

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-509656

(P2017-509656A)

(43) 公表日 平成29年4月6日 (2017. 4. 6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/09 (2006. 01)	A 6 1 K 39/09 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/39 (2006. 01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 K 9/08 (2006. 01)	A 6 1 K 9/08	4 H 0 4 5
A 6 1 K 9/19 (2006. 01)	A 6 1 K 9/19	
A 6 1 K 47/02 (2006. 01)	A 6 1 K 47/02	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 185 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-559412 (P2016-559412)	(71) 出願人	593141953 ファイザー・インク アメリカ合衆国10017ニューヨーク州 ニューヨーク市イースト・フォーティーセ カンド・ストリート235
(86) (22) 出願日	平成27年1月15日 (2015. 1. 15)	(74) 代理人	100133927 弁理士 四本 能尚
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月7日 (2016. 9. 7)	(74) 代理人	100137040 弁理士 宮澤 純子
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/050315	(74) 代理人	100147186 弁理士 佐藤 真紀
(87) 国際公開番号	W02015/110941	(74) 代理人	100174447 弁理士 龍田 美幸
(87) 国際公開日	平成27年7月30日 (2015. 7. 30)		
(31) 優先権主張番号	61/929, 547		
(32) 優先日	平成26年1月21日 (2014. 1. 21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

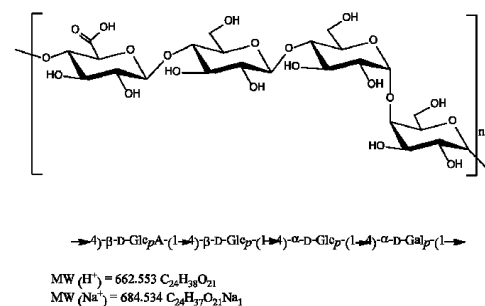
(54) 【発明の名称】 コンジュゲート化莢膜糖類抗原を含む免疫原性組成物およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、コンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 莢膜糖類抗原 (グリココンジュゲート) を含む新規免疫原性組成物およびその使用に関する。本発明の免疫原性組成物は、典型的には、Prevna r、Synflorixおよび/またはPrevna r 13中には見出されないストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。本発明はまた、前記新規免疫原性組成物を用いた、肺炎球菌感染に対するヒト対象、特に、幼児および高齢者のワクチン接種にも関する。

【図1】

FIGURE 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型15Bに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22Fに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型33Fに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型10Aに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型11Aに由来するグリココンジュゲートおよびストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型8に由来するグリココンジュゲートからなる群から選択される少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む免疫原性組成物。

10

【請求項2】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項3】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む、請求項1から2のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項4】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型33Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項5】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項6】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型10Aに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項7】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型11Aに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項8】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型8に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項9】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートおよびストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型33Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む免疫原性組成物。

【請求項10】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート

50

、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 33 F に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 12 F に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 10 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 11 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートおよびストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 8 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む免疫原性組成物。

【請求項 11】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 15 B に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む免疫原性組成物。

10

【請求項 12】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 22 F に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 11 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 33 F に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 11 から 12 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 12 F に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 15】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 10 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 11 から 14 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 11 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 11 から 15 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 17】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 8 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 11 から 16 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 1、5 および 7 F に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 20】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 6 A および 19 A に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 3 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 20 のいずれか一項

50

に記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項1から21のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 23】

14、15、16、17、18または19価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項1から21のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 24】

16価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項1から21のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 25】

19価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項1から21のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 26】

20価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項1から21のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 27】

前記グリココンジュゲートがCRM₁₉₇に個別にコンジュゲートされている、請求項1から26のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 28】

全てのグリココンジュゲートがCRM₁₉₇に個別にコンジュゲートされている、請求項1から26のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 29】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型1、4、5、6B、7F、9V、14および／または23Fに由来するグリココンジュゲートがPDに個別にコンジュゲートされている、請求項19から26のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 30】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型18Cに由来するグリココンジュゲートがTTにコンジュゲートされている、請求項18から26または29のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 31】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型19Fに由来するグリココンジュゲートがDTにコンジュゲートされている、請求項18から26または29から30のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 32】

前記血清型15Bグリココンジュゲートが1000kDa～20,000kDaの分子量を有する、請求項2、9から31のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 33】

前記血清型15Bグリココンジュゲートが10,000kDa～16,000kDaの分子量を有する、請求項2、9から32のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 34】

血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖の担体タンパク質に対する比(w/w)が0.5～3である、請求項2、9から33のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 35】

血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖の担体タンパク質に対する比(w/w)が0.7～0.9である、請求項2、9から33のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートが、血清型 15 B 莢膜多糖の総量と比較して約 50 %未満の遊離血清型 15 B 莢膜多糖を含む、請求項 2、9 から 35 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 37】

血清型 15 B グリココンジュゲートの少なくとも 40 %が、CL-4 B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する、請求項 2、9 から 36 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 38】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートが、血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.1 mM のアセテートを含む、請求項 2、9 から 37 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 39】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートが、血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.7 mM のアセテートを含む、請求項 2、9 から 37 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 40】

血清型 15 B グリココンジュゲート中の血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM の、単離された多糖中の血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM に対する比が、少なくとも 0.6 である、請求項 2、9 から 39 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 41】

血清型 15 B グリココンジュゲート中の血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM の、活性化された多糖中の血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM に対する比が、少なくとも 0.6 である、請求項 2、9 から 40 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 42】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートが、血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.1 mM のグリセロールを含む、請求項 2、9 から 41 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 43】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートが、血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.5 mM のグリセロールを含む、請求項 2、9 から 42 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 44】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートが、血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.7 mM のグリセロールを含む、請求項 2、9 から 43 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 45】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートのコンジュゲーション度が 2 ~ 15 である、請求項 2、9 から 44 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 46】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートが、10 kDa ~ 1,500 kDa の分子量を有する糖類を含む、請求項 2、9 から 45 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 47】

前記血清型 15 B グリココンジュゲートの担体タンパク質が、DT (ジフテリア毒素)、TT (破傷風毒素)、CRM₁₉₇、他の DT 変異体、PD (ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae) タンパク質 D)、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される、請求項 2、9 から 46 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

50

【請求項 48】

前記血清型 15B グリココンジュゲートの担体タンパク質が CRM₁₉₇ である、請求項 2、9 から 47 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 49】

前記血清型 15B グリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 2、9 から 48 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 50】

前記血清型 22F グリココンジュゲートが 400 kDa ～ 15,000 kDa の分子量を有する、請求項 3、9、10、12 から 49 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 51】

前記血清型 22F グリココンジュゲートが 1,000 kDa ～ 8,000 kDa の分子量を有する、請求項 3、9、10、12 から 49 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 52】

血清型 22F グリココンジュゲート中の血清型 22F 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.5 ～ 3 である、請求項 3、9、10、12 から 51 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 53】

血清型 22F グリココンジュゲート中の血清型 22F 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.9 ～ 1.1 である、請求項 3、9、10、12 から 52 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 54】

前記血清型 22F グリココンジュゲートが、血清型 22F 莢膜多糖の総量と比較して約 50% 未満の遊離血清型 22F 莢膜多糖を含む、請求項 3、9、10、12 から 53 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 55】

血清型 22F グリココンジュゲートの少なくとも 30% が、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する、請求項 3、9、10、12 から 54 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 56】

前記血清型 22F グリココンジュゲートが、血清型 22F 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.1 mM のアセテートを含む、請求項 3、9、10、12 から 54 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 57】

前記血清型 22F グリココンジュゲートが、血清型 22F 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.7 mM のアセテートを含む、請求項 3、9、10、12 から 56 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 58】

血清型 22F グリココンジュゲート中の血清型 22F 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM の、単離された多糖中の血清型 22F 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM に対する比が、少なくとも 0.6 である、請求項 3、9、10、12 から 57 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 59】

血清型 22F グリココンジュゲート中の血清型 22F 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM の、活性化された多糖中の血清型 22F 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM に対する比が、少なくとも 0.6 である、請求項 3、9、10、12 から 58 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 60】

前記血清型 22F グリココンジュゲートのコンジュゲーション度が 2 ～ 15 である、請求項 3、9、10、12 から 59 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 6 1】

前記血清型 2 2 F グリココンジュゲートが、1 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a の分子量を有する糖類を含む、請求項 3、9、1 0、1 2 から 6 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6 2】

前記血清型 2 2 F グリココンジュゲートの担体タンパク質が、D T（ジフテリア毒素）、T T（破傷風毒素）、C R M₁₉₇、他の D T 変異体、P D（ヘモフィルス・インフルエンザ（*Haemophilus influenzae*）タンパク質 D）、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される、請求項 3、9、1 0、1 2 から 6 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 6 3】

前記血清型 2 2 F グリココンジュゲートの担体タンパク質が C R M₁₉₇ である、請求項 3、9、1 0、1 2 から 6 2 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6 4】

血清型 2 2 F グリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 3、9、1 0、1 2 から 6 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。
の免疫原性組成物。

【請求項 6 5】

前記血清型 3 3 F グリココンジュゲートが 5 0 k D a ~ 2 0 , 0 0 0 k D a の分子量を有する、請求項 4、9、1 0、1 3 から 6 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 6 6】

前記血清型 3 3 F グリココンジュゲートが 1 , 0 0 0 k D a ~ 5 , 0 0 0 k D a の分子量を有する、請求項 4、9、1 0、1 3 から 6 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6 7】

血清型 3 3 F グリココンジュゲート中の血清型 3 3 F 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比（w/w）が 0 . 2 ~ 4 である、請求項 4、9、1 0、1 3 から 6 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6 8】

血清型 3 3 F グリココンジュゲート中の血清型 3 3 F 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比（w/w）が 0 . 4 ~ 1 . 7 である、請求項 4、9、1 0、1 3 から 6 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 6 9】

前記血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、血清型 3 3 F 莢膜多糖の総量と比較して約 4 0 % 未満の遊離血清型 3 3 F 莢膜多糖を含む、請求項 4、9、1 0、1 3 から 6 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 0】

血清型 3 3 F グリココンジュゲートの少なくとも 3 5 % が、C L - 4 B カラム中で 0 . 3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する、請求項 4、9、1 0、1 3 から 6 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 7 1】

前記血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、血清型 3 3 F 莢膜多糖 1 m M あたり少なくとも 0 . 1 m M のアセテートを含む、請求項 4、9、1 0、1 3 から 7 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 2】

前記血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、血清型 3 3 F 莢膜多糖 1 m M あたり少なくとも 0 . 7 m M のアセテートを含む、請求項 4、9、1 0、1 3 から 7 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7 3】

血清型 3 3 F グリココンジュゲート中の血清型 3 3 F 莢膜多糖 1 m M あたりのアセテ-

50

トのmMの、単離された多糖中の血清型33F莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比が、少なくとも0.6である、請求項4、9、10、13から72のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項74】

血清型33Fグリココンジュゲート中の血清型33F莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型33F莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比が、少なくとも0.6である、請求項4、9、10、13から73のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項75】

前記血清型33Fグリココンジュゲートのコンジュゲーション度が2～20である、請求項4、9、10、13から74のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項76】

前記血清型33Fグリココンジュゲートが、10kDa～2,000kDaの分子量を有する糖類を含む、請求項4、9、10、13から75のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項77】

前記血清型33Fグリココンジュゲートが、2～25個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と糖類との間に少なくとも1個の共有結合を含む、請求項4、9、10、13から76のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項78】

前記血清型33Fグリココンジュゲートの担体タンパク質が、DT（ジフテリア毒素）、TT（破傷風毒素）、CRM₁₉₇、他のDT変異体、PD（ヘモフィルス・インフルエンザ（Haemophilus influenzae）タンパク質D）、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される、請求項4、9、10、13から77のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項79】

前記血清型33Fグリココンジュゲートの担体タンパク質がCRM₁₉₇である、請求項4、9、10、13から78のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項80】

前記血清型33Fグリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項4、9、10、13から79のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

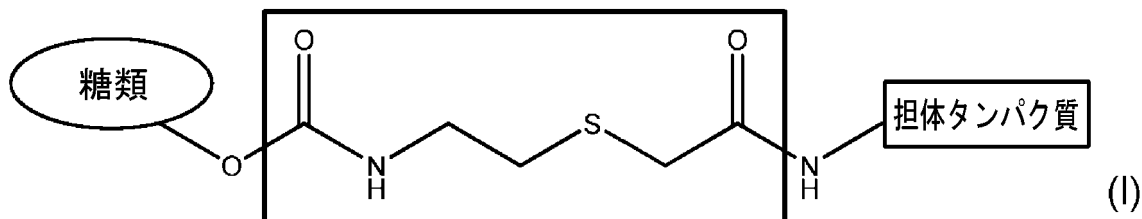
【請求項81】

前記血清型33FグリココンジュゲートがeTECコンジュゲーションを用いて調製される、請求項4、9、10、13から79のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項82】

前記血清型33Fグリココンジュゲートが、一般式（I）：

【化1】



40

（式中、eTECスペーサーを構成する原子は中央のボックス中に含まれる）により表される、請求項80に記載の免疫原性組成物。

【請求項83】

前記血清型12Fグリココンジュゲートが50kDa～2,000kDaの分子量を有する、請求項5、10、14から82のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項84】

50

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートが 5 0 0 k D a ～ 5 , 0 0 0 k D a の分子量を有する、請求項 5、1 0、1 4 から 8 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 5】

血清型 1 2 F グリココンジュゲート中の血清型 1 2 F 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0 . 2 ～ 4 である、請求項 5、1 0、1 4 から 8 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 6】

血清型 1 2 F グリココンジュゲート中の血清型 1 2 F 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0 . 8 ～ 1 . 8 である、請求項 5、1 0、1 4 から 8 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 8 7】

前記血清型 2 2 F グリココンジュゲートが、血清型 1 2 F 莢膜多糖の総量と比較して約 5 0 % 未満の遊離血清型 1 2 F 莢膜多糖を含む、請求項 5、1 0、1 4 から 8 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 8】

血清型 1 2 F グリココンジュゲートの少なくとも 3 5 % が、C L - 4 B カラム中で 0 . 3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する、請求項 5、1 0、1 4 から 8 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8 9】

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートのコンジュゲーション度が 2 ～ 2 0 である、請求項 5、1 0、1 4 から 8 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 9 0】

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートが、1 0 k D a ～ 2 , 0 0 0 k D a の分子量を有する糖類を含む、請求項 5、1 0、1 4 から 8 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9 1】

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートが、2 ～ 2 5 個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と糖類との間に少なくとも 1 個の共有結合を含む、請求項 5、1 0、1 4 から 9 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9 2】

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートの担体タンパク質が、D T (ジフテリア毒素)、T T (破傷風毒素)、C R M₁₉₇、他の D T 変異体、P D (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 e) タンパク質 D)、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される、請求項 5、1 0、1 4 から 9 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 9 3】

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートの担体タンパク質が C R M₁₉₇ である、請求項 5、1 0、1 4 から 9 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9 4】

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 5、1 0、1 4 から 9 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 9 5】

前記血清型 1 2 F グリココンジュゲートが、T E M P O / N C S 還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 5、1 0、1 4 から 9 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9 6】

前記血清型 1 0 A グリココンジュゲートが 5 0 k D a ～ 2 0 , 0 0 0 k D a の分子量を有する、請求項 6、1 0、1 5 から 9 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9 7】

前記血清型 1 0 A グリココンジュゲートが 1 , 0 0 0 k D a ～ 1 0 , 0 0 0 k D a の分子量を有する、請求項 6、1 0、1 5 から 9 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

50

【請求項 98】

血清型 10A グリココンジュゲート中の血清型 10A 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.5～3 である、請求項 6、10、15 から 97 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 99】

血清型 10A グリココンジュゲート中の血清型 10A 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.8～1.2 である、請求項 6、10、15 から 98 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 100】

前記血清型 10A グリココンジュゲートが、血清型 10A 莢膜多糖の総量と比較して約 50% 未満の遊離血清型 10A 莢膜多糖を含む、請求項 6、10、15 から 99 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 101】

血清型 10A グリココンジュゲートの少なくとも 30% が、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する、請求項 6、10、15 から 100 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 102】

前記血清型 10A グリココンジュゲートのコンジュゲーション度が 2～15 である、請求項 6、10、15 から 101 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 103】

前記血清型 10A グリココンジュゲートが、10kDa～2,000kDa の分子量を有する糖類を含む、請求項 6、10、15 から 102 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 104】

前記血清型 10A グリココンジュゲートの担体タンパク質が、DT (ジフテリア毒素)、TT (破傷風毒素)、CRM₁₉₇、他の DT 変異体、PD (ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae) タンパク質 D)、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される、請求項 6、10、15 から 103 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 105】

前記血清型 10A グリココンジュゲートの担体タンパク質が CRM₁₉₇ である、請求項 6、10、15 から 104 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 106】

前記血清型 10A グリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 6、10、15 から 105 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 107】

前記血清型 11A グリココンジュゲートが 50kDa～20,000kDa の分子量を有する、請求項 7、10、16 から 106 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 108】

前記血清型 11A グリココンジュゲートが 500kDa～20,000kDa の分子量を有する、請求項 7、10、16 から 107 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 109】

血清型 11A グリココンジュゲート中の血清型 11A 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.2～4 である、請求項 7、10、16 から 108 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 110】

血清型 11A グリココンジュゲート中の血清型 11A 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.8～1.6 である、請求項 7、10、16 から 109 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 111】

50

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、血清型 1 1 A 莢膜多糖の総量と比較して約 5 0 % 未満の遊離血清型 1 1 A 莢膜多糖を含む、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 2】

血清型 1 1 A グリココンジュゲートの少なくとも 3 0 % が、C L - 4 B カラム中で 0 . 3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 3】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたり少なくとも 0 . 3 m M のアセテートを含む、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 2 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 4】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたり少なくとも 1 . 8 m M のアセテートを含む、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 5】

血清型 1 1 A グリココンジュゲート中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたりのアセテートの m M の、単離された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたりのアセテートの m M に対する比が、少なくとも 0 . 6 である、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 6】

血清型 1 1 A グリココンジュゲート中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたりのアセテートの m M の、活性化された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたりのアセテートの m M に対する比が、少なくとも 0 . 6 である、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 7】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたり少なくとも 0 . 1 m M のグリセロールを含む、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 8】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 m M あたり少なくとも 0 . 4 m M のグリセロールを含む、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 1 9】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートのコンジュゲーション度が 1 ~ 1 5 である、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 2 0】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、1 0 k D a ~ 2 , 0 0 0 k D a の分子量を有する糖類を含む、請求項 7、1 0、1 6 から 1 1 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 2 1】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートの担体タンパク質が、D T (ジフテリア毒素)、T T (破傷風毒素)、C R M ₁₉₇、他の D T 変異体、P D (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 e) タンパク質 D)、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される、請求項 7、1 0、1 6 から 1 2 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 2 2】

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートの担体タンパク質が C R M ₁₉₇ である、請求項 7、1 0、1 6 から 1 2 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 2 3】

10

20

30

40

50

前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 7、10、16 から 122 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 124】

前記血清型 8 グリココンジュゲートが 50 kDa ～ 20,000 kDa の分子量を有する、請求項 8、10、17 から 123 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 125】

前記血清型 8 グリココンジュゲートが 1,000 kDa ～ 15,000 kDa の分子量を有する、請求項 8、10、17 から 124 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 126】

血清型 8 グリココンジュゲート中の血清型 8 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.2 ～ 4 である、請求項 8、10、17 から 125 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 127】

血清型 8 グリココンジュゲート中の血清型 8 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.8 ～ 1.5 である、請求項 8、10、17 から 126 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 128】

前記血清型 8 グリココンジュゲートが、血清型 8 莢膜多糖の総量と比較して約 50 % 未満の遊離血清型 8 莢膜多糖を含む、請求項 8、10、17 から 127 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 129】

血清型 8 グリココンジュゲートの少なくとも 30 % が、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する、請求項 8、10、17 から 128 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 130】

前記血清型 8 グリココンジュゲートのコンジュゲーション度が 2 ～ 20 である、請求項 8、10、17 から 129 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 131】

前記血清型 8 グリココンジュゲートが、10 kDa ～ 2,000 kDa の分子量を有する糖類を含む、請求項 8、10、17 から 130 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 132】

前記血清型 8 グリココンジュゲートの担体タンパク質が、DT (ジフテリア毒素)、TT (破傷風毒素)、CRM₁₉₇、他の DT 変異体、PD (ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae) タンパク質 D)、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される、請求項 8、10、17 から 131 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 133】

前記血清型 8 グリココンジュゲートの担体タンパク質が CRM₁₉₇ である、請求項 8、10、17 から 132 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 134】

前記血清型 8 グリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 8、10、17 から 133 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 135】

各用量が 0.1 ～ 100 μg の各血清型の多糖を含む、請求項 1 から 134 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 136】

各用量が 1 ～ 10 μg の各血清型の多糖を含む、請求項 1 から 134 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 137】

50

各用量が、特定の各グリココンジュゲートについて約 1.0 μ g、約 1.2 μ g、約 1.4 μ g、約 1.6 μ g、約 1.8 μ g、約 2.0 μ g、約 2.2 μ g、約 2.4 μ g、約 2.6 μ g、約 2.8 μ g、約 3.0 μ g、約 3.2 μ g、約 3.4 μ g、約 3.6 μ g、約 3.8 μ g、約 4.0 μ g、約 4.2 μ g、約 4.4 μ g、約 4.6 μ g、約 4.8 μ g、約 5.0 μ g、約 5.2 μ g、約 5.4 μ g、約 5.6 μ g、約 5.8 μ g または約 6.0 μ g の多糖を含む、請求項 1 から 136 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 138】

各用量が、存在する場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F および／または 33F に由来する各グリココンジュゲートについて約 1.5 μ g ～ 約 3.0 μ g の多糖を含み、存在する場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 6B に由来するグリココンジュゲートについて約 3.0 μ g ～ 約 6.0 μ g の多糖を含む、請求項 1 から 134 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 139】

各用量が、10 μ g ～ 150 μ g の担体タンパク質を含む、請求項 1 から 138 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 140】

前記担体タンパク質が CRM₁₉₇ である、請求項 1 から 139 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 141】

各用量が、約 25 μ g、約 26 μ g、約 27 μ g、約 28 μ g、約 29 μ g、約 30 μ g、約 31 μ g、約 32 μ g、約 33 μ g、約 34 μ g、約 35 μ g、約 36 μ g、約 37 μ g、約 38 μ g、約 39 μ g、約 40 μ g、約 41 μ g、約 42 μ g、約 43 μ g、約 44 μ g、約 45 μ g、約 46 μ g、約 47 μ g、約 48 μ g、約 49 μ g、約 50 μ g、約 51 μ g、約 52 μ g、約 53 μ g、約 54 μ g、約 55 μ g、約 56 μ g、約 57 μ g、約 58 μ g、約 59 μ g、約 60 μ g、約 61 μ g、約 62 μ g、約 63 μ g、約 64 μ g、約 65 μ g、約 66 μ g、約 67 μ g、約 68 μ g、約 69 μ g、約 70 μ g、約 71 μ g、約 72 μ g、約 73 μ g、約 74 μ g または約 75 μ g の担体タンパク質を含む、請求項 1 から 140 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 142】

他の病原体に由来する抗原をさらに含む、請求項 1 から 141 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 143】

ジフテリアトキソイド (D)、破傷風トキソイド (T)、典型的には無細胞性 (Pa) である、百日咳抗原 (P)、B 型肝炎ウイルス (HBV) 表面抗原 (HBsAg)、A 型肝炎ウイルス (HAV) 抗原、コンジュゲート化ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b 型莢膜糖類 (Hib)、不活化ポリオウイルスワクチン (IPV) から選択される抗原をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 144】

D-T-Pa をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 145】

D-T-Pa-Hib をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 146】

D-T-Pa-IPV をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 147】

D-T-P a-H B s A g をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 148】

D-T-P a-H B s A g-I P V をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 149】

D-T-P a-H B s A g-H i b をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 150】

D-T-P a-H B s A g-I P V-H i b をさらに含む、請求項 1 から 142 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 151】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 Y 莢膜糖類 (Men Y) をさらに含む、請求項 1 から 150 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 152】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 C 莢膜糖類 (Men C) をさらに含む、請求項 1 から 151 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 153】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 A 莢膜糖類 (Men A) をさらに含む、請求項 1 から 152 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 154】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 W135 莢膜糖類 (Men W135) をさらに含む、請求項 1 から 153 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 155】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 Y 莢膜糖類 (Men Y)、およびコンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 C 莢膜糖類 (Men C) をさらに含む、請求項 1 から 150 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 156】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 W135 莢膜糖類 (Men W135)、コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 Y 莢膜糖類 (Men Y)、および／またはコンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 C 莢膜糖類 (Men C) をさらに含む、請求項 1 から 150 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 157】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 A 莢膜糖類 (Men A)、コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 W135 莢膜糖類 (Men W135)、コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 Y 莢膜糖類 (Men Y)、および／またはコンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (N. meningitidis) 血清群 C 莢膜糖類 (Men C) をさらに含む、請求項 1 から 150 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 158】

少なくとも 1 つのアジュバント、最も好ましくは、本明細書に開示されるアジュバント

10

20

30

40

50

のいずれかをさらに含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 159】

ミョウバン（例えば、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム）、リン酸カルシウム、リポソーム、MF59（4.3%w/vスクアレン、0.5%w/vポリソルベート80（Tween80）、0.5%w/vトリオレイン酸ソルビタン（Span85））などの水中油乳濁液、モンタニドなどの油中水乳濁液、およびポリ（D，L－ラクチド－c o－グリコリド）（PLG）マイクロ粒子またはナノ粒子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 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 160】

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少なくとも1つのアジュバントをさらに含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 161】

アジュバントとしてリン酸アルミニウムをさらに含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 162】

アジュバントとして硫酸アルミニウムをさらに含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 163】

アジュバントとして水酸化アルミニウムをさらに含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 164】

アジュバントとしてリン酸アルミニウムの形態の0.1mg/mL～1mg/mLのアルミニウム元素を含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 165】

アジュバントとしてリン酸アルミニウムの形態の0.2mg/mL～0.3mg/mLのアルミニウム元素を含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 166】

アジュバントとしてリン酸アルミニウムの形態の約0.25mg/mLのアルミニウム元素を含む、請求項 1 から 157 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 167】

アジュバントとしてCpGオリゴヌクレオチド、好ましくは、本明細書に開示されるCpGオリゴヌクレオチドのいずれかを含有、請求項 1 から 166 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 168】

液体形態で製剤化された、請求項 1 から 167 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 169】

凍結乾燥形態で製剤化された、請求項 1 から 167 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 170】

水性液体形態で製剤化された、請求項 1 から 167 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 171】

緩衝液、塩、二価陽イオン、非イオン性界面活性剤、糖などの凍結防止剤、およびフリーラジカルスカベンジャーもしくはキレート剤などの酸化防止剤のうちの1つもしくは複数、またはその任意の複数の組合せを含む、請求項 1 から 170 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 172】

緩衝液を含む、請求項 1 から 170 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 173】

前記緩衝液が約 3.5～約 7.5 の pKa を有する、請求項 171 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 174】

前記緩衝液が、リン酸、コハク酸、ヒスチジンまたはクエン酸である、請求項 172 または 173 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 175】

前記緩衝液が 1 mM～10 mM の最終濃度のコハク酸緩衝液である、請求項 172 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 176】

前記緩衝液が約 5 mM の最終濃度のコハク酸緩衝液である、請求項 172 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 177】

塩を含む、請求項 1 から 176 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 178】

前記塩が、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムまたはその組合せからなる群から選択される、請求項 177 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 179】

前記塩が塩化ナトリウムである、請求項 177 に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 180】

150 mM の塩化ナトリウムを含む、請求項 177 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 181】

界面活性剤を含む、請求項 1 から 180 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 182】

前記界面活性剤が、ポリソルベート 20、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65、ポリソルベート 80、ポリソルベート 85、Triton N-101、Triton X-100、オキシトキシノール 40、ノノキシノール 9、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンポリペプチドオレエート、ポリオキシエチレン-660、ヒドロキシステアリン酸、ポリオキシエチレン-35-リシノレエート、大豆レシチンおよびポロキサマーの群から選択される、請求項 181 に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 183】

前記界面活性剤が、ポリソルベート 20、ポリソルベート 40、ポリソルベート 60、ポリソルベート 65、ポリソルベート 80、ポリソルベート 85 およびポロキサマーの群から選択される、請求項 181 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 184】

前記界面活性剤がポリソルベート 80 である、請求項 181 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 185】

製剤中のポリソルベート 80 の最終濃度が、少なくとも 0.0001%～10% 重量/重量 (w/w) のポリソルベート 80 である、請求項 184 に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 186】

製剤中のポリソルベート 80 の最終濃度が、少なくとも 0.001%～1% 重量/重量 (w/w) のポリソルベート 80 である、請求項 184 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 187】

製剤中のポリソルベート 80 の最終濃度が、少なくとも 0.01%～1% 重量/重量 (w/w) のポリソルベート 80 である、請求項 184 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 188】

製剤中のポリソルベート 80 の最終濃度が、0.01%、0.02%、0.03%、0

50

． 0 4 %、0． 0 5 %、0． 0 6 %、0． 0 7 %、0． 0 8 %、0． 0 9 %または0． 1 %（w／w）のポリソルベート 8 0 である、請求項 1 8 4 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 8 9】

5． 5～7． 5 の p H を有する、請求項 1 から 1 8 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 9 0】

5． 6～7． 0 の p H を有する、請求項 1 から 1 8 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 9 1】

5． 8～6． 0 の p H を有する、請求項 1 から 1 8 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 1 9 2】

請求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物のいずれかを充填した容器。

【請求項 1 9 3】

バイアル、シリンジ、フラスコ、発酵器、バイオリアクター、バッグ、ジャー、アンプル、カートリッジおよび使い捨て型ペンからなる群から選択される、請求項 1 9 2 に記載の容器。

【請求項 1 9 4】

シリコン処理されている、請求項 1 9 2 または 1 9 3 に記載の容器。

20

【請求項 1 9 5】

ガラス、金属（例えば、スチール、ステンレススチール、アルミニウムなど）および／またはポリマー（例えば、熱可塑性物質、エラストマー、熱可塑性エラストマー）から作られている、請求項 1 9 2 から 1 9 4 のいずれか一項に記載の容器。

【請求項 1 9 6】

ガラスから作られている、請求項 1 9 2 から 1 9 4 のいずれか一項に記載の容器。

【請求項 1 9 7】

請求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物のいずれかを充填したシリンジ。

【請求項 1 9 8】

シリコン処理されている、および／またはガラスから作られている、請求項 1 9 7 に記載のシリンジ。

30

【請求項 1 9 9】

0． 1 m L～2 m L の容量の前記免疫原性組成物を充填した、請求項 1 9 2 から 1 9 8 のいずれか一項に記載の容器またはシリンジ。

【請求項 2 0 0】

約 0． 5 m l の容量の前記免疫原性組成物を充填した、請求項 1 9 2 から 1 9 8 のいずれか一項に記載の容器またはシリンジ。

【請求項 2 0 1】

薬剤としての使用のための請求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 2 0 2】

ワクチンとしての使用のための請求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 0 3】

対象における細菌感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善するための方法における使用のための請求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 0 4】

対象における細菌感染、疾患または状態を防止するための方法における使用のための請

50

求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 0 5】

全身経路または粘膜経路により前記免疫原性組成物を投与することにより、肺炎球菌感染に罹りやすいヒトを保護または処置するための方法における使用のための請求項 1 から 1 9 1、2 2 8 から 2 8 0 または 2 0 1 から 2 0 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 0 6】

筋肉内、腹腔内、皮内または皮下経路により投与される、請求項 2 0 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 0 7】

筋肉内、腹腔内、皮内または皮下注射により投与される、請求項 2 0 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 0 8】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) と関連する感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善する方法であって、対象に、免疫学的に有効な量の請求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含む方法。

【請求項 2 0 9】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) による感染を防止する方法であって、対象に、免疫学的に有効な量の請求項 1 から 1 9 1 または 2 2 8 から 2 8 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与することを含む方法。

【請求項 2 1 0】

ワクチン接種しようとする対象が 1 歳未満のヒトである、ワクチンとしての使用のための請求項 1 から 1 9 1、2 2 8 から 2 8 0 または 2 0 1 から 2 0 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 1】

ワクチン接種しようとする対象が 2 歳未満のヒトである、ワクチンとしての使用のための請求項 1 から 1 9 1、2 2 8 から 2 8 0 または 2 0 1 から 2 0 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 2】

ワクチン接種しようとする対象が 5 0 歳以上の成人である、ワクチンとしての使用のための請求項 1 から 1 9 1、2 2 8 から 2 8 0 または 2 0 1 から 2 0 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 3】

ワクチン接種しようとする対象が免疫障害を有するヒトである、ワクチンとしての使用のための請求項 1 から 1 9 1、2 2 8 から 2 8 0、2 0 1 から 2 0 7、または 2 1 0 から 2 1 2 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 4】

単回用量スケジュールにおける使用のための請求項 1 から 1 9 1、2 2 8 から 2 8 0、2 0 1 から 2 0 7、または 2 1 0 から 2 1 2 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 5】

複数回用量スケジュールにおける使用のための請求項 1 から 1 9 1、2 2 8 から 2 8 0、2 0 1 から 2 0 7、または 2 1 0 から 2 1 2 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 6】

前記複数回用量スケジュールが、約 1 カ月～約 2 カ月の間隔で隔てられた 2 回用量シリーズからなる、請求項 2 1 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 7】

前記複数回用量スケジュールが、約 1 カ月～約 2 カ月の間隔で隔てられた 3 回用量シリーズからなる、請求項 2 1 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 1 8】

前記複数回用量スケジュールが、約 1 カ月～約 2 カ月の間隔で隔てられた 3 回用量シリーズ、およびそれに続く、1 回目の用量の約 10 カ月～約 13 カ月後の 4 回目の用量からなる、請求項 215 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 219】

前記複数回用量スケジュールが、1 歳目における少なくとも 1 回の用量、およびそれに続く、少なくとも 1 回の幼児用量からなる、請求項 215 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 220】

前記複数回用量スケジュールが、2 カ月齢で開始する、約 1 カ月～約 2 カ月の間隔で隔てられた一連の 2 回または 3 回用量、およびそれに続く、12～18 カ月齢での幼児用量からなる、請求項 215 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 221】

前記複数回用量スケジュールが、2、4、6 および 12～15 カ月齢での 4 回用量シリーズのワクチンからなる、請求項 215 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 222】

対象に投与された場合、標準的な ELISA アッセイにより測定される、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15B および 15C に結合することができる抗体の形成を誘導することができる、請求項 2 から 191、201 から 207、または 210 から 221 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 223】

対象に投与された場合、オプソニン貪食作用アッセイにおいてストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15B を殺傷することができる抗体の形成を誘導することができる、請求項 2 から 191、201 から 207、または 210 から 221 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 224】

対象に投与された場合、オプソニン貪食作用アッセイにおいてストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15B および 15C を殺傷することができる抗体の形成を誘導することができる、請求項 2 から 191、201 から 207、または 210 から 221 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 225】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15A、15B および／または 15C と関連するストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 感染、疾患または状態を処置する、または防止する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項 2 から 191、201 から 207、または 210 から 221 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

30

【請求項 226】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15B および／または 15C と関連するストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 感染を防止する方法であって、予防的に有効な量の、請求項 2 から 191、201 から 207、または 210 から 221 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

40

【請求項 227】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) による感染に対して対象を保護する、ならびに／またはストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) による感染を防止する、ならびに／またはストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) により引き起こされる感染と関連する少なくとも 1 つの症状の重症度を軽減する、もしくはその開始を遅延させる、ならびに／または血清型 15A、15B および／もしくは 15C (好ましくは、15B および／もしくは 15C、より好ましくは、15B) ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) による感染に対して対象を保護する、ならびに／または血清型 15A、15B および／も

50

しくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）による感染を防止する、ならびに／または血清型15A、15Bおよび／もしくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）により引き起こされる感染と関連する少なくとも1つの症状の重症度を軽減する、もしくはその開始を遅延させる方法における使用のための、請求項2から191、201から207、または210から221のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項228】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Nに由来する莢膜糖類を含まない、請求項1から191のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項229】

前記組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Aに由来する莢膜糖類を含まない、請求項1から191のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項230】

前記組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Lに由来する莢膜糖類を含まない、請求項1から191のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項231】

前記組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Nおよび9Aに由来する莢膜糖類を含まない、請求項1から191のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項232】

前記組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Nおよび9Lに由来する莢膜糖類を含まない、請求項1から191のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項233】

前記組成物が、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Aおよび9Lに由来する莢膜糖類を含まない、請求項1から191のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項234】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9N、9Aおよび9Lに由来する莢膜糖類を含まない、請求項1から191のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項235】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Vに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項1から17のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項236】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型4、6B、14、18C、19Fおよび23Fに由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項235に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項237】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項235または236に記載の免疫原性組成物。

【請求項238】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型5に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項235から237のいずれ

50

か一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 3 9】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 7 F に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 2 3 5 から 2 3 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 0】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、5 および 7 F に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 2 3 5 から 2 3 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 1】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 6 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 2 3 5 から 2 4 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 2】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1 9 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 2 3 5 から 2 4 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 3】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 6 A および 1 9 A に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 2 3 5 から 2 4 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 4】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 3 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 2 3 5 から 2 4 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 5】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 2 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 1 9 1 または 2 3 5 から 2 4 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 6】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1 7 F に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 1 9 1 または 2 3 5 から 2 4 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 7】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 2 0 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 1 9 1 または 2 3 5 から 2 4 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 8】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 2、1 7 F および 2 0 に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 1 9 1 または 2 3 5 から 2 4 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 4 9】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1 5 C に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 1 9 1 または 2 3 5 から 2 4 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5 0】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 9 N に由来する荚膜糖類を含まない、請求項 2 3 5 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5 1】

前記組成物が、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 9 A に由来する莢膜糖類を含まない、請求項 2 3 5 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5 2】

前記組成物が、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 9 L に由来する莢膜糖類を含まない、請求項 2 3 5 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5 3】

前記組成物が、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 9 N および 9 A に由来する莢膜糖類を含まない、請求項 2 3 5 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 2 5 4】

前記組成物が、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 9 N および 9 L に由来する莢膜糖類を含まない、請求項 2 3 5 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5 5】

前記組成物が、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 9 A および 9 L に由来する莢膜糖類を含まない、請求項 2 3 5 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5 6】

前記組成物が、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 9 N、9 A および 9 L に由来する莢膜糖類を含まない、請求項 2 3 5 から 2 4 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 2 5 7】

7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 または 24 価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項 2 3 5 から 2 5 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 5 8】

14、15、16、17、18、19 または 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項 2 3 5 から 2 5 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 2 5 9】

16 価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項 2 3 5 から 2 5 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 6 0】

20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項 2 3 5 から 2 5 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 6 1】

前記グリココンジュゲートが CRM₁₉₇ に個別にコンジュゲートされている、請求項 2 3 5 から 2 6 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 6 2】

全てのグリココンジュゲートが CRM₁₉₇ に個別にコンジュゲートされている、請求項 2 3 5 から 2 6 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 2 6 3】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 1、4、5、6 B、7 F、9 V、14 および／または 23 F に由来するグリココンジュゲートが PD に個別にコンジュゲートされている、請求項 2 3 5 から 2 6 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 2 6 4】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 18 C に由来するグリココンジュゲートが TT にコンジュゲートされている、請求項 2 3 6 から 2 6 0

50

または 263 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 265】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 19F に由来するグリココンジュゲートが DT にコンジュゲートされている、請求項 236 から 260 または 264 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 266】

存在する場合、前記血清型 15B グリココンジュゲートが、請求項 32 から 49 のいずれか一項に記載の通りである、請求項 235 から 265 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 267】

存在する場合、前記血清型 22F グリココンジュゲートが、請求項 50 から 64 のいずれか一項に記載の通りである、請求項 235 から 266 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 268】

存在する場合、前記血清型 33F グリココンジュゲートが、請求項 65 から 82 のいずれか一項に記載の通りである、請求項 235 から 267 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 269】

存在する場合、前記血清型 12F グリココンジュゲートが、請求項 83 から 95 のいずれか一項に記載の通りである、請求項 235 から 268 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 270】

存在する場合、前記血清型 10A グリココンジュゲートが、請求項 96 から 106 のいずれか一項に記載の通りである、請求項 235 から 269 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 271】

存在する場合、前記血清型 11A グリココンジュゲートが、請求項 107 から 123 のいずれか一項に記載の通りである、請求項 235 から 270 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 272】

存在する場合、前記血清型 8 グリココンジュゲートが、請求項 124 から 134 のいずれか一項に記載の通りである、請求項 235 から 271 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 273】

各用量が 0.1 μ g ~ 100 μ g の各血清型の多糖を含む、請求項 228 から 272 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 274】

各用量が 10 μ g ~ 150 μ g の担体タンパク質を含む、請求項 228 から 273 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 275】

他の病原体に由来する抗原をさらに含む、請求項 228 から 274 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 276】

請求項 143 から 157 のいずれか一項に記載の抗原をさらに含む、請求項 228 から 274 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 277】

少なくとも 1 つのアジュバント、最も好ましくは、本明細書に開示される任意のアジュバントをさらに含む、請求項 228 から 276 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 278】

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

10

20

30

40

50

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228から276のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項279】

アジュバントとしてリン酸アルミニウムをさらに含む、請求項228から276のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項280】

請求項168から191のいずれか一項に記載のように製剤化された、請求項228から276のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項281】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型15A、15Bおよび／または15Cに対する免疫応答を誘導する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項2から191、222から224または227から280のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

10

【請求項282】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型22Fに対する免疫応答を誘導する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項3から191、222から224または227から280のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項283】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型33Fに対する免疫応答を誘導する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項4から191、222から224または227から280のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

20

【請求項284】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型12Fに対する免疫応答を誘導する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項5から191、222から224または227から280のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項285】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型10Aに対する免疫応答を誘導する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項6から191、222から224または227から280のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

30

【請求項286】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型11Aに対する免疫応答を誘導する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項7から191、222から224または227から280のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

【請求項287】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型8に対する免疫応答を誘導する方法であって、治療的または予防的に有効な量の、請求項8から191、222から224または227から280のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コンジュゲート化莢膜糖類抗原（グリココンジュゲート）を含む新規免疫原性組成物およびその使用に関する。本発明の免疫原性組成物は、典型的には、糖類が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グリココンジュゲートを含む。本発明はまた、前記新規免疫原性組成

50

物を用いた肺炎球菌感染に対する、ヒト対象、特に、幼児および高齢者のワクチン接種に関する。

【背景技術】

【0002】

肺炎球菌により引き起こされる感染は、全世界における罹患および死亡の主な原因である。肺炎、熱性菌血症および髄膜炎は、侵襲性肺炎球菌疾患の最も一般的な兆候であるが、一方、気道内での細菌拡散は中耳感染、副鼻腔炎または反復性気管支炎をもたらす。侵襲性疾患と比較して、非侵襲的兆候は通常、あまり重篤ではないが、さらにより一般的である。

【0003】

欧州および米国においては、肺炎球菌性肺炎は、最も一般的な市中感染型細菌性肺炎であり、毎年、成人100,000人あたり約100人が罹患すると見積もられている。熱性菌血症および髄膜炎に関する対応する数字は、それぞれ、100000人あたり15~19人および100,000人あたり1~2人である。1つまたは複数のこれらの兆候に関するリスクは、幼児および高齢者、ならびに任意の年齢の免疫力が低下した人々においてははるかに高い。経済的に発展した地域においても、侵襲性肺炎球菌疾患は死亡率が高い；肺炎球菌性肺炎を有する成人については、死亡率は平均で10%~20%であるが、高リスク群においては50%を超える可能性がある。肺炎は、世界中で肺炎球菌による死亡の圧倒的に最も一般的な原因である。

【0004】

肺炎球菌疾患の原因菌であるストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) (肺炎球菌) は、多糖莢膜により取り囲まれた、グラム陽性被包性球菌である。この莢膜の組成における差異により、約91種の莢膜型間の血清学的鑑別が可能になり、そのうちのいくつかは肺炎球菌疾患と関連することが多いが、他のものはそうであることは稀である。侵襲性肺炎球菌感染としては、肺炎、髄膜炎および熱性菌血症が挙げられる；特に、一般的な非侵襲的兆候は、中耳炎、副鼻腔炎および気管支炎である。

【0005】

肺炎球菌コンジュゲートワクチン (PCV) は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) (肺炎球菌) により引き起こされる疾患に対して保護するために用いられる肺炎球菌ワクチンである。現在、世界市場で入手可能な3つのPCVワクチンが存在する：PREVNAR (登録商標) (いくつかの国では *Prevenar* と呼ばれる) (7価ワクチン)、SYNFLORIX (登録商標) (10価ワクチン) および PREVNAR13 (登録商標) (13価ワクチン)。

【0006】

必須の抗生物質に対する幅広い微生物耐性が最近発生しており、免疫力が低下した人々の数が増加していることから、さらにより広い保護を示す肺炎球菌ワクチンの必要性が強調される。

【0007】

特に、PREVNAR13 (登録商標) には見出されない血清型があり、またいずれは血清型置換の生じる可能性があることから、肺炎球菌疾患をカバーする医学的必要性は未だ満たされておらず、対処が必要である。PREVNAR13 (登録商標) における13を超える疾患を引き起こす特定の血清型は、地域、集団によって変化し、抗生物質耐性の獲得、肺炎球菌ワクチン導入および未知の起源の長期的傾向のため、時間と共に変化し得る。ヒトおよび特に、2歳未満の子供においてさらなるストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) に対する免疫応答を誘導するために用いることができる免疫原性組成物が必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

10

20

30

40

50

本発明の新規免疫原性組成物の目的は、PREVNAR13（登録商標）には見出されないストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型に対する適切な保護を提供することである。一態様において、本発明の免疫原性組成物の目的は、PREVNAR（登録商標）（7価ワクチン）、SYNFLORIX（登録商標）および／またはPREVNAR13（登録商標）によって現在包含される血清型に対する免疫応答を維持しながら、前記ワクチンには見出されないストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型に対する適切な保護を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型22Fに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型33Fに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型10Aに由来するグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型11Aに由来するグリココンジュゲートおよびストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型8に由来するグリココンジュゲートからなる群から選択される少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む免疫原性組成物に関する。

【0010】

一態様において、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型22Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型33Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。

【0011】

別の態様において、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型22Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型33Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型10Aに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型11Aに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートおよびストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型8に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。

【0012】

ある態様において、上記の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fに由来するグリココンジュゲートをさらに含む。

【0013】

別の態様において、上記の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、5および7Fに由来するグリココンジュゲートをさらに含む。

【0014】

別の態様において、上記の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S.*

． p n e u m o n i a e) 血清型 6 A および 1 9 A に由来するグリココンジュゲートをさらに含む。

【 0 0 1 5 】

別の態様において、上記の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 3 に由来するグリココンジュゲートをさらに含む。

【 0 0 1 6 】

別の態様において、上記の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 2 、 9 N 、 1 7 F 、 2 0 および／または 1 5 C に由来するグリココンジュゲートをさらに含む。

【 0 0 1 7 】

ある態様において、上記の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 9 N 、 9 A および／または 9 L に由来する莢膜糖類を含まない。

【 0 0 1 8 】

ある態様において、上記の免疫原性組成物は、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 または 2 0 価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。
ある態様において、上記の免疫原性組成物は、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 、 1 4 、 1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 8 、 1 9 、 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 または 2 5 価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。

【 0 0 1 9 】

ある態様において、グリココンジュゲートは、 D T (ジフテリア毒素)、 T T (破傷風毒素)、 C R M _{1 9 7}、他の D T 変異体、 P D (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 e) タンパク質 D)、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群から選択される担体タンパク質に個別にコンジュゲートされている。

【 0 0 2 0 】

一態様において、本発明は、本文献で定義される任意の免疫原性組成物を充填した容器を提供する。

【 0 0 2 1 】

一態様において、本発明は、薬剤としての使用、特に、ワクチンとしての使用のための本文献で定義される任意の免疫原性組成物を提供する。

【 0 0 2 2 】

一態様において、本発明は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) と関連する感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善する方法であって、対象に、免疫学的に有効な量の本文献で定義される任意の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1】ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 8 (P n - 8) 莢膜多糖の反復多糖構造を示す図である。

【図 2】ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 1 0 A (P n - 1 0 A) 莢膜多糖の反復多糖構造を示す図である。

【図 3】ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 1 1 A (P n - 1 1 A) 莢膜多糖の反復多糖構造を示す図である。

【図 4】ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 1 2 F (P n - 1 2 F) 莢膜多糖の反復多糖構造を示す図である。

【図 5】ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 1 5 B (P n - 1 5 B) 莢膜多糖の反復多糖構造を示す図である。

【図 6】ストレプトコッカス・ニューモニエ (S ． p n e u m o n i a e) 血清型 2 2 F (P n - 2 2 F) 莢膜多糖の反復多糖構造を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 7】ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 33F (Pn-33F) 莢膜多糖の反復多糖構造を示す図である。

【図 8】Pn-33F グリココンジュゲートの調製において用いることができる活性化 (A) およびコンジュゲーション (B) プロセスに関する代表的なプロセス流れ図を示す図である。

【図 9】TEMPO/NCS 酸化反応における NCS の量の変化による DO に対する効果を示す図である。

【図 10】Pn-12F グリココンジュゲートの安定性の評価を示す図である。

【図 11】機能横断型 OPA 応答を示す図である。13 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (US Study 6115A1-004; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00427895) をワクチン接種された成人からの 59 種の血清のサブセットを、血清型 9V、9A、9L、および 9N に対する機能的抗体の存在について OPA において評価した。OPA 陽性力価 (すなわち、1:8 以上) を有する試料のパーセントを、各群の上に示す。幾何平均力価 (GMT) を、各群の下に x 軸に列挙する。

10

【図 12】66 種の対応付けられた前/後血清の機能横断型 OPA 応答を示す図である。13 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (試験 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) をワクチン接種された成人からの 66 種の対応付けられたワクチン接種前および接種後の血清パネルのサブセットを、血清型 9V、9A、9L、および 9N に対する機能的抗体の存在について OPA において評価した。OPA 陽性力価 (すなわち、1:8 以上) を有する試料のパーセントを、各群の上に示す。幾何平均力価 (GMT) を、各群の下に x 軸に列挙する。

20

【図 13】肺炎球菌血清型 9V (Pn9V) による免疫化の前および後の逆累積分布曲線 (RCD) を示す図である。13 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (試験 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) をワクチン接種された、対応付けられたワクチン接種前および接種後の血清パネル (N=66) からの血清型 9V に対する OPA 力価の逆累積分布曲線である。プロットは、OPA 陽性力価 (すなわち、1:8 以上) を有する血清のパーセントを表す。

【図 14】肺炎球菌血清型 9A (Pn9A) による免疫化の前および後の逆累積分布曲線 (RCD) を示す図である。13 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (試験 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) をワクチン接種された、対応付けられたワクチン接種前および接種後の血清パネル (N=66) からの血清型 9A に対する OPA 力価の逆累積分布曲線である。プロットは、OPA 陽性力価 (すなわち、1:8 以上) を有する血清のパーセントを表す。

30

【図 15】肺炎球菌血清型 9L (Pn9L) による免疫化の前および後の逆累積分布曲線 (RCD) を示す図である。13 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (試験 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) をワクチン接種された、対応付けられたワクチン接種前および接種後の血清パネル (N=66) からの血清型 9L に対する OPA 力価の逆累積分布曲線である。プロットは、OPA 陽性力価 (すなわち、1:8 以上) を有する血清のパーセントを表す。

40

【図 16】肺炎球菌血清型 9N (Pn9N) による免疫化の前および後の逆累積分布曲線 (RCD) を示す図である。13 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (試験 6115A1-3005; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) をワクチン接種された、対応付けられたワクチン接種前および接種後の血清パネル (N=66) からの血清型 9N に対する OPA 力価の逆累積分布曲線である。プロットは、OPA 陽性力価 (すなわち、1:8 以上) を有する血清のパーセントを表す。

50

【発明を実施するための形態】

【0024】

1 本発明の免疫原性組成物

本発明の免疫原性組成物は、典型的には、糖類がストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）の血清型に由来するコンジュゲート化莢膜糖類抗原（グリココンジュゲートとも呼ばれる）を含む。

【0025】

好ましくは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）莢膜糖類の数は、8種の異なる血清型（または「v」、価）～20種の異なる血清型（20v）の範囲であってもよい。一実施形態においては、8種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、9種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、10種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、11種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、12種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、13種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、14種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、15種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、16種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、17種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、18種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、19種の異なる血清型が存在する。一実施形態においては、20種の異なる血清型が存在する。莢膜糖類を担体タンパク質にコンジュゲートさせて、本明細書の以下に記載されるようなグリココンジュゲートを形成させる。

【0026】

タンパク質担体が組成物中の2つ以上の糖類について同じである場合、糖類を、タンパク質担体の同じ分子（それにコンジュゲートされた2つ以上の異なる糖類を有する担体分子）にコンジュゲートさせることができる[例えば、WO 2004/083251を参照されたい]。

【0027】

しかし、好ましい実施形態においては、糖類を、タンパク質担体の異なる分子（それにコンジュゲートされた1つの種類の糖類のみを有するタンパク質担体のそれぞれの分子）にそれぞれ個別にコンジュゲートさせる。前記実施形態においては、莢膜糖類は、担体タンパク質に個別にコンジュゲートされていると言われる。

【0028】

本発明の目的では、用語「グリココンジュゲート」は、担体タンパク質に共有的に連結された莢膜糖類を示す。一実施形態においては、莢膜糖類は、担体タンパク質に直接連結される。第2の実施形態においては、細菌糖類はスパーサー／リンカーを介してタンパク質に連結される。

【0029】

1.1 本発明の担体タンパク質

本発明のグリココンジュゲートの成分は、糖類がコンジュゲートされている担体タンパク質である。用語「タンパク質担体」または「担体タンパク質」または「担体」は、本明細書では互換的に用いることができる。担体タンパク質は、標準的なコンジュゲーション手順に従うべきである。

【0030】

好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートの担体タンパク質は、DT（ジフテリア毒素）、TT（破傷風毒素）またはTTの断片C、CRM₁₉₇（ジフテリア毒素の非毒性的であるが、抗原的に同一であるバリエーション）、他のDT変異体（CRM176、CRM228、CRM45（Uchidaら（1973）*J. Biol. Chem.* 218:3838～3844）、CRM9、CRM102、CRM103またはCRM107；NichollsおよびYoule、*Genetically Engineered Toxins*、Frankel（編）、Maecel Dekker Inc.（1992）により記載された他の突然変異；Glu-148からAsp、Glnもしくはは

