

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7132954号
(P7132954)

(45)発行日 令和4年9月7日(2022.9.7)

(24)登録日 令和4年8月30日(2022.8.30)

(51)国際特許分類

C 0 7 K	14/315 (2006.01)	F I	C 0 7 K	14/315
A 6 1 K	47/65 (2017.01)		A 6 1 K	47/65
A 6 1 K	39/09 (2006.01)		A 6 1 K	39/09
A 6 1 P	31/04 (2006.01)		A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	37/04 (2006.01)		A 6 1 P	37/04

請求項の数 53 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-567989(P2019-567989)
(86)(22)出願日	平成30年6月11日(2018.6.11)
(65)公表番号	特表2020-523323(P2020-523323)
	A)
(43)公表日	令和2年8月6日(2020.8.6)
(86)国際出願番号	PCT/US2018/036868
(87)国際公開番号	WO2018/227177
(87)国際公開日	平成30年12月13日(2018.12.13)
審査請求日	令和3年3月18日(2021.3.18)
(31)優先権主張番号	62/517,905
(32)優先日	平成29年6月10日(2017.6.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73)特許権者	517358982 インベントプライズ リミテッド ライア ビリティ カンパニー
(74)代理人	アメリカ合衆国 98052 ワシントン 州 レッドモンド ノースイースト シッ クスティエイス ストリート 18133 ディー 150
(72)発明者	110001173弁理士法人川口國際特許事 務所
(72)発明者	カブレ,スバッシュ・ブイ アメリカ合衆国、ワシントン・9805 2、レドモンド、ノースイースト、ワン ハンドレッドシックスティファースト・ アベニュー・11802
(72)発明者	ダッタ,アヌーブ・ケイ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改善された免疫原性及び結合活性を提供する 2 倍又は多価コンジュゲート多糖を含む多価コンジュゲートワクチン

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫原性組成物であって、

第 1 の群のコンジュゲート及び第 2 の群のコンジュゲートを含み、

第 1 の群のコンジュゲートが、1 倍コンジュゲートの第 1 の集合物を含み、各 1 倍コンジュゲートは、第 1 の担体タンパク質、及びストレプトコッカス・ニューモニエ (S tr e p t o c o c c u s P e n u m o n i a e) の莢膜多糖を含み、前記第 1 の集合物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、7 F、8、10 A、11 A、12 F、14、17 F、18 C、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の莢膜多糖を含み、

第 2 の群のコンジュゲートが、2 倍及び / 又は多価コンジュゲートの第 2 の集合物を含み、各 2 倍又は多価コンジュゲートは、第 2 の担体タンパク質、及びストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A、6 B、6 C 及び 6 D、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 9 V、9 N、9 A 及び 9 B、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 15 B、15 A 及び 15 C、並びに、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 19 A 及び 19 F からなる群の 1 又は複数から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエの少なくとも 2 つの莢膜多糖を含み、前記莢膜多糖の 1 又は複数が、二官能性リンカーにより連結され、前記多価コンジュゲートが、莢膜多糖の量よりも少ない担体タンパク質の量を含む、免疫原性組成物。

【請求項 2】

第 2 の群のコンジュゲートが、2 値である、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

2 値コンジュゲートが、式 P S 1 - 担体タンパク質 - P S 2 で表される 2 つの免疫学的に交差反応性の血清型を含み、式中、P S 1 及び P S 2 が異なる多糖を表し、担体タンパク質は、第 2 の担体タンパク質である、請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

2 値コンジュゲートが、同一の担体タンパク質に連続的に又は同時にコンジュゲートされる、請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

第 2 の群のコンジュゲートが、2 値コンジュゲートを含み、前記 2 値コンジュゲートの莢膜多糖が、10 kDa ~ 50 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。 10

【請求項 6】

二官能性リンカーが、9 ~ 40 のスペーサーアームをさらに含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

第 1 の担体タンパク質及び / 又は第 2 の担体タンパク質が、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM197、破傷風トキソイド断片 (TTHc)、N. meningitidis (N. meningitidis) タンパク質 PorB、RSVウイルスタンパク質、ボルデテラ・ペルツッシス (Bordetella Pertussis) タンパク質、ペルツッシストキソイド (PT)、アデニル酸シクラーゼ毒素 (ACT)、ヒトパピローマウイルスタンパク質抗原、ヒトパピローマウイルス 69 KDa タンパク質、ヒトパピローマウイルス VLP 型、B 型肝炎ウイルスコア抗原、B 型肝炎ウイルス VLP 型、HBsAg の誘導体、及び / 又はこれらの組合せを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。 20

【請求項 8】

1 回投与量が、4 マイクログラム未満を含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

第 1 の担体タンパク質及び第 2 の担体タンパク質の量が、コンジュゲートの 0.5 重量 % ~ 0.8 重量 % である、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

第 2 の群のコンジュゲートが、2 値コンジュゲートを含み、前記 2 値コンジュゲートの莢膜多糖が、30 KDa ~ 100 KDa の分子量を有する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。 30

【請求項 11】

1 値コンジュゲートの 1 又は複数が、リンカーを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

アルミニウム塩、リン酸カルシウム、一リン酸化脂質 A (MPLA) のリポソーム、サポニン QS-21、及び強力な TLR7/8 アゴニストからなる群から選択される少なくとも 1 つのアジュバントをさらに含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。 40

【請求項 13】

アルミニウム塩が、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 12 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

第 2 の集合物が、 streptococcus · ニューモニエの血清型 6A、6B、6C 及び 6D、streptococcus · ニューモニエの血清型 9V、9N、9A 及び 9B、streptococcus · ニューモニエの血清型 15B、15A 及び 15C、並びに streptococcus · ニューモニエの血清型 19A 及び 19F を含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

ヘモフィルス · インフルエンザ (Haemophilus influenza) a 型

10

20

30

40

50

及び / 若しくは b 型、 B 群ストレプトコッカス、モラクセラ・カタラーリス (M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s) リポオリゴ多糖 (L O S) 、無莢膜型ヘモフィルス・インフルエンザ (N T H i) 並びに / 又はネイセリア・メニンギティディス (N e i s s e r i a m e n i n g i t i s) の一又は複数の血清型の莢膜多糖をさらに含む、請求項 1 4 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 6】

第 2 の群のコンジュゲートが、2 倍コンジュゲートを含み、前記 2 倍コンジュゲートの莢膜多糖が、1 0 0 K D a ~ 3 0 0 K D a の分子量を有する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 7】

1 回投与量の投与が、同一の多糖の 1 倍コンジュゲートのみを含む同様のコンジュゲートの投与と比べて、担体タンパク質に対するより低い免疫応答を生じる、請求項 1 の免疫原性組成物。

【請求項 1 8】

第 1 の群の 1 倍莢膜多糖、及び第 2 の群の 2 倍又は多価莢膜多糖を含む免疫原性組成物であって、

前記第 1 の群の 1 倍莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 7 F 、 8 、 1 0 A 、 1 1 A 、 1 2 F 、 1 4 、 1 7 F 、 1 8 C 、 2 0 、 2 2 F 、 2 3 F 、 2 4 F 、 3 3 F 及び 3 5 B の多糖を含み、

前記第 2 の群の 2 倍又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A 、 6 B 、 6 C 及び 6 D 、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 9 V 、 9 N 、 9 A 及び 9 B 、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1 5 B 、 1 5 A 及び 1 5 C 、並びに、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1 9 A 及び 1 9 F からなる群の 1 又は複数から選択される 2 以上の多糖を含み、

前記第 1 の群の 1 倍莢膜多糖は、第 1 の担体タンパク質に連結した第 1 の P E G リンカーにそれぞれ共有結合し、

前記第 2 の群の 2 倍又は多価莢膜多糖は、第 2 の担体タンパク質に連結した第 2 の P E G リンカーにそれぞれ共有結合している、免疫原性組成物。

【請求項 1 9】

2 倍又は多価莢膜多糖が、ストレプトコッカス・ニューモニエの 2 つの免疫学的に交差反応性の血清型を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

第 2 の群の 2 倍又は多価莢膜多糖が、多糖 - P E G - 担体タンパク質 - P E G - 多糖の構造を含む、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

第 2 の P E G リンカーに共有結合している 2 倍又は多価莢膜多糖が、第 2 の担体タンパク質に連続的に又は同時に共有結合される、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

第 1 の群の 1 倍莢膜多糖及び / 又は第 2 の群の 2 倍又は多価莢膜多糖が、1 0 k D a ~ 5 0 k D a 、3 0 k D a ~ 1 0 0 k D a 、及び / 又は1 0 0 k D a ~ 3 0 0 k D a の莢膜多糖を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

第 2 の群の 2 倍又は多価莢膜多糖が、6 A - P E G - C R M 1 9 7 - P E G - 6 B の構造を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

第 1 の担体タンパク質及び / 又は第 2 の担体タンパク質が、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、C R M 1 9 7 、破傷風トキソイド断片 (T T H c) 、ネイセリア・メニンギティディス (N . m e n i n g i t i d i s) タンパク質 P o r B 、 R S V ウイルスタンパク質、ボルデテラ・ペルツッシス (B o r d e t e l l a P e r t u s s i s) タンパク質、ペルツッシストキソイド (P T) 、アデニル酸シクラーゼ毒素 (A C T) 、

10

20

30

40

50

ヒトパピローマウイルス 6 9 K D a タンパク質、ヒトパピローマウイルスタンパク質抗原、ヒトパピローマウイルスウイルス様粒子（V L P）型、B 型肝炎ウイルスコア抗原、B 型肝炎ウイルス V L P 型、B 型肝炎ウイルス表面抗原（H B s A g）、及び／又はこれらの組合せを含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

1 回投与あたり 4 マイクログラム以下の総多糖を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

第 1 の担体タンパク質及び第 2 の担体タンパク質が、0.5 重量%～0.8 重量% 含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

総担体タンパク質に対して、重量で約等量の莢膜多糖を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

総担体タンパク質に対して、重量でより多い量の莢膜多糖を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

少なくとも 1 つのアジュバントをさらに含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

アジュバントが、アルミニウム塩、リン酸カルシウム、一リン酸化脂質 A (M P L A) のリポソーム、サポニン Q S - 2 1、T L R 7 / 8 アゴニスト、及びその組み合わせからなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

アルミニウム塩が、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 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

ヘモフィルス・インフルエンザ (*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a*) a 型若しくは b 型、B 群ストレプトコッカス、ネイセリア・メニンギティディス、又はその組み合わせの一又は複数の血清型をさらに含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖及び／又は第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖が、ヘモフィルス・インフルエンザ血清型 a / b / c / d / e / f、無莢膜型ヘモフィルス・インフルエンザ (N T H i) 多糖、モラクセラ・カタラーリスピロオリゴ糖 (L O S)、又はその組み合わせに由来する、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖及び／又は第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖が、N . メニンギティディス血清型 A、B、C、Y、W - 1 3 5 又は X の莢膜多糖を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖及び／又は第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖が、B 群ストレプトコッカス血清型 I a、I b、I I、I I I、I V、V、V I、V I I I、V I I I I、I X 又は N の莢膜多糖を含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖が、第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖と、重量でほぼ等量である、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

対象に投与すると、同一の多糖に含まれる 1 価コンジュゲートと比較して、担体タンパク質に対してより低い免疫応答を生じる、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

ストレプトコッカスによる感染の効果的な治療又は予防を提供する、請求項 1 8 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 9】

