



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0066032  
 (43) 공개일자 2019년06월12일

- |   |  |
|---|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>A61K 39/385 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)<br>A61K 39/09 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)<br>(52) CPC특허분류<br>A61K 39/385 (2013.01)<br>A61K 39/092 (2013.01)<br>(21) 출원번호 10-2019-7012456<br>(22) 출원일자(국제) 2017년09월29일<br>심사청구일자 없음<br>(85) 번역문제출일자 2018년04월29일<br>(86) 국제출원번호 PCT/US2017/054237<br>(87) 국제공개번호 WO 2018/064444<br>국제공개일자 2018년04월05일<br>(30) 우선권주장<br>201641033563 2016년09월30일 인도(IN) | (71) 출원인<br>바이오로지칼 이 리미티드<br>인도 텔랑가나 하이데라바드 - 500020 아자마바드<br>18/1 앤드 3<br>(72) 발명자<br>마투르 라메쉬 벤카트<br>인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드<br>18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드<br>만데나 나렌더 데브<br>인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드<br>18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드<br>(뒷면에 계속)<br>(74) 대리인<br>김진희, 김태홍 |
|---|--|

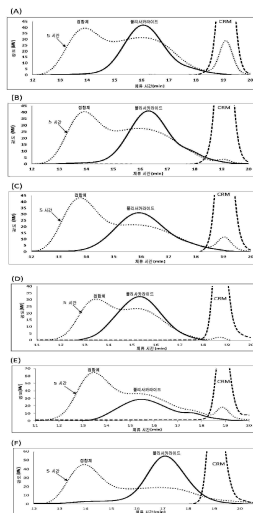
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 **폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 다가 폐렴구균 백신 조성물**

**(57) 요약**

본 개시내용은 담체 단백질에 각각 개별적으로 접합된 피막 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 다가 폐렴구균 백신 조성물에 관한 것이다. 접합된 경우, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 및 담체 단백질의 조합물을 본원에서 폴리사카라이드-단백질 접합체로 지칭한다. 상기 폐렴구균 백신 조성물은 다음 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: 약학적으로 허용 가능한 담체, 약학적으로 허용 가능한 희석제, 완충제, 보존제, 안정화제, 면역보강제 및/또는 동결건조 부형제. 본원에서 설명되는 폐렴구균 백신 조성물의 제조 및 투여 방법이 또한 제공된다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

**A61P 31/04** (2018.01)

**A61K 2039/55505** (2013.01)

**A61K 2039/6068** (2013.01)

(72) 발명자

**스리라만 라잔**

인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드  
18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드

**차카 데비프라산나**

인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드  
18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드

**수레디 사트얌 나이두**

인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드  
18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드

**부르키 라젠다르**

인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드  
18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드

**간티 스투에니바사 라오**

인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드  
18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드

**다틀라 마히마**

인도 500 020 텔랑가나 하이데라바드 아자마바드  
18/1 앤드 3 바이오로지칼 이 리미티드

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

담체 단백질 폐렴구균 표면 부착 단백질 A(PsaA) 또는 담체 단백질로서의 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 2종 이상의 피막 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 10가, 13가, 14가, 15가, 17가, 18가, 19가, 20가, 22가, 23가, 24가 또는 25가 폐렴구균 백신 조성물인 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드가 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되는 하나 이상의 혈청형을 포함하는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 담체 단백질 대 폐렴구균 폴리사카라이드의 백분율 비(단백질/PS)가 약 0.5 내지 약 2.0 단백질/PS인 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 폴리사카라이드가 적어도 10종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하고, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고, 담체 단백질은 PsaA, 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물을 포함하는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 14종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 17종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 19종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 20종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 22종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 24종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고, 담체 단백질이 PsA인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 14가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3 및 6B는 PsA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 14가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3 및 6A는 PsA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 15가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 17가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 20가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45는 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B, 및 38로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 20가 폐렴구균 백신 조성물.

이드를 포함하는 22가 폐렴구균 백신이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 22가 폐렴구균 백신이고, 여기서 혈청형 1, 3, 6A, 10A, 12F, 15A, 15B, 22F, 34, 35B, 38은 PsaA에 접합되고, 혈청형 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 24가 폐렴구균 백신이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 24가 폐렴구균 백신이고, 여기서 혈청형 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A, 15B, 16F, 22F, 34, 35B, 38은 PsaA에 접합되고, 혈청형 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 23**

2종 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물로서, 상기 혈청형이 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 19A 및 22F로부터 선택되고, 담체 단백질이 PsaA인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 24**

2종 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물로서, 상기 혈청형이 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19F, 19A, 22F, 23F, 33F, 34, 35, 38 및 45로부터 선택되고, 담체 단백질이 PsaA인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 단위로 제제화되는 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 단위가 약 0.1  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드, 약 0.1  $\mu\text{g}$  내지 약 10  $\mu\text{g}$ , 또는 약 1  $\mu\text{g}$  내지 약 5  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하고, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드는 약 1.5  $\mu\text{g}$  내지 약 5  $\mu\text{g}$ 의 담체 단백질에 각각 개별적으로 접합되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 희석제, 완충제, 보존제, 안정화제, 면역보강제 및/또는 동결건조 부형제를 추가로 포함하는 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 단위가 단위 용량 바이알, 다회 용량 바이알 또는 프리필드 시린지로서 공급되는 것인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 29**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2 내지 4.4  $\mu\text{g}$ 의 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드;  
 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드 각각에 접합된 약 1  $\mu\text{g}$  내지 약 10  $\mu\text{g}$ 의 PsaA;  
 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드 각각에 접합된 약 1  $\mu\text{g}$  내지 약 10  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>;  
 약 0.2 mg 내지 약 1 mg의 인산알루미늄 면역보강제; 및  
 부형제  
 를 포함하는 단위 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 13가 폐렴구균 백신 조성물이고, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드는 PsaA 또는 PsaA CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합되며,  
 여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 25  $\mu\text{g}$  내지 약 30  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 31**

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 14가 폐렴구균 백신 조성물이고, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드는 PsaA 또는 PsaA CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합되며,  
 여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 35  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 32**

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 14가 폐렴구균 백신 조성물이고, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드는 PsaA 또는 PsaA CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합되며,

여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 35  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 33**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 15가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고,

여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA,  
 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 17가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고,

여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA,  
 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 35**

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 20가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈

청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고,  
 여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA,  
 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 36**

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 22가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합되고,  
 여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA,  
 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.

**청구항 37**

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 폐렴구균 백신 조성물이 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 24가 폐렴구균 백신 조성물이고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고,  
 여기서 폐렴구균 백신 조성물이  
 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드,  
 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA,  
 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>,  
 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄,  
 염화나트륨, 및  
 L-히스티딘 완충제  
 를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량인 폐렴구균 백신 조성물.



**청구항 38**

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 폐렴구균 백신 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 대상체가 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)에 의해 매개되는 질환을 갖는 것인 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에에 의해 매개되는 질환이 침습성 폐렴구균 질환(IPD)인 방법.

**청구항 41**

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 인간이 영아(약 1세 미만), 걸음마 아기(약 12개월 내지 약 24개월), 유아(약 2세 내지 약 5세), 아동(약 5세 내지 약 13세), 청소년(약 13세 내지 약 18세), 성인(약 18세 내지 약 65세), 또는 노인(약 65세 초과)인 방법.

**청구항 43**

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 폐렴구균 백신 조성물의 면역학적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 폴리사카라이드-단백질 접합체를 면역보강제, 부형제 및 완충제를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물로 제제화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 면역보강제가 인산알루미늄인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2016년 9월 30일 출원되고 그 전문이 본원에 참고로 포함된 인도 특허 가출원 제201641033563호에 기초한 우선권을 주장한다.
- [0003] 기술 분야
- [0004] 본 개시내용은 하나 이상의 담체 단백질에 접합된 하나 이상의 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*) 혈청형의 피막 폐렴구균(capsular pneumococcal) 폴리사카라이드를 포함하는 다가 폐렴구균 백신 조성물에 관한 것이다. 접합된 경우, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질은 본원에서 폴리사카라이드-단백질 접합체로 지칭된다.

**배경 기술**

- [0005] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에("폐렴구균")는 폐렴, 균혈증 및 수막염과 같은 침습성 질환, 및 급성 중이염 (예를 들어, 중이의 집락 형성(colonization))과 같은 집락 형성과 연관된 질환을 유발하는 그람 양성 박테리아이다. 이러한 폐렴구균 유발 질환은 특히 24개월 미만 및 60세 초과와 사람에서 이환 및 사망을 초래한다. 미국에서 60세 초과와 사람에서 폐렴구균성 폐렴 발생률은 10만 명당 3 내지 8명으로 추정된다. 20%의 사례에서, 폐렴구

균성 폐렴은 균혈증 및 수막염으로 이어지며, 항생제 치료에도 불구하고 그 사망률은 30%에 근접한다.

- [0006] 뉴몰리신(pneumolysin) 및 폐렴구균 표면 단백질 A(PspA)와 같은 단백질은 폐렴구균 백신에서 담체 단백질 후보 물질로서의 적합성에 대해 평가되어 왔다. 상기 단백질은 둘 모두 마우스에서 부분적으로 보호되지만([Paton et al. "Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with Streptococcus pneumoniae." Infect Immun. 1983 May; 40(2): 548-552] 및 [McDaniel et al. "PspA, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type" Infect Immun. 1991 Jan; 59(1): 222-228]), 백신에서 면역원으로 사용하기에는 단점이 있다. 폐렴구균 사이에서 잘 보존되지만, 뉴몰리신은 그의 천연 상태에서 독성 효과를 보인다(AlonsoDeVelasco et al. "Streptococcus pneumoniae: Virulence factors, pathogenesis, and vaccines." Microbiol Rev. 1995 Dec; 59(4): 591-603). 다른 한편으로, PspA는 혈청학적 및 구조적으로 이질적이다(Crain et al. "Pneumococcal surface protein A) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of Streptococcus pneumoniae." Infect Immun. 1990 Oct; 58(10): 3293-3299). 백신 제제에서의 그의 사용은 여러 PspA 유형을 필요로 하고, 따라서 백신 제조의 복잡성을 증가시킨다.
- [0007] 폐렴구균 표면 부착 A("PsaA")는 다기능성 지단백질이며, 숙주 세포 부착 및 집락 형성에 관여한다. 이것은 고도로 보존된 표면 단백질이고, 에스. 뉴모니아에(*S. pneumoniae*)의 알려진 혈청형에 걸쳐 97% 상동성이다. PsaA는 면역원성이고, 항-PsaA 항체는 폐렴구균의 자연적 비인두 집락 형성 동안 증가하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 폐렴구균 백신은 감염을 예방하기 위해 투여될 수 있다. 현재 백신은 다가 폐렴구균 폴리사카라이드 백신(2종 이상의 혈청형으로부터의 폐렴구균 폴리사카라이드 포함) 및 폐렴구균 접합 백신을 포함한다. 폐렴구균 폴리사카라이드 백신의 보호 효능은 피막 폴리사카라이드에 대해 생성된 항체의 농도와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 폐렴구균 세포는 90종 초과의 상이한 폐렴구균 혈청형을 생성하는 폴리사카라이드로 피막화된다. 피막은 폐렴구균의 주요한 병독성 결정 인자이고, 이것은 보체 매개 세포 용해로부터 세포의 내부 표면을 보호할 뿐만 아니라, 약한 면역원성을 갖는다.
- [0009] 머크(Merck)의 뉴모박스(Pneumovax)<sup>®</sup>23은 다가 폐렴구균 폴리사카라이드 백신이며, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 23종의 폐렴구균 혈청형으로부터의 비접합된 피막 폴리사카라이드를 함유한다. 뉴모박스<sup>®</sup>23 외에, 지금까지 허가된 다가 폐렴구균 폴리사카라이드 백신은 성인, 특히 고령자와 고위험군에서 폐렴구균성 질환의 예방에 유용한 것으로 입증되었다. 그러나, 영아 및 유아들은 이러한 비접합된 폐렴구균 폴리사카라이드 백신에 잘 반응하지 않는다.
- [0010] 프레브나(Prevnar)<sup>®</sup>-7은 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신으로서, 7종의 가장 빈번하게 단리되는 폴리사카라이드 혈청형(예를 들어, CRM<sub>197</sub>에 접합된 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F)을 포함한다. 프레브나<sup>®</sup>-7이 2000년도에 미국에서 사용되기 시작한 이후에, 어린이의 침습성 폐렴구균 질환(IPD)이 크게 감소하였다. CRM<sub>197</sub>에 접합된 13종의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 함유하는 13가 접합체 백신 프레브나-13<sup>®</sup>이 개발되었고, 이것은 세계의 일부 지역에서 프레브나<sup>®</sup>-7을 사용한 혈청형 적용 범위(coverage)의 한계 때문에 승인되었다.
- [0011] 신플로릭스(Synflorix)<sup>®</sup>는 10종의 폴리사카라이드 혈청형, 즉 단백질 D(PD)에 접합된 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7, 9, 14, 23F, 파상풍 독소이드(TT)에 접합된 혈청형 18C 및 디프테리아 독소이드(DT)에 접합된 혈청형 19F를 포함하는 폐렴구균 백신이다. 각각의 혈청형 폴리사카라이드는 제어된 pH 하에 1-시아노-4-디메틸아미노-피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)를 사용하여 커플링된다.
- [0012] 이러한 백신에도 불구하고, 대체 폴리사카라이드 혈청형 및 담체 단백질을 포함하는 추가의 다가 폐렴구균 백신 뿐만 아니라, 그의 간단하고 효율적인 생산이 요구되고 있다.
- [0013] 폐렴구균 백신은 추가의 참고 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,360,897호는 적어도 2개의 카르보닐기를 갖는 박테리아 병원체 에스. 뉴모니아에의 무손상 피막 중합체 및 박테리아 독소 또는 독소이드의 환원성 아민화 생성물을 포함하는 면역원성 접합체를 개시하고 있고, 상기 접합체는 피막 중합체와 독소 또는 독소이드 사이에 직접적인 공유 결합이 존재하는 가교결합된 접합체를 포함한다.
- [0014] 미국 특허 제5,693,326호는 접합체 백신을 제조하는 일반화된 방법을 제공하고, 이 방법에서 바이러스, 진균 또는 박테리아 폴리사카라이드를 활성화하기 위해 1-시아노-4-(디메틸아미노)-피리디늄 테트라플루오로보레이트,

N-시아노트리에틸-암모늄 테트라플루오로보레이트 및 p-니트로페닐시아네이트 기로부터 선택되는 유기 시아닐화제가 사용되어 활성화된 탄수화물을 형성한 후, 단백질 또는 담체 단백질에 커플링된다.

