



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0119108
(43) 공개일자 2019년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/385 (2006.01) A61K 39/09 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)
A61K 47/34 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 9/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/385 (2013.01)
A61K 39/092 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7027397
(22) 출원일자(국제) 2018년02월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년09월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/018659
(87) 국제공개번호 WO 2018/156468
국제공개일자 2018년08월30일
(30) 우선권주장
62/463,220 2017년02월24일 미국(US)

(71) 출원인
머크 샤프 앤드 돔 코퍼레이션
미국 뉴저지 (우편번호 07065-0907) 라웨이 이스
트 링컨 애비뉴 126
(72) 발명자
스미스, 윌리엄, 제이.
미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770
지오발레리, 세실리아
미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770
나로키, 데니스, 케이.
미국 19486 펜실베이니아주 웨스트 포인트 섬니타운
파이크 770
(74) 대리인
장덕순, 심미성

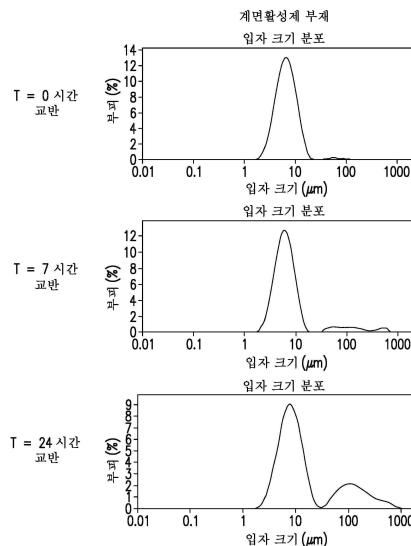
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 폐렴구균 접합체 백신 제제

(57) 요약

본 발명은 폴리소르베이트 20 또는 폴록사머와 폴리올의 조합물이 혼입된 계면활성제 시스템을 포함하는 폐렴구균 접합체 백신 제제를 제공한다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)
A61K 9/0095 (2013.01)
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 9/10 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체; (ii) 5.0 내지 7.5 범위의 pH를 갖는 pH 완충 염수 용액; (iii) 알루미늄 염; 및 (iv) (a) 폴리소르베이트 20 및 (b) 1100 Da 내지 17,400 Da 범위의 분자량을 갖는 폴록사머, 및 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 400으로부터 선택된 폴리올로부터 선택된 계면활성제 시스템을 포함하는 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 1종 이상이 비양성자성 용매에서 제조된 것인 제제.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 단백질 중량 기준 10 내지 100%가 비양성자성 용매에서 제조된 것인 제제.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 비양성자성 용매가 DMSO인 제제.

청구항 5

제1항에 있어서, 계면활성제 시스템이 1100 Da 내지 17,400 Da 범위의 분자량을 갖는 폴록사머를 포함하는 것인 제제.

청구항 6

제5항에 있어서, 폴록사머가 7,500 Da 내지 15,000 Da 범위의 분자량을 갖는 것인 제제.

청구항 7

제5항에 있어서, 폴록사머가 7,500 Da 내지 10,000 Da 범위의 분자량을 갖는 것인 제제.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 폴록사머가 폴록사머 188 또는 폴록사머 407인 제제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 폴록사머의 최종 농도가 0.001% 내지 5% 중량/부피인 제제.

청구항 10

제9항에 있어서, 폴록사머의 최종 농도가 0.025% 내지 1% 중량/부피인 제제.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리올이 프로필렌 글리콜이고, 1% 내지 20% 중량/부피의 최종 농도로 존재하는 것인 제제.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리올이 폴리에틸렌 글리콜 400이고, 1% 내지 20% 중량/부피의 최종 농도로 존재하는 것인 제제.

청구항 13

제1항에 있어서, 계면활성제 시스템이 폴리소르베이트 20을 포함하는 것인 제제.

청구항 14

제13항에 있어서, 폴리소르베이트 20의 최종 농도가 0.001% 내지 10% 중량/부피의 범위인 제제.

청구항 15

제13항에 있어서, 폴리소르베이트 20의 최종 농도가 0.025% 내지 2.5% 중량/부피의 범위인 제제.

청구항 16

제13항에 있어서, 폴리소르베이트 20의 최종 농도가 0.025% 내지 0.1% 중량/부피의 범위인 제제.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된 폴리올을 추가로 포함하는 제제.

청구항 18

제17항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜 또는 프로필렌 글리콜이 6% 내지 20% 중량/부피의 최종 농도로 존재하는 것인 제제.

청구항 19

제18항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜이 폴리에틸렌 글리콜 400인 제제.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, pH 완충 염수 용액이 5.0 내지 7.0 범위의 pH를 갖는 것인 제제.

청구항 21

제20항에 있어서, 완충제가 포스페이트, 숙시네이트, L-히스티딘, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 및 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제제.

청구항 22

제21항에 있어서, 완충제가 5 mM 내지 50 mM의 최종 농도의 L-히스티딘, 또는 1 mM 내지 10 mM의 최종 농도의 숙시네이트인 제제.

청구항 23

제22항에 있어서, L-히스티딘이 20 mM $\pm$ 2 mM의 최종 농도로 존재하는 것인 제제.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, pH 완충 염수 용액 중의 염이 염화마그네슘, 염화칼륨, 염화나트륨 또는 그의 조합인 제제.

청구항 25

제24항에 있어서, pH 완충 염수 용액 중의 염이 염화나트륨인 제제.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 염수가 20 mM 내지 170 mM의 농도로 존재하는 것인 제제.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체가 담체 단백질에 접합된 1종 이상의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 것인 제제.

청구항 28

제27항에 있어서, 담체 단백질이 CRM₁₉₇, 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFB C8, 디프테리아 독소이드 (DT), 과상독 독소이드 (TT), TT의 단편 C, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드, 이. 콜라이(*E. coli*) LT, 이. 콜라이 ST, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A 및 그의 조합으로부터 선택된 것인 제제.

청구항 29

제28항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 1종 이상이 CRM₁₉₇에 접합된 것인 제제.

청구항 30

제29항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 제제가 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*) 폴리사카라이드로 본질적으로 이루어진 15가 폐렴구균 접합체 (15vPnC) 제제인 제제.

청구항 31

제30항에 있어서, 폴리사카라이드 단백질 접합체 중 1종 이상이 DMSO 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 것인 제제.

청구항 32

제31항에 있어서, 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체가 DMSO 조건 하에 제조되고, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체가 수성 조건을 사용하여 제조된 것인 제제.

청구항 33

제32항에 있어서, 각각의 용량이 4 µg/mL 또는 8 µg/mL의 각각의 사카라이드, 예외로 8 µg/mL 또는 16 µg/mL의 6B; 및 약 64 µg/mL 또는 128 µg/mL CRM₁₉₇ 담체 단백질을 함유하도록 제제화된 것인 제제.

청구항 34

제33항에 있어서, 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM 염화나트륨, 0.25 mg/mL의 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA) 및 0.2% w/v PS-20을 추가로 포함하는 제제.

청구항 35

CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드; 20 mM 히스티딘 pH 5.8; 150 mM NaCl; 250 µg/mL APA; 및 0.2% w/v PS-20로 본질적으로 이루어진 15가 폐렴구균 접합체 조성물을 포함하고; 4 µg/mL의 각각의 사카라이드, 예외로 8 µg/mL의 6B; 및 약 64 µg/mL CRM₁₉₇ 담체 단백질을 함유하는 투여 형태로서 제제화되며; 여기서 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 제조되고 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건을 사용하여 제조된 것인 제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리소르베이트 20 또는 폴록사머와 폴리올의 조합물이 혼입된 계면활성제 시스템을 포함하는 폐렴구균 접합체 백신 제제를 제공한다.

배경 기술

[0002] 폐막화된 박테리아의 한 예인 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)는 전세계적으로 심각한 질

환의 유의한 원인이다. 1997년에, 질환 제어 및 예방 센터 (CDC)는 미국에서 매년 3,000건의 폐렴구균성 수막염 사례, 50,000건의 폐렴구균성 박테리아혈증 사례, 7,000,000건의 폐렴구균성 중이염 사례 및 500,000건의 폐렴구균성 폐렴 사례가 있는 것으로 추정하였다. 문헌 [Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997, 46(RR-8):1-13]을 참조한다. 또한, 이들 질환의 합병증은 유의할 수 있으며, 일부 연구는 폐렴구균성 수막염에 의한 최대 8%의 사망률 및 25%의 신경계 후유증을 보고하고 있다. 문헌 [Arditi et al., 1998, Pediatrics 102:1087-97]을 참조한다.

[0003] 수년 동안 허가되어 온 다가 폐렴구균 폴리사카라이드 백신은 성인, 특히 고령자 및 고위험자에서 폐렴구균성 질환을 예방하는데 매우 유용한 것으로 입증되었다. 그러나, 영아 및 소아는 접합되지 않은 폐렴구균 폴리사카라이드에 불량하게 반응한다. 박테리아 폴리사카라이드는 T-세포-비의존성 면역원이며, 영아에서 약한 반응을 도출하거나 전혀 반응을 도출하지 않는다. 박테리아 폴리사카라이드 면역원의 담체 단백질에의 화학적 접합은 영아에서의 면역 반응을 T-세포 의존성 면역 반응으로 전환시킨다. 디프테리아 독소이드 (DTx, DT의 화학적으로 해독된 버전) 및 CRM₁₉₇은 그의 아미노산 서열 내 T-세포-자극 에피토프의 존재로 인해 박테리아 폴리사카라이드 면역원을 위한 담체 단백질로서 기재되었다.

[0004] 그 당시 소아 및 영아에서 침습성 폐렴구균성 질환을 야기하는 7종의 가장 빈번하게 단리된 혈청형 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F)을 함유하는 폐렴구균 접합체 백신인 프레브나르(Prevnar)®는 미국에서 2000년 2월에 처음 허가되었다. 미국에서 프레브나르®의 보편적인 사용 후에, 프레브나르®에 존재하는 혈청형으로 인한 아동에서의 침습성 폐렴구균성 질환은 유의하게 감소되었다. 문헌 [Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7] 참조). 그러나, 세계의 특정 지역에서의 프레브나르®에 의한 혈청형 적용범위 및 미국에서의 특정 출현 혈청형 (예를 들어, 19A 등)에 관한 일부 증거에 있어서는 한계가 있다. 문헌 [O'Brien et al., 2004, Am J Epidemiol 159:634-44; Whitney et al., 2003, N Engl J Med 348:1737-46; Kyaw et al., 2006, N Engl J Med 354:1455-63; Hicks et al., 2007, J Infect Dis 196:1346-54; Traore et al., 2009, Clin Infect Dis 48:S181-S189]을 참조한다.

[0005] 프레브나르 13®은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함하는 13가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신이다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2006/0228380 A1, 문헌 [Prymula et al., 2006, Lancet 367:740-48 및 Kieninger et al., Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers, presented at the 48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Washington DC, October 25-28, 2008]을 참조한다. 또한, 문헌 [Dagan et al., 1998, Infect Immun. 66: 2093-2098 및 Fattom, 1999, Vaccine 17:126]을 참조한다.

[0006] 중국 특허 출원 공개 번호 CN 101590224 A는 혈청형 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 포함하는 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신을 기재한다.

[0007] 미국 특허 번호 8,192,746은 모두 개별적으로 CRM₁₉₇ 폴리펩티드에 접합된, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 갖는 15가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신을 기재한다.

[0008] 다수의 담체 단백질 시스템이 또한 기재되었다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 20100209450, 20100074922, 20090017059, 20090010959 및 20090017072를 참조한다.

[0009] 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드-단백질 접합체 및 폴리소르베이트 80 (PS-80) 및 폴록사머 188 (P188)을 포함한 계면활성제를 포함하는 제제가 개시되었다. 각각 미국 특허 번호 8,562,999 및 미국 특허 출원 공개 번호 US20130273098을 참조한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 (i) 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체; (ii) 5.0 내지 7.5 범위의 pH를 갖는 pH 완충 염수 용액; (iii) 알루미늄 염; 및 (iv) (a) 폴리소르베이트 20 및 (b) 1100 Da 내지 17,400 Da 범위의 분자량을 갖는 폴록사머, 및 프로필렌 글리콜 (PG) 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 400으로부터 선택된 폴리올로부터 선택된 계면활성제 시스템을 포함하는 제제를 제공한다.

[0011] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 1종 이상은 비양성자성 용매, 예를 들어 디메틸설폭시드

(DMSO)에서 제조된다. 이러한 실시양태의 특정 측면에서, 접합체의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 또는 그 초과 (총 단백질 기준으로)가 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 제조된다. 대안적으로, 접합체의 10-100%, 24%-100% 또는 24-80% (총 단백질 기준으로)가 비양성자성 용매, 예를 들어 DMSO에서 제조된다. 이들 실시양태의 특정 측면에서, 계면활성제 시스템은 상기 기재된 바와 같은 폴리소르베이트 20 또는 폴록사머/폴리올 조합물이다.

[0012] 특정 실시양태에서, 계면활성제 시스템은 1100 Da 내지 17,400 Da, 7,500 Da 내지 15,000 Da, 또는 7,500 Da 내지 10,000 Da 범위의 분자량을 갖는 폴록사머를 포함한다. 폴록사머는 폴록사머 188 또는 폴록사머 407일 수 있다. 특정 측면에서, 폴록사머의 최종 농도는 0.001% 내지 5% w/v, 0.025% 내지 1% w/v이다. 구체적인 측면에서, 폴리올은 프로필렌 글리콜이고, 1% 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 측면에서, 폴리올은 폴리에틸렌 글리콜 400이고, 1% 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 계면활성제 시스템은 폴리소르베이트 20을 포함한다. 특정 측면에서, 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 0.001% 내지 10% w/v, 또는 0.025% 내지 2.5% w/v, 또는 0.025% 내지 0.1% w/v의 범위이다. 계면활성제 시스템이 PS-20을 포함하는 특정 측면에서, 제제는 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택된 폴리올을 추가로 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 또는 프로필렌 글리콜은 6% 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 400이다.

[0013] 특정 실시양태에서, pH 완충 염수 용액은 5.0 내지 7.0 범위의 pH를 가질 수 있다. 완충제는 포스페이트, 숙시네이트, L-히스티딘, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 또는 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 한 측면에서, 완충제는 5 mM 내지 50 mM의 최종 농도의 L-히스티딘, 또는 1 mM 내지 10 mM의 최종 농도의 숙시네이트이다. 구체적인 측면에서, L-히스티딘은 20 mM $\pm$ 2 mM의 최종 농도로 존재한다. pH 완충 염수 용액 중의 염은 염화마그네슘, 염화칼륨, 염화나트륨 또는 그의 조합일 수 있다. 한 측면에서, pH 완충 염수 용액은 염화나트륨이다. 염수는 20 mM 내지 170 mM의 농도로 존재할 수 있다.

[0014] 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 담체 단백질에 접합된 1종 이상의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함한다. 특정 측면에서, 담체 단백질은 CRM₁₉₇, 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFB C8, 디프테리아 독소이드 (DT), 과상풍 독소이드 (TT), TT의 단편 C, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드, 이. 콜라이(*E. coli*) LT (열-불안정성 장독소), 이. 콜라이 ST (열-안정성 장독소), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A 및 그의 조합으로부터 선택된다. 한 구체적인 측면에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 1종 이상은 CRM₁₉₇에 접합된다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드 단백질 접합체 중 1종 이상은 비-수성 용매 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다. 이러한 측면에서, 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조될 수 있고, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수용액에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조될 수 있다. 특정 측면에서, 각각의 용량이 4 μ g/mL 또는 8 μ g/mL의 각각의 사카라이드, 예외로 8 μ g/mL 또는 16 μ g/mL의 6B; 및 약 64 μ g/mL 또는 128 μ g/mL CRM₁₉₇ 담체 단백질을 함유하도록 제제화된다.

[0015] 본 발명은 또한 CRM₁₉₇ 폴리펩티드에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드, 20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% (w/v) PS-20 및 250 μ g/ml APA를 포함하는 15가 페렴구균 접합체 제제에 관한 것이다. 특정 측면에서, 제제는 4 μ g/mL 또는 8 μ g/mL의 각각의 사카라이드, 예외로 8 μ g/mL 또는 16 μ g/mL의 6B; 및 약 64 μ g/mL 또는 128 μ g/mL CRM₁₉₇ 담체 단백질을 함유하는 투여 형태로서 제제화된다. 특정 측면에서, 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO 조건 하에 제조되고, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 조건을 사용하여 제조된다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a-d: 비-환원 조건 하의 DTFB 공정 중간체의 SDS-PAGE 분석. a: 제시된 샘플은 다음과 같다: 분자량 표준물 (좌측에서부터 라인 1); 3개의 반복 다중모드 음이온 교환 크로마토그래피 실행으로부터의 용리액 생성물 (MM AEX1, MM AEX2, MM AEX3, 라인 2-4); 다중모드 음이온 교환 크로마토그래피 실행으로부터의 풀링된 용리액 생성물 (MM AEX 풀, 라인 5); 투석여과된 보유물 (UF-DR, 라인 6); 및 0.2-마이크로미터 여과 후 최종 벌크 중간체 (FBI, 라인 7). SDS PAGE: NuPAGE 4-12% 비스-트리스 겔; 5 μ g/라인; SYPRO 루비 단백질 겔 염색. b: 환원 조건 하에 실행된 DTFB 공정 중간체의 SDS-PAGE 분석 (NuPAGE 4-12% 비스-트리스 겔; 라인 2, 4, 8, 10; 5 μ g/라인; 라인 6: 2 μ g/라인; SYPRO 루비 단백질 겔 염색). 제시된 샘플은 다음과 같다: 마크-12 표준물

(레인 1 및 12); DTFB를 생성하는데 사용된 정제된 CRM₁₉₇ (CRM₁₉₇, 레인 2 및 10); 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피 수지 상에 로딩된, 트립신 소화 단계 후 단백질을 분해적으로 절단된 CRM₁₉₇ (MM CEX 공급물, 레인 4); 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피로부터의 생성물 (MM CEX 생성물, 레인 6); 및 0.2-마이크로미터 여과 후 최종 벌크 중간체 (DTFB-FBI, 레인 8). c: 제시된 샘플은 다음과 같다: 분자량 마커 (좌측에서부터 레인 1); 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피 후 초기 농축된 보유물 (ICR, 레인 2); 투석여과된 보유물 (UF-DR, 레인 3); 투석여과 후 농축된 보유물 (UF-OCR, 레인 4); 생성물 회수를 위한 막 플러쉬 (UF-W, 레인 5); 최종 폴링된 보유물 플러쉬 플러쉬 (UF-FR, 레인 6); 및 0.2-마이크로미터 여과 후 최종 벌크 중간체 (FBI, 레인 6). SDS-PAGE: 14% 트리스-글리신 겔; 8.3-8.4 μ g/레인; 겔코드 블루 단백질 겔 염색. d: 환원 조건 하에 실행된 DTFB 공정 중간체의 SDS-PAGE 분석 (NuPAGE 4-12% 비스-트리스 겔; SYPRO 루비 단백질 겔 염색). 제시된 샘플은 다음과 같다: 마크-12 표준물 (레인 1 및 12); 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피 수지 상에 로딩된, 트립신 소화 단계 후 단백질을 분해적으로 절단된 CRM₁₉₇ (MM CEX 공급물, 레인 2); DTFB를 생성하는데 사용된 정제된 CRM₁₉₇ (CRM₁₉₇, 레인 3); 칼럼 로딩 동안 통과물 (MM CEX 통과물, 레인 4); 로딩 후 칼럼의 세척물 (MM CEX 세척물, 레인 5); 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피로부터의 단계 용리 후 수집된 생성물 (MM CEX 생성물, 레인 7); 10배 희석된 MM CEX 생성물, 레인 9); 및 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피로부터의 단계 용리 후 수집된 후기 용리 생성물 (후기 용리 MM CEX 생성물, 레인 11).

도 2: pH 및 염화나트륨 (NaCl) 농도의 함수로서의 100 mM 인산칼륨 (KPi) 중 DTFB 단백질 농도. 용액을 실온에서 밤새 유지한 다음 원심분리하였다. UV280 흡광도 검출을 동반한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 상청액을 검정하였다.

도 3: 폴리소르베이트 20 (PS-20) 농도의 함수로서의 인산칼륨 (KPi) 용액 중 DTFB 단백질 농도. 용액을 실온에서 5분 동안 볼텍싱한 다음 원심분리하였다. UV280 흡광도 검출을 동반한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 상청액을 검정하였다.

도 4: CRM₁₉₇ 또는 DTFB 담체 단백질에 접합되고 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 사용하여 제제화된 에스. 뉴모니아에 혈청형 3 폴리스카라이드로 면역화된 마우스에 대한 ELISA 항체 역가. 마우스를 2개의 독립적인 혈청형 3-CRM₁₉₇ 접합체 로트 (로트 1 및 2) 중 하나로 면역화시켰다.

도 5: CRM₁₉₇ 또는 DTFB 담체 단백질에 접합되고 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 사용하여 제제화된 에스. 뉴모니아에 혈청형 3 피막 폴리스카라이드로 면역화된 마우스에 대한 생존 곡선. 마우스를 2개의 독립적인 혈청형 3-CRM₁₉₇ 접합체 로트 (로트 1 및 2) 중 하나로 면역화시켰다. APA 또는 염수 단독의 제제를 대조군으로서 연구에 또한 포함시켰다. 면역화 후, 마우스에게 후속적으로 혈청형 3 박테리아를 복강내로 췌린지하였다.

도 6: 정적 광 산란 (SLS)에 의해 측정된 바와 같은 15가 폐렴구균 폴리스카라이드 (PnPs) 접합체 제제의 입자 크기 분포에 대한 시간 및 교반의 영향을 평가하기 위한 실험실 규모 교반 연구. 모든 15종의 폐렴구균 폴리스카라이드 혈청형을 수용액에서 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합시켰다. 교반 연구를 위해 접합체를 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 및 0.25 mg/mL (w/v Al⁺³) APA에서 제제화하였다.

도 7: SLS에 의해 측정된 바와 같은 15가 폐렴구균 폴리스카라이드 접합체 제제의 입자 크기 분포에 대한 시간 및 교반의 영향을 평가하기 위한 실험실 규모 교반 연구. 모든 15종의 폐렴구균 폴리스카라이드 혈청형을 수용액에서 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합시켰다. 교반 연구를 위해 접합체를 0.08% w/v 또는 0.24% w/v 폴록사머 188 (P188)과 함께 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 및 0.25 mg/mL (w/v Al⁺³) APA에서 제제화하였다.

도 8a-b: 시린지 내의 15가 폐렴구균 폴리스카라이드 접합체 제제의 실험실 규모 모의 적송 및 취급 연구. 모든 15종의 폐렴구균 폴리스카라이드 혈청형을 수용액에서 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합시켰다. 접합체를 P188 없이 또는 0.2% w/v P188과 함께 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 및 0.25 mg/mL (w/v Al⁺³) APA에서 제제화하였다. 24시간의 수평 회전 전 및 후 SLS에 의해 측정된 바와 같은 입자 크기 분포 (a) 및 24시간의 수평 회전 후 시린지의 시각적 평가 (b)가 제시된다.

도 9: 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl, 0.25 mg/mL (w/v Al^{+3}) APA 및 0.2% w/v P188을 갖는 2종의 15가 폐렴구균 폴리사카라이드 접합체 제제의 입자 크기 분포 (SLS에 의해 측정된 바와 같은 부피-가중 분포 또는 D[4,3]으로 표현됨). 제제 PCV15_{Aq}는 수용액에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 폐렴구균 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체로 구성되었다. 제제 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}는, 일부는 수용액에서의 환원성 아미노화에 의해 생성되고 다른 것은 비-수용액에서의 환원성 아미노화에 의해 생성된, 15종의 폐렴구균 폴리사카라이드 접합체의 조합물을 사용하였고; PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}에서의 모든 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형은 DTFB에 접합된 혈청형 3 (ST3)을 제외하고는 CRM₁₉₇에 접합되었다. 제제를 시린지 내로 충전하고, SLS 평가 전에 4°C에서 최대 24시간 동안 수평으로 교반하였다.

도 10a-b: 1.5 mL 하이팩 시린지에서의 교반 및 최대 24시간의 수평 회전 후 P188 (a), PS-80 (b) 및 PS-20 (a, b)을 함유하는 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제의 SLS에 의해 측정된 바와 같은 D[4,3] 값.

도 11: 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)를 갖는 15가 폐렴구균 폴리사카라이드 접합체 제제로 면역화된 새끼 래스스 원숭이 (IRM)로부터의 폐렴구균 혈청형 3-특이적 IgG 농도. 모든 제제는 CRM₁₉₇ 또는 DTFB에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 3 피막 폴리사카라이드 (ST3)를 함유하였다. 제제 PCV15_{Aq/비-Aq}는, 일부는 수용액에서의 환원성 아미노화에 의해 생성되고 다른 것은 비-수용액에서의 환원성 아미노화에 의해 생성된, 15종의 폐렴구균 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체의 조합물을 사용하였다. PCV15 제제는 도면에 나타난 바와 같이 0.2% w/v P188 또는 0.1% w/v PS-20을 함유하였다.

도 12: 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA) 및 0.2% w/v P188을 사용하여 제제화된 2종의 15가 폐렴구균 폴리사카라이드 접합체 백신으로 면역화된 새끼 래스스 원숭이에 대한 혈청형 3 OPA (OPK) 역가. 제제는 CRM₁₉₇에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 3 피막 폴리사카라이드 (ST3) (PCV15_{Aq}) 또는 DTFB에 접합된 ST3 (PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB})을 함유하였다.

도 13: 1시간의 교반 및 최대 24시간의 수평 회전 후 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제의 SLS에 의해 측정된 바와 같은 입자 크기 분포. 제제는 도면에 나타난 바와 같이 0.2% w/v 폴록사머 188 및 다양한 농도의 프로필렌 글리콜 (PG) 또는 폴리에틸렌 글리콜 400 (PEG₄₀₀)을 함유하였다.

도 14a-b: 실시예 12에 기재된 바와 같은 0.2% w/v P188과 15% w/v PG 또는 0.1% w/v PS-20을 함유하는 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제에 대한 새끼 래스스 원숭이에서의 면역원성 비교 연구. 군당 8 마리의 동물은 T=0 (1회 투여), 1개월령 (2회 투여) 및 2개월령 (3회 투여)에서 2종의 제제 중 어느 하나를 근육내 주사로 받았다. 1회 투여 전에 및 1, 2 및 3회 투여로부터 2주 후에 혈청을 수집하였다. 면역-전, 1회 투여 후, 2회 투여 후 및 3회 투여 후 혈청 샘플로부터의 혈청형-특이적 IgG 농도 (IgG GMC)를 실시예 10에 기재된 바와 같이 측정하였다. 패널 a는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F 및 9V에 대한 면역원성 결과를 보여준다. 패널 b는 혈청형 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F에 대한 면역원성 결과를 보여준다.

도 15a-e: 1.5 mL 하이팩 시린지에서의 교반 및 최대 24시간의 수평 회전 후 0.05% w/v PS-80, 0.05% w/v PS-20 및 0.2% w/v PS-20을 함유하는, DMSO에서 제조된 상이한 백분율의 혈청형 (패널 a: 24%; 패널 b: 50%; 패널 c: 62%; 패널 d: 79%; 및 패널 e: 100%)을 갖는, 실시예 13에 기재된 바와 같은 PCV_{Aq/비-Aq} 제제의 SLS에 의해 측정된 바와 같은 D[4,3] 값.

