



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0103831
 (43) 공개일자 2013년09월24일

- | | |
|---|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/145 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7023760(분할)
(22) 출원일자(국제) 2006년12월20일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2008-7017942
원출원일자(국제) 2006년12월20일
심사청구일자 2011년12월08일
(85) 번역문제출일자 2013년09월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/069974
(87) 국제공개번호 WO 2007/071707
국제공개일자 2007년06월28일
(30) 우선권주장
0526232.4 2005년12월22일 영국(GB)
(뒷면에 계속) | (71) 출원인
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89
(72) 발명자
비에만스, 랄프 레온
벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스에이
가르콘, 나탈리에 마리-요셉
벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스에이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남 |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 13 항

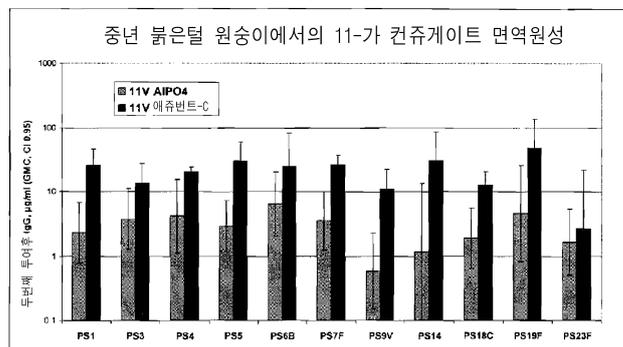
(54) 발명의 명칭 **폐렴구균 다당류 컨주게이트 백신**

(57) 요약

본 발명은 폐렴구균 캡슐 당류 컨주게이트 백신의 분야에 관한 것이다. 특히, 2개 이상의 상이한 담체 단백질에 컨주게이팅된 다양한 S. 뉴모니에 혈청형으로부터의 다양한 컨주게이팅된 캡슐 당류를 지니는 다가 스트렙토코쿠스 뉴모니에 면역원성 조성물이 제공되며, 이러한 조성물은 디프테리아 독소이드 (DT) 또는 CRM197에 컨주게이팅된 혈청형 19F 캡슐 당류를 포함하고, 임의로 19F는 디프테리아 독소이드 (DT) 또는 CRM197에 컨주게이팅된 조성물 내의 유일한 당류이다.

대표도 - 도1

중년 붉은털 원숭이(Rhesus monkey)에서의 컨주게이트 면역원성 (두번째 투여후 항-PS IgG 수준)



(72) 발명자

헤르만드, 필리페 빈센트

벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스에이

폴맨, 안

벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스에이

반 메첼렌, 마르셀 플레뜨

벨기에 비-1330 릭센사르트 루 드 린스티튜트 89
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스에이

(30) 우선권주장

0607087.4 2006년04월07일 영국(GB)

0607088.2 2006년04월07일 영국(GB)

0609902.2 2006년05월18일 영국(GB)

0620336.8 2006년10월12일 영국(GB)

0620337.6 2006년10월12일 영국(GB)

0620815.1 2006년10월19일 영국(GB)

0620816.9 2006년10월19일 영국(GB)

PCT/GB2006/004634 2006년12월12일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

혈청형 19A 균주로부터의 스트렙토코쿠스 뉴모니에 (*Streptococcus pneumoniae*) 감염에 의해 야기되는 질병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 2개 이상의 상이한 담체 단백질에 컨쥬게이트된 상이한 스트렙토코쿠스 뉴모니에 혈청형으로부터의 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 13개 이상 또는 14개 이상의 캡슐 당류를 포함하는 스트렙토코쿠스 뉴모니에 면역원성 조성물로서, 상기 조성물은 디프테리아 독소(DT)에 컨쥬게이트된 혈청형 19F 캡슐 당류를 포함하지만, 혈청형 19A로부터의 캡슐 당류를 포함하지 않는 것인, 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혈청형 19F 캡슐 당류가 디프테리아 독소(DT)에 컨쥬게이트된 조성물 내의 유일한 당류인 것인, 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 19F 캡슐 당류가 담체 단백질에 직접 컨쥬게이트된 것인, 면역원성 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 19F 캡슐 당류가 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이트된 것인, 면역원성 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 19F 당류가 CDAP 화학을 이용하여 담체 단백질 또는 링커에 컨쥬게이트된 것인, 면역원성 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 담체 단백질 대 19F 당류의 비가 5:1 내지 1:5, 4:1 내지 1:1 또는 2:1 내지 1:1, 또는 1.5:1 내지 1.4:1 (w/w)인 것인, 면역원성 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 19F 당류의 평균 크기 (Mw)가 100 kDa 이상인 것인, 면역원성 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 19F 당류 컨쥬게이트의 투여량이 1 내지 10 μg , 1 내지 5 μg , 또는 1 내지 3 μg 의 당류인 것인, 면역원성 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 다른 담체 단백질을 포함하는 것인, 면역원성 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 모든 담체 단백질은 DT, CRM197, TT, 단편 C, dPly, PhtA, PhxB, PhtD, PhtE, PhtDE, PhtC, PorS 및 헤모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*) 단백질 D로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 면역원성 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 파상풍 독소이드(TT)에 컨쥬게이트된 캡슐 당류 18C

를 포함하는 것인, 면역원성 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 18C는 TT에 컨쥬게이트된 조생물 내의 유일한 당류인 것인, 면역원성 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청형 19A 균주로부터의 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 감염에 의해 야기되는 질병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에 사용하기 위한, 혈청형 19F의 캡슐 당류 컨쥬게이트는 포함하지만 혈청형 19A로부터의 캡슐 당류는 포함하지 않는 것인, 면역원성 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 개선된 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*) 백신에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 2세 미만의 아동은 대부분의 다당류 백신에 대한 면역 반응을 발생시키지 않으므로, 단백질 담체로의 화학적 컨쥬게이션에 의해 다당류에 면역원성을 제공하는 것이 필요하였다. T 의존성 항원인 단백질에 대한 T 비의존성 항원인 다당류의 커플링은 다당류에 동형 전환 (isotype switching), 친화성 성숙, 및 기억 유도를 포함하는 T 의존성 특성을 수여한다.

[0003] 그러나, 다당류-단백질 컨쥬게이트, 또는 다당류-단백질 컨쥬게이트의 조합물의 반복 투여는 다가 백신을 형성시킬 수 있다. 예를들어, 단백질 담체로 파상풍 독소이드 (TT)를 이용하는 헤모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*) 타입 b 다당류 (PRP) 백신이 표준 유아 스케줄에 따른 (자유) TT 및 폐렴구균 다당류-TT 컨쥬게이트 백신과의 동시 면역화로 용량-범위로 시험된 것이 보고되어 있다. 폐렴구균 백신의 투여량이 증가함에 따라, Hib 컨쥬게이트 백신의 PRP 다당류 부분에 대한 면역 반응이 감소하였고, 이는 아마 동일한 담체 단백질의 사용을 통한 다당류의 면역 간섭 (immune interference)을 나타낸다 (Dagan et al., *Infect Immun.* (1998); 66: 2093-2098).

[0004] 단백질 자체에 대한 체액성 반응에 있어서 담체-단백질 투여량의 효과가 다양한 면이 존재하는 것으로 입증되었다. 인간 유아에서, 4가 파상풍 독소이드 컨쥬게이트의 투여량의 증가가 파상풍 담체에 대한 반응을 감소시키는 것이 보고되었다 (Dagan et al., *supra*). 조합 백신의 상기 효과의 고전적인 분석은 완전히 이해되어 있지 않지만, 과량의 담체 단백질로부터 발생하는 것으로 생각되는 담체에 의해 유도된 에피토프 억제제로 기술되었다 (Fattom, *Vaccine* 17: 126 (1999)). 이는 담체 단백질에 대한 B-세포, 및 다당류에 대해 B-세포에 의한, Th-세포에 대한 경쟁을 발생시키는 것으로 보인다. 담체 단백질에 대해 B-세포가 우세한 경우, 다당류에 특이적인 B-세포에 대해 필수적인 도움을 제공하는데 이용가능한 Th-세포가 충분하지 않게 된다. 그러나, 관찰된 면역학적 효과는 일치하지 않았으며, 몇몇 경우에 담체 단백질의 전체 양은 면역 반응을 증가시켰고, 다른 경우에는 면역 반응을 감소시켰다.

[0005] 그러므로, 다수의 다당류 컨쥬게이트를 단일한 효과적인 백신 제형에 조합시키는데 있어서 기술적 어려움이 존재한다.

[0006] 스트렙토코쿠스 뉴모니아는 침습성 질병, 예를들어 폐렴, 균혈증 및 수막염, 및 집락화와 관련된 질병, 예를들어 급성 중이염을 발생시키는, 적지 않은 이환률 및 사망률의 원인 (특히, 연소하거나 노령에서)이 되는 그람-양성 박테리아이다. 미국에서 60세 이상의 연령의 인간에 대한 폐렴구균성 폐렴의 비는 100,000명당 3 내지 8 명으로 추정된다. 상기 환자중 20%는 항생제 치료에도 불구하고 사망률이 30%에 근접하는 균혈증, 및 기타 증상, 예를들어 수막염으로 진행된다.

[0007] 폐렴구균은 혈청형 특이성을 수여하는 화학적으로 연결된 다당류로 캡슐화되어 있다. 90개의 공지된 폐렴구균 혈청형이 존재하며, 캡슐은 캡슐은 보체로부터 박테리아의 내부 표면을 보호할 뿐만 아니라 그 자체로 불완전한 면역원이므로, 폐렴구균에 대한 주요 독성 결정인자이다. 다당류는 T-비의존성 항원이고, 가공되거나 MHC 분자에 제시되어 T-세포와 상호작용할 수 없다. 그러나, 이들은 B 세포 상의 표면 수용체의 가교를 포함하는 대안적인 메커니즘을 통해 면역계를 자극할 수 있다.

- [0008] 여러 실험에서, 침습성 폐렴구균 질병에 대한 보호가 캡슐에 특이적인 항체와 매우 강하게 관련되고, 상기 보호가 혈청형 특이적인 것으로 밝혀졌다.
- [0009] 스트렙토코쿠스 뉴모니에는 유아 및 어린 아동에서의 침습성 박테리아 질병 및 중이염의 가장 흔한 원인체이다. 마찬가지로, 중년의 인간은 폐렴구균 백신에 대해 충분치 않은 반응을 발생시키며 [Roghmann et al., (1987), J. Gerontol. 42: 265-270], 따라서 이러한 집단에서 박테리아성 폐렴의 발생률을 증가한다 [Verghese and Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62: 271-285].
- [0010] S. 뉴모니에에 의해 야기되는 주요 임상 증후군은 널리 인지되어 있고, 모든 표준 의학 교과서에 논의되어 있다 (Fedson DS, Muscher DM. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4rth edition. PhiladelphiaWB Saunders Co, 2004a: 529-588). 예를들어, 침습성 폐렴구균 질병 (IPD)는 S. 뉴모니에가 혈액 또는 또 다른 일반적인 무균 부위로부터 분리되는 임의의 감염으로 정의된다 (Musher DM Streptococcus pneumoniae. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious diseases (5th ed). New York, Churchill Livingstone, 2001, p2128-2147). 만성폐쇄폐병 (COPD)은 종종 공존하는 여러 질환 (기류 폐쇄, 만성 기관지염, 세기관지염 또는 소기도 질병 및 폐기종)을 포함하는 것으로 인지되어 있다. 환자는 보통 호흡곤란 증가와 관련되는 이들 질환의 악화를 경험하게 되고, 종종 점성 및 화농성 타액을 발생시킬 수 있는 기침이 증가하게 된다 (Wilson, Eur Respir J 2001 17:995-1007). COPD는 생리학적으로 만성 기관지염 및/또는 폐기종을 지니는 환자에서의 비가역적 또는 부분적으로 가역적인 기도 폐색의 존재로 정의된다 (Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. 1995 Nov;152(5 Pt 2):S77-121). COPD의 악화는 종종 박테리아 (예를들어, 폐렴구균) 감염에 의해 야기된다 (Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):336-63).
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 다수의 혈청형의 스트렙토코쿠스 뉴모니에 다당류 컨주게이트 백신의 개선된 제형을 개발하는 것이다.

발명의 내용

- [0012] 본 발명은 2개 이상의 담체 단백질에 컨주게이팅된 상이한 스트렙토코쿠스 뉴모니에 혈청형으로부터의 10개 이상 (예를들어, 11, 12, 13, 14 또는 15개 이상)의 캡슐 당류를 포함하는 개선된 S. 뉴모니에 백신을 제공하며, 이러한 백신은 디프테리아 독소이드 또는 CRM197에 컨주게이팅된 혈청형 19F 캡슐 당류를 포함하고, 임의로 이러한 백신은 자유 단백질로서 또는 추가의 담체 단백질 또는 둘 모두로서 헤모필루스 인플루엔자로부터의 단백질 D를 추가로 포함한다.
- [0013] 본 발명의 목적상, "COPD의 악화에 대한 인간 숙주의 면역화" 또는 "COPD의 악화의 치료 또는 예방" 또는 "COPD 악화의 중증도의 감소"는, 예를들어 본 발명의 조성물 또는 백신으로 면역화된 환자 그룹 내에서의 COPD 악화의 발생률 또는 속도의 감소 (예를들어, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 또는 20% 이상의 속도의 감소) 또는 상기 정의된 바와 같은 COPD 악화의 중증도의 감소를 의미한다.
- [0014] 통상적으로, 본 발명의 스트렙토코쿠스 뉴모니에 백신은 캡슐 당류 항원 (바람직하게는, 컨주게이팅된 항원)을 포함할 것이고, 당류는 S. 뉴모니에의 10개 이상의 혈청형으로부터 유래된다. S. 뉴모니에 캡슐 당류의 수는 10개의 상이한 혈청형 (또는 "V", 결합가) 내지 23개의 상이한 혈청형 (23V)의 범위일 수 있다. 한 구체예에서, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 상이한 혈청형이 존재한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 백신은 컨주게이팅된 S. 뉴모니에 당류 및 컨주게이팅되지 않은 S. 뉴모니에 당류를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 당류 혈청형의 전체 수는 23개 이하이다. 예를들어, 본 발명은 10개의 컨주게이팅된 혈청형 및 13개의 컨주게이팅되지 않은 당류를 포함할 수 있다. 유사한 방식으로, 백신은 11, 12, 13, 14, 15 또는 16개의 컨주게이팅된 당류 및 각각 12, 11, 10, 9, 8 또는 7개의 컨주게이팅되지 않은 당류를 포함할 수 있다.
- [0015] 한 구체예에서, 본 발명의 다가 폐렴구균 백신은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로부터 선택될 수 있으나, 하나 또는 두개의 기타 혈청형이 백신을 투여받는 수용자의 연령 및 백신이 투여되는 지리적 위치에 따라 대체될 수 있음이 인지되며, 예를들어 혈청형 6A가 상기 목록에 포함될 수 있다. 예를들어, 10가 백신은 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터의 다당류를 포함할 수 있다. 11가 백신은 또한 혈청형 3으로부터의 당류를 포함할 수 있다. 12 또는 13가 소아 (유아) 백신은 또한 혈청형 6A 및 19A, 또는 6A 및 22F, 또는 19A 및 22F, 또는 6A 및 15B, 또는 19A 및 15B, 또는 22F 및 15B가 보충된 10가 또는 11가 제형을 포함할 수 있는 반면, 13가의 중년 인간용 백

신은 혈청형 19A 및 22F, 8 및 12F, 또는 8 및 15B, 또는 8 및 19A, 또는 8 및 22F, 또는 12F 및 15B, 또는 12F 및 19A, 또는 12F 및 22F, 또는 15B 및 19A, 또는 15B 및 22F가 보충된 11가 제형을 포함할 수 있다. 14가 소아 백신은 혈청형 3, 6A, 19A 및 22F; 혈청형 6A, 8, 19A 및 22F; 혈청형 6A, 12F, 19A 및 22F; 혈청형 6A, 15B, 19A 및 22F; 혈청형 3, 8, 19A 및 22F; 혈청형 3, 12F, 19A 및 22F; 혈청형 3, 15B, 19A 및 22F; 혈청형 3, 6A, 8 및 22F; 혈청형 3, 6A, 12F 및 22F; 또는 혈청형 3, 6A, 15B 및 22F가 보충된 상기 기술된 바와 같은 10가 제형을 포함할 수 있다.

[0016] 한 구체예에서, 조성물은 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F (바람직하게는, 컨주게이팅된 것)로부터 유래된 캡슐 당류를 포함한다. 본 발명의 한 추가 구체예에서, 11개 이상의 당류 항원 (바람직하게는, 컨주게이팅된 것), 예를 들어 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F로부터 유래된 캡슐 당류의 항원이 포함된다. 본 발명의 한 추가 구체예에서, 12 또는 13개 이상의 당류 항원이 포함되고, 예를 들어 백신은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 유래된 캡슐 당류 또는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 및 23F로부터 유래된 캡슐 당류를 포함할 수 있으나, 추가의 당류 항원, 예를 들어 23가 (예를 들어, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F)가 또한 본 발명에 고려된다.

[0017] 본 발명의 백신은 헤모필루스 인플루엔자로부터의 단백질 D (PD)를 포함할 수 있다 (참고: EP 0594610). 헤모필루스 인플루엔자는 중이염의 주요 원인체공 유기체이고, 본 발명의 발명자들은 스트렙토코쿠스 뉴모니아 백신에서의 상기 단백질의 포함이 헤모필루스 인플루엔자 관련 중이염에 대한 보호 수준을 제공한다는 발견하였다 (참고: POET 공개). 한 구체예에서, 백신 조성물은 단백질 D를 포함한다. 한 양태에서, PD는 하나 이상의 당류에 대해 담체 단백질로 존재한다. 또 다른 양태에서, 단백질 D는 백신 조성물에서 자유 단백질로 존재할 수 있다. 한 추가 양태에서, 단백질 D는 담체 단백질 및 자유 단백질 둘 모두로 존재한다. 단백질 D는 전장 단백질 또는 단편으로 사용될 수 있다 (W00056360). 한 추가 양태에서, 단백질 D는 당류의 대부분에 대해 담체 단백질로 존재하고, 예를 들어 당류의 6, 7, 8 또는 9개 이상이 단백질 D에 컨주게이팅될 수 있다. 이러한 양태에서, 단백질 D는 또한 자유 단백질로 존재할 수 있다.

[0018] 본 발명의 백신은 두개 이상의 상이한 유형의 담체 단백질을 포함한다. 각각의 유형의 담체 단백질은 하나 이상의 당류에 대해 담체로 작용할 수 있고, 당류는 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 혈청형 3 및 4는 동일한 담체 단백질에 컨주게이팅될 수 있고, 담체 단백질의 동일한 분자 또는 동일한 담체 단백질의 상이한 분자에 컨주게이팅될 수 있다. 한 구체예에서, 두개 이상의 상이한 당류가 동일한 담체 단백질에 컨주게이팅될 수 있고, 담체 단백질의 동일한 분자 또는 동일한 담체 단백질의 상이한 분자에 컨주게이팅될 수 있다.

[0019] 항상 DT 또는 CRM197, 바람직하게는 DT에 컨주게이팅되는 혈청형 19F로부터의 당류가 아닌, 각각의 스트렙토코쿠스 뉴모니아 캡슐 당류는 TT, DT, CRM197, TT의 단편 C, PhtD, PhtDE 융합체 (특히, WO 01/98334 및 WO 03/54007에 기술된 것), 무독화된 뉴몰리신 및 단백질 D로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된 담체 단백질에 컨주게이팅될 수 있다. 본 발명의 컨주게이트에 사용될 수 있는 단백질 담체의 더욱 완전한 목록은 하기 제시된다.

[0020] 단백질 담체가 조성물 내의 2개 이상의 당류에 대해 동일한 경우, 당류는 단백질 담체의 동일한 분자 (컨주게이팅된 2개 이상의 상이한 당류를 지니는 담체 분자)에 컨주게이팅될 수 있다 [참고: WO 04/083251]. 대안적으로, 당류는 각각 단백질 담체의 상이한 분자 (컨주게이팅된 하나의 유형의 당류만을 지니는 단백질 담체의 각각의 분자)에 컨주게이팅될 수 있다.

[0021] 본 발명의 면역원성 조성물에 존재하는 컨주게이트 내의 하나 이상의 S. 뉴모니아 캡슐 당류에 컨주게이팅된 담체 단백질은 임의로 다수의 폴리히스티딘 트라이어드 족 (Pht) 단백질, 이의 단편 또는 융합 단백질이다. PhtA, PhtB, PhtD 또는 PhtE 단백질은 WO 00/37105 또는 WO 00/39299에 기술된 서열 (예를 들어, PhtD에 대해서는 WO 00/37105의 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열 1-838 또는 21-838)과 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 100%의 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 지닐 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질은 PhtA, PhtB, PhtD 및 PhtE 중 2, 3 또는 4개의 전장 단백질 또는 이의 단편으로 구성된다. 융합 단백질의 예는 PhtA/B, PhtA/D, PhtA/E, PhtB/A, PhtB/D, PhtB/E, PhtD/A, PhtD/B, PhtD/E, PhtE/A, PhtE/B 및 PhtE/D이고, 단백질은 N-말단에서 첫번째로 언급한 것과 연결된다 (참고: WO 01 /98334).

[0022] Pht 단백질의 단편이 사용되는 경우 (개별적으로 또는 융합 단백질의 일부로), 각각의 단편은 임의로 상기 폴리펩티드의 하나 이상의 히스티딘 트라이어드 모티프(들) 및/또는 코일드 코일 (coiled coil) 영역을 함유한다. 히스티딘 트라이어드 모티프는 서열 HxxHxH를 지니는 폴리펩티드의 일부이고, 여기서 H는 히스티딘이고, x는 히

스티딘이 아닌 아미노산이다. 코일드 코일 영역은 문헌["Coils" algorithm Lupus, A et al (1991) Science 252; 1162-1164]에 의해 예측된 영역이다. 한 구체예에서, 단편 또는 각각의 단편은 하나 이상의 히스티딘 트라이어드 모티프 뿐만 아니라 하나 이상의 코일드 코일 영역을 포함한다. 한 구체예에서, 단편 또는 각각의 단편은 정확히 2, 3, 4 또는 5개 또는 이 이상의 히스티딘 트라이어드 모티프 (임의로, 2개 이상의 트라이어드 사이의 천연 Pht 서열, 또는 천연 페렴구균 트라이어드내 Pht 서열 (예를들어, PhtD에 대해서는 WO 00/37105의 SEQ ID NO: 4에 나타난 바와 같은 트라이어드내 서열)과 50, 60, 70, 80, 90 이상 또는 100% 동일한 트라이어드내 서열을 지님)를 함유한다. 한 구체예에서, 단편 또는 각각의 단편은 정확히 2, 3 또는 4개 또는 이 이상의 코일드 코일 영역을 함유한다. 한 구체예에서, 본원에 기술된 Pht 단백질은 신호 서열이 부착된 전장 단백질, 신호 펩티드 (예를들어, N-말단의 20개의 아미노산)가 제거된 성숙한 전장 단백질, Pht 단백질의 천연 발생 변이체 및 Pht 단백질의 단편 (예를들어, 상기 기술된 바와 같은 단편, 또는 WO 00/37105 또는 WO 00/39299 내의 아미노산 서열에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 WO 00/37105 또는 WO 00/39299의 상기 아미노산 서열로부터의 15 또는 20개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드)을 포함한다.

[0023] 특히, 본원에서 사용되는 용어 "PhtD"는 신호 서열이 부착된 전장 단백질, 신호 펩티드 (예를들어, N-말단의 20개의 아미노산)가 제거된 성숙 전장 단백질, PhtD의 천연 발생 변이체 및 PhtD의 면역원성 단편 (예를들어, 상기 기술된 단편, 또는 W000/37105 또는 W000/39299 내의 PhtD 아미노산 서열 (예를들어, PhtD에 대해 WO 00/37105의 SEQ ID NO: 4)에 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있는 WO 00/37105 또는 WO 00/39299의 PhtD 아미노산 서열로부터의 15 또는 20개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 폴리펩티드)을 포함한다.

[0024] 단백질 담체가 조성물 내의 2개 이상의 당류에 대해 동일한 경우, 당류는 단백질 담체의 동일한 분자 (컨쥬게이팅된 2개 이상의 상이한 당류를 지니는 담체 분자)에 컨쥬게이팅될 수 있다 [참고: WO 04/083251]. 대안적으로, 당류는 각각 단백질 담체의 상이한 분자 (컨쥬게이팅된 하나의 유형의 당류만을 지니는 단백질 담체의 각각의 분자)에 개별적으로 컨쥬게이팅될 수 있다

[0025] 본 발명에 사용될 수 있는 담체 단백질의 예는 DT (디프테리아 독소이드), TT (파상풍 독소이드) 또는 TT의 단편 C, DT CRM197 (DT 돌연변이), 기타 DT 점 돌연변이, 예를들어 CRM176, CRM228, CRM45 (Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM9, CRM45, CRM102, CRM103 및 CRM107 및 문헌[Nicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992]에 기술된 기타 돌연변이, Glu-148의 결실 또는 Asp, Gln 또는 Ser으로의 돌연변이 및/또는 Ala-158의 결실 또는 Gly로의 돌연변이 및 US 4709017 또는 US 4950740에 기술된 기타 돌연변이; Lys516, Lys526, Phe530 및/또는 Lys534중 하나 이상의 잔기의 돌연변이 및 US 5917017 또는 US 6455673에 기술된 기타 돌연변이; 또는 US 5843711에 기술된 단편, 페렴구균 뉴몰리신 (Kuo et al (1995) Infect Immun 63, 2706-13), 예를들어 dPLY-GMBS의 몇몇 형태의 무독화된 ply (WO 04081515, PCT/EP2005/010258) 또는 dPLY-formol, PhtX, 예를들어 PhtA, PhtB, PhtD, PhtE 및 Pht 단백질의 융합체, 예를들어 PhtDE 융합체, PhtBE 융합체 (WO 01/98334 및 WO 03/54007), (하기에 보다 상세하게 기술된 Pht A-E) OMPC (수막구균 외막 단백질 - 보통 N. 메닌지티디스 혈청군 B로부터 추출 - EP0372501), PorB (N. 메닌지티디스로부터 추출), PD (헤모필루스 인플루엔자 단백질 D - 참고: EP 0 594 610 B) 또는 이의 면역학적 기능 동등체, 합성 펩티드 (EP0378881, EP0427347), 열충격 단백질 (WO 93/17712, WO 94/03208), 백일해 단백질 (WO 98/58668, EP0471177), 사이토카인, 림포카인, 성장 인자 또는 호르몬 (WO 91/01146), 인공 단백질, 예를들어 다양한 병원체 유래 항원으로부터의 다중 인간 CD4+ T 세포 에피토프 (Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824), 예를들어 N19 단백질 (Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7), 페렴구균 표면 단백질 PspA (WO 02/091998), 철 흡수 단백질 (WO 01/72337), C. 디피실레 (C. difficile)의 독소 A 또는 B (WO 00/61761)이다.

