

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-515035

(P2014-515035A)

(43) 公表日 平成26年6月26日(2014.6.26)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 39/09 (2006.01)	A 61 K 39/09	4 C 076
A 61 K 9/127 (2006.01)	A 61 K 9/127	4 C 085
A 61 K 39/39 (2006.01)	A 61 K 39/39	4 H 045
A 61 K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00	Z
A 61 P 31/04 (2006.01)	A 61 P 31/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-510771 (P2014-510771)	(71) 出願人	305060279 グラクソsmithkline バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー-1330 リクセンサー ル リュ ドランスティチュ 89
(86) (22) 出願日	平成24年5月15日 (2012.5.15)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月12日 (2013.12.12)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/058987	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(87) 國際公開番号	W02012/156391	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(87) 國際公開日	平成24年11月22日 (2012.11.22)	(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子
(31) 優先権主張番号	1108256.7		
(32) 優先日	平成23年5月17日 (2011.5.17)		
(33) 優先権主張国	英國 (GB)		
(31) 優先権主張番号	1121647.0		
(32) 優先日	平成23年12月16日 (2011.12.16)		
(33) 優先権主張国	英國 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ストレプトコッカス・ニューモニエに対するワクチン

## (57) 【要約】

本発明は、改良された免疫原性組成物およびワクチン、それらの製造方法ならびに医薬におけるそれらの使用に関する。特に、本発明は、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアド(Polyhistidine Triad)ファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、非コンジュゲート化ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)タンパク質の免疫原性組成物に関し、該組成物は、QS21およびモノホスホリルリピドA(MPL)を含むアジュバントを含有し、リポソームの形態で提示される。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ニュー モリシンおよびポリヒスチジントライアド(Polyhistidine Triad)ファミリーのメンバーから選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化ストレプトコッカス・ニューモニエ(Streptococcus pneumoniae)タンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュvant、を含有する免疫原性組成物。

**【請求項 2】**

ストレプトコッカス・ニューモニエタンパク質：モノホスホリルリピドA(MPL)の比が0.05：1から3：1(w/w)である、請求項1記載の免疫原性組成物。 10

**【請求項 3】**

ストレプトコッカス・ニューモニエタンパク質：QS21の比が0.05：1から3：1(w/w)である、請求項1または2記載の免疫原性組成物。

**【請求項 4】**

5～60、45～55、5～20、または20～30 μg(例えば、20、25、30、35、40、45または50 μg)のモノホスホリルリピドA(MPL)を含有する、請求項1～3のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

**【請求項 5】**

5～60、45～55、5～20、または20～30 μg(例えば、20、25、30、35、40、45または50 μg)のQS21を含有する、請求項1～4のいずれか一項記載の免疫原性組成物。 20

**【請求項 6】**

0.1～10mg、0.2～7、0.3～5、0.4～2、または0.5～1mg(例えば、0.4～0.6、0.9～1.1、0.5または1mg)のリン脂質を含有する、請求項1～5のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

**【請求項 7】**

0.025～2.5、0.05～1.5、0.075～0.75、0.1～0.3、または0.125～0.25mg(例えば、0.2～0.3、0.1～0.15、0.25または0.125mg)のステロールを含有する、請求項1～6のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

**【請求項 8】**

モノホスホリルリピドA(MPL)が3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)である、請求項1～7のいずれか一項記載の免疫原性組成物。 30

**【請求項 9】**

3D-MPLの量がヒト用量あたり50 μgである、請求項8記載の免疫原性組成物。

**【請求項 10】**

QS21の量がヒト用量あたり50 μgである、請求項1～9のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

**【請求項 11】**

リン脂質がジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)である、請求項1～10のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

**【請求項 12】**

DOPCの量がヒト用量あたり1000 μgである、請求項11記載の免疫原性組成物。 40

**【請求項 13】**

ステロールがコレステロールである、請求項1～12のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

**【請求項 14】**

コレステロールの量がヒト用量あたり250 μgである、請求項13記載の免疫原性組成物。

**【請求項 15】**

哺乳動物において細胞溶解性T細胞応答を惹起させることが可能である、請求項1～14のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

**【請求項 16】**

10

20

30

40

50

インターフェロン 産生を刺激することが可能である、請求項1～15のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

IL-17産生を刺激することが可能である、請求項1～16のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

ニューモリシンが解毒されたニューモリシン(dPly)である、請求項1～17のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

ニューモリシンが化学的に解毒されている、請求項18記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 20】

ニューモリシンが遺伝子的に解毒されている、請求項18または19記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

ヒト用量あたり3～90、3～20、20～40、または40～70 μg(例えば、10、30または60 μg)の非コンジュゲート化肺炎球菌ニューモリシンを含有する、請求項1～20のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

ポリヒスチジントライアドファミリーのメンバーがPhtDである、請求項1～21のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 23】

PhtDがWO00/37105の配列番号4のアミノ酸21-838の配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、請求項22記載の免疫原性組成物。

【請求項 24】

PhtDがWO00/37105の配列番号4のアミノ酸21-838の配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する、請求項22記載の免疫原性組成物。

【請求項 25】

PhtDがWO00/37105の配列番号4のアミノ酸21-838を含むアミノ酸配列を有する、請求項22記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 26】

PhtDがWO00/37105の配列番号4からの少なくとも10個連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を有する、請求項22記載の免疫原性組成物。

【請求項 27】

ヒト用量あたり3～90、3～20、20～40、または40～70 μg(例えば、10、30または60 μg)の非コンジュゲート化PhtDを含有する、請求項1～26のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 28】

非コンジュゲート化ニューモリシンおよび非コンジュゲート化肺炎球菌PhtDを含有する、請求項1～27のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 29】

1種以上のさらなる抗原を含有する、請求項1～28のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 30】

1種以上のS.ニューモニ工莢膜糖類を含有する、請求項1～28のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 31】

投与量が0.4～1.5mlである、請求項1～30のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項 32】

投与量が0.5mlである、請求項31記載の免疫原性組成物。

50

【請求項 33】

請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物を含むワクチン。

【請求項34】

非コンジュゲート化ストレプトコッカス・ニューモニエタンパク質をアジュバント組成物と混合する段階を含んでなる、請求項33記載のワクチンの製造方法。

【請求項35】

請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物で哺乳動物を免疫することによって免疫応答を誘発する方法。

【請求項36】

ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患を治療または予防する方法であって、ストレプトコッカス・ニューモニエ感染に罹っているかまたは罹りやすい患者に、請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物を投与することを含んでなる方法。 10

【請求項37】

AE COPDを治療または予防する方法であって、AE COPDに罹っているかまたは罹りやすい患者に、請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物を投与することを含んでなる方法。

【請求項38】

ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患を治療または予防する方法であって、それを必要としている被験者に、請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物を筋肉内投与することを含んでなる方法。 20

【請求項39】

ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患を治療または予防する方法であって、それを必要としているヒトに、請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物を筋肉内投与することを含んでなる方法。

【請求項40】

ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するための請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物。

【請求項41】

AE COPDの治療または予防に使用するための請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物。 30

【請求項42】

ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するための医薬の製造における請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項43】

ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するための筋肉内ワクチンの製造における請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物の使用。

【請求項44】

AE COPDの治療または予防に使用するための医薬の製造における請求項1～32のいずれか一項記載の免疫原性組成物の使用。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改良された免疫原性組成物およびワクチン、それらの製造方法ならびに医薬におけるそれらの使用に関する。特に、本発明は、ニューモリシンおよびポリヒシチジントライアド(Polyhistidine Triad)ファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、非コンジュゲート化ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)タンパク質の免疫原性組成物に関し、該組成物は、QS21およびモノホスホリルリピドA(MPL)を含むアジュバントを含有し、リポソームの形態で提示される。

10

20

30

40

50

**【背景技術】****【0002】**

ストレプトコッカス・ニューモニエ(*S.ニューモニエ*)は、肺炎球菌の別名でも知られている、グラム陽性菌である。*S.ニューモニエ*は、世界中の主要な公衆衛生問題であり、特に乳幼児、高齢者および免疫に障害がある者の間では、かなりの罹患率と死亡率を占めている。*S.ニューモニエ*は、市中肺炎、急性副鼻腔炎、中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症、骨髄炎、敗血症性関節炎、心内膜炎、腹膜炎、心膜炎、蜂巣炎、および脳膿瘍を含めて、広範囲の重大なヒト病変を引き起す。*S.ニューモニエ*は、米国だけでも毎年3,000症例の髄膜炎、50,000症例の菌血症、500,000症例の肺炎、および7,000,000症例の中耳炎における病原菌であると推定されている(Reichler, M. R. et al., 1992, *J. Infect. Dis.* 166: 1346; Stool, S. E. and Field, M. J., 1989 *Pediatr. Infect. Dis J.* 8: S11)。肺炎球菌疾患による死亡率は、先進国と途上国の両方の5歳未満の小児では特に高くなっている。高齢者、免疫に障害のある者、および他の基礎疾患(糖尿病、喘息)のある患者も病気に特にかかりやすい。

10

**【0003】**

*S.ニューモニエ*が引き起こす主要な臨床症候群は広く認識されており、すべての標準的な医学の教科書で説明されている(Fedson D S, Muscher D M. In: Plotkin S A, Orenstein W A, 編. *Vaccines*. 第4版. Philadelphia WB Saunders Co, 2004a: 529-588)。例えば、侵襲性肺炎球菌疾患(IPD)は、*S.ニューモニエ*が血液または他の通常は無菌の部位から分離されるあらゆる感染症として定義される(Musher D M. *Streptococcus pneumoniae*. In Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (編). *Principles and Practice of Infectious diseases* (第5版). New York, Churchill Livingstone, 2001, p 2128-2147)。

20

**【0004】**

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は肺の慢性炎症性疾患であり、世界中で高い罹患率と死亡率の主要な原因となっている。米国では2005年に死者20人のうちほぼ1人が根本的な原因としてCOPDにかかっていた(Drugs and Aging 26:985-999 (2009))。2020年には、COPDは、慢性の虚弱化(invalidating)疾患による障害調整生存年(disability adjusted life year)の主因の第5位に上昇し、また、死亡率の最重要原因の第3位に上昇することが予測される(Lancet 349:1498-1504 (1997))。

30

**【0005】**

COPDの経過は、気流制限の進行性悪化と肺機能の低下によって特徴づけられる。COPDは頻繁かつ再発性の急性増悪(AE)を伴って重症化し、これは膨大な医療費と高い死亡率に関連づけられる(Proceedings of the American Thoracic Society 4:554-564 (2007))。ある研究では、COPDの症状の急性増悪の約50%が分類不可能なヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)、モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)、およびシュードモナス・エルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)によって引き起こされることが示唆されている(Drugs and Aging 26:985-999 (2009))。H.インフルエンザはCOPDの増悪の20~30%に；ストレプトコッカス・ニューモニエはCOPDの増悪の10~15%に；そしてモラクセラ・カタラーリスはCOPDの増悪の10~15%に見られる(New England Journal of Medicine 359:2355-2365 (2008))。ヘモフィルス・インフルエンザ、ストレプトコッカス・ニューモニエ、およびモラクセラ・カタラーリスは香港、韓国およびフィリピンにおいて気管支炎の急性増悪の主な病原菌であり、一方、クレブシエラ属(*Klebsiella spp.*)、シュードモナス・エルギノーサおよびアシネットバクター属(*Acinetobacter spp.*)はインドネシア、タイ、マレーシアおよび台湾などの他のアジア諸国/地域において病原菌の大部分を構成することが示されている(Respirology, (2011) 16, 532-539; doi:10.1111/j.1440.1843.2011.01943.x)。バングラデシュでは、COPD患者の20%は、シュードモナス属、クレブシエラ属、ストレプトコッカス・ニューモニエ、およびヘモフィルス・インフルエンザの陽性喀痰培養を示した一方で、AECOPD患者の65%はシュードモナス属、クレブシエラ属、アシネットバクター属、エンテロバクター属(*Enterobacter*)、モラクセラ・カタラーリスおよびそれらの

40

50

組み合わせの陽性培養を示した(Mymensingh Medical Journal 19:576-585 (2010))。しかし、COPD増悪を防ぐための2つの最も重要な対策は、能動免疫化および薬物療法の長期的維持であることが示唆されている(Proceedings of the American Thoracic Society 4:55 4-564 (2007))。

#### 【0006】

抗菌薬の登場は、肺炎球菌疾患からの全体的な死亡率を減少させたが、S.ニューモニエの抗生物質耐性株の出現が深刻かつ急速に増大する問題となっている。したがって、S.ニューモニエに対する効果的なワクチンを開発することが重要である。効果的な肺炎球菌ワクチンは、S.ニューモニエ疾患に関連する罹患率と死亡率に大きな影響を与える可能性がある。

10

#### 【0007】

本発明は、リポソームの形態で提示される非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質の免疫原性組成物に関する。リポソーム製剤は当技術分野で公知であり、アジュバント組成物として有用であると提案されている(WO96/33739、WO07/068907)。WO96/33739には、リポソームの形態で提示され得る、抗原、QS21などのQuillaja Saponaria Molina(シャボンノキ)の樹皮由来の免疫活性画分、およびステロールを含有する特定のワクチン、ならびにリポソームの製造方法が開示される。WO07/068907には、抗原または抗原調製物を、アジュバントと組み合わせて含有する特定の免疫原性組成物が開示され、該アジュバントは、リポソームの形態で提示されるQuillaja Saponaria Molinaの樹皮由来の免疫活性サポニン画分、およびリポ多糖体を含み、サポニン画分とリポ多糖体は両方ともヒト用量中に30 μg以下のレベルとして存在する。

20

#### 【0008】

しかしながら、改良されたワクチン組成物、特に高齢者および幼児の肺炎球菌疾患を予防または軽減する上でより効果的なもの、についての必要性が依然として存在する。本発明は、非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質とアジュバントの特定の組み合わせに基づいた改良型ワクチンを提供する。