治療有効量の薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 4 0】

ヘモフィルス・インフルエンザ、ネイセリア・メニンギティディス、B 群ストレプトコッカス、及びその組み合わせの莢膜多糖をさらに含む、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 4 1】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖、及び第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖を含む免疫原性組成物であって、

前記第 1 の群の 1 価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、7 F、8、10 A、11 A、12 F、14、17 F、18 C、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、10

前記第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A、6 B、6 C 及び 6 D、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 9 A、9 B、9 N 及び 9 V、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 15 A、15 B 及び 15 C、並びに、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 19 A 及び 19 F からなる群の 1 又は複数から選択される 2 以上の多糖を含み、

前記第 2 の群に含まれないストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A、6 B、6 C、6 D、9 A、9 B、9 N、9 V、15 A、15 B、15 C、19 A 及び 19 F の多糖は、前記第 1 の群に含まれ、20

前記第 1 の群の 1 価莢膜多糖は、第 1 の担体タンパク質に連結した第 1 の PEG リンカーにそれぞれ共有結合し、20

前記第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖は、第 2 の担体タンパク質に連結した第 2 の PEG リンカーにそれぞれ共有結合している、免疫原性組成物。

【請求項 4 2】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、7 F、8、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A、6 B、6 C、6 D、9 A、9 B、9 N 及び 9 V の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。30

【請求項 4 3】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、7 F、8、9 A、9 B、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A、6 B、6 C、6 D、15 A、15 B 及び 15 C の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。30

【請求項 4 4】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、7 F、8、9 A、9 B、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A、6 B、6 C、6 D、19 A 及び 19 F の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。40

【請求項 4 5】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 F、8、10 A、11 A、12 F、14、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、第 2 の群の 2 価又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 9 A、9 B、9 N、9 V、15 A、15 B 及び 15 C の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。40

【請求項 4 6】

第 1 の群の 1 価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 F、8、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B 及び 15 C の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。50

5 B、15 C、17 F、18 C、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、第 2 の群の 2 値又は多価莢膜多糖は、9 A、9 B、9 N、9 V、19 A 及び 19 F の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

第 1 の群の 1 値莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 F、8、9 A、9 B、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、17 F、18 C、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、第 2 の群の 2 値又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 15 A、15 B、15 C、19 A 及び 19 F の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

第 1 の群の 1 値莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、7 F、8、10 A、11 A、12 F、14、17 F、18 C、20、22 F、23 F、24 F、33 F 及び 35 B の多糖を含み、第 2 の群の 2 値又は多価莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 6 A、6 B、6 C、6 D、9 A、9 B、9 N、9 V、15 A、15 B、15 C、19 A 及び 19 F の多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

第 1 の群の 1 値莢膜多糖及び / 又は第 2 の群の 2 値又は多価莢膜多糖は、10 kDa ~ 50 kDa、30 kDa ~ 100 kDa、及び / 又は100 kDa ~ 300 kDa の莢膜多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

1 回投与当たり、4 マイクログラム以下の総多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

第 1 の担体タンパク質及び第 2 の担体タンパク質の含量が、0.5 重量 % ~ 0.7 重量 % 含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 5 2】

総担体タンパク質に対して、重量で約等量の莢膜多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

総担体タンパク質に対して、重量でより多い量の莢膜多糖を含む、請求項 4 1 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、この全体を特に参照により本明細書に組み込む、2017年6月10日に出願された米国仮出願第 62/517,905 号の優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、担体タンパク質とコンジュゲートされている細菌莢膜多糖を含む多価コンジュゲート、免疫原性組成物及びワクチン並びにこれらの使用を対象とする。具体的には、本発明の組成物は、1 値及び多価の細菌莢膜多糖 - タンパク質コンジュゲートを含み、細菌莢膜多糖及びオリゴ糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) の血清型に由来する。担体タンパク質は、好ましくは定義された長さの単官能性並びに二官能性リンカーを介して、細菌莢膜多糖とコンジュゲートされ、単官能性又は二官能性リンカーは、ホモ単官能性、ホモ二官能性、ヘテロ単官能性又はヘテロ二官能性でありうる。

【背景技術】

【0003】

ストレプトコッカス・ニューモニエは、肺炎、菌血症、髄膜炎及び急性中耳炎のような侵襲性肺炎球菌疾患 (IPD) の原因である、グラム陽性病原体である。肺炎は最も一般的な侵襲性肺炎球菌疾患の兆候であり、他方で、気道内に細菌が蔓延すると、中耳感染、副鼻腔炎又は再発性気管支炎をもたらすことがある。肺炎球菌は、化学的に結合した多糖

10

20

30

40

50

でカプセル化されており、これにより血清型特異性がもたらされる。少なくとも 90 個の肺炎球菌の血清型が知られており、約 23 個が侵襲性疾患の 90 % を占め、莢膜多糖は、貧弱な免疫原である。

【 0 0 0 4 】

現在、世界市場で入手可能な 3 つの P C V ワクチン、 P R E V N A R (登録商標)、 S Y N F L O R I X (登録商標) 及び P R E V N A R - 1 3 (登録商標) が存在する。 P R E V N A R - 1 3 (登録商標) において見出されない血清型のため及び経時的な血清型置換の可能性のために、肺炎球菌疾患の適用範囲について残存する満たされていない医学的必要性に対処することが必要とされている。ヒトにおいて及び 2 歳未満の小児において、さらなるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に対する免疫反応を誘導するために使用することができる、免疫原性組成物が必要とされている。

10

【 0 0 0 5 】

莢膜多糖 (C P S) は、主要な病原性決定基であり、概して、幼児及び小児において T 細胞依存性免疫反応を誘導するためには免疫原性が不十分である。担体タンパク質の C P S とのコンジュゲーションは、クラススイッチを受ける免疫反応を誘導することができる。したがって、7 倍の肺炎球菌コンジュゲートワクチン (P C V - 7、 P f i z e r I n c . 、 U S A) 、 10 倍の肺炎球菌コンジュゲートワクチン (S y n f l o r o x - 1 0 、 G S K ワクチン) 及び 13 倍の肺炎球菌コンジュゲートワクチン (P C V - 1 3 、 P f i z e r I n c . 、 U S A) が、 I P D の発生を効率的に予防するために開発されている。還元的アミノ化化学及びシアニル化化学は、コンジュゲートワクチンを調製するために、広く使用されている。

20

【 0 0 0 6 】

これらのコンジュゲートにおいて、 C P S と担体タンパク質との間の短い C - N 結合 (2.1) は、担体タンパク質及び低い C P S / タンパク質比により、 C P S エピトープの立体遮蔽をもたらす。現在のワクチンの不利益を最小化するために、重要なパラメーターが必要とされている。

【 0 0 0 7 】

米国特許第 9,492,559 号は、コンジュゲートされている莢膜多糖抗原を含む免疫原性組成物及びその使用を開示している。開示された免疫原性組成物は、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 又は 20 倍の肺炎球菌コンジュゲート組成物を含む。 7 、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 22 、 23 、 24 又は 25 倍の肺炎球菌コンジュゲート組成物も開示されている。

30

【 0 0 0 8 】

国際出願公開第 2014/097099 A2 号は、 P r e e v n a r - 1 3 倍コンジュゲートに加えて、数種の血清型を対象とするグリココンジュゲーション方法を開示している。新規の多糖コンジュゲートが、ワクチンの有効性を増加させるために、製剤に加えられる。

【 0 0 0 9 】

米国特許出願公開第 2011/023526 号は、 15 倍肺炎球菌多糖 - タンパク質コンジュゲートワクチン組成物を開示している。この特許は、現在入手可能な 1 ~ 3 つのワクチンに 2 つ以上の血清型を加えることにより作製された、 15 倍コンジュゲートワクチンを対象とする。

40

【 0 0 1 0 】

国際出願公開第 2016/207905 号は、多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンを開示している。この出願は、 13 倍以上のコンジュゲートワクチン及び血清型 6 A の欠失を対象とする。

【 0 0 1 1 】

米国特許出願公開第 2017/007713 号は、官能性が強化された、 ((2 - オキソエチル) チオ) を含有するリンカーを開示している。

50

【 0 0 1 2 】

国際出願公開第 2 0 1 4 / 0 9 2 3 7 7 号は、12 個の血清型が、血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F 及び 23 F からなる群から選択され、1つが 12 又は 9 N から選択される、13 値組成物を開示している。

【 0 0 1 3 】

国際出願公開第 2 0 1 4 / 0 9 2 3 7 8 号は、13 個の異なる多糖 - タンパク質コンジュゲートを有し、各コンジュゲートが、血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F 及び 23 F からなる群から選択される 12 個の血清型並びに血清型 22 F 又は 33 F から単離された莢膜多糖を含有する、免疫原性組成物を開示している。 10

【 0 0 1 4 】

中国出願公開第 1 0 1 5 9 0 2 2 4 号は、血清型 1、2、4、5、6 A、6 B、7 F、9 N、9 V、14、18 C、19 A、19 F 及び 23 F を含有する、14 値肺炎球菌多糖 - タンパク質コンジュゲートワクチンを開示している。

【 0 0 1 5 】

中国出願公開第 1 0 4 0 6 9 4 8 8 号は、14 個の血清型が 1、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F 及び 33 F であった、14 値多糖タンパク質コンジュゲートを開示している。

【 0 0 1 6 】

国際出願公開第 2 0 1 6 2 0 7 9 0 5 号は、CRM 197 と血清型 1、3、4、5、6 B、7 F、9 N、9 V、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F 及び 33 F から選択される少なくとも 14 個の莢膜多糖のコンジュゲートとを含む、多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンを開示している。米国特許第 8,192,746 号は、CRM 197 とコンジュゲートされている、血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F 及び 33 F に由来する莢膜多糖を含む、15 値免疫原性組成物を開示している。 20

【 0 0 1 7 】

国際出願公開第 2 0 1 3 / 1 9 1 4 5 9 号は、1、2、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 N、9 V、14、18 C、19 A、19 F 及び 23 F の血清型由来の S. ニューモニウム (S. pneumoniae) 莢膜多糖を含む、15 値組成物を開示している。 30

【 0 0 1 8 】

中国出願公開第 1 0 3 6 5 6 6 3 2 号は、血清型 6 A 並びに 1、2、3、4、5、6 B、7 F、8、9 N、10 A、11 A、12 F、14、15 B、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F 及び 33 F からなる群から選択される少なくとも 1 つの追加の血清型を含有し、24 個の異なる肺炎球菌血清型に対する防御を提供する、多価肺炎球菌莢膜多糖組成物を開示している。

【 0 0 1 9 】

中国出願公開第 1 0 3 6 5 6 6 3 1 号は、24 個の異なる血清型、すなわち、1、2、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F 及び 33 F の肺炎球菌の莢膜多糖を含む、多価肺炎球菌莢膜多糖 - タンパク質コンジュゲート組成物を開示している。 40

【 0 0 2 0 】

米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 3 2 4 9 5 0 号は、B 群ストレプトコッカス (group B streptococcus) (GBS) とも称される、ストレプトコッカス・アガラクチア (Streptococcus agalactiae) 由来の莢膜多糖 (CP) 及び担体タンパク質を含み、CP が血清型 Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII 及び IX からなる群から選択される、免疫原性多糖 - タンパク質コンジュゲートを開示している。これは、慢性糖尿病、がん、心不全、神経学的及び泌尿器科学的状態の治療のためにあった。担体タンパク質莢膜多糖コンジュゲートは多様であった。 50

