명세서

발명의 명칭: 다가 폐렴구균 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 각각 상이한 다가 폐렴구균 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것으로, 각 접합체는 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 폐렴구균 유래의 협막 다당류를 포함한다.

[2]

배경기술

[3] 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae,* 이하 폐렴구균)는 폐렴의 주요한 원인균이다. 통계청 「2010년 주요 사망 원인별 사망률 추이」에 의하면 2010년 폐렴으로 인한 사망률은 10만 명당 14.9 명으로 10대 사망 원인 중 하나이며, 2000년 대비 82.9% 증가한 것으로 나타났다. 또한 2012년 WHO에 따르면 2008년도에 전세계적으로 HIV 음성인 5세 이하 어린이 476,000명이 폐렴구균에 의한 감염으로 사망했으며, 5세 이하 어린이 전체 사망자 중 5%가 이 균에 의한 질환으로 사망하였다.

[4]

[5] 폐렴구균에 의한 질환을 예방하기 위해 1931년 Harold J. White에 의해 세계최초 다당류 백신이 개발이 되었다. 하지만 1929년 개발된 페니실린에 의해 미생물 감염 질환은 항생제에 의해 치료가 되었고, 항생제 내성균주의 발생을 초래하였다. 이에 기존의 항생제에 의한 치료가 효과를 거두지 못하자 1947년 프랑스의 Marie M. Dr Lapi에 의해 6가 다당류 백신이 개발되었고, 1977 년 Dr. Robert Austrian에 의해 14가 다당류 백신이 개발되었고, Merck, Wyeth, Pasteur에 의해 17가 다당 백신류 백신이 개발되어 전세계적으로 판매를 시작하였고, 이후 23가 다당류 백신으로 발전하였다. 다가 폐렴구균 다당류 백신은 노인 및 고위험 환자에서 폐렴구균 질환을 예방하는데 있어서 유용한 것으로 입증되었다. 그러나 유아 및 소아는 대부분의 폐렴구균 다당류에 대해 면역 반응이 잘 일어나지 않는데 이는 T-cell 비의존적 면역반응 현상 때문이다. 이러한 현상은 다른 미생물 백신에서도 유사하게 나타났으며, 이러한 현상을 극복하여 최초 다당-단백 접합 백신인 뇌수막염 백신(Hib)이 1987년 개발이 되었다. 이 후 뇌수막염(Meningitides)과 폐렴구균, 장티푸스 등의 미생물 백신의 접합 기술이 도입되었다. 폐렴구균 접합 백신의 경우, 2000년 7가 폐렴구균 접합 백신이 미국 출시되기 전, 개발사인 Pfizer(Wyeth)는 1994년부터 2가 폐렴구균 접합 백신을 개발을 시작하여, 2000년 7가 형태까지 개발을 하였다. 7가 폐렴구균 접합체 백신(프리베나®)은 가장 발생 빈도가 높은 7개 혈청형 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F 유래의 협막 다당류(Capsular Polysaccharide)를 포함한다. 2000년 미국에서

최초로 승인된 이후 유아 및 소아에서 침습성 질환 및 중이염에 대해 면역원성이 높고 효과적인 것으로 입증되었다. 이 백신은 현재 전세계 약 80여 개 국가에서 승인되어 있다. 프리베나의 도입 이후에 수년간 축적된 감시(Surveillance) 데이터에서는 예상된 바와 같이, 미국에서 프리베나에 포함된 혈청형에 의한 침습성 폐렴구균 질환이 명확히 감소하였다. 하지만 일부 지역에서는 혈청형 적용 범위에 한계가 있었으며, 프리베나에 포함되지 않은 혈청형으로 인한 침습성 폐렴구균 질환은 증가하였다. 이후 Pfizer에서는 7가 혈청형 이후 침습성 폐질환을 일으키는 주요 6개 혈청형을 선정하였고 13가 폐렴구균 접합 백신(프리베나13)을 2010년 출시하였다. 이후 기존 7가 폐렴구균 접합 백신의 사례와 유사한 형태로 백신에 포함되지 않는 혈청형이 유행하는 혈청형 치환(Serotype Replacement)이 발생하고 있는 것으로 보고 되고 있다.

[6]

[7] 프리베나13에 포함되지 않은 혈청형으로 인한 폐렴구균 감염이 증가됨에 따라, 폐렴구균 혈청형의 추가에 대해서는 계속해서 연구가 진행되고 있었다. 하지만, 다가 주사에 접합체를 조합함으로 인해 상이한 구성성분들 사이에 경쟁(면역 간섭 효과)이 일어날 수 있고 임의의 개별 접합체의 면역원성에 불리한 영향을 미칠 수 있기 때문에, 면역원성 조성물에 접합체를 추가하는 것에 큰 어려움이 있어왔다.

[8]

[9] 면역 간섭 효과는 다가 백신 개발에 있어 큰 이슈사항으로서, 주로 폐렴구균 백신의 개발과정에서 제기되어 왔다. 2000년에 PCV7이 처음 출시된 이후, 2010년에 출시된 PCV10의 도입 시 폐렴구균 백신에서의 면역간섭 효과가 크게 대두된 적이 있다. PCV11가로 출시 예정이었으나, 면역 간섭 효과로 인해 Pn6B가 면역반응이 나오지 않자, 6B를 제외한 PCV10로 출시를 한 적이 있다. 또한, 최근에 Merck에서 개발 중인 PCV15의 임상 2상 결과 (HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS, 2019, A dose ranging study of 2 different formulations of 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15) in healthy infants)를 통해 일부 혈청형에서 양성대조군인 PCV13보다 오히려 면역원성이 떨어지는 결과가 확인된 적이 있다. 폐렴구균 백신이 다가(Multi-valent)백신 형태로 개발되는 현 추세에서 개별 혈청형의 면역원성을 확보하면서 동시에 면역 간섭 효과가 없는 다가 백신 조성물은 백신 개발에 필수적이다.

[10]

[11] 이러한 면역 간섭 현상은 다가 백신에 포함될 수 있는 접합체의 수를 제한할 수 있다. 따라서, 수 많은 혈청형에 대한 보호가 상당한 가치가 있음에도 불구하고 조성물 중 접합체의 수를 제한하면서 이를 달성하기는 매우 어려웠던 것이 사실이다.

[12]

[13] 이에, 본 발명자들은 아시아 대륙 국가 (한국, 중국, 일본, 대만, 싱가폴, 호주,

인도)의 유행 혈청형 조사 결과를 토대로, 아시아 국가에 유행하는 혈청형을 10A, 11A, 15B, 22F, 23A, 35B로 최종 선정하였고, 기존 PCV13에 해당 6종을 추가한 PCV19 형태로 개발하여 해당 면역원성 조성물의 조합이 면역 간섭 효과를 발생시키지 않음을 최종적으로 확인하였다.

[14]

[15] 이는 기존 프리베나13 제품이 커버하지 못했던 혈청형을 최종 보완함으로써 PCV13이 도입되지 않았거나, NIP가 도입되지 않은 국가 및 혈청형 치환 발생 국가의 IPD 발생율을 크게 낮출 수 있음을 의미한다.

[16]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[17] 이에 본 발명자들은 기존 프리베나13 제품이 커버하지 못했던 혈청형을 커버할 수 있으면서, 면역 간섭 없는 면역원성 조성물 조합을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[18]

[19] 따라서, 본 발명의 해결하려는 과제는 다당류-단백질 접합체를 포함하는 다가 면역원성 조성물로서, 각각의 접합체가 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcuspneumoniae*) 유래의 협막 다당류(capsular polysaccharide)를 포함하며, 상기 협막 다당류가 14가 내지 19가의 혈청형인 다가 면역원성 조성물을 제공하는 것이다.

[20]

[21] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 다가 면역원성 조성물의 면역학적 유효량을 포함하는, 스트렙토코커스 뉴모니애 협막 다당류 접합체에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[22]

[23] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 다가 면역원성 조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[24]

[25] 아울러, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 상기 다가 면역원성 조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[26]

과제 해결 수단

[27] 상기 과제를 해결하고자, 본 발명은 다당류-단백질 접합체를 포함하는 다가 면역원성 조성물로서, 각각의 접합체가 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 스트렙토코커스 뉴모니애 유래의 협막 다당류(capsular

polysaccharide)를 포함하며, 상기 협막 다당류는 a) 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 혈청형의 협막 다당류; 및 b) 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 혈청형의 협막 다당류를 포함하는 다가 면역원성 조성물을 제공한다.

[28] 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물에 있어서, 상기 a) 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어지는 13개의 혈청형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[29] 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물에 있어서, 상기 운반체 단백질은 디프테리아 톡소이드, 파상풍 톡소이드, 백일해 톡소이드, 콜레라 톡소이드, 대장균 유래 불화성화 독소, 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래 불활성화 독소 및 세균 외막 단백질(OMP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[30] 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물에 있어서, 상기 디프테리아 톡소이드는 CRM_{197}, CRM_{173}, CRM_{228} 및 CRM_{45} 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 운반체 단백질은 CRM_{197} 일 수 있다.