도 16: DMSO에서의 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 및 수용액에서의 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드를 가지며, 4 µg/mL의 각각의 사카라이드, 예외로 8 µg/mL의 6B; 및 약 64 µg/mL CRM₁₉₇ 담체 단백질을 함유하는 투여 형태로서 제제화된, 20 mM 히스티딘 pH 5.8, 150 mM NaCl, 250 µg/mL APA, 0.2% w/v PS-20 중 15가 폐렴구균 접합체 제제에 대한 뉴질랜드 백색 토끼에서의 면역원성 결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은, 부분적으로, 다가 접합체 백신 제제에서의 특정 계면활성제가, 특히 접합체 중 1종 이상이 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 제조되는 경우에 접합체의 안정성 및 그의 응집하려는 경향에 영향을 줄 수 있다는 발견에 기초한다. 추가적으로, 일부 계면활성제는 필요한 안정성을 얻기 위해 폴리올의 첨가를 필요로 한다.
- [0018] 본원에 사용된 "양성자성 용매"는 수소 원자가 (히드록실 기에서와 같은) 산소에 또는 (아민 기에서와 같은) 질소에 결합된 용매이다. 일반적 용어에서, 불안정성 H⁺를 함유하는 임의의 용매는 양성자성 용매로 불린다.
- [0019] 본원에 사용된 "비양성자성 용매"는 극성 비양성자성 용매를 지칭한다. 이러한 용매는 산성 수소가 결여되어 있고 수소를 공여할 수 없다. 극성 비양성자성 용매의 예는 디메틸설폭사이드 (DMSO), 디메틸포름아미드 (DMF) 및 헥사메틸포스포르아미드 (HMPA)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비-수성 용액 또는 용매는 비양성자성 용매와 상호교환가능하게 사용된다. 비양성자성 용매는, 예를 들어 최대 1%, 2%, 5%, 10% 또는 20%로 존재하는 일부 물을 가질 수 있다.
- [0020] 본원에 사용된 용어 "폴리사카라이드" (Ps)는 "사카라이드", "올리고사카라이드", "폴리사카라이드", "리포사카라이드", "리포-올리고사카라이드 (LOS)", "리포폴리사카라이드 (LPS)", "글리코실레이트", "당접합체" 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 면역학적 및 박테리아 백신 분야에서 통상적으로 사용되는 임의의 항원성 사카라이드 요소 (또는 항원성 단위)를 포함하는 것으로 의도된다.
- [0021] 본원에 사용된 바와 같이, 본 발명의 면역원성 조성물과 함께 사용된 경우의 용어 "포함하다"는 임의의 다른 성분 (항원 혼합물에 대해 "로 이루어진"이라는 표현의 제한을 받음), 예컨대 아주반트 및 부형제를 포함함을 지칭한다. 다가 폴리사카라이드-단백질 접합체 혼합물과 함께 사용되는 경우의 용어 "로 이루어진"은 특정한 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 단백질 접합체를 가지며 상이한 혈청형으로부터의 다른 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 단백질 접합체는 갖지 않는 혼합물을 지칭한다.
- [0022] 본원에 정의된 용어 "침전", "침전물", "미립자 형성", "혼탁" 및 "응집"은 상호교환가능하게 사용될 수 있고, 폴리사카라이드-단백질 접합체의 응집을 유발하는 임의의 물리적 상호작용 또는 화학적 반응을 지칭하는 것으로 의도된다. 응집 과정 (예를 들어, 단백질 응집)은 열, 압력, pH, 교반, 전단력, 동결-해동, 탈수, 증금속, 펄스, 화합물, 실리콘 오일, 변성제 등을 포함한 수많은 물리화학적 스트레스에 의해 유도될 수 있다.
- [0023] 본원에 정의된 바와 같이, 본 발명의 "계면활성제"는 면역원성 조성물 제제의 표면 장력을 낮추는 임의의 분자 또는 화합물이다. "계면활성제 시스템"은 계면활성제를 포함하지만 계면활성제의 효과를 증가시키는 폴리올과 같은 추가의 부형제를 포함하도록 할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 면역원성 조성물은 1종 이상의 담체 단백질에 접합된 1종 이상의 항원을 함유하는 다가 조성물일 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 항원은 피막화된 박테리아로부터의 사카라이드이다. 이러한 백신에서, 사카라이드는 특정 유형의 박테리아의 표면과 유사한 당 분자의 장쇄로 구성된다. 피막화된 박테리아는 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*), 네이세리아 메닝기티데스(*Neisseria meningitides*) 및 헤모필루스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*) 유형 b를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 항원은 동일한 유기체로부터의 것일 수 있거나 또는 상이한 유기체로부터의 것일 수 있다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 항원은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드이다.
- [0025] 2종의 담체 단백질이 사용되는 실시양태에서, 제1 담체 단백질에 접합되지 않은 각각의 피막 폴리사카라이드는 동일한 제2 담체 단백질에 접합된다 (예를 들어, 각각의 피막 폴리사카라이드 분자는 단일 담체 단백질에 접합된다). 또 다른 실시양태에서, 제1 담체 단백질에 접합되지 않은 피막 폴리사카라이드는 2종 이상의 담체 단백질에 접합된다 (각각의 피막 폴리사카라이드 분자는 단일 담체 단백질에 접합된다). 이러한 실시양태에서, 동일한 혈청형의 각각의 피막 폴리사카라이드는 전형적으로 동일한 담체 단백질에 접합된다.
- [0026] 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*)에 의해 분비된 외독소인 디프테리아 독소는 디설파이드 가교에 의해 연결되고 3개의 도메인을 갖는 2개의 서브유닛 (단편)으로 구성된 전형적인 A-B 독소이다. 단편 A (DTFA)는 ADP-리보스 촉매 C 도메인을 함유하고, 한편 단편 B (DTFB)는 중심 전위 T 도메인 및 카르복시 말단 수용체-결합 R 도메인을 함유한다. DTFB는 DT의 총 아미노산 서열의 대략 60%를 구성하는 비-독성 모이어티이다. 예를 들어, 문헌 [Gill, D. M. and Dinis, L. L., J. Biol. Chem., 246, 1485-1491 (1971), Gill, D. M. and Pappenheimer, Jr., A. M., J. Biol. Chem., 246, 1492-1495 (1971), Collier, R. J. and Kandel, J., J. Biol. Chem., 246, 1496-1503 (1971); 및 Drazin, R., Kandel, J., and Collier, R. J., J. Biol. Chem., 246, 1504-1510 (1971)]을 참조한다.

- [0027] 디프테리아 독소의 완성된 아미노산 서열이 공개되었다. 문헌 [Greenfield, L., Bjorn, M.J., Horn, G., Fong, D., Buck, G.A., Collier, R.J. and Kaplan, D.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6853-6857 (1983)]을 참조한다. 구체적으로, DTFB는 DT의 아미노산 잔기 194 내지 535를 포함한다.
- [0028] CRM₁₉₇ 담체 단백질은 잔기 52에서의 단편 A에서 단일 아미노산 치환에 의해 비독성이 된 DT의 돌연변이체 형태이다. CRM₁₉₇ 및 DT는 단편 B에서 완전한 서열 상동성을 공유한다. 주요 T-세포 에피토프는 DT 아미노산 서열의 B 단편에서 우세하게 발견되었다. 문헌 [Bixler et al., Adv Exp Med Biol. (1989) 251:175-80; Raju et al., Eur. J. Immunol. (1995) 25: 3207-3214; Diethelm-Okita et al., J Infect Dis (2000) 181:1001-9; 및 McCool et al., Infect. and Immun. 67 (Sept. 1999), p. 4862-4869]을 참조한다.
- [0029] 본원에 기재된 바와 같은 DTFB의 사용은 ADP-리보실화 활성 도메인의 디프테리아 독소 결실을 포함한다. DTFB의 사용은 또한 결실, 치환 및 부가를 포함한, 적어도 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함한다. 변이체의 예는 시스테인 201의 결실 또는 돌연변이이다. DTFB (C8)는 ADP-리보실화 활성화 도메인의 디프테리아 독소가 결실되고, 시스테인 201이 제거되거나 돌연변이된 것을 의미한다. DTFB의 사용은 또한 공개된 T-세포 에피토프를 포함하는 DT의 서열 265-450을 포함하는 단편을 포함한다 (문헌 [Bixler et al., Adv Exp Med Biol. (1989) 251:175-80; Raju et al., Eur. J. Immunol. (1995) 25: 3207-3214] 참조). DTFB는 또한 단량체, 이량체 또는 올리고머의 상태를 포함한다. DTFB의 사용은 또한 임의의 단백질 복합체 (전장 DT 또는 CRM₁₉₇ 제외), 하이브리드 단백질, 또는 DTFB 또는 단편을 함유하는 접합된 단백질을 포함한다. DTFB의 사용은 또한 화학적으로 변형된 DTFB 또는 단편 (즉, PEG화, 비천연 아미노산 변형)을 포함한다.
- [0030] 특정 실시양태에서, DTFB는 천연 DT 또는 돌연변이체 CRM₁₉₇의 효소적 소화 및 환원 후 흡착 크로마토그래피에 의한 정제로부터 생성된다. 따라서, DT C201 잔기에서의 돌연변이를 갖거나 갖지 않는 정제된 DTFB는 전장 천연 또는 C201-돌연변이된 DT 또는 CRM₁₉₇, 또는 A-단편이 말단절단된 그의 변이체로부터 유사하게 제조될 수 있는 것으로 생각된다. 캡토(Capto)TM어드하이어 및 캡토TMMMC로 판매되는 다중모드 수지 및 크로마토그래피 사이클 동안 50 mM 초과인 트리스 농도는 절단된 천연 DTFB를 정제하는 예외적인 모드를 제공하는 것으로 구체적으로 공지되어 있다.
- [0031] 특정 실시양태에서, DTFB의 제제는 최대 10 mM DTT를 포함한다. DTT는 잔기 위치 201에서의 유리 시스테인으로 인한 DTFB 단량체 사이의 디설피드 결합 형성에 의해 야기되는 이량체화를 방지한다. 이러한 경우에, 니켈은 접합 반응 혼합물에 첨가되지 않는다. 그러나, 접합 반응은 그 외에는 동일한 방법에 의해 진행된다. DTT가 사용되지 않는 경우에, 이량체화된 DTFB는 니켈의 존재 하에 Ps에 접합되어 잔류 억제성 시아나이드를 격리시킴으로써 접합의 정도를 개선시킬 수 있다.
- [0032] DTFB에서의 유리 시스테인의 제거 (DT C201의 돌연변이)는 다중모드 수지에서 유사한 거동을 제공할 것으로 예상된다. 유리 시스테인의 제거는 DTT에 대한 필요성을 제거할 것으로 예상되며, 이는 유리 시스테인 사이의 디설피드 결합 형성에 의한 이량체화가 실행불가능할 것이기 때문이다. 트리스 완충제 농도 및 염화나트륨 용리 완충제 농도를 증가시키는 것은 캡토 MMC 크로마토그래피 수지로부터 DTFB 단백질의 회수를 개선시키는 것으로 입증되었다. DTFB 정제는 다른 다중모드 수지를 사용하여 달성될 수 있는 것으로 예상된다.
- [0033] 특정 실시양태에서, DTFB는 DT C201 잔기의 돌연변이와 함께 또는 그 없이 제조합적으로 발현되고, 후속적으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술에 의해 정제된다.
- [0034] 본 발명의 특정한 실시양태에서, CRM₁₉₇이 담체 단백질로서 사용된다. CRM₁₉₇은 디프테리아 독소의 비-독성 변이체 (즉, 독소이드)이다. 한 실시양태에서, 이는 카사미노산 및 효모 추출물-기재 배지에서 성장한 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*) 균주 C7 (β 197)의 배양물로부터 단리된다. 또 다른 실시양태에서, CRM₁₉₇은 미국 특허 번호 5,614,382에 기재된 방법에 따라 제조합적으로 제조된다. 전형적으로, CRM₁₉₇은 한외여과, 황산암모늄 침전 및 이온-교환 크로마토그래피의 조합을 통해 정제된다. 일부 실시양태에서, CRM₁₉₇은 페넥스 발현 기술(Pfenex Expression Technology)TM (페넥스 인크.(Pfenex Inc.), 캘리포니아주 샌디에고)을 사용하여 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)에서 제조된다.
- [0035] DTFB 및 그의 변이체는 단백질 (펩티드) 및 사카라이드를 포함한 항원에 대한 담체 단백질로서 사용될 수 있다. 다른 적합한 담체 단백질은 추가의 불활성화된 박테리아 독소, 예컨대 DT (디프테리아 독소이드), TT (파상풍 독소이드) 또는 TT의 단편 C, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드 (예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO

2004/083251에 기재된 바와 같음), 이. 콜라이 LT, 이. 콜이라 ST, 및 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터의 외독소 A를 포함한다. 박테리아 외막 단백질, 예컨대 외막 복합체 c (OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 페렴구균 표면 단백질 A (PspA; 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/091998 참조), 페렴구균 어드헤신 단백질 (PsaA), A군 또는 B군 스트렙토코쿠스로부터의 C5a 펩티다제, 또는 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D, 페렴구균 뉴모리신 (Kuo et al., 1995, Infect Immun 63: 2706-13), 예를 들어 일부 방식으로 해독된 ply, 예를 들어 dPLY-GMBS (국제 특허 출원 공개 번호 WO 04/081515 참조) 또는 dPLY-포르몰, PhtX, 예를 들어 PhtA, PhtB, PhtD, PhtE 및 Pht 단백질의 융합체, 예를 들어 PhtDE 융합체, PhtBE 융합체 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 01/98334 및 WO 03/54007 참조)가 또한 사용될 수 있다. 다른 단백질, 예컨대 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 투베르쿨린 (PPD)의 정제된 단백질 유도체, PorB (엔. 메닝기티디스(*N. meningitidis*)로부터의 것), PD (헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D; 예를 들어, 유럽 특허 번호 EP 0 594 610 B 참조), 또는 그의 면역학상 기능적 등가물, 합성 펩티드 (유럽 특허 번호 EP0378881 및 EP0427347 참조), 열 쇼크 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 93/17712 및 WO 94/03208 참조), 백일해 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/58668 및 유럽 특허 번호 EP0471177 참조), 시토카인, 림포카인, 성장 인자 또는 호르몬 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 91/01146 참조), 다양한 병원체 유래 항원으로부터의 다중 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질 (문헌 [Falugi et al., 2001, Eur J Immunol 31:3816-3824] 참조), 예컨대 N19 단백질 (문헌 [Baraldoi et al., 2004, Infect Immun 72:4884-7] 참조), 철 흡수 단백질 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 01/72337 참조), 씨. 디피실레(*C. difficile*)의 독소 A 또는 B (국제 특허 공개 번호 WO 00/61761 참조), 및 플라젤린 (문헌 [Ben-Yedidia et al., 1998, Immunol Lett 64:9] 참조)이 또한 담체 단백질로서 사용될 수 있다.

[0036] 제2 담체 단백질로서 다른 DT 돌연변이체, 예컨대 CRM₁₇₆, CRM₂₂₈, CRM₄₅ (Uchida et al., 1973, J Biol Chem 218:3838-3844); CRM₉, CRM₄₅, CRM₁₀₂, CRM₁₀₃ 및 CRM₁₀₇ 및 문헌 [Nicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992]에 기재된 다른 돌연변이; 결실 또는 Glu-148에서 Asp, Gln 또는 Ser로의 돌연변이 및/또는 Ala 158에서 Gly로의 돌연변이 및 미국 특허 번호 4,709,017 또는 미국 특허 번호 4,950,740에 개시된 다른 돌연변이; 적어도 1개 이상의 잔기 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534의 돌연변이 및 미국 특허 번호 5,917,017 또는 미국 특허 번호 6,455,673에 개시된 돌연변이; 또는 미국 특허 번호 5,843,711에 개시된 단편이 사용될 수 있다. 이러한 DT 돌연변이체는 또한 DTFB 변이체를 제조하는데 사용될 수 있으며, 여기서 변이체는 에피토프 영역을 함유하는 B 단편을 포함한다.

[0037] 한 실시양태에서, 본 발명은 1종 이상의 담체 단백질에 접합된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에의 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 적어도 1종으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하는 폴리사카라이드-단백질 접합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 CRM₁₉₇에 개별적으로 접합된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 또는 44 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어진다. 본 발명의 특정 측면에서, CRM₁₉₇은 사용된 유일한 담체 단백질이다.

[0038] 특정 실시양태에서, 상기 기재된 면역원성 조성물은 임의로, 제2 담체 단백질 (이는 제1 담체 단백질과 적어도 1개의 아미노산에서 상이함)에 접합된 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 적어도 1종으로부터 선택된 1종의 추가의 에스. 뉴모니아에 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 추가로 포함한다. 바람직하게는, 특정한 혈청형으로부터의 사카라이드는 1종 초과와 담체 단백질에 접합되지 않는다.

[0039] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 제2 담체 단백질에 접합된 적어도 1종의 추가의 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 추가로 포함한다. 이들 실시양태에서, 면역원성 조성물은 CRM₁₉₇이 아닌 제2 담체 단백질에 개별적으로 접합된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 또는 44 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어진다.

- [0040] 본 발명의 특정 실시양태에서, 면역원성 조성물은 N이 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 또는 44인 N 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지고; 각각의 N 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드는 CRM₁₉₇인 제1 단백질 담체에 접합된다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 1, 2, 3 ... 또는 N-1 혈청형으로부터의 피막 폴리사카라이드는 제1 단백질 담체에 접합되고, N-1, N-2, N-3 ... 1 혈청형으로부터의 폴리사카라이드는 CRM₁₉₇과 상이한 제2 단백질 담체에 접합된다.
- [0041] 본 발명의 하나의 구체적 실시양태에서, 본 발명은 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 피막 폴리사카라이드를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어진 15가 면역원성 조성물을 제공한다.
- [0042] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에로부터의 피막 폴리사카라이드는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 폴리사카라이드는 박테리아로부터 단리될 수 있고, 공지된 방법 (예를 들어, 유럽 특허 번호 EP497524 및 EP497525 참조); 및 바람직하게는 균질화기를 사용하여 수행되는 미세유동화에 의해 또는 화학적 가수분해에 의해 어느 정도 크기조정될 수 있다. 한 실시양태에서, 각각의 폴리사카라이드 혈청형에 상응하는 에스. 뉴모니아에 균주는 대두-기재 배지에서 성장된다. 이어서, 개별 폴리사카라이드가 원심분리, 침전 및 한외-여과를 포함한 표준 단계를 통해 정제된다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2008/0286838 및 미국 특허 번호 5,847,112를 참조한다. 폴리사카라이드는 점도를 감소시키고/거나 후속 접합된 생성물의 여과성을 개선시키기 위해 크기조정될 수 있다. 본 발명에서, 피막 폴리사카라이드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 1종 이상으로부터 제조된다.
- [0043] 정제된 폴리사카라이드는 화학적으로 활성화되어 담체 단백질과 반응할 수 있는 관능기를 도입한다. 활성화되면, 각각의 피막 폴리사카라이드는 담체 단백질에 개별적으로 접합되어 당접합체를 형성한다. 폴리사카라이드 접합체는 공지된 커플링 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0044] 한 실시양태에서, 폴리사카라이드의 화학적 활성화 및 이후 담체 단백질에의 접합은 미국 특허 번호 4,365,170, 4,673,574 및 4,902,506에 기재된 수단에 의해 달성된다. 간략하게, 페럼구균 폴리사카라이드는 퍼아이오데이트-기재 산화제, 예컨대 과아이오딘산나트륨, 과아이오딘산칼륨 또는 과아이오딘산과 반응하여 이웃자리 히드록실 기의 무작위 산화적 절단을 유발함으로써 반응성 알데히드 기를 생성한다.
- [0045] 산화된 폴리사카라이드를 단백질 담체 상의 1급 아민 기 (주로 리신 잔기)에 직접적으로 아미노화 커플링시키는 것은 환원성 아미노화에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 접합은 활성화된 폴리사카라이드 및 담체 단백질의 혼합물을 니켈의 존재 하에 환원제, 예컨대 소듐 시아노보로히드라이드와 반응시킴으로써 수행된다. 접합 반응은 수용액 또는 유기 용매, 예컨대 DMSO에서 수행될 수 있다. 예를 들어, US2015/0231270 A1, EP 0471 177 B1 및 US2011/0195086 A1을 참조한다. 접합 반응의 종결 시에, 미반응 알데히드는 강한 환원제, 예컨대 수소화붕소나트륨의 첨가에 의해 캡핑된다.
- [0046] 한 실시양태에서, 제제화 전에, 각각의 페럼구균 피막 폴리사카라이드 항원은 에스. 뉴모니아에로부터 개별적으로 정제되고, 활성화되어 반응성 알데히드를 형성하고, 이어서 니켈의 존재 하에 소듐 시아노보로히드라이드에 의한 환원성 아미노화를 사용하여 제1 또는 제2 담체 단백질에 공유 접합된다. 니켈은 환원성 아미노화에 사용되는 소듐 시아노보로히드라이드 환원제로부터의 잔류 억제성 시아나이드와 착물을 형성한다.
- [0047] 특정 실시양태에서, 접합 반응은 보다 큰 접합 반응 효율을 위해 및 유리 시아나이드 제거를 보조하는데 니켈이 사용되는 환원성 아미노화에 의해 수행된다. 전이 금속은 시아나이드와 안정한 착물을 형성하는 것으로 공지되어 있고, 소듐 시아노보로히드라이드에 의한 단백질 아미노 기 및 포름알데히드의 환원성 메틸화를 개선시키는 것으로 공지되어 있다 (Gidley et al., 1982, Biochem J. 203: 331-334; Jentoft et al., 1980, Anal Biochem. 106: 186-190). 니켈의 첨가는, 잔류 억제성 시아나이드와 착물을 형성함으로써, 접합 동안 단백질의 소비를 증가시키고 보다 큰, 잠재적으로 보다 면역원성인 접합체의 형성을 유도한다.
- [0048] 상업적 소듐 시아노보로히드라이드 시약 로트에서 유리 시아나이드 수준의 가변성은 일관되지 않은 접합 성능을 유도하여, 가변적인 접합체 속성, 예컨대 분자 질량 및 폴리사카라이드-대-단백질 비를 생성한다. 접합 반응에

대한 니켈의 첨가는 유리 시아나이드의 수준을 감소시키고, 따라서 로트-대-로트 접합체 일관성의 정도를 개선시킨다.

- [0049] 또 다른 실시양태에서, 접합 방법은 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)에 의한 폴리사카라이드의 활성화를 사용하여 시아네이트 에스테르를 형성할 수 있다. 활성화된 사카라이드는 담체 단백질 상의 아미노기에 직접 커플링될 수 있다.
- [0050] 또 다른 실시양태에서, 반응성 동종이관능성 또는 이종이관능성 기는 시아네이트 에스테르를 여러 이용가능한 양식 중 임의의 것과 반응시킴으로써 활성화된 폴리사카라이드 상에 도입될 수 있다. 예를 들어, 시스타민 또는 시스테아민이 사용되어 티올화된 폴리사카라이드를 제조할 수 있으며, 이는 말레이미드-활성화된 담체 단백질을 (예를 들어 GMBS를 사용함) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질을 (예를 들어 아이오도아세트이미드 [예를 들어, 에틸 아이오도아세트이미드 HCl] 또는 N-숙신이미딜 브로모아세테이트 또는 SIAB, 또는 SIA, 또는 SBAP를 사용함)과의 반응 후에 수득된 티오에테르 연결을 통해 담체에 커플링될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 시아네이트 에스테르는 핵산 디아민 또는 아디프산 디히드라지드 (ADH)와 반응하고, 생성된 아미노-유도체화된 사카라이드는 카르보디이미드 (예를 들어 EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 담체 단백질 상의 유리 카르복시기에 접합된다. 이러한 접합체는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/29094; 및 문헌 [Chu et al., 1983, Infect. Immunity 40:245-256]에 기재되어 있다.
- [0051] 다른 적합한 접합 방법은 카르보디이미드, 히드라지드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC 및 TSTU를 사용한다. 다수가 국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/42721에 기재되어 있다. 접합은 사카라이드의 유리 히드록실 기와 CDI의 반응에 의해 형성될 수 있는 카르보닐 링커를 포함할 수 있고 (문헌 [Bethell et al., 1979, J. Biol. Chem. 254:2572-4; Hearn et al., 1981, J. Chromatogr. 218:509-18] 참조), 이는 이어서 담체 단백질과 반응하여 카르바메이트 연결을 형성할 수 있다. 이러한 화학은 탄수화물의 아노머 말단의 환원으로 1급 히드록실 기를 형성하고, 이어서 1급 히드록실과 CDI의 반응으로 카르바메이트 중간체를 형성하고, 이후 단백질 담체 아미노 기에의 커플링으로 이루어진다. 반응은 사카라이드 상의 다른 1급 히드록실 기의 임의적인 보호/탈보호를 필요로 할 수 있다.
- [0052] 접합 후에, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 농축/투석여과 작업, 한외여과, 침전/용리, 칼럼 크로마토그래피 및 심층 여과를 포함한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 임의의 기술 중 1종 이상에 의해 정제되어 과량의 접합 시약 뿐만 아니라 잔류 유리 단백질 및 유리 폴리사카라이드를 제거한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,146,902를 참조한다.
- [0053] 개별 당접합체가 정제된 후에, 이들은 배합되어 본 발명의 면역원성 조성물로 제제화한다. 이들 페렴구균 접합체는 개별 공정에 의해 제조되고, 단일 투여 제제로 벌크 제제화된다.
- [0054] 제약/백신 조성물
- [0055] 본 발명은 제약상 허용되는 담체 및 아주반트와 함께 상기 기재된 임의의 폴리사카라이드 혈청형 조합물을 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 대안적으로 그로 이루어진 제약, 면역원성 및 백신 조성물을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 한 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 담체 및 아주반트와 함께, 2 내지 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 또는 44종의 별개의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하거나, 그로 본질적으로 이루어지거나, 또는 그로 이루어지며, 여기서 각각의 접합체는 제1 담체 단백질 또는 제2 담체 단백질에 접합된 상이한 피막 폴리사카라이드를 함유하고, 여기서 스트렙토코쿠스 뉴모니아에의 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38 중 적어도 1종으로부터의 피막 폴리사카라이드는 CRM₁₉₇로부터 선택된 제1 담체 단백질에 접합되고, 임의로 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 6D, 7B, 7C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 21, 22A, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 27, 28A, 31, 33F, 34, 35A, 35B, 35F 및 38로부터 선택된 추가의 에스. 뉴모니아에 혈청형을 갖는 피막 폴리사카라이드는 제2 담체 단백질 (이는 제1 담체 단백질과 적어도 1개의 아미노산에서 상이함)에 접합된다.
- [0056] 본 발명의 폴리사카라이드-단백질 접합체의 제제화는 관련 기술분야에 인식된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 15종의 개별 페렴구균 접합체는 생리학상 허용되는 비히클과 함께 제제화되어 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 완충 염수, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌

글리콜) 및 텍스트로스 용액을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0057] 또 다른 실시양태에서, 백신 조성물은 염화나트륨을 갖는 L-히스티딘 완충제에서 제제화된다.

