(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-542316
(P2022-542316A)
(43)公表日　令和4年9月30日(2022.9.30)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/385 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/385	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｋ	*39/09 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/09	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*39/116 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/116	
Ａ６１Ｋ	*47/64 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/64	
Ａ６１Ｋ	*39/39 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/39	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全82頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-506101(P2022-506101)
(86)(22)出願日　令和2年7月27日(2020.7.27)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月15日(2022.3.15)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/043729
(87)国際公開番号　WO2021/021729
(87)国際公開日　令和3年2月4日(2021.2.4)
(31)優先権主張番号　62/949,164
(32)優先日　令和1年12月17日(2019.12.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　10-2019-0093276
(32)優先日　令和1年7月31日(2019.7.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　517055195
サノフィ　パスツール　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　１８７３０　ペンシルベニア州　スウィフトウォーター　ディスカバリー　ドライブ　１
(71)出願人　519038714
エスケー　バイオサイエンス　カンパニー　リミテッド
大韓民国　１３４９４　キョンギ－ド　ソンナム－シ　ブダン－グ　パンギョ－ロ　３１０
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100140132
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　多価肺炎球菌多糖体－タンパク質コンジュゲート組成物およびその使用方法

(57)【要約】
２２～２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物が提供される。多価肺炎球菌コンジュゲート組成物の製造方法、および対象において肺炎連鎖球菌感染または疾患を予防するためのその使用方法も提供される。少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、多糖体が、肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、２４Ｆ、および／または３５Ｂ由来の莢膜多糖体である免疫原性組成物、ならびにその製造方法も提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
多価肺炎球菌コンジュゲート組成物であって、２２～２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される、前記多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項２】
２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２２Ｆ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂから選択される、請求項１に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項３】
２６種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される４つの血清型から選択される、請求項１に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項４】
２５種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される３つの血清型から選択される、請求項１に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項５】
２４種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される２つの血清型から選択される、請求項１に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項６】
２３種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される１つの血清型から選択される、請求項１に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項７】

２２種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂから選択される、請求項１に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項８】

タンパク質担体がＣＲＭ$_{197}$および／または破傷風トキソイドを含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項９】

莢膜多糖体の少なくとも２種が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されており、破傷風トキソイドにコンジュゲート化されている少なくとも２種の莢膜多糖体は、血清型１、３、５、１５Ｂ、および２２Ｆからなる群から選択されている、請求項８に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項１０】

血清型１および５由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている、請求項２に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項１１】

血清型１および３由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている、請求項２に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項１２】

血清型３および５由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型１、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている、請求項２に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項１３】

血清型１、５、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている、請求項２に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項１４】

血清型１、３、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている、請求項２に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項１５】

血清型３、５、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型１、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されてい

る、請求項２に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項１６】
アジュバントをさらに含む、請求項１～１５のいずれか１項に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項１７】
アジュバントがアルミニウム系アジュバントである、請求項１６に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項１８】
アジュバントが、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、および水酸化アルミニウムからなる群から選択される、請求項１７に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項１９】
アジュバントがリン酸アルミニウムである、請求項１８に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。
【請求項２０】
対象における肺炎連鎖球菌感染または疾患の予防のための、請求項１～１９のいずれか１項に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物の使用。
【請求項２１】
請求項１～１９のいずれか１項に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物および薬学的に許容される賦形剤を含むワクチン。
【請求項２２】
対象において肺炎連鎖球菌感染または疾患を予防する方法であって、請求項１～１９のいずれか１項に記載の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物または請求項２１に記載のワクチンを対象に予防有効量投与することを含む前記方法。
【請求項２３】
対象が、少なくとも５０歳であるヒトであり、疾患が、肺炎または侵襲性肺炎球菌感染症（ＩＰＤ）である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
対象が、少なくとも６週齢であるヒトであり、疾患が、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症（ＩＰＤ）、または急性中耳炎（ＡＯＭ）である。請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
対象が、６週齢～５歳、２～１５か月齢、または６～１７歳である、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
対象がヒトである、請求項２０に記載の使用または請求項２２に記載の方法。
【請求項２７】
多価肺炎球菌コンジュゲート組成物またはワクチンが、筋肉内注射によって投与される、請求項２２～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
多価肺炎球菌コンジュゲート組成物またはワクチンが、一連の免疫化の一部として投与される、請求項２２～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
免疫原性組成物であって、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートにおける多糖体は、肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ、血清型１５Ｃ、血清型２３Ａ、血清型２３Ｂ、血清型２４Ｆ、または血清型３５Ｂ由来の莢膜多糖体である、前記免疫原性組成物。
【請求項３０】
本文書に記載するとおりの、肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ、血清型１５Ｃ、血清型２３Ａ、血清型２３Ｂ、血清型２４Ｆ、または血清型３５Ｂ由来の莢膜多糖体を作製する方法。
【請求項３１】
血清型が血清型１５Ａであり、方法が、

（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体を、酸加水分解反応および熱またはマイクロフルイダイザーにかけ、次いで、酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体および担体タンパク質を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
血清型が血清型１５Ｃであり、方法が、
（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体を酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化血清型１５Ｃ多糖体と担体タンパク質の混合物を還元剤と反応させて、血清型１５Ｃ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）血清型１５Ｃ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
血清型が血清型２３Ａであり、方法が、
（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型２３Ａを酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体と担体タンパク質の混合物を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
血清型が血清型２３Ｂであり、方法が、
（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂを酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体および担体タンパク質をジメチルスル

ホキシド（ＤＭＳＯ）に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体と担体タンパク質の混合物を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３５】
血清型が血清型２４Ｆであり、方法が、
（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体を、酸加水分解反応またはマイクロフルイダイザーにかけ、次いで、酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体および担体タンパク質を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３６】
血清型が血清型３５Ｂであり、方法が、
（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂを酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む、請求項３０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１９年１２月１７日に出願された米国仮特許出願第６２／９４９，１６４号、および２０１９年７月３１日に出願された韓国特許出願第１０－２０１９－００９３２７６号の利益を主張し、これらの出願日に依拠するものであり、これらの開示全体を参照によって本明細書に組み入れる。
【０００２】
技術分野
本出願は、一般に、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物、それを含むワクチン、ならび

に対象において肺炎連鎖球菌感染および疾患を予防するための、そうした組成物およびワクチンの使用方法に関する。

【背景技術】

【０００３】

肺炎球菌（肺炎連鎖球菌）は、槍形のグラム陽性通性嫌気性細菌であり、９０を超える血清型が知られている。ほとんどの肺炎連鎖球菌血清型が、（肺炎、菌血症、髄膜炎、および耳炎疾患などの）疾患を引き起こし、最も一般的な２３の血清型が、世界中の侵襲性疾患のおよそ９０％の原因になっていることが示されている。血清型は、肺炎球菌にとって最も重要な病原性因子である莢膜多糖体の血清学的応答に基づいて分類される。莢膜多糖体は、ヘルパーＴ細胞が存在しなくても抗体産生を誘導するＴ細胞非依存性抗原である。Ｔ細胞非依存性抗原は、一般に、親和性の低い抗体を誘導し、免疫記憶をほとんど乃至まったく残さない短命な免疫応答を誘発する。

【０００４】

初期の肺炎球菌ワクチンは、異なる血清型由来の莢膜多糖体の組合せを含んでいた。こうしたワクチンは、免疫系が発達しているまたは健康である患者において、肺炎連鎖球菌に対する免疫を付与しうるが、しかし、免疫系の発達が不十分である小児、および免疫機能が往々にして弱っている高齢対象においては有効でなかった。特に、肺炎連鎖球菌感染を起こすリスクのより高い小児および高齢対象において、肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答を向上させるために、莢膜多糖体が適切な担体タンパク質にコンジュゲート化されて、肺炎球菌コンジュゲートワクチンが作製された。適切な担体タンパク質へのコンジュゲート化によって、莢膜多糖体は、Ｔ細胞非依存性抗原からＴ細胞依存性抗原に変化する。そのため、コンジュゲート化された莢膜多糖体に対する免疫応答には、ヘルパーＴ細胞が関与し、その結果、莢膜多糖体に再び曝露されると、より強力かつ急速な免疫応答の誘発が助長される。

【０００５】

肺炎球菌糖コンジュゲートワクチンを開発するには、少なくとも２つの手法：単一担体手法および混成担体手法が存在する。異なる莢膜多糖体コンジュゲートの免疫原性は、使用する肺炎球菌血清型および担体タンパク質に応じて様々となりうる。単一担体手法では、異なる血清型由来の莢膜多糖体が、単一のタンパク質担体にコンジュゲート化される。ＰｆｉｚｅｒのＰＲＥＶＮＡＲシリーズのワクチンは、単一担体手法の一例であり、グリシンのグルタミン酸での単一アミノ酸置換を有するジフテリアトキソイドの非毒性変異体であるＣＲＭ$_{197}$タンパク質担体に、異なる莢膜多糖体がコンジュゲート化されている。７価のＰＲＥＶＮＡＲワクチン（ＰＲＥＶＮＡＲ）は、２０００年に最初に承認されており、承認の時期に最も流行していた肺炎連鎖球菌血清型：４、６Ｂ、９Ｖ、１４、１８Ｃ、１９Ｆ、および２３Ｆ由来の莢膜多糖体を含んでいる。１３価ワクチンであるＰＲＥＶＮＡＲ１３では、ＣＲＭ$_{197}$タンパク質担体に、血清型１、５、７Ｆ、３、６Ａ、および１９Ａが加えられた。Ｍｅｒｃｋは、ＰＲＥＶＮＡＲ１３に存在する１３の血清型に加えて２２Ｆおよび３３ＦがＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されたものを含む、１５価のＶ１１４ワクチンを開発中である。特許文献１を参照されたい。Ｍｅｒｃｋは、ＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化された次の２１の肺炎連鎖球菌血清型：３、６Ｃ、７Ｆ、８、９Ｎ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１５Ａ、１６Ｆ、１７Ｆ、１９Ａ、２０Ａ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２４Ｆ、３１、３３Ｆ、３５Ｂ、および１５Ｂ、１５Ｃ、または脱Ｏ－アセチル化１５Ｂの少なくとも１つを含む、２１価の肺炎球菌コンジュゲート組成物（ＰＣＶ２１）も開示している。特許文献２を参照されたい。

【０００６】

第２の肺炎球菌コンジュゲートワクチン手法は、混成担体手法である。混成担体手法では、単一のタンパク質担体を使用する代わりに、２種以上のタンパク質担体が使用され、特定の血清型由来の莢膜多糖体が第１のタンパク質担体にコンジュゲート化され、異なる血清型由来の莢膜多糖体が少なくとも、第２の異なるタンパク質担体にコンジュゲート化される。たとえば、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅが、タンパク質担体として、インフ

ルエンザ菌タンパク質Ｄ、破傷風トキソイド、およびジフテリアトキソイドを使用した１０価（血清型１、４、５、６Ｂ、７Ｆ、９Ｖ、１４、１８Ｃ、１９Ｆ、および２３Ｆ）混成担体肺炎球菌コンジュゲートワクチンであるＳＹＮＦＬＯＲＩＸを開発している。ＳＹＮＦＬＯＲＩＸでは、血清型１、４、５、６Ｂ、７Ｆ、９Ｖ、１４、および２３Ｆがタンパク質Ｄにコンジュゲート化され；血清型１８Ｃが破傷風トキソイドにコンジュゲート化され；血清型１９Ｆがジフテリアトキソイドにコンジュゲート化されている。非特許文献１。より最近では、Ｓａｎｏｆｉ　ＰａｓｔｅｕｒおよびｓＫ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓが、公開国際出願である特許文献３、特許文献４、特許文献５、および特許文献６で開示されているとおりの、１６価（血清型１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、９Ｖ、１２Ｆ、１４、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、および３３Ｆ）、２０価（血清型１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、および３３Ｆ）、および２１価（１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、および３３Ｆ）混成担体肺炎球菌コンジュゲートワクチンを作製しており、これら文献それぞれの全体を参照によって組み入れる。こうした混成担体多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンでは、２つの血清型（血清型１、３、および５のうちの２つ）または４つの血清型（血清型１５Ｂおよび２２Ｆならびに血清型１、３、および５のうちの２つ）が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの血清型がCRM_{197}にコンジュゲート化されている。

【０００７】

単一担体および混成担体どちらの糖コンジュゲートワクチンも、ワクチンに含まれている肺炎球菌血清型に対する様々なレベルの防御の提供に使用されてきたが、血清型置換、または糖コンジュゲートワクチンに含まれていない病原性肺炎球菌株／血清型の有病率の増大が認められており、懸案となっている。非特許文献２。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】米国特許第８，１９２，７４６号

【特許文献２】ＵＳ２０１９／０１９２６４８

【特許文献３】ＷＯ２０１８／０２７１２３

【特許文献４】ＷＯ２０１８／０２７１２６

【特許文献５】ＷＯ２０１９／１５２９２１

【特許文献６】ＷＯ２０１９／１５２９２５

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Ｖｅｓｉｋａｒｉら、ＰＩＤＪ、２８（４）：Ｓ６６～７６（２００９）

【非特許文献２】Ｄａｎｉｅｌｓら、Ｊ　Ｐｅｄｉａｔｒ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ　Ｔｈｅｒ．２０１６　Ｊａｎ－Ｆｅｂ；２１（１）：２７～３５

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本出願は、新たな改良された多価肺炎球菌コンジュゲート組成物およびそれを含むワクチンを提供する。一態様では、本出願は、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物であって、２２～２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を提供する。

該当する他の肺炎連鎖球菌血清型が、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物に加えられる場合もある。ある特定の実施形態では、各莢膜多糖体が、同じタンパク質担体にコンジュゲート化されている。混成担体実施形態と呼ぶ、ある特定の実施形態では、１種に留まらないタンパク質担体、たとえば、２種の異なるタンパク質担体が使用される。たとえば、ある特定の実施形態では、ある特定の莢膜多糖体が第１のタンパク質担体にコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体が第２のタンパク質担体に取り付けられる。ある特定の実施形態では、第１および第２のタンパク質担体は、ＣＲＭ$_{197}$および破傷風トキソイドを含む。ある特定の実施形態では、莢膜多糖体のうちの２種が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ある特定の実施形態では、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される２種の莢膜多糖体は、血清型１、３、および５からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される２種の莢膜多糖体は、血清型１、３、５、１５Ｂ、および２２Ｆからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、莢膜多糖体のうちの４種が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ある特定の実施形態では、４種の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される４種の莢膜多糖体のうちの２種は、血清型１、３、および５からなる群から選択され、残りの２種の莢膜多糖体は、血清型１５Ｂおよび２２Ｆである。

【００１１】

一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートは、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【００１２】

ある特定の実施形態では、血清型１および５由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。別の一実施形態では、血清型１および３由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。さらに別の一実施形態では、血清型３および５由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型１、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。

【００１３】

ある特定の実施形態では、莢膜多糖体のうちの４種が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されており、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される４種の莢膜多糖体のうちの２種は、血清型１、３、および５からなる群から選択され、残りの２種の莢膜多糖体は、血清型１５Ｂおよび２２Ｆである。

【００１４】

一実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、血清型１、５、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ

、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。

【００１５】

別の一実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、血清型１、３、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。

【００１６】

別の一実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、血清型３、５、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型１、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。

【００１７】

ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２６種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートは、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【００１８】

ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２５種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートは、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【００１９】

ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２４種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートは、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【００２０】

ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２３種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートは、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【００２１】

ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２２種の異なる肺炎

球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートは、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【００２２】

一部の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、限定はしないが、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、および水酸化アルミニウムを始めとするアルミニウム系アジュバントなどのアジュバントをさらに含む。

【００２３】

別の一態様は、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物のワクチンとしての使用を対象とする。

【００２４】

さらに別の一態様は、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物および薬学的に許容される賦形剤を含むワクチンを対象とする。

【００２５】

さらに別の一態様は、ヒトなどの対象において肺炎連鎖球菌感染または疾患を予防する方法であって、予防有効量の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物またはそれを含むワクチンを対象に投与することを含む方法を対象とする。

【００２６】

ある特定の実施形態では、対象は、少なくとも５０歳であるヒトであり、疾患は、肺炎または侵襲性肺炎球菌感染症（ＩＰＤ）である。

【００２７】

他の実施形態では、対象は、少なくとも６週齢であるヒトであり、疾患は、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症（ＩＰＤ）、または急性中耳炎（ＡＯＭ）である。一部の実施形態では、ヒト対象は、６週齢～５歳である。他の実施形態では、ヒト対象は、２～１５か月齢または６～１７歳である。

【００２８】

ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物またはワクチンは、筋肉内注射によって投与される。ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物またはワクチンは、一連の免疫化の一部として投与される。

【００２９】

さらに別の一態様は、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物、およびそれを調製する方法であって、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートにおける多糖体が、肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ由来の莢膜多糖体である、免疫原性組成物および方法を対象とする。

【００３０】

さらに別の一態様は、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物、およびそれを調製する方法であって、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートにおける多糖体が、肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ由来の莢膜多糖体である、免疫原性組成物および方法を対象とする。

【００３１】

さらに別の一態様は、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物、およびそれを調製する方法であって、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートにおける多糖体が、肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ由来の莢膜多糖体である、免疫原性組成物および方法を対象とする。

【００３２】

さらに別の一態様は、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物、およびそれを調製する方法であって、少なくとも１種の多糖体－タンパク質

コンジュゲートにおける多糖体が、肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ由来の莢膜多糖体である、免疫原性組成物および方法を対象とする。

【００３３】

さらに別の一態様は、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物、およびそれを調製する方法であって、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートにおける多糖体が、肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ由来の莢膜多糖体である、免疫原性組成物および方法を対象とする。

【００３４】

さらに別の一態様は、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物、およびそれを調製する方法であって、少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートにおける多糖体が、肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ由来の莢膜多糖体である、免疫原性組成物および方法を対象とする。

【００３５】

肺炎球菌コンジュゲート組成物の前述および他の目的、構成、および利点は、以下の詳細な記述からより明白となる。

【００３６】

定義

本開示をより容易く理解するために、ある特定の用語について、まず以下で定義する。以下の用語および他の用語についての追加の定義が、本明細書の至る所に記載される場合がある。

【００３７】

本明細書および添付の請求項において使用するとき、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈からそうでないことが明らかに規定されない限り、複数の言及を包含する。したがって、たとえば、「ａ　ｍｅｔｈｏｄ」への言及は、本文書に記載するような、および／または本開示を読めば当業者に明白となるような１つまたはそれ以上の方法および／または工程などを含む。

【００３８】

投与する：本文書で使用するとき、組成物を対象に「投与する」とは、組成物を対象に与える、適用する、または接触させることを意味する。投与は、たとえば、局所、経口、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、くも膜下腔内、皮内などのいくつかの経路のいずれかによって実現することができる。

【００３９】

およそ：本文書で使用するとき、該当する１またはそれ以上の値に適用される用語「およそ」または「約」とは、明記された参考値と近似する値を指す。ある特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、別段明記しない限り、またはそうでないことが文脈から明らかでない限り、いずれの方向（より大きいまたは小さい）においても、明記された参考値に対して２５％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、またはより低い％内に収まる値の範囲を指す（そうした数が、考えられる値の１００％を超える場合を除く）。

【００４０】

コンジュゲート：本文書において使用され、妥当な文脈から理解されるとき、用語「コンジュゲート」または「糖コンジュゲート」とは、いずれかの共有結合的または非共有結合的バイオコンジュゲーション戦略を使用して担体タンパク質にコンジュゲート化された肺炎連鎖球菌多糖体を指す。

【００４１】

酸化度：本文書で使用するとき、用語「酸化度」（ＤＯ）とは、精製またはサイジングされた糖を酸化剤で活性化したときに生じたアルデヒド基あたりの糖繰り返し単位の数を指す。糖の酸化度は、当業者に知られている型通りの方法を使用して求めることができる。

【００４２】
実施形態：本文書で使用するとき、用語「ある特定の実施形態では」、「一部の実施形態では」などは、文脈からそうでないことが明らかに規定されない限り、本開示のすべての態様の実施形態を指す。
【００４３】
賦形剤：本文書で使用するとき、用語「賦形剤」とは、たとえば、所望の稠性または安定化効果を得るまたはそれに寄与するように、組成物中に含めることのできる非治療的薬剤を指す。
【００４４】
混成担体：本文書で使用するとき、混成担体肺炎球菌コンジュゲート組成物とは、２種以上のタイプのタンパク質担体を有する肺炎球菌コンジュゲート組成物を指す。
【００４５】
２２価の肺炎球菌コンジュゲート組成物：本文書で使用するとき、用語「２２価の肺炎球菌コンジュゲート組成物」または「ＰＣＶ－２２」とは、２２種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。
【００４６】
２３価の肺炎球菌コンジュゲート組成物：本明細書で使用するとき、用語「２３価の肺炎球菌コンジュゲート組成物」または「ＰＣＶ－２３」とは、２３種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。
【００４７】
２４価の肺炎球菌コンジュゲート組成物：本文書で使用するとき、用語「２４価の肺炎球菌コンジュゲート組成物」または「ＰＣＶ－２４」とは、２４種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。
【００４８】
２５価の肺炎球菌コンジュゲート組成物：本文書で使用するとき、用語「２５価の肺炎球菌コンジュゲート組成物」または「ＰＣＶ－２５」とは、２５種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される

。

【００４９】

２６価の肺炎球菌コンジュゲート組成物：本文書で使用するとき、用語「２６価の肺炎球菌コンジュゲート組成物」または「ＰＣＶ－２６」とは、２６種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【００５０】

２７価の肺炎球菌コンジュゲート組成物：本文書で使用するとき、用語「２７価の肺炎球菌コンジュゲート組成物」または「ＰＣＶ－２７」とは、２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂである。

【００５１】

分子量：別段指定しない限り、本文書で使用するとき、莢膜糖または莢膜糖－担体タンパク質コンジュゲートの「分子量」という用語は、多角度レーザー光散乱法（ＭＡＬＬＳ）と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）によって算出された平均分子量を指す。

【００５２】

多価：本文書で使用するとき、用語「多価」とは、２つ以上の肺炎連鎖球菌血清型由来の肺炎球菌莢膜多糖体を有する肺炎球菌コンジュゲート組成物を指す。

【００５３】

薬学的に許容される賦形剤：本開示において使用できる薬学的に許容される賦形剤は、常套的である。Ｅ．Ｗ．ＭａｒｔｉｎによるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、ペンシルベニア州イーストン、第１５版（１９７５）は、１種またはそれ以上のワクチンなどの治療用組成物および追加医薬品の薬学的送達に適する組成物および製剤を記載している。適切な医薬賦形剤としては、たとえば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアリン酸エステル、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。一般に、賦形剤の種類は、用いられる特定の投与方式に応じて決まる。たとえば、非経口製剤は、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、緩衝液、デキストロース水溶液、グリセロールなどの、薬学的および生理的に許容される流体を媒体として含む注射液を含むのが普通である。固体組成物（たとえば、粉末、丸剤、錠剤、またはカプセル形態）用には、従来の非毒性固体賦形剤として、たとえば、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを挙げることができる。投与される医薬組成物は、生物学的に中立な担体に加えて、湿潤または乳化剤、界面活性剤、保存剤、ｐＨ緩衝剤などのような非毒性補助物質、たとえば、酢酸ナトリウムやモノラウリン酸ソルビタンを少量含有してよい。

【００５４】

予防有効量：本文書で定義するとき、用語「予防有効量」または「予防有効用量」とは、肺炎連鎖球菌感染によって引き起こされる１つまたはそれ以上の症状の発症を遅らせる、ならびに／または頻度および／もしくは重症度を低減するのに十分な免疫応答の誘発に