Serおよび／またはAla-158からGlyへの欠失または突然変異ならびに米国特許第4,709,017号および第4,950,740号に開示された他の突然変異；Lys516、Lys526、Phe530および／またはLys534のうちの少なくとも1つまたは複数の残基の突然変異ならびに米国特許第5,917,017号および第6,455,673号に開示された他の突然変異；または米国特許第5,843,711号に開示された断片、肺炎球菌ニューモリシン（ply）（Kuoら（1995）*Infect Immun* 63:2706～2713）、例えば、いくつかの様式で解毒されたply、例えば、dPLY-GMBS（WO2004/081515、WO2006/032499）またはdPLY-formol、PhTX、例えば、PhTA、PhTB、PhTD、PhTE（PhTA、PhTB、PhTDまたはPhTEの配列は、WO00/37105およびWO00/39299に開示されている）およびPhTタンパク質の融合物、例えば、PhTDE融合物、PhTBE融合物、PhT A-E（WO01/98334、WO03/054007、WO2009/000826）、通常、ナイセリア・メニンギティディス（*Neisseria meningitidis*）血清群Bから抽出されるOMPC（髄膜炎菌外膜タンパク質）（EP0372501）、PorB（ナイセリア・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（*Haemophilus influenzae*）タンパク質D；例えば、EP0594610Bを参照されたい）、または免疫学的に機能的なその等価物、合成ペプチド（EP0378881、EP0427347）、熱ショックタンパク質（WO93/17712、WO94/03208）、百日咳タンパク質（WO98/58668、EP0471177）、サイトカイン、リンホカイン、増殖因子またはホルモン（WO91/01146）、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ら（2001）*Eur J Immunol* 31:3816～3824）、例えば、N19タンパク質（Baraldoiら（2004）*Infect Immun* 72:4884～4887）、肺炎球菌表面タンパク質PspA（WO02/091998）、鉄取込みタンパク質（WO01/72337）、クロストリジウム・ディフィシレ（*Clostridium difficile*）の毒素AまたはB（WO00/61761）、トランスフェリン結合タンパク質、肺炎球菌接着タンパク質（PsaA）、組換えシュドモナス・エルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素A（特に、その非毒性変異体（グルタミン酸553に置換を担持する外毒素Aなど）（Douglasら（1987）*J. Bacteriol.* 169（11）:4967～4971））からなる群において選択される。オブアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン（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）などの他のタンパク質を、担体タンパク質として用いることもできる。他の好適な担体タンパク質としては、コレラトキソイド（例えば、WO2004/083251に記載される）、大腸菌（*Escherichia coli*）LT、大腸菌（*E. coli*）ST、およびシュドモナス・エルギノーサ（*P. aeruginosa*）に由来する外毒素Aなどの不活化細菌毒素が挙げられる。

【0031】

好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートの担体タンパク質は、TT、DT、DT変異体（CRM₁₉₇など）、ヘモフィルス・インフルエンザ（*H. influenzae*）タンパク質D、PhTX、PhTD、PhTDE融合物（特に、WO01/98334およびWO03/054007に記載のもの）、解毒されたニューモリシン、PorB、N19タンパク質、PspA、OMPC、クロストリジウム・ディフィシレ（*C. difficile*）の毒素AまたはBおよびPsaAからなる群から独立に選択される。

【0032】

1つの実施形態においては、本発明のグリココンジュゲートの担体タンパク質は、DT（ジフテリアトキソイド）である。別の実施形態においては、本発明のグリココンジュゲ

ートの担体タンパク質は、T T（破傷風毒素）である。

【0033】

別の実施形態においては、本発明のグリココンジュゲートの担体タンパク質は、PD（ヘモフィルス・インフルエンザ（*H. influenzae*）タンパク質D；例えば、EP0594610Bを参照されたい）である。

【0034】

好ましい実施形態においては、本発明の莢膜糖類は、CRM₁₉₇タンパク質にコンジュゲートされている。CRM₁₉₇タンパク質は、非毒性形態のジフテリア毒素であるが、ジフテリア毒素とは免疫学的に区別がつかない。CRM₁₉₇は、毒素原性コリネファージベータ（Uchidaら（1971）*Nature New Biology* 233: 8~11）のニトロソグアニジン突然変異誘発により作出された非毒素原性ファージβ197^{tox-}により感染したコリネバクテリウム・ジフテリア（*Corynebacterium diphtheriae*）により産生される。CRM₁₉₇タンパク質は、ジフテリア毒素と同じ分子量を有するが、構造遺伝子中の単一塩基変化（グアニンからアデニンへの）によりそれとは異なる。この単一塩基変化は、成熟タンパク質中のアミノ酸置換（グルタミン酸からグリシンへの）を引き起こし、ジフテリア毒素の毒性を除去する。CRM₁₉₇タンパク質は、糖類のための安全かつ有効なT細胞依存的担体である。CRM₁₉₇およびその産生に関するさらなる詳細を、例えば、米国特許第5,614,382号に見出すことができる。

【0035】

1つの実施形態において、本発明の莢膜糖類は、CRM₁₉₇タンパク質またはCRM₁₉₇のA鎖にコンジュゲートされている（CN103495161を参照されたい）。1つの実施形態において、本発明の莢膜糖類は、遺伝子組換え体大腸菌（*E. coli*）による発現を介して得られたCRM₁₉₇のA鎖にコンジュゲートされている（CN103495161を参照されたい）。1つの実施形態において、本発明の莢膜糖類は、全てCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。1つの実施形態において、本発明の莢膜糖類は、全てCRM₁₉₇のA鎖にコンジュゲートされている。

【0036】

したがって、よくある実施形態において、本発明のグリココンジュゲートは、担体タンパク質としてCRM₁₉₇を含み、ここで、莢膜多糖はCRM₁₉₇に共有的に連結される。

【0037】

1. 2 本発明の莢膜糖類

本明細書を通して、用語「糖類」は、多糖またはオリゴ糖類を含んでもよく、両方を含む。よくある実施形態において、糖類は多糖、特に、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）莢膜多糖である。

【0038】

莢膜多糖は、当業者には公知の標準的な技術により調製される。

【0039】

本発明において、莢膜多糖を、例えば、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）の血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fから調製することができる。典型的には、莢膜多糖を、培地（例えば、ダイズ系培地）中でそれぞれのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型を増殖させることにより生産した後、細菌培養物から調製する。本発明のグリココンジュゲートにおいて用いられるそれぞれの多糖を作製するために用いられるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）の細菌株を、確立された培養株保存機関または臨床標本から得ることができる。

【0040】

生物の集団（それぞれのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）

e) 血清型) を、種バイアルから種ボトルまでスケールアップし、生産規模の発酵容量に達するまで増大する容量の1つまたは複数の種発酵器により継代することが多い。増殖サイクルの終わりに、細胞を溶解した後、溶解物培養液を、下流の(精製)プロセスのために収穫する(例えば、WO2006/110381、WO2008/118752、ならびに米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2008/0102498号、および第2008/0286838号を参照されたい)。

【0041】

個々の多糖を、典型的には、遠心分離、沈降、限外濾過、および/またはカラムクロマトグラフィーにより精製する(例えば、WO2006/110352およびWO2008/118752を参照されたい)。

10

【0042】

精製された多糖を、活性化(例えば、化学的に活性化)して、それらが反応(例えば、eTECスパーサーと)することができるようにした後、本明細書にさらに記載されるように、本発明のグリココンジュゲート中に組み込むことができる。

【0043】

ストレプトコッカス・ニューモニエ(*S. pneumoniae*) 莢膜多糖は、最大8個の糖残基を含有してもよい反復オリゴ糖単位を含む。

【0044】

1つの実施形態において、本発明の莢膜糖類は、1つのオリゴ糖単位または反復オリゴ糖単位の天然の長さの糖鎖よりも短いものであってもよい。1つの実施形態において、本発明の莢膜糖類は、関連する血清型の1つの反復オリゴ糖単位である。

20

【0045】

1つの実施形態において、本発明の莢膜糖類は、オリゴ糖単位であってもよい。オリゴ糖類は、少数の反復単位(典型的には、5~15の反復単位)を有し、典型的には、合成的に、または多糖の加水分解により誘導される。

【0046】

しかし、好ましくは、本発明の、および本発明の免疫原性組成物中の莢膜糖類の全部は、多糖である。高分子量の莢膜多糖は、抗原表面上に存在するエピトープのため、ある特定の抗体免疫応答を誘導することができる。高分子量莢膜多糖の単離および精製は、好ましくは、本発明のコンジュゲート、組成物および方法における使用のために企図される。

30

【0047】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前に精製された多糖は、10kDa~4,000kDaの分子量を有する。他のそのような実施形態においては、多糖は、50kDa~4,000kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、多糖は、50kDa~3,500kDa; 50kDa~3,000kDa; 50kDa~2,500kDa; 50kDa~2,000kDa; 50kDa~1,750kDa; 50kDa~1,500kDa; 50kDa~1,250kDa; 50kDa~1,000kDa; 50kDa~750kDa; 50kDa~500kDa; 100kDa~4,000kDa; 100kDa~3,500kDa; 100kDa~3,000kDa; 100kDa~2,500kDa; 100kDa~2,000kDa; 100kDa~1,750kDa; 100kDa~1,500kDa; 100kDa~1,250kDa; 100kDa~1,000kDa; 100kDa~750kDa; 100kDa~500kDa; 200kDa~4,000kDa; 200kDa~3,500kDa; 200kDa~3,000kDa; 200kDa~2,500kDa; 200kDa~2,000kDa; 200kDa~1,750kDa; 200kDa~1,500kDa; 200kDa~1,250kDa; 200kDa~1,000kDa; 200kDa~750kDa; または200kDa~500kDaの分子量を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

40

50

【0048】

多糖は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってよい。さらに、本明細書に記載のように、多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけてもよい。機械的または化学的サイジングを用いることができる。化学的加水分解を、酢酸を用いて行うことができる。機械的サイジングを、高圧均一化剪断を用いて行うことができる。上記の分子量範囲は、コンジュゲーション前（例えば、活性化前）の精製された多糖を指す。

【0049】

好ましい実施形態においては、精製された多糖は、莢膜多糖が本明細書に上記された分子量範囲の1つの中にある分子量を有する、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）の血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fまたは33Fに由来する莢膜多糖である。

【0050】

本明細書で用いられる場合、多糖または担体タンパク質-多糖コンジュゲートの「分子量」という用語は、多角レーザー光散乱検出器（MALLS）と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により算出される分子量を指す。

【0051】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型9V、18C、11A、15B、22Fおよび／または33Fに由来する肺炎球菌糖類は、O-アセチル化されている。いくつかの実施形態においては、本発明の血清型9V、11A、15B、22Fおよび／または33Fに由来する肺炎球菌糖類は、O-アセチル化されている。

【0052】

本明細書に記載の精製された多糖を化学的に活性化して、担体タンパク質と反応することができる糖類を作製する。これらの肺炎球菌コンジュゲートを、別々のプロセスによって調製し、以下に記載の単一用量製剤に製剤化する。

【0053】

1. 2. 1 ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fに由来する肺炎球菌多糖

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fに由来する莢膜糖類を、当業者には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、WO2006/110381を参照されたい）。莢膜多糖を、培地中でそれぞれのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型を増殖させることにより生産することができる；増殖サイクルの終わりに、細胞を溶解した後、溶解物培養液を下流の（精製）プロセスのために収獲する。個々の多糖は、典型的には、遠心分離、沈降、限外濾過、および／またはカラムクロマトグラフィーにより精製される（例えば、WO2006/110352およびWO2008/118752を参照されたい）。精製された多糖を、本明細書にさらに記載されるようにさらにプロセッシングして、本発明のグリココンジュゲートを調製することができる。

【0054】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび／または23Fに由来する精製された多糖は、10kDa～4,000kDaの分子量を有する。他のそのような実施形態においては、多糖は、50kDa～4,000kDa；50kDa～3,000kDaまたは50kDa～2,000kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、多糖は、50kDa～3,500kDa；50kDa～3,000kDa；50kDa～2,500kDa；50kDa～2,000kDa；50kDa～1,750kDa；50kDa

～1, 500 kDa; 50 kDa～1, 250 kDa; 50 kDa～1, 000 kDa;
 50 kDa～750 kDa; 50 kDa～500 kDa; 100 kDa～4, 000 kDa;
 100 kDa～3, 500 kDa; 100 kDa～3, 000 kDa; 100 kDa
 ～2, 500 kDa; 100 kDa～2, 000 kDa; 100 kDa～1, 750 kDa;
 100 kDa～1, 500 kDa; 100 kDa～1, 250 kDa; 100 kDa
 ～1, 000 kDa; 100 kDa～750 kDa; 100 kDa～500 kDa; 20
 0 kDa～4, 000 kDa; 200 kDa～3, 500 kDa; 200 kDa～3, 0
 00 kDa; 200 kDa～2, 500 kDa; 200 kDa～2, 000 kDa; 20
 0 kDa～1, 750 kDa; 200 kDa～1, 500 kDa; 200 kDa～1, 2
 50 kDa; 200 kDa～1, 000 kDa; 200 kDa～750 kDa; または2
 00 kDa～500 kDaの分子量を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が
 、本開示の実施形態として企図される。

【0055】

多糖は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってよい。さらに
 、本明細書に記載のように、多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけて
 もよい。上記の分子量範囲は、最終的なサイジングステップの後、コンジュゲーションの
 前（例えば、活性化の前）の精製された多糖を指す。

【0056】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型9Vおよび／または18Cに由来する
 肺炎球菌糖類は、O-アセチル化されている。いくつかの実施形態においては、本発明の
 血清型9Vに由来する肺炎球菌糖類は、O-アセチル化されており、本発明の血清型18
 Cに由来する肺炎球菌糖類は、脱-O-アセチル化されている。

【0057】

1. 2. 2 肺炎球菌多糖血清型8

血清型8の多糖反復単位は、1つのグルクロン酸 (Glc pA)、2つのグルコピラノ
 ース (Glc p) および1つのガラクトピラノース (Gal p) を有する直鎖状四糖類か
 らなる (Jonesら (1957) The Journal of the American Chemical Society, 79 (11): 2787～2793)。
 4つ全ての単糖類は、図1に示されるように1, 4-結合により連結される。

【0058】

血清型8の糖類を、当業者には公知の単離手順を用いて細菌から直接得ることができる
 (例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/022838
 1号、第2007/0184071号、第2007/0184072号、第2007/0
 231340号、および第2008/0102498号、ならびにWO2008/118
 752に開示された方法を参照されたい)。さらに、それらを、合成プロトコールを用い
 て生産することができる。

【0059】

血清型8のストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 株を、確
 立された培養株保存機関 (例えば、Streptococcal Reference
 Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) など) または臨床標本から得るこ
 とができる。

【0060】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前のストレプトコッカス・ニュー
 モニエ (S. pneumoniae) 血清型8に由来する精製された多糖は、10 kDa
 ～2, 000 kDaの分子量を有する。一実施形態においては、莢膜多糖は、50 kDa
 ～1, 000 kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、70 kD
 a～900 kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、100 kD
 a～800 kDaの分子量を有する。

【0061】

10

20

30

40

50

さらなる実施形態においては、莢膜多糖は、100kDa～600kDa；100kDa～500kDa；100kDa～400kDa；150kDa～600kDa；150kDa～500kDa；150kDa～400kDa；200kDa～600kDa；200kDa～500kDa；200kDa～400kDa；250kDa～600；250kDa～500kDa；250kDa～400kDa；250kDa～350kDa；300kDa～600kDa；300kDa～500kDa；300kDa～400kDa；400kDa～600kDa；500kDa～600kDaの分子量；および同様の所望の分子量範囲を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0062】

10

多糖は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってよい。さらに、本明細書に記載のように、多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけてもよい。上記の分子量範囲は、最終的なサイジングステップの後、コンジュゲーションの前（例えば、活性化の前）の精製された多糖を指す。

【0063】

1. 2. 3 肺炎球菌多糖血清型10A

血清型10Aの多糖反復単位は、2つのガラクトフラノース（Gal_f）、3つのガラクトピラノース（Gal_p）、1つのN-アセチルガラクトサミン（Gal_pNAc）およびホスホリビトール骨格を有する分枝状六糖類反復単位からなる（Jones, C. (2005) Carbohydrate Research 269 (1): 175～181）。図2に示されるように、β-Gal_pNAc部分（β-3-Gal_pおよびβ-6-Gal_f）に2つの分枝単糖類が存在する。

20

【0064】

血清型10Aの糖類を、当業者には公知の単離手順を用いて細菌から直接得ることができる（例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2007/0184071号、第2007/0184072号、第2007/0231340号、および第2008/0102498号、ならびにWO2008/118752に開示された方法を参照されたい）。さらに、それらを、合成プロトコールを用いて生産することができる。

【0065】

30

血清型10Aのストレプトコッカス・ニューモニエ（S. pneumoniae）株を、確立された培養株保存機関（例えば、Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA) など）または臨床標本から得ることができる。

【0066】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前のストレプトコッカス・ニューモニエ（S. pneumoniae）血清型10Aに由来する精製された多糖は、10kDa～2,000kDaの分子量を有する。一実施形態においては、莢膜多糖は、50kDa～1,000kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、70kDa～900kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、100kDa～800kDaの分子量を有する。

40

【0067】

さらなる実施形態においては、莢膜多糖は、100kDa～600kDa；100kDa～500kDa；100kDa～400kDa；150kDa～600kDa；150kDa～500kDa；150kDa～400kDa；200kDa～600kDa；200kDa～500kDa；200kDa～400kDa；250kDa～600kDa；250kDa～500kDa；250kDa～400kDa；250kDa～350kDa；300kDa～600kDa；300kDa～500kDa；300kDa～400kDa；400kDa～600kDa；500kDa～600kDaの分子量；および

50

同様の所望の分子量範囲を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0068】

多糖は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってよい。さらに、本明細書に記載のように、多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけてもよい。上記の分子量範囲は、最終的なサイジングステップの後、コンジュゲーションの前（例えば、活性化の前）の精製された多糖を指す。

【0069】

1. 2. 4 肺炎球菌多糖血清型 11A

血清型 11A の多糖反復単位は、図 3 に示されるように、直鎖状四糖類骨格（2 つのガラクトピラノース（Gal_p）および 2 つのグルコピラノース（Glc_p））およびペンダントホスホグリセロールからなる（Richards ら（1988）Adv. Exp. Med. Biol. 228: 595～597）。多糖は、複数の位置で O-アセチル化されており、文献（Calix ら（2011）J. Bacteriol. 193（19）: 5271～5278）中の報告されたデータに基づくと、11A 多糖中の O-アセチル化の総量は、多糖反復単位あたり約 2.6 個の O-アセチル基である。

【0070】

血清型 11A の糖類を、当業者には公知の単離手順を用いて細菌から直接得ることができる（例えば、米国特許出願公開第 2006/0228380 号、第 2006/0228381 号、第 2007/0184071 号、第 2007/0184072 号、第 2007/0231340 号、および第 2008/0102498 号、ならびに WO2008/118752 に開示された方法を参照されたい）。さらに、それらを、合成プロトコルを用いて生産することができる。

【0071】

血清型 11A のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）株を、確立された培養株保存機関（例えば、Streptococcal Reference Laboratory（Centers for Disease Control and Prevention、Atlanta、GA）など）または臨床標本から得ることができる。

【0072】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）溶解物に由来する血清型 11A 多糖の精製により得られた単離された血清型 11A 莢膜多糖および場合により、精製された多糖のサイジングを、例えば、分子量（MW）および前記血清型 11A 莢膜多糖 1 mM あたりのアセテートの mM を含む、様々な属性により特徴付けることができる。

【0073】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 11A に由来する精製された多糖は、10 kDa～2,000 kDa の分子量を有する。一実施形態においては、莢膜多糖は、50 kDa～1,000 kDa の分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、70 kDa～900 kDa の分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、100 kDa～800 kDa の分子量を有する。

【0074】

さらなる実施形態においては、莢膜多糖は、100 kDa～600 kDa；100 kDa～500 kDa；100 kDa～400 kDa；100 kDa～300 kDa；100 kDa～200 kDa；150 kDa～600 kDa；150 kDa～500 kDa；150 kDa～400 kDa；150 kDa～300 kDa；150 kDa～200 kDa；200 kDa～600 kDa；200 kDa～500 kDa；200 kDa～400 kDa；250 kDa～600 kDa；250 kDa～500 kDa；250 kDa～400 kDa；250 kDa～350 kDa；300 kDa～600 kDa；300 kDa～

10

20

30

40

50

500 kDa；300 kDa～400 kDa；400 kDa～600 kDa；500 kDa～600 kDaの分子量；および同様の所望の分子量範囲を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0075】

多糖は、通常の精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってよい。さらに、本明細書に記載のように、多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけてもよい。上記の分子量範囲は、最終的なサイジングステップの後、コンジュゲーションの前（例えば、活性化の前）の精製された多糖を指す。

【0076】

1つの実施形態においては、精製された血清型11A多糖のサイズを、高圧均一化により減少させる。高圧均一化は、十分に小さい寸法を有する流路を通してプロセス流をポンプすることにより高い剪断速度を達成する。剪断速度は、より大きい印加される均一化圧力を用いることにより増大し、ホモジェナイザーにより供給流を再循環させることにより曝露時間を増大させることができる。

【0077】

高圧均一化プロセスは、O-アセチル基の存在などの、多糖の構造的特徴を保持しながら、精製された血清型11A多糖のサイズを減少させるのに特に好適である。

【0078】

精製された、単離された、もしくは活性化された血清型11A莢膜多糖中または血清型11A多糖-担体タンパク質コンジュゲート中のO-アセチルの存在は、前記多糖1 mMあたりのアセテートのmM数として、または多糖反復単位あたりのO-アセチル基の数として表される。

【0079】

好ましい実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型11Aに由来する精製された多糖は、前記血清型11A莢膜多糖1 μmolあたり、少なくとも0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4または1.6 μmolのアセテートを有する。

【0080】

1.2.5 肺炎球菌多糖血清型12F

血清型12Fの多糖反復単位は、図4に示されるように、2つの分枝：Fuc_pNAcのC3で連結されたペンダントα-ガラクトピラノース（Gal_p）およびMan_pNAcAのC3で連結されたα-Glc_p-(1→2)-α-Glc_p二糖類分枝を有する、直鎖状三糖類骨格（1つのN-アセチルフコサミン（Fuc_pNAc）、1つのN-アセチルガラクトサミン（Gal_pNAc）および1つのN-アセチルマヌロン酸（Man_pNAcA））からなる（Leonteinら（1983）*Carbohydrate Research* 114（2）：257～266）。

【0081】

血清型12Fのストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）株を、確立された培養株保存機関（例えば、*Streptococcal Reference Laboratory*（Centers for Disease Control and Prevention、Atlanta、GA）など）または臨床標本から得ることができる。

【0082】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来する莢膜糖類は、当業者には公知の標準的な技術により調製される。典型的には、莢膜多糖を、培地（例えば、ダイズ系培地）中でそれぞれのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型を増殖させることにより生産した後、多糖を細菌培養物から調製する。生物の集団（ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12F）を、種バイアルから種ボトルまでスケールアップし、生産規模の発酵容量に達するまで増大する容量の1つまたは複数の種発酵器により継代することが

10

20

30

40

50

多い。増殖サイクルの終わりに、細胞を溶解した後、溶解物培養液を、下流の（精製）プロセスのために収穫する（例えば、WO2006/110381およびWO2008/118752、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2008/0102498号、および第2008/0286838号を参照されたい）。多糖を、典型的には、遠心分離、沈降、限外濾過、および／またはカラムクロマトグラフィーにより精製する（例えば、WO2006/110352およびWO2008/118752を参照されたい）。

【0083】

本明細書にさらに記載されるように、血清型12Fに由来する精製された多糖を、活性化（例えば、化学的に活性化）して、それらを反応することができるようにした後、本発明のグリココンジュゲート中に組み込むことができる。

10

【0084】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来する精製された多糖は、10 kDa～2,000 kDaの分子量を有する。一実施形態においては、莢膜多糖は、50 kDa～1,000 kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、50 kDa～300 kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、70 kDa～300 kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、莢膜多糖は、90 kDa～250 kDa；90 kDa～150 kDa；90 kDa～120 kDa；80 kDa～120 kDa；70 kDa～100 kDa；70 kDa～110 kDa；70 kDa～120 kDa；70 kDa～130 kDa；70 kDa～140 kDa；70 kDa～150 kDa；70 kDa～160 kDa；80 kDa～110 kDa；80 kDa～120 kDa；80 kDa～130 kDa；80 kDa～140 kDa；80 kDa～150 kDa；80 kDa～160 kDa；90 kDa～110 kDa；90 kDa～120 kDa；90 kDa～130 kDa；90 kDa～140 kDa；90 kDa～150 kDa；90 kDa～160 kDa；100 kDa～120 kDa；100 kDa～130 kDa；100 kDa～140 kDa；100 kDa～150 kDa；100 kDa～160 kDaの分子量；および同様の所望の分子量範囲を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

20

【0085】

多糖は、通常の前記精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってもよい。さらに、本明細書に記載のように、多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけてもよい。上記の分子量範囲は、最終的なサイジングステップの後、コンジュゲーションの前（例えば、活性化の前）の精製された多糖を指す。

30

【0086】

1. 2. 6 肺炎球菌多糖血清型15B

図5に示されるように、血清型15Bの多糖反復単位は、Glc_pNAcのC4ヒドロキシル基に連結されたαGal_p–βGal_p二糖類を有する、分枝状三糖類骨格（1つのN-アセチルグルコサミン（Glc_pNAc）、1つのガラクトピラノース（Gal_p）および1つのグルコピラノース（Glc_p））からなる。ホスホグリセロールを、二糖類分枝中のβGal_p残基のC3ヒドロキシル基に連結する（Jonesら（2005）*Carbohydrate Research* 340（3）：403～409）。血清型15Cに由来する莢膜多糖は、血清型15Bと同一の骨格構造を有するが、O-アセチル化を欠く。

40

【0087】

血清型15B多糖を、当業者には公知の単離手順を用いて細菌から直接得ることができる（例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2007/0184071号、第2007/0184072号、第2007/0231340号、および第2008/0102498号、ならびにWO2008/118752に開示された方法を参照されたい）。また、それらを、当業者には公知の合成プ

50

ロトコールを用いて生産することができる。

【0088】

血清型15Bのストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 株を、確立された培養株保存機関 (例えば、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA USA) など (例えば、寄託株 ATCC 10354) もしくは Streptococcal Reference Laboratory (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA USA)) または臨床標本から得ることができる。

【0089】

細菌細胞を、培地、好ましくはダイズ系培地中で増殖させる。ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型15B莢膜多糖を生産する細菌細胞の発酵後、細菌細胞を溶解して、細胞溶解物を得る。次いで、血清型15Bの多糖を、遠心分離、深層濾過、沈降、限外濾過、活性炭を用いる処理、透析濾過および／またはカラムクロマトグラフィーの使用を含む、当技術分野で公知の精製技術を用いて細胞溶解物から単離することができる (例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2007/0184071号、第2007/0184072号、第2007/0231340号、および第2008/0102498号、ならびにWO2008/118752を参照されたい)。次いで、精製された血清型15Bの莢膜多糖を、免疫原性コンジュゲートの調製のために用いることができる。

【0090】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 溶解物からの血清型15B多糖の精製により得られる単離された血清型15B莢膜多糖および場合により、精製された多糖のサイジングを、例えば、分子量 (MW)、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmM、および前記血清型15B莢膜多糖1mMあたりのグリセロールのmMを含む、様々なパラメータにより特徴付けることができる。

【0091】

好ましくは、有利な濾過特徴および／または収率を有する15Bコンジュゲートを生成するために、標的分子量範囲への多糖のサイジングを、担体タンパク質へのコンジュゲーションの前に実施する。有利には、精製された血清型15B多糖のサイズを、例えば、O-アセチル基の存在などの多糖の構造の重要な特徴を保持しながら減少させる。好ましくは、精製された血清型15B多糖のサイズを、機械的均一化により減少させる。

【0092】

好ましい実施形態においては、精製された血清型15B多糖のサイズを、高圧均一化により減少させる。高圧均一化は、十分に小さい寸法を有する流路を通してプロセス流をポンプすることにより高い剪断速度を達成する。剪断速度は、より大きい印加される均一化圧力を用いることにより増大し、ホモジェナイザーにより供給流を再循環させることにより曝露時間を増大させることができる。

【0093】

高圧均一化プロセスは、O-アセチル基の存在などの、多糖の構造的特徴を保持しながら、精製された血清型15B多糖のサイズを減少させるのに特に好適である。

【0094】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、5kDa~500kDa、50kDa~500kDa、50kDa~450kDa、100kDa~400kDa、および100kDa~350kDaの分子量を有する。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、100kDa~350kDaの分子量を有する。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、100kDa~300kDaの分子量を有する。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa~300kDaの分子量を有する。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa~350kDaの分子量を有する

。さらなる実施形態においては、莢膜多糖は、100kDa～500kDa；100kDa～400kDa；100kDa～300kDa；100kDa～200kDa；150kDa～500kDa；150kDa～400kDa；150kDa～300kDa；150kDa～200kDa；200kDa～500kDa；200kDa～400kDa；250kDa～500kDa；250kDa～400kDa；250kDa～350kDa；300kDa～500kDa；300kDa～400kDaの分子量；および同様の所望の分子量範囲を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0095】

血清型15Bの多糖は、O-アセチル化されており、O-アセチル化の総量は、多糖反復単位あたり約0.8～0.9個のO-アセチル基である。多糖のO-アセチル化の程度を、当技術分野で公知の任意の方法により、例えば、プロトンNMR（例えば、Lemercinierら（1996）Carbohydrate Research 296：83～96；Jonesら（2002）J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30：1233～1247；WO2005/033148およびWO00/56357を参照されたい）により決定することができる。別の一般的に用いられる方法は、Hestrin, S.（1949）J. Biol. Chem. 180：249～261に記載されている。好ましくは、O-アセチル基の存在は、イオン-HPLC分析により決定される。

【0096】

精製された、単離された、もしくは活性化された血清型15B莢膜多糖中、または血清型15B多糖-担体タンパク質コンジュゲート中のO-アセチルの存在は、前記多糖1mMあたりのアセテートのmM数として、または多糖反復単位あたりのO-アセチル基の数として表される。

【0097】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7または0.8mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.5、0.6または0.7mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.7mMのアセテートを含む。

【0098】

グリセロールリン酸側鎖の存在は、多糖をフッ化水素酸（HF）で処理することによって遊離させた後にパルスアンペロメトリック検出（HPAEC-PAD）を用いた高速陰イオン交換クロマトグラフィーを使用してグリセロールを測定することにより決定される。精製された、単離された、もしくは活性化された血清型15B多糖における、または血清型15B多糖-担体タンパク質コンジュゲートにおけるグリセロールの存在は、血清型15B多糖1mMあたりのグリセロールのmM数として表される。

【0099】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7または0.8mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.5、0.6または0.7mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.7mMのグリセロールを含む。

。

10

20

30

40

50

【0100】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、100kDa～350kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含む。

【0101】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、100kDa～350kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。

【0102】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa～300kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含む。

10

【0103】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa～300kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。

【0104】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa～350kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含む。

20

【0105】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa～350kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。

【0106】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートおよび前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。

【0107】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、100kDa～350kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートおよび前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。

30

【0108】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa～300kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートおよび前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。

【0109】

好ましい実施形態においては、単離された血清型15B莢膜多糖は、150kDa～350kDaの分子量を有し、前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートおよび前記血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。

40

【0110】

1. 2. 7 肺炎球菌多糖血清型22F

図6に示されるように、血清型22Fの多糖反復単位は、 β Rha_pのC3ヒドロキシル基に連結された α Glc_p分枝を有する分枝状五糖類骨格（1つのグルクロン酸（Glc_pA）、1つのグルコピラノース（Glc_p）、1つのガラクトフラノース（Gal_f）および2つのラムノピラノース（Rha_p））からなる（Richardsら（1989）、Canadian Journal of Chemistry 67（6）：1

50

038～1050)。多糖反復単位中の β Rhap残基の約80%のC2ヒドロキシル基がO-アセチル化されている。

【0111】

血清型22F多糖を、当業者には公知の単離手順を用いて細菌から直接得ることができる（例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2007/0184071号、第2007/0184072号、第2007/0231340号、および第2008/0102498号、ならびにWO2008/118752に開示された方法を参照されたい）。さらに、それらを、合成プロトコルを用いて生産することができる。

【0112】

血清型22Fのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）株を、確立された培養株保存機関（例えば、Streptococcal Reference Laboratory（Centers for Disease Control and Prevention、Atlanta、GA）など）または臨床標本から得ることができる。

【0113】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）溶解物からの血清型22F多糖の精製により得られる単離された血清型22F莢膜多糖および場合により、精製された多糖のサイジングを、例えば、分子量（MW）および前記血清型22F莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMを含む、様々なパラメータにより特徴付けることができる。

【0114】

好ましくは、有利な濾過特徴および／または収率を有する血清型22Fコンジュゲートを生成するために、標的分子量範囲への多糖のサイジングを、担体タンパク質へのコンジュゲーションの前に実施する。有利には、精製された血清型22F多糖のサイズを、例えば、O-アセチル基の存在などの多糖の構造の重要な特徴を保持しながら減少させる。好ましくは、精製された血清型22F多糖のサイズを、機械的均一化により減少させる。

【0115】

好ましい実施形態においては、精製された多糖のサイズを、高圧均一化により減少させる。高圧均一化は、十分に小さい寸法を有する流路を通してプロセス流をポンプすることにより高い剪断速度を達成する。剪断速度は、より大きい印加される均一化圧力を用いることにより増大し、ホモジェナイザーにより供給流を再循環させることにより曝露時間を増大させることができる。

【0116】

高圧均一化プロセスは、O-アセチル基の存在などの、多糖の構造的特徴を保持しながら、精製された血清型22F多糖のサイズを減少させるのに特に好適である。

【0117】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型22Fからの精製された多糖は、10kDa～2,000kDaの分子量を有する。一実施形態においては、莢膜多糖は、50kDa～1,000kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、70kDa～900kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、100kDa～800kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、200kDa～600kDaの分子量を有する。別の実施形態においては、莢膜多糖は、400kDa～700kDaの分子量を有する。

【0118】

さらなる実施形態においては、莢膜多糖は、100kDa～1,000kDa；100kDa～900kDa；100kDa～800kDa；100kDa～700kDa；100kDa～600kDa；100kDa～500kDa；100kDa～400kDa；100kDa～300kDa；150kDa～1,000kDa；150kDa～90

10

20

30

40

50

0 kDa ; 150 kDa ~ 800 kDa ; 150 kDa ~ 700 kDa ; 150 kDa ~ 600 kDa ; 150 kDa ~ 500 kDa ; 150 kDa ~ 400 kDa ; 150 kDa ~ 300 kDa ; 200 kDa ~ 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 kDa ; 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 ; 500 kDa ~ 600 kDa の分子量 ; および同様の所望の分子量範囲を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

10

【0119】

多糖は、通常の前製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってもよい。さらに、本明細書の上記に記載のように、22F多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけてもよい。上記の分子量範囲は、最終的なサイジングステップの後、コンジュゲーションの前（例えば、活性化の前）の前製された多糖を指す。

20

【0120】

多糖のO-アセチル化の程度を、当技術分野で公知の任意の方法により、例えば、プロトンNMR (Lemer c i n i e r ら (1996) Carbohydrate Research 296:83~96; Jones ら (2002) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30:1233~1247; WO2005/033148 および WO00/56357 を参照されたい) により決定することができる。別の一般的に用いられる方法は、Hestrin, S. (1949) J. Biol. Chem. 180:249~261 に記載されている。好ましくは、O-アセチル基の存在は、イオン-HPLC 分析により決定される。

【0121】

前製された、単離された、もしくは活性化された血清型22F莢膜多糖中、または血清型22F多糖-担体タンパク質コンジュゲート中のO-アセチルの存在は、前記多糖1mMあたりのアセテートのmM数として、または多糖反復単位あたりのO-アセチル基の数として表される。

30

【0122】

好ましい実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22Fからの前製された多糖は、前記血清型22F莢膜多糖1μmolあたり少なくとも0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4または1.6μmolのアセテートを有する。

【0123】

1.2.8 肺炎球菌多糖血清型33F

図7に示されるように、血清型33Fの多糖反復単位は、骨格内のαGal_p残基のC2ヒドロキシル基に連結された末端αGal_pを有する分枝状五糖類骨格 (2つのガラクトピラノース (Gal_p)、2つのガラクトフラノース (Gal_f) および1つのグルコピラノース (Glc_p) からなる (Lemer c i n i e r ら (2006)、Carbohydrate Research 341(1):68~74)。骨格3-β-Gal_f残基のC2ヒドロキシル基がO-アセチル化されていることが文献中で報告されている。

【0124】

血清型33F多糖を、当業者には公知の単離手順を用いて細菌から直接得ることができ

40

50

る（例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2007/0184071号、第2007/0184072号、第2007/0231340号、および第2008/0102498号、ならびにWO2008/118752に開示された方法を参照されたい）。さらに、それらを、合成プロトコルを用いて生産することができる。

【0125】

血清型33Fのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）株を、確立された培養株保存機関（例えば、Streptococcal Reference Laboratory（Centers for Disease Control and Prevention、Atlanta、GA）など）または臨床標本から得ることができる。

10

【0126】

血清型33Fからの精製された多糖を活性化（例えば、化学的に活性化）して、それらが反応できるようにした後、本明細書にさらに記載されるように、本発明のグリココンジュゲート中に組み込むことができる。

【0127】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）溶解物からの血清型33F多糖の精製により得られる単離された血清型33F莢膜多糖および場合により、精製された多糖のサイジングを、例えば、分子量および前記血清型33F莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMを含む、様々なパラメータにより特徴付けることができる。

20

【0128】

いくつかの実施形態においては、コンジュゲーション前のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型33Fからの精製された多糖は、10kDa～2,000kDaの分子量を有する。他のそのような実施形態においては、糖類は、50kDa～2,000kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、糖類は、50kDa～1,750kDa；50kDa～15,000kDa；50kDa～1,250kDa；50kDa～1,000kDa；50kDa～7500kDa；50kDa～500kDa；100kDa～2,000kDa；100kDa～1,750kDa；100kDa～1,500kDa；100kDa～1,250kDa；100kDa～1,000kDa；100kDa～750kDa；100kDa～500kDa；200kDa～2,000kDa；200kDa～1,750kDa；200kDa～1,500kDa；200kDa～1,250kDa；200kDa～1,000kDa；200kDa～750kDa；または200kDa～500kDaの分子量を有する。上記の範囲のいずれかの中の全ての整数は本開示の実施形態と企図される。

30

【0129】

多糖は、通常の前記精製手順の間にサイズがわずかに減少するようになってもよい。さらに、本明細書に記載のように、多糖を、コンジュゲーションの前にサイジング技術にかけてもよい。上記の分子量範囲は、最終的なサイジングステップの後、コンジュゲーションの前（例えば、活性化の前）の精製された多糖を指す。

【0130】

精製された、単離された、もしくは活性化された血清型33F莢膜多糖中、または血清型33F多糖-担体タンパク質コンジュゲート中のO-アセチルの存在は、前記多糖1mMあたりのアセテートのmM数として、または多糖反復単位あたりのO-アセチル基の数として表される。

40

【0131】

好ましい実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型33Fからの精製された多糖は、前記血清型33F莢膜多糖1μmolあたり少なくとも0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4または1.6μmolのアセテートを有する。

【0132】

50

1. 3 本発明のグリココンジュゲート

精製された糖類は、担体タンパク質と反応することができる糖類（すなわち、活性化された糖類）を作製するために化学的に活性化される。一度活性化されたら、それぞれの莢膜糖類は、担体タンパク質に別々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。一実施形態においては、それぞれの莢膜糖類は、同じ担体タンパク質にコンジュゲートされている。糖類の化学的活性化およびその後の担体タンパク質へのコンジュゲーションは、本明細書に開示される活性化およびコンジュゲーションの方法によって達成することができる。

【0133】

1. 3. 1 ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来するグリココンジュゲート

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) の血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来する莢膜多糖は、当業者には公知の標準的な技術により調製される（例えば、WO 2006/110381、WO 2008/118752、WO 2006/110352、ならびに米国特許出願公開第 2006/0228380 号、第 2006/0228381 号、第 2008/0102498 号、および第 2008/0286838 号を参照されたい）。

【0134】

1つの実施形態において、多糖を、1-シアノー-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸 (CDAP) を用いて活性化して、シアン酸エステルを形成させる。次いで、活性化された多糖を、担体タンパク質（好ましくは、CRM₁₉₇）上のアミノ基に、直接、またはスペーサー（リンカー）基を介してカップリングさせる。例えば、スペーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド活性化担体タンパク質（例えば、N-[γ-マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル (GMB S) を用いる）またはハロアセチル化担体タンパク質（例えば、ヨードアセトイミド、N-スクシンイミジルプロモアセテート (SBA; SIB)、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノ安息香酸 (SIB)、スルホスクシンイミジル (4-ヨードアセチル) アミノ安息香酸 (スルホ-SIB)、N-スクシンイミジルヨードアセテート (SIA) もしくはスクシンイミジル 3-[プロモアセトアミド]プロピオネート (SBAP)）との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル (CDAP 化学反応により作製されていてもよい) を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) とカップリングし、アミノ誘導体化糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド（例えば、EDAC または EDC）化学反応を用いて担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）にコンジュゲートする。そのようなコンジュゲートは、例えば、WO 93/15760、WO 95/08348 および WO 96/129094 に記載されている。

【0135】

コンジュゲーションのための他の好適な技術は、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NH₂、EDC、TSTU を用いる。多くは、国際特許出願公開第 WO 98/42721 号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基と 1, 1'-カルボニルジイミダゾール (CDI) との反応 (Bethell ら (1979)、J. Biol. Chem. 254: 2572~2574; Hearn ら (1981)、J. Chromatogr. 218: 509~518 を参照されたい)、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護/脱保護、CDI カルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基と CDI との反応および CDI カルバメート中間体とタンパク質上

10

20

30

40

50

のアミノ基とのカップリングを含んでもよい。

【0136】

好ましい実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) の血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来する少なくとも 1 つの莢膜多糖を、還元的アミノ化 (米国特許出願公開第 2006/0228380 号、第 2007/0231340 号、第 2007/0184071 号、および第 2007/0184072 号、WO 2006/110381、WO 2008/079653、および WO 2008/143709 に記載のような) により担体タンパク質にコンジュゲートさせる。好ましい実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) の血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来する莢膜多糖を、還元的アミノ化により担体タンパク質に全てコンジュゲートさせる。

10

【0137】

還元的アミノ化は、2 つのステップ、(1) 多糖の酸化、(2) コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元を含む。酸化の前に、多糖を加水分解してもよい。機械的または化学的加水分解を用いることができる。化学的加水分解を、酢酸を用いて行うことができる。酸化ステップは、過ヨウ素酸塩との反応を含んでもよい。本発明の目的では、用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む；この用語はまた、メタ過ヨウ素酸塩 (IO_4^-) とオルト過ヨウ素酸塩 (IO_6^{5-}) の両方および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) も含む。

20

【0138】

1 つの実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) の血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F または 23 F に由来する莢膜多糖を、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 (NaIO_4) の存在下で酸化させる。別の実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) の血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来する莢膜多糖を、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せる。

【0139】

多糖の酸化ステップの後、多糖は活性化されると言われ、本明細書の以下では「活性化された多糖」と呼ばれる。活性化された多糖および担体タンパク質を、独立に (個別凍結乾燥) または一緒に (同時凍結乾燥)、凍結乾燥 (凍結-乾燥) することができる。一実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質は同時に凍結乾燥される。別の実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質は独立に凍結乾燥される。

30

【0140】

一実施形態においては、凍結乾燥は、非還元糖の存在下で行われ、可能な非還元糖としては、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびバラチニットが挙げられる。

40

【0141】

コンジュゲーションプロセスの第 2 のステップは、還元剤を用いた、コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元 (いわゆる、還元的アミノ化) である。好適である還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどのシアノ水素化ホウ素、ボラン-ピリジン、または水素化ホウ素交換樹脂が挙げられる。一実施形態においては、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

【0142】

1 つの実施形態において、還元反応は、水性溶媒中で実行され、別の実施形態においては、反応は非プロトン性溶媒中で実行される。1 つの実施形態において、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) 溶媒中で実行さ

50

れる。DMSOまたはDMF溶媒を用いて、凍結乾燥された活性化された多糖および担体タンパク質を復元させることができる。

【0143】

還元反応の終わりに、コンジュゲート中に残存する未反応のアルデヒド基があってもよく、これらのものを好適なキャッピング剤を用いてキャップすることができる。一実施形態においては、このキャッピング剤は、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) である。コンジュゲーション（還元反応および場合により、キャッピング）の後、グリココンジュゲートを精製することができる。グリココンジュゲートを、透析濾過および／またはイオン交換クロマトグラフィーおよび／またはサイズ排除クロマトグラフィーにより精製することができる。1つの実施形態において、グリココンジュゲートは透析濾過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。一実施形態においては、グリココンジュゲートは滅菌濾過される。

10

【0144】

いくつかの実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型9Vおよび／または18Cに由来するグリココンジュゲートは、10%~100%、20%~100%、30%~100%、40%~100%、50%~100%、60%~100%、70%~100%、75%~100%、80%~100%、90%~100%、50%~90%、60%~90%、70%~90%または80%~90%のO-アセチル化度を有する糖類を含む。他の実施形態においては、O-アセチル化度は、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、もしくは90%以上、または約100%である。

20

【0145】

いくつかの実施形態においては、本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型9Vおよび／または18Cに由来するグリココンジュゲートは、O-アセチル化されている。いくつかの実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型9Vに由来するグリココンジュゲートはO-アセチル化されており、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型18Cに由来するグリココンジュゲートは、脱-O-アセチル化されている。

【0146】

1. 3. 2 ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型22Fに由来するグリココンジュゲート

30

1つの実施形態において、血清型22Fグリココンジュゲートは、1-シアノー-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸 (CDAP) を用いて多糖を活性化して、シアン酸エステルを形成させることにより得られる。活性化された多糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接、またはスペーサー（リンカー）基を介してカップリングさせることができる。例えば、スペーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド-活性化担体タンパク質（例えば、GMB Sを用いる）またはハロアセチル化担体タンパク質（例えば、ヨードアセトイミド、SIB、S IAB、スルホ-S IAB、S I A、もしくはS B A Pを用いる）との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル (CDAP 化学反応により作製されていてもよい) を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) とカップリングし、アミノ誘導体化された糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド（例えば、EDACまたはEDC）化学反応を用いて担体タンパク質にコンジュゲートさせる。そのようなコンジュゲートは、例えば、WO 93 / 1 5 7 6 0、WO 95 / 0 8 3 4 8 および WO 96 / 1 2 9 0 9 4 に記載されている。

40

【0147】

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、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを用い

50

る。多くは、国際特許出願公開第WO98/42721号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基とCDIとの反応(Bethellら(1979)、J. Biol. Chem. 254:2572~2574; Hearnら(1981)、J. Chromatogr. 218:509~518を参照されたい)、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護/脱保護、CDIカルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基とCDIとの反応および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を含んでもよい。

【0148】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型22Fグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。還元的アミノ化は、2つのステップ、(1)個々の六糖単位中の隣接ジオールからアルデヒド官能基を生成するための多糖の酸化、(2)コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質(例えば、CRM₁₉₇)の還元を含む。

【0149】

好ましくは、酸化の前に、標的分子量(MW)範囲への血清型22F多糖のサイジングを実施する。有利には、精製された血清型22F多糖のサイズを、例えば、O-アセチル基の存在などの多糖の構造の重要な特徴を保持しながら減少させる。好ましくは、精製された血清型22F多糖のサイズを、機械的均一化により減少させる(上記のセクション1.2.7を参照されたい)。

【0150】

1つの実施形態において、血清型多糖は、
(a)単離された血清型22F多糖を、酸化剤と反応させるステップ；
(b)クエンチング剤の添加により酸化反応をクエンチして、活性化された血清型22F多糖を得るステップ
を含むプロセスにより活性化(酸化)する。

【0151】

好ましい実施形態においては、酸化剤は、過ヨウ素酸塩である。本発明の目的では、用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む；この用語はまた、メタ過ヨウ素酸塩(IO_4^-)とオルト過ヨウ素酸塩(IO_6^{5-})の両方および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)も含む。好ましい実施形態においては、酸化剤は、過ヨウ素酸ナトリウムである。好ましい実施形態においては、血清型22F多糖の酸化に用いられる過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸塩である。好ましい実施形態においては、血清型22F多糖の酸化に用いられる過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムである。

【0152】

一実施形態においては、クエンチング剤は、隣接ジオール、1,2-アミノアルコール、アミノ酸、グルタチオン、亜硫酸塩、重硫酸塩、亜ジチオン酸塩、メタ重亜硫酸塩、チオ硫酸塩、亜リン酸塩、次亜リン酸塩または亜リン酸から選択される。

【0153】

一実施形態においては、クエンチング剤は、式(I)：

【0154】

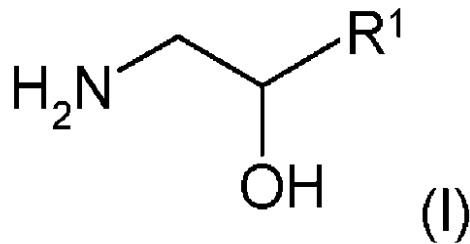
10

20

30

40

【化 1】



（式中、 R^1 は、H、メチル、エチル、プロピルまたはイソプロピルから選択される）の 10

【0155】

一実施形態においては、クエンチング剤は、亜硫酸塩、重硫酸塩、亜ジチオン酸塩、メタ重亜硫酸塩、チオ硫酸塩、亜リン酸塩、次亜リン酸塩または亜リン酸のナトリウムおよびカリウム塩から選択される。

【0156】

一実施形態においては、クエンチング剤は、アミノ酸である。そのような実施形態においては、前記アミノ酸を、セリン、トレオニン、システイン、シスチン、メチオニン、プロリン、ヒドロキシプロリン、トリプトファン、チロシン、およびヒスチジンから選択することができる。 20

【0157】

一実施形態においては、クエンチング剤は、重硫酸塩、亜ジチオン酸塩、メタ重亜硫酸塩、チオ硫酸塩などの亜硫酸塩である。

【0158】

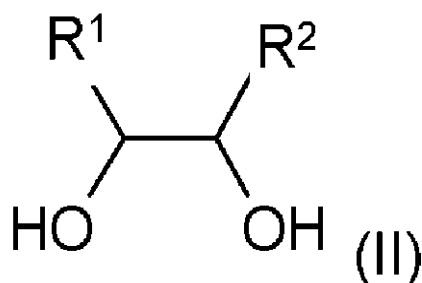
一実施形態においては、クエンチング剤は、2つの隣接ヒドロキシル基（隣接ジオール）、すなわち、2つの隣接する炭素原子に共有的に連結された2つのヒドロキシル基を含む化合物である。

【0159】

好ましくは、クエンチング剤は、式（II）：

【0160】

【化 2】



（式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に、H、メチル、エチル、プロピルまたはイソプロピルから選択される）の化合物である。 40

【0161】

好ましい実施形態においては、クエンチング剤は、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-ジオールもしくはブタン-2, 3-ジオール、またはアスコルビン酸である。好ましい実施形態においては、クエンチング剤は、ブタン-2, 3-ジオールである。

【0162】

好ましい実施形態においては、単離された血清型 22F 多糖は、

（a）単離された血清型 22F 多糖を過ヨウ素酸塩と反応させるステップ； 50

(b) ブタン-2, 3-ジオールの添加により酸化反応をクエンチングして、活性化された血清型 2 2 F 多糖を得るステップを含むプロセスにより活性化する。

【0163】

多糖の酸化ステップの後、多糖は活性化されると言われ、本明細書の以下では「活性化された多糖」と呼ばれる。

【0164】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は精製される。活性化された血清型 2 2 F 多糖は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、透析または限外濾過／透析濾過などの当業者には公知の方法に従って精製される。例えば、活性化された 2 2 F 多糖は、限外濾過装置を用いる濃縮および透析濾過により精製される。

10

【0165】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖の酸化度は、2～30、2～25、2～20、2～15、2～10、2～5、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、10～30、10～25、10～20、10～15、15～30、15～25、15～20、20～30、または20～25である。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖の酸化度は、2～10、4～8、4～6、6～8、6～12、8～14、9～11、10～16、12～16、14～18、16～20、16～18、18～22、または18～20である。

【0166】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、25 kDa～1,000 kDa、100 kDa～1,000 kDa、300 kDa～800 kDa、300 kDa～700 kDa、300 kDa～600 kDa、400 kDa～1,000 kDa、400 kDa～800 kDa、400 kDa～700 kDaまたは400 kDa～600 kDaの分子量を有する。1つの実施形態において、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、300 kDa～800 kDaの分子量を有する。1つの実施形態において、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、400 kDa～600 kDaの分子量を有する。好ましい実施形態において、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、400 kDa～600 kDaの分子量および10～25、10～20、12～20または14～18の酸化度を有する。好ましい実施形態において、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、400 kDa～600 kDaの分子量および10～20の酸化度を有する。

20

30

【0167】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、血清型 2 2 F 多糖 1 mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6もしくは0.7または約0.8 mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、血清型 2 2 F 多糖 1 mMあたり少なくとも0.5、0.6もしくは0.7 mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、血清型 2 2 F 多糖 1 mMあたり少なくとも0.6 mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、血清型 2 2 F 多糖 1 mMあたり少なくとも0.7 mMのアセテートを含む。

40

【0168】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、400 kDa～800 kDaの分子量を有し、血清型 2 2 F 多糖 1 mMあたり少なくとも0.6 mMのアセテートを含む。

【0169】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 2 2 F 多糖は、400 kDa～800 kDaの分子量、12～20の酸化度を有し、血清型 2 2 F 多糖 1 mMあたり少なくとも0.6 mMのアセテートを含む。

【0170】

活性化された多糖および／または担体タンパク質を、独立に（個別凍結乾燥）または一

50

緒に（同時凍結乾燥）凍結乾燥（凍結－乾燥）することができる。

【0171】

1つの実施形態において、活性化された血清型22F多糖を、場合により、糖類の存在下で凍結乾燥する。好ましい実施形態においては、糖類は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態においては、糖類はスクロースである。一実施形態においては、次いで、凍結乾燥された活性化された多糖を、担体タンパク質を含む溶液と混合する。

【0172】

別の実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質を同時に凍結乾燥する。そのような実施形態においては、活性化された血清型22F多糖を、担体タンパク質と混合し、場合により、糖類の存在下で凍結乾燥する。好ましい実施形態においては、糖類は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態においては、糖類はスクロースである。次いで、同時に凍結乾燥された多糖および担体タンパク質を、溶液中に再懸濁し、還元剤と反応させることができる。

【0173】

コンジュゲーションプロセスの第2のステップは、還元剤を用いて、コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元（還元的アミノ化）である。

【0174】

活性化された血清型22F多糖は、

(c) 活性化された血清型22F多糖を担体タンパク質と混合するステップ；ならびに
(d) 混合された活性化された血清型22F多糖および担体タンパク質を、還元剤と反応させて、血清型22F多糖－担体タンパク質コンジュゲートを形成させるステップを含むプロセスによって担体タンパク質にコンジュゲートさせることができる。

【0175】

1つの実施形態において、還元反応を水性溶媒中で実行し、別の実施形態においては、反応を非プロトン性溶媒中で実行する。1つの実施形態において、還元反応を、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）溶媒中で実行する。DMSOまたはDMF溶媒を用いて、凍結乾燥された活性化された多糖および担体タンパク質を還元させることができる。

