(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0042378
(43) 공개일자 2022년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/09 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 27/16* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/092 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7004904
(22) 출원일자(국제) 2020년07월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/043729
(87) 국제공개번호 WO 2021/021729
국제공개일자 2021년02월04일
(30) 우선권주장
1020190093276 2019년07월31일 대한민국(KR)
62/949,164 2019년12월17일 미국(US)

(71) 출원인
사노피 파스퇴르 인코포레이티드
미국 펜실바니아주 18370-0187 스위프트워터 디스커버리 드라이브 1
에스케이바이오사이언스(주)
경기도 성남시 분당구 판교로 310 (삼평동)
(72) 발명자
신진환
서울특별시 송파구 중대로 24, 233-1201
김성현
경기도 용인시 기흥구 신갈로96번길 11-46
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인필앤온지

전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **다가 폐렴구균 다당류-단백질 접합체 조성물 및 그 사용 방법**

(57) 요 약

22-27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물이 제공되고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다. 또한, 대상체에서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염 또는 질환에 대한 예방을 위한 다가 폐렴구균 접합체 조성물을 생산하는 방법 및 이를 사용하는 방법이 제공된다. 또한, 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하며, 여기서 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A, 15C, 23A, 23B, 24F, 및/또는 35B 유래의 협막 다당류인, 면역원성 조성물, 및 이를 제조하는 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류
A61P 27/16 (2018.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61K 2039/55505 (2013.01)
A61K 2039/6037 (2013.01)
A61K 2039/622 (2013.01)
A61K 2039/70 (2013.01)
(72) 발명자
김훈
경기도 수원시 영통구 센트럴 타운로 76, 6114-2903
안경준
서울특별시 관악구 보라매로 62 103-408
이정민
경기도 안양시 만안구 박달로 453, 110동 1804호 (박달동, 한라비발디아파트)
캬우, 모에
미국, 펜실바니아 18370, 스위프트워터, 1 디스커버리 드라이브, 사노피 파스퇴르 내
타라가, 필립
프랑스, 69367 리옹 세덱스 07, 애비뉴 폰트 파스퇴르, 2, 사노피 파스퇴르 에스에이 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

22-27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물로서, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 26개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B, 및 24F로부터 선택된 4개의 혈청형으로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 25개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B 및 24F로부터 선택된 3개의 혈청형으로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 24개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B 및 24F로부터 선택된 2개의 혈청형으로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 23개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B 및 24F로부터 선택된 1개의 혈청형으로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 22개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청

형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 담체는 CRM_{197} 및/또는 파상풍 변이독소를 포함하는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 협막 다당류 중 적어도 2개는 파상풍 변이독소에 접합되고 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되고, 상기 파상풍 변이독소에 접합된 적어도 2개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 5, 15B, 및 22F로 이루어진 군으로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서, 혈청형 1 및 5 유래의 협막 다당류는 상기 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 11

제2항에 있어서, 혈청형 1 및 3 유래의 협막 다당류는 상기 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 12

제2항에 있어서, 혈청형 3 및 5 유래의 협막 다당류는 상기 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 13

제2항에 있어서, 혈청형 1, 5, 15B 및 22F 유래의 협막 다당류는 상기 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 14

제2항에 있어서, 혈청형 1, 3, 15B 및 22F 유래의 협막 다당류는 상기 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 15

제2항에 있어서, 혈청형 3, 5, 15B 및 22F 유래의 협막 다당류는 상기 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 아쥬반트를 추가로 포함하는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 아쥬반트는 알루미늄-계 아쥬반트인, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 아쥬반트는 인산알루미늄, 황산알루미늄, 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 아쥬반트는 인산알루미늄인, 다가 폐렴구균 접합체 조성물.

청구항 20

대상체 내의 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염 또는 질환에 대한 예방을 위한 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 다가 폐렴구균 접합체 조성물의 용도.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 다가 폐렴구균 접합체 조성물 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 백신.

청구항 22

대상체 내의 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염 또는 질환의 예방 방법으로서, 상기 방법은 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 다가 폐렴구균 접합체 조성물 또는 제21항의 백신의 예방적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 50세인 인간이고, 상기 질환은 폐렴 또는 침습성 폐렴구균 질환(IPD)인, 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 6주령인 인간이고, 상기 질환은 폐렴, 침습성 폐렴구균 질환(IPD), 또는 급성 중이염(AOM)인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 대상체는 6주 내지 5세, 2 내지 15개월, 또는 6 내지 17세인, 방법.

청구항 26

제20항의 용도 또는 제22항의 방법에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 용도 또는 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물 또는 상기 백신은 근육내 주사에 의해 투여되는, 방법.

청구항 28

제22항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물 또는 상기 백신은 면역화 시리즈의 일부로서 투여되는, 방법.

청구항 29

적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물로서, 여기서 상기 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체 내의 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A, 혈청형 15C, 혈청형 23A, 혈청형 23B, 혈청형 24F, 또는 혈청형 35B 유래의 협막 다당류인, 면역원성 조성물.

청구항 30

본원에 기술된 바와 같은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A, 혈청형 15C, 혈청형 23A, 혈청형 23B, 혈청형 24F, 또는 혈청형 35B 유래의 협막 다당류를 제조하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 혈청형은 혈청형 15A이고, 상기 방법은:

(i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류를 산 가수분해 반응 및 열 또는 미세유동화기로 처리한 다음, 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류를 생산하는 단계;

(ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

(iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO)에 현탁시키는 단계;

(iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류 및 상기 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

(v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 혈청형은 혈청형 15C이고, 상기 방법은:

(i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류를 생산하는 단계;

(ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

(iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

(iv) 상기 활성화된 혈청형 15C 다당류 및 상기 담체 단백질의 혼합물을 환원제와 반응시켜 혈청형 15C 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

(v) 상기 혈청형 15C 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 혈청형은 혈청형 23A이고, 상기 방법은:

(i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류를 생산하는 단계;

(ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

(iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

(iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류 및 상기 담체 단백질의 혼합물을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

(v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

제30항에 있어서, 상기 혈청형은 혈청형 23B이고, 상기 방법은:

(i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류를 생산하는 단계;

(ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

(iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO)에 현탁시키는 단계;

(iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류 및 상기 담체 단백질의 혼합물을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

(v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

제30항에 있어서, 상기 혈청형은 혈청형 24F이고, 상기 방법은:

(i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류를 산 가수분해 반응 또는 미세유동화기로 처리한 다음, 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류를 생산하는 단계;

(ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

(iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

(iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류 및 상기 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

(v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

제30항에 있어서, 상기 혈청형은 혈청형 35B이고, 상기 방법은:

(i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류를 생산하는 단계;

(ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

(iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

(iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류 및 상기 담체 단백

질을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

(v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2019년 12월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 62/949,164, 및 2019년 7월 31일에 출원된 한국 특허 출원 번호 10-2019-0093276의 이익을 주장하며, 이들의 출원일에 의존하며, 이들의 전체 개시내용은 본원에 참조로서 통합된다.

[0003] 본 출원은 일반적으로 다가 폐렴구균 접합체 조성물, 이를 포함하는 백신 및 이 조성물을 사용하는 방법, 및 대상체에서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염 또는 질환의 예방용 백신에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 폐렴구균(pneumococcus)(스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*))은 90개 넘는 공지된 혈청형을 가진 그램 양성, 란셋 모양(lancet-shaped), 조건부 혐기성 세균이다. 대부분의 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) 혈청형은 질환(예컨대 폐렴, 균혈증, 수막염 및 이염(Otitis) 질환)을 유발하는 것으로 나타났으며, 23개의 가장 흔한 혈청형이 전 세계적으로 침습성 질환의 약 90%를 차지한다. 혈청형은 폐렴구균의 가장 중요한 독성 인자인, 협막 다당류(capsular polysaccharide)의 혈청학적 반응에 기초하여 분류된다. 협막 다당류는 T 헬퍼 세포가 없을 때 항체 생산을 유도하는 T-세포 비의존성 항원이다. T-세포 비의존성 항원은 일반적으로 면역학적 기억이 거의 없거나 전혀 없는 낮은 친화도 및 단기간 면역 반응을 갖는 항체를 유도한다.

[0005] 초기 폐렴구균 백신은 상이한 혈청형들 유래의 협막 다당류의 조합을 포함하였다. 이들 백신은 발달되거나 건강한 면역 체계를 가진 환자에서는 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)에 대한 면역력을 부여할 수 있지만, 이들은 발달된 면역 체계가 결여된 영유아, 및 종종 면역 기능이 손상된 고령 대상체에서는 효과적이지 않았다. S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) 감염에 걸릴 위험이 더 높은, 특히 영유아 및 고령 대상체에서, 폐렴구균 백신에 대한 면역 반응을 개선하기 위해, 협막 다당류를 적절한 담체 단백질에 접합시켜 폐렴구균 접합체 백신을 생성하였다. 적절한 담체 단백질에 접합하면, 협막 다당류가 T-세포 비의존성 항원에서 T-세포 의존성 항원으로 변한다. 이와 같이, 접합된 협막 다당류에 대한 면역 반응에는 T 헬퍼 세포가 관여하며, 이는 협막 다당류에 대한 재노출 시 더욱 강력하고 신속한 면역 반응을 유도하는 데 도움을 준다.

[0006] 폐렴구균 당접합체 백신을 개발하기 위한 적어도 두 가지 접근법이 있다: 단일 담체 접근법 및 혼합 담체 접근법. 상이한 협막 다당류 접합체들의 면역원성은 사용된 폐렴구균 혈청형 및 담체 단백질에 따라 달라질 수 있다. 단일 담체 접근법에서는, 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류가 단일 단백질 담체에 접합된다. Pfizer의 PREVNAR 시리즈 백신은 단일 담체 접근법의 예로, 상이한 협막 다당류가 글리신에 대한 글루탐산의 단일 아미노산 치환을 갖는 디프테리아 변이독소의 비독성 변이체인, CRM_{197} 단백질 담체에 접합된다. 7가 PREVNAR 백신(PREVNAR)은 2000년 처음 승인되었으며 승인 당시 가장 유행했던 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) 혈청형 유래의 협막 다당류를 함유하고 있다: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F. 13가 백신인 PREVNAR 13은 혈청형 1, 5, 7F, 3, 6A 및 19A를 CRM_{197} 단백질 담체에 추가하였다. Merck는 CRM_{197}에 접합된 22F 및 33F에 더하여 PREVNAR 13에 존재하는 13개의 혈청형을 포함하는 15가 V114 백신을 개발하고 있다. 미국 특허 제8,192,746호 *참조*. Merck는 또한 CRM_{197}에 접합된 다음의 21개 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) 혈청형을 포함하는 21가 폐렴구균 접합체 조성물(PCV21)을 개시한다: 3, 6C, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 16F, 17F, 19A, 20A, 22F, 23A, 23B, 24F, 31, 33F, 35B, 및 15B, 15C, 또는 탈-O-아세틸화 15B 중 적어도 하나. US2019/0192648 *참조*.

[0007] 두 번째 폐렴구균 접합체 백신 접근법은 혼합 담체 접근법이다. 혼합 담체 접근법에서는, 단일 단백질 담체를 사용하는 대신에, 2개 이상의 단백질 담체가 사용되며, 특이적 혈청형 유래의 협막 다당류가 제1 단백질 담체에 접합되고 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류가 적어도 제2의 상이한 단백질 담체에 접합된다. 예를 들어,

GlaxoSmithKline은, *H. 인플루엔자* 단백질 D, 파상풍 변이독소 및 디프테리아 변이독소를 단백질 담체로서 사용하는 10가 (혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F), 혼합 담체, 폐렴구균 접합 백신인, SYNFLORIX를 개발하였다. SYNFLORIX에서, 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및 23F는 단백질 D에 접합되고; 혈청형 18C는 파상풍 변이독소에 접합되고; 혈청형 19F는 디프테리아 변이독소에 접합된다. Vesikari 등, *PIDJ*, 28(4):S66-76 (2009). 보다 최근에는 Sanofi Pasteur와 SK Biosciences는 16가 (혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F), 20가 (혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F) 및 21가 (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F), 혼합 담체, 폐렴구균 접합체 백신을 만들었으며, 이들은 공개된 국제 출원 WO2018/027123, WO2018/027126, WO2019/152921, 및 WO2019/152925에 개시된 바와 같으며, 이들 문헌 각각은 그 전체가 참조로서 통합된다. 이들 혼합 담체에서, 다가 폐렴구균 접합체 백신 2개의 혈청형(혈청형 1, 3 및 5 중 2개) 또는 4개의 혈청형(혈청형 15B 및 22F 및 혈청형 1, 3 및 5 중 2개)이 파상풍 변이독소에 접합하는 반면, 나머지 혈청형은 CRM_{197}에 접합된다.

[0008] 단일 담체 및 혼합 담체 당접합체 백신 둘 다 백신에 함유된 폐렴구균 혈청형에 대해 다양한 수준의 보호를 제공하기 위해 사용되었지만, 혈청형 교체, 또는 당접합체 백신에 함유되지 않은 독성 폐렴구균 균주/혈청형의 유병률 증가가 관찰되었으며 여전히 우려 사항으로 남아 있다. Daniels 등, *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2016 Jan-Feb; 21(1): 27-35.

발명의 내용

[0009] 본 출원은 새롭고 개선된 다가 폐렴구균 접합체 조성물 및 이를 포함하는 백신을 제공한다. 일 측면에서, 본 출원은 22-27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는, 다가 폐렴구균 접합체 조성물을 제공하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다. 관심있는 다른 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형이 다가 폐렴구균 접합체 조성물에 추가될 수 있다. 소정의 구현예에서, 각각의 협막 다당류는 동일한 단백질 담체에 접합된다. 혼합 담체 구현예로 불리는, 소정의 구현예에서, 둘 이상의 단백질 담체, 예를 들어 2개의 상이한 단백질 담체가 사용된다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 소정의 협막 다당류는 제1 단백질 담체에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 제2 단백질 담체에 부착된다. 소정의 구현예에서, 제1 및 제2 단백질 담체는 CRM_{197} 및 파상풍 변이독소를 포함한다. 소정의 구현예에서, 협막 다당류 중 2개는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합된 2개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3 및 5로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합된 2개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 5, 15B, 및 22F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, 협막 다당류 중 4개는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합되는 4개의 협막 다당류로서, 파상풍 변이독소에 접합되는 4개의 협막 다당류 중 2개는 혈청형 1, 3 및 5로 이루어진 군으로부터 선택되고, 나머지 2개의 협막 다당류는 혈청형 15B 및 22F이다.

[0010] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다.

[0011] 소정의 구현예에서, 혈청형 1 및 5 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. 또 다른 구현예에서, 혈청형 1 및 3 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. 또 다른 구현예에서, 혈청형 3 및 5 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A,

12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다.

[0012] 소정의 구현예에서, 협막 다당류 중 4개는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합되고, 여기서, 파상풍 변이독소에 접합되는 4개의 협막 다당류 중 2개는 혈청형 1, 3 및 5로 이루어진 군으로부터 선택되고, 나머지 2개의 협막 다당류는 혈청형 15B 및 22F이다.

[0013] 일 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 혈청형 1, 5, 15B 및 22F 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다.

[0014] 또 다른 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 혈청형 1, 3, 15B 및 22F 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다.

[0015] 또 다른 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 혈청형 3, 5, 15B 및 22F 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다.

[0016] 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 26개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다.

[0017] 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 25개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다.

[0018] 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 24개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다.

[0019] 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 23개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다.

[0020] 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 22개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B로부터 선택된다.

[0021] 일부 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 아쥬반트, 예컨대 인산알루미늄, 황산알루미늄, 및 수산화알루미늄을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 알루미늄-계 아쥬반트를 추가로 포함한다.

[0022] 또 다른 측면은 백신으로서 다가 폐렴구균 접합체 조성물의 사용에 관한 것이다.

[0023] 또 다른 측면은 다가 폐렴구균 접합체 조성물 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 백신에 관한 것이다.

[0024] 또 다른 측면은 인간과 같은 대상체, 예컨대 인간에서, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염 또는 질환의 예방 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 예방적으로 유효량의 다가 폐렴구균 접합체 조성물 또는 이를 포함하는 백신을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] 소정의 구현예에서, 대상체는 적어도 50세인 인간이고, 질환은 폐렴 또는 침습성 폐렴구균 질환(invasive pneumococcal disease, IPD)이다.

[0026] 다른 구현예에서, 대상체는 적어도 6주령인 인간이고, 질환은 폐렴, 침습성 폐렴구균 질환(IPD), 또는 급성 중이염(acute otitis media, AOM)이다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 6주 내지 5세이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 2 내지 15개월 또는 6 내지 17세이다.

[0027] 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물 또는 백신은 근육내 주사로 투여된다. 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물 또는 백신은 면역화 시리즈의 일부로서 투여된다.

[0028] 또 다른 측면은 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물 및 이를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 여기서 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체 내의 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 유래의 협막 다당류이다.

[0029] 또 다른 측면은 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물 및 이를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 여기서 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체 내의 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 유래의 협막 다당류다.

[0030] 또 다른 측면은 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물 및 이를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 여기서 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체 내의 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 유래의 협막 다당류이다.

[0031] 또 다른 측면은 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물 및 이를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 여기서 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체 내의 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 유래의 협막 다당류이다.

[0032] 또 다른 측면은 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물 및 이를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 여기서 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체 내의 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 유래의 협막 다당류이다.

[0033] 또 다른 측면은 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물 및 이를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로서, 여기서 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체 내의 다당류는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 유래의 협막 다당류이다.

[0034] 폐렴구균 접합체 조성물의 전술한 것 및 기타 목적, 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] **정의**

[0036] 본 개시내용이 보다 쉽게 이해되도록, 특정 용어들이 먼저 아래에 정의된다. 다음의 용어들 및 다른 용어들에 대한 추가 정의가 본 명세서를 통해 제시될 수 있다.

[0037] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "한", "하나" 및 "상기"는 문맥상 달리 명시되지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "방법"에 대한 언급은, 본 개시내용을 읽는 즉시 해당 분야 숙련자에게 명백해질 하나 이상의 방법, 및/또는 본원에 기술된 유형의 단계를 포함한다.

[0038] *투여하다:* 본원에서 사용되는 바와 같이, 조성물을 대상체에게 "투여"하는 것은, 조성물을 대상체에게 주거나, 적용하거나, 대상체와 접촉하게 하는 것을 의미한다. 투여는, 예를 들어 국소, 경구, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 척수강내 및 피내와 같은 다수의 경로 중 어느 하나에 의해 달성될 수 있다.

[0039] *대략:* 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대략" 또는 "약"은, 하나 이상의 관심 값에 적용되는 바와 같이, 명

시된 참조 값과 유사한 값을 지칭한다. 소정의 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되지 않는 한 또는 문맥상 달리 분명하지 않는 한 (그와 같은 수가 가능한 값의 100 %를 초과하는 경우를 제외하고) 명시된 참조 값의 어느 방향으로든지 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % 또는 그 미만(초과 또는 미만)의 값 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다.

[0040] *접합체:* 본원에서 사용되는 바와 같이, 그리고 적절한 문맥으로부터 이해되는 바와 같이, 용어 "접합체(들)" 또는 "당접합체(들)"는 임의의 공유 또는 비공유 생체접합 전략을 사용하여 담체 단백질에 접합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 다당류를 지칭한다.

[0041] *산화도*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "산화도"(degree of oxidation, DO)는 정제된 또는 크기조절된 당류가 산화제로 활성화될 때 생성되는 알데히드기당 당 반복 단위의 수를 지칭한다. 당류의 산화도는 해당 분야 숙련자에게 공지된 일상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0042] *구현예:* 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "소정의 구현예에서", "일부 구현예에서" 등은, 문맥상 달리 명시되지 않는 한, 본 개시내용의 모든 측면의 구현예를 지칭한다.

[0043] *부형제*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "부형제"는, 예를 들어 원하는 일관성 또는 안정화 효과를 제공하거나 이에 기여하기 위해 조성물에 포함될 수 있는 비-치료제를 지칭한다.

[0044] *혼합 담체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 혼합 담체, 폐렴구균 접합체 조성물은 하나보다 많은 유형의 단백질 담체를 갖는 폐렴구균 접합체 조성물을 지칭한다.

[0045] *22가 폐렴구균 접합체 조성물*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "22가 폐렴구균 접합체 조성물(들)" 또는 "PCV-22"는 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 조성물을 지칭하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 22개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다.

[0046] *23가 폐렴구균 접합체 조성물*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "23가 폐렴구균 접합체 조성물(들)" 또는 "PCV-23"은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 조성물을 지칭하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 23개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다.

[0047] *24가 폐렴구균 접합체 조성물*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "24가 폐렴구균 접합체 조성물(들)" 또는 "PCV-24"는 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 조성물을 지칭하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 24개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다.

[0048] *25가 폐렴구균 접합체 조성물*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "25가 폐렴구균 접합체 조성물(들)" 또는 "PCV-25"는 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 조성물을 지칭하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 25개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다.

[0049] *26가 폐렴구균 접합체 조성물*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "26가 폐렴구균 접합체 조성물(들)" 또는 "PCV-26"은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 조성물을 지칭하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다

당류-단백질 접합체는 26개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다.

[0050] *27가 폐렴구균 접합체 조성물*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "27가 폐렴구균 접합체 조성물(들)" 또는 "PCV-27"은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 조성물을 지칭하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다.

[0051] *분자량:* 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 바와 같이, 협막 당류 또는 협막 당류-담체 단백질 접합체의 용어 "분자량"은 다각도 레이저 광 산란(multi-angle laser light scattering, MALLS)과 조합하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 계산되는 평균 분자량을 지칭한다.

[0052] *다가(multivalent):* 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "다가"는 하나보다 많은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 유래의 폐렴구균 협막 다당류를 갖는 폐렴구균 접합체 조성물을 지칭한다.

[0053] *약제학적으로 허용 가능한 부형제*: 본 개시내용에서 유용한 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 종래의 것이다. Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)은, 백신을 포함한, 하나 이상의 치료 조성물 및 추가 약제학적 제제를 약제학적으로 전달하기에 적합한 조성물 및 제형을 기술하고 있다. 적절한 약제학적 부형제는, 예를 들어, 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 일반적으로, 부형제의 성질은 사용되는 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 비경구 제형은 일반적으로 물, 생리 식염수, 평형 염 용액, 완충액, 수성 덱스트로스, 글리세롤 등과 같은, 약제학적 및 생리학적으로 허용 가능한 유체를 비히클로서 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 고형 조성물(예를 들어, 분말, 알약, 정제, 또는 캡슐 형태)의 경우, 종래의 비독성 고형 부형제는, 예를 들어, 만니톨, 락토오스, 전분, 또는 스테아르산 마그네슘의 약제학적 등급을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체 이외에, 투여될 약제학적 조성물은 습윤제 또는 유화제, 표면 활성제, 보존제, 및 pH 완충제 등, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트와 같은, 소량의 비독성 보조 물질을 함유할 수 있다.

[0054] *예방적 유효량*: 본원에서 정의된 바와 같이, 용어 "예방적 유효량" 또는 "예방적 유효 용량"은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염에 의해 야기되는 하나 이상의 증상을 발생을 지연시키고/또는 빈도 및/또는 중증도 감소에 충분한 면역 반응을 유도하는 데 필요한 양 또는 용량을 지칭한다.

[0055] *예방(prophylaxis):* 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "예방"은 특정 질환, 장애 또는 병태(예를 들어, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염)의 질환 발현의 회피, 발병 지연, 및/또는 하나 이상의 증상의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 지칭한다. 일부 구현예에서, 예방은, 질환, 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상의 진행, 빈도 및/또는 강도의 통계적으로 유의한 감소가 질환, 장애 또는 병태에 민감한 모집단에서 관찰되는 경우, 제제가 특정 질환, 장애 또는 병태에 대한 예방을 제공하는 것으로 고려되도록 모집단 기준으로 평가된다.

[0056] *대상체*: 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 마우스, 토끼 및 인간을 포함하는 임의의 포유동물을 의미한다. 소정의 구현예에서, 대상체는 성인, 청소년 또는 영유아이다. 일부 구현예에서, 용어 "개체" 또는 "환자"가 사용되고 "대상체"와 상호교환 가능하도록 의도된다.

