



(21)申請案號：109125637

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K39/02 (2006.01)

A61K35/74 (2015.01)

A61K39/09 (2006.01)

(30)優先權：2019/12/17 美國

62/949,164

2019/07/31 南韓

10-2019-0093276

(71)申請人：南韓商 S K 生物科技股份有限公司 (南韓) SK BIOSCIENCE CO., LTD. (KR)
南韓

美商賽諾菲巴斯德股份有限公司 (美國) SANOFI PASTEUR INC. (US)

美國

(72)發明人：申珍煥 SHIN, JINHWAN (KR)；金成炫 KIM, SUNGHYUN (KR)；金勳 KIM, HUN (KR)；安京俊 AN, KYUNGJUN (KR)；李正民 LEE, JEONG-MIN (KR)；覺莫 KYAW, MOE (US)；塔拉加 菲利普 TALAGA, PHILIPPE (FR)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：0 共 99 頁

(54)名稱

多價肺炎球菌多醣-蛋白質共軛物組成物及使用其之方法

(57)摘要

本發明提供多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 22-27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。亦提供產生多價肺炎球菌共軛物組成物之方法及使用該組成物預防個體之肺炎鏈球菌感染或疾病之方法。亦提供包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中該多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 15A、15C、23A、23B、24F 及/或 35B 之莢膜多醣。

Provided are multivalent pneumococcal conjugate compositions comprising 22-27 different pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugates, wherein each pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate comprises a protein carrier conjugated to a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae*, wherein the *Streptococcus pneumoniae* serotypes are selected from 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, and 35B. Also provided are methods of producing the multivalent pneumococcal conjugate compositions and methods of using the same for prophylaxis against *Streptococcus pneumoniae* infection or disease in a subject. Also provided are immunogenic compositions comprising at least one polysaccharide-protein conjugate wherein the polysaccharide is a capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 15A, 15C, 23A, 23B, 24F, and/or 35B and methods of preparing the same.



202106332

【發明摘要】

【中文發明名稱】

多價肺炎球菌多醣-蛋白質共軛物組成物及使用其之方法

【英文發明名稱】

MULTIVALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN
CONJUGATE COMPOSITIONS AND METHODS OF USING THE SAME

【中文】

本發明提供多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 22-27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。亦提供產生多價肺炎球菌共軛物組成物之方法及使用該組成物預防個體之肺炎鏈球菌感染或疾病之方法。亦提供包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中該多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 15A、15C、23A、23B、24F 及/或 35B 之莢膜多醣。

【英文】

Provided are multivalent pneumococcal conjugate compositions comprising 22-27 different pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugates, wherein each pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugate comprises a protein carrier conjugated to a capsular polysaccharide from a different serotype of *Streptococcus pneumoniae*, wherein the *Streptococcus pneumoniae* serotypes are selected from 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, and 35B. Also provided are methods of producing the multivalent pneumococcal conjugate compositions and methods of using the same for prophylaxis against *Streptococcus pneumoniae* infection or disease in a subject. Also provided are immunogenic compositions comprising at least one polysaccharide-protein conjugate wherein the polysaccharide is a capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 15A, 15C, 23A, 23B, 24F, and/or 35B and methods of preparing the same.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

多價肺炎球菌多醣-蛋白質共軛物組成物及使用其之方法

【英文發明名稱】

MULTIVALENT PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-PROTEIN
CONJUGATE COMPOSITIONS AND METHODS OF USING THE SAME

【技術領域】

相關申請案之交叉引用

【0001】 本申請案主張 2019 年 12 月 17 日申請之美國臨時專利申請案第 62/949,164 號及 2019 年 7 月 31 日申請之韓國專利申請案第 10-2019-0093276 號的權益，且依賴於該等專利申請案之申請日，該等專利申請案之全部揭示內容以引用的方式併入本文中。

發明領域

【0002】 本申請案大體上涉及多價肺炎球菌共軛物組成物、包含其之疫苗及使用此等組成物及疫苗用於預防個體之肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)感染或疾病之方法。

【先前技術】

發明背景

【0003】 肺炎球菌(肺炎鏈球菌)為一種革蘭氏陽性、柳葉刀形、兼性厭氧細菌，具有超過 90 種已知的血清型。已顯示大多數肺炎鏈球菌血清型會引起疾病(諸如肺炎、菌血症、腦膜炎及耳炎病)，其中 23 種最常見的血清型約佔全球侵襲性疾病之 90%。基於肺炎球菌最重要的毒力因子——莢膜多醣之血清學反應來對血清型進行分類。莢膜多醣為 T 細胞非依賴性抗原，可在不存在 T 輔助細胞之情況下誘導抗體產生。T 細胞非依賴性抗原一般誘導親和力低、免疫反應

時間短、幾乎沒有免疫學記憶之抗體。

【0004】 最初的肺炎球菌疫苗包括來自不同血清型之莢膜多醣的組合。此等疫苗可賦予免疫系統發達或健康的患者對肺炎鏈球菌之免疫力，然而，此等疫苗對缺乏發達免疫系統的嬰兒及經常免疫功能受損的老年個體無效。為了改良對肺炎球菌疫苗之免疫反應，特別是在感染肺炎鏈球菌風險較高之嬰兒及老年個體中，將莢膜多醣與適合之載體蛋白共軛以產生肺炎球菌共軛物疫苗。與適合之載體蛋白共軛將莢膜多醣自 T 細胞非依賴性抗原變為 T 細胞依賴性抗原。因此，針對共軛莢膜多醣之免疫反應涉及 T 輔助細胞，當再次暴露於莢膜多醣時，T 輔助細胞有助於誘導更有效及快速的免疫反應。

【0005】 存在至少二種開發肺炎球菌糖共軛物疫苗之方法：單載體方法及混合載體方法。不同莢膜多醣共軛物之免疫原性可視所用的肺炎球菌血清型及載體蛋白而變化。在單載體方法中，來自不同血清型之莢膜多醣與單一蛋白載體共軛。Pfizer 的 PREVNAR 系列疫苗為單載體方法之一個實例，其中不同的莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 蛋白載體共軛，該蛋白載體為白喉類毒素之無毒變體，具有麩胺酸取代甘胺酸之單個胺基酸取代。7 價 PREVNAR 疫苗(PREVNAR)於 2000 年首次獲批，且含有來自以下獲批時最流行的肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣：4、6B、9V、14、18C、19F 及 23F。13 價疫苗 PREVNAR 13 向 CRM₁₉₇ 蛋白載體中添加血清型 1、5、7F、3、6A 及 19A。Merck 正在開發 15 價 V114 疫苗，其包括 PREVNAR 13 中存在的 13 種血清型加上 22F 及 33F 與 CRM₁₉₇ 共軛。參見美國專利第 8,192,746 號。Merck 亦揭示一種 21 價肺炎球菌共軛物組成物(PCV21)，其包括與 CRM₁₉₇ 共軛的以下 21 種肺炎鏈球菌血清型：3、6C、7F、8、9N、10A、11A、12F、15A、16F、17F、19A、20A、22F、23A、23B、24F、31、33F、35B 及 15B、15C 或去 O-乙醯化 15B 中之至少一者。參見 US2019/0192648。

【0006】 第二種肺炎球菌共軛物疫苗方法為混合載體方法。在混合載體方法中，代替使用單一蛋白載體，使用二種或更多種蛋白載體，其中來自特定血

清型之莢膜多醣與第一種蛋白載體共軛，且來自不同血清型之莢膜多醣與至少第二種不同蛋白載體共軛。舉例而言，GlaxoSmithKline 已開發 SYNFLORIX，一種 10 價(血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 及 23F)、混合載體、肺炎球菌共軛物疫苗，其使用流感嗜血桿菌蛋白 D、破傷風類毒素及白喉類毒素作為蛋白載體。在 SYNFLORIX 中，血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14 及 23F 與蛋白 D 共軛；血清型 18C 與破傷風類毒素共軛；且血清型 19F 與白喉類毒素共軛。Vesikari 等人, *PIDJ*, 28(4):S66-76 (2009)。最近，Sanofi Pasteur 及 SK Biosciences 已製造 16 價(血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、12F、14、18C、19A、19F、22F、23F 及 33F)、20 價(血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F 及 33F)及 21 價(1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F 及 33F)、混合載體、肺炎球菌共軛物疫苗，如公開的國際申請案 WO2018/027123、WO2018/027126、WO2019/152921 及 WO2019/152925 中所揭示，其各自以全文引用的方式併入本文中。在此等混合載體、多價肺炎球菌共軛物疫苗中，二種血清型(血清型 1、3 及 5 中之二者)或四種血清型(血清型 15B 及 22F 以及血清型 1、3 及 5 中之二者)與破傷風類毒素共軛，而其餘血清型與 CRM₁₉₇ 共軛。

【0007】 儘管單載體及混合載體糖共軛物疫苗已被用於提供針對疫苗中所含之肺炎球菌血清型的不同水準的保護，但已觀察到血清型替換或糖共軛物疫苗中不含之毒性肺炎球菌菌株/血清型的流行率增加且仍為一個問題。Daniels 等人, *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2016 年 1 月-2 月; 21(1): 27-35。

【發明內容】

發明概要

【0008】 本申請案提供新的且改良的多價肺炎球菌共軛物組成物及包含其之疫苗。在一個態樣中，本申請案提供一種多價肺炎球菌共軛物組成物，其包

含 22-27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。其他感興趣的肺炎鏈球菌血清型可添加至多價肺炎球菌共軛物組成物中。在某些實施例中，各莢膜多醣與相同的蛋白載體共軛。在稱為混合載體實施例之某些實施例中，使用不止一種蛋白載體，例如二種不同的蛋白載體。舉例而言，在某些實施例中，某些莢膜多醣與第一蛋白載體共軛，而其餘莢膜多醣與第二蛋白載體連接。在某些實施例中，第一及第二蛋白載體包含 CRM₁₉₇ 及破傷風類毒素。在某些實施例中，二種莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之二種莢膜多醣係選自由血清型 1、3 及 5 組成之群。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之二種莢膜多醣係選自由血清型 1、3、5、15B 及 22F 組成之群。在某些實施例中，四種莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之四種莢膜多醣，其中與破傷風類毒素共軛之四種莢膜多醣中之二者係選自由血清型 1、3 及 5 組成之群，而其餘二種莢膜多醣為血清型 15B 及 22F。

【0009】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含 27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0010】 在某些實施例中，來自血清型 1 及 5 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B

之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在另一個實施例中，來自血清型 1 及 3 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在另一個實施例中，來自血清型 3 及 5 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【0011】 在某些實施例中，四種莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛，其中與破傷風類毒素共軛之四種莢膜多醣中之二者係選自由血清型 1、3 及 5 組成之群，而其餘二種莢膜多醣為血清型 15B 及 22F。

【0012】 在一個實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物包含 27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中來自血清型 1、5、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【0013】 在另一個實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物包含 27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中來自血清型 1、3、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【0014】 在另一個實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物包含 27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中來自血清型 3、5、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【0015】 在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含 26 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0016】 在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含 25 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0017】 在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含 24 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0018】 在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含 23 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0019】 在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含 22 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0020】 在一些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物進一步包含佐劑，諸如以鋁為主之佐劑，包括但不限於磷酸鋁、硫酸鋁及氫氧化鋁。

【0021】 另一個態樣係關於多價肺炎球菌共軛物組成物作為疫苗之用途。

【0022】 另一個態樣係關於包含多價肺炎球菌共軛物組成物及醫藥學上可接受之賦形劑的疫苗。

【0023】 另一個態樣係關於一種用於預防諸如人類之個體之肺炎鏈球菌感染或疾病的方法，該方法包含向該個體投與預防有效量之多價肺炎球菌共軛物組成物或包含其之疫苗。

【0024】 在某些實施例中，個體為至少 50 歲之人類，且疾病為肺炎或侵襲性肺炎球菌病(IPD)。

【0025】 在其他實施例中，個體為至少 6 週齡之人類，且疾病為肺炎、侵襲性肺炎球菌病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。在一些實施例中，人類個體為 6 週至 5 歲。在其他實施例中，人類個體為 2 至 15 個月或 6 至 17 歲。

【0026】 在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物或疫苗係藉由肌肉內注射投與。在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物或疫苗係作為免疫系列之一部分投與。

【0027】 另一個態樣係關於包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中至少一種多醣-蛋白質共軛物中之多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 15A 之莢膜多醣。

【0028】 另一個態樣係關於包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中至少一種多醣-蛋白質共軛物中之多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 15C 之莢膜多醣。

【0029】 另一個態樣係關於包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中至少一種多醣-蛋白質共軛物中之多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 23A 之莢膜多醣。

【0030】 另一個態樣係關於包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中至少一種多醣-蛋白質共軛物中之多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 23B 之莢膜多醣。

【0031】 另一個態樣係關於包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中至少一種多醣-蛋白質共軛物中之多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 24F 之莢膜多醣。

【0032】 另一個態樣係關於包含至少一種多醣-蛋白質共軛物之免疫原性組成物及其製備方法，其中至少一種多醣-蛋白質共軛物中之多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 35B 之莢膜多醣。

【0033】 根據以下詳細描述，肺炎球菌共軛物組成物之前述及其他目標、特徵及優點將變得更加明顯。

定義

【0034】 為了使本揭示案更容易理解，首先在下文定義某些術語。以下術語及其他術語之附加定義可貫穿本說明書闡述。

【0035】 如本說明書及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a/an)」及「該」包括多個提及物，除非上下文另外明確規定。因此，舉例而言，對「一種方法」之提及包括本文所述之類型及/或在閱讀本揭示案後對熟習此項技術者而言變得顯而易見的一或多種方法及/或步驟等。

【0036】 *投與*：如本文所用，向個體「投與」組成物意謂給予、施用組成物或使組成物與個體接觸。投與可藉由多種途徑中之任一者來完成，諸如局部、經口、皮下、肌肉內、腹膜內、靜脈內、鞘內及皮內。

【0037】 *大致*：如本文所用，術語「大致」或「約」在應用於一或多個感興趣的值時，係指與陳述之參考值類似的值。在某些實施例中，術語「大致」或「約」係指落入任一方向(大於或小於)之陳述之參考值的 25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、

5%、4%、3%、2%、1%或更小之數值範圍，除非另有說明或另外自上下文顯而易見(除了該數目將超過可能值的 100%)。

【0038】 *共軛物*：如本文所用且自適當的上下文理解，術語「共軛物」或「糖共軛物」係指使用任何共價或非共價生物共軛策略與載體蛋白共軛之肺炎鏈球菌多醣。

【0039】 *氧化程度*：如本文所用，術語「氧化程度」(DO)係指當用氧化劑活化經純化或分級之糖時，每個醛基產生之糖重複單元的數目。糖之氧化程度可使用一般熟習此項技術者已知的常規方法來確定。

【0040】 *實施例*：如本文所用，術語「在某些實施例中」、「在一些實施例中」或其類似術語係指本揭示案之所有態樣的實施例，除非上下文另外明確指示。

【0041】 *賦形劑*：如本文所用，術語「賦形劑」係指可包括在組成物中之非治療劑，例如提供或有助於所需稠度或穩定效應。

【0042】 *混合載體*：如本文所用，混合載體、肺炎球菌共軛物組成物係指具有不止一種類型之蛋白載體的肺炎球菌共軛物組成物。

【0043】 *22 價肺炎球菌共軛物組成物*：如本文所用，術語「22 價肺炎球菌共軛物組成物」或「PCV-22」係指包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物之組成物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 22 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0044】 *23 價肺炎球菌共軛物組成物*：如本文所用，術語「23 價肺炎球菌共軛物組成物」或「PCV-23」係指包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物之組成物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 23 種不同的肺炎球菌莢膜多

醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0045】 24 價肺炎球菌共軛物組成物：如本文所用，術語「24 價肺炎球菌共軛物組成物」或「PCV-24」係指包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物之組成物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 24 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0046】 25 價肺炎球菌共軛物組成物：如本文所用，術語「25 價肺炎球菌共軛物組成物」或「PCV-25」係指包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物之組成物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 25 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0047】 26 價肺炎球菌共軛物組成物：如本文所用，術語「26 價肺炎球菌共軛物組成物」或「PCV-26」係指包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物之組成物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 26 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0048】 27 價肺炎球菌共軛物組成物：如本文所用，術語「27 價肺炎球菌共軛物組成物」或「PCV-27」係指包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物之組成物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型為 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 及 35B。

【0049】 分子量：除非另外規定，否則如本文所用，莢膜糖或莢膜糖-載體蛋白共軛物之術語「分子量」係指藉由尺寸排阻層析(SEC)結合多角度雷射光散射(MALLS)計算之平均分子量。

【0050】 多價：如本文所用，術語「多價」係指具有來自不止一種肺炎鏈球菌血清型之肺炎球菌莢膜多醣的肺炎球菌共軛物組成物。

【0051】 醫藥學上可接受之賦形劑：可用於本揭示案之醫藥學上可接受之賦形劑為習知的。E. W. Martin 所著的 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第 15 版 (1975)描述適合於醫藥遞送一或多種治療組成物，包括疫苗及其他藥劑之組成物及調配物。適合之醫藥賦形劑包括例如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻穀、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇及其類似物。一般而言，賦形劑之性質將視所採用之特定投藥模式而定。舉例而言，非經腸調配物通常包含可注射流體，其包括醫藥學上及生理學上可接受之流體，諸如水、生理鹽水、平衡鹽溶液、緩衝液、右旋糖水溶液、甘油或其類似物作為媒劑。對於固體組成物(例如，散劑、丸劑、錠劑或膠囊形式)，習知無毒固體賦形劑可包括例如醫藥級甘露糖醇、乳糖、澱粉或硬脂酸鎂。除生物中性載體之外，待投與之醫藥組成物可含有少量無毒輔助物質，諸如潤濕或乳化劑、表面活性劑、防腐劑、pH 緩衝劑及其類似物，例如乙酸鈉或脫水山梨糖醇單月

桂酸酯。

【0052】 *預防有效量*：如本文所定義，術語「預防有效量」或「預防有效劑量」係指誘導免疫反應所需之量或劑量，該免疫反應足以延遲肺炎鏈球菌感染引起的一或多種症狀的發作及/或降低其頻率及/或嚴重程度。

【0053】 *預防*：如本文所用，術語「預防」係指避免特定疾病、病症或病況(例如，肺炎鏈球菌感染)之一或多種症狀的疾病表現、延遲其發作及/或降低其頻率及/或嚴重程度。在一些實施例中，預防係基於群體評定的，因此，若在易患疾病、病症或病況之群體中觀察到疾病、病症或病況之一或多種症狀的發展、頻率及/或強度有統計學上顯著之降低，則將藥劑視為提供針對特定疾病、病症或病況的預防。

【0054】 *個體*：如本文所用，術語「個體」意謂任何哺乳動物，包括小鼠、兔子及人類。在某些實施例中，個體為成人、青少年或嬰兒。在一些實施例中，使用術語「個體(individual)」或「患者」，且意欲可與「個體(subject)」互換。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

【0055】 以下對所揭示之實施例及實例的描述本質上僅為例示性的，且絕不意欲限制本發明、其應用或用途。

【0056】 本申請案提供新的且改良的多價肺炎球菌共軛物組成物及包含其之疫苗。如實例中所示，針對 PCV-27 中之 27 種血清型，包括現有肺炎球菌疫苗未覆蓋的血清型，諸如血清型 15A、血清型 15C、血清型 23A、血清型 23B、血清型 24F 及血清型 35B，獲得穩健的抗體反應。

肺炎球菌多醣血清型 15A

【0057】 血清型 15A 多醣可藉由使用一般熟習此項技術者已知的分離程序(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)直接自細菌獲得。另外，可使用合成方案產生 15A 寡糖。

【0058】血清型 15A 肺炎鏈球菌菌株可自己建立的菌種保存中心(例如，疾病控制與預防中心之鏈球菌參考實驗室(Atlanta, Georgia))或臨床樣本獲得。