必要となる量または用量を指す。
【００５５】
予防：本文書で使用する用語「予防」とは、特定の疾患、障害、または状態（たとえば、肺炎連鎖球菌感染）の疾患出現を回避する、その１つまたはそれ以上の症状の発症を遅らせる、ならびに／またはその頻度および／もしくは重症度を低減することを指す。一部の実施形態では、集団を基盤として予防を評価した結果、特定の疾患、障害、または状態に罹りやすい集団において、疾患、障害、または状態の１つまたはそれ以上の症状の発現、頻度、および／または強度に統計的に有意な低減が認められる場合、薬剤によって、特定の疾患、障害、または状態に対する予防が実現されるとみなされる。
【００５６】
対象：本文書で使用するとき、用語「対象」とは、マウス、ウサギ、およびヒトを含む、いずれかの哺乳動物を意味する。ある特定の実施形態では、対象は、成人、青年、または小児である。一部の実施形態では、用語「個体」または「患者」が使用され、「対象」と交換可能であるものとされる。
【発明を実施するための形態】
【００５７】
開示する実施形態および実施例についての以下の記述は、例示的な性質のものにすぎず、本発明、その適用、または使用を一切限定しないものである。
【００５８】
本出願は、新たな改良された多価肺炎球菌コンジュゲート組成物およびそれを含むワクチンを提供する。実施例において示すとおり、血清型１５Ａ、血清型１５Ｃ、血清型２３Ａ、血清型２３Ｂ、血清型２４Ｆ、血清型３５Ｂなどの、現存する肺炎球菌ワクチンによってカバーされていない血清型を含む、ＰＣＶ－２７における２７の血清型に対して、ロバストな抗体応答が認められた。
【００５９】
肺炎球菌多糖体血清型１５Ａ
血清型１５Ａ多糖体は、当業者に知られている単離手順（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用することにより、細菌から直接取得することができる。加えて、合成プロトコールを使用して、１５Ａオリゴ糖を生成することもできる。
【００６０】
血清型１５Ａ肺炎連鎖球菌株は、確立された培養細胞保存機関（たとえば、Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ（ジョージア州アトランタ）のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）または臨床検体から取得することができる。
【００６１】
細菌細胞は、通常、大豆系培地などの培地で増殖させる。肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ莢膜多糖体を産生する細菌細胞による発酵の後、細菌細胞を溶解させて、細胞溶解物を生じさせる。次いで、遠心分離、深層濾過、沈殿、限外濾過、活性炭処理、ダイアフィルトレーション、および／またはカラムクロマトグラフィーを始めとする、当業界で知られている精製技術（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用して、細胞溶解物から、血清型１５Ａ多糖体を単離することができる。
【００６２】
精製された血清型１５Ａ多糖体を、担体タンパク質にコンジュゲート化すると、血清型１５Ａ多糖体および担体タンパク質を含む少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物ができる。一態様では、１５Ａ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、
（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体を、酸加水分解反応および熱またはマイクロフルイダイザーにかけ、次いで、酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清

型１５Ａ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体および担体タンパク質を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む方法によって作製することができる。この方法において使用することのできる試薬（たとえば、酸化剤、還元剤、担体タンパク質など）および条件についてのさらなる細目は、後続のセクションおよび実施例の中を含む、本出願における他の箇所で開示する。

【００６３】
活性化血清型１５Ａ莢膜多糖体は、たとえば、分子量（ＭＷ）および／または酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴付けることができる。

【００６４】
一態様では、たとえば、コンジュゲート化される前に約１０～１２０ｋＤａ、５０～１２０ｋＤａ、７０～１２０ｋＤａ、７０～８０ｋＤａ、７０～１１８ｋＤａ、１１４～１１８ｋＤａ、または約１１６ｋＤａの分子量を有する活性化血清型１５Ａ莢膜多糖体を含めて、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体は、コンジュゲート化される前の分子量が１２０ｋＤａ未満である。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【００６５】
一態様では、肺炎連鎖球菌血清型１５Ａ多糖体の分子量が、コンジュゲート化される前に１２０ｋＤａ未満であるとき、約１，０００～５，０００ｋＤａの多糖体－タンパク質コンジュゲート、たとえば、約１，２００～４，０００ｋＤａ、１，２００～１，５００ｋＤａ、１，２００～３，５００ｋＤａ、１，４００～４，０００ｋＤａ、約１，２００ｋＤａ、約１，４００ｋＤａ、または約４，０００ｋＤａの多糖体－タンパク質コンジュゲートを生成することができる。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【００６６】
精製された血清型１５Ａ多糖体は、酸化剤で活性化された後の酸化度によって特徴付けることもできる。一態様では、活性化血清型１５Ａ多糖体は、４～１０、４～８、４～５、５～８、または約４などの、１～１５の範囲にある酸化度を有する場合がある。

【００６７】
一態様では、約４の酸化レベル（Ｄｏ）を有する肺炎連鎖球菌血清型１５Ａの活性化多糖体が、担体タンパク質とコンジュゲート化されて、４０％以下、たとえば、５～４０％、２０～４０％、２５～４０％、２０～３５％、２５～３５％、３０～３５％の遊離多糖体（遊離ＰＳ）の含有率を有する血清型１５Ａ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが得られる。

【００６８】
多糖体は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに縮小する場合がある。加えて、本開示において記載するとおり、多糖体は、コンジュゲート化の前にサイジングにかけられる場合もある。上で言及した分子量範囲は、コンジュゲート化される前の、（たとえば、精製、加水分解、および活性化後の）最終のサイジング工程の後の精製多糖体の分子量範囲を指す。

【００６９】
肺炎球菌多糖体血清型１５Ｃ

血清型１５Ｃ多糖体は、当業者に知られている単離手順（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用することにより、細菌から直接取得することができる。加えて、合成プロトコールを使用して、１５Ｃオリゴ糖を生成することもできる。

【００７０】

血清型１５Ｃ肺炎連鎖球菌株は、確立された培養細胞保存機関（たとえば、Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ（ジョージア州アトランタ）のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）または臨床検体から取得することができる。別法として、血清型１５Ｃ多糖体は、通常はアルカリ処理による、血清型１５Ｂ多糖体の脱Ｏ－アセチル化によって得ることもできる。

【００７１】

細菌細胞は、通常、大豆系培地などの培地で増殖させる。肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ莢膜多糖体を産生する細菌細胞による発酵の後、細菌細胞を溶解させて、細胞溶解物を生じさせる。次いで、遠心分離、深層濾過、沈殿、限外濾過、活性炭処理、ダイアフィルトレーション、および／またはカラムクロマトグラフィーを始めとする、当業界で知られている精製技術（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用して、細胞溶解物から、血清型１５Ｃ多糖体を単離することができる。

【００７２】

精製された血清型１５Ｃ多糖体を、担体タンパク質にコンジュゲート化すると、血清型１５Ｃ多糖体および担体タンパク質を含む少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物ができる。一態様では、１５Ｃ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、

（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体を酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体を生成する工程；

（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；

（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；

（ｉｖ）活性化血清型１５Ｃ多糖体と担体タンパク質の混合物を還元剤と反応させて、血清型１５Ｃ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および

（ｖ）血清型１５Ｃ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程

を含む方法によって作製することができる。この方法において使用することのできる試薬（たとえば、酸化剤、還元剤、担体タンパク質など）および条件についてのさらなる細目は、後続のセクションおよび実施例の中を含む、本出願における他の箇所で開示する。

【００７３】

活性化血清型１５Ｃ莢膜多糖体は、たとえば、分子量（ＭＷ）および／または酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴付けることができる。

【００７４】

一態様では、コンジュゲート化される前の活性化肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体は、４００～８００ｋＤａ、５００～７７５ｋＤａ、４７０～７７５ｋＤａ、５００～７７０ｋＤａ、５２０～６８０ｋＤａ、５１０～７７０ｋＤａ、５１０～５５０ｋＤａ、６７０～７７０ｋＤａ、または同様の分子量範囲などの、２００～１，０００ｋＤａの分子量を有する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【００７５】

約１，０００～１０，０００ｋＤａの分子量を有する１５Ｃ多糖体－タンパク質コンジ

ュゲート、たとえば、約２，０００～６，０００ｋＤａ、２，５００～５，０００ｋＤａ、６，０００～１０，０００ｋＤａ、または６，２００～９，４００ｋＤａの１５Ｃ多糖体－タンパク質コンジュゲートを生成することができる。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【００７６】

精製された血清型１５Ｃ多糖体は、酸化剤で活性化された後の酸化度によって特徴付けることもできる。一態様では、活性化血清型１５Ｃ多糖体は、１～４０の範囲にある酸化度を有する場合がある。肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃ多糖体に過ヨウ素酸ナトリウムを加えることにより、８～３５、１５～３５、８～２０、８～９、９～２０、または３０～３５の酸化度を実現することができる。

【００７７】

一態様では、３０～３５の酸化レベル（Ｄｏ）を有する肺炎連鎖球菌血清型１５Ｃの活性化多糖体が、担体タンパク質とコンジュゲート化されて、４０％以下、たとえば、５～４０％、２０～４０％、２５～４０％、２０～３５％、２５～３５％、または３０～３５％の遊離多糖体（遊離ＰＳ）の含有率を有する血清型１５Ｃ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが得られる。

【００７８】

多糖体は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに縮小する場合がある。加えて、本開示において記載するとおり、多糖体は、コンジュゲート化の前にサイジングにかけられる場合もある。上で言及した分子量範囲は、コンジュゲート化される前の、（たとえば、精製、加水分解、および活性化後の）最終のサイジング工程の後の精製多糖体の分子量範囲を指す。

【００７９】

肺炎球菌多糖体血清型２３Ａ

血清型２３Ａ多糖体は、当業者に知られている単離手順（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用することにより、細菌から直接取得することができる。加えて、合成プロトコールを使用して、２３Ａオリゴ糖を生成することもできる。

【００８０】

血清型２３Ａ肺炎連鎖球菌株は、確立された培養細胞保存機関（たとえば、Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ（ジョージア州アトランタ）のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）または臨床検体から取得することができる。

【００８１】

細菌細胞は、通常、大豆系培地などの培地で増殖させる。肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ莢膜多糖体を産生する細菌細胞による発酵の後、細菌細胞を溶解させて、細胞溶解物を生じさせる。次いで、遠心分離、深層濾過、沈殿、限外濾過、活性炭処理、ダイアフィルトレーション、および／またはカラムクロマトグラフィーを始めとする、当業界で知られている精製技術（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用して、細胞溶解物から、血清型２３Ａ多糖体を単離することができる。

【００８２】

精製された血清型２３Ａ多糖体を、担体タンパク質にコンジュゲート化すると、血清型２３Ａ多糖体および担体タンパク質を含む少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物ができる。一態様では、２３Ａ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、

（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型２３Ａを酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体を生成する工程；

（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；

（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体と担体タンパク質の混合物を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む方法によって作製することができる。この方法において使用することのできる試薬（たとえば、酸化剤、還元剤、担体タンパク質など）および条件についてのさらなる細目は、後続のセクションおよび実施例の中を含む、本出願における他の箇所で開示する。

【００８３】
活性化血清型２３Ａ莢膜多糖体は、たとえば、分子量（ＭＷ）および／または酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴付けることができる。

【００８４】
一態様では、コンジュゲート化される前の活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ａ多糖体は、４００～６５０ｋＤａ、４３０～６５０ｋＤａ、４７０～６５０ｋＤａ、４７０～５７０ｋＤａ、４７０～４９０ｋＤａ、または同様の分子量範囲などの、３００～７００ｋＤａの分子量を有する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【００８５】
本文書で開示する方法を使用して、約２，０００～７，０００ｋＤａの血清型２３Ａ多糖体－タンパク質コンジュゲートを生成することができる。血清型２３Ａ莢膜多糖－タンパク質コンジュゲートの分子量は、約２，０００～４，０００ｋＤａ、４，０００～７，０００ｋＤａ、４，２００～６，７００ｋＤａ、４，３５０～６，６５０ｋＤａ、５，０００～６，７００ｋＤａ、約４，３００ｋＤａ、約５，０００ｋＤａ、または約６，６００ｋＤａになる場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【００８６】
精製された血清型２３Ａ多糖体は、酸化剤で活性化された後の酸化度によって特徴付けることもできる。一態様では、活性化血清型２３Ａ多糖体は、６～２４、６～１８、９～１８、６～９、６～１０、６～１１、または９～１１などの、４～２５の範囲にある酸化度を有する場合がある。

【００８７】
一態様では、９～１１の酸化レベル（Ｄｏ）を有する肺炎連鎖球菌血清型２３Ａの活性化多糖体が、担体タンパク質とコンジュゲート化されて、４０％以下、たとえば、５～４０％、２０～４０％、２５～４０％、２０～３５％、２５～３５％、または３０～３５％の遊離多糖体（遊離ＰＳ）の含有率を有する血清型２３Ａ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが得られる。

【００８８】
コンジュゲート化には、ＤＭＳＯまたはリン酸緩衝液を始めとして、適切ないずれの緩衝液を使用してもよい。ＤＭＳＯを使用するとき、多糖体の反応濃度は、たとえば、１．０ｍｇ／ｍＬ～２．５ｍｇ／ｍＬ、１．０ｍｇ／ｍＬ～２．０ｍｇ／ｍＬ、または１．０ｍｇ／ｍＬ～１．５ｍｇ／ｍＬを始めとして、２．５ｍｇ／ｍＬ以下にすることができる。リン酸緩衝液を使用するとき、多糖体の反応濃度は、たとえば、１５ｍｇ／ｍＬを始めとして、１０～２０ｍｇ／ｍＬにすることができる。

【００８９】
多糖体は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに縮小する場合がある。加えて、本開示において記載するとおり、多糖体は、コンジュゲート化の前にサイジングにかけられる場合もある。

【００９０】
肺炎球菌多糖体血清型２３Ｂ
血清型２３Ｂ多糖体は、当業者に知られている単離手順（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用することにより、細菌から直接取得することができる。加えて、合成プロトコールを使用して、２３Ｂオリゴ糖を生成することもできる。
【００９１】
血清型２３Ｂ肺炎連鎖球菌株は、確立された培養細胞保存機関（たとえば、Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ（ジョージア州アトランタ）のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）または臨床検体から取得することができる。
【００９２】
細菌細胞は、通常、大豆系培地などの培地で増殖させる。肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ莢膜多糖体を産生する細菌細胞による発酵の後、細菌細胞を溶解させて、細胞溶解物を生じさせる。次いで、遠心分離、深層濾過、沈殿、限外濾過、活性炭処理、ダイアフィルトレーション、および／またはカラムクロマトグラフィーを始めとする、当業界で知られている精製技術（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用して、細胞溶解物から、血清型２３Ｂ多糖体を単離することができる。
【００９３】
精製された血清型２３Ｂ多糖体を、担体タンパク質にコンジュゲート化すると、血清型２３Ｂ多糖体および担体タンパク質を含む少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物ができる。一態様では、２３Ｂ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、
（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂを酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体を生成する工程；
（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；
（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体と担体タンパク質の混合物を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む方法によって作製することができる。この方法において使用することのできる試薬（たとえば、酸化剤、還元剤、担体タンパク質など）および条件についてのさらなる細目は、後続のセクションおよび実施例の中を含む、本出願における他の箇所で開示する。
【００９４】
活性化血清型２３Ｂ莢膜多糖体は、たとえば、分子量（ＭＷ）および／または酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴付けることができる。
【００９５】
一態様では、コンジュゲート化される前の活性化肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂ多糖体は、２００～７００ｋＤａ、２００～６５０ｋＤａ、３００～６５０ｋＤａ、３８０～６４０ｋＤａ、５５０～６７５ｋＤａ、２００～２５０ｋＤａ、２２０～２３０ｋＤａ、２２０～２２５ｋＤａ、または同様の分子量範囲などの、１００～８００ｋＤａの分子量を有する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。
【００９６】

本文書で開示する方法を使用して、約２，０００～７，０００ｋＤａの血清型２３Ｂ多糖体－タンパク質コンジュゲートを生成することができる。血清型２３Ｂ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートの分子量は、約２，０００～４，０００ｋＤａ、２，０００～５，０００、４，０００～７，０００ｋＤａ、２，４００～６，８００ｋＤａ、４，６００～６，８００ｋＤａ、または６，４００～６，８００ｋＤａの範囲になる場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【００９７】

精製された血清型２３Ｂ多糖体は、酸化剤で活性化された後の酸化度によって特徴付けることもできる。一態様では、活性化血清型２３Ｂ多糖体は、５．４以下の酸化度、たとえば、１～５．４、２～５．４、２．３～５．４、２～３、２．３～２．８の酸化度を有する場合がある。

【００９８】

一態様では、３以下の酸化レベル（Ｄｏ）を有する（上で論じたとおり）肺炎連鎖球菌血清型２３Ｂの活性化多糖体が、担体タンパク質とコンジュゲート化されて、４０％以下、たとえば、５～４０％、２０～４０％、２５～４０％、２０～３５％、２５～３５％、または３０～３５％の遊離多糖体（遊離ＰＳ）の含有率を有する血清型２３Ｂ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが得られる。

【００９９】

多糖体は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに縮小する場合がある。加えて、本開示において記載するとおり、多糖体は、コンジュゲート化の前にサイジングにかけられる場合もある。

【０１００】

肺炎球菌多糖体血清型２４Ｆ

血清型２４Ｆ多糖体は、当業者に知られている単離手順（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用することにより、細菌から直接取得することができる。加えて、合成プロトコールを使用して、２４Ｆオリゴ糖を生成することもできる。

【０１０１】

血清型２４Ｆ肺炎連鎖球菌株は、確立された培養細胞保存機関（たとえば、Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ（ジョージア州アトランタ）のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）または臨床検体から取得することができる。

【０１０２】

細菌細胞は、通常、大豆系培地などの培地で増殖させる。肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ莢膜多糖体を産生する細菌細胞による発酵の後、細菌細胞を溶解させて、細胞溶解物を生じさせる。次いで、遠心分離、深層濾過、沈殿、限外濾過、活性炭処理、ダイアフィルトレーション、および／またはカラムクロマトグラフィーを始めとする、当業界で知られている精製技術（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用して、細胞溶解物から、血清型２４Ｆ多糖体を単離することができる。

【０１０３】

精製された血清型２４Ｆ多糖体を、担体タンパク質にコンジュゲート化すると、血清型２４Ｆ多糖体および担体タンパク質を含む少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物ができる。一態様では、２４Ｆ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、

（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体を、酸加水分解反応またはマイクロフルイダイザーにかけ、次いで、酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体を生成する工程；

（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；

（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；
（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体および担体タンパク質を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および
（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程
を含む方法によって作製することができる。この方法において使用することのできる試薬（たとえば、酸化剤、還元剤、担体タンパク質など）および条件についてのさらなる細目は、後続のセクションおよび実施例の中を含む、本出願における他の箇所で開示する。

【０１０４】

活性化血清型２４Ｆ莢膜多糖体は、たとえば、分子量（ＭＷ）および／または酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴付けることができる。

【０１０５】

一態様では、コンジュゲート化される前の活性化肺炎連鎖球菌血清型２４Ｆ多糖体は、１５０～３５０ｋＤａ、２００～４００ｋＤａ、２００～３００ｋＤａ、２２５～２７５ｋＤａ、２４０～２６０ｋＤａ、２４５～２５５ｋＤａ、約２５０ｋＤａ、または同様の分子量範囲などの、１００～５００ｋＤａの分子量を有する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１０６】

本文書で開示する方法を使用して、約１，０００～５，０００ｋＤａの血清型２４Ｆ多糖体－タンパク質コンジュゲートを生成することができる。血清型２４Ｆ莢膜多糖－タンパク質コンジュゲートの分子量は、約１，５００～５，０００ｋＤａ、２，０００～４，５００、または２，５００～３，５００ｋＤａの範囲になる場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１０７】

精製された血清型２４Ｆ多糖体は、酸化剤で活性化された後の酸化度によって特徴付けることもできる。一態様では、活性化血清型２４Ｆ多糖体は、約９０～１００を始めとして、少なくとも９０の酸化度を有する場合がある。

【０１０８】

一態様では、少なくとも９０の酸化度を有する活性化血清型２４Ｆ多糖体と担体タンパク質を反応させる工程において、２．０以下のモル当量の還元剤を使用すると、４０％以下、たとえば、５～４０％、２０～４０％、２５～４０％、２０～３５％、２５～３５％、または３０～３５％の遊離糖（遊離ＰＳ）を有する血清型２４Ｆ莢膜多糖－タンパク質コンジュゲートを得ることができる。０．５～１．２、１．０～１．２、または約１．２のモル当量の還元剤が使用される場合がある。

【０１０９】

多糖体は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに縮小する場合がある。加えて、本開示において記載するとおり、多糖体は、コンジュゲート化の前にサイジングにかけられる場合もある。

【０１１０】

肺炎球菌多糖体血清型３５Ｂ

血清型３５Ｂ多糖体は、当業者に知られている単離手順（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用することにより、細菌から直接取得することができる。加えて、合成プロトコールを使用して、３５Ｂオリゴ糖を生成することもできる。

【０１１１】

血清型３５Ｂ肺炎連鎖球菌株は、確立された培養細胞保存機関（たとえば、Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ（ジョ

ージア州アトランタ）のＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃａｌ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）または臨床検体から取得することができる。

【０１１２】

細菌細胞は、通常、大豆系培地などの培地で増殖させる。肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ莢膜多糖体を産生する細菌細胞による発酵の後、細菌細胞を溶解させて、細胞溶解物を生じさせる。次いで、遠心分離、深層濾過、沈殿、限外濾過、活性炭処理、ダイアフィルトレーション、および／またはカラムクロマトグラフィーを始めとする、当業界で知られている精製技術（限定はしないが、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号で開示されている方法が挙げられる）を使用して、細胞溶解物から、血清型３５Ｂ多糖体を単離することができる。

【０１１３】

精製された血清型３５Ｂ多糖体を、担体タンパク質にコンジュゲート化すると、血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質を含む少なくとも１種の多糖体－タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物ができる。一態様では、３５Ｂ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、

（ｉ）精製された肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂを酸化剤と反応させて、活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体を生成する工程；

（ｉｉ）場合により、活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質を凍結乾燥する工程；

（ｉｉｉ）活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質をジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）またはリン酸緩衝液に懸濁させる工程；

（ｉｖ）活性化肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質を還元剤と反応させて、肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；および

（ｖ）肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを製造する工程

を含む方法によって作製することができる。この方法において使用することのできる試薬（たとえば、酸化剤、還元剤、担体タンパク質など）および条件についてのさらなる細目は、後続のセクションおよび実施例の中を含む、本出願における他の箇所で開示する。

【０１１４】

活性化血清型３５Ｂ莢膜多糖体は、たとえば、分子量（ＭＷ）および／または酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。

【０１１５】

たとえば、担体タンパク質へのコンジュゲート化の前に、たとえば、高圧ホモジナイゼーションまたは機械的ホモジナイゼーションによって、精製された血清型３５Ｂ多糖体の大きさを低減できる。一態様では、活性化血清型３５Ｂ多糖体は、コンジュゲート化の前に１０～２０，０００ｋＤａ、１０～１，０００ｋＤａ、１０～５００ｋＤａ、１０～３００ｋＤａ、２０～２００ｋＤａまたは２０～１２０ｋＤａの分子量を有する。

【０１１６】

精製された血清型３５Ｂ多糖体は、酸化剤で活性化された後の酸化度（Ｄｏ）によって特徴づけることができる。一態様では、活性化血清型３５Ｂ多糖体は、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または４～３０の酸化度を有する場合がある。

【０１１７】

一態様では、４～３０の酸化レベル（Ｄｏ）を有する肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂの活性化多糖体が、担体タンパク質とコンジュゲート化されて、４０％以下、たとえば、５～４０％、２０～４０％、２５～４０％、２０～３５％、２５～３５％または３０～３５％の遊離多糖体（遊離ＰＳ）の含有率を有する血清型３５Ｂ莢膜多糖体－タンパク質コンジュ

ゲートが得られる。

【０１１８】

有利な免疫原性特性を有する血清型３５Ｂ糖コンジュゲートを生成するために、活性化（酸化）、コンジュゲート化および／またはキャッピング工程における以下のプロセスパラメーターのうち１つまたは複数を組み合わせることができる：

・活性化工程において、過ヨウ素酸（たとえば、過ヨウ素酸ナトリウムまたはカリウム）を、血清型３５Ｂ多糖体１Ｍあたり０．００５～０．５、０．００５～０．３、０．００５～０．２または０．００７～０．１５のモル当量と反応させる、

・活性化工程は、酢酸ナトリウム緩衝液または脱イオン水のような水性溶媒中で実施できる、

・活性化工程は、０．１ｍＭ～１５ｍＭまたは０．１～１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液中で実施できる、