[0026] 문헌[Nurkka et al Pediatric Infectious Disease Journal. 23(11): 1008-14, 2004 Nov.]에는 모든 혈청형이 PD에 컨쥬게이팅된 11가 페렴구균 백신이 기술되어 있다. 그러나, 본 발명자들은 옉소노과고사이토시스 활성이 PD에 컨쥬게이팅된 19F에 비해 DT에 컨쥬게이팅된 19F를 지니는 컨쥬게이트를 이용하여 유도된 항체에서 개선되었음을 발견하였다. 또한, 본 발명자들은 DT에 컨쥬게이팅된 19F를 이용하여 19A에 대한 보다 큰 교차 반응성이 관찰되는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 조성물의 특징은 혈청형 19F가 DT 또는 CRM197에 컨쥬게이팅되는 것이다. 한 양태에서, 혈청형 19F는 DT에 컨쥬게이팅된다. 면역원성 조성물의 잔여 당류 혈청형은 모두 DT가 아닌 하나 이상의 담체 단백질에 컨쥬게이팅 (즉, 19F만이 DT에 컨쥬게이팅됨)될 수 있거나, DT가 아닌 하나 이상의 담체 단백질과 DT 그 자체 사이에 분할될 수 있다. 한 구체예에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨쥬게이팅되고, 잔여 혈청형 모두는 PD에 컨쥬게이팅된다. 한 추가 구체예에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨쥬게이팅되고, 잔여 혈청형은 PD와 TT 또는 DT 또는 CRM197 사이에 분할된다. 한 추가 구체예에서, 19F는 DT 또는

CRM197에 컨주게이팅되고, 하나의 당류가 TT에 컨주게이팅된다. 이러한 구체예의 한 양태에서, 상기 하나의 당류는 18C 또는 12F이다. 한 추가 양태에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨주게이팅되고, 2개의 당류는 TT에 컨주게이팅된다. 한 추가 양태에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨주게이팅되고, 잔여 혈청형은 PD 또는 TT와 DT 또는 CRM197 사이에 분할된다. 한 추가 구체예에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨주게이팅되고, 잔여 혈청형은 PD 또는 TT와 뉴몰리신 사이에 분할된다. 한 추가 구체예에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨주게이팅되고, 잔여 혈청형은 PD 또는 TT와 CRM197 사이에 분할된다. 한 추가 구체예에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨주게이팅되고, 잔여 혈청형은 PD, TT 또는 뉴몰리신과 임의로 PhtD 또는 PhtD/E 융합 단백질 사이에 분할된다. 한 추가 구체예에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨주게이팅되고, 19A는 뉴몰리신 또는 TT에 컨주게이팅되고, 하나 (두개 또는 세개)의 추가 당류(들)은 TT에 컨주게이팅되고, 하나의 추가 당류는 PhtD 또는 PhtD/E에 컨주게이팅되고, 모든 추가의 당류는 PD에 컨주게이팅된다. 한 추가 구체예에서, 19F는 DT 또는 CRM197에 컨주게이팅되고, 19A는 뉴몰리신에 컨주게이팅되고, 하나 (두개 또는 세개)의 추가 당류(들)은 TT에 컨주게이팅되고, 하나의 추가 당류는 뉴몰리신에 컨주게이팅되고, 2개의 추가 당류는 PhtD 또는 PhtD/E에 컨주게이팅되고, 모든 추가 당류는 PD에 컨주게이팅된다.

[0027] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 헤모필루스 인플루엔자로부터의 단백질 D를 포함한다. 이러한 구체예에서, PD가 컨주게이팅시키는데 사용된 담체 단백질중 하나가 아닌 경우, 19F가 아닌 임의의 당류, 예를들어 19F가 DT에 컨주게이팅되는 반면, 기타 혈청형은 PD가 아닌 하나 이상의 상이한 담체 단백질에 컨주게이팅되고, PD는 백신 조성물에서 자유 단백질로 존재하게 될 것이다. PD가 19F가 아닌 당류를 컨주게이팅시키는데 사용된 담체 단백질중 하나인 경우, PD는 임의로 백신 조성물에서 자유 단백질로 존재하게 될 것이다.

[0028] 본 명세서를 통한 용어 "당류"는 다당류 또는 올리고당류를 나타낼 수 있고, 둘 모두를 포함한다. 다당류는 박테리아로부터 분리되고, 공지된 방법 (참고: EP497524 및 EP497525) 및 바람직하게는 미세유동화에 의해 일정한 정도로 크기 조절될 수 있다. 다당류는 다당류 샘플의 점성을 감소시키고/시커거나 컨주게이팅된 생성물의 여과성을 개선시키기 위해 크기 조절될 수 있다. 올리고당류는 적은 수의 반복 단위 (통상적으로, 5 내지 30개의 반복 단위)를 지니고, 통상적으로 가수분해된 다당류이다.

[0029] 스트렙토코쿠스 뉴모니애의 캡슐 다당류는 8개 이하의 당 잔기를 함유할 수 있는 반복 올리고당류 단위를 포함한다. 주요 스트렙토코쿠스 뉴모니애 혈청형에 대한 올리고당류 단위의 개관을 위해 문헌[JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Cienc, June 2005, vol.77, no.2, p.293-324. ISSN 0001-3765]를 참조하라. 한 구체예에서, 캡슐 당류 항원은 전장 다당류일 수 있으나, 다른 구체예에서 이는 하나의 올리고당류 단위이거나, 반복 올리고당류 단위의 천연 길이의 당류 사슬보다 짧을 수 있다. 한 구체예에서, 백신에 존재하는 모든 당류는 다당류이다. 전장 다당류는 "크기 조절된 것"이며, 즉 이들의 크기는 다양한 방법, 예를들어 산 가수분해 처리, 과산화수소 처리, 올리고당류 단편을 생성시키기 위한 에멀시플렉스(emulsiflex®)에 의한 크기 조절 후의 과산화수소 처리 또는 미세유동화에 의해 감소될 수 있다.

[0030] 본 발명자들은 또한 당 분야의 초점이 컨주게이트 생성의 용이함을 위해 올리고당류를 사용하는 데에 있음을 인지하였다. 본 발명자들은 천연 또는 약간 크기 조절된 다당류 컨주게이트를 사용함으로써 다음과 같은 이점중 하나 이상이 실현될 수 있음을 발견하였다: 1) 여과가능한 높은 면역원성을 지니는 컨주게이트, 2) 컨주게이트 내의 다당류 대 단백질의 비 (w/w)가 증가 (담체 억제 효과에 대한 영향력을 지닐 수 있음)될 수 있도록 변경될 수 있음, 3) 컨주게이션을 위한 보다 큰 당류의 사용에 의해 가수분해되기 쉬운 면역원성 컨주게이트가 확립될 수 있음. 보다 큰 다당류의 사용은 컨주게이트 담체와의 보다 많은 가교를 발생시킬 수 있고, 컨주게이트로부터의 자유 당류의 유리를 감소시킬 수 있다. 종래의 기술된 컨주게이트 백신은 컨주게이션을 개선시키기 위해 컨주게이션 전에 다당류를 해중합시키는 경향이 있었다. 본 발명자들은 보다 큰 크기의 당류를 보유하는 당류 컨주게이트 백신이 폐렴구균 질병에 대해 우수한 면역 반응을 제공할 수 있음을 발견하였다.

[0031] 따라서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 당류 컨주게이트를 포함할 수 있고, 여기서 컨주게이션 전의 각각의 당류의 평균 크기 (예를들어, 중량-평균 분자량; Mw)은 80kDa, 100kDa, 200kDa, 300kDa, 400kDa, 500kDa 또는 1000kDa 이상이다. 한 구체예에서, 본 발명의 하나 이상의 당류 컨주게이트는 50 내지 1600, 80 내지 1400, 100 내지 1000, 150 내지 500, 또는 200 내지 400 kDa (평균 크기가 Mw인 경우, 'kDa' 단위는 본원에서 'x10³'으로 대체되어야 함을 주의)의 컨주게이션 전 당류의 평균 크기를 지녀야 한다. 한 구체예에서, 컨주게이션 후의 컨주게이트는 여과전 샘플에 비해 50, 60, 70, 80, 90 또는 95% 이상의 수득량이 여과 후에 수득되도록 0.2 마이크론 필터를 통해 용이하게 여과되어야 한다.

- [0032] 본 발명의 목적상, "천연 다당류"는 당류의 크기를 감소시키기 위한 목적의 가공 (예를들어, 정제후)에 적용되지 않은 당류를 의미한다. 다당류는 일반적인 정제 과정 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 이러한 당류는 여전히 천연 당류이다. 단지 다당류가 크기를 조절하는 기술에 적용된 경우에만 다당류가 천연으로 간주되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 목적상, "2배 이하로 크기 조절된"은 당류가 당류의 크기를 감소시키기 위한 공정에 적용되나, 천연 다당류 크기의 반 이상이 유지되는 것을 의미한다. 3배 또는 4배 등은 동일한 방식, 즉 당류가 다당류의 크기를 감소시키기 위한 공정에 적용되나, 천연 다당류의 크기의 1/3, 1/4 이상의 크기가 유지되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0034] 본 발명의 한 양태에서, 면역원성 조성물은 담체 단백질에 컨쥬게이팅된 10개 이상의 혈청형으로부터의 스트렙토코쿠스 뉴모니에 당류를 포함하고, 여기서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 이상 또는 각각의 S. 뉴모니에 당류는 천연 다당류이다.
- [0035] 본 발명의 한 양태에서, 면역원성 조성물은 담체 단백질에 컨쥬게이팅된 10개 이상의 혈청형으로부터의 스트렙토코쿠스 뉴모니에 당류를 포함하고, 여기서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 이상 또는 각각의 S. 뉴모니에 당류는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 이하로 크기 조절된 것이다. 이러한 양태의 한 구체예에서, 대부분의 당류, 예를들어 6, 7, 8 또는 이 이상의 당류는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10배 이하로 크기 조절된 것이다.
- [0036] 본원의 당류의 분자량 또는 평균 분자량 (또는 크기)는 컨쥬게이션 전에 측정된 당류의 중량-평균 분자량 (Mw)을 의미하며, MALLS에 의해 측정된다.
- [0037] MALLS 기술은 당 분야에 널리 공지되어 있고, 통상적으로 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행된다. 페럼구균 당류의 MALLS 분석을 위해, 두개의 쉘림 (TSKG6000 및 5000PWx1)이 조합되어 사용될 수 있고, 당류는 수중에 용리된다. 당류는 광산란 검출기 (예를들어, 488nm에서의 10mW 아르곤 레이저가 장착된 Wyatt Dawn DSP) 및 간섭 굴절계 (inferometric refractometer) (예를들어, 498nm에서의 P100 셀 (cell) 및 적색 필터가 장착된 Wyatt Otilab DSP)를 이용하여 검출된다.
- [0038] 한 구체예에서, S. 뉴모니에 당류는 천연 다당류 또는 일반적인 추출 과정 동안 크기가 감소된 천연 다당류이다.
- [0039] 한 구체예에서, S. 뉴모니에 당류는 기계적 절단, 예를들어 미세유동화 또는 음파처리에 의해 크기 조절된다. 미세유동화 및 음파처리는 보다 큰 천연 다당류의 크기를 여과가능한 컨쥬게이트를 제공하기에 충분한 크기로 감소시키는 이점을 지닌다. 크기는 20, 10, 8, 6, 5, 4, 3 또는 2배 이하로 조절된다.
- [0040] 한 구체예에서, 면역원성 조성물은 천연 다당류 및 20배 이하로 크기 조절된 당류의 혼합물로부터 제조된 S. 뉴모니에 컨쥬게이트를 포함한다. 이러한 구체예의 한 양태에서, 대부분의 당류, 예를들어 6, 7 또는 8개 이상의 당류는 2, 3, 4, 5 또는 6배 이하로 크기 조절된다.
- [0041] 한 구체예에서, 스트렙토코쿠스 뉴모니에 당류는 링커, 예를들어 이기능성 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이팅된다. 링커는 임의로 예를들어 반응성 아미노기 및 반응성 카르복실산기, 2개의 반응성 아미노기 또는 두개의 반응성 카르복실산기를 지니는 이중이기능성(heterobifunctional) 또는 동중이기능성(homobifunctional) 링커이다. 링커는, 예를들어 4 내지 20, 4 내지 12, 5 내지 10개의 탄소 원자를 지닌다. 가능한 링커는 ADH이다. 기타 링커는 B-프로피오아미도 (WO 00/10599), 니트로페닐-에틸아민 (Gever et al (1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288), 할로알킬 할라이드 (US4057685), 글리코시드 결합 (US4673574, US4808700), 헥산 디아민 및 6-아미노카프론산 (US4459286)을 포함한다. 한 구체예에서, ADH는 혈청형 18C로부터의 당류를 컨쥬게이팅시키기 위한 링커로 사용된다. 한 구체예에서, ADH는 혈청형 22F로부터의 당류를 컨쥬게이팅시키기 위한 링커로 사용된다.
- [0042] 본 발명의 면역원성 조성물에 존재하는 당류 컨쥬게이트는 임의의 공지된 커플링 기술에 의해 제조될 수 있다. 컨쥬게이션 방법은 1-시아노-4-디메틸아미노 피리딘류 테트라플루오로보레이트 (CDAP)를 이용하여 당류를 활성화시켜, 시아네이트 에스테르를 형성시키는 것을 기초로 할 수 있다. 따라서, 활성화된 당류는 직접적으로 또는 스페이서 (링커)기를 통해 담체 단백질 상의 아미노기에 커플링될 수 있다. 예를들어, 스페이서는 말레이미드-활성화된 담체 단백질 (예를들어, GMBS를 이용함) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질 (예를들어, 요오도아세트이미드 [예를들어, 에틸 요오도아세트이미드 HCl] 또는 N-숙신이미딜 브로모아세테이트 또는 SIAB, 또는 SIA, 또는 SBAP를 이용함)과의 반응 후에 수득된 티오에테르 결합을 통해 담체에 커플링될 수 있는 티올화된 다당류

를 제공하는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 바람직하게는, 시아네이트 에스테르 (임의로, CDAP 화학에 의해 제조됨)는 핵산 디아민 또는 ADH와 함께 커플링되고, 아미노-유도된 당류는 단백질 담체 상의 카르복실기를 통해 카르보디이미드 (예를들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 이용하여 담체 단백질에 컨쥬게이팅된다. 이러한 컨쥬게이트는 PCT 공개 출원 WO 93/15760 (Uniformed Services University) 및 WO 95/08348 및 WO 96/29094에 기술되어 있다.

- [0043] 기타 적절한 기술은 카르보디이미드, 히드라지드, 활성 에테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC 및 TSTU를 이용한다. 다양한 기술이 WO 98/42721에 기술되어 있다. 컨쥬게이션은 당류의 자유 히드록실기와 CDI의 반응 (Bethell et al J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al J. Chromatogr. 1981, 218; 509-18) 후에 단백질과의 반응에 의해 카르바메이트 결합을 형성함으로써 형성될 수 있는 카르보닐 링커를 포함할 수 있다. 이는 아노머 말단의 일차 히드록실기와의 환원, 임의로 일차 히드록실기의 보호/탈보호, 일차 히드록실기와 CDI의 반응에 의한 CDI 카르바메이트 중간체의 형성, 및 CDI 카르바메이트 중간체와 단백질 상의 아미노기와의 커플링을 포함할 수 있다.
- [0044] 컨쥬게이트는 또한 US 4365170 (Jennings) 및 US 4673574 (Anderson)에 기술된 바와 같은 직접적인 환원성 아민화 방법에 의해 제조될 수 있다. 기타 방법이 EP-0-161-188, EP-208375 및 EP-0-477508에 기술되어 있다.
- [0045] 한 추가 방법은 카르보디이미드 축합(Chu C et al Infect. Immunity, 1983 245 256), 예를들어 EDAC를 이용한, 아디프산 디히드라지드 (ADH)로 유도된 시아노겐 브로마이드 (또는 CDAP) 활성화 당류의 단백질 담체로의 커플링을 포함한다.
- [0046] 한 구체예에서, 당류 상의 히드록실기 (바람직하게는, 활성화된 히드록실기, 예를들어 시아네이트 에스테르를 제조하기 위해 활성화된 히드록실기 [예를들어, CDAP를 이용함])는 단백질 상의 아미노기 또는 카르복실기에 직접적 또는 간접적 (링커를 포함)으로 연결된다. 링커가 존재하는 경우, 바람직하게는 당류 상의 히드록실기는 예를들어 CDAP 컨쥬게이션을 이용하여 링커 상의 아미노기에 연결된다. 링커 내의 한 추가 아미노기 (예를들어, ADH)는 예를들어 카르보디이미드 화학, 예를들어 EDAC를 이용하여 단백질 상의 카르복실산기에 컨쥬게이팅될 수 있다. 한 구체예에서, 페렴구균 캡슐 당류(들)은 링커가 담체 단백질에 컨쥬게이팅되기 전에 먼저 링커에 컨쥬게이팅된다. 대안적으로, 링커는 당류로의 컨쥬게이션 전에 담체에 컨쥬게이팅될 수 있다.
- [0047] 일부가 CDAP에 의해 제조되고, 일부가 환원성 아민화에 의해 제조되는 상기 기술의 조합이 또한 이용될 수 있다.
- [0048] 일반적으로, 단백질 담체 상의 하기 유형의 화학기가 커플링/컨쥬게이션에 사용될 수 있다:
- [0049] A) 카르복실 (예를들어, 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 당류 상의 아미노기에 직접 연결되거나, 카르보디이미드 화학, 예를들어 EDAC를 이용하여 링커 상의 아미노기에 연결된다.
- [0050] B) 아미노기 (예를들어, 리신을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 당류 상의 카르복실기에 직접 연결되거나, 카르보디이미드 화학, 예를들어 EDAC를 이용하여 링커 상의 카르복실기에 연결된다. 또 다른 구체예에서, 이러한 기는 당류 상의 CDAP 또는 CNBr를 이용하여 활성화된 히드록실기에 직접 연결되거나, 링커 상의 상기 기에 연결되거나; 알데히드기를 지니는 당류 또는 링커에 연결되거나; 숙신이미드 에스테르기를 지니는 당류 또는 링커에 연결된다.
- [0051] C) 술폰드릴 (예를들어, 시스테인을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 말레이미드 화학을 이용하여 브로모 또는 클로로 아세틸화된 당류 또는 링커에 연결된다. 한 구체예에서, 이러한 기는 비스 디아조벤지딘을 이용하여 활성화되고/변형된다.
- [0052] D) 히드록실기 (예를들어, 티로신을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 비스 디아조벤지딘을 이용하여 활성화되고/변형된다.
- [0053] E) 이미다졸릴기 (예를들어, 히스티딘을 포함). 한 구체예에서, 이러한 기는 비스 디아조벤지딘을 이용하여 활성화되고/변형된다.
- [0054] F) 구아니딜기 (예를들어, 아르기닌을 포함).
- [0055] G) 인돌릴기 (예를들어, 트립토판을 포함).
- [0056] 당류에서, 일반적으로 커플링을 위해 다음과 같은 기가 이용될 수 있다: OH, COOH 또는 NH₂. 알데히드기는 당 분야에 공지된 다양한 처리, 예를들어 과요오드 처리, 산 가수분해, 과산화수소 등의 처리 후에 생성될 수

있다.

[0057] 직접적 커플링 방법:

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

[0059] 당류-알데히드 + NH₂-Prot ----> 쉬프 염기 + NaCNBH₃ ----> 컨쥬게이트

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

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

[0062] 스페이서 (링커)를 통한 간접적 커플링 방법:

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

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

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

[0066] 당류-OH + CNBr 또는 CDAP ----> 시아네이트 에스테르 + NH₂----SH ----> 당류-SH + 할로아세틸화된-Prot ----> 컨쥬게이트

[0067] 당류-COOH + EDAC + NH₂----NH₂ ----> 당류 NH₂ + EDAC + COOH-Prot ----> 컨쥬게이트

[0068] 당류-COOH + EDAC+ NH₂----SH ----> 당류----SH + SH-Prot (노출된 시스테인을 지니는 천연 단백질 또는 예를들어 SPDP에 의한 단백질의 아미노기의 변형 후에 수득된 단백질) ----> 당류-S-S-Prot

[0069] 당류-COOH + EDAC+ NH₂----SH ----> 당류----SH + 말레이미드-Prot (아미노기의 변형) ----> 컨쥬게이트

[0070] 당류-COOH + EDAC + NH₂----SH ----> 당류-SH + 할로아세틸화된-Prot ----> 컨쥬게이트

[0071] 당류-알데히드 + NH₂----NH₂ ----> 당류----NH₂ + EDAC + COOH-Prot ----> 컨쥬게이트

[0072] 주의: 상기 EDAC 대신, 임의의 적절한 카르보디이미드가 사용될 수 있다.

[0073] 요약하면, 당류와의 커플링에 일반적으로 사용될 수 있는 단백질 담체 화학기의 유형은 아미노기 (예를들어, 리신 잔기 상), COOH 기 (예를들어, 아스파르트산 및 글루탐산 잔기 상) 및 SH 기 (접근 가능시) (예를들어, 시스테인 잔기 상)이다.

[0074] 바람직하게는, 담체 단백질 대 S. 뉴모니아 당류의 비는 1:5 내지 5:1; 예를들어, 1:0.5 내지 4:1, 1:1 내지 3.5:1, 1.2:1 내지 3:1, 1.5:1 내지 2.5:1; 예를들어, 1:2 내지 2.5:1; 1:1 내지 2:1 (w/w)이다. 한 구체예에서, 대부분의 컨쥬게이트, 예를들어 6, 7, 8 또는 9개 이상의 컨쥬게이트는 1:1 이상, 예를들어 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 1.5:1 또는 1.6:1의 담체 단백질 대 당류의 비를 지닌다.

[0075] 한 구체예에서, 하나 이상의 S. 뉴모니아 당류가 CDAP 및 EDAC를 이용하여 링커를 통해 담체 단백질에 컨쥬게이팅된다. 예를들어, 18C 또는 22F는 상기 기술된 바와 같이 CDAP 및 EDAC를 이용하여 링커 (예를들어, 말단에 두개의 히드라지노기를 지니는 링커, 예를들어 ADH)를 통해 단백질에 컨쥬게이팅될 수 있다. 링커가 사용되는 경우, 당류를 링커에 컨쥬게이팅시키기 위해 CDAP가 사용될 수 있고, 이후 링커를 단백질에 컨쥬게이팅시키기 위해 EDAC가 사용될 수 있거나, 대안적으로 링커를 단백질에 컨쥬게이팅시키기 위해 먼저 EDAC가 사용될 수 있고, 이후 링커를 당류에 컨쥬게이팅시키기 위해 CDAP가 사용될 수 있다.

[0076] 일반적으로, 본 발명의 면역원성 조성물은 0.1 내지 20 μg, 1 내지 10 μg 또는 1 내지 3 μg의 당류의 각각의 당류 컨쥬게이트의 투여량을 포함할 수 있다.

