

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7275277号

(P7275277)

(45)発行日 令和5年5月17日(2023.5.17)

(24)登録日 令和5年5月9日(2023.5.9)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/116 (2006.01)	A 6 1 K	39/116
A 6 1 K	39/09 (2006.01)	A 6 1 K	39/09
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04

請求項の数 6 (全124頁)

(21)出願番号 特願2021-535080(P2021-535080)
 (86)(22)出願日 令和1年12月17日(2019.12.17)
 (65)公表番号 特表2022-515098(P2022-515098
 A)
 (43)公表日 令和4年2月17日(2022.2.17)
 (86)国際出願番号 PCT/US2019/066682
 (87)国際公開番号 WO2020/131763
 (87)国際公開日 令和2年6月25日(2020.6.25)
 審査請求日 令和3年8月16日(2021.8.16)
 (31)優先権主張番号 62/781,835
 (32)優先日 平成30年12月19日(2018.12.19)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/853,331
 (32)優先日 令和1年5月28日(2019.5.28)

最終頁に続く

(73)特許権者 522242018
 メルク・シャープ・アンド・ドーム・エ
 ルエルシー
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・
 0 7 0 6 5 - 0 9 0 7、ローウェイ、イ
 ースト・リンカーン・アベニュー・1 2
 6
 (74)代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74)代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教
 (74)代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
 (74)代理人 100129713
 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖－タンパク質コンジュゲートを含む組成物および
 その使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

24個の異なるストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 多糖担体タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物であって、該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化された特定のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型が1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、脱O-アセチル化15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35Bであり、担体タンパク質がCRM197であり、該組成物が、いずれの他のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の多糖を含有する多糖担体タンパク質コンジュゲートをも含まない、多価免疫原性組成物。

【請求項2】

アジュバントを含む、請求項1に記載の多価免疫原性組成物。

【請求項3】

アジュバントが、リン酸アルミニウムアジュバントである、請求項2に記載の多価免疫原性組成物。

【請求項4】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (S. pneumoniae) 多糖担体タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物であって、該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化された特定のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型

の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型が1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、脱O-アセチル化15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35Bからなり、担体タンパク質がCRM197である、多価免疫原性組成物。

【請求項5】

アジュバントを含む、請求項4に記載の多価免疫原性組成物。

【請求項6】

アジュバントが、リン酸アルミニウムアジュバントである、請求項5に記載の多価免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、異なる多糖-タンパク質コンジュゲートを含有する多価免疫原性組成物を提供する。各コンジュゲートは、担体タンパク質、好ましくはCRM197にコンジュゲート化 (conjugate) された異なる血清型のストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) (肺炎球菌) から製造された莢膜多糖からなる。該免疫原性組成物は肺炎球菌疾患に対して広範な有効範囲をもたらす。

【0002】

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表 (その全体を参照により本明細書に組み入れることとする) を含む。2019年12月3日付で作成された前記ASCIIコピーは24683WOPCT-SEQTXT-03DEC2019と称され、6キロバイトのサイズを有する。

【背景技術】

【0003】

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) はグラム陽性菌であり、乳幼児における侵襲性細菌性疾患 (例えば、肺炎、細菌血症、髄膜炎および中耳炎) の最も一般的な原因である。肺炎球菌は、血清型特異性をもたらす化学結合多糖で被包されている。肺炎球菌には90個を超える公知血清型が存在し、莢膜は肺炎球菌の主要な病原性決定因子である。なぜなら、莢膜は細菌の内表面を補体から保護するだけでなく、それ自体は低免疫原性であるからである。多糖はT細胞非依存的抗原であり、ほとんどの場合、T細胞と相互作用するようにプロセッシングされたりMHC分子上に提示されたりすることはない。しかし、それは、B細胞上の表面受容体の架橋を含む代替メカニズムによって免疫系を刺激しうる。

【0004】

長年認可されてきた多価肺炎球菌多糖ワクチンは、成人、特に高齢者および高リスク者における肺炎球菌疾患の予防に有用であることが判明している。しかし、乳幼児は非コンジュゲート化肺炎球菌多糖に対する応答が不十分である。乳幼児において侵襲性肺炎球菌疾患を当時引き起こしていた最も頻繁に分離された7つの血清型 (4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23F) を含有する肺炎球菌コンジュゲートワクチンPrevnar (登録商標) が2000年2月に米国で最初に認可された。Prevnar (登録商標) が米国で広く使用された後、小児における侵襲性肺炎球菌疾患は、Prevnar (登録商標) 中に存在する血清型によって、有意に減少している。Centers for Disease Control and Prevention, MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2005, 54 (36): 893-7を参照されたい。しかし、世界の或る地域においてはPrevnar (登録商標) による血清型の有効範囲が限定され、米国においては、ある新興血清型 (例えば、19Aなど) の、幾つかの証拠が存在する。O'Brienら, 2004, Am J Epidemiol 159: 634-44; Whitneyら, 2003, N Engl J Med 348: 1737-46; Kyawら, 2006, N Engl J Med 354: 1455-63; Hic

10

20

30

40

50

ksら, 2007, J Infect Dis 196:1346-54; Traoreら, 2009, Clin Infect Dis 48:S181-S189を参照されたい。
【0005】

米国特許出願公開番号US2006/0228380は、血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fを含む13価肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲートワクチンを記載している。中国特許出願公開番号CN101590224Aは、血清型1、2、4、5、6A、6B、7F、9N、9V、14、18C、19A、19Fおよび23Fを含む14価肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲートワクチンを記載している。

【0006】

他のPCVは、PCV-15に含有される7、10、11または13の血清型をカバーしているが（米国特許公開番号2011/0195086）、幾つかの血清型において免疫干渉が観察されており（例えば、GSKのPCV-11における血清型3に関する、より低い防御）、ファイザー（Pfizer）のPCV-13 [PREVNAR（登録商標）13] においては、血清型6Bに対する、より低い応答率が観察されている。Prymulaら, 2006, Lancet 367:740-48およびKieningerら, Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers (48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Washington DC, 2008年10月25~28日において発表)を参照されたい。

【0007】

現在の多価肺炎球菌ワクチンは、ワクチンに存在する血清型に関連する肺炎球菌疾患の発生率を低下させるのに有効である。しかし、現在利用可能なワクチンに存在しない血清型を発現する肺炎球菌の保有率が増加してきている。したがって、現在利用可能なワクチンに存在しない肺炎球菌血清型に対する防御をもたらしうる追加的な肺炎球菌ワクチン組成物が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【文献】米国特許出願公開番号US2006/0228380

中国特許出願公開番号CN101590224A

米国特許公開番号2011/0195086

【非特許文献】

【0009】

【文献】O'Brienら, 2004, Am J Epidemiol 159:634-44; Whitneyら, 2003, N Engl J Med 348:1737-46; Kyawら, 2006, N Engl J Med 354:1455-63; Hicksら, 2007, J Infect Dis 196:1346-54; Traoreら, 2009, Clin Infect Dis 48:S181-S189; Prymulaら, 2006, Lancet 367:740-48; Kieningerら, Safety and Immunologic Non-inferiority of 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to 7-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a 4-Dose Series in Healthy Infants and Toddlers (48th Annual ICAAC/ISDA 46th Annual Meeting, Washington DC, 2008年10月25~28日において発表)

【発明の概要】

【0010】

発明の概括

本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）（肺炎球菌）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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コンジュゲートは、以下のものからなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の群の多糖を含む：

a) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、DeOAc15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

10

b) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

c) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、DeOAc15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

d) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

e) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

20

f) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、DeOAc15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

g) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

h) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

30

i) 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 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

j) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

k) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

l) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

m) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

40

n) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

o) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

p) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

q) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび

50

3 5 B ;

r) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

s) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

t) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

u) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

v) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

w) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

x) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

y) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

z) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ; ならびに

a a) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B。

【0011】

本発明は、22個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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含み、多糖はストレプトコッカス・ニューモニエ血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 Bから製造される。

【0012】

本発明は、22個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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コンジュゲートは、1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 Bからなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の群の多糖を含む。

【0013】

本発明は、23個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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含み、多糖はストレプトコッカス・ニューモニエ血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 Bから製造される。

【0014】

本発明は、23個の異なるストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢

10

20

30

40

50

膜多糖を含み、それぞれの異なる多糖タンパク質コンジュゲートは、肺炎球菌のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B 由来の多糖を含み、担体タンパク質は CRM197 である。

【0015】

本発明は、24 個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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含み、多糖はストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B から製造される。

10

【0016】

本発明は、24 個の異なるストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含み、それぞれの異なる多糖タンパク質コンジュゲートはそれぞれストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B 由来の多糖を含み、キャリアタンパク質は CRM197 である。

20

【0017】

本発明は、24 個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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含み、多糖はストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B から製造される。

【0018】

本発明は、24 個の異なるストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含み、それぞれの異なる多糖タンパク質コンジュゲートはそれぞれストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B 由来の多糖を含み、担体タンパク質は CRM197 である。

30

【0019】

本発明は、33 個まで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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コンジュゲートは、1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B からなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型、更に 7 C、9 N、16 F、21、23 A、31、34、35 F および 38 から選択される 1、2、3、4、5、6、7、8 または 9 個の追加的なストレプトコッカス・ニューモニエ血清型を含む群の多糖を含む。

40

【0020】

本発明は、30 個まで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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コン

50

ジュゲートは、1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bからなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型、更に7 C、9 N、16 F、23 A、35 Fおよび38から選択される1、2、3、4、5または6個の追加的なストレプトコッカス・ニューモニエ血清型を含む群の多糖を含む。
【0021】

本発明は、33個まで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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コンジュゲートは、1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bからなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型、更に7 C、9 N、16 F、21、23 A、31、34、35 Fおよび38から選択される1、2、3、4、5、6、7、8または9個の追加的なストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の群の多糖を含む。

10

【0022】

本発明は、30個まで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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コンジュゲートは、1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bからなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型、更に7 C、9 N、16 F、23 A、35 Fおよび38から選択される1、2、3、4、5または6個の追加的なストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の群の多糖を含む。

20

【0023】

幾つかの実施形態においては、多糖タンパク質コンジュゲートの少なくとも1つは、非プロトン性溶媒、例えばジメチルスルホキシド (DMSO) を含むコンジュゲート化反応により形成される。特定の実施形態においては、多糖タンパク質コンジュゲートのそれぞれは、非プロトン性溶媒、例えば (DMSO) を含むコンジュゲート化反応により形成される。本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与することを含む、ヒト患者において防御免疫応答を誘導するための方法も提供する。本発明の方法の幾つかの実施形態においては、患者は以前に多価肺炎球菌ワクチンで治療されていた。

30

【0024】

本発明の多価免疫原性組成物は、異なる補足的肺炎球菌ワクチンによる治療レジメンの一部として使用されうる。したがって、本発明は、本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与すること、そして更に、多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与することを、任意の順序で含む、ヒト患者において防御免疫応答を誘導する方法を提供する。特定の実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートから構成され、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含む。他の実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは非コンジュゲート化莢膜多糖から構成されている。本発明はまた、ストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの選択された血清型は、他の選択された血清型に対して交差反応性をもたらす。

40

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】非アジュバント化PCV22 (PCV22 unadj) またはリン酸アルミニウムアジュバントと共に製剤化されたPCV22 (PCV22/APA) で免疫化された

50

マウスに関してECLにより測定された免疫前(Pre)、投与後1(PD1)、2(PD2)および3(PD3) IgG抗体希釈力価。左から右に、Pre PCV22 unadj、Pre PCV22/APA、PD1 PCV22 unadj、PD1 PCV22/APA、PD2 PCV22 unadj、PD2 PCV22/APA、PD3 PCV22 unadjおよびPD3 PCV22/APA。

【図2】PD3における非アジュバント化PCV22(PCV22 unadj)と比較したPCV22/APAのECL希釈力価比。

【図3】非アジュバント化PCV22(PCV22 unadj)またはAPAと共に製剤化されたPCV22(PCV22/APA)で免疫化されたマウスに関する血清型特異的OPA希釈力価(免疫前、PD1、PD2、PD3)。左から右に、Pre PCV22 unadj、Pre PCV22/APA、PD1 PCV22 unadj、PD1 PCV22/APA、PD2 PCV22 unadj、PD2 PCV22/APA、PD3 PCV22 unadjおよびPD3 PCV22/APA。

10

【図4】PD3における非アジュバント化PCV22(PCV22 unadj)と比較したPCV22/APAのOPA希釈力価比。

【図5】PCV22免疫化マウスはストレプトコッカス・ニューモニエ24F気管内チャレンジに対して防御される。

【図6】非アジュバント化PCV22またはPCV22/APAで免疫化されたウサギに関してECLにより測定された免疫前(Pre)、PD1およびPD2 IgG抗体希釈力価。エラーバーは幾何平均力価(GMT)の95%信頼区間(CI)を表す。左から右に、Pre PCV22 unadj、Pre PCV22/APA、PD1 PCV22 unadj、PD1 PCV22/APA、PD2 PCV22 unadjおよびPD2 PCV22/APA。

20

【図7】PD2における非アジュバント化PCV22と比較したPCV22/APAのECL GMT比。エラーバーは95%信頼区間(CI)を表す。

【図8】非アジュバント化PCV22またはPCV22/APAで免疫化されたウサギに関する血清型特異的OPA希釈力価(免疫前「Pre」およびPD2)。エラーバーは5頭のウサギに関する機能的抗体価の変動を表す。

【図9A】非アジュバント化PCV23で免疫化されたIRMに関してECLにより測定された免疫前(Pre)、PD1、PD2およびPD3 IgG抗体希釈力価。エラーバーは幾何平均力価(GMT)の95%信頼区間(CI)を表す。

30

【図9B】PCV23(DMSO)/APAで免疫化されたIRMに関してECLにより測定された免疫前(Pre)、PD1、PD2およびPD3 IgG抗体希釈力価。エラーバーは幾何平均力価(GMT)の95%信頼区間(CI)を表す。

【図9C】PCV23(DMSO+Aq)/APAで免疫化されたIRMに関してECLにより測定された免疫前(Pre)、PD1、PD2およびPD3 IgG抗体希釈力価。エラーバーは幾何平均力価(GMT)の95%信頼区間(CI)を表す。

【図9D】PCV15/APA+PCV8/APAで免疫化されたIRMに関してECLにより測定された免疫前(Pre)、PD1、PD2およびPD3 IgG抗体希釈力価。エラーバーは幾何平均力価(GMT)の95%信頼区間(CI)を表す。

40

【図10A】APAの存在下または非存在下のPCV23でのワクチン接種の後のIRM(群当たり8~9頭)におけるECL抗体応答の比較。記号はPD1における比率を示す。95%CIを表すエラーバー付きのGMT比。

【図10B】APAの存在下または非存在下のPCV23でのワクチン接種の後のIRM(群当たり8~9頭)におけるECL抗体応答の比較。記号はPD2における比率を示す。95%CIを表すエラーバー付きのGMT比。

【図10C】APAの存在下または非存在下のPCV23でのワクチン接種の後のIRM(群当たり8~9頭)におけるECL抗体応答の比較。記号はPD3における比率を示す。95%CIを表すエラーバー付きのGMT比。

【図11A】PCV23(DMSO+Aq)/APAでのワクチン接種の後の又はPCV

50

15 / APA + PCV 8 / APAで共投与されたIRM（群当たり9頭）におけるECL抗体応答の比較。記号はPD1における比を示す。95%CIを表すエラーバー付きのGMT比。

【図11B】PCV 23（DMSO + Aq） / APAでのワクチン接種の後の又はPCV 15 / APA + PCV 8 / APAで共投与されたIRM（群当たり9頭）におけるECL抗体応答の比較。記号はPD2における比を示す。95%CIを表すエラーバー付きのGMT比。

【図11C】PCV 23（DMSO + Aq） / APAでのワクチン接種の後の又はPCV 15 / APA + PCV 8 / APAで共投与されたIRM（群当たり9頭）におけるECL抗体応答の比較。記号はPD3における比を示す。95%CIを表すエラーバー付きのGMT比。

10

【図12A】非アジュバント化PCV 23、PCV 23（DMSO） / APA、PCV 23（DMSO + Aq） / APAまたはPCV 15 / APA + PCV 8 / APAでワクチン接種された後のIRM（群当たり8～9頭）における増強したECL抗体応答の比較。PD1 / Pre。記号はGMT比であり、エラーバーは95%CIを表す。

【図12B】非アジュバント化PCV 23、PCV 23（DMSO） / APA、PCV 23（DMSO + Aq） / APAまたはPCV 15 / APA + PCV 8 / APAでワクチン接種された後のIRM（群当たり8～9頭）における増強したECL抗体応答の比較。PD2 / Pre。記号はGMT比であり、エラーバーは95%CIを表す。

【図12C】非アジュバント化PCV 23、PCV 23（DMSO） / APA、PCV 23（DMSO + Aq） / APAまたはPCV 15 / APA + PCV 8 / APAでワクチン接種された後のIRM（群当たり8～9頭）における増強したECL抗体応答の比較。PD3 / Pre。記号はGMT比であり、エラーバーは95%CIを表す。

20

【図12D】非アジュバント化PCV 23、PCV 23（DMSO） / APA、PCV 23（DMSO + Aq） / APAまたはPCV 15 / APA + PCV 8 / APAでワクチン接種された後のIRM（群当たり8～9頭）における増強したECL抗体応答の比較。PD2 / PD1。記号はGMT比であり、エラーバーは95%CIを表す。

【図12E】非アジュバント化PCV 23、PCV 23（DMSO） / APA、PCV 23（DMSO + Aq） / APAまたはPCV 15 / APA + PCV 8 / APAでワクチン接種された後のIRM（群当たり8～9頭）における増強したECL抗体応答の比較。PD3 / PD2。記号はGMT比であり、エラーバーは95%CIを表す。

30

【図13A】リン酸アルミニウムアジュバントと共に製剤化されたPCV 24（PCV 24 / APA）で免疫化されたニュージーランド（New Zealand）白ウサギに関してECLにより測定された免疫前（Pre）、投与後1（PD1）および2（PD2）IgG抗体希釈力価。エラーバーは幾何平均力価（GMT）の95%信頼区間（CI）を表す。

【図13B】PCV 24 / APAで免疫化されたNZWRに関する血清型特異的OPA希釈力価（免疫前およびPD2）。エラーバーは8頭のNZWRに関する機能的抗体価の変動を表す。

【図14A】リン酸アルミニウムアジュバントと共に製剤化されたPCV 24（PCV 24 / APA）で免疫化された乳仔アカゲザル（IRM）に関してECLにより測定された免疫前（Pre）、投与後1（PD1）、2（PD2）および3（PD3）IgG抗体希釈力価。エラーバーは幾何平均力価（GMT）の95%信頼区間（CI）を表す。

40

【図14B】PCV 24 / APAで免疫化されたIRMに関する血清型特異的OPA希釈力価（免疫前およびPD3）。エラーバーは5頭のIRMの機能的抗体価の変動を表す。

【0026】

発明の詳細な説明

本発明は、肺炎球菌多糖－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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ（*S. pneumoniae*）血清型由来の多糖を含み

50

、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は本明細書中に定義されているとおりである。

【0027】

幾つかの実施形態においては、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コンジュゲートは、以下のものからなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の群の多糖を含む：

a) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、DeOAc15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

10

b) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

c) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、DeOAc15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

d) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

e) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

20

f) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、DeOAc15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

g) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

h) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

30

i) 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 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

j) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

k) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

l) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

m) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

40

n) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

o) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

p) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

q) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび

50

3 5 B ;

r) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

s) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

t) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

u) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

v) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

w) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

x) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

y) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

z) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

a a) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび3 5 B ;

b b) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、De OAc 15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

c c) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

d d) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、De OAc 15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

e e) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

f f) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

g g) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、De OAc 15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

h h) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

i i) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

j j) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、3 5 B および3 9 ;

10

20

30

40

50

kk) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

ll) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

mm) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

nn) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

oo) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

pp) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

qq) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

rr) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

ss) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

tt) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

uu) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

vv) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

ww) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

xx) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

yy) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

zz) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

aaa) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；ならびに

bbb) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39。

【0028】

幾つかの実施形態においては、多価免疫原性組成物は、i) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；またはii) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；またはiii) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 B；

10

20

30

40

50

または i v) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B からなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型を含む。特定の実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物は複数の肺炎球菌ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は血清型：i) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B；または ii) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B；または iii) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F および 35 B を含む。該組成物はマウス、ウサギおよび／またはサルにおいて免疫原性であり、試験された全ての用量においてワクチン型細菌株を殺滅する機能的抗体を生成することが判明した。

【0029】

本発明の多価免疫原性組成物は、ワクチン型ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に対して患者を免疫化するのに、および／または異なる補足的肺炎球菌ワクチンによる治療レジメンの一部として有用である。したがって、本発明は、本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与すること、そして更に、多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与することを、任意の順序で含む、ヒト患者において防御免疫応答を誘導する方法を提供する。他の実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物は、異なる多価肺炎球菌ワクチンで以前に免疫化された患者に投与される。

【0030】

本発明の実施形態においては、少なくとも1つの肺炎球菌血清型に由来するコンジュゲートを、非プロトン性溶媒、例えば DMSO 中での還元的アミノ化を用いて製造する。他の実施形態においては、多価免疫原性組成物は、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いてそれぞれが製造される肺炎球菌コンジュゲートを含む。DMSO 溶媒の使用は、担体タンパク質の表面上のリジン残基の直接消費により、タンパク質への多糖の共有結合を増強する。共有結合の増強は、DMSO 中でコンジュゲート化された多糖抗原を含む多価免疫原性組成物の多糖タンパク質コンジュゲートの安定性の増強に直接的利益をもたらす。

【0031】

I. 定義および略語

本明細書および添付の特許請求の範囲の全体において、以下の略語が適用される。

【0032】

A P A リン酸アルミニウムアジュバント
A P C 抗原提示細胞
C I 信頼区間
D M S O ジメチルスルホキシド
D S 多糖-タンパク質薬物
G M C 幾何平均濃度
G M T 幾何平均力価
H P S E C 高速サイズ排除クロマトグラフィー
I M 筋肉内または筋内
I R M 乳仔アカゲザル
L O S リポオリゴ糖
L P S リポ多糖
M A L S 多角度光散乱

M B C 一価バルクコンジュゲート
M n 数平均分子量
M O P A 多重オプソニン作用アッセイ
M W 分子量
N M W C O 公称分子量カットオフ
N Z W R ニューゼーランド白 (New Zealand White) ウサギ
O P A オプソニン作用アッセイ
P C V 肺炎球菌コンジュゲートワクチン
P D 1 投与後 1
P D 2 投与後 2
P D 3 投与後 3
P n P s 肺炎球菌多糖
P s 多糖
P S - 2 0 ポリソルベート - 2 0
R I 屈折率
U V 紫外線
w / v 重量 / 体積

本発明がより容易に理解されうるように、幾つかの科学技術用語を以下に具体的に定義する。本明細書中の他の箇所で特に定義されていない限り、本明細書中で用いる他の全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解される意味を有する。

【 0 0 3 3 】

本明細書の全体および添付の特許請求の範囲において用いる単数形の語は、文脈に明らかに矛盾しない限り、その複数対象物を含む。

【 0 0 3 4 】

「または」なる語は、示されている可能性の 1 つを文脈が明らかに定めている場合を除き、可能性の一方または両方を示す。幾つかの場合においては、一方または両方の可能性を強調するために「および／または」を用いた。

【 0 0 3 5 】

還元的アミノ化のようなコンジュゲート化に関して用いられた場合の「水性溶媒」または「水性条件」なる語は、コンジュゲート化反応のための溶媒としての水の使用を指す。水はバッファーおよび他の成分を含みうるが、ただし、有機溶媒は存在しない。

【 0 0 3 6 】

還元的アミノ化のようなコンジュゲート化に関して用いられた場合の「非プロトン性溶媒」、「DMSO 溶媒」または「DMSO 条件」なる語は、コンジュゲート化反応用の溶媒としての非プロトン性溶媒または複数の非プロトン性溶媒（または適用可能な場合には DMSO）の組合せの使用を指す。非プロトン性溶媒は、幾らかの水、例えば最大 1 %、2 %、5 %、1 0 % または 2 0 % の水を含有しうる。

【 0 0 3 7 】

本発明の免疫原性組成物に関して用いられた場合の「含む」なる語は、アジュバントおよび賦形剤のような任意の他の成分の包含、または具体的に挙げられていない 1 以上の多糖-タンパク質コンジュゲートの添加を意味する。多価多糖-タンパク質コンジュゲート混合物に関して用いられた場合の「からなる」なる語は、それらの特定のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含有し、異なる血清型に由来する他のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含有しない混合物を指す。「から実質的になる」およびその派生語、例えば「から実質的になり」または「から実質的になって」は、列挙されている任意の要素または要素群の包含、および列挙要素と類似した又は異なる性質の他の要素であって、特定されている投与レジメン、方法または組成物の基本的または新規特性を実質的に変化させない要素の随意的包含（すなわち、包含されていても包含されていなくてもよい）を示す。

【 0 0 3 8 】

本発明の組成物の「有効量」は、後続チャレンジ中に、微生物、例えばストレプトコッカス・ニューモニエの感染性の可能性または重症度を有意に低下させる抗体を誘導するのに必要な用量を意味する。

【0039】

本明細書中で用いる「肺炎球菌疾患の予防に適応となる」なる句は、肺炎球菌疾患全般、肺炎球菌肺炎、肺炎球菌髄膜炎、肺炎球菌性菌血症、ストレプトコッカス・ニューモニエにより引き起こされる侵襲性疾患およびストレプトコッカス・ニューモニエにより引き起こされる中耳炎（これらに限定されるものではない）を含むストレプトコッカス・ニューモニエの任意の血清型により引き起こされる1以上の疾患の予防に関して、ワクチンまたは免疫原性組成物が米国食品医薬品局（US Food and Drug Administration）のような1以上の規制当局により承認されることを意味する。

10

【0040】

「多価肺炎球菌ワクチン」は、ストレプトコッカス・ニューモニエの複数の血清型により引き起こされる疾患または病態に対する能動免疫をもたらす複数の活性物質（例えば、肺炎球菌莢膜多糖または肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲート）を含む医薬製剤である。

【0041】

「多糖」なる語は、「糖」、「オリゴ糖」、「多糖」、「リポ糖」、「リポオリゴ糖（LOS）」、「リポ多糖（LPS）」、「グリコシラート」、「複合糖質」など（これらに限定されるものではない）を含む、免疫学および細菌ワクチン技術で一般に使用される任意の抗原性糖要素（または抗原単位）を含むと意図される。

20

【0042】

本発明のワクチンまたは免疫原性組成物の文脈における「非アジュバント化（unadjuvanted）」なる語は、PCV8、PCV15、PCV22、PCV23およびPCV24（これらに限定されるものではない）を含む肺炎球菌多糖組成物であって、アジュバントを含有しない組成物を意味する。

【0043】

「PCV8」は、ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖（PnP）血清型-8、-10A、-12F、-15A、-15C、-23B、-24Fおよび-35Bを含有する免疫原性組成物を意味する。

【0044】

「PCV15」は、ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖（PnP）血清型-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-9V、-14、-18C、-19A、-19F、-22F、-23Fおよび-33Fを含有する免疫原性組成物を意味する。

30

【0045】

「PCV22」は、ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖（PnP）血清型-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-9V、-10A、-12F、-14、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-22F、-23B、-23F、-24F、-33Fおよび-35Bを含有する免疫原性組成物を意味する。

【0046】

「PCV23」は、ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖（PnP）血清型-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-8、-9V、-10A、-12F、-14、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-22F、-23B、-23F、-24F、-33Fおよび-35Bを含有する免疫原性組成物を意味する。

40

【0047】

「PCV24」は、ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖（PnP）血清型-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-8、-9V、-10A、-11A、-12F、-14、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-22F、-23B、-23F、-24F、-33Fおよび-35Bを含有する免疫組成物を意味する。

【0048】

「CpG含有ヌクレオチド」、「CpG含有オリゴヌクレオチド」、「CpGオリゴヌ

50

クレオチド」および同様の用語は、非メチル化 CpG 部分を含有する 6 ～ 50 ヌクレオチド長のヌクレオチド分子を意味する。例えば、Wang ら, 2003, Vaccine 21: 4297 を参照されたい。CpG 含有オリゴヌクレオチドには、任意の合成ヌクレオシド間結合、修飾塩基および／または修飾糖を用いた修飾オリゴヌクレオチドが含まれる。

【0049】

本明細書中で定義される「アジュバント」は、本発明の免疫原性組成物の免疫原性を増強するのに役立つ物質である。免疫アジュバントは、単独で投与された場合に弱免疫原性である（例えば、抗体価または細胞性免疫応答を全く又は弱くしか誘導しない）抗原に対する免疫応答を増強し、抗原に対する抗体価を増加させ、および／または個体における免疫応答を達成するのに有効な抗原の用量を減少させる。したがって、アジュバントは、免疫応答を増強するためにしばしば投与され、当業者によく知られている。

【0050】

「患者」（あるいは、本明細書においては「対象」とも称される）は、ストレプトコッカス・ニューモニエに感染しうる哺乳動物を意味する。好ましい実施形態においては、患者はヒトである。患者は予防的または治療的に治療される。予防的治療は、肺炎球菌疾患またはその影響、例えば肺炎球菌肺炎の可能性または重症度を低下させるのに十分な防御免疫をもたらす。ストレプトコッカス・ニューモニエ感染またはその臨床効果の重症度を低減し、または再発を予防するために、治療的治療が行われうる。予防的治療は、本明細書に記載されているとおり、本発明の多価免疫原性組成物を使用して行われうる。本発明の組成物は、一般集団、または肺炎球菌感染の高リスク者、例えば高齢者または高齢者と同居している若しくは高齢者の世話をしている者に投与されうる。

【0051】

「治療を要する」者には、以前にストレプトコッカス・ニューモニエに曝露または感染した者、以前にストレプトコッカス・ニューモニエに対してワクチン接種された者、易感染者、または感染可能性の低減が望ましい任意の者、例えば免疫不全者、高齢者、小児、成人または健康個体が含まれる。

