, 15B, 22F 및 23F 혈청형은 PREVNAR-13®에 존재하지 않으므로, IgG 값은 측정 안함; 1가 접합체로서 18-V 제형은 6B 접합체가 4.4  $\mu\text{g}$ 인 것을 제외하고는, 각 혈청형은 2.2  $\mu\text{g}$ 을 사용해 제조하였다. 염화나트륨 (150 mM) 용액, 10-20 mM 히스티딘, 20 mM HEPES 또는 MOPS 완충제 및 0.001% Tween-20을 제형화시 희석제로서 사용하고, 알루미늄 포스페이트 (Adju-

Phos, Brenntag, USA)는 시험 보강제로서 사용하였으며; 피막 다당류 항체 (총 IgG)를 비드 기반의 ELISA에 사용하였다: 18-V 접합체 백신 제형-2 (IVT-18V-2): 1가 접합체들로 된 10-V 제형 및 나머지 8-V는 6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F를 포함하는 2가 접합체로서 첨가됨. (사용된 백신 투여량은 각 혈청형에 대해 2.2 µg이나, 6B는 4.4 µg임) 10-V 제형은 1가 접합체로서, 나머지 8-V는 6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F를 포함하는 2가-접합체로서 첨가한다. 6A-6B 2가 단분자 접합체는 2.2 µg/용량으로 사용하였으며, 나머지 2가 접합체는 2.2 µg/용량으로 사용하였다. 염화나트륨 (150 mM) 용액, 10-20 mM 히스티딘, 20 mM HEPES 또는 MOPS 완충제 및 0.001% Tween-20은 제형화시 희석제로 사용하고, 알루미늄 포스페이트 (Adju-Phos, Brenntag, USA)는 시험 보강제로 사용하였다.

[0134] 접합체의 면역원성, 피막 다당류 특이 항체 (총 IgG)를 표 7에 제시된 비드 기반의 ELISA 분석 방법으로 측정하였다. 총 IgG 값을 토끼 면역원성 데이터에서 PREVNAR-13®와 헤드 투 헤드로 비교하였다. 14일 데이터는 IVT-18V-2 백신에서 역가가 PREVNAR-13® 백신과 비교해 현저하게 증가함을 보여준다. 흥미롭게도, 2가 접합체 혈청형 (예, 6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F)에 대한 IVT-18V-2 총 IgG 데이터는, 1가 접합체를 이용한 IVT-18V-1 제형과 비교해 IgG 값에 대해 현저한 부스터 효과를 나타내었다. 따라서, 2가 접합체는 1가 접합체와 비교해 면역원성이 더 높은 것으로 결론내릴 수 있다 (표 7). 즉, IVT-18V-2 접합체 백신 제형은 PREVNAR-13®뿐 아니라 IVT-18V-1 제형에 비해서도 우수한 면역원성을 가진다. 1-3.5K 링커 (HZ-PEG-HZ)를 사용해 접합된 다당류는, 짧은 링커 (ADH) 또는 PREVNAR-13®과 같이 링커가 없는 접합체와 비교해, 훨씬 더 높은 면역원성을 나타낸다.

[0135] 표 7

[0136] 멀티플렉스 비드 기반의 ELISA를 이용한 피막 다당류 항체 (총 IgG).

표 7

[0137]

PREVNAR-13® 2.2µg/용량	비율 14일/0일	비율 28일/0일	IVT-18V-2 2.2µg/용량	비율 14일/0일	비율 28일/0일
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	50	530
6A	188	560	6A/6B	875/762	4375/4662
6B	165	780			
18C	50	280	18C	316	3600
19A	45	235	19A/19F	300/198	3500/2700
19F	29	290			
4	49	230	4	180	1000
5	186	700	5	550	3600
7F	180	680	7F	360	4100
9V	52	520	9V/9N	350/300	3400/3200
9N	-	-			
14	85	400	14	310	32000
15A	-	-	15A/15B	872/850	5900/5600
15B	-	-			
18C	175	800	18C	600	6800
22F	-	-	22F	1020	8150
23F	53	450	23F	300	3200

[0138] 주석: IVT-18V-2 = 1가 접합체 10종과 2가 접합체 4종의 혼합물; 18-V 접합체 백신 제형 (IVT-18V-3): 2.2 µg 로 사용되는 1가 접합체로서 10-V 제형 및 나머지 8-V는 1.1 µg/용량으로 사용되는 6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F를 포함하는 2가 접합체로서 8-V 첨가하며, 단 6B는 2.2 µg/용량임.