【0059】細菌細胞通常在培養基，諸如以大豆為主之培養基中生長。在細菌細胞發酵產生肺炎鏈球菌血清型 15A 莢膜多醣後，將細菌細胞溶解以產生細胞溶解物。隨後，可使用此項技術中已知的純化技術，包括離心、深度過濾、沈澱、超濾、活性炭處理、透濾及/或管柱層析(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)，自細胞溶解物分離血清型 15A 多醣。

【0060】經純化之血清型 15A 多醣與載體蛋白共軛以形成免疫原性組成物，其包含至少一種包含血清型 15A 多醣及載體蛋白之多醣-蛋白質共軛物。在一個態樣中，15A 多醣-蛋白質共軛物可藉由包含以下步驟之方法製備：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣經受酸水解反應及加熱或微流化床(microfluidizer)，且隨後與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣；

(ii)任擇地凍乾活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣及載體蛋白；

(iii)將活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣及載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)中；

(iv)使活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣及載體蛋白與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣的免疫原性共軛物。關於此方法中可用之試劑(例如，氧化劑、還原劑、載體蛋白等)及條件的其他細節揭示在本申請案別處，包括後面的部分及實例中。

【0061】活化的血清型 15A 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如分子量(MW)及/或氧化程度(Do)。

【0062】在一個態樣中，活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣在共軛前之分

子量小於 120 kDa，包括例如在共軛前之分子量為約 10-120 kDa、50-120 kDa、70-120 kDa、70-80 kDa、70-118 kDa、114-118 kDa 或約 116 kDa 之活化的血清型 15A 莢膜多醣。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0063】 在一個態樣中，當肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣在共軛前之分子量小於 120 kDa 時，可產生約 1,000-5,000 kDa 之多醣-蛋白質共軛物，諸如約 1,200-4,000 kDa、1,200-1,500 kDa、1,200-3,500 kDa、1,400-4,000 kDa、約 1,200 kDa、約 1,400 kDa 或約 4,000 kDa 之多醣-蛋白質共軛物。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0064】 經純化之血清型 15A 多醣可藉由用氧化劑活化後之氧化程度來表徵。在一個態樣中，活化的血清型 15A 多醣之氧化程度可介於 1 至 15，諸如 4-10、4-8、4-5、5-8 或約 4。

【0065】 在一個態樣中，將氧化水準(Do)為約 4 之活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣與載體蛋白共軛，以獲得游離多醣(游離 PS)含量為 40%或更少，諸如 5-40%、20-40%、25-40%、20-35%、25-35%或 30-35%之血清型 15A 莢膜多醣-蛋白質共軛物。

【0066】 在正常的純化程序期間，多醣的大小可略微減小。另外，如本揭示案中所述，多醣可在共軛前進行分級。上述分子量範圍係指在最終分級步驟後(例如，在純化、水解及活化後)的經純化之多醣在共軛前的分子量範圍。

肺炎球菌多醣血清型 15C

【0067】 血清型 15C 多醣可藉由使用一般熟習此項技術者已知的分離程序(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)直接自細菌獲得。另外，可使用合成方案產生 15C 寡糖。

【0068】 血清型 15C 肺炎鏈球菌菌株可自己建立的菌種保存中心(例如，疾病控制與預防中心之鏈球菌參考實驗室(Atlanta, Georgia))或臨床樣本獲得。或

者，血清型 15C 多醣可通常藉由鹼性處理使血清型 15B 多醣去 O-乙醯化獲得。

【0069】細菌細胞通常在培養基，諸如以大豆為主之培養基中生長。在細菌細胞發酵產生肺炎鏈球菌血清型 15C 莢膜多醣後，將細菌細胞溶解以產生細胞溶解物。隨後，可使用此項技術中已知的純化技術，包括離心、深度過濾、沈澱、超濾、活性炭處理、透濾及/或管柱層析(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)，自細胞溶解物分離血清型 15C 多醣。

【0070】經純化之血清型 15C 多醣與載體蛋白共軛以形成免疫原性組成物，其包含至少一種包含血清型 15C 多醣及載體蛋白之多醣-蛋白質共軛物。在一個態樣中，15C 多醣-蛋白質共軛物可藉由包含以下步驟之方法製備：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣；

(ii)任擇地凍乾活化的肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣及載體蛋白；

(iii)將活化的肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣及載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使活化的血清型 15C 多醣及載體蛋白之混合物與還原劑反應，產生血清型 15C 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將血清型 15C 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣的免疫原性共軛物。關於此方法中可用之試劑(例如，氧化劑、還原劑、載體蛋白等)及條件的其他細節揭示在本申請案別處，包括後面的部分及實例中。

【0071】活化的血清型 15C 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如分子量(MW)及/或氧化程度(Do)。

【0072】在一個態樣中，活化的肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣在共軛前之分子量可為 200-1,000 kDa，諸如 400-800 kDa、500-775 kDa、470-775 kDa、500-770 kDa、520-680 kDa、510-770 kDa、510-550 kDa、670-770 kDa 或類似的分子量範

圍。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0073】 可產生分子量為約 1,000-10,000 kDa 之 15C 多醣-蛋白質共軛物，諸如約 2,000-6,000 kDa、2,500-5,000 kDa、6,000-10,000 kDa 或 6,200-9,400 kDa 之 15C 多醣-蛋白質共軛物。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0074】 經純化之血清型 15C 多醣可藉由用氧化劑活化後之氧化程度來表徵。在一個態樣中，活化的血清型 15C 多醣之氧化程度可介於 1 至 40。藉由向肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣中添加過碘酸鈉，可獲得 8-35、15-35、8-20、8-9、9-20 或 30-35 之氧化程度。

【0075】 在一個態樣中，將氧化水準(D_o)為 30-35 之活化的肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣與載體蛋白共軛，以獲得游離多醣(游離 PS)含量為 40%或更少，諸如 5-40%、20-40%、25-40%、20-35%、25-35%或 30-35%之血清型 15C 莢膜多醣-蛋白質共軛物。

【0076】 在正常的純化程序期間，多醣的大小可略微減小。另外，如本揭示案中所述，多醣可在共軛前進行分級。上述分子量範圍係指在最終分級步驟後(例如，在純化、水解及活化後)的經純化之多醣在共軛前的分子量範圍。

肺炎球菌多醣血清型 23A

【0077】 血清型 23A 多醣可藉由使用一般熟習此項技術者已知的分離程序(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)直接自細菌獲得。另外，可使用合成方案產生 23A 寡糖。

【0078】 血清型 23A 肺炎鏈球菌菌株可自己建立的菌種保存中心(例如，疾病控制與預防中心之鏈球菌參考實驗室(Atlanta, Georgia))或臨床樣本獲得。

【0079】 細菌細胞通常在培養基，諸如以大豆為主之培養基中生長。在細菌細胞發酵產生肺炎鏈球菌血清型 23A 莢膜多醣後，將細菌細胞溶解以產生細胞溶解物。隨後，可使用此項技術中已知的純化技術，包括離心、深度過濾、

沈澱、超濾、活性炭處理、透濾及/或管柱層析(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)，自細胞溶解物分離血清型 23A 多醣。

【0080】經純化之血清型 23A 多醣與載體蛋白共軛以形成免疫原性組成物，其包含至少一種包含血清型 23A 多醣及載體蛋白之多醣-蛋白質共軛物。在一個態樣中，23A 多醣-蛋白質共軛物可藉由包含以下步驟之方法製備：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 23A 與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣；

(ii)任擇地凍乾活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣及載體蛋白；

(iii)將活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣及載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣及載體蛋白之混合物與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣的免疫原性共軛物。關於此方法中可用之試劑(例如，氧化劑、還原劑、載體蛋白等)及條件的其他細節揭示在本申請案別處，包括後面的部分及實例中。

【0081】活化的血清型 23A 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如分子量(MW)及/或氧化程度(Do)。

【0082】在一個態樣中，活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣在共軛前之分子量可為 300-700 kDa，諸如 400-650 kDa、430-650 kDa、470-650 kDa、470-570 kDa、470-490 kDa 或類似的分子量範圍。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0083】使用本文所揭示之方法可產生約 2,000-7,000 kDa 之血清型 23A 多醣-蛋白質共軛物。血清型 23A 莢膜多醣-蛋白質共軛物之分子量可為約 2,000-4,000 kDa、4,000-7,000 kDa、4,200-6,700 kDa、4,350-6,650 kDa、5,000-6,700

kDa、約 4,300 kDa、約 5,000 kDa 或約 6,600 kDa。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0084】 經純化之血清型 23A 多醣可藉由用氧化劑活化後之氧化程度來表徵。在一個態樣中，活化的血清型 23A 多醣之氧化程度可介於 4 至 25，諸如 6-24、6-18、9-18、6-9、6-10、6-11 或 9-11。

【0085】 在一個態樣中，將氧化水準(D_o)為 9-11 之活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣與載體蛋白共軛，以獲得游離多醣(游離 PS)含量為 40%或更少，諸如 5-40%、20-40%、25-40%、20-35%、25-35%或 30-35%之血清型 23A 莢膜多醣-蛋白質共軛物。

【0086】 可使用任何適合之緩衝液進行共軛，包括 DMSO 或磷酸鹽緩衝液。當使用 DMSO 時，多醣之反應濃度可為 2.5 mg/mL 或更低，包括例如 1.0 mg/mL 至 2.5 mg/mL、1.0 mg/mL 至 2.0 mg/mL、或 1.0 mg/mL 至 1.5 mg/mL。當使用磷酸鹽緩衝液時，多醣之反應濃度可為 10 至 20 mg/mL，包括例如 15 mg/mL。

【0087】 在正常的純化程序期間，多醣的大小可略微減小。另外，如本揭示案中所述，多醣可在共軛前進行分級。

肺炎球菌多醣血清型 23B

【0088】 血清型 23B 多醣可藉由使用一般熟習此項技術者已知的分離程序(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)直接自細菌獲得。另外，可使用合成方案產生 23B 寡糖。

【0089】 血清型 23B 肺炎鏈球菌菌株可自已建立的菌種保存中心(例如，疾病控制與預防中心之鏈球菌參考實驗室(Atlanta, Georgia))或臨床樣本獲得。

【0090】 細菌細胞通常在培養基，諸如以大豆為主之培養基中生長。在細菌細胞發酵產生肺炎鏈球菌血清型 23B 莢膜多醣後，將細菌細胞溶解以產生細胞溶解物。隨後，可使用此項技術中已知的純化技術，包括離心、深度過濾、沈澱、超濾、活性炭處理、透濾及/或管柱層析(包括但不限於美國專利申請公開

案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)，自細胞溶解物分離血清型 23B 多醣。

【0091】經純化之血清型 23B 多醣與載體蛋白共軛以形成免疫原性組成物，其包含至少一種包含血清型 23B 多醣及載體蛋白之多醣-蛋白質共軛物。在一個態樣中，23B 多醣-蛋白質共軛物可藉由包含以下步驟之方法製備：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 23B 與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣；

(ii)任擇地凍乾活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣及載體蛋白；

(iii)將活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣及載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)中；

(iv)使活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣及載體蛋白之混合物與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣的免疫原性共軛物。關於此方法中可用之試劑(例如，氧化劑、還原劑、載體蛋白等)及條件的其他細節揭示在本申請案別處，包括後面的部分及實例中。

【0092】活化的血清型 23B 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如分子量(MW)及/或氧化程度(Do)。

【0093】在一個態樣中，活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣在共軛前之分子量可為 100-800 kDa，諸如 200-700 kDa、200-650 kDa、300-650 kDa、380-640 kDa、550-675 kDa、200-250 kDa、220-230 kDa、220-225 kDa 或類似的分子量範圍。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0094】使用本文所揭示之方法可產生約 2,000-7,000 kDa 之血清型 23B 多醣-蛋白質共軛物。血清型 23B 莢膜多醣-蛋白質共軛物之分子量可在約 2,000-4,000 kDa、2,000-5,000、4,000-7,000 kDa、2,400-6,800 kDa、4,600-6,800 kDa 或 6,400-6,800 kDa 之範圍內。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之

一個實施例而涵蓋。

【0095】 經純化之血清型 23B 多醣可藉由用氧化劑活化後之氧化程度來表徵。在一個態樣中，活化的血清型 23B 多醣之氧化程度可為 5.4 或更低，諸如 1-5.4、2-5.4、2.3-5.4、2-3 或 2.3-2.8 之氧化程度。

【0096】 在一個態樣中，將氧化水準(Do)為 3 或更低(如上文所論述)之活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣與載體蛋白共軛，以獲得游離多醣(游離 PS)含量為 40%或更少，諸如 5-40%、20-40%、25-40%、20-35%、25-35%或 30-35%之血清型 23B 莢膜多醣-蛋白質共軛物。

【0097】 在正常的純化程序期間，多醣的大小可略微減小。另外，如本揭示案中所述，多醣可在共軛前進行分級。

肺炎球菌多醣血清型 24F

【0098】 血清型 24F 多醣可藉由使用一般熟習此項技術者已知的分離程序(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)直接自細菌獲得。另外，可使用合成方案產生 24F 寡糖。

【0099】 血清型 24F 肺炎鏈球菌菌株可自已建立的菌種保存中心(例如，疾病控制與預防中心之鏈球菌參考實驗室(Atlanta, Georgia))或臨床樣本獲得。

【0100】 細菌細胞通常在培養基，諸如以大豆為主之培養基中生長。在細菌細胞發酵產生肺炎鏈球菌血清型 24F 莢膜多醣後，將細菌細胞溶解以產生細胞溶解物。隨後，可使用此項技術中已知的純化技術，包括離心、深度過濾、沈澱、超濾、活性炭處理、透濾及/或管柱層析(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)，自細胞溶解物分離血清型 24F 多醣。

【0101】 經純化之血清型 24F 多醣與載體蛋白共軛以形成免疫原性組成物，其包含至少一種包含血清型 24F 多醣及載體蛋白之多醣-蛋白質共軛物。在一個態樣中，24F 多醣-蛋白質共軛物可藉由包含以下步驟之方法製備：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣經受酸水解反應或微流化床，且

隨後與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣；

(ii)任擇地凍乾活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣及載體蛋白；

(iii)將活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣及載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣及載體蛋白與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣的免疫原性共軛物。關於此方法中可用之試劑(例如，氧化劑、還原劑、載體蛋白等)及條件的其他細節揭示在本申請案別處，包括後面的部分及實例中。

【0102】 活化的血清型 24F 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如分子量(MW)及/或氧化程度(Do)。

【0103】 在一個態樣中，活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣在共軛前之分子量可為 100-500 kDa，諸如 150-350 kDa、200-400 kDa、200-300 kDa、225-275 kDa、240-260 kDa、245-255 kDa、約 250 kDa 或類似的分子量範圍。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0104】 使用本文所揭示之方法可產生約 1,000-5,000 kDa 之血清型 24F 多醣-蛋白質共軛物。血清型 24F 莢膜多醣-蛋白質共軛物之分子量可在約 1,500-5,000 kDa、2,000-4,500 或 2,500-3,500 kDa 之範圍內。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0105】 經純化之血清型 24F 多醣可藉由用氧化劑活化後之氧化程度來表徵。在一個態樣中，活化的血清型 24F 多醣之氧化程度可為至少 90，包括約 90-100。

【0106】 在一個態樣中，在使氧化程度為至少 90 之活化的血清型 24F 多醣及載體蛋白反應的步驟中，可使用 2.0 或更少之莫耳當量的還原劑，以獲得游離

糖(游離 PS)為 40%或更少，諸如 5-40%、20-40%、25-40%、20-35%、25-35%或 30-35%之血清型 24F 莢膜多醣-蛋白質共軛物。可使用 0.5 至 1.2、1.0 至 1.2 或約 1.2 之莫耳當量的還原劑。

【0107】 在正常的純化程序期間，多醣的大小可略微減小。另外，如本揭示案中所述，多醣可在共軛前進行分級。

肺炎球菌多醣血清型 35B

【0108】 血清型 35B 多醣可藉由使用一般熟習此項技術者已知的分離程序(包括但不限於美國專利申請公開案第 2006/0228380 號中所揭示之方法)直接自細菌獲得。另外，可使用合成方案產生 35B 寡糖。

【0109】 血清型 35B 肺炎鏈球菌菌株可自已建立的菌種保存中心(例如，疾病控制與預防中心之鏈球菌參考實驗室(Atlanta, Georgia))或臨床樣本獲得。

【0110】 細菌細胞通常在培養基，諸如以大豆為主之培養基中生長。在細菌細胞發酵產生肺炎鏈球菌血清型35B莢膜多醣後，將細菌細胞溶解以產生細胞溶解物。隨後，可使用此項技術中已知的純化技術，包括離心、深度過濾、沈澱、超濾、活性炭處理、透濾及/或管柱層析(包括但不限於美國專利申請公開案第2006/0228380號中所揭示之方法)，自細胞溶解物分離血清型35B多醣。

【0111】 經純化之血清型 35B 多醣與載體蛋白共軛以形成免疫原性組成物，其包含至少一種包含血清型 35B 多醣及載體蛋白之多醣-蛋白質共軛物。在一個態樣中，35B 多醣-蛋白質共軛物可藉由包含以下步驟之方法製備：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 35B 與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣；

(ii)任擇地凍乾活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣及載體蛋白；

(iii)將活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣及載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣及載體蛋白與還原劑反應，產生肺

炎鏈球菌血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣的免疫原性共軛物。關於此方法中可用之試劑(例如，氧化劑、還原劑、載體蛋白等)及條件的其他細節揭示在本申請案別處，包括後面的部分及實例中。

【0112】活化的血清型 35B 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如分子量(MW)及/或氧化程度(Do)。

【0113】舉例而言，在與載體蛋白共軛之前，可例如藉由高壓均質化或機械均質化來減小經純化之血清型 35B 多醣的大小。在一個態樣中，活化的血清型 35B 多醣在共軛前之分子量為 10 至 20,000 kDa、10 至 1,000 kDa、10 至 500 kDa、10 至 300 kDa、20 至 200 kDa 或 20 至 120 kDa。

【0114】經純化之血清型 35B 多醣可藉由用氧化劑活化後之氧化程度來表徵。在一個態樣中，活化的血清型 35B 多醣之氧化程度可為 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 或 4-30。

【0115】在一個態樣中，將氧化水準(Do)為 4-30 之活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣與載體蛋白共軛，以獲得游離多醣(游離 PS)含量為 40%或更少，諸如 5-40%、20-40%、25-40%、20-35%、25-35%或 30-35%之血清型 35B 莢膜多醣-蛋白質共軛物。

【0116】為了產生具有有利的免疫原性特性之血清型 35B 糖共軛物，可組合活化(氧化)、共軛及/或封端步驟中之以下過程參數中之一或多者：

- 在活化步驟中，過碘酸鹽(例如，過碘酸鈉或過碘酸鉀)以每 1M 血清型 35B 多醣 0.005 至 0.5、0.005 至 0.3、0.005 至 0.2 或 0.007 至 0.15 之莫耳當量反應；
- 活化步驟可在諸如乙酸鈉緩衝液或去離子水之水性溶劑中進行；
- 活化步驟可在 0.1 mM 至 15 mM 或 0.1 至 10 mM 乙酸鈉緩衝液中進行；

- 活化步驟可在 pH4-8 或 pH4-7.5 下進行；
- 在活化步驟中，過碘酸鹽可在 21°C 至 25°C 下處理；
- 在活化步驟中，過碘酸鹽及血清型 35B 多醣可反應 0.5 至 50 小時或 1 至 25 小時；
- 在活化步驟後，可使用例如 30 kDa MWCO 超濾過濾器濃縮活化的血清型 35B 多醣；
- 在共軛步驟中，共軛反應中活化的血清型 35B 多醣之濃度可為 5 mg/mL 至 30 mg/mL 或 10 mg/mL 至 20 mg/mL；
- 在共軛步驟中，載體蛋白及活化的血清型 35B 多醣之初始裝載比(PR:PS) 可為 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 或 1:3，且較佳 1:0.5 至 2；
- 在共軛步驟中，還原劑之使用量可為每 1M 活化多醣 0.1 至 5 莫耳或 0.5 至 2 當量，較佳每 1M 活化糖 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 或 2 莫耳當量，或更佳每 1M 活化多醣 0.8 至 1.6 莫耳當量的還原劑；
- 在共軛步驟中，溫度可為 20°C 至 45°C、30°C 至 40°C、35 至 40°C 或 37 ± 2°C；
- 在共軛步驟中，pH 可為 5.5 至 8.5、5.5 至 7.5 或 6 至 7.5；
- 在共軛步驟中，載體蛋白及活化的血清型 35B 多醣可與還原劑反應 1 至 70 小時或 40 至 60 小時；
- 在共軛步驟後，血清型 35B 糖共軛物之產率可為至少 20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85% 或 90%；
- 在封端步驟中，硼氫化鈉可按每 1M 活化的血清型 35B 多醣 0.5 至 5 莫耳當量處理，諸如每 1M 活化的血清型 35B 多醣 1 至 3 或 1.5 至 2.5 莫耳當量，

