

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7001687号

(P7001687)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和3年12月28日(2021.12.28)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	39/116	(2006.01)	A 6 1 K	39/116
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 K	39/09	(2006.01)	A 6 1 K	39/09

請求項の数 17 (全37頁)

(21)出願番号 特願2019-527780(P2019-527780)
 (86)(22)出願日 平成29年8月4日(2017.8.4)
 (65)公表番号 特表2019-526621(P2019-526621 A)
 (43)公表日 令和1年9月19日(2019.9.19)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/045483
 (87)国際公開番号 WO2018/027126
 (87)国際公開日 平成30年2月8日(2018.2.8)
 審査請求日 令和2年7月1日(2020.7.1)
 (31)優先権主張番号 62/525,945
 (32)優先日 平成29年6月28日(2017.6.28)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/371,553
 (32)優先日 平成28年8月5日(2016.8.5)

最終頁に続く

(73)特許権者 517211436
 サノフィ パスツール インコーポレイテ
 ィッド
 アメリカ合衆国 1 8 3 7 0 ペンシルベ
 ニア スウィフトウォーター ディスカバ
 リー ドライブ 1
 (73)特許権者 519038714
 エスケー バイオサイエンス カンパニー
 リミテッド
 大韓民国 1 3 4 9 4 キョンギ - ド ソ
 ンナム - シ ブダン - グ バンギョ - ロ
 3 1 0
 (74)代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72)発明者 アン キョンジュン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多価肺炎球菌多糖体 - タンパク質コンジュゲート組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

20個の異なる肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートを含み、
 肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートはそれぞれ、異なる血清型のストレプト
 コッカス・ニューモニエ由来の莢膜多糖体にコンジュゲートされたタンパク質担体を含み、
 該ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型は、1、3、4、5、6A、6B、7F、8
 、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、2
 3F、及び33Fから選択され、
 該タンパク質担体は、CRM₁₉₇又は破傷風トキソイドであり、
 該莢膜多糖体のうちの2つは、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖
 体は、CRM₁₉₇にコンジュゲートされ、
 破傷風トキソイドにコンジュゲートされる該2つの莢膜多糖体は、血清型1、3及び5か
 らなる群から選択される、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項 2】

血清型1及び5由来の前記莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清
 型3、4、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18
 C、19A、19F、22F、23F、及び33F由来の前記莢膜多糖体は、CRM₁₉₇
 にコンジュゲートされる、請求項1に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組
 成物。

【請求項 3】

血清型 1 及び 3 由来の前記莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型 4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の前記莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる、請求項 1 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項 4】

血清型 3 及び 5 由来の前記莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型 1、4、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の前記莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる、請求項 1 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

10

【請求項 5】

アジュバントを更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項 6】

前記アジュバントは、アルミニウムベースのアジュバントである、請求項 5 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項 7】

前記アジュバントは、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、及び水酸化アルミニウムからなる群から選択される、請求項 6 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

20

【請求項 8】

前記アジュバントは、リン酸アルミニウムである、請求項 7 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項 9】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ感染又は疾患に対する予防のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物と薬学的に許容可能な賦形剤とを含むワクチン。

30

【請求項 11】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ感染又は疾患の予防のための、請求項 10 に記載のワクチン。

【請求項 12】

前記対象は、少なくとも 50 歳のヒトであり、前記疾患は、肺炎又は侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) である、請求項 9 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は請求項 11 に記載のワクチン。

【請求項 13】

前記対象は、少なくとも 6 週齢のヒトであり、前記疾患は、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD)、又は急性中耳炎 (AOM) である、請求項 9 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は請求項 11 に記載のワクチン。

40

【請求項 14】

前記対象は、6 週齢から 5 歳、2 ヶ月齢から 15 ヶ月齢、又は 6 歳から 17 歳である、請求項 13 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又はワクチン。

【請求項 15】

前記対象はヒトである、請求項 9 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は請求項 11 に記載のワクチン。

【請求項 16】

前記混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は前記ワクチンは、筋内注射によって投与される、請求項 9 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は請求

50

項 1 1 に記載のワクチン。

【請求項 1 7】

前記混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は前記ワクチンは、一連の免疫付与の一部として投与される、請求項 9 に記載の混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は請求項 1 1 に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2016年8月5日付で出願された米国仮特許出願第62/371,553号及び2017年6月28日付で出願された米国仮特許出願第62/525,945号の利益を主張し、その出願日に依拠し、その開示全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【0 0 0 2】

本出願は概して、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物、該組成物を含むワクチン、並びに対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 感染又は疾患に対する予防のための、これらの組成物及びワクチンを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

肺炎球菌 (*Pneumococcus*) (ストレプトコッカス・ニューモニエ) は、90個を超える既知の血清型を有するグラム陽性のランセット型通性嫌気性菌である。ほとんどの *S. ニューモニエ* (*S. pneumoniae*) 血清型が、疾患を引き起こすと示されており、23個の最も一般的な血清型が、世界規模で侵襲性疾患のおよそ90%を占める。血清型は、肺炎球菌に関して最も重要な病原性因子である莢膜多糖体の血清学的応答に基づいて分類される。莢膜多糖体は、ヘルパー T 細胞の非存在下で抗体産生を誘導する T 細胞非依存性抗原である。T 細胞非依存性抗原は一般的に、免疫記憶をほとんど〜全く有さずに、低親和性及び一時的な免疫応答を有する抗体を誘導する。

【0 0 0 4】

初期の肺炎球菌ワクチンは、異なる血清型由来の莢膜多糖体の組合せを含んでいた。これらのワクチンは、発達した免疫系又は健全な免疫系を有する患者において、*S. ニューモニエ* に対する免疫力を付与することができるが、これらのワクチンは、発達した免疫系を欠如する乳幼児、及び免疫機能が損なわれている場合が多い高齢者においては有効ではなかった。特に *S. ニューモニエ* 感染を発症するリスクがより高い乳幼児及び高齢者において、肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答を改善するために、莢膜多糖体を、適切な担体タンパク質にコンジュゲートして、肺炎球菌コンジュゲートワクチン (*pneumococcal conjugate vaccines*) を作製した。適切な担体タンパク質へのコンジュゲーションは、莢膜多糖体を、T 細胞非依存性抗原から T 細胞依存性抗原へと変化させる。したがって、コンジュゲートされた莢膜多糖体に対する免疫応答は、ヘルパー T 細胞に關与し、ヘルパー T 細胞は、莢膜多糖体への再曝露時に、より強力かつ迅速な免疫応答を誘導するのを助長する。

【0 0 0 5】

肺炎球菌コンジュゲートワクチンの開発に対して、単一担体アプローチ及び混合担体アプローチという少なくとも2つのアプローチが存在する。異なる莢膜多糖体コンジュゲートの免疫原性は、肺炎球菌血清型及び使用する担体タンパク質に応じて多様であり得る。単一担体アプローチでは、異なる血清型由来の莢膜多糖体を、単一タンパク質担体にコンジュゲートする。Pfizer社のPREVNARシリーズのワクチンは、異なる莢膜多糖体を、グリシンに代わってグルタミン酸の単一アミノ酸置換を有するジフテリアトキソイドの無毒性変異体であるCRM₁₉₇タンパク質担体にコンジュゲートする単一担体アプローチの例である。7価PREVNARワクチン (PREVNAR) は、2000年に最初に認

10

20

30

40

50

可され、7つの最も流行している血清型：4、6 B、9 V、1 4、1 8 C、1 9 F及び2 3 F由来の莢膜多糖体を含有する。1 3価ワクチンであるPREVNAR 1 3は、血清型1、5、7 F、3、6 A、及び1 9 Aを、CRM 1 9 7タンパク質担体に付加したものである。単一担体のPREVNAR ワクチンにおいて使用されるタンパク質担体であるCRM 1 9 7は、肺炎球菌コンジュゲートワクチンにおける混合担体系の一部として使用されたことはこれまでにない。

【0 0 0 6】

第2の肺炎球菌ワクチンアプローチは、混合担体アプローチである。混合担体アプローチでは、単一タンパク質担体を使用する代わりに、2つ以上のタンパク質担体を使用され、特異的な血清型由来の莢膜多糖体が、第1のタンパク質担体にコンジュゲートされ、異なる血清型由来の莢膜多糖体が、少なくとも第2の異なるタンパク質担体にコンジュゲートされる。例えば、GlaxoSmithKline社は、タンパク質担体としてH. インフルエンザエ (H influenzae) タンパク質D、破傷風トキソイド及びジフテリアトキソイドを使用する1 0価(血清型1、4、5、6 B、7 F、9 V、1 4、1 8 C、1 9 F及び2 3 F)の混合担体の肺炎球菌コンジュゲートワクチンであるSYNFLORIXを開発している。SYNFLORIXにおいて、血清型1、4、5、6 B、7 F、9 V、1 4、及び2 3 Fは、タンパク質Dにコンジュゲートされ、血清型1 8 Cは、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型1 9 Fは、ジフテリアトキソイドにコンジュゲートされる[7]。血清型3は、急性中耳炎の治験において血清型特異的な有効性を示さなかったため、SYNFLORIXの1 1価の前駆体から除かれた[1]。別のグループのAventis Pasteur社は、タンパク質担体としてジフテリアトキソイド及び破傷風トキソイドを使用する1 1価(血清型1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、1 4、1 8 C、1 9 F及び2 3 F)の混合担体の肺炎球菌コンジュゲートワクチンを開発した[2、3]。血清型3、9 V、1 4及び1 8 C由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされた場合よりも、ジフテリアトキソイドにコンジュゲートされた場合により良好な応答を誘発することができる[2、6]。したがって、血清型3、6 B、1 4及び1 8 Cは、ジフテリア毒素にコンジュゲートされ、血清型1、4、5、7 F、9 V、1 9 F、及び2 3 Fは、破傷風トキソイドにコンジュゲートされた。この混合担体の肺炎球菌ワクチンの開発は、幾分技術的な理由及び無細胞百日咳ワクチンと組み合わせた場合の応答の低減の可能性に起因して終了した[3]。近年、血清型5及び1は、全てのPREVNAR 1 3血清型の中で由来の観察されるOPA力価が最小であるものの1つであり、Ig G力価とOPA活性との間に相関関係が関連付けられると報告された[4]。また、血清型3に関しては、はるかに高い血清Ig G濃度が、防御に必要とされると示唆された[5]。

【発明の概要】

【0 0 0 7】

本出願は、新たな改善された混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物及び該組成物を含むワクチンを提供する。1つの態様において、本出願は、2 0個の異なる肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートを含み、肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートはそれぞれ、異なる血清型のストレプトコッカス・ニューモニエ由来の莢膜多糖体にコンジュゲートされたタンパク質担体を含み、該ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型は、1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 4、1 5 B、1 8 C、1 9 A、1 9 F、2 2 F、2 3 F、及び3 3 Fから選択され、該タンパク質担体は、CRM 1 9 7又は破傷風トキソイドであり、該莢膜多糖体のうちの2つは、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM 1 9 7にコンジュゲートされ、破傷風トキソイドにコンジュゲートされる該2つの莢膜多糖体は、血清型1、3及び5からなる群から選択される、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を提供する。

【0 0 0 8】

1つの態様において、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、2 0個の異なる肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートを含み、肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク

10

20

30

40

50

質コンジュゲートはそれぞれ、異なる血清型のストレプトコッカス・ニューモニエ由来の莢膜多糖体にコンジュゲートされたタンパク質担体を含み、該ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型は、1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、及び33Fから選択され、該タンパク質担体は、CRM197又は破傷風トキソイドであり、該莢膜多糖体のうちの2つは、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされ、破傷風トキソイドにコンジュゲートされる該2つの莢膜多糖体は、血清型1、3及び5からなる群から選択される。

【0009】

混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物の幾つかの実施の形態において、血清型1及び5由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型3、4、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、及び33F由来の莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる。

10

【0010】

混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物の別の実施の形態において、血清型1及び3由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、及び33F由来の莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる。

20

【0011】

混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物の更に別の実施の形態において、血清型3及び5由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型1、4、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、18C、19A、19F、22F、23F、及び33F由来の莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる。

【0012】

幾つかの実施の形態において、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、及び水酸化アルミニウムを含むがこれらに限定されない、アルミニウムベースのアジュバント等のアジュバントを更に含む。

30

【0013】

別の態様は、ワクチンとしての混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物の使用に関する。

【0014】

更に別の態様は、混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物と薬学的に許容可能な賦形剤とを含むワクチンに関する。

【0015】

更に別の態様は、対象、例えばヒトにおけるストレプトコッカス・ニューモニエ感染又は疾患を予防する方法であって、予防上有効な量の混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は該組成物を含むワクチンを、該対象に投与することを含む、方法に関する。

40

【0016】

或る特定の実施の形態において、対象は、少なくとも50歳のヒトであり、疾患は、肺炎又は侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）である。

【0017】

他の実施の形態において、対象は、少なくとも6週齢のヒトであり、疾患は、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）、又は急性中耳炎（AOM）である。幾つかの実施の形態において、ヒト対象は、6週齢から5歳である。他の実施の形態において、ヒト対象は、2ヵ月齢から15ヵ月齢、又は6歳から17歳である。

【0018】

或る特定の実施の形態において、混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物又はワ

50

クチンは、筋内注射によって投与される。或る特定の実施の形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物又はワクチンは、一連の免疫付与の一部として投与される。

【0019】

混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物の上述及び他の目的、特色及び利点は、下記の詳細な説明からより明らかとなる。

【0020】

本明細書中に含まれる図面は、添付の図で構成され、単に説明の目的であり、限定の目的ではない。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1A～図1Dは、幾何平均力価（GMT）で測定される、血清型8（図A）、血清型10A（図B）、血清型11A（図C）、及び血清型15B（図D）のモノコンジュゲートの *in vivo* での用量依存性抗体応答を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

定義

本開示のより容易な理解のために、幾つかの用語を初めに下記に規定する。以下の用語及び他の用語の付加的な定義は本明細書を通して示され得る。

【0023】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合に、文脈上他に明らかに指示されない限り、数量を特定していない単数形（the singular forms "a," "an," and "the"）は複数の指示対象を含む。このため、例えば「方法（a method）」への言及には1つ以上の方法、及び／又は本明細書に記載される及び／又は本開示を読むことで当業者に明らかとなるタイプの工程等が含まれる。

【0024】

アジュバント：本明細書中で使用する場合、「アジュバント」は、抗原に対する免疫応答を非特異的に増強する物質又はビヒクル（vehicle）を指す。

【0025】

投与する：本明細書で使用する場合、組成物を対象に「投与する」ことは、対象に組成物を与える、適用する又は対象を組成物と接触させることを意味する。投与は例えば局所、経口、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、髄腔内及び皮内等の多数の経路のいずれかによって達成することができる。