#### 【発明の概要】

#### 【0009】

#### 発明の説明

本発明者らは、リポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバントと組み合わせた、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された非コンジュゲート化ストレプトコッカス・ニューモニエタンパク質のワクチンまたは免疫原性組成物が、有利な特性を備えていることを見出した。この非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質とアジュバントの組み合わせは、増強された免疫原応答をもたらすことが判明した。

30

#### 【0010】

したがって、本発明の第1の態様では、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバント、を含有する、免疫原性組成物を提供する。

40

#### 【0011】

本発明の別の態様では、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバント、を含有する、ワクチン組成物を提供する。

#### 【0012】

本発明のさらなる態様では、ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こ

50

される疾患を治療または予防する方法であって、それを必要としている被験者に、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバント、を含有する免疫原性組成物を筋肉内投与することを含んでなる方法を提供する。

#### 【0013】

本発明のさらなる態様では、S.ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するための医薬の製造における、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバント、を含有する免疫原性組成物の使用を提供する。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【図1】血液中の全体的なdPIy特異的T細胞応答：AS03B対AS01B。PIII(すなわち、3回目の免疫後)にいずれかのサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-17、IL-13)を発現するT細胞。

20

【図2】血液中の全体的なPhtD特異的T細胞応答：AS03B対AS01B。いずれかのサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-17、IL-13)を発現するT細胞。

#### 【図3】dPIy特異的Th1応答：AS03B対AS01B。IFN- $\gamma$ 発現T細胞(Th1)。

#### 【図4】PhtD特異的Th1応答：AS03B対AS01B。IFN- $\gamma$ 発現T細胞(Th1)。

#### 【図5】dPIy特異的Th17応答：AS03B対AS01B PIII。

#### 【図6】PhtD特異的Th17応答：AS03B対AS01B。

#### 【図7a】AS01B対AS03B：抗体応答。PhtD投与IgG合計。

#### 【図7b】AS01B対AS03B：抗体応答。dPIy投与IgG合計。

#### 【図8】致死チャレンジモデルにおけるAS01BおよびAS01Eの評価。

#### 【図9】肺コロニー形成モデルにおけるAS01BおよびAS01Eの評価。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0015】

#### 発明の詳細な説明

30

本発明は、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化ストレプトコッカス・ニューモニエタンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバントを含有する免疫原性組成物を提供する。S.ニューモニエタンパク質は「非コンジュゲート化」されたものであり、「非コンジュゲート化」は、該タンパク質が、例えば担体タンパク質としての、糖類に共有結合されていないことを意味する。

#### 【0016】

#### ニューモリシン

40

一態様において、本発明は、ニューモリシンから選択された少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバントを含有する免疫原性組成物を提供する。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ヒト用量あたり3~90、3~20、20~40、または40~70 μg(例えば10、30または60 μg)の非コンジュゲート化肺炎球菌ニューモリシンを含有する。

#### 【0017】

ニューモリシンまたは「PIy」とは、肺炎球菌由来の天然もしくは野生型のニューモリシン、組換えニューモリシン、ならびにその断片および/または変異体を意味する。一実施形態では、ニューモリシンは肺炎球菌由来の天然もしくは野生型ニューモリシン、または組換えニューモリシンである。ニューモリシンはS.ニューモニエのすべての菌株に見ら

50

れる53kDaのチオール活性化細胞溶解素であり、自己溶菌の際に放出されて、S.ニューモニエの病原性に関与している。それは高度に保存されており、異なる血清型のPlyタンパク質間にごくわずかのアミノ酸置換が存在するにすぎない。ニューモリシンは明確に区別される細胞溶解(溶血)作用と補体活性化作用を有する多機能性毒素である(Rubins et al., Am. Respir. Crit Care Med, 153:1339-1346 (1996))。その作用としては、例えば、ヒト単球による炎症性サイトカイン産生の刺激、ヒト呼吸上皮の纖毛の鼓動の抑制、ならびに好中球の殺菌作用および移動の減少が挙げられる。ニューモリシンの最も明白な作用は赤血球の溶解であり、これはコレステロールへの結合を伴う。野生型または天然ニューモリシンの発現およびクローニングは当技術分野で公知である。例えば、Walker et al. (Infect Immun, 55:1184-1189 (1987))、Mitchell et al. (Biochim Biophys Acta, 1007:67-72 (1989) および Mitchell et al (NAR, 18:4010 (1990)) を参照されたい。WO2010/071986には、野生型Ply、例えば配列番号2~42(例:配列番号34、35、36、37、41)が記載されている。一態様では、ニューモリシンはWO2010/071986の配列番号34である。別の態様では、ニューモリシンはWO2010/071986の配列番号35である。別の態様では、ニューモリシンはWO2010/071986の配列番号36である。別の態様では、ニューモリシンはWO2010/071986の配列番号37である。別の態様では、ニューモリシンはWO2010/071986の配列番号41である。さらに、EP1601689B1には、肺炎球菌ニューモリシンなどの細菌の細胞溶解素を、界面活性剤と高塩濃度の存在下でのクロマトグラフィーによって、精製するための方法が記載されている。

10

20

30

## 【0018】

本明細書中で用いる用語「断片」は、宿主動物において体液性および/または細胞性免疫応答を誘発することができる部分である。タンパク質の断片は、当技術分野で公知の技法を用いて、例えば組換え的に、タンパク質分解消化によって、または化学合成によって、生成することができる。ポリペプチドの内部または末端断片は、ポリペプチドをコードする核酸の一端から(末端断片の場合)、または両端から(内部断片の場合)、1個以上のヌクレオチドを除去することによって、生成することができる。一般的に、断片は全長配列の少なくとも10、20、30、40または50個連続したアミノ酸を含む。断片は、N末端とC末端のいずれか一方または両方から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40または50個のアミノ酸を除去または追加することによって、容易に改変することができる。

30

## 【0019】

本明細書中で用いる用語「保存的アミノ酸置換」は、野生型のアミノ酸残基を、その位置のアミノ酸残基の大きさ、極性、電荷、疎水性または親水性に影響がほとんどまたはまったくないように、かつ免疫原性の低下をもたらすことなく、非野生型の残基で置換することを含む。例えば、これらは次のグループ内での置換であり得る:バリン、グリシン；グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸；アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リシン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。ポリペプチドの配列への保存的アミノ酸改変(およびコード化ヌクレオチドへの対応する改変)は、親ポリペプチドと同様の機能的および化学的特性を有するポリペプチドを生成することができる。

40

## 【0020】

本明細書中で用いる用語「欠失」は、タンパク質配列から1個以上のアミノ酸残基が除去されることである。一般的には、せいぜい1~6個程度の残基(例えば、1~4個の残基)がタンパク質分子内のいずれか1つの部位で欠失される。

50

## 【0021】

本明細書中で用いる用語「挿入」は、タンパク質配列中に1個以上の非野生型のアミノ酸残基が追加されることである。一般的には、せいぜい1~6個程度の残基(例えば、1~4個の残基)がタンパク質分子内のいずれか1つの部位に挿入される。

50

## 【0022】

一実施形態では、本発明は、野生型配列と比較して、核酸またはアミノ酸配列に差異がある、ニューモリシンの断片および/または変異体を包含する。ニューモリシンの断片を

用いる場合、これらの断片は少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、または少なくとも約60個連続したアミノ酸残基の長さである。本発明の一実施形態では、ニューモリシンの免疫原性断片は、全長配列の少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、または少なくとも約60個連続したアミノ酸残基を含み、このポリペプチドは前記アミノ酸配列に特異的な免疫応答を誘発することが可能である。ニューモリシンは4つの主要な構造ドメインからなることが知られている(Rossjohn et al. Cell. 1997 May 30; 89(5):685-92)。これらのドメインは、これらのドメインの1つ以上を除去および/または修飾することによって、改変することができる。一実施形態では、該断片または各断片は、正確にまたは少なくとも1、2もしくは3つのドメインを含む。別の実施形態では、該断片または各断片は、正確にまたは少なくとも2もしくは3つのドメインを含む。別の実施形態では、該断片または各断片は少なくとも3つのドメインを含む。該断片または各断片は野生型ニューモリシン配列と50%超、60、70、80、90または100%同一であり得る。

10

## 【0023】

本発明によると、ニューモリシンの変異体は、野生型配列と比べて、1個以上のアミノ酸が置換および/または欠失および/または挿入されている配列を包含する。アミノ酸置換は保存的または非保存的であってよい。一態様では、アミノ酸置換は保存的である。置換、欠失、挿入またはこれらの任意の組み合わせは、変異体が免疫原性ポリペプチドである限り、単一の変異体内で組み合わせることができる。ニューモリシンの変異体は、一般的に、野生型ニューモリシン配列と少なくとも80、90、94、95、98または99%のアミノ酸配列同一性を共有する任意のニューモリシンまたは任意のニューモリシン断片、例えばWO2010/071986からの配列番号2～42(例：配列番号34、35、36、37、41)を包含する。一実施形態では、ニューモリシンの変異体は、一般的に、WO2010/07198からの配列番号36と少なくとも80、90、94、95、98または99%のアミノ酸配列同一性を共有する任意のニューモリシンまたは任意のニューモリシン断片を包含する。一実施形態では、本発明は、数個、5～10、1～5、1～3、1～2または1個のアミノ酸が任意の組み合わせで置換、欠失または付加された断片および/または変異体を包含する。別の実施形態では、本発明はB細胞またはT細胞エピトープを含む断片および/または変異体を包含する。そのようなエピトープは、例えばPSIPREDプログラム(提供先：David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK)を用いる、二次構造予測と、Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988])に記載の方法に基づいて算出される抗原指数の組み合わせを用いて、予測することができる。ニューモリシンの変異体は、例えば、WO04/43376、WO05/108580、WO05/076696、WO10/071986、WO10/109325(配列番号44、45および46)、ならびにWO10/140119(配列番号50および51)に記載されている。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ニューモリシンの変異体、例えばWO05/108580、WO05/076696、WO10/071986に記載されるもの、を含有する。

20

## 【0024】

本発明の一実施形態では、ニューモリシンとその断片および/または変異体は、ニューモリシンの野生型配列と少なくとも80、85、90、95、98、99または100%の同一性を共有するアミノ酸配列、例えばWO2010/071986からの配列番号34、35、36、37、41を有する。本発明の別の実施形態では、ニューモリシンとその断片および/または変異体は、ニューモリシンの野生型配列の少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、または少なくとも約60個連続したアミノ酸残基を含む。

30

## 【0025】

ニューモリシンは通常、解毒された(すなわち、保護に適した投与量で与える際にヒトに対して無毒性にされた)後で投与される。本明細書中で用いるとき、用語「dPly」は医療用途に適する解毒された(すなわち、無毒性の)ニューモリシンを意味することが理解される。ニューモリシンは化学的および/または遺伝子的に解毒することができる。したがって、一実施形態では、本発明の免疫原性組成物はdPlyを含有する。

40

## 【0026】

ニューモリシンの解毒は、化学的手段によって、例えば、ホルムアルデヒド、グルタル

50

アルデヒドなどの架橋剤、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルおよび/またはマレイミド基を含む架橋試薬(例:GMBS)、またはこれらの組み合わせを用いて、行うことができる。こうした方法は種々の毒素について当技術分野でよく知られており、例えば、EP1601689B1、W004/081515、W02006/032499を参照されたい。化学的解毒に用いられるニューモリシンは、天然もしくは組換えタンパク質、またはその毒性を軽減するために遺伝子操作されたタンパク質(下記参照)であり得る。ニューモリシンの融合タンパク質またはニューモリシンの断片および/もしくは変異体もまた、化学的手段によって解毒することができる。したがって、一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、例えばホルムアルデヒド処理によって、化学的に解毒されたニューモリシンを含むことができる。

## 【0027】

10

ニューモリシンは遺伝子的に解毒することも可能である。したがって、本発明は、例えば変異型タンパク質であり得る、肺炎球菌タンパク質を包含する。用語「変異型」は、例えばよく知られた部位特異的変異誘発の技術または他のいずれかの従来方法を用いることによって、1個以上のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個のアミノ酸)の欠失、付加または置換を受けた分子を意味するために本明細書中で用いられる。一実施形態では、その分子は1~15個、適切には10~15個、のアミノ酸の欠失または置換を受けている。変異型配列は、ヒトへの投与後に抗ニューモリシン防御および/または中和抗体を誘導する能力を保持しながら、毒性を軽減する目的で、例えば膜透過、細胞溶解、およびヒト赤血球や他の細胞に対する細胞溶解活性といった望ましくない活性を取り除くことができる。ニューモリシンの融合タンパク質またはニューモリシンの断片および/もしくは変異体も遺伝子的手段によって解毒することが可能である。これらの改変はいずれも標準的な分子生物学的および生化学的技術を用いて導入することができる。例えば、上述したように、変異型ニューモリシンタンパク質は、その免疫原性エピトープをまだ維持しながら、生物学的に不活性であるように改変することができ、例えば、W090/06951、Berry et al. (Infect Immun, 67:981-985 (1999))およびW099/03884を参照されたい。例えば、ニューモリシンタンパク質は、T<sub>65</sub>からCへの、G<sub>293</sub>からCへの、およびC<sub>248</sub>からAへの置換を含む3箇所のアミノ酸置換によって解毒され得る。本発明で用いることができる、遺伝子的に解毒されたニューモリシンの別の例は、W02011/075823からの配列番号9である。かくして、さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、遺伝子的に解毒されたニューモリシンを含むことができる。

20

## 【0028】

30

ニューモリシンを解毒するために、複数の技術の組み合わせを用いることができる。例えば、本発明の免疫原性組成物は、化学的および遺伝子的に解毒されたニューモリシンを含むことができる。

## 【0029】

40

ポリヒスチジントライアドファミリータンパク質

別の態様において、本発明は、ポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質;ならびにリボソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリビドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバントを含有する免疫原性組成物を提供する。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ヒト用量あたり3~90、3~20、20~40、または40~70 μg(例えば10、30または60 μg)の、ポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質を含有する。