・活性化工程は、ｐＨ４～８またはｐＨ４～７．５で実行できる、

・活性化工程において、過ヨウ素酸は、２１℃～２５℃で処置できる、

・活性化工程において、過ヨウ素酸および血清型３５Ｂ多糖体は、０．５～５０時間または１～２５時間反応させることができる、

・活性化工程後、活性化血清型３５Ｂ多糖体を、たとえば、３０ｋＤａ　ＭＷＣＯ限外濾過フィルターを使用して濃縮できる、

・コンジュゲート化工程において、コンジュゲート化反応における活性化血清型３５Ｂ多糖体の濃度は、５ｍｇ／ｍＬ～３０ｍｇ／ｍＬまたは１０ｍｇ／ｍＬ～２０ｍｇ／ｍＬである場合がある、

・コンジュゲート化工程では、担体タンパク質および活性化血清型３５Ｂ多糖体（ＰＲ：ＰＳ）の最初のローディング比は、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または１：３、好ましくは、１：０．５～２である場合がある、

・コンジュゲート化工程では、使用される還元剤の量は、活性化多糖体１Ｍあたり０．１～５モルまたは０．５～２当量、好ましくは、活性化糖類１Ｍあたり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もしくは２モル当量、またはより好ましくは、活性化多糖体１Ｍあたり０．８～１．６モル当量の還元剤である場合がある、

・コンジュゲート化工程では、温度は、２０℃～４５℃、３０℃～４０℃、３５～４０℃または３７±２℃である場合がある、

・コンジュゲート化工程では、ｐＨは、５．５～８．５、５．５～７．５または６～７．５である場合がある、

・コンジュゲート化工程において、担体タンパク質および活性化血清型３５Ｂ多糖体を、還元剤と１～７０時間または４０～６０時間反応させることができる、

・コンジュゲート化工程後、血清型３５Ｂ糖コンジュゲートの収率は、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％または９０％である場合がある、

・キャッピング工程において、水素化ホウ素ナトリウムを、活性化血清型３５Ｂ多糖体１Ｍあたり１～３もしくは１．５～２．５モル当量または活性化多糖体１Ｍあたり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もしくは３モル当量の水素化ホウ素ナトリウムのような活性化血清型３５Ｂ多糖体１Ｍあたり０．５～５モル当量で処置できる、

・キャッピング工程において、温度は、１０～４０℃、１５～３０℃、２０～２６℃または２３±２℃である場合がある、

・キャッピング工程において、反応時間は、０．５～１０時間または２～８時間である場合がある、ならびに／あるいは
・キャッピング工程後に、血清型３５Ｂ糖コンジュゲートを、たとえば、１００ｋＤａＭＷＣＯ限外濾過フィルターを使用して濃縮できる。

【０１１９】

例示的一実施形態では、血清型３５Ｂ糖コンジュゲートを生成する方法は、以下の工程：
（ｉ）単離された血清型３５Ｂ多糖体を、酢酸ナトリウム緩衝液（ＮａＯＡｃ、ｐＨ４．５～ｐＨ６．０）またはＤＷ（脱イオン水）で希釈する工程；
（ｉｉ）血清型３５Ｂ多糖体を０．００５～０．５モル当量の過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて活性化血清型３５Ｂ多糖体を製造する工程；
（ｉｉｉ）活性化血清型３５Ｂ多糖体を精製し、次いで、凍害防御物質と混合する工程；
（ｉｖ）活性化血清型３５Ｂおよび担体タンパク質をそれぞれ凍結乾燥する工程；
（ｖ）活性化血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質をＤＭＳＯまたはリン酸緩衝液に再懸濁させる工程；
（ｖｉ）再懸濁した活性化血清型３５Ｂ多糖体を担体タンパク質と混合し、シアノ水素化ホウ素ナトリウムと反応させて血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；
（ｖｉｉ）血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドを水素化ホウ素ナトリウムを用いてキャッピングする工程；ならびに
（ｖｉｉｉ）担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを得る工程
を含む。

【０１２０】

別の例示的実施形態では、血清型３５Ｂ糖コンジュゲートを生成する方法は、以下の工程：
（ｉ）単離された血清型３５Ｂ多糖体を酢酸ナトリウム緩衝液（ＮａＯＡｃ、ｐＨ４．５～ｐＨ６．０）またはＤＷ（脱イオン水）を用いて希釈する工程；
（ｉｉ）血清型３５Ｂ多糖体を０．００５～０．５モル当量の過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、活性化血清型３５Ｂ多糖体を製造する工程；
（ｉｉｉ）活性化血清型３５Ｂ多糖体を精製する工程；
（ｉｖ）活性化血清型３５Ｂ多糖体を担体タンパク質と混合し、続いて、同時に凍結乾燥する工程；
（ｖ）同時に凍結乾燥された活性化血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質をＤＭＳＯまたはリン酸緩衝液に再懸濁させる工程；
（ｖｉ）シアノ水素化ホウ素ナトリウムと反応させて血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲートを生成する工程；
（ｖｉｉ）血清型３５Ｂ多糖体－担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドを、水素化ホウ素ナトリウムを用いてキャッピングする工程；および
（ｖｉｉｉ）担体タンパク質に共有結合連結された肺炎連鎖球菌血清型３５Ｂ多糖体を含む免疫原性コンジュゲートを得る工程
を含む。

【０１２１】

肺炎球菌多糖体血清型２２Ｆ

活性化血清型２２Ｆ莢膜多糖体は、たとえば、酸化剤で活性化された後の酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、活性化血清型２２Ｆ多糖体は、２０～１００、２０～８０、２０～６０、２０～５０、２０～４０、２０～３５、２５～１００、２５～５０、２５～３５、２８～３２または２９～３１のＤｏを有する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整

数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１２２】

血清型２２Ｆ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、たとえば、コンジュゲート化後のタンパク質対多糖体（ＰＳ／ＰＲ）比、遊離糖（遊離ＰＳ）、ＭＳＤ％または分子量（ＭＡＬＬＳ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、２２Ｆ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、２２Ｆ－ＴＴ）のＰＳ／ＰＲ比は、０．２～１．５、０．２～０．５、０．３～０．４、０．６～１．０、０．７～０．９または０．６～０．８である場合がある。ある特定の実施形態では、２２Ｆ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、２２Ｆ－ＴＴ）は、４０％以下、たとえば、２～４０％、２～２０％、２～１０％、５～３０％、１０～２５％、１５～２５％、１７～２１％または約１９％の遊離ＰＳを有する。ある特定の実施形態では、血清型２２Ｆ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、２２Ｆ－ＴＴ）は、５～６０％、５～１０％、５～５０％、１０～５０％、２５～５０％、４０～５０％、４２～４６％または約４４％のＭＳＤ（％）を有する。ある特定の実施形態では、２２Ｆ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、２２Ｆ－ＴＴ）の分子量は、約１，０００～６，０００ｋＤａ、２，０００～５，０００ｋＤａ、２，５００～４，０００ｋＤａ、３，０００～３，５００ｋＤａまたは３，０００～３，１００ｋＤａの範囲である場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１２３】

血清型２２Ｆの上記のパラメーターのいずれも、記載されるように組み合わせることができる。たとえば、ある特定の実施形態では、血清型２２Ｆ多糖体－タンパク質コンジュゲートを作製するために使用される活性化血清型２２Ｆ多糖体は、約２９～３１のＤｏを有し、約１：１のタンパク質（ＴＴ）対多糖体の反応比を有する。ある特定の実施形態では、最終コンジュゲートにおける多糖体／担体タンパク質比（ＰＳ／ＰＲ）は約０．６～０．８であり、遊離ＰＳは約１７～２１％であり、ＭＳＤ％は約４２～４６％であり、場合により、ＭＡＬＬＳによる約３，０００～３，１００ｋＤａの分子量を有する。

【０１２４】

肺炎球菌多糖体血清型１５Ｂ

活性化血清型１５Ｂ莢膜多糖体は、たとえば、酸化剤で活性化された後の酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、活性化血清型１５Ｂ多糖体は、１～１５、５～１０、６～８または約７の酸化度を有する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１２５】

血清型１５Ｂ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、たとえば、コンジュゲート化後のタンパク質対多糖体（ＰＳ／ＰＲ）比、遊離糖（遊離ＰＳ）、ＭＳＤ％または分子量（ＭＡＬＬＳ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、１５Ｂ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１５Ｂ－ＴＴ）のＰＳ／ＰＲ比は、０．２～１．５、０．２～０．５、０．３～０．４、０．６～１．０、０．７～０．９または０．８～１．０である場合がある。ある特定の実施形態では、１５Ｂ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１５Ｂ－ＴＴ）は、３０％以下、たとえば、２～３０％、２～２０％、２～１０％、５～１０％、８～１０％または約９％の遊離ＰＳを有する。ある特定の実施形態では、血清型１５Ｂ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１５Ｂ－ＴＴ）は、５０～９０％、６０～８５％、６５～８０％、７０～８０％、７４～７８％または約７６％のＭＳＤ（％）を有する。ある特定の実施形態では、１５Ｂ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１５Ｂ－ＴＴ）の分子量は、約２，０００～１５，０００ｋＤａ、１０，０００～１５，０００ｋＤａ、２，０００～１０，０００ｋＤａ、３，０００～７，５００ｋＤａ、４，０００～６，０００ｋＤａ、５，０００～６，０００ｋＤａまたは５，５００～５，６００ｋＤ

ａの範囲である場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１２６】

血清型１５Ｂの上記のパラメーターのいずれも記載されるように組み合わせることができる。たとえば、ある特定の実施形態では、血清型１５Ｂ多糖体－タンパク質コンジュゲートを作製するために使用される活性化血清型１５Ｂ多糖体は、約７．０のＤｏを有し、約１．２５：１のタンパク質（ＴＴ）対多糖体の反応比を有する。ある特定の実施形態では、最終コンジュゲートにおける多糖体／担体タンパク質比（ＰＳ／ＰＲ）は約０．８～１．０であり、遊離ＰＳは約８～１０％であり、ＭＳＤ％は約７４～７８％であり、場合により、ＭＡＬＬＳによる約５，５００～５，６００の分子量を有する。

【０１２７】

肺炎球菌多糖体血清型１９Ａ

活性化血清型１９Ａ莢膜多糖体は、たとえば、酸化剤で活性化された後の酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、活性化血清型１９Ａ多糖体は、２０～４０、３０～４０、３５～４０、３０～３５、２０～３０、２２～２８、２４～２８、２５～３０または２５～２７の酸化度を有する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１２８】

血清型１９Ａ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、たとえば、コンジュゲート化後のタンパク質対多糖体（ＰＳ／ＰＲ）比、遊離糖（遊離ＰＳ）、ＭＳＤ（％）または分子量（ＭＡＬＬＳ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、１９Ａ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１９Ａ－ＣＲＭ$_{197}$）のＰＳ／ＰＲ比は、０．２～１．５、０．２～０．５、０．３～０．４、０．６～１．０、０．７～０．９または０．６～０．８である場合がある。ある特定の実施形態では、１９Ａ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１９Ａ－ＣＲＭ$_{197}$）は、５０％以下、たとえば、１０～４０％、１５～４０％、２０～４０％、２５～４０％、２５～３５％、３０～４０％、３０～３５％、３２～３４％または約３３％の遊離ＰＳを有する。ある特定の実施形態では、血清型１９Ａ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１９Ａ－ＣＲＭ$_{197}$）は、３５～７０％、４０～５０％、５０～７０％、６０～７０％、６３～６８％または約６５％のＭＳＤ（％）を有する。ある特定の実施形態では、血清型１９Ａ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１９Ａ－ＣＲＭ$_{197}$）の分子量は、約２，０００～８，０００ｋＤａ、３，５００～７，０００ｋＤａ、４，５００～６，５００ｋＤａ、５，０００～６，５００ｋＤａまたは５，２５０～６，２５０ｋＤａの範囲である場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１２９】

血清型１９Ａの上記のパラメーターのいずれも、記載されるように組み合わせることができる。たとえば、ある特定の実施形態では、血清型１９Ａ多糖体－タンパク質コンジュゲートを作製するために使用される活性化血清型１９Ａ多糖体は、約２５～２７のＤｏを有し、約１：１のタンパク質（ＣＲＭ$_{197}$）対多糖体の反応比を有する。またある特定の実施形態では、最終コンジュゲートにおける多糖体／担体タンパク質比（ＰＳ／ＰＲ）は約０．７であり、遊離ＰＳは約３０～３５％であり、ＭＳＤ％は約６３～６８％であり、場合により、ＭＡＬＬＳによる約５，２５０～６，２５０の分子量を有する。

【０１３０】

肺炎球菌多糖体血清型１９Ｆ

活性化血清型１９Ｆ莢膜多糖体は、たとえば、酸化剤で活性化された後の酸化度（Ｄｏ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、活性化血清型１９Ｆ多糖体は、２０～５０、３０～５０、４０～５０、２５～３５、２０～３０、２２～２８、２５～３０、２３～２７または２４～２６の酸化度を有

する場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１３１】

血清型１９Ｆ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、たとえば、コンジュゲート化後のタンパク質対多糖体（ＰＳ／ＰＲ）比、ＭＳＤ（％）または遊離糖（遊離ＰＳ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、１９Ｆ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１９Ｆ－ＣＲＭ$_{197}$）のＰＳ／ＰＲ比は、０．２～１．５、０．２～０．５、０．３～０．４、０．６～１．０、０．７～０．９または０．６～０．８である場合がある。ある特定の実施形態では、血清型１９Ｆ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１９Ｆ－ＣＲＭ$_{197}$）は、２５～８０％、３５～７５％、４０～６０％、７０～８０％、７５～８０％または約７７％のＭＳＤ（％）を有する。ある特定の実施形態では、血清型１９Ｆ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、１９Ｆ－ＣＲＭ$_{197}$）は、３０％以下、たとえば、２～３０％、２～２０％、２～１０％、２～９％、３～７％、４～６％または約５％の遊離ＰＳを有する。

【０１３２】

血清型１９Ｆの上記のパラメーターのいずれも、記載されるように組み合わせることができる。たとえば、ある特定の実施形態では、血清型１９Ｆ多糖体－タンパク質コンジュゲートを作製するために使用される活性化血清型１９Ｆ多糖体は、約２４～２６のＤｏを有し、約１．５：１のタンパク質（ＣＲＭ$_{197}$）対多糖体の反応比を有する。またある特定の実施形態では、最終コンジュゲートにおける多糖体／担体タンパク質比（ＰＳ／ＰＲ）は約０．７であり、遊離ＰＳは約４～６％であり、ＭＳＤ％は約７５～８０％である。

【０１３３】

肺炎球菌多糖体血清型４

血清型４多糖体－タンパク質コンジュゲートは、たとえば、コンジュゲート化後のタンパク質対多糖体（ＰＳ／ＰＲ）比、遊離糖（遊離ＰＳ）、ＭＳＤ（％）または分子量（ＭＡＬＬＳ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、４莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、４－ＣＲＭ$_{197}$）のＰＳ／ＰＲ比は、０．２～１．５、０．８～１．１、０．８～１．３、０．９～１．１または約１．０である場合がある。ある特定の実施形態では、血清型４莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、４－ＣＲＭ$_{197}$）は、４０％以下、たとえば、５～３０％、１５～３５％、５～１５％、７～１３％、９～１１％または約１０％の遊離ＰＳを有する。ある特定の実施形態では、血清型４莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、４－ＣＲＭ$_{197}$）は、４０～８０％、４５～７５％、４５～５５％、６０～７５％または７０～７５％のＭＳＤ（％）を有する。ある特定の実施形態では、血清型４莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、４－ＣＲＭ$_{197}$）の分子量は、約５００～２，５００ｋＤａ、５００～１，０００ｋＤａ、１，０００～２，０００ｋＤａ、１，５００～２，０００ｋＤａ、１，８００～２，０００ｋＤａまたは１，８５０～１，９５０ｋＤａの範囲である場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１３４】

血清型４の上記のパラメーターのいずれも、記載されるように組み合わせることができる。たとえば、ある特定の実施形態では、血清型４多糖体－タンパク質コンジュゲートを作製するために使用される活性化血清型４多糖体は、約１．４のＤｏを有し、約１．２５：１のタンパク質（ＣＲＭ$_{197}$）対多糖体の反応比を有する。またある特定の実施形態では、最終コンジュゲートにおける多糖体／担体タンパク質比（ＰＳ／ＰＲ）は約１．０であり、遊離ＰＳは約９～１１％であり、ＭＳＤ％は約７０～７５％であり、場合により、ＭＡＬＬＳによる約１，８５０～１，９５０の分子量を有する。

【０１３５】

肺炎球菌多糖体血清型９Ｖ

血清型９Ｖ多糖体－タンパク質コンジュゲートは、たとえば、コンジュゲート化後のタンパク質対多糖体（ＰＳ／ＰＲ）比、遊離糖（遊離ＰＳ）、ＭＳＤ（％）または分子量（ＭＡＬＬＳ）を始めとする、種々のパラメーターによって特徴づけることができる。ある特定の実施形態では、９Ｖ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、９Ｖ－ＣＲＭ$_{197}$）のＰＳ／ＰＲ比は、０．２～１．５、０．２～０．５、０．３～０．４、０．８～１．３、１．０～１．２または約１．１である場合がある。ある特定の実施形態では、血清型９Ｖ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、９Ｖ－ＣＲＭ$_{197}$）は、３５％以下、たとえば、１０～３５％、２０～３５％、５～１５％、７～１３％、９～１１％または約１０％の遊離ＰＳを有する。ある特定の実施形態では、血清型９Ｖ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、９Ｖ－ＣＲＭ$_{197}$）は、４０～８０％、４５～７５％、４５～６０％、５０～６５％、５５～６５、５７～６１％または約５９％のＭＳＤ（％）を有する。ある特定の実施形態では、血清型９Ｖ莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲート（たとえば、（９Ｖ－ＣＲＭ$_{197}$）の分子量は、約５００～２，０００ｋＤａ、５００～１，５００ｋＤａ、１，０００～２，０００ｋＤａ、１，０００～１，５００ｋＤａ、１，０００～１，２００ｋＤａまたは１，１００～１，２００ｋＤａの範囲である場合がある。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１３６】

血清型９Ｖの上記のパラメーターのいずれも、記載されるように組み合わせることができる。たとえば、ある特定の実施形態では、血清型９Ｖ多糖体－タンパク質コンジュゲートを作製するために使用される活性化血清型９Ｖ多糖体は、約７．４のＤｏを有し、約１．２５：１のタンパク質（ＣＲＭ$_{197}$）対多糖体の反応比を有する。またある特定の実施形態では、最終コンジュゲートにおける多糖体／担体タンパク質比（ＰＳ／ＰＲ）は約１．１であり、遊離ＰＳは約９～１１％であり、ＭＳＤ％は約５７～６１％であり、場合により、ＭＡＬＬＳによる約１，１００～１，２００の分子量を有する。

【０１３７】

多価肺炎球菌コンジュゲート組成物およびその作製方法

本開示は、異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含む多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を提供する。多価肺炎球菌コンジュゲート組成物の種々の態様および実施形態をここに記載する。

【０１３８】

一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２２～２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。

【０１３９】

一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２７種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂである。この多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、ＰＣＶ－２７とも呼ぶ。

【０１４０】
一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２６種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。この多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、ＰＣＶ－２６とも呼ぶ。ＰＣＶ－２６のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型の少なくとも１つが、３５Ｂである。ＰＣＶ－２６のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される４つの血清型を含むまたはそれからなる。たとえば、ＰＣＶ－２６は、２６種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含みうる、またはそれからなりうる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、
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、および２３Ｂ；
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、および２４Ｆ；
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、および２４Ｆ；
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、および２４Ｆ；または
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、および２４Ｆ
である。
【０１４１】
一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２５種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。この多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、ＰＣＶ－２５とも呼ぶ。ＰＣＶ－２５のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型の少なくとも１つが、３５Ｂである。ＰＣＶ－２５のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される３つの血清型を含むまたはそれからなる。たとえば、ＰＣＶ－２５は、２５種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含みうる、またはそれからなりうる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多

糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、
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、および２３Ａ；
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、および２３Ｂ；
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、および２４Ｆ；
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、および２３Ｂ；
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、および２４Ｆ；
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、および２４Ｆ；
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、および２３Ｂ；
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、および２４Ｆ；
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、および２４Ｆ；または
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、および２４Ｆ
である。

【０１４２】

一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２４種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。この多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、ＰＣＶ－２４とも呼ぶ。ＰＣＶ－２４のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型の少なくとも１つが、３５Ｂである。ＰＣＶ－２４のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される２つの血清型を含むまたはそれからなる。たとえば、ＰＣＶ－２４は、２４種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含みうる、またはそれからなりうる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコ

ンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、
ａ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、１５Ａ、および１５Ｃ；
ｂ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、１５Ａ、および２３Ａ；
ｃ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、１５Ａ、および２３Ｂ；
ｄ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、１５Ａ、および２４Ｆ；
ｅ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、１５Ｃ、および２３Ａ；
ｆ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、１５Ｃ、および２３Ｂ；
ｇ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、１５Ｃ、および２４Ｆ；
ｈ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、２３Ａ、および２３Ｂ；
ｉ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、２３Ａ、および２４Ｆ；または
ｊ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、２３Ｂ、および２４Ｆ
である。

【０１４３】

一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２３種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。この多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、ＰＣＶ－２３とも呼ぶ。ＰＣＶ－２３のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型の少なくとも１つが、３５Ｂである。ＰＣＶ－２３のある特定の実施形態では、肺炎連鎖球菌血清型は、１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ、ならびに１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、および２４Ｆから選択される１つの血清型を含むまたはそれからなる。たとえば、ＰＣＶ－２３は、２３種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含みうる、またはそれからなりうる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、

ａ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、および１５Ａ；
ｂ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、および１５Ｃ；
ｃ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、および２３Ａ；
ｄ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、および２３Ｂ；または
ｅ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、３５Ｂ、および２４Ｆ
である。

【０１４４】

一態様では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、２２種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含むまたはそれからなる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、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、および３５Ｂから選択される。この多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、ＰＣＶ－２２とも呼ぶ。たとえば、ＰＣＶ－２２は、２２種の異なる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含みうる、またはそれからなりうる肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを含み、各肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートが、異なる血清型の肺炎連鎖球菌由来の莢膜多糖体にコンジュゲート化されたタンパク質担体を含み、肺炎連鎖球菌血清型は、
ａ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および１５Ａ；
ｂ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および１５Ｃ；
ｃ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および２３Ａ；
ｄ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および２３Ｂ；
ｅ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および２４Ｆ；または
ｆ）１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ
である。

【０１４５】

ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、およびＰＣＶ－２７実施形態は、血清型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、および３５Ｂ以外の、該当する肺炎連鎖球菌血清型を含んでもよい。たとえば、ある特定の実施形態では、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７は、肺炎連鎖

球菌血清型２、１２Ａ、１６Ｆ、１７Ｆ、２０Ａ、２０Ｂ、２０Ｆ、３１、４５、および４６の１つまたはそれ以上をさらに含む。ある特定の実施形態では、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７は、肺炎連鎖球菌血清型６Ｃ、６Ｄ、７Ｂ、７Ｃ、１８Ｂ、２１、２２Ａ、２４Ｂ、２７、２８Ａ、３４、３５Ｆ、３８、および３９の１つまたはそれ以上をさらに含む。他の該当する肺炎連鎖球菌血清型が、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７のいずれか１つに加えられる場合もある。

【０１４６】

ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７の肺炎連鎖球菌血清型の１つまたはそれ以上を、血清型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、および３５Ｂ以外の、該当する１つまたはそれ以上の肺炎連鎖球菌血清型と入れ替えることも可能である。たとえば、ある特定の実施形態では、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７における、血清型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、および３５Ｂの１つまたはそれ以上が、肺炎連鎖球菌血清型２、１２Ａ、１４、１６Ｆ、２０Ａ、２０Ｂ、２０Ｆ、３１、４５、および４６の１つまたはそれ以上と入れ替えられる。ある特定の実施形態では、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７における、血清型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、および３５Ｂの１つまたはそれ以上が、肺炎連鎖球菌血清型６Ｃ、６Ｄ、７Ｂ、７Ｃ、１８Ｂ、２１、２２Ａ、２４Ｂ、２７、２８Ａ、３４、３５Ｆ、３８、および３９の１つまたはそれ以上と入れ替えられる。ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７のいずれか１つにおける、血清型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、および３５Ｂの１つまたはそれ以上を、他の該当する肺炎連鎖球菌血清型を使用して入れ替えてもよい。