- [0015] 미국 특허 제5,854,416호는 PsaA(폐렴구균 표면 부착 A)로 알려진 에스. 뉴모니아에로부터의 37 kDa 단백질의 아미노산 및 DNA 서열을 개시하고 있고, 미국 특허 제7,862,823호는 DT 및 TT와 같은 적어도 2종의 상이한 담체 단백질과 함께 폐렴구균 피막 폴리사카라이드를 포함하는 다가 접합체 백신 조성물을 개시하고 있다.
- [0016] 미국 특허 제7,955,605호는 활성화된 혈청형 19A 폴리사카라이드 및 담체 단백질이 디메틸 술폭시드(DMSO)에 재현탁되어 접합체를 형성하는, 19A로 이루어진 면역원성 접합체의 제조 방법이 기재되어 있다.
- [0017] 미국 특허 제8,192,746호는 CRM<sub>197</sub>에 접합된 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 및 33F로부터의 피막 폴리사카라이드를 갖는 15가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 개시하고 있다.
- [0018] 미국 특허 제8,465,749호는 폴리사카라이드를 CDAP와 반응시키고 특정 pH 범위 하에서 히드라진 또는 아디프산 디히드라이드와 단백질을 반응시킴으로써 접합체 백신을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0019] 미국 특허 제8,557,250 B2호는 다수의 시아네이트 활성화된 별개의 면역원성 폴리사카라이드의 혼합물을 적어도 하나의 히드라이드 활성화된 단백질과 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 개시하고 있다.
- [0020] 미국 특허 제8,808,708호, 제7,955,605호 및 미국 특허 제8,603,484호는 혈청형이 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로 이루어진 폴리사카라이드-단백질 접합체 및 담체 단백질 CRM<sub>197</sub>로 이루어진 13가 면역원성 조성물을 설명하고 있다.
- [0021] 미국 특허 공개 제2009/0017059 A1호는 혈청형 19A 및 19F가 과상풍 독소이드, 디프테리아 독소이드, 백일해 독소이드, 박테리아 시톨리신(cytolysin) 및/또는 뉴몰리신을 포함하는 상이한 박테리아 독소이드에 접합된 면역원성 조성물을 개시하고 있다.
- [0022] 미국 특허 공개 제2010/0074922 A1호는 19F 피막 사카라이드가 DT에 접합되고, 혈청형 18C 피막 사카라이드가 과상풍 독소이드에 접합되고 혈청형 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 및 23F 피막 사카라이드가 해모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)로부터 단리된 단백질 D에 접합된, 10종 이상의 혈청형을 함유하는 면역원성 조성물을 개시하고 있다.
- [0023] 미국 특허 공개 제2010/0239604호는 혈청형 19A 및 19F로부터의 다가 에스. 뉴모니아에 피막 사카라이드 접합체를 포함하는 면역원성 조성물을 기재하고 있고, 여기서 혈청형 19A는 제1 박테리아 독소이드에 접합되고, 19F는 제2 박테리아 독소이드에 접합되고, 에스. 뉴모니아에 피막 사카라이드의 2-9종이 단백질 D에 접합된다.
- [0024] 미국 특허 공개 제2012/321658 A1호는 직접 또는 환원성 아민화 이외의 다른 화학을 통해 간접적으로 단백질 담체(들)에 연결된 혈청형 1, 3, 19A 및 19F 및 하나 이상의 상이한 사카라이드가 환원성 아민화에 의해 단백질 담체(들)에 연결된 혈청형 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C 및 23F로 이루어진 제2 군으로부터 선택되는 것인 면역원성 조성물을 개시하고 있다.
- [0025] IN 140/DEL/2011은 (a) DT, 디프테리아 독소이드, CRM<sub>197</sub> 및 과상풍 독소이드를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 2종 이상의 담체 단백질에 접합된 상이한 혈청형으로부터의 (a) 7종 이상 또는 (b) 10종 이상의 폴리사카라이드를 포함하는 에스. 뉴모니아에 백신을 제공한다.
- [0026] WO 공개 제2013/191459 A1호는 CRM<sub>197</sub>에 접합된 피막 폴리사카라이드 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 유래된 에스. 뉴모니아에의 상이한 혈청형을 포함하는 접합된 15가 조성물을 개시하고 있다.
- [0027] WO 공개 제2014/092377 A1호에는 13가 조성물이 개시되어 있고, 여기서 12종의 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 선택되고, 마지막 혈청형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 12 또는 9N이다.
- [0028] WO 공개 제2014/092378 A1호에는 12종의 혈청형이 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F로부터 선택되고 나머지 하나는 CRM<sub>197</sub>에 접합된 22F 또는 33F로부터 선택되는 면역원성 접합체가 기재되어 있다.
- [0029] WO 2016207905 A2는 1) CDAP로 활성화되고 담체 단백질 CRM<sub>197</sub>에 접합된 에스. 뉴모니아에의 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9N, 9V, 15B, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 적어도 12종의 피막 폴리사카라이드

이드, 및 2) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 다가 폐렴구균 접합체 백신 (PCV) 조성물을 개시하고 있고, 이 조성물은 혈청형 6A로부터의 피막 폴리사카라이드를 함유하지 않는다.

- [0030] 중국 특허 출원 공개 제CN 101590224호는 CRM<sub>197</sub>에 접합된 혈청형 1, 2, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9N, 9V, 14, 18C, 19A, 19F 및 23F를 함유하는 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신을 기재하고 있다.
- [0031] 중국 특허 출원 공개 제CN 103623401호는 14종의 다가 폐렴구균 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 개시하고 있고, 여기서 상기 14종의 상이한 혈청형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F이다.
- [0032] 중국 특허 출원 공개 제CN 103656632호에는 혈청형 6A, 및 CRM<sub>197</sub>에 접합된 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 혈청형을 함유하는 다가 폐렴구균 피막 폴리사카라이드 조성물이 개시되어 있다.
- [0033] 중국 특허 출원 공개 제CN 103656631호는 다가 폐렴구균 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물 및 이의 제조 방법을 제공한다. 접합체 조성물은 24종의 상이한 혈청형의 폐렴구균의 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하며 공유 연결 방식으로 제조되며, 24종의 상이한 혈청형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F이다.
- [0034] 중국 특허 출원 공개 제CN 104069488호는 14종의 상이한 혈청형의 다가 폐렴구균 피막 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 개시하고 있으며, 상기 14종의 혈청형은 CRM<sub>197</sub>에 접합된 1, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함한다.
- [0035] 문헌 [Deborah et al., 1996, Volume 21, Issue 1, Pages 17-22]은 PsaA가 펴브리아(fimbrial) 부착 단백질과 유의한 상동성을 갖는 것으로 기술하고 있다. 완전 프로인트(Freund) 또는 TiterMax™ 면역보강제를 사용하여 CBA/CaHnJ Xid 마우스를 PsaA로 면역화하면, LD<sub>50</sub>의 45배까지의 용량으로 3형 폐렴구균 균주 WU2를 사용한 이중 정맥 내 시험 접종에서 마우스를 유의하게 보호할 수 있었다.
- [0036] 문헌 [Miyaji E N et al., 2001, Vaccine; 20 (5-6): 805-12]에는 가장 중요한 인간 병원체 중 하나로서 에스. 뉴모니아에가 개시되어 있다. 전장 PsaA 또는 말단절단된 PspA 유전자를 함유하는 DNA 백신 벡터가 구축되었다. 두 구축물 모두 척추동물 세포에서 항원의 일시적인 발현을 보였고, 근육 내로 주사된 BALB/c 마우스에서 폐렴구균 항원에 대한 유의한 항체 반응을 유도하였다.
- [0037] 문헌 [Wuorimaa et al. 2001, The Paediatric Infectious Disease Journal, Volume 20(3), pp 272-277]는 TT와 DT 둘 모두를 담체로 사용하는 11가 폐렴구균 접합체 백신의 건강한 걸음마 아기에서의 내약성 및 면역원성을 평가하는 연구를 개시하고 있다.
- [0038] 문헌 [Gatchalian et al. 2001, 17th Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis (ESPID), poster number 4, P1A Poster Session 1, Istanbul Turkey]에는 11가 백신을 투여한 영아가 혈청형 3에 대한 항체 반응을 다른 시험된 혈청형과 대등한 수준으로 나타내지 못했음을 보여주는 흡소닌 식작용 검정(OPA) 결과가 개시되어 있다.
- [0039] 문헌 [Anderson P et al., 2003, Vaccine; 21 (13-14):1554-9]은 파상풍 독소이드 또는 디프테리아 CRM<sub>197</sub>에 별개로 커플링된 폴리사카라이드 유형 6A, 14, 19F 및 23F를 갖는 4가 접합체 백신 또는 파상풍 독소이드 또는 디프테리아 CRM<sub>197</sub>에 별개로 커플링된 폴리사카라이드 유형 6A, 14, 19F 및 23F의 1/2 투여량의 혼합물에 대한 비교 연구를 개시하고 있다.
- [0040] 문헌 [Nurkka et al. 2004, Ped. Inf. Dis. J., 23:1008-1014]은 11가 폐렴구균 단백질 D 접합체 백신의 면역원성 및 안전성에 대한 연구를 개시하고 있고, 여기서 백신을 3회 투여한 후, 동일한 백신 또는 폐렴구균 폴리사카라이드 백신의 부스터 투여를 실시한 영아에서 혈청형 3에 대한 프라이밍 효과는 관찰되지 않았다.
- [0041] 상기 언급된 참고 문헌에는 다른 조성물, 방법 등 중에서, 하나 이상의 혈청형으로부터의 폴리사카라이드뿐만 아니라, CRM<sub>197</sub>, 단백질 D, DT, 및 TT와 같은 담체 단백질과 상기 폴리사카라이드의 접합체를 포함하는 다가 폐렴구균 백신이 개시되어 있다. 다양한 영역에 걸쳐 유행하는 상이한 혈청형을 고려할 때, 면역 반응이 개선되고 그의 간단하고 효율적인 생산이 가능한, 폴리사카라이드 혈청형의 신규한 접합체를 포함하는 추가의 다가 폐렴

구균 백신에 대한 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

- [0042] 개요
- [0043] 몇몇 실시양태에서, 본 개시내용은 담체 단백질로서의 페렴구균 표면 부착 단백질 A(PsaA) 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 2종 이상의 피막 페렴구균 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0044] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 10가, 14가, 15가, 17가, 18가, 19가, 20가, 22가, 23가, 24가 또는 25가 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0045] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 각각 페렴구균 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39, 및 45로부터 선택되는 혈청형인 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0046] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 담체 단백질로서의 페렴구균 표면 부착 단백질 A(PsaA)와 접합된, 페렴구균 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39, 및 45로부터 선택되는 각각의 혈청형으로부터의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0047] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 담체 단백질로서의 페렴구균 표면 부착 단백질 A(PsaA) 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물과 접합된, 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39, 및 45로부터 선택되는 혈청형으로부터의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0048] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39, 및 45로부터 선택되는 혈청형으로부터의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 적어도 3종의 페렴구균 폴리사카라이드는 페렴구균 표면 부착 단백질 A(PsaA)와 접합된다.
- [0049] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 페렴구균 표면 부착 단백질 A(PsaA)와 접합된 혈청형 3, 6A, 6B로부터의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0050] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되는 적어도 10종의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 개시하고, 담체 단백질은 PsaA, 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물을 포함한다.
- [0051] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 적어도 14종의 페렴구균 폴리사카라이드 접합체를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0052] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 적어도 17종의 페렴구균 폴리사카라이드 접합체를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0053] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 적어도 19종의 페렴구균 폴리사카라이드 접합체를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0054] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 적어도 20종의 페렴구균 폴리사카라이드 접합체를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0055] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 적어도 22종의 페렴구균 폴리사카라이드 접합체를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0056] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 적어도 24종의 페렴구균 폴리사카라이드 접합체를 포함하는 페렴구균 백신 조성물을 제공한다.

- [0057] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 2종 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 혈청형은 3, 5, 6A, 6B, 9V 및 18C로부터 선택되며, 담체 단백질은 PsaA이다.
- [0058] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 2종 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 19A 및 22F로부터 선택되며, 담체 단백질은 PsaA이다.
- [0059] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 2종 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 혈청형은 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19F, 19A, 22F, 23F, 33F, 34, 35, 38 및 45로부터 선택되며, 담체 단백질은 PsaA이다.
- [0060] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 혈청형은 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되며, 담체 단백질은 PsaA이다.
- [0061] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 폐렴구균 폴리사카라이드는 PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된다.
- [0062] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA에 각각 개별적으로 접합된 적어도 6종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 및 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0063] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA에 각각 개별적으로 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 및 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0064] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA에 각각 개별적으로 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 및 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 14가 폐렴구균 백신을 제공한다.
- [0065] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형, 및 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형을 포함하는 17가 폐렴구균 백신을 제공한다.
- [0066] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형, 및 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형을 포함하는 20가 폐렴구균 백신을 제공한다.
- [0067] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형, 및 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형을 포함하는 22가 폐렴구균 백신을 제공한다.
- [0068] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형, 및 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드의 적어도 5종의 혈청형을 포함하는 24가 폐렴구균 백신을 제공한다.
- [0069] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 14가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0070] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 14가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3 및 6A는 PsaA

에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.