或每 1M 活化多醣 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 或 3 莫耳當量之硼氫化鈉；

- 在封端步驟中，溫度可為 10 至 40°C、15 至 30°C、20 至 26°C 或 23 ± 2 °C；
- 在封端步驟中，反應時間可為 0.5 至 10 小時或 2 至 8 小時；及/或
- 在封端步驟後，可使用例如 100 kDa MWCO 超濾過濾器濃縮血清型 35B 糖共軛物。

【0117】 在一個例示性實施例中，生產血清型 35B 糖共軛物之方法包含以下步驟：

(i)用乙酸鈉緩衝液(NaOAc, pH 4.5 至 pH 6.0)或去離子水(DW)稀釋經分離之血清型 35B 多醣；

(ii)使血清型 35B 多醣與 0.005 至 0.5 莫耳當量之過碘酸鈉反應，以製備活化的血清型 35B 多醣；

(iii)將活化的血清型 35B 多醣純化，且隨後與冷凍保護劑混合；

(iv)分別凍乾活化的血清型 35B 及載體蛋白；

(v)將活化的血清型 35B 多醣及載體蛋白再懸浮於 DMSO 或磷酸鹽緩衝液中；

(vi)將再懸浮的活化的血清型 35B 多醣與載體蛋白混合，且與氰基硼氫化鈉反應，產生血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物；

(vii)用硼氫化鈉使血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端；及

(viii)獲得包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣的免疫原性共軛物。

【0118】 在另一個例示性實施例中，生產血清型 35B 糖共軛物之方法包含以下步驟：

(i)用乙酸鈉緩衝液(NaOAc, pH 4.5 至 pH 6.0)或去離子水(DW)稀釋經分離之

血清型 35B 多醣；

(ii)使血清型 35B 多醣與 0.005 至 0.5 莫耳當量之過碘酸鈉反應，以製備活化的血清型 35B 多醣；

(iii)將活化的血清型 35B 多醣純化；

(iv)將活化的血清型 35B 多醣與載體蛋白混合，隨後共同凍乾；

(v)將共同凍乾的活化的血清型 35B 多醣及載體蛋白再懸浮於 DMSO 或磷酸鹽緩衝液中；

(vi)與氰基硼氫化鈉反應，產生血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物；

(vii)用硼氫化鈉使血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端；及

(viii)獲得包含與載體蛋白共價連接之肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣的免疫原性共軛物。

肺炎球菌多醣血清型 22F

【0119】 活化的血清型 22F 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如用氧化劑活化後的氧化程度(Do)。在某些實施例中，活化的血清型 22F 多醣之 Do 可為 20-100、20-80、20-60、20-50、20-40、20-35、25-100、25-50、25-35、28-32 或 29-31。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0120】 血清型 22F 多醣-蛋白質共軛物可藉由不同的參數表徵，包括例如共軛後的蛋白質與多醣(PS/PR)比、游離糖(游離 PS)、MSD%或分子量(MALLS)。在某些實施例中，22F 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 22F-TT)之 PS/PR 比可為 0.2 至 1.5、0.2 至 0.5、0.3 至 0.4、0.6 至 1.0、0.7 至 0.9 或 0.6 至 0.8。在某些實施例中，22F 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 22F-TT)之游離 PS 為 40%或更少，諸如 2-40%、2-20%、2-10%、5-30%、10-25%、15-25%、17-21%或約 19%。在某些實施例中，血清型 22F 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 22F-TT)之 MSD (%)為 5-60%、5-10%、5-50%、10-50%、25-50%、40-50%、42-46%或約 44%。在某些實施例中，22F 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 22F-TT)之分子量可在約 1,000-6,000

kDa、2,000-5,000 kDa、2,500-4,000 kDa、3,000 至 3,500 kDa 或 3,000 至 3,100 kDa 之範圍內。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0121】血清型 22F 之上述任何參數均可視需要進行組合。舉例而言，在某些實施例中，用於製造血清型 22F 多醣-蛋白質共軛物之活化的血清型 22F 多醣之 Do 為約 29-31，蛋白質(TT)與多醣之反應比為約 1:1。且在某些實施例中，最終共軛物中之多醣/載體蛋白比(PS/PR)為約 0.6 至 0.8，游離 PS 為約 17-21%，且 MSD%為約 42-46%，任擇地按 MALLS 計之分子量為約 3,000 至 3,100 kDa。

肺炎球菌多醣血清型 15B

【0122】活化的血清型 15B 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如用氧化劑活化後的氧化程度(Do)。在某些實施例中，活化的血清型 15B 多醣之氧化程度可為 1 至 15、5 至 10、6 至 8 或約 7。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0123】血清型 15B 多醣-蛋白質共軛物可藉由不同的參數表徵，包括例如共軛後的蛋白質與多醣(PS/PR)比、游離糖(游離 PS)、MSD%或分子量(MALLS)。在某些實施例中，15B 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 15B-TT)之 PS/PR 比可為 0.2 至 1.5、0.2 至 0.5、0.3 至 0.4、0.6 至 1.0、0.7 至 0.9 或 0.8 至 1.0。在某些實施例中，15B 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 15B-TT)之游離 PS 為 30%或更少，諸如 2-30%、2-20%、2-10%、5-10%、8-10%或約 9%。在某些實施例中，血清型 15B 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 15B-TT)之 MSD (%)為 50-90%、60-85%、65-80%、70-80%、74-78%或約 76%。在某些實施例中，15B 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 15B-TT)之分子量可在約 2,000-15,000 kDa、10,000-15,000 kDa、2,000-10,000 kDa、3,000 至 7,500 kDa、4,000 至 6,000 kDa、5,000 至 6,000 kDa 或 5,500 至 5,600 kDa 之範圍內。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0124】血清型 15B 之上述任何參數均可視需要進行組合。舉例而言，在

某些實施例中，用於製造血清型 15B 多醣-蛋白質共軛物之活化的血清型 15B 多醣之 Do 為約 7.0，蛋白質(TT)與多醣之反應比為約 1.25:1。且在某些實施例中，最終共軛物中之多醣/載體蛋白比(PS/PR)為約 0.8 至 1.0，游離 PS 為約 8-10%，且 MSD%為約 74-78%，任擇地按 MALLS 計之分子量為約 5,500 至 5,600。

肺炎球菌多醣血清型 19A

【0125】活化的血清型 19A 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如用氧化劑活化後的氧化程度(Do)。在某些實施例中，活化的血清型 19A 多醣之氧化程度可為 20-40、30-40、35-40、30-35、20-30、22-28、24-28、25-30 或 25-27。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0126】血清型 19A 多醣-蛋白質共軛物可藉由不同的參數表徵，包括例如共軛後的蛋白質與多醣(PS/PR)比、游離糖(游離 PS)、MSD (%)或分子量(MALLS)。在某些實施例中，19A 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 19A-CRM₁₉₇)之 PS/PR 比可為 0.2 至 1.5、0.2 至 0.5、0.3 至 0.4、0.6 至 1.0、0.7 至 0.9 或 0.6 至 0.8。在某些實施例中，19A 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 19A-CRM₁₉₇)之游離 PS 為 50%或更少，諸如 10-40%、15-40%、20-40%、25-40%、25-35%、30 至 40%、30 至 35%、32 至 34%或約 33%。在某些實施例中，血清型 19A 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 19A-CRM₁₉₇)之 MSD (%)為 35-70%、40-50%、50-70%、60-70%、63-68%或約 65%。在某些實施例中，血清型 19A 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 19A-CRM₁₉₇)之分子量可在約 2,000-8,000 kDa、3,500-7,000 kDa、4,500-6,500 kDa、5,000 至 6,500 kDa 或 5,250 至 6,250 kDa 之範圍內。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0127】血清型 19A 之上述任何參數均可視需要進行組合。舉例而言，在某些實施例中，用於製造血清型 19A 多醣-蛋白質共軛物之活化的血清型 19A 多醣之 Do 為約 25 至 27，蛋白質(CRM₁₉₇)與多醣之反應比為約 1:1。且在某些實施例中，最終共軛物中之多醣/載體蛋白比(PS/PR)為約 0.7，游離 PS 為約 30-35%，

且 MSD%為約 63-68%，任擇地按 MALLS 計之分子量為約 5,250 至 6,250。

肺炎球菌多醣血清型 19F

【0128】活化的血清型 19F 莢膜多醣可藉由不同的參數表徵，包括例如用氧化劑活化後的氧化程度(Do)。在某些實施例中，活化的血清型 19F 多醣之氧化程度可為 20-50、30-50、40-50、25-35、20-30、22-28、25-30、23-27 或 24-26。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0129】血清型 19F 多醣-蛋白質共軛物可藉由不同的參數表徵，包括例如共軛後的蛋白質與多醣(PS/PR)比、MSD (%)或游離糖(游離 PS)。在某些實施例中，19F 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 19F-CRM₁₉₇)之 PS/PR 比可為 0.2 至 1.5、0.2 至 0.5、0.3 至 0.4、0.6 至 1.0、0.7 至 0.9 或 0.6 至 0.8。在某些實施例中，血清型 19F 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 19F-CRM₁₉₇)之 MSD (%)為 25-80%、35-75%、40-60%、70-80%、75-80%或約 77%。在某些實施例中，血清型 19F 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 19F-CRM₁₉₇)之游離 PS 為 30%或更少，諸如 2-30%、2-20%、2-10%、2-9%、3-7%、4-6%或約 5%。

【0130】血清型 19F 之上述任何參數均可視需要進行組合。舉例而言，在某些實施例中，用於製造血清型 19F 多醣-蛋白質共軛物之活化的血清型 19F 多醣之 Do 為約 24 至 26，蛋白質(CRM₁₉₇)與多醣之反應比為約 1.5:1。且在某些實施例中，最終共軛物中之多醣/載體蛋白比(PS/PR)為約 0.7，游離 PS 為約 4-6%，且 MSD%為約 75-80%。

肺炎球菌多醣血清型 4

【0131】血清型 4 多醣-蛋白質共軛物可藉由不同的參數表徵，包括例如共軛後的蛋白質與多醣(PS/PR)比、游離糖(游離 PS)、MSD (%)或分子量(MALLS)。在某些實施例中，4 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 4-CRM₁₉₇)之 PS/PR 比可為 0.2 至 1.5、0.8 至 1.1、0.8 至 1.3、0.9 至 1.1 或約 1.0。在某些實施例中，血清型 4 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 4-CRM₁₉₇)之游離 PS 為 40%或更少，諸如 5-30%、

15-35%、5-15%、7-13%、9-11%或約 10%。在某些實施例中，血清型 4 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 4-CRM₁₉₇)之 MSD (%)為 40-80%、45-75%、45-55%、60-75%或 70-75%。在某些實施例中，血清型 4 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 4-CRM₁₉₇)之分子量可在約 500-2,500 kDa、500-1,000 kDa、1,000-2,000 kDa、1,500 至 2,000 kDa、1,800 至 2,000 kDa 或 1,850 至 1,950 kDa 之範圍內。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0132】血清型 4 之上述任何參數均可視需要進行組合。舉例而言，在某些實施例中，用於製造血清型 4 多醣-蛋白質共軛物之活化的血清型 4 多醣之 Do 為約 1.4，蛋白質(CRM₁₉₇)與多醣之反應比為約 1.25:1。且在某些實施例中，最終共軛物中之多醣/載體蛋白比(PS/PR)為約 1.0，游離 PS 為約 9-11%，且 MSD% 為約 70-75%，任擇地按 MALLS 計之分子量為約 1,850 至 1,950。

肺炎球菌多醣血清型 9V

【0133】血清型 9V 多醣-蛋白質共軛物可藉由不同的參數表徵，包括例如共軛後的蛋白質與多醣(PS/PR)比、游離糖(游離 PS)、MSD (%)或分子量(MALLS)。在某些實施例中，9V 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 9V-CRM₁₉₇)之 PS/PR 比可為 0.2 至 1.5、0.2 至 0.5、0.3 至 0.4、0.8 至 1.3、1.0 至 1.2 或約 1.1。在某些實施例中，血清型 9V 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 9V-CRM₁₉₇)之游離 PS 為 35%或更少，諸如 10-35%、20-35%、5-15%、7-13%、9-11%或約 10%。在某些實施例中，血清型 9V 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如 9V-CRM₁₉₇)之 MSD (%)為 40-80%、45-75%、45-60%、50-65%、55-65、57-61%或約 59%。在某些實施例中，血清型 9V 莢膜多醣-蛋白質共軛物(例如(9V-CRM₁₉₇))之分子量可在約 500-2,000 kDa、500-1,500 kDa、1,000-2,000 kDa、1,000 至 1,500 kDa、1,000 至 1,200 kDa 或 1,100 至 1,200 kDa 之範圍內。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0134】血清型 9V 之上述任何參數均可視需要進行組合。舉例而言，在

某些實施例中，用於製造血清型 9V 多醣-蛋白質共軛物之活化的血清型 9V 多醣之 Do 為約 7.4，蛋白質(CRM₁₉₇)與多醣之反應比為約 1.25:1。且在某些實施例中，最終共軛物中之多醣/載體蛋白比(PS/PR)為約 1.1，游離 PS 為約 9-11%，且 MSD% 為約 57-61%，任擇地按 MALLS 計之分子量為約 1,100 至 1,200。

【0135】

多價肺炎球菌共軛物組成物及其製造方法

【0136】 本揭示案提供包含不同肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體。本文描述多價肺炎球菌共軛物組成物之不同態樣及實施例。

【0137】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 22-27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【0138】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型為 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 及 35B。此多價肺炎球菌共軛物組成物亦稱為 PCV-27。

【0139】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含肺炎球菌莢膜多

醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 26 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。此多價肺炎球菌共軛物組成物亦稱為 PCV-26。在 PCV-26 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型中之至少一者為 35B。在 PCV-26 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型包含或由 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、23B 及 24F 之四種血清型組成。舉例而言，PCV-26 包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物可包含或由 26 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型為：

- 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 及 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 及 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 及 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 及 24F；或
- 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 及 24F

【0140】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 25 種不同的

肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。此多價肺炎球菌共軛物組成物亦稱為 PCV-25。在 PCV-25 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型中之至少一者為 35B。在 PCV-25 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型包含或由 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、23B 及 24F 之三種血清型組成。舉例而言，PCV-25 包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物可包含或由 25 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型為：

- 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 24F；或

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 及 24F。

【0141】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 24 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。此多價肺炎球菌共軛物組成物亦稱為 PCV-24。在 PCV-24 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型中之至少一者為 35B。在 PCV-24 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型包含或由 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、23B 及 24F 之二種血清型組成。舉例而言，PCV-24 包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物可包含或由 24 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型為：

a) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F、35B、15A 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 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 及 24F；或

j) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F、35B、23B 及 24F。

【0142】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 23 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。此多價肺炎球菌共軛物組成物亦稱為 PCV-23。在 PCV-23 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型中之至少一者為 35B。在 PCV-23 之某些實施例中，肺炎鏈球菌血清型包含或由 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、

15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、23B 及 24F 之一種血清型組成。舉例而言，PCV-23 包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物可包含或由 23 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型為：

- a) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F、35B 及 15A；
- b) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F、35B 及 15C；
- c) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F、35B 及 23A；
- d) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F、35B 及 23B；或
- e) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F、35B 及 24F。

【0143】 在一個態樣中，多價肺炎球菌共軛物組成物包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含或由 22 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。此多價肺炎球菌共軛物組成物亦稱為 PCV-22。舉例而言，PCV-22 包含肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物可包含或由 22 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物組成，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中

肺炎鏈球菌血清型為：

- a) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 15A；
- b) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 15C；
- c) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 23A；
- d) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 23B；
- e) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 24F；或
- f) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B。

【0144】 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 及 PCV-27 實施例亦可包括除血清型 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 及 35B 以外的感興趣的肺炎鏈球菌血清型。舉例而言，在某些實施例中，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 進一步包含肺炎鏈球菌血清型 2、12A、16F、17F、20A、20B、20F、31、45 及 46 中之一或多者。在某些實施例中，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 進一步包含肺炎鏈球菌血清型 6C、6D、7B、7C、18B、21、22A、24B、27、28A、34、35F、38 及 39 中之一或多者。其他感興趣的肺炎鏈球菌血清型亦可添加至 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 中之任一者中。

【0145】 亦可用除血清型 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 及 35B 以外的一或多種感興趣的肺炎鏈球菌血清型置換 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 之肺炎鏈球菌血清型中之一或多者。舉例而言，在某些實施例中，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 中之血清型 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 及 35B 中之一或多者用肺炎鏈球菌血清型 2、12A、14、16F、20A、20B、20F、31、45 及 46 中之一或多者置換。在某些實施例中，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 中之血清型 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 及 35B 中之一或多者用肺炎鏈球菌血清型 6C、6D、7B、7C、18B、21、22A、24B、27、28A、34、35F、38 及 39 中之一或多者置換。其他感興趣的肺炎鏈球菌血清型亦可用於置換 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 中之任一者中之血清型 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 及 35B 中之一或多者。

【0146】 載體蛋白

【0147】 在多醣-蛋白質共軛物疫苗中，載體蛋白與多醣抗原共軛以形成糖共軛物。載體蛋白有助於增強對多醣抗原之免疫反應(例如抗體反應)。載體蛋白應能夠使用標準共軛程序與肺炎球菌多醣共軛。

【0148】 可用於糖共軛物中之載體蛋白包括但不限於白喉類毒素(DT)、破傷風類毒素(TT)、TT 之片段 C、CRM₁₉₇(白喉毒素之基因衍生之無毒變體，其保留野生型白喉毒素之免疫學特性)、其他基因衍生之白喉毒素變體(例如，CRM176、CRM228、CRM45 (Uchida 等人 (1973) *J. Biol. Chem.* 218:3838-3844)、CRM9、CRM102、CRM103 或 CRM107；及 Nicholls 及 Youle 在 *Genetically Engineered Toxins*, Ed: Frankel, Marcel Dekker Inc. (1992)中所描述之其他突變；缺