【0176】

ジメチルスルホキシド（DMSO）中での還元的アミノ化による活性化された血清型22F多糖とタンパク質担体とのコンジュゲーションは、例えば、多糖のO-アセチル化のレベルを有意に低下させ得る水性相における還元的アミノ化と比較して、多糖のO-アセチル含量を保持するのに好適である。したがって、好ましい実施形態においては、ステップ(c)およびステップ(d)を、DMSO中で実行する。

【0177】

1つの実施形態において、還元剤は、BronstedまたはLewis酸の存在下のシアノ水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウムまた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、 $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$ 、ベンジルアミン- BH_3 または5-エチル-2-メチルピリジンボラン（PEMB）などのアミンボランである。好ましい実施形態においては、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

【0178】

還元反応の終わりに、コンジュゲート中に残存する未反応のアルデヒド基が存在してもよく、これらのものを、好適なキャッピング剤を用いてキャップすることができる。一実施形態においては、このキャッピング剤は、水素化ホウ素ナトリウム（ NaBH_4 ）であ

10

20

30

40

50

る。

【0179】

担体タンパク質への血清型22F多糖のコンジュゲーション後、グリココンジュゲートを、当業者には公知の様々な技術により精製する（多糖－タンパク質コンジュゲートの量に関して富化する）ことができる。これらの技術としては、透析、濃縮／透析濾過操作、接線流濾過沈降／溶出、カラムクロマトグラフィー（DEAEまたは疎水性相互作用クロマトグラフィー）、および深層濾過が挙げられる。

【0180】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型22Fグリココンジュゲートは、10 kDa～2,000 kDaの分子量を有する糖類を含む。他のそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa～1,000 kDaの分子量を有する。他のそのような実施形態においては、糖類は、70 kDa～900 kDaの分子量を有する。他のそのような実施形態においては、糖類は、100 kDa～800 kDaの分子量を有する。他のそのような実施形態においては、糖類は、200 kDa～600 kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、糖類は、100 kDa～1,000 kDa；100 kDa～900 kDa；100 kDa～800 kDa；100 kDa～700 kDa；100 kDa～600 kDa；100 kDa～500 kDa；100 kDa～400 kDa；100 kDa～300 kDa；150 kDa～1,000 kDa；150 kDa～900 kDa；150 kDa～800 kDa；150 kDa～700 kDa；150 kDa～600 kDa；150 kDa～500 kDa；150 kDa～400 kDa；150 kDa～300 kDa；200 kDa～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 kDa；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～1000 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；500 kDa～600 kDaの分子量を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。いくつかのそのような実施形態においては、血清型22Fグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

【0181】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型22Fグリココンジュゲートは、400 kDa～15,000 kDa；500 kDa～10,000 kDa；2,000 kDa～10,000 kDa；3,000 kDa～8,000 kDa；または3,000 kDa～5,000 kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、血清型22Fグリココンジュゲートは、500 kDa～10,000 kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、血清型22Fグリココンジュゲートは、1,000 kDa～8,000 kDaの分子量を有する。さらに他の実施形態においては、血清型22Fグリココンジュゲートは、2,000 kDa～8,000 kDaまたは3,000 kDa～7,000 kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型22Fグリココンジュゲートは、200 kDa～20,000 kDa；200 kDa～15,000 kDa；200 kDa～10,000 kDa；200 kDa～7,500 kDa；200 kDa～5,000 kDa；200 kDa～3,000 kDa；200 kDa～1,000 kDa；500 kDa～20,000 kDa；500 kDa～15,000 kDa；500 kDa～12,500 kDa；500 kDa～10,000 kDa；500 kDa～7,500 kDa；500 kDa～6,000 kDa；500 kDa～5,000 kDa；500 kDa

a~4, 000kDa; 500kDa~3, 000kDa; 500kDa~2, 000kDa; 500kDa~1, 500kDa; 500kDa~1, 000kDa; 750kDa~20, 000kDa; 750kDa~15, 000kDa; 750kDa~12, 500kDa; 750kDa~10, 000kDa; 750kDa~7, 500kDa; 750kDa~6, 000kDa; 750kDa~5, 000kDa; 750kDa~4, 000kDa; 750kDa~3, 000kDa; 750kDa~2, 000kDa; 750kDa~1, 500kDa; 1, 000kDa~15, 000kDa; 1, 000kDa~12, 500kDa; 1, 000kDa~10, 000kDa; 1, 000kDa~7, 500kDa; 1, 000kDa~6, 000kDa; 1, 000kDa~5, 000kDa; 1, 000kDa~4, 000kDa; 1, 000kDa~2, 500kDa; 2, 000kDa~15, 000kDa; 2, 000kDa~12, 500kDa; 2, 000kDa~10, 000kDa; 2, 000kDa~7, 500kDa; 2, 000kDa~6, 000kDa; 2, 000kDa~5, 000kDa; 2, 000kDa~4, 000kDa; または 2, 000kDa~3, 000kDa の分子量を有する。

【0182】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型 22F グリココンジュゲートは、3, 000kDa~20, 000kDa; 3, 000kDa~15, 000kDa; 3, 000kDa~10, 000kDa; 3, 000kDa~7, 500kDa; 3, 000kDa~5, 000kDa; 4, 000kDa~20, 000kDa; 4, 000kDa~15, 000kDa; 4, 000kDa~12, 500kDa; 4, 000kDa~10, 000kDa; 4, 000kDa~7, 500kDa; 4, 000kDa~6, 000kDa; または 4, 000kDa~5, 000kDa の分子量を有する。

【0183】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型 22F グリココンジュゲートは、5, 000kDa~20, 000kDa; 5, 000~15, 000kDa; 5, 000kDa~10, 000kDa; 5, 000kDa~7, 500kDa; 6, 000kDa~20, 000kDa; 6, 000kDa~15, 000kDa; 6, 000kDa~12, 500kDa; 6, 000kDa~10, 000kDa; または 6, 000kDa~7, 500kDa の分子量を有する。

【0184】

グリココンジュゲートの分子量は、SEC-MALLS により測定される。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0185】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型 22F グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖 1mM あたり少なくとも 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 もしくは 0.7 または約 0.8mM のアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖 1mM あたり少なくとも 0.5、0.6 または 0.7mM のアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖 1mM あたり少なくとも 0.6mM のアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖 1mM あたり少なくとも 0.7mM のアセテートを含む。

【0186】

好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型 22F 多糖 1mM あたりのアセテートの mM の、単離された多糖中の血清型 22F 多糖 1mM あたりのアセテートの mM に対する比は、少なくとも 0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または 0.95 である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型 22F 多糖 1mM あたりのアセテートの mM の、単離された多糖中の血清型 22F 多糖 1mM あたりのアセテートの mM に対する比は、少なくとも 0.7 である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型 22F 多糖 1mM あたりのアセテートの mM の、単離された多糖中の血清型 22F 多糖 1mM あたりのアセテート

のmMに対する比は、少なくとも0.9である。

【0187】

好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型22F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型22F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または0.95である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型22F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型22F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.7である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型22F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型22F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.9である。

10

【0188】

本発明の血清型22Fグリココンジュゲートを特徴付けるための別の方法は、コンジュゲートされたリシンの範囲（コンジュゲーション度）として特徴付けることができる、糖類にコンジュゲートされる担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）中のリシン残基の数によるものである。多糖への共有結合に起因する、担体タンパク質のリシン改変の証拠を、当業者には公知の日常的な方法を用いる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は、コンジュゲート材料を生成するために用いられるCRM₁₉₇タンパク質出発材料と比較して、回収されるリシン残基の数の減少をもたらす。好ましい実施形態においては、本発明の血清型22Fグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、2

20

【0189】

本発明の血清型22Fグリココンジュゲートを、糖類の担体タンパク質に対する比（重量／重量）により特徴付けることもできる。いくつかの実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型22F多糖の担体タンパク質に対する比（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。他の実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（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。さらなる実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.8～1.2である。好ましい実施形態においては、コンジュゲート中の血清型22F莢膜多糖の担体タンパク質に対する比は、0.9～1.1である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

30

40

【0190】

本発明の血清型22Fグリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされないが、それにも拘わらず、グリココンジュゲート組成物中に存在する遊離糖類を含有してもよい。遊離糖類を、グリココンジュゲートと非共有的に会合させる（すなわち、非共有的に結合させる、吸着させる、またはその中に、もしくはそれと共に捕捉させる）ことができる。

【0191】

好ましい実施形態においては、血清型22Fグリココンジュゲートは、血清型22F多

50

糖の総量と比較して約 50 %、45 %、40 %、35 %、30 %、25 %、20 %または 15 %未満の遊離血清型 22F 多糖を含む。好ましい実施形態においては、血清型 22F グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖の総量と比較して約 40 %未満の遊離血清型 22F 多糖を含む。好ましい実施形態においては、血清型 22F グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖の総量と比較して約 25 %未満の遊離血清型 22F 多糖を含む。好ましい実施形態においては、血清型 22F グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖の総量と比較して約 20 %未満の遊離血清型 22F 多糖を含む。好ましい実施形態においては、血清型 22F グリココンジュゲートは、血清型 22F 多糖の総量と比較して約 15 %未満の遊離血清型 22F 多糖を含む。

【0192】

血清型 22F グリココンジュゲートを、その分子サイズ分布 (K_d) により特徴付けることもできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体 (CL-4B) を用いて、コンジュゲートの相対分子サイズ分布を決定することができる。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、コンジュゲートの分子サイズ分布をプロファイルするための重力送りカラム中で用いられる。媒体中の小孔から排除される高分子は低分子よりも迅速に溶出する。画分収集装置を用いて、カラム溶出液を収集する。画分を、糖類アッセイにより比色的に試験する。 K_d の決定のために、カラムを校正して、分子が完全に排除される画分 (V_0)、($K_d = 0$)、最大保持を表す画分 (V_i)、($K_d = 1$) を確立する。特定の試料属性に達する画分 (V_e) は、 $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ の式により K_d と関連する。

【0193】

好ましい実施形態においては、少なくとも 30 %の血清型 22F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 40 %のグリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、または 85 %の血清型 22F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 60 %の血清型 22F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、50 %～80 %の血清型 22F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、65 %～80 %の血清型 22F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0194】

1. 3. 3 ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 33F に由来するグリココンジュゲート

1つの実施形態において、血清型 33F グリココンジュゲートは、1-シアノー-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸 (CDAP) を用いて多糖を活性化して、シアン酸エステルを形成させることにより得られる。活性化された多糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接、またはスパーサー (リンカー) 基を介してカップリングさせることができる。例えば、スパーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド-活性化担体タンパク質 (例えば、GMB Sを用いる) またはハロアセチル化担体タンパク質 (例えば、ヨードアセトイミド、SIB、SIA B、スルホ-SIA B、SIA、もしくはSBAPを用いる) との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル (CDAP 化学反応により作製されていてもよい) を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) とカップリングし、アミノ誘導体化された糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド (例えば、EDAC または EDC) 化学反応を用いて担体タンパク質にコンジュゲートさせ

10

20

30

40

50

る。そのようなコンジュゲートは、例えば、WO 93/15760、WO 95/08348 および WO 96/129094 に記載されている。

【0195】

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、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを用いる。多くは、国際特許出願公開第WO 98/42721号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基とCDIとの反応(Bethellら(1979)、J. Biol. Chem. 254:2572~2574; Hearnら(1981)、J. Chromatogr. 218:509~518を参照されたい)、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護/脱保護、CDIカルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基とCDIとの反応および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を含んでもよい。

【0196】

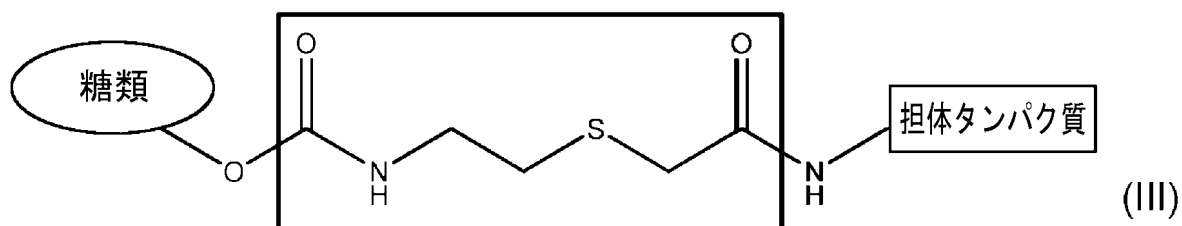
ある特定の実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。そのような実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートを、水性相中での還元的アミノ化(RAC/水性)を用いて調製することができる。水性相中での還元的アミノ化は、肺炎球菌コンジュゲートワクチンを生産するために適用され、成功を収めてきた(例えば、WO 2006/110381を参照されたい)。しかし、好ましくは、還元的アミノ化を用いる場合、血清型33Fグリココンジュゲートは、DMSO中での還元的アミノ化(RAC/DMSO)により調製される。RAC/水性プロセスを用いてO-アセチル官能基を保持することに関連する課題を考慮すれば、DMSO中での還元的アミノ化が好ましい。RAC/DMSOは、肺炎球菌コンジュゲートワクチンを生産するために適用され、成功を収めてきた(例えば、WO 2006/110381を参照されたい)。

【0197】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートは、実施例1、2および3ならびにWO 2014/027302に記載のような、eTECコンジュゲーション(以後、「血清型33F eTEC結合されたグリココンジュゲート」)を用いて調製される。前記33Fグリココンジュゲートは、1つまたは複数のeTECスペーサーを介して担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされた糖類を含み、糖類はカルバメート結合を介してeTECスペーサーに共有的にコンジュゲートされ、担体タンパク質はアミド結合を介してeTECスペーサーに共有的にコンジュゲートされている。本発明のeTEC結合されたグリココンジュゲートを、一般式(III)：

【0198】

【化3】



(式中、eTECスペーサーを構成する原子は、中央の箱に含まれる)により表すことができる。

【0199】

eTECスペーサーは、7つの直鎖状原子(すなわち、 $-C(O)NH(CH_2)_2SCH_2C(O)-$)を含み、糖類と担体タンパク質との安定なチオエーテルおよびアミド

結合を提供する。e T E C 結合されたグリココンジュゲートの合成は、糖類の活性化ヒドロキシル基と、チオアルキルアミン試薬、例えば、シスタミンもしくはシステインアミンまたはその塩のアミノ基との反応を含み、糖類とのカルバメート結合を形成して、チオール化された糖類を生ずる。1つまたは複数の遊離スルフヒドリル基の生成は、活性化されたチオール化された糖類を得るための還元剤との反応により達成される。活性化されたチオール化された糖類の遊離スルフヒドリル基と、アミン含有残基上に1つまたは複数の α -ハロアセトアミド基を有する活性化された担体タンパク質との反応は、チオエーテル結合を生成してコンジュゲートを形成し、ここで、担体タンパク質はアミド結合により e T E C スペーサーに結合される。

【0200】

本発明の血清型 33 F グリココンジュゲートにおいて、糖類は、多糖またはオリゴ糖類であってもよい。担体タンパク質を、本明細書に記載の、または当業者には公知の任意の好適な担体から選択することができる。よくある実施形態においては、糖類は多糖である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質は CRM₁₉₇ である。いくつかのそのような実施形態においては、e T E C 結合されたグリココンジュゲートは、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 33 F 莢膜多糖を含む。

【0201】

特に好ましい実施形態においては、e T E C 結合されたグリココンジュゲートは、e T E C スペーサーを介して CRM₁₉₇ に共有的にコンジュゲートされている Pn-33 F 莢膜多糖を含む (血清型 33 F e T E C 結合されたグリココンジュゲート)。

【0202】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型 33 F グリココンジュゲートは、10 kDa ~ 2,000 kDa の分子量を有する糖類を含む。他のそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa ~ 2,000 kDa の分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa ~ 1,750 kDa ; 50 kDa ~ 1,500 kDa ; 50 kDa ~ 1,250 kDa ; 50 kDa ~ 1,000 kDa ; 50 kDa ~ 750 kDa ; 50 kDa ~ 500 kDa ; 100 kDa ~ 2,000 kDa ; 100 kDa ~ 1,750 kDa ; 100 kDa ~ 1,500 kDa ; 100 kDa ~ 1,250 kDa ; 100 kDa ~ 1,000 kDa ; 100 kDa ~ 750 kDa ; 100 kDa ~ 500 kDa ; 200 kDa ~ 2,000 kDa ; 200 kDa ~ 1,750 kDa ; 200 kDa ~ 1,500 kDa ; 200 kDa ~ 1,250 kDa ; 200 kDa ~ 1,000 kDa ; 200 kDa ~ 750 kDa ; または 200 kDa ~ 500 kDa の分子量を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0203】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型 33 F グリココンジュゲートは、50 kDa ~ 2,000 kDa の分子量を有する。他の実施形態においては、血清型 33 F グリココンジュゲートは、500 kDa ~ 10,000 kDa の分子量を有する。他の実施形態においては、血清型 33 F グリココンジュゲートは、200 kDa ~ 10,000 kDa の分子量を有する。さらに他の実施形態においては、血清型 33 F グリココンジュゲートは、1,000 kDa ~ 3,000 kDa の分子量を有する。

【0204】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型 33 F グリココンジュゲートは、200 kDa ~ 2,000 kDa ; 200 kDa ~ 15,000 kDa ; 200 kDa ~ 10,000 kDa ; 200 kDa ~ 7,500 kDa ; 200 kDa ~ 5,000 kDa ; 200 kDa ~ 3,000 kDa ; 200 kDa ~ 1,000 kDa ; 500 kDa ~ 2,000 kDa ; 500 kDa ~ 15,000 kDa ; 500 kDa ~ 12,500 kDa ; 500 kDa ~ 10,000 kDa ; 500 kDa ~ 7,500 kDa ; 500 kDa ~ 6,000 kDa ; 500 kDa ~ 5,000 kDa ; 500 kDa ~ 4,000

10

20

30

40

50

kDa; 500kDa~3, 000kDa; 500kDa~2, 000kDa; 500kDa~1, 500kDa; 500kDa~1, 000kDa; 750kDa~20, 000kDa; 750kDa~15, 000kDa; 750kDa~12, 500kDa; 750kDa~10, 000kDa; 750kDa~7, 500kDa; 750kDa~6, 000kDa; 750kDa~5, 000kDa; 750kDa~4, 000kDa; 750kDa~3, 000kDa; 750kDa~2, 000kDa; 750kDa~1, 500kDa; 1, 000kDa~15, 000kDa; 1, 000kDa~12, 500kDa; 1, 000kDa~10, 000kDa; 1, 000kDa~7, 500kDa; 1, 000kDa~6, 000kDa; 1, 000kDa~5, 000kDa; 1, 000kDa~4, 000kDa; 1, 000kDa~2, 500kDa; 2, 000kDa~15, 000kDa; 2, 000kDa~12, 500kDa; 2, 000kDa~10, 000kDa; 2, 000kDa~7, 500kDa; 2, 000kDa~6, 000kDa; 2, 000kDa~5, 000kDa; 2, 000kDa~4, 000kDa; 2, 000kDa~3, 000kDa; 3, 000kDa~20, 000kDa; 3, 000kDa~15, 000kDa; 3, 000kDa~12, 500kDa; 3, 000kDa~10, 000kDa; 3, 000kDa~9, 000kDa; 3, 000kDa~8, 000kDa; 3, 000kDa~7, 000kDa; 3, 000kDa~6, 000kDa; 3, 000kDa~5, 000kDa; または3, 000kDa~4, 000kDaの分子量を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0205】

本発明の血清型33Fグリココンジュゲートの特徴付けるための別の方法は、コンジュゲートされたリシンの範囲（コンジュゲーション度）として特徴付けることができる、糖類にコンジュゲートされる担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）中のリシン残基の数によるものである。

【0206】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、2~20、4~16、2~15、2~13、2~10、2~8、2~6、2~5、2~4、3~15、3~13、3~10、3~8、3~6、3~5、3~4、5~15、5~10、8~15、8~12、10~15または10~12である。1つの実施形態において、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19または約20である。好ましい実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、4~16である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0207】

好ましい実施形態においては、担体タンパク質は、39個のリシン残基を含むCRM₁₉₇を含む。いくつかのそのような実施形態においては、CRM₁₉₇は、糖類に共有的に連結された39個のうちの4~16個のリシン残基を含んでもよい。このパラメータを表現するための別の方法は、約10%~約41%のCRM₁₉₇リシンが糖類に共有的に連結されることである。別のそのような実施形態においては、CRM₁₉₇は、糖類に共有的に連結された39個のうちの2~20個のリシン残基を含んでもよい。このパラメータを表現するための別の方法は、約5%~約50%のCRM₁₉₇リシンが糖類に共有的に連結されることである。いくつかの実施形態においては、CRM₁₉₇は、糖類に共有的に連結された39個のうちの約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、または約16個のリシン残基を含んでもよい。

【0208】

よくある実施形態においては、担体タンパク質は、担体タンパク質上のリシン残基の1つまたは複数のε-アミノ基へのアミド結合を介してeTECスパーサーに共有的にコン

ジュゲートされている。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質は、糖類に共有的にコンジュゲートされた2～20個のリシン残基を含む。他のそのような実施形態においては、担体タンパク質は、糖類に共有的にコンジュゲートされた4～16個のリシン残基を含む。

【0209】

本発明の血清型33Fグリココンジュゲートを、糖類の担体タンパク質に対する比（重量／重量）により特徴付けることもできる。いくつかの実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は0.2～4.0（例えば、約0.2、約0.3、約0.4、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、約3.0、約3.1、約3.2、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、または約4.0）である。他の実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は1.0～2.5である。さらなる実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は0.4～1.7である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0210】

担体タンパク質上のリシンへの糖鎖の結合の頻度は、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートを特徴付けるための別のパラメータである。例えば、いくつかの実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の少なくとも1つの共有結合は、多糖の4個の糖類反復単位ごとに存在する。別の実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の10個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。別の実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の15個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。さらなる実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の25個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。

【0211】

よくある実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇であり、CRM₁₉₇と多糖との間のeTECスパーサーを介する共有結合は、多糖の4、10、15または25個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。

【0212】

他の実施形態においては、コンジュゲートは、5～10個の糖類反復単位ごと；2～7個の糖類反復単位ごと；3～8個の糖類反復単位ごと；4～9個の糖類反復単位ごと；6～11個の糖類反復単位ごと；7～12個の糖類反復単位ごと；8～13個の糖類反復単位ごと；9～14個の糖類反復単位ごと；10～15個の糖類反復単位ごと；2～6個の糖類反復単位ごと；3～7個の糖類反復単位ごと；4～8個の糖類反復単位ごと；6～10個の糖類反復単位ごと；7～11個の糖類反復単位ごと；8～12個の糖類反復単位ごと；9～13個の糖類反復単位ごと；10～14個の糖類反復単位ごと；10～20個の糖類反復単位ごと；4～25個の糖類反復単位ごとまたは2～25個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と糖類との間に少なくとも1つの共有結合を含む。よくある実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0213】

別の実施形態においては、担体タンパク質と糖類との間の少なくとも1つの結合は、多糖の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個の糖類反復単位ごとに存在する。1つの実施形態において、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0214】

コンジュゲーション中に考慮する重要な点は、糖類エピトープの一部を形成し得るオーアシル、リン酸またはグリセロールリン酸側鎖などの個々の成分の潜在的に感受性の非糖類置換官能基の保持を可能にする条件の開発である。

【0215】

一実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートは、10%～100%のO-アセチル化度を有する糖類を含む。いくつかのそのような実施形態においては、糖類は、50%～100%のO-アセチル化度を有する。

【0216】

他のそのような実施形態においては、糖類は、75%～100%のO-アセチル化度を有する。さらなる実施形態においては、糖類は、70%より高いか、またはそれと等しい（70%以上）のO-アセチル化度を有する。

【0217】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートは、血清型33F莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7または0.8mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型33F莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.5、0.6または0.7mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型33F莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型33F莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.7mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、O-アセチル基の存在は、イオン-HPLC分析により決定される。

【0218】

好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または0.95である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.7である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.9である。

【0219】

好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または0.95である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.7である。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲート中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型33F多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.9である。

【0220】

本発明の血清型33Fグリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされないが、それにも拘わらず、グリココンジュゲート組成物中に存在する遊離糖類を含有してもよい。遊離糖類を、グリココンジュゲートと非共有的に会合させる（すなわち、非共有的に結合させる、吸着させる、またはその中に、もしくはそれと共に捕捉させる）ことができる。

【0221】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型33Fグリココンジュゲートは、血清型33F多糖の総量と比較して約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%未満の遊離血清型33F多糖を含む。好ましくは、血清型33Fグリココンジュゲートは、15%未満の遊離糖類、より好ましくは、10%未満の遊離糖類、さらにより好ましくは、5%未満の遊離糖類を含む。好ましい実施形態にお

10

20

30

40

50

いては、血清型 3 3 F グリココンジュゲートは、血清型 3 3 F 多糖の総量と比較して約 25 % 未満の遊離血清型 3 3 F 多糖を含む。好ましい実施形態においては、血清型 3 3 F グリココンジュゲートは、血清型 3 3 F 多糖の総量と比較して約 20 % 未満の遊離血清型 3 3 F 多糖を含む。好ましい実施形態においては、血清型 3 3 F グリココンジュゲートは、血清型 3 3 F 多糖の総量と比較して約 15 % 未満の遊離血清型 3 3 F 多糖を含む。

【0222】

ある特定の好ましい実施形態においては、本発明は、1つまたは複数の以下の特徴を、単独で、または組み合わせて有する血清型 3 3 F グリココンジュゲートを提供する：多糖が 50 kDa ~ 2,000 kDa の分子量を有する；グリココンジュゲートが 500 kDa ~ 10,000 kDa の分子量を有する；担体タンパク質が糖類に共有的に連結された 2 ~ 20 個のリシン残基を含む；糖類の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.2 ~ 4.0 である；グリココンジュゲートが多糖の 4、10、15 または 25 個の糖類反復単位ごとに少なくとも 1 個の担体タンパク質と多糖との間の共有結合を含む；糖類が 75 % ~ 100 % の O-アセチル化度を有する；コンジュゲートが全多糖に対して約 15 % 未満の遊離多糖を含む；担体タンパク質が CRM₁₉₇ である。

【0223】

血清型 3 3 F グリココンジュゲートを、その分子サイズ分布 (K_d) により特徴付けることもできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体 (CL-4B) を用いて、上記のように、コンジュゲートの相対分子サイズ分布を決定することができる。1つの実施形態において、少なくとも 15 % の本発明の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。1つの実施形態において、少なくとも 15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、60 %、70 %、80 % または 90 % の本発明の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0224】

好ましい実施形態においては、少なくとも 35 % の本発明の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 % または 85 % の本発明の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 60 % の本発明の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 70 % の本発明の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0225】

好ましい実施形態においては、40 % ~ 90 % の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、50 % ~ 90 % の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、65 % ~ 80 % の血清型 3 3 F グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0226】

1. 3. 4 ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 15B に由来するグリココンジュゲート

1つの実施形態において、血清型 15B グリココンジュゲートは、1-シアノー-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸 (CDAP) を用いて多糖を活性化して、シアン酸エステルを形成させることにより得られる。活性化された多糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接、またはスパーサー (リンカー) 基を介してカップリングさせることができる。例えば、スパーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド-活性化担体タンパ

ク質（例えば、G M B Sを用いる）またはハロアセチル化担体タンパク質（例えば、ヨードアセトイミド、S I B、S I A B、スルホーS I A B、S I A、もしくはS B A Pを用いる）との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル（C D A P化学反応により作製されていてもよい）を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド（A D H）とカップリングし、アミノ誘導体化された糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド（例えば、E D A CまたはE D C）化学反応を用いて担体タンパク質にコンジュゲートさせる。そのようなコンジュゲートは、例えば、W O 9 3 / 1 5 7 6 0、W O 9 5 / 0 8 3 4 8 および W O 9 6 / 1 2 9 0 9 4 に記載されている。

【0227】

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、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを用いる。多くは、国際特許出願公開第W O 9 8 / 4 2 7 2 1 号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基とC D Iとの反応（B e t h e l l ら（1979）、J. Biol. Chem. 254: 2572~2574; H e a r n ら（1981）、J. Chromatogr. 218: 509~518を参照されたい）、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護/脱保護、C D Iカルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基とC D Iとの反応およびC D Iカルバメート中間体とタンパク質上のアミノ基とのカップリングを含んでもよい。

【0228】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。還元的アミノ化は、2つのステップ、（1）個々の六糖単位中の隣接ジオールからアルデヒド官能基を生成するための多糖の酸化、（2）コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元を含む。

【0229】

好ましくは、酸化の前に、標的分子量（MW）範囲への血清型15B多糖のサイジングを実施する。有利には、精製された血清型15B多糖のサイズを、例えば、O-アセチル基の存在などの多糖の構造の重要な特徴を保持しながら減少させる。好ましくは、精製された血清型15B多糖のサイズを、機械的均一化により減少させる（上記のセクション1.2.6を参照されたい）。

【0230】

酸化ステップは、過ヨウ素酸塩との反応を含んでもよい。本発明の目的では、用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む；この用語はまた、メタ過ヨウ素酸塩（ IO_4^- ）とオルト過ヨウ素酸塩（ IO_6^{5-} ）の両方および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）も含む。好ましい実施形態においては、血清型15B莢膜多糖の酸化に用いられる過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸塩である。好ましい実施形態においては、血清型15B莢膜多糖の酸化に用いられる過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムである。

【0231】

好ましい実施形態においては、多糖を、0.01~10.0、0.05~5.0、0.1~1.0、0.5~1.0、0.7~0.8、0.05~0.5、0.1~0.3モル当量の酸化剤と反応させる。好ましい実施形態においては、多糖を、約0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95モル当量の酸化剤と反応させる。好ましい実施形態においては、多糖を、約0.15モル当量の酸化剤と反応させる。好ましい実施形態においては、多糖を、約0.25モル当量の酸化剤と反応させる。好ましい実施形態においては、多糖を、約0.5モル当量の酸化剤と反応させる。好ましい実施形態においては、多糖を、約0.6モル当量の酸化剤と反応させる。好まし

10

20

30

40

50

い実施形態においては、多糖を、約 0.7 モル当量の酸化剤と反応させる。

【0232】

好ましい実施形態においては、反応の持続時間は、1 時間～50 時間、10 時間～30 時間、15 時間～20 時間、15 時間～17 時間または約 16 時間である。

【0233】

好ましい実施形態においては、反応の温度を、15℃～45℃、15℃～30℃、20℃～25℃に維持する。好ましい実施形態においては、反応の温度を、約 23℃に維持する。

【0234】

好ましい実施形態においては、酸化反応を、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES) または Bis-Tris から選択される緩衝液中で実行する。好ましい実施形態においては、緩衝液はリン酸カリウムである。

【0235】

好ましい実施形態においては、緩衝液は 1 mM～500 mM、1 mM～300 mM、または 50 mM～200 mM の濃度を有する。好ましい実施形態においては、緩衝液は約 100 mM の濃度を有する。

【0236】

好ましい実施形態においては、酸化反応を、4.0～8.0、5.0～7.0、または 5.5～6.5 の pH で実行する。好ましい実施形態においては、pH は約 6.0 である。

【0237】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖は、0.5 mg/mL～5 mg/mL の単離された血清型 15 B 莢膜多糖を、0.2～0.3 モル当量の過ヨウ素酸塩と、20℃～25℃の温度で反応させることにより得る。

【0238】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖を精製する。活性化された血清型 15 B 莢膜多糖を、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、透析または限外濾過／透析濾過などの、当業者には公知の方法に従って精製する。例えば、活性化された莢膜多糖を、限外濾過装置を用いる濃縮および透析濾過により精製する。

【0239】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖の酸化度は、2～20、2～15、2～10、2～5、5～20、5～15、5～10、10～20、10～15、または 15～20 である。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖の酸化度は、2～10、4～8、4～6、6～8、6～12、8～12、9～11、10～16、12～16、14～18、16～20、16～18、または 18～20 である。

【0240】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖は、5 kDa～500 kDa、50 kDa～500 kDa、50 kDa～450 kDa、100 kDa～400 kDa、100 kDa～350 kDa の分子量を有する。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖は、100 kDa～350 kDa の分子量を有する。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖は、100 kDa～300 kDa の分子量を有する。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖は、100 kDa～250 kDa の分子量を有する。

【0241】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖は、前記血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 または 0.8 mM のアセテートを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15 B 莢膜多糖は、前記血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.5、0.6 または 0.7 mM のアセテートを含む。好ましい実施形態においては、活性化され

10

20

30

40

50

た血清型 1 5 B 莢膜多糖は、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のアセテートを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 7 mM のアセテートを含む。

【0 2 4 2】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7 または 0. 8 mM のグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 5、0. 6 または 0. 7 mM のグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 7 mM のグリセロールを含む。

10

【0 2 4 3】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、1 0 0 k D a ~ 2 5 0 k D a の分子量を有し、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のアセテートを含む。

【0 2 4 4】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、1 0 0 k D a ~ 2 5 0 k D a の分子量を有し、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のグリセロールを含む。

20

【0 2 4 5】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のアセテートおよび前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のグリセロールを含む。

【0 2 4 6】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、1 0 0 k D a ~ 2 5 0 k D a の分子量を有し、前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のアセテートおよび前記血清型 1 5 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0. 6 mM のグリセロールを含む。

30

【0 2 4 7】

1 つの実施形態において、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、場合により、糖類の存在下で凍結乾燥される。好ましい実施形態においては、糖類は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態においては、糖類はスクロースである。次いで、凍結乾燥された活性化された莢膜多糖を、担体タンパク質を含む溶液と混合することができる。

【0 2 4 8】

別の実施形態においては、活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖を、担体タンパク質と混合し、場合により、糖類の存在下で凍結乾燥する。好ましい実施形態においては、糖類は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態においては、糖類はスクロースである。次いで、同時に凍結乾燥された多糖および担体タンパク質を、溶液中に再懸濁し、還元剤と反応させることができる。

40

【0 2 4 9】

活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖は、

(a) 活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖を担体タンパク質と混合するステップ、ならびに

(b) 混合された活性化された血清型 1 5 B 莢膜多糖および担体タンパク質を還元剤と反

50

応させて、血清型 15B 莢膜多糖-担体タンパク質コンジュゲートを形成させるステップを含むプロセスにより担体タンパク質にコンジュゲートさせることができる。

【0250】

ジメチルスルホキシド (DMSO) 中での還元的アミノ化による活性化された血清型 15B 莢膜多糖と、タンパク質担体とのコンジュゲーションは、例えば、多糖の O-アセチル化のレベルが有意に低い水性溶液中での還元的アミノ化と比較して、多糖の O-アセチル含量を保持するのに好適である。好ましい実施形態においては、ステップ (a) およびステップ (b) を、DMSO 中で実行する。

【0251】

好ましい実施形態においては、ステップ (a) は、担体タンパク質と DMSO とを含む溶液中に凍結乾燥された血清型 15B 莢膜多糖を溶解させることを含む。好ましい実施形態においては、ステップ (a) は、DMSO 中に同時に凍結乾燥された血清型 15B 莢膜多糖および担体タンパク質を溶解させることを含む。

【0252】

ステップ (a) および (b) を水性溶液中で実行する場合、ステップ (a) および (b) は、好ましくは、PBS、MES、HEPES、Bis-tris、ADA、PIPES、MOPSO、BES、MOPS、DIPSO、MOBS、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、ピシンまたは HEPB から選択される緩衝液中、6.0~8.5、7.0~8.0 または 7.0~7.5 の pH で実行される。好ましい実施形態においては、緩衝液は PBS である。好ましい実施形態においては、pH は約 7.3 である。好ましい実施形態においては、ステップ (b) における活性化された血清型 15B 莢膜多糖の濃度は、0.1 mg/mL~10 mg/mL、0.5 mg/mL~5 mg/mL、または 0.5 mg/mL~2 mg/mL である。好ましい実施形態においては、ステップ (b) における活性化された血清型 15B 莢膜多糖の濃度は、約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 または 3.0 mg/mL である。

【0253】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15B 莢膜多糖の担体タンパク質に対する初期入力比 (重量/重量) は、5:1~0.1:1、2:1~0.1:1、2:1~1:1、1.5:1~1:1、0.1:1~1:1、0.3:1~1:1、または 0.6:1~1:1 である。

【0254】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15B 莢膜多糖の担体タンパク質に対する初期入力比は、約 0.6:1~1:1 である。別の好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15B 莢膜多糖と担体タンパク質との初期入力比は、約 0.6:1~1.5:1 である。そのような初期入力比は、グリココンジュゲート中の低レベルの遊離多糖を得るのに特に好適である。

【0255】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 15B 莢膜多糖の担体タンパク質に対する初期入力比は、約 0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1 または 2:1 である。

【0256】

1つの実施形態においては、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、Bronsted または Lewis 酸の存在下での水素化ホウ素ナトリウムまた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-BuMeiPrN-BH₃、ベンジルアミン-BH₃ または 5-エチル-2-メチルピリジンボラン (PEMB) などのアミンボランである。好ましい実施形態においては、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナト

10

20

30

40

50

リウムである。好ましい実施形態においては、還元剤は、2-ピコリンボランナトリウムである。

【0257】

好ましい実施形態においては、ステップ(b)において用いられる還元剤の量は、約0.1~10.0モル当量、0.5~5.0モル当量、または1.0~2.0モル当量である。好ましい実施形態においては、ステップ(b)において用いられる還元剤の量は、約1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0モル当量である。

【0258】

好ましい実施形態においては、ステップ(b)の持続時間は、1時間~60時間、10時間~50時間、40時間~50時間、または42時間~46時間である。好ましい実施形態においては、ステップ(b)の持続時間は、約44時間である。

【0259】

好ましい実施形態においては、ステップ(b)における反応温度は、10℃~40℃、15℃~30℃または20℃~26℃に維持される。好ましい実施形態においては、ステップ(b)における反応温度は、約23℃に維持される。

【0260】

好ましい実施形態においては、担体タンパク質に共有的に連結されたストレプトコッカス・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)血清型15B莢膜多糖を含むグリココンジュゲートの調製のためのプロセスは、 NaBH_4 の添加により未反応のアルデヒドをキ

10

20

【0261】

好ましい実施形態においては、ステップ(c)で用いられる NaBH_4 の量は、0.1~10モル当量、0.5~5.0モル当量または1.0~3.0モル当量である。好ましい実施形態においては、ステップ(c)で用いられる NaBH_4 の量は、約2モル当量である。

【0262】

好ましい実施形態においては、ステップ(c)の持続時間は、0.1時間~10時間、0.5時間~5時間、または2時間~4時間である。好ましい実施形態においては、ステップ(c)の持続時間は、約3時間である。

30

【0263】

好ましい実施形態においては、ステップ(c)における反応温度は、15℃~45℃、15℃~30℃または20℃~26℃に維持される。好ましい実施形態においては、ステップ(c)における反応温度は、約23℃に維持される。

【0264】

好ましい実施形態においては、コンジュゲーションステップの収率は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%または90%より高い。好ましい実施形態においては、コンジュゲーションステップ(ステップb)の収率は、60%より高い。好ましい実施形態においては、コンジュゲーションステップ(ステップb)の収率は、70%より高い。収率は、コンジュゲート中の血清型15B多糖の量 $\times 100$ /コンジュゲーションステップにおいて用いられる活性化された多糖の量である。

40

【0265】

好ましい実施形態においては、担体タンパク質に共有的に連結されたストレプトコッカス・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)血清型15B莢膜多糖を含むグリココンジュゲートの調製のためのプロセスは、

- (a) 高圧均一化により精製された血清型15B多糖をサイジングするステップ；
- (b) サイジングされた血清型15B多糖を酸化剤と反応させるステップ；
- (c) 活性化された血清型15B多糖を担体タンパク質と混合するステップ；
- (d) 混合された活性化された血清型15B多糖および担体タンパク質を、還元剤と反応させて、血清型15B多糖-担体タンパク質コンジュゲートを形成させるステップ；なら

50

びに

(e) NaBH_4 の添加により未反応のアルデヒドをキャップする (クエンチする) ステップを含む。

【0266】

好ましい実施形態においては、上記のプロセスのコンジュゲーションステップ (ステップd) の収率は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%または90%より高い。好ましい実施形態においては、コンジュゲーションステップ (ステップd) の収率は、60%より高い。好ましい実施形態においては、コンジュゲーションステップ (ステップd) の収率は、70%より高い。収率は、コンジュゲート中の血清型15B多糖の量 $\times 100 / \text{コンジュゲーションステップにおいて用いられる活性化された多糖の量}$ である。

10

【0267】

担体タンパク質への血清型15B莢膜多糖のコンジュゲーション後、多糖-タンパク質コンジュゲートを、当業者には公知の様々な技術により精製する (多糖-タンパク質コンジュゲートの量に関して富化する) ことができる。これらの技術としては、透析、濃縮/透析濾過操作、接線流濾過、沈降/溶出、カラムクロマトグラフィー (DEAEまたは疎水性相互作用クロマトグラフィー)、および深層濾過が挙げられる。

【0268】

1つの実施形態において、担体タンパク質は、セクション1.1で定義されている。1つの実施形態において、担体タンパク質は、DT (ジフテリア毒素)、TT (破傷風毒素)、CRM₁₉₇、他のDT変異体、PD (ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae) タンパク質D)、またはその免疫学的に機能的な等価物からなる群において選択される。1つの実施形態において、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

20

【0269】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、担体タンパク質 (例えば、CRM₁₉₇) にコンジュゲートされ、5kDa~1,500kDaの分子量を有する糖類を含む。他のそのような実施形態においては、糖類は、10kDa~1,500kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、糖類は、50kDa~1,500kDa; 50kDa~1,250kDa; 50kDa~1,000kDa; 50kDa~750kDa; 50kDa~500kDa; 50kDa~250kDa; 100kDa~1,500kDa; 100kDa~1,250kDa; 100kDa~1,000kDa; 100kDa~750kDa; 100kDa~500kDa; 100kDa~250kDa; 200kDa~1,500kDa; 200kDa~1,250kDa; 200kDa~1,000kDa; 200kDa~750kDa; または200kDa~500kDa; または200kDa~400kDaの分子量を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。いくつかの実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、50kDa~20,000kDaの分子量を有する。いくつかの実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、1,000kDa~20,000kDaの分子量を有する。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、3,000kDa~20,000kDa、5,000kDa~10,000kDa、5,000kDa~20,000kDa、8,000kDa~20,000kDa、8,000kDa~16,000kDaまたは10,000kDa~16,000kDaの分子量を有する。

30

40

【0270】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、約1,000kDa、約1,500kDa、約2,000kDa、約2,500kDa、約3,000kDa、約3,500kDa、約4,000kDa、約4,500kDa、約5,

50

000kDa、約5、500kDa、約6、000kDa、約6、500kDa、約7、000kDa、約7、500kDa、約8、000kDa、約8、500kDa、約9、000kDa、約9、500kDa、約10、000kDa、約10、500kDa、約11、000kDa、約11、500kDa、約12、000kDa、約12、500kDa、約13、000kDa、約13、500kDa、約14、000kDa、約14、500kDa、約15、000kDa、約15、500kDa、約16、000kDa、約16、500kDa、約17、000kDa、約17、500kDa、約18、000kDa、約18、500kDa、約19、000kDa、約19、500kDa、または約20、000kDaの分子量を有する。

【0271】

10

さらなる実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、1、000kDa～20、000kDa；1、000kDa～15、000kDa；1、000kDa～10、000kDa；1、000kDa～7、500kDa；1、000kDa～5、000kDa；1、000kDa～4、000kDa；1、000kDa～3、000kDa；2、000kDa～20、000kDa；2、000kDa～15、000kDa；2、000kDa～12、500kDa；2、000kDa～10、000kDa；2、000kDa～7、500kDa；2、000kDa～6、000kDa；2、000kDa～5、000kDa；2、000kDa～4、000kDa；または2、000kDa～3、000kDaの分子量を有する。

【0272】

20

さらなる実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、3、000kDa～20、000kDa；3、000kDa～15、000kDa；3、000kDa～10、000kDa；3、000kDa～7、500kDa；3、000kDa～5、000kDa；3、000kDa～4、000kDa；4、000kDa～20、000kDa；4、000kDa～15、000kDa；4、000kDa～12、500kDa；4、000kDa～10、000kDa；4、000kDa～7、500kDa；4、000kDa～6、000kDa；または4、000kDa～5、000kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、5、000kDa～20、000kDa；5、000kDa～15、000kDa；5、000kDa～10、000kDa；5、000kDa～7、500kDa；6、000kDa～20、000kDa；6、000kDa～15、000kDa；6、000kDa～12、500kDa；6、000kDa～10、000kDa；または6、000kDa～7、500kDaの分子量を有する。

30

【0273】

グリココンジュゲートの分子量は、SEC-MALLSにより測定される。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。1つの実施形態において、前記血清型15Bグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

【0274】

本発明の血清型15Bグリココンジュゲートを、糖類の担体タンパク質に対する比（重量／重量）により特徴付けることもできる。好ましい実施形態においては、コンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖の担体タンパク質に対する比（重量／重量）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。好ましい実施形態においては、コンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖の担体タンパク質に対する比は、0.4～2である。好ましい実施形態においては、コンジュゲート中の血清型15

40

50

B 莢膜多糖の担体タンパク質に対する比は、0.7～0.9である。

【0275】

本発明の血清型15Bグリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされていないが、それにも拘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類を含有してもよい。遊離糖類を、グリココンジュゲートと非共有的に会合させる（すなわち、非共有的に結合させる、吸着させる、またはその中に、もしくはそれと共に捕捉させる）ことができる。

【0276】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖の総量と比較して約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%または15%未満の遊離血清型15B莢膜多糖を含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖の総量と比較して約25%未満の遊離血清型15B莢膜多糖を含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖の総量と比較して約20%未満の遊離血清型15B莢膜多糖を含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖の総量と比較して約15%未満の遊離血清型15B莢膜多糖を含む。

【0277】

血清型15Bグリココンジュゲートを、その分子サイズ分布 (K_d) によって特徴付けることもできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体 (CL-4B) を用いて、上記のように、コンジュゲートの相対分子サイズ分布を決定することができる。好ましい実施形態においては、少なくとも20%の本発明の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも30%の免疫原性コンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも40%の本発明の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、または85%の本発明の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも60%の本発明の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも70%の本発明の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0278】

好ましい実施形態においては、40%～90%の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、50%～90%の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、65%～80%の血清型15Bグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0279】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7または0.8mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.5、0.6または0.7mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.7mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、O-アセチル基

の存在を、イオンーHPLC分析により決定する。

【0280】

好ましい実施形態においては、血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または0.95である。好ましい実施形態においては、血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.7である。好ましい実施形態においては、血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.9である。好ましい実施形態においては、Oーアセチル基の存在を、イオンーHPLC分析により決定する。

10

【0281】

好ましい実施形態においては、血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または0.95である。好ましい実施形態においては、血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.7である。好ましい実施形態においては、血清型15Bグリココンジュゲート中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型15B莢膜多糖1mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.9である。好ましい実施形態においては、Oーアセチル基の存在を、イオンーHPLC分析により決定する。

20

【0282】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7または0.8mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.5、0.6、または0.7mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートは、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.7mMのグリセロールを含む。

30

【0283】

本発明の血清型15Bグリココンジュゲートを特徴付けるための別の方法は、コンジュゲートされたリシンの範囲（コンジュゲーション度）として特徴付けることができる、糖類にコンジュゲートされる担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）中のリシン残基の数によるものである。多糖への共有結合に起因する、担体タンパク質のリシン改変に関する証拠を、当業者には公知の日常的な方法を用いる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は、コンジュゲート材料を生成するために用いられるCRM₁₉₇タンパク質出発材料と比較して、回収されるリシン残基の数の減少をもたらす。

40

【0284】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、2～15、2～13、2～10、2～8、2～6、2～5、2～4、3～15、3～13、3～10、3～8、3～6、3～5、3～4、5～15、5～10、8～15、8～12、10～15または10～12である。1つの実施形態において、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約1

50

5である。好ましい実施形態においては、本発明の血清型15Bグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、2～5である。

【0285】

1. 3. 5 ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲート

本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲートにおいて、糖類は、多糖およびオリゴ糖類からなる群から選択され、担体タンパク質は、本明細書に記載の、または当業者には公知の任意の好適な担体から選択される。いくつかの好ましい実施形態においては、糖類は、血清型12Fのストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) に由来する多糖である。

10

【0286】

1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、CDAPを用いて調製される。多糖を、1-シアノー-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸 (CDAP) を用いて活性化して、シアン酸エステルを形成させる。次いで、活性化された多糖を、直接的に、またはスペーサー (リンカー) 基を介して、担体タンパク質 (好ましくは、CRM₁₉₇) 上のアミノ基にカップリングさせる。例えば、スペーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド活性化担体タンパク質 (例えば、GMB Sを用いる) またはハロアセチル化担体タンパク質 (例えば、ヨードアセトイミド、SIB、S I A B、スルホ-S I A B、S I A、もしくはS B A P) との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル (場合により、CDAP化学反応により作製される) を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) とカップリングさせ、アミノ誘導体化された糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド (例えば、EDACまたはEDC) 化学反応を用いて担体タンパク質 (例えば、CRM₁₉₇) にコンジュゲートさせる。

20

【0287】

コンジュゲーションのための他の技術は、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを用いる。多くは、国際特許出願公開第WO98/42721号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基とCDIとの反応 (Bethellら (1979)、J. Biol. Chem. 254:2572~2574; Hearnら (1981)、J. Chromatogr. 218:509~518を参照されたい)、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護/脱保護、CDIカルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基とCDIとの反応および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を含んでもよい。

30

【0288】

1つの実施形態において、血清型12Fのストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) に由来する莢膜多糖を、還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートさせる。還元的アミノ化は、2つのステップ、(1) 個々の六糖単位中の隣接ジオールからアルデヒド官能基を生成するための多糖の酸化、(2) コンジュゲートを形成させるための活性化された糖類および担体タンパク質の還元を含む。

40

【0289】

酸化の前に、血清型12F多糖を、場合により、加水分解 (サイジング) する。機械的または化学的加水分解を用いることができる。化学的加水分解を、酢酸を用いて行うことができる。

【0290】

50

1つの実施形態において、酸化剤は過ヨウ素酸塩である。用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む（以下を参照されたい）。

【0291】

好ましい実施形態においては、酸化剤は、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共酸化剤としてのN-クロロスクシンイミド (NCS) である。そのような実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲートを、実施例7およびWO2014/097099に記載のように、2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ (TEMPO) フリーラジカルを用いて調製し、共酸化剤としてN-クロロスクシンイミド (NCS) を用いて糖類の第1級アルコールをアルデヒドに酸化する（以後、「TEMPO/NCS酸化」とする）。したがって、一態様においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、a) 12F糖類を、水性溶媒中で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、活性化された糖類を生産するステップ；ならびにb) 活性化された糖類を、1つまたは複数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（以後、「TEMPO/NCS-還元的アミノ化」とする）を含む方法により得ることができる。一態様においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、前記方法により得られる。1つの実施形態において、活性化された12F糖類の酸化度は、1~50、1~40、1~30、1~20、1~10、1~5、3~40、3~30、3~20、3~10、4~40、4~30、4~20、4~10、5~30、5~25、5~20、5~10、6~50、6~40、6~30、6~20、6~15、6~14、6~13、6~12、6~11、6~10、7~40、7~30、7~20、7~15、7~14、7~13、7~12、7~11、7~10、8~40、8~30、8~20、8~15、8~14、8~13、8~12、8~11、8~10、9~40、9~30、9~20、9~15、10~40、10~30、10~20、または10~15の範囲である。さらなる態様において、活性化された糖類の酸化度は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40である。好ましくは、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0292】

1つの実施形態において、ステップa)の前に、12F糖類を、100kDa~400kDaの範囲の分子量まで加水分解する。例えば、一態様において、分子量は、100kDa~350kDa、100kDa~300kDa、100kDa~250kDa、100kDa~200kDa、100kDa~150kDa、200kDa~400kDa、200kDa~350kDa、200kDa~300kDa、200kDa~250kDa、300kDa~400kDa、または300kDa~350kDaの範囲である。

【0293】

さらなる態様において、本方法は、ステップb)の前に活性化された多糖を精製するステップをさらに含む。さらなる態様において、本方法は、ステップb)の後に還元剤を添加するステップをさらに含む。一態様において、還元剤はNaCNBH₃である。さらなる態様において、本方法は、NaCNBH₃の添加後にNaBH₄を添加するステップをさらに含む。さらなる態様において、本方法は、NaBH₄の添加後に精製ステップを含む。

【0294】

別の態様において、本開示は、上記に開示された方法のいずれかにより生産されるまたは得ることができる、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲートを提供すること。例えば、一態様において、本開示は、a) 糖類を、水性溶媒中で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、活性化された糖類を生産するステップ; ならびに b) 活性化された糖類を、1 つまたは複数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により生産されるまたは得ることができる、担体タンパク質にコンジュゲートされている糖類を含むストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 12 F に由来するグリココンジュゲートを提供する。

【0295】

一実施形態においては、本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 12 F に由来するグリココンジュゲートは、約 50 kDa ~ 約 20,000 kDa の分子量を有する。別の実施形態においては、グリココンジュゲートは、約 200 kDa ~ 約 10,000 kDa の分子量を有する。別の実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 12 F に由来するグリココンジュゲートは、約 500 kDa ~ 約 5,000 kDa の分子量を有する。一実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 12 F に由来するグリココンジュゲートは、約 1,000 kDa ~ 約 3,000 kDa の分子量を有する。他の実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 12 F に由来するグリココンジュゲートは、約 600 kDa ~ 約 2,800 kDa; 約 700 kDa ~ 約 2,700 kDa; 約 1,000 kDa ~ 約 2,000 kDa; 約 1,800 kDa ~ 約 2,500 kDa; 約 1,100 kDa ~ 約 2,200 kDa; 約 1,900 kDa ~ 約 2,700 kDa; 約 1,200 kDa ~ 約 2,400 kDa; 約 1,700 kDa ~ 約 2,600 kDa; 約 1,300 kDa ~ 約 2,600 kDa; 約 1,600 kDa ~ 約 3,000 kDa の分子量を有する。

【0296】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型 12 F グリココンジュゲートは、1,000 kDa ~ 20,000 kDa; 1,000 kDa ~ 15,000 kDa; 1,000 kDa ~ 10,000 kDa; 1,000 kDa ~ 7,500 kDa; 1,000 kDa ~ 5,000 kDa; 1,000 kDa ~ 4,000 kDa; 1,000 kDa ~ 3,000 kDa; 2,000 kDa ~ 20,000 kDa; 2,000 kDa ~ 15,000 kDa; 2,000 kDa ~ 12,500 kDa; 2,000 kDa ~ 10,000 kDa; 2,000 kDa ~ 7,500 kDa; 2,000 kDa ~ 6,000 kDa; 2,000 kDa ~ 5,000 kDa; 2,000 kDa ~ 4,000 kDa; または 2,000 kDa ~ 3,000 kDa の分子量を有する。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質は CRM₁₉₇ である。いくつかのそのような実施形態においては、血清型 12 F グリココンジュゲートは、TEMPO/NCS-還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている。