- [0071] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 15가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0072] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B를 포함하는 17가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0073] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45를 포함하는 20가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0074] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38을 포함하는 22가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0075] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38을 포함하는 22가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 1, 3, 6A, 10A, 12F, 15A, 15B, 22F, 34, 35B, 38은 PsaA에 접합되고, 혈청형 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0076] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38을 포함하는 24가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0077] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38을 포함하는 24가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 혈청형 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A, 15B, 16F, 22F, 34, 35, 38은 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0078] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 투여 단위로 제제화된 폐렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0079] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 투여 단위로 제제화된 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 투여 단위는 약 0.1  $\mu$ g 내지 약 50  $\mu$ g의 각각의 폴리사카라이드, 약 0.1  $\mu$ g 내지 약 10  $\mu$ g, 또는 약 1  $\mu$ g 내지 약 5  $\mu$ g의 각각의 폴리사카라이드를 포함하고, 각각의 폴리사카라이드는 약 1.5  $\mu$ g 내지 약 5  $\mu$ g의 담체 단백질에 각각 개별적으로 접합된다.
- [0080] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 약학적으로 허용 가능한 희석제, 완충제, 보존제, 안정화제, 면역보강제 및/또는 동결건조 부형제를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0081] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 단위 용량 바이알, 다회 용량 바이알 또는 프리필드 시린지로서 공급되는 투여 단위로 제제화된 폐렴구균 백신 조성물을 제공한다.
- [0082] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 0.5 mL의 단위 용량의 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 단위 용량은 약 2.2 내지 4.4  $\mu$ g의 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드; 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드 각각에 접합된 약 1  $\mu$ g 내지 약 10  $\mu$ g의 PsaA; 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드 각각에 접합된 약 1  $\mu$ g 내지 약 10  $\mu$ g의 CRM<sub>197</sub>; 약 0.2 mg 내지 약 1 mg의 인산알루미늄 면역보강제; 및 부형제를 포함한다.
- [0083] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴

리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 및 33F를 포함하는 13가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 25  $\mu\text{g}$  내지 약 30  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0084] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 14가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 30  $\mu\text{g}$  내지 약 35  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0085] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 14가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2 내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 30  $\mu\text{g}$  내지 약 35  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0086] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F를 포함하는 15가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고, 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0087] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B를 포함하는 17가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고, 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0088] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45를 포함하는 20가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고, 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0089] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38을 포함하는 22가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합되고, 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0090] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38을 포함하는 22가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 1, 3, 6A, 10A, 12F, 15A, 15B, 22F, 34, 35B, 38은 PsaA에 접합되고, 혈청형 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합되고, 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$



내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

[0091] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38을 포함하는 24가 폐렴구균 백신을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합되고, 폐렴구균 백신 조성물은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.5 mg의 인산알루미늄으로서의 약 0.125 mg의 원소 알루미늄, 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함하는 멸균 액체로서 제제화된 약 0.5 mL 용량이다.

### 도면의 간단한 설명

[0092] 도 1: SEC-HPLC 크로마토그램은 혈청형 7F(A), 혈청형 14(B), 혈청형 19F(C), 혈청형 3(D), 혈청형 6A(E) 및 혈청형 6B(F)의 접합 반응 동역학을 도시한 것이다.

도 2: SEC-HPLC 크로마토그램은 혈청형 5(A), 혈청형 9V(B), 혈청형 18C(C), 혈청형 3(D), 혈청형 6A(E) 및 혈청형 6B(F)의 접합 반응 동역학을 도시한 것이다.

도 3: 실시예 3에서 설명되는, 본 개시내용의 조성물로 면역화된 토끼의 상이한 혈청형에 대한 면역 반응.

도 4: 프레브나(Prevnar) 13®으로 면역화된 토끼의 상이한 혈청형에 대한 면역 반응.

도 5: 실시예 4에서 설명되는, 본 개시내용의 또 다른 조성물로 면역화된 토끼의 상이한 혈청형에 대한 면역 반응.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] 상세한 설명

[0094] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드는 천연 폐렴구균 폴리사카라이드이다.

[0095] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 여기서 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드는 단편화되고, 각각의 단편화된 폐렴구균 폴리사카라이드의 평균 분자량은 천연 폐렴구균 폴리사카라이드의 평균 분자량보다 더 작다.

[0096] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하며, 여기서 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드는 담체 단백질에 접합하기 전에 1-시아노-4-디메틸아미노-피리디늄 테트라플루오로보레이트(CDAP)로 활성화되어 시아네이트 에스테르를 형성한다.

[0097] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하며, 여기서 하나 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드는 담체 단백질의 아미노기에 직접 커플링되거나 또는 스페이서에 의해 아미노기에 커플링된다.

[0098] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하며, 여기서 스페이서는 시스타민, 시스테아민, 헥산 디아민, 아디프산 디히드라지드(ADH), EDAC 또는 EDC이다.

[0099] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하며, 여기서 PsaA 담체 단백질은 변형된 PsaA이고 야생형 수소성 N 말단 리더 펩티드를 포함하지 않는다.

[0100] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 혈청형의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하며, 여기서 PsaA 담체 단백질은 290종의 아미노산을 포함한다.

[0101] 본 개시내용은 본원에서 폴리사카라이드-단백질 접합체 및/또는 접합체로 언급되는, 담체 단백질에 각각 개별적으로 접합된 2 이상의 피막 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공한다. 본원에서 설명되는 폐렴구균 백신 조성물에 포함되는 경우, 폐렴구균 백신은 다가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백

질 접합체 백신(본원에서 다가 접합체 백신, 접합체 백신 및/또는 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신으로도 언급됨)이다. 다가 접합 백신 이외에, 본 개시내용은 백신의 제조 방법 및/또는 이를 필요로 하는 대상체에 대한 백신의 투여 방법을 제공한다.

- [0102] 일부 실시양태에서, 폐렴구균 백신 조성물은 하나 이상의 접합체를 포함하는 다가 면역원성 조성물이다. 예를 들어, 접합체는 2종 이상의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함할 수 있으며, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39, 및 45의 폐렴구균 폴리사카라이드로부터 선택된다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 폐렴구균 백신 조성물은 다가이고, 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드(5가), 10종의 폐렴구균 폴리사카라이드(10가), 11종의 폐렴구균 폴리사카라이드(11가), 12종의 폐렴구균 폴리사카라이드(12가), 13종의 폐렴구균 폴리사카라이드(13가), 14종의 폐렴구균 폴리사카라이드(14가), 15종의 폐렴구균 폴리사카라이드(15가), 16종의 폐렴구균 폴리사카라이드(16가), 17종의 폐렴구균 폴리사카라이드(17가), 18종의 폐렴구균 폴리사카라이드(18가), 19종의 폐렴구균 폴리사카라이드(19가), 20종의 폐렴구균 폴리사카라이드(20가), 21종의 폐렴구균 폴리사카라이드(21가), 22종의 폐렴구균 폴리사카라이드(22가), 23종의 폐렴구균 폴리사카라이드(23가), 24종의 폐렴구균 폴리사카라이드(24가), 25종의 폐렴구균 폴리사카라이드(25가), 26종의 폐렴구균 폴리사카라이드(26가), 27종의 폐렴구균 폴리사카라이드(27가), 28종의 폐렴구균 폴리사카라이드(28가), 29종의 폐렴구균 폴리사카라이드(29가), 또는 30종의 폐렴구균 폴리사카라이드(30가)를 포함한다. 다른 실시양태에서, 폐렴구균 백신 조성물은 10가, 14가, 15가, 17가, 18가, 19가, 20가, 22가, 23가, 24가 또는 25가 폐렴 백신 조성물이다.
- [0104] 놀랍게도, 본 개시내용의 다가 폐렴구균 접합체 백신 조성물은 담체 단백질에 접합되지 않은 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 다가 폐렴구균 백신에 비해 개선된 면역 반응을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 개시내용의 다가 폐렴구균 접합체 백신 조성물은 놀랍게도 스트렙토코쿠스 뉴모니아에의 하나 이상의 혈청형으로부터의 폐렴구균 폴리사카라이드가 PsaA 및/또는 CRM<sub>197</sub>에 접합될 때 가장 효과적이었다.
- [0105] 담체 단백질은 충분한 양 및 순도로 수득할 수 있는 무독성 및 비반응원성 단백질이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드(본원에서 "폐렴구균 폴리사카라이드"라고 언급됨)에 접합된 하나 이상의 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 접합체 백신 조성물을 제공한다. 폐렴구균 폴리사카라이드를 담체 단백질에 접합시킴으로써, 폐렴구균 폴리사카라이드는 비접합된 폐렴구균 폴리사카라이드에 비해 면역원성을 증가시켰다. 본 개시내용에서 유용한 담체 단백질은 표준 접합 절차를 잘 따라야 한다.
- [0106] CRM<sub>197</sub>은 디프테리아 독소의 변이체이고, 백신에 사용하기 위해 무독성이다. CRM<sub>197</sub>은 카사미노산 및 효모 추출물 기반 배지에서 성장한 코리네박테리움 디프테리아에(*Corynebacterium diphtheriae*) 균주 C7(β 197)의 배양액로부터 단리될 수 있다. CRM<sub>197</sub>은 미국 특허 제5,614,382호에 기재된 방법에 따라 재조합 방식으로 제조될 수 있다. 다르게는, CRM<sub>197</sub>은 문헌에 공지된 방법에 따라 또는 PCT 공개 WO 2016/079755에 개시된 방법에 따라 재조합 방식으로 제조될 수 있다. CRM<sub>197</sub>은 한외여과, 황산암모늄 침전, 및 이온 교환 크로마토그래피 또는 관련 기술 분야에 널리 공지된 다른 방법에 의해 정제될 수 있다.
- [0107] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 폐렴구균 폴리사카라이드는 하나 이상의 담체 단백질에 접합된다. 예를 들어, 폐렴구균 폴리사카라이드는 담체 단백질에 각각 개별적으로 접합된다. 다른 실시양태에서, 하나 초과 폐렴구균 폴리사카라이드가 담체 단백질에 접합된다. 예를 들어, 2종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 3종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 4종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 6종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 7종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 8종의 폐렴구균 폴리사카라이드, 9종의 폐렴구균 폴리사카라이드 또는 10종의 폐렴구균 폴리사카라이드가 담체 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 폐렴구균 폴리사카라이드는 하나 초과 담체 단백질에 접합된다. 예를 들어, 폐렴구균 폴리사카라이드는 하나의 담체 단백질, 2종의 담체 단백질, 3종의 담체 단백질 및/또는 4종의 담체 단백질에 접합된다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 담체 단백질은 PsaA이다. 추가 실시양태에서, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드에 각각 개별적으로 접합된 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>과 같은 2종 이상의 담체 단백질의 조합물이 사용된다. 추가 실시양태에서, 담체 단백질은 2종의 담체 단백질이며, PsaA 및 CRM<sub>197</sub>을 포함한다.

- [0109] 일부 실시양태에서, 담체 단백질은 다음 담체 단백질 중 하나 이상으로부터 선택된다: PsaA, CRM<sub>197</sub>, 불활성화된 박테리아 독소, 예를 들어 과상풍 독소이드, 백일해 독소이드; 콜레라 독소이드, 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)의 외독소 A, 박테리아 외막 단백질, 예를 들어 외막 복합체 c(OMPC), 포린, 트랜스 페린 결합 단백질, 뉴몰리신, PspA, A군 또는 B군 스트렙토코쿠스로부터의 C5a 펩티다제, 또는 해모필루스 인플 루엔자에 단백질 D, 오발부민, 키홀 립렛 헤모시아닌(KLH), 소 혈청 알부민(BSA) 및 투베르쿨린의 정제된 단백질 유도체(PPD).
- [0110] 또한, 하나 이상의 접합체는 천연(예를 들어, 야생형) 담체 단백질을 포함할 수 있고/있거나, 하나 이상의 접합체는 그들의 천연 형태로부터 비천연 형태로 변형된(예를 들어, 하나 이상의 아미노산이 결여되도록 조작된) 담체 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 담체 단백질은 하나 이상의 단백질 도메인, 예를 들어 리더 펩티드, 또는 본 개시내용의 접합체에 바람직하지 않은 특성을 가질 수 있는 다른 도메인을 제거하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, PsaA는 소수성 지수(hydrophathy index)가 2.052인 소수성 N 말단 펩티드가 결여되도록 조작된 290종 아미노산의 담체 단백질일 수 있다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택된 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 페렴구균 폴리사카라이드는 담체 단백질 PsaA에 각각 개별적으로 접합되거나, 또는 선택된 페렴구균 폴리사카라이드의 제1 부분은 PsaA에 접합되고 선택된 페렴구균 폴리사카라이드의 제2 부분은 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 이들 실시양태 중 임의의 실시양태에서, 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물, 예를 들어 10가, 13가, 14가, 15가, 17가, 18가, 19가, 20가, 22가, 23가, 24가 또는 25가 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물이다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택된 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 페렴구균 폴리사카라이드는 담체 단백질 PsaA에 각각 개별적으로 접합된다. 다른 실시양태에서, 선택된 페렴구균 폴리사카라이드의 제1 부분은 PsaA에 접합되고, 선택된 페렴구균 폴리사카라이드의 제2 부분은 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 이들 실시양태 중 임의의 실시양태에서, 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물, 예를 들어 10가, 13가, 14가, 15가, 17가, 18가, 19가, 20가, 22가, 23가, 24가 또는 25가 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물이다.
- [0113] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택된 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 이들 실시양태에서, 선택된 페렴구균 폴리사카라이드 중 적어도 3종은 담체 단백질 PsaA에 각각 개별적으로 접합되고, 추가의 페렴구균 폴리사카라이드는 담체 단백질 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된다. 이들 실시양태 중 임의의 실시양태에서, 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물, 예를 들어 10가, 13가, 14가, 15가, 17가, 18가, 19가, 20가, 22가, 23가, 24가 또는 25가 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물이다.
- [0114] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택된 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 이들 실시양태에서, 선택된 페렴구균 폴리사카라이드 중 적어도 5종의 제1 폴리사카라이드는 담체 단백질 PsaA에 각각 개별적으로 접합되고, 적어도 5종의 제2 폴리사카라이드는 담체 단백질 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된다. 5종의 선택된 제1 페렴구균 폴리사카라이드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고,

5종의 선택된 제2 페렴구균 폴리사카라이드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 선택된 페렴구균 폴리사카라이드의 제1 부분은 PsaA에 접합되고, 선택된 페렴구균 폴리사카라이드의 제2 부분은 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 이들 실시양태 중 임의의 실시양태에서, 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물, 예를 들어 10가, 14가, 15가, 17가, 18가, 19가, 20가, 22가, 23가, 24가 또는 25가 면역원성 다가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물이다.

