

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5523836号  
(P5523836)

(45) 発行日 平成26年6月18日(2014.6.18)

(24) 登録日 平成26年4月18日(2014.4.18)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 39/09	(2006.01) A 61 K 39/09
A 61 K 47/48	(2006.01) A 61 K 47/48
A 61 K 47/42	(2006.01) A 61 K 47/42
A 61 P 11/00	(2006.01) A 61 P 11/00
A 61 P 37/04	(2006.01) A 61 P 37/04

請求項の数 22 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-543052 (P2009-543052)	(73) 特許権者 309040701 ワイス・エルエルシー
(86) (22) 出願日	平成19年12月10日 (2007.12.10)	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 セカンド・ストリート 235
(65) 公表番号	特表2010-513549 (P2010-513549A)	(74) 代理人 100133927 弁理士 四本 能尚
(43) 公表日	平成22年4月30日 (2010.4.30)	(74) 代理人 100131934 弁理士 ▲高▼橋 宏次
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/086941	(74) 代理人 100137040 弁理士 宮澤 純子
(87) 國際公開番号	W02008/143709	(74) 代理人 100147186 弁理士 佐藤 真紀
(87) 國際公開日	平成20年11月27日 (2008.11.27)	(74) 代理人 100174447 弁理士 龍田 美幸
審査請求日	平成22年12月9日 (2010.12.9)	
(31) 優先権主張番号	11/644,924	
(32) 優先日	平成18年12月22日 (2006.12.22)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多価肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲート組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3多糖を含む免疫原性コンジュゲートを製造するための方法であって、

(a) 精製血清型3多糖を弱酸と反応させて加水分解された血清型3多糖にすること、  
(b) 加水分解された血清型3多糖を、二価カチオンの存在下で酸化剤と反応させて活性化血清型3多糖にし、ここで酸化剤が過ヨウ素酸であって二価カチオンがMg<sup>2+</sup>またはCa<sup>2+</sup>であること、

(c) 活性化血清型3多糖を担体タンパク質と混ぜ合わせること、

(d) 混ぜ合わせた活性化血清型3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3多糖：担体タンパク質コンジュゲートにすること、および

(e) 血清型3多糖：担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3多糖を含む免疫原性コンジュゲートにすることを含む方法。

## 【請求項 2】

多糖-タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物を製造するための方法であって、コンジュゲートのそれぞれが、担体タンパク質にコンジュゲートしているストレプトコッカス・ニューモニアエの異なる血清型由来の莢膜多糖を含有し、莢膜多糖が血清型3および少なくとも1種類の追加血清型から調製され、各莢膜多糖が別々に担体タンパク質にコンジュゲートしており、

10

20

- ( a ) 精製血清型 3 多糖を弱酸と反応させて加水分解された血清型 3 多糖にすること、  
 ( b ) 加水分解された血清型 3 多糖を、二価カチオンの存在下で酸化剤と反応させて活性化血清型 3 多糖にし、ここで酸化剤が過ヨウ素酸であって二価カチオンが  $Mg^{2+}$  または  $Ca^{2+}$  であること、  
 ( c ) 活性化血清型 3 多糖を担体タンパク質と混ぜ合わせること、  
 ( d ) 混ぜ合わせた活性化血清型 3 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 3 多糖 : 担体タンパク質コンジュゲートにすること、  
 ( e ) 血清型 3 多糖 : 担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型 3 多糖を含む免疫原性コンジュゲートにすること、および 10  
 ( f ) ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型 3 多糖を含む免疫原性コンジュゲートおよび追加ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型多糖を含む少なくとも 1 種類の免疫原性コンジュゲートを混ぜ合わせて多価免疫原性組成物にすることを含む方法。

【請求項 3】

莢膜多糖が血清型 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F および 23F から調製される請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

担体タンパク質と混ぜ合わせる前に、活性化血清型 3 多糖を精製することをさらに含む請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

還元剤と反応させる前に、混ぜ合わせた活性化血清型 3 多糖および担体タンパク質を共凍結乾燥することをさらに含む請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

免疫原性コンジュゲートを精製することをさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

弱酸が酢酸である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

担体タンパク質が CRM<sub>197</sub> である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 9】

還元剤がシアノ水素化ホウ素ナトリウムである請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 10】

未反応アルデヒドをキャッピングすることが、血清型 3 多糖 : 担体タンパク質コンジュゲートを水素化ホウ素ナトリウムと反応させることを含む請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 11】

担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型 3 多糖を含む免疫原性コンジュゲートを製造するための方法であって、

- ( a ) 精製血清型 3 多糖を酢酸と反応させて加水分解された血清型 3 多糖にすること、  
 ( b ) 加水分解された血清型 3 多糖を、 $MgCl_2$  の存在下で過ヨウ素酸と反応させて活性化血清型 3 多糖にすること、

( c ) 活性化血清型 3 多糖を精製すること、

( d ) 活性化血清型 3 多糖を担体タンパク質と混ぜ合わせること、

( e ) 混ぜ合わせた活性化血清型 3 多糖および担体タンパク質を共凍結乾燥すること、

- ( f ) 共凍結乾燥した活性化血清型 3 多糖および担体タンパク質をシアノ水素化ホウ素ナトリウムと反応させて血清型 3 多糖 : 担体タンパク質コンジュゲートにすること、および  
 ( g ) 血清型 3 多糖 : 担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドを水素化ホウ素ナトリウムでキャッピングして、担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型 3 多糖を含む免疫原性コンジュゲートにすることを含む方法。

【請求項 12】

多糖 - タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物を製造するための方法であ

10

20

30

40

50

って、コンジュゲートのそれぞれが、担体タンパク質にコンジュゲートしているストレプトコッカス・ニューモニアエの異なる血清型由来の莢膜多糖を含有し、莢膜多糖が血清型3および少なくとも1種類の追加血清型から調製され、各莢膜多糖が別々に担体タンパク質にコンジュゲートしており、

(a) 精製血清型3多糖を酢酸と反応させて加水分解された血清型3多糖にすること、  
(b) 加水分解された血清型3多糖を、 $MgCl_2$ の存在下で過ヨウ素酸と反応させて活性化血清型3多糖にすること、

(c) 活性化血清型3多糖を精製すること、

(d) 活性化血清型3多糖を担体タンパク質と混ぜ合わせること、

(e) 混ぜ合わせた活性化血清型3多糖および担体タンパク質を共凍結乾燥すること、  
10

(f) 共凍結乾燥した活性化血清型3多糖および担体タンパク質をシアノ水素化ホウ素ナトリウムと反応させて血清型3多糖：担体タンパク質コンジュゲートにすること、

(g) 血清型3多糖：担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドを水素化ホウ素ナトリウムでキャッピングして、担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3多糖を含む免疫原性コンジュゲートにすること、および

(i) ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3多糖を含む免疫原性コンジュゲートおよび追加ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型多糖を含む少なくとも1種類の免疫原性コンジュゲートを混ぜ合わせて多価免疫原性組成物にすることを含む方法。

【請求項13】

莢膜多糖が血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、  
20  
19Fおよび23Fから調製される請求項12に記載の方法。

【請求項14】

免疫原性コンジュゲートを精製することをさらに含む請求項11に記載の方法。

【請求項15】

担体タンパク質がCRM<sub>197</sub>である請求項11または12に記載の方法。

【請求項16】

活性化されたストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3多糖を製造するための方法であって、

(a) 精製血清型3多糖を弱酸と反応させて加水分解された血清型3多糖にすること、および  
30

(b) 加水分解された血清型3多糖を、二価カチオンの存在下で酸化剤と反応させて活性化血清型3多糖にすることであって、ここで酸化剤が過ヨウ素酸であって二価カチオンが $Mg^{2+}$ または $Ca^{2+}$ であること、

を含む方法。

【請求項17】

酸化の後に、活性化血清型3多糖を精製することをさらに含む請求項16に記載の方法。

【請求項18】

弱酸が酢酸である請求項16に記載の方法。

【請求項19】

生理学的に許容できるビヒクルと一緒に13種類の異なる多糖-タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物を調製する方法であって、コンジュゲートのそれぞれが、担体タンパク質にコンジュゲートしている異なる莢膜多糖を含有し、莢膜多糖がストレプトコッカス・ニューモニアエの血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fから調製され、

血清型3多糖-タンパク質コンジュゲートが請求項1～18のいずれか1項に記載の方法に従って製造され、

各グリココンジュゲートは精製された後に、混ぜ合わされ、免疫原性組成物が製剤化される、方法。

【請求項20】

10

20

30

40

50

前記多価免疫原性組成物が、さらにアジュバントを含む、請求項 1 9 に記載の方法。

**【請求項 2 1】**

アジュバントがアルミニウムベースのアジュバントである、請求項 2 0 に記載の方法。

**【請求項 2 2】**

アジュバントが、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムおよび水酸化アルミニウムからなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

本発明は、一般的に、医学の分野、具体的には、微生物学、免疫学、ワクチンおよび細菌性病原体による感染の免疫化による予防に関する。 10

**【背景技術】**

**【0 0 0 2】**

ストレプトコッカス・ニューモニアエ ( *S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e* ) は、世界中で乳児および幼児における髄膜炎、肺炎、および重度の侵襲性疾患の主な原因である。多価肺炎球菌多糖ワクチンは、長年にわたって認可され、高齢者および高リスク患者において肺炎球菌疾患を予防するのに有益であることを証明してきた。しかしながら、乳児および幼児は、大部分の肺炎球菌多糖にほとんど反応しない。7価肺炎球菌コンジュゲートワクチン ( 7 v P n C、*P r e v n a r* (登録商標) ) は、その種の中で乳児および幼児において侵襲性疾患および中耳炎に対して免疫原性および有効性が極めて高いことが立証された最初のワクチンであった。このワクチンは、現在、世界中の多くの国で承認されている。*P r e v n a r* は、血清型 4、6 B、9 V、1 4、1 8 C、1 9 F および 2 3 F 由来の莢膜多糖を含有し、それぞれは、C R M<sub>1 9 , 7</sub> と呼ばれる担体タンパク質にコンジュゲートしている。*P r e v n a r* は、それぞれ米国、欧州、および世界の他の地域において侵襲性肺炎球菌疾患 ( I P D ) の約 8 0 ~ 9 0 %、6 0 ~ 8 0 %、および 4 0 ~ 8 0 % をカバーしている [ 1、2 ]。*P r e v n a r* の導入後何年もの間に集められたサーベイランスデータから、予想通り、米国の幼児における侵襲性肺炎球菌疾患の減少が明示されている ( 図 1 ) [ 3、4 ]。 20

**【0 0 0 3】**

*P r e v n a r* の導入前に米国の幼児において行われた I P D のサーベイランスは、血清群 6 および 1 9 に起因する疾患のかなりの部分が、6 A ( 約 3 分の 1 ) および 1 9 A ( 約 4 分の 1 ) 血清型に起因していることを立証した [ 5、6 ]。*P r e v n a r* の認可の後に米国において行われた肺炎球菌侵襲性疾患サーベイランスは、疾患の大きな負担が、依然として血清型 6 A および 1 9 A に帰せられることを示唆している ( 図 1 ) [ 3 ]。さらに、これら 2 種類の血清型は、血清型 1、3、5、および 7 F を合わせたよりも侵襲性疾患の症例数が多い ( 2 歳未満の小児 1 0 万人当たりの症例数 8 . 2 対 3 . 3 )。さらに、血清型 6 A および 1 9 A は、高率の抗生物質耐性を伴う ( 図 2 ) [ 7、8、9 ]。より多くの小児を免疫化すれば、血清群交差防御が、血清型 6 A および 1 9 A 疾患の減少をもたらすであろうが、減少には限界があり、これらの血清型に起因する疾患のかなりの負担が残るであろうことを示唆する証拠がある ( 以下を参照 )。 30

**【先行技術文献】**

**【非特許文献】**

**【0 0 0 4】**

**【非特許文献 1】** Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:100-21.

**【非特許文献 2】** Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:122-40. 40

【非特許文献3】Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *New Engl J Med* 2003; 348(18):1737-46.

【非特許文献4】Black S, Shinefield H, Hansen J, et al. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:1105-7.

【非特許文献5】Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001; 285:1729-35.

【非特許文献6】Butler J, Breiman R, Lipman H, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994. *J Infect Dis* 1995; 171:885-9.

【非特許文献7】Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.

【非特許文献8】Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* 1995; 333:481-6.

【非特許文献9】Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Hausdorff WP, Jacobs MR. Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis media. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1489-94.

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

血清型1、3、5、6A、7F、および19Aに起因する侵襲性肺炎球菌疾患の相対的な負担および重要性を考えて、Prevnar製剤にこれらの血清型を加えると、侵襲性疾患についての適用範囲が、米国および欧州においては90%超、アジアおよびラテンアメリカにおいては70%~80%まで高まるであろう。このワクチンは、Prevnarの適用範囲を超えて適用範囲を著しく広げ、血清型交差防御の限界に左右されない6Aおよび19Aについての適用範囲を提供するであろう。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

したがって、本発明は、一般的に、生理学的に許容できるビヒクルと一緒に、13種類の異なる多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートのそれぞれが、担体タンパク質にコンジュゲートしているストレプトコッカス・ニューモニアエの異なる血清型由来の莢膜多糖を含有する多価免疫原性組成物を提供する。所望により、アルミニウムベースのアジュバントなどのアジュバントが製剤中に包含される。より具体的には、本発明は、7vPnCワクチン中の7種類の血清型(4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23F)に加えて6種類の追加血清型(1、3、5、6A、7Fおよび19A)を含む13価肺炎球菌コンジュゲート(13vPnC)組成物を提供する。

#### 【0007】

本発明は、莢膜多糖がストレプトコッカス・ニューモニアエの血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23F由来であり、担体タンパク質がCRM<sub>197</sub>である、多価免疫原性組成物も提供する。

#### 【0008】

本発明は、莢膜多糖がストレプトコッカス・ニューモニアエの血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23F由来であり、担体タンパク質がCRM<sub>197</sub>であり、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などのアルミニウムベースのアジュバントである、多価免疫原性組成物をさらに提供する。本発明の特定の実施形態において、アジュバントは、リン

10

20

30

40

50

酸アルミニウムである。

【0009】

本発明は、生理学的に許容できるビヒクルと一緒に多糖 - タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートのそれぞれが、担体タンパク質にコンジュゲートしているストレプトコッカス・ニューモニアエの異なる血清型由来の莢膜多糖を含み、莢膜多糖が、血清型3および少なくとも1種類の追加血清型から調製される多価免疫原性組成物も提供する。

【0010】

この多価免疫原性組成物の一実施形態において、追加血清型は、血清型1、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、および23Fからなる群から選択される。別の実施形態において、担体タンパク質は、CRM<sub>197</sub>である。さらに別の実施形態において、組成物は、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選択されるアルミニウムベースのアジュバントなどのアジュバントを含む。特定の実施形態において、アジュバントは、リン酸アルミニウムである。

【0011】

本発明は、生理学的に許容できるビヒクルと一緒に多糖 - タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートのそれぞれが、担体タンパク質にコンジュゲートしているストレプトコッカス・ニューモニアエの異なる血清型由来の莢膜多糖を含み、莢膜多糖が、血清型4、6B、9V、14、18C、19F、23Fおよび少なくとも1種類の追加血清型から調製される多価免疫原性組成物も提供する。

【0012】

この多価免疫原性組成物の一実施形態において、追加血清型は、血清型1、3、5、6A、7F、および19Aからなる群から選択される。別の実施形態において、担体タンパク質は、CRM<sub>197</sub>である。さらに別の実施形態において、組成物は、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選択されるアルミニウムベースのアジュバントなどのアジュバントを含む。特定の実施形態において、アジュバントは、リン酸アルミニウムである。

【0013】

本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニアエ莢膜多糖コンジュゲートに対する免疫応答を誘導する方法であって、免疫学的に有効な量の前記免疫原性組成物のいずれかをヒトに投与することを含む方法も提供する。

【0014】

本発明は、投与されるどの免疫原性組成物も、4 μgの6Bを除いて、各糖類2 μg、CRM<sub>197</sub>担体タンパク質約29 μg、元素アルミニウム(リン酸アルミニウム0.5 mg)アジュバント0.125 mg、ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有するように製剤化される単一0.5 mL投与量であることをさらに規定する。

【0015】

担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3(Pn3)多糖を含む免疫原性コンジュゲートを製造するための方法も提供される。一実施形態において、この方法は、(i)精製Pn3多糖を弱酸と反応させて加水分解されたPn3多糖にすること、(ii)加水分解されたPn3多糖を、2価カチオンの存在下で酸化剤と反応させて活性化Pn3多糖にすること、(iii)活性化Pn3多糖を担体タンパク質と混ぜ合わせること、(iv)混ぜ合わせた活性化Pn3多糖および担体タンパク質を還元剤と反応させてPn3多糖:担体タンパク質コンジュゲートにすること、および(v)Pn3多糖:担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドをキャッピングして、担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエPn3多糖を含む免疫原性コンジュゲートにすることを含む。