【0297】

本発明の血清型 12 F グリココンジュゲートを特徴付けるための別の方法は、コンジュゲートされたリシンの範囲 (コンジュゲーション度) として特徴付けることができる、糖類にコンジュゲートされる担体タンパク質 (例えば、CRM₁₉₇) 中のリシン残基の数によるものである。

【0298】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型 12 F グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、2 ~ 20、4 ~ 16、4 ~ 15、2 ~ 15、2 ~ 13、2 ~ 10、2 ~ 8、2 ~ 6、2 ~ 5、2 ~ 4、3 ~ 15、3 ~ 13、3 ~ 10、3 ~ 8、3 ~ 6、3 ~ 5、3 ~ 4、5 ~ 15、5 ~ 10、8 ~ 15、8 ~ 12、10 ~ 15 または 10 ~ 12 である。1 つの実施形態において、本発明の血清型 12 F グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19 または 約 20 である。

【0299】

糖類にコンジュゲートされている担体タンパク質中のリシン残基の数を、モル比として表すこともできる。例えば、CRM₁₉₇の4～15個のリシン残基が糖類に共有的に連結されるグリココンジュゲートにおいては、グリココンジュゲート中のコンジュゲートしたリシン残基のCRM₁₉₇に対するモル比は、約10：1～約40：1である。CRM₁₉₇の2～20個のリシン残基が糖類に共有的に連結される免疫原性組成物において、グリココンジュゲート中のコンジュゲートしたリシンのCRM₁₉₇に対するモル比は、約5：1～約50：1である。一実施形態においては、本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲート中、コンジュゲートしたリシンの担体タンパク質に対するモル比は、約10：1～約25：1である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。いくつかの実施形態においては、CRM₁₉₇は、糖類に共有的に連結される39個のうちの約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、または16リシン残基を含んでもよい。いくつかのそのような実施形態においては、血清型12Fグリココンジュゲートは、TEMPO／NCS－還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている。

10

【0300】

一実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲート中で0.2～4（例えば、約0.2、約0.3、約0.4、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、約3.0、約3.1、約3.2、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、または約4.0）である。別の実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲート中で1.1～1.7である。他の実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.8～1.8（例えば、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または約1.8）である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。いくつかのそのような実施形態においては、血清型12Fグリココンジュゲートは、TEMPO／NCS－還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている。

20

30

【0301】

担体タンパク質上のリシンへの糖鎖の結合の頻度は、本開示の血清型12Fグリココンジュゲートを特徴付けるための別のパラメータである。例えば、一実施形態においては、多糖の100個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と多糖との間の少なくとも1つの共有結合が存在する。一実施形態においては、多糖の50個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と多糖との間の少なくとも1つの共有結合が存在する。一実施形態においては、多糖の25個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と多糖との間の少なくとも1つの共有結合が存在する。別の実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の4個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。別の実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の10個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。さらなる実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の15個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。よくある実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇であり、CRM₁₉₇と多糖との間の共有結合は、多糖の4、10、15または25個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。

40

【0302】

他の実施形態においては、コンジュゲートは、5～10個の糖類反復単位ごと；2～7個の糖類反復単位ごと；3～8個の糖類反復単位ごと；4～9個の糖類反復単位ごと；6～11個の糖類反復単位ごと；7～12個の糖類反復単位ごと；8～13個の糖類反復単

50

位ごと；9～14個の糖類反復単位ごと；10～15個の糖類反復単位ごと；2～6個の糖類反復単位ごと；3～7個の糖類反復単位ごと；4～8個の糖類反復単位ごと；6～10個の糖類反復単位ごと；7～11個の糖類反復単位ごと；8～12個の糖類反復単位ごと；9～13個の糖類反復単位ごと；10～14個の糖類反復単位ごと；10～20個の糖類反復単位ごと；4～25個の糖類反復単位ごと、または2～25個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と糖類との間の少なくとも1個の共有結合を含む。よくある実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0303】

別の実施形態においては、CRM₁₉₇と糖類との間の少なくとも1個の結合は、多糖の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25個の糖類反復単位ごとに存在する。いくつかのそのような実施形態においては、血清型12Fグリココンジュゲートは、TEMPO/NC S-還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている。

10

【0304】

一実施形態においては、本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、多糖の25個の糖類反復単位ごとに担体タンパク質と多糖との間に少なくとも1個の共有結合を含む。別の実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の4個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。別の実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の10個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。さらなる実施形態においては、担体タンパク質と多糖との間の共有結合は、多糖の15個の糖類反復単位ごとに少なくとも1回存在する。いくつかのそのような実施形態においては、血清型12Fグリココンジュゲートは、TEMPO/NC S-還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている。

20

【0305】

本発明の血清型12Fグリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされていないが、それにも拘わらず、グリココンジュゲート組成物中に存在する遊離糖類を含有してもよい。遊離糖類を、グリココンジュゲートと非共有的に会合させる（すなわち、非共有的に結合させる、吸着させる、またはその中に、もしくははそれと共に捕捉させる）ことができる。

30

【0306】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型12Fグリココンジュゲートは、血清型12F多糖の総量と比較して約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%未満の遊離血清型12F多糖を含む。一実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、血清型12F多糖の総量と比較して約50%未満の遊離血清型12F多糖を含む。一実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、血清型12F多糖の総量と比較して約45%未満の遊離血清型12F多糖を含む。別の実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型12F多糖の総量と比較して約30%未満の遊離血清型12F多糖を含む。別の実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、血清型12F多糖の総量と比較して約20%未満の遊離血清型12F多糖を含む。さらなる実施形態においては、グリココンジュゲートは、血清型12F多糖の総量と比較して約10%未満の遊離血清型12F多糖を含む。別の実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、血清型12F多糖の総量と比較して約5%未満の遊離血清型12F多糖を含む。いくつかのそのような実施形態においては、血清型12Fグリココンジュゲートは、TEMPO/NC S-還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている。

40

50

【0307】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型12Fグリココンジュゲートは、10 kDa~2,000 kDaの分子量を有する糖類を含む。他のそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa~2,000 kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa~1,750 kDa; 50 kDa~1,500 kDa; 50 kDa~1,250 kDa; 50 kDa~1,000 kDa; 50 kDa~750 kDa; 50 kDa~500 kDa; 100 kDa~2,000 kDa; 100 kDa~1,750 kDa; 100 kDa~1,500 kDa; 100 kDa~1,250 kDa; 100 kDa~1,000 kDa; 100 kDa~750 kDa; 100 kDa~500 kDa; 200 kDa~2,000 kDa; 200 kDa~1,750 kDa; 200 kDa~1,500 kDa; 200 kDa~1,250 kDa; 200 kDa~1,000 kDa; 200 kDa~750 kDa; または200 kDa~500 kDa; または200 kDa~400 kDaの分子量を有する。いくつかのそのような実施形態においては、血清型12Fグリココンジュゲートは、TEMPO/NC S-還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている。

【0308】

血清型12Fグリココンジュゲートを、その分子サイズ分布(K_d)により特徴付けることもできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体(CL-4B)を用いて、上記のように、コンジュゲートの相対分子サイズ分布を決定することができる。好ましい実施形態においては、少なくとも35%の本発明の血清型12Fグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%または85%の本発明の血清型12Fグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも60%の本発明の血清型12Fグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも70%の本発明の血清型12Fグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0309】

好ましい実施形態においては、40%~90%の血清型12FグリココンジュゲートがCL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、50%~90%の血清型12FグリココンジュゲートがCL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、65%~80%の血清型12FグリココンジュゲートがCL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0310】

1. 3. 6 ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型10Aに由来するグリココンジュゲート

1つの実施形態において、血清型10Aグリココンジュゲートは、1-シアノー-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸(CDAP)を用いて多糖を活性化して、シアン酸エステルを形成させることにより得られる。活性化された多糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接、またはスペーサー(リンカー)基を介してカップリングさせることができる。例えば、スペーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド-活性化担体タンパク質(例えば、GMB Sを用いる)またはハロアセチル化担体タンパク質(例えば、ヨードアセトイミド、SIB、S IAB、スルホ-S IAB、S I A、もしくはS B A Pを用いる)との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル(CDAP化学反応により作製されていてもよい)を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド(ADH)とカップリングし、アミノ誘導体化された糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド(

例えば、EDACまたはEDC）化学反応を用いて担体タンパク質にコンジュゲートさせる。そのようなコンジュゲートは、例えば、WO93/15760、WO95/08348およびWO96/129094に記載されている。

【0311】

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、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを用いる。多くは、国際特許出願公開第WO98/42721号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基とCDIとの反応（Bethellら（1979）、J. Biol. Chem. 254:2572~2574；Hearnら（1981）、J. Chromatogr. 218:509~518を参照されたい）、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護／脱保護、CDIカルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基とCDIとの反応および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を含んでもよい。

10

【0312】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。還元的アミノ化は、2つのステップ、（1）個々の六糖類単位中の隣接ジオールからアルデヒド官能基を生成するための多糖の酸化、（2）コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元を含む。

20

【0313】

酸化の前に、血清型10A多糖を、場合により、加水分解（サイジング）する。機械的または化学的加水分解を用いることができる。化学的加水分解を、酢酸を用いて行うことができる。

【0314】

1つの実施形態において、血清型多糖は、

（a）単離された血清型10A多糖を、酸化剤と反応させるステップ；

（b）クエンチング剤の添加により酸化反応をクエンチして、活性化された血清型10A多糖を得るステップ

を含むプロセスにより活性化（酸化）する。

30

【0315】

好ましい実施形態においては、酸化剤は、過ヨウ素酸塩である。本発明の目的のために、用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む；この用語はまた、メタ過ヨウ素酸塩（ IO_4^- ）とオルト過ヨウ素酸塩（ IO_6^{5-} ）の両方および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）も含む。好ましい実施形態においては、酸化剤は、過ヨウ素酸ナトリウムである。好ましい実施形態においては、血清型10A多糖の酸化に用いられる過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸塩である。好ましい実施形態においては、血清型10A多糖の酸化に用いられる過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムである。

【0316】

一実施形態においては、クエンチング剤は、隣接ジオール、1,2-アミノアルコール、アミノ酸、グルタチオン、亜硫酸塩、重硫酸塩、亜ジチオン酸塩、メタ重亜硫酸塩、チオ硫酸塩、亜リン酸塩、次亜リン酸塩または亜リン酸から選択される。

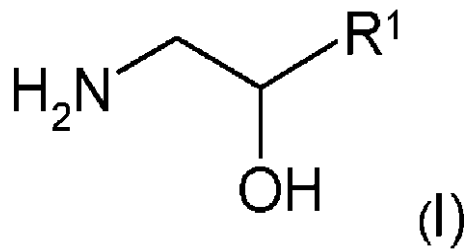
40

【0317】

一実施形態においては、クエンチング剤は、式（I）：

【0318】

【化 4】



(式中、 R^1 は、H、メチル、エチル、プロピルまたはイソプロピルから選択される)
の 1, 2-アミノアルコールである。

10

【0319】

一実施形態においては、クエンチング剤は、亜硫酸塩、重硫酸塩、亜ジチオン酸塩、メタ重亜硫酸塩、チオ硫酸塩、亜リン酸塩、次亜リン酸塩または亜リン酸のナトリウムおよびカリウム塩から選択される。

【0320】

一実施形態においては、クエンチング剤は、アミノ酸である。そのような実施形態においては、前記アミノ酸を、セリン、トレオニン、システイン、シスチン、メチオニン、プロリン、ヒドロキシプロリン、トリプトファン、チロシン、およびヒスチジンから選択することができる。

20

【0321】

一実施形態においては、クエンチング剤は、重硫酸塩、亜ジチオン酸塩、メタ重亜硫酸塩、チオ硫酸塩などの亜硫酸塩である。

【0322】

一実施形態においては、クエンチング剤は、2つの隣接ヒドロキシル基（隣接ジオール）、すなわち、2つの隣接する炭素原子に共有的に連結された2つのヒドロキシル基を含む化合物である。

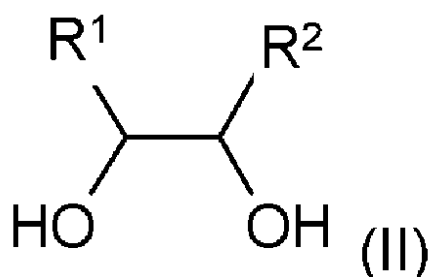
【0323】

好ましくは、クエンチング剤は、式 (II) :

【0324】

30

【化 5】



40

(式中、 R^1 および R^2 はそれぞれ独立に、H、メチル、エチル、プロピルまたはイソプロピルから選択される)
の化合物である。

【0325】

好ましい実施形態においては、クエンチング剤は、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-ジオールもしくはブタン-2, 3-ジオール、アスコルビン酸である。好ましい実施形態においては、クエンチング剤は、ブタン-2, 3-ジオールである。

【0326】

好ましい実施形態においては、単離された血清型 10A 多糖は、

50

(a) 単離された血清型 10A 多糖を過ヨウ素酸塩と反応させるステップ；
(b) ブタン-2，3-ジオールの添加により酸化反応をクエンチングして、活性化された血清型 10A 多糖を得るステップ
を含むプロセスにより活性化する。

【0327】

多糖の酸化ステップの後、多糖は活性化されると言われ、本明細書の以下では「活性化された多糖」と呼ばれる。

【0328】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 10A 多糖は精製される。活性化された血清型 10A 多糖は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、透析または限外濾過／透析濾過などの当業者には公知の方法に従って精製される。例えば、活性化された 10A 多糖は、限外濾過装置を用いる濃縮および透析濾過により精製される。

【0329】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 10A 多糖の酸化度は、2～30、2～25、2～20、2～15、2～10、2～5、5～30、5～25、5～20、5～15、5～10、10～30、10～25、10～20、10～15、15～30、15～25、15～20、20～30、または 20～25 である。好ましい実施形態においては、活性化された血清型 10A 多糖の酸化度は、2～10、4～8、4～6、6～8、6～12、8～14、9～11、10～16、12～16、14～18、16～20、16～18、18～22、または 18～20 である。

【0330】

好ましい実施形態においては、活性化された血清型 10A 多糖は、50 kDa～400 kDa、50 kDa～350 kDa、50 kDa～300 kDa、50 kDa～250 kDa、50 kDa～200 kDa、100 kDa～300 kDa、100 kDa～250 kDa、または 100 kDa～200 kDa の分子量を有する。好ましい実施形態において、活性化された血清型 10A 多糖は、50 kDa～300 kDa の分子量を有する。好ましい実施形態において、活性化された血清型 10A 多糖は、100 kDa～200 kDa の分子量を有する。好ましい実施形態において、活性化された血清型 10A 多糖は、100 kDa～200 kDa の分子量および 5～20、5～15、8～14、8～12、または 9～11 の酸化度を有する。好ましい実施形態において、活性化された血清型 10A 多糖は、100 kDa～200 kDa の分子量および 9～11 の酸化度を有する。

【0331】

活性化された多糖および／または担体タンパク質を、独立に（個別凍結乾燥）または一緒に（同時凍結乾燥）凍結乾燥（凍結-乾燥）することができる。

【0332】

1つの実施形態において、活性化された血清型 10A 多糖を、場合により、糖類の存在下で凍結乾燥する。好ましい実施形態においては、糖類は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態においては、糖類はスクロースである。一実施形態においては、次いで、凍結乾燥された活性化された多糖を、担体タンパク質を含む溶液と混合する。

【0333】

別の実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質を同時に凍結乾燥する。そのような実施形態においては、活性化された血清型 10A 多糖を、担体タンパク質と混合し、場合により、糖類の存在下で凍結乾燥する。好ましい実施形態においては、糖類は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態においては、糖類はスクロースである。次いで、同時に凍結乾燥された多糖および担体タンパク質を、溶液中に再懸濁し、還元剤と反応させることができる。

【0334】

コンジュゲーションプロセスの第2のステップは、還元剤を用いて、コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元（還元的アミノ化）である。

【0335】

活性化された血清型10A多糖は、

(c) 活性化された血清型10A多糖を担体タンパク質と混合するステップ；ならびに
(d) 混合された活性化された血清型10A多糖および担体タンパク質を、還元剤と反応させて、血清型10A多糖-担体タンパク質コンジュゲートを形成させるステップを含むプロセスによって担体タンパク質にコンジュゲートさせることができる。

【0336】

1つの実施形態において、還元反応を水性溶媒中で実行し、別の実施形態においては、反応を非プロトン性溶媒中で実行する。1つの実施形態において、還元反応を、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）溶媒中で実行する。DMSOまたはDMF溶媒を用いて、凍結乾燥された活性化された多糖および担体タンパク質を再構成させることができる。

【0337】

1つの実施形態において、還元剤は、BronstedまたはLewis酸の存在下のシアノ水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウムまた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*-BuMeiPrN-BH₃、ベンジルアミン-BH₃または5-エチル-2-メチルピリジンボラン（PEMB）などのアミンボランである。好ましい実施形態においては、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

【0338】

還元反応の終わりに、コンジュゲート中に残存する未反応のアルデヒド基が存在してもよく、これらのものを、好適なキャッピング剤を用いてキャップすることができる。一実施形態においては、このキャッピング剤は、水素化ホウ素ナトリウム（NaBH₄）である。

【0339】

担体タンパク質への血清型10A多糖のコンジュゲーション後、グリココンジュゲートを、当業者には公知の様々な技術により精製する（多糖-タンパク質コンジュゲートの量に関して富化する）ことができる。これらの技術としては、透析、濃縮／透析濾過操作、接線流濾過沈降／溶出、カラムクロマトグラフィー（DEAEまたは疎水性相互作用クロマトグラフィー）、および深層濾過が挙げられる。

【0340】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、10 kDa～2, 000 kDaの分子量を有する糖類を含む。他のそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa～2, 000 kDaの分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa～1, 750 kDa；50 kDa～1, 500 kDa；50 kDa～1, 250 kDa；50 kDa～1, 000 kDa；50 kDa～750 kDa；50 kDa～500 kDa；100 kDa～2, 000 kDa；100 kDa～1, 750 kDa；100 kDa～1, 500 kDa；100 kDa～1, 250 kDa；100 kDa～1, 000 kDa；100 kDa～750 kDa；100 kDa～500 kDa；200 kDa～2, 000 kDa；200 kDa～1, 750 kDa；200 kDa～1, 500 kDa；200 kDa～1, 250 kDa；200 kDa～1, 000 kDa；200 kDa～750 kDa；または200 kDa～500 kDa；または200 kDa～400 kDaの分子量を有する。いくつかのそのような実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

【0341】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、50

10

20

30

40

50

kDa～20, 000kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートは、50kDa～15, 000kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートは、500kDa～15, 000kDa、500kDa～10, 000kDa；2, 000kDa～10, 000kDa；または3, 000kDa～8, 000kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートは、1, 000kDa～10, 000kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートは、1, 000kDa～8, 000kDaの分子量を有する。さらに他の実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートは、2, 000kDa～8, 000kDaまたは3, 000kDa～7, 000kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、200kDa～20, 000kDa；200kDa～15, 000kDa；200kDa～10, 000kDa；200kDa～7, 500kDa；200kDa～5, 000kDa；200kDa～3, 000kDa；200kDa～1, 000kDa；500kDa～20, 000kDa；500kDa～15, 000kDa；500kDa～12, 500kDa；500kDa～10, 000kDa；500kDa～7, 500kDa；500kDa～6, 000kDa；500kDa～5, 000kDa；500kDa～4, 000kDa；500kDa～3, 000kDa；500kDa～2, 000kDa；500kDa～1, 500kDa；500kDa～1, 000kDa；750kDa～20, 000kDa；750kDa～15, 000kDa；750kDa～12, 500kDa；750kDa～10, 000kDa；750kDa～7, 500kDa；750kDa～6, 000kDa；750kDa～5, 000kDa；750kDa～4, 000kDa；750kDa～3, 000kDa；750kDa～2, 000kDa；750kDa～1, 500kDa；1, 000kDa～15, 000kDa；1, 000kDa～12, 500kDa；1, 000kDa～10, 000kDa；1, 000kDa～7, 500kDa；1, 000kDa～6, 000kDa；1, 000kDa～5, 000kDa；1, 000kDa～4, 000kDa；1, 000kDa～2, 500kDa；2, 000kDa～15, 000kDa；2, 000kDa～12, 500kDa；2, 000kDa～10, 000kDa；2, 000kDa～7, 500kDa；2, 000kDa～6, 000kDa；2, 000kDa～5, 000kDa；2, 000kDa～4, 000kDa；または2, 000kDa～3, 000kDaの分子量を有する。

【0342】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、3, 000kDa～20, 000kDa；3, 000kDa～15, 000kDa；3, 000kDa～10, 000kDa；3, 000kDa～7, 500kDa；3, 000kDa～5, 000kDa；4, 000kDa～20, 000kDa；4, 000kDa～15, 000kDa；4, 000kDa～12, 500kDa；4, 000kDa～10, 000kDa；4, 000kDa～7, 500kDa；4, 000kDa～6, 000kDa；または4, 000kDa～5, 000kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、5, 000kDa～20, 000kDa；5, 000kDa～15, 000kDa；5, 000kDa～10, 000kDaまたは5, 000kDa～7, 500kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、6, 000kDa～20, 000kDa；6, 000kDa～15, 000kDa；6, 000kDa～10, 000kDaまたは6, 000kDa～7, 500kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、7, 000kDa～20, 000kDa；7, 000kDa～15, 000kDa；7, 000kDa～10, 000kDaまたは7, 000kDa～8, 000kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、8, 000kDa～20, 000kDa；8, 000kDa～15, 000kDa；または8, 000kDa～

10,000 kDaの分子量を有する。

【0343】

上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。グリココンジュゲートの分子量は、SEC-MALLSにより測定される。

【0344】

本発明の血清型10Aグリココンジュゲートの特徴付けるための別の方法は、コンジュゲートされたリシンの範囲（コンジュゲーション度）として特徴付けることができる、糖類にコンジュゲートされる担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）中のリシン残基の数によるものである。多糖への共有結合に起因する、担体タンパク質のリシン改変の証拠を、当業者には公知の日常的な方法を用いる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は、コンジュゲート材料を生成するために用いられるCRM₁₉₇タンパク質出発材料と比較して、回収されるリシン残基の数の減少をもたらす。

【0345】

好ましい実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、2～15、2～13、2～10、2～8、2～6、2～5、2～4、3～15、3～13、3～10、3～8、3～6、3～5、3～4、5～15、5～10、8～15、8～12、10～15または10～12である。好ましい実施形態においては、血清型10Aグリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、6～8である。好ましい実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0346】

本発明の血清型10Aグリココンジュゲートを、糖類の担体タンパク質に対する比（重量／重量）により特徴付けることもできる。いくつかの実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（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。好ましい実施形態においては、コンジュゲート中の血清型10A糖類の担体タンパク質に対する比は、0.5～2.0、0.5～1.5、0.5～1.0、1.0～1.5または1.0～2.0である。好ましい実施形態においては、コンジュゲート中の血清型10A多糖の担体タンパク質に対する比は、0.8～1.4である。好ましい実施形態においては、コンジュゲート中の血清型10A多糖の担体タンパク質に対する比は、0.8～1.2（例えば、約0.8、約0.9、約1.0、約1.1または約1.2）である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0347】

本発明の血清型10Aグリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされないが、それにも拘わらず、グリココンジュゲート組成物中に存在する遊離糖類を含有してもよい。遊離糖類を、グリココンジュゲートと非共有的に会合させる（すなわち、非共有的に結合させる、吸着させる、またはその中に、もしくはそれと共に捕捉させる）ことができる。

【0348】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型10Aグリココンジュゲートは、10A糖類の総量に対して、約50%未満の遊離糖類、約45%未満の遊離糖類、約40%未満の遊離糖類、約35%未満の遊離糖類、約30%未満の遊離糖類、約25%未満の遊離糖類、約20%未満の遊離糖類、約15%未満の遊離糖類、約10%未満の遊離糖類、または約5%未満の遊離糖類を含む。好ましくは、血清型10Aグリココンジュゲートは、15%未満の遊離糖類、より好ましくは、10%未満の遊離糖類、さらにより好ましくは、5%未満の遊離糖類を含む。

【0349】

血清型10Aグリココンジュゲートを、その分子サイズ分布（K_d）により特徴付ける

こともできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体（CL-4B）を用いて、上記のように、コンジュゲートの相対分子サイズ分布を決定することができる。好ましい実施形態においては、少なくとも30%の本発明の血清型10Aグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも40%の本発明の血清型10Aグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、または85%の本発明の血清型10Aグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも60%の血清型10Aグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、50%～80%の本発明の血清型10Aグリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

10

【0350】

1. 3. 7 ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型11Aに由来するグリココンジュゲート

1つの実施形態において、血清型11Aグリココンジュゲートは、1-シアノー-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸（CDAP）を用いて多糖を活性化して、シアン酸エステルを形成させることにより得られる。活性化された多糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接、またはスパーサー（リンカー）基を介してカップリングさせることができる。例えば、スパーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド-活性化担体タンパク質（例えば、GMBsを用いる）またはハロアセチル化担体タンパク質（例えば、ヨードアセトイミド、SIB、SIAB、スルホ-SIAB、SIA、もしくはSBAPを用いる）との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル（CDAP化学反応により作製されていてもよい）を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド（ADH）とカップリングし、アミノ誘導体化された糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド（例えば、EDACまたはEDC）化学反応を用いて担体タンパク質にコンジュゲートさせる。そのようなコンジュゲートは、例えば、WO93/15760、WO95/08348およびWO96/129094に記載されている。

20

30

【0351】

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、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを用いる。多くは、国際特許出願公開第WO98/42721号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基とCDIとの反応（Bethellら（1979）、*Biol. Chern.* 254:2572~2574；Hearnら（1981）、*J. Chromatogr.* 218:509~518を参照されたい）、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護/脱保護、CDIカルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基とCDIとの反応および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を含んでもよい。

40

【0352】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型11Aグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。還元的アミノ化は、2つのステップ、（1）個々の六糖単位中の隣接ジオールからアルデヒド官能基を生成するための多糖の酸化、（2）コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元を含む。

【0353】

酸化の前に、血清型11A多糖を、場合により、加水分解して、その粘度を低下させる

50

。機械的または化学的加水分解を用いることができる。化学的加水分解を、酢酸を用いて行うことができる。機械的サイジングを、高圧均一化剪断を用いて行うことができる。

【0354】

酸化ステップは、過ヨウ素酸塩との反応を含んでもよい。本発明の目的では、用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む；この用語はまた、メタ過ヨウ素酸塩 (IO_4^-) とオルト過ヨウ素酸塩 (IO_6^{5-}) の両方および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）も含む。1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) の莢膜多糖血清型 11A を、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 (NaIO_4) の存在下で酸化する。別の実施形態においては、血清型 11A に由来する莢膜多糖を、オルト過ヨウ素酸塩、好ましくは、過ヨウ素酸の存在下で酸化する。

10

【0355】

多糖の酸化ステップの後、多糖は活性化されると言われ、本明細書の以下では「活性化された多糖」と呼ばれる。活性化された多糖を、精製し、凍結乾燥（凍結－乾燥）することができる。

【0356】

活性化された多糖および担体タンパク質を、独立に（個別凍結乾燥）または一緒に（同時凍結乾燥）、凍結乾燥（凍結－乾燥）することができる。一実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質は同時に凍結乾燥される。別の実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質は独立に凍結乾燥される。

20

【0357】

一実施形態においては、凍結乾燥は、非還元糖の存在下で行われ、可能な非還元糖としては、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットが挙げられる。

【0358】

コンジュゲーションプロセスの第2のステップは、還元剤を用いた、コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元（還元的アミノ化）である。好適である還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどのシアノ水素化ホウ素、ボラン－ピリジン、または水素化ホウ素交換樹脂が挙げられる。一実施形態においては、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

30

【0359】

1つの実施形態において、還元反応は、水性溶媒中で実行され、別の実施形態においては、反応は非プロトン性溶媒中で実行される。1つの実施形態において、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）溶媒中で実行される。DMSOまたはDMF溶媒を用いて、凍結乾燥された活性化された多糖および担体タンパク質を還元させることができる。

【0360】

一実施形態においては、0.1～3.0、0.15～2.0、0.2～2.0、または0.5～1.5モル当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムが還元反応において用いられる。一実施形態においては、約0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.9または3.0モル当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムが還元反応において用いられる。

40

【0361】

一実施形態においては、還元剤はトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムであり、さらなる実施形態においては、1.0～6.0モル当量、2.0～5.0モル当量または約3.0モル当量のトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムが還元反応において用いられる。

【0362】

還元反応の終わりに、コンジュゲート中に残存する未反応のアルデヒド基が存在してもよく、これらのものを好適なキャッピング剤を用いてキャップすることができる。一実施

50

10

20

30

40

50

【 0 3 6 6 】

【 0 3 6 7 】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型 11A グリココンジュゲートは、200 kDa ~ 20,000 kDa ; 200 kDa ~ 17,500 kDa ; 200 kDa ~ 15,000 kDa ; 200 kDa ~ 10,000 kDa ; 200 kDa ~ 7,500 kDa ; 200 kDa ~ 5,000 kDa ; 200 kDa ~ 3,000 kDa ; 200 kDa ~ 2,000 kDa ; 200 kDa ~ 1,000 kDa ; 500 kDa ~ 20,000 kDa ; 500 kDa ~ 17,500 kDa ; 500 kDa ~ 15,000 kDa ; 500 kDa ~ 12,500 kDa ; 500 kDa ~ 10,000 kDa ; 500 kDa ~ 7,500 kDa ; 500 kDa ~ 6,000 kDa ; 500 kDa ~ 5,000 kDa ; 500 kDa ~ 4,000 kDa ; 500 kDa ~ 3,000 kDa ; 500 kDa ~ 2,000 kDa ; 500 kDa ~ 1,500 kDa ; 500 kDa ~ 1,000 kDa ; 700 kDa ~ 20,000 kDa ; 700 kDa ~ 17,500 kDa ; 700 kDa ~ 15,000 kDa ; 700 kDa ~ 12,500 kDa ; 700 kDa ~ 10,000 kDa ;

Da; 700kDa~7, 500kDa; 700kDa~6, 000kDa; 700kDa~5, 000kDa; 700kDa~4, 500kDa; 700kDa~4, 000kDa; 700kDa~3, 500kDa; 700kDa~3, 000kDa; 700kDa~2, 000kDa; 700kDa~1, 500kDa; 1, 000kDa~20, 000kDa; 1, 000kDa~17, 500kDa; 1, 000kDa~15, 000kDa; 1, 000kDa~12, 500kDa; 1, 000kDa~10, 000kDa; 1, 000kDa~7, 500kDa; 1, 000kDa~6, 000kDa; 1, 000kDa~5, 000kDa; 1, 000kDa~4, 000kDa; 1, 000kDa~2, 500kDa; 2, 000kDa~20, 000kDa; 2, 000kDa~17, 500kDa; 2, 000kDa~15, 000kDa; 2, 000kDa~12, 500kDa; 2, 000kDa~10, 000kDa; 2, 000kDa~7, 500kDa; 2, 000kDa~6, 000kDa; 2, 000kDa~5, 000kDa; 2, 000kDa~4, 000kDa; または2, 000kDa~3, 000kDaの分子量を有する。

【0368】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型11Aグリココンジュゲートは、3, 000kDa~20, 000kDa; 3, 000kDa~17, 500kDa; 3, 000kDa~15, 000kDa; 3, 000kDa~10, 000kDa; 3, 000kDa~7, 500kDa; 3, 000kDa~5, 000kDa; 4, 000kDa~20, 000kDa; 4, 000kDa~17, 500kDa; 4, 000kDa~15, 000kDa; 4, 000kDa~12, 500kDa; 4, 000kDa~10, 000kDa; 4, 000kDa~7, 500kDa; 4, 000kDa~6, 000kDa; または4, 000kDa~5, 000kDaの分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型11Aグリココンジュゲートは、5, 000kDa~20, 000kDa; 5, 000kDa~17, 500kDa; 5, 000kDa~15, 000kDa; 5, 000kDa~10, 000kDaまたは5, 000kDa~7, 500kDaの分子量を有する。

【0369】

1つの実施形態において、前記血清型11Aグリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

【0370】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型11Aグリココンジュゲートは、血清型11A多糖1mMあたり少なくとも0.3、0.5、0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、3.0、3.4、3.8、4.2、4.6または5mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、血清型11Aグリココンジュゲートは、血清型11A多糖1mMあたり少なくとも1.8、2.2または2.6mMのアセテートを含む。1つの実施形態において、グリココンジュゲートは、血清型11A多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型11Aグリココンジュゲートは、血清型11A多糖1mMあたり少なくとも0.6、1、1.4、1.8、2.2、2.6、3、3.4、3.8、4.2または4.6mMのアセテートおよび血清型11A多糖1mMあたり約5mM未満のアセテートを含む。1つの実施形態において、本発明の血清型11Aグリココンジュゲートは、血清型11A多糖1mMあたり少なくとも0.6、1.0、1.4、1.8、2.2、2.6、または3.0mMのアセテートおよび血清型11A多糖1mMあたり約3.4mM未満のアセテートを含む。1つの実施形態において、本発明の血清型11Aグリココンジュゲートは、血清型11A多糖1mMあたり少なくとも0.6、1、1.4、1.8、2.2、2.6、または約3.0mMのアセテートおよび血清型11A多糖1mMあたり約3.3mM未満のアセテートを含む。任意の上記数が本開示の実施形態として企図される。

【0371】

好ましい実施形態においては、血清型11Aグリココンジュゲート中の血清型11A英

膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または0.95である。好ましい実施形態においては、血清型 1 1 A グリココンジュゲート中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.7である。好ましい実施形態においては、血清型 1 1 A グリココンジュゲート中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMの、単離された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.9である。好ましい実施形態においては、O-アセチル基の存在は、イオン-HPLC分析により決定される。

10

【0372】

好ましい実施形態においては、血清型 1 1 A グリココンジュゲート中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、または0.95である。好ましい実施形態においては、血清型 1 1 A グリココンジュゲート中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.7である。好ましい実施形態においては、血清型 1 1 A グリココンジュゲート中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMの、活性化された多糖中の血清型 1 1 A 莢膜多糖 1 mMあたりのアセテートのmMに対する比は、少なくとも0.9である。好ましい実施形態においては、O-アセチル基の存在は、イオン-HPLC分析により決定される。

20

【0373】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートは、血清型 1 1 A 多糖 1 mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9または1.0 mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、血清型 1 1 A グリココンジュゲートは、血清型 1 1 A 多糖 1 mMあたり少なくとも0.2、0.3または0.4 mMのグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートは、血清型 1 1 A 多糖 1 mMあたり少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8または0.9 mMのグリセロールおよび血清型 1 1 A 多糖 1 mMあたり約1.0 mM未満のグリセロールを含む。好ましい実施形態においては、本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートは、血清型 1 1 A 多糖 1 mMあたり少なくとも0.3、0.4、0.5、0.6、または0.7 mMのグリセロールおよび血清型 1 1 A 多糖 1 mMあたり約0.8 mM未満のグリセロールを含む。任意の上記数が本開示の実施形態として企図される。

30

【0374】

本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートを特徴付けるための別の方法は、コンジュゲートされたリシンの範囲（コンジュゲーション度）として特徴付けることができる、糖類にコンジュゲートされる担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）中のリシン残基の数によるものである。

40

【0375】

多糖への共有結合に起因する、担体タンパク質のリシン改変に関する証拠を、当業者には公知の日常的な方法を用いる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は、コンジュゲート材料を生成するために用いられるCRM₁₉₇タンパク質出発材料と比較して、回収されるリシン残基の数の減少をもたらす。

【0376】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、1~15、1~13、1~10、1~8、1~6、1~5、1~4、2~15、2~13、2~10、2~8、2~6、2~5、2~4、5~15、5~10、8~15、8~12、10~15または10~12である。1つの実施形態において、本

50

発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14 または約 15 である。好ましい実施形態においては、本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、1～6 または 2～5 である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質は CRM₁₉₇ である。

【0377】

本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートを、糖類の担体タンパク質に対する比（重量／重量）により特徴付けることもできる。いくつかの実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.2～4（例えば、約 0.2、約 0.3、約 0.4、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、約 3.0、約 3.1、約 3.2、約 3.3、約 3.4、約 3.5、約 3.6、約 3.7、約 3.8、約 3.9 または約 4.0）である。他の実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.7～2.5、0.8～2.0、0.7～2.0、0.8～1.5、0.7～1.5、0.7～1.4、0.8～1.4、0.7～1.45 または 0.8～1.45 である。さらなる実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.8～1.6（例えば、約 0.8、約 0.9、約 1.0、約 1.1、約 1.2、約 1.3、約 1.4、約 1.5 または約 1.6）である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質は CRM₁₉₇ である。1つの実施形態において、前記血清型 1 1 A グリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

【0378】

本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされないが、それにも拘わらず、グリココンジュゲート組成物中に存在する遊離糖類を含有してもよい。遊離糖類を、グリココンジュゲートと非共有的に会合させる（すなわち、非共有的に結合させる、吸着させる、またはその中に、もしくはそれと共に捕捉させる）ことができる。

【0379】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートは、血清型 1 1 A 莢膜多糖の総量と比較して約 50 % 未満の遊離血清型 1 1 A 莢膜多糖、血清型 1 1 A 莢膜多糖の総量と比較して約 45 % 未満の遊離糖類、約 40 % 未満の遊離糖類、約 35 % 未満の遊離糖類、約 30 % 未満の遊離糖類、約 25 % 未満の遊離糖類、約 20 % 未満の遊離糖類、約 15 % 未満の遊離糖類、約 10 % 未満の遊離糖類、または約 5 % 未満の遊離血清型 1 1 A 莢膜多糖を含む。好ましくは、血清型 1 1 A グリココンジュゲートは、15 % 未満の遊離糖類、より好ましくは、10 % 未満の遊離糖類、さらにより好ましくは、5 % 未満の遊離糖類を含む。

【0380】

血清型 1 1 A グリココンジュゲートを、その分子サイズ分布（K_d）により特徴付けることもできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体（CL-4B）を用いて、上記のように、コンジュゲートの相対分子サイズ分布を決定することができる。好ましい実施形態においては、少なくとも 30 % の本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 % または 85 % の本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 60 % の本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも 65 % の本発明の血清型 1 1 A グリココンジュゲートが、CL-4B カラム中で 0.3 より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0381】

1. 3. 8 ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 8 に由来するグリココンジュゲート

1つの実施形態において、血清型 8 グリココンジュゲートは、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ホウ酸 (CDAP) を用いて多糖を活性化して、シアン酸エステルを形成させることにより得られる。活性化された多糖を、担体タンパク質上のアミノ基に直接、またはスペーサー (リンカー) 基を介してカップリングさせることができる。例えば、スペーサーをシスタミンまたはシステアミンとして、チオール化された多糖を得てもよく、このチオール化された多糖は、マレイミド-活性化担体タンパク質 (例えば、GMB Sを用いる) またはハロアセチル化担体タンパク質 (例えば、ヨードアセトイミド、SIB、SIAB、スルホ-SIAB、SIA、もしくはSBAPを用いる) との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングすることができる。好ましくは、シアン酸エステル (CDAP 化学反応により作製されていてもよい) を、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) とカップリングし、アミノ誘導体化された糖類を、タンパク質担体上のカルボキシル基を介してカルボジイミド (例えば、EDAC または EDC) 化学反応を用いて担体タンパク質にコンジュゲートさせる。そのようなコンジュゲートは、例えば、WO 93/15760、WO 95/08348 および WO 96/129094 に記載されている。

10

【0382】

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、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTU を用いる。多くは、国際特許出願公開第 WO 98/42721 号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを伴ってもよく、これは、糖類の遊離ヒドロキシル基と CDI との反応 (Bethell ら (1979)、J. Biol. Chem. 254: 2572~2574; Hearn ら (1981)、J. Chromatogr. 218: 509~518 を参照されたい)、およびそれに続く、カルバメート結合を形成させるためのタンパク質との反応により形成され得る。これは、アノマー末端の一次ヒドロキシル基への還元、場合により、一次ヒドロキシル基の保護/脱保護、CDI カルバメート中間体を形成させるための一次ヒドロキシル基と CDI との反応および 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を含んでもよい。

20

30

【0383】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。還元的アミノ化は、2つのステップ、(1) 個々の六糖単位中の隣接ジオールからアルデヒド官能基を生成するための多糖の酸化、(2) コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元を含む。

【0384】

酸化の前に、血清型 8 多糖を、場合により、加水分解して、その粘度を低下させる。機械的または化学的加水分解を用いることができる。化学的加水分解を、酢酸を用いて行うことができる。

【0385】

酸化ステップは、過ヨウ素酸塩との反応を含んでもよい。本発明の目的のために、用語「過ヨウ素酸塩」は、過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む; この用語はまた、メタ過ヨウ素酸塩 (IO_4^-) とオルト過ヨウ素酸塩 (IO_6^{5-}) の両方および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) も含む。1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) の莢膜多糖血清型 8 を、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 (NaIO_4) の存在下で酸化する。別の実施形態においては、血清型 8 に由来する莢膜多糖を、オルト過ヨウ素酸塩、好ましくは、過ヨウ素酸の存在下で酸化する。

40

【0386】

多糖の酸化ステップの後、多糖は活性化されると言われ、本明細書の以下では「活性化

50

された多糖」と呼ばれる。活性化された多糖を、精製し、凍結乾燥（凍結－乾燥）することができる。

【0387】

活性化された多糖および担体タンパク質を、独立に（個別凍結乾燥）または一緒に（同時凍結乾燥）、凍結乾燥（凍結－乾燥）することができる。一実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質は同時に凍結乾燥される。別の実施形態においては、活性化された多糖および担体タンパク質は独立に凍結乾燥される。

【0388】

一実施形態においては、凍結乾燥は、非還元糖の存在下で行われ、可能な非還元糖としては、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットが挙げられる。

10

【0389】

コンジュゲーションプロセスの第2のステップは、還元剤を用いた、コンジュゲートを形成させるための活性化された多糖および担体タンパク質の還元（還元的アミノ化）である。好適である還元剤としては、シアノ水素化ホウ素ナトリウムなどのシアノ水素化ホウ素、ボラン－ピリジン、または水素化ホウ素交換樹脂が挙げられる。一実施形態においては、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

【0390】

1つの実施形態において、還元反応は、水性溶媒中で実行され、別の実施形態においては、反応は非プロトン性溶媒中で実行される。1つの実施形態において、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）溶媒中で実行される。DMSOまたはDMF溶媒を用いて、凍結乾燥された活性化された多糖および担体タンパク質を再構成させることができる。

20

【0391】

一実施形態においては、0.1～3.0、0.15～2.0、0.2～1.0、または0.25～0.5モル当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムが還元反応において用いられる。一実施形態においては、約0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.9または3.0モル当量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムが還元反応において用いられる。

30

【0392】

一実施形態においては、還元剤はトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムである。さらなる実施形態においては、1.0～6.0モル当量、2.0～5.0モル当量または約3.0モル当量のトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムが還元反応において用いられる。

【0393】

還元反応の終わりに、コンジュゲート中に残存する未反応のアルデヒド基が存在してもよく、これらのものを好適なキャッピング剤を用いてキャップすることができる。一実施形態においては、このキャッピング剤は、水素化ホウ素ナトリウム（ NaBH_4 ）である。1つの実施形態において、キャッピングは、還元反応物を、0.5～5.0モル当量の NaBH_4 、例えば、約1.0、1.5、2.0、2.5または3.0モル当量の NaBH_4 と混合することにより達成される。

40

【0394】

コンジュゲーション（還元反応および場合により、キャッピング）の後、グリココンジュゲートを精製することができる。グリココンジュゲートを、透析濾過および／またはイオン交換クロマトグラフィーおよび／またはサイズ排除クロマトグラフィーにより精製することができる。1つの実施形態において、グリココンジュゲートは、透析濾過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。

【0395】

一実施形態においては、グリココンジュゲートは滅菌濾過される。

【0396】

50

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）にコンジュゲートされ、10 kDa～2,000 kDa の分子量を有する多糖を含む。他のそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa～2,000 kDa の分子量を有する。さらなるそのような実施形態においては、糖類は、50 kDa～1,750 kDa；50 kDa～1,500 kDa；50 kDa～1,250 kDa；50 kDa～1,000 kDa；50 kDa～750 kDa；50 kDa～500 kDa；100 kDa～2,000 kDa；100 kDa～1,750 kDa；100 kDa～1,500 kDa；100 kDa～1,250 kDa；100 kDa～1,000 kDa；100 kDa～750 kDa；100 kDa～500 kDa；200 kDa～2,000 kDa；200 kDa～1,750 kDa；200 kDa～1,500 kDa；200 kDa～1,250 kDa；200 kDa～1,000 kDa；200 kDa～750 kDa；または 200 kDa～500 kDa；または 200 kDa～400 kDa の分子量を有する。1つの実施形態において、前記血清型 8 グリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

10

【0397】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、50 kDa～20,000 kDa の分子量を有する。他の実施形態においては、血清型 8 グリココンジュゲートは、50 kDa～15,000 kDa の分子量を有する。他の実施形態においては、血清型 8 グリココンジュゲートは、500 kDa～10,000 kDa の分子量を有する。他の実施形態においては、血清型 8 グリココンジュゲートは、200 kDa～10,000 kDa の分子量を有する。さらに他の実施形態においては、血清型 8 グリココンジュゲートは、1,000 kDa～8,000 kDa または 2,000 kDa～8,000 kDa の分子量を有する。

20

【0398】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、200 kDa～20,000 kDa；200 kDa～15,000 kDa；200 kDa～10,000 kDa；200 kDa～7,500 kDa；200 kDa～5,000 kDa；200 kDa～3,000 kDa；200 kDa～1,000 kDa；500 kDa～20,000 kDa；500 kDa～15,000 kDa；500 kDa～12,500 kDa；500 kDa～10,000 kDa；500 kDa～7,500 kDa；500 kDa～6,000 kDa；500 kDa～5,000 kDa；500 kDa～4,000 kDa；500 kDa～3,000 kDa；500 kDa～2,000 kDa；500 kDa～1,500 kDa；500 kDa～1,000 kDa；750 kDa～20,000 kDa；750 kDa～15,000 kDa；750 kDa～12,500 kDa；750 kDa～10,000 kDa；750 kDa～7,500 kDa；750 kDa～6,000 kDa；750 kDa～5,000 kDa；750 kDa～4,000 kDa；750 kDa～3,000 kDa；750 kDa～2,000 kDa；750 kDa～1,500 kDa；1,000 kDa～15,000 kDa；1,000 kDa～12,500 kDa；1,000 kDa～10,000 kDa；1,000 kDa～7,500 kDa；1,000 kDa～6,000 kDa；1,000 kDa～5,000 kDa；1,000 kDa～4,000 kDa；1,000 kDa～2,500 kDa；2,000 kDa～15,000 kDa；2,000 kDa～12,500 kDa；2,000 kDa～10,000 kDa；2,000 kDa～7,500 kDa；2,000 kDa～6,000 kDa；2,000 kDa～5,000 kDa；2,000 kDa～4,000 kDa；または 2,000 kDa～3,000 kDa の分子量を有する。

30

40

【0399】

さらなる実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、3,000 kDa～20,000 kDa；3,000 kDa～15,000 kDa；3,000 kDa～10,000 kDa；3,000 kDa～7,500 kDa；3,000 kDa～5,000 kDa；4,000 kDa～20,000 kDa；4,000 kDa～15,000 kDa；

50

00 kDa ; 4, 000 kDa ~ 12, 500 kDa ; 4, 000 kDa ~ 10, 000 kDa ; 4, 000 kDa ~ 7, 500 kDa ; 4, 000 kDa ~ 6, 000 kDa ; または 4, 000 kDa ~ 5, 000 kDa の分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、5, 000 kDa ~ 20, 000 kDa ; 5, 000 kDa ~ 15, 000 kDa ; 5, 000 kDa ~ 10, 000 kDa または 5, 000 kDa ~ 7, 500 kDa の分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、6, 000 kDa ~ 20, 000 kDa ; 6, 000 kDa ~ 15, 000 kDa ; 6, 000 kDa ~ 10, 000 kDa または 6, 000 kDa ~ 7, 500 kDa の分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、7, 000 kDa ~ 20, 000 kDa ; 7, 000 kDa ~ 15, 000 kDa ; 7, 000 kDa ~ 10, 000 kDa または 7, 000 kDa ~ 8, 000 kDa の分子量を有する。さらなる実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートは、8, 000 kDa ~ 20, 000 kDa ; 8, 000 kDa ~ 15, 000 kDa ; または 8, 000 kDa ~ 10, 000 kDa の分子量を有する。

10

【0400】

1つの実施形態において、前記血清型 8 グリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

【0401】

本発明の血清型 8 グリココンジュゲートを特徴付けるための別の方法は、コンジュゲートされたリシンの範囲（コンジュゲーション度）として特徴付けることができる、糖類にコンジュゲートされる担体タンパク質（例えば、CRM₁₉₇）中のリシン残基の数によるものである。

20

【0402】

多糖への共有結合に起因する、担体タンパク質のリシン改変に関する証拠を、当業者には公知の日常的な方法を用いるアミノ酸分析により得ることができる。よくある実施形態においては、担体タンパク質は、担体タンパク質上のリシン残基の1つまたは複数のε-アミノ基へのアミン結合を介して活性化された多糖に共有的にコンジュゲートされている。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質は、糖類に共有的にコンジュゲートされた2~20個のリシン残基を含む。他のそのような実施形態においては、担体タンパク質は、糖類に共有的にコンジュゲートされた4~16個または6~14個のリシン残基を含む。

30

【0403】

好ましい実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、2~20、2~15、2~13、2~10、2~8、2~6、2~5、2~4、3~15、3~13、3~10、3~8、3~6、3~5、3~4、5~15、5~10、8~15、8~12、10~15または10~12である。1つの実施形態において、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15である。好ましい実施形態においては、本発明の血清型 8 グリココンジュゲートのコンジュゲーション度は、4~16または6~14である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

40

【0404】

好ましい実施形態においては、担体タンパク質は、39個のリシン残基を含有するCRM₁₉₇を含む。いくつかのそのような実施形態においては、CRM₁₉₇は、糖類に共有的に連結された39個のうちの4~16個または6~14個のリシン残基を含んでもよい。このパラメータを表現する別の方法は、約10%~約41%または約15%~約36%のCRM₁₉₇リシンが糖類に共有的に連結されるということである。別のそのような実施形態においては、CRM₁₉₇は、糖類に共有的に連結された39個のうちの2~20個のリシン残基を含んでもよい。このパラメータを表現する別の方法は、約5%~約5

50

0%のCRM₁₉₇リシンが糖類に共有的に連結されるということである。いくつかのそのような実施形態においては、CRM₁₉₇は、糖類に共有的に連結された39個のうちの約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個のリシン残基を含んでもよい。

【0405】

本発明の血清型8グリココンジュゲートを、糖類の担体タンパク質に対する比（重量／重量）により特徴付けることもできる。いくつかの実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.2～4.0（例えば、約0.2、約0.3、約0.4、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、約3.0、約3.1、約3.2、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9または約4.0）である。他の実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.7～2.5である。さらなる実施形態においては、糖類の担体タンパク質に対する比（w/w）は、0.8～1.5（例えば、約0.8、約0.9、約1.0、約1.1、約1.2、約1.3、約1.4または約1.5）である。いくつかのそのような実施形態においては、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。1つの実施形態において、前記血清型8グリココンジュゲートは、還元的アミノ化を用いて調製される。

【0406】

本発明の血清型8グリココンジュゲートおよび免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有的にコンジュゲートされないが、それにも拘わらず、グリココンジュゲート組成物中に存在する遊離糖類を含有してもよい。遊離糖類を、グリココンジュゲートと非共有的に会合させる（すなわち、非共有的に結合させる、吸着させる、またはその中に、もしくはそれと共に捕捉させる）ことができる。

【0407】

いくつかの実施形態においては、本発明の血清型8グリココンジュゲートは、血清型8糖類の総量に対して約50%未満の遊離糖類、約45%未満の遊離糖類、約40%未満の遊離糖類、約35%未満の遊離糖類、約30%未満の遊離糖類、約25%未満の遊離糖類、約20%未満の遊離糖類、約15%未満の遊離糖類、約10%未満の遊離糖類、または約5%未満の遊離糖類を含む。好ましくは、血清型8グリココンジュゲートは、15%未満の遊離糖類、より好ましくは10%未満の遊離糖類、さらにより好ましくは、5%未満の遊離糖類を含む。

【0408】

血清型8グリココンジュゲートを、その分子サイズ分布（K_d）により特徴付けることもできる。サイズ排除クロマトグラフィー媒体（CL-4B）を用いて、コンジュゲートの相対分子サイズ分布を決定することができる。サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、コンジュゲートの分子サイズ分布をプロファイルするための重力送りカラム中で用いられる。媒体中の小孔から排除される高分子は低分子よりも迅速に溶出する。画分収集装置を用いて、カラム溶出液を収集する。画分を、糖類アッセイにより比色的に試験する。K_dの決定のために、カラムを校正して、分子が完全に排除される画分（V₀）、（K_d=0）、最大保持を表す画分（V_i）、（K_d=1）を確立する。特定の試料属性に達する画分（V_e）は、 $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ の式によりK_dと関連する。

【0409】

好ましい実施形態においては、少なくとも40%の本発明の血清型8グリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しいK_dを有する。好ましい実施形態においては、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、または85%の本発明の血清型8グリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しいK_dを

有する。好ましい実施形態においては、少なくとも60%の本発明の血清型8グリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、少なくとも70%の本発明の血清型8グリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0410】

好ましい実施形態においては、40%~90%の血清型8グリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、50%~90%の血清型8グリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。好ましい実施形態においては、65%~80%の血清型8グリココンジュゲートが、CL-4Bカラム中で0.3より低いか、またはそれと等しい K_d を有する。

【0411】

1. 4 本発明のグリココンジュゲートの組合せ

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、本明細書に開示されるグリココンジュゲートのいずれかを含む。

【0412】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型15Bに由来するグリココンジュゲート (上記のセクション1.3.4に記載のグリココンジュゲートなど)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22Fに由来するグリココンジュゲート (上記のセクション1.3.2に記載のグリココンジュゲートなど)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型33Fに由来するグリココンジュゲート (上記のセクション1.3.3に記載のグリココンジュゲートなど)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来するグリココンジュゲート (上記のセクション1.3.5に記載のグリココンジュゲートなど)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型10Aに由来するグリココンジュゲート (上記のセクション1.3.6に記載のグリココンジュゲートなど)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型11Aに由来するグリココンジュゲート (上記のセクション1.3.7に記載のグリココンジュゲートなど) およびストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型8に由来するグリココンジュゲート (上記のセクション1.3.8に記載のグリココンジュゲートなど) からなる群から選択される少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

【0413】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1.3.4に記載のグリココンジュゲートなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1.3.2に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1.3.3に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型33Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1.3.5に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型12Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1.3.6に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型10Aに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1.3.7に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型11Aに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

トを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1. 3. 8に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型8に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