[0139] 접합체의 면역원성, 즉 피막 다당류 특이 항체 (총 IgG)는 표 8에 제시된 멀티플렉스 비드 기반의 ELISA 분석으로 측정하였다. 총 IgG 값을 토끼 면역원성 데이터에서 PREVNAR-13®와 헤드 투 헤드로 비교하였다. 14일 데이터는 IVT-18V-3 백신에서 역가가 PREVNAR-13® 백신과 비교해 현저하게 증가함을 보여준다. 흥미롭게도, 2가 접합체 혈청형 (예, 6A/6B, 9V/9N, 15A/15B 및 19A/19F)에 대한 총 IgG 데이터는, 2가 접합체 혈청형에 대한 IVT-18V-2 제형과 비교해 비슷한 IgG 값을 나타내었으며, IVT-18V-3 제형은 투여량이 더 낮다 (투여량 2.2 vs 1.1 µg). 따라서, 2가 접합체는 1가 접합체와 비교해 면역원성이 우수하며, 투여량이 더 적은 것으로 결론내릴

수 있다. IVT-18V-2 접합체 백신 제형은 PREVNAR-13®뿐 아니라 IVT-18V-1 제형에 비해서도 우수한 면역원성을 가진다. 1-3.5K 링커 (HZ-PEG-HZ)를 사용해 접합된 다당류는, 짧은 링커 (ADH) 또는 PREVNAR-13®과 같이 링커가 없는 접합체와 비교해, 훨씬 더 높은 면역원성을 나타낸다 (표 8).

[0140]

표 8

[0141]

2가 접합체 혈청형의 총 IgG 데이터

표 8

[0142]

PREVNAR-13® 2.2µg/용량	비율 14일/0일	비율 28일/0일	IVT-18V-2 2.2µg/용량	비율 14일/0일	비율 28일/0일
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	50	530
6A	188	560	6A/6B	825/860	4275/4900
6B	165	780			
18C	50	280	18C	316	3600
19A	45	235	19A/19F	275/250	3400/3000
19F	29	290			
4	49	230	4	180	1000
5	186	700	5	550	3600
7F	180	680	7F	360	4100
9V	52	520	9V/9N	320/380	3300/3800
9N	-	-			
14	85	400	14	310	32000
15A	-	-	15A/15B	790/900	5800/6200
15B	-	-			
18C	175	800	18C	600	6800
22F	-	-	22F	1020	8150
23F	53	450	23F	300	3200

[0143]

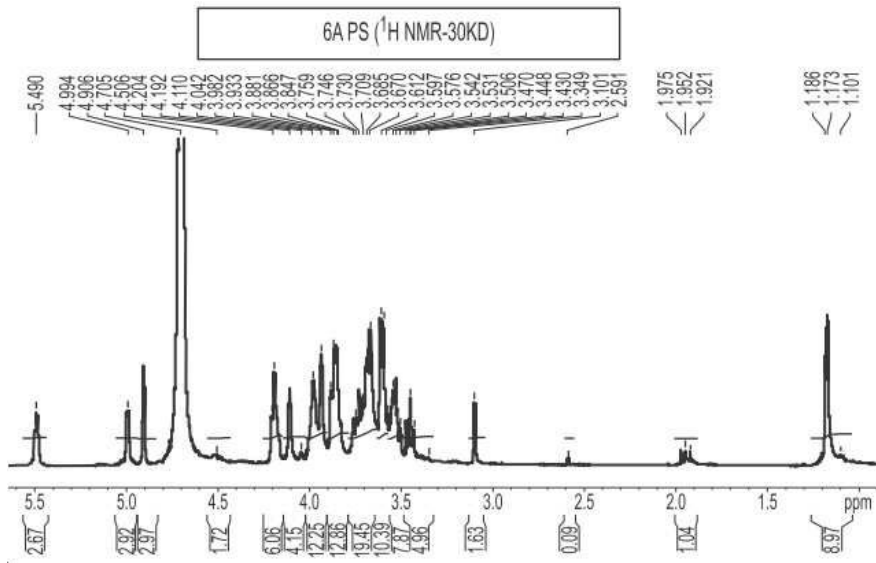
주석: 1VI-18V-3 = 1가 접합체 10종과 2가 접합체 4종의 혼합물.