[31] 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물에 있어서, 상기 협막 다당류와 상기 운반체 단백질의 접합 방법은 CDAP 접합 방법, 리덕티브 아미네이션 방법 및 티올-말레마이드(Thiol-Malemide) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[32] 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물은 애주번트를 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어, 애주번트로서 알루미늄 염을 포함할 수 있다. 상기 알루미늄 염은 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 알루미늄 포스페이트일 수 있다.

[33] 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 다가 면역원성 조성물의 면역학적 유효량을 포함하는, 스트렙토코커스 뉴모니애 협막 다당류 접합체에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학 조성물을 제공한다.

[34] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 2 μg의 각 당류, 단 6B는 4 μg; 약 34 μg의 CRM_{197} 운반체 단백질; 0.125mg의 알루미늄 원소(0.5mg의 알루미늄 포스페이트) 애주번트; 및 부형제로서 염화나트륨 및 나트륨 석시네이트 완충액을 함유하도록 제제화된 면역원성 조성물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[35] 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 다가 면역원성 조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[36] 아울러, 본 발명의 또 다른 과제를 해결하고자, 본 발명은 상기의 다가 면역원성

조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[37]

발명의 효과

[38] 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물은 기존 프리베나13 대비 더욱 다양한 혈청형에 대하여 면역 반응을 유도할 수 있다. 특히, 기존 프리베나13은 유럽 및 북미에서 빈발하는 혈청형을 위주로 설계되어 생산된 반면, 본 발명의 면역원성 조성물은 유럽 및 북미뿐만 아니라 아시아 전역에 대한 높은 커버리지를 갖는 면역원성 조성물이다. 따라서, 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물은 영·유아, 소아 및 성인의 폐렴구균에 의한 질환을 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[39]

도면의 간단한 설명

[40] 도 1은 13가 폐렴구균 백신 혈청형에 대한 IgG ELISA 결과를 나타낸 그림이다.

[41] 도 2는 13가 폐렴구균 백신 혈청형에 대한 OPA 결과를 나타낸 그림이다.

[42]

발명의 실시를 위한 형태

[43] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[44] 그러나 본 기재는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 발명의 상세한 설명에 기재된 사항들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[45]

[46] 혈청형 분포의 지역간 편차로 인해 프리베나 적용범위가 지역에 따라 달라지는 한계가 제기되었다. 따라서 기존의 폐렴구균 접합체 백신으로부터 어떤 혈청형도 제거할 이유가 없으며 오히려 혈청형을 추가하여 적용범위를 더 넓혀야 할 필요성이 있다.

[47]

[48] 프리베나13의 혈청형은 유럽 및 미국에서 유행하는 혈청형으로 개발이 되었으며, 프리베나13 도입 이후 국가마다 혈청형 치환 현상이 발생하고 있다. 이는 아시아와 유럽/미국간 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다. 본 발명에서는 프리베나13 도입 이후 아시아와 유럽/미국 유행되고 있는 혈청형을 선정하였다. 각 국의 폐렴구균 발병률 기준은 1) 5세이하 어린이, 2) 각 국의 프리베나13 도입 이후 발병율 결과, 3) 유행/비유행 혈청형을 조사하여 국가 별 유행/비유행 혈청형을 선정 하였고, 아시아/유럽/미국의 공통 유행 혈청형을 선정하였다.

[49]

[50] 혈청형 치환 (Serotype Replacement)은 연령, 국가, 백신 도입 시기, 국가백신프로그램 (NIP, National Immunization program) 도입 유무에 따라 영향을 받는다고 알려져 있다. 이에 폐렴구균 백신 개발사는 이러한 현상을 극복하기

위해 IPD (침습성 폐질환)을 일으키는 대표 혈청형을 추가하는 전략으로 신규 백신을 개발하고 있으며, Merck의 PCV15는 PCV13에 22F와 33F를 추가하였고, Pfizer의 PCV20은 PCV13에 8, 10A, 11A, 12F, 15B, 22F, 33F를 추가한 형태로 개발하고 있다. Merck와 Pfzer의 혈청형 선정 기준을 확인 시, 미국과 유럽의 IPD를 일으키는 유행 혈청형으로 선정을 하였고, 특히 Merck의 경우 미국/유럽의 교집합 혈청형인 22F, 33F를 선정한 것이 특징이다.

[51]

[52] 백신 선진국으로 평가받는 일본의 경우, PCV7, PCV13이 출시된 직후, 일본에 NIP에 등록이 되었으며, 등록 이후, PCV13에 포함된 혈청형은 급격히 IPD 환자수가 줄어드는 현상이 확인된 바 있다. 이러한 현상은 미국/유럽이 동일하게 나타나는 현상이다. 하지만 PCV13에 포함된 혈청형의 IPD 발생 추세는 유사하나, Non-PCV13 (백신 비 포함 혈청형)에서 유행하는 혈청형은 국가별/대륙별 유행 정도에서 차이를 확인할 수 있다. (출처 1, Vaccine 34 (2016) 67-76, 출처 2, Vaccines 4 (2016), 2000-2014: A Pooled Data Analysis, 출처 3. Plos one (2017) A systematic review and meta-analysis)

[53] 일본은 2010년 PCV7, 2013년 PCV13이 도입되었으며, PCV13 백신 도입 전/후의 유행 혈청형의 큰 차이를 보이는 것으로 알려져 있다. PCV13 도입 초기인 2011~2013년 기간에는 PCV13 포함 혈청의 발생빈도가 있었으나, 백신 도입 2~3년 후인 2014~2016년부터 급격하게 serotype replacement(혈청형 치환) 현상이 발생되었다. PCV13에 포함되는 혈청형 중 최근까지 발병이 되는 것 혈청형은 3>6A,6B,19F,23F 순으로 발생을 하고 있으나, 발생환자 수는 백신 도입 전과 비교할 때 1/10 수준이다. 백신 도입 이후, non-PCV13 혈청형이 유행하고 있으며, 24F>15A>12F>15B>22F 순으로 발생을 하고 있다.

[54]

[55] 예를 들어, 미국의 경우, 위 일본의 사례와 달리 22F, 33F가 PCV13 도입 이후 유행하고 있지만, 일본을 포함한 아시아 대륙에서 33F는 크게 유행하고 있지는 않다. (출처 1. Clin Microbiol Infect 2016; 22: 60.e9-60.e29, 출처 2. WHO 2011, Global review of the distribution of pneumococcal disease by age and region, 출처 3. CDC (US) homepage)

[56]

[57] 또한, 유럽의 경우, 백신도입 시기, NIP 도입 시기가 상이하지만, 영국/독일/프랑스의 사례를 참고해보면, PCV13 도입 이후 유행하는 혈청형은 8> 22F> 33F> 24> 9N으로 아시아 대륙과 차이를 보인다. (Expert review of vaccines. 2019).

[58]

[59] 아시아 대륙의 유행 혈청형을 확인하기 위해 한국, 일본, 대만, 중국, 호주, 싱가폴, 인도의 사례를 조사하였으며, 조사의 기준으로서 5세이하, 65세 이상, PCV13 도입 이후에 따른 IPD 유행 혈청형을 확인하고자 하였다. 그 결과, 일본의

경우, 2013년 PCV13이 도입되었고, Non-PCV13 중 유행 혈청형은 24F> 15A> 12F> 15B> 22F로 확인되었고, 한국의 경우, 10A> 15A,23A> 15B,35B가 유행하고 있으며, 호주의 경우, 23B> 22F> 35B> 33F가 유행하고 있고, 대만의 경우, 23A> 15B> 15A> 22F,11A가 유행하고 있음을 확인하였다. 싱가폴의 경우 해당 사례가 적지만 15B, 15A가 Non-PCV13 중 유행하는 것으로 보고되고 있고, 중국/인도의 경우, 두 국가 모두 NIP 도입 시기가 늦고, (2017년 이후) NIP 도입 이후 역학 조사 결과가 나오지 않아, 유행 혈청형을 산출하지는 못하였으나, 앞선 국가의 유행 혈청형을 참고하면, 중국/인도 모두 혈청형 치환이 발생할 가능성이 높으며, 유럽/미국 유행 혈청형과 다른 아시아 유행 혈청형이 유행할 가능성이 높을 것으로 예상된다.

[60]

[61] 아시아 국가들의 유행 혈청형을 분석한 결과, 아시아 유행하는 혈청형 중, 3개 국가 이상 중복되는 혈청형은 15B, 15A, 22F, 23A이며, 이 중 15B 와 15A는 교차반응 (Cross-reactiviity)이 있다는 보고가 있어, 15B 하나의 혈청형을 선정하였고, 아시아 국가에 특이적인 35B와 아시아를 포함한 유럽/미국에 유행하는 10A, 11A를 포함하여 총 6종 (10A,11A,15B, 22F,23A,35B)를 선정하고자 하였다.

[62]

[63] 한국의 경우, 프리베나13이 2010년 도입이 되었고, 일본과 유사하게 혈청형 치환이 빠르게 일어났다. 2016 - 2017년부터 non-프리베나13의 증가세를 보여주고 있다. 프리베나13 혈청형 중 최근까지 발병이 되고 있는 혈청형은 19F 및 6A이며, 이 혈청형 역시 발생 환자 수 및 빈도는 백신 도입 전과 비교 시 현격히 감소를 하였다. non-프리베나13 중 백신 도입 이후 유행하는 혈청형은 10A > 15A, 23A > 15B, 35B 순으로 발생하고 있다.