【0414】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、15Bおよび22F、15Bおよび33F、15Bおよび12F、15Bおよび10A、15Bおよび11A、15Bおよび8、22Fおよび33F、22Fおよび12F、22Fおよび10A、22Fおよび11A、22Fおよび8、33Fおよび12F、33Fおよび10A、33Fおよび11A、33Fおよび8、12Fおよび10A、12Fおよび11A、12Fおよび8、10Aおよび11A、10Aおよび8、ならびに11Aおよび8からなる群から選択されるそれぞれ2種のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型のうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

10

【0415】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、それぞれ3種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：

15Bおよび22Fおよび33F、

15Bおよび22Fおよび12F、

15Bおよび22Fおよび10A、

15Bおよび22Fおよび11A、

15Bおよび22Fおよび8、

20

15Bおよび33Fおよび12F、

15Bおよび33Fおよび10A、

15Bおよび33Fおよび11A、

15Bおよび33Fおよび8、

15Bおよび12Fおよび10A、

15Bおよび12Fおよび11A、

15Bおよび12Fおよび8、

15Bおよび10Aおよび11A、

15Bおよび10Aおよび8、

30

15Bおよび11Aおよび8、

22Fおよび33Fおよび12F、

22Fおよび33Fおよび10A、

22Fおよび33Fおよび11A、

22Fおよび33Fおよび8、

22Fおよび12Fおよび10A、

22Fおよび12Fおよび11A、

22Fおよび12Fおよび8、

22Fおよび10Aおよび11A、

22Fおよび10Aおよび8、

40

22Fおよび11Aおよび8、

33Fおよび12Fおよび10A、

33Fおよび12Fおよび11A、

33Fおよび12Fおよび8、

33Fおよび10Aおよび11A、

33Fおよび10Aおよび8、

33Fおよび11Aおよび8、

12Fおよび10Aおよび11A、

12Fおよび10Aおよび8、

12Fおよび11Aおよび8または

10Aおよび11Aおよび8

50

のうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

【0416】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、それぞれ4種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：

15Bおよび22Fおよび33Fおよび12F、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび10A、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび11A、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび8、
 15Bおよび22Fおよび12Fおよび10A、
 15Bおよび22Fおよび12Fおよび11A、 10
 15Bおよび22Fおよび12Fおよび8、
 15Bおよび22Fおよび10Aおよび11A、
 15Bおよび22Fおよび10Aおよび8、
 15Bおよび22Fおよび11Aおよび8、
 15Bおよび33Fおよび12Fおよび10A、
 15Bおよび33Fおよび12Fおよび11A、
 15Bおよび33Fおよび12Fおよび8、
 15Bおよび33Fおよび10Aおよび11A、
 15Bおよび33Fおよび10Aおよび8、
 15Bおよび33Fおよび11Aおよび8、 20
 15Bおよび12Fおよび10Aおよび11A、
 15Bおよび12Fおよび10Aおよび8、
 15Bおよび12Fおよび11Aおよび8、
 15Bおよび10Aおよび11Aおよび8、
 22Fおよび33Fおよび12Fおよび10A、
 22Fおよび33Fおよび12Fおよび11A、
 22Fおよび33Fおよび12Fおよび8、
 22Fおよび33Fおよび10Aおよび11A、
 22Fおよび33Fおよび10Aおよび8、
 22Fおよび33Fおよび11Aおよび8、 30
 22Fおよび12Fおよび10Aおよび11A、
 22Fおよび12Fおよび10Aおよび8、
 22Fおよび12Fおよび11Aおよび8、
 22Fおよび10Aおよび11Aおよび8、
 33Fおよび12Fおよび10Aおよび11A、
 33Fおよび12Fおよび10Aおよび8、
 33Fおよび12Fおよび11Aおよび8、
 33Fおよび10Aおよび11Aおよび8または
 12Fおよび10Aおよび11Aおよび8

のうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。 40

【0417】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、それぞれ5種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：

15Bおよび22Fおよび33Fおよび12Fおよび10A、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび12Fおよび11A、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび12Fおよび8、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび10Aおよび11A、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび10Aおよび8、
 15Bおよび22Fおよび33Fおよび11Aおよび8、
 15Bおよび22Fおよび12Fおよび10Aおよび11A、 50

1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 1 2 Fおよび 1 1 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 A、
 1 5 Bおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 1 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 3 3 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8、
 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 A、
 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 8、
 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 1 Aおよび 8、
 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8、
 2 2 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8 または
 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8
 のうちの少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む。

10

【0418】

1 つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、それぞれ 6 種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型：

1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 A、
 1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 1 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8、
 1 5 Bおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8 または
 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8
 のうちの少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む。

20

【0419】

1 つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、それぞれ 7 種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型：1 5 Bおよび 2 2 Fおよび 3 3 Fおよび 1 2 Fおよび 1 0 Aおよび 1 1 Aおよび 8 のうちの少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む。

30

【0420】

1 つの実施形態において、このセクションで定義された免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1 5 B、2 2 F、3 3 F、1 2 F、1 0 A、1 1 A および／または 8 に由来するグリココンジュゲートは、上記のセクション 1. 3. 2～1. 3. 8 に開示されたものである。

【0421】

1 つの実施形態において、上記の免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 4、6 B、9 V、1 4、1 8 C、1 9 F および 2 3 F に由来するグリココンジュゲート（上記のセクション 1. 3. 1 に記載のグリココンジュゲートなど）をさらに含む。

40

【0422】

1 つの実施形態において、上記の免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、5 および 7 F に由来するグリココンジュゲート（上記のセクション 1. 3. 1 に記載のグリココンジュゲートなど）をさらに含む。

【0423】

1 つの実施形態において、上記の免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 6 A および 1 9 A に由来するグリココンジュゲート（上記のセクション 1. 3. 1 に記載のグリココンジュゲートなど）をさら

50

に含む。

【0424】

1つの実施形態において、上記の免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型3に由来するグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.1に記載のグリココンジュゲートなど）をさらに含む。

【0425】

好ましくは、上記の免疫原性組成物の全てのグリココンジュゲートは、担体タンパク質に個別にコンジュゲートされている。

【0426】

上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型22Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型33Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型10Aに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型11Aに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型8に由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、5および7Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Aおよび19Aに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記の免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型3に由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。

【0427】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のいずれかのグリココンジュゲートは、全てCRM₁₉₇に個別にコンジュゲートされている。

【0428】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6B、7F、9V、14および／または23Fに由来するグリココンジュゲートは、PDに個別にコンジュゲートされている。

【0429】

1つの実施形態においては、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型18Cに由来するグリココンジュゲートは、TTにコンジュゲートされている。

【0430】

1つの実施形態においては、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型19Fに由来するグリココンジュゲートは、DTにコンジュゲートされている。

【0431】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6B、7F、9V、14および／または23Fに由来するグリココンジュゲートは、PDに個別にコンジュゲートされ、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型18Cに由来するグリココンジュゲートは、TTにコンジュゲートされ、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型19Fに由来するグリココンジュゲートは、DTにコンジュゲートされている。

10

【0432】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）の8～20種の異なる血清型を含む。一実施形態においては、上記免疫原性組成物は、12、13、14、15、16、17、18、19または20種の異なる血清型に由来するグリココンジュゲートを含む。

【0433】

一実施形態においては、上記免疫原性組成物は、16または20種の異なる血清型に由来するグリココンジュゲートを含む。

20

【0434】

1つの実施形態においては、上記免疫原性組成物は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態においては、上記免疫原性組成物は、14、15、16、17、18、または19価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態においては、上記免疫原性組成物は、16価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態においては、上記免疫原性組成物は、19価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。

【0435】

1. 1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、上記のセクション1.3.4に記載のグリココンジュゲートなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

30

【0436】

2. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント1に加えて、上記のセクション1.3.2に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型22Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

【0437】

3. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント1または2に加えて、上記のセクション1.3.3に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型33Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

40

【0438】

4. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント1、2または3に加えて、上記のセクション1.3.5に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートを含む。

【0439】

5. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント1、2、3または4に加えて、上記のセクション1.3.6に開示されたものなどの、ストレプトコ

50

ツカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 10 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む。

【0440】

6. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント 1、2、3、4 または 5 に加えて、上記のセクション 1. 3. 7 に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 11 A に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む。

【0441】

7. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント 1、2、3、4、5 または 6 に加えて、上記のセクション 1. 3. 8 に開示されたものなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 8 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートを含む。

10

【0442】

8. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント 1、2、3、4、5、6 または 7 に加えて、上記のセクション 1. 3. 1 に記載のグリココンジュゲートなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F に由来するグリココンジュゲートを含む。

【0443】

9. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント 1、2、3、4、5、6、7 または 8 に加えて、上記のセクション 1. 3. 1 に記載のグリココンジュゲートなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、5 および 7 F に由来するグリココンジュゲートを含む。

20

【0444】

10. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 に加えて、上記のセクション 1. 3. 1 に記載のグリココンジュゲートなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 6 A および 19 A に由来するグリココンジュゲートを含む。

【0445】

11. 別の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、上記のポイント 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 に加えて、上記のセクション 1. 3. 1 に記載のグリココンジュゲートなどの、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 3 に由来するグリココンジュゲートを含む。

30

【0446】

1 つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F および 33 F に由来するグリココンジュゲートを含む。

【0447】

1 つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F および 33 F に由来するグリココンジュゲートを含む。

40

【0448】

1 つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F および 33 F に由来するコンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 糖類を含む。

【0449】

1 つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、血清型 1、4、5、6 A、6

50

B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 Fおよび33 Fに由来するコンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 糖類を含む。

【0450】

1つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物のグリココンジュゲートは、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 Fおよび33 Fに由来するグリココンジュゲートからなる。1つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物のグリココンジュゲートは、血清型1、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 Fおよび33 Fに由来するグリ
10
ココンジュゲートからなる。1つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物のグリココンジュゲートは、血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 Fおよび33 Fに由来するグリココンジュゲートからなる。1つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物のグリココンジュゲートは、1、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 Fおよび33 Fに由来するグリココンジュゲートからなる。

【0451】

好ましくは、本発明の免疫原性組成物のグリココンジュゲートは全て（例えば、上記のポイント1～11のいずれかの）、担体タンパク質に個別にコンジュゲートされている。
20

【0452】

1つの実施形態において、上記のポイント8～11のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型1、4、5、6 B、7 F、9 V、14および／または23 Fに由来するグリココンジュゲートは、PDに個別にコンジュゲートされている。

【0453】

1つの実施形態において、上記のポイント8～11のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型18 Cに由来するグリココンジュゲートは、TTにコンジュゲートされている。

【0454】

1つの実施形態において、上記のポイント8～11のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型19 Fに由来するグリココンジュゲートは、DTにコンジュゲートされている。
30

【0455】

上記のポイント8～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型1、4、5、6 B、7 F、9 V、14および／または23 Fに由来するグリココンジュゲートは、PDに個別にコンジュゲートされ、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型18 Cに由来するグリココンジュゲートは、TTにコンジュゲートされ、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型19 Fに由来するグリココンジュゲート
40
は、DTにコンジュゲートされている。

【0456】

上記のポイント1～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型22 Fに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント2～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型33 Fに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント3～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型15 Bに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント4～11のいずれか
50

の1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型12Fに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント5～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型10Aに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント6～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型11Aに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント7～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型8に由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント8～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント9～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、5および7Fに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント10～11のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Aおよび19Aに由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記のポイント11の1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型3に由来するグリココンジュゲートはCRM₁₉₇にコンジュゲートされている。

【0457】

1つの実施形態において、上記のポイント1～11の免疫原性組成物のグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇に個別にコンジュゲートされている。

【0458】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）の12～20種の異なる血清型を含む。一実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、12、13、14、15、16、17、18、19または20種の異なる血清型に由来するグリココンジュゲートを含む。一実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、16または20種の異なる血清型に由来するグリココンジュゲートを含む。

【0459】

1つの実施形態において、上記のポイント1～11の免疫原性組成物は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態において、上記のポイント1～11の免疫原性組成物は、15、16、17、18または19価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態において、上記のポイント1～11の免疫原性組成物は、16価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態において、上記のポイント1～11の免疫原性組成物は、19価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。

【0460】

担体タンパク質への莢膜多糖のコンジュゲーション後、グリココンジュゲートを、様々な技術により精製する（多糖－タンパク質コンジュゲートの量に関して富化する）。これらの技術としては、濃縮／透析濾過操作、沈降／溶出、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過が挙げられる（例えば、米国特許出願公開第2007／0184072号またはWO2008／079653を参照されたい）。個々のグリココンジュゲートを精製した後、それらを混合して、本発明の免疫原性組成物を製剤化する。

【0461】

1. 5 本発明のグリココンジュゲートのさらなる組合せ

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Vに

由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0462】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、9Vおよび4、9Vおよび6B、9Vおよび14、9Vおよび18C、9Vおよび19F、9Vおよび23Fからなる群から選択されるそれぞれ2種のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型のうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0463】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、それぞれ7種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：9V、4、6B、14、18C、19Fおよび23Fのうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

10

【0464】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、それぞれ8種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：

9Vおよび1および4および6Bおよび14および18Cおよび19Fおよび23F、
9Vおよび4および5および6Bおよび14および18Cおよび19Fおよび23F、または

9Vおよび4および6Bおよび7Fおよび14および18Cおよび19Fおよび23F
のうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

20

【0465】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、それぞれ10種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：9V、1、5、4、6B、7F、14、18C、19Fおよび23Fのうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0466】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、それぞれ11種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：

30

9Vおよび1および4および5および6Aおよび6Bおよび7Fおよび14および18C
および19Fおよび23Fまたは

9Vおよび1および4および5および6Bおよび7Fおよび14および18Cおよび19
Aおよび19Fおよび23F

のうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0467】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、それぞれ12種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：9V、1、4、5、6A、6B、7F、14、18C、19A、19Fおよび23Fのうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

40

【0468】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、それぞれ13種の下記のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型：9V、1、3、4、5、6A、6B、7F、14、18C、19A、19Fおよび23Fのうちの少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0469】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型2に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0470】

50

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型17Fに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0471】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型20に由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0472】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

10

【0473】

1つの実施形態において、上記のセクション1. 4で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Nに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲートをさらに含む。

【0474】

好ましくは、上記免疫原性組成物のグリココンジュゲートは全て、担体タンパク質に個別にコンジュゲートされている。

【0475】

上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Vに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型4、6B、14、18C、19Fおよび23Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、5および7Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Aおよび19Aに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型3に由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型2に由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型17Fに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型20に由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。上記免疫原性組成物のいずれかの1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Nに由来するグリココンジュゲートは、CRM₁₉₇にコンジュゲートされている。

20

30

40

【0476】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のグリココンジュゲートは全て、CRM₁₉₇に個別にコンジュゲートされている。

【0477】

別の実施形態においては、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニュー

50

ーモニエ (S. pneumoniae) 血清型 9 V に由来するグリココンジュゲートは、PD に個別にコンジュゲートされている。

【0478】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、4、5、6 B、7 F、9 V、14 および／または 23 F に由来するグリココンジュゲートは、PD に個別にコンジュゲートされている。

【0479】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 18 C に由来するグリココンジュゲートは、TT にコンジュゲートされている。

10

【0480】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 19 F に由来するグリココンジュゲートは、DT にコンジュゲートされている。

【0481】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物のいずれかのストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、4、5、6 B、7 F、9 V、14 および／または 23 F に由来するグリココンジュゲートは、PD に個別にコンジュゲートされ、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 18 C に由来するグリココンジュゲートは、TT にコンジュゲートされ、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 19 F に由来するグリココンジュゲートは、DT にコンジュゲートされている。

20

【0482】

1つの実施形態において、上記免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) の 7～25 種の異なる血清型を含む。一実施形態においては、上記免疫原性組成物は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 または 25 種の異なる血清型に由来するグリココンジュゲートを含む。一実施形態においては、上記免疫原性組成物は、16 または 20 種の異なる血清型に由来するグリココンジュゲートを含む。1つの実施形態において、上記免疫原性組成物は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態において、上記免疫原性組成物は、14、15、16、17、18 または 19 価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態において、上記免疫原性組成物は、16 価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態において、上記免疫原性組成物は、19 価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。1つの実施形態において、上記免疫原性組成物は、20 価の肺炎球菌コンジュゲート組成物である。

30

【0483】

担体タンパク質への莢膜多糖のコンジュゲーション後、グリココンジュゲートを、様々な技術により精製する（多糖－タンパク質コンジュゲートの量に関して富化する）。これらの技術としては、濃縮／透析濾過操作、沈降／溶出、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過が挙げられる（例えば、米国特許出願公開第 2007／0184072 号または WO 2008／079653 を参照されたい）。個々のグリココンジュゲートを精製した後、それらを混合して、本発明の免疫原性組成物を製剤化する。

40

【0484】

1. 6 本発明のグリココンジュゲートの特定の組合せ

1つの実施形態において、上記のセクション 1. 4 または 1. 5 で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 9 N に由来する莢膜糖類を含まない。

【0485】

50

1つの実施形態において、上記のセクション1.4または1.5で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Aに由来する莢膜糖類を含まない。

【0486】

1つの実施形態において、上記のセクション1.4または1.5で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Lに由来する莢膜糖類を含まない。

【0487】

1つの実施形態において、上記のセクション1.4または1.5で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Nおよび9Aに由来する莢膜糖類を含まない。

10

【0488】

1つの実施形態において、上記のセクション1.4または1.5で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Nおよび9Lに由来する莢膜糖類を含まない。

【0489】

1つの実施形態において、上記のセクション1.4または1.5で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9Aおよび9Lに由来する莢膜糖類を含まない。

【0490】

20

1つの実施形態において、上記のセクション1.4または1.5で定義された免疫原性組成物のいずれかは、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型9N、9Aおよび9Lに由来する莢膜糖類を含まない。

【0491】

2 免疫原性組成物の用量

各用量中のグリココンジュゲートの量は、典型的なワクチン被接種者において有意な有害副作用なしに免疫保護応答を誘導する量として選択される。そのような量は、用いられる特定の免疫原およびそれが提示される方法に応じて変化する。

【0492】

2.1 グリココンジュゲートの量

30

免疫原性組成物中の特定のグリココンジュゲートの量を、そのコンジュゲートの総多糖（コンジュゲート化および非コンジュゲート化）に基づいて算出することができる。例えば、20%の遊離多糖を含むグリココンジュゲートは、100 μ gの多糖用量中、約80 μ gのコンジュゲート化多糖および約20 μ gの非コンジュゲート化多糖を有する。グリココンジュゲートの量は、肺炎球菌血清型に応じて変化してもよい。糖類の濃度を、ウロン酸アッセイによって決定することができる。

【0493】

免疫原性組成物中の様々な多糖成分の「免疫原性量」は、異なってもよく、それぞれ、約1 μ g、約2 μ g、約3 μ g、約4 μ g、約5 μ g、約6 μ g、約7 μ g、約8 μ g、約9 μ g、約10 μ g、約15 μ g、約20 μ g、約30 μ g、約40 μ g、約50 μ g、約60 μ g、約70 μ g、約80 μ g、約90 μ g、または約100 μ gの任意の特定の多糖抗原を含んでもよい。

40

【0494】

一般に、各用量は、所与の血清型について0.1 μ g～100 μ gの多糖、特に、0.5 μ g～20 μ g、より特には、1.0 μ g～10 μ g、さらにより特に好ましくは、2.0 μ g～5.0 μ gを含む。上記範囲のいずれかの中の任意の全整数が、本開示の実施形態として企図される。

【0495】

1つの実施形態において、各用量は、それぞれの特定のグリココンジュゲートについて約1.0 μ g、約1.2 μ g、約1.4 μ g、約1.6 μ g、約1.8 μ g、約2.0 μ

50

g、約2.2 μg、約2.4 μg、約2.6 μg、約2.8 μg、約3.0 μg、約3.2 μg、約3.4 μg、約3.6 μg、約3.8 μg、約4.0 μg、約4.2 μg、約4.4 μg、約4.6 μg、約4.8 μg、約5.0 μg、約5.2 μg、約5.4 μg、約5.6 μg、約5.8 μgまたは約6.0 μgの多糖を含む。

【0496】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび／または33Fに由来するグリココンジュゲートについて、約1.1 μg、約1.2 μg、約1.3 μg、約1.4 μg、約1.5 μg、約1.6 μg、約1.7 μg、約1.8 μg、約1.9 μg、約2.0 μg、約2.1 μg、約2.2 μg、約2.3 μg、約2.4 μg、約2.5 μg、約2.6 μg、約2.7 μg、約2.8 μg、約2.9 μg、または約3.0 μgの多糖を含む。

10

【0497】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび／または33Fに由来するグリココンジュゲートについて、約1.1 μg、約1.2 μg、約1.3 μg、約1.4 μg、約1.5 μg、約1.6 μg、約1.7 μg、約1.8 μg、約1.9 μg、約2.0 μg、約2.1 μg、約2.2 μg、約2.3 μg、約2.4 μg、約2.5 μg、約2.6 μg、約2.7 μg、約2.8 μg、約2.9 μg、または約3.0 μgの多糖を含む。

20

【0498】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約2.0 μg、約2.2 μg、約2.4 μg、約2.6 μg、約2.8 μg、約3.0 μg、約3.2 μg、約3.4 μg、約3.6 μg、約3.8 μg、約4.0 μg、約4.2 μg、約4.4 μg、約4.6 μg、約4.8 μg、約5.0、約5.2 μg、約5.4 μg、約5.6 μg、約5.8 μg、または約6.0 μgの多糖を含む。

【0499】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約1.5 μg～約3.0 μgの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約3.0 μg～約6.0 μgの多糖を含む。

30

【0500】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約2.0 μg～約2.5 μgの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.0 μg～約4.8 μgの多糖を含む。

40

【0501】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートに由来する、約2.2 μgの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.4 μgの多糖を含む。

50

【0502】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約1.5 μ g～約3.0 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約3 μ g～約6 μ gの多糖を含む。

【0503】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約2.0 μ g～約2.5 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.0 μ g～約4.8 μ gの多糖を含む。

10

【0504】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートに由来する約2.2 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.4 μ gの多糖を含む。

20

【0505】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約1.5 μ g～約3.0 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約3.0 μ g～約6.0 μ gの多糖を含む。

【0506】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約2.0 μ g～約2.5 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.0 μ g～約4.8 μ gの多糖を含む。

30

【0507】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートに由来する、約2.2 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.4 μ gの多糖を含む。

40

【0508】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約1.5 μ g～約3.0 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約3.0 μ g～約6.0 μ gの多糖を含む。

【0509】

50

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートについて、約2.0 μ g～約2.5 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.0 μ g～約4.8 μ gの多糖を含む。

【0510】

1つの実施形態において、各用量は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲートに由来する約2.2 μ gの多糖、ならびにストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲートについて、約4.4 μ gの多糖を含む。

10

【0511】

2.2 担体の量

一般に、各用量は、10 μ g～150 μ gの担体タンパク質、特に、15 μ g～100 μ gの担体タンパク質、より特には、25 μ g～75 μ gの担体タンパク質、さらにより特には、40 μ g～60 μ gの担体タンパク質を含む。1つの実施形態において、前記担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0512】

1つの実施形態において、各用量は、約25 μ g、約26 μ g、約27 μ g、約28 μ g、約29 μ g、約30 μ g、約31 μ g、約32 μ g、約33 μ g、約34 μ g、約35 μ g、約36 μ g、約37 μ g、約38 μ g、約39 μ g、約40 μ g、約41 μ g、約42 μ g、約43 μ g、約44 μ g、約45 μ g、約46 μ g、約47 μ g、約48 μ g、約49 μ g、約50 μ g、約51 μ g、約52 μ g、約53 μ g、約54 μ g、約55 μ g、約56 μ g、約57 μ g、約58 μ g、約59 μ g、約60 μ g、約61 μ g、約62 μ g、約63 μ g、約64 μ g、約65 μ g、約66 μ g、約67 μ g、約68 μ g、約69 μ g、約70 μ g、約71 μ g、約72 μ g、約73 μ g、約74 μ gまたは約75 μ gの担体タンパク質を含む。1つの実施形態において、前記担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

20

30

【0513】

3 さらになる抗原

本発明の免疫原性組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）糖類抗原（グリココンジュゲート）を含む。それらはまた、他の病原体、特に、細菌および／またはウイルスに由来する抗原をさらに含んでもよい。好ましいさらになる抗原は、ジフテリアトキソイド（D）、破傷風トキソイド（T）、典型的には無細胞性（Pa）である百日咳抗原（P）、B型肝炎ウイルス（HBV）表面抗原（HBsAg）、A型肝炎ウイルス（HAV）抗原、コンジュゲート化ヘモフィルス・インフルエンザ（*Haemophilus influenzae*）b型莢膜糖類（Hib）、不活化ポリオウイルスワクチン（IPV）から選択される。

40

【0514】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、D-T-Paを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、D-T-Pa-Hib、D-T-Pa-IPVまたはD-T-Pa-HBsAgを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、D-T-Pa-HBsAg-IPVまたはD-T-Pa-HBsAg-Hibを含む。1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、D-T-Pa-HBsAg-IPV-Hibを含む。

【0515】

百日咳抗原：ボルデテラ・ペルツシス（*Bordetella pertussis*）は、百日咳を引き起こす。ワクチン中の百日咳抗原は細胞性（全細胞、不活化ボルデテラ

50

・ペルツシス (*B. pertussis*) 細胞の形態) または無細胞性である。細胞性百日咳抗原の調製は、文書で十分に立証されている (例えば、それをボルデテラ・ペルツシス (*B. pertussis*) のフェーズ I 培養物の熱不活化により得ることができる)。しかしながら、好ましくは、本発明は無細胞性抗原を用いる。無細胞性抗原を用いる場合、1つ、2つまたは (好ましくは) 3つの以下の抗原: (1) 解毒された百日咳毒素 (百日咳トキソイド、または PT); (2) 線維性ヘマグルチニン (FHA); (3) ペルタクチン (69 キロダルトン外膜タンパク質としても知られる) を用いることが好ましい。FHA およびペルタクチンを、本発明による使用の前にホルムアルデヒドで処理することができる。PT を、好ましくは、ホルムアルデヒドおよび/またはグルタルアルデヒドを用いる処理により解毒する。無細胞性百日咳抗原を、好ましくは、1つまたは複数のアルミニウム塩アジュバント上に吸着させる。代替手段として、それらを非吸着状態で添加してもよい。ペルタクチンを添加する場合、それは水酸化アルミニウムアジュバント上に既に吸着されていることが好ましい。PT および FHA を、水酸化アルミニウムアジュバントまたはリン酸アルミニウム上に吸着させることができる。PT、FHA およびペルタクチンの全部の水酸化アルミニウムへの吸着が最も好ましい。

10

【0516】

不活化ポリオウイルスワクチン: ポリオウイルスは急性灰白髄炎を引き起こす。経口ポリオウイルスワクチンを用いるよりもむしろ、本発明の好ましい実施形態は IPV を用いる。患者に投与する前に、ポリオウイルスを不活化する必要がある、これを、ホルムアルデヒドを用いる処理により達成することができる。急性灰白髄炎は、3つの型のポリオウイルスのうちの1つにより引き起こされ得る。3つの型は類似しており、同一の症状を引き起こすが、それらは抗原的に異なり、1つの型による感染は他の型による感染に対して保護しない。したがって、本発明においては3つのポリオウイルス抗原を用いることが好ましい: ポリオウイルス1型 (例えば、Mahoney 株)、ポリオウイルス2型 (例えば、MEF-1 株)、およびポリオウイルス3型 (例えば、Saukett 株)。このウイルスを、好ましくは個別に増殖させ、精製し、不活化した後、混合して、本発明と共に使用するためのバルク三価混合物を得る。

20

【0517】

ジフテリアトキソイド: コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheriae*) はジフテリアを引き起こす。ジフテリア毒素を (例えば、ホルマリンまたはホルムアルデヒドを用いて) 処理して、注射後、特定の抗毒素抗体を誘導する能力を保持しながら毒性を除去することができる。これらのジフテリアトキソイドは、ジフテリアワクチン中で用いられる。好ましいジフテリアトキソイドは、ホルムアルデヒド処理により調製されるものである。ジフテリアトキソイドを、増殖培地中でコリネバクテリウム・ジフテリア (*C. diphtheriae*) を増殖させた後、ホルムアルデヒドで処理し、限外濾過し、沈降させることにより得ることができる。次いで、トキソイド化された材料を、滅菌濾過および/または透析を含むプロセスにより処理することができる。ジフテリアトキソイドを、好ましくは、水酸化アルミニウムアジュバント上に吸着させる。

30

【0518】

破傷風トキソイド: クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*) は破傷風を引き起こす。破傷風毒素を処理して、保護トキソイドを得ることができる。トキソイドは破傷風ワクチン中で用いられる。好ましい破傷風トキソイドは、ホルムアルデヒド処理により調製されるものである。破傷風トキソイドを、増殖培地中でクロストリジウム・テタニ (*C. tetani*) を増殖させた後、ホルムアルデヒドで処理し、限外濾過し、沈降させることにより得ることができる。次いで、材料を、滅菌濾過および/または透析を含むプロセスにより処理することができる。

40

【0519】

A型肝炎ウイルス抗原: A型肝炎ウイルス (HAV) は、ウイルス性肝炎を引き起こす公知の因子の1つである。好ましい HAV 成分は不活化ウイルスに基づくものであり、不

50

活化はホルマリン処置により達成することができる。

【0520】

B型肝炎ウイルス（HBV）は、ウイルス性肝炎を引き起こす公知の因子の1つである。キャプシドの主成分は、HBV表面抗原として知られるタンパク質であり、またはより一般的には、典型的には約24kDaの分子量を有する226アミノ酸のポリペプチドであるHBsAgである。全ての存在するB型肝炎ワクチンは、HBsAgを含有し、この抗原を正常なワクチン被接種者に投与する場合、それはHBV感染に対して保護する抗HBsAg抗体の産生を刺激する。

【0521】

ワクチン製造のために、HBsAgは2つの方法で作製されてきた：慢性B型肝炎キャリアの血漿からの粒子状形態の抗原の精製または組換えDNA法によるタンパク質の発現（例えば、酵母細胞中での組換え発現）。天然のHBsAg（すなわち、血漿精製産物中として）と違って、酵母により発現されるHBsAgは一般的にはグリコシル化されておらず、これは本発明と共に使用するためのHBsAgの最も好ましい形態である。

【0522】

コンジュゲート化ヘモフィルス・インフルエンザ（Haemophilus influenzae）b型抗原：ヘモフィルス・インフルエンザ（Haemophilus influenzae）b型（Hib）は、細菌性髄膜炎を引き起こす。Hibワクチンは、典型的には莢膜糖類抗原に基づくものであり、その調製は文書で十分に立証されている。Hib糖類を担体タンパク質にコンジュゲートさせて、特に、子供におけるその免疫原性を増強することができる。典型的な担体タンパク質は、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM₁₉₇、ヘモフィルス・インフルエンザ（H. influenzae）タンパク質D、およびB血清群髄膜炎菌に由来する外膜タンパク質複合体である。コンジュゲートの糖類部分は、Hib細菌から調製される完全長ポリリボシルリビトールリン酸（PRP）および／または完全長PRPの断片を含んでもよい。Hibコンジュゲートを、アルミニウム塩アジュバントに吸着させても、またはさせなくてもよい。

【0523】

1つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、コンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群Y莢膜糖類（MenY）、および／またはコンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群C莢膜糖類（MenC）をさらに含む。

【0524】

1つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、コンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群A莢膜糖類（MenA）、コンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群W135莢膜糖類（MenW135）、コンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群Y莢膜糖類（MenY）、および／またはコンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群C莢膜糖類（MenC）をさらに含む。

【0525】

1つの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、コンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群W135莢膜糖類（MenW135）、コンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群Y莢膜糖類（MenY）、および／またはコンジュゲート化ナイセリア・メニンギティディス（N. meningitidis）血清群C莢膜糖類（MenC）をさらに含む。

【0526】

4 アジュバント

いくつかの実施形態においては、本明細書に開示される免疫原性組成物は、少なくとも1つ、2つまたは3つのアジュバントをさらに含んでもよい。用語「アジュバント」とは

10

20

30

40

50

、抗原に対する免疫応答を増強する化合物または混合物を指す。抗原は、主に送達系として、主に免疫モジュレータとして作用するか、またはその両方の強力な特徴を有してもよい。好適なアジュバントとしては、ヒトを含む哺乳動物における使用にとって好適なものが挙げられる。

【0527】

ヒトにおいて用いることができる公知の好適な送達系型アジュバントの例としては、限定されるものではないが、ミョウバン（例えば、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム）、リン酸カルシウム、リポソーム、MF59（4.3% w/v スクアレン、0.5% w/v ポリソルベート80（Tween 80）、0.5% w/v 三オレイン酸ソルビタン（Span 85））などの水中油乳濁液、モンタニドなどの油中水乳濁液、およびポリ（D，L-ラクチド-α-D-グリコリド）（PLG）マイクロ粒子またはナノ粒子が挙げられる。

10

【0528】

1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、アジュバントとしてアルミニウム塩（ミョウバン）（例えば、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム）を含む。好ましい実施形態においては、本明細書に開示される免疫原性組成物は、アジュバントとしてリン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムを含む。1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、0.1 mg/mL ~ 1 mg/mL または 0.2 mg/mL ~ 0.3 mg/mL の、リン酸アルミニウムの形態のアルミニウム元素を含む。1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、約 0.25 mg/mL の、リン酸アルミニウムの形態のアルミニウム元素を含む。

20

【0529】

ヒトにおいて用いることができる公知の好適な免疫調節型アジュバントの例としては、限定されるものではないが、アクイラ（Aquilia）の木の樹皮に由来するサポニン抽出物（QS21、QuilA）、MPL（モノホスホリルリビドA）、3DMPL（3-O-脱アシル化MPL）またはGLA-AQなどのTLR4アゴニスト、LT/Ct変異体、様々なインターロイキン（例えば、IL-2、IL-12）またはGM-CSFなどのサイトカインその他が挙げられる。

【0530】

30

ヒトにおいて用いることができる送達および免疫調節の両方を特徴とする公知の好適な免疫調節型アジュバントの例としては、限定されるものではないが、ISCOMS（例えば、Sjolanderら（1998）J. Leukocyte Biol. 64:713; WO90/03184、WO96/11711、WO00/48630、WO98/36772、WO00/41720、WO2006/134423およびWO2007/026190を参照されたい）またはTLR4アゴニストと水中油乳濁液との組合せであるGLA-EMが挙げられる。

【0531】

限定されるものではないが、動物実験などの獣医学的適用のためには、当業者であれば、完全Freundアジュバント（CFA）、Freund不完全アジュバント（IFA）、Emulsigen、N-アセチル-L-アラニン-L-トレオニン-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチル-L-アルギニン-L-アラニン-D-イソグルタミン（CGP11637、ノル-MDPと呼ばれる）、N-アセチル-L-アラニン-L-アラニン-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-（1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロール-3-ヒドロキシホスホリルオキシ）-エチルアミン（CGP19835A、MTP-PEと呼ばれる）、ならびに2%スクアレン/Tween 80乳濁液中に細菌から抽出される3つの成分、モノホスホリルリビドA、トレハロースジミコール酸および細胞壁骨格（MPL+TDM+CWS）を含有するRIBIを用いることができる。

40

【0532】

本明細書に開示される肺炎球菌ワクチンの有効性を増強するためのさらなる例示的アジ

50

ュバントとしては、限定されるものではないが、(1) 例えば、(a) より大きい粒径の乳濁液を生成するためにサブミクロン乳濁液中にマイクロ流体化された、またはボルテックスされた10%スクアラン、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、および (b) 2% スクアレン、0.2% Tween 80、ならびにモノホスホリルリピド A (MPL)、トレハロースジミコール酸 (TDM)、および細胞壁骨格 (CWS)、好ましくは、MPL+CWS (DET OX (商標)) などの1つまたは複数の細菌細胞壁成分を含有する RIBI (商標) アジュバント系 (RAS) (Ribi Immunochem、Hamilton、MT) などの、水中油乳濁液製剤 (ムラミルペプチド (下記参照) または細菌細胞壁成分などの他の特異的免疫刺激剤を含む、または含まない) ; (2) QS21、STIMULON (商標) (Cambridge Bioscience、Worcester、MA)、ABISCO (登録商標) (Isconova、Sweden)、または用いることができる ISCOMATRIX (登録商標) (Commonwealth Serum Laboratories、Australia) またはさらなる界面活性剤を含まなくてもよい ISCOM (免疫刺激複合体) などのそれから生成される粒子 (例えば、WO00/07621) などのサポニンアジュバント ; (3) 完全 Freund アジュバント (CFA) および不完全 Freund アジュバント (IFA) ; (4) 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 (例えば、WO99/44636))、インターフェロン (例えば、ガンマインターフェロン)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF) などのサイトカイン ; (5) 場合により、肺炎球菌糖類と共に用いられる場合 (例えば、WO00/56358 を参照されたい)、ミョウバンの実質的な非存在下にあるモノホスホリルリピド A (MPL) または 3-O-脱アシル化 MPL (3dMPL) (例えば、GB-2220221、EP0689454 を参照されたい) ; (6) 3dMPL と、例えば、QS21 および/または水中油乳濁液との組合せ (例えば、EP0835318、EP0735898、EP0761231 を参照されたい) ; (7) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル (例えば、WO99/52549 を参照されたい) ; (8) オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤 (例えば、WO01/21207) またはオクトキシノールなどの少なくとも1つのさらなる非イオン性界面活性剤と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルもしくはエステル界面活性剤 (例えば、WO01/21152) ; (9) サポニンおよび免疫刺激オリゴヌクレオチド (例えば、CpG オリゴヌクレオチド) (例えば、WO00/62800) ; (10) 免疫刺激剤および金属塩の粒子 (例えば、WO00/23105 を参照されたい) ; (11) サポニンおよび水中油乳濁液 (例えば、WO99/11241) ; (12) サポニン (例えば、QS21) + 3dMPL + IM2 (場合により、+ ステロール) (例えば、WO98/57659) ; (13) 組成物の効能を増強するための免疫刺激剤として作用する他の物質が挙げられる。ムラミルペプチドとしては、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-25アセチルノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (ノル-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン MTP-PE) などが挙げられる。

【0533】

本発明の1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、アジュバントとして CpG オリゴヌクレオチドを含む。本明細書で用いられる CpG オリゴヌクレオチドとは、免疫刺激 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) を指し、したがって、これらの用語は、別途指摘しない限り互換的に用いられる。免疫刺激 CpG オリゴデオキシヌクレオチドは、場合により、ある特定の好ましい塩基の文脈内で、非メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチドである、1つまたは複数の免疫刺激 CpG モチーフを含有する。CpG 免疫刺激モチーフのメチル化状態は、一般に、ジヌクレオチド中の

シトシン残基を指す。少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチドを含有する免疫刺激オリゴヌクレオチドは、3'グアニンにリン酸結合により連結された5'非メチル化シトシンを含有し、トール様受容体9 (TLR-9) への結合により免疫系を活性化するオリゴヌクレオチドである。別の実施形態においては、免疫刺激オリゴヌクレオチドは、1つまたは複数のメチル化CpGジヌクレオチドを含有してもよく、これらはCpGモチーフがメチル化されていない場合ほど強くないが、TLR9により免疫系を活性化する。CpG免疫刺激オリゴヌクレオチドは、順に、CpGジヌクレオチドを包含してもよい1つまたは複数のパンドロームを含んでもよい。CpGオリゴヌクレオチドは、いくつかの発行された特許、公開された特許出願、および他の刊行物、例えば、米国特許第6, 194, 388号; 第6, 207, 646号; 第6, 214, 806号; 第6, 218, 371号; 第6, 239, 116号; および第6, 339, 068号に記載されている。

10

【0534】

本発明の1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、WO2010/125480の3頁、22行目~12頁、36行目に記載された任意のCpGオリゴヌクレオチドを含む。

【0535】

異なるクラスのCpG免疫刺激オリゴヌクレオチドが同定されている。これらのものは、A、B、CおよびPクラスと呼ばれ、WO2010/125480の3頁、22行目~12頁、36行目により詳細に記載されている。本発明の方法は、これらの異なるクラスのCpG免疫刺激オリゴヌクレオチドの使用を包含する。

20

【0536】

本発明の1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、AクラスのCpGオリゴヌクレオチドを含む。好ましくは、本発明の「Aクラス」のCpGオリゴヌクレオチドは、以下の核酸配列: 5'GGGGACGACGTCGTGGGGGGGG3' (配列番号1) を有する。Aクラスのオリゴヌクレオチドのいくつかの非限定例としては、5'G*G*G__G__A__C__G__A__C__G__T__C__G__T__G__G*G*G*G*G*G*G3' (配列番号2) (式中、「*」はホスホロチオエート結合を指し、「__」はホスホジエステル結合を指す) が挙げられる。

【0537】

本発明の1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、BクラスのCpGオリゴヌクレオチドを含む。一実施形態においては、本発明における使用のためのCpGオリゴヌクレオチドは、少なくとも式: 5'X₁X₂CGX₃X₄3' (式中、X₁、X₂、X₃およびX₄はヌクレオチドである) により表されるBクラスのCpGオリゴヌクレオチドである。一実施形態においては、X₂はアデニン、グアニン、またはチミンである。別の実施形態においては、X₃はシトシン、アデニン、またはチミンである。

30

【0538】

本発明のBクラスのCpGオリゴヌクレオチド配列は、上記に広く記載されたもの、ならびにWO96/02555、WO98/18810ならびに米国特許第6, 194, 388号; 第6, 207, 646号; 第6, 214, 806号; 第6, 218, 371号; 第6, 239, 116号; および第6, 339, 068号に開示されたものである。例示的な配列としては、限定されるものではないが、これらの後者の出願および特許に開示されたものが挙げられる。

40

【0539】

1つの実施形態において、本発明の「Bクラス」のCpGオリゴヌクレオチドは、以下の核酸配列:

5'TCGTCGTTTTTTCGGTGCCTTTT3' (配列番号3)、または

5'TCGTCGTTTTTTCGGTCGTTTTT3' (配列番号4)、または

5'TCGTCGTTTTTGTCGTTTTTGTCGTTT3' (配列番号5)、または

5'TCGTCGTTTTCGTCGTTTTTGTCGTTT3' (配列番号6)、または

50

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTTTTCGA3' (配列番号7)
を有する。

【0540】

これらの配列のいずれかにおいて、全ての結合は全てホスホロチオエート結合であってもよい。別の実施形態においては、これらの配列のいずれかにおいて、1つまたは複数の結合は、好ましくは、セミソフトCpGオリゴヌクレオチドを作るCpGモチーフの「C」と「G」の間のホスホジエステルであってもよい。これらの配列のいずれかにおいて、エチルーウリジンまたはハロゲンは、5'Tに置き換わってもよい；ハロゲン置換の例としては、限定されるものではないが、プロモウリジンまたはヨードウリジン置換が挙げられる。

10

【0541】

Bクラスのオリゴヌクレオチドのいくつかの非限定例としては、

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*G*C*T*T*T*T*T*3' (配列番号8)、または

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*T*T*3' (配列番号9)、または

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*3' (配列番号10)、または

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*3' (配列番号11)、または

20

5'T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C*G*A3' (配列番号12)

(式中、「*」はホスホロチオエート結合を指す)が挙げられる。

【0542】

本発明の1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、CクラスのCpGオリゴヌクレオチドを含む。1つの実施形態において、本発明の「Cクラス」のCpGオリゴヌクレオチドは、以下の核酸配列：

5'TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号13)、または

5'TCGTCGACGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号14)、または

5'TCGGACGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号15)、または

30

5'TCGGACGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号16)、または

5'TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号17)、または

5'TCGACGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号18)、または

5'TCGACGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号19)、または

5'TCGCGTCGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号20)、または

5'TCGCGACGTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号21)、または

5'TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号22)、または

5'TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCGCGCGCG3' (配列番号23)、または

5'TCGTCGTTTTCACGGCGCGCGCGTGC CG3' (配列番号24)、または

5'TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCGCGCGCGT3' (配列番号25)

40

を有する。

【0543】

これらの配列のいずれかにおいて、全ての結合は全てホスホロチオエート結合であってもよい。別の実施形態においては、これらの配列のいずれかにおいて、1つまたは複数の結合は、好ましくは、セミソフトCpGオリゴヌクレオチドを作るCpGモチーフの「C」と「G」の間のホスホジエステルであってもよい。

【0544】

Cクラスのオリゴヌクレオチドのいくつかの非限定例としては、

5'T*C__G*C__G*T*C__G*T*T*C__G*G*C*G*C__G*C*G*C*C*G3' (配列番号26)、または

50

5' T * C _ G * T * C _ G * A * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C _ G * C * G * C * C * G 3' (配列番号27)、または

5' T * C _ G * G * A * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C _ G * C * G * C * C * G 3' (配列番号28)、または

5' T * C _ G * G * A * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C * G * C * C * G 3' (配列番号29)、または

5' T * C _ G * C _ G * T * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C * G * C * C * G 3' (配列番号30)、または

5' T * C _ G * A * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C _ G * C * G * C * C * G 3' (配列番号31)、または

10

5' T * C _ G * A * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C * G * C * C * G 3' (配列番号32)、または

5' T * C _ G * C _ G * T * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C * C * G 3' (配列番号33)、または

5' T * C _ G * C _ G * A * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C _ G * C * G * C * C * G 3' (配列番号34)、または

5' T * C * G * T * C * G * T * T * T * T * C * G * G * C * G * C * G * C * G * C * C * G 3' (配列番号35)、または

5' T * C * G * T * C * G * T * T * T * T * C * G * G * C * G * G * C * C * G * C * C * G 3' (配列番号36)、または

20

5' T * C * G * T * C _ G * T * T * T * T * A * C _ G * G * C * G * C * C _ G * T * G * C * C * G 3' (配列番号37)、または

5' T * C _ G * T * C * G * T * T * T * T * C * G * G * C * G * C * G * C * G * C * C * G * T 3' (配列番号38)

(式中、「*」はホスホロチオエート結合を指し、「_」はホスホジエステル結合を指す)が挙げられる。これらの配列のいずれかにおいて、エチルーウリジンまたはハロゲンは5' Tに置き換わってもよい; ハロゲン置換の例としては、限定されるものではないが、プロモウリジンまたはヨードウリジン置換が挙げられる。

【0545】

本発明の1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、PクラスのCpGオリゴヌクレオチドを含む。1つの実施形態において、本発明における使用のためのCpGオリゴヌクレオチドは、5' TLR活性化ドメインと、少なくとも2つのパリンドローム領域とを含有するPクラスのCpGオリゴヌクレオチドであって、一方のパリンドローム領域が、少なくとも6ヌクレオチド長の5'パリンドローム領域であり、直接的に、またはスパーサーを介して少なくとも8ヌクレオチド長の3'パリンドローム領域に接続されている、少なくとも1つのYpRジヌクレオチドを含むCpGオリゴヌクレオチドである。1つの実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、T * C _ G * T * C _ G * A * C _ G * T * T * C _ G * G * C * G * C _ G * C * G * C * C * G (配列番号27)ではない。一実施形態においては、PクラスのCpGオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの非メチル化CpGジヌクレオチドを含む。別の実施形態においては、TLR活性化ドメインは、TCG、TTCG、TTTCG、TYpR、TTYpR、TTTYpR、UCG、UUCG、UUUCG、TTT、またはTTTTである。さらに別の実施形態においては、TLR活性化ドメインは、5'パリンドローム領域内にある。別の実施形態においては、TLR活性化ドメインは、5'パリンドローム領域のすぐ5'側にある。

30

40

【0546】

1つの実施形態において、本発明の「Pクラス」のCpGオリゴヌクレオチドは、以下の核酸配列: 5' TCGTCGACGATCGGCGCGCGCGCG 3' (配列番号39)を有する。

【0547】

前記配列において、全ての結合は、全てホスホロチオエート結合であってもよい。別の

50

実施形態において、1つまたは複数の結合は、好ましくは、セミソフトCpGオリゴヌクレオチドを作るCpGモチーフの「C」と「G」との間のホスホジエステルであってもよい。これらの配列のいずれかにおいて、エチルーウリジンまたはハロゲンは5' Tに置き換わってもよい；ハロゲン置換の例としては、限定されるものではないが、プロモウリジンまたはヨードウリジン置換が挙げられる。

【0548】

Pクラスのオリゴヌクレオチドの非限定例としては、

5' T * C _ G * T * C _ G * A * C _ G * A * T * C _ G * G * C * G * C _ G * C * G * C * C * G 3' (配列番号40)

(式中、「*」はホスホロチオエート結合を指し、「_」はホスホジエステル結合を指す)を含む。

10

【0549】

一実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含む。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチド間結合はホスホロチオエート結合である。別の実施形態においては、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのホスホジエステル様結合を含む。別の実施形態においては、ホスホジエステル様結合は、ホスホジエステル結合である。別の実施形態においては、親油性基をオリゴヌクレオチドにコンジュゲートさせる。一実施形態においては、親油性基はコレステロールである。

【0550】

20

1つの実施形態において、本明細書に開示されるCpGオリゴヌクレオチドの全てのヌクレオチド間結合は、ホスホジエステル結合(WO2007/026190に記載された「ソフト」オリゴヌクレオチド)である。別の実施形態においては、本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、分解に耐性にされる(例えば、安定化される)。「安定化されたオリゴヌクレオチド」とは、in vivoでの分解(例えば、エキソまたはエンドヌクレアーゼによる)に比較的耐性であるオリゴヌクレオチドを指す。核酸安定化を、骨格改変により達成することができる。ホスホロチオエート結合を有するオリゴヌクレオチドは、最大活性を生じ、細胞内エキソおよびエンドヌクレアーゼによる分解からオリゴヌクレオチドを保護する。

【0551】

30

免疫刺激オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合とホスホロチオエート結合との組合せを有するキメラ骨格を有してもよい。本発明の目的では、キメラ骨格とは、部分的に安定化された骨格であって、少なくとも1つのヌクレオチド間結合がホスホジエステルまたはホスホジエステル様であり、少なくとも1つの他のヌクレオチド間結合が安定化されたヌクレオチド間結合であり、少なくとも1つのホスホジエステルまたはホスホジエステル様結合と、少なくとも1つの安定化された結合とが異なるものである、骨格を指す。ホスホジエステル結合がCpGモチーフ内に優先的に配置される場合、そのような分子は、WO2007/026190に記載されたような「セミソフト」と呼ばれる。

【0552】

他の改変オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、および/またはp-エトキシ結合の組合せを含む。

40

【0553】

混合骨格改変ODNを、WO2007/026190に記載のように合成することができる。CpGオリゴヌクレオチドのサイズ(すなわち、オリゴヌクレオチドの長さに沿ったヌクレオチド残基の数)は、オリゴヌクレオチドの刺激活性にも寄与し得る。細胞中への取込みを容易にするために、本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、好ましくは、6ヌクレオチドの残基の最小の長さを有する。より大きいオリゴヌクレオチドは細胞内で分解されるため、十分な免疫刺激モチーフが存在する場合、6ヌクレオチドを超える任意のサイズのオリゴヌクレオチド(多くのkb長であっても)は、免疫応答を誘導することがで

50

きる。ある特定の実施形態においては、CpGオリゴヌクレオチドは、6～100ヌクレオチド長、好ましくは、8～30ヌクレオチド長である。重要な実施形態においては、本発明の核酸およびオリゴヌクレオチドは、プラスミドまたは発現ベクターではない。

【0554】

1つの実施形態において、本明細書に開示されるCpGオリゴヌクレオチドは、WO2007/026190の段落134～147に記載されたような塩基および／または糖などにおける、置換または改変を含む。

【0555】

1つの実施形態において、本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、化学的に改変される。化学的改変の例は、当業者には公知であり、例えば、Uhlmannら(1990) C hem. Rev. 90:543; S. Agrawal (編)、Humana Press、Totowa、USA 1993; Crookeら(1996) Annu. Rev. P harmacol. Toxicol. 36:107～129; およびHunzikerら(1995) Mod. Synth. Methods 7:331～417に記載されている。本発明によるオリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の改変を有してもよく、ここで、各改変は、天然のDNAまたはRNAから構成される同じ配列のオリゴヌクレオチドと比較して、特定のホスホジエステルヌクレオシド間架橋および／または特定のβ-D-リボース単位および／または特定の天然ヌクレオシド塩基位置に位置する。

【0556】

本発明のいくつかの実施形態においては、CpG含有核酸を、当業者には公知の方法(例えば、WO03/024480を参照されたい)に従って免疫原性担体と単純に混合することができる。

【0557】

本発明の特定の実施形態においては、本明細書に開示される任意の免疫原性組成物は、2μg～100mgのCpGオリゴヌクレオチド、好ましくは、0.1mg～50mgのCpGオリゴヌクレオチド、好ましくは、0.2mg～10mgのCpGオリゴヌクレオチド、好ましくは、0.3mg～5mgのCpGオリゴヌクレオチド、好ましくは、0.3mg～5mgのCpGオリゴヌクレオチド、さらに好ましくは、0.5～2mgのCpGオリゴヌクレオチド、さらに好ましくは、0.75～1.5mgのCpGオリゴヌクレオチドを含む。好ましい実施形態においては、本明細書に開示される任意の免疫原性組成物は、約1mgのCpGオリゴヌクレオチドを含む。

【0558】

5 製剤

本発明の免疫原性組成物を、液体形態(すなわち、溶液もしくは懸濁液)または凍結乾燥形態で製剤化することができる。液体製剤は、有利には、その包装された形態から直接的に投与することができ、したがって、本発明の凍結乾燥組成物について別途必要とされるような水性媒体中での復元を必要とせず、注射にとって理想的である。

【0559】

本発明の免疫原性組成物の製剤を、当技術分野で認識される方法を用いて達成することができる。例えば、個々の肺炎球菌コンジュゲートを、生理的に許容できるビヒクルと共に製剤化して、組成物を調製することができる。そのようなビヒクルの例としては、限定されるものではないが、水、緩衝塩水、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が挙げられる。

【0560】

本開示は、本明細書に開示されるグリココンジュゲートの任意の組合せと、薬学的に許容できる賦形剤、担体、または希釈剤とを含む免疫原性組成物を提供する。

【0561】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、液体形態、好ましくは、水性液体形態にある。

【0562】

10

20

30

40

50

本開示の免疫原性組成物は、緩衝液、塩、二価陽イオン、非イオン性界面活性剤、糖などの凍結防止剤、フリーラジカルスカベンジャーもしくはキレート剤などの酸化防止剤のうちの1つもしくは複数、またはその任意の複数の組合せを含んでもよい。

【0563】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、緩衝液を含む。1つの実施形態において、前記緩衝液は、約3.5～約7.5のpKaを有する。いくつかの実施形態においては、緩衝液は、リン酸、コハク酸、ヒスチジンまたはクエン酸である。ある特定の実施形態においては、緩衝液は最終濃度1mM～10mMのコハク酸である。1つの特定の実施形態においては、コハク酸緩衝液の最終濃度は約5mMである。

【0564】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、塩を含む。いくつかの実施形態においては、塩は塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよびその組合せからなる群から選択される。1つの特定の実施形態においては、塩は塩化ナトリウムである。1つの特定の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、150mMの塩化ナトリウムを含む。