[0057] **상세한 설명**

[0058] 개시된 구현예(들) 및 실시예들에 대한 다음의 설명은 사실상 단지 예시적인 것이며, 어떤 식으로든지 본 발명, 그 적용 또는 용도를 제한하려는 의도가 아니다.

[0059] 본 출원은 새롭고 개선된 다가 폐렴구균 접합체 조성물 및 이를 포함하는 백신을 제공한다. 실시예들에 나타낸

바와 같이, 혈청형 15A, 혈청형 15C, 혈청형 23A, 혈청형 23B, 혈청형 24F, 및 혈청형 35B과 같은, 기존의 폐렴구균 백신에 의해 커버되지 않는 혈청형을 포함하여, PCV-27 내의 27개의 혈청형에 대해 강력한 항체 반응이 얻어졌다.

[0060] **폐렴구균 다당류 혈청형 15A**

[0061] 혈청형 15A 다당류는 (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 해당 분야 숙련자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 세균으로부터 직접적으로 수득될 수 있다. 또한, 합성 프로토콜을 사용하여 15A 올리고당이 생산될 수 있다.

[0062] 혈청형 15A 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 균주는 확립된 배양 수집처(예, 미국 질병통제예방센터(the Centers for Disease Control and Prevention)의 연쇄구균 표준 실험실(조지아주, 애틀란타)) 또는 임상 시편으로부터 수득될 수 있다.

[0063] 세균 세포는 일반적으로 대두계 배지와 같은 배지에서 성장된다. 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 협막 다당류를 생산하는 세균 세포의 발효 후, 세균 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생산한다. 그런 다음, 혈청형 15A 다당류는, (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄 처리, 정용여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피로를 포함한, 해당 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 세포 용해물로부터 단리될 수 있다.

[0064] 정제된 혈청형 15A 다당류는 담체 단백질에 접합되어 혈청형 15A 다당류 및 담체 단백질을 포함하는 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 형성한다. 일 측면에서, 15A 다당류-단백질 접합체는 다음의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조 가능하다:

[0065] (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류를 산 가수분해 반응 및 열 또는 미세유동화기로 처리한 다음, 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류를 생산하는 단계;

[0066] (ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

[0067] (iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO)에 현탁시키는 단계;

[0068] (iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류 및 상기 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

[0069] (v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계. 본 방법에서 사용될 수 있는 시약(예, 산화제, 환원제, 담체 단백질 등) 및 조건에 대한 추가적인 세부 사항은, 이어지는 섹션 및 실시예를 포함하여, 본 출원의 다른 곳에서 개시된다.

[0070] 활성화된 혈청형 15A 협막 다당류는, 예를 들어, 분자량(MW) 및/또는 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다.

[0071] 일 측면에서, 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류는, 예를 들어, 접합 전에 약 10-120 kDa, 50-120 kDa, 70-120 kDa, 70-80 kDa, 70-118 kDa, 114-118 kDa, 또는 약 116 kDa의 분자량을 갖는 활성화된 혈청형 15A 협막 다당류를 포함하여, 접합 전에 120 kDa 미만의 분자량을 갖는다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0072] 일 측면에서, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A 다당류의 분자량이 접합 전에 120 kDa 미만인 경우, 약 1,200-4,000 kDa, 1,200-1,500 kDa, 1,200-3,500 kDa, 1,400-4,000 kDa, 약 1,200 kDa, 약 1,400 kDa, 또는 약 4,000 kDa의 다당류-단백질 접합체와 같은, 약 1,000-5,000 kDa의 다당류-단백질 접합체가 생산될 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0073] 정제된 혈청형 15A 다당류는 산화제를 이용한 활성화 후 산화도를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 활성화된 혈청형 15A 다당류는 1 내지 15 범위, 예컨대 4-10, 4-8, 4-5, 5-8, 또는 약 4의 산화도를 가질 수 있다.

[0074] 일 측면에서, 약 4의 산화 수준(Do)을 갖는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15A의 활성화된 다당류는 담체 단백질과 접합되어, 40% 이하, 예컨대 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35%, 또는 30-35%의 유리 다당류(유리 PS) 함량의 혈청형 15A 담체 다당류-단백질 접합체를 수득한다.

[0075] 다당류는 정상적인 정제 절차 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 또한, 본 개시내용에 기술된 바와 같이, 다당류는 접합 전에 크기조절을 거칠 수 있다. 상기에서 언급된 분자량 범위는 접합 전에 (예를 들어, 정제, 가수분해 및 활성화 후) 최종 크기조절 단계 후의 정제된 다당류의 분자량 범위를 지칭한다.

[0076] **폐렴구균 다당류 혈청형 15C**

[0077] 혈청형 15C 다당류는 (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 해당 분야 숙련자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 세균으로부터 직접적으로 수득될 수 있다. 또한, 합성 프로토콜을 사용하여 15C 올리고당이 생산될 수 있다.

[0078] 혈청형 15C 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 균주는 확립된 배양 수집처(예, 미국 질병통제예방센터(the Centers for Disease Control and Prevention)의 연쇄구균 표준 실험실(조지아주, 애틀란타)) 또는 임상 시편으로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 혈청형 15C 다당류는 혈청형 15B 다당류의 탈-O-아세틸화에 의해, 일반적으로 알칼리 처리에 의해 수득될 수 있다.

[0079] 세균 세포는 일반적으로 대두계 배지와 같은 배지에서 성장된다. 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 협막 다당류를 생산하는 세균 세포의 발효 후, 세균 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생산한다. 그런 다음, 혈청형 15C 다당류는, (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄 처리, 정용여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피로를 포함한, 해당 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 세포 용해물로부터 단리될 수 있다.

[0080] 정제된 혈청형 15C 다당류는 담체 단백질에 접합되어 혈청형 15C 다당류 및 담체 단백질을 포함하는 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 형성한다. 일 측면에서, 15C 다당류-단백질 접합체는 다음의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조 가능하다:

[0081] (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류를 생산하는 단계;

[0082] (ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

[0083] (iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

[0084] (iv) 상기 활성화된 혈청형 15C 다당류 및 상기 담체 단백질의 혼합물을 환원제와 반응시켜 혈청형 15C 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

[0085] (v) 상기 혈청형 15C 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계. 본 방법에서 사용될 수 있는 시약(예, 산화제, 환원제, 담체 단백질 등) 및 조건에 대한 추가적인 세부 사항은, 이어지는 섹션 및 실시예를 포함하여, 본 출원의 다른 곳에서 개시된다.

[0086] 활성화된 혈청형 15C 협막 다당류는, 예를 들어, 분자량(MW) 및/또는 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다.

[0087] 일 측면에서, 접합 전에 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류는, 200-1,000 kDa의 분자량, 예컨대 400-800 kDa, 500-775 kDa, 470-775 kDa, 500-770 kDa, 520-680 kDa, 510-770 kDa, 510-550 kDa, 670-770 kDa, 또는 유사한 분자량 범위를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0088] 약 1,000-10,000 kDa의 분자량을 갖는 15C 다당류-단백질 접합체, 예컨대 약 2,000-6,000 kDa, 2,500-5,000 kDa, 6,000-10,000 kDa, 또는 6,200-9,400 kDa의 15C 다당류-단백질 접합체가 생산될 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0089] 정제된 혈청형 15C 다당류는 산화제를 이용한 활성화 후 산화도를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 활성화된

혈청형 15C 다당류는 1 내지 40 범위의 산화도를 가질 수 있다. 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C 다당류에 과요오드산나트륨을 첨가하여 8-35, 15-35, 8-20, 8-9, 9-20 또는 30-35의 산화도를 얻을 수 있다.

[0090] 일 측면에서, 30-35의 산화 수준(Do)을 갖는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 15C의 활성화된 다당류는 담체 단백질과 접합되어, 40% 이하, 예컨대 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35%, 또는 30-35%의 유리 다당류(유리 PS) 함량의 혈청형 15C 담체 다당류-단백질 접합체를 수득한다.

[0091] 다당류는 정상적인 정제 절차 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 또한, 본 개시내용에 기술된 바와 같이, 다당류는 접합 전에 크기조절을 거칠 수 있다. 상기에서 언급된 분자량 범위는 접합 전에 (예를 들어, 정제, 가수분해 및 활성화 후) 최종 크기조절 단계 후의 정제된 다당류의 분자량 범위를 지칭한다.

[0092] **폐렴구균 다당류 혈청형 23A**

[0093] 혈청형 23A 다당류는 (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 해당 분야 숙련자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 세균으로부터 직접적으로 수득될 수 있다. 또한, 합성 프로토콜을 사용하여 23A 올리고당이 생산될 수 있다.

[0094] 혈청형 23A 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 균주는 확립된 배양 수집처(예, 미국 질병통제예방센터(the Centers for Disease Control and Prevention)의 연쇄구균 표준 실험실(조지아주, 애틀란타)) 또는 임상 시편으로부터 수득될 수 있다.

[0095] 세균 세포는 일반적으로 대두계 배지와 같은 배지에서 성장된다. 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 협막 다당류를 생산하는 세균 세포의 발효 후, 세균 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생산한다. 그런 다음, 혈청형 23A 다당류는, (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄 처리, 정용여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피로를 포함한, 해당 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 세포 용해물로부터 단리될 수 있다.

[0096] 정제된 혈청형 23A 다당류는 담체 단백질에 접합되어 혈청형 23A 다당류 및 담체 단백질을 포함하는 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 형성한다. 일 측면에서, 23A 다당류-단백질 접합체는 다음의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조 가능하다:

[0097] (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류를 생산하는 단계;

[0098] (ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

[0099] (iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

[0100] (iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류 및 상기 담체 단백질의 혼합물을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

[0101] (v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계. 본 방법에서 사용될 수 있는 시약(예, 산화제, 환원제, 담체 단백질 등) 및 조건에 대한 추가적인 세부 사항은, 이어지는 섹션 및 실시예를 포함하여, 본 출원의 다른 곳에서 개시된다.

[0102] 활성화된 혈청형 23A 협막 다당류는, 예를 들어, 분자량(MW) 및/또는 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다.

[0103] 일 측면에서, 접합 전에 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A 다당류는 300-700 kDa, 예컨대 400-650 kDa, 430-650 kDa, 470-650 kDa, 470-570 kDa, 470-490 kDa, 또는 유사한 분자량 범위를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0104] 약 2,000-7,000 kDa의 혈청형 23A 다당류-단백질 접합체는 본원에 개시된 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 혈

청형 23A 협막 다당류-단백질 접합체의 분자량은 약 2,000-4,000 kDa, 4,000-7,000 kDa, 4,200-6,700 kDa, 4,350-6,650 kDa, 5,000-6,700 kDa, 약 4,300 kDa, 약 5,000 kDa, 또는 약 6,600 kDa일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0105] 정제된 혈청형 23A 다당류는 산화제를 이용한 활성화 후 산화도를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 활성화된 혈청형 23A 다당류는 4 내지 25 범위, 예컨대 6-24, 6-18, 9-18, 6-9, 6-10, 6-11, 또는 9-11의 산화도를 가질 수 있다.

[0106] 일 측면에서, 9-11의 산화 수준(Do)을 갖는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23A의 활성화된 다당류는 담체 단백질과 접합되어, 40% 이하, 예컨대 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35%, 또는 30-35%의 유리 다당류(유리 PS) 함량의 혈청형 23A 담체 다당류-단백질 접합체를 수득한다.

[0107] DMSO 또는 인산염 완충액을 포함하여, 임의의 적절한 완충액이 접합을 위해 사용될 수 있다. DMSO가 사용될 때, 다당류의 반응 농도는 예를 들어 1.0 mg/mL 내지 2.5 mg/mL, 1.0 mg/mL 내지 2.0 mg/mL, 또는 1.0 mg/mL 내지 1.5 mg/mL를 포함하여, 2.5 mg/mL 이하일 수 있다. 인산염 완충액이 사용될 때, 다당류의 반응 농도는, 예를 들어, 15 mg/mL를 포함하여, 10 내지 20 mg/mL일 수 있다.

[0108] 다당류는 정상적인 정제 절차 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 또한, 본 개시내용에 기술된 바와 같이, 다당류는 접합 전에 크기조절을 거칠 수 있다.

[0109] **폐렴구균 다당류 혈청형 23B**

[0110] 혈청형 23B 다당류는 (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 해당 분야 숙련자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 세균으로부터 직접적으로 수득될 수 있다. 또한, 합성 프로토콜을 사용하여 23B 올리고당이 생산될 수 있다.

[0111] 혈청형 23B 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 균주는 확립된 배양 수집처(예, 미국 질병통제예방센터(the Centers for Disease Control and Prevention)의 연쇄구균 표준 실험실(조지아주, 애틀란타)) 또는 임상 시편으로부터 수득될 수 있다.

[0112] 세균 세포는 일반적으로 대두계 배지와 같은 배지에서 성장된다. 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 협막 다당류를 생산하는 세균 세포의 발효 후, 세균 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생산한다. 그런 다음, 혈청형 23B 다당류는, (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄 처리, 정용여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피로를 포함한, 해당 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 세포 용해물로부터 단리될 수 있다.

[0113] 정제된 혈청형 23B 다당류는 담체 단백질에 접합되어 혈청형 23B 다당류 및 담체 단백질을 포함하는 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 형성한다. 일 측면에서, 23B 다당류-단백질 접합체는 다음의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조 가능하다:

[0114] (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류를 생산하는 단계;

[0115] (ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

[0116] (iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO)에 현탁시키는 단계;

[0117] (iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류 및 상기 담체 단백질의 혼합물을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

[0118] (v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계. 본 방법에서 사용될 수 있는 시약(예, 산화제, 환원제, 담체 단백질 등) 및 조건에 대한 추가적인 세부 사항은, 이어지는 섹션 및 실시예를 포함하여, 본 출원의 다른 곳에서 개시된다.

[0119] 활성화된 혈청형 23B 협막 다당류는, 예를 들어, 분자량(MW) 및/또는 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다.

[0120] 일 측면에서, 접합 전에 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B 다당류는 100-800 kDa, 예컨대 200-700 kDa, 200-650 kDa, 300-650 kDa, 380-640 kDa, 550-675 kDa, 200-250 kDa, 220-230 kDa, 220-225 kDa, 또는 유사한 분자량 범위를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0121] 약 2,000-7,000 kDa의 혈청형 23B 다당류-단백질 접합체는 본원에 개시된 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 혈청형 23B 협막 다당류-단백질 접합체의 분자량은 약 2,000-4,000 kDa, 2,000-5,000, 4,000-7,000 kDa, 2,400-6,800 kDa, 4,600-6,800 kDa, 또는 6,400-6,800 kDa 범위일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0122] 정제된 혈청형 23B 다당류는 산화제를 이용한 활성화 후 산화도를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 활성화된 혈청형 23B 다당류는 5.4 이하의 산화도, 예컨대 1-5.4, 2-5.4, 2.3-5.4, 2-3, 또는 2.3-2.8의 산화도를 가질 수 있다.

[0123] 일 측면에서, (전술한 바와 같이) 3 이하의 산화 수준(Do)을 갖는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 23B의 활성화된 다당류는 담체 단백질과 접합되어, 40% 이하, 예컨대 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35%, 또는 30-35%의 유리 다당류(유리 PS) 함량의 혈청형 23B 담체 다당류-단백질 접합체를 수득한다.

[0124] 다당류는 정상적인 정제 절차 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 또한, 본 개시내용에 기술된 바와 같이, 다당류는 접합 전에 크기조절을 거칠 수 있다.

[0125] **폐렴구균 다당류 혈청형 24F**

[0126] 혈청형 24F 다당류는 (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 해당 분야 숙련자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 세균으로부터 직접적으로 수득될 수 있다. 또한, 합성 프로토콜을 사용하여 24F 올리고당이 생산될 수 있다.

[0127] 혈청형 24F 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 균주는 확립된 배양 수집처(예, 미국 질병통제예방센터(the Centers for Disease Control and Prevention)의 연쇄구균 표준 실험실(조지아주, 애틀란타)) 또는 임상 시편으로부터 수득될 수 있다.

[0128] 세균 세포는 일반적으로 대두계 배지와 같은 배지에서 성장된다. 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 협막 다당류를 생산하는 세균 세포의 발효 후, 세균 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생산한다. 그런 다음, 혈청형 24F 다당류는, (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄 처리, 정용여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피로를 포함한, 해당 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 세포 용해물로부터 단리될 수 있다.

[0129] 정제된 혈청형 24F 다당류는 담체 단백질에 접합되어 혈청형 24F 다당류 및 담체 단백질을 포함하는 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 형성한다. 일 측면에서, 24F 다당류-단백질 접합체는 다음의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조 가능하다:

[0130] (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류를 산 가수분해 반응 또는 미세유동화기로 처리한 다음, 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류를 생산하는 단계;

[0131] (ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

[0132] (iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

[0133] (iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류 및 상기 담체 단백질을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

[0134] (v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계. 본 방법에서 사용될 수 있는 시약(예, 산화제, 환원제, 담체 단백질 등) 및 조건에 대한 추가적인 세부 사항은, 이어지는 섹션 및 실시예를 포함하여, 본 출원의 다른 곳에서 개시된다.

[0135] 활성화된 혈청형 24F 협막 다당류는, 예를 들어, 분자량(MW) 및/또는 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다.

[0136] 일 측면에서, 접합 전에 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 24F 다당류는, 100-500 kDa, 예컨대 150-350 kDa, 200-400 kDa, 200-300 kDa, 225-275 kDa, 240-260 kDa, 245-255 kDa, 약 250 kDa의 분자량, 또는 유사한 분자량 범위를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0137] 약 1,000-5,000 kDa의 혈청형 24F 다당류-단백질 접합체는 본원에 개시된 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 혈청형 24F 협막 다당류-단백질 접합체의 분자량은 약 1,500-5,000 kDa, 2,000-4,500, 또는 2,500-3,500 kDa의 범위일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0138] 정제된 혈청형 24F 다당류는 산화제를 이용한 활성화 후 산화도를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 활성화된 혈청형 24F 다당류는 약 90-100을 포함하여, 적어도 90의 산화도를 가질 수 있다.

[0139] 일 측면에서, 2.0 이하의 환원제의 몰당량을, 적어도 90의 산화도를 갖는 활성화된 혈청형 24F 다당류 및 담체 단백질을 반응시키는 단계에 사용하여, 40% 이하, 예컨대 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35%, 또는 30-35%의 유리 다당류(유리 PS) 함량의 혈청형 24F 담체 다당류-단백질 접합체를 수득할 수 있다. 0.5 내지 1.2, 1.0 내지 1.2 또는 약 1.2의 환원제의 몰당량이 사용될 수 있다.

[0140] 다당류는 정상적인 정제 절차 동안 크기가 약간 감소될 수 있다. 또한, 본 개시내용에 기술된 바와 같이, 다당류는 접합 전에 크기조절을 거칠 수 있다.

[0141] **폐렴구균 다당류 혈청형 35B**

[0142] 혈청형 35B 다당류는 (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 해당 분야 숙련자에게 공지된 단리 절차를 사용하여 세균으로부터 직접적으로 수득될 수 있다. 또한, 합성 프로토콜을 사용하여 35B 올리고당이 생산될 수 있다.

[0143] 혈청형 35B 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 균주는 확립된 배양 수집처(예, 미국 질병통제예방센터(the Centers for Disease Control and Prevention)의 연쇄구균 표준 실험실(조지아주, 애틀란타)) 또는 임상 시편으로부터 수득될 수 있다.

[0144] 세균 세포는 일반적으로 대두계 배지와 같은 배지에서 성장된다. 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 협막 다당류를 생산하는 세균 세포의 발효 후, 세균 세포를 용해시켜 세포 용해물을 생산한다. 그런 다음, 혈청형 35B 다당류는, (미국 특허 출원 공개번호 2006/0228380에 개시된 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는) 원심분리, 심층 여과, 침전, 한외여과, 활성탄 처리, 정용여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피로를 포함한, 해당 기술분야에 공지된 정제 기술을 사용하여 세포 용해물로부터 단리될 수 있다.

[0145] 정제된 혈청형 35B 다당류는 담체 단백질에 접합되어 혈청형 35B 다당류 및 담체 단백질을 포함하는 적어도 하나의 다당류-단백질 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 형성한다. 일 측면에서, 35B 다당류-단백질 접합체는 다음의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조 가능하다:

[0146] (i) 정제된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B를 산화제와 반응시켜 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류를 생산하는 단계;

[0147] (ii) 선택적으로 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류 및 담체 단백질을 동결건조시키는 단계;

[0148] (iii) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류 및 상기 담체 단백질을 디메틸 설폭시드(DMSO) 또는 인산염 완충액에 현탁시키는 단계;

[0149] (iv) 상기 활성화된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류 및 상기 담체 단백

질을 환원제와 반응시켜 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계; 및

[0150] (v) 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체에서 미반응된 알데히드를 캡핑하여 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 제조하는 단계. 본 방법에서 사용될 수 있는 시약(예, 산화제, 환원제, 담체 단백질 등) 및 조건에 대한 추가적인 세부 사항은, 이어지는 섹션 및 실시예를 포함하여, 본 출원의 다른 곳에서 개시된다.

[0151] 활성화된 혈청형 35B 협막 다당류는, 예를 들어, 분자량(MW) 및/또는 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다.

[0152] 예를 들어, 정제된 혈청형 35B 다당류의 크기는, 예를 들어 담체 단백질에 접합되기 전에, 고압 균질화 또는 기계적 균질화에 의해 감소될 수 있다. 일 측면에서, 활성화된 혈청형 35B 다당류는 접합 전에 10 내지 20,000 kDa, 10 내지 1,000 kDa, 10 내지 500 kDa, 10 내지 300 kDa, 20 내지 200 kDa, 또는 20 내지 120 kDa의 분자량을 갖는다.

[0153] 정제된 혈청형 35B 다당류는 산화제를 이용한 활성화 후 산화도를 특징으로 할 수 있다. 일 측면에서, 활성화된 혈청형 35B 다당류는 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 2-50, 2-45, 2-40, 2-35, 2-30, 3-40, 3-35, 3-30, 4-40 4-35, 또는 4-30의 산화도를 가질 수 있다.

[0154] 일 측면에서, 4-30의 산화 수준(Do)을 갖는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B의 활성화된 다당류는 담체 단백질과 접합되어, 40% 이하, 예컨대 5-40%, 20-40%, 25-40%, 20-35%, 25-35%, 또는 30-35%의 유리 다당류(유리 PS) 함량의 혈청형 35B 담체 다당류-단백질 접합체를 수득한다.

