

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7438102号  
(P7438102)

(45)発行日 令和6年2月26日(2024.2.26)

(24)登録日 令和6年2月15日(2024.2.15)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 8 B	37/00 (2006.01)	C 0 8 B	37/00 Q
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39
請求項の数 34 (全42頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-513549(P2020-513549)	(73)特許権者	522242018
(86)(22)出願日	平成30年9月4日(2018.9.4)		メルク・シャープ・アンド・ドーム・エ
(65)公表番号	特表2020-533439(P2020-533439		ルエルシー
	A)		アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・
(43)公表日	令和2年11月19日(2020.11.19)		0 7 0 6 5 - 0 9 0 7、ローウェイ、イ
(86)国際出願番号	PCT/US2018/049308		ースト・リンカーン・アベニュー・1 2
(87)国際公開番号	WO2019/050815		6
(87)国際公開日	平成31年3月14日(2019.3.14)	(74)代理人	100114188
審査請求日	令和3年7月9日(2021.7.9)		弁理士 小野 誠
(31)優先権主張番号	62/555,461	(74)代理人	100119253
(32)優先日	平成29年9月7日(2017.9.7)		弁理士 金山 賢教
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100124855
	米国(US)		弁理士 坪倉 道明
(31)優先権主張番号	62/645,252	(74)代理人	100129713
(32)優先日	平成30年3月20日(2018.3.20)		弁理士 重森 一輝
最終頁に続く		最終頁に続く	

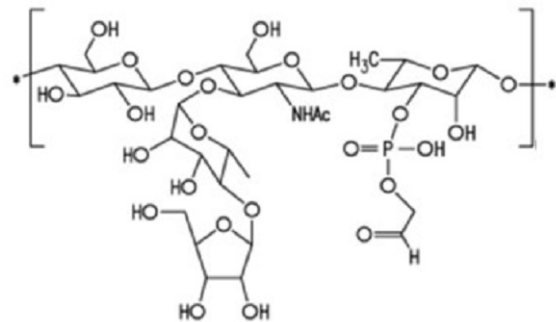
(54)【発明の名称】 肺炎球菌多糖体および免疫原性多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートでのその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートであって、  
ここで、キャリアタンパク質のアミノ基が、以下の構造の活性化された繰り返し単位のアルデヒド基において多糖体とコンジュゲートされ、引き続いて還元されて、 - O - P ( = O ) ( O H ) - O - C H <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> - N H - タンパク質部分を形成し、

【化 1】



ここで、前記キャリアタンパク質が、CRM197であり、そしてここで、多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、1000kDa ~ 10,000kDaの分子量を有する、多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 2】

前記多糖体が、50 kDa ~ 1000 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 3】

前記多糖体が、100 kDa ~ 800 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 4】

前記多糖体が、100 kDa ~ 300 kDa の分子量を有する、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 5】

多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートのコンジュゲーションの程度が、2 ~ 15 である、請求項 1 に記載の多糖体 - タンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 6】

多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートのコンジュゲーションの程度が、3 ~ 10 である、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 7】

多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートのコンジュゲーションの程度が、5 ~ 10 である、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 8】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、0.5 ~ 3.0 の多糖体対タンパク質質量比を有する、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 9】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、0.8 ~ 1.2 の多糖体対タンパク質質量比を有する、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 10】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、0.94 の多糖体対タンパク質質量比を有する、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 11】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、0.81 の多糖体対タンパク質質量比を有する、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 12】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、多糖体の総量と比較して 30 % 未満の遊離多糖体を更に含む、  
請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 13】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、多糖体の総量と比較して 25 % 未満の遊離多糖体を含む、請求項 12 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 14】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、多糖体の総量と比較して 20 % 未満の遊離多糖体を含む、請求項 12 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 15】

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、多糖体の総量と比較して 15 % 未満の遊離多糖体を含む、請求項 12 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 16】

多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートのコンジュゲーションの程度が、5 ~ 10 であり、

前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、0.8 ~ 1.2 の多糖体対タンパク質質量比を有し、そしてここで、  
前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、多糖体の総量と比較して 15 % 未満の多糖体を更に含む、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

10

20

30

40

50

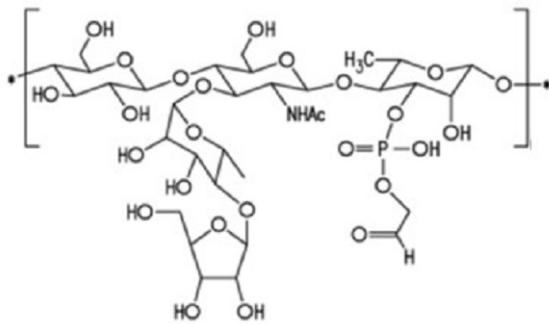
## 【請求項 17】

キャリアタンパク質が、少なくとも 50 % の繰り返し単位が、アルデヒド基において多糖体とコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 18】

多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートであって、  
キャリアタンパク質のアミノ基は、以下の構造の活性化された繰り返し単位のアルデヒド基において多糖体とコンジュゲートされ、引き続いて還元されて、 $-O-P(=O)(OH)-O-CH_2CH_2-NH$  タンパク質部分を形成し、

## 【化 2】



ここで、キャリアタンパク質は、少なくとも 50 % の繰り返し単位が、アルデヒド基において多糖体とコンジュゲートされており、

ここで、多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートのコンジュゲーションの程度が、5 ~ 10 であり、

ここで、前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、0.8 ~ 1.2 の多糖体対タンパク質量比を有する、多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートであり、

更に、前記多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートが、多糖体の総量と比較して 1.5 % 未満の遊離多糖体を含む、

多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲート。

## 【請求項 19】

請求項 1 に記載の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む免疫原性組成物。

## 【請求項 20】

1 以上の追加の多糖体 - キャリアタンパク質コンジュゲートをさらに含む請求項 19 に記載の免疫原性組成物であって、ここで、各コンジュゲートは、CRM 197 にコンジュゲートされた、特定のストレプトコッカス・ニューモニエの血清型の多糖体を含み、そしてここで、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は、1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 B、7 C、7 F、8、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、21、22 A、22 F、23 A、23 B、23 F、24 F、27、28 A、31、33 F、34、35 A、35 B、35 F および 38 よりなる群から選択される、請求項 19 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 21】

存在する場合 0.8 ~ 8  $\mu\text{g/mL}$  の多糖体を含有する血清型 6 B 多糖体を除いて、0.4 ~ 4  $\mu\text{g/mL}$  の各多糖体と、多糖体の総量の 0.5 倍 ~ 3 倍の量の CRM 197 キャリアタンパク質とを含有するように製剤化される、請求項 20 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 22】

150 mM 塩化ナトリウムと、20 mM L - ヒスチジン緩衝液と、0.05 ~ 2 % w/v の界面活性剤とをさらに含有するように製剤化される、請求項 21 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 23】

アジュバントをさらに含む、請求項 22 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 24】

前記アジュバントがアルミニウムベースのアジュバントである、請求項 23 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 25】

前記アジュバントが、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムおよ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 24 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 26】

前記アジュバントがリン酸アルミニウムである、請求項 25 に記載の免疫原性組成物。

10

## 【請求項 27】

前記リン酸アルミニウムアジュバントが 0.05 ~ 0.5 mg/mL の濃度で存在する、請求項 26 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 28】

ストレプトコッカス・ニューモニエ莢膜多糖体に対する免疫応答を誘発するための、請求項 20 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 29】

前記免疫原性組成物が、存在する場合 4 µg である血清型 6B 多糖体を除いて、2 µg の各多糖体と、32 µg の CRM 197 キャリアタンパク質と、0.125 mg のリン酸アルミニウムアジュバントと、150 mM 塩化ナトリウムと、20 mM L-ヒスチジン緩衝液と、0.2% w/v の PS-20 とを含有するように製剤化された単一の 0.5 mL 用量である、請求項 28 に記載の免疫原性組成物。

20

## 【請求項 30】

請求項 18 に記載の多糖体-キャリアタンパク質コンジュゲートと、薬学的に許容される担体とを含む免疫原性組成物。

## 【請求項 31】

1 以上の追加の多糖体-キャリアタンパク質コンジュゲートをさらに含む請求項 30 に記載の免疫原性組成物であって、ここで、各コンジュゲートは、CRM 197 にコンジュゲートされた、特定のストレプトコッカス・ニューモニエの血清型の多糖体を含み、そしてここで、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は、1、2、3、4、5、6A、6B、6C、6D、7B、7C、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、17F、18C、19A、19F、20、21、22A、22F、23A、23B、23F、24F、27、28A、31、33F、34、35A、35B、35F および 38 よりなる群から選択される、免疫原性組成物。

30

## 【請求項 32】

ストレプトコッカス・ニューモニエ莢膜多糖体に対する免疫応答を誘発するための、請求項 30 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 33】

ストレプトコッカス・ニューモニエ莢膜多糖体に対する免疫応答を誘発するための、請求項 31 に記載の免疫原性組成物。

40

## 【請求項 34】

前記免疫原性組成物が、存在する場合 4 µg である血清型 6B 多糖体を除いて、2 µg の各多糖体と、32 µg の CRM 197 キャリアタンパク質と、0.125 mg のリン酸アルミニウムアジュバントと、150 mM 塩化ナトリウムと、20 mM L-ヒスチジン緩衝液と、0.2% w/v の PS-20 とを含有するように製剤化された単一の 0.5 mL 用量である、請求項 33 に記載の免疫原性組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pne

50

umoniae) 血清型 24F 由来の精製された莢膜多糖体、およびこの血清型由来の多糖体を有する多糖体 - タンパク質コンジュゲートを提供する。この血清型由来の多糖体 - タンパク質コンジュゲートは、多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンに含まれ得る。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

被包性細菌の一例であるストレプトコッカス・ニューモニエは、世界的に見て、重篤な疾患の重大な原因である。1997年、疾病管理予防センター(CDC)は、米国では、毎年3,000例の肺炎球菌性髄膜炎、50,000例の肺炎球菌性菌血症、7,000,000例の肺炎球菌性中耳炎および500,000例の肺炎球菌性肺炎が発生していると推定した。Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997, 46 (RR-8): 1-13を参照されたい。さらに、これらの疾患の合併症は重大となり得、いくつかの試験では、肺炎球菌性髄膜炎による死亡率は最大8%および神経学的後遺症発生率は25%と報告されている。Arditi et al., 1998, Pediatrics 102: 1087-97を参照されたい。

10

##### 【0003】

長年にわたって認可されてきた多価肺炎球菌多糖体ワクチンは、成人、特に高齢者および高リスク者の肺炎球菌疾患を予防する点で極めて有益であることが証明されている。しかし、乳児および幼児では非コンジュゲート肺炎球菌多糖体に対する応答が不良である。細菌多糖体はT細胞非依存性免疫原であり、乳児では弱い応答を誘発するか応答がない。キャリアタンパク質への細菌多糖体免疫原の化学的コンジュゲーションは、乳児の免疫応答をT細胞依存性の応答に変化させる。ジフテリアトキソイド(DTの化学的解毒版であるDTx)およびCRM197は、それらのアミノ酸配列にT細胞刺激エпитープが存在するため、細菌多糖体免疫原のためのキャリアタンパク質として記載されている。

20

##### 【0004】

肺炎球菌コンジュゲートワクチンPrevnar(登録商標)は、当時幼児および乳児に侵襲性肺炎球菌疾患を引き起こしていた最も高頻度に単離された7つの血清型(4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23F)を含有しており、2000年2月に米国で初めて認可された。米国でのPrevnar(登録商標)の普遍的な使用に続いて、Prevnar(登録商標)に存在する血清型により、小児の侵襲性肺炎球菌疾患が大幅に減少した。Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36): 893-7を参照されたい。ただし、世界の特定の地域ではPrevnar(登録商標)による血清型適用範囲には限界があり、米国では特定の血清型(例えば、19Aなど)が新たに出現していることを示すいくつかの証拠がある。O'Brien et al., 2004, Am J Epidemiol 159: 634-44; Whitney et al., 2003, N Engl J Med 348: 1737-46; Kyaw et al., 2006, N Engl J Med 354: 1455-63; Hicks et al., 2007, J Infect Dis 196: 1346-54; Traore et al., 2009, Clin Infect Dis 48: S181-S189を参照されたい。

30

40

##### 【0005】

Prevnar13(登録商標)は、血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fを含む13価肺炎球菌多糖体 - タンパク質コンジュゲートワクチンである。例えば、米国特許出願公開番号2006/0228380A1、Prymula et al., 2006, Lancet 367: 740-48、および2008年10月25~28日にワシントンDCでの48<sup>th</sup> Annual ICAAC/ISDA 46<sup>th</sup> Annual Meetingで発表されたKieninger et al., Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjug

50

ate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlersを参照されたい。また、Dagan et al., 1998, Infect Immun. 66: 2093-2098 and Fattom, 1999, Vaccine 17:126を参照されたい。

【0006】

S.ニューモニエは、莢膜多糖体の構造に基づいて90超の血清型に分類されている。既知の肺炎球菌莢膜多糖体構造の一覧は、Geno, 2015, Clinical Microbiology Reviews 28:871-899に記載されている。

10

【0007】

現在の多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンは、ワクチン中に存在する血清型に関連する肺炎球菌疾患の発生率を低下させるのに効果的である。しかし、ワクチン中に存在しない血清型を発現する肺炎球菌の有病率は増加している。したがって、今後のワクチンに含めるために、新たに出現した肺炎球菌血清型を同定および特性評価する必要がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】米国特許出願公開番号2006/0228380A1

【非特許文献】

20

【0009】

【文献】Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997, 46(RR-8):1-13

【文献】Arditi et al., 1998, Pediatrics 102:1087-97

【文献】Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54(36):893-7

【文献】O'Brien et al., 2004, Am J Epidemiol 159:634-44

30

【文献】Whitney et al., 2003, N Engl J Med 348:1737-46

【文献】Kyaw et al., 2006, N Engl J Med 354:1455-63

【文献】Hicks et al., 2007, J Infect Dis 196:1346-54

【文献】Traore et al., 2009, Clin Infect Dis 48:S181-S189

【文献】Prymula et al., 2006, Lancet 367:740-48

40

【文献】Kieninger et al., Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers

【文献】Dagan et al., 1998, Infect Immun. 66:2093-2098 and Fattom, 1999, Vaccine 17:126

【文献】Geno, 2015, Clinical Microbiology Reviews 28:871-899

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0010】

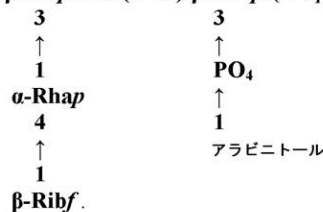
本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型24F由来の精製された莢膜多糖体、およびこの血清型を有する多糖体タンパク質コンジュゲートを提供する。本発明は、この血清型由来の莢膜多糖体の構造的同定に部分的に基づく。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0011】

したがって、一実施形態では、本発明は、以下の繰り返し単位を有する多糖体を提供する：

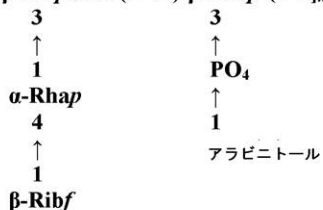
## 【化1】



## 【0012】

ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型24F由来の多糖体は、以下によって表すことができ、

## 【化2】



式中、nは繰り返し単位の数を表す。

## 【0013】

特定の実施形態では、多糖体は5～5000の繰り返し単位を有する。特定の態様では、多糖体は、10～3,000、20～2,000、50～1,500または100～1,000の繰り返し単位を有する。

## 【0014】

特定の実施形態では、多糖体は、5kDa～5,000kDaの分子量を有する。特定の態様では、多糖体は、10kDa～2,000kDa、50kDa～1,500kDaまたは100kDa～1,000kDaの分子量を有する。

## 【0015】

本発明はさらに、上記実施形態のいずれかから生成される活性化多糖体を提供し、ここで、多糖体は、化学試薬によって活性化されて、リンカーまたはキャリアタンパク質へのコンジュゲーションのための反応基を生成する。特定の実施形態では、活性化はアラビニトール-1-PO<sub>4</sub>で起こる。特定の実施形態では、多糖体は、過ヨウ素酸塩によって活性化される。この実施形態の特定の態様では、活性化はアラビニトール-1-PO<sub>4</sub>の炭素2位で起こる。

## 【0016】

本発明はさらに、上記で提供される多糖体または活性化多糖体がキャリアタンパク質にコンジュゲートされている多糖体-タンパク質コンジュゲートを提供する。特定の態様で

10

20

30

40

50

は、キャリアタンパク質は、CRM197、ジフテリア毒素フラグメントB (DTFB)、DTFB C8、ジフテリアトキソイド(DT)、破傷風トキソイド(TT)、TTのフラグメントC、百日咳トキソイド、コレラトキソイド、E. coli LT、E. coli ST、およびシュードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)由来の外毒素Aから選択される。特定の一態様では、キャリアタンパク質はCRM197である。

#### 【0017】

特定の態様では、多糖体-タンパク質コンジュゲートは、水性条件下、またはジメチルスルホキシド(DMSO)のような非プロトン性溶媒中で還元的アミノ化化学を使用して調製される。特定の態様では、多糖体-タンパク質コンジュゲートは、DMSO中の還元的アミノ化化学を使用して調製される。