## 【0030】

50

Pht(ポリヒスチジントライアド、PhtX)ファミリーには、PhtA、PhtB、PhtD、およびPhtEが含まれる。このファミリーは、脂質付加配列、プロリンリッチ領域と数個のヒスチジントライアドによって分離された2つのドメイン(おそらく金属もしくはヌクレオシド結合または酵素活性に関与する)、(3~5箇所の)コイルドコイル領域、保存されたN末端および不均一のC末端により特徴づけられる。

## 【0031】

50

用語「ポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー」には、全長のポリヒスチジントライアドファミリー(Pht)タンパク質、その断片または融合タンパク質または免疫学的に機能性の均等物が含まれる。これらは、W000/37105またはW000/39299に開示された配列と少なくとも80、85、90、95、98、99または100%の同一性を共有するアミノ酸配列を有するPhtA、PhtB、PhtDまたはPhtEタンパク質から選択することができる。Phtタンパク質の断片が(別個にまたは融合タンパク質の一部として)用いられる場合、これらの断片は、例えばW000/37105またはW000/39299に記載のPhtアミノ酸配列からの、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、または少なくとも約60個連続したアミノ酸残基の長さであり、ここで、前記ポリペプチドはW000/37105またはW000/39299に記載の前記アミノ酸配列に特異的な免疫応答を誘発することが可能である。一実施形態では、該断片または各断片は、正確にまたは少なくとも2、3、4もしくは5つのヒスチジントライアドモチーフ(任意で、2つ以上のトライアド間の天然のPht配列、または天然の肺炎球菌トライアド内Pht配列と50%超、60、70、80、90または100%同一であるトライアド内配列を有する)を含む。一実施形態では、該断片または各断片は、正確にまたは少なくとも2、3もしくは4つのコイルドコイル領域を含む。融合タンパク質は、PhtA、PhtB、PhtD、PhtEのうちの2、3または4つの全長または断片から構成され、例えば、PhtA/B、PhtA/E、PhtB/A、PhtB/E、PhtE/A、PhtE/B、PhtA/D、PhtB/D、PhtD/A、PhtD/B、PhtD/EおよびPhtE/Dから構成することができ、ここで、タンパク質同士は最初に挙げたものとN末端で連結される(例えばW001/98334参照)。

10

20

30

40

50

## 【0032】

PhtXタンパク質に関して、W098/18930に開示されたPhtAはSp36とも呼ばれる。これはポリヒスチジントライアドファミリー由来のタンパク質であり、タイプIIのシグナルモチーフを有する。PhtBはW000/37105に開示され、Sp036Bとも呼ばれる。PhtBファミリーの別のメンバーは、W000/17370に開示されるように、C3分解ポリペプチドである。このタンパク質もポリヒスチジントライアドファミリー由来のものであり、タイプIIのシグナルモチーフを有する。免疫学的に機能性の均等物は、W098/18930に開示されるタンパク質Sp42である。PhtBトランケート(約79kD)はW099/15675に開示され、これもまたPhtXファミリーのメンバーとみなされる。PhtEはW000/30299に開示され、BVH-3と称される。

## 【0033】

一実施形態において、ポリヒスチジントライアドファミリーのメンバーから選択されたS.ニューキニエタンパク質は、PhtDである。本明細書中で用いる用語「PhtD」は、シグナル配列が結合されている全長タンパク質、またはシグナルペプチド(例えばN末端の20アミノ酸)が除去されている成熟全長タンパク質、ならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質、例えばW000/37105の配列番号4、を包含する。PhtDは「Sp036D」とも呼ばれる。一態様では、PhtDはシグナル配列が結合されている全長タンパク質であり、例えば、W000/37105の配列番号4である。別の態様では、PhtDはシグナルペプチド(例えばN末端の20アミノ酸)が除去されている成熟全長タンパク質を含む配列であり、例えば、W000/37105の配列番号4のアミノ酸21-838である。好適には、PhtD配列はN末端メチオニンを含む。本発明はまた、例えばW000/37105、W000/39299、US6699703およびW009/12588に記載されるような、PhtDの免疫原性断片、PhtDの変異体および/またはPhtDの融合タンパク質であるPhtDポリペプチドを包含する。

## 【0034】

PhtDタンパク質の断片が(別個にまたは融合タンパク質の一部として)用いられる場合、これらの断片は、例えばW000/37105またはW000/39299に記載のPhtDアミノ酸配列(例えばW000/37105の配列番号4)からの、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、または少なくとも約60個連続したアミノ酸残基の長さである。本発明の一実施形態では、PhtDタンパク質の免疫原性断片は、W000/37105の配列番号4に示される配列の少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、または少なくとも約60個連続したアミノ酸残基を含み、ここで、前記ポリペプチドは前記アミノ酸配列に特異的な免疫応答を誘発することが可能である。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、例えばW009/12601、W001/9

8334およびWO09/12588に記載される、PhtDの断片を含有する。PhtDタンパク質の断片が(別個にまたは融合タンパク質の一部として)用いられる場合、各断片は必要に応じて、そのようなポリペプチドの1つ以上のヒスチジントライアドモチーフを含む。ヒスチジントライアドモチーフは配列HxxHxHを有するポリペプチドの部分であり、ここでHはヒスチジンであり、xはヒスチジン以外のアミノ酸である。本発明の一実施形態では、該断片または各断片は、正確にまたは少なくとも2、3、4もしくは5つのヒスチジントライアドモチーフ(任意で、2つ以上のトライアド間の天然のPhtD配列、またはトライアド内配列を有する)を含み、その場合には、該断片は天然の肺炎球菌トライアド内PhtD配列(例えばWO00/37105の配列番号4に示されるトライアド内配列)と50%超、60、70、80、90または100%同一である。PhtDタンパク質の断片は必要に応じて、そのようなポリペプチドの1つ以上のコイルドコイル領域を含む。コイルドコイル領域は「Coils」アルゴリズム(Lupus, A et al (1991) Science 252; 1162-1164)により予測される領域である。本発明の一実施形態では、該断片または各断片は、正確にまたは少なくとも2、3もしくは4つのコイルドコイル領域を含む。本発明の一実施形態では、該断片または各断片は、正確にまたは少なくとも2、3もしくは4つのコイルド

コイル領域を含み、その場合には、該断片は天然の肺炎球菌PhtD配列(例えばWO00/37105の配列番号4に示される配列)と50%超、60、70、80、90、95、96または100%同一である。本発明の別の実施形態では、該断片または各断片は、1つ以上のヒスチジントライアドモチーフだけでなく、少なくとも1、2、3または4つのコイルドコイル領域をも含む。

#### 【0035】

PhtDポリペプチドが変異体である場合には、その変異は一般的に、ヒスチジントライアド残基およびコイルドコイル領域以外の部分にあるが、これらの領域の1つ以上に変異があつてもよい。本発明によると、ポリペプチド変異体には、野生型配列と比較して、1個以上のアミノ酸が置換および/または欠失および/または挿入された配列が含まれる。アミノ酸置換は保存的または非保存的であり得る。一様では、アミノ酸置換は保存的である。置換、欠失、挿入またはこれらの任意の組み合わせは、変異体が免疫原性ポリペプチドである限り、単一の変異体内で組み合わせることができる。PhtDの変異体は、一般的に、野生型PhtD配列(例えばWO00/37105の配列番号4)と少なくとも80、90、95、96、98または99%のアミノ酸配列同一性を共有するPhtDの任意の断片または変異体を包含する。一実施形態では、本発明は、数個、5~10、1~5、1~3、1~2または1個のアミノ酸が任意の組み合わせで置換、欠失または付加された断片および/または変異体を包含する。別の実施形態では、本発明はB細胞またはT細胞エピトープを含む断片および/または変異体を包含する。そのようなエピトープは、例えばPSIPREDプログラム(提供先: David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK)を用いる、二次構造予測と、Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988])に記載の方法に基づいて算出される抗原指数の組み合わせを用いて、予測することができる。変異体は、従来の分子生物学的技法によって生成することができる。本明細書中で用いる変異体はまた、相同PhtD遺伝子内の1つ以上の部位で多型を示す別のストレプトコッカス属菌株からの天然に存在するPhtD対立遺伝子を含むことができる。

#### 【0036】

融合タンパク質は、PhtDと、PhtA、PhtBおよび/またはPhtEの全長または断片から構成される。融合タンパク質の例は、PhtA/D、PhtB/D、PhtD/A、PhtD/B、PhtD/EおよびPhtE/Dであり、ここで、タンパク質同士は最初に挙げたものとN末端で連結される(例えばWO01/98334参照)。融合断片または融合ポリペプチドは、例えば、組換え法によって、または予め調製されたポリペプチドもしくは活性断片を融合させるための適切なリンカーを用いて、生成することができる。

#### 【0037】

本発明の一実施形態において、PhtDならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質は、WO00/37105の配列番号4のアミノ酸配列21-838と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99または100%の同一性を共有するアミノ酸配列を含む。本発明の別の実施形

10

20

30

40

50

態では、PhtDならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質は、W000/37105の配列番号4のアミノ酸配列21-838と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99または100%の同一性を共有するアミノ酸配列を有する。好適には、PhtDならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質は、N末端メチオニンをもつアミノ酸配列を含む。本発明の別の実施形態では、PhtDならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質は、W000/37105の配列番号4に示される配列の少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、少なくとも約60、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約400、または少なくとも約800個連続したアミノ酸残基を含む。

#### 【0038】

本発明の一実施形態において、PhtDならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質は、W000/39299の配列番号73のアミノ酸配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99または100%の同一性を共有するアミノ酸配列を含む。本発明の別の実施形態では、PhtDならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質は、W000/39299の配列番号73のアミノ酸配列と少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99または100%の同一性を共有するアミノ酸配列を有する。本発明の別の実施形態では、PhtDならびにその断片、変異体および/または融合タンパク質は、W000/39299の配列番号73に示される配列の少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、少なくとも約60、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約400、または少なくとも約800個連続したアミノ酸残基を含む。本発明の別の実施形態では、PhtD配列はW02011/075823からの配列番号1または5である。

10

20

30

40

#### 【0039】

本発明はまた、アミノ酸配列に関係しない形で天然のS.ニューモニエポリペプチドとは異なるPhtDタンパク質を包含する。非配列修飾には、アセチル化、メチル化、リン酸化、カルボキシル化、またはグリコシル化の変更が含まれる。本発明の範囲内には、ペプチドの安定性を高める修飾を加えたものも含まれる；そうした類似体は、例えば、ペプチド配列に1つ以上の非ペプチド結合(ペプチド結合に取って代わる結合)を含むことができる。本発明の範囲内には、天然に存在するL-アミノ酸以外の残基、例えばD-アミノ酸または非天然もしくは合成アミノ酸(例：またはアミノ酸、および環状類似体)を含む類似体も含まれる。

#### 【0040】

一態様において、本発明の免疫原性組成物は、ニューモリシン(例えばdPIy)およびPhtD(例えばW000/37105の配列番号4のアミノ酸21-838を含む配列)から選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質；ならびにリポソームの形態で提示される、QS21、モノホスホリルリピドA(MPL)、リン脂質およびステロールを含むアジュバントを含有する。本発明の免疫原性組成物はまた、2種以上の異なる非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質抗原を含んでもよい。別の態様では、本発明の免疫原性組成物は、ニューモリシンおよびPhtDから選択された、2種以上の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質を含有する。別の態様では、本発明の免疫原性組成物はニューモリシンおよびPhtDを含む。例えば、本発明の免疫原性組成物は、非コンジュゲート化肺炎球菌PhtDを含むことができる。

#### 【0041】

##### QS21

本発明者らは、ニューモリシンおよびポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)から選択された、少なくとも1種の非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質を、QS21およびモノホスホリルリピドA(MPL)を含むアジュバントと、組み合わせた免疫原性組成物は有利な特性を提供する、ことを見出した。

#### 【0042】

QS-21は、南米の樹木Quillaja saponariaの樹皮抽出物から精製されたサボニン画分である。QS21は、典型的には、トリテルペン、分枝状三糖、およびグリコシル化された擬似二量体アシル鎖を共有する、2つの主要な異性体を含む。2つの異性体の形態は、直鎖状四

50

糖セグメント内の末端糖の構成の点で異なっており、主要な異性体QS-21-Apiは-D-アピオース残基を組み込んでおり、そしてマイナーな異性体QS-21-Xylは-D-キシロース置換基で終わっている(Cleland, J. L. et al. J. Pharm. Sci. 1996, 85, 22-28)。

#### 【0043】

QS21はQuill AからHPLC精製によって調製することができる。Quill Aは1974年にDalsgaardら("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254)によってアジュバント活性をもつことが記載された。QS21の生産方法は、US5057540(QA21として)およびEP0362278に記載されている。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は実質的に純粋な形態のQS21を含有し、すなわち、QS21は少なくとも90%純粋、例えば少なくとも95%純粋、または少なくとも98%純粋である。

10

#### 【0044】

QS21の用量は、好適には、ヒトにおいて抗原に対する免疫応答を増強することができる量である。特に、好適なQS21量は、アジュバント非添加組成物と比べて、または他のQS21量を添加した組成物と比べて、組成物の免疫学的能力を向上させる一方で、反応原性(reactogenicity)プロファイルから許容される量である。QS21は、例えば、組成物用量あたり1~100μgの量で、例えば組成物用量あたり10~50μgの量で用いることができる。QS21の適切な量は、例えば、組成物用量あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50μgのいずれかである。一実施形態では、QS21量は、組成物用量あたり25~75μgの範囲である。