【0016】

他の実施形態において、この方法は、(i)精製Pn3多糖を酢酸と反応させて加水分解されたPn3多糖にすること、(ii)加水分解されたPn3多糖を、MgCl<sub>2</sub>の存

10

20

30

40

50

在下で過ヨウ素酸と反応させて活性化 Pn3 多糖にすること、(i i i) 活性化 Pn3 多糖を精製すること、(i v) 活性化 Pn3 多糖を担体タンパク質と混ぜ合わせること、(v) 混ぜ合わせた活性化 Pn3 多糖および担体タンパク質を共凍結乾燥すること、(v i) 共凍結乾燥した活性化 Pn3 多糖および担体タンパク質をシアノ水素化ホウ素ナトリウムと反応させて Pn3 多糖：担体タンパク質コンジュゲートにすること、および(v i i) Pn3 多糖：担体タンパク質コンジュゲート中の未反応アルデヒドを水素化ホウ素ナトリウムでキャッピングして、担体タンパク質に共有結合しているストレプトコッカス・ニューモニアエ Pn3 多糖を含む免疫原性コンジュゲートにすることを含む。

## 【0017】

活性化されたストレプトコッカス・ニューモニアエ Pn3 多糖を製造するための方法も 10 提供される。この方法は、(i) 精製 Pn3 多糖を弱酸と反応させて加水分解された Pn3 多糖にすること、および(i i) 加水分解された Pn3 多糖を、2 倍力チオンの存在下で酸化剤と反応させて活性化 Pn3 多糖にすることを含む。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0018】

【図1】ベースライン(1998年/1999年)から2001年までの2歳未満の米国 10 の小児における血清型別のIPD率の変化を示す図である。

【図2】5歳未満の小児におけるペニシリン(PCN)に対する耐性を持つ肺炎球菌分離株の分布を示す図である(1998年)。

【図3】D118-P16 Prevnar 試験からの3回目投与後OPA結果の逆累積分布曲線(RCDC)を示す図である。 20

## 【発明を実施するための形態】

## 【0019】

Prevnar 血清型 4、6B、9V、14、18C、19F、23F の包含 1995~1998 年の間の IPD サーベイランスからのデータは、Prevnar 中の 7 種類の血清型が、2 歳未満の小児における IPD の約 82% の原因になっていると推定した [5]。有効性試験の場所である北カリフォルニアにおいて、Prevnar 血清型は、乳児および幼児における IPD の全症例の 90% を占めていた [10]。2000 年の Prevnar ワクチンの導入以来、ワクチン血清型に起因する疾患の減少により、全 IPD 率が著しく減少している [3, 4]。したがって、現時点において、次世代の肺炎球菌コンジュゲートワクチンから Prevnar 血清型のいずれかを除去するのではなく、むしろ、より広い適用範囲を得るために血清型を追加することを正当化することはできない。 30

## 【0020】

血清型 1、3、5 および 7F の包含

米国において、5 歳未満の小児における血清型 1 により引き起こされる IPD 率は、タイプ 3 および 7F のそれぞれについてとほぼ同じで 2% 未満である [1, 6]。血清型 1 および 5 は、侵襲性肺炎球菌疾患の危険性の高い米国住民において高率の IPD を占めている。具体的には、血清型 1 は、2 歳未満のアラスカ先住民の小児において IPD の 3.5% を、2~4 歳の小児において 18% を引き起こす [11]。血清型 1 と血清型 5 は共に、世界の他の部分および先進国における土着住民において疾患をかなり引き起こす [12, 13, 14]。 40

## 【0021】

血清型 1 は、他の肺炎球菌血清型と比べて、より重度の疾患を伴うこともある [15]。この知見は、米国と欧州の間の症例識別率の差、およびそれに関連した医療行為における差に基づいている。全体として、IPD の発生率は米国よりも欧州において低い。しかしながら、欧州において血清型 1 により引き起こされる IPD の割合は、米国におけるよりも不釣り合いに高い(それぞれ 6~7% 対 1~2%)。欧州では、血液培養物を、主に入院中の小児から入手する。米国では、39 以上の発熱および白血球数の上昇を示す小児から外来患者として血液培養物を入手することが日常の医療行為である。医療行為の差 50

を考えると、米国において血清型 1 により引き起こされる疾患の低い割合は、より軽度の疾患を引き起こす高率の他の血清型により下げられているが、欧州における高い割合は、より重篤な疾患を反映していることが想定される。さらに、複雑性肺炎の小児に関する血清疫学研究は、血清型 1 が不釣り合いに示されることを立証している [ 16、17、18 ]。このことは、血清型 1 の包含が、重度の肺炎球菌疾患の総計を低減するばかりでなく、侵襲性肺炎球菌疾患の全体的な低減に寄与することを示唆している。

#### 【 0 0 2 2 】

血清型 3 および 7 F の追加は、IPD に対する適用範囲を、世界の大部分の地域で約 3 % ~ 7 %、アジアでは約 9 % 高めるであろう。すなわち、11 価ワクチンは、アジアでは IPD の 50 % を、すべての他の地域では約 80 % をカバーするであろう [ 1、2 ]。これらの血清型は、中耳炎適用範囲に関しても重要である [ 19 ]。中耳炎を引き起こす肺炎球菌血清型に関する多国研究において、Hausdorff 他は、血清型 3 が、全体で 8 番目に最も一般的な中耳液分離株であることを見い出した [ 20 ]。血清型 3 は、中耳炎に関係する肺炎球菌血清型の最大で 8.7 % を占めていた。したがって、中耳炎、ならびに IPD におけるタイプ 3 および 7 F の重要性は、肺炎球菌コンジュゲートワクチンにおけるそれらの包含を正当化している。

#### 【 0 0 2 3 】

しかしながら、血清型 3 多糖に関して著しい免疫原性を示す多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンを製造する試みは成功していない。例えば、11 価肺炎球菌タンパク質 D コンジュゲートワクチン (11 - Pn - PD) の免疫原性および安全性に関する研究において、ワクチンの 3 回投与と、続く、同じワクチンか肺炎球菌多糖ワクチンのどちらかのブースター投与を受けた乳児において、血清型 3 についてのプライミング効果は観察されなかつた (Nurkka 他 (2004) Ped. Inf. Dis. J., 23: 1008 ~ 1014)。別の研究において、複数回の 11 - Pn - PD の投与を受けた乳児からのオプソニン食作用 (opsonophagocytic) アッセイ (OPA) の結果は、他の試験血清型に匹敵するレベルにおいて血清型 3 についての抗体応答を示さなかつた (Gatchalian 他、17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Eur. Soc. Paed. Inf. Dis. (ESPID)、Poster No. 4、PIA Poster Session 1、Istanbul Turkey、Mar. 27、2001)。急性中耳炎の予防における 11 - Pn - PD の有効性を評価したさらに別の研究において、ワクチンは、血清型 3 により引き起こされるエピソードに対する防御を提供しなかつた (Prymula 他 (2006) Lancet, 367: 740 ~ 748)。したがって、血清型 3 由来の莢膜多糖を含み、血清型 3 多糖に対する免疫原性応答を誘発することができる肺炎球菌コンジュゲートワクチンは、現状の技術を上回る著しい改善を提供する。

#### 【 0 0 2 4 】

血清型 6 A および 19 A の包含

##### a . 血清型 6 A および 19 A の疫学

文献におけるサーベイランスデータは、血清型 6 A および 19 A が、血清型 1、3、5、および 7 F を合わせたものに比べて、2 歳未満の米国的小児においてより多くの侵襲性肺炎球菌疾患を占めることを示唆している (図 1) [ 1、5 ]。さらに、これらの血清型は、抗生物質耐性を一般的に伴い (図 2)、中耳炎において重要な役割を果たす [ 6、19、20 ]。6 A および 9 A に起因する疾患を予防する現在の Prevnar ワクチンの能力は不明である。13 vPnC ワクチンにおける 6 A および 19 A 成分の包含についての理論的根拠を以下で論議する。

#### 【 0 0 2 5 】

##### b . 6 B および 19 F 多糖により誘導される 6 A および 19 A に対する応答

認可されたコンジュゲートされていない肺炎球菌多糖ワクチン (少なくとも 2 歳のヒトで使用するための) は、6 A または 6 B 莢膜多糖を含有し、両方は含有していなかつた [ 21 ]。23 価肺炎球菌多糖ワクチンの製剤化時に作成された免疫原性データは、6 B 1

10

20

30

40

50

価ワクチンが、6 A と 6 B 荚膜の双方に対する抗体を誘導したことを立証した。遊離多糖および肺炎球菌コンジュゲートワクチンについて様々な集団における Ig G およびオプソニン食作用アッセイ (O P A) 応答を評価するいくつかの試験からのデータは、6 A に対する Ig G 応答が、6 B 抗原により誘導されるが、応答は一般的に低く、6 A 生物体による O P A 活性は、6 B 生物体とは異なっていることを示唆した [22, 23, 24, 25]。さらに、高い 6 B 抗体で応答する被験者は、6 A に対する活性をほとんど有していないことがある。

#### 【0026】

高度の類似性が存在する 6 A および 6 B 荚膜多糖の化学的組成とは対照的に、19 A および 19 F 荚膜は、19 A 多糖中の 2 種類の追加側鎖の存在によりまったく異なっている。驚くほどのことではないが、19 F 多糖ワクチンで免疫化されたヒト志願者において測定された免疫応答は、19 F に対する応答が、被験者の 80 % において誘導されるが、19 A に対する応答を有するのは被験者の 20 % に過ぎないことを示した [26]。19 F 多糖による免疫化の後の血清型 19 A に対する低レベルの交差反応性の Ig G および O P A 応答も、コンジュゲートワクチンによる試験において同様に立証されている [24, 26]。

#### 【0027】

6 A および 19 A に対する交差反応性 O P A 応答に関する内部データは、米国の乳児において行われた 7 v P n C ブリッジング試験 (D118 - P16) から作成されている (図 3)。これらの研究は、他の研究者の知見と一致しており、交差反応性の、低レベルではあるが、6 B 多糖による免疫化の後の 6 A 多糖に対する機能的抗体、および 19 F による免疫化の 19 A に対する極めてわずかの機能的抗体の誘導を立証している。

#### 【0028】

##### 動物モデルにおける 6 A および 19 A に対する 6 B および 19 F 免疫化の影響

多糖免疫化による交差防御についての可能性を評価するために動物モデルが使用されてきた。Giebink 他により開発された中耳炎モデルにおいて、チンチラは、4 価多糖外膜タンパク質 (OMP) コンジュゲートワクチン (6 B, 14, 19 F, 23 F 糖類を含有する) またはプラセボで免疫化された [27]。この試験において、6 A について一部の交差防御が見られたが、これは、統計的有意性に達することではなく、防御のレベルは、中耳炎に対する 6 B によるよりも低かった。この同じモデルにおいて、19 F 中耳炎に対する 100 % の防御が存在したが、19 A 中耳炎に対する防御は 17 % に過ぎなかった。

#### 【0029】

Saeland 他は、8 価肺炎球菌破傷風コンジュゲートワクチン (6 B および 19 F を含有する) で免疫化された乳児からの血清を使用し、肺感染モデルにおいて、6 A 生物体による鼻腔内チャレンジの前にマウスを受動的に免疫化した [28]。59 の血清サンプルのうち、53 % が、6 B による菌血症に対してマウスを防御し、37 % が、6 A に対して防御した。11 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン (破傷風トキソイドにコンジュゲートしている 19 F を含有する) の 4 回投与で免疫化された乳児からの血清で受動的に免疫化されたマウスに、同じモデルにおいて、19 A 生物体による鼻腔内チャレンジを与えた [29]。受動的に免疫化され、次いで、チャレンジされた 100 匹のマウスのうち、60 匹のマウスは、肺組織で検出される 19 A 生物体を有していないが、生理食塩水プラセボを与えたすべてのマウスでは生物体が識別された。しかしながら、受動免疫化は、このモデルにおいて 19 F 生物体によるチャレンジに対して防御しなかった。したがって、血清群 19 についてのモデルの妥当性は疑わしい。一般に、これらのモデルは、6 A 生物体に対する 6 B 免疫化の一部の生物学的影響の証拠を提供するが、異種血清型に対する効果は、同種血清型について観測されたものほど大きくなかった。19 A 生物体に対する 19 F 免疫化の影響は、これらのモデルからは十分に理解されない。

#### 【0030】

##### 有効性 / 有用性試験における 6 A および 19 A 疾患に対する 6 B および 19 F 多糖コンジュゲート免疫化の影響

10

20

30

40

50

7vPnC および 9vPnC (7vPnC に血清型 1 および 5 を加える) 有効性試験における 6B、6A、19F、および 19A 血清型に起因する疾患の症例数を表 1 に示す [30、10、31]。侵襲性疾患症例の数は、少な過ぎて、血清型 6A および 19A についていかなる結論も出すことができない。しかしながら、フィンランド中耳炎試験は、多数の肺炎球菌分離株をもたらした [32]。パープロトコル解析において、7vPnC は、血清型 6B に起因する中耳炎に対して 84% (95% CI 62%、93%) 有効であり、血清型 6A に起因する中耳炎に対して 57% (95% CI 24%、76%) 有効であった (表 1)。対照的に、7vPnC による血清型特異的有効性は、19F か 19A のどちらかに起因する中耳炎については立証されなかった。

【0031】

10

【表 1】

表 1. 7vPnC および 9vPnC ワクチンでの有効性試験における血清型 6B、6A、19F、および 19A に起因する肺炎球菌疾患の症例

	6B		6A		19F		19A	
	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.	PnC	Contr.
カイザー(Kaiser) 有効性試験 – 7vPnC (ITT)	1	7	0	1	2*	13	0	1
ナバホ(Navajo)有効性 試験– 7vPnC (ITT)	0	5	1	0	1	1	1	0
南アフリカ有効性試験 – 9vPnC HIV (-) (ITT)	1	2	1	0	0	1	3	1
南アフリカ有効性試験 – 9vPnC HIV (+) (ITT)	1	7	3	10	2	3	2	3
フィンランド 中耳炎試験 – 7vPnC (PP)	9*	56	19*	45	43	58	17	26

統計的に有意な有効性が立証された

30

参考文献 30、10 および 33、ならびに私信から

Contr=対照

ITT=治療企図解析

PP=パープロトコル解析

【0032】

市販後 IPD サーベイランスデータも、Prevnar の有用性を評価するために Centers for Disease Control により行われた症例対照試験から入手可能である [33]。生後 3 ~ 23 ヶ月の小児で発生した侵襲性肺炎球菌疾患の症例は、サーベイランス研究室において識別され、年齢および郵便番号により 3 つの対照症例に対応付けられた。同意を得た後に、病歴および免疫化歴 (被験者は、Prevnar の少なくとも 1 回の投与を受けていた場合に免疫化されていると見なされた) は、症例および対照について、両親および医療提供者から入手された。予備結果は、2003 年の ICACC ミーティングで提示された。6B、19F、19A、および 6A 疾患についての知見の要約を表 2 に示す。これらのデータは、Prevnar が、血清型 6B 疾患よりもいくらくらい低いレベルであるが、6A に起因する疾患を予防できることを示している。これらのデータは、19A に起因する侵襲性疾患についての交差防御が制限されていることを示している。

【0033】

40

50

## 【表2】

表2.CDCにより行われた症例対照試験の予備結果(ICAAC、2003年にて提示)

血清型	情報価値のある組, n	VE* (95% CI)
ワクチンタイプ、すべて	115	94 (87, 97)
関連ワクチン、すべて	36	70 (38, 86)
非ワクチンタイプ、すべて	43	-4 (-106, 48)
6B	27	94 (72, 99)
19F	19	73 (16, 92)
6A	15	87 (53, 97)
19A	16	40 (-87, 80)

ワクチン接種(1投与以上)対非ワクチン接種を比較し、基礎的条件について  
調整したワクチン有用性  
参考文献40および私信/秘信

10

20

## 【0034】

P revn arの使用に関する公表された分析 [3] は、血清型 6 B および 19 F が、2歳未満の小児の中で血清型 6 A および 19 A により引き起こされるIPDの中等度減少をもたらすことも示した([3]の表1)。血清型 6 A、9 A、9 L、9 N、18 A、18 B、18 F、19 A、19 B、19 C、23 A および 23 B(「すべてのワクチン関連血清型」)により引き起こされる非免疫化成人の中の疾患率は、いくらか軽減された([3]の表2)。これらのデータは、2歳未満の小児におけるP revn arの使用からの集団免疫は、血清型 6 A および 19 A について適度であることを立証し、本発明の 13 v P n C ワクチンにおける血清型 6 A および 19 A の包含の根拠を提供する。

30

## 【0035】

## 6 A および 19 A の追加についての結論

7 v P n C ワクチンについて図1および表2に述べられている市販後サーベイランスデータおよび症例対照試験結果は、上記に記載されている動物モデルにおける免疫応答および免疫性能に関する他の情報と一致して、6 A 疾患に対する一部の交差防御があっても、6 B 疾患に対するよりも少ない程度であることを示唆している。さらに、19 A に対する防御が制限されているように見える。したがって、血清型 6 A および 19 A を含有する 13 v P n C ワクチンは、血清型 6 B および 19 F による血清群交差防御の限界に左右されない適用範囲を提供する。