10

#### 【0018】

一実施形態では、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型24F由来の非コンジュゲート多糖体または多糖体-タンパク質コンジュゲートと、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型1、2、3、4、5、6A、6B、6C、6D、7B、7C、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18B、18C、19A、19F、20、21、22A、22F、23A、23B、23F、24B、27、28A、31、33F、34、35A、35B、35Fおよび38のうちの1つ以上に由来する非コンジュゲート多糖体または多糖体-タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物を提供する。1つの下位実施形態では、多価免疫原性組成物は、非コンジュゲート多糖体または多糖体-キャリアタンパク質コンジュゲートを含むが、両方は含まない。1つの下位実施形態では、多価免疫原性組成物は、非コンジュゲート多糖体または多糖体-キャリアタンパク質コンジュゲートの混合物を含む。特定の下位実施形態では、本発明の多価免疫原性組成物は、最大4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85または90までの血清型を有する。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0019】

【図1A】S・ニューモニエ血清型24F多糖体の繰り返し単位構造の画像表示を示す。

30

【図1B】過ヨウ素酸塩活性化S・ニューモニエ血清型24F繰り返し構造の画像表示を示す。図1Bに示す構造は、主要な活性化部位(活性化された糖として)を示すものであることに留意されたい。多糖鎖内では、図1Bに示すようにあらゆる繰り返し単位が活性化される必要はない。

【図2】50のD<sub>2</sub>O中のS・ニューモニエ血清型24F由来の莢膜多糖体の600 MHz 1次元<sup>1</sup>H NMRスペクトルを示す。内部標準(DMSOおよびDSS-d6)、残留水(HOD)、および精製プロセス由来の他の残留成分(エタノール(EtOH)、イソプロパノール(IPA)およびアセテート)から生じるシグナルを示す。\*により標識された軽微なシグナルは、C-多糖体および/またはペプチドグリカンのようなS・ニューモニエ細胞壁残留物によるものである。

40

【図3】S・ニューモニエ血清型24Fの血清型同定に使用された1次元(1D)<sup>1</sup>H NMR同一性領域を示す。各単糖残基からの繰り返し単位の各アノマープロトンのシグナル位置を示す。

【図4】繰り返し構造の糖残基間の共有結合を確立する、S・ニューモニエ血清型24Fの部分的な2次元(2D)<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C多重結合相関NMRスペクトルを示す。図中ではグリコシド結合を確立する相関が表示されている。

【図5】S・ニューモニエ血清型24Fの莢膜多糖体繰り返し単位内のホスホジエステル結合の確立を示す。

【図6】上部スペクトル; 3.86 ppmのシグナルに対する単一相関を示す、5.19 ppmのピークを中心とした励起を示す、活性化された血清型24F多糖体の1D TO

50



C S Yである。下部スペクトルは、血清型 2 4 F の標準的な 1 D プロトンスペクトルであり、5 . 1 9 p p m のトリプレットを同定する。

【図 7】上部スペクトルは、活性化された血清型 2 4 F 多糖体の 1 D T O C S Y を示し、励起は 5 . 1 9 p p m のシグナルを中心としている。下部の図は、多重度編集 g H S Q C A D である。黒い楕円はメチルおよびメチン基であり、白い楕円はメチレンである。

【図 8】CRM 1 9 7 にコンジュゲートされ、リン酸アルミニウムアジュバント ( A P A ) で製剤化された S . ニューモニエー価血清型を用いて免疫したウサギの E L I S A I g G 抗体価 ( 投与後 2 ) を示す。エラーバーは、幾何平均 + 9 5 % 信頼区間を表す。

【図 9】CRM 1 9 7 にコンジュゲートされ、リン酸アルミニウムアジュバント ( A P A ) で製剤化された S . ニューモニエー価血清型を用いて免疫したウサギの血清型特異的 O P A 力価 ( 投与後 2 ) を示す。エラーバーは、幾何平均 + 9 5 % 信頼区間を表す。

【図 1 0】リン酸アルミニウムアジュバント ( A P A ) で製剤化された 2 4 F - CRM 1 9 7 価コンジュゲートワクチンを用いて免疫した C 5 7 B L / 6 マウスの S . ニューモニエー血清型 2 4 F 気管内惹起からの防御を示す。M a n t e l C o x ログランク検定は、2 4 F - CRM 1 9 7 / A P A ワクチンを用いて免疫した C 5 7 B L / 6 マウスが、A P A 免疫マウス (  $P = 0 . 0 0 0 4$  ) およびナイーブマウス (  $P < 0 . 0 0 0 1$  ) の両方と比較して、惹起から有意に防御されたことを示す。

【図 1 1】リン酸アルミニウムアジュバント ( A P A ) で製剤化された 2 4 F - CRM 1 9 7 価コンジュゲートワクチンを用いて免疫した C D - 1 マウスの S . ニューモニエー血清型 2 4 F 気管内惹起からの防御を示す。M a n t e l C o x ログランク検定は、2 4 F - CRM 1 9 7 / A P A ワクチンを用いて免疫した C D - 1 マウスが、A P A 免疫マウス (  $P = 0 . 0 0 9 9$  ) およびナイーブマウス (  $P = 0 . 0 0 7 6$  ) の両方と比較して、惹起から有意に防御されたことを示す。

【図 1 2】リン酸アルミニウムアジュバント ( A P A ) で製剤化されした 2 4 F - CRM 1 9 7 価コンジュゲートワクチンを用いて免疫した S w i s s W e b s t e r マウスの S . ニューモニエー血清型 2 4 F 気管内惹起からの防御を示す。M a n t e l C o x ログランク検定は、2 4 F - CRM 1 9 7 / A P A ワクチンを用いて免疫した S w i s s W e b s t e r マウスが、A P A 免疫マウス (  $P < 0 . 0 0 0 1$  ) およびナイーブマウス (  $P = 0 . 0 0 0 2$  ) の両方と比較して、惹起から有意に防御されたことを示す。

【図 1 3】多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (  $2 \mu g / P n P s$  ) を用いて免疫したウサギの血清型特異的 ( S . ニューモニエー血清型 1 6 F、2 3 A、2 3 B、2 4 F、3 1 ) 免疫前、P D 1 および P D 2 の幾何平均抗体価を示す。エラーバーは、各血清型 ( X 軸 ) の幾何平均力価の 2 つの標準誤差を表す。

【図 1 4】多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (  $2 \mu g / P n P s$  ) を用いて免疫したウサギの血清型特異的 ( S . ニューモニエー血清型 1 6 F、2 3 A、2 3 B、2 4 F、3 1 ) 免疫前、P D 1 および P D 2 の O P A 希釈力価を示す。記号は個々の力価を示し、エラーバーは幾何平均力価 ( G M T ) の 9 5 % 信頼区間 ( C I ) を表す。\*  $p < 0 . 0 5$ 、\* \*  $p < 0 . 0 1$ 、\* \* \*  $p < 0 . 0 0 1$ 、n s = 有意差なし。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 0 】

本発明は、N M R 技術による新規肺炎球菌多糖体構造 ( 類 ) の同定に部分的に基づいている。本明細書で提供される構造は、S . ニューモニエー血清型 2 4 F の最初の同定または最初の正しい同定であると考えられている。

【 0 0 2 1 】

S . ニューモニエー血清型 2 4 F 多糖体は、そのそれぞれの株から生産され、精製された。生産された ( および精製された ) 多糖体を使用して、個々の P s - CRM 1 9 7 コンジュゲートを作製した。S . ニューモニエー血清型 2 4 F は、固有の多糖体を有し、これにより、固有のコンジュゲート作製プロセスが生じる。得られたコンジュゲート ( 類 ) は、動物試験で免疫原性であることが実証された。

【 0 0 2 2 】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される用語「多糖体」(P s)は、限定するものではないが、「糖」、「オリゴ糖」、「多糖体」、「リポ糖(liposaccharide)」、「リポオリゴ糖(LOS)」、「リポ多糖体(LPS)」、「グリコシレート」、「グリココンジュゲート」、「誘導体化または活性化多糖体またはオリゴ糖」などを含め、免疫学および細菌ワクチンの分野で一般的に使用される任意の抗原性糖要素(または抗原単位)を含むことを意味する。特に指定のない限り、本明細書で使用される多糖体の名称は、IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBM)Recommendations 1980に従う。JCBN, 1982, J. Biol. Chem. 257: 3352-3354を参照されたい。

【0023】

10

本明細書で使用される「免疫原性組成物」とは、哺乳動物のような宿主に対して、体液性もしくは細胞性に媒介された、または体液性におよび細胞性に媒介された免疫応答を誘発する能力を有する細菌莢膜多糖体または多糖体-タンパク質コンジュゲートのような抗原を含有する組成物を指す。免疫原性組成物は、細胞表面でのMHC分子に関連した抗原の提示により宿主を感作するのに役立ち得る。さらに、抗原特異的T細胞または抗体を作製して、免疫された宿主を将来にわたって保護することができる。したがって、免疫原性組成物は、細菌による感染から宿主を保護し、重症度を低下させることができ、または細菌感染による死から宿主を保護することができるかもしれない。免疫原性組成物はまた、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を作製するために使用され得、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、対象に受動免疫を付与するために使用され得る。また、免疫原性組成物を使用して、動物の有効性モデルでまたはオプソニン食作用傷害アッセイを介して細菌を死滅させることによって測定されるように機能的な抗体を作製してもよい。

【0024】

20

本明細書で使用される場合、多糖体に関連する「単離された」という用語は、遠心分離、深層濾過、沈殿、限外濾過、活性炭を用いた処理、ダイアフィльтраーションおよび/またはカラムクロマトグラフィーの使用を含め、当技術分野で公知の精製技術を使用した、精製された多糖体からのS.ニューモニエ血清型特異的莢膜多糖体の単離を指す。一般に、単離された多糖体とは、タンパク質、核酸、および非特異的な内因性の多糖体(C多糖体)の部分的な除去を指す。単離された多糖体は、10%、8%、6%、4%または2%未満のタンパク質不純物および/または核酸を含有する。単離された多糖体は、型特異的多糖体に対して20%未満のC多糖体を含有する。

【0025】

30

本明細書で使用される場合、細菌莢膜多糖体に関連する「精製された」という用語は、遠心分離、沈殿および限外濾過のような手段による細胞溶解物からの多糖体の精製を指す。一般に、精製された多糖体とは、細胞片およびDNAの除去を指す。

【0026】

本明細書で使用される用語「Mw」は、重量平均分子量を指し、典型的にはDaまたはkDaで表される。Mwは、小さな分子が含有するよりも大きな分子の方がポリマー試料の総質量を多く含有することを考慮に入れる。Mwは、静的光散乱、中性子線小角散乱、X線散乱および沈降速度のような技術によって決定することができる。

【0027】

40

本明細書で使用される用語「Mn」は、数平均分子量を指し、典型的にはDaまたはkDaで表される。Mnは、試料の総重量を試料中の分子数で割ることによって計算され、ゲル浸透クロマトグラフィー、(Mark-Houwink方程式)による粘度測定、束一法(colligative methods)、例えば、蒸気圧浸透圧測定、末端基決定またはプロトンNMRのような技術によって決定することができる。Mw/Mnは多分散性を反映する。

【0028】

本明細書で使用される用語「モル比」は、典型的には、10分の1の位または100分の1の位までの小数として表される割合である。例えば、10分の1で表される0または

50

0.1 ~ 1.0 のモル比には、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 または 1.0 のいずれかが含まれる。

【0029】

本明細書で使用される略語「P n P s」は、肺炎球菌多糖体を指す。

【0030】

本明細書で使用される場合、本発明の免疫原性組成物とともに使用する場合の「含む」という用語は、アジュバントおよび賦形剤のような任意の他の成分の包含を指す（抗原混合物では「からなる」という言葉の制限を受ける）。本発明の多価多糖体-タンパク質コンジュゲート混合物とともに使用される場合の「からなる」という用語は、それらの特定の S. ニューモニエ多糖体タンパク質コンジュゲートを有し、異なる血清型由来の他の S. ニューモニエ多糖体タンパク質コンジュゲートを有しない混合物を指す。

10

【0031】

本明細書で使用される場合、糖上の「活性化部位」という語句は、部位が化学的に修飾されて反応基を形成することができることを意味する。活性化部位は、特定の部位で反応する活性化剤の好ましい傾向を考慮に入れる。

【0032】

本明細書で使用される語句「活性化多糖体」は、多糖鎖中に反応基を形成するように化学的に修飾された多糖体を指す。活性化多糖体とは、利用可能なあらゆる活性化部位が化学的に修飾されていることを必ずしも意味しない。

【0033】

本明細書で使用される場合、多糖鎖上の「活性化の程度」という語句は、活性化された化学基の数と多糖鎖上の繰り返し単位の数との全体的な比を指す。

20

【0034】

特に指定のない限り、本明細書で提供されるあらゆる範囲は、列挙された下限および上限を含む。

【0035】

S. ニューモニエ血清型 24 F の単糖分析では、構成成分として、Glc、Rha、GlcN、Rib（リボース）および Rib-ol-P（リボースリン酸）が示された（構造情報は入手することができなかった）。Kamerling, 2000, Pneumococcal polysaccharides: a chemical view, p. 81-114. In Tomasz(ed), Streptococcus pneumoniae molecular biology & mechanisms of disease. Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, NY を参照されたい。実施例で同定された構造は、以前に同定された糖組成と一致している。比較のための血清型 24 A または 24 B 多糖体の構造情報は、これまで入手することができなかった。

30

【0036】

これらの多糖体血清型（類）の構造を同定することにより、非コンジュゲート多糖体または多糖体-タンパク質コンジュゲートとして肺炎球菌ワクチンにそれらを組み込むことが可能になり得る。連鎖球菌および肺炎球菌 P s を含むコンジュゲートワクチンは、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第 6,248,570 号、米国特許第 5,866,135 号および米国特許第 5,773,007 号を参照されたい。

40

【0037】

莢膜多糖体

本発明の血清型（類）からのストレプトコッカス・ニューモニエ由来の莢膜多糖体は、当業者に公知の標準的な技術により調製することができる。例えば、多糖体は、細菌から単離することができ、既知の方法によって（例えば、欧州特許番号 EP 497524 および欧州特許番号 EP 497525 を参照）、好ましくは、ホモジナイザーを使用して達成されるマイクロ流動化または化学的加水分解によって、ある程度までサイズ調整され得る。一実施形態では、各多糖体血清型に対応する S. ニューモニエ株を大豆ベースの培地で

50

増殖させる。次いで、遠心分離、沈殿および限外濾過を含む標準的な工程によって個々の多糖体を精製する。例えば、米国特許出願公開番号 2 0 0 8 / 0 2 8 6 8 3 8 および米国特許第 5 , 8 4 7 , 1 1 2 号を参照されたい。多糖体をサイズ調整して、粘度を低下させる、および/またはその後のコンジュゲート生成物の濾過性を改善することができる。化学的加水分解は、酢酸を使用して行われ得る。機械的サイジングは、高圧ホモジナイズ化せん断を使用して行われてもよい。

#### 【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーション前の精製された多糖体は、5 k D a ~ 4 , 0 0 0 k D a の分子量を有する。分子量は、多角度光散乱検出器 ( M A L S ) と屈折率検出器 ( R I ) とを組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー ( S E C ) により計算することができる。他のそのような実施形態では、多糖体は、1 0 k D a ~ 4 , 0 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 4 , 0 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 3 , 0 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 1 , 5 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 1 , 0 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 7 5 0 k D a 、5 0 k D a ~ 5 0 0 k D a 、1 0 0 k D a ~ 4 , 0 0 0 k D a 、1 0 0 k D a ~ 3 , 0 0 0 k D a 、5 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a 、1 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a 、1 0 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a 、1 0 0 k D a ~ 1 , 5 0 0 k D a 、1 0 0 k D a ~ 1 , 0 0 0 k D a 、1 0 0 k D a ~ 7 5 0 k D a 、1 0 0 k D a ~ 5 0 0 k D a 、1 0 0 ~ 4 0 0 k D a 、2 0 0 k D a ~ 4 , 0 0 0 k D a 、2 0 0 k D a ~ 3 , 0 0 0 k D a 、2 0 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a 、2 0 0 k D a ~ 1 , 5 0 0 k D a 、2 0 0 k D a ~ 1 , 0 0 0 k D a または 2 0 0 k D a ~ 5 0 0 k D a の平均分子量を有する。特定の実施形態では、多糖体は、5 0 k D a ~ 5 , 0 0 0 k D a の分子量を有する。特定の態様では、多糖体は、1 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a 、5 0 k D a ~ 1 , 5 0 0 k D a または 7 5 k D a ~ 2 0 0 k D a の分子量を有する。

#### 【 0 0 3 9 】

特定の実施形態では、S . ニューモニエ血清型 2 4 F 多糖体は、5 ~ 2 , 0 0 0 の繰り返し単位を有する。特定の態様では、多糖体は、1 5 ~ 1 , 5 0 0 、2 0 ~ 4 0 0 、3 0 ~ 3 0 0 、4 0 ~ 2 5 0 または 5 0 ~ 2 0 0 の繰り返し単位を有する。

#### 【 0 0 4 0 】

##### キャリアタンパク質

血清型のうちの 1 つ以上に由来する多糖体は、キャリアタンパク質 ( 「 P r 」 ) にコンジュゲートされ、小児、高齢者および/または免疫不全患者の免疫原性を改善することができる。多価組成物に複数の血清型が使用される場合、同じキャリアタンパク質または異なるキャリアタンパク質を用いて血清型が調製されてもよい。同じ血清型の各荚膜多糖体は、典型的には、同じキャリアタンパク質にコンジュゲートされる。