失或 Glu-148 突變成 Asp、Gln 或 Ser 及/或 Ala 158 突變成 Gly 以及美國專利第 4,709,017 號及第 4,950,740 號中所揭示之其他突變；至少一或多個殘基 Lys 516、Lys 526、Phe 530 及/或 Lys 534 之突變及美國專利第 5,917,017 號及第 6,455,673 號中所揭示之其他突變；或美國專利第 5,843,711 號中所揭示之片段；肺炎鏈球菌溶血素(ply) (Kuo 等人 (1995) *Infect Immun* 63:2706-2713)，包括以某種方式解毒的 ply，例如 dPLY-GMBS (WO 2004/081515、WO 2006/032499)或 dPLY-formol；PhtX，包括 PhtA、PhtB、PhtD、PhtE (WO 00/37105 及 WO 00/39299 中所揭示之 PhtA、PhtB、PhtD 或 PhtE 的序列)及 Pht 蛋白之融合物，例如 PhtDE 融合物、PhtBE 融合物、Pht A-E (WO 01/98334、WO 03/054007、WO 2009/000826)；腦膜炎球菌外膜蛋白(OMPC)，其通常自腦膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)血清群 B 提取(EP0372501)；PorB (來自腦膜炎奈瑟菌)；PD (流感嗜血桿菌蛋白 D；參見例如 EP0594610 B)；或其免疫學功能等效物；合成肽(EP0378881、EPO427347)；熱休克蛋白(WO 93/17712、WO 94/03208)；百日咳蛋白(WO 98/58668、EPO471177)；細胞介素；淋巴介質；生長因子或激素(WO 91/01146)；包含來自各種病原體衍生抗原之多個人類 CD4+ T 細胞抗原決定基之人工蛋白 (Falugi 等人 (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824)，諸如 N19 蛋白(Baraldoi 等人 (2004) *Infect Immun* 72:4884-4887)肺炎球菌表面蛋白 PspA (WO 02/091998)；鐵攝取蛋白(WO 01/72337)；艱難梭菌(*Clostridium difficile*)之毒素 A 或 B (WO 00/61761)；運鐵蛋白結合蛋白；肺炎球菌黏附蛋白(PsaA)；重組綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒素 A (特別是其無毒突變體(諸如帶有在麩胺酸 553 處之取代的外毒素 A (Douglas 等人 (1987) *J. Bacteriol.* 169(11):4967-4971))。其他蛋白，諸如卵白蛋白、匙孔螺血氰蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或結核菌素之純化蛋白衍生物(PPD)亦可用作載體蛋白。其他適合之載體蛋白包括不活化的細菌毒素，諸如霍亂類毒素(例如，如 WO 2004/083251 中所述)、大腸桿菌 LT、大腸桿菌 ST 及來自綠膿桿菌之外毒素 A，且其免疫學功能等效物亦可用作本發

明中之載體蛋白。當在本說明書中提及每一種載體蛋白時，其應理解為涵蓋其免疫學功能等效物。

【0149】在某些實施例中，糖共軛物之載體蛋白係選自由以下組成之群：TT (包括 TT 之片段 C)、DT (包括 DT 變體，諸如 CRM₁₉₇ 及上文所論述之其他變體)、PD、PhtX、PhtD、PhtDE 融合物(尤其 WO 01/98334 及 WO 03/054007 中所揭示之彼等融合物)、解毒的肺炎鏈球菌溶血素、PorB、N19 蛋白、PspA、OMPC、艱難梭菌之毒素 A 或 B 及 PsaA。當在本說明書中提及每一種載體蛋白時，其應理解為涵蓋其免疫學功能等效物。熟習此項技術者應瞭解，例如，當在本說明書中提及 DT 時，亦包括 DT 突變體，亦即其免疫學功能等效物，包括但不限於上文所論述之彼等免疫學功能等效物。

【0150】在某些實施例中，糖共軛物之載體蛋白係選自由 DT (白喉類毒素)、CRM₁₉₇、TT (破傷風類毒素)、TT 之片段 C 及 PD (流感嗜血桿菌蛋白 D) 組成之群。

【0151】在一個實施例中，本發明之糖共軛物之載體蛋白可為 DT (白喉類毒素)。天然存在的或野生型白喉毒素可自包括美國菌種保存中心(ATCC)之各種公眾來源購得之產毒菌株獲得。如本文所用，術語 DT (白喉類毒素)意欲包括充當其功能等效物之所有 DT 變體。此類 DT 突變體包括例如 CRM176、CRM228、CRM45、CRM9、CRM102、CRM103 或 CRM107；與野生型 DT 相比 Glu148 突變成 Asp 或缺失(美國專利第 4,709,017 號中所揭示)；美國專利第 4,709,017 號及第 4,950,740 號中所揭示之 Glu148 缺失或突變成 Asp、Ala158 缺失或突變成 Gly；美國專利第 5,917,017 號中所揭示之至少一或多個選自由 Lys 516、Lys 526、Phe 530 及 Lys 534 組成之群之殘基的突變；及美國專利第 6,455,673 號中所揭示之 Glu148、Glu349、Lys516 或/及 Phe530 之突變；或美國專利第 5,843,711 號中之突變體及其類似物，但不限於此。在一個實施例中，經分離之莢膜糖與 CRM₁₉₇ 蛋白共軛。CRM₁₉₇ 蛋白為白喉毒素之無毒形式，其保留野生型白喉毒素之免疫

學特性。CRM₁₉₇係由受無毒噬菌體 $\beta_{197\text{tox}}$ 感染之白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium diphtheriae*)產生，該無毒噬菌體由產毒棒狀桿菌噬菌體 β 之亞硝基胍突變誘發產生(Uchida 等人 (1971) *Nature New Biology* 233:8-11)。CRM₁₉₇ 蛋白具有與白喉毒素相同的分子量，但與之不同之處在於結構基因中之單鹼基變化(鳥嘌呤變為腺嘌呤)。此單鹼基變化造成成熟蛋白中之胺基酸取代(麩胺酸取代甘胺酸)，且消除白喉毒素之毒性。CRM₁₉₇ 蛋白為安全且有效的 T 細胞依賴性醣類載體。關於 CRM₁₉₇ 及其生產之其他細節可見於例如美國專利第 5,614,382 號中，其以全文引用之方式併入本文中。

【0152】 在另一個實施例中，糖共軛物之載體蛋白為 TT (破傷風類毒素)。破傷風類毒素在全世界範圍內製備且用於針對由破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)引起之破傷風(或牙關緊閉)的大規模免疫接種。破傷風類毒素亦可單獨及與白喉及/或百日咳疫苗組合使用。母體蛋白破傷風毒素一般在破傷風梭菌之培養物中獲得。破傷風毒素為一種約 150 kDa 之蛋白質，且由二硫鍵連接之二個次單元(約 100 kDa 及約 50 kDa)組成。該毒素通常用甲醛解毒，且可使用已知方法自培養物濾液純化，諸如硫酸銨沈澱法(參見例如 Levin 及 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.))或層析技術，如 WO 1996/025425 中所揭示。破傷風毒素亦可藉由重組基因的手段不活化。

【0153】 在另一個實施例中，糖共軛物之載體蛋白可為 PD (流感嗜血桿菌蛋白 D；參見例如 EP 0594610B)。

【0154】 在某些實施例中，在多價肺炎球菌共軛物組成物中使用單一載體蛋白。在某些實施例中，使用不止一種蛋白載體(「混合載體」)。在此等混合載體實施例中，可使用 2、3、4、5、6、7、8、9 或更多種載體蛋白。通常，混合載體實施例包括二種載體蛋白。舉例而言，在某些實施例中，某些莢膜多醣與第一蛋白載體共軛，而其餘莢膜多醣與第二蛋白載體連接。

【0155】 在一個態樣中，第一蛋白載體為 CRM₁₉₇ 且第二蛋白載體為破傷風類毒素。在某些實施例中，二種莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之二種莢膜多醣係選自由血清型 1、3 及 5 組成之群。在某些實施例中，四種莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之四種莢膜多醣係選自由血清型 1、3、5、15B 及 22F 組成之群。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之四種莢膜多醣為血清型 1、5、15B 及 22F；血清型 1、3、15B 及 22F；或血清型 3、5、15B 及 22F。

【0156】 在 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 之一些實施例中，來自血清型 1 及 5 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而來自其餘血清型之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 之另一個實施例中，來自血清型 1 及 3 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 之另一個實施例中，來自血清型 3 及 5 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 之另一個實施例中，來自血清型 1、5、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 之另一個實施例中，來自血清型 1、3、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在 PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27 之另一個實施例中，來自血清型 3、5、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，而其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【0157】 本文所述之組成物及疫苗中使用的肺炎球菌莢膜多醣，包括來自血清型 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 及 35B 之莢膜

多醣，可使用任何可用的技術由肺炎鏈球菌製備，包括一般熟習此項技術者已知的標準技術，包括例如 WO 2006/110381、WO 2008/118752、WO 2006/110352 以及美國專利申請公開案第 2006/0228380 號、第 2006/0228381 號、第 2007/0184071 號、第 2007/0184072 號、第 2007/0231340 號、第 2008/0102498 號及第 2008/0286838 號中所揭示之彼等技術，該等專利均以全文引用的方式併入。舉例而言，各肺炎球菌莢膜多醣血清型可在培養基(例如以大豆為主之培養基)中生長。將細胞溶解，且經由離心、沈澱、超濾及/或管柱層析自溶胞物中純化各個多醣。另外，可使用合成方案產生肺炎球菌莢膜寡糖。

【0158】 肺炎鏈球菌之莢膜多醣包含重複的寡醣單元，其可含有至多 8 個糖殘基。莢膜糖抗原可為全長多醣，或其可減小大小(例如，單個寡醣單元，或比天然長度短的重複寡醣單元的糖鏈)。莢膜多醣的大小可藉由此項技術中已知的各種方法來減小，諸如酸水解處理；過氧化氫處理；藉由高壓均質機分級，任擇地隨後進行過氧化氫處理以產生寡醣片段；或微流體化。在某些實施例中，在使經純化之莢膜多醣與氧化劑反應以產生活化的莢膜多醣之前，對經純化之莢膜多醣進行分級步驟，諸如酸水解處理或微流體化，以減小其大小。在某些實施例中，在使經純化之莢膜多醣與氧化劑反應以產生活化的莢膜多醣之前，不對莢膜多醣進行分級步驟，諸如酸水解處理或微流體化。

【0159】 各血清型之肺炎球菌共軛物可藉由將各血清型之莢膜多醣與載體蛋白共軛來製備。不同的肺炎球菌共軛物可調配成組成物，包括單劑型調配物。

【0160】 莢膜多醣之活化

【0161】 為了製備多醣-蛋白質共軛物，可對由各肺炎球菌血清型製備之莢膜多醣進行化學活化，使得莢膜多醣可與載體蛋白反應。一旦活化，各莢膜多醣可分別與載體蛋白共軛以形成糖共軛物。多醣之化學活化及隨後與載體蛋白共軛可藉由習知方法來達成。

【0162】 舉例而言，在莢膜多醣末端之鄰位羥基可藉由諸如過碘酸鹽(包括

過碘酸鈉、過碘酸鉀或過碘酸)之氧化劑氧化成醛基，如美國專利第 4,365,170 號、第 4,673,574 號及第 4,902,506 號中所揭示，其特此以全文引用之方式併入。過碘酸鹽隨機氧化碳化合物之鄰位羥基以形成反應性醛基，且造成 C-C 鍵之裂解。術語「過碘酸鹽」包括過碘酸鹽及過碘酸。此術語亦包括偏過碘酸鹽(IO_4^-)及原過碘酸鹽(IO_6^{5-})。術語「過碘酸鹽」亦包括各種過碘酸鹽，包括過碘酸鈉及過碘酸鉀。在某些實施例中，多醣可在偏過碘酸鈉存在下氧化。

【0163】 在某些實施例中，過碘酸鹽可以每 1 μg 多醣約 0.03-0.17 μg 之量使用。在某些實施例中，過碘酸鹽可以每 1 μg 多醣約 0.025-0.18 μg 或約 0.02-0.19 μg 之量使用。糖可在上述範圍內視需要活化。在該範圍之外，效果可能不令人滿意。

【0164】 多醣亦可用四氟硼酸 1-氰基-4-二甲基胺基吡錠(CDAP)活化以形成氰酸酯。隨後，將活化的多醣直接或經由間隔基團或連接基團與載體蛋白上的胺基偶合。

【0165】 舉例而言，間隔基團可為肱胺或半肱胺，以得到硫醇化多醣，其可經由與馬來醯亞胺活化之載體蛋白(例如，使用 N-[γ -馬來醯亞胺基丁醯氧基]琥珀醯亞胺酯(GMBS))或鹵代乙醯化之載體蛋白(例如，使用碘乙醯胺、溴乙酸 N-琥珀醯亞胺基酯(SBA；SIB)、N-琥珀醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)、磺基琥珀醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(sulfo-SIAB)、碘乙酸 N-琥珀醯亞胺基酯(SIA)或 3-[溴乙醯胺基]丙酸琥珀醯亞胺基酯(SBAP))反應後獲得之硫醚鍵與載體偶合。較佳地，氰酸酯(任擇地由 COAP 化學物質製備)與己烷二胺或己二酸二醯肼(AOH)偶合，且使用碳化二亞胺(例如，EDAC 或 EDC)化學物質，經由蛋白載體上之羧基，將胺基衍生之糖與載體蛋白共軛。此類共軛物描述於例如 WO 93/15760、WO 95/08348 及 WO 96/129094 中，其均特此以全文引用之方式併入。

【0166】 在活化步驟後，任擇地將活化的莢膜多醣凍乾，隨後將活化的多

醣與載體蛋白混合。活化的多醣及載體蛋白可分別凍乾，或可彼此組合且隨後凍乾。

【0167】 活化的莢膜多醣可在任何冷凍保護劑，諸如糖存在下凍乾。舉例而言，糖可選自但不限於蔗糖、海藻糖、棉子糖、水蘇糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇及異麥芽糖醇(palatinin)。在某些實施例中，糖為蔗糖。隨後，在共軛反應之前，將凍乾的多醣再懸浮於溶劑中。凍乾的活化莢膜多醣可與包含載體蛋白之溶液混合。或者，在共軛反應之前，將共同凍乾的多醣及載體蛋白再懸浮於溶劑中。

【0168】 活化的莢膜多醣與載體蛋白之共軛

【0169】 活化的莢膜多醣及載體蛋白之共軛可例如藉由還原胺化來實現，如美國專利申請公開案第 2006/0228380 號、第 2007/0231340 號、第 2007/0184071 號及第 2007/0184072 號、WO 2006/110381、WO 2008/079653 及 WO 2008/143709 中所述，其均以全文引用的方式併入。舉例而言，活化的莢膜多醣及載體蛋白可與還原劑反應以形成共軛物。適合之還原劑包括硼氫化物，諸如氰基硼氫化鈉、硼烷-吡啶、三乙醯氧基硼氫化鈉、鈉或硼氫化物、或硼氫化物交換樹脂。在還原反應結束時，可能會有未反應的醛基留在共軛物中。未反應的醛基可使用適合之封端劑，諸如硼氫化鈉(NaBH_4)來封端。在一個實施例中，還原反應在水性溶劑中進行。在另一個實施例中，該反應在非質子性溶劑中進行。在一個實施例中，還原反應在 DMSO (二甲亞砜)或 DMF (二甲基甲醯胺)溶劑中進行。其他可能的還原劑包括但不限於胺-硼烷，諸如吡啶-硼烷、2-甲基吡啶-硼烷、2,6-二硼烷-甲醇、二甲胺-硼烷、t-BuMeiPrN-BH₃、苯甲胺-BH₃ 或 5-乙基-2-甲基吡啶-硼烷(PEMB)。

【0170】 活化的莢膜多醣可直接或經由使用間隔基團或連接基團，諸如雙官能連接基團間接與載體蛋白共軛。連接基團任擇地為異雙官能或同雙官能，具有例如一個反應性胺基及一個反應性羧酸基、2 個反應性胺基或二個反應性羧

酸基。

【0171】 其他適合之共軛技術使用碳化二亞胺、醯肼、活性酯、降冰片烷、對硝基苯甲酸、N-羥基琥珀醯亞胺、S--NHS、EDC、TSTU，如國際專利申請公開案第 WO 98/42721 號所述，其以全文引用之方式併入。共軛可涉及羰基連接基團，其可藉由糖之游離羥基與 1,1'-羰基二咪唑(CDI)反應形成(參見 Bethell 等人 (1979) *J. Biol. Chem.* 254:2572-2574；Hearn 等人 (1981) *J. Chromatogr.* 218:509-518)，隨後與蛋白質反應形成胺基甲酸酯鍵。此可能涉及將變旋異構端還原成一級羥基，一級羥基之任擇的保護/去保護，一級羥基與 CDI 反應以形成 CDI 胺基甲酸酯中間物，以及 CDI 胺基甲酸酯中間物與蛋白質上之胺基偶合。

【0172】 肺炎球菌共軛物疫苗之多醣與載體蛋白之比率通常在 0.3-3.0 (w/w)之範圍內，但可隨血清型而變化。該比率可藉由獨立量測所存在之蛋白質及多醣的量，或藉由此項技術中已知的直接量測該比率之方法來確定。包括 ¹H NMR 光譜法或 SEC-HPLC-UV/RI 與雙重監測(例如折射率及 UV，分別用於監測總物質及蛋白質含量)之方法可在共軛物之大小分佈上以及藉由 SEC-HPLC-MALLS 或 MALDI-TOF-MS 對糖/蛋白質比進行剖析。

【0173】 由此獲得之多醣-蛋白質共軛物可藉由各種方法純化及富集。此等方法包括濃縮/透濾、管柱層析及深度過濾。將經純化之多醣-蛋白質共軛物組合以調配多價肺炎球菌共軛物組成物，其可用作疫苗。

【0174】 調配物

【0175】 疫苗組成物之調配可使用此項技術中公認的方法來完成。疫苗組成物經調配以與其預期的投與途徑相容。各個肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物可與生理學上可接受之媒劑一起調配以製備組成物。此類媒劑之實例包括但不限於水、緩衝鹽水、多元醇(例如，甘油、丙二醇、液體聚乙二醇)及右旋糖溶液。

【0176】 在一些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物進一步包含佐劑。如本文所用，「佐劑」係指非特異性地增強對抗原之免疫反應的物質或媒劑。

佐劑可包括但不限於以下：

【0177】 (1)鋁鹽(礬)，諸如氫氧化鋁、磷酸鋁、硫酸鋁、硫酸羥基磷酸鋁等；

【0178】 (2)水包油型乳液調配物(具有或不具有其他特定免疫刺激劑，諸如胞壁醯肽(下文定義)或細菌細胞壁組分)，諸如(a) MF59 (WO 90/14837)，含有 5% 角鯊烯、0.5% Tween 80 及 0.5% Span 85 (任擇地含有各種量之 MTP-PE (參見下文)，但並非必需的)，使用微流化床諸如型號 110Y 微流化床(Microfluidics, Newton, Mass.)調配成次微米級粒子，(b) SAF，含有 10%角鯊烯、0.4% Tween 80、5%普洛尼克嵌段聚合物 L121 及 thr-MDP (參見下文)，微流化成次微米級乳液或渦旋以產生較大粒度乳液，及(c) Ribi™佐劑系統(RAS) (Corixa, Hamilton, Mont.)，含有 2%角鯊烯、0.2% Tween 80 及一或多種細菌細胞壁組分，該等細菌細胞壁組分來自由以下組成之群：美國專利第 4,912,094 號(Corixa)中所述之 3-O-去醯化單磷醯脂 A (MPL™)、海藻糖二黴菌酸酯(TDM)及細胞壁骨架(CWS)，較佳 MPL+CWS (Detox™)；

【0179】 (3)皂素佐劑，諸如 Quil A 或 STIMULON™ QS-21 (Antigenics, Framingham, Mass.) (美國專利第 5,057,540 號)或由其產生之粒子，諸如免疫刺激複合物(ISCOM)；

【0180】 (4)細菌脂多醣、合成的脂質 A 類似物，諸如胺基烷基葡萄糖胺磷酸化合物(AGP)或其衍生物或類似物，其可購自 Corixa，且描述於美國專利第 6,113,918 號中；一種此類 AGP 為 2-[(R)-3-十四烷醯氧基十四烷醯胺基]乙基 2-去氧-4-O-磷醯基-3-O-[(R)-3-十四烷醯氧基十四烷醯]-2-[(R)-3-十四烷醯氧基十四烷醯胺基]-b-D-葡萄糖吡喃糖苷，其亦稱為 529 (以前稱為 RC529)，其調配為水性形式或穩定的乳液，

【0181】 (5)合成的多核苷酸，諸如含有 CpG 基元之寡核苷酸(美國專利第 6,207,646 號)；

【0182】 (6)細胞介素，諸如介白素(例如，IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18等)、干擾素(例如， γ 干擾素)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、巨噬細胞群落刺激因子(M-CSF)、腫瘤壞死因子(TNF)、共刺激分子 B7-1 及 B7-2 等；

【0183】 (7)細菌 ADP 核糖基化毒素之解毒突變體，諸如野生型或突變型之霍亂毒素(CT)，例如其中根據 WO 00/18434 (亦參見 WO 02/098368 及 WO 02/098369)在胺基酸位置 29 處之麩胺酸經另一種胺基酸，較佳組胺酸置換；百日咳毒素(PT)；或大腸桿菌不耐熱毒素(LT)，尤其 LT-K63、LT-R72、CT-S109、PT-K9/G129 (參見例如 WO 93/13302 及 WO 92/19265)；及

【0184】 (8)補體組分，諸如補體組分 C3d 之三聚體；

【0185】 (9)生物分子，諸如脂質及共刺激分子。例示性生物佐劑包括 AS04、IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L 及 41 BBL。

【0186】 胞壁醯肽包括但不限於 N-乙醯基-胞壁醯基-L-蘇胺醯基-D-異麩醯胺酸(thr-MDP)、N-乙醯基-去甲胞壁醯基-L-丙胺酸-2-(1'-2'二棕櫚醯基-sn-甘油基-3-羥基磷醯氧基)-乙胺(MTP-PE)等。

【0187】 根據組成物中共軛物之量及價數適當選擇佐劑。在一些實施例中，佐劑為以鋁為主之佐劑。當使用以鋁為主之佐劑時，基於鋁元素之組成物中之鋁元素可經添加以佔 0.01 mg/mL 至 1 mg/mL。通常，單次 0.5 ml 疫苗劑量經調配以含有約 0.1 mg 至 2.5 mg 以鋁為主之佐劑。在其他實施例中，單次 0.5 ml 疫苗劑量經調配以含有 0.1 mg 至 2 mg、0.1 mg 至 1 mg、0.1 mg 至 0.5 mg、0.1 mg 至 0.2 mg、0.125 mg 至 2.5 mg、0.125 mg 至 0.5 mg、0.125 mg 至 0.2 mg 或 0.125 至 0.25 mg 以鋁為主之佐劑。在某些實施例中，單次 0.5 ml 疫苗劑量經調配以含有約 0.125 mg 至約 0.250 mg 以鋁為主之佐劑。在某些實施例中，單次 0.5 ml 疫苗劑量經調配以含有約 0.125 mg 以鋁為主之佐劑。在某些實施例中，單次 0.5 ml

疫苗劑量經調配以含有約 0.250 mg 以鋁為主之佐劑。

【0188】 在特定實施例中，佐劑係選自由磷酸鋁、硫酸鋁及氫氧化鋁組成之群。

【0189】 在特定實施例中，佐劑為磷酸鋁。

【0190】 在一些實施例中，組成物用作針對肺炎鏈球菌感染之疫苗。

肺炎球菌莢膜多醣-蛋白載體共軛物之表徵

【0191】 在某些實施例中，多醣-蛋白載體共軛物之分子量可為 100-10,000 kDa。在某些實施例中，該共軛物之分子量為 200-9,000 kDa。在某些實施例中，該共軛物之分子量為 300-8,000 kDa。在某些實施例中，該共軛物之分子量為 400-7,000 kDa。在某些實施例中，該共軛物之分子量為 500-6,000 kDa。在某些實施例中，該共軛物之分子量為 600-5,000 kDa。在某些實施例中，該共軛物之分子量為 500-4,000 kDa 分子量。在任何上述範圍內之任何整數均作為本揭示案之一個實施例而涵蓋。

【0192】 當分子量在上述範圍內時，可以高產率穩定地形成共軛物。另外，可降低游離多醣之比例。另外，在上述分子量範圍內可實現優異的免疫原性。

【0193】 在將各個多醣-蛋白質共軛物純化後，將其混配以調配本揭示案之免疫原性組成物。

【0194】 本揭示案之血清型的糖-蛋白質共軛物可藉由多醣與蛋白載體之比率(多醣之量/蛋白載體之量，w/w)來表徵。

【0195】 在某些實施例中，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物中多醣與蛋白載體之比率(w/w)為 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 或 0.7-0.9 (例如，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 或約 2.5)。

【0196】 當多醣與蛋白載體之比率在上述範圍內時，可以高產率穩定地形

成共軛物。另外，可降低游離多醣之比例。另外，在上述範圍內可實現優異的免疫原性，並且可穩定地維持共軛物而不受其他血清型干擾。

【0197】 本揭示案之共軛物及免疫原性組成物可含有游離多醣，其不與蛋白載體共價共軛，但仍存在於多醣-蛋白載體共軛物組成物中。游離多醣可與多醣-蛋白載體共軛物非共價締合(亦即，非共價結合於、吸附於或包埋於多醣-蛋白載體共軛物)。

【0198】 在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 60%、約 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%或 15%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 60%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 50%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 40%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 30%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 25%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 20%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 15%之各血清型之游離多醣。在某些實施例中，以各血清型之多醣之總量計，各血清型之多醣-蛋白載體共軛物含有少於約 10%之各血清型之游離多醣。

【0199】 各血清型之多醣-蛋白載體共軛物亦可藉由其分子大小分佈(K_d)來表徵。可使用尺寸排阻層析介質(CL-4B；交聯瓊脂糖珠粒，4%)來確定共軛物之相對分子大小分佈。尺寸排阻層析(SEC)在重力進樣管柱中使用，以剖析共軛物之分子大小分佈。自介質之孔排阻的大分子比小分子更快溶離。使用溶離份收

集器收集管柱溶離液。藉由糖分析比色測試溶離份。為了測定 K_d ，對管柱進行校準，以確立分子被完全排阻之溶離份(V_0 ； $K_d = 0$)及代表最大保留之溶離份(V_i ； $K_d = 1$)。達到指定樣品屬性之溶離份(V_e)藉由表達式 $K_d = (V_e - V_0)/(V_i - V_0)$ 與 K_d 相關。

【0200】 在某些實施例中，至少 15% 之各血清型之多醣-蛋白載體共軛物在 CL-4B 管柱中之 K_d 可為 0.3 或以下。

【0201】 在某些實施例中，至少 20% 之各血清型之多醣-蛋白載體共軛物在 CL-4B 管柱中之 K_d 可為 0.3 或以下。在某些實施例中，至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85% 或 90% 之各血清型之多醣-蛋白載體共軛物在 CL-4B 管柱中之 K_d 可為 0.3 或以下。在某些實施例中，至少 60% 之各血清型之多醣-蛋白載體共軛物在 CL-4B 管柱中之 K_d 可為 0.3 或以下。在某些實施例中，至少 50-80% 之各血清型之多醣-蛋白載體共軛物在 CL-4B 管柱中之 K_d 可為 0.3 或以下。在某些實施例中，至少 65-80% 之各血清型之多醣-蛋白載體共軛物在 CL-4B 管柱中之 K_d 可為 0.3 或以下。在某些實施例中，至少 15-60% 之各血清型之醣-蛋白共軛物在 CL-4B 管柱中之 K_d 可為 0.3 或以下。

預防方法及用途

【0202】 在一個態樣中，本揭示案提供一種疫苗，其包含多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)及醫藥學上可接受之賦形劑。在一些實施例中，醫藥學上可接受之賦形劑至少包含緩衝劑，諸如琥珀酸鹽緩衝劑；鹽，諸如氯化鈉；及/或表面活性劑，諸如聚氧乙烯脫水山梨糖醇酯(例如，聚山梨醇酯 80)。

【0203】 在一些實施例中，該疫苗在人類個體中引發針對由肺炎鏈球菌感染引起之疾病的保護性免疫反應。

【0204】 根據另一個態樣，本揭示案提供一種預防肺炎鏈球菌感染或疾病

之方法，該方法包含向人類個體投與預防有效量之多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)或包含其之疫苗。多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)或包含其之疫苗可藉由任何途徑投與，包括例如藉由全身或黏膜途徑，如下文進一步詳細描述。

【0205】 在某些實施例中，人類個體為老年個體，且疾病為肺炎或侵襲性肺炎球菌病(IPD)。在某些實施例中，老年個體為至少 50 歲。在其他實施例中，老年個體為至少 55 歲。在其他實施例中，老年個體為至少 60 歲。

【0206】 在其他實施例中，人類個體為嬰兒，且疾病為肺炎、侵襲性肺炎球菌病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。在某些實施例中，嬰兒為 0-2 歲。在其他實施例中，嬰兒為 2 至 15 個月。

【0207】 在另一個實施例中，人類個體為 6 週至 17 歲，且疾病為肺炎、侵襲性肺炎球菌病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。在某些實施例中，人類個體為 6 週至 5 歲。在其他實施例中，人類個體為 5 至 17 歲。

【0208】 各疫苗劑量或預防有效量之混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物中共軛物之量可選擇為誘導預防而無顯著副作用之量。該量可視肺炎球菌血清型而變化。一般而言，各劑量可包括約 0.1 μg 至約 100 μg 多醣，具體地，約 0.1 至 10 μg ，且更具體地，約 1 μg 至約 5 μg 。特定疫苗之組分的最佳量可藉由涉及觀察個體之適當免疫反應的標準研究來確定。舉例而言，人類個體之疫苗接種量可藉由外推動物測試結果來確定。另外，可憑經驗確定劑量。

【0209】 在一些實施例中，疫苗或多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有約 1 μg 至約 5 μg 各莢膜多醣；約 20 μg 至約 85 μg 載體蛋白(例如，CRM₁₉₇)；及任擇地約 0.1 mg 至約 0.5 mg 元素鋁佐劑。在一些實施例中，疫苗或多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、

PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有除以約 4 μg 至約 5 μg 之量存在的血清型 6B 及任擇地血清型 3 之外，約 2 μg 至約 2.5 μg 各莢膜多醣；約 40 μg 至約 75 μg 蛋白載體(例如，CRM₁₉₇)；及任擇地約 0.1 mg 至約 0.25 mg 元素鋁佐劑。

【0210】 在一些實施例中，疫苗或混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有約 1 μg 至約 5 μg 各莢膜多醣；約 1 μg 至約 30 μg 第一載體蛋白(例如，TT)；約 20 μg 至約 100 μg 第二載體蛋白(例如，CRM₁₉₇)；及任擇地約 0.1 mg 至約 0.5 mg 元素鋁佐劑。

【0211】 在一些實施例中，疫苗或混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有除以約 4 μg 至約 5 μg 之量存在的血清型 6B 及任擇地血清型 3 之外，約 2 μg 至約 2.5 μg 各莢膜多醣；約 2 μg 至約 25 μg 第一載體蛋白(例如，TT)；約 40 μg 至約 100 μg 第二載體蛋白(例如，CRM₁₉₇)；及任擇地約 0.1 mg 至約 0.25 mg 元素鋁佐劑。

【0212】 在一些實施例中，疫苗或多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有除以約 4.4 μg 之量存在的血清型 6B 之外，約 2.2 μg 各莢膜多醣。

【0213】 在一些實施例中，疫苗或多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有約 2 μg 至約 2.5 μg 各莢膜多醣，但至多六種選自由血清型 1、3、4、5、6B、9V、19A 及 19F 組成之群之莢膜多醣除外，其各自以約 4 μg 至約 5 μg 之量存在。在一個實施例中，以約 4 μg 至約 5 μg 之量存在的至多六種莢膜多醣係選自由血清型 1、3、4、6B、9V、19A 及 19F 組成之群。在其他實施例中，疫苗或混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、

PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有約 2.2 μg 各莢膜多醣，但至多六種選自由血清型 1、3、4、5、6B、9V、19A 及 19F 組成之群之莢膜多醣除外，其各自以約 4.4 μg 之量存在。在一個實施例中，以約 4.4 μg 之量存在的至多六種莢膜多醣係選自由血清型 1、3、4、6B、9V、19A 及 19F 組成之群。

【0214】 在一些實施例中，疫苗或多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有約 2 μg 至約 2.5 μg 血清型 1、5、6A、7F、8、9N、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及/或 35B 之莢膜多醣，及約 4 μg 至約 5 μg 血清型 3、4、6B、9V、19A 及/或 19F 之莢膜多醣。

【0215】 在某些實施例中，疫苗或多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有約 2 至約 2.5 μg 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 及/或 35B 之莢膜多醣，及約 4 至約 5 μg 血清型 3 及/或 6B 之莢膜多醣。

【0216】 在一些實施例中，疫苗或多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可為單次 0.5 ml 劑量，其經調配以含有約 2 至約 2.5 μg 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 及/或 35B 之莢膜多醣，及約 4 至約 5 μg 血清型 6B 之莢膜多醣及/或約 8 至約 9 μg 血清型 3 之莢膜多醣，且更佳約 8.8 μg 血清型 3 之莢膜多醣。

【0217】 在某些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)或包含其之疫苗進一步包含氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0218】 在一些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可調配成液體調配物，其中來自血清型 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 及/或 35B 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與載體蛋白(例如 CRM₁₉₇)共軛。各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 血清型 6B 之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 40 µg 至約 100 µg 載體蛋白(例如 CRM₁₉₇)；約 0.125 至 0.250 mg 元素鋁(約 0.5 至約 1.2 mg 磷酸鋁)作為佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0219】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)包含二種或更多種載體蛋白(混合載體)。舉例而言，在某些實施例中，至少二種血清型與第一載體蛋白(例如破傷風類毒素)共軛，而其餘血清型與第二載體蛋白(例如 CRM₁₉₇)共軛。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之二種莢膜多醣係選自由血清型 1、3 及 5 組成之群。在某些實施例中，與破傷風類毒素共軛之二種莢膜多醣係選自由血清型 1、3、5、15B 及 22F 組成之群。代替或除選自血清型 1、3、5、15B 及 22F 之血清型之外，亦可將血清型 4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及/或 35B 中之一或多者與破傷風類毒素共軛。其他感興趣的血清型可與破傷風類毒素共軛。

【0220】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可調配成液體調配物，其中血清型 1 及 3 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛，且來自血清型 4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及/或 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 血清型 6B 之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 2 µg 至約 25 µg TT 載體蛋白(僅針對血清型 1 及 3)及約

40 µg 至約 100 µg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 至 0.250 mg 元素鋁(約 0.5 至約 1.2 mg 磷酸鋁)作為佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0221】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 1 及 5 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛，且來自血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及/或 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。在一個實施例中，各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 血清型 6B 及約 2.2-8.8 µg 血清型 3 之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 2 µg 至約 25 µg TT 載體蛋白(僅針對血清型 1 及 5)及約 40 µg 至約 100 µg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 至 0.250 mg 元素鋁(約 0.5 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。在某些實施例中，血清型 3 以約 2.2 µg 存在。在其他實施例中，血清型 3 以約 4.4 µg 存在。在其他實施例中，血清型 3 以約 8.8 µg 存在。在另一個實施例中，各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 至多六種選自由血清型 1、3、4、5、6B、9V、19A 及 19F 組成之群之莢膜多醣之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 2 µg 至約 25 µg TT 載體蛋白(僅針對血清型 1 及 5)及約 40 µg 至約 100 µg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 mg 至 0.250 mg 元素鋁(0.5 mg 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。在一個實施例中，約 4.4 µg 之至多六種莢膜多醣係選自由血清型 1、3、4、6B、9V、19A 及 19F 組成之群。在另一個實施例中，各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 血清型 3、4、6B、9V、19A 及 19F 之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 2 µg 至約 25 µg TT 載體蛋白(僅針對血清型 1 及 5)及約 40 µg 至約 100 µg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 mg 至 0.250 mg 元素鋁(0.5 mg 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。在另一個實施例中，各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 血清型 3 及 4 之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 2 µg 至約 25 µg TT 載體蛋白(僅針對血清型 1 及 5)及約 40 µg 至約 100

μg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 mg 至 0.250 mg 元素鋁(0.5 mg 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0222】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 3 及 5 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛，且來自血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 μg 6B 之外，約 2.2 μg 各莢膜多醣；約 2 μg 至約 25 μg TT 載體蛋白(僅針對血清型 3 及 5)及約 40 μg 至約 100 μg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 至 0.250 mg 元素鋁(約 0.5 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0223】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 1、3 及 5 以及血清型 15B 及 22F 之肺炎球菌莢膜多醣中之至少二者與破傷風類毒素共軛，而其餘血清型之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【0224】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 1、5、15B 及 22F 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 μg 6B 之外，約 2.2 μg 各莢膜多醣；約 2 μg 至約 25 μg TT 載體蛋白(僅針對血清型 3 及 5)及約 40 μg 至約 100 μg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 至 0.250 mg 元素鋁(約 0.5 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0225】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 1、3、15B 及 22F 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及

35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 6B 之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 2 µg 至約 25 µg TT 載體蛋白(僅針對血清型 3 及 5)及約 40 µg 至約 100 µg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 至 0.250 mg 元素鋁(約 0.5 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0226】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 3、5、15B 及 22F 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。各 0.5 mL 劑量可調配成含有以下之液體：除約 4.4 µg 6B 之外，約 2.2 µg 各莢膜多醣；約 2 µg 至約 25 µg TT 載體蛋白(僅針對血清型 3 及 5)及約 40 µg 至約 100 µg CRM₁₉₇ 載體蛋白；約 0.125 至 0.250 mg 元素鋁(約 0.5 至 1.2 mg 磷酸鋁)佐劑；及氯化鈉及琥珀酸鈉緩衝劑作為賦形劑。

【0227】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 1 及 5 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛。

【0228】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 3 及 5 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛。

【0229】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 1 及 3 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛。

【0230】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 1、5、15B 及 22F 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛。

【0231】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配成液體調配物，其中血清型 3、5、15B 及 22F 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛。

【0232】 在一些實施例中，混合載體、多價肺炎球菌共軛物組成物可調配

成液體調配物，其中血清型 1、3、15B 及 22F 之肺炎球菌莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛。

【0233】 在一些實施例中，液體調配物可在無防腐劑之情況下填充至單次劑量注射器中。在震盪後，液體調配物成為準備用於肌肉內投與之均勻白色懸浮液的疫苗。

【0234】 多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可以單次注射或作為免疫系列之一部分投與。舉例而言，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可以適當的間隔投與 2、3、4 或更多次，諸如 1、2、3、4、5 或 6 個月間隔或其組合。在一些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)在嬰兒出生後的前 15 個月內投與 4 次，包括例如在約 2、3、4 及 12-15 月齡時；在約 3、4、5 及 12-15 月齡時；或在約 2、4、6 及 12-15 月齡時。此第一劑量最早可在 6 週齡時投與。在另一個實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)在嬰兒出生後的前 15 個月內投與 3 次，包括例如在約 2、4 及 11-12 月齡時。

【0235】 多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)亦可包括一或多種來自肺炎鏈球菌之蛋白質。適合包含之肺炎鏈球菌蛋白質之實例包括國際專利申請案 WO02/083855 中鑑別之蛋白質，以及國際專利申請案 WO02/053761 中所述之蛋白質。

【0236】 多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可經由一般熟習此項技術者已知的一或多種投與途徑，諸如非經腸、經皮或經黏膜、鼻內、肌肉內、腹膜內、皮內、靜脈內或皮下途徑投與個體，且據此調配。多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可經調配以與其預期的投與途徑

相容。

【0237】 在一些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可作為液體調配物藉由肌肉內、腹膜內、皮下、靜脈內、動脈內或經皮注射或呼吸道黏膜注射投與。多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可以液體形式或凍乾形式調配。在一些實施例中，可注射組成物以習知形式製備，呈液體溶液或懸浮液形式、在注射前在液體中溶解或懸浮之固體形式或乳液形式。在一些實施例中，注射溶液及懸浮液由無菌粉末或顆粒製備。在調配及製造藉由此等途徑投與之醫藥劑時的一般考慮因素可見於例如 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 19 版, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995；其以引用的方式併入本文中。目前，經口或鼻用噴霧或氣溶膠途徑(例如藉由吸入)最常用於將治療劑直接遞送至肺及呼吸系統。在一些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)使用遞送計量劑量之組成物的裝置投與。適用於遞送本文所述之皮內醫藥組成物的裝置包括短針裝置，諸如美國專利第 4,886,499 號、美國專利第 5,190,521 號、美國專利第 5,328,483 號、美國專利第 5,527,288 號、美國專利第 4,270,537 號、美國專利第 5,015,235 號、美國專利第 5,141,496 號、美國專利第 5,417,662 號(其均以引用的方式併入本文中)中所述之裝置。皮內組成物亦可藉由限制針頭進入皮膚之有效穿透長度的裝置來投與，諸如以引用的方式併入本文中之 WO1999/34850 中所述之裝置，及其功能等效物。噴射注射裝置亦為適合的，其經由液體噴射注射器或經由刺穿角質層且產生到達真皮之噴射的針頭來將液體疫苗遞送至真皮。噴射注射裝置描述於例如美國專利第 5,480,381 號、美國專利第 5,599,302 號、美國專利第 5,334,144 號、美國專利第 5,993,412 號、美國專利第 5,649,912 號、美國專利第 5,569,189 號、美國專利第 5,704,911 號、美國專利第 5,383,851 號、美國專利第 5,893,397 號、美國專利第 5,466,220 號、美國專利