【0565】

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、界面活性剤を含む。1つの実施形態において、界面活性剤は、ポリソルベート20（TWEEN（商標）20）、ポリソルベート40（TWEEN（商標）40）、ポリソルベート60（TWEEN（商標）60）、ポリソルベート65（TWEEN（商標）65）、ポリソルベート80（TWEEN（商標）80）、ポリソルベート85（TWEEN（商標）85）、TRITON（商標）N-101、TRITON（商標）X-100、オキシトキシノール（oxytnol）40、ノノキシノール-9、トリエタノールアミン、トリエタノールアミンポリペプチドオレエート、ポリオキシエチレン-660ヒドロキシステアレート（PEG-15、Solutol H15）、ポリオキシエチレン-35-リシノレエート（CREMOPHOR（登録商標）EL）、大豆レシチンおよびポロキサマーからなる群から選択される。1つの特定の実施形態においては、界面活性剤は、ポリソルベート80である。いくつかの前記実施形態においては、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、少なくとも0.0001%～10%重量/重量（w/w）のポリソルベート80である。いくつかの前記実施形態においては、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、少なくとも0.001%～1%重量/重量（w/w）のポリソルベート80である。いくつかの前記実施形態においては、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、少なくとも0.01%～1%重量/重量（w/w）のポリソルベート80である。他の実施形態においては、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%または0.1%（w/w）のポリソルベート80である。別の実施形態においては、製剤中のポリソルベート80の最終濃度は、1%（w/w）のポリソルベート80である。

【0566】

ある特定の実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、5.5～7.5のpH、より好ましくは、5.6～7.0のpH、さらにより好ましくは、5.8～6.0のpHを有する。

【0567】

一実施形態においては、本発明は、本明細書に開示される免疫原性組成物のいずれかを充填された容器を提供する。一実施形態においては、容器は、バイアル、シリンジ、フラスコ、発酵器、バイオリアクター、バッグ、ジャー、アンプル、カートリッジおよび使い捨て型ペンからなる群から選択される。ある特定の実施形態においては、容器はシリコン処理されている。

【0568】

1つの実施形態において、本発明の容器は、ガラス、金属（例えば、スチール、ステンレススチール、アルミニウムなど）および/またはポリマー（例えば、熱可塑性物質、エ

10

20

30

40

50

ラストマー、熱可塑性エラストマー）から作られている。1つの実施形態において、本発明の容器は、ガラスから作られている。

【0569】

一実施形態においては、本発明は、本明細書に開示される免疫原性組成物のいずれかを充填されたシリンジを提供する。ある特定の実施形態においては、シリンジはシリコン処理されている、および／またはガラスから作られている。

【0570】

注射のための本発明の免疫原性組成物の典型的な用量は、0.1 mL～2 mL、より好ましくは、0.2 mL～1 mL、さらにより好ましくは、約0.5 mLの容量を有する。

【0571】

したがって、上記で定義された容器またはシリンジは、0.1 mL～2 mL、より好ましくは、0.2 mL～1 mL、さらにより好ましくは、約0.5 mLの容量の本明細書で定義される任意の免疫原性組成物を充填される。

【0572】

6 本発明の免疫原性組成物の使用

1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、薬剤としての使用のためのものである。

【0573】

本明細書に記載の免疫原性組成物を、対象における細菌感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善するための様々な治療的または予防的方法において用いることができる。特に、本明細書に記載の免疫原性組成物を用いて、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善することができる。

【0574】

かくして、一態様において、本発明は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）と関連する感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善する方法であって、対象に、免疫学的に有効な量の本発明の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0575】

いくつかのそのような実施形態において、感染、疾患または状態は、肺炎、副鼻腔炎、中耳炎、急性中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症、膿胸、結膜炎、骨髄炎、敗血症性関節炎、心内膜炎、腹膜炎、心膜炎、乳様突起炎、蜂巣炎、軟組織感染および脳膿瘍からなる群から選択される。

【0576】

1つの実施形態において、本発明は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）に対する免疫応答を誘導する方法であって、対象に免疫学的に有効な量の本発明の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0577】

1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、ワクチンとしての使用のためのものである。そのような実施形態においては、本明細書に記載の免疫原性組成物を用いて、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）感染を防止することができる。かくして、一態様において、本発明は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）による感染を防止する方法であって、対象に、免疫学的に有効な量の本発明の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。いくつかのそのような実施形態においては、感染は、肺炎、副鼻腔炎、中耳炎、急性中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症、膿胸、結膜炎、骨髄炎、敗血症性関節炎、心内膜炎、腹膜炎、心膜炎、乳様突起炎、蜂巣炎、軟組織感染および脳膿瘍からなる群から選択される。一態様において、ワクチン接種される対象は、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシまたはイヌなどの哺乳動物である。

【0578】

一態様において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）と関連する感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような実施形態においては、感染、疾患または状態は、肺炎、副鼻腔炎、中耳炎、急性中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症、膿胸、結膜炎、骨髄炎、敗血症性関節炎、心内膜炎、腹膜炎、心膜炎、乳様突起炎、蜂巣炎、軟組織感染および脳膿瘍からなる群から選択される。

【0579】

1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、ワクチンとしての使用のためのものである。そのような実施形態においては、本明細書に記載の免疫原性組成物を用いて、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）感染を防止することができる。かくして、一態様において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）による感染を防止する方法における使用のためのものである。いくつかのそのような実施形態においては、感染は、肺炎、副鼻腔炎、中耳炎、急性中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症、膿胸、結膜炎、骨髄炎、敗血症性関節炎、心内膜炎、腹膜炎、心膜炎、乳様突起炎、蜂巣炎、軟組織感染および脳膿瘍からなる群から選択される。一態様において、ワクチン接種される対象は、ヒト、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシまたはイヌなどの哺乳動物である。

【0580】

本発明の免疫原性組成物を用いて、全身経路または粘膜経路を介して免疫原性組成物を投与することにより、肺炎球菌感染に感受性であるヒトを防止する、または処置することができる。1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、筋肉内、腹腔内、皮内、または皮下経路により投与される。1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、筋肉内、腹腔内、皮内または皮下注射により投与される。1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、筋肉内または皮下注射により投与される。

【0581】

1つの実施形態において、対象に投与された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、標準的なELISAアッセイにより測定された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B、15Aおよび／または15Cに結合することができる抗体の形成を誘導することができる。1つの実施形態において、対象に投与された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、標準的なELISAアッセイにより測定された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bおよび15Cに結合することができる抗体の形成を誘導することができる。

【0582】

ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）法においては、ワクチン接種された対象の血清に由来する抗体を、固相支持体に吸着させた多糖と共にインキュベートする。結合した抗体を、酵素コンジュゲート化二次検出抗体を用いて検出する。

【0583】

1つの実施形態において、前記標準的なELISAアッセイは、「Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of Streptococcus pneumoniae serotype specific IgG (Pn P S ELISA)」(<http://www.vaccine.uab.edu/ELI>

10

20

30

40

50

SA%20protocol.pdfでアクセス可能；2014年3月31日にアクセスされた）においてWHOにより定義された標準化された（WHO）ELISAアッセイである。

【0584】

ELISAによって、ヒト血清中に存在する、型特異的IgG抗ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）莢膜多糖（PS）抗体を測定する。ヒト血清の希釈液を型特異的莢膜PS被覆マイクロタイタープレートに添加する場合、その莢膜PSに特異的な抗体がマイクロタイタープレートに結合する。プレートに結合した抗体を、ヤギ抗ヒトIgGアルカリホスファターゼ標識抗体、次いで、p-ニトロフェニルリン酸基質を用いて検出する。着色された最終産物の光密度は、血清中に存在する抗莢膜PS抗体の量に比例する。

10

【0585】

1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、ELISAアッセイにより決定された場合、少なくとも0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4または0.5 µg/mlの濃度でストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B多糖に結合することができる、ヒトにおけるIgG抗体を惹起することができる。

【0586】

1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、ELISAアッセイにより決定された場合、少なくとも0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4または0.5 µg/mlの濃度でストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15C多糖に結合することができる、ヒトにおけるIgG抗体を惹起することができる。

20

【0587】

1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、ELISAアッセイにより決定された場合、少なくとも0.05、0.1、0.2、0.3、0.35、0.4または0.5 µg/mlの濃度でストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bおよび15C多糖に結合することができる、ヒトにおけるIgG抗体を惹起することができる。

30

【0588】

1つの実施形態において、対象に投与された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、本明細書に開示されるオブソニン貪食作用アッセイにおいてストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bを殺傷することができる抗体の形成を誘導することができる。

40

【0589】

1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、本明細書に開示されるOPAアッセイ（実施例12のOPAアッセイなど）において試験した場合、コンジュゲートされていない天然のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B莢膜多糖を用いて得られるOPA力価よりも高いOPA力価を有する。

50

【0590】

1つの実施形態において、対象に投与された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、本明細書に開示されるオプソニン貪食作用アッセイ（実施例12のOPAアッセイなど）においてストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cを殺傷することができる抗体の形成を誘導することができる。1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、本明細書に開示されるOPAアッセイ（実施例12のOPAアッセイなど）において試験した場合、コンジュゲートされていない天然のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B莢膜多糖を用いて得られるOPA力価よりも高いOPA力価を有する。

10

【0591】

機能的抗体および補体の存在下での食作用エフェクター細胞によるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）細胞の殺傷を測定する、肺炎球菌オプソニン貪食作用アッセイ（OPA）は、肺炎球菌ワクチンの有効性を評価するための重要な代理物であると考えられる。

【0592】

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）細胞、試験される熱不活化ヒト血清、分化したHL-60細胞（食細胞）および外来補体源（例えば、子ウサギ補体）の混合物と一緒にインキュベートすることにより、オプソニン貪食作用アッセイ（OPA）を行うことができる。オプソニン貪食作用は、インキュベーションの間に進行し、抗体および補体で被覆された細菌細胞は、オプソニン貪食作用の際に殺傷される。オプソニン貪食作用を逃れる生存細菌のコロニー形成単位（cfu）は、アッセイ混合物を塗布することにより決定される。OPA力価は、試験血清を含まない対照ウェルに対して細菌計数の50%の減少をもたらす希釈率の逆数と定義される。OPA力価は、この50%の殺傷のカットオフを挟む2つの希釈率から内挿される。

20

【0593】

1：8またはそれ以上の終点力価は、これらの殺傷型OPAにおける陽性の結果と考えられる。

30

【0594】

1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、オプソニン貪食作用殺傷アッセイ（OPA）により決定される場合、少なくとも50%の対象においてストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに対する少なくとも1：8の力価を惹起することができる。1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、オプソニン貪食作用殺傷アッセイ（OPA）により決定される場合、少なくとも60%、70%、80%、90%、または少なくとも93%の対象においてストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに対する少なくとも1：8の力価を惹起することができる。

40

【0595】

1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、オプソニン貪食作用殺傷アッセイ（OPA）により決定される場合、少なくとも50%の対象においてストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cに対

50

する少なくとも1：8の力価を惹起することができる。1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、オプソニン貪食作用殺傷アッセイ（OPA）により決定される場合、少なくとも60%、70%、80%、90%、または少なくとも95%の対象においてストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cに対する少なくとも1：8の力価を惹起することができる。

【0596】

さらなる態様において、本開示は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／または15Cと関連するストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）感染、疾患または状態を処置する、または防止する方法であって、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む、本開示の任意の免疫原性組成物の治療的または予防的に有効な量を投与するステップを含む方法を提供する。1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、対象に投与された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B、15Aおよび／または15Cに結合することができる抗体の形成を誘導する。1つの実施形態において、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の免疫原性組成物は、対象に投与された場合、本明細書に開示されるオプソニン貪食作用アッセイ（実施例12のOPAアッセイなど）においてストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B、15Cおよび／または15Aを殺傷することができる抗体の形成を誘導する。

【0597】

本開示の一実施形態は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cによる感染に対して対象を保護する方法、またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cによる感染を防止する方法、またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Cにより引き起こされる感染と関連する少なくとも1つの症状の重症度を軽減する、もしくはその開始を遅延させる方法であって、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む、本開示の任意の免疫原性組成物の免疫原性量を対象に投与することを含む方法を提供する。本開示の一実施形態は、対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／または15C（好ましくは、15Bおよび／または15C、より好ましくは、15B）と関連するストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）感染、疾患または状態を処置する、または防止する方法であって、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1. 3. 4のグリココンジュゲートなど）を含む、本開示の任意の免疫原性

10

20

30

40

50

組成物からポリクローナルまたはモノクローナル抗体調製物を生成すること、および対象に対する受動免疫を付与するために前記抗体調製物を使用することを含む方法を提供する。

【0598】

一実施形態においては、本開示は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）による感染に対して対象を保護する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）による感染を防止する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）により引き起こされる感染と関連する少なくとも1つの症状の重症度を軽減する、もしくはその開始を遅延させる、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／もしくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）による感染に対して対象を保護する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／もしくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）による感染を防止する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／もしくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）により引き起こされる感染と関連する少なくとも1つの症状の重症度を軽減する、もしくはその開始を遅延させるための薬剤の製造のための、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の任意の免疫原性組成物の使用に関する。

【0599】

一実施形態においては、本開示は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）による感染に対して対象を保護する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）による感染を防止する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）により引き起こされる感染と関連する少なくとも1つの症状の重症度を軽減する、もしくはその開始を遅延させる、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／もしくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）による感染に対して対象を保護する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／もしくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）による感染を防止する、および／またはストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15A、15Bおよび／もしくは15C（好ましくは、15Bおよび／もしくは15C、より好ましくは、15B）により引き起こされる感染と関連する少なくとも1つの症状の重症度を軽減する、もしくはその開始を遅延させるための、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに由来する少なくとも1つのグリココンジュゲート（上記のセクション1.3.4のグリココンジュゲートなど）を含む本開示の任意の免疫原性組成物の使用に関する。

【0600】

7 本発明の免疫原性組成物を用いて処置される対象

本明細書に開示されるように、本明細書に記載の免疫原性組成物を、対象における細菌感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善するための様々な治療的または予防的方法において用いることができる。

【0601】

好ましい実施形態においては、前記対象はヒトである。最も好ましい実施形態においては、前記対象は、新生児（すなわち、3カ月齢より下）、乳児（すなわち、3カ月齢～1歳）または幼児（すなわち、1歳～4歳）である。

【0602】

1つの実施形態において、本明細書に開示される免疫原性組成物は、ワクチンとしての使用のためのものである。

【0603】

そのような実施形態においては、ワクチン接種される対象は、1歳未満の年齢であってもよい。例えば、ワクチン接種される対象は、約1カ月齢、約2カ月齢、約3カ月齢、約4カ月齢、約5カ月齢、約6カ月齢、約7カ月齢、約8カ月齢、約9カ月齢、約10カ月齢、約11カ月齢または約12カ月齢であってもよい。1つの実施形態においては、ワクチン接種される対象は、約2、約4または約6カ月齢である。別の実施形態においては、ワクチン接種される対象は、2歳未満の年齢である。例えば、ワクチン接種される対象は、約12～約15カ月齢であってもよい。いくつかの場合、わずか1回用量の本発明による免疫原性組成物が必要であるが、いくつかの状況下では、第2、第3または第4の用量を与えてもよい（以下のセクション8を参照されたい）。

10

【0604】

本発明の1つの実施形態において、ワクチン接種される対象は、50歳またはそれ以上の成人、より好ましくは、55歳またはそれ以上の成人である。1つの実施形態において、ワクチン接種される対象は、65歳もしくはそれ以上、70歳もしくはそれ以上、75歳もしくはそれ以上、または80歳もしくはそれ以上の成人である。

【0605】

1つの実施形態において、ワクチン接種される対象は、免疫障害を有する個体、特に、ヒトである。免疫障害を有する個体は、一般に、感染性因子によるチャレンジに対して正常な体液性または細胞性防御を高める能力が減衰または低下した人と定義される。

20

【0606】

本発明の1つの実施形態において、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、免疫系を減弱させる疾患または状態に罹患し、肺炎球菌疾患に対して保護する、またはそれを処置するのに不十分である抗体応答をもたらす。

【0607】

1つの実施形態において、前記疾患は、原発性免疫不全障害である。好ましくは、前記原発性免疫不全障害は、混合TおよびB細胞免疫不全、抗体欠損、明確に定義された症候群、免疫脱調節疾患、食細胞障害、自然免疫不全、自己炎症障害、および補体欠損からなる群から選択される。1つの実施形態において、前記原発性免疫不全障害は、WO 2010/125480の24頁、11行目～25頁、19行目に開示されたものから選択される。

30

【0608】

本発明の特定の実施形態においては、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、HIV感染、後天性免疫不全症候群（AIDS）、がん、慢性心臓または肺障害、鬱血性心不全、糖尿病、慢性肝疾患、アルコール依存症、肝硬変、髄液漏、心筋症、慢性気管支炎、肺気腫、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、脾臓機能障害（鎌状赤血球症など）、脾臓機能の欠如（無脾症）、血液悪性腫瘍、白血病、多発性硬化症、ホジキン病、リンパ腫、腎不全、ネフローゼ症候群および喘息からなる群から選択される疾患に罹患する。

【0609】

本発明の1つの実施形態において、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、栄養不良に罹患する。

40

【0610】

本発明の特定の実施形態においては、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、感染に対する身体の耐性を低下させる薬物または処置を受けている。1つの実施形態において、前記薬物は、WO 2010/125480の26頁、33行目～26頁、4行目に開示されたものから選択される。

【0611】

本発明の特定の実施形態においては、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、喫煙者である。

50

【0612】

本発明の特定の実施形態においては、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、 5×10^9 細胞／リットルより下、または 4×10^9 細胞／リットルより下、または 3×10^9 細胞／リットルより下、または 2×10^9 細胞／リットルより下、または 1×10^9 細胞／リットルより下、または 0.5×10^9 細胞／リットルより下、または 0.3×10^9 細胞／リットルより下、または 0.1×10^9 細胞／リットルより下の白血球数（白血球算定）を有する。

【0613】

白血球数（白血球算定）：血液中の白血球（WBC）の数。WBCは通常、CBC（完全血球算定）の一部として測定される。白血球は、血液中の感染と戦う細胞であり、赤血球として知られる赤い（酸素運搬）血液細胞と異なる。好中球（多形核白血球；PMN）、桿状球（わずかに未熟な好中球）、T型リンパ球（T細胞）、B型リンパ球（B細胞）、単球、好酸球、好塩基球などの、異なる型の白血球が存在する。全ての型の白血球が白血球数に反映される。白血球数の正常な範囲は通常、血液1立方ミリメートルあたり $4,300 \sim 10,800$ 個の細胞である。これはまた、白血球算定ということもでき、 $4.3 \sim 10.8 \times 10^9$ 細胞／リットルの国際単位で表すことができる。

【0614】

本発明の特定の実施形態においては、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、好中球減少症に罹患する。本発明の特定の実施形態においては、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、 2×10^9 細胞／リットルより下、または 1×10^9 細胞／リットルより下、または 0.5×10^9 細胞／リットルより下、または 0.1×10^9 細胞／リットルより下、または 0.05×10^9 細胞／リットルより下の好中球数を有する。

【0615】

低い白血球数または「好中球減少症」は、循環血液中の異常に低レベルの好中球を特徴とする状態である。好中球は、感染を防止し、それと戦うのを助ける特定の種類の白血球である。がん患者が好中球減少症を経験する最も一般的な理由は、化学療法の副作用としてのものである。化学療法により誘導される好中球減少症は、患者の感染リスクを増大させ、がん処置を中断させる。

【0616】

本発明の特定の実施形態においては、ワクチン接種される免疫障害を有する対象は、 $500/\text{mm}^3$ より下のCD4+細胞数、または $300/\text{mm}^3$ より下のCD4+細胞数、または $200/\text{mm}^3$ より下のCD4+細胞数、または $100/\text{mm}^3$ より下のCD4+細胞数、または $75/\text{mm}^3$ より下のCD4+細胞数、または $50/\text{mm}^3$ より下のCD4+細胞数を有する。

【0617】

CD4細胞試験は通常、 1mm^3 中の細胞数として報告される。正常なCD4計数は $500 \sim 1,600$ であり、CD8計数は $375 \sim 1,100$ である。CD4計数はHIVを有する人々においては劇的に低下する。

【0618】

本発明の1つの実施形態において、本明細書に開示される任意の免疫障害を有する対象は、ヒト男性またはヒト女性である。

【0619】

8 レジメン

いくつかの場合、わずか1回用量の本発明による免疫原性組成物が必要であるが、より高い免疫不全の状態などの、いくつかの状況下では、第2、第3または第4の用量を与えてもよい。初回ワクチン接種後、対象は、十分に間隔を空けた1回または数回の追加免疫を受けてもよい。

【0620】

1つの実施形態において、本発明による免疫原性組成物のワクチン接種のスケジュールは、単回用量である。特定の実施形態においては、前記単回用量スケジュールは、少なく

10

20

30

40

50

とも2歳の年齢である健康な人々のためのものである。

【0621】

1つの実施形態において、本発明による免疫原性組成物のワクチン接種のスケジュールは、複数回用量スケジュールである。特定の実施形態においては、前記複数回用量スケジュールは、約1カ月～約2カ月の間隔で隔てられた2回用量シリーズからなる。特定の実施形態においては、前記複数回用量スケジュールは、約1カ月の間隔で隔てられた2回用量シリーズ、または約2カ月の間隔で隔てられた2回用量シリーズからなる。

【0622】

別の実施形態においては、前記複数回用量スケジュールは、約1カ月～約2カ月の間隔で隔てられた3回用量シリーズからなる。別の実施形態においては、前記複数回用量スケジュールは、約1カ月の間隔で隔てられた3回用量シリーズ、または約2カ月の間隔で隔てられた3回用量シリーズからなる。

【0623】

別の実施形態においては、前記複数回用量スケジュールは、約1カ月～約2カ月の間隔で隔てられた3回用量シリーズ、およびそれに続く、1回目の用量の約10カ月～約13カ月後の4回目の用量からなる。別の実施形態においては、前記複数回用量スケジュールは、約1カ月の間隔で隔てられた3回用量シリーズ、およびそれに続く、1回目の用量の約10カ月～約13カ月後の4回目の用量、または約2カ月の間隔で隔てられた3回用量シリーズ、およびそれに続く、1回目の用量の約10カ月～約13カ月後の4回目の用量からなる。

【0624】

1つの実施形態において、複数回用量スケジュールは、1歳目に少なくとも1回の用量（例えば、1、2または3回用量）、およびそれに続く、少なくとも1回の幼児用量からなる。

【0625】

1つの実施形態において、複数回用量スケジュールは、2カ月齢で開始する、約1カ月～約2カ月の間隔で隔てられた2回もしくは3回用量シリーズ（例えば、投与間は28～56日）、およびそれに続く、12～18カ月齢での幼児用量からなる。1つの実施形態において、前記複数回用量スケジュールは、2カ月齢で開始する、約1カ月～約2カ月の間隔で隔てられた3回用量シリーズ（例えば、用量間は28～56日）、およびそれに続く、12～15カ月齢での幼児用量からなる。別の実施形態においては、前記複数回用量スケジュールは、2カ月齢で開始する、約2カ月の間隔で隔てられた2回用量シリーズ、およびそれに続く、12～18カ月齢での幼児用量からなる。

【0626】

1つの実施形態において、複数回用量スケジュールは、2、4、6、および12～15カ月齢での4回用量シリーズのワクチンからなる。

【0627】

1つの実施形態において、初回用量は、0日目に与えられ、1回または複数回の追加は、約2～約24週間の範囲の間隔で、好ましくは4～8週間の投与間隔で与えられる。

【0628】

1つの実施形態において、初回用量は、0日目に与えられ、追加は約3カ月後に与えられる。

【0629】

本明細書で用いられる用語「約」は、記述される濃度範囲、時間枠、分子量、温度またはpHなどの、ある値の統計的に意味のある範囲内にあることを意味する。そのような範囲は、所与の値または範囲の1桁分以内、典型的には、20%以内、より典型的には、10%以内、さらにより典型的には、5%以内、または1%以内であってもよい。時には、そのような範囲は、所与の値または範囲の測定および／または決定のために用いられる標準的な方法に典型的な実験誤差の範囲内であってもよい。用語「約」により包含される許容し得る変動は、試験下の特定のシステムに依存し、当業者であれば容易に理解すること

10

20

30

40

50

ができる。範囲がこの適用の範囲内で記載される場合はいつでも、範囲内の全ての全整数も本開示の実施形態として企図される。

【0630】

本明細書における用語「含む (comprising)」、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」および「含む (comprises)」は、それぞれ、例ごとに、用語「本質的にからなる (consisting essentially of)」、「本質的にからなる (consist essentially of)」、「本質的にからなる (consists essentially of)」、「からなる (consisting of)」、「からなる (consist of)」および「からなる (consists of)」と置換可能であってもよいと本発明者らによって意図される。

10

【0631】

本特許明細書内で引用される全ての参考文献または特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0632】

本発明を、添付の実施例に例示する。以下の実施例は、別途詳細に記載される場合を除いて、当業者には周知であり、日常的である標準的な技術を用いて実行される。実施例は例示的なものであるが、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0633】

(実施例1)

20

e T E C 結合されたグリココンジュゲートの調製のための一般的プロセス

シスタミンジヒドロクロリドによる糖類の活性化およびチオール化

糖類を、無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で還元させる。溶液の湿度含量を、Karl Fischer (KF) 分析により決定し、0.1%~0.4%、典型的には、0.2%の湿度含量に達するように調整する。

【0634】

活性化を開始させるために、1, 1'-カルボニルジー-1, 2, 4-トリアゾール (CDT) または 1, 1'-カルボニルジイミダゾール (CDI) の溶液を、DMSO 中、100 mg/mL の濃度で新鮮に調製する。糖類を、様々な量の CDT/CDI (1~10 モル当量) で活性化し、23±2℃で1時間、反応を進行させる。活性化レベルを、HPLC により決定することができる。シスタミンジヒドロクロリドを、50 mg/mL の濃度に無水 DMSO 中で新鮮に調製する。活性化された糖類を、1 モル当量 (mol. eq.) のシスタミンジヒドロクロリドと反応させる。あるいは、活性化された糖類を、1 mol. eq. のシステアミンヒドロクロリドと反応させる。チオール化反応を、23±2℃で21±2時間進行させて、チオール化された糖類を生産する。チオール化レベルを、添加された量の CDT/CDI により決定する。

30

【0635】

活性化反応溶液中の残留 CDT/CDI を、100 mM 四ホウ酸ナトリウム、pH 9.0 溶液の添加によりクエンチする。計算を実施して、添加される四ホウ酸の量を決定し、最終湿度含量が総水性のうちの1~2%となるように調整する。

40

【0636】

活性化されたチオール化された糖類の還元および精製

チオール化された糖類の反応混合物を、0.9%塩水、pH 6.0 中の予め冷却した 5 mM のコハク酸ナトリウムへの添加により10倍に希釈し、5 μm フィルターを通して濾過する。チオール化された糖類の透析濾過を、40倍の透析容量の WFI に対して実施する。10%容量の0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 により希釈した後、保持液に、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP)、1~5 mol. eq. の溶液を添加する。この還元反応を、5±3℃で20±2時間進行させる。活性化されたチオール化された糖類の精製を、好ましくは、予め冷却した10 mM リン酸二水素ナトリウム、pH 4.3 に対して限外濾過/透析濾過により実施する。あるいは、チオール化さ

50

れた糖類を、標準的なサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）手順またはイオン交換クロマトグラフィー法により精製する。活性化されたチオール化された糖類の保持液のアリコートを取って、糖類濃度を決定し、チオール含量（Ellman）アッセイを行う。

【0637】

活性化されたチオール化された糖類の代替的な還元および精製

また、上記の精製手順に対する代替として、活性化されたチオール化された糖類を、以下のように精製した。

【0638】

チオール化された糖類の反応混合物に、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TECP）の溶液、5~10 mol. eq. を添加し、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で 3 ± 1 時間進行させた。次いで、反応混合物を、0.9%塩水、pH 6.0中の予め冷却した5 mMコハク酸ナトリウムへの添加により5倍希釈し、5 μm フィルターを通して濾過した。チオール化された糖類の透析濾過を、予め冷却した10 mMリン酸二水素ナトリウム、pH 4.3の40倍透析容量を用いて実施した。活性化されたチオール化された糖類の保持液のアリコートを取って、糖類濃度を決定し、チオール含量（Ellman）アッセイを行った。

【0639】

ブロモアセチル化担体タンパク質の活性化および精製

担体タンパク質の遊離アミノ基を、ブロモ酢酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（BAANS）、ブロモアセチルブロミド、または別の好適な試薬などのブロモアセチル化剤との反応によりブロモアセチル化する。

【0640】

担体タンパク質（0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 8.0 ± 0.2 中）を、活性化の前にまず、約pH 7で、 $8 \pm 3^\circ\text{C}$ で保持する。タンパク質溶液に、ストックジメチルスルホキシド（DMSO）溶液（20 mg/mL）の形のブロモ酢酸のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（BAANS）を、0.25~0.5の比のBAANS：タンパク質（w/w）で添加する。反応物を、 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ で30~60分間、穏やかに混合する。得られるブロモアセチル化（活性化）されたタンパク質を、例えば、10 mMリン酸（pH 7.0）緩衝液を用いた10 kDaのMWCO膜を用いる限外濾過／透析濾過により精製する。精製後、ブロモアセチル化された担体タンパク質のタンパク質濃度を、Lowryのタンパク質アッセイにより見積もる。

【0641】

活性化の程度を、抑制電導度検出（イオンクロマトグラフィー）と共役させたイオン交換液体クロマトグラフィーによる総ブロミドアッセイにより決定する。活性化されたブロモアセチル化されたタンパク質上の結合したブロミドを、アッセイ試料調製物中のタンパク質から切断し、存在し得る任意の遊離ブロミドと共に定量する。タンパク質上に残存する共有的に結合した臭素は全て、アルカリ2-メルカプトエタノール中で試料を加熱することにより、イオン性ブロミドへの変換により遊離させる。

【0642】

ブロモアセチル化されたCRM₁₉₇の活性化および精製

CRM₁₉₇を、10 mMリン酸緩衝化0.9% NaCl pH 7（PBS）を用いて5 mg/mLに希釈した後、1 Mストック溶液を用いて、0.1 M NaHCO₃、pH 7.0を作製した。BAANSを、20 mg/mLのDMSOのBAANSストック溶液を用いてCRM₁₉₇：BAANS比1：0.35（w:w）で添加した。反応混合物を $3^\circ\text{C} \sim 11^\circ\text{C}$ で30 min~1時間インキュベートした後、10 K MWCO膜および10 mMリン酸ナトリウム／0.9% NaCl、pH 7.0を用いる限外濾過／透析濾過により精製した。精製された活性化されたCRM₁₉₇を、Lowryアッセイによりアッセイして、タンパク質濃度を決定した後、PBSで5 mg/mLに希釈した。スクロースを凍結保護剤として5% w/vまで添加し、活性化されたタンパク質を凍結し、コンジュゲーションのために必要となるまで -25°C で保存した。

【0643】

CRM₁₉₇のリシン残基のプロモアセチル化は非常に一貫しており、利用可能な39個のリシンから15～25個のリシンの活性化が得られた。この反応は、高収率で活性化されたタンパク質を生じた。

【0644】

プロモアセチル化された担体タンパク質への活性化されたチオール化された糖類のコンジュゲーション

コンジュゲーション反応を開始する前に、反応容器を5℃に予め冷却する。続いて、プロモアセチル化された担体タンパク質および活性化されたチオール化された糖類を添加し、150～200rpmの攪拌速度で混合する。糖類／タンパク質の入力比は0.9±0.1である。反応のpHを、1M NaOH溶液で8.0±0.1に調整する。コンジュゲーション反応を20±2時間、5℃で進行させる。

10

【0645】

残存する反応性官能基のキャッピング

担体タンパク質上の未反応のプロモアセチル化された残基を、5℃で3時間、キャッピング試薬である2mol. eq. のN-アセチル-L-システインと反応させることによりクエンチする。残存する遊離スルフヒドリル基を、5℃で20時間、4mol. eq. のヨードアセトアミド (IAA) でキャッピングする。

【0646】

eTEC結合グリココンジュゲートの精製

コンジュゲーション反応 (ポストIAAキャップ) 混合物を、0.45μmフィルターを通して濾過する。グリココンジュゲートの限外濾過／透析濾過を、5mMコハク酸-0.9%塩水、pH6.0に対して実施する。次いで、グリココンジュゲート保持液を、0.2μmフィルターを通して濾過する。グリココンジュゲートのアリコート、アッセイのために取る。残りのグリココンジュゲートを5℃で保存する。

20

【0647】

(実施例2)

Pn-33F eTECコンジュゲートの調製

活性化プロセス

Pn33F多糖の活性化

Pn-33F多糖を、500mMの1, 2, 4-トリアゾール (WFI中) と混合して、多糖1グラムあたり10グラムのトリアゾールを得た。混合物をドライアイス-エタノール浴中でシェル凍結した後、乾固まで凍結乾燥した。凍結乾燥された33F多糖を、無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で復元させた。凍結乾燥された33F/DMSO溶液の湿度含量を、Karl Fischer (KF) 分析により決定した。33F/DMSO溶液にWFIを添加して、0.2%の湿度含量を達成することにより、湿度含量を調整した。

30

【0648】

活性化を開始する前に、1, 1'-カルボニル-2, 4-トリアゾール (CDT) を、DMSO溶液中、100mg/mLとして新鮮に調製した。チオール化ステップの前に、Pn33F多糖を、様々な量のCDTで活性化した。CDT活性化を23±2℃で1時間実行した。活性化レベルを、HPLC (A220/A205) により決定した。四ホウ酸ナトリウム、100mM、pH9.0溶液を添加して、活性化反応溶液中に残存するCDTを完全にクエンチした。計算を行って、四ホウ酸の添加される量を決定し、最終湿度含量が総水性の1.2%となるようにする。反応を23±2℃で1時間進行させた。

40

【0649】

活性化されたPn-33F多糖のチオール化

シスタミン-ジヒドロクロリドを、無水DMSO中で新鮮に調製し、1mol. eq. のシスタミン-ジヒドロクロリドを活性化された多糖反応溶液に添加した。反応を、23±2℃で21±3時間進行させた。チオール化された糖類溶液を、0.9%塩水、pH6.

50

0 中の予め冷却した 5 mM コハク酸ナトリウムへの添加により 10 倍希釈した。希釈された反応溶液を、5 μ m フィルターを通して濾過した。チオール化された Pn-33F 多糖の透析濾過を、注射用水 (WFI) を用いて、100 K MWC O 限外濾過膜カセットを用いて実行した。

【0650】

活性化されたチオール化された Pn-33F 多糖の還元および精製

10% 容量の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 により希釈した後、保持液に、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP)、5 mol. eq. の溶液を添加した。この還元反応を、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で 2 ± 1 時間進行させた。チオール化された 33F 多糖の透析濾過を、100 K MWC O 限外濾過膜カセットを用いて実行した。透析濾過を、予め冷却した 10 mM リン酸ナトリウム、pH 4.3 に対して実施した。チオール化された 33F 多糖の保持液を、糖類濃度とチオール (Ellman) アッセイの両方のために取った。

10

【0651】

活性化されたチオール化された Pn-33F 多糖の代替的還元および精製

また、上記の精製手順に対する代替として、33F 活性化されチオール化された糖類を以下のように精製した。

【0652】

チオール化された糖類の反応混合物に、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP)、5 mol. eq. の溶液を添加し、 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で 3 ± 1 時間進行させた。次いで、反応混合物を、0.9% 塩水、pH 6.0 中の予め冷却した 5 mM コハク酸ナトリウムへの添加により 5 倍希釈し、5 μ m フィルターを通して濾過した。チオール化された糖類の透析濾過を、100 K MWC O 限外濾過膜カセットを用いて、予め冷却した 10 mM リン酸二水素ナトリウム、pH 4.3 の 40 倍透析容量を用いて実施した。チオール化された 33F 多糖保持液を、糖類濃度とチオール (Ellman) アッセイとの両方のために取った。活性化プロセスの流れ図を、図 8 (A) に提供する。

20

【0653】

コンジュゲーションプロセス

ブロモアセチル化された CRM₁₉₇ へのチオール化された Pn-33F 多糖のコンジュゲーション

30

CRM₁₉₇ 担体タンパク質を、実施例 1 に記載のように、ブロモアセチル化により別々に活性化した後、コンジュゲーション反応のために活性化された Pn-33F 多糖と反応させた。コンジュゲーション反応を開始する前に、反応容器を 5°C に予め冷却した。ブロモアセチル化された CRM₁₉₇ とチオール化された 33F 多糖を、150~200 rpm の攪拌速度で、反応容器中で一緒に混合した。糖類/タンパク質入力比は 0.9 ± 0.1 であった。反応の pH を 8.0~9.0 に調整した。コンジュゲーション反応を、 5°C で 20 ± 2 時間進行させた。

【0654】

ブロモアセチル化された CRM₁₉₇ とチオール化された Pn-33F 多糖上の反応性基のキャッピング

40

CRM₁₉₇ タンパク質上の未反応のブロモアセチル化された残基を、 5°C で 3 時間、2 mol. eq. の N-アセチル-L-システインと反応させた後、 5°C で 20 時間、4 mol. eq. のヨードアセトアミド (IAA) を用いてチオール化された 33F 多糖に残存する遊離スルフヒドリル基を完全にキャッピングすることによりキャッピングした。

【0655】

eTEC 結合 Pn-33F グリココンジュゲートの精製

コンジュゲーション溶液を、0.45 μ m または 5 μ m フィルターを通して濾過した。33F グリココンジュゲートの透析濾過を、300 K MWC O 限外濾過膜カセットを用いて実行した。透析濾過を、5 mM コハク酸-0.9% 塩水、pH 6.0 に対して実施した。次いで、Pn-33F グリココンジュゲート 300 K 保持液を、0.22 μ m フィル

50

ターを通して濾過し、5℃で保存した。コンジュゲーションプロセスの流れ図を、図8（B）に提供する。

【0656】

結果

Pn-33F eTEC グリココンジュゲートのいくつかのバッチに関する反応パラメータおよび特徴付けデータを、表1に示す。シスタミンジヒドロクロリドを用いるCDT活性化チオール化は、63%～90%の糖類収率および1%～13%未満の遊離糖類を有するグリココンジュゲートを生成した。

【0657】

【表1】

10

表1 Pn33F eTEC コンジュゲートの実験パラメータおよび特徴付けデータ

コンジュゲートバッチ	33F-1A	33F-2B	33F-3C	33F-4D	33F-5E	33F-6F	33F-7G
活性化レベル(チオールのモル数/多糖のモル数)	0.21	0.13	0.164	0.103	0.183	0.22	0.19
活性化レベル(%チオール)	21	13	16.4	10.3	18.3	22	19
糖類/タンパク質(入力)比	0.75	1.0	0.75	1.0	1.0	0.75	0.80
糖類の収率(%)	69%	63%	71%	63%	69%	82%	90%
糖類/タンパク質比	1.3	1.7	1.2	1.9	1.6	1.1	1.5
遊離糖類	12.9%	7.7%	4.4%	7.2%	7.3%	< 4%	< 4%
SEC-MALLS による MW(kDa)	2627	2561	4351	2981	3227	3719	5527
CMCA/CMC	14.4/0	13.4/0	6.8/1.9	2.7/0.6	5.9/0.6	8.2/0	11.4/0.6
%K _d (≤ 0.3)	N/A	85%	88%	75%	68%	67%	76%
アセチル化レベル(アセテートのモル数/多糖のモル数)	0.89	1.16	0.99	0.85	0.81	0.85	1.01

20

N/A=入手可能でない

30

【0658】

CRM₁₉₇に対するPn-33F eTEC グリココンジュゲートのOPA力価
マウスにおけるPn-33FのOPA力価を、標準的な条件下で決定した（10Aおよび22Fコンジュゲートについて以下に記載されるOPA手順と同様）。4および7週でのOPA力価（95%CIを有するGMT）を表2に示し、これは、血清型33F Pnグリココンジュゲートがマウス免疫原性モデルにおいてOPA力価を惹起したことを示している。

【0659】

【表2】

40

表2 Pn-33F OPA 力価(95%CI を有する GMT)

33F Pn コンジュゲート	0.001μg	0.01μg	0.1μg
4 週目	4 (4, 5)	37 (17, 82)	414 (234, 734)
7 週目	8 (5, 13)	131 (54, 314)	17567 (9469, 32593)

【0660】

50

(実施例 3)

さらなる Pn-33F eTEC コンジュゲートの調製

さらなる Pn-33F eTEC コンジュゲートを、実施例 2 に記載のプロセスを用いて生成した。Pn-33F eTEC グリココンジュゲートのこれらのさらなるバッチに関する反応パラメータおよび特徴付けデータを、表 3 に示す。

【0661】

【表 3】

表 3 さらに Pn33F eTEC コンジュゲートの実験パラメータおよび特徴付けデータ

コンジュゲートバッチ	33F-8H	33F-9I	33F-10J	33F-11K	33F-12L	33F-13M	33F-14N	33F-15O	33F-16P
活性化レベル (チオールのモル数/多糖のモル数)	0.22	0.11	0.11	0.13	0.14	0.13	0.06	0.13	0.11
糖類/タンパク質 (入力)比	0.75	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
糖類の収率 (%)	78%	88%	89%	67%	69%	86%	81%	91%	88%
糖類/タンパク質比	1.0	2.2	2.1	1.4	1.4	1.4	2.2	1.9	1.9
遊離糖類	< 1%	6.8%	5.9%	2.3%	3.6%	LOQ	8.2%	3.6%	6.6%
SEC-MALLS による MW(kDa)	4729	3293	3295	2246	2498	5539	3070	6009	3789
CMCA/ CMC	6.6/ LOQ	14.2/ 2.1	15.4/ 2.1	5.5/ 1	5.4/ 1.1	NA/ LOQ	1.7/ 1.2	4.1/ 2.2	2.2/ 1.2
%K _d (≤ 0.3)	69%	N/A	N/A	N/A	N/A	88%	87%	87%	85%
アセチル化レベル (アセテートのモル数/多糖のモル数)	0.86	0.93	0.87	1.01	0.99	0.71	0.78	0.8	0.82

LOQ=定量限界；N/A=入手可能でない

【0662】

上記および表 3 に示されるように、上記の eTEC コンジュゲーションを用いて、いくつかの Pn-33F コンジュゲートを得た。eTEC 化学反応により、高収率、低い%の遊離糖類および高いコンジュゲーション度（コンジュゲートしたリシン）を示すコンジュゲートの調製が可能になった。さらに、eTEC コンジュゲーションプロセスを用いて 80%を超えるアセチル官能基を保持することができた。

【0663】

(実施例 4)

Pn-33F eTEC グリココンジュゲートの安定性の評価：遊離糖類の%の傾向

コンジュゲートバッチ 33F-2B のアリコート（表 1 を参照されたい）をポリプロピレン管に分注し、それぞれ、4℃、25℃および 37℃で保存し、遊離糖類%における傾向についてモニタリングした。データ（遊離糖類%）を表 4 に示す。この表に示されるように、遊離糖類%における有意な変化はなかった。

【0664】

【表 4】

表 4 4℃、25℃および 37℃での Pn-33F eTEC グリココンジュゲートに関する遊離糖類の安定性(%)

ロット番号	遊離糖類(%)						
時間							
33F-2B	0	1wk	3wks	1M	2M	3M	6M
	4°C						
	7.7	N/A	8.3	N/A	9.7	11.2	13
	25°C						
	7.7	N/A	10.8	N/A	11.8	N/A	N/A
	37°C						
	7.7	12.1	N/A	13.4	N/A	N/A	N/A

wk=週 ; M=月 ; N/A=入手可能でない

【0665】

また、別のコンジュゲートロット（バッチ 33F-3C）の加速安定性試験も 37℃で 1 カ月まで行った。表 5 に示されるように、37℃で 1 カ月まで、遊離糖類 % に対する有意な変化はなかった。

【0666】

【表 5】

表 5 37℃での Pn-33F eTEC グリココンジュゲートに関する遊離糖類の安定性(%)

ロット番号	遊離糖類(%)				
時間					
33F-3C	0	1 日	1wk	2wks	1M
	37°C				
	4.4	5.9	6.4	7.1	7.2

【0667】

eTEC コンジュゲートの安定性をさらに確認するために、4℃で保存されたさらなるコンジュゲートバッチ（33F-3C および 33F-5E（表 1 を参照されたい））を、遊離糖類 % における潜在的な傾向について、約 1 年までモニタリングした。表 6 に示されるように、約 1 年までの長期間にわたって 4℃で保存されたコンジュゲートについて遊離糖類レベル（%）における有意な変化はなかった。

【0668】

【表 6】

表 6 4℃での Pn-33F eTEC グリココンジュゲートに関する遊離糖類の安定性(%)の結果

ロット番号	遊離糖類(%)				
	時間				
	0	3M	4M	12M	14M
4℃					
33F-3C	4.4	N/A	5.3	N/A	7.6
33F-5E	7.3	6.3	N/A	7.4	N/A

M=月; N/A=入手可能でない

【0669】

33F eTEC 化学反応により生成された血清型 33F コンジュゲートは、様々な温度における遊離糖類の傾向によりモニタリングされる（リアルタイムおよび加速）顕著な

分解なしに安定であることが示された。

【0670】

(実施例5)

CRM₁₉₇に対するPn-8コンジュゲートの調製

Pn-8 RAC/DMSOグリココンジュゲートの調製

凍結された多糖を解凍し、反応容器に移した。2 M酢酸およびWFI（注射用水）を多糖溶液に添加して、約2.5 g/Lの最終多糖濃度および0.2 Mの最終酢酸濃度を達成した。

【0671】

多糖の加水分解

天然多糖を、活性化の前に化学的に加水分解した。希釈された多糖溶液を70℃に加熱した後、この温度を3.5時間保持した。

【0672】

多糖の酸化

多糖の酸化を、過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始し、反応を23℃で20h進行させ続けた。

【0673】

活性化された多糖の精製

活性化された多糖を、限外濾過カセットを用いて濃縮した。透析濾過を、20倍透析容量のWFIに対して実施した。

【0674】

凍結乾燥

活性化された多糖を、活性化された多糖1グラムあたり25グラムのスクロースの比率でスクロースと混合する。活性化された糖類とスクロースとを含有するボトルを、エタノール浴中でシェル凍結し、凍結乾燥する。

【0675】

CRM₁₉₇への活性化された多糖のコンジュゲーションおよびキャッピング

凍結乾燥された活性化された多糖を、DMSO中で2 mg/mLに復元させた。復元のために、凍結乾燥されたCRM₁₉₇にDMSOを添加した。復元されたCRM₁₉₇を、復元された活性化された多糖に添加した。次いで、コンジュゲーションを、反応混合物にシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより開始させ、23℃で24hインキュベートした。コンジュゲーション反応の終結を、2 MEqの水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより行う。このキャッピング反応を、23℃で3h進行させた。

【0676】

コンジュゲートの精製

次いで、コンジュゲート溶液を、冷却した5 mMコハク酸-0.9%塩水（pH 6.0）中で希釈し、濾過し、300 Kセルロース膜を用いて2~4 g/Lに濃縮し、第1段階の透析濾過を、5 mMコハク酸-0.9%塩水（pH 6.0）に対して実施した。最終精製ステップを、5 mMコハク酸-0.9%塩水、pH 6.0緩衝液を用いる透析濾過により行った。透析濾過が完了した後、精製されたコンジュゲートを、0.22 μmフィルターを通して収集タンクに移した。

【0677】

一価バルクコンジュゲートの希釈

コンジュゲートを、5 mMコハク酸/0.9%塩水（pH 6）を用いて、0.5 mg/mLの標的糖類濃度にさらに希釈した。最終的な0.22 μmの濾過ステップを完了させて、製剤のための一価バルクコンジュゲート（MBC）産物を調製した。

【0678】

様々なパラメータ（例えば、糖類-タンパク質入力比、反応物濃度およびシアノ水素化ホウ素ナトリウムのMEq）を変化させることにより上記のプロセスを用いて、いくつかのコンジュゲートを得た。CRM₁₉₇に対する代表的なPn-8グリココンジュゲート

10

20

30

40

50

に関する特徴付けを、表 7 に示す。

【0679】

【表 7】

表 7 Pn8-CRM₁₉₇ コンジュゲートの特徴付け

試料番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MALLS による活性化された糖類の MW(kDa)	267	270	352	65	233	340	113	250	230
糖類/タンパク質比	0.81	0.84	0.5	2.7	1.15	1.0	0.81	0.64	0.42
SEC-MALLS による MW(kDa)	12200	8670	3460	3379	4748	4255	5470	9924	6787

10

【0680】

マウスにおける血清型 8-CRM₁₉₇ コンジュゲートに関するオプソニン貪食活性 (OPA) 力価を、標準的な条件下 (10A および 22F コンジュゲートについて以下に記載される OPA 手順と同様)、マウスにおいて決定した。様々な用量で 4 週での OPA 力価 (95% 信頼区間 (CI) を有する幾何平均力価 (GMT)) を表 8 および表 9 (2 つの別々の実験) に示し、これは、血清型 8 コンジュゲート (試料 1~9; これらのコンジュゲートの特徴付けデータについては表 7 も参照されたい) がマウス免疫原性モデルにおいて OPA 力価を惹起したことを示している。

20

【0681】

表 8 に示されるように、血清型 8 コンジュゲートは、低い抗体力価を有する対照の非コンジュゲート化多糖と比較して、有意により高い抗体力価を有することが示された。

【0682】

【表 8】

表 8 血清型 8-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

30

	OPA GMT (95% CI)		
試料番号	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
1	17 (10, 30)	88 (47, 165)	1344 (896, 2016)
2	7 (4, 11)	184 (87, 387)	1934 (1313, 2847)
3	4 (4, 4)	17 (9, 30)	779 (345, 1757)
4	5 (4, 7)	74 (41, 136)	558 (311, 1001)
非コンジュゲート化 PS			13 (3, 55)

40

【0683】

【表 9】

表 9 血清型 8-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

	OPA GMT (95% CI)	
試料番号	0.001μg	0.01μg
5	8 (5, 12)	322 (208, 498)
6	12 (8, 19)	264 (129, 537)
7	12 (7, 21)	521 (366, 743)
8	19 (10, 38)	404 (238, 687)
9	33 (14, 80)	686 (380, 1237)
2	13 (7, 23)	177 (94, 336)

10

20

【0684】

上記の還元的アミノ化プロセスにより調製されたコンジュゲートから生成された全データにより、良好なコンジュゲーション収率、低い遊離糖類%、および良好な安定性を示すコンジュゲートを調製することができることが示された。さらに、調製されたコンジュゲートは、マウス免疫原性モデルにおいて良好なOPA力価を惹起した。

【0685】

(実施例6)

血清型10A多糖-CRM₁₉₇コンジュゲートの調製

単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型10A多糖の調製

血清型10A莢膜多糖を、当業者には公知の単離手順（例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、第2006/0228381号、第2007/0184071号、第2007/0184072号、第2007/0231340号、および第2008/0102498号ならびにWO2008/118752に開示された方法を参照されたい）を用いて、細菌から直接得ることができる。

30

【0686】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) 血清型10Aを、種ボトル中で増殖させた後、種発酵器に移した。一度、標的光密度に達したら、細胞を生産発酵器に移した。発酵培地を、N-ラウロイルサルコシンの添加により不活化し、限外濾過および透析濾過により精製した。

40

【0687】

単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) 血清型10A莢膜多糖の酸化

計算された容量の0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) および注射用水 (WFI) を多糖溶液に添加して、必要なpHを約6.0に調整した場合、2.5g/Lの最終多糖濃度および25mMリン酸カリウム緩衝液の最終濃度を達成した。次いで、希釈した多糖を5℃に冷却した。0.25モル当量 (MEq) の過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により、酸化を開始させた。酸化反応時間は5℃で約4hであった。酸化反応を、5℃で1~2hの連続攪拌下で、1MEqの2,3-ブタンジオールを用いてクエンチした。

50

【0688】

標的反応時間に達した後、活性化された多糖を、30K MWCO Millipore 限外濾過カセットを用いて濃縮した。次いで、透析濾過を、20倍透析容量のWFIに対して実施した。精製された活性化された多糖を、5℃で保存した。精製された活性化された糖類を、特に、(i) SEC-MALLSによる分子量および(ii)酸化度により特徴付ける。

【0689】

活性化されたストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 10A多糖とCRM₁₉₇とのコンジュゲーション

コンジュゲーションプロセスは、以下のステップからなっていた：

10

- a. スクロース賦形剤との混合、および凍結乾燥；
- b. 凍結乾燥された多糖およびCRM₁₉₇の復元；
- c. CRM₁₉₇への活性化された多糖のコンジュゲーションおよびキャッピング；ならびに
- d. コンジュゲートの精製

【0690】

- a. スクロースとの混合

活性化された多糖を、活性化された多糖1グラムあたり25gのスクロースの比でスクロースと混合する。次いで、混合された混合物のボトルを凍結乾燥した。凍結乾燥後、凍結乾燥された活性化された多糖を含有するボトルを、-20℃で保存した。

20

【0691】

- b. 凍結乾燥された活性化された多糖とCRM₁₉₇タンパク質の復元

凍結乾燥された活性化された多糖を、無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で復元させた。多糖が完全に溶解されたら、復元のために、計算されたCRM₁₉₇に同量のDMSOを添加した。

【0692】

- c. CRM₁₉₇への活性化された多糖のコンジュゲーションおよびキャッピング

復元されたCRM₁₉₇ (DMSO中) を、コンジュゲーション反応器中で復元された活性化された多糖に添加した。最終多糖濃度は1g/Lである。1.2MEqのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加することにより、コンジュゲーションを実施した。反応物を23℃で24hインキュベートした。2MEqの水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより、コンジュゲーション反応の終結を行う。キャッピング反応を、23℃で3hインキュベートした。

30

【0693】

2MEqの水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより、コンジュゲーション反応の終結を行う。このキャッピング反応を、23℃で3h進行させた。

【0694】

- d. コンジュゲートの精製

次いで、コンジュゲート溶液を、冷却した5mMコハク酸-0.9%塩水 (pH 6.0) で5倍 (容量で) に希釈し、20X透析濾過を、5mMコハク酸-0.9%塩水 (pH 6.0) を用いて実施した。初回の透析濾過が完了した後、コンジュゲート保持液を、0.22μmフィルターを通して移した。コンジュゲートを、5mMコハク酸/0.9%塩水 (pH 6) でさらに希釈し、最終的な0.22μm濾過ステップの後、それを2~8℃で保存した。

40

【0695】

様々なパラメータ (例えば、糖類-タンパク質入力比、反応物濃度およびシアノ水素化ホウ素ナトリウムのMEq) を変化させることにより上記のプロセスを用いて、いくつかのコンジュゲートを得た。上記の化学反応により、血清型10Aコンジュゲートを生成することが可能になり、様々な温度での遊離糖類の傾向によりモニタリングされるように (リアルタイムおよび加速)、顕著な分解なしに安定であることが示された。CRM₁₉₇

50

に対する代表的な P n - 1 0 A グリココンジュゲートに関する特徴付けを、表 1 0 に示す。

【 0 6 9 6 】

【表 1 0 】

表 10 Pn-10A-CRM₁₉₇ コンジュゲートの特徴付け

コンジュゲート番号	1	2	3	4	5	6
DO	12.2	19.5	5.2	10.3	10.8	10.5
活性化された糖類の MW、kDa	191	240	80	170	170	170
入力比	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1
収率(%)	56	28.5	65	82	73	66
遊離糖類(%)	6.8	10.0	6.7	6.8	6.4	9.7
コンジュゲートの MW、kDa	3838	5810	4630	4034	3463	5540
糖類/タンパク質比	0.82	0.88	0.85	1.1	1.2	1.0
Lys 改変 AAA	7.4	3.7	13.1	6.9	6.7	6.1