- [0077] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 0.1 내지 20 μg ; 0.5 내지 10 μg ; 0.5 내지 5 μg 또는 1 내지 3 μg 의 당류의 투여량으로 각각의 S. 뉴모니아 캡슐 당류를 함유한다. 한 구체예에서, 캡슐 당류는 다양한 투여량으로 존재할 수 있고, 예를들어 몇몇 캡슐 당류는 정확히 1 μg 의 투여량으로 존재할 수 있거나 몇몇 캡슐 당류는 정확히 3 μg 의 투여량으로 존재할 수 있다. 한 구체예에서, 혈청형 3, 18C 및 19F (또는 4, 18C 및 19F) 으로부터의 당류는 기타 당류보다 많은 투여량으로 존재한다. 이러한 구체예의 한 양태에서, 혈청형 3, 18C 및 19F (또는 4, 18C 및 19F)는 약 또는 정확히 3 μg 의 투여량으로 존재하는 반면, 면역원성 조성물 내의 기타 당류는 약 또는 정확히 1 μg 의 투여량으로 존재한다.
- [0078] "약" 또는 "대략"은 본 발명의 목적상 제공된 수의 10% 이상 또는 이하의 범위로 정의된다.
- [0079] 한 구체예에서, 하나 이상의 S. 뉴모니아 캡슐 당류가 담체 단백질에 직접적으로 컨주게이팅된다 (예를들어, 상기 기술된 화학중 하나를 이용함). 바람직하게는, 하나 이상의 S. 뉴모니아 캡슐 당류는 CDAP에 의해 직접 컨주게이팅된다. 한 구체예에서, 대부분의 캡슐 당류, 예를들어 5, 6, 7, 8 또는 9개 이상의 캡슐 당류가 CDAP에 의해 담체 단백질에 직접 연결된다 (참고: WO 95/08348 및 WO 96/29094).
- [0080] 면역원성 조성물은 본원에서 본 발명의 스트렙토코쿠스 뉴모니아 단백질로 언급되는 스트렙토코쿠스 뉴모니아 단백질을 포함할 수 있다. 이러한 단백질은 담체 단백질로 사용될 수 있거나, 자유 단백질로 존재할 수 있거나, 담체 단백질 및 자유 단백질 둘 모두로 존재할 수 있다. 본 발명의 스트렙토코쿠스 뉴모니아 단백질은 적어도 폐렴구균 생활 주기의 일부 동안 표면 노출되거나, 폐렴구균에 의해 분비되거나 방출되는 단백질이다. 바람직하게는, 본 발명의 단백질은 하기 범주로부터 선택된다: LXXC의 타입 II 신호 서열 모티프 (여기서, X는 임의의 아미노산임)를 지니는 단백질 (예를들어, 폴리히스티딘 트라이어드 족 (PhtX)), 콜린 결합 단백질 (CbpX), 타입 I 신호 서열 모티프를 지니는 단백질 (예를들어, Sp101), LPXTG 모티프 (여기서, X는 임의의 아미노산임)를 지니는 단백질 (예를들어, Sp128, Sp130), 및 독소 (예를들어, Ply). 이러한 범주 (또는 모티프) 내의 바람직한 예는 하기 단백질, 또는 이의 면역학적 기능 동등체이다.
- [0081] 한 구체예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 폴리 히스티딘 트라이어드 족 (PhtX), 콜린 결합 단백질 족 (CbpX), CbpX 트렁케이트, LytX 족, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질 (또는 융합체), 뉴몰리신 (Ply), PspA, PsaA, Sp128, Sp101, Sp130, Sp125 및 Sp133으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 포함한다. 한 추가 구체예에서, 면역원성 조성물은 폴리 히스티딘 트라이어드 족 (PhtX), 콜린 결합 단백질 족 (CbpX), CbpX 트렁케이트, LytX 족, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질 (또는 융합체), 뉴몰리신 (Ply), PspA, PsaA, 및 Sp128로 구성된 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단백질을 포함한다. 하나 이상의 구체예에서, 면역원성 조성물은 폴리 히스티딘 트라이어드 족 (PhtX), 콜린 결합 단백질 족 (CbpX), CbpX 트렁케이트, LytX 족, LytX 트렁케이트, CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질 (또는 융합체), 뉴몰리신 (Ply), 및 Sp128로 구성된 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단백질을 포함한다.
- [0082] Pht (폴리 히스티딘 트라이어드) 족은 단백질 PhtA, PhtB, PhtD 및 PhtE를 포함한다. 이러한 족은 지질화 서열, 프롤린-풍부 영역에 의해 분리된 두개의 도메인 및 여러 히스티딘 트라이어드를 특징으로 하며, 이는 금속 또는 뉴클레오시드 결합 또는 효소 활성, (3-5) 코일드 코일 영역, 보존된 N-말단 및 이종성 C 말단을 포함할 수 있다. 이는 시험된 모든 균주의 폐렴구균에 존재한다. 동종성 단백질이 또한 기타 스트렙토코쿠스 및 나이세리아에서 발견되었다. 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명의 Pht 단백질은 PhtD이다. 그러나, 용어 Pht A, B, D 및 E는 하기 인용문에 기술된 서열을 지니는 단백질 뿐만 아니라 참조 단백질과 90% 이상 동일한 서열 상동성을 지니는 이의 천연 발생 (및 인공) 변이체를 의미하는 것이 이해된다. 바람직하게는, 이는 95% 이상 동일하고, 가장 바람직하게는 97% 이상 동일하다.
- [0083] PhtX 단백질에 대해, PhtA는 WO 98/18930에 기술되어 있고, 또한 Sp36로 언급되어 있다. 상기 기술된 바와 같이, 이는 폴리히스티딘 트라이어드 족으로부터의 단백질이며, LXXC의 타입 II 신호 모티프를 지닌다. PhtD는 WO 00/37105에 기술되어 있고, 이는 또한 Sp036D로 언급되어 있다. 상기 기술된 바와 같이, 이는 또한 폴리히스티딘 트라이어드 족으로부터의 단백질이고, 타입 II LXXC 신호 모티프를 지닌다. PhtB는 WO 00/37105에 기술되어 있고, 이는 또한 Sp036B로 언급되어 있다. PhtB 족의 또 다른 일원은 WO 00/17370에 기술된 바와 같은 C3-분해 폴리펩티드이다. 이러한 단백질은 또한 폴리히스티딘 트라이어드 족으로부터의 단백질이고, 타입 II LXXC 신호 모티프를 지닌다. 바람직한 면역학적 기능 동등체는 WO 98/18930에 기술된 단백질 Sp42이다. PhtB 트렁케이트 (대략 79kD)가 W099/15675에 기술되어 있으며, 이 또한 PhtX 족의 일원으로 간주된다. PhtE가 W000/30299에 기술되어 있으며, 이는 BVH-3로 언급되어 있다. 임의의 Pht 단백질이 본원에 언급되는 경우, Pht

단백질의 면역원성 단편 또는 이의 융합체가 사용될 수 있음을 의미한다. 예를들어, PhtX에 대한 참고는 임의의 Pht 단백질로부터의 면역원성 단편 또는 이의 융합체를 포함한다. PhtD 또는 PhtB에 대한 참고는 예를들어 W00198334에서 발견되는 바와 같은 PhtDE 또는 PhtBE 융합체를 참고로 한다.

[0084] 뉴몰리신은 별개의 세포용해 (용혈) 활성 및 보체 활성화 활성을 지니는 다기능성 독소이다 (Rubins et al., *Am. Respi. Cit Care Med*, 153:1339-1346 (1996)). 독소는 폐렴구균에 의해 분비되지 않지만, 자가용해소의 영향하에서 폐렴구균의 용해시에 방출된다. 이의 효과는, 예를들어 인간 단핵구에 의한 염증성 사이토카인 생성의 자극, 인간 호흡 상피에서의 섬모의 고동의 억제, 및 호중구의 살균 활성 및 이동의 감소를 포함한다. 뉴몰리신의 가장 명백한 효과는 콜레스테롤로의 결합을 포함하는 적혈구 세포의 용해에 있다. 이는 독소이므로, 생체내에 투여되기 전에 무독화 (즉, 보호에 적합한 투여량으로 제공시 인간에 대해 무독성)되는 것이 필요하다. 야생형 또는 천연 뉴몰리신의 발현 및 클로닝은 당 분야에 공지되어 있다. 예를들어, 문헌[Walker et al. (*Infect Immun*, 55:1184-1189 (1987)), Mitchell et al. (*Biochim Biophys Acta*, 1007:67-72 (1989) and Mitchell et al (*NAR*, 18:4010 (1990))]을 참조하라. ply의 무독화는 화학적 수단, 예를들어 포르말린 처리 또는 글루타르알데히드 처리 또는 둘 모두의 조합으로의 적용 (WO 04081515, PCT/EP2005/010258)에 의해 수행될 수 있다. 이러한 방법은 다양한 독소에 대해 당 분야에 널리 공지되어 있다. 대안적으로, ply는 유전적으로 무독화될 수 있다. 따라서, 본 발명은 예를들어 돌연변이된 단백질일 수 있는 폐렴구균 단백질의 유도체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "돌연변이된"은 부위 특이적 돌연변이유발 또는 임의의 기타 통상적인 방법을 위한 널리 공지된 기술을 이용하여 하나 이상의 아미노산이 결실, 첨가 또는 치환된 분자를 의미한다. 예를들어, 상기 기술된 바와 같이, 돌연변이 ply 단백질은 여전히 이의 면역원성 에피토프를 유지하면서 생물학적으로 비활성화 되도록 변경될 수 있다. 예를들어, W090/06951, 문헌[Berry et al (*Infect Immun*, 67: 981-985 (1999))] 및 W099/03884를 참조하라.

[0085] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "Ply"는 의약 용도에 적합한 돌연변이되거나 무독화된 (즉, 비독성) 뉴몰리신을 의미하는 것으로 이해된다.

[0086] 콜린 결합 단백질 족 (CbpX)과 관련하여, 이러한 족의 일원은 본래 콜린-친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있는 폐렴구균 단백질로 확인되었다. 모든 콜린-결합 단백질은 세포벽 타이코산 및 막-관련 지질타이코산의 포스포릴콜린 부분에 비공유적으로 결합되어 있다. 구조적으로, 이들은 전체 족에 걸쳐서 공통적인 여러 영역을 지니지만, 단백질의 정확한 특성 (아미노산 서열, 길이 등)은 다양할 수 있다. 일반적으로, 콜린 결합 단백질은 N 말단 영역 (N), 보존된 반복 영역 (R1 및/또는 R2), 프롤린 풍부 영역 (P) 및 단백질의 대략 절반을 포함하는 다중 반복부로 이루어진 보존된 콜린 결합 영역 (C)을 포함한다. 본 출원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "콜린 결합 단백질 족 (CbpX)"은 W097/41151에서 확인된 콜린 결합 단백질, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD 및 CbpG로 구성된 그룹으로부터 선택된다. CbpA는 W097/41151에 기술되어 있다. CbpD 및 CbpG는 W000/29434에 기술되어 있다. PspC는 W097/09994에 기술되어 있다. PbcA는 W098/21337에 기술되어 있다. SpsA는 W098/39450에 기술된 콜린 결합 단백질이다.

[0087] 바람직하게는, 콜린 결합 단백질은 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0088] 또 다른 바람직한 구체예는 CbpX 트렁케이트로, "CbpX"는 상기 정의되어 있고, "트렁케이트"는 콜린 결합 영역 (C)의 50% 이상이 결핍된 CbpX 단백질을 의미한다. 바람직하게는, 이러한 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 결핍되어 있다. 더욱 바람직하게는, 이러한 단백질 트렁케이트는 (i) 콜린 결합 영역 및 (ii) 단백질의 N-말단의 절반 부분이 결핍되어 있으나, 하나 이상의 반복 영역 (R1 또는 R2)은 여전히 보유한다. 더욱 바람직하게는, 트렁케이트는 2개의 반복 영역 (R1 또는 R2)을 지닌다. 이러한 바람직한 구체예의 예는 W099/51266 또는 W099/51188에 예시된 바와 같은 NR1xR2 및 R1xR2이나, 유사한 콜린 결합 영역이 결핍된 기타 콜린 결합 단백질이 또한 본 발명의 범위에 고려된다.

[0089] LytX 족은 세포 용해와 관련된 막 관련 단백질이다. N-말단 도메인은 콜린 결합 도메인(들)을 포함하나, LytX 족은 상기 기술된 CbpA 족에서 발견되는 모든 특징을 지니지 않으며, 따라서 본 발명에 있어서 LytX 족은 CbpX 족과는 별개의 것으로 간주된다. CbpX 족과는 대조적으로, C-말단 도메인은 LytX 단백질 족의 촉매 도메인을 함유한다. 이러한 족은 LytA, B 및 C를 포함한다. LytX 족과 관련하여, LytA는 문헌[Ronda et al., *Eur J Biochem*, 164:621-624 (1987)]에 기술되어 있다. LytB는 W098/18930에 기술되어 있고, 또한 Sp46으로 언급되어 있다. LytC는 또한 W098/18930에 기술되어 있고, 또한 Sp91로 언급되어 있다. 상기 족의 바람직한 일원은 LytC이다.

[0090] 또 다른 바람직한 구체예는 LytX 트렁케이트이고, 여기서 "LytX"는 상기 정의된 바와 같고, "트렁케이트"는 콜

린 결합 영역의 50% 이상이 결핍된 LytX 단백질을 의미한다. 바람직하게는, 이러한 단백질은 전체 콜린 결합 영역이 결핍되어 있다. 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예는 CbpX 트렁케이트-LytX 트렁케이트 키메라 단백질 (또는 융합체)이다. 바람직하게는, 이는 CbpX의 NR1xR2 (또는 R1xR2) 및 LytX의 C-말단 부분 (Cterm, 즉, 콜린 결합 도메인이 결핍) (예를들어, LytCCterm 또는 Sp91 Cterm)을 포함한다. 더욱 바람직하게는, CbpX는 CbpA, PbcA, SpsA 및 PspC로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 이는 CbpA이다. 바람직하게는, LytX는 LytC (또한 Sp91로 언급됨)이다. 본 발명의 또 다른 구체예는 콜린 결합 도메인 (C)이 결핍되고, LytX와의 융합 단백질로 발현되는 PspA 또는 PsaA 트렁케이트이다. 바람직하게는, LytX는 LytC이다.

[0091] PsaA 및 PspA에 관하여, 둘 모두는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 예를들어, PsaA 및 이의 막횡단 결실 변이체가 문헌[Berry & Paton, *Infect Immun* 1996 Dec;64(12):5255-62]에 기술되어 있다. PspA 및 이의 막횡단 결실 변이체는 예를들어 US 5804193, WO 92/14488 및 WO 99/53940에 기술되어 있다.

[0092] Sp128 및 Sp130은 W000/76540에 기술되어 있다. Sp125는 LPXTG의 세포막 부착 모티프 (여기서, X는 임의의 아미노산임)를 지니는 페렴구균 표면 항원의 예이다. 상기 모티프를 지니는 상기 부류의 페렴구균 표면 단백질에서의 임의의 단백질이 본 발명의 상황에서 유용한 것으로 밝혀졌고, 따라서 본 발명의 추가 단백질로 간주된다. Sp125 자체는 WO 98/18930에 기술되어 있고, 이는 또한 ZmpB - 아연 금속단백분해효소로 공지되어 있다. Sp101은 WO 98/06734 (여기서, 이는 # y85993의 참고번호를 지님)에 기술되어 있다. 이는 타입 I 신호 서열을 특징으로 한다. Sp133은 WO 98/06734 (여기서, 이는 # y85992의 참고번호를 지님)에 기술되어 있다. 이 또한 타입 I 신호 서열을 특징으로 한다.

[0093] 조합 백신 (특히, 중이염의 예방을 위한 것)에 포함될 수 있는 바람직한 모락셀라 카타랄리스 단백질 항원의 예는 OMP106 [WO 97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21 또는 이의 단편 (WO 0018910); LbpA 및/또는 LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA 및/또는 TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, et al. (1993) *Infect. Immun.* 61.2003-2010]; UspA1 및/또는 UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpIA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); 및 OmpE이다. 조합 백신 (특히, 중이염의 예방을 위한 것)에 포함될 수 있는 유형 분류할 수 없는 헤모필루스 인플루엔자 항원 또는 이의 단편의 예는 펄브린 단백질 [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] 및 이로부터의 펩티드를 포함하는 융합체 [예를들어, LB1 (f) 펩티드 융합체; US 5843464 (OSU) 또는 WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA 및/또는 TbpB; Hia, Hsf; Hin47, Hif, Hmw1; Hmw2; Hmw3, Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); P2; 및 P5 (WO 94/26304)를 포함한다.

[0094] 본 발명의 단백질은 또한 유리하게는 조합될 수 있다. 조합은 면역원성 조합물이 담체 단백질 또는 자유 단백질 또는 이들 둘 모두의 혼합물로서 하기 조합으로부터의 모든 단백질을 포함하는 것을 의미한다. 예를들어, 하기에 기술되는 두개의 단백질 조합에서, 둘 모두의 단백질은 담체 단백질로 사용될 수 있거나, 둘 모두의 단백질은 자유 단백질로 존재할 수 있거나, 둘 모두의 단백질은 담체 단백질 및 자유 단백질로 존재할 수 있거나, 하나의 단백질은 담체 단백질 및 자유 단백질로 존재하는 반면 나머지 단백질은 단지 담체 단백질 또는 단지 자유 단백질로 존재할 수 있거나, 하나의 단백질은 담체 단백질로 존재하고 나머지는 자유 단백질로 존재할 수 있다. 세개의 단백질의 조합물이 제공되는 경우, 유사한 가능성이 존재한다. 바람직한 조합물은 PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91 Cterm 키메라 또는 융합 단백질, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91 Cterm 키메라 또는 융합 단백질, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 + LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, NR1xR2 (또는 R1xR2)는 CbpA 또는 PspC로부터 유래된다. 더욱 바람직하게는, 이는 CbpA로부터 유래된다. 기타 조합물은 3개의 단백질 조합물, 예를들어 PhtD + NR1xR2 + Ply, 및 PhtA + NR1xR2 + PhtD를 포함한다. 한 구체예에서, 백신 조성물은 담체 단백질로서 무독화된 뉴몰리신 및 PhtD 또는 PhtDE를 포함한다. 한 추가 구체예에서, 백신 조성물은 자유 단백질로서 무독화된 뉴몰리신 및 PhtD 또는 PhtDE를 포함한다.

[0095] 본 발명은 본 발명의 면역원성 조성물 및 약학적으로 허용되는 부형제를 함유하는 백신을 추가로 제공한다.

[0096] 본 발명의 백신은 특히 중년 집단 뿐만 아니라 유아 집단에 사용하려는 경우 애쥬번팅될 수 있다. 적절한 애쥬번트는 알루미늄염, 예를들어 알루미늄 히드록시드 겔 또는 알루미늄 포스페이트 또는 명반을 포함하나, 또한 칼슘, 마그네슘, 철 또는 아연의 염이 존재할 수 있거나, 아실화된 티로신 또는 아실화된 당, 양이온 또는 음이

온적으로 유도된 당류, 또는 폴리포스파젠의 불용성 현탁액으로 존재할 수 있다.

- [0097] 애주번트가 TH1 유형의 반응의 우선적인 유도인자인 것으로 선택되는 것이 바람직하다. 고수준의 이러한 Th1-유형 사이토카인은 제공된 항원에 대해 세포 매개 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있는 반면, 고수준의 Th2-유형 사이토카인은 항원에 대해 체액성 면역 반응의 유도를 선호하는 경향이 있다.
- [0098] Th1 및 Th2-유형 면역 반응의 구별은 절대적이지는 않다. 실제로, 개체는 Th1 우선적이거나 Th2 우선적인 것으로 기재되는 면역 반응을 뒷받침할 것이다. 그러나, 모스만 및 코프만 (Mosmann and Coffman)에 의한 뮤린 CD4 +ve T 세포 클론에 기술된 것과 관련한 사이토카인 족을 고려하는 것이 종종 편리하다 (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173). 전통적으로, Th1-유형 반응은 T-림프구에 의한 INF- γ 및 IL-2 사이토카인의 생성과 관련된다. Th1-유형 면역 반응의 유도와 종종 직접적으로 관련된 기타 사이토카인, 예를들어 IL-12는 T-세포에 의해 생성되지 않는다. 대조적으로, Th2-유형 반응은 IL-4, IL-5, IL-6 및 IL-10의 분비와 관련된다. Th1 반응을 우선적으로 촉진하는 적절한 애주번트 시스템은 모노포스포릴 지질 A 또는 이의 유도체, 특히 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL) (이의 제법에 대해서는 GB 2220211 A 참조); 및 모노포스포릴 지질 A, 바람직하게는 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A와 알루미늄염 (예를들어, 알루미늄 포스페이트 또는 알루미늄 히드록시드) 또는 수중유 에멀전의 조합물을 포함한다. 이러한 조합물에서, 항원 및 3D-MPL이 동일한 미립자 구조로 함유되고, 이는 항원성 및 면역자극 신호의 보다 효과적인 전달을 가능케 한다. 연구들은 3D-MPL이 명반-흡수된 항원의 면역원성을 추가로 향상시킬 수 있음을 나타내었다 [Thoelen et al. Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].
- [0099] 향상된 시스템은 모노포스포릴 지질 A와 사포닌 유도체의 조합물, 특히 WO 94/00153에 기술된 QS21과 3D-MPL의 조합물, 또는 WO 96/33739에 기술된 바와 같은 QS21이 콜레스테롤로 쉐딩된 덜 부반응성인 조성물을 포함한다. 수중유 에멀전에 QS21, 3D-MPL 및 토코페롤을 포함하는 특히 효능있는 애주번트 제형이 WO 95/17210에 기술되어 있다. 한 구체예에서, 면역원성 조성물은 추가로 QS21일 수 있는 사포닌을 포함한다. 제형은 또한 수중유 에멀전 및 토코페롤을 포함할 수 있다 (WO 95/17210). 올리고뉴클레오티드 (WO 96/02555) 및 기타 면역조절 올리고뉴클레오티드 (WO0226757 및 WO03507822)를 함유하는 메틸화되지 않은 CpG가 또한 TH1 반응의 우선적인 유도인자이고, 본 발명에 사용하기에 적합하다.
- [0100] 특히, 애주번트는 금속염, 수중유 에멀전, Toll 유사 수용체 효능제 (특히, Toll 유사 수용체 2 효능제, Toll 유사 수용체 3 효능제, Toll 유사 수용체 4 효능제, Toll 유사 수용체 7 효능제, Toll 유사 수용체 8 효능제 및 Toll 유사 수용체 9 효능제), 사포닌 또는 이들의 조합물의 그룹으로부터 선택된 것이다.
- [0101] 본 발명의 백신 조성물과 함께 사용될 수 있는 애주번트는 WO02/09746에 교시된 바와 같은 그람 음성 박테리아 균주로부터의 수포 또는 외막 소포 제조물, 특히 M. 메니지티디스 수포이다. 수포의 애주번트 특성은 이의 표면 상에 LOS (리포올리고사카라이드)를 유지 (예를들어, 저농도의 세제 [예를들어, 0 내지 0.1% 데옥시콜레이트]를 이용한 추출에 의함)시킴으로써 개선될 수 있다. LOS는 WO02/09746에 논의된 msbB(-) 또는 htrB(-) 돌연변이를 통해 무독화될 수 있다. 애주번트 특성은 또한 수막구균 수포로부터 PorB를 유지(및 임의로 PorA를 제거)시킴으로써 개선될 수 있다. 애주번트 특성은 또한 예를들어 WO2004/014417에 논의된 바와 같은 IgtB(-) 돌연변이를 통한 수막구균 수포 상의 LOS의 외부 코어 당류 구조를 트렁케이팅시킴으로써 개선될 수 있다. 대안적으로, 상술된 LOS (예를들어, msbB(-) 및/또는 IgtB(-) 균주로부터 분리됨)는 정제될 수 있고, 본 발명의 조성물 내에서 애주번트로 사용될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 조성물과 함께 사용될 수 있는 추가의 애주번트는 사포닌, 지질 A 또는 이의 유도체, 면역자극 올리고뉴클레오티드, 알킬 글루코사미나이드 포스페이트, 수중유 에멀전 또는 이들의 조합물의 그룹으로부터 선택될 수 있다. 추가의 바람직한 애주번트는 또 다른 애주번트와 조합된 금속염이다. 애주번트가 Toll 유사 수용체 효능제, 특히 Toll 유사 수용체 2, 3, 4, 7, 8 또는 9의 효능제, 또는 사포닌, 특히 Qs21인 것이 바람직하다. 애주번트 시스템이 상기 목록으로부터의 두개 이상의 애주번트를 포함하는 것이 추가로 바람직하다. 특히, 조합물은 바람직하게는 사포닌 (특히, Qs21) 애주번트 및/또는 Toll 유사 수용체 9 효능제, 예를들어 CpG 함유 면역자극 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 기타 바람직한 조합물은 사포닌 (특히, QS21) 및 Toll 유사 수용체 4 효능제, 예를 들어 모노포스포릴 지질 A 또는 이의 3 데아실화된 유도체, 3D-MPL, 또는 사포닌 (특히, QS21) 및 Toll 유사 수용체 4 리간드, 예를들어 알킬 글루코사미나이드 포스페이트를 포함한다.
- [0103] 특히 바람직한 애주번트는 3D-MPL과 QS21의 조합물 (EP 0 671 948 B1), 3D-MPL 및 QS21을 포함하는 수중유 에멀전 (WO 95/17210, WO 98/56414), 또는 기타 담체와 함께 제형화된 3D-MPL (EP 0 689 454 B1)이다. 기타 바

람직한 애주번트 시스템은 US6558670, US6544518에 기술된 바와 같은 3D-MPL, QS21 및 CpG 올리고뉴클레오티드의 조합물을 포함한다.

