

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6289632号
(P6289632)

(45) 発行日 平成30年3月7日 (2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日 (2018.2.16)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/112 (2006.01)	A 6 1 K 39/112
A 6 1 K 39/05 (2006.01)	A 6 1 K 39/05
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
C 0 7 K 2/00 (2006.01)	C 0 7 K 2/00

請求項の数 8 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2016-528102 (P2016-528102)	(73) 特許権者	305060279
(86) (22) 出願日	平成26年11月7日 (2014.11.7)		グラクソスミスクライン バイオロジカル
(65) 公表番号	特表2016-536317 (P2016-536317A)		ズ ソシエテ アノニム
(43) 公表日	平成28年11月24日 (2016.11.24)		ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/065869		ル リュ ドランスティテュ 8 9
(87) 国際公開番号	W02015/068129	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成27年5月14日 (2015.5.14)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成28年6月23日 (2016.6.23)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	13192176.9		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成25年11月8日 (2013.11.8)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 新井 栄一
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		(74) 代理人	100169971
			弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サルモネラコンジュゲートワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

断片化型Vi多糖、およびCRM₁₉₇またはジフテリアトキソイドから選択されるキャリアタンパク質を含むコンジュゲートを含有する、哺乳動物でT非依存性免疫応答を実質的に含まないT依存性免疫応答を生起するための免疫原性組成物であって、該断片化型多糖が40～55kDaの平均分子量を有する、上記組成物。

【請求項 2】

断片化型多糖が41～49kDaの平均分子量を有する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

断片化型多糖が51～55kDaの平均分子量を有する、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項 4】

キャリアタンパク質がCRM₁₉₇である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 5】

製薬上許容される担体を更に含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 6】

組成物がアジュバント化されていない、請求項5に記載の組成物。

【請求項 7】

組成物がアジュバントを含む、請求項5に記載の組成物。

【請求項 8】

腸チフスを予防するための、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、断片化されているVi多糖およびキャリアタンパク質に基づくコンジュゲート、該コンジュゲートを含む組成物、ならびに該コンジュゲートおよび組成物の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細菌由来の糖は、ワクチン中で長年用いられてきた。しかしながら、糖はT非依存性抗原であるので、免疫原性には乏しい。また、糖は、2歳未満の乳幼児では有効でない。キャリアへのコンジュゲート化は、T非依存性抗原をT依存性抗原へと効率的に変換することができ、それにより、記憶応答を強化し、かつ防御免疫が生じることを可能にする。したがって、現在、最も有効な糖ワクチンは、糖コンジュゲートに基づく。国際公開第95/31994号および同第94/03208号（両方ともYeda Research and Development Co. Ltd.に対する）、米国特許第5,204,098号および国際公開第2008/081022号は、免疫原性の不十分な抗原のコンジュゲートに関する。

【0003】

多数のコンジュゲート化プロセスが短鎖オリゴ糖を用い、これは主に、製造プロセスの改善（製造一貫性のよりよい制御、最終生成物のよりよい特性決定）のためである。糖鎖長がコンジュゲートワクチンの免疫原性に影響を及ぼし得ることは周知である（P. Costa ntino et al. Expert Opin. Drug Discov., 6 (2011) 1045）。Serum Institute of India Ltdに対するインド特許出願第1330MUM2010号は、コンジュゲート化に好適な多糖断片の製造方法に関する。米国特許第6,045,805号もまた、オリゴ糖の製造方法を記載する。

【0004】

腸チフスは、発展途上国では未だに深刻な疾患であり、毎年数百万人が罹患する（Crum p JA et al., Bull. Wld. Hlth. Org. 82, 346-353 (2004); Ochai RL et al. and the D omi Typhoid Study Group, Bull. Wld. Hlth. Org. 86, 260-268 (2008)）。この10年で、コンジュゲートワクチンがこの疾患に対して開発された。例えば、Vi（チフス菌（*Salmonella enterica* serovar Typhi）由来の多糖）およびrEPAタンパク質キャリアに基づく、安全かつ免疫原性の高いコンジュゲートワクチンが、NICHD/NIHにより開発された（Lan h et al., N. Eng. J. Med. 2003; Thiem et al., Clin Vac. Immunol. 2011; Szu, Expe rt Rev. Vaccines 12(11), 1273-1286 (2013)）。多数の論文が、Viの免疫原性、そのコンジュゲートワクチンおよび現在までに最適であると考えられるVi鎖長について論じている（Szu et al., Infection and Immunity, 1989, 3823; Szu et al., Infection and Im munity, 1991, 4555; Szu et al. Infection and Immunity, 1994, 5545; Kossaczka et al., Infection and Immunity, 1999, 5806; Cui et al., Clin. Vaccine Immunol., 17 (2010), 73-79; Micoli et al., Vaccine, 29 (2011), 712-720; An et al., Vaccine, 29 (2011), 7618-23; Rondini et al., Clin.Vaccine Immunol., 18 (2011), 460-68; An et al., Vaccine, 30 (2012), 1023-1028）。

【0005】

より近年には、精製された広義のシトロバクター・フレウンディイ（*Citrobacter freu ndii sensu lato*）由来のViおよびCRM₁₉₇タンパク質キャリアに基づくチフス菌（*Salmonella* Typhi）ワクチンコンジュゲートが、Micoli et al. Vaccine 2012およびRondini et al., J. Infect. Dev Ctries, 2012に記載されている。ヒトで試験した場合、Vi-CRM₁₉₇コンジュゲートワクチンは、単回接種後かつ比較的低用量では、未コンジュゲート化型Viと比較してより高い抗Vi抗体応答をもたらした（van Damme et al., PlosOne 2011; さらなる結果は、the 8th International Conference on Typhoid Fever and Other Invasive Salmonellosis, Bangladesh (2013年3月)にて発表された）。しかしながら、再接種後の抗Vi応答は初回応答よりも低く、抗Vi持続性は望んだよりも短かった（Bhutta et al. Lancet Infect Dis, 14 (2014) 119）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第95/31994号

【特許文献2】国際公開第94/03208号

【特許文献3】米国特許第5,204,098号

【特許文献4】国際公開第2008/081022号

【特許文献5】インド特許出願第1330MUM2010号

【特許文献6】米国特許第6,045,805号

【非特許文献】

10

【0007】

【非特許文献1】P. Costantino et al. Expert Opin. Drug Discov., 6 (2011) 1045

【非特許文献2】Crump JA et al., Bull. Wld. Hlth. Org. 82, 346-353 (2004)

【非特許文献3】Ochai RL et al. and the Domi Typhoid Study Group, Bull. Wld. Hlth. Org. 86, 260-268 (2008)

【非特許文献4】Lanh et al., N. Eng. J. Med. 2003

【非特許文献5】Thiem et al., Clin Vac. Immunol. 2011

【非特許文献6】Szu, Expert Rev. Vaccines 12(11), 1273-1286 (2013)

【非特許文献7】Szu et al., Infection and Immunity, 1989, 3823

【非特許文献8】Szu et al., Infection and Immunity, 1991, 4555

20

【非特許文献9】Szu et al. Infection and Immunity, 1994, 5545

【非特許文献10】Kossaczka et al., Infection and Immunity, 1999, 5806

【非特許文献11】Cui et al., Clin. Vaccine Immunol., 17 (2010), 73-79

【非特許文献12】Micoli et al., Vaccine, 29 (2011), 712-720

【非特許文献13】An et al., Vaccine, 29 (2011), 7618-23

【非特許文献14】Rondini et al., Clin.Vaccine Immunol., 18 (2011), 460-68

【非特許文献15】An et al., Vaccine, 30 (2012), 1023-1028

【非特許文献16】Micoli et al. Vaccine 2012

【非特許文献17】Rondini et al., J. Infect. Dev Ctries, 2012

【非特許文献18】van Damme et al., PlosOne 2011

30

【非特許文献19】Bhutta et al. Lancet Infect Dis, 14 (2014) 119

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、改善されたコンジュゲートワクチンを提供する必要が未だにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、断片化されているVi多糖およびキャリアタンパク質に基づくコンジュゲートに関する。特に、断片化型Vi多糖は、40~55kDaの平均分子量を有する。本発明はさらに、本発明のコンジュゲートを含む医薬組成物、本発明のコンジュゲートまたは医薬組成物を哺乳動物に投与するステップを含む、該哺乳動物での免疫応答を生起するための方法、本発明のコンジュゲートまたは医薬組成物を哺乳動物に投与するステップを含む、該哺乳動物でのT非依存性免疫応答を実質的に含まないT依存性免疫応答を生起するための方法、有効量の本発明のコンジュゲートまたは医薬組成物をそれを必要とする被験体に投与するステップを含む、被験体での腸チフスの予防のための方法、および該コンジュゲートの製造のための方法を提供する。

40

【0010】

本発明の好ましいコンジュゲートは、記憶応答を誘導し、再接種時に追加免疫効果を提供し、持続的な抗体レベルを提供することができるはずである。理想的には、コンジュゲートは、すべての年齢の集団で、特に2歳未満の小児で有効であるべきである。

50

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明のコンジュゲートを作製するための合成ステップを示す図である（PS＝断片化型多糖；prot.＝キャリアタンパク質；RC=N=CR'はいずれかのカルボジイミド、典型的には、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドであり得る）。

【図2】第1～10群のマウスでの免疫学的応答を示す図である。第1～4群は、断片化型Viおよびキャリアタンパク質としてのCRM₁₉₇を含むコンジュゲートを用いて免疫化され、第1群での断片化型Viは9.5kDaの平均分子量（avMW）を有し；第2群での断片化型Viは22.8kDaのavMWを有し；第3群での断片化型Viは42.7kDaのavMWを有し；かつ第4群での断片化型Viは82kDaのavMWを有する。第5群は、CRM₁₉₇にコンジュゲート化された天然型Viを注入され、第6～9群は、それぞれ第1～4群のavMWを有するコンジュゲート化されていない断片化型Viを注入された。第10群は天然型のViを投与された。

【図3】チフス菌（*Salmonella Typhi*）Vi多糖の反復単位を示す図であり、ここで、Acはアセチル基である。

【図4】天然型Viおよび断片化型Vi中のO-アセチル化の量を示す¹H NMRスペクトル（NaOD 200mM中、RT、500MHz）を示す図である（プール1～4）。

【図5】断片化型Vi混合物と比較した天然型ViのHPLC-SECプロファイル（214nm）を示す図である。

【図6】異なるavMWの4種の断片化型Viプール（プール1～4）を示す図である。サンプルは、TSK gel 3000 PWXLカラムに流し、NaH₂PO₄ 100mM NaCl 100mM 5%CH₃CN pH7.2を用いて、0.5mL/分にて溶出した。Vo 10.663分；Vtot 23.326分。

【図7】断片化型Vi avMW 42.7kDaのHPLC-SECプロファイル（214nm）を示す図である（TSK gel 3000 PWXLカラム、NaH₂PO₄ 100mM NaCl 100mM 5%CH₃CN pH7.2、0.5mL/分；Vo 10.663分；Vtot 23.326分；デキストランを標準として用いて）。ピーク面積のうちの80%が、70～25kDaの間である。

【図8】全長未コンジュゲート化型Vi、全長Viコンジュゲートおよび断片化型Viコンジュゲートを用いて免疫化された場合の野生型マウスとT細胞ノックアウト（TCRβδ^{-/-}）とで観察された応答を示す図である。

【図9】CRM₁₉₇、DTおよびTTにコンジュゲート化された、全長Viコンジュゲートおよび断片化型Viコンジュゲートで観察された応答を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、キャリアタンパク質にコンジュゲート化された断片化型Viを含むコンジュゲートに関する。

【0013】

本明細書を解釈する目的のために、以下の定義が適用され、適宜、単数形で用いられる用語は複数形も含むであろうし、逆もまた同じである。

本明細書中で用いる場合、「a」、「an」、「the」および本発明の文脈中で（特に特許請求の範囲の文脈中で）用いられる同様の用語は、本明細書中で特に示されないか、または文脈により明らかに否定されない限り、単数形および複数形の両方を包含すると理解されるべきである。

数値xとの関連での「約」との用語は、任意的であり、例えば、x±10%を意味する。

【0014】

本明細書中で用いる場合、「Vi」または「Vi多糖」との用語は、シトロバクターから精製されたチフス菌（*Salmonella enterica* serovar Typhi）の莢膜多糖に関する（Rondini et al., J. Infect. Dev. Ctries, 2012）。

本明細書中で用いる場合、「天然型多糖」との用語は、該多糖のサイズを低減させる目的のプロセスに供されていない多糖を意味する。

【0015】

本明細書中で用いる場合、Vi多糖に関して「断片化型」との用語は、サイズの低減が行なわれ、したがって多糖中の反復単位の数が増加しているVi多糖を意味する。したがって、断片化型Viは、天然型Viと比較して低いavMWを有する。例えば、断片化型Viは、天然型Viの600個超の反復単位と比較して、30～300個の反復単位を含むことができる。Vi単量体反復単位の構造は、図3に示される。本発明の断片化型Viでは、好ましくは天然型Viと比較して反復単位の構造の変化は観察されない。これは、¹H NMR分析により確認できる（図4を参照されたい）。また、断片化型ViでのO-アセチル基の割合（％）は、好ましくは天然型Viと同じ（すなわち、約95％のO-アセチル化）であるが、変化することができ、約65％O-アセチル化まで減少させることができる。O-アセチル化は、¹H NMR、Hestrin比色法などの標準的な計測法により測定することができる。