[0115] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 PsaA에 접합된 적어도 3종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 14가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 또한, 14가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 CRM<sub>197</sub>에 접합된 적어도 5종의 페렴구균 폴리사카라이드를 추가로 포함한다.

[0116] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 PsaA에 접합된 적어도 3종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 15가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 또한, 15가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 CRM<sub>197</sub>에 접합된 적어도 5종의 페렴구균 폴리사카라이드를 추가로 포함한다.

[0117] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 PsaA에 접합된 적어도 3종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 17가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 또한, 17가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 CRM<sub>197</sub>에 접합된 적어도 5종의 페렴구균 폴리사카라이드를 추가로 포함한다.

[0118] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 PsaA에 접합된 적어도 3종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 20가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 또한, 20가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 CRM<sub>197</sub>에 접합된 적어도 5종의 페렴구균 폴리사카라이드를 추가로 포함한다.

[0119] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 PsaA에 접합된 적어도 5종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 페렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 22가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 또한, 22가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 CRM<sub>197</sub>에 접합된 적어도 5종의 페렴구균 폴리사카라이드를 추가로 포함한다.

- [0120] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 PsaA에 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 24가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 또한, 24가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 CRM<sub>197</sub>에 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 추가로 포함한다.
- [0121] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 PsaA에 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 25가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 또한, 25가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되고 CRM<sub>197</sub>에 접합된 적어도 5종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 추가로 포함한다.
- [0122] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 적어도 혈청형 3 및 혈청형 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0123] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 적어도 혈청형 3 및 혈청형 6A는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0124] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 15가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 17가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0126] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 20가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45는 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0127] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 22가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고, 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A,

15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.

- [0128] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 22가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 혈청형 1, 3, 6A, 10A, 12F, 15A, 15B, 22F, 34, 35, 및 38은 PsaA에 접합되고, 혈청형 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 및 33F는 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0129] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 피막 폐렴구균 폴리사카라이드)를 포함하는 24가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다. 선택된 혈청형 중에서, 혈청형 1, 3, 6A, 8, 10A, 12F, 15A, 15B, 16F, 22F, 34, 35, 및 38은 PsaA에 접합되고, 혈청형 14, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F 및 33F는 각각 CRM<sub>197</sub>에 접합된다.
- [0130] 본 개시내용의 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 약학적으로 허용 가능한 담체, 약학적으로 허용 가능한 희석제, 완충제, 보존제, 안정화제, 면역보강제 및/또는 동결 건조 부형제를 추가로 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용의 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15A, 15B, 15C, 16F, 17F, 18C, 19F, 19A, 20A, 20B, 22F, 23A, 23B, 23F, 24B, 24F, 31, 33F, 34, 35B, 35F, 38, 39 및 45로부터 선택되는 적어도 10종의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함한다. 선택된 혈청형은 PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물, 및 약학적으로 허용 가능한 담체에 각각 개별적으로 접합된다.
- [0131] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물에 유용한 폐렴구균 폴리사카라이드는 통상적인 방법에 따라 하나 이상의 미생물(예를 들어, 스트렙토코쿠스 뉴모니아에)로부터 추출될 수 있다. 예를 들어, 폐렴구균 폴리사카라이드는 공지된 절차에 따라 제조될 수 있다. 또한, 폐렴구균 폴리사카라이드의 정제는 PCT 공개 WO 2016/174683 A1에 기술된 절차에 따라 수행될 수 있다.
- [0132] 추출된 폐렴구균 폴리사카라이드는 통상적인 방법에 따라 정제될 수 있으며, 그의 천연 형태로 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 추출되고 정제된 폐렴구균 폴리사카라이드는 단편화되어 폐렴구균 폴리사카라이드의 하나 이상의 부분을 얻을 수 있으며, 폐렴구균 폴리사카라이드의 각각의 부분은 추출 및 정제된 폐렴구균 폴리사카라이드의 평균 분자량보다 더 작은 평균 분자량을 갖는다.
- [0133] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하며, 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드의 분자량은 약 150 kDa 내지 450 kDa이다.
- [0134] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 단백질에 각각 개별적으로 접합된 하나 이상의 피막 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형, 예를 들어 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하며, 여기서 각각의 폴리사카라이드-단백질 접합체의 분자량은 약 1,500 kDa 내지 약 15,000 kDa이다.
- [0135] 다른 실시양태에서, 추출되고 정제된 폐렴구균 폴리사카라이드는 하나 이상의 담체 단백질에 접합하기 전에 활성화될 수 있다. 예를 들어, 추출되고 정제된 폐렴구균 폴리사카라이드는 하나 이상의 담체 단백질에 접합하기 전에 활성화될 수 있다(예를 들어, 화학적으로). 각각의 활성화된 폐렴구균 폴리사카라이드는 폴리사카라이드-단백질 접합체(예를 들어, 당접합체(glycoconjugate))를 형성하는 담체 단백질에 각각 개별적으로 접합될 수 있다. 다른 실시양태에서, 하나 이상의 활성화된 폐렴구균 폴리사카라이드가 개별적인 담체 단백질에 접합될 수 있고/있거나, 하나의 활성화된 폐렴구균 폴리사카라이드가 개별적인 담체 단백질에 접합될 수 있다. 접합체는 공지된 기술에 의해 제조될 수 있다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 폐렴구균 폴리사카라이드는 화학적으로 활성화된 후, 공지된 기술, 예를 들어 미국 특허 제 4,365,170호, 제4,673,574호 및 제4,902,506호에 기재된 기술에 따라 담체 단백질에 접합될 수 있다. 예를 들어, 폐렴구균 폴리사카라이드는 탄수화물의 하나 이상의 인접 히드록실기의 무작위 산화 절단 및 하나 이상의 반응성 알데히드기의 형성에 의해, 산화제, 예를 들어 과요오드산염(예를 들어, 과요오드산나트륨, 과요오드산 칼륨 또는 과요오드산)을 사용한 말단 히드록실기의 알데히드로의 산화에 의해 활성화될 수 있다.
- [0137] 폐렴구균 폴리사카라이드는 또한 CDAP(1-시아노-4-디메틸아미노-피리딘늄 테트라플루오로보레이트)에 의해 활성화

화된 후, 하나 이상의 담체 단백질, 예를 들어 PsaA, CRM<sub>197</sub>, PspA 또는 이들의 조합물에 접합될 수 있다. 다른 실시양태에서, CDAP로 활성화되어 시아네이트 에스테르를 형성하는 폐렴구균 폴리사카라이드는 하나 이상의 담체 단백질에 직접 접합되거나 또는 스페이서(예를 들어, 링커)를 사용하여 접합될 수 있다. 스페이서는 담체 단백질 상의 아미노기에 커플링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 말레이미드 활성화된 담체 단백질(예를 들어, GMBS를 사용하여) 또는 할로아세틸화된 담체 단백질(예를 들어, 요오도아세트이미드, 에틸 요오도아세트이미드 HCl, SIAB, SIA, SBAP 및/또는 N-숙신이미딜 브로모아세테이트를 사용하여)에 대한 티오에테르 연결을 통해 담체 단백질에 커플링될 수 있는 티올화된 폴리사카라이드를 생성하는 시스타민 또는 시스테아민일 수 있다. 다른 실시양태에서, 시아네이트 에스테르는 핵산 디아민 또는 아디프산 디히드라이드(ADH)를 사용하여 커플링되고, 아미노-유도체화된 사카라이드는 단백질 담체 상의 카르복실기를 통해 카르보디이미드(예를 들어, EDAC 또는 EDC) 화학을 사용하여 담체 단백질에 접합된다. 이러한 접합체는 국제 특허 출원 공개 WO 93/15760, 국제 특허 출원 공개 WO 95/08348, 국제 특허 출원 공개 WO 96/29094 및 문헌 [Chu et al., 1983, *Infect. Immunity* 40:245-256]에 기재되어 있다.

- [0138] 본 개시내용의 폴리사카라이드-단백질 접합체 및 백신 조성물과 함께 사용하기 위한 다른 적합한 활성화 및/또는 커플링 기술은 카르보디이미드, 히드라이드, 활성 에스테르, 노르보란, p-니트로벤조산, N-히드록시숙신이미드, S-NHS, EDC, TSTU의 사용 및 국제 특허 출원 공개 WO 98/42721에 기재된 다른 방법을 포함한다. 예를 들어, 접합은 사카라이드의 유리 히드록실기와 CDI의 반응(Bethell et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:2572-4; Hearn et al., 1981, *J. Chromatogr.* 218:509-18), 이어서 카르바메이트 연결을 형성하기 위한 단백질과의 커플링에 의해 형성될 수 있는 카르보닐 링커를 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아노머 말단은 1차 히드록실기로 환원될 수 있고, 선택적으로 1차 히드록실기는 보호/탈보호되고, 1차 히드록실기와 CDI의 반응을 통해 CDI 카르바메이트 중간체를 형성하고, CDI 카르바메이트 중간체를 단백질 상의 아미노기와 커플링시킬 수 있다.
- [0139] 예를 들어, 본 개시내용의 폴리사카라이드-단백질 접합체 및 백신 조성물과 함께 사용하기 위한 또 다른 적합한 활성화 및/또는 커플링 기술은 다음 방법을 포함한다: 크기가 조절된 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, 약 10 mg/mL 농도의 약 6 mL의 크기가 조절된 폴리사카라이드) 및 CDAP(예를 들어, 아세트오니트릴 중의 약 100 mg/mL(w/v))를 약 1 내지 약 1의 비율로 유리 바이알 내에서(예를 들어, 약 1분 동안 교반함으로써) 혼합될 수 있다. 폴리사카라이드 용액의 pH는 필요에 따라 조정될 수 있다(예를 들어, 약 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 약 9.25로, 실온에서 3분 동안 교반됨). 또한, PsaA(예를 들어, 농도가 약 15 mg/mL인 약 4 mL의 용액)는 활성화된 폐렴구균 폴리사카라이드에 천천히 첨가될 수 있다(예를 들어, 약 1 대 약 1의 비(Ps:Carrier protein)로). 반응물의 pH는 조정될 수 있고(예를 들어, 0.2 M 트리메틸아민을 사용하여 약 9.05로), 반응은 계속될 수 있다(예를 들어, 실온에서 5시간 동안 교반함으로써). 반응 혼합물을 쉐킷할 수 있다(예를 들어, 과도한 농도의 글리신을 첨가하여).
- [0140] 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 막(예를 들어, 100 K MWCO 막)을 사용하여 투석여과될 수 있고, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 투석여과되고 정제된 분획은 SEC-MALLS 및 안트론 방법을 사용하여 분석할 수 있다. 접합체를 함유하는 분석된 분획을 모으고, 멸균 여과(예를 들어, 0.2 µm 필터 사용)할 수 있다.
- [0141] 폐렴구균 폴리사카라이드를 하나 이상의 담체 단백질에 접합시킨 후, 폴리사카라이드-단백질 접합체는 다양한 기술에 의해 정제될 수 있다(예를 들어, 폴리사카라이드-단백질 접합체의 양에 대하여 농축됨). 이러한 기술은 농축/투석여과 조작, 침전/용리, 컬럼 크로마토그래피 및 심층 여과를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 접합체가 정제된 후에, 접합체는 백신으로서 사용될 수 있는 본 개시내용의 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제제화하기 위해 배합될 수 있다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폐렴구균 백신 조성물의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 폴리사카라이드-단백질 접합체를 면역보강제, 부형제, 또는 완충제를 포함하는 폐렴구균 백신 조성물로 제제화하는 것을 추가로 포함한다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폐렴구균 백신 조성물의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 제조하는 방법을 제공하며, 여기서 면역보강제는 인산알루미늄이다.
- [0144] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폐렴구균 백신 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다.
- [0145] 일부 실시양태에서, 대상체는 침습성 폐렴구균 질환(IPD)과 같은 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 의해 매개되는 질환을 갖는다.