#### 【 0 0 4 1 】

本発明の特定の実施形態では、CRM 1 9 7 がキャリアタンパク質として使用される。CRM 1 9 7 は、ジフテリア毒素 ( D T ) の非毒性変異体である。CRM 1 9 7 キャリアタンパク質は、残基 5 2 にあるフラグメント A の単一のアミノ酸置換によって非毒性にされる D T の変異体である。一実施形態では、CRM 1 9 7 キャリアタンパク質は、カザミノ酸および酵母エキスの培地で増殖させたコリネバクテリウム・ジフテリア ( *Corynebacterium diphtheria* ) 株 C 7 ( 1 9 7 ) の培養物から単離される。別の実施形態では、CRM 1 9 7 は、米国特許第 5 , 6 1 4 , 3 8 2 号に記載された方法に従って組換えにより調製される。典型的に、CRM 1 9 7 は、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿およびイオン交換クロマトグラフィーの組合せにより精製される。いくつかの実施形態では、CRM 1 9 7 は、P f e n e x E x p r e s s i o n T e c h n o l o g y ( 商標 ) ( P f e n e x I n c . , S a n D i e g o , C A ) を使用して、シュドモナス・フルオレッセンス ( *Pseudomonas fluorescens* ) において調製される。

#### 【 0 0 4 2 】

他の好適なキャリアタンパク質には、追加の不活化細菌毒素、例えば、D T 、ジフテリア

アトキソイドフラグメント B (DTFB)、TT (破傷風トキソイド)、または TT のフラグメント C、百日咳トキソイド、コレラトキソイド (例えば、国際特許出願公開番号 WO 2004/083251 に記載される)、E. coli LT (熱不安定エンテロトキシン)、E. coli ST (熱安定エンテロトキシン)、およびシュードモナス・エルギノーサ由来の外毒素 A が含まれる。また、細菌の外膜タンパク質、例えば、外膜複合体 c (OMPc)、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質、肺炎球菌表面タンパク質 A (PspA; 国際出願特許公開番号 WO 02/091998 を参照)、肺炎球菌付着因子タンパク質 (PsaA)、A 群もしくは B 群のストレプトコッカス由来の C5a ペプチダーゼ、またはヘモフィルス・インフルエンザエ (Haemophilus influenzae) のプロテイン D、肺炎球菌ニューモリシン (Kuo et al., 1995, Infect Immun 63: 2706-13)、例えば、何らかの様式で無毒化された ply、例えば、dPLY-GMBS (国際特許出願公開番号 WO 04/081515 を参照) または dPLY-ホルモール、PhTX、例えば、PhTA、PhTB、PhTD、PhTE、および PhT タンパク質の融合体、例えば、PhTDE 融合体、PhTBE 融合体 (国際特許出願公開番号 WO 01/98334 および国際特許出願公開番号 WO 03/54007 を参照) も使用することができる。他のタンパク質、例えば、オボアルブミン、スカシ貝ヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、またはツベルクリンの精製タンパク質誘導体 (PPD)、PorB (N. メニンギティディス (N. meningitidis) 由来)、PD (ヘモフィルス・インフルエンザエのプロテイン D; 例えば、欧州特許番号 EP 0594610 B を参照)、またはその免疫学的機能等価体、合成ペプチド (欧州特許番号 EP 0378881 および欧州特許番号 EP 0427347 を参照)、熱ショックタンパク質 (国際特許出願公開番号 WO 93/17712 および国際特許出願公開番号 WO 94/03208 を参照)、百日咳タンパク質 (国際特許出願公開番号 WO 98/58668 および欧州特許番号 EP 0471177 を参照)、サイトカイン、リンホカイン、増殖因子もしくはホルモン (国際特許出願公開番号 WO 91/01146 を参照)、様々な病原体由来抗原に由来する複数のヒト CD4+T 細胞エピトープを含む人工タンパク質 (Falugi et al., 2001, Eur J Immunol 31: 3816-3824 を参照)、例えば N19 タンパク質 (Baraldoi et al., 2004, Infect Immun 72: 4884-7 を参照)、鉄取込みタンパク質 (国際特許出願公開番号 WO 01/72337 を参照)、C. ディフィシル (C. difficile) の毒素 A もしくは B (国際特許公開番号 WO 00/61761 を参照)、およびフラジェリン (Ben-Yedidia et al., 1998, Immunol Lett 64: 9 を参照) もまた、キャリアタンパク質として使用することができる。

#### 【0043】

キャリアタンパク質として、他の DT 変異体、例えば、CRM176、CRM228、CRM45 (Uchida et al., 1973, J Biol Chem 218: 3838-3844); CRM9、CRM45、CRM102、CRM103 および CRM107、ならびに Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992 に Nicholls および Youle によって記載された他の変異; Glu-148 から Asp、Gln または Ser および / または Ala158 から Gly への欠失または変異、および米国特許第 4,709,017 号または米国特許第 4,950,740 号に開示された他の変異; 少なくとも 1 つ以上の残基 Lys516、Lys526、Phe530 および / または Lys534 の変異、および米国特許第 5,917,017 号または米国特許第 6,455,673 号に開示された他の変異; または米国特許第 5,843,711 号に開示されたフラグメントを使用することもできる。

#### 【0044】

多価ワクチンが使用される場合、抗原のうちの 1 つ以上に対して第 2 のキャリアタンパク質を使用することができる。第 2 のキャリアタンパク質は、好ましくは、非毒性かつ非

10

20

30

40

50

反応原性であり、十分な量および純度で入手可能なタンパク質である。第2のキャリアタンパク質はまた、抗原の免疫原性を高めるために、抗原、例えばS・ニューモニエ多糖体とコンジュゲートまたは接合される。キャリアタンパク質は、標準的なコンジュゲーション手順に適しているべきである。一実施形態では、第1のキャリアタンパク質にコンジュゲートされていない各莢膜多糖体が、同じ第2のキャリアタンパク質にコンジュゲートされる（例えば、各莢膜多糖体分子が単一のキャリアタンパク質にコンジュゲートされる）。別の実施形態では、第1のキャリアタンパク質にコンジュゲートされていない莢膜多糖体が、2つ以上のキャリアタンパク質にコンジュゲートされる（各莢膜多糖体分子が単一のキャリアタンパク質にコンジュゲートされる）。そのような実施形態では、同じ血清型の各莢膜多糖体が、典型的には、同じキャリアタンパク質にコンジュゲートされる。

10

【0045】

#### コンジュゲーション

コンジュゲーションの前に、精製された多糖体を、糖をキャリアタンパク質と反応させて活性化多糖体を形成させることができるように化学的に活性化され得る。本明細書で使用する用語「活性化多糖体」は、リンカーまたはキャリアタンパク質へのコンジュゲーションを可能にするために、以下に記載されるように化学的に修飾された多糖体を指す。精製された多糖体は、リンカーに接続されてもよい。活性化されるかリンカーに接続されると、各莢膜多糖体は、キャリアタンパク質に別個にコンジュゲートされてグリココンジュゲートを形成する。多糖体コンジュゲートは、既知のカップリング技術によって調製され得る。

20

【0046】

本発明はさらに、上記実施形態のいずれかから生成される活性化多糖体を提供し、ここで、多糖体は、化学試薬によって活性化されて、リンカーまたはキャリアタンパク質へのコンジュゲーションのための反応基を生成する。特定の実施形態では、活性化はアラビニトール-1- $\text{PO}_4$ で起こる。特定の実施形態では、多糖体は過ヨウ素酸塩によって活性化される。この実施形態の特定の態様では、活性化はアラビニトール-1- $\text{PO}_4$ の炭素2位で起こる。過ヨウ素酸塩活性化血清型24F多糖体の構造については、図1Bを参照されたい。主に第2の炭素でのアルデヒドの形成は、ビシナルジオールによる2,3-炭素の選択的開裂、またはビシナルジオール（またはアルデヒド）によるさらに高い番号の炭素での好ましい連続した一連の酸化が、最終的にアラビニトール糖の第2の炭素での酸化まで必要であるという点で驚くべきことであった。特定の実施形態では、本発明は、活性化多糖体および（過ヨウ素酸塩活性化による）アルデヒド基の50%、60%、70%または80%超がアラビニトールにある活性化多糖体の混合物を提供する。この実施形態の一態様では、活性化多糖体は図1Bに示すような構造を有する。

30

【0047】

特定の実施形態では、多糖体はリンカーに結合され、リンカーの遊離末端がエステル基である多糖体-リンカー中間体を形成することができる。したがって、リンカーは、少なくとも1つの末端がエステル基であるリンカーである。もう一方の末端は、それが多糖体と反応して多糖体-リンカー中間体を形成することができるように選択される。

【0048】

特定の実施形態では、多糖体中の第一級アミン基を使用して、多糖体をリンカーに結合することができる。この場合、リンカーは、典型的には、両末端にエステル基を有する。これは、カップリングが、求核アシル基置換によって1つのエステル基を多糖体中の第一級アミン基と反応することを引き起こすことを許容する。この反応により、アミド結合を介して多糖体がリンカーに結合する多糖体-リンカー中間体となる。したがって、リンカーは、多糖体中の第一級アミン基と反応するための第1のエステル基と、キャリア分子中の第一級アミン基と反応するための第2のエステル基とを提供する二官能性リンカーである。典型的なリンカーは、アジピン酸N-ヒドロキシスクシンイミドジエステル（SIDEA）である。

40

【0049】

50

特定の実施形態では、カップリングは間接的に、すなわち、リンカーへのカップリングの前に多糖体を誘導体化するために使用される付加的リンカーを用いて行うこともできる。多糖体は、多糖体の還元末端でカルボニル基を使用して付加的リンカーに結合される。このカップリングは、2つの工程、すなわち、(a1)カルボニル基を付加的リンカーと反応させる工程、及び(a2)付加的リンカーの遊離末端をリンカーと反応させる工程、を含む。これらの実施形態では、付加的リンカーは、典型的には、両末端に第一級アミン基を有するため、還元的アミノ化によって第一級アミン基のいずれかを多糖体のカルボニル基と反応させることにより工程(a1)を起こさせることを許容する。多糖体中のカルボニル基と反応する第一級アミン基が使用される。ヒドラジドまたはヒドロキシルアミノ基が適している。典型的には、付加的リンカーの両末端に同じ第一級アミン基が存在する。この反応により、多糖体がC-N結合を介して付加的リンカーに結合される多糖体-付加的リンカー中間体が得られる。

10

#### 【0050】

特定の実施形態では、多糖体の異なる基、特にカルボキシル基を使用して、付加的リンカーに多糖体を結合することができる。このカップリングは、2つの工程、すなわち、(a1)基を付加的リンカーと反応させる工程、および(a2)付加的リンカーの遊離末端をリンカーと反応させる工程、を含む。この場合、付加的リンカーは、典型的には、両末端に第一級アミン基を有するため、EDAC活性化によって第一級アミン基のいずれかを多糖体のカルボキシル基と反応させることにより工程(a1)を起こさせることを許容する。多糖体中のEDAC活性化カルボキシル基と反応する第一級アミン基が使用される。ヒドラジド基が適している。典型的には、付加的リンカーの両末端に同じ第一級アミン基が存在する。この反応により、多糖体がアミド結合を介して付加的リンカーに結合される多糖体-付加的リンカー中間体が得られる。

20

#### 【0051】

一実施形態では、多糖体の化学的活性化、およびその後の還元的アミノ化によるキャリアタンパク質へのコンジュゲーションは、米国特許第4,365,170号、米国特許第4,673,574号および米国特許第4,902,506号、米国特許出願公開番号2006/0228380、米国特許出願公開番号2007/184072、米国特許出願公開番号2007/0231340および米国特許出願公開番号2007/0184071、ならびに国際特許出願公開番号WO2006/110381、国際特許出願公開番号WO2008/079653および国際特許出願公開番号WO2008/143709に記載されている手段によって達成することができる。その化学は、酸化体の存在下でのTEMPOのような、アルデヒドに対する第一級ヒドロキシル基である任意の酸化剤との反応(WO2104/097099)、または過ヨウ素酸塩(過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムまたは過ヨウ素酸を含む)のような、アルデヒドに対する2つのビナルヒドロキシル基の反応による肺炎球菌多糖体の活性化を伴ってもよい。この反応は、反応性アルデヒド基の形成を伴う、炭水化物の第一級ヒドロキシル基のランダム酸化またはビナルヒドロキシル基のランダム酸化的開裂をもたらす。

30

#### 【0052】

この実施形態では、キャリアタンパク質へのカップリングは、タンパク質のリジル基への直接的なアミノ化を介した還元的アミノ化による。例えば、コンジュゲーションは、ニッケルの存在下で、活性化多糖体とキャリアタンパク質との混合物をシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような還元剤と反応させることにより行われる。コンジュゲーション反応は、水溶液下でまたはジメチルスルホキシド(DMSO)の存在下で起こり得る。例えば、米国特許出願公開番号US2015/0231270および米国特許出願公開番号US2011/0195086ならびに欧州特許番号EP0471177B1を参照されたい。次いで、水素化ホウ素ナトリウムのような強力な還元剤を加えて、未反応アルデヒドをキャップする。

40

#### 【0053】

還元的アミノ化には、2つの工程、すなわち、(1)多糖体の酸化による反応性アルデ

50

ヒドの形成、(2) 活性化多糖体とキャリアタンパク質との間に形成されたイミン( Schiff 塩基) の還元による安定なアミンコンジュゲート結合の形成が含まれる。任意に、酸化の前に、多糖体のサイズを縮小してもよい。機械的方法(例えば、均質化)または化学的加水分解が使用されてもよい。化学的加水分解は、酢酸を使用して行われ得る。酸化工程は、過ヨウ素酸塩との反応を含み得る。本発明の目的では、用語「過ヨウ素酸塩」には、過ヨウ素酸塩および過ヨウ素酸の両方が含まれ; この用語にはまた、メタ過ヨウ素酸塩( $\text{IO}_4^-$ ) およびオルト過ヨウ素酸塩( $\text{IO}_6^{5-}$ ) も含まれ、過ヨウ素酸塩の様々な塩(例えば、過ヨウ素酸ナトリウムおよび過ヨウ素酸カリウム) も含まれる。一実施形態では、莢膜多糖体は、メタ過ヨウ素酸塩の存在下、好ましくは過ヨウ素酸ナトリウム( $\text{NaIO}_4$ ) の存在下で酸化される。別の実施形態では、莢膜多糖体は、オルト過ヨウ素酸塩の存在下、好ましくは過ヨウ素酸の存在下で酸化される。

10

#### 【0054】

一実施形態では、酸化剤は、ピペリジン-N-オキシまたはピロリジン-N-オキシ化合物のような、第一級ヒドロキシルを選択的に酸化する酸化体の存在下で安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物である(例えば、国際特許出願公開番号WO 2014/097099に記載される)。上記反応では、実際の酸化体は、触媒サイクルにおけるN-オキソアンモニウム塩である。一態様では、上記安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物は、ピペリジン-N-オキシまたはピロリジン-N-オキシ化合物である。一態様では、上記安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物は、TEMPO(2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ)またはPROXYL(2, 2, 5, 5-テトラメチル-1-ピロリジニルオキシ)部分を有する。一態様では、上記安定なニトロキシルラジカル化合物は、TEMPOまたはその誘導体である。一態様では、上記酸化体は、N-ハロ部分を含む分子である。一態様では、上記酸化体は、N-クロロスクシンイミド、N-ブロモスクシンイミド、N-ヨードスクシンイミド、ジクロロイソシアヌル酸、1, 3, 5-トリクロロ-1, 3, 5-トリアジナン-2, 4, 6-トリオン、ジブロモイソシアヌル酸、1, 3, 5-トリブロモ-1, 3, 5-トリアジナン-2, 4, 6-トリオン、ジヨードイソシアヌル酸および1, 3, 5-トリヨード-1, 3, 5-トリアジナン-2, 4, 6-トリオンからなる群から選択される。好ましくは、上記酸化体はN-クロロスクシンイミドである。

20

#### 【0055】

特定の態様では、酸化剤は、共酸化体としての2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ(TEMPO)フリーラジカルおよびN-クロロスクシンイミド(NCS)である(国際特許出願公開番号WO 2014/097099に記載される)。したがって、一態様では、S-ニューモニエ由来のグリココンジュゲートは、以下の工程、すなわち、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(TEMPO)およびN-クロロスクシンイミド(NCS)と反応させて活性化された糖を生成する工程、および、b) 活性化された糖を1つ以上のアミン基を含むキャリアタンパク質と反応させる工程を含む方法によって得ることができる(上記方法は、以降「TEMPO/NCS 還元的アミノ化」と呼ばれる)。

30

#### 【0056】

任意に、クエンチ剤を加えることにより酸化反応がクエンチされてもよい。クエンチ剤は、ビスナルジオール、1, 2-アミノアルコール、アミノ酸、グルタチオン、サルファイト、バイサルフェート、ジチオナイト、メタバイサルファイト、チオサルフェート、ホスファイト、ハイポホスファイトまたは亜リン酸(グリセロール、エチレングリコール、プロパン-1, 2-ジオール、ブタン-1, 2-ジオールまたはブタン-2, 3-ジオール、アスコルビン酸のような)から選択され得る。

40

#### 【0057】

還元的アミノ化のためのコンジュゲーションプロセスの第2の工程は、安定なコンジュゲート結合(いわゆる還元的アミノ化)を形成するための還元剤を使用する、活性化多糖体とキャリアタンパク質との間のイミン(Schiff 塩基)結合の還元である。好適な還元剤

50



には、シアノ水素化ホウ素（例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウム）または水素化ホウ素ナトリウムが含まれる。一実施形態では、還元剤はシアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

#### 【0058】

本発明の方法の特定の実施形態では、還元的アミノ化反応は、非プロトン性溶媒（または非プロトン性溶媒の混合物）中で行われる。一実施形態では、還元反応は、DMSO（ジメチルスルホキシド）またはDMF（ジメチルホルムアミド）溶媒中で行われる。凍結乾燥されている場合、DMSOまたはDMF溶媒を使用して、活性化多糖体およびキャリアタンパク質を再構成してもよい。一実施形態では、非プロトン性溶媒はDMSOである。