[0058] 본원에 정의된 바와 같이, "아주반트"는 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성을 증진시키는 역할을 하는 물질이다. 면역 아주반트는 단독으로 투여시 약하게 면역원성인 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있고/거나, 예를 들어 항체 역가 또는 세포-매개 면역 반응을 유도하지 않거나 약하게 유도할 수 있고/거나, 항원에 대한 항체 역가를 증가시킬 수 있고/거나, 개체에서 면역 반응을 달성하는데 효과적인 항원의 용량을 낮출 수 있다. 따라서, 아주반트는 종종 면역 반응을 부스팅하기 위해 제공되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 조성물의 유효성을 증진시키기 위한 적합한 아주반트는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다:

[0059] (1) 알루미늄 염 (명반), 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄 등;

[0060] (2) 수중유 에멀전 제제 (다른 특정 면역자극제, 예컨대 무라밀 펩티드 (하기 정의됨) 또는 박테리아 세포벽 성분이 있거나 없음), 예컨대, 예를 들어, (a) 미세유동화기, 예컨대 모델 110Y 미세유동화기 (마이크로플루이딕스(Microfluidics), 매사추세츠주 뉴턴)를 사용하여 서브마이크로미터 입자로 제제화된, 5% 스쿠알렌, 0.5% 트윈 80 및 0.5% 스핀 85를 함유 (임의로 다양한 양의 MTP-PE 함유)하는 MF59 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 90/14837), (b) 서브마이크로미터 에멀전으로 미세유동화되거나 보다 큰 입자 크기 에멀전을 생성하기 위해 볼텍스된, 10% 스쿠알렌, 0.4% 트윈 80, 5% 플루로닉-차단된 중합체 L121 및 thr-MDP를 함유하는 SAF, (c) 2% 스쿠알렌, 0.2% 트윈 80, 및 미국 특허 번호 4,912,094에 기재된 3-O-테아실화 모노포스포리피드 A (MPL™), 트레할로스 디미콜레이트 (TDM) 및 세포벽 골격 (CWS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 박테리아 세포벽 성분, 바람직하게는 MPL+CWS (디톡스(Detox)™)를 함유하는 리비(Ribi)™ 아주반트 시스템 (RAS) (코릭사(Corixa), 몬타나주 해밀턴); 및 (d) 몬타니드 ISA;

[0061] (3) 사포닌 아주반트, 예컨대 퀴(Quil) A 또는 스티물론(STIMULON)™ QS-21 (안티제닉스(Antigenics), 매사추세츠주 프레이밍햄) (예를 들어, 미국 특허 번호 5,057,540 참조), 또는 그로부터 생성된 입자, 예컨대 ISCOM (콜레스테롤, 사포닌, 인지질 및 양친매성 단백질의 조합에 의해 형성된 면역자극 복합체) 및 이스코매트릭스(Iscomatrix)® (ISCOM과 본질적으로 동일한 구조를 갖지만 단백질이 없는 것)가 사용될 수 있음;

[0062] (4) 박테리아 리포폴리사카라이드, 합성 지질 A 유사체, 예컨대 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물 (AGP), 또는 그의 유도체 또는 유사체, 이는 코릭사로부터 입수가 가능하고 미국 특허 번호 6,113,918에 기재됨; 하나의 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코피라노시드이며, 이는 또한 529로 공지되어 있고 (이전에 RC529로서 공지됨), 수성 형태 또는 안정한 에멀전으로서 제제화됨;

[0063] (5) 합성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 CpG 모티프(들)를 함유하는 올리고뉴클레오티드 (미국 특허 번호 6,207,646);

[0064] (6) 시토카인, 예컨대 인터류킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 등), 인터페론 (예를 들어, 감마 인터페론), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 종양 괴사 인자 (TNF), 공동자극 분자 B7-1 및 B7-2 등; 및

[0065] (7) 보체, 예컨대 보체 성분의 삼량체 C3d.

[0066] 또 다른 실시양태에서, 아주반트는 상기 아주반트 중 2, 3종 또는 그 초과 혼합물, 예를 들어 SBAS2 (3-탈아실화 모노포스포릴 지질 A 및 QS21을 또한 함유하는 수중유 에멀전)이다.

[0067] 무라밀 펩티드는 N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민 (thr-MDP) 및 N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민 (MTP-PE) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0068] 특정 실시양태에서, 아주반트는 알루미늄 염이다. 알루미늄 염 아주반트는 명반-침전된 백신 또는 명반-흡착된 백신일 수 있다. 알루미늄-염 아주반트는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Harlow, E. and D. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) and Nicklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143:489-493)]에 기재되어 있다. 알루미늄 염은 수화 알루미늄, 알루미늄 수화물, 알루미늄 3수화물 (ATH), 알루미늄 수화물, 알루미늄 3수화물,

알히드로겔(Alhydrogel)®, 슈퍼포스, 암포겔(Amphogel)®, 알루미늄 (III) 히드록시드, 알루미늄 히드록시포스페이트 술페이트 (알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)), 무정형 알루미늄, 3수화 알루미늄 또는 트리히드록시 알루미늄을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0069] APA는 알루미늄 히드록시포스페이트의 수성 현탁액이다. APA는 인산알루미늄 및 인산나트륨을 1:1 부피 비로 블렌딩하여 알루미늄 히드록시포스페이트를 침전시킴으로써 제조된다. 블렌딩 공정 후에, 물질은 고-전단 혼합기로 크기-감소되어 단분산 입자 크기 분포를 달성한다. 이어서, 생성물은 생리학적 염수에 대해 투석여과되고, 증기 멸균된다.
- [0070] 특정 실시양태에서, 상업적으로 입수가 가능한 $Al(OH)_3$ (예를 들어, 뉴욕주 웨스트베리 소재 덴마크/아큐레이트 케미칼 앤 사이언티픽 캄파니(Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co.)의 알히드로겔® 또는 슈퍼포스)이 단백질을 50 - 200 g 단백질/mg 수산화알루미늄의 비로 흡착시키는데 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 단백질의 흡착은 단백질의 pI (등전 pH) 및 배지의 pH에 좌우된다. 보다 낮은 pI를 갖는 단백질은 보다 높은 pI를 갖는 단백질보다 양으로 하전된 알루미늄 이온에 더 강하게 흡착한다. 알루미늄 염은 2-3주의 기간에 걸쳐 서서히 방출되는 Ag의 데포를 확립할 수 있고/거나, 대식세포 및 보체 활성화의 비특이적 활성화에 관여할 수 있고/거나, 선천성 면역 메카니즘을 자극할 수 있다 (가능하게는 요산의 자극을 통해). 예를 들어, 문헌 [Lambrecht et al., 2009, Curr Opin Immunol 21:23]을 참조한다.
- [0071] 1가 벌크 수성 접합체는 전형적으로 함께 블렌딩되고 희석된다. 희석되면, 배치가 멸균 여과된다. 8 $\mu\text{g/mL}$ 를 표적으로 희석되는 6B를 제외한 모든 혈청형에 대해 4 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도, 및 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종 알루미늄 농도를 표적으로 알루미늄 포스페이트 아주반트가 무균으로 첨가된다. 아주반트화된 제제화된 배치는 바이알 또는 시린지 내에 충전될 것이다.
- [0072] 특정 실시양태에서, 아주반트는 CpG-함유 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 CpG-함유 올리고뉴클레오티드, 특히 CpG-함유 올리고데옥시뉴클레오티드 (CpG ODN)이다. 또 다른 실시양태에서, 아주반트는 ODN 1826이며, 이는 콜리 파마슈티칼 그룹(Coley Pharmaceutical Group)으로부터 획득될 수 있다.
- [0073] "CpG-함유 뉴클레오티드", "CpG-함유 올리고뉴클레오티드", "CpG 올리고뉴클레오티드" 및 유사 용어는 비메틸화 CpG 모이어티를 함유하는 6-50개 뉴클레오티드 길이의 뉴클레오티드 분자를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Wang et al., 2003, Vaccine 21:4297]을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 용어의 임의의 다른 관련 기술분야에서 허용되는 정의가 의도된다. CpG-함유 올리고뉴클레오티드는 임의의 합성 뉴클레오타이드간 연결, 변형된 염기 및/또는 변형된 당을 사용하는 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0074] CpG 올리고뉴클레오티드의 사용 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Sur et al., 1999, J Immunol. 162:6284-93; Verthelyi, 2006, Methods Mol Med. 127:139-58; 및 Yasuda et al., 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 23:89-110]에 기재되어 있다.
- [0075] 투여/투여량
- [0076] 본 발명의 조성물 및 제제는 전신 또는 점막 경로를 통해 백신을 투여함으로써 감염, 예를 들어 폐렴구균 감염에 걸리기 쉬운 인간을 보호하거나 치료하기 위해 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명의 면역원성 조성물을 인간에게 투여하는 것을 포함하는, 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 면역학적 유효량의 본 발명 면역원성 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 감염에 대해 인간을 백신접종하는 방법을 제공한다.
- [0077] 특정한 백신에 대한 성분의 최적량은 대상체에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 인간 백신접종을 위한 투여량은 동물 연구로부터 인간 데이터로의 외삽에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 투여량은 경험적으로 결정된다. 실시예에 제공된 새끼 래서스 원숭이 동물 데이터는 백신이 면역원성이라는 것을 입증한다.
- [0078] 본 발명의 조성물의 "유효량"은 후속 챌린지 동안 미생물, 예를 들어 에스. 뉴모니아에의 감염성의 가능성 또는 중증도를 유의하게 감소시키는 항체를 도출하는데 요구되는 용량을 지칭한다.
- [0079] 본 발명의 방법은 침습성 감염 (수막염, 폐렴 및 박테리아혈증) 및 비침습성 감염 (급성 중이염 및 부비동염)을 둘 다 포함한, 미생물, 예를 들어 에스. 뉴모니아에 의해 야기되는 1차 임상 증후군의 예방 및/또는 감소를 위해 사용될 수 있다.

- [0080] 본 발명의 조성물의 투여는 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 또는 구강/소화기, 호흡기도 또는 비뇨생식관에 대한 점막 투여를 통한 것 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 비강내 투여는 폐렴 또는 중이염의 치료를 위해 사용된다 (폐렴구균의 비인두 담지가 보다 효과적으로 예방될 수 있어, 그의 가장 초기 단계에서 감염을 약화시킬 수 있으므로).
- [0081] 각각의 백신 용량 내 접합체의 양은 유의한 유해 효과 없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 이러한 양은 폐렴구균 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 폴리사카라이드-기체의 접합체의 경우, 각각의 용량은 각각의 폴리사카라이드 0.1 내지 100 μg , 특히 0.1 내지 10 μg , 보다 특히 1 내지 5 μg 을 포함할 것이다. 예를 들어, 각각의 용량은 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 또는 750 ng, 또는 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 μg 을 포함할 수 있다.
- [0082] 특정한 백신에 대한 성분의 최적량은 대상체에서의 적절한 면역 반응의 관찰을 수반하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 인간 백신접종을 위한 투여량은 동물 연구로부터 인간 데이터로의 외삽에 의해 결정된다. 또 다른 실시양태에서, 투여량은 경험적으로 결정된다.
- [0083] 한 실시양태에서, 알루미늄 염의 용량은 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70, 100, 125, 150, 200, 300, 500 또는 700 μg , 또는 1, 1.2, 1.5, 2, 3, 5 mg 또는 그 초과이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 기재된 알루미늄 염의 용량은 제조합 단백질 μg 당이다.
- [0084] 본 발명의 특정한 실시양태에서, PCV15 백신은 CRM₁₉₇에 개별적으로 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F의 폐렴구균 피막 폴리사카라이드의 멸균 액체 제제이다. 한 측면에서, 각각의 용량은 4 $\mu\text{g/mL}$ 또는 8 $\mu\text{g/mL}$ 의 각각의 사카라이드, 예외로 8 $\mu\text{g/mL}$ 또는 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 6B; 및 약 64 $\mu\text{g/mL}$ 또는 128 $\mu\text{g/mL}$ CRM₁₉₇ 담체 단백질을 함유하도록 제제화된다. 한 측면에서, 각각의 0.5 mL 용량은 2 μg 의 각각의 사카라이드, 예외로 4 μg 의 6B; 약 32 μg CRM₁₉₇ 담체 단백질 (예를 들어, 32 $\mu\text{g} \pm 5 \mu\text{g}$, $\pm 3 \mu\text{g}$, $\pm 2 \mu\text{g}$, 또는 $\pm 1 \mu\text{g}$), 0.125 mg의 원소 알루미늄 (0.5 mg 알루미늄 포스페이트) 아주반트; 및 염화나트륨 및 L-히스티딘 완충제를 함유하도록 제제화된다. 염화나트륨 농도는 약 150 mM (예를 들어, 150 mM $\pm 25 \text{ mM}$, $\pm 20 \text{ mM}$, $\pm 15 \text{ mM}$, $\pm 10 \text{ mM}$, 또는 $\pm 5 \text{ mM}$)이고, L-히스티딘 완충제는 약 20 mM (예를 들어, 20 mM $\pm 5 \text{ mM}$, $\pm 2.5 \text{ mM}$, $\pm 2 \text{ mM}$, $\pm 1 \text{ mM}$, 또는 $\pm 0.5 \text{ mM}$)이다.
- [0085] 본 발명의 임의의 방법에 따르면, 한 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 인간 대상체는 영아 (1세 미만), 유아 (대략 12 내지 24개월), 또는 소아 (대략 2 내지 5세)이다. 다른 실시양태에서, 인간 대상체는 고령 환자 (> 65세)이다. 본 발명의 조성물은 또한 아동, 청소년 및 성인 (예를 들어, 18 내지 45세 또는 18 내지 65세)에서 사용하기에 적합하다.
- [0086] 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 단일 접종으로서 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 백신은 적절하게 간격을 두어 2회, 3회 또는 4회 또는 그 초과로 투여된다. 예를 들어, 조성물은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 간격으로 또는 그의 임의의 조합으로 투여될 수 있다. 면역화 스케줄은 폐렴구균 백신에 대해 지정된 것을 따를 수 있다. 예를 들어, 에스. 뉴모니아에에 의해 야기된 침습성 질환에 대한 영아 및 유아의 통상적 스케줄은 2, 4, 6 및 12-15개월령이다. 따라서, 또 다른 실시양태에서, 조성물은 2, 4, 6 및 12-15개월령에서 4-용량 시리즈로서 투여된다.
- [0087] 본 발명의 조성물은 또한 에스. 뉴모니아에로부터의 1종 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 포함시키기에 적합한 에스. 뉴모니아에 단백질의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/083855 및 WO 02/053761에서 확인된 것들을 포함한다.
- [0088] 제제
- [0089] 본 발명의 조성물은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 1종 이상의 방법에 의해, 예컨대 비경구로, 경점막으로, 경피로, 근육내로, 정맥내로, 피부내로, 비강내로, 피하로, 복강내로 대상체에게 투여될 수 있고, 그에 따라 제제화될 수 있다.
- [0090] 한 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 액체 제제의 표피 주사, 근육내 주사, 정맥내, 동맥내, 피하 주사, 또는 호흡기내 점막 주사를 통해 투여된다. 주사용 액체 제제는 용액 등을 포함한다.
- [0091] 본 발명의 조성물은 단일 용량 바이알, 다중-용량 바이알 또는 사전-충전된 시린지로서 제제화될 수 있다.

- [0092] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 경구로 투여되고, 따라서 경구 투여에 적합한 형태로, 즉, 고체 또는 액체 제제로서 제제화된다. 고체 경구 제제는 정제, 캡슐, 환제, 과립, 펠릿 등을 포함한다. 액체 경구 제제는 용액, 현탁액, 분산액, 에멀전, 오일 등을 포함한다.
- [0093] 액체 제제에 대한 제약상 허용되는 담체는 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액, 에멀전 또는 오일이다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 주사가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 물, 알콜성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액, 예를 들어 염수 및 완충 매질을 포함한다. 오일의 예는 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 해바라기 오일, 어류-간 오일, 또 다른 해양 오일, 또는 우유 또는 난으로부터의 지질이다.
- [0094] 제약 조성물은 등장성, 저장성 또는 고장성일 수 있다. 그러나, 주입 또는 주사용 제약 조성물이 투여될 때 본질적으로 등장성인 것이 종종 바람직하다. 따라서, 저장을 위해 제약 조성물은 바람직하게는 등장성 또는 고장성일 수 있다. 제약 조성물이 저장을 위해 고장성인 경우에, 이는 투여 전에 등장성 용액이 되도록 희석될 수 있다.
- [0095] 등장화제는 이온성 등장화제, 예컨대 염 또는 비-이온성 등장화제, 예컨대 탄수화물일 수 있다. 이온성 등장화제의 예는 NaCl, CaCl₂, KCl 및 MgCl₂를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비-이온성 등장화제의 예는 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0096] 적어도 1종의 제약상 허용되는 첨가제는 완충제인 것이 또한 바람직하다. 일부 목적을 위해, 예를 들어, 제약 조성물이 주입 또는 주사를 위해 의도되는 경우에, 조성물은 용액을 4 내지 10, 예컨대 5 내지 9, 예를 들어 6 내지 8 범위의 pH로 완충할 수 있는 완충제를 포함하는 것이 종종 바람직하다.
- [0097] 완충제는, 예를 들어 트리스, 아세테이트, 글루타메이트, 락테이트, 말레에이트, 타르테이트, 포스페이트, 시트레이트, 카르보네이트, 글리시네이트, L-히스티딘, 글리신, 숙시네이트 및 트리에탄올아민 완충제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0098] 완충제는 또한, 예를 들어, 특히 제약 제제가 비경구 용도를 위한 것인 경우에, 비경구 용도를 위한 USP 상용성 완충제로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 완충제는 일염기성 산, 예컨대 아세트산, 벤조산, 글루콘산, 글리세르산 및 락트산; 이염기성 산, 예컨대 아코니트산, 아디프산, 아스코르브산, 탄산, 글루탐산, 말산, 숙신산 및 타르타르산, 다염기성 산, 예컨대 시트르산 및 인산; 및 염기, 예컨대 암모니아, 디에탄올아민, 글리신, 트리에탄올아민 및 트리스로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0099] 비경구 비히클 (피하, 정맥내, 동맥내 또는 근육내 주사용)은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거 및 고정 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충제, 전해질 보충제, 예컨대 링거 텍스트로스를 기재로 하는 것 등을 포함한다. 예는 계면활성제 및 다른 제약상 허용되는 보조제를 첨가하거나 첨가하지 않은 멸균 액체, 예컨대 물 및 오일이다. 일반적으로, 물, 염수, 수성 텍스트로스 및 관련 당 용액, 글리콜, 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리소르베이트 80 (PS-80), 폴리소르베이트 20 (PS-20) 및 폴록사머 188 (P188)이 특히 주사가능한 용액을 위한 바람직한 액체 담체이다. 오일의 예는 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 올리브 오일, 해바라기 오일, 어류-간 오일, 또 다른 해양 오일, 또는 우유 또는 난으로부터의 지질이다.
- [0100] 본 발명의 제제는 또한 계면활성제를 함유할 수 있다. 바람직한 계면활성제는 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제 (통상적으로 트윈으로 지칭됨), 특히 PS-20 및 PS-80; 에틸렌 옥시드 (EO), 프로필렌 옥시드 (PO) 및/또는 부틸렌 옥시드 (BO)의 공중합체, 다우팍스(DOWFAX)TM 상표명으로 판매됨, 예컨대 선형 EO/PO 블록 공중합체; 반복 에톡시 (옥시-1,2-에탄디일) 기의 수가 다양할 수 있는 옥톡시놀, 옥톡시놀-9 (트리톤 X-100 또는 t-옥틸페녹시폴리에탄올)가 특히 관심대상임; (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올 (이게팔 CA-630/NP-40); 인지질, 예컨대 포스파티딜콜린 (레시틴); 노닐페놀 에톡실레이트, 예컨대 테르기톨(Tergitol)TM NP 시리즈; 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알콜로부터 유도된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르 (브리즈 계면활성제로 공지됨), 예컨대 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르 (브리즈 30); 및 소르비탄 에스테르 (통상적으로 스펠스로 공지됨), 예컨대 소르비탄 트리올레에이트 (스판 85) 및 소르비탄 모노라우레이트.
- [0101] 계면활성제의 혼합물, 즉 PS-80/스판 85 혼합물이 사용될 수 있다. 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르, 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트 (PS-80) 및 옥톡시놀, 예컨대 t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올 (트리톤 X-100)의 조합물이 또한 적합하다. 또 다른 유용한 조합물은 라우레트 9 플러스 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스

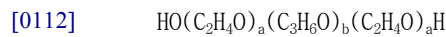
테르 및/또는 옥톡시놀을 포함한다.

- [0102] 계면활성제의 바람직한 양은 다음과 같다: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 (예컨대 PS-80) 0.01 내지 1% w/v, 특히 약 0.1% w/v; 옥틸- 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올 (예컨대 트리톤 X-100, 또는 트리톤 시리즈의 다른 세제) 0.001 내지 0.1% w/v, 특히 0.005 내지 0.02% w/v; 폴리옥시에틸렌 에테르 (예컨대 라우레트 9) 0.1 내지 20% w/v, 바람직하게는 0.1 내지 10% w/v, 특히 0.1 내지 1% w/v 또는 약 0.5% w/v.
- [0103] 특정 실시양태에서, 조성물은 pH 5.8에서의 L-히스티딘 (20 mM), 염수 (150 mM) 및 0.2% w/v PS-20과 250 ug/mL의 APA (알루미늄 포스페이트 아주반트)로 본질적으로 이루어진다. PS-20은 모의 제조 동안 및 1차 포장을 사용하는 적송 동안 응집을 제어하는 제제 내의 PS-20의 존재 하에 0.005 내지 0.3% w/v 범위일 수 있다. 공정은 최대 44종의 혈청형의 블렌드를 L-히스티딘, 염화나트륨 및 PS-20에서 합한 다음, 이러한 블렌딩된 물질을 항미생물 보존제와 함께 또는 보존제 없이 APA 및 염화나트륨과 합하는 것으로 이루어진다.
- [0104] 본원에서 입증되는 바와 같이, 계면활성제의 선택은 상이한 약물 제품 및 약물 물질에 대해 최적화될 필요가 있을 수 있다. 15종 이상의 혈청형을 함유하는 다가 백신의 경우, PS-20 및 P188이 바람직하다. 접합체를 제조하기 위해 사용되는 화학의 선택은 제제의 안정화에 영향을 미치는 유의한 인자인 것으로 여겨진다. 특히, 하기 예시된 바와 같이, 수성 또는 DMSO 용매에서 제조되고 다가 조성물에서 합해진 페루구균 폴리사카라이드-단백질 접합체는 제제에 사용되는 특정한 계면활성제 시스템에 따라 안정성에 있어서 유의한 차이를 나타낸다. 기재된 바와 같이, 특히 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체가 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 제조되었을 때, 폴리소르베이트 20 단독 또는 폴리올과 조합된 폴록사머 188에서 개선된 안정성이 관찰되었다.
- [0105] 본 발명은, 부분적으로, 일부는 수성 조건 하에 제조되고 다른 것은 DMSO 조건 하에 제조된, 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 폴리사카라이드-단백질 접합체를 함유하는 제제 중에 폴리소르베이트 20 또는 폴록사머 188과 폴리올의 조합물을 사용하는 것이, 면역원성 조성물의 제조 및 적송 스트레스에 의해 유도된 물리-화학적 불안정성을 제어하는데 보조하고 다른 계면활성제 및 안정화제에 비해 예상외의 우수한 특성을 제공한다는 발견에 기초한다. 특정 세제가 생물요법제를 보호하는 방법의 정확한 메카니즘은 잘 이해되지 않고 선형적으로 예측될 수 없다. 가능한 안정화 메카니즘은 우선적 수화, 우선적 배제, 생물요법제와 표면 사이의 공기/액체 계면 경쟁, 표면 장력, 및/또는 세제와 생물요법제와의 직접적 회합으로 응집을 위한 시드로서의 역할을 하는 소수성 패치를 차폐하는 것을 포함한다. 본 발명은 관련 기술분야에서 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물의 안정성을 개선시키고 미립자 형성 (예를 들어, 응집, 침전)을 억제하는 지속적인 필요성을 다룬다. 본 발명의 제제는 폴록사머 188 및 폴리소르베이트 80을 포함한 이전에 사용된 계면활성제에 비해, 복합 생물요법제의 제조, 적송 및 취급에 의해 유도된 응집을 제어하는데 있어서 유의한 이점을 제공하는 것으로 여겨진다.
- [0106] 폴리사카라이드-단백질 접합체 내 단백질 성분이 응집에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 이는 동일한 혈청형 조성의 접합체를 사용하지만 상이한 접합 용매를 사용하는 약물 제품의 상이한 응집 현상에서 입증된다. 폴리사카라이드 접합체의 제조에 사용되는 비양성자성 용매는 단백질의 구조를 변경시키고, APA 아주반트의 존재 하에 상이한 응집 경향을 나타낼 수 있다. 2종 이상의 담체 단백질이 사용되는 경우에, 중량 백분율이 계산될 수 있다.
- [0107] 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, 본 발명은 (i) 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체; (ii) 5.0 내지 7.5 범위의 pH를 갖는 pH 완충 염수 용액; (iii) 알루미늄 염; 및 (iv) (a) 폴리소르베이트 20 및 (b) 1100 Da 내지 17,400 Da 범위의 분자량을 갖는 폴록사머, 및 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 400으로부터 선택된 폴리올로부터 선택된 계면활성제 시스템을 포함하는 제제를 제공한다. 이러한 실시양태의 특정 측면에서, 1종 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체는 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 제조된다. 총 단백질 질량의 대략 10-100%, 24%-100% 또는 24-80%의 범위가 비양성자성 용매, 예컨대 DMSO에서 제조되고 접합될 수 있다.
- [0108] 특정 실시양태에서, 계면활성제 시스템은 통상적으로 트윈(Tween)® 20으로 지칭되는, 상업적으로 입수가능한 계면활성제인 폴리소르베이트 20 (IUPAC 명칭: 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트; PS-20)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제 중 폴리소르베이트 20의 최종 농도는 0.001% 내지 10% w/v, 0.025% 내지 2.5% w/v, 또는 0.025% 내지 0.3% w/v의 범위이다. 폴리소르베이트 20을 포함하는 계면활성제 시스템은 폴리올을 추가로 포함할 수 있다. 폴리올은 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택될 수 있다. 특정 측면에서, 폴리에틸렌 글리콜 또는 프로필렌 글리콜은 6% 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 400이다.

[0109] 특정 실시양태에서, 계면활성제 시스템은 1100 Da 내지 17,400 Da 범위의 분자량을 갖는 폴록사머, 및 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 400으로부터 선택된 폴리올을 포함한다.

[0110] 폴록사머는 폴리옥시에틸렌 (폴리(에틸렌 옥시드))의 2개의 친수성 쇠가 플랭킹되어 있는 폴리옥시프로필렌 (폴리(프로필렌 옥시드))의 중심 소수성 쇠로 구성된 비이온성 삼블록 공중합체이다. 폴록사머는 또한 상표명 플루로닉(Pluronic)®으로 공지되어 있다. 중합체 블록의 길이는 맞춤화될 수 있기 때문에, 약간 상이한 특성을 갖는 다수의 상이한 폴록사머가 존재한다. 일반적 용어 "폴록사머"의 경우, 이들 공중합체는 통상적으로 문자 "P" (폴록사머에 대한 것)에 이어서 3개의 숫자로 명명되고, 처음 2개의 숫자 x 100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략적인 분자 질량을 제공하고, 마지막 숫자 x 10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다 (예를 들어, P407 = 4,000 g/mol의 폴리옥시프로필렌 분자 질량 및 70% 폴리옥시에틸렌 함량을 갖는 폴록사머). 플루로닉® 상표명의 경우, 이들 공중합체의 부호화는 실온에서 그의 물리적 형태를 규정하기 위한 문자 (L = 액체, P = 페이스트, F = 박편 (고체))로 시작한 후 2 또는 3개의 숫자가 이어진다. 수치 지정에 있어서 처음 숫자 (3자리 숫자에서 2개의 숫자)에 300을 곱한 것은 소수성물질의 대략적인 분자량을 나타내고; 마지막 숫자 x 10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 나타낸다 (예를 들어, L61 = 1,800 g/mol의 폴리옥시프로필렌 분자 질량 및 10% 폴리옥시에틸렌 함량을 갖는 플루로닉®). 미국 특허 번호 3,740,421을 참조한다.

[0111] 폴록사머의 예는 하기 화학식을 갖는다:



[0113] 여기서 a 및 b 블록은 하기 값을 갖는다:

플루로닉®	폴록사머	a	b	분자량
L31		2	16	1100 (평균)
L35				1900 (평균)
L44NF	124	12	20	2090 내지 2360
L64				2900 (평균)
L81				2800 (평균)
L121				4400 (평균)
P123		20	70	5750 (평균)
F68NF	188	80	27	7680 내지 9510
F87NF	237	64	37	6840 내지 8830
F108NF	338	141	44	12700 내지 17400
F127NF	407	101	56	9840 내지 14600

[0114]

[0115] 본원에 사용된 분자량 단위는 달톤 (Da) 또는 g/mol이다.