一実施形態では、QS21量は、組成物用量あたり1~30μg、好適には組成物用量あたり5~20μg、例えば組成物用量あたり5~15μg、または組成物用量あたり6~14μg、または組成物用量あたり7~13μgの範囲である。一実施形態では、QS21の100μgの最終濃度がワクチン組成物1mlあたりに含まれ、または50μgが0.5mlワクチン用量あたりに含まれる。別の実施形態では、QS21の50μgの最終濃度がワクチン組成物1mlあたりに含まれ、または25μgが0.5mlワクチン用量あたりに含まれる。具体的には、0.5mlワクチン投与量(dose volume)は1回分として25μgまたは50μgのQS21を含有する。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は5~60、45~55、または20~30μg(例えば、20、25、30、35、40、45または50μg)のQS21を含有する。例えば、本発明の免疫原性組成物は、ヒト用量あたり50μgのQS21を含むことができる。好適には、S.ニューモニエタンパク質:QS21の比は、重量基準(w/w)(μg)で0.05:1から3:1、例えば1:1から3:1である。

20

30

30

#### 【0045】

##### モノホスホリルリピドA

モノホスホリルリピドA(MPL)は、グラム陰性菌、例えばサルモネラ・ミネソタ(Salmonella minnesota)R595のリポ多糖(LPS)の非毒性誘導体である。それは、低減された毒性を示しつつ、LPSのアジュバント特性を保持している(Johnson et al. 1987 Rev. Infect. Dis. 9 Suppl:S512-S516)。MPLは、脂肪酸置換の程度および位置が異なる一連の4'-モノホスホリルリピドA種から構成される。それは、LPSを弱酸および弱塩基加水分解で処理した後、改変されたLPSを精製することによって調製することができる。例えば、LPSを適度の濃度の鉱酸溶液(例えば0.1M HCl)中で約30分間還流する。このプロセスは1位での脱リン酸化および6'位での脱糖鎖化(decarbohydration)をもたらす。本明細書中で用いる用語「モノホスホリルリピドA(MPL)」はモノホスホリルリピドAの誘導体を包含する。モノホスホリルリピドAの誘導体には、3D-MPLおよび合成誘導体が含まれる。

40

#### 【0046】

3D-MPLは3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(または3脱O-アシル化モノホスホリルリピドA)である。化学的には、それは4-、5-または6-アシル化鎖を有する3-脱アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。3D-MPLはグラクソsmithKline Biologicals North America)から商標MPL(登録商標)の下に入手可能である。3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)。これは、なおもアジュバント性を維持しつつ、さらに低減された毒性を有し、一般的には弱アルカリ加水分解によって調製するこ

50

でき、例えばUS4912094を参照されたい。アルカリ加水分解は、通常、クロロホルム/メタノールの混合物などの有機溶媒中で、pH10.5の0.5M炭酸ナトリウムなどの弱塩基の水溶液で飽和させることによって行われる。3D-MPLの調製に関するさらなる情報については、GB2220211AおよびWO02078637 (Corixa社)を参照されたい。本発明の一態様では、小粒子3D-MPLが使用される。小粒子3D-MPLは、それが0.22 μmフィルターを通して滅菌濾過され得るような粒子サイズを有する。このような調製物は国際特許出願公開WO94/21292に記載されている。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)を含有する。

## 【0047】

グラム陰性菌由来のリポ多糖(LPS)およびその誘導体、またはその断片(3D-MPLを含む)は、TLR-4(Toll様受容体4)リガンドであり、TLR-4シグナル伝達経路を介してシグナル伝達応答を生じさせることができる(Sabroe et al, JI 2003 p1630-5)。Toll様受容体(TLR)は、昆虫とヒトの間で進化的に保存された、I型膜貫通受容体である。これまでに10種類のTLRが確立されている(TLRs 1-10)。TLRファミリーのメンバーは同様の細胞外および細胞内ドメインを有する;それらの細胞外ドメインはロイシンリッチ反復配列をもつことが示されており、また、それらの細胞内ドメインはインターロイキン-1受容体(IL-1R)の細胞内領域に類似している。TLR細胞は免疫細胞および他の細胞(血管上皮細胞、脂肪細胞、心筋細胞および腸上皮細胞を含む)の間で異なって発現される。TLRの細胞内ドメインはアダプタータンパク質Myd88と相互作用することができ、Myd88もまた、その細胞質領域にIL-1Rドメインを保有して、サイトカインのNF-B活性化につながる;このMyd88経路は、サイトカイン放出がTLR活性化によって達成される1つの方法である。これまでに実施された研究から、TLRは異なるタイプのアゴニストを認識するが、一部のアゴニストはいくつかのTLRに共通することが判明した。

## 【0048】

リピドAの合成誘導体は知られており、TLR 4アゴニストであると考えられ、これらには、限定するものではないが、以下が含まれる:

OM 174 (2-デオキシ-6-o-[2-デオキシ-2-[(R)-3-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-o-ホスホノ-D-グルコピラノシリル]-2-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]-D-グルコピラノシリル二水素ホスフェート) (WO95/14026);

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9(R)-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1,10-ビス(二水素ホスフェート) (WO99/64301およびWO00/0462);

OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-[(R)-ドデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]-4-オキソ-5-アザ-9-[(R)-3-ヒドロキシテトラデカノイルアミノ]デカン-1,10-ジオール,1-二水素ホスフェート 10-(6-アミノヘキサノアート) (WO01/46127)。

## 【0049】

モノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLの用量は、好適には、ヒトにおいて抗原に対する免疫応答を増強することができる量である。特に、好適なモノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLの量は、アジュバント非添加組成物と比べて、または別のMPL量を添加した組成物と比べて、組成物の免疫学的能力を向上させる一方で、反応原性プロファイルから許容される量である。モノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLは、例えば、組成物用量あたり1~100 μgの量で、例えば組成物用量あたり10~50 μgの量で用いることができる。モノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLの適切な量は、例えば、組成物用量あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49または50 μgのいずれかである。一実施形態では、モノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLの量は、組成物用量あたり25~75 μgの範囲である。一実施形態では、3D-MPL量は、組成物用量あたり1~30 μg、好適には組成物用量あたり5~20 μg、例えば組成物用量あたり5~15 μg、または組成物用量あたり6~14 μg、または組成物用量あたり7~13 μgの範囲である。一実施形態では、モノホスホリルリピドA(

10

20

30

40

50

MPL)、例えば3D-MPL、の100 μgの最終濃度がワクチン組成物1mlあたりに含まれ、または50 μgが0.5mlワクチン用量あたりに含まれる。別の実施形態では、モノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPL、の50 μgの最終濃度がワクチン組成物1mlあたりに含まれ、または25 μgが0.5mlワクチン用量あたりに含まれる。具体的には、0.5mlワクチン投与量は1回分として25 μgまたは50 μgのモノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLを含有する。一態様では、本発明の免疫原性組成物は5~60、45~55、または20~30 μg(例えば、20、25、30、35、40、45または50 μg)のモノホスホリルリピドA(MPL)を含有する。例えば、本発明の免疫原性組成物は、ヒト用量あたり50 μgの3D-MPLを含むことができる。好適には、S.ニューキニエタンパク質：モノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPL、の比は、重量基準(w/w)(μg)で0.05:1から3:1、例えば1:1から3:1である。

10

### 【0050】

別の実施形態では、TLR分子の他の天然または合成アゴニストが任意の追加的な免疫刺激剤として用いられる。これらには、限定するものではないが、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8およびTLR9のアゴニストまたはこれらの組み合わせが含まれる(例えば、Sabroe et al, JI 2003 p1630-5を参照されたい)。使用できる他のTLR4リガンドは、アルキルグルコサミニドホスフェート(AGP)、例えばWO9850399またはUS6303347に開示されるもの(AGPの調製方法も開示される)、またはUS6764840に開示されるAGPの薬学的に許容される塩である。いくつかのAGPはTLR4アゴニストであり、いくつかはTLR4アンタゴニストである。両方ともアジュバントとして有用であると考えられる。他の好適なTLRアゴニストは次のものである：熱ショックタンパク質(HSP) 10、60、65、70、75または90；界面活性剤プロテインA、ヒアルロン酸オリゴ糖、ヘパラン硫酸断片、フィブロネクチン断片、フィブリノーゲンペプチドおよび-ディフェンシン2、ムラミルジペプチド(MDP)または呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質。一実施形態では、TLRアゴニストはHSP 60、70または90である。

20

### 【0051】

本発明の一実施形態では、QS21およびモノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLは、免疫原性組成物のヒト用量あたり同じ最終濃度で存在する。別の実施形態では、本発明の免疫原性組成物のヒト用量は、最終レベルで50 μgのモノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPL、および50 μgのQS21を含む。さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物のヒト用量は、最終レベルで25 μgのモノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPL、および25 μgのQS21を含む。

30

### 【0052】

#### リポソーム担体

本発明の組成物に用いられるアジュバントはリポソーム担体を含む。リポソームは、リン脂質(例えば、ジオレオイルホスファチジルコリン:DOPC)およびステロール(例えば、コレステロール)から、当技術分野で公知の技術を用いて製造することができる。こうしたリポソーム担体はQS21および/またはモノホスホリルリピドA(MPL)、例えば3D-MPLを運ぶことができる。本発明の好適な組成物は、リポソームが、最初にMPLなしで調製され(WO 96/33739に記載される)、後でMPLが好ましくは100nm以下の小粒子または0.22 μmメンブレンを通して滅菌濾過され得る粒子として添加されるものである。したがって、MPLは小胞膜の内部に含まれない(MPLアウトとして知られる)。MPLが小胞膜内に含まれる(MPLインとして知られる)組成物もまた、本発明の一態様を構成する。非コンジュゲート化S.ニューキニエタンパク質は、小胞膜内に含まれても、小胞膜外に含まれてもよい。好適には、可溶性抗原は膜外であり、疎水性または脂質付加抗原は膜内または膜外のいずれかに含まれる。リポソーム内部へのカプセル化はUS4235877に記載されている。

40

### 【0053】

本発明のリポソームは、リン脂質、例えば室温で非晶質であり得るホスファチジルコリン、例えば卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリンまたはジラウリルホスファチジルコリンを含む。好ましくは、リン脂質はジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)である。さらなる態様は、0.1~10mg、0.2~7、0.3~5、0.4~2、または0.5

50

~1mg(例えば、0.4~0.6、0.9~1.1、0.5または1mg)のリン脂質を含む本発明の免疫原性組成物である。本発明の特定の実施形態では、DOPCの量はヒト用量あたり1000μgである。本発明の別の特定の実施形態では、DOPCの量はヒト用量あたり500μgである。

#### 【0054】

本発明のリポソームはステロールを含む。ステロールはリポソーム構造の安定性を向上させる。適当なステロールとしては、 $\alpha$ -シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、エルゴカルシフェロールおよびコレステロールが挙げられる。これらのステロールは当技術分野でよく知られており、例えば、コレステロールは動物性脂肪に見出せる天然に存在するステロールとして、Merck Index, 第11版, 341ページに開示されている。本発明の特定の実施形態では、ステロールはコレステロールである。一般的には、ステロールは、WO96/33739に記載されるように、ステロールでクエンチされたQS21を用いて、抗原調製物の処方中に添加される。10

#### 【0055】

リン脂質に対するステロールの量は1~50%(w/w)、好適には20~35%、例えば25%である。QS21:ステロールの比は、好適には1:10から1:1(w/w)である。適切には過剰のステロールが存在し、QS21:ステロールの比は少なくとも1:2(w/w)、例えば1:5(w/w)である。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は0.025~2.5、0.05~1.5、0.075~0.75、0.1~0.3、または0.125~0.25mg(例えば0.2~0.3、0.1~0.15、0.25または0.125mg)のステロールを含む。さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ヒト用量あたり250μgのステロール、例えばコレステロールを含む。さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ヒト用量あたり125μgのステロール、例えばコレステロールを含む。20

#### 【0056】

本発明のリポソームは好適には液体媒体中に含まれる。液体媒体は生理学的に許容される液体、例えば水、塩水溶液および緩衝液(例:PBSなど)を含む。例えば、本発明の免疫原性組成物は水とリン酸ナトリウム緩衝液を含むことができる。

#### 【0057】

本発明の一態様では、アジュバントはAS01Bである(例えばWO96/33739参照)。本発明の別の態様では、アジュバントはAS01Eである(例えばWO2007/068907参照)。

#### 【0058】

##### さらなる抗原

本発明の免疫原性組成物は、ヒトまたは動物病原体に対する免疫応答を誘発することができる、さらなる抗原を含むことができる。こうしたさらなる抗原には、例えばさらなるS.ニューモニエ抗原(例:S.ニューモニエタンパク質抗原)が含まれる。さらなる抗原が肺炎球菌タンパク質である場合、そのタンパク質は任意で、例えば糖に、コンジュゲート化されていてもよい。必要に応じて、肺炎球菌タンパク質は非コンジュゲート型であり、つまり遊離のタンパク質として免疫原性組成物中に存在する。30

#### 【0059】

一実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、以下からなる群より選択される少なくとも1つのさらなるタンパク質を含有する:ポリヒスチジントライアドファミリー(PhtX)、コリン結合タンパク質ファミリー(CbpX)、CbpXトランケート、LytXファミリー、LytXトランケート、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質(または融合体)、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125およびSp133。さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、以下からなる群より選択される2つ以上のさらなるタンパク質を含有する:ポリヒスチジントライアドファミリー(PhtX)、コリン結合タンパク質ファミリー(CbpX)、CbpXトランケート、LytXファミリー、LytXトランケート、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質(または融合体)、PspA、PsaA、およびSp128。さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、以下からなる群より選択される2つ以上のさらなるタンパク質を含有する:ポリヒスチジントライアドファミリー(PhtX)、コリン結合タンパク質ファミリー(CbpX)、CbpXトランケート、LytXファミリー、LytXトランケート、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質(または融合体)、およびSp128。40