#### 【0059】

還元反応の最後に、コンジュゲート中に未反応のアルデヒド基が残存し得、これは、好適なキャッピング剤またはクエンチ剤を使用してキャップまたはクエンチングされ得る。一実施形態では、このキャッピング剤またはクエンチ剤は、水素化ホウ素ナトリウム（ $\text{NaBH}_4$ ）である。好適な代替物には、ブレンステッド酸またはルイス酸の存在下でのトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化ホウ素ナトリウムもしくは水素化ホウ素亜鉛）、ピリジンボラン、2-ピコリンボラン、2,6-ジボラン-メタノール、ジメチルアミン-ボラン、 $t\text{-BuMe}^+\text{PrN-BH}_3$ 、ベンジルアミン- $\text{BH}_3$ もしくは5-エチル-2-メチルピリジンボラン（PEMB）のようなアミンボラン、または水素化ホウ素交換樹脂が含まれる。

#### 【0060】

非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を使用して調製されたグリココンジュゲートは、一般に多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンに使用される。したがって、あらゆる血清型が非プロトン性溶媒中で調製されるわけではない多価組成物の特定の実施形態では、残りの血清型の還元反応は、水性溶媒（例えば、PBS（リン酸緩衝食塩水）、MES（2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸）、HEPES、（4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジエタンスルホン酸）、ピス-トリス、ADA（N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸）、PIPES（ピペラジン-N,N'-ビス（2-エタンスルホン酸））、MOPSO（3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、BES（N,N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸）、MOPS（3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸）、DIPSO（3-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ-2-ヒドロキシプロパン-1-スルホン酸）、MOBS（4-（N-モルホリノ）ブタンスルホン酸）、HEPPSO（N-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-N-（2-ヒドロキシプロパンスルホン酸））、POPSO（ピペラジン-1,4-ビス（2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸））、TEA（トリエタノールアミン）、EPPS（4-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-1-プロパンスルホン酸）、ビシンまたはHEPBから選択される、 $\text{pH } 6.0 \sim 8.5$ 、 $7.0 \sim 8.0$ または $7.0 \sim 7.5$ において）中で行われる。

#### 【0061】

いくつかの実施形態では、本発明のグリココンジュゲートは、 $10 \text{ kDa} \sim 10,000 \text{ kDa}$ の分子量を有する多糖体を含む。他のそのような実施形態では、多糖体は、 $25 \text{ kDa} \sim 5,000 \text{ kDa}$ の分子量を有する。他のそのような実施形態では、多糖体は、 $50 \text{ kDa} \sim 1,000 \text{ kDa}$ の分子量を有する。他のそのような実施形態では、多糖体は、 $70 \text{ kDa} \sim 900 \text{ kDa}$ の分子量を有する。他のそのような実施形態では、多糖体は、 $100 \text{ kDa} \sim 800 \text{ kDa}$ の分子量を有する。他のそのような実施形態では、多糖体は、 $200 \text{ kDa} \sim 600 \text{ kDa}$ の分子量を有する。さらなるそのような実施形態では、多糖体は、 $100 \text{ kDa} \sim 1,000 \text{ kDa}$ 、 $100 \text{ kDa} \sim 900 \text{ kDa}$ 、 $100 \text{ kDa} \sim 800 \text{ kDa}$ 、 $100 \text{ kDa} \sim 700 \text{ kDa}$ 、 $100 \text{ kDa} \sim 600 \text{ kDa}$ 、 $100 \text{ kDa} \sim 500 \text{ kDa}$ 、 $100 \text{ kDa} \sim 400 \text{ kDa}$ 、 $100 \text{ kDa} \sim 300 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 1,000 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 900 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 800 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 700 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 600 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 500 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 400 \text{ kDa}$ 、 $150 \text{ kDa} \sim 300 \text{ kDa}$ 、 $200 \text{ kDa}$

10

20

30

40

50

～ 1,000 kDa、200 kDa～900 kDa、200 kDa～800 kDa、200 kDa～700 kDa、200 kDa～600 kDa、200 kDa～500 kDa、200 kDa～400 kDa、200 kDa～300、250 kDa～1,000 kDa、250 kDa～900 kDa、250 kDa～800 kDa、250 kDa～700 kDa、250 kDa～600 kDa、250 kDa～500 kDa、250 kDa～400 kDa、250 kDa～350 kDa、300 kDa～1,000 kDa、300 kDa～900 kDa、300 kDa～800 kDa、300 kDa～700 kDa、300 kDa～600 kDa、300 kDa～500 kDa、300 kDa～400 kDa、400 kDa～1,000 kDa、400 kDa～900 kDa、400 kDa～800 kDa、400 kDa～700 kDa、400 kDa～600 kDaまたは500 kDa～600 kDaの分子量を有する。

10

#### 【0062】

特定の実施形態では、コンジュゲーション反応は還元的アミノ化によって行われ、コンジュゲーション反応の効率を高め、遊離シアン化物の除去を促進するためにニッケルが使用される。遷移金属はシアン化物と安定な錯体を形成することが知られており、シアノ水素化ホウ素ナトリウムによるタンパク質アミノ基とホルムアルデヒドとの還元的メチル化を改善することが知られている (S Gidley et al., Biochem J. 1982, 203: 331-334; Jentoft et al. Anal Biochem. 1980, 106: 186-190)。ニッケルの添加は、残存する抑制性シアン化物と複合体を形成することにより、コンジュゲーション中のタンパク質の消費を増加させ、さらに大きく、潜在的にさらに免疫原性の高いコンジュゲートの形成をもたらす。

20

#### 【0063】

好適な代替化学には、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート (CDAP) による糖の活性化によるシアネートエステルの形成が含まれる。したがって、活性化された糖は、直接またはスペーサー (リンカー) 基を介してキャリアタンパク質上のアミノ基に結合され得る。例えば、スペーサーは、チオール化多糖体をもたらすシスタミンまたはシステアミンであり得、これは、マレイミド活性化キャリアタンパク質 (例えば、GMB Sを使用して) またはハロアセチル化キャリアタンパク質 (例えば、ヨードアセトイミド [例えば、エチルヨードアセトイミド HCl] または N-スクシンイミジルプロモアセテートまたは S I A B、または S I A、または S B A P を使用して) との反応後に得られるチオエーテル結合を介してキャリアに結合することができる。好ましくは、シアネートエステル (CDAP 化学により作製されてもよい) は、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) と結合し、アミノ誘導体化糖は、カルボジイミド (例えば、EDAC または EDC) 化学を使用して、タンパク質キャリア上のカルボキシル基を介してキャリアタンパク質にコンジュゲートされる。そのようなコンジュゲートは、国際特許出願公開番号 WO 93 / 15760、国際特許出願公開番号 WO 95 / 08348 および国際特許出願公開番号 WO 96 / 29094 ならびに Chu et al., 1983, Infect. Immunity 40: 245-256 に記載されている。

30

#### 【0064】

他の好適な技術は、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボルネン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-S-NHS、EDC、TSTU を使用する。多くは国際特許出願公開番号 WO 98 / 42721 に記載されている。コンジュゲーションには、糖の遊離ヒドロキシル基と CDI との反応 (Bethell et al., 1979, J. Biol. Chem. 254: 2572-4; Hearn et al., 1981, J. Chromatogr. 218: 509-18 を参照)、次いでタンパク質との反応によりカルバメート結合を形成することにより形成され得るカルボニルリンカーが含まれ得る。これには、第一級ヒドロキシル基へのアノマー末端の還元、任意に第一級ヒドロキシル基の保護/脱保護、第一級ヒドロキシル基と CDI との反応による CDI カルバメート中間体の形成、および CDI カルバメート中間体とタンパク質上のアミノ基とのカップリングが含まれ得る。

40

50

## 【 0 0 6 5 】

コンジュゲーション（還元反応および任意にキャッピングまたはクエンチング反応）に続いて、グリココンジュゲートは、当業者に公知の様々な技術によって精製（多糖体 - タンパク質コンジュゲートの量に関して濃縮）されてもよい。これらの技術には、透析、濃縮 / ダイアフィルトレーション操作、接線流濾過、限外濾過、沈殿 / 溶出、カラムクロマトグラフィー（イオン交換クロマトグラフィー、マルチモーダルイオン交換クロマトグラフィー、D E A E または疎水性相互作用クロマトグラフィー）および深層濾過が含まれる。例えば、米国特許第 6 , 1 4 6 , 9 0 2 号を参照されたい。一実施形態では、グリココンジュゲートは、ダイアフィルトレーションまたはイオン交換クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーにより精製される。

10

## 【 0 0 6 6 】

本発明のグリココンジュゲートを特徴付ける 1 つの方法は、糖にコンジュゲートされるキャリアタンパク質中（例えば、C R M 1 9 7）のリジン残基の数によるものであり、これは、コンジュゲートされたリジンの範囲（コンジュゲーションの程度）として特徴付けることができる。多糖体への共有結合によるキャリアタンパク質のリジン修飾の証拠は、当業者に公知のルーチンの方法を使用したアミノ酸分析により得ることができる。コンジュゲーションにより、コンジュゲート材料を作製するために使用されるキャリアタンパク質出発材料と比較して、回収されるリジン残基の数が減少する。好ましい実施形態では、本発明のグリココンジュゲートのコンジュゲーションの程度は、2 ~ 1 5、2 ~ 1 3、2 ~ 1 0、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 5、2 ~ 4、3 ~ 1 5、3 ~ 1 3、3 ~ 1 0、3 ~ 8、3 ~ 6、3 ~ 5、3 ~ 4、5 ~ 1 5、5 ~ 1 0、8 ~ 1 5、8 ~ 1 2、1 0 ~ 1 5 または 1 0 ~ 1 2 である。一実施形態では、本発明のグリココンジュゲートのコンジュゲーションの程度は、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 1 0、約 1 1、約 1 2、約 1 3、約 1 4 または約 1 5 である。好ましい実施形態では、本発明のグリココンジュゲートのコンジュゲーションの程度は 4 ~ 7 である。いくつかのそのような実施形態では、キャリアタンパク質は C R M 1 9 7 である。

20

## 【 0 0 6 7 】

本発明のグリココンジュゲートはまた、糖とキャリアタンパク質との比（重量 / 重量）によって特徴付けられてもよい。いくつかの実施形態では、グリココンジュゲート中の多糖体とキャリアタンパク質との比（w / w）は、0 . 5 ~ 3 . 0（例えば、約 0 . 5、約 0 . 6、約 0 . 7、約 0 . 8、約 0 . 9、約 1 . 0、約 1 . 1、約 1 . 2、約 1 . 3、約 1 . 4、約 1 . 5、約 1 . 6、約 1 . 7、約 1 . 8、約 1 . 9、約 2 . 0、約 2 . 1、約 2 . 2、約 2 . 3、約 2 . 4、約 2 . 5、約 2 . 6、約 2 . 7、約 2 . 8、約 2 . 9 または約 3 . 0）である。他の実施形態では、糖とキャリアタンパク質との比（w / w）は、0 . 5 ~ 2 . 0、0 . 5 ~ 1 . 5、0 . 8 ~ 1 . 2、0 . 5 ~ 1 . 0、1 . 0 ~ 1 . 5 または 1 . 0 ~ 2 . 0 である。さらなる実施形態では、糖とキャリアタンパク質との比（w / w）は 0 . 8 ~ 1 . 2 である。好ましい実施形態では、コンジュゲート中の英膜多糖体とキャリアタンパク質との比は 0 . 9 ~ 1 . 1 である。いくつかのそのような実施形態では、キャリアタンパク質は C R M 1 9 7 である。本発明のグリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、キャリアタンパク質に共有結合的にコンジュゲートされていない遊離糖を含有してもよく、それにもかかわらずグリココンジュゲート組成物中に存在する。遊離糖は、グリココンジュゲートと非共有結合的に結合（すなわち、グリココンジュゲートに非共有結合、吸着またはグリココンジュゲート中にもしくはグリココンジュゲートとともに捕捉）され得る。

30

40

## 【 0 0 6 8 】

好ましい実施形態では、グリココンジュゲートは、多糖体の総量と比較して約 5 0 %、4 5 %、4 0 %、3 5 %、3 0 %、2 5 %、2 0 % または 1 5 % 未満の遊離多糖体を含む。好ましい実施形態では、グリココンジュゲートは、多糖体の総量と比較して約 2 5 % 未満の遊離多糖体を含む。好ましい実施形態では、グリココンジュゲートは、多糖体の総量と比較して約 2 0 % 未満の遊離多糖体を含む。好ましい実施形態では、グリココンジュゲ

50

ートは、多糖体の総量と比較して約 15 % 未満の遊離多糖体を含む。

【0069】

多価多糖体 - タンパク質コンジュゲートワクチン

本発明の特定の実施形態では、多価肺炎球菌ワクチンを提供するために、遊離多糖体、多糖体 - タンパク質コンジュゲートの成分またはそれらの組合せとして、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 24 F 由来の非コンジュゲート多糖体または多糖体 - タンパク質コンジュゲートと、S・ニューモニエ血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 B、7 C、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、16 F、17 F、18 B、18 C、19 A、19 F、20、21、22 A、22 F、23 A、23 B、23 F、24 B、27、28 A、31、33 F、34、35 A、35 B、35 F および 38 のうちの 1 つ以上に由来する莢膜多糖体とを含む多価多糖体ワクチン。本発明の特定の実施形態では、免疫原性組成物は、1 つ以上のキャリアタンパク質に個々にコンジュゲートされた、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43 または 44 の S・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖体を含むか、それから本質的になるか、それからからなる。好ましくは、特定の血清型に由来する糖は、複数のキャリアタンパク質にはコンジュゲートされていない。

10

【0070】

個々のグリココンジュゲートを精製した後、それらを配合して、本発明の免疫原性組成物を製剤化する。これらの肺炎球菌コンジュゲートは、別個のプロセスによって調製され、単一の投与製剤にバルク製剤 (bulk formulated) される。

20

【0071】

医薬組成物 / ワクチン組成物

本発明はさらに、薬学的に許容される担体およびアジュバントとともに、上記の多糖体 S・ニューモニエ血清型の組合せのいずれかを含むか、それから本質的になるか、それからなる医薬、免疫原性およびワクチン組成物を含む組成物を提供する。

【0072】

本発明の多糖体 - タンパク質コンジュゲートの製剤化は、当技術分野で認識されている方法を使用して達成され得る。例えば、個々の肺炎球菌コンジュゲートは、組成物を調製するために生理学的に許容されるビヒクルを配合され得る。そのようなビヒクルの例には、限定するものではないが、水、緩衝食塩水、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール) およびデキストロース溶液を含む。

30

【0073】

好ましい実施形態では、ワクチン組成物は、塩化ナトリウムを含む L - ヒスチジン緩衝液と製剤化される。

【0074】

本明細書で定義されるように、「アジュバント」とは、本発明の免疫原性組成物の免疫原性を高めるのに役立つ物質である。免疫アジュバントは、単独で投与された場合に弱い免疫原性である、例えば、抗体価をまったく誘発しないか、弱い抗体価を誘発するか、細胞性免疫応答を誘発する抗原に対する免疫応答を増強し、抗原に対する抗体価を増加させ得、および / または個体の免疫応答を達成するのに有効な抗原の用量を低下させる。したがって、アジュバントは、しばしば免疫応答を促進するために投与され、当業者に周知である。組成物の有効性を高めるための好適なアジュバントには、限定するものではないが、以下が含まれる：

40

(1) アルミニウム塩 (ミョウバン)、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど；

(2) (ムラミルペプチド (以下に定義) などの特定の免疫刺激剤または細菌細胞壁成分の有無にかかわらず) 水中油型エマルジョン製剤、例えば、(a) モデル 110 Y マイクロフルイダイザー (Microfluidics, Newton, MA) のようなマイ

50

クロフルイダイザーを使用してサブミクロン粒子に配合された5%スクアレン、0.5% Tween 80および0.5% Span 85を含有する(様々な量のMTP-PEを含有してもよい)MF59(国際特許出願公開番号WO90/14837)、(b)サブミクロンエマルジョンにマイクロ流動化されるか、大きな粒径のエマルジョンを生成するためにボルテックスされた10%スクアレン、0.4% Tween 80、5%プルロニックブロックポリマー-L121およびthr-MDPを含有するSAF、(c)2%スクアレン、0.2% Tween 80、ならびに米国特許第4,912,094号に記載の3-O-脱アシル化モノホスホリルリピドA(MPL(商標))、トレハロースジミコレート(TDM)、および細胞壁骨格(CWS)、好ましくはMPL+CWS(Detox(商標))からなる群からの1つ以上の細菌細胞壁成分を含有するRibbi(商標)アジュバント系(RAS)、(Corixa, Hamilton, MT); (d) Montanide ISA;

10

(3) Quil AまたはSTIMULON(商標)QS-21(Antigenics, Framingham, MA)のようなサポニンアジュバント(例えば、米国特許第5,057,540号を参照)が使用されるか、ISCOM(コレステロール、サポニン、リン脂質および両親媒性タンパク質の組合せにより形成された免疫刺激複合体)およびIscomatrix(登録商標)(ISCOMと本質的に同じ構造を有するが、タンパク質を含まない)のようなそれから生成された粒子;

(4) Corixaから入手可能であり、米国特許第6,113,918号に記載されているアミノアルキルグルコサミンホスフェート化合物(AGP)またはその誘導体もしくは類似体などの細菌リポ多糖、合成脂質A類似体;そのようなAGPの1種は、水性形態または安定なエマルジョンとして製剤化されている529としても知られている(以前はRC529として知られていた)2-[ (R) - 3 - テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ ] エチル 2 - デオキシ - 4 - O - ホスホノ - 3 - O - [ (R) - 3 - テトラデカノイルオキシテトラデカノイル ] - 2 - [ (R) - 3 - テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ ] - b - D - グルコピラノシドである;