[0144]

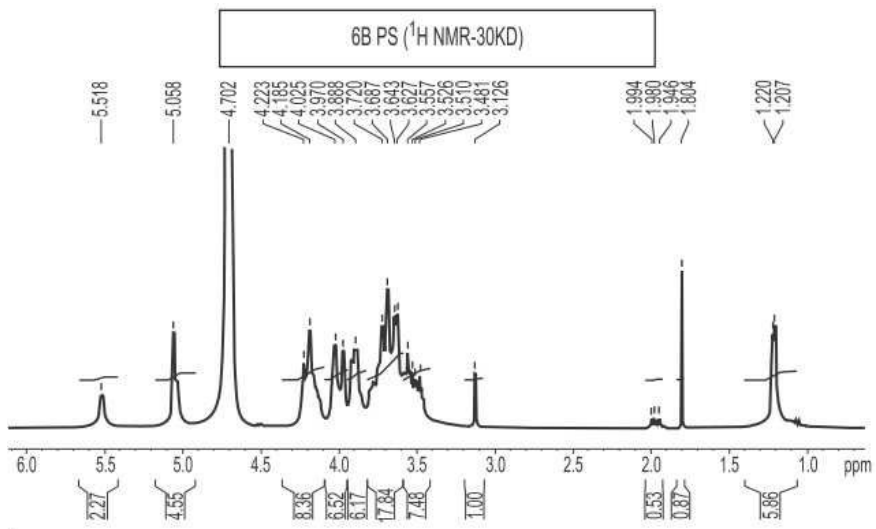
본 발명의 다른 구현예들과 용도는 본원에 개시된 본 발명의 설명 및 실시를 고려하여 당해 기술 분야의 당업자에게 자명할 것이다. 모든 간행물, 미국 및 외국 특허 및 특허 출원을 비롯하여 본원에 인용된 모든 참조문헌들은 그 전체가 원용에 의해 구체적으로 본원에 포함된다. 본원의 설명 및 실시에는 후술한 청구항에 의해 정해지는 본 발명의 진정한 범위 및 사상내에서만 예시적인 것으로 간주되는 것으로 의도된다. 또한, 용어 "를 포함하는"은 용어 "로 구성되는" 및 "로 필수적으로 구성되는"을 포괄한다.