- [0104] 한 구체예에서, 애주번트는 Toll 유사 수용체 (TLR) 4 리간드, 바람직하게는 효능제, 예를들어 지질 A 유도체, 특히 모노포스포릴 지질 A, 더욱 특히 3-데아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)이다 (또는 이들을 포함한다).
- [0105] 3D-MPL은 글락소스미스클라인 바이오로지칼즈사 (GlaxoSmithKline Biologicals, North America)에서 시판되고, IFN- γ (Th1) 표현형을 지니는 CD4+ T 세포 반응을 주로 촉진한다. 이는 GB 2 220 211 A에 기술된 방법에 따라 생성될 수 있다. 화학적으로, 이는 3-데아실화된 모노포스포릴 지질 A와 3, 4, 5 또는 6개의 아실화된 사슬의 혼합물이다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물에서, 작은 입자의 3D-MPL이 사용된다. 작은 입자의 3D-MPL은 0.22 μ m의 필터를 통해 멸균 여과될 수 있는 입자 크기를 지닌다. 이러한 제조물은 국제 특허 출원 WO 94/21292에 기술되어 있다. 지질 A의 합성 유도체가 공지되어 있고, 비제한적인 예로 하기의 화합물을 포함하는 TLR 4 효능제인 것으로 생각된다:
- [0106] OM174 (2-데옥시-6-*o*-[2-데옥시-2-[(R)-3-도데카노일옥시테트라-데카노일아미노]-4-*o*-포스포노- β -D-글루코피라노실]-2-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]- α -D-글루코피라노실디히드로겐포스페이트), (WO 95/14026)
- [0107] OM294 DP (3S, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9(R)-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]테칸-1,10-디올, 1,10-비스(디히드로게노포스페이트) (WO99/64301 및 WO 00/0462)
- [0108] OM 197 MP-Ac DP (3S-, 9R)-3-[(R)-도데카노일옥시테트라데카노일아미노]-4-옥소-5-아자-9-[(R)-3-히드록시테트라데카노일아미노]테칸-1,10-디올, 1-디히드로게노포스페이트 10-(6-아미노헥사노에이트) (WO 01/46127)
- [0109] 사용될 수 있는 기타 TLR4 리간드는 알킬 글루코사미나이드 포스페이트 (AGP), 예를들어 WO9850399 또는 US6303347에 기술 (AGP의 제조 방법이 또한 기술되어 있음)된 것, 또는 US6764840에 기술된 바와 같은 AGP의 약학적으로 허용되는 염이다. 몇몇 AGP는 TLR4 효능제이고, 몇몇은 TLR4 길항제이다. 둘 모두가 애주번트로서 유용한 것으로 생각된다.
- [0110] 본 발명에 사용하기 위한 또 다른 바람직한 면역자극제는 Quil A 및 이의 유도체이다. Quil A는 남아메리카의 나무 켈라자 사포나리아 몰리나 (Quilaja Saponaria Molina)로부터 분리된 사포닌 제조물이고, 문헌[Dalsgaard et al. in 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)]에 의해 애주번트 활성을 지니는 것으로 처음 기술되었다. Quil A와 관련된 독성이 없이 애주번트 활성을 유지하는 Quil A의 정제된 단편, 예를들어 QS7 및 QS21 (QA7 및 QA21로도 공지됨)이 HPLC에 의해 분리되었다 (EP 0 362 278). QS-21은 CD8+ 세포독성 T 세포 (CTL), Th1 세포 및 우세한 IgG2a 항체 반응을 유도하는 켈라자 사포나리아 몰리나의 나무껍질로부터 유래된 천연 사포닌이며, 본 발명의 상황에 바람직한 사포닌이다.
- [0111] 특히 바람직한 QS21의 특정 제형이 기술되어 있고, 이들 제형은 스테롤을 추가로 포함한다 (WO96/33739). 본 발명의 일부를 이루는 사포닌은 마이셀, 혼합된 마이셀 (바람직하게는, 담즙산염과의 혼합된 마이셀, 그러나 이로 한정되지는 않음)의 형태로 개별적으로 존재할 수 있거나, 콜레스테롤 및 지질과 함께 제형화되는 경우 ISCOM 매트릭스 (EP 0 109 942 B1), 리포솜 또는 관련된 콜로이드성 구조, 예를들어 나사(worm)-유사 또는 고리-유사 다중 복합체 또는 지질/층화 구조 및 층판의 형태로 존재할 수 있거나, 수중유 에멀전의 형태 (예를들어, WO 95/17210)로 존재할 수 있다. 바람직하게는, 사포닌은 금속염, 예를들어 알루미늄 히드록시드 또는 알루미늄 포스페이트와 관련하여 존재할 수 있다 (WO 98/15287). 바람직하게는, 사포닌은 리포솜, ISCOM 또는 수중유 에멀전의 형태로 존재한다.
- [0112] 향상된 시스템은 모노포스포릴 지질 A (또는 무독화된 지질 A)와 사포닌 유도체의 조합물, 특히 WO 94/00153에 기술된 바와 같은 QS21 및 3D-MPL의 조합물, 또는 WO 96/33739에 기술된 바와 같은 QS21이 콜레스테롤로 쉐딩된 덜 부반응성인 조성물을 포함한다. 수중유 에멀전 내에 QS21 및/또는 3D-MPL을 지니거나 지니지 않는 토크페롤을 포함하는 특히 효능있는 애주번트 제형이 WO 95/17210에 기술되어 있다. 한 구체예에서, 면역원성 조성물은 QS21일 수 있는 사포닌을 추가로 포함한다.
- [0113] 면역자극성 올리고뉴클레오티드 또는 임의의 기타 Toll-유사 수용체 (TLR) 9 효능제가 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 애주번트 또는 백신에 사용하기에 바람직한 올리고뉴클레오티드는 CpG 함유 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 세개 이상, 더욱 바람직하게는 6개 이상의 뉴클레오티드에 의해 분리된 두개 이상의 디뉴클레오티드 CpG 모티프 함유 올리고뉴클레오티드이다. CpG 모티프는 시토신 뉴클레오티드에 후속하는 구아니딘 뉴클레오티드이

다. 본 발명의 CpG 올리고뉴클레오티드는 통상적으로 데옥시뉴클레오티드이다. 한 바람직한 구체예에서, 올리고뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드간 결합은 포스포로디티오에이트, 더욱 바람직하게는 포스포로티오에이트 결합이나, 포스포다이에스테르 및 기타 뉴클레오티드간 결합이 본 발명의 범위에 해당한다. 혼합된 뉴클레오티드간 결합을 지니는 올리고뉴클레오티드가 또한 본 발명의 범위에 해당한다. 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드 또는 포스포로디티오에이트를 생성하는 방법은 US5,666,153, US5,278,302 및 W095/26204에 기술되어 있다.

[0114] 바람직한 올리고뉴클레오티드의 예는 하기 서열을 지닌다. 서열은 바람직하게는 포스포로티오에이트 변형 뉴클레오티드간 결합을 함유한다.

[0115] OLIGO 1 (SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

[0116] OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

[0117] OLIGO 3 (SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

[0118] OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

[0119] OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

[0120] OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

[0121] 대안적 CpG 올리고뉴클레오티드는 중요하지 않은 결실 또는 첨가를 지니는 상기 바람직한 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 사용된 CpG 올리고뉴클레오티드는 당 분야에 공지된 임의의 방법 (예를들어, EP 468520 참조)에 의해 합성될 수 있다. 편리하게는, 이러한 올리고뉴클레오티드는 자동화 합성기를 이용하여 합성될 수 있다.

[0122] 애쥬번트는 수중유 에멀전일 수 있거나, 기타 애쥬번트와 조합된 수중유 에멀전을 포함할 수 있다. 에멀전 시스템의 오일상은 바람직하게는 대사가가능한 오일을 포함한다. 용어 대사가가능한 오일의 의미는 당 분야에 널리 공지되어 있다. 대사가가능한 "물질대사에 의해 변형될 수 있음"으로 정의될 수 있다 (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 25th edition (1974)). 오일은 수용자에게 비독성인 임의의 식물성 오일, 어류 오일, 동물 또는 합성 오일일 수 있으며, 이는 물질대사에 의해 변형될 수 있다. 견과류, 씨앗 및 곡물이 식물성 오일의 통상적인 공급원이다. 합성 오일이 또한 본 발명의 일부를 이루며, 시판되는 오일, 예를들어 NEOBEE® 및 기타 오일을 포함할 수 있다. 스쿠알렌 (2,6,10,15,19,23-헥사메틸-2,6,10,14,18,22-테트라코사헥사엔)은 상어-간 오일에서 대량으로 발견되고, 올리브유, 맥아유, 현미유, 및 효모에서 소량 발견되는 불포화 오일로, 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 오일이다. 스쿠알렌은 이러한 스쿠알렌이 콜레스테롤의 생합성에서 중간체라는 사실 (Merck index, 10th Edition, entry no.8619)에 비추어 대사가가능한 오일이다.

[0123] 토클 (예를들어, 비타민 E)이 또한 종종 오일 에멀전 애쥬번트에 사용된다 (EP 0 382 271 B1; US5667784; WO 95/17210). 본 발명의 에멀전 (바람직하게는, 수중유 에멀전)에 사용된 토클은 EP 0 382 271 B1에 기술된 바와 같이 제형화될 수 있고, 이러한 토클은 바람직하게는 1 마이크로미터 이하의 직경의 유화제를 임의로 포함하는 토클 비말의 분산액일 수 있다. 대안적으로, 토클은 오일 에멀전의 오일 상을 형성시키기 위해 또 다른 오일과 조합하여 사용될 수 있다. 상기 기술된 대사가가능한 오일과 같은, 토클과 조합하여 사용될 수 있는 오일 에멀전의 예가 본원에 기술되어 있다.

[0124] 수중유 에멀전 애쥬번트 그 자체가 애쥬번트 조성물로서 유용한 것으로 제안되었으며 (EP 0 399 843B), 또한 수중유 에멀전과 기타 활성제의 조합물이 백신용 애쥬번트로 기재되었다 (WO 95/17210; WO 98/56414, WO 99/12565; WO 99/11241). 유중수 에멀전 (US 5,422,109; EP 0 480 982 B2) 및 수중유중수 에멀전 (US 5,424,067; EP 0 480 981 B)과 같은 기타 오일 에멀전 애쥬번트가 기술되었다. 본 발명의 애쥬번트 및 조성물을 형성하는 어떠한 형태의 오일 에멀전 시스템 (특히, 토클을 함유하는 경우)이 모두 바람직하다.

[0125] 가장 바람직하게는, 오일 에멀전 (예를들어, 수중유 에멀전)은 유화제, 예를들어 TWEEN 80 및/또는 스테롤, 예를들어 콜레스테롤을 추가로 포함한다. 바람직한 오일 에멀전 (바람직하게는, 수중유 에멀전)은 대사가가능한 무독성 오일, 예를들어 스쿠알렌, 스쿠알렌 또는 토클로펜, 예를들어 알파 토클로펜 (및 바람직하게는 스쿠알렌 및 알파 토클로펜 둘 모두) 및 임의로 유화제 (또는 계면활성제), 예를들어 Tween 80을 포함한다. 스테롤 (바람직하게는, 콜레스테롤)이 또한 포함될 수 있다. 수중유 에멀전을 생성하는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 보통, 이러한 방법은 토클 함유 오일상을 계면활성제, 예를들어 PBS/TWEEN80™ 용액과 혼합시킨 후, 균질화기를 이용하여 균질화시키는 것을 포함하며, 주사 바늘을 통해 2회 혼합물을 통과시키는 것을 포함하는 방법이 소량의 액체를 균질화시키는데 적합함이 당업자에게 명백할 것이다. 또한, 미세유화기 (microfluidiser)

에서의 에멀전화 방법 (M110S 미세유화기 기기, 최대 50회의 통과, 6 바(bar)의 최대 투입압에서 2분의 기간 (약 850 바의 출력압)이 보다 적은 양 또는 보다 많은 양의 에멀전을 생성시키기 위해 당업자에 의해 적합화될 수 있다. 적합화는 제조물이 요망되는 직경의 오일 비말로 달성될때까지 생성 에멀전을 측정하는 것을 포함하는 통상적인 실험에 의해 달성될 수 있다. 수중유 에멀전에서, 오일 및 유화제는 수성 담체로 존재해야 한다. 수성 담체는 예를들어 인산염 완충 염수일 수 있다.

[0126] 안정한 수중유 에멀전 내에서 발견되는 오일 비말의 크기는 광자상관분광법(photon correlation spectroscopy)으로 측정시 바람직하게는 1 마이크론 미만이며, 실질적으로는 30 내지 600 nm, 바람직하게는 실질적으로 약 30 내지 500 nm, 가장 바람직하게는 실질적으로 150 내지 500 nm, 특히 약 150 nm의 직경의 범위일 수 있다. 이에 관하여, 수에 의한 오일 비말의 80%는 바람직한 범위로 존재하여야 하며, 더욱 바람직하게는 수에 의한 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 오일 비말이 규정된 크기 범위 내로 존재한다. 본 발명의 오일 에멀전에 존재하는 성분의 양은 통상적으로 0.5 내지 20% 또는 2 내지 10%의 오일 (전체 투여량중), 예를들어 스쿠알렌; 존재시, 2 내지 10%의 알파 토크페롤, 0.3 내지 3%의 계면활성제, 예를들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올리에이트의 범위로 존재한다. 바람직하게는, 오일 (바람직하게는, 스쿠알렌) : 토크 (바람직하게는 α -토크페롤)의 비는 1 이하이며, 이는 보다 안정한 에멀전을 제공한다. 유화제, 예를들어 Tween80 또는 Span 85가 또한 약 1%의 수준으로 존재할 수 있다. 몇몇 경우에, 본 발명의 백신이 안정화제를 추가로 함유하는 것이 이로울 수 있다.

[0127] 바람직한 에멀전 시스템의 예는 임의로 면역자극제 QS21 및/또는 3D-MPL과 함께 제형화된 스쿠알렌, α -토크페롤 및 TWEEN 80을 기재로 하는 에멀전 애쥬번트를 기술하는 WO 95/17210, WO 99/11241 및 WO 99/12565에 기술되어 있다. 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 애쥬번트는 추가의 면역자극제, 예를들어 LPS 또는 이의 유도체, 및/또는 사포닌을 추가로 포함할 수 있다. 추가의 면역자극제의 예는 본원 및 문헌 ["Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., and Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X]에 기술되어 있다.

[0128] 한 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 애쥬번트 및 면역원성 조성물은 상기 기술된 오일 에멀전 내에 사포닌 (바람직하게는, QS21) 및/또는 LPS 유도체 (바람직하게는, 3D-MPL)과 함께, 임의로 스테롤 (바람직하게는, 콜레스테롤)을 포함한다. 또한, 오일 에멀전 (바람직하게는, 수중유 에멀전)은 Span 85 및/또는 레시틴 및/또는 트리카프릴린을 함유할 수 있다. 수중유 에멀전, 스테롤 및 사포닌을 포함하는 애쥬번트가 WO 99/12565에 기술되어 있다.

[0129] 통상적으로, 인간 투여를 위해, 사포닌 (바람직하게는, QS 21) 및/또는 LPS 유도체 (바람직하게는, 3D-MPL)은 투여량당 1 μ g 내지 200 μ g, 예를들어 10 내지 100 μ g, 바람직하게는 10 μ g 내지 50 μ g의 범위로 인간 투여량의 면역원성 조성물에 존재할 것이다. 통상적으로, 오일 에멀전 (바람직하게는, 수중유 에멀전)은 2 내지 10%의 대사가능한 오일을 포함할 것이다. 바람직하게는, 이는 2 내지 10%의 스쿠알렌, 2 내지 10%의 알파 토크페롤 및 0.3 내지 3% (바람직하게는, 0.4 내지 2%)의 유화제 (바람직하게는, tween 80 [폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올리에이트])를 포함할 것이다. 스쿠알렌 및 알파 토크페롤 둘 모두가 존재하는 경우, 바람직하게는 스쿠알렌:알파 토크페롤의 비는 1 이하이며, 이는 보다 안정한 에멀전을 제공한다. Span 85 (소르비탄 트리올리에이트)가 또한 본 발명에 사용되는 에멀전 내에 0.5 내지 1%의 수준으로 존재할 수 있다. 몇몇 경우에, 본 발명의 면역원성 조성물 및 백신이 안정화제, 예를들어 기타 유화제/표면활성제, 예를들어 카프릴산 (merck index 10th Edition, entry no. 1739)을 추가로 함유하는 것이 이로울 수 있고, 트리카프릴린이 특히 바람직하다.

[0130] 스쿠알렌 및 사포닌 (바람직하게는, QS21)이 포함되는 경우, 제형에 스테롤 (바람직하게는, 콜레스테롤)을 포함시키는 것이 유리한데, 이는 에멀전 내의 오일의 전체 수준을 감소시키기 때문이다. 이는 제조 비용을 감소시키고, 예방접종의 종합적인 편의성을 개선시키고, 또한 IFN- γ 생성을 개선시키는 것과 같은 발생되는 면역 반응을 정성 및 정량적으로 개선시킨다. 따라서, 본 발명의 애쥬번트 시스템은 통상적으로 200:1 내지 300:1의 범위의 대사가능한 오일:사포닌 (w/w) 비를 포함하고, 또한 본 발명은 1:1 내지 200:1, 바람직하게는 20:1 내지 100:1, 가장 바람직하게는 실질적으로 48:1의 바람직한 범위의 "저(low) 오일" 형태로 사용될 수 있으며, 이러한 백신은 매우 감소된 부반응성 프로파일과 함께 모든 성분의 이로운 애쥬번트 특성을 유지한다. 따라서, 특히 바람직한 구체예는 1:1 내지 250:1의 범위, 바람직하게는 20:1 내지 200:1, 더욱 바람직하게는 20:1 내지 100:1, 가장 바람직하게는 실질적으로 48:1의 범위의 스쿠알렌:QS21 (w/w) 비를 지닌다. 바람직하게는, 스테롤 (가장 바람직하게는, 콜레스테롤)은 또한 상기 기술된 바와 같은 사포닌:스테롤의 비로 존재하도록 포함된다.

- [0131] 본 발명의 에멀전 시스템은 바람직하게는 서브-마이크론 범위의 작은 오일 비말 크기를 지닌다. 가장 바람직하게는, 오일 비말 크기는 120 내지 750 nm, 가장 바람직하게는 120 내지 600 nm의 직경 범위일 것이다.
- [0132] 특히 효능있는 애주번트 제형 (본 발명의 면역원성 조성물에서 $AlPO_4$ 와의 궁극적인 조합을 위한 것)은 WO 95/17210 또는 WO 99/12565에 기술된 바와 같이 사포닌 (바람직하게는, QS21) 및 LPS 유도체 (바람직하게는, 3D-MPL) 및 오일 에멀전 (바람직하게는, 수중유 에멀전 내의 스쿠알렌 및 알파 토크페롤)을 포함한다 (특히, 실시예 2, 표 1의 애주번트 제형 11).
- [0133] TLR 2 효능제의 예는 펩티도글리칸 또는 지질단백질을 포함한다. 이미다조퀴놀린, 예를들어 이미퀴모드 (Imiquimod) 및 레시퀴모드 (Resiquimod)가 공지된 TLR7 효능제이다. 단일 가닥 RNA가 또한 공지된 TLR 효능제 (인간에서의 TLR8 및 마우스에서의 TLR7)인 반면, 이중 가닥 RNA 및 폴리 IC (폴리이노신산-폴리시티딜산 - 바이러스 RNA의 시판되는 합성 모방체 (mimetic))가 TLR 3 효능제의 예이다. 3D-MPL은 TLR4 효능제의 예인 반면, CPG는 TLR9 효능제의 예이다.
- [0134] 면역원성 조성물은 금속염에 흡착된 항원 및 면역자극제를 포함할 수 있다. 항원 및 면역자극제 3-테-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)가 동일한 입자에 흡착된 알루미늄 기재 백신 제형이 EP 0 576 478 B1, EP 0 689 454 B1, 및 EP 0 633 784 B1에 기재되어 있다. 이러한 경우에, 항원이 먼저 알루미늄염에 흡착된 후, 동일한 알루미늄염 입자로 면역자극제 3D-MPL이 흡착된다. 이러한 과정은 먼저 입자가 80 내지 500 nm의 크기에 도달할때까지 수조에서의 음파처리에 의한 3D-MPL의 현탁을 포함한다. 항원은 통상적으로 교반하에서 실온에서 1 시간 동안 알루미늄염으로 흡착된다. 이후, 3D-MPL 현탁액이 흡착된 항원에 첨가되고, 제형이 1시간 동안 실온에서 인큐베이팅된 후, 사용시까지 4°C에서 유지된다.
- [0135] 또 다른 방법에서, EP 1126876에 기술된 바와 같이 면역자극제 및 항원이 별개의 금속 입자에 존재한다. 개선된 방법은 금속염 입자로 면역자극제를 흡착시키고, 또 다른 금속염 입자로 항원을 흡착시킨 후, 별개의 금속 입자를 혼합시켜 백신을 형성시키는 것을 포함한다. 본 발명에 사용하기 위한 애주번트는 금속염 입자에 흡착된 면역자극제를 포함하는 애주번트 조성물일 수 있고, 이러한 금속염 입자는 실질적으로 기타 항원을 포함하지 않는 것을 특징으로 한다. 또한, 백신이 본 발명에 의해 제공되고, 여기서 면역자극제는 실질적으로 기타 항원을 포함하지 않는 금속염의 입자에 흡착되는 것을 특징으로 하고, 항원에 흡착된 금속염의 입자는 실질적으로 기타 면역자극제를 포함하지 않는 것을 특징으로 한다. 따라서, 본 발명은 금속염의 입자에 흡착된 면역자극제를 포함하는 애주번트 제형을 제공하며, 조성물은 실질적으로 기타 항원을 포함하지 않는 것을 특징으로 한다. 또한, 이러한 애주번트 제형은, 애주번트가 사용되는 경우 백신의 제조에 요구되는 중간체일 수 있다. 따라서, 하나 이상의 면역자극제가 금속 입자에 흡착된 애주번트 조성물과 항원을 혼합시키는 것을 포함하는 백신의 제조 방법이 제공된다. 바람직하게는, 항원은 금속염에 예비-흡착된다. 상기 금속염은 면역자극제로 흡착된 금속염과 동일하거나 유사할 수 있다. 바람직하게는, 금속염은 알루미늄염, 예를들어 알루미늄 포스페이트 또는 알루미늄 히드록시드이다. 본 발명은 추가로 금속염의 첫번째 입자에 흡착된 면역자극제 및 금속염에 흡착된 항원을 포함하는 백신 조성물을 제공하고, 금속염의 첫번째 및 두번째 입자는 별개의 입자임을 특징으로 한다.
- [0136] 본원에 기술된 LPS 또는 LOS 유도체 또는 돌연변이 또는 지질 A 유도체는 천연 지질다당류 보다 덜 독성이 되도록 고안되며 (예를들어, 3D-MPL), 이들은 본원에 기술된 상기 부분의 사용과 관련하여 상호교환될 수 있는 동등물이다. 이들은 상기 기술된 바와 같이 TLR4 리간드일 수 있다. 기타 이러한 유도체가 WO020786737, WO9850399, WO0134617, WO0212258 및 WO03065806에 기술되어 있다.
- [0137] 한 구체예에서, 본 발명의 조성물에 사용된 애주번트는 리포솜 담체 (인지질 (예를들어, 디올레일 포스파티딜 콜린 [DOPC]) 및 임의로 스테롤 [예를들어, 콜레스테롤]로부터 공지된 기술에 의해 제조)를 포함한다. 이러한 리포솜 담체는 지질 A 유도체 [예를들어, 3D-MPL - 상기 참조] 및/또는 사포닌 (예를들어, QS21 - 상기 참조)을 지닐 수 있다. 한 구체예에서, 애주번트는 (0.5 mL의 투여량당) 0.1 내지 10 mg, 0.2 내지 7, 0.3 내지 5, 0.4 내지 2, 또는 0.5 내지 1 mg (예를들어, 0.4 내지 0.6, 0.9 내지 1.1, 0.5 또는 1 mg)의 인지질 (예를들어, DOPC), 0.025 내지 2.5, 0.05 내지 1.5, 0.075 내지 0.75, 0.1 내지 0.3, 또는 0.125 내지 0.25 mg (예를들어, 0.2 내지 0.3, 0.1 내지 0.15, 0.25 또는 0.125 mg)의 스테롤 (예를들어, 콜레스테롤, 5 내지 60, 10 내지 50, 또는 20 내지 30 μ g (예를들어, 5 내지 15, 40 내지 50, 10, 20, 30, 40 또는 50 μ g)의 지질 A 유도체 (예를들어, 3D-MPL), 및 5 내지 60, 10 내지 50, 또는 20 내지 30 μ g (예를들어, 5 내지 15, 40 내지 50, 10, 20, 30, 40 또는 50 μ g)의 사포닌 (예를들어, QS21)을 포함한다.
- [0138] 이러한 애주번트는 중년 인간용 백신 제형에 특히 적합하다. 한 구체예에서, 상기 애주번트를 포함하는 백신

조성물은 적어도 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F 모두로부터 유래된 당류 컨주게이트를 포함 (및 혈청형 3, 6A, 19A 및 22F로부터의 하나 이상의 당류 컨주게이트도 포함할 수 있음)하고, 여기서 백신 성분 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F중 하나 이상(또는 모두)에 대해 유도된 GMC 항체 역가는 인간 예방접종자에서 프레브나르(Prevnar®)에 의해 유도된 GMC 항체 역가에 비해 현저하게 열등하지 않다.

[0139] 한 구체예에서, 본 발명의 조성물에 사용된 애주번트는 대사가 가능한 오일 (예를들어, 스쿠알렌), 유화제 (예를들어, Tween 80) 및 임의로 토클 (예를들어, 알파 토클로페롤)로부터 제조된 수중유 에멀전을 포함한다. 한 구체예에서, 애주번트는 (0.5 mL의 투여량당) 0.5 내지 15, 1 내지 13, 2 내지 11, 4 내지 8, 또는 5 내지 6 mg (예를들어, 2 내지 3, 5 내지 6, 또는 10 내지 11 mg)의 대사가 가능한 오일 (예를들어, 스쿠알렌), 0.1 내지 10, 0.3 내지 8, 0.6 내지 6, 0.9 내지 5, 1 내지 4, 또는 2 내지 3 mg (예를들어, 0.9 내지 1.1, 2 내지 3 또는 4 내지 5 mg)의 유화제 (예를들어, Tween 80) 및 임의로 0.5 내지 20, 1 내지 15, 2 내지 12, 4 내지 10, 5 내지 7 mg (예를들어, 11 내지 13, 5 내지 6, 또는 2 내지 3 mg)의 토클 (예를들어, 알파 토클로페롤)을 포함한다.