10

【0016】

本明細書中で用いる場合、「プール」との用語は、所定の平均分子量範囲を有し、かつ標準的な方法により互いに分離することができる、断片化型Viの群を意味する。プールは、本明細書中で定義される通りの断片化型Viからなる。

【0017】

その生来のサイズでは、Vi多糖は、HPLCサイズ排除クロマトグラフィー（HPLC-SEC）により測定される約165kDaの平均分子量を有する。本発明で用いる断片化型Viは、40～55kDaのavMWを有する。この値は、HPLC-SECにより測定される。

【0018】

典型的には、平均分子量は、デキストランを標準（5、25、50、80、150kDa）として用いて、TSK gel 3000 PWXLカラム（30cm×7.8mm；粒径7μm；cod. 808021）およびTSK gel PWXL guardカラム（4.0cm×6.0mm；粒径12μm；cod. 808033）（Tosoh Bioscience社）にサンプルを流すことにより算出される。移動相は、0.1M NaCl、0.1M NaH₂PO₄、5%CH₃CN、pH7.2、流速0.5mL/分（30分間のイソクラティック法）である。空隙および床容量校正（void and bed volume calibration）は、λ-DNA（λ-DNA Molecular Weight Marker II 0.12-21.2 kb；Roche社）およびアジ化ナトリウム（NaN₃；Merck社）をそれぞれ用いて行なう。

20

【0019】

本発明の断片化型Viはさらに、異なる平均分子量範囲のプールへと分離させることができる。これは、陰イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、タンジェンシャルフロー過などの当技術分野で公知の方法により達成することができる。

30

【0020】

本発明の一実施形態では、断片化型Viは、約40～55kDa、より好ましくは42～53kDa、さらにより好ましくは45～50kDaのavMWを有する。別の実施形態では、断片化型Viは、約41～49kDa、好ましくは41～48kDa、より好ましくは42～46kDaのavMWを有する。さらなる実施形態では、断片化型Viは、約43kDaのavMWを有する。さらなる実施形態では、断片化型Viは、51～55kDa、好ましくは52～54kDaのavMWを有する。さらなる実施形態では、断片化型Viは、約53kDaのavMWを有する。

【0021】

Viまたはその断片の平均分子量が測定法に応じて変わり得ることは、当業者には明らかであろう。本明細書中に記載される通り、平均分子量に関して与えられる値は、典型的には本明細書中に記載されるカラム、バッファーおよび標準を用いて、HPLCサイズ排除クロマトグラフィーにより測定される。しかしながら、用いるカラム、バッファーおよび/または標準の変更が、計算上の平均分子量に影響するであろうことは、当業者が理解するであろう。例えば、天然型Viは、0.45mL/分にてAcquity UPLC BEH200 1.7mmカラム（4.6×150mm）と共にUPLC-SECシステムを用いて測定された場合には148kDaの計算上avMWを有し、それと比較して、本明細書中に記載される方法を用いて測定された場合には165kDaである。したがって、約±10％の実測avMWでの変動が生じ得、本発明は絶対値により限定されず、測定変動の範囲内で変化する場合があることは、当業者には理解されるであろう。

40

【0022】

50

本発明で用いられる断片化型Viのプールは、多分散性指数（PDI）によってさらに特徴付けすることができる一定の平均分子量範囲分布を有する。多分散性指数は、以下の等式に示される通りに算出される：

$$PDI = M_w / M_n$$

[式中、 M_w は重量平均分子量であり、 M_n は数平均分子量である]。

分子量分布が狭いほど、PDI値は1に近づく。

【0023】

断片化型Viのプールは、プールのうちの少なくとも80%が25kDa～70kDaのavMWを有することを特徴とするavMW分布を有することができる。プールは、プールのうちの少なくとも50%が35kDa～60kDaのavMWを有することを特徴とするavMW分布を有することができる。プールは、プールのうちの少なくとも30%が41kDa～55kDaのavMWを有することを特徴とするavMW分布を有することができる。

10

【0024】

断片化は、天然型多糖の化学的加水分解、天然型多糖の酵素的断片化、天然型多糖のガンマ線照射、または天然型多糖の超音波処理、高圧ホモジナイザー/マイクロフルイダイザー/HPCDS（高圧細胞破碎システム）などの機械的方法などの、当技術分野で公知の多数の方法により行なうことができる。

本発明で用いられる断片化法は、80kDa未満、好ましくは60kDa未満、より好ましくは40～55kDaのavMWを有する断片化型Viを生じることができるように選択される。

【0025】

20

方法はまた、好ましくは、反復単位の構造に変化がないように選択される。

好ましくは、断片化は機械的方法によるものではない。好ましくは、断片化はアルカリ加水分解によるものではない。

本発明の断片化型Viは、好ましくは、過酸化水素を用いる化学的加水分解により取得される。この方法を用いると、Vi多糖が反復単位の構造を変化させずにサイズを低減させることができることが見出された。また、過酸化水素を用いる加水分解は、機械的方法を用いる場合よりも低い平均分子量を有する断片化型Viの形成を可能にすることができた。

【0026】

本発明の断片化型Viが過酸化水素を用いる化学的加水分解により取得される場合、触媒量の塩化第二鉄（ $FeCl_3$ ）の添加が、比較的穏やかな条件（より低い温度およびより短い反応時間）下の反応を可能にすることが見出された。つまり、本発明の一態様では、塩化第二鉄の存在下で過酸化水素と天然型多糖を反応させるステップを含む、多糖を断片化するための方法が提供される。より詳細には、本発明の一態様は、塩化第二鉄の存在下で過酸化水素と天然型Viを反応させるステップを含む、Viを断片化するための方法に関する。さらにより詳細には、該方法は、水中の約3%過酸化水素および0.1mM塩化第二鉄を用いてViを反応させるステップを含む。好ましくは、反応の温度は約20～40℃である。

30

【0027】

本発明の別の態様では、硫酸第一鉄の存在下で、過酸化水素と天然型多糖を反応させるステップを含む、多糖を断片化させるための方法が提供される。 $FeCl_3$ よりも可溶性である硫酸第一鉄の使用は、より再現性のあるプロセスをもたらす。一実施形態では、本発明は、触媒としての硫酸第一鉄の存在下で過酸化水素と天然型Viを反応させるステップを含む、Viを断片化するための方法に関する。特に、該方法は、0.1mM硫酸第一鉄の存在下で、水中の約0.5%過酸化水素と天然型Viを反応させるステップを含む。好ましくは、反応の温度は、約20～40℃である。この方法により取得される断片化型Viは、好ましくは、本発明のコンジュゲート化法での使用前に、加熱ステップ（約80℃）に供される。

40

【0028】

断片化は、一般的に、その後に精製が続く。

精製は、当技術分野で公知の方法により行なうことができる。典型的には、精製は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより行なう。

精製は、典型的には、異なる長さおよび異なる平均分子量範囲の断片化型Viの「プール

50

」を生じる。

【0029】

本発明のコンジュゲートのキャリアタンパク質は、CRM₁₉₇またはジフテリアトキソイドから選択することができる。最も好ましくは、キャリアタンパク質はCRM₁₉₇である。図9は、CRM₁₉₇、ジフテリアトキソイド (DT) および破傷風トキソイド (TT) にコンジュゲート化された断片化型Viの免疫学的応答の差異を示す。CRM₁₉₇およびジフテリアトキソイド (DT) との断片化型Viのコンジュゲートで見られる応答は、T依存性免疫応答に典型的なものである (1回目の注入後の比較的低い免疫学的応答 (14日目および35日目) およびそれに続く2回目の注入後の追加免疫応答 (49日目))。それに対して、破傷風トキソイド (TT) との断片化型Viのコンジュゲートは、第2用量に対する明らかな既往反応なしに、ワクチンの1回用量に対して高い抗体応答を示し、これは、著しいT非依存性応答が存在する場合に観察される知見である。

10

【0030】

本発明はさらに、断片化型Vi、およびCRM₁₉₇またはジフテリアトキソイドから選択されるキャリアタンパク質を含むコンジュゲートを製造するための方法に関し、該方法は、以下のステップを含む：

(a) 40～55kDaのavMWを有する断片化型Vi多糖を得るために、Vi多糖を断片化するステップ；

(b) ステップ(a)で得られた断片化型Vi多糖を、カルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシンイミドとpH5～6にて反応させてN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを形成させるステップ；

20

(c) ステップ(b)で得られたN-ヒドロキシスクシンイミドエステルをキャリアタンパク質と反応させて該コンジュゲートを生成させるステップ。

【0031】

本方法の一実施形態は、図1に示される。

本方法では、ステップ(a)は、任意により、その後に精製ステップが続く。精製ステップは、異なる平均分子量範囲の断片化型Viプールを生じる。40～55kDaの平均分子量範囲を有する断片化型Viプールが、本方法のステップ(b)および(c)で用いられる。

【0032】

本方法のステップ(b)で用いられるカルボジイミドは、水性媒体中で糖とタンパク質とをコンジュゲート化することが可能であるいずれかの好適なカルボジイミドであり得る。典型的には、用いるカルボジイミドは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDAC) である。あるいは、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-p-トルエンスルホネート (CMC) を用いることができる。

30

該方法のステップ(b)では、断片化型Vi多糖は、好ましくは、COOH基換算で50 μmol/mL～200 μmol/mLの濃度で存在する。

【0033】

該方法のステップ(b)では、断片化型Viの濃度は、約15mg/mL～約50mg/mLであり得る。断片化型ViのavMWが低いほど、本方法のステップ(b)でのVi濃度が高くなり得る。

反応媒体中のカルボジイミドと断片化型ViのCOOH基とのモル比は、1：1～10：1の間で変動し得る。該モル比は、5：1であり得る。断片化型ViのCOOH基の数は、典型的には、Vi反復単位の数に対応する。

40

ステップ(b)では、断片化型Viのカルボン酸基とカルボジイミドとの反応は、O-アシル尿素中間体を生じ、これが次にN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) と反応して、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを生じる。

ステップ(b)で用いられるNHSの濃度は、好ましくは約0.1M～0.4Mである。

【0034】

本発明の方法のための反応媒体は、典型的には、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES) バッファーである。

ステップ(b)の反応時間は、典型的には、約1時間である。反応温度は、典型的には、約

50

20～30℃である。

【0035】

ステップ(b)で取得される、結果として生じる中間体（エステル基を用いて誘導体化された断片化型Vi）は、全糖含有量に関してHPAEC-PAD（高速陰イオン交換クロマトグラフィー・パルス電流検出法）を用いて分析することができ、NHS定量のためにイオン対HPLC-RP（逆相HPLC）により分析することができる。これは、活性化された断片化型Vi反復単位（すなわち、NHSと反応した断片化型Vi）の割合（%）を決定することを可能にする。好ましくは、活性化された断片化型Viの割合（%）は10～50%、より好ましくは約20～30%である。

本方法のステップ(b)で得られる中間体は、任意により、低pHでの脱塩またはエタノール沈殿により精製することができる。

【0036】

本方法のステップ(c)では、本方法のステップ(b)で得られたN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを、続いてキャリアタンパク質と反応させて、断片化型Viおよび該キャリアタンパク質を含むコンジュゲートを生成させる。

キャリアタンパク質は、ワクチンでの使用のためのコンジュゲートの製造で典型的に用いられるタンパク質である。例えば、キャリアタンパク質は、CRM₁₉₇またはジフテリアトキシノイドであり得る。最も好ましくは、キャリアタンパク質はCRM₁₉₇である。

【0037】

キャリアタンパク質は、本方法のステップ(b)で得られるNHSエステルとの反応に先立って、誘導体化することができる。タンパク質キャリアは、典型的には、ヒドラジドを用いて誘導体化することができる。典型的には、タンパク質キャリアは、アジピン酸ジヒドラジド（ADH）を用いて誘導体化される（図1に示される通り）。

本方法のステップ(c)でのキャリアタンパク質としてCRM₁₉₇を用いる場合、ViとCRM₁₉₇とのw/w比率は、好ましくは2：1～1：2である。例えば、これは2：1、1：1または1：2であり得る。

【0038】

本発明の方法のステップ(c)では、反応媒体中の誘導体化された断片化型Vi（すなわち、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステル）の濃度は、約5mg/mL～約10mg/mLであり得る。断片化型Viの平均分子量が低いほど、本方法のステップ(c)でのNHSエステルの濃度が高くなり得る。

本発明の方法のステップ(c)のための反応時間は、典型的には約2時間である。本発明の方法のステップ(c)のための反応温度は、典型的には約20～30℃である。反応の完了を評価するために、公知の方法を用いることができる。

【0039】

コンジュゲート化ステップ(c)は、好ましくは、MESバッファー、pH6中で、通常は約20mMの濃度で行なわれる。

本方法のステップ(c)では、pHは好ましくは約6である。このpH値は、コンジュゲート化化学でNHSを用いる場合に報告されているものよりも低い。理論に拘泥することを望まないが、このpH範囲では、NHS加水分解は、より高いpHでのものよりも緩慢であり、より効率的なコンジュゲート化プロセスをもたらすと考えられる。

【0040】

本方法により得られるコンジュゲートは、さらなる精製プロセスに供することができる。例えば、コンジュゲートは、サイズ排除クロマトグラフィーまたはタンジェンシャルフロー過、疎水性クロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィーにより精製することができる。

本方法では、ステップ(b)で用いられるカルボジイミドおよびNHSの存在は、断片化型Vi反復単位の構造を変化させることなく、高いコンジュゲート化効率を有することを可能にする。EDACなどのカルボジイミドのみを用いる場合（すなわち、NHSの存在なしに）、高濃度の該カルボジイミドが、プロセスを効率的にするために必要とされる。さらに、断片