【０１４７】

担体タンパク質

多糖体－タンパク質コンジュゲートでは、ワクチン、担体タンパク質は、多糖体抗原にコンジュゲート化されて糖コンジュゲートを形成する。担体タンパク質は、多糖体抗原に対する免疫応答（たとえば、抗体応答）を増強するのに役立つ。担体タンパク質は、標準コンジュゲート化手順を使用する肺炎球菌多糖体とのコンジュゲート化に適したものでなくてはならない。

【０１４８】

糖コンジュゲートにおいて使用できる担体タンパク質として、限定はしないが、ＤＴ（ジフテリアトキソイド）、ＴＴ（破傷風トキソイド）、ＴＴの断片Ｃ、CRM_{197}（野生型ジフテリア毒素の免疫学的特性を保持するジフテリア毒素の遺伝的に誘導された非毒性変異体）、他の遺伝的に誘導されたジフテリア毒素バリアント（たとえば、ＣＲＭ１７６、ＣＲＭ２２８、ＣＲＭ４５（Ｕｃｈｉｄａら（１９７３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２１８：３８３８～３８４４）、ＣＲＭ９、ＣＲＭ１０２、ＣＲＭ１０３またはＣＲＭ１０７；ならびにＮｉｃｈｏｌｌｓ ａｎｄ Ｙｏｕｌｅ ｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｔｏｘｉｎｓ、Ｅｄ：Ｆｒａｎｋｅｌ、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ Ｉｎｃ（１９９２）によって記載された他の突然変異；米国特許第４，７０９，０１７号および第４，９５０，７４０号に開示されたＧｌｕ－１４８の欠失もしくはＡｓｐ、ＧｌｎもしくはＳｅｒへの突然変異および／またはＡｌａ１５８の欠失もしく

はＧｌｙへの突然変異および他の突然変異；米国特許第５，９１７，０１７号および第６，４５５，６７３号に開示されたＬｙｓ５１６、Ｌｙｓ５２６、Ｐｈｅ５３０および／またはＬｙｓ５３４のうち少なくとも１つまたは複数の残基の突然変異および他の突然変異；または米国特許第５，８４３，７１１号に開示された断片、いくつかの方法で解毒されたｐｌｙ、たとえば、ｄＰＬＹ－ＧＭＢＳ（ＷＯ２００４／０８１５１５、ＷＯ２００６／０３２４９９）またはｄＰＬＹ－ｆｏｒｍｏｌを始めとする肺炎球菌ニューモリシン（ｐｌｙ）（Ｋｕｏら（１９９５） Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ ６３：２７０６～２７１３）、ＰｈｔＡ、ＰｈｔＢ、ＰｈｔＤ、ＰｈｔＥを始めとするＰｈｔＸ（ＰｈｔＡ、ＰｈｔＢ、ＰｈｔＤまたはＰｈｔＥの配列は、ＷＯ００／３７１０５およびＷＯ００／３９２９９に開示されている）およびＰｈｔタンパク質の融合物、たとえば、ＰｈｔＤＥ融合物、ＰｈｔＢＥ融合物、Ｐｈｔ Ａ－Ｅ（ＷＯ０１／９８３３４、ＷＯ０３／０５４００７、ＷＯ２００９／０００８２６）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）血清群Ｂ（ＥＰ０３７２５０１）から普通抽出されるＯＭＰＣ（髄膜炎菌性外膜タンパク質）、ＰｏｒＢ（Ｎ．メニンギティディスから）、ＰＤ（インフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａ）タンパク質Ｄ；たとえば、ＥＰ０５９４６１０Ｂを参照されたい）またはその免疫学的機能的等価物、合成ペプチド（ＥＰ０３７８８８１、ＥＰＯ４２７３４７）、熱ショックタンパク質（ＷＯ９３／１７７１２、ＷＯ９４／０３２０８）、百日咳タンパク質（ＷＯ９８／５８６６８、ＥＰＯ４７１１７７）、サイトカイン、リンホカイン、増殖因子またはホルモン（ＷＯ９１／０１１４６）、Ｎ１９タンパク質（Ｂａｒａｌｄｏｉら（２００４） Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ ７２：４８８４～４８８７）肺炎球菌表面タンパク質ＰｓｐＡ（ＷＯ０２／０９１９９８）、鉄取り込みタンパク質（ＷＯ０１／７２３３７）、クロストリジウム・ディフィシル（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）の毒素ＡまたはＢ（ＷＯ００／６１７６１）、トランスフェリン結合タンパク質、肺炎球菌接着タンパク質（ＰｓａＡ）、組換え緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）外毒素Ａ（特に、その非毒性突然変異体（グルタミン酸５５３に置換を有する外毒素Ａのような（Ｄｏｕｇｌａｓら（１９８７） Ｊ． Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ． １６９（１１）：４９６７～４９７１））のような種々の病原体由来抗原に由来する複数のヒトＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープを含む人工タンパク質（Ｆａｌｕｇｉら（２００１） Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ３１：３８１６～３８２４）が挙げられる。オボアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）またはツベルクリンの精製されたタンパク質誘導体（ＰＰＤ）のような他のタンパク質も担体タンパク質として使用できる。他の適切な担体タンパク質として、不活性化細菌毒素、たとえば、コレラトキソイド（たとえば、ＷＯ２００４／０８３２５１に記載されるような）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）ＬＴ、大腸菌ＳＴおよび緑膿菌由来の外毒素Ａが挙げられ、その免疫学的機能的等価物も本発明において担体タンパク質として使用できる。担体タンパク質の各々が本明細書において言及される場合には、それらはその免疫学的機能的等価物を包含すると理解される。

【０１４９】

ある特定の実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、ＴＴ（ＴＴの断片Ｃを含む）、ＤＴ（ＣＲＭ$_{197}$のようなＤＴバリアントおよび上記で論じられる他のものを含む）、ＰＤ、ＰｈｔＸ、ＰｈｔＤ、ＰｈｔＤＥ融合物（特に、ＷＯ０１／９８３３４およびＷＯ０３／０５４００７において開示されるもの）、解毒されたニューモリシン、ＰｏｒＢ、Ｎ１９タンパク質、ＰｓｐＡ、ＯＭＰＣ、クロストリジウム・ディフィシルの毒素ＡまたはＢおよびＰｓａＡからなる群から選択される。本明細書において担体タンパク質の各々が言及される場合には、それらはその免疫学的機能的等価物を包含すると理解される。たとえば、限定はしないが、上記で論じられるものを含む免疫学的機能的等価物であるＤＴ突然変異体も、ＤＴが本明細書において言及される場合に含まれるということは当業者には理解されるであろう。

【０１５０】

ある特定の実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、ＤＴ（ジフテリアトキソイド）、ＣＲＭ$_{197}$、ＴＴ（破傷風トキソイド）、ＴＴの断片ＣおよびＰＤ（インフルエンザ菌のタンパク質Ｄ）からなる群から選択される。

【０１５１】

一実施形態では、本発明の糖コンジュゲートの担体タンパク質は、ＤＴ（ジフテリアトキソイド）である場合がある。天然に存在するまたは野生型ジフテリア毒素は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）を含む、種々の公的供給源から入手可能な毒素産生株から得ることができる。本明細書で使用される場合、ＤＴ（ジフテリアトキソイド）という用語は、その機能的等価物として機能するすべてのＤＴバリアントを含むものとする。このようなＤＴ突然変異体として、たとえば、ＣＲＭ１７６、ＣＲＭ２２８、ＣＲＭ４５、ＣＲＭ９、ＣＲＭ１０２、ＣＲＭ１０３またはＣＲＭ１０７；野生型ＤＴと比較したＧｌｕ１４８のＡｓｐへの突然変異または欠失（米国特許第４，７０９，０１７号に開示される）；米国特許第４，７０９，０１７および第４，９５０，７４０号に開示されるＧｌｕ１４８の欠失もしくはＡｓｐへの突然変異、Ａｌａ１５８の欠失もしくはＧｌｙへの突然変異；米国特許第５，９１７，０１７号に開示されたＬｙｓ５１６、Ｌｙｓ５２６、Ｐｈｅ５３０およびＬｙｓ５３４からなる群から選択される少なくとも１つまたは複数の残基の突然変異ならびに米国特許第６，４５５，６７３号に開示されたＧｌｕ１４８、Ｇｌｕ３４９、Ｌｙｓ５１６または／およびＰｈｅ５３０の突然変異；米国特許第５，８４３，７１１号においてなどが挙げられるがそれに限定されない。一実施形態では、単離された莢膜糖類は、ＣＲＭ$_{197}$タンパク質にコンジュゲート化される。ＣＲＭ$_{197}$タンパク質は、野生型ジフテリア毒素の免疫学的特性を保持するジフテリア毒素の非毒性形態である。ＣＲＭ$_{197}$は、毒素産生性コリネファージ（ｃｏｒｙｎｅｐｈａｇｅ）ベータのニトロソグアニジン突然変異誘発によって作出された無毒のファージβ$_{197}$ｔｏｘ－に感染したコリネバクテリウム・ジフテリエ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）によって産生される（Ｕｃｈｉｄａら（１９７１） Ｎａｔｕｒｅ Ｎｅｗ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２３３：８～１１）。ＣＲＭ$_{197}$タンパク質は、ジフテリア毒素と同一分子量を有するが、構造遺伝子中の単一塩基変化（グアニンからアデニンへ）によって異なる。この単一塩基変化は、成熟タンパク質におけるアミノ酸置換（グルタミン酸のグリシンとの）を引き起こし、ジフテリア毒素の毒性特性を排除する。ＣＲＭ$_{197}$タンパク質は、糖の安全で有効なＴ細胞依存性担体である。ＣＲＭ$_{197}$およびその生成についてのさらなる詳細は、たとえば、全体を参照によって本明細書に組み入れる米国特許第５，６１４，３８２号において見出すことができる。

【０１５２】

別の実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、ＴＴ（破傷風トキソイド）である。破傷風トキソイドは、破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）によって引き起こされる破傷風（または開口障害）に対する大規模免疫化のために世界中で製造され、使用されている。破傷風トキソイドはまた、単一で、ならびにジフテリアおよび／または百日咳ワクチンと組み合わせての両方で使用される。本タンパク質、破傷風菌毒素は、一般に破傷風菌の培養物から得られる。破傷風菌毒素は、約１５０ｋＤａのタンパク質であり、ジスルフィド結合によって連結される２つのサブユニット（約１００ｋＤａおよび約５０ｋＤａ）からなる。毒素は、通常、ホルムアルデヒドを用いて解毒され、硫酸アンモニウム沈殿（たとえば、Ｌｅｖｉｎ ａｎｄ 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．）を参照されたい）またはたとえば、ＷＯ１９９６／０２５４２５において開示されるようなクロマトグラフィー技術のような公知の方法を使用して培養濾液から精製できる。破傷風菌毒素はまた、組換え遺伝的手段によって不活性化される場合もある。

【０１５３】

別の実施形態では、糖コンジュゲートの担体タンパク質は、ＰＤ（インフルエンザ菌のタンパク質Ｄ；たとえば、ＥＰ０５９４６１０Ｂを参照されたい）である場合もある。

【０１５４】

ある特定の実施形態では、単一担体タンパク質は、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物中で使用される。ある特定の実施形態では、１種に留まらないタンパク質担体が使用される（「混成担体」）。これらの混成担体実施形態では、２、３、４、５、６、７、８、９種またはそれより多い担体タンパク質を使用できる。通常、混成担体実施形態は、２種の担体タンパク質を含む。たとえば、ある特定の実施形態では、ある特定の莢膜多糖体は、第１のタンパク質担体にコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体が、第２のタンパク質担体に取り付けられる。

【０１５５】

一態様では、第１のタンパク質担体がＣＲＭ$_{197}$であり、第２のタンパク質担体が破傷風トキソイドである。ある特定の実施形態では、莢膜多糖体のうちの２種が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ある特定の実施形態では、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される２種の莢膜多糖体は、血清型１、３、および５からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、莢膜多糖体のうちの４種が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ある特定の実施形態では、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される４種の莢膜多糖体は、血清型１、３、５、１５Ｂ、および２２Ｆからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される４種の莢膜多糖体は、血清型１、５、１５Ｂ、および２２Ｆ；血清型１、３、１５Ｂ、および２２Ｆ；または血清型３、５、１５Ｂ、および２２Ｆである。

【０１５６】

ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７の一部の実施形態では、血清型１および５由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの血清型由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７の別の一実施形態では、血清型１および３由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７の別の一実施形態では、血清型３および５由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７の別の一実施形態では、血清型１、５、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７の別の一実施形態では、血清型１、３、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７の別の一実施形態では、血清型３、５、１５Ｂ、および２２Ｆ由来の莢膜多糖体が破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている。

【０１５７】

血清型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、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体を含む、本文書に記載の組成物およびワクチンにおいて使用される肺炎球菌莢膜多糖体は、たとえば、ＷＯ２００６／１１０３８１、ＷＯ２００８／１１８７５２、ＷＯ２００６／１１０３５２、ならびに米国

特許出願公開第２００６／０２２８３８０号、第２００６／０２２８３８１号、第２００７／０１８４０７１号、第２００７／０１８４０７２号、第２００７／０２３１３４０号、第２００８／０１０２４９８号、および第２００８／０２８６８３８号で開示されているものを始めとする、当業者に知られている標準技術を含めて、利用可能ないずれかの技術を使用して、肺炎連鎖球菌から調製することができ、これら文献すべての全体を参照によって組み入れる。たとえば、各肺炎球菌莢膜多糖体血清型を、培養培地（たとえば、大豆系培地）で増殖させることができる。細胞を溶解させ、溶解物から、遠心分離、沈殿、限外濾過、および／またはカラムクロマトグラフィーによって、個々の多糖体を精製することができる。加えて、合成プロトコールを使用して、肺炎球菌莢膜オリゴ糖を生成することもできる。

【０１５８】

肺炎連鎖球菌の莢膜多糖体は、８個までの糖残基を含みうる繰り返しオリゴ糖単位を含む。莢膜糖抗原は、全長多糖体になる場合もあり、またはサイズが縮小化される場合もある（たとえば、単一のオリゴ糖単位になる、または繰り返しオリゴ糖単位の本来の長さの糖鎖より短くなる）。莢膜多糖体のサイズは、当業界で知られている種々の方法、たとえば、酸加水分解処理、過酸化水素処理、高圧ホモジナイザーによるサイジング後に場合により過酸化水素処理してオリゴ糖断片を生じさせるもの、または微小流体化（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｚａｔｉｏｎ）によって縮小化することができる。ある特定の実施形態では、精製された莢膜多糖体を酸化剤と反応させて活性化莢膜多糖体を生成する前に、精製された莢膜多糖体が、酸加水分解処理や微小流体化などのサイジング工程にかけられて、そのサイズの縮小化がなされる。ある特定の実施形態では、莢膜多糖体は、精製された莢膜多糖体を酸化剤と反応させて活性化莢膜多糖体を生成する前に、酸加水分解処理や微小流体化などのサイジング工程にかけられない。

【０１５９】

血清型それぞれの肺炎球菌コンジュゲートは、各血清型の莢膜多糖体を担体タンパク質にコンジュゲート化することによって製造することができる。異なる肺炎球菌コンジュゲートは、単一投与量製剤を始めとする組成物に製剤化することができる。

【０１６０】

莢膜多糖体の活性化

多糖体－タンパク質コンジュゲートを製造するには、各肺炎球菌血清型から調製された莢膜多糖体を、莢膜多糖体が担体タンパク質と反応しうるように、化学的に活性化させることができる。活性化させたなら、各莢膜多糖体を担体タンパク質に個別にコンジュゲート化して、糖コンジュゲートにすることができる。多糖体の化学的な活性化および後続の担体タンパク質へのコンジュゲート化は、従来の方法によって実現することができる。

【０１６１】

たとえば、莢膜多糖体の末端にあるビシナルヒドロキシル基を、たとえば、米国特許第４，３６５，１７０号、第４，６７３，５７４号、および第４，９０２，５０６号において開示されているように、（過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウム、または過ヨウ素酸を始めとする）ペルヨーデートなどの酸化剤によって酸化させてアルデヒド基にすることができ、これら文献の全体を参照によって組み入れる。ペルヨーデートは、炭水化物のビシナルヒドロキシル基をランダムに酸化させて反応性アルデヒド基とし、Ｃ－Ｃ結合の切断を引き起こす。用語「ペルヨーデート（ｐｅｒｉｏｄａｔｅ）」は、過ヨウ素酸イオン（ｐｅｒｉｏｄａｔｅ）および過ヨウ素酸（ｐｅｒｉｏｄｉｃ　ａｃｉｄ）の両方を包含する。この用語はまた、メタ過ヨウ素酸イオン（IO_4^-）およびオルト過ヨウ素酸イオン（IO_6^{5-}）の両方を包含する。用語「ペルヨーデート」は、過ヨウ素酸ナトリウムおよび過ヨウ素酸カリウムを始めとする、過ヨウ素酸イオンの種々の塩も包含する。ある特定の実施形態では、多糖体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムの存在下で酸化させることができる。

【０１６２】

ある特定の実施形態では、ペルヨーデートは、多糖体１μｇあたり約０．０３～０．１

７μｇの量で使用することができる。ある特定の実施形態では、ペルヨーデートは、多糖体１μｇあたり約０．０２５～０．１８μｇまたは約０．０２～０．１９μｇの量で使用することができる。糖は、上記範囲内で、所望されるとおりに活性化しうる。範囲外では、効果が不十分になる場合がある。

【０１６３】

多糖体を１－シアノ－４－ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート（ＣＤＡＰ）で活性化させて、シアン酸エステルとしてもよい。活性化された多糖体は、次いで、担体タンパク質上のアミノ基に、直接またはスペーサーもしくはリンカーを介して、つなげられる。

【０１６４】

たとえば、スペーサーをシスタミンまたはシステアミンとすると、チオール化多糖体を得ることができ、チオール化多糖体は、マレイミド活性化担体タンパク質（たとえば、Ｎ－［γ－マレイミドブチリルオキシ］スクシンイミドエステル（ＧＭＢＳ）を使用）と、またはハロアセチル化担体タンパク質（たとえば、ヨードアセトイミド、ブロモ酢酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＢＡ、ＳＩＢ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ＳｌＡＢ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ－ＳＩＡＢ）、ヨード酢酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＩＡ）、もしくはスクシンイミジル３－［ブロモアセトアミド］プロプリオネート（ＳＢＡＰ）を使用）と反応させた後に得られるチオエーテル結合によって、担体につなぐことができる。（場合によりＣＤＡＰ化学反応によって生成された）シアン酸エステルを、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド（ＡＯＨ）と結合させ、アミノ誘導体化された糖を、カルボジイミド（たとえば、ＥＤＡＣまたはＥＤＣ）化学を使用して、担体タンパク質に、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してコンジュゲート化することが好ましい。このようなコンジュゲートは、たとえば、ＷＯ９３／１５７６０、ＷＯ９５／０８３４８、およびＷＯ９６／１２９０９４に記載されており、これら文献すべての全体を参照によって組み入れる。

【０１６５】

活性化工程の後、活性化莢膜多糖体は、活性化多糖体を担体タンパク質と混合する前に、場合により凍結乾燥される。活性化多糖体および担体タンパク質は、別々に凍結乾燥してもよいし、または互いを合わせ、次いで凍結乾燥してもよい。

【０１６６】

活性化莢膜多糖体は、糖などのいずれかの凍害防御物質の存在下で凍結乾燥することができる。たとえば、糖は、限定はしないが、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレチトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトール、およびｐａｌａｔｉｎｉｔから選択される場合がある。ある特定の実施形態では、糖は、スクロースである。凍結乾燥された多糖体は、次いで、コンジュゲート化反応の前に、溶媒に再懸濁される。凍結乾燥された活性化莢膜多糖体を、担体タンパク質を含む溶液と混合することができる。別法としては、同時に凍結乾燥された多糖体および担体タンパク質を、コンジュゲート化反応の前に、溶媒に再懸濁する。

【０１６７】

活性化莢膜多糖体の担体タンパク質へのコンジュゲート化

活性化莢膜多糖体と担体タンパク質のコンジュゲート化は、たとえば、米国特許出願公開第２００６／０２２８３８０号、第２００７／０２３１３４０号、第２００７／０１８４０７１号、および第２００７／０１８４０７２号、ＷＯ２００６／１１０３８１、ＷＯ２００８／０７９６５３、ならびにＷＯ２００８／１４３７０９号に記載されているように、たとえば、還元的アミノ化によって実現することができ、これら文献すべての全体を参照によって組み入れる。たとえば、活性化莢膜多糖体および担体タンパク質を還元剤と反応させて、コンジュゲートとすることができる。適切である還元剤としては、水素化ホウ素塩、たとえば、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、ボラン－ピリジン、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素交換樹脂が挙げられる

。還元反応の終わりに、未反応アルデヒド基がコンジュゲートに残存している場合がある。未反応アルデヒド基は、水素化ホウ素ナトリウム（ＮａＢＨ$_4$）などの、適切なキャッピング剤を使用してキャッピングすることができる。一実施形態では、還元反応は、水性溶媒中で実施される。別の一実施形態では、非プロトン性溶媒中で反応が実施される。一実施形態では、還元反応は、ＤＭＳＯ（ジメチルスルホキシド）またはＤＭＦ（ジメチルホルムアミド）溶媒中で実施される。考えられる他の還元剤として、限定はしないが、アミン－ボラン、たとえば、ピリジン－ボラン、２－ピコリン－ボラン、２，６－ジボラン－メタノール、ジメチルアミン－ボラン、ｔ－ＢｕＭｅｉＰｒＮ－ＢＨ３、ベンジルアミン－ＢＨ３、５－エチル－２－メチルピリジン－ボラン（ＰＥＭＢ）が挙げられる。

【０１６８】

活性化莢膜多糖体は、担体タンパク質に直接、またはスペーサーもしくはリンカー、たとえば二官能性リンカーを使用して間接的にコンジュゲート化される場合がある。リンカーは、場合により、ヘテロ二官能性またはホモ二官能性であり、たとえば、反応性アミノ基と反応性カルボン酸基、２つの反応性アミノ基、または２つの反応性カルボン酸基を有する。

【０１６９】

コンジュゲート化に適する他の技術では、たとえば、国際特許出願公開第ＷＯ９８／４２７２１号に記載されているとおり、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、ｐ－ニトロ安息香酸、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、Ｓ－ＮＨＳ、ＥＤＣ、ＴＳＴＵが使用され、この文献の全体を参照によって組み入れる。コンジュゲート化には、糖の遊離ヒドロキシル基を１，１’－カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）と反応させた後（Ｂｅｔｈｅｌｌら（１９７９）　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５４：２５７２～２５７４、Ｈｅａｒｎら（１９８１）　Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．２１８：５０９～５１８を参照されたい）、タンパク質と反応させてカルバメート結合を作ることにより生成されうるカルボニルリンカーが関与する場合がある。これは、芳香族末端を還元して第一級ヒドロキシル基とし、場合により、第一級ヒドロキシル基を保護／脱保護し、第一級ヒドロキシル基をＣＤＩと反応させてＣＤＩカルバメート中間体を生成し、ＣＤＩカルバメート中間体をタンパク質上のアミノ基と結合させるものでよい。

【０１７０】

肺炎球菌コンジュゲートワクチンについての、多糖体の担体タンパク質に対する比は、通常は０．３～３．０（ｗ／ｗ）の範囲にあるが、血清型によってばらつく場合がある。比は、タンパク質および多糖体の存在量の単独での測定、または当業界で知られている、比が直接測定できる方法のいずれかによって求めることができる。^{1}Ｈ　ＮＭＲ分光法、または二重モニタリングを用いたＳＥＣ－ＨＰＬＣ－ＵＶ／ＲＩ（たとえば、それぞれ、全材料およびタンパク質含有量についての、屈折率およびＵＶ）を始めとする方法によって、コンジュゲートのサイズ分布にかけての糖／タンパク質比をプロファイルすることができ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ－ＭＡＬＬＳまたはＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ－ＭＳによっても同様である。

【０１７１】

そうして得られた多糖体－タンパク質コンジュゲートは、様々な方法によって精製および富化することができる。そうした方法には、濃縮／ダイアフィルトレーション、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過が含まれる。精製された多糖体－タンパク質コンジュゲートを合わせて、ワクチンとして使用することのできる多価肺炎球菌コンジュゲート組成物が製剤される。