【 0 6 9 7 】

マウスにおける血清型 1 0 A - C R M _{1 9 7} コンジュゲートに関するオプソニン貪食活性（O P A）力価を、標準的な条件下で決定した。3 0 匹の 6 ～ 7 週齢のメスの S w i s s W e b s t e r マウスの群を、0 週目に皮下経路により 0 . 0 0 1 μ g、0 . 0 1 μ g、または 0 . 1 μ g の試験コンジュゲートで免疫した。3 週目にマウスに同じ用量のコンジュゲートを追加接種した後、4 週目に出血させた。血清型特異的 O P A を 4 週目の血清試料に対して実施した。

【 0 6 9 8 】

オプソニン貪食活性（O P A）アッセイを用いて、ストレプトコッカス・ニューモニエ（S . p n e u m o n i a e）血清型 1 0 A に特異的なマウス血清中の機能的抗体を測定する。試験血清を、細菌をオプソニン化し、補体沈着を誘発し、それによって食細胞による細菌の食作用および殺傷を容易にする莢膜多糖特異的免疫グロブリンの能力を測定するアッセイ反応において設定する。O P A 力価を、試験血清を含まない対照ウェル上での細菌計数の 5 0 % の減少をもたらす希釈率の逆数として定義する。O P A 力価を、この 5 0 % の殺傷カットオフを挟む 2 つの希釈率から内挿する。O P A 手順は、以下の改変を含む、H u ら（2 0 0 5）C l i n D i a g n L a b I m m u n o l 1 2（2）：2 8 7 ～ 2 9 5 に記載の方法に基づくものであった。試験血清を 2 . 5 倍に連続希釈し、マイクロタイターアッセイプレートに添加した。生きた血清型 1 0 A 標的細菌株をウェルに添加し、プレートを 3 7 ° C で 3 0 分間振盪した。

【 0 6 9 9 】

分化した H L - 6 0 細胞（食細胞）および子ウサギ血清（3 ～ 4 週齢、P E L - F R E E Z（登録商標）、1 2 . 5 % 最終濃度）をウェルに添加し、プレートを 3 7 ° C で 6 0 分間振盪した。反応を終結させるために、8 0 μ L の 0 . 9 % N a C l を全てのウェルに添加し、混合し、1 0 μ L のアリコート、2 0 0 μ L の水を含む M U L T I S C R E E N（登録商標）H T S H V フィルタープレート（M I L L I P O R E（登録商標））

のウェルに移した。液体を減圧下でプレートを通して濾過し、150 μ LのHYSOY（登録商標）培地を各ウェルに添加し、濾過した。次いで、フィルタープレートを37℃、5%CO₂で一晩インキュベートした後、Destain Solution（Bio-Rad Laboratories, Inc.、Hercules、CA）を用いて固定した。次いで、プレートをクマシーブルーで染色し、一度脱色した。コロニーを画像化し、Cellular Technology Limited（CTL）（Shaker Heights、OH）IMMUNOSPOT（登録商標）Analyzer上で数えた。生コロニー計数を用いて、殺傷曲線をプロットし、OPA力価を算出した。

【0700】

様々な用量で4週でのOPA力価（95%信頼区間（CI）を有する幾何平均力価（GMT））を表11に示し、これは血清型10Aコンジュゲート（試料1～3；これらのコンジュゲートの特徴付けデータについては表10も参照されたい）がマウス免疫原性モデルにおいてOPA力価を惹起したことを示している。表11に示されるように、血清型10Aコンジュゲートは、低いOPA応答を有する対照の非コンジュゲート化多糖と比較して、有意により高いOPA力価を有することが示された。

【0701】

【表11】

表 11 血清型 10A-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

	OPA GMT (95% CI)		
試料番号	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
1	858 (556, 1324)	1015 (610, 1691)	4461 (3065, 6494)
2	1411 (737, 2703)	796 (460, 1378)	2873 (1768, 4842)
3	322 (180, 574)	1062 (528, 2135)	2618 (1415, 4842)
非コンジュゲート化 PS			602 (193, 1882)

【0702】

（実施例7）

TEMPO／NCSを用いるPn血清型12Fのコンジュゲーション

血清型12F-CRM₁₉₇グリココンジュゲートの安定性を改善するために、第1級アルコールをアルデヒド基に酸化するための共酸化剤として2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシフリーラジカル（TEMPO）およびN-クロロスクシンイミド（NCS）を用いて、代替化学反応を探索した。GC／MS分析により、酸化部位が過ヨウ素酸媒介性酸化のものと異なることが示された。TEMPO-NCS酸化の場合、 α -D-Glc pおよび2-Glc pが酸化されたが、過ヨウ素酸塩を用いた場合、 α -D-Gal pが主要な酸化部位であった（図4を参照されたい）。本明細書にさらに詳細に記載されるように、TEMPOを触媒量（0.1モル当量以下）で用いて、所望の酸化度（DO）を、用いたNCSの量を変化させることにより達成した。続いて、いくつかのコンジュゲートを合成し、特徴付けた。一般に、血清型12Fグリココンジュゲートの生産を、以下のように、いくつかのフェーズで実行した：

- 分子量50 kDa～500 kDaへの血清型12F多糖の加水分解；
- TEMPO／NCSによる血清型12F多糖の活性化；
- 活性化された多糖の精製；
- CRM₁₉₇タンパク質への活性化された血清型12Fのコンジュゲーション；および
- 血清型12F-CRM₁₉₇コンジュゲートの精製。

【0703】

血清型12Fの加水分解および酸化

多糖の加水分解を、典型的には、加熱しながら酸性条件下で実施して、100kDa～350kDaの所望の範囲の平均分子量を得た。典型的な実験を、以下に記載する。

【0704】

加水分解

血清型12F多糖溶液を、カバー付き反応容器に添加した。これに、必要な容量の0.30M酢酸および注射用水(WFI)を添加して、約0.1Mの酢酸濃度を維持した。溶液のpHを、1N NaOHまたは水酢酸を用いて3.2±0.3に調整した。反応混合物の温度を、70±5℃まで上昇させた。反応混合物を70±5℃で90～120分間攪拌した。反応混合物を23±2℃に冷却し、1M NaOH溶液を添加することにより中和した(pH7.0)。加水分解された多糖を、30K MWCO膜を用いてWFIに対して限外濾過／透析濾過により精製した。溶液を、0.22μmフィルターを通して濾過し、酸化まで2～8℃で保存した。加水分解された多糖の分子量を、SEC-MALLSにより分析して、分子量が100kDa～350kDaの標的範囲を満たすことを保証した。

10

【0705】

部分酸化

1つの実験において、マイクロフレイダイザーを用いる圧力均一化を用い、血清型12F多糖を機械的にサイジングして、分子量を約100kDa～500kDaに低下させた。サイジングされた多糖を4.0mg/mLの濃度で反応容器に添加し、1:1v/vの比で重炭酸／炭酸緩衝液(0.5M NaHCO₃/0.05M Na₂CO₃緩衝液、pH8.6)と混合した。攪拌した混合物に、0.1モル当量以下のTEMPOを添加した。0.6～1.0モル当量のNCSの添加により、反応を開始させた。反応混合物を室温で2時間攪拌した後、30K限外濾過膜を用いて、WFIを用いる透析濾過により活性化された多糖を精製した。精製された多糖を回収し、アルデヒド(3-メチルー2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)アッセイを用いる)および多糖(アントロンアッセイを用いる)の定量測定により酸化度(DO)を決定した。

20

【0706】

別の実験において、血清型12F多糖を加水分解して、分子量を、約100kDa～500kDaの分子量に低下させた。血清型12F多糖を反応容器に添加し、1:1v/vの比で0.5M NaHCO₃/0.05M Na₂CO₃緩衝液(pH8.6)と混合した。攪拌した混合物に、WFI中に溶解した0.6～1.0モル当量のNCSを添加した。WFI中に溶解した約0.1モル当量のTEMPOの添加により、活性化を開始させた。反応混合物を室温で2時間攪拌した後、30K限外濾過膜を用いて、WFIを用いる透析濾過により活性化された多糖を精製した。精製された活性化された多糖を、0.2μmフィルターを通して濾過し、使用前に4℃で保存した。

30

【0707】

また、TEMPO/NCS媒介性酸化を、pH6.5、7.0、7.5および8.0のリン酸ナトリウム緩衝液において実施することに成功した。いくつかの活性化実験において、n-プロパノールなどの第1級アルコールを用いて試薬をクエンチして、糖類の過剰酸化を回避した。別のセットの実験において、化学的に加水分解された多糖を、限外濾過／透析濾過精製ステップを用いずに、直接的に酸化にかけた。

40

【0708】

血清型12F酸化多糖のコンジュゲーション

1つの実験において、精製された酸化された血清型12F多糖を、反応容器に添加した後、0.1Mの最終緩衝液濃度となるように0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を添加した。この溶液に、予め凍結乾燥されたCRM₁₉₇を添加し、完全に混合して、均一な溶液を得た。pHを、希HClまたは1N NaOH溶液を用いて6.8に調整した。この後、1.5モル当量のNaCNBH₃を添加した。反応混合物を、室温(2

50

3℃)で24時間および37℃で2.5日間攪拌した。次いで、反応混合物を1X0.9%塩水で希釈し、未反応のアルデヒド基を2モル当量の水素化ホウ素ナトリウムで「キャッピング」した。キャッピング反応時間は3時間であった。

【0709】

別の実験において、精製された活性化された血清型12Fを反応容器に添加した後、0.1Mの最終緩衝液濃度となるように0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)を添加した。この溶液に、予め凍結乾燥されたCRM₁₉₇を添加し、完全に混合して、均一な溶液を得た。pHを、希HClまたは1N NaOH溶液を用いて6.8に調整した。この後、3モル当量のNaCNBH₃を添加した。反応混合物を、23℃で24時間および37℃で48h攪拌した。次いで、反応混合物を1X0.9%塩水で希釈し、攪拌しながら、未反応のアルデヒド基を1モル当量の水素化ホウ素ナトリウムNaBH₄で「キャッピング」した。キャッピング反応時間は3時間であった。

10

【0710】

別の実験において、精製された活性化された血清型12Fを反応容器に添加し、CRM₁₉₇溶液と混合した。混合物を凍結乾燥し、5mg/mLの最終糖類濃度となるように0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)中に粉末を溶解した。必要に応じて、希HClまたは1N NaOH溶液を用いて、pHを6.8に調整した。この後、3モル当量のNaCNBH₃を添加した。反応混合物を、23℃で24時間および37℃で48h攪拌した。次いで、反応混合物を1X0.9%塩水で希釈し、未反応のアルデヒド基を1モル当量の水素化ホウ素ナトリウムNaBH₄で「キャッピング」した。キャッピング反応時間は3時間であった。

20

【0711】

コンジュゲーション精製

キャッピングされた反応混合物を、5μmフィルターを用いて濾過した後、100K MWCO限外濾過膜を用いて精製した。コンジュゲートを、まず、10mMコハク酸/0.9%塩水、pH6.0緩衝液を用いて透析濾過した。次いで、精製されたコンジュゲートを、0.45/0.22μmフィルターを通して濾過して、バルクコンジュゲートを得た。

【0712】

酸化度

血清型12F多糖における第1級アルコールの酸化の成功を、TEMPO/NCSS系を用いて達成した。加水分解された血清型12F多糖を、NCSS共酸化剤の量を調整することにより様々な酸化度(DO)レベルに酸化した。様々な多糖バッチおよび分子量を用いてNCSSの量を変化させることによるDOに対する効果を、図9に示す。DOにおける有意な変化は2時間後でも観察されなかったため、典型的には、酸化反応は2時間以内に完了する。

30

【0713】

いくつかの血清型12Fコンジュゲートを生成し、TEMPO/NCSS酸化多糖を用いて特徴付けた。結果を、表12にまとめる。

【0714】

40

【表 12】

表 12 肺炎球菌血清型 12F-CRM₁₉₇ コンジュゲート

コンジュゲートバッチ	12F-84A	12F-97B	12F-147C	12F-171D	12F-177-6E	12F-181F
酸化時間(hr)	2	2	4	2	2	2
酸化度(DO)	12.0	6.0	9.6	12.0	11.5	11.5
活性化された糖類の収率(%)	80	71	70	89	86	86
MALLS による活性化された糖類の MW(kDa)	137	155	170	190	240	240
コンジュゲーションプロセス	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Lyo-CRM	Co-Lyo
コンジュゲートの結果						
糖類の収率(%)	51.6	76.8	53.6	76.3	65.8	40.7
糖類/タンパク質比	1.2	0.9	1.0	1.1	1.4	0.9
遊離糖類(%)	24	10	17	20	23	14
SEC-MALLS による MW(kDa)	2050	3000	3600	1500	2400	2100

10

20

【0715】

(実施例 8)

TEMPO/NCS 酸化法を用いた Pn-血清型 12F-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

マウスにおける血清型 12F-CRM₁₉₇ コンジュゲートに関するオプソニン貪食活性 (OPA) 力価を、標準的な条件下でマウスにおいて決定した。4 および 7 週での OPA 力価 (95% 信頼区間 (CI) を有する幾何平均力価 (GMT)) を表 13 に示し、これは、血清型 12F-CRM₁₉₇ コンジュゲート (バッチ 12F-97B; このコンジュゲートの特徴付けデータについては、表 12 も参照されたい) がマウス免疫原性モデルにおいて OPA 力価を惹起したことを示している。TEMPO-NCS により生成されたコンジュゲートは、過ヨウ素酸酸化から生成された対照コンジュゲート (171B) よりも免疫原性が高かった。

30

【0716】

【表 13】

表 13 血清型 12F-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

コンジュゲート試料/用量	0.001μg	0.01μg	0.1μg
過ヨウ素酸酸化(171B)対照	4	16	172
TEMPO/NCS 酸化(12F-97B)	40	417	880

40

【0717】

(実施例 9)

Pn-12F グリココンジュゲート安定性の評価

過ヨウ素酸酸化と TEMPO/NCS 酸化により生成されたコンジュゲートの安定性 (25℃での) の比較 (図 10 を参照されたい) により、Pn-12F 多糖の酸化により生成されたコンジュゲートが相対的により安定であることが示された。図 10 に示されるように、経時的な遊離糖類の増加が、25℃での Pn-12F 多糖の過ヨウ素酸酸化により生成されたグリココンジュゲートについて観察された。対照的に、Pn-12F 多糖の T

50

EMPO/NC S酸化を用いて調製されたグリココンジュゲートは、同様の条件下で遊離糖類に関する有意な傾向を示さなかった。

【0718】

(実施例10)

血清型15B多糖-CRM₁₉₇コンジュゲートの調製

単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型15B多糖の調製

血清型15B莢膜多糖を、当業者には公知の単離手順を用いて、細菌から直接得ることができる。ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型15Bを、種ボトル中で増殖させた後、種発酵器に移した。一度、標的光密度に達したら、細胞を生産発酵器に移した。発酵培地を、N-ラウロイルサルコシンの添加により不活化し、限外濾過および透析濾過により精製した。

10

【0719】

次いで、精製されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型15B多糖を、PANDA 2K (登録商標) ホモジェナイザー (GEA Nirx Soavi, Parma, Italy) を用いる高圧均一化によりサイジングして、単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型15B多糖を生産した。

【0720】

好ましくは、上記プロセスにより得られた単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型15B莢膜多糖は、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含み、50kDa~500kDa、好ましくは、150kDa~350kDaの分子量を有する。

20

【0721】

単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型15B莢膜多糖の酸化

多糖の酸化を、計算された量の500mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) およびWFIの連続的添加により100mMリン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 中で実行して、2.0g/Lの最終多糖濃度を得た。必要に応じて、反応のpHを約pH6.0に調整した。pH調整の後、反応温度を23℃に調整した。約0.25モル当量の過ヨウ素酸ナトリウムの添加により、酸化を開始させた。酸化反応を、約16h、23℃で実施した。

30

【0722】

活性化された多糖の濃縮および透析濾過を、10K MWCO限外濾過カセットを用いて実行した。20倍透析容量のWFIに対して透析濾過を実施した。次いで、精製された活性化された多糖を5℃で保存した。精製された活性化された糖類を、特に、(i) 比色アッセイによる糖類濃度；(ii) 比色アッセイによるアルデヒド濃度；(iii) 酸化度；(iv) SEC-MALLSによる分子量ならびに(v) O-アセチルおよびグリセロールの存在により特徴付けた。

【0723】

多糖および多糖-タンパク質コンジュゲートの分子量の決定のために、SEC-MALLSを用いる。流体力学的容積により多糖を分離するために、SECを用いる。分子量の決定のために、屈折率 (RI) および多角レーザー光散乱 (MALLS) 検出器を用いる。光が物質と相互作用する場合、それは散乱し、散乱光の量は物質の濃度、 dn/dc (特定の屈折率増分) の2乗、および分子量に関連する。分子量測定を、MALLS検出器からの散乱光シグナルおよびRI検出器からの濃度シグナルからの読み取り値に基づいて算出する。

40

【0724】

活性化された多糖の酸化度 ($DO = \text{糖反復単位のモル数} / \text{アルデヒドのモル数}$) を、以下のように決定した：

糖反復単位のモル数を、様々な比色法により、例えば、Anthrone法を用いること

50

により決定する。多糖を、硫酸および熱の作用により最初に単糖類まで破壊する。Anthrone試薬は、ヘキソースと反応して黄緑色の複合体を形成し、その吸光度は625nmで分光光度的に読み取られる。アッセイの範囲内で、吸光度は存在するヘキソースの量に正比例する。

【0725】

また、アルデヒドのモル数を、MBTH比色法を用いて同時に決定する。MBTHアッセイは、アルデヒド基（所与の試料に由来する）を3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン（MBTHアッセイ試薬）と反応させることによるアジン化合物の形成を含む。過剰の3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾンは酸化して、反応性陽イオンを形成する。反応性陽イオンとアジンは反応して、青色の発色団を形成する。次いで、形成された発色団を、650nmで分光光度的に読み取る。

10

【0726】

好ましくは、上記プロセスにより得られた活性化されたストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B莢膜多糖は、血清型15B莢膜多糖1mMあたり少なくとも0.6mMのアセテートを含み、50kDa～500kDa、好ましくは、150kDa～350kDaの分子量を有する。

【0727】

活性化されたストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15B莢膜多糖とCRM₁₉₇とのコンジュゲーション

コンジュゲーションプロセスは、以下のステップからなっていた：

20

- a) スクロース賦形剤との混合および凍結乾燥；
- b) 凍結乾燥された活性化された多糖とCRM₁₉₇の復元；
- c) CRM₁₉₇への活性化された多糖のコンジュゲーションおよびキャッピング；ならびに
- d) コンジュゲートの精製

【0728】

- a) スクロース賦形剤との混合および凍結乾燥

活性化された多糖を、活性化された多糖1グラムあたり25グラムのスクロースの比でスクロースと混合した。次いで、混合された混合物のボトルを凍結乾燥した。凍結乾燥後、凍結乾燥された活性化された多糖を含有するボトルを、-20℃で保存した。計算された量のCRM₁₉₇タンパク質をシェル凍結し、別々に凍結乾燥した。凍結乾燥されたCRM₁₉₇を、-20℃で保存した。

30

【0729】

- b) 凍結乾燥された活性化された多糖とCRM₁₉₇タンパク質の復元

凍結乾燥された活性化された多糖を、無水ジメチルスルホキシド（DMSO）中で復元させた。多糖が完全に溶解されたら、復元のために、凍結乾燥されたCRM₁₉₇に等量の無水DMSOを添加した。

【0730】

- c) コンジュゲーションおよびキャッピング

復元された活性化された多糖を、反応容器中で復元されたCRM₁₉₇と混合（入力比：0.8：1）した後、完全に混合して、シアノ水素化ホウ素ナトリウムとのコンジュゲーションを開始する前に透明な溶液を得た。反応溶液中の最終多糖濃度は、約1g/Lである。反応混合物に1.0～1.5Meqのシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより、コンジュゲーションを開始させ、23℃で40～48hインキュベートした。2Meqの水素化ホウ素ナトリウム（NaBH₄）を添加して未反応のアルデヒドをキャッピングすることにより、コンジュゲーション反応を終結させた。このキャッピング反応を、23℃で3h継続した。

40

【0731】

- d) コンジュゲートの精製

コンジュゲート溶液を、100～300K MWCO膜を用いる接線流濾過による精製

50

のための調製物中、冷却した 5 mM コハク酸 - 0.9 % 塩水 (pH 6.0) を用いて 1 : 10 に希釈した。希釈したコンジュゲート溶液を、5 μ m フィルターに通過させ、媒体として 5 mM コハク酸 - 0.9 % 塩水 (pH 6.0) を用いて透析濾過を実施した。透析濾過が完了した後、コンジュゲート保持液を、0.22 μ m フィルターを通して移した。

【0732】

コンジュゲートを、約 0.5 mg/mL の標的糖類濃度となるように 5 mM コハク酸 / 0.9 % 塩水 (pH 6) でさらに希釈した。最終的な 0.22 μ m の濾過ステップを完了させて、グリココンジュゲートを得た。

【0733】

好ましくは、上記プロセスにより得られたコンジュゲートは、血清型 15 B 莢膜多糖 1 mM あたり少なくとも 0.6 mM のアセテートを含み、3,000 kDa ~ 20,000 kDa の分子量を有し、2 ~ 6 のコンジュゲーション度を有する。

10

【0734】

(実施例 11)

CRM₁₉₇ に共有的に連結されたストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15 B 莢膜多糖を含むグリココンジュゲートの特徴付け

コンジュゲート 1 を、実施例 10 のプロセスにより調製した。コンジュゲート 2 および 3 を、異なる量の酸化剤を用いる同様のプロセスにより調製した。コンジュゲート 4 を、精製された血清型 15 B 莢膜多糖をサイジングせず、より低い DO (より高い酸化レベル) まで活性化し、コンジュゲーションを水性媒体中で実施した以外は同様のプロセスによって調製した。コンジュゲート 5 を、精製された血清型 15 B 莢膜多糖を化学的加水分解によりサイジングし、コンジュゲーションを水性媒体中で実施した以外は同様のプロセスによって調製した。コンジュゲート 6 および 7 を、精製された血清型 15 B 莢膜多糖をサイジングしなかった以外は同様のプロセスによって調製した。

20

【0735】

得られたコンジュゲートを特徴付け、その結果を表 14 にまとめる。

【0736】

【表 1 4】

表 14 ストレプトコッカス・ニューモニエ(Streptococcus pneumoniae)血清型 15B 莢膜多糖-CRM₁₉₇ コンジュゲート

コンジュゲート	1	2	3	4	5	6	7
多糖	サイジングされた	サイジングされた	サイジングされた	天然	加水分解された	天然	天然
O-アセチル;活性化された多糖 (アセテート μmol /多糖 μmol)	0.69	0.69	0.69	1.01	0.66	0.76	N/A
溶媒	DMSO	DMSO	DMSO	水性	水性	DMSO	DMSO
活性化された多糖の DO	11.4	5.8	9.7	4.8	8.8	5	12
活性化された多糖の MW	196 KDa	218 KDa	235 KDa	435 KDa	270 KDa	431 KDa	460 KDa
収率(%)	87.2	64	63.7	96.2	78.8	24.2	26.2
糖類タンパク質比	0.68	0.65	0.71	1.22	1.29	0.9	1.5
遊離糖類(%)	< 5	< 5	6.1	18.1	14.2	8.8	18
コンジュゲートの MW、SEC-MALLS(kDa)	6190	7090	7937	1766	1029	6293	4466
O-アセチル化、コンジュゲート (アセテート μmol /多糖 μmol)	0.68	0.7	0.68	0.61	0.44	0.85	N/A
< 0.3 K _d (%), SEC	N/A	73	N/A	N/A	62	N/A	N/A
コンジュゲーション度(AAA);改変Lys	3.7	3.9	4.1	N/A	3.4	N/A	N/A
コンジュゲート中で保持されたO-アセチル(%)	99%	100%	99.5%	60%	67%	100%	N/A

N/A=入手可能でない

【0 7 3 7】

遊離多糖のパーセンテージは、水酸化アルミニウムゲルを用いて、タンパク質および共有的に結合した糖類を結合させ、遠心分離により除去する手順により測定する。試料をリン酸緩衝水酸化アルミニウムゲルと混合し、遠心分離する。結合した糖類はゲルと共にペレット化し、遊離糖類は上清中に残存する。得られる上清および対照試料を、適切な比色アッセイにより定量して、遊離糖類のパーセンテージを決定し、タンパク質の十分な除去および糖類の回収を確認する。

【0 7 3 8】

アミノ酸分析のために、多糖-タンパク質試料を最初に、減圧および加熱下（160℃で15分間）での6N塩酸（HCl）加水分解を用いて、遊離アミノ酸としてその個々の成分に加水分解する。加水分解後、試料を、アミノ酸分析装置を用いて分析する。個々のアミノ酸を、温度および流量を変化させながらクエン酸ナトリウム緩衝液の段階勾配を用いて、イオン交換クロマトグラフィーにより分離する。分離後、それぞれのアミノ酸残留

物の量を、ポストカラムニンヒドリンカップリング検出システムを用いて定量的に決定する。このシステムにおいては、ニンヒドリンを、ポストカラムリアクターシステム中でカラム溶出液と混合し、混合物を光度計に通過させる。ニンヒドリンと溶出したアミノ酸との反応は、570 nmで最大吸収する紫色の化合物をもたらす。この吸光度は、存在するα-アミノ基の量の線形応答（関数）であり、この反応はα-アミノ基を有する全ての有機化合物のための定量比色アッセイとなる。遊離アミノ基を有さない、プロリンおよびヒドロキシプロリンなどのイミノ酸との反応においては、明黄色の化合物が生成され、440 nmでモニタリングされる。各アミノ酸に関するピーク面積を、570 nmと440 nmの波長の出力の両方を用いて算出する。

【0739】

10

収率を以下のように算出する：（コンジュゲート中の多糖の量 x 100）／活性化された多糖の量。

【0740】

水性媒体を用いて生成されたコンジュゲート（4および5）は、O-アセチルレベルの有意な喪失を示した。MWサイジングを用いずに天然多糖を用いてDMSO溶媒中で生成されたコンジュゲート（6および7）は、O-アセチルレベルの喪失を示さなかった。しかしながら、低い濾過可能性特徴に加えて、コンジュゲート収率も非常に低かった。高圧均一化によりサイジングされた多糖を用いてDMSO中で生成されたコンジュゲート（1、2および3）は、O-アセチルレベルの有意な保持と共に、高い収率およびより良好な濾過可能性特徴を有していた。これらのコンジュゲートもまた、非常に低レベルの遊離多糖を有していた。

20

【0741】

（実施例12）

Pn-血清型15B-CRM₁₉₇コンジュゲートを用いたオプソニン貪食活性（OPA）アッセイ

本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bコンジュゲートの免疫原性を、以下に記載のOPAアッセイを用いて評価することができる。

【0742】

30匹の6～7週齢のメスのSwiss Websterマウスの群を、0週目に皮下経路により0.001 μg、0.01 μg、または0.1 μgの試験コンジュゲートで免疫した。3週目にマウスに同じ用量のコンジュゲートを追加接種した後、4週目に出血させた。血清型特異的OPAを4週目の血清試料に対して実施した。

30

【0743】

OPAを用いて、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型15Bに特異的なマウス血清中の機能的抗体を測定する。試験血清を、細菌をオプソニン化し、補体沈着を誘発し、それによって食細胞による細菌の食作用および殺傷を容易にする莢膜多糖特異的免疫グロブリンの能力を測定するアッセイ反応において設定する。OPA力価を、試験血清を含まない対照ウェル上に対して、細菌計数の50%の減少をもたらす希釈率の逆数として定義する。OPA力価を、この50%の殺傷カットオフを挟む2つの希釈率から内挿する。

40

【0744】

OPA手順は、以下の改変を含む、Huら（2005）Clin Diagn Lab Immunol 12（2）：287～295に記載の方法に基づくものであった。試験血清を2.5倍に連続希釈し、マイクロタイターアッセイプレートに添加した。生きた血清型15B標的細菌をウェルに添加し、プレートを37℃で30分間振盪した。分化したHL-60細胞（食細胞）および子ウサギ血清（3～4週齢、PEL-FREEZ（登録商標）、6.25%最終濃度）をウェルに添加し、プレートを37℃で45分間振盪した。反応を終結させるために、80 μLの0.9%NaClを全てのウェルに添加し、混合し、10 μLのアリコートをし、200 μLの水を含有するMULTISCREEN（登

50

録商標) HTS HVフィルタープレート (MILLIPORE (登録商標)) のウェルに移した。液体を減圧下でプレートを通して濾過し、150 μ L の HYSOY (登録商標) 培地を各ウェルに添加し、濾過した。次いで、フィルタープレートを 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で一晩インキュベートした後、Destain Solution (Bio-Rad Laboratories, Inc.、Hercules、CA) を用いて固定した。次いで、プレートをクマシーブルーで染色し、一度脱色した。コロニーを画像化し、Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights、OH) IMMUNOSPOT (登録商標) Analyzer 上で数えた。生コロニー計数を用いて、殺傷曲線をプロットし、OPA 力価を算出した。

【0745】

コンジュゲート 1 および 2 の免疫原性を、上記のアッセイに従って試験した。また、同じアッセイにおいて、1 つのさらなるコンジュゲートおよび非コンジュゲート化天然ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15B 莢膜多糖 (非コンジュゲート化 PS) を試験した。

【0746】

コンジュゲート 9 を、水性溶液中での還元的アミノ化による CRM₁₉₇ への天然 (すなわち、サイジングされていない) 血清型 15B 莢膜多糖のコンジュゲーションにより調製した。

【0747】

その結果を、表 15 に示す。

【0748】

【表 15】

表 15 血清型 15B-CRM₁₉₇ コンジュゲートを用いた動物試験の OPA 力価

	OPA GMT (95% CI)		
	0.001 μ g	0.01 μ g	0.1 μ g
コンジュゲート 1	485 (413, 569)	804 (565, 1145)	1563 (1048, 2330)
コンジュゲート 2	556 (438, 707)	871 (609, 1247)	1672 (1054, 2651)
コンジュゲート 9	395 (329, 475)	856 (627, 1168)	1802 (1108, 2930)
非コンジュゲート化された PS	-	-	698 (466, 1045)

【0749】

上記の表 15 に示されたように、コンジュゲート 1 および 2 は、マウスに投与された場合、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15B をオプソニン化し、補体沈着を誘発し、それによって、食細胞による細菌の食作用および殺傷を容易にすることができる抗体を生成した。さらに、その低い分子量にも拘わらず、それらはまたサイジングされていないコンジュゲート 9 と比較して同様のレベルの免疫原性を示した。

【0750】

(実施例 13)

血清型 22F 多糖-CRM₁₉₇ コンジュゲートの調製

単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 22F 多糖の調製

ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) 血清型 22F を、種ボトル中で増殖させた後、種発酵器に移した。一度、標的光密度に達したら、細胞を生産発酵器に移した。発酵培地を、N-ラウロイルサルコシンの添

10

20

30

40

50

加により不活化し、限外濾過および透析濾過により精製した。

【0751】

精製されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型 22F 多糖を、PANDA 2K (登録商標) ホモジェナイザー (GEA Niro Soavi, Parma, Italy) を用いる高圧均一化によりサイジングして、単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 22F 多糖を生産した。

【0752】

単離されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 22F 荚膜多糖の酸化

多糖の酸化を、計算された量の 500 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.8) および WFI の連続的添加により 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 5.8) 中で実行して、2.0 g/L の最終多糖濃度を得た。必要に応じて、反応の pH を約 pH 5.8 に調整した。pH 調整の後、反応温度を 5℃ に低下させた。0.10 モル当量 (MEq) の過ヨウ素酸ナトリウムの添加により、酸化を開始させた。標的酸化反応時間は 5℃ で 16 h である。

【0753】

酸化反応を、5℃ で 1~2 h、連続攪拌下で 2 MEq の 2, 3-ブタンジオールを用いてクエンチした。

【0754】

活性化された多糖の濃縮および透析濾過を、100 K MWCO 限外濾過カセットを用いて実行した。35 倍透析容量の WFI に対して透析濾過を実施した。精製された活性化された多糖を 5℃ で保存した。精製された活性化された糖類を、特に、(i) SEC-MALLS による分子量、(ii) O-アセチルの存在および (iii) 酸化度により特徴付ける。

【0755】

多糖および多糖-タンパク質コンジュゲートの分子量の決定のために、SEC-MALLS を用いる。流体力学的容積により多糖を分離するために、SEC を用いる。分子量の決定のために、屈折率 (RI) および多角レーザー光散乱 (MALLS) 検出器を用いる。光が物質と相互作用する場合、それは散乱し、散乱光の量は物質の濃度、 dn/dc (特定の屈折率増分) の 2 乗、および分子量に関連する。分子量測定を、MALLS 検出器からの散乱光シグナルおよび RI 検出器からの濃度シグナルからの読み取り値に基づいて算出する。

【0756】

活性化された多糖の酸化度 ($DO = \text{糖反復単位の数} / \text{アルデヒドの数}$) を、以下のように決定した：

糖反復単位の数、様々な比色法により、例えば、Anthrone 法を用いることにより決定する。多糖を、硫酸および熱の作用により最初に単糖類まで破壊する。Anthrone 試薬は、ヘキソースと反応して黄緑色の複合体を形成し、その吸光度は 625 nm で分光光度的に読み取られる。アッセイの範囲内で、吸光度は存在するヘキソースの量に正比例する。

【0757】

また、アルデヒドの数を、MBTH 比色法を用いて同時に決定する。MBTH アッセイは、アルデヒド基 (所与の試料に由来する) を 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン (MBTH アッセイ試薬) と反応させることによるアジン化合物の形成を含む。過剰の 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾンは酸化して、反応性陽イオンを形成する。反応性陽イオンとアジンは反応して、青色の発色団を形成する。次いで、形成された発色団を、650 nm で分光光度的に読み取る。

【0758】

活性化されたストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型

10

20

30

40

50

2 2 F 多糖と CRM₁₉₇ とのコンジュゲーション

コンジュゲーションプロセスは以下のステップからなっていた：

- a. スクロース賦形剤との混合、および凍結乾燥；
- b. 凍結乾燥された多糖および CRM₁₉₇ の復元；
- c. CRM₁₉₇ への活性化された多糖のコンジュゲーションおよびキャッピング；ならびに
- d. コンジュゲートの精製

【0759】

- a. スクロースとの混合および凍結乾燥

活性化された多糖を、活性化された多糖 1 グラムあたり 25 g のスクロースの比でスクロース (WFI 中の 50 % w/v) と混合した。次いで、混合された混合物のボトルを凍結乾燥した。凍結乾燥後、凍結乾燥された活性化された多糖を含有するボトルを、-20 °C で保存した。計算された量の CRM₁₉₇ タンパク質 (標的 S/P 入力比 = 1) をシェール凍結し、別々に凍結乾燥した。凍結乾燥された CRM₁₉₇ を -20 °C で保存した。

【0760】

- b. 凍結乾燥された活性化された多糖と CRM₁₉₇ タンパク質の復元

凍結乾燥された活性化された多糖を、無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で復元させた。多糖が完全に溶解されたら、復元のために、凍結乾燥された CRM₁₉₇ に、等量の無水 DMSO を添加した。

【0761】

- c. CRM₁₉₇ への活性化された多糖のコンジュゲーションおよびキャッピング

復元された CRM₁₉₇ (DMSO 中) を、コンジュゲーション反応容器中で復元された活性化された多糖と混合した。反応溶液中の最終多糖濃度は 1 g/L である。1.5 M E q のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加することにより、コンジュゲーションを開始させ、反応物を 23 °C で 20 h インキュベートした。2 M E q の水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより、コンジュゲーション反応の終結を行う。キャッピング反応を、23 °C で 3 h インキュベートした。

【0762】

- d. コンジュゲートの精製

コンジュゲート溶液を、100 K MWCO 膜を用いる接線流濾過による精製のための調製物中、冷却した 5 mM コハク酸-0.9 % 塩水 (pH 6.0) で 1:5 に希釈し、20 X 透析濾過を、媒体として 5 mM コハク酸-0.9 % 塩水 (pH 6.0) を用いて実施した。透析濾過が完了した後、コンジュゲート保持液を、さらに希釈し、0.22 μm フィルターを通して濾過し、2~8 °C で保存した。

【0763】

様々なパラメータ (例えば、糖類-タンパク質入力比、反応物濃度およびシアノ水素化ホウ素ナトリウムの M e q) を変化させることにより上記のプロセスを用いて、いくつかのコンジュゲートを得た。CRM₁₉₇ に対する代表的な P n-22 F グリココンジュゲートに関する特徴付けを、表 16 に示す。

【0764】

10

20

30

40

【表 16】

表 16 肺炎球菌血清型 22F-CRM₁₉₇ コンジュゲート

バッチ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
酸化度(D.O)	12.6	19.5	17.2	14.0	12.4	14.9	11.1	14.6	14.4	13.7
MALLS による活性化された糖類の MW(kDa)	540	697	864	92	866	631	614	639	709	416
コンジュゲートの結果										
糖類/タンパク質比	0.75	0.87	2	0.8	0.8	0.4	1.9	0.8	0.65	1.0
O-Ac (%)	105	100	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
遊離糖類(%)	<5	2	15.5	35	<5	<5	33	<5	<5	8
SEC-MALLS による MW(kDa)	2787	1668	2194	1419	5039	10450	1577	3911	3734	4453

N/A=入手可能でない

【0765】

最終コンジュゲート中の O-アセチル（保持された）レベルの％を、多糖の O-アセチル含量（血清型 22F 多糖反復単位 1 μmol あたりの O-アセチルの μmol ）に対する、コンジュゲートの O-アセチル含量（血清型 22F 糖類反復単位 1 μmol あたりの O-アセチルの μmol ）の比から算出した。

【0766】

上記で得られたコンジュゲートの免疫原性を、以下に記載のオプソニン貪食作用アッセイ（OPA）を用いて評価した。

【0767】

30匹の6～7週齢のメスの Swiss Webster マウスの群を、0週目に皮下経路により 0.001 μg 、0.005 μg 、または 0.01 μg の試験コンジュゲートで免疫した。3週目にマウスに同じ用量のコンジュゲートを追加接種した後、4週目に出血させた。血清型特異的 OPA を 4週目の血清試料に対して実施した。

【0768】

オプソニン貪食活性（OPA）アッセイを用いて、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型 22F に特異的なマウス血清中の機能的抗体を測定する。試験血清を、細菌をオプソニン化し、補体沈着を誘発し、それによって食細胞による細菌の貪食作用および殺傷を容易にする莢膜多糖特異的免疫グロブリンの能力を測定するアッセイ反応において設定する。OPA 力価を、試験血清を含まない対照ウェル上での細菌計数の 50% の減少をもたらす希釈率の逆数として定義する。OPA 力価を、この 50% の殺傷カットオフを挟む 2つの希釈率から内挿する。

【0769】

OPA 手順は、以下の改変を含む、Huら（2005）Clin Diagn Lab Immunol 12（2）：287～295に記載の方法に基づくものであった。試験血清を 2.5 倍に連続希釈し、マイクロタイターアッセイプレートに添加した。生きた血清型 22F 標的細菌株をウェルに添加し、プレートを 25℃で 30 分間振盪した。

【0770】

分化した HL-60 細胞（食細胞）および子ウサギ血清（3～4週齢、PEL-FREEZ（登録商標）、12.5%最終濃度）をウェルに添加し、プレートを 37℃で 45 分間振盪した。反応を終結させるために、80 μL の 0.9% NaCl を全てのウェルに添加し、混合し、10 μL のアリコート、200 μL の水を含む MULTISCREEN（登録商標）HTS HV フィルタープレート（MILLIPORE（登録商標））

10

20

30

40

50

のウェルに移した。液体を減圧下でプレートを通して濾過し、150 μ LのHYSOY（登録商標）培地を各ウェルに添加し、濾過した。次いで、フィルタープレートを37℃、5%CO₂で一晩インキュベートした後、Destain Solution（Bio-Rad Laboratories, Inc.、Hercules、CA）を用いて固定した。次いで、プレートをクマシーブルーで染色し、一度脱色した。コロニーを画像化し、Cellular Technology Limited（CTL）（Shaker Heights、OH）IMMUNOSPOT（登録商標）Analyzer上で数えた。生コロニー計数を用いて、殺傷曲線をプロットし、OPA力価を算出した。

【0771】

血清型22F-CRM₁₉₇コンジュゲートに関するオプソニン貪食活性（OPA）力価を、上記のように決定した。様々な用量で4週でのOPA力価（95%信頼区間（CI）を有する幾何平均力価（GMT））を表17および表18（2つの別々の実験）に示し、これは、血清型22Fコンジュゲート（バッチ1～7；これらのコンジュゲートの特徴付けデータについては、表16も参照されたい）がマウス免疫原性モデルにおいてOPA力価を惹起したことを示している。

【0772】

【表17】

表 17 血清型 22F-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

	OPA GMT (95% CI)		
試料番号	0.001 μ g	0.005 μ g	0.01 μ g
1	86 (45, 165)	597 (285, 1252)	2519 (1409, 4504)
2	98 (51, 191)	782 (410, 1492)	2236 (1319, 3790)
3	35 (18, 69)	250 (122, 512)	509 (273, 950)

【0773】

【表18】

表 18 血清型 22F-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

	OPA GMT (95% CI)	
試料番号	0.001 μ g	0.01 μ g
4	37 (18, 76)	3383 (1911, 5987)
5	45 (20, 103)	1773 (1072, 2931)
6	235 (108, 513)	4335 (3018, 6226)
7	10 (7, 13)	252 (138, 457)

【0774】

（実施例14）

CRM₁₉₇に対するPn-11Aコンジュゲートの調製

Pn-11A RACグリココンジュゲートの調製

脱イオン水または25mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）中で保存された凍結さ

れサイジングされた多糖を、5℃で解凍した。

【0775】

多糖の酸化

多糖酸化を、500mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）およびWFIの添加により100mMリン酸カリウム緩衝液（pH6.0）中で実行して、2.0g/Lの最終多糖濃度を得た。酸化反応を、23℃で実行した。酸化を、過ヨウ素酸ナトリウムの添加により開始させた。攪拌速度は100～140rpmの範囲である。

【0776】

活性化された11A多糖の精製

活性化された多糖の濃縮および透析濾過を、限外濾過カセットを用いて実行した。透析濾過を、20倍透析容量のWFIに対して実施した。0.22μm濾過後、精製された活性化された多糖を、5℃で保存した。

【0777】

コンジュゲーションプロセスの説明

コンジュゲーションプロセスは以下のステップからなっていた：

- CRM₁₉₇タンパク質のシェル凍結および凍結乾燥；
- 活性化された多糖およびCRM₁₉₇の復元；
- CRM₁₉₇への活性化された多糖のコンジュゲーション；ならびに
- コンジュゲートの精製および希釈

【0778】

- CRM₁₉₇タンパク質のシェル凍結および凍結乾燥

CRM₁₉₇タンパク質をシェル凍結し、凍結乾燥した。

【0779】

- 活性化された多糖およびCRM₁₉₇タンパク質の復元

活性化された多糖溶液（約10g/L）をリアクター中に入れた後、計算された量の0.5Nリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.2）を添加した。攪拌下で、凍結乾燥されたCRM₁₉₇を添加し、反応混合物を2～4時間攪拌して、CRM₁₉₇の完全な溶解を達成した。

【0780】

- コンジュゲーションおよびキャッピング

コンジュゲーションを、シアノ水素化ホウ素を添加することにより開始させた。反応混合物を23℃で72～96hインキュベートした。コンジュゲーション反応の終結を、0.5X WFI、次いで、2Meqの水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより行った。このキャッピング反応を23℃で3～4h保持した。

【0781】

- コンジュゲートの希釈および初期精製

コンジュゲート溶液を、接線流濾過（TFF）による精製のための調製物中で0.15Nリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）を用いて1：5（反応容量）に希釈した。希釈されたコンジュゲートを、希釈容器中で混合した後、5μmフィルターに通過させた。次いで、濾過されたコンジュゲート溶液を、1～2g/Lまで濃縮した。2ステップの透析濾過プロセスを実施した。ステップ1においては、30X（透析濾過容量）の0.15Nリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）、次いで、20Xの5mMコハク酸－0.9%NaCl（pH6.0）を用いて、TFFを実行した。初回の透析濾過が完了した後、コンジュゲート保持液を、0.45μmフィルターを通して収集タンク中に移した。

【0782】

コンジュゲートの最終透析濾過

最終精製ステップは、再生セルロース膜を用いた、5mMコハク酸－0.9%NaCl、pH6.0媒体を用いる20X透析濾過であった。

【0783】

一価バルクコンジュゲート（MBC）の希釈

コンジュゲートを、5 mMコハク酸／0.9 % NaCl、pH 6を用いて、0.5 mg／mLの標的糖類濃度にさらに希釈した。最終的な0.22 μmの濾過ステップを完了させて、製剤化のための一価バルクコンジュゲート（MBC）産物を調製した。

【0784】

様々なパラメータ（例えば、糖類－タンパク質入力比、反応物濃度およびシアノ水素化ホウ素ナトリウムのMeq）を変化させることにより上記のプロセスを用いて、いくつかのコンジュゲートを得た。CRM₁₉₇に対する代表的なPn-11Aグリココンジュゲートに関する特徴付けを、表19（バッチ1～5）に提供する。

【0785】

RAC／DMSOを用いたPn-11Aグリココンジュゲートの調製

酸化された多糖を、上記のように調製および精製した（Pn-11A RACグリココンジュゲートの調製を参照されたい）。

【0786】

DMSO中での還元的アミノ化によるコンジュゲーション（RAC／DMSO）

RAC／DMSOによる11Aのコンジュゲーションは、以下のステップからなっていた：

- スクロースとの混合、シェル凍結および凍結乾燥；
- 活性化された多糖およびCRM₁₉₇の復元；
- CRM₁₉₇への活性化された多糖のコンジュゲーション；ならびに
- コンジュゲートの精製および希釈。

【0787】

a. スクロースとの混合、シェル凍結および凍結乾燥

サイジングされた多糖から調製された活性化された多糖を、活性化された多糖1グラムあたり25 gのスクロースの比でスクロース（WFI中の50 % w／v）と混合した。成分を混合した後、混合された混合物のシェル凍結されたボトルを凍結乾燥した。CRM₁₉₇タンパク質をシェル凍結し、別々に凍結乾燥した。

【0788】

b. 凍結乾燥された活性化された多糖とCRM₁₉₇タンパク質の復元

凍結乾燥された活性化された多糖を、DMSO中で2 mg／mL濃度に復元させた。多糖が完全に溶解されたら、復元のために、凍結乾燥されたCRM₁₉₇にDMSOを添加した。

【0789】

c. コンジュゲーションおよびキャッピング

復元されたCRM₁₉₇（DMSO中）を、コンジュゲーション反応容器中で復元された活性化された多糖と混合した。反応溶液中の最終多糖濃度は1 g／Lである。シアノ水素化ホウ素を反応混合物に添加することにより、コンジュゲーションを開始させ、23℃で22 hインキュベートした。2 Meqの水素化ホウ素ナトリウムを添加することにより、コンジュゲーション反応の終結を行う。このキャッピング反応を、23℃で3～4 h保持した。

【0790】

d. コンジュゲートの精製および希釈

コンジュゲート溶液を、上記と同様のプロセスを用いて精製および希釈した。

【0791】

様々なパラメータ（例えば、糖類－タンパク質入力比、反応物濃度およびシアノ水素化ホウ素ナトリウムのMeq）を変化させることにより上記のプロセスを用いて、いくつかのコンジュゲートを得た。上記プロセスにより得られたCRM₁₉₇に対する代表的なPn-11Aグリココンジュゲートに関する特徴付けを、表19（バッチ6～8）に提供する。

【0792】

10

20

30

40

【表 19】

表 19 肺炎球菌血清型 11A-CRM₁₉₇ コンジュゲート

バッチ	1	2	3	4	5	6	7	8
MALLS による活性化された糖類の MW(kDa)	207	129	103	199	183	232	113	113
コンジュゲートの結果								
糖類/タンパク質比	1.24	1.09	1.32	1.47	1.31	1	0.78	0.68
アセテート(mol/mol PS)	2.72	2.89	2.72	3.2	3.13	N/A	N/A	N/A
グリセロール(mol/mol PS)*	0.62	0.68	0.75	0.51	0.41	N/A	N/A	N/A
SEC-MALLS による MW(kDa)	3224	837	623	827	994	12200	6543	15730

N/A=入手可能でない

*グリセロールは、フッ化水素酸(HF)によって多糖から遊離させた後にパルスアンペロメトリック検出を用いた高速陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD)により定量された。

【0793】

上記の還元的アミノ化により調製されたコンジュゲートから生成された全データにより、良好なコンジュゲーション収率、低い遊離糖類%および良好な安定性を示すコンジュゲートを調製することができることが示された。

【0794】

上記で得られたコンジュゲートの免疫原性を、以下に記載のオプソニン貪食作用アッセイ(OPA)を用いて評価した。

【0795】

30匹の6~7週齢のメスのSwiss Websterマウスの群を、0週目に皮下経路により0.001μg、0.005μg、0.01μg、または0.1μgの試験コンジュゲートで免疫した。3週目にマウスに同じ用量のコンジュゲートを追加接種した後、4週目に出血させた。血清型特異的OPAを4週目の血清試料に対して実施した。

【0796】

オプソニン貪食活性(OPA)アッセイを用いて、ストレプトコッカス・ニューモニエ(S. pneumoniae)血清型11Aに特異的なマウス血清中の機能的抗体を測定する。試験血清を、細菌をオプソニン化し、補体沈着を誘発し、それによって食細胞による細菌の貪食作用および殺傷を容易にする莢膜多糖特異的免疫グロブリンの能力を測定するアッセイ反応において設定する。OPA力価を、試験血清を含まない対照ウェル上での細菌計数の50%の減少をもたらす希釈率の逆数として定義する。OPA力価を、この50%の殺傷カットオフを挟む2つの希釈率から内挿する。

【0797】

OPA手順は、以下の改変を含む、Huら(2005)Clin Diagn Lab Immunol 12(2):287~295に記載の方法に基づくものであった。試験血清を2.5倍に連続希釈し、マイクロタイターアッセイプレートに添加した。生きた血清型22F標的細菌株をウェルに添加し、プレートを25℃で30分間振盪した。

【0798】

分化したHL-60細胞(食細胞)および子ウサギ血清(3~4週齢、PEL-FREEZ(登録商標)、12.5%最終濃度)をウェルに添加し、プレートを37℃で60分間振盪した。反応を終結させるために、80μLの0.9%NaClを全てのウェルに添加し、混合し、10μLのアリコートをし、200μLの水を含有するMULTISCREEN(登録商標)HTS HVフィルタープレート(MILLIPORE(登録商標))のウェルに移した。液体を減圧下でプレートを通して濾過し、150μLのHYSOY(

10

20

30

40

50

登録商標) 培地を各ウェルに添加し、濾過した。次いで、フィルタープレートを 37℃、5% CO₂ で一晩インキュベートした後、Destain Solution (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) を用いて固定した。次いで、プレートをクマシーブルーで染色し、一度脱色した。コロニーを画像化し、Cellular Technology Limited (CTL) (Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT (登録商標) Analyzer 上で数えた。生コロニー計数を用いて、殺傷曲線をプロットし、OPA 力価を算出した。

【0799】

血清型 11A-CRM₁₉₇ コンジュゲートに関するオプソニン貪食活性 (OPA) 力価を、上記のように決定した。様々な用量で 4 週での OPA 力価 (95% 信頼区間 (CI) を有する幾何平均力価 (GMT)) を表 20 に示し、これは、血清型 11A コンジュゲート (バッチ 2~4 および 8; これらのコンジュゲートの特徴付けデータについては、表 19 も参照されたい) がマウス免疫原性モデルにおいて OPA 力価を惹起したことを示している。

【0800】

【表 20】

表 20 血清型 11A-CRM₁₉₇ コンジュゲートの免疫原性

	OPA GMT (95% CI)		
バッチ番号	0.001μg	0.01μg	0.1μg
2	326 (260, 408)	1391 (794, 2437)	4366 (3063, 6223)
3	389 (316, 478)	1113 (690, 1795)	5527 (3698, 8260)
4	192 (149, 248)	926 (661, 1298)	2800 (1975, 3970)
8	303 (224, 411)	1099 (624, 1935)	3861 (2629, 5669)

【0801】

(実施例 15)

16 価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤

CRM₁₉₇ に全て個別にコンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23F および 33F (16vPnC) に由来するグリココンジュゲートを含む 16 価コンジュゲート組成物を製剤化した。

【0802】

血清型 15B、22F および 33F に由来するストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) に由来するグリココンジュゲートを、上記に開示されたように生産し、血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F および 23F に由来するストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) グリココンジュゲートを、WO 2006/110381 に開示されたように生産した。

【0803】

バルク濃縮物の必要な容量を、バッチ容量およびバルク糖類濃度に基づいて算出した。必要な容量の NaCl/コハク酸緩衝液 (pH 5.8) を添加して、5.0 mM コハク酸および 150 mM NaCl の最終標的緩衝液濃度を得ることにより、製剤化されたバルクワクチンを調製した。0.02% の最終濃度となるようにポリソルベート 80 および 16 価肺炎球菌コンジュゲートを添加した。調製物を 0.2 μm Millipore PES 膜を通して濾過した後、AlPO₄ を添加した。製剤を混合して、結合を可能にし、均一性を達成した。

【0804】

次いで、0.5 mLの用量を送達するために、製剤をガラスシリンジ中に充填した。

【0805】

最終的な剤形は、0.5 mLの用量について、CRM₁₉₇に個別にコンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、9V、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲート2.2 μg、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲート4.4 μg、5 mMコハク酸緩衝液pH 5.8、0.02 PS80、150 mM NaClおよびAlPO₄として0.25 mg/mLのアルミニウムからなっていた。CRM₁₉₇ 10
 含量は、0.5 mLの用量について約38 μgであった。

【0806】

（実施例16）

20価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤

CRM₁₉₇に全て個別にコンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33F（20vPnC）に由来するグリココンジュゲートを含む20価コンジュゲート組成物を製剤化した。

【0807】

血清型8、10A、11A、12F、15B、22Fおよび33Fに由来するストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）に由来するグリココンジュゲートを、上記に開示されたように生産し、血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fに由来するストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）グリココンジュゲートを、WO2006/110381 20
 1に開示されたように生産した。

【0808】

バルク濃縮物の必要な容量を、バッチ容量およびバルク糖類濃度に基づいて算出した。必要な容量のNaCl／コハク酸緩衝液（pH 5.8）を添加して、5.0 mMコハク酸および150 mM NaClの最終標的緩衝液濃度を得ることにより、製剤化されたバルクワクチンを調製した。0.02%の最終濃度となるようにポリソルベート80および20 30
 0価肺炎球菌コンジュゲートを添加した。調製物を0.2 μm Millipore PES膜を通して濾過した後、AlPO₄を添加した。製剤をよく混合して、アルミニウムへのコンジュゲートの最大結合を得た。