- [0146] 한 실시양태에서, 대상체는 인간, 예를 들어 영아(약 1세 미만), 걸음마 아기(약 12개월 내지 약 24개월), 유아(약 2세 내지 약 5세), 아동(약 5세 내지 약 13세), 청소년(약 13세 내지 약 18세), 성인(약 18세 내지 약 65세), 또는 노인(약 65세 초과)이다.
- [0147] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 면역학적 유효량의 폐렴구균 백신 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0148] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 폐렴구균 백신 조성물을 대상체에게 전신, 피하 및/또는 점막 투여하는 것을 포함하는, 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드 접합체에 대한 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0149] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 백신 조성물의 용량 내의 각각의 접합체의 양은 면역보호 반응, 예를 들어 유의한 부작용을 야기하지 않으면서 면역보호 반응을 유도하기에 충분한 양이다. 각각의 접합체의 양은 폐렴구균 혈청형에 따라 다를 수 있지만, 백신 조성물의 각각의 용량은 약 1.5  $\mu\text{g}$  내지 약 5  $\mu\text{g}$ 의 담체 단백질을 포함하는 각각의 담체 단백질에 접합된 약 0.1  $\mu\text{g}$  내지 약 50  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드, 약 0.1  $\mu\text{g}$  내지 약 10  $\mu\text{g}$ , 또는 약 1  $\mu\text{g}$  내지 약 5  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함할 수 있다.
- [0150] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폐렴구균 폴리사카라이드 및 담체 단백질을 포함하는 폐렴구균 백신 조성물을 제공하고, 상기 폐렴구균 백신 조성물에서 단백질 대 폴리사카라이드의 백분율 비(단백질/PS)는 약 0.5 내지 약 2.0 단백질/PS, 바람직하게는 0.7 내지 1.2이다.
- [0151] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 분자량이 약 100 kDa 내지 약 400 kDa, 약 125 kDa 내지 약 425 kDa, 약 150 kDa 내지 약 450 kDa, 약 175 kDa 내지 약 475 kDa, 약 200 kDa 내지 약 500 kDa, 약 250 kDa 내지 약 550 kDa, 또는 약 300 kDa 내지 약 600 kDa인 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다.
- [0152] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 분자량이 약 1,000 kDa 내지 약 10,000 kDa, 약 1,500 kDa 내지 약 15,000 kDa, 약 2,000 kDa 내지 약 20,000 kDa, 약 2,500 kDa 내지 약 25,000 kDa, 또는 약 3,000 kDa 내지 약 30,000 kDa인 하나 이상의 폴리사카라이드-단백질 접합체를 포함하는 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물을 제공한다.
- [0153] 본 개시내용의 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 약제학적으로 허용되는 희석제 또는 비히클, 예를 들어 물 또는 염수 용액과 함께 제제화될 수 있다. 또한, 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물은 다음 중의 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: 완충제, 보존제 또는 안정화제, 폴리소르베이트, 면역보강제, 예를 들어 알루미늄 화합물, 예를 들어 수산화알루미늄, 인산알루미늄 또는 히드록시인산알루미늄 및/또는 동결건조 부형제. 본 개시내용의 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신 조성물에 상기 화합물 중 임의의 하나를 포함시키는 것은 이를 필요로 하는 대상체에 대한 투여 방식 및 투여 경로의 함수로서 선택될 수 있고, 추가로 표준 제약 실무에 기초할 수 있다.
- [0154] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 폐렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3 및 6B는 PsaA에 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 상기 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물의 제조 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0155] (a) 14종의 폐렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, CDAP를 이용하여 활성화된) 중 하나 이상을 면역원성 담체 단백질, 예를 들어 PsaA 및/또는 CRM<sub>197</sub>에 개별적으로 접합하는 단계,
- [0156] (b) 접합체를 투석여과하고 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하는 단계,
- [0157] (c) SEC-MALLS를 사용하여 정제된 분획을 분석하고, 14종의 각각의 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 1가 접합체 분획을 평균 여과하는 단계, 및
- [0158] (d) 14종의 접합체(예를 들어, 약 2.2 내지 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 10  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 및 약 15  $\mu\text{g}$  내지 약 36  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>), 면역보강제(예를 들어, 인산알루미늄), 부형제 및 완충제를 14가 폐렴구균 폴리사



카라이드-단백질 접합체 조성물로 제제화하는 단계.

- [0159] 일부 실시양태에서, 14가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 여과(예를 들어, 무균)될 수 있다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 14가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3 및 6A는 PsaA에 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 상기 14가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물의 제조 방법은 다음 단계를 포함한다:
  - [0161] (a) 14종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, CDAP를 이용하여 활성화된) 중 하나 이상을 면역원성 담체 단백질, 예를 들어 PsaA 및/또는 CRM<sub>197</sub>에 개별적으로 접합하는 단계,
  - [0162] (b) 접합체를 투석여과하고 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하는 단계,
  - [0163] (c) SEC-MALLS를 사용하여 정제된 분획을 분석하고, 14종의 각각의 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 1가 접합체 분획을 멸균 여과하는 단계, 및
  - [0164] (d) 14종의 접합체(예를 들어, 약 2.2 내지 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 10  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 및 약 15  $\mu\text{g}$  내지 약 36  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>), 면역보강제(예를 들어, 인산알루미늄), 부형제 및 완충제를 14가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물로 제제화하는 단계.
- [0165] 일부 실시양태에서, 14가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 여과(예를 들어, 무균)될 수 있다.
- [0166] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F로부터 선택되는 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 15가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 상기 15가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물의 제조 방법은 다음 단계를 포함한다:
  - [0167] (a) 15종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, CDAP를 이용하여 활성화된) 중 하나 이상을 면역원성 담체 단백질, 예를 들어 PsaA 및/또는 CRM<sub>197</sub>에 개별적으로 접합하는 단계,
  - [0168] (b) 접합체를 투석여과하고 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하는 단계,
  - [0169] (c) SEC-MALLS를 사용하여 정제된 분획을 분석하고, 15종의 각각의 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 1가 접합체 분획을 멸균 여과하는 단계, 및
  - [0170] (d) 15종의 접합체(예를 들어, 약 2.2 내지 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 및 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>), 면역보강제(예를 들어, 인산알루미늄), 부형제 및 완충제를 15가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물로 제제화하는 단계.
- [0171] 일부 실시양태에서, 15가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 여과(예를 들어, 무균)될 수 있다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B로부터 선택되는 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 17가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 상기 17가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물의 제조 방법은 다음 단계를 포함한다:
  - [0173] (a) 17종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, CDAP를 이용하여 활성화된) 중 하나 이상을 면역원성 담체 단백질, 예를 들어 PsaA 및/또는 CRM<sub>197</sub>에 개별적으로 접합하는 단계,
  - [0174] (b) 접합체를 투석여과하고 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하는 단계,
  - [0175] (c) SEC-MALLS를 사용하여 정제된 분획을 분석하고, 17종의 각각의 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 1가 접합체 분획을 멸균 여과하는 단계, 및
  - [0176] (d) 17종의 접합체(예를 들어, 약 2.2 내지 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 및 약 20

$\mu\text{g}$  내지 약  $40 \mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>), 면역보강제(예를 들어, 인산알루미늄), 부형제 및 완충제를 17가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물로 제제화하는 단계.

- [0177] 일부 실시양태에서, 17가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 여과(예를 들어, 무균)될 수 있다.
- [0178] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45로부터 선택되는 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 20가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45는 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 상기 20가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물의 제조 방법은 다음 단계를 포함한다:
  - [0179] (a) 20종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, CDAP를 이용하여 활성화된) 중 하나 이상을 면역원성 담체 단백질, 예를 들어 PsaA 및/또는 CRM<sub>197</sub>에 개별적으로 접합하는 단계,
  - [0180] (b) 접합체를 투석여과하고 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하는 단계,
  - [0181] (c) SEC-MALLS를 사용하여 정제된 분획을 분석하고, 20종의 각각의 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 1가 접합체 분획을 평균 여과하는 단계, 및
  - [0182] (d) 20종의 접합체(예를 들어, 약 2.2 내지  $4.4 \mu\text{g}$ 의 각각의 혈청형, 약  $5 \mu\text{g}$  내지 약  $20 \mu\text{g}$ 의 PsaA, 및 약  $20 \mu\text{g}$  내지 약  $50 \mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>), 면역보강제(예를 들어, 인산알루미늄), 부형제 및 완충제를 20가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물로 제제화하는 단계.
- [0183] 일부 실시양태에서, 20가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 여과(예를 들어, 무균)될 수 있다.
- [0184] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38로부터 선택되는 하나 이상의 페렴구균 폴리사카라이드를 포함하는 22가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 접합된다. 상기 22가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물의 제조 방법은 다음 단계를 포함한다:
  - [0185] (a) 22종의 페렴구균 폴리사카라이드(예를 들어, CDAP를 이용하여 활성화된) 중 하나 이상을 면역원성 담체 단백질, 예를 들어 PsaA 및/또는 CRM<sub>197</sub>에 개별적으로 접합하는 단계,
  - [0186] (b) 접합체를 투석여과하고 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하는 단계,
  - [0187] (c) SEC-MALLS를 사용하여 정제된 분획을 분석하고, 22종의 각각의 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 1가 접합체 분획을 평균 여과하는 단계, 및
  - [0188] (d) 22종의 접합체(예를 들어, 약 2.2 내지  $4.4 \mu\text{g}$ 의 각각의 혈청형, 약  $5 \mu\text{g}$  내지 약  $20 \mu\text{g}$ 의 PsaA, 및 약  $20 \mu\text{g}$  내지 약  $50 \mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>), 면역보강제(예를 들어, 인산알루미늄), 부형제 및 완충제를 22가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물로 제제화하는 단계.
- [0189] 일부 실시양태에서, 22가 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물은 여과(예를 들어, 무균)될 수 있다.
- [0190] 본 개시내용의 조성물은 단위 투여, 예를 들어 단위 용량 바이알, 다회 용량, 예를 들어 다회 용량 바이알, 또는 프리필드 시린지로 제제화될 수 있다. 본 개시내용의 조성물은 티오메르살, 2-페녹시에탄올 등으로부터 선택된 하나 이상의 보존제(들)를 약 4 mg/mL 내지 약 20 mg/mL일 수 있는 양으로 추가로 포함할 수 있다.
- [0191] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단위 용량으로 투여되는 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 페렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: 약 2.2 내지  $4.4 \mu\text{g}$ 의 2종 이상의 페렴구균 폴리사카라이드 혈청형, 혈청형당 약  $1 \mu\text{g}$  내지 약  $10 \mu\text{g}$ 의 PsaA, 각각의 혈청형에 대해 약  $1 \mu\text{g}$  내지 약  $10 \mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.2 mg 내지 약 1 mg의 면역보강제(예를 들어, 인산알루미늄), 및 하나 이상의 부형제(예를 들어, 염화나트륨 및/또는 완충제)를 포함할 수 있다.
- [0192] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단위 용량으로 투여되는, 평균 액체 제제 내의 13가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 13가 페렴구균 폴리사카라이드-단

백질 접합체 조성물을 제공한다: PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F 및 33F.

- [0193] 13가 백신은 약 0.5 mL 용량의 하나 이상의 용량으로 추가로 제제화될 수 있으며, 각각의 0.5 mL 용량은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 13종의 각각의 혈청형, 약 25  $\mu\text{g}$  내지 약 30  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>, 약 0.125 mg의 면역보강제(예를 들어, 원소 알루미늄, 예를 들어 약 0.5 mg의 인산알루미늄), 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함한다.
- [0194] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단회 용량으로 투여되는, 멸균 액체 제제 내의 14가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F.
- [0195] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단회 용량으로 투여되는, 멸균 액체 제제 내의 14가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 14가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: PsaA 또는 PsaA와 CRM<sub>197</sub>의 조합물에 각각 개별적으로 접합된 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F.
- [0196] 14가 백신은 약 0.5 mL 용량의 하나 이상의 용량으로 추가로 제제화될 수 있으며, 각각의 0.5 mL 용량은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 14종의 각각의 혈청형, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 35  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 및 CRM<sub>197</sub>, 약 0.125 mg의 면역보강제(예를 들어, 원소 알루미늄, 예를 들어 약 0.5 mg의 인산알루미늄), 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함한다.
- [0197] 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단회 용량으로 투여되는, 멸균 액체 제제 내의 15가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 15가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F(여기서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 각각 개별적으로 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F 및 33F는 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된다).
- [0198] 15가 백신은 약 0.5 mL 용량의 하나 이상의 용량으로 추가로 제제화될 수 있으며, 각각의 0.5 mL 용량은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 15종의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 약 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.125 mg의 면역보강제(예를 들어, 원소 알루미늄, 예를 들어 약 0.5 mg의 인산알루미늄), 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함한다.
- [0199] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단회 용량으로 투여되는, 멸균 액체 제제 내의 17가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 17가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B(여기서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 각각 개별적으로 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 12F, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F 및 35B는 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된다).
- [0200] 17가 백신은 약 0.5 mL 용량의 하나 이상의 용량으로 추가로 제제화될 수 있으며, 각각의 0.5 mL 용량은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 17종의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 40  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.125 mg의 면역보강제(예를 들어, 원소 알루미늄, 예를 들어 약 0.5 mg의 인산알루미늄), 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함한다.
- [0201] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단회 용량으로 투여되는, 멸균 액체 제제 내의 20가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 20가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45(여기서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 각각 개별적으로 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 11A, 12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 35B 및 45는 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된다).
- [0202] 20가 백신은 약 0.5 mL 용량의 하나 이상의 용량으로 추가로 제제화될 수 있으며, 각각의 0.5 mL 용량은 약 2.2

$\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 20종의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.125 mg의 면역보강제(예를 들어, 원소 알루미늄, 예를 들어 약 0.5 mg의 인산알루미늄), 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함한다.

[0203] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단위 용량으로 투여되는, 멸균 액체 제제 내의 22가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 22가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38(여기서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 각각 개별적으로 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된다).