20

(5) (1または複数の) CpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドなどの合成ポリヌクレオチド(米国特許第6,207,646号);

(6) サイトカイン、例えば、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18など)、インターフェロン(例えば、ガンマインターフェロン)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)、共刺激分子B7-1およびB7-2など;ならびに

30

(7) 補体、例えば、補体成分C3dの三量体。

#### 【0075】

別の実施形態では、アジュバントは、上記のアジュバントのうちの2つ、3つまたはそれ以上の混合物、例えば、SBAS2(3-脱アシル化モノホスホリルリピドAおよびQS21も含有する水中油型エマルジョン)である。

#### 【0076】

ムラミルペプチドには、限定するものではないが、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-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)などを含む。

40

#### 【0077】

特定の実施形態では、アジュバントはアルミニウム塩である。アルミニウム塩アジュバントは、ミョウバン沈殿ワクチンまたはミョウバン吸着ワクチンであり得る。アルミニウム塩アジュバントは、当技術分野で周知であり、例えば、Harlow, E. and D. Lane(1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory)およびNicklas, W.(1992; Aluminum salts. Research in Immuno

50

logy 143:489-493)に記載されている。アルミニウム塩には、限定するものではないが、水和アルミナ、アルミナ水和物、アルミナ三水和物(ATH)、アルミニウム水和物、アルミニウム三水和物、Alhydrogel(登録商標)、Superfos、Amphogel(登録商標)、水酸化アルミニウム(III)、ヒドロキシリン酸アルミニウム(リン酸アルミニウムアジュバント(APA))、非晶質アルミナ、三水和アルミナまたはトリヒドロキシアリミニウムを含む。

【0078】

APAは、ヒドロキシリン酸アルミニウムの水性懸濁液である。APAは、塩化アルミニウムとリン酸ナトリウムとを1:1の体積比でブレンドして、ヒドロキシリン酸アルミニウムを沈殿させることにより製造される。ブレンドプロセス後、高せん断ミキサーを用いて材料のサイズを縮小して、単分散の粒径分布を達成する。次いで、生理食塩水に対して生成物をダイアフィルトレーションし、蒸気滅菌する。

10

【0079】

特定の実施形態では、市販のAl(OH)<sub>3</sub>(例えば、Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NYのAlhydrogel(登録商標)またはSuperfos)を使用してタンパク質を吸着する。別の実施形態では、タンパク質の吸着は、タンパク質のpI(等電pH)および培地のpHに依存する。pIが低いタンパク質は、pIが高いタンパク質よりも強力に正荷電アルミニウムイオンに吸着する。アルミニウム塩は2~3週間かけてゆっくりと放出されるAgの貯蔵部を確立し、マクロファージの非特異的活性化および補体の活性化に参与し得、および/または(おそらくは尿酸の刺激を通じた)先天性免疫機構を刺激し得る。例えば、Lambrecht et al., 2009, Curr Opin Immunol 21:23を参照されたい。

20

【0080】

一価のバルク水性コンジュゲートは、典型的には一緒にブレンドされ、希釈される。希釈したら、バッチを滅菌濾過する。リン酸アルミニウムアジュバントを無菌的に加えて、血清型6Bを除くあらゆるS.ニューモニエ血清型の最終濃度4μg/mLを目標とし、これを8μg/mLの目標値まで希釈し、最終アルミニウム濃度を250μg/mLにする。アジュバント化された製剤バッチを、バイアルまたはシリンジに充填する。

【0081】

30

特定の実施形態では、アジュバントは、CpG含有ヌクレオチド配列、例えば、CpG含有オリゴヌクレオチド、特にCpG含有オリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)である。別の実施形態では、アジュバントは、Coley Pharmaceutical Groupから入手することができるODN 1826である。

【0082】

「CpG含有ヌクレオチド」、「CpG含有オリゴヌクレオチド」、「CpGオリゴヌクレオチド」および同様の用語は、非メチル化CpG部分を含む長さ6~50ヌクレオチドのヌクレオチド分子を指す。例えば、Wang et al., 2003, Vaccine 21:4297を参照されたい。別の実施形態では、この用語の当技術分野で認められた任意の他の定義が意図されている。CpG含有オリゴヌクレオチドには、任意の合成ヌクレオシド間結合、修飾塩基および/または修飾糖を使用した修飾オリゴヌクレオチドが含まれる。

40

【0083】

CpGオリゴヌクレオチドの使用法は当技術分野で周知であり、例えば、Sur et al., 1999, J Immunol 162:6284-93; Verthelyi, 2006, Methods Mol Med 127:139-58; および Yasuda et al., 2006, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 23:89-110に記載されている。

【0084】

投与/投与量

50

本発明の組成物および製剤は、全身または粘膜経路を介してワクチンを投与することにより、感染症、例えば肺炎球菌感染症に易感染性のヒトを防御または治療するために使用することができる。一実施形態では、本発明は、S・ニューモニエ英膜多糖体コンジュゲートに対する免疫応答を誘発する方法であって、本発明の免疫原性組成物の免疫学的有効量をヒトに投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、肺炎球菌感染に対してヒトをワクチン化する方法であって、本発明の免疫原性組成物の免疫学的有効量をヒトに投与する工程を含む方法を提供する。

#### 【0085】

特定のワクチンに対する成分の最適量は、対象の適切な免疫応答の観察を含む標準的な試験によって確認することができる。例えば、別の実施形態では、ヒトワクチン化の投与量は、動物試験からヒトデータに外挿することにより決定される。別の実施形態では、投与量は経験的に決定される。

10

#### 【0086】

本発明の組成物の「有効量」とは、後続のチャレンジ中に、微生物、例えばS・ニューモニエの感染の可能性または重症度を顕著に低下させる抗体を誘発するのに必要な用量を指す。

#### 【0087】

本発明の方法は、侵襲性感染症（髄膜炎、肺炎および菌血症）および非侵襲性感染症（急性中耳炎および副鼻腔炎）の両方を含む、微生物、例えばS・ニューモニエによって引き起こされる原発性臨床症候群の予防および／または軽減に使用することができる。

20

#### 【0088】

本発明の組成物の投与には、筋肉内、腹腔内、皮内もしくは皮下経路を介した注射、または口腔／消化管、呼吸器管もしくは泌尿生殖器管への粘膜投与を介したもののうち1つ以上を含み得る。一実施形態では、肺炎または中耳炎の治療に鼻腔内投与が使用される（肺炎球菌の鼻咽頭保菌を比較的効果的に予防し、ひいては初期段階で感染を減弱させることができるため）。

#### 【0089】

各ワクチン用量中のコンジュゲートの量は、重大な有害作用を伴うことなく免疫防御応答を誘発する量として選択される。そのような量は、肺炎球菌血清型によって異なり得る。一般に、多糖体ベースのコンジュゲートの場合、各用量は0.1～100 μgの各多糖体、具体的には0.1～10 μg、さらに具体的には1～5 μgを含む。例えば、各用量は、100、150、200、250、300、400、500もしくは750 ngまたは1、1.5、2、3、4、5、6、7、7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、22、25、30、40、50、60、70、80、90もしくは100 μgの各多糖体を含むことができる。

30

#### 【0090】

特定のワクチンに対する成分の最適量は、対象の適切な免疫応答の観察を含む標準的な試験によって確認することができる。例えば、別の実施形態では、ヒトワクチン化の投与量は、動物試験からヒトデータに外挿することにより決定される。別の実施形態では、投与量は経験的に決定される。

40

#### 【0091】

一実施形態では、アルミニウム塩の用量は、10、15、20、25、30、50、70、100、125、150、200、300、500もしくは700 μgまたは1、1.2、1.5、2、3、5 mgまたはそれ以上である。さらに別の実施形態では、上記のアルミニウム塩の用量は、組換えタンパク質1 μg当たりである。

#### 【0092】

一般に、各0.5 mL用量は、4 μgの血清型6B多糖体を除き、2 μgの各S・ニューモニエ多糖体、約32 μgのCRM197キャリアタンパク質（例えば、32 μg ± 5 μg、± 3 μg、± 2 μgまたは± 1 μg）、0.125 mgの元素アルミニウム（0.5 mgのリン酸アルミニウム）アジュバント、ならびに塩化ナトリウムおよびL-ヒスチ

50

ジン緩衝液を含有するように製剤化される。塩化ナトリウム濃度は、約 150 mM（例えば、 $150\text{ mM} \pm 25\text{ mM}$ 、 $\pm 20\text{ mM}$ 、 $\pm 15\text{ mM}$ 、 $\pm 10\text{ mM}$ または $\pm 5\text{ mM}$ ）であり、そして約 20 mM（例えば、 $20\text{ mM} \pm 5\text{ mM}$ 、 $\pm 2.5\text{ mM}$ 、 $\pm 2\text{ mM}$ 、 $\pm 1\text{ mM}$ または $\pm 0.5\text{ mM}$ ）の L - ヒスチジン緩衝液である。

【0093】

本発明の方法のいずれかによれば、一実施形態では、対象はヒトである。特定の実施形態では、ヒト患者は、乳児（1歳未満）、歩き始めの幼児（約12～24カ月）または幼児（約2～5歳）である。他の実施形態では、ヒト患者は高齢患者（65歳超）である。本発明の組成物はまた、年長の小児、青少年および成人（例えば、18歳～45歳または18歳～65歳）に使用するのに適している。

10

【0094】

本発明の方法の一実施形態では、本発明の組成物は単回接種として投与される。別の実施形態では、組成物は、適切に間隔を空けて2回、3回または4回以上投与される。例えば、組成物は、1、2、3、4、5もしくは6カ月間隔で、またはそれらの任意の組合せで投与され得る。予防接種スケジュールは、肺炎球菌ワクチン用に指定されたスケジュールに従うことができる。例えば、S・ニューモニエによって引き起こされる侵襲性疾患に対する乳幼児のルーチンのスケジュールは、月齢2、4、6および12～15カ月である。したがって、好ましい実施形態では、組成物は、月齢2、4、6および12～15カ月での4回投与シリーズとして投与される。

【0095】

20

本発明の組成物はまた、S・ニューモニエ由来の1つ以上のタンパク質を含み得る。含めるのに適したS・ニューモニエタンパク質の例には、国際特許出願公開番号WO 02 / 083855および国際特許出願公開番号WO 02 / 053761で同定されたものを含む。

【0096】

製剤

本発明の組成物は、非経口的、経粘膜的、経皮的、筋肉内、静脈内、皮内、鼻腔内、皮下、腹腔内のような当業者に公知の1つ以上の方法によって対象に投与することができ、それに応じて製剤化することができる。

【0097】

30

一実施形態では、本発明の組成物は、液体製剤の表皮注射、筋肉内注射、静脈内、動脈内、皮下注射または呼吸器内粘膜注射を介して投与される。注射用の液体製剤は、溶液などを含む。

【0098】

本発明の組成物は、単回用量バイアル、複数回用量バイアルまたは事前充填シリンジとして製剤化することができる。

【0099】

別の実施形態では、本発明の組成物は経口投与され、したがって、経口投与に適した形態で、すなわち、固体または液体製剤として製剤化される。固体経口製剤には、錠剤、カプセル、丸薬、顆粒、ペレットなどが含まれる。液体経口製剤には、溶液、懸濁液、分散液、エマルジョン、油類などが含まれる。

40

【0100】

液体製剤用の薬学的に許容される担体は、水性もしくは非水性の溶液、懸濁液、エマルジョンまたは油類である。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、およびオレイン酸エチルのような注射用有機エステルである。水性担体には、水、アルコール性溶液／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液、例えば、生理食塩水および緩衝媒体が含まれる。油類の例は、動物、植物または合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、別の魚油、または乳汁もしくは卵に由来する脂質である。

【0101】

50



医薬組成物は、等張性、低張性または高張性であり得る。しかし、注入または注射用の医薬組成物は、投与時に本質的に等張性であることがしばしば好ましい。したがって、医薬組成物は、保存のために好ましくは等張性または高張性であり得る。医薬組成物が保存のために高張性である場合、投与前に希釈して等張性溶液にすることができる。

#### 【0102】

等張剤は、塩のようなイオン性等張剤または炭水化物のような非イオン性等張剤であり得る。イオン性等張剤の例には、限定するものではないが、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{KCl}$ および $\text{MgCl}_2$ を含む。非イオン性等張剤の例には、限定するものではないが、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールを含む。

#### 【0103】

また、少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤は、緩衝液であることが好ましい。いくつかの目的のために、例えば、医薬組成物が注入または注射用を意味する場合、組成物は、4~10、例えば5~9、例えば6~8の範囲のpHに溶液を緩衝することができる緩衝液を含むことがしばしば望ましい。

#### 【0104】

緩衝液は、例えば、トリス、アセテート、グルタメート、ラクテート、マレエート、タータレート、ホスフェート、シトレート、カーボネート、グリシネート、L-ヒスチジン、グリシン、スクシネートおよびトリエタノールアミン緩衝液からなる群から選択され得る。

#### 【0105】

緩衝液は、例えば、特に医薬製剤が非経口使用用である場合、非経口使用用のUSP適合緩衝液からさらに選択され得る。例えば、緩衝液は、一塩基酸、例えば酢酸、安息香酸、グルコン酸、グリセリン酸および乳酸；二塩基酸、例えばアコニット酸、アジピン酸、アスコルピン酸、炭酸、グルタミン酸、リンゴ酸、コハク酸および酒石酸、多塩基酸、例えばクエン酸およびリン酸；ならびに塩基、例えばアンモニア、ジエタノールアミン、グリシン、トリエタノールアミンおよびトリスからなる群から選択され得る。

#### 【0106】

非経口ビヒクル（皮下、静脈内、動脈内または筋肉内注射用）には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液および固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、液体および栄養補給液、リンゲルデキストロースに基づくものなどのような電解質補給液が含まれる。例には、界面活性剤および他の薬学的に許容されるアジュバントの添加の有無にかかわらず、水および油類のような滅菌液体である。一般に、水、生理食塩水、水性デキストロースおよび関連糖溶液、グリコール、例えば、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール、ポリソルベート80（PS-80）、ポリソルベート20（PS-20）およびポロキサマー188（P188）が、特に注射用溶液に好ましい液体担体である。油類の例は、動物、植物または合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、別の魚油、または乳汁もしくは卵に由来する脂質である。

#### 【0107】

製剤はまた、界面活性剤を含有してもよい。好ましい界面活性剤には、限定するものではないが、ポリオキシエチレンソルピタンエステル界面活性剤（一般にTweenと呼ばれる）、特にPS-20およびPS-80；DOWFAX（商標）の商品名の下に販売されているエチレンオキシド（EO）、プロピレンオキシド（PO）および/またはブチレンオキシド（BO）のコポリマー、例えば、直鎖EO/POブロックコポリマー；反復エトキシ（オキシ-1,2-エタンジイル）基の数が様々であり得るオクトキシノール、オクトキシノール-9（Triton X-100またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）が特に興味深い；（オクチルフェノキシ）ポリエトキシエタノール（IGEPAL CA-630/NP-40）；リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（レシチン）；ノニルフェノールエトキシレート、例えば、Tergitol（商標）NPシリーズ；ラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコール（Brj界面活性

10

20

30

40

50

剤として知られる) から誘導されたポリオキシエチレン脂肪エーテル、例えばトリエチレングリコールモノラウリルエーテル (B r i j 30) ; ならびにソルビタンエステル (一般に S P A N として知られている)、例えば、ソルビタントリオレート (S p a n 85) およびソルビタンモノラウレートが含まれる。エマルジョンに含めるのに好ましい界面活性剤は、P S - 20 または P S - 80 である。

#### 【0108】

界面活性剤の混合物、例えば、P S - 80 / S p a n 85 混合物を使用することができる。ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (P S - 80) のようなポリオキシエチレンソルビタンエステルと t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (T r i t o n X - 100) のようなオクトキシノールとの組合せも適している。別の有用な組合せは、ラウレス9 + ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび / またはオクトキシノールを含む。

10

#### 【0109】

界面活性剤の好ましい量は、ポリオキシエチレンソルビタンエステル (P S - 80 など) 0.01 ~ 1 % w / v、特に約 0.1 % w / v ; オクチルまたはノニルフェノキシポリエトキシエタノール (T r i t o n X - 100、または T r i t o n シリーズの他の洗浄剤など) 0.001 ~ 0.1 % w / v、特に 0.005 ~ 0.02 % w / v ; ポリオキシエチレンエーテル (ラウレス9 など) 0.1 ~ 20 % w / v、好ましくは 0.1 ~ 10 % w / v、特に 0.1 ~ 1 % w / v または約 0.5 % w / v である。

#### 【0110】

20

特定の実施形態では、組成物は、250  $\mu$ g / mL の A P A (リン酸アルミニウムアジュバント) とともに L - ヒスチジン (20 mM)、生理食塩水 (150 mM)、および p H 5.8 の 0.2 % w / v の P S - 20 から本質的になる。P S - 20 は 0.005 から 0.1 % w / v の範囲であり得、製剤中の P S - 20 または P S - 80 の存在は、製造のシミュレーション中、および一次包装を使用した出荷中の凝集を制御する。プロセスは、L - ヒスチジン、塩化ナトリウムおよび P S - 20 中の最大 44 の S . ニューモニエ多糖体血清型のブレンドを組み合わせることと、次いでこのブレンドされた材料と A P A および塩化ナトリウムとを、抗菌防腐剤の有か無で組み合わせることからなる。