## 【 0 0 6 0 】

コリン結合タンパク質ファミリー(CbpX)に関して、このファミリーのメンバーは、N末端領域(N)、保存された反復領域(R1および/またはR2)、プロリンリッチ領域(P)、および保存されたコリン結合領域(C)(複数のリピート領域で構成され、このタンパク質のほぼ半分を占める)を含む。本出願中で用いる用語「コリン結合タンパク質ファミリー(CbpX)」は、WO97/41151で確認されたコリン結合タンパク質、PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD、およびCbpGからなる群より選択される。CbpAはWO97/41151に開示される。CbpDおよびCbpGはWO00/29434に開示される。PspCはWO97/09994に開示される。PbcAはWO98/21337に開示される。SpsAはWO98/39450に開示されるコリン結合タンパク質である。任意で、コリン結合タンパク質はCbpA、PbcA、SpsAおよびPspCからなる群より選択される。

10

## 【 0 0 6 1 】

本発明の一実施形態は、CbpXトランケートを含み、ここで「CbpX」は先に定義したとおりであり、そして「トランケート」はコリン結合領域(C)の50%以上を欠いているCbpXタンパク質を指す。場合により、このようなタンパク質はコリン結合領域全体を欠く。場合により、このようなタンパク質トランケートは、(i)コリン結合領域と、さらに(ii)該タンパク質のN末端側半分の部分をも欠くが、少なくとも1つの反復領域(R1またはR2)を保持する。場合により、トランケートは2つの反復領域(R1およびR2)を有する。このような実施形態の例は、WO99/51266またはWO99/51188に記載されるNR1xR2およびR1xR2であるが、同様のコリン結合領域を欠く他のコリン結合タンパク質も本発明の範囲内で考えられる。別の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、例えばS.ニューモニエTIGR4、S.ニューモニエ14453、S.ニューモニエB6(GenBankアクセッション番号CAB04758)、またはS.ニューモニエR6(GenBankアクセッション番号NP\_359536)から選択される、PcpAの免疫原性ポリペプチドを含み得る。一実施形態では、免疫原性ポリペプチドPcpAはN末端シグナル配列を欠く。別の実施形態では、免疫原性ポリペプチドPcpAは、天然に存在する配列に見られるコリン結合ドメインアンカー配列を欠く。別の実施形態では、免疫原性ポリペプチドPcpAは、シグナル配列とコリン結合ドメイン(複数可)の両方を欠く。例えば、本発明の免疫原性組成物は、WO2011/075823からの配列番号2に対して少なくとも50、60、70、80、90、95、97、99%の同一性を有するPcpAの免疫原性ポリペプチドを含んでもよい。別の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、WO2011/075823からの配列番号7の配列を有するPcpAの免疫原性ポリペプチドを含み得る。

20

## 【 0 0 6 2 】

LytXファミリーは、細胞溶解と関連づけられる膜結合型タンパク質である。そのN末端ドメインはコリン結合ドメイン(複数可)を含むが、LytXファミリーは上記のCbpAファミリーに見られる特性をすべて備えているわけではなく、それゆえ、本発明では、LytXファミリーはCbpXファミリーと異なると見なされる。CbpXファミリーと対照的に、C末端ドメインはLytXタンパク質ファミリーの触媒ドメインを含む。このファミリーにはLytA、BおよびCが含まれる。LytXファミリーに関して、LytAはRonda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987)に開示される。LytBはWO98/18930に開示され、Sp46とも呼ばれる。LytCもまたWO98/18930に開示され、Sp91とも呼ばれる。本発明の一実施形態はLytCを含む。

30

## 【 0 0 6 3 】

別の実施形態はLytXトランケートを含み、ここで「LytX」は先に定義したとおりであり、そして「トランケート」はコリン結合領域の50%以上を欠いているLytXタンパク質を指す。場合により、このようなタンパク質はコリン結合領域全体を欠く。本発明のさらに別の実施形態は、CbpXトランケート-LytXトランケートキメラタンパク質(または融合体)を含む。場合により、それはCbpXのNR1xR2(またはR1xR2)およびLytXのC末端部分(Cterm、すなわちコリン結合ドメインを欠く)(例えばLytCCtermまたはSp91Cterm)を含む。必要に応じて、CbpXはCbpA、PbcA、SpsAおよびPspCからなる群より選択される。場合により、それはCbpAである。場合により、LytXはLytC(Sp91とも呼ばれる)である。本発明の別の実施形態は、コリン結合ドメイン(C)を欠き、LytXとの融合タンパク質として発現される、PspAまたはPsaAトランケートである。場合により、LytXはLytCである。

40

50

## 【 0 0 6 4 】

PsaAおよびPspAに関して、どちらも当技術分野で公知である。例えば、PsaAおよびその膜貫通領域欠失変異体は、Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62に記載されている。PspAおよびその膜貫通領域欠失変異体は、例えばUS5804193、WO92/14488、およびWO99/53940に開示されている。

## 【 0 0 6 5 】

Sp128およびSp130はWO00/76540に開示される。Sp125は、LPXTG(ここでXは任意のアミノ酸)の細胞壁アンカーモチーフを有する肺炎球菌表面タンパク質の一例である。このモチーフを有する肺炎球菌表面タンパク質のこのクラス内のタンパク質はどれも、本発明において有用であることが判明し、したがって、本発明のさらなるタンパク質と考えられる。Sp125それ自体はWO98/18930に開示され、ZmpB(亜鉛メタロプロテイナーゼ)の別名でも知られる。Sp101はWO98/06734(そこでは、それは参照番号y85993を有する)に開示される。それはタイプIシグナル配列によって特徴づけられる。Sp133はWO98/06734(そこでは、それは参照番号y85992を有する)に開示される。これもまた、タイプIシグナル配列により特徴づけられる。

10

## 【 0 0 6 6 】

本発明の免疫原性組成物はまた、S.ニューモニエ茨膜糖類(好適には担体タンパク質にコンジュゲート化される)を含むことができる。該糖類(例えば多糖)は、肺炎球菌の血清型、例えば血清型1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23Fおよび33Fに由来するものであってよい。一実施形態では、少なくとも4つの血清型が本組成物中に含まれ、例えば6B、14、19Fおよび23Fが含まれる。別の実施形態では、少なくとも7つの血清型、例えば4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fが、本組成物中に含まれる。好適には、糖類のそれぞれは担体タンパク質にコンジュゲート化される。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ニューモリシンおよび/またはポリヒスチジントライアドファミリーのメンバー(例えばPhtD)を担体タンパク質として含む。

20

## 【 0 0 6 7 】

投与量

本明細書中で用いる用語「ヒト用量」(human dose)とは、ヒトへの使用に適した用量中に含まれる1回分の投与量を意味する。一般的に、最終投与量(ワクチン組成物の量)は0.25～1.5ml、0.4～1.5ml、または0.4～0.6mlであり得る。一実施形態では、ヒト用量は0.5mlである。さらなる実施形態では、ヒト用量は0.5mlより多く、例えば0.6、0.7、0.8、0.9または1mlである。さらなる実施形態では、ヒト用量は1mlと1.5mlの間である。別の実施形態では、特に免疫原性組成物が小児集団用である場合、ヒト用量は0.5ml未満、例えば0.25mlと0.5mlの間であり得る。

30

## 【 0 0 6 8 】

各用量中のS.ニューモニエタンパク質の量は、ワクチン接種を受ける典型的な個体において重大かつ有害な副作用なしに免疫防御応答を誘導する量として選択される。そうした量は、どの特定の免疫原が使用されるか、また、それがどのように提示されるか、に応じて変化する。一般的に、各用量は1～1000 μgのタンパク質抗原、例えば1～500 μg、1～100 μg、または1～50 μgを含む。特定の免疫原性組成物の最適量は、被験者の適切な免疫応答の観察を含む標準的な試験によって、確認することができる。

40

## 【 0 0 6 9 】

ワクチン接種

本発明は、本発明の免疫原性組成物を含むワクチンを提供する。本発明の「免疫原性組成物」に関する本明細書中の実施形態は、本発明の「ワクチン」に関する実施形態にも適用可能であり、その逆もそうである。一実施形態では、ワクチンは本発明の免疫原性組成物および薬学的に許容される添加剤を含有する。

## 【 0 0 7 0 】

本発明のワクチンは、皮内、粘膜、例えば鼻腔内、経口、筋肉内または皮下などの任意

50

の適切な送達経路によって投与することができる。その他の送達経路は当技術分野で周知である。ワクチンの製造は、Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (Powell M.F. & Newman M.J.編) (1995) Plenum Press New York)に一般的に記述されている。

#### 【0071】

一態様において、本発明の免疫原性組成物は筋肉内送達経路によって投与される。筋肉内投与は太ももまたは上腕に行うことができる。注射は一般的に針(例えば皮下注射針)によるが、代わりに無針注射を使用してもよい。典型的な筋肉内用量は0.5mlである。

#### 【0072】

ワクチンの皮内投与は本発明の一実施形態を構成する。ヒトの皮膚は、角質層と呼ばれる外側の「角質」キューティクルを含み、それは表皮を覆っている。この表皮の下には真皮と呼ばれる層があり、真皮は皮下組織を覆っている。皮内注射の従来技術である「マントー法」(mantoux procedure)は、皮膚を洗浄してから片手で引き伸ばす段階と、狭いゲージ針(26~31ゲージ)のベベル(刃面)を上方に向けて針を10~15°の角度で挿入する段階を含む。針のベベルが挿入されたら、針のバレルを下げる、それを皮膚の下で持ち上げるためにわずかな圧力を加えながら、さらに前進させる。その後、液体を極めて遅い速度で注入し、それによって皮膚表面に水泡(bleb)または隆起(bump)を形成し、続いて針をゆっくり引き抜く。

#### 【0073】

つい最近、液体の薬剤を皮膚にまたは皮膚を通して投与するために特に設計された装置が記載されており、例えば、WO99/34850およびEP1092444に記載された装置、さらに例えばWO01/13977、US5,480,381、US5,599,302、US5,334,144、US5,993,412、US5,649,912、US5,569,189、US5,704,911、US5,383,851、US5,893,397、US5,466,220、US5,339,163、US5,312,335、US5,503,627、US5,064,413、US5,520,639、US4,596,556、US4,790,824、US4,941,880、US4,940,460、WO97/37705およびWO97/13537に記載されたジェット式注射装置がそれである。ワクチン製剤の皮内投与の代替方法には、従来の注射器と針、または固体のワクチンの弾道的(ballistic)送達用に設計された装置(WO99/27961)、もしくは経皮パッチ(WO97/48440、WO98/28037)、または皮膚の表面への適用(経皮的(transdermal, transcutaneous)送達WO98/20734、WO98/28037)が含まれる。

#### 【0074】

本発明のワクチンを皮膚に、またはより具体的には真皮に投与しようとする場合、ワクチンは低液体量、特に約0.05ml~0.2mlの量である。

#### 【0075】

他の適切な投与経路は皮下経路である。皮下送達のために任意の適切な装置、例えば古典的な針、を使用することができる。本発明の一態様では、無針のジェット式注射器サービスが用いられ、例えば、それはWO01/05453、WO01/05452、WO01/05451、WO01/32243、WO01/41840、WO01/41839、WO01/47585、WO01/56637、WO01/58512、WO01/64269、WO01/78810、WO01/91835、WO01/97884、WO02/09796、WO02/34317に発表されたものである。本発明の別の態様では、前記装置は液体のワクチン製剤が予め充填されている。

#### 【0076】

あるいは、ワクチンは鼻腔内に投与される。一般的には、ワクチンは、例えば肺に吸入されずに、鼻咽頭領域に局所的に投与される。ワクチン製剤が肺に入ることなく(または実質的に入ることなく)、ワクチン製剤を鼻咽頭領域に送達する鼻腔内送達装置を使用することが望ましい。本発明によるワクチンの鼻腔内投与のための好ましい装置はスプレー装置である。好適な市販の鼻スプレー装置として、Accuspray(商標)(Becton Dickinson社)が挙げられる。

#### 【0077】

一実施形態では、鼻腔内使用のためのスプレー装置は、その装置の性能が使用者によって加えられる圧力に依存しない装置である。こうした装置は圧力閾値装置として知られている。液体は、閾値圧力が加えられたときだけノズルから放出される。これらの装置では

10

20

30

40

50

、規則的な液滴サイズでスプレーすることが容易である。本発明で使用するのに適した圧力閾値装置は当技術分野で知られており、例えば、参照により本明細書に組み入れられるWO91/13281、EP311863およびEP516636に記載されている。こうした装置はPfeiffer社から販売されており、また、Bommer, R. Pharmaceutical Technology Europe, Sept 1999にも記述されている。

#### 【0078】

別の実施形態では、鼻腔内装置は1~200μm、例えば10~120μmの範囲の液滴(液体として水を用いて測定)を生成する。10μm以下では、吸入の危険性があるため、10μm以下の液滴が約5%を超えないことが望ましい。120μm以上の液滴はより小さい液滴と同様にはうまく広がらないため、120μm超の液滴は約5%を超えないことが望ましい。

10

#### 【0079】

2回用量(bi-dose)送達は、本発明によるワクチンで使用するための鼻腔内送達システムの別の実施形態である。2回用量装置は単回ワクチン用量の2つの分割用量を含み、各鼻孔に1つの分割用量が投与される。一般的に、2つの分割用量は単一のチャンバ内に存在し、該装置の構成が1度に1回の分割用量の効率的な送達を可能にする。あるいはまた、本発明によるワクチンを投与するために単回用量(monodose)装置を使用することも可能である。

#### 【0080】

本発明のさらなる態様は、非コンジュゲート化S.ニューモニエタンパク質をアジュvantと混合する段階を含んでなる、本発明のワクチンの製造方法である。

20

#### 【0081】

本発明のワクチンは単回用量として投与することができるが、その諸成分を、同時にまたは異なる時間に、共投与することも可能である(例えば、肺炎球菌糖類コンジュゲート類は、互いに対する免疫応答の最適な調整のために、ワクチンの任意の細菌タンパク質成分投与と別々に、同時に、または1~2週間後に、投与され得る)。最初のワクチン接種後、被験者は適切な時間的間隔を置いて1回または数回の追加免疫を受けることができる。