[0116] 제제의 경우, 폴록사머는 일반적으로 1100 Da 내지 17,400 Da, 7,500 Da 내지 15,000 Da, 또는 7,500 Da 내지 10,000 Da 범위의 분자량을 갖는다. 폴록사머는 폴록사머 188 또는 폴록사머 407로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 제제 중 폴록사머의 최종 농도는 0.001 내지 5% w/v, 또는 0.025 내지 1% w/v이다. 폴록사머를 포함하는 계면활성제 시스템은 폴리올을 추가로 포함해야 한다. 특정 측면에서, 폴리올은 프로필렌 글리콜이고, 1 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 폴리올은 폴리에틸렌 글리콜 400이고, 1 내지 20% w/v의 최종 농도로 존재한다.

[0117] 제제에 적합한 폴리올은 중합체 폴리올, 특히 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나 이에 제한되지는 않는 폴리에테르 디올, 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르이다. 프로필렌 글리콜은 ~425 내지 ~2700의 단량체의 분자량 범위에서 이용가능하다. 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르는 또한 PEG200, PEG300, PEG400, PEG1000, PEG MME 550, PEG MME 600, PEG MME 2000, PEG MME 3350 및 PEG MME 4000을 포함하나 이에 제한되지는 않는, ~200 내지 ~35000 범위의 분자량의 범위에서 이용가능하다. 또 다른 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 400이다. 본 발명의 제제 중 폴리올의 최종 농도는 1 내지 20% w/v 또는 6 내지 20% w/v일 수 있다.

[0118] 제제는 또한 pH-완충 염수 용액을 함유한다. 완충제는, 예를 들어 트리스, 아세테이트, 글루타메이트, 락테이트, 말레에이트, 타르트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 카르보네이트, 글리시네이트, L-히스티딘, 글리신, 숙

시네이트, HEPES (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산), MOPS (3-(N-모르폴리노)프로판술폰산), MES (2-(N-모르폴리노)에탄술폰산) 및 트리에탄올아민 완충제로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 완충제는 용액을 4 내지 10, 5.2 내지 7.5, 또는 5.8 내지 7.0 범위의 pH로 완충시킬 수 있다. 본 발명의 특정 측면에서, 완충제는 포스페이트, 숙시네이트, L-히스티딘, MES, MOPS, HEPES, 아세테이트 또는 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다. 완충제는 또한, 예를 들어, 특히 제약 제제가 비경구 용도를 위한 것인 경우에, 비경구 용도를 위한 USP 상용성 완충제로부터 선택될 수 있다. 완충제의 농도는 1 mM 내지 50 mM 또는 5 mM 내지 50 mM 범위일 것이다. 특정 측면에서, 완충제는 5 mM 내지 50 mM의 최종 농도의 L-히스티딘, 또는 1 mM 내지 10 mM의 최종 농도의 숙시네이트이다. 특정 측면에서, L-히스티딘은 20 mM $\pm$ 2 mM의 최종 농도로 존재한다.

[0119] 염수 용액 (즉, NaCl을 함유하는 용액)이 바람직하지만, 제제에 적합한 다른 염은 CaCl_2 , KCl 및 MgCl_2 및 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨 및 글리세롤을 포함하나 이에 제한되지 않는 비-이온성 등장화제가 염 대신에 사용될 수 있다. 적합한 염 범위는 25 mM 내지 500 mM 또는 40 mM 내지 170 mM을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 한 측면에서, 염수는 임의로 20 mM 내지 170 mM의 농도로 존재하는 NaCl이다.

[0120] 바람직한 실시양태에서, 제제는 염화나트륨을 갖는 L-히스티딘 완충제를 포함한다.

[0121] 본원에 기재된 제제의 특정 실시양태에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 담체 단백질에 접합된 1종 이상의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함한다. 담체 단백질은 CRM₁₉₇, 디프테리아 독소 단편 B (DTFB), DTFBC8, 디프테리아 독소이드 (DT), 과산포 독소이드 (TT), TT의 단편 C, 백일해 독소이드, 콜레라 독소이드, 이. 콜라이 LT, 이. 콜라이 ST, 슈도모나스 아에루기노사로부터의 외독소 A 및 그의 조합으로부터 선택될 수 있다. 특정 측면에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 중 1종 이상은 DTFB에 접합된다. 한 측면에서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 모두는 수성 화학을 사용하여 제조된다. 예로서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 제제는 CRM₁₉₇ 폴리펩티드에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드로 본질적으로 이루어진 15가 페렴구균 접합체 (15vPnC) 제제일 수 있다. 또 다른 측면에서, 폴리사카라이드 단백질 접합체 중 1종 이상은 DMSO 화학을 사용하여 제조된다. 예로서, 폴리사카라이드-단백질 접합체 제제는 15가 페렴구균 접합체 (15vPnC) 제제일 수 있으며, 여기서 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 DMSO 화학을 사용하여 제조되고, 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 폴리사카라이드 단백질 접합체는 수성 화학을 사용하여 제조된다.

[0122] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 제어 방출 시스템으로 전달된다. 예를 들어, 작용제는 정맥내 주입, 경피 패치, 리소솜 또는 다른 투여 방식을 사용하여 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 중합체 물질이, 예를 들어 마이크로스피어에 또는 이식물에 사용된다.

[0123] 본 발명의 조성물은 또한 에스. 뉴모니아로부터의 1종 이상의 단백질을 포함할 수 있다. 포함시키기에 적합한 에스. 뉴모니아에 단백질의 예는 국제 특허 출원 공개 번호 WO 02/083855 및 WO 02/053761에서 확인된 것들을 포함한다.

[0124] 첨부된 설명 및 도면을 참조하여 본 발명의 다양한 실시양태를 기재하였지만, 본 발명이 그러한 정확한 실시양태에 제한되지 않는다는 것, 및 그 안에서 다양한 변화 및 변형이 첨부된 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 범주 또는 취지를 벗어나지 않으면서 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이루어질 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0125] 하기 실시예는 본 발명을 예시하지만, 제한하지는 않는다.

[0126] 실시예

[0127] 실시예 1: DTFB 담체 단백질의 제조

[0128] DTFB 제조를 위한 다중모드 음이온 교환 크로마토그래피의 사용

[0129] 이전에 기재된 바와 같이 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/173876 A1 참조) 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된 CRM₁₉₇을 50 mM 트리스, pH 8.0에서 대략 22°C에서 대략 1시간 동안 재조합 트립신을 1:500 물비의 트립신 대 CRM₁₉₇로 사용하여 소화시켰다. 이어서, 50 mM 트리스, pH 8 중 디티오프레이틀 (DTT)을 대략 22°C에서 30분 동안 5 mM의 최종 농도로 첨가하여 단백질분해적으로 절단된 CRM₁₉₇의 A 단편과 B 단편

사이의 디설파이드 결합을 환원시켰다.

- [0130] 이어서, 소화 반응물을 50 mM 트리스, pH 8로 평형화시킨 다중모드 음이온 교환 크로마토그래피 칼럼 (캡토TM어 드히어, 지이 헬스케어(GE Healthcare)) 상에 로딩하였다. 칼럼을 50 mM 트리스, pH 8로 세척하고, DTFB 생성물을 50 mM 트리스, pH 8 중 0.45 M 내지 0.65 M 염화나트륨의 구배로 용리시켰다. 생성물을 농축시키고, 5 kDa 공칭 분자량 컷-오프 (NMWCO) 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 10 mM 인산칼륨, pH 8에 대해 투석여과하였다. DTFB 생성물을 함유하는 보유물을 0.2-마이크로미터-여과하고, 2-8℃에서 저장하였다. 생성물 농도를 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하고, 순도를 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 평가하였다.
- [0131] 결과는 다중모드 음이온 교환 크로마토그래피 용리액이, 주로 단량체로서 존재하고 소량의 이량체를 갖는, 비교적 순수한 DTFB를 함유하였다는 것을 보여준다. 도 1a를 참조한다. 이량체 형성은 DTFB 단량체를 사이의 디설파이드 결합 형성에 기인한 것이었다. 하기 섹션에 예시된 바와 같이, DTT는 크로마토그래피 및 한외여과 단계에서 사용되어 이량체 형성에 대한 잠재력을 최소화하였다.
- [0132] DTFB 제조를 위한 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피의 사용
- [0133] DTFB 이량체의 존재로 인해, 대안적 정제 방법을 조사하였다. 이전에 재된 바와 같이 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된 CRM₁₉₇을 300 mM 트리스, pH 7.5를 사용하여 대략 1 mg/mL의 단백질 농도로 희석하였다. 트립신을 단백질 용액에 대략 1:3250의 트립신 대 CRM₁₉₇ 물비를 사용하여 첨가하였다. 용액을 실온에서 대략 20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 300 mM 트리스, pH 7.5 중 DTT를 최종 농도 10 mM의 DTT로 첨가하여 단백질분해적으로 절단된 CRM₁₉₇들 사이의 디설파이드 결합을 환원시킴으로써, A 단편과 B 단편을 분리하였다.
- [0134] 대략 75분 후, 환원된 단백질 용액을 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼 (캡토TMMMC, 지이 헬스케어) 상에 로딩하였다. 칼럼을 2-8℃에서 300 mM 트리스, 10 mM DTT, pH 7.5로 평형화시킨 후 단백질 용액을 로딩하였다. 로딩 후, 칼럼을 2-8℃에서 200 mM 염화나트륨 및 10 mM DTT를 함유하는 300 mM 트리스, pH 7.5로 세척한 다음, 생성물을 2-8℃에서 300 mM 트리스, pH 8.5 중 1 M 염화나트륨으로 용리시켰다. 대략 0.002% w/v PS-20을 배치에 첨가한 후 5 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2-8℃에서 농축시켰다. 농축 후, 추가의 PS-20을 0.02% w/v PS-20의 농도로 배치에 첨가하고, 배치를 100 mM 인산칼륨, 10 mM DTT, pH 8에 대해 투석여과하였다. 5 kDa 막으로 접선 흐름 여과를 사용하여 배치를 추가로 농축시켰다. 최종 보유물을 0.2-마이크로미터 여과하고, 동결 저장하거나 2-8℃에서 저장한 후 접합시켰다.
- [0135] DTFB 샘플을 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 분석하였다 (도 1b 및 1c). 겔의 밀도측정 분석은 0.2-마이크로미터 여과 (FBI) 후 최종 벌크 중간체가 > 98%의 순도를 갖는다는 것을 보여준다.
- [0136] 도 1c에 제시된 최종 벌크 중간체 (FBI)를 질량 분광측정법 동반 액체 크로마토그래피 (LC-MS)에 의해 분석하여 무손상 단백질 질량을 측정하였다. DTT로 환원시킨 후의 샘플에 대해 LC-MS 분석을 수행하였다. 주요 피크로부터의 미가공 데이터의 디컨볼루션은 37,194.2 Da의 측정 질량을 가져왔다. 이 질량 측정치는 DTFB에 대한 37,194.4 Da의 이론 질량과 일치하며, 이는 예상된 아미노산 서열을 확인시켜 준다.
- [0137] 트립신, 엔도프로테아제 Asp-N 및 엔도프로테아제 Glu-C 소화물의 조합물로부터 펩티드 맵을 수득하였다. 샘플을 6 M 구아니딘-HCl의 존재 하에 아이오도아세트아미드를 사용하여 환원성 알킬화시키고, 각각의 효소를 개별적으로 사용하여 37℃에서 대략 16-17시간 동안 소화시켰다. 포름산을 첨가하여 소화물을 켄칭하였다. 펩티드를 분리하고 LC-MS에 의해 분석하였다. 개별 소화물에 의해 확인된 펩티드의 조합물을 사용하여, 아미노산 서열 커버리지는 대략 98%였다. 발견된 펩티드는 예측된 DTFB 서열과 일치하였다.
- [0138] DTFB 정제를 위한 대안적 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피 방법
- [0139] 이전에 재된 바와 같이 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된 CRM₁₉₇을 300 mM 트리스, pH 7.5를 사용하여 대략 5 mg/mL의 단백질 농도로 희석하였다. 트립신을 단백질 용액에 대략 1:3000의 트립신 대 CRM₁₉₇ 물비를 사용하여 첨가하였다. 용액을 대략 22℃에서 대략 15-20시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 300 mM 트리스, pH 7.5 중 DTT를 최종 농도 $\geq$ 10 mM의 DTT로 첨가하여 단백질분해적으로 절단된 CRM₁₉₇들 사이의 디설파이드 결합을 환원시킴으로써, A 단편과 B 단편을 분리하였다.
- [0140] 환원된 단백질 용액을 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피 칼럼 (캡토TMMMC, 지이 헬스케어) 상에 수지 L당 대략 25 g 단백질로 로딩하였다. 칼럼을 대략 22℃에서 300 mM 트리스, 10 mM DTT, pH 7.5로 평형화시킨 후 단

백질 용액을 로딩하였다. 로딩 후, 칼럼을 대략 22℃에서 200 mM 염화나트륨 및 10 mM DTT를 함유하는 300 mM 트리스, pH 7.5로 세척한 다음, 생성물을 22℃에서 300 mM 트리스, pH 8.5 중 1 M 염화나트륨으로 용리시켰다. 다중모드 양이온 교환 크로마토그래피로부터의 DTFB 생성물을 상기 기재된 바와 같이 투석여과하고, 5 kDa NMWCO 점선 흐름 한외여과 막을 사용하여 농축시키고, 0.2-마이크로미터 여과할 수 있다.

[0141] 다중모드 양이온 교환 공정으로부터의 DTFB 샘플을 환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 분석하였다 (도 1d). 겔의 밀도측정 분석은 다중모드 양이온 교환 칼럼으로부터 용리된 DTFB 단백질 생성물이 고도로 정제된다는 것을 보여준다.

[0142] 한외여과 동안 DTFB 안정성에 대한 완충제 pH, 이온 강도 및 PS-20 계면활성제 농도의 효과

[0143] 완충제 pH, 이온 강도 및 PS-20 계면활성제 연구를 수행하여 DTFB 한외여과 단계의 개발 동안 관찰된 단백질 입자 형성을 다루었다. DTFB를 0, 200 또는 500 mM 염화나트륨을 사용하여 pH 7, 7.5 또는 pH 8의 100 mM 인산칼륨으로 조정하였다. 시차 주사 열량측정법을 사용하여 pH 및 염화나트륨 농도의 함수로서 DTFB 용액의 안정성 (용융 온도, T_m)을 평가하였다. 표 1에 제시된 바와 같이, pH 7에서 8로의 증가는 DTFB T_m 을 대략 3℃만큼 증가시켰다. 0 내지 500 mM 염화나트륨의 범위의 염화나트륨은 조사된 pH 값에서 T_m 에 유의하게 영향을 미치지 않았다.

[0144] 표 1: 시차 주사 열량측정법에 의해 측정된 완충제 pH 및 염화나트륨 농도의 함수로서의 DTFB 용액의 안정성.

인산칼륨 완충제의 pH	염화나트륨 농도 (mM)	용융 온도, T_m (°C)
7	0	50.6
	200	50.4
	500	50.6
7.5	0	51.5
	200	51.3
	500	51.2
8	0	52.8
	200	53.2
	500	53.3

[0145]

[0146] 개별 연구에서, 정제된 DTFB를 0, 150, 500 및 1000 mM 염화나트륨을 사용하여 100 mM 인산칼륨 중 pH 6.0, pH 7.0 및 pH 8.5로 조정하였다. 용액을 실온에서 밤새 유지한 다음, 원심분리하여 침전된 단백질을 제거하였다. UV280 흡광도 검출을 동반한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 상청액을 단백질 농도에 대해 검정하였다 (도 2). 본 연구에서의 상청액 단백질 농도는 0 및 150 mM 염화나트륨에서의 용액 pH에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나, 보다 높은 염화나트륨 농도 (500 및 1000 mM)에서, 결과는 완충제 pH가 pH 7.0 또는 8.5에서 6.0으로 감소함에 따라, 상청액 단백질 농도의 현저한 감소를 보여주며, 이는 감소된 DTFB 안정성을 나타낸다.

[0147] 50 및 100 mM 인산칼륨, pH 8 용액 및 50 mM 인산칼륨, 150 mM 염화나트륨, pH 8에서 증가하는 양의 PS-20을 DTFB 용액에 첨가함으로써, DTFB 안정성에 대한 PS-20 농도의 효과를 연구하였다. 용액을 5분 동안 불텍성한 다음 원심분리하였다. UV280 흡광도 검출을 동반한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 상청액을 단백질 농도에 대해 검정하였다 (도 3). PS-20을 함유하지 않는 샘플에서 유의한 불텍성-유도 단백질 손실이 관찰되었다. DTFB 회수는 $\geq 0.01\%$ w/v PS-20을 함유하는 샘플에서 특히 개선되었다.

[0148] 실시예 2: 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드의 제조

[0149] 폐렴구균을 배양하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Chase, 1967, Methods of Immunology and Immunochemistry 1:52]을 참조한다. 폐렴구균 피막 폴리사카라이드를 제조하는 방법도 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 유럽 특허 번호 EP0497524를 참조한다. 폐렴구균 하위유형의 단리물은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (버지니아주 마나사스)으로부터 입수가능하다. 박테리아는 혈액-한천 상에서 알파-용혈성인 피막화된, 비-운동성, 그람-양성, 란셋-형상 쌍구균으로서 확인되어 있다. 하위유형은 특정 항혈청을 사용하는 팽화 반응에 기초하여 구별될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,847,112를 참조한다.

[0150] 관심있는 각각의 에스. 뉴모니아에 혈청형을 나타내는 세포 은행을 냉동 바이알 내의 것으로 머크 컬처 콜렉션(Merck Culture Collection) (뉴저지주 라웨이)으로부터 얻었다. 해동된 시드 배양물을 에스. 뉴모니아에에 적절한 사전-멸균된 성장 배지를 함유하는 시드 발효기로 옮겼다. 배양물을 온도 및 pH 제어 하의 시드 발효기에서 성장시켰다. 시드 발효기의 전체 부피를 사전-멸균된 성장 배지를 함유하는 생산 발효기로 옮겼다. 생산

발효는 공정의 최종 세포 성장 단계였다. 온도, pH 및 교반 속도를 제어하였다.

- [0151] 불활성화제의 첨가를 통해 발효 공정을 종결시켰다. 불활성화 후에, 배치를 불활성화 탱크로 옮겨 제어된 온도 및 교반 하에 유지하였다. 원심분리와 여과의 조합을 사용하여 세포 파편을 제거하였다. 배치를 한외여과하고 투석여과하였다. 이어서 배치를 용매-기반 분획화에 적용하여 불순물을 제거하고 폴리사카라이드를 회수하였다.
- [0152] 실시예 3: 수용액에서의 환원성 아미노화를 사용한 DTFB 담체 단백질에 대한 폴리사카라이드의 접합
- [0153] 마우스 면역원성 연구를 위한 혈청형 3-DTFB (ST3-DTFB) 접합체의 제조
- [0154] 실시예 2에 기재된 바와 같이 수득된 정제된 혈청형 3 폴리사카라이드를 물에 용해시켰다. 얼음에서 냉각된 샘플에 대해 프로브 소니케이터를 사용하여 대략 200 kDa의 평균 분자량으로의 Ps 크기 감소를 수행하였다. 초음파처리된 샘플을 0.2 마이크로미터-여과하고, 2-8℃에서 저장하였다. 폴리사카라이드 용액을 30 kDa NMWCO 접선 흐름 여과 막에 대한 투석여과에 의해 농축시켰다.
- [0155] 소듐 메타퍼아이오데이트 산화를 사용하는 접합을 위한 폴리사카라이드를 제조하였다 (문헌 [Anderson et al., 1986, J. Immunol. 137:1181-1186]; 및 미국 특허 출원 공개 번호 US20110195086 참조). 100 mM 소듐 메타퍼아이오데이트 용액을 50 mM 아세트산나트륨 중 폴리사카라이드 용액에 첨가하였다. 샘플을 광으로부터 보호하면서 19-25℃에서 14-18시간 동안 혼합하였다. 에틸렌 글리콜 (폴리사카라이드 반복 단위에 대해 100:1 몰 과량)을 첨가하고, 19-25℃에서 추가의 16-18시간 동안 혼합하여 잔류 소듐 메타퍼아이오데이트를 쉐칭하고 산화 반응을 정지시켰다. 생성된 용액을 10 부피의 물에 대해 투석여과하였다. 산화된 폴리사카라이드 용액을 -70℃에서 분취물로 저장하였다.
- [0156] 퍼아이오데이트-산화된 폴리사카라이드를 실시예 1에 기재된 바와 같이 (다중모드 음이온 교환 크로마토그래피를 사용하여) 제조된 DTFB와 0.6:1의 폴리사카라이드 대 단백질 질량 비로 혼합하였다. 인산칼륨, pH 6.4 및 염화니켈을 각각 145 mM 및 2.2 mM의 최종 농도로 첨가하였다. 이어서, 소듐 시아노보로히드라이드를 대략 1-2 몰 당량으로 첨가하였다. 반응물을 광으로부터 보호하고, 반응을 2-8℃에서 120시간의 기간에 걸쳐 수행하였다.
- [0157] 이어서, 혼합물을 2-8℃에서 총 14 - 18시간 동안 25 mM 인산칼륨 완충제, pH 6.4, 0.3 M 염화나트륨의 2회 변화에 대해 투석하였다. 불용성 물질을 간단히 원심분리에 의해 제거하고, 접합체를 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 폴리싱하여 유리 폴리사카라이드 및 단백질을 감소시켰다. SEC-폴리싱된 접합체를 30 kD NMWCO 원심분리 농축기 상에서 농축시켰다.
- [0158] 새끼 레서스 원숭이 면역원성 연구를 위한 혈청형 3-DTFB 접합체의 제조
- [0159] 정제된 혈청형 3 페렘구균 피막 폴리사카라이드 분말을 물에 용해시키고, 0.45-마이크로미터 여과하였다. 배치를 균질화하여 Ps의 분자 질량을 감소시키고, 0.22-마이크로미터 여과하였다. 접합 전 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 폴리사카라이드의 크기 감소는 보다 구체적이고 재현가능하며 관리가능한 물리적 특성을 갖는 폴리사카라이드를 생성하기 위한 수단으로서 이전에 기재되었다 (Marburg et al., 1997, 미국 특허 5,623,057). 문헌 [Marburg et al.]에 기재된 바와 같이, 폴리사카라이드 크기 감소는 용해도 및 여과성을 증가시키고 다분산도 및 점도를 감소시킴으로써 접합 일관성 및 접합 용이성을 개선시키는 것으로 알려져 있다. 균질화를 사용하는 에스. 뉴모니아에로부터의 혈청형 19F 폴리사카라이드의 폴리사카라이드 크기 감소는 이전에 기재되었다 (Lander et al., 2000, Biotechnol. Prog. 2000, 16, 80-85). 이어서, 크기-감소된 폴리사카라이드를 농축시키고, 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 물에 대해 투석여과하였다.
- [0160] 이어서, 50 mM 아세트산나트륨을 첨가하고, 100 mM 소듐 메타퍼아이오데이트 용액을 첨가하여 폴리사카라이드 활성화를 개시함으로써 폴리사카라이드 상에 반응성 알데히드를 형성하였다. 배치를 대략 22℃에서 대략 12시간 동안 인큐베이션하였다. 배치를 ≤ 8℃에서 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 10 mM 인산칼륨, pH 6.4에 대해 투석여과하고, 생성물-풍부 보유물을 농축시켰다.
- [0161] 활성화된 폴리사카라이드 용액을 물 및 1.5 M 인산칼륨, pH 7.0과 블렌딩하였다. 정제된 DTFB를 0.2-마이크로미터 여과한 다음, 완충제-조정된 폴리사카라이드 용액과 1.3:1의 폴리사카라이드 대 단백질 질량 비로 합하였다. 이어서, 용액을 0.2 마이크로미터 여과하였다. 염화니켈을 100 mM 염화니켈 원액을 사용하여 대략 2 mM의 최종 농도로 배치에 첨가하였다. 이어서, 소듐 시아노보로히드라이드 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 2 몰)를 첨가하였다. 폴리사카라이드 및 단백질의 소비를 최대화하기 위해 대략 10℃에서 대략 120시간 동안 배치가 반

응하도록 하였다.

- [0162] 접합 반응 후, 배치를 대략 3.5 g/L의 폴리사카라이드 농도로 희석하고, 2-8℃로 냉각시키고, 1.2 마이크로미터 여과하고, 100 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2-8℃에서 100 mM 인산칼륨, pH 7.0에 대해 투석여과하였다. 이어서, 보유물에 회수된 배치를 대략 2.0 g 폴리사카라이드/L로 희석하고, 1.2 M 중탄산나트륨, pH 9.4의 첨가에 의해 pH-조정하였다. 수소화붕소나트륨 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 1몰)을 첨가하였다. 이후 1.5 M 인산칼륨, pH 6.0을 첨가하였다.
- [0163] 이어서, 배치를 농축시키고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2-8℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM L-히스티딘에 대해 투석여과하였다. 보유물을 0.2 마이크로미터 여과하고, 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 추가의 10 mM L-히스티딘에 의해 1.0 g/L의 폴리사카라이드 농도로 조정하였다. 배치를 분취물로 분배하고, ≤ -60℃에서 동결시켰다.
- [0164] 실시예 4: 수용액에서의 환원성 아미노화를 사용한 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F의 CRM₁₉₇에의 접합
- [0165] 공통 공정 흐름을 사용하여 상이한 혈청형 폴리사카라이드를 정제된 CRM₁₉₇ 담체 단백질에 개별적으로 접합시켰다. 폴리사카라이드를 용해시키고, 크기 감소시키고, 화학적으로 활성화시키고, 한외여과에 의해 완충제-교환하였다. 이어서, 정제된 CRM₁₉₇을 활성화된 폴리사카라이드에 반응 혼합물 중 NiCl₂ (2 mM)를 이용하여 접합시키고, 생성된 접합체를 한외여과에 의해 정제한 후 최종 0.2 마이크로미터 여과하였다. 각각의 단계 내의 여러 공정 파라미터, 예컨대 pH, 온도, 농도 및 시간을 하기 섹션에서의 혈청형-특이적 값에 따라 제어하였다.
- [0166] 폴리사카라이드 크기 감소 및 산화
- [0167] 정제된 페럼구균 피막 폴리사카라이드 분말을 물에 용해시키고, 혈청형 19A를 제외한 모든 혈청형을 0.45-마이크로미터 여과하였다. 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 균질화하여 폴리사카라이드의 분자 질량을 감소시켰다. 혈청형 18C를 ≥ 90℃에서 균질화 또는 산 가수분해에 의해 크기-감소시켰다. 혈청형 19A는 그의 비교적 낮은 출발 크기로 인해 크기 감소시키지 않았다. 균질화 압력 및 균질화기 통과 횟수를 혈청형-특이적 표적에 따라 제어하여 (150-1000 bar; 4-7회 통과) 혈청형-특이적 분자 질량을 달성하였다. 크기-감소된 폴리사카라이드를 0.2-마이크로미터 여과한 다음, 농축시키고, 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 물에 대해 투석여과하였다. 산-가수분해된 혈청형 18C에 대해서는 5 kDa NMWCO 막을 사용하였다.
- [0168] 이어서, 폴리사카라이드 용액을 아세트산나트륨 완충제를 사용하여 혈청형-특이적 온도 (4-22℃) 및 pH (4-5)로 조정하여 활성화로 인한 폴리사카라이드 크기 감소를 최소화하였다. 모든 혈청형 (혈청형 4 제외)에 대해, 100 mM 소듐 메타퍼아यो데이트 용액을 첨가하여 폴리사카라이드 활성화를 개시하였다. 첨가된 소듐 메타퍼아यो데이트의 양은 폴리사카라이드 반복 단위 몰당 대략 0.1 내지 0.5 몰의 소듐 메타퍼아यो데이트 범위로, 혈청형-특이적이었다. 소듐 메타퍼아यो데이트의 혈청형-특이적 전하는 폴리사카라이드 활성화의 표적 수준 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 알데히드 몰)을 달성하기 위한 것이었다. 혈청형 4의 경우, 소듐 메타퍼아यो데이트 첨가 전에, 배치를 대략 50℃ 및 pH 4.1에서 인큐베이션하여 폴리사카라이드를 부분적으로 탈케탈화시켰다.
- [0169] 혈청형 5 및 7F를 제외한 모든 혈청형의 경우, 활성화된 생성물을 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 10 mM 인산칼륨, pH 6.4에 대해 투석여과하였다. 산-가수분해된 혈청형 18C에 대해서는 5 kDa NMWCO 막을 사용하였다. 혈청형 5 및 7F를 10 mM 아세트산나트륨에 대해 투석여과하였다. 모든 혈청형에 대한 한외여과를 2-8℃에서 수행하였다.
- [0170] CRM₁₉₇에 대한 폴리사카라이드 접합
- [0171] 산화된 폴리사카라이드 용액을 혈청형에 따라 1.5 M 인산칼륨, pH 6.0 또는 pH 7.0 및 물과 혼합하였다. 선택된 완충제 pH는 접합 반응 동안 활성화된 폴리사카라이드의 안정성을 개선시키기 위한 것이었다. 이전에 기재된 바와 같이 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/173876 A1 참조) 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된 CRM₁₉₇을 0.2-마이크로미터 여과하고, 완충 폴리사카라이드 용액과, 혈청형에 따라 0.4 내지 1.0 w/w 범위의 CRM₁₉₇에 대한 폴리사카라이드 질량 비로 합하였다. 질량 비는 생성된 접합체에서 CRM₁₉₇에 대한 폴리사카라이드 비를 제어하도록 선택하였다. 폴리사카라이드 및 포스페이트 농도는 혈청형에 따라 각각 3.6 내지 10.0 g/L 및 100 내지 150 mM 범위로, 혈청형-특이적이었다. 혈청형-특이적 폴리사카라이드 농도는 생성된

접합체의 크기를 제어하도록 선택하였다. 이어서, 용액을 0.2-마이크로미터 여과하였다. 100 mM 염화니켈 용액을 사용하여 염화니켈을 대략 2 mM로 첨가하였다. 소듐 시아노보로하이드라이드 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 2몰)를 첨가하였다. 폴리사카라이드 및 단백질의 소비를 최대화하기 위해 혈청형-특이적 지속기간 (72 내지 120시간) 동안 접합을 진행시켰다.