[0140] 이러한 애주번트는 임의로 5 내지 60, 10 내지 50, 또는 20 내지 30 μg (예를들어, 5 내지 15, 40 내지 50, 10, 20, 30, 40 또는 50 μg)의 지질 A 유도체 (예를들어, 3D-MPL)을 포함할 수 있다.

[0141] 이러한 애주번트는 특히 유아용 또는 중년 인간용 백신 제형에 적합하다. 한 구체예에서, 이러한 애주번트를 포함하는 백신 조성물은 적어도 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F 모두로부터 유래된 당류 컨주게이트를 포함 (및 혈청형 3, 6A, 19A 및 22F로부터의 하나 이상의 당류 컨주게이트도 포함할 수 있음)하고, 여기서 백신 성분 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F중 하나 이상 (또는 모두)에 대해 유도된 GMC 항체 역가는 인간 예방접종자에서 프레브나르®에 의해 유도된 GMC 항체 역가에 비해 현저하게 열등하지 않다.

[0142] 이러한 애주번트는 임의로 0.025 내지 2.5, 0.05 내지 1.5, 0.075 내지 0.75, 0.1 내지 0.3, 또는 0.125 내지 0.25 mg (예를들어, 0.2 내지 0.3, 0.1 내지 0.15, 0.25 또는 0.125 mg)의 스테롤 (예를들어, 콜레스테롤), 5 내지 60, 10 내지 50, 또는 20 내지 30 μg (예를들어, 5 내지 15, 40 내지 50, 10, 20, 30, 40 또는 50 μg)의 지질 A 유도체 (예를들어, 3D-MPL), 및 5 내지 60, 10 내지 50, 또는 20 내지 30 μg (예를들어, 5 내지 15, 40 내지 50, 10, 20, 30, 40 또는 50 μg)의 사포닌 (예를들어, QS21)을 함유할 수 있다.

[0143] 이러한 애주번트는 특히 중년 인간용 백신 제형에 적합하다. 한 구체예에서, 이러한 애주번트를 포함하는 백신 조성물은 적어도 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F 모두로부터 유래된 당류 컨주게이트를 포함 (및 혈청형 3, 6A, 19A 및 22F로부터의 하나 이상의 당류 컨주게이트도 포함할 수 있음)하고, 여기서 백신 성분 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F중 하나 이상 (또는 모두)에 대해 유도된 GMC 항체 역가는 인간 예방접종자에서 프레브나르®에 의해 유도된 GMC 항체 역가에 비해 현저하게 열등하지 않다.

[0144] 한 구체예에서, 본 발명의 조성물에 사용된 애주번트는 알루미늄 포스페이트 및 지질 A 유도체 (예를들어, 3D-MPL)을 포함한다. 이러한 애주번트는 (0.5 mL의 투여량당) 알루미늄 포스페이트로서 100 내지 750, 200 내지 500, 또는 300 내지 400 μg 의 Al, 및 5 내지 60, 10 내지 50, 또는 20 내지 30 μg (예를들어, 5 내지 15, 40 내지 50, 10, 20, 30, 40 또는 50 μg)의 지질 A 유도체 (예를들어, 3D-MPL)를 포함할 수 있다.

[0145] 이러한 애주번트는 특히 중년 또는 유아용 백신 제형에 적합하다. 한 구체예에서, 이러한 애주번트를 포함하는 백신 조성물은 적어도 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5, 7F 모두로부터 유래된 당류 컨주게이트를 포함 (및 혈청형 3, 6A, 19A 및 22F로부터의 하나 이상의 당류 컨주게이트도 포함할 수 있음)하고, 여기서 백신 성분 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F중 하나 이상 (또는 모두)에 대해 유도된 GMC 항체 역가는 인간 예방접종자에서 프레브나르®에 의해 유도된 GMC 항체 역가에 비해 현저하게 열등하지 않다.

[0146] 본 발명의 면역원성 조성물을 함유하는 백신 제조물은 상기 백신을 전신 또는 점막 경로를 통해 투여함으로써 감염에 민감한 포유동물을 보호하거나 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 투여는 근내, 복막내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사, 또는 경구/소화관, 호흡기, 비노생식관으로의 점막 투여를 포함할 수 있다. 폐렴 또는 중이염의 치료를 위해 백신의 비내 투여 (폐렴구균의 비인두 보균 (carriage)은 보다 효과적으로 예방될 수 있으므로, 초기 단계에서 감염을 약화시킴)가 바람직하다. 본 발명의 백신은 단일 투여로 투여될 수 있으나, 이의 성분이 또한 동시에 또는 상이한 시간 (예를들어, 폐렴구균 당류 컨주게이트는 서로에 대해 면역 반응의 최적 협동을 위해 백신의 임의의 박테리아 단백질 성분의 투여와 동시에 또는 투여 1-2주 후에 개별적으로 투여될 수 있음)에 함께 공동투여될 수 있다. 공동투여를 위해, 임의의 Th1 애주번트가 임의의 상이한 투여 또는 모든 상이한 투여에 존재할 수 있다. 단일 경로의 투여 외에, 2개의 상이한 경로의 투여가 이용될 수 있다. 예를들어, 당류 또는 당류 컨주게이트가 IM (또는 ID) 투여될 수 있고, 박테리아 단백질이 IN (또는 ID) 투여될 수 있

다. 또한, 본 발명의 백신은 프라이밍 투여를 위해 IM 투여되고, 부스터 투여를 위해 IN 투여될 수 있다.

- [0147] 백신 내의 단백질 항원의 함량은 통상적으로 1 내지 100 μg , 바람직하게는 5 내지 50 μg , 가장 통상적으로는 5 내지 25 μg 의 범위로 존재할 수 있다. 최초 예방접종 후, 피검체는 적절한 간격으로 1회 또는 수회의 부스터 면역접종을 투여받을 수 있다.
- [0148] 백신 제조물은 일반적으로 문헌[Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York)]에 기술되어 있다. 리포솜 내의 캡슐화는 문헌[Fullerton, US Patent 4,235,877]에 기술되어 있다.
- [0149] 본 발명의 백신은 용액으로 또는 동결건조된 상태로 보관될 수 있다. 바람직하게는, 용액은 당, 예를 들어 수크로오스 또는 락토오스의 존재하에서 동결건조된다. 이들은 동결건조되고 사용전에 즉석으로 재구성되는 것이 추가로 바람직하다. 동결건조는 보다 안정한 조성물 (백신)을 생성시킬 수 있고, 3D-MPL의 존재 및 알루미늄 기재 애드ju번트의 부재하에서 보다 높은 항체 역가를 생성시킬 수도 있다.
- [0150] 본 발명의 한 양태에서 임의로 동결건조된 형태의 본 발명의 면역원성 조성물을 함유하는 바이얼을 포함하고, 본원에 기술된 애드ju번트를 함유하는 바이얼을 추가로 포함하는 백신 키트가 제공된다. 본 발명의 이러한 양태에서, 애드ju번트는 동결건조된 면역원성 조성물을 재구성시키기 위해 사용될 것이다.
- [0151] 본 발명의 백신은 임의의 경로에 의해 투여될 수 있으나, 기술된 백신의 피부 (ID)로의 투여가 본 발명의 한 구체예를 이룬다. 인간 피부는 표피를 덮고 있는 각질층으로 언급되는 외부 "빨 모양의" 외피를 포함한다. 이러한 표피 아래에 진피로 언급되는 층이 존재하고, 차례로 이는 피하 조직을 덮고 있다. 연구자들은 피부, 특히 진피로의 백신의 주사가 면역 반응을 자극할 수 있고, 이는 또한 다수의 추가 장점과 관련이 있다는 것을 발견하였다. 본원에 기술된 백신을 이용한 피내 예방접종은 본 발명의 바람직한 특징을 이룬다.
- [0152] *피내 주사의 통상적인 기술인 "망토우 (mantoux) 방법"은 피부의 소독 단계, 이후의 한 손을 이용한 스트레칭 단계, 및 위로 향하는 빗각의 좁은 게이지 바늘 (26-31 게이지)을 이용하여 바늘을 10-15°의 각으로 삽입하는 단계를 포함한다. 일단 빗각의 바늘이 삽입되면, 빗각의 바늘을 낮추고, 피부 아래로 바늘을 이동시키기 위해 약간의 압력을 제공하면서 추가로 전진시킨다. 이후, 액체가 매우 천천히 주사됨으로써 피부 표면 상에 수포 또는 용기가 형성된 후, 바늘을 천천히 회수한다.
- [0153] 보다 최근에, 피부로 또는 피부를 가로질러 액체 작용제를 투여하기 위해 특별히 고안된 장치가 기술되었으며, 이러한 장치는 WO 99/34850 및 EP 1092444에 기술되어 있으며, 또한 예를 들어 분사 (jet) 주사 장치가 WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US 5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520,639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 및 WO 97/13537에 기술되었다. 백신 제조물의 피내 투여의 대안적 방법은 통상적인 주사기 및 바늘, 또는 고체 백신의 발리스틱 (ballistic) 전달을 위해 고안된 장치 (WO 99/27961), 또는 경피 패치 (WO 97/48440; WO 98/28037)를 포함할 수 있고; 피부의 표면에 적용될 수 있다 (경피 또는 피하 전달 WO 98/20734 ; WO 98/28037).
- [0154] 본 발명의 백신을 피부, 더욱 특히 진피에 투여하려는 경우, 백신의 양은 적은 액체량, 특히 약 0.05 ml 내지 0.2 ml의 양이다.
- [0155] 본 발명의 피부 또는 피내 백신에서의 항원의 함량은 근대 백신 (상기 참조)에서 발견되는 통상적인 투여량과 유사할 수 있다. 그러나, 피부 또는 피내 백신의 특징은 제형이 "적은 투여량"일 수 있다는 점이다. 따라서, "적은 투여량"의 백신의 단백질 항원은 바람직하게는 투여량당 0.1 내지 10 μg , 바람직하게는 0.1 내지 5 μg 만 큼 적게 존재하고; 당류 (바람직하게는, 컨주게이팅된 당류) 항원은 투여량당 0.01 내지 1 μg , 바람직하게는 0.01 내지 0.5 μg 의 당류의 범위로 존재할 수 있다.
- [0156] 본원에서 사용되는 용어 "피내 전달"은 피부 내의 진피 영역으로의 백신의 전달을 의미한다. 그러나, 백신은 반드시 진피 내에만 존재할 필요는 없다. 진피는 인간 피부의 표면으로부터 약 1.0 내지 약 2.0 mm에 위치한 피부 내의 층이나, 개체마다 또한 신체의 상이한 부분마다 특정한 수치의 변화가 존재한다. 일반적으로, 피부의 표면 아래로 1.5 mm를 진행하면 진피에 도달하는 것으로 예상될 수 있다. 진피는 각질층 및 피부의 외피와 및 피하층 사이에 위치하고 있다. 전달 방법에 따라, 백신은 궁극적으로 진피내에만 또는 주로 진피에 위치될

수 있거나, 궁극적으로 외피 및 진피 내에 분배될 수 있다.

[0157] *본 발명은 헤모필루스 인플루엔자 단백질, 예를들어 자유 형태 또는 컨주게이팅된 형태의 단백질 D의 첨가에 의한 헤모필루스 인플루엔자에 의해 야기된 중이염의 예방 또는 개선을 위한 개선된 백신을 추가로 제공한다. 또한, 본 발명은 본 발명의 S. 뉴모니아 컨주게이트 조성물로의 자유 단백질 또는 컨주게이팅된 단백질로서 하나 또는 두개의 폐렴구균 단백질의 첨가에 의한, 유아에서의 폐렴구균 감염 (예를들어, 중이염)의 예방 또는 개선을 위한 개선된 백신을 추가로 제공한다. 상기 폐렴구균 자유 단백질은 담체 단백질로 사용된 임의의 S. 뉴모니아 단백질과 동일하거나 상이할 수 있다. 하나 이상의 모락셀라 카타랄리스 단백질 항원이 또한 자유 형태 또는 컨주게이팅된 형태로 조합 백신에 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명은 유아에서의 중이염에 대한 (보호) 면역 반응을 유도하는 개선된 방법에 관한 것이다.

[0158] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 안전하고 효과적인 양의 본 발명의 백신 [소아 백신]을 투여함으로써 유아 (본 발명의 상황에서 0 내지 2세로 정의됨)에서 (보호) 면역 반응을 유도하는 개선된 방법에 관한 것이다. 본 발명의 추가 구체예는 약제로 사용하기 위한 본 발명의 항원성 S. 뉴모니아 컨주게이트 조성물 및 폐렴구균 질병의 예방 (또는 치료)을 위한 약제의 제조에 있어서 본 발명의 S. 뉴모니아 컨주게이트의 용도의 제공을 포함한다.

[0159] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 바람직하게는 자유 단백질 또는 컨주게이팅된 단백질로 존재하는 하나 또는 두개의 S. 뉴모니아 단백질과 함께 안전하고 유효한 양의 본 발명의 백신을 투여함으로써 중년 집단 (본 발명의 상황에서, 50세 이상, 통상적으로 55세 이상, 가장 일반적으로 60세 이상의 연령인 경우 환자가 중년인 것으로 간주함)에서 (보호) 면역 반응을 유도하는 개선된 방법에 관한 것으로, 여기서 자유 S. 뉴모니아 단백질은 담체 단백질로 사용된 임의의 S. 뉴모니아 단백질과 동일하거나 상이할 수 있다.

[0160] 본 발명의 한 추가 양태는 면역보호량의 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트를 숙주에게 투여하는 것을 포함하여, S. 뉴모니아에 의해 야기된 질병 및 임의로 헤모필루스 인플루엔자 감염에 대해 인간 숙주를 면역화시키는 방법에 관한 것이다.

[0161] 본 발명의 한 추가 양태는 S. 뉴모니아에 의해 야기된 질병 및 임의로 헤모필루스 인플루엔자 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[0162] 본 발명의 한 추가 양태는 S. 뉴모니아에 의해 야기된 질병 및 임의로 헤모필루스 인플루엔자 감염의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서, 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신 또는 키트의 용도에 관한 것이다.

[0163] 본원의 용어 "포함하는", "-들을 포함하다" 및 "-를 포함하다"는 각각의 상황에서 각각 용어 "구성되는", "-들로 구성되다" 및 "-로 구성되다"로 임의로 대응될 수 있다.

[0164] 본 발명의 "백신 조성물"과 관련된 본원의 구체예는 또한 본 발명의 "면역원성 조성물"과 관련된 구체예에 적용될 수 있고, 그 반대도 마찬가지이다.

[0165] 본 특허 명세서에 인용된 모든 참고문헌 또는 특허 출원은 참고로서 본원에 포함된다. 본 발명의 보다 나은 이해를 위해, 하기 실시예가 기술된다. 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것으로, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 바가 아니다.

도면의 간단한 설명

[0166] 도 1은 중년의 붉은털 원숭이에서의 11가 컨주게이트의 면역원성을 나타내는 막대 도표를 도시한다. 보다 밝은 색의 막대는 알루미늄 포스페이트 애주번트 내의 11가 컨주게이트를 이용한 2회의 접종 후의 GMC를 나타낸다. 보다 어두운 색의 막대는 애주번트 C 내의 11가 컨주게이트를 이용한 2회의 접종 후의 GMC를 나타낸다.

도 2는 애주번트 C 또는 알루미늄 포스페이트 애주번트 내의 11가 컨주게이트를 이용한 접종 후의 PS3에 대한 기억 B 세포를 나타내는 막대 도표를 도시한다.

도 3은 4가 플레인 (plain) 다당류 및 4가 dPly 컨주게이트에 대한 Balb/C 마우스에서의 항-다당류 19F 면역원성을 나타내는 막대 도표를 도시한다.

도 4는 4가 플레인 다당류 및 4가 PhtD 컨주게이트에 대한 Balb/C 마우스에서의 항-다당류 22F 면역원성을 나타내는 막대 도표를 도시한다.

도 5는 Balb/c 마우스에서의 항-22F IgG 반응을 나타내는 막대 도표를 도시한다.

도 6은 Balb/c 마우스에서의 항-22F 흡소노-과고사이토시스 (opsono-phagocytosis) 역가를 나타내는 막대 도표를 도시한다.

도 7은 상이한 애쥬번트 내에 제형화된 13가 컨쥬게이트 백신을 이용한 면역화 후의 어린 C57B1 마우스에서 유도된 IgG 반응을 비교하는 막대 도표를 도시한다.

도 8은 원숭이 폐렴 모델에서의 상이한 백신 조성물의 보호 효능을 나타내는 막대 도표를 도시한다.

도 9는 22F-PhtD 또는 22F-AH-PhtD 컨쥬게이트를 이용한 면역화 후의 Balb/c 마우스에서의 항 PhtD IgG 반응을 나타내는 막대 도표를 도시한다.

도 10은 22F-PhtD 또는 22F-AH-PhtD를 이용한 면역화 후의 마우스에서의 타입 4 폐렴구균 공격에 대한 보호를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0167] 실시예 1 : 단백질 D의 발현

[0168] 헤모필루스 인플루엔자 단백질 D

[0169] 단백질 D 발현을 위한 유전적 작제물

[0170] 시작 물질

[0171] 단백질 D 엔코딩 DNA

[0172] 단백질 D는 모든 혈청형 및 유형 분류할 수 없는 균주의 H. 인플루엔자에서 매우 보존되어 있다. 전체 단백질 D 유전자를 엔코딩하는 DNA 서열을 함유하는 벡터 pHIC348을 A. 포르스그렌 박사 (Dr. A. Forsgren) (Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmo, Sweden)로부터 입수하였다. 단백질 D의 DNA 서열은 문헌[Janson et al. (1991) Infect. Immun. 59: 119-125]에 공개되어 있다.

[0173] 발현 벡터 pMG1

[0174] 발현 벡터 pMG1는 외래 삽입 유전자의 전사 및 번역을 위한 박테리오파지 λ 유래 조절 성분이 도입 (Shatzman et al., 1983)된 pBR322의 유도물이다 (Gross et al., 1985). 또한, 앰피실린 내성 유전자가 카나마이신 내성 유전자로 대체되었다.

[0175] 대장균 균주 AR58

[0176] 대장균 균주 AR58를 SA500 유도체에서 미리 성장시킨 P1 파지 스톱 (galE::TN10, lambdaKil⁻ c1857 ΔH1)을 이용하여 N99의 형질도입을 발생시켰다. N99 및 SA500은 미국립보건원의 마틴 로젠버그 박사 (Dr. Martin Rosenberg)의 실험실에서 유래된 대장균 K12 균주이다.

[0177] 발현 벡터 pMG 1

[0178] 단백질 D의 생성을 위해, 단백질을 엔코딩하는 DNA를 발현 벡터 pMG1으로 클로닝시켰다. 이러한 플라스미드는 삽입된 외래 유전자의 전사 및 번역을 구동시키기 위해 람다파지 DNA로부터의 신호를 이용한다. 벡터는 프로모터 PL, 작동자 OL 및 N 단백질이 제공되는 경우 전사 극성 영향을 경감시키기 위한 두개의 이용부(utilisation site) (NutL 및 NutR)를 함유한다 (Gross et al., 1985). PL 프로모터 함유 벡터를 대장균 용원성 숙주에 도입시켜 플라스미드 DNA를 안정화시켰다. 용원성 숙주 균주는 유전체로 통합된 복제-결어 람다파지 DNA를 함유한다 (Shatzman et al., 1983). 염색체 람다파지 DNA는 벡터의 OL 억제자에 결합하여 PL 프로모터에 대한 RNA 중합효소의 결합을 방지함으로써 삽입된 유전자의 전사를 방지하는 c1 억제자 단백질을 합성시킨다. 발현 균주 AR58의 c1 유전자는 온도 감응성 돌연변이를 함유하므로, PL 특이적 전사는 온도 변환에 의해 조절될 수 있으며, 즉 배양 온도의 증가는 억제자를 불활성화시키고, 외래 단백질의 합성이 개시된다. 이러한 발현 시스템은 외래 단백질, 특히 세포에 독성일 수 있는 외래 단백질의 합성 제어를 가능케 한다 (Shimatata & Rosenberg, 1981).

[0179] 대장균 균주 AR58

- [0196] 단백질 D의 수거된 세포로부터의 추출 및 정제를 다음과 같이 수행하였다. 수거된 브로쓰를 냉각시키고, 약 800 바의 압력에서 고압 균질화기를 통해 2회 직접 통과시켰다.
- [0197] 첫번째 정제 단계에서, 세포 배양 균질화물을 희석시키고, 양이온 교환 크로마토그래피 컬럼 (SP Sepharose Big beads)에 적용시켰다. 이온 상호작용에 의해 PD가 겔 매트릭스에 결합하였고, 용리 완충용액의 이온 강도를 증가시키는 단계에 의해 용리시키고, 여과시켰다.
- [0198] 두번째 정제 단계에서, 불순물을 음이온 교환 매트릭스 (Q Sepharose Fast Flow)에 유지시켰다. PD는 겔에 결합하지 않았고, 통과액으로 수거할 수 있었다.
- [0199] 둘 모두의 컬럼 크로마토그래피 단계에서, 분획 수거를 OD에 의해 모니터하였다. 정제된 단백질 D를 함유하는 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피의 통과액을 초여과에 의해 농축시키고, 정용여과시켰다.
- [0200] 단백질 D 함유 초여과 보진물을 0.2 μ m 막을 통해 최종적으로 통과시켰다.
- [0201] **실시예 1b: PhtD의 발현**
- [0202] PhtD 단백질은 히스티딘-트라이어드 (HXXHXH 모티프)의 존재를 특징으로 하는 폐렴구균 히스티딘-트라이어드 (Pht) 단백질 족의 일원이다. PhtD는 838개의 아미노산의 분자이고, 5개의 히스티딘 트라이어드를 지닌다 (참고: 메디이문(MedImmune) W000/37105, SEQ ID NO: 4 (아미노산 서열), SEQ ID NO: 5 (DNA 서열)). PhtD는 또한 중앙에 프롤린 풍부 영역을 함유한다 (아미노산 위치 348-380). PhtD는 LXXC 모티프를 지닌 20개의 아미노산의 N-말단 신호 서열을 지닌다.
- [0203] **유전 작제물**
- [0204] 성숙 메디이문 (MedImmune) PhtD 단백질의 유전자 서열 (아미노산 21로부터 아미노산 838)을 p λ 프로모터를 지니는 사내 pTCMP14 벡터를 이용하여 대장균에 재조합적으로 이동시켰다. 대장균 숙주 균주는 프로모터의 열-유도를 가능케 하는 열감응성 억제자인 cI857를 지니는 AR58이었다.
- [0205] 메디이문 플라스미드 (스트렙토코쿠스 뉴모니아 균주 노르웨이 4로부터의 phtD 유전자를 지닌 (혈청형 4) - W000/37105에 기술된 SEQ ID NO: 5)로부터 phtD 유전자를 증폭시키기 위해 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. phtD 유전자에만 특이적인 프라이머를 두개의 단편 내의 phtD 유전자를 증폭시키기 위해 사용하였다. 프라이머는 Nde I 및 Kpn I 또는 Kpn I 및 Xba I 제한 부위를 지녔다. 이러한 프라이머는 벡터로부터의 임의의 누클레오티드와 하이브리드되지 않고, phtD 특이적 유전자 서열에만 하이브리드된다. 인공 ATG 시작 코돈을 Nde I 제한 부위를 지니는 첫번째 프라이머를 이용하여 삽입하였다. 이후, 생성된 PCR 생성물을 pGEM-T 클로닝 벡터 (Promega)에 삽입하고, DNA 서열을 확인하였다. 이후, TCMP 14 발현 벡터 내의 단편의 서브클로닝을 표준 기술을 이용하여 수행하고, 벡터를 AR58 대장균에 형질전환시켰다.
- [0206] **PhtD 정제**
- [0207] PhtD 정제를 다음과 같이 수행하였다:
- [0208] 카나마이신의 존재하에서의 대장균 세포의 성장: 30°C에서 30시간 성장시킨 후, 39.5°C에서 18시간 동안 유도하였다.
- [0209] 프로테아제 억제제로서 EDTA 5 mM 및 PMSF 2 mM의 존재하에서 OD \pm 115에서의 전체 배양물로부터의 대장균 세포의 파괴: 레이니(Rannie), 2회의 계대, 1000 바.
- [0210] 실온 (20°C)에서의 확장된 베드 (bed) 모드의 스트림라인 (Streamline) Q XL 크로마토그래피에 의한 항원 포획 및 세포 파편의 제거; 컬럼을 NaCl 150 mM + 엠펜젠(Empigen) 0.25% (pH 6.5)으로 세척하고, 25 mM 칼륨 포스페이트 완충용액 중의 NaCl 400 mM + 엠펜젠 0.25% (pH 7.4)로 용리시켰다.
- [0211] 사르토크렌 (Sartobran) 150 카트리지 (0.45 + 0.2 μ m)에서의 여과.
- [0212] 4°C에서 5 mM의 이미다졸의 존재하에서 pH 7.4에서의 Zn⁺⁺ 킬레이팅 세파로오스 FF IMAC 크로마토그래피에 의한 항원 결합; 컬럼을 25 mM 칼륨 포스페이트 완충용액 중의 이미다졸 5 mM 및 엠펜젠 1% (pH 8.0)로 세척하고, 25 mM 칼륨 포스페이트 완충용액 중의 50 mM 이미다졸 (pH 8.0)로 용리시켰다.
- [0213] 4°C에서의 pH 8.0 (25 mM 칼륨 포스페이트)에서의 프랙토겔 (Fractogel) EMD DEAE에서의 양성 모드의 약한 음이온 교환 크로마토그래피; 컬럼을 140 mM NaCl로 세척하고, 오염물질 (단백질 및 DNA)를 교환기에 흡착된 채

로 유지시키면서 200 mM NaCl로 용리시켰다.