[64]

[65] 호주의 경우, 프리베나13이 2011년 도입이 되었다. 14년부터 혈청형 치환을 보이고 있으며, non-프리베나13 혈청형 증가세를 보이고 있다. non-프리베나13 중, 백신 도입 이후 유행하는 혈청형은 23B > 22F > 35B > 33F 순으로 발생하고 있다.

[66]

[67] 대만의 경우, 프리베나13이 2010년 도입이 되었다. 2016년도부터 혈청형 치환 현상을 보이고 있다. non-PV13 중, 백신 도입 이후 유행 혈청형은 23A > 15B > 15A > 22F, 11A 순으로 발생하고 있다.

[68]

[69] 싱가폴의 경우, 2011년 프리베나13이 도입되었다. 다른 아시아 국가와 같이 백신 도입 후, 혈청형 치환이 발생하였다. non-프리베나13 중 유행하는 혈청형은 15B > 15A 순으로 발생하고 있다.

[70]

[71] 인도의 경우, 프리베나13이 2017년 도입이 되었다. 인도의 경우, 프리베나13의 도입 이후 기간이 1 - 2년 밖에 되지 않아, 혈청형 치환이 완전히 진행되지 않았으며, 백신 보급률 증가에 따라 혈청형 치환이 증가될 것으로 예상한다. 현재 보고된 자료에 의하면 non-프리베나13 중 유행 혈청형은 23A > 22F > 15B > 6D 순으로 발생하고 있다.

[72]

[73] 중국의 경우, 프리베나7은 2008년, 프리베나13은 2016년에 판매 허가 되었지만, 국가무료예방접종 사업에 포함되지 않아 접종률 및 보급률은 현저하게 떨어지게 보고되고 있다. 하지만 중국의 경제 성장률에 따라 건강에 대해 기대심리가 높아져 백신 보급률이 올라감에 따라 혈청형 치환 현상은 다른 국가와 같이 시간 차이를 두고 발생할 것으로 예상한다.

[74]

[75] 아시아 6개국(한국, 일본, 대만, 싱가폴, 인도 및 호주)의 프리베나13 도입 이후, non-프리베나13 혈청형을 발생빈도를 나열한 결과 15B가 아시아 6개국에 가장 많이 발병을 한 것으로 확인되며, 그 다음으로는 22F, 23A, 35B 순으로 많이 발생을 하였다. 미국과 유럽의 경우, 공통적으로 많이 발생하는 혈청형은 22F, 33F이며, 그 다음으로 발병하는 혈청형은 10A, 11A로 보고되었다. 이에 아시아 유행 혈청형 6종(10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B)를 추가하였고, 유럽과 미국 유행 혈청형 4종(10A, 11A, 22F 및 35B)을 추가하여 최종 혈청형 구성을 선정하였다.

[76]

[77] 이에 본 발명자들은 아시아 대륙 국가 (한국, 중국, 일본, 대만, 싱가폴, 호주, 인도)의 유행 혈청형 조사 결과를 토대로, 아시아 국가에 유행하는 혈청형을 10A, 11A, 15B, 22F, 23A, 35B로 최종 선정하였고, 기존 PCV13에 해당 6종을 추가한 최종 PCV19 형태로 개발하였다.

[78]

[79] 백신은 국가 산업이기에 백신 접종률은 해당 백신의 국가무료백신프로그램 포함 여부가 중요하다. 이는 각 국의 경제수준 및 보건 당국의 입장에 따라 백신프로그램(NIP)에 포함되는 백신의 종류와 접종 대상은 큰 차이를 보이고 있다. 이 중 폐렴구균 접합 백신은 고가의 백신에 포함되는 백신 중 하나이며, 이를 국가무료백신프로그램에 포함시킨 국가는 전세계 중 일부 국가에 불가하다. 일본의 경우, 선진국에 준하는 국가무료백신프로그램을 운영하고 있어, 미국/유럽과 유사한 수준의 폐렴구균 접종률을 보이며, 결과적으로 유럽 및 미국과 유사한 시기에 혈청형 치환이 발생 하였다. 아시아 국가 간의 혈청형 치환의 차이는 인종 간의 차이에 기인할 수 있다. 하지만 혈청형 치환의 공통분모를 찾을 수 있고, 이는 유럽 및 미국의 non-프리베나13 유행 혈청형과 차이를 보인다. 유럽 및 미국에 공통으로 유행하는 22F와 33F 혈청형 중에서 33F 혈청형의 경우, 혈청형 치환이 발생하고 있는 아시아 국가 중 유일하게

호주에서만 발생을 하였고, 한국, 일본, 대만, 싱가폴 및 인도에서는 발생이 되지 않았다. 유럽 및 미국과 달리 아시아 국가에서는 15A, 15B, 22F 및 23A 혈청형이 유행하고 있어, 유럽 및 미국 유행 혈청형과는 차이를 보이고 있다.

[80]

[81] 본 발명의 신규 혈청형 6종(10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B)을 포함한 19가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 감염에 의해 유발되는 질환에 대해 사람에서 기능적 면역 반응을 유도한다. 보다 구체적으로는 일 구현예에서, 사람 대상체는 노인 대상체이며 질환은 폐렴 또는 침습성 폐렴구균 질환이다. 보다 구체적으로는, 일 구현예에서, 노인 대상체는 적어도 50세이다. 보다 구체적으로는, 일 구현예에서, 노인 대상체는 적어도 55세이다. 보다 구체적으로는, 일 구현예에서, 노인 대상체는 적어도 60세이다.

[82] 보다 구체적으로는, 일 구현예에서, 사람 대상체는 유아이고 질환은 폐렴, 침습성 폐렴구균 질환(IPD), 또는 급성 중이염(AOM)이다.

[83] 보다 구체적으로는, 일 구현예에서, 유아는 0 내지 2세 또는 2 내지 15개월령이다.

[84] 다른 실시형태에서, 사람 대상체는 6주령 내지 17세이며 질환은 폐렴, 침습성 폐렴구균 질환(IPD) 또는 급성 중이염(AOM)이다. 특정 실시형태에서, 사람 대상체는 6주령 내지 5세이다. 또 다른 실시형태에서, 사람 대상체는 5주령 내지 17세이다.

[85]

[86] 본 발명은 프리베나13가 백신에 포함된 혈청형을 모두 포함하고, 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 혈청형을 추가로 포함하는 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 다가 면역원성 조성물을 제공한다. 즉, 본 발명은 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께 14개 이상의 상이한 다당류-단백질 접합체를 포함하는 다가 면역원성 조성물로서, 각각의 접합체가 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 폐렴구균 유래의 협막 다당류를 포함한다.

[87]

[88] 협막 다당류는 당업자에게 공지된 표준 기술에 의해서 제조될 수 있다. 협막 다당류는 점도를 감소시키기 위해서 또는 활성화된 협막 다당류의 용해도를 증가시키기 위해서 크기를 줄일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 협막 다당류는 폐렴구균의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어진 13개의 혈청형과 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 혈청형 협막 다당류로 제조된다.

[89]

[90] 이 폐렴구균 접합체들은 별개의 과정에 의해서 제조되고 단일 투여 제형으로 제제화된다. 예를 들면, 각 폐렴구균 다당류 혈청형을 대두-기제 배지에서 증식시키고, 이어서 개개의 다당류를 원심분리, 침전, 한외여과를 통해서

정제한다.

[91]

[92] 운반체 단백질은 바람직하게는 무독성이고 비반응원성이며, 충분한 양 및 순도로 수득할 수 있는 단백질이다. 상기 운반체 단백질은 표준 접합 방법에 적절해야 한다. 본 발명에 따른 다가 면역원성 조성물에 있어서, 상기 운반체 단백질은 CRM_{197}일 수 있다. CRM_{197}은 카사미노산 및 효모 추출물-기제 배지에서 증식시킨 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*) 균주 C7(β197)의 배양물로부터 분리된 디프테리아 독소의 무독성 변이체이다. CRM_{197}은 한외여과, 암모늄 설페이트 침전 및 이온 교환 크로마토그래피를 통해서 정제된다. CRM_{197}은 미국특허 제5,614,382호에 따라 유전자 재조합하여 제조될 수 있다.

[93]

[94] 다른 디프테리아 톡소이드도 또한 운반체 단백질로서 사용될 수 있다. 다른 적당한 운반체 단백질에는, 파상풍 톡소이드, 백일해 톡소이드, 콜레라 톡소이드, 대장균(*E. coli*) 및 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래의 외독소 A와 같은 불활성화된 세균 독소가 포함된다. 세균 외막 단백질, 예를 들면, 외막 복합체 c(OMPC), 포린, 트랜스페린 결합 단백질, 뉴모리신, 폐렴구균 표면 단백질 A(PspA), 폐렴구균 어드헤신(adhesin) 단백질(PsaA), 그룹 A 또는 그룹 B 연쇄구균 유래의 C5a 펩티다제, 또는 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D도 또한 사용될 수 있다. 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 소 혈청 알부민(BSA) 또는 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)와 같은 다른 단백질도 또한 운반체 단백질로서 사용될 수 있다. CRM_{173}, CRM_{228}, CRM_{45}와 같은 디프테리아 독소의 변이체도 운반체 단백질로 사용할 수 있다.