【0026】

およそ：本明細書で使用する場合、「およそ」又は「約」という用語は対象となる1つ以上の値に適用される場合、述べられる参照値と同様の値を指す。或る特定の実施形態では、「およそ」又は「約」という用語は、他に指定のない限り又は文脈から明らかでない限りにおいて（かかる数が可能な値の100%を超える場合を除いて）、述べられる参照値のいずれかの方向で（それを上回る又は下回る）25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%又はそれ以下に含まれる値の範囲を指す。

【0027】

コンジュゲート：本明細書中で使用する場合、また適正な状況から理解されるように、「コンジュゲート（複数の場合もある）」又は「複合糖質（複数の場合もある）」という用語は、任意の共有結合又は非共有結合的なバイオコンジュゲーション戦略を使用して、担体タンパク質にコンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体を指す。

【0028】

賦形剤：本明細書中で使用する場合、「賦形剤」という用語は、例えば所望の一貫性（consistency）又は安定化効果を提供するか、又はそれに寄与するために組成物中に含まれ得る非治療用作用物質を指す。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

混合担体：本明細書中で使用する場合、混合担体の肺炎球菌コンジュゲート組成物は、2つ以上のタイプのタンパク質担体を有する肺炎球菌コンジュゲート組成物を指す。

【 0 0 3 0 】

多価：本明細書中で使用する場合、「多価」という用語は、2つ以上のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の肺炎球菌莢膜多糖体を有する肺炎球菌コンジュゲート組成物を指す。

【 0 0 3 1 】

混合担体の16価肺炎球菌コンジュゲート組成物：本明細書中で使用する場合、「混合担体の16価肺炎球菌コンジュゲート組成物（複数の場合もある）」は、16個の異なる肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、ここで、肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートはそれぞれ、異なる血清型のストレプトコッカス・ニューモニエ由来の莢膜多糖体にコンジュゲートされたタンパク質担体を含み、ここで、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型は、1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、及び33Fであり、ここで、タンパク質担体は、CRM197又は破傷風トキシソイドであり、ここで、莢膜多糖体のうちの2つは、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされ、ここで、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされる2つの莢膜多糖体は、血清型1、3及び5からなる群から選択される。幾つかの実施形態において、血清型1及び5由来の莢膜多糖体は、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの血清型由来の莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる（本明細書においてPCV16-15TTとも称される）。別の実施形態において、血清型1及び3由来の莢膜多糖体は、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる（本明細書においてPCV16-13TTとも称される）。更に別の実施形態において、血清型3及び5由来の莢膜多糖体は、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる（本明細書においてPCV16-35TTとも称される）。

【 0 0 3 2 】

混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物：本明細書中で使用する場合、「混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物（複数の場合もある）」は、20個の異なる肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートを含む組成物を指し、ここで、肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートはそれぞれ、異なる血清型のストレプトコッカス・ニューモニエ由来の莢膜多糖体にコンジュゲートされたタンパク質担体を含み、ここで、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型は、1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、及び33Fであり、ここで、タンパク質担体は、CRM197又は破傷風トキシソイドであり、ここで、莢膜多糖体のうちの2つは、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされ、ここで、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされる2つの莢膜多糖体は、血清型1、3及び5からなる群から選択される。幾つかの実施形態において、血清型1及び5由来の莢膜多糖体は、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの血清型由来の莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる。別の実施形態において、血清型1及び3由来の莢膜多糖体は、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる。更に別の実施形態において、血清型3及び5由来の莢膜多糖体は、破傷風トキシソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM197にコンジュゲートされる。

【 0 0 3 3 】

薬学的に許容可能な賦形剤：本開示において有用な薬学的に許容可能な賦形剤は、従来型である。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)は、ワクチンを含む1つ以上の治療用組成物の医薬送達に適した組成物及び製剤、並びに更なる薬剤について記載している。適切な医

10

20

30

40

50

薬賦形剤として、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。概して、賦形剤の性質は、用いられる特定の投与様式に依存する。例えば、非経口製剤は通常、ビヒクルとして、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、緩衝液、水性デキストロース、グリセロール等の薬学的にかつ生理学的に許容可能な流体を含む注射可能な流体を含む。固体組成物（例えば、粉末、丸剤、錠剤又はカプセル形態）に関して、従来型無毒性固体賦形剤として、例えば、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、又は硫酸マグネシウムを挙げることができる。生物学的に中性の担体の他に、投与される医薬組成物は、少量の、湿潤剤又は乳化剤、界面活性剤、防腐剤及びpH緩衝剤等の無毒性補助物質、例えば酢酸ナトリウム又はソルビタンモノラウレートを含むことができる。

10

【0034】

予防上有効な量：本明細書中で規定する場合、「予防上有効な量」又は「予防上有効な用量」という用語は、ストレプトコッカス・ニューモニエによる感染によって引き起こされる1つ以上の症状の発生を遅延して、及び/又はそれらの頻度及び/又は重篤性を低減するのに十分な免疫応答を誘導するのに必要とされる量又は用量を指す。

【0035】

予防：「予防」という用語は、本明細書中で使用する場合、特定の疾患、障害又は状態（例えば、ストレプトコッカス・ニューモニエによる感染）の疾患徴候の回避、それらの発生の遅延、及び/又はそれらの1つ以上の症状の頻度及び/又は重篤性の低減を指す。幾つかの実施形態において、予防は、特定の疾患、障害又は状態の1つ以上の症状の発症、頻度及び/又は強度の統計学的に有意な減少が、その疾患、障害又は状態にかかりやすい集団において観察される場合に、作用物質が、その疾患、障害又は状態に対する予防をもたらすとみなされるように集団ベースで評価される。

20

【0036】

対象：本明細書中で使用する場合、「対象」という用語は、マウス、ウサギ、及びヒトを含む任意の哺乳動物を意味する。或る特定の実施形態において、対象は、成体、青年又は乳幼児である。幾つかの実施形態において、「個体」又は「患者」という用語が使用され、「対象」と区別なく使用可能であると意図される。

30

【0037】

詳細な説明

開示する実施形態（複数の場合もある）及び実施例の下記の説明は、事実上、単なる例示的なものであり、本発明、その用途、又は使用を限定すると意図されるものではない。

【0038】

本出願は、新たな改善された混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物及び該組成物を含むワクチンを提供する。タンパク質担体であるCRM₁₉₇は、これまで単一担体の肺炎球菌コンジュゲートワクチンで使用されてきたのに対して、本出願は、混合担体の肺炎球菌コンジュゲートワクチンにおけるCRM₁₉₇の使用について初めて記載する。

【0039】

上述するように、異なる莢膜多糖体コンジュゲートの免疫原性は、肺炎球菌血清型及び使用する担体タンパク質に応じて多様であり得る。血清型3が、破傷風トキシソイドではなくジフテリアトキシソイドにコンジュゲートされた場合に、より免疫原性が高かったというこれまでの教示[2、6]はあるが、本出願は、血清型3の、混合担体ワクチンの一部としての破傷風トキシソイドへの首尾よいコンジュゲーションについて記載する。本出願はまた、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物において破傷風トキシソイドにコンジュゲートされた血清型3に対する抗体応答が、血清型3が単一担体の13価肺炎球菌コンジュゲート組成物（PREVNAR13）においてCRM₁₉₇にコンジュゲートされた場合よりもPCV16組成物及びPCV20組成物にてそれぞれ約4倍及び約7倍高かったという予期せぬ発見を開示している。

40

50

【 0 0 4 0 】

さらに、予期せぬ発見は、血清型 3 に限定されず、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物において破傷風トキソイドにコンジュゲートされた他の血清型に関しても観察された。実施例において示すように、残りの血清型が C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた、混合担体の 1 6 価又は 2 0 価肺炎球菌コンジュゲート組成物における破傷風トキソイドへの血清型 1 及び 3、1 及び 5、又は 3 及び 5 のコンジュゲーション（例えば、P C V 1 6 - 1 3 T T、P C V 1 6 - 1 5 T T、及び P C V 1 6 - 3 5 T T 又は P C V 2 0 - 3 5 T T、P C V 2 0 - 1 3 T T、及び P C V 2 0 - 1 5 T T）は、単一担体の肺炎球菌コンジュゲート組成物（P R E V N A R 1 3）において C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた同じ血清型に対する抗体応答（I g G 応答又は M O P A 力価）と比較した場合に、破傷風トキソイドにコンジュゲートされた血清型に対して、有意に増強された抗体応答を一貫して誘導し、この特異的な混合担体（破傷風トキソイド及び C R M 1 9 7）アプローチを確証した。混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物の抗体応答を、以下の表において概説する。

【 0 0 4 1 】

【表 1】

表 1. P R E V N A R 1 3 と比較した、混合担体ワクチンにおける破傷風トキソイドにコンジュゲートした血清型に対する抗体応答の増加倍数

血清型	P R E V N A R 1 3 と比較した抗体応答の増加倍数					
	PCV16-13TT	PCV16-15TT	PCV16-35TT	PCV20-13TT	PCV20-15TT	PCV20-35TT
1 (IgG)	3X	3.9X	N/A	4.9X	1.7X	N/A
1 (MOPA)	6.3X	6.3X	N/A	19X	8.9X	N/A
3 (IgG)	5.5X	N/A	2.8X	1X	N/A	7.5X
3 (MOPA)	4X	N/A	4X	7.9X	N/A	4.4X
5 (IgG)	N/A	8.7X	3.2X	N/A	2.5X	1X
5 (MOPA)	N/A	5X	4X	N/A	3.6X	2X

【 0 0 4 2 】

本出願において記載する混合担体の 2 0 価肺炎球菌コンジュゲート組成物はまた、世界市場で現在入手可能な 3 つの肺炎球菌コンジュゲートワクチン：P R E V N A R（国によっては、P r e v e n a r と呼ばれる）、S Y N F L O R I X 及び P R E V N A R 1 3 の適用外の肺炎球菌血清型を含む。現在適用外の肺炎球菌血清型によって引き起こされる疾患は、抗菌耐性の発現、免疫不全患者数の増加、及び免疫力（immune pressure）の欠如に幾分起因して上昇傾向にある。例えば、現在入手可能な肺炎球菌コンジュゲートワクチンはいずれも、血清型 1 2 F を含まない。さらに、現在入手可能な肺炎球菌コンジュゲートワクチンはいずれも、血清型 8、1 0 A、1 1 A、1 5 B、2 2 F 及び 3 3 F を含まない。本開示は、混合担体（破傷風トキソイド及び C R M 1 9 7）の肺炎球菌コンジュゲートワクチンへの血清型 8、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 5 B、2 2 F 及び 3 3 F の首尾よく導入を実証している。

【 0 0 4 3 】

混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物及び該組成物を作製する方法

1 つの態様において、本開示は、2 0 個の異なる肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートを含み、肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートはそれぞれ、異なる血清型のストレプトコッカス・ニューモニエ由来の莢膜多糖体にコンジュゲートされたタンパク質担体を含み、該ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型は、1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 4、1 5 B、1 8 C、1 9 A、1 9 F、2 2 F、2 3 F、及び 3 3 F であり、該タンパク質担体は、C R M 1 9 7 又は破傷風トキソイドであり、該莢膜多糖体のうちの 2 つは、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、C R M 1 9 7 にコンジュゲートされ、破傷風トキソイドにコンジュゲートされる該 2 つの莢膜多糖体は、血清型 1、3 及び 5 からなる群から選択さ

れる、混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物を提供する。

【 0 0 4 4 】

幾つかの実施形態において、血清型 1 及び 5 由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、残りの血清型由来の莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる。別の実施形態において、血清型 1 及び 3 由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる。更に別の実施形態において、血清型 3 及び 5 由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、残りの莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる。

【 0 0 4 5 】

多糖体 - タンパク質コンジュゲートワクチンにおいて、担体タンパク質は、主に多糖体抗原に対する免疫応答（例えば、抗体応答）を増強するのに助長するために、多糖体抗原にコンジュゲートされる。担体タンパク質は、ほとんど又は全く免疫原性を有さない無毒性のタンパク質であることが好ましい。担体タンパク質は、以下で更に詳細に論述するように、標準的なコンジュゲーション法を使用した、肺炎球菌多糖体とのコンジュゲーションに適するものであるべきである。混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物において使用する担体タンパク質は、破傷風トキソイド（TT）及び CRM 197 であり、それらはそれぞれ、肺炎球菌コンジュゲートワクチンの設計において使用されているが、同じ混合担体ワクチンでは使用されていない。

【 0 0 4 6 】

CRM 197 は、野生型ジフテリア毒素の免疫原性特性を保持するジフテリア毒素の無毒性変異体（即ち、トキソイド）である。CRM 197 は、構造遺伝子において単一塩基で野生型ジフテリア毒素と異なり、それが、グルタミン酸からグリシンへの単一アミノ酸置換を生じる。CRM 197 は通常、カザミノ酸及び酵母抽出物ベースの培地上で成長させたコリネバクテリウム・ジフテリア（*Corynebacterium diphtheria*）株 C7（197）の培養物から単離される。CRM 197 は、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿、及びイオン交換クロマトグラフィーにより精製され得る。あるいは、CRM 197 は、その全体が引用することにより本明細書の一部をなす米国特許第 5,614,382 号に従って、組換えにより作製することができる。CRM 197 は、肺炎球菌コンジュゲートワクチンの設計において使用されているが、混合担体ワクチンの一部としては使用されていない。

【 0 0 4 7 】

破傷風トキソイドは、クロストリジウム・テタニ（*Clostridium tetani*）によって引き起こされる破傷風（又は牙関緊急）に対する大規模な免疫付与用に、世界規模で作製及び使用されている。破傷風トキソイドはまた、単独で、並びにジフテリア及び/又は百日咳ワクチンと組み合わせて使用される。親タンパク質である破傷風毒素は、一般的にクロストリジウム・テタニの培養物において得られる。破傷風毒素は、約 150 kDa のタンパク質であり、スルフィド結合で連結される 2 つのサブユニット（約 100 kDa 及び約 50 kDa）からなる。毒素は通常、ホルムアルデヒドで解毒されて、硫酸アンモニウム沈殿（例えば、[7]、[8]を参照）又は例えば国際公開第 1996/025425 号に開示されるようなクロマトグラフィー技法等の既知の方法を使用して、培養物濾液から精製することができる。破傷風毒素はまた、組換え遺伝子手段によって不活性化させてもよい。

【 0 0 4 8 】

破傷風トキソイドはまた、肺炎球菌コンジュゲートワクチンを含む他のワクチンにおいて、担体タンパク質として使用されてきた。しかし、破傷風トキソイドは、CRM 197 と組み合わせた混合担体の肺炎球菌コンジュゲートワクチンにおいては一切使用されていない。また、当該技術分野では、血清型 3 が、破傷風トキソイドと比較した場合、ジフテリアトキソイドにコンジュゲートされた場合により免疫原性が高いことが示されたので、混合担体の肺炎球菌コンジュゲートワクチンにおいて、血清型 3 を破傷風トキソイドにコンジュゲートすることから遠ざけることが教示されている [2、6]。