40

## 【0036】

したがって、本発明は、生理学的に許容できるビヒクルと一緒に、13種類の異なる多糖-タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物であって、コンジュゲートのそれぞれが、担体タンパク質にコンジュゲートしている異なる莢膜多糖を含有し、莢膜多糖が、ストレプトコッカス・ニューモニアエの血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F および 23 F から調製される組成物を提供する。1つのそのような担体タンパク質は、CRM<sub>197</sub>と呼ばれるジフテリアトキソイドである。免疫原性組成物は、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などのアルミニウムベースのアジュバントなどのアジュバントをさらに含むことがある

50

。

## 【0037】

莢膜多糖は、当業者に知られている標準的技法により調製される。本発明において、莢膜多糖は、ストレプトコッカス・ニューモニアエの血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fから調製される。これらの肺炎球菌コンジュゲートは、別々のプロセスにより調製され、単回投与製剤に製剤化される。例えば、一実施形態において、各肺炎球菌多糖血清型は、大豆ベースの培地内で成育される。次いで、個々の多糖は、遠心分離、沈殿、限外濾過、およびカラムクロマトグラフィーにより精製される。精製した多糖は、担体タンパク質と反応することができる糖類を製造するために化学的に活性化される。

10

## 【0038】

活性化されたらすぐに、各莢膜多糖は、別々に担体タンパク質にコンジュゲートされ、グリココンジュゲートを形成する。一実施形態において、各莢膜多糖は、同じ担体タンパク質にコンジュゲートされる。この実施形態において、コンジュゲーションは、還元アミノ化により行われる。

## 【0039】

多糖の化学的活性化と、続く担体タンパク質とのコンジュゲーションは、従来の手段により行われる。例えば、米国特許第4,673,574号および第4,902,506号を参照されたい[34、35]。

## 【0040】

担体タンパク質は、無毒性かつ非反応原性(non-reactogenic)であり、十分な量および純度で得られるタンパク質であることが好ましい。担体タンパク質は、標準的なコンジュゲーション手順に適していなければならない。本発明の特定の実施形態において、CRM<sub>197</sub>が担体タンパク質として使用される。

20

## 【0041】

CRM<sub>197</sub>(Wyeth、Sanford、NC)は、カザミノ酸および酵母エキスベースの培地内で成育されたコリネバクテリウム・ジフテリア(Corynebacterium diphtheriae)C7株(197)の培養物から単離されるジフテリア毒素の無毒性変異体(すなわち、トキソイド)である。CRM<sub>197</sub>は、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿、およびイオン交換クロマトグラフィーにより精製される。代替方法として、CRM<sub>197</sub>は、参考により本明細書に組み込まれている米国特許第5,614,382号に従って組換え技術により調製される。他のジフテリアトキソイドも、担体タンパク質として使用するのに適している。

30

## 【0042】

他の適当な担体タンパク質は、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、コレラトキソイド(例えば、国際特許出願WO2004/083251[38]に記載されているよう)、エシェリヒア・コリ(E. coli)LT、エシェリヒア・コリST、およびシードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)由来の外毒素Aなどの不活性細菌毒素を包含する。外膜複合体c(OMPc)などの細菌外膜タンパク質、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質、ニューモリシン、肺炎球菌表面タンパク質A(PspA)、肺炎球菌アドヘシンタンパク質(PsaA)、A群もしくはB群ストレプトコッカス由来のC5aペプチダーゼ、またはヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenzae)タンパク質Dも使用することができる。オボアルブミン、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も担体タンパク質として使用することができる。

40

## 【0043】

莢膜多糖の担体タンパク質とのコンジュゲーションの後に、多糖-タンパク質コンジュゲートを、様々な技法により精製する(多糖-タンパク質コンジュゲートの量に関して富化される)。これらの技法は、濃縮/透析濾過操作、沈殿/溶出、カラムクロマトグラフ

50

イー、および深層濾過を包含する。以下の実施例を参照されたい。

【0044】

個々のグリココンジュゲートを精製した後に、それらを混ぜ合わせ、ワクチンとして使用することができる本発明の免疫原性組成物を製剤化する。本発明の免疫原性組成物の製剤化は、当技術分野において知られている方法を使用して行うことができる。例えば、13種類の個々の肺炎球菌コンジュゲートを、生理学的に許容できるビヒクルと一緒に製剤化し、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は、水、緩衝生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）およびブドウ糖溶液を包含するが、これらに限定されるものではない。

【0045】

特定の実施形態において、免疫原性組成物は、1種類または複数のアジュバントを含むであろう。本明細書で定義されるように、「アジュバント」は、本発明の免疫原性組成物の免疫原性を高める役割を果たす物質である。すなわち、アジュバントは、免疫応答を高めるために与えられることが多く、当業者にはよく知られている。組成物の有用性を高めるのに適しているアジュバントは、

(1) 水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩（ミヨウバン）、

(2) 水中油型エマルジョン製剤（ムラミルペプチド（以下で定義される）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）、例えば、

(a) モデル 110Yマイクロフルイダイザー（Microfluidics, Newton, MA）などのマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロン粒子に製剤化された、スクアレン 5%、Tween 80 0.5%、およびSpan 85 0.5%（所望により、様々な量のMTP-PEを含有する（以下を参照、必要とされないにしても））を含有するMF 59（PCT公開第WO 90/14837号）、

(b) サブミクロンエマルジョンにマイクロ流動化されるか、より大きい粒径のエマルジョンを作成するためにボルテックスされた、スクアレン 10%、Tween 80 0.4%、ブルロニック - ブロックドポリマー L 121 5%、およびthr-MDP（以下を参照）を含有するSAF、ならびに

(c) スクアレン 2%、Tween 80 0.2%、ならびに米国特許第4,912,094号（Corixa）に記載されている3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質 A（MPL（商標））、トレハロースジミコレート（TDM）、および細胞壁骨格（CWS）からなる群からの1種類または複数の細菌細胞壁成分、好ましくは、MPL+CWS（Detoxy（商標））を含有するRibi（商標）アジュバント系（RAS）（Corixa, Hamilton, MT）、

(3) Quill AまたはSTIMULON（商標）QS-21（Antigenics, Framingham, MA）などのサポニンアジュバント（米国特許第5,057,540号）が使用されることがあり、またはISCOM（免疫賦活複合体）などのそれから作成される粒子、

(4) Corixaから入手可能であり、米国特許第6,113,918号に記載されている、細菌性リポ多糖、アミノアルキルグルコサミンホスフェート化合物（AGP）、またはそれらの誘導体もしくは類似体などの合成脂質 A 類似体；1つのそのようなAGPは、529（以前は、RC529として知られている）としても知られており、水性形態または安定なエマルジョンとして製剤化される2-[（R）-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]エチル 2-デオキシ-4-O-ホスホノ-3-O-[（R）-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル] - 2 - [（R）-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ] - b - D - グルコピラノシド、1個または複数のCpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチドなどの合成ポリヌクレオチド（米国特許第6,207,646号）であり、

(5) インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18など）、インターフェロン（例えば

10

20

30

40

50

、インターフェロン)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壞死因子(TNF)、共刺激分子B7-1およびB7-2などのサイトカイン、

(6)野生型か、アミノ酸29位のグルタミン酸が、公開済み国際特許出願第WO00/18434号(WO02/098368およびWO02/098369も参照)に従つて別のアミノ酸、好ましくは、ヒスチジンにより置き換えられている突然変異形態のどちらかのコレラ毒素(CT)、百日咳毒素(PT)、またはエシェリヒア・コリ易熱性毒素(LT)、特に、LT-K63、LT-R72、CT-S109、PT-K9/G129(例えば、WO93/13302およびWO92/19265を参照)などの細菌性ADP-リボシル化毒素の無毒化突然変異体、ならびに

(7)組成物の有効性を高めるための免疫刺激剤として作用する他の物質を包含するが、これらに限定されるものではない。

【0046】

ムラミルペプチドは、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニン-2-(1'-2'ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリオキシ)-エチルアミン(MTP-E)などを包含するが、これらに限定されるものではない。

【0047】

本発明のワクチン製剤は、全身経路または粘膜経路を介してワクチンを投与することにより、肺炎球菌感染を起こしやすいヒトを予防または治療するために使用することができる。これらの投与は、筋肉内、腹腔内、皮内、もしくは皮下経路を介する注射、または口道/消化管、気道もしくは尿生殖路への粘膜投与を包含することができる。一実施形態において、鼻腔内投与が、肺炎または中耳炎を治療するために使用される(肺炎球菌の鼻咽頭保菌をより効果的に予防し、その最初期段階で感染を軽減することができるため)。

【0048】

各ワクチン投与におけるコンジュゲートの量は、著しい副作用なしに免疫防御応答を誘導する量として選択される。そのような量は、肺炎球菌血清型に応じて変わることがある。一般的に、各投与は、多糖0.1~100μg、詳細には、0.1~10μg、より詳細には、1~5μgを含むであろう。

【0049】

特定のワクチンについての成分の最適量は、被験者における適切な免疫応答の観察が関わる標準的研究により確定することができる。最初のワクチン接種の後に、被験者は、十分に間隔をおいた1回または数回のブースター免疫化を受けることができる。

【0050】

本発明の特定の実施形態において、13vPnCワクチンは、個々にCRM<sub>197</sub>にコンジュゲートしている血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、および23Fの肺炎球菌莢膜多糖の滅菌液体製剤である。各0.5mL投与量は、4μgの6Bを除き、各糖類2μg、CRM<sub>197</sub>担体タンパク質約29μg、元素アルミニウム0.125mg(リン酸アルミニウム0.5mg)アジュvant、ならびに賦形剤としての塩化ナトリウムおよびコハク酸ナトリウム緩衝液を含有するよう40に製剤化される。液体は、保存剤なしで単回投与シリングに充填される。振盪した後に、ワクチンは、筋肉内投与が可能な状態の均一な白色の懸濁液である。

【0051】

13vPnCワクチンについての投与量レベルの選択は、市販の7vPnCワクチン(Prevnar)と同様である。1投与当たり4μgの6Bを除き、すべての血清型について糖類2μgの投与量レベルが選択された。7vPnCワクチンは、血清型4、9V、14、18C、19F、および23Fについては2μgの糖類投与量レベルで、6Bについては4μgの投与量で、IPDに対する望ましい安全性、免疫原性、および有効性を示した。

【0052】

10

20

30

40

50

免疫スケジュールは、7vPnCワクチンに合わせて設計されたスケジュールに従うことができる。例えば、13vPnCワクチンに包含される血清型に起因するストレプトコッカス・ニューモニアエにより引き起こされる侵襲性疾患に対する乳児および幼児のための通常のスケジュールは、生後2、4、6、および12～15ヶ月である。本発明の組成物は、より年長の小児、青少年、および成人での使用にも適している。

#### 【0053】

本発明の組成物は、他の細菌の感染により引き起こされる中耳炎に対して使用するための1種類または複数の追加抗原をさらに包含することがある。そのような細菌は、型別不能なヘモフィルス・インフルエンザ、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) (以前は、ブランハメラ・カタラーリス (*Branhamella catarrhalis*)として知られている) およびアロイオコッカス・オティティディス (*Alloioococcus otitidis*) を包含する。

#### 【0054】

包含に適している型別不能なヘモフィルス・インフルエンザ抗原の例は、タンパク質「e」としても知られているP4タンパク質(米国特許第5,601,831号；国際特許出願WO03/078453)、PALまたはPBOMP-1タンパク質としても知られているP6タンパク質(米国特許第5,110,908号；国際特許出願WO0100790)、P5タンパク質(米国再発行特許第37,741号)、ヘモフィルス接着および透過タンパク質(米国特許第6,245,337号および第6,676,948号)、LK P先端アドヘシンタンパク質(米国特許第5,643,725号)、およびNucAタンパク質(米国特許第6,221,365号)を包含する。

#### 【0055】

包含に適しているモラクセラ・カタラーリス抗原の例は、UspA2タンパク質(米国特許第5,552,146号、第6,310,190号)、CDタンパク質(米国特許第5,725,862号)、Eタンパク質(米国特許第5,948,412号)および74キロダルトン外膜タンパク質(米国特許第6,899,885号)を包含する。

#### 【0056】

包含に適しているアロイオコッカス・オティティディス抗原の例は、国際特許出願WO03/048304に規定されているものを包含する。

#### 【0057】

本発明の組成物は、ストレプトコッカス・ニューモニアエ由来の1種類または複数のタンパク質を包含することもある。包含に適しているストレプトコッカス・ニューモニアエタンパク質の例は、国際特許出願WO02/083855に規定されているもの、ならびに国際特許出願WO02/053761に記載されているものを包含する。

#### 【0058】

本発明の組成物は、ナイセリア・メニンジティディス (*Neisseria meningitidis*) B型由来の1種類または複数のタンパク質をさらに包含することがある。包含に適しているナイセリア・メニンジティディス B型タンパク質の例は、国際特許出願WO03/063766、WO2004/094596、WO01/85772、WO02/16612およびWO01/87939に規定されているものを包含する。

#### 【0059】

コンジュゲーションのためのストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3多糖の活性化  
多糖中の炭水化物の部分酸化を効果的に利用してアルデヒド基を作成し、次いで、担体タンパク質のリシン残基に連結させ、免疫原性コンジュゲート(すなわち、脊椎動物において特異的免疫応答を刺激または誘発するのに有用な、ワクチンなどの組成物)を作成した。多くの応用例について、汎用酸化剤過ヨウ素酸ナトリウムは、担体タンパク質とのコンジュゲーション前に、多糖中の炭水化物の効果的な酸化を提供する。しかしながら、過ヨウ素酸ナトリウムによるPn3多糖の直接酸化は、残ったアルデヒドがわずかしか存在しない分解多糖をもたらすことがある。代替酸化手順は、二価カチオン(例えば、Mg<sup>2+</sup>またはCa<sup>2+</sup>)存在下の過ヨウ素酸を取り入れ、Pn3多糖の効果的な酸化を提供す

10

20

30

40

50

る（表3）

【0060】

【表3】

表3:過ヨウ素酸/MgCl<sub>2</sub>を使用するPn3の酸化データ

サンプルID	過ヨウ素酸量 (meq) <sup>**</sup>	酸化 (時間)	温度(°C)	DO#***	Kd # (CL4B)
PP3 天然型	0	--	4	0.0	0.048
PP3酸化型	0.2	16	25	5.8	0.24
PP3酸化型	0.2	72	4	9.0	0.1
PP3酸化型	1	16	4	13.2	0.24
PP3酸化型	1	16	25	4.1	0.24
PP3酸化型	1	72	4	7.9	0.29

PP3:天然型肺炎球菌(Pneumo)多糖タイプ3

\*\*Meq:モル当量

\*\*\*DO:酸化度

10

【0061】

20

粘度および関連濾過問題を低減するために、Pn3多糖を、まず、酢酸、クエン酸または炭酸などの弱酸を使用して加水分解／脱重合にかける。「活性化」Pn3多糖を製造するための部分酸化を、制御された量の酸化剤を使用して加水分解／脱重合の後に行う。特異的糖酸化酵素を包含する、末端ヒドロキシル基を酸化してアルデヒドにする任意の選択的酸化剤を使用することができる（例えば、過ヨウ素酸ナトリウムもしくはカリウム、または過ヨウ素酸）。上記で議論されているように、好ましい酸化剤は、二価カチオン存在下の過ヨウ素酸である。次いで、活性化Pn3多糖を所望により精製する（例えば、緩衝生理食塩水に対する透析濾過により）。

【0062】

30

活性化Pn3多糖を、担体タンパク質と混ぜ合わせることができる。担体タンパク質は、結合したPn3多糖の免疫原性を高め、かつ／または診断上、分析上、および／または治療上有益である担体タンパク質に対する抗体を誘発するように選択される。抗原性分子（例えば、多糖）の担体との共有結合は、免疫原性およびT細胞依存性の増強を付与する（Pozsgay他（1999）PNAS、96：5194～97；Lee他（1976）J. Immunol.、116：1711～18；Dintzis他（1976）PNAS、73：3671～75）。本明細書に記載されているように、有用な担体タンパク質は、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、コレラトキソイド（例えば、国際特許出願WO2004/083251に記載されているような）、エシェリヒア・コリLT、エシェリヒア・コリST、およびシュードモナス・エルギノーサ由来の外毒素Aなどの不活性細菌毒素を包含する。外膜複合体cなどの細菌外膜タンパク質、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質、ニューモリシン、肺炎球菌表面タンパク質A、肺炎球菌アドヘシントンパク質、A群もしくはB群ストレプトコッカス由来のC5aペプチダーゼ、またはヘモフィルス・インフルエンザタンパク質Dも使用することができる。オボアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、またはツベルクリンの精製タンパク質誘導体などの他のタンパク質も担体タンパク質として使用することができる。好ましい担体タンパク質は、突然変異ジフテリアトキシンCRM<sub>1,97</sub>である。担体タンパク質と混ぜ合わせた後に、活性化Pn3多糖／タンパク質混合物を所望により凍結し（例えば、シェル凍結し）、共凍結乾燥する。