第 5,339,163 號、美國專利第 5,312,335 號、美國專利第 5,503,627 號、美國專利第 5,064,413 號、美國專利第 5,520,639 號、美國專利第 4,596,556 號、美國專利第 4,790,824 號、美國專利第 4,941,880 號、美國專利第 4,940,460 號、WO1997/37705 及 WO1997/13537 中(其均以引用的方式併入本文中)。彈道式粉末/粒子遞送裝置亦為適合的，其使用壓縮氣體加速粉末形式之疫苗通過皮膚外層至真皮。另外，習知注射器可用於皮內投與之經典曼托法(Mantoux method)。

【0238】用於非經腸投與之製劑包括無菌水性或非水性溶液、懸浮液及乳液。非水性溶劑之實例為丙二醇、聚乙二醇、油(諸如橄欖油)及可注射有機酯(諸如油酸乙酯)。油之實例包括植物油或動物油、花生油、大豆油、橄欖油、葵花籽油、肝油、合成油(諸如海洋油)以及自牛奶或雞蛋中獲得的脂質。水性載劑包括水、醇/水溶液、乳液或懸浮液，包括鹽水及緩衝介質。非經腸媒劑包括氯化鈉溶液、林格氏右旋糖(Ringer's dextrose)、右旋糖及氯化鈉、乳酸化林格氏液或不揮發性油。靜脈內媒劑包括流體及營養補充劑、電解質補充劑(諸如基於林格氏右旋糖之電解質補充劑)及其類似物。亦可存在防腐劑及其他添加劑，諸如抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑、惰性氣體及其類似物。

【0239】多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可以單位劑量小瓶、多劑量小瓶或預填充注射器形式調配。液體調配物之醫藥學上可接受之載劑包括水性或非水性溶劑、懸浮液、乳液或油。組成物可為等張的、高張的或低張的。然而，期望用於輸注或注射之組成物基本上為等張的。因此，等張性或高張性對於組成物之儲存可能為有利的。當組成物為高張的時，可在投與之前將組成物稀釋至等張。張力劑可為諸如鹽之離子張力劑或諸如碳水化合物之非離子張力劑。離子張力劑包括但不限於氯化鈉、氯化鈣、氯化鉀及氯化鎂。非離子張力劑包括但不限於山梨糖醇及甘油。較佳地，包括至少一種醫藥學上可接受之緩衝劑。舉例而言，當組成物為輸液或注射劑時，較佳在緩衝能力為 pH 4 至 pH 10，諸如 pH 5 至 pH 9 或

pH 6 至 pH 8 之緩衝液中調配。緩衝劑可選自適合於美國藥典(USP)之緩衝劑。舉例而言，緩衝劑可選自由以下組成之群：一元酸，諸如乙酸、苯甲酸、葡萄糖酸、甘油酸及乳酸；二元酸，諸如烏頭酸、己二酸、抗壞血酸、碳酸、麩胺酸、蘋果酸、琥珀酸及酒石酸；多元酸，諸如檸檬酸及磷酸；及鹼，諸如氨、二乙醇胺、甘胺酸、三乙醇胺及 TRIS。

【0240】多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可包含表面活性劑。表面活性劑之實例包括但不限於聚氧乙烯脫水山梨糖醇酯(一般稱為 Tween)，特別是聚山梨醇酯 20 及聚山梨醇酯 80；環氧乙烷(EO)、環氧丙烷(PO)、環氧丁烷(BO)之共聚物(諸如 DOWFAX)；具有不同重複的乙氧基(氧基-1,2-乙二基)基團之辛苯聚醇，特別是辛苯聚醇-9 (Triton-100)；乙基苯氧基聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40)；磷脂，諸如卵磷脂；壬基酚乙氧基化物，諸如 TERGITOL NP 系列；月桂醇、鯨蠟醇、硬脂醇、油醇衍生之聚氧乙烯脂肪醚(Brij 界面活性劑)，特別是三乙二醇單月桂基醚(Brij 30)；稱為 SPAN 之脫水山梨糖醇醚，特別是脫水山梨糖醇三油酸酯(Span 85)及脫水山梨糖醇單月桂酸酯。

【0241】可使用表面活性劑之混合物，諸如 Tween 80/Span 85。聚氧乙烯脫水山梨糖醇酯諸如 Tween 80 及辛苯聚醇諸如 Triton X-100 之組合亦為適合的。Laureth 9 及 Tween 及/或辛苯聚醇之組合亦為有利的。較佳地，所包括之聚氧乙烯脫水山梨糖醇酯(諸如 Tween 80)之量可為 0.01%至 1% (w/v)、0.01%至 0.1% (w/v)、0.01%至 0.05% (w/v)或約 0.02%；所包括之辛基苯氧基聚氧乙醇或壬基苯氧基聚氧乙醇(諸如 Triton X-100)之量可為 0.001%至 0.1% (w/v)，尤其 0.005%至 0.02%；且所包括之聚氧乙烯醚(諸如 Laureth 9)之量可為 0.1%至 20% (w/v)，可能為 0.1%至 10%，尤其 0.1%至 1%或約 0.5%。

【0242】在一些實施例中，多價肺炎球菌共軛物組成物(例如，PCV-22、PCV-23、PCV-24、PCV-25、PCV-26 或 PCV-27)可經由釋放控制系統遞送。舉例

而言，靜脈內輸注、經皮貼片、脂質體或其他途徑可用於投藥。在一個態樣中，可使用大分子諸如微球體或植入物。

【0243】 上述揭示內容大體上描述本發明。藉由參考以下具體實例可獲得更完整的理解。此等實例僅出於說明之目的而描述，且不意欲限制本發明之範疇。

實例

【0244】 實例 1.製備肺炎鏈球菌莢膜多醣

【0245】 如熟習此項技術者已知的，進行肺炎鏈球菌之培養及莢膜多醣之純化。肺炎鏈球菌血清型自美國菌種保存中心(ATCC)獲得(血清型 1：ATCC 編號 6301；血清型 3：ATCC 編號 6303；血清型 4：ATCC 編號 6304；血清型 5：ATCC 編號 6305；血清型 6A：ATCC 編號 6306；血清型 6B：ATCC 編號 6326；血清型 7F：ATCC 編號 10351；血清型 9N：ATCC 編號 6309；血清型 9V：ATCC 編號 10368；血清型 14：ATCC 編號 6314；血清型 18C：ATCC 編號 10356；血清型 19A：ATCC 編號 10357；血清型 19F：ATCC 編號 6319；血清型 23B：ATCC 編號 10364；血清型 23F：ATCC 編號 6323)。對於血清型 8、10A、11A、12F、15A、15B、15C、22F、23A、23B、24F、33F 及 35B，使用內部菌株或自其他來源獲得之菌株，但可使用任何可公開獲得的菌株。肺炎鏈球菌之特徵在於莢膜及運動性、革蘭氏陽性、柳葉刀形雙球菌及在血液瓊脂培養基中之 α 溶血。使用特異性抗血清藉由 Quelling 測試鑑別血清型(美國專利案第 5,847,112 號)。

【0246】 製備細胞庫

【0247】 為了擴大菌株及移除動物來源之組分，產生數代菌種原種(F1、F2 及 F3 代)。產生額外二代菌種原種。自 F3 小瓶培養額外第一代，且自額外第一代之小瓶培養後一代。將菌種小瓶冷凍儲存(低於-70°C)，使用合成甘油作為冷凍保存劑。對於細胞庫的製備，所有培養物均在以大豆為主之培養基中生長。在冷凍前，藉由離心濃縮細胞，移除廢培養基，且將細胞離心塊再懸浮於含有

冷凍保存劑(諸如合成甘油)之新鮮培養基中。

【0248】 培養及收集

【0249】 將工作細胞庫之培養物接種至含有以大豆為主之培養基的菌種瓶中且培養。在達到目標光密度(吸光度)後，將菌種瓶用於接種含有以大豆為主之培養基的醱酵槽。當光密度值開始保持不變時，終止培養。在終止培養後，向培養物中添加去氧膽酸鈉以溶解細胞。將所得醱酵槽內含物冷卻，且誘導蛋白質沈澱。隨後，將混合物離心以移除沈澱的蛋白質及細胞碎片。

【0250】 純化

【0251】 將離心獲得之溶液經由深度過濾器過濾，以移除離心中未沈澱之蛋白質及細胞碎片。將濾液濃縮在 100 kDa MW 膜上，且將濃縮液用 10 體積之 25 mM 磷酸鈉緩衝液(pH 7.2)透濾，以獲得樣品。將樣品過濾以收集上清液，自其中沈澱出多醣且過濾。將濾液濃縮在 30 kDa 膜上，且使用約 10 體積之三重蒸餾水對濃縮液進行透濾。在進行透濾後，剩餘溶液經由 0.2 μ m 過濾器過濾。對濾液進行過程中控制測試(外觀、剩餘蛋白質、剩餘核酸、內毒素、分子量及多醣總量)。將濃縮液無菌過濾且在-20°C下儲存。

【0252】 **實例 2.製備肺炎鏈球菌莢膜多醣及載體蛋白之共軛物(血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F 及 33F)**

【0253】 不同血清型之多醣按照不同的途徑活化，且隨後與載體蛋白 CRM₁₉₇ 或 TT 共軛。具體而言，一種多價肺炎球菌多醣-蛋白質共軛物，其包含血清型 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 及 35B 之莢膜多醣，係藉由將血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F 及 33F 之莢膜多醣中之每一者與 CRM₁₉₇ 共軛且藉由將血清型 1 及 5 之莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛來製備，如下文所揭示。

血清型 15A、15C、23A、23B、24F 及 35B 與 CRM₁₉₇ 之共軛描述於實例 3-8 中。另一種多價肺炎球菌多醣-蛋白質共軛物，其包含血清型 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 及 35B 之莢膜多醣，係藉由將血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、18C、19A、19F、23F 及 33F 之莢膜多醣中之每一者與 CRM₁₉₇ 共軛且藉由將血清型 1、5、15B 及 22F 之莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛來製備，如下文所揭示。

【0254】 代替或除血清型 1 或 5 之外，亦設想血清型 3 可與 TT 共軛，如 WO2019/152925 中所揭示。視天然血清型之大小而定，活化過程可包括將各莢膜多醣之大小減小至目標分子量、化學活化及經由超濾進行緩衝液交換。

【0255】 不同血清型之多醣按照不同的途徑活化，且隨後與載體蛋白 CRM₁₉₇ 或 TT 共軛。具體而言，共軛物係藉由將除 15B 及 22F 之外的所有血清型之莢膜多醣中之每一者與 CRM₁₉₇ 共軛且藉由將血清型 1、3、5、15B 及 22F 之莢膜多醣中之每一者與 TT 共軛來製備。視天然血清型之大小而定，活化過程可包括將各莢膜多醣之大小減小至目標分子量、化學活化及經由超濾進行緩衝液交換。使用超濾純化共軛物，最後經由 0.2 μm 過濾器過濾。諸如 pH、溫度、濃度及時間之過程參數如下。

【0256】 (1)活化過程

【0257】 步驟 1：水解

【0258】 還原胺化為已知的共軛聚合物的方法，其中在蛋白質之一級胺 (-NH₂) 基團與糖之醛之間形成醯胺鍵。將醛基添加至肺炎球菌莢膜多醣中，以促進與載體蛋白之共軛。單糖之鄰二醇結構可藉由過碘酸鈉 (NaIO₄) 氧化以形成醛基。血清型 1、3、4、6A、8、11A、12F、14、15B、18C、22F 及 33F 之莢膜多醣如下進行預處理。

【0259】 在血清型 1 之情況下，將氫氧化鈉(最終鹼濃度為 0.05 M)添加至

莢膜多醣之溶液中，且將溶液在 $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育。隨後將溶液冷卻至約 21°C 至約 25°C 範圍內之溫度，且向其中添加鹽酸至最終 pH 為 6.0 ± 0.1 ，從而停止水解。

【0260】在血清型 3、8、11A 及 15B 之情況下，將鹽酸(最終酸濃度為 0.01 M)添加至莢膜多醣之溶液中，且將溶液在 $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育。隨後將溶液冷卻至約 21°C 至約 25°C 範圍內之溫度，且向其中添加 0.1M 磷酸鈉至最終 pH 為 6.0 ± 0.1 ，從而停止水解。

【0261】在血清型 4 之情況下，將鹽酸(最終酸濃度為 0.1 M)添加至莢膜多醣之溶液中，且將溶液在 $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育。隨後將溶液冷卻至約 21°C 至約 25°C 範圍內之溫度，且向其中添加 1M 磷酸鈉至最終 pH 為 6.0 ± 0.1 ，從而停止水解。

【0262】在血清型 6A 之情況下，將冰乙酸(最終酸濃度為 0.1 M)添加至莢膜多醣之溶液中，且將溶液在 $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育。隨後將溶液冷卻至約 21°C 至約 25°C 範圍內之溫度，且向其中添加 1M 氫氧化鈉至最終 pH 為 6.0 ± 0.1 ，從而停止水解。

【0263】在血清型 12F 之情況下，將鹽酸(最終酸濃度為 0.01 M)添加至莢膜多醣之溶液中，且將溶液在 $70\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育。隨後將溶液冷卻至約 21°C 至約 25°C 範圍內之溫度，且向其中添加 0.1M 磷酸鈉至溶液之最終 pH 為 6.0 ± 0.1 ，從而停止水解。

【0264】在血清型 14 及 18C 之情況下，將冰乙酸(最終酸濃度為 0.2 M)添加至莢膜多醣之溶液中，且將溶液在 $94\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育。隨後將溶液冷卻至約 21°C 至約 25°C 範圍內之溫度，且向其中添加 1M 磷酸鈉至溶液之最終 pH 為 6.0 ± 0.1 ，從而停止水解。

【0265】在血清型 22F 及 33F 之情況下，將鹽酸(最終酸濃度為 0.01 M)添加至莢膜多醣之溶液中，且將溶液在 $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育。隨後將溶液冷卻至約 21°C 至約 25°C 範圍內之溫度，且向其中添加 0.1M 磷酸鈉至最終 pH 為 6.0 ± 0.1 ，從而停止水解。

【0266】 將獲得之莢膜多醣中之每一者在注射用水(WFI)、乙酸鈉及磷酸鈉中稀釋至約 1.0 mg/mL 至約 2.0 mg/mL 之最終濃度。

【0267】 步驟 2：過碘酸鹽反應

【0268】 基於重複單元莫耳質量確定各肺炎球菌糖活化之過碘酸鈉莫耳當量。在充分混合之情況下，除 1、7F 及 19F (溫度為 10°C 或更低)之外，使所有血清型之氧化反應在 21°C 至 25°C 下進行 16 至 20 小時。為了幫助維持共軛物之一致且穩定的生產，在共軛過程中以各血清型之氧化程度(Do)水準範圍為目標。表 1 及表 2 中示出各血清型之 Do 水準的較佳目標範圍。

表 1. 將與 CRM₁₉₇ 共軛之所有血清型的 Do 範圍

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

表 2. 將與 TT 共軛之血清型 1、3、5、15B 及 22F 的 Do 範圍

血清型	Do 之範圍	血清型	Do 之範圍
血清型 1 (1-TT)	1 至 15	血清型 15B (15B-TT)	1 至 15
血清型 3 (3-TT)	2 至 14	血清型 22F (22F-TT)	20 至 50
血清型 5 (5-TT)	1 至 15		

【0269】 步驟 3：超濾

【0270】 將經氧化之糖濃縮且在 100 kDa MWCO 超濾器(30 kDa 超濾器用於血清型 1 且 5 kDa 超濾器用於血清型 18C)上用 WFI 透濾。對於血清型 1，使用 0.9%氯化鈉溶液，對於血清型 7F 及 23F，使用 0.01 M 乙酸鈉緩衝液(pH 4.5)，且對於血清型 19F，使用 0.01 M 磷酸鈉緩衝液(pH 6.0)，進行透濾。棄去滲透物，且經由 0.2 µm 過濾器過濾保留物。

【0271】 步驟 4：凍乾

【0272】 對於藉由使用水性溶劑與載體蛋白共軛之血清型 3、4、5、8、9N、9V、10A、14 及 33F 之莢膜多醣，在不進一步添加蔗糖之情況下，製備多醣及載體蛋白之混合溶液，凍乾，且隨後在 $-25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下儲存。

【0273】 對於藉由使用水性溶劑與載體蛋白共軛之血清型 1 及 18C 之莢膜多醣，在不進一步添加蔗糖之情況下，獨立地製備多醣及載體蛋白，凍乾，且隨後在 $-25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下儲存。

【0274】 對於藉由使用 DMSO 溶劑與載體蛋白共軛之血清型 6A、6B、7F、15B-TT、19A、19F、22F-TT 及 23F 之莢膜多醣，將預定量之蔗糖添加至活化的醣中，以達到 $5\%\pm 3\%$ (w/v)之最終蔗糖濃度，獨立地製備樣品，凍乾，且隨後在 $-25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下儲存。

【0275】 對於血清型 11A 之莢膜多醣，將預定量之蔗糖添加至活化糖中，以達到 $20\%\pm 5\%$ (w/v)之最終蔗糖濃度，獨立地製備多醣及載體蛋白，凍乾，且隨後在 $-25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下儲存。

【0276】 對於血清型 12F 之莢膜多醣，將預定量之蔗糖添加至活化糖中，以達到 $10\%\pm 5\%$ (w/v)之最終蔗糖濃度，獨立地製備多醣及載體蛋白，凍乾，且隨後在 $-25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下儲存。

【0277】 (2)共軛過程

【0278】 對血清型 1、3、4、5、8、9N、9V、10A、14、18C 及 33F 進行水性共軛，且對血清型 6A、6B、7F、11A、12F、15B-TT、19A、19F、22F-TT 及 23F 進行 DMSO 共軛。各莢膜多醣以 0.2 至 2:1 之比率與載體蛋白共軛。

【0279】 步驟 1：溶解

【0280】 水性共軛

【0281】 對於血清型 1、3、4、5、8、9N、9V、10A、14、18C 及 33F，將凍乾的樣品解凍且在室溫下平衡。藉由使用磷酸鈉緩衝溶液，在 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下按各

血清型設定之比率，將凍乾的樣品復原至反應濃度。

【0282】 二甲亞砜(DMSO)共軛

【0283】 對於血清型 6A、6B、7F、11A、12F、15B-TT、19A、19F、22F-TT 及 23F，將凍乾的樣品解凍，在室溫下平衡，且在 DMSO 中復原。

【0284】 步驟 2：共軛反應

【0285】 水性共軛

【0286】 對於血清型 3-TT、4、5-TT、8、9N、9V、10A、14、18C 及 33F，藉由添加氰基硼氫化鈉溶液(100 mg/mL)達到每莫耳糖 1.0 至 1.4 莫耳氰基硼氫化鈉來引發共軛反應。然而，對於血清型 1、1-TT 及 3，藉由添加氰基硼氫化鈉溶液達到每莫耳糖 0.5 莫耳氰基硼氫化鈉來引發反應。