【０１７２】

製剤

ワクチン組成物の製剤は、業界で受け入れられている方法を使用して実現することができる。ワクチン組成物は、その意図された投与経路と適合するように製剤される。個々の肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質コンジュゲートを、生理的に許容される媒体と一緒に製剤して、組成物を調製することができる。そのような媒体の例としては、限定はしないが

、水、緩衝食塩水、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）、およびデキストロース溶液が挙げられる。

【０１７３】

一部の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、アジュバントをさらに含む。本文書で使用するとき、「アジュバント」とは、抗原に対する免疫応答を非特異的に増強する物質または媒体を指す。アジュバントとして、限定はしないが、以下のものを挙げることができる：

（１）アルミニウム塩（アラム）、たとえば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、ヒドロキシリン酸硫酸アルミニウムなど；

（２）（ムラミルペプチド（以下で定義する）や細菌細胞壁成分などの他の特定の免疫刺激薬を含むまたは含まない）水中油エマルション製剤、たとえば、（ａ）Ｍｏｄｅｌ１０Ｙマイクロフルイダイザー（Ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｃｓ、マサチューセッツ州ニュートン）などのマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロン粒子に製剤された、５％のスクアレン、０．５％のＴｗｅｅｎ８０、および０．５％のＳｐａｎ８５を含有する（場合により、必須ではないが、種々の量のＭＴＰ－ＰＥ（以下を参照）を含有する）ＭＦ５９（ＷＯ９０／１４８３７）、（ｂ）サブミクロンエマルションに微小流体化された、または粒径がより大きいエマルションを生じるようにボルテックス撹拌された、１０％のスクアレン、０．４％のＴｗｅｅｎ８０、５％のプルロニックブロックポリマー（ｐｌｕｒｏｎｉｃ－ｂｌｏｃｋｅｄ　ｐｏｌｙｍｅｒ）Ｌ１２１、およびｔｈｒ－ＭＤＰ（以下を参照）を含有する、ＳＡＦ、ならびに（ｃ）２％のスクアレン、０．２％のＴｗｅｅｎ８０、ならびに米国特許第４，９１２，０９４号に記載されている３－Ｏ－脱アセチル化モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ（商標））（Ｃｏｒｉｘａ）、トレハロースジミコレート（ＴＤＭ）、および細胞壁骨格（ＣＷＳ）、好ましくは、ＭＰＬ＋ＣＷＳ（Ｄｅｔｏｘ（商標））からなる群からの１種またはそれ以上の細菌細胞壁成分を含有する、Ｒｉｂｉ（商標）アジュバント系（ＲＡＳ）（Ｃｏｒｉｘａ、モンタナ州ハミルトン）；

（３）サポニンアジュバント、たとえば、ＱｕｉＡやＳＴＩＭＵＬＯＮ（商標）ＱＳ－２１（Ａｎｔｉｇｅｎｉｃｓ、マサチューセッツ州フレーミングハム）（米国特許第５，０５７，５４０号）、またはこれから生成された粒子、たとえば、ＩＳＣＯＭ（免疫刺激複合体）；

（４）細菌リポ多糖、合成リピドＡ類似体、たとえば、Ｃｏｒｉｘａから入手可能であり、米国特許第６，１１３，９１８号に記載されている、リン酸アミノアルキルグルコサミン化合物（ＡＧＰ）またはその誘導体もしくは類似体；このようなＡＧＰの１つは、５２９としても知られる（以前はＲＣ５２９として知られた）２－［（Ｒ）－３－テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ］エチル２－デオキシ－４－Ｏ－ホスホノ－３－Ｏ－［（Ｒ）－３－テトラデカノイルオキシテトラデカノイ］－２－［（Ｒ）－３－テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ］－ｂ－Ｄ－グルコピラノシドであり、水溶液形態または安定なエマルションとして製剤されている、

（５）合成ポリヌクレオチド、たとえば、ＣｐＧモチーフを含んでいるオリゴヌクレオチド（米国特許第６，２０７，６４６号）；

（６）サイトカイン、たとえば、インターロイキン（たとえば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８など）、インターフェロン（たとえば、ガンマインターフェロン）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、共刺激分子Ｂ７－１およびＢ７－２など；

（７）細菌ＡＤＰリボシル化毒素の無毒化突然変異体、たとえば、ＷＯ００／１８４３４（ＷＯ０２／０９８３６８およびＷＯ０２／０９８３６９も参照されたい）によれば、たとえば、アミノ酸２９位にあるグルタミン酸が別のアミノ酸、好ましくは、ヒスチジンで置き換えられている、野生型または突然変異体形態のコレラ毒素（ＣＴ）、百日咳毒素（ＰＴ）、または大腸菌熱不安定性毒素（ＬＴ）、特に、ＬＴ－Ｋ６３、ＬＴ－Ｒ７２、ＣＴ－Ｓ１０９、ＰＴ－Ｋ９／Ｇ１２９（たとえば、ＷＯ９３／１３３０２およびＷＯ９

２／１９２６５を参照されたい）；ならびに
（８）補体成分、たとえば、補体成分Ｃ３ｄの三量体；
（９）生体分子、たとえば、脂質や共刺激分子。例となる生物学的アジュバントには、ＡＳ０４、ＩＬ－２、ＲＡＮＴＥＳ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、Ｇ－ＣＳＦ、ＬＦＡ－３、ＣＤ７２、Ｂ７－１、Ｂ７－２、ＯＸ－４０Ｌ、および４１ＢＢＬが含まれる。

【０１７４】
ムラミルペプチドには、限定はしないが、Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－トレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチル－ノルムラミル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ヒドロキシホスホリルオキシ）エチルアミン（ＭＴＰ－ＰＥ）などが含まれる。

【０１７５】
アジュバントは、組成物中のコンジュゲートの量および価に従って適切に選択される。一部の実施形態では、アジュバントは、アルミニウム系アジュバントである。アルミニウム系アジュバントを使用する場合、アルミニウム元素を主体とした組成物中のアルミニウム元素は、０．０１ｍｇ／ｍＬ～１ｍｇ／ｍＬを構成するように加えることができる。通常、０．５ｍｌの単一ワクチン用量が、アルミニウム系アジュバント約０．１ｍｇ～２．５ｍｇを含有するように製剤される。他の実施形態では、０．５ｍｌの単一ワクチン用量が、０．１ｍｇ～２ｍｇ、０．１ｍｇ～１ｍｇ、０．１ｍｇ～０．５ｍｇ、０．１ｍｇ～０．２ｍｇ、０．１２５ｍｇ～２．５ｍｇ、０．１２５ｍｇ～０．５ｍｇ、０．１２５ｍｇ～０．２ｍｇ、または０．１２５～０．２５ｍｇの間のアルミニウム系アジュバントを含有するように製剤される。ある特定の実施形態では、０．５ｍｌの単一ワクチン用量が、アルミニウム系アジュバント約０．１２５ｍｇ～約０．２５０ｍｇを含有するように製剤される。ある特定の実施形態では、０．５ｍｌの単一ワクチン用量が、アルミニウム系アジュバント約０．１２５ｍｇを含有するように製剤される。ある特定の実施形態では、０．５ｍｌの単一ワクチン用量が、アルミニウム系アジュバント約０．２５０ｍｇを含有するように製剤される。

【０１７６】
特定の実施形態では、アジュバントは、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、および水酸化アルミニウムからなる群から選択される。

【０１７７】
特定の実施形態では、アジュバントは、リン酸アルミニウムである。

【０１７８】
一部の実施形態では、組成物は、肺炎連鎖球菌の感染に備えたワクチンとして使用するためのものである。

【０１７９】
肺炎球菌莢膜多糖体－タンパク質担体コンジュゲートの特徴付け
ある特定の実施形態では、多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、１００～１０，０００ｋＤａの分子量を有する場合がある。ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、２００～９，０００ｋＤａの分子量を有する。ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、３００～８，０００ｋＤａの分子量を有する。ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、４００～７，０００ｋＤａの分子量を有する。ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、５００～６，０００ｋＤａの分子量を有する。ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、６００～５，０００ｋＤａの分子量を有する。ある特定の実施形態では、コンジュゲートは、５００～４，０００ｋＤａの分子量を有する。上記のいずれの範囲の内にあるいずれの整数も、本開示の実施形態として企図される。

【０１８０】
分子量が上記範囲内にあるとき、コンジュゲートは、高い収率で安定して生成しうる。また、遊離多糖体の割合も減らすことができる。加えて、上記分子量範囲内では、優れた免疫原性を得ることができる。

【０１８１】
個々の多糖体－タンパク質コンジュゲートを精製した後、それらを配合して、本開示の免疫原性組成物が製剤される。
【０１８２】
本開示の血清型の糖－タンパク質コンジュゲートは、多糖体のタンパク質担体に対する比（多糖体の量／タンパク質担体の量、ｗ／ｗ）によって特徴付けることができる。
【０１８３】
ある特定の実施形態では、各血清型についての多糖体－タンパク質担体コンジュゲートにおける多糖体のタンパク質担体に対する比（ｗ／ｗ）は、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、または０．７～０．９（たとえば、約０．７、約０．８、約０．９、約１．０、約１．１、約１．２、約１．３、約１．４、約１．５、約１．６、約１．７、約１．８、約１．９、約２．０、約２．１、約２．２、約２．３、約２．４、または約２．５）である。
【０１８４】
多糖体のタンパク質担体に対する比が上記範囲内にあるとき、コンジュゲートは、高い収率で安定して生成しうる。また、遊離多糖体の割合も減らすことができる。加えて、上記範囲内では、優れた免疫原性を得ることができ、他の血清型による干渉なく、コンジュゲートを安定に保つことができる。
【０１８５】
本開示のコンジュゲートおよび免疫原性組成物は、タンパク質担体に共有結合的にコンジュゲート化されていないが、それにもかかわらず、多糖体－タンパク質担体コンジュゲート組成物中に存在する、遊離多糖体を含有する場合がある。遊離多糖体は、多糖体－タンパク質担体コンジュゲートと非共有結合性に関連する（すなわち、多糖体－タンパク質担体コンジュゲートに非共有結合的に結合する、吸着される、または閉じ込められるもしくは捕らえられる）場合がある。
【０１８６】
ある特定の実施形態では、多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約６０％、約５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２５％、２０％、または１５％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約６０％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約５０％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約４０％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約３０％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約２５％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約２０％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約１５％未満しか含有しない。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、各血清型の遊離多糖体を、各血清型の多糖体の総量を基準として、約１０％未満しか含有しない。
【０１８７】
各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートは、その分子サイズ分布（K_d）によって特徴付けることもできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体（ＣＬ－４Ｂ；架橋

アガロースビーズ、４％）を使用して、コンジュゲートの相対的な分子サイズ分布を明らかにすることができる。重力式カラムにおいてサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を使用して、コンジュゲートの分子サイズ分布がプロファイルされる。媒体にある孔から排除された大きい分子は、小さい分子より速やかに溶離される。画分収集装置を使用して、カラム溶出液が収集される。画分は、糖アッセイによる比色試験にかけられる。K_dを求めるために、カラムを較正して、分子が完全に排除される画分（V_0；$K_d=0$）および最大滞留に相当する画分（V_i；$K_d=1$）が定められる。特定のサンプル属性を満たす画分（V_e）は、式$K_d=(V_e-V_0)/(V_i-V_0)$によってK_dに関連付けられる。

【０１８８】

ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートの少なくとも１５％が、ＣＬ－４Ｂカラムにおいて、０．３以下のK_dを示しうる。

【０１８９】

ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートの少なくとも２０％が、ＣＬ－４Ｂカラムにおいて、０．３以下のK_dを示しうる。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートの少なくとも１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、または９０％が、ＣＬ－４Ｂカラムにおいて、０．３以下のK_dを示しうる。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートの少なくとも６０％が、ＣＬ－４Ｂカラムにおいて、０．３以下のK_dを示しうる。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートの少なくとも５０～８０％が、ＣＬ－４Ｂカラムにおいて、０．３以下のK_dを示しうる。ある特定の実施形態では、各血清型の多糖体－タンパク質担体コンジュゲートの少なくとも６５～８０％が、ＣＬ－４Ｂカラムにおいて、０．３以下のK_dを示しうる。ある特定の実施形態では、各血清型の糖－タンパク質コンジュゲートの少なくとも１５～６０％が、ＣＬ－４Ｂカラムにおいて、０．３以下のK_dを示しうる。

【０１９０】

予防的方法および使用

一態様では、本開示は、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）および薬学的に許容される賦形剤を含むワクチンを提供する。一部の実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、少なくとも、コハク酸緩衝液などの緩衝液、塩化ナトリウムなどの塩、および／またはポリオキシエチレンソルビタンエステル（たとえば、ポリソルベート８０）などの界面活性剤を含む。

【０１９１】

一部の実施形態では、ワクチンは、肺炎連鎖球菌感染によって引き起こされる疾患に備えて、ヒト対象において防御免疫応答を誘発する。

【０１９２】

さらなる態様によれば、本開示は、肺炎連鎖球菌感染または疾患を予防する方法であって、ヒト対象に、予防有効量の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、もしくはＰＣＶ－２７）またはそれを含むワクチンを投与することを含む方法を提供する。多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、もしくはＰＣＶ－２７）またはそれを含むワクチンは、以下でさらに詳細に記載するとおり、たとえば、全身または粘膜経路によるものを始めとする、いずれかの経路によって投与することができる。

【０１９３】

ある特定の実施形態では、ヒト対象は、高齢の対象であり、疾患は、肺炎または侵襲性肺炎球菌感染症（ＩＰＤ）である。ある特定の実施形態では、高齢の対象は、少なくとも５０歳である。他の実施形態では、高齢の対象は、少なくとも５５歳である。さらに他の

実施形態では、高齢の対象は、少なくとも６０歳である。

【０１９４】

他の実施形態では、ヒト対象は、小児であり、疾患は、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症（ＩＰＤ）、または急性中耳炎（ＡＯＭ）である。ある特定の実施形態では、小児は、０～２歳である。他の実施形態では、小児は、２～１５か月齢である。

【０１９５】

さらに別の一実施形態では、ヒト対象は、６週齢～１７歳であり、疾患は、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症（ＩＰＤ）、または急性中耳炎（ＡＯＭ）である。ある特定の実施形態では、ヒト対象は、６週齢～５歳である。他の実施形態では、ヒト対象は、５～１７歳である。

【０１９６】

各ワクチン用量中のコンジュゲートの量または混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物の予防有効量は、重大な有害作用なく予防をもたらす量として選択することができる。そのような量は、肺炎球菌血清型に応じて様々となりうる。一般に、各用量が、多糖体約０．１μｇ～約１００μｇ、詳細には、約０．１～１０μｇ、より詳細には、約１μｇ～約５μｇを含む場合がある。特定のワクチンに最適な成分量は、対象における適正な免疫応答の観察を含む標準の研究によって見極めることができる。たとえば、ヒト対象のワクチン接種のための量が、動物での試験結果から推定されて決定される場合がある。加えて、用量が経験的に決められる場合もある。

【０１９７】

一部の実施形態では、ワクチンまたは多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、各莢膜多糖約１μｇ～約５μｇ；担体タンパク質（たとえば、CRM_{197}）約２０μｇ～約８５μｇ；および場合により、約０．１ｍｇ～約０．５ｍｇの元素としてのアルミニウムアジュバントを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。一部の実施形態では、ワクチンまたは多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、約４μｇ～約５μｇの量で存在する血清型６Ｂおよび場合により血清型３以外は、各莢膜多糖体約２μｇ～約２．５μｇ；タンパク質担体（たとえば、CRM_{197}）約４０μｇ～約７５μｇ；および場合により、約０．１ｍｇ～約０．２５ｍｇの元素としてのアルミニウムアジュバントを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。

【０１９８】

一部の実施形態では、ワクチンまたは混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、各莢膜多糖約１μｇ～約５μｇ；第１の担体タンパク質（たとえば、ＴＴ）約１μｇ～約３０μｇ；第２の担体タンパク質（たとえば、CRM_{197}）約２０μｇ～約１００μｇ；および場合により、約０．１ｍｇ～約０．５ｍｇの元素としてのアルミニウムアジュバントを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。

【０１９９】

一部の実施形態では、ワクチンまたは混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、約４μｇ～約５μｇの量で存在する血清型６Ｂおよび場合により血清型３以外は、各莢膜多糖体約２μｇ～約２．５μｇ；第１の担体タンパク質（たとえば、ＴＴ）約２μｇ～約２５μｇ；第２の担体タンパク質（たとえば、CRM_{197}）約４０μｇ～約１００μｇ；および場合により、約０．１ｍｇ～約０．２５ｍｇの元素としてのアルミニウムアジュバントを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。

【０２００】

一部の実施形態では、ワクチンまたは多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、約４．４μｇの量で存在する血清型６Ｂ以外は、各莢膜多糖体約２．２μｇを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。

【０２０１】

一部の実施形態では、ワクチンまたは多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、それぞれ約４μｇ～約５μｇの量で存在する、血清型１、３、４、５、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および１９Ｆからなる群から選択される６種までの莢膜多糖体以外は、各莢膜多糖体約２μｇ～約２．５μｇを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。一実施形態では、約４μｇ～約５μｇの量で存在する６種までの莢膜多糖体は、血清型１、３、４、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および１９Ｆからなる群から選択される。他の実施形態では、ワクチンまたは混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、それぞれ約４．４μｇの量で存在する、血清型１、３、４、５、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および１９Ｆからなる群から選択される６種までの莢膜多糖体以外は、各莢膜多糖体約２．２μｇを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。一実施形態では、約４．４μｇの量で存在する６種までの莢膜多糖体は、血清型１、３、４、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および１９Ｆからなる群から選択される。

【０２０２】

一部の実施形態では、ワクチンまたは多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、血清型１、５、６Ａ、７Ｆ、８、９Ｎ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および／または３５Ｂの莢膜多糖体約２μｇ～約２．５μｇ、ならびに血清型３、４、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および／または１９Ｆの莢膜多糖体約４μｇ～約５μｇを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。

【０２０３】

ある特定の実施形態では、ワクチンまたは多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、血清型１、４、５、６Ａ、７Ｆ、８、９Ｖ、９Ｎ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および／または３５Ｂの莢膜多糖体約２～約２．５μｇ、ならびに血清型３および／または６Ｂの莢膜多糖体約４～約５μｇを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。

【０２０４】

一部の実施形態では、ワクチンまたは多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、血清型１、４、５、６Ａ、７Ｆ、８、９Ｖ、９Ｎ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および／または３５Ｂの莢膜多糖体約２～約２．５μｇ、ならびに血清型６Ｂの莢膜多糖体約４～約５μｇ、および／または血清型３の莢膜多糖体約８～約９μｇ、より好ましくは、血清型３の莢膜多糖体約８．８μｇを含有するように製剤された単一の０．５ｍｌ用量とすることができる。

【０２０５】

ある特定の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、もしくはＰＣＶ－２７）またはそれを含むワクチンは、賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液をさらに含む。

【０２０６】
一部の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、血清型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、および／または３５Ｂ由来の肺炎球菌莢膜多糖体それぞれが担体タンパク質（たとえば、ＣＲＭ$_{197}$）にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの血清型６Ｂ以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；担体タンパク質（たとえば、ＣＲＭ$_{197}$）約４０μｇ～約１００μｇ；アジュバントとしての約０．１２５～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（約０．５～約１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。
【０２０７】
一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、２種またはそれ以上の担体タンパク質（混成担体）を含む。たとえば、ある特定の実施形態では、少なくとも２つの血清型が第１の担体タンパク質（たとえば、破傷風トキソイド）にコンジュゲート化され、残りの血清型が第２の担体タンパク質（たとえば、ＣＲＭ$_{197}$）にコンジュゲート化されている。ある特定の実施形態では、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される２種の莢膜多糖体は、血清型１、３、および５からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、破傷風トキソイドにコンジュゲート化される２種の莢膜多糖体は、血清型１、３、５、１５Ｂ、および２２Ｆからなる群から選択される。血清型１、３、５、１５Ｂ、および２２Ｆから選択される血清型の代わりに、またはこれらに加えて、血清型４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および／または３５Ｂの１つまたはそれ以上を破傷風トキソイドにコンジュゲート化することも可能となりうる。該当する他の血清型が破傷風トキソイドにコンジュゲート化される場合もある。
【０２０８】
一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、血清型１および３の肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化され、血清型４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および／または３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの血清型６Ｂ以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型１および３についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；アジュバントとしての約０．１２５～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（約０．５～約１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。
【０２０９】
一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１および５の肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化され、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および／または３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。一実施形態では、各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの血清型６Ｂおよび約２．２～８．８μｇの血清型３以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型１および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{19}$

7担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（約０．５～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。ある特定の実施形態では、血清型３は、約２．２μｇで存在する。他の実施形態では、血清型３は、約４．４μｇで存在する。他の実施形態では、血清型３は、約８．８μｇで存在する。さらに別の一実施形態では、各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの、血清型１、３、４、５、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および１９Ｆからなる群から選択される６種までの莢膜多糖体以外は、各莢膜多糖約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型１および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５ｍｇ～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（０．５ｍｇ～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。一実施形態では、約４．４μｇの６種までの莢膜多糖体は、血清型１、３、４、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および１９Ｆからなる群から選択される。別の一実施形態では、各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの血清型３、４、６Ｂ、９Ｖ、１９Ａ、および１９Ｆ以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型１および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５ｍｇ～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（０．５ｍｇ～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。別の一実施形態では、各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの血清型３および４以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型１および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５ｍｇ～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（０．５ｍｇ～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。

【０２１０】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型３および５の肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化され、血清型１、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの６Ｂ以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型３および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（約０．５～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。

【０２１１】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１、３、および５の肺炎球菌莢膜多糖体の少なくとも２つならびに血清型１５Ｂおよび２２Ｆが破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、残りの血清型由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。

【０２１２】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１、５、１５Ｂ、および２２Ｆの肺炎球菌莢膜多糖体それぞれが破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの６Ｂ以外は各莢膜

多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型３および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（約０．５～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。

【０２１３】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１、３、１５Ｂ、および２２Ｆの肺炎球菌莢膜多糖体それぞれが破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの６Ｂ以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型３および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（約０．５～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。

【０２１４】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型３、５、１５Ｂ、および２２Ｆの肺炎球菌莢膜多糖体それぞれが破傷風トキソイドにコンジュゲート化され、血清型１、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆ、および３５Ｂ由来の莢膜多糖体がＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。各０．５ｍＬ用量を、約４．４μｇの６Ｂ以外は各莢膜多糖体約２．２μｇ；ＴＴ担体タンパク質約２μｇ～約２５μｇ（血清型３および５についてのみ）、およびＣＲＭ$_{197}$担体タンパク質約４０μｇ～約１００μｇ；約０．１２５～０．２５０ｍｇの元素としてのアルミニウム（約０．５～１．２ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント；ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体に製剤することができる。

【０２１５】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１および５の肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。

【０２１６】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型３および５の肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。

【０２１７】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１および３の肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。

【０２１８】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１、５、１５Ｂ、および２２Ｆの肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。

【０２１９】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型３、５、１５Ｂ、および２２Ｆの肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。

【０２２０】

一部の実施形態では、混成担体多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型１、３、１５Ｂ、および２２Ｆの肺炎球菌莢膜多糖体それぞれがＴＴにコンジュゲート化されている液体製剤に製剤することができる。

【０２２１】

一部の実施形態では、液体製剤は、保存剤なしで一用量注射器に充填することができる。液体製剤は、震盪後、筋肉内投与の準備が整った白色の均質な懸濁液であるワクチンになる。

【０２２２】

多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、単回注射で、または一連の免疫化の部分として投与される場合がある。たとえば、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、適切な間隔、たとえば、１、２、３、４、５、もしくは６か月、またはこれを取り合わせた間隔を空けて、２回、３回、４回、またはより多数回投与される場合がある。一部の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、小児に、たとえば、約２、３、４、および１２～１５か月齢時；約３、４、５、および１２～１５か月齢時；または約２、４、６、および１２～１５月齢時を含む、生後１５か月以内に４回投与される。この１回目の用量は、早ければ６週齢で投与してよい。別の一実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、小児に、たとえば、約２、４、および１１～１２か月齢時を含む、生後１５か月以内に３回投与される。

【０２２３】

多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、肺炎連鎖球菌由来の１種またはそれ以上のタンパク質も含む場合がある。含めるのに適する肺炎連鎖球菌タンパク質の例としては、国際特許出願ＷＯ０２／０８３８５５において確認されるもの、ならびに国際特許出願ＷＯ０２／０５３７６１に記載されているものが挙げられる。