[0214] □ 농축 및 50 kDa 막에서의 2 mM Na/K 포스페이트 (pH 7.15)를 이용한 초여과.

[0215] □ 밀리팩 (Millipak)-20 0.2 μm 필터 카트리지에서 정제된 벌크의 멸균 여과.

[0216] **실시예 1c: 뉴몰리신의 발현**

[0217] W02004/081515 및 W02006/032499에 기술된 바와 같이 페렴구균 뉴몰리신을 제조하고 무독화시켰다.

[0218] **실시예 2: 컨주게이트의 제조**

[0219] 정제된 페렴구균 다당류를 제조하는 방법은 당 분야에 널리 공지되어 있다. 본 실시예의 목적을 위해, 다당류를 본질적으로 EP072513에 기술된 바와 같이 또는 이와 밀접하게 관련된 방법으로 제조하였다. 컨주게이션 전에 다당류를 하기 기술되는 바와 같이 미세유동화에 의해 크기 조절하였다.

[0220] 활성화 및 커플링 조건은 각각의 다당류에 대해 특이적이다. 이들은 표 1에 제공된다. 크기 조절된 다당류 (PS5, 6B 및 23F 제외)를 NaCl 2M, NaCl 0.2M 또는 주사용수 (WFI)에 용해시켰다. 모든 혈청형에 대해 최적 다당류 농도를 평가하였다. 혈청형 18C를 제외한 모든 혈청형을 하기 상세하게 기술되는 바와 같이 담체 단백질에 직접 컨주게이팅시켰다. 두개의 대안적인 혈청형 22F 컨주게이트를 하나는 직접 컨주게이팅시키고, 하나는 ADH 링커를 통해 컨주게이팅시켜 제조하였다.

[0221] 아세토니트릴 또는 아세토니트릴/물 (50%/50%) 용액 중의 100 mg/ml 스탁 용액으로부터, CDAP (CDAP/PS 비 0.5 내지 1.5 mg/mg PS)를 다당류 용액에 첨가하였다. 1.5분 후, 0.2M 내지 0.3M NaOH를 첨가하여 특정 활성화 pH를 수득하였다. 다당류의 활성화를 25°C에서 3분 동안 상기 pH에서 수행하였다. 정제된 단백질 (단백질 D, PhtD, 뉴몰리신 또는 DT) (최초 PS/담체 단백질 비에 의존한 양)을 활성화된 다당류에 첨가하고, pH 조절하에서 2시간 이하 동안 (혈청형에 좌우됨) 특정 pH에서 커플링 반응을 수행하였다. 미반응된 시아네이트 에스테르기를 켄칭시키기 위해, 2M 글리신 용액을 혼합물을 첨가하였다. pH를 켄칭 pH (pH 9.0)로 조정하였다. 용액을 25°C에서 30분 동안 교반한 후, 2-8°C에서 지속적으로 천천히 밤새 교반하였다.

[0222] 18C의 제조:

[0223] 18C를 링커인 아디프산 디히드라지드 (ADH)를 통해 담체 단백질에 연결시켰다. 다당류 혈청형 18C를 컨주게이션 전에 미세유동화시켰다.

[0224] **EDAC를 이용한 파상풍 독소이드의 유도체화**

[0225] 파상풍 독소이드의 유도체화를 위해, 정제된 TT를 0.2M NaCl 중에 25 mg/ml로 희석시키고, ADH 스페이서를 첨가하여 0.2M의 최종 농도에 도달시켰다. 스페이서의 용해가 완료된 후, pH를 6.2로 조정하였다. EDAC (1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카르보디이미드)를 첨가하여 0.02M의 최종 농도에 도달시키고, 혼합물을 pH 조절하에서 1시간 동안 교반하였다. pH를 25°C에서 최소 30분 동안 9.0으로 증가시킴으로써 촉발 반응을 중지시켰다. 유도체화된 TT를 정용여과 (10 kDa CO 막)시켜, 잔여 ADH 및 EDAC 시약을 제거하였다.

[0226] TT_{AH} 벌크를 커플링 단계때까지 최종적으로 멸균 여과시키고, -70°C에서 보관하였다.

[0227] **PS 18C에 대한 TT_{AH}의 화학적 커플링**

[0228] 컨주게이션 파라미터에 대한 세부사항은 표 1에 제시되어 있다.

[0229] 2 그램의 미세유동화된 PS를 물에 규정된 농도로 희석시키고, NaCl 분말을 첨가하여 2M NaCl로 조정하였다.

[0230] CDAP 용액 (50/50 v/v의 아세토니트릴/WFI에서 새로이 제조된 100 mg/ml)을 첨가하여 적절한 CDAP/PS 비에 도달시켰다. 0.3M NaOH를 첨가하여 pH를 활성화 pH인 9.0까지 상승시키고, TT_{AH}를 첨가할때까지 이러한 pH에서 안정화시켰다. 3분 후, 유도체화된 TT_{AH} (0.2M NaCl 중의 20 mg/ml)를 첨가하여 TT_{AH}/PS의 비를 2에 도달시키고; pH를 커플링 pH인 9.0으로 조절하였다. 용액을 pH 조절하에서 1시간 동안 두었다. 켄칭을 위해, 2M 글리신 용액을 PS/TT_{AH}/CDAP 혼합물에 첨가하였다. pH를 켄칭 pH (pH 9.0)로 조정하였다. 용액을 25°C에서 30분 동안 교반한 후, 지속적으로 천천히 교반하면서 2-8°C에서 밤새 두었다.

[0231] PS22F_{AH}-PhtD 컨주게이트

- [0232] 이러한 당류를 위한 두번째 컨쥬게이션 방법 (첫번째는 표 1에 나타난 직접적인 PS22-PhtD 컨쥬게이션 방법임)에서, 22F를 링커인 아디프산 디히드라지드 (ADH)를 통해 담체 단백질에 연결시켰다. 다당류 혈청형 22F를 컨쥬게이션 전에 미세유동화시켰다.
- [0233] **PS 22F 유도체화**
- [0234] 활성화 및 커플링을 온도-제어 수조에서 지속적인 교반하에서 25°C에서 수행하였다. 미세유동화된 PS22F를 희석시켜 0.2M NaCl 중에서의 6 mg/ml의 최종 PS 농도를 획득하고, 용액을 0.1N HCl을 이용하여 pH 6.05 ± 0.2로 조정하였다. CDAP 용액 (아세트니트릴/WFI (50/50)에서 새로이 제조된 100 mg/ml)을 첨가하여 적절한 CDAP/PS 비 (1.5/1 ww)에 도달시켰다. 0.5M NaOH를 첨가하여 pH를 활성화 pH인 9.00 ± 0.05까지 상승시키고, ADH의 첨가때까지 이러한 pH를 안정화시켰다. 3분 후, ADH를 첨가하여 적절한 ADH/PS 비 (8.9/1 w/w)에 도달시키고, pH를 커플링 pH인 9.0으로 조절하였다. 용액을 pH 조절하에서 1시간 동안 두었다. PS_{AH} 유도체를 농축시키고, 정용여과시켰다.
- [0235] 커플링
- [0236] *0.2M NaCl 중에서의 10 mg/ml의 PhtD를 PS22F_{AH} 유도체에 첨가하여, 4/1 (w/w)의 PhtD/PS22F_{AH} 비에 도달시켰다. pH를 HCl을 이용하여 5.0 ± 0.05로 조정하였다. EDAC 용액 (0.1M Tris-HCl 중의 20 mg/ml, pH 7.5)을 10분 (250 μl/분) 동안 수작업으로 첨가하여 1 mg EDAC/mg PS22F_{AH}에 도달시켰다. 생성된 용액을 교반 및 pH 조절하에서 25°C에서 150분 (60분이 또한 이용됨) 동안 인큐베이션시켰다. 1M Tris-HCl pH 7.5 (최종 부피의 1/10)를 첨가하여 용액을 중화시키고, 25°C에서 30분 동안 두었다.
- [0237] 세파크릴 S400HR에서의 용리 전에, 컨쥬게이트를 5 μm 미니사르트 (Minisart) 필터를 이용하여 정화시켰다.
- [0238] 생성된 컨쥬게이트는 4.1의 최종 PhtD/PS (w/w) 비, 1% 미만의 자유 PS 함량 및 36.3%의 항원성 (α-PS/α-PS) 및 7.4%의 항-PhtD 항원성을 지닌다.
- [0239] 컨쥬게이트의 정제:
- [0240] 컨쥬게이트를 0.15M NaCl로 평형화된 세파크릴 S400HR 젤 여과 컬럼 (18C에 대해서는 S500HR)을 이용하는 젤 여과에 의해 정제하여 소분자 (DMAP 포함) 및 컨쥬게이팅되지 않은 PS 및 단백질을 제거하였다. 반응 성분의 다양한 분자 크기에 기초하여, PS-PD, PS-TT, PS-PhtD, PS-뉴물리신 또는 PS-DT 컨쥬게이트를 먼저 용리시킨 후, 자유 PS를 용리시키고, 이후 자유 PD 또는 자유 DT를 용리시키고, 최종적으로 DMAP 및 기타 염 (NaCl, 글리신)을 용리시켰다. 컨쥬게이트를 함유하는 분획을 UV_{280nm}에 의해 검출하였다. 분획을 이들의 Kd에 따라 풀링시키고, 평균 여과 (0.22 μm)시키고, +2-8°C에서 보관하였다. 컨쥬게이트 제조물 내의 PS/단백질 비를 결정하였다.
- [0241] **PS S. 뉴모니아-단백질 D/TT/DT/PhtD/Ply 컨쥬게이트의 특정 활성화/커플링/퀵 조건**
- [0242] "μ 플루이드"가 행 헤더 (row header)로 나타나는 경우, 이는 당류가 컨쥬게이션 전에 미세유동화에 의해 크기 조정된 것을 의미한다. 미세유동화 후의 당류의 크기가 표 2에 제공된다.

[0243] 표 1: PS S. 뉴모니에 - 단백질 D/TT/DT/PhD/Ply 컨쥬게이트의 특정 활성화/커플링/켄칭 조건

혈청형	1 μ플루이드	4 μ플루이드	5	6A	6B	7F μ플루이드
PS 농도(mg/ml)	2.5	2.5	7.1	5.0	5.0	5.0
PS 용해	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 농도 (mg/ml)	10.0	10.0	5.0	5.0	5.0	10.0
최초 PD/PS 비 (w/w)	1.5/1	1.5/1	1/1	1/1	1.1/1	1.2/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	0.50	0.50	0.79	0.83	0.83	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0

[0244]

혈청형	9V μ플루이드	14 μ플루이드	18C μ플루이드	19A μ플루이드	19F μ플루이드	22F μ플루이드	23F
PS 농도(mg/ml)	5.0	5.0	4.5	15.0	9.0	6.0	2.38
PS 용해	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0.2M	NaCl 2M
담체 단백질 농도 (mg/ml)	10.0	10.0	20.0 (TT)	10.0 (Ply)	20.0 (DT)	10.0 (PhD)	5.0
최초 담체 단백질/PS 비 (w/w)	1.2/1	1.2/1	2/1	2.5/1	1.5/1	3/1	1/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	0.50	0.75	0.75	1.5	1.5	1.5	0.79
pH _a =pH _c =pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0

[0245]

[0246] 주의: pH a,c,q는 각각 활성화, 커플링 및 켄칭을 위한 pH에 해당한다.

[0247] 특성규명:

[0248] 각각의 컨쥬게이트를 특성규명하였고, 표 2에 기술된 명세를 충족시켰다. 다당류 함량 (μg/ml)을 레조르시놀 시험으로 측정하고, 단백질 함량 (μg/ml)을 로우리 (Lowry) 시험으로 측정하였다. 최종 PS/PD 비 (w/w)를 농도의 비로 결정하였다.

[0249] 자유 다당류 함량 (%):

[0250] 4°C에서 유지시키거나 37°C에서 7일간 보관된 컨쥬게이트의 자유 다당류 함량을 α-담체 단백질 항체 및 포화된 암모늄 설페이트와의 인큐베이션 후에 원심분리에 의해 수득된 상층액에서 결정하였다. 상층액 내의 자유 다당류의 정량을 위해 α-PS/α-PS ELISA를 이용하였다. 컨쥬게이트의 부재를 또한 α-담체 단백질/α-PS ELISA에 의해 조절하였다.

[0251] 항원성:

[0252] 동일한 컨쥬게이트에 대한 항원성을 샌드위치-유형 ELISA로 분석하였고, 여기서 항체의 포획 및 검출은 각각 α-PS 및 α-단백질이었다.

[0253] 자유 단백질 함량 (%):

[0254] 컨쥬게이팅되지 않은 담체 단백질을 정제 단계 동안 컨쥬게이트로부터 분리시킬 수 있었다. 자유 잔여 단백질의 함량을 크기 배제 크로마토그래피 (TSK 5000-PWXL) 후의 UV 검출 (214 nm)을 이용하여 결정하였다. 용리 조건은 자유 담체 단백질과 컨쥬게이트의 분리를 가능케 하였다. 이후, 컨쥬게이트 벌크 내의 자유 단백질 함량을 교정 곡선 (0 내지 50 µg의 담체 단백질)에 대비하여 결정하였다. 자유 담체 단백질 %를 다음과 같이 수득하였다: 자유 담체 % = (자유 담체 (µg/ml) / 로우리에 의해 측정된 상응하는 담체 단백질의 전체 농도 (µg/ml) * 100%).

[0255] 안정성:

[0256] 4°C에서 유지되고 37°C에서 7일 동안 보관된 컨쥬게이트에 대해 HPLC-SEC 겔 여과 (TSK 5000-PWXL)로 분자량 분포 (K_{av}) 및 안정성을 측정하였다. 10/11/13/14-가 특성은 표 2에 제공되어 있다 (표 2에 따른 코멘트 참조). 단백질 컨쥬게이트를 알루미늄 포스페이트에 흡착시키고, 풀링시켜, 최종 백신을 형성시켰다.

[0257] 결론:

[0258] 유망한 백신의 성분이 존재하는 것으로 나타난 바, 면역원성 컨쥬게이트가 생성되었다.

[0259] 표 2 - 컨쥬게이트의 특성

컨쥬게이트	PS 크기 (Dax10 ³)	담체/PS 비	자유 PS (Elisa)	자유 담체	PS 항원성 (Elisa)	컨쥬게이트 크기 (kDa)
PS1-PD	349-382*	1.5-1.6	1.0%-1.2%	3.9%-4.8%	87%-95%	1499 - 1715
PS4-PD	93-100*	1.5-1.6	4.7-6.5%	3.2%-4.0%	90%-96%	1303 - 1606
PS5-PD***	367-443	0.80	8.7-11.2%	2.2%-3.8%	93%-108%	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0.61	4.5%	수행하지 않음	45.9%	수행하지 않음
PS6B-PD***	1069-1391	0.7-0.8	1.3-1.6%	<2.0%	68%-75%	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1.1-1.2	<1%	<1.4%	58%	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1.3-1.5	<1%	<1.3%	67%-69%	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1.4	<1%	<1.5%	70%	3430-3779
PS18C-TT	89-97*	2.2-2.4	1.5-2.2%	<4%	46%-56%	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3.2	<1%		29%	
PS19F-DT	133-143*	1.4-1.5	4.1%-5.9%	<1.2%-<1.3%	82%-88%	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2.17	5.8	수행하지 않음	37%	수행하지 않음
PS22F-AHPhtD*	159-167	3.66-4.34	<1%	수행하지 않음	28-31%	수행하지 않음
PS23F-PD***	914-980	0.5	1.4-1.9%	3.7%-4.9%	137%-154%	2933-3152

[0260]

[0261] ** 천연 PS의 미세유동화 후의 PS 크기

[0262] 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F 컨쥬게이트 (예를들어, 인간 투여량당 각각 1, 3, 1, 1, 1, 1, 1, 3, 3 및 1 µg의 당류의 투여량)를 혼합시킴으로써 10가 백신을 제조하였다. 표 5로부터의 혈청형 3 컨쥬게이트 (인간 투여량당 1 µg의 당류)를 추가로 첨가하여 11가 백신을 제조하였다. 상기 혈청형 19A 및 22F 컨쥬게이트 (22F는 PhtD에 직접 연결되거나, 대안적으로 ADH 링커를 통해 연결됨) [예를들어, 인간 투여량당 각각 3 µg의 당류의 투여량]를 추가로 첨가하여 13가 백신을 제조하였다. 상기 혈청형 6A 컨쥬게이트 [예를들어, 인간 투여량당 1 µg의 당류의 투여량]을 추가로 첨가하여 14가 백신을 제조할 수 있다.

[0263] 실시예 3: 본 발명의 면역원성 조성물 내의 헤모필루스 인플루엔자 단백질 D의 포함이 급성 중이염 (AOM)에 대한 개선된 보호를 제공할 수 있는 증거.

[0264] 연구 계획.

[0265] 본 연구는 H. 인플루엔자로부터의 단백질 D에 각각 컨쥬게이팅된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F (실시에 4의 표 5에 언급됨)를 포함하는 11 Pn-PD 백신을 이용하였다. 피검체를 약 3, 4, 5 및 12-15개월의 연령에서 11 Pn-PD 백신 또는 하브릭스 (*Havrix*)의 4회 투여를 위한 2개의 그룹으로 무작위화시켰다. 모든 피검체에 3, 4 및 5개월의 연령에서 GSK 바이오로지칼즈사의 인펀릭스 (Infanrix)-핵사 (DTPa-HBV-IPV/Hib) 백신을 동시에 투여하였다. 인펀릭스-핵사는 투여 전에 혼합되는 페디아릭스 (Pediarix) 및 Hib의 조합물이다. "프로토콜에 따른 (According-to-Protocol)" 분석을 위한 효능 추적 검사를 세번째 백신 투여 2주 후에 시작하였고, 24-27개월의 연령까지 지속하였다. S. 뉴모니아 및 H. 인플루엔자의 비인두 보균을 선택된 서브셋의 피검체에서 평가하였다. 아동이 아프거나, 귀에 동통이 있거나, 고막의 자연적인 천공 또는 자연적인 귀의 고름이 있는 경우 부모가 연구자와 상담하였다. AOM의 에피소드가 의심되는 경우, 진단의 확인을 위해 아동을 이비인후과 (ENT) 전문가에게 즉시 위탁하였다. AOM의 임상 증상은 고막의 시각적 증상 (즉, 발적, 융기, 광반사 손실) 또는 중이 유동체 유출 (단순이경검사 또는 공기이경검사 또는 현미경검사에 의해 입증)의 존재를 기초로 하였다. 또한, 하기 징후 또는 증상중 두개 이상이 존재하여야 한다: 귀 동통, 귀 고름, 청각 손실, 열, 기면, 과민성, 식욕부진, 구토 또는 설사. ENT 전문가가 임상 증상을 확인한 경우, 중이 유체의 표본을 세균학적 검사를 위한 고막천자에 의해 수거하였다. 병으로 인해 반복되는 진찰을 받는 피검체에 대해, 기존의 에피소드의 시작 후에 30일 이상이 경과한 경우 새로운 AOM 에피소드가 시작되는 것으로 간주하였다. 또한, 두 연속적인 에피소드 사이에 간격이 어떠한 간에 분리된 박테리아/혈청형이 이전의 분리물과 상이한 경우 새로운 박테리아 에피소드인 것으로 간주하였다.

[0266] 시험 결과

[0267] 11 Pn-PD 그룹의 2489명 및 대조그룹의 2479명의 4968명을 등록시켰다. 두 그룹 사이에 인구학적 특징 및 위험 인자에 있어서 큰 차이가 없었다.

[0268] 임상 에피소드 및 AOM 환자 정의

[0269] 프로토콜에 따른 (per protocol) 추적검사 기간 동안, 11 Pn-PD 그룹에서 전체 333개의 에피소드의 임상 AOM가 기록되었고, 대조그룹에 대해 499개의 에피소드가 기록되었다. 표 3은 AOM의 임의의 에피소드 및 다양한 폐렴 구균 혈청형, H. 인플루엔자, *NTHi* 및 M. 카타랄리스에 야기된 AOM에 대한 11 Pn-PD 백신 및 이전에 핀란드에서 시험된 두개의 7-가 백신 (Eskola et al N Engl J Med 2001; 344: 403 - 409 and Kilpi et al Clin Infect Dis 2003 37:1 155-64)의 보호 효능을 나타낸다. 전체 AOM 질병 부담의 33.6%의 통계적으로 유의하고 임상적으로 관련된 감소가 병인학과는 상관 없이 11 Pn-PD를 이용하여 달성되었다 (표 3). 11 Pn-PD 백신에 함유된 11개의 폐렴구균 혈청형중 임의의 것에 의한 AOM 에피소드에 대한 전체 효능은 57.6%였다 (표 3).

[0270] 본 연구에서의 또 다른 중요한 발견은 H. 인플루엔자에 의해 야기된 AOM에 대한 11 Pn-PD 백신에 의해 제공된 35.6%의 보호 (특히, *NTHi*에 제공되는 보호는 35.3%임)이다. 이러한 발견은 폐렴구균 컨쥬게이트 백신 연대에서 AOM의 주요 원인체로서 H. 인플루엔자의 중요성이 증가되는, 임상적으로 중요한 의의를 가진다. AOM에 대해 제공된 보호와 함께, 11 Pn-PD 백신은 또한 2세에서의 부스터 투여 후에 H. 인플루엔자의 비인두 보균을 감소시켰다. 이러한 발견은 두개의 7-가 폐렴구균 컨쥬게이트 백신에서, 병인학적 대체 (etiologial replacement)의 증거로서 H. 인플루엔자로 인한 AOM 에피소드의 증가가 관찰 (Eskola et al and Kilpi et al)된 핀란드에서 이전의 관찰과는 대조적이다.

[0271] Hi AOM 에피소드가 없는 채로 유지되는 11 Pn-PD 예방접종자에서의 일차 투여 후의 항-PD IgG 항체 농도가 효능 추적기간 동안의 하나 이상의 Hi AOM 에피소드가 발생한 11 Pn-PD 예방접종자에서 측정된 일차 투여 후의 항-PD IgG 항체 수준과 본질적으로 동일하므로, Hi로 인한 AOM 에피소드와 담체 단백질 D에 대한 항체 수준 사이의 명백한 상관관계는 확립될 수 없었다. 그러나, 백신의 생물학적 영향과 일차 투여 후의 IgG 항-PD 면역원성 사이에 상관관계가 확립될 수 없었지만, H. 인플루엔자 균주 사이에 고도로 보존된 PD 담체 단백질이 Hi에 대한 보호의 유도에 크게 기여하는 것으로 추정하는 것이 타당하다.

[0272] 백신 혈청형 폐렴구균 및 H. 인플루엔자에 대해 유사했던 비인두 보균에 대한 효과에 의해 AOM 질병에 대한 효과가 달성되었다 (도 1). PD-컨쥬게이트 예방접종자에서의 H. 인플루엔자의 비인두 보균의 상기 감소는 ELISA로 측정시 보호 효과가 항-PD IgG 면역 반응과 상관 관계가 없을 수 있다 하더라도, H. 인플루엔자에 대한 PD-컨쥬게이트 백신의 직접적인 보호 효과의 가설을 뒷받침한다.

[0273] 하기 실험에서, 본 실시예의 11가 제형 또는 실시예 2의 10가 백신을 이용하여 면역화된 유아로부터의 혈청 풀과 함께 친칠라 중이염 모델을 이용하였다 (또한, 표 1 및 2 및 이에 따른 주석 참고). 둘 모두의 풀은 면역전

SF에 대해 조정된 내부 표준을 동일한 방식으로 처리하고, 각각의 플레이트에 포함시켰다. 세척 후, 결합된 항체를 10% FBS (PBS중)에 희석된 퍼옥시다아제-컨쥬게이팅된 항-인간 IgG 모노클로날 항체(Stratech Scientific Ltd, Soham, UK)를 이용하여 검출하고, 교반시키면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 실온에서 어두운 곳에서 레디-투-유스 (ready-to-use) 단일 성분 테트라메틸벤지딘 퍼옥시다아제 효소 면역분석 기질 키트 (BioRad, Hercules, CA, US)를 이용하여 색을 발달시켰다. H₂SO₄ 0.18M을 이용하여 반응을 중지시키고, 450 nm에서 광학 밀도를 관독하였다. 샘플 내의 혈청형-특이적 IgG 농도 (µg/mL)를 내부 표준 혈청 곡선에 대한 소정의 한도 내의 광학 밀도 포인트를 참조로 하여 계산하였고, 이를 SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 소프트웨어로 계산된 4-파라미터 산정 로그식으로 모델화시켰다. ELISA에 대한 컷-오프는 검출 한도 및 정량 한도를 고려하여 모든 혈청형에 대해 0.05 µg/mL였다.

[0279] 흡소노파고사이토시스 분석

[0280] 2003년 6월의 WHO 협의 회의에서, 문헌[Romero-Steiner et al Clin Diagn Lab Immunol 2003 10 (6): pp1019-1024]에 기술된 OPA 분석을 이용하는 것이 권고되었다. 이러한 프로토콜을 하기 시험에서 혈청형의 OPA 활성을 시험하기 위해 이용하였다.

[0281] 컨쥬게이트의 제조

[0282] 11Pn-PD&Di-001 및 11 Pn-PD&Di-007 연구에서, 단백질 D에 컨쥬게이팅된 1 µg의 다당류 (19F-PD) 대신 3 µg의 19F 다당류가 디프테리아 독소이드에 컨쥬게이팅된 (19F-DT) 3개의 11가 백신 제형 (표 4)을 포함시켰다. 11Pn-PD, 11Pn-PD&Di-001 및 11Pn-PD&Di-007 연구에 대한 컨쥬게이션 파라미터는 각각 표 5, 6 및 7에 기술되어 있다.