#### 【0082】

本発明の一態様では、標的集団は、ナイーブである(抗原刺激を受けていない)か、または以前に感染もしくはワクチン接種に応答することに失敗したかのいずれかの、未感作(unprimed)集団である。別の態様では、標的集団は、65歳以上の高齢者、医療施設で働いている人々などの、より若い高リスク成人(すなわち18~64歳)、または心血管および肺疾患もしくは糖尿病などのリスク要因をかかえた若年成人である。別の標的集団は、6ヶ月齢以上のすべての子供、特に生後6~23ヶ月の子供である。別の標的集団は、免疫不全の人々である。

30

#### 【0083】

本発明の免疫原性組成物は、予防と治療の両目的のために使用され得る。S.ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患としては、肺炎、急性副鼻腔炎、中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症、骨髄炎、敗血症性関節炎、心内膜炎、腹膜炎、心膜炎、蜂巣炎、および脳膿瘍が挙げられる。本発明の一実施形態では、S.ニューモニエ感染症として、肺炎、中耳炎、髄膜炎および菌血症が挙げられる。一実施形態では、S.ニューモニエによって引き起こされる疾患は、肺炎、例えば市中肺炎である。別の実施形態では、S.ニューモニエによって引き起こされる疾患は、侵襲性肺炎球菌疾患(IPD)、すなわちS.ニューモニエが血液または他の通常無菌の部位から分離され得る感染症である。別の実施形態では、S.ニューモニエによって引き起こされる疾患は、肺炎、例えば重症肺炎である。「重症肺炎」として知られる病態は、米国胸部学会(American Thoracic Society: ATS)(Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1730-1754)をはじめとする、各種組織・団体が定めたガイドラインに従って特徴づけられる。例えば、ATSは、重症肺炎の診断のための他の基準に加えて、機械的換気の必要性または敗血症性ショックなどの、少なくとも1つの主要基準を設けている。一般的に、重症肺炎は、急性の肺疾患、肺の炎症性疾患、または炎症もしくは凝血などの要因による肺機能の障害(perturbations)に起因し得る。本発明の免疫原性組成物はまた、AECOPDの治療または予防にも有用であり得る。一態様では、本発明の免疫原性組

40

50

成物はストレプトコッカス・ニューモニエによって引き起こされるAECOPDの治療または予防に用いることができる。

#### 【0084】

本発明のさらなる態様には、以下が含まれる：

- 本発明の免疫原性組成物で哺乳動物を免疫することによって免疫応答を誘発する方法；
- ストレプトコッカス・ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患を治療または予防する方法であって、それを必要としている被験者(例えばヒト)に本発明の免疫原性組成物を筋肉内投与することを含む方法；
- S.ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患を治療または予防する方法であって、S.ニューモニエ感染に罹っているか罹りやすい患者に本発明の免疫原性組成物を筋肉内投与することを含む方法；
- S.ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するための本発明の免疫原性組成物；
- S.ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するための医薬の製造における本発明の免疫原性組成物の使用；
- S.ニューモニエ感染によって引き起こされる疾患の治療または予防に使用するための筋肉内ワクチンの製造における本発明の免疫原性組成物の使用。

#### 【0085】

##### 免疫原特性

本発明のさらなる態様は、哺乳動物においてT細胞応答を惹起させることが可能な本発明の免疫原性組成物である。一態様において、T細胞応答は細胞溶解性T細胞応答であり得る。細胞溶解性T細胞応答は、標準的なアッセイを用いて測定することができ、例えば、クロム放出アッセイ(例えば、 $^{51}\text{Cr}$ を標的細胞に添加し、溶解細胞によって放出された $^{51}\text{Cr}$ の量を測定する)を用いてT細胞の細胞傷害活性を測定するか、またはフローサイトメトリーによってT細胞の細胞傷害性に関する分子(例えばグランザイムB、パーフォリン)の発現を測定する。

#### 【0086】

一態様において、本発明の免疫原性組成物は、アジュバント非添加型、すなわち外因性アジュバントを含まない対応組成物(本明細書では「ブレーン組成物」とも言う)および/または当技術分野で公知の他のアジュバントを添加した組成物により得られるCD4 T細胞免疫応答と比較して、向上したCD4 T細胞免疫応答を成分抗原の少なくとも1つまたは抗原性組成物に対して誘導することが可能である。

#### 【0087】

「向上したCD4 T細胞免疫応答」とは、アジュバントを含まないおよび/または他の公知のアジュバントを含む同一組成物の投与後に得られるCD4応答よりも高いCD4応答が、アジュバントを添加した免疫原性組成物の投与後に哺乳動物(例えばヒト)において得られる、ことを意味する。例えば、より高いCD4 T細胞応答は、アジュバント非添加の免疫原性組成物および/または当技術分野で公知の他のアジュバントを添加した組成物の投与後に誘導される該応答と比較して、本発明の免疫原性組成物の投与後に哺乳動物において得られる。

#### 【0088】

向上したCD4 T細胞免疫応答は、次のサイトカインのいずれかを産生する細胞の数を測定することによって評価され得る：

- ・任意のサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-17、IL-13)を産生する細胞
- ・IFN- $\gamma$ を産生する細胞
- ・IL-17を産生する細胞

向上したCD4 T細胞免疫応答は、上記サイトカインのいずれかを産生する細胞が、アジュバント非添加組成物および/または他のアジュバント添加組成物の投与と比較して、本発明の免疫原性組成物の投与後により多い量で存在する場合に見られる。一実施形態では、

10

20

30

40

50

上で挙げた3つの条件のうちの少なくとも1つが満たされる。別の実施形態では、上で挙げた3つの条件のうちの少なくとも2つが満たされる。別の実施形態では、上で挙げた条件の3つすべてが満たされる。さらなる態様では、本発明の免疫原性組成物はIFN 産生を刺激することができる。IFN 産生は、本明細書中の実施例に記載されるように測定することができる。例えば、IFN 産生は、IFN に対応する抗原(例えばPhtDおよびdPly)を用いてインビトロで末梢血抗原特異的CD4およびCD8 T細胞を再刺激し、従来の免疫蛍光ラベリングを行い、そしてフローサイトメトリーで測定してCD4またはCD8細胞亜集団内のサイトカイン陽性CD4またはCD8 T細胞の頻度を決定することによって、測定することができる。さらなる態様では、本発明の免疫原性組成物は、IL-17産生を刺激することができる。IL-17産生は、本明細書中の実施例に記載されるように測定することができる。例えば、IL-17産生は、IL-17に対応する抗原(例えばPhtDおよびdPly)を用いてインビトロで末梢血抗原特異的CD4およびCD8 T細胞を再刺激し、従来の免疫蛍光ラベリングを行い、そしてフローサイトメトリーで測定してCD4またはCD8細胞亜集団内のサイトカイン陽性CD4またはCD8 T細胞の頻度を決定することによって、測定することができる。

10

## 【0089】

以下の非限定的な実施例を参照することによって、本発明をさらに説明することにする。  
。

## 【実施例1】

## 【0090】

PhtDおよびdPlyのマウスモデル(C57B16)におけるAS01B対AS03B Th応答の前臨床比較

20

6週齢のC57B16マウスを、AS01BまたはAS03B中に製剤化された9 µgもしくは3 µgのPhtDまたはdPlyを用いて、0、14および28日目にIM経路で免疫した。対照グループは、AS15中に製剤化された5 µgのPhtD、dPlyまたはSivp27(Sivp27は陽性対照として用いた)により免疫した。FACS解析は、2回目と3回目の免疫の7日後に全血で、そして3回目の免疫の9日後に脾臓で実施した。

## 【0091】

## 実験1:

30

グループ	抗原/処方物	抗原用量
1	AS01B	
2	AS03B	
3	dPly/AS01B	9 µg
4	dPly/AS01B	3 µg
5	dPly/AS03B	9 µg
6	dPly/AS03B	3 µg
7	AS15/dPly	5 µg
8	AS15/sivP17 (Th17 対照)	5 µg

## 実験 2:

グループ	抗原/処方物	抗原用量
1	AS01B	
2	AS03B	
3	PhtD/AS01B	9 µg
4	PhtD/AS01B	3 µg
5	PhtD/AS03B	9 µg
6	PhtD/AS03B	3 µg
7	AS15/PhtD	5 µg
8	AS15/sivP27 (Th17 対照)	5 µg

10

20

40

50

アジュバント処方物の調製

## AS01Bの最終組成 / 用量 :

リポソーム : DOPC 1000 µ g、コレステロール 250 µ g、3D-MPL 50 µ g

QS21 50 µ g

PBSを加えて用量0.5mlにする

## AS01Eの最終組成 / 用量 :

リポソーム : DOPC 500 µ g、コレステロール 125 µ g、3D-MPL 25 µ g

QS21 25 µ g

PBSを加えて用量0.5mlにする

## AS03Bの最終組成 / 用量 :

水中油型エマルション : スクアレンおよびDL- -トコフェロール

ポリソルベート80(Tween 80)

## AS15の最終組成 / 用量 :

リポソーム : DOPC 1000 µ g、コレステロール 250 µ g、3D-MPL 50 µ g

QS21 50 µ g

CpG7909: 420 µ g

MPL/QS21リポソームアジュバントAS01の調製 : AS01と名付けられたアジュバントは、コレステロールでクエンチされた形で3D-MPLおよびQS21を含み、参照により本明細書に組み入れられるWO 96/33739に記載されるように調製した。特に、AS01アジュバントは、本質的にWO 96/33739の実施例1.1のように調製した。AS01Bアジュバントは以下を含む：ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、コレステロールおよび3D MPLを順に含むリポソーム[DOPC 1000 µ g、コレステロール250 µ gおよび3D-MPL 50 µ gの量で含み、それぞれの値はほぼ1回分のワクチン用量として示される]、QS21[50 µ g/用量]、リン酸塩NaClバッファーおよび水を加えて0.5mlの用量にする。

## 【0092】

AS01Eアジュバントは、AS01Bと同じ成分を含むが、より低濃度でDOPC 500 µ g、コレステロール 125 µ g、3D-MPL 25 µ gおよびQS21 25 µ gの量を含み、リン酸塩NaClバッファーおよび水を加えて0.5mlの用量にする。

## 【0093】

MPLを含有するリポソームの製造過程では、DOPC(ジオレイルホスファチジルコリン)、コレステロールおよびMPLをエタノールに溶解する。真空下での溶媒蒸発により脂質薄膜を形成させる。pH6.1のリン酸緩衝生理食塩水(9mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 41mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl)を加え、その混合物をプレホモジナイゼーションにかけ、続いて15,000psiで高圧ホモジ

ナイゼーション(約15~20サイクル)にかける。これによってリポソームを生産でき、無菌(クラス100)エリア内で0.22μmメンブレンを通してリポソームを滅菌濾過する。その後、無菌の生産品を滅菌ガラス容器に分配して、冷蔵室(+2~+8℃)で保存する。

#### 【0094】

このようにして生産されたリポソームは膜内にMPLを含有する(WO 96/33739の「MPLイン」の実施形態)。

#### 【0095】

QS21は、水溶液中に添加して所望の濃度にする。

#### 【0096】

水中油型エマルションおよびアジュバント処方物AS03Bの調製：特に明記しない限り、後続の実施例で用いる油/水型エマルションは、2種類の油(-トコフェロールおよびスクアレン)からなる有機相と、乳化剤としてTween 80を含むPBSの水性相から構成される。特に明記しない限り、後続の実施例で用いる水中油型エマルションアジュバント処方物は、次の水中油型エマルション成分(最終濃度が示される)を含むように調製した：2.5%スクアレン(v/v)、2.5% -トコフェロール(v/v)、0.9%ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(v/v)(Tween 80)、WO 95/17210参照。後続の実施例でAS03と呼ばれるこのエマルションは、以下では2倍濃縮物として調製された。

10

#### 【0097】

エマルションSB62の調製：SB62エマルションの調製は、疎水性成分(DL- -トコフェロールおよびスクアレン)からなる油相と水溶性成分(アニオン性界面活性剤Tween 80およびPBS mod(modified：変性)、pH6.8)を含む水相を強力な攪拌下で混合することにより行う。攪拌しながら、油相(全用量の1/10)を水相(全用量の9/10)に移し、その混合物を室温で15分間攪拌する。次に、得られた混合物をマイクロフルイダイザーの相互作用チャンバ内でせん断、衝撃およびキャビテーション力(15000PSI - 8サイクル、または実施例IIIで報告した臨床試験に用いるアジュバントでは3サイクル)に供して、サブミクロン液滴(100~200nmの分布)を生成させる。結果としてpHは6.8±0.1の間である。その後、SB62エマルションは0.22μmメンブレンを通して滅菌濾過し、無菌バルクエマルションをCupac容器に入れて2~8℃で冷蔵保存する。無菌の不活性ガス(窒素またはアルゴン)をSB62エマルション最終バルク容器のデッドボリュームに少なくとも15秒間フラッシュする。

20

#### 【0098】

SB62エマルションの最終組成は次のとおりである：Tween 80：1.8%(v/v) 19.4mg/ml；スクアレン：5%(v/v) 42.8mg/ml； -トコフェロール：5%(v/v) 47.5mg/ml；PBS-mod：NaCl 121mM, KCl 2.38mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.14mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3mM；pH6.8±0.1。

30

#### 【0099】

アジュバント処方物AS15の調製：アジュバント系AS15は以前にWO 00/62800に記載されている。

#### 【0100】

AS15は2つのアジュバント系の組み合わせであり、1つ目のAS01Bは3D-MPLを含むリポソームとQS21から構成され、2つ目はリン酸緩衝生理食塩水中のCpG 7909(CpG 2006の別名でも知られる)で構成される。

40

#### 【0101】

#### 抗原の調製

dPIyの調製：肺炎球菌ニューモリシンは、ホルムアルデヒド解毒を用いてWO2004/081515およびWO2006/32499に記載されるように調製し、無毒化した。