[95]

[96] 운반체 단백질과 다당류를 접합하기 위해서는 기존에 공지된 접합 방법을 사용할 수 있다. 예시로 리딕티브 아미네이션 방법, CDAP 접합 방법 또는 티올-말레마이드(Thiol-Malemide) 방법을 사용할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 운반체 단백질과 반응할 수 있는 당류를 제조하기 위하여, 정제된 다당류는 화학적으로 활성화시킬 수 있다. 일단 활성화되면, 각 협막 다당류를 운반체 단백질에 하나씩 접합시켜서 당접합체(Glycoconjugate)를 형성한다. 일 구현예에서, 각 협막 다당류를 동일한 운반체 단백질에 접합시킨다. 다당류의 화학적 활성화 및 이어지는 운반체 단백질에의 접합은 공지의 방법에 의해 수행될 수 있다(미국특허 제4,673,574호, 제4,902,506호 등).

[97]

[98] 얻어진 다당류-단백질 접합체는 다양한 방법에 의해 정제할 수 있다(즉, 다당류-단백질 접합체의 양을 풍부화할 수 있다). 이들 방법의 예는 농축/투석여과 공정, 칼럼 크로마토그래피 및 다층 여과를 포함한다. 정제된

다당류-단백질 접합체들은 각각을 혼합하여 본 발명의 면역원성 조성물로 제제화하고, 이를 백신으로서 사용할 수 있다. 당업계에서 인정된 방법을 사용하여 본 발명의 면역원성 조성물의 제제화를 수행할 수 있다. 예를 들면, 14 내지 19개의 개개의 폐렴구균 접합체를 생리학적으로 허용되는 비히클과 함께 제형화하여 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예에는, 물, 완충 식염수, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 덱스트로스 용액이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[99]

[100] 일 구현예에서, 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 애주번트를 포함한다. 본원에서 정의되는 '애주번트'는 본 발명의 면역원성 조성물의 면역원성을 증가시키는데 사용되는 물질이다. 따라서, 애주번트는 종종 면역 반응을 부스터하기 위하여 제공되고 당업자에게 잘 알려져 있다. 조성물의 유효성을 증가시키기에 적당한 애주번트는 다음을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[101]

[102] 특정 구현예에서, 알루미늄 염이 애주번트로서 사용된다. 알루미늄 염 애주번트는 알루미늄-침전 백신(Alum-precipitated Vaccine)이거나 알루미늄-흡착 백신(Alum-adsorbed Vaccine)일 수 있다. 알루미늄 염에는 수화된 알루미나, 알루미나 수화물, 알루미나 3수화물(ATH) 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 염화 알루미늄과 인산나트륨을 1:1의 비율로 혼합하면 알루미늄 히드록시포스페이트 설페이트가 침전된다. High Shear Mixer를 이용하여 침전물의 크기가 2 - 8㎛이 되도록 한 다음 생리식염수로 투석하고 멸균하여 제조한다. 일 구현예에서, 상업적으로 이용가능한 $Al(OH)_3$(예를 들어 알하이드로겔 또는 Superfos)를 사용하여 단백질을 흡착한다. 수산화알루미늄 1mg당 50 - 200g의 단백질이 흡착될 수 있으며 이 비율은 단백질의 pI와 용매의 pH에 의존적이다. 낮은 pI의 단백질은 높은 pI를 가진 단백질에 비해 강하게 결합한다. 알루미늄 염은 2 - 3주간 서서히 항원을 방출하는 항원 저장소를 형성하여 비특이적으로 대식세포, 보체, 선천성 면역 메커니즘을 활성화시킨다.

[103]

[104] 본 발명은 상기 다가 면역원성 조성물의 면역학적 유효량을 포함하는, 스트렙토코커스 뉴모니애 협막 다당류 접합체에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학 조성물(예를 들어, 백신 제제)을 제공한다.

[105]

[106] 본 발명에 따른 백신 제제는, 전신 또는 점막 경로로 투여함으로써, 폐렴구균에 감염되기 쉬운 사람을 보호 또는 치료하는데 사용될 수 있다. 본원에서 정의되는 '유효량'이란 폐렴구균에 감염될 확률 또는 감염의 심각성을 상당히 감소시킬 수 있을 정도의 항체를 유발하는데 필요한 투여량을 말한다. 투여에는 근육내, 복강내, 피내 또는 피하 경로를 통한 주사; 또는 구강/소화관, 기도관 또는

비뇨생식관으로의 점막 투여가 포함될 수 있다. 일 구현예에서, 폐렴 또는 중이염의 치료를 위하여 비내 투여가 사용되며, 이는 폐렴구균의 비인두 보균을 보다 효과적으로 예방하여, 초기 단계에서 감염을 약화시킬 수 있기 때문이다.

[107]

[108] 각 백신 용량에서 상기 접합체의 양은, 상당한 부작용 없이 면역보호 반응을 유도하는 양으로 선택된다. 이러한 양은 폐렴구균의 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 각 용량은 0.1 내지 100 μg, 바람직하게는 0.1 내지 10 μg, 더욱 바람직하게는 1 내지 5μg의 다당류를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특정 백신에 대한 성분의 최적량은 피험자에서 적당한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해서 확인될 수 있다. 예를 들어 동물실험 결과를 외삽하여 사람을 대상으로 한 백신접종 용량을 결정할 수 있다. 또한 경험적으로 용량을 결정할 수 있다.

[109]

[110] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 백신 조성물은 각각 CRM_{197}에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어진 13개의 혈청형의 협막 다당류와 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 혈청형 협막 다당류를 포함하는 멸균 액체 제형이다. 각 0.5mL 용량에, 2 μg의 각 당류, 단 6B는 4 μg; 약 34μg CRM_{197} 운반체 단백질; 0.125mg의 알루미늄 원소(0.5mg 알루미늄 포스페이트) 애주번트; 및 부형제로서 염화나트륨 및 나트륨 석시네이트 완충액이 함유되도록 제제화될 수 있다. 상기 액체는 보존제 없이 단일 용량 주사기 속에 충전될 수 있다. 진탕하고 나면, 즉시 근육 내 투여할 수 있는 균질한 백색 현탁액의 백신이 된다.

[111]

[112] 본 발명의 조성물은 단회 투여 용량 바이알, 다회 투여 용량 바이알 또는 프리필드시린지 형태로 제제화할 수 있다.

[113]

[114] 본 발명의 제제(Formulation)은 계면활성제를 포함할 수 있으며, Tween 80 또는 Span 85와 같은 계면활성제의 혼합물을 포함할 수 있다.

[115]

[116] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 상기 다가 면역원성 조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[117]

[118] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 상기 다가 면역원성 조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 폐렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[119]

[120] **프리베나13 혈청형의 포함**

[121] 북부 캘리포니아에서, 프리베나13 혈청형이 유아 및 소아에서 침습성 폐렴구균 질환의 모든 증례의 90% 이상을 차지하였다. 또한, 서부 유럽에서 프리베나13 혈청형이 유아 및 소아에서 침습성 폐렴구균 질환의 모든 증례의 70%이상을 차지하였다. 미국과 유럽은 최대 백신 판매 시장이므로, 차세대 폐렴구균 접합 백신으로부터 어떤 프리베나13 혈청형도 제거시킬 이유가 없으며, 오히려 혈청형을 추가하여 적용범위를 더 넓히는 것이 바람직하다.

[122]

[123] **혈청형 6가의 추가**

[124] 프리베나13의 혈청형은 유럽, 미국에 유행하는 혈청형으로 개발이 되었으며, 프리베나13 도입 이후 국가마다 혈청형 치환 현상이 발생하고 있으며, 이는 아시아와 유럽, 미국과의 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다. 본 발명에서는 프리베나13 도입 이후 아시아와 유럽/미국 유행되고 있는 혈청형을 선정하였다. 각 국의 폐렴구균 발병률 기준은 1) 5세이하 어린이, 2) 각 국의 프리베나13 도입 이후 발병율 결과, 3) 유행/비유행 혈청형을 조사하여, 각 국가 별 유행/비유행 혈청형을 선정하였고, 아시아/유럽/미국의 공통 유행 혈청형을 선정 하였다.

[125]

[126] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 설명을 위한 것이며, 이들 실시예에 의해 본 발명이 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[127]

[128] **실시예 1. 폐렴구균 협막 다당류의 제조 및 정제**

[129] 폐렴구균 배양과 협막 다당류의 정제는 당업자에게 공지된 방법에 의해서 수행하였다. 폐렴 구균 각 혈청형은 수탁기관(CDC, Center for Disease Control and Prevention)으로부터 입수할 수 있다. 협막과 비운동성, 그람 양성, Lancet-shaped 쌍구균, 혈액한천배지에서 알파용혈현상으로 폐렴 구균을 동정하였다. 혈청형은 특정한 항혈청을 이용한 Quellung Test를 바탕으로 확인하였다.

[130]

[131] **실시예 1-1. 세포 은행 제조**

[132] 19 종의 각기 다른 혈청형(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 11A, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23F 및 35B)을 가진 폐렴구균을 수탁기관인 미국 CDC(Center for Disease Control and Prevention, US)로부터 입수하였다.