化型ViのCOOH基上にN-アシル尿素基が生成され、これは多糖構造を修飾し、そのエピトープを変化させる。NHSの使用は、これらの誘導体の形成を回避する。本方法を用いると、断片化型Viコンジュゲート中のこれらの誘導体の割合(%)は2モル%未満(カルボジイミド/ViのCOOH)であり、残余のエステル基もまた1モル%未満である。

【0041】

本方法により得られるコンジュゲートはまた、遊離の、すなわちコンジュゲート化されていない断片化型Viの量によっても特徴付けられ、これは20%未満、好ましくは15%未満、より好ましくは5%未満である。好ましくは、遊離の断片化型Viが検出されない。また、好ましくは、遊離のタンパク質が検出されない。本発明のコンジュゲートは、その断片化型Viとキャリアタンパク質との比率によってさらに特徴付けることができる。例えば、断片化型Vi：タンパク質キャリアのw/w比率は、約1.5：1～約1：3であり得る。これらの比率は、用いる断片化型Viの平均分子量範囲に依存して変わり得る。これはまた、用いるキャリアタンパク質によっても変わり得る。タンパク質キャリアとしてCRM₁₉₇が用いられる場合、CRM₁₉₇に対するViのw/w比率は、約0.33～約1.33であり得る。本発明の一実施形態では、これは約0.33である。本発明の一実施形態では、これは約0.52である。本発明の一実施形態では、これは約0.64である。本発明の一実施形態では、これは約1.33である。

ジフテリアトキシソイド(DT)がタンパク質キャリアとして用いられる場合、DTに対するViのw/w比率は約0.85であり得る。

【0042】

本発明のコンジュゲートは、好ましくは、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%のO-アセチル化を有する。最も好ましい実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約95%のO-アセチル化を有する。これは、天然型ViのO-アセチル化と同等であり、断片化型Vi単量体反復単位の構造が断片化によって変化しないことの確認となる。

O-アセチル化の割合(%)は、¹H NMR、Hestrin比色法などの当技術分野で公知の方法により測定することができる。

【0043】

本発明の一実施形態では、コンジュゲートは、5～25 μgの断片化型Viを含む。本発明の一実施形態では、コンジュゲートは、8 μgの断片化型Viを含む。

本発明の一実施形態では、コンジュゲート中のキャリアタンパク質はCRM₁₉₇である。本発明の一実施形態では、コンジュゲートは、5～25 μgのCRM₁₉₇を含む。一実施形態では、コンジュゲートは、10～15 μgのCRM₁₉₇を含む。

【0044】

本発明の1種のコンジュゲートでは、断片化型Viの量は8 μgであり、CRM₁₉₇の量は12.5 μgである。

本発明のコンジュゲートは、本明細書中に記載される方法によりさらに取得することができる。したがって、本発明の方法により取得可能であるコンジュゲートもまた、本発明の一部である。

【0045】

本発明のコンジュゲートは、医薬組成物へとさらに加工することができる。つまり、本発明はまた、製薬上許容される担体と組み合わせて本発明のコンジュゲートを含む医薬組成物も提供する。本明細書中で用いる場合、「製薬上許容される担体」との用語は、当業者には公知であろう通り、いずれかおよびすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤(例えば、抗細菌剤、抗真菌剤)、等張化剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物安定化剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味料、香料、色素など、およびそれらの組み合わせを含む(例えば、Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472を参照されたい)。いずれかの慣用の担体が活性成分と不適合である場合を除いて、治療用組成物または医薬組成物中のその使用が意図される。

【0046】

本発明の化合物の「治療上有効量」との用語は、被験体の生物学的応答もしくは医学的応答を惹起するか、または疾患などを予防するであろう本発明のコンジュゲートの量を意味する。1つの非限定的実施形態では、「治療上有効量」との用語は、被験体に投与される場合に、チフス菌（*Salmonella Typhi*）により媒介される状態、または障害もしくは疾患を予防するために有効である、本発明の化合物の量を意味する。

本明細書中で用いる場合、「被験体」との用語は、動物を指す。典型的には、動物は哺乳動物である。被験体はまた、例えば、霊長類（例えば、ヒト、男性または女性）、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、魚類、鳥類なども意味する。特定の実施形態では、被験体は霊長類である。また他の実施形態では、被験体はヒトである。

10

【0047】

微生物感染は身体のような部位に影響を及ぼし、よって本発明の組成物は様々な剤形に調製される場合がある。例えば、組成物は、溶液または懸濁液として、注射剤として調製することができる。注射前の液体ビヒクル中への溶解または懸濁に好適である固体剤形もまた調製することができる。組成物は、例えば、軟膏、クリームまたはパウダーとして、局所投与用に調製することができる。組成物は、例えば、錠剤もしくはカプセル剤として、またはシロップ剤（任意により風味付けされている）として、経口投与用に調製することができる。組成物は、例えば、微粒子またはスプレーを用いる吸入剤として、肺内投与用に調製することができる。組成物は、坐剤またはペッサリーとして調製することができる。組成物は、例えば、滴下剤として、噴霧剤として、または散剤として、鼻内投与、耳内投与または眼内投与用に調製することができる。組成物は、洗口剤に含ませることができる。組成物は、凍結乾燥することができる。

20

【0048】

医薬組成物は、好ましくは無菌である。パイロジェン不含であることが好ましい。例えば、pH6～pH8、一般的にはpH7付近に緩衝されているのが好ましい。

本発明の組成物は、本発明のコンジュゲートおよび生理食塩液を含むことができる。

本発明はまた、本発明の医薬組成物を収容する送達デバイスも提供する。デバイスは、例えば、シリンジまたは吸入器であり得る。

【0049】

本発明の医薬組成物は、好ましくは、免疫原性組成物であり、このとき、該組成物は免疫学的有効量の多糖免疫原を含む。「免疫学的有効量」とは、単回用量または連続投与の一部としての個体へのその量の投与が、予防のために有効であることを意味する。この量は、治療対象である個体の健康状態および身体状態、年齢、治療対象である個体の分類群（例えば、非ヒト霊長類、霊長類等）、個体の免疫系が抗体を合成する能力、所望される保護の程度、ワクチンの製剤化、治療する医師の医学的状況の評価、および他の関連する因子に応じて変わる。該量は、日常的な試験を通して決定することができる比較的広い範囲に入るであろうことが予測される。1 μg ～20 μg の糖の用量、例えば、約5 μg /用量が予測される。投与治療は、単回用量計画または複数回用量計画（例えば、追加免疫用量を含む）であり得る。組成物は、他の免疫調節剤と組み合わせて投与することができる。

30

製剤化されたら、本発明の組成物は、被験体に直接的に投与することができる。治療対象である被験体は動物であることができ；特に、ヒト被験体を治療することができる。

40

【0050】

本発明の免疫原性組成物は、典型的には、予防的に（すなわち、未来の感染を防ぐために）用いられる。

一実施形態では、医薬組成物はアジュバント化されなくても良い。

別の実施形態では、免疫原性組成物は、アジュバントを含むことができる。アジュバントは、組成物を投与される患者で惹起される免疫応答（体液性および/または細胞性）を強化するために機能することができる。本発明で用いることができるアジュバントとしては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：

【0051】

50

・カルシウム塩およびアルミニウム塩（またはその混合物）をはじめとする鉱物含有組成物。カルシウム塩としては、リン酸カルシウム（例えば、米国特許第6355271号に開示される「CAP」粒子）が挙げられる。アルミニウム塩としては、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩等が挙げられ、塩は、いずれかの好適な形態（例えば、ゲル、結晶、非晶質等）を取る。これらの塩への吸着が好ましい。鉱物含有組成物はまた、金属塩の粒子として製剤化することもできる（国際公開第2000/0023105号）。水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムとして知られるアジュバントを用いることができる。これらの名称は慣用名であるが、いずれも、存在する実際の化合物の正確な説明ではないので、便宜のためのみに用いられる（例えば、Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995, chapter 9を参照されたい）。本発明は、アジュバントとして一般的に用いられている「水酸化物」または「リン酸塩」アジュバントのいずれかを用いることができる。「水酸化アルミニウム」（aluminium hydroxide）として知られるアジュバントは、典型的にはオキシ水酸化アルミニウム塩（aluminium oxyhydroxide salt）であり、これらは、通常は少なくとも部分的には結晶である。「リン酸アルミニウム」として知られるアジュバントは、典型的にはヒドロキシリン酸アルミニウム（aluminum hydroxyphosphate）であり、多くの場合に少量の硫酸塩も含有する（すなわち、ヒドロキシリン酸硫酸アルミニウム（aluminum hydroxyphosphate sulfate））。これは沈殿により取得することができ、沈殿中の反応条件および濃度が、塩の中のヒドロキシルのホスフェートによる置換の程度に影響する。本発明は、水酸化アルミニウムとリン酸アルミニウムの両者の混合物を用いることができる。この場合、例えば、少なくとも2:1、例えば、 $\geq 5:1$ 、 $\geq 6:1$ 、 $\geq 7:1$ 、 $\geq 8:1$ 、 $\geq 9:1$ などの重量比で、リン酸アルミニウムの方が水酸化物よりも多く存在し得る。患者への投与用の組成物中の Al^{+3} の濃度は、好ましくは10mg/mL未満、例えば、 $\leq 5\text{mg/mL}$ 、 $\leq 4\text{mg/mL}$ 、 $\leq 3\text{mg/mL}$ 、 $\leq 2\text{mg/mL}$ 、 $\leq 1\text{mg/mL}$ などである。好ましい範囲は、0.3~1mg/mLである。0.85mg/用量の最大値が好ましい。

【0052】

・広範囲の植物種の樹皮、葉、茎、根および花にさえも見出されるステロール配糖体およびトリテルペノイド配糖体の不均質な群である、サポニン（Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995, chapter 22）。シャボンノキ（*Quillaia saponaria* Molina）の樹皮由来のサポニンは、アジュバントとして広く研究されてきた。サポニンはまた、スマラックス・オルタナ（*Smilax ornata*）（サルサパリラ（*sarsapilla*））、シュッコンカスミソウ（*Gypsophilla paniculata*（*brides veil*））、およびサボンソウ（*Saponaria officinalis*（*soap root*））由来の市販品を入手することもできる。サポニンアジュバント製剤としては、QS21などの精製製剤ならびにISCOMなどの脂質製剤が挙げられる。QS21は、StimulonTMとして販売されている。サポニン組成物は、HPLCおよびRP-HPLCを用いて精製されてきた。これらの技術を用いた特異的精製画分が特定されており、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-BおよびQH-Cが挙げられる。好ましくは、サポニンはQS21である。QS21の製造方法は、米国特許第5,057,540号に開示されている。サポニン製剤はまた、コレステロールなどのステロールも含むことができる（国際公開第96/33739号）。サポニンとコレステロールとの組み合わせは、免疫刺激性複合体（ISCOM）と称される特有の粒子を形成させるために用いることができる。（Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995, chapter 23）。ISCOMとしてはまた、典型的にはホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなどのリン脂質が挙げられる。いずれの公知のサポニンも、ISCOM中で用いることができる。好ましくは、ISCOMは、Quila、QHAおよびQHCのうちの1種以上を含む。ISCOMは、国際公開第96/33739号および欧州特許第0109942号にてさらに説明されている。任意により、ISCOMは、追加の界面活性剤を含まないことができる（国際公開第00/07621号）。サポニンベースのアジュバントの開発についての総説は、以下の参考文献に見出すことができる：Barr et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271およびSjolander et al. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338。

10

20

30

40

50

【0053】

・細菌性ADP-リボシル化毒素（例えば、大腸菌易熱性エンテロトキシン「LT」、コレラ毒素「CT」、または百日咳毒素「PT」）ならびにLT-K63およびLT-R72として知られる突然変異体毒素などのそれらの無毒化型誘導体（Pizza et al. (2000) Int J Med Microbiol 290:455-461）。粘膜アジュバントとしての無毒化型ADP-リボシル化毒素の使用が、国際公開第95/17211号に記載され、非経口用アジュバントとしての使用が同第98/42375号に記載されている。

【0054】

・生体接着物質（bioadhesive）および粘膜接着物質（mucoadhesive）、例えばエステル化ヒアルロン酸ミクロスフェア（Singh et al. (2001) J Cont Release 70:267-276）またはキトサンおよびその誘導体（国際公開第99/27960号）。

10

・生分解性かつ非毒性である材料（例えば、ポリ(α-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル（polyorthoester）、ポリ無水物（polyanhydride）、ポリカプロラクトン等）、好ましくはポリ(ラクチドコグリコリド)から形成され、任意により、負に荷電した表面（例えば、SDSを用いて）または正に荷電した表面（例えば、CTABなどの陽イオン性界面活性剤を用いて）を有するように処理された、微粒子（すなわち、直径約100nm～約150 μm、より好ましくは直径約200nm～約30 μm、または直径約500nm～約10 μmの粒子）。

【0055】

・リボソーム（Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995, Chapters 13 & 14）。アジュバントとしての使用のための好適なリボソーム製剤の例は、米国特許第6,090,406号および同第5,916,588号に記載されている。

20

・ムラミルペプチド、例えばN-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン（「thr-MDP」）、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（nor-MDP）、N-アセチルグルコサミニル-N-アセチルムラミル-L-Al-D-イソグル-L-Ala-ジパルミトキシプロピルアミド（N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxy propylamide）（「DTP-DPP」、または「TheramideTM」）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン（「MTP-PE」）。