[0155] 유리한 면역원성 특성을 갖는 혈청형 35B 당접합체를 생산하기 위해 활성화(산화), 접합 및/또는 캡핑 단계에서 다음 공정 파라미터들 중 하나 이상이 조합될 수 있다:

[0156] · 활성화 단계에서, 과요오드산염(예, 나트륨 또는 칼륨 과요오드산염)이 혈청형 35B 다당류 1M 당 0.005 내지 0.5, 0.005 내지 0.3, 0.005 내지 0.2, 또는 0.007 내지 0.15의 몰당량과 반응되고;

[0157] · 활성화 단계는 아세트산나트륨 완충액 또는 탈이온수와 같은, 수성 용매에서 수행될 수 있고;

[0158] · 활성화 단계는 0.1mM 내지 15mM 또는 0.1 내지 10mM 아세트산나트륨 완충액에서 수행될 수 있고;

[0159] · 활성화 단계는 pH 4-8 또는 pH 4-7.5에서 수행될 수 있고;

[0160] · 활성화 단계에서, 과요오드산염이 21℃ 내지 25℃에서 처리될 수 있고;

[0161] · 활성화 단계에서, 과요오드산염 및 혈청형 35B 다당류가 0.5 내지 50시간 또는 1 내지 25시간 동안 반응될 수 있고;

[0162] · 활성화 단계 후, 활성화된 혈청형 35B 다당류는, 예를 들어, 30 kDa MWCO 한외여과 필터를 사용하여 농축될 수 있고;

[0163] · 접합 단계에서, 접합 반응에서 활성화된 혈청형 35B 다당류의 농도는 5 mg/mL 내지 30 mg/mL 또는 10 mg/mL 내지 20 mg/mL일 수 있고;

[0164] · 접합 단계에서, 담체 단백질 및 활성화된 혈청형 35B 다당류의 초기 로딩 비율은 (PR:PS) 1:0.3, 1:0.4, 1:0.5, 1:0.6, 1:0.7, 1:0.8, 1:0.9, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1: 1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9, 1:2, 1:2.1, 1:2.2, 1:2.3, 1:2.4, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9 또는 1:3, 및 바람직하게는 1:0.5 내지 2일 수 있고;

[0165] · 접합 단계에서, 사용된 환원제의 양은 1M 활성화된 다당류 당 0.1 내지 5 몰 또는 0.5 내지 2당량, 바람직하게는 1M 활성화된 다당류 당 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2 몰당량, 또는 보다 바람직하게는 1M 활성화된 다당류 당 0.8 내지 1.6몰당량의 환원제일 수 있고;

[0166] · 접합 단계에서, 온도는 20℃ 내지 45℃, 30℃ 내지 40℃, 35 내지 40℃, 또는 37 ± 2℃일 수 있고;

[0167] · 접합 단계에서, pH는 5.5 내지 8.5, 5.5 내지 7.5, 또는 6 내지 7.5일 수 있고;

[0168] · 접합 단계에서, 담체 단백질 및 활성화된 혈청형 35B 다당류는 1 내지 70시간 또는 40 내지 60시간 동안 환

원제와 반응할 수 있고;

[0169] · 접합 단계 후, 혈청형 35B 당접합체의 수율은 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%일 수 있고;

[0170] · 캡핑 단계에서, 수소화붕소나트륨은 활성화된 혈청형 35B 다당류 1M 당 0.5 내지 5 몰당량, 예컨대 활성화된 혈청형 35B 다당류 1M 당 1 내지 3 또는 1.5 내지 2.5 몰당량, 또는 활성화된 다당류 1M 당 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3 몰당량의 수소화붕소나트륨으로 처리될 수 있고;

[0171] · 캡핑 단계에서, 온도는 10 내지 40℃, 15 내지 30℃, 20 내지 26℃, 또는 23 ± 2℃일 수 있고;

[0172] · 캡핑 단계에서, 반응 시간은 0.5 내지 10시간 또는 2 내지 8시간일 수 있고; 그리고/또는

[0173] · 캡핑 단계 후, 혈청형 35B 당접합체는, 예를 들어, 100 kDa MWCO 한외여과 필터를 사용하여 농축될 수 있다.

[0174] 하나의 예시적인 구현예에서, 혈청형 35B 당접합체를 생산하는 방법은 다음 단계들을 포함한다:

[0175] (i) 단리된 혈청형 35B 다당류를 아세트산나트륨 완충액(NaOAc, pH 4.5 내지 pH 6.0) 또는 DW(탈이온수)로 희석하는 단계;

[0176] (ii) 상기 혈청형 35B 다당류를 0.005 내지 0.5 몰당량의 과요오드산염나트륨과 반응시켜 활성화된 혈청형 35B 다당류를 제조하는 단계;

[0177] (iii) 상기 활성화된 혈청형 35B 다당류를 정제한 다음 동결보호제와 혼합하는 단계;

[0178] (iv) 상기 활성화된 혈청형 35B형 및 담체 단백질을 각각 동결건조시키는 단계;

[0179] (v) 상기 활성화된 혈청형 35B 다당류 및 담체 단백질을 DMSO 또는 인산염 완충액에 재현탁하는 단계;

[0180] (vi) 상기 재현탁된 활성화된 혈청형 35B 다당류를 상기 담체 단백질과 혼합하고 시아노수소화붕소나트륨과 반응시켜 상기 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계;

[0181] (vii) 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체에서 비반응된 알데히드를 수소화붕소나트륨으로 캡핑하는 단계; 및

[0182] (viii) 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 수득하는 단계.

[0183] 또 다른 예시적인 구현예에서, 혈청형 35B 당접합체를 생산하는 방법은 다음 단계들을 포함한다:

[0184] (i) 단리된 혈청형 35B 다당류를 아세트산나트륨 완충액(NaOAc, pH 4.5 내지 pH 6.0) 또는 DW(탈이온수)로 희석하는 단계;

[0185] (ii) 상기 혈청형 35B 다당류를 0.005 내지 0.5 몰당량의 과요오드산염나트륨과 반응시켜 활성화된 혈청형 35B 다당류를 제조하는 단계;

[0186] (iii) 상기 활성화된 혈청형 35B 다당류를 정제하는 단계;

[0187] (iv) 상기 활성화된 혈청형 35B 다당류를 담체 단백질과 혼합한 다음, 공동- 동결건조시키는 단계;

[0188] (v) 공동-동결건조된 활성화된 혈청형 35B 다당류 및 담체 단백질을 DMSO 또는 인산염 완충액에 재현탁하는 단계;

[0189] (vi) 시아노수소화붕소나트륨과 반응하여 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체를 생산하는 단계;

[0190] (vii) 혈청형 35B 다당류-담체 단백질 접합체에서 비반응된 알데히드를 수소화붕소나트륨으로 캡핑하는 단계; 및

[0191] (viii) 상기 담체 단백질에 공유 결합된 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 35B 다당류를 포함하는 면역원성 접합체를 수득하는 단계.

[0192] **폐렴구균 다당류 혈청형 22F**

[0193] 활성화된 혈청형 22F 협막 다당류는, 예를 들어, 산화제를 이용한 활성화 후 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파

라미터를 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 활성화된 혈청형 22F 다당류는 20-100, 20-80, 20-60, 20-50, 20-40, 20-35, 25-100, 25-50, 25-35, 28-32, 또는 29-31의 Do를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0194] 혈청형 22F 다당류-단백질 접합체는, 예를 들어, 접합 후 단백질 대 다당류 (PS/PR) 비율, 유리 당(유리 PS), MSD%, 또는 분자량(MALLS)을 포함하여, 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 22F 협막 다당류-단백질 접합체(예, 22F-TT)의 PS/PR 비율은 0.2 내지 1.5, 0.2 내지 0.5, 0.3 내지 0.4, 0.6 내지 1.0, 0.7 내지 0.9, 또는 0.6 내지 0.8일 수 있다. 소정의 구현예에서, 22F 협막 다당류-단백질 접합체(예, 22F-TT)는 40% 이하, 예컨대 2-40 %, 2-20 %, 2-10 %, 5-30 %, 10-25 %, 15-25 %, 17-21%, 또는 약 19%의 유리 PS를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 22F 협막 다당류-단백질 접합체(예, 22F-TT)는 5-60 %, 5-10 %, 5-50 %, 10-50 %, 25-50 %, 40-50 %, 42-46 % 또는 약 44%의 MSD(%)를 갖는다. 소정의 구현예에서, 22F 협막 다당류-단백질 접합체(예, 22F-TT)의 분자량은 약 1,000-6,000 kDa, 2,000-5,000 kDa, 2,500-4,000 kDa, 3,000 to 3,500 kDa, 또는 3,000 내지 3,100 kDa의 범위일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0195] 혈청형 22F에 대해 전술한 파라미터 중 어느 하나가 원하는 대로 조합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 혈청형 22F 다당류-단백질 접합체를 만드는 데 사용된 활성화된 혈청형 22F 다당류는 약 29-31의 Do를 가지며, 단백질(TT) 대 다당류의 반응 비율은 약 1:1이다. 또한, 소정의 구현예에서, 최종 접합체에서의 다당류/담체 단백질 비율(PS/PR)은 약 0.6 내지 0.8이고, 유리 PS는 약 17-21%이고, MSD%는 약 42-46%이고, 임의로 MALLS에 의해 분자량이 약 3,000 내지 3,100 kDa이다.

[0196] **폐렴구균 다당류 혈청형 15B**

[0197] 활성화된 혈청형 15B 협막 다당류는, 예를 들어, 산화제를 이용한 활성화 후 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터를 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 활성화된 혈청형 15B 다당류는 1 내지 15, 5 내지 10, 6 내지 8, 또는 약 7의 산화도를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0198] 혈청형 15B 다당류-단백질 접합체는, 예를 들어, 접합 후 단백질 대 다당류 (PS/PR) 비율, 유리 당(유리 PS), MSD%, 또는 분자량(MALLS)을 포함하여, 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 15B 협막 다당류-단백질 접합체(예, 15B-TT)의 PS/PR 비율은 0.2 내지 1.5, 0.2 내지 0.5, 0.3 내지 0.4, 0.6 내지 1.0, 0.7 내지 0.9, 또는 0.8 내지 1.0일 수 있다. 소정의 구현예에서, 15B 협막 다당류-단백질 접합체(예, 15B-TT)는 30% 이하, 예컨대 2-30 %, 2-20 %, 2-10 %, 5-10 %, 8-10 %, 또는 약 9%의 유리 PS를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 15B 협막 다당류-단백질 접합체(예, 15B-TT)는 50-90 %, 60-85 %, 65-80 %, 70-80 %, 74-78 %, 또는 약 76%의 MSD(%)를 갖는다. 소정의 구현예에서, 15B 협막 다당류-단백질 접합체(예, 15B-TT)의 분자량은 약 2,000-15,000 kDa, 10,000-15,000 kDa, 2,000-10,000 kDa, 3,000 내지 7,500 kDa, 4,000 내지 6,000 kDa, 5,000 내지 6,000 kDa, 또는 5,500 내지 5,600 kDa의 범위일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0199] 혈청형 15B에 대해 전술한 파라미터 중 어느 하나가 원하는 대로 조합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 혈청형 15B 다당류-단백질 접합체를 만드는 데 사용된 활성화된 혈청형 15B 다당류는 약 7.0의 Do를 가지며, 단백질(TT) 대 다당류의 반응 비율은 약 1.25:1이다. 또한, 소정의 구현예에서, 최종 접합체에서의 다당류/담체 단백질 비율(PS/PR)은 약 0.8 내지 1.0이고, 유리 PS는 약 8-10%이고, MSD%는 약 74-78%이고, 임의로 MALLS에 의해 분자량이 약 5,500 내지 5,600이다.

[0200] **폐렴구균 다당류 혈청형 19A**

[0201] 활성화된 혈청형 19A 협막 다당류는, 예를 들어, 산화제를 이용한 활성화 후 산화도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터를 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 활성화된 혈청형 19A 다당류는 20-40, 30-40, 35-40, 30-35, 20-30, 22-28, 24-28, 25-30, 또는 25-27의 산화도를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0202] 혈청형 19A 다당류-단백질 접합체는, 예를 들어, 접합 후 단백질 대 다당류(PS/PR) 비율, 유리 당(유리 PS), MSD(%) 또는 분자량(MALLS)을 포함하여, 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 19A 협막 다당류-단백질 접합체(예, 19A-CRM_{197})의 PS/PR 비율은 0.2 내지 1.5, 0.2 내지 0.5, 0.3 내지 0.4, 0.6 내지 1.0, 0.7 내지 0.9, 또는 0.6 내지 0.8일 수 있다. 소정의 구현예에서, 19A 협막 다당류-단백질 접합체(예,

19A-CRM_{197})는 50% 이하, 예컨대 10-40 %, 15-40 %, 20-40 %, 25-40 %, 25-35 %, 30 내지 40%, 30 내지 35%, 32 내지 34% 또는 약 33%의 유리 PS를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 19A 협막 다당류-단백질 접합체(예, 19A-CRM_{197})는 35-70 %, 40-50 %, 50-7 0%, 60-70 %, 63-68 %, 또는 약 65%의 MSD(%)를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 19A 협막 다당류-단백질 접합체(예, 19A-CRM_{197})의 분자량은 약 2,000-8,000 kDa, 3,500-7,000 kDa, 4,500-6,500 kDa, 5,000 내지 6,500 kDa, 또는 5,250 내지 6,250 kDa의 범위일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0203] 혈청형 19A에 대해 전술한 파라미터 중 어느 하나가 원하는 대로 조합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 혈청형 19A 다당류-단백질 접합체를 만드는 데 사용된 활성화된 혈청형 19A 다당류는 약 25 내지 27의 Do를 가지며, 단백질(CRM_{197}) 대 다당류의 반응 비율은 약 1:1이다. 또한, 소정의 구현예에서, 최종 접합체에서의 다당류/담체 단백질 비율(PS/PR)은 약 0.7이고, 유리 PS는 약 30-35%이고, MSD%는 약 63-68%이고, 임의로 MALLS에 의해 분자량이 약 5,250 내지 6,250이다.

[0204] **폐렴구균 다당류 혈청형 19F**

[0205] 활성화된 혈청형 19F 협막 다당류는, 예를 들어, 산화제를 이용한 활성화 후 산화 정도(Do)를 포함하는 상이한 파라미터를 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 활성화된 혈청형 19F 다당류는 20-50, 30-50, 40-50, 25-35, 20-30, 22-28, 25-30, 23-27, 또는 24-26의 산화도를 가질 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0206] 혈청형 19F 다당류-단백질 접합체는, 예를 들어, 접합 후 단백질 대 다당류(PS/PR) 비율, MSD(%) 또는 유리 당(유리 PS)을 포함하여, 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 19F 협막 다당류-단백질 접합체(예, 19F-CRM_{197})의 PS/PR 비율은 0.2 내지 1.5, 0.2 내지 0.5, 0.3 내지 0.4, 0.6 내지 1.0, 0.7 내지 0.9, 또는 0.6 내지 0.8일 수 있다. 소정의 구현예에서, 혈청형 19F 협막 다당류-단백질 접합체(예, 19F-CRM_{197})는 25-80 %, 35-75 %, 40-60 %, 70-80 %, 75-80%, 또는 약 77%의 MSD(%)를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 19F 협막 다당류-단백질 접합체(예, 19F-CRM_{197})는 30% 이하, 예컨대 2-30 %, 2-20 %, 2-10 %, 2-9 %, 3-7 %, 4-6 %, 또는 약 5%의 유리 PS를 갖는다.

[0207] 혈청형 19F에 대해 전술한 파라미터 중 어느 하나가 원하는 대로 조합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 혈청형 19F 다당류-단백질 접합체를 만드는 데 사용된 활성화된 혈청형 19F 다당류는 약 24 내지 26의 Do를 가지며, 단백질(CRM_{197}) 대 다당류의 반응 비율은 약 1.5:1이다. 또한, 소정의 구현예에서, 최종 접합체에서의 다당류/담체 단백질 비율(PS/PR)은 약 0.7이고, 유리 PS는 약 4-6%이고, MSD%는 약 75-80%이다.

[0208] **폐렴구균 다당류 혈청형 4**

[0209] 혈청형 4 다당류-단백질 접합체는, 예를 들어, 접합 후 단백질 대 다당류 (PS/PR) 비율, 유리 당(유리 PS), MSD%, 또는 분자량(MALLS)을 포함하여, 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 4개의 협막 다당류-단백질 접합체(예, 4-CRM_{197})의 PS/PR 비율은 0.2 내지 1.5, 0.8 내지 1.1, 0.8 내지 1.3, 0.9 내지 1.1, 또는 약 1.0일 수 있다. 소정의 구현예에서, 혈청형 4 협막 다당류-단백질 접합체(예, 4-CRM_{197})는 40% 이하, 예컨대 5-30 %, 15-35 %, 5-15 %, 7-13 %, 9-11 % 또는 약 10%의 유리 PS를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 4 협막 다당류-단백질 접합체(예, 4-CRM_{197})는 40-80 %, 45-75 %, 45-55 %, 60-75 %, 또는 70-75%의 MSD(%)를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 4 협막 다당류-단백질 접합체(예, 4-CRM_{197})의 분자량은 약 500-2,500 kDa, 500-1,000 kDa, 1,000-2,000 kDa, 1,500 내지 2,000 kDa, 1,800 내지 2,000 kDa, 또는 1,850 내지 1,950 kDa의 범위일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0210] 혈청형 4에 대해 전술한 파라미터 중 어느 하나가 원하는 대로 조합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 혈청형 4 다당류-단백질 접합체를 만드는 데 사용된 활성화된 혈청형 4 다당류는 약 1.4의 Do를 가지며, 다당류에 대한 단백질(CRM_{197})의 반응 비율은 약 1.25:1이다. 또한, 소정의 구현예에서, 최종 접합체에서의 다당류/담체 단백질 비율(PS/PR)은 약 1.0이고, 유리 PS는 약 9-11%이고, MSD%는 약 70-75%이고, 임의로 MALLS에 의해 분자량이 약 1,850 내지 1,950이다.

[0211] **폐렴구균 다당류 혈청형 9V**

[0212] 혈청형 9V 다당류-단백질 접합체는, 예를 들어, 접합 후 단백질 대 다당류 (PS/PR) 비율, 유리 당(유리 PS), MSD%, 또는 분자량(MALLS)을 포함하여, 상이한 파라미터들을 특징으로 할 수 있다. 소정의 구현예에서, 9V 협막 다당류-단백질 접합체(예, 9V-CRM_{197})의 PS/PR 비율은 0.2 내지 1.5, 0.2 내지 0.5, 0.3 내지 0.4, 0.8 내지 1.3, 1.0 내지 1.2, 또는 약 1.1일 수 있다. 소정의 구현예에서, 혈청형 9V 협막 다당류-단백질 접합체(예, 9V-CRM_{197})는 35 % 이하, 예컨대 10-35%, 20-35%, 5-15%, 7-13%, 9-11% 또는 약 10%의 유리 PS를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 9V 협막 다당류-단백질 접합체(예, 9V-CRM_{197})는 40-80 %, 45-75 %, 45-60 %, 50-65 %, 55-65, 57-61 %, 또는 약 59%의 MSD(%)를 갖는다. 소정의 구현예에서, 혈청형 9V 협막 다당류-단백질 접합체(예, (9V-CRM_{197}))의 분자량은 약 500-2,000 kDa, 500-1,500 kDa, 1,000-2,000 kDa, 1,000 내지 1,500 kDa, 1,000 내지 1,200 kDa, 또는 1,100 내지 1,200 kDa의 범위일 수 있다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0213] 혈청형 9V에 대해 전술한 파라미터 중 어느 하나가 원하는 대로 조합될 수 있다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 혈청형 9V 다당류-단백질 접합체를 만드는 데 사용된 활성화된 혈청형 9V 다당류는 약 7.4의 Do를 가지며, 단백질(CRM_{197}) 대 다당류의 반응 비율은 약 1.25:1이다. 또한, 소정의 구현예에서, 최종 접합체에서의 다당류/담체 단백질 비율(PS/PR)은 약 1.1이고, 유리 PS는 약 9-11%이고, MSD%는 약 57-61%이고, 임의로 MALLS에 의해 분자량이 약 1,100 내지 1,200이다.

[0214] **다가 폐렴구균 접합체 조성물 및 이의 제조 방법**

[0215] 본 개시내용은 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하는 다가 폐렴구균 접합체 조성물을 제공하고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함한다. 다가 폐렴구균 접합체 조성물의 상이한 측면들 및 구현예들이 본원에 기술된다.

[0216] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 22-27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다.

[0217] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 27개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다. 이러한 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 PCV-27로도 지칭된다.

[0218] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 상기 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 26개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 이루어지고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다. 이러한 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 PCV-26으로도 지칭된다. PCV-26의 소정의 구현예에서, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 중 적어도 하나는 35B이다. PCV-26의 소정의 구현예에서, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B, 및 24F로부터 선택된 4개의 혈청형을 포함하거나 이들로 구성된다. 예를 들어, PCV-26은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 26개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성될 수 있고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커

스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 다음과 같다:

[0219] a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 23A, 및 23B;

[0220] b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 23A, 및 24F;

[0221] c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 23B, 및 24F.

[0222] d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23A, 23B, 및 24F; 또는

[0223] e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23A, 23B, 및 24F

[0224] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 25개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성되고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다. 이러한 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 PCV-25로도 지칭된다. PCV-25의 소정의 구현예에서, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 중 적어도 하나는 35B이다. PCV-25의 소정의 구현예에서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B 및 24F로부터 선택된 3개의 혈청형을 포함하거나 이들로 구성된다. 예를 들어, PCV-25는 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 25개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성될 수 있고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 다음과 같다:

[0225] a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 및 23A;

[0226] b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 및 23B;

[0227] c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 15C, 및 24F;

[0228] d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23A, 및 23B;

[0229] e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23A, 및 24F;

[0230] f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 23B, 및 24F;

[0231] g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23A, 및 23B;

[0232] h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23A, 및 24F;

[0233] i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 23B, 및 24F; 또는

[0234] j) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 23A, 23B, 및 24F.

[0235] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 24개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성되고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다. 이러한 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 PCV-24로도 지칭된다. PCV-24의 소정의 구현예에서, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 중 적어도 하나는 35B이다. PCV-24의 소정의 구현예에서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B 및 24F로부터 선택된 2개의 혈청형을 포함하거나 이들로 구성된다. 예를 들어, PCV-24는 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 24개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성될 수 있고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 다음과 같다:

[0236] a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 및 15C;

[0237] b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A 및 23A;

[0238] c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 및 23B;

[0239] d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15A, 및 24F;

[0240] e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 및 23A;

[0241] f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 및 23B;

[0242] g) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 15C, 및 24F;

[0243] h) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 23A, 및 23B;

[0244] i) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 23A, 및 24F; 또는

[0245] j) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 23B, 및 24F.

[0246] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 23개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성되고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다. 이러한 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 PCV-23으로도 지칭된다. PCV-23의 소정의 구현예에서, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 중 적어도 하나는 35B이다. PCV-23의 소정의 구현예에서 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C,

19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B 및 15A, 15C, 23A, 23B 및 24F로부터 선택된 1개의 혈청형을 포함하거나 이들로 구성된다. 예를 들어, PCV-23는 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 23개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성될 수 있고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 다음과 같다:

[0247] a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 및 15A;

[0248] b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 및 15C;

[0249] c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 및 23A;

[0250] d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 및 23B; 또는

[0251] e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B, 및 24F.

[0252] 일 측면에서, 상기 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 22개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성되고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B로부터 선택된다. 이러한 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 PCV-22로도 지칭된다. 예를 들어, PCV-22는 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하고, 여기서 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 22개의 상이한 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체를 포함하거나 이들로 구성될 수 있고, 여기서 각각의 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 상이한 혈청형 유래의 협막 다당류에 접합된 단백질 담체를 포함하고, 여기서 상기 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형은 다음과 같다:

[0253] a) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 15A;

[0254] b) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 15C;

[0255] c) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 23A;

[0256] d) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 23B;

[0257] e) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 24F; 또는

[0258] f) 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 및 35B.

[0259] 상기 PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26 및 PCV-27 구현예들은 또한 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B 이외에 관심있는 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 2, 12A, 16F, 17F, 20A, 20B, 20F, 31, 45 및 46 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 소정의 구현예에서, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 6C, 6D, 7B, 7C, 18B, 21, 22A, 24B, 27, 28A, 34, 35F, 38, 및 39 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 관심있는 다른 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형이 PCV-22, PCV-23, PCVPCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27 중 어느 하나에 또한 추가될 수도 있다.

[0260] 또한, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, PCV-27의 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 중 하나 이상을 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A,

15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B 이외에 관심있는 하나 이상의 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형으로 교체하는 것도 가능하다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27에서 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B 중 하나 이상이, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 2, 12A, 14, 16F, 20A, 20B, 20F, 31, 45, 및 46 중 하나 이상으로 교체된다. 소정의 구현예에서, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27에서 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B 중 하나 이상이, 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형 6C, 6D, 7B, 7C, 18B, 21, 22A, 24B, 27, 28A, 34, 35F, 38, 및 39 중 하나 이상으로 교체된다. 관심있는 다른 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형이 PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27 중 어느 하나에서 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B 중 하나 이상을 교체하는 데 사용될 수도 있다.

[0261] **담체 단백질**

[0262] 다당류-단백질 접합체 백신에서, 담체 단백질은 다당류 항원에 접합되어 당접합체를 형성한다. 담체 단백질은 다당류 항원에 대한 면역 반응(예, 항체 반응)을 향상시키는 데 도움을 준다. 담체 단백질은 표준 접합 절차를 사용하여 폐렴구균 다당류와의 접합할 수 있어야 한다.