[0172] 산-가수분해된 혈청형 18C를 각각 대략 12.0 g/L 및 6.0 g/L의 폴리사카라이드 및 단백질 농도를 사용하여 소듐 시아노보로하이드라이드를 갖는 대략 pH 8의 100 mM 인산칼륨에서 37℃에서 접합시켰다.

[0173] 수소화붕소나트륨에 의한 환원

[0174] 접합 반응 후, 배치를 대략 3.5 g/L의 폴리사카라이드 농도로 희석하고, 2-8℃로 냉각시키고, 1.2-마이크로미터 여과하였다. 모든 혈청형 (혈청형 5 제외)을 100 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2-8℃에서 100 mM 인산칼륨, pH 7.0에 대해 투석여과하였다. 이어서, 보유물에 회수된 배치를 대략 2.0 g 폴리사카라이드/L로 희석하고, 1.2 M 중탄산나트륨, pH 9.4의 첨가에 의해 pH-조정하였다. 수소화붕소나트륨 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 1몰)을 첨가하였다. 이후 1.5 M 인산칼륨 (pH 6.0)을 첨가하였다. 혈청형 5를 100 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 300 mM 인산칼륨에 대해 투석여과하였다.

[0175] 최종 여과 및 생성물 저장

[0176] 이어서, 배치를 농축시키고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 4℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0에서 10 mM L-히스티딘에 대해 투석여과하였다. 보유물 배치를 0.2 마이크로미터 여과하였다.

[0177] 혈청형 19F를 22℃에서 대략 7일 동안 인큐베이션하고, 100 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 4℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM L-히스티딘에 대해 투석여과하고, 0.2-마이크로미터 여과하였다.

[0178] 배치를 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 추가의 10 mM L-히스티딘에 의해 1.0 g/L의 폴리사카라이드 농도로 조정하였다. 배치를 분취물로 분배하고, ≤ -60℃에서 동결시켰다.

[0179] 실시예 5: 디메틸술폭시드에서의 환원성 아미노화를 사용한 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F의 CRM₁₉₇에 대한 접합 방법

[0180] 공통 공정 흐름을 사용하여 상이한 혈청형 폴리사카라이드를 정제된 CRM₁₉₇ 담체 단백질에 개별적으로 접합시켰다. 폴리사카라이드를 용해시키고, 표적 분자 질량으로 크기조정하고, 화학적으로 활성화시키고, 한외여과에 의해 완충제-교환하였다. 활성화된 폴리사카라이드 및 정제된 CRM₁₉₇을 개별적으로 동결건조시키고 디메틸술폭시드 (DMSO)에 재용해시켰다. 이어서, 재용해된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇ 용액을 합하고 하기 기재된 바와 같이 접합시켰다. 생성된 접합체를 한외여과에 의해 정제한 후 최종 0.2-마이크로미터 여과하였다. 각각의 단계 내의 여러 공정 파라미터, 예컨대 pH, 온도, 농도 및 시간을 하기 섹션에서의 혈청형-특이적 값에 따라 제어하였다.

[0181] 폴리사카라이드 크기 감소 및 산화

[0182] 정제된 페럼구균 피막 폴리사카라이드 분말을 물에 용해시키고, 혈청형 19A를 제외한 모든 혈청형을 0.45-마이크로미터 여과하였다. 혈청형 18C 및 19A를 제외한 모든 혈청형을 균질화하여 폴리사카라이드의 분자 질량을 감소시켰다. 균질화 압력 및 균질화기 통과 횟수를 혈청형-특이적 표적에 따라 제어하였다 (150-1000 bar; 4-7 회 통과). 혈청형 18C를 ≥ 90℃에서 산 가수분해에 의해 크기-감소시켰다. 혈청형 19A는 크기 감소시키지 않았다.

[0183] 크기-감소된 폴리사카라이드를 0.2-마이크로미터 여과한 다음, 농축시키고, 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 물에 대해 투석여과하였다. 혈청형 18C에 대해서는 5 kDa NMWCO 막을 사용하였다.

[0184] 이어서, 폴리사카라이드 용액을 아세트산나트륨 완충제를 사용하여 혈청형-특이적 온도 (4-22℃) 및 pH (4-5)로 조정하였다. 소듐 메타퍼아이오데이트 용액을 첨가하여 폴리사카라이드 활성화를 개시하였다. 첨가된 소듐 메타퍼아이오데이트의 양은 폴리사카라이드 반복 단위 몰당 대략 0.1 내지 0.5 몰의 소듐 메타퍼아이오데이트 범위로, 혈청형-특이적이었다.

[0185] 모든 혈청형에 대해, 활성화된 생성물을 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 10 mM 인산칼륨, pH 6.4에 대해 투석여과하였다. 혈청형 18C에 대해서는 5 kDa NMWCO 막을 사용하였다. 모든 혈청형에 대한 한외여과를 2-8℃에서 수행하였다.

- [0186] CRM₁₉₇에 대한 폴리사카라이드 접합
- [0187] 이전에 기재된 바와 같이 (국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/173876 A1 참조) 슈도모나스 플루오레센스에서의 발현을 통해 수득된 정제된 CRM₁₉₇을 5 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 2 mM 포스페이트, pH 7 완충제에 대해 투석여과하고, 0.2-마이크로미터 여과하였다.
- [0188] 산화된 폴리사카라이드 용액을 동결건조를 위한 제제에서 물 및 수크로스와 함께 제제화하였다. 단백질 용액을 동결건조를 위한 제제에서 물, 포스페이트 완충제 및 수크로스와 함께 제제화하였다. 수크로스 농도는 동결건조 후 DMSO 중 최적 재용해를 달성하기 위해 1 내지 5% 범위였다.
- [0189] 제제화된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇ 용액을 개별적으로 동결건조시켰다. 동결건조된 폴리사카라이드 및 CRM₁₉₇ 물질을 DMSO 중에 재용해시키고, 티 혼합기를 사용하여 합하였다. 소듐 시아노보로히드라이드 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 1몰)를 첨가하고, 혈청형-특이적 지속기간 (1 내지 48시간) 동안 접합을 진행시켜 표적으로 하는 접합체 크기를 달성하였다.
- [0190] 수소화붕소나트륨에 의한 환원
- [0191] 접합 반응 후에 수소화붕소나트륨 (폴리사카라이드 반복 단위 몰당 2 몰)을 첨가하였다. 배치를 대략 4℃에서 150 mM 염화나트륨 내로 희석하였다. 이어서, 인산칼륨 완충제를 첨가하여 pH를 중화시켰다. 배치를 농축시키고, 10 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 150 mM 염화나트륨에 대해 대략 4℃에서 투석여과하였다.
- [0192] 최종 여과 및 생성물 저장
- [0193] 이어서 각각의 배치를 농축시키고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 4℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM L-히스티딘에 대해 투석여과하였다. 보유물 배치를 0.2-마이크로미터 여과하였다.
- [0194] 혈청형 19F를 대략 5일 동안 인큐베이션하고, 300 kDa NMWCO 접선 흐름 한외여과 막을 사용하여 대략 4℃에서 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 10 mM L-히스티딘에 대해 투석여과하고, 0.2-마이크로미터 여과하였다.
- [0195] 배치를 150 mM 염화나트륨, pH 7.0 중 추가의 10 mM L-히스티딘으로 희석하고, 분취물로 분배하고, ≤ -60℃에서 동결시켰다.
- [0196] 실시예 6: ST3-DTFB 1가 접합체 제제를 사용한 마우스 면역원성 연구
- [0197] 마우스 모델에서 ST3-CRM₁₉₇과 비교하여 ST3-DTFB의 면역성을 평가하였다. 마우스에게 투여하기 위한 아주반트화된 제제는 24 μL의 멸균-여과된 접합체 (염수 중 1:10 - mL당 0.1258 mg DTFB 또는 CRM₁₉₇-접합된 폴리사카라이드)와 62 μL의 APA, 및 100 μL 당 0.08 μg의 폴리사카라이드 및 5 μg의 알루미늄의 용량을 위한 3.664 ml의 멸균 염수를 혼합함으로써 제조하였다. 개별 면역화를 지원하기 위해 제제화된 백신을 개별 보로실리케이트 마개 바이알에 넣어 2-8℃에서 저장하였다.
- [0198] ST3-DTFB를 6-8주령 암컷 Balb/C 마우스에서 평가하였다 (n=10/군). 실시예 3 및 4에 기재된 바와 같이 제조된 고유한 ST3-DTFB 및 ST3-CRM₁₉₇ 접합체 제제를 사용하여 제조된 ST3-DTFB/APA 및 2종의 ST3-CRM₁₉₇/APA 로트로 마우스를 면역화시켰다. ST3 PnPs 농도는 5 μg의 APA를 함유하면서, 0.1 ml 부피에서 용량당 0.08 μg이었고, 이를 제0일, 제14일 및 제28일에 복강내로 투여하였다. 혈청을 연구 시작 전 (pre) 및 3회 투여-후 (PD3) 제39일에 수집하고, ST3 WHO ELISA [표준화된 세계 보건 기구 (WHO) 프로토콜에 따름] 뿐만 아니라 단백질 담체 ELISA (CRM₁₉₇ 및 DTFB)에서 시험하였다. 마우스에게 제49일에 에스. 뉴모니아에 혈청형 3 (207 CFU/0.5 ml)을 복강내로 챌린지하였다.
- [0199] WHO ELISA 결과 (도 4)는 ST3-DTFB/APA 및 ST3-CRM₁₉₇/APA 둘 다로 면역화된 마우스가 유사한 PD3 PnPs 3 역가를 가졌다는 것을 보여주었다. ST3-DTFB/APA 및 ST3-CRM₁₉₇/APA로 면역화된 마우스는 혈청형 3 챌린지에 대해 ≥ 90% 보호를 나타냈으며, 이는 음성 대조군 염수 및 APA 면역화된 마우스에 비해 유의하게 더 높았다 (도 5).
- [0200] 실시예 7: 상이한 계면활성제 및 안정화제를 사용한 15가 폐렴구균 접합체 백신의 제제화
- [0201] 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 갖는 15가 폐렴구균 접합체 백신 (PCV15)의 제제화에 상기 기재된 바와 같이 제조된 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체를 사용하였다. 수용액 (실시예 4) 또는 DMSO (실시예 5)에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 폐렴구균 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접

합체를 사용하여 제제를 제조하였다. ST3-DTFB 접합체를 실시예 3에 따라 제조하였다. 개별 혈청형의 표적 최종 농도를 수득하는데 필요한 벌크 접합체의 필요한 부피를 배치 부피 및 벌크 폴리사카라이드 농도를 기준으로 계산하였다. 15종의 접합체를 염화나트륨, L-히스티딘, pH 5.8 완충제와 PS-20, PS-80 또는 P188로부터 선택된 부형제와 혼합하였다.

[0202] 멸균 제제화된 벌크를 벌크 알루미늄 포스페이트 아주반트 (APA)와 블렌딩하는 동안 및 그 후에 프로필렌 글리콜 (PG) 및 폴리에틸렌 글리콜 400 (PEG₄₀₀)과 함께 또는 그 없이 서서히 혼합하였다. 다양한 제제에서 2가지 농도의 접합체 및 APA를 연구하였다. 하나는 8 µg/mL 혈청형 6B 폴리사카라이드, 모든 다른 혈청형에 대해 4 µg/mL 폴리사카라이드, 및 250 µg/mL APA를 함유하였다. 다른 것은 16 µg/mL 혈청형 6B 폴리사카라이드, 모든 다른 혈청형에 대해 8 µg/mL 폴리사카라이드, 및 500 µg/mL APA를 함유하였다. 제제화된 백신을 2 - 8°C에서 저장하였다.

[0203] 실시예 8: 수용액에서의 환원성 아미노화에 의해 생성된 접합체를 함유하는 폐렴구균 접합체 백신 제제의 안정성에 대한 부형제의 영향

[0204] 실시예 7에 기재된 바와 같이 제조된 15가 폐렴구균 접합체 백신 (PCV15)의 안정성을 교반, 재순환 및 회전 교반 연구 후 다양한 부형제 조건에 대해 평가하여, 발생할 수 있는 제조 및 적송 스트레스를 모의실험하였다. 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM 염화나트륨, 및 실시예 7에 열거된 2가지 농도의 접합체 및 APA 중 어느 하나를 사용하여 PCV15를 제조하였다. 결과가 상이한 농도의 접합체 및 APA를 함유한 두 제제 사이에서 매우 유사하였기 때문에, 단지 보다 낮은 농도의 접합체 및 APA를 함유한 PCV15 제제의 결과만을 본 실시예에 제시하였다. 교반 연구를 위해, PCV15 제제를 유리 용기에서 자기 교반 막대를 사용하여 혼합하였다. 재순환 및 전단 연구를 위해, PCV15 제제를 튜브 루프에서 재순환시켰다. 회전 연구를 위해, 실시예 7 및 표 2에 요약된 바와 같이 PCV15 베이스 제제 (L-히스티딘, pH 5.8 및 염화나트륨)를 제조하고 계면활성제 또는 안정화제를 첨가하였다. 4°C에서 최대 24시간 동안 회전 즉 교반을 사용하여 교반 연구를 설계하였다. 시각적 평가를 사용하여 제제를 평가하였다. 용기를 통과하는 광빔의 경로는 미립자의 검출을 가능하게 하였다. 또한, 정적 광 산란 (SLS)을 사용하여 입자 크기 분포에 대한 제조 및 적송 및 취급 스트레스의 영향을 평가하였다. 현탁액 기재 약물 제품의 정적 광 산란은 입자 크기 분포에 의해 나타난 바와 같은 응집의 보다 민감한 검출을 가능하게 한다. PCV15 약물 제품의 단분산 (단일모드) 입자 크기 분포는 비-응집된 약물 제품을 나타낸다. 그러나, 다분산, 다모드 입자 크기 분포는 응집을 나타낸다.

[0205] 교반 연구에서의 PCV15의 안정성

[0206] 실시예 4에 기재된 바와 같이 수성 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드 약물 물질을 이용한 PCV15 제제 (PCV15_{Aq}로 지칭됨)를 상기와 같이 실험실 규모 혼합 실험 설정 (비커 및 자기 교반 막대)을 사용하여 스크리닝하였다. PCV15_{Aq}는 수성 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합된 에스. 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터의 폴리사카라이드를 함유한다. APA를 함유한 20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl 중의 PCV15를 비커 및 자기 교반 막대를 사용하여 100 mL 실험실 규모 배치 제조로 제조하였다. 계면활성제의 부재 하에, PCV15_{Aq} 제제는 백신 약물 제품의 균질성을 보장하기 위한 교반 동안 백신 약물 제품의 응집을 일으키는 (교반) 유도된 손상을 만들기 쉽다.

[0207] 비-이온성 트리블록 공중합체의 부류는 다양한 부형제의 스크리닝 연구 동안 강건한 안정성을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 응집을 제어하고 강건하며 안정한 백신 약물 제품 제제를 제공하기 위해 폴록사머 188 (P188)을 선택하였다. 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl, APA 및 P188 부재, 0.08% w/v P188 또는 0.24% w/v P188 중 어느 하나를 사용하여 PCV15_{Aq} 제제를 제조하였다. 자기 교반 막대를 사용하는 일정한 교반 하의 시간의 영향을 정적 광 산란을 사용하여 평가하였다 (도 6-7). 입자 크기 분포를 말번 마스테사이저(Malvern Mastersizer) 2000을 사용하여 평가하였다. 5 µm NIST 입자 크기 표준물을 실행시켰으며, 이는 예상되는 크기 분포를 생성하였다. 모든 제제 (폴록사머 188 함유 및 무함유)에 대해, APA에 대한 접합체의 첨가 후 단분산 히스토그램 프로파일이 관찰되었다 (T = 0시간 교반). 적제는 7시간의 연속 혼합 (T = 7시간 교반)에서, P188 무함유 제제는 증가된 입자 크기 분포 및 응집의 외관을 나타냈다 (도 6). 그러나, P188을 함유하는 제제는 어느 농도에서나 최대 24시간 연속 혼합 (T = 24시간 교반)시 증가된 입자 크기 또는 응집의 외관을 나타내지 않았다 (도 7).

- [0208] 수평 교반 연구에서의 PCV15의 안정성
- [0209] 0.2% w/v P188을 함유하거나 함유하지 않는 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 및 APA 중의 추가의 PCV15_{Aq} 제제를 실시예 7에 기재된 바와 같이 100 mL 실험실 규모 배치 제제로 제조하였다. 적송 및 취급을 모의실험하고 백신 약물 제품의 안정성에 대한 영향을 평가하기 위해, 수평 교반 연구를 이용하였다. 본 연구는 용기 폐쇄 시스템 (시린지 또는 바이알)에서 표면과의 상호작용을 통한 PCV15_{Aq} 제제의 직접 교반 및 최종 용기 성분 및 공기 계면에 대한 제제의 노출을 나타낸다. 0.64 mL를 시린지 내로 분배하고 마개를 막았다. 이들 시린지를 24시간 동안 2-8℃에서 수평으로 회전시키고, SLS를 사용하여 입자 크기 분포에 대해 평가하였다 (도 8a). 시각적 평가를 또한 수행하였다 (도 8b). P188의 부재 하에 모의 적송 및 취급 스트레스에 적용된 PCV15_{Aq} 제제는 용기 폐쇄 시스템, 예컨대 시린지에서 약물 제품의 입자 크기 분포의 증가 및 응집 및 응괴의 시각적 징후를 나타낸다. P188을 함유한 PCV15 제제는 입자 크기 분포의 증가 또는 응집 및 응괴의 시각적 징후를 나타내지 않았다.
- [0210] 실시예 9: 수용액 및 DMSO 용액에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 접합체의 혼합물을 사용하여 제조된 페렴구균 접합체 백신 약물 제품 안정화에 대한 부형제의 영향
- [0211] 강건한 제조가능하며 상업적으로 실행가능한 백신 약물 제품 제제를 보장하기 위해 실험실 규모 모의 적송 연구를 사용하여 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 중의 APA를 함유한 다중 15가 (PCV15) 제제를 평가하였다. 제제 PCV15_{Aq}는 수용액에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 페렴구균 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체를 함유하였다. 제제 PCV15_{Aq/비-Aq}는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 혈청형 6A, 6B, 7F, 19A, 19F 및 23F 접합체 및 수용액에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18C, 22F 및 33F 접합체를 함유하였으며, 여기서 모든 폴리사카라이드는 CRM₁₉₇에 접합되었다. 제제 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}는, 혈청형 3이 CRM₁₉₇이 아니라 DTFB 단백질에 접합된 것을 제외하고는, PCV15_{Aq/비-Aq}와 유사하였다. 결과가 실시예 7에 열거된 상이한 농도의 접합체 및 APA를 함유한 두 제제 사이에서 매우 유사하였기 때문에, 달리 명시되지 않는 한, 단지 보다 낮은 농도의 접합체 및 APA를 함유한 PCV15 제제에 대한 결과만을 본 실시예에 제시하였다. 상이한 페렴구균 접합체 백신 제품에서의 PS-80의 적합성을 시험하기 위한 다가 제제의 또 다른 예로서 프레브나르 130을 사용하였다. 이는 CRM₁₉₇ 담체 단백질에 접합된 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 폴리사카라이드, 폴리소르베이트 80, 숙시네이트 완충제 및 알루미늄 포스페이트 아주반트를 함유한다. 접합체는 DMSO를 사용하거나 또는 수성 조건 하에 환원성 아미노화를 사용하여 제조된다.
- [0212] 백신 제제의 안정성에 대한 영향을 평가하기 위해, 수평 교반 연구를 이용하였다. 본 연구는 용기 폐쇄 시스템 (시린지 또는 바이알)에서 표면과의 상호작용을 통한 제제의 직접 교반 및 최종 용기 성분 및 공기 계면에 대한 제제의 노출을 나타낸다. 제제를 0.64 mL 충전으로서 시린지 내로 분배하고 마개를 막았다. 이들 시린지를 2-8℃에서 최대 8시간 동안 수평으로 회전시켰다. 입자 크기 분포에 대한 수평 교반 하의 시간의 영향을 정적 광산란 (SLS)을 사용하여 평가하였다. 말번 마스테사이저 2000을 사용하여 입자 크기 및 분포를 평가하였다. 5 μm NIST 입자 크기 표준물을 실행시켰으며, 이는 예상된 크기 분포를 생성하였다. 도 9에 제시된 바와 같이, P188은 PCV15_{Aq} 제제에 대한 강건한 안정화제임에도 불구하고 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제에 대한 응집을 제어하기 위한 효과적인 안정화제는 아니었다. P188을 함유한 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제에서 입자 크기 분포의 증가 및 응집 및 응괴의 시각적 징후가 나타났다.
- [0213] P188은 DMSO에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 접합체를 함유한 PCV15 제제에 강건한 안정성을 제공하지 않았다는 놀라운 발견으로 인해, 추가의 안정화제 및 부형제를 스크리닝하였다. PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제 (20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 및 다양한 안정화제 중 APA 함유)를 시린지 내로 분배하고 수평 교반을 사용하여 스크리닝하였다. 일정한 수평 회전 하의 시간의 영향을 시각적 평가를 사용하여 평가하였다 (표 2).
- [0214] 표 2: 시린지에서 1시간의 교반 및 최대 24시간의 수평 회전 후에, 계면활성제 부재, P188 존재, PS-80 존재 또는 PS-20 존재 하에 64 μg PnPs/mL 및 250 μg/mL APA를 함유하는 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제의 시각적 관찰. 패닝은 용기 폐쇄 시스템 (예를 들어 시린지 또는 바이알)의 표면 상에 약물 제품 제제의 침착을 지칭하고, 제제의 표면 침전을 나타낸다.

PCV15 제제	회전 부재	1 hr 회전	3 hr 회전	6 hr 회전	8.5 hr 회전	24 hr 회전
계면활성제 부재	응집 부재	약간의 패닝	패닝	패닝	패닝	미립자
0.05% w/v P188	응집 부재	패닝	패닝	패닝	더 이른 시점에서의 패닝으로 인해 시험되지 않음	
0.1% w/v P188	응집 부재	적은 패닝	적은 패닝	적은 패닝		
0.5% w/v P188	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
0.7% w/v P188	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
1.0% w/v P188	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
0.005% w/v PS-80	응집 부재	패닝	패닝	패닝	더 이른 시점에서의 패닝 또는 미립자로 인해 시험되지 않음	
0.01% w/v PS-80	응집 부재	패닝	패닝	패닝		
0.05% w/v PS-80	응집 부재	패닝	패닝	패닝		
0.005% w/v PS-20	응집 부재	패닝	패닝 및 작은 미립자	패닝 및 큰 미립자		
0.01% w/v PS-20	응집 부재	패닝	패닝	패닝 및 큰 미립자		
0.05% w/v PS-20	응집 부재	응집 부재	응집 부재	적은 패닝	적은 패닝	미립자
0.07% w/v PS-20	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
0.1% w/v PS-20	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재

[0215]

[0216]

PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제의 시각적 평가는 보다 높은 P188 및 PS-20 농도에서 응집의 징후를 나타내지 않았다 (표 2). 그러나, P188 (0.05% w/v 내지 1.0% w/v) 또는 PS-20 (0.005% w/v - 0.1% w/v)을 함유하는 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제의 육안으로 보이지 않는 입자 크기 분포를 평가하기 위한 보다 고해상도 연구를 SLS를 사용하여 수행하였다. 이들 제제를 1.5 mL 하이팩 시린지 (벡톤-딕킨슨(Becton-Dickinson))에서 최대 24시간 동안 수평으로 회전시켰다. SLS에 의해 측정된 바와 같은 D[4,3] 값은 도 10a-b에 제시되어 있다. D[4,3] 결과는 보다 높은 농도의 PS-20이 제제의 물리-화학적 안정성을 유의하게 개선시켰으며 P188은 모든 농도에서 효과적이지 않았다는 것을 보여준다. 도 10b에 제시된 바와 같이, 프레브나르 13®의 최대 24시간 동안의 수평 교반은 D[4,3] 값의 증가 및 미립자의 증가를 보여주었으며, 이는 제제가 모의 적송 유도된 응집으로부터 충분히 보호되지 않았고 본 발명자들의 제제에서 PS-80을 사용한 본 발명자들의 경험과 유사하였다는 것을 나타낸다.

[0217]

PS-20 및 PS-80을 사용한 본 발명자들의 데이터에 기초하여, 비양성자성 용매에서 생성된 1종 이상의 접합체를 함유하는 다른 페럼구균 폴리사카라이드-단백질 접합체에서 안정성의 개선이 예상될 것이다.

[0218]

실시예 10: PCV15에서 제제화된 ST3-DTFB 접합체를 사용한 새끼 레서스 원숭이 (IRM) 면역원성 연구

[0219]

실시예 1 (다중모드 양이온 교환 크로마토그래피)에 기재된 바와 같이 제조된 DTFB를 사용하여 실시예 3에 기재된 바와 같이 ST3-DTFB 접합체를 제조하였다. 실시예 7에서와 같이 PCV15 제제를 제조하였다. IRM (새끼 레서스 원숭이, n=8/군)을 제0일, 제28일 및 제56일에 하기 표 3에 기재된 바와 같이 100 μ L 백신을 사용하여 근육 내로 (부문 1-4) 면역화시켰다. 연구 시작 전 (pre) 및 제14일, 제28일, 제42일, 제56일 및 제70일에 혈청을 수집하였다. IRM을 질병 또는 불쾌감의 임의의 징후에 대해 훈련된 동물 관리 스태프에 의해 1일 2회 관찰하였다. IRM에서의 백신 제제는 백신-관련 유해 사건이 나타나지 않았으므로 안전하고 잘 허용되는 것으로 간주되었다.