【 0 0 2 1 】

米国特許第 5 , 3 6 0 , 8 9 7 号は、少なくとも 2 つのカルボニル基を有する、細菌病原体である S . ニュー モニ工のインタクトな莢膜ポリマーの還元的アミノ化生成物及び細胞毒素又はトキソイドを含む免疫原性コンジュゲートであって、莢膜ポリマーと毒素又はトキソイドとの間に直接共有結合が存在する架橋コンジュゲートを含む、免疫原性コンジュゲートを開示している。

【 0 0 2 2 】

米国特許第 7 , 8 6 2 , 8 2 3 号は、少なくとも 2 つの異なる担体タンパク質を含む、多価コンジュゲートワクチン組成物を記述している。

【 0 0 2 3 】

10

米国特許第 8 , 8 0 8 , 7 0 8 号は、血清型が 1 、 3 、 4 、 5 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 9 V 、 1 4 、 1 8 C 、 1 9 A 、 1 9 F 及び 2 3 F からなり、担体タンパク質が C R M I 9 7 である、多糖 - タンパク質コンジュゲートからなる 1 3 倍免疫原性組成物を開示している。

【 0 0 2 4 】

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 1 7 0 5 9 号は、血清型 1 9 A 及び 1 9 F が異なる細菌トキソイドとコンジュゲートされている、免疫原性組成物を開示している。

【 0 0 2 5 】

国際出願公開第 2 0 1 1 / 1 1 0 2 4 1 号は、免疫原性組成物又はワクチンの異なる成分について異なるコンジュゲーション化学が使用された、肺炎球菌コンジュゲート免疫原性組成物又はワクチンを記述している。少なくとも 1 つの血清型のコンジュゲーションについて還元的アミノ化が使用され、異なる血清型のコンジュゲーションについて還元的アミノ化以外のコンジュゲーションが使用されていた。異なる血清型について選択されるコンジュゲーション方法により、糖エピトープを最も良好に提示させるコンジュゲーション方法を使用して、各血清型が提示された。いくつかの肺炎球菌糖は、還元的アミノ化を使用して良好にコンジュゲートされ、一方、他の肺炎球菌糖は異なってコンジュゲートされ、環構造を壊れないままにさせ、より良い結果を提供する。

20

【 0 0 2 6 】

米国特許第 7 , 9 5 5 , 6 0 5 号は、血清型 1 9 A からなる担体タンパク質多糖コンジュゲートを作製する方法であって、活性化血清型 1 9 A 多糖及び担体タンパク質をジメチルスルホキシド (D M S O) に再懸濁させて、コンジュゲートを形成する方法を開示している。

30

【 0 0 2 7 】

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 7 4 9 2 2 号は、10 個以上の血清型を含有する免疫原性組成物であって、1 9 F 莢膜糖が、ジフテリアトキソイド (D T) とコンジュゲートされ、血清型 1 8 C 莢膜糖が、破傷風トキソイドとコンジュゲートされ、血清型 1 、 4 、 5 、 6 B 、 7 F 、 9 V 、 1 4 及び 2 3 F 莢膜糖が、ヘモフィルス・インフルエンザ (H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a) 由来のタンパク質 D とコンジュゲートされている、免疫原性組成物を開示している。

【 0 0 2 8 】

40

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 3 9 6 0 4 号は、多価 S . ニュー モニ工莢膜糖コンジュゲートを含む組成物であって、血清型 1 9 A が、第 1 の細菌トキソイドとコンジュゲートされ、1 9 F が、第 2 の細菌トキソイドとコンジュゲートされ、S . ニュー モニ工莢膜糖の 2 ~ 9 つが、タンパク質 D とコンジュゲートされている、組成物を開示している。より多数の血清型に対する防御を提供するワクチンの開発による防御の範囲の増加とは別に、合成の新規の方法を開発することに集中した取り組みがなされている。

【 0 0 2 9 】

米国特許第 7 , 7 0 9 , 0 0 1 号は、莢膜多糖の担体タンパク質コンジュゲートの合成の方法であって、1) 精製した多糖を弱酸と反応させて小型化をもたらすステップ、2) 2 倍陽イオンの存在下で、ステップ 1 の多糖を酸化剤と反応させて、活性化多糖をもたらすステップ、3) 活性化多糖を担体タンパク質と化合させるステップ、4) ステップ 3 の

50

活性化多糖及び担体タンパク質を還元剤と反応させて、多糖 - 担体タンパク質コンジュゲートを形成するステップ及び 5) ステップ 4 の生成物中の未反応のアルデヒドをキャッピングして、免疫原性多糖 - 担体タンパク質コンジュゲートを得るステップからなる、方法を記述している。

【 0 0 3 0 】

国際出願公開第 2 0 1 4 / 0 9 7 0 9 9 号は、担体タンパク質コンジュゲートを合成する方法であって、 a) 水性溶媒中で、糖を 2 , 2 , 6 , 6 - テトラメチル - 1 - ピペリジニルオキシ (T E M P O) 及び N - クロロスクシンイミド (N C S) と反応させて、活性化糖を生成するステップ並びに b) 活性化糖を、 1 つ以上のアミン基を含む担体タンパク質と反応させるステップを含む、方法を開示している。

10

【 0 0 3 1 】

米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 3 2 1 6 5 8 号は、血清型 1 、 3 、 1 9 A 及び 1 9 F が、還元的アミノ化以外の化学によって直接的又は間接的のいずれかで、タンパク質担体に結合結合しており、 1 つ以上の異なる糖が、還元的アミノ化によりタンパク質担体) と結合結合している血清型 4 、 5 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 9 V 、 1 4 、 1 8 C 及び 2 3 F からなる第 2 の群から選択される、免疫原性組成物を開示している。

【 0 0 3 2 】

肺炎球菌ワクチンは、 1) 肺炎球菌多糖ワクチン及び 2) 肺炎球菌コンジュゲートワクチンをベースとする。 M e r c k から販売されている P N E U M O V A X (登録商標) は、血清型 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 B 、 7 F 、 8 、 9 N 、 9 V 、 1 0 A 、 1 1 A 、 1 2 F 、 1 4 、 1 5 B 、 1 7 F 、 1 8 e 、 1 9 F 、 1 9 A 、 2 0 、 2 2 F 、 2 3 F 及び 3 3 F に属する非コンジュゲート多糖を含んでなる。幼児及び低年齢小児は、大半の肺炎球菌多糖に不十分にしか反応しない。不十分な免疫原の免疫原性は、担体タンパク質とコンジュゲートすることにより強化される。多糖タンパク質コンジュゲートワクチンは、タンパク質担体と結合している莢膜多糖を使用して作製される。コンジュゲートは、特定の血清型に対する T 細胞依存性の強化された免疫反応を誘導する。

20

【 0 0 3 3 】

コンジュゲートは、さまざまな長さのホモ二官能性、ヘテロ二官能性リンカーのような多様な試薬を使用して合成される。 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 (登録商標) 、 S Y N F L O R I X (登録商標) 及び P R E V N A R - 1 3 (登録商標) が、市場で入手可能である。 P R E V N A R (登録商標) は、 C R M 1 9 7 と名付けられている担体タンパク質とそれぞれコンジュゲートしている、血清型 4 、 6 B 、 9 Y 、 1 4 、 1 8 C 、 1 9 F 及び 2 3 F 由来の莢膜多糖を含有する、 7 倍ワクチンである。 S Y N F L O R I X (登録商標) は、 N T H i 由来のタンパク質 D とコンジュゲートされている 1 0 個の莢膜多糖を組み込んだ、 3 つのさらなる肺炎球菌株である血清型 1 、 5 及び 7 F に対する適用範囲を提供する、 G S K B i o l o g i c a l s からの 1 0 倍ワクチンである。 P R E V N A R - 1 3 (登録商標) は、 C R M 1 9 7 と名付けられている担体タンパク質とコンジュゲートされている、ストレプトコッカス・ニューモニエの 1 3 個の血清型 (1 、 3 、 4 、 5 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 9 Y 、 1 4 、 1 8 C 、 1 9 A 、 1 9 F 及び 2 3 F) から調製されている 1 3 個の莢膜多糖を含有する、 1 3 倍ワクチンである。

30

【 0 0 3 4 】

増加しつつある抗生物質への微生物耐性及び増加しつつある免疫不全者の数は、さらなるより広い防御を有する肺炎球菌ワクチンの開発を必要とし、これにより、特に、 P R E V N A R - 1 3 (登録商標) において見出されない血清型による肺炎球菌疾患の適用範囲について、より多くの血清型に対して有効な多価ワクチンの開発がもたらされてきた。特定の血清型についての必要性は、地域及び発生した抗生物質耐性に依存する。したがって、米国特許第 8 1 9 2 7 4 6 号は、 1 5 個の別個の多糖 - タンパク質コンジュゲートを有する、多価免疫原性組成物を報告している。各コンジュゲートは、担体タンパク質 C R M 1 9 7 とコンジュゲートされている、ストレプトコッカス・ニューモニエ (1 、 3 、 4 、 5 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 9 \ 1 、 1 4 、 1 8 C 、 1 9 A 、 1 9 F 、 2 2 F 、 2 3 F 又は 3

40

50

3 F) の血清型から調製された莢膜多糖からなる。血清型 15 B 、 15 C 及び 15 A に対する免疫反応を誘導するワクチンが必要とされている。

【 0 0 3 5 】

多価コンジュゲートワクチン製剤における多糖抗原数の増加と共に、担体タンパク質の含有量が増加する。この増加は、全身的な過剰負荷を引き起こすことがある、担体タンパク質に対する免疫反応の増加をもたらす。

【 0 0 3 6 】

したがって、増加しつつある血清型数に対して防御を提供する、肺炎球菌ワクチンを開発する必要がある。コンジュゲーションによるより高い価のワクチンは非常に望ましいが、担体タンパク質に対する免疫反応も低下させることが好ましい。さらなる血清型への防御の範囲を広げる多価ワクチンの開発において、コンジュゲートワクチンの免疫原性及び結合活性を改善し、すべてに対する免疫反応を損なうことなく、増えつつある血清型数を受け入れる必要があり、これは従来のコンジュゲーション方法では不可能である。増えつつある血清型数に対する防御に加え、増えつつある血清型数にさえ対する免疫反応を改善し、並びに担体タンパク質反応を低下させる（及び立体障害も避ける）ために、コンジュゲーションのための新規のリンカーを開発する必要もある。

10

【 0 0 3 7 】

多数の参考文献が現在入手可能なワクチンの有効性を唱えているが、複数の新規の血清型を加えると、元の血清型に対する数の増加に伴い、免疫反応は低下する。免疫反応の有効性を増加させるための、さらなる血清型が必要とされている。加えて、より大きな有効性は、好ましくは、担体タンパク質に対する免疫反応の低下を含むべきである。したがって、世界中で感染に対する障壁を提供するための、より高い価数の肺炎球菌コンジュゲートワクチンについての大きな必要性が残っている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 3 8 】