[0263] 당접합체에 사용될 수 있는 운반체 단백질에는, 이들에만 한정되는 것은 아니지만, DT(디프테리아 변이독소), TT(파상풍 변이독소), TT의 단편 C, CRM_{197} (야생형 디프테리아 독소의 면역학적 특성을 보유하는 디프테리아 독소의 유전적으로 유래된 비독성 변이체), 기타 유전적으로 유래된 디프테리아 독소 변이체(예를 들어, CRM176, CRM228, CRM45(Uchida 등 (1973) *J. Biol. Chem.* 218:3838-3844), CRM9, CRM102, CRM103 또는 CRM107; 및 in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Marcel Dekker Inc. (1992)에서 Nicholls 및 Youle이 기술한 기타 돌연변이; Glu-148의 Asp, Gln 또는 Ser로 및/또는 Ala 158의 Gly로의 결실 또는 돌연변이 및 미국 특허 제4,709,017호 및 제4,950,740호에 개시된 기타 돌연변이; 적어도 하나 이상의 잔기 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및/또는 Lys 534의 돌연변이 및 미국 특허 제5,917,017호 및 제6,455,673호에 개시된 기타 돌연변이; 또는 미국 특허 제5,843,711호에 개시된 단편, 몇몇 방식으로 무독화된 ply를 포함하는 폐렴구균 뉴몰리신(pneumococcal pneumolysin, ply) (Kuo 등의 (1995) *Infect Immun* 63:2706-2713), 예를 들어 dPLY-GMBS (WO 2004/081515, WO 2006/032499) 또는 dPLY-formol, PhtX, PhtA, PhtB, PhtD, PhtE (PhtA, PhtB, PhtD 또는 PhtE의 서열은 WO 00/37105 및 WO 00/39299에 개시됨)을 비롯한, PhtX 및 Pht 단백질들의 융합, 예를 들어, PhtDE 융합, PhtBE 융합, Pht A-E (WO 01/98334, WO 03/054007, WO 2009/000826), OMPC(수막구균 외막 단백질), (이는 일반적으로 나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 혈청군 B로부터 추출됨(EP0372501)), PorB N. 메닌지티디스(*N. meningitidis*) 유래), PD 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*) 단백질 D; 예를 들어, EP0594610 B 참조), 또는 이의 면역학적 기능적 등가물, 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), 다양한 병원균 유래 항원으로부터의 다수의 인간 CD4+ T 세포 에피토프를 포함하는 인공 단백질 (Falugi 등 (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824), 예컨대 N19 단백질(Baraldoi 등 (2004) *Infect Immun* 72:4884-4887) 폐렴구균 표면 단백질 PspA(WO 02/091998), 철 흡수 단백질(WO 01/72337), 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*)의 독소 A 또는 B(WO 00/61761), 트랜스페린 결합 단백질, 폐렴구균 부착 단백질(PsaA), 재조합 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 엑소독소 A(특히 이의 비독성 돌연변이체 (예컨대 글루탐산 553에서 치환을 지닌 엑소독소 A (Douglas 등 (1987) *J. Bacteriol.* 169(11):4967-4971)). 기타 단백질, 예컨대 오브알부민, 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 소 혈청 알부민(BSA) 또는 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD)도 담체 단백질로서 사용될 수 있다. 기타 적절한 담체 단백질은 불활성화된 세균 독소, 예컨대 콜레라 변이독소(예를 들어, WO 2004/083251에 기술된 바와 같음), 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*) LT, E. 콜리(*E. coli*) ST, 및 P. 애루기노사(*P. aeruginosa*) 유래의 엑소독소 A를 포함하며, 이의 면역학적 기능적 등가물도 본 발명의 담체 단백질로서 사용될 수 있다. 각각의 담체 단백질이 본 명세서에서 지칭될 때, 이들은 그 면역학적 기능적 등가물을 포함하는 것으로 이해된다.

[0264] 소정의 구현예에서, 당접합체의 담체 단백질은 TT(TT의 단편 C를 포함함), DT(CRM_{197} 및 전술한 다른 것들과 같은 DT 변이체를 포함함), PD, PhtX, PhtD, PhtDE 융합(특히 WO 01/98334 및 WO 03/054007에 개시된 것들), 무독화된 뉴몰리신, PorB, N19 단백질, PspA, OMPC, 클로스트리듐 디피실의 독소 A 또는 B, 및 PsaA으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 각각의 담체 단백질이 본 명세서에서 지칭될 때, 이들은 그 면역학적 기능적 등가물을 포

함하는 것으로 이해된다. 해당 분야 숙련자라면, 예를 들어, 전술한 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 이의 면역학적으로 기능적 등가물인 DT 돌연변이체가 본 명세서에서 DT를 지칭할 때에도 포함된다는 것을 이해할 것이다.

[0265] 소정의 구현예에서, 당접합체의 담체 단백질은 DT(디프테리아 변이독소), CRM_{197}, TT(파상풍 변이독소), TT의 단편 C 및 PD (헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)의 단백질 D)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0266] 일 구현예에서, 본 발명의 당접합체의 담체 단백질은 DT(디프테리아 변이독소)일 수 있다. 자연적으로 발생하는 또는 야생형 디프테리아 독소는 ATCC을 포함하는 다양한 공공 공급원으로부터 이용 가능한 독소-생산 균주로부터 수득될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 DT(디프테리아 변이독소)는 이의 기능적 등가물로서 기능하는 모든 DT 변이체를 포함하는 것을 의미한다. 이러한 DT 돌연변이체는, 예를 들어, CRM176, CRM228, CRM45, CRM9, CRM102, CRM103 또는 CRM107; 야생형 DT와 비교하여 Glu148의 Asp로의 돌연변이 또는 결실(미국 특허 제4,709,017호에 개시됨); Glu148의 Asp로의 결실 또는 돌연변이, 미국 특허 제4,709,017호 및 제4,950,740호에 개시된 Ala158의 Asp로의 결실 또는 돌연변이; 미국 특허 제5,917,017호에 개시된 Lys 516, Lys 526, Phe 530 및 Lys 534로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나 이상의 잔기의 돌연변이 및 미국 특허 제6,455,673호; 또는 미국 특허 제5,843,711호 등에 개시된 Glu148, Glu349, Lys516 또는/및 Phe530의 돌연변이를 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 단리된 협막 당류는 CRM_{197} 단백질에 접합된다. CRM_{197} 단백질은 야생형 디프테리아 독소의 면역학적 특성을 보유하는 비독성 형태의 디프테리아 독소이다. CRM_{197}은 독소생성 코리네파지 베타의 니트로소구아니딘 돌연변이유발에 의해 생성된-비독성생성 파지 β*197*독소에 의해 감염된 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*)에 의해 생산된다(Uchida 등 (1971) *Nature New Biology* 233:8-11). CRM_{197} 단백질은 디프테리아 독소와 동일한 분자량을 가지지만, 구조 유전자에서 단일 염기 변화(구아닌에서 아데닌으로)에 의해 그와 다르다. 이러한 단일 염기 변화는 성숙한 단백질에서 아미노산 치환(글리신에 대해 글루탐산으로)을 유발하고, 디프테리아 독소의 독성 특성을 제거한다. CRM_{197} 단백질은 당류에 대한 안전하고 효과적인 T-세포 의존성 담체이다. CRM_{197} 및 이의 생산에 대한 더 상세한 내용은, 예를 들어, 미국 특허 제5,614,382호에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0267] 또 다른 구현예에서, 당접합체의 담체 단백질은 TT(파상풍 변이독소)이다. 파상풍 변이독소는 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)에 의해 유발되는 파상풍(또는 lockjaw)에 대한 대규모 면역화를 위해 전세계적으로 제조되고 사용된다. 파상풍 변이독소는 또한 단독으로 및 디프테리아 및/또는 백일해 백신과 조합하여 사용된다. 부모 단백질인, 파상풍 독소는 일반적으로 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*)의 배양물에서 수득된다. 파상풍 독소는 약 150 kDa의 단백질이며, 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 서브유닛(약 100 kDa 및 약 50 kDa)으로 구성된다. 독소는 일반적으로 포름알데히드로 해독되고, 공지된 방법들, 예컨대 황산암모늄 침전(예를 들어, Levin 및 Stone, *J. Immunol.*, 67:235-242 (1951); W.H.O. Manual for the Production and Control of Vaccines: Tetanus Toxoid, 1977 (BLG/UNDP/77.2 Rev.I.)) 또는 예를 들어, WO 1996/025425에 개시된, 크로마토그래피 기법을 사용하여 배양 여과물로부터 정제 가능하다. 파상풍 독소는 또한 재조합 유전자 수단에 의해 불활성화될 수 있다.

[0268] 또 다른 구현예에서, 당접합체의 담체 단백질은 PD (헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)의 단백질 D; 예를 들어, EP 0594610B 참조)일 수 있다.

[0269] 소정의 구현예에서, 단일 담체 단백질이 다가 폐렴구균 접합체 조성물에 사용된다. 소정의 구현예에서, 둘 이상의 단백질 담체("혼합 담체")가 사용된다. 이들 혼합 담체 구현예에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 그 이상의 담체 단백질이 사용될 수 있다. 일반적으로, 혼합 담체 구현예는 2개의 담체 단백질을 포함한다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 소정의 협막 다당류는 제1 단백질 담체에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 제2 단백질 담체에 부착된다.

[0270] 일 측면에서, 제1 단백질 담체는 CRM_{197}이고 제2 단백질 담체는 파상풍 변이독소다. 소정의 구현예에서, 협막 다당류 중 2개는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합된 2개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3 및 5로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, 협막 다당류 중 4개는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합된 4개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 5, 15B, 및 22F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합된 4개의 협막 다당류는 혈청형 1, 5, 15B, 및 22F; 혈청

형 1, 3, 15B, 및 22F; 또는 혈청형 3, 5, 15B, 및 22F이다.

[0271] PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27의 일부 구현예에서, 혈청형 1 및 5 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 혈청형 유래의 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27의 또 다른 구현예에서, 혈청형 1 및 3 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27의 또 다른 구현예에서, 혈청형 3 및 5 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27의 또 다른 구현예에서, 혈청형 1, 5, 15B, 및 22F 유래의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27의 또 다른 구현예에서, 혈청형 1, 3, 15B, 및 22F의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다. PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27의 또 다른 구현예에서, 혈청형 3, 5, 15B, 및 22F의 협막 다당류는 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 협막 다당류는 CRM_{197}에 접합된다.

[0272] 본원에 기술된 조성물 및 백신에 사용된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류를 포함하는, 폐렴구균 협막 다당류는, 예를 들어, WO 2006/110381, WO 2008/118752, WO 2006/110352, 및 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0228380, 2006/0228381, 2007/0184071, 2007/0184072, 2007/0231340, 2008/0102498 및 2008/0286838에 개시된 것을 비롯하여, 해당 분야 숙련자에게 공지된 표준 기술을 포함하는, 임의의 이용 가능한 기술을 사용하여 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)로부터 제조될 수 있으며, 이들 모두는 그 전체가 참조로서 통합된다. 예를 들어, 각각의 폐렴구균 협막 다당류 혈청형은 배양 배지(예를 들어, 대두계 배지)에서 성장될 수 있다. 세포를 용해시키고, 개별 다당류를 원심분리, 침전, 한외여과 및/또는 컬럼 크로마토그래피를 통해 용해물로부터 정제할 수 있다. 또한, 폐렴구균 협막 올리고당이 합성 프로토콜을 사용하여 생산될 수 있다.

[0273] 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)의 협막 다당류는 최대 8개의 당 잔기를 함유할 수 있는, 반복 올리고당 단위를 포함한다. 협막 당류 항원은 전장 다당류일 수 있거나, 크기가 감소될 수도 있다(예를 들어, 단일 올리고당 단위, 또는 반복 올리고당 단위의 천연 길이 당류 사슬보다 짧음). 협막 다당류의 크기는 해당 기술분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 산 가수분해 처리, 과산화수소 처리, 고압 균질화기에 의한 크기조정에 이어서, 선택적으로 과산화수소 처리에 의해 감소되어 올리고당 단편을 생성하거나, 미세유체화할 수 있다. 소정의 구현예에서, 정제된 협막 다당류를 산화제와 반응시켜 활성화된 협막 다당류를 생산하기 전에, 정제된 협막 다당류가 산 가수분해 처리 또는 미세유체화와 같은 크기조절 단계를 거쳐 그 크기를 감소시킨다. 소정의 구현예에서, 정제된 협막 다당류를 산화제와 반응시켜 활성화된 협막 다당류를 생성하기 전에, 협막 다당류는 산 가수분해 처리 또는 미세유체화와 같은 크기조절 단계를 거치지 않는다.

[0274] 각각의 혈청형의 폐렴구균 접합체는 각각의 혈청형의 협막 다당류를 담체 단백질에 접합시킴으로써 제조될 수 있다. 상이한 폐렴구균 접합체는 단일 투여량 제형을 포함하는, 조성물로 제형화될 수 있다.

[0275] **협막 다당류의 활성화**

[0276] 다당류-단백질 접합체를 제조하기 위해, 각각의 폐렴구균 혈청형으로부터 제조된 협막 다당류는, 협막 다당류가 담체 단백질과 반응할 수 있도록 화학적으로 활성화될 수 있다. 일단 활성화되면, 각각의 협막 다당류는 담체 단백질에 별도로 접합되어 당접합체를 형성할 수 있다. 다당류의 화학적 활성화 및 담체 단백질에 대한 후속 접합은 종래의 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0277] 예를 들어, 협막 다당류의 말단에 있는 인접 히드록실기는, 예를 들어, 미국 특허 번호 4, 365,170, 4,673,574 및 4,902,506에 개시된 바와 같이, 산화제 예컨대 (과요오드산나트륨, 과요오드산칼륨, 또는 과요오드산을 포함한) 과요오드산염에 의해 알데히드기로 산화될 수 있으며, 이 문헌들은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 과요오드산염은 탄수화물의 인접 히드록실기를 무작위로 산화시켜 반응성 알데히드기를 형성하고, C-C 결합의 절단을 야기한다. 용어 "과요오드산염"은 과요오드산염 및 과요오드산을 모두 포함한다. 이 용어는 또한 메타과요오드산염(IO_4^-) 및 오르토과요오드산염(IO_6^{5-})를 모두 포함한다. 용어 "과요오드산염"은 또한 과요오드산나트륨 및 과요오드산칼륨을 포함하는 다양한 과요오드산 염을 포함한다. 소정의 구현예에서, 다당류는 메타과요오드산나트륨의 존재 시에 산화될 수 있다.

[0278] 소정의 구현예에서, 과요오드산염은 다당류 1 μg 당 약 0.03-0.17 μg의 양으로 사용될 수 있다. 소정의 구현예에서, 과요오드산염은 다당류 1 μg 당 약 0.025-0.18 μg 또는 약 0.02-0.19 μg의 양으로 사용될 수 있다. 당류는 상기 범위 내에서 원하는 대로 활성화될 수 있다. 범위를 벗어나면, 효과가 만족스럽지 않을 수 있다.

[0279] 다당류는 또한 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화되어 시아네이트 에스테르를 형성할 수 있다. 그런 다음, 활성화된 다당류는 직접 또는 스페이서 또는 링커기를 통해 담체 단백질 상의 아미노기에 결합된다.

[0280] 예를 들어, 스페이서는, (예를 들어, N-[y-말레이미도부티릴옥시]숙신이미드 에스테르(GMBS)를 사용하는) 말레이미드-활성화 담체 단백질 또는 (예를 들어, 요오드아세트이미드, N-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA; SIB), N-숙신이미딜(4-요오드아세틸)아미노벤조에이트(SIAB), 설포숙신이미딜(4-요오드아세틸)아미노벤조에이트(설포-SIAB), N-숙신이미딜 요오드아세테이트(SIA) 또는 숙신이미딜 3-[브로모아세트아미도]프로프리오네이트(SBAP)를 사용하는) 할로아세틸화된 담체 단백질과의 반응 후에 수득된 티오에테르 연결을 통해 담체에 결합될 수 있는 티올화된 다당류를 얻기 위해 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 바람직하게는, 시아네이트 에스테르(선택적으로 COAP 화학에 의해 제조됨)는 헥산 디아민 또는 아디프산 디하이드라지드(AOH)와 결합되고, 아미노-유도체화된 당류는 단백질 담체 상의 카르복실기를 통해 카르보디이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 담체 단백질에 접합된다. 이러한 접합체는, 예를 들어, WO 93/15760, WO 95/08348 및 WO 96/129094에 기술되어 있으며, 이들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0281] 활성화 단계 후, 활성화된 다당류를 담체 단백질과 혼합하기 전에 활성화된 협막 다당류는 선택적으로 동결건조된다. 활성화된 다당류 및 담체 단백질은 개별적으로 동결건조될 수 있거나, 서로 합쳐진 다음 동결건조될 수도 있다.

[0282] 활성화된 협막 다당류는 당류와 같은, 임의의 동결보호제의 존재 시에 동결건조될 수도 있다. 예를 들어, 당류는 수크로오스, 트레할로스, 라피노오스, 스타키오스, 멜레지토오스, 덱스트란, 만니톨, 락티톨 및 팔라티니트로부터 선택될 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 소정의 구현예에서, 당류는 수크로오스이다. 그런 다음, 동결건조된 다당류는 접합 반응 전에 용매에 재현탁된다. 동결건조된 활성화된 협막 다당류는 담체 단백질을 포함하는 용액과 혼합될 수 있다. 대안적으로, 공동-동결건조된 다당류 및 담체 단백질은 접합 반응 전에 용매에 재현탁된다.

[0283] **담체 단백질에 대한 활성화된 협막 다당류의 접합**

[0284] 활성화된 협막 다당류와 담체 단백질의 접합은, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0228380, 2007/0231340, 2007/0184071 및 2007/0184072, WO 2006/110381, WO 2008/079653, 및 WO 2008/143709에 기술된 바와 같이, 예를 들어, 환원성 아민화로 달성될 수 있고, 이 문헌들 모두는 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 예를 들어, 활성화된 협막 다당류 및 담체 단백질은 환원제와 반응하여 접합체를 형성할 수 있다. 적합한 환원제는 시아노수소화붕소 나트륨, 보란-피리딘, 트리아세톡시수소화붕소 나트륨, 나트륨 또는 수소화붕소, 또는 수소화붕소 교환 수지와 같은, 수소화붕소를 포함한다. 환원 반응 종료 시, 접합체에 미반응 알데히드기가 남아있을 수도 있다. 미반응된 알데히드기는 수소화붕소 나트륨($NaBH_4$)과 같은, 적절한 캡핑제를 사용하여 캡핑될 수 있다. 일 구현예에서, 환원 반응은 수성 용매 중에서 수행된다. 또 다른 구현예에서, 반응은 비양성자성 용매 중에서 수행된다. 일 구현예에서, 환원 반응은 DMSO(디메틸설폭시드) 또는 DMF(디메틸포름아미드) 용매 중에서 수행된다. 다른 가능한 환원제는 아민-보란, 예컨대 피리딘-보란, 2-피콜린-보란, 2,6-디보란-메탄올, 디메틸아민-보란, t-BuMeiPrN-BH3, 벤질아민-BH3 또는 5-에틸-2-메틸피리딘-보란(PEMB)을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0285] 활성화된 협막 다당류는 담체 단백질에 직접 접합되거나, 스페이서 또는 링커, 예컨대 이기능성 링커의 사용을 통해 간접적으로 접합될 수 있다. 링커는 선택적으로 이종이기능성 또는 동종이기능성이며, 이들은 예를 들어 반응성 아미노기 및 반응성 카르복실산기, 2개의 반응성 아미노기 또는 2개의 반응성 카르복실산기를 갖는다.

[0286] 접합을 위한 다른 적절한 기술은, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 98/42721에 기술된 바와 같이, 카르보디이미드, 히드라지드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC, TSTU를 사용하며, 이는 그 전체가 참조로서 통합된다. 접합에는, 당류의 유리 히드록실기와 1,1'-카르보닐디이미다졸(CDI)의 반응에 의해 형성될 수 있는 카르보닐 링커(Bethell 등의 (1979) *J. Biol. Chem.* 254:2572-2574; Hearn 등의 (1981) *J. Chromatogr.* 218:509-518)에 이어서 단백질과 반응하여 카르바메이트 연결을 형성하는 것이 관여할 수 있다. 이는 아노머 말단의 일차 히드록실기로의 환원, 선택적인 일차 히드록실기의

보호/탈보호, CDI와 일차 히드록실기의 반응으로 CDI 카르바메이트 중간체를 형성하고, CDI 카르바메이트 중간체를 단백질 상의 아미노기와 결합시키는 것이 관여할 수 있다.

[0287] 폐렴구균 접합체 백신에 대한 다당류 대 담체 단백질의 비율은 일반적으로 0.3-3.0(w/w)의 범위이지만 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 비율은 존재하는 단백질 및 다당류의 양에 대한 독립적인 측정에 의해, 또는 해당 기술분야에 공지된 비율의 직접적인 측정을 제공하는 방법에 의해 결정될 수 있다. 이중 모니터링(예: 총 물질 및 단백질 함량에 대해 각각 굴절 지수 및 UV)을 갖는 ^{1}H NMR 분광법 또는 SEC-HPLC-UV/RI를 포함하는 방법은, 접합체의 크기 분포에 대해 당류/단백질 비율을 프로파일링할 수 있을 뿐만 아니라, SEC-HPLC-MALLS 또는 MALDI-TOF-MS에 의해서도 프로파일링할 수 있다.

[0288] 이에 따라 수득된 다당류-단백질 접합체는 다양한 방법에 의해 정제되고 농축될 수 있다. 이들 방법은 농축/정용여과, 컬럼 크로마토그래피 및 심층 여과를 포함한다. 정제된 다당류-단백질 접합체를 조합하여 백신으로서 사용될 수 있는 다가 폐렴구균 접합체 조성물을 제형화한다.

[0289] **제형**

[0290] 백신 조성물의 제형화는 해당 기술분야에서 인정된 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 백신 조성물은 의도된 투여 경로와 양립할 수 있도록 제형화된다. 개별 폐렴구균 협막 다당류-단백질 접합체는 생리학적으로 허용 가능한 비히클과 함께 제형화되어 조성물을 제조할 수 있다. 이러한 비히클의 예는 물, 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 덱스트로스 용액을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0291] 일부 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 아쥬반트를 추가로 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "아쥬반트(adjuvant)"는 항원에 대한 면역 반응을 비-특이적으로 향상시키는 물질 또는 비히클을 지칭한다. 아쥬반트는 다음을 포함할 수 있지만 이들에 한정되지 않는다:

[0292] (1) 알루미늄 염(alum), 예컨대 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 황산알루미늄, 황산알루미늄 하이드록시 인산염 등;

[0293] (2) 수중유 유화액 제형(무라밀 펩티드(아래에 정의됨) 또는 세균 세포벽 성분과 같은 다른 특이적 면역자극제의 포함 또는 불포함), 예컨대, 예를 들어, (a) Model 110Y 미세유동화기(Microfluidics, 매사추세츠주 뉴턴)와 같은 미세유동화기를 이용하여 서브미크론 입자로 제형화된 5% 스쿠알렌, 0.5% Tween 80, 및 0.5% Span 85를 함유한 (필수는 아니지만, 선택적으로 다양한 양의 MTP-PE를 함유함 (아래 참조)), MF59 (WO 90/14837), (b) 서브미크론 유화액으로 미세유동화되거나 더 큰 입자 크기 유화액을 생성하기 위해 볼텍싱된, 10% 스쿠알렌, 0.4% Tween 80, 5% 플루로닉-차단 고분자 L121, 및 thr-MDP(아래 참조)를 함유한, SAF, 및 (c) 2% 스쿠알렌, 0.2% Tween 80, 및 미국 특허 번호 4,912,094(Corixa)에 기술된 3-O-탈아실화된 모노인지질 A (MPL™), 트레할로오스 디미콜레이트(TDM), 및 세포벽 골격(CWS), 바람직하게는 MPL+CWS(Detox™)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세균 세포벽 성분;

[0294] (3) 사포닌 아쥬반트, 예컨대 Quil A 또는 STIMULON™ QS-21(Antigenics, 매사추세츠주 프라밍햄) (미국 특허 번호 5,057,540) 또는 이로부터 생성된 입자, 예컨대 ISCOM(면역자극 복합체);

[0295] (4) 세균성 지질다당류, 합성 지질 A 유사체, 예컨대 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물(AGP), 또는 그 유도체 또는 유사체, 코릭사로부터 입수 가능하며, 미국 특허 번호 6,113,918에 기술되어 있음; 하나의 이러한 AGP는 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노이]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코피라노시드이며, 이는 또한 529로도 알려져 있으며(이전에 RC529로 알려져 있음), 이는 수성 형태 또는 안정한 유화액으로서 제형화됨,

[0296] (5) 합성 폴리뉴클레오티드, 예컨대 CpG 모티프(들)를 함유하는 올리고뉴클레오티드 (미국 특허 번호 6,207,646);

[0297] (6) 사이토카인, 예컨대 인터루킨 (예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 등), 인터페론 (예를 들어, 감마 인터페론), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 대식세포 콜로니 자극 인자 (M-CSF), 종양 괴사 인자 (TNF), 공자극 분자 B7-1 및 B7-2 등;

[0298] (7) 세균 ADP-리보실화 독소의 해독된 돌연변이체, 예컨대, 야생형 또는 돌연변이체 형태의 콜레라 독소(CT), 예를 들어, 여기에서 WO 00/18434(또한 WO 02/098368 및 WO 02/098369 참조)에 따라, 아미노산 위치 29에서의

글루탐산은 다른 아미노산, 바람직하게는 히스티딘으로 대체됨, 백일해 독소 (LT), 특히 LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129 (예를 들어, WO 93/13302 및 WO 92/19265 참조); 및

[0299] (8) 보체 성분, 예컨대 보체 성분 C3d의 삼량체;

[0300] (9) 생물학적 분자, 예컨대 지질 및 공자극 분자. 예시적인 생물학적 아쥬반트는 AS04, IL-2, RANTES, GM-CSF, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, LFA-3, CD72, B7-1, B7-2, OX-40L 및 41 BBL을 포함한다.