40

【0063】

コンジュゲーションを、活性化Pn3多糖／タンパク質混合物を、シアノ水素化ホウ素

50

ナトリウムなどの還元剤と反応させることにより行う。次いで、未反応アルデヒドを、水素化ホウ素ナトリウム還元を介してキャッピングする。コンジュゲートを精製すると(例えば、リン酸塩緩衝液と、続く、緩衝生理食塩水に対する透析濾過により)、緩衝生理食塩水中のグリココンジュゲートの最終バッチ濃縮物が得られる。

#### 【0064】

上記の開示は、一般的に、本発明について記載している。より完全な理解は、以下の具体的な実施例を参照することにより得ることができる。これらの実施例は、例示の目的のみで記載されており、本発明の範囲を限定することは意図されていない。

#### 【実施例】

#### 【0065】

##### 実施例1

###### ストレプトコッカス・ニューモニアエ莢膜多糖血清型1の調製

###### マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクの調製

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型1を American Type Culture Collection、ATCC、6301株から入手した。数世代のシードストックを、株を増やして動物由来成分を除去するために作成した(F1、F2、およびF3世代)。2つの追加世代のシードストックを製造した。第1の追加世代をF3バイアルから製造し、次の世代を、第1の追加世代のバイアルから製造した。シードバイアルを、冷凍保存剤としての合成グリセロールと共に冷凍保存した(-70℃未満)。冷凍バイアルの他に、凍結乾燥バイアルをF4世代について調製した。セルバンク調製については、すべての培養物を大豆ベースの培地中に成育させた。冷凍する前に、細胞を遠心分離により濃縮し、使用済み培地を除去し、細胞ペレットを、合成グリセロールなどの冷凍保存剤を含有する新鮮な培地中に再懸濁した。

#### 【0066】

##### 発酵および集菌

ワーキングセルバンクからの培養物を使用し、大豆ベースの培地を含有するシードボトルに接種した。ボトルを、成育要件が満たされるまで、かき混ぜずに36±2℃にてインキュベートした。シードボトルを使用し、大豆ベースの培地を含有するシード発酵槽に接種した。約7.0のpHを、滅菌炭酸ナトリウム溶液で維持した。目標光学密度に達した後に、シード発酵槽を使用し、大豆ベースの培地を含有する生産発酵槽に接種した。pHを、滅菌炭酸ナトリウム溶液で維持した。発酵を、成育の停止の後にまたは発酵槽の作業容量に達した場合に終了させた。適切な量の滅菌12%デオキシコール酸ナトリウムを培養物に添加し、細菌細胞を溶解し、細胞関連多糖を遊離させた。溶解した後に、発酵槽内容物を冷却した。溶解した培養プロスのpHを、酢酸で約pH6.6に調整した。溶解物を、連続流遠心分離と、続いて、深層濾過および0.45μm精密濾過により清澄化した。

#### 【0067】

代替プロセスにおいて、約7.0の発酵pHを、3N NaOHで維持した。目標光学密度に達した後に、シード発酵槽を使用し、大豆ベースの培地を含有する生産発酵槽に接種した。pHを、3N NaOHで維持した。発酵を、成育の停止の後にまたは発酵槽の使用容量に達した場合に終了させた。適切な量の滅菌12%デオキシコール酸ナトリウムを培養物に添加し、プロス中0.12%濃度とし、細菌細胞を溶解し、細胞関連多糖を遊離させた。溶解させた後に、発酵槽内容物を、かき混ぜながら、7~13℃の温度にて8~24時間の時間間隔にわたって保持し、完全な細胞溶解および多糖遊離が起こったことを保証した。この保持時間中のかき混ぜは、発酵槽壁およびpHプローブ上に溶解物堆積物が沈着するのを防ぎ、それによって、pHプローブ保全を維持した。次に、溶解した培養プロスのpHを、50%酢酸で約pH5.0に調整した。15~25℃の温度にて12~24時間の時間間隔にわたるかき混ぜない保持時間の後に、これまで可溶性のタンパク質のかなりの部分が、固体沈殿物として溶液から落下し、溶液中に残っている多糖の損失と分解はほとんどなかった。次いで、沈殿物を含む溶液を、連続流遠心分離と、続

10

20

30

40

50

く、深層濾過および0.45 μm精密濾過により清澄化した。

【0068】

精製

肺炎球菌多糖の精製は、いくつかの濃縮／透析濾過操作、沈殿／溶出、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過工程からなっていた。すべての手順は、特別の定めのない限り、室温にて行った。

【0069】

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型1の発酵槽培養物からの清澄化プロセスを、100kDa MWCO (キロダルトン分子量カットオフ) フィルターを使用して濃縮および透析濾過した。透析濾過は、中性pHにてリン酸ナトリウム緩衝液を使用して行った。透析濾過は、核酸、タンパク質および多糖などの高分子量バイオポリマーから低分子量培地成分を除去した。

10

【0070】

多糖を、ストック溶液からのヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミド (HB) を添加して1%HB (w/v) の最終濃度とすることにより、濃縮および透析濾過した溶液から沈殿させた。多糖/HB沈殿物をデブスフィルター上に捕捉し、濾液を廃棄した。多糖沈殿物を、沈殿物を含有するデブスフィルターに通して塩化ナトリウム溶液を再循環することにより再可溶化および溶出した。次いで、フィルターを、追加の塩化ナトリウム溶液ですすいだ。

20

【0071】

ヨウ化ナトリウム (NaI) を、ストックNaI溶液ストック溶液から多糖溶液に添加して0.5%の最終濃度とし、HBを沈殿させた。沈殿物を深層濾過により除去した。濾液は、目標多糖を含有している。沈殿容器およびフィルターをNaCl/NaI溶液ですすぎ、すすぎ液を、部分的に精製した多糖溶液と合わせた。フィルターを廃棄した。次いで、多糖を、0.2 μmフィルターに通して濾過した。

【0072】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、塩化ナトリウム溶液で透析濾過した。

【0073】

部分的に精製した多糖溶液を、活性炭を含浸させたデブスフィルターに通して濾過することによりさらに精製した。濾過の後に、炭素フィルターを塩化ナトリウム溶液ですすぎた。すすぎ液を多糖溶液と合わせ、次いで、0.2 μmフィルターに通して濾過した。

30

【0074】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、1Mリン酸ナトリウム緩衝液で調整して0.025Mリン酸ナトリウムの最終濃度とした。pHをチェックし、7.0 ± 0.2に調整した。

【0075】

セラミックヒドロキシアパタイト (HA) カラムを、塩化ナトリウムを含有するリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化して適切な伝導率 (15 μS 未満) とした。次いで、多糖溶液を、カラム上にロードした。これらの条件下で、樹脂および多糖に結合している不純物を、カラムからのフロースルー中に回収した。多糖溶液を、カラムの前後に位置する0.2 μm直列フィルターに通して濾過した。

40

【0076】

多糖溶液を、30kDa MWCOフィルターを使用して濃縮した。次いで、濃縮物を、注射用水 (WFI) で透析濾過した。

【0077】

透析濾過した多糖溶液を、0.2 μm膜フィルターに通してポリプロピレンボトル中に濾過した。サンプルを、遊離試験のために取り出し、精製多糖を -25 ± 5 °C にて冷凍保存した。

【0078】

50

## キャラクタリゼーション

1 H - N M R データは、多糖分子のプロトンに割り当てられたシグナルの帰属により化学構造と一致した。1 H - N M R スペクトルは、多糖中のO - アセチル官能基を定量化するための一連のよく分離したシグナル（メチル基由来のプロトン）を示した。

### 【0079】

1価多糖の同一性は、特異抗血清を使用する向流免疫電気泳動により確認された。

### 【0080】

屈折率検出器および多角度レーザー光散乱（M A L L S）検出器と連結している高速ゲルfiltrationクロマトグラフィーを、サンプル濃度と連動して使用し、分子量を計算した。

### 【0081】

サイズ排除クロマトグラフィー媒体（C L - 4 B）を使用し、多糖の相対的分子サイズ分布をプロファイルした。

### 【0082】

#### 実施例 2

##### 血清型1肺炎球菌多糖 - C R M<sub>1,9,7</sub>コンジュゲートの調製

##### 活性化およびコンジュゲーション

精製多糖の容器を解凍し、反応容器中で合わせた。容器に、0.2 M炭酸ナトリウム、p H 9.0を、50にて3時間にわたる部分的脱アセチル化（加水分解）のために添加した。反応物を20まで冷却し、中和を、0.2 M酢酸により行った。過ヨウ素酸ナトリウム存在下の酸化を、2~8におけるインキュベーションにより行い、混合物を15~21時間にわたって攪拌した。

### 【0083】

活性化反応混合物を、30K M W C O 膜を使用して0.9%NaClで10倍に濃縮および透析filtrationした。保持液を、0.2 μmfiltrationした。活性化糖類を、100mLガラス凍結乾燥ボトルに充填し、-75にてシェル凍結し、凍結乾燥した。

### 【0084】

「シェル凍結」は、凍結乾燥（フリーズドライ（freeze - drying））用のサンプルを調製するための方法である。フラスコを、アルコールまたはその他の適切な流体を含有する冷蔵浴中でモーター駆動のローラーにより自動的に回転させる。生成物の薄い被膜がフラスコの内面「シェル」の周りに均等に凍結され、各フリーズドライ実行中に多量の材料を安全に処理すること可能である。これらの自動冷蔵ユニットは、一度に多くのフラスコを予め冷凍する簡単かつ効率的な手段を提供し、望ましい被膜を内側に作り出し、効率的なフリーズドライにとって十分な表面積を提供する。

### 【0085】

凍結乾燥材料のボトルを室温にし、2:1の糖類/タンパク質比でC R M<sub>1,9,7</sub>溶液中に再懸濁した。糖類/タンパク質混合物に、1Mリン酸ナトリウム緩衝液を添加し、最終0.2 Mイオン強度および7.5のp H 7.5とし、次いで、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加した。反応物を18時間にわたって23にてインキュベートし、続いて、72時間にわたって37にて2回目のインキュベーションを行った。シアノ水素化ホウ素インキュベーションの後に、反応混合物を冷たい生理食塩水で希釈し、続いて、1M炭酸ナトリウムを添加して反応混合物をp H 9.0に調整した。未反応アルデヒドを、3~6時間にわたる23におけるインキュベーションにより、水素化ホウ素ナトリウムの添加によりクエンチした。

### 【0086】

反応混合物を生理食塩水で2倍に希釈し、0.45~5 μmプレフィルターに通して保持液容器中に移した。反応混合物を、0.15 Mリン酸塩緩衝液、p H 6で30倍に、生理食塩水で20倍に透析filtrationした。保持液を0.2 μmフィルターに通してfiltrationした。

### 【0087】

コンジュゲート溶液を、0.9%生理食塩水中で0.5 mg / mLの目標まで希釈し、次いで、クラス100フード内の最終バルク濃縮物（F B C）容器中に滅菌filtrationした。コ

10

20

30

40

50

ンジュゲートを 2 ~ 8 にて保存した。

【0088】

キャラクタリゼーション

サイズ排除クロマトグラフィー媒体 (CL-4B) を使用し、コンジュゲートの相対的分子サイズ分布をプロファイルした。

【0089】

コンジュゲートの同一性は、特異抗血清を使用するスロット - プロットアッセイにより確認された。

【0090】

糖類濃度およびタンパク質濃度は、それぞれウロン酸およびローリーアッセイにより決定した。共有結合したコンジュゲート複合体中のタンパク質に対する糖類の比は、計算：

【0091】

【数1】

$$\text{比} = \frac{\mu\text{ g/mL 糖類}}{\mu\text{ g/mL タンパク質}}$$

【0092】

O-アセチル含有量は、Hestrin法 (Hestrin他、J. Biol. Chem. 1949、180、p. 249) により測定した。総糖類濃度に対するO-アセチル濃度の比から、糖類 1 mg当たりのO-アセチルのマイクロモルが得られた。

【0093】

実施例3

ストレプトコッカス・ニューモニアエ 筒膜多糖血清型3の調製

マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクの調製

ストレプトコッカス・ニューモニアエ 血清型3は、Dr. Robert Austrian、University of Pennsylvania、Philadelphia、Pennsylvaniaから入手した。セルバンクシステムの調製については、実施例1を参照されたい。

【0094】

発酵および集菌

ワーキングセルバンクからの培養物を使用し、大豆ベースの培地を含有するシードボトルに接種した。ボトルを、成育要件が満たされるまで、かき混ぜずに 36 ± 2 にてインキュベートした。シードボトルを使用し、大豆ベースの培地を含有するシード発酵槽に接種した。約 7.0 の pH を、滅菌炭酸ナトリウム溶液で維持した。目標光学密度に達した後に、シード発酵槽を使用し、中間シード発酵槽に接種した。目標光学密度に達した後に、中シード発酵槽を使用し、生産発酵槽に接種した。pH を、滅菌炭酸ナトリウム溶液で維持した。発酵を、発酵槽の作業容量に達した場合に終了させた。適切な量の滅菌 12 % デオキシコール酸ナトリウムを培養物に添加し、細菌細胞を溶解し、細胞関連多糖を遊離させた。溶解した後に、発酵槽内容物を冷却した。溶解した培養プロスの pH を、酢酸で約 pH 6.6 に調整した。溶解物を、連続流遠心分離と、続いて、深層濾過および 0.45 μm 精密濾過により清澄化した。

【0095】

精製

肺炎球菌多糖の精製は、いくつかの濃縮 / 透析濾過操作、沈殿 / 溶出、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過工程からなっていた。すべての手順は、特別の定めのない限り、室温にて行った。

【0096】

10

20

30

40

50

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型3の発酵槽培養物からの清澄化プロセスを、100kDa MWCOフィルターを使用して濃縮および透析濾過した。透析濾過は、中性pHにてリン酸ナトリウム緩衝液を使用して行った。透析濾過は、核酸、タンパク質および多糖などの高分子量バイオポリマーから低分子量培地成分を除去した。

【0097】

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミド(HB)の添加前に、計算した容量のNaClストック溶液を、濃縮および透析濾過した多糖溶液に添加して0.25M NaClの最終濃度とした。次いで、多糖を、ストック溶液からのHBを添加して1%HB(w/v)の最終濃度とすることにより沈殿させた。多糖/HB沈殿物を、デブスフィルター上に捕捉し、濾液を廃棄した。多糖沈殿物を、沈殿物を含有するデブスフィルターに通して塩化ナトリウム溶液を再循環することにより再可溶化および溶出した。次いで、フィルターを、追加の塩化ナトリウム溶液ですすいだ。

【0098】

ヨウ化ナトリウム(NaI)を、ストックNaI溶液から多糖溶液に添加して0.5%の最終濃度とし、HBを沈殿させた。沈殿物を深層濾過により除去した。濾液は、目標多糖を含有していた。沈殿容器およびフィルターをNaCl/NaI溶液ですすぎ、すすぎ液を、部分的に精製した多糖溶液と合わせた。フィルターを廃棄した。次いで、多糖を、0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0099】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、塩化ナトリウム溶液で透析濾過した。

【0100】

部分的に精製した多糖溶液を、活性炭を含浸させたデブスフィルターに通して濾過することによりさらに精製した。濾過の後に、炭素フィルターを塩化ナトリウム溶液ですすぎだ。すすぎ液を多糖溶液と合わせ、次いで、0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0101】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、1Mリン酸ナトリウム緩衝液で調整して0.025Mリン酸ナトリウムの最終濃度とした。pHをチェックし、7.0±0.2に調整した。

【0102】

セラミックヒドロキシアパタイト(HA)カラムを、塩化ナトリウムを含有するリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化して適切な伝導率(15μS)とした。次いで、多糖溶液を、カラム上にロードした。これらの条件下で、樹脂および多糖に結合している不純物を、カラムからのフロースルー中に回収した。多糖溶液を、緩衝液と共にカラムに通して流し、0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0103】

多糖溶液を、30kDa MWCOフィルターを使用して濃縮した。次いで、濃縮物を、WF1で透析濾過した。

【0104】

透析濾過した多糖溶液を、0.2μm膜フィルターに通してステンレス鋼容器中に濾過した。サンプルを、遊離試験のために取り出し、精製多糖を-25±5にて冷凍保存した。

【0105】

キャラクタリゼーション

1H-NMRデータは、多糖分子のプロトンに割り当てられたシグナルの帰属により化学構造と一致した。

【0106】

1価多糖の同一性は、特異抗血清を使用する向流免疫電気泳動により確認された。

【0107】

屈折率検出器および多角度レーザー光散乱(MALLS)検出器と連結している高速ゲ

10

20

30

40

50

ル濾過クロマトグラフィーを、サンプル濃度と連動して使用し、分子量を計算した。

【0108】

サイズ排除クロマトグラフィー媒体（CL-4B）を使用し、多糖の相対的分子サイズ分布をプロファイルした。

【0109】

実施例4

血清型3肺炎球菌糖類-CRM<sub>197</sub>コンジュゲートの調製

活性化およびコンジュゲーション

精製した血清型3糖類の容器を解凍し、反応容器中で合わせた。容器に、WFIおよび2M酢酸を添加して0.2Mおよび2mg/mL糖類の最終濃度とした。溶液の温度を1時間にわたって85まで上げ、多糖を加水分解した。反応物を25以下まで冷却し、1M塩化マグネシウムを添加して0.1Mの最終濃度とした。過ヨウ素酸ナトリウム存在下の酸化を、23にて16~24時間にわたるインキュベーションにより行った。