【文献】米国特許第 9 , 492 , 559 号明細書

国際公開第 2014 / 097099 号

米国特許出願公開第 2011 / 023526 号明細書

国際公開第 2016 / 207905 号

30

米国特許出願公開第 2017 / 007713 号明細書

国際公開第 2014 / 092377 号

国際公開第 2014 / 092378 号

中国特許出願公開第 101590224 号明細書

中国特許出願公開第 104069488 号明細書

米国特許第 8 , 192 , 746 号明細書

国際公開第 2013 / 191459 号

中国特許出願公開第 103656632 号明細書

中国特許出願公開第 103656631 号明細書

米国特許出願公開第 2016 / 0324950 号明細書

40

米国特許第 5 , 360 , 897 号明細書

米国特許第 7 , 862 , 823 号明細書

米国特許第 8 , 808 , 708 号明細書

米国特許出願公開第 2009 / 0017059 号明細書

国際公開第 2011 / 110241 号

米国特許第 7 , 955 , 605 号明細書

米国特許出願公開第 2010 / 0074922 号明細書

米国特許出願公開第 2010 / 0239604 号明細書

米国特許第 7 , 709 , 001 号明細書

米国特許出願公開第 2012 / 321658 号明細書

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0039】**

本発明は、現在の方策及び設計に関連する問題及び不利益を克服し、コンジュゲートされている莢膜糖を含む新規の免疫原性組成物及びこの使用を提供する。

【課題を解決するための手段】**【0040】**

本発明の一実施形態は、2つの群のコンジュゲートを含み、群1が1価細菌莢膜多糖コンジュゲートを含み、群2が交差反応性を有する2価細菌莢膜多糖のコンジュゲートを含有する多価コンジュゲートを含む、多価S.ニューモニエコンジュゲートワクチンを対象とする。好ましくは、群1のコンジュゲートは、1つ以上のS.ニューモニエ血清型1、2、3、4、5、7F、8、10A、11A、12F、14、17F、18C、20、22F、23F、24F、33F及び35Bの1価莢膜多糖コンジュゲートから構成されている。好ましくは、群2のコンジュゲートは、S.ニューモニエ血清型6A/6B/6C/6Dの1つ若しくは2つ以上、S.ニューモニエ血清型9V/9N/9A/9Bの1つ、若しくは2つ以上又はS.ニューモニエ血清型15B/15A/15Cの1つ、若しくは2つ以上又はS.ニューモニエ血清型19A/19Fの交差反応性血清型の2価又は多価莢膜多糖コンジュゲート、及び担体タンパク質から構成されている。好ましくは、多価S.ニューモニエコンジュゲートワクチンを構成する第2の群は、S.ニューモニエ交差反応性血清型の多価コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、2価の単分子であり、細菌莢膜多糖に由来する。好ましくは、ワクチンは、同一の担体タンパク質に連続的に又は同時にコンジュゲートされている、2つの免疫学的に交差反応性の血清型の莢膜多糖を含む。好ましくは、第1の又は第2の群の1価細菌莢膜多糖コンジュゲートは、10KDa~50KDa、30KDa~100KDa又は100KDa~300KDaの範囲の分子量で、天然の細菌莢膜多糖から合成される。

10

20

30

【0041】

好ましくは、2つの免疫学的に交差反応性の血清型の2価莢膜多糖は、式PS1 - 担体タンパク質 - PS2で表され、また好ましくは、コンジュゲートは6APS-CRM197-6BPSを含む。好ましくは、担体タンパク質は、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM197、破傷風トキソイド断片(PTHc)、N.メンингイティディス(N.meningitidis)タンパク質PorB、RSVウイルスタンパク質、B.ペルツッシス(B.Pertussis)タンパク質、ペルツッシストキソイド(PT)、アデニル酸シクラーゼ毒素(ACt)、69KDaタンパク質、ヒトパピローマウイルスタンパク質抗原、ヒトパピローマウイルスVLP型、B型肝炎ウイルスコア抗原、B型肝炎ウイルスVLP型、HBsAgの誘導体又はこれらの組合せを含む。好ましくは、2価交差反応性多糖コンジュゲートの単回用量は、4マイクログラム以上である同一の2つの多糖ワクチンの1価コンジュゲートと比較して、4マイクログラム未満を含む。

【0042】

好ましくは、多価コンジュゲートワクチン中の総担体タンパク質量は、同一の交差反応性血清型の、各個の多糖のモノコンジュゲートにおいて使用される量よりも、有意に少ない。好ましくは、本発明のワクチンにおいて、2価交差反応性多糖とコンジュゲートされている担体タンパク質の量は、同一の2つの多糖の1価コンジュゲートの担体タンパク質の量と比較して、血清型あたり少ないタンパク質を有するので、したがって、ワクチンにより発生する担体タンパク質免疫反応は、他の、別個の多糖のモノコンジュゲートを含有するものにより作製されたワクチンの担体タンパク質への反応よりも低い。好ましくは、多価コンジュゲートワクチン中の総担体タンパク質含有量は、同一の交差反応性血清型の各個の多糖のモノコンジュゲートの0.5~0.7重量%である(PS:担体タンパク質の間の比が1:1である)。好ましくは、コンジュゲートワクチンは、アルミニウム若しくはアルミニウム塩、リン酸カルシウム、一リン酸化脂質A(MPLA)のリポソーム、サポニンQS-21及び/又は強力なTLR7/8アゴニストからなる群から選択される

40

50

、少なくとも 1 つのアジュバントをさらに含む。好ましくは、少なくとも 1 つのアジュバントは、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、アルミニウムアジュバントを含む。好ましくは、細菌多糖は、S . ニューモニエ工及び H . インフルエンザ (H . i n f l u e n z a) a 、 b 血清型、 S . ニューモニエ工及び B 群ストレプトコッカス血清型、 H . インフルエンザ a 、 b 血清型又は N . メニンギティディス血清型を含む、異なる細菌莢膜多糖及び / 又は細菌多糖由來の交差反応性の 2 つ以上の血清型からなる群から選択される。好ましくは、莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ヘモフィルス・インフルエンザ、 N . メニンギティディス、 B 群ストレプトコッカス又はモラクセラ・カタラーリス (M o r a x e l l a c a t a r r h a l i s) リポオリゴ糖 (L O S) に由來する多糖を含む。また好ましくは、 S . ニューモニエ工莢膜多糖は、 6 A / 6 B / 6 C / 6 D 、 9 V / 9 A / 9 B . 9 N 、 1 5 A / 1 5 B 、 1 9 A / 1 9 F からなる群から選択される血清型及び同様の種類の交差反応性多糖と、免疫化学的に交差反応性である。好ましくは、莢膜多糖は、ヘモフィルス・インフルエンザ血清型 a / b / c / d / e / f 、無莢膜型ヘモフィルス・インフルエンザ (N T H i) 多糖又はモラクセラ・カタラーリスリポオリゴ糖 (L O S) 又は N . メニンギティディス血清型 A 、 B 、 C 、 Y 、 W - 1 3 5 若しくは X 又は B 群ストレプトコッカス血清型 I a 、 I b 、 I I 、 I I I 、 I V 、 V 、 V I 、 V I I 、 V I I I . I X 及び N 並びに N . メニンギティディス血清型 A 、 C 、 Y 、 X 及び W - 1 3 5 に由來する。

【 0 0 4 3 】

本発明の別の実施形態は、治療有効量の本発明のコンジュゲートワクチン及び、任意選択的に、薬学的に許容される担体を含む、グラム陽性又はグラム陰性病原体による感染の治療又は予防のためのコンジュゲートワクチンを対象とする。好ましくは、莢膜多糖は、ヘモフィルス・インフルエンザ、 N . メニンギティディス、 B 群ストレプトコッカス、 N . メニンギティディス、 H . インフルエンザ、モラクセラ・カタラーリスリポオリゴ糖 (L O S) 及びこれらの組合せに由來する。

【 0 0 4 4 】

本発明の別の実施形態は、多糖を担体タンパク質とカップリングさせるための方法であって、多糖を活性化するステップ、約 2 . 0 ~ 4 0 の定義された長さのスペーサーアームを活性化多糖に付着させるステップ、及び活性化多糖が付着したスペーサーアームを担体タンパク質に付着させるステップを含む、方法を対象とする。

【 0 0 4 5 】

本発明の別の実施形態は、担体タンパク質を多糖とカップリングさせる方法であって、前記担体タンパク質を活性化するステップ、担体タンパク質ジスルフィドを還元して、スルフヒドリル基を生成する、好ましくは 2 - イミノチオラン (2 - I T) 、二官能性リンカーのような S M P H を使用してスルフヒドリル基を生成するステップ、 4 ~ 4 0 の定義された長さのスペーサーアームを活性化担体タンパク質に付着させるステップ、及び多糖を活性化担体タンパク質に付着したスペーサーアームに付着させるステップを含む、方法を対象とする。好ましくは、活性化担体タンパク質は、 C . ジフテリア (C . d i p h t h e r i a) から得られた若しくはこれに由來する交差反応性材料 (C R M 1 9 7) 又は P . フルオレッセンス (P . f l u o r e s c e n s) 若しくは E . コリ (E . c o l i) から得られた若しくはこれらに由來する組換え C R M 1 9 7 からなる群から選択される。

【 0 0 4 6 】

本発明の別の実施形態は、ホモ二官能性又はヘテロ二官能性である二官能性リンカーを対象とする。

【 0 0 4 7 】

本発明の別の実施形態は、担体タンパク質が、 C . ジフテリアから得られた交差反応性材料 (C R M 1 9 7) 、 P . フルオレッセンスから得られた組換え C R M 1 9 7 又は E . コリから得られた組換え C R M 1 9 7 である、多価 S . ニューモニエコンジュゲートワクチンを対象とする。

10

20

30

40

50

【0048】

本発明の他の実施形態及び利益は、一部には、本明細書の以下の部分において記載されており、一部には、この説明から明らかとすることができます、又は本発明を実践することから学習することができる。

【図面の簡単な説明】**【0049】**

【図1A】血清型6Aの小型化した莢膜多糖の¹H-NMRスペクトル(500MHz)

-NMRデータが、天然のPSと比較して構造統合性の喪失がないことを示す図である。

【図1B】血清型6Bの小型化した莢膜多糖の¹H-NMRスペクトル(500MHz)

-NMRデータが、天然のPSと比較して構造統合性の喪失がないことを示す図である。

10

【図2A】マルチブレックスピーズベースアッセイ手順を使用した(これらのコンジュゲートについて使用した多糖は10~50kDaの範囲である)莢膜多糖特異的抗体(総IgG)の図である。

【図2B】マルチブレックスピーズベースアッセイ手順を使用した莢膜多糖特異的抗体(総IgG)であり、多糖が200~300kDa以上の範囲である、図である。

【図2C】マルチブレックスピーズベースアッセイ手順を使用した6A及び6B莢膜多糖特異的抗体(総IgG)の2価コンジュゲートであり、多糖が10~50kDa及び200~400kDaの範囲である、図である。

【図3A】1価コンジュゲート合成の作業フローチャートである。

【図3B】リンカーを用いたPS1及びPS2活性化のフローチャートである。

20

【図4A】2価単分子コンジュゲート及び2価コンジュゲート合成の作業フローチャートである。

【図4B】CRM化学カップリングの図である。

【図5】CDAP(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、シアヌル酸クロリド(2,4,6-トリクロロ-1,3,5-トリアジン)、臭化シアン(CNB_r)の図である。

【図6】イミノチオレンとCRM197のチオール化の図である。

【発明を実施するための形態】**【0050】**

ストレプトコッカス・ニューモニエは、肺炎、菌血症、髄膜炎及び急性中耳炎のような疾患を引き起こすことがある、グラム陽性細菌である。肺炎球菌は、化学的に結合した多糖でカプセル化されており、これにより血清型特異性がもたらされる。少なくとも90個の肺炎球菌の血清型が知られており、約23個が侵襲性疾患の90%を占める。侵襲性肺炎球菌疾患に対する防御は、莢膜多糖に特異的な抗体と関連し、したがって、防御は血清特異的である。