[0204] 22가 백신은 약 0.5 mL 용량의 하나 이상의 용량으로 추가로 제제화될 수 있으며, 각각의 0.5 mL 용량은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 22종의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.125 mg의 면역보강제(예를 들어, 원소 알루미늄, 예를 들어 약 0.5 mg의 인산알루미늄), 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함한다.

[0205] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 적어도 다음을 함유하도록 제제화된 약 0.5 mL의 단위 용량으로 투여되는, 멸균 액체 제제 내의 24가 면역원성 조성물(예를 들어, 백신), 예를 들어 24가 폐렴구균 폴리사카라이드-단백질 접합체 조성물을 제공한다: 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38(여기서, 적어도 혈청형 3, 6A 및 6B는 PsaA에 각각 개별적으로 접합되고 하나 이상의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 8, 9V, 10A, 12F, 14, 15A, 15B, 16F, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F, 34, 35B 및 38은 CRM<sub>197</sub>에 각각 개별적으로 접합된다).

[0206] 24가 백신은 약 0.5 mL 용량의 하나 이상의 용량으로 추가로 제제화될 수 있으며, 각각의 0.5 mL 용량은 약 2.2  $\mu\text{g}$  내지 약 4.4  $\mu\text{g}$ 의 22종의 각각의 혈청형, 약 5  $\mu\text{g}$  내지 약 20  $\mu\text{g}$ 의 PsaA, 약 20  $\mu\text{g}$  내지 50  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub>, 약 0.125 mg의 면역보강제(예를 들어, 원소 알루미늄, 예를 들어 약 0.5 mg의 인산알루미늄), 염화나트륨, 및 L-히스티딘 완충제를 포함한다.

[0207] 본 개시내용의 조성물은 백신 분야에서 사용되는 임의의 수의 통상의 경로에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 조성물은 전신으로, 예를 들어 비경구로(예를 들어, 피하, 근육 내로, 피내 및/또는 정맥 내로) 또는 점막으로(예를 들어, 경구로 및/또는 비강으로) 투여될 수 있다.

[0208] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 하나 이상의 담체 단백질에 접합된 하나 이상의 에스. 뉴모니아에 피막 폴리사카라이드에 대한 면역 반응을 이를 필요로 하는 대상체에서 유도하는 방법을 제공한다. 면역 반응을 유도하는 방법은 면역학적으로 유효한 양의 본원에서 설명되는 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0209] 본 개시내용의 방법에 따르면, 본원에서 설명되는 조성물이 투여되는 대상체는 인간, 예를 들어 영아(약 1세 미만), 걸음마 아기(약 12개월 내지 약 24개월), 유아(약 2세 내지 약 5세), 아동(약 5세 내지 약 13세), 청소년(약 13세 내지 약 18세), 성인(약 18세 내지 약 65세), 또는 노인(약 65세 초과)이다.

[0210] 본원에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 설명되는 조성물의 "유효량"은 조성물이 투여된 대상체에서 면역 반응을 유도하기 위해 필요한 양을 지칭한다. 면역 반응은 후속적인 시험접종 동안 에스. 뉴모니아에의 감염 가능성 또는 중증도를 유의하게 감소시키는 하나 이상의 에스. 뉴모니아에 항원 특이적 항체가 대상체에 존재하는 것을 특징으로 한다.

[0211] 실시예

[0212] 하기 실시예는 본 개시내용을 설명하기 위해 제공되며, 이것은 단지 예시적인 목적을 위한 것으로서, 본 개시내용의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0213] 실시예 1: 폴리사카라이드-PsaA 접합체를 형성하기 위한, 담체 단백질에 대한 개별적인 폐렴구균 폴리사카라이드의 접합

[0214] A) PsaA 제조:

[0215] PsaA 유전자를 그의 소수성 리더 펩티드 서열이 결여된 상태로 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 혈청형 4로부터 PCR

에 의해 증폭하였다. 이 유전자를 서열 검증하고, 보다 높은 발현을 위해 자체 구축한 벡터(pBE66)를 이용하여 이. 콜라이(*E. coli*)에 클로닝하였다.

- [0216] PsaA 유전자를 코딩하는 글리세롤 원액 배양액을 150 mL 삼각 플라스크 내의 1 mL의 글리세롤 원액을 함유하는 20 mL LB 배지에서 재생시켰다. 배양액을 최종 OD<sub>600nm</sub>가 3.5 OD가 되도록 37°C에서 200 rpm 하에 약 6시간 동안 인큐베이팅하였다. 재생된 배양액을 5 L 원뿔 플라스크 내의 1 L 씨드 배양액으로 옮겼다. 배양액을 최종 OD<sub>600nm</sub>가 3이 되도록 37°C에서 200 rpm 하에 약 10시간 동안 성장시켰다.
- [0217] 씨드 배양액을 다음 배지 성분을 함유하는 20 L 발효조로 멸균 상태로 옮겼다: HyPeptone 6 g/L, 효모 추출물 12/L, 이칼륨 오르토인산염 13.5 g/L, 제2 인산암모늄 4 g/L, 시트르산 1.7 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.2 g/L, 글루코스 4 g/L, 티아민 HCl 10 mg/L + 1 mL/L의 미량 원소(예를 들어, 100 mL 조성물에 대한 미량 원소 FeCl<sub>3</sub> 2.7 g, ZnCl<sub>2</sub> 0.2 g, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.2 g, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.2 g, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.1 g, 붕산 0.05 g, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.1 g, 진한 HCl 10 mL). 초기 발효는 0.2 OD의 OD<sub>600nm</sub>로 시작되었다. pH는 20% 오르토인산 및 12.5% 수산화암모늄을 사용하여 발효 전체에 걸쳐 7±0.2로 유지하였다.
- [0218] 글루코스 수준이 0.5 g/L 미만으로 떨어지면, 3 - 4 g/L/hr의 일정한 속도로 공급 배치를 개시하고, DO%는 산소 농축물을 사용하여 발효 전체에 걸쳐 > 20%로 유지하였다.
- [0219] 세포를 발효조에서 성장시키고, 세포 펠렛을 원심분리에 의해 수거하였다. 세포 파괴 장치(Panda)를 사용하여 세포를 용해시켰다. 용해물을 10000 g에서 원심분리하고, 맑은 상청액을 정제하였다.
- [0220] PsaA 정제는 문헌 [Larentis et al., 2011 (Protein expression and Purification 78 (2011) 38)]에 기재된 절차와 유사하게 수행하였다. 보다 높은 순도의 PsaA를 달성하기 위해 DEAE 후에 혼합 모드 크로마토그래피(세라믹 히드록시아파타이트 타입-II)를 사용함으로써 정제를 더욱 최적화하였다.
- [0221] *음이온 교환 크로마토그래피*: 30 mL의 DEAE 세파로스(GE) 수지로 XK16/20 컬럼을 충전하였다. 수지를 5 컬럼 부피의 멸균 증류수, 이어서 10 컬럼 부피의 20 mM 트리스, 1 mM EDTA(pH 8.0)(평형 완충제)으로 세척하였다. 30 mL의 상청액을 평형 완충제로 100 mL로 희석하고, 컬럼 상에 로딩하고, 통과액을 수집하였다. 컬럼을 5 부피의 평형 완충제로 세척하였다. PsaA는 12부피의 선형 구배(0-100% B)로 용리되었다. (완충제 A: 20 mM 트리스, 1 mM EDTA 함유, pH 8.0; 완충제 B: 20 mM 트리스, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, pH 8.0). 이어서, 컬럼을 20 mM 트리스, 1 mM EDTA, 1M NaCl(pH8.0)로 세척하였다.
- [0222] *혼합 모드 크로마토그래피*: 25 ml의 세라믹 히드록시아파타이트 타입 II(CHT-II)로 컬럼을 충전하였다. 수지를 수 부피의 멸균 증류수로 세척한 후, 10부피의 20 mM 트리스(pH 6.8)로 세척하였다. SDS PAGE에서 약 37 KD의 양호한 농도의 PsaA의 선명한 주요 가시 밴드를 나타낸 DEAE 수지로부터의 용리 분획을 모으고, CHT-II 수지 상에 로딩하였다. 통과액을 수집하고, 컬럼을 5 컬럼 부피의 평형 완충제로 세척하였다. 단백질은 5 컬럼 부피의 단계 구배(15% B, 20% B, 50% B 및 100% B)로 용리되었다. 완충제 A는 20 mM 트리스(pH 6.8)을 함유하고, 완충제 B는 250 mM 포스페이트 완충제(pH 6.8)를 함유한다.
- [0223] 예상된 크기의 PsaA에서 선명한 밴드를 나타내는 모든 용리 분획을 모으고, 10 kDa MWC0 카세트에 의해 농축하고, 20 mM 포스페이트 완충제(pH 7.5)에 대해 투석여과하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하여 순도를 평가하였다.
- [0224] B) *폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 3의 활성화 및 PsaA에 대한 접합*
- [0225] 혈청형 3의 크기가 감소된 폴리사카라이드(농도 5 mg/mL) 및 1.5 mL의 CDAP(아세토니트릴 중의 100 mg/mL(w/v))를 유리병 내에서 1:0.5(PS:CDAP)의 비율로 혼합하고, 1분 동안 교반하였다. 폴리사카라이드 용액의 pH를 3.5 mL의 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 9.0으로 조정하고, 실온(RT)에서 1분 동안 교반하였다. 210 mg의 PsaA(14.0 mL의 15.0 mg/mL 농도)를 활성화된 폴리사카라이드에 1:0.7(PS:담체 단백질)의 비율로 서서히 첨가하였다.
- [0226] 0.7 mL의 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 반응 pH를 약 9.01로 조정하고, 실온에서 5시간 동안 교반하면서 계속 반응시킨 후, 과도한 농도의 글리신(100 mM)을 첨가하여 반응을 캔칭하였다. 접합 반응 동역학은 반응 동안 각 시간마다 SEC-HPLC를 사용하여 모니터링하였다.
- [0227] 반응 혼합물을 투석여과하고, 100 kDa MWC0 TFF 막을 사용하여 농축하였다. 농축물을 크기 배제 크로마토그래피

에 의해 정제하였다. 분획을 SEC-MALLS, 안트론 방법에 의해 분석하고, 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 0.2  $\mu\text{m}$  필터로 멸균 여과하였다.

- [0228] C) 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 6A의 활성화 및 PsaA에 대한 접합
- [0229] 크기가 감소된 폴리사카라이드 6A(농도 14.6 mg/mL) 및 400  $\mu\text{l}$ 의 CDAP(아세트니트릴 중의 100 mg/mL(w/v))를 유리병 내에서 1:1(PS:CDAP)의 비율로 혼합하고, 1분 동안 교반하였다. 폴리사카라이드 용액의 pH를 800  $\mu\text{l}$ 의 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 9.5로 조정하고, 실온(RT)에서 1분 동안 교반하였다. 40 mg의 PsaA(3.78 mL의 11.0 mg/mL 농도)를 활성화된 폴리사카라이드에 1:1(Ps:담체 단백질)의 비율로 서서히 첨가하였다.
- [0230] 0.7 mL의 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 반응 pH를 약 9.01로 조정하고, 실온에서 5시간 동안 교반하면서 계속 반응시킨 후, 과도한 농도의 글리신(100 mM)을 첨가하여 반응을 쉐킹하였다. 접합 반응 속도는 반응 동안 각 시간마다 SEC-HPLC를 사용하여 모니터링하였다.
- [0231] 반응 혼합물을 투석여과하고, 100 kDa MWCOT TFF 막을 사용하여 농축하였다. 농축물을 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 SEC-MALLS, 안트론 방법에 의해 분석하고, 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 0.2  $\mu\text{m}$  필터로 멸균 여과하였다.
- [0232] D) 폐렴구균 폴리사카라이드 혈청형 6B의 활성화 및 PsaA에 대한 접합
- [0233] 크기가 감소된 폴리사카라이드 타입 6B(농도 14.97 mg/mL) 및 4.0 mL의 CDAP(아세트니트릴 중의 100 mg/mL(w/v))를 유리병 내에서 1:2(PS:CDAP)의 비율로 혼합하고, 1분 동안 교반하였다. 폴리사카라이드 용액의 pH를 8.0 mL의 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 9.1로 조정하고, 실온(RT)에서 1분 동안 교반하였다. 340 mg의 PsaA(22.66 mL의 15.0 mg/mL 농도)를 활성화된 폴리사카라이드에 1:1.7(Ps:담체 단백질)의 비율로 서서히 첨가하였다.
- [0234] 0.7 mL의 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 반응 pH를 약 9.01로 조정하고, 실온에서 5시간 동안 교반하면서 계속 반응시킨 후, 과도한 농도의 글리신(100 mM)을 첨가하여 반응을 쉐킹하였다. 접합 반응 속도는 반응 동안 각 시간마다 SEC-HPLC를 사용하여 모니터링하였다.
- [0235] 반응 혼합물을 투석여과하고, 100 kDa MWCOT TFF 막을 사용하여 농축하였다. 농축물을 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 SEC-MALLS, 안트론 방법에 의해 분석하고, 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 0.2  $\mu\text{m}$  필터로 멸균 여과하였다.
- [0236] 혈청형 3(D), 6A(E) 및 6B(F)의 접합 반응 동역학에 대한 SEC-HPLC 크로마토그램을 수행하였다. 세 가지 크로마토그램 모두에 대해 다음 기호가 사용되었다: 폴리사카라이드(실선), PsaA(파선), 3 또는 5시간 반응(점선). 모든 크로마토그램에 대해 도 2에 도시된 바와 같이, PsaA의 소비는 약 19분의 체류 시간에서 PsaA에 속하는 피크의 감소 또는 소멸에 기초하여 표시된다. 접합은 약 13.5분 내지 약 14분에서의 새로운 피크의 형성에 기초하여 확인된다.
- [0237] 혈청형 5, 9V, 12F, 10A, 15B, 18C 및 45로부터의 폐렴구균 폴리사카라이드와 PsaA의 접합체를 상기 설명한 바와 유사한 절차를 사용하여 제조하였다. 혈청형 5(A), 9V(B) 및 18C(C)의 접합 반응 동역학에 대한 SEC-HPLC 크로마토그램을 수행하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 세 가지 크로마토그램 모두에 대해 다음 기호가 사용되었다: 폴리사카라이드(실선), PsaA(파선), 3 또는 5시간 반응(점선). 모든 크로마토그램에서, PsaA의 소비는 약 19분의 체류 시간에서 PsaA에 속하는 피크의 감소 또는 소멸에 기초하여 표시된다. 접합은 약 13.5분 내지 약 14분에서의 새로운 피크의 형성에 기초하여 확인된다.
- [0238] 실시예 2: 폐렴구균 피막 폴리사카라이드-CRM<sub>197</sub> 접합체의 제조
- [0239] A) 폴리사카라이드의 활성화 및 담체 단백질에 대한 접합:
- [0240] 크기가 조절된 폴리사카라이드(6.0 mL의 Ps, 농도 10 mg/mL) 및 CDAP(아세트니트릴 중의 100 mg/mL(w/v))를 유리 바이알 내에서 1:1의 비율로 혼합하고, 1분 동안 교반하였다. 폴리사카라이드 용액의 pH를 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 9.25로 조정하고, 실온(RT)에서 3분 동안 교반하였다. CRM<sub>197</sub>(4.0 mL의 농도 15.0 mg/mL)를 활성화된 폴리사카라이드에 1:1(Ps:담체 단백질)의 비율로 서서히 첨가하였다.
- [0241] 0.2 M 트리에틸아민을 사용하여 반응 pH를 약 9.05로 조정하고, 실온에서 5시간 동안 교반하면서 계속 반응시킨 후, 최종적으로 과도한 농도의 글리신을 첨가하여 반응을 쉐킹하였다.