[0301] 무라밀 펩티드는 N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-MDP), N-아세틸-노르무라밀-L-알라닌-2-(1'-2' 디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민(MTP-PE) 등을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0302] 아쥬반트는 조성물 중 접합체의 양과 원자가에 따라 적절히 선택된다. 일부 구현예에서, 아쥬반트는 알루미늄계 아쥬반트다. 알루미늄 기반 아쥬반트를 사용하는 경우, 알루미늄 원소에 기초한 조성물 중의 알루미늄 원소는 0.01 mg/mL 내지 1 mg/mL를 포함하도록 첨가될 수 있다. 일반적으로, 0.5 ml의 단일 백신 투여량은 약 0.1 mg 내지 2.5 mg의 알루미늄계 아쥬반트를 함유하도록 제형화된다. 다른 구현예에서, 0.5 ml의 단일 백신 투여량은 0.1 mg 내지 2 mg, 0.1 mg 내지 1 mg, 0.1 mg 내지 0.5 mg, 0.1 mg 내지 0.2 mg, 0.125 mg 내지 2.5 mg, 0.125 mg 내지 0.5 mg, 0.125 mg 내지 0.2 mg 또는 0.125 mg 내지 0.25 mg의 알루미늄계 아쥬반트를 함유하도록 제형화된다. 소정의 구현예에서, 0.5 ml의 단일 백신 투여량은 약 0.125 mg 내지 약 0.250 mg의 알루미늄계 아쥬반트를 함유하도록 제형화된다. 소정의 구현예에서, 0.5 ml의 단일 백신 투여량은 약 0.125 mg의 알루미늄계 아쥬반트를 함유하도록 제형화된다. 소정의 구현예에서, 0.5 ml의 단일 백신 투여량은 약 0.250 mg의 알루미늄계 아쥬반트를 함유하도록 제형화된다.

[0303] 소정의 구현예에서, 아쥬반트는 인산알루미늄, 황산알루미늄, 및 수산화알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0304] 소정의 구현예에서, 아쥬반트는 인산알루미늄이다.

[0305] 일부 구현예에서, 조성물은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcuspneumoniae*)의 감염에 대한 백신으로서 사용하기 위한 것이다.

[0306] **폐렴구균 협막 다당류-단백질 담체 접합체의 특성 분석**

[0307] 소정의 구현예에서, 다당류-단백질 담체 접합체는 100-10,000 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 소정의 구현예에서, 접합체는 200-9,000 kDa의 분자량을 갖는다. 소정의 구현예에서, 접합체는 300-8,000 kDa의 분자량을 갖는다. 소정의 구현예에서, 접합체는 400-7,000 kDa의 분자량을 갖는다. 소정의 구현예에서, 접합체는 500-6,000 kDa의 분자량을 갖는다. 소정의 구현예에서, 접합체는 600-5,000 kDa의 분자량을 갖는다. 소정의 구현예에서, 접합체는 500-4,000 kDa 분자량을 갖는다. 상기 범위 중 어느 하나 이내의 임의의 정수가 본 개시의 구현예로서 고려된다.

[0308] 분자량이 상기 범위 내에 있는 경우, 접합체는 높은 수율로 안정적으로 형성될 수 있다. 또한, 유리 다당류의 비율이 감소될 수 있다. 또한, 상기 분자량 범위 내에서 우수한 면역원성이 달성될 수 있다.

[0309] 개별 다당류-단백질 접합체를 정제한 후, 이들을 화합하여 본 개시의 면역원성 조성물을 형성한다.

[0310] 본 개시의 혈청형의 당류-단백질 접합체는 다당류 대 단백질 담체의 비율(다당류의 양/단백질 담체의 양, w/w)을 특징으로 할 수 있다.

[0311] 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형에 대한 다당류-단백질 담체 접합체에서 다당류 대 단백질 담체의 비율(w/w)은 0.5-2.5, 0.4-2.3, 0.3-2.1, 0.24-2, 0.2-1.8, 0.18-1.6, 0.16-1.4, 0.14-1.2, 0.12-1, 0.1-1, 0.4-1.3, 0.5-1, 또는 0.7-0.9 (예를 들어, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 약 2.0, 약 2.1, 약 2.2, 약 2.3, 약 2.4 또는 약 2.5)이다.

[0312] 다당류 대 단백질 담체의 비율이 상기 범위 내에 있는 경우, 접합체는 높은 수율로 안정적으로 형성될 수 있다. 또한, 유리 다당류의 비율이 감소될 수 있다. 또한, 우수한 면역원성이 달성될 수 있고, 접합체는 상기 범위 내에서 다른 혈청형에 의한 간섭 없이 안정적으로 유지될 수 있다.

[0313] 본 개시의 접합체 및 면역원성 조성물은 단백질 담체에 공유 접합되지는 않지만 그럼에도 다당류-단백질 담체 접합체 조성물에 존재하는 유리 다당류를 함유할 수 있다. 유리 다당류는 다당류-단백질 담체 접합체와 비공유

결합될 수 있다(즉, 다당류-단백질 담체 접합체에 비공유 결합하거나, 이에 흡착되거나, 또는 이에 의해 포착됨).

[0314] 소정의 구현예에서, 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 60%, 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% 또는 15% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로, 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 60% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 50% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 40% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로, 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 30% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 25% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 20% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 15% 미만을 함유한다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 각각의 혈청형의 다당류의 총량을 기준으로 각각의 혈청형의 유리 다당류의 약 10% 미만을 함유한다.

[0315] 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체는 또한 분자 크기 분포(K_d)를 특징으로 할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피 배지(CL-4B; 가교 결합된 아가로오스 비드, 4%)를 사용해 접합체의 상대 분자 크기 분포를 결정할 수 있다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 중력 공급식 컬럼에서 접합체의 분자 크기 분포를 프로파일링하기 위해 사용된다. 배지 내의 기공으로부터 배제된 큰 분자는 작은 분자보다 더 신속하게 용리된다. 분별 수집기를 사용하여 컬럼 용리물을 수집한다. 분획을 당류 검정에 의해 비색계로 시험한다. K_d의 결정을 위해, 컬럼을 보정하여 분자가 완전히 배제되는 분획(V_0; $K_d = 0$) 및 최대 보유를 나타내는 분획(V_i; $K_d = 1$)을 확립한다. 특정 샘플 속성에 도달하는 분율(V_e)은 식 $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$에 의해 K_d에 관련된다.

[0316] 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체의 적어도 15%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d를 가질 수 있다.

[0317] 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체의 적어도 20%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d를 가질 수 있다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체의 적어도 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d를 가질 수 있다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체의 적어도 60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d를 가질 수 있다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체의 적어도 50-80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d를 가질 수 있다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 다당류-단백질 담체 접합체의 적어도 65-80%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d를 가질 수 있다. 소정의 구현예에서, 각각의 혈청형의 당류-단백질 접합체의 적어도 15-60%는 CL-4B 컬럼에서 0.3 이하의 K_d를 가질 수 있다.

[0318] **예방적 방법 및 용도**

[0319] 일 측면에서, 본 개시내용은 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27) 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 백신을 제공한다. 일부 구현예에서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 적어도 완충액, 예컨대 숙시네이트 완충액, 염, 예컨대 염화나트륨, 및/또는 표면 활성제, 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(예: 폴리소르베이트 80)를 포함한다.

[0320] 일부 구현예에서, 백신은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcuspneumoniae*) 감염에 의해 야기된 질환에 대해 인간 대상체에서 보호성 면역 반응을 유도한다.

[0321] 추가 측면에 따르면, 본 개시내용은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 감염 또는 질환의 예방을 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 인간 대상체에게 예방적 유효량의 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27) 또는 이를 포함하는 백신을 투여하는 단계를

포함한다. 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27) 또는 이를 포함하는 백신은, 예를 들어, 이하에서 더 상세히 설명되는 바와 같이, 전신 또는 점막 경로를 포함하는, 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0322] 소정의 구현예에서, 인간 대상체는 고령 대상체이고, 질환은 폐렴 또는 침습성 폐렴구균 질환(IPD)이다. 소정의 구현예에서, 고령 대상체는 적어도 50세이다. 다른 구현예에서, 고령 대상체는 적어도 55세이다. 또 다른 구현예에서, 고령 대상체는 적어도 60세이다.

[0323] 다른 구현예에서, 인간 대상체는 영유아이고, 질환은 폐렴, 침습성 폐렴구균 질환(IPD), 또는 급성 중이염(AOM)이다. 소정의 구현예에서, 영유아는 0-2세이다. 다른 구현예에서, 영유아는 2 내지 15개월이다.

[0324] 또 다른 구현예에서, 인간 대상체는 6주 내지 17세이고, 질환은 폐렴, 침습성 폐렴구균 질환(IPD) 또는 급성 중이염(AOM)이다. 소정의 구현예에서, 인간 대상체는 6주 내지 5세이다. 다른 구현예에서, 인간 대상체는 5 내지 17세이다.

[0325] 각각의 백신 투여량에서의 접합체의 양 또는 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물의 예방적 유효량은, 유의한 부작용 없이 예방을 유도하는 양으로 선택될 수 있다. 이러한 양은 폐렴구균 혈청형에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로, 각각의 투여량은 약 0.1 μg 내지 약 100 μg의 다당류, 구체적으로는 약 0.1 내지 10 μg, 보다 구체적으로는 약 1 μg 내지 약 5 μg를 포함할 수 있다. 특정 백신에 대한 최적의 성분의 양은 대상체에서 적절한 면역 반응의 관찰을 포함하는 표준 연구에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 인간 대상체의 백신접종을 위한 양은 동물 시험 결과를 외삽하여 결정될 수 있다. 또한, 투여량은 경험적으로 결정될 수 있다.

[0326] 일부 구현예에서, 백신 또는 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 약 1 μg 내지 약 5 μg의 각 협막 다당류; 약 20 μg 내지 약 85 μg의 담체 단백질(예, CRM_{197}); 및 선택적으로 약 0.1 mg 내지 약 0.5 mg의 알루미늄 원소 아쥬반트를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다. 일부 구현예에서, 백신 또는 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 (약 4 μg 내지 약 5 μg의 양으로 존재하는) 혈청형 6B 및 임의로 혈청형 3을 제외하고 약 2 μg 내지 약 2.5 μg의 각 협막 다당류; 약 40 μg 내지 약 75 μg의 단백질 담체(예, CRM_{197}); 및 선택적으로 약 0.1 mg 내지 약 0.25 mg의 알루미늄 원소 아쥬반트를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다.

[0327] 일부 구현예에서, 백신 또는 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 약 1 μg 내지 약 5 μg의 각 협막 다당류; 약 1 μg 내지 약 30 μg의 제1 담체 단백질(예, TT); 약 20 μg 내지 약 100 μg의 제2 담체 단백질(예, CRM_{197}); 및 선택적으로 약 0.1 mg 내지 약 0.5 mg의 알루미늄 원소 아쥬반트를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다.

[0328] 일부 구현예에서, 백신 또는 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 (약 4 μg 내지 약 5 μg의 양으로 존재하는) 혈청형 6B 및 임의로 혈청형 3을 제외하고 약 2 μg 내지 약 2.5 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 제1 담체 단백질(예, TT); 약 40 μg 내지 약 100 μg의 제2 담체 단백질(예, CRM_{197}); 및 선택적으로 약 0.1 mg 내지 약 0.25 mg의 알루미늄 원소 아쥬반트를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다.

[0329] 일부 구현예에서, 백신 또는 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 약 4.4 μg의 양으로 존재하는, 혈청형 6B를 제외하고 약 2.2 μg의 각 협막 다당류를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다.

[0330] 일부 구현예에서, 백신 또는 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 (각각 약 4 μg 내지 약 5 μg의 양으로 존재하는) 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A 및 19F로 이루어진 군으로부터 선택되는 최대 6개의 협막 다당류를 제외하고, 약 2 μg 내지 약 2.5 μg의 각 협막 다당류를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다. 일 구현예에서, 약 4 μg 내지 약 5 μg의 양으로 존재하는 최대 6개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 4, 6B, 9V, 19A, 및 19F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 백신 또는 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은, (각각 약 4.4 μg의 양으로 존재하는) 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A, 및 19F로 이루어진 군으로부터 선택되는 최대 6개의 협막 다당류를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다. 일 구현예에서, 약 4.4 μg의 양으로 존재하는 최대 6개의 협

막 다당류는 혈청형 1, 3, 4, 6B, 9V, 19A, 및 19F로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0331] 일부 구현예에서, 백신 또는 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 혈청형 1, 5, 6A, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및/또는 35B의 약 2 내지 약 2.5 μg의 협막 다당류 및 혈청형 3, 4, 6B, 9V, 19A, 및/또는 19F의 약 4 내지 약 5 μg의 협막 다당류를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다.

[0332] 소정의 구현예에서, 백신 또는 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및/또는 35B의 약 2 내지 약 2.5 μg의 협막 다당류 및 혈청형 3 및/또는 6B의 약 4 내지 약 5 μg의 협막 다당류를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다.

[0333] 일부 구현예에서, 백신 또는 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 혈청형 1, 4, 5, 6A, 7F, 8, 9V, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및/또는 35B의 약 2 내지 약 2.5 μg의 협막 다당류 및 혈청형 6B의 약 4 내지 약 5 μg의 협막 다당류 및/또는 혈청형 3의 약 8 내지 약 9 μg의 협막 다당류, 더욱 바람직하게는 혈청형 3의 약 8.8 μg의 협막 다당류를 함유하도록 제형화된 단일 0.5 ml 투여량일 수 있다.

[0334] 소정의 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27) 또는 이를 포함하는 백신은 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액을 추가로 포함한다.

[0335] 일부 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 또는 35B 유래의 각각의 폐렴구균 협막 다당류가 담체 단백질(예: CRM_{197})에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다. 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 6B를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 40 μg 내지 약 100 μg의 담체 단백질 (예: CRM_{197}); 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액.

[0336] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCVPCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 2개 이상의 담체 단백질(혼합 담체)을 포함한다. 예를 들어, 소정의 구현예에서, 적어도 2개의 혈청형은 제1 담체 단백질(예: 파상풍 변이독소)에 접합되고, 나머지 혈청형은 제2 담체 단백질(예: CRM_{197})에 접합된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합된 2개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3 및 5로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 구현예에서, 파상풍 변이독소에 접합된 2개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 5, 15B, 및 22F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또한, 혈청형 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및/또는 35B 중 하나 이상을 혈청형, 1, 3, 5, 15B 및 22F로부터 선택된 혈청형 대신에 또는 이에 추가하여 파상풍 변이독소에 접합시키는 것이 가능할 수도 있다. 다른 관심 혈청형이 파상풍 변이독소에 접합될 수도 있다.

[0337] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은, 혈청형 1 및 3의 각각의 폐렴구균 협막 다당류가 TT에 접합되고 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및/또는 35B 유래의 협막 다당류가 CRM_{197}에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다. 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 6B를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 1 및 3의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액.

[0338] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 혈청형 1 및 5의 각각의 폐렴구균 협막 다당류가 TT에 접합되고 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및/또는 35B 유래의 협막 다당류가 CRM_{197}에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다. 일 구현예에서, 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 6B 및 약 2.2-8.8 μg의 혈청형 3를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 1 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반

트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액. 소정의 구현예에서, 혈청형 3은 약 2.2 μg으로 존재한다. 다른 구현예에서, 혈청형 3은 약 4.4 μg로 존재한다. 다른 구현예에서, 혈청형 3은 약 8.8 μg으로 존재한다. 또 다른 구현예에서, 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 9V, 19A, 및 19F로 이루어진 군으로부터 선택되는 최대 6개의 협막 다당류를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 1 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액. 일 구현예에서, 약 4.4 μg의 최대 6개의 협막 다당류는 혈청형 1, 3, 4, 6B, 9V, 19A, 및 19F로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 3, 4, 6B, 9V, 19A, 및 19F를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 1 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액. 또 다른 구현예에서, 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 3 및 4를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 1 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액.

[0339] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 혈청형 3 및 5의 각각의 폐렴구균 협막 다당류가 TT에 접합되고 혈청형 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류가 CRM_{197}에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다. 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 6B를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 3 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액.

[0340] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 혈청형 1, 3 및 5의 폐렴구균 협막 다당류 중 적어도 두개 및 혈청형 15B 및 22F 둘 다가 파상풍 변이독소에 접합되고, 나머지 혈청형 유래의 협막 다당류가 CRM_{197}에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다.

[0341] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 혈청형 1, 5, 15B 및 22F의 폐렴구균 협막 다당류 중 각각이 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류가 CRM_{197}에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다. 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 6B를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 3 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액.

[0342] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 혈청형 1, 3, 15B 및 22F의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류가 CRM_{197}에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다. 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 6B를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 3 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액.

[0343] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은, 혈청형 3, 5, 15B 및 22F의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 파상풍 변이독소에 접합되고, 혈청형 1, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류가 CRM_{197}에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다. 각각의 0.5 mL 투여량은 다음을 함유하는 액체로 제형화될 수 있다: 약 4.4 μg의 혈청형 6B

를 제외하고, 약 2.2 μg의 각 협막 다당류; 약 2 μg 내지 약 25 μg의 TT 담체 단백질 (혈청형 3 및 5의 경우에만 해당) 및 약 40 μg 내지 약 100 μg의 CRM_{197} 담체 단백질; 아쥬반트로서 약 0.125 내지 0.250 mg의 원소 알루미늄(약 0.5 내지 약 1.2 mg의 인산알루미늄); 및 부형제로서 염화나트륨 및 숙신산 나트륨 완충액.

[0344] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 혈청형 1 및 5의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 TT에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다.

[0345] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 혈청형 3 및 5의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 TT에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다.

[0346] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 혈청형 1 및 3의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 TT에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다.

[0347] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 혈청형 1, 5, 15B, 및 22F의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 TT에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다.

[0348] 일부 구현예에서, 혼합 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 혈청형 3, 5, 15B 및 22F의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 TT에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다.

[0349] 일부 구현예에서, 혼합된 담체, 다가 폐렴구균 접합체 조성물은 혈청형 1, 3, 15B, 및 22F의 폐렴구균 협막 다당류의 각각이 TT에 접합되는 액체 제형으로 제형화될 수 있다.

[0350] 일부 구현예에서, 액체 제형은 보존제 없이 단일 투여량 주사기에 충진될 수 있다. 진탕 후, 액체 제형은 근육내 투여용의 균질한 백색 현탁액인 백신이 된다.

[0351] 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 단일 주사 또는 면역화 시리즈의 일부로서 투여될 수 있다. 예를 들어, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월 간격과 같은 적절한 간격에서 2, 3, 4회 이상 또는 이들의 조합으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은, 예를 들어, 생후 약 2, 3, 4 및 12-15개월, 약 3, 4, 5 및 12-15개월, 또는 약 2, 4, 6 및 12-15개월을 포함하여, 출생 후 첫 15개월 이내에 4회 영유아에게 투여된다. 이러한 제1 투여량은 이르면 6주령에 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은, 예를 들어, 약 2, 4 및 11-12개월을 포함하여, 출생 후 첫 15개월 이내에 3회 영유아에게 투여된다.

[0352] 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae* 유래의 하나 이상의 단백질을 포함할 수도 있다. 봉입에 적합한 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 단백질의 예는 국제 특허 출원 WO02/083855에서 확인된 것뿐만 아니라 국제 특허 출원 WO02/053761에 기술된 것을 포함한다.

[0353] 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 비경구, 경피, 또는 점막내, 비강내, 근육내, 복강내, 피내, 정맥내, 또는 피하 경로와 같은 해당 분야 숙련자에게 공지된 하나 이상의 투여 경로를 통해 대상체에게 투여될 수 있고, 이에 따라 제형화될 수 있다. 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 의도된 투여 경로와 양립가능하도록 제형화될 수 있다.

[0354] 일부 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 근육내, 복강내, 피하, 정맥내, 동맥내, 또는 피내 주사 또는 호흡기 점막 주사에 의해 액체 제형으로서 투여될 수 있다. 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 액체 형태 또는 동결건조된 형태로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 주사 가능한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서, 종래의 형태, 주사 전에 액체 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고형분 형태, 또는 유화액으로서 제조된다. 일부 구현예에서, 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말 또는 과립으로부터 제조된다. 이들 경로에 의한 투여를 위한 약제학적 제제의 제형 및 제조에서의 일반적인 고려 사항은, 예를 들어, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995에서 확인할 수 있으며, 이는 참조로서 본원에 통합된다. 현재, (*예를 들어*, 흡입에 의한) 경구 또는 비강 분무 또는 에어로졸 경로는 치료제를 폐 및 호흡기계에 직접 전달하는 데 가장 일반적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 조성물의 정량 투여량을 전달하는 장치를 사용

하여 투여된다. 본원에 기술된 피내 약제학적 조성물을 전달하는 데 사용하기에 적합한 장치는, 미국 특허 제4,886,499호, 미국 특허 제5,190,521호, 미국 특허 제5,328,483호, 미국 특허 제5,527,288호, 미국 특허 제4,270,537호, 미국 특허 제5,015,235호, 미국 특허 제5,141,496호, 미국 특허 제5,417,662호에 기술된 것과 같은 짧은 바늘 장치를 포함한다(이 문헌 모두 참조로서 본원에서 통합된다). 피내 조성물은 또한 본원에 참조로서 통합된 WO1999/34850에 기술된 것들 및 이의 기능적 등가물과 같이, 피부 내로의 바늘의 효과적인 침투 길이를 제한하는 장치에 의해 투여될 수 있다. 또한, 액체 제트 주사기를 통해 또는 각질층을 뚫고 진피에 도달하는 제트를 생성하는 바늘을 통해 진피에 액체 백신을 전달하는 제트 주사 장치가 적합하다. 제트 주사 장치는, 예를 들어 미국 특허 제5,480,381호, 미국 특허 제5,599,302호, 미국 특허 제5,334,144호, 미국 특허 제5,993,412호, 미국 특허 제5,649,912호, 미국 특허 제5,569,189호, 미국 특허 제5,704,911호, 미국 특허 제5,383,851호, 미국 특허 제5,893,397호, 미국 특허 제5,466,220호, 미국 특허 제5,339,163호, 미국 특허 제5,312,335호, 미국 특허 제5,503,627호, 미국 특허 제5,064,413호, 미국 특허 제5,520,639호, 미국 특허 제4,596,556호, 미국 특허 제4,790,824호, 미국 특허 제4,941,880호, 미국 특허 제4,940,460호, WO1997/37705, 및 WO1997/13537에 설명되어 있다 (이들 모두는 참조로서 본원에 통합됨). 또한, 피부의 외층을 통해 진피까지 분말 형태로 백신을 촉진시키기 위해 압축 가스를 사용하는 탄도 분말/입자 전달 장치가 적합하다. 또한, 종래의 주사기는 피내 투여의 고전적인 Mantoux 방법에 사용될 수 있다.