【 0 0 4 9 】

血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、

10

20

30

40

50

15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び33 F由来の莢膜多糖体を含む、本明細書中に記載する組成物及びワクチンにおいて使用される肺炎球菌莢膜多糖体は、例えば、いずれもそれらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす国際公開第2006/110381号、国際公開第2008/118752号、国際公開第2006/110352号、及び米国特許出願公開第2006/0228380号、同第2006/0228381号、同第2007/0184071号、同第2007/0184072号、同第2007/0231340号、同第2008/0102498及び同第2008/0286838号に開示されるものを含む、当業者に既知の標準的な技法を含む任意の利用可能な技法を使用して、ストレプトコッカス・ニューモニエから作製され得る。例えば、肺炎球菌莢膜多糖体血清型はそれぞれ、培養培地（例えば、大豆ベースの培地）中で成長させてもよい。細胞を溶解させて、個々の多糖体を、遠心分離、沈殿、限外濾過及び/又はカラムクロマトグラフィーにより溶解産物から精製してもよい。さらに、肺炎球菌莢膜多糖体は、合成プロトコルを使用して産生することができる。

10

【0050】

ストレプトコッカス・ニューモニエの莢膜多糖体は、最大8つの糖残基を含有し得る反復オリゴ糖単位を含む。莢膜多糖体抗原は、完全長多糖体であってもよく、又は莢膜多糖体抗原は、サイズが低減されてもよい（例えば、単一オリゴ糖単位、又は反復オリゴ糖単位の自然長よりも短い糖鎖）。莢膜多糖体のサイズは、酸加水分解処理、過酸化水素処理、高圧ホモジナイザーによるサイジング、任意選択で続くオリゴ糖断片を生成するための過酸化水素処理、又は顕微溶液化（microfluidization）等の当該技術分野で既知の各種方法によって低減され得る。

20

【0051】

血清型それぞれの肺炎球菌コンジュゲートは、各血清型の莢膜多糖体を、担体タンパク質にコンジュゲートすることによって作製され得る。異なる肺炎球菌コンジュゲートを、単回投薬製剤を含む組成物へと配合してもよい。

【0052】

多糖体-タンパク質コンジュゲートを作製するために、各肺炎球菌血清型から作製される莢膜多糖体を、莢膜多糖体が担体タンパク質と反応し得るように化学的に活性化させてもよい。活性化されると、莢膜多糖体はそれぞれ、担体タンパク質に個別にコンジュゲートされて、複合糖質を形成し得る。多糖体の化学的活性化、及び続く担体タンパク質へのコンジュゲーションは、従来法によって達成され得る。例えば、莢膜多糖体の末端にある近接した水酸基は、例えばそれらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす米国特許第4,365,170号、同第4,673,574号及び同第4,902,506号に開示されるように、過ヨウ素酸塩（過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウム、又は過ヨウ素酸を含む）等の酸化剤によって、アルデヒド基に酸化することができる。多糖体はまた、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート（CDAP）で活性化して、シアン酸エステルを形成してもよい。続いて、活性化された多糖体は、直接、又はスパーサー若しくはリンカー基を介して、担体タンパク質上のアミノ基ヘカップリングされる。

30

【0053】

例えば、スパーサーは、マレイミドで活性化された担体タンパク質（例えば、N-[γ-マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル（GMBSE）を使用して）又はハロアセチル化された担体タンパク質（例えば、ヨードアセトイミド、プロモ酢酸N-スクシンイミジル（SBA; SIB）、（4-ヨードアセチル）アミノ安息香酸N-スクシンイミジル（SIAB）、（4-ヨードアセチル）アミノ安息香酸スルホスクシンイミジル（スルホ-SIAB）、ヨード酢酸N-スクシンイミジル（SIA）又は3-[プロモアセトアミド]プロピオン酸スクシンイミジル（SBAP）を使用して）との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができるチオール化された多糖体を付与するシスタミン又はシステアミンであり得る。好ましくは、シアン酸エステル（任意選択で、COAP化学によって作製される）は、ヘキサンジアミン又はアジピン酸ジ

40

50

ヒドラジド (A O H) とカップリングされて、アミノで誘導体化された糖類は、カルボジイミド (例えば、E O A C 又は E O C) 化学を使用して、タンパク質担体上のカルボキシル基を介して担体タンパク質にコンジュゲートされる。かかるコンジュゲートは、例えば、国際公開第 9 3 / 1 5 7 6 0 号、国際公開第 9 5 / 0 8 3 4 8 号及び国際公開第 9 6 / 1 2 9 0 9 4 号に記載されている。

【 0 0 5 4 】

活性化された莢膜多糖体及び担体タンパク質のコンジュゲーションは、例えば、いずれもそれらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 2 8 3 8 0 号、同第 2 0 0 7 / 0 2 3 1 3 4 0 号、同第 2 0 0 7 / 0 1 8 4 0 7 1 号及び同第 2 0 0 7 / 0 1 8 4 0 7 2 号、国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 0 3 8 1 号、国際公開第 2 0 0 8 / 0 7 9 6 5 3 号、及び国際公開第 2 0 0 8 / 1 4 3 7 0 9 号に記載されるように、例えば、還元的アミノ化によって達成され得る。例えば、活性化された莢膜多糖体及び担体タンパク質は、還元剤と反応させて、コンジュゲートを形成してもよい。適切な還元剤として、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、ボラン - ピリジン、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム、又は水素化ホウ素交換樹脂等の水素化ホウ素が挙げられる。還元反応の最後に、未反応のアルデヒド基が、コンジュゲート中に残存し得る。未反応のアルデヒド基は、水素化ホウ素ナトリウム (N a B H₄) 等の適切なキャッピング剤を使用してキャッピングされ得る。或る実施形態において、還元反応は、水性溶媒中で行われる。別の実施形態において、反応は、非プロトン性溶媒中で行われる。或る実施形態において、還元反応は、D M S O (ジメチルスルホキシド) 中又は D M F (ジメチルホルムアミド) 溶媒中で行われる。

【 0 0 5 5 】

活性化された莢膜多糖体は、担体タンパク質に直接的に、又は二官能性リンカー等のスペーサー若しくはリンカーの使用により間接的にコンジュゲートされ得る。リンカーは、任意選択で、例えば、1つの反応性アミノ基及び1つの反応性カルボン酸基、2つの反応性アミノ基又は2つの反応性カルボン酸基を有する、ヘテロ二官能性又はホモ二官能性である。

【 0 0 5 6 】

コンジュゲーションに関する他の適切な技法は、例えば国際公開第 9 8 / 4 2 7 2 1 号に記載されるように、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、p - ニトロ安息香酸、N - ヒドロスクシンイミド、S - N H S、E O C、T S T U を使用する。コンジュゲーションは、糖類の遊離水酸基と、1, 1' - カルボニルジイミダゾール (C D I) との反応 (Bethell et al. (1979) J. Biol. Chem. 254:2572-2574, Hearn et al. (1981) J. Chromatogr. 218:509-518を参照されたい)、続くカルバメート結合を形成するタンパク質との反応によって形成され得るカルボニルリンカーが関与し得る。これは、アノマー末端の、第一級水酸基への還元、第一級水酸基の任意選択の保護 / 脱保護、C D I カルバメート中間体を形成する第一級水酸基と C D I との反応、及び C D I カルバメート中間体と、タンパク質上のアミノ基とのカップリングを包含し得る。

【 0 0 5 7 】

肺炎球菌コンジュゲートワクチンに関する多糖体対担体タンパク質の比は通常、0.3 (w / w) ~ 3.0 (w / w) の範囲であるが、血清型によって多様であり得る。比は、存在するタンパク質及び多糖体の量の独立した測定によって、又は当該技術分野で既知の比の直接的な測定を行う方法のいずれかによって決定することができる。方法として、¹H N M R 分光法又はコンジュゲートのサイズ分布にわたって糖類 / タンパク質の比をプロファイリングすることができる二重モニタリング (例えば、総材料及びタンパク質含有量に関してそれぞれ屈折率及び U V) を用いた S E C - H P L C - U V / R I の使用及び S E C - H P L C - M A L L S 又は M A L D I - T O F - M S が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

このようにして得られた多糖体 - タンパク質コンジュゲートは、様々な方法によって精製及び富化され得る。これらの方法として、濃縮 / ダイアフィルトレーション、カラムクロ

10

20

30

40

50

マトグラフィー、及び深層濾過が挙げられる。精製した多糖体 - タンパク質コンジュゲートを組み合わせて、混合担体の 16 価肺炎球菌コンジュゲート組成物を配合して、それをワクチンとして使用することができる。

【0059】

ワクチン組成物の配合は、当該技術分野で認識されている方法を使用して遂行することができる。ワクチン組成物は、その意図される投与経路に適合するように配合される。個々の肺炎球菌莢膜多糖体 - タンパク質コンジュゲートは、生理学的に許容可能なビヒクルと一緒に配合されて、組成物を作製することができる。かかるビヒクルの例として、水、平衡生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）及びデキストロス溶液が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0060】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、アジュバントを更に含む。アジュバントは、抗原が吸着される鉱物（ミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、ヒドロキシリン酸硫酸アルミニウム等のアルミニウム塩）の懸濁液、又は抗原溶液が鉱油中で乳化される油中水型エマルジョン（例えば、フロイント不完全アジュバント）、また場合によっては抗原性を更に増強するために死菌マイコバクテリア（mycobacteria）を含む油中水型エマルジョン（フロイント完全アジュバント）を含み得る。免疫賦活性オリゴヌクレオチド（CpGモチーフを含むもの等）もまた、アジュバントとして使用することができる（例えば、米国特許第 6, 194, 388 号、同第 6, 207, 646 号、同第 6, 214, 806 号、同第 6, 218, 371 号、同第 6, 239, 116 号、同第 6, 339, 068 号、同第 6, 406, 705 号、及び同第 6, 429, 199 号を参照）。アジュバントはまた、脂質及び共刺激性分子等の生物学的分子を含む。例示的な生物学的アジュバントとして、AS04 [9]、IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L 及び 41BBL が挙げられる。

20

【0061】

幾つかの実施形態において、アジュバントは、アルミニウムベースのアジュバントである。通常、単回 0.5 ml ワクチン用量は、アルミニウムベースのアジュバント約 0.1 mg ~ 2.5 mg を含有するように配合される。他の実施形態において、単回 0.5 ml ワクチン用量は、アルミニウムベースのアジュバント 0.1 mg ~ 2 mg、0.1 mg ~ 1 mg、0.1 mg ~ 0.5 mg、0.1 mg ~ 0.2 mg、0.125 mg ~ 2.5 mg、0.125 mg ~ 0.5 mg、0.125 mg ~ 0.2 mg 又は 0.125 mg ~ 0.25 mg を含有するように配合される。或る特定の実施形態において、単回 0.5 ml ワクチン用量は、アルミニウムベースのアジュバント約 0.125 mg を含有するように配合される。

30

【0062】

特定の実施形態において、アジュバントは、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、及び水酸化アルミニウムからなる群から選択される。

【0063】

特定の実施形態において、アジュバントは、リン酸アルミニウムである。

40

【0064】

幾つかの実施形態において、組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエの感染に対するワクチンとして使用するためのものである。

【0065】

予防上の方法及び使用

1 つの態様において、本開示は、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物と薬学的に許容可能な賦形剤とを含むワクチンを提供する。幾つかの実施形態において、薬学的に許容可能な賦形剤は、少なくとも、コハク酸塩緩衝液等の緩衝液、塩化ナトリウム等の塩、及び / 又はポリオキシエチレンソルビタンエステル（例えば、ポリソルベート 80）

50

等の界面活性剤を含む。幾つかの実施形態において、血清型 1 及び 5 由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型 3、4、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる。

【0066】

別の実施形態において、血清型 1 及び 3 由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型 4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる。

【0067】

更に別の実施形態において、血清型 3 及び 5 由来の莢膜多糖体は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされ、血清型 1、4、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の莢膜多糖体は、CRM 197 にコンジュゲートされる。

【0068】

幾つかの実施形態において、ワクチンは、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される疾患に対するヒト対象における防御免疫応答を誘発する。

【0069】

更なる態様によれば、本開示は、ストレプトコッカス・ニューモニエ感染又は疾患を予防する方法であって、ヒト対象に、予防上有効な量の混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は該組成物を含むワクチンを投与することを含む、方法を提供する。混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は該組成物を含むワクチンは、以下で更に詳細に記載するように、例えば全身経路又は粘膜経路を含む任意の経路によって投与され得る。

【0070】

或る特定の実施形態において、ヒト対象は、高齢対象であり、疾患は、肺炎又は侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) である。或る特定の実施形態において、高齢対象は、少なくとも 50 歳である。他の実施形態において、高齢対象は、少なくとも 55 歳である。更に他の実施形態において、高齢対象は、少なくとも 60 歳である。

【0071】

他の実施形態において、ヒト対象は、乳幼児であり、疾患は、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD)、又は急性中耳炎 (AOM) である。或る特定の実施形態において、乳幼児は、0 歳 ~ 2 歳である。他の実施形態において、乳幼児は、2 ヶ月 ~ 15 ヶ月である。

【0072】

更に別の実施形態において、ヒト対象は、6 週齢 ~ 17 歳であり、疾患は、肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) 又は急性中耳炎 (AOM) である。或る特定の実施形態において、ヒト対象は、6 週齢 ~ 5 歳である。他の実施形態において、ヒト対象は、5 歳 ~ 17 歳である。

【0073】

各ワクチン用量におけるコンジュゲートの量又は混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物の予防上の有効量は、著しい有害作用を伴わずに予防を誘導する量として選択され得る。かかる量は、肺炎球菌血清型に応じて多様であり得る。概して、各用量は、多糖体約 0.1 µg ~ 約 100 µg、具体的には約 0.1 µg ~ 10 µg、より具体的には約 1 µg ~ 約 5 µg を含み得る。特定のワクチンに関する構成成分の最適な量は、対象における適切な免疫応答の観察を含む標準的な研究によって確認することができる。例えば、ヒト対象のワクチン接種に関する量は、動物試験の結果を外挿することによって決定することができる。さらに、用量は、経験的に決定することができる。

【0074】

幾つかの実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、各莢膜多糖体約 1 µg ~ 約 5 µg、TT 約 1 µg ~ 約 25 µg、CRM 197 約 2