[133] 폐렴구균 균주를 혈액 한천배지에 도말하여 단일 콜로니를 분리하였다. 10개 이상의 단일 콜로니 중 성장이 좋은 단일 콜로니를 선정한 후 동물 유래의 성분을 포함하지 않은 액상배지에 접종하여 배양한 후 합성 글리세롤을 함유한 연구용 세포 은행(Research Cell Bank, RCB)을 제조하였다

[134] 고유의 혈청형을 가진 다당류 발현이 확인 된 연구용 세포 은행 중 바이알 1 개를 꺼내어 동물 유래의 성분을 포함하지 않은 액상배지에 세포를 증식시킨 후 합성 글리세롤을 추가하여 마스터 세포은행을 제조하였으며, 마스터 세포 은행

중 바이알 1 개를 꺼내어 동물 유래의 성분들을 포함하지 않은 액상배지에 세포를 증식시킨 후 합성 글리세롤을 추가하여 제조용 세포 은행을 제조하였다. 제조된 세포 은행은 다음 단계에서 사용하기 위해 -70℃ 이하에서 보관하여 사용하였다.

[135]

[136] **실시예 1-2. 발효 및 다당류 분리**

[137] 제조용 세포 은행 중 바이알 1 개를 해동하여 동물 유래의 성분을 포함하지 않은 액상배지에 접종하여 종 발효를 시작하였다. 일정 균체 농도(Optical Density, OD600)에 도달하여 중간-지수 증식기의 종말점에 도달할 때까지 무교반 상태로 37 ± 2℃에서 종배양을 실시 하였다. 종배양에서 얻은 배양액을 동물 유래의 성분을 포함하지 않은 액상배지를 함유하는 발효기에 접종하여 주 발효(Main Fermentation)를 시작하였다.

[138] 그 다음 37 ± 2℃에서 수산화 칼륨 용액으로 배지의 pH를 조절하면서 본 배양을 실시하였다. 2 시간 마다 최적의 세포 밀도와 배지에 포함된 글루코스 농도를 측정하였다. 발효는 배지 내 글루코스가 고갈되었을 때 종료하였다.

[139] 발효가 종료된 후, 12 % 소듐 데옥시콜레이트(Sodium Deoxycholate)를 최종 0.12 %가 되도록 배양물에 1시간동안 첨가하여 세포를 용해시키고 세포에 결합된 다당류를 유리시켰다.

[140]

[141] **실시예 1-3. 협막 다당의 정제**

[142] 소듐 데옥시콜레이트가 처리된 샘플에 인산을 가한 뒤, 원심 분리를 통해 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액을 Depth Filter에 통과시킨 다음, 농축 및 인산 완충용액으로 버퍼 교환을 진행하였다. 버퍼 교환 후, 샘플을 탄소활성탄 필터(Active Carbon Filter)에 통과시킨 다음, 하기와 같은 두 가지 방법으로 불순물 제거를 진행하였다.

[143]

[144] 17 개의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 10A, 11A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23F 및 35B의 경우, CTAB(Cetyltrimethylammonium Bromide)와 이온 결합이 가능하므로 CTAB 공정을 진행하였다. CTAB 처리, 원심 분리, 염화나트륨(NaCl) 및 요오드화 나트륨(NaI) 처리, 및 원심 분리 과정을 수행하였다.

[145] CTAB와 반응하지 않는 2 개의 혈청형 7F 및 14는 인산 알루미늄겔(Algel) 용액을 첨가하여 반응시킨 다음, 원심 분리를 통해 얻어진 상층액을 사용하였다.

[146] 상기 두 가지 형태의 불순물 제거 공정을 완료한 샘플은 Depth Filter 및 한외여과(UF/DF) 공정을 거친 다음, 에탄올과 염화나트륨의 양을 조절하며 원말 형태로 만들어 보관하였다.

[147]

[148] **실시예 1-4. 협막 다당류의 용해 및 가수분해**

[149] 각각의 혈청형에서 유래한 협막 다당류 원말을 최종 농도 범위가 아래 기술된

범위가 되도록 주사용수에 용해하고 0.45 ㎛ 필터를 통해 여과시켰다.

[150] 세부적으로 혈청형 1, 3 및 4의 경우 0.8 - 2.0mg/㎖의 범위로 용해하였고, 혈청형 5, 6B, 9V, 18C 및 19F 의 경우 4 - 8mg/㎖, 혈청형 6A 및 19A는 8 - 12mg/㎖, 혈청형 7F, 10A, 11A 및 23F의 경우 2 - 4mg/㎖로 용해하여 여과를 진행하였다. 또한, 혈청형 15B, 22F 및 35B의 경우 2 - 5mg/㎖의 범위로 용해하여 여과를 진행하였다.

[151] 혈청형 별로 아래 기술된 pH 및 온도 범위에서 용액을 항온 처리하여 진행하였다. 세부적으로 혈청형 1, 3, 5, 6B, 7F, 10A, 11A, 14 및 23F의 경우 밤새 70 - 80℃, 혈청형 6A 및 19F 경우 1 - 4시간 동안 70 - 80℃, 혈청형 9V 및 18C의 경우, 인산용액을 이용하여 1 - 3 시간 동안 pH 2.0, 65 - 80℃ 에서 항온처리 과정을 수행하였다. 혈청형 22F, 23A 및 35B의 경우 밤새 75 - 85℃, 혈청형 4, 15B, 19A의 경우 가수분해를 진행하지 않았다. 그 다음 21 내지 24℃로 냉각시키고 6.0 ± 1.0의 목표 pH로 수산화 나트륨을 첨가함으로써 가수분해를 중지시켰다.

[152]

[153] **실시예 2. 폐렴구균 협막 다당류와 CRM197 단백질 운반체의 접합 및 정제**

[154] **실시예 2-1. CRM197 단백질 운반체의 준비**

[155] CRM_{197} 단백질 운반체는 미국의 와이어쓰(Wyeth, Sanford, NC)로부터 구입하여 준비하였다.

[156]

[157] **실시예 2-2. 협막 다당류와 CRM197의 접합**

[158] 모든 혈청형에 염화나트륨 분말을 첨가하여 2 M NaCl 다당류 용액을 제조하였다. 각 혈청 별로 적절한 CDAP(1-Cyano-4-dimethylaminopyridinium Tetrafluoroborate)를 50/50 아세토니트릴/주사용수(v/v) 용액 100 ㎖ 당 CDAP 1 g의 비율로 용해하였다. 세부적으로 혈청형 6A 및 14의 경우 다당 대비 CDAP 1w/w%를, 혈청형 4의 경우 2w/w%를, 혈청형 1, 3, 6B, 7F 15B 및 19A의 경우 3w/w%를, 그 외 혈청형의 경우 4w/w%의 무게비율로 용해하고 각각의 다당류 용액에 첨가하였다. 이어, 1 내지 3 분 후 수산화 나트륨 용액을 첨가하여 pH 9.4 내지 9.7로 상승시킨 후 다당류의 하이드록실기가 CDAP에 의해 충분히 활성화될 수 있도록 3 내지 7 분 동안 교반하였다. 다당 대비 CRM_{197} 0.5 - 1.0w/w%를 각 혈청형 다당 용액에 첨가하여 1 시간 내지 4 시간 동안 접합반응을 진행하였으며 HPLC-SEC을 이용하여 반응 전환율을 측정하였고 필요에 따라 CDAP를 추가 투입하였다.

[159]

[160] **실시예 2-3. 접합 반응 종료**

[161] 모든 혈청형에 대해 첨가한 CDAP 1 몰 당량 대비 3 내지 6 몰 당량의 글리신 용액을 첨가하고 pH를 9.0으로 조정하여 반응을 종결하였다. 접합 용액을 21 내지 24℃에서 1시간 교반한 후 2 내지 8℃ 저온에서 밤새 보관하였다.

[162]

[163] **실시예 2-4. 한외 여과**

[164] 희석된 접합 혼합물을 최소 20 용적의 완충액을 사용하여 한외여과필터에 농축 및 투석 여과시켰다. 여기서 완충액은 pH 5.5 내지 6.5의 범위를 유지하며, 0.9% 염화나트륨을 포함한 완충액을 사용하였다. 한외여과필터의 분획 분자량은 모든 혈청형에서 300kDa을 사용하여 실시하였고, 투과액은 폐기하였다.

[165]

[166] **실시예 2-5. 제균 여과**

[167] 투석 여과 후의 잔류액을 완충액을 이용하여 다당함량 농도 기준으로 0.4g/L 미만이 되도록 희석하여 0.22㎛ 필터를 통해서 여과시켰다. 여과된 산물에 대해 제조과정 중 제어(당류 함량, 잔류 DMAP)를 실시하였다. 여과시킨 잔류액에 대해 제조과정 중 제어를 실시하여 추가적인 농축, 투석 여과 및/또는 희석이 필요한지의 여부를 결정하였다.