【0287】 將反應混合物在 23°C 至 37°C 下培育 44 至 106 小時。按血清型調整反應溫度及時間。隨後將溫度降至 23±2°C，且向反應器中添加 0.9%氯化鈉。添加硼氫化鈉溶液(100 mg/mL)，以達到每莫耳糖 1.8 至 2.2 莫耳當量之硼氫化鈉。將混合物在 23±2°C 下培育 3 至 6 小時。此程序減少醣上存在的任何未反應的醛。隨後，將混合物用 0.9%氯化鈉稀釋，且使用 0.8 或 0.45 μm 預過濾器過濾經稀釋之共軛混合物。

【0288】 DMSO 共軛

【0289】 對於血清型 6A、6B、7F、11A、12F、15B-TT、19A、19F、22F-TT 及 23F 之莢膜多醣，藉由添加氰基硼氫化鈉溶液(100 mg/mL)達到每一莫耳活化糖 0.8 至 1.2 莫耳當量之氰基硼氫化鈉之比率來引發共軛反應。將 WFI 添加至反應混合物中，達到 1% (v/v)之目標濃度，且將混合物在 23±2°C 下培育 12 至 26 小時。將 100 mg/mL 硼氫化鈉溶液(典型的每莫耳活化糖 1.8 至 2.2 莫耳當量硼氫化鈉)及 WFI (目標 5% v/v)添加至反應物中，且將混合物在 23±2°C 下培育 3 至 6 小時。此程序減少醣上存在的任何未反應的醛。隨後，將反應混合物用 0.9%氯

化鈉稀釋，且使用 0.8 或 0.45 μm 預過濾器過濾經稀釋之共軛混合物。

【0290】 步驟 3：超濾

【0291】 將經稀釋之共軛物混合物濃縮，且在 100 kDa MWCO 超濾過濾器或 300 kDa MWCO 超濾過濾器上用最少 15 體積之 0.9% 氯化鈉或緩衝液透濾。另外，該過程中使用之緩衝液的組成及 pH 視各血清型而變化。

【0292】 步驟 4：無菌過濾

【0293】 將超濾後之保留物無菌過濾(0.2 μm)，且對經過濾之共軛物進行過程內控制(外觀、游離蛋白質、游離糖、分子大小分佈、無菌性、糖含量、蛋白質含量、pH、內毒素、殘餘氰化物、殘餘 DMSO、糖特性、TT 特性及 CRM₁₉₇ 特性)。將最終濃縮物冷藏且在 2°C 至 8°C 下儲存。

【0294】 血清型 15A、15C、23A、23B、24F 及 35B 與 CRM₁₉₇ 之共軛描述於實例 3-8 中。

【0295】 實例 3. 製備血清型 15A 及 CRM₁₉₇ 之單共軛物

【0296】 血清型 15A 多醣可如上文所論述或參考 WO2013/191459 中所述之用於純化其他血清型之多醣的方法來純化。如表 1 中所示，藉由對經純化之血清型 15A 多醣施加酸及熱來進行酸水解，且隨後進行活化過程。觀察到，水解條件影響活化的多醣的氧化程度(Do)及分子量，以及共軛結果。活化過程及共軛過程在相同的條件下進行。添加過碘酸鈉，且在 21 至 25°C 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於 DMSO 中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1.5 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 23°C $\pm$ 2°C 下培育 20 至 28 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23°C $\pm$ 2°C 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。

【0297】 表 3. 根據水解條件之 15A 共軛結果

活化的多醣			15A-CRM ₁₉₇ 共軛物			
水解條件	Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)
-	13.4	340.8	0.98	76.5	86	30517
0.01M HCl, 60°C, 60min	11.5	304.5	1.20	79.0	93	25933
0.01M HCl, 60°C, 90min	10.6	373.4	1.09	76.7	94	25899
0.01M HCl, 60°C, 120min	10.8	350.8	0.97	73.7	88	24734
0.1M HCl, 60°C, 45min	16.0	197.0	1.34	76.6		32898
0.1M HCl, 60°C, 90min	7.9	116.3	0.73	11.4		3924

【0298】 評定氧化水準(Do)對血清型 15A 及 CRM₁₉₇ 共軛之影響。在 60°C 下將 0.1M HCl 添加至 15A 多醣中，持續 90 分鐘。調整過碘酸鈉之量，且在 21 至 25°C 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於 DMSO 中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1.5 mg/mL，且在評定酸水解對血清型 15A 之影響時，如上所述與氰基硼氫化物進行共軛。

【0299】 表 4. 根據氧化水準之 15A 共軛結果

活化的多醣		15A-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0300】 亦評定多醣與蛋白質之反應比率對共軛之影響。將活化的 15A 多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於 DMSO 中。將活化的多醣及蛋白質以表 5 中所述之比率混合，反應濃度以多醣含量計為 1.0 mg/mL，且在評定酸水解對血清型 15A 之影響時，如上所述與氰基硼氫化物進行共軛。

【0301】 表 5. 根據多醣與蛋白質比率之共軛結果

活化的多醣		反應比率	15A-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	反應比率 (PR:PS)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0302】 實例 4. 製備血清型 15C 及 CRM₁₉₇ 之單共軛物

【0303】 血清型 15C 多醣可如上文所論述或參考 WO2013/191459 中所述之用於純化其他血清型之多醣的方法來純化。調整添加至 15C 多醣中之過碘酸鈉之量，且在 21 至 25℃ 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於磷酸鹽緩衝液中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 15 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 37℃±2℃ 下培育 44 至 52 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23℃±2℃ 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。

【0304】 表 6. 使用磷酸鹽緩衝液根據氧化水準之 15C 共軛結果

活化的多醣		15C-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0305】 評定氧化水準(Do)對使用 DMSO 進行血清型 15C 及 CRM₁₉₇ 共軛之影響。調整添加至 15C 多醣中之過碘酸鈉之量，且在 21 至 25℃ 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於 DMSO 中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1.5 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 23℃±2℃ 下培育 20 至 28 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23℃±2℃ 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。

【0306】 表 7. 使用 DMSO 根據氧化水準之 15C 共軛結果

活化的多醣		15C-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0307】 實例 5. 製備血清型 23A 及 CRM₁₉₇ 之單共軛物

【0308】 血清型 23A 多醣可如上文所論述或參考 WO2013/191459 中所述之用於純化其他血清型之多醣的方法來純化。為了評定氧化程度(Do)對共軛之影響，調整過碘酸鈉之量，且在 21 至 25℃ 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於 DMSO 中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1 mg/mL。或者，將活化的多醣及蛋白質以表 8 中所述之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1.5 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 23℃±2℃ 下培育 20 至 28 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23℃±2℃ 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。不同 Do 水準對共軛之影響顯示於表 8 中。

【0309】 表 8. 根據氧化水準之 23A 共軛結果

活化的多醣		23A-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0310】 多醣與蛋白質之反應比率對共軛之影響顯示於表 9 中。

【0311】 表 9. 根據多醣與蛋白質比率之 23A 共軛結果

活化的多醣		反應比率	23A-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	反應比率 (PR:PS)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0312】 評定反應濃度對血清型 23A 與 CRM₁₉₇ 之間的共軛的影響。如上文所論述，用過碘酸鈉活化經純化之血清型 23A 多醣。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於 DMSO 中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計如表 10 中所述，且在評定 Do 對血清型 23A 之影響時，如上所述與氰基硼氫化物進行共軛。

【0313】 表 10. 根據共軛反應濃度之 23A 共軛結果

活化的多醣		反應濃度	23A-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	反應濃度 (mg/ml)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0314】 評定酸水解對血清型 23A 與 CRM₁₉₇ 之間的共軛的影響。如表 11 中所示，藉由對經純化之血清型 23A 多醣施加酸及熱來進行酸水解，且隨後進行活化過程。活化過程及共軛過程在相同的條件下進行。添加過碘酸鈉，且在 21 至 25°C 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於磷酸鹽緩衝液中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1.5 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 37°C±2°C 下培育 44 至 52 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23°C±2°C 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。

【0315】 表 11. 在多醣之酸水解後製備 23A 糖共軛物

活化的多醣			23A-CRM ₁₉₇ 共軛物				
水解條件	Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
X	10.9	639.3	1.21	22.0	89	5981	19.6
0.1M HCl, 60°C, 30min	9.4	595.4	1.17	17.0	91	5844	13.2
0.1M HCl, 60°C, 60min	9.1	571.1	1.21	10.9	82	3360	10.5
0.1M HCl, 60°C, 90min	9.0	535.3	1.07	9.9	83	2911	10.3
0.1M HCl, 60°C, 120min	9.3	507.9	1.26	5.2	64	1846	5.6

【0316】 評定使用磷酸鹽緩衝液對血清型 23A 與 CRM₁₉₇ 之間的共軛的影響。調整過碘酸鈉之量以活化血清型 23A，且在 21 至 25°C 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的血清型 23A 多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於磷酸鹽緩衝液中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 15 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 23°C±2°C 下培育 20 至 28 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23°C±2°C 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。

【0317】 表 12. 使用磷酸鹽緩衝液製備 23A 糖共軛物

活化的多醣		23A-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0318】 實例 6. 製備血清型 23B 及 CRM₁₉₇ 之單共軛物

【0319】 血清型 23B 多醣可如上文所論述或參考 WO2013/191459 中所述之用於純化其他血清型之多醣的方法來純化。為了評定氧化程度(Do)對共軛之影響，調整過碘酸鈉之量以活化血清型 23B，且在 21 至 25°C 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於 DMSO 中。將活化的多

醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1.5 mg/mL。或者，保持過碘酸鈉之量恆定，且將活化的多醣及蛋白質以表 13 中所述之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 1.5 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 23°C±2°C 下培育 20 至 28 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23°C±2°C 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。不同 Do 水準對共軛之影響顯示於表 13 中。

【0320】 表 13. 根據氧化水準之 23B 共軛結果

活化的多醣		23B-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0321】 多醣與蛋白質之反應比率對共軛之影響顯示於表 14 中。

【0322】 表 14. 根據多醣與蛋白質比率之 23B 共軛結果

活化的多醣		反應比率	23B-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	反應比率 (PR:PS)	比率 (PS/PR)	游離 PS (%)	MSD (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0323】 實例 7. 製備血清型 24F 及 CRM₁₉₇ 之單共軛物

【0324】 血清型 24F 多醣可如上文所論述或參考 WO2013/191459 中所述之用於純化其他血清型之多醣的方法來純化。對經純化之血清型 24F 多醣進行酸水解或微流化床，隨後向血清型 24F 多醣中添加過碘酸鈉，且在 21 至 25°C 下進行氧化反應 16 至 20 小時。將活化的多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白凍乾且懸浮於磷酸鹽緩

衝液中。將活化的多醣及蛋白質以 1:1 之比率混合，同時反應濃度以多醣含量計為 10 mg/mL。添加氰基硼氫化物以引發共軛反應，且將混合物在 37°C ±2°C 下培育 44 至 52 小時。將硼氫化物溶液混合物在 23°C ±2°C 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。氰基硼氫化物及硼氫化物之莫耳當量如表 15 中所述。由於向活化的 24F 多醣及 CRM₁₉₇ 蛋白中添加氰基硼氫化物而非封端試劑(硼氫化物)，因此共軛物之品質得到改良，如共軛物之分子量增加所表明。添加過量封端試劑(硼氫化物)對 24F-CRM₁₉₇ 共軛物具有負面影響，如共軛物之分子量降低所表明。

【0325】 表 15. 根據還原劑(PO₄ 緩衝劑)之量的共軛結果

活化的多醣		24F-CRM ₁₉₇ 共軛物				
Do	活化的 PS M.W. (kDa)	NaCNBH3 Meq	NaBH4 Meq	比率 (PS/PR)	游離 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

【0326】 實例 8：製備血清型 35B 及 CRM₁₉₇ 之單共軛物

【0327】 血清型 35B 多醣可如上文所論述或參考 WO2013/191459 中所述之用於純化其他血清型之多醣的方法來純化。將經純化之血清型 35B 多醣在蒸餾水(DW)中稀釋至 1.0 mg/mL 至 2.0 mg/mL 之最終濃度。

【0328】 過碘酸反應。為了評定氧化程度(Do)對共軛之影響，調整過碘酸鈉之量以活化血清型 35B，且在 21 至 25°C 下進行氧化反應 16 至 20 小時。相對於多醣含量，使用 0.007 至 0.15 莫耳當量之過碘酸鈉。

【0329】 超濾。濃縮活化的血清型 35B 多醣，且使用 30 kDa MWCO 超濾過濾器用 DW 透濾。棄去滲透物，且經由 0.22 µm 過濾器過濾殘餘物。

【0330】 凍乾。將經計算達到 5% ± 3% 蔗糖濃度之特定量的蔗糖添加至活化的血清型 35B 多醣中。將濃縮的糖及 CRM₁₉₇ 載體蛋白各自裝入小瓶中且凍

乾。或者，將活化的血清型 35B 多醣及載體蛋白混合，裝入玻璃瓶中且凍乾。

【0331】 **溶解**。將凍乾的活化血清型 35B 糖及凍乾的 CRM₁₉₇ 載體蛋白在室溫下平衡。將活化的血清型 35B 糖以 12.5 g/L 至 17.5 g/L 之糖濃度再懸浮於磷酸鹽緩衝液中。將用於共軛反應之磷酸鹽緩衝液的 pH 調整至 pH 6.0 至 pH 7.2。此時，載體蛋白以 6.25 g/L 至約 35 g/L 之濃度使用(PR:PS 重量比對應於 1:0.5 至 2)。

【0332】 **共軛反應**。藉由以每 1 莫耳活化糖 1.0 至 1.4 莫耳當量之比率添加氰基硼氫化鈉溶液(100 mg/mL)來引發共軛反應。將混合物在 37±2°C 下培育 44 至 52 小時。將 100 mg/mL 硼氫化鈉溶液(通常每 1 莫耳活化糖 1.8 至 2.2 莫耳當量之硼氫化鈉)添加至反應材料中，且將混合物在 23°C±2°C 下培育 3 至 6 小時。經由此過程，將糖中存在之任何未反應的醛還原，隨後濃縮且用超濾過濾器透析。隨後用 0.9%氯化鈉稀釋反應混合物，且經由 0.45 μm 過濾器過濾經稀釋之共軛物混合物。

【0333】 **超濾**。將經稀釋之共軛物混合物濃縮，且使用 100 kDa MWCO 超濾過濾器用至少 20 體積之 0.9%氯化鈉溶液或緩衝液透濾。棄去滲透物。

【0334】 **無菌過濾**。100 kDa MWCO 透濾後之殘餘物經由 0.22 μm 過濾器過濾。對經過濾之產物 35B-CRM₁₉₇ 共軛物進行過程中控制(糖含量、游離蛋白質、游離糖及殘餘氰化物)。對經過濾之殘餘物進行過程中控制，以確定是否需要額外的濃縮、透濾及/或稀釋。若需要，用 0.9%氯化鈉稀釋經過濾之共軛物，以使得最終濃度小於 0.55 g/L。在此階段，進行糖含量、蛋白質含量及糖:蛋白質比率之測試。將共軛物過濾(0.22 μm 過濾器)，且進行自由測試(外觀、游離蛋白質、游離醣、內毒素、分子分級、殘餘氰化物、糖特性及 CRM₁₉₇ 特性)。血清型 35B 糖共軛物每 mM 35B 多醣包含至少 0.2 mM 乙酸鹽。最終共軛物濃縮物在 2 至 8°C 下冷藏。血清型 35B 糖共軛物之一些代表性製備實例的分析結果顯示於下

表 16。

【0335】 表 16. 根據氧化水準之共軛結果(PO₄ 緩衝液)

活化條件及結果		35B-CRM ₁₉₇ 共軛物				
分子量 (kDa)	活化 程度	緩衝液 pH	比率 (PS/PR)	游離糖 (%)	MALLS (kDa)	共軛產率 (%)
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

【0336】 如表 16 中所見，本文所述之用於製造血清型 35B 糖共軛物之方法顯示良好的共軛產率，且允許製備具有低游離糖%及良好穩定性之共軛物。

【0337】 實例 9：血清型特異性 IgG 濃度量測

【0338】 測試實例 3 中製備之血清型 15A-CRM₁₉₇ 單共軛物、實例 4 中製備

之血清型 15C-CRM₁₉₇ 單共軛物、實例 5 中製備之血清型 23A-CRM₁₉₇ 單共軛物、實例 6 中製備之血清型 23B-CRM₁₉₇ 單共軛物、實例 7 中製備之血清型 24F-CRM₁₉₇ 單共軛物及實例 8 中製備之血清型 35B-CRM₁₉₇ 單共軛物在兔子中誘導免疫原性反應之能力。藉由針對血清 IgG 濃度之抗原特異性 ELISA 及針對抗體功能之調理吞噬活性分析(OPA)進行免疫原性評定。紐西蘭白兔在第 0 週及第 2 週用人類劑量(2.2 µg 多醣)進行肌肉內免疫接種。免疫接種後每 2 週取樣一次血清。

【0339】 將血清型 15A、15C、23A、23B、24F 及 35B 中之每一者的莢膜多醣(PnPs)以 0.5 µg/孔至 1 µg/孔塗佈在 96 孔盤上。自各個體抽取等量的血清，且按組彙集。用洗滌緩衝液洗滌盤，且在 37°C 下用阻斷緩衝液培育 1 小時。將血清池用包含 Tween 20 及自 Statens Serum Institut 獲得之肺炎球菌細胞壁多醣(CWPS)(5 µg/mL)之抗體稀釋緩衝液連續稀釋 2.5 倍，且隨後在室溫下反應 30 分鐘。用洗滌緩衝液洗滌盤 5 次，且隨後將 50 µl 預先吸附及稀釋之血清添加至經塗佈之孔盤，隨後在室溫下培育 2 小時至 18 小時。以相同方式洗滌孔盤，且隨後向各孔中添加山羊抗兔 IgG-鹼性磷酸酶共軛物，隨後在室溫下培育 2 小時。如上所述洗滌盤，將 1 mg/mL 對硝基苯胺緩衝液作為受質添加至各孔中，且隨後在室溫下反應 2 小時。藉由添加 50 µl 之 3 M NaOH 使反應淬滅，且量測在 405 nm 及 690 nm 處之吸光度。結果展示於表 17 中。

【0340】 表 17. 二次免疫後 2 週之 IgG 濃度(U/mL)

血清型	1 次免疫前	1 次免疫後	2 次免疫前	2 次免疫後
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

【0341】 對於血清型 35B，基於共軛反應之 pH 及 35B 糖共軛物之分子量

量測不同組糖共軛物之 IgG 濃度，如表 18 所示。

【0342】 表 18. 二次免疫後 2 週之 IgG 濃度

組	35B 糖共軛物		IgG 濃度 U/mL (95% CI)	
	共軛反應之 pH	分子量 (kDa)	測試前	測試後
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：信賴區間

第 1、2、3 組之顯著性：P=0.384

【0343】 單價共軛物之功能免疫原性測試(MOPA)

【0344】 藉由在 MOPA 分析中測試血清來評估抗體功能。將儲存在-70℃或更低溫度下的肺炎鏈球菌 MOPA 菌株稀釋至相應的最終稀釋倍數，以使每個菌株之濃度為約 50,000 CFU/mL。自各個體抽取等量的血清，按組彙集且進行 2 倍連續稀釋，以使得 20 µl 血清保留在 U 形底盤中。稀釋樣品後，將針對各血清型製備之 10 µl 菌株與經稀釋之樣品混合，且使混合物在室溫下反應 30 分鐘，以使肺炎鏈球菌及抗體充分混合。添加預先分化之 HL-60 細胞及補體之混合物，且在 CO₂ 培育箱(37℃)中反應 45 分鐘。降低溫度以停止吞噬，且將 10 µl 反應溶液點樣於預乾燥之 THY 瓊脂盤上 30 至 60 分鐘，隨後使其吸附在盤上 20 分鐘，直至乾燥。將 25 mg/mL TTC 儲備溶液添加至製備的覆蓋瓊脂，且向其中添加適合於相應菌株之抗體。將混合物充分混合，隨後將約 25 mL 混合物添加於盤上且硬化約 30 分鐘。將完全硬化之盤在 CO₂ 培育箱(37℃)中培育 12 至 18 小時，且隨後計數菌落。MOPA 效價以觀察到 50%殺滅之稀釋率表示。結果展示於表 19 中。