#### 【0111】

界面活性剤の選択は、異なる薬物製品および薬物物質に合わせて最適化する必要があり得る。15 以上の S . ニューモニエ多糖体血清型を含有する多価ワクチンの場合、P S - 20 および P 188 が好ましい。コンジュゲートの調製に使用される化学の選択も、製剤の安定化に影響を与える可能性がある。特に、以下に例示されるように、水性または D M S O 溶媒中で調製され、多価組成物に組み合わされた肺炎球菌多糖体 - タンパク質コンジュゲートは、製剤に使用される特定の界面活性剤系に依存して安定性に顕著な差を示す。

30

#### 【0112】

本明細書に記載の製剤では、ポロキサマーは、一般に、1,100 Da ~ 17,400 Da、7,500 Da ~ 15,000 Da または 7,500 Da ~ 10,000 Da の範囲の分子量を有する。ポロキサマーは、ポロキサマー 188 またはポロキサマー 407 から選択することができる。本発明の製剤中のポロキサマーの最終濃度は、0.001 ~ 5 % w / v または 0.025 ~ 1 % w / v である。ポロキサマーを含む界面活性剤系は、ポリオールをさらに含まなければならない。特定の態様では、ポリオールはプロピレングリコールであり、1 ~ 20 % w / v の最終濃度にある。特定の態様では、ポリオールはポリエチレングリコール 400 であり、1 ~ 20 % w / v の最終濃度にある。

40

#### 【0113】

製剤に適したポリオールは、ポリマー性ポリオール、特に、限定するものではないが、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルを含むポリエーテルジオールである。プロピレングリコールは、約 425 Da ~ 約 2,700 Da のモノマーの分子量の範囲で入手可能である。ポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールモノメチルエーテルはまた、限定するものではないが、

50

PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 1000、PEG MME 550、PEG MME 600、PEG MME 2000、PEG MME 3350およびPEG MME 4000を含め、約200Da～約35,000Daの範囲の分子量の範囲で入手可能である。好ましいポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコール400である。製剤中のポリオールは最終濃度は、1～20%w/vまたは6～20%w/vであってよい。

#### 【0114】

製剤はまた、pH緩衝生理食塩水を含む。緩衝液は、例えば、トリス、アセテート、グルタメート、ラクテート、マレエート、タータレート、ホスフェート、シトレート、カーボネート、グリシネート、L-ヒスチジン、グリシン、スクシネート、HEPES (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸)、MOPS (3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、MES (2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸)およびトリエタノールアミン緩衝液からなる群から選択されてもよい。緩衝液は、溶液を4～10、5.2～7.5または5.8～7.0の範囲のpHに緩衝することができる。特定の態様では、ホスフェート、スクシネート、L-ヒスチジン、MES、MOPS、HEPES、アセテートまたはシトレートからなる群から選択される緩衝液である。緩衝液は、例えば、特に医薬製剤が非経口使用用である場合、非経口使用用のUSP適合緩衝液からさらに選択され得る。緩衝液の濃度は、1mM～50mMまたは5mM～50mMの範囲である。特定の態様では、緩衝液は、5mM～50mMの最終濃度のL-ヒスチジンまたは1mM～10mMの最終濃度のスクシネートである。特定の態様では、L-ヒスチジンは20mM±2mMの最終濃度にある。

#### 【0115】

生理食塩水(すなわち、NaClを含む溶液)が好ましいが、製剤に適した他の塩には、限定するものではないが、CaCl<sub>2</sub>、KClおよびMgCl<sub>2</sub>ならびにそれらの組合せが含まれる。限定するものではないが、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールを含む非イオン性等張剤が塩の代わりに使用されてもよい。好適な塩の範囲には、限定するものではないが、25mM～500mMまたは40mM～170mMが含まれる。一態様では、生理食塩水はNaClであり、場合により20mM～170mMの濃度で存在してもよい。

#### 【0116】

好ましい実施形態では、製剤は、塩化ナトリウムとともにL-ヒスチジン緩衝液を含む。

#### 【0117】

別の実施形態では、医薬組成物は制御放出システムで送達される。例えば、薬剤は、静脈内注入、経皮パッチ、リポソームまたは他の投与様式を使用して投与することができる。別の実施形態では、例えば、ポリマー材料は、微小球内またはインプラント内で使用される。

#### 【0118】

本発明の組成物はまた、S-ニューモニエ由来の1つ以上のタンパク質を含み得る。含めるのに適したS-ニューモニエタンパク質の例には、国際特許出願公開番号WO 02/083855および国際特許出願公開番号WO 02/053761で同定されたものを含む。

#### 【0119】

##### 分析方法

HPSEC/UV/MALS/RIアッセイを使用したコンジュゲートの分子量および濃度分析

高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)によって、コンジュゲート試料が注入および分離される。紫外線(UV)、多角度光散乱(MALS)および屈折率(RI)検出器を順次使用して検出が達成される。吸光係数を使用してUV 280からタンパク質濃度が計算される。mL/gで報告された溶質濃度の変化を伴う、溶液の屈折率の変化であるdn/dc因子を使用して、RIシグナル(タンパク質および多糖体の両方によって

10

20

30

40

50

もたらされる)から多糖体濃度がデコンボリューションされる。全試料ピークにわたる測定濃度および光散乱情報を使用するAstraソフトウェア(Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA)によって、試料の平均分子量が計算される。多分散分子の分子量の平均値には複数の形態がある。例えば、数平均分子量 $M_n$ 、重量平均分子量 $M_w$ および $z$ 平均分子量 $M_z$ (Molecules, 2015, 20:10313-10341)である。指定されない限り、本明細書全体にわたって使用される用語「分子量」は、重量平均分子量である。

#### 【0120】

多糖体とキャリアタンパク質との間の共有結合の数の尺度としてのコンジュゲートされたタンパク質のリジン消費の決定

10

コンジュゲート試料のコンジュゲーションの程度を測定するために、Waters AccQ-Tagアミノ酸分析(AAA)が使用される。Eldexワークステーションにおいて気相酸加水分解を使用して試料を加水分解して、キャリアタンパク質をそれらの成分のアミノ酸に分解する。6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート(AQC)を使用して遊離アミノ酸を誘導体化する。次いで、C18カラム上でのUV検出を伴うUPLCを使用して誘導体化された試料を分析する。リジン以外の代表的なアミノ酸を使用して平均タンパク質濃度を得る。コンジュゲーション中のリジン消費(すなわちリジン損失)は、コンジュゲート中の平均測定リジン量と出発タンパク質中の予測リジン量との差によって決定される。

#### 【0121】

20

##### 遊離多糖体試験

コンジュゲート試料中の遊離多糖体(すなわち、CRM197とコンジュゲートしていない多糖体)を、遊離タンパク質、ならびにデオキシコレート(DOC)および塩酸とのコンジュゲートを最初に沈殿させることによって測定する。次いで、沈殿物を濾過し、濾液を、遊離多糖体濃度についてHPSEC/UV/MALS/RIにより分析する。遊離多糖体は、HPSEC/UV/MALS/RIによって測定された総多糖体の割合として計算される。

#### 【0122】

##### 遊離タンパク質試験

ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)モードのキャピラリー電気泳動により、コンジュゲート試料中の遊離多糖体、多糖体 CRM197コンジュゲートおよび遊離CRM197を分離する。簡潔には、試料を25mMボレート、100mM SDS、pH9.3を含有するMEKCランニング緩衝液と混合し、プレコンディションされた裸溶解シリカキャピラリーで分離する。分離を200nmでモニターし、CRM197標準曲線を用いて遊離CRM197を定量する。遊離タンパク質の結果は、HPSEC/UV/MALS/RI手順によって決定された総タンパク質含有量の割合として報告される。

30

#### 【0123】

添付の説明および図面を参照して本発明の様々な実施形態を説明してきたが、本発明はこれらの正確な実施形態に限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲に定義される本発明の範囲または精神から逸脱することなく、当業者によって様々な変更および修正が行われ得ることを理解されたい。

40

#### 【0124】

以下の実施例は、本発明を例示するが限定するものではない。

#### 【0125】

##### [実施例]

##### [実施例1]

##### S.ニューモニエ英膜多糖体の調製

肺炎球菌を培養する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Chase, 1967, Methods of Immunology and Immunochimistry 1:52を参照されたい。肺炎球菌英膜多糖体を調製する方法も当技術分野で周知で

50

ある。例えば、欧州特許番号 E P 0 4 9 7 5 2 4 B 1 を参照されたい。以下に説明するプロセスは、一般に、欧州特許番号 E P 0 4 9 7 5 2 4 B 1 に記載された方法に従い、特に変更された場合を除き、あらゆる肺炎球菌血清型に一般に適用可能である。

#### 【 0 1 2 6 】

肺炎球菌サブタイプ 2 4 F の単離株は、Merck Culture Collection から得た。必要に応じて、特異的抗血清を使用した Quellung 反応に基づいてサブタイプを区別することができる。例えば、米国特許第 5 , 8 4 7 , 1 1 2 号を参照されたい。大豆ペプトン、酵母エキス、および、ヘミンを含まないグルコースを含有する動物成分不含培地からなる寒天プレート上に二段階で連続的に播種することにより、得られた単離株をさらにクローン単離した。大豆ペプトン、酵母エキス、H E P E S、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、リン酸カリウム、グルコースおよびグリセロールを含有する動物成分不含培地を使用した液体培養で、各血清型のクローン単離株をさらに増殖させて、プレマスタ細胞バンクを調製した。

10

#### 【 0 1 2 7 】

肺炎球菌多糖体の各血清型の生成は、細胞増殖と、バッチ生産発酵、それに続く下流精製前の化学的不活化とからなった。大豆ペプトンまたは大豆ペプトン限外濾過物、酵母エキスまたは酵母エキス限外濾過物、H E P E S、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、リン酸カリウムおよびグルコースを含有する予め滅菌された動物成分不含増殖培地を含む振盪フラスコまたは培養ボトルを使用して、各血清型からの解凍された細胞バンクのバイアルを増殖させた。密閉振盪フラスコまたはボトル内で細胞増殖培養物を増殖させて、温度および攪拌制御によるガス交換を最小限に抑えた。6 0 0 n m の光学密度によって測定されるように、特定の培養密度を達成した後、大豆ペプトンまたは大豆ペプトン限外濾過物、酵母エキスまたは酵母エキス限外濾過物、塩化ナトリウム、リン酸カリウムおよびグルコースを含有する予め滅菌された動物成分不含増殖培地を含む生産発酵槽に細胞増殖培養物の一部を移した。温度、p H、圧力および攪拌を制御した。スパーキングを使用しなかったため、気流オーバーレイ ( A i r f l o w o v e r l a y ) も制御した。

20

#### 【 0 1 2 8 】

グルコースがほぼ枯渇した際に、化学的不活化剤、フェノールを加えることによりバッチ発酵を終了した。純粋なフェノールを 0 . 8 ~ 1 . 2 % の最終濃度まで加えて、細胞を不活化し、細胞壁から莢膜多糖体を遊離させた。一次不活化は、温度および攪拌が継続して制御される発酵槽内で特定の時間にわたり起こる。一次不活化後、バッチを別の容器に移し、そこで、完全に不活化するために、温度および攪拌を制御しながらさらに特定の時間にわたり保持した。これは、微生物プレーティング技術によって、またはフェノール濃度および特定の時間の検証によって確認した。次いで、不活化されたブロスを経製した。

30

#### 【 0 1 2 9 】

##### P s の精製

肺炎球菌多糖体の精製は、いくつかの遠心分離、深層濾過、濃縮 / ダイアフィルトレーション操作および沈殿工程からなった。特に指定のない限り、手順はいずれも室温で行った。

#### 【 0 1 3 0 】

40

カチオン性ポリマー ( B P A - 1 0 0 0、P e t r o l i t e 「 T r e t o l i t e 」および「 S p e c t r u m 8 1 6 0 」およびポリ ( エチレンイミン )、「 M i l l i p o r e p D A D M A C 」など ) を用いて、S . ニューモニエの発酵槽培養物からの不活化ブロスを凝集させた。カチオン性ポリマーは、不純物タンパク質、核酸および細胞片を結合した。凝集工程および熟成期間の後、遠心分離および複数の深層濾過工程によって、凝集した固体を除去した。精製したブロスを濃縮し、1 0 0 k D a ~ 5 0 0 k D a の M W C O ( 分子量カットオフ ) フィルターを使用してダイアフィルトレーションした。トリス、M g C l <sub>2</sub> 緩衝液およびリン酸ナトリウム緩衝液を使用してダイアフィルトレーションを行った。ダイアフィルトレーションにより、残留核酸およびタンパク質が除去された。

#### 【 0 1 3 1 】

50

さらに、変性アルコールおよび/またはイソプロパノールを用いた酢酸ナトリウムおよびフェノール中の多糖体の再沈殿によって、不純物を除去した。フェノール沈殿工程中、ダイアフィルトレーションした保持液に、リン酸ナトリウム生理食塩水緩衝液中の酢酸ナトリウムとフェノール（液状フェノールまたは固体フェノール）とを加えた。次いで、多糖体のアルコール分画を２段階で行った。第一段階では、調製物に低パーセントのアルコールを加えて細胞片および他の望ましくない不純物を沈殿させたが、粗多糖体は溶液中に残った。不純物は、遠心分離に続いて深層濾過工程により除去した。次いで、追加のイソプロパノールまたは変性アルコールをバッチに加えることにより、溶液から多糖体を回収した。沈殿した多糖体ペレットを遠心分離により回収し、粉碎し、粉末として乾燥させ、 $-70^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

10

【0132】

[実施例2]

多糖体のNMR構造分析

多糖体構造を決定するための戦略には、Abeygunawardana et al., Determination of the Chemical Structure of Complex Polysaccharides by Heteronuclear NMR Spectroscopy in Advances in Biophysical Chemistry 1993, Vol 3, pages 199-249, JAI Press Inc.に記載されているように実質的に行われる複数工程のプロセスを含めた。標準の $1\text{D}$ および $2\text{D}$  NMR技術を使用して、精製された多糖体を調査した。最後に、 $^{31}\text{P}$  NMRを使用して、ホスフェートの存在について多糖体を調査した。

20

【0133】

$^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY、二重量子フィルタ等核COSY (double quantum filtered homonuclear COSY) および全相関分光法 (TOCSY) により、単糖残基の帰属を行った。異種核単一量子コヒーレンス分光法 (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) (HSQC)、およびHSQC TOCSYの組合せにより、 $^{13}\text{C}$  化学シフトを帰属した。多重度編集HSQCを使用して、メチレン基とメチン基とを区別した。HMBCおよびNOESY分光法の組合せにより、残基間結合を決定した。アノマープロトンならびに炭素化学シフト、 $^3\text{J}_{\text{H}1, \text{H}2}$  および $^1\text{J}_{\text{H}1, \text{C}1}$  値から残基のアノマー配置を決定した。 $^3\text{J}_{\text{H}1, \text{H}2}$  および $^1\text{J}_{\text{H}1, \text{C}1}$  値からフラノース環のアノマー配置を評価することは困難であるため、この決定にアノマー炭素からの環プロトンの長距離カップリングを利用した。

30

【0134】

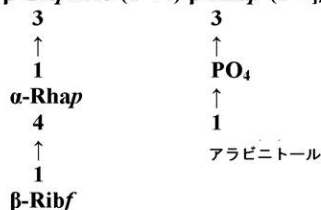
$1\text{D}$  リンNMR分光法は、血清型24F多糖体が構造内にリンを含むことを示した。精製された（図5A）多糖体および過ヨウ素酸塩酸化（図5B）多糖体に対する $^1\text{H}-^{31}\text{P}$  HMBC分光法により、リン結合部位の帰属を行った。

【0135】

図2～図5のNMRデータに基づいて、S.ニューモニエ血清型24F多糖体の構造を以下のように決定し、

40

【化3】

[ $\rightarrow 4$ ]- $\beta$ -GlcP-( $1\rightarrow 4$ )- $\beta$ -GlcPNAc-( $1\rightarrow 4$ )- $\beta$ -Rhap-( $1\rightarrow$ ) $_n$ 

式中、 $n$  は多糖体を構成する繰り返し単位の数を表す。図1Aも参照されたい。

50

## 【0136】

糖残基は、ラムノース ( R h a )、リボース ( R i b )、グルコース ( G l c ) およびアラビニトールを含む。グルコース残基の1つはN - アセチル化されている。リボースはフラノースの形態である。

## 【0137】

イタリック体 ( p および f ) は、ピラノース ( 6 つの原子からなる閉環 ) およびフラノース ( 5 つの原子からなる閉環 ) を指す。

## 【0138】

および は、糖単位のアノマー炭素に結合したプロトンの立体配置を指す。糖単位で炭素原子を標識する場合、アノマー炭素は常に1番である ( 通常 1 ~ 6 )。 は、アノマープロトンが3D構造内でエクアトリアル位にあることを意味する。 は、アノマープロトンがアキシアル位にあることを意味する。

10

## 【0139】

矢印に関連付けられた数字は、個々の糖単位がどのように互いに接続されているかを示している。例えば、 - R h a p - ( 1 3 ) - - G l c p - という命名は、ラムノースの1番炭素がグルコースの3番炭素に結合していることを意味する ( p はこれらがいずれもピラノース環であることを意味する )。

## 【0140】

S . ニューモニエ血清型 2 4 F 多糖体の主な活性化部位の同定

S . ニューモニエ血清型 2 4 F の主な活性化部位は、アラビニトール側鎖の第2の炭素にあることが分かった。

20

## 【0141】

酸化血清型 2 4 F 多糖体を凍結乾燥させ、次いで、NMR分析のために重水を用いて再溶解させた。極低温に冷却されたプローブを使用して、37 のプローブ温度で600 MHz でNMR実験を行った。16トランジェントの90度パルスと、パルス間の10秒遅延 ( 取得時間3秒を含む ) とを使用して、1次元 ( 1 D ) プロトンスペクトルを取得した。第1次元では4および16トランジェント ( それぞれ )、第2次元では512インクリメントにより勾配 C O S Y および T O C S Y データを取得した。リサイクル時間10秒 ( 取得時間3秒を含む ) および混合時間90ms で1024トランジェントにより、5 . 19 ppm のトリプレットを中心とする1D T O C S Y を取得した。64トランジェントおよび512インクリメントにより多重度編集 g H S Q C A D を取得した。

30

## 【0142】

1Dプロトンスペクトルは、非活性化多糖体と比較して、5 . 19 ppm のアノマー領域に追加のシグナル ( トリプレット ) を示した。g C O S Y および T O C S Y データは、5 . 19 ppm のシグナルから3 . 86 ppm のシグナルへのクロスピークを示した。5 . 19 ppm を中心とする選択バンドを有する1D T O C S Y は、3 . 86 ppm のトリプレットとの単一相関のみを示した ( 図6 )。g H S Q C A D データにより、91 . 13 ppm ( 5 . 19 ppm のシグナル ) および70 . 79 ppm ( 3 . 86 ppm のシグナル ) の炭素化学シフトが得られた。91 . 13 ppm での炭素化学シフトは、アノマーシグナルが典型的に観察される場所からややアップフィールドであり、これが水和アルデヒドであることを示している。70 . 69 ppm でのもう1つのシグナルはメチレンであることが同定された ( 多重度編集 g H S Q C A D 実験では、メチレン炭素はメチン炭素およびメチル炭素の逆相を有する ; 図7 )。このデータは、5 . 19 ppm のプロトン ( 水和アルデヒド由来 ) がメチレン基 ( 3 . 86 ppm のプロトンおよび70 . 69 ppm の炭素 ) に隣接していることを示している。これが発生し得る唯一の場所は、24F多糖体の構造に基づいて炭素2のアラビニトール側鎖上である。

40

## 【0143】

主に第2の炭素でのアルデヒドの形成は、ビシナルジオールによる2, 3 - 炭素の選択的開裂、またはビシナルジオール ( またはアルデヒド ) によるさらに高い番号の炭素での好ましい連続した一連の酸化が、アラビニトール糖の第2の炭素での最終的な酸化まで必

50

要であるという点で驚くべきことであった。

【 0 1 4 4 】

[ 実施例 3 ]

ジメチルスルホキシド中の還元的アミノ化を使用した C R M 1 9 7 への S . ニューモニエ血清型 2 4 F 多糖体のコンジュゲーション

多糖体を溶解させ、目標分子量にサイズ調整し、化学的に活性化し、限外濾過により緩衝液交換した。活性化多糖体および精製された C R M 1 9 7 を個別に凍結乾燥させ、ジメチルスルホキシド ( D M S O ) に再溶解させた。次いで、再溶解させた多糖体および C R M 1 9 7 溶液を組み合わせ、下記のようにコンジュゲートさせた。最終的な 0 . 2 ミクロン濾過の前に、得られたコンジュゲートを、限外濾過により精製した。p H、温度、濃度および時間のような、各工程内のいくつかのプロセスパラメーターを制御して、望ましい属性を有するコンジュゲートを得た。

10

【 0 1 4 5 】

多糖体のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 P s 粉末を水に溶解させ、0 . 4 5 ミクロンで濾過した。溶解させた多糖体のサイズを、酢酸を 2 0 0 m M まで加え、9 2 で 5 0 分間インキュベートし、次いで、冷リン酸カリウム p H 7 緩衝液を 4 0 0 m M まで加えて中和することによる酸加水分解により縮小した。

【 0 1 4 6 】

サイズが縮小された多糖体を濃縮し、5 N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して、水に対してダイアフィルトレーションした。

20

【 0 1 4 7 】

次いで、酢酸ナトリウム緩衝液を用いて多糖体溶液を 2 2 および p H 5 に調整して、活性化による多糖体のサイズ縮小を最小限に抑えた。1 0 0 m M メタ過ヨウ素酸塩ナトリウム溶液を加えることにより、多糖体の活性化を開始した。多糖体活性化の目標レベルを達成するために、加えられたメタ過ヨウ素酸塩ナトリウムは、多糖体繰り返し単位 1 モル当たりメタ過ヨウ素酸塩ナトリウム 0 . 1 8 ~ 0 . 2 1 モルであった ( 多糖体繰り返し単位 1 モル当たりのアルデヒドのモル数 ) 。酸化反応は 2 2 で 2 時間進行させた。

【 0 1 4 8 】

1 0 m M リン酸カリウム、p H 6 . 4 に対して、活性化された生成物をダイアフィルトレーションし、続いて 5 k D a N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2 ~ 8 で行った。

30

【 0 1 4 9 】

C R M 1 9 7 への多糖体のコンジュゲーション

前述のように ( W O 2 0 1 2 / 1 7 3 8 7 6 A 1 ) シュードモナス・フルオレッセンスでの発現により得られた精製された C R M 1 9 7 を、5 k D a N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して、2 m M ホスフェート、p H 7 . 0 緩衝液に対してダイアフィルトレーションし、そして、0 . 2 ミクロンで濾過した。

【 0 1 5 0 】

活性化多糖体は、1 0 % w / v のスクロース濃度を有する 2 m g P s / m L で凍結乾燥用に製剤化した。C R M 1 9 7 は、1 % w / v のスクロース濃度を有する 6 m g P r / m L で凍結乾燥用に製剤化した。

40

【 0 1 5 1 】

製剤化された P s および C R M 1 9 7 溶液を個別に凍結乾燥させた。凍結乾燥させた P s および C R M 1 9 7 材料を、等量の D M S O に個別に再溶解させた。多糖体溶液に塩化ナトリウムを 2 0 ~ 5 0 m M の最終濃度まで添加した。多糖体溶液と C R M 1 9 7 溶液とをブレンドして、多糖体濃度 1 . 4 ~ 1 . 5 g P s / L ( 多糖体のグラム数 / リットル ) および多糖体と C R M 1 9 7 との質量比 1 . 5 を達成した。質量比を選択して、得られたコンジュゲート中の多糖体と C R M 1 9 7 との比を制御した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム ( 多糖体繰り返し単位 1 モル当たり 1 モル ) を加え、2 2 で 2 時間コンジュゲ

50



ションを進行させた。

#### 【 0 1 5 2 】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲーション反応に続いて、水素化ホウ素ナトリウム（多糖体繰り返し単位 1 モル当たり 2 モル）を加え、22 で 1 時間インキュベートした。約 4 で、約 0.025 % (w/v) ポリソルベート 20 を含む 150 mM 塩化ナトリウムでバッチを希釈した。次いで、リン酸カリウム緩衝液を加えて pH を中和した。いくつかのバッチについては、バッチを濃縮し、30 kD NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム pH 7 に対して約 4 でダイアフィルトレーションした。

10

#### 【 0 1 5 3 】

最終濾過および生成物保存

次いで、バッチを濃縮し、300 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、0.015 % (w/v) ポリソルベート 20 を含む 150 mM 塩化ナトリウム pH 7.0 中の 10 mM ヒスチジンに対して 4 でダイアフィルトレーションした。

#### 【 0 1 5 4 】

保持液バッチを 0.2 ミクロンで濾過し、次いで、0.015 % (w/v) ポリソルベート 20 を含む、追加の 150 mM 塩化ナトリウム pH 7.0 中の 10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60 で凍結させた。

#### 【 0 1 5 5 】

表 1 は、DMSO 中で調製された S. ニューモニエ血清型 24F 多糖体コンジュゲートの属性を示す。

20

#### 【表 1】

表 1.DMSO コンジュゲーションから得られた S.ニューモニエ血清型 24F 多糖体コンジュゲートの属性

酸化 Ps Mw	コンジュゲート Mw	Ps:Pr	リジン消費 (mol/mol CRM197)	遊離 Ps/総 Ps	遊離タンパク質/総タンパク質
100kD	4875kD	0.94	7.3	4.4%	1.4%
101kD	3970kD	0.81	7.9	5.8%	4.6%

30

#### 【 0 1 5 6 】

##### [ 実施例 4 ]

一価コンジュゲートの製剤化

実施例 3 に記載されているように、肺炎球菌多糖体 - CRM197 コンジュゲートを調製した。個々のバルク多糖体濃度のバッチ容量および濃度に基づいて、個々の血清型の目標濃度を得るのに必要なバルクコンジュゲートの必要量を計算した。S. ニューモニエ血清型 24F のバルクコンジュゲートを賦形剤と組み合わせ、滅菌濾過し、混合条件下で APA に加えた。20 mM ヒスチジン、150 mM NaCl、0.2 % (w/v) PS-20、および APA の形態の 0.250 mg/mL (w/v Al) を含む S. ニューモニエ血清型 24F 一価コンジュゲートワクチンの最終濃度は、4 µg/mL (w/v PnPs) であった。

40

#### 【 0 1 5 7 】

##### [ 実施例 5 ]

一価コンジュゲートニュージーランド白ウサギ免疫原性試験

ニュージーランド白ウサギ (NZWR) モデルにおいて、一価コンジュゲートの免疫原性を評価した。0 日目および 14 日目 (交互の体側部) に、各一価コンジュゲートワクチン 0.25 mL を用いて、成体ニュージーランド白ウサギ (NZWR、n = 3 / 群) を筋

50

肉内 (IM) 免疫した。免疫 1 回当たり、 $62.5 \mu\text{g}$  のリン酸アルミニウムアジュバント (APA) とともに  $1 \mu\text{g}$  の PnPs (CRM197 にコンジュゲートされた S・ニューモニエ血清型 24F 多糖体) の用量で一価肺炎球菌ワクチンを投与した。試験開始前 (免疫前) および 14 日目 (投与後 1、PD1) および 28 日目 (投与後 2、PD2) に血清を採取した。病気または苦痛の徴候がないか、訓練を受けた動物ケアスタッフが NZWR を少なくとも連日観察した。NZWR に対するワクチン製剤は安全で忍容性が高いとみなされた。動物実験はいずれも、国立衛生研究所の Guide for Care and Use of Laboratory Animals の推奨事項に厳密に従って行った。NZWR 実験プロトコルは、Merck & Co., Inc (Kenilworth, NJ) および Covance (Denver, PA) の Institutional Animal Care and Use Committees によって承認された。

10

#### 【0158】

$1 \sim 2 \text{ mg/ml}$  の各 PnPs コーティング濃度を使用して、NZWR 血清を ELISA アッセイで試験して IgG の免疫原性を評価した。前述のプロトコルに基づいてオプソニン化貪食作用アッセイ (OPA) によって機能的抗体を決定した。例えば、Caro-Aguilar et al., 2017, Vaccine 35: 865-72 および Burton et al., 2006, Clin Vaccine Immunol 13 (9): 1004-9 を参照されたい。

#### 【0159】

S・ニューモニエ血清型 24F 由来の一価肺炎球菌コンジュゲートワクチンは、ウサギに対して免疫原性であり (図 8)、各細菌株を死滅させる機能的抗体を産生することが見出された (図 9)。

20

#### 【0160】

##### [ 実施例 6 ]

##### 一価コンジュゲートマウスチャレンジ試験

S・ニューモニエ血清型 24 グリココンジュゲートの免疫原性を検証するために、マウスチャレンジモデルを対象にそれらを試験した。0 日目、14 日目および 28 日目に  $0.1 \text{ ml}$  の 24F-CRM197 一価コンジュゲートワクチンを用いて、幼若マウス (6~8 週齢) を免疫した ( $n = 10$  / 群)。C57BL/6 マウスおよび Swiss Webster マウスは、1 つの部位に  $0.1 \text{ ml}$  を注射して腹腔内 (IP) 免疫した。CD-1 マウスは、2 つの部位に  $0.05 \text{ ml}$  を注射して筋肉内 (IM) 免疫した。免疫 1 回当たり、 $25 \mu\text{g}$  のリン酸アルミニウムアジュバント (APA) とともに  $0.4 \mu\text{g}$  の PnPs (CRM197 にコンジュゲートされた 24F 多糖体) の用量で一価肺炎球菌ワクチンを投与した。病気または苦痛の徴候がないか、訓練を受けた動物ケアスタッフがマウスを少なくとも連日観察した。マウスに対するワクチン製剤は安全で忍容性が高いとみなされた。

30

#### 【0161】

52 日目に S・ニューモニエ血清型 24F を用いて、マウスを気管内チャレンジした。S・ニューモニエの対数期培養物を遠心分離し、洗浄し、滅菌 PBS に懸濁した。チャレンジの前にイソフルランを用いてマウスを麻酔した。切歯によって直立に吊したマウスの喉に、 $0.1 \text{ ml}$  の PBS 中の  $10^6 \text{ cfu}$  の S・ニューモニエを入れた。舌を外側に軽く引っ張り、鼻孔を覆うことにより、細菌の吸引を誘導した。マウスの体重を連日測定し、体重減少が開始時体重の 20% を超えた場合は安楽死させた。24 時間、48 時間および 72 時間の時点で血液を採取して、菌血症を評価した。病気または苦痛の徴候がないか、訓練を受けた動物ケアスタッフがマウスを少なくとも 1 日 2 回観察した。動物実験はいずれも、国立衛生研究所の Guide for Care and Use of Laboratory Animals の推奨事項に厳密に従って行った。マウスの実験プロトコルは、Merck & Co., Inc. の Institutional Animal Care and Use Committee によって承認された。

40

#### 【0162】

50

24F - CRM197 一価肺炎球菌コンジュゲートワクチンは、S . ニューモニエ 24 F を用いたチャレンジ後のマウスの 3 系統いずれにも防御的であることが分かった。図 10 ~ 図 12 を参照されたい。

【0163】

[ 実施例 7 ]

ウサギ多価試験のための肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤化

肺炎球菌多糖体 - CRM197 コンジュゲートを使用して、様々なコンジュゲートバルクブレンド調製物 ( S . ニューモニエ血清型 16 F、23 A、23 B、24 F および 31 由来のものを含む ) からなる多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンを調製し、総多糖体濃度  $84 \mu\text{g} / \text{mL}$  に対して各血清型  $4 \mu\text{g} / \text{mL}$  で、20 mM ヒスチジン pH 5 . 8 および 150 mM 塩化ナトリウムおよび 0 . 1 % w / v のポリソルベート - 20 ( PS - 20 ) に製剤化した。肺炎球菌多糖体 ( P n P s ) 型 ( S . ニューモニエ血清型 16 F、23 A、23 B、24 F および 31 由来のものを含む ) に CRM197 タンパク質を個別にコンジュゲートさせることによりコンジュゲートを調製した。個々のバルク多糖体濃度のバッチ容量および濃度に基づいて、個々の血清型の目標濃度を得るのに必要なバルクコンジュゲートの必要量を計算した。個々のコンジュゲートを、ヒスチジン、塩化ナトリウムおよびポリソルベート - 20 ( PS - 20 ) の溶液に加えてコンジュゲートブレンドを作製した。磁気攪拌棒を使用して、コンジュゲートブレンドを含む製剤容器を混合し、滅菌濾過して別の容器に入れた。次いで、製剤を、プラスチック製シリンジ、ガラス製シリンジまたはバイアルに充填し、2 ~ 8 で保存した。

【0164】

[ 実施例 8 ]

ニュージーランド白ウサギにおける多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの免疫原性

0 日目および 14 日目 ( 交互の体側部 ) に、実施例 7 に記載の 21 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン 0 . 5 ml を用いて、成体ニュージーランド白ウサギ ( NZWR、n = 5 / 群 ) を筋肉内 ( IM ) 免疫した。免疫 1 回当たり各コンジュゲート P n P s  $2 \mu\text{g}$  で PCV21 肺炎球菌ワクチンを投与した。試験開始前 ( 免疫前 ) および 14 日目 ( 投与後 1、PD1 ) および 28 日目 ( 投与後 2、PD2 ) に血清を採取した。病気または苦痛の徴候がないか、訓練を受けた動物ケアスタッフが NZWR を少なくとも連日観察した。NZWR に対するワクチン製剤は、安全で忍容性が高いとみなされた。動物実験はいずれも、国立衛生研究所の Guide for Care and Use of Laboratory Animals の推奨事項に厳密に従って行った。NZWR 実験プロトコルは、Merck & Co . , Inc および Covance ( Denver , PA ) の Institutional Animal Care and Use Committees によって承認された。

【0165】

多重化電気化学発光 ( multiplexed electrochemiluminescence ) ( ECL ) アッセイを使用して、NZWR 血清の IgG 免疫原性を評価した。電気化学的刺激により発光する SULFO - TAG ( 商標 ) 標識を利用する、MesoScale Discovery ( MesoScale Diagnostics , LLC , Gaithersburg , MD の一部門 ) によって開発された技術を使用する、Marchese et al . ( Optimization and validation of a multiplex , electrochemiluminescence - based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype - specific antipneumococcal antibodies in human serum . Clin Vaccine Immunol . 16 ( 3 ) : 387 - 96 ( 2009 ) ) によって記載されたヒトアッセイに基づいて、ウサギ血清に使用するためにこのアッセイを開発した。NZWR 血清試料を試験するための二次抗体として SULFO - TAG ( 商標 ) 標識抗ウサギ IgG を使用した。OpsoTiter ( 登録商標 ) 3 ソフトウェア