10

20

30

40

50

0 μg ~ 約 75 μg 、及び任意選択で、元素アルミニウムアジュバント約 0.1 mg ~ 約 2.5 mg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得る。幾つかの実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、各莢膜多糖体約 2 μg ~ 約 4 μg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得るが、但し、約 4 μg ~ 約 8 μg 、任意選択で約 4 μg ~ 約 5 μg の量で存在する血清型 6 B は除く。幾つかの実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、各莢膜多糖体約 2.0 μg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得るが、但し、約 4.0 μg の量で存在する血清型 6 B は除く。他の実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、各莢膜多糖体約 2.2 μg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得るが、但し、約 4.4 μg の量で存在する血清型 6 B は除く。幾つかの実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F、及び 33 F の莢膜多糖体約 2 μg ~ 約 2.5 μg 、並びに血清型 1、3、6 B、12 F、19 A、及び 19 F の莢膜多糖体約 4 μg ~ 約 5 μg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得る。幾つかの実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F、及び 33 F の莢膜多糖体約 2.0 μg 、並びに血清型 1、3、6 B、12 F、19 A、及び 19 F の莢膜多糖体約 4.0 μg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得る。他の実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F、及び 33 F の莢膜多糖体約 2.2 μg 、並びに血清型 1、3、6 B、12 F、19 A、及び 19 F の莢膜多糖体約 4.4 μg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得る。

【0075】

幾つかの実施形態において、ワクチン又は混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F、及び 33 F の莢膜多糖体約 2 μg ~ 約 2.5 μg 、血清型 1、3、6 B、12 F、19 A、及び 19 F の莢膜多糖体約 4 μg ~ 約 5 μg 、TT 約 5 μg ~ 約 15 μg 、CRM 197 約 50 μg ~ 約 60 μg 、並びに任意選択で、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.1 mg ~ 約 0.2 mg を含有するように配合された単回 0.5 mL 用量であり得る。或る特定の実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物又は該組成物を含むワクチンは、賦形剤として塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を更に含む。

【0076】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 1 及び 3 の肺炎球菌莢膜多糖体がそれぞれ、TT にコンジュゲートされ、血清型 4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の莢膜多糖体が、CRM 197 にコンジュゲートされる液体製剤へと配合され得る。或る実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、約 4.4 μg の 6 B を除く各多糖体約 2.2 μg 、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 3 のみに関して）約 10 μg ~ 約 15 μg 及び CRM 197 担体タンパク質約 50 μg ~ 約 60 μg 、アジュバントとしての元素アルミニウム 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。別の実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、約 4.0 μg の 6 B を除く各多糖体約 2.0 μg 、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 3 のみに関して）約 10 μg ~ 約 15 μg 及び CRM 197 担体タンパク質約 50 μg ~ 約 60 μg 、アジュバントとしての元素アルミニウム 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 1 及び 3 の肺炎球菌莢膜多糖体がそれぞれ、TT にコンジュゲートされ、血清型 4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の莢膜多糖体が、CRM₁₉₇ にコンジュゲートされる液体製剤へと配合され得る。或る実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F、及び 33 F の莢膜多糖体約 2.2 µg、血清型 1、3、6 B、12 F、19 A、及び 19 F の莢膜多糖体約 4.4 µg、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 3 のみに関して）約 10 µg ~ 約 15 µg 及び CRM₁₉₇ 担体タンパク質約 50 µg ~ 約 60 µg、アジュバントとしての元素アルミニウム 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。別の実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F、及び 33 F の莢膜多糖体約 2.0 µg、血清型 1、3、6 B、12 F、19 A、及び 19 F の莢膜多糖体約 4.0 µg、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 3 のみに関して）約 10 µg ~ 約 15 µg 及び CRM₁₉₇ 担体タンパク質約 50 µg ~ 約 60 µg、アジュバントとしての元素アルミニウム 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。

10

20

【 0 0 7 8 】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 1 及び 5 の肺炎球菌莢膜多糖体がそれぞれ、TT にコンジュゲートされ、血清型 3、4、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の莢膜多糖体が、CRM₁₉₇ にコンジュゲートされる液体製剤へと配合され得る。或る実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、約 4.4 µg の 6 B を除く各多糖体約 2.2 µg、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 5 のみに関して）約 5 µg ~ 約 10 µg 及び CRM₁₉₇ 担体タンパク質約 50 µg ~ 約 60 µg、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。別の実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、約 4.0 µg の 6 B を除く各多糖体約 2.0 µg、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 5 のみに関して）約 5 µg ~ 約 10 µg 及び CRM₁₉₇ 担体タンパク質約 50 µg ~ 約 60 µg、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。

30

【 0 0 7 9 】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 1 及び 5 の肺炎球菌莢膜多糖体がそれぞれ、TT にコンジュゲートされ、血清型 3、4、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F 由来の莢膜多糖体が、CRM₁₉₇ にコンジュゲートされる液体製剤へと配合され得る。或る実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F、及び 33 F の莢膜多糖体約 2.2 µg、血清型 1、3、6 B、12 F、19 A、及び 19 F の莢膜多糖体約 4.4 µg、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 5 のみに関して）約 5 µg ~ 約 10 µg 及び CRM₁₉₇ 担体タンパク質約 50 µg ~ 約 60 µg、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。別の実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、血清型 4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、14、15 B、18 C、22 F、23 F

40

50

、及び 33F の莢膜多糖体約 2.0 μg 、血清型 1、3、6B、12F、19A、及び 19F の莢膜多糖体約 4.0 μg 、TT 担体タンパク質（血清型 1 及び 5 のみに関して）約 5 μg ~ 約 10 μg 及び CRM 197 担体タンパク質約 50 μg ~ 約 60 μg 、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。

【0080】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 3 及び 5 の肺炎球菌莢膜多糖体がそれぞれ、TT にコンジュゲートされ、血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、及び 33F 由来の莢膜多糖体が、CRM 197 にコンジュゲートされる液体製剤へと配合され得る。或る実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、約 4.4 μg の 6B を除く各糖類約 2.2 μg 、TT 担体タンパク質（血清型 3 及び 5 のみに関して）約 10 μg ~ 約 15 μg 及び CRM 197 担体タンパク質約 50 μg ~ 約 60 μg 、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。別の実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、約 4.0 μg の 6B を除く各糖類約 2.0 μg 、TT 担体タンパク質（血清型 3 及び 5 のみに関して）約 10 μg ~ 約 15 μg 及び CRM 197 担体タンパク質約 50 μg ~ 約 60 μg 、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。

【0081】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、血清型 3 及び 5 の肺炎球菌莢膜多糖体がそれぞれ、TT にコンジュゲートされ、血清型 1、4、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F、及び 33F 由来の莢膜多糖体が、CRM 197 にコンジュゲートされる液体製剤へと配合され得る。或る実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、血清型 4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、14、15B、18C、22F、23F、及び 33F の莢膜多糖体約 2.2 μg 、血清型 1、3、6B、12F、19A、及び 19F の莢膜多糖体約 4.4 μg 、TT 担体タンパク質（血清型 3 及び 5 のみに関して）約 10 μg ~ 約 15 μg 及び CRM 197 担体タンパク質約 50 μg ~ 約 60 μg 、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。別の実施形態において、0.5 mL 用量はそれぞれ、血清型 4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、14、15B、18C、22F、23F、及び 33F の莢膜多糖体約 2.0 μg 、血清型 1、3、6B、12F、19A、及び 19F の莢膜多糖体約 4.0 μg 、TT 担体タンパク質（血清型 3 及び 5 のみに関して）約 10 μg ~ 約 15 μg 及び CRM 197 担体タンパク質約 50 μg ~ 約 60 μg 、アジュバントとしての元素アルミニウム約 0.125 mg（リン酸アルミニウム 0.5 mg）、並びに賦形剤としての塩化ナトリウム及びコハク酸ナトリウム緩衝液を含有する液体へと配合され得る。

【0082】

幾つかの実施形態において、液体製剤は、防腐剤を用いずに単回用量シリンジへ充填され得る。振盪後、液体製剤は、筋内投与の準備が整った均質な白色懸濁液であるワクチンとなる。

【0083】

混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、単回注射で、又は一連の免疫付与の一部として投与することができる。例えば、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月、若しくは 6 ヶ月間隔又はそれらの組

合せ等の適切に空けられた間隔で、2回、3回、4回、又はそれ以上の回数で投与することができる。幾つかの実施形態において、混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、例えば、約2ヵ月齢、3ヵ月齢、4ヵ月齢、及び12ヵ月齢～15ヵ月齢；約3ヵ月齢、4ヵ月齢、5ヵ月齢、及び12ヵ月齢～15ヵ月齢；又は約2ヵ月齢、4ヵ月齢、6ヵ月齢、及び12ヵ月齢～15ヵ月齢を含む、生後の最初の15ヵ月以内に4回、乳幼児に投与される。この最初の用量は、早ければ6週齢で投与することができる。別の実施形態において、混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、例えば約2ヵ月齢、4ヵ月齢、及び11ヵ月齢～12ヵ月齢を含む、生後の最初の15ヵ月以内に3回、乳幼児に投与される。

【0084】

混合担体の多価肺炎球菌コンジュゲート組成物はまた、ストレプトコッカス・ニューモニエ由来の1つ以上のタンパク質を含み得る。含むのに適したストレプトコッカス・ニューモニエタンパク質の例として、国際公開第02/083855号において同定されるもの、及び国際公開第02/053761号に記載されるものが挙げられる。

【0085】

混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、非経口、経皮、又は経粘膜、鼻腔内、筋内、腹腔内、皮内、静脈内、又は皮下経路等の当業者に既知の1つ以上の投与経路を介して、対象に投与することができ、それに応じて配合することができる。混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、その意図される投与経路に適合するように配合され得る。

【0086】

幾つかの実施形態において、混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、筋内、腹腔内、皮下、静脈内、動脈内、若しくは経皮注射又は呼吸器粘膜注射によって、液体製剤として投与することができる。混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、液体形態で、又は凍結乾燥形態で配合され得る。幾つかの実施形態において、注射可能な組成物は、従来の形態で、液体溶液又は懸濁液のいずれかとして、注射前の液体中の溶解若しくは懸濁に適した固体形態として、又はエマルジョンとして作製される。幾つかの実施形態において、注射溶液及び懸濁液は、滅菌粉末又は顆粒から作製される。これらの経路による投与用の医薬品の配合及び製造における概論は、例えば、引用することにより本明細書の一部をなすRemington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に見出され得る。目下のところ、経口若しくは鼻腔スプレー又はエアロゾル経路（例えば、吸入による）は、治療薬を肺及び呼吸器系に直接送達するのに最も一般的に使用される。幾つかの実施形態において、混合担体の20価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、定量投与量の組成物を送達するデバイスを使用して投与される。本明細書中に記載する皮内医薬組成物を送達する際にの使用に適したデバイスとして、米国特許第4,886,499号、米国特許第5,190,521号、米国特許第5,328,483号、米国特許第5,527,288号、米国特許第4,270,537号、米国特許第5,015,235号、米国特許第5,141,496号、米国特許第5,417,662号（引用することによりそれらの全てが本明細書の一部をなす）に記載されるもの等のショートニードルデバイスが挙げられる。皮内組成物はまた、引用することにより本明細書の一部をなす国際公開第1999/34850号に記載されるもの及びそれらの機能性等価体等の、皮膚への針の有効な侵入長を制限するデバイスによって投与され得る。また、液体ジェット式注射器により、又は角質層を貫通して、真皮に達するジェットを生じる針により、液体ワクチンを真皮へ送達するジェット式注射デバイスも適している。ジェット式注射デバイスは、例えば、米国特許第5,480,381号、米国特許第5,599,302号、米国特許第5,334,144号、米国特許第5,993,412号、米国特許第5,649,912号、米国特許第5,569,189号、米国特許第5,704,911号、米国特許第5,383,851号、米国特許第5,893,397号、米国特許第5,466,220号、米国特許第5,339,163号、米国特許第5,312,335号、米国特許第5,503,627号、米国特許第5,064,413号

10

20

30

40

50

、米国特許第 5, 520, 639 号、米国特許第 4, 596, 556 号、米国特許第 4, 790, 824 号、米国特許第 4, 941, 880 号、米国特許第 4, 940, 460 号、国際公開第 1997/37705 号及び国際公開第 1997/13537 号（引用することによりそれらの全てが本明細書の一部をなす）に記載されている。また、圧縮ガスを使用して、粉末形態のワクチンを、皮膚の外層を通して真皮へと加速させるパリスティック粉末／粒子送達デバイスも適切である。さらに、従来型のシリンジは、皮内投与の古典的なマントゥー法において使用され得る。

【0087】

非経口投与用の調製物として、滅菌水性又は非水性の溶液、懸濁液及びエマルジョンが挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の油、及びオレイン酸エチル等の注射可能な有機エステルである。油の例として、植物油又は動物油、落花生油、大豆油、オリーブ油、ヒマワリ油、肝油、魚油（marine oil）等の合成油、及び牛乳又は卵から得られる脂質が挙げられる。水性担体として、水、生理食塩水及び緩衝媒質を含むアルコール性／水性の溶液、エマルジョン又は懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとして、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、又は固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとして、流体及び栄養補液、電解質補液（リンゲルのデキストロースに基づくもの等）等が挙げられる。例えば、抗菌薬、酸化防止剤、キレート剤及び不活性ガス等の防腐剤及び他の添加剤もまた、存在し得る。

【0088】

混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、単位用量バイアル、複数回用量バイアル、又はプレフィルドシリンジの形態で配合され得る。液体製剤用の薬学的に許容可能な担体として、水性若しくは非水性の溶媒、懸濁液、エマルジョン又は油が挙げられる。組成物は、等張性、高張性又は低張性であり得る。しかしながら、注入又は注射用の組成物は、基本的に等張性であることが望ましい。したがって、等張性又は高張性は、組成物の保管に好適であり得る。組成物が高張性である場合、組成物は、投与前に等張性へと希釈することができる。等張化剤は、塩等のイオン性等張化剤又は炭水化物等の非イオン性等張化剤であり得る。イオン性等張化剤として、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウム、及び塩化マグネシウムが挙げられるが、これらに限定されない。非イオン性等張化剤として、ソルビトール及びグリセロールが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、少なくとも 1 つの薬学的に許容可能な緩衝液が含まれる。例えば、組成物が、注入又は注射用である場合、pH 4 ~ pH 10、例えば pH 5 ~ pH 9、又は pH 6 ~ pH 8 で緩衝能を有する緩衝液中で配合されることが好適である。緩衝液は、米国薬局方（USP）に適したもののから選択され得る。例えば、緩衝液は、酢酸、安息香酸、グルコン酸、グリセリン酸及び乳酸等の一塩基酸；アコニット酸、アジピン酸、アスコルビン酸、炭酸、グルタミン酸、リンゴ酸、コハク酸及び酒石酸等の二塩基酸；クエン酸及びリン酸等の多塩基酸；並びにアンモニア、ジエタノールアミン、グリシン、トリエタノールアミン、及び TRIS 等の塩基からなる群から選択することができる。

【0089】

混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、界面活性剤を含んでもよい。界面活性剤の例として、ポリオキシエチレンソルビタンエステル（一般的に、Tween と称される）、特に、ポリソルベート 20 及びポリソルベート 80；エチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）、ブチレンオキシド（BO）の共重合体（DOWFAX 等）；エトキシ（オキシ - 1, 2 - エタンジール）基の種々の反復を伴うオクトキシノール、特にオクトキシノール - 9（Triton - 100）；エチルフェノキシポリエトキシエタノール（IGEPALECA - 630 / NP - 40）；レシチン等のリン脂質；TERGITOL NP シリーズ等のノニルフェノールエトキシレート；ラウリル、セチル、ステアリル、オレイルアルコール由来のポリオキシエチレン脂肪エーテル（Brij 界面活性剤）、特にトリエチレングリコールモノラウリルエーテル（Brij 30）；SPAN として知られているソルビタンエーテル、特にソルビタントリオレート（Span

85) 及びソルビタンモノラウレートが挙げられるが、これらに限定されない。

【0090】

Tween 80 / Span 85 等の界面活性剤の混合物を使用することができる。Tween 80 等のポリオキシエチレンソルビタンエステル及び Triton X-100 等のオクトキシノールの組合せもまた適切である。Laureth 9 及び Tween 及び / 又はオクトキシノールの組合せもまた好適である。好ましくは、含まれるポリオキシエチレンソルビタンエステル (Tween 80 等) の量は、0.01% (w/v) ~ 1% (w/v)、0.01% (w/v) ~ 0.1% (w/v)、0.01% (w/v) ~ 0.05% (w/v)、又は約 0.02% であってもよく、含まれるオクチルフェノキシポリオキシエタノール又はノニルフェノキシポリオキシエタノール (Triton X-100 等) の量は、0.001% (w/v) ~ 0.1% (w/v)、特に 0.005% ~ 0.02% であってもよく、含まれるポリオキシエチレンエーテル (Laureth 9 等) の量は、0.1% (w/v) ~ 20% (w/v)、場合によっては 0.1% ~ 10%、特に 0.1% ~ 1% 又は約 0.5% であってもよい。

10

【0091】

幾つかの実施形態において、混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、放出制御系により送達されてもよい。例えば、静脈内注入、経皮膚パッチ、リポソーム、又は他の経路を投与に使用することができる。1つの態様において、ミクロスフェア等の巨大分子又はインプラントを使用することができる。

20

【0092】

上述の開示は、本発明を一般的に記載している。より完全な理解は、下記の特定の実施例を参照することによって得ることができる。これらの実施例は、単に説明の目的で記載されており、本発明の範囲を限定するものと意図されない。

【実施例】

【0093】

実施例 1. S. ニューモニエ英膜多糖体の作製

S. ニューモニエの培養及び英膜多糖体の精製は、当業者に既知であるように実施した。S. ニューモニエ血清型は、American Type Culture Collection (ATCC) から入手した (血清型 1: ATCC 番号 6301、血清型 3: ATCC 番号 6303、血清型 4: ATCC 番号 6304; 血清型 5: ATCC 番号 6305; 血清型 6A: ATCC 番号 6306; 血清型 6B: ATCC 番号 6326; 血清型 7F: ATCC 番号 10351; 血清型 9V: ATCC 番号 10368; 血清型 12F: ATCC 番号 6312; 血清型 14: ATCC 番号 6314; 血清型 18C: ATCC 番号 10356; 血清型 19A: ATCC 番号 10357; 血清型 19F: ATCC 番号 6319; 血清型 22F: ATCC 番号 6322; 血清型 23F: ATCC 番号 6323; 血清型 33F: ATCC 番号 10370)。血清型 8、10A、11A、及び 15B については、社内の株を使用した。S. ニューモニエは、英膜及び非運動性、グラム陽性のランセット型双球菌、及び血液寒天培地におけるアルファ溶血を特徴とした。血清型は、特異的な抗血清を使用して膨化試験によって同定された (米国特許第 5,847,112 号)。

30

【0094】

細胞バンクの作製

株を増殖させて、動物起源の構成成分を除去するために、数世代の種ストックを生成した (世代 F1、F2、及び F3)。2つの更なる世代の種ストックを生産した。第1の更なる世代は、F3 バイアルから培養し、続く世代は、第1の更なる世代のバイアルから培養した。種バイアルは、凍結保存料として合成グリセロールを用いて凍結保管した (-70 未満)。細胞バンク作製に関して、培養物は全て、大豆ベースの培地中で成長させた。凍結に先立って、細胞を遠心分離によって濃縮して、使用済みの培地を除去して、細胞ペレットを、凍結保存料 (合成グリセロール等) を含有する新鮮な培地中に再懸濁させた。

40

【0095】

培養及び収集

50

研究中の細胞バンク由来の培養物を、大豆ベースの培地を含有する種ボトルに接種して、培養した。標的光学密度（吸光度）に到達した後、種ボトルを使用して、大豆ベースの培地を含有する発酵槽に接種した。光学密度値が一定に維持され始めたら、培養を終結させた。培養を終結した後、デオキシコール酸ナトリウムを培養物に添加して、細胞を溶解させた。得られた発酵槽の内容物を冷却して、タンパク質沈殿を誘導した。続いて、混合物を遠心分離して、沈殿したタンパク質及び細胞残屑を除去した。

【0096】

精製

遠心分離から得られた溶液を、デプスフィルターに通して濾過して、遠心分離で沈殿されなかったタンパク質及び細胞残屑を除去した。濾液を、100 kDaのMW膜上で濃縮して、10倍容量の25 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）を用いて、濃縮液をダイアフィルトレーションして、試料を得た。試料を濾過して、上清を収集し、そこから、多糖体を沈殿及び濾過した。濾液を、30 kDaの膜上で濃縮して、約10倍容量の三重蒸留水を使用して、濃縮液をダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーションを実施した後、残存した溶液を、0.2 µmのフィルターに通して濾過した。インプロセス管理試験を濾液に対して実施した（外観、残存タンパク質、残存核酸、エンドトキシン、分子量、及び多糖体の総量）。濃縮液を滅菌濾過して、-20 で保管した。

【0097】

実施例2．S．ニューモニエ膜多糖体及び担体タンパク質のコンジュゲートの作製

異なる血清型の多糖体を、下記の異なる経路で活性化した後、担体タンパク質であるCRM197又はTTにコンジュゲートした。具体的には、コンジュゲートは、全ての血清型の英膜多糖体それぞれを、CRM197にコンジュゲートすることによって、また血清型1、3及び5の英膜多糖体それぞれを、TTにコンジュゲートすることによって作製した。活性化プロセスは、各英膜多糖体のサイズを標的分子量へ低減すること、化学的活性化及び限外濾過による緩衝液交換を含む。コンジュゲートを、限外濾過を使用して精製し、最終的に0.2 µmのフィルターに通して濾過した。pH、温度、濃度、及び時間等のプロセスパラメーターは下記の通りであった。

【0098】

（1）活性化プロセス

工程1：加水分解

還元的アミノ化は、ポリマーをコンジュゲートする既知の方法であり、還元的アミノ化において、タンパク質の第一級アミン（-NH₂）基と糖類のアルデヒドとの間で、アミド結合が形成される。しかしながら、S．ニューモニエ多糖体は、いかなるアルデヒド基も有さないため、アルデヒド基を肺炎球菌英膜多糖体に付加する。単糖類のジオール構造は、過ヨウ素酸ナトリウム（NaIO₄）によって酸化されて、アルデヒド基を形成することができる。血清型1、3、4、6A、8、11A、12F、14、15B、18C、22F、及び33F由来の英膜多糖体を、下記の通りに前処理した。

【0099】

血清型1の場合、水酸化ナトリウム（最終塩基濃度0.05 Mで）を英膜多糖体の溶液に添加して、溶液を50 ± 2 でインキュベートした。次に、溶液を、約21 ~ 約25 の範囲の温度に冷却して、最終pHが6.0 ± 0.1になるように、塩酸をそこに添加して、それによって加水分解を停止させた。

【0100】

血清型3、8、11A、及び15Bの場合、塩酸（最終酸濃度0.01 Mで）を英膜多糖体の溶液に添加して、溶液を60 ± 2 でインキュベートした。次に、溶液を、約21 ~ 約25 の範囲の温度に冷却して、最終pHが6.0 ± 0.1になるように、0.1 Mリン酸ナトリウムをそこに添加して、それによって加水分解を停止させた。

【0101】

血清型4の場合、塩酸（最終酸濃度0.1 Mで）を英膜多糖体の溶液に添加して、溶液を45 ± 2 でインキュベートした。次に、溶液を、約21 ~ 約25 の範囲の温度に

10

20

30

40

50

冷却して、最終 pH が 6.0 ± 0.1 になるように、1 M リン酸ナトリウムをそこに添加して、それによって加水分解を停止させた。

【0102】

血清型 6A の場合、氷酢酸（最終酸濃度 0.1 M で）を莢膜多糖体の溶液に添加して、溶液を 60 ± 2 でインキュベートした。次に、溶液を、約 21 ~ 約 25 の範囲の温度に冷却して、最終 pH が 6.0 ± 0.1 になるように、1 M 水酸化ナトリウムをそこに添加した。

【0103】

血清型 12F の場合、塩酸（最終酸濃度 0.01 M で）を莢膜多糖体の溶液に添加して、溶液を 70 ± 2 でインキュベートした。次に、溶液を、約 21 ~ 約 25 の範囲の温度に冷却して、溶液の最終 pH が 6.0 ± 0.1 になるように、0.1 M リン酸ナトリウムをそこに添加して、それによって加水分解を停止させた。

【0104】

血清型 14 及び 18C の場合、氷酢酸（最終酸濃度 0.2 M で）を莢膜多糖体の溶液に添加して、溶液を約 91 ~ 96 でインキュベートした。次に、溶液を、約 21 ~ 約 25 の範囲の温度に冷却して、溶液の最終 pH が 6.0 ± 0.1 になるように、1 M リン酸ナトリウムをそこに添加した。

【0105】

血清型 22F 及び 33F の場合、塩酸（最終酸濃度 0.01 M で）を莢膜多糖体の溶液に添加して、溶液を 60 ± 2 でインキュベートした。次に、溶液を、約 21 ~ 約 25 の範囲の温度に冷却して、最終 pH が 6.0 ± 0.1 になるように、0.1 M リン酸ナトリウムをそこに添加して、それによって加水分解を停止させた。

【0106】

得られた莢膜多糖体をそれぞれ、最終濃度が約 1.0 mg/mL ~ 約 2.0 mg/mL になるように、注射用水（WFI）、酢酸ナトリウム、及びリン酸ナトリウム中に希釈した。

【0107】

工程 2：過ヨウ素酸塩反応

各肺炎球菌糖類活性化に対してモル当量の過ヨウ素酸ナトリウムを、総糖類含有量を使用して決定した。完璧に混合して、酸化反応を、1、7F 及び 19F を除く全ての血清型に関して 21 ~ 25 で 16 時間 ~ 20 時間進行させ、1、7F 及び 19F に関しては、温度は、10 以下にした。コンジュゲーションプロセス中、適切なレベルでアルデヒド濃度を維持することによって、コンジュゲートの一貫した、かつ安定な生産が行われる。アルデヒドの生産度は、生産されるアルデヒドの濃度と、糖類の濃度との間の比によって決定され、この度合いは、表 2 及び表 3 に示すように、各血清型に関して設定される酸化度（Do）に関連する。

【0108】

【表 2】

表 2. CRM₁₉₇ にコンジュゲートされる全ての血清型に関する Do の範囲

血清型	Do の範囲	血清型	Do の範囲
血清型 1	4~10	血清型 11A	1~15
血清型 3	2~8	血清型 12F	1~9
血清型 4	1~5	血清型 14	6~13
血清型 5	2~6	血清型 15B	1~17
血清型 6A	5~15	血清型 18C	6~14
血清型 6B	7~13	血清型 19A	7~13
血清型 7F	2~8	血清型 19F	6~12
血清型 8	1~17	血清型 22F	1~16
血清型 9V	4~9	血清型 23F	6~14
血清型 10A	1~12	血清型 33F	1~15

【0109】

【表 3】

表 3. T T にコンジュゲートされる血清型 1、3 及び 5 に関する D o の範囲

血清型	D o の範囲
血清型 1	1~15
血清型 3	2~14
血清型 5	1~15

【0 1 1 0】

工程 3：限外濾過

酸化した糖類を濃縮して、1 0 0 k D a M W C O 限外濾過膜（血清型 1 に関しては 3 0 k D a の限外濾過膜及び血清型 1 8 C に関しては 5 k D a の限外濾過膜）上で、W F I を用いてダイアフィルトレーションした。血清型 1 に関しては 0 . 9 % 塩化ナトリウム溶液、血清型 7 F 及び 2 3 F に関しては 0 . 0 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液（p H 4 . 5 ）、並びに血液型 1 9 F に関しては 0 . 0 1 M リン酸ナトリウム緩衝液（p H 6 . 0 ）を使用して、ダイアフィルトレーションを実施した。透過液を廃棄して、残余分を、0 . 2 μ m のフィルターに通して濾過した。

10

【0 1 1 1】

工程 4：凍結乾燥

担体タンパク質にコンジュゲートされる血清型 3、4、5、8、9 V、1 0 A、1 4、1 5 B、2 2 F、及び 3 3 F の莢膜多糖体に関して、水性溶媒を使用することによって、多糖体及び担体タンパク質の混合溶液を、スクロースを添加せずに作製して、凍結乾燥させた後、- 2 5 ± 5 で保管した。

20

【0 1 1 2】

担体タンパク質にコンジュゲートされる血清型 1 及び 1 8 C の莢膜多糖体に関して、水性溶媒を使用することによって、多糖体及び担体タンパク質を、スクロースを添加せずに独立して作製して、凍結乾燥させた後、- 2 5 ± 5 で保管した。

【0 1 1 3】

担体タンパク質にコンジュゲートされる血清型 6 A、6 B、7 F、1 9 A、1 9 F、及び 2 3 F の莢膜多糖体に関して、D M S O 溶媒を使用することによって、最終スクロース濃度 5 % ± 3 % に達する既定量のスクロースを、活性化した糖類に添加して、試料を、独立して作製して、凍結乾燥させた後、- 2 5 ± 5 で保管した。

30

【0 1 1 4】

血清型 1 1 A の莢膜多糖体に関して、最終スクロース濃度 2 0 % ± 5 % に達する既定量のスクロースを、活性化した糖類に添加して、多糖体及び担体タンパク質を、別個に調製して、凍結乾燥させた後、- 2 5 ± 5 で保管した。