도면

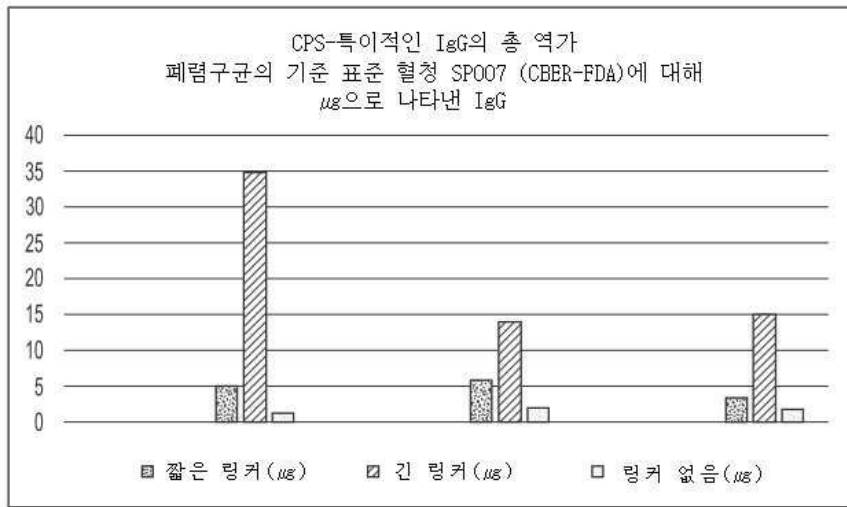
도면1a



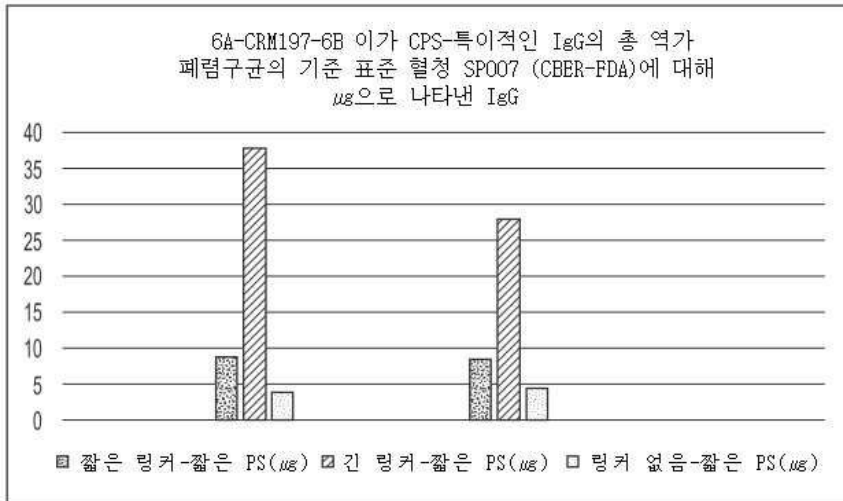
도면1b



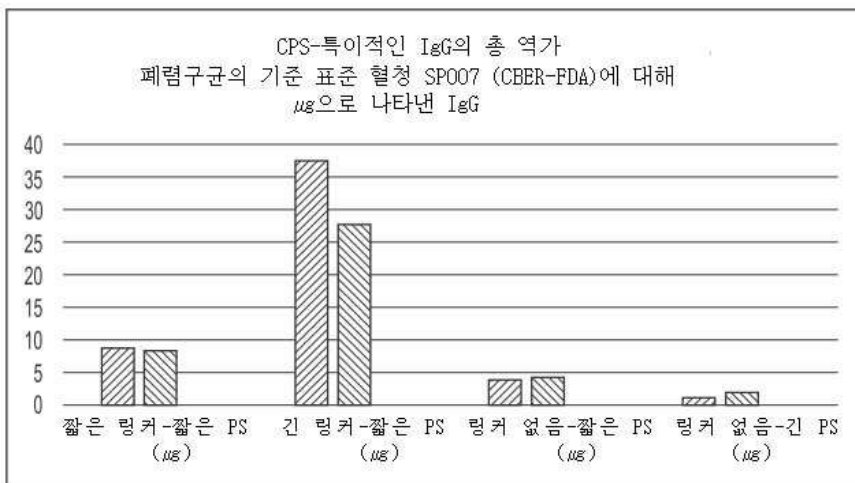
도면2a



도면2b



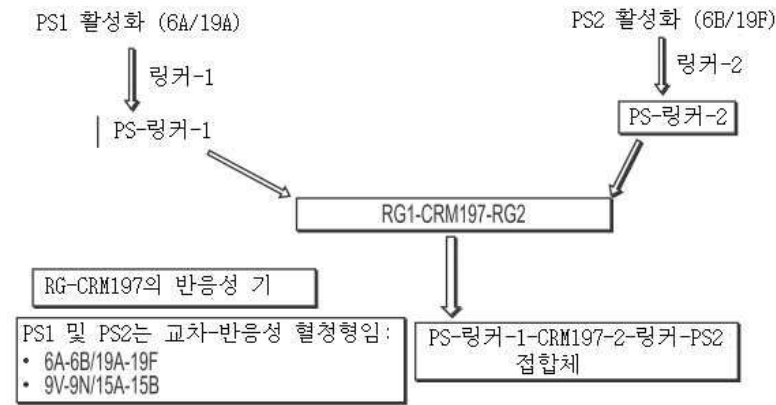