30

【0056】

・ポリオキシドニウム（polyoxidonium）ポリマー（Dyakonova et al. (2004) Int Immunopharmacol 4(13):1615-23）または他のN-酸化ポリエチレン-ピペラジン誘導体。

・CD1dリガンド、例えばα-グリコシルセラミド（De Libero et al, Nature Reviews Immunology, 2005, 5: 485-496および米国特許第5,936,076号）（例えば、α-ガラクトシルセラミド）、フィトスフィンゴシン含有α-グリコシルセラミド、OCH、KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α-D-ガラクトピラノシル)-2-(N-ヘキサコサノイルアミノ)-1,3,4-オクタデカントリオール]、CRONY-101、3'-O-スルホ-ガラクトシルセラミド。

・γイヌリン（Cooper (1995) Pharm Biotechnol 6:559-80）またはアルガムリン（algammulin）などのその誘導体。

40

【0057】

・水中油型エマルジョン。様々なそのようなエマルジョンが公知であり、典型的には少なくとも1種の油および少なくとも1種の界面活性剤を含み、油および界面活性剤は生分解性（代謝可能性）かつ生体適合性である。エマルジョン中の油滴は、一般的に直径5 μm未満であり、サブミクロンの直径を有する場合さえあり、これらの小さなサイズはマイクロフルイダイザーにより達成されて、安定的なエマルジョンを提供する。220nm未満のサイズを有する液滴が、ろ過滅菌に供することができるので、好ましい。

【0058】

・免疫刺激性オリゴヌクレオチド、例えばCpGモチーフ（リン酸結合によりグアノシン残基へと連結された非メチル化シトシン残基を含むジヌクレオチド配列）、もしくはCp

50

Iモチーフ（イノシンに連結されたシトシンを含むジヌクレオチド配列）を含むもの、または二本鎖RNA、または回文配列を含むオリゴヌクレオチド、またはポリ(dG)配列を含むオリゴヌクレオチド。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート修飾などのヌクレオチド修飾/アナログを含むことができ、二本鎖または（RNAを除いて）一本鎖であることができる。以下の参考文献：Kandimalla et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400、および国際公開第99/62923号は、考えられるアナログ置換（例えば、2'-デオキシ-7-デアザグアノシンによるグアノシンの置換）を開示している。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835、McCluskie et al. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185、国際公開第98/40100号、米国特許第6,207,646号、同第6,239,116号、同第6,429,199号などの参考文献にてさらに議論されている。CpG配列は、モチーフGTCGTTまたはTTCGTTなどのTLR9を標的とする場合がある（Kandimalla et al. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658）。CpG-A ODN（オリゴデオキシヌクレオチド）などのCpG配列は、Th1免疫応答の誘導に特異的であり得、または、CpG-B ODNなどのCpG配列は、B細胞応答の誘導に対してより特異的であり得る。CpG-AおよびCpG-B ODNは、以下の参考文献にて議論されている：Blackwell et al. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068、Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65、国際公開第01/95935号。好ましくは、CpGはCpG-A ODNである。好ましくは、CpGオリゴヌクレオチドは、5'末端が受容体認識に関してアクセス可能であるように構築される。任意により、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列がその3'末端で結合して、「イムノマー」（immunomer）を形成することができる。例えば、以下の参考文献：Kandimalla et al. (2003) *BBRC* 306:948-953、Bhagat et al. (2003) *BBRC* 300:853-861、および国際公開第03/035836号を参照されたい。有用なCpGアジュバントは、ProMune™（Coley Pharmaceutical Group, Inc.）としても知られるCpG7909である。別の有用なアジュバントは、CpG1826である。CpG配列を用いることの代替として、またはそれに加えて、TpG配列を用いることができ（国際公開第01/22972号）、これらのオリゴヌクレオチドは、非メチル化CpGモチーフを含まないことができる。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、ピリミジンを多く含むことができる。例えば、これは、2個以上の連続したチミジンヌクレオチドを含むことができ（例えば、参考文献である国際公開第01/22972号に開示されている通りのTTTT）、かつ/または25%超がチミジンである（例えば、35%超、40%超、50%超、60%超、80%超など）ヌクレオチド組成を有することができる。例えば、これは、2個以上の連続したシトシンヌクレオチドを含むことができ（例えば、国際公開第01/22972号に開示されている通りのCCCC）、かつ/または25%超がシトシンである（例えば、35%超、40%超、50%超、60%超、80%超など）ヌクレオチド組成を有することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、非メチル化CpGモチーフを含まないことができる。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、典型的には、少なくとも20個のヌクレオチドを含むであろう。免疫刺激性オリゴヌクレオチドは、100個よりも少ないヌクレオチドを含むことができる。

【0059】

免疫刺激性オリゴヌクレオチドに基づく特に有用なアジュバントは、IC31™（Schellack et al. (2006) *Vaccine* 24:5461-72）として知られる。つまり、本発明で用いられるアジュバントは、(i) 少なくとも1つ（好ましくは複数）のCpIモチーフを含むオリゴヌクレオチド（例えば、15~40ヌクレオチド）、および(ii) 少なくとも1つ（好ましくは複数）のLys-Arg-Lysトリペプチド配列を含むオリゴペプチド（例えば、5~20アミノ酸）などのポリカチオン性ポリマー、の混合物を含むことができる。オリゴヌクレオチドは、26mer配列である5'-(IC)₁₃-3'を含むデオキシヌクレオチドであり得る。ポリカチオン性ポリマーは、11merアミノ酸であるLys-Leu-Lys-Leu₅-Lys-Leu-Lysを含むペプチドであり得る。

【0060】

・3-0-脱アシル化モノホスホリルリピドA（「3dMPL」、「MPL™」とも称される）（Myers et al. (1990) *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*の第145~156頁；Ulrich (2000) *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Methods in Molecular Medicine seriesのVolume 42)のChapter 16（第273~282頁

); Johnson et al. (1999) J Med Chem 42:4640-9; Baldrick et al. (2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413)。水性条件では、3dMPLは、異なるサイズを有する（例えば、150nm未満または500nm超の直径を有する）ミセル状凝集体または粒子を形成することができる。これらのいずれかまたは両方を本発明で用いることができ、よりよい粒子を、日常的なアッセイにより選択することができる。より小さな粒子（例えば、3dMPLの透明な水性懸濁液を生じるのに十分に小さい）が、その優れた活性により、本発明に従う使用のために好ましい（国際公開第94/21292号）。好ましい粒子は、220nm未満、より好ましくは200nm未満または150nm未満または120nm未満の平均直径を有し、100nm未満の平均直径でさえ有することができる。しかしながら、大部分の場合には、平均直径は50nm未満ではないであろう。

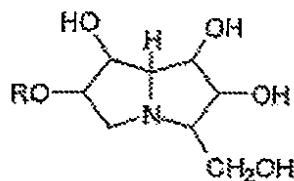
10

・メチルイノシン5'-モノホスフェート（「MIMP」）（Signorelli & Hadden (2003) Int Immunopharmacol 3(8):1177-86）。

【0061】

・ポリヒドロキシル化ピロリジジン（polyhydroxylated pyrrolizidine）化合物（国際公開第2004/064715号）、例えば以下の式を有するもの：

【化1】



20

[式中、Rは、水素、直鎖もしくは分岐鎖の、非置換もしくは置換、飽和もしくは不飽和アシル、アルキル（例えば、シクロアルキル）、アルケニル、アルキニルおよびアリール基を含む群から選択される]、またはその製薬上許容される塩もしくは誘導体。例としては、限定するものではないが、カスアリン（casuarine）、カスアリン-6- α -D-グルコピラノース、3-*epi*-カスアリン、7-*epi*-カスアリン、3,7-ジ*epi*-カスアリン等が挙げられる。

【0062】

・イミダゾキノリン化合物、例えばイミキモド（Imiquimod）（「R-837」）（米国特許第4,680,338号、同第4,988,815号）、レシキモド（Resiquimod）（「R-848」）（国際公開第92/15582号）およびそれらのアナログ；ならびにその塩（例えば、塩酸塩）。免疫刺激性イミダゾキノリンに関するさらなる詳細は、以下の参考文献に見出すことができる：Stanley (2002) Clin Exp Dermatol 27:571-577、Wu et al. (2004) Antiviral Res. 64(2):79-83、Vasilakos et al. (2000) Cell Immunol. 204(1):64-74、米国特許第4689338号、同第4929624号、同第5238944号、同第5266575号、同第5268376号、同第5346905号、同第5352784号、同第5389640号、同第5395937号、同第5482936号、同第5494916号、同第5525612号、同第6083505号、同第6440992号、同第6627640号、同第6656938号、同第6660735号、同第6660747号、同第6664260号、同第6664264号、同第6664265号、同第6667312号、同第6670372号、同第6677347号、同第6677348号、同第6677349号、同第6683088号、同第6703402号、同第6743920号、同第6800624号、同第6809203号、同第6888000号および同第6924293号、ならびにJones (2003) Curr Opin Investig Drugs 4:214-218。

30

40

【0063】

・チオセミカルバゾン化合物、例えば参考文献である国際公開第2004/060308号に開示されるもの。活性化合物に対する製剤化、製造およびスクリーニング法もまた、該参考文献中に記載されている。チオセミカルバゾンは、TNF- α などのサイトカインの産生に関するヒト末梢血単核細胞の刺激において、特に有効である。

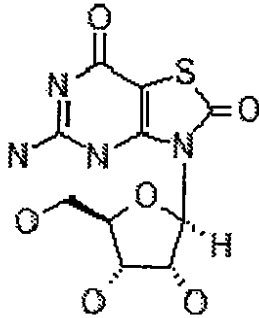
・トリプタントリン（tryptanthrin）化合物、例えば参考文献である国際公開第2004/064759号に開示されるもの。活性化合物に対する製剤化、製造およびスクリーニング法もまた、該参考文献中に記載されている。チオセミカルバゾンは、TNF- α などのサイトカインの産生に関するヒト末梢血単核細胞の刺激において、特に有効である。

50

【0064】

・ヌクレオシドアナログ、例えば(a) イサトラビン (Isatorabine) (ANA-245 ; 7-チア-8-オキソグアノシン) :

【化2】



10

およびそのプロドラッグ ; (b) ANA975 ; (c) ANA-025-1 ; (d) ANA380 ; (e) 参考文献である米国特許第6,924,271号、米国特許出願公開第2005/0070556号、米国特許第5,658,731号に開示される化合物、ロキシリビン (Loxoribine) (7-アリル-8-オキソグアノシン) (米国特許第5,011,828号)。

【0065】

・参考文献である国際公開第2004/87153号に開示される化合物、例えばアシルピペラジン化合物、インドールジオン化合物、テトラヒドロイソキノリン (Tetrahydroisoquinoline) (THIQ) 化合物、ベンゾシクロジオン化合物、アミノアザビニル化合物、アミノベンズイミダゾールキノリノン (ABIQ) 化合物 (米国特許第6,605,617号、国際公開第02/18383号)、ヒドラフタルイミド (Hydraphtalamide) 化合物、ベンゾフェノン化合物、イソキサゾール化合物、ステロール化合物、キナジリノン化合物、ピロール化合物 (国際公開第2004/018455号)、アントラキノン化合物、キノキサリン化合物、トリアジン化合物、ピラザロピリミジン (Pyrazalopyrimidine) 化合物、およびベンズアゾール化合物 (国際公開第03/082272号)。

20

【0066】

・RC-529などの、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート誘導体 (Johnson et al. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278、Evans et al. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229)。

30

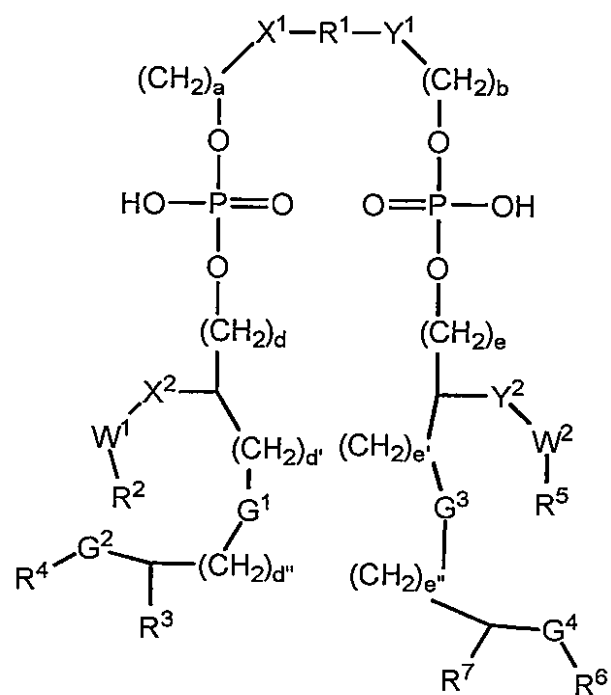
・ホスファゼン、例えば、参考文献であるAndrianov et al. (1998) Biomaterials 19:109-115およびPayne et al. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196に記載される通りの、ポリ[ジ(カルボキシラトフェノキシ)ホスファゼン] (「PCPP」)。

【0067】

国際公開第03/011223号に定義される通りの、「ER 803058」、「ER 803732」、「ER 804053」、「ER 804058」、「ER 804059」、「ER 804442」、「ER 804680」、「ER 804764」、「ER 803022」または「ER 804057」などの化合物：