【0110】

活性化反応混合物を、100K MWCO膜を使用してWFIで10倍に濃縮および透析濾過した。保持液を0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0111】

混ぜ合わせる場合、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7.0を、活性化糖類に添加して10mMの最終濃度および6.0~6.5のpHとした。CRM<sub>197</sub>担体タンパク質を、CRM<sub>197</sub>1g当たり糖類2gの比まで糖類溶液と混合した。合わせた糖類/タンパク質溶液を、50mL目標充填で100mLガラス凍結乾燥ボトルに充填し、-75にてシェル凍結し、凍結乾燥させた。

【0112】

共凍結乾燥した糖類/タンパク質材料のボトルを室温にし、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中に再懸濁して20mg/mLの最終糖類濃度とした。pHを6.5に調整し、次いで、シアノ水素化ホウ素ナトリウム0.5モル当量を添加した。反応物を、48時間にわたって37にてインキュベートした。シアノ水素化ホウ素インキュベーションの後に、反応混合物を、冷たい5mMコハク酸塩/0.9%生理食塩水緩衝液で希釈した。未反応アルデヒドを、水酸化ホウ素ナトリウムの添加および3~6時間にわたる23におけるインキュベーションによりクエンチした。反応混合物を、0.45~5μmプレフィルターに通して保持液容器中に移した。

【0113】

反応混合物を、0.1Mのリン酸塩緩衝液（pH9）で30倍に、0.15Mリン酸塩緩衝液（pH6）で20倍に、5mMコハク酸塩/0.9%生理食塩水で20倍に透析濾過した。保持液を0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0114】

コンジュゲート溶液を、0.5mg/mLの糖類目標まで希釈し、次いで、クラス100フード内のFBC容器中に滅菌濾過した。コンジュゲートを2~8にて保存した。

【0115】

キャラクタリゼーション

サイズ排除クロマトグラフィー媒体（CL-4B）を使用し、コンジュゲートの相対的分子サイズ分布をプロファイルした。

【0116】

コンジュゲートの同一性は、特異抗血清を使用するスロット-プロットアッセイにより確認された。

【0117】

糖類濃度およびタンパク質濃度は、それぞれアントロンおよびローリーアッセイにより決定した。共有結合したコンジュゲート複合体中のタンパク質に対する糖類の比は、計算：

【0118】

10

20

30

40

50

## 【数2】

$$\text{比} = \frac{\mu\text{ g/mL 糖類}}{\mu\text{ g/mL タンパク質}}$$

により得られた。

## 【0119】

## 実施例5

10

## ストレプトコッカス・ニューモニアエ茨膜多糖血清型5の調製

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型5は、State University of New York、Brooklyn、New YorkのDr. Gerald Schiffmannから入手した。セルバンクシステムの調製については、実施例1を参照されたい。多糖の発酵、集菌、精製、およびキャラクタリゼーションについては、実施例1を参照されたい。

## 【0120】

## 代替発酵プロセス

ワーキングセルバンクからの培養物を使用し、大豆ベースの培地および10 mM滅菌NaHCO<sub>3</sub>溶液を含有するシードボトルに接種した。ボトルを、成育要件が満たされるまで、かき混ぜずに36 ± 2にてインキュベートした。シードボトルを使用し、大豆ベースの培地および10 mM滅菌NaHCO<sub>3</sub>溶液を含有するシード発酵槽に接種した。約7.0のpHを、3N NaOHで維持した。目標光学密度に達した後に、シード発酵槽を使用し、10 mM NaHCO<sub>3</sub>濃度の大豆ベースの培地を含有する生産発酵槽に接種した。pHを、3N NaOHで維持した。発酵を、成育の停止の後にまたは発酵槽の作業容量に達した場合に終了させた。適切な量の滅菌12%デオキシコール酸ナトリウムを培養物に添加し、プロス中0.12%濃度とし、細菌細胞を溶解し、細胞関連多糖を遊離させた。溶解した後に、発酵槽内容物を、かき混ぜながら、7 ~ 13の温度にて8 ~ 24時間の時間間隔にわたって保持し、完全な細胞溶解および多糖の遊離が起こったことを保証した。この保持時間中のかき混ぜは、発酵槽壁およびpHプローブ上に溶解物堆積物が沈着するのを防ぎ、それによって、pHプローブ保全を維持した。次に、溶解した培養プロスのpHを、50%酢酸で約pH 4.5に調整した。15 ~ 25の温度にて12 ~ 24時間の時間間隔にわたるかき混ぜない保持時間の後に、これまでに可溶性のタンパク質のかなりの部分が、固体沈殿物として溶液から落下し、溶液中に残っている多糖の損失と分解はほとんどなかった。次いで、沈殿物を含む溶液を、連続流遠心分離と、続く、深層濾過および0.45 μm精密濾過により清澄化した。

20

## 【0121】

## 実施例6

30

血清型5肺炎球菌糖類-CRM<sub>197</sub>コンジュゲートの調製

## 活性化およびコンジュゲーション

40

血清型5糖類の容器を解凍し、反応容器中で合わせた。容器に、0.1 M酢酸ナトリウム、pH 4.7を添加し、続いて、23にて16 ~ 22時間にわたるインキュベーションによる過ヨウ素酸ナトリウム存在下の酸化を行った。

## 【0122】

活性化反応混合物を、100 K MWCO膜を使用し、WF1で10倍に濃縮および透析濾過した。保持液を0.2 μmフィルターに通して濾過した。

## 【0123】

血清型5活性化糖類を、0.8 : 1の比でCRM<sub>197</sub>と合わせた。合わせた糖類/タンパク質溶液を、100 mLガラス凍結乾燥ボトル(50 mL目標充填)に充填し、-75にてシェル凍結し、共凍結乾燥した。

50

## 【0124】

共凍結乾燥材料のボトルを室温にし、0.1Mリン酸ナトリウム、pH 7.5中に再懸濁し、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加した。反応物を72時間にわたって30にてインキュベートし、続いて、シアノ水素化ホウ素の2回目の添加を行い、20~28時間にわたって30にてインキュベートした。

## 【0125】

シアノ水素化ホウ素インキュベーションの後に、反応混合物を生理食塩水で2倍に希釈し、0.45~5  $\mu$ mプレフィルターに通して保持液容器中に移した。反応混合物を、0.01Mリン酸塩緩衝液、pH 8で30倍に、0.15Mリン酸塩緩衝液、pH 6で20倍に、生理食塩水で20倍に透析濾過した。保持液を0.2  $\mu$ mフィルターに通して濾過した。

10

## 【0126】

コンジュゲート溶液を希釈し、0.5 mg / mLの糖類目標とし、次いで、クラス100フード内のFBC容器中に滅菌濾過した。コンジュゲートを2~8にて保存した。

## 【0127】

コンジュゲートのキャラクタリゼーションについては、実施例2を参照されたい。

## 【0128】

## 実施例7

## ストレプトコッカス・ニューモニアエ莢膜多糖血清型6Aの調製

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型6Aは、State University of New York、Brooklyn、New YorkのDr. Gerald Schiffmanから入手した。セルバンクシステムの調製については、実施例1を参照されたい。多糖の発酵、集菌、および精製については、精製中に、クロマトグラフィー工程の前に、30kDa MWCO濃縮工程を省略することを除き、実施例1を参照されたい。

20

## 【0129】

## 実施例8

血清型6A肺炎球菌糖類-CRM<sub>197</sub>コンジュゲートの調製

## 活性化およびコンジュゲーション

血清型6A多糖は、酸化前にサイズを縮小しなければならなかった高分子量ポリマーである。血清型6A糖類の容器を解凍し、反応容器中に合わせた。容器に、60にて1.5時間にわたる加水分解のために、2M酢酸を添加して0.1Mの最終濃度とした。反応物を23まで冷却し、中和を、反応混合物を1M NaOHでpH 6に調整することにより行った。過ヨウ素酸ナトリウム存在下の酸化を、14~22時間にわたる23におけるインキュベーションにより行った。

30

## 【0130】

活性化反応混合物を、100K MWCO膜を使用し、WF1で10倍に濃縮および透析濾過した。保持液を0.2  $\mu$ mフィルターに通して濾過した。

## 【0131】

血清型6Aを、ショ糖と混ぜ合わせ、100mLガラス凍結乾燥ボトル(50mL目標充填)に充填し、-75にてシェル凍結し、凍結乾燥した。

40

## 【0132】

凍結乾燥した材料のボトルを室温とし、1:1の糖類/タンパク質の比でジメチルスルホキシド(DMSO)中に再懸濁した。シアノ水素化ホウ素ナトリウムの添加の後に、反応混合物を18時間にわたって23にてインキュベートした。シアノ水素化ホウ素インキュベーションの後に、反応混合物を冷たい生理食塩水で希釈した。未反応アルデヒドを、3~20時間にわたる23におけるインキュベーションにより、水素化ホウ素ナトリウムの添加によりクエンチした。

## 【0133】

希釈した反応混合物を、5  $\mu$ mプレフィルターに通して保持液溶液中に移した。反応混

50

合物を、0.9% NaClで10倍に、およびコハク酸塩-緩衝NaClで30倍に透析濾過した。保持液を0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0134】

コンジュゲート溶液を希釈し、0.5mg/mLの糖類目標とし、次いで、クラス100フード内のFBC容器中に滅菌濾過した。コンジュゲートを2~8にて保存した。

【0135】

コンジュゲートのキャラクタリゼーションについては、実施例2を参照されたい。

【0136】

実施例9

ストレプトコッカス・ニューモニアエ莢膜多糖血清型7Fの調製

10

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型7Fは、State University of New York, Brooklyn, New YorkのDr. Gerald Schiffmanから入手した。セルバンクシステムの調製、ならびに多糖の発酵および集菌については、実施例3を参照されたい。代替発酵プロセスおよび集菌プロセスについては、実施例1に記載されている代替プロセスを参照されたい。

【0137】

精製

肺炎球菌多糖の精製は、いくつかの濃縮/透析濾過操作、沈殿/溶出、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過工程からなっていた。すべての手順は、特別の定めのない限り、室温にて行った。

20

【0138】

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型7Fの発酵槽培養物からの清澄化プロセスを、100kDa MWCOフィルターを使用して濃縮および透析濾過した。透析濾過は、中性pHにてリン酸ナトリウム緩衝液を使用して行った。透析濾過は、核酸、タンパク質および多糖などの高分子量バイオポリマーから低分子量培地成分を除去した。

【0139】

血清型7Fは、HBと沈殿物を形成しない。その代わり、不純物を、ストック溶液からのHBを添加して1%HBの最終濃度とすることにより、濃縮および透析濾過した溶液から沈殿させた。沈殿物をデブスフィルター上に捕捉し、フィルターを廃棄した。多糖は、濾液中に含有されていた。

30

【0140】

ヨウ化ナトリウム(NaI)を、ストックNaI溶液から多糖溶液に添加して0.5%の最終濃度とし、HBを沈殿させた。沈殿物を深層濾過により除去した。濾液は、目標多糖を含有していた。沈殿容器およびフィルターをNaCl/NaI溶液ですすぎ、すすぎ液を、部分的に精製した多糖溶液と合わせた。フィルターを廃棄した。次いで、多糖を、0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0141】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、塩化ナトリウム溶液で透析濾過した。

40

【0142】

部分的に精製した多糖溶液を、活性炭を含浸させたデブスフィルターに通して濾過することによりさらに精製した。濾過の後に、炭素フィルターを塩化ナトリウム溶液ですすぎだ。すすぎ液を多糖溶液と合わせ、次いで、0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0143】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、1Mリン酸ナトリウム緩衝液で調整して0.025Mリン酸ナトリウムの最終濃度とした。pHをチェックし、7.0±0.2に調整した。

【0144】

セラミックヒドロキシアパタイト(HA)カラムを、塩化ナトリウムを含有するリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化して適切な伝導率(15μS)とした。次いで、多糖溶液を、

50

カラム上にロードした。これらの条件下で、樹脂および多糖に結合している不純物を、カラムからのフロースルー中に回収した。多糖を、緩衝液と共にカラムに通して流し、0.2  $\mu$ m フィルターに通して濾過した。

【0145】

多糖溶液を、30 kDa MWCO フィルターを使用して濃縮した。次いで、濃縮物を、WFI で透析濾過した。

【0146】

透析濾過した多糖溶液を、0.2  $\mu$ m 膜フィルターに通してステンレス鋼容器中に濾過した。サンプルを、遊離試験のために取り出し、精製多糖を2~8にて保存した。

【0147】

多糖のキャラクタリゼーションについては、実施例3を参照されたい。

【0148】

実施例10

血清型7F肺炎球菌糖類-CRM<sub>197</sub>コンジュゲートの調製

活性化およびコンジュゲーション

過ヨウ素酸ナトリウム存在下の酸化を、23における16~24時間にわたるインキュベーションにより行った。

【0149】

活性化反応混合物を、100kMWCO膜を使用して10mM NaOAc、pH4.5で10倍に濃縮および透析濾過した。保持液を0.2  $\mu$ m フィルターに通して濾過した。

【0150】

血清型7Fを、100mLガラス凍結乾燥ボトル(50mL目標充填)に充填し、-75にてシェル凍結し、凍結乾燥した。

【0151】

凍結乾燥した血清型7FおよびCRM<sub>197</sub>のボトルを室温とし、1.5:1の糖類/タンパク質の比でDMSO中に再懸濁した。シアノ水素化ホウ素ナトリウムの添加の後に、反応物を8~10時間にわたって23にてインキュベートした。未反応アルデヒドを、16時間にわたる23におけるインキュベーションにより、水素化ホウ素ナトリウムの添加によりクエンチした。

【0152】

反応混合物を冷たい生理食塩水で10倍に希釈し、5  $\mu$ m プレフィルターに通して保持液容器中に移した。反応混合物を、0.9%生理食塩水で10倍に、コハク酸塩-緩衝生理食塩水で30倍に透析濾過した。保持液を0.2  $\mu$ m フィルターに通して濾過した。

【0153】

コンジュゲート溶液を希釈し、0.9%生理食塩水1mL当たり0.5mgの糖類目標として、次いで、クラス100フード内のFBC容器中に滅菌濾過した。コンジュゲートを2~8にて保存した。

【0154】

コンジュゲートのキャラクタリゼーションについては、実施例4を参照されたい。

【0155】

実施例11

ストレプトコッカス・ニューモニアエ莢膜多糖血清型19Aの調製

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型19Aは、State University of New York、Brooklyn、New York の Dr. Gerald Schiffman から入手した。セルバンクシステムの調製については、実施例1を参照されたい。多糖の発酵、集菌、および精製については、実施例7を参照されたい。キャラクタリゼーションについては、実施例3を参照されたい。

【0156】

実施例12

10

20

30

40

50

血清型 19 A 肺炎球菌糖類 - C R M<sub>19</sub>コンジュゲートの調製

## 活性化およびコンジュゲーション

血清型 19 A 糖類の容器を解凍し、反応容器中で合わせた。酢酸ナトリウムを添加して 10 mM (pH 5.0) とし、酸化を、23 における 16 ~ 24 時間にわたるインキュベーションにより過ヨウ素酸ナトリウムの存在下で行った。

## 【0157】

活性化反応混合物を、100 K MWCO 膜を使用して 10 mM 酢酸、pH 5.0 で 10 倍に濃縮および透析濾過した。保持液を 0.2 μm フィルターに通して濾過した。

## 【0158】

活性化糖類をショ糖と混ぜ合わせ、続いて CRM<sub>19</sub>を添加した。血清型 19 A 活性化糖類および CRM<sub>19</sub>混合物 (0.8 : 1 比) を、100 mL ガラス凍結乾燥ボトル (50 mL 目標充填) に充填し、-75 にてシェル凍結し、凍結乾燥した。

## 【0159】

凍結乾燥した材料のボトルを室温とし、DMSO 中に再懸濁した。糖類 / タンパク質混合物に、シアノ水素化ホウ素ナトリウム (100 mg / mL) を添加した。反応物を 15 時間にわたって 23 にてインキュベートした。シアノ水素化ホウ素インキュベーションの後に、未反応アルデヒドを、3 ~ 20 時間にわたる 23 におけるインキュベーションにより、水素化ホウ素ナトリウムの添加によりクエンチした。

## 【0160】

反応混合物を冷たい生理食塩水で 10 倍に希釈し、5 μm プレフィルターに通して保持液容器中に移した。反応混合物を、0.45 μm フィルターで濾過した 0.9% NaCl で 10 倍に、5 mM コハク酸 / 0.9% NaCl 緩衝液、pH 6 を使用する透析濾過で 30 倍に透析濾過した。保持液を 0.2 μm フィルターに通して濾過した。