[0355] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액, 및 유화액을 포함한다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 오일, 및 에틸 올레에이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르이다. 오일의 예는 식물성 또는 동물성 오일, 땅콩유, 대두유, 올리브유, 해바라기유, 간유, 해양유와 같은 합성유, 및 우유 또는 달걀로부터 수득된 지질을 포함한다. 수성 담체는 식염수 및 완충 배지를 포함하는, 물, 알코올/수성 용액, 유화액 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로스, 덱스트로스 및 염화나트륨, 락트산 링거, 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제, 전해질 보충제(예컨대, 링거 덱스트로스에 기초한 것들) 등을 포함한다. 예를 들어, 항균제, 항산화제, 킬레이트제, 및 불활성 기체 등과 같은 보존제 및 다른 첨가제가 또한 존재할 수 있다.

[0356] 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 단위 투여량 바이알, 다중 투여량 바이알, 또는 미리 채워진 주사기의 형태로 제형화될 수 있다. 액체 제형을 위한 약제학적으로 허용 가능한 담체는 수성 또는 비수성 용매, 현탁액, 유화액, 또는 오일을 포함한다. 조성물은 등장성, 고장성, 또는 저장성일 수 있다. 그러나, 주입 또는 주사용 조성물은 기본적으로 등장성인 것이 바람직하다. 따라서, 등장성 또는 고장성은 조성물의 보관에 유리할 수 있다. 조성물이 고장성일 때에는, 조성물은 투여 전에 등장성으로 희석될 수 있다. 등장성 제제는 염과 같은 이온성 등장성 제제 또는 탄수화물과 같은 비-이온성 등장성 제제일 수 있다. 이온성 등장성 제제는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화칼륨, 및 염화마그네슘을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다. 비이온성 등장성 제제는 소르비톨 및 글리세롤을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 완충액이 포함된다. 예를 들어, 조성물이 주입 또는 주사일 때, pH 4 내지 pH 10, 예컨대 pH 5 내지 pH 9, 또는 pH 6 내지 pH 8의 완충 용량을 갖는 완충액에서 제형화되는 것이 바람직하다. 완충액은 미국 약전(USP)에 적합한 것들로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 완충액은 아세트산, 벤조산, 글루콘산, 글리세린산, 및 락트산과 같은 일염기산; 아코나이트산, 아디프산, 아스코르브산, 탄산, 글루탐산, 말산, 숙신산, 및 타르타르산과 같은 이염기산; 시트르산 및 인산과 같은 다염기산; 및 암모니아, 디에탄올아민, 글리신, 트리에탄올아민, 및 TRIS과 같은 염기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0357] 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예를 들어, PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 표면 활성제를 포함할 수 있다. 표면 활성제의 예는, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(일반적으로 Tweens로 지칭됨), 특히, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; 에틸렌 옥사이드(EO), 프로필렌 옥사이드(PO), 부틸렌 옥사이드(BO)의 공중합체(예컨대 DOWFAX); 에톡시(옥시-1,2-에탄디일) 기의 상이한 반복부를 가진 옥톡시놀, 특히, 옥톡시놀-9(Triton-100); 에틸페녹시폴리에톡시에탄올(IGEPAL CA-630/NP-40); 인지질, 예컨대 레시틴; 노닐페놀 에톡실레이트, 예컨대 TERGITOL NP 시리즈; 라우릴, 세틸, 스테아릴, 올레일 알코올-유래 폴리옥시에틸렌 지방 에테르(Brij 계면활성제), 특히, 트리에틸렌글리콜 모노라우릴 에테르(Brij 30); SPAN으로 알려진 소르비탄 에테르, 특히, 소르비탄 트리올레이트(Span 85) 및 소르비탄 모노라우레이트를 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0358] Tween 80/Span 85와 같은 표면 활성제의 혼합물이 사용될 수 있다. Tween 80과 같은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 및 Triton X-100과 같은 옥톡시놀의 조합도 적합하다. Laureth 9와 Tween 및/또는 옥톡시놀의 조합도

유리하다. 바람직하게는, 포함된 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(예컨대, Tween 80)의 양은 0.01% 내지 1%(w/v), 0.01% 내지 0.1% (w/v), 0.01% 내지 0.05% (w/v), 또는 약 0.02%일 수 있으며; 포함된 옥틸페녹시 폴리옥시에탄올 또는 노닐페녹시 폴리옥시에탄올(예컨대, Triton X-100)의 양은 0.001% 내지 0.1% (w/v), 특히 0.005% 내지 0.02%일 수 있으며; 포함된 폴리옥시에틸렌 에테르(예컨대, 라우레스 9)의 양은 0.1% 내지 20%(w/v), 가능하게는 0.1% 내지 10%, 특히 0.1% 내지 1% 또는 약 0.5%일 수 있다.

[0359] 일부 구현예에서, 다가 폐렴구균 접합체 조성물(예: PCV-22, PCV-23, PCV-24, PCV-25, PCV-26, 또는 PCV-27)은 방출 제어 시스템을 통해 전달될 수 있다. 예를 들어, 정맥내 주입, 경피 패치, 리포좀, 또는 다른 경로가 투여용으로 사용될 수 있다. 일 측면에서, 미소구체 또는 임플란트와 같은 거대분자가 사용될 수 있다.

[0360] 상기 개시내용은 일반적으로 본 발명을 설명한다. 보다 완전한 이해는 다음의 구체적인 실시예들을 참조하여 얻어질 수 있다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적을 위해 설명되며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다.

[0361] **실시예**

[0362] **실시예 1. S. 뉴모니애 협막 다당류의 제조**

[0363] S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)의 배양 및 협막 다당류의 정제를 해당 분야 숙련자에게 공지된 바와 같이 수행하였다. S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) 혈청형은 ATCC(American Type Culture Collection) (혈청형 1: ATCC 번호 6301; 혈청형 3: ATCC 번호 6303; 혈청형 4: ATCC 번호 6304; 혈청형 5: ATCC 번호 6305; 혈청형 6A: ATCC 번호 6306; 혈청형 6B: ATCC 번호 6326; 혈청형 7F: ATCC 번호 10351; 혈청형 9N: ATCC 번호 6309; 혈청형 9V: ATCC 번호 10368; 혈청형 14: ATCC 번호 6314; 혈청형 18C: ATCC 번호 10356; 혈청형 19A: ATCC 번호 10357; 혈청형 19F: ATCC 번호 6319; 혈청형 23B: ATCC 번호 10364; 혈청형 23F: ATCC 번호 6323)으로부터 수득되었다. 혈청형 8, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 22F, 23A, 23B, 24F, 33F, 및 35B의 경우 내부 균주 또는 다른 공급원으로부터 수득된 균주를 사용하였지만, 임의의 공개적으로 이용 가능한 균주가 사용될 수 있다. S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)은 캡슐 및 운동성, 그램 양성, 란셋 모양 디플로코쿠스, 및 혈액 한천 배지에서의 알파 용혈을 특징으로 하였다. 혈청형은 특이적 항혈청(미국 특허 제5,847,112호)을 사용하는 쿠엘링(Quelling) 시험으로 확인하였다.

[0364] **세포 은행의 제조**

[0365] 균주를 확장하고 동물 기원(F1, F2, 및 F3 세대) 성분을 제거하기 위해 여러 세대의 씨드 스톡을 생성하였다. 추가로 2세대의 씨드 스톡을 생산하였다. 제1 추가 세대를 F3 바이알로부터 배양하고, 후속 세대를 제1 추가 세대의 바이알로부터 배양하였다. 씨드 바이알을 동결보존제로서 합성 글리세롤로 냉동 보관하였다(-70℃ 미만). 세포 은행 제조를 위해, 모든 배양물을 대두 기반 배지에서 성장시켰다. 동결 전에, 세포를 원심분리에 의해 농축시키고, 사용한 배지를 제거하고, 세포 펠릿을 동결보존제(예컨대, 합성 글리세롤)를 함유하는 신선한 배지에 재현탁시켰다.

[0366] **배양 및 수확**

[0367] 작업용 세포은행으로부터의 배양물을 대두 기반 배지가 포함된 씨드 병에 접종하고 배양하였다. 목표 광학 밀도(흡광도)에 도달한 후, 씨드 병을 사용하여 대두 기반 배지를 함유하는 발효기를 접종하였다. 광학 밀도 값이 일정하게 유지되기 시작할 때 배양을 종료하였다. 배양 종료 후, 배양물에 데옥시콜산 나트륨을 첨가하여 세포를 용해시켰다. 생성된 발효기 내용물을 냉각시키고, 단백질 침전을 유도하였다. 그런 다음, 혼합물을 원심분리하여 침전된 단백질 및 세포 잔해를 제거하였다.

[0368] **정제**

[0369] 원심분리로부터 수득된 용액을 심층 필터를 통해 여과하여 원심분리에서 침전되지 않은 단백질 및 세포 잔해를 제거하였다. 여과물을 100 kDa MW 멤브레인 상에서 농축시키고, 농축물을 10 부피의 25 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.2)으로 정용여과하여 샘플을 수득하였다. 샘플을 여과하여 상청액을 수집하고, 이 상청액으로부터 다당류를 침전시키고 여과하였다. 여과물을 30 kDa 멤브레인 상에서 농축시키고, 약 10 부피의 삼중 증류수를 사용하여 농축물을 정용여과하였다. 정용여과를 수행한 후, 남은 용액을 0.2 μm 필터를 통해 여과하였다. 여과물에 대해 공정-내(in-process) 제어 시험을 수행하였다(성상, 잔여 단백질, 잔여 핵산, 내독소, 분자량, 및 다당류의 총량). 농축물을 멸균 여과하고 -20℃에서 보관하였다.

[0370] **실시예 2. S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) 협막 다당류 및 담체 단백질의 접합체의 제조 (혈청형 1, 3, 4, 5, 6A,**

6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 및 33F)

[0371] 상이한 혈청형의 다당류를 상이한 경로 후에 활성화시킨 다음 담체 단백질인 CRM_{197} 또는 TT에 접합시켰다. 구체적으로, 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류를 포함하는 다가 폐렴구균 다당류-단백질 접합체를, 하기에 개시된 바와 같이, 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 및 33F의 경우 각각의 협막 다당류를 CRM_{197}에 접합시킴으로써, 그리고 혈청형 1 및 5의 각각의 협막 다당류를 TT에 접합함으로써 제조하였다. CRM_{197}에 대한 혈청형 15A, 15C, 23A, 23B, 24F 및 35B의 접합은 실시예 3-8에 기술되어 있다. 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F, 및 35B 유래의 협막 다당류를 포함하는 또 다른 다가 폐렴구균 다당류-단백질 접합체를, 하기에 개시된 바와 같이, 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 23F, 및 33F의 경우 각각의 협막 다당류를 CRM_{197}에 접합시킴으로써, 그리고 혈청형 1, 5, 15B 및 22F의 각각의 협막 다당류를 TT에 접합함으로써 제조하였다.

[0372] 혈청형 1 또는 5를 대신하여 또는 이에 추가하여, WO2019/152925에 개시된 바와 같이, 혈청형 3이 TT에 접합될 수 있는 것으로 또한 고려된다. 천연 혈청형의 크기에 따라, 활성화 공정에는 각 협막 다당류의 크기를 표적 분자량으로 감소시키는 것, 화학적 활성화, 및 한외여과를 통한 완충액 교환이 포함될 수 있다.

[0373] 상이한 혈청형의 다당류를 상이한 경로 후에 활성화시킨 다음 담체 단백질인 CRM_{197} 또는 TT에 접합시켰다. 구체적으로, 접합체는 15B 및 22F를 제외한 모든 혈청형의 각 협막 다당류를 CRM_{197}에 접합시킴으로써, 그리고 혈청형 1, 3, 5, 15B 및 22F의 각 협막 다당류를 TT에 접합시킴으로써 제조하였다. 천연 혈청형의 크기에 따라, 활성화 공정에는 각 협막 다당류의 크기를 표적 분자량으로 감소시키는 것, 화학적 활성화, 및 한외여과를 통한 완충액 교환이 포함될 수 있다. 한외여과를 사용하여 접합체를 정제하고, 마지막으로 0.2 μm 필터를 통해 여과하였다. pH, 온도, 농도, 및 시간과 같은 공정 파라미터는 다음과 같았다.

[0374] (1) 활성화 공정

[0375] 단계 1: 가수분해

[0376] 환원성 아미노화는 단백질의 일차 아민($-NH_2$) 기와 당류의 알데히드 사이에 아미드 결합이 형성되는 중합체를 접합하기 위한 공지된 방법이다. 알데히드기를 폐렴구균 협막 다당류에 첨가하여 담체 단백질에 대한 접합을 촉진시킨다. 단당류의 인접 디올 구조는 과요오드산나트륨($NaIO_4$)에 의해 산화되어 알데히드기를 형성할 수 있다. 혈청형 1, 3, 4, 6A, 8, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 22F, 및 33F 유래의 협막 다당류를 다음과 같이 전처리하였다.

[0377] 혈청형 1의 경우, (최종 염기 농도가 0.05 M인) 수산화나트륨을 협막 다당류의 용액에 첨가하고, 용액을 50±2℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 용액을 약 21℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도로 냉각시키고, 염산을 용액의 최종 pH가 6.0±0.1이 되도록 첨가하고, 이에 의해 가수분해를 중단시켰다.

[0378] 혈청형 3, 8, 11A 및 15B의 경우, (최종 산 농도가 0.01 M인) 염산을 협막 다당류의 용액에 첨가하고, 용액을 60±2℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 용액을 약 21℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도로 냉각시키고, 0.1M 인산나트륨을 용액의 최종 pH가 6.0±0.1이 되도록 첨가하고, 이에 의해 가수분해를 중단시켰다.

[0379] 혈청형 4의 경우, (최종 산 농도가 0.1 M인) 염산을 협막 다당류의 용액에 첨가하고, 용액을 45±2℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 용액을 약 21℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도로 냉각시키고, 1M 인산나트륨을 용액의 최종 pH가 6.0±0.1이 되도록 첨가하고, 이에 의해 가수분해를 중단시켰다.

[0380] 혈청형 6A의 경우, (최종 산 농도가 0.1 M인) 빙초산을 협막 다당류의 용액에 첨가하고, 용액을 60±2℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 용액을 약 21℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도로 냉각시키고, 1M 수산화나트륨을 용액의 최종 pH가 6.0±0.1이 되도록 첨가하고, 이에 의해 가수분해를 중단시켰다.

[0381] 혈청형 12F의 경우, (최종 산 농도가 0.01 M인) 염산을 협막 다당류의 용액에 첨가하고, 용액을 70±2℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 용액을 약 21℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도로 냉각시키고, 0.1M 인산나트륨을 용액의 최종 pH가 6.0±0.1이 되도록 첨가하고, 이에 의해 가수분해를 중단시켰다.

[0382] 혈청형 14 및 18C의 경우, (최종 산 농도가 0.2 M인) 빙초산을 협막 다당류의 용액에 첨가하고, 용액을 94±2℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 용액을 약 21℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도로 냉각시키고, 1M 인산나트륨을

용액의 최종 pH가 6.0±0.1이 되도록 첨가하여 가수분해를 중단시켰다.

[0383] 혈청형 22F 및 33F의 경우, (최종 산 농도가 0.01 M인) 염산을 협막 다당류의 용액에 첨가하고, 용액을 60±2℃에서 인큐베이션하였다. 그런 다음, 용액을 약 21℃ 내지 약 25℃ 범위의 온도로 냉각시키고, 0.1M 인산나트륨을 최종 pH가 6.0±0.1이 되도록 첨가하고, 이에 의해 가수분해를 중단시켰다.

[0384] 각각의 수득된 협막 다당류를 주사용수(WFI), 아세트산나트륨, 및 인산나트륨 중에서 약 1.0 mg/mL 내지 약 2.0 mg/mL의 최종 농도로 희석하였다.

[0385] 단계 2: 과요오드산염 반응

[0386] 각 폐렴구균 당류 활성화를 위한 과요오드산 나트륨 몰 당량은 반복 단위 몰 질량을 기준으로 결정하였다. 철저한 혼합을 통해, 1, 7F, 및 19F를 제외한 모든 혈청형에 대해 산화 반응을 21℃ 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 진행시켰는데, 이의 경우 온도는 10℃ 이하였다. 접합체의 일관되고 안정적인 생산을 유지하기 위해, 각각의 혈청형에 대한 다양한 산화도(Do) 수준이 접합 과정 동안 표적화된다. 각각의 혈청형에 대한 Do 수준에 대한 바람직한 표적화된 범위는 표 1 및 표 2에 나타나 있다.

표 1

[0387] CRM_{197}에 접합될 모든 혈청형에 대한 Do 범위

혈청형	Do 범위	혈청형	Do 범위
혈청형 1	4 내지 10	혈청형 10A	1 내지 12
혈청형 3	2 내지 8	혈청형 11A	1 내지 15
혈청형 4	1 내지 5	혈청형 12F	1 내지 9
혈청형 6A	5 내지 15	혈청형 14	6 내지 13
혈청형 6B	7 내지 13	혈청형 18C	6 내지 14
혈청형 7F	2 내지 8	혈청형 19A	20 내지 40
혈청형 8	1 내지 17	혈청형 19F	20 내지 40
혈청형 9N	5 내지 10	혈청형 23F	6 내지 14
혈청형 9V	4 내지 9	혈청형 33F	1 내지 15

표 2

[0388] TT에 접합될 혈청형 1, 3, 5, 15B 및 22F에 대한 Do 범위

혈청형	Do 범위	혈청형	Do 범위
혈청형 1 (1-TT)	1 내지 15	혈청형 15B (15B-TT)	1 내지 15
혈청형 3 (3-TT)	2 내지 14	혈청형 22F (22F-TT)	20 내지 50
혈청형 5 (5-TT)	1 내지 15		

[0389] 단계 3: 한외여과

[0390] 산화된 당류를 농축시키고, 100 kDa MWCO 한외여과기(혈청형 1용 30 kDa 한외여과기 및 혈청형 18C용 5 kDa 한외여과기) 상에서 WFI로 정용여과하였다. 혈청형 1의 경우 0.9% 염화나트륨 용액, 혈청형 7F 및 23F의 경우 0.01 M 아세트산 나트륨 완충액(pH 4.5), 혈청형 19F의 경우 0.01 M 인산나트륨 완충액(pH 6.0)을 사용하여 정용여과를 수행하였다. 투과물을 폐기하고, 체류물을 0.2 μm 필터를 통해 여과하였다.

[0391] 단계 4: 동결건조

[0392] 수성 용매를 사용하여 담체 단백질에 접합될 혈청형 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14 및 33F의 협막 다당류의 경우, 다당류 및 담체 단백질의 혼합 용액을 수크로오스를 추가로 첨가하지 않고 제조하고, 동결건조시킨 다음, -25℃ ± 5℃에서 보관하였다.

[0393] 수성 용매를 사용하여 담체 단백질에 접합되어야 하는 혈청형 1 및 18C의 협막 다당류의 경우, 수크로오스를 추가로 첨가하지 않고, 다당류 및 담체 단백질을 독립적으로 제조하고, 동결건조시킨 다음, -25℃ ± 5℃에서 보관하였다.

[0394] DMSO 용매를 사용하여 담체 단백질에 접합될 혈청형 6A, 6B, 7F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT 및 23F의 협막 다당류의 경우, 5% ± 3%(w/v)의 최종 수크로오스 농도에 도달하기 위해 미리 결정된 양의 수크로오스를 활성화된 당류에 첨가하고, 샘플을 독립적으로 제조하고, 동결건조시킨 다음, -25℃ ± 5℃에서 보관하였다.

[0395] 혈청형 11A의 협막 다당류의 경우, 20% ±5%(w/v)의 최종 수크로오스 농도에 도달하기 위해 미리 결정된 양의 수크로오스를 활성화된 당류에 첨가하고, 다당류 및 담체 단백질을 독립적으로 제조하고, 동결건조시킨 다음, -25℃ ± 5℃에서 보관하였다.

[0396] 혈청형 12F의 협막 다당류의 경우, 10% ±5%(w/v)의 최종 수크로오스 농도에 도달하기 위해 미리 결정된 양의 수크로오스를 활성화된 당류에 첨가하고, 다당류 및 담체 단백질을 독립적으로 제조하고, 동결건조시킨 다음, -25℃ ± 5℃에서 보관하였다.

[0397] (2) 접합 공정

[0398] 혈청형 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C, 및 33F에 대해 수성 접합을 수행하고, 혈청형 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT 및 23F에 대해 DMSO 접합을 수행하였다. 각각의 협막 다당류는 0.2 내지 2:1의 비율로 담체 단백질에 접합되었다.

[0399] 단계 1: 용출

[0400] **수성 접합**

[0401] 혈청형 1, 3, 4, 5, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C, 및 33F의 경우, 동결건조된 샘플을 해동하고 실온에서 평형화시켰다. 동결건조된 샘플을 23±2℃에서 각각의 혈청형에 대해 설정된 비율로 인산나트륨 완충액을 사용하여 반응 농도로 재구성하였다.

[0402] **디메틸 설폭시드(DMSO) 접합**

[0403] 혈청형 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT 및 23F의 경우, 동결건조된 샘플을 해동하고, 실온에서 평형화시키고, DMSO에 재구성하였다.

[0404] 단계 2: 접합 반응

[0405] **수성 접합**

[0406] 혈청형 3-TT, 4, 5-TT, 8, 9N, 9V, 10A, 14, 18C, 및 33F의 경우, 접합 반응은 시아노수소화붕소나트륨 용액(100 mg/mL)을 당류 몰 당 1.0 내지 1.4 몰의 시아노수소화붕소나트륨으로 첨가하여 개시하였다. 그러나, 혈청형 1, 1-TT 및 3의 경우, 시아노수소화붕소나트륨 용액을 당류 몰 0.5몰의 시아노수소화붕소나트륨으로 첨가하여 반응을 개시하였다.

[0407] 반응 혼합물을 23℃ 내지 37℃에서 44 내지 106시간 동안 인큐베이션하였다. 반응 온도 및 시간을 혈청형에 의해 조정하였다. 그런 다음, 온도를 23±2℃로 낮추고, 0.9% 염화나트륨을 반응기에 첨가하였다. 수소화붕소나트륨 용액(100 mg/mL)을 첨가하여 당류 몰 당 1.8 내지 2.2 몰 당량의 수소화붕소나트륨을 수득하였다. 혼합물을 23±2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 절차는 당류에 존재하는 미반응 알데히드를 감소시켰다. 그런 다음, 혼합물을 0.9% 염화나트륨으로 희석하고, 희석된 접합 혼합물을 0.8 또는 0.45 μm 사전-필터를 사용하여 여과하였다.

[0408] **DMSO 접합**

[0409] 혈청형 6A, 6B, 7F, 11A, 12F, 15B-TT, 19A, 19F, 22F-TT 및 23F의 협막 다당류의 경우, 활성화된 당류 1몰 당 0.8-1.2 몰 당량의 시아노수소화붕소나트륨의 비율로 시아노수소화붕소나트륨 용액(100 mg/mL)을 첨가하여 접합 반응을 개시하였다. WFI를 반응 혼합물에 1 %(v/v)의 목표 농도까지 첨가하고, 혼합물을 23±2℃에서 12 내지 26시간 동안 인큐베이션하였다. 100 mg/mL의 시아노수소화붕소나트륨 용액(몰 활성화된 당류 당 전형적인 1.8 내지 2.2 몰 당량 수소화붕소나트륨) 및 WFI (표적 5 % v/v)을 반응물에 첨가하고, 혼합물을 23±2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 절차는 당류에 존재하는 미반응 알데히드를 감소시켰다. 그런 다음, 반응 혼합물을 0.9% 염화나트륨으로 희석하고, 희석된 접합 혼합물을 0.8 또는 0.45 μm 사전-필터를 사용하여 여과하였다.

[0410] 단계 3: 한외여과

[0411] 희석된 접합체 혼합물을 농축시키고, 0.9% 염화나트륨 또는 완충액의 최소 15부피를 갖는 100 kDa MWCO 한외여과 필터 또는 300 kDa MWCO 한외여과 필터 상에서 정용여과하였다. 또한, 공정에 사용된 완충액의 조성 및 pH는 각각의 혈청형에 따라 다양하였다.

[0412] 단계 4: 멸균 여과

[0413] 한외여과 후의 체류물을 멸균 여과(0.2 μm)하고, 공정-내 제어(성상, 유리 단백질, 유리 당류, 분자 크기 분포, 멸균성, 당류 함량, 단백질 함량, pH, 내독소, 잔류 시안화물, 잔류 DMSO, 당류 정체, TT 정체, 및 CRM_{197} 정체)을 여과된 접합체에 대해 수행하였다. 최종 농축물을 냉장시키고 2℃ 내지 8℃에서 보관하였다.

[0414] CRM_{197}에 대한 혈청형 15A, 15C, 23A, 23B, 24F 및 35B의 접합은 실시예 3-8에 기술되어 있다.

[0415] **실시예 3. 혈청형 15A 및 CRM_{197}의 단일접합체의 제조**

[0416] 혈청형 15A 다당류를 위에서 논의된 바와 같이 정제할 수 있거나, 다른 혈청형들의 다당류를 정제하기 위해 WO2013/191459에 기술된 방법을 참조하여 정제할 수 있다. 표 1에 나타낸 바와 같이 정제된 혈청형 15A 다당류에 산과 열을 가하여 산 가수분해를 수행한 다음 활성화 공정을 수행하였다. 가수분해 조건이 산화도(Do) 및 활성화된 다당류의 분자량, 및 접합 결과에 영향을 미쳤다는 것을 관찰하였다. 활성화 공정 및 접합 공정은 동일한 조건 하에서 수행하였다. 과요오드산나트륨을 첨가하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 DMSO에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.5 mg/mL였다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 20 내지 28시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다.

표 3

[0417] 가수분해 조건에 따른 15A 접합 결과

활성화된 다당류			**15A-CRM_{197} 접합체**			
가수분해 조건	**Do**	**활성화된 PS M.W. (kDa)**	**비율 (PS/PR)**	**유리 PS (%)**	**MSD (%)**	**MALLS (kDa)**
-	13.4	340.8	0.98	76.5	86	30517
0.01 M HCl, 60℃, 60분	11.5	304.5	1.20	79.0	93	25933
0.01 M HCl, 60℃, 90분	10.6	373.4	1.09	76.7	94	25899
0.01 M HCl, 60℃, 120분	10.8	350.8	0.97	73.7	88	24734
0.1 M HCl, 60℃, 45분	16.0	197.0	1.34	76.6		32898
0.1 M HCl, 60℃, 90분	7.9	116.3	0.73	11.4		3924

[0418] 혈청형 15A 및 CRM_{197}의 접합에 대한 산화 수준(Do)의 효과를 평가하였다. 0.1M HCl을 60℃에서 90분 동안 15A 다당류에 첨가하였다. 과요오드산나트륨의 양을 조정하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 DMSO에 현탁시켰다. 혈청형 15A에 대한 산 가수분해의 효과를 평가할 때, 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.5 mg/mL이었고, 시아노수소화붕소와의 접합은 전술한 바와 같이 수행하였다.

표 4

[0419] 산화 수준에 따른 15A 접합 결과

활성화된 다당류		15A-CRM_{197} 접합체				
Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
19.6	139.7	-	-	-	888	9.8
17.7	158.6	-	-	-	1753	3.9
7.9	116.3	0.73	11.4		3924	43.8
4.4	75.7	0.77	1.3		1411	47.1
3.9	69.3	0.71	1.1		1217	43.7

[0420] 접합에 있어서 다당류 대 단백질의 반응 비율의 효과 또한 평가하였다. 활성화된 15A 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조시키고 DMSO에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 표 5에 기술된 비율로 혼합하고, 혈청형 15A에 대한 산 가수분해의 효과를 평가할 때, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.0 mg/mL이었고, 시아노수소화붕소와의 접합은 전술한 바와 같이 수행하였다.

표 5

[0421] 다당류 대 단백질 비율에 따른 접합 결과

활성화된 다당류		반응비	15A-CRM_{197} 접합체				
Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	반응비 (PR:PS)	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
4.7	67.9	2:1	0.44	3.2	69	3631	59.0
		1.75:1	0.46	3.2	71	3616	50.8
		1.5:1	0.52	1.9	71	3834	39.0
		1.25:1	0.66	3.1	61	2027	50.5
		1:1	0.62	3.3	59	1707	40.8

[0422] **실시예 4. 혈청형 15C 및 CRM_{197}의 단일 접합체의 제조**

[0423] 혈청형 15C 다당류를 위에서 논의된 바와 같이 정제할 수 있거나, 다른 혈청형들의 다당류를 정제하기 위해 WO2013/191459에 기술된 방법을 참조하여 정제할 수 있다. 15C 다당류에 첨가된 과요오드산나트륨의 양을 조정하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 인산염 완충액에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 15 mg/mL였다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 37℃ ± 2℃에서 44 내지 52시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다.

표 6

[0424] 인산염 완충액을 사용한 산화 수준에 따른 15C 접합 결과

활성화된 다당류		15C-CRM_{197} 접합체				
Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
35.1	657.6	5.49	31.2	85	1506	67.4
31.1	549.9	5.71	37.8	77	1268	73.2
18.4	678.6	3.24	12.5	89	2885	67.0
16.3	525.3	3.29	17.8	76	1877	68.3
8.9	768.5	1.83	4.6	91	2767	54.8
8.1	510.1	2.26	7.8	78	4833	63.4
5.5	755.7	1.50	1.8	85	3899	17.4
4.5	472.4	1.67	7.2	75	5618	39.2

2.3	471.0	1.36	3.2	62	2610	13.8

[0425] DMSO를 사용하여 혈청형 15C 및 CRM_{197}의 접합에 대한 산화 수준(Do)의 효과를 평가하였다. 15C 다당류에 첨가된 과요오드산나트륨의 양을 조정하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 DMSO에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.5 mg/mL였다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 20 내지 28시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다.

표 7

[0426] DMSO를 사용한 산화 수준에 따른 15C 접합 결과

활성화된 다당류		**15C-CRM_{197} 접합체**				
Do	**활성화된 PS M.W. (kDa)**	**비율 (PS/PR)**	**유리 PS (%)**	**MSD (%)**	**MALLS (kDa)**	**접합 수율 (%)**
31.1	549.9	1.28	19.8	91	13992	61.6
16.3	525.3	1.16	4.7	86	13733	57.2
8.1	510.1	1.11	2.7	77	6248	18.0
4.5	472.4	1.04	2.5	78	9364	31.0
2.3	471.0	0.87	2.7	80	8105	41.7

[0427] **실시예 5. 혈청형 23A 및 CRM_{197}의 단일 접합체의 제조**

[0428] 혈청형 23A 다당류를 위에서 논의된 바와 같이 정제할 수 있거나, 다른 혈청형들의 다당류를 정제하기 위해 WO2013/191459에 기술된 방법을 참조하여 정제할 수 있다. 접합에 대한 산화도(Do)의 효과를 평가하기 위해, 과요오드산나트륨의 양을 조정하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 DMSO에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1 mg/mL였다. 대안적으로, 활성화된 다당류와 단백질을 표 8에 기술된 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.5 mg/mL이었다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 20 내지 28시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다. 접합에 대한 다양한 Do 수준의 효과는 표 8에 나타나 있다.

표 8

[0429] 산화 수준에 따른 23A 접합 결과

활성화된 다당류		**23A-CRM_{197} 접합체**				
Do	**활성화된 PS M.W. (kDa)**	**비율 (PS/PR)**	**유리 PS (%)**	**MSD (%)**	**MALLS (kDa)**	**접합 수율 (%)**
23.9	429.0	1.17	32.2	98	6561	27.9
17.3	472.6	1.11	19.7	96	4982	69.9
10.9	640.0	0.97	3.2	92	4335	62.2
9.7	486.8	1.08	21.5	89	2917	55.9
8.8	565.0	1.22	33.7	91	5081	45.3
6.7	489.0	1.01	19.2	87	2635	71.1

[0430] 접합에 대한 다당류 대 단백질의 반응 비율의 효과는 표 9에 나타나 있다.

표 9

[0431] 다당류 대 단백질 비율에 따른 23A 접합 결과

활성화된 다당류		반응비	23A-CRM_{197} 접합체				
Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	반응비 (PR:PS)	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
10.9	640.0	2:1	0.49	0	91	11065	36.0
		1.75:1	0.59	0.2	91	8345	52.9
		1.5:1	0.66	1.3	90	4963	26.7
		1.25:1	0.80	1.1	91	5524	52.0
		1:1	0.97	3.2	92	4335	62.2

[0432] 혈청형 23A형과 CRM_{197} 간의 접합에 대한 반응 농도의 효과를 평가하였다. 정제된 혈청형 23A 다당류를 위에서 논의된 바와 같이 과요오드산염나트륨으로 활성화하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 DMSO에 현탁시켰다. 혈청형 23A에 대한 Do의 효과를 평가할 때, 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 표 10에 기술된 바와 같았고, 시아노수소화붕소와의 접합은 전술한 바와 같이 수행하였다.

표 10

[0433] 접합 반응의 농도에 따른 23A 접합 결과

활성화된 다당류		반응 농도	23A-CRM_{197} 접합체				
Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	반응 농도 (mg/ml)	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
8.8	565.0	1.0	1.22	33.7	91	5081	45.3
		1.5	1.27	20.5	93	6612	29.4
		2.0	1.37	35.1	96	4373	19.3
		2.5	2.63	21.3	-	2223	4.1
		3.0	-	-	-	2471	2.3

[0434] 혈청형 23A과 CRM_{197} 간의 접합에 대한 산 가수분해의 효과를 평가하였다. 표 11에 나타낸 바와 같이 정제된 혈청형 23A 다당류에 산과 열을 가하여 산 가수분해를 수행한 다음 활성화 공정을 수행하였다. 활성화 공정 및 접합 공정은 동일한 조건 하에서 수행하였다. 과요오드산나트륨을 첨가하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 인산염 완충액에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.5 mg/mL였다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 37℃ ± 2℃에서 44 내지 52시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다.

표 11

[0435] 다당류의 산 가수분해 후 23A 당접합체의 제조

활성화된 다당류			23A-CRM_{197} 접합체				
가수분해 조건	Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
X	10.9	639.3	1.21	22.0	89	5981	19.6
0.1 M HCl, 60 ℃, 30분	9.4	595.4	1.17	17.0	91	5844	13.2
0.1 M HCl, 60 ℃, 60분	9.1	571.1	1.21	10.9	82	3360	10.5
0.1 M HCl, 60 ℃, 90분	9.0	535.3	1.07	9.9	83	2911	10.3

0.1 M HCl, 60 ℃, 120분	9.3	507.9	1.26	5.2	64	1846	5.6

[0436] 혈청형 23A과 CRM_{197} 간의 접합에 대한 인산염 완충액 사용의 효과를 평가하였다. 혈청형 23A를 활성화시키기 위해 과요오드산나트륨의 양을 조정하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 혈청형 23A 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조시키고 인산염 완충액에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 15 mg/mL였다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 20 내지 28시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다.

표 12

[0437] 인산염 완충액을 사용한 23A 당접합체의 제조

활성화된 다당류		**23A-CRM_{197} 접합체**				
Do	**활성화된 PS M.W. (kDa)**	**비율 (PS/PR)**	**유리 PS (%)**	**MSD (%)**	**MALLS (kDa)**	**접합 수율 (%)**
18.0	630.1	2.98	73.1	89	2790	58.9
9.5	633.1	2.41	61.5	88	1901	35.9
6.6	627.5	1.74	33.0	77	2067	21.8
5.1	613.4	1.50	27.9	80	2794	20.9
4.5	608.0	1.07	19.4	81	6182	37.5

[0438] **실시예 6. 혈청형 23B 및 CRM_{197}의 단일접합체의 제조**

[0439] 혈청형 23B 다당류를 위에서 논의된 바와 같이 정제할 수 있거나, 다른 혈청형들의 다당류를 정제하기 위해 WO2013/191459에 기술된 방법을 참조하여 정제할 수 있다. 접합에 대한 산화도(Do)의 효과를 평가하기 위해, 혈청형 23B를 활성화하기 위해 과요오드산나트륨의 양을 조정하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 DMSO에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.5 mg/mL였다. 대안적으로, 과요오드산나트륨의 양은 일정하게 유지되었고, 활성화된 다당류와 단백질은 표 13에 기술된 비율로 혼합되었지만, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 1.5 mg/mL였다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 20 내지 28시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다. 다양한 Do 수준이 접합에 미치는 효과는 표 13에 나타나 있다.

표 13

[0440] 산화 수준에 따른 23B 접합 결과

활성화된 다당류		**23B-CRM_{197} 접합체**				
Do	**활성화된 PS M.W. (kDa)**	**비율 (PS/PR)**	**유리 PS (%)**	**MSD (%)**	**MALLS (kDa)**	**접합 수율 (%)**
23.3	590.8	1.33	87.1	98	34676	67.7
14.2	583.7	1.25	74.4	99	20774	63.0
7.4	674.5	0.74	36.7	95	4891	47.0
6.6	547.3	0.95	65.4	97	9609	57.7
5.7	631.4	0.84	46.9	81	5149	52.9
5.5	549.7	1.12	85.6	92	8839	70.2
5.4	635.8	1.03	50.9	90	5647	63.9
2.8	391.4	0.64	50.3	77	5213	31.1
2.3	221.6	0.27	26.3	56	3878	21.2
0.9	267.5	0.23	39.9	49	2588	7.2

[0441] 접합에 대한 다당류 대 단백질의 반응 비율의 효과는 표 14에 나타나 있다.

표 14

[0442] 다당류 대 단백질 비율에 따른 23B 접합 결과

활성화된 다당류		반응 비율	23B-CRM_{197} 접합체				
Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	반응비 (PR:PS)	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
2.3	221.6	2:1	0.21	15.2	69	6720	25.0
		1.75:1	0.22	20.5	71	6408	22.6
		1.5:1	0.23	19.6	68	4694	16.7
		1.25:1	0.31	34.0	58	2448	21.2
		1:1	0.27	26.3	56	3878	12.0

[0443] **실시예 7. 혈청형 24F 및 CRM_{197}의 단일접합체의 제조**

[0444] 혈청형 24F 다당류를 위에서 논의된 바와 같이 정제할 수 있거나, 다른 혈청형들의 다당류를 정제하기 위해 WO2013/191459에 기술된 방법을 참조하여 정제할 수 있다. 정제된 혈청형 24F 다당류를 산 가수분해 또는 미세유동화기로 처리한 다음, 혈청형 24F 다당류에 과요오드산나트륨을 첨가하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 활성화된 다당류 및 CRM_{197} 단백질을 동결건조하고 인산염 완충액에 현탁시켰다. 활성화된 다당류와 단백질을 1:1의 비율로 혼합한 반면, 반응 농도는 다당류 함량을 기준으로 10 mg/mL였다. 시아노수소화붕소를 첨가하여 접합 반응을 개시하고, 혼합물을 37℃ ± 2℃에서 44 내지 52시간 동안 인큐베이션하였다. 수소화붕소 용액 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다. 시아노수소화붕소 및 수소화붕소의 몰 당량은 표 15에 기술된 바와 같았다. 캡핑 시약(수소화붕소) 대신에 시아노수소화붕소를 활성화된 24F 다당류 및 CRM_{197} 단백질에 첨가함에 따라, 접합체의 분자량을 증가시킴으로써 나타낸 바와 같이, 접합체의 품질이 개선된다. 과량의 캡핑 시약(수소화붕소)을 첨가하는 것은, 접합체의 분자량을 감소시킴으로써 나타낸 바와 같이, 24F- CRM_{197} 접합체에 부정적인 영향을 미쳤다.

표 15

[0445] 환원제의 양에 따른 접합 결과 (PO_4 완충액)

활성화된 다당류		24F-CRM_{197} 접합체				
Do	활성화된 PS M.W. (kDa)	NaCNBH3 Meq	NaBH4 Meq	비율 (PS/PR)	유리 PS (%)	MALLS (kDa)
98.5	241.8	1.2	-	3.72	35.5	3295
		1.2 / 0.5	-	3.91	32.4	3413
		1.2 / 1.0	-	3.81	29.5	4562
		1.2	0.1	3.39	30.2	3096
		1.2	0.5	3.33	23.0	2615
		1.2	1.0	3.51	27.7	1807

[0446] **실시예 8: 혈청형 35B 및 CRM_{197}의 단일접합체의 제조**

[0447] 혈청형 35B 다당류를 위에서 논의된 바와 같이 정제할 수 있거나, 다른 혈청형들의 다당류를 정제하기 위해 WO2013/191459에 기술된 방법을 참조하여 정제할 수 있다. 정제된 혈청형 35B 다당류를 DW(증류수)에서 1.0 mg/mL 내지 2.0 mg/mL의 최종 농도로 희석하였다.

[0448] **주기적 산 반응.** 접합에 대한 산화도(Do)의 효과를 평가하기 위해, 혈청형 35B를 활성화시키기 위해 과요오드산나트륨의 양을 조정하고, 산화 반응을 21 내지 25℃에서 16 내지 20시간 동안 수행하였다. 다당류 함량에 대해

0.007 내지 0.15 과요오드산나트륨의 몰 당량을 사용하였다.

[0449] **한외여과.** 활성화된 혈청형 35B 다당류를 농축시키고 30 kDa MWCO 한외여과 필터를 사용하여 DW로 정용여과하였다. 투과물을 폐기하고, 여액을 0.22 μm 필터를 통해 여과하였다.

[0450] **동결건조.** 5% ± 3% 수크로오스 농도에 도달하기 위해 계산된 특정 양의 수크로오스를 활성화된 혈청형 35B 다당류에 첨가하였다. 농축된 당류 및 CRM_{197} 담체 단백질을 각각 바이알에 채우고 동결건조시켰다. 대안적으로, 활성화된 혈청형 35B 다당류 및 담체 단백질을 혼합하고 유리 병에 채우고 동결건조시켰다.

[0451] **용해.** 동결건조된 활성화된 혈청형 35B 당류 및 동결건조된 CRM_{197} 담체 단백질을 실온에서 평형화시켰다. 활성화된 혈청형 35B 당류를 12.5 g/L 내지 17.5 g/L 당류의 농도로 인산염 완충액에 재현탁시켰다. 접합 반응을 위한 인산염 완충액의 pH를 pH 6.0 내지 pH 7.2로 조정하였다. 이 때, 담체 단백질을 6.25 g/L 내지 약 35 g/L의 농도로 사용하였다(PR:PS 중량비는 1:0.5 내지 2에 해당함).

[0452] **접합 반응.** 접합 반응은 시아노수소화붕소나트륨 용액(100 mg/mL)을 활성화된 당류 1몰 당 1.0 대 1.4 몰 당량 비율로 첨가하여 개시하였다. 혼합물을 37±2℃에서 44 내지 52시간 동안 인큐베이션하였다. 100 mg/mL의 수소화붕소나트륨 용액(일반적으로 활성화된 당류 1몰 당 1.8 내지 2.2 몰 당량의 수소화붕소나트륨)을 반응 물질에 첨가하고, 혼합물을 23℃ ± 2℃에서 3 내지 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이 공정을 통해, 당류에 존재하는 임의의 미반응된 알데히드를 감소시키고, 이어서 농축하고, 한외여과 필터로 투석하였다. 그런 다음, 반응 혼합물을 0.9% 염화나트륨으로 희석하고, 희석된 접합체 혼합물을 0.45 μm 필터를 통해 여과하였다.

[0453] **한외여과.** 희석된 접합체 혼합물을 농축시키고, 적어도 20부피의 0.9% 염화나트륨 용액 또는 완충액을 갖는 100 kDa MWCO 한외여과 필터를 사용하여 정용여과하였다. 투과물을 폐기하였다.

[0454] **멸균 여과.** 100 kDa MWCO 정용여과 후의 여액을 0.22 μm 필터를 통해 여과하였다. 공정-내 제어(당류 함량, 유리 단백질, 유리 당류, 및 잔류 시안화물)를 여과된 생성물 35B-CRM_{197} 접합체에 대해 수행하였다. 여과된 여액에 대해 공정-내 제어를 수행하여 추가 농도, 정용여과 및/또는 희석이 필요한지 여부를 결정하였다. 필요한 경우, 여과된 접합체를 0.9% 염화나트륨으로 희석하여 최종 농도가 0.55 g/L 미만이 되도록 하였다. 이 단계에서, 당류 함량, 단백질 함량 및 당류:단백질 비율에 대한 시험을 수행하였다. 접합체를 여과하고(0.22 μm 필터) 자유 시험(성상, 유리 단백질, 유리 당류, 내독소, 분자 크기 결정, 잔류 시안화물, 당류 정체 및 CRM_{197} 정체)을 수행하였다. 혈청형 35B 당접합체는 35B 다당류의 mM 당 적어도 0.2 mM의 아세테이트를 포함한다. 최종 접합체 농축물을 2 내지 8℃에서 냉각시켰다. 혈청형 35B 당접합체의 일부 대표적인 제조 예에 대한 분석 결과를 하기 표 16에 나타냈다.

표 16

[0455] 산화 수준에 따른 접합 결과 (PO_4 완충액)

활성화 조건 및 결과		35B-CRM_{197} 접합체				
분자량 (kDa)	활성화 정도	완충액 pH	비율 (PS/PR)	유리 당류 (%)	MALLS (kDa)	접합 수율 (%)
103.6	26.8	7.2	1.51	26.8	1162	48.4
85.7	26.2	7.2	1.74	26.0	413	75.2
97.8	26.2	7.2	2.04	29.6	323	30.9
97.8	26.2	6.0	1.27	19.1	3153	40.9
104.5	25.0	7.2	1.80	15.8	449	46.2
101.8	23.3	7.2	1.55	37.5	433	23.6
99.0	23.0	6.0	1.76	28.0	2211	43.7
93.8	21.3	7.2	2.20	32.8	568	21.6
80.6	20.5	6.0	1.53	35.4	2621	23.4
84.8	20.5	6.0	1.93	26.1	4301	31.6
63.1	20.1	7.2	1.31	23.1	370	43.7
63.1	20.1	6.0	1.08	17.5	1966	42.0
81.0	19.5	6.0	1.37	23.4	1043	25.2
58.9	18.5	7.2	1.74	14.6	1211	66.6
70.5	17.7	7.2	1.56	18.1	786	37.4

56.6	17.1	6.0	1.42	17.3	1044	51.3
61.9	16.5	7.2	1.39	12.5	722	60.4
48.6	14.6	7.2	1.21	18.5	584	47.0
45.4	12.9	7.2	1.12	12.6	716	60.9
41.8	12.8	7.2	1.51	14.6	1031	49.0
46.1	12.7	6.0	1.21	14.8	1539	49.1
45.0	12.6	6.0	1.17	11.2	1219	54.8
45.0	12.6	7.2	1.36	12.4	676	42.4
36.5	12.2	6.0	0.96	7.7	1155	66.0
34.8	12.0	7.2	0.90	5.0	643	23.3
47.0	11.9	7.2	1.33	19.1	826	47.5
37.1	9.7	6.0	1.10	11.7	1202	41.8
35.9	7.1	6.0	0.96	12.6	1079	33.4

[0456] 표 16에서 보이는 바와 같이, 혈청형 35B 당접합체를 제조하기 위한 본원에 기술된 방법은 양호한 접합 수율을 나타냈으며, 낮은 유리 당류 % 및 양호한 안정성을 갖는 접합체의 제조를 가능하게 한다.