【０２２４】

多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、非経口、経皮もしくは経粘膜、鼻腔内、筋肉内、腹腔内、皮内、静脈内、または皮下経路などの当業者に知られている１つまたはそれ以上の投与経路で対象に投与することができ、しかるべく製剤することができる。多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、その意図された投与経路と適合するように製剤することができる。

【０２２５】

一部の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、液体製剤として、筋肉内、腹腔内、皮下、静脈内、動脈内、もしくは経皮注射、または呼吸器粘膜注入によって投与することができる。多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、液体形態または凍結乾燥形態として製剤することができる。一部の実施形態では、液体の溶液もしくは懸濁液、注射前に液体に溶解もしくは懸濁させるのに適する固体形態として、または乳濁液として、従来の形で注射用組成物が調製される。一部の実施形態では、滅菌粉末または顆粒から注射溶液および懸濁液が調製される。こうした経路で投与される医薬品の製剤および製造における全般的な検討事項は、たとえば、参照によって本明細書に組み入れる、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、第１９版、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、ペンシ

ルバニア州イーストン、１９９５において見ることができる。現在のところ、治療薬の肺および呼吸器系への直接の送達には、口腔もしくは鼻用噴霧剤または（たとえば、吸入による）エアロゾル経路が最も一般的に使用されている。一部の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６、またはＰＣＶ－２７）は、計量された投与量の組成物を送達するデバイスを使用して投与される。本文書に記載の皮内用医薬組成物の送達において使用するのに適するデバイスとしては、米国特許第４，８８６，４９９号、米国特許第５，１９０，５２１号、米国特許第５，３２８，４８３号、米国特許第５，５２７，２８８号、米国特許第４，２７０，５３７号、米国特許第５，０１５，２３５号、米国特許第５，１４１，４９６号、米国特許第５，４１７，６６２号（これらすべてを参照によって本明細書に組み入れる）に記載されているものなどの、短針デバイスが挙げられる。参照によって本明細書に組み入れるＷＯ１９９９／３４８５０に記載されているものおよびその機能等価物などの、針が皮膚に入る有効侵入長を制限するデバイスによって皮内用組成物が投与される場合もある。また、液体ジェット注射器によって、または角質層を貫き真皮に到達するジェットを発生させる針によって液体ワクチンを真皮に送達する、ジェット注射デバイスも適する。ジェット注射デバイスは、たとえば、米国特許第５，４８０，３８１号、米国特許第５，５９９，３０２号、米国特許第５，３３４，１４４号、米国特許第５，９９３，４１２号、米国特許第５，６４９，９１２号、米国特許第５，５６９，１８９号、米国特許第５，７０４，９１１号、米国特許第５，３８３，８５１号、米国特許第５，８９３，３９７号、米国特許第５，４６６，２２０号、米国特許第５，３３９，１６３号、米国特許第５，３１２，３３５号、米国特許第５，５０３，６２７号、米国特許第５，０６４，４１３号、米国特許第５，５２０，６３９号、米国特許第４，５９６，５５６号、米国特許第４，７９０，８２４号、米国特許第４，９４１，８８０号、米国特許第４，９４０，４６０号、ＷＯ１９９７／３７７０５、およびＷＯ１９９７／１３５３７（これらすべてを参照によって本明細書に組み入れる）に記載されている。また、圧縮気体を使用して、粉末形態のワクチンを外側の皮膚層を経て真皮へと加速させる、弾道学的粉末／粒子送達デバイスも適する。加えて、古典的なＭａｎｔｏｕｘ法の皮内投与において従来の注射器を使用してもよい。

【０２２６】

非経口投与用の製造物として、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンが挙げられる。非水性溶媒の例として、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような油およびオレイン酸エチルのような注射用有機エステルがある。油の例として、植物油または動物油、ピーナッツ油、ダイズ油、オリーブ油、サンフラワー油、肝油、魚油のような合成油およびミルクまたは卵から得られた脂質が挙げられる。水性担体として、生理食塩水および緩衝媒体を含む、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとして、塩化ナトリウム溶液、リンゲル溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲルまたは固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとして、流体および栄養補給剤、電解質補給剤（リンゲルデキストロースをベースとするもののような）などが挙げられる。たとえば、抗菌剤、抗酸化物質、キレート化剤および不活性ガスなどのような保存料および他の添加物が存在する場合もある。

【０２２７】

多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６またはＰＣＶ－２７）は、単位用量バイアル、複数回用量バイアルまたは予め充填されたシリンジの形態で製剤化できる。溶液のための薬学的に許容される担体として、水性または非水性溶媒、懸濁液、エマルジョンまたは油が挙げられる。組成物は、等張性、高帳性または低張性でありうる。しかし、注入または注射用組成物は、基本的に等張性であることが望ましい。したがって、等張性または高張性は、組成物の保存のために有利である場合がある。組成物が高張性である場合には、組成物を投与前に等張性に希釈することができる。張性剤は、塩のようなイオン性張性剤または

炭水化物のような非イオン性張性剤でありうる。イオン性張性剤として、限定はしないが、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウムおよび塩化マグネシウムが挙げられる。非イオン性張性剤として、限定はしないが、ソルビトールおよびグリセリンが挙げられる。好ましくは、少なくとも１種の薬学的に許容される緩衝液が含まれる。たとえば、組成物が注入液または注射液である場合には、ｐＨ５～ｐＨ９またはｐＨ６～ｐＨ８のようなｐＨ４～ｐＨ１０で緩衝能を有する緩衝液中で製剤化されることが好ましい。緩衝液は、米国薬局方（ＵＳＰ）にとって適切なものから選択できる。たとえば、緩衝液は、酢酸、安息香酸、グルコン酸、グリセリン酸のような一塩基酸および乳酸；アコニット酸、アジピン酸、アスコルビン酸、炭酸、グルタミン酸、リンゴ酸、コハク酸および酒石酸のような二塩基酸；クエン酸およびリン酸のような多塩基酸；ならびにアンモニア、ジエタノールアミン、グリシン、トリエタノールアミンおよびＴＲＩＳのような塩基からなる群から選択できる。

【０２２８】

多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６またはＰＣＶ－２７）は、界面活性剤を含む場合がある界面活性剤の例として、限定はしないが、ポリオキシエチレンソルビタンエステル（一般に、Ｔｗｅｅｎｓと呼ばれる）、特に、ポリソルベート２０およびポリソルベート８０；エチレンオキシド（ＥＯ）、プロピレンオキシド（ＰＯ）、ブチレンオキシド（ＢＯ）の共重合体（ＤＯＷＦＡＸのような）；エトキシ（オキシ－１，２－エタンジイル）基の種々の反復を有するオクトキシノール、特に、オクトキシノール－９（Ｔｒｉｔｏｎ－１００）；エチルフェノキシポリエトキシエタノール（ＩＧＥＰＡＬ　ＣＡ－６３０／ＮＰ－４０）；レシチンのようなリン脂質；ＴＥＲＧＩＴＯＬ　ＮＰシリーズのようなノニルフェノールエトキシレート；ラウリル、セチル、ステアリル、オレイルアルコール由来ポリオキシエチレン脂肪エーテル（Ｂｒｉｊ界面活性剤）、特に、トリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Ｂｒｉｊ　３０）；ＳＰＡＮとして知られるソルビタンエーテル、特に、ソルビタントリオレエート（Ｓｐａｎ　８５）およびソルビタンモノラウレートが挙げられる。

【０２２９】

Ｔｗｅｅｎ　８０／Ｓｐａｎ　８５のような界面活性剤の混合物を使用できる。Ｔｗｅｅｎ　８０のようなポリオキシエチレンソルビタンエステルの組合せおよびＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００のようなオクトキシノールも適切である。Ｌａｕｒｅｔｈ　９およびＴｗｅｅｎおよび／またはオクトキシノールの組合せも有利である。好ましくは、含まれるポリオキシエチレンソルビタンエステル（Ｔｗｅｅｎ　８０のような）の量は、０．０１％～１％（ｗ／ｖ）、０．０１％～０．１％（ｗ／ｖ）、０．０１％～０．０５％（ｗ／ｖ）または約０．０２％である場合があり；含まれるオクチルフェノキシポリオキシエタノールまたはノニルフェノキシポリオキシエタノール（たとえば、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００）の量は、０．００１％～０．１％（ｗ／ｖ）、特に、０．００５％～０．０２％である場合があり；含まれるポリオキシエチレンエーテル（たとえば、Ｌａｕｒｅｔｈ　９）の量は、０．１％～２０％（ｗ／ｖ）、おそらくは、０．１％～１０％、特に、０．１％～１％または約０．５％である場合がある。

【０２３０】

一部の実施形態では、多価肺炎球菌コンジュゲート組成物（たとえば、ＰＣＶ－２２、ＰＣＶ－２３、ＰＣＶ－２４、ＰＣＶ－２５、ＰＣＶ－２６またはＰＣＶ－２７）は、放出制御システムを介して送達できる。たとえば、静脈内注入、経皮パッチ、リポソームまたは他の経路を投与のために使用できる。一態様では、ミクロスフェアのような高分子またはインプラントを使用できる。

【０２３１】

上記の開示内容は、全体的に本発明を説明する。以下の具体例を参照することによって、より完全な理解を得ることができる。これらの実施例は単に例示目的で記載されるのであって、本発明の範囲を制限することを意図するものではない。

【実施例１】
【０２３２】
肺炎球菌莢膜多糖体の製造
肺炎球菌の培養および莢膜多糖体の精製を、当業者に公知であるように実施した。肺炎球菌血清型は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手した（血清型１：ＡＴＣＣ番号６３０１；血清型３：ＡＴＣＣ番号６３０３；血清型４：ＡＴＣＣ番号６３０４；血清型５：ＡＴＣＣ番号６３０５；血清型６Ａ：ＡＴＣＣ番号６３０６；血清型６Ｂ：ＡＴＣＣ番号６３２６；血清型７Ｆ：ＡＴＣＣ番号１０３５１；血清型９Ｎ：ＡＴＣＣ番号６３０９；血清型９Ｖ：ＡＴＣＣ番号１０３６８；血清型１４：ＡＴＣＣ番号６３１４；血清型１８Ｃ：ＡＴＣＣ番号１０３５６；血清型１９Ａ：ＡＴＣＣ番号１０３５７；血清型１９Ｆ：ＡＴＣＣ番号６３１９；血清型２３Ｂ：ＡＴＣＣ番号１０３６４；血清型２３Ｆ：ＡＴＣＣ番号６３２３）。血清型８、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２４Ｆ、３３Ｆおよび３５Ｂについては、他の供給源から入手した内部株（単数または複数）を使用したが、任意の公的に入手可能な株を使用できる。肺炎球菌は、莢膜および運動性、グラム陽性、ランセット型の双球菌、および血液寒天培地でのアルファ溶血によって特徴づけた。血清型は特異的抗血清を使用する膨化試験によって同定した（米国特許第５，８４７，１１２号）。
【０２３３】
細胞バンクの製造
株を拡大増殖させ、動物由来の成分を除去するために数世代のシードストックを作製した（世代Ｆ１、Ｆ２およびＦ３）。２つのさらなる世代のシードストックを生成した。Ｆ３バイアルから第１のさらなる世代を培養し、第１のさらなる世代のバイアルからその後の世代を培養した。シードバイアルは、凍結保存剤としての合成グリセリンとともに凍結して保存した（－７０℃未満）。細胞バンク製造のために、すべての培養物をダイズベースの培地で増殖させた。凍結前に、細胞を遠心分離によって濃縮し、使用済み培地を除去し、細胞ペレットを凍結保存剤（合成グリセリンのような）を含有する新鮮培地に再懸濁させた。
【０２３４】
培養および回収
作業細胞バンクから得た培養物を、ダイズベースの培地を含有するシードボトルに播種し、培養した。標的光学濃度（吸光度）に到達した後、シードボトルを使用して、ダイズベースの培地を含有する発酵槽に播種した。光学濃度値が一定に維持され始めた時点で培養を終結させた。培養を終結させた後、培養物にデオキシコール酸ナトリウムを添加して、細胞を溶解させた。得られた発酵槽内容物を冷却し、タンパク質沈殿を誘導した。次いで、混合物を遠心分離して、沈殿したタンパク質および細胞片を除去した。
【０２３５】
精製
遠心分離から得られた溶液を、デプスフィルターを通して濾過して、遠心分離で沈殿しなかったタンパク質および細胞片を除去した。濾液を１００ｋＤａ ＭＷメンブレンで濃縮し、濃縮物を１０体積の２５ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．２）を用いてダイアフィルトレーションしてサンプルを得た。サンプルを濾過して、多糖体が沈殿され、濾過される上清を収集した。濾液を３０ｋＤａメンブレンで濃縮し、濃縮物を約１０体積の３回蒸留水を使用してダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーションを実施した後、残存する溶液を０．２μｍフィルターを通して濾過した。濾液で工程内管理試験を実施した（外観、残存タンパク質、残存核酸、エンドトキシン、分子量および多糖体の総量）。濃縮物を滅菌濾過し、－２０℃で保存した。
【実施例２】
【０２３６】
肺炎球菌莢膜多糖体および担体タンパク質（血清型１、３、４、５、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、

８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆおよび３３Ｆ）のコンジュゲートの製造

種々の血清型の多糖体を種々の経路に従って活性化させ、次いで、担体タンパク質、ＣＲＭ$_{197}$またはＴＴにコンジュゲート化した。具体的には、以下に開示されるように、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ｆおよび３３Ｆの莢膜多糖体の各々をＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化することによって、ならびに血清型１および５の莢膜多糖体の各々をＴＴにコンジュゲート化することによって、血清型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および３５Ｂ由来の莢膜多糖体を含む多価肺炎球菌多糖体－タンパク質コンジュゲートを製造した。血清型１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、２４Ｆおよび３５Ｂの、ＣＲＭ$_{197}$へのコンジュゲート化は、実施例３～８に記載されている。血清型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および３５Ｂ由来の莢膜多糖体を含む別の多価肺炎球菌多糖体－タンパク質コンジュゲートは、以下に開示されるように、血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ｆおよび３３Ｆの莢膜多糖体の各々をＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化することによって、ならびに血清型１、５、１５Ｂおよび２２Ｆの莢膜多糖体の各々をＴＴにコンジュゲート化することによって製造した。

【０２３７】

ＷＯ２０１９／１５２９２５に開示されるように血清型１もしくは５の代わりに、またはそれに加えて、血清型３をＴＴにコンジュゲート化してもよいということも企図される。天然血清型のサイズに応じて、活性化プロセスは各莢膜多糖体のサイズの標的分子量への低減、化学的活性化および限外濾過による緩衝液交換を含む場合がある。

【０２３８】

種々の血清型の多糖体を以下の種々の経路に従って活性化し、次いで、担体タンパク質、ＣＲＭ$_{197}$またはＴＴにコンジュゲート化した。具体的には、１５Ｂおよび２２Ｆを除くすべての血清型の莢膜多糖体の各々をＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化することによって、ならびに血清型１、３、５、１５Ｂおよび２２Ｆの莢膜多糖体の各々をＴＴにコンジュゲート化することによってコンジュゲートを製造した。天然血清型のサイズに応じて、活性化プロセスは、各莢膜多糖体のサイズの標的分子量への低減、化学的活性化および限外濾過による緩衝液交換を含む場合がある。コンジュゲートを限外濾過を使用して精製し、最後に０．２μｍフィルターを通して濾過した。ｐＨ、温度、濃度および時間のようなプロセスパラメーターは、以下の通りとした。

【０２３９】

（１）活性化プロセス

工程１：加水分解

還元アミノ化は、タンパク質の第一級アミン（－ＮＨ$_2$）基と糖のアルデヒドの間にアミド結合が形成されるポリマーをコンジュゲート化する公知の方法である。担体タンパク質へのコンジュゲート化を促進するために、肺炎球菌莢膜多糖体にアルデヒド基を付加する。単糖の近接しているジオール構造を過ヨウ素酸ナトリウム（ＮａＩＯ$_4$）によって酸化して、アルデヒド基を形成することができる。血清型１、３、４、６Ａ、８、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ｂ、１８Ｃ、２２Ｆおよび３３Ｆ由来の莢膜多糖体を、以下の通りに前処置した。

【０２４０】

血清型１の場合には、莢膜多糖体の溶液に水酸化ナトリウムを添加し（０．０５Ｍの最終塩基濃度で）、溶液を５０±２℃でインキュベートした。次いで、溶液を約２１℃～約２５℃の範囲の温度に冷却し、それに塩酸を６．０±０．１の最終ｐＨまで添加し、それによって、加水分解を停止した。

【０２４１】
血清型３、８、１１Ａおよび１５Ｂの場合には、莢膜多糖体の溶液に塩酸を添加し（０．０１Ｍの最終酸濃度で）、溶液を６０±２℃でインキュベートした。次いで、溶液を約２１℃～約２５℃の範囲の温度に冷却し、それに０．１Ｍリン酸ナトリウムを６．０±０．１の最終ｐＨまで添加し、それによって、加水分解を停止した。
【０２４２】
血清型４の場合には、莢膜多糖体の溶液に塩酸を添加し（０．１Ｍの最終酸濃度で）、溶液を４５±２℃でインキュベートした。次いで、約２１℃～約２５℃の範囲の温度に冷却し、それに塩酸を６．０±０．１の最終ｐＨまで添加し、それによって、加水分解を停止した。
【０２４３】
血清型６Ａの場合には、莢膜多糖体の溶液に氷酢酸を添加し（０．１Ｍの最終酸濃度で）、溶液を６０±２℃でインキュベートした。次いで、溶液を約２１℃～約２５℃の範囲の温度に冷却し、それに１Ｍリン酸ナトリウムを６．０±０．１の最終ｐＨまで添加し、それによって、加水分解を停止した。
【０２４４】
血清型１２Ｆの場合には、莢膜多糖体の溶液に塩酸を添加し（０．０１Ｍの最終酸濃度で）、溶液を７０±２℃でインキュベートした。次いで、溶液を約２１℃～約２５℃の範囲の温度に冷却し、それに０．１Ｍリン酸ナトリウムを６．０±０．１の溶液の最終ｐＨまで添加し、それによって、加水分解を停止した。
【０２４５】
血清型１４および１８Ｃの場合には、莢膜多糖体の溶液に氷酢酸を添加し（０．２Ｍの最終酸濃度で）、溶液を９４±２℃でインキュベートした。次いで、溶液を約２１℃～約２５℃の範囲の温度に冷却し、それに１Ｍリン酸ナトリウムを溶液の最終ｐＨが６．０±０．１であるように添加し、それによって、加水分解を停止した。
【０２４６】
血清型２２Ｆおよび３３Ｆの場合には、莢膜多糖体の溶液に塩酸を添加し（０．０１Ｍの最終酸濃度で）、溶液を６０±２℃でインキュベートした。次いで、溶液を約２１℃～約２５℃の範囲の温度に冷却し、それに０．１Ｍリン酸ナトリウムを６．０±０．１の最終ｐＨまで添加し、それによって、加水分解を停止した。
【０２４７】
得られた莢膜多糖体の各々を、注射水（ＷＦＩ）、酢酸ナトリウムおよびリン酸ナトリウムで約１．０ｍｇ／ｍＬから約２．０ｍｇ／ｍＬの間の最終濃度に希釈した。
【０２４８】
工程２：過ヨウ素酸反応
各肺炎球菌糖活性化のための過ヨウ素酸ナトリウムモル当量を、繰り返し単位モル質量に基づいて決定した。１、７Ｆおよび１９Ｆを除くすべての血清型について、十分に混合しながら酸化反応を２１℃～２５℃で１６～２０時間進行させ、それらについては、温度は１０℃以下とした。コンジュゲートの一定の安定した生成を維持するのを補助するために、コンジュゲート化プロセスの間各血清型の酸化度（Ｄｏ）レベルの範囲が標的とされる。各血清型のＤｏレベルの好ましい標的とされる範囲は、表１および表２に示されている。
【０２４９】

【表１】

表 1. CRM_{197}にコンジュゲート化されるべきすべての血清型の Do の範囲

血清型	Do の範囲	血清型	Do の範囲
血清型 1	4～10	血清型 10A	1～12
血清型 3	2～8	血清型 11A	1～15
血清型 4	1～5	血清型 12F	1～9
血清型 6A	5～15	血清型 14	6～13
血清型 6B	7～13	血清型 18C	6～14
血清型 7F	2～8	血清型 19A	20～40
血清型 8	1～17	血清型 19F	20～40
血清型 9N	5～10	血清型 23F	6～14
血清型 9V	4～9	血清型 33F	1～15

【０２５０】

【表２】

表 2. TT にコンジュゲート化されるべき血清型 1、3、5、15B および 22F の Do の範囲

血清型	Do の範囲	血清型	Do の範囲
血清型 1 (1-TT)	1～15	血清型 15B (15B-TT)	1～15
血清型 3 (3-TT)	2～14	血清型 22F (22F-TT)	20～50
血清型 5 (5-TT)	1～15		

【０２５１】

工程３：限外濾過

酸化糖を濃縮し、１００ｋＤａ　ＭＷＣＯ限外濾過膜（血清型１のための３０ｋＤａ限外濾過膜および血清型１８Ｃのための５ｋＤａ限外濾過膜）でＷＦＩを用いてダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーションは、血清型１のために０．９％塩化ナトリウム溶液、血清型７Ｆおよび２３Ｆのために０．０１Ｍ酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ４．５）および血清型１９Ｆのために０．０１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．０）を使用して実施した。濾過生成物を廃棄し、保持液を０．２μｍフィルターを通して濾過した。

【０２５２】

工程４：凍結乾燥

水性溶媒を使用することによって担体タンパク質にコンジュゲート化されるべき血清型３、４、５、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１４および３３Ｆの莢膜多糖体については、多糖体および担体タンパク質の混合溶液をさらなるスクロースを添加することなく製造し、凍

結乾燥し、次いで、－２５℃±５℃で保存した。

【０２５３】

水性溶媒を使用することによって担体タンパク質にコンジュゲート化されるべき血清型１および１８Ｃの莢膜多糖体については、多糖体および担体タンパク質をさらなるスクロースを添加することなく独立に製造し、凍結乾燥し、次いで、－２５℃±５℃で保存した。

【０２５４】

ＤＭＳＯ溶媒を使用することによって担体タンパク質にコンジュゲート化されるべき血清型６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、１５Ｂ－ＴＴ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ－ＴＴおよび２３Ｆの莢膜多糖体については、活性化糖に５％±３％（ｗ／ｖ）の最終スクロース濃度に到達するための所定量のスクロースを添加し、サンプルを独立に製造し、凍結乾燥し、次いで、－２５℃±５℃で保存した。

【０２５５】

血清型１１Ａの莢膜多糖体については、活性化糖に２０％±５％（ｗ／ｖ）の最終スクロース濃度に到達するための所定量のスクロースを添加し、多糖体および担体タンパク質を独立に製造し、凍結乾燥し、次いで、－２５℃±５℃で保存した。

【０２５６】

血清型１２Ｆの莢膜多糖体については、活性化糖に１０％±５％（ｗ／ｖ）の最終スクロース濃度に到達するための所定量のスクロースを添加し、多糖体および担体タンパク質を独立に製造し、凍結乾燥し、次いで、－２５℃±５℃で保存した。

【０２５７】

（２）コンジュゲート化プロセス

血清型１、３、４、５、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１４、１８Ｃおよび３３Ｆの水性コンジュゲート化を実施し、血清型６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、１１Ａ、１２Ｆ、１５Ｂ－ＴＴ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ－ＴＴおよび２３ＦのＤＭＳＯコンジュゲート化を実施した。莢膜多糖体の各々を担体タンパク質に０．２～２：１の比でコンジュゲート化した。

【０２５８】

工程１：溶解

水性コンジュゲート化

血清型１、３、４、５、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１４、１８Ｃおよび３３Ｆについては、凍結乾燥サンプルを解凍し、室温で平衡化した。凍結乾燥サンプルを、各血清型の比セットで２３±２℃でリン酸ナトリウム緩衝液溶液を使用することによって反応濃度に復元した。

【０２５９】

ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）コンジュゲート化

血清型６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、１１Ａ、１２Ｆ、１５Ｂ－ＴＴ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ－ＴＴおよび２３Ｆについては、凍結乾燥サンプルを解凍し、室温で平衡化し、ＤＭＳＯで復元した。