[0283] 상기 19F-DT 제형을 이용한 일차 예방접종 1개월 후의 혈청형 19F에 대한 항-폐렴구균 항체 반응 및 OPA 활성은 각각 표 8 및 9에 제시되어 있다.

[0284] 표 10은 23-가 플레인 다당류 부스터 예방접종 전 및 후의 22F-ELISA 항체 농도 및 0.2 µg/mL 역치에 도달한 피검체의 백분율을 도시한다. 일차 예방접종 1개월 후에 보다 높은 혈청양성률 (흡소노파고사이토시스 역가 ≥ 1:8) 및 OPA GMT에 의해 입증되는 바와 같이 상기 19F-DT 제형을 이용하여 유도된 항체에 대해 흡소노파고사이토시스 활성이 명백하게 개선된 것으로 나타났다 (표 9). 23-가 플레인 다당류 부스터 예방접종 1개월 후, 19F 항체의 흡소노파고사이토시스 활성은 19F-DT 제형으로 프라이밍된 아동에 비해 현저하게 나은 채로 유지되었다 (표 11).

[0285] 표 12는 프레브나르 (Prevnar®)의 4회의 연속적인 투여에 비한 19F-DT 또는 19F-PD 컨쥬게이트로 이전에 프라이밍된 유아에서의 11 Pn-PD 부스터 투여 후의 면역원성 데이터를 나타낸다. 미국에서의 프레브나르®의 도입 후에 보고된 비약적인 발전의 상황을 고려하면, DT 담체 단백질에 컨쥬게이팅되는 경우의 혈청형 19F에 대한 개선된 흡소노파고사이토시스 활성이 후보 백신에 유리할 수 있다. 표 13은 교차-반응성 혈청형 19A와 관련하여 19F-DT 컨쥬게이트에 대한 ELISA 및 OPA 데이터를 제공한다. 19F-DT가 19A에 대해 낮지만 유의한 OPA 활성을 유도하는 것을 발견하였다.

[0286] 표 4: 임상 연구에 사용된 폐렴구균 컨쥬게이트 백신 제형.

제형	폐렴구균 혈청형 µg/ 담체 단백질											Al ³⁺ mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	< 0.8
19F-DT 형태 1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/DT	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	5/DT	≤ 0.35
19F-DT 형태 2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/DT	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/DT	5/DT	≤ 0.35
19F-DT 형태 3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/DT	3/PD	= 0.5

[0287]

[0288] 표 5: PS S. 뉴모니에-단백질 D/TT/DT 컨쥬게이트의 특정 활성화/커플링/켄칭 조건

혈청형	1 천연	3 μ플루이드	4 천연	5 천연	6B 천연	7F 천연
PS 농도 (mg/ml)	1.5	2	2.0	7.5	5.5	3.0
PS 용해	NaCl 150mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 농도 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
최초 PS/PD 비 (w/w)	1/0.7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _d	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0
커플링 시간	60 분	60 분	45 분	40 분	60 분	60 분

[0289]

혈청형	9V 천연	14 천연	18C 천연	19F 천연	23F 천연
PS 농도 (mg/ml)	1.75	2.5	1.75	4.0	2.5
PS 용해	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 농도 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
최초 PS/PD 비 (w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1.2	1/1	1/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _d	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0
커플링 시간	60 분	60 분	45 분	30 분	60 분

[0290]

[0291] 표 6: 11 Pn-PD&Di-001 연구를 위한 PS S. 뉴모니에-단백질 D/DT 컨쥬게이트의 특정 활성화/커플링/켄칭 조건

혈청형	1 μ플루이드	3 μ플루이드	4 μ플루이드	5 μ플루이드	6B μ플루이드	7F 천연
PS 농도 (mg/ml)	4	2.0	2.5	7.5	10	3.0
PS 용해	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 농도 (mg/ml)	10.0	5.0	5.0	5.0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5.0
최초 PD/PS 비 (w/w)	1.2/1	1/1	1/1	1/1	1.5/1	1/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	1.50	0.75	1.5	2	1.5	0.75
pH _a =pH _c =pH _d	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9/9/9
커플링 시간	60 분	60 분	60 분	60 분	60 분	60 분

[0292]

혈청형	9V 천연	14 천연	18C μ플루이드	19F μ플루이드	23F μ플루이드
PS 농도 (mg/ml)	1.75	2.5	5.0	9.0	10
PS 용해	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
담체 단백질 농도 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	20 (DT)	10 (DT)
최초 담체 단백질/PS 비 (w/w)	0.75/1	0.75/1	1.2/1	1.5/1	1.5/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	0.75	0.75	1.5	1.5	0.75
pH _a =pH _c =pH _g	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
커플링 시간	60 분	60 분	30 분	60 분	60 분

[0293]

[0294] 표 7: 11 Pn-PD&Di-007 연구를 위한 PS S. 뉴모니아-단백질 D/DT 컨쥬게이트의 특정 활성화/커플링/켄칭 조건

혈청형	1 천연	3 μ플루이드	4 천연	5 천연	6B 천연	7F μ플루이드
PS 농도 (mg/ml)	1.5	2.0	2	7.5	5.5	5.0
PS 용해	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 농도 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5	10
최초 PD/PS 비 (w/w)	0.7/1	1/1	1	1/1	1/1	1.2/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _g	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5./9.5/9
커플링 시간	60 분	60 분	45 분	40 분	60 분	60 분

[0295]

혈청형	9V μ플루이드	14 μ플루이드	18C 천연	19F μ플루이드	19F μ플루이드	23F μ플루이드
PS 농도 (mg/ml)	5.0	5.0	1.75	9.0	10.0	9.5
PS 용해	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
담체 단백질 농도 (mg/ml)	10	10.0	5.0	20 (DT)	5.0 (PD)	10
최초 담체 단백질/PS 비 (w/w)	1.2/1	1.2/1	1.2/1	1.5/1	1.2/1	1/1
CDAP 농도 (mg/mg PS)	0.5	0.75	0.75	1.5	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _g	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
커플링 시간	60 분	60 분	45 분	120 분	120 분	60 분

[0296]

[0297] 표 8: 1 μg의 19F-PD, 3 μg의 19F-DT 또는 프레브나르 (2 μg의 19F-CRM) 일차 예방접종 1개월 후의 0.20 μg/mL 이상의 19F 항체 농도를 지니는 피검체의 백분율 및 19F 항체 기하학적 평균 항체 농도 (95% CI를 지니는 GMC; μg/mL) (전체 코호트)

그룹	11Pn-PD&Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD&Di-007 (22F-ELISA)		
	N	% ≥ 0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/mL) (95% CI)	N	% ≥ 0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/mL) (95% CI)
11Pn-PD	152	98.7 (95.3-99.8)	1.93 (1.67-2.22)	50	100 (92.9-100)	2.78 (2.31-3.36)
19F-DT 형태 1 [†]	146	99.3 (96.2-100)	2.88 (2.45-3.38)	-	-	-
19F-DT 형태 2 [†]	150	96.0 (91.5-98.5)	2.43 (2.01-2.94)	-	-	-
19F-DT 형태 3 [†]	-	-	-	50	96.0 (86.3-99.5)	3.70 (2.58-5.30)
프레브나르	148	98.6 (95.2-99.8)	2.98 (2.60-3.41)	41	97.6 (87.1-99.9)	2.91 (2.15-3.94)

[0298]

「다양한 제형의 조성물이 표 4에 제공된다.

[0299]

[0300]

표 9: 1 µg의 19F-PD, 3 µg의 19F-DT 또는 프레브나르 (2 µg의 19F-CRM)를 이용한 일차 예방접종 1개월 후에 1:8 이상의 19F OPA를 지니는 피검체의 백분율 및 19F OPA GMT (전체 코호트)

그룹	11Pn-PD&Di-001			11Pn-PD&Di-007		
	N	≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	136	84.6 (77.4-90.2)	77.8 (58.1-104.4)	46	95.7 (85.2-99.5)	167.8 (118.1-238.6)
19F-DT 형태 1 [†]	137	95.6 (90.7-98.4)	263.2 (209.4-330.7)	-	-	-
19F-DT 형태 2 [†]	139	92.1 (86.3-96.0)	218.9 (166.5-287.9)	-	-	-
19F-DT 형태 3 [†]	-	-	-	49	91.8 (80.4-97.7)	403.1 (225.7-719.9)
프레브나르	131	86.3 (79.2-91.6)	82.6 (61.1-111.6)	38	81.6 (65.7-92.3)	65.0 (37.7-112.2)

[0301]

「다양한 제형의 조성물이 표 4에 제공된다.

[0302]

[0303]

표 10: 1 µg의 19F-PD, 3 µg의 19F-DT 또는 프레브나르 (2 µg의 19F-CRM)으로 프라이밍된 아동에서의 23-가 플레인 다당류 부스터 전 및 1개월 후에 0.20 µg/mL 이상의 19F 항체 농도를 지니는 피검체의 백분율 및 19F 항체 GMC (µg/mL) (전체 코호트)

일차 그룹	11Pn-PD&Di-002 (22F ELISA)					
	부스터 예방접종 전			23-가 PS 부스터 1개월 후		
	N	% ≥ 0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/ml) (95% CI)	N	% ≥ 0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/ml) (95% CI)
11Pn-PD	70	77.1 (65.6-86.3)	0.67 (0.45-0.98)	67	94.0 (85.4-98.3)	11.50 (7.76-17.03)
19F-DT 형태 1 [†]	68	91.2 (81.8-96.7)	0.71 (0.54-0.94)	69	98.6 (92.2-100)	14.50 (10.47-20.07)
19F-DT 형태 2 [†]	74	81.1 (70.3-89.3)	0.59 (0.43-0.80)	72	95.8 (88.3-99.1)	9.90 (6.74-14.54)
프레브나르	65	64.6 (51.8-76.1)	0.40 (0.27-0.60)	67	100 (94.6-100)	9.40 (6.95-12.71)

[0304]

「다양한 제형의 조성물이 표 4에 제공된다.

[0305]

[0306]

표 11: 1 µg의 19F-PD, 3 µg의 19F-DT 또는 프레브나르 (2 µg의 19F-CRM)으로 프라이밍된 아동에서의 23-가 플레인 다당류 부스터 전 및 1개월 후에 1:8 이상의 19F OPA 역가를 지니는 피검체의 백분율 및 19F OPA GMT (전체 코호트)

일차 그룹	11Pn-PD&Di-002					
	부스터 예방접종 전			23-가 PS 부스터 1개월 후		
	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	29	27.6 (12.7-47.2)	10.9 (5.0-23.7)	28	82.1 (63.1-93.9)	408.0 (157.3-1058.3)
19F-DT 형태 1 ^T	19	47.4 (24.4-71.1)	18.1 (7.2-45.7)	18	94.4 (72.7-99.9)	1063.8 (386.6-2927.5)
19F-DT 형태 2 ^T	27	33.3 (16.5-54.0)	8.5 (4.7-15.3)	28	100 (87.7-100)	957.6 (552.8-1659.0)
프레브나르	24	12.5 (2.7-32.4)	8.1 (3.4-19.6)	23	82.6 (61.2-95.0)	380.9 (133.2-1089.5)

[0307]

「다양한 제형의 조성물이 표 4에 제공된다.

[0308]

[0309]

표 12: 1 µg의 19F-PD, 3 µg의 19F-DT 또는 프레브나르 (2 µg의 19F-CRM)으로 프라이밍된 아동에서의 11 Pn-PD 또는 프레브나르 부스터 1개월 후에 0.2 µg/mL 이상의 항체 농도 및 1:8 이상의 OPA를 지니는 피검체의 백분율 및 19F 페렴구균에 대한 GMC/GMT (전체 코호트)

일차 그룹	11Pn-PD&Di-002					
	22F-ELISA 분석			OPA 분석		
	N	% ≥ 0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/ml) (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	70	100 (94.9-100)	4.52 (3.7-5.5)	21	100 (83.9-100)	255.6 (135.5-481.9)
19F-DT 형태 1 ^T	66	98.5 (91.8-100)	3.45 (2.8-4.3)	23	95.7 (78.1-99.9)	374.0 (192.6-726.2)
19F-DT 형태 2 ^T	70	98.6 (92.3-100)	3.80 (2.9-4.9)	29	96.6 (82.2-99.9)	249.1 (144.7-428.7)
프레브나르	69	97.1 (89.9-99.6)	2.56 (2.0-3.3)	31	96.8 (83.3-99.9)	528.7 (319.4-875.2)

[0310]

「다양한 제형의 조성물이 표 4에 제공된다.

[0311]

[0312]

표 13: 1 µg의 19F-PD, 3 µg의 19F-DT 또는 프레브나르 (2 µg의 19F-CRM)을 이용한 일차 예방접종 1개월 후에 0.2 µg/mL 이상의 항체 농도 및 1:8 이상의 OPA를 지니는 피검체의 백분율 및 19A 페렴구균에 대한 GMC/GMT (전체 코호트)

그룹	11Pn-PD&Di-001					
	22F-ELISA 분석			OPA 분석		
	N	% ≥ 0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/mL) (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	45	28.9 (16.4-44.3)	0.09 (0.07-0.11)	52	7.7 (2.1-18.5)	5.2 (4.0-6.8)
19F-DT 형태 2 ^T	51	29.4 (17.5-43.8)	0.11 (0.08-0.16)	59	27.1 (16.4-40.3)	12.4 (7.6-20.3)
프레브나르	55	18.2 (9.1-30.9)	0.10 (0.08-0.12)	61	3.3 (0.4-11.3)	4.6 (3.8-5.6)

[0313]

* 「다양한 제형의 조성물이 표 4에 제공된다.

[0314]

[0315]

실시예 5: 전임상 모델에서의 애주번트 실험: 중년의 붉은털 원숭이에서의 페렴구균 11-가 다당류 컨쥬게이트의 면역원성에 대한 영향

[0316]

중년 집단에서 컨쥬게이트 페렴구균 백신에 대해 유도된 반응을 최적화시키기 위해, GSK사에서 신규한 애주번트인 애주번트 C를 지니는 11-가 다당류 (PS) 컨쥬게이트 백신을 제형화하였다 - 하기 참조.

[0317]

5 마리의 중년 붉은털 원숭이 (14 내지 28세) 그룹을 500 µL의 AlPO₄ (315 µg)에 흡착된 11-가 PS 컨쥬게이트 또는 애주번트 C와 혼합된 11-가 PS 컨쥬게이트로 0 및 28일째에 근내 (IM) 면역화시켰다.

[0318]

둘 모두의 백신 제형에서, 11-가 PS 컨쥬게이트 각각은 PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-PD, PS19F-PD, PS23F-DT 및 PS6B-DT의 컨쥬게이트로 구성되었다. 사용된 백신은 9 mg/ml의 크기 조절된 당류, 5 mg/ml의 PD, 1.2/1의 최초 PD/PS 비, 0.75 mg/mg PS의 CDAP 농도, 9.0/9.0/9.0의 pH=pHc=pHq 및 60 분의 커플링 시간의 CDAP 공정 조건에 따라 제조된 19F를 제외하고는, 표 6의 조건 (실시예

4)에 따라 컨쥬게이팅된 백신의 인간 투여량 (6B [10 µg]을 제외하고는 인간 투여량당 각각 5 µg의 당류)의 1/5 투여량이었다.

[0319] 항-PS ELISA IgG 수준 및 흡소노-파고사이토시스 역가를 42일째에 수거된 혈청에서 결정하였다. 항-PS3 기억 B 세포 빈도를 42일째에 수거된 말초 혈액 세포로부터 Elispot에 의해 측정하였다.

[0320] 하기 나타낸 결과에 따라, 애쥬번트 C는 중년의 붉은털 원숭이에서 AlPO₄를 지닌 컨쥬게이트에 비해 11-가 PS 컨쥬게이트의 면역원성을 현저하게 개선시켰다. 신규한 애쥬번트는 PS에 대한 IgG 반응 (도 1) 및 흡소노-파고 사이토시스 항체 역가 (표 14)를 향상시켰다. PS3-특이적 기억 B 세포의 빈도가 애쥬번트 C의 사용에 의해 증가하는 것을 뒷받침하는 증거가 또한 있었다 (도 2).

[0321] **도 14: 중년의 붉은털 원숭이에서의 컨쥬게이트 면역원성 (두번째 투여후 흡소노-파고사이토시스 역가)**

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS8V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11-가 AlPO ₄	면역 전	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	두번째 투여 14일 후	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11-가 Adj-C	면역 전	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
	두번째 투여 14일 후	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

[0322]

[0323] **B 세포 Elispot**

[0324] 상기 분석의 원리는 기억 B 세포가 5일 동안의 CpG와의 배양 후에 시험관내에서 형질 세포로 성숙한다는 사실을 기초로 한다. 시험관내에서 생성된 항원-특이적 형질 세포는 용이하게 검출될 수 있고, 따라서 B-세포 elispot 분석을 이용하여 계수될 수 있다. 특정 형질 세포의 수는 배양 개시에서의 기억 B 세포의 빈도를 반영한다.

[0325] 간단하게, 시험관내에서 생성된 형질 세포는 항원으로 코팅된 배양 플레이트에서 인큐베이션된다. 항체/항원 스폿 (spot)으로부터의 항원-특이적 형질 세포는 통상적인 면역-효소 방법에 의해 검출되고, 기억 B 세포로 계수된다. 본 연구에서, 배양 플레이트를 코팅하기 위해 다당류를 사용하여 각각의 기억 B 세포를 계수하였다. 결과를 백만개의 기억 B 세포 내에서의 PS 특이적 기억 B 세포의 빈도로 나타내었다.

[0326] 본 연구는 애쥬번트 C가 PS3의 부스터능력 (boostability)의 공지된 문제점을 경감시킬 수 있음을 나타낸다 (참고: [5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, April 2-6 2006, Alice Springs, Central Australia. Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book p 245, P010.06]).

[0327] **실시예 6: 어린 Balb/c 마우스에서의 PS 19F의 면역원성을 향상시키는 단백질 담체로서의 무독화된 뉴몰리신 (dPly)의 효과**

[0328] 40마리의 암컷 Balb/c 마우스 (4주령) 그룹을 애쥬번트 C와 혼합된 50 µl의 4-가 플레인 PS 또는 4가 dPly-컨쥬게이팅된 PS로 0, 14 및 28일째에 IM 면역화시켰다. 둘 모두의 백신 제형은 각각 0.1 µg (당류의 양)의 PS8, PS12F, PS19F 및 PS22F의 PS로 구성되었다. 항-PS ELISA IgG 수준을 42일째에 수거된 혈청에서 결정하였다. 도 3에 예로 나타낸 항-PS19F 반응은 플레인 PS로 면역화된 마우스에 비해 4-가 dPly 컨쥬게이트를 투여한 마우스에서 강하게 향상되었다. 항-PS8, 12F 및 22F IgG 반응에 대해 동일한 개선이 관찰되었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0329] **실시예 7: 어린 Balb/c 마우스에서의 PS 22F의 면역원성을 향상시키는 단백질 담체로서의 페렴구균 히스티딘 트라이어드 단백질 D (PhtD)의 효과**

[0330] 40마리의 암컷 Balb/c 마우스 (4주령) 그룹을 애쥬번트 C와 혼합된 50 µl의 4-가 플레인 PS 또는 4가 PhtD-컨쥬게이팅된 PS로 0, 14 및 28일째에 IM 면역화시켰다. 둘 모두의 백신 제형은 각각 0.1 µg (당류의 양)의 PS8, PS12F, PS19F 및 PS22F의 PS로 구성되었다. 항-PS ELISA IgG 수준을 42일째에 수거된 혈청에서 결정하였다. 도 4에 예로 나타낸 항-PS22F 반응은 플레인 PS로 면역화된 마우스에 비해 4-가 PhtD 컨쥬게이트를 투여한 마우스에서 강하게 향상되었다. 항-PS8, 12F 및 19F IgG 반응에 대해 동일한 개선이 관찰되었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0331] **실시예 8: 19A-dPly 및 22F-PhtD를 함유하는 13-가 PS 컨쥬게이트의 중년의 C57BI 마우스에서의 면역원성**

[0332] 30마리의 나이든 C57BI 마우스 (69주령 초과) 그룹을 애쥬번트 C와 혼합된 50 µl의 11-가 PS 컨쥬게이트 또는

13-가 PS 컨쥬게이트로 0, 14 및 28일째에 IM 면역화시켰다 (하기 참조). 11-가 백신 제형은 각각 0.1 μg 의 당류의 PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT 및 PS23F-PD 컨쥬게이트로 구성되었다 (표 1 및 표2의 하기에 논의된 11가 백신에 대한 주석 참조). 13-가 백신 제형은 0.1 μg 의 PS19A-dPly 및 PS22F-PhtD 컨쥬게이트를 추가로 함유하였다 (표 1 및 표2의 하기에 논의된 13가 백신 [직접 컨쥬게이팅된 22F를 이용]에 대한 주석 참조). 그룹 2 및 4에서 뉴몰리신 담체를 GMBS 처리로 무독화시키고, 그룹 3 및 5에서 뉴몰리신 담체를 포름알데히드로 무독화시켰다. 그룹 2 및 3에서 PS 22F를 컨쥬게이팅시키기 위해 PhtD를 사용하였고, 그룹 4 및 5에서 PhtD_E 용합체 (WO 03/054007로부터의 작제물 VP147)를 사용하였다.

[0333] 그룹 6에서, 19A를 디프테리아 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 22F를 단백질 D에 컨쥬게이팅시켰다. 항-PS19A 및 22F ELISA IgG 수준을 42일째에 수거된 개별적 혈청에서 결정하였다. 기타 PS에 대해 생성된 ELISA IgG 반응을 풀링된 혈청에서 측정하였다. 13-가 컨쥬게이트 백신 제형 내에 투여된 19A-dPly 및 22F-PhtD가 나이든 C57BI 마우스에서 면역원성을 나타내었다 (표 15). 기타 PS에 대해 유도된 면역 반응은 11-가 제형으로 면역화된 마우스에 비해 13-가 제형이 투여된 마우스에서 부정적인 영향을 미치지 않았다.

[0334] 표 15: 나이든 C57BI 마우스에서의 PS 면역원성 (세번째 투여 후 IgG 수준)

나이든 C57 블랙(Black) 마우스						
ELISA	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 4	그룹 5	그룹 6
	11V 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD-E 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C
1 평균 풀(pool)	19.30	20.20	24.40	12.80	12.10	13.60
3 평균 풀	6.32	4.84	5.21	6.74	2.38	2.54
4 평균 풀	60.9	67.1	51.4	47.4	45.5	41.1
5 평균 풀	1.34	3.81	3.06	2.75	1.26	1.23
6B 평균 풀	4.41	4.12	5.88	1.58	2.31	5.64
7F 평균 풀	0.83	0.81	1.65	1.98	0.89	0.99
9V 평균 풀	13.8	23.7	20.0	13.1	15.5	9.6
14 평균 풀	25.73	42.96	34.12	32.53	23.97	15.60
18C 평균 풀	13.4	20.1	11.9	9.1	8.3	8.4
19F 평균 풀	57.5	90.0	63.8	36.5	47.0	69.1
23F 평균 풀	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A GMC	0.06	0.09	0.25	0.08	0.23	0.19
IC	0.04-0.1	0.05-0.14	0.15-0.41	0.06-0.12	0.14-0.38	0.09-0.3
% 혈청	33%	47%	83%	53%	80%	73%
22F GMC	NR	5.81	3.76	0.54	0.85	2.02
IC		3.2-10.6	1.8-7.9	0.3-1.1	0.4-1.7	1.2-3.4
% 혈청	0%	97%	90%	77%	87%	97%

[0335]

[0336] 실시예 9: 19A-dPly 및 22F-PhtD를 함유하는 13-가 PS 컨쥬게이트의 어린 Balb/c 마우스에서의 면역원성

[0337] 30마리의 어린 Balb/c 마우스 (4주령)의 그룹을 애쥬번트 C와 혼합된 50 μl 의 11-가 PS 컨쥬게이트 또는 13-가

PS 컨쥬게이트로 0, 14 및 28일째에 IM 면역화시켰다 (하기 참조). 11-가 백신 제형은 각각 0.1 μg 의 당류의 PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT 및 PS23F-PD 컨쥬게이트로 구성되었다 (표 1 및 표2의 하기에 논의된 11가 백신에 대한 주석 참조). 13-가 백신 제형은 0.1 μg 의 PS19A-dPly 및 PS22F-PhtD 컨쥬게이트를 추가로 함유하였다 (표 1 및 표2의 하기에 논의된 13가 백신 [직접 컨쥬게이팅된 22F를 이용]에 대한 주석 참조). 그룹 2 및 4에서 뉴몰리신 담체를 GMBS 처리로 무독화시키고, 그룹 3 및 5에서 뉴몰리신 담체를 포름알데히드로 무독화시켰다. 그룹 2 및 3에서 PS 22F를 컨쥬게이팅시키기 위해 PhtD를 사용하였고, 그룹 4 및 5에서 PhtD_E 융합체 (WO 03/054007로부터의 작제물 VP14 7)를 사용하였다. 그룹 6에서, 19A를 디프테리아 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 22F를 단백질 D에 컨쥬게이팅시켰다. 항-PS19A 및 22F ELISA IgG 수준을 42일째에 수거된 개별적 혈청에서 결정하였다. 기타 PS에 대해 생성된 ELISA IgG 반응을 폴링된 혈청에서 측정하였다. 13-가 컨쥬게이트 백신 제형 내에 투여된 119A-dPly 및 22F-PMD가 어린 Balb/c 마우스에서 면역원성을 나타내었다 (표 16). 기타 PS에 대해 유도된 면역 반응은 11-가 제형으로 면역화된 마우스에 비해 13-가 제형이 투여된 마우스에서 부정적인 영향을 미치지 않았다.