【0 1 1 5】

血清型 1 2 F の莢膜多糖体に関して、最終スクロース濃度 1 0 % ± 5 % に達する既定量のスクロースを、活性化した糖類に添加して、多糖体及び担体タンパク質を、別個に調製して、凍結乾燥させた後、- 2 5 ± 5 で保管した。

【0 1 1 6】

(2) コンジュゲーションプロセス

水性コンジュゲーションは、血清型 1、3、4、5、8、9 V、1 0 A、1 4、1 5 B、1 8 C、2 2 F、及び 3 3 F に関して行われ、D M S O コンジュゲーションは、血清型 6 A、6 B、7 F、1 1 A、1 2 F、1 9 A、1 9 F、及び 2 3 F に関して行われた。莢膜多糖体はそれぞれ、0 . 2 ~ 2 : 1 の比で、担体タンパク質にコンジュゲートされた。

40

【0 1 1 7】

工程 1：溶解

水性コンジュゲーション

血清型 1、3、4、5、8、9 V、1 0 A、1 4、1 5 B、1 8 C、2 2 F、及び 3 3 F に関して、凍結乾燥した試料を、解凍して、室温で平衡化した。凍結乾燥した試料は、各

50

血清型に関して設定された比で、 23 ± 2 で、リン酸ナトリウム緩衝液溶液を使用することによって、反応濃度に再構成させた。

【0118】

ジメチルスルホキシド (DMSO) コンジュゲーション

血清型 6 A、6 B、7 F、11 A、12 F、19 A、19 F、及び 23 F に関して、凍結乾燥した試料を解凍して、室温で平衡化して、DMSO 中に再構成させた。

【0119】

工程 2：コンジュゲーション反応

水性コンジュゲーション

血清型 1、3、4、5、8、9 V、10 A、14、15 B、18 C、22 F、及び 33 F に関して、コンジュゲーション反応は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液 (100 mg/mL) を、糖類 1 モルにつき $1.0 \text{ モル} \sim 1.4 \text{ モル}$ のシアノ水素化ホウ素ナトリウムになるように添加することによって開始した。しかしながら、血清型 1 及び 3 に関しては、反応は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を、糖類 1 モルにつき 0.5 モル のシアノ水素化ホウ素ナトリウムになるように添加することによって開始した。

10

【0120】

TT にコンジュゲートされる血清型 1、3 及び 5 に関して、コンジュゲーション反応は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液 (100 mg/mL) を、糖類 1 モルにつき $1.0 \text{ モル} \sim 1.4 \text{ モル}$ のシアノ水素化ホウ素ナトリウムになるように添加することによって開始したが、但し、糖類 1 モルにつき 0.5 モル のシアノ水素化ホウ素ナトリウムになるように添加する血清型 1 を除く。

20

【0121】

反応混合物は、 $23 \sim 37$ で、44 時間 ~ 106 時間インキュベートした。反応温度及び時間は、血清型によって調節した。次に、温度を 23 ± 2 に低減して、塩化ナトリウム 0.9% を反応器に添加した。水素化ホウ素ナトリウム溶液 (100 mg/mL) を、糖類 1 モルにつき $1.8 \text{ モル当量} \sim 2.2 \text{ モル当量}$ の水素化ホウ素ナトリウムを達成するように添加した。混合物は、 23 ± 2 で、3 時間 ~ 6 時間インキュベートした。この手順により、糖類上に存在する任意の未反応アルデヒドが低減された。続いて、混合物を塩化ナトリウム 0.9% で希釈して、希釈したコンジュゲーション混合物を、 $0.8 \mu\text{m}$ 又は $0.45 \mu\text{m}$ のプレフィルターを使用して濾過した。

30

【0122】

DMSO コンジュゲーション

血清型 6 A、6 B、7 F、11 A、12 F、19 A、19 F、及び 23 F の莢膜多糖体に関して、コンジュゲーション反応は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液 (100 mg/mL) を、活性化した糖類 1 モルにつき $0.8 \text{ モル当量} \sim 1.2 \text{ モル当量}$ のシアノ水素化ホウ素ナトリウムの比になるように添加することによって開始した。WFI を、標的濃度 $1\% (v/v)$ になるように反応混合物に添加して、混合物を、 23 ± 2 で 12 時間 ~ 26 時間インキュベートした。 100 mg/mL の水素化ホウ素ナトリウム溶液 (通常、活性化した糖類 1 モルにつき $1.8 \text{ モル当量} \sim 2.2 \text{ モル当量}$ の水素化ホウ素ナトリウム) 及び WFI (標的 $5\% v/v$) を反応物に添加して、混合物を、 23 ± 2 で 3 時間 ~ 6 時間インキュベートした。この手順により、糖類上に存在する任意の未反応アルデヒドが低減された。続いて、反応混合物を塩化ナトリウム 0.9% で希釈して、希釈したコンジュゲーション混合物を、 $0.8 \mu\text{m}$ 又は $0.45 \mu\text{m}$ のプレフィルターを使用して濾過した。

40

【0123】

工程 3：限外濾過

希釈したコンジュゲート混合物を濃縮して、最低 15 倍容量の 0.9% 塩化ナトリウム又は緩衝液を用いて、 100 kDa の MWCO 限外濾過フィルター又は 300 kDa の MWCO 限外濾過フィルター上でダイアフィルトレーションした。また、プロセスで使用する緩衝液のタイプ及び pH は、血清型それぞれに応じて多様であった。

50

【 0 1 2 4 】

工程 4 : 滅菌濾過

限外濾過後の残余分を滅菌濾過して (0 . 2 μ m)、インプロセス管理 (外観、遊離タンパク質、遊離糖類、分子サイズ分布、滅菌性、糖類含有量、タンパク質含有量、pH、エンドトキシン、残留シアン化物、残留 DMSO、糖類アイデンティティ (identity : 同一性)、TT アイデンティティ、及び CRM 197 アイデンティティ) を、濾過したコンジュゲートに対して実施した。最終濃縮液を冷蔵して、2 ~ 8 で保管した。

【 0 1 2 5 】

実施例 3 . 多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの配合

実施例 2 から得られる最終的なバルク濃縮液の望ましい容量は、バッチ容量及びバルク糖類濃度に基づいて算出した。0 . 8 5 % 塩化ナトリウム (生理食塩水)、ポリソルベート 80、及びコハク酸塩緩衝液を、予めラベルをした配合容器に添加した後、バルク濃縮液を添加した。次に、調製物を完全に混合して、0 . 2 μ m の膜に通して滅菌濾過した。配合したバルクを、バルクリン酸アルミニウムの添加中及び後に、穏やかに混合した。pH を確認して、必要に応じて調節した。配合したバルク生成物を、2 ~ 8 で保管した。

【 0 1 2 6 】

下記の 3 つのタイプの多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン製剤を作製して、それぞれ、PCV20 - 13 TT、PCV20 - 15 TT、及び PCV20 - 35 TT と名付けた。

【 0 1 2 7 】

PCV20 - 13 TT は、血清型 1 及び 3 の多糖体それぞれを TT に、また血清型 4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F の多糖体それぞれを CRM 197 にコンジュゲートすることによって作製される多糖体 - コンジュゲートを含んでおり、

【 0 1 2 8 】

PCV20 - 15 TT は、血清型 1 及び 5 の多糖体それぞれを TT に、また血清型 3、4、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F の多糖体それぞれを CRM 197 にコンジュゲートすることによって作製される多糖体 - コンジュゲートを含んでおり、

【 0 1 2 9 】

PCV20 - 35 TT は、血清型 3 及び 5 の多糖体それぞれを TT に、また血清型 1、4、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び 33 F の多糖体それぞれを CRM 197 にコンジュゲートすることによって作製される多糖体 - コンジュゲートを含んでいた。

【 0 1 3 0 】

得られた PCV20 - 13 TT 及び PCV20 - 35 TT ワクチン組成物には、総計 0 . 5 ml 用量中に、4 . 4 μ g の血清型 6 B を除く各糖類 2 . 2 μ g、TT (血清型 1、3、及び 5 に関して) 10 μ g ~ 15 μ g 及び CRM 197 50 μ g ~ 60 μ g、アジュバントとしての元素アルミニウム 0 . 125 mg (リン酸アルミニウム 0 . 5 mg)、塩化ナトリウム 4 . 25 mg、コハク酸塩緩衝液溶液約 295 μ g、及びポリソルベート 80 約 100 μ g が含まれた。総用量 0 . 5 ml 中の PCV20 - 15 TT 組成物には、TT (血清型 1 及び 5 に関して) 5 μ g ~ 10 μ g 及び CRM 197 50 μ g ~ 60 μ g が含まれ、それぞれ、他の構成成分及びそれらの含有量は、PCV20 - 13 TT の他の構成成分及びそれらの含有量と同一であった。

【 0 1 3 1 】

実施例 4 : モノコンジュゲート (血清型 8、10 A、11 A、及び 15) の免疫原性

上述するように、本明細書中に記載する混合担体の 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物は、世界市場で現在入手可能な 3 つの肺炎球菌コンジュゲートワクチンの適用外の肺炎球菌血清型を含む。現在入手可能なワクチンの一部ではないこれらの肺炎球菌血清型として、血清型 8、10 A、11 A 及び 15 B が挙げられる。血清型 8、10 A、11 A 及び 15 B のモノコンジュゲートは、実施例 2 に記載するように作製した。これらのモノコンジ

10

20

30

40

50

ュゲートの免疫原性を、*in vivo*で検査した。より具体的には、ウサギ（ニュージ
ーランドホワイト、雌、2 kg ~ 3 kg）をモノコンジュゲートで、0 週及び2 週に免疫
付与した。抗体力価を4 週（28 日目）に測定し、図1 A ~ 図1 Dに示す。図1 A ~ 図1
Dに示すように、血清型8、10、11 A及び15 Bのモノコンジュゲートはそれぞれ、
幾何平均力価（GMT）によって測定されるように、*in vivo*で用量依存性抗体応
答を示した。

【0132】

実施例5．16 価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの免疫原性

PCV16 - 13 TT、PCV16 - 15 TT、及びPCV16 - 35 TTを含む混合担
体の16 価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、実施例3に概説する一般的な方法を使用し
て作製した。対照の混合担体の16 価肺炎球菌組成物も作製し、ストレプトコッカス・ニ
ューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F
、9 V、12 F、14、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F、及び33 F由来の莢
膜多糖体にコンジュゲートされたCRM197（「PCV - CRM197」）を含んでい
た。これらの免疫原性効果は、血清IgG濃度に関しては抗原特異的ELISAによって
、また抗体機能に関してはオプソニン作用アッセイ（opsonophagocytic assay）（OPA）
によって特性化した。計画的なヒト臨床用量よりも5 %高い用量の製剤中の各多糖体
（各多糖体2．31 µg、但し、4．62 µgの6 Bは除く）又はヒト用量（各多糖体2
．2 µg、但し、4．4 µgの6 Bは除く）で、0 週及び3 週にニュージ
ーランドホワイトウサギの筋肉に免疫付与した。免疫付与後の3 週毎に、血清を試料採取した。濃度はと
もに、同じ結果を示した。

【0133】

PCV16 - CRM197、PCV16 - 13 TT、PCV16 - 15 TT、及びPCV
16 - 35 TT組成物に関する血清型特異的な免疫反応は、IgG ELISA及び機能
性抗体を測定する補体媒介性OPAによって評価した。

【0134】

4 - 1．PCV16 - CRM197

血清型特異的なIgG濃度測定

各血清型に関する莢膜多糖体（PnP）を、96 ウェルプレート上で、0．5 µg / ウェ
ル ~ 1 µg / ウェルでコーティングした。等価量の血清を、各対象から試料採取して、群
毎にプールした。血清プールを、Tween 20 及びCWPS 5 µg / mLを含む抗体
希釈緩衝液にて2．5 倍で段階希釈して、続いて、室温で30 分間反応させた。プレート
を洗浄緩衝液で5 回洗浄した後、前吸着させて、希釈した血清50 µlを、コーティング
したウェルプレートに添加して、続いて室温で2 時間 ~ 18 時間インキュベートした。ウ
ェルプレートを同じ方法で洗浄した後、ヤギ抗ウサギIgG - アルカリホスファターゼコ
ンジュゲートを各ウェルに添加して、続いて室温で2 時間インキュベートした。プレート
を上述するように洗浄して、基質として1 mg / mLのp - ニトロフェニルアミン緩衝液
を各ウェルに添加して、続いて室温で2 時間反応させた。3 M NaOH 50 µlを添加
することによって、反応をクエンチして、405 nm及び690 nmでの吸光度を測定し
た。比較例として、市販の13 価ワクチン（PREVNAR13）を同じ手順に付した。
結果を表4に示す。

【0135】

10

20

30

40

【表 4】

表 4. 二次免疫付与の 3 週後の 16 個の血清型に関する I g G 濃度 (U / m L)

血清型	PREVNAR13	PCV16-CRM197	血清型	PREVNAR13	PCV16-CRM197
1	320.99	379.99	12F	-	120.44
3	436.85	653.84	14	482.05	502.6
4	1820.49	1948.29	18C	1731.07	2915.55
5	466.09	380.18	19A	993.68	672.2
6A	1064.69	1643.6	19F	863.32	1054.3
6B	326.94	552.58	22F	1.33	678.45
7F	1010.79	833.11	23F	329.11	185.97
9V	715.40	433.33	33F	4.58	499.3

10

【0136】

PCV16 - CRM197 は、16 個全ての血清型に関して、良好なレベルの血清型特異的な I g G 濃度をもたらすことがわかった。PCV16 - CRM197 に関して、PCV16 - CRM197 及び PREVNAR13 に共通する血清型は、PREVNAR13 の血清型特異的な I g G 濃度に等しいか、又はそれよりも高い血清型特異的な I g G 濃度を示し、また、新たに加えられた血清型 12F、22F、及び 33F それぞれも、良好なレベルの血清型特異的な I g G 濃度を示した。

【0137】

機能性免疫原性試験 (MOPA)