[168]

[169] **실시예 3. 13가 폐렴구균 백신의 제제화 및 면역원성 연구**

[170] **실시예 3-1. 13가 폐렴구균 백신의 제제화**

[171] 실시예 2로부터 수득된 최종 벌크(bulk) 농축물의 최종 용적은 배치(batch) 용적 및 벌크 당류 농도에 기초하여 계산하였다. 0.85% 염화나트륨(생리 식염수), 폴리소르베이트 80, 및 석시네이트 완충액을 예비-표지된 제형 용기에 첨가한 후, 벌크 농축물을 첨가하였다. 그 후, 제제를 완전히 혼합하고 0.2 μm 막을 사용하여 멸균 여과하였다. 벌크 알루미늄 포스페이트의 첨가 과정 중 및 최종 첨가의 완료 후 제형화된 벌크를 부드럽게 혼합하였으며, pH를 확인한 후 필요에 따라 이를 조절하였다. 또한, 제형화된 벌크 생성물은 2℃내지 8℃에서 최종 저장하였다. 하기 표에 제조한 다가 폐렴구균 접합체 백신 제형을 나타내었다.

[172]

[173]

[표1]
비교예와 실험예의 구성

구분	구성
비교예 1	PBS
비교예 2	CRM $_{197}$
비교예 3	프리베나13 ® 제품
비교예 4	신플로릭스 ® 제품
실험예 1	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 다당체와 CRM $_{197}$ 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물 (Human dose)
실험예 2	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 다당체와 CRM $_{197}$ 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물 (1/4, Human dose)
실험예 3	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 다당체와 CRM $_{197}$ 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물 (1/16, Human dose)

[174] (※ 신플로릭스는 GSK 제품으로서, 11가에 해당함)

[175]

[176] 얻어진 백신 조성물은 총 0.5 mL 중에 2 ㎍의 각 당류, 단 6B는 4 ㎍; 약 35 ㎍ 내외의 CRM $_{197}$ 운반체 단백질; 0.125 mg의 알루미늄 원소(0.5 mg 알루미늄 포스페이트) 애주번트; 염화나트륨 약 4.25 mg; 석시네이트 완충액 약 295 ㎍; 및 폴리솔베이트 80 약 100 ㎍을 함유하였다.

[177]

[178] **실시예 3-2. 혈청형 특이 IgG 농도 ELISA 측정**

[179] 상기 실시예에서 제조한 각각의 13가 폐렴구균 백신 조성물이 마우스에서 면역반응을 유도하는 능력을 갖는 지의 여부를 확인하고자 아래와 같이 실험하였다.해당 면역원성은, 항원-특이적 ELISA를 통해 혈청 IgG 농도를 측정하여 확인하였다.

[180] 제제화된 각각의 다가 폐렴구균 백신 조성물 혹은 대조군인 프리베나13 ®을 계획된 사람 임상 용량 (각 다당류 4.4 ㎍/mL, 예외: 6B 8.8 ㎍/mL인 경우를 100 %로 하여 필요에 따라 일부 혈청형의 함량을 조절)으로 0 주차, 2 주차 및 4 주차에 마우스 (C57BL/6)의 근육 내로 면역 접종시키고, 마지막 접종 후 1 주 후에 각각의 혈청을 채취하였다. 채취된 혈청에 대하여 ELISA 를 이용하여 혈청형 특이적 IgG 농도를 측정하였다.

[181] 이를 상세히 설명하면 다음과 같다. 흡광도 값이 0.175미만으로 떨어지는 각 혈청의 희석배수를 이용하여 분석하였으며, 혈청형 협막 다당질을 96-웰(well)

이뮤노플레이트(immunoplate)에 5 μg/ml의 농도로 코팅한 후 4℃에서 방치하였다. 비특이적 결합을 차단하고자 5 μg/ml의 세포벽 협막 다당질 (cell wall capsular polysaccharides; CWPS)과 22F를 이용하여 희석한 혈청을 코팅한 플레이트(plate)에 가하였고, 2시간 후, HRP가 부착된 2차 항체인 anti-mouse IgG을 처리한 후 1시간 동안 실온에서 방치하였다. 1시간 후, HRP와 반응하는 기질 (3,3′5,5'-Tetramethylbenzidine; TMB)을 10분 동안 처리하여 2N H_2SO_4를 이용하여 반응을 정지시킨 후, 10분 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[182]

[183] [표2]

3차 면역화 후 1주 후, 13가 혈청형에 대한 IgG 상대 비교

혈청형	PCV13/Prevnar13 ELISA IgG 상대 비교		
	Full dose	1/4 dose	1/16 dose
1	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6A	+	+	+
6B	+	+	+
7F	+	+	+
9V	+	+	+
14	+	+	+
18C	+	+	+
19A	+	+	+
19F	+	+	+
23F	+	+	+

[184] (※+: 대조군 대비 1 내지 3배 효과 확인)

[185]

[186] 본 발명자들은 다가 혼합백신의 제작하기 앞서, 기존 시판 중인 13가 접합체의 효과를 프리베나13(Prevenar 13)과 비교하였다. 그 결과, 13가 면역원성 조성물의 농도 의존적인 IgG 역가와 상관성이 있는 혈청형과 그렇지 않은 혈청형을 확인하였다. 또한 프리베나 13과 비교 시, 농도와 무방하게 유사한 IgG 역가를 가짐을 확인하였다. (표 2 및 도 1)

[187]

[188] **실시예 3-3. 항체 기능 옵소닌 시험(MOPA 검정법)**

[189] 항체 기능은 MOPA 검정으로 혈청을 시험함으로써 평가하였다. 분석법은 기공지된 방법 (폐구균에 대한 항체 기능 측정을 위한 multiplexed opsonophagocytic killing assay (UAB-MOPA) 시험방법, 2013)으로 수행을 하였고, 대략적인 실험방법은 다음과 같다.

[190] 탐식세포가 보체와 항체에 의해 병원체를 탐식하는 과정을 옵소닌화(opsonization)라고 하며, 백신 접종에 의해 생성된 혈청형 특이 항체의 능력을 확인하고자 옵소닌화 과정을 이용한 실험법인 Single/Multiplex opsonophagocytic assay를 통해 분석하였다. 다른 항생제 내성을 갖는 1개 또는 2개 이상의 혈청형의 폐렴구균과 혈청, 보체 및 탐식세포를 같이 배양하여 탐식과정을 유도하며, 각 혈청형이 내성을 갖는 항생제가 첨가된 한천배지 위에 도말하여 혈청 희석배수에 따른 군체 수를 측정한다. 대조군에서 균주가 100% 생존한 군체 수(0% killing)에서 균주의 50% 제거율(50% killing)을 측정하여 각 샘플의 50% 제거율을 보이는 희석 배율을 통해 옵소닌화 지수 (opsonization index; OI)를 비교하였다.

[191]

[192] [표3]

3차 면역화 후 1주 후, 13가 혈청형에 대한 MOPA 상대 비교

혈청형	PCV13/Prevnar13 OPA상대 비교		
	Full dose	1/4 dose	1/16 dose
1	+++	+++	+
3	+++	++++	+++
4	+++	+++	+
5	+	+	+
6A	+	++	+
6B	+	+	+
7F	++	++	+
9V	+	+	+
14	+++	++	+
18C	++	++++	++++
19A	+	++++	+++
19F	+++	++++	++++
23F	+	+	+

[193] (※+: 대조군 대비 1 내지 3배 효과 확인/ ++: 대조군 대비 3 내지 5배 효과 확인/ +++: 대조군 대비 5 내지 7배 효과 확인/ ++++: 대조군 대비 5 내지 7배 효과 확인)

[194]

[195] 그 결과, 모든 혈청형에 프리베나13보다 높거나 유사한 항체가와 OPA 역가를 확인하였고, 13가 면역원성 조성물에서 큰 면역 간섭 효과는 확인되지 않았다. 일부 투여 농도 및 혈청형에서 낮은 역가를 보이는 그룹이 있었으나, 해당 현상은 7가 면역원성 조성물 실험 및 일부 논문에서 이미 잘 알려져 있던 현상임을 확인하였다. 앞선 ELISA 역가 분석에서는 프리베나13 역가와 유사한 수준의 역가가 확인되었으나, OPA 역가의 경우, 일부 혈청형은 프리베나13보다 월등히 높은 혈청형과 유사한 혈청형이 다르게 분포되어 있음을 확인하였다. 또한, 이는 ELISA 결과 보다 OPA 결과에서 신뢰도/변별력이 더욱 높음을 확인하였다.(표 3 및 도 2)

[196]

[197] **실시예 4. 다가 폐렴구균 백신의 제제화 및 면역원성 연구**

[198] **실시예 4-1. 다가 폐렴구균 백신의 제제화**

[199] 실시예 2로부터 수득된 최종 벌크(Bulk) 농축물의 최종 용적은 배치(Batch) 용적 및 벌크 당류 농도에 기초하여 계산하였다. 0.85% 염화나트륨(생리 식염수), 폴리소르베이트 80, 및 석시네이트 완충액을 예비-표지된 제형 용기에 첨가한 후, 벌크 농축물을 첨가하였다. 그 후, 제제를 완전히 혼합하고 0.2μm 막을 사용하여 멸균 여과하였다. 벌크 알루미늄 포스페이트의 첨가 과정 및 최종 첨가 완료 후 제형화된 벌크를 부드럽게 혼합하였으며, pH를 확인하여 필요에 따라 이를 조절하였다. 제형화된 벌크 생성물을 2 내지 8℃에서 저장하였다. 하기 표에 4 유형의 다가 폐렴구균 접합체 백신 제형을 나타내었다.