#### 【0102】

#### PhtDの発現および精製：

PhtDの発現：PhtDタンパク質は、ヒスチジントライアドの存在によって特徴づけられる肺炎球菌ヒスチジントライアド(Pht)タンパク質ファミリーのメンバーである。PhtDは838アミノ酸分子であり、5つのヒスチジントライアドを保持する(MedImmune WO00/37105、アミノ酸配列は配列番号4、DNA配列は配列番号5を参照されたい)。PhtDはまた、中央部(アミ

50

ノ酸位置348-380)にプロリンリッチ領域を含む。PhtDは20アミノ酸のN末端シグナル配列を有する。PhtDの調製および精製は、WO2007/071710(実施例1b参照)に記載されている。

### 【0103】

#### 導入される材料の説明 : SIV-p27 ロットPE04MY1901

バッファー : DPBS(NaCl 136.87mM, KCl 2.68mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.03mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47mM)

組換えタンパク質 : SIV mac 251由来のSIV p27はWO2009/077436(配列番号19)に記載される。

調製 :

大腸菌による発現、50mM TRIS-HCl pH8.0での抽出、BLUE Trisacryl Plus、硫酸アンモニウム沈殿、DPBS回収、DPBS透析、Acticlean Etox(エンドトキシン吸着)、濃縮、Acticlean Etox、濃縮。

タンパク質特性 :

分子量	27477 Da
モル吸光係数	38010 ± 5 %
	1A(280) = 0.72mg/ml

等電点 : 5.77

### 【0104】

#### アジュバントを含むワクチン組成物の調製

##### 1. AS01B

###### 1.1 2倍濃縮AS01Bの調製

10倍に希釈してpH6.1のリン酸緩衝生理食塩水を、最終製剤中10mMリン酸塩および140mM NaClの濃度にそれぞれ達するように注射用水に添加した。濃縮リポソーム(DOPC、コレステロールおよびMPLから作られた)をQS21に添加し、磁気攪拌により室温で15分混合した。リポソームとQS21からなる混合物を希釈したバッファーに加え、磁気攪拌により室温で30分混合した。pHを調べて約6.0になるようにした。この2倍濃縮アジュバントでは、QS21の濃度は200 μg/mlであり、MPLの濃度は200 μg/mlであった。

### 【0105】

###### 1.2 最終製剤の調製

###### AS01B中180または60 μg/mlのPhtDまたはdPly

製剤は以下の順序に従って下準備なしに調製した :

注射用水 + 10倍に希釈してpH6.1の緩衝生理食塩水 + 2倍濃縮アジュバント、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で5分混合、+ 抗原(量は180 μg/mlまたは60 μg/mlの最終濃度に達するように添加した)、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で5分混合。

### 【0106】

###### AS01B単独

製剤は以下の順序に従って下準備なしに調製した :

注射用水 + 10倍に希釈してpH6.1の緩衝生理食塩水 + 2倍濃縮アジュバント、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で2×5分混合。

### 【0107】

##### 2. AS15

###### 2.1 2倍濃縮AS15の調製

10倍に希釈してpH6.1のリン酸緩衝生理食塩水を、最終製剤中10mMリン酸塩および140mM NaClの濃度にそれぞれ達するように注射用水に添加した。濃縮リポソーム(DOPC、コレステロールおよびMPLから作られた)をQS21に添加し、磁気攪拌により室温で15分混合した。リポソームとQS21からなる混合物を希釈したバッファーに加え、磁気攪拌により室温で30分混合した。CpGを濃縮アジュバント中1680 μg/mlとなるように添加した。そのアジュバントを磁気攪拌により室温で15分混合した。pHを調べて約6.0になるようにした。この2倍濃縮アジュバントでは、QS21の濃度は200 μg/ml、MPLの濃度は200 μg/ml、そしてCpGの濃度は1680 μg/mlであった。

### 【0108】

10

20

30

40

50

## 2.2 最終製剤の調製

AS15中100 µg/mlのPhtDまたはdPlyまたはp27gag

製剤は以下の順序に従って下準備なしに調製した：

注射用水 + 10倍に希釈してpH6.1の緩衝生理食塩水 + 2倍濃縮アジュバント、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で5分混合、 + 抗原(量は100 µg/mlの最終濃度に達するように添加した)、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で5分混合。

【0109】

### 3. AS03B

#### 3.1 最終製剤の調製

AS03B中180または60 µg/mlのPhtDまたはdPly

10

製剤は以下の順序に従って下準備なしに調製した：

注射用水 + 10倍に希釈してpH6.8の緩衝生理食塩水 + SB62水中油型エマルション(250 µl/ml最終製剤)、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で5分混合、 + 抗原(量は180 µg/mlまたは60 µg/mlの最終濃度に達するように添加した)、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で5分混合。

【0110】

#### AS03B単独

製剤は以下の順序に従って下準備なしに調製した：

注射用水 + 10倍に希釈してpH6.8の緩衝生理食塩水 + SB62水中油型エマルション(250 µl/ml最終製剤)、オービタルシェーカーのテーブル上にて室温で2×5分混合。

20

【0111】

#### T細胞応答

簡単に説明すると、1群28匹のマウスおよび陽性対照のための1群14匹のマウスから末梢血リンパ球(PBL)を採取して、プールした(1群7匹のマウスを4または2プール)。赤血球の溶解を行ってから、丸型96ウェルプレートにウェルあたり100万個の細胞をまいた。次いで、細胞は重複する15merペプチド(1 µg/ml/ペプチド、2つの抗体CD49dおよびCD28を含む)のプールを用いて2時間にわたりインビトロで再刺激した。培地に残っている細胞(ペプチド刺激なし)をバックグラウンド応答の陰性対照として用いた。ペプチドのプールとの共培養の2時間後、ブレフェルディン(Brefeldin)Aをウェルに添加し(サイトカイン分泌を抑制するため)、細胞を5%CO<sub>2</sub>、37 °Cでさらに一晩インキュベートした。続いて、細胞を次のマーカーについて染色した：CD4、CD8、IL-2、IFN-γ、IL13およびIL17。サンプルをフローサイトメトリーにより解析した。

30

【0112】

#### 細胞内サイトカイン染色

抗原再刺激段階の後、PBLをブレフェルディン(1 µg/ml)の存在下に37 °Cで一晩インキュベートしてサイトカイン分泌を抑制する。

【0113】

IFN-γ/IL17/IL3またはIL5/IL2/CD4/CD8染色は次のように行った：細胞懸濁液を洗浄し、2%Fcプロッキング(抗CD16/32)試薬(1/50)を含む50 µlのPBS 1%FCS中に再懸濁した。

40

【0114】

4 °Cで10分のインキュベーション後、抗CD4 pacific Blue(1/50)と抗CD8 perCP-Cy5.5(1/50)の混合物50 µlを加えて、4 °Cで30分インキュベートした。PBS 1%FCS中で洗浄した後、細胞を200 µlのCytofix-Cytoperm(キットBD(商標))中に再懸濁することによって透過性にし、4 °Cで20分インキュベートした。次いで、細胞をPerm Wash(キットBD(商標))で洗浄し、Perm Wash中に希釈した抗IFN-γ APC(1/50) + 抗IL-2-FITC(1/50) + 抗IL13またはIL5-PE(1/50) + 抗IL17-Alexa 700(1/50)の混合物50 µlを用いて再懸濁した。1時間のインキュベーション後、細胞をBD(商標)安定化・固定液(BD Biosciences社)により洗浄した。サンプルの解析はFACSを行った。生細胞をゲーティングし(FCS/SSC)、アクイジョン(acquisition)を約10,000個のCD8細胞で行った。IFN-γ+またはIL17+またはIL3もしくはIL5+またはIL2の割合は、CD4およびCD8+ゲーテッド集団で算出した。

50

## 【0115】

細胞性免疫はサイトカインフローサイトメトリー(CFC)により評価した

末梢血抗原特異的CD4およびCD8 T細胞は、それらの対応する抗原とインキュベートする場合には、IFN、IL2、IL13、IL17を産生するようにインビトロで再刺激することができる。これにより、抗原特異的CD4およびCD8 T細胞は、細胞表現型ならびに細胞内サイトカイン産生の従来の免疫蛍光ラベリング後にフローサイトメトリーにより数えることが可能である。本研究では、PhtDおよびdPlyタンパク質、ならびにこれらの特定のストレプトコッカスタンパク質由来のペプチドを、特異的T細胞を再刺激するための抗原として使用した。結果は、CD4またはCD8細胞亜集団内のサイトカイン陽性CD4またはCD8 T細胞の頻度として表した。

10

## 【0116】

IgGの定量：

精製したPhtDおよびPlyを、それぞれPBS中1および4 μg/mlで、高結合マイクロタイヤープレート(NUNC Maxisorp)に37℃で2時間コーティングした。マウス抗血清を希釈し、次いで、さらなる2倍希釈をマイクロプレート内で行い、攪拌しながら室温で30分間インキュベートした。洗浄後、結合した抗体は、PBS-Tween 0.05%中に1/2500希釈した、Jackson ImmunoLaboratories社のペルオキシダーゼ結合affinipureヤギ抗マウスIgG(H+L)(参照：15-035-003)を用いて検出した。これらの検出抗体を攪拌しながら室温で30分間インキュベートした。洗浄後、0.1Mクエン酸バッファー(pH4.5)10mlあたり4mgのOPD + 5 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて、室温で暗所にて15分間発色させた。この反応を50 μlの1N HClで停止させ、光学濃度(OD)を490～620nmで読み取った。血清サンプル中に存在する抗PhtDおよび抗dPly IgGのレベルは、基準曲線と比較することによって決定し、μg/mlで表した。

20

## 【0117】

結果のまとめおよび結論

AS01BまたはAS03B中のdPly/PhtDにより誘導された抗原特異的T細胞応答を、C57BL6マウスにおいて3回目の免疫後(post-III)に血液で評価した。高い抗原特異的T細胞応答がAS01B中のdPly/PhtDにより誘導されたが、AS03Bでは低い応答または無応答が観察された。AS01Bは主にIFN 分泌CD4+ T細胞(Th1)を誘導する。AS01Bは3回目の免疫の7日後に主にdPlyに特異的なTh17を誘導するのに対し、AS03Bではかろうじて検出可能なTh17応答が誘導されるにすぎない。AS15/sivP27またはdPly/AS15はTh17誘導の陽性対照として使用した。2つのタンパク質に対してAS01Bにより誘導された抗体IgG応答もまた、AS03Bを用いた場合よりも高かった。

30

## 【実施例2】

## 【0118】

致死チャレンジモデル(4CDC菌株に感染したMF1)におけるアジュバントの評価

さまざまなアジュバントを致死チャレンジモデルで評価した。OF1雌性マウス(4週齢)を、異なるアジュバント系(AS01B、AS01EおよびAS03)で処方した3 μg/50 μlのPhtD抗原2回分で0日目と14日目に筋肉内(IM)免疫した。対照マウスにはアジュバント系のみを接種した。その後、マウスに5 × 10<sup>6</sup>CFUのS.ニューモニエ4CDC型で鼻腔内チャレンジした。死亡率を8日間記録した。結果を図8に示す。

40

## 【0119】

菌株4CDCに対する防御は、PhtDと組み合わせたAS01E、およびPhtDと組み合わせたAS03の場合にほぼ完全(約90%)であった。有意差(PhtD/AS(ワクチン接種マウス)とAS単独(陰性対照)の間)はすべてのアジュバントで観察された。それにしても、ワクチン接種マウスと対応する陰性対照の間の最大差はAS01Eについて観察された。

## 【0120】

肺コロニー形成モデルにおけるアジュバントの評価

2種類のアジュバントを肺コロニー形成モデルで評価した。CBAJ雌性マウスを、異なるアジュバント系(AS01B、AS01E)で処方したPhtDを用いて0日目、14日目および28日目に筋肉内(IM)免疫した。対照マウスにはアジュバント系のみを接種した。その後、マウスを2

50

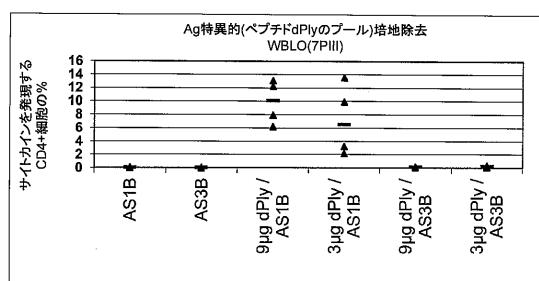
$\times 10^7$ CFUのS.ニューモニエ19F/2737型で鼻腔内チャレンジした。細菌負荷は、チャレンジの3日および5日後に回収された肺でのコロニー計数によって測定した。結果を図9に示す。

### 【0121】

このモデルでは、アジュバントAS01BまたはAS01Eのみ投与された陰性対照群と比較して、対応するいずれかのアジュバントを添加したPhDで免疫した後に、有意な防御が誘導された。