- [0242] 반응 혼합물을 100 K MWCO 막을 사용하여 투석여과하고, 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 분획을 SEC-MALLS, 안트론 방법에 의해 분석하고, 접합체를 함유하는 분획을 모으고, 0.2  $\mu\text{m}$  필터로 멸균 여과하였다. 이 물질은 1가 접합체 벌크로 불린다.
- [0243] 혈청형 7F(A), 14(B) 및 19F(C)와 CRM<sub>197</sub>로부터 제조된 접합체를 제조하고, 반응 동역학을 도 1에 도시한다. 세 가지 크로마토그램 모두에 대해 다음 기호가 사용되었다: 폴리사카라이드(실선), CRM<sub>197</sub>(파선), 5시간 반응(점선). 모든 크로마토그램에서, CRM<sub>197</sub>의 소비는 약 19분의 체류 시간에서 CRM<sub>197</sub>에 속하는 피크의 감소 또는 소멸에 기초하여 표시된다. 접합은 약 13.5분 내지 약 14분에서의 새로운 피크의 형성에 기초하여 확인된다.
- [0244] 혈청형 3(D), 6A(E) 및 6B(F)와 CRM<sub>197</sub>로부터 제조된 접합체를 제조하고, 반응 동역학을 도 1에 도시한다. 세 가지 크로마토그램 모두에 대해 다음 기호가 사용되었다: 폴리사카라이드(실선), CRM<sub>197</sub>(파선), 5시간 반응(점선). 모든 크로마토그램에서, CRM<sub>197</sub>의 소비는 약 19분의 체류 시간에서 CRM<sub>197</sub>에 속하는 피크의 감소 또는 소멸에 기초하여 표시된다. 접합은 약 13.5분 내지 약 14분에서의 새로운 피크의 형성에 기초하여 확인된다.
- [0245] 실시예 3: 폐렴구균 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신의 제제화
- [0246] 15가의 접합된 백신을, ~28  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub> 단백질에 접합된 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F & 33F로부터의 2.2  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폐렴구균 폴리사카라이드 및 약 7  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 단백질에 접합된 혈청형 3, 6A 및 6B로부터의 2.2  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드를 함유하는 0.5 mL 용량으로서 제제화하였다. 모든 접합체는 0.5 mL의 용량당 0.5 mg의 Al<sup>3+</sup>에 해당하는 인산알루미늄 겔에 흡착되었다. 제제화를 위한 희석제 및 비히클로서 0.9% W/V 염수를 사용하였고, 최종 제제의 pH는 1 N 염산을 사용하여 pH 6으로 조정하였다. pH 조정 후 효과적인 흡착을 위해, 제제를 일정한 교반 하에 2시간 동안 혼합하였다. 블렌딩 2시간 후, 제제화된 블렌드를 3 mL 멸균 비실리콘화된 바이알 내에 바이알당 0.58 mL의 충전 부피로 무균 방식으로 채우고, 멸균된 13 mm 고무 마개로 막고, 알루미늄 씬을 벗긴 13 mm 멸균 분홍색 플립으로 밀봉한 후, 충전된 바이알을 광학적으로 검사하고, 라벨을 부착하였다. 로트로부터, 무작위로 선정된 일부 바이알은 외관, pH, 삼투질 농도, 전체 폴리사카라이드 및 단백질 함량( $\mu\text{g}/\text{SHD}$ ), 흡착 %, 알루미늄 함량(mg/SHD)을 분석하기 위해 시험되었다.
- [0247] 실시예 4: 폐렴구균 피막 폴리사카라이드-단백질 접합체 백신의 제제화
- [0248] 15가의 접합된 백신을, ~28  $\mu\text{g}$ 의 CRM<sub>197</sub> 단백질에 접합된 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F & 33F로부터의 2.2  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드 및 ~14  $\mu\text{g}$ 의 PsaA 단백질에 접합된 혈청형 3, 6A 및 6B로부터의 4.4  $\mu\text{g}$ 의 각각의 폴리사카라이드를 함유하는 0.5 mL 용량으로서 제제화하였다. 모든 접합체는 0.5 mL의 용량당 0.5 mg의 Al<sup>3+</sup>에 해당하는 인산알루미늄 겔에 흡착되었다. 제제화를 위한 희석제 및 비히클로서 0.9% w/v 염수를 사용하였고, 최종 제제의 pH는 1 N 염산을 사용하여 pH 6으로 조정하였다. pH 조정 후 효과적인 흡착을 위해, 제제를 일정한 교반 하에 2시간 동안 혼합하였다. 블렌딩 2시간 후, 제제화된 블렌드를 3 mL 멸균 비실리콘화된 바이알 내에 바이알당 0.58 mL의 충전 부피로 무균 방식으로 채우고, 멸균된 13 mm 고무 마개로 막고, 알루미늄 씬을 벗긴 13 mm 멸균 분홍색 플립으로 밀봉한 후, 충전된 바이알을 광학적으로 검사하고, 라벨을 부착하였다. 로트로부터, 무작위로 선정된 일부 바이알은 외관, pH, 삼투질 농도, 전체 폴리사카라이드 및 단백질 함량( $\mu\text{g}/\text{SHD}$ ), 흡착 %, 알루미늄 함량(mg/SHD)을 분석하기 위해 시험되었다.
- [0249] A) 제제화된 백신을 사용한 토끼의 면역화
- [0250] 각각 1.5 내지 2 kg의 건강한 토끼를 특정 병원균이 없는 수용 시설에서 기르고 사육하였다. 토끼는 상기 언급된 제제로 다음 일정에 따라 면역화하였다.
- [0251] 그룹 1은 15가의 접합체 백신(실시예 3)으로 면역화된 7마리의 토끼로 구성되었다. CRM<sub>197</sub>에 접합된 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F의 2.2  $\mu\text{g}$ 의 각각의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드 및 PsaA에 접합된 혈청형 3, 6A 및 6B의 2.2  $\mu\text{g}$ 의 각각의 에스. 뉴모니아에 폴리사카라이드를 포함하였다. 토끼는 제1일, 제15일 및 제29일에 면역화하고; 혈액 샘플을 제0일, 제15일 및 제36일에 수집하였다. 혈액 샘플로부터 혈청을 분리하고, -80°C에서 보관하였다.
- [0252] 그룹 2는 13가 접합체 백신인 프레브나13®으로 면역화된 7마리의 토끼로 구성된다. 토끼는 제1일, 제15일 및 제29일에 면역화되고; 혈액 샘플을 제0일, 제12일, 제26일 및 제40일에 수집하였다. 제12일 및 제40일의 데이터

를 사용하여 PsaA 연구와 비교하기 위한 그래프를 작성하였다(도 4). 혈액 샘플로부터 혈청을 분리하고, -80℃에서 보관하였다.

[0253] 그룹 3은 15가의 접합체 백신(실시에 4)으로 면역화된 7마리의 토끼로 구성된다. ~28 µg의 CRM<sub>197</sub> 단백질에 접합된 각각의 혈청형 1, 4, 5, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F & 33F의 2.2 µg의 폴리사카라이드 및 ~14 µg의 PsaA 단백질에 접합된 혈청형 3, 6A 및 6B의 4.4 µg의 각각의 폴리사카라이드를 포함하였다. 토끼는 제1일, 제15일 및 제29일에 면역화하고; 혈액 샘플을 제0일, 제15일 및 제36일에 수집하였다. 혈액 샘플로부터 혈청을 분리하고, -80℃에서 보관하였다. 면역화된 토끼로부터 얻은 혈청을 ELISA를 사용하여 혈청 특이적 면역 반응에 대해 분석하였다.

[0254] ELISA는 WHO에서 제안된 프로토콜에 따라 수행하였다. 간단히 설명하면, 맥시소프(Maxisorp)<sup>TM</sup> ELISA 플레이트를 주어진 혈청형의 PnCPS로 코팅하였다(PBS를 사용하여 1 µg/50 µl/웰; 멸균 내독소 미함유, 0.02% 아지드화나트륨 함유). 플레이트를 가슴을 위해 축축한 페이퍼 타월이 든 상자에 넣고, 5시간 동안 37℃ ± 2℃에서 인큐베이팅한 후, 플레이트를 5℃ ± 3℃에서 사용할 때까지 보관하였다.

[0255] 세포벽 폴리사카라이드로부터 유래하는 배경 반응성을 제거하기 위해 시험 혈청을 CWPS Mlti<sup>TM</sup>에 예비 흡착시켰다. 이를 달성하기 위해, 998 µl의 예비 흡착 용액(PBST 중의 999 µl의 10% SuperBlock<sup>TM</sup> 중의 1 mL-1 µl CWPS Multi<sup>TM</sup>)을 사용하여 2 µl의 시험 및 양성 대조군 혈청을 희석하여 1:500의 최종 희석액을 얻었다. 희석된 샘플을 실온(25℃ ± 5℃)에서 1시간 동안 연속적으로 진탕하면서 인큐베이팅하였다. 비결합된 PnCPS는 플레이트를 가볍게 쳐서 제거하고, 200 µl의 차단제(PBS 중의 20% SuperBlock<sup>TM</sup>)를 첨가하여 웰 내의 자유로운 부위를 차단하였다. 플레이트를 진탕하지 않으면서 실온(25℃ ± 5℃)에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다.

[0256] B) 시험 샘플 및 대조군 첨가

[0257] A1 내지 A12를 제외한 모든 웰에 50 µl의 희석액(PBST 중의 10% SuperBlock<sup>TM</sup>)을 첨가하였다. 이어서, 100 µl/웰의 예비 흡착된 시험 혈청 샘플을 A1 내지 A10에 첨가하고, 대조군 혈청 샘플을 A11 및 A12에 첨가하였다. 시험 샘플의 2배 연속 희석은 A1-A10으로부터 H1-H10으로, 처음 웰로부터 다음 웰로 50 µl을 옮기는 과정을 반복함으로써 수행한다. 이와 유사하게, A11 및 12로부터 E11 및 E12로 대조군 샘플(007SP)의 연속 희석이 수행되었다. 희석하지 않은 F11 및 F12 내지 H11 및 H12는 블랭크로 설정하였다.

[0258] 플레이트를 진탕하지 않으면서 실온(25℃ ± 5℃)에서 2시간 동안 인큐베이팅하였다. 인큐베이팅 단계 후, 내용물을 버리고, 플레이트를 PBST(~250 µl/웰)로 수동으로 또는 플레이트 와셔로 3회 세척하였다.

[0259] C) 1차 항체 첨가

[0260] 50 µl/웰의 재조합 단백질 A/G 퍼옥시다제(PBST 중의 10% SuperBlock<sup>TM</sup>을 사용하여 1:20000으로 희석됨)를 모든 웰에 첨가하고, 플레이트를 진탕하지 않으면서 실온(25℃ ± 5℃)에서 1시간 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 플레이트를 PBST(250 µl/웰)로 수동으로 또는 플레이트 와셔로 3회 세척하였다.

[0261] D) 발색 및 관독

[0262] 발색 반응은 50 µl/웰의 TMB 기질을 첨가하여 발생시키고, 진탕하지 않으면서 실온(25℃ ± 5℃)에서 15분 동안 인큐베이팅하였다. 50 µl/웰의 1.25 M 황산을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 450 nm에서의 OD를 측정하였다.

[0263] E) 역가 추정

[0264] 면역화된 동물에서 항체 역가는 희석 배수의 역수로서 규정되었다. 면역 전 역가(약 0.2)의 2배의 OD<sub>450nm</sub>를 나타내는 가장 높은 희석률을 역가로서 기록하였다. 각각의 혈청형에 대한 혈청 항체의 역가가 그래프로 제시되고, 다른 처리 그룹과 비교되었다.