抗体機能は、MOPA アッセイにおいて血清を検査することによって評価した。- 70 以下で保管した S . ニューモニエ MOPA 株を、各株の濃度が、約 50000 CFU / mL になるように、相当する最終希釈倍数に希釈した。等価量の血清を各対象から試料採取して、群毎にプールして、血清 20 µl が U 底プレート中に残るように 2 倍で段階希釈した。試料を希釈した後、各血清型に関して作製された株 10 µl を、希釈した試料と混合して、混合物を室温で 30 分間反応させて、その結果、S . ニューモニエ及び抗体は良好に混合された。予め分化させた HL - 60 細胞及び補体の混合物を添加して、CO₂ インキュベーター (37) 中で 45 分間反応させた。温度を低減させて、食作用を停止させて、反応溶液 10 µl を、30 分 ~ 60 分間予め乾燥させた寒天プレート上にスポッティングして、続いて、乾燥するまで 20 分間、プレート上に吸収させた。25 mg / mL の TTC ストック溶液を、作製したオーバーレイ寒天に添加して、そこに、相当する株に適した抗体を添加した。混合物を完全に混合した後、混合物 約 25 mL をプレート上に添加して、約 30 分間硬化させた。完全に硬化したプレートを、CO₂ インキュベーター (37) 中で 12 時間 ~ 18 時間インキュベートして、続いてコロニーを計数した。MOPA 力価は、50 % 死滅が観察される希釈率として表した。比較例として、市販の 13 価ワクチン (PREVNAR13) を同じ手順に付した。結果を表 5 に示す。

20

30

【0138】

【表 5】

表 5. 二次免疫付与の 3 週後の 16 個の血清型に関する MOPA 力価

血清型	PREVNAR13	PCV16-CRM197	血清型	PREVNAR13	PCV16-CRM197
1	128	128	12F	4	1024
3	512	1024	14	2048	1024
4	2048	2048	18C	1024	2048
5	512	256	19A	4096	2048
6A	4096	4096	19F	2048	2048
6B	4096	4096	22F	16	4096
7F	2048	1024	23F	2048	1024
9V	1024	512	33F	32	1024

40

【0139】

全ての血清型が、PCV16 - CRM197 において、優れたレベルの機能性免疫原性を

50

示した。PCV16 - CRM197に関して、PCV16 - CRM197及びPREVNAR13に共通する血清型は、PREVNAR13の機能性免疫原性に等しいか、又はそれよりも良好な機能性免疫原性を示し、新たに加えられた血清型12F、22F、及び33Fそれぞれも、高レベルの機能性免疫原性を示した。

【0140】

4 - 2 . PCV16 - 13TT

血清型特異的なIgG濃度及び機能性免疫原性力価を、4 - 1と同じように測定したが、但し、PCV16 - 13TTを、PCV16 - CRM197に代わって使用し、結果を下記の通りに示す。

【0141】

血清型特異的なIgG濃度測定

【0142】

【表6】

表6. 二次免疫付与の3週後の16個の血清型に関するIgG濃度 (U/mL)

血清型	PREVNAR13	PCV16-13TT	血清型	PREVNAR13	PCV16-13TT
1	276.92	844.48	12F	0.37	354.00
3	539.40	2980.73	14	254.59	582.61
4	1000.76	1698.00	18C	3266.87	5553.58
5	303.20	184.49	19A	681.62	1702.05
6A	533.35	532.02	19F	528.77	1998.83
6B	172.75	451.18	22F	0.74	1583.58
7F	726.27	3449.73	23F	576.63	367.71
9V	647.71	725.14	33F	0.25	977.02

【0143】

血清型1及び3の莢膜多糖体が、TTにコンジュゲートされた場合、それらは、血清型がCRM197にコンジュゲートされた場合に得られる血清型特異的なIgGと比較して、著しく増加したレベルの血清型特異的なIgGを示した。また、CRM197にコンジュゲートされた血清型12F、22F、及び33Fの莢膜多糖体はそれぞれ、十分なレベルの血清型特異的なIgG濃度を示し、血清型4、6B、7F、14、18C、19A、及び19Fは、PREVNAR13よりも高レベルの血清型特異的なIgG濃度を示した。

【0144】

機能性免疫原性試験 (MOPA)

【0145】

【表7】

表7. 二次免疫付与の3週後の16個の血清型に関するMOPA力価

血清型	PREVNAR13	PCV16-13TT	血清型	PREVNAR13	PCV16-13TT
1	102	645	12F	4	1625
3	813	3251	14	2048	4096
4	2580	3251	18C	4096	4096
5	813	406	19A	2580	5161
6A	4096	4096	19F	2048	5161
6B	4096	6502	22F	8	5161
7F	2580	6502	23F	4096	3251
9V	2048	3251	33F	4	3251

【0146】

血清型1及び3の莢膜多糖体が、TTにコンジュゲートされた場合、機能性免疫原性は、それらがCRM197にコンジュゲートされた場合に得られる機能性免疫原性と比較して改善された。また、CRM197にコンジュゲートされた血清型12F、22F、及び33Fの莢膜多糖体はそれぞれ、優れた機能性免疫原性を示し、血清型4、6B、7F、9V、14、19A、及び19Fの莢膜多糖体はそれぞれ、PREVNAR13よりも良好

な機能性免疫原性を示した。

【 0 1 4 7 】

4 - 3 . P C V 1 6 - 1 5 T T

血清型特異的な I g G 濃度及び機能性免疫原性力価を、4 - 1 と同じように測定したが、但し、P C V 1 6 - 1 5 T T を、P C V 1 6 - C R M 1 9 7 に代わって使用し、結果を下記の通りに示す。

【 0 1 4 8 】

血清型特異的な I g G 濃度測定

【 0 1 4 9 】

【表 8】

表 8 . 二次免疫付与の 3 週後の 1 6 個の血清型に関する I g G 濃度 (U / m L)

血清型	PREVNAR13	PCV16-15TT	血清型	PREVNAR13	PCV16-15TT
1	276.92	1083.23	12F	0.37	303.99
3	539.40	901.37	14	254.59	493.06
4	1000.76	2655.28	18C	3266.87	4075.62
5	303.20	2645.56	19A	681.62	937.41
6A	533.35	1460.65	19F	528.77	1355.08
6B	172.75	603.87	22F	0.74	1874.55
7F	726.27	2285.92	23F	576.63	607.40
9V	647.71	663.37	33F	0.25	880.54

【 0 1 5 0 】

血清型 1 及び 5 の莢膜多糖体が、T T にコンジュゲートされた場合、血清型特異的な I g G 濃度は、それらが C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた場合に得られる血清型特異的な I g G 濃度と比較して、著しく増加された。また、C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた血清型 1 2 F、2 2 F、及び 3 3 F の莢膜多糖体はそれぞれ、高レベルの血清型特異的な I g G 濃度を示し、血清型 3、4、6 A、6 B、7 F、1 4、1 8 C、1 9 A、及び 1 9 F の莢膜多糖体はそれぞれ、P R E V N A R 1 3 よりも高レベルの血清型特異的な I g G 濃度を示した。

【 0 1 5 1 】

機能性免疫原性試験 (M O P A)

【 0 1 5 2 】

【表 9】

表 9 . 二次免疫付与の 3 週後の 1 6 個の血清型に関する M O P A 力価

血清型	PREVNAR13	PCV16-15TT	血清型	PREVNAR13	PCV16-15TT
1	102	645	12F	4	1290
3	813	1290	14	2048	2580
4	2580	4096	18C	4096	3251
5	813	4096	19A	2580	2580
6A	4096	6502	19F	2048	4096
6B	4096	6502	22F	8	6502
7F	2580	4096	23F	4096	3251
9V	2048	1290	33F	4	2580

【 0 1 5 3 】

血清型 1 及び 5 の莢膜多糖体が、T T にコンジュゲートされた場合、機能性免疫原性は、それらが C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた場合に得られる機能性免疫原性と比較して改善された。また、C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた血清型 1 2 F、2 2 F、及び 3 3 F の莢膜多糖体はそれぞれ、優れた機能性免疫原性を示し、血清型 3、4、6 A、6 B、7 F、及び 1 9 F の莢膜多糖体はそれぞれ、P R E V N A R 1 3 よりも高レベルの機能性免疫原性を示した。

【 0 1 5 4 】

4 - 4 . P C V 1 6 - 3 5 T T

血清型特異的な I g G 濃度及び機能性免疫原性力価を、4 - 1 と同じように測定したが、但し、P C V 1 6 - 3 5 T T を、P C V 1 6 - C R M 1 9 7 に代わって使用し、結果を下記の通りに示す。

【 0 1 5 5 】

血清型特異的な I g G 濃度測定

【 0 1 5 6 】

【表 1 0】

表 1 0 . 二次免疫付与の 3 週後の 1 6 個の血清型に関する I g G 濃度 (U / m L)

血清型	PREVNAR13	PCV16-35TT	血清型	PREVNAR13	PCV16-35TT
1	242.33	367.13	12F	0.25	334.45
3	656.91	1837.36	14	320.12	1055.422
4	1305.61	1786.84	18C	2920.75	3665.59
5	408.78	1316.12	19A	652.67	409.17
6A	737.55	957.85	19F	411.07	534.19
6B	167.41	322.61	22F	1.15	1176.6
7F	808.75	1357.46	23F	742.55	408.88
9V	775.28	966.22	33F	0.25	855.55

10

【 0 1 5 7 】

血清型 3 及び 5 の莢膜多糖体が、T T にコンジュゲートされた場合、血清型特異的な I g G 濃度は、それらが C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた場合に得られる血清型特異的な I g G 濃度と比較して、著しく増加された。また、C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた血清型 1 2 F、2 2 F、及び 3 3 F の莢膜多糖体はそれぞれ、良好な血清型特異的な I g G 濃度を有し、血清型 1、4、6 A、6 B、7 F、9 V、1 4、1 8 C、及び 1 9 F の莢膜多糖体はそれぞれ、P R E V N A R 1 3 よりも高レベルの血清型特異的な I g G 濃度を示した。

20

【 0 1 5 8 】

機能性免疫原性試験 (M O P A)

【 0 1 5 9 】

【表 1 1】

表 1 1 . 二次免疫付与の 3 週後の 1 6 個の血清型に関する M O P A 力価

血清型	PREVNAR13	PCV16-35TT	血清型	PREVNAR13	PCV16-35TT
1	128	256	12F	4	512
3	512	2048	14	2048	4096
4	2048	4096	18C	1024	4096
5	512	2048	19A	4096	4096
6A	4096	4096	19F	2048	4096
6B	4096	4096	22F	16	4096
7F	2048	2048	23F	2048	2048
9V	1024	2048	33F	32	2048

30

40

【 0 1 6 0 】

血清型 3 及び 5 が、T T にコンジュゲートされた場合、機能性免疫原性は、それらが C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた場合に得られる機能性免疫原性と比較して改善された。また、C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた血清型 1 2 F、2 2 F、及び 3 3 F の莢膜多糖体はそれぞれ、優れた機能性免疫原性を示し、血清型 1、4、9 V、1 2 F、1 4、1 8 C 及び 1 9 F の莢膜多糖体はそれぞれ、P R E V N A R 1 3 よりも高レベルの機能性免疫原性を示した。

【 0 1 6 1 】

これらの結果は、混合担体の多価肺炎球菌莢膜多糖体コンジュゲート組成物が、単一担体の肺炎球菌莢膜多糖体コンジュゲートワクチンである P R E V N A R 1 3 に等しいか、又

50

はそれよりも良好な免疫原性を誘導することを示す。これらの結果はまた、予期せぬことに、混合担体組成物において破傷風トキソイドにコンジュゲートされた血清型 1、3 及び / 又は 5 に対する抗体応答が、単一担体の P R E V N A R 1 3 ワクチンにおいて C R M 1 9 7 にコンジュゲートされた同じ血清型に対する抗体応答と比較した場合に、著しく増強されたことを示す。さらに、これらの結果は、混合担体の多価肺炎球菌莢膜多糖体コンジュゲート組成物が、加えられた血清型 1 2 F、2 2 F、及び 3 3 F に対する抗体応答を首尾よく誘導し、現在市場に出回っている肺炎球菌莢膜多糖体コンジュゲートワクチンよりも広範囲の血清型防御をもたらすことを示している。

【 0 1 6 2 】

実施例 6 . 2 0 価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの免疫原性

10

P C V 2 0 - 1 3 T T、P C V 2 0 - 1 5 T T、及び P C V 2 0 - 3 5 T T を含む混合担体の 2 0 価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、実施例 3 に概説する一般的な方法を使用して作製した。これらの 2 0 価肺炎球菌コンジュゲート組成物を、ウサギにおいて免疫原性応答を誘導する能力に関して検査した。これらの免疫原性効果は、血清 I g G 濃度に関しては抗原特異的 E L I S A によって、また抗体機能に関してはオプソニン作用アッセイ (o p s o n o p h a g o c y t i c a s s a y) (O P A) によって特性化した。計画的なヒト臨床用量よりも 5 % 高い用量の製剤中の各多糖体 (各多糖体 2 . 3 1 μ g、但し、4 . 6 2 μ g の 6 B は除く) 又はヒト用量 (各多糖体 2 . 2 μ g、但し、4 . 4 μ g の 6 B は除く) で、0 週及び 3 週にニュージーランドホワイトウサギの筋肉に免疫付与した。免疫付与後の 3 週毎に、血清を試料採取した。濃度はともに、同じ結果を示した。

20

【 0 1 6 3 】

P C V 2 0 - 1 3 T T、P C V 2 0 - 1 5 T T、及び P C V 2 0 - 3 5 T T 組成物に関する血清型特異的な免疫反応は、I g G E L I S A 及び機能性抗体を測定する補体媒介性 M O P A によって評価した。

【 0 1 6 4 】

6 - 1 . P C V 2 0 - 3 5 T T

血清型特異的な I g G 濃度測定

各血清型に関する莢膜多糖体 (P n P) を、9 6 ウェルプレート上で、0 . 5 μ g / ウェル ~ 1 μ g / ウェルでコーティングした。等価量の血清を、各対象から試料採取して、群毎にプールした。血清プールを、T w e e n 2 0 及び C W P S 5 μ g / m L を含む抗体希釈緩衝液にて 2 . 5 倍で段階希釈して、続いて、室温で 3 0 分間反応させた。プレートを洗浄緩衝液で 5 回洗浄した後、前吸着させて、希釈した血清 5 0 μ l を、コーティングしたウェルプレートに添加して、続いて室温で 2 時間 ~ 1 8 時間インキュベートした。ウェルプレートを同じ方法で洗浄した後、ヤギ抗ウサギ I g G - アルカリホスファターゼコンジュゲートを各ウェルに添加して、続いて室温で 2 時間インキュベートした。プレートを上述するように洗浄して、基質として 1 m g / m L の p - ニトロフェニルアミン緩衝液を各ウェルに添加して、続いて室温で 2 時間反応させた。3 M N a O H 5 0 μ l を添加することによって、反応をクエンチして、4 0 5 n m 及び 6 9 0 n m での吸光度を測定した。比較例として、市販の 1 3 価ワクチン (P R E V N A R 1 3) を同じ手順に付した。結果を表 1 2 に示す。

30

40

【 0 1 6 5 】

【表 1 2】

表 1 2. 二次免疫付与の 4 週後の 2 0 個の血清型に関する I g G 濃度 (U / m L)