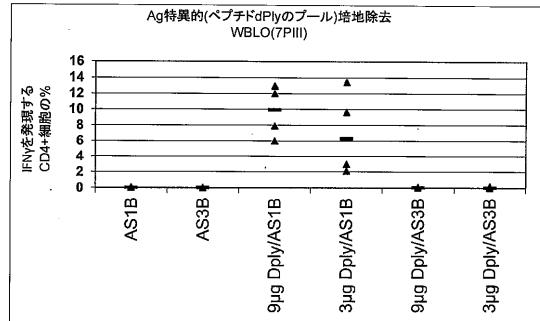
### 【図1】

図1 血液中の全体的なdPly特異的T細胞応答: AS03B対AS01B



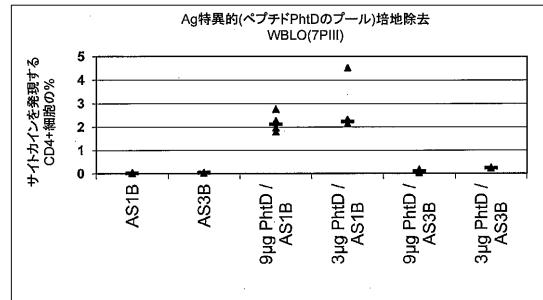
### 【図3】

図3 dPly特異的Th1応答: AS03B対AS01B



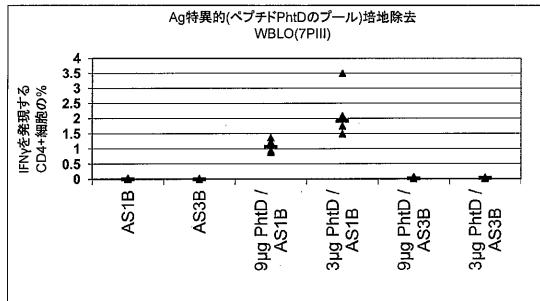
### 【図2】

図2 血液中の全体的なPhD特異的T細胞応答: AS03B対AS01B



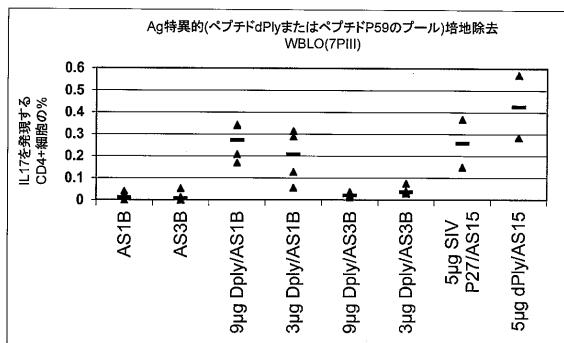
### 【図4】

図4 PhD特異的Th1応答: AS03B対AS01B



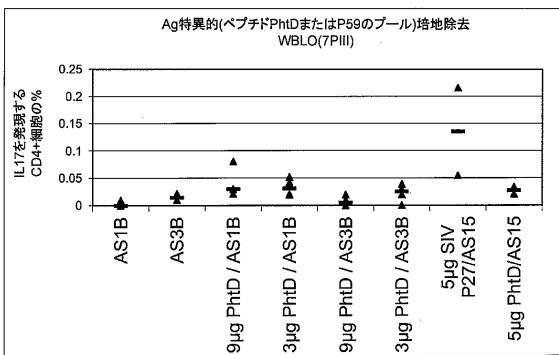
【図5】

図5 dPly特異的Th17応答: AS03B対AS01B PIII



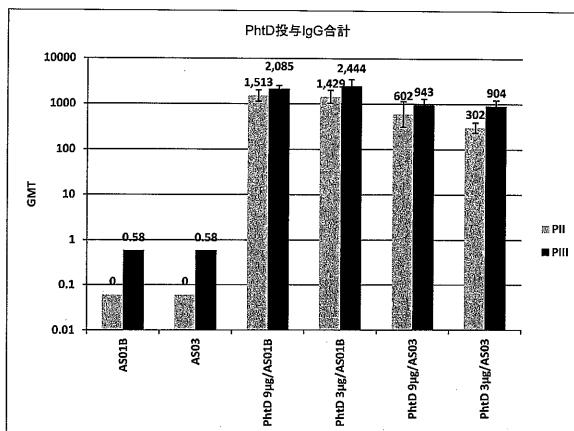
【図6】

図6 PhtD特異的Th17応答: AS03B対AS01B



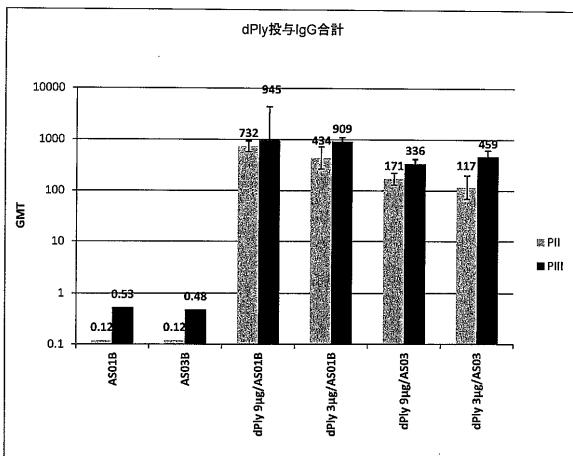
【図7a】

図7a AS01B対AS03B:抗体応答



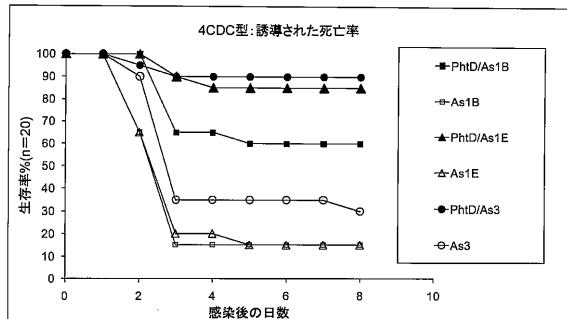
【図7b】

図7b AS01B対AS03B:抗体応答



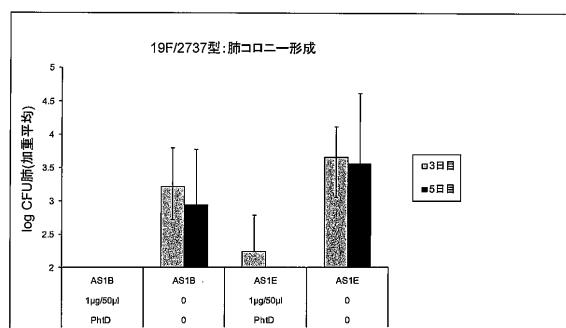
【図8】

図8 4CDC型:誘導された死亡率



【図9】

図9 19F/2737型:肺コロニー形成



## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP2012/058987
<b>Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)</b>	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:</p> <p>a. (means)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form</p> <p>b. (time)</p> <p><input type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input checked="" type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purpose of search</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/058987
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/09 A61P31/00 ADD.
---

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

B. FIELDS SEARCHED
--------------------

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
--

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data
--

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/068907 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; GLAXO GROUP LTD [GB]; VANDEPAELIERE P) 21 June 2007 (2007-06-21) cited in the application the whole document in particular pg. 28-33; 70-71 example II.2., VIII -----	1-34
Y	----- WO 02/22168 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; HERMAND PHILIPPE [BE]; LAFERRIERE CRAI) 21 March 2002 (2002-03-21) examples; page 12 -----	35-44
Y	----- -----	35-44
		-/-

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.
--

<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
---

Date of mailing of the international search report
--

7 August 2012
---------------

20/08/2012
------------

Name and mailing address of the ISA/
--------------------------------------

Authorized officer
--------------------

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Bernhardt, Wiebke
-------------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/058987
---

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/071707 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIEMANS RALPH LEON [BE]; GARCON NATHAL) 28 June 2007 (2007-06-28)  the whole document in particular pages 20, 24, 27 claims 1-99 -----	1,8, 18-20, 22-26, 28-30, 33,34
A	WO 00/37105 A2 (MEDIMMUNE INC [US]) 29 June 2000 (2000-06-29) cited in the application sequence 4 -----	23-26
A	EP 1 601 689 B1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]) 28 November 2007 (2007-11-28) paragraphs [0085] - [0093], [0103] -----	1-44
A	WO 2010/071986 A1 (SANOFI PASTEUR LTD [CA]; OLOO ELIUD [CA]; COMEN RAYMOND [CA]; OCHS MAR) 1 July 2010 (2010-07-01) cited in the application the whole document -----	1-44

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/058987

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007068907	A2 21-06-2007	AR 058543 A1 AT 542543 T AU 2006325377 A1 BR P10619795 A2 CA 2633008 A1 CR 10118 A DK 1959992 T3 EA 200801307 A1 EA 201001189 A1 EP 1959992 A2 EP 2364720 A1 EP 2364721 A1 EP 2364722 A1 EP 2364723 A1 EP 2364724 A1 ES 2378471 T3 HR P20120136 T1 JP 2009519309 A KR 20080079312 A MA 30023 B1 NZ 568825 A PE 10982007 A1 PT 1959992 E SG 170127 A1 SI 1959992 T1 US 2008279926 A1 US 2011206758 A1 WO 2007068907 A2	13-02-2008 15-02-2012 21-06-2007 18-10-2011 21-06-2007 21-08-2008 23-04-2012 30-12-2008 28-02-2011 27-08-2008 14-09-2011 14-09-2011 14-09-2011 14-09-2011 14-09-2011 12-04-2012 31-03-2012 14-05-2009 29-08-2008 01-12-2008 12-01-2012 07-11-2007 06-03-2012 29-04-2011 30-04-2012 13-11-2008 25-08-2011 21-06-2007
-----			
WO 0222168	A2 21-03-2002	AT 516815 T AU 2054802 A AU 3819302 A AU 2002220548 B2 AU 2002238193 B2 BR 0113821 A BR 0113822 A CA 2421998 A1 CA 2422002 A1 CN 1477970 A CN 1694723 A CN 101502648 A CZ 20030756 A3 CZ 20030757 A3 DK 1317279 T3 EP 1317279 A2 EP 1317280 A2 EP 2140878 A1 EP 2305297 A1 EP 2305298 A1 EP 2314313 A1 ES 2368902 T3 HU 0301043 A2 HU 0301092 A2 IL 154607 A IL 154608 A JP 4880184 B2 JP 4903975 B2 JP 2004508416 A	15-08-2011 26-03-2002 26-03-2002 14-04-2005 12-05-2005 24-06-2003 24-06-2003 21-03-2002 21-03-2002 25-02-2004 09-11-2005 12-08-2009 15-10-2003 15-10-2003 24-10-2011 11-06-2003 11-06-2003 06-01-2010 06-04-2011 06-04-2011 27-04-2011 23-11-2011 29-09-2003 29-09-2003 30-11-2010 30-11-2010 22-02-2012 28-03-2012 18-03-2004

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/058987

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		JP 2004508417 A	18-03-2004	
		JP 2012006969 A	12-01-2012	
		KR 20080080683 A	04-09-2008	
		KR 20100091241 A	18-08-2010	
		KR 20110132483 A	07-12-2011	
		MX PA03002264 A	03-12-2004	
		MX PA03002265 A	03-12-2004	
		NO 20031183 A	13-05-2003	
		NO 20031184 A	14-05-2003	
		NZ 524286 A	27-05-2005	
		NZ 524287 A	24-03-2005	
		PL 361395 A1	04-10-2004	
		PL 361401 A1	04-10-2004	
		PT 1317279 E	11-10-2011	
		SI 1317279 T1	30-11-2011	
		US 2004081662 A1	29-04-2004	
		US 2006051361 A1	09-03-2006	
		US 2008081050 A1	03-04-2008	
		US 2011008419 A1	13-01-2011	
		WO 0222167 A2	21-03-2002	
		WO 0222168 A2	21-03-2002	
		ZA 200301524 A	21-04-2004	
		ZA 200301526 A	04-06-2004	
<hr/>				
WO 2007071707	A2	28-06-2007	KR 20080081061 A	05-09-2008
			WO 2007071707 A2	28-06-2007
			WO 2007071710 A2	28-06-2007
			WO 2007071711 A2	28-06-2007
<hr/>				
WO 0037105	A2	29-06-2000	AT 422899 T	15-03-2009
			AU 776828 B2	23-09-2004
			AU 2373100 A	12-07-2000
			CA 2355364 A1	29-06-2000
			DK 1140157 T3	08-06-2009
			EP 1140157 A2	10-10-2001
			EP 2050464 A2	22-04-2009
			ES 2322306 T3	18-06-2009
			JP 4689044 B2	25-05-2011
			JP 2002532561 A	02-10-2002
			PT 1140157 E	06-05-2009
			US 6582706 B1	24-06-2003
			US 2004001836 A1	01-01-2004
			US 2004005331 A1	08-01-2004
			US 2004052781 A1	18-03-2004
			US 2007065458 A1	22-03-2007
			WO 0037105 A2	29-06-2000
<hr/>				
EP 1601689	B1	28-11-2007	AU 2004219910 A1	23-09-2004
			AU 2010212257 A1	02-09-2010
			BR P10408094 A	14-02-2006
			CA 2518669 A1	23-09-2004
			CN 101818185 A	01-09-2010
			DE 602004010376 T2	23-10-2008
			DK 1601689 T3	25-03-2008
			EG 24449 A	13-07-2009
			EP 1601689 A2	07-12-2005
			ES 2295836 T3	16-04-2008
			HK 1086013 A1	17-04-2009

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/058987

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		IS 7993 A	18-08-2005
		JP 4597123 B2	15-12-2010
		JP 2006520205 A	07-09-2006
		JP 2010259448 A	18-11-2010
		KR 20050111357 A	24-11-2005
		MA 27666 A1	01-12-2005
		MX PA05009579 A	17-11-2005
		NZ 541969 A	31-01-2008
		PT 1601689 E	04-01-2008
		RU 2340627 C2	10-12-2008
		US 2007026010 A1	01-02-2007
		US 2011311577 A1	22-12-2011
		WO 2004081515 A2	23-09-2004
<hr/>			
WO 2010071986 A1 01-07-2010		AU 2009329782 A1	04-08-2011
		CA 2748149 A1	01-07-2010
		EP 2376526 A1	19-10-2011
		KR 20110128800 A	30-11-2011
		US 2011287046 A1	24-11-2011
		WO 2010071986 A1	01-07-2010
<hr/>			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
C 0 7 K 14/315 (2006.01)	C 0 7 K 14/315 Z N A	

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

(74)代理人 100125508

弁理士 藤井 愛

(74)代理人 100171505

弁理士 内藤 由美

(72)発明者 ドノエル, フィリップ

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサー, リュ ドランスティユ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 プールマン, ジャン

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサー, リュ ドランスティユ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ヴェルラント, ヴィンセント

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサー, リュ ドランスティユ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72)発明者 ワッレマック, ユーグ

ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサー, リュ ドランスティユ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4C076 AA19 BB15 CC15 CC31 DD63 DD70 EE30

4C085 AA03 AA38 BA14 CC21 DD01 EE01 FF11 FF14 GG03

4H045 AA11 AA30 CA11 DA86 EA31