도면2c



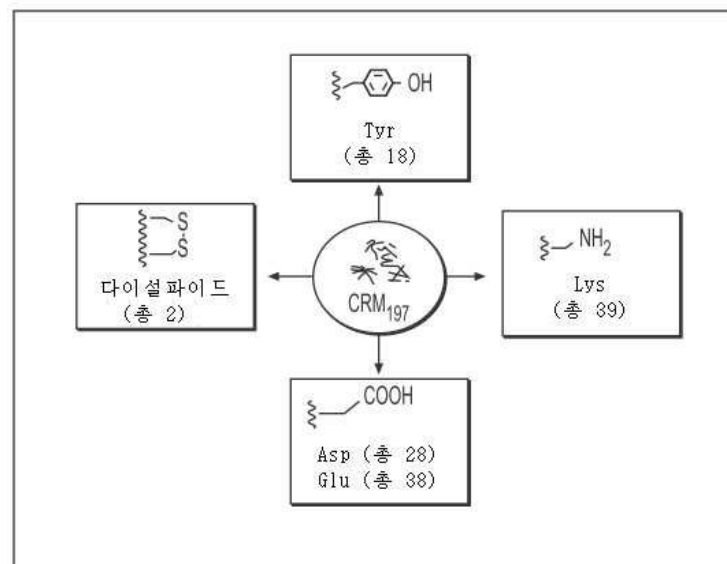
도면3a



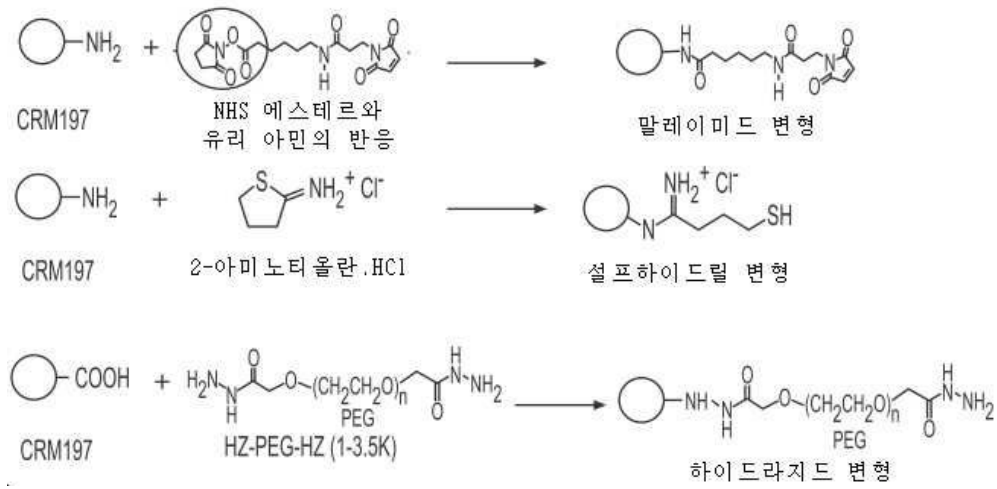
도면3b



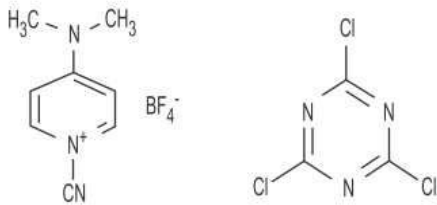
도면4a



도면4b



도면5



도면6

이미노티올렌을 이용한 CRM197의 티올화