血清型	PREVNAR13	PCV20-35TT	血清型	PREVNAR13	PCV20-35TT
1	8856.5	53170.2	11A	547.7	30690.8
3	5310.1	39965.2	12F	343.9	14071.5
4	8831.8	93626.2	14	15202.0	39933.6
5	3890.0	4241.1	15B	905.6	26347.9
6A	24412.1	13284.2	18C	104985.9	106523.3
6B	7528.5	4120.1	19A	13799.6	8035.9
7F	61054.8	46334.1	19F	19124.3	39824.7
8	591.4	47418.7	22F	201.2	57170.0
9V	20912.3	50598.3	23F	8109.6	9615.9
10A	477.9	39935.5	33F	191.0	35957.0

10

【 0 1 6 6】

PCV20-35TTにおいて、PCV20-35TT及びPREVNAR13に共通する血清型は、PREVNAR13の血清型特異的なIgG濃度に等しいか、又はそれよりも高い血清型特異的なIgG濃度を示し、また、新たに加えられた血清型8、10A、11A、12F、15B、22F、及び33Fそれぞれも、良好なレベルの血清型特異的なIgG濃度を示した。

【 0 1 6 7】

20

機能性免疫原性試験 (MOPA)

抗体機能は、MOPAアッセイにおいて血清を検査することによって評価した。 - 70 以下で保管したS.ニューモニエMOPA株を、各株の濃度が、約50000CFU/mLになるように、相当する最終希釈倍数に希釈した。等価量の血清を各対象から試料採取して、群毎にプールして、血清20μlがU底プレート中に残るように2倍で段階希釈した。試料を希釈した後、各血清型に関して作製された株10μlを、希釈した試料と混合して、混合物を室温で30分間反応させて、その結果、S.ニューモニエ及び抗体は良好に混合された。予め分化させたHL-60細胞及び補体の混合物を添加して、CO₂インキュベーター(37)中で45分間反応させた。温度を低減させて、食作用を停止させて、反応溶液10μlを、30分~60分間予め乾燥させた寒天プレート上にスポッティングして、続いて、乾燥するまで20分間、プレート上に吸収させた。25mg/mLのTTCストック溶液を、作製したオーバーレイ寒天に添加して、そこに、相当する株に適した抗体を添加した。混合物を完全に混合した後、混合物 約25mLをプレート上に添加して、約30分間硬化させた。完全に硬化したプレートを、CO₂インキュベーター(37)中で12時間~18時間インキュベートして、続いてコロニーを計数した。MOPA力価は、50%死滅が観察される希釈率として表した。比較例として、市販の13価ワクチン(PREVNAR13)を同じ手順に付した。結果を表13に示す。

30

【 0 1 6 8】

40

50

【表 1 3】

表 1 3. 二次免疫付与の 4 週後の 2 0 個の血清型に関する M O P A 力価

血清型	PREVNAR13	PCV20-35TT	血清型	PREVNAR13	PCV20-35TT
1	78	236	11A	-	2055
3	758	3360	12F	-	598
4	2389	2725	14	1855	1398
5	372	757	15B	-	956
6A	6375	3099	18C	6549	3904
6B	6798	5000	19A	5131	664
7F	2872	2434	19F	5197	2848
8	-	1705	22F	55	11337
9V	2026	928	23F	2064	1568
10A	-	1472	33F	-	1531

10

【 0 1 6 9】

全ての血清型が、優れたレベルの機能性免疫原性を示した。P C V 2 0 - 3 5 T T において、P C V 2 0 - 3 5 T T 及び P R E V N A R 1 3 に共通する血清型は、P R E V N A R 1 3 の機能性免疫原性に等しいか、又はそれよりも良好な機能性免疫原性を示し、新たに加えられた血清型 8、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 5 B、2 2 F、及び 3 3 F それぞれも、高レベルの機能性免疫原性を示した。

【 0 1 7 0】

20

6 - 2 . P C V 2 0 - 1 3 T T

血清型特異的な I g G 濃度及び機能性免疫原性力価を、6 - 1 と同じように測定したが、但し、P C V 2 0 - 1 3 T T を、P C V 2 0 - 3 5 T T に代わって使用し、結果を下記の通りに示す。

【 0 1 7 1】

血清型特異的な I g G 濃度測定

【 0 1 7 2】

【表 1 4】

表 1 4. 二次免疫付与の 4 週後の 2 0 個の血清型に関する I g G 濃度 (U / m L)

血清型	PREVNAR13	PCV20-13TT	血清型	PREVNAR13	PCV20-13TT
1	8856.5	43835.7	11A	547.7	26830.0
3	5310.1	5251.4	12F	343.9	8849.8
4	8831.8	56988.7	14	15202.0	25402.0
5	3890.0	12600.1	15B	905.6	12057.3
6A	24412.1	19211.1	18C	104985.9	70935.6
6B	7528.5	11142.8	19A	13799.6	12017.3
7F	61054.8	37449.3	19F	19124.3	39708.2
8	591.4	39845.1	22F	201.2	35974.6
9V	20912.3	23632.9	23F	8109.6	9397.4
10A	477.9	21153.0	33F	191.0	33665.6

30

【 0 1 7 3】

P C V 2 0 - 1 3 T T において、P C V 2 0 - 1 3 T T 及び P R E V N A R 1 3 に共通する血清型は、P R E V N A R 1 3 の血清型特異的な I g G 濃度に等しいか、又はそれよりも高い血清型特異的な I g G 濃度を示し、また、新たに加えられた血清型 8、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 5 B、2 2 F、及び 3 3 F それぞれも、良好なレベルの血清型特異的な I g G 濃度を示した。

【 0 1 7 4】

機能性免疫原性試験 (M O P A)

【 0 1 7 5】

40

50

【表 1 5】

表 1 5 . 二次免疫付与の 4 週後の 2 0 個の血清型に関する M O P A 力価

血清型	PREVNAR13	PCV20-13TT	血清型	PREVNAR13	PCV20-13TT
1	78	1519	11A	-	1882
3	758	5989	12F	-	845
4	2389	7520	14	1855	3819
5	372	672	15B	-	879
6A	6375	6154	18C	6549	8139
6B	6798	6112	19A	5131	2072
7F	2872	2358	19F	5197	6146
8	-	2785	22F	55	13123
9V	2026	5282	23F	2064	2131
10A	-	2173	33F	-	1254

10

【 0 1 7 6】

全ての血清型が、優れたレベルの機能性免疫原性を示した。P C V 2 0 - 1 3 T T において、P C V 2 0 - 1 3 T T 及び P R E V N A R 1 3 に共通する血清型は、P R E V N A R 1 3 の機能性免疫原性に等しいか、又はそれよりも良好な機能性免疫原性を示し、新たに加えられた血清型 8、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 5 B、2 2 F、及び 3 3 F それぞれも、高レベルの機能性免疫原性を示した。

【 0 1 7 7】

6 - 3 . P C V 2 0 - 1 5 T T

血清型特異的な I g G 濃度及び機能性免疫原性力価を、6 - 1 と同じように測定したが、但し、P C V 2 0 - 1 5 T T を、P C V 2 0 - 3 5 T T に代わって使用し、結果を下記の通りに示す。

【 0 1 7 8】

血清型特異的な I g G 濃度測定

【 0 1 7 9】

【表 1 6】

表 1 6 . 二次免疫付与の 4 週後の 2 0 個の血清型に関する I g G 濃度 (U / m L)

血清型	PREVNAR13	PCV20-15TT	血清型	PREVNAR13	PCV20-15TT
1	8856.5	15443.5	11A	547.7	23066.5
3	5310.1	26383.7	12F	343.9	9830.6
4	8831.8	15534.5	14	15202.0	11218.9
5	3890.0	9591.5	15B	905.6	6268.9
6A	24412.1	35326.2	18C	104985.9	56224.9
6B	7528.5	10561.9	19A	13799.6	4660.7
7F	61054.8	54145.8	19F	19124.3	25815.4
8	591.4	38313.5	22F	201.2	31025.9
9V	20912.3	34801.5	23F	8109.6	11888.4
10A	477.9	47071.9	33F	191.0	24332.6

30

【 0 1 8 0】

P C V 2 0 - 1 5 T T において、P C V 2 0 - 1 5 T T 及び P R E V N A R 1 3 に共通する血清型は、P R E V N A R 1 3 の血清型特異的な I g G 濃度に等しいか、又はそれよりも高い血清型特異的な I g G 濃度を示し、また、新たに加えられた血清型 8、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 5 B、2 2 F、及び 3 3 F それぞれも、良好なレベルの血清型特異的な I g G 濃度を示した。

【 0 1 8 1】

機能性免疫原性試験 (M O P A)

【 0 1 8 2】

40

50

【表 17】

表 17. 二次免疫付与の 4 週後の 20 個の血清型に関する M O P A 力価

血清型	PREVNAR13	PCV20-15TT	血清型	PREVNAR13	PCV20-15TT
1	78	700	11A	-	1854
3	758	1677	12F	-	889
4	2389	6170	14	1855	1983
5	372	1371	15B	-	948
6A	6375	2750	18C	6549	4810
6B	6798	7229	19A	5131	1879
7F	2872	2508	19F	5197	5089
8	-	2016	22F	55	6676
9V	2026	2081	23F	2064	1347
10A	-	1049	33F	-	2606

10

【0183】

全ての血清型が、優れたレベルの機能性免疫原性を示した。PCV20-15TTにおいて、PCV20-15TT及びPREVNAR13に共通する血清型は、PREVNAR13の機能性免疫原性に等しいか、又はそれよりも良好な機能性免疫原性を示し、また、新たに加えられた血清型 8、10A、11A、12F、15B、22F、及び 33F それぞれも、高レベルの機能性免疫原性を示した。

【0184】

20

1つ以上の例示的な実施形態を、本明細書において記載してきたが、形態及び詳細における様々な変更が、添付の特許請求の範囲によって規定されるような本発明の概念の趣旨及び範囲を逸脱することなく、それらの実施形態において成され得ることは、当業者に理解されよう。

【0185】

参照文献

下記の参照文献は、本出願において引用され、当該技術分野に関する一般的な情報を提供し、本出願で論述するアッセイ及び他の詳細を提供する。下記の参照文献は、それらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

- [1] Prymula et al., Lancet, 367:740-48 (2006).
- [2] Vesikari et al., PIDJ, 28(4):S66-76 (2009).
- [3] Dagan et al. Infection & Immunity, 5383-91 (2004).
- [4] Juergens et al., Clinical and Vaccine Immunology, 21(9):1277-1281 (2014).
- [5] Andrews et al., Lancet, 14:839-846 (2014).
- [6] Nurkka et al., Vaccine, 20:194-201 (2001).
- [7] Levin and Stone, J. Immunology, 67:235-242 (1951).
- [8] W.H.O. Manual for the Production and Control of Vaccines: Tetanus Toxo id, 1977 (BLG/UNDP/77.2 Rev.I.)
- [9] Didierlaurent et al., J. Immunol., 183: 6186-6197 (2009).

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

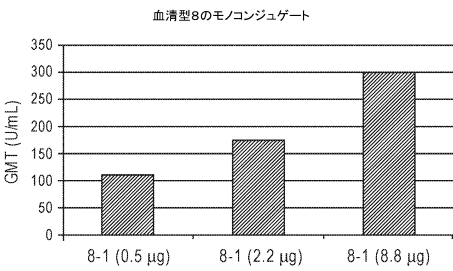


FIG. 1A

【図 1 B】

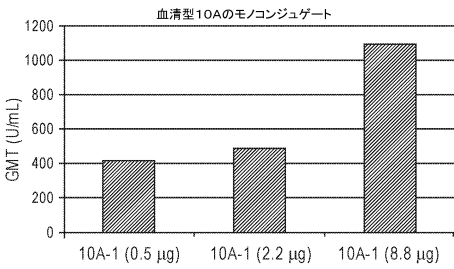


FIG. 1B

10

【図 1 C】

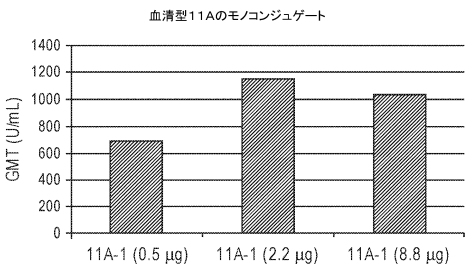


FIG. 1C

【図 1 D】

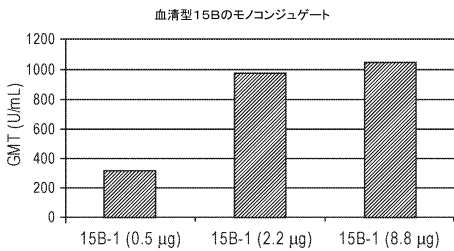


FIG. 1D

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

大韓民国 08709 ソウル クワナク - グ ボラメ - ロ 62 103 - 408

(72)発明者 チェ ウヨン

大韓民国 17066 キョンギ - ド ヨンイン - シ キフン - グ キフンヨク - ロ 58ボン - ギル
78 キフンヨク ザ シャープ 104 - 4102

(72)発明者 ハン ドンス

大韓民国 16493 キョンギ - ド スウォン - シ パルダル - グ クォンワン - ロ 373 113
- 505

(72)発明者 キム フン

大韓民国 16505 キョンギ - ド スウォン - シ ヨントン - グ セントラル タウン - ロ 76
6114 - 2903

(72)発明者 シン ジンファン

大韓民国 05834 ソウル ソンバ - グ チョンデ - ロ 24 233 - 1201

(72)発明者 ホッパー ロバート

アメリカ合衆国 18370 ペンシルベニア スウィフトウォーター ディスカバリー ドライブ 1
シー / オー サノフィ パスツール

(72)発明者 ケンジンガー リチャード ディー .

アメリカ合衆国 18370 ペンシルベニア スウィフトウォーター ディスカバリー ドライブ 1
シー / オー サノフィ パスツール

(72)発明者 チョー モー

アメリカ合衆国 18370 ペンシルベニア スウィフトウォーター ディスカバリー ドライブ 1
シー / オー サノフィ パスツール

(72)発明者 ドゥソージェル エリック

フランス国 69367 リヨン セデックス 07 アヴェニュー ポン パスツール 2 シー / オー
サノフィ パスツール エスアー

(72)発明者 エル ゲルシュ セブラン クロティルド

フランス国 69367 リヨン セデックス 07 アヴェニュー ポン パスツール 2 シー / オー
サノフィ パスツール エスアー

(72)発明者 タラガ フィリップ

フランス国 69367 リヨン セデックス 07 アヴェニュー ポン パスツール 2 シー / オー
サノフィ パスツール エスアー

審査官 福山 則明

(56)参考文献 国際公開第2015/110941(WO, A2)

特表2001-525815(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 39/00 - 39/44

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)