【０２６０】

工程２：コンジュゲート化反応

水性コンジュゲート化

血清型３－ＴＴ、４、５－ＴＴ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１４、１８Ｃおよび３３Ｆについては、糖１モルあたり１．０～１．４モルのシアノ水素化ホウ素ナトリウムにシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液（１００ｍｇ／ｍＬ）を添加することによって、コンジュゲート化反応を開始した。しかし、血清型１、１－ＴＴおよび３については、糖１モルあたり０．５モルのシアノ水素化ホウ素ナトリウムにシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を添加することによって反応を開始した。

【０２６１】

反応混合物を２３℃～３７℃で４４～１０６時間インキュベートした。血清型別に反応温度および時間を調整した。次いで、温度を２３±２℃に低下させ、リアクターに塩化ナ

トリウム０．９％を添加した。糖１モルあたり１．８～２．２モル当量の水素化ホウ素ナトリウムを達成するように水素化ホウ素ナトリウム溶液（１００ｍｇ／ｍＬ）を添加した。混合物を２３±２℃で３～６時間インキュベートした。この手順によって糖上に存在する任意の未反応アルデヒドが低減された。次いで、混合物を塩化ナトリウム０．９％を用いて希釈し、０．８または０．４５μｍプレフィルターを使用して希釈されたコンジュゲート化混合物を濾過した。

【０２６２】

ＤＭＳＯコンジュゲート化

血清型６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、１１Ａ、１２Ｆ、１５Ｂ－ＴＴ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ－ＴＴおよび２３Ｆの莢膜多糖体については、活性化糖１モルあたり０．８～１．２モル当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムの比にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液（１００ｍｇ／ｍＬ）を添加することによってコンジュゲート化反応を開始した。反応混合物にＷＦＩを１％（ｖ／ｖ）の標的濃度に添加し、混合物を２３±２℃で１２～２６時間インキュベートした。反応物に１００ｍｇ／ｍＬの水素化ホウ素ナトリウム溶液（通常、活性化糖１モルあたり１．８～２．２モル当量の水素化ホウ素ナトリウム）およびＷＦＩ（標的５％　ｖ／ｖ）を添加し、混合物を２３±２℃で３～６時間インキュベートした。この手順によって糖上に存在する任意の未反応アルデヒドが低減された。次いで、反応混合物を塩化ナトリウム０．９％を用いて希釈し、０．８または０．４５μｍプレフィルターを使用して希釈されたコンジュゲート化混合物を濾過した。

【０２６３】

工程３：限外濾過

希釈されたコンジュゲート混合物を濃縮し、１００ｋＤａ　ＭＷＣＯ限外濾過フィルターまたは３００ｋＤａ　ＭＷＣＯ限外濾過フィルターで最小１５体積の０．９％塩化ナトリウムまたは緩衝液を用いてダイアフィルトレーションした。また、使用された緩衝液の組成およびｐＨは、各血清型に応じて変わった。

【０２６４】

工程４：滅菌濾過

限外濾過後の保持液を滅菌濾過し（０．２μｍ）、濾過されたコンジュゲートで工程内管理を実施した（外観、遊離タンパク質、遊離糖、分子サイズ分布、無菌性、糖含有量、タンパク質含有量、ｐＨ、エンドトキシン、残存シアン化物、残存ＤＭＳＯ、糖同一性、ＴＴ同一性およびＣＲＭ$_{197}$同一性）。最終濃縮物を２℃～８℃で冷蔵し、保存した。

【０２６５】

血清型１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、２４Ｆおよび３５ＢのＣＲＭ$_{197}$へのコンジュゲート化を実施例３～８に記載する。

【実施例３】

【０２６６】

血清型１５ＡおよびＣＲＭ$_{197}$のモノコンジュゲートの製造

血清型１５Ａ多糖体は、上記で論じたように、または他の血清型の多糖体を精製するためにＷＯ２０１３／１９１４５９に記載された方法を参照することによって精製できる。表１に示されるように精製された血清型１５Ａ多糖体に酸および熱をかけることによって酸加水分解を実施し、次いで、活性化プロセスを実施した。加水分解の条件が、酸化度（Ｄｏ）および活性化多糖体の分子量ならびにコンジュゲート化結果に影響を及ぼしたことが観察された。活性化プロセスおよびコンジュゲート化プロセスは、同一条件下で実施した。過ヨウ素酸ナトリウムを添加し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびＣＲＭ$_{197}$タンパク質を凍結乾燥し、ＤＭＳＯに懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を２３℃±２℃で２０～２８時間インキュベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃

縮および透析した。

【０２６７】

【表３】

表 3. 加水分解条件による 15A コンジュゲート化結果

活性化多糖体			15A-CRM_{197} コンジュゲート			
加水分解条件	Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)
-	13.4	340.8	0.98	76.5	86	30517
0.01M HCl、60℃、60 分	11.5	304.5	1.20	79.0	93	25933
0.01M HCl、60℃、90 分	10.6	373.4	1.09	76.7	94	25899
0.01M HCl、60℃、120 分	10.8	350.8	0.97	73.7	88	24734
0.1M HCl、60℃、45 分	16.0	197.0	1.34	76.6		32898
0.1M HCl、60℃、90 分	7.9	116.3	0.73	11.4		3924

【０２６８】

血清型１５ＡおよびCRM_{197}のコンジュゲート化に対する酸化レベル（Ｄｏ）の効果を評価した。１５Ａ多糖体に０．１Ｍ　ＨＣｌを添加し６０℃で９０分間おいた。過ヨウ素酸ナトリウムの量を調整し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびCRM_{197}タンパク質を凍結乾燥し、ＤＭＳＯに懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合し、血清型１５Ａに対する酸加水分解の効果を評価する場合には、シアノ水素化ホウ素を用いるコンジュゲート化を上記のように実行した。

【０２６９】

【表４】

表 4. 酸化レベルによる 15A コンジュゲート化結果

活性化多糖体		15A-CRM_{197} コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【０２７０】

コンジュゲート化に対する多糖体対タンパク質の反応比の効果も評価した。活性化１５Ａ多糖体およびCRM_{197}タンパク質を凍結乾燥し、ＤＭＳＯに懸濁させた。活性化多糖体およびタンパク質を、表５に記載された比で混合し、反応濃度は、多糖体含有量に基づいて１．０ｍｇ／ｍＬとし、血清型１５Ａに対する酸加水分解の効果を評価する場合にはシアノ水素化ホウ素を用いるコンジュゲート化を実行した。

【０２７１】

【表５】

表 5. 多糖体対タンパク質比によるコンジュゲート化結果

活性化多糖体		反応比	15A-CRM$_{197}$コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	反応比 (PR:PS)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【実施例４】

【０２７２】

血清型１５Ｃおよびｃｒｍ１９７のモノコンジュゲートの製造

血清型１５Ｃ多糖体は、上記で論じられたように、または他の血清型の多糖体を精製するためにＷＯ２０１３／１９１４５９に記載された方法を参照することによって精製できる。１５Ｃ多糖体に添加される過ヨウ素酸ナトリウムの量を調整し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびＣＲＭ１９７タンパク質を凍結乾燥し、リン酸緩衝液に懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を３７℃±２℃で４４～５２時間インキュベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮および透析した。

【０２７３】

【表６】

表 6. リン酸緩衝液を使用する酸化レベルによる 15C コンジュゲート化結果

活性化多糖体		15C-CRM$_{197}$コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【０２７４】

ＤＭＳＯを使用する血清型１５ＣおよびＣＲＭ１９７のコンジュゲート化に対する酸化レベル（Ｄｏ）の効果を評価した。１５Ｃ多糖体に添加される過ヨウ素酸ナトリウムの量を調整し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびＣＲＭ１９７タンパク質を凍結乾燥し、ＤＭＳＯに懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を２３℃±２℃で２０～２８時間インキュベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で

３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮および透析した。

【０２７５】

【表７】

表 7. DMSO を使用する酸化レベルによる 15C コンジュゲート化結果

活性化多糖体		15C-CRM_{197} コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【実施例５】

【０２７６】

血清型２３ＡおよびＣＲＭ１９７のモノコンジュゲートの製造

血清型２３Ａ多糖体は、上記で論じられたように、または他の血清型の多糖体を精製するためにＷＯ２０１３／１９１４５９に記載された方法を参照することによって精製できる。コンジュゲート化に対する酸化度（Ｄｏ）の効果を評価するために、過ヨウ素酸ナトリウムの量を調整し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびＣＲＭ１９７タンパク質を凍結乾燥し、ＤＭＳＯに懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。あるいは、反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を表８に記載される比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を２３℃±２℃で２０～２８時間インキュベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮および透析した。コンジュゲート化に対する変動するＤｏレベルの効果が、表８に示されている。

【０２７７】

【表８】

表 8. 酸化レベルによる 23A コンジュゲート化結果

活性化多糖体		23A-CRM_{197} コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【０２７８】

コンジュゲート化に対する多糖体対タンパク質の反応比の効果が、表９に示されている。

【０２７９】

【表９】

表9. 多糖体対タンパク質比による23Aコンジュゲート化結果

活性化多糖体		反応比	23A-CRM$_{197}$コンジュゲート				
Do	活性化PS M.W. (kDa)	反応比 (PR:PS)	比 (PS/PR)	遊離PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【０２８０】

血清型２３ＡおよびＣＲＭ$_{197}$間のコンジュゲート化に対する反応濃度の効果を評価した。精製された血清型２３Ａ多糖体を、上記で論じられたように過ヨウ素酸ナトリウムを用いて活性化した。活性化多糖体およびＣＲＭ$_{197}$タンパク質を凍結乾燥し、ＤＭＳＯに懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて表１０に記載の通りとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合し、血清型２３Ａに対するＤｏの効果を評価する場合にはシアノ水素化ホウ素を用いるコンジュゲート化を上記のように実行した。

【０２８１】

【表１０】

表10. コンジュゲートの濃度による23Aコンジュゲート化結果

活性化多糖体		反応濃度	23A-CRM$_{197}$コンジュゲート				
Do	活性化PS M.W. (kDa)	反応濃度 (mg/ml)	比 (PS/PR)	遊離PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【０２８２】

血清型２３ＡおよびＣＲＭ$_{197}$の間のコンジュゲート化に対する酸加水分解の効果を評価した。表１１に示されるように精製された血清型２３Ａ多糖体に酸および熱をかけることによって酸加水分解を実施し、次いで、活性化プロセスを実施した。活性化プロセスおよびコンジュゲート化プロセスは、同一条件下で実施した。過ヨウ素酸ナトリウムを添加し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびＣＲＭ$_{197}$タンパク質を凍結乾燥し、リン酸緩衝液に懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を３７℃±２℃で４４～５２時間インキュベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮および透析した。

【０２８３】

【表１１】

表 11. 多糖体の酸加水分解後の 23A 糖コンジュゲートの製造

活性化多糖体			23A-CRM$_{197}$ コンジュゲート				
加水分解条件	Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
X	10.9	639.3	1.21	22.0	89	5981	19.6
0.1M HCl、60℃、30 分	9.4	595.4	1.17	17.0	91	5844	13.2
0.1M HCl、60℃、60 分	9.1	571.1	1.21	10.9	82	3360	10.5
0.1M HCl、60℃、90 分	9.0	535.3	1.07	9.9	83	2911	10.3
0.1M HCl、60℃、120 分	9.3	507.9	1.26	5.2	64	1846	5.6

【０２８４】

血清型２３ＡおよびＣＲＭ$_{197}$間のコンジュゲート化に対するリン酸緩衝液を使用する効果を評価した。血清型２３Ａを活性化するために過ヨウ素酸ナトリウムの量を調整し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化血清型２３Ａ多糖体およびＣＲＭ$_{197}$タンパク質を凍結乾燥し、リン酸緩衝液に懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を２３℃±２℃で２０～２８時間インキュベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮および透析した。

【０２８５】

【表１２】

表 12. リン酸緩衝液を使用する 23A 糖コンジュゲートの製造

活性化多糖体		23A-CRM$_{197}$ コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【実施例６】

【０２８６】

血清型２３ＢおよびＣＲＭ$_{197}$のモノコンジュゲートの製造

血清型２３Ｂ多糖体は、上記で論じられたように、または他の血清型の多糖体を精製するためにＷＯ２０１３／１９１４５９に記載された方法を参照することによって精製できる。コンジュゲート化に対する酸化度（Ｄｏ）の効果を評価するために、血清型２３Ｂを活性化するための過ヨウ素酸ナトリウムの量を調整し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびＣＲＭ$_{197}$タンパク質を凍結乾燥し、ＤＭＳＯに懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。あるいは、反応濃度を多糖体含有量に基づいて１．５ｍｇ／ｍＬとしながら、過ヨウ素酸ナトリウムの量を一定に保持し、活性化多糖体およびタンパク質を表１３に記載される比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添

加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を２３℃±２℃で２０～２８時間インキュベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮および透析した。コンジュゲート化に対する変動するＤｏレベルの効果は、表１３に示されている。

【０２８７】

【表１３】

表 13. 酸化レベルによる 23B コンジュゲート化結果

活性化多糖体		23B-CRM$_{197}$ コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【０２８８】

コンジュゲート化に対する多糖体対タンパク質の反応比の効果は、表１４に示されている。

【０２８９】

【表１４】

表 14. 多糖体対タンパク質比による 23B コンジュゲート化

活性化多糖体		反応比	23B-CRM$_{197}$ コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	反応比 (PR:PS)	比 (PS/PR)	遊離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率(%)
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

【実施例７】

【０２９０】

血清型２４ＦおよびＣＲＭ$_{197}$のモノコンジュゲートの製造

血清型２４Ｆ多糖体は、上記で論じられたように、または他の血清型の多糖体を精製するためにＷＯ２０１３／１９１４５９に記載された方法を参照することによって精製できる。精製された血清型２４Ｆ多糖体を酸加水分解またはマイクロフルイダイザーに供し、続いて、血清型２４Ｆ多糖体に過ヨウ素酸ナトリウムを添加し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。活性化多糖体およびＣＲＭ$_{197}$タンパク質を凍結乾燥し、リン酸緩衝液に懸濁させた。反応濃度を多糖体含有量に基づいて１０ｍｇ／ｍＬとしながら、活性化多糖体およびタンパク質を１：１の比で混合した。シアノ水素化ホウ素を添加して、コンジュゲート化反応を開始し、混合物を３７℃±２℃で４４～５２時間インキュ

ベートした。水素化ホウ素溶液混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮および透析した。シアノ水素化ホウ素および水素化ホウ素のモル当量は、表１５に記載される通りとした。キャッピング試薬（水素化ホウ素）の代わりにシアノ水素化ホウ素を活性化２４Ｆ多糖体およびＣＲＭ１９７タンパク質に添加したので、コンジュゲートの分子量の増大によって示されるようにコンジュゲートの品質が改善される。過剰量のキャッピング試薬（水素化ホウ素）を添加することは、コンジュゲートの分子量の減少によって示されるように、２４Ｆ－ＣＲＭ１９７コンジュゲートに対して負の効果を有していた。

【０２９１】

【表１５】

表 15. 還元剤(PO_4緩衝液)の量によるコンジュゲート化結果

活性化多糖体		24F-CRM_{197}コンジュゲート				
Do	活性化 PS M.W. (kDa)	NaCNBH3 Meq	NaBH4 Meq	比 (PS/PR)	遊離 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

【実施例８】

【０２９２】

血清型３５ＢおよびＣＲＭ１９７のモノコンジュゲートの製造

血清型３５Ｂは、上記で論じられたように、または他の血清型の多糖体を精製するためにＷＯ２０１３／１９１４５９に記載された方法を参照することによって精製できる。血清型３５Ｂ多糖体を１．０ｍｇ／ｍＬ～２．０ｍｇ／ｍＬの最終濃度にＤＷ（蒸留水）で希釈した。

【０２９３】

過ヨウ素酸反応。コンジュゲート化に対する酸化度（Ｄｏ）の効果を評価するために、血清型３５Ｂを活性化するための過ヨウ素酸ナトリウムの量を調整し、酸化反応を２１～２５℃で１６～２０時間実行した。多糖体含有量に対して０．００７～０．１５過ヨウ素酸ナトリウムのモル当量を使用した。

【０２９４】

限外濾過。３０ｋＤａ　ＭＷＣＯ限外濾過フィルターを使用しＤＷを用いて、活性化血清型３５Ｂ多糖体を濃縮し、ダイアフィルトレーションした。濾過生成物を廃棄し、残留物を０．２２μｍフィルターを通して濾過した。

【０２９５】

凍結乾燥。５％±３％スクロース濃度に到達するように算出された指定量のスクロースを活性化血清型３５Ｂ多糖体に添加した。濃縮糖およびＣＲＭ１９７担体タンパク質を各々バイアルに充填し、凍結乾燥した。あるいは、活性化血清型３５Ｂ多糖体および担体タンパク質を混合し、ガラスボトル中に充填し、凍結乾燥した。

【０２９６】

溶解。凍結乾燥した活性化血清型３５Ｂ糖および凍結乾燥したＣＲＭ１９７担体タンパク質を室温で平衡化した。活性化血清型３５Ｂ糖を、１２．５ｇ／Ｌ～１７．５ｇ／Ｌ糖の濃度でリン酸緩衝液に再懸濁した。コンジュゲート化反応のためのリン酸緩衝液のｐＨは、ｐＨ６．０～ｐＨ７．２に調整した。この時点で、担体タンパク質は６．２５ｇ／Ｌ～約３５ｇ／Ｌの濃度で使用した（ＰＲ：ＰＳ重量比は、１：０．５～２に相当する）。

【０２９７】

コンジュゲート化反応。コンジュゲート化反応は、活性化糖１モルあたり１．０～１．４モル当量の比でシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液（１００ｍｇ／ｍＬ）を添加することによって開始した。混合物を３７±２℃で４４～５２時間インキュベートした。反応材料に１００ｍｇ／ｍＬの水素化ホウ素ナトリウム溶液（通常、活性化糖１モルあたり１．８～２．２モル当量の水素化ホウ素ナトリウム）を添加し、混合物を２３℃±２℃で３～６時間インキュベートした。このプロセスによって、糖中に存在する任意の未反応アルデヒドが低減され、続いて、限外濾過フィルターを用いて濃縮し、透析した。次いで、反応混合物を０．９％塩化ナトリウムを用いて希釈し、希釈されたコンジュゲートを０．４５μｍフィルターを通して濾過した。

【０２９８】

限外濾過。希釈されたコンジュゲート混合物を、少なくとも２０体積の０．９％塩化ナトリウム溶液または緩衝液を用い、１００ｋＤａ　ＭＷＣＯ限外濾過フィルターを使用して濃縮し、ダイアフィルトレーションした。濾過生成物を廃棄した。

【０２９９】

滅菌濾過。１００ｋＤａ　ＭＷＣＯダイアフィルトレーション後の残留物を、０．２２μｍフィルターを通して濾過した。濾過された生成物３５Ｂ－ＣＲＭ$_{197}$コンジュゲートで工程内管理（糖含有量、遊離タンパク質、遊離糖および残存シアン化物）を実施した。濾過された残留物で工程内管理を実施して、さらなる濃縮、ダイアフィルトレーションおよび／または希釈が必要とされるか否かを決定した。必要に応じて、濾過されたコンジュゲートを、最終濃度が０．５５ｇ／Ｌ未満であるように０．９％塩化ナトリウムを用いて希釈した。この段階で、糖含有量、タンパク質含有量および糖：タンパク質比についての試験を実施した。コンジュゲートを濾過し（０．２２μｍフィルター）、遊離試験（外観、遊離タンパク質、遊離糖、エンドトキシン、分子サイジング、残存シアン化物、糖同一性およびＣＲＭ$_{197}$同一性）を実施した。血清型３５Ｂ糖コンジュゲートは、３５Ｂ多糖体１ｍＭあたり少なくとも０．２ｍＭのアセテートを含む。最終コンジュゲート濃縮物を２～８℃で冷蔵した。血清型３５Ｂ糖コンジュゲートのいくつかの代表的な製造例の分析結果が以下の表１６に示されている。

【０３００】

【表１６】

表 16. 酸化レベル(PO_4緩衝液)によるコンジュゲート化結果

活性化条件および結果		35B-CRM_{197}コンジュゲート				
分子量 (kDa)	活性化度	緩衝液 pH	比 (PS/PR)	遊離糖 (%)	MALLS (kDa)	コンジュゲート化収率 (%)
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

【０３０１】

表１６において見られるように、血清型３５Ｂ糖コンジュゲートを作製するための本明細書において記載される方法は、良好なコンジュゲート化収率を示し、低い遊離糖％および良好な安定性を有するコンジュゲートの製造が可能となる。

【実施例９】

【０３０２】

血清型特異的ＩｇＧ濃度測定

実施例３において製造された血清型１５Ａ－ＣＲＭ$_{197}$モノコンジュゲート、実施例４において製造された血清型１５Ｃ－ＣＲＭ$_{197}$モノコンジュゲート、実施例５におい

て製造された血清型２３Ａ－ＣＲＭ$_{197}$モノコンジュゲート、実施例６において製造された血清型２３Ｂ－ＣＲＭ$_{197}$モノコンジュゲート、実施例７において製造された血清型２４Ｆ－ＣＲＭ$_{197}$モノコンジュゲートおよび実施例８において製造された血清型３５Ｂ－ＣＲＭ$_{197}$モノコンジュゲートを、ウサギにおいて免疫原性応答を誘導する能力について試験した。免疫原性評価は、血清ＩｇＧ濃度について抗原特異的ＥＬＩＳＡによって、および抗体機能性についてオポソニン作用アッセイ（ＯＰＡ）によって実施した。ヒト用量（２．２μｇの多糖体）を用いて０週目および２週目にニュージーランドホワイトウサギを筋肉内免疫化した。免疫化後２週間ごとに血清をサンプリングした。

【０３０３】

血清型１５Ａ、１５Ｃ、２３Ａ、２３Ｂ、２４Ｆおよび３５Ｂ各々の莢膜多糖体（ＰｎＰｓ）を、０．５μｇ／ウェル～１μｇ／ウェルで９６ウェルプレート上にコーティングした。各対象から等量の血清をサンプリングし、群別にプールした。プレートを洗浄緩衝液を用いて洗浄し、ブロッキング緩衝液とともに３７℃で１時間インキュベートした。血清プールを、Ｔｗｅｅｎ ２０およびＳｔａｔｅｎｓ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔから入手した肺炎球菌細胞壁多糖体（ＣＷＰＳ）（５μｇ／ｍＬ）を含む抗体希釈緩衝液を用いて２．５倍に段階希釈し、次いで、室温で３０分間反応させた。プレートを洗浄緩衝液を用いて５回洗浄し、次いで、吸着済みの希釈された血清５０μｌをコーティングされたウェルプレートに添加し、続いて、室温で２時間～１８時間インキュベートした。同一方法でウェルプレートを洗浄し、次いで、各ウェルにヤギ抗ウサギＩｇＧアルカリホスファターゼコンジュゲートを添加し、続いて、室温で２時間インキュベートした。上記のようにプレートを洗浄し、各ウェルに基質として１ｍｇ／ｍＬのｐ－ニトロフェニルアミン緩衝液を添加し、次いで、室温で２時間反応させた。５０μｌの３Ｍ ＮａＯＨを添加することによって反応をクエンチし、４０５ｎｍおよび６９０ｎｍでの吸光度を測定した。結果は、表１７に示されている。

【０３０４】

【表１７】

表 17. 第 2 の免疫化後 2 週間での IgG 濃度(U/mL)

血清型	プレ-1	ポスト-1	プレ-2	ポスト-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

【０３０５】

血清型３５Ｂについて、表１８に示されるようなコンジュゲート化反応のｐＨおよび３５Ｂ糖コンジュゲートの分子量に基づいて、糖コンジュゲートの種々の群からＩｇＧ濃度を測定した。

【０３０６】

【表１８】

表 18. 第２の免疫化後２週間での IgG 濃度

群	35B 糖コンジュゲート		IgG 濃度 U/mL (95% CI)	
	コンジュゲート化反応の pH	分子量 (kDa)	プレテスト	ポスト
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)