[200]

[201] [표4]

비교예와 실험예의 구성

구분	구성
비교예1	프리베나13 ® 제품
실험예1	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 협막 다당류 + 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F 협막 다당류;와 CRM_{197} 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물
실험예2	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 협막 다당류 + 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 협막 다당류;와 CRM_{197} 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물
실험예3	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 협막 다당류 + 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A, 35B 협막 다당류;와 CRM_{197} 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물

[202]

[203] 얻어진 백신 조성물은 총 0.5 mL 중에 2 ㎍의 각 당류, 단 6B는 4 ㎍; 약 35 ㎍ 내외의 CRM_{197} 운반체 단백질; 0.125mg의 알루미늄 원소(0.5mg 알루미늄 포스페이트) 애주번트; 염화나트륨 약 4.25mg; 석시네이트 완충액 약 295 ㎍; 및 폴리솔베이트 80 약 100 ㎍을 함유하였다.

[204]

[205] **실시예 4-2. 혈청형 특이 IgG 농도 ELISA 측정**

[206] 상기 실시예에서 제조한 각각의 다가 폐렴구균 백신 조성물이 토끼에서 면역 반응을 유도하는 능력을 갖는 지의 여부를 확인하고자 아래와 같이 실험을 진행하였다. 해당 면역원성은, 항원-특이적 ELISA를 통해 혈청 IgG 농도를 측정하여 확인하였다.

[207] 제제화된 각각의 다가 폐렴구균 백신 조성물 혹은 대조군인 프리베나13 ®을 계획된 사람 임상 용량(각 다당류 4.4㎍/㎖, 예외: 6B 8.8㎍/㎖인 경우를 100 %로 하여 필요에 따라 일부 혈청형의 함량을 조절)으로 0 주차, 2 주차 및 4 주차에 뉴질랜드 화이트(New Zealand White) 토끼의 근육 내로 면역 접종시키고, 접종 후 2 주 간격으로 각각의 혈청을 채취하였다. 채취된 혈청에 대하여 멀티플렉스 비드 어세이(Multiplex Bead Assay)를 이용하여 혈청형 특이적 IgG 농도를 측정하였다. 이를 상세히 설명하면 다음과 같다.

[208] 자성을 가지는 비드(Magnetic Bead)에 13 혹은 17종의 다당항원을 접합시킨 용액을 96-웰 플레이트에 넣고 부착시켰다. 각 개체 별 혈청은 비특이적 항원-항체반응을 최소화 하기 위해 CWPS 다중 용액(CWPS multi ®, Statens Serum Institute) 1mg/mL과 상온에서 30 분간 반응시켜 흡착 시킨 후, Tween 20이 포함된 항체 희석용 완충액을 이용하여 적당한 희석 배수로 희석하였다. 13, 17, 18 또는 19종의 다당 항원 접합 자성 비드가 부착된 플레이트를 세척용 완충액으로 2회 세척하고, 미리 흡착 및 희석한 혈청 50㎕를 플레이트에 넣은 후 실온에서 30분간 반응시켰다.

[209] 반응시킨 플레이트를 같은 방법으로 3 회 세척하고, 각 웰에 R-PE 고우트 항-래빗 IgG(R-Phycoerythrin goat anti-Rabbit IgG)(1:500)를 넣은 후 실온에서 30 분간 반응시켰다. 플레이트를 위와 같은 방법으로 3회 세척하고 각 웰에 완충액을 80㎕씩 넣은 후, 멀티플렉스 리더(Multiplex Reader)를 이용해 형광을 측정하였다. 객관적인 면역원성 평가를 위해 대조군으로 프리베나13 ®을 면역화하여 채취한 혈액 샘플을 같이 분석하였다.

[210]

[211]

[표5]

3차 면역화 후 1주 후, 17 - 19가 혈청형에 대한 IgG 상대 비교

혈청형	프리베나13	PCV17-CRM197	PCV18-CRM197	PCV19-CRM197
1	+	++	+	+
3	+	++	+	+
4	+	++	++	++
5	+	++	++	++
6A	+	++	++	++
6B	+	++	++	++
7F	+	++	+++	++
9V	+	+	++	+
10A	-	++	++	++
11A	-	++	++	++
14	+	+	+	+
15B	-	++	++	++
18C	+	+++	+++	+++
19A	+	++	++	++
19F	+	++	++	++
22F	-	++	++	++
23A	-	N/A	++	++
23F	+	++	+++	+++
35B	-	N/A	N/A	++

[212] (※ +: 대조군 대비 1 내지 3배 효과 확인/ ++: 대조군 대비 3 내지 5배 효과 확인/ +++: 대조군 대비 5 내지 7배 효과 확인)

[213]

[214] 그 결과, PCV17-CRM $_{197}$은 모든 17가 혈청형에 대해 우수한 수준의 혈청형 특이 IgG 농도를 보이는 것을 확인하였다. PCV17-CRM $_{197}$의 경우, 프리베나13과 공통인 혈청형은 프리베나13과 같거나 더 높은 혈청형-특이 IgG 농도를 보였으며 새로 추가된 혈청형 10A, 11A, 15B 및 22F 각각 우수한 수준의 혈청형 특이 IgG 농도를 보였다.

[215] 23A, 35B은 폐렴구균 다당 백신(PPV, Pneumococcal Polysaccharide Vaccine)인

PPV23에 포함되지 않는 혈청형이며, 현재까지 폐렴백신에 사용되지 않는 혈청형으로 아시아와 유럽에 혈청형 치환 이후 도래한 혈청형 중 하나이다.

[216] 23A, 35B가 포함된 PCV18-CRM $_{197}$, PCV19-CRM $_{197}$ 모든 혈청형에 대해 우수한 수준의 혈청형 특이 IgG 농도를 보이는 것을 확인하였다. 프리베나13과 공통인 혈청형은 프리베나13과 같거나 더 높은 혈청형-특이 IgG 농도를 보였으며 새로 추가된 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B 각각 모두 우수한 수준의 혈청형 특이 IgG 농도를 보임을 확인하였다.(표 5)

[217]

[218] **실시예 4-3. 항체 기능 옵소닌 시험(MOPA 검정법)**

[219] 항체 기능은 MOPA(Multiplex Opsonophagocytosis Assay) 검정으로 혈청을 시험함으로써 평가하였다. 각 균주의 농도가 약 50,000 CFU/mL로 되도록, -70℃이하에서 저장된 폐렴연쇄구균 MOPA 균주를 상응하는 최종 희석도로 희석시켰다. 등가량의 혈청을 각 대상체로부터 샘플링하고, 그룹별로 모으고, 20㎕의 혈청이 U-바닥 플레이트에 남도록 2배 연속 희석시켰다. 샘플을 희석한 후, 각 혈청형에 대해 제조된 10㎕의 균주를 희석된 샘플과 혼합하고, 폐렴연쇄구균과 항체가 잘 혼합되도록 혼합물을 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 예비-분화된 HL-60 세포와 보체의 혼합물을 첨가하고 CO_2 배양기(37℃에서 45분 동안 반응시켰다. 온도를 낮추어 식균 작용을 중단시키고 10㎕의 반응 용액을 30 내지 60분 동안 예비-건조된 한천 플레이트 상에 스폿팅(Spotting)한 다음 건조될 때까지 20분 동안 플레이트 상에 흡수되도록 하였다. 25mg/mL TTC 스톡 용액을 제조된 오버레이 한천(Overlay Agar)에 첨가하고, 상응하는 균주에 적합한 항체를 이에 첨가하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 다음 약 25 mL의 혼합물을 플레이트에 첨가하고 약 30분 동안 경화시켰다. 완전히 경화된 플레이트를 CO_2 배양기(37℃에서 12 내지 18시간 동안 배양한 다음 콜로니를 계수하였다. MOPA 역가는 50% 사멸이 관찰되는 희석률로 표현되었다. 비교예로서, 상업적으로 이용 가능한, 13가 백신(프리베나13)을 동일한 과정에 적용하였다.

[220]

[221]

[표6]

3차 면역화 후 1주 후, 17 - 19가 혈청형에 대한 MOPA 상대 비교

혈청형	프리베나13	PCV17-CRM197	PCV18-CRM197	PCV19-CRM197
1	+	++	+	+
3	+	++	+	+
4	+	++	++	++
5	+	++	++	++
6A	+	++	++	++
6B	+	++	++	++
7F	+	++	+++	++
9V	+	+	++	+
10A	-	++	++	++
11A	-	++	++	++
14	+	+	+	+
15B	-	++	++	++
18C	+	+++	+++	+++
19A	+	++	++	++
19F	+	++	++	++
22F	-	++	++	++
23A	-	N/A	++	++
23F	+	++	+++	+++
35B	-	N/A	N/A	++

[222] (※ +: 대조군 대비 1 내지 3배 효과 확인/ ++: 대조군 대비 3 내지 5배 효과 확인/ +++: 대조군 대비 5 내지 7배 효과 확인)

[223]

[224] 그 결과, 모든 혈청형이 PCV17-CRM $_{197}$에서 탁월한 수준의 기능적 면역원성을 보임을 확인하였다. PCV17-CRM $_{197}$의 경우, 프리베나13과 공통인 혈청형은 프리베나13과 유사하거나 더 양호한 기능적 면역원성을 보였으며 새로 추가된 혈청형 10A, 11A, 15B 및 22F은 각각 또한 높은 수준의 기능적 면역원성을 보였다.