[0220] 표 3: 새끼 레서스 원숭이 연구 제제

부분	제제	PnPs 용량 (μg)	접합 과정	혈청형 3에 대한 단백질 담체
1	20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% w/v P188, 250 μg/mL APA 중 PCV15 _{Aq}	6B에 대해 0.8 μg, 모든 다른 혈청형에 대해 0.4 μg	수용액에서 단백질 담체에 접합된 모든 PnPs 혈청형	CRM ₁₉₇
2	20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% w/v P188, 250 μg/mL APA 중 PCV15 _{Aq/비-Aq}		DMSO에서 단백질 담체에 접합된 혈청형 6A, 6B, 7F, 19A, 19F, 23F; 수용액에서 단백질 담체에 접합된 다른 혈청형	DTFB
3	20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 0.2% w/v P188, 250 μg/mL APA 중 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}			
4	20 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl, 0.1% w/v PS-20, 250 μg/mL APA 중 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}			

[0221]

[0222] IgG 반응을 평가하기 위해 WHO ELISA가 완료된 단일 PnPs 혈청형 3을 갖는 1가 접합체를 사용하여 실시예 6에 기재된 마우스 연구를 완료하였다. 15가 백신에서 혈청형-특이적 IgG 반응을 평가하기 위해, 전기화학 자극시 광을 방출하는 술포-태그(SULFO-TAG)TM 표지를 이용하는 MSD 기술 (MSD는 미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재 메소스케일 다이아그노스틱스, 엘엘씨.(MesoScale Diagnostics, LLC.)의 자회사인 메소스케일 디스커버리 (MesoScale Discovery)의 상표임)을 사용하여 문헌 [Marchese et al.]에 기재된 인간 검정에 기초하여 레서스 원숭이 혈청에서 사용하기 위한 멀티플렉스화 전기화학발광 (ECL) 검정을 개발하였다. 새끼 원숭이 샘플을 시험할 때 인간 항체 시약 및 표준물을 사용하였다. 새끼 레서스 원숭이 결과를 인간 참조 표준물 (007sp)에 배경된 혈청형-특이적 IgG 농도를 사용하여 표준 곡선으로부터 판독된 기하 평균 농도로 표현하였다.

[0223]

혈청형 3 3회 투여-후 (PD3) IgG 반응 (도 11)은 면역화된 군 사이에 임의의 통계적 차이를 나타내지 않았다. 에스. 뉴모니아에 혈청형 3을 사용한 OPA 검정에서 평가된 기능적 항체 (도 12)는 면역화된 군 사이에 어떠한 통계적 차이도 나타내지 않았다.

[0224]

실시예 11: PCV15 제제의 최적화

[0225]

결과가 실시예 7에 열거된 상이한 농도의 접합체 및 APA를 함유한 두 제제 사이에서 매우 유사하였기 때문에, 달리 명시되지 않는 한 단지 보다 낮은 농도의 접합체 및 APA를 함유한 PCV15 제제에 대한 결과만을 본 실시예에 제시하였다.

[0226]

백신 약물 제품을 시린지 및 바이알 충전 기계에 공급하기 위해 PCV15 제제화 공정에서 재순환 라인이 사용된다. 상용 충전 동안의 재순환은 생물요법 약물 제품에 추가의 전단 및 스트레스를 부여하고, 따라서 평가하기 위한 중요한 처리 단계이다. 0.2% w/v P188 및 0.1% w/v PS-20을 함유하는 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 및 제제 (64 μg/mL 총 폴리사카라이드 및 250 μg/mL APA를 함유한 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 중)에 대한 재순환의 영향을 평가하기 위해 연구를 수행하였다. 연동 펌프를 사용하여 180 mL/분의 유량으로 공급 용기로부터 배관을 통해 24시간 동안 제제를 재순환시켰다. 자석 교반 막대를 사용하여 공급 용기를 연속적으로 혼합하고, 시각적 관찰을 위해 샘플을 주기적으로 취하였다. P188을 함유하는 제제는 응괴 또는 시각적 응집의 외관을 나타냈고 (표 4), 한편 PS-20을 함유하는 제제는 시각적 응집의 징후를 나타내지 않았다.

[0227]

표 4: 24시간의 연속 혼합 및 재순환 동안 0.2% w/v P188 또는 0.1% w/v PS-20을 함유하는 PCV15 제제의 시각적 평가

PCV15 제제	재순환 시간							
	0 시간	0.5 시간	1 시간	3 시간	6 시간	8 시간	12 시간	24 시간
0.2% w/v P188을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}	부재	부재	부재	부재	부재	부재	부재	존재
0.1% w/v PS-20을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}	부재	부재	부재	부재	부재	부재	부재	부재

[0228]

[0229] 부재 = 응집 부재; 존재 = 재순환 용기에서 응집이 관찰됨

[0230]

최대 500 μg/mL (w/v Al⁺³) APA 및 P188 또는 PS-20을 함유한 PCV15_{Aq/비-Aq} 및 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제를 사용하

여 추가의 재순환 연구를 수행하였다. 일정하게 혼합하면서 24시간의 재순환 후에, 제제를 시린지 내로 분배하고, 최대 24시간 동안 수평으로 교반하였다. 제제를 검사하였으며, 시린지에 대한 시각적 평가의 요약을 표 5에 제시한다. 이들 결과는 PS-20이 상용 제조 및 적송 및 취급 동안 발생할 수 있는 물리적 불안정성 또는 응집에 대한 강건한 해결책을 제공한다는 것을 나타낸다. P188은 PCV15_{Aq} 제제를 안정화하는데 있어서 그의 성공에도 불구하고 이러한 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제에 대해 적절한 안정성 프로파일을 제공할 수 없었다 (도 7-9).

[0231] 표 5: 1.5 mL 하이팩 시린지에서 24시간의 혼합 및 재순환 및 최대 24시간의 수평 회전 후에 0.1% w/v PS-20 또는 0.2% w/v P188을 함유한 PCV15 제제의 시각적 평가

PCV15 제제	24시간의 재순환 후 수평 회전 시간					
	0 시간	1 시간	3 시간	6 시간	10 시간	24 시간
0.2% w/v P188을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}	작은 응집체	작은 응집체	작은 응집체	큰 응집체	매우 큰 응집체	완전히 침전된 매우 큰 응집체
0.1% w/v PS-20을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
0.1% w/v PS-20을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq}	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
0.2% w/v PS-20을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq}	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재

[0232]

[0233] DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 ST18C를 제조한 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제 (PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB/ST18C-비-Aq})에 대해 추가의 연구를 수행하였다. PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB/ST18C-비-Aq} 제제를 64 µg/mL 총 폴리사카라이드, 250 µg/mL APA 및 0.2% w/v PS-20을 함유한 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 중에서 제조하였다. PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB/ST18C-비-Aq} 제제를 일정하게 혼합하면서 최대 6시간 동안 재순환시킨 후에, 제제를 시린지 내로 분배하고 최대 24시간 동안 수평으로 교반하였다. 상기 제제를 검사하였으며, 시린지에 대한 시각적 평가의 요약을 표 6에 제시한다. 이들 결과는 PS-20이, 250 µg/mL APA 및 0.2% w/v PS-20을 함유한 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 중에서 제조된 PCV15 제제를 포함하고, DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F 접합체 및 수용액에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F 접합체를 함유하며, 여기서 모든 폴리사카라이드는 CRM₁₉₇에 접합된 것인 제제에서 상용 제조 및 적송 및 취급 동안 발생할 수 있는 물리적 불안정성 또는 응집에 대한 강건한 해결책을 제공한다는 것을 나타낸다.

[0234] 표 6: 1.5 mL 하이팩 시린지에서 24시간의 혼합 및 재순환 및 최대 24시간의 수평 회전 후에 0.2% w/v PS-20을 함유한 PCV15 제제의 시각적 평가

PCV15 제제	24시간의 재순환 후 수평 회전 시간			
	0 시간	8 시간	16 시간	24 시간
0.2% PS20을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB/ST18C-비-Aq}	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재

[0235]

[0236] 도 10 및 표 4-5에 제시된 바와 같이, P188 단독은 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 생성된 접합체 및/또는 ST3-DTFB 접합체로 구성된 현탁액-기재 PCV15 제제의 응집을 방지하는데 있어서 최소 이익을 제공하였다. 0.2% w/v P188 및 PEG₄₀₀ (PEG) 또는 프로필렌 글리콜 (PG) 안정화제를 함유하는 제제를 사용하여 추가의 혼합 및 수평 회전 연구를 수행하였다. PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제를 실시예 7에 기재된 바와 같이 500 mL 규모로 제조하였다. PEG₄₀₀ 또는 PG를 APA에 첨가하고, 이어서 접합체를 첨가하였다. PEG₄₀₀ 또는 PG의 최종 농도는 64 µg PnPs/mL, 250 µg/mL APA 및 0.2% w/v P188을 함유하는 제제에서 0% w/v 내지 15% w/v였다. 제제를 자기 교반 막대를 사용하여 1시간 동안 연속적으로 혼합하고, 시린지 내로 분배하였다. 시린지를 최대 24시간 동안 수평으로 교반하였다. 제제를 시각적 평가 및 SLS에 의한 입자 크기 분포 측정을 위해 주기적으로 샘플링하였다. 시린지의 시각적 평가로부터의 결과를 표 7-8에 제시한다. 입자 크기 분포 결과를 도 13에 제시한다. P188은 단독으로 첨가하였을 때, 제제에서 응집을 제어하지 않았다. 놀랍게도, PEG₄₀₀ 또는 PG는 P188과 조합하였을 때

적절한 안정성을 제공하였다.

[0237] 표 7: 1.5 mL 하이팩 시린지에서 1시간의 혼합 및 최대 24시간의 수평 회전 후에 0.2% w/v P188 및 다양한 PEG₄₀₀ 농도를 갖는 PCV15 제제의 시각적 평가

0.2% w/v P188을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}	1시간의 혼합 후 수평 회전 시간				
	0 시간	3 시간	6 시간	18 시간	24 시간
0% PEG ₄₀₀ 포함	응집 부재	응집 부재	작은 응집체	큰 응집체; 패닝	큰 응집체; 상당한 패닝
6% PEG ₄₀₀ 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	약간의 패닝 고리	작은 응집체; 약간의 패닝
8% PEG ₄₀₀ 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	약간의 패닝 고리
10% PEG ₄₀₀ 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
12% PEG ₄₀₀ 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
15% PEG ₄₀₀ 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재

[0238]

[0239] 표 8: 1.5 mL 하이팩 시린지에서 1시간의 혼합 및 최대 24시간의 수평 회전 후에 0.2% w/v P188 및 다양한 PG 농도를 갖는 PCV15 제제의 시각적 평가

0.2% w/v P188을 갖는 PCV15 _{Aq/비-Aq/ST3-DTFB}	1시간의 혼합 후 수평 회전 시간				
	0 시간	3 시간	6 시간	18 시간	24 시간
0% PG 포함	응집 부재	응집 부재	작은 응집체	큰 응집체; 약간의 패닝	큰 응집체; 패닝
8% PG 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	작은 응집체
10% PG 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재
15% PG 포함	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재	응집 부재

[0240]

[0241] 실시예 12: 페렴구균 접합체 백신의 안정화 제제의 면역원성

[0242] 제조 및 적층 유도 불안정성을 제어하도록 최적화된 PCV15 함유 제제의 새끼 레서스 원숭이 면역원성에 대한 영향을 평가하였다. 군당 8 마리의 동물은 실시예 11에 기재된 바와 같은 64 µg PnPs/mL, 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM 염화나트륨, 250 µg/mL APA, 및 0.2% w/v P188, 15% w/v PG 또는 0.1% w/v PS-20을 함유하는 0.1 mL의 PCV15_{Aq/비-Aq/ST3-DTFB} 제제를 사용한 근육내 주사를 받았다. 주사를 T=0 (1회 투여), 1개월령 (2회 투여) 및 2개월령 (3회 투여)에서 투여하였다. 1회 투여 전 및 1, 2 및 3회 투여로부터 2주 후에 혈청을 수집하였다. 면역-전, 1회 투여 후, 2회 투여 후 및 3회 투여 후 혈청 샘플로부터의 혈청 IgG 수준을 상기 실시예 10에 기재된 바와 같이 결정하였다. 도 14에 제시된 결과는 PS-20 또는 P188과 PG의 조합물을 함유한 PCV15 제제가 면역원성이었다는 것을 나타낸다.

[0243]

실시예 13: 양성자성 (수성) 및 비양성자성 (DMSO) 용액에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 상이한 접합체의 혼합물을 사용하여 제조된 페렴구균 접합체 백신 약물 제품의 안정화에 대한 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80의 영향

[0244]

상기 실시예에서 PCV15 제제에서 관찰된 유망한 결과는 DMSO 대 수성 조건에서 제조된 당접합체 내 단백질 수준의 비의 하한 및 상한의 탐구를 보증해 주었다. 상이한 비의 당접합체를 갖는 다중 다가 PCV 제제는 수용액 또는 DMSO에서 환원성 아미노화에 의해 생성된 페렴구균 폴리사카라이드-CRM₁₉₇ 접합체를 함유하였다. 각각의 제제를 단백질의 양에 대해 정규화하였으며, 이는 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM NaCl 중 250 µg/mL APA와 총 폴리사카라이드 (Ps) 농도 64 µg/mL (w/v Ps)를 함유하였다. PS-80 또는 PS-20 중 어느 하나를 각각의 제제에 첨가하여 PS-80 (0.05% w/v) 또는 PS-20 (0.05% w/v) 또는 PS-20 (0.2% w/v)의 최종 농도를 달성하였다. 제제를 BD 하이팩 사전충전 시린지 내로 분배하고, 강건한 제조가능하며 상업적으로 실행가능한 백신 약물 제품 제제를 보장하기 위해 실험실 규모 모의 적층 연구를 사용하여 평가하였다.

[0245]

DMSO를 사용하여 제조된 당접합체의 목적하는 백분율 범위를 달성하기 위해, 모든 폴리사카라이드를 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합시킨 하기 제제를 제조하였다:

[0246]

제제 PCV_{24F}는 DMSO에서 제조된 혈청형 6A, 6B 및 23F 접합체 및 수용액에서 제조된 혈청형 1, 3, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 및 33F 접합체를 함유하였다. 이러한 제제 중 총 단백질은 56 µg/mL였고, 13 µ

g/mL 또는 총 단백질의 ~24%는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 폴리사카라이드에 접합된 CRM₁₉₇로 이루어져 있었다.

[0247] 제제 PCV_{50%}는 DMSO에서 제조된 혈청형 6A, 6B, 7F, 19A, 19F 및 23F 접합체 및 수용액에서 제조된 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 18C, 22F 및 33F 접합체를 함유하였다. 이러한 제제 중 총 단백질은 62 µg/mL였고, 31 µg/mL 또는 총 단백질의 50%는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 폴리사카라이드에 접합된 CRM₁₉₇로 이루어져 있었다.

[0248] 제제 PCV_{62%}는 DMSO에서 제조된 혈청형 6A, 6B, 7F, 19A, 19F 및 23F 접합체 및 수용액에서 제조된 혈청형 1, 5, 9V, 14, 18C, 22F 및 33F 접합체를 함유하였다. 이러한 제제 중 총 단백질은 61 µg/mL였고, 38 µg/mL 또는 총 단백질의 ~62%는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 폴리사카라이드에 접합된 CRM₁₉₇로 이루어져 있었다.

[0249] 제제 PCV_{79%}는 DMSO에서 제조된 혈청형 6A, 6B, 7F, 19A, 19F 및 23F 접합체 및 수용액에서 제조된 혈청형 1, 5, 18C 및 33F 접합체를 함유하였다. 이러한 제제 중 총 단백질은 63 µg/mL였고, 50 µg/mL 또는 총 단백질의 ~79%는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 폴리사카라이드에 접합된 CRM₁₉₇로 이루어져 있었다.

[0250] 제제 PCV_{100%}는 DMSO에서 환원성 아미노화를 사용하여 제조된 혈청형 6A, 6B, 7F, 19A, 19F 및 23F 접합체를 함유하였다. 이러한 제제 중 총 단백질은 65 µg/mL였고, 65 µg/mL 또는 총 단백질의 100%는 DMSO에서 폴리사카라이드에 접합된 CRM₁₉₇로 이루어져 있었다.

[0251] DMSO에서 폴리사카라이드에 접합된 단백질 대 총 단백질의 비의 생성물 안정성에 대한 영향을 평가하기 위해 수평 교반 연구를 이용하였다. 본 연구는 용기 폐쇄 시스템 (시린지 또는 바이알)에서 표면과의 상호작용을 통한 제제의 직접 교반 및 최종 용기 성분 및 공기 계면에 대한 제제의 노출을 나타낸다. 제제를 0.64 mL 충전으로서 시린지 내로 분배하고 마개를 막았다. 이들 시린지를 최대 24시간 동안 2-8°C에서 수평으로 회전시켰다. 입자 크기 분포에 대한 수평 교반 하의 시간의 영향을 정적 광 산란 (SLS)을 사용하여 평가하였다. 말번 마스 테사이저 2000을 사용하여 입자 크기 및 분포를 평가하였다. 5 µm NIST 입자 크기 표준물을 실행시켰으며, 이는 예상된 크기 분포를 생성하였다. 도 15a-e에 제시된 바와 같이, PS-80은 모든 PCV 함유 약물 제품 (PCV_{24%} 내지 PCV_{100%})에 대해 응집을 제어하기 위한 효과적인 안정화제가 아니었다. PS-80을 함유한 모든 제제에서 입자 크기 분포의 증가 및 응집 (입자의 외관) 및 응괴의 시각적 징후가 관찰되었다.

[0252] 놀랍게도, PS-80에 대해 사용된 농도와 대등한 농도의 PS-20은 시험된 DMSO 접합체 백분율의 범위에 걸쳐 개선된 안정성 프로파일을 제공하였다. 제제 완충제 중 0.2% PS-20의 농도를 달성하도록 PS-20을 첨가한 것은 시험된 DMSO 접합체 백분율의 범위에 걸쳐 0.05% PS-20과 비교하여 우수한 안정성을 가져왔다.

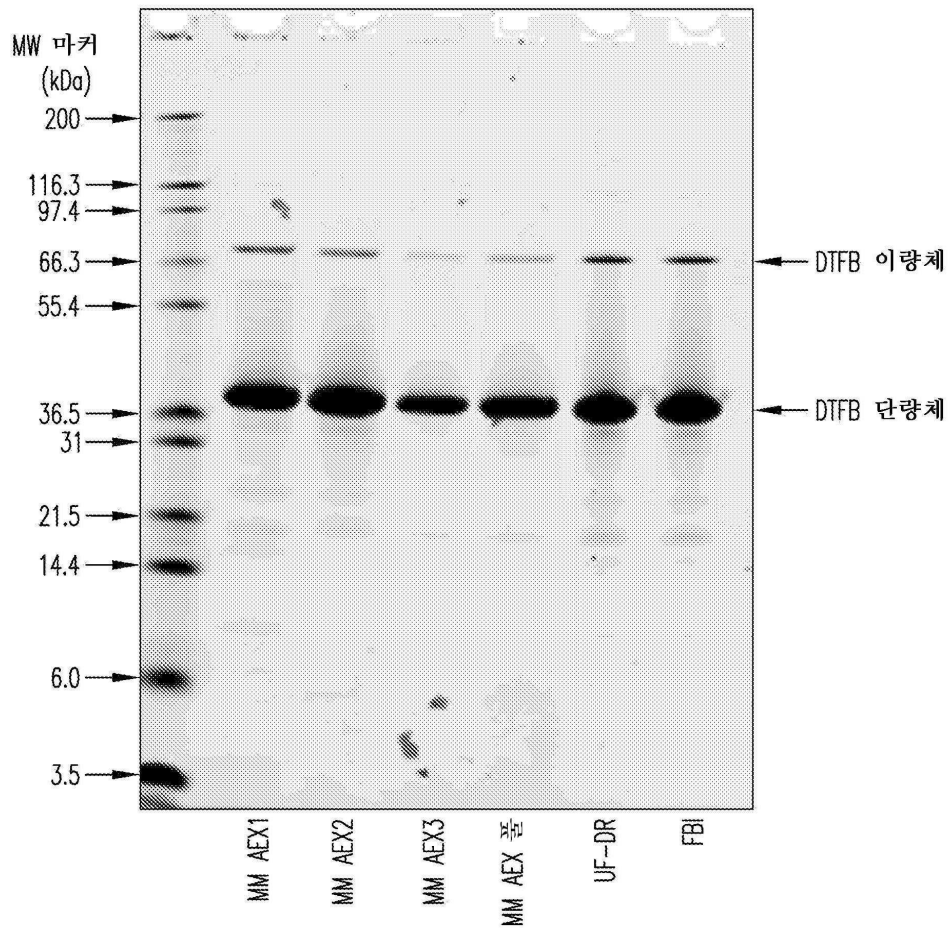
[0253] 실시예 14: 뉴질랜드 백색 토끼에서의 폐렴구균 접합체 백신의 안정화 제제의 면역원성

[0254] 제조 및 적송 유도 불안정성을 제어하도록 최적화된 PCV15 함유 제제의 뉴질랜드 백색 토끼 면역원성에 대한 영향을 평가하였다. 군당 8 마리의 동물은 실시예 11에 기재된 바와 같은 64 mg PnPs/mL, 20 mM L-히스티딘, pH 5.8, 150 mM 염화나트륨, 250 µg/mL APA 및 0.2% w/v PS-20을 함유하는 0.1 mL의 PCV15Aq/비-Aq 제제를 사용한 근육내 주사를 받았다. 제0일 및 제14일에 주사를 투여하였다. 제0일 및 제14일 및 또한 제28일에 백신접종 전 혈청을 수집하였다. 면역-전, 1회 투여 후, 2회 투여 후 혈청 샘플로부터의 혈청 IgG 수준을 ECL 분석에 의해 결정하였다.

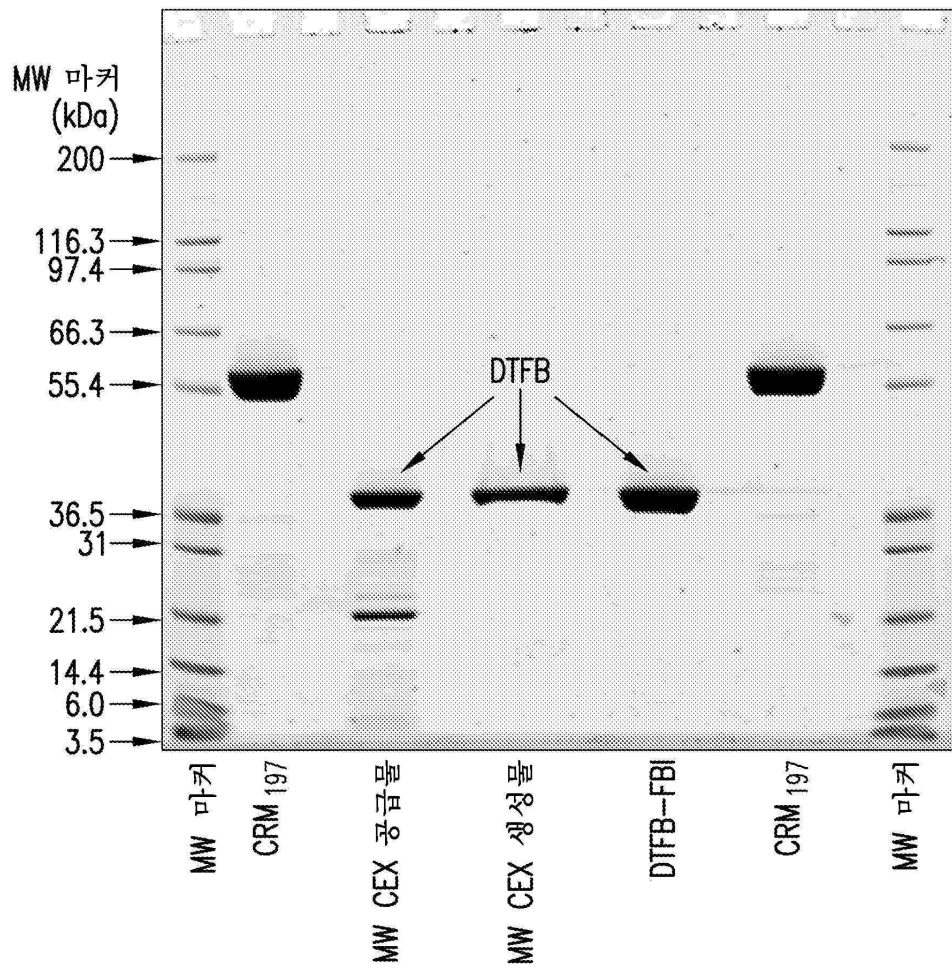
[0255] 도 16에 제시된 결과는 DMSO에서의 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 6A, 6B, 7F, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 및 수용액에서의 환원성 아미노화를 사용하여 CRM₁₉₇에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22F 및 33F로부터의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드를 가지며, 4 µg/mL의 각각의 사카라이드, 예외로 8 µg/mL의 6B; 및 약 64 µg/mL CRM₁₉₇ 담체 단백질을 함유하는 투여 형태로서 제제화된, 20 mM 히스티딘 pH 5.8, 150 mM NaCl, 250 µg/mL APA, 0.2% w/v PS-20 중 15가 폐렴구균 접합체 제제가 면역원성이라는 것을 나타낸다.