[0265] 그룹 1의 동물에서의 면역 반응 데이터는 혈청 항체 역가의 혈청형 특이적 증가의 용량 의존적 증가를 나타내며, 즉, 항체 역가의 수준이 백신 접종된 동물에서 각각의 후속 투여에서 증가한다. 혈청형 3에 대한 면역 반응(도 5)은 동물을 4.4 µg의 폴리사카라이드를 함유하는 PsaA의 접합체로 면역화할 때(그룹 3)의 약 1:10000이었다. 또한, 혈청형 3, 6A 및 6B에 대한 혈청 항체 역가는 프레브나®13으로 면역화된 토끼에서 얻은 면역 반응과 비교했을 때 적어도 2배 더 높았다. 프레브나®13을 사용한 토끼의 제1 면역화 후의 혈청 IgG 역가는 본 개시내용의 15가 제제에서 관찰된 것과 동일한 정도의 상승을 나타나지 않는다(도 3 & 4). 프레브나®13 내의 혈청형 6B에 대한 폴리사카라이드의 농도가 PsaA에 접합된 혈청형 3 폴리사카라이드의 농도와 비교할 때 2배(4.4 µg)이지만(도 3), IgG 반응 수준의 2배이다. 혈청형 3 항체의 역가는 CRM<sub>197</sub>에 접합된 2.2 µg의 혈청형 3



을 함유하는 제제에서 겨우 8000에 도달한다. 이 역가는 4.4  $\mu\text{g}$ 의 PsaA에 접합될 때 현저한 개선(16000)을 나타낸다. 이것은 PsaA에 대한 혈청형 3, 6A 및 6B 폴리사카라이드의 접합으로 인한 면역 반응의 개선이다. 프레브나®13 백신 접종된 동물에서 혈청형 14에 대한 혈청 항체 역가는 본 개시내용의 제제에 비해 더 낮았다. 본 개시내용의 백신 제제 또는 프레브나®13을 사용하여 백신 접종된 동물에서 다른 혈청형에 대한 IgG 반응은 유사하였다. 혈청형 3, 6A 및 6B 역가는 2.2  $\mu\text{g}$  농도에서도 PsaA에 대한 접합시에 개선되었다.

[0266] 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 특정된 수치 사용은 언급된 범위 내의 특정된 최소값 및 최대값을 통해 근사값을 나타내고, "약"이라는 단어가 선행한다. 범위의 개시는 인용된 최소값과 최대값 사이의 모든 값을 포함하는 연속적인 범위 및 이러한 값을 통해 형성될 수 있는 임의의 범위로서 의도된다. 본원에서 제시되는 수치는 본 개시내용의 다양한 실시양태를 나타낸다.

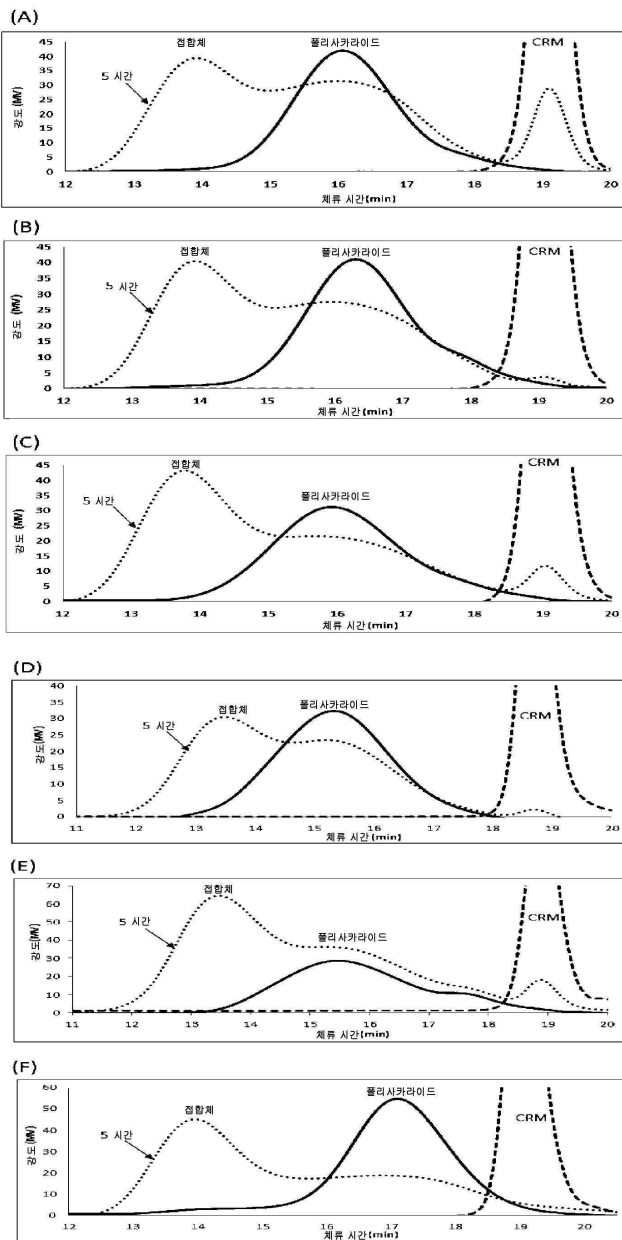
[0267] 본 개시내용 전체에 걸쳐, 단수 용어 "하나", "하나의" 및 "그"는 문맥이 달리 지시하지 않는 한 복수 대상체를 포함한다. 이와 유사하게, "또는"이라는 단어가 2개 이상의 항목의 목록과 관련하여 다른 항목들로부터 독립적으로 단일 항목만을 의미하는 것으로 명백히 제한되지 않는 한, 상기 목록에서 "또는"을 사용하는 것은 다음을 포함하는 것으로 해석되어야 한다: (a) 목록 내의 임의의 단일 항목, (b) 목록 내의 모든 항목 또는 (c) 목록의 항목의 임의의 조합. 추가로, "포함하는" 등의 용어는 임의의 더 많은 수의 동일한 특징(들) 및/또는 하나 이상의 추가의 유형의 특징이 배제되지 않도록 적어도 열거된 특징(들)을 포함하는 것을 의미하기 위해 본 개시내용 전체에 걸쳐 사용된다. 본원에서 "한 실시양태", "실시양태" 또는 유사한 표현에 대한 언급은 그 실시양태와 관련하여 설명되는 조성물, 조성, 방법 또는 특색의 특정 특징이 본 발명의 기술의 적어도 하나의 실시양태에 포함될 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 본원에서 상기 문구 또는 표현의 제시가 모두 반드시 동일한 실시양태를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 다양한 특정 특징, 조성물, 방법 또는 특색이 하나 이상의 실시양태에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다.

[0268] 본 개시내용은 본 발명의 기술을 본원에서 개시된 정확한 형태로 한정하거나 포괄하려는 것이 아니다. 특정 실시양태가 예시의 목적으로 본원에서 개시되지만, 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면 인식할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 기술로부터 벗어나지 않으면서 다양한 균등한 수정이 가능하다. 일부 경우에, 본 발명의 기술의 실시양태의 설명을 불필요하게 모호하게 하는 것을 피하기 위해 공지된 구조 및 기능은 상세하게 제시 및/또는 설명되지 않았다. 방법의 단계가 특정 순서로 본원에서 제시될 수 있지만, 다른 실시양태에서는 단계가 또 다른 적절한 순서를 가질 수 있다. 이와 유사하게, 특정 실시양태의 맥락에서 개시된 본 발명의 기술의 특정 실시양태는 다른 실시양태에서 조합되거나 제거될 수 있다. 또한, 특정 실시양태와 관련된 이점이 그 실시양태와 관련하여 개시되었을 수 있지만, 다른 실시양태가 또한 이러한 이점을 나타낼 수 있으며, 모든 실시양태가 본 발명의 기술의 범위 내에 속하기 위해 본원에 개시된 상기 이점 또는 다른 이점을 반드시 나타낼 필요는 없다. 따라서, 본 개시양태 및 관련 기술은 본원에서 명시적으로 제시 및/또는 설명되지 않은 다른 실시양태를 포함할 수 있다.

[0269] 상기 내용으로부터, 본 개시내용의 특정 실시양태가 예시의 목적으로 설명되었지만, 본 개시내용의 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 본 개시내용은 첨부된 청구 범위를 제외하고는 이들 실시양태로 제한되지 않는다.

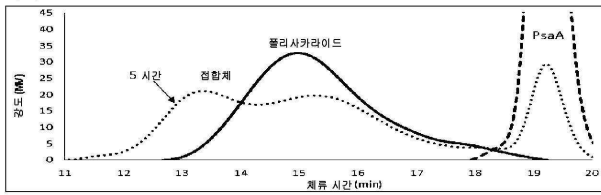
도면

도면1

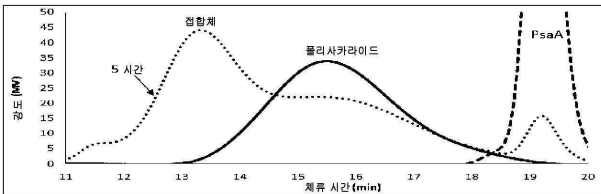


도면2

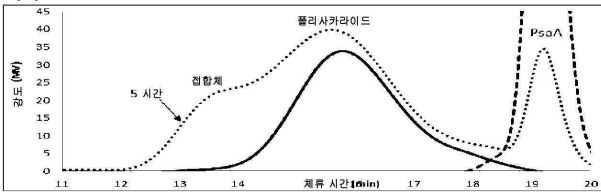
(A)



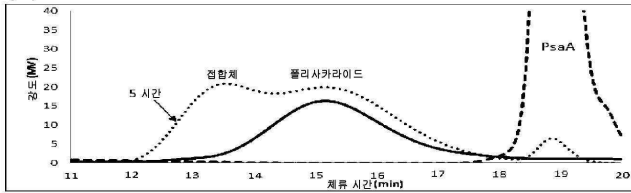
(B)



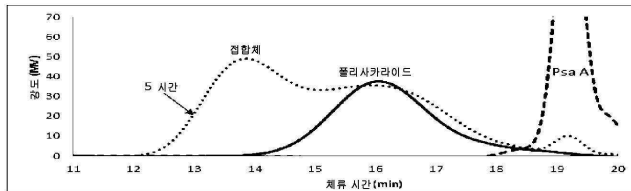
(C)



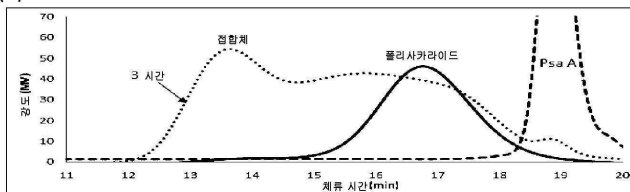
(D)



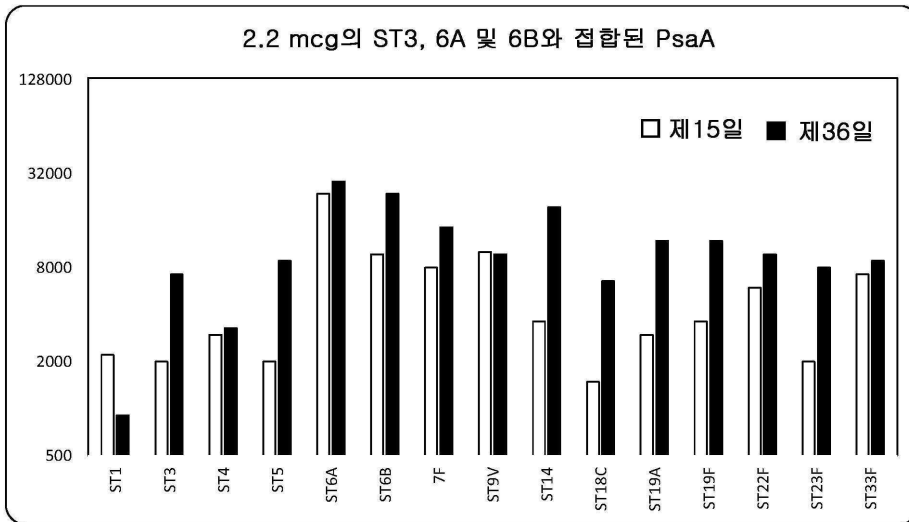
(E)



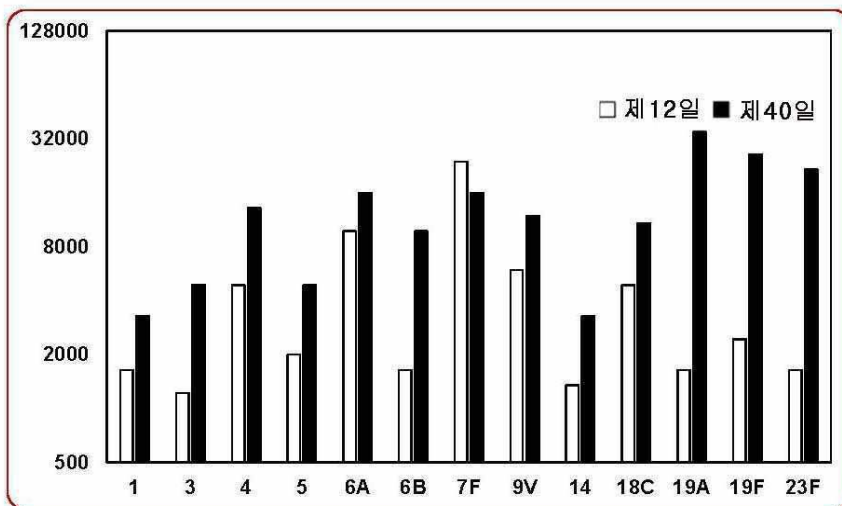
(F)



도면3



도면4



도면5