[0338] 표 16: 어린 Balb/c 마우스에서의 PS 면역원성 (세번째 투여 후 IgG 수준)

BalbC 마우스						
ELISA	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 4	그룹 5	그룹 6
	11V 0.1 μg /50 μl Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0.1 μg /50 μl Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0.1 μg /50 μl Adj C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0.1 μg /50 μl Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0.1 μg /50 μl Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1 μg /50 μl Adj C
1 평균 풀	131.70	101.20	83.00	82.40	67.90	85.50
3 평균 풀	21.85	10.38	12.53	8.83	8.73	14.98
4 평균 풀	147.4	127.0	104.4	95.0	113.6	114.2
5 평균 풀	21.38	20.29	18.26	18.95	18.02	23.04
6B 평균 풀	1.97	4.76	3.72	2.35	1.43	1.05
7F 평균 풀	7.69	4.58	4.77	4.24	3.92	3.94
9V 평균 풀	30.1	30.7	26.5	21.4	23.4	28.3
14 평균 풀	28.78	27.67	26.23	21.54	24.34	13.73
18C 평균 풀	53.4	52.37	46.5	57.8	47.8	75.8
19F 평균 풀	186.6	157.7	169.3	178.9	181.9	223.2
23F 평균 풀	4.98	3.9	5.11	0.57	3.13	4.57
19A GMC IC %혈청	0.4 0.2-0.6 93%	32.8 26.4-40.7 100%	25.1 20.6-30.6 100%	21.6 17.5-26.7 100%	18.9 15.1-23.5 100%	23.5 19.5-28.5 100%
22F GMC IC %혈청	NR 0%	3.99 1.9-8.42 93%	3.76 1.8-8 100%	6.27 3.8-10.4 100%	8.70 5.4-13.9 100%	18.76 15.2-23.1 100%

[0339]

[0340] 실시예 10: 19A-dPly 및 22F-PhtD를 함유하는 13-가 PS 컨쥬게이트의 기니아 피그에서의 면역원성

[0341] 20마리의 어린 기니아 피그 (하틀리(Hartley) 계통; 5주령) 그룹을 애쥬번트 C와 혼합된 125 μl 의 11-가 PS 컨쥬게이트 또는 13-가 PS 컨쥬게이트로 0, 14 및 28일째에 IM 면역화시켰다 (하기 참조). 11-가 백신 제형은 각

각 0.25 μg 의 당류의 PS1-PD, PS3-PD, PS4-PD, PS5-PD, PS6B-PD, PS7F-PD, PS9V-PD, PS14-PD, PS18C-TT, PS19F-DT 및 PS23F-PD 컨주게이트로 구성되었다 (표 1 및 표2의 하기에 논의된 11가 백신에 대한 주석 참조). 13-가 백신 제형은 0.1 μg 의 PS19A-dPly 및 PS22F-PhtD 컨주게이트를 추가로 함유하였다 (표 1 및 표2의 하기에 논의된 13가 백신 [직접 컨주게이팅된 22F를 이용]에 대한 주석 참조). 2 및 4에서 뉴몰리신 담체를 GMBS 처리로 무독화시키고, 그룹 3 및 5에서 뉴몰리신 담체를 포름알데히드로 무독화시켰다. 그룹 2 및 3에서 PS 22F를 컨주게이팅시키기 위해 PhtD를 사용하였고, 그룹 4 및 5에서 PhtD_E 용합체 (WO 03/054007로부터의 작제물 VP147)를 사용하였다. 그룹 6에서, 19A를 디프테리아 독소이드에 컨주게이팅시키고, 22F를 단백질 D에 컨주게이팅시켰다. 항-PS19A 및 22F ELISA IgG 수준을 42일째에 수거된 개별적 혈청에서 결정하였다. 기타 PS에 대해 생성된 ELISA IgG 반응을 풀링된 혈청에서 측정하였다.

[0342] 표 17: 어린 Balb/c 마우스에서의 PS 면역원성 (세번째 투여 후의 IgG 수준)

기니아 피그						
ELISA	그룹 1	그룹 2	그룹 3	그룹 4	그룹 5	그룹 6
	11V 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD- E 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-dPly formol 22F-PhtD-E 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Adj C
1 평균 풀	78.00	77.21	76.15	68.77	68.59	81.04
3 평균 풀	7.75	9.31	12.73	7.94	4.75	9.59
4 평균 풀	130.7	94.4	132.6	166.8	85.0	101.3
5 평균 풀	109.10	117.10	110.70	158.40	74.10	100.40
6B 평균 풀	3.14	4.26	14.4	7.63	6.3	7.52
7F 평균 풀	154.2	216.0	240.0	181.0	142.0	179.1
9V 평균 풀	90.69	105.45	98.20	93.45	54.12	73.05
14 평균 풀	71.19	77.18	46.53	59.67	38.47	53.69
18C 평균 풀	109.4	122.3	137.1	79.9	73.7	83.1
19F 평균 풀	73.9	102.5	112.2	75.5	62.3	72.1
23F 평균 풀	19.19	30.74	29.44	31.52	19.13	24.94
19A GMC	0.4	25.58	41.49	14.25	27.49	6.74
IC	0.24-0.68	12-54.5	24.4-70.5	5.9-34.6	16.6-45.4	4-11.3
%혈청	75%	100%	100%	100%	100%	100%
22F GMC	0.12	2.51	3.67	45.74	30.68	96.38
IC	0.09-0.16	0.94-6.73	1.59-8.42	29.3-71.4	17-53.3	73.5-126.4
%혈청	10%	95%	95%	100%	100%	100%

[0343]

[0344] 실시예 11: 제조되고 시험된 제형

[0345] a) 하기의 제형을 제조하였다 (표 1로부터의 13가 백신 및 표 5로부터의 혈청형 3을 이용함 - 표 2 하기에 논의된 14가 백신 [직접 컨주게이팅된 22F 또는 ADH 링커를 통해 컨주게이팅된 22F를 이용함]에 대한 주석을 참고). 하기 나타낸 바와 같이 알루미늄 포스페이트 및 3D-MPL을 이용하여 당류를 제형화하였다.

14V 25µg MPL BAC 알루미늄 함량의 합계 -> FF 투여량 당:						14V 10µg MPL BAC 알루미늄 함량의 합계 -> FF 투여량 당:					
PS	담체	µg PS	µg MPL	비 PS/Al 1/x	µg Al	PS	담체	µg PS	µg MPL	비 PS/Al 1/x	µg Al
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TL _{Al}	3		15	45	18C	TL _{Al}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhID	3		10	30	22F	PhID	3		10	30
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100	BAC MPL 50/200			10	4	40
FF 알루미늄 함량				합계 =	355	FF 알루미늄 함량				합계 =	295

[0346]

[0347] b) 동일한 당류 제형을 하기 애쥬번트 각각으로 애쥬번팅시켰다:

[0348] - 하기의 표에서, 500 µl의 투여량 당 에멀전 성분의 농도를 나타내었다.

성분	애쥬번트 A1	애쥬번트 A2	애쥬번트 A3
	250µl o/w	125µl o/w	50µl o/w
	에멀전	에멀전	에멀전
알파 토코페롤	11.88mg	5.94mg	2.38mg
스쿠알렌	10.7mg	5.35mg	2.14mg
Tween 80	4.85mg	2.43mg	0.97mg

성분	애쥬번트 A4	애쥬번트 A5	애쥬번트 A6	애쥬번트 A7
	250µl o/w	250µl o/w	125µl o/w	50µl o/w
	에멀전	에멀전	에멀전	에멀전
알파 토코페롤	11.88mg	11.88mg	5.94mg	2.38mg
스쿠알렌	10.7mg	10.7mg	5.35mg	2.14mg
Tween 80	4.85mg	4.85mg	2.43mg	0.97mg
3D-MPL	50µg	25µg	25µg	10µg

[0349]

[0350] c) 당류를 또한 두개의 리포솜 기재 애쥬번트와 함께 제형화하였다:

[0351] 애쥬번트 B1의 조성

[0352] 정성 정량 (0.5mL 투여량당)

[0353] 리포솜:

[0354] - DOPC 1 mg

[0355] - 콜레스테롤 0.25 mg

[0356] 3DMPL 50 µg

[0357] QS21 50 µg

[0358] KH₂PO₄ 1 3.124 mg 완충용액

[0359] Na₂HPO₄ 1 0.290 mg 완충용액

[0360] NaCl 2.922 mg

[0361] (100 mM)

[0362] WFI q.s. ad 0.5 ml 용매

[0363] pH 6.1

- [0364] 1. 전체 PO₄ 농도 = 50 mM
- [0365] **애주번트 B2의 조성**
- [0366] **정성 정량 (0.5mL 투여량당)**
- [0367] 리포솜:
- [0368] - DOPC 0.5 mg
- [0369] - 콜레스테롤 0.125 mg
- [0370] 3DMPL 25 μg
- [0371] QS21 25 μg
- [0372] KH₂PO₄ 1 3.124 mg 완충용액
- [0373] Na₂HPO₄ 1 0.290 mg 완충용액
- [0374] NaCl 2.922 mg
- [0375] (100 mM)
- [0376] WFI q.s. ad 0.5 ml 용매
- [0377] pH 6.1
- [0378] d) 당류를 또한 애주번트 C와 함께 제형화하였다 (이러한 애주번트가 사용된 기타 조성에 대해서는 상기 참조):
- [0379] **정성 정량 (0.5mL 투여량당)**
- [0380] 수중유 에멀전: 50 μl
- [0381] - 스쿠알렌 2.136 mg
- [0382] - α-토코페롤 2.372 mg
- [0383] - Tween80 0.97 mg
- [0384] - 콜레스테롤 0.1 mg
- [0385] 3DMPL 50 μg
- [0386] QS21 50 μg
- [0387] KH₂PO₄ 1 0.470 mg 완충용액
- [0388] Na₂HPO₄ 1 0.219 mg 완충용액
- [0389] NaCl 4.003 mg
- [0390] (137 mM)
- [0391] KCl 0.101 mg
- [0392] (2.7 mM)
- [0393] WFI q.s. ad 0.5 ml 용매
- [0394] pH 6.8
- [0395] **실시예 12: Balb/c 마우스에서의 22F-PhtD 컨쥬게이트 면역원성에 대한 컨쥬게이션 화학의 영향**
- [0396] 30마리의 암컷 Balb/c 마우스 그룹을 PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 및 23F (투여량: 0.3 μg 당류 / PS 4, 18C, 19A, 19F 및 22F, 및 0.1 μg 당류 / 기타 PS)를 함유하는 13-가 PS 제형으로 0, 14 및 28일째에 근내 (IM) 경로로 면역화시켰다.

- [0397] *PS 18C를 과상풍 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 19F를 디프테리아 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 19A를 포르몰-무독화된 Ply에 컨쥬게이팅시키고, 22F를 PhtD에 컨쥬게이팅시키고, 나머지 PS를 PD에 컨쥬게이팅시켰다.
- [0398] 직접적인 CDAP 화학에 의해 제조된 22F-PhtD 또는 22F-AH-PhtD (ADH-유도체화된 PS)로 구성된 두개의 제형을 제조하였다. 직접 컨쥬게이팅되거나 ADH 스페이서를 통해 컨쥬게이팅된 22F를 이용하여 제조된 13가 백신의 특성에 대해서는 실시예 2의 표 1 및 표 2의 하기의 주석을 참조하라. 백신 제형에 애쥬번트 C를 보충하였다.
- [0399] 항-PS22F ELISA IgG 수준 및 흡소노-과고사이토시스 역가를 42일째에 수거된 혈청으로부터 측정하였다.
- [0400] 22F-AH-PhtD는 IgG 수준 (도 5) 및 흡소노-과고사이토시스 역가 (도 6)와 관련하여 22F-PhtD보다 더욱 면역원성인 것으로 나타났다.
- [0401] **실시예 13: 스트렙토코쿠스 뉴모니에 캡슐 PS 컨쥬게이트의 면역원성에 대한** 신규한 애쥬번트의 영향
- [0402] 40마리의 암컷 Balb/c 마우스 그룹을 PS 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 및 23F (투여량: 0.3 μg 당류 / PS 4, 18C, 19A, 19F 및 22F, 및 0.1 μg 당류 / 기타 PS)를 함유하는 13-가 PS 제형으로 0, 14 및 28일째에 근내 (IM) 경로로 면역화시켰다.
- [0403] PS 18C를 과상풍 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 19F를 디프테리아 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 19A를 포르몰-무독화된 Ply에 컨쥬게이팅시키고, 22F를 PhtD에 컨쥬게이팅시키고, 나머지 PS를 PD에 컨쥬게이팅시켰다. 직접 컨쥬게이팅된 22F를 이용하여 제조된 13가 백신의 특성에 대해서는 실시예 2의 표 1 및 표 2의 하기의 주석을 참조하라.
- [0404] AlPO_4 , 애쥬번트 A1, 애쥬번트 A4 또는 애쥬번트 A5가 보충된 4개의 제형을 제조하였다.
- [0405] 42일째에 수거되고 그룹당 풀링된 혈청에서 항-PS, Ply, PhtD 및 PD ELISA IgG 수준을 측정하였다. 각각의 항원에 대해 하기의 비를 계산하였다: 시험된 신규한 애쥬번트로 유도된 IgG 수준 / AlPO_4 로 유도된 IgG 수준.
- [0406] 시험된 모든 신규한 애쥬번트는 고전적인 AlPO_4 제형에 비해 13-가 컨쥬게이트에 대한 면역 반응을 2-배 이상 개선시켰다 (도 7).
- [0407] **실시예 14: 폐렴구균 원숭이 폐렴 모델에서의 PhtD/무독화된 Ply 결합의 보호 효능**
- [0408] 미리 존재하는 가장 낮은 항-19F 항체 수준을 지니는 것으로 선택된 6마리의 붉은털 원숭이 (3 내지 8세) 그룹을 11-가 PS 컨쥬게이트 (즉, 1 μg 의 PS 1, 3, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및 23F, 3 μg 의 PS 4, 18C 및 19F) 또는 PhtD (10 μg) + 포르몰-무독화된 Ply (10 μg) 또는 애쥬번트 단독으로 0 및 28일째에 근내 면역화시켰다.
- [0409] PS 18C를 과상풍 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 19F를 디프테리아 독소이드에 컨쥬게이팅시키고, 나머지 PS를 PD에 컨쥬게이팅시켰다. 11가 백신의 특성에 대해서는 실시예 2의 표 1 및 표 2의 하기의 주석을 참조하라. 모든 제형에 애쥬번트 C를 보충하였다.
- [0410] 타입 19F 폐렴구균 ($5 \cdot 10^8$ cfu)를 42일째에 우측 폐에 접종시켰다. 공격 1, 3 및 7일 후에 수거된 기관지폐포 세척액에서 집락을 계수하였다. 결과를 공격 7일후에 사망하거나, 폐에 집락화되었거나, 제거된 그룹당 동물수로 나타내었다.
- [0411] 도 8에 나타낸 바와 같이, 통계적 유의성에 근접한 우수한 보호 (적은 수의 동물이 사용되었음에도 불구하고)가 애쥬번트 단독 그룹에 비해 11-가 컨쥬게이트 및 PhtD+dPly 결합 ($p < 0.12$, 피셔 정확도 검정 (Fisher Exact test))으로 획득되었다.
- [0412] **실시예 15: 22F-PhtD 컨쥬게이트에 의해 유도된 타입 4 공격에 대한 항-PhtD 항체 반응 및 보호 효능에 대한** 컨쥬게이션 화학의 영향
- [0413] 20마리의 암컷 OF1 마우스 그룹을 3 μg 의 22F-PhtD (직접적인 CDAP 화학에 의해 제조) 또는 22F-AH-PhtD (ADH-유도체화된 PS), 또는 애쥬번트 단독으로 0 및 14일째에 근내 경로로 면역화시켰다. 둘 모두의 1가 22F 컨쥬게이트를 실시예 2의 방법으로 제조하였다 (표 1 및 표 2를 또한 참조). 각각의 제형에 애쥬번트 C를 보충하였다.
- [0414] 항-PhtD ELISA IgG 수준을 27일째에 수거된 혈청에서 측정하였다.

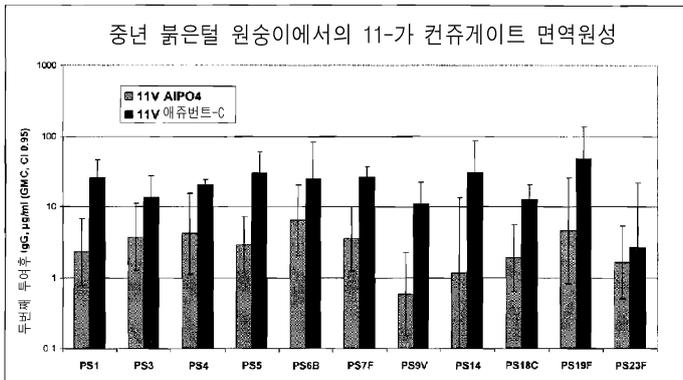
[0415] 마우스를 28일째에 5.10^6 cfu의 타입 4 폐렴구균으로 비내 공격하였다 (즉, 폐렴구균 혈청형은 시험된 백신 제형에 존재하는 PS에 의해 잠재적으로 포함되지 않는다). 공격 8일후까지 유도되는 사망률을 모니터하였다.

[0416] 22F-AH-PMD는 22F-PhtD보다 현저하게 높은 항-PhtD IgG 반응을 유도하였고, 타입 4 공격에 대해 보다 나은 보호를 제공하였다.

도면

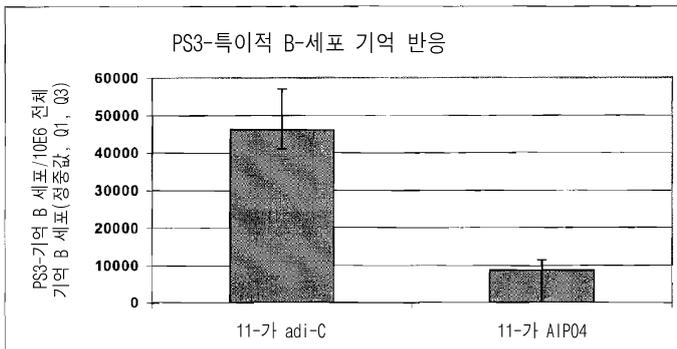
도면1

중년 붉은털 원숭이(Rhesus monkey)에서의 컨쥬게이트 면역원성 (두번째 투여후 항-PS IgG 수준)



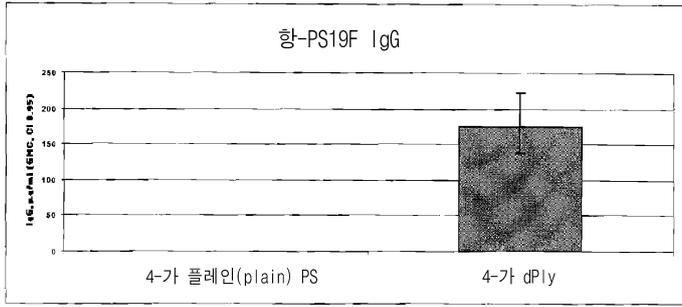
도면2

중년 붉은털 원숭이에서의 컨쥬게이트 면역원성 (두번째 투여후 항-PS3 기억 B 세포 빈도)



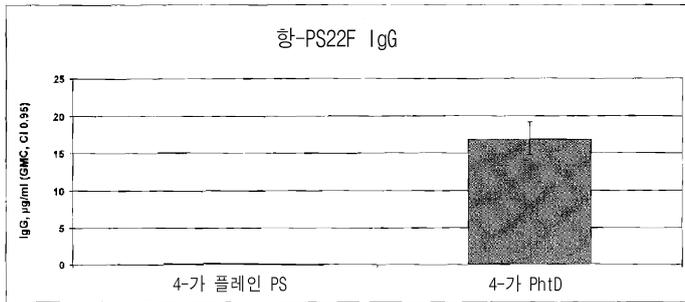
도면3

Balb/c 마우스에서의 PS19F 면역원성
(세번째 투여후 IgG 수준)



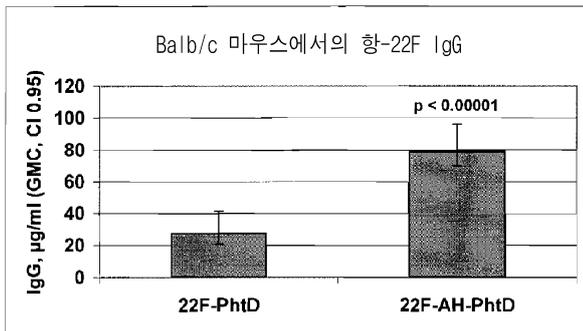
도면4

Balb/c 마우스에서의 PS22F 면역원성
(세번째 투여후 IgG 수준)



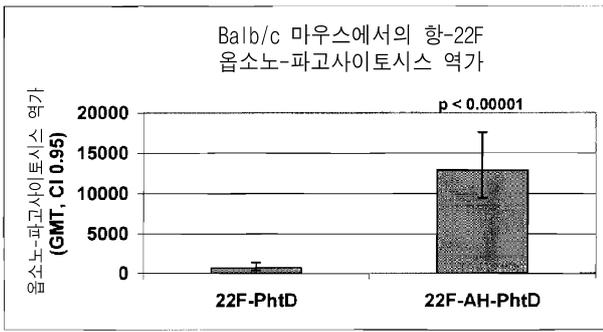
도면5

혈청 항-PS IgG 항체 수준



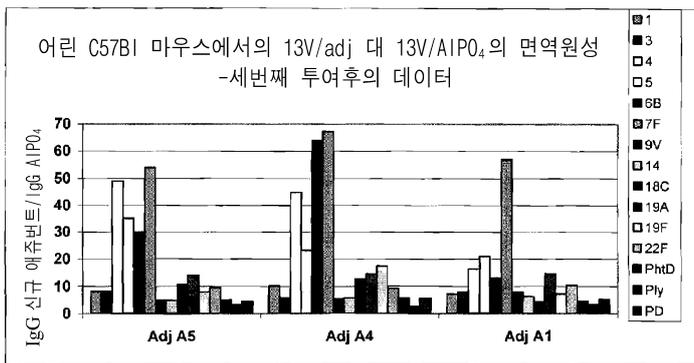
도면6

옵소노-파고사이토시스(opsono-phagocytosis) 역가



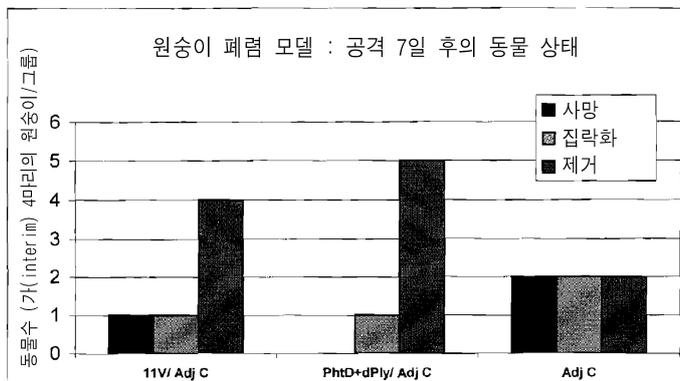
도면7

AIP0₄로 유도된 IgG 반응에 대한 신규한 애주번트로 유도된 IgG 반응의 비교

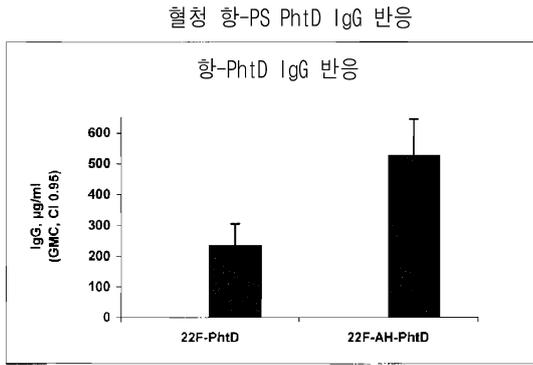


도면8

붉은털 원숭이에서의 타입 19F 폐 집락화에 대한 PhtD+dPly 단백질 결합의 보호 효능

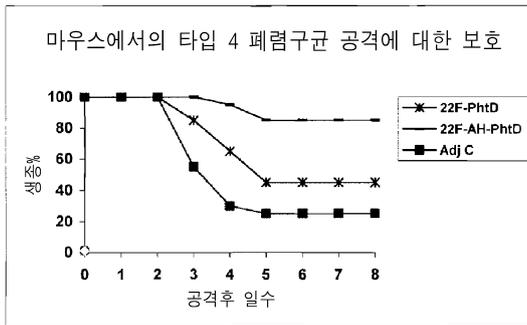


도면9



도면10

마우스에서의 타입 4 폐렴구균 공격에 대한 보호



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
- <120> Vaccine
- <130> VB61783
- <160> 7
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> CpG immunostimulatory oligonucleotide
- <400> 1
- tccatgacgt tctgacgtt
- <210> 2

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CpG immunostimulatory oligonucleotide
 <400> 2
 tctcccagcg tgcgcat 18

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CpG immunostimulatory oligonucleotide
 <400> 3
 accgatgacg tcgccgtga cggcaccacg 30

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CpG immunostimulatory oligonucleotide
 <400> 4
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CpG immunostimulatory oligonucleotide
 <400>
 > 5
 tccatgacgt tctgatgct 20

<210> 6
 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CpG immunostimulatory oligonucleotide

<400> 6

tcgacgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N terminal sequence of protein D construct

<400> 7

Met Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr

1

5

10