도면

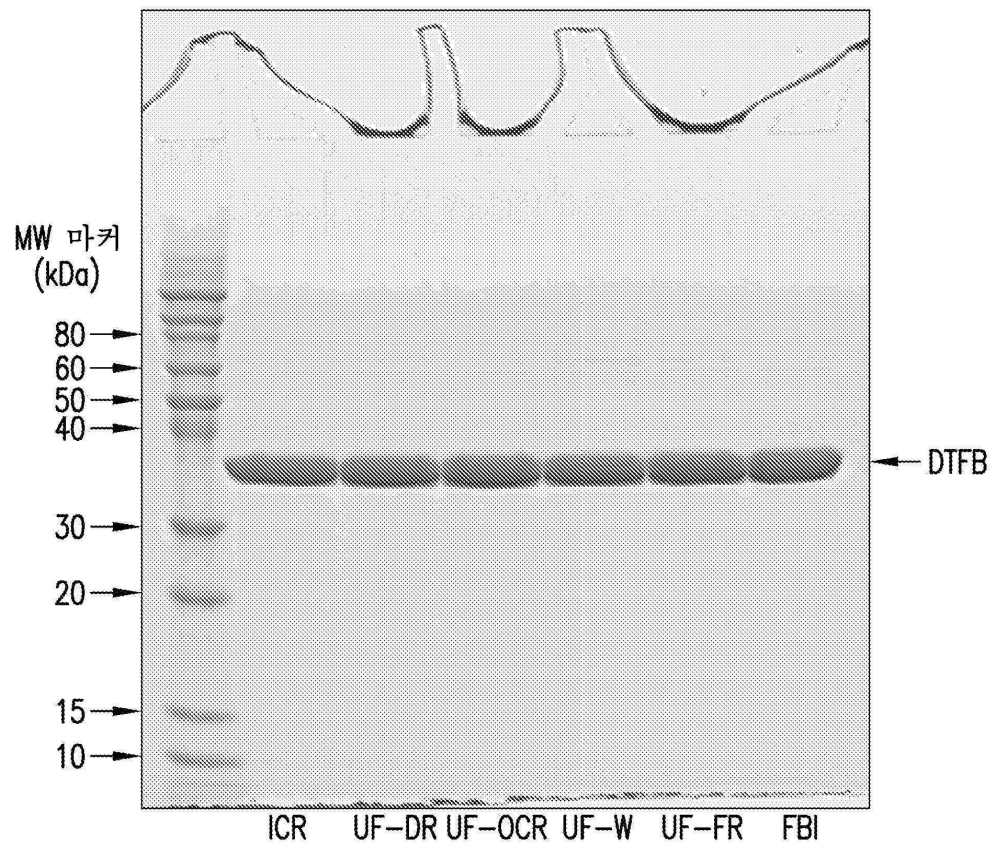
도면1a



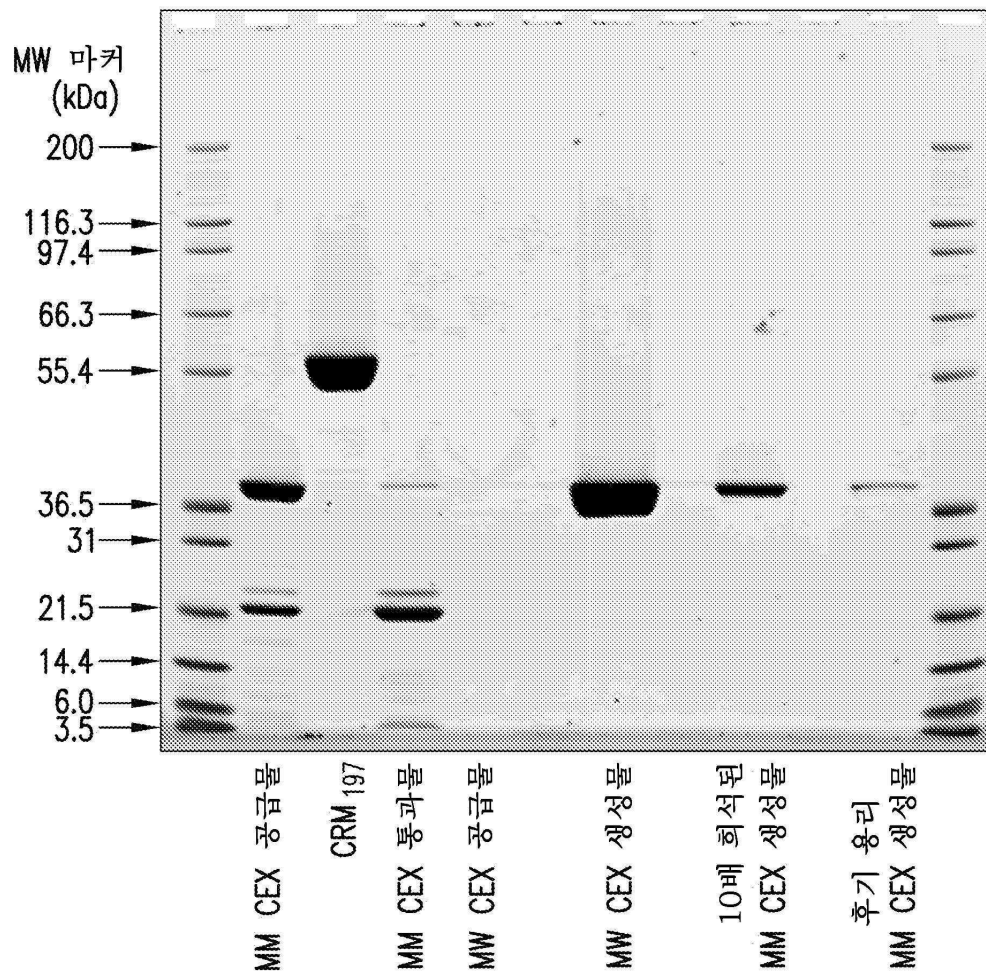
도면1b



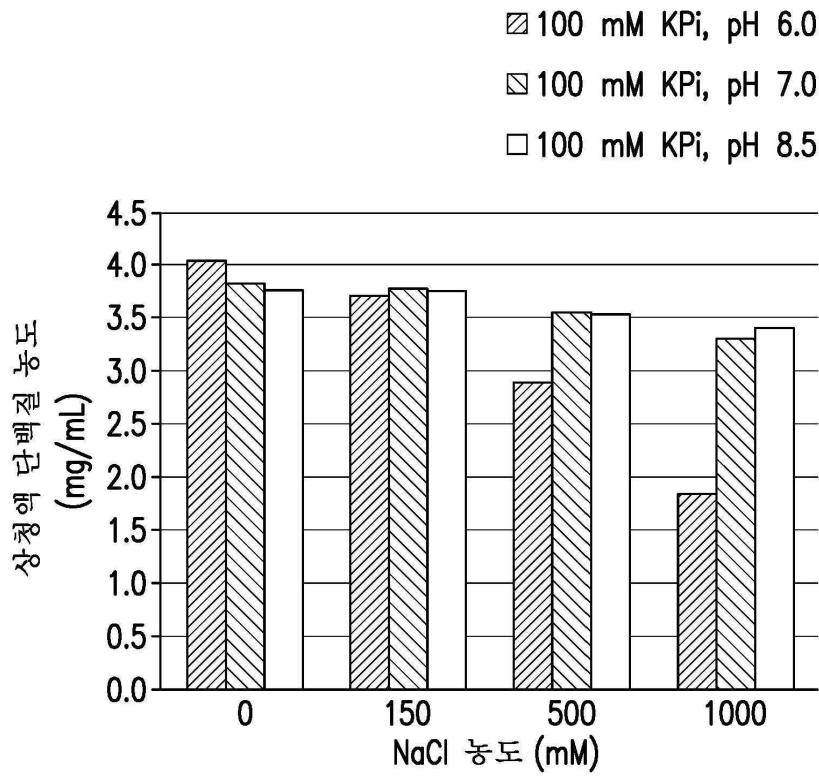
도면1c



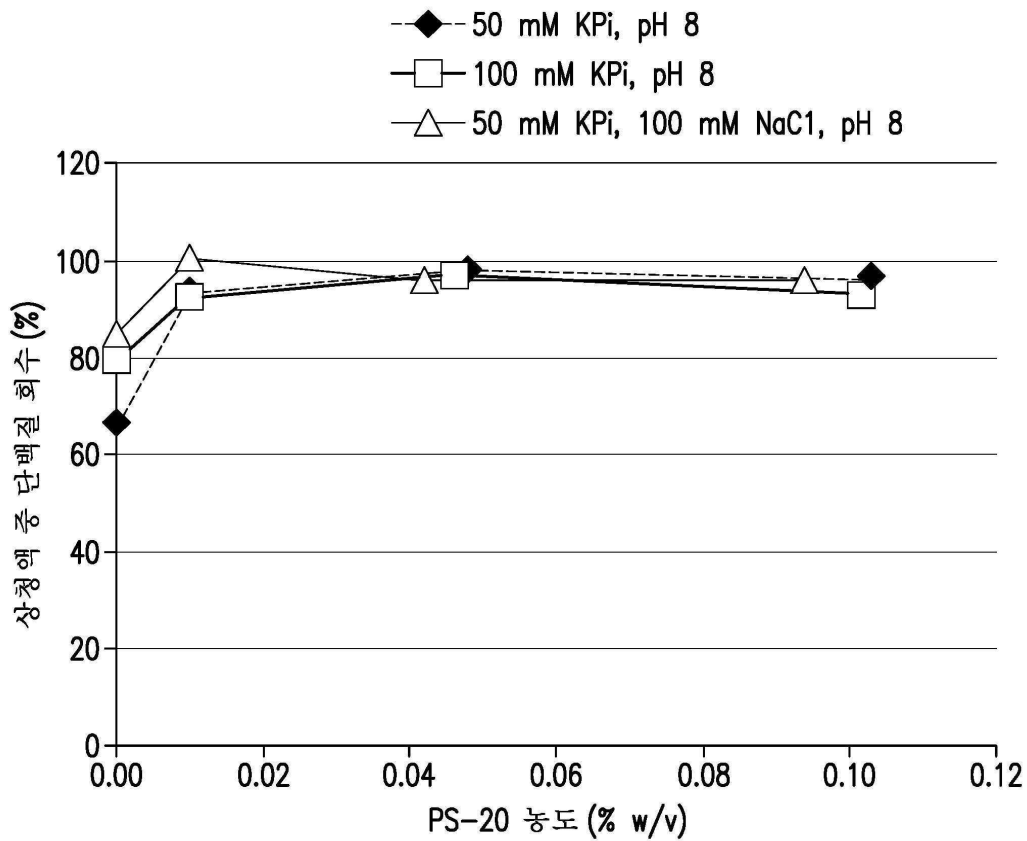
도면1d



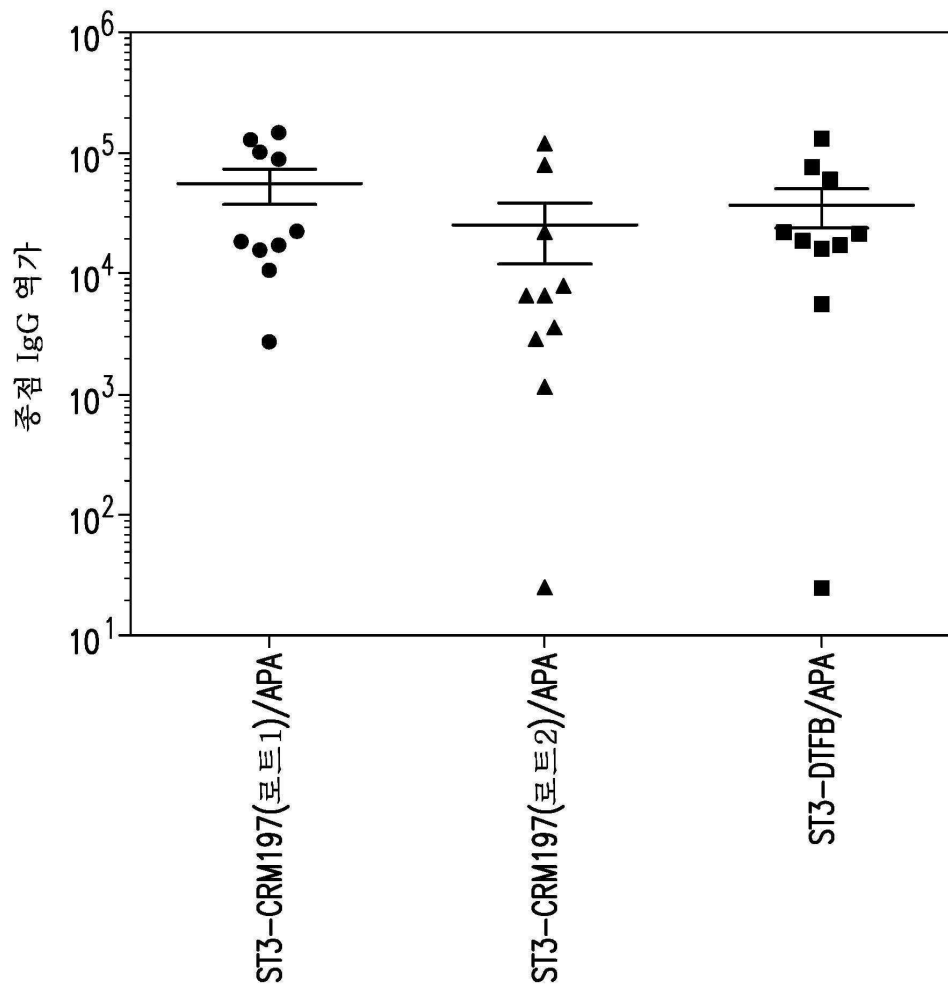
도면2



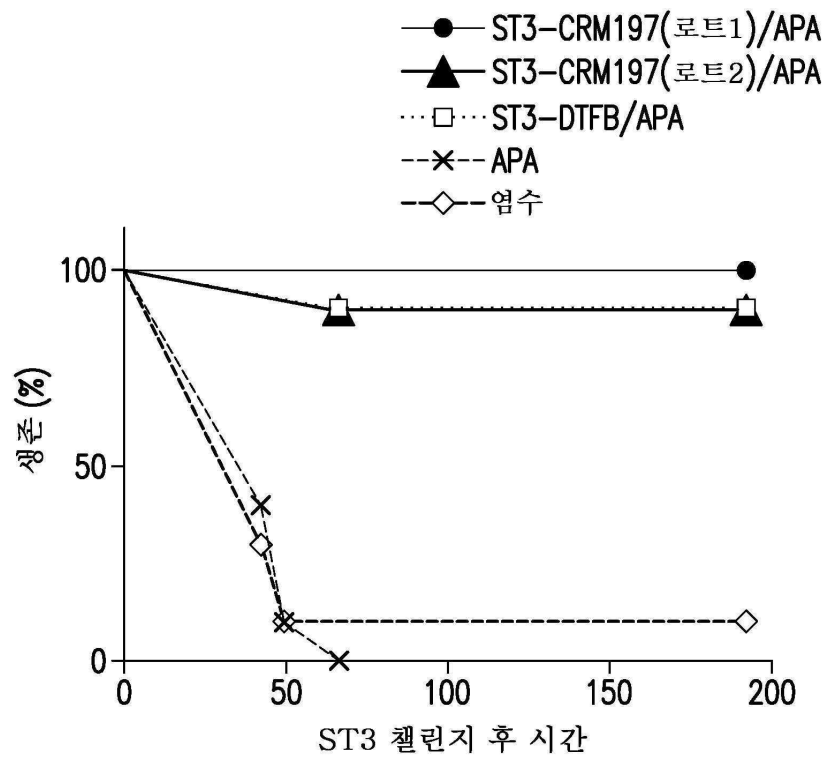
도면3



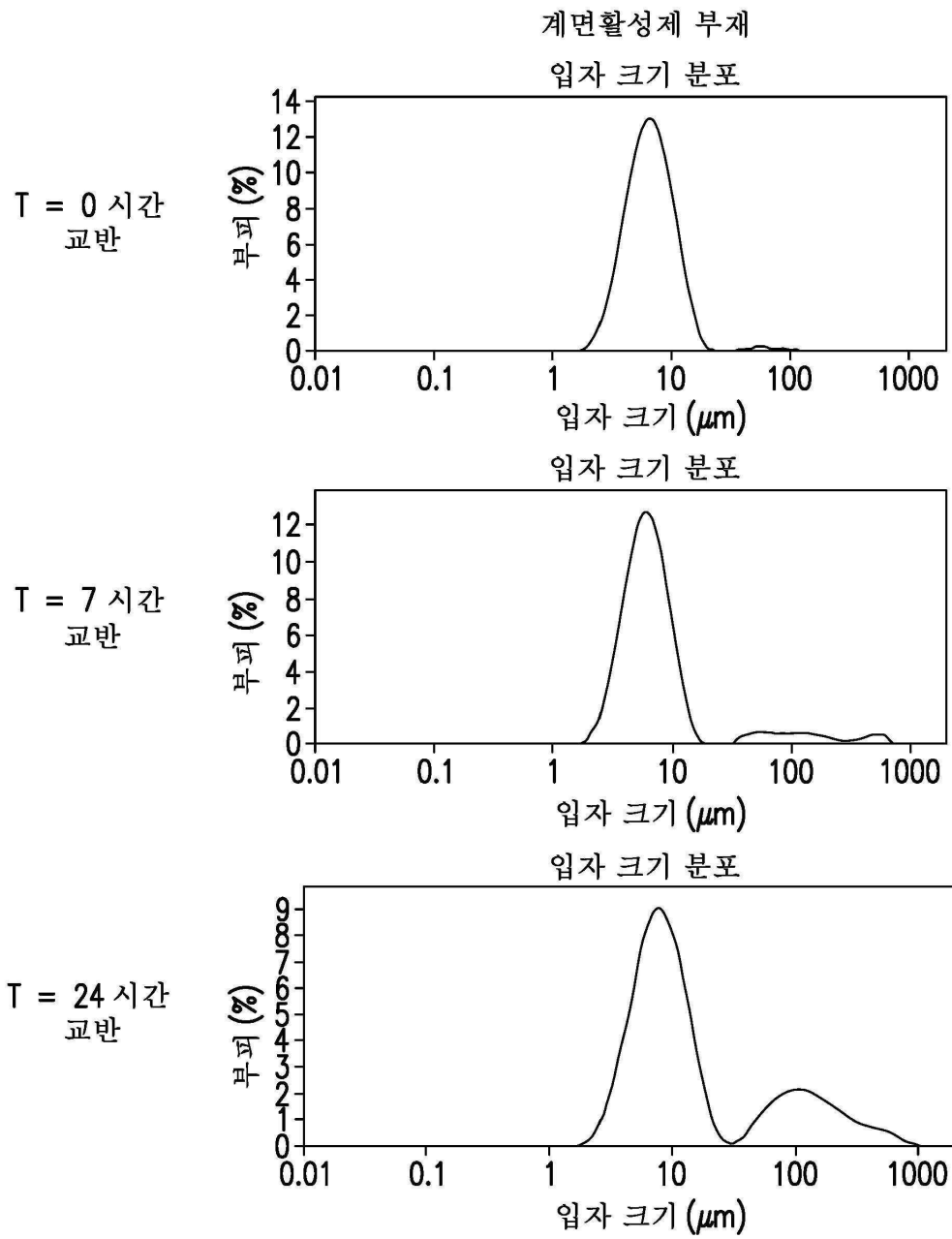
도면4



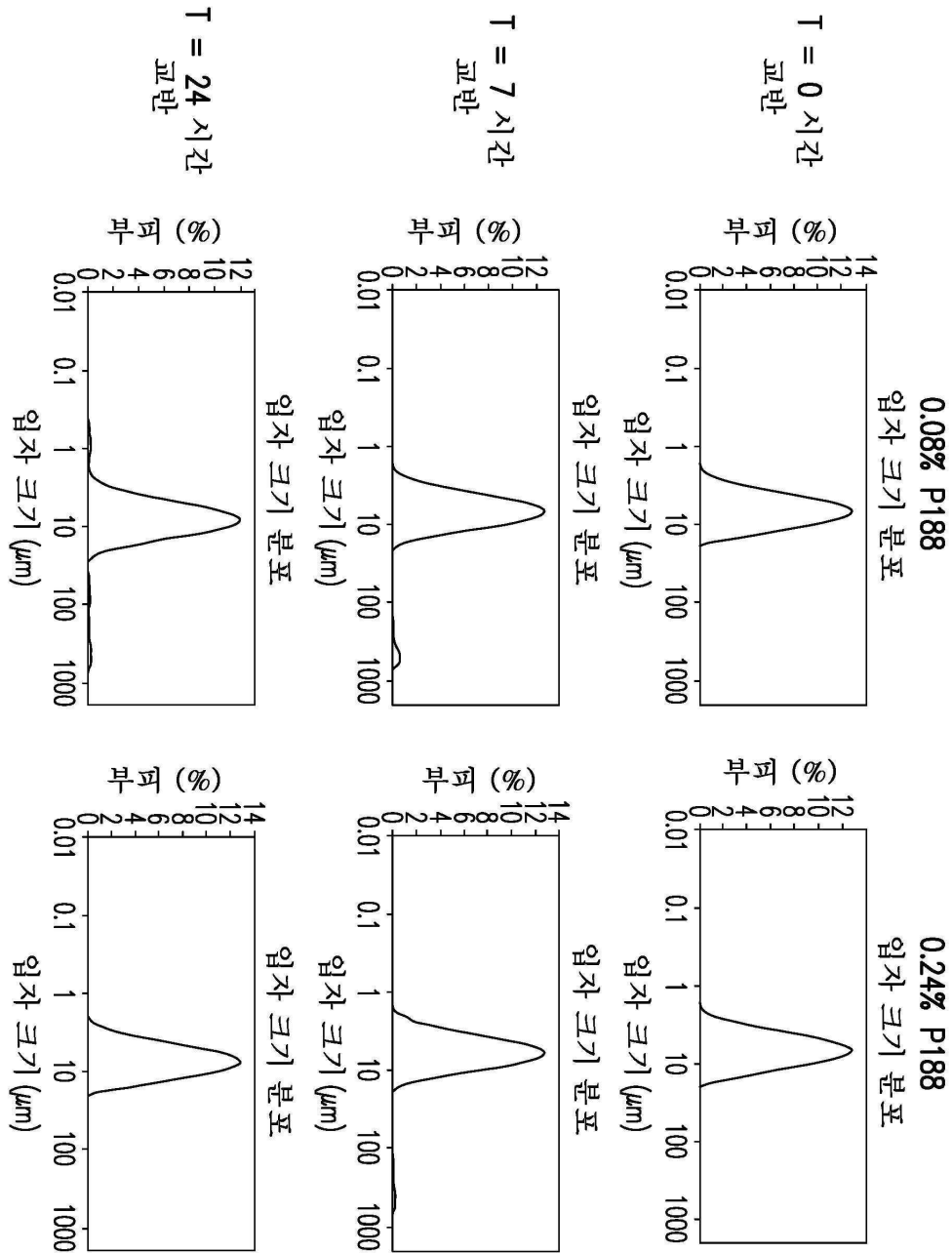
도면5



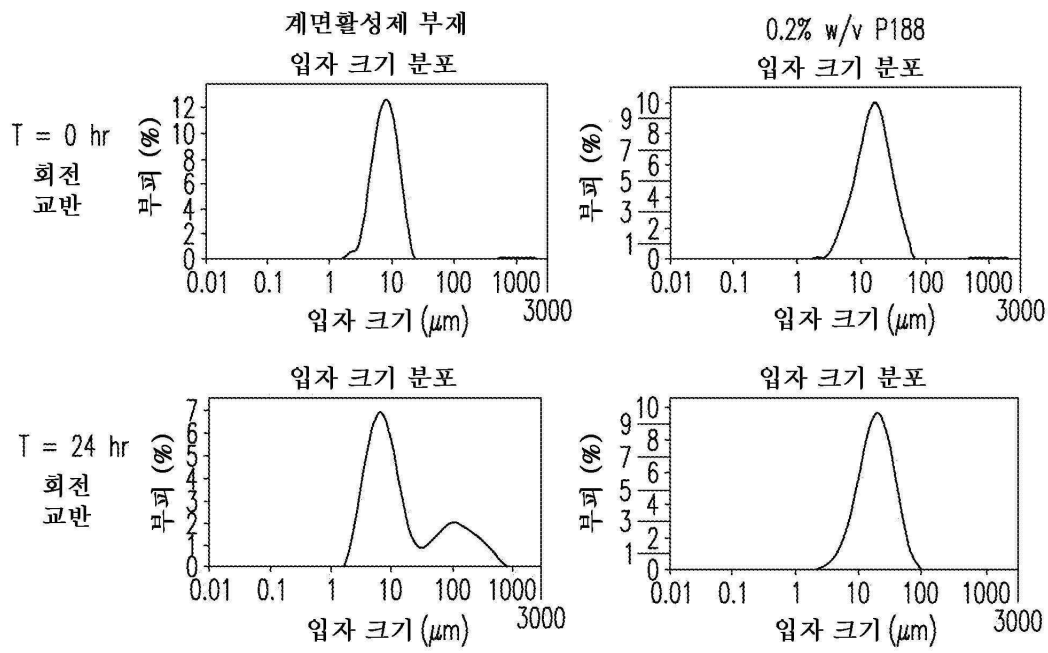
도면6



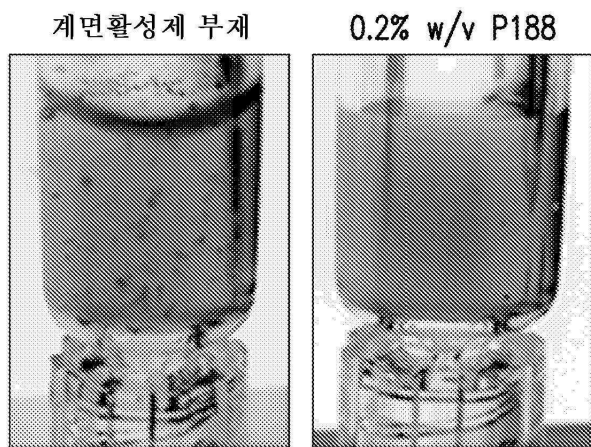
도면7



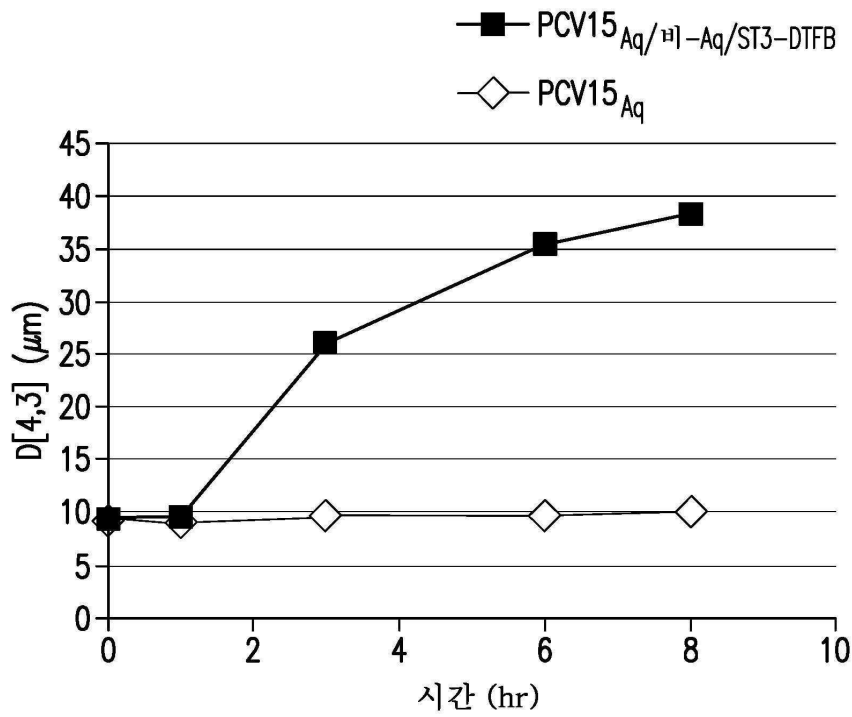
도면8a



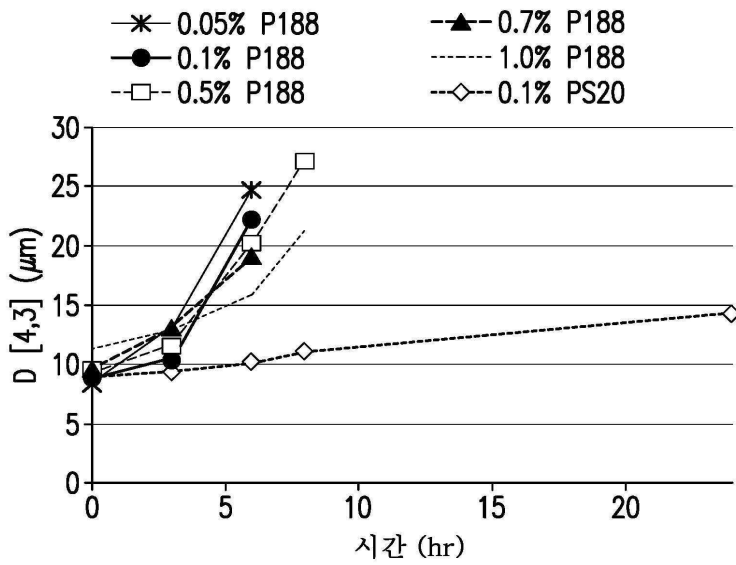
도면8b



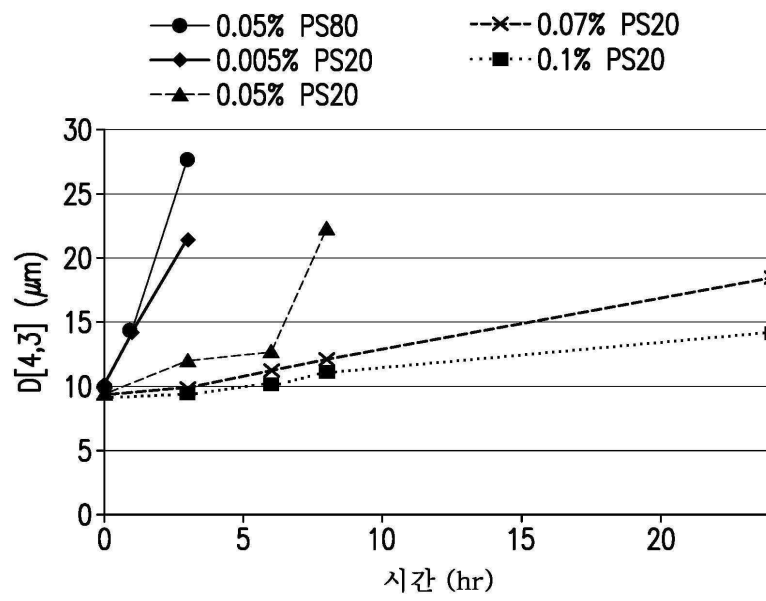
도면9



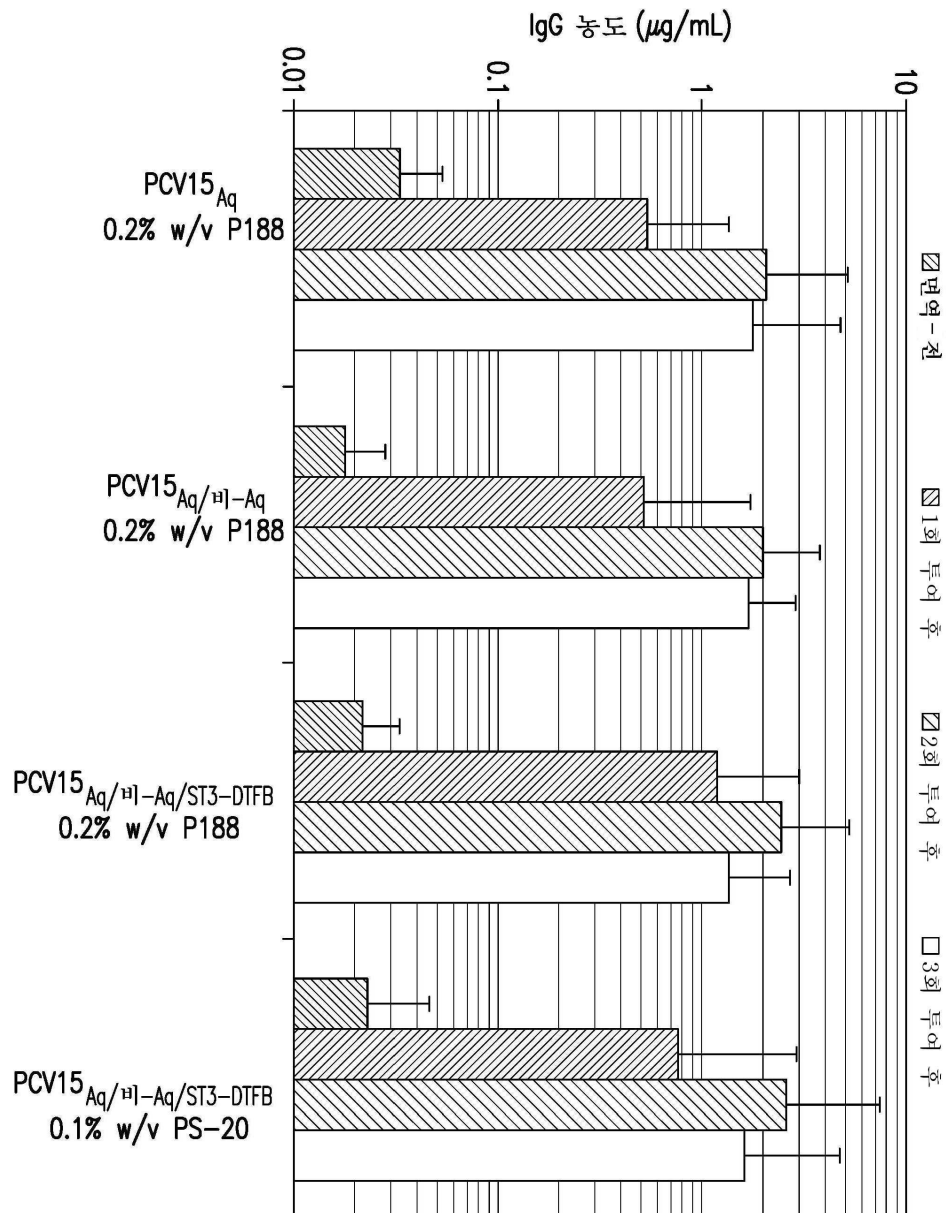
도면10a



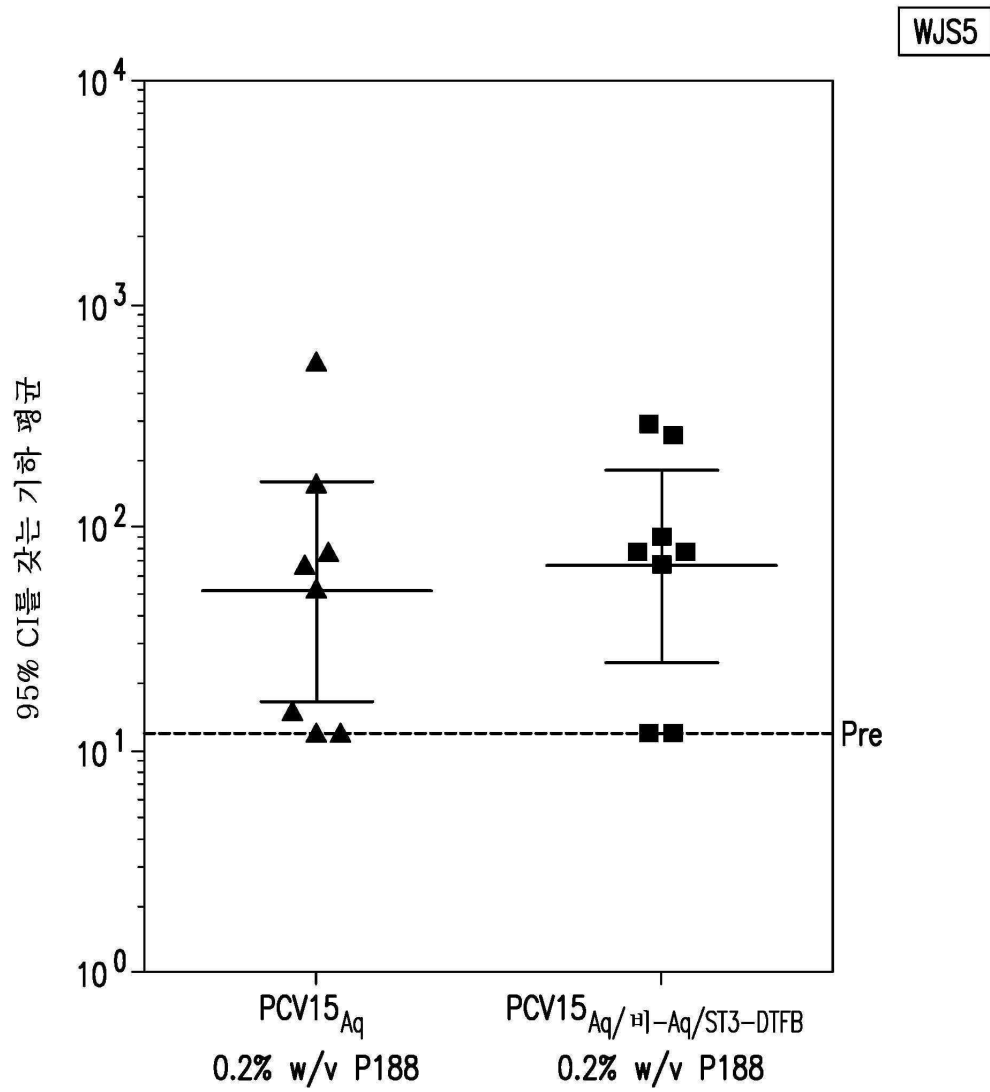
도면10b



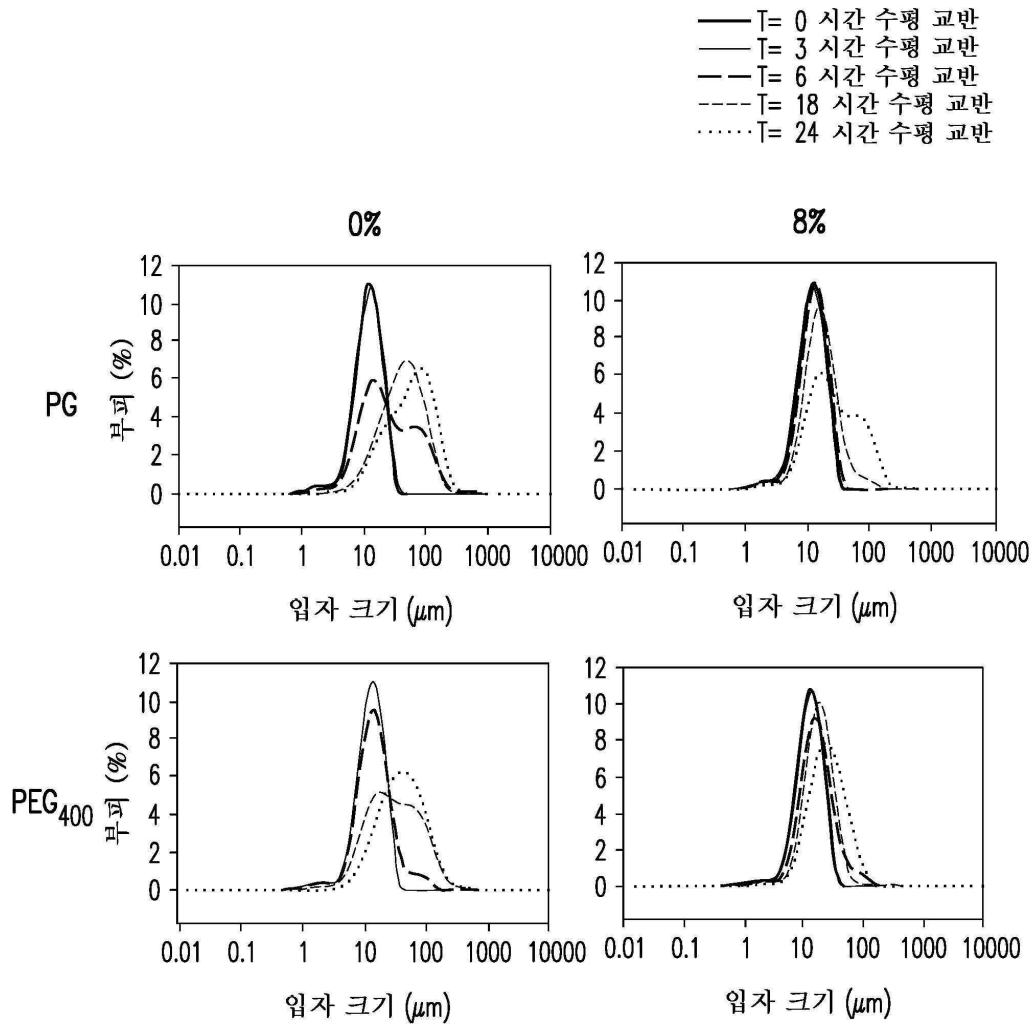
도면11



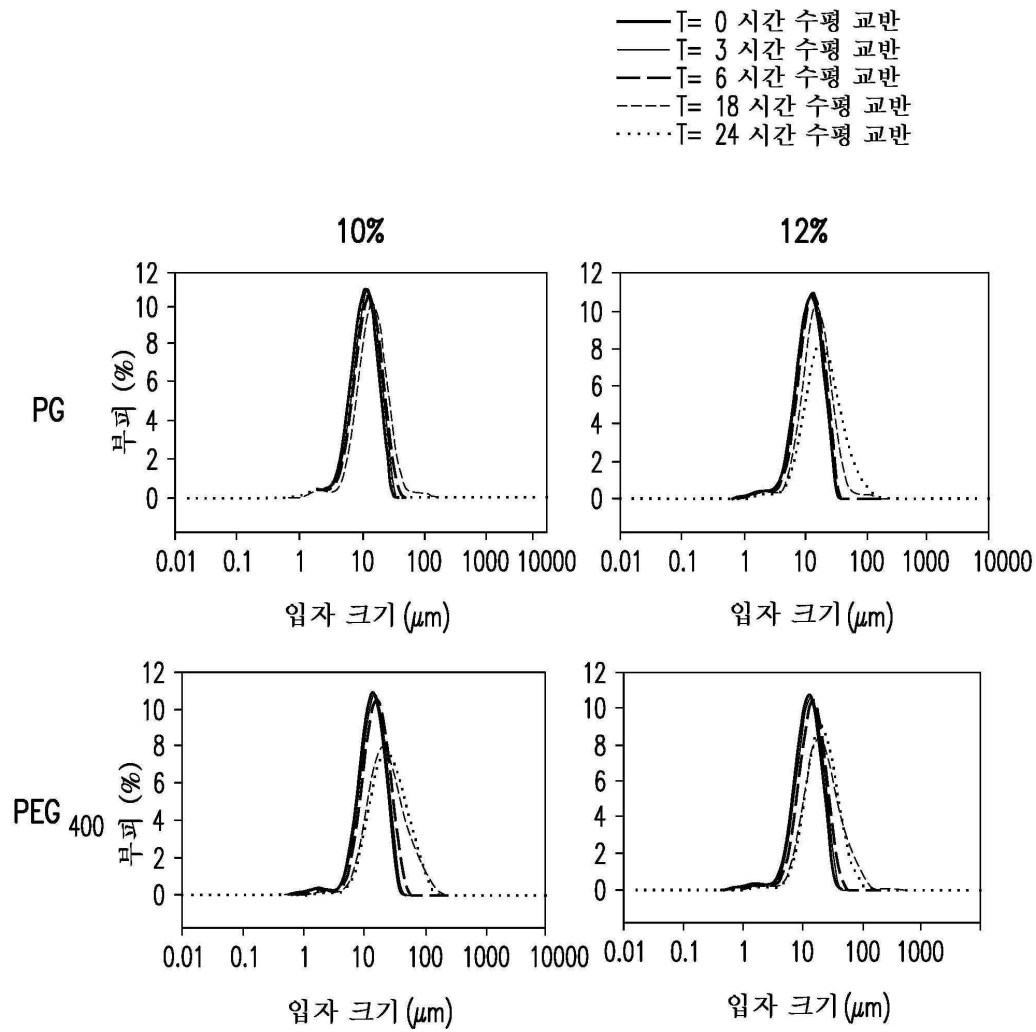
도면12



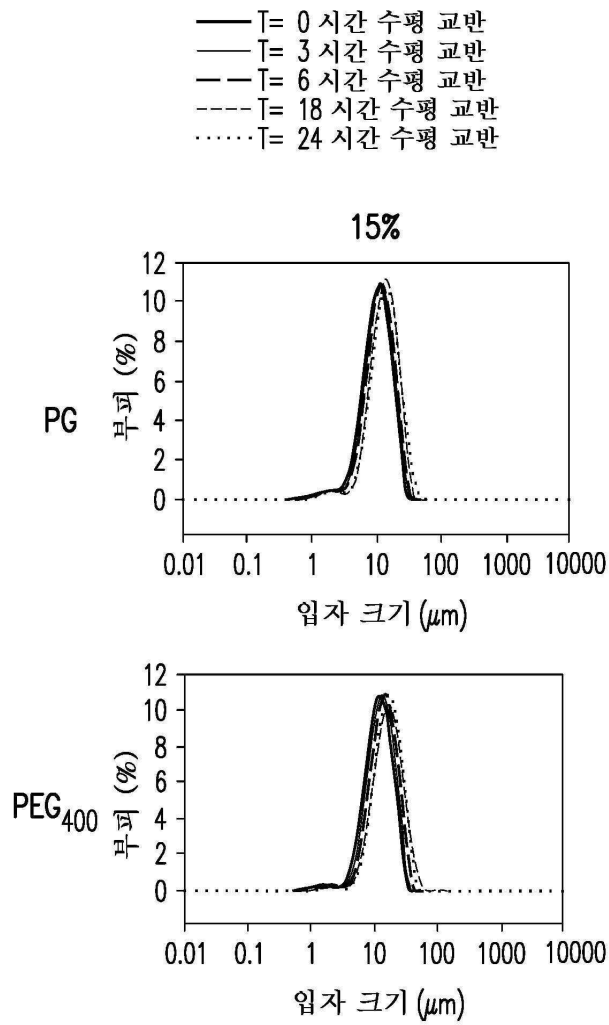
도면13a



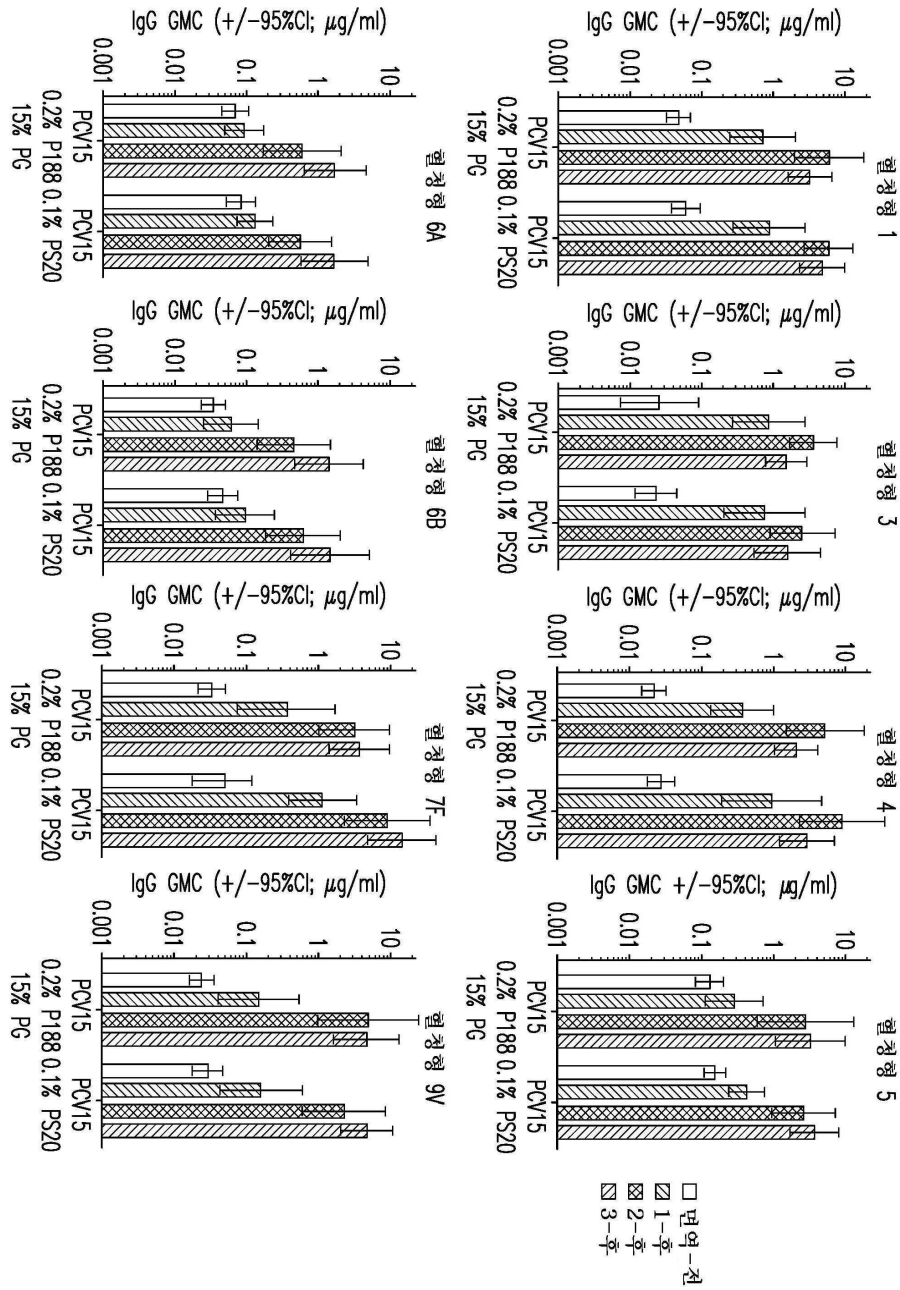
도면13b



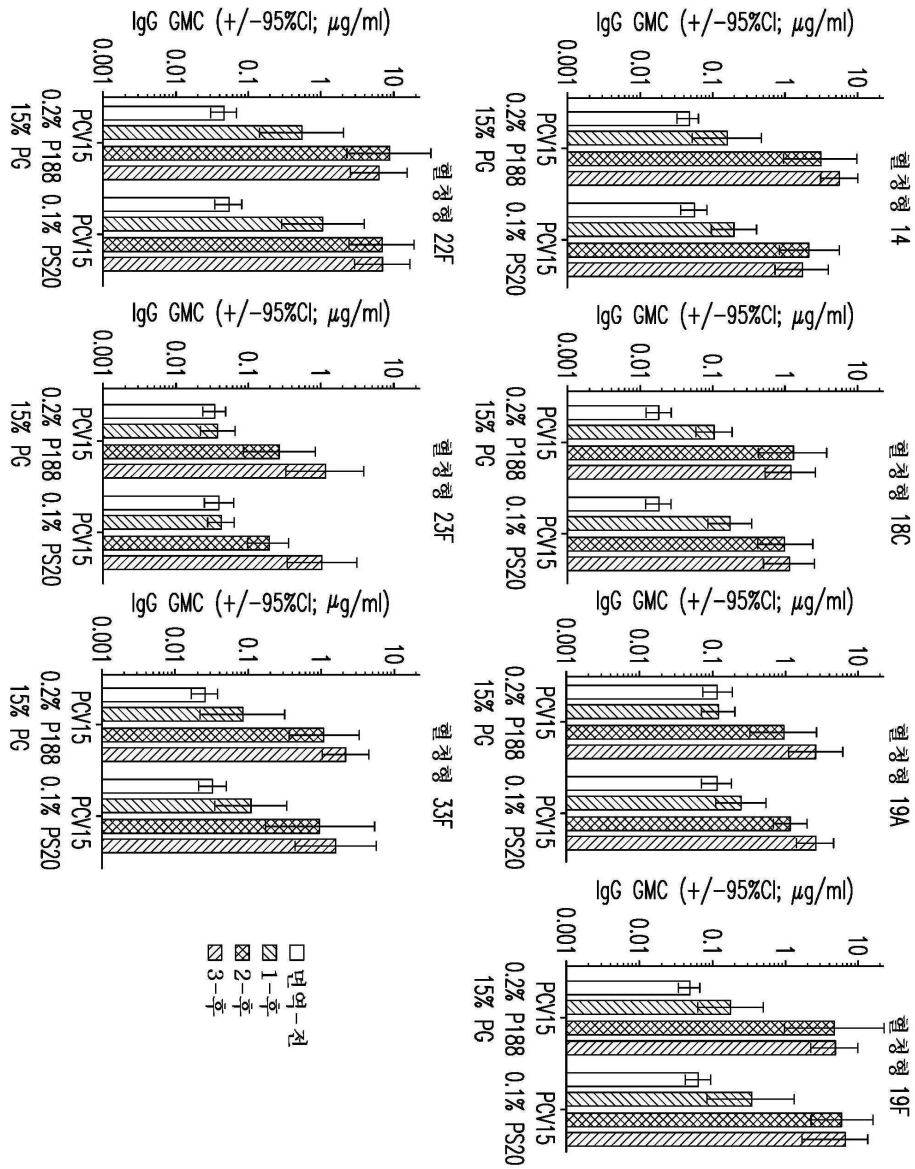
도면13c



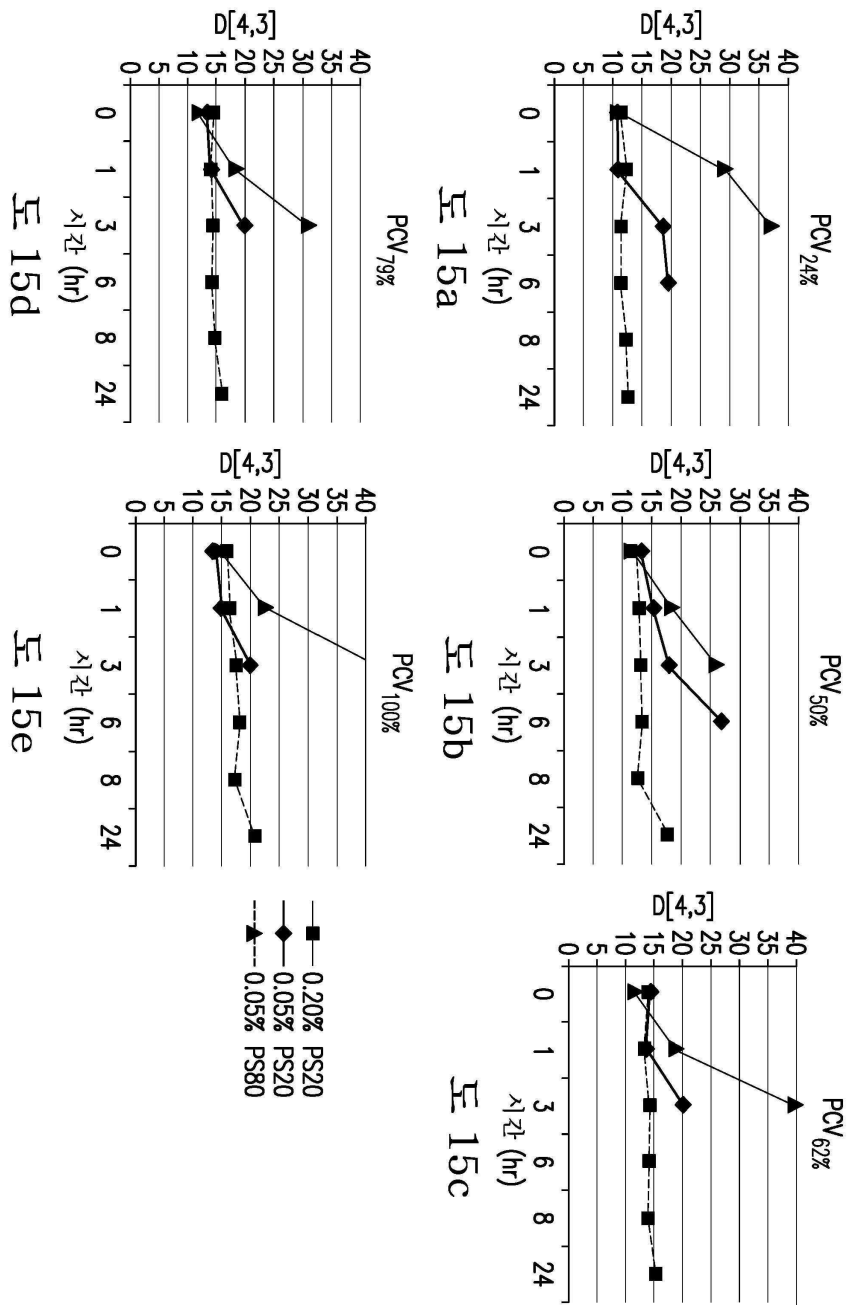
도면14a



도면14b



도면15



도면16