## 【0161】

コンジュゲート溶液を、5 mM コハク酸塩 / 0.9% 生理食塩水を使用して 0.5 mg / mL の目標まで希釈し、次いで、クラス 100 フード内の FBC 容器中に滅菌濾過した。コンジュゲートを 2 ~ 8 にて保存した。

## 【0162】

コンジュゲートのキャラクタリゼーションについては、実施例 4 を参照されたい。

## 【0163】

## 実施例 13

ストレプトコッカス・ニューモニアエ莢膜多糖血清型 4、6B、9V、14、18C、19F、および 23F の調製

## ストレプトコッカス・ニューモニアエシード培養物の調製

ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型 4、6B、9V、18C、19F、および 23F は、Dr. Gerald Schiffman, State University of New York, Brooklyn, New York から入手した。ストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型 14 は、ATCC、6314 株から得た。

## 【0164】

別々に、ストレプトコッカス・ニューモニアエの望ましい血清型のそれぞれの 1 つのバイアルを使用し、発酵バッチを開始した。大豆ベースの培地およびフェノールレッドを含有する 2 つのボトルを、炭酸ナトリウムを使用して 7.4 ± 0.2 の pH 範囲に調整し、次いで、必要容量の 50% ブドウ糖 / 1% 硫酸マグネシウム溶液をボトルに添加した。2 つのボトルに、異なる量のシードを接種した。ボトルを、培地が黄色に変わるまで、36 ± 2 にてインキュベートした。インキュベーションの後に、サンプルを、各ボトルから取り出し、光学密度 (OD) (0.3 ~ 0.9) および pH (4.6 ~ 5.5) について試験した。2 つのボトルのうちの 1 つを、シード発酵槽の接種用に選択した。

## 【0165】

大豆ベースの培地をシード発酵槽に移し、滅菌した。次いで、ある容量の 50% ブドウ糖 / 1% 硫酸マグネシウム溶液を発酵槽に添加した。シード発酵槽の pH およびかき混ぜ

10

20

30

40

50

をモニターおよび制御した( pH 6.7 ~ 7.4)。温度を 36 ± 2 に維持した。シード接種物(ボトル)を、シード発酵槽と無菌的に連結し、接種物を移した。発酵槽を pH 制御で維持し、サンプルを定期的に取り出し、OD および pH について試験した。600 nm にて 0.5 の望ましい OD に達した場合、中間発酵槽に、シード発酵槽からの発酵プロスを接種した。

【0166】

大豆ベースの培地を中間発酵槽に移し、滅菌した。次いで、ある容量の 50% ブドウ糖 / 1% 硫酸マグネシウム溶液を発酵槽に添加した。中間発酵槽の pH およびかき混ぜをモニターおよび制御した( pH 6.7 ~ 7.4)。温度を 36 ± 2 に維持した。シード発酵槽の内容物を中間発酵槽に移した。発酵槽を pH 制御で維持し、サンプルを定期的に取り出し、OD および pH について試験した。600 nm にて 0.5 の望ましい OD に達した場合、生産発酵槽に、中間発酵槽からの発酵プロスを接種した。

10

【0167】

大豆ベースの培地を生産発酵槽に移し、滅菌した。次いで、ある容量の 50% ブドウ糖 / 1% 硫酸マグネシウム溶液を発酵槽に添加した。生産発酵槽の pH およびかき混ぜをモニターおよび制御した( pH 6.7 ~ 7.4)。温度を 36 ± 2 に維持した。発酵が終了するまで、発酵槽を pH 制御で維持し、サンプルを定期的に取り出し、OD および pH について試験した。

【0168】

デオキシコール酸ナトリウムを発酵槽に添加して約 0.12% w/v の最終濃度とした。培養物を最短で 30 分にわたって混合し、温度設定点を 10 まで下げた。培養物を一夜にわたってインキュベートし、不活化を確認した後に、培養物の pH を、必要に応じて、50% 酢酸で 6.4 ~ 6.8 に調整した。発酵槽の温度を 20 ± 5 まで上げ、内容物を清澄化保持タンクに移した。

20

【0169】

清澄化保持タンクの内容物(細胞残屑を包含する)を、1 時間当たり 25 ~ 600 リットルの流量にて遠心機により処理した(細胞残屑を廃棄し、流量を 1 時間当たり 25 ~ 250 リットルに固定した血清型 4 を除いて)。上清のサンプルを取り出し、OD について試験した。遠心分離中の望ましい OD を 0.15 以下とした。

【0170】

30

初めに、上清を、0.05 ± 0.03 の OD が得られるまで、デブスフィルターアセンブリに通して再循環した。次いで、上清を、デブスフィルターアセンブリおよび 0.45 μm 膜フィルターに通して 濾液保持タンクに移した。

【0171】

続いて、生成物を、閉管に通して処理用の精製領域に移した。

【0172】

上記の操作(遠心分離、濾過および移送)はすべて、10 ~ 30 にて行った。

【0173】

血清型 4 および 6B についての代替発酵プロセスおよび集菌プロセスについては、実施例 1 に記載されている代替プロセスを参照されたい。

40

【0174】

精製

各肺炎球菌多糖の精製は、いくつかの濃縮 / 透析濾過操作、沈殿 / 溶出、カラムクロマトグラフィー、および深層濾過工程からなっていた。すべての手順は、特別の定めのない限り、室温にて行った。

【0175】

望ましいストレプトコッカス・ニューモニアエ血清型の発酵槽培養物からの清澄化プロスを、100 kDa MWCO フィルターを使用して濃縮および透析濾過した。透析濾過は、9.0 未満の pH にてリン酸ナトリウム緩衝液を使用して行った。透析濾過は、核酸、タンパク質、および多糖などの高分子量バイオポリマーから低分子量培地成分を除去し

50

た。

【0176】

多糖を、ストック溶液からのHBを添加して1%HB(w/v)の最終濃度とすることにより、濃縮および透析濾過した溶液から沈殿させた(2.5%の最終濃度であった血清型23Fを除いて)。多糖/HB沈殿物をデブスフィルター上に捕捉し、濾液を廃棄した(注:血清型14は沈殿しない。したがって、濾液を保持した)。多糖沈殿物を、沈殿物を含有するデブスフィルターに通して塩化ナトリウム溶液を再循環することにより再可溶化および溶出した。次いで、フィルターを、追加の塩化ナトリウム溶液ですすいだ。

【0177】

ヨウ化ナトリウム(NaI)を、ストックNaI溶液から多糖溶液に添加して0.5%の最終濃度とし、HBを沈殿させた(0.25%の最終濃度であった血清型6Bを除いて)。沈殿物を深層濾過により除去した。濾液は、目標多糖を含有していた。フィルターを廃棄した。次いで、多糖を0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0178】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、塩化ナトリウム溶液で透析濾過した。

【0179】

部分的に精製した多糖溶液を、活性炭を含浸させたデブスフィルターに通して濾過することによりさらに精製した。濾過の後に、炭素フィルターを塩化ナトリウム溶液ですすいだ。すすぎ液を多糖溶液と合わせ、次いで、0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0180】

多糖溶液を、30kDa MWCOウルトラフィルター上にて濃縮し、フィルターを、塩化ナトリウム溶液ですすいだ。pHをチェックし、7.0±0.3に調整した。

【0181】

セラミックヒドロキシアパタイト(HA)カラムを、pHが7.0±0.3になり伝導率が26±4μSになるまで、塩化ナトリウムを含有するリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化した。次いで、多糖溶液をカラム上にロードした。これらの条件下で、樹脂および多糖に結合している不純物を、カラムからのフロースルー中に回収した。多糖溶液を、0.2μmフィルターに通して濾過した。

【0182】

多糖溶液を、30kDa MWCOフィルターを使用して濃縮した。次いで、濃縮物を、伝導率が15μS未満になるまで、WF1で透析濾過した。

【0183】

透析濾過した多糖溶液を、0.2μm膜フィルターに通してバルク容器中に濾過し、2~8にて保存した。

【0184】

実施例14

肺炎球菌糖類-CRM<sub>197</sub>コンジュゲートの調製

血清型4、6B、9V、14、18C、19F、および23Fについて

活性化プロセス

異なる血清型糖類は、この実施例に記載されているように、活性化(活性化前に加水分解するかまたは加水分解しない)およびコンジュゲーション(水性またはDMSO反応)のための異なる経路に従う。

【0185】

多糖を、バルク容器から反応器に移した。次いで、多糖を、WF1およびリン酸ナトリウム中で希釈して1.6~2.4mg/mLの最終濃度範囲とした。

【0186】

工程1.

血清型6B、9V、14、19F、および23Fについては、pHをpH6.0±0.3に調整した。

10

20

30

40

50

## 【0187】

血清型4については、塩酸（最終酸濃度0.01M）を添加し、溶液を45±2にて25~35分にわたってインキュベートした。加水分解を、21~25まで冷却し、1Mリン酸ナトリウムを添加してpH6.7±0.2の目標とすることにより停止させた。インプロセス試験を行い、適切なレベルの脱ピルビル化を確認した。

## 【0188】

血清型18Cについては、氷酢酸（0.2M最終酸濃度）を添加し、溶液を94±2にて205~215分にわたってインキュベートした。次いで、温度を21~25まで下げ、1~2Mリン酸ナトリウムを添加してpH6.8±0.2の目標とした。

## 【0189】

## 工程2：過ヨウ素酸反応

10

肺炎球菌糖類活性化に必要とされる過ヨウ素酸ナトリウムモル当量は、総糖類含有量を使用して決定した（血清型4を除いて）。血清型4については、糖類1モル当たり過ヨウ素酸ナトリウム0.8~1.2モルの比を使用した。十分に混合しながら、酸化反応を、温度が15以下である19Fを除くすべての血清型について、21~25にて16~20時間で進行させた。

## 【0190】

## 工程3：限外濾過

酸化した糖類を、100kDa MWCOウルトラフィルター（18Cについては5kDaウルトラフィルター）上にてWFI（血清型19Fについては0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液pH6.0）で濃縮および透析濾過した。浸透液を廃棄し、保持液を0.22μmフィルターに通して濾過した。

20

## 【0191】

## 工程4：凍結乾燥

血清型4、9V、および14については、濃縮糖類をCRM<sub>197</sub>担体タンパク質と混合し、ガラスボトルに充填し、シェル凍結し、-65以下にて保存した。凍結した濃縮糖類-CRM<sub>197</sub>を凍結乾燥し、次いで、-25±5にて保存した。

## 【0192】

血清型6B、19F、および23Fについては、コンジュゲーション反応混合物中で5%±3%ショ糖濃度となるように計算された指定量のショ糖を添加した。血清型18Cは、ショ糖添加を必要としなかった。次いで、濃縮糖類をガラスボトルに充填し、シェル凍結し、-65以下にて保存した。凍結した濃縮糖類を凍結乾燥し、次いで、-25±5にて保存した。

30

## 【0193】

## コンジュゲーションプロセス

2種類のコンジュゲーションプロセス、すなわち、血清型4、9V、14および18Cについては水性コンジュゲーション、血清型6B、19Fおよび23FについてはDMSOコンジュゲーションを使用した。

## 【0194】

## 水性コンジュゲーション

40

## 工程1：溶解

血清型4、9V、および14については、凍結乾燥した活性化糖類-CRM<sub>197</sub>混合物を解凍し、室温にて平衡化した。次いで、凍結乾燥した活性化糖類-CRM<sub>197</sub>を、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液中で、

- ・血清型4および9Vについては、糖類16~24g当たり緩衝液1L
  - ・血清型14については、糖類6~10g当たり緩衝液1L
- の典型的な比で再構成した。

## 【0195】

反応混合物を、完全に溶解するまで、血清型9Vについては37±2にて、血清型4および14については23±2にてインキュベートした。

50

## 【0196】

血清型18Cについては、凍結乾燥した糖類を、CRM<sub>1,9,7</sub>溶液1L当たりリン酸ナトリウム0.11Lの典型的な比で、1M第二リン酸ナトリウム中のCRM<sub>1,9,7</sub>の溶液中で再構成した。反応混合物(8~12g/L糖類濃度)を、完全に溶解するまで、23±2にてインキュベートした。

## 【0197】

pHは、この段階でインプロセスコントロールとして試験した。

## 【0198】

## 工程2：コンジュゲーション反応

血清型4および9Vについては、コンジュゲーション反応を、シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液(100mg/mL)を添加して糖類1モル当たりシアノ水素化ホウ素ナトリウム1.0~1.4モルとすることにより開始させた。反応混合物を37±2にて44~52時間にわたってインキュベートした。次いで、温度を23±2まで下げ、塩化ナトリウム0.9%を反応器に添加した。水素化ホウ素ナトリウム溶液(100mg/mL)を添加して糖類1モル当たり水素化ホウ素ナトリウム1.8~2.2モル当量とした。混合物を23±2にて3~6時間にわたってインキュベートした。混合物を塩化ナトリウム0.9%で希釈し、反応器をすすいだ。希釈したコンジュゲーション混合物を、1.2μmのプレフィルターを使用して保持容器中に濾過した。

## 【0199】

血清型14および18Cについては、コンジュゲーション反応を、シアノ水素化ホウ素溶液(100mg/mL)を添加して糖類1モル当たりシアノ水素化ホウ素ナトリウム1.0~1.4モルとすることにより開始させた。反応混合物を23±2にて12~24時間にわたってインキュベートした。温度を37±2まで上げ、反応物を72~96時間にわたってインキュベートした。次いで、温度を23±2まで下げ、0.9%塩化ナトリウムを反応器に添加した。水素化ホウ素ナトリウム溶液(100mg/mL)を添加して糖類1モル当たり水素化ホウ素ナトリウム1.8~2.2モル当量とした。混合物を23±2にて3~6時間にわたってインキュベートした。混合物を0.9%塩化ナトリウムで希釈し、反応器をすすいだ。次いで、希釈したコンジュゲーション混合物を、1.2μmプレフィルターを使用して保持容器中に濾過した。

## 【0200】

## 工程3：限外濾過100kDa

希釈したコンジュゲーション混合物を、100kDa MWCOウルトラフィルター上にて最少で15容量(血清型4)か40容量(血清型9V、14、および18C)のどちらかの0.9%塩化ナトリウムで濃縮および透析濾過した。

## 【0201】

浸透液を廃棄した。

## 【0202】

血清型4については、保持液を0.45μmフィルターに通して濾過した。

## 【0203】

インプロセスコントロール(糖類含有量)は、この工程で行った。

## 【0204】

## 工程4：HAカラム精製

この工程は、血清型4コンジュゲートについてのみ行った。

## 【0205】

HAカラムを、まず、0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液を使用して中和し(pH7.0±0.3)、次いで、0.9%の塩化ナトリウムで平衡化した。濾過した保持液(血清型4)を、1.0L/分の流量にてカラムにロードした。カラムを、2.0L/分以下の流量にて0.9%塩化ナトリウムで洗浄した。次いで、生成物を、2.0L/分以下の流量にて0.5Mのリン酸ナトリウム緩衝液で溶出した。

## 【0206】

10

20

30

40

50

次いで、H A画分を、1 0 0 k D a M W C O膜上にて最少で2 0容量の0 . 9%塩化ナトリウムで濃縮および透析濾過した。浸透液を廃棄した。

【0 2 0 7】

工程5：滅菌濾過

1 0 0 k D a M W C O透析濾過の後の保持液を0 . 2 2  $\mu$ mフィルターに通して濾過した。インプロセスコントロール（糖類含有量、遊離タンパク質、遊離糖類およびシアノ化物）を、濾過した生成物について行った。濾過した保持液に対するインプロセスコントロールを行い、F B C目標を満たすために追加の濃縮、透析濾過、および／または希釈が必要か否かを決定した。これらの試験および追加試験をF B Cサンプルで繰り返した。

【0 2 0 8】

必要に応じて、濾過したコンジュゲートを、0 . 9%塩化ナトリウムで希釈して0 . 55 g / L未満の最終濃度とした。糖類含有量、タンパク質含有量および糖類：タンパク質比についての遊離試験をこの段階で行った。

【0 2 0 9】

最後に、コンジュゲートを濾過し(0 . 2 2  $\mu$ m)、2 . 6 4 g / キャニスターの典型的な量で1 0 Lステンレス鋼キャニスターに充填した。この段階で、収率、糖類含有量、タンパク質含有量、p H、糖類：タンパク質比、およびリシン含有量を、インプロセスコントロールとして行った。遊離試験（外観、遊離タンパク質、遊離糖類、内毒素、分子サイズ決定、残留シアノ化物、糖類同一性、C R M<sub>1,9</sub>同一性）をこの段階で行った。

【0 2 1 0】

D M S Oコンジュゲーション

工程I：溶解

凍結乾燥した活性化糖類血清型6 B、1 9 F、2 3 F、および凍結乾燥したC R M<sub>1,9</sub>、担体タンパク質を室温にて平衡化し、D M S O中で再構成した。溶解濃度は、典型的には、D M S O 1リットル当たり糖類2 ~ 3グラム(2 ~ 2 . 5 gタンパク質)の範囲であった。