[225] 23A 및 35B의 경우, 폐렴구균 다당 백신인 PPV23에 포함되지 않는

혈청형이기에 항생제 내성 균주가 존재하지 않는 것으로 알려져 있는데, 이에 항생제 내성 균주를 제작하여 MOPA 분석에 사용하였으며, 내성균주 제작은 UAB항생제 내성 균주 제조방법(MOPA Protocol)에 근거하여 제작하였고, 제작 후 균주 특성화 분석 및 동정을 통해 각 23A 및 35B 혈청형 특성을 확인하였다.

[226] 상기 실험을 통해, 23A 및 35B가 포함된 PCV18-CRM $_{197}$, PCV19-CRM $_{197}$ 모든 혈청형에 대해 우수한 수준의 혈청형 기능적 항체를 생성하는 것을 확인하였다. 프리베나13과 공통인 혈청형은 프리베나13과 같거나 더 높은 기능적 항체를 보였으며 새로 추가된 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B 각각 우수한 수준의 기능적 항체를 보였다.

[227] 아울러, 상기 결과에서 PCV17, 18, 19 조성물이 양성대조군인 PCV13 대비 떨어지는 면역원성의 혈청형을 보이지 않았고, PCV13 대비 유사하거나 높은 수준의 역가를 최종 확인하였으므로 PCV19 조성물이 면역 간섭 효과가 없음을 최종적으로 확인하였다.(표 6)

[228]

[229] **실시예 5. 다가 폐렴구균 백신의 제제화 및 면역원성 연구**

[230] **실시예 5-1. 다가 폐렴구균 백신의 제제화**

[231] 상기 실시예를 참고하여 하기와 같은 면역원성 조성물을 만들었으며, 하기 표에 각 구성의 다가 폐렴구균 접합체 백신 제형을 나타내었다

[232]

[233] [표7]

비교예와 실험예의 구성

구분	구성
비교예 1	프리베나13 ® 제품
실험예 1	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F + 10A, 11A, 15B, 22F, 23A, 35B 다당체;와 CRM $_{197}$ 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물 (Human dose)
실험예 2	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F + 10A, 11A, 15B, 22F, 23A, 35B 다당체;와 CRM $_{197}$ 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물 (1/4, Human dose)
실험예 3	혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F + 10A, 11A, 15B, 22F, 23A, 35B 다당체;와 CRM $_{197}$ 운반체 단백질이 각각 접합된 백신 조성물 (1/16, Human dose)

[234]

[235] **실시예 5-2. 혈청형 특이 IgG 농도 ELISA 측정**

[236] 상기 실시예에서와 같이 마우스에서 얻은 혈청을 이용하여 ELISA를 수행하였고, 결과는 다음과 같다.

[237]

[238] [표8]

3차 면역화 후 1주 후, 19가 혈청형에 대한 IgG 상대 비교

혈청형	Prevnar13	PCV19-Full dose	PCV19-1/4 dose	PCV19-1/16 dose
1	+	++	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	++	++
5	+	++	++	++
6A	+	++	++	+
6B	+	+	+	++
7F	+	+	+	+
9V	+	+	+	+
10A	N/A	+	+	+
11A	N/A	+	+	+
14	+	+	++	++
15B	N/A	+	++	++
18C	+	+	+	+
19A	+	+	++	++
19F	+	+	++	++
22F	N/A	++	++	++
23A	N/A	+	++	+
23F	+	+	+	+
35B	N/A	++	+	+

[239] (※ +: 대조군 대비 1 내지 3배 효과 확인/ ++: 대조군 대비 3 내지 5배 효과 확인)

[240]

[241] 그 결과, PCV19-CRM $_{197}$ full dose는 모든 19가지 혈청형에 대해 우수한 수준의 혈청형 특이 IgG 농도를 생성함을 확인하였다. PCV19-CRM $_{197}$의 경우, 프리베나13과 공통인 혈청형은 프리베나13과 같거나 더 높은 혈청형-특이 IgG 농도를 보였으며 새로 추가된 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F 각각 또한 우수한 수준의 혈청형 특이 IgG 농도를 보였다.

[242] 프리베나13과 공통인 혈청형은 프리베나13과 같거나 더 높은 혈청형-특이 IgG

농도를 보였으며 새로 추가된 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 그리고 23A, 35B 각각 또한 우수한 수준의 혈청형 특이 IgG 농도를 보이는 것을 확인하였다.(표 8)

[243]

[244] **실시예 5-3. 항체 기능 옵소닌 시험(MOPA 검정법)**

[245] 상기 실시예를 참고하여 마우스에서 얻은 혈청을 이용하여 OPA 분석을 수행하였고, 결과는 다음과 같다.

[246]

[247] [표9]

3차 면역화 후 1 주 후, 19가 혈청형에 대한 MOPA 상대 비교

혈청형	Prevnar13	PCV19-Full dose	PCV19-1/4 dose	PCV19-1/16 dose
1	+	++	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	++	++
5	+	+++	+++	++
6A	+	++	++	+
6B	+	+	+	++
7F	+	+	+	+
9V	+	+	+	+
10A	N/A	+	+	+
11A	N/A	+	+	+
14	+	+	++	++
15B	N/A	+	++	++
18C	+	+	+	+
19A	+	+	++	++
19F	+	+	+++	+++
22F	N/A	++	++	++
23A	N/A	+	++	+
23F	+	+	+	+
35B	N/A	++	+	+

[248] (※ +: 대조군 대비 1 내지 3배 효과 확인/ ++: 대조군 대비 3 내지 5배 효과 확인/ +++: 대조군 대비 5 내지 7배 효과 확인)

[249]

[250] 그 결과, 모든 혈청형은 PCV19-CRM $_{197}$ Full , 1/4. 1/16 dose 모든 그룹에서 프리베나13과 같거나 더 높은 수준의 기능적 항체가를 보이는 것을 확인하였다.

[251] 23A, 35B가 포함된 PCV19 Full, 1/4, 1/16 dose 그룹에서 거의 모든 혈청형에 대해 우수한 수준의 혈청형 기능적 항체를 야기하는 것을 확인하였다. 프리베나13과 공통인 혈청형은 프리베나13과 같거나 더 높은 기능적 항체를 보였으며 새로 추가된 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 그리고 23A, 35B 각각 또한 우수한 수준의 기능적 항체를 보여주었다.

[252] 아울러, 상기 결과에서 PCV19 조성물이 양성대조군인 PCV13 대비 떨어지는 면역원성의 혈청형을 보이지 않았고, PCV13 대비 유사하거나 높은 수준의 역가를 최종 확인하였으므로 PCV19 조성물이 면역 간섭 효과가 없음을 재차 확인하였다.(표 9)

청구범위

[청구항 1] 다당류-단백질 접합체를 포함하는 다가 면역원성 조성물로서, 각각의 접합체가 운반체 단백질에 접합된 상이한 혈청형의 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcuspneumoniae*) 유래의 협막 다당류(capsular polysaccharide)를 포함하며,
상기 협막 다당류는
a) 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 혈청형의 협막 다당류; 및
b) 혈청형 10A, 11A, 15B, 22F, 23A 및 35B로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 혈청형의 협막 다당류를 포함하는
다가 면역원성 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 a) 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어지는 13개의 혈청형임을 특징으로 하는, 다가 면역원성 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 운반체 단백질은 디프테리아 톡소이드, 파상풍 톡소이드, 백일해 톡소이드, 콜레라 톡소이드, 대장균 유래 불화성화 독소, 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래 불활성화 독소 및 세균 외막 단백질(OMP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는, 다가 면역원성 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 디프테리아 톡소이드는 CRM_{197}, CRM_{173}, CRM_{228} 및 CRM_{45}로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는, 면역원성 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 협막 다당류와 상기 운반체 단백질의 접합 방법은 CDAP 접합 방법, 리덕티브 아미네이션 방법 및
티올-말레마이드(Thiol-Malemide) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상임을 특징으로 하는, 면역원성 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 애주번트를 추가로 포함하는 다가 면역원성 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 애주번트는 알루미늄 염임을 특징으로 하는, 다가 면역원성 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 알루미늄 염은 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 설페이트 및 알루미늄 하이드록사이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는, 다가 면역원성 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 다가 면역원성 조성물은 0.1 내지 100 μg 용량의 다당류를 포함하는 것을 특징으로 하는, 다가 면역원성 조성물.

[청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 다가 면역원성 조성물의 면역학적 유효량을 포함하는, 스트렙토코커스 뉴모니애 협막 다당류 접합체에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 약학 조성물.

[청구항 11] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 다가 면역원성 조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 페렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 12] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 다가 면역원성 조성물을 예방 또는 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 페렴구균 관련 질환의 예방 또는 치료 용도.