【0052】

「安定」多価免疫原性組成物は、冷蔵温度（例えば、2 ～ 8℃または4℃）で少なくとも少なくとも1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、6ヶ月間、12ヶ月間および／または24ヶ月間、有意な変化が観察されない組成物である。また、「安定」組成物は、25℃および37℃を含む温度で、1ヶ月間、3ヶ月間、6ヶ月間、12ヶ月間および／または24ヶ月間を含む期間にわたって所望の特徴を示すものを含む。安定性に関する典型的な許容基準は以下のとおりである：以下のうちの1以上において約5%、約10%、約15%または約20%以下の変動：（a）組成物におけるストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートの数平均分子量（Mn）、（b）組成物におけるストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートの重量平均分子量（Mw）、（c）組成物における総多糖濃度、（d）特定の励起波長、例えば280ナノメートルで固有タンパク質蛍光分光法を用いて測定された、組成物における最大発光、および（e）特定の励起波長で固有タンパク質蛍光分光法を用いて測定された、組成物における蛍光強度。「安定」なる語は、多価免疫原性組成物内の個々の肺炎球菌コンジュゲートに関しても用いられうる。そのような使用において、この用語は、特定の温度において経時的に所望の特性を示すコンジュゲートを指し、そのような特性は、示されている時間にわたって及び示されている温度において約5%、約10%、約15%または約20%以下しか変動しない。

【0053】

II. 多価免疫原性組成物

本発明は、複数のストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含む。本発明の多価免疫原性組成物の種々の態様および実施形態を以下に記載する。

【0054】

1つの実施形態（実施形態E1）においては、本発明は、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖をそれぞれが含む複数のストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は、i) 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B、またはii) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B、またはiii) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35Bを含み、またはそれらからなり、またはそれらから実質的になる。実施形態E1の下位実施形態においては、免疫原性組成物は他のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含まない。

10

【0055】

本明細書中で用いる脱O-アセチル化血清型15B（DeOAc15B）肺炎球菌多糖は血清型15C肺炎球菌多糖と実質的に同等であり、実質的に同一のNMRスペクトルを有する（データ非表示）。本明細書中で用いる脱O-アセチル化血清型15B肺炎球菌多糖および血清型15C肺炎球菌多糖はそれぞれ、反復単位当たり0～5%の範囲または0～4%の範囲または0～3%の範囲または0～2%の範囲または0～1%の範囲または0～0.5%の範囲または0～0.1%の範囲または0%のO-アセチル含有量を有する。Spencer B. L.らの報告によると、肺炎球菌多糖15Cは僅かにO-アセチル化されている可能性がある（Spencer, B. L.ら, Clin. Vac. Immunol. (2017) 24(8): 1-13）。したがって、本明細書における多価免疫原性組成物の実施形態のいずれにおいても、血清型15Cの代わりに脱Oアセチル化血清型15B（DeOAc15B）が使用されうる。脱O-アセチル化方法は、例えば、Rajamら, Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(9): 1223-1227に記載されているとおり、当技術分野で公知である。

20

【0056】

実施形態E1およびその任意の下位実施形態を含む、本発明の多価免疫原性組成物のいずれかの特定の実施形態においては、組成物は、薬学的に許容される担体を更に含む。

30

【0057】

交差反応性

1つの実施形態においては、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化された、血清型6Cを含むストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に由来する多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型6Cはストレプトコッカス・ニューモニエの血清型6Aおよび6Bに対する交差反応性をもたらす。

【0058】

1つの実施形態においては、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化された、血清型6Aを含むストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に由来する多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型6Aはストレプトコッカス・ニューモニエの血清型6Bおよび／または6Cに対する交差防御をもたらす。

40

【0059】

1つの実施形態においては、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化された、血清型6Bを含むストレプトコッカ

50

ス・ニューモニエ血清型に由来する多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型 6 B はストレプトコッカス・ニューモニエの血清型 6 A および／または 6 C に対する交差防御をもたらす。

【0060】

1つの実施形態においては、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化された、血清型 15 C を含むストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に由来する多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型 15 C はストレプトコッカス・ニューモニエの血清型 15 B に対する交差防御をもたらす。

10

【0061】

1つの実施形態においては、本発明は、ストレプトコッカス・ニューモニエ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提供し、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化された、血清型 15 B を含むストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に由来する多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型 15 B はストレプトコッカス・ニューモニエの血清型 15 C に対する交差防御をもたらす。

【0062】

担体タンパク質

本発明の特定の実施形態においては、担体タンパク質として CRM 197 を使用する。CRM 197 は、以下のアミノ酸配列を有するジフテリア毒素の無毒性変異体（すなわち、トキシド）である：

20

【化1】

GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYYYYW
KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSVEYI
NNWEQAKALS VELEINFETR GKRQGDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS
CINLDWDVIR DKTKTKIESL KEHGPIKNKM SESPKNKTVE EKAKQYLEEF
HQTALHPHEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEIVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL
VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPFL HDGYAVSWNT
VEDSIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI
SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH
SNEISSDSIG VLG YQKTVDH TKVNSKLSLF FEIKS (配列番号 1)

30

40

【0063】

1つの実施形態においては、CRM 197 は、カザミノ酸および酵母エキス培地で増殖したコリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheria*) 株 C 7 (β 197) の培養物から単離される。もう1つの実施形態においては、CRM 197 は、米国特許第 5, 614, 382 号に記載されている方法に従い組換え的に製造される。典型的には、CRM 197 は、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿およびイオン交換クロマトグラフィーの組合せにより精製される。幾つかの実施形態に

50

においては、CRM197は、Pfenex Expression Technology (商標) (Pfenex Inc., San Diego, CA) を使用して、シュードモナス・フルオレセンス (シュードモナス・フルオレッセンス) において製造される。

【0064】

他の適切な担体タンパク質には、追加的な不活性化 (不活化) 細菌毒素、例えばDT (ジフテリアトキソイド) またはDTの断片B (DTFB)、TT (破傷風トキソイド) またはTTの断片C、百日咳トキソイド、コレラトキソイド (例えば、WO 2004/083251に記載されているもの)、大腸菌 (E. coli) LT、大腸菌 (E. coli) ST、およびシュードモナス・エルジノーサ (Pseudomonas aeruginosa) 由来の外毒素Aが含まれる。細菌外膜タンパク質、例えば外膜タンパク質複合体 (OMPC)、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質、肺炎球菌表面タンパク質A (PspA; WO 02/091998を参照されたい)、肺炎球菌アドヘンシタンパク質 (PsaA)、群Aもしくは群B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・インフルエンゼ (Haemophilus influenzae) プロテインD、肺炎球菌ニューモリシン (Kuoら, 1995, Infect Immun 63; 2706-13)、例えば何らかの様態で解毒されたply、例えばdPLY-GMBS (WO 04/081515を参照されたい) もしくはdPLY-フォルモール (formol)、PhtX、例えばPhtA、PhtB、PhtD、PhtEおよびPhtタンパク質の融合物、例えばPhtDE融合物、PhtBE融合物 (WO 01/98334およびWO 03/54007を参照されたい) も使用されうる。他のタンパク質、例えばオボアルブミン、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)、PorB (N. meningitidis由来)、PD (Haemophilus influenzaeプロテインD; 例えばEP 0 594 610 Bを参照されたい)、またはその免疫学的に機能的な同等物、合成ペプチド (EP 0378881およびEP 0427347を参照されたい)、熱ショックタンパク質 (WO 93/17712およびWO 94/03208を参照されたい)、百日咳タンパク質 (WO 98/58668およびEP 0471177を参照されたい)、サイトカイン、リンホカイン、増殖因子またはホルモン (WO 91/01146を参照されたい)、種々の病原体由来抗原からの複数のヒトCD4+ T細胞エпитープを含む人工タンパク質 (Falugira, 2001, Eur J Immunol 31: 3816-3824を参照されたい)、例えばN19タンパク質 (Baraldoira, 2004, Infect Immun 72: 4884-7を参照されたい)、鉄取り込みタンパク質 (WO 01/72337を参照されたい)、クロストリジウム・ディフィシレ (C. difficile) の毒素AまたはB (WO 00/61761を参照されたい)、およびフラゲリン (Ben-Yedidiaら, 1998, Immunol Lett 64: 9を参照されたい) も担体タンパク質として使用されうる。

【0065】

他のDT突然変異体、例えばCRM176、CRM228、CRM45 (Uchidaら, 1973, J Biol Chem 218: 3838-3844); CRM9、CRM45、CRM102、CRM103およびCRM107、ならびにNichollsおよびYoule, Genetically Engineered Toxins, Frankel編, Maecel Dekker Inc, 1992に記載されている他の突然変異を有するもの; Glu-148の欠失またはそれからAsp、GlnまたはSerへの突然変異および/またはAla 158からGlyへの突然変異およびU. S. 4, 709, 017またはU. S. 4, 950, 740に開示されている他の突然変異を有するもの; Lys 516、Lys 526、Phe 530および/またはLys 534の少なくとも1以上の残基の突然変異およびU. S. 5, 917, 017号または米国特許第6, 455, 6735号に開示されている他の突然変異を有するもの; またはU. S. 5, 843, 711に開示されている断片も、担体タンパク質として使用されうる。そのよ

10

20

30

40

50

うなDT突然変異体は、エピトープ領域を含有するB断片を含むDTFB変異体を製造するためにも使用されうる。

【0066】

特定の実施形態においては、担体タンパク質は、外膜タンパク質複合体（OMP C）、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、プロテインD（タンパク質D）およびCRM 197からなる群から選択される。

【0067】

本発明の幾つかの実施形態においては、多価免疫原性組成物内の多糖タンパク質コンジュゲートの1以上に、第2担体を使用されうる。第2担体タンパク質は、好ましくは、無毒性かつ無反応性であり、十分な量および純度で入手可能なタンパク質である。第2担体タンパク質も、抗原の免疫原性を増強するために高ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖にコンジュゲート化または結合される。担体タンパク質は、標準的なコンジュゲート化法に適合しているべきである。1つの実施形態においては、第1担体タンパク質にコンジュゲート化されていない各莢膜多糖は、同じ第2担体タンパク質にコンジュゲート化されている（例えば、各莢膜多糖分子は、単一の担体タンパク質にコンジュゲート化されている）。もう1つの実施形態においては、第1担体タンパク質にコンジュゲート化されていない莢膜多糖は2以上の担体タンパク質にコンジュゲート化されている（各莢膜多糖分子は、単一の担体タンパク質にコンジュゲート化されている）。そのような実施形態においては、同じ血清型の各莢膜多糖は、典型的には、同じ担体タンパク質にコンジュゲート化されている。

【0068】

実施形態E1およびその任意の下位実施形態を含む本発明の実施形態においては、多糖血清型の1以上（適用可能な場合には、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個以上を含む）がCRM 197にコンジュゲート化されている。実施形態E1およびその任意の下位実施形態を含む本発明の他の実施形態においては、多糖血清型のそれぞれがCRM 197にコンジュゲート化されている。

【0069】

本発明の多糖-タンパク質コンジュゲートの製剤化（処方）は、当技術分野で認められている方法を使用して達成されうる。例えば、個々の肺炎球菌コンジュゲートは、組成物を製造するために生理的に許容されるビヒクルを使用して製剤化されうる。そのようなビヒクルの例には、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）およびデキストロース溶液が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0070】

好ましい実施形態においては、ワクチン組成物は、塩化ナトリウムを含有するL-ヒスチジンバッファー中で製剤化される。

【0071】

本発明の幾つかの実施形態においては、多価免疫原性組成物は、担体タンパク質およびアジュバントにコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含む複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型は本明細書に記載されているとおりである。組成物の有効性を増強するための適切なアジュバントには、以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：

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

（2）水中油型エマルジョン製剤〔他の特定の免疫刺激剤、例えばムラミルペプチド（後記に定義されている）または細菌細胞壁成分を含有する又は含有しない〕、例えば、（a）モデル110Yマイクロフルイダイザー（Microfluidics, Newton, MA）のようなマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロン粒子内に製剤化さ

10

20

30

40

50

れた、5% スクアレン、0.5% Tween (トウイーン) 80 および 0.5% Span (スパン) 85 (所望により、種々の量の MTP-PE を含有していてもよい) を含有する MF59 (国際特許出願公開番号 WO 90/14837)、(b) サブミクロンエマルジョンへとマイクロフルイダイズされた、またはより大きな粒子サイズのエマルジョンを生成させるためにボルテックスされた、10% スクアレン、0.4% Tween 80、5% プルロニックブロック化ポリマー L121 および thr-MDP を含有する SAF、(c) Ribbi (商標) アジュバント系 (RAS) (Corixa, Hamilton, MT) であって、以下のものを含有するもの：2% スクアレン、0.2% Tween 80、および以下のものからなる群からの 1 以上の細菌細胞壁成分：米国特許第 4, 912, 094 号に記載されている 3-O-脱アシル化モノリン脂質 A (MPL (商標))、トレハロースジミコラート (TDM) および細胞壁骨格 (CWS)、好ましくは MPL+CWS (Detox (商標))、ならびに (d) モンタニド (Montanide) ISA；

10

(3) サポニンアジュバント、例えば Quil (クイル) A または STIMULON (商標) QS-21 (Antigenics, Framingham, MA) (例えば、米国特許第 5, 057, 540 号を参照されたい)、またはそれから生成された粒子、例えば ISCOM (コレステロール、サポニン、リン脂質および両親媒性タンパク質の組合せから形成される免疫刺激複合体) および Iscomatrix (登録商標) (タンパク質を含有しないこと以外は ISCOM と実質的に同じ構造を有する) が使用されうる；

20

(4) 細菌性リポ多糖、合成リピド A 類似体、例えば アミノアルキルグルコサミンホスファート化合物 (AGP) またはその誘導体もしくは類似体 (これらは 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；1つのそのような AGP は 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]-β-D-グルコピラノシド [これは 529 (以前は RC529 として公知であった) としても公知であり、水性形態または安定エマルジョンとして製剤化される] である；

(5) 合成ポリヌクレオチド、例えば、CpG モチーフを含有するオリゴヌクレオチド (米国特許第 6, 207, 646 号)；

30

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

(7) 補体、例えば、補体成分 C3d の三量体。

【0072】

もう 1 つの実施形態においては、アジュバントは、前記アジュバントの 2 個、3 個またはそれ以上の混合物、例えば、SBAS2 (3-脱アシル化モノホスホリルリピド A および QS21 をも含有する水中油型エマルジョン) である。

【0073】

40

ムラミルペプチドには、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-L-ノルムラミル-L-アラニン-2-(1', 2' ジパルミトイル-sn-グリセロ)-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (MTP-PE) などが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0074】

特定の実施形態においては、アジュバントはアルミニウム塩である。アルミニウム塩アジュバントはミョウバン沈殿ワクチンまたはミョウバン吸着ワクチンでありうる。アルミニウム塩アジュバントは当技術分野で周知であり、例えば、Harlow, E. および D. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) ならびに Nicklas

50

, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143: 489-493)に記載されている。アルミニウム塩には、水和アルミナ、アルミナ水和物、アルミナ三水和物 (ATH)、アルミニウム水和物、アルミニウム三水和物、アルヒドロゲル (Alhydrogel)、スーパーホス (Superfos)、アンホゲル (Amphogel)、水酸化アルミニウム (III)、ヒドロキシリン酸アルミニウム硫酸塩、リン酸アルミニウムアジュバント (APA)、アモルファスアルミナ、三水和アルミナまたはトリヒドロキシアアルミニウムが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0075】

APAはヒドロキシリン酸アルミニウムの水性懸濁液である。APAは、塩化アルミニウムとリン酸ナトリウムとを1:1の体積比で混合してヒドロキシリン酸アルミニウムを沈殿させることにより製造される。混合プロセスの後、物質を高せん断ミキサーでサイズ減少させて、単分散粒子サイズ分布を得る。ついで、生成物を生理食塩水に対してダイアフィльтраーションし、蒸気滅菌する。1つの実施形態においては、アルミニウム塩の用量は10、15、20、25、30、50、70、100、125、150、200、300、500または700 μg 、あるいは1、1.2、1.5、2、3、5 mgまたはそれ以上である。更にもう1つの実施形態においては、前記のミョウバン塩の用量は組換えタンパク質1 μg 当たりである。

【0076】

特定の実施形態においては、水酸化アルミニウム1 mg 当たりタンパク質50~200 μg の比でタンパク質を吸着させるために、商業的に入手可能な $\text{Al}(\text{OH})_3$ [例えば、Denmark/Accurate Chemical and Scientific Co., Westbury, NYのアルヒドロゲル (Alhydrogel) またはスーパーホス (Superfos)] を使用する。もう1つの実施形態においては、タンパク質の吸着はタンパク質のpI (等電点pH) および培地のpHに左右される。より低いpIを有するタンパク質は、より高いpIを有するタンパク質より強く、正荷電アルミニウムイオンに吸着される。アルミニウム塩は、2~3週間にわたってゆっくりと放出される抗原のデポを形成し、マクロファージの非特異的活性化および補体活性化に関与し、ならびに/または自然免疫機構を刺激する (これは、おそらく、尿酸の刺激によるものであろう)。例えば、Lambrechtら, 2009, Curr Opin Immunol 21: 23を参照されたい。

【0077】

一価バルク水性コンジュゲートを、典型的には、一緒に混合し、6B (これは目標濃度8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈されうる) を除く全ての血清型に関して目標濃度4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈する。希釈したら、バッチを濾過滅菌し、等体積のリン酸アルミニウムアジュバントを無菌的に添加して、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終アルミニウム濃度を目標にする。アジュバント化され製剤化されたバッチを、使い捨ての0.5 mL / 用量バイアル内に充填する。

【0078】

特定の実施形態においては、アジュバントはCpG含有ヌクレオチド配列、例えばCpG含有オリゴヌクレオチド、特にCpG含有オリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) である。もう1つの実施形態においては、アジュバントはODN 1826であり、これはColey Pharmaceutical Corpから入手可能である。

【0079】

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

【0080】

代替的な実施形態においては、免疫原性組成物は、本明細書、例えば実施形態E1また

10

20

30

40

50

はその任意の下位実施形態において記載されている複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、アジュバントを含まない。

【0081】

製剤

本発明の多価免疫原性組成物は単回投与用バイアル、複数回投与用バイアルまたは予充填ガラスもしくはプラスチックシリンジとして製剤化されうる。

【0082】

もう1つの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物は経口投与され、したがって、経口投与に適した形態で、すなわち、固体または液体製剤として製剤化される。固体経口製剤には、錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、ペレット剤などが含まれる。液体経口製剤には、溶液、懸濁液、分散液、乳濁液（エマルジョン）、油などが含まれる。

【0083】

液体製剤用の薬学的に許容される担体は水性または非水性の溶液、懸濁液、乳濁液または油である。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルが挙げられる。水性担体には、水、アルコール性／水性の溶液、乳濁液または懸濁液（生理食塩水および緩衝媒体を含む）が含まれる。油の例としては、動物、植物または合成由来のものが挙げられ、例えばピーナッツ油、ダイズ油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、他の魚油、またはミルクもしくは卵由来の脂質が挙げられる。

【0084】

本発明の多価免疫原性組成物は等張性、低張性または高張性でありうる。しかし、注入または注射用の組成物は投与時に実質的に等張性であることがしばしば好ましい。したがって、貯蔵用には、組成物は、好ましくは、等張性または高張性でありうる。組成物が貯蔵用に高張性である場合、それは投与前に等張液となるように希釈されうる。

【0085】

等張化剤は、イオン性等張化剤、例えば塩、または非イオン性等張化剤、例えば炭水化物ありうる。イオン性等張化剤の例には、 NaCl 、 CaCl_2 、 KCl および MgCl_2 が含まれるが、これらに限定されるものではない。非イオン性等張化剤の例には、マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0086】

少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤がバッファーであることも好ましい。幾つかの目的においては、例えば、医薬組成物が注入または注射を意図したものである場合、該組成物は、4～10の範囲のpH、例えば5～9のpH、例えば6～8のpHに溶液を緩衝化しうるバッファーを含むことがしばしば望ましい。

【0087】

バッファーは、例えば、 TRIS 、アセタート、グルタマート、ラクタート、マレアート、タルトラート、ホスファート、シトラート、カルボナート、グリシナート、ヒスチジン、グリシン、スクシナートおよびトリエタノールアミンバッファーからなる群から選択されうる。

【0088】

バッファーは、特に医薬製剤が非経口用である場合、非経口用のUSP適合性バッファーから選択されうる。例えば、バッファーは、一塩基酸、例えば酢酸、安息香酸、グルコン酸、グリセリン酸および乳酸；二塩基酸、例えばアコニット酸、アジピン酸、アスコルビン酸、炭酸、グルタミン酸、リンゴ酸、コハク酸および酒石酸；多塩基酸、例えばクエン酸およびリン酸；ならびに塩基、例えばアンモニア、ジエタノールアミン、グリシン、トリエタノールアミンおよび TRIS からなる群から選択されうる。

【0089】

非経口ビヒクル（皮下、静脈内、動脈内または筋肉内注射用）には、塩化ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液

10

20

30

40

50

および不揮発性油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体および栄養補充剤、電解質補充剤、例えば、リンゲルデキストロースに基づくものなどが含まれる。例示としては、界面活性剤および他の薬学的に許容されるアジュバントの添加の存在下または非存在下の例えば水および油のような無菌液が挙げられる。一般に、水、生理食塩水、水性デキストロースおよび関連糖溶液、グリコール、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコール、ポリソルベート 80 (PS-80)、ポリソルベート 20 (PS-20) およびポロキサマー 188 (P188) が、特に注射可能溶液の場合に、好ましい液体担体である。油の例としては、動物、植物または合成由来のもの、例えばピーナッツ油、ダイズ油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、他の魚油、またはミルクもしくは卵由来の脂質が挙げられる。

10

【0090】

本発明の製剤は界面活性剤を含みうる。好ましい界面活性剤には以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：ポロキサマー 188 (P188；プルロニック；F68 NF)、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤（一般に Tween (トゥイーン) と称される）、特に PS-20 および PS-80；DOWFAX (商標) の商品名で販売されているエチレンオキシド (EO)、プロピレンオキシド (PO) および／またはブチレンオキシド (BO) のコポリマー、例えば直鎖状 EO/PO ブロックコポリマー；オクトキシノール [これは、反復エトキシ (オキシ-1, 2-エタンジイル) 基の数において様々でありうるが、オクトキシノール-9 (Triton X-100 または α -オクチルフェノキシポリエトキシエタノール) に特に関心が持たれる]；(オクチルフェノキシ) ポリエトキシエタノール (IGEPAL CA-630/NP-40)；リン脂質、例えばホスファチジルコリン (レシチン)；ノニルフェノールエトキシラート、例えば Tergitol (商標) NP シリーズ；ラウリル、セチル、ステアリル およびオレイルアルコールから誘導されたポリオキシエチレン脂肪エーテル (Brij 界面活性剤として公知である)、例えば トリエチレングリコールモノラウリルエーテル (Brij 30)；ならびにソルビタンエステル（一般に SPAN として公知である）、例えばソルビタントリオレアート (スパン 85) およびソルビタンモノラウラート。エマルジョン中に配合するための好ましい界面活性剤は PS-80 である。

20

【0091】

界面活性剤の混合物、例えば PS-80/スパン 85 混合物が使用されうる。ポリオキシエチレンソルビタンエステル、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート (PS-80) と、オクトキシノール、例えば α -オクチルフェノキシポリエトキシエタノール (トリトン X-100) との組合せも好適である。もう 1 つの有用な組合せは、ラウレス 9 に加えて、ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび／またはオクトキシノールを含む。

30

【0092】

界面活性剤の好ましい量 (重量%) は以下のとおりである：0.01~1%、特に約 0.1% のポリオキシエチレンソルビタンエステル (例えば、PS-80)；0.001~0.1%、特に 0.005~0.02% のオクチルまたはノニルフェノキシポリオキシエタノール (例えば、Triton X-100 または Triton シリーズにおける他の界面活性剤)；0.1~20%、好ましくは 0.1~10%、特に 0.1~1% または約 0.5% のポリオキシエチレンエーテル (例えば、ラウレス 9)。

40

【0093】

特定の実施形態においては、組成物は、250 μ g/mL の APA (リン酸アルミニウムアジュバント) の存在下、ヒスチジン (20 mM)、生理食塩水 (150 mM) および 0.2% PS-20 (pH 5.8) から実質的になる。PS-20 は 0.005%~0.3% (w/v) の範囲でありうる。もう 1 つの実施形態においては、PS-20 は 0.025%~0.8% (w/v) の範囲でありうる。もう 1 つの実施形態においては、PS-20 は 0.05%~0.8% (w/v) の範囲でありうる。もう 1 つの実施形態においては、PS-20 は 0.05%~0.2% (w/v) の範囲でありうる。該方法は、ヒス

50

チジン、生理食塩水および P S - 2 0 中で最大 2 4 個の血清型の混合物（ブレンド）を一緒にし、ついでこの混合物を、抗微生物保存剤の存在下または非存在下、A P A および生理食塩水と一緒にすることからなる。

【0094】

特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物はストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲート、そして更に、20～80mM ヒスチジン（pH5.8）および150mM NaClを含み、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、多糖タンパク質コンジュゲートにおけるストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は、本明細書に記載されている血清型の組合せのいずれかを含む。幾つかの実施形態においては、多価免疫原性組成物は0.2%～0.8% w/v ポリソルベート20を更に含む。

10

【0095】

多価免疫原性組成物 P C V 2 4 は、非プロトン性溶媒（DMSO 化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖（P n P）血清型-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-8、-9V、-10A、-11A、-12F、-14、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-22F、-23B、-23F、-24F、-33F および -35B に C R M 1 9 7 タンパク質を個々にコンジュゲート化することにより製造され、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）、150mM NaCl および 0.1% w/v ポリソルベート-20（P S - 2 0）中、各多糖血清型 4 μg/mL または 8 μg/mL（総多糖濃度はそれぞれ 96 μg/mL または 192 μg/mL）で製剤化され、「P C V 2 4 u n a d j」と称される。もう1つの特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物 P C V 2 4 は、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）、150mM NaCl および 0.2% w/v ポリソルベート-20（P S - 2 0）中、更にリン酸アルミニウムアジュバントの形態の [A L] 250 μg/mL を含有させて、各多糖血清型 4 μg/mL（総多糖濃度は 96 μg/mL）で製造される。これは「P C V 2 4 / A P A」と称される。

20

【0096】

界面活性剤の選択は、種々の医薬品および薬物に合わせて最適化されることを要する。15個以上の血清型を含有する多価ワクチンの場合、P S - 2 0 および P 1 8 8 が好ましい。コンジュゲートを製造するために用いられる化学法の選択も製剤の安定化において重要な役割を果たしうる。特に、多価組成物中の種々の多糖タンパク質コンジュゲートを製造するために用いられるコンジュゲート化反応が水性溶媒と DMSO 溶媒との両方を含む場合、個々の界面活性剤系は安定性における有意差をもたらす。多糖タンパク質コンジュゲートの安定性の改善が、ポリソルベート20のみ、またはポロキサマー188とポリオールとの組合せで認められた。

30

【0097】

特定の界面活性剤が生物療法物質をどのようにして保護するのかの厳密なメカニズムは十分には理解されておらず、事前に予測することができない。可能な安定化メカニズムには、優先的水和、優先的排除、生物療法物質と表面との間の気/液界面競合、表面張力、および/または凝集のシード（seed）として働く疎水性パッチをマスクするための界面活性剤と生物療法物質との直接的結合が含まれる。

40

【0098】

ポロキサマーも本発明の組成物において使用されうる。ポロキサマーは、ポリオキシエチレン（ポリ（エチレンオキシド））の2つの親水性鎖に隣接するポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中央の疎水性鎖から構成される非イオン性トリブロックコポリマーである。ポロキサマーは商品名 P l u r o n i c（登録商標）としても公知である。ポリマーブロックの長さはカスタマイズ可能であるため、わずかに異なる特性を有する多数の異なるポロキサマーが存在する。一般的な用語「ポロキサマー」の場合、これらのコポリマーは、一般に、文字「P」（ポロキサマーの場合）およびそれに続く3桁

50

の数字として命名され、ここで、最初の2桁の数字×100はポリオキシプロピレンコアのおおよその分子量を示し、最後の桁の数字×10はポリオキシエチレン含有量の百分率を示す（例えば、P407は4,000 g/molのポリオキシプロピレン分子量および70%のポリオキシエチレン含有量のポロキサマーである）。Pluronic（登録商標）商品名の場合、これらの共重合体の記号は、室温でのその物理的形狀を定める文字（L＝液体、P＝ペースト、F＝フレーク（固体））で始まり、2桁または3桁の数字が続く。数字表示部分における最初の桁（3桁数字の場合には2桁）×300は該疎水性物質のおおよその分子量を示し、最後の桁×10はポリオキシエチレン含有量の百分率を示す（例えば、L61は、1,800 g/molのポリオキシプロピレン分子量および10%のポリオキシエチレン含有量を有するPluronic（登録商標）である）。米国特許第3,740,421号を参照されたい。

10

【0099】

ポロキサマーの具体例は一般式： $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a$ Hを有し、ここで、aブロックおよびbブロックは以下の値を有する。

【表1】

Pluronic®	ポロキサマー	A	B	分子量
L31		2	16	1100 (平均)
L35				1900 (平均)
L44NF	124	12	20	2090～2360
L64				2900 (平均)
L81				2800 (平均)
L121				4400 (平均)
P123		20	70	5750 (平均)
F68NF	188	80	27	7680～9510
F87NF	237	64	37	6840～8830
F108NF	338	141	44	12700～17400
F127NF	407	101	56	9840～14600

20

30

ここで用いている分子量単位はダルトン(Da)または g/mol である。

【0100】

好ましくは、ポロキサマーは、一般に、1,100～17,400 Da、7,500～15,000 Daまたは7,500～10,000 Daの範囲の分子量を有する。ポロキサマーはポロキサマー188またはポロキサマー407から選択されうる。製剤中のポロキサマーの最終濃度は0.001%～5%（重量／体積）または0.025%～1%（重量／体積）である。特定の態様においては、ポリオールはプロピレングリコールであり、最終濃度は1%～20%（重量／体積）である。特定の態様においては、ポリオールはポリエチレングリコール400であり、最終濃度は1%～20%（重量／体積）である。

40

【0101】

本発明の製剤のための適切なポリオールは重合性ポリオール、特にポリエーテルジオール、例えばプロピレングリコールおよびポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールモノメチルエーテル（これらに限定されるものではない）である。プロピレングリコールは約425～約2,700の単体分子量の範囲のものが入手可能である。ポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールモノメチルエーテルは約200～約35,0

50

00の範囲の分子量範囲のもの、例えばPEG200、PEG300、PEG400、PEG1000、PEG MME 550、PEG MME 600、PEG MME 2000、PEG MME 3350およびPEG MME 4000（これらに限定されるものではない）が入手可能である。好ましいポリエチレングリコールはポリエチレングリコール400である。本発明の製剤におけるポリオールは最終濃度は1%~20%（重量／体積）または6%~20%（重量／体積）でありうる。

【0102】

製剤はpH緩衝食塩水をも含有する。バッファーは、例えば、TRIS、アセタート、グルタマート、ラクタート、マレアート、タルトラート、ホスファート、シトラート、カルボナート、グリシナート、ヒスチジン、グリシン、スクシナート、HEPES（4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸）、MOPS（3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸）、MES（2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸）およびトリエタノールアミンバッファーからなる群から選択されうる。バッファーは4~10、5.2~7.5または5.8~7.0の範囲のpHに溶液を緩衝化しうる。本発明の特定の態様においては、バッファーは、ホスファート、スクシナート、ヒスチジン、MES、MOPS、HEPES、アセタートまたはシトラートからなる群から選択される。バッファーは更に、例えば、特に医薬製剤が非経口用である場合には、非経口用のUSP適合性バッファーから選択されうる。1つの実施形態においては、バッファーの濃度は1mM~100mMの範囲である。もう1つの実施形態においては、バッファーの濃度は10mM~80mMの範囲である。もう1つの実施形態においては、バッファーの濃度は1mM~50mMまたは5mM~50mMの範囲である。特定の態様においては、バッファーは5mM~50mMの最終濃度のヒスチジンまたは1mM~10mMの最終濃度のスクシナートである。特定の態様においては、ヒスチジンバッファーは20mM±2mMの最終濃度である。

【0103】

食塩水（例えば、NaClを含有する溶液）が好ましいが、製剤化に適した他の塩には、CaCl₂、KClおよびMgCl₂ならびにそれらの組合せ（これらに限定されるものではない）が含まれる。塩の代わりに、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトールおよびグリセロール（これらに限定されるものではない）を含む非イオン性等張化剤が使用されうる。適切な塩濃度範囲には、20mM~500mMまたは40mM~170mMが含まれるが、これらに限定されるものではない。1つの態様においては、食塩水はNaClであり、所望により、25mM~170mMの濃度で存在しうる。

【0104】

好ましい実施形態においては、製剤は、塩化ナトリウムを含有するL-ヒスチジンバッファーを含む。

【0105】

もう1つの実施形態においては、医薬組成物はコントロールリリース（制御放出）システムで送達される。例えば、物質は、静脈内注入、経皮パッチ、リポソームまたは他の投与様式を用いて投与されうる。もう1つの実施形態においては、例えばミクロスフェアまたはインプラントにおいて、高分子材料が使用される。

【0106】

組成物の各用量におけるコンジュゲートの量は、有意な有害作用を伴うことなく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動しうる。一般に、多糖に基づくコンジュゲートの場合、各用量は0.08~100μgの各多糖を含む。本発明の幾つかの実施形態においては、各多糖コンジュゲートの用量は0.08~10μgである。他の実施形態においては、各コンジュゲートの用量は1~5μg、0.4~4μg、0.4~3μg、0.4~2μgまたは0.4~1μgである。幾つかの実施形態においては、1以上の多糖コンジュゲートの用量は100、150、200、250、300、400、500もしくは750ng、または0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1、1.5、2、3、4、5、6、7、7.5、8

10

20

30

40

50

、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、22、25、30、40、50、60、70、80、90または100 μ gである。

【0107】

本発明の組成物の幾つかの実施形態においては、多糖コンジュゲートの全ては、同じ量で組成物中に存在する。他の実施形態においては、多糖コンジュゲートは、異なる量で組成物中に存在する（すなわち、少なくとも1つの多糖コンジュゲートは、組成物のその他の多糖コンジュゲートの1以上とは異なる量で存在する）。

【0108】

個々の免疫原性組成物の成分の最適量は、対象における適切な免疫応答の観察を含む標準的な研究により確認されうる。例えば、もう1つの実施形態においては、ヒトワクチン接種の投与量は動物研究からヒトデータへの外挿により決定される。もう1つの実施形態においては、投与量は経験的に決定される。

【0109】

本発明の組成物はストレプトコッカス・ニューモニエ由来の1以上のタンパク質を含みうる。配合に適したストレプトコッカス・ニューモニエタンパク質の例には、国際特許出願公開番号WO 02/083855およびWO 02/053761において特定されているものが含まれる。

【0110】

特定の実施形態においては、本発明の組成物は、当業者に公知の1以上の方法により、例えば非経口的、経粘膜的、経皮的、筋肉内、静脈内、皮内、鼻腔内、皮下、腹腔内に、対象に投与され、それに応じて製剤化される。1つの実施形態においては、本発明の組成物は液体製剤の表皮注射、筋肉内注射、静脈内、動脈内、皮下注射または呼吸器内粘膜注射により投与される。注射用の液体製剤には、溶液などが含まれる。

【0111】

III. 製造方法

ストレプトコッカス・ニューモニエ由来の荚膜多糖は、当業者に公知の標準的な技術により製造されうる。例えば、多糖は細菌から単離可能であり、公知方法により（例えば、欧州特許番号EP 497524およびEP 497525を参照されたい）、好ましくは、ホモジナイザーを使用して達成されるマイクロフルイダイゼーションにより、または化学的加水分解により、ある程度サイジングされうる。1つの実施形態においては、各ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖血清型を、ダイズに基づく培地内で増殖させる。ついで個々の多糖を、遠心分離、沈殿および限外濾過を含む標準的な工程で精製する。例えば、米国特許出願公開番号2008/0286838および米国特許第5,847,112号を参照されたい。多糖サンプルの粘度を低減するために、および／またはコンジュゲート化産物の濾過性を改善するために、機械的または化学的サイジングのような技術を用いて、多糖をサイジングすることが可能である。化学的加水分解は、酢酸を使用して行われうる。機械的サイジングは、高圧均質化せん断を用いて行われうる。

【0112】

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しうる多糖を得ることが可能である。精製された多糖はリンカーに連結されうる。各荚膜多糖は、活性化され又はリンカーに連結されたら、タンパク質に個々にコンジュゲート化されて糖コンジュゲート（複合糖質）を形成する。多糖コンジュゲートは、公知のカップリング技術により製造されうる。

【0113】

多糖はリンカーにカップリング（結合）されて、リンカーの遊離末端がエステル基である多糖-リンカー中間体を形成しうる。したがって、リンカーは、少なくとも1つの末端がエステル基であるリンカーである。他方の末端は、それが多糖と反応して多糖-リンカー中間体を形成しうるように選択される。

【0114】

多糖は、多糖における第一級アミン基を使用してリンカーにカップリングされうる。こ

の場合、リンカーは、典型的には、両方の末端にエステル基を有する。これは、エステル基の1つを多糖の第一級アミン基と求核アシル置換により反応させることにより、カップリングが生じることを可能にする。該反応は、多糖がアミド結合を介してリンカーにカップリングされた多糖-リンカー中間体を生成する。したがって、該リンカーは、多糖の第一級アミン基と反応するための第1エステル基と、担体分子の第一級アミン基と反応するための第2エステル基とを提供する二官能性リンカーである。典型的なリンカーはアジピン酸N-ヒドロキシスクシンイミドジエステル (SIDEA) である。

【0115】

カップリングは間接的に行われることも可能であり、すなわち、リンカーへのカップリングの前に多糖を誘導体化するために使用される追加的リンカーを使用して行われうる。

【0116】

多糖は、多糖の還元末端におけるカルボニル基を使用して、追加的リンカーにカップリングされる。このカップリングは、以下の2つの工程、すなわち、(a1) カルボニル基を追加的リンカーと反応させる工程、および(a2) 追加的リンカーの遊離末端をリンカーと反応させる工程を含む。これらの実施形態においては、追加的リンカーは、典型的には、両方の末端に第一級アミン基を有し、それにより、第一級アミン基の1つを多糖のカルボニル基と還元的アミノ化により反応させることにより工程(a1)を行うことを可能にする。多糖のカルボニル基と反応性である第一級アミン基が使用される。ヒドラジドまたはヒドロキシルアミノ基が好適である。同じ第一級アミン基が、典型的には、追加的リンカーの両方の末端に存在する。該反応は、多糖がC-N結合を介して追加的リンカーにカップリングされた多糖-追加的リンカー中間体を生成する。

【0117】

多糖は、多糖における異なる基、特にカルボキシル基を使用して、追加的リンカーにカップリングされうる。このカップリングは、以下の2つの工程、すなわち、(a1) 該基を追加的リンカーと反応させる工程、および(a2) 追加的リンカーの遊離末端をリンカーと反応させる工程を含む。この場合、追加的リンカーは、典型的には、両方の末端に第一級アミン基を有し、それにより、第一級アミン基の1つを多糖のカルボキシル基とEDAC活性化により反応させることにより工程(a1)を行うことを可能にする。多糖のEDAC活性化カルボキシル基と反応性である第一級アミン基が使用される。ヒドラジド基が好適である。同じ第一級アミン基が、典型的には、追加的リンカーの両方の末端に存在する。該反応は、多糖がアミド結合を介して追加的リンカーにカップリングされた多糖-追加的リンカー中間体を生成する。

【0118】

1つの実施形態においては、多糖の化学的活性化、およびそれに続く、還元的アミノ化による担体タンパク質へのコンジュゲート化は、米国特許第4,365,170号、第4,673,574号および第4,902,506号、米国特許出願公開番号2006/0228380、2007/184072、2007/0231340および2007/0184071、ならびにWO2006/110381、WO2008/079653およびWO2008/143709に記載されている手段により達成されうる。該化学法は、末端ヒドロキシル基をアルデヒドへと酸化する任意の酸化剤、例えばペルヨードート(過ヨウ素酸塩)(過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムまたは過ヨウ素酸を含む)との反応による肺炎球菌多糖の活性化を含みうる。該反応は、反応性アルデヒド基の形成と共に、カルボヒドラートの隣接ヒドロキシル基のランダムな酸化的切断をもたらす。

【0119】

担体タンパク質へのカップリングは、タンパク質のリシル基への直接的アミノ化による還元的アミノ化によるものである。例えば、コンジュゲート化は、活性化多糖と担体タンパク質との混合物をシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような還元剤と反応させることにより行われうる。コンジュゲート化反応は水溶液またはDMSOの存在下で生じるうる。例えば、US2015/0231270、US2011/0195086およびEP 0471 177 B1を参照されたい。ついで未反応アルデヒドを水素化ホウ素ナトリウムの

10

20

30

40

50

ような強力な還元剤の添加によりキャップ化 (cap) する。

【0120】

還元的アミノ化は、以下の2つの工程、すなわち、(1) 多糖を酸化して反応性アルデヒドを形成させる工程、(2) 活性化多糖と担体タンパク質との間で形成されたイミン (Schiff塩基) を還元して安定なアミンコンジュゲート結合を形成させる工程を含む。酸化前に、多糖は、所望により、サイズ縮小されうる。機械的方法 (例えば、均質化) または化学的加水分解が用いられうる。化学的加水分解は、酢酸を使用して行われうる。酸化工程はペルヨードートとの反応を含みうる。本発明の目的においては、「ペルヨードート」なる語は過ヨウ素酸塩 (ペルヨードート) および過ヨウ素酸の両方を含む。この用語はまた、メタペルヨードート (IO_4^-) およびオルトペルヨードート (IO_6^-) の両方を含み、ペルヨードートの種々の塩 (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) を含む。1つの実施形態においては、莢膜多糖は、メタペルヨードートの存在下、好ましくは、過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_4) の存在下で酸化される。もう1つの実施形態においては、莢膜多糖は、オルトペルヨードートの存在下、好ましくは、過ヨウ素酸の存在下で酸化される。

【0121】

1つの実施形態においては、酸化剤は、第一級ヒドロキシルを選択的に酸化する酸化剤の存在下の、安定なニトロキシルまたはニトロオキシドラジカル化合物、例えばピペリジン-N-オキシまたはピロリジン-N-オキシ化合物 (WO 2014/097099に記載されている) である。前記反応においては、実際の酸化剤は触媒サイクルにおけるN-オキソアンモニウム塩である。1つの態様においては、前記の安定なニトロキシルまたはニトロオキシドラジカル化合物はピペリジン-N-オキシまたはピロリジン-N-オキシ化合物である。1つの態様においては、前記の安定なニトロキシルまたはニトロオキシドラジカル化合物はTEMPO (2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ) またはPROXYL (2, 2, 5, 5-テトラメチル-1-ピロリジニルオキシ) 部分を含有する。1つの態様においては、前記の安定なニトロキシルラジカル化合物はTEMPOまたはその誘導体である。1つの態様においては、前記酸化剤は、N-ハロ部分を含む分子である。1つの態様においては、前記酸化剤は、N-クロロスクシンイミド、N-ブロモスクシンイミド、N-ヨードスクシンイミド、ジクロロイソシアヌル酸、1, 3, 5-トリクロロ-1, 3, 5-トリアジナン-2, 4, 6-トリオン、ジブロモイソシアヌル酸、1, 3, 5-トリブロモ-1, 3, 5-トリアジナン-2, 4, 6-トリオン、ジヨードイソシアヌル酸および1, 3, 5-トリヨード-1, 3, 5-トリアジナン-2, 4, 6-トリオンからなる群から選択される。好ましくは、前記酸化剤はN-クロロスクシンイミドである。

【0122】

特定の態様においては、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 (WO 2014/097099に記載されている)。したがって、1つの態様においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ由来の複合糖質は、a) 糖を水性溶媒中で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糖を得、b) 活性化糖を、1以上のアミン基を含む担体タンパク質と反応させる工程を含む方法 (以下、該方法は「TEMPO/NCS-還元的アミノ化」と称される) により入手可能である。

【0123】

所望により、酸化反応はクエンチ化剤の添加によりクエンチされる。クエンチ化剤は、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、スルフィト、ビスルファート、ジチオニト、メタビスルフィト、チオスルファート、ホスフィト、ヒポホスフィトまたは亜リン酸 (例えば、グリセロール、エチレングリコール、プロパン-1, 2-ジオール、ブタン-1, 2-ジオールまたはブタン-2, 3-ジオール、アスコルビン酸) から選択されうる。

【0124】

特定の実施形態においては、本発明は、非プロトン性溶媒中でのコンジュゲート化反応を利用する、血清型8ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖-タンパク質コンジュゲートの製造方法を提供し、ここで、コンジュゲート化反応はシアノボロヒドリドを使用しない。他の実施形態においては、コンジュゲート化反応はシッフ塩基還元または還元的アミノ化である。他の実施形態においては、タンパク質は破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドまたはCRM197である。更に他の実施形態においては、タンパク質はCRM197である。他の実施形態においては、コンジュゲート化反応は還元的アミノ化である。他の実施形態においては、還元的アミノ化はジメチルスルホキシド（DMSO）中で行われる。

10

【0125】

幾つかの実施形態においては、コンジュゲート化前の酸化多糖は30kDa~1,000kDaの分子量を有する。分子量は、多角度光散乱検出器（MALS）および屈折率検出器（RI）と組合されたサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により計算される。幾つかの実施形態においては、多糖は50kDa~300kDaの分子量を有する。幾つかの実施形態においては、多糖は50kDa~1,000kDaの分子量を有する。追加的な実施形態においては、多糖は70kDa~900kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、多糖は100kDa~800kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、多糖は200kDa~600kDaの分子量を有する。他の実施形態においては、多糖は100kDa~1,000kDa、100kDa~900kDa、100kDa~800kDa、100kDa~700kDa、100kDa~600kDa、100kDa~500kDa、100kDa~400kDa、100kDa~300kDa、150kDa~1,000kDa、150kDa~900kDa、150kDa~800kDa、150kDa~700kDa、150kDa~600kDa、150kDa~500kDa、150kDa~400kDa、150kDa~300kDa、200kDa~1,000kDa、200kDa~900kDa、200kDa~800kDa、200kDa~700kDa、200kDa~600kDa、200kDa~500kDa、200kDa~400kDa、200kDa~300、250kDa~1,000kDa、250kDa~900kDa、250kDa~800kDa、250kDa~700kDa、250kDa~600kDa、250kDa~500kDa、250kDa~400kDa、250kDa~350kDa、300kDa~1,000kDa、300kDa~900kDa、300kDa~800kDa、300kDa~700kDa、300kDa~600kDa、300kDa~500kDa、300kDa~400kDa、400kDa~1,000kDa、400kDa~900kDa、400kDa~800kDa、400kDa~700kDa、400kDa~600kDa、または500kDa~600kDaの分子量を有する。

20

30

【0126】

コンジュゲート化方法の第2工程は、還元剤を使用して、活性化多糖と担体タンパク質との間のイミン（シッフ塩基）結合を還元して、安定なコンジュゲート結合を形成させること（いわゆる還元的アミノ化）である。適切な還元剤には、シアノボロヒドリド（例えば、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化ホウ素ナトリウムなど）が含まれる。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である。

40

【0127】

特定の実施形態においては、還元的アミノ化反応は非プロトン性溶媒（または非プロトン性溶媒の混合物）中で行われる。1つの実施形態においては、還元反応はDMSOまたはDMF（ジメチルホルムアミド）溶媒中で行われる。活性化多糖および担体タンパク質が凍結乾燥されている場合には、それらを再構成させるために、DMSOまたはDMF溶媒が使用される。1つの実施形態においては、非プロトン性溶媒はDMSOである。

【0128】

還元反応の終了時に、コンジュゲート内に未反応アルデヒド基が残存している可能性が

50

あり、これは、適切なキャップ化剤を使用してキャップ化されうる。1つの実施形態においては、このキャップ化剤は水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) である。適切な代替物には、ブロンステッドまたはルイス酸の存在下のナトリウムもしくは亜鉛ボロヒドリドまたはナトリウムトリアセトキシボロヒドリド、アミンボラン、例えばピリジンボラン、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、 $\text{t-BuMe}^+\text{PrN-BH}_3$ 、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) またはボロヒドリド交換樹脂が含まれる。コンジュゲート化 (還元反応、および所望により行われうるキャップ化) の後、複合糖質は、当業者に公知の種々の技術により精製されうる (多糖-タンパク質コンジュゲートの量に関して濃縮されうる)。これらの技術には、透析、濃縮/ダイアフィルトレーション操作、接線流濾過、沈殿/溶出、カラムクロマトグラフィー (イオン交換クロマトグラフィー、マルチモードイオン交換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) およびデプス濾過が含まれる。1つの実施形態においては、複合糖質はダイアフィルトレーションまたはイオン交換クロマトグラフィーまたはサイズ排除クロマトグラフィーにより精製される。

【0129】

非プロトン性溶媒中で還元的アミノ化を用いて製造された複合糖質は多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンにおいて一般に使用される。したがって、全ての血清型が非プロトン性溶媒中で製造されるわけではない多価組成物に関する特定の実施形態においては、残りの血清型のための還元反応は水性溶媒 [例えば、PBS (リン酸緩衝食塩水)、MES (2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸)、HEPES (4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸)、ビス-トリリス、ADA (N-(2-アセトアミド) イミノニ酢酸)、PIPES (ピペラジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸))、MOPSO (3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)、BES (N, N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸)、MOPS (3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸)、DIPSO (3-ビス(2-ヒドロキシエチル) アミノ-2-ヒドロキシプロパン-1-スルホン酸)、MOBS (4-(N-モルホリノ) ブタンスルホン酸)、HEPPSO (N-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-N-(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸))、POPSO (ピペラジン-1, 4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸))、TEA (トリエタノールアミン)、EPSPS (4-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-1-プロパンスルホン酸) またはビシン (Bicine) (pH 6.0~8.5、7.0~8.0 または 7.0~7.5)] 中で行われる。

【0130】

非プロトン性溶媒中で還元的アミノ化を用いて製造されうるストレプトコッカス・ニューモニエ英膜多糖-タンパク質コンジュゲートには、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、3、4、5、6A、6B、6C、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33F および 35B が含まれるが、これらに限定されるものではない。多糖はオリゴ糖の形態で使用されうる。これらは精製多糖の断片化 (例えば、加水分解によるもの) によって簡便に形成され、ついで、通常、所望のサイズの断片の精製が行われる。

【0131】

特定の実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 1、3、4、5、6A、6B、6C、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33F および 35B の 1 以上の肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲートは、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて製造される。特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物におけるコンジュゲートのそれぞれは、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて製造される。特定の実施形態においては、本発明の多価組成物における 1 以上の血清型の多糖は、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて担体タンパク質にコンジュゲート化

され、1以上の血清型の多糖は、水性溶媒中での還元的アミノ化を用いてコンジュゲート化される。特定の実施形態においては、本発明の多価組成物における2以上の血清型の多糖は、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて担体タンパク質にコンジュゲート化される。他の実施形態においては、本発明の多価組成物における3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、17個以上、18個以上、19個以上、20個以上、21個以上、22個以上、23個以上または24個以上の血清型が、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて担体タンパク質にコンジュゲート化される。特定の実施形態においては、本発明の多価組成物における1以上の血清型由来の多糖は、非プロトン性溶媒または水性溶媒に存在しうる他の化学的性質を用いて担体タンパク質にコンジュゲート化される。

10

【0132】

したがって、本発明は、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖をそれぞれが含む複数のストレプトコッカス・ニューモニエ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に関するものであり、ここで、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は本明細書（すなわち、第II節における「多価免疫原性組成物」）に記載されているとおりであり、ここで、1以上の多糖タンパク質コンジュゲートのストレプトコッカス・ニューモニエ多糖を担体タンパク質にコンジュゲート化するコンジュゲート化反応は非プロトン性溶媒中で行われる。特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物における肺炎球菌血清型の少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%は非プロトン性溶媒中でコンジュゲート化される。残りの血清型は、代替的化学法を用いて、および／または水性溶媒中でコンジュゲート化される。

20

【0133】

多糖-タンパク質コンジュゲートの還元的アミノ化中の溶媒としてのDMSOの使用は、それらの血清型に関して、水性条件下で製造された同じコンジュゲートと比較して予想外に優れた安定性および免疫原性の増強をもたらすことが判明した（米国特許出願番号62/463,216および62/555,444を参照されたい）。

【0134】

本発明の特定の実施形態においては、組成物における総多糖濃度は約0.02~約0.288mg/mLである。本発明の特定の実施形態においては、組成物における総多糖濃度は約0.03~約0.192mg/mLである。本発明の特定の実施形態においては、組成物における総多糖濃度は約0.04~約0.192mg/mLである。他の実施形態においては、組成物における総多糖濃度は約0.065~約0.096mg/mL、約0.070~約0.080mg/mL、約0.065~約0.080mg/mL、約0.070~約0.085mg/mL、約0.110~約0.128mg/mL、約0.110~約0.175mg/mL、約0.10~約0.175mg/mL、約0.110~約0.170mg/mL、約0.115~約0.15mg/mL、約0.110~約0.15mg/mL、約0.110~約0.125mg/mL、約0.150~約0.170mg/mL、約0.150~約0.165mg/mL、約0.140~約0.170mg/mL、約0.130~約0.170mg/mL、約0.150~約0.175mg/mL、約0.070~約0.170mg/mL、約0.065~約0.175mg/mL、または約0.065~約0.180mg/mLである。

30

40

【0135】

多価免疫原性組成物における多糖-タンパク質コンジュゲートの1以上または全てが非プロトン性溶媒中で製造される本発明の実施形態においては、組成物における総多糖濃度は37℃で4週間以上、25℃で4週間以上または4℃で12週間以上安定である。

【0136】

多価免疫原性組成物における多糖-タンパク質コンジュゲートの1以上または全てが非

50

プロトン性溶媒中で製造される本発明の特定の実施形態においては、組成物におけるストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートの全ての平均分子量（Mw）（組成物における全コンジュゲートの平均）は約2,000～約6,500kDa、約2,500～約6,000kDa、約3,000～約5,500kDa、約3,500～約5,000kDa、約3,500～約4,500kDa、約3,500～約4,700kDa、約3,500～約4,600kDa、約3,500～約4,500kDa、約3,500～約4,400kDa、約3,500～約4,300kDa、約3,500～約4,200kDa、約3,600～約4,700kDa、約3,600～約4,600kDa、約3,600～約4,500kDa、約3,600～約4,400kDa、約3,600～約4,300kDa、約3,600～約4,200kDa、約3,700～約4,700kDa、約3,700～約4,600kDa、約3,700～約4,500kDa、約3,700～約4,400kDa、約3,700～約4,300kDa、約3,700～約4,200kDa、約3,800～約4,700kDa、約3,800～約4,600kDa、約3,800～約4,500kDa、約3,800～約4,400kDa、約3,800～約4,300kDa、約3,800～約4,200kDa、約3,900～約4,700kDa、約3,900～約4,600kDa、約3,900～約4,500kDa、約3,900～約4,400kDa、約3,900～約4,300kDa、または約3,900～約4,200kDaである。

【0137】

多価免疫原性組成物における多糖－タンパク質コンジュゲートが非プロトン性溶媒中で製造される本発明の特定の実施形態においては、（単一血清型に関する）組成物におけるストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートのそれぞれのMwは約1,000～約10,000kDa、約1500～約5,500kDa、約1500～約5,600kDa、約1500～約5,700kDa、約1500～約5,800kDa、約1500～約5,900kDa、約1500～約6000kDa、約1,000～約5,500kDa、約1,000～約5,000kDa、約1,000～約4,000kDa、約1,000～約4,500kDa、約1,000～約4,000kDa、または約1,000～約3,500kDaである。他の実施形態においては、組成物における単一血清型からのコンジュゲートのMwは約1,000kDa、約1,100kDa、約1,200kDa、約1,300kDa、約1,400kDa、約1,500kDa、約1,600kDa、約1,700kDa、約1,800kDa、約1,900kDa、約2,000kDa、約2,100kDa、約2,200kDa、約2,300kDa、約2,400kDa、約2,500kDa、約2,600kDa、約2,700kDa、約2,800kDa、約2,900kDa、約3,000kDa、約3,100kDa、約3,200kDa、約3,300kDa、約3,400kDa、約3,500kDa、約3,600kDa、約3,700kDa、約3,800kDa、約3,900kDa、約4,000kDa、約4,100kDa、約4,200kDa、約4,300kDa、約4,400kDa、約4,500kDa、約4,600kDa、約4,700kDa、約4,800kDa、約4,900kDa、約5,000kDa、約5,100kDa、約5,200kDa、約5,300kDa、約5,400kDaまたは約5,500kDaである。

【0138】

本発明の特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物における多糖－タンパク質コンジュゲートは非プロトン性溶媒中で製造される。特定の実施形態においては、非プロトン性溶媒中で製造されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型特異的コンジュゲートの割合（非プロトン性溶媒中で製造された多糖血清型の数を多糖血清型の総数で割り算することにより計算されたもの；ここで、総数は、非プロトン性溶媒またはプロトン性溶媒中で製造されたものを含む）は50%超（すなわち、50%を超える）または60%超または70%超または80%超または90%超または100%でありうる。

【0139】

本発明の特定の実施形態においては、組成物における血清型3多糖－タンパク質コンジ

10

20

30

40

50

ュゲートは非プロトン性溶媒中で製造され、該コンジュゲートのMwは約1,000～約5,000kDa、または約1,000～約4000kDa、または1,000～約3,000kDa、または約1,000～約2,500kDa、または約1,000～約2,000kDaである。

【0140】

多価免疫原性組成物における多糖－タンパク質コンジュゲートの1以上または全てが非プロトン性溶媒中で製造される本発明の特定の実施形態においては、組成物におけるストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートの数平均分子量(Mn)(組成における全コンジュゲートの平均)は約900～約3,000kDa、約1,000～約3,000kDa、約1,000～約2,500kDa、約1,500～約2,500kDa、約1,800～約2,500kDa、約1,900～約2,500kDa、または約2,000～約2,500kDaである。

10

【0141】

多価免疫原性組成物における多糖－タンパク質コンジュゲートの1以上または全てが非プロトン性溶媒中で製造される本発明の特定の実施形態においては、組成物におけるストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートのそれぞれのMn(単一血清型に関するもの)は約700～約7,000kDa、約1,000～約6,000kDa、約1,000～約5,000kDa、約1,000～約4,000kDa、約1,000～約3,000kDa、約900～約5,500kDa、約900～約5,000kDa、約900～約4,500kDa、約900～約4,000kDa、約900～約3,500kDa、または約900～約3,000kDaである。

20

【0142】

本発明の実施形態においては、組成物におけるストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートのMwおよび／またはMnは37℃で4週間以上、25℃で4週間以上および／または4℃で12週間以上安定である。

【0143】

本発明の実施形態においては、多糖濃度、Mwおよび／またはMnは、HPSEC UV/MALS/RIを用いて決定される。

【0144】

多価免疫原性組成物における多糖－タンパク質コンジュゲートの1以上または全てが非プロトン性溶媒中で製造される本発明の幾つかの実施形態においては、280ナノメートル(nm)の励起波長で内部タンパク質蛍光分光法を用いて測定された組成物の最大発光は約335nm～約342nmである。幾つかの実施形態においては、最大発光は約335nm～約342nmのままであり、蛍光強度は37℃で少なくとも1週間安定である。幾つかの実施形態においては、最大発光は約335nm～約342nmのままであり、蛍光強度は37℃で1週間安定である。

30

【0145】

幾つかの実施形態においては、多価組成物における肺炎球菌多糖コンジュゲートの全ては、DMSO中の還元的アミノ化を用いて製造される。特定の下位実施形態においては、DMSOを使用して全てが製造された多糖コンジュゲートを含む多価組成物はアジュバントを含まない。

40

【0146】

いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、DMSO中で製造された複合糖質で観察される免疫原性の増強に関する1つの可能なメカニズムは炭水化物(莢膜多糖)と担体タンパク質の表面上のリジン残基との間の結合の数の増加を含み、これは、該タンパク質と多糖との間の追加的な結合点をもたらして、安定性を付与し、ペプチド炭水化物結合の化学的解重合または分解に対抗するであろう。例えば、Hsieh, Characterization of Saccharide-CRM197 Conjugate Vaccines in Brown F, Corbel M, Griffiths E (編): Physico-Chemical Procedures for the Ch

50

aracterization of Vaccines. Dev. Biol. Basel, Karger, 2000, vol 103, pp. 93-104を参照されたい。DMSO溶媒中のコンジュゲート化中に生成される多糖-タンパク質結合の増加の追加的な利点はT細胞へのペプチド-炭水化物の提示の成功のための追加的な機会であろう。DMSO溶媒中のコンジュゲート化により観察される免疫原性の増強の可能なメカニズムは有機溶媒中のCRM197の変性によるものであろう。これは多糖結合のための追加的なリジンを露出させて、種々のペプチドエピトープに対するT細胞依存性応答のためのAPC表面における糖ペプチド提示の可能性を増大させる。Avciら, 2011, Nature Medicine 17: 1602-1610を参照されたい。

【0147】

コンジュゲートにおいて変性CRM197を生成する、有機溶媒中のコンジュゲート化の更にもう1つの利点は、天然CRM197エピトープに対する抗体の免疫学的干渉の低減であろう。DMSO溶媒中のコンジュゲート化中に生成される多糖-タンパク質結合の増加のもう1つの利点は、免疫原性の増強をもたらす、より大きなサイズの多糖タンパク質コンジュゲートの形成であろう。本発明の組成物は、ヒトでの応答の誘導において重要な利点をもたらすと考えられている。

【0148】

特定の実施形態においては、コンジュゲート化反応は還元的アミノ化により行われ、この場合、より大きなコンジュゲート化反応効率のために、および遊離シアニドの除去を促進させるために、ニッケルが使用される。遷移金属はシアニドとの安定錯体を形成することが公知であり、シアノ水素化ホウ素ナトリウムによるタンパク質アミノ基およびホルムアルデヒドの還元的メチル化を改善することが公知である (S Gidleyら, Biochem J. 1982, 203: 331-334; Jentoftら Anal Biochem. 1980, 106: 186-190)。ニッケルの添加は、残留抑制性シアニドを錯化することにより、コンジュゲート化中のタンパク質の消費を増加させ、より大きな、潜在的に、より免疫原性のコンジュゲートの形成をもたらす。

【0149】

シアノ水素化ホウ素ナトリウム試薬ロットにおける初期シアニドレベルの差異もコンジュゲート化性能の非一貫性をもたらして、コンジュゲートサイズおよびコンジュゲートPs対CRM197比のような産物特性の変動をもたらす。ニッケルの添加は、シアニドを錯化してシアノ水素化ホウ素ナトリウムのロットにおける差異を排除することにより、コンジュゲート化の非一貫性を低減した。

【0150】

適切な代替的化学法は1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボラート (CDAP) での糖の活性化によるシアナートエステルの形成を含む。したがって、活性化された糖は、直接的に、またはスペーサー (リンカー) 基を介して、担体タンパク質上のアミノ基にカップリングされうる。例えば、スペーサーは、マレイミド活性化担体タンパク質 (例えば、GMB Sを使用) 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 [例えば、エチルヨードアセトイミドHCL] またはN-スクシンイミジルプロモアセテートまたはS I A B、またはS I A、またはS B A Pを使用) との反応の後で得られるチオエーテル結合により担体にカップリングされうるチオール化多糖を得るためのシスタミンまたはシステアミンでありうる。好ましくは、シアナートエステル (所望により、CDAP化学法により調製されうる) はヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) にカップリングされ、アミノ誘導体化糖は、カルボジイミド (例えば、EDACまたはEDC) 化学法を用いて、タンパク質担体上のカルボキシル基を介して担体タンパク質にコンジュゲート化される。そのようなコンジュゲートは国際特許出願公開番号WO 93/15760、WO 95/08348およびWO 96/29094、ならびにChuら, 1983, Infect. Immunity 40: 245-256に記載されている。

【0151】

10

莢膜多糖を担体タンパク質にコンジュゲート化した後、多糖－タンパク質コンジュゲートを1以上の種々の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濃縮する）。これらの技術の例は当業者によく知られており、濃縮／ダイアフィльтраシオン操作、限外濾過、沈殿／溶出、カラムクロマトグラフィーおよびデプス濾過を含む。例えば、米国特許第6,146,902号を参照されたい。

20

30

40

． 2、1． 0～2． 4、1． 0～2． 3、1． 0～2． 2、1． 0～2． 1、1． 0～2． 0、1． 0～1． 9、1． 0～1． 8、1． 0～1． 7、1． 0～1． 6、1． 0～1． 5、1． 0～1． 4、1． 0～1． 3または1． 0～1． 2である。他の実施形態においては、糖対担体タンパク質比（w／w）は0． 8～1． 2である。幾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。担体タンパク質に共有結合（共有結合コンジュゲート化）していないが、それでも複合糖質組成物に存在する遊離糖を本発明の複合糖質および免疫原性組成物は含有しうる。遊離糖は複合糖質に非共有結合的に会合していてもよい（例えば、複合糖質に非共有結合的に結合していても、吸着されていても、その内部に又はそれにより取り込まれていてもよい）。

【0156】

特定の実施形態においては、血清型15Aコンジュゲートの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 0～約2． 0、約1． 25～約1． 75または約1． 3～約1． 7である。他の実施形態においては、血清型15Aの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 1、1． 2、1． 3、1． 4、1． 5、1． 6、1． 7または1． 8である。

【0157】

特定の実施形態においては、血清型15Cコンジュゲートの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 0～約2． 0、約1． 25～約1． 75または約1． 3～約1． 7である。他の実施形態においては、血清型15Cの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 1、1． 2、1． 3、1． 4、1． 5、1． 6、1． 7または1． 8である。

【0158】

特定の実施形態においては、血清型33Fコンジュゲートの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 0～約2． 0、約1． 25～約1． 75または約1． 3～約1． 7である。他の実施形態においては、血清型33Fの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 1、1． 2、1． 3、1． 4、1． 5、1． 6、1． 7または1． 8である。

【0159】

特定の実施形態においては、血清型35Bコンジュゲートの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 25～約2． 25、約1． 25～約2． 0または約1． 3～約1． 8である。他の実施形態においては、血清型35Bの糖対担体タンパク質比（w／w）は約1． 2、1． 3、1． 4、1． 5、1． 6、1． 7、1． 8、1． 9または2． 0である。

【0160】

特定の実施形態においては、血清型24Fコンジュゲートの糖対担体タンパク質比（w／w）は約0． 5～約1． 5、約0． 75～約1． 25または約0． 8～約1． 0である。他の実施形態においては、血清型24Fの糖対担体タンパク質比（w／w）は約0． 5、0． 6、0． 7、0． 8、0． 9または1． 0である。

【0161】

好ましい実施形態においては、複合糖質組成物は、多糖の総量と比較して、約50％、45％、40％、35％、30％、25％、20％または15％未満の遊離多糖を含む。好ましい実施形態においては、複合糖質組成物は、多糖の総量と比較して、約25％未満の遊離多糖を含む。好ましい実施形態においては、複合糖質組成物は、多糖の総量と比較して、約20％未満の遊離多糖を含む。好ましい実施形態においては、複合糖質組成物は、多糖の総量と比較して、約15％未満の遊離多糖を含む。

【0162】

IV．使用方法

本発明の実施形態はまた、（i）（a）治療（例えば、人体の治療）、（b）医薬、（c）ストレプトコッカス・ニューモニエによる感染の抑制、（d）ストレプトコッカス・ニューモニエに対する免疫応答または防御免疫応答の誘導、（e）ストレプトコッカス・ニューモニエによる感染の予防、（f）ストレプトコッカス・ニューモニエ感染の再発の予防、（g）脳損傷、難聴および発作を含む関連合併症の予防を含む、ストレプトコッカス・ニューモニエ感染に関連する病的症状の進行、発症または重症度の低減、（h）ストレプトコッカス・ニューモニエ感染の可能性の低減、または、（i）肺炎球菌肺炎、肺炎

10

20

30

40

50

球菌細菌血症、肺炎球菌髄膜炎、中耳炎および副鼻腔炎を含む肺炎球菌疾患の治療、予防または発症、重症化もしくは進行の遅延における使用のための、(i i) それらのための医薬または組成物としての使用のための、または(i i i) それらのための医薬の製造における使用のための、本明細書に記載されている多価免疫原性組成物の1以上を含む。これらの使用においては、本発明の多価肺炎球菌多糖-コンジュゲート組成物は、所望により、1以上のアジュバントと組合せて、またはアジュバント無しで使用されうる。

【0163】

したがって、本発明は、治療を要する患者に本発明の多価免疫原性肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲート組成物の1以上を投与することを含む、ストレプトコッカス・ニューモニエ感染または肺炎球菌疾患（すなわち、それに対する防御）の予防的治療方法を提供する。

10

【0164】

本発明の組成物および製剤は、そのような組成物または製剤を全身または粘膜経路により投与することにより、感染、例えば肺炎球菌感染に感受性であるヒトを防御または治療するために使用されうる。

【0165】

1つの実施形態においては、本発明は、本発明の多価免疫原性組成物の免疫学的有効量を患者に投与することを含む、ストレプトコッカス・ニューモニエに対する免疫応答を誘導する方法を提供する。もう1つの実施形態においては、本発明は、本発明の多価免疫原性組成物の免疫学的有効量をヒトに投与する工程を含む、肺炎球菌感染に対してヒトにワクチン接種する方法を提供する。

20

【0166】

したがって、1つの態様においては、本発明は、本発明の多価免疫原性組成物（すなわち、本明細書に記載されている任意の多価免疫原性組成物、例えば、前記の「多価免疫原性組成物」と題された第II節に記載されている多価免疫原性組成物）を患者に投与することを含む(1) ヒト患者において免疫応答を誘導する、(2) ヒト患者において防御免疫応答を誘導する、(3) ストレプトコッカス・ニューモニエによる感染に対してヒト患者にワクチン接種する、または(4) ヒト患者におけるストレプトコッカス・ニューモニエ感染の可能性を低減するための方法を提供する。

【0167】

1つの実施形態においては、本発明は乳児（1歳未満）、幼児（約12～24月齢）または小児（約2～5歳）における肺炎球菌肺炎および／または侵襲性肺炎球菌疾患の予防方法を提供する。

30

【0168】

もう1つの実施形態においては、本発明は6週齢～17歳の患者における肺炎球菌肺炎および／または侵襲性肺炎球菌疾患の予防方法を提供する。

【0169】

もう1つの実施形態においては、本発明は6月齢～17歳の患者における肺炎球菌肺炎および／または侵襲性肺炎球菌疾患の予防方法を提供する。

【0170】

もう1つの実施形態においては、本発明は18歳以上の成人における肺炎球菌肺炎および／または侵襲性肺炎球菌疾患の予防方法を提供する。

40

【0171】

もう1つの実施形態においては、本発明は50歳以上の成人における肺炎球菌肺炎および／または侵襲性肺炎球菌疾患の予防方法を提供する。

【0172】

もう1つの実施形態においては、本発明は65歳以上の成人における肺炎球菌肺炎および／または侵襲性肺炎球菌疾患の予防方法を提供する。

【0173】

もう1つの実施形態においては、本発明は、以下のストレプトコッカス・ニューモニエ

50

株、すなわち、1、3、4、5、6 A、6 B、6 C、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bの1以上により引き起こされる肺炎球菌肺炎および／または侵襲性肺炎球菌疾患の予防方法を提供する。

【0174】

前記方法の1つの実施形態においては、組成物は複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は血清型1、3、4、5、6 A、6 B、6 C、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bまたは血清型1、3、4、5、6 A、6 B、6 C、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bを含む。前記方法のもう1つの実施形態においては、組成物は複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は血清型1、3、4、5、6 A、6 B、6 C、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bまたは血清型1、3、4、5、6 A、6 B、6 C、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bからなる。前記方法の1つの実施形態においては、組成物は複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bまたは血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bからなる。前記方法の1つの実施形態においては、組成物は複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は血清型1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bまたは血清型を含む。

10

20

30

40

50

【0175】

血清型6A多糖を含む肺炎球菌コンジュゲートワクチンは血清型6Cに対して幾らかの交差防御をもたらしうることを示されている（Cooperら，Vaccine 29（2011）7207-7211）。したがって、前記方法の幾つかの実施形態においては、本発明はまた、血清型6C多糖コンジュゲートを含まないが、代わりに血清型6A多糖コンジュゲートまたは血清型6Aおよび6B多糖コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物の使用を提供する。他の実施形態においては、免疫原性組成物は血清型6A、6Bおよび6Cの肺炎球菌多糖コンジュゲートを含む。

【0176】

前記方法の特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物は、以下のものからなる群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の群の多糖を含む肺炎球菌コンジュゲートを含む：

- a) 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、10A、12F、14、15A、DeOAc15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- b) 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- c) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、DeOAc15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- d) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- e) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- f) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、DeOAc15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- g) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- h) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- i) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- j) 1、3、4、5、6A、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- k) 1、3、4、5、6B、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- l) 1、3、4、5、6C、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- m) 1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- n) 1、3、4、5、6B、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- o) 1、3、4、5、6C、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；
- p) 1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15

10

20

30

40

50

A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

q) 1、3、4、5、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

r) 1、3、4、5、6C、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

s) 1、3、4、5、6A、7F、9V、10A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

t) 1、3、4、5、6B、7F、9V、10A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

u) 1、3、4、5、6C、7F、9V、10A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

v) 1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

w) 1、3、4、5、6B、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

x) 1、3、4、5、6C、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

y) 1、3、4、5、6A、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；

z) 1、3、4、5、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；ならびに

aa) 1、3、4、5、6C、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B。

【0177】

前記方法の他の実施形態においては、組成物は複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、コンジュゲートのそれぞれは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含み、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は血清型：i) 1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；またはii) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；またはiii) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；またはiv) 1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35Bを含む。

【0178】

血清型10A多糖を含む肺炎球菌コンジュゲートワクチンは血清型39に対する幾らかの交差防御をもたらしくることも示されている(WO 2017/085586を参照されたい)。したがって、前記方法の幾つかの実施形態においては、本発明はまた、血清型10A多糖コンジュゲートを含まないが、代わりに血清型39多糖コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物の使用を提供する。他の実施形態においては、免疫原性組成物は血清型10Aおよび39の肺炎球菌多糖コンジュゲートを含む。前記方法の特定の実施形態に

10

20

30

40

50

においては、ストレプトコッカス・ニューモニエの血清型は、以下のものからなる群から選択される血清型の群を含む：

b b) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、De O A c 15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

c c) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

d d) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、De O A c 15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

e e) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

f f) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

g g) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、De O A c 15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

h h) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

i i) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

j j) 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

k k) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

l l) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

m m) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

n n) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

o o) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

p p) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

q q) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

r r) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

s s) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

t t) 1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 B および 39；

10

20

30

40

50

uu) 1、3、4、5、6 B、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

vv) 1、3、4、5、6 C、7 F、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

ww) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

xx) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

yy) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

zz) 1、3、4、5、6 A、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；

aaa) 1、3、4、5、6 B、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39；ならびに

bbb) 1、3、4、5、6 C、7 F、8、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 B、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 F、35 Bおよび39。

【0179】

担体タンパク質に共有結合したストレプトコッカス・ニューモニエ血清型15 B英膜多糖を含む免疫原性コンジュゲートは血清型15 Cおよび／または血清型15 Aに対する幾らかの交差防御をもたらすことも示されている（WO 2015／110942を参照されたい）。したがって、前記方法の幾つかの実施形態においては、本発明はまた、血清型15 C（または脱Oーアセチル化15 B）多糖コンジュゲートを含まないが、代わりに血清型15 B多糖コンジュゲートを含む（すなわち、血清型15 B多糖は実質的に脱Oーアセチル化されていない）多価免疫原性組成物の使用を提供する。他の実施形態においては、免疫原性組成物は血清型15 Bおよび15 C（または脱Oーアセチル化15 B）の肺炎球菌多糖コンジュゲートを含む。

【0180】

本発明の組成物は、以前に多価肺炎球菌ワクチンを接種された患者においてストレプトコッカス・ニューモニエに対する補完的防御を付与するための方法において有用である。この使用においては、本発明の組成物は、患者が以前にワクチン接種されていない特定のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に対する防御をもたらすことが可能であり、患者が以前にワクチン接種されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型に対する追加的な防御をもたらすことが可能であり、あるいは、患者が以前にワクチン接種されていないストレプトコッカス・ニューモニエ血清型と、患者が以前にワクチン接種されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型の両方に対する防御をもたらすことが可能である。

【0181】

したがって、本発明は、多価免疫原性組成物を患者に投与することを含む、患者においてストレプトコッカス・ニューモニエに対して免疫応答を誘導する、またはワクチン接種する、または防御免疫応答を誘導する方法を提供し、該組成物は複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、多糖タンパク質コンジュゲートは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の英膜多糖を含み、患者は以前にストレプトコッカス・ニューモニエに対してワクチン接種されている。本発明のこの態様の実施形態においては、多価免疫原性組成物は、本明細書に記載されている任意の多価免疫原性組成物でありうる。本発明の方法の特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物は、多価肺炎球菌ワクチンで以前に治療された患者に投与される。多価免疫原性ワクチンは、ストレプトコッカス・ニューモニエの複数の血清型により引き起こされる肺炎球菌疾患の予防に適応となる任意のワクチンで

10

20

30

40

50

ありうる。

【0182】

前記方法の特定の実施形態においては、患者は、

i. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 Fおよび23 F；

ii. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、6 A、7 Fおよび19 A；

iii. 1、4、5、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 Fおよび23 F；

iv. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、6 A、7 F、19 A、22 Fおよび33 F；

v. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、7 F、19 A、22 F、33 F、2、8、9 N、10 A、11 A、12 F、15 B、17 Fおよび20；
ならびに

vi. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、6 A、7 F、19 A、22 F、33 F、8、10 A、11 A、12 Fおよび15 B

からなる群から選択される血清型の群内の1以上のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型により引き起こされる肺炎球菌疾患の予防に適応となる多価肺炎球菌ワクチンで以前に治療されていた。

【0183】

前記方法の特定の実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは複数の多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、多糖タンパク質コンジュゲートは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含む。他の実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは、担体タンパク質にコンジュゲート化されていない複数の肺炎球菌莢膜多糖を含む。

【0184】

前記方法の追加的な実施形態においては、患者はPREVNAR（登録商標）13〔肺炎球菌13価コンジュゲートワクチン（ジフテリアCRM197タンパク質），Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA〕で以前に治療されていた。

【0185】

前記方法の他の実施形態においては、患者は、PNEUMOVAX（登録商標）23〔肺炎球菌ワクチン多価（Pneumococcol Vaccine Polyvalent），Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ〕で以前に治療されていた。

【0186】

前記方法の更にもう1つの実施形態においては、患者はSYNFLORIX（商標）〔肺炎球菌多糖コンジュゲートワクチン（吸着），GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rixensart, Belgium〕で以前に治療されていた。

【0187】

前記方法の実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物は、医療専門家、例えば医師により提供される治療レジメンに従い、患者が多価肺炎球菌ワクチンの投与を受けた後の任意の時点で患者に投与される。特定の実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物は、患者が多価肺炎球菌ワクチンの投与を受けてから約1ヶ月～約5年後に患者に投与され、あるいは、患者が多価肺炎球菌ワクチンの投与を受けてから1ヶ月～1年、1ヶ月～2年、1ヶ月～3年、1ヶ月～4年、1ヶ月～6ヶ月、2ヶ月～6ヶ月、2ヶ月～1年、1年～5年、6ヶ月～5年、6ヶ月～4年、6ヶ月～3年、6ヶ月～2年、6ヶ月～1年、1年～4年、1年～3年、または1年～2年後に患者に投与される。他の実施形態においては、多価免疫原性組成物は、患者が多価肺炎球菌ワクチンの投与を受けてから約1ヶ月、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月、約1年、約1.25年、約1.5年、約1.75年、約2年、約2.25年、約2.5年、約2.75年、約3年、約3.25年、約3.5

年、約 3.75 年、約 4 年、約 4.25 年、約 4.5 年、約 4.75 年または約 5 年後に患者に投与される。

【0188】

他の実施形態においては、本発明は、本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与することと、多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与することとを、任意の順序で含む、(1) ヒト患者において免疫応答を誘導する、(2) ヒト患者において防御免疫応答を誘導する、(3) ストレプトコッカス・ニューモニエによる感染に対してヒト患者にワクチン接種する、または(4) ヒト患者においてストレプトコッカス・ニューモニエ感染の可能性を低減するための方法を提供する。例えば、最初に多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与し、ついで本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与する。あるいは、最初に本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与し、ついで多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与する。多価肺炎球菌ワクチンは、ストレプトコッカス・ニューモニエの複数の血清型により引き起こされる肺炎球菌疾患の予防に適応となる任意のワクチンでありうる。

10

【0189】

前記方法の特定の実施形態においては、患者は、本発明の多価免疫原性組成物と、

i. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F；

ii. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、6 A、7 F および 19 A；

iii. 1、4、5、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 F および 23 F；

iv. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、6 A、7 F、19 A、22 F および 33 F；

20

v. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、7 F、19 A、22 F、33 F、2、8、9 N、10 A、11 A、12 F、15 B、17 F および 20；
ならびに

vi. 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、6 A、7 F、19 A、22 F、33 F、8、10 A、11 A、12 F および 15 B

からなる群から選択される血清型の群の 1 以上のストレプトコッカス・ニューモニエ血清型により引き起こされる肺炎球菌疾患の予防に適応となる多価肺炎球菌ワクチンとで治療される。

【0190】

30

前記方法の特定の実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F、23 F、1、3、5、7 F、19 A、22 F、33 F、2、8、9 N、10 A、11 A、12 F、15 B、17 F および 20 A の荚膜多糖を含む。

【0191】

前記方法の特定の実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは複数の多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、多糖タンパク質コンジュゲートは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の多糖を含む。他の実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは、担体タンパク質にコンジュゲート化されていない複数のストレプトコッカス・ニューモニエ荚膜多糖を含む。

40

【0192】

前記方法の追加的な実施形態においては、患者は、本発明の多価免疫原性組成物での治療、および PREVNAR（登録商標）13 [肺炎球菌 13 価コンジュゲートワクチン（ジフテリア CRM197 タンパク質），Pfizer, Inc., Philadelphia, PA, USA] での治療を、任意の順序で受ける。1つの実施形態においては、最初に PREVNAR（登録商標）13 を患者に投与し、ついで本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与する。代替的实施形態においては、最初に本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与し、ついで PREVNAR（登録商標）13 を患者に投与する。

【0193】

前記方法の他の実施形態においては、患者は、本発明の多価免疫原性組成物での治療、

50

およびPNEUMOVAX（登録商標）23〔肺炎球菌ワクチン多価（Pneumococcol Vaccine Polyvalent），Merck & Co.，Inc.，Kenilworth，NJ〕での治療を、任意の順序で受ける。1つの実施形態においては、最初にPNEUMOVAX（登録商標）23を患者に投与し、ついで本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与する。代替的实施形態においては、最初に本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与し、ついでPNEUMOVAX（登録商標）23を患者に投与する。

【0194】

前記方法の更にもう1つの実施形態においては、患者は、本発明の多価免疫原性組成物での治療、およびSYNFLORIX（商標）〔肺炎球菌多糖コンジュゲートワクチン（吸着），GlaxoSmithKline Biologicals s.a.，Rixensart，Belgium〕での治療を、任意の順序で受ける。1つの実施形態においては、最初にSYNFLORIX（商標）を患者に投与し、ついで本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与する。代替的实施形態においては、最初に本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与し、ついでSYNFLORIX（商標）を患者に投与する。

【0195】

前記方法の幾つかの実施形態においては、多価免疫原性組成物および多価肺炎球菌ワクチンを共投与する。本明細書中で用いる「共投与」は2つの組成物の同時投与には限定されず、任意の順序で次々に投与することを含む。幾つかの実施形態においては、多価免疫原性組成物および多価肺炎球菌ワクチンを筋肉内または皮下投与により、別々の解剖学的部位、例えば2つの異なる腕に投与する。

【0196】

前記方法の幾つかの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の投与と多価肺炎球菌ワクチンの投与との間の時間の長さは約4週～約1年である。代替的实施形態においては、期間は約1ヶ月～約5年である。

【0197】

1つの実施形態においては、最初に多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与し、ついで本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与する。代替的实施形態においては、最初に本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与し、ついで多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与する。

【0198】

また、

- (1) 本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与すること、
- (2) 所定時間が経過するのを待つこと、および
- (3) 多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与すること

を含む、患者においてストレプトコッカス・ニューモニエに対する免疫応答を誘導する、またはワクチン接種する、または防御免疫応答を誘導する方法も提供する。この方法においては、多価免疫原性組成物は、本明細書に記載されているストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートの任意の組合せを含むことが可能であり、多価肺炎球菌ワクチンは、ストレプトコッカス・ニューモニエの複数の血清型により引き起こされる疾患の予防に適応となる任意のワクチンでありうる。

【0199】

また、本発明は、

- (1) 多価肺炎球菌ワクチンを患者に投与すること、
- (2) 所定時間が経過するのを待つこと、および
- (3) 本発明の多価免疫原性組成物を患者に投与すること

を含む、患者においてストレプトコッカス・ニューモニエに対する免疫応答を誘導する、またはワクチン接種する、または防御免疫応答を誘導する方法を提供する。

【0200】

この方法においては、多価免疫原性組成物は、本明細書に記載されているストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートの任意の組合せを含むことが可能で

10

20

30

40

50

あり、多価肺炎球菌ワクチンは、ストレプトコッカス・ニューモニエの複数の血清型により引き起こされる疾患の予防に適応となる任意のワクチンでありうる。

【0201】

前記方法の幾つかの実施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは複数のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖タンパク質コンジュゲートを含み、ここで、多糖タンパク質コンジュゲートは、担体タンパク質にコンジュゲート化されたストレプトコッカス・ニューモニエ血清型由来の莢膜多糖を含む。代替的实施形態においては、多価肺炎球菌ワクチンは、担体タンパク質にコンジュゲート化されていないストレプトコッカス・ニューモニエ莢膜多糖を含む。

【0202】

本発明の方法の任意の実施形態（すなわち、本明細書に記載されている方法のいずれか）においては、該方法は、本発明の多価免疫原性組成物の、1以上の追加用量を患者に投与することを更に含む。そのような方法においては、患者は、前記の本発明の多価免疫原性組成物の初回用量の投与を受ける前に多価肺炎球菌ワクチンの投与を既に受けていることが可能であり、あるいは、本発明の多価免疫原性組成物の投与を受ける前に、ストレプトコッカス・ニューモニエに対してワクチン接種されていないことが可能である。したがって、1つの実施形態においては、ストレプトコッカス・ニューモニエにより引き起こされる肺炎球菌疾患の予防に適応となる多価肺炎球菌ワクチンの投与を受けた患者に本発明の多価免疫原性組成物の2以上の用量を投与する。代替的实施形態においては、肺炎球菌疾患の予防に適応となるいずれのワクチンによっても以前に治療されていない患者に本発明の多価免疫原性組成物の2以上の用量を投与する。

【0203】

前記方法の実施形態においては、2以上の用量は本発明の同じ多価免疫原性組成物のものである。代替的实施形態においては、2以上の用量は本発明の異なる多価免疫原性組成物のものである。

【0204】

これらの方法のいずれかの特定の実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の2、3または4用量を患者に投与する。特定の実施形態においては、患者は（例えば、幹細胞移植後の免疫抑制レジメンにより）免疫無防備状態である。

【0205】

幾つかの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の各用量の投与の間の時間の長さは約4週～約1年である。代替的实施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の各用量の投与の間の時間の長さは約1ヶ月～約5年である。

【0206】

本発明の方法のいずれかの実施形態においては、本発明の組成物で治療される患者はヒトである。特定の実施形態においては、ヒト患者は乳児（約6週～12ヶ月）である。特定の実施形態においては、ヒト患者は幼児（約12～24ヶ月）または小児（約2～5歳）である。本発明の組成物は、より年長の子供、青年および成人（例えば、18～45歳、18～50歳、18～55歳、18～60歳または18～65歳）における使用にも適している。本発明の方法のいずれかの他の実施形態においては、患者は約2歳～約18歳である。本発明の方法のいずれかの他の実施形態においては、患者は18歳以上である。

【0207】

本発明の方法の他の実施形態においては、患者は乳児であり、本発明の多価免疫原性組成物の1、2または3用量を乳児に投与する。各用量の投与の間の時間の長さは変動可能であるが、投薬スケジュールの例は、2月齢で用量を投与し、ついで4月齢で用量を更に投与し、最後に6月齢で用量を最終投与することを含む。乳児における投与スケジュールのもう1つの例は、2月齢で用量を投与し、ついで3月齢で用量を更に投与する。乳児における投与スケジュールのもう1つの例は、2月齢で用量を投与し、ついで3月齢で用量を更に投与し、最後に6月齢で用量を最終投与する。他の実施形態においては、乳児患者は、乳児が幼児になった際に本発明の多価免疫原性組成物の追加的な「ブースター」用量

の投与を受けうる。例えば、乳児に２月齢で投与し、ついで４月齢で用量を更に投与し、最後に６月齢で用量を最終投与し、ついで、乳児が幼児の年齢に達した際に、本発明の多価免疫原性組成物の追加的な「ブースター」用量を１１～１５月齢で投与する。

【０２０８】

１つの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の２用量を乳児に投与する。

【０２０９】

１つの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の３用量を乳児に投与する。

【０２１０】

１つの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の３用量を患者に投与し、ここで、第１用量および第２用量を２～１０月齢で投与し、第３用量を１１～１５月齢で投与する。

10

【０２１１】

１つの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物の４用量を患者に投与し、ここで、第１用量を２月齢で投与し、第２用量を４月齢で投与し、第３用量を６月齢で投与し、第４用量を１１～１５月齢で投与する。

【０２１２】

本発明の方法の他の実施形態においては、ヒト患者は高齢者である。本発明の方法のいずれかの幾つかの実施形態においては、患者は５０歳以上である。本発明の方法のいずれかの幾つかの実施形態においては、患者は５５歳以上である。本発明の方法のいずれかの幾つかの実施形態においては、患者は６０歳以上である。本発明の方法のいずれかの更に他の実施形態においては、患者は６５歳以上である。本発明の方法のいずれかの追加的な実施形態においては、患者は７０歳以上である。

20

【０２１３】

本発明の方法のいずれかの幾つかの実施形態においては、本発明の免疫原性組成物で治療される患者は免疫無防備状態である。

【０２１４】

本発明の方法のいずれかの幾つかの実施形態においては、本発明の多価免疫原性組成物はインフルエンザに対するワクチンと共に投与される。特定の実施形態においては、インフルエンザワクチンは「シニアインフルエンザワクチン」、すなわち、高齢者、例えば６５歳以上の者に適応となる高用量インフルエンザワクチンである。

30

【０２１５】

本発明は、本明細書に記載されている多価免疫原性肺炎球菌多糖－タンパク質コンジュゲート組成物のいずれかの免疫学的有効量を患者に投与する工程を含む、肺炎球菌感染に対して患者において防御免疫応答を誘導するための方法を提供する。特定のワクチン（例えば、本発明の多価免疫原性組成物）のための成分の最適量は、対象における適切な免疫応答の観察を含む標準的な研究により確認されうる。例えば、もう１つの実施形態においては、ヒトワクチン接種の投与量は動物研究からヒトデータへの外挿により決定される。もう１つの実施形態においては、投与量は経験的に決定される。

【０２１６】

本発明の方法は、侵襲性感染症（髄膜炎、肺炎および細菌血症）および非侵襲性感染症（急性中耳炎および副鼻腔炎）の両方を含む、微生物、例えばストレプトコッカス・ニューモニエにより引き起こされる主要臨床症候群の予防および／または軽減のために使用されうる。

40

【０２１７】

本発明の組成物の投与は筋肉内、腹腔内、皮内もしくは皮下経路による注射；または経口／消化管、呼吸器もしくは泌尿生殖器への粘膜投与による投与の１以上を含む。１つの実施形態においては、肺炎または中耳炎の治療には鼻腔内投与が用いられる（なぜなら、肺炎球菌の鼻咽頭保菌がより有効に予防可能であり、したがって、その初期段階で感染を減弱させることが可能だからである）。特定の実施形態においては、本発明の組成物は筋肉内または皮下投与により患者に投与される。

50

【0218】

本明細書中に挙げられている全ての刊行物を、本発明に関して用いられうる方法および材料を記載し開示する目的で、参照により本明細書に組み入れることとする。

【0219】

添付の図面を参照して本発明の種々の実施形態が本明細書に記載されているが、本発明はそれらの厳密な実施形態には限定されず、添付の特許請求の範囲に定められている本発明の範囲または精神から逸脱することなく種々の変更および修飾がそれらにおいて当業者により行われうると理解されるべきである。

【0220】

以下の実施例は本発明を例示するものであり、本発明を限定するものではない。

【0221】

実施例1

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) 莢膜多糖の製造

肺炎球菌の培養方法は当技術分野で周知である。例えば、Chase, 1967, *Methods of Immunology and Immunochemistry* 1: 52を参照されたい。肺炎球菌莢膜多糖の製造方法も当技術分野で周知である。例えば、欧州特許番号EP 0 497 524 B1を参照されたい。後記プロセスは、一般に、欧州特許番号EP 0 497 524 B1に記載されている方法に従い、全ての肺炎球菌血清型に一般に適用可能である。

【0222】

血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、18C、19A、19F、22F、23F、33Fおよび35Bの肺炎球菌株の分離株はメルク・カルチャー・コレクション (Merck Culture Collection) から入手した。血清型23Bの株は米国疾病予防管理センター (Disease Control and Prevention) およびアラバマ大学バーミングハム校 (University of Alabama Birmingham) から入手した。血清型24Fの株はメルク・カルチャー・コレクション (Merck Culture Collection) およびアラバマ大学バーミングハム校 (University of Alabama Birmingham) から入手した。必要な場合には、特異的抗血清を使用するケルング (Quellung) 反応に基づいて亜型を区別した。例えば、米国特許第5, 847, 112号を参照されたい。得られた分離株を、ダイズペプトン、酵母エキスおよびグルコース（ヘミン非含有）を含有する動物成分非含有培地からなる寒天プレート上で2段階で連続的にプレーティングすることにより更にクローン的に単離した。血清型7Fの場合には、使用した寒天プレートはヘミンも含有していた。各血清型のクローン分離株を、ダイズペプトン、酵母エキス、HEPES、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、リン酸カリウム、グルコースおよびグリセロールを含有する動物成分非含有培地を使用して液体培養内で更に増殖させて、プレマスター細胞バンクを調製した。

【0223】

肺炎球菌多糖の各血清型の製造は、細胞増殖およびバッチ生産発酵、ならびにそれに続く、下流精製前の化学的不活性化（化学的不活化）からなるものであった。各血清型からの解凍された細胞バンクバイアルを、ダイズペプトンまたはダイズペプトン限外濾過液、酵母エキスまたは酵母エキス限外濾過液、HEPES、塩化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、リン酸カリウムおよびグルコースを含有する予め滅菌された動物成分非含有増殖培地を含有する振とうフラスコまたは培養ボトルを使用して、増殖に付した。温度および攪拌を制御しながらガス交換が最小限となるように、密封振とうフラスコまたはボトル内で該細胞増殖培養物を増殖に付した。これらの血清型の細胞増殖中に、温度、pH、圧力および攪拌を制御した。スパーキング (sparging) を用いなかったため、気流オーバーレイ (overlay) をも制御した。600nmでの光学密度による測定で、特定された培養密度が得られた後、該細胞増殖培養物の一部を、ダイズペプトンまたはダイズペ

10

20

30

40

50

プトン限外濾過液、酵母エキスまたは酵母エキス限外濾過液、塩化ナトリウム、リン酸カリウムおよびグルコースを含有する予め滅菌された動物成分非含有増殖培地を含有する生産発酵槽に移した。温度、pH、圧力および攪拌を制御した。スパージングを用いなかったため、気流オーバーレイをも制御した。

【0224】

グルコースがほぼ消費されたら、化学不活性化剤であるフェノールの添加によりバッチ発酵を終了させた。純粋フェノールを0.8~1.2%の最終濃度まで添加して、細胞を不活性化し、細胞壁から莢膜多糖を遊離させた。発酵槽内で、特定された時間にわたって一次不活性化を行い、この場合、温度および攪拌を制御し続ける。一次不活性化後、バッチをもう1つの容器に移し、それを、制御された温度および攪拌で、追加的な特定された時間にわたって維持して、完全な不活性化を行った。これは、微生物プレーティング技術またはフェノール濃度および特定された時間の検証のいずれかにより確認された。ついで不活性化ブロスを精製した。

【0225】

実施例2

肺炎球菌多糖の精製

肺炎球菌多糖の精製プロセスは幾つかの遠心分離、デプス濾過、濃縮／ダイアフィルトレーション操作および沈殿工程からなるものであった。特に示されていない限り、全ての手順は室温で行った。

【0226】

ストレプトコッカス・ニューモニエの発酵槽培養物からの不活性化ブロスをカチオン性ポリマー〔例えば、BPA-1000、TRETOLITE（登録商標）（Baker Hughes Inc., Houston, TX）、Spectrum 8160、ポリ（エチレンイミン）およびMillipore pDADMAC〕で凝集させた。カチオン性ポリマーは不純物タンパク質、核酸、細胞破片に結合した。凝集工程および熟成期間の後、凝集固体を遠心分離および複数のデプス濾過工程により除去した。清澄化ブロスを濃縮し、100kDa~500kDa MWCO（分子量カットオフ）フィルターを使用してダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーションは、Tris、MgCl₂バッファーおよびリン酸ナトリウムバッファーを使用して行った。ダイアフィルトレーションは残留核酸およびタンパク質を除去した。

【0227】

更なる不純物の除去は、酢酸ナトリウムおよびフェノール中の多糖を変性アルコールおよび／またはイソプロパノールで再沈殿させることにより達成された。フェノール沈殿工程中に、リン酸ナトリウム生理食塩バッファー中の酢酸ナトリウムおよびフェノール（液化フェノールまたは固体フェノール）を、ダイアフィルトレーションされた保持液に充填した。ついで多糖のアルコール分画を2段階で行った。最初の段階においては、低比率のアルコールを調製物に添加して、細胞破片および他の不要な不純物を沈殿させ、一方、粗製多糖は溶液中に残存させた。不純物を遠心分離およびそれに続くデプス濾過工程により除去した。ついで、追加的なイソプロパノールまたは変性アルコールをバッチに加えることにより、多糖を溶液から回収した。沈殿した多糖ペレットを遠心分離により回収し、粉碎（トリチュレート）し、粉末として乾燥させ、-70℃で凍結保存した。

【0228】

実施例3

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）多価研究用の血清型1コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、標的分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、ジメチルスルホキシド（DMSO）中に再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを透析により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲ

トが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0229】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 P s 粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化（ホモジナイズ）して、P s の分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 250 bar / 5 回通過に制御した。

【0230】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0231】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃ および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃ で 15 時間進行させた。

【0232】

活性化生成物を、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 10 mM リン酸カリウム（pH 6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2～8℃で行った。

【0233】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに（WO 2012 / 173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンス（*Pseudomonas fluorescens*）における発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート（pH 7.2）バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0234】

活性化多糖を 10% w / v スクロース濃度で 2.5 mg P s / mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w / v スクロース濃度で 6 mg P r / mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0235】

製剤化した P s および CRM197 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および CRM197 物質を等体積の DMSO 中に個別に再溶解した。1.0 g P s / L の多糖濃度および 1.5 の多糖対 CRM197 質量比が得られるように、多糖溶液と CRM197 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル）を加え、22℃ でコンジュゲート化を進行させた。

【0236】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル）を加え、22℃ で 1 時間インキュベートした。約 0.025%（w / v）ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃ で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。300 kDa NMWCO 透析カセットを使用して、150 mM 塩化ナトリウム、0.05%（w / v）ポリソルベート 20 に対して約 4℃ で 3 日間、バッチを透析した。

【0237】

最終濾過および生成物貯蔵

バッチを（0.5 ミクロンプレフィルターで）0.2 ミクロン濾過し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0238】

10

20

30

40

50

実施例 4

水性コンジュゲート化を用いた P C V 2 3 (D M S O + A q) 多価研究用の血清型 1 コ
ンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換し
た。ついで精製 C R M 1 9 7 を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコ
ンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0 .
2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程
内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【 0 2 3 9 】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、0 . 4 5 ミクロンで濾過した。溶解し
た多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧
力およびホモナイザー通過回数を 2 5 0 b a r / 5 回通過に制御した。ついでサイズ縮
小多糖を濃縮し、1 0 k D a N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイア
フィルトレーションした。

【 0 2 4 0 】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 2 2 ° C および pH 5 に調整して、活性化
による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 1 0 0 m M メタ過ヨウ素酸ナ
トリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 2 2 ° C で 1 5 時間進行させた。

【 0 2 4 1 】

活性化生成物を、1 0 k D a N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して 1 0 m M リン酸
カリウム (pH 6 . 4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2 ~ 8 ° C で
行った。

【 0 2 4 2 】

C R M 1 9 7 への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および 1 . 5 M リン酸カリウム (pH 7 . 0) と混合した。
選択されたバッファー pH は、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善す
るためのものであった。既に記載されているとおりに (W O 2 0 1 2 / 1 7 3 8 7 6 A 1)
シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 C R M 1 9 7 を緩
衝化多糖溶液と 0 . 5 の多糖対 C R M 1 9 7 質量比で一緒にした。得られるコンジュゲ
ートにおける多糖対 C R M 1 9 7 比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホ
スファートの濃度はそれぞれ 6 . 9 g / L および 1 0 0 m M であった。得られるコンジュ
ゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。1 0 0 m M 塩化ニッケル溶
液を使用して、塩化ニッケルを約 2 m M まで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多
糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるよ
うに、コンジュゲート化を 1 2 0 時間進行させた。

【 0 2 4 3 】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約 3 . 5 g / L の多糖濃度に希釈し、2 ~ 8 ° C に冷
却し、1 . 2 ミクロンで濾過した。1 0 0 k D a N M W C O 接線流限外濾過膜を使用し
て、バッチを 1 0 0 m M リン酸カリウム (pH 7 . 0) に対して 2 ~ 8 ° C でダイアフィ
ルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約 2 . 0 g 多糖 / L に希釈
し、1 . 2 M 重炭酸ナトリウム (pH 9 . 4) の添加により pH を調整した。水素化ホ
ウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加えた。ついで 1 . 5 M リン酸
カリウム (pH 6 . 0) を加えた。

【 0 2 4 4 】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、3 0 0 k D a N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して、1 5
0 m M 塩化ナトリウム (pH 7 . 0) 中の 1 0 m M L - ヒスチジンに対して 4 ° C で透析
した。ポリソルベート 2 0 を 0 . 0 5 % (w / v) の濃度まで保持液バッチに加え、バツ

10

20

30

40

50

チを0.2ミクロンで濾過した。

【0245】

0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10mM L-ヒスチジンでバッチを1.0g/Lの多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0246】

実施例5

水性コンジュゲート化を用いたPCV22多価研究のための血清型1コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製CRM197を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0247】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を250bar/5回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイア

【0248】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で15時間進行させた。

【0249】

活性化生成物を、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して10mM リン酸カリウム (pH6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0250】

CRM197への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および1.5M リン酸カリウム (pH7.0) と混合した。選択されたバッファーpHは、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を緩衝化多糖溶液と0.5の多糖対CRM197質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ6.9g/Lおよび100mMであった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を0.2ミクロンで濾過した。100mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約2mMまで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を120時間進行させた。

【0251】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約3.5g/Lの多糖濃度に希釈し、2~8℃に冷却し、1.2ミクロンで濾過した。100kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、バッチを100mM リン酸カリウム (pH7.0) に対して2~8℃でダイアフィルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約2.0g多糖/Lに希釈し、1.2M 重炭酸ナトリウム (pH9.4) の添加によりpHを調整した。水素化ホ

10

20

30

40

50

ウ素ナトリウム（多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル）を加えた。ついで 1.5 M リン酸カリウム（pH 6.0）を加えた。

【0252】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム（pH 7.0）中の 10 mM L-ヒスチジンに対して 4℃で透析した。ポリソルベート 20 を 0.05%（w/v）の濃度まで保持液バッチに加え、バッチを 0.2 ミクロンで濾過した。

【0253】

0.015%（w/v）ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム（pH 7.0）中の追加的な 10 mM L-ヒスチジンでバッチを 1.0 g/L の多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0254】

実施例 6

DMSO コンジュゲート化を用いた PCV23（DMSO）多価研究用の血清型 3 コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製 CRM197 を個別に凍結乾燥し、ジメチルスルホキシド（DMSO）中に再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液と CRM197 溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0255】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 Ps 粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Ps の分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 810 bar / 6 回通過、ついで 900 bar / 3 回通過に制御した。

【0256】

サイズ縮小多糖を濃縮し、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0257】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで 22℃および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃で 12 時間進行させた。

【0258】

活性化生成物を 10 mM リン酸カリウム（pH 6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2～8℃で行った。

【0259】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに（WO 2012 / 173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート（pH 7.2）バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0260】

活性化多糖を 10% w/v スクロース濃度で 2.5 mg Ps / mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w/v スクロース濃度で 6 mg Pr / mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0261】

10

20

30

40

50

製剤化した P s および C R M 1 9 7 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および C R M 1 9 7 物質を等体積の D M S O 中に個別に再溶解した。2.25 g P s / L の多糖濃度および 1.35 の多糖対 C R M 1 9 7 質量比が得られるように、多糖溶液と C R M 1 9 7 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 C R M 1 9 7 比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0262】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル）を加え、22℃で 1 時間インキュベートした。約 0.025% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファを加えて pH を中和した。

10

【0263】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0264】

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

20

【0265】

実施例 7

水性コンジュゲート化を用いた P C V 2 2 および P C V 2 3 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型 3 コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。ついで精製 C R M 1 9 7 を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

30

【0266】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 380 bar / 5 回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0267】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで 22℃および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃で 12 時間進行させた。

40

【0268】

活性化生成物を、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃で行った。

【0269】

C R M 1 9 7 への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および 1.5 M リン酸カリウム (pH 6.0) と混合した。選択されたバッファ pH は、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善する

50

ためのものであった。既に記載されているとおりに（WO 2012/173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を0.2ミクロン濾過し、緩衝化多糖溶液と0.6の多糖対CRM197質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ4.1g/Lおよび150mMであった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を0.2ミクロンで濾過した。100mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約2mMまで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を10℃で120時間進行させた。

10

【0270】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約3.5g/Lの多糖濃度に希釈し、2～8℃に冷却し、1.2ミクロンで濾過した。100kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、バッチを100mM リン酸カリウム（pH7.0）に対して2～8℃でダイアフィльтраーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約2.0g多糖/Lに希釈し、1.2M 重炭酸ナトリウム（pH9.4）の添加によりpHを調整した。水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加えた。ついで1.5M リン酸カリウム（pH6.0）を加えた。

【0271】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM L-ヒスチジンに対して4℃で透析した。バッチを0.2ミクロンで濾過した。

20

【0272】

150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）バッファー中の追加的な10mM L-ヒスチジンでバッチを1.0g/Lの多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0273】

実施例8

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）多価研究用の血清型4コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを透析により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

30

【0274】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を300bar/5回通過に制御した。

40

【0275】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィльтраーションした。

【0276】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで50℃およびpH4.1に調整して、多糖を部分的に脱ケタール化した。ついで多糖溶液を活性化前に22℃に冷却した。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応

50

は 22℃で 4 時間進行させた。

【0277】

活性化生成物を、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃で行った。

【0278】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに (WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0279】

活性化多糖を 5% w/v スクロース濃度で 6 mg Ps/mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w/v スクロース濃度で 6 mg Pr/mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0280】

製剤化した Ps および CRM197 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した Ps および CRM197 物質を等体積の DMSO 中に個別に再溶解した。5.0 g Ps/L の多糖濃度および 2.0 の多糖対 CRM197 質量比が得られるように、多糖溶液と CRM197 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0281】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加え、22℃で 1 時間インキュベートした。約 0.025% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。300 kDa NMWCO 透析カセットを使用して、150 mM 塩化ナトリウム、0.05% (w/v) ポリソルベート 20 に対して約 4℃で 3 日間、バッチを透析した。

【0282】

最終濾過および生成物貯蔵

バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0283】

実施例 9

PCV23 (DMSO + Aq) および水性コンジュゲート化を用いた PCV22 多価研究用の血清型 4 コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製 CRM197 を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0284】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 300 bar/5 回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイア

10

20

30

40

50

フィルトレーションした。

【0285】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで50℃およびpH4.1に調整して、多糖を部分的に脱ケタール化した。ついで多糖溶液を活性化前に22℃に冷却した。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で4時間進行させた。

【0286】

活性化生成物を、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して10mM リン酸カリウム (pH6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0287】

CRM197への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および1.5M リン酸カリウム (pH7.0) と混合した。選択されたバッファーpHは、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を0.2ミクロン濾過し、緩衝多糖溶液と0.5の多糖対CRM197質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ8.3g/Lおよび100mMであった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を0.2ミクロンで濾過した。100mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約2mMまで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を120時間進行させた。

【0288】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約3.5g/Lの多糖濃度に希釈し、2～8℃に冷却し、1.2ミクロンで濾過した。100kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、バッチを100mM リン酸カリウム (pH7.0) に対して2～8℃でダイアフィルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約2.0g多糖/Lに希釈し、1.2M 重炭酸ナトリウム (pH9.4) の添加によりpHを調整した。水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加えた。ついで1.5M リン酸カリウム (pH6.0) を加えた。

【0289】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) 中の10mM L-ヒスチジンに対して4℃で透析した。ついでバッチを0.2ミクロンで濾過した。

【0290】

150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) バッファー中の追加的な10mM L-ヒスチジンでバッチを1.0g/Lの多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0291】

実施例10

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) 多価研究用の血清型5コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを透析により精製した後、最後の0.

10

20

30

40

50

2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0292】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 P s 粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、P s の分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 600 bar / 5 回通過に制御した。

【0293】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0294】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 4℃ および pH 4.1 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 4℃ で 4 時間進行させた。

【0295】

活性化生成物を、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.1) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃ で行った。

【0296】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0297】

活性化多糖を 5% w / v スクロース濃度で 6 mg P s / mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w / v スクロース濃度で 6 mg P r / mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0298】

製剤化した P s および CRM197 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および CRM197 物質を等体積の DMSO 中に個別に再溶解した。多糖溶液に塩化ナトリウムを 20 mM の濃度まで添加 (スパイク) した。2.0 g P s / L の多糖濃度および 1.5 の多糖対 CRM197 質量比が得られるように、多糖溶液と CRM197 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加え、22℃ でコンジュゲート化を進行させた。

【0299】

希釈および中和

約 0.025% (w / v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃ で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。300 kDa NMWCO 透析カセットを使用して、150 mM 塩化ナトリウム、0.05% (w / v) ポリソルベート 20 に対して約 4℃ で 3 日間、バッチを透析した。

【0300】

最終濾過および生成物貯蔵

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、アリコートに分注し、-60℃ 以下で凍結した。

【0301】

実施例 11

水性コンジュゲート化を用いた PCV22 および PCV23 (DMSO + Aq) 多価研

10

20

30

40

50

究用の血清型 5 コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製 CRM 197 を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0302】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 600 bar / 5 回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

10

【0303】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 4℃ および pH 4.1 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 4℃ で 4 時間進行させた。

【0304】

10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、活性化生成物を 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.1) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2 ~ 8℃ で行った。

20

【0305】

CRM 197 への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および 1.5 M リン酸カリウム (pH 6.0) と混合した。選択されたバッファー pH は、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM 197 を緩衝化多糖溶液と 0.4 の多糖対 CRM 197 質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM 197 比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ 3.8 g / L および 150 mM であった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を 0.2 ミクロンで濾過した。100 mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約 2 mM まで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を 96 時間進行させた。

30

【0306】

精製および中和

コンジュゲート化反応後、バッチを約 3.5 g / L の多糖濃度に希釈し、2 ~ 8℃ に冷却し、1.2 ミクロンで濾過した。100 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、300 mM 重炭酸ナトリウム (pH 9.3) に対してバッチを 2 ~ 8℃ でダイアフィルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを 1.5 M リン酸カリウム (pH 6.0) で中和した。

40

【0307】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の 10 mM L-ヒスチジンに対して 4℃ で透析した。ポリソルベート 20 を 0.05 % (w / v) の濃度まで保持液バッチに加え、バッチを 0.2 ミクロンで濾過した。

【0308】

0.015 % (w / v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM L-ヒスチジンでバッチを 1.0 g / L の多糖濃度

50

に調整した。バッチをアリコートに分注し、 -60°C 以下で凍結した。

【0309】

実施例12

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) およびPCV23 (DMSO + Aq) およびPCV22多価研究用の血清型6Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

10

【0310】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を200bar / 5回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0311】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22°C およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22°C で2時間進行させた。

20

【0312】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で行った。

【0313】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションした。

30

【0314】

活性化多糖を5% w / v スクロース濃度で6mg Ps / mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w / v スクロース濃度で6mg Pr / mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0315】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。1.5g Ps / Lの多糖濃度および1.4の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、 22°C でコンジュゲート化を進行させた。

40

【0316】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、 22°C で3時間インキュベートした。約0.025% (w / v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウムでバッチを約 4°C で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム (pH7) に対して約 4°C でダイアフィルトレーションした。

50

【0317】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0318】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0319】

実施例13

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) およびPCV23 (DMSO/Aq) 多価研究用の血清型6Bコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0320】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を200 bar / 5回通過に制御した。

【0321】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0322】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0323】

活性化生成物を10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0324】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0325】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6 mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6 mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0326】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。1.85 g Ps/Lの多糖濃度および1.35の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制

10

20

30

40

50

御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0327】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム（pH7）に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

10

【0328】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0329】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0330】

実施例14

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究のための血清型6Bコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

20

【0331】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を200bar/5回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

30

【0332】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0333】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

40

【0334】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに（WO 2012/173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート（pH7.2）バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0335】

50

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0336】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。1.75g Ps/Lの多糖濃度および1.35の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

10

【0337】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム（pH7）に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0338】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

20

【0339】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0340】

実施例15

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）およびPCV23（DMSO + Aq）多価研究用の血清型7Fコンジュゲートの製造

30

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0341】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を150bar/7回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

40

【0342】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで4℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は4℃で4時間進行させた。

【0343】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイ

50

アフイルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0344】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWC O接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート(pH 7.2)バッファーに対してダイアフイルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0345】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6 mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6 mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

10

【0346】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.6 g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0347】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

20

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWC O接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム(pH 7)に対して約4℃でダイアフイルトレーションした。

【0348】

最終濾過および生成物貯蔵

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

30

【0349】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム(pH 7.0)中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0350】

実施例16

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究のための血清型7Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

40

【0351】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を150 bar/7回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NM

50

WCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0352】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで4℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は4℃で4時間進行させた。

【0353】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0354】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0355】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0356】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.04g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0357】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム (pH7) に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0358】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) 中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0359】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) 中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0360】

実施例17

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) およびPCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型8コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおり

10

20

30

40

50

コンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0361】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 P s 粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、P s の分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 600 bar / 6 回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0362】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃ および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃ で 4 時間進行させた。

【0363】

活性化生成物を 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃ で行った。

【0364】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0365】

活性化多糖を 5% w/v スクロース濃度で 6 mg P s / mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w/v スクロース濃度で 6 mg P r / mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0366】

製剤化した P s および CRM197 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および CRM197 物質を等体積の DMSO 中に個別に再溶解した。4.5 g P s / L の多糖濃度および 1.5 の多糖対 CRM197 質量比が得られるように、多糖溶液と CRM197 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。混合後、コンジュゲート化反応を 22℃ で進行させた。

【0367】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加え、22℃ で 1 時間インキュベートした。約 0.025% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃ で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。

【0368】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0369】

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃ 以下で凍結した。

【0370】

10

20

30

40

50

実施例 18

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) 多価研究用の血清型9Vコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0371】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を230bar/5.5回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0372】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で6時間進行させた。

【0373】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0374】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH7.2) バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0375】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0376】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.0g Ps/Lの多糖濃度および1.3の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0377】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム (pH7) に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0378】

最終濾過および生成物貯蔵

10

20

30

40

50

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

【0379】

保持液バッチを(0.5ミクロンプレフィルターで)0.2ミクロン濾過し、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、60℃以下で凍結した。

【0380】

実施例19

水性コンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型9Vコンジュゲートの製造
多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製CRM197を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0381】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜多糖粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を100 bar/5回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0382】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で6時間進行させた。

【0383】

活性化生成物を、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0384】

CRM197への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および1.5 M リン酸カリウム (pH 7.0) と混合した。選択されたバッファーpHは、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を0.2ミクロン濾過し、緩衝化多糖溶液と0.7の多糖対CRM197質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ10.0 g/Lおよび100 mMであった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を0.2ミクロンで濾過した。100 mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約2 mMまで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を120時間進行させた。

【0385】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約3.5 g/Lの多糖濃度に希釈し、2～8℃に冷却し、1.2ミクロンで濾過した。100 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、バッチを100 mM リン酸カリウム (pH 7.0) に対して2～8℃でダイアフィ

10

20

30

40

50

ルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約 2.0 g 多糖 / L に希釈し、1.2 M 重炭酸ナトリウム (pH 9.4) の添加により pH を調整した。水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加えた。ついで 1.5 M リン酸カリウム (pH 6.0) を加えた。

【0386】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の 10 mM L-ヒスチジンに対して 4℃ で透析した。ポリソルベート 20 を 0.05% (w/v) の濃度まで保持液バッチに加え、バッチを 0.2 ミクロンで濾過した。

【0387】

0.015% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM L-ヒスチジンでバッチを 1.0 g / L の多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃ 以下で凍結した。

【0388】

実施例 20

水性コンジュゲート化を用いた PCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型 9V コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製 CRM197 を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0389】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 100 bar / 5 回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0390】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃ および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ウ酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃ で 6 時間進行させた。

【0391】

活性化生成物を、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃ で行った。

【0392】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および 1.5 M リン酸カリウム (pH 7.0) と混合した。選択されたバッファー pH は、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を 0.2 ミクロン濾過し、緩衝化多糖溶液と 0.7 の多糖対 CRM197 質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ 10.0 g / L および 100 mM であった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を 0.2 ミクロンで濾過した。100 mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約 2 mM まで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当

10

20

30

40

50

たり2モル)を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を120時間進行させた。

【0393】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約3.5 g/Lの多糖濃度に希釈し、2~8℃に冷却し、1.2ミクロンで濾過した。100 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、バッチを100 mM リン酸カリウム(pH 7.0)に対して2~8℃でダイアフィльтраーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約2.0 g多糖/Lに希釈し、1.2 M 重炭酸ナトリウム(pH 9.4)の添加によりpHを調整した。水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加えた。ついで1.5 M リン酸カリウム(pH 6.0)を加えた。

10

【0394】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム(pH 7.0)中の10 mM L-ヒスチジンに対して4℃で透析した。ポリソルベート20を0.05% (w/v)の濃度まで保持液バッチに加え、バッチを0.2ミクロンで濾過した。

【0395】

0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム(pH 7.0)中の追加的な10 mM L-ヒスチジンでバッチを1.0 g/Lの多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

20

【0396】

実施例21

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23多価研究用の血清型10Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

30

【0397】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を615 bar/5回通過に制御した。

【0398】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィльтраーションした。

【0399】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

40

【0400】

活性化生成物を10 mM リン酸カリウム(pH 6.4)に対してダイアフィльтраーションし、ついで、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィльтраーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0401】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・

50

フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0402】

活性化多糖を5 % w/v スクロース濃度で6 mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1 % w/v スクロース濃度で6 mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0403】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.5 g Ps/Lの多糖濃度および1.6の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0404】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025 % (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。

【0405】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0406】

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、ついで、0.015 % (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0407】

実施例 22

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型10Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0408】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を600 bar / 5回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0409】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0410】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0411】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

10

【0412】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0413】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.4g Ps/Lの多糖濃度および1.6の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

20

【0414】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。

【0415】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム (pH 7) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

30

【0416】

保持液バッチを (0.5ミクロンプレフィルターで) 0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0417】

実施例23

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型10Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

40

【0418】

50

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 P s 粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、P s の分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 600 bar / 5 回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0419】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃ および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃ で 2 時間進行させた。

【0420】

活性化生成物を 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃ で行った。

【0421】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0422】

活性化多糖を 5% w/v スクロース濃度で 6 mg P s / mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w/v スクロース濃度で 6 mg P r / mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0423】

製剤化した P s および CRM197 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および CRM197 物質を等体積の DMSO 中に個別に再溶解した。3.8 g P s / L の多糖濃度および 1.75 の多糖対 CRM197 質量比が得られるように、多糖溶液と CRM197 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加え、22℃ でコンジュゲート化を進行させた。

【0424】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加え、22℃ で 1 時間インキュベートした。約 0.025% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃ で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム (pH 7) に対して約 4℃ でダイアフィルトレーションした。

【0425】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0426】

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃ 以下で凍結した。

【0427】

実施例 X

10

20

30

40

50

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV24多価研究用の血清型11Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0428】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を800bar/8回通過に制御した。サイズ縮小多糖を濃縮し、5kDa NMWC O接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0429】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0430】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム(pH6.4)に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5kDa NMWC O接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0431】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり(WO 2012/173876 Al)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWC O接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート(pH7.2)バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0432】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0433】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.3g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0434】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウムでバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。

【0435】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWC O接線流限外濾過膜を使用して、0.015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム(pH7.0)中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

10

20

30

40

50

【0436】

保持液バッチを（0.5ミクロンプレフィルターで）0.2ミクロン濾過し、150mM 塩化ナトリウム（pH7.0、0.015%（w/v）ポリソルベート20）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0437】

実施例24

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）およびPCV23（DMSO + Aq）多価研究用の血清型12Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおり

10

にコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0438】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を酸加水分解によりサイズ縮小した。該酸加水分解は、酢酸を200mMまで加え、80℃で155分間インキュベートし、ついで冷リン酸カリウム（pH7）バッファを400mMまで加えて中和することにより行った。

20

【0439】

サイズ縮小多糖を濃縮し、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0440】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0441】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

30

【0442】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり（WO 2012/173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート（pH7.2）バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0443】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

40

【0444】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.7g Ps/Lの多糖濃度および1.8の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0445】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

50

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。

【0446】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0447】

保持液バッチを（0.5ミクロンプレフィルターで）0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0448】

実施例25

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）およびPCV23（DMSO+Aq）多価研究用の血清型12Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0449】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を酸加水分解によりサイズ縮小した。該酸加水分解は、酢酸を200mMまで加え、90℃で60分間インキュベートし、ついで冷リン酸カリウム（pH7）バッファーを400mMまで加えて中和することにより行った。

【0450】

サイズ縮小多糖を濃縮し、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0451】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0452】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0453】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに（WO 2012/173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート（pH7.2）バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0454】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に

10

20

30

40

50

製剤化した。

【0455】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.0g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0456】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム（pH7.0）に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0457】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0458】

保持液バッチを（0.5ミクロンプレフィルターで）0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0459】

実施例26

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）多価研究用の血清型14コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを透析により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0460】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を200bar/6回通過に制御した。

【0461】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0462】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で4時間進行させた。

【0463】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレー

10

20

30

40

50

ションし、ついで、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィльтраーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0464】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート(pH 7.2)バッファーに対してダイアフィльтраーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0465】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6 mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6 mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0466】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。1.8 g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0467】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。300 kDa MWCO透析カセットを使用して、150 mM 塩化ナトリウム、0.05% ポリソルベート20に対して、バッチを約4℃で22.5時間透析した。

【0468】

最終濾過および生成物貯蔵

保持液バッチを(0.5ミクロンプレフィルターで)0.2ミクロン濾過し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0469】

実施例27

水性コンジュゲート化を用いたPCV22およびPCV23(DMSO+Aq)多価研究用の血清型14コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製CRM197を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0470】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜多糖粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を200 bar/6回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィльтраーションした。

【0471】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100 mM メタ過ヨウ素酸ナ

10

20

30

40

50

トリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で4時間進行させた。

【0472】

活性化生成物を、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して10mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0473】

CRM197への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および1.5M リン酸カリウム (pH 7.0) と混合した。選択されたバッファーpHは、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに (WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を0.2ミクロン濾過し、緩衝化多糖溶液と1.0の多糖対CRM197質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ3.8g/Lおよび100mMであった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を0.2ミクロンで濾過した。100mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約2mMまで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を72時間進行させた。

【0474】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約3.5g/Lの多糖濃度に希釈し、2～8℃に冷却し、1.2ミクロンで濾過した。100kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、バッチを100mM リン酸カリウム (pH 7.0) に対して2～8℃でダイアフィルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約2.0g多糖/Lに希釈し、1.2M 重炭酸ナトリウム (pH 9.4) の添加によりpHを調整した。水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加えた。ついで1.5M リン酸カリウム (pH 6.0) を加えた。

【0475】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の10mM L-ヒスチジンに対して4℃で透析した。ついでバッチを0.2ミクロンで濾過した。

【0476】

150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) バッファー中の追加的な10mM L-ヒスチジンでバッチを1.0g/Lの多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0477】

実施例28

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) およびPCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型15Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0478】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解し

10

20

30

40

50

た多糖を均質化して、P s の分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 210 bar / 5 回通過に制御した。

【0479】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWC O 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0480】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃ および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃ で 20 時間進行させた。

【0481】

活性化生成物を 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10 kDa NMWC O 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃ で行った。

【0482】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWC O 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0483】

活性化多糖を 5% w / v スクロース濃度で 6 mg P s / mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w / v スクロース濃度で 6 mg P r / mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0484】

製剤化した P s および CRM197 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および CRM197 物質を、34℃ に予熱された等体積の DMSO 中に個別に再溶解した。多糖溶液に塩化ナトリウムを 25 mM の濃度まで添加した。5.0 g P s / L の多糖濃度および 2.0 の多糖対 CRM197 質量比が得られるように、多糖溶液と CRM197 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加え、34℃ でコンジュゲート化を進行させた。

【0485】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加え、34℃ で 1 時間インキュベートした。約 0.025% (w / v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃ で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。

【0486】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0487】

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w / v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃ 以下で凍結した。

【0488】

実施例 29

DMSO コンジュゲート化を用いた PCV22 多価研究用の血清型 15A コンジュゲ

10

20

30

40

50

トの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0489】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を200bar/5回通過に制御した。

【0490】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0491】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で20時間進行させた。

【0492】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム(pH6.4)に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0493】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート(pH7.2)バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0494】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0495】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を、34℃に予熱された等体積のDMSO中に個別に再溶解した。多糖溶液に塩化ナトリウムを25mMの濃度まで添加した。5.0g Ps/Lの多糖濃度および2.0の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加え、34℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0496】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム(pH7)に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0497】

10

20

30

40

50

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0498】

保持液バッチを(0.5ミクロンプレフィルターで)0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0499】

実施例30

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) およびPCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型15Cコンジュゲートの製造

ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 血清型15Bに由来する多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、O-アセチル基を遊離させるために穏やかな塩基加水分解に付し、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0500】

多糖のサイズ縮小、塩基加水分解および酸化

精製された血清型15B肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を300 bar / 5回通過に制御した。

【0501】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0502】

多糖溶液を60℃に加熱し、重炭酸ナトリウム (pH 9) バッファーを50 mMの最終濃度まで加えた。バッチを、混合しながら、60℃で13時間インキュベートして、O-アセチル基を遊離させた。リン酸カリウム (pH 6) バッファーを136 mMの最終濃度まで加えてpHを中和し、溶液を周囲温度に冷却した。ついで溶液を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0503】

多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0504】

活性化生成物を10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0505】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

10

20

30

40

50

【0506】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0507】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.0g Ps/Lの多糖濃度および1.75の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

10

【0508】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム（pH7）に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

20

【0509】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0510】

保持液バッチを（0.5ミクロンプレフィルターで）0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0511】

実施例31

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型15Cコンジュゲートの製造

ストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）血清型15Bに由来する多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、O-アセチル基を遊離させるために穏やかな塩基加水分解に付し、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

40

【0512】

多糖のサイズ縮小、塩基加水分解および酸化

精製された血清型15B肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を300bar/5回通過に制御し、サイズ縮小多糖溶液を60℃に加熱し、重炭酸ナトリウム（pH9.4）バッファーを50mMの最終濃度まで加えた。バッチを、混合しながら、60℃で12時間インキュベートして、O-アセチル基を遊離させた。リン酸カリウム（pH6）バッファーを150mMの最終濃度まで加えてpHを中

50

和し、溶液を周囲温度に冷却した。ついで溶液を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0513】

多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0514】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0515】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0516】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0517】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.2g Ps/Lの多糖濃度および1.75の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0518】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム (pH7) に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0519】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) 中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0520】

保持液バッチを (0.5ミクロンプレフィルターで) 0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) 中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0521】

実施例32

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO) およびPCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型18Cコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッフ

10

20

30

40

50

ァー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0522】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を酸加水分解によりサイズ縮小した。該酸加水分解は、酢酸を200mMまで加え、90℃で160分間インキュベートし、ついで冷リン酸カリウム(pH7)バッファを400mMまで加えて中和することにより行った。

【0523】

サイズ縮小多糖を濃縮し、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0524】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0525】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム(pH6.4)に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0526】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート(pH7.2)バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0527】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0528】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.49g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0529】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム(pH7)に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0530】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.

10

20

30

40

50

0.15% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0531】

保持液バッチを(0.5ミクロンプレフィルターで)0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0532】

実施例33

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型18Cコンジュゲートの製造

10

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0533】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を酸加水分解によりサイズ縮小した。該酸加水分解は、酢酸を200mMまで加え、90℃で160分間インキュベートし、ついで冷リン酸カリウム (pH 7) バッファーを400mMまで加えて中和することにより行った。

20

【0534】

サイズ縮小多糖を濃縮し、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0535】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

30

【0536】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0537】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

40

【0538】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0539】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.49g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル

50

当たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0540】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM塩化ナトリウム、25mMリン酸カリウム(pH7)に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0541】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM塩化ナトリウム(pH7.0)中の10mMヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0542】

保持液バッチを(0.5ミクロンプレフィルターで)0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM塩化ナトリウム(pH7.0)中の追加的な10mMヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0543】

実施例34

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23(DMSO)およびPCV23(DMSO+Aq)多価研究用の血清型19Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0544】

多糖の酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.22ミクロンで濾過した。多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0545】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mMメタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で20時間進行させた。

【0546】

活性化生成物を10mMリン酸カリウム(pH6.4)に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0547】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mMホスファート(pH7.2)バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0548】

活性化多糖を5% w/vスクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化

10

20

30

40

50

した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0549】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.8g Ps/Lの多糖濃度および1.33の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0550】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム（pH7）に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0551】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0552】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0553】

実施例35

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型19Aコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0554】

多糖の酸化

精製された肺炎球菌荚膜Ps粉末を水に溶解し、0.22ミクロンで濾過した。多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0555】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で20時間進行させた。

【0556】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0557】

10

20

30

40

50

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート(pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0558】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6 mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6 mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0559】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。3.8 g Ps/Lの多糖濃度および1.33の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0560】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム(pH 7)に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0561】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0562】

保持液バッチを0.2 ミクロンで濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム(pH 7.0)中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0563】

実施例36

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23(DMSO)、PCV23(DMSO+ Aq)およびPCV22多価研究用の血清型19Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0564】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜Ps粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を150 bar/5回通過に制御した。

【0565】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対

10

20

30

40

50

してダイアフィルトレーションした。

【0566】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで4℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は4℃で4時間進行させた。

【0567】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0568】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに（WO 2012/173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート（pH7.2）バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0569】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0570】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.0g Ps/Lの多糖濃度および1.2の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0571】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム（pH7）に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで22℃で4.5日間インキュベートした。

【0572】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）、4℃で10mM ヒスチジンに対してダイアフィルトレーションした。

【0573】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0574】

実施例37

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）多価研究用の血清型22Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶

10

20

30

40

50

解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおり
にコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の
0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各
工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0575】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解し
た多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過
回数を810bar/5回通過に制御した。

【0576】

サイズ縮小多糖を濃縮し、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対し
てダイアフィルトレーションした。

【0577】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化
による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナ
トリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0578】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム(pH6.4)に対してダイアフィルトレー
ションし、ついで、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイア
フィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0579】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・
フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO
接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート(pH7.2)バッファーに対して
ダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0580】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化
した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に
製剤化した。

【0581】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよ
びCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.3g Ps/Lの多
糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM1
97溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御さ
れるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当
たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0582】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル
)を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベ
ート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリ
ン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。

【0583】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.
015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム(pH7
.0)中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0584】

保持液バッチを0.5ミクロンプレフィルターで0.2ミクロン濾過し、0.015%

10

20

30

40

50

(w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0585】

実施例 38

水性コンジュゲート化を用いた PCV 22 および PCV 23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型 22 F コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製 CRM 197 を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

【0586】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜多糖粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 350 bar / 5 回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0587】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃ および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃ で 2 時間進行させた。

【0588】

活性化生成物を、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃ で行った。

【0589】

CRM 197 への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および 1.5 M リン酸カリウム (pH 7.0) と混合した。選択されたバッファー pH は、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに (WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM 197 を 0.2 ミクロン濾過し、緩衝化多糖溶液と 0.6 の多糖対 CRM 197 質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM 197 比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ 7.5 g/L および 100 mM であった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を 0.2 ミクロンで濾過した。100 mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約 2 mM まで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を 120 時間進行させた。

【0590】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約 3.5 g/L の多糖濃度に希釈し、2~8℃ に冷却し、1.2 ミクロンで濾過した。100 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、バッチを 100 mM リン酸カリウム (pH 7.0) に対して 2~8℃ でダイアフィルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約 2.0 g 多糖/L に希釈し、1.2 M 重炭酸ナトリウム (pH 9.4) の添加により pH を調整した。水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加えた。ついで 1.5 M リン酸カリウム (pH 6.0) を加えた。

10

20

30

40

50

【0591】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の10 mM L-ヒスチジンに対して4℃で透析した。

【0592】

バッチを0.2ミクロンで濾過し、150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) バッファ中の追加的な10 mM L-ヒスチジンで1.0 g/Lの多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0593】

実施例39

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23 (DMSO)、PCV23 (DMSO + Aq) およびPCV22多価研究用の血清型23Bコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0594】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を400 bar / 5回通過に制御した。

【0595】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0596】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0597】

活性化生成物を10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0598】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0599】

活性化多糖を5 % w/v スクロース濃度で6 mg Ps / mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1 % w/v スクロース濃度で6 mg Pr / mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0600】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。5.0 g Ps / Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御さ

10

20

30

40

50

れるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0601】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル）を加え、22℃で 1 時間インキュベートした。約 0.025% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム (pH 7) に対して約 4℃でダイアフィルトレーションした。

10

【0602】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0603】

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な 10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

20

【0604】

実施例 40

DMSO コンジュゲート化を用いた PCV23 (DMSO) および PCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型 23F コンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製 CRM197 を個別に凍結乾燥し、DMSO に再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液と CRM197 溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の 0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えば pH、温度、濃度および時間を制御した。

30

【0605】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 Ps 粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Ps の分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を 400 bar / 5 回通過に制御した。

【0606】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0607】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃で 5 時間進行させた。

40

【0608】

活性化生成物を 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2~8℃で行った。

【0609】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに (WO 2012 / 173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO

50

O接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0610】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6 mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6 mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0611】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.1 g Ps/Lの多糖濃度および1.25の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、22°Cでコンジュゲート化を進行させた。

10

【0612】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、22°Cで3時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4°Cで希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム (pH 7) に対して約4°Cでダイアフィルトレーションした。

20

【0613】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0614】

保持液バッチを0.2 ミクロンで濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60°C以下で凍結した。

30

【0615】

実施例 41

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型23Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2 ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

40

【0616】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜Ps粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を400 bar/5回通過に制御した。

【0617】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0618】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22°CおよびpH 5に調整して、活性化

50

による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で4時間進行させた。

【0619】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム(pH6.4)に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

【0620】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート(pH7.2)バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0621】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0622】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.1g Ps/Lの多糖濃度および1.25の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0623】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、22℃で3時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム(pH7)に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0624】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム(pH7.0)中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0625】

保持液バッチを0.2ミクロンで濾過し、ついで、0.015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム(pH7.0)中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0626】

実施例42

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23(DMSO)およびPCV23(DMSO+Aq)多価研究用の血清型24Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0627】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜 P s 粉末を水に溶解し、0.45 ミクロンで濾過した。溶解した多糖を酸加水分解によりサイズ縮小した。該酸加水分解は、酢酸を 200 mM まで加え、80℃で150分間インキュベートし、ついで冷リン酸カリウム (pH 7) バッファーを 400 mM まで加えて中和することにより行った。

【0628】

サイズ縮小多糖を濃縮し、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0629】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで 22℃および pH 5 に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を 100 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は 22℃で2時間進行させた。

【0630】

活性化生成物を 10 mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は 2～8℃で行った。

【0631】

CRM197 への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに (WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製 CRM197 を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 mM ホスファート (pH 7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2 ミクロンで濾過した。

【0632】

活性化多糖を 10% w/v スクロース濃度で 2 mg P s / mL で凍結乾燥用に製剤化した。CRM197 を 1% w/v スクロース濃度で 6 mg P r / mL で凍結乾燥用に製剤化した。

【0633】

製剤化した P s および CRM197 溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および CRM197 物質を等体積の DMSO 中に個別に再溶解した。多糖溶液に塩化ナトリウムを 10 mM の最終濃度まで添加した。1.4 g P s / L の多糖濃度および 1.5 の多糖対 CRM197 質量比が得られるように、多糖溶液と CRM197 溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対 CRM197 比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 1 モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0634】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位 1 モル当たり 2 モル) を加え、22℃で1時間インキュベートした。約 0.025% (w/v) ポリソルベート 20 を含有する 150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約 4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム (pH 7) に対して約 4℃でダイアフィルトレーションした。

【0635】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0636】

保持液バッチを (0.5 ミクロンプレフィルターで) 0.2 ミクロン濾過し、ついで、

10

20

30

40

50

0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0637】

実施例43

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型24Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファ交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおり

10

【0638】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌荚膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を酸加水分解によりサイズ縮小した。該酸加水分解は、酢酸を200mMまで加え、80℃で150分間インキュベートし、ついで冷リン酸カリウム (pH 7) バッファを400mMまで加えて中和することにより行った。

【0639】

20

サイズ縮小多糖を濃縮し、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0640】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファで22℃およびpH 5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0641】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2~8℃で行った。

30

【0642】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおり (WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH 7.2) バッファに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0643】

活性化多糖を10% w/v スクロース濃度で2mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

40

【0644】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。多糖溶液に塩化ナトリウムを25mMの最終濃度まで添加した。1.4g Ps/Lの多糖濃度および1.5の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり1モル) を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0645】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

50

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム（pH7）に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0646】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0647】

保持液バッチを（0.5ミクロンプレフィルターで）0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015%（w/v）ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム（pH7.0）中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0648】

実施例44

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23（DMSO）多価研究用の血清型33Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、目標分子量にサイジングし、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0649】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して、Psの分子量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を510bar/5回通過に制御した。

【0650】

サイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0651】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0652】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム（pH6.4）に対してダイアフィルトレーションし、ついで、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0653】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに（WO 2012/173876 A1）シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート（pH7.2）バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0654】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化

10

20

30

40

50

した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0655】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。2.5g Ps/Lの多糖濃度および1.75の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。シアノ水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり1モル）を加え、22℃でコンジュゲート化を進行させた。

【0656】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム（多糖反復単位1モル当たり2モル）を加え、22℃で1時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。

【0657】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0658】

保持液バッチを（0.5ミクロンプレフィルターで）0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0659】

実施例45

水性コンジュゲート化を用いたPCV22およびPCV23 (DMSO + Aq) 多価研究用の血清型33Fコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、サイズ縮小させ、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。ついで精製CRM197を、反応混合物中で塩化ニッケルを使用して活性化多糖にコンジュゲート化させ、得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0660】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製された肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を均質化して分子量を減少させた。目標分子量にサイズ縮小するために、均質化圧力およびホモジナイザー通過回数を350bar/4回通過に制御した。ついでサイズ縮小多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0661】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0662】

活性化生成物を、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して10mM リン酸カリウム (pH 6.4) に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0663】

10

20

30

40

50

CRM197への多糖コンジュゲート化

酸化された多糖溶液を水および1.5M リン酸カリウム(pH7.0)と混合した。選択されたバッファーpHは、コンジュゲート化反応中の活性化多糖の安定性を改善するためのものであった。既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を0.2ミクロン濾過し、緩衝化多糖溶液と0.7の多糖対CRM197質量比で一緒にした。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。多糖およびホスファートの濃度はそれぞれ6.5g/Lおよび100mMであった。得られるコンジュゲートのサイズが制御されるように、多糖濃度を選択した。ついで溶液を0.2ミクロンで濾過した。100mM 塩化ニッケル溶液を使用して、塩化ニッケルを約2mMまで加えた。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加えた。多糖およびタンパク質の消費が最大となるように、コンジュゲート化を96時間進行させた。

【0664】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、バッチを約3.5g/Lの多糖濃度に希釈し、2~8℃に冷却し、1.2ミクロンで濾過した。100kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、バッチを100mM リン酸カリウム(pH7.0)に対して2~8℃でダイアフィルトレーションした。ついで、保持液中に回収されたバッチを約2.0g多糖/Lに希釈し、1.2M 重炭酸ナトリウム(pH9.4)の添加によりpHを調整した。水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり1モル)を加えた。ついで1.5M リン酸カリウム(pH6.0)を加えた。

【0665】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム(pH7.0)中の10mM L-ヒスチジンに対して4℃で透析した。バッチを0.2ミクロンで濾過し、150mM 塩化ナトリウム(pH7.0)バッファー中の追加的な10mM L-ヒスチジンで1.0g/Lの多糖濃度に調整した。バッチをアリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0666】

実施例46

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV23(DMSO)およびPCV23(DMSO+Aq)多価研究用の血清型35Bコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0667】

多糖の酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解した多糖を濃縮し、10kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0668】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0669】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム(pH6.4)に対してダイアフィルトレー

10

20

30

40

50

ションし、ついで、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0670】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1)シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して2 mM ホスファート(pH 7.2)バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0671】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6 mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6 mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0672】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。多糖溶液に塩化ナトリウムを20 mMの最終濃度まで添加した。6.0 g Ps/Lの多糖濃度および3.0の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。コンジュゲート化を34℃で進行させた。

【0673】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム(多糖反復単位1モル当たり2モル)を加え、34℃で1時間インキュベートした。約0.025%(w/v)ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO接線流限外濾過膜を使用して、150 mM 塩化ナトリウム、25 mM リン酸カリウム(pH 7)に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0674】

最終濾過および生成物貯蔵

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

【0675】

保持液バッチを(0.5ミクロンプレフィルターで)0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015%(w/v)ポリソルベート20を含有する150 mM 塩化ナトリウム(pH 7.0)中の追加的な10 mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0676】

実施例47

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV22多価研究用の血清型35Bコンジュゲートの製造

多糖を溶解し、化学的に活性化し、限外濾過によりバッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。

【0677】

多糖の酸化

精製された肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、0.45ミクロンで濾過した。溶解し

10

20

30

40

50

た多糖を濃縮し、10 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。

【0678】

ついで多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで22℃およびpH5に調整して、活性化による多糖サイズ縮小を最小限に抑えた。多糖の活性化を100mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液の添加により開始させた。酸化反応は22℃で2時間進行させた。

【0679】

活性化生成物を10mM リン酸カリウム (pH6.4) に対してダイアフィルトレーションし、ついで、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して水に対してダイアフィルトレーションした。限外濾過は2～8℃で行った。

【0680】

CRM197への多糖コンジュゲート化

既に記載されているとおりに(WO 2012/173876 A1) シュードモナス・フルオレッセンスにおける発現により得られた精製CRM197を、5 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して2mM ホスファート (pH7.2) バッファーに対してダイアフィルトレーションし、0.2ミクロンで濾過した。

【0681】

活性化多糖を5% w/v スクロース濃度で6mg Ps/mLで凍結乾燥用に製剤化した。CRM197を1% w/v スクロース濃度で6mg Pr/mLで凍結乾燥用に製剤化した。

【0682】

製剤化したPsおよびCRM197溶液を個別に凍結乾燥した。凍結乾燥したPsおよびCRM197物質を等体積のDMSO中に個別に再溶解した。多糖溶液に塩化ナトリウムを20mMの最終濃度まで添加した。6.0g Ps/Lの多糖濃度および3.0の多糖対CRM197質量比が得られるように、多糖溶液とCRM197溶液とを混合した。得られるコンジュゲートにおける多糖対CRM197比が制御されるように、質量比を選択した。コンジュゲート化を34℃で進行させた。

【0683】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲート化反応後、水素化ホウ素ナトリウム (多糖反復単位1モル当たり2モル) を加え、34℃で1時間インキュベートした。約0.025% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム中にバッチを約4℃で希釈した。ついでリン酸カリウムバッファーを加えてpHを中和した。バッチを濃縮し、30 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、150mM 塩化ナトリウム、25mM リン酸カリウム (pH7) に対して約4℃でダイアフィルトレーションした。

【0684】

最終濾過および生成物貯蔵

ついでバッチを濃縮し、300 kDa NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) 中の10mM ヒスチジンに対して4℃でダイアフィルトレーションした。

【0685】

保持液バッチを(0.5ミクロンプレフィルターで)0.2ミクロン濾過し、ついで、0.015% (w/v) ポリソルベート20を含有する150mM 塩化ナトリウム (pH7.0) 中の追加的な10mM ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、-60℃以下で凍結した。

【0686】

実施例Y

DMSOコンジュゲート化を用いたPCV24多価研究用の血清型の製造

前記実施例に記載されたものと同様の方法を用いて、PCV24研究用のコンジュゲートを製造した。各血清型に関して、多糖を溶解し、化学的に活性化し、限外濾過によりバ

10

20

30

40

50

ッファー交換した。活性化多糖および精製CRM197を個別に凍結乾燥し、DMSOに再溶解した。ついで、再溶解した多糖溶液とCRM197溶液とを一緒にし、後記のとおりによりコンジュゲート化させた。得られたコンジュゲートを限外濾過により精製した後、最後の0.2ミクロン濾過に付した。

【0687】

所望の特性を有するコンジュゲートが得られるように、各工程内の幾つかのプロセスパラメータ、例えばpH、温度、濃度および時間を制御した。前記実施例との差異には、均質化圧力および通過回数、酸化時間、凍結乾燥のための多糖およびスクロースの濃度、コンジュゲート化中の多糖濃度、多糖対CRM197質量比、ならびにコンジュゲート化反応における塩濃度が含まれる。

【0688】

実施例48

肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤化

前記実施例に記載されている種々の化学的方法を用いて製造された個々の肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートを8、15、22、23および24価肺炎球菌コンジュゲートワクチンの製剤化に使用した。

【0689】

PCV8/APAワクチン医薬品は、非プロトン性溶媒（DMSO化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質を肺炎球菌多糖（PnP）型（-8、-10A、-12F、-15A、-15C、-23B、-24Fおよび-35B）に個別にコンジュゲート化させることにより製造され、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）および150mM NaCl 0.1% w/v ポリソルベート-20（PS-20）および250μg [Al]/mL（アジュバントとしてリン酸アルミニウムアジュバントの形態）中で各血清型4μg/mL（32μg/mLの総多糖濃度）で製剤化される。

【0690】

PCV15/APAワクチン医薬品は、非プロトン性溶媒（DMSO化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質を肺炎球菌多糖（PnP）型（-6A、-6B、-7F、-9V、-18C、-19A、-19F、-23F）に個別にコンジュゲート化させ、あるいは、型-1、-3、-4、-5、-14、-22Fおよび-33Fの場合には、プロトン性溶媒（水性化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質を肺炎球菌多糖（PnP）型に個別にコンジュゲート化させることにより製造され、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）および150mM NaCl 0.2% w/v ポリソルベート-20（PS-20）および250μg [Al]/mL（アジュバントとしてリン酸アルミニウムアジュバントの形態）中で各血清型4μg/mL（ただし、6Bは8μg/mL）（64μg/mLの総多糖濃度）で製剤化される。

【0691】

マウスおよびウサギを免疫化するのに使用されるPCV22ワクチン医薬品を、プロトン性溶液および非プロトン性溶液（DMSO/水性「Aq」）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質を肺炎球菌多糖（PnP）型（-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-9V、-10A、-12F、-14、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-22F、-23B、-23F、-24F、-33Fおよび-35B）に個別にコンジュゲート化させることにより製造し、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）および150mM NaClおよび0.2% w/v ポリソルベート-20（PS-20）中で各血清型0.8μg/mL（ただし、6Bは1.6μg/mL）（18.4μg/mLの総多糖濃度）で製剤化した（PCV22非アジュバント化またはunadjと称される）。もう1つの特定の実施形態においては、製剤は、アジュバントとしてのリン酸アルミニウムの形態の50μg [Al]/mLを使用して製造され、PCV22/APAと称される。

【0692】

PCV23ワクチン医薬品は、非プロトン性溶媒（DMSO化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質を肺炎球菌多糖（PnP）型（-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-8、-9V、-10A、-12F、-14、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-22F、-23B、-23F、-24F、-33Fおよび-35B）に個別にコンジュゲート化させることにより製造され、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）および150mM NaClおよび0.2% w/v ポリソルベート-20（PS-20）中で各血清型4μg/mL（92μg/mLの総多糖濃度）で製剤化され、PCV23 unadjuvと称される。もう1つの特定の実施形態においては、製剤は、アジュバントとしてのリン酸アルミニウムの形態の250μg [Al]/mLを使用して製造され、PCV23/APAと称される。もう1つの実施形態においては、PCV23ワクチン医薬品は、プロトン性溶媒（水性化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質を肺炎球菌多糖（PnP）型（-1、3、-4、-5、-9V、-14、-22Fおよび-33F）に個別にコンジュゲート化させ、および非プロトン性溶媒（DMSO化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質を肺炎球菌多糖（PnP）型（-6A、-6B、-7F、-8、-10A、-12F、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-23B、-23F、-24Fおよび-35B）に個別にコンジュゲート化させることにより製造される。該ワクチン医薬品は、0.01% カルボキシメチルセルロース（CMC）の存在下の20mM L-ヒスチジン（pH5.8）および150mM NaClおよび0.1% w/v ポリソルベート-20（PS-20）中で各血清型4μg/mL（ただし、6Bは8μg/mL）（96μg/mLの総多糖濃度）で製剤化され、およびアジュバントとしてのリン酸アルミニウムの形態の250μg [Al]/mLを使用して製造され、PCV23（DMSO+Aq）/APAと称される。

【0693】

多価免疫原性組成物PCV24は、非プロトン性溶媒（DMSO化学とも称される）中で還元的アミノ化を用いて、CRM197タンパク質をストレプトコッカス・ニューモニエ多糖（PnP）型-1、-3、-4、-5、-6A、-6B、-7F、-8、-9V、-10A、-11A、-12F、-14、-15A、-15C、-18C、-19A、-19F、-22F、-23B、-23F、-24F、-33Fおよび-35Bに個別にコンジュゲート化させることにより製造され、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）、150mM NaClおよび0.1% w/v ポリソルベート-20（PS-20）中で各血清型4μg/mLまたは8μg/mL（それぞれ96μg/mLまたは192μg/mLの総多糖濃度）で製剤化され、「PCV24 unadj」と称される。もう1つの特定の実施形態においては、多価免疫原性組成物PCV24は、20mM L-ヒスチジン（pH5.8）、150mM NaClおよび0.2% w/v ポリソルベート-20（PS-20）、そして更に250μg [Al]/mL（アジュバントとしてのリン酸アルミニウムアジュバントの形態）中で各血清型4μg/mL（96μg/mLの総多糖濃度）で製剤化される。これは「PCV24/APA」と称される。

【0694】

個々の血清型の目標濃度を得るために必要なバルクコンジュゲートの必要体積を、個々のバルク多糖濃度のバッチ体積および濃度に基づいて計算した。個々のコンジュゲートをヒスチジン、塩化ナトリウムおよびポリソルベート-20（PS-20）の溶液に加えて、2×〜4×コンジュゲート混合物を得た。該コンジュゲート混合物を含有する製剤容器を、マグネチックスターラーを使用して混合し、別の容器内に滅菌濾過する。滅菌濾過した2×〜4×混合物を、リン酸アルミニウムアジュバントを含有する別の容器に加え、または生理食塩水で希釈して、所望の目標総多糖、賦形剤およびAPAアジュバント（必要な場合）濃度を得る。ついで製剤をガラスバイアルまたはシリンジ内に充填し、2〜8℃で貯蔵する。

【0695】

実施例 49

マウスにおけるPCV22免疫原性および機能的抗体

若い雌Balb/cマウス（6～8週齢、n=10/群）を第0日、第14日および第28日に0.1mLの22価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV22/APAまたは非アジュバント化PCV22）で免疫化した。PCV22を各肺炎球菌多糖0.08μg（1、3、4、5、6A、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33F、35B）および0.16μg（6B）（全てはCRM197にコンジュゲート化されていた）で非アジュバント化形態または5μgのリン酸アルミニウムアジュバント（APA）（免疫化ごと）の存在下で投与した。熟練した動物管理スタッフが、疾患または苦痛の兆候に関して、少なくとも毎日、マウスを観察した。ワクチン関連有害事象が認められなかったため、マウスにおけるワクチン製剤は安全かつ高忍容性であるとみなされた。第52日に、マウスをストレプトコッカス・ニューモニエ血清型24Fで気管内チャレンジした。ストレプトコッカス・ニューモニエの指数増殖期培養物を遠心分離し、洗浄し、滅菌PBS中に懸濁させた。チャレンジ前に、マウスをイソフルランで麻酔した。0.1mLのPBS中の 10^5 cfuのストレプトコッカス・ニューモニエを、切歯でまっすぐに吊るしたマウスの喉内に配置した。舌を穏やかに外側に引っ張り、鼻孔を覆うことにより、該細菌の吸引を誘導した。マウスを毎日秤量し、体重減少が開始体重の20%を超えた場合には安楽死させた。細菌血症を評価するために、24時間、48時間および72時間の時点で採血した。熟練した動物管理スタッフが、疾患または苦痛の兆候に関して、マウスを少なくとも1日2回観察した。全ての動物実験は、米国国立衛生研究所の実験動物の管理および使用に関する指針（Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health）の推奨事項を厳守して行った。マウス実験プロトコルはメルク（Merck & Co., Inc.）の動物管理・使用委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）により承認された。

【0696】

多重電気化学発光（ECL）アッセイを使用して、マウス血清をIgG免疫原性に関して評価した。このアッセイは、Marcheseら^[3]により記載されているヒトアッセイに基づいてマウス血清で使用するために開発されたものであり、電気化学的刺激時に発光するSULFO-TAG（商標）標識を利用するMesoScale Discovery（MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MDの一部門）により開発された技術を用いる。SULFO-TAG（商標）標識抗マウスIgGを、マウス血清サンプルを試験するための二次抗体として使用した。www.vaccine.uab.eduに既に記載されているプロトコル、ならびにアラバマ大学（UAB）研究財団 [Alabama (UAB) Research Foundation] により所有されライセンスされているOpsoTiter（登録商標）3ソフトウェアに基づく多重オブソニン食作用アッセイ（MOPA）により、機能的抗体を決定した^[1, 2]。

【0697】

マウス血清を各群に関してプールし、多重電気化学発光アッセイにおいて試験して抗体価を決定した。PCV22は、該ワクチンでの1、2および3回の免疫化の後、全ての血清型に関して、マウスにおける抗体価を生成した（図1）。IgG力価により実証されているとおり、PCV22は血清型15Bに対する交差反応性を示した（図1）。APAと共に製剤化されたPCV22は、PD2（データ非表示）およびPD3（図2）のマウスにおいて、非アジュバント化PCV22と比較して、より高い免疫原性をもたらす傾向にあった。

【0698】

マウス血清を各群に関してプールし、多重オブソニン食作用アッセイ（MOPA）において試験して機能的抗体価を決定した。PCV22は、該ワクチンでの3回の免疫化の後

10

20

30

40

50

、ワクチン型細菌血清型を殺滅する機能的抗体価をマウスにおいて生成した（図3）。APAと共に製剤化されたPCV22は、IgG力価（図2）と同様に、PD2（データ非表示）およびPD3（図4）において、非アジュバント化PCV22と比較して、より高い機能的抗体力価をもたらす傾向にあった。

【0699】

PCV22免疫化マウスはストレプトコッカス・ニューモニエ24Fでの気管内チャレンジから防御された（図5）。マンテル・コックス（Mantel Cox）対数順位検定は、非アジュバント化PCV22（PCV22 unadj）群とPCV22/APA群との両方が、ナイーブ群と比較して、チャレンジから有意に防御されることを示した（ $P < 0.0001$ ）。同様に、両方のPCV22免疫化マウス群は細菌血症をほとんど又は全く示さず、これは、ナイーブ群と比較して有意に少なかった（データ非表示）。

【0700】

実施例50

ウサギにおけるPCV22免疫原性および機能的抗体

成体New Zealand（ニュージーランド）白ウサギ（NZWR、 $n = 5$ ／群）を、第0日および第14日（交互の側）に、0.1mLの22価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV22/APAまたは非アジュバント化PCV22）で筋肉内（IM）免疫化した。PCV22を各肺炎球菌多糖0.08 μ g（1、3、4、5、6A、7F、9V、10A、12F、14、15A、15C、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33F、35B）および0.16 μ g（6B）（全てはCRM197にコンジュゲート化されていた）で非アジュバント化形態または5 μ gのリン酸アルミニウムアジュバント（APA）（免疫化ごと）の存在下で投与した。研究開始前（免疫前）ならびに第14日（PD1）および第28日（PD2）に血清を収集した。熟練した動物管理スタッフが、疾患または苦痛の兆候に関して、少なくとも毎日、NZWRを観察した。ワクチン関連有害事象が認められなかったため、NZWRにおけるワクチン製剤は安全かつ高忍容性であるとみなされた。全ての動物実験は、米国国立衛生研究所の実験動物の管理および使用に関する指針（Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health）の推奨事項を厳守して行った。NZWR実験プロトコルはメルク（Merck & Co., Inc.）およびコバンス（Covance）（Denver, PA）の両方の動物管理・使用委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）により承認された。

【0701】

多重電気化学発光（ECL）アッセイを使用して、ウサギ血清をIgG免疫原性に関して評価した。このアッセイは、Marcheseら^[3]により記載されているヒトアッセイに基づいてウサギ血清で使用するために開発されたものであり、電気化学的刺激時に発光するSULFO-TAG（商標）標識を利用するMesoScale Discovery（MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MDの一部門）により開発された技術を用いる。SULFO-TAG（商標）標識抗ウサギIgGを、NZWR血清サンプルを試験するための二次抗体として使用した。www.vaccine.uab.eduに既に記載されているプロトコル、ならびにアラバマ大学（UAB）研究財団[Alabama（UAB）Research Foundation]により所有されライセンスされているOpsotiter（登録商標）3ソフトウェアに基づく多重オプソニン食作用アッセイ（MOPA）により、機能的抗体を決定した^[1, 2]。

【0702】

抗体価を決定するために、多重電気化学発光アッセイにおいてウサギの血清を個別に試験した。PCV22は、該ワクチンでの免疫化の後、全ての血清型に対するウサギにおける抗体価を生成した（図6）。PCV22でのウサギの免疫化は、血清型15B多糖に結合する抗体をも生成する（図6）。ウサギにおいては、PCV22と共にAPAを配合す

る利点はなかった。なぜなら、P D 2において、（血清型1）非アジュバント化P C V 2 2と比較して、免疫原性が同等以下だったからである（図7）。

【0703】

機能的抗体価を決定するために、多重オプソニン食作用アッセイ（M O P A）においてウサギ血清を個別に試験した。P C V 2 2は、該ワクチンでの2回の免疫化の後、ワクチン型細菌血清型を殺滅する機能的抗体価をウサギにおいて生成した（図8）。非アジュバント化P C V 2 2は、A P Aと共に製剤化されたP C V 2 2と比較して、血清型4ではP D 1（データ非表示）において、そして血清型1、3および4ではP D 2において、より高い機能的抗体価を示した。A P Aと共に製剤化されたP C V 2 2は、非アジュバント化P C V 2 2と比較して、血清型のほとんどに関して、P D 1（データ非表示）およびP D 2において、より高い機能的抗体価を示さなかった（図8）。

10

【0704】

実施例51

乳児アカゲザルにおけるP C V 2 3免疫原性

乳児アカゲザル（I R M、2～3月齢、n = 8～9／群）を、第0日、第28日および第56日に、0.1 mLの23価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（P C V 2 3）で筋肉内免疫化した。P C V 2 3を総肺炎球菌多糖9.6 μg（0.4 μgの1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、10 A、12 F、14、15 A、15 C、18 C、19 A、19 F、22 F、23 B、23 F、24 F、33 Fおよび35 Bならびに0.8 μgの6 B；全てはCRM197にコンジュゲート化されている）で、非アジュバント化形態または免疫化ごとに25 μgのリン酸アルミニウムアジュバント（A P A）と共に製剤化された形態で投与した。前記と同じスケジュールに従い、P C V 1 5を総肺炎球菌多糖6.4 μg（0.4 μgの1、3、4、5、6 A、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F、22 F、23 Fおよび33 Fならびに0.8 μgの6 B；全てはCRM197にコンジュゲート化されており、免疫化ごとに25 μgのA P Aが配合される）で1つの四頭筋に投与し、0.1 mLのP C V 8（0.4 μgの8、10 A、12 F、15 A、15 C、23 B、24 Fおよび35 B；全てはCRM197にコンジュゲート化されており、免疫化ごとに25 μgのA P Aが配合される）を別の四頭筋に投与した。研究開始前（免疫前、第0日）ならびに第14日（P D 1）、第28日、第42日（P D 2）、第56日および第70日（P D 3）に血清を収集した。熟練した動物管理スタッフが、疾患または苦痛の兆候に関して、少なくとも毎日、I R Mを観察した。全ての動物実験は、米国国立衛生研究所の実験動物の管理および使用に関する指針（Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health）の推奨事項を厳守して行った。実験プロトコルはメルク（Merck & Co., Inc.）およびニューイベリア研究所（New Iberia Research Center）の動物管理・使用委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）により承認された。

20

30

【0705】

多重電気化学発光（E C L）アッセイを使用して、アカゲザル血清をI g G免疫原性に関して評価した。このアッセイは、MarcheseらおよびSkinnerら^[3, 4]により記載されているヒトアッセイに基づいてアカゲザル血清で使用するために開発されたものであり、電気化学的刺激時に発光するS U L F O - T A G（商標）標識を利用するMesoScale Discovery（MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MDの一部門）により開発された技術を用いる。S U L F O - T A G（商標）標識抗ヒトI g Gを、アカゲザル血清サンプルを試験するための二次抗体として使用した。

40

【0706】

P C V 2 3でのI R M免疫化は、評価されたP C V 2 3ワクチン製剤の全てに関して、全ての血清型に関して抗体価を生成した（図9 A～9 D）。多糖コンジュゲート15 A - CRM197および15 C - CRM197を含有するP C V 2 3は、E C Lにおいて実証

50

されているとおり、15Bに対する交差反応性をももたらすことにも注目すべきである（図9A～9D）。PCV23は、IRMにおいて、1用量のワクチンで免疫原性であった（図9A～9D）。

【0707】

PCV23（DMSO）／APA製剤は、PD1において、非アジュバント化PCV23より高い、血清型22Fに関する免疫原性を示し、一方、PCV23（DMSO+Aq）／APAは、PD1において、非アジュバント化PCV23より高い、血清型1および血清型15Cに関する免疫原性を示した（図10A）。PCV23（DMSO）／APA製剤は、PD2において、非アジュバント化PCV23より高い、血清型18Cに関する免疫原性を示した（図10B）。PCV23（DMSO+Aq）／APAは、PD2において、大多数の血清型（1、3、4、7F、8、9V、12F、14、15A、15B、15C、18C、19F、22Fおよび23F）に関して、非アジュバント化PCV23より高い免疫原性を示した（図10B）。PCV23（DMSO+Aq）／APAは、PD3において、非アジュバント化PCV23より高い、血清型1、4および9Vに関する免疫原性を示した（図10C）。

【0708】

PCV23（DMSO+Aq）／APAでワクチン接種された、または別々の肢におけるPCV15／APA+PCV8／APAの共投与でワクチン接種されたIRMは、PD1において、多数の免疫原性の差異を示さなかった。ただし、血清型10Aは、共投与群において、より高い免疫原性を示した（図11A）。しかし、PCV23（DMSO+Aq）／APAでワクチン接種されたIRMは、血清型1、3、4、5、7F、8、9V、14、15A、15B、15C、18C、19F、22F、23Bおよび23Fの大多数に関して、PCV15／APA+PCV8／APAの共投与より高いPD2免疫原性を示した（図11B）。PD3においては、それらの2つのワクチンの間で免疫原性の差異は認められなかった（図11C）。

【0709】

抗体増強効果を評価したところ、PCV23（DMSO+Aq）／APAで免疫化されたIRMにおける血清型23Bを除く全ての血清型に関して、PCVの全てが、免疫前血清と比較して、PD1における一次免疫応答を引き起こした（図12A）。評価された全てのPCVは、全ての血清型に関して、免疫前血清と比較して、PD2およびPD3における、有意に高い抗体価を生成した（図12Bおよび12C）。PCVの第2用量は、非アジュバント化PCV23、PCV23（DMSO）／APAおよびPCV15／APA+PCV8／APAで免疫化されたIRMにおける血清型3および血清型1を除く全ての血清型に関して、PD1と比較して、PD2からの抗体価の増加を引き起こす（図12D）。PCVの第3用量は、大多数の血清型に関して、抗体価の増加をもたらすが、例外的に、PCV23（DMSO+Aq）／APAで免疫化されたIRMにおいては、PD2と比較してPD3における減少が認められ、このことは、PCV23（DMSO+Aq）／APAで免疫化されたIRMがPD2において最大抗体応答に達したことを示唆している（図12E）。

【0710】

実施例Z

New Zealand白ウサギおよび幼児アカゲザルにおけるPCV24免疫原性
New Zealand白ウサギ（NZWR、n=8／群）を、第0日および第14日に、0.1mLの24価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV24）で筋肉内免疫化した。PCV24を総肺炎球菌多糖9.6μg（0.4μgの1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、deOAc15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；全てはCRM197にコンジュゲート化されている）を投与した。該PCV24は免疫化ごとにリン酸アルミニウムアジュバント（APA、25μg）と共に製剤化された。研究開始前（免疫前、第0日）ならびに第14日（PD1）および第28日（PD2）に、血清を収集

した。熟練した動物管理スタッフが、疾患または苦痛の兆候に関して、少なくとも毎日、NZWRを観察した。

【0711】

乳児アカゲザル（IRM、2～3月齢、 $n=5$ ／群）を、第0日、第28日、第56日に、0.1mLの24価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV24）で筋肉内免疫化した。PCV24を総肺炎球菌多糖9.6 μ g（0.4 μ gの1、3、4、5、6A、6B、7F、8、9V、10A、11A、12F、14、15A、deOAc15B、18C、19A、19F、22F、23B、23F、24F、33Fおよび35B；全てはCRM197にコンジュゲート化されている）を投与した。該PCV24は免疫化ごとにリン酸アルミニウムアジュバント（APA、25 μ g）と共に製剤化された。研究開始前（免疫前、第0日）ならびに第14日（PD1）、第28日、第42日（PD2）、第56日および第70日（PD3）に、血清を収集した。熟練した動物管理スタッフが、疾患または苦痛の兆候に関して、少なくとも毎日、IRMを観察した。全ての動物実験は、米国国立衛生研究所の実験動物の管理および使用に関する指針（Guide for Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health）の推奨事項を厳守して行った。実験プロトコルはメルク（Merck & Co., Inc.）およびニューイベリア研究所（New Iberia Research Center）の動物管理・使用委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）により承認された。

【0712】

多重電気化学発光（ECL）アッセイを使用して、アカゲザル血清をIgG免疫原性に関して評価した。このアッセイは、MarcheseらおよびSkinnerら[3, 4]により記載されているヒトアッセイに基づいてアカゲザル血清で使用するために開発されたものであり、電気化学的刺激時に発光するSULFO-TAG（商標）標識を利用するMesoScale Discovery（MesoScale Diagnostics, LLC, Gaithersburg, MDの一部門）により開発された技術を用いる。SULFO-TAG（商標）標識抗ヒトIgGを、アカゲザル血清サンプルを試験するための二次抗体として使用し、SULFO-TAG（商標）標識抗ウサギIgGをNew Zealand白ウサギサンプルのために使用した。

【0713】

機能的抗体を、www.vaccine.uab.eduに既に記載されているプロトコル、ならびにアラバマ大学（UAB）研究財団 [Alabama (UAB) Research Foundation] により所有されライセンスされているOpsotiter（登録商標）3ソフトウェアに基づく多重オプソニン食作用アッセイ（MOPA）により決定した[1, 2]。

【0714】

PCV24でのNZWR免疫化は、ワクチンにおける全ての血清型に関して、抗体価を生成した（図13A）。多糖コンジュゲート15A-CRM197、deOAc15B-CRM197、6A-CRM197、6B-CRM197を含有するPCV24は、ECLにおいて実証されているとおり、15Bおよび6Cに対する交差反応性をもたらしことにも注目すべきである（図13A）。

【0715】

機能的抗体価を決定するために、多重オプソニン食作用アッセイ（MOPA）において、NZWR血清を個別に試験した。PCV24は、全てのワクチン型細菌血清型を殺滅する機能的抗体価をNZWRにおいて生成した（図13B）。

【0716】

PCV24でのIRM免疫化は、ワクチンにおける全ての血清型に関して、抗体価を生成した（図14A）。多糖コンジュゲート15A-CRM197、deOAc15B-CRM197、6A-CRM197、6B-CRM197を含有するPCV24は、ECLにお

いて実証されているとおり、15Bおよび6Cに対する交差反応性をももたらすことにも注目すべきである（図14A）。

【0717】

機能的抗体価を決定するために、多重オプソニン食作用アッセイ（MOPA）において、IRM血清を個別に試験した。PCV24は、ワクチン型細菌血清型を殺滅する機能的抗体価をIRMにおいて生成した（図14B）。ただし、33Fは例外的に、ECLにおいて、より低いPD3／Pre結合抗体価を示した。しかし、PCV24／APAをNew Zealand白ウサギにおいて評価したところ、PD2 33F OPA力価は免疫前力価より58倍以上高かった（図13B）。

【0718】

参考文献

1. Caro-Aguilar I, Indrawati L, Kaufhold RM, Gaunt C, Zhang Y, Nawrocki DKら, Immunogenicity differences of a 15-valent pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (PCV15) based on vaccine dose, route of immunization and mouse strain. Vaccine 2017 Feb 07; 35 (6) : 865-72.

2. Burton RL, Nahm MH. Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. Clin Vaccine Immunol 2006 Sep; 13 (9) : 1004-9.

3. Marchese RD, Puchalski D, Miller P, Antonello J, Hammond O, Green T, Rubinstein LJ, Caulfield MJ, Sikkema D. Optimization and validation of a multiplex, electrochemiluminescence-based detection assay for the quantitation of immunoglobulin G serotype-specific antipneumococcal antibodies in human serum. Clin Vaccine Immunol. 2009 Mar; 16 (3) : 387-96.

4. Skinner, J. M. ら, Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. Vaccine, 2011. 29 (48) : p. 8870-8876.

実施例52

材料および方法

遊離多糖試験

コンジュゲートサンプルにおける遊離多糖（CRM197にコンジュゲート化されていない多糖）を、まず、遊離タンパク質およびコンジュゲートをデオキシコラート（DOC）および塩酸で沈殿させることにより測定する。ついで沈殿物を濾去し、濾液をHPSEC／UV／MALS／RIにより遊離多糖濃度に関して分析する。遊離多糖を、HPSEC／UV／MALS／RIにより測定された全多糖に対する百分率として計算する。

【0719】

遊離タンパク質試験

コンジュゲートサンプル中の遊離多糖、多糖-CRM197コンジュゲートおよび遊離CRM197をミセル界面動電クロマトグラフィー（MEKC）モードのキャピラリー電気泳動により分離する。簡潔に説明すると、サンプルを、25mM ボラート、100mM

10

20

30

40

50

S D S (p H 9 . 3) を含有する M E K C ランニングバッファーと混合し、前処理されたベアフューズド (b a r e - f u s e d) シリカキャピラリーで分離する。分離を 2 0 0 n m でモニターし、遊離 C R M 1 9 7 を C R M 1 9 7 標準曲線で定量する。遊離タンパク質の結果を、H P S E C / U V / M A L S / R I 法により決定された総タンパク質含有量に対する百分率として表す。

【 0 7 2 0 】

H P S E C / U V / M A L S / R I アッセイを用いたコンジュゲートの分子量および濃度分析

コンジュゲートサンプルを注入し、高速サイズ排除クロマトグラフィー (H P S E C) により分離した。紫外線 (U V)、多角度光散乱光散乱 (M A L S) および屈折率 (R I) 検出器を直列で使用して、検出を行った。吸光係数を使用して、U V 2 8 0 からタンパク質濃度を計算した。m L / g で表された溶質濃度の変化に伴う溶液の屈折率の変化である $d n / d c$ 係数を使用して、R I シグナル (タンパク質と多糖との両方が寄与) から多糖濃度をデコンボリューションした。測定濃度および光散乱情報 (サンプルピーク全体にわたるもの) を用いて、A s t r a ソフトウェア (W y a t t T e c h n o l o g y C o r p o r a t i o n, S a n t a B a r b a r a, C A) により、サンプルの平均分子量を計算した。多分散分子の分子量の平均値には複数の形態が存在する。例えば、数平均分子量 M_n 、重量平均分子量 M_w および z 平均分子量 M_z (M o l e c u l e s, 2 0 1 5, 2 0, 1 0 3 1 3 - 1 0 3 4 1) が挙げられる。特に示されていない限り、分子量は重量平均分子量である。

【 0 7 2 1 】

多糖と担体タンパク質との間の共有結合の数の尺度としてのコンジュゲート化タンパク質におけるリジン消費の決定

W a t e r s A c c Q - T a g アミノ酸分析 (A A A) を用いて、コンジュゲートサンプルにおけるコンジュゲート化の度合を測定した。E l d e x ワークステーションにおいて気相酸加水分解を用いて、サンプルを加水分解して、担体タンパク質をそれらの成分アミノ酸に分解した。6 - アミノキノリル - N - ヒドロキシスクシンイミジルカルバマート (A Q C) を使用して、遊離アミノ酸を誘導体化した。ついで、C 1 8 カラム上の U V 検出付き U P L C を使用して、誘導体化サンプルを分析した。リジン以外の代表的なアミノ酸を使用して、平均タンパク質濃度を得た。コンジュゲートにおけるリジンの平均測定量と出発タンパク質におけるリジンの予想量との差により、コンジュゲート化中のリジン消費 (すなわち、リジン損失) を決定した。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