【0 2 1 1】

工程I I：コンジュゲーション反応

活性化糖類およびC R M<sub>1,9</sub>担体タンパク質を、血清型6 Bおよび1 9 FについてはC R M<sub>1,9</sub> 1 g当たり糖類0 . 6 ~ 1 . 0 gの比範囲で、または血清型2 3 FについてはC R M<sub>1,9</sub> 1 g当たり糖類1 . 2 ~ 1 . 8 gの比範囲で、2 3  $\pm$  2にて6 0 ~ 7 5分にわたって混合した。

【0 2 1 2】

コンジュゲーション反応を、活性化糖類1モルに対するシアノ水素化ホウ素ナトリウム0 . 8 ~ 1 . 2モル当量の比でシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液(1 0 0 m g / m L)を添加することにより開始させた。W F Iを、反応混合物に添加して1% (v / v)の目標とし、混合物を、2 3  $\pm$  2にて4 0時間以上にわたってインキュベートした。

【0 2 1 3】

水素化ホウ素ナトリウム溶液、1 0 0 m g / m L（典型的には、活性化糖類1モル当たり水素化ホウ素ナトリウム1 . 8 ~ 2 . 2モル当量）およびW F I（目標5% v / v）を反応物に添加し、混合物を2 3  $\pm$  2にて3 ~ 6時間にわたってインキュベートした。この手順は、糖類上に存在する未反応アルデヒドを減らした。次いで、反応混合物を、1 5未満にて0 . 9%塩化ナトリウムを含有する希釈タンクに移した。

【0 2 1 4】

工程I I I：1 0 0 k D a限外濾過

希釈したコンジュゲート混合物を、1 . 2  $\mu$ mフィルターに通して濾過し、1 0 0 k D a M W C O膜上にて最少で1 5容量の0 . 9%塩化ナトリウム（血清型2 3 Fについては、0 . 0 1 Mリン酸ナトリウム／0 . 0 5 M N a C 1緩衝液を使用した）で濃縮および透析濾過した。浸透液を廃棄した。保持液を0 . 4 5  $\mu$ mフィルターに通して濾過した。インプロセス糖類含有量サンプルをこの段階で採取した。

10

20

30

40

50

## 【0215】

## 工程Ⅴ：D E A E カラム精製

この工程は、血清型23Fについてのみ行った。

## 【0216】

D E A E カラムを、0.01Mリン酸ナトリウム／0.05M塩化ナトリウム緩衝液で平衡化した。濾過した保持液（血清型23F）をカラム上にロードし、0.01Mリン酸ナトリウム／0.05M塩化ナトリウム緩衝液で洗浄した。次いで、カラムを、0.01Mリン酸ナトリウム／0.9%NaCl緩衝液で洗浄した。次いで、生成物を、0.01Mリン酸ナトリウム／0.5M塩化ナトリウム緩衝液で溶出した。

## 【0217】

10

## 工程V：100kDa限外濾過

6Bおよび19Fからの保持液を、少なくとも30容量の0.9%塩化ナトリウムで濃縮および透析濾過した。浸透液を廃棄した。

## 【0218】

血清型23Fからの溶出液を、最少で20容量の0.9%塩化ナトリウムで濃縮および透析濾過した。浸透液を廃棄した。

## 【0219】

## 工程VⅠ：滅菌濾過

100kDa MWCO透析濾過の後の保持液を、0.22μmフィルターに通して濾過した。インプロセスコントロール（糖類含有量、遊離タンパク質、遊離糖類、残留DM SOおよび残留シアン化物）を、濾過した生成物で行った。濾過した保持液に対するインプロセスコントロールを行い、FBC目標を満たすために追加の濃縮、透析濾過、および／または希釈が必要か否かを決定した。これらの試験および追加試験を、FBCサンプルで繰り返した。

20

## 【0220】

必要に応じて、濾過したコンジュゲートを0.9%塩化ナトリウムで希釈して0.55g/L未満の最終濃度とした。糖類含有量、タンパク質含有量、および糖類：タンパク質の比についての遊離試験をこの段階で行った。

## 【0221】

最後に、コンジュゲートを濾過し（0.22μm）、2.64g/キャニスターの量で10Lステンレス鋼キャニスターに充填した。この段階で、収率、糖類含有量、タンパク質含有量、pH、糖類：タンパク質比およびリシン含有量を、インプロセスコントロールとして行った。遊離試験（外観、遊離タンパク質、遊離糖類、内毒素、分子サイズ決定、残留シアン化物、糖類同一性、CRM<sub>197</sub>同一性）をこの段階で行った。

30

## 【0222】

## 実施例15

## 多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤化

13種類のコンジュゲートの最終バルク濃縮物は、0.85%塩化ナトリウムを含有する。タイプ3、6A、7F、および19Aバルク濃縮物は、pH 5.8の5mMコハク酸ナトリウム緩衝液も含有する。バルク濃縮物の必要容量を、バッチ容量およびバルク糖類濃度に基づいて計算した。0.85%塩化ナトリウム（生理食塩水）の80%および必要量のコハク酸塩緩衝液を、予め標識した製剤化容器に添加した後に、バルク濃縮物を添加した。次いで、調製物を、Millipore Durapore膜フィルターユニットを使用することにより0.22μm膜に通して第2の容器中に滅菌濾過した。第1の容器を、0.85%塩化ナトリウムの残りの20%で洗浄し、溶液を同じフィルターに通過させ、第2の容器中に集めた。製剤化したバルクを、バルクリン酸アルミニウムの添加の間および添加の後に穏やかに混合した。必要に応じて、pHをチェックし調整した。製剤化したバルク生成物を2~8にて保存した。

40

## 【0223】

## 製剤化したバルク生成物を、Becton Dickinsonから入手したタイプ1

50

ホウケイ酸塩ガラスシリンジに充填した。ワクチンを、濁度について一定の間隔をおいてモニターし、充填操作の均一性を確保した。充填したワクチン（最終製品）を2～8にて保存した。

【0224】

実施例16

13価コンジュゲートワクチンの免疫原性

今日まで、13vPnCワクチンに関する前臨床研究をウサギで行ってきた。研究#HT01-0021および#HT01-0036は、ストレプトコッカス・ニューモニアエ由来の莢膜多糖（PS）のCRM<sub>197</sub>との化学的コンジュゲーションの効果、およびウサギにおける13vPnCワクチンへの免疫応答に対するリン酸アルミニウム（AlPO<sub>4</sub>）アジュバントの効果を独立して調べるために設計された。これらの効果を、血清IgG濃度については抗原特異的ELISAにより、抗体機能についてはオプソニン食作用アッセイ（OPA）により特徴付けた。

【0225】

研究#HT01-0021

研究#HT01-0021は、AlPO<sub>4</sub>アジュバントを含む13vPnCワクチンがワクチン血清型特異的免疫応答を誘発する能力を調べた。13vPnCワクチンで表される肺炎球菌血清型は、タイプ1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fを包含する。第2の目的は、抗体応答の動力学および持続時間の評価を包含していた。ニュージーランド白色ウサギを、AlPO<sub>4</sub>（100μg/投与量）と共に、またはAlPO<sub>4</sub>なしで製剤化された各多糖の計画的ヒト臨床投与量（6Bの4μgを除いて、各PS 2μg）で0週目および2週目に筋肉注射で免疫化した。血清を様々な時点で集めた。血清型特異的IgGをELISAにより測定し、機能的活性をOPAにより評価した。

【0226】

表4は、13vPnCワクチンの2回投与の後に、プールした血清サンプルにおいて得られた幾何平均力価（GMT）を示している。IgG/GMTの比を使用し、4週目から0週目までの応答を比較した。これらのデータは、13vPnC製剤におけるAlPO<sub>4</sub>の包含が、アジュバントのない同じワクチンと比べ、より高いレベルのIgG抗体を誘発したことを立証している。抗体応答は、AlPO<sub>4</sub>が製剤中に含まれた場合により大きいが、これらの増加は、統計的に有意ではなかった。

【0227】

機能的抗体応答も、2種類の13vPnC製剤による免疫化の後にウサギで評価した（表5）。アジュバントを含む、またはアジュバントを含まないワクチン製剤を比較すると、より高いOPA GMTは、13vPnC+AlPO<sub>4</sub>ワクチン処置群で観測された。OPA力価は、両グループにおけるすべてのワクチン血清型に対して4週目の血清プールで検出された。血清型の大部分について、4週目に測定されたOPA力価は、0週目（ベースライン）のOPA力価に比べて少なくとも4倍高かった。

【0228】

13vPnCワクチン血清型のそれぞれに対する動力学的応答を、両処置群の血清プールから評価した。各血清型に対するIgG力価を、0週目ならびに、1、2、3、4、8、12、26、および39週目における採血から測定し、次いで、比較した。血清型1を除いて、アジュバント化ワクチンを受けた動物における抗体応答は、非アジュバント化ワクチンを受けた動物を上回り、免疫化スケジュールの2週目でピークに達した（データ省略）。

【0229】

全体として、データは、リン酸アルミニウムと共に製剤化された13vPnCワクチンが、ウサギにおいて免疫原性であり、ワクチンに含有される肺炎球菌莢膜多糖に対して実質的な抗体応答を誘発し、これらの応答が、機能的活性に関係していることを示している。13vPnC+AlPO<sub>4</sub>による免疫化の後に7種類の中核血清型に対して観測された

10

20

30

40

50

応答は、7価製剤に対するウサギの過去の応答と一致している。

【0230】

【表4】

ALPO <sub>4</sub> を含む希釈液 <sup>a</sup>	13價肺炎球菌グリココングリュゲートの2回投与による免疫化の後のウサギIgG免疫応答(GMT)						比 4週目:0週目	
	13vPnC <sup>a</sup>			13vPnC + ALPO <sub>4</sub> <sup>a</sup>				
	0週目	4週目	比	4週目	0週目	比		
1	<100	<100	1.0	50	5,926 (2,758-12,733)	119	50 (95% CI) 11,091 (5,327-23,093)	
3	<100	<100	1.0	50	6,647 (2,773-15,932)	133	58 (95% CI) 16,443 (7,096-38,106)	
4	<100	<100	1.0	50	13,554 (8,031-22,875)	271	50 (95% CI) 29,183 (15,342-55,508)	
5	134	<100	0.4	50	5,859 (2,450-14,009)	117	50 (95% CI) 16,714 (6,959-40,140)	
6A	141	<100	0.4	74	22,415 (11,987-41,914)	303	83 (95% CI) 63,734 (21,141-192,146)	
6B	<100	<100	1.0	57	8,108 (3,564-18,444)	142	54 (95% CI) 23,505 (11,286-48,955)	
7F	3,859	579	0.2	171	43,591 (26,931-70,557)	444	143 (95% CI) 84,888 (46,445-155,151)	
9V	289	995	3.4	205	15,780 (7,193-34,616)	125	208 (95% CI) 43,331 <sup>b</sup> (23,256-71,510)	
14	437	177	0.4	61	6,906 (3,416-13,962)	113	70 (95% CI) 16,076 (9,649-26,785)	
18C	<100	<100	1.0	50	21,283 (15,770-28,725)	426	50 (95% CI) 35,040 (24,708-49,692)	
19A	<100	<100	1.0	121	113,599 (54,518-236,707)	939	144 (95% CI) 280,976 (119,587-660,167)	
19F	<100	<100	1.0	50	14,365 (7,346-28,090)	287	50 (95% CI) 24,912 (9,243-67,141)	
23F	<100	<100	1.0	50	5,323 (1,894-14,962)	106	50 (95% CI) 15,041 (4,711-48,018)	

a.群内の個々のウサギからの等容量の血清からなるブーレした血清のGMT  
b. ALPO<sub>4</sub>なしの処置群と統計学的に異なる(p=0.022)

## 【表5】

表5.13価肺炎球菌グリココンジュゲートの2回投与による免疫化の後のNZWウサギ血清プールについてのストレプトコッカス・ニューモニアエOPA GMT

血清型	0週目	13vPnC <sup>a</sup>		13vPnC + ALPO <sub>4</sub> <sup>a</sup>		比 4週目:0週目
		4週目	比	0週目	4週目	
1	<8	64	16	<8	64	16
3	<8	8	2	<8	16	4
4	<8	16	4	<8	32	8
5	<8	128	32	<8	512	128
6A	8	128	16	8	512	64
6B	<8	256	64	8	1,024	128
7F	8	64	8	8	128	16
9V	8	64	8	8	128	16
14	16	32	2	16	32	2
18C	8	256	32	<8	256	64
19A	<8	256	64	<8	1,024	256
19F	<8	128	32	<8	512	128
23F	8	64	8	<8	256	64

A:処置群(n=12)内の個々のウサギからの等容量の血清からなるプール

20

## 【0232】

研究#HT01-0036

研究#HT01-0036は、CRM<sub>197</sub>タンパク質とのコンジュゲーションを含む、または含まない13vPnCワクチンによる免疫化の後の、ワクチンに含有される多糖(PS)に対するウサギ免疫応答を比較した。ニュージーランド白色サギを、各PS2.2μg(6Bの4.4μgを除いて)の投与量で、0週目および2週目に筋肉注射で免疫化した。動物は、3種類のワクチン調製物、すなわち、(a)13vPnC(CRM<sub>197</sub>に直接コンジュゲートしているPS)、(b)13vPnP(S(遊離PS)、または(c)13vPnP(S+CRM<sub>197</sub>(CRM<sub>197</sub>と混合された遊離PS)のうちの1つを受けた。すべてのワクチン調製物は、125μg/投与量でアジュバントとしてのAlPO<sub>4</sub>を含有していた。

30

## 【0233】

すべてのワクチン調製物についての血清型特異的免疫応答を、IgGELISAおよび機能的抗体を測定する補体介在性OPAで評価した。免疫応答を処置群間で比較した。

## 【0234】

表6は、抗原特異的IgGELISAで分析した4週目の血液から得られたGMTデータを示している。追加分析は、0週目に対する4週目のGMT値の比を示している。データは、コンジュゲートワクチン調製物が、遊離PSまたは遊離PS+CRM<sub>197</sub>ワクチンよりも高い血清IgG力を誘発したことを示している。ストレプトコッカス・ニューモニアエタイプ14を除いて、13vPnCワクチンは、OPAにおいてストレプトコッカス・ニューモニアエの代表的な株に対する機能的抗体を誘導することができた(表7)。13vPnP(Sか13vPnP(S+CRM<sub>197</sub>ワクチンのどちらかによる2種類の免疫化の後に、どちらも、測定した13種類のうちの10種類の血清型について、0週目に比べて4週目に8倍以上のOPA力を誘導することはできなかった(表7)。

40

## 【0235】

結論として、これらの結果は、13価肺炎球菌ワクチン多糖のコンジュゲーションが、遊離多糖単独または非コンジュゲートCRM<sub>197</sub>と混合された遊離多糖で見られるよりも高い血清IgG力を誘導する全般的な大きい機能的抗体活性を示している

50

◦  
【 0 2 3 6 】

【表6】

血清型	0週目 (95% CI)	4週目 (95% CI)		4週目:0週目 (95% CI)		4週目:0週目 (95% CI)		4週目:0週目 (95% CI)		4週目:0週目 (95% CI)	
		4週目	0週目	4週目:0週目	0週目	4週目	0週目	4週目:0週目	0週目	4週目	0週目
(CRM <sub>197</sub> と混合されたPS)											
1	378 (843-5,790)	2,290 (843-5,790)	5.8 (809-4,739)	395 (809-4,739)	1,959 (809-4,739)	5.0 (809-4,739)	472 (809-4,739)	35,970 (29,130-44,417)	35,970 (29,130-44,417)	76.2 (10,414-16,676)	76.2 (10,414-16,676)
3	57 (64-908)	240 (64-908)	4.2 (74-358)	89 (74-358)	163 (74-358)	1.8 (74-358)	50 (74-358)	50 (10,414-16,676)	50 (10,414-16,676)	208.3 (12,857-42,723)	208.3 (12,857-42,723)
4	50 (150-959)	379 (150-959)	7.6 (313-1,178)	50 (313-1,178)	607 (313-1,178)	12.1 (313-1,178)	50 (313-1,178)	50 (9,117-18,224)	50 (9,117-18,224)	257.8 (24,467-50,824)	257.8 (24,467-50,824)
5	343 (113-450)	226 (113-450)	4.5 (147-701)	50 (147-701)	321 (147-701)	6.4 (147-701)	50 (147-701)	50 (24,467-50,824)	50 (24,467-50,824)	705.3 (234,245-1,437.1)	705.3 (234,245-1,437.1)
6A	154 (316-688)	466 (316-688)	3.0 (95-464)	98 (95-464)	210 (95-464)	2.1 (95-464)	163 (95-464)	163 (167,152-328,283)	163 (167,152-328,283)	1,437.1 (1,437.1-2,222)	1,437.1 (1,437.1-2,222)
6B	63 (384-1,375)	727 (384-1,375)	11.6 (384-1,440)	62 (384-1,440)	745 (384-1,440)	12.0 (384-1,440)	12.0 (384-1,440)	131 (22,934-49,222)	131 (22,934-49,222)	256.5 (33,599-256.5)	256.5 (33,599-256.5)
7F	50 (39-95)	61 (39-95)	1.2 (47-111)	50 (47-111)	72 (47-111)	1.4 (47-111)	50 (47-111)	50 (24,350-52,347)	50 (24,350-52,347)	714.0 (24,350-52,347)	714.0 (24,350-52,347)
9V	50 (48-195)	104 (48-195)	2.1 (74-390)	55 (74-390)	169 (74-390)	3.0 (74-390)	50 (74-390)	50 (34,765-72,007)	50 (34,765-72,007)	1,000.7 (50,033-1,000.7)	1,000.7 (50,033-1,000.7)
14	66 (117-757)	298 (117-757)	4.5 (71-535)	50 (71-535)	195 (71-535)	3.9 (71-535)	50 (71-535)	50 (12,087-32,138)	50 (12,087-32,138)	402.4 (20,121-402.4)	402.4 (20,121-402.4)
18C	89 (655-3,688)	1,555 (655-3,688)	17.5 (300-1,935)	66 (300-1,935)	761 (300-1,935)	11.5 (300-1,935)	101 (300-1,935)	101 (32,745-124,641)	101 (32,745-124,641)	707.4 (71,451-707.4)	707.4 (71,451-707.4)
19A	50 (44-179)	89 (44-179)	1.8 (39-163)	50 (39-163)	80 (39-163)	1.6 (39-163)	50 (39-163)	50 (23,485-469.7)	50 (23,485-469.7)	469.7 (12,857-42,723)	469.7 (12,857-42,723)
19F	61 (559-3,317)	1,362 (559-3,317)	22.3 (370-2,654)	61 (370-2,654)	991 (370-2,654)	16.3 (370-2,654)	67 (370-2,654)	67 (19,358-288.9)	67 (19,358-288.9)	288.9 (12,553-33,173)	288.9 (12,553-33,173)
23F	73 (4,872,420)	1,085 (4,872,420)	14.9 (311-1,311)	121 (311-1,311)	638 (311-1,311)	5.3 (25,134-84,089)	68 (25,134-84,089)	68 (25,134-84,089)	68 (25,134-84,089)	676.1 (45,972-676.1)	676.1 (45,972-676.1)