[0457] **실시예 9: 혈청형 특이적 IgG 농도 측정**

[0458] 실시예 3에서 제조한 혈청형 15A-CRM_{197} 단일접합체, 실시예 4에서 제조한 혈청형 15C-CRM_{197} 단일접합체, 실시예 5에서 제조한 혈청형 23A-CRM_{197} 단일접합체, 실시예 6에서 제조한 혈청형 23B-CRM_{197} 단일접합체, 실시예 7에서 제조한 혈청형 24F-CRM_{197} 단일접합체, 및 실시예 8에서 제조한 혈청형 35B-CRM_{197} 단일접합체를 토끼에서 면역원성 반응 유도 능력에 대해 시험하였다. 면역원성 평가는 혈청 IgG 농도에 대한 항원 특이적 ELISA에 의해, 그리고 항체 기능성에 대한 옵소닌탐식작용 분석(OPA, opsonophagocytic assay)에 의해 수행하였다. 뉴질랜드 흰토끼를 0주차와 2주차에 인간 투여량(2.2 μg의 다당류)으로 근육내 면역화하였다. 면역화 후 2주마다 혈청을 샘플링하였다.

[0459] 혈청형 15A, 15C, 23A, 23B, 24F, 및 35B 각각에 대한 협막 다당류(PnP)를 96-웰 플레이트 상에 0.5 μg/웰 내지 1 μg/웰까지 코팅하였다. 각 대상체로부터 동등한 양의 혈청을 샘플링하고 그룹별로 풀링하였다. 플레이트를 세척 완충액으로 세척하고 블로킹 완충액으로 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 혈청 풀을 Tween 20과 Statens Serum Institut에서 수득한 폐렴구균 세포벽 다당류(CWPS)(5 μg/mL)를 포함하는 항체 희석 완충액으로 2.5배 연속 희석한 후 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한 다음, 사전 흡착되고 희석된 혈청 50 μl를 코팅된 웰 플레이트에 첨가하고, 이어서 실온에서 2시간 내지 18시간 동안 인큐베이션하였다. 웰 플레이트를 동일한 방식으로 세척한 다음, 염소 항-토끼 IgG-알칼리성 인산분해효소 접합체를 각 웰에 첨가한 다음, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 전술한 바와 같이 세척하고, 기질로서 1 mg/mL p-니트로페닐아민 완충액을 각 웰에 첨가한 다음 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 50 μl의 3 M NaOH를 첨가하여 반응물을 급냉시키고, 405 nm 및 690 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결과를 표 17에 나타냈다.

표 17

[0460] 2차 면역화 후 2주차 IgG 농도 (U/mL)

혈청형	사전-1	사후-1	사전-2	사후-2
15A	312.5	5637.2	312.5	5703.2
15C	130	84369.0	-	-
23A	130	367.9	-	-
23B	141.5	30775.9	152.1	185474.0
24F	309.0	3200.1	476.1	4529.5

[0461] 혈청형 35B의 경우, 표 18에 제시된 바와 같이, 접합 반응의 pH 및 35B 당접합체의 분자량에 기초하여 상이한 당접합체들의 그룹에 대해 IgG 농도를 측정하였다.

표 18

[0462] 2차 면역화 후 2주차 IgG 농도

그룹	35B 당접합체		IgG 농도 U/mL (95% CI)	
	접합 반응의 pH	분자량 (kDa)	사전시험	사후
1	7.2	1162	130 (130-130)	19333 (7330-50991)
2	7.2	323	130(130-130)	10309 (5271-20160)
3	6.0	3153	130 (130-130)	12317 (6718-22584)

[0463] * CI: 신뢰 구간

[0464] 그룹 1, 2 및 3의 유의도: P=0.384

[0465] **1가 접합체에 대한 기능적 면역원성 시험(MOPA)**

[0466] 항체 기능을 MOPA 검정으로 혈청을 시험하여 평가하였다. -70℃ 이하에서 보관된 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) MOPA 균주를 상응하는 최종 희석 배수까지 희석시켜서 각 균주의 농도가 약 50,000 CFU/mL가 되도록 하였다. 각 대상체로부터 동등한 양의 혈청을 샘플링하고, 그룹별로 풀링하고, 20 μl의 혈청이 U-바닥 플레이트에 남아있도록 2배 연속 희석하였다. 시료를 희석한 후, 각각의 혈청형에 대해 제조된 10 μl의 균주를 희석된 시료와 혼합하고, 혼합물이 실온에서 30분 동안 반응하게 해서 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)와 항체가 잘 혼합되도록 하였다. 사전 분화된 HL-60 세포 및 보체의 혼합물을 첨가하고, CO_2 인큐베이터(37℃)에서 45분 동안 반응시켰다. 온도를 감소시켜 탐식작용을 중단시키고, 10 μl의 반응 용액을 30 내지 60분 동안 예비 건조시킨 THY 한천 플레이트 상에 점적시키고, 그런 다음 건조될 때까지 20분 동안 플레이트 상으로 흡수시켰다. 준비된 오버레이 한천에 25 mg/mL TTC 원액을 첨가하고, 상응하는 균주에 적합한 항체를 그 위에 가하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 다음, 약 25 mL의 혼합물을 플레이트 상에 첨가하고 약 30분 동안 경화시켰다. 완전히 경화된 플레이트를 CO_2 인큐베이터(37℃)에서 12 내지 18시간 동안 인큐베이션한 다음 콜로니를 계수하였다. MOPA 역가는 50% 사멸이 관찰된 희석 비율로 표현하였다. 결과를 표 19에 나타냈다.

표 19

[0467] 2차 면역화 후 2주차 단일접합체에 대한 MOPA 역가

혈청형	**사전-1**	**사후-1**	**사전-2**	**사후-2**
15A	5	3555	10	3107
15C	2	31575.3	-	-
23A	2	313.7	-	-
23B	28	18807	57	7375
24F	2	260	2	367

[0468] 혈청형 35B의 경우, 표 20에 제시된 바와 같이, 접합 반응의 pH 및 35B 당접합체의 분자량에 기초하여 상이한 당접합체 그룹에 대해 MOPA 역가를 측정하였다.

표 20

[0469] 2차 면역화 후 2주차 35B-CRM_{197}에 대한 MOPA 역가

그룹	35B 당접합체		기하 평균 역가 (95% CI*)	
	접합 반응의 pH	분자량 (kDa)	사전시험	사후
1	7.2	1162	2	16019 (8621-29766)
2	7.2	323	2	11568 (6434-20798)
3	6.0	3153	2	14151 (9027-22183)

[0470] * CI: 신뢰 구간

[0471] 그룹 1, 2 및 3의 유의도: P=0.621

[0472] **실시예 10: 파상풍 변이독소에 접합된 혈청형 1 및 5 유래 다당류 함유 27가 폐렴구균 접합체 백신의 제형**

[0473] 실시예 2-8로부터 수득한 최종 벌크 농축물의 원하는 부피를 배치 부피 및 벌크 당류 농도에 기초하여 계산하였다. 0.85% 염화나트륨(생리 식염수), 폴리소르베이트 80, 및 숙시네이트 완충액을 미리 표지된 제형 용기에 첨가한 후, 벌크 농축물을 첨가하였다. 그런 다음, 제조물을 완전히 혼합하고 0.2 μm 멤브레인을 통해 멸균 여과하였다. 벌크 인산알루미늄을 첨가하는 동안 및 첨가 후에 제형화된 벌크를 부드럽게 혼합하였다. pH를 확인하고 필요한 경우 조정하였다. 제형화된 벌크 생성물을 2 내지 8℃에서 보관하였다. 다음의 다가 폐렴구균 접합체 백신 제형을 제조하여 PCV27-(1/5)-TT로 명명하였다.

[0474] PCV27(1/5)-TT는 혈청형 1 및 5의 각 다당류를 TT에 접합시키고 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 18C, 19A, 19F, 22F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B의 각 다당류를 CRM_{197}에 접합시켜 제조한 다당류-접합체를 포함한다.

[0475] 0.5 ml의 총 투여량의 PCV27(1/5)-TT는, 4.4 μg의 혈청형 6B를 제외하고, 2.2 μg의 각 다당류; 약 2 μg 내지 25 μg의 TT(혈청형 1 및 5의 경우) 및 약 45 μg 내지 100 μg의 CRM_{197}; 0.125 mg의 원소 알루미늄(0.5 mg의 인산알루미늄) 아쥬반트; 약 4.25 mg의 염화나트륨; 약 295 μg의 숙시네이트 완충 용액; 및 약 120 μg의 폴리소르베이트 80을 포함하였다.

[0476] **실시예 11. 다가 폐렴구균 접합체 백신(PCV27(1/5)-TT)의 면역원성**

[0477] 실시예 10에서 제조된 혼합 담체, 다가 폐렴구균 백신, PCV27(1/5)-TT를 토끼에서 면역원성 반응을 유도하는 능력에 대해 시험하였다. 면역원성 평가는 혈청 IgG 농도에 대한 항원 특이적 ELISA에 의해, 그리고 항체 기능성에 대한 옵소닌탐식작용 분석(OPA)에 의해 수행하였다. 뉴질랜드 흰토끼를 0주차와 2주차에 인간 투여량으로 근육내 면역화하였다(4.4 μg에서 6B를 제외하고, 2.2 μg의 각 다당류). 면역화 후 2주마다 혈청을 샘플링하였다.

[0478] **혈청형 특이적 IgG 농도 측정**

[0479] 각각의 혈청형에 대한 협막 다당류(PnP)를 96-웰 플레이트 상에 0.5 μg/웰 내지 1 μg/웰까지 코팅하였다. 각 대상체로부터 동등한 양의 혈청을 샘플링하고 그룹별로 풀링하였다. 혈청 풀을 Tween 20과 Statens Serum Institut에서 수득한 폐렴구균 세포벽 다당류(CWPS)(5 μg/mL)를 포함하는 항체 희석 완충액으로 2.5배 연속 희석한 후 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한 다음, 사전 흡착되고 희석된 혈청 50 μl를 코팅된 웰 플레이트에 첨가하고, 이어서 실온에서 2시간 내지 18시간 동안 인큐베이션하였다. 웰 플레이트를 동일한 방식으로 세척한 다음, 염소 항-토끼 IgG-알칼리성 인산분해효소 접합체를 각 웰에 첨가한 다음, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 전술한 바와 같이 세척하고, 기질로서 1 mg/mL p-니트로페닐아민 완충액을 각 웰에 첨가한 다음 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 50 μl의 3 M NaOH를 첨가하여 반응물을 급냉시키고, 405 nm 및 690 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결과를 표 21에 나타냈다.

표 21

[0480] 2차 면역화 후 2주차 IgG 농도 (U/mL)

혈청형	PCV27(1/5)-TT 사전	PCV27(1/5)-TT 사후
1	130.0	5929.1
3	130.0	3161.6
4	130.0	5883.6
5	130.0	14645.5
6A	130.0	5823.0
6B	130.0	725.1
7F	130.0	6569.9
8	251.4	11743.1
9N	130.0	20552.6

9V	130.0	13890.2
10A	130.0	5400.2
11A	130.0	5769.0
12F	130.0	2004.1
14	147.9	2631.1
15A	130.0	1632.9
15B	130.0	13427.9
15C	130.0	22777.7
18C	130.0	12984.3
19A	130.0	2117.9
19F	130.0	5464.1
22F	130.0	11996.1
23A	130.0	173.7
23B	155.4	4392.8
23F	130.0	568.7
24F	361.1	1141.5
33F	130.0	11650.0
35B	130.0	656.6

[0481] **기능적 면역원성 시험(MOPA)**

[0482] 항체 기능을 MOPA 검정으로 혈청을 시험하여 평가하였다. -70℃ 이하에서 보관된 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) MOPA 균주를 상응하는 최종 희석 배수까지 희석시켜서 각 균주의 농도가 약 50,000 CFU/mL가 되도록 하였다. 각 대상체로부터 동등한 양의 혈청을 샘플링하고, 그룹별로 풀링하고, 20 μl의 혈청이 U-바닥 플레이트에 남아있도록 2배 연속 희석하였다. 시료를 희석한 후, 각각의 혈청형에 대해 제조된 10 μl의 균주를 희석된 시료와 혼합하고, 혼합물이 실온에서 30분 동안 반응하게 해서 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)와 항체가 잘 혼합되도록 하였다. 사전 분화된 HL-60 세포 및 보체의 혼합물을 첨가하고, CO_2 인큐베이터(37℃)에서 45분 동안 반응시켰다. 온도를 감소시켜 탐식작용을 중단시키고, 10 μl의 반응 용액을 30 내지 60분 동안 예비 건조시킨 한천 플레이트 상에 점적시키고, 그런 다음 건조될 때까지 20분 동안 플레이트 상으로 흡수시켰다. 준비된 오버레이 한천에 25 mg/mL TTC 원액을 첨가하고, 상응하는 균주에 적합한 항체를 그 위에 가하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 다음, 약 25 mL의 혼합물을 플레이트 상에 첨가하고 약 30분 동안 경화시켰다. 완전히 경화된 플레이트를 CO_2 인큐베이터(37℃)에서 12 내지 18시간 동안 인큐베이션한 다음 콜로니를 계수하였다. MOPA 역가는 50% 사멸이 관찰된 희석 비율로 표현하였다. 결과를 표 22에 나타냈다.

표 22

[0483] 2차 면역화 후 2주차 MOPA 역가

혈청형	PCV27(1/5)-TT 사전	PCV27(1/5)-TT 사후
1	2	237
3	2	240
4	2	1564
5	2	975
6A	2	981
6B	2	241
7F	2	479
8	36	901
9N	2	2108
9V	2	261
10A	2	219
11A	16	730
12F	2	193
14	22	416
15A	2	3099
15B	22	501

15C	2	6743
18C	2	816
19A	2	261
19F	2	571
22F	6	477
23A	2	203
23B	2	565
23F	2	221
24F	2	143
33F	2	312
35B	6	627

[0484] **실시예 12: 파상풍 변이독소에 접합된 혈청형 1, 5, 15B 및 22F 유래 다당류 함유 27가 폐렴구균 접합체 백신의 제형**

[0485] 실시예 2-8에 기술된 일반적인 방법에 따라 단일접합체들을 수득하였다. 최종 벌크 농축물의 원하는 부피를 배치 부피 및 벌크 당류 농도에 기초하여 계산하였다. 0.85% 염화나트륨(생리 식염수), 폴리소르베이트 80, 및 숙시네이트 완충액을 미리 표지된 제형 용기에 첨가한 후, 벌크 농축물을 첨가하였다. 그런 다음, 제조물을 완전히 혼합하고 0.2 μm 멤브레인을 통해 멸균 여과하였다. 벌크 인산알루미늄을 첨가하는 동안 및 첨가 후에 제형화된 벌크를 부드럽게 혼합하였다. pH를 확인하고 필요한 경우 조정하였다. 제형화된 벌크 생성물을 2 내지 8℃에서 보관하였다. 다음의 다가 폐렴구균 접합체 백신 제형을 제조하여 PCV27-(1/5/15B/22F)-TT로 명명하였다.

[0486] PCV27(1/5/15B/22F)-TT는 혈청형 1, 5, 15B, 및 22F의 각 다당류를 TT에 접합시키고 혈청형 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15C, 18C, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 24F, 33F 및 35B의 각 다당류를 CRM_{197}에 접합시켜 제조한 다당류-접합체를 포함한다.

[0487] 0.5 ml의 총 투여량의 PCV27(1/5/15B/22F)-TT는, 4.4 μg의 혈청형 6B를 제외하고, 2.2 μg의 각 다당류; 약 2 μg 내지 25 μg의 TT(혈청형 1, 5, 15B, 22F의 경우) 및 약 45 μg 내지 100 μg의 CRM_{197}; 0.125 mg의 원소 알루미늄(0.5 mg의 인산알루미늄) 아쥬반트; 약 4.25 mg의 염화나트륨; 약 295 μg의 숙시네이트 완충 용액; 및 약 120 μg의 폴리소르베이트 80을 포함하였다.

[0488] **실시예 13. 다가 폐렴구균 접합체 백신, PCV27(1/5/15B/22F)-TT의 면역원성**

[0489] 실시예 12에서 제조된 혼합 담체, 다가 폐렴구균 백신, PCV27(1/5/15B/22F)-TT를 토끼에서 면역원성 반응을 유도하는 능력에 대해 시험하였다. 면역원성 평가는 혈청 IgG 농도에 대한 항원 특이적 ELISA에 의해, 그리고 항체 기능성에 대한 옵소닌탐식작용 분석(OPA)에 의해 수행하였다. 뉴질랜드 흰토끼를 0주차와 2주차에 인간 투여량으로 근육내 면역화하였다(4.4 μg에서 6B를 제외하고, 2.2 μg의 각 다당류). 면역화 후 2주마다 혈청을 샘플링하였다.

[0490] **혈청형 특이적 IgG 농도 측정**

[0491] 각각의 혈청형에 대한 협막 다당류(PnP)를 96-웰 플레이트 상에 0.5 μg/웰 내지 1 μg/웰까지 코팅하였다. 각 대상체로부터 동등한 양의 혈청을 샘플링하고 그룹별로 풀링하였다. 혈청 풀을 Tween 20과 Statens Serum Institut에서 수득한 폐렴구균 세포벽 다당류(CWPS)(5 μg/mL)를 포함하는 항체 희석 완충액으로 2.5배 연속 희석한 후 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 플레이트를 세척 완충액으로 5회 세척한 다음, 사전 흡착되고 희석된 혈청 50 μl를 코팅된 웰 플레이트에 첨가하고, 이어서 실온에서 2시간 내지 18시간 동안 인큐베이션하였다. 웰 플레이트를 동일한 방식으로 세척한 다음, 염소 항-토끼 IgG-알칼리성 인산분해효소 접합체를 각 웰에 첨가한 다음, 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 전술한 바와 같이 세척하고, 기질로서 1 mg/mL p-니트로페닐아민 완충액을 각 웰에 첨가한 다음 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 50 μl의 3 M NaOH를 첨가하여 반응물을 급냉시키고, 405 nm 및 690 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 비교예로서, 상업적으로 이용 가능한 13가 백신(PREVNAR13)에 동일한 절차를 수행하였다. 결과를 표 23에 나타냈다.

표 23

[0492] 2차 면역화 후 2주차 IgG 농도 (U/mL)

혈청형	Prevnar13		PCV27(1/5/15B/22F)-TT	
	사전	사후	사전	사후
1	130.0	471.2	130.0	6174.5
3	173.7	1052.8	130.0	4296.6
4	130.0	1267.1	130.0	5237.9
5	130.0	1551.7	130.0	28839.0
6A	130.0	722.4	130.0	2538.2
6B	130.0	252.9	130.0	671.5
7F	130.0	5969.8	130.0	6056.5
8	130.0	130.0	140.6	7108.9
9N	169.4	225.0	211.2	25748.1
9V	130.0	7085.3	130.0	6228.0
10A	130.0	130.0	130.0	3022.1
11A	130.0	130.0	130.0	3928.1
12F	130.0	130.0	130.0	1393.4
14	130.0	777.7	107.3	1132.9
15A	130.0	130.0	130.0	416.8
15B	130.0	130.0	130.0	4196.6
15C	130.0	130.0	130.0	5882.5
18C	143.2	2387.1	130.0	7544.2
19A	147.7	1643.5	130.0	899.9
19F	130.0	6623.0	130.0	12785.6
22F	130.0	130.0	130.0	5492.0
23A	130.0	158.5	130.0	840.1
23B	203.4	2098.3	141.6	2765.6
23F	130.0	566.4	130.0	588.8
24F	377.6	362.7	362.7	2351.9
33F	130.0	130.0	130.0	3573.9
35B	148.0	150.5	130.0	936.6

[0493] **기능적 면역원성 시험(MOPA)**

[0494] 혈청형 1 및 5의 협막 다당류가 TT에 접합되었을 때, 혈청형 특이적 IgG 농도는 이들이 CRM_{197}에 접합되었을 때의 농도에 비해 상당히 증가하였다. PCV27(1/5/15B/22F)-TT로 면역화된 토끼는 또한 PREVNAR13에 존재하지 않는 추가의 14개의 혈청형(즉, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 22F, 23A, 23B, 24F, 33F 및 35B)에 대해 IgG 농도의 유의한 증가를 나타냈다. 혈청형 8 및 9N은, 특히, PREVNAR13에 비해 혈청 특이적 IgG 농도가 50배 넘게 증가하였다.

[0495] 항체 기능을 MOPA 검정으로 혈청을 시험하여 평가하였다. -70℃ 이하에서 보관된 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*) MOPA 균주를 상응하는 최종 희석 배수까지 희석시켜서 각 균주의 농도가 약 50,000 CFU/mL가 되도록 하였다. 각 대상체로부터 동등한 양의 혈청을 샘플링하고, 그룹별로 풀링하고, 20 μl의 혈청이 U-바닥 플레이트에 남아있도록 2배 연속 희석하였다. 시료를 희석한 후, 각각의 혈청형에 대해 제조된 10 μl의 균주를 희석된 시료와 혼합하고, 혼합물이 실온에서 30분 동안 반응하게 해서 S. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)와 항체가 잘 혼합되도록 하였다. 사전 분화된 HL-60 세포 및 보체의 혼합물을 첨가하고, CO_2 인큐베이터(37℃)에서 45분 동안 반응시켰다. 온도를 감소시켜 탐식작용을 중단시키고, 10 μl의 반응 용액을 30 내지 60분 동안 예비 건조시킨 한천 플레이트 상에 점적시키고, 그런 다음 건조될 때까지 20분 동안 플레이트 상으로 흡수시켰다. 준비된 오버레이 한천에 25 mg/mL TTC 원액을 첨가하고, 상응하는 균주에 적합한 항체를 그 위에 가하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 다음, 약 25 mL의 혼합물을 플레이트 상에 첨가하고 약 30분 동안 경화시켰다. 완전히 경화된 플레이트를 CO_2 인큐베이터(37℃)에서 12 내지 18시간 동안 인큐베이션한 다음 콜로니를 계수하였다. MOPA 역가는 50% 사멸이 관찰된 희석 비율로 표현하였다. 비교예로서, 상업적으로 이용 가능한 13가 백신(PREVNAR13)에 동일한 절차를 수행하였다. 결과를 표 24에 나타냈다.

표 24

[0496] 2차 면역화 후 2주차 MOPA 역가

혈청형	Prevnar13		PCV27(1/5/15B/22F)-TT	
	사전	사후	사전	사후
1	2	72	61	527
3	18	154	131	280
4	2	91	2	374
5	2	213	182	1967
6A	2	253	2	292
6B	2	250	2	591
7F	2	218	2	259
8	2	2	2	671
9N	2	2	2	1564
9V	2	289	2	99
10A	2	2	2	92
11A	2	2	2	10923
12F	2	2	2	140
14	2	213	2	273
15A	2	80	2	635
15B	10	40	49	199
15C	25	73	56	1837
18C	2	356	2	940
19A	2	468	2	211
19F	2	240	2	628
22F	2	2	2	639
23A	2	66	2	404
23B	2	426	2	823
23F	2	223	2	222
24F	2	2	2	169
33F	2	2	2	80
35B	2	51	2	237

[0497] 혈청형 1과 5를 TT에 접합시켰을 때, 기능적 MOPA 역가는 CRM_{197}에 접합했을 때 수득한 MOPA 역가에 비해 유의하게 증가하였다. PCV27(1/5/15B/22F)-TT로 면역화된 토끼는 또한 PREVNAR13에 존재하지 않는 추가의 14개의 혈청형(즉, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 15B, 15C, 22F, 23A, 23B, 24F, 33F 및 35B) 각각에 대해 기능적 MOPA 역가의 유의한 증가를 나타냈다.

[0498] 하나 이상의 예시적인 구현예가 본 명세서에 설명되었지만, 해당 분야 숙련자라면 하기 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 개념의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않고서 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 그 안에서 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.