30

【0051】

担体タンパク質と多糖との間のリンカーを含んでなり、2つの群のコンジュゲートを形成し、群1が1価細菌莢膜多糖コンジュゲートを含み、他の群が多価担体タンパク質コンジュゲートを含む、多価S.ニューモニエコンジュゲートワクチンが、実質的に改善された結果をもたらすことが、驚くべきことに発見された。特に、2価コンジュゲート及び2価単分子コンジュゲートは、好ましくは、担体タンパク質と、交差反応性S.ニューモニエ血清型に付着した二官能性リンカーとの間の反応により合成される。達成された結果は、リンカーの代わりに2つの間に直接的なコンジュゲーションを有する同数の血清型を有する、1価細菌莢膜多糖コンジュゲートを含有する、多価S.ニューモニエコンジュゲートワクチンを含有するワクチンと比較して、実質的に改善された。

40

【0052】

本発明の一実施形態は、免疫原性が強化された、2価多糖タンパク質コンジュゲートを含んでなる、多価コンジュゲートワクチンを対象とする。一般構造PS1-担体タンパク質-PS2を有する2価コンジュゲートは、PS1及びPS2がグラム陰性及びグラム陽性細菌病原体に由来する2つの異なる血清型多糖である、同様の1価コンジュゲートと比

50

較して、より高い免疫原性を有する。2価コンジュゲートワクチンを開発することにより、ワクチンの有効性は増加し、担体の免疫原性は低下する。本明細書に開示される化学は、コンジュゲートの免疫原性を実質的に増加させ、同時に、担体タンパク質の負荷を低下させる。

【0053】

本発明の別の実施形態は、より低い分子量の多糖及びより長いアームの二官能性リンカーを有し、好ましくは免疫原性が強化された、ワクチンを対象とする。本発明の別の実施形態は、2価コンジュゲートのより高い免疫原性及び結合活性並びに、担体タンパク質のより低い免疫原性を提供することを対象とする。本発明の別の実施形態は、より高い免疫原性により、コンジュゲートワクチンの用量を減少させることを対象とする。

10

【0054】

本明細書で開示されるように、従来のワクチンの不利益を最小化するために、4つのパラメーターが導入されている。

- ・多糖のサイズは、好ましくは10～50KDaである。
- ・交差反応性多糖の、担体タンパク質との同時のコンジュゲーション。
- ・2つ以上の交差反応血清型は、同時に担体タンパク質とコンジュゲートされている。
- ・好ましくは2～40（また、2～40、4～40、10～40、20～40、9～20、5～20、5～30）の、長いヘテロ又はホモ二官能性スペーサーアーム。

これらの4つのパラメーターは、一緒になって、コンジュゲートの多糖／タンパク質比を増加させるため、担体タンパク質の負荷を低下させるため並びに免疫原性及び結合活性に数倍の増加をもたらすために、おおいに有効である。

20

【0055】

本発明は、免疫原性が強化され、有意に高い抗体力値を示す、多糖-タンパク質コンジュゲートを対象とする。担体タンパク質は、例えば、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM197、破傷風トキソイド断片（TTHc）、N.メニンギティディスタンパク質PorB、RSVウイルスタンパク質、ペルツッシストキソイド（PT）などのB.ペルツッシスタンパク質、アデニル酸シクラーゼ毒素（ACT）、69KDaタンパク質及びヒトパピローマウイルスタンパク質抗原若しくはこのVLP型、B型肝炎コア抗原若しくはこのVLP型又はHBsAgの誘導体並びに他の従来の担体から得られる。多糖断片は、グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌の群、好ましくはS.ニューモニエの免疫化学的に交差反応性の多糖から得られる。本発明は、担体タンパク質が、切断及び脱重合された最適な鎖長の多糖断片と反応する、多糖-タンパク質コンジュゲートを調製する方法も対象とする。

30

【0056】

本発明の免疫原性組成物は、PREVNAR-13（登録商標）及びSYNFLORIX-10（登録商標）において見出されない、S.ニューモニエ血清型に対する適切なレベル及び改善された防御を提供する。

【0057】

本試験において、短鎖分子サイズ（10～50KDa）を有する、S.ニューモニエ血清型（6A/6B、9V/9N、15A/15B及び19A/19F並びに同様の交差反応性血清型）の交差反応性多糖を有する2価コンジュゲートを使用して、16～26価肺炎球菌CPSコンジュゲートワクチンを調製した。肺炎球菌6A及び6B型多糖を、モデル交差反応性CPSとして使用した。臨床的受容性のために、CRM197を担体タンパク質として使用した。

40

【0058】

多価モノコンジュゲートも、担体タンパク質CRM197を伴うホモ又はヘテロ二官能性PEG又は非PEGリンカーと共に、より短いPS鎖長（0～50KDa）、長いスペーサーアーム（9～40）を使用して、調製されている。

【0059】

50

C P S を、酸化又はシアニル化化学のいずれかにより活性化し、過ヨウ素酸ナトリウムにより酸化し、C P S 中の - 反応性アルデヒド又はイソチオシアネート (- O C N) 基のいずれかに導入した。

【 0 0 6 0 】

2 つの方策（短い及び長いリンカー、短い及び長いC P S ）を、それぞれ、導入のために使用した。この後、2 倍コンジュゲートワクチンの物理化学的及び免疫学的特性を、独立して又は多価コンジュゲート製剤と組み合わせて研究した。

【 0 0 6 1 】

以下の実施例は、本発明の実施形態を例示するが、本発明の範囲を限定するものとしてみなすべきではない。

10

【 実施例 】

【 0 0 6 2 】

【 実施例 1 】 多価 S . ニューモニエ血清型 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 8 、 10 A 、 11 A 、 12 F 、 14 、 15 A 、 15 B 、 17 F 、 18 C 、 19 A 、 19 F 、 20 、 22 F 、 23 F 、 33 F 及び 35 B についての、多糖の小型化、活性化及びコンジュゲーション方法

【 0 0 6 3 】

6 A 及び 6 B 多糖

各々 100 mg の S . ニューモニエ 6 A 及び 6 B の莢膜多糖を、p H 2 . 5 ~ 3 . 0 の 10 mM 酢酸又は 0 . 1 M H C l を含有する 10 m l の水溶液に溶解し、溶液を 60 ~ 85 の温度に 60 ~ 120 分間維持することにより、加水分解を実行する。中和後、このように得られたオリゴ糖を、3 ~ 10 K D a T F F C e n t r i c o n フィルターを使用して透析ろ過した。¹ H N M R 分析（図 1 A 及び 1 B ）すると、形成されたオリゴ糖は、構造統合性エピトープの喪失又は繰り返し単位構造の喪失を示さない。アントロンアッセイを使用して多糖を測定し、得られた分子サイズ分布（K D a ）は、10 ~ 50 K D a 、 30 ~ 100 K D a 及び 100 ~ 300 K D a の範囲である。

20

【 0 0 6 4 】

C P S (50 m g) 部分（ 200 ~ 500 K D a の間のサイズの天然の多糖又は 10 ~ 50 K D a の間の小型化した多糖）は、活性化方法において一般的に使用される活性化シアニル化試薬であった（表 1 ）。多糖分子サイズ分布を、(10 ~ 1000 K D a) P o l l u l a n 混合物を参照基準（Shodex、USA からの Polylulan 基準）として使用した分析で、S E C - H P L C (Shodex S B - 405 及び S B - 406 S E C カラム）を使用して決定した。

30

【 0 0 6 5 】

短いスペーサーアームを、p H 5 . 6 ~ 6 . 0 で、3 ~ 5 時間の、5 ~ 8 倍モル過剰の A D H (S i g m a) との反応により、P S に導入した。長いスペーサーアーム（二官能性リンカー又は長い 4 アームリンカー）を、p H 5 . 6 ~ 6 . 0 で、3 ~ 5 時間の、5 ~ 10 倍モル過剰との反応により、P S に導入した。

【 0 0 6 6 】

40

50

【表1】

表1

コンジュゲーションに使用されている多糖サイズ分布(KDa)

PS	多糖 KDa
6A	10-30KDa
6B	20-50KDa
15B	20-40KDa
18C	20-50KDa
22F	10-30KDa

10

【0067】

活性化 PS は、短いアームリンカー（アジピン酸ジ - ヒドラジド、ADH、174.2 g / mole）、サイズが 2 ~ 4 ~ 8 ~ 20 で変動するもう 1 つのスペーサーアームリンカー（600 g / mole ~ 3.5 g / mole）とさらに誘導体化する。

【0068】

ジアミン官能基を有するホモ又はヘテロ二官能性 PEG リンカー、例えば NH₂ - PEG_{0.6}K - NH₂、NH₂ - PEG_{3.5}K - COOH が、付着する（表 2）。 20

【0069】

20

30

40

50

【表2】

表2

使用されている多糖又は担体タンパク質の誘導化に使用されている短鎖及び長鎖リンカー(ペグ化形態又は非ペグ化形態のいずれかである、数種の他のリンカーも使用されている)

リンカー番号	リンカー構造	化学構造/KDa 又はÅを使用
1	NH ₂ -PEG-NH ₂ /NHS	H ₂ N-(CH ₂ CH ₂ O) _n -CH ₂ CH ₂ -NH ₂ 1K 及び 3.5K
2	NHS/NH ₂ -PEG-COOH	 1K 及び 3.5K
3	Mal-PEG-NH ₂	 1K 及び 3.5K
4	Mal-PEG-NHS	 1K 及び 3.5K
5	CHO-PEG-CHO	 1K 及び 3.5K
6	SH-PEG-NH ₂	 1K 及び 3.5K
7	ADH	

10

20

30

40

50

8	HZ-PEG-HZ	
9	SMPH	 SMPH スクシニミド'ル6-[〔β-マレイミド'リビ'オノアミド〕ヘキサエート] MW 379.36 Spacer Arm 14.2 Å
11	SMCC	 SMCC スクシニミド'ル4-(N-マレイミド'メチル)クロヘキサン-1-カルボ'キシレート MW 334.32 Spacer Arm 8.3 Å
12	4-アーム-PEG-NH ₂ 又は NHS	

Mal-マレイミド、NHS-スクシンイミド、PEG-ポリエチレングリコール誘導体、ADH-アジピン酸ジヒドラジド。

10

20

【0070】

誘導体化したCPS (10 mg / ml) の各2mlの2つのアリコートを、2つのCRM197タンパク質試料 (10 mg / ml) の1mlのアリコートと、4で8~12時間、混合した。長い及び短いスペーサーアームを有するコンジュゲートを、100~300kDa Centrificonフィルター (EMD Millipore) により精製した (表3)。

【0071】

【表3】

表3

30

1価コンジュゲートの物理化学的特性評価

PS	SEC-HPLCによる活性化PS KDa	SEC-HPLCによるコンジュゲート KDa	PS:タンパク質比	遊離PS%
6A	10-30KDa, 200-300KDa	>200-300, >2500	0.5-2, 1-2	<2
6B	20-50KDa, 200-400KDa	>300-500, >2500	0.5-2, 1-2	<1
15B	20-40KDa	>300-500	0.5-2, 1:1	<1
18C	20-50KDa	>300-500	0.5-2, 1:1	<2
22F	10-30KDa	>200-300	0.5-2, 1:1	<1

40

注釈: PSのKDa決定のためのSEC-HPLCについての内部標準: Pullulan標準混合物 (2KDa~2500KDa)

【0072】

[実施例2] 異なる分子量の小型化した多糖の活性化

実施例1に記述されたように、合成された異なる分子量のオリゴ糖を活性化した。シアニル化試薬を、活性化方法において一般的に使用した。

50

【0073】

C D A P (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 (S i g m a A l d r i c h, U S A)) シアヌル酸クロリド (2 , 4 , 6 - トリクロロ - 1 , 3 , 5 - トリアジン) 又は臭化シアン (C N B r) 及びカップリング担体タンパク質 (図 5 及び 6 を参照) 。