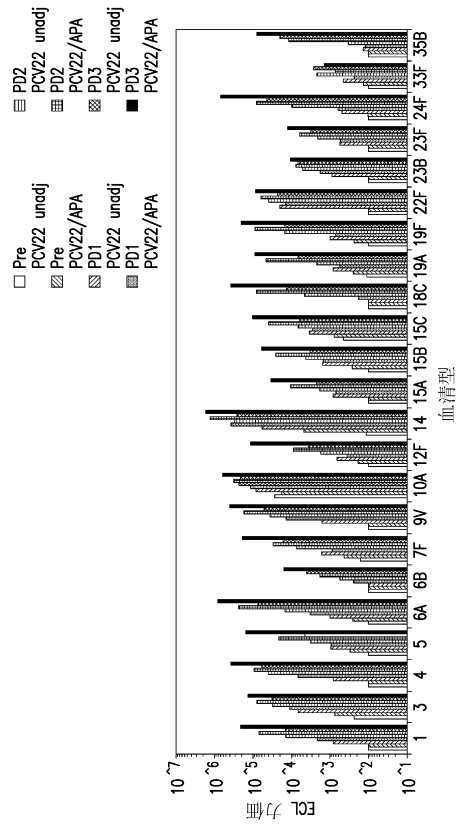


FIG.1

【図 2】

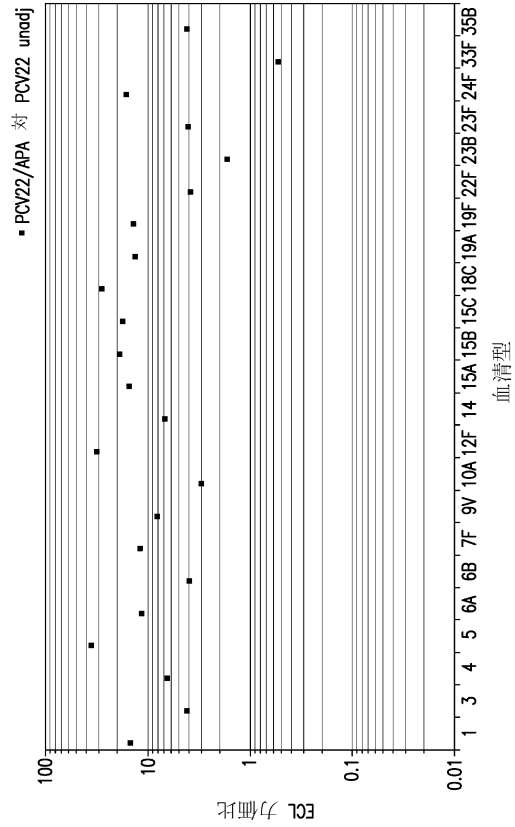


FIG.2

【図 3】

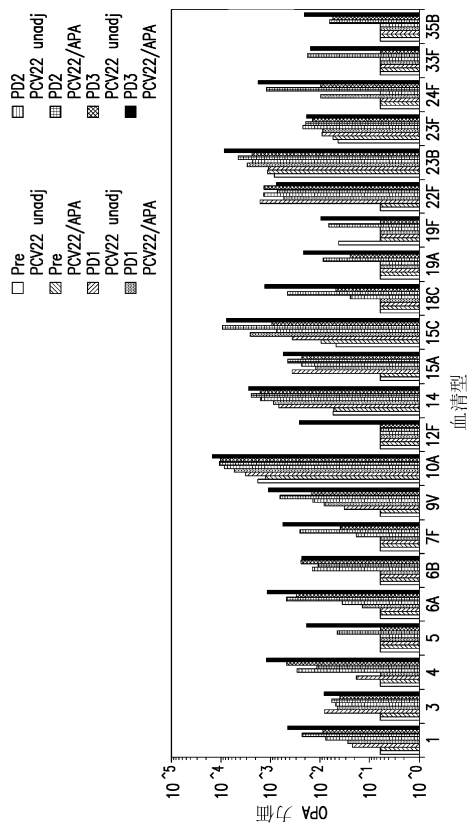


FIG.3

【図 4】

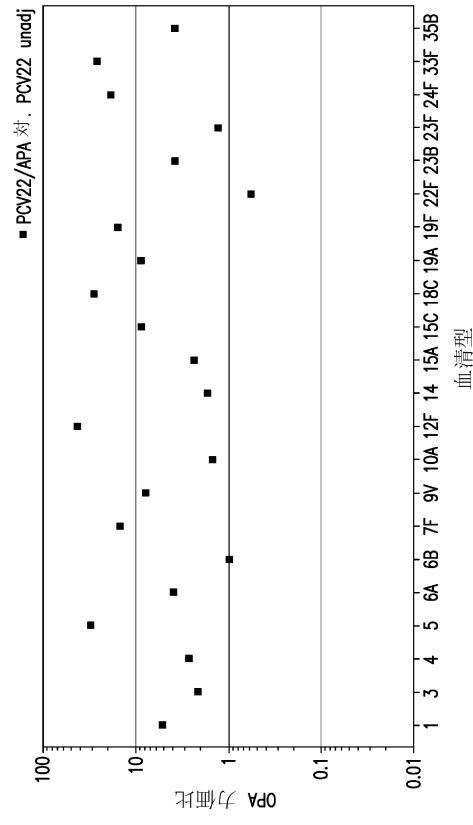


FIG.4

10

20

30

40

50

【図 5】

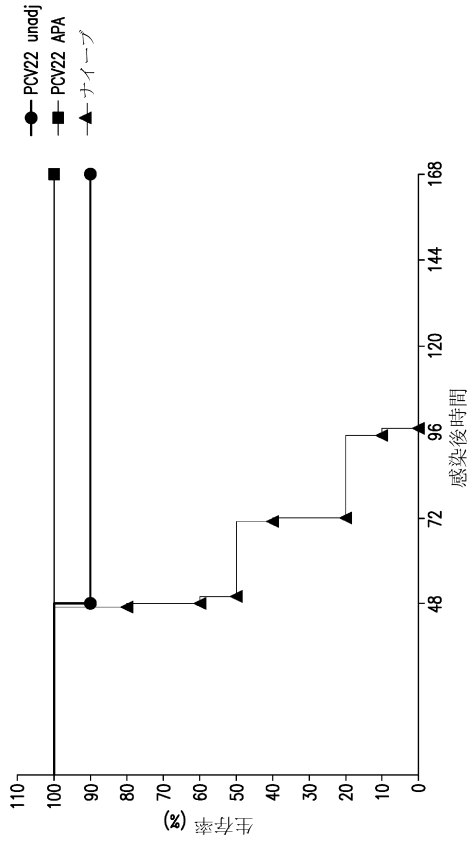


FIG. 5

【図 6】

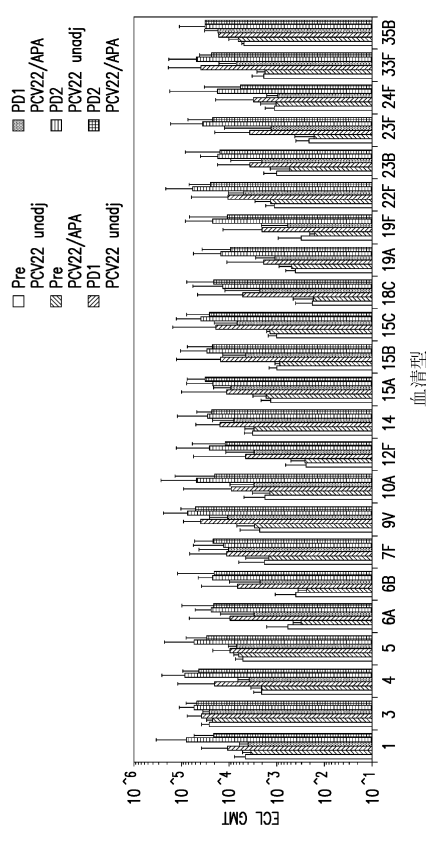


FIG. 6

【図 7】

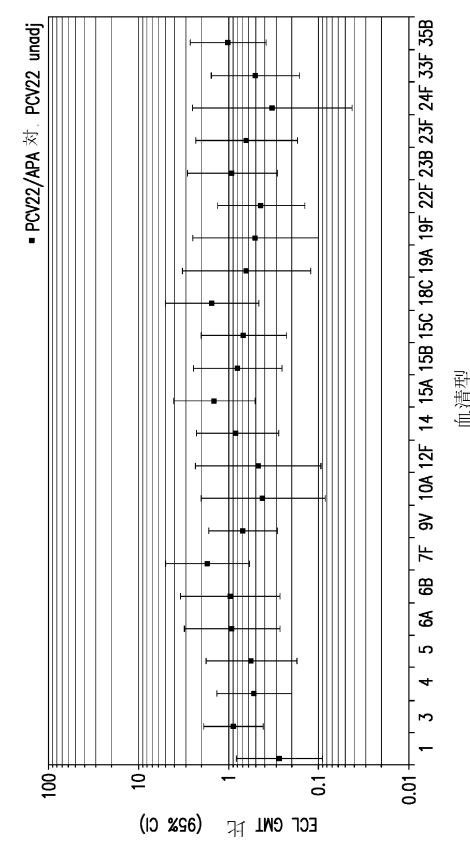


FIG. 7

【図 8】

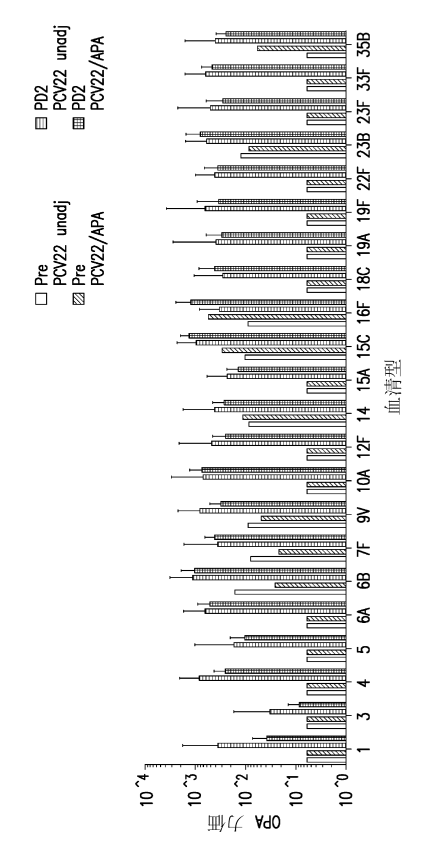


FIG. 8

10

20

30

40

50

【図 9 A】

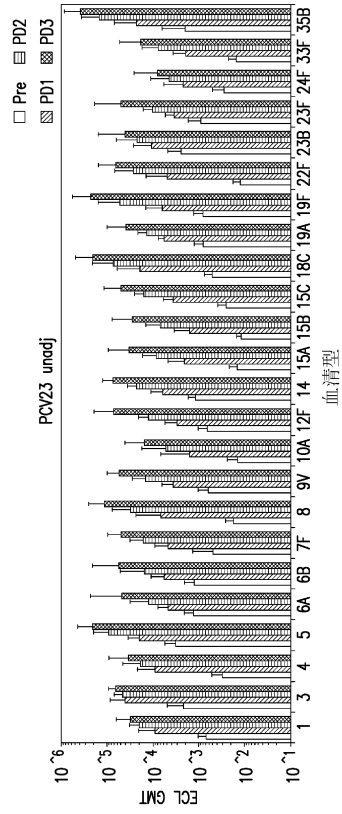


FIG.9A

【図 9 B】

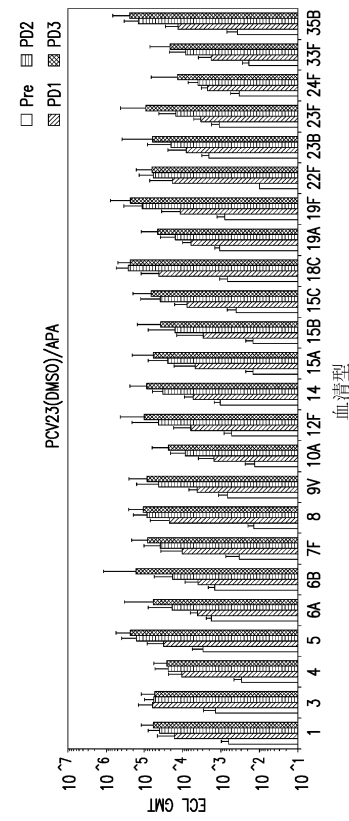


FIG.9B

【図 9 C】

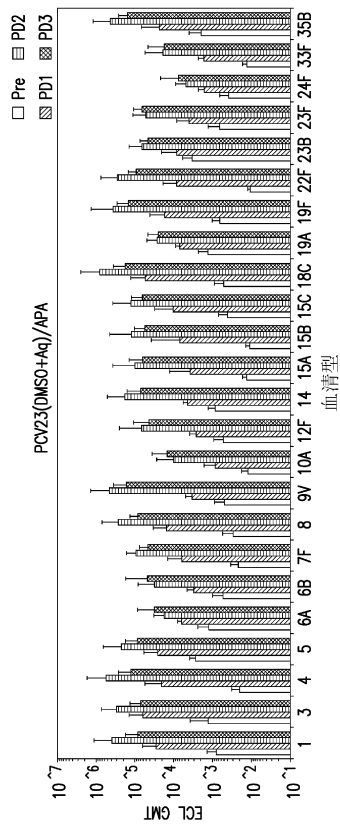


FIG.9C

【図 9 D】

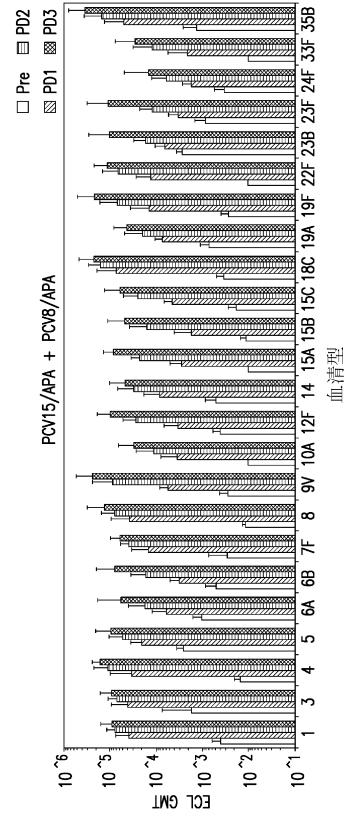


FIG.9D

10

20

30

40

50

【図 10 A】

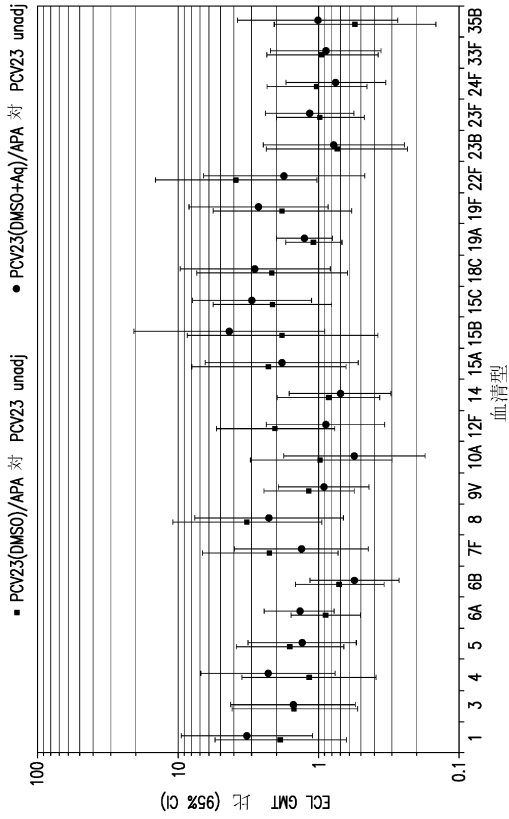


FIG.10A

【図 10 B】

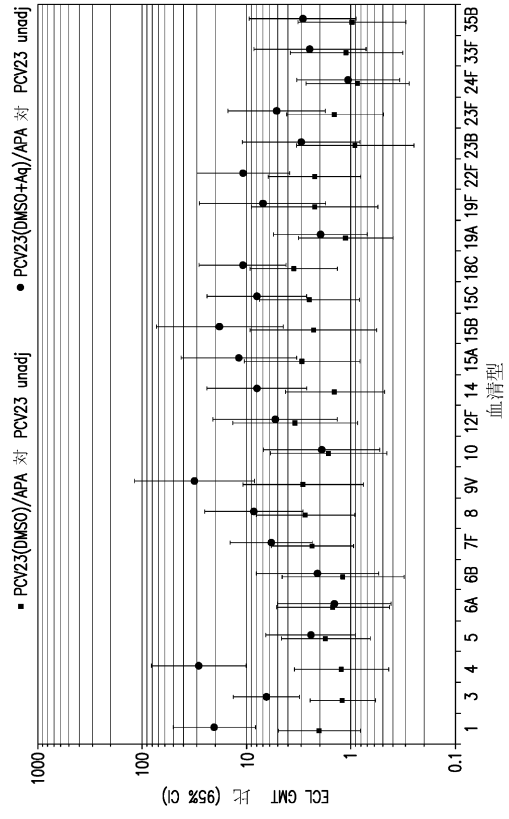


FIG.10B

【図 10 C】

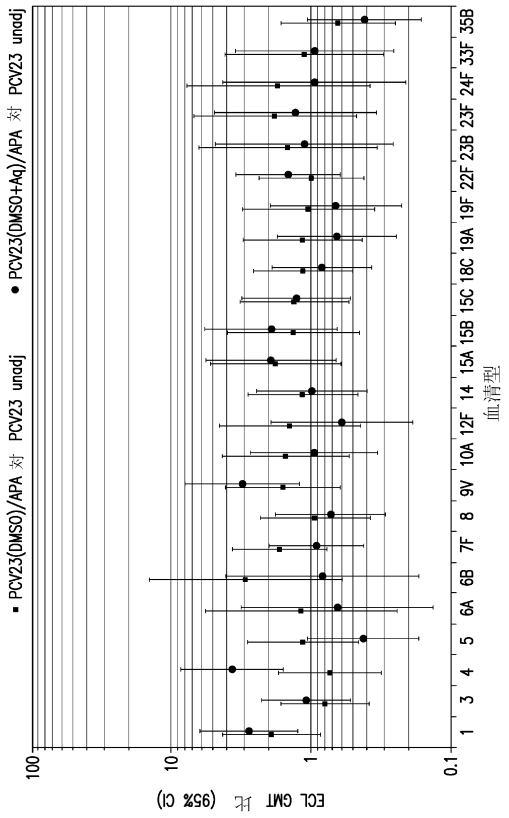


FIG.10C

【図 11 A】

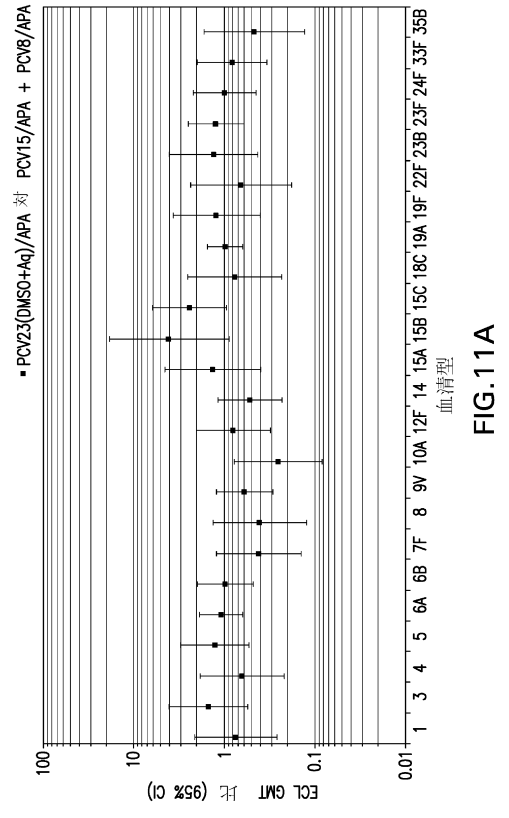


FIG.11A

10

20

30

40

50

【図 1 1 B】

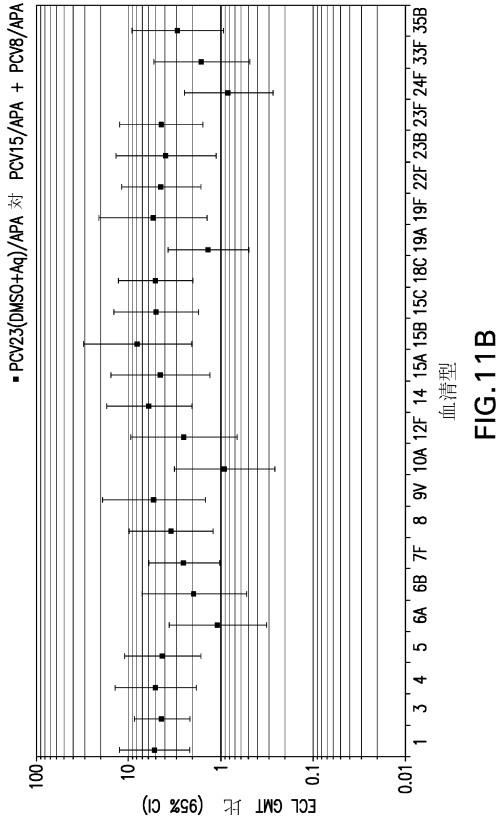


FIG.11B

【図 1 1 C】

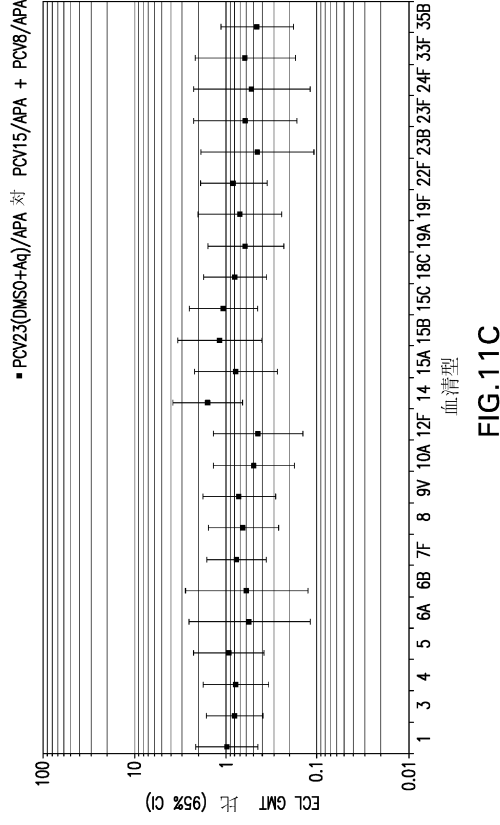


FIG.11C

【図 1 2 A】

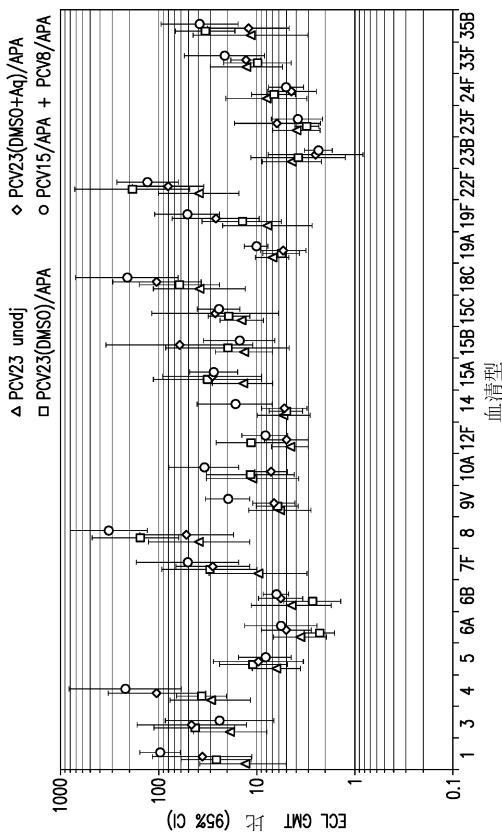


FIG.12A

【図 1 2 B】

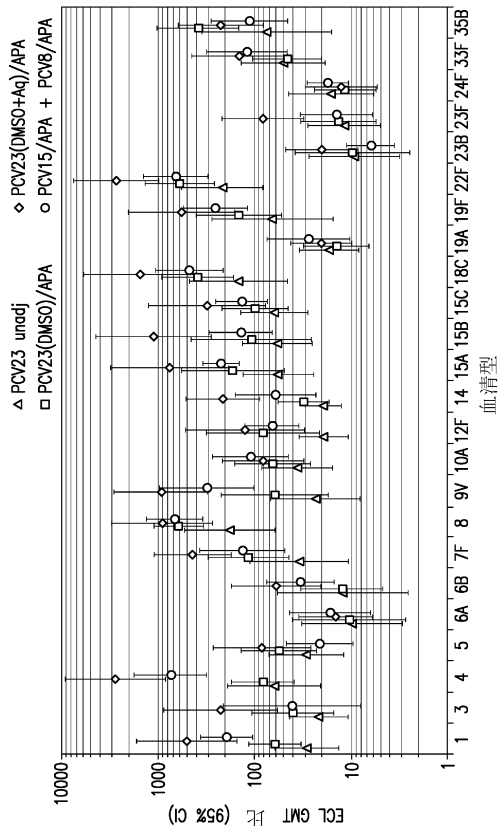


FIG.12B

10

20

30

40

50

【図 1 2 C】

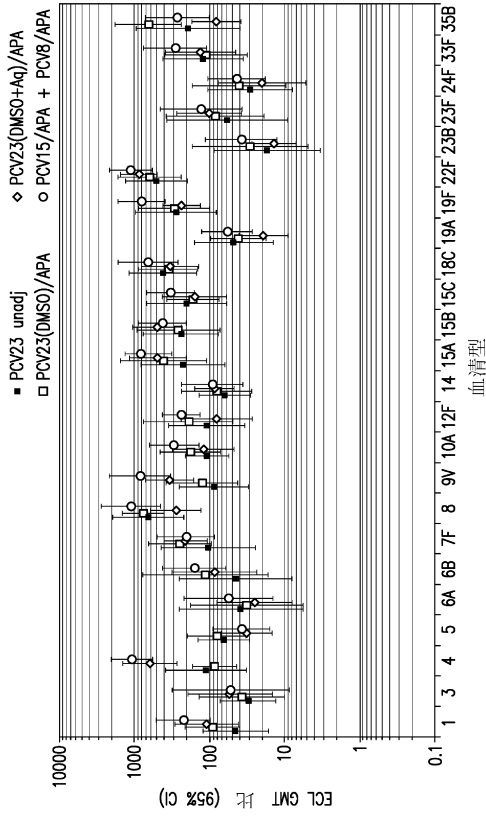


FIG.12C

【図 1 2 D】

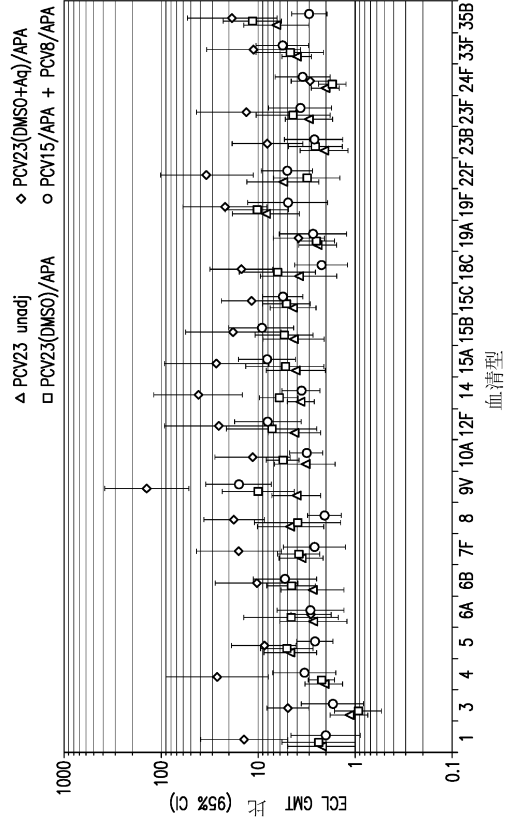


FIG.12D

【図 1 2 E】

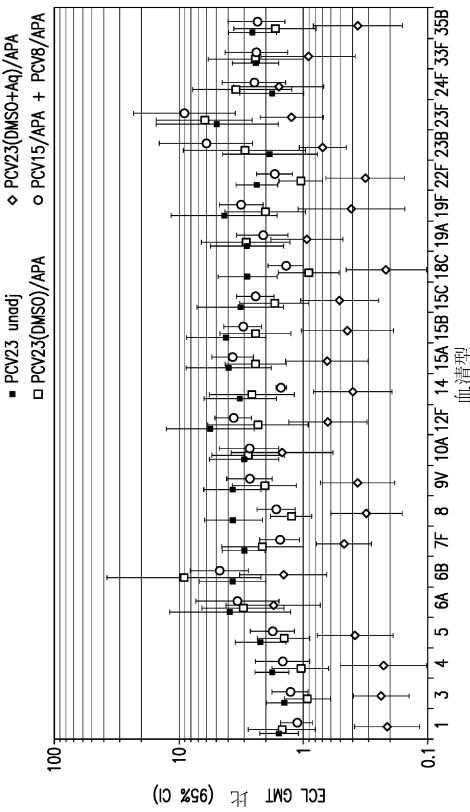


FIG.12E

【図 1 3 A】

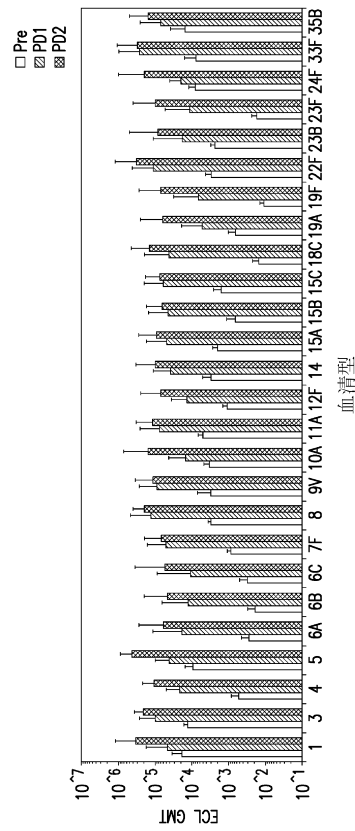


FIG.13A

10

20

30

40

50

【図 1 3 B】

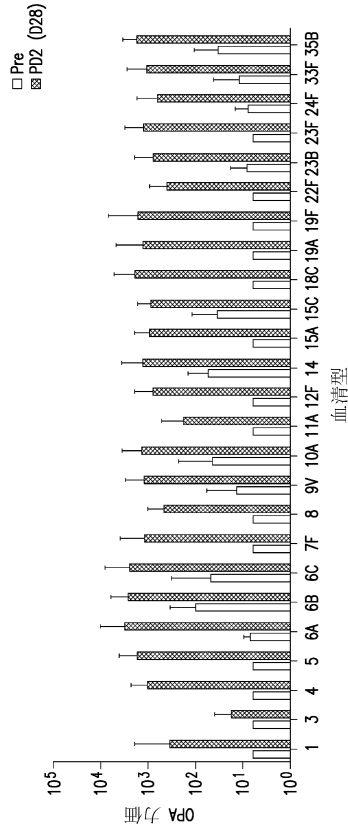


FIG.13B

【図 1 4 A】

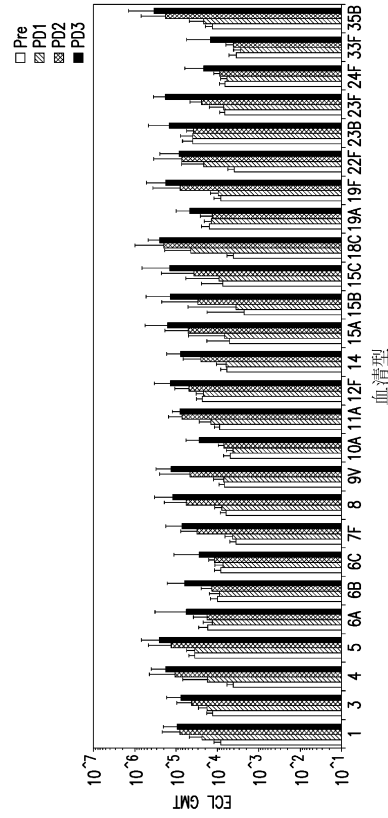


FIG.14A

【図 1 4 B】

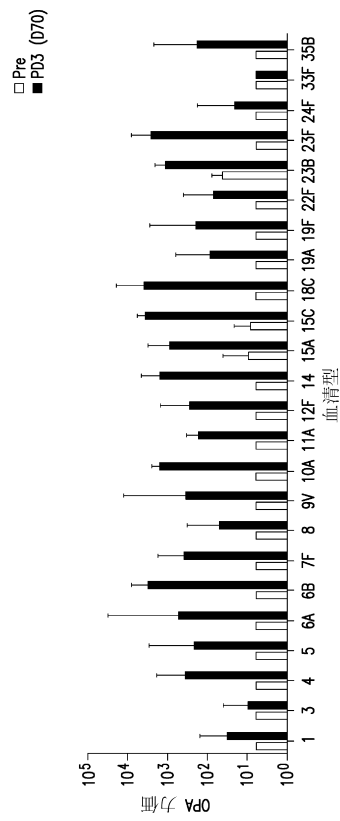


FIG.14B

10

20

30

40

50

【配列表】
0007275277000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100182132

弁理士 河野 隆

(74)代理人 100172683

弁理士 綾 聡平

(74)代理人 100219265

弁理士 鈴木 崇大

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(72)発明者 アビーグナーワードナ, チトラナンダ

アメリカ合衆国、19454・ペンシルバニア、ノース・ウェールズ、ノース・サムニータウン・
パイク・351

(72)発明者 クイ, ヤドン・アダム

アメリカ合衆国、19454・ペンシルバニア、ノース・ウェールズ、ノース・サムニータウン・
パイク・351

(72)発明者 フェレロ, ロムロ

アメリカ合衆国、19454・ペンシルバニア、ノース・ウェールズ、ノース・サムニータウン・
パイク・351

(72)発明者 ヘ, ジアン

アメリカ合衆国、19486・ペンシルバニア、ウエスト・ポイント、サムニータウン・パイク・
770

(72)発明者 ミュージー, ルイ

アメリカ合衆国、19454・ペンシルバニア、ノース・ウェールズ、ノース・サムニータウン・
パイク・351

(72)発明者 ペティガラ, タナズ

アメリカ合衆国、19103・ペンシルバニア、フィラデルフィア、サウス・セブンティーンズ・
ストリート・30、スイート・1303

(72)発明者 スキナー, ジュリー・エム

アメリカ合衆国、19486・ペンシルバニア、ウエスト・ポイント、サムニータウン・パイク・
770

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第2018/064444 (WO, A1)

国際公開第2018/126229 (WO, A2)

特表2017-504661 (JP, A)

国際公開第2017/173415 (WO, A2)

特表2018-534307 (JP, A)

Clinical and Vaccine Immunology, 2007, Vol.14, No.9, pp.1223-1227

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K 39/09 - 39/44

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Google Scholar