*CI: 信頼区間

群 1、２および３の有意性: P=0.384

【０３０７】

一価コンジュゲートについての機能的免疫原性試験（ＭＯＰＡ）

抗体機能は、ＭＯＰＡアッセイにおいて血清を試験することによって評価した。－７０℃以下で保存された肺炎球菌ＭＯＰＡ株を、各株の濃度が約５０，０００ＣＦＵ／ｍＬであるように対応する最終希釈倍数に希釈した。各対象から等量の血清をサンプリングし、群別にプールし、Ｕ底プレート中に２０μｌの血清が残るように２倍段階希釈した。サンプルを希釈した後、各血清型について製造された株１０μｌを、希釈されたサンプルと混合し、肺炎球菌および抗体が十分に混合されるように混合物を室温で３０分間反応させた。事前に分化したＨＬ－６０細胞および補体の混合物を添加して、CO_2インキュベーター（３７℃）中で４５分間反応させた。温度を低下させて、貪食を停止し、１０μｌの反応溶液を、３０～６０分間事前に乾燥させたＴＨＹ寒天プレート上にスポットし、次いで、乾燥するまでプレート上に２０分間吸収させた。２５ｍｇ／ｍＬのＴＴＣストック溶液を製造したオーバーレイ寒天に添加し、対応する株にとって適当な抗体をそれに添加した。混合物を十分に混合し、次いで、約２５ｍＬの混合物をプレート上に添加し、約３０分間硬化した。完全に硬化したプレートをCO_2インキュベーター（３７℃）中で１２～１８時間インキュベートし、次いで、コロニーをカウントした。ＭＯＰＡ力価は、５０％死滅が観察された希釈率として表された。結果は、表１９に示されている。

【０３０８】

【表１９】

表 19. 第２の免疫化後２週間でのモノコンジュゲートの MOPA 力価

血清型	プレ-1	ポスト-1	プレ-2	ポスト-2
15A	5	3555	10	3107
15C	2	31575.3	-	-
23A	2	313.7	-	-
23B	28	18807	57	7375
24F	2	260	2	367

【０３０９】
血清型３５Ｂについて、表２０に示されるようなコンジュゲート化反応のｐＨおよび３５Ｂ糖コンジュゲートの分子量に基づいて、糖コンジュゲートの種々の群についてＭＯＰＡ力価を測定した。
【０３１０】
【表２０】

表 20. 第 2 の免疫化後 2 週間での 35B-CRM_{197} の MOPA 力価

群	35B 糖コンジュゲート		幾何平均力価(95% CI*)	
	コンジュゲート化反応の pH	分子量 (kDa)	プレテスト	ポスト
1	7.2	1162	2	16019 (8621-29766)
2	7.2	323	2	11568 (6434-20798)
3	6.0	3153	2	14151 (9027-22183)

*CI: 信頼区間
群 1、2 および 3 の有意性: P=0.621

【実施例１０】
【０３１１】
破傷風トキソイドにコンジュゲート化された血清型１および５由来の多糖体を有する２７価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤化
バッチ体積およびバルク糖濃度に基づいて、実施例２～８から得た最終バルク濃縮物の所望の体積を算出した。事前にラベルをつけた製剤容器に０．８５％塩化ナトリウム（生理食塩水）、ポリソルベート８０およびコハク酸緩衝液を添加した後、バルク濃縮物を添加した。次いで、製造物を十分に混合し、０．２μｍメンブレンを通して滅菌濾過した。製剤化されたバルクを、バルクリン酸アルミニウムの添加の間およびその後、穏やかに混合した。ｐＨを調べ、必要な場合には調整した。製剤化されたバルク生成物は２～８℃で保存した。以下の多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン製剤を製造し、名付けた、ＰＣＶ２７－（１／５）－ＴＴ。
【０３１２】
ＰＣＶ２７（１／５）－ＴＴは、血清型１および５の各多糖体をＴＴに、ならびに血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆおよび３５Ｂの各多糖体を$ＣＲＭ_{１９７}$にコンジュゲート化することによって製造された多糖体コンジュゲートを含む。
【０３１３】
０．５ｍｌの総用量中のＰＣＶ２７（１／５）－ＴＴは、４．４μｇの血清型６Ｂを除いて２．２μｇの各糖、約２μｇ～２５μｇのＴＴ（血清型１および５について）および約４５μｇ～１００μｇの$ＣＲＭ_{１９７}$、０．１２５ｍｇのアルミニウム元素（０．５ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント、４．２５ｍｇの塩化ナトリウム、約２９５μｇのコハク酸緩衝液溶液および約１２０μｇのポリソルベート８０を含んでいた。
【実施例１１】
【０３１４】

多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（ＰＣＶ２７（１／５）－ＴＴ）の免疫原性

実施例１０で製造された混成担体、多価肺炎球菌ワクチン、ＰＣＶ２７（１／５）－ＴＴを、ウサギにおいて免疫原性応答を誘導する能力について試験した。免疫原性評価は、血清ＩｇＧ濃度について抗原特異的ＥＬＩＳＡによって、および抗体機能性についてオポソニン作用アッセイ（ＯＰＡ）によって実施した。ヒト用量（４．４μｇの６Ｂを除いて、２．２μｇの多糖体）を用いて０週目および２週目にニュージーランドホワイトウサギを筋肉内免疫化した。免疫化後２週間ごとに血清をサンプリングした。

【０３１５】

血清型特異的ＩｇＧ濃度測定

各血清型の莢膜多糖体（ＰｎＰｓ）を０．５μｇ／ウェル～１μｇ／ウェルで９６ウェルプレート上にコーティングした。各対象から等量の血清をサンプリングし、群別にプールした。血清プールを、Ｔｗｅｅｎ ２０およびＳｔａｔｅｎｓ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔから入手した肺炎球菌細胞壁多糖体（ＣＷＰＳ）（５μｇ／ｍＬ）を含む抗体希釈緩衝液を用いて２．５倍に段階希釈し、次いで、室温で３０分間反応させた。プレートを洗浄緩衝液を用いて５回洗浄し、次いで、吸着済みの希釈された血清５０μｌをコーティングされたウェルプレートに添加し、続いて、室温で２時間～１８時間インキュベートした。同一方法でウェルプレートを洗浄し、次いで、各ウェルにヤギ抗ウサギＩｇＧアルカリホスファターゼコンジュゲートを添加し、続いて、室温で２時間インキュベートした。上記のようにプレートを洗浄し、各ウェルに基質として１ｍｇ／ｍＬのｐ－ニトロフェニルアミン緩衝液を添加し、次いで、室温で２時間反応させた。５０μｌの３Ｍ ＮａＯＨを添加することによって反応をクエンチし、４０５ｎｍおよび６９０ｎｍでの吸光度を測定した。結果は、表２１に示されている。

【０３１６】

【表２１】

表21. 第2の免疫化後2週間でのIgG濃度(U/mL)

血清型	PCV27(1/5)-TT プレ	PCV27(1/5)-TT ポスト
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

【０３１７】

機能的免疫原性試験（ＭＯＰＡ）

抗体機能は、ＭＯＰＡアッセイにおいて血清を試験することによって評価した。－７０℃以下で保存された肺炎球菌ＭＯＰＡ株を、各株の濃度が約５０，０００ＣＦＵ／ｍＬであるように対応する最終希釈倍数に希釈した。各対象から等量の血清をサンプリングし、群別にプールし、Ｕ底プレート中に２０μｌの血清が残るように2倍段階希釈した。サンプルを希釈した後、各血清型について製造された株１０μｌを、希釈されたサンプルと混合し、肺炎球菌および抗体が十分に混合されるように混合物を室温で３０分間反応させた。事前に分化したＨＬ－６０細胞および補体の混合物を添加して、CO_2インキュベータ

ー（３７℃）中で４５分間反応させた。温度を低下させて、貪食を停止し、１０μｌの反応溶液を、３０～６０分間事前に乾燥させた寒天プレート上にスポットし、次いで、乾燥するまでプレート上に２０分間吸収させた。２５ｍｇ／ｍＬのＴＴＣストック溶液を製造したオーバーレイ寒天に添加し、対応する株にとって適当な抗体をそれに添加した。混合物を十分に混合し、次いで、約２５ｍＬの混合物をプレート上に添加し、約３０分間硬化した。完全に硬化したプレートをCO_2インキュベーター（３７℃）中で１２～１８時間インキュベートし、次いで、コロニーをカウントした。ＭＯＰＡ力価は、５０％死滅が観察された希釈率として表された。結果は、表２２に示されている。

【０３１８】

【表２２】

表 22. 第 2 の免疫化後 2 週間での MOPA 力価

血清型	PCV27(1/5)-TT プレ	PCV27(1/5)-TT ポスト
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

【実施例１２】
【０３１９】
破傷風トキソイドにコンジュゲート化された血清型１、５、１５Ｂおよび２２Ｆ由来の多糖体を有する２７価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤化
実施例２～８に記載される一般法に従ってモノコンジュゲートを得た。バッチ体積およびバルク糖濃度に基づいて、最終バルク濃縮物の所望の体積を算出した。事前にラベルをつけた製剤容器に０．８５％塩化ナトリウム（生理食塩水）、ポリソルベート８０およびコハク酸緩衝液を添加した後、バルク濃縮物を添加した。次いで、製造物を十分に混合し、０．２μｍメンブレンを通して滅菌濾過した。製剤化されたバルクを、バルクリン酸アルミニウムの添加の間およびその後、穏やかに混合した。ｐＨを調べ、必要な場合には調整した。製剤化されたバルク生成物は２～８℃で保存した。以下の多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン製剤を製造し、名付けた、ＰＣＶ２７－（１／５／１５Ｂ／２２Ｆ）－ＴＴ。
【０３２０】
ＰＣＶ２７（１／５／１５Ｂ／２２Ｆ）－ＴＴは、血清型１、５、１５Ｂおよび２２Ｆの各多糖体をＴＴに、ならびに血清型３、４、６Ａ、６Ｂ、７Ｆ、８、９Ｎ、９Ｖ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１４、１５Ａ、１５Ｃ、１８Ｃ、１９Ａ、１９Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２３Ｆ、２４Ｆ、３３Ｆおよび３５Ｂの各多糖体をCRM_{197}にコンジュゲート化することによって製造された多糖体コンジュゲートを含む。
【０３２１】
０．５ｍｌの総用量中のＰＣＶ２７（１／５／１５Ｂ／２２Ｆ）－ＴＴは、４．４μｇの血清型６Ｂを除いて２．２μｇの各糖、約２μｇ～２５μｇのＴＴ（血清型１、５、１５Ｂ、２２Ｆについて）および約４５μｇ～１００μｇのCRM_{197}、０．１２５ｍｇのアルミニウム元素（０．５ｍｇのリン酸アルミニウム）アジュバント、４．２５ｍｇの塩化ナトリウム、約２９５μｇのコハク酸緩衝液溶液および約１２０μｇのポリソルベート８０を含んでいた。
【実施例１３】
【０３２２】
多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン、ＰＣＶ２７（１／５／１５Ｂ／２２Ｆ）－ＴＴの免疫原性
実施例１２で製造された混成担体、多価肺炎球菌ワクチン、ＰＣＶ２７（１／５／１５Ｂ／２２Ｆ）－ＴＴを、ウサギにおいて免疫原性応答を誘導する能力について試験した。免疫原性評価は、血清ＩｇＧ濃度について抗原特異的ＥＬＩＳＡによって、および抗体機能性についてオポソニン作用アッセイ（ＯＰＡ）によって実施した。ヒト用量（４．４μｇの６Ｂを除いて、２．２μｇの多糖体）を用いて０週目および２週目にニュージーランドホワイトウサギを筋肉内免疫化した。免疫化後２週間ごとに血清をサンプリングした。免疫化後２週間ごとに血清をサンプリングした。
【０３２３】
血清型特異的ＩｇＧ濃度測定
各血清型の莢膜多糖体（ＰｎＰｓ）を０．５μｇ／ウェル～１μｇ／ウェルで９６ウェルプレート上にコーティングした。各対象から等量の血清をサンプリングし、群別にプールした。血清プールを、Ｔｗｅｅｎ ２０およびＳｔａｔｅｎｓ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔから入手した肺炎球菌細胞壁多糖体（ＣＷＰＳ）（５μｇ／ｍＬ）を含む抗体希釈緩衝液を用いて２．５倍に段階希釈し、次いで、室温で３０分間反応させた。プレートを洗浄緩衝液を用いて５回洗浄し、次いで、吸着済みの希釈された血清５０μｌをコーティングされたウェルプレートに添加し、続いて、室温で２時間～１８時間インキュベートした。同一方法でウェルプレートを洗浄し、次いで、各ウェルにヤギ抗ウサギＩｇＧアルカリホスファターゼコンジュゲートを添加し、続いて、室温で２時間インキュベートした。上記のようにプレートを洗浄し、各ウェルに基質として１ｍｇ／ｍＬのｐ－ニトロフェニルアミン緩衝液を添加し、次いで、室温で２時間反応させた。５０μｌの３Ｍ ＮａＯ

Ｈを添加することによって反応をクエンチし、４０５ｎｍおよび６９０ｎｍでの吸光度を測定した。比較例として、市販の１３価ワクチン（ＰＲＥＶＮＡＲ１３）を同一手順に供した。結果は、表２３に示されている。

【０３２４】

【表２３】

表 23. 第 2 の免疫化後 2 週間での IgG 濃度(U/mL)

血清型	Prevnar13		PCV27(1/5/15B/22F)-TT	
	プレ	ポスト	プレ	ポスト
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

【０３２５】

機能的免疫原性試験（ＭＯＰＡ）

血清型１および５の莢膜多糖体がＴＴにコンジュゲート化される場合には、血清型特異的ＩｇＧ濃度は、それらがＣＲＭ$_{197}$にコンジュゲート化されたものと比較して有意に増大した。ＰＣＶ２７（１／５／１５Ｂ／２２Ｆ）－ＴＴを用いて免疫化されたウサギもまた、ＰＲＥＶＮＡＲ１３には存在しないさらなる１４種の血清型（すなわち、８、９Ｎ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２４Ｆ、３３Ｆおよび３５Ｂ）に対するＩｇＧ濃度の有意な増大を示した。特に、血清型８および９Ｎは、ＰＲＥＶＮＡＲ１３に対して血清特異的ＩｇＧ濃度を５０倍よりも多く増大した。

【０３２６】

抗体機能は、ＭＯＰＡアッセイにおいて血清を試験することによって評価した。－７０℃以下で保存された肺炎球菌ＭＯＰＡ株を、各株の濃度が約５０，０００ＣＦＵ／ｍＬであるように対応する最終希釈倍数に希釈した。各対象から等量の血清をサンプリングし、群別にプールし、Ｕ底プレート中に２０μｌの血清が残るように２倍段階希釈した。サン

プルを希釈した後、各血清型について製造された株１０μｌを、希釈されたサンプルと混合し、肺炎球菌および抗体が十分に混合されるように混合物を室温で３０分間反応させた。事前に分化したＨＬ－６０細胞および補体の混合物を添加して、CO_2インキュベーター（３７℃）中で４５分間反応させた。温度を低下させて、貪食を停止し、１０μｌの反応溶液を、３０～６０分間事前に乾燥させた寒天プレート上にスポットし、次いで、乾燥するまでプレート上に２０分間吸収させた。２５ｍｇ／ｍＬのＴＴＣストック溶液を製造したオーバーレイ寒天に添加し、対応する株にとって適当な抗体をそれに添加した。混合物を十分に混合し、次いで、約２５ｍＬの混合物をプレート上に添加し、約３０分間硬化した。完全に硬化したプレートをCO_2インキュベーター（３７℃）中で１２～１８時間インキュベートし、次いで、コロニーをカウントした。ＭＯＰＡ力価は、５０％死滅が観察された希釈率として表された。比較例として、市販の１３価ワクチン（ＰＲＥＶＮＡＲ１３）を同一手順に供した。結果は、表２４に示されている。

【０３２７】

【表２４】

表 24. 第 2 の免疫化後 2 週間での MOPA 力価

血清型	Prevnar13		PCV27(1/5/15B/22F)-TT	
	プレ	ポスト	プレ	ポスト
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

【０３２８】

血清型１および５がＴＴにコンジュゲート化される場合には、機能的ＭＯＰＡ力価は、それらがCRM_{197}にコンジュゲート化された場合に得られたＭＯＰＡ力価と比較して有意に増大した。ＰＣＶ２７（１／５／１５Ｂ／２２Ｆ）－ＴＴを用いて免疫化されたウサギも、ＰＲＥＶＮＡＲ１３には存在しないさらなる１４種の血清型（すなわち、８、９Ｎ、１０Ａ、１１Ａ、１２Ｆ、１５Ａ、１５Ｂ、１５Ｃ、２２Ｆ、２３Ａ、２３Ｂ、２４

Ｆ、３３Ｆおよび３５Ｂ）の各々に対する機能的ＭＯＰＡ力価の有意な増大を示した。

【０３２９】

本明細書において１つまたはそれ以上の例示的実施形態が記載されているが、当業者によって形態および詳細における種々の変法を、以下の特許請求の範囲によって定義される本発明の概念の趣旨および範囲から逸脱することなく行うことができるということは理解されるであろう。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/043729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/09 A61P11/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/064444 A1 (BIOLOGICAL E LTD [IN]; MATUR RAMESH VENKAT [IN] ET AL.) 5 April 2018 (2018-04-05)	1-8, 16-29
Y	paragraph [0142] - paragraph [0146]; claims 1-3 paragraph [0103] - paragraph [0104] paragraphs [0109], [0121] paragraph [0154] - paragraph [0155] examples 3,4	9-28, 30-36

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 October 2020	04/11/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Renggli-Zulliger, N

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/043729

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/027123 A1 (SANOFI PASTEUR INC [US]; SK CHEMICALS CO LTD [KR]) 8 February 2018 (2018-02-08) cited in the application paragraph [00172] - paragraph [0173]; table 24 claim 1 claim 6 paragraph [00172]	9-28
X	WO 2015/110942 A2 (PFIZER [US]) 30 July 2015 (2015-07-30)	29
Y	figure 1 page 4 - page 5 claims 26-43	30-36
Y	US 2015/202309 A1 (EMINI EMILIO ANTHONY [US] ET AL) 23 July 2015 (2015-07-23) examples 10-13 example 17 example 20	30-36
Y	MARK VAN DER LINDEN ET AL: "Increase of serotypes 15A and 23B in IPD in Germany in the PCV13 vaccination era", BMC INFECTIOUS DISEASES, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 15, no. 1, 5 May 2015 (2015-05-05), page 207, XP021220921, ISSN: 1471-2334, DOI: 10.1186/S12879-015-0941-9	9-28
A	abstract	29
Y	BERNARD BEALL ET AL: "A Population-Based Descriptive Atlas of Invasive Pneumococcal Strains Recovered Within the U.S. During 2015-2016", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 9, 19 November 2018 (2018-11-19), XP055743219, DOI: 10.3389/fmicb.2018.02670	9-28
A	abstract	29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/043729

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018064444 A1	05-04-2018	AU 2017336806 A1	02-05-2019
		BR 112019006278 A2	02-07-2019
		CA 3037056 A1	05-04-2018
		CL 2019000849 A1	23-09-2019
		CN 109789198 A	21-05-2019
		CO 2019002955 A2	11-06-2019
		CU 20190030 A7	04-11-2019
		EA 201990838 A1	30-08-2019
		EP 3518965 A1	07-08-2019
		JP 2019529497 A	17-10-2019
		KR 20190066032 A	12-06-2019
		PH 12019500672 A1	29-07-2019
		US 2019224295 A1	25-07-2019
		WO 2018064444 A1	05-04-2018
WO 2018027123 A1	08-02-2018	AR 109290 A1	14-11-2018
		AU 2017306708 A1	14-02-2019
		BR 112019001995 A2	07-05-2019
		CA 3031797 A1	08-02-2018
		CN 109890415 A	14-06-2019
		EA 201990126 A1	30-08-2019
		EP 3493840 A1	12-06-2019
		JP 2019526620 A	19-09-2019
		KR 20190051945 A	15-05-2019
		PH 12019500238 A1	21-10-2019
		SG 11201900789V A	27-02-2019
		TW 201811362 A	01-04-2018
		US 2020230233 A1	23-07-2020
		WO 2018027123 A1	08-02-2018
WO 2015110942 A2	30-07-2015	AU 2015208822 A1	21-07-2016
		AU 2020204508 A1	23-07-2020
		CA 2937190 A1	30-07-2015
		CN 106413747 A	15-02-2017
		EP 3096786 A2	30-11-2016
		EP 3583947 A1	25-12-2019
		HK 1232133 A1	05-01-2018
		JP 6585624 B2	02-10-2019
		JP 2017504661 A	09-02-2017
		JP 2019172701 A	10-10-2019
		KR 20160104076 A	02-09-2016
		KR 20190133066 A	29-11-2019
		MX 371453 B	29-01-2020
		RU 2016127123 A	28-02-2018
		US 2016324949 A1	10-11-2016
		US 2019070283 A1	07-03-2019
		WO 2015110942 A2	30-07-2015
US 2015202309 A1	23-07-2015	AR 099445 A1	27-07-2016
		AU 2015208821 A1	07-07-2016
		AU 2017268651 A1	21-12-2017
		AU 2019204623 A1	18-07-2019
		BR 112016015525 A2	24-10-2017
		CA 2937186 A1	30-07-2015
		CN 106102770 A	09-11-2016
		CN 110787290 A	14-02-2020
		CN 110859957 A	06-03-2020
		DK 3096785 T3	21-09-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/043729

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 3096785 A2	30-11-2016
		EP 3607966 A1	12-02-2020
		EP 3616716 A2	04-03-2020
		JP 6335326 B2	30-05-2018
		JP 2017509656 A	06-04-2017
		JP 2018135374 A	30-08-2018
		JP 2020164550 A	08-10-2020
		KR 20160098507 A	18-08-2016
		KR 20200108496 A	18-09-2020
		PE 20161095 A1	26-10-2016
		PH 12016501243 A1	15-08-2016
		RU 2016129991 A	01-03-2018
		RU 2019112411 A	31-05-2019
		SG 10201803187V A	30-05-2018
		SG 11201604728X A	30-08-2016
		TW 201531299 A	16-08-2015
		TW 201828978 A	16-08-2018
		TW 202003024 A	16-01-2020
		US 2015202309 A1	23-07-2015
		WO 2015110941 A2	30-07-2015
		ZA 201603925 B	27-09-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
A61P	*11/00*	*(2006.01)*	A61P	11/00	
A61P	*31/04*	*(2006.01)*	A61P	31/04	
A61P	*27/16*	*(2006.01)*	A61P	27/16	
A61P	*37/04*	*(2006.01)*	A61P	37/04	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ
２．プルロニック
３．ＰＬＵＲＯＮＩＣ
４．ＴＲＩＴＯＮ
５．ＢＲＩＪ
６．ＳＰＡＮ
７．ＩＧＥＰＡＬ
８．ＴＥＲＧＩＴＯＬ

弁理士　竹林 則幸

(72)発明者　ジンファン・シン
大韓民国０５８３４．ソウル．ソンパ－グ．チョンデ－ロ．２４．２３３－１２０１

(72)発明者　スンヒョン・キム
大韓民国１６９６８．キョンギ－ド．ヨンジン－シ．キフン－グ．シンガル－ロ　９６ボン－ギル．１１－４６

(72)発明者　フン・キム
大韓民国１６５０５．キョンギ－ド．スウォン－シ．ヨントン－グ．セントラル・タウン－ロ．７６．６１１４－２９０３

(72)発明者　キョンジュン・アン
大韓民国０８７０９．ソウル．クヮナク－グ．ボラメ－ロ６２．１０３－４０８

(72)発明者　ジョン－ミン・リー
大韓民国１３９７９．キョンギ－ド．アニャン－シ．マナン－グ．パクダル－ドン１１４．ハラ・ヴィヴァルディ・アパートメント１１０－１８０４

(72)発明者　モー・チョー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１８３７０．スウィフトウォーター．ディスカバリー・ドライブ１．サノフィ・パスツール・インコーポレイテッド

(72)発明者　フィリップ・タラガ
フランス国６９３６７リヨン・セデックス０７．アヴェニュ・ポン・パスツール．２．サノフィ・パスツール・エス・アー

Ｆターム（参考）　4C076　BB15 CC06 CC10 EE41 EE59 FF68
4C085　AA04 AA05 BA14 BB24 CC07 CC24 DD57 DD58 DD84 EE01
EE03 EE06 FF01 FF02 GG03