【0345】 表 19. 二次免疫後 2 週單共軛物之 MOPA 效價

血清型	1 次免疫前	1 次免疫後	2 次免疫前	2 次免疫後
15A	5	3555	10	3107
15C	2	31575.3	-	-
23A	2	313.7	-	-
23B	28	18807	57	7375
24F	2	260	2	367

【0346】 對於血清型 35B，基於共軛反應之 pH 及 35B 糖共軛物之分子量量測不同組糖共軛物之 MOPA 效價，如表 20 所示。

【0347】 表 20. 二次免疫後 2 週 35B-CRM₁₉₇ 之 MOPA 效價

組	35B 糖共軛物		幾何平均效價(95% CI*)	
	共軛反應之 pH	分子量 (kDa)	測試前	測試後
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：信賴區間

第 1、2、3 組之顯著性：P=0.621

【0348】 實例 10：用與破傷風類毒素共軛之血清型 1 及 5 之多醣調配 27 價肺炎球菌共軛物疫苗

【0349】 基於批次體積及本體糖濃度計算自實例 2-8 獲得之最終本體濃縮物之所需體積。將 0.85%氯化鈉(生理鹽水)、聚山梨醇酯 80 及琥珀酸鹽緩衝液添加至預先標記之調配容器中後，添加本體濃縮物。隨後將製劑充分混合，且經由 0.2 μm 膜進行無菌過濾。在添加本體磷酸鋁期間及之後，將經調配之本體輕輕混合。檢查 pH 值且在必要時進行調整。將經調配之本體產物在 2 至 8℃下儲存。製備以下多價肺炎球菌共軛物疫苗調配物，且命名為 PCV27-(1/5)-TT。

【0350】 PCV27(1/5)-TT 包括藉由將血清型 1 及 5 之各多醣與 TT 共軛且將血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、

15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之各多醣與 CRM₁₉₇ 共軛製備之多醣-共軛物。

【0351】 總劑量為 0.5 ml 之 PCV27(1/5)-TT 包括除血清型 6B 為 4.4 µg 之外，2.2 µg 各糖；約 2 µg 至 25 µg TT (針對血清型 1 及 5)及約 45 µg 至 100 µg CRM₁₉₇；0.125 mg 元素鋁(0.5 mg 磷酸鋁)佐劑；4.25 mg 氯化鈉；約 295 µg 琥珀酸鹽緩衝溶液；及約 120 µg 聚山梨醇酯 80。

【0352】 實例 11. 多價肺炎球菌共軛物疫苗(PCV27(1/5)-TT)之免疫原性

【0353】 測試實例 10 中製備之混合載體、多價肺炎球菌疫苗 PCV27(1/5)-TT 在兔子中誘導免疫原性反應之能力。藉由針對血清 IgG 濃度之抗原特異性 ELISA 及針對抗體功能之調理吞噬活性分析(OPA)進行免疫原性評定。紐西蘭白兔在第 0 週及第 2 週用人類劑量(除 6B 為 4.4 µg 之外，2.2 µg 各多醣)進行肌肉內免疫接種。免疫接種後每 2 週取樣一次血清。

【0354】 血清型特異性 IgG 濃度量測

【0355】 將各血清型之莢膜多醣(PnPs)以 0.5 µg/孔至 1 µg/孔塗佈在 96 孔板上。自各個體抽取等量的血清，且按組彙集。將血清池用包含 Tween 20 及自 Statens Serum Institut 獲得之肺炎球菌細胞壁多醣(CWPS)(5 µg/mL)之抗體稀釋緩衝液連續稀釋 2.5 倍，且隨後在室溫下反應 30 分鐘。用洗滌緩衝液洗滌盤 5 次，且隨後將 50 µl 預先吸附及稀釋之血清添加至經塗佈之孔盤，隨後在室溫下培育 2 小時至 18 小時。以相同方式洗滌孔盤，且隨後向各孔中添加山羊抗兔 IgG-鹼性磷酸酶共軛物，隨後在室溫下培育 2 小時。如上所述洗滌盤，將 1 mg/mL 對硝基苯胺緩衝液作為受質添加至各孔中，且隨後在室溫下反應 2 小時。藉由添加 50 µl 之 3 M NaOH 使反應淬滅，且量測在 405 nm 及 690 nm 處之吸光度。結果展示於表 21 中。

【0356】 表 21. 二次免疫後 2 週之 IgG 濃度(U/mL)

血清型	PCV27(1/5)-TT 前	PCV27(1/5)-TT 後
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

【0357】 功能免疫原性測試(MOPA)

【0358】 藉由在 MOPA 分析中測試血清來評估抗體功能。將儲存在-70℃ 或更低溫度下的肺炎鏈球菌 MOPA 菌株稀釋至相應的最終稀釋倍數，以使每個菌株之濃度為約 50,000 CFU/mL。自各個體抽取等量的血清，按組彙集且進行 2 倍連續稀釋，以使得 20 μl 血清保留在 U 形底盤中。稀釋樣品後，將針對各血清型製備之 10 μl 菌株與經稀釋之樣品混合，且使混合物在室溫下反應 30 分鐘，以使肺炎鏈球菌及抗體充分混合。添加預先分化之 HL-60 細胞及補體之混合物，且在 CO₂ 培育箱(37℃)中反應 45 分鐘。降低溫度以停止吞噬，且將 10 μl 反應溶液點樣於預乾燥之瓊脂盤上 30 至 60 分鐘，隨後使其吸附在盤上 20 分鐘，直至乾燥。將 25 mg/mL TTC 儲備溶液添加至製備的覆蓋瓊脂，且向其中添加適合於

相應菌株之抗體。將混合物充分混合，隨後將約 25 mL 混合物添加於盤上且硬化約 30 分鐘。將完全硬化之盤在 CO₂ 培育箱(37°C)中培育 12 至 18 小時，且隨後計數菌落。MOPA 效價以觀察到 50%殺滅之稀釋率表示。結果展示於表 22 中。

【0359】 表 22. 二次免疫後 2 週之 MOPA 效價

血清型	PCV27(1/5)-TT 前	PCV27(1/5)-TT 後
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

【0360】 實例 12：用與破傷風類毒素共軛之血清型 1、5、15B 及 22F 之多醣調配 27 價肺炎球菌共軛物疫苗

【0361】 按照實例 2-8 中所述之一般方法獲得單共軛物。基於批次體積及本體糖濃度計算最終本體濃縮物之所需體積。將 0.85%氯化鈉(生理鹽水)、聚山梨醇酯 80 及琥珀酸鹽緩衝液添加至預先標記之調配容器中後，添加本體濃縮物。隨後將製劑充分混合，且經由 0.2 μm 膜進行無菌過濾。在添加本體磷酸鋁

期間及之後，將經調配之本體輕輕混合。檢查 pH 值且在必要時進行調整。將經調配之本體產物在 2 至 8°C 下儲存。製備以下多價肺炎球菌共軛物疫苗調配物，且命名為 PCV27-(1/5/15B/22F)-TT。

【0362】 PCV27(1/5/15B/22F)-TT 包括藉由將血清型 1、5、15B 及 22F 之各多醣與 TT 共軛且將血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之各多醣與 CRM₁₉₇ 共軛製備之多醣-共軛物。

【0363】 總劑量為 0.5 ml 之 PCV27(1/5/15B/22F)-TT 包括除血清型 6B 為 4.4 µg 之外，2.2 µg 各糖；約 2 µg 至 25 µg TT (針對血清型 1、5、15B、22F) 及約 45 µg 至 100 µg CRM₁₉₇；0.125 mg 元素鋁(0.5 mg 磷酸鋁)佐劑；4.25 mg 氯化鈉；約 295 µg 琥珀酸鹽緩衝溶液；及約 120 µg 聚山梨醇酯 80。

【0364】 **實例 13. 多價肺炎球菌共軛物疫苗 PCV27(1/5/15B/22F)-TT 之免疫原性**

【0365】 測試實例 12 中製備之混合載體、多價肺炎球菌疫苗 PCV27(1/5/15B/22F)-TT 在兔子中誘導免疫原性反應之能力。藉由針對血清 IgG 濃度之抗原特異性 ELISA 及針對抗體功能之調理吞噬活性分析(OPA)進行免疫原性評定。紐西蘭白兔在第 0 週及第 2 週用人類劑量(除 6B 為 4.4 µg 之外，2.2 µg 各多醣)進行肌肉內免疫接種。免疫接種後每 2 週取樣一次血清。

【0366】 **血清型特異性 IgG 濃度量測**

【0367】 將各血清型之莢膜多醣(PnPs)以 0.5 µg/孔至 1 µg/孔塗佈在 96 孔板上。自各個體抽取等量的血清，且按組彙集。將血清池用包含 Tween 20 及自 Statens Serum Institut 獲得之肺炎球菌細胞壁多醣(CWPS)(5 µg/mL)之抗體稀釋緩衝液連續稀釋 2.5 倍，且隨後在室溫下反應 30 分鐘。用洗滌緩衝液洗滌盤 5 次，且隨後將 50 µl 預先吸附及稀釋之血清添加至經塗佈之孔盤，隨後在室溫下培育

2 小時至 18 小時。以相同方式洗滌孔盤，且隨後向各孔中添加山羊抗兔 IgG-鹼性磷酸酶共軛物，隨後在室溫下培育 2 小時。如上所述洗滌盤，將 1 mg/mL 對硝基苯胺緩衝液作為受質添加至各孔中，且隨後在室溫下反應 2 小時。藉由添加 50 µl 之 3 M NaOH 使反應淬滅，且量測在 405 nm 及 690 nm 處之吸光度。作為比較例，對市售 13 價疫苗(PREVNAR13)進行相同程序。結果展示於表 23 中。

【0368】 表 23. 二次免疫後 2 週之 IgG 濃度(U/mL)

血清型	Pprevnar13		PCV27(1/5/15B/22F)-TT	
	前	後	前	後
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

【0369】 功能免疫原性測試(MOPA)

【0370】 當血清型 1 及 5 之莢膜多醣與 TT 共軛時，血清型特異性 IgG 濃度比與 CRM₁₉₇ 共軛時獲得之濃度顯著增加。經 PCV27(1/5/15B/22F)-TT 免疫之兔子亦表現出針對 PREVNAR13 中不存在的額外十四種血清型(亦即，8、9N、10A、

11A、12F、15A、15B、15C、22F、23A、23B、24F、33F 及 35B)之 IgG 濃度顯著增加。特別是血清型 8 及 9N，相對於 PREVNAR13，血清特異性 IgG 濃度增加 50 倍以上。

【0371】藉由在 MOPA 分析中測試血清來評估抗體功能。將儲存在-70°C 或更低溫度下的肺炎鏈球菌 MOPA 菌株稀釋至相應的最終稀釋倍數，以使每個菌株之濃度為約 50,000 CFU/mL。自各個體抽取等量的血清，按組彙集且進行 2 倍連續稀釋，以使得 20 µl 血清保留在 U 形底盤中。稀釋樣品後，將針對各血清型製備之 10 µl 菌株與經稀釋之樣品混合，且使混合物在室溫下反應 30 分鐘，以使肺炎鏈球菌及抗體充分混合。添加預先分化之 HL-60 細胞及補體之混合物，且在 CO₂ 培育箱(37°C)中反應 45 分鐘。降低溫度以停止吞噬，且將 10 µl 反應溶液點樣於預乾燥之瓊脂盤上 30 至 60 分鐘，隨後使其吸附在盤上 20 分鐘，直至乾燥。將 25 mg/mL TTC 儲備溶液添加至製備的覆蓋瓊脂，且向其中添加適合於相應菌株之抗體。將混合物充分混合，隨後將約 25 mL 混合物添加於盤上且硬化約 30 分鐘。將完全硬化之盤在 CO₂ 培育箱(37°C)中培育 12 至 18 小時，且隨後計數菌落。MOPA 效價以觀察到 50%殺滅之稀釋率表示。作為比較例，對市售 13 價疫苗(PREVNAR13)進行相同程序。結果展示於表 24 中。

【0372】 表 24. 二次免疫後 2 週之 MOPA 效價

血清型	Pevnar13		PCV27(1/5/15B/22F)-TT	
	前	後	前	後
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

【0373】 當血清型 1 及 5 與 TT 共軛時，功能性 MOPA 效價比其與 CRM₁₉₇ 共軛時獲得之 MOPA 效價顯著增加。經 PCV27(1/5/15B/22F)-TT 免疫之兔子亦表現出針對 PREVNAR13 中不存在的額外十四種血清型(亦即，8、9N、10A、11A、12F、15A、15B、15C、22F、23A、23B、24F、33F 及 35B)之功能性 MOPA 效價顯著增加。

【0374】 儘管在本說明書中已描述一或多個例示性實施例，但一般熟習此項技術者應理解，在不脫離如以下申請專利範圍中所定義之本發明概念之精神及範疇的情況下，可對其中的形式及細節進行各種改變。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 22-27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【請求項2】 如請求項 1 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 27 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 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 及 35B。

【請求項3】 如請求項 1 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 26 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、23B 及 24F 之四種血清型。

【請求項4】 如請求項 1 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 25 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、

23B 及 24F 之三種血清型。

【請求項5】 如請求項 1 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 24 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、23B 及 24F 之二種血清型。

【請求項6】 如請求項 1 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 23 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B 以及選自 15A、15C、23A、23B 及 24F 之一種血清型。

【請求項7】 如請求項 1 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其包含 22 種不同的肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物，其中各肺炎球菌莢膜多醣-蛋白質共軛物包含與來自不同肺炎鏈球菌血清型之莢膜多醣共軛的蛋白載體，其中該等肺炎鏈球菌血清型係選自 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33F 及 35B。

【請求項8】 如請求項 1 至 7 中任一項之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中該蛋白載體包含 CRM₁₉₇ 及/或破傷風類毒素。

【請求項9】 如請求項 8 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中該等莢膜多醣中之至少二者與破傷風類毒素共軛且其餘莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛，其中與破傷風類毒素共軛之該至少二種莢膜多醣係選自由血清型 1、3、5、15B 及 22F 組成之群。

【請求項10】如請求項 2 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中來自血清型 1 及 5 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【請求項11】如請求項 2 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中來自血清型 1 及 3 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【請求項12】如請求項 2 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中來自血清型 3 及 5 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【請求項13】如請求項 2 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中來自血清型 1、5、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 3、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【請求項14】如請求項 2 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中來自血清型 1、3、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【請求項15】如請求項 2 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中來自血清型 3、5、15B 及 22F 之莢膜多醣與破傷風類毒素共軛，且來自血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、23A、23B、23F、24F、33F 及 35B 之莢膜多醣與 CRM₁₉₇ 共軛。

【請求項16】如請求項 1 至 15 中任一項之多價肺炎球菌共軛物組成物，其進一步包含佐劑。

【請求項17】如請求項 16 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中該佐劑為以鋁為主之佐劑。

【請求項18】如請求項 17 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中該佐劑係選自由磷酸鋁、硫酸鋁及氫氧化鋁組成之群。

【請求項19】如請求項 18 之多價肺炎球菌共軛物組成物，其中該佐劑為磷酸鋁。

【請求項20】一種如請求項 1 至 19 中任一項之多價肺炎球菌共軛物組成物之用途，其用於預防個體之肺炎鏈球菌感染或疾病。

【請求項21】一種疫苗，其包含如請求項 1 至 19 中任一項之多價肺炎球菌共軛物組成物及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項22】一種用於預防個體之肺炎鏈球菌感染或疾病之方法，該方法包含向該個體投與預防有效量之如請求項 1 至 19 中任一項之多價肺炎球菌共軛物組成物或如請求項 21 之疫苗。

【請求項23】如請求項 22 之方法，其中該個體為至少 50 歲之人類，且該疾病為肺炎或侵襲性肺炎球菌病(IPD)。

【請求項24】如請求項 22 之方法，其中該個體為至少 6 週齡之人類，且該疾病為肺炎、侵襲性肺炎球菌病(IPD)或急性中耳炎(AOM)。

【請求項25】如請求項 24 之方法，其中該個體為 6 週至 5 歲、2 至 15 個月或 6 至 17 歲。

【請求項26】如請求項 20 之用途或如請求項 22 之方法，其中該個體為人類。

【請求項27】如請求項 22 至 26 中任一項之方法，其中該多價肺炎球菌共

軛物組成物或該疫苗係藉由肌肉內注射投與。

【請求項28】如請求項 22 至 27 中任一項之方法，其中該多價肺炎球菌共軛物組成物或該疫苗係作為免疫系列之一部分投與。

【請求項29】一種免疫原性組成物，其包含至少一種多醣-蛋白質共軛物，其中該至少一種多醣-蛋白質共軛物中之多醣為來自肺炎鏈球菌血清型 15A、血清型 15C、血清型 23A、血清型 23B、血清型 24F 或血清型 35B 之莢膜多醣。

【請求項30】一種製造如本文所述之來自肺炎鏈球菌血清型 15A、血清型 15C、血清型 23A、血清型 23B、血清型 24F 或血清型 35B 之莢膜多醣的方法。

【請求項31】如請求項 30 之方法，其中該血清型為血清型 15A 且該方法包含：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣經受酸水解反應及加熱或微流化床(microfluidizer)，且隨後與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣；

(ii)任擇地凍乾該活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣及載體蛋白；

(iii)將該活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣及該載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)中；

(iv)使該活化的肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣及該載體蛋白與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將該肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與該載體蛋白共價連接之該肺炎鏈球菌血清型 15A 多醣的免疫原性共軛物。

【請求項32】如請求項 30 之方法，其中該血清型為血清型 15C 且該方法包含：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣與氧化劑反應，產生活化的肺炎

鏈球菌血清型 15C 多醣；

(ii)任擇地凍乾該活化的肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣及載體蛋白；

(iii)將該活化的肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣及該載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使該活化的血清型 15C 多醣及該載體蛋白之混合物與還原劑反應，產生血清型 15C 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將該血清型 15C 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與該載體蛋白共價連接之該肺炎鏈球菌血清型 15C 多醣的免疫原性共軛物。

【請求項33】如請求項 30 之方法，其中該血清型為血清型 23A 且該方法包含：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 23A 與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣；

(ii)任擇地凍乾該活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣及載體蛋白；

(iii)將該活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣及該載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使該活化的肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣及該載體蛋白之混合物與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將該肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與該載體蛋白共價連接之該肺炎鏈球菌血清型 23A 多醣的免疫原性共軛物。

【請求項34】如請求項 30 之方法，其中該血清型為血清型 23B 且該方法包含：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 23B 與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣；

(ii)任擇地凍乾該活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣及載體蛋白；

(iii)將該活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣及該載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)中；

(iv)使該活化的肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣及該載體蛋白之混合物與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將該肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與該載體蛋白共價連接之該肺炎鏈球菌血清型 23B 多醣的免疫原性共軛物。

【請求項35】如請求項 30 之方法，其中該血清型為血清型 24F 且該方法包含：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣經受酸水解反應或微流化床，且隨後與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣；

(ii)任擇地凍乾該活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣及載體蛋白；

(iii)將該活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣及該載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使該活化的肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣及該載體蛋白與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將該肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與該載體蛋白共價連接之該肺炎鏈球菌血清型 24F 多醣的免疫原性共軛物。

【請求項36】如請求項 30 之方法，其中該血清型為血清型 35B 且該方法包含：

(i)使經純化之肺炎鏈球菌血清型 35B 與氧化劑反應，產生活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣；

(ii)任擇地凍乾該活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣及載體蛋白；

(iii)將該活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣及該載體蛋白懸浮於二甲亞砜(DMSO)或磷酸鹽緩衝液中；

(iv)使該活化的肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣及該載體蛋白與還原劑反應，產生肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物；及

(v)將該肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣-載體蛋白共軛物中未反應的醛封端，以製備包含與該載體蛋白共價連接之該肺炎鏈球菌血清型 35B 多醣的免疫原性共軛物。