(UAB Research Foundation, Caro-Aguilar et al., 2017、上記参照、Burton et al., 2006、上記参照)を使用する、アラバマ大学バーミングハム校のBacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratoryでオンラインで入手可能な前述のプロトコルに基づいて、multiplexed opsonophagocytic assays (MOPA)によって機能的抗体を決定した。

【0166】

多価肺炎球菌コンジュゲートワクチン中の、S. ニューモニエ血清型16F、23A、23B、24Fおよび31から調製された多糖体-タンパク質コンジュゲートは、投与後1 (PD1) および投与後2 (PD2) のいずれでもウサギに対して免疫原性であることが見出された (図13)。これらはまた、ワクチン型細菌株を死滅させる機能的抗体を生成した (図14)。2 µg の用量の多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンを用いて免疫したウサギでは、免疫前のウサギ血清と比較して、4つの血清型についてPD1のMOPA力価が有意に高かった (図14)。2 µg の用量のPCV21を用いて免疫したウサギでは、免疫前のウサギ血清と比較して、5つの血清型いずれについてもPD2のMOPA力価が有意に高かった (図14)。ダネットの検定を用いた一元配置分散分析によって、Log変換されたデータを分析して、有意性を決定した。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

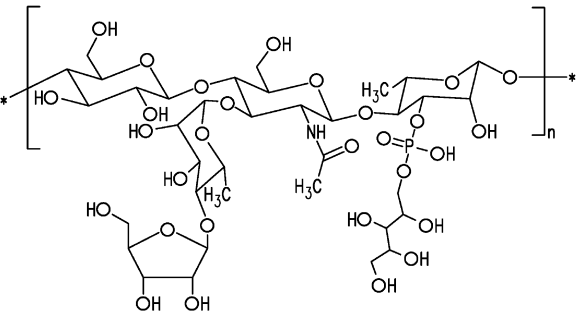


FIG.1A

【図 1 B】

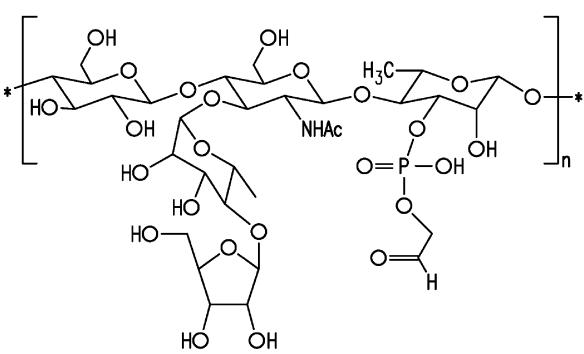


FIG.1B

10

【図 2】

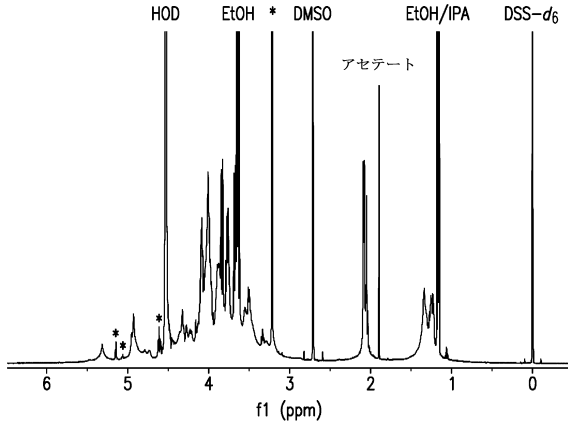


FIG.2

【図 3】

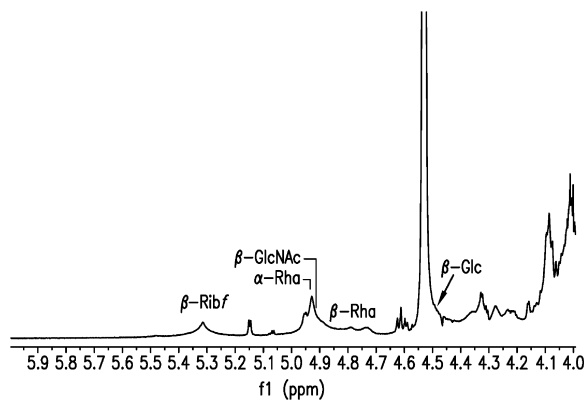


FIG.3

20

30

40

50

【 図 4 】

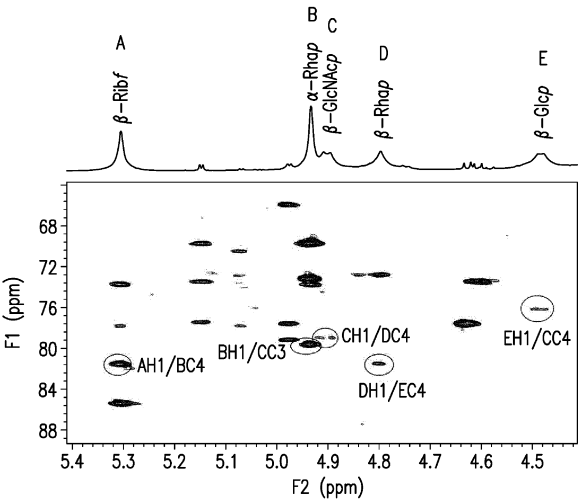


FIG. 4

【 図 5 】

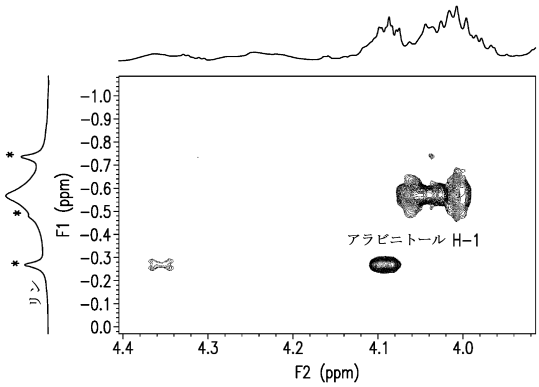


FIG. 5A

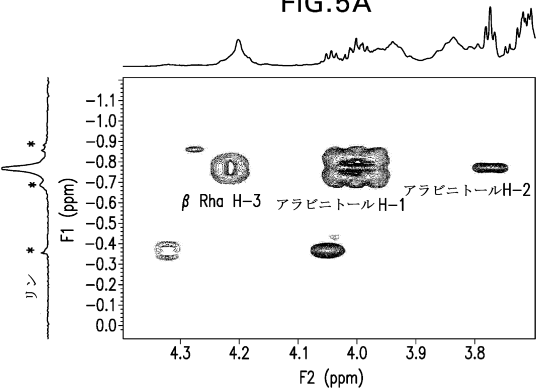


FIG. 5B

【 図 6 】

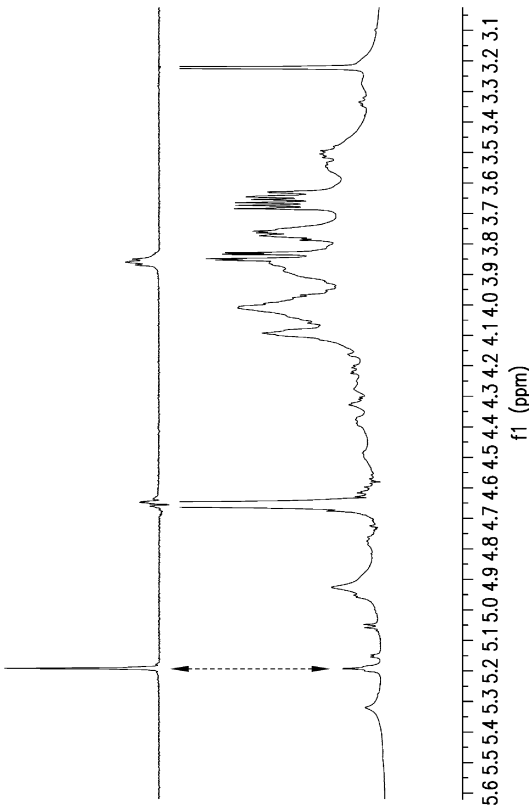


FIG. 6

【 図 7 】

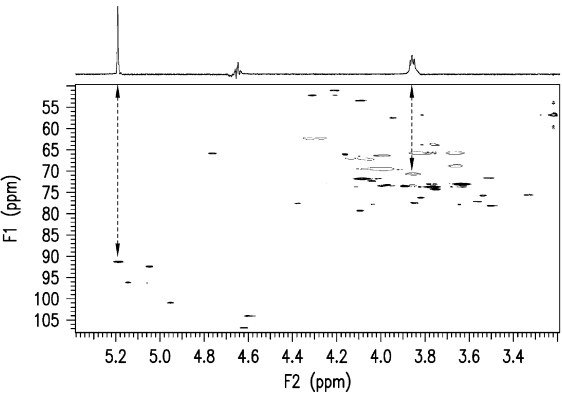


FIG. 7

10

20

30

40

50

【図 8】

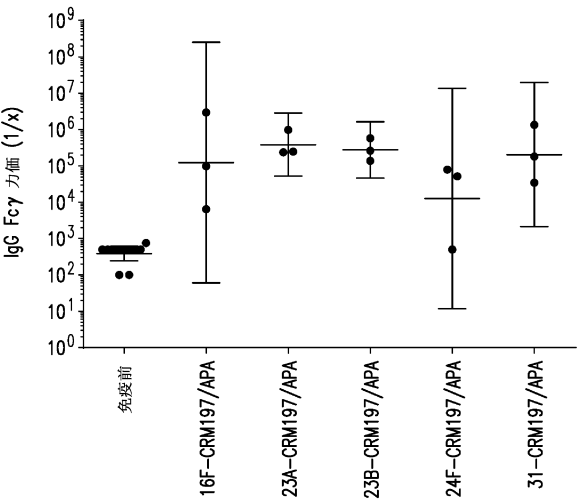


FIG.8

【図 9】

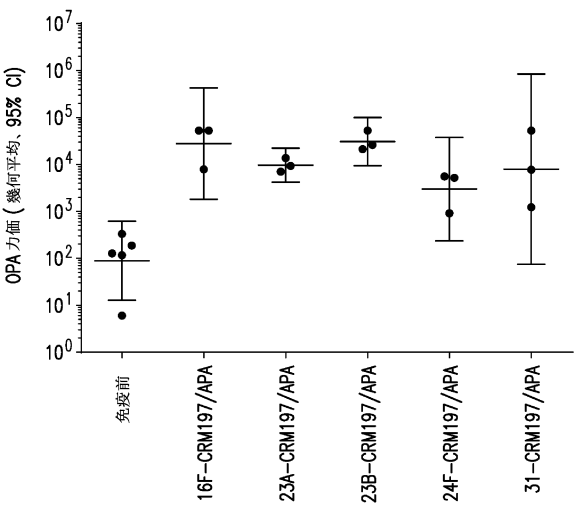


FIG.9

【図 10】

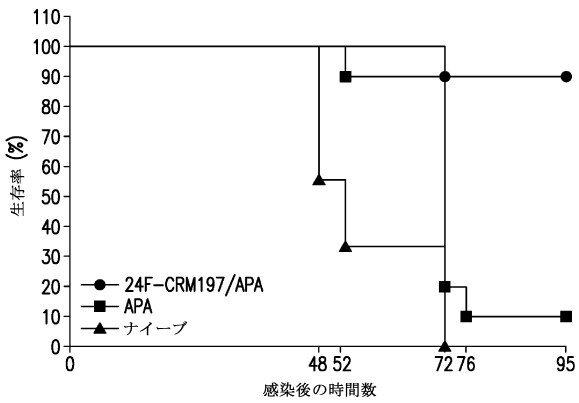


FIG.10

【図 11】

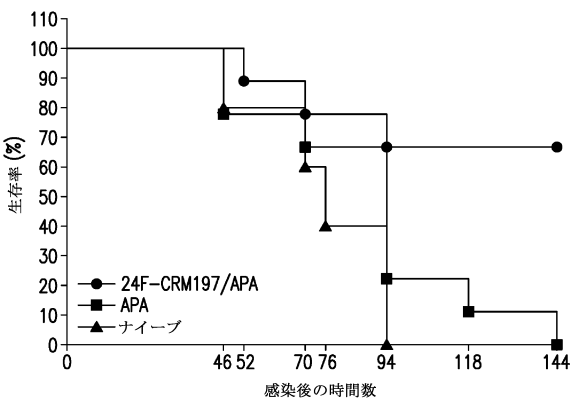


FIG.11

10

20

30

40

50

【 図 1 2 】

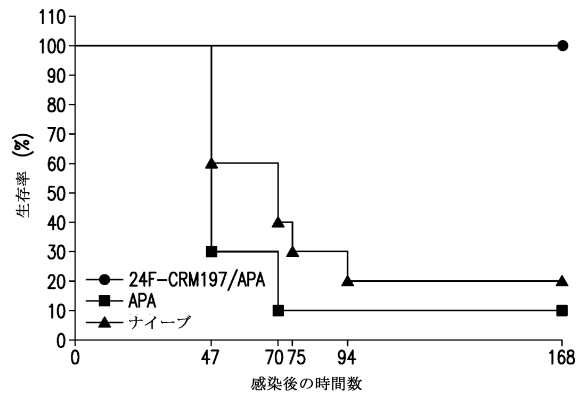


FIG.12

【 図 1 3 】

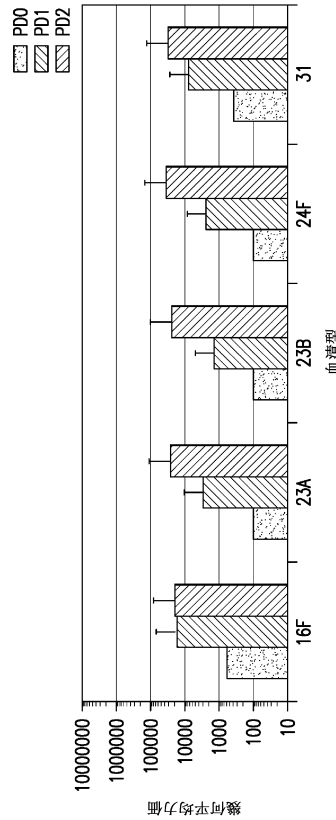


FIG.13

【 図 1 4 】

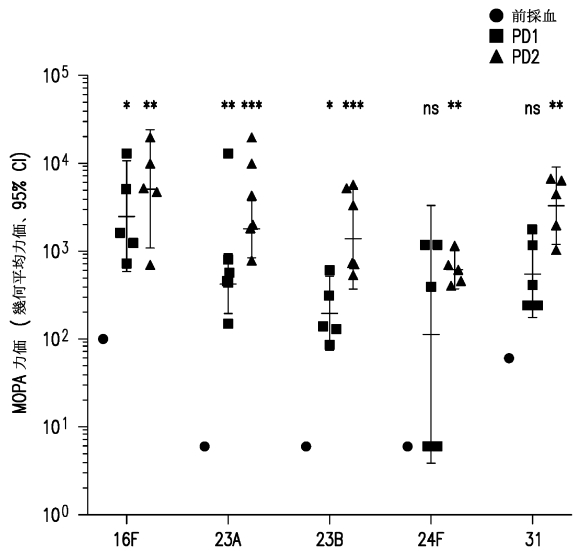


FIG.14

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	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	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

- (74)代理人 100137213  
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483  
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255  
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100182132  
弁理士 河野 隆
- (74)代理人 100172683  
弁理士 綾 聡平
- (74)代理人 100219265  
弁理士 鈴木 崇大
- (74)代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812  
弁理士 城山 康文
- (74)代理人 100203035  
弁理士 五味淵 琢也
- (74)代理人 100185959  
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100202267  
弁理士 森山 正浩
- (72)発明者 ボランボ, リチャード・ジェー  
アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウェスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・  
7 7 0
- (72)発明者 アビーグナーワードナ, チトラナンダ  
アメリカ合衆国、 1 9 4 5 4 ・ ペンシルバニア、 ノース・ウェールズ、 ノース・サムニータウン・  
パイク・ 3 5 1
- (72)発明者 ミュージー, ルイ・カフカ  
アメリカ合衆国、 1 9 4 5 4 ・ ペンシルバニア、 ノース・ウェールズ、 ノース・サムニータウン・  
パイク・ 3 5 1
- (72)発明者 コジンスキー, マイケル・ジェー  
アメリカ合衆国、 1 9 4 8 6 ・ ペンシルバニア、 ウェスト・ポイント、 サムニータウン・パイク・  
7 7 0
- (72)発明者 クイ, ヤドン・アダム  
アメリカ合衆国、 1 9 4 5 4 ・ ペンシルバニア、 ノース・ウェールズ、 ノース・サムニータウン・  
パイク・ 3 5 1

(72)発明者   マクヒュー，パトリック  
              アメリカ合衆国、１９４８６・ペンシルバニア、ウエスト・ポイント、サムニータウン・パイク・  
              ７７０

(72)発明者   コニエツコ，ジャネール  
              アメリカ合衆国、１９４８６・ペンシルバニア、ウエスト・ポイント、サムニータウン・パイク・  
              ７７０

      審査官   三木 寛

(56)参考文献    米国特許出願公開第２０１７／００２１００６（ＵＳ，Ａ１）  
                  国際公開第１９９６／０３４６０９（ＷＯ，Ａ１）

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)  
                  Ｃ０８Ｂ    ３７／００  
                  Ａ６１Ｋ    ４７／６４  
                  Ａ６１Ｋ    ４７／０２  
                  Ａ６１Ｋ    ４７／２２  
                  Ａ６１Ｋ    ３９／３９  
                  Ａ６１Ｋ    ３９／０９  
                  Ａ６１Ｐ    ３１／０４  
                  Ａ６１Ｐ    １１／００  
                  Ａ６１Ｋ    ９／０８  
                  ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）