【0074】

多糖溶液 (1 0 m g / m l) を、 2 M N a C l 又は 2 0 0 ~ 3 0 0 m M 重炭酸緩衝液中の 1 0 m g / m l の C D A P (アセトニトリル中 1 0 0 m g / m l) と共に、 R T で 4 ~ 6 分間インキュベートした。 1 N の N a O H 又は 1 N の H C l のいずれかを使用して、 p H を 1 0 ~ 1 0 . 5 に維持した。 この後、 p H を 8 . 1 ~ 8 . 2 に調整し、 ペグ化リンカ - (H z - P E G - H z) を、 C D A P で処理した P S と 8 ~ 1 2 時間、 R T で反応させた。 反応混合物をデブスフィルターにかけ、 続いて、 1 5 0 m M N a C l を使用して、 1 0 0 ~ 3 0 0 K D a カットオフ c e n t r i c o n フィルターに 5 ~ 8 回かけた。 10

【0075】

小型化した活性化多糖の誘導体化

活性化オリゴ糖を、 短鎖ホモ二官能性ヒドラジドリンカーを用いてさらに誘導体化した。 典型的な試薬は、 アジピン酸ジ - ヒドラジド、 A D H 、 分子量 1 7 4 . 2 g / m o l e) であった。 ジ - アミン、 ジ - ヒドラジド又はアミン若しくはヒドラジド - カルボン酸 / アルデヒド官能基を有するホモ又はヘテロ二官能性 P E G リンカー、 例えば、 N H 2 - P E G (1 K ~ 3 . 5 K) - N H 2 、 H z - P E G (1 ~ 3 . 5 K) - H z 、 N H 2 - P E G 3 . 5 K - C O O H を使用した (表 2) 。 数種の他のホモ又はヘテロ二官能性スペーサー - アームも、 誘導体化のために使用することができる (表 2) 。 p H 5 . 8 ~ 6 . 0 で 3 ~ 5 時間の 5 ~ 8 倍モル過剰のアジピン酸ジ - ヒドラジド (S i g m a) との反応により、 短いスペーサー - アームをオリゴ糖に導入した。 p H 5 . 8 ~ 6 . 0 で、 3 ~ 5 時間、 R T での、 5 ~ 1 0 倍モル過剰のリンカーとオリゴ糖との反応により、 長鎖リンカー (二官能性リンカー又は長い四官能性リンカー (表 2) 、 番号 1 2 ~ 4 アームリンカー) を多糖に導入した。 20

【0076】

短い又は長いリンカーを用いた担体タンパク質の誘導体化

担体タンパク質 C R M 1 9 7 を、 短鎖ホモ二官能性ヒドラジドリンカーを用いて、 さらに誘導体化した。 典型的な試薬は、 アジピン酸ジ - ヒドラジド、 A D H 、 分子量 1 7 4 . 2 g / m o l e) であった。 ジ - アミン、 ジ - ヒドラジド若しくはアミン又はヒドラジド - カルボン酸 / アルデヒド官能基を有するホモ又はヘテロ二官能性 P E G リンカー、 例えば、 N H 2 - P E G (1 K ~ 3 . 5 K) - N H 2 、 H z - P E G (1 ~ 3 . 5 K) - H z 、 N H 2 - P E G 3 . 5 K - C O O H を使用した (表 2) 。 数種の他のホモ又はヘテロ二官能性スペーサー - アームも、 表 2 において列挙されているような誘導体化のために使用することができる。 p H 5 . 8 ~ 6 . 2 で、 3 0 0 ~ 6 0 0 m M M E S 緩衝液中、 3 ~ 5 時間、 R T での 5 ~ 8 倍モル過剰のアジピン酸ジ - ヒドラジド (S i g m a) との反応により、 短いスペーサー - アームを担体タンパク質 C R M 1 9 7 に導入した。 p H 5 . 8 ~ 6 . 2 で、 3 0 0 ~ 6 0 0 m M M E S 緩衝液中、 3 ~ 5 時間、 R T (室温) での 5 ~ 1 0 倍モル過剰のリンカーとオリゴ糖との反応により、 長鎖リンカー (二官能性リンカー又は長い四官能性リンカー (表 2 、 番号 1 2 ~ 4 アームリンカー) を担体タンパク質に導入した。 40

【0077】

[実施例 3] 交差反応性多糖血清型の活性化及び短い又は長いスペーサー - アームリンカ - の付着 (対象の血清型は、 6 A / 6 B 、 9 V / 9 N 、 1 5 A / 1 5 B 及び 1 9 A / 1 9 F 又は任意の他の交差反応性血清型である) 。

【0078】

S . ニューモニエ 6 A 及び 6 B 型の莢膜多糖の C R M 1 9 7 とのコンジュゲーションに由来するオリゴ糖の活性化並びに一級アミノ基のオリゴ糖への導入は、 同時である。 50

【0079】

血清型 6 A 及び 6 B の天然の又は小型化した多糖 (200 ~ 400 KDa) を、実施例 1 及び 2 に記述されたような同一の手順を使用して、コンジュゲートした。

【0080】

実施例 1 において報告されたような、このようにして得られたオリゴ糖混合物を、WF I 中に溶解し、最終濃度を 10 mg / ml とする。反応の終了時に、3 ~ 10 KDa Centrificon フィルターを使用した透析ろ過により、オリゴ糖を精製する。

【0081】

アミノ基が導入されたオリゴ糖を、DMSO の水溶液 (20 ~ 30 % v / v) 中、10 mg / ml の濃度に希釈して、ADH の短いリンカー又は長いスペーサーアームリンカーを含有する DMSO を、オリゴ糖中に導入されたアミノ基に対してモル過剰とする（通常は 5 ~ 10 : 1）。溶液を 4 ~ 12 時間、RT に維持することにより、反応を実行した。期間の終了時に、3 ~ 10 KDa Centrificon フィルターを使用して、オリゴ糖を再び精製した。10

【0082】**[実施例 4] 肺炎球菌多糖 1 値コンジュゲートの合成**

同一であり又は異なり小型化した 2 つの別個のアリコート、及び実施例 3 において合成したような、誘導体化した小型化した多糖（短いスペーサーアーム ADH 及び長いスペーサーアーム HZ - PEG - HZ を有する）(10 mg / ml) を、CRM197 タンパク質試料 (10 mg / ml) の 1 ml のアリコートと、4 で 8 ~ 12 時間、混合した。20 100 ~ 300 KDa centrificon フィルター (EMD Millipore) を使用して、長鎖又は短鎖リンカーの両方を含有するコンジュゲートを精製した。各 1 値コンジュゲートを、アントロン又はウロン酸アッセイのいずれかにより総多糖含有量について、BCA 又は Lowry アッセイにより総タンパク質含有量について、アッセイした（表 4）。

【0083】

すべての他の交差反応性多糖コンジュゲートは、上記のような同一の手順を使用して作製される。

【0084】

30

40

50

【表4】

表4

一般構造6A-CRM197-6Bの2価コンジュゲートの物理化学的特性評価

PS	活性化オリゴ糖 KDa	コンジュゲート KDa	オリゴ糖:タンパク質比(重量比)	遊離オリゴ糖重量%
6A	≥100-300KDa	>200-300KDa, >2500KDa	0.5-2, 1-2	<2
6B	≥200-400KDa	>300-500KDa,>2500KDa	0.5-2, 1-2	<1
6C	≥200-400KDa	>300-500KDa,>2500KDa	0.5-2, 1-2	<1
15B	≥100-300KDa	>300-500KDa, >1500KDa	0.5-2, 1:1	<1
15A	≥100-300KDa	>300-500KDa, >1500KDa	0.5-2, 1:1	<1
18C	≥100-300KDa	>300-500KDa, >1500KDa	0.5-2, 1:1	<2
22F	≥100-300KDa	>200-300KDa, >1000KDa	0.5-2, 1:1	<1
1	≥100-300KDa	>200-300KDa, >2500KDa	0.5-2, 1-2	<2
3	≥200-400KDa	>300-500KDa,>2500KDa	0.5-2, 1-2	<1
4	≥100-300KDa	>300-500KDa, >1500KDa	0.5-2, 1:1	<1
7F	≥100-300KDa	>300-500KDa, >1500KDa	0.5-2, 1:1	<2
9V	≥100-300KDa	>200-300KDa, >1000KDa	0.5-2, 1:1	<1
9N	≥100-300KDa	>200-300KDa, >1000KDa	0.5-2, 1:1	<1
14	>100-300KDa	>200-300KDa, >2500KDa	0.5-2, 1-2	<2
18C	≥200-400KDa	>800KDa,>2500KDa	0.5-2, 1-2	<1
19A	≥100-300KDa	>300-500KDa, >1500KDa	0.5-2, 1:1	<1
19F	≥100-300KDa	>300-500KDa, >1500KDa	0.5-2, 1:1	<2
23F	≥100-300KDa	>200-300KDa, >1000KDa	0.5-2, 1:1	<1
33F	≥100-300KDa	>200-300KDa, >2500KDa	0.5-2, 1-2	<2

注釈:SEC-HPLCについての内部標準(KDa):P_ollulan標準混合物(2KDa~1200KDa)

【0085】

[実施例4] 16V以上の価の肺炎球菌コンジュゲートワクチンの実験製剤

1、3、5、7F、14、15B、18C、22F、23F、33F、35Bを含有する血清型についてのニューモ多糖-CRM197コンジュゲート及び交差反応性多糖コンジュゲート6A、6B、9V、9N、15A、15B、19A及び19Fを組み合わせて、4.0 µg PS/mLの最終抗原濃度を得た。塩化ナトリウム(150mM)溶液、10~20 mMヒスチジン、コハク酸及び0.001% Tween-20も、製剤方法中に希釈剤として使用し、リン酸アルミニウム(Adj u - Phos、Brenntag、USA)を、実験アジュバントとして使用した。16-Vコンジュゲートを、2mLの滅菌バイアルに無菌で充填した。PNEUMOVAX(登録商標)(Merck、USA)又はPREVNAR-13(登録商標)(Pfizer、USA)を、2つの対照市販ワクチン製剤として使用した。

【0086】

10

20

30

40

50

[実施例 5] コンジュゲートの免疫原性試験

ニュージーランド白ウサギモデル (N Z W) を、この作業において選択し、ニューモ P S - C R M 1 9 7 コンジュゲートの免疫原性を比較した。すべての群からのウサギ (16 - V {価}、P R E V N A R - 1 3 (登録商標) 及び P N E U M O V A X (登録商標)) を、免疫化期間の前後の臨床徵候について試験した。すべての群について、予備免疫、追加抗原投与 (7 及び 14 日) 及び終末期の出血 (28 日) を回収し、アリコートし、使用までマイナス 80 度で保存した。総 I g G の決定のためのマルチプレックス免疫原性アッセイを、参照標準血清 007 (C B E R、F D A、U S A) を使用する標準プロトコールに従って実施した。参照血清及びウサギ血清を希釈し、肺炎球菌 C W P S 及び 22 F P S 又は 25 P S のいずれかの処置により、交差反応性抗体についてあらかじめ吸着した。ヒトモノクローナル抗多糖抗体 (P a m l i c o B i o p h a r m a、U S A) を、総 I g G 推定のために使用した。B i o - P l e x 2 0 0 (B i o - R a d)。マルチプレックスリーダーを、製造元の指示に従って使用した (図 2 A、2 B 及び 2 C を参照)。

【0087】

[実施例 5] S . ニューモニエ交差反応性莢膜多糖血清型の活性化並びに短い及び長いスペーサーリンカーの付着

交差反応性血清型である血清型 6 A / 6 B、9 V / 9 N、15 A / 15 B 及び 19 A / 19 F を、莢膜多糖及び担体タンパク質を含有する 2 価コンジュゲートの合成のために使用する。定義上、2 価コンジュゲートは、C R M 1 9 7 に同時に又は並行して付着した 2 つの莢膜多糖を含有する。

【0088】

S . ニューモニエ 6 A 及び 6 B 型の莢膜多糖に由来する小型化した多糖の活性化、C R M 1 9 7 とのコンジュゲーション並びに一級アミノ基又はヒドラジド基のオリゴ糖への導入を、同時に実行した。

【0089】

血清型 6 A 及び 6 B の天然の多糖又は小型化したオリゴ糖 (200 ~ 400 K D a) を、実施例 1 ~ 4 に記述されたような同一の手順を使用して、コンジュゲートした。

【0090】

このようにして得られた小型化した多糖混合物を、注入のために、最終濃度が 10 m g / m l となるように、水に溶解した。アミノ又はヒドラジド基が導入された、小型化した多糖を、ジメチルスルホキシド (D M S O) の水溶液中、10 m g / m l の濃度に希釈し、D M S O のパーセンテージは 20 ~ 30 % (v / v) の範囲であった。これを、表 2 において記述されているような、A D H のような短鎖リンカー又は長鎖リンカーを含有する D M S O に、小型化した多糖中に導入されたアミノ / ヒドラジド基に対して、モル過剰で (通常は 5 : 1 又は 10 : 1)、より具体的には、8 : 1 で加えた。

【0091】

溶液を室温で 4 ~ 12 時間の期間、反応を実行した。反応期間の終了時に、3 ~ 10 K D a C e n t r i c o n フィルターを使用して、反応生成物を再び精製した。

【0092】

[実施例 6] 2 価コンジュゲート製造としての、6 A 型及び 6 B 型の S . ニューモニエオリゴ糖と C R M 1 9 7 担体タンパク質との同時の又は並行するコンジュゲーション

15 m g / m l の C R M 1 9 7 を含有する水溶液を、S . ニューモニエ 6 A 型の莢膜多糖に由来する、リンカーが付着したオリゴ糖 (水中 20 ~ 30 %) を含有する D M S O に加えた。リンカーが付着したオリゴ糖の、C R M 1 9 7 に対する比は、1 : 1、2 : 1、1 : 2 から選択した。このようにして得られた混合物を、緩やかな攪拌下、8 ~ 12 時間、室温に維持した。前記時間の終了時、S . ニューモニエ 6 B の莢膜多糖に由来する誘導体化オリゴ糖を含有する溶液を加えた。S . ニューモニエ 6 B の莢膜多糖の、C R M 1 9 7 に対するモル比は、1 : 1、2 : 1、1 : 2 から選択した。結果として生じた混合物を、8 ~ 12 時間、室温に維持した (表 5)。コンジュゲーション反応は、それぞれ、S . ニューモニエ 6 A 型の莢膜多糖及び S . ニューモニエ 6 B 型の莢膜多糖に由来する、2

10

20

30

40

50

つの活性化オリゴ糖を、同時に（並行して）CRM197含有溶液に加えることによっても実行することができる。このようにして得られたオリゴ糖 - タンパク質コンジュゲートを、100~300KDa透析膜（Spectrum lab、USA）を使用して透析し、0.2M NaCl（pH=6.6~7.0）を含有する0.01Mリン酸緩衝液中に調節し、最終的に0.22μmフィルターを介してろ過した。

【0093】

すべての他の交差反応性多糖コンジュゲートは、上記で使用されたような同一の手順を使用して作製された。反応順序は、図3A、3B、4A及び4Bに図示されている。

【0094】

【表5】

10

表5
PS含有量の比較

2価オリゴ糖	活性化オリゴ糖 KDa	コンジュゲート Kda	総多糖タンパク 質重量比	遊離オリゴ糖 重量%
6A-6B	≥100-300	2.0:1.5	2-1.5 (1:0.75)	<2
6A-6B	≥100-300, ≥300	>1200-2500KDa	2-1.4 (1: 0.7)	<3
19A-19F	≥100-300	>500-800KDa	2-1.6 (1: 0.8)	<2
15A-15B	≥100-300, ≥300	>500-1000KDa	2-1.3 (1: 0.65)	<3
9V-9N	≥100-300, ≥300	>500-1000KDa	2-1.3 (1: 0.65)	<3

20

【0095】

【実施例7】 18価以上の価数の肺炎球菌コンジュゲートワクチンの実験的製剤。

【0096】

1、3、5、7F、14、18C、22F、23F、33F、35B（10個の血清型多糖）を含有する血清型についての肺炎球菌多糖 - CRM197コンジュゲート並びに（6A、6B）、（9V、9N）、（15A、15B）及び（19A、19F）（8つの血清型）の交差反応性多糖コンジュゲートを組み合わせて、2.2~4.4μg PS/mL（1.1~2.2μg /ヒト用量、0.5mL）の最終多糖濃度を得た。塩化ナトリウム（150mM）溶液、10~20mMヒスチジン、20mM HEPES又はMOPS緩衝液及び0.001% Tween-20も、製剤方法中に希釈剤として使用し、リン酸アルミニウム（Adjuvants、Brenntag、USA）を、実験アジュvantとして使用した。

30

【0097】

18価以上の価数（>20V~24V）のコンジュゲートを、2mLの滅菌バイアルに無菌で充填した。PNEUMOVAX（登録商標）（Merck、USA）及び/又はPREVNAR-13（登録商標）（Pfizer、USA）を、対照として使用した。

40

【0098】

【実施例9】 コンジュゲートの免疫原性試験。

【0099】

ニュージーランド白ウサギモデル（NZW）を、この作業において選択し、肺炎球菌PS-CRM197コンジュゲートの免疫原性を比較した。すべての群からのウサギ（18価以上の価のコンジュゲート、PREVNAR-13（登録商標）、Pfizer及びPNEUMOVAX（登録商標）-23（Merck USA）を、免疫化期間の前後の血清学的力価について試験した。すべての群について、予備免疫、追加抗原投与（7及び14日）及び終末期時出血（28日）を回収し、アリコートし、使用まで-80°で保存する。総IgGの決定のための免疫原性アッセイを、参照標準血清007（CBER、FD

50

A、U S A)を使用する標準プロトコールに従って実施した。参照血清及びウサギ血清を希釈し、肺炎球菌C W P S 及び非ワクチン血清型2 5 P S の処置により、交差反応性抗体についてあらかじめ吸着した。ヒト／ウサギ／マウスモノクローナル抗多糖抗体を、総Ig G推定のために使用した。B i o - P l e x 2 0 0 (B i o - R a d) リーダーを、製造元の指示に従って使用した。

【0100】

ビーズベースE L I S A アッセイ方法を使用して測定した、コンジュゲートの免疫原性、すなわち、莢膜多糖特異的抗体（総Ig G）を、表6に示した。総Ig G値を、ウサギの免疫原性データにおいて、P R E V N A R - 1 3（登録商標）と突き合わせて比較した。14日のデータは、P R E V N A R - 1 3（登録商標）ワクチンと比較した、I V T - 1 8 V - 1 ワクチンの力価における著しい増加を示している。同様に、I V T - 1 8 V - 1 のデータは、P R E V N A R - 1 3（登録商標）と比較して、Ig G値に対する著しい追加抗原刺激を有する（表6）。

10

【0101】

20

30

40

50

【表 6】

表6

18V-1 値コンジュゲートワクチンについての、マルチプレックスビーズベース ELISA

アッセイを使用した莢膜多糖特異的抗体(μg/ml)での総 IgG)

PREVNAR-13 (登録商標) 2.2 μg/用量	(IgG) 14日/0日	(IgG) 28日/0日	IVT-18V-1 2.2 μg/用量	(IgG) 14日/0日	(IgG) 28日/0日
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	48	480
6A	188	560	6A	775	3775
6B	165	780	6B	662	3662
18C	50	280	18C	306	3560
19A	45	235	19A	233	2500
19F	29	290	19F	72	720
4	49	230	4	150	750
5	186	700	5	550	3550
7F	180	680	7F	332	3860
9V	52	520	9V	212	2400
9N	-	-	9N	200	2200
14	85	400	14	272	2890
15A	-	-	15A	672	3900
15B	-	-	15B	750	4000
18C	175	800	18C	550	5500
22F	-	-	22F	1000	8000
23F	53	450	23F	212	2420

注釈: IVT-18V=18-V コンジュゲートワクチン(1 値コンジュゲートと一緒に混合した); 9N、15A、15B、22F 及び 23F 血清型は、PREVNAR-13(登録商標)中に存在せず、IgG 値は測定されない; 1 値コンジュゲートとしての 18-V 製剤を、4.4 μg の 6B コンジュゲートを除いて、各血清型について 2.2 μg を使用して調製した。塩化ナトリウム(150mM) 溶液、10~20mM ヒスチジン、20mM HEPES 又は MOPS 緩衝液及び 0.001% Tween-20 も、製剤方法中に希釈剤として使用し、リン酸アルミニウム(Adju-Phos、Brenntag、USA)を、

10

20

30

40

50

実験アジュバントとして使用した；ビーズベース ELISA を使用した莢膜多糖抗体(総 IgG) : 18-V コンジュゲートワクチン製剤-2 (IVT-18V-2) : 1 倍コンジュゲートとしての 10-V 製剤並びに 6A/6B、9V/9N、15A/15B 及び 19A/19F を含む 2 倍コンジュゲートとして加えられた残りの 8-V。(ワクチン用量を、 $4.4\mu\text{g}$ の 6B を除いて、各血清型について $2.2\mu\text{g}$ として使用した) 1 倍コンジュゲートとしての 10-V 製剤並びに 6A/6B、9V/9N、15A/15B 及び 19A/19F を含む 2 倍コンジュゲートとして加えられた残りの 8-V。6A-6B2 10 倍単分子コンジュゲートを、 $2.2\mu\text{g}/\text{用量}$ として使用し、残りの 2 倍コンジュゲートを、 $2.2\mu\text{g}/\text{用量}$ として使用する。塩化ナトリウム(150mM) 溶液、10~20mM ヒスチジン、20mM HEPES 又は MOPS 緩衝液及び 0.001% Tween-20 も、製剤方法中に希釈剤として使用し、リン酸アルミニウム(Adju-Phos、Brenntag、USA) を、実験アジュバントとして使用した。

【 0 1 0 2 】

ビーズベース E L I S A アッセイ方法を使用して測定した、コンジュゲートの免疫原性、莢膜多糖特異的抗体(総 Ig G)を表 7 に示した。総 Ig G 値を、ウサギの免疫原性データにおいて、PREVNAR-13(登録商標)と突き合わせて比較した。14日のデータは、PREVNAR-13(登録商標)ワクチンと比較した、IVT-18V-2ワクチンの力値における著しい増加を示す。興味深いことに、2 倍コンジュゲート血清型についての IVT-18V-2 の総 Ig G データ(例えば、6A/6B、9V/9N、15A/15B 及び 19A/19F)は、1 倍コンジュゲートを有する IVT-18V-1 製剤と比較して、Ig G 値に対する著しい追加抗原刺激を有する。したがって、2 倍コンジュゲートは、1 倍コンジュゲートと比較して、より良好な免疫原性を有すると結論づけることができる(表 7)。したがって、IVT-18V-2 コンジュゲートワクチン製剤は、PREVNAR-13(登録商標)に対してだけでなく、IVT-18V-1 製剤に対しても、優れた免疫原性を有する。1~3.5K リンカー(HZ-PEG-HZ)のいずれかとコンジュゲートされている多糖は、PREVNAR-13(登録商標)におけるような、短いリンカー(ADH)又はリンカーのないコンジュゲートと比較して、はるかに高い免疫原性を誘発する。 20 30

【 0 1 0 3 】

【表7】

表7

マルチプレックスビーズベース ELISA を使用した莢膜多糖抗体(総 IgG)

PREVNAR-13(登録商標) 2.2 μg/用量	比 14日/0日	比 28日/0日	IVT-18V-2 2.2 μg/用量	比 14日/0日	比 28日/0日
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	50	530
6A	188	560	6A/6B	875/762	4375/4662
6B	165	780			
18C	50	280	18C	316	3600
19A	45	235	19A/19F	300/198	3500/2700
19F	29	290			
4	49	230	4	180	1000
5	186	700	5	550	3600
7F	180	680	7F	360	4100
9V	52	520	9V/9N	350/300	3400/3200
9N	-	-			
14	85	400	14	310	32000
15A	-	-	15A/15B	872/850	5900/5600
15B	-	-			
18C	175	800	18C	600	6800
22F	-	-	22F	1020	8150
23F	53	450	23F	300	3200

注釈: 1VI-18V-2=10-1価コンジュゲート及び4つの2価コンジュゲートと一緒に混合した; 18-Vコンジュゲートワクチン製剤(IVT-18V-3): 1価コンジュゲートとしての10-V製剤を2.2 μg/用量として使用し、残りの8-Vを、6Bの2.2 μg/用量を除いて1.1 μg/用量として使用した、6A/6B、9V/9N、15A/15B及び19A/19Fを含む2価コンジュゲートとして加えた。

【0104】

マルチプレックスビーズベース ELISA アッセイ方法を使用して測定した、コンジュゲートの免疫原性、すなわち、莢膜多糖特異的抗体(総 IgG)を表8に示した。総 Ig G 値を、ウサギの免疫原性データにおいて、PREVNAR-13(登録商標)と突き合わせて比較した。14日のデータは、PREVNAR-13(登録商標)ワクチンと比較した、IVT-18V-3ワクチンの力価における著しい増加を示す。興味深いことに、低用量(2.2対1.1 μg用量)のIVT-18V-3製剤の、2価コンジュゲート血清型(例えば、6A/6B、9V/9N、15A/15B及び19A/19F)についての総 Ig G データは、2価コンジュゲート血清型についてのIVT-18V-2製剤と比較して類似した Ig G 値を有する。したがって、2価コンジュゲートは、低用量の1価コンジュゲートと比較して、より良好な免疫原性を有すると結論づけることができる。したがって、IVT-18V-2コンジュゲートワクチン製剤は、PREVNAR-13(登

10

20

30

40

50

録商標)に対してだけでなく、IVT-18V-1製剤に対しても、優れた免疫原性を有する。1~3.5Kリンカー(HZ-PEG-HZ)のいずれかとコンジュゲートされている多糖は、PREVNAR-13(登録商標)におけるような、短いリンカー(ADH)又はリンカーのないコンジュゲートと比較して、はるかに高い免疫原性を誘発する(表8)。

【0105】

【表8】

表8

2価コンジュゲート血清型についての総IgGデータ

10

PREVNAR-13 (登録商標) 2.2 μg/用量	比 14日/0日	比 28日/0日	IVT-18V-2 2.2 μg/用量	比 14日/0	比 28日/0日
1	45	350	1	375	1500
3	47	200	3	50	530
6A	188	560	6A/6B	825/860	4275/4900
6B	165	780			
18C	50	280	18C	316	3600
19A	45	235	19A/19F	275/250	3400/3000
19F	29	290			
4	49	230	4	180	1000
5	186	700	5	550	3600
7F	180	680	7F	360	4100
9V	52	520	9V/9N	320/380	3300/3800
9N	-	-			
14	85	400	14	310	32000
15A	-	-	15A/15B	790/900	5800/6200
15B	-	-			
18C	175	800	18C	600	6800
22F	-	-	22F	1020	8150
23F	53	450	23F	300	3200

注釈: IVT-18V-3=10-1価コンジュゲート及び4つの2価コンジュゲートを、一緒に混合した。

【0106】

本発明の他の実施形態及び使用は、本明細書で開示される本発明の仕様及び実践の考慮から、当業者に明らかとなる。すべての刊行物、米国及び外国の特許及び特許出願を含む、本明細書に引用されているすべての参照を、具体的に及び全体的に参照により組み込む。仕様及び実施例が、添付の特許請求の範囲によって示される本発明の真の範囲及び精神

20

30

40

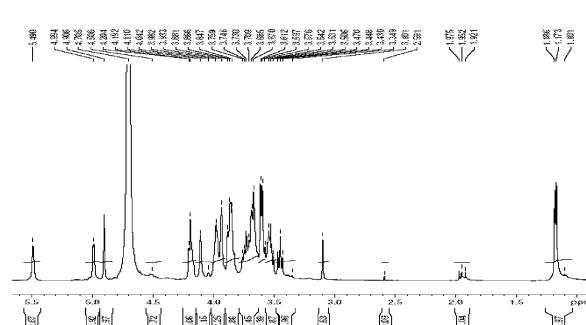
50

によってのみ、例示的に考慮されることが意図されている。さらに、「含んでなる」という用語は、「からなる」及び「本質的に～からなる」という用語を含む。

【図面】

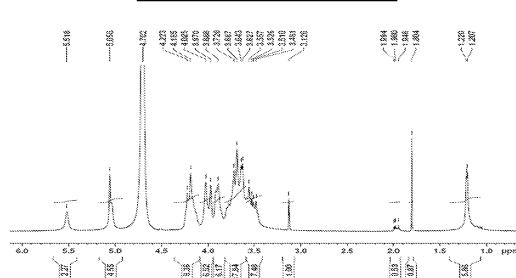
【図 1 A】

Figure 1A

6A PS (^1H NMR-30KD)

【図 1 B】

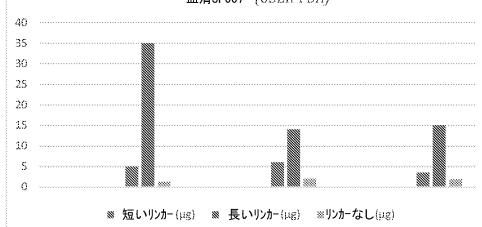
Figure 1B

6B PS (^1H NMR-30KD)

【図 2 A】

Figure 2A

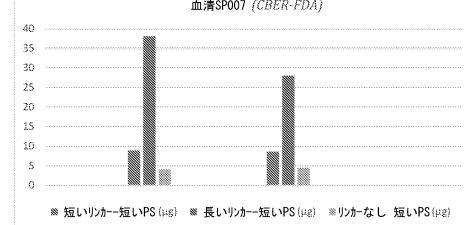
CPS特異的総IgG力値
IgGは肺炎球菌参照標準をベースとするugで表す
血清SP007 (CBER-FDA)



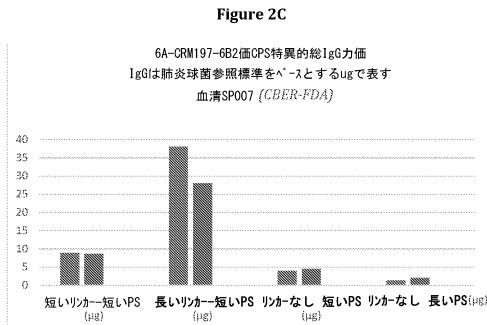
【図 2 B】

Figure 2B

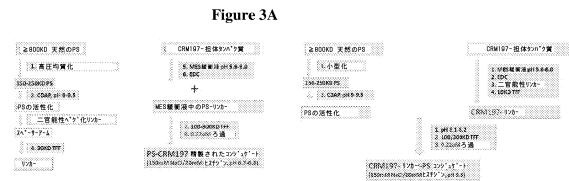
CPS特異的総IgG力値
IgGは肺炎球菌参照標準をベースとするugで表す
血清SP007 (CBER-FDA)



【図 2 C】

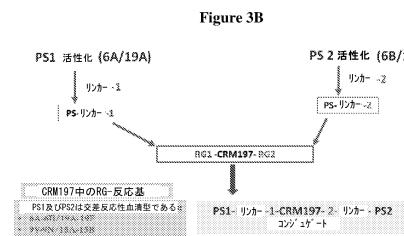


【図 3 A】

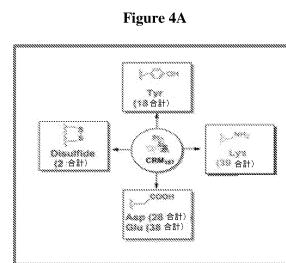


10

【図 3 B】

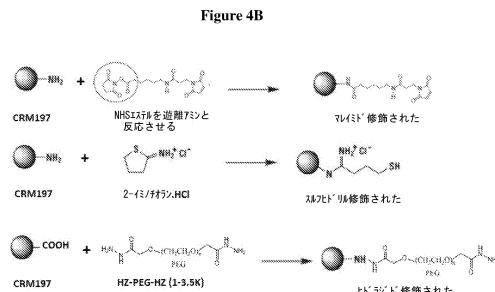


【図 4 A】



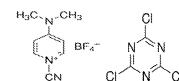
20

【図 4 B】



【図 5】

Figure 5



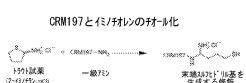
30

40

50

【図 6】

Figure 6



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/295 (2006.01)	A 6 1 K 39/295
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195
C 0 7 K 14/025 (2006.01)	C 0 7 K 14/025
C 0 7 K 14/02 (2006.01)	C 0 7 K 14/02
C 0 7 K 14/11 (2006.01)	C 0 7 K 14/11
C 0 7 K 14/34 (2006.01)	C 0 7 K 14/34
C 0 7 K 14/21 (2006.01)	C 0 7 K 14/21
C 0 7 K 14/245 (2006.01)	C 0 7 K 14/245

アメリカ合衆国、ワシントン・98058、レントン、サウスイースト・ワンハンドレッドエイト
イファースト・ストリート・16243

審査官 野村 英雄

(56)参考文献

- 特表2017-509656 (JP, A)
- 特表2017-505792 (JP, A)
- 特表2015-524839 (JP, A)
- 特表2005-516932 (JP, A)
- 特表2010-532793 (JP, A)
- 特表2015-522692 (JP, A)
- 特表2008-525423 (JP, A)
- 国際公開第2017/085586 (WO, A1)
- 特表2010-500354 (JP, A)
- 国際公開第2015/175355 (WO, A1)
- 特表2013-521315 (JP, A)
- 特表2013-518891 (JP, A)
- 特表2009-532439 (JP, A)
- 特表2010-531329 (JP, A)
- 国際公開第2016/207905 (WO, A2)

HUANG, Q., et al., "PEG as a spacer arm markedly increases the immunogenicity of meningococcal group Y polysaccharide conjugate vaccine." , JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE , 2013年11月28日 , Vol.172, No.1 , pp.382-389 , DOI: 10.1016/j.conrel.2013.03.008 , EPUB 17 March 2013

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B名)

- C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
- C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
- J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
- C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
- P u b M e d