【0809】

次いで、0.5 mLの用量を送達するために、製剤をガラスシリンジ中に充填した。

【0810】

最終的な剤形は、0.5 mLの用量について、CRM₁₉₇に個別にコンジュゲートされたストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A 40
 、19F、22F、23Fおよび33Fに由来するそれぞれのグリココンジュゲート2.2 μg、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型6Bに由来するグリココンジュゲート4.4 μg、5 mMコハク酸緩衝液pH 5.8、0.02 PS80、150 mM NaClおよびAlPO₄として0.25 mg/mLのアルミニウムからなっていた。CRM₁₉₇ 含量は、0.5 mLの用量について約46 μgであった。

【0811】

（実施例17）

16価免疫原性組成物の免疫原性

16価免疫原性組成物の免疫原性（実施例15を参照されたい）を、多重化直接 Lum 50

i n e x イムノアッセイ (d L I A) を用いてウサギにおいて評価して、血清中の血清型特異的 I g G 濃度および血清型特異的 O P A を測定した。

【0812】

10匹の2.5kg～3.5kgのメスのNew Zealand白ウサギの群を、0週目に筋肉内経路により、提唱されるヒト臨床用量(4.4μgであった血清型6B以外は2.2μgのコンジュゲート、加えてAlPO₄の形の0.1mgのアルミニウム)で免疫した。ウサギに、2週目に同じ用量のコンジュゲートワクチンを追加接種した後、4週目に出血させた。血清型特異的dL I AおよびO P Aを、0週目および4週目の血清試料に対して実施した。

【0813】

それぞれの肺炎球菌多糖(P n P S)に特異的な総多糖結合抗体(I g G)を定量するために、ウサギ血清を2つの直接L u m i n e x イムノアッセイ(d L I A; 13プレックスd L I A、PREVNAR13(登録商標)血清型および7プレックスd L I A、さらなる血清型)において評価した。13プレックスアッセイは、13価肺炎球菌コンジュゲート(P n C)ワクチン(1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、および23F)中に含まれる13種の血清型に特異的な抗P n P S抗体を測定し、7プレックスアッセイは、さらなる血清型(15B、22F、33F)に対する抗P n P S抗体を測定する。それぞれのアッセイは、P n P Sコンジュゲート(P n P S-P L Lコンジュゲート: ポリ-L-リシンにコンジュゲートされたP n P S)に結合した13または7種のスペクトルが異なる磁気マイクロスフェアの組合せを含有する。

【0814】

簡単に述べると、参照標準、対照および試験血清を、最初に2つのP n 吸収剤; C W P S 1 (P n A 含有C多糖に由来する細胞壁多糖)およびC W P S 2 (無莢膜ストレプトコッカス・ニューモニエ(S. p n e u m o n i a e)血清型2に由来するC W P)に予め吸着させて、非特異的抗体がP n P S被覆抗原に結合しないようにした。予備吸着後、P n P Sに結合したマイクロスフェアを、適切に希釈された参照標準血清、対照またはウサギ試験血清と共にインキュベートした。インキュベーション後、各混合物を洗浄し、R-フィコエリトリンコンジュゲート化ヤギ抗ウサギI g G二次抗体を添加した。蛍光シグナル(中央蛍光強度(M F I)として表される)を、B i o-P l e xリーダーを用いて測定し、結合したP n P S特異的I g Gの量と相関付けた。試験血清に関する値を、(単位/

【0815】

血清型特異的O P Aを、上記のように実施した。O P A力価は、血清を含まない対照(バックグラウンドC F Uとして定義される)と比較した場合、細菌コロニー形成単位(C F U)数の50%の減少をもたらす最も高い血清希釈率の逆数である。力価を、この50%の殺傷カットオフを挟む2つの希釈率から内挿する。

【0816】

10

20

30

【表 2 1】

表 21 16vPnC 総 IgG 濃度および OPA 力価

血清型	総 IgG(Pn dLIA)				オプソニン貪食抗体(OPA)			
	Wk0 GMC (μg/ml)	Wk4 GMC (μg/ml)	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	IgG GMC 比 Wk4: Wk0	Wk0 GMT	Wk4 GMT	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	OPA GMT 比 Wk4: Wk0
1	0.08	28	17 - 44	369	4	87	55 - 139	22
3	0.08	88	60 - 128	1062	4	214	151 - 304	54
4	0.08	30	14 - 67	402	4	934	551 - 1583	233
5	0.08	34	18 - 64	449	4	368	232 - 584	87
6A	0.03	46	15 - 142	1835	4	3026	1607 - 5696	756
6B	0.08	89	33 - 241	1182	4	6156	3043 - 12453	1539
7F	0.01	50	31 - 78	3969	6	2917	2013 - 4227	528
9V	0.03	24	15 - 38	881	5	613	426 - 883	112
14	0.08	28	20 - 39	368	19	449	331 - 610	24
18C	0.05	79	45 - 139	1587	4	1847	1003 - 3401	462
19A	0.08	120	71 - 205	1605	4	1410	851 - 2336	352
19F	0.08	156	96 - 255	2083	4	3207	1783 - 5771	802
23F	0.05	33	13 - 84	668	4	997	487 - 2042	249
15B	0.05	54	40 - 71	1073	6	741	514 - 1069	116
22F	0.08	158	95 - 262	2103	5	1078	661 - 1756	211
33F	0.10	11	6 - 20	115	49	1337	829 - 2154	27

省略形:GMC、幾何平均濃度;CI、信頼区間;LCI、下側信頼区間;UCI、上側信頼区間

【0 8 1 7】

結果は、16vPnCを用いる2回の免疫化後に血清型特異的IgGおよび機能的OPA抗体応答の有意な増加を示した(表21)。血清IgGレベルは、ベースラインよりも210gを超えて増加した。同様に、ベースラインの上のOPA GMTにおいて最小で22倍の増加と共にロバストな機能的OPA抗体応答が惹起された。免疫前血清(Wk0)により、血清型14および33Fを除いて、16vPnC血清型の大部分について検出可能なレベルのPnPST特異的IgGおよび機能的OPA抗体が示された。低レベルのOPA力価がこれらの血清型について存在していたが、これらのベースライン応答はワクチン接種後の抗体応答に有害に影響しなかった。

【0 8 1 8】

(実施例18)

20価免疫原性組成物の免疫原性

20価免疫原性組成物(実施例16で調製された)の免疫原性を、多重化直接Luminexイムノアッセイ(dLIA)を用いてウサギにおいて評価して、血清中の血清型特異的IgG濃度および血清型特異的OPAを測定した。

【0 8 1 9】

10匹の2.5kg~3.5kgのメスのNew Zealand白ウサギの群を、0週目に筋肉内経路により、提唱されるヒト臨床用量(4.4μgであった血清型6B以外は2.2μgのコンジュゲート加えてAlPO₄の形の0.1mgのアルミニウム)で免疫した。ウサギに、2週目に同じ用量のコンジュゲートワクチンを追加接種した後、4週

目に出血させた。血清型特異的 d L I A および O P A を、0 週目および 4 週目の血清試料に対して実施した。

【0820】

それぞれの肺炎球菌多糖 (P n P S) に特異的な総多糖結合抗体 (I g G) を定量するために、ウサギ血清を 2 つの直接 L u m i n e x イムノアッセイ (d L I A ; 13 プレックス d L I A、P R E V N A R 13 (登録商標) 血清型および 7 プレックス d L I A、さらなる血清型) において評価した。13 プレックスアッセイは、13 価肺炎球菌コンジュゲート (P n C) ワクチン (1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F、および 23 F) 中に含まれる 13 種の血清型に特異的な抗 P n P S 抗体を測定し、7 プレックスアッセイは、さらなる血清型 (15 B、22 F、33 F) に対する抗 P n P S 抗体を測定する。それぞれのアッセイは、P n P S コンジュゲート (P n P S - P L L コンジュゲート : ポリ-L-リシンにコンジュゲートされた P n P S) に結合した 13 または 7 種のスペクトルが異なる磁気マイクロスフェアの組合せを含有する。

10

【0821】

簡単に述べると、参照標準、対照および試験血清を、最初に 2 つの P n 吸収剤 ; C W P S 1 (P n A 含有 C 多糖に由来する細胞壁多糖) および C W P S 2 (無莢膜ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. p n e u m o n i a e) 血清型 2 に由来する C W P) に予め吸着させて、非特異的抗体が P n P S 被覆抗原に結合しないようにした。予備吸着後、P n P S に結合したマイクロスフェアを、適切に希釈された参照標準血清、対照またはウサギ試験血清と共にインキュベートした。インキュベーション後、各混合物を洗浄し、R-フ

20

【0822】

血清型特異的 O P A を、上記のように実施した。O P A 力価は、血清を含まない対照 (バックグラウンド C F U として定義される) と比較した場合、細菌コロニー形成単位 (C F U) 数の 50 % の減少をもたらす最も高い血清希釈率の逆数である。力価を、この 50 % の殺傷カットオフを挟む 2 つの希釈率から内挿する。

【0823】

20 v P n C で免疫されたウサギはまた、16 v および 20 v 製剤ならびにさらなる 4 つの血清型 (8、10 A、11 A および 12 F) に共通の血清型に対する総 I g G および機能的 O P A 抗体力価の有意な増加を示した (表 22)。20 種の血清型にわたる血清 I g G レベルの 2 l o g の増加が、2 回の免疫化後に誘導された。ワクチンを用いて惹起された O P A G M T は、ベースラインの少なくとも 27 倍上であった。血清型 14 および 33 F に関する免疫前血清における低レベルの O P A 力価は 20 v P n C ワクチン接種後に同様に観察されたが、再度、ワクチン接種後の抗体応答のロバスト性を変化させなかった。

30

【0824】

16 v P n C および 20 v P n C 製剤は、両方とも肺炎球菌多糖に特異的であり、細菌の機能的殺傷と関連するロバストな体液性応答を惹起した (表 21 および表 22 を参照されたい)。結論として、実施例 17 および実施例 18 に示された試験は、16 c P n C と 20 v P n C 製剤の両方の良好な免疫原性を示した。

40

【0825】

【表 2 2】

表 22 20vPnC 総 IgG 濃度および OPA 力価

血清型	総 IgG(Pn dLIA)				オプソニン貪食抗体(OPA)			
	Wk0 GMC (μg/ml)	Wk4 GMC (μg/ml)	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	IgG GMC 比 Wk4: Wk0	Wk0 GMT	Wk4 GMT	Wk4 95% CI (LCI - UCI)	OPA GMT 比 Wk4: Wk0
1	0.08	28	19 - 43	379	4	106	69 - 164	27
3	0.08	116	76 - 176	1542	4	286	193 - 425	72
4	0.08	62	39 - 97	821	4	1477	954 - 2287	369
5	0.08	49	33 - 71	648	4	509	350 - 742	127
6A	0.03	30	14 - 66	1209	4	3682	2743 - 4944	849
6B	0.08	58	36 - 94	775	4	4469	3002 - 6653	1117
7F	0.02	62	39 - 101	3681	6	3226	2226 - 4675	500
9V	0.05	30	19 - 48	644	6	956	634 - 1442	150
14	0.08	34	20 - 60	457	12	506	348 - 736	42
18C	0.05	106	67 - 166	2115	4	1942	1263 - 2986	485
19A	0.08	112	73 - 171	1493	4	1580	1071 - 2332	395
19F	0.08	178	119 - 266	2372	4	3392	2085 - 5519	848
23F	0.05	48	23 - 103	960	4	1514	889 - 2577	378
15B	0.05	70	51 - 98	1410	6	1332	949 - 1869	210
22F	0.10	172	118 - 250	1811	5	1304	1000 - 1700	279
33F	0.12	14	10 - 20	120	54	1490	1117 - 1989	28
8	0.13	144	100 - 207	1149	4	1388	988 - 1949	333
10A	0.13	54	31 - 94	433	5	1129	732 - 1741	236
11A	0.13	178	125 - 254	1423	7	10483	6373 - 17241	1434
12F	0.08	31	15 - 63	408	4	828	608 - 1127	191

省略形:GMC、幾何平均濃度;CI、信頼区間;LCI、下側信頼区間;UCI、上側信頼区間

【0 8 2 6】

(実施例 1 9)

ストレプトコッカス・ニューモニエ (Streptococcus pneumoniae) の血清型 9 内の交差反応性オプソニン貪食作用免疫応答の評価

機能的抗体および補体の存在下での食作用エフェクター細胞によるストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 細胞の殺傷を測定する、肺炎球菌オプソニン貪食作用アッセイ (OPA) は、肺炎球菌ワクチンの有効性を評価するための重要な代用物であると考えられる。

【0 8 2 7】

材料および方法

1 3 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (1 3 v P n C) をワクチン接種された成人からの免疫血清の 2 つの無作為に選択されたサブセットを、血清型 9 V、9 A、9 L および 9 N について O P A アッセイにおいて試験した。血清を、それぞれ、米国臨床試験 6 1 1 5 A 1 - 0 0 4 (N = 5 9、ワクチン接種後) および 6 1 1 5 A 1 - 3 0 0 5 (N = 6 6、対応付けられたワクチン接種前および後) から収集した。

【0828】

試験6115A1-3005 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00546572) は、試験登録の少なくとも5年前に1回用量の23vPSを受けた70歳以上の外来高齢者における23価肺炎球菌多糖ワクチン(23vPS)と比較した、Prevnar13の安全性、忍容性、および免疫原性を評価するフェーズ3、無作為化、実薬対照、改変二重盲検であった(<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00546572>を参照; 2014年3月31日にアクセス)。

【0829】

試験6115A1-004 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00427895) は、23vPSに対してナイブである60~64歳の成人における23価肺炎球菌多糖ワクチン(23vPS)と比較した13価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(13vPnC)の安全性、忍容性、および免疫原性ならびに23vPSに対してナイブである18~59歳の成人における13vPnCの安全性、忍容性、および免疫原性を評価するフェーズ3、無作為化、実薬対照、改変二重盲検であった(<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00427895>を参照; 2014年3月31日にアクセス)。

10

【0830】

これらの試験において試験された13価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(13vPnC)は、ジフテリア交差反応物質197 (CRM₁₉₇)担体タンパク質に個別にコンジュゲートされた、肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、および23Fに由来するコンジュゲートを含んでいた。

20

【0831】

OPAを用いて、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型9V、9N、9Aおよび/または9Lに対するヒト血清中の機能的抗体を測定する。試験血清を、細菌をオプソニン化し、補体沈着を誘発し、それによって食細胞による細菌の食作用および殺傷を容易にする莢膜多糖特異的免疫グロブリンの能力を測定するアッセイ反応において設定する。OPA力価を、試験血清を含まない対照ウェル上での細菌計数の50%の減少をもたらす希釈率の逆数として定義する。OPA力価を、この50%の殺傷カットオフを挟む2つの希釈率から内挿する。

30

【0832】

OPA手順は、Huら(2005) Clin Diagn Lab Immunol 12(2): 287~295に記載の方法に基づくものであった。試験熱不活化血清を2.5倍に連続希釈し、アッセイプレート中に標的細菌と一緒に添加し、振盪しながら30分間インキュベートした。次いで、分化したHL-60細胞(食細胞)および子ウサギ血清(3~4週齢、PEL-FREEZ(登録商標)、Arkansas、12.5%最終濃度)を、200:1の近似エフェクターと標的との比でウェルに添加し、37℃で振盪しながらインキュベートした。反応を終結させるために、80μLの0.9%NaClを全てのウェルに添加し、混合し、10μLのアリコートをし、200μLの水を含有するMULTISCREEN(登録商標)HTS HVフィルタープレート(MILLIPORE(登録商標))のウェルに移した。液体を減圧下でプレートを通して濾過し、150μLのHYSOY(登録商標)培地を各ウェルに添加し、濾過した。次いで、フィルタープレートを37℃、5%CO₂で一晩インキュベートした後、Destain Solut ion(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)を用いて固定した。次いで、プレートをクマシーブルーで染色し、一度脱色した。コロニーを画像化し、Cellular Technology Limited(CTL)(Shaker Heights, OH) IMMUNOSPOT(登録商標) Analyzer上で数えた。

40

【0833】

統計分析: Pearsonの両側相関を算出した。

50

【0834】

結果－9V、9A、9Lおよび9NにおけるOPA応答

血清型9A、9Lおよび9Nに対する13vPnCで免疫された成人の免疫血清からの機能横断型応答を、血清型9Vに対する相同な機能的応答と共に、それぞれのマイクロコロニーオプソニン貪食作用アッセイ（mcOPA）において評価した。13vPnCをワクチン接種された成人からの免疫血清の2つの無作為に選択されたサブセットを試験した。血清を、それぞれ、米国臨床試験6115A1-004（N=59、ワクチン接種後）および6115A1-3005（N=66、対応付けられたワクチン接種前および後）から収集した。

【0835】

試験6115A1-004における対象は任意の肺炎球菌ワクチン接種に対して以前はナイーブであり、試験プロトコールの一部として単回用量の13vPnCを受けた。試験6115A1-004からの免疫血清は、それぞれ、9V、9A、9Lおよび9Nについて98.3%、98.3%、100%および93.2%の値を示す全ての血清群に対する類似するパーセンテージの応答者を示し（図11）、6115A1-3005（図12）からの結果を支持する。比較的良好なOPA力価の相関が、9N（ $p=0.1217$ 、 $p<0.3627$ ）ではなく、血清型9Vと9A（Pearson相関 $p=0.5456$ 、 $p<0.0001$ ）または9L（ $p=0.7353$ 、 $p<0.0001$ ）との間で観察された。

【0836】

試験6115A1-3005における対象は、試験登録の少なくとも5年前に1回用量の23vPSを以前に受けており、試験プロトコールの一部として単回用量の13vPnCを受けた。13vPnCで免疫された成人からの対応付けられたワクチン接種前および後の血清パネル（N=66）（試験6115A1-3005）を、血清型9Vに対する相同な応答について、ならびに血清型9A、9Lおよび9Nに対する抗9V抗体の交差反応性についてOPAによって評価した。図12に示されるように、9V（84%）、9A（82%）、9L（82%）および9N（86%）に対する比較的高い免疫（応答者のパーセンテージ）が、おそらく血清型9Vおよび9Nに由来する非コンジュゲート化多糖を含む23vPSを用いる、対象に対する以前の免疫化のため、OPAアッセイにおいて検出された。しかしながら、応答者のパーセンテージは、血清群9に由来する血清型9Vコンジュゲートのみを含有する13vPnCを用いるワクチン接種後、4つ全部の血清型について95%またはそれ以上に増加した。力価の値における倍数の上昇を表23に示し、これは血清型間で類似し、交差反応性も示唆する。

【0837】

【表23】

表23 対応付けられた13vPnC ワクチン接種前および後におけるOPA力価上昇倍率

	OPA 力価							
	9V		9A		9L		9N	
	前	後	前	後	前	後	前	後
GMT	221	1323	41	308	165	706	322	693
上昇倍率	5.9		7.5		4.2		2.1	

【0838】

OPA力価分布のより包括的な分析を、図13～図16中の逆累積分布曲線（RCD C）に示す。RCD Cは、血清型9V、9A、9Lおよびより低い程度では9Nに関するワ

クチン接種後の血清型特異的免疫応答の増加を示す。個々の対応付けられた試料の力価の上昇倍率の、9 V、9 A、9 V／9 L、および9 V／9 N間における相関も、Pearsonの相関を用いて分析した。9 Lに関してはより低い程度であるが ($p = 0.1804$ 、 $p < 0.1640$)、血清型9 Vと9 A (Pearsonの相関 $p = 0.8720$ 、 $p < 0.0001$) または9 N ($p = 0.5801$ 、 $p < 0.0001$) の間で、力価の上昇倍率の比較的良好な相関が観察された。

【0839】

結論

これらのデータに基づけば、13 v P n C ワクチンは、血清型9 A、9 Lおよび9 Nに対するさらなる保護を提供することによって、より広い血清型包含率を実現する可能性がある。

10

【0840】

(実施例20)

血清型15 Bと血清型15 Cとの間の機能横断型OPA応答

肺炎球菌血清群15は、4つの構造的に関連する血清型：15 A、15 B、15 Cおよび15 Fを含む。血清型15 Bおよび15 Cは、遺伝子タイピング技術によっては識別不可能であり、15 B-PSが15 C-PSのO-アセチル化変異体であることを除いて、類似する莢膜多糖(PS)組成を有する。血清型15 Bに対する抗莢膜PS抗体が血清型15 Cと機能的に交差反応するかどうかを理解するために、10匹のウサギを、16 v P n C (実施例15を参照されたい) および20 v P n C (実施例16を参照されたい) ワクチンで免疫した。いずれのワクチンも、その製剤の一部として、本明細書に開示されるCRM₁₉₇に共有的に連結されたストレプトコッカス・ニューモニエ(*S. pneumoniae*)血清型15 B莢膜多糖を含む免疫原性コンジュゲートを含有する。ワクチン接種の前および後に由来する血清を、血清型15 Bおよび15 C標的肺炎球菌株に対するOPAアッセイにおいて試験した。

20

【0841】

各群からの10匹のウサギのうちの100%が、血清型15 Bコンジュゲートを用いる免疫化後に血清型15 Bに対するOPA応答を有していた。これらの同じ試料のうちの100%が、同様に血清型15 Cに対するOPA応答を有していた(表24および表25)。15 C OPAにおいては、ワクチン接種前の血清中で低いOPA力価が観察された。しかしながら、ワクチン接種前と比較したワクチン接種後の血清に関する10倍を超えるGMT OPA力価の増加により、本発明の免疫原性コンジュゲートがOPAにおいて血清型15 Bおよび15 Cストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)を殺傷することができる抗体の形成を誘導することが示された。

30

【0842】

【表 2 4】

表24 16vPnCによるワクチン接種前後のウサギ血清中の血清型15Bおよび15C株に対するOPA力価

動物	15B OPA		15C OPA	
	wk0	wk4	wk0	wk4
1	4	4129	50	2524
2	4	1645	182	472
3	4	1131	126	818
4	4	3199	50	1189
5	4	2664	36	727
6	4	4589	68	2492
7	11	3601	169	1137
8	4	1838	165	672
9	4	1334	98	528
10	4	1108	204	2425
GMT	4	2222	98	1075

10

20

【0 8 4 3】

【表 2 5】

表 25 20vPnC によるワクチン接種前後のウサギ血清中の血清型 15B および 15C 株に対する OPA 力価

動物	15B OPA		15C OPA	
	wk0	wk4	wk0	wk4
1	4	3784	決定不可*	2353
2	4	862	480	938
3	4	3056	69	1497
4	4	1948	決定不可*	1316
5	4	2360	4	4665
6	4	1594	決定不可*	1835
7	4	4943	172	4085
8	4	2419	117	1458
9	4	1245	決定不可*	527
10	4	616	決定不可*	545
GMT	4	1917	77	1515

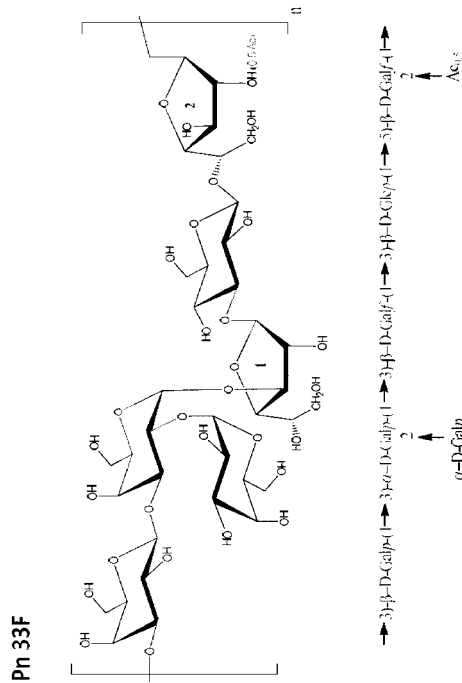
30

40

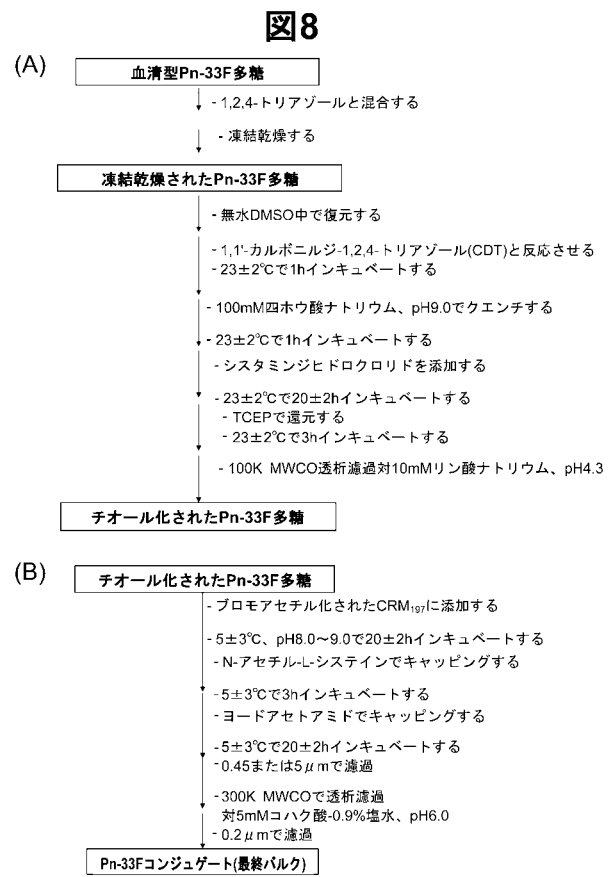
*殺傷曲線不良のため力価を決定することができない

50

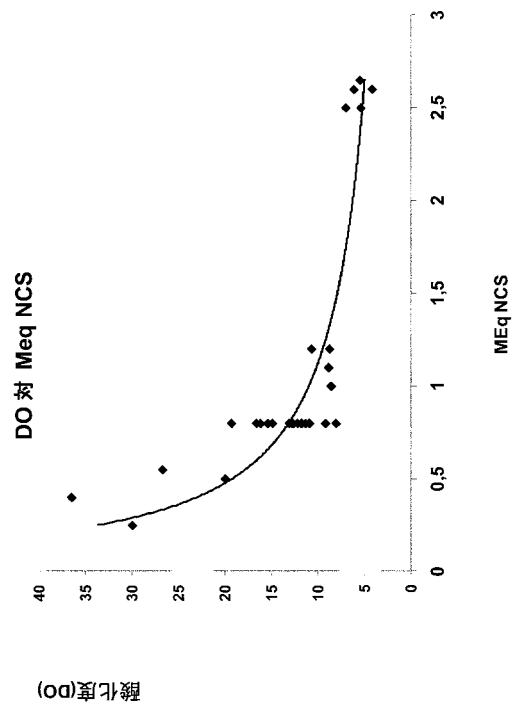
【図 7】



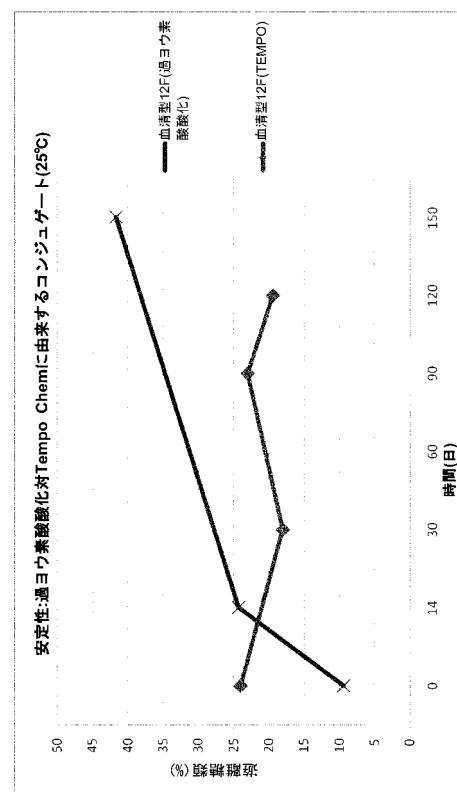
【図 8】



【図 9】

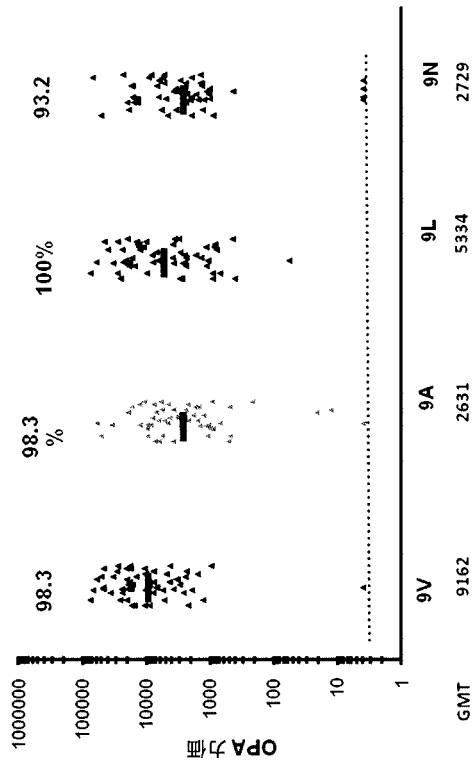


【図 10】



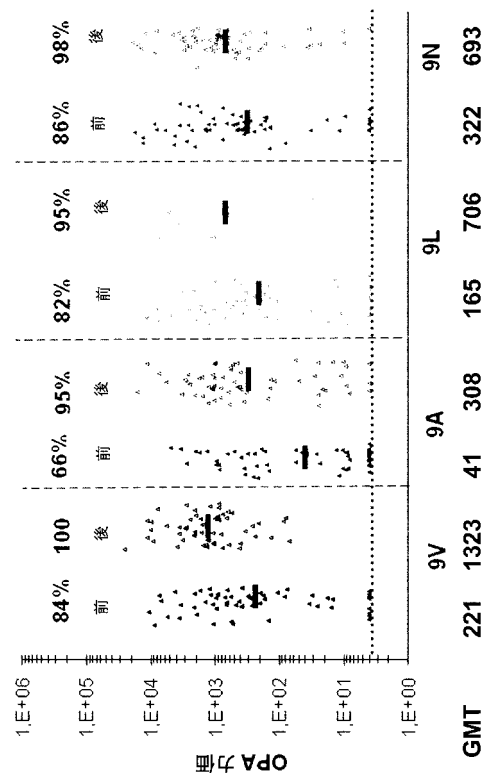
【図 1 1】

図11



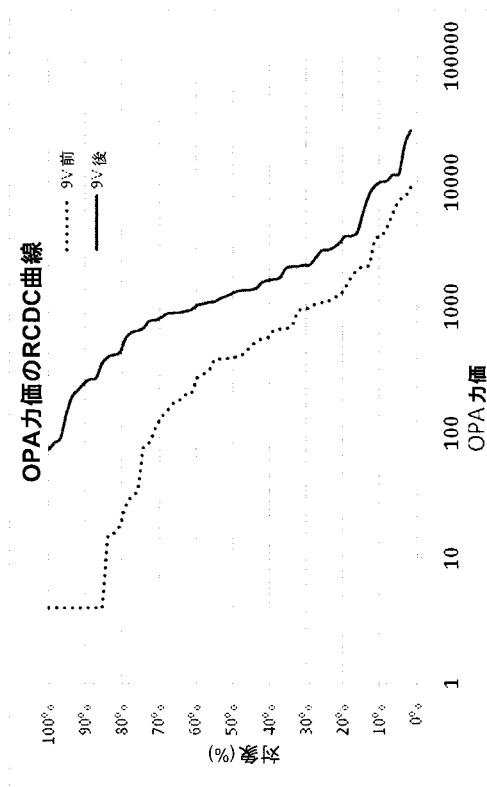
【図 1 2】

図12



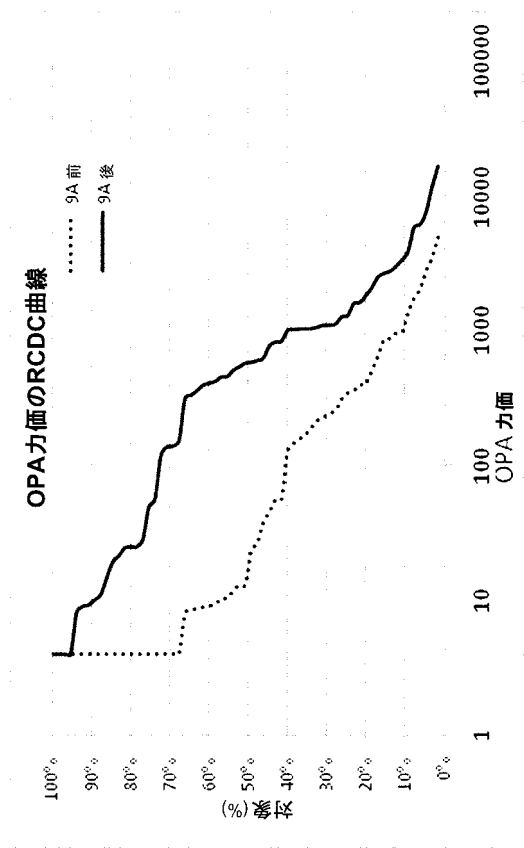
【図 1 3】

図13

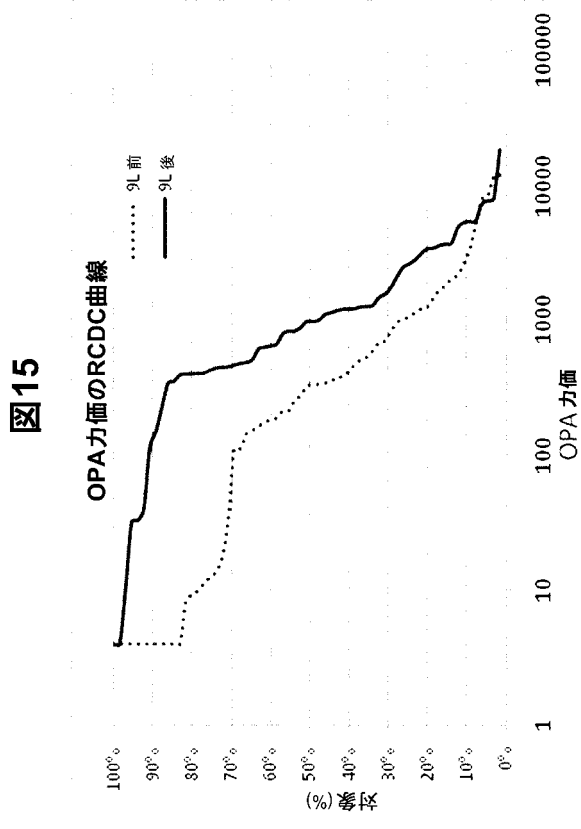


【図 1 4】

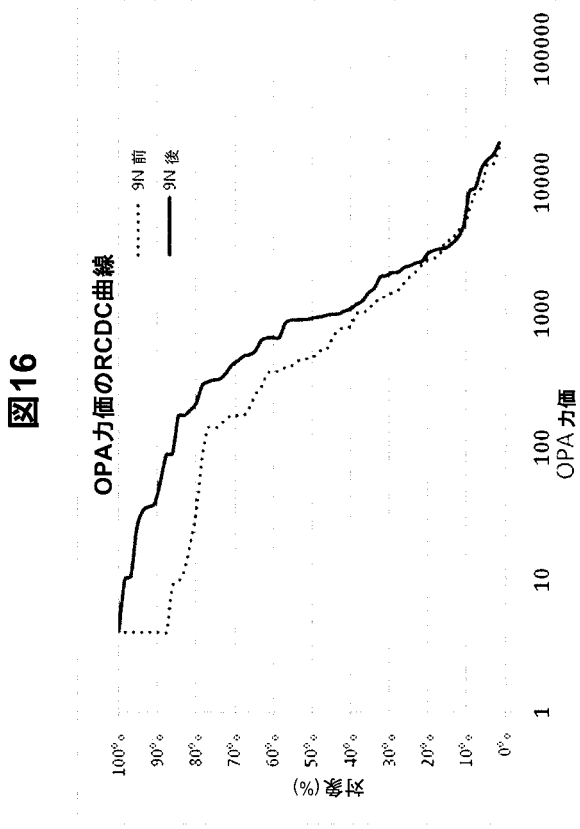
図14



【図 15】



【図 16】



【配列表】

2017509656000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年9月26日(2016.9.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 22F グリココンジュゲートを含む免疫原性組成物であって、グリココンジュゲートが 1000 kDa ~ 12,500 kDa の分子量を有し、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 22F に由来する単離された莢膜多糖および担体タンパク質を含み、多糖の担体タンパク質に対する比 (w/w) が 0.4 ~ 2 である、免疫原性組成物。

【請求項 2】

グリココンジュゲートが、1 mM 多糖あたり少なくとも 0.1 mM アセテートを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

少なくとも 30 % のグリココンジュゲートが CL-4B カラムにおいて 0.3 より低いカそれと等しい K_d を有する、請求項 1 から 2 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

グリココンジュゲートが多糖総量と比較して約 50 % 未満の遊離多糖を含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

グリココンジュゲートにおける多糖 1 mMあたりのアセテートの mMの、単離された多糖 1 mMあたりのアセテートの mMに対する比が、少なくとも 0.6 である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

グリココンジュゲートにおける多糖 1 mMあたりのアセテートの mMの、活性化された多糖における多糖 1 mMあたりのアセテートの mMに対する比が、少なくとも 0.6 である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

グリココンジュゲートのコンジュゲーション度が 2～15 である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

多糖が 10 kDa～2,000 kDa の分子量を有する、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

グリココンジュゲートが還元的アミノ化を用いて調製される、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

還元的アミノ化が、

(a) 多糖を酸化し、活性化多糖を生成すること、

(b) 活性化多糖と担体タンパク質を還元し、グリココンジュゲートを生成すること、を含む、請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

担体タンパク質が、DT (ジフテリア毒素)、TT (破傷風毒素)、CRM₁₉₇、他の DT 変異体、PD (ヘモフィルス・インフルエンザ (Haemophilus influenzae) タンパク質 D)、および免疫学的に機能的なその等価物からなる群から選択される、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

前記担体タンパク質が CRM₁₉₇ である、請求項 11 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

前記多糖が CRM₁₉₇ に個別にコンジュゲートされている、請求項 12 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 15B グリココンジュゲートおよびストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 33F グリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 12F グリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 10A グリココンジュゲート、ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 11A グリココンジュゲートおよびストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 8 グリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 4、6B、9V、14、18C、19F および 23F に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 17】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 1、5 および

7 F に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 6 A および 19 A に由来するグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 血清型 3 に由来する少なくとも 1 つのグリココンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 価肺炎球菌コンジュゲート組成物である、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

各用量が 0.1 ~ 100 μ g の多糖を含む、請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

各用量が、10 μ g ~ 150 μ g の担体タンパク質を含む、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 23】

他の病原体に由来する抗原をさらに含む、請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 24】

抗原が、ジフテリアトキソイド (D)、破傷風トキソイド (T)、百日咳抗原 (P)、無細胞性百日咳抗原 (Pa)、B 型肝炎ウイルス (HBV) 表面抗原 (HBsAg)、A 型肝炎ウイルス (HAV) 抗原、コンジュゲート化ヘモフィルス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) b 型莢膜糖類 (Hib)、および不活化ポリオウイルスワクチン (IPV) 抗原からなる群から選択される、請求項 23 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 25】

コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (*N. meningitidis*) 血清群 A 莢膜糖類 (MenA)、コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (*N. meningitidis*) 血清群 W135 莢膜糖類 (MenW135)、コンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (*N. meningitidis*) 血清群 Y 莢膜糖類 (MenY)、またはコンジュゲート化されたナイセリア・メニンギティディス (*N. meningitidis*) 血清群 C 莢膜糖類 (MenC) をさらに含む、請求項 1 から 24 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 26】

少なくとも 1 つのアジュバントをさらに含む、請求項 1 から 25 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 27】

少なくとも 1 つのアジュバントが、アルミニウム、リン酸カルシウム、リボソーム、水中油乳濁液、ポリ (D, L-ラクチド- α -グリコリド) (PLG) マイクロ粒子またはナノ粒子からなる群から選択される、請求項 26 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 28】

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アルミニウムアジュバントである、請求項 26 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 29】

少なくとも一つのアジュバントが C p G オリゴヌクレオチドである、請求項 26 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 30】

液体形態で製剤化された、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 31】

凍結乾燥形態で製剤化された、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 32】

緩衝液、塩、二価陽イオン、非イオン性界面活性剤、凍結防止剤、酸化防止剤、またはその組合せを含む、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 33】

さらに緩衝液を含む、請求項 32 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 34】

緩衝液がリン酸、コハク酸、ヒスチジンまたはクエン酸である、請求項 33 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 35】

請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物のいずれかを充填した容器。

【請求項 36】

請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物のいずれかを充填したシリンジ。

【請求項 37】

シリンジがシリコーン化されているか、またはガラス製である、請求項 36 に記載のシリンジ。

【請求項 38】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) と関連する感染、疾患または状態を防止する、処置する、または改善するための請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物であって、対象に有効な量で投与されることを特徴とする、免疫原性組成物。

【請求項 39】

対象におけるストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) による感染を防止するための請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物であって、対象に有効な量で投与されることを特徴とする、免疫原性組成物。

【請求項 40】

対象が 2 歳未満のヒトである、請求項 38 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 41】

対象が 50 歳以上の成人である、請求項 38 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 42】

対象が免疫障害を有するヒトである、請求項 38 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 43】

単回用量スケジュールで投与される、請求項 38 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 44】

複数回用量スケジュールで投与される、請求項 38 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 45】

対象においてストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 血清型 22 F に対する免疫応答を生じさせるための、請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物であって、有効な量で投与されることを特徴とする、免疫原性組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/050315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/09 A61K39/385 A61K39/00 A61K47/48 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, FSTA, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/157590 A1 (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; MICHON FRANCIS [US]; SARKA) 24 December 2008 (2008-12-24)	1,2,11, 135-139, 141, 168-180, 189-234, 281
Y	See e.g. the abstract; paragraphs [0059], [0091] and [0098]; claims 29, 33, 34 ----- -/-	1,2,11, 135-139, 141, 168-180, 189-234
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 August 2015		10/09/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Valcárcel, Rafael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/050315

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/273098 A1 (BLUE JEFFREY T [US] ET AL) 17 October 2013 (2013-10-17)	1,2,11, 135-139, 141, 168-180, 189-234, 281
Y	See e.g. abstract; paragraphs [0011], [0055], [0074] and [0077]	1,2,11, 135-139, 141, 168-180, 189-234
Y	----- WO 2008/079653 A1 (WYETH CORP [US]; HAUSDORFF WILLIAM P [BE]; SIBER GEORGE RAINER [US]; P) 3 July 2008 (2008-07-03)	1,2,11, 135-139, 141, 168-180, 189-234
Y	See e.g. the abstract ----- OOSTERHUIS-KAFEJA ET AL: "Immunogenicity, efficacy, safety and effectiveness of pneumococcal conjugate vaccines (1998-2006)", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 25, no. 12, 13 February 2007 (2007-02-13), pages 2194-2212, XP005886439, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2006.11.032 See e.g. the abstract	1,2,11, 135-139, 141, 168-180, 189-234
X,P	----- WO 2014/118201 A1 (BIOSYNTH SRL [IT]) 7 August 2014 (2014-08-07)	1,2,11, 135-139, 141,192, 193, 201-204, 208,209, 222, 224-234, 281
Y,P	See e.g. claims 7, 18 or 27 -----	1,2,11, 135-139, 141, 168-180, 189-234

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2015/050315**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
50-134, 281(completely); 1, 2, 11, 135-139, 141, 168-180
189-234(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ IB2015/ 050315

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 281(completely); 1, 2, 11, 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

An immunogenic composition comprising at least one glycoconjugate from *S. pneumoniae* serotype 15B and other component (e.g. a carrier, although it is not limited to a carrier). In this subject 1 neither the 15B polysaccharide nor the the carrier are further defined. Compositions comprising said 15B polysaccharide and standard buffers are also included. A method of inducing an immune response according to claim 281.

- 2-40. claims: 1-26, 135-139, 141, 168-180, 189-280, 282-287(all partially)

As subject 1 but comprising *S. pneumoniae* serotypes 22F (2); 33F(3); 12F (4); 10A (5); 11A (6); 8 (7); 15B+22F+33F (8); 15B+22F+33F+12F+10A+11A+8 (9); 15B+22F (10); 15B+33F (11); 15B+12F (12); 15B+10A (13); 15B+11A (14); 15B+8 (15); at least one of 15B, 22F, 33F, 12F, 10A, 11A or 8 and 4 (16), 6B (17), 9v (18), 14 (19), 18C (20), 19F (21), 23F (22), 1 (22), 5 (23), 7F (24), 6A 825), 19A (26), 3 (27); whis is 8-valent (28), 9-valent (29) until 20-valent (40)

41. claims: 27, 28, 140(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

A glycoconjugate comprising at least one of the *S. pneumoniae* serotypes of claims 1-26 conjugated to CRM197

42. claims: 29(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

A glycoconjugate comprising at least one of the *S. pneumoniae* serotypes of claims 1-26 wherein the glycoconjugates listed on claim 29 are conjugated to PD

43. claims: 30(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

A glycoconjugate comprising at least one of the *S. pneumoniae* serotypes of claims 18-26 wherein the serotype 18C is conjugated to TT

44. claims: 31(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

International Application No. PCT/ IB2015/ 050315

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A glycoconjugate comprising at least one of the S.
pneumoniae serotypes of claims 18-26 wherein the serotype
19F is conjugated to DT

45. claims: 32, 33, 46(completely); 135-139, 141, 168-180,
189-234(partially)

As subject 1 wherein the serotype 15B glycoconjugate is
defined by its molecular weight

46. claims: 34, 35(completely); 135-139, 141, 168-180,
189-234(partially)

As subject 1 wherein glycoconjugate is defined by the ratio
of capsular polysaccharide to carrier protein

47. claims: 36(completely); 135-139, 141, 168-180,
189-234(partially)

As subject 1 wherein glycoconjugate is defined by the
percentage of free capsular polysaccharide

48. claims: 37(completely); 135-139, 141, 168-180,
189-234(partially)

As subject 1 wherein the glycoconjugate is defined by the Kd
of a certain percentage of glycoconjugates (said definition
appears however unclear)

49. claims: 38-41(completely); 135-139, 141, 168-180,
189-234(partially)

As subject 1 wherein glycoconjugate is defined by the
comprising serotype 15B and acetate

50. claims: 42-44(completely); 135-139, 141, 168-180,
189-234(partially)

As subject 1 wherein glycoconjugate is defined by the
comprising serotype 15B and glycerol

51. claims: 45(completely); 135-139, 141, 168-180,
189-234(partially)

As subject 1 wherein glycoconjugate is defined by the degree
of conjugation

International Application No. PCT/ IB2015/ 050315

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

52-56. claims: 47, 48, 135-139, 141, 168-180, 189-234(all partially)

As subject 1 wherein glycoconjugate is defined by the comprising serotype 15B conjugated to DT (52); TT (53); CRM197 (54); other DT mutants (55); or PD (56)

57. claims: 49(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

As subject 1 wherein glycoconjugate is defined by the serotype 15B glycoconjugate bein prepared using reductive amination

58. claims: 50-64(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

This subject refers to many different groups of potential inventions but are grouped together for the sake of efficiency. All these groups must comprise a serotype 22F glycoconjugate: the definitions of the different conjugates include defination by molecular weight of the glycoconjugate, ratio of polysaccharide to carrier to carrier protein, comprising acetate or glycerol etc..

59. claims: 65-82(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

As subject 58 but for serotype 33F

60. claims: 83-95(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

As subject 58 but for serotype 12F

61. claims: 96-106(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

As subject 58 but for serotype 10A

62. claims: 107-123(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

As subject 58 but for serotype 11A

63. claims: 124-134(completely); 135-139, 141, 168-180, 189-234(partially)

International Application No. PCT/ IB2015/ 050315

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

As subject 58 but for serotype 8

64. claims: 142-157

An immunogenic composition of e.g. claim 1 further comprising antigens from other pathogens. While further lack of unity clearly exists in this group since combination vaccines for several pathogens including *S. pneumoniae* and other pathogens are known, for the sake of efficiency these inventions are grouped here

65. claims: 158-167

An immunogenic composition of e.g. claim 1 and an adjuvant. While further lack of unity clearly exists in this group, for the sake of efficiency these inventions are grouped here

66. claims: 181-188

An immunogenic composition of e.g. claim 1 and a surfactant. While further lack of unity clearly exists in this group, for the sake of efficiency these inventions are grouped here

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/050315

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2008157590	A1	24-12-2008	AU	2008265767 A1		24-12-2008
			CA	2692069 A1		24-12-2008
			CN	101754773 A		23-06-2010
			EP	2170391 A1		07-04-2010
			JP	5555623 B2		23-07-2014
			JP	2010532793 A		14-10-2010
			US	2010189740 A1		29-07-2010
			US	2013197203 A1		01-08-2013
			WO	2008157590 A1		24-12-2008

US 2013273098	A1	17-10-2013	AR	084158 A1		24-04-2013
			AU	2011338723 A1		30-05-2013
			CA	2819366 A1		14-06-2012
			CN	103391714 A		13-11-2013
			EP	2648506 A1		16-10-2013
			JP	2014502595 A		03-02-2014
			KR	20140005892 A		15-01-2014
			RU	2013131795 A		20-01-2015
			TW	201304803 A		01-02-2013
			US	2013273098 A1		17-10-2013
			WO	2012078482 A1		14-06-2012

WO 2008079653	A1	03-07-2008	AU	2007337214 A1		03-07-2008
			BR	PI0721136 A2		01-04-2014
			CA	2673558 A1		03-07-2008
			CN	101610788 A		23-12-2009
			EP	2094304 A1		02-09-2009
			IL	199324 A		31-10-2013
			JP	2010513550 A		30-04-2010
			JP	2014065721 A		17-04-2014
			KR	20090094164 A		03-09-2009
			KR	20140130564 A		10-11-2014
			RU	2009123449 A		27-01-2011
			SG	177174 A1		30-01-2012
			US	2007184072 A1		09-08-2007
			US	2009234108 A1		17-09-2009
			US	2011071279 A1		24-03-2011
			US	2015038685 A1		05-02-2015
			WO	2008079653 A1		03-07-2008
			ZA	200904619 A		28-07-2010

WO 2014118201	A1	07-08-2014	CA	2897272 A1		07-08-2014
			WO	2014118201 A1		07-08-2014

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22
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
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00
A 6 1 K	39/05 (2006.01)	A 6 1 K	39/05
A 6 1 K	39/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/08
A 6 1 K	39/10 (2006.01)	A 6 1 K	39/10
A 6 1 K	39/29 (2006.01)	A 6 1 K	39/29
A 6 1 K	39/102 (2006.01)	A 6 1 K	39/102
A 6 1 K	39/13 (2006.01)	A 6 1 K	39/13
A 6 1 K	39/095 (2006.01)	A 6 1 K	39/095
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34
C 0 7 K	14/285 (2006.01)	C 0 7 K	14/285
C 0 7 K	14/33 (2006.01)	C 0 7 K	14/33
C 0 7 K	14/34 (2006.01)	C 0 7 K	14/34
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

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

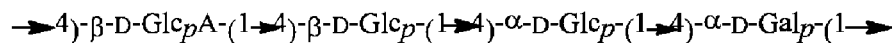
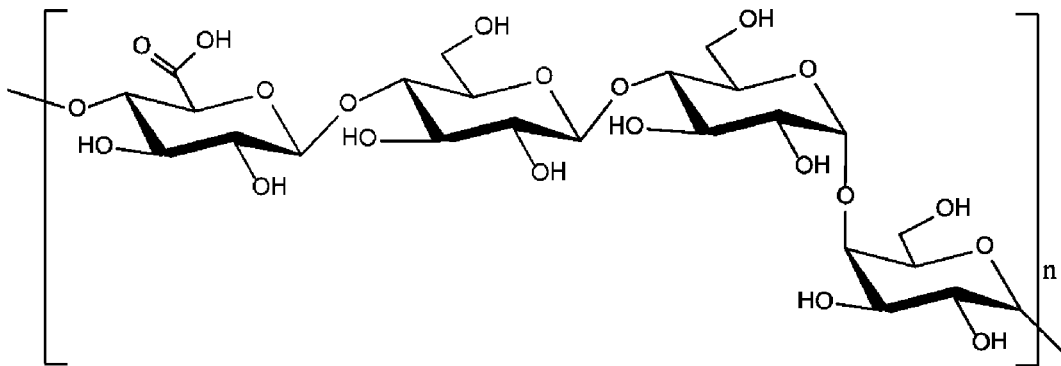
- (72)発明者 デイヴィッド クーパー
アメリカ合衆国 10950 ニューヨーク州 モンロー市 ウェブ・ファーム・ロード 9
- (72)発明者 エミリオ アンソニー エミニ
アメリカ合衆国 19025 ペンシルヴァニア州 ドウレシャー市 ストニングトン・コート 5
- (72)発明者 チアンシン グ
アメリカ合衆国 07652 ニュージャージー州 パラマス市 バラード・アヴェニュー 367
- (72)発明者 ミングミン グ ハン
アメリカ合衆国 18064 ペンシルヴァニア州 ナザレス市 オールド・タウン・ロード 2302
- (72)発明者 キャサリン ウテ ジャンセン
アメリカ合衆国 10065 ニューヨーク州 ニューヨーク市 65ティエイチ・ストリート 160イー アpartment 11・シー
- (72)発明者 ラジェシュ クマール カインサン
アメリカ合衆国 10983 ニューヨーク州 タパン市 キー・プレイス 15
- (72)発明者 ジン・フアン キム
アメリカ合衆国 10901 ニューヨーク州 サファーン市 サマーセット・ドライブ 44
- (72)発明者 アヴァリ クリシュナ プラサド
アメリカ合衆国 27516 ノースキャロライナ州 チャペル・ヒル市 ウォーシャム・ドライブ 105

- (72)発明者 マイケル ウィリアム プライド
 アメリカ合衆国 10301 ニューヨーク州 スタテン・アイランド市 ベイ・ストリート・ラ
 ンディング 80 ユニット・8エー
- (72)発明者 ウェンディ ジョー ワトソン
 アメリカ合衆国 19422 ペンシルヴァニア州 ブルー・ベル市 ベイ・ヒル・ドライヴ 1
 21
- (72)発明者 ユーイング ヤング
 アメリカ合衆国 06905 コネチカット州 スタムフォード市 ペパー・リッジ・ロード 1
 54 ユニット11

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA29 BB11 BB15 BB16 CC06 DD09 DD23 DD26 DD43
 DD60A EE23 FF14 FF61
 4C085 AA03 AA04 BA14 BA38 DD52 EE01 EE03 EE06 FF01 FF02
 FF11 FF17 GG03 GG04 GG05 GG06
 4H045 BA10 BA53 CA11 DA86 EA31 FA41 GA10

【要約の続き】

図1



$$\text{MW (H}^+) = 662.553 \text{ C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{21}$$

$$\text{MW (Na}^+) = 684.534 \text{ C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_{21}\text{Na}_1$$