【化 3】

I

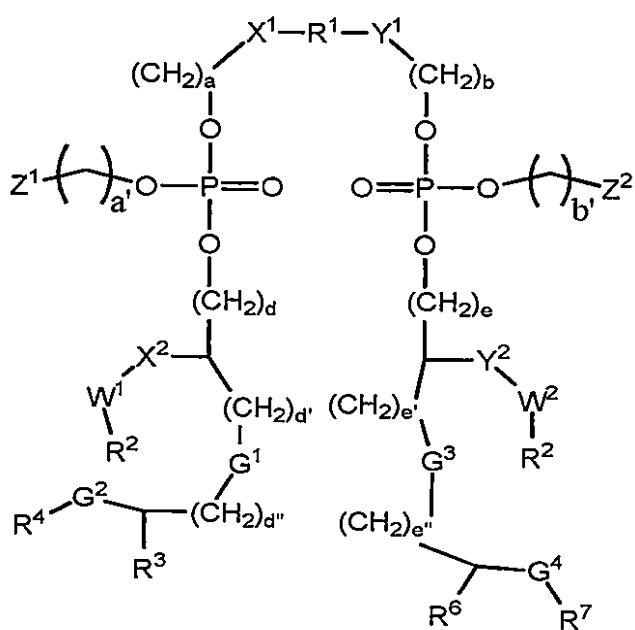


10

20

【化 4】

II

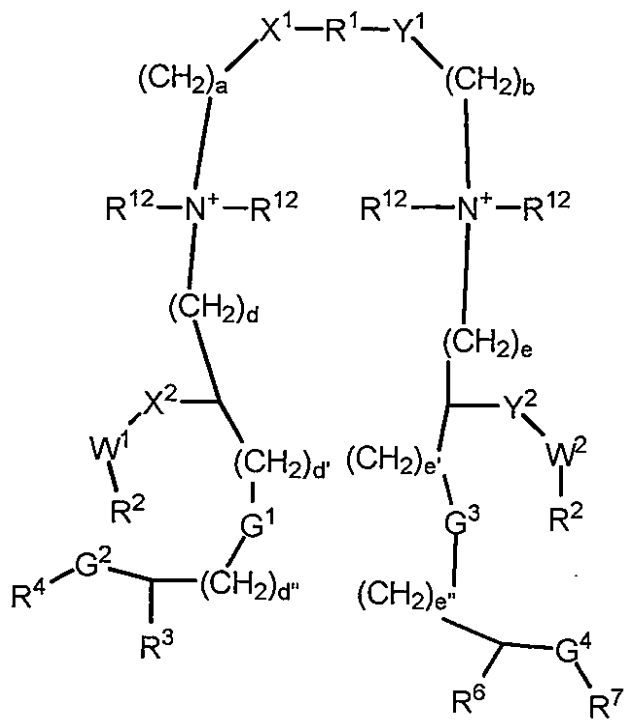


30

40

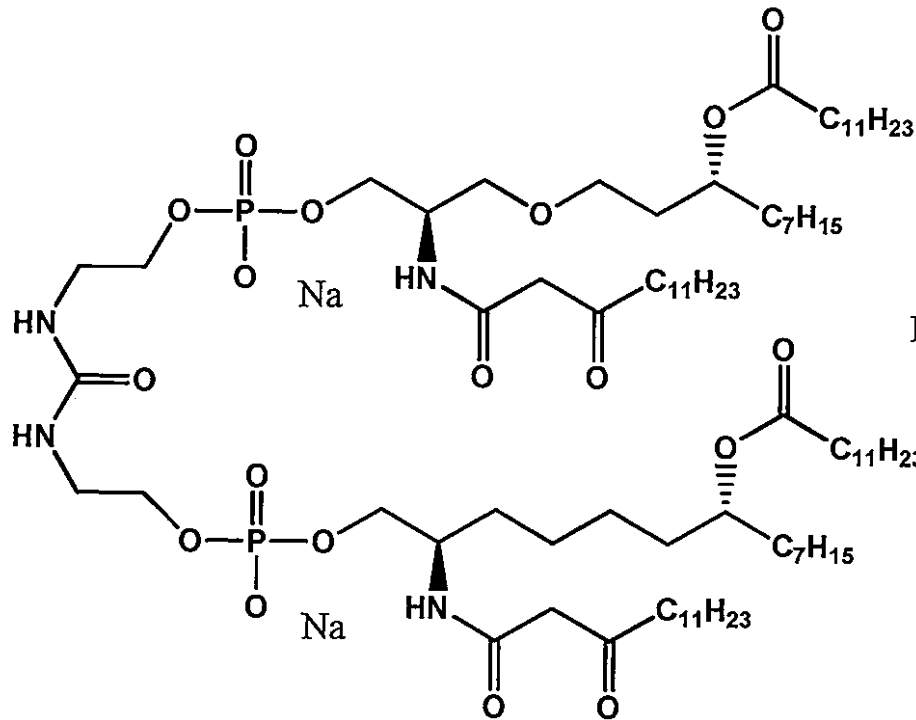
【化 5】

III



例えば：

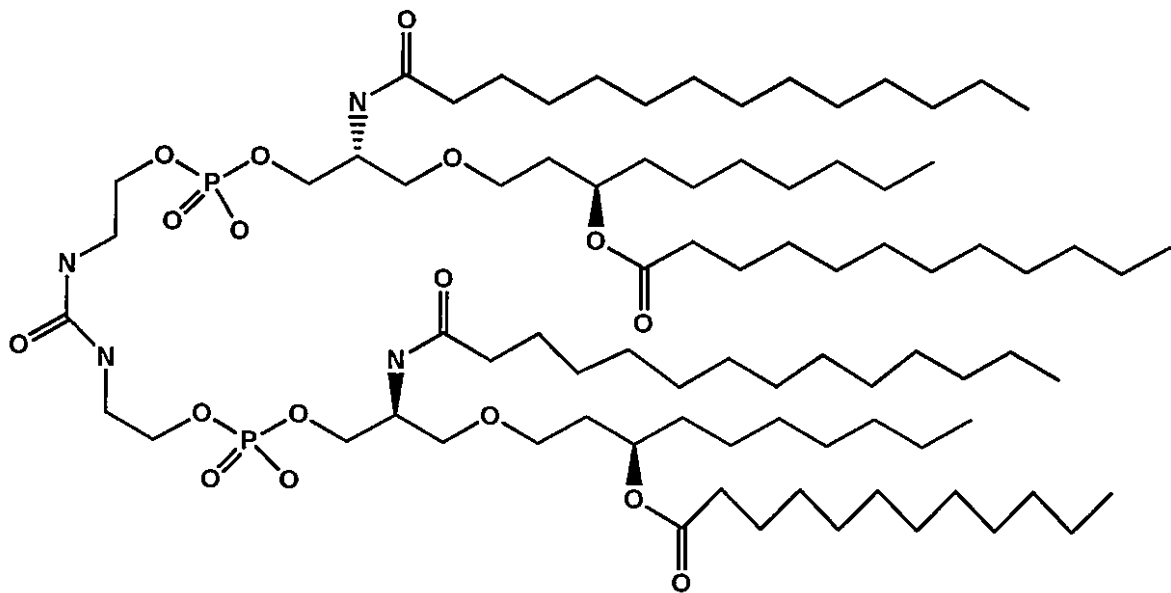
【化 6】



ER804057

10

20



ER-803022

30

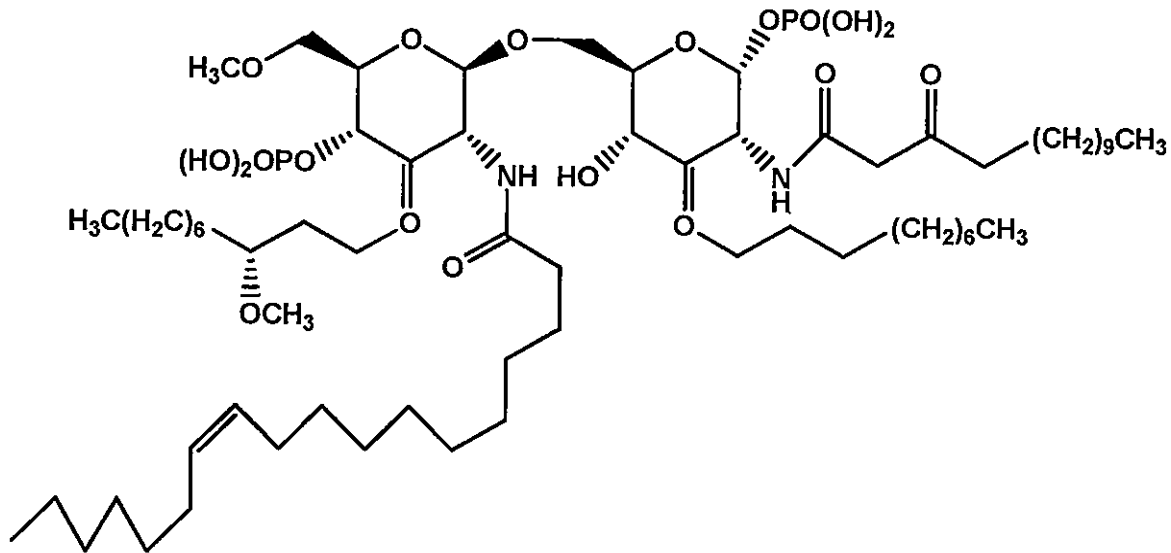
40

OM-174などの大腸菌由来の脂質Aの誘導体（参考文献であるMeraldi et al. (2003) Vaccine 21:2485-2491およびPajak et al. (2003) Vaccine 21:836-842に記載される）。

【 0 0 6 8 】

・TLR4アンタゴニストE5564などの、ホスフェート含有非環式骨格に連結された脂質含有化合物（Wong et al. (2003) J Clin Pharmacol 43(7):735-42、米国特許出願公開第2005/0215517号）：

【化 7】



10

【0069】

これらおよび他のアジュバントとして活性な物質は、参考文献であるVaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995およびVaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocolsにて、より詳細に議論されている。

20

組成物中の抗原およびアジュバントは、典型的には混合状態であろう。

組成物は、2種以上の上記アジュバントを含むことができる。例えば、これらは、有利には、水中油型エマルジョンおよび3dMPL等の両方を含むことができる。

【0070】

本発明で用いて有用な具体的な水中油型エマルジョンアジュバントとしては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：

・スクアレン、Tween80、およびSpan85のサブミクロンエマルジョン。体積基準のエマルジョンの組成は、約5%スクアレン、約0.5%ポリソルベート80および約0.5%Span85であり得る。重量基準では、これらの比率は、4.3%スクアレン、0.5%ポリソルベート80および0.48%Span85となる。このアジュバントは、「MF59」として公知であり（国際公開第90/14837号、Podda & Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203、Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680）、Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995のChapter 10、およびVaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Methods in Molecular Medicine seriesのVolume 42)のchapter 12に、より詳細に記載される。MF59エマルジョンは、有利にはクエン酸イオンを含み、例えば、10mMクエン酸ナトリウムバッファーを含む。

30

【0071】

・スクアレン、トコフェロール、およびTween80のエマルジョン。エマルジョンは、リン酸緩衝生理食塩液を含むことができる。エマルジョンは、Span85（例えば、1%）および/またはレシチンもまた含むことができる。これらのエマルジョンは、2~10%スクアレン、2~10%トコフェロールおよび0.3~3%Tween80を有することができ、スクアレン：トコフェロールの重量比は好ましくは ≤ 1 であり、これは、この重量比がより安定なエマルジョンを提供するからである。スクアレンおよびTween80は、約5：2の体積比で存在することができる。1種のそのようなエマルジョンは、PBS中にTween80を溶解させて2%溶液を得、続いて90mLのこの溶液を（5gのDL- α -トコフェロールおよび5mLスクアレン）の混合物と混合し、次に、該混合物をマイクロ流体化することにより作製できる。得られるエマルジョンは、例えば、100~250nm、好ましくは約180nmの平均直径を有する、サブミクロン油滴を有し得る。

40

【0072】

50

・スクアレン、トコフェロール、およびTriton界面活性剤（例えば、Triton X-100）のエマルジョン。エマルジョンは、3d-MPLも含むことができる（下記を参照されたい）。エマルジョンは、リン酸バッファーを含有することができる。

・ポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）、Triton界面活性剤（例えば、Triton X-100）およびトコフェロール（例えば、コハク酸 α -トコフェロール）を含むエマルジョン。エマルジョンは、これらの3種類の成分を約75:11:10（例えば、750 μ g/mLポリソルベート80、110 μ g/mL Triton X-100および100 μ g/mLコハク酸 α -トコフェロール）の質量比で含むことができ、これらの濃度は、抗原由来のこれらの成分のいずれかの寄与も含むはずである。エマルジョンはまた、スクアレンも含むことができる。エマルジョンはまた、3d-MPLも含むことができる（下記を参照されたい）。水相は、リン酸バッファーを含有することができる。

10

【0073】

・スクアラン、ポリソルベート80およびポロキサマー401（「プルロニックTML121」）のエマルジョン。エマルジョンは、リン酸緩衝生理食塩液（pH7.4）中に製剤化することができる。このエマルジョンは、ムラミルジペプチドに対する有用な送達ビヒクルであり、「SAF-1」アジュバント中でトレオニルMDPと共に用いられてきた（Allison & Byars (1992) Res Immunol 143:519-25）（0.05~1%Thr-MDP、5%スクアラン、2.5%プルロニックL121および0.2%ポリソルベート80）。「AF」アジュバントと同様に、これは、Thr-MDPなしでも用いることができる（Hariharan et al. (1995) Cancer Res 55:3486-9）（5%スクアラン、1.25%プルロニックL121および0.2%ポリソルベート80）。マイクロ流体化が好ましい。

20

【0074】

・0.5~50%の油、0.1~10%のリン脂質、および0.05~5%の非イオン性界面活性剤を有するエマルジョン。国際公開第95/11700号に記載される通り、好ましいリン脂質成分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンおよびカルジオリピンである。サブミクロンの液滴サイズが有利である。

【0075】

・非代謝性油（軽油など）および少なくとも1種の界面活性剤（レシチン、Tween80またはSpan80など）のサブミクロン水中油型エマルジョン。添加剤としては、Quilaサポニン、コレステロール、サポニン親油性コンジュゲート（米国特許第6,080,725号に記載されるGPI-0100など、グルクロン酸のカルボキシル基を介してデスアシルサポニン（desacylsaponin）に脂肪族アミンを添加することにより作製される）、ジメチルイディオクタデシルアンモニウムブロミド（dimethyldioctadecylammonium bromide）および/またはN,N-ジオクタデシル-N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)プロパンジアミンなどを含めることができる。

30

・サポニン（例えば、QuilaまたはQS21）およびステロール（例えば、コレステロール）がらせん状ミセルとして会合しているエマルジョン（国際公開第2005/097181号）。

【0076】

本発明はまた、医薬での使用のための本発明のコンジュゲートも提供する。例えば、一実施形態では、本発明のコンジュゲートは、哺乳動物での抗体応答の生起での使用のためのものである。

40

本発明はまた、哺乳動物に本発明のコンジュゲートまたは医薬組成物を投与するステップを含む、哺乳動物での免疫応答を生起するための方法も提供する。本発明はまた、哺乳動物に本発明のコンジュゲートまたは医薬組成物を投与するステップを含む、哺乳動物でのT非依存性免疫応答を実質的に含まないT依存性免疫応答を生起するための方法も提供する。

【0077】

本発明はまた、疾患の予防のためのワクチンの製造での本発明のコンジュゲートまたは医薬組成物の使用も提供する。

50

一実施形態では、本発明はまた、哺乳動物での腸チフスを予防するための医薬品の製造での本発明のコンジュゲートの使用も提供する。

【0078】

これらの方法および使用により生起される免疫応答は、一般的に、抗体応答、好ましくは防御的抗体応答を含むであろう。糖免疫化後の抗体応答を評価するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、ELISAアッセイ（酵素免疫測定法）が、抗Vi IgG応答を測定するために一般的に用いられる。抗体応答は、好ましくは、糖コンジュゲートワクチンに特徴的なIgMからIgGへの典型的なアイソタイプスイッチを伴うIgG応答である。免疫応答は、典型的には予防的である。哺乳動物は、好ましくはヒトである。

【0079】

本発明のコンジュゲートは、Vi多糖が断片化されていないコンジュゲートと比較して、T依存性応答を生じさせる上で、より有効であると考えられる。「T依存性」応答とは、コンジュゲートが、再注入の後の抗Vi応答の上昇（典型的な既往反応）を引き起こすことができることを意味する。「T非依存性応答を実質的に含まないT依存性応答」とは、コンジュゲートが、T細胞ノックアウトマウスでの抗Vi応答を引き起こすことができないことを意味する。

【0080】

T非依存性応答は、記憶を引き起こさないことが見出されており、2歳未満の小児では最適未満であると思われ、二次リンパ組織の胚中心での体細胞超変異およびしたがって抗体応答の親和性成熟をもたらさないもので、T依存性応答を生じさせるコンジュゲートは、T非依存性応答を生じさせるものよりも有利であると思われる（例えば、Pollard A. J. et al., Nat. Rev. Immunol., 2009; 9: 213を参照されたい）。また、T非依存性応答は、引き続きワクチン接種に対する低応答性状態を引き起こし得る（例えば、Poolman J. et al., Expert Rev. Vaccines, 2011; 10: 307を参照されたい）。

【0081】

本発明のコンジュゲートは、図2および図8に示される通り、T依存性応答を生じさせると思われる。図2は、天然型のViコンジュゲートと比較して、かつコンジュゲート化されていない天然型および断片化型Viと比較して、本発明の断片化型Viコンジュゲートに対するマウスでの抗Vi抗体応答を示す。用いた材料の説明は、実施例5の表に与えられる。第1～4群（CRM₁₉₇にコンジュゲート化された断片化型Viプール1～4に対応する）に関して、天然型Viコンジュゲート（第5群）と比較して、14日目（T14）での低い抗Vi IgG応答にもかかわらず（天然型Viと比較してプール1～3で有意、それぞれ、 $p=0.0418$ 、 <0.0001 、 0.0297 ）、35日目での2回目の注入の2週間後（T49）に、目立った追加免疫効果が観察される（ $p=0.004\sim0.008$ ）ことが見て取れる。図2に示される通り、上昇した抗Viは、1回目の注入後には天然型Vi-CRM₁₉₇（第5群）により誘導されたが、2回目の注入後には上昇しなかった。2回目の注入後のこの上昇の欠如はまた、比較的低用量の天然型Vi-CRM₁₉₇コンジュゲートを用いた場合（ $0.044\mu\text{g}$ 、 $0.35\mu\text{g}$ および $2.8\mu\text{g}$ 、データ示さず）にも観察され、このことは、抗体レベルの上昇の欠如は、1回用量後に最大応答が引き起こされるためではないことを示す。天然型Viコンジュゲートに対する応答は、長い天然型Vi鎖がT非依存性抗原として機能する能力によるものであるとの仮説を立てることができる。このことは、コンジュゲート化されていない天然型Vi（第10群）が、天然型Viコンジュゲート（第5群）よりは低いとしても、より短いVi鎖（第6～9群）よりも高い応答を引き起こすことができるという事実により支持される。対照的に、断片化型Viコンジュゲート（第1～4群）は14日目に比較的低い応答を引き起こし、これは2回目の注入によりさらに上昇し、2回の用量後には天然型Viコンジュゲートと同等の抗Vi IgG力価に達した。82kDaのVi鎖長により特徴付けられる第4群コンジュゲートは、より低い平均分子量を有する断片化型Viのコンジュゲート（第1～3群）および天然型Viコンジュゲート（第5群）と比較した場合に、中間的な挙動を示した。実際には、14日目の応答は、より短い断片化型Viコンジュゲートよりも高く、天然型Viコンジュゲートとは有意に異ならなかった。

【0082】

図2に示すことができるように、コンジュゲート化されていない断片化型Viは、天然型Vi (第10群)と比較して減少したVi IgG抗体応答 (第6~9群)を引き起こす。天然型Vi (165kDa)に対する応答は、断片化型Vi (82kDa、第9群)に対する応答よりも大きく、これはその次には、断片化型Vi (9.5kDa、22.8kDa、42.7kDa;それぞれ、第6~8群)に対する応答よりも大きい (14日目に、コンジュゲート化されていない断片化型Viプール1~3により引き起こされる応答は、天然型Viに対して有意に低く、それぞれ、 $p=0.0004$ 、 0.0056 、 0.0403 である)。つまり、本発明者らは、それよりも短いVi多糖がもはやT非依存性抗原として機能できないという臨界鎖長 (約82kDa)を特定した。T非依存性抗原に特徴的な応答を引き起こすことができない多糖から調製されるViコンジュゲートが好ましい。

【0083】

コンジュゲート化されていない断片化型Viに関して、T非依存性抗体応答を惹起する能力が障害されているという仮説、および断片化型ViコンジュゲートがT非依存性応答を実質的に含まないT依存性応答を引き起こすことができるという仮説を確認するために、断片化型Vi-CRM₁₉₇コンジュゲートおよび天然型Vi-CRM₁₉₇コンジュゲートを、T細胞ノックアウトマウス (TCR β $\delta^{-/-}$ マウス)で試験した。図8で見て取れる通り、T細胞ノックアウトマウスは、コンジュゲート化されていない全長Viおよびコンジュゲート化された全長Viのみに応答するが、断片化型Viコンジュゲートには応答しない。さらに、コンジュゲート化された天然型ViはT細胞ノックアウトマウスよりも野生型で高い応答を引き起こすことができるが、コンジュゲート化されていない天然型Viは高い応答を引き起こすことができず ($p=0.028$ 、14日目; $p=0.002$ 、42日目)、このことは、野生型マウスでの高い応答が、T依存性/T非依存性の混合型活性に由来することを示す。

【0084】

つまり、本発明の態様は、哺乳動物に本発明のコンジュゲートまたは医薬組成物を投与するステップを含む、哺乳動物でのT非依存性免疫応答を実質的に含まないT依存性免疫応答を生起するための方法に関する。

本発明の一態様では、哺乳動物で多糖コンジュゲートにより生じる免疫応答を強化するための方法が提供される。該方法は、以下のステップを含む:

(a) コンジュゲート化されていない多糖が著明な抗Vi IgG抗体応答を引き起こさなくなる (ceases to induce) 平均分子量値を特定するステップ;

(b) ステップ(a)で決定される値より低い平均分子量を有する多糖のコンジュゲートを生成させるステップ;および

(c) 哺乳動物に、ステップ(b)で得られるコンジュゲートを投与するステップ。

【0085】

本発明のコンジュゲート、すなわち、本明細書中で定義される通りの、キャリアタンパク質にコンジュゲート化された断片化型Viを含有するコンジュゲートはまた、適切な抗体応答の誘導においても、コンジュゲート化されていない断片化型Viよりも有効である (図2を参照されたい)。

本発明の組成物は、一般的に、被験体に直接的に投与されるであろう。直接送達は、非経口注入 (例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋内に、または組織の間質腔への)、または直腸投与、経口投与、腔内投与、局所投与、経皮投与、皮内投与、眼内投与、鼻内投与、耳内投与、もしくは肺内投与により、達成することができる。注入または鼻内投与が好ましい。

【0086】

本発明は、全身性および/または粘膜免疫を惹起するために用いることができる。

本発明に従って調製されるワクチンは、小児 (乳児を含む) および成人の両方を治療するために用いることができる。つまり、被験体は、1歳未満、1~5歳、5~15歳、15~55歳、または少なくとも55歳であり得る。ワクチンを投与されるのに好ましい被験体は、子供 (例えば、 ≤ 5 歳)である。しかしながら、ワクチンは、それらの群のみに好適なものではなく、集団中でより広く用いることができる。

【0087】

治療は、単回用量計画または複数用量計画によるものであり得る。複数用量は、初回免疫化計画および/または追加免疫化計画で用いることができる。複数用量計画では、別々の用量を、同じかまたは異なる経路により、投与することができる（例えば、非経口的初回免疫および粘膜追加免疫、粘膜初回免疫および非経口的追加免疫等）。2回以上の用量の投与（典型的には2回用量または3回用量）が、免疫学的にナイーブな患者では特に有用である。複数用量は、典型的に、少なくとも1週間の間隔で（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約10週間、約12週間、約16週間等）投与されるであろう。例となる計画は、既存の乳児予防接種と同時にるように（EPIワクチンとの同時投与）、6週齢での第1用量および10週齢での第2用量を提供する。この初回計画には、小児の最初の誕生日後の追加免疫用量を続けても良い。

10

【0088】

本発明のコンジュゲートは、他の抗原と組み合わせて、複数の病原体に対する同時免疫化のための単一組成物にすることができる。組み合わせワクチンを作製することの代替として、コンジュゲートは、他のワクチンと実質的に同時に（例えば、同じ診察または医療専門家もしくは予防接種センターへの通院時に）、被験体に投与することができる。これらの組み合わせワクチンでの使用のための、または同時投与のための抗原としては、例えば、ストレプトコッカス・アガラクティエ（B群連鎖球菌）（*Streptococcus agalactiae*）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）および/または緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）（血清型A、C、W135および/またはYに対する糖またはコンジュゲート化糖など）、肺炎連鎖球菌（*Streptococcus pneumoniae*）（糖またはコンジュゲート化糖など）等由来の免疫原が挙げられる。

20

【0089】

一実施形態では、組成物は、二価腸チフスワクチンを提供するために、キャリアタンパク質にコンジュゲート化されたHまたはO抗原などのパラチフス菌（*Salmonella Paratyphi A*）抗原（例えば、O:2糖抗原）と組み合わせて、本発明のコンジュゲートを含むことができる。別の実施形態では、組成物は、キャリアタンパク質にコンジュゲート化されたHまたはO抗原などのネズミチフス菌（*Salmonella Typhimurium*）抗原（例えば、O:9糖）と組み合わせて、本発明のコンジュゲートを含むことができる。別の実施形態では、組成物は、キャリアタンパク質にコンジュゲート化されたHまたはO抗原などの腸炎菌（*Salmonella Enteritidis*）抗原（例えば、O:4,5糖）と組み合わせて、本発明のコンジュゲートを含むことができる。別の実施形態では、本発明のコンジュゲートは、膜抗原に関する汎用モジュール（Generalized Modules for Membrane Antigens）（GMMA）と称される外膜粒子または天然型外膜小胞（native outer membrane vesicles）（NOMV）の形態で提示される抗原と組み合わせることができる。そのような膜粒子の例は、例えば、国際公開第2012/049662号および同第2011/036564号に開示されている。

30

【0090】

以下の実施例は、本発明を例示することが意図され、本発明に対する限定であると解釈されるものではない。温度は摂氏で与えられる。最終生成物、中間体および出発材料の構造は、標準的な分析法、例えば、微量分析および分光学的特性により確認される。用いられる略語は、当技術分野で慣用のものである。

40

略語

ADH	アジピン酸ジヒドラジド (adipic adic dihydrazide)
avMW	平均分子量
BCA	ビシンコニン酸アッセイ
EDAC	1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド
h	時間
HPAEC-PAD	高速陰イオン交換クロマトグラフィー・パルス電流検出法
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HR	高分解能

50

IR	赤外線分光法
kDa	キロダルトン
LCMS	液体クロマトグラフィー・質量分析
M	モル濃度
MS	質量分析
min	分
mL	ミリリットル
mM	ミリモル濃度
NHS	N-ヒドロキシスクシンイミド
NMR	核磁気共鳴
PS	多糖
rpm	回転/分
RT	室温
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
TFF	タンジェンシャルフローろ過

10

【実施例】

【0091】

実施例1

断片化型Viプールの作製および分離方法

Viを水に可溶化し、 H_2O_2 30%wtを添加して、2.5mg/mL Viおよび5% (wt/v) H_2O_2 の最終濃度とした。混合物を、 $80 \pm 0.5^\circ\text{C}$ にて2時間加熱した。この時間後に、混合物をHiscreen Capto Qカラム（100mgの断片化型Vi混合物に対して4.7mLの樹脂を詰める）に注入し、異なる平均分子量（avMW）の4種類の集団を、勾配ステップ法を用いて分離した。 NaH_2PO_4 20mM pH7.2および NaH_2PO_4 20mM NaCl 1M pH7.2を、それぞれバッファーAおよびBとして用いた。断片化型Vi混合物を水に加え、漸増するavMWのプールを、それぞれ25%、30%、37%および45%のバッファーBにて溶出した。それぞれの収集されたプールを、SEC Sephadex G-15カラムにて水に対して脱塩した。

20

【0092】

得られた断片化型Viプールを、avMW計算に関してHPLC-SECにより（図6を参照されたい）、Vi含有量に関してHPAEC-PADにより（Micoli et al., Vaccine 2011）、CHO基測定に

30

に関してマイクロBCAにより（標準としてNAcGlcNを用いて）（Meeuwsen et al. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000 89(1): 107-109）、特性決定した。Viの正体を

確認し、かつO-アセチル化レベルを計算するために、 ^1H NMRを用いた（図4を参照されたい）（Micoli et al. Vaccine 2011）。図7は、断片化型Viプール3のHPLC-SECプロファイルを示し、該プールは、42.7kDaのavMWを有し、25~70kDaが面積（214nm）の80%である。

【表1】

断片化型 Vi	HPLC-SEC による avMW (kDa)	Vi 回収率 (%)	Vi O-アセチル化 (%)
プール1	9.5	37.7	66.0
プール2	22.8	20.0	80.5
プール3	42.7	26.5	95.0
プール4	82.0	11.8	95.0
天然型 Vi	165.0	-	95.0

40

【0093】

実施例2

 H_2O_2 および FeCl_3 を用いる断片化型Viの作製および分離方法

50

100mg Vi PSを水に可溶化し；FeCl₃ 10mMおよびH₂O₂ 30%wtを添加して、2.5mg/mL Vi、0.1mM FeCl₃および3% (wt/v) H₂O₂の最終濃度とした。混合物を、30±0.1℃にて1時間加熱した。この時間後、混合物を、Capto Qカラムに注入し、1mLの樹脂当たり5mgの断片化型Vi混合物を加えた。NaH₂PO₄20mM pH7.2およびNaH₂PO₄ 20mM NaCl 1M pH7.2を、それぞれバッファーAおよびBとして用いた。断片化型Vi混合物を350mM NaClに加え、対象となる集団を40%バッファーBにて溶出した。断片化型Viプールを、10倍体積の水に対して、TFF 30-kDaにより透析ろ過した。断片化型Viプールを、avMW計算に関してHPLC-SECにより、Vi含有量に関してHPAEC-PADにより、Viの正体を確認し、かつO-アセチル化レベルを計算するために¹H NMRにより、特性決定した。特に、1種類の調製物では、avMW 53.8kDaの断片化型Viが得られた（17%未満の面積<30kDa、16%未満の面積>80kDa）。O-アセチル化レベルは高いまま留まった（88%）。 10

【0094】

実施例3

H₂O₂およびFeSO₄を用いる断片化型Viの作製および分離方法

100mg Vi PSを水に可溶化し；FeSO₄ 10mMおよびH₂O₂ 30%wtを添加して、2.5mg/mL Vi、0.1mM FeSO₄および0.5% (wt/v) H₂O₂の最終濃度とした。混合物を、30±0.1℃にて2時間加熱した。この時間後、触媒をクエンチするために、EDTAを10mMの最終濃度まで添加した。過酸化水素を、タンジェンシャルフローろ過（30kDaメンブレン）により除去し、NaH₂PO₄10mM pH7でバッファー交換した。混合物を80℃にて2時間加熱し、続いて、Capto Qカラムに注入し、1mLの樹脂当たり5mgの断片化型Vi混合物を加えた。NaH₂PO₄20mM pH7.2およびNaH₂PO₄ 20mM NaCl 1M pH7.2を、それぞれバッファーAおよびBとして用いた。断片化型Vi混合物をバッファーAに加え、所望のMWの集団を、線形勾配にて分画した（50カラム体積で100%バッファーAから100%バッファーBまで）。選択された断片化型Viプールを、10倍体積の水に対して、TFF 30-kDaにより透析ろ過した。断片化型Viプールを、avMW計算に関してHPLC-SECにより、Vi含有量に関してHPAEC-PADにより、Viの正体を確認し、かつO-アセチル化レベルを計算するために¹H NMRにより、特性決定した。特に、1種類の調製物では、avMW 43.4kDaの断片化型Viが得られた（20%未満の面積<25kDa、20%未満の面積>70kDa）。O-アセチル化レベルは高いまま留まった（85%）。 20

【0095】

実施例4

断片化型Viコンジュゲートの作製方法

断片化型Viプール1~3（実施例1で取得された）のコンジュゲート化のために、コンジュゲート調製に関して以下の手順を用いた。断片化型ViをMES 100mM pH6に50mg/mLの濃度で可溶化した。NHSおよび続いてEDACを添加し、EDAC/Vi反復単位モル比を5とし、かつNHS濃度を0.33Mとした。反応物をRTにて1時間混合した。この時間後に、Micoli et al. Vaccine 2011に以前に記載された通りに調製したCRM₁₉₇-ADHを添加し、MES 20mM pH6中でViおよびタンパク質濃度7.8mg/mL（Vi：タンパク質w/w比率=1）とした。混合物をRTにて2時間混合した。HPLC-SEC（TSK gel 3000 PWXLカラム）によりコンジュゲート形成を確認し、反応混合物中には残留タンパク質は観察されなかった。1.6cm×60cm Sephacryl 100 HRカラム上でのサイズ排除クロマトグラフィーにより、未反応のPSからコンジュゲートを分離した。コンジュゲート化されていない断片化型Viを含まない画分を一緒にプールし、特性決定した。 40

【0096】

精製されたコンジュゲートを、総Vi含有量に関してHPAEC-PADにより（Micoli et al. Vaccine 2011）、総タンパク質含有量に関してマイクロBCAにより、コンジュゲートのavMW分布の決定のためにHPLC-SECにより特性決定し、遊離タンパク質および遊離糖の量を評価した。プール3およびプール4のコンジュゲートに関して、遊離糖はCapto Adhere/HPAEC-PAD法により推定された。以下の表は、実施例5で試験されたコンジュゲートの主要な特性を報告する。

【表 2】

コンジュゲート	Vi avMW (Da)	ViAc %	Vi:CRM ₁₉₇ 比率 (w/w)	モル比 Vi/CRM ₁₉₇	遊離 Vi (%)	遊離 CRM ₁₉₇ (%)
Vifrag-CRM ₁₉₇ P1	9493	66	0.33	2.05	10.6	nd
Vifrag-CRM ₁₉₇ P2	22808	80.5	0.52	1.35	<5	nd
Vifrag-CRM ₁₉₇ P3	42689	95	0.64	0.88	13.7	nd
Vifrag-CRM ₁₉₇ P4	81990	95	1.33	0.96	17.2	nd
Vi-CRM ₁₉₇	164857	95	1.27	0.45	<13	nd

10

【0097】

実施例1で取得された断片化型Viプール4では、上記の反応条件はゲル形成を生じた。これはおそらく、この集団の比較的高いavMWが原因である。この特定のプールに対して、EDAC/NHSを用いる活性化ステップは、Vi濃度15mg/mL、NHS濃度0.1MおよびEDAC/Vi反復単位モル比5で行なった。同じ条件をCRM₁₉₇-ADHを用いるコンジュゲート化ステップで用いた。

【0098】

Capto Adhere/HPAEC-PAD法によるコンジュゲート中の遊離Vi量の測定

500 μ LのCapto Adhere樹脂懸濁液由来のペレット（20mM AcONa 30%CH₃CN pH5を用いて洗浄された）を、サンプルの処理のために用いた。20mM NaH₂PO₄ pH7.2中の1.3mLのコンジュゲート（総Vi濃度60~150 μ g/mL）を390 μ L CH₃CNに加えた（得られた溶液はここではロード済みサンプルと表わされる）。1ミリリットルのロード済みサンプルを樹脂に添加し、回転ホイール上でRTにて30分間インキュベートした。この時間後、サンプルを遠心分離し（4°C、14000rpmにて5分間）、上清（フロースルーと表わされる）を廃棄した。ペレットを、1mLの20mM AcONa 30%CH₃CN pH5を用いて洗浄した（2回）（溶媒を樹脂に添加し、手で混合した）。ペレットを、遠心分離（4°C、14000rpmにて5分間）により回収した。収集した上清（合計体積2mL）を、洗浄溶液と表わした。ペレットを500 μ Lの1M AcONa 30%CH₃CN pH5に添加し、手で混合し、遠心分離（4°C、14000rpmにて5分間）により分離した。この操作を6回繰り返し、ストリップ溶液と表わされる上清をプールした（合計体積3mL）。ストリップ溶液、洗浄溶液、フロースルーおよび0.5mLのロード済みサンプルをspeedvacにて乾燥させ、等量の水の中に再調製した。すべてのサンプルを、フロースルー、洗浄溶液およびストリップ溶液中のコンジュゲートの非存在を確認するためにHPLC-SEC（蛍光発光）により分析した。ロード済みサンプルおよびストリップ溶液を、HPAEC-PADによりVi含有量に関してアッセイした。

20

30

【0099】

希釈に関して補正したストリップ溶液中（未コンジュゲート化型Vi）およびロード済み溶液中（総Vi）のVi含有量の比率を、サンプル中の遊離Viの割合（%）として表わす。

【0100】

HPLC-SECによるコンジュゲート特性決定

遊離タンパク質および遊離糖に関してコンジュゲートを特性決定するために、HPLC-SECを用いた。すべてのサンプルを、TSK gel G3000 PW_{XL}カラム（30cm×7.8mm；粒径7 μ m；cod. 808021）およびTSK gel PW_{XL} guardカラム（4.0cm×6.0mm；粒径12 μ m；cod. 808033）（Tosoh Bioscience社）にて溶出した。移動相は0.1M NaCl、0.1M NaH₂PO₄、5%CH₃CN、pH7.2、流速0.5mL/分（30分間のイソクラティック法）であった。コンジュゲートサンプル中の未コンジュゲート化型タンパク質（蛍光発光検出）および断片化型Vi（プール1および2に関して）（屈折率検出）の量を推定するためにも、HPLC-SECを用いた。未反応タンパク質の面積を、5~50 μ g/mLの範囲のタンパク質サンプルを用いて作成した較正曲線に対して定量化した。未コンジュゲート化型タンパク質の割合（%）は、HPLC-SECにより検出された遊離タンパク質の量を、マイクロBCAにより該サンプル中で定量されたタンパク質の総量で除算して算出した。同様に、コンジュゲート化されていない断片化型Viの

40

50

量は、20～50 $\mu\text{g/mL}$ の範囲の（同じavMWの）断片化型Viの校正曲線に対して定量化した。コンジュゲート化されていない糖の割合（％）は、HPLC-SECにより検出された遊離Viの量を、HPAEC-PADにより該サンプル中で定量された糖の総量で除算して算出した。

【0101】

実施例5

断片化型Viコンジュゲート（キャリアとしてのDTおよびTT）

Viプール3（実施例1で取得された）のコンジュゲート化を、キャリアタンパク質としてDT（ジフテリアトキソイド）およびTT（破傷風トキソイド）を用いて行なった。断片化型Viを実施例3に記載される通りに活性化し、DT-ADHまたはTT-ADH（CRM₁₉₇-ADHとして調製される）を、実施例3に記載されているものと同じ反応条件を用いてコンジュゲート化ス

【表3】

コンジュゲート	Vi avMW (kDa)	タンパク質 1モル당に 導入された ADH リンカー数	Vi: タンパク質 比率 (w/w)	Vi: タンパク質 モル比	遊離 Vi (%)	遊離 CRM ₁₉₇ (%)
Vifrag-DT P3	52.9	12	0.86	1.01	<20	nd
Vifrag-TT P3	52.9	23.5	0.4	1.16	<6.8	nd

【0102】

実施例6

マウスでのin vivo試験

10群のCD1雌性マウス（10週齢）を、様々な鎖長のViを有するVi-CRM₁₉₇コンジュゲート（実施例3で取得される通り、下記の表中の第1～4群）、天然型Vi-CRM₁₉₇コンジュゲート（下記の表中の第5群）、および対応するコンジュゲート化されていないVi多糖（第6～10群）を用いて免疫化した。下記の表で、研究設計の概要をまとめた。8 μg のVi抗原をそれぞれ含有する200 μL の2回の皮下注入を、0日目および35日目に行ない、14日目、35日目および49日目に採血した。抗原は、アジュバントを含まない生理食塩液中で注入した。抗Viおよび抗CRM₁₉₇応答を、ELISAにより評価した（図2に示される通り）。

【表4】

群#	抗原名	Vi avMW (kDa)	Vi 投与量 (μg)	CRM ₁₉₇ 投与量 (μg)
1	VifragCRM ₁₉₇ P1	9.5	8	24.2
2	VifragCRM ₁₉₇ P2	22.8	8	15.4
3	VifragCRM ₁₉₇ P3	42.7	8	12.5
4	VifragCRM ₁₉₇ P4	82.0	8	6.0
5	ViCRM ₁₉₇	165.0	8	6.3
6	断片化型 Vi プール 1	9.5	8	-
7	断片化型 Vi プール 2	22.8	8	-
8	断片化型 Vi プール 3	42.7	8	-
9	断片化型 Vi プール 4	82.0	8	-
10	天然型 Vi	165.0	8	-

【0103】

図2で見て取れる通り、コンジュゲート化されていないVi（第6～10群）の中で、全長Vi（第10群）は、1回目の注入後に明らかな応答を誘導できる唯一のものであった。同じことが、対応するコンジュゲート（第5群）について当てはまった。天然型Vi-CRM₁₉₇は、1回目の注入後に既に高い応答を誘導でき、2回目の注入後にブースターがない唯一のものであった。それとは異なり、すべての断片化型Viコンジュゲート（第1～4群）で、応答は1回目の注入後には低く、再注入後に著明に高くなった。

【0104】

野生型およびTCR β $\delta^{-/-}$ マウスでの天然型および断片化型Vi-CRM₁₉₇コンジュゲートを比較するために、次の研究を行なった（図8）。10群の雌性CD1野生型マウス（下記の表の第1～5群）およびT細胞ノックアウトマウス（下記の表の第6～10群）（10週齢）を、様々な鎖長のViを有するVi-CRM₁₉₇コンジュゲート、天然型Vi-CRM₁₉₇コンジュゲート、およびコンジュゲート化されていない天然型Vi多糖を用いて免疫化した。8 μ gのVi抗原をそれぞれ含有する200 μ Lの2回の皮下注入を、0日目および28日目に行ない、14日目、28日目および42日目に採血した。抗原は、アジュバントを含まない生理食塩液中で注入した。抗Viおよび抗CRM₁₉₇応答を、ELISAにより評価した（図8に示される通り）。

【表5】

群#	マウス	抗原名	Vi avMW (kDa)	Vi 投与量 (μ g)	CRM ₁₉₇ 投与量 (μ g)
1	野生型	VifragCRM ₁₉₇ P1	9.5	8	24.2
2		VifragCRM ₁₉₇ P3	42.7	8	12.5
3		VifragCRM ₁₉₇ P4	82.0	8	6.0
4		ViCRM ₁₉₇	165.0	8	6.3
5		天然型 Vi	165.0	8	-
6	TCR β $\delta^{-/-}$	VifragCRM ₁₉₇ P1	9.5	8	24.2
7		VifragCRM ₁₉₇ P3	42.7	8	12.5
8		VifragCRM ₁₉₇ P4	82.0	8	6.0
9		ViCRM ₁₉₇	165.0	8	6.3
10		天然型 Vi	165.0	8	-

【0105】

得られたデータから、断片化型ViがT非依存性応答を誘導できないという仮説、および対応するVi-CRM₁₉₇コンジュゲートがマウスでのT非依存性応答を実質的に含まないT依存性応答を誘導できるという仮説が確認された。

【0106】

実施例7 - 様々なキャリアタンパク質にコンジュゲート化された全長および断片化型Vi（fVi）（実施例1に記載されたプール3）のマウスでのin vivo試験

6群の8頭のCD1雌性マウス（10週齢）を、下記の表で報告するコンジュゲートを用いて免疫化した。

【表 6】

コンジュゲート	コンジュゲート化型 Vi:タンパク質モル比	総 Vi:タンパク質 w/w 比率	遊離 Vi (%)	遊離タンパク質 (%)
Vi-CRM ₁₉₇	0.46	1.37	6.7	nd
Vi-DT	1.11	3.14	6	nd
Vi-TT	0.78	1.27	34.2	nd
fVi-CRM ₁₉₇	0.65	0.58	<15	nd
fVi-DT	1.01	0.86	<20	nd
fVi-TT	1.16	0.4	<6.8	nd

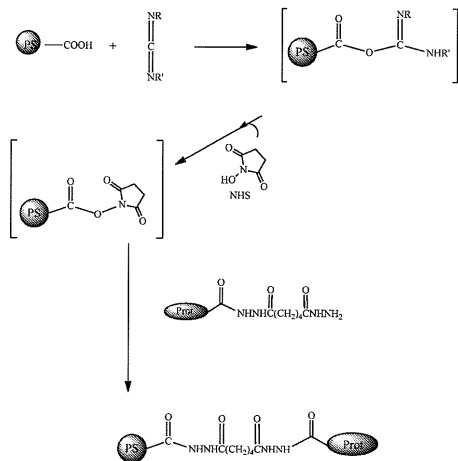
nd:検出不可

【0107】

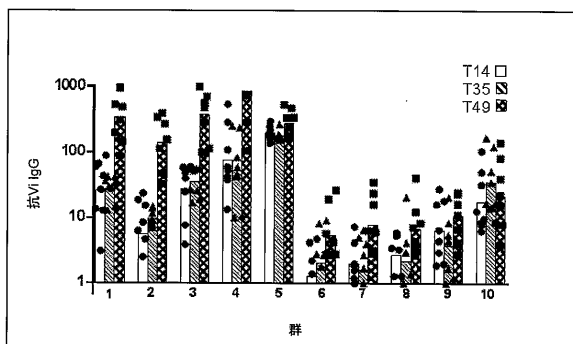
1 μgのVi抗原をそれぞれ含有する200 μLの2回の皮下注入を、0日目および35日目に行ない、14日目、35日目および49日目に採血した。抗原は、アジュバントを含まない生理食塩溶液中で注入した。抗Viを、ELISAにより評価した（図9に示される通り）。

図9にて見て取れる通り、すべての天然型Viコンジュゲートについて、14日目で高い応答が観察され、2回目の注入後にブースターは見られなかった。抗Vi IgG応答は、用いたキャリアに関わりなく、すべての全長天然型Viコンジュゲートで同様であった。断片化型Viコンジュゲートでは、2回目の注入後に抗Vi IgG応答の上昇（追加免疫効果）がCRM₁₉₇およびDTについて観察されたが、TTについては観察されず、CRM₁₉₇またはDTにコンジュゲートした断片化型Viが、T非依存性応答を実質的に含まないT依存性免疫応答を誘導できることを示唆する。2回目の注入後、抗Vi IgG応答は、用いたキャリアに関わりなく同様であった。

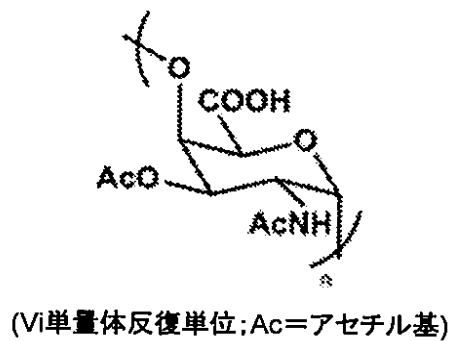
【図 1】



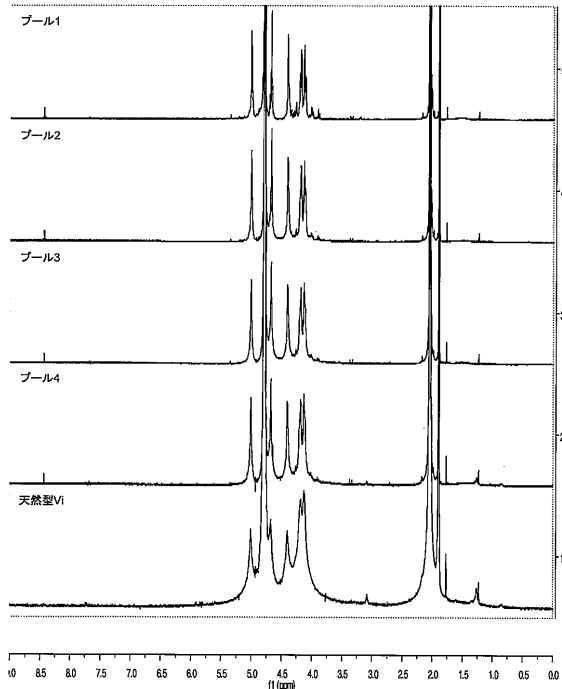
【図 2】



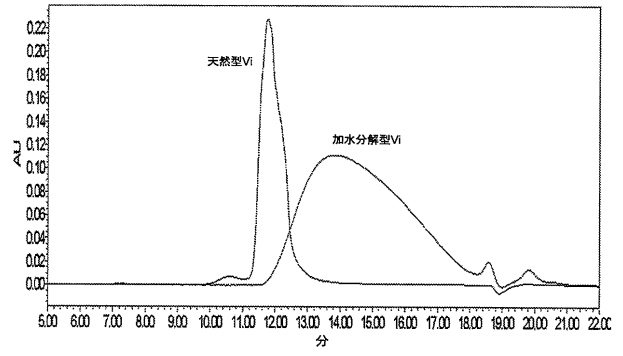
【図 3】



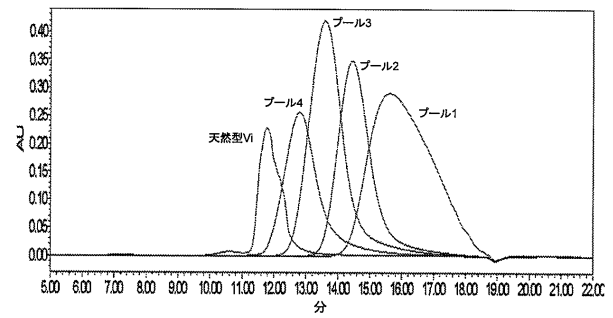
【図 4】



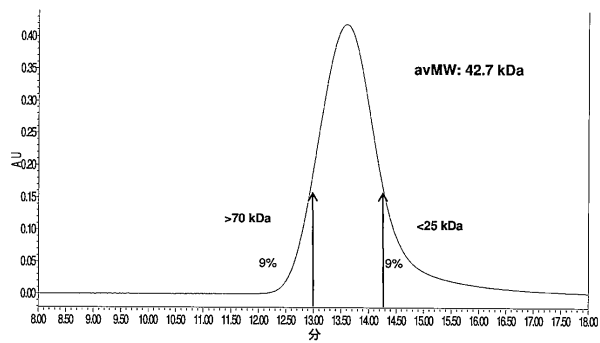
【図 5】



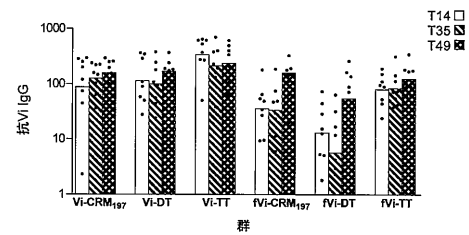
【図 6】



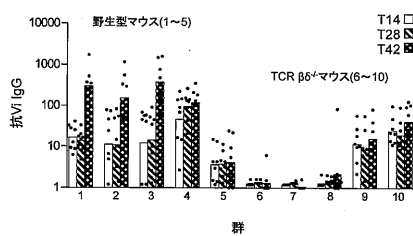
【図 7】



【図 9】



【図 8】



フロントページの続き

(74)代理人 100171505

弁理士 内藤 由美

(72)発明者 マクレナン, カルマン アレクサンダー

イタリア国 アイ-53100 シエナ, ビア フィオレンティーナ 1, ジーエスケー ワクチ
ンズ エス. アール. エル.

(72)発明者 マーティン, ローラ バートル

イタリア国 アイ-53100 シエナ, ビア フィオレンティーナ 1, ジーエスケー ワクチ
ンズ エス. アール. エル.

(72)発明者 ミコリ, フランチェスカ

イタリア国 アイ-53100 シエナ, ビア フィオレンティーナ 1, ジーエスケー ワクチ
ンズ エス. アール. エル.

(72)発明者 サウル, アラン ジェイムズ

イタリア国 アイ-53100 シエナ, ビア フィオレンティーナ 1, ジーエスケー ワクチ
ンズ エス. アール. エル.

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 国際公開第2009/150543 (WO, A1)

特表2010-514818 (JP, A)

特表平10-504524 (JP, A)

特表平08-500102 (JP, A)

特表平11-506110 (JP, A)

特表平03-502691 (JP, A)

特表2013-521315 (JP, A)

特開平08-208705 (JP, A)

特表昭63-500184 (JP, A)

特開平07-206902 (JP, A)

特開平11-019664 (JP, A)

特開平02-022234 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/112

A61K 39/05

A61P 31/04

A61P 37/04

C07K 2/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)