## 【表7】

表7.13 僨肺炎球菌グリココンジュゲートの2回投与による免疫化の後のウサギ血清プールについてのストレプトコッカス・ニューモニアエOPA力価

血清型	OPA力価							
	無処置	13vPnPS (遊離PS)		13vPnPS + CRM <sub>197</sub> (CRM <sub>197</sub> と混合された 遊離PS)		13vPhC		10
		0週目 <sup>a</sup>	4週目	比	4週目	比	4週目	
				4週目:0週目		4週目:0週目		4週目:0週目
1	4	16	4		16	4	8	32
3	4	4	1		4	1	4	8
4	4	4	1		4	1	4	64
5	4	32	8		16	4	16	64
6A	8	64	8		32	4	32	664
6B	8	64	8		32	4	32	32
7F	16	32	2		16	1	16	16
9V	16	16	1		32	2	32	8
14	16	16	1		16	1	16	2
18C	4	16	4		16	4	8	64
19A	8	8	1		8	1	16	64
19F	4	4	1		4	1	8	64
23F	16	32	2		16	1	32	32

a:全群について0週目の値として使用した

## 【0238】

## 実施例17

血清型3肺炎球菌糖類-CRM<sub>197</sub>コンジュゲーションについての代替手順

## 【0239】

精製多糖の容器を解凍し、反応容器中で合わせ、85の温度まで加熱した。混合物の温度が、温度上昇中に約35に達した場合、2M酢酸を添加して0.1M酢酸濃度とした。混合物の温度が85に達した場合、1時間にわたってこの温度に維持し、加水分解/脱重合を行った。加水分解/脱重合した多糖を23まで冷却し、1M MgCl<sub>2</sub>を添加して0.1M MgCl<sub>2</sub>濃度とした。酸化を、WFI中の50mg/mL溶液として添加する過ヨウ素酸1~1.25モル当量を使用して行った。混合物を23で16~24時間インキュベートした。

## 【0240】

反応混合物を、100K MWCOポリエーテルスルホン(PES)膜を使用して10倍容量のWFIに対する透析濾過により精製した。精製した活性化多糖を、0.2Mリン酸塩緩衝液(pH7.0)を使用して6.0のpHに調整し、2:1の多糖/タンパク質比でCRM<sub>197</sub>と混ぜ合わせ、-75にてシェル凍結し、71時間にわたって共凍結乾燥した。共凍結乾燥の後に、多糖/CRM<sub>197</sub>混合物を、コンジュゲーションまで-25°±5にて保存した。コンジュゲーションについては、共凍結乾燥した多糖/CRM<sub>197</sub>混合物を、20mg/mL多糖の濃度で0.1Mリン酸塩緩衝液に溶かし、pHを、0.2Mリン酸塩緩衝液、pH4.6と1M NaOHの組合せで6.2に調整し、続いて、0.15Mリン酸塩緩衝液、pH7.5中の100mg/mL溶液としてシアノ水素化ホウ素ナトリウム0.5モル当量を添加した。反応混合物を、44時間にわたって37にて攪拌およびインキュベートした。シアノ水素化ホウ素インキュベーションの後に、反応混合物を、冷たい(2~8)0.9%生理食塩水で1倍に希釈し、続いて、W

10

20

30

40

50

F I 中の 100 mg / mL 溶液として水素化ホウ素ナトリウム 1 モル当量を添加し、3 ~ 6 時間にわたって 23 にて未反応アルデヒドをキャッピングした。

#### 【0241】

反応混合物を、0.45 ~ 5 μm プレフィルターに通して保持液容器中に移し、次いで、100 K MWCO 再生セルロース膜を使用する透析濾過により精製した。次いで、反応混合物を、0.1 M リン酸塩緩衝液、pH 9.0 に対して 30 倍に、および 0.15 M リン酸塩緩衝液、pH 6.0 に対して 20 倍に透析濾過した。最終 20 倍透析濾過を、5 mM コハク酸塩 / 0.9% 生理食塩水、pH 6.0 に対して行った。透析濾過したコンジュゲートを 0.2 μm フィルターに通して濾過し、糖類含有量についてアッセイした。糖類分析に基づき、コンジュゲート溶液を、0.5 mg / mL の目標まで 5 mM コハク酸塩 / 0.9% 生理食塩水、pH 6.0 で希釈し、再び滅菌濾過 (0.2 μm) すると、最終バッヂ濃縮物コンジュゲートが得られた。コンジュゲートを 2 ~ 8 にて保存した。

#### 【0242】

コンジュゲートのキャラクタリゼーションについては、実施例 4 を参照されたい。

#### 【0243】

上記の議論および実施例は、単に、特定の実施形態の詳細な説明を提示するものであることが理解されるべきである。したがって、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変形態および等価形態を製造することができる当業者に明らかにされるべきである。

#### 【0244】

本特許出願に規定されているすべての学術論文、他の参考文献、特許および特許出願は、全体として参考により組み込まれるものとする。

##### (参考文献)

1. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:100-21.
2. Hausdorff WP, Bryant J, Kloek C, Paradiso PR, Siber GR. The contribution of specific pneumococcal serogroups to different disease manifestations: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:122-40.
3. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *New Engl J Med* 2003; 348(18):1737-46.
4. Black S, Shinefield H, Hansen J, et al. Postlicensure evaluation of the effectiveness of seven valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:1105-7.
5. Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA* 2001; 285:1729-35.
6. Butler J, Breiman R, Lipman H, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994. *J Infect Dis* 1995; 171:885-9.
7. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343:1917-24.
8. Hofmann J, Cetron MS, Farley MM, et al. The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *N Engl J Med* 1995; 333:481-6.
9. Joloba ML, Windau A, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Hausdorff WP, Jacobs MR. Pneumococcal conjugate vaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates and the antimicrobial susceptibility of such isolates in children with otitis medi

10

20

30

40

50

- a. Clin Infect Dis 2001; 33:1489-94.
10. Black S, Shinefield H, Fireman B, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Pediatr Infect Dis J 2000; 19:187-95.
11. Rudolph KM, Parkinson AJ, Reasonover AL, Bulkow LR, Parks DJ, Butler JC. Serotype distribution and antimicrobial resistance patterns of invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*: Alaska, 1991-1998. J Infect Dis 2000; 182:490-6.
12. Sniadack DH, Schwartz B, Lipman H, et al. Potential interventions for the prevention of childhood pneumonia: geographic and temporal differences in serotype and serogroup distribution of sterile site pneumococcal isolates from children: implications for vaccine strategies. Pediatr Infect Dis J 1995; 14:503-10.
13. Fagan RL, Hanna JN, Messer RD, Brookes DL, Murphy DM. The epidemiology of invasive pneumococcal disease in children in Far North Queensland. J. Paediatr Child Health 2001; 37:571-5.
14. Kertesz DA, Di Fabio JL, de Cunto Brandileone MC, et al. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization Surveillance Study. Clin Infect Dis 1998; 26:1355-61.
15. Hausdorff W, Siber G, Paradiso P. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. Lancet 2001; 357:950-52.
- 20
16. Buckingham SC, King MD, Miller ML. Incidence and etiologies of complicated parapneumonic effusions in children, 1996 to 2001. Pediatr Infect Dis J 2003; 22:499-504.
17. Byington C, Spencer L, Johnson T, et al. An epidemiological investigation of a sustained high rate of pediatric parapneumonic empyema: risk factors and microbiological associations. Clin Infect Dis 2002; 34:434-40.
18. Tan T, Mason E, Wald E, et al. Clinical characteristics with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. Pediatrics 2002; 110:1-6.
19. Block SL, Hedrick J, Harrison CJ, et al. Pneumococcal serotypes from acute otitis media in rural Kentucky. Pediatr Infect Dis J 2002; 21:859-65.
- 30
20. Hausdorff WP, Yothers G, Dagan R, et al. Multinational study of pneumococcal serotypes causing acute otitis media in children. Pediatr Infect Dis J 2002; 21:1008-16.
21. Robbins JB, Austrian R, Lee CJ, et al. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. J Infect Dis 1983; 148:1136-59.
22. Nahm MH, Olander JV, Magyarlaki M. Identification of cross-reactive antibodies with low opsonophagocytic activity for *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1997; 176:698-703.
- 40
23. Yu X, Gray B, Chang S, Ward JI, Edwards KM, Nahm MH. Immunity to cross-reactive serotypes induced by pneumococcal conjugate vaccines in infants. J Infect Dis 1999; 180:1569-76.
24. Vakevainen M, Eklund C, Eskola J, Kayhty H. Cross-reactivity of antibodies to type 6B and 6A polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*, evoked by pneumococcal conjugate vaccines, in infants. J Infect Dis 2001; 184:789-93.
25. Ekstrom N, Kilpi T, Lahdenkari M, Lehtonen H, Ahman H, Kayhty, H. Immune response to cross-reacting pneumococcal serotypes 6A/6B and 19A/19F in the FinOM vaccine trial, Third World of Congress of Pediatric Infectious Diseases, Santiago, Chile, November 19-23, 2003.
26. Penn RL, Lewin EB, Douglas RG, Jr., Schiffman G, Lee CJ, Robbins JB. Antib 50

- ody responses in adult volunteers to pneumococcal polysaccharide types 19F and 1 9A administered singly and in combination. *Infect Immun* 1982; 36:1261-2.
27. Giebink GS, Meier JD, Quartey MK, Liebeler CL, Le CT. Immunogenicity and efficacy of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-protein conjugate vaccines against homologous and heterologous serotypes in the chinchilla otitis media model. *J Infect Dis* 1996; 173:119-27.
28. Saeland E, Jakobsen H, Ingolfsdottir G, Sigurdardottir ST, Jonsdottir I. Serum samples from infants vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine, PncT, protect mice against invasive infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6A and 6B. *J Infect Dis* 2001; 183:253-60. 10
29. Jakobsen H, Sigurdsson VD, Sigurdardottir S, Schulz D, Jonsdottir I. Pneumococcal serotype 19F conjugate vaccine induces cross-protective immunity in serotype 19A in a murine pneumococcal pneumonia model. *Infect Immun* 2003; 71:2956-9.
30. Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med* 2003; 349:1341-8.
31. O'Brien KL, Moulton LH, Reid R, et al. Efficacy and safety of seven-valent conjugate pneumococcal vaccine in American Indian children: group randomised trial. *Lancet* 2003; 362:355-61.
32. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001; 344:403-9. 20
33. Pilishvili T, Farley M, Vazquez M, Reingold A, Nyquist A, et al. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Abst G-1079, IC AAC, Chicago, IL, 2003.
34. U.S. Patent No. 4,673,574.
35. U.S. Patent No. 4,902,506.

【図1】

ベースライン（1998年／1999年）から2001年（ABCsサーベイランス）までの  
2歳未満の米国の小児における血清型別のIPD率の変化

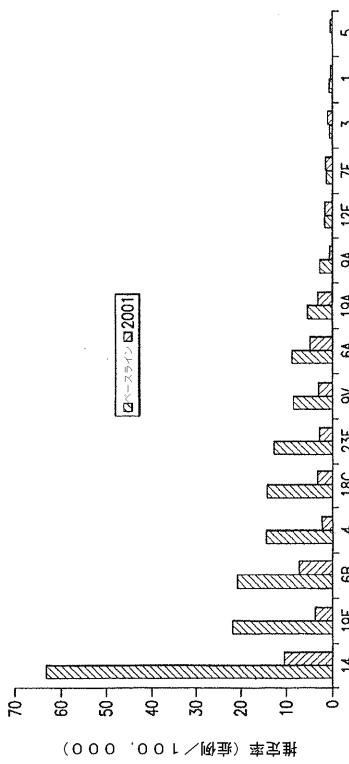


FIG.1

【図2】

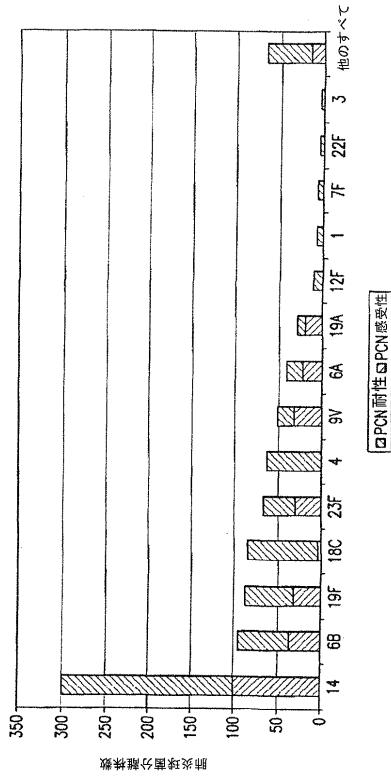


FIG.2

【図3】

D118-P16 Prev(e) nar試験-Prev(e) nar (登録商標)の  
製造規模ロットを受けるコホートから3回目投与の後のOPA結果のRCDC (n=98)

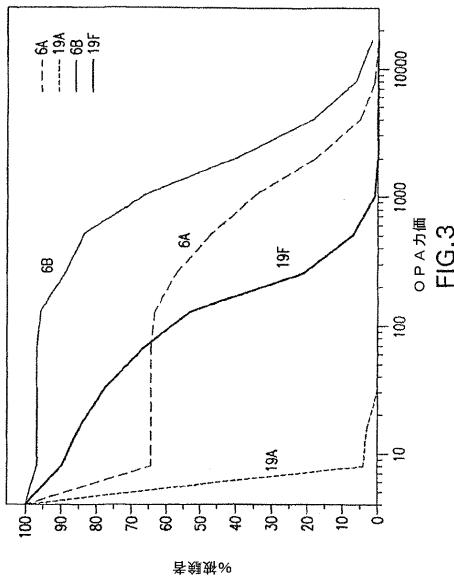


FIG.3

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 31/04 (2006.01) A 6 1 P 31/04

(72)発明者 ウィリアム・ピー・ホースドーフ  
ベルギー、バー-1200ウォルウ-サン-ランベール、アヴニユ・ドゥ・ラ・シャペル19番  
(72)発明者 ジョージ・レイナー・サイバー  
アメリカ合衆国10023ニューヨーク州ニューヨーク、ウエスト・シックスティシックスス・ストリート160番  
(72)発明者 ピーター・アール・パラディソ  
アメリカ合衆国19481ペンシルベニア州バレー・フォージ、フリーダムビュー・レイン445番  
(72)発明者 エイ・クリシュナ・プラサド  
アメリカ合衆国27516ノースカロライナ州チャペル・ヒル、ワーシャム・ドライブ105番

審査官 池上 京子

(56)参考文献 国際公開第2006/110381(WO, A1)  
特開2000-273182(JP, A)  
特開平06-098749(JP, A)  
特表2001-525369(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 31 / 00 - 31 / 80  
A 6 1 K 38 / 00 - 38 / 58  
A 6 1 K 39 / 00 - 39 / 44  
A 6 1 K 48 / 00  
A 6 1 K 9 / 00 - 9 / 72  
A 6 1 K 47 / 00 - 47 / 48  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )