

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7680185号
(P7680185)

(45)発行日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(24)登録日 令和7年5月12日(2025.5.12)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	39/09 (2006.01)	F I	A 6 1 K	39/09
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
A 6 1 P	37/04 (2006.01)		A 6 1 P	37/04

Z N A

請求項の数 1 (全42頁)

(21)出願番号 特願2019-546002(P2019-546002)
 (86)(22)出願日 平成30年2月20日(2018.2.20)
 (65)公表番号 特表2020-514326(P2020-514326)
 A)
 (43)公表日 令和2年5月21日(2020.5.21)
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/018729
 (87)国際公開番号 WO2018/156491
 (87)国際公開日 平成30年8月30日(2018.8.30)
 審査請求日 令和3年2月17日(2021.2.17)
 審判番号 不服2023-138(P2023-138/J1)
 審判請求日 令和5年1月5日(2023.1.5)
 (31)優先権主張番号 62/463,216
 (32)優先日 平成29年2月24日(2017.2.24)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

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】 肺炎連鎖球菌多糖 - タンパク質コンジュゲートの免疫原性の増強

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型3に由来する多糖を含む免疫原性組成物の製造方法であって、前記多糖を前記担体タンパク質にコンジュゲートさせるコンジュゲーション反応が非プロトン性溶媒中で行われ、前記担体タンパク質がCRM₁₉₇であり、前記コンジュゲーション反応が還元的アミノ化によるコンジュゲーション反応であり、前記非プロトン性溶媒がジメチルスルホキシド(DMSO)である、前記方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ジメチルスルホキシド(DMSO)のような非プロトン性溶媒中で還元的アミノ化を用いてCRM₁₉₇にコンジュゲートさせた少なくとも1つの肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)多糖を含む免疫原性組成物を提供する。本発明はまた、肺炎連鎖球菌莖膜に由来する1つ以上の多糖がDMSOなどの非プロトン性溶媒中で行われる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させた1つ以上の多糖 - タンパク質コンジュゲートを有する免疫原性組成物の免疫原性を増強するための方法を提供する。

【背景技術】**【0002】**

肺炎連鎖球菌はグラム陽性菌で、乳児や小児の侵襲性細菌性疾患(肺炎、菌血症、髄膜

炎、中耳炎など)の最も一般的な原因である。肺炎球菌は、血清型特異性を付与する化学的に結合した多糖で被包されている。肺炎球菌には90を超える既知の血清型があり、莢膜は、細菌の内表面を補体から保護するだけでなく、それ自体免疫原性も低いので、肺炎球菌の主要な病原性決定因子である。多糖はT細胞非依存性抗原であるので、T細胞と相互作用するようにMHC分子上で処理または提示されることはできない。しかしながらそれらは、B細胞上の表面受容体の架橋を伴う他のメカニズムを通して免疫系を刺激することができる。

【0003】

2歳未満の子供は、ほとんどの多糖ワクチンに対して免疫応答を起こさないので、タンパク質担体への化学的コンジュゲーションによって多糖を免疫原性にすることが必要であった。多糖(T細胞非依存性抗原)をタンパク質(T細胞依存性抗原)にカップリングすることにより、アイソタイプ転換、親和性成熟および記憶誘導を含むT細胞依存性の特性が多糖に付与される。

【0004】

多くのコンジュゲーション反応が、多糖をタンパク質に共有結合させるために使用されてきた。より一般的に用いられている方法には以下の3つの方法が含まれる。1)還元的アミノ化:反応の一方の成分上のアルデヒドまたはケトン基が他方の成分上のアミノまたはヒドラジド基と反応し、続いて、形成されたC=N二重結合が還元剤によりC-N単結合に還元される。2)シアニル化コンジュゲーション:多糖が臭化シアン(CNBr)または1-シアノ-4-ジメチルアンモニウムピリジニウムテトラフルオロボレート(CDAP)のいずれかによって活性化されて、ヒドロキシリル基にシアネート基を導入し、これがタンパク質成分の添加により、アミノまたはヒドラジド基との共有結合を形成する。3)カルボジイミド反応:カルボジイミドがコンジュゲーション反応の一方の成分上のカルボキシリル基を活性化させ、活性化したカルボニル基が他方の成分上のアミノまたはヒドラジド基と反応する。これらの反応はまた、コンジュゲーション反応の前にコンジュゲートの成分を活性化するためにしばしば用いられる。

【0005】

還元的アミノ化は、肺炎連鎖球菌多糖をコンジュゲートさせるために利用してきた。例えば、米国特許第8,192,746号、米国特許出願公開第20170021006号、国際公開第2011/110381号および国際公開第2015/110941号を参考のこと。還元的アミノ化は、以下の2つの工程を含む:(1)抗原の酸化、および(2)当該抗原と担体タンパク質の還元によるコンジュゲートの形成。還元工程は水性溶媒またはDMSOのような非プロトン性溶媒中で行われ得る。例えば、国際公開第2016/113644号を参考のこと。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】米国特許第8,192,746号

【文献】米国特許出願公開第20170021006号

【文献】国際公開第2011/110381号

【文献】国際公開第2015/110941号

【文献】国際公開第2016/113644号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型1、2、3、4、5、6C、6D、7B、7C、8、9N、9V、11A、12F、14、15A、15C、16F、17F、18C、20、21、22A、23A、23B、24F、27、28A、31、34、35A、35B、35Fおよび38のうちの1つ以上に由来する多糖を含む免疫原性組成物であって、該多糖を該担体タンパク質にコンジュゲートさせるコン

10

20

30

40

50

ジュゲーション反応が非プロトン性溶媒中で行われる、免疫原性組成物を提供する。一実施形態において、同一の血清型を有する組成物に関して、非プロトン性溶媒中で調製された1つ以上の血清型は、水性条件下で調製された同じ1つ以上の血清型と比較したときに免疫原性が高い。

【0008】

本発明は、担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型1、2、3、4、5、6C、6D、7B、7C、8、9N、9V、11A、12F、14、15A、15C、16F、17F、18C、20、21、22A、23A、23B、24F、27、28A、31、34、35A、35B、35Fおよび38のうちの1つ以上から調製された多糖タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物であって、該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該多糖を該担体タンパク質にコンジュゲートさせる工程を含むプロセスによって製造される、免疫原性組成物を提供する。

10

【0009】

本発明はまた、肺炎連鎖球菌血清型1、2、3、4、5、6C、6D、7B、7C、8、9N、9V、11A、12F、14、15A、15C、16F、17F、18C、20、21、22A、23A、23B、24F、27、28A、31、34、35A、35B、35Fまたは38に由来する多糖を担体タンパク質にコンジュゲートさせる方法であって、非プロトン性溶媒中で該多糖を該担体タンパク質にコンジュゲートさせる工程を含む方法を提供する。

20

【0010】

本発明はまた、担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型1、2、3、4、5、6C、6D、7B、7C、8、9N、9V、11A、12F、14、15A、15C、16F、17F、18C、20、21、22A、23A、23B、24F、27、28A、31、34、35A、35B、35Fまたは38に由来する1つ以上の多糖を含む免疫原性組成物を用いて被検体を処置する方法であって、該多糖が非プロトン性溶媒中で該担体タンパク質にコンジュゲートされる、方法も提供する。

20

【0011】

特定の実施形態において、肺炎連鎖球菌血清型1、3、4、5、9V、11A、12Fおよび14の1つ以上に由来する多糖は、非プロトン性溶媒中で担体タンパク質にコンジュゲートされる。特定の実施形態において、肺炎連鎖球菌血清型2、6C、6D、7B、7C、8、9N、15A、15C、16F、17F、20、21、22A、23A、23B、24F、27、28A、31、34、35A、35B、35Fおよび38のうちの1つ以上に由来する多糖は、非プロトン性溶媒中で担体タンパク質にコンジュゲートされる。

30

【0012】

特定の実施形態において、肺炎連鎖球菌血清型3および18Cのうちの1つ以上に由来する多糖は、非プロトン性溶媒中で担体タンパク質にコンジュゲートされる。この実施形態の1つの態様において、肺炎連鎖球菌血清型3に由来する多糖は、非プロトン性溶媒中で担体タンパク質にコンジュゲートされる。この実施形態の1つの態様において、肺炎連鎖球菌血清型18Cに由来する多糖は、非プロトン性溶媒中で担体タンパク質にコンジュゲートされる。

40

【0013】

特定の実施形態において、多糖を担体タンパク質にコンジュゲートさせるために使用されるコンジュゲーション反応は還元的アミノ化である。

【0014】

特定の実施形態において、非プロトン性溶媒はDMSOである。

【0015】

特定の実施形態において、担体タンパク質はCRM197である。

【0016】

特定の実施形態において、DMSO中で調製されたコンジュゲートは、5.0より大きいリシン損失値を有する。1つの態様において、DMSO中で調製されたコンジュゲート

50

は、両端値を含む 7 . 0 ~ 18 . 0 のリシン損失値を有する。

【 0 0 1 7 】

特定の実施形態において、免疫原性組成物は、担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型 6 A、6 B、7 F、10 A、15 B、19 A、19 F、22 F、23 F および 33 F のうちの 1 つ以上に由来する多糖を更に含み、該多糖を担体タンパク質にコンジュゲートさせるコンジュゲーション反応は、非プロトン性溶媒中で行われる。この実施形態の特定の態様において、コンジュゲーション反応は還元的アミノ化である。特定の態様において、非プロトン性溶媒は D M S O である。特定の態様において、担体タンパク質は C R M 197 である。1 つの態様において、免疫原性組成物は、担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型 6 A、6 B、7 F、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来する多糖を含み、該肺炎連鎖球菌血清型 6 A、6 B、7 F、18 C、19 A、19 F または 23 F に由来する多糖を該担体タンパク質にコンジュゲートさせるコンジュゲーション反応は、非プロトン性溶媒中で行われる。特定の態様において、多糖は肺炎連鎖球菌血清型 18 C、19 A、19 F または 23 F 由来である。

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 B、7 C、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、16 F、17 F、18 C、19 A、19 F、20、21、22 A、22 F、23 A、23 B、23 F、24 F、27、28 A、31、33 F、34、35 A、35 B、35 F および 38 のうちの 1 つ以上に由来する多糖を更に含み、該肺炎連鎖球菌血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 B、7 C、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、16 F、17 F、18 C、19 A、19 F、20、21、22 A、22 F、23 A、23 B、23 F、24 F、27、28 A、31、33 F、34、35 A、35 B、35 F または 38 に由来する多糖を該担体タンパク質にコンジュゲートさせるコンジュゲーション反応は、水性溶媒中で行われる。1 つの態様において、免疫原性組成物における血清型の 35 ~ 100 % は D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製され、かつ、残りの多糖タンパク質コンジュゲートは水性条件下で調製される。

【 0 0 1 9 】

1 つの特定実施形態において、本発明は、C R M 197 多糖にコンジュゲートさせた肺炎連鎖球菌血清型 1、3、4、5、6 A、6 B、7 F、9 V、14、18 C、19 A、19 F、22 F、23 F および 33 F に由来する多糖から本質的になる免疫原性組成物であって、該肺炎連鎖球菌血清型 6 A、6 B、7 F、18 C、19 A、19 F および 23 F のコンジュゲーション反応は D M S O 条件下で行われ、かつ、該肺炎連鎖球菌血清型 1、3、4、5、9 V、14、22 F および 33 F のコンジュゲーション反応は水性溶媒中で行われ、約 0 . 2 % w / v の P S - 20 を更に含んでいてもよい免疫原性組成物を提供する。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、本発明の免疫原性組成物のいずれかを投与することを含む、ヒト被検体において防御的免疫応答を誘導するための方法を提供する。特定の実施形態において、被検体は、50 歳以上および / または免疫無防備状態である。特定の実施形態において、被検体は 2 歳以下である。特定の実施形態において、被検体は免疫無防備状態である。

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、肺炎球菌多糖 (P n P) タンパク質コンジュゲートワクチンに対する増強された免疫応答を提供するための方法であって、1 つ以上の担体タンパク質にコンジュゲートさせた 2 つ以上の肺炎連鎖球菌血清型の第一セットに由来する肺炎連鎖球菌莢膜多糖を含む多糖 - タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物を動物被検体に投与することを含み、該第一セットに由来する該多糖 - タンパク質コンジュゲートの 2 つ以上が、D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製される、方法を提供する。一実施形態において、前記増強された免疫応答は、第一セットに由来する 2 つ以上の多糖 - タンパク質

10

20

30

40

50

コンジュゲートのうちの 1 つ以上が水性条件下での還元的アミノ化を用いて調製される免疫原性組成物を与えられる対照動物に対するものである。一実施形態において、対照動物はマウスである。別の実施形態において、対照動物はヒトである。特定の実施形態において、本方法は、1 つ以上の担体タンパク質にコンジュゲートさせた肺炎球菌血清型の第二セットに由来する肺炎連鎖球菌莢膜多糖を含む更なる多糖 - タンパク質コンジュゲートを含む肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用するものであり、該多糖 - タンパク質コンジュゲートは水性条件下での還元的アミノ化を用いて調製され、第二セットに由来する血清型は第一セットの血清型とは異なる。

【 0 0 2 2 】

特定の実施形態において、本方法は、肺炎球菌血清型が血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 B、7 C、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、16 F、17 F、18 C、19 A、19 F、20、21、22 A、22 F、23 A、23 B、23 F、24 F、27、28 A、33 F、34、35 A、35 B、35 F および 38 から選択される肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。

【 0 0 2 3 】

特定の実施形態において、本方法は、血清型 3 または 18 C に由来する多糖 - タンパク質コンジュゲートが D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製される肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態において、本方法は、肺炎球菌血清型の第一セットに由来する多糖 - タンパク質コンジュゲートが血清型 6 A、6 B、7 F、18 C、19 A、19 F および 23 F から選択される肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。

【 0 0 2 5 】

特定の実施形態において、本方法は、肺炎球菌血清型の第一セットに由来する多糖 - タンパク質コンジュゲートが D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製された血清型 6 A、6 B、7 F、18 C、19 A、19 F および 23 F を含み、血清型の第二セットに由来する多糖 - タンパク質コンジュゲートが水性条件下で調製される肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。

【 0 0 2 6 】

1 つの特定実施形態において、本方法は、血清型 6 A、6 B、7 F、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来する多糖 - タンパク質コンジュゲートが D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製され、血清型 1、3、4、5、9 V、14、22 F および 33 F に由来する多糖タンパク質コンジュゲートが水性条件下で調製される肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。

【 0 0 2 7 】

特定の実施形態において、本方法は、血清型の 35 ~ 100 % に由来する多糖タンパク質コンジュゲートが D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製され、かつ、残りの多糖タンパク質コンジュゲートが水性条件下で調製される肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。1 つの態様において、血清型の 45 ~ 80 % に由来する多糖タンパク質コンジュゲートは D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製され、かつ、残りの多糖タンパク質コンジュゲートは水性条件下で調製される。別の態様において、血清型の 75 ~ 100 % に由来する多糖タンパク質コンジュゲートは D M S O 条件下での還元的アミノ化を用いて調製され、かつ、残りの多糖タンパク質コンジュゲートは水性条件下で調製される。

【 0 0 2 8 】

特定の実施形態において、本方法は、担体タンパク質が髄膜炎菌 (*N e i s s e r i a m e n i n g i t i d e s*) 外膜タンパク質複合体 (O M P C) 、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、タンパク質 D および C R M₁₉₇ からなる群から選択される肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。1 つの態様において、担体タンパク

10

20

30

40

50

質はCRM₁₉₇である。

【0029】

特定の実施形態において、本方法は、DMSO条件下での還元的アミノ化を用いて調製されたコンジュゲートが、5.0より大きいタンパク質リシン損失値によって測定される場合、より高い割合の形成されたグリコペプチド結合を有する肺炎球菌多糖タンパク質コンジュゲートワクチンを使用する。この実施形態の1つの態様において、DMSO条件下での還元的アミノ化を用いて調製されたコンジュゲートは、両端値を含む7.0～18のリシン損失値を有する。別の態様において、DMSO条件下での還元的アミノ化を用いて調製されたコンジュゲートは、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5または10.0より大きいリシン損失値を有する。

10

【0030】

別の特定実施形態において、本発明は、CRM₁₉₇多糖にコンジュゲートさせた肺炎球菌血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fに由来する多糖から本質的になる肺炎球菌多糖(PnP)タンパク質コンジュゲートワクチンに対する増強された免疫応答を提供するための方法であって、肺炎球菌血清型の第一セットおよび同第二セットに由来する多糖-タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物をヒト被検体に投与することを含み、血清型の第一セットが、6A、6B、7F、18C、19A、19Fおよび23Fからなり、かつ、DMSO条件下での還元的アミノ化を用いて調製され、血清型の第二セットが、1、3、4、5、9V、14、22Fおよび33Fからなり、かつ、水性条件下で調製される、方法を提供する。

20

【0031】

特定の実施形態において、本発明の方法によって產生された免疫原性組成物をワクチン接種された動物における増強された免疫応答は、血清IgGまたはオプソニン食作用性抗体の幾何平均力値によって測定される。1つの態様において、肺炎球菌血清型に対する増強された免疫応答は、水性条件下で調製された同じ肺炎球菌血清型に由来する多糖-タンパク質コンジュゲートと比較して10%以上である。一実施形態において、動物はマウスである。別の実施形態において、動物はヒトである。

30

【0032】

特定の実施形態において、本方法は、50歳以上のヒト被検体に対して用いられる。特定の実施形態において、本方法は、2歳以下のヒト被検体に対して用いられる。特定の実施形態において、本方法は、免疫無防備状態のヒト被検体に対して用いられる。

【0033】

本発明はまた、還元的アミノ化により肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲートを調製する方法であって、

a) 血清型3、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fから選択される肺炎連鎖球菌多糖をある量の酸化剤(例えば過ヨウ素酸塩)と反応させて、0.05～0.22の活性化レベルを有する活性化多糖を形成し、

b) 任意選択的に還元剤の存在下で、非プロトン性溶媒中で活性化多糖を担体タンパク質と反応させて多糖-タンパク質コンジュゲートを形成することを含み、

40

コンジュゲートが両端値を含む7.0～18.0の範囲内のリシン損失値を有する、方法を提供する。

【0034】

特定の実施形態において、活性化レベルは0.09～0.22である。

【0035】

特定の実施形態において、酸化剤は過ヨウ素酸塩である。

【0036】

特定の実施形態において、活性化レベルは、チオセミカルバジドを用いて多糖上のアルデヒドを誘導体化することによって測定される。

【0037】

50

特定の実施形態において、還元剤はシアノ水素化ホウ素ナトリウムなどのシアノ水素化ホウ素塩である。

【0038】

特定の実施形態において、担体タンパク質は、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドおよびCRM₁₉₇からなる群から選択される。一実施形態において、担体タンパク質はCRM₁₉₇である。

【0039】

本発明はまた、活性化多糖中のアルデヒドレベル（すなわち、過ヨウ素酸塩活性化レベル）を決定するための定量的方法であって、

a) 完了する（すなわち、反応プラトー）まで誘導体化剤と反応させることによって活性化多糖を誘導体化して誘導体化多糖を形成する工程；

b) (未反応誘導体化剤およびマトリックス成分を除去するために) 高性能サイズ排除クロマトグラフィーにより誘導体化多糖を単離する工程；および

c) 誘導体化多糖のUV吸光度を定量する工程
を含む方法を提供する。

【0040】

誘導体化剤は、チオセミカルバジド、チオセミカルバジド構造類似体、ヒドラジド、ヒドラジン、セミカルバジド、セミカルバジド構造類似体、アミノオキシ化合物または芳香族アミンからなる群から選択することができる。

【0041】

一実施形態において、工程c)における定量化は、誘導体標準との比較による。一実施形態において、工程c)における定量化は、所定の吸光係数に対する測定によるものである。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】トリプシンペプチドマッピングにより決定された、CRM₁₉₇上の異なるリシン部位でのコンジュゲーションの程度。水溶液中またはDMSO中での還元的アミノ化によって調製された血清型19APS-CRM₁₉₇コンジュゲートをトリプシンによって消化し、LC-UV-MSによって分析した。CRM₁₉₇対照試料と比較したペプチドシグナルの損失をコンジュゲーション部位に対してプロットした。

【図2】水溶液中またはDMSO中での還元的アミノ化によって調製された血清型3PS-CRM₁₉₇コンジュゲートを比較する、マウス試験群から得られた電気化学発光(EL)免疫原性の結果。リン酸アルミニウムアジュvant(APA)を配合したコンジュゲート。ワクチン接種前(Pre)および3回目の投与後(PD3)の結果が示されている。APAのみの対照についての結果も示されている。

【図3】水溶液中またはDMSO中での還元的アミノ化によって調製された血清型3PS-CRM₁₉₇コンジュゲートを比較する、マウス試験群から得られた3回目の投与後の食作用活性(OPA)の結果。ワクチン接種前(免疫前)およびAPAのみの対照についてのOPA結果も示す。

【発明を実施するための形態】

【0043】

本発明は、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がDMSOなどの非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて調製された肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物を提供する。本発明は、多糖-タンパク質コンジュゲートの還元的アミノ化の間に溶媒として使用されるDMSOが、水性条件下で調製された同じコンジュゲートと比較して、それらの血清型に関して予想外に優れた安定性および増強された免疫原性をもたらすという発見に部分的に基づく。本発明は、担体タンパク質の表面上にあるリシン残基の直接消費によって多糖のタンパク質への共有会合を増強するまでのDMSO溶媒の利点に関する。試験した大半の血清型について、水性バッファー中よりも非プロトン性溶媒中でのコンジュゲーションによる方が、より低い多糖活性化レベ

10

20

30

40

50

ル(0.05~0.22)で、良好な免疫原性(7.0)を与える「リシン損失」を達成することができた。共有会合の増加は、多糖タンパク質コンジュゲートの安定性を増加させ、DMSO中でコンジュゲートさせたそれら特定の多糖抗原に対する免疫応答を増強する上で直接的な利益を有する。

【0044】

いかなる理論にも縛られることなく、DMSO中で調製された複合糖質で観察される免疫原性増強のための1つの可能なメカニズムとして、担体タンパク質表面上にあるリシン残基と炭水化物(莢膜多糖)との結合数が増えると、タンパク質と多糖との結合点が増え、それによって安定性を付与すると共に、ペプチド炭水化物結合の破壊または化学的解重合を阻止することが挙げられる。例えば、Hsieh, Characterization of Saccharide-CRM₁₉₇ Conjugate Vaccines in Brown F, Corbel M, Griffiths E (eds): Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines. Dev. Biol. Basel, Karger, 2000, vol. 103, pp. 93-104を参照のこと。DMSO溶媒中でのコンジュゲーション中に作成される多糖-タンパク質結合が増えることの更なる利点は、ペプチド-炭水化物のT細胞への提示が成功する可能性が増えることであり得る。ヒト集団における遺伝的可変性が炭水化物抗原にコンジュゲートさせた特定のペプチド配列との会合またはその使用(loading)の感受性や能力の変動をもたらすことに起因して、担体タンパク質上の結合点が増えることで、APC表面での抗原提示が成功する可能性が高まり、別種のT細胞非依存性抗原に対するT細胞依存性応答が可能となることが分かる。DMSO溶媒中でのコンジュゲーションによって観察される免疫原性増強のもう1つの可能なメカニズムは、有機溶媒中でのCRM₁₉₇変性に起因するものであり得る。この変性により、更なるリシンが多糖結合に供されて、APC表面でのグリコペプチド提示の可能性が高くなり、異なるペプチドエピトープに対するT細胞依存性応答が得られる。Avci et al., 2011, Nature Medicine 17: 1602-1610を参照のこと。

【0045】

コンジュゲート中に変性CRM₁₉₇を生成する有機溶媒中でのコンジュゲーションの更に別の利点は、天然のCRM₁₉₇エピトープに対する抗体の免疫学的干渉の減少であり得る。DMSO溶媒中でのコンジュゲーション中に作成される多糖-タンパク質結合増加の更なる利点は、より大きなサイズの多糖-タンパク質コンジュゲートが形成されて、免疫原性の増強をもたらすことであり得る。本発明の組成物は、ヒト応答を誘導する上で有意な利点を提供すると考えられている。

【0046】

実施例5に示すように、DMSO中での還元的アミノ化を用いて肺炎連鎖球菌血清型3から調製された多糖タンパク質コンジュゲートは、(水中での還元的アミノ化を用いて調製された同じコンジュゲートと比較して)食作用活性(OPA)によって測定されるマウスモデルでの免疫原性の増加を示した。更に、実施例6に示すように、DMSO中での還元的アミノ化を用いて調製された7つの血清型(および水性溶媒中で調製された他の8つの血清型)を有する15価肺炎球菌コンジュゲートワクチンは、15の血清型全てが、水性溶媒中で調製された場合の対応する15価PCVと比較して、DMSO中で調製された7つの血清型全てに関し、(統計学的有意性を有する優れた4つの血清型を持つ)ヒトにおいて優れた免疫原性を示す傾向があった。

【0047】

実施例4に示されるように、(CRM₁₉₇対照と比較して)血清型19Aコンジュゲート中のCRM₁₉₇タンパク質上のリシン位置についてのペプチドシグナル減少を、可能なコンジュゲーション部位に対してプロットすることにより、以前に同定された一般的なヒトT細胞ペプチドエピトープに更なるコンジュゲーション部位があることが明らかになった(Raju et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25: 3207

10

20

30

40

50

- 3 2 1 4 を参照； C R M 1 9 7 配列のペプチド 4 1 1 ~ 4 3 0 およびペプチド 4 3 1 ~ 4 5 0 にある）。したがって、特定の実施形態において、本発明はまた、1つ以上の多糖 - C R M 1 9 7 コンジュゲートを含む免疫原性組成物であって、該多糖 - C R M 1 9 7 コンジュゲートの少なくとも1つが非プロトン性溶媒中で調製され、かつ、非プロトン性溶媒中で調製されたコンジュゲートが、水性溶媒中で調製された同じコンジュゲートと比較して、C R M 1 9 7 のアミノ酸 4 1 1 ~ 4 3 0 または 4 3 1 ~ 4 5 0 におけるリシン残基のより大きなアクセシビリティを実証する、免疫原性組成物にも関する。特定の実施形態において、本発明はまた、1つ以上の多糖 - C R M 1 9 7 コンジュゲートを含む免疫原性組成物であって、該多糖 - C R M 1 9 7 コンジュゲートの少なくとも1つが非プロトン性溶媒中で調製され、かつ、非プロトン性溶媒中で調製されたコンジュゲート中の C R M 1 9 7 のアミノ酸 4 1 1 ~ 4 3 0 または 4 3 1 ~ 4 5 0 における1つ以上のリシン残基が10%を超えてコンジュゲートされる、免疫原性組成物に関する。特定の実施形態において、本発明は、非プロトン性溶媒中で多糖を C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせることを含む、C R M 1 9 7 内、特に C R M 1 9 7 のアミノ酸 4 1 1 ~ 4 3 0 または 4 3 1 ~ 4 5 0 におけるリシン残基のアクセシビリティを高める方法に関する。この実施形態の特定の態様において、非プロトン性溶媒中で調製されたコンジュゲート中の C R M 1 9 7 のアミノ酸 4 1 1 ~ 4 3 0 または 4 3 1 ~ 4 5 0 における1つ以上のリシン残基は10%を超えてコンジュゲートされる。これらの実施形態において、多糖は、免疫原性組成物を調製するのに適した任意の生物由来のものであり得る。特定の態様において、多糖は、髄膜炎菌または肺炎連鎖球菌由来のものである。多糖はこれら生物の任意の血清型に由来し得る。

10

20

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される際、用語「水性溶媒」または「水性条件」は、還元的アミノ化などのコンジュゲーションと共に使用される場合、コンジュゲーション反応のための溶媒としての水の使用を指す。有機溶媒が存在しないことを除いて、この水はバッファーおよび他の成分を含有してもよい。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される際、用語「非プロトン性溶媒」は、還元的アミノ化のようなコンジュゲーションと共に使用される場合、コンジュゲーション反応のための溶媒としての、極性非プロトン性溶媒の使用または極性非プロトン性溶媒の組み合わせを指す。極性非プロトン溶媒の例としては、ジメチルスルホキシド (D M S O) 、ジメチルホルムアミド (D M F) およびヘキサメチルホスホルアミド (H M P A) が挙げられるが、これらに限定されない。非プロトン性溶媒には、例えば1%、2%、5%、10%または20%までのいくらかの水が存在していてもよい。

30

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される際、「D M S O 溶媒」および「D M S O 条件」は互換的に使用される。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される際、用語「～を含む (c o m p r i s e s) 」は、本発明の免疫原性組成物について用いる場合、アジュvantおよび賦形剤などの任意の他の成分の包含（抗原混合物に対する文言「～からなる (c o n s i s t i n g o f) 」の制限を受ける）を指す。用語「～からなる (c o n s i s t i n g o f) 」は、多価多糖 - タンパク質コンジュゲート混合物について用いる場合、混合物がそれらの特定の肺炎連鎖球菌多糖タンパク質コンジュゲートを有するが、異なる血清型に由来する他の肺炎連鎖球菌多糖タンパク質コンジュゲートは有さないことを指す。

40

【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される際、「リシン損失」は、コンジュゲーション中のリシン消費量を指し、コンジュゲート中の平均測定リシン量と出発タンパク質中の予想リシン量との間の差によって決定される。実施例4は、「リシン損失」を決定するための一方法を記載する。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用される際、用語「多糖」は、免疫学的および細菌性ワクチンの分野で一

50

一般的に使用される任意の抗原性糖要素（または抗原性単位）を包含することを意味し、「糖」、「オリゴ糖」、「多糖」、「リポ糖」、「リポ・オリゴ糖（L O S）」、「リポ多糖（L P S）」、「グリコシレート」、「複合糖質」などを含むがこれらに限定されない。

【0054】

非プロトン性溶媒（例えば、D M S O）中で調製される免疫原性組成物および水性条件下で調製される残りの多糖タンパク質コンジュゲート中の血清型のパーセンテージについて言及する場合、単に、非プロトン性溶媒中で調製された血清型の数を、組成物中の血清型の総数で割った数を指すことを意味する。

【0055】

本明細書で使用される際、p H、温度および濃度などの全ての範囲は両端値を含むことを意味する。例えば、5 . 0 ~ 9 . 0 のp H範囲は、5 . 0 のp Hおよび9 . 0 のp Hを含むことを意味する。同様に、4 ~ 25 の温度範囲は、と当該範囲の外側限界、すなわち4 および25 を含むことを意味する。

10

【0056】

多糖

本発明の方法、すなわち非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化によって調製することができる肺炎連鎖球菌莢膜多糖は、血清型：1、2、3、4、5、6 A、6 B、6 C、6 D、7 B、7 C、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 A、15 B、15 C、16 F、17 F、18 C、19 A、19 F、20、21、22 A、22 F、23 A、23 B、23 F、24 F、27、28 A、31、33 F、34、35 A、35 B、35 Fおよび38 を含むが、これらに限定されない。多糖は、オリゴ糖の形態で使用してもよい。これらは、精製された多糖の断片化によって（例えば加水分解によって）都合よく形成され、通常は、所望のサイズの断片の精製が続く。

20

【0057】

特定の実施形態において、血清型1、2、3、4、5、6 C、6 D、7 B、7 C、8、9 N、9 V、11 A、12 F、14、15 A、15 C、16 F、17 F、18 C、20、21、22 A、23 A、23 B、24 F、27、28 A、31、34、35 A、35 B、35 Fおよび38 のうちの1つ以上は、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて調製される。特定の態様において、血清型1、3、4、5、9 V、11 A、12 Fおよび14 のうちの1つ以上に由来する肺炎球菌多糖は、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて調製される。特定の態様において、血清型2、6 C、6 D、7 B、7 C、8、9 N、15 A、15 C、16 F、17 F、19 F、20、21、22 A、23 A、23 B、24 F、27、28 A、31、34、35 A、35 B、35 Fおよび38 のうちの1つ以上に由来する肺炎球菌多糖は、非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて調製される。ある態様において、血清型3または18 Cの一方または両方に由来する肺炎球菌多糖は、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される。多価組成物中の他の血清型に由来する多糖は、水性溶媒中または非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いてコンジュゲートされていてもよい。また、多価組成物中の他の血清型に由来する多糖は、非プロトン性溶媒中または水性溶媒中で行われ得る他の化学を用いてコンジュゲートされてもよい。

30

【0058】

肺炎連鎖球菌由來の莢膜多糖は、当業者に知られている標準的な技術によって調製することができる。例えば、多糖は細菌から単離することができ、既知の方法によって（例えば、欧州特許第497524号および同第497525号を参照）、および好ましくはホモジナイザーを用いて達成されるマイクロフルイダイズによって、または化学的加水分解によって、ある程度の大きさにサイジングすることができる。一実施形態において、各肺炎球菌多糖血清型は、大豆ベースの媒体中で増殖する。次に、遠心分離、沈殿および限外濾過を含む標準的な工程により個々の多糖を精製する。例えば、米国特許公開第2008 / 0286838号および米国特許第5,847,112号を参照のこと。多糖試料中の粘度を低下させるために、および/または機械的または化学的サイジングなどの技術を用

40

50

いてコンジュゲートさせた生成物の濾過性を向上させるために、多糖をサイジングすることができる。化学的加水分解は酢酸を用いて実施することができる。機械的サイジングは高压均質化剪断を用いて実施することができる。

【0059】

いくつかの実施形態において、コンジュゲーション前の精製多糖は、5 kDa ~ 4,000 kDa 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) と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって計算することができる。他のかかる実施形態において、多糖は、10 kDa ~ 4,000 kDa ; 50 kDa ~ 4,000 kDa ; 50 kDa ~ 3,000 kDa ; 50 kDa ~ 2,000 kDa ; 50 kDa ~ 1,500 kDa ; 50 kDa ~ 1,000 kDa ; 50 kDa ~ 1,000 kDa ; 50 kDa ~ 750 kDa ; 50 kDa ~ 500 kDa ; 100 kDa ~ 4,000 kDa ; 100 kDa ~ 3,000 kDa ; 100 kDa ~ 2,000 kDa ; 100 kDa ~ 1,500 kDa ; 100 kDa ~ 1,000 kDa ; 100 kDa ~ 750 kDa ; 100 kDa ~ 500 kDa ; 100 ~ 400 kDa ; 200 kDa ~ 4,000 kDa ; 200 kDa ~ 3,000 kDa ; 200 kDa ~ 2,000 kDa ; 200 kDa ~ 1,500 kDa ; 200 kDa ~ 1,000 kDa の、または 200 kDa ~ 500 kDa の分子量を有する。

10

【0060】

精製多糖は、糖を担体タンパク質と反応させることができるように化学的に活性化することができる。精製多糖はリンカーに接続することができる。一旦活性化されるかまたはリンカーに接続されると、各莢膜多糖は別々に担体タンパク質にコンジュゲートされて複合糖質を形成する。多糖コンジュゲートは、既知のカップリング技術によって調製してもよい。

20

【0061】

多糖をリンカーにカップリングさせて、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することができる。したがって、リンカーは、少なくとも 1 つの末端がエステル基であるものである。他方の末端は、リンカーが多糖と反応して多糖 - リンカー中間体を形成することができるように選択される。

【0062】

多糖は、その中の第一級アミン基を使用してリンカーにカップリングすることができる。この場合、リンカーは典型的には両末端にエステル基を有する。これは、求核アシル置換により多糖中でエステル基の 1 つを第一級アミン基と反応させることによりカップリングを生じさせることを可能にする。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している多糖 - リンカー中間体をもたらす。したがって、リンカーは、多糖中の第一級アミン基と反応するための第一エステル基と、担体分子中の第一級アミン基と反応するための第二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。

30

【0063】

カップリングはまた、間接的に、すなわちリンカーへのカップリングの前に多糖を誘導体化するために使用される更なるリンカーを用いても起こり得る。

40

【0064】

多糖は、多糖の還元末端にあるカルボニル基を使用して更なるリンカーにカップリングされる。このカップリングは、(a1) カルボニル基を更なるリンカーと反応させ、(a2) 更なるリンカーの遊離末端をリンカーと反応させるという 2 つの工程を含む。これらの実施形態において、更なるリンカーは典型的には両末端に第一級アミン基を有し、それによって還元アミノ化により第一級アミン基の 1 つを多糖中のカルボニル基と反応させることによって工程 (a1) の実施を可能にする。多糖中のカルボニル基と反応性の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リアルミノ基が適している。同じ第一級アミン基が、典型的には更なるリンカーの両末端に存在する。当該反応は、多糖が更なるリンカーに C - N 結合を介してカップリングしている多糖 - 更なるリンカー中間体

50

をもたらす。

【 0 0 6 5 】

多糖は、その中の異なる基、特にカルボキシル基を使用して更なるリンカーにカップリングすることができる。このカップリングは、(a 1)当該基を更なるリンカーと反応させ、(a 2)更なるリンカーの遊離末端をリンカーと反応させるという2つの工程を含む。この場合、更なるリンカーは典型的には両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つを多糖中のカルボキシル基と E D A C 活性化によって反応させることにより工程(a 1)の実施を可能にする。多糖中の E D A C 活性化カルボキシル基と反応性のある第一級アミン基が使用される。ヒドラジド基が適している。同じ第一級アミン基が、典型的には更なるリンカーの両末端に存在する。当該反応は、多糖が更なるリンカーにアミド結合を介してカップリングしている多糖 - 更なるリンカー中間体をもたらす。

10

【 0 0 6 6 】

一実施形態において、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ションは、米国特許第4,365,170号、同第4,673,574号および同第4,902,506号、米国特許公開第2006/0228380号、同第2007/184072号、同第2007/0231340号および同第2007/0184071号、ならびに国際公開第2006/110381号、同第2008/079653号および同第2008/143709号)に記載されている手段によって達成することができる。化学は、過ヨウ素酸塩(過ヨウ素酸ナトリウム、過ヨウ素酸カリウムまたは過ヨウ素酸を含む)などの、末端ヒドロキシル基を酸化してアルデヒドにする任意の酸化剤との反応による肺炎球菌多糖の活性化を必要とする場合がある。当該反応は、反応性アルデヒド基を形成しつつ、炭水化物の隣接するヒドロキシル基のランダムな酸化的開裂をもたらす。

20

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、0.01~10.0、0.05~5.0、0.1~1.0、0.5~1.0、0.7~0.8、0.05~0.5、0.1~0.3モル当量の酸化剤と多糖を反応させる。一実施形態では、約0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95モル当量の酸化剤と多糖を反応させる。限定された多糖活性化を達成するべく、活性化のためにより少量の、例えば0.1~0.3M eqの過ヨウ素酸塩を使用する(例えば、多糖反復単位1モル当たり0.05~0.22または0.09~0.22モルのアルデヒド)ことが一般に好ましい。本明細書で使用される際、「活性化レベル」は、多糖反復単位1モル当たりのアルデヒドのモル数を指す。多糖の活性化が少ないほど、より天然に近い多糖となる。すなわち、より少ないヒドロキシル基がアルデヒドに変換される。

30

【 0 0 6 8 】

別の実施形態において、酸化反応の期間は、1時間~50時間、10時間~30時間、15時間~20時間、15時間~17時間、または約16時間である。

【 0 0 6 9 】

別の実施形態において、酸化反応の温度は15~45、15~30、20~25で維持される。別の実施形態において、反応の温度は約23で維持される。

40

【 0 0 7 0 】

担体タンパク質へのカップリングは、当該タンパク質のリシル基への直接アミノ化による還元的アミノ化によって行われる。例えば、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などの還元剤と、ニッケルの存在下で反応させることによってコンジュゲーションが行われる。コンジュゲーション反応は、水溶液下またはジメチルスルホキシド(D M S O)の存在下で起こり得る。例えば、米国特許公開第2015/0231270号および同第2011/0195086号ならびに欧州特許第E P 0 471 177 B 1号を参照のこと。次いで、未反応アルデヒドを、水素化ホウ素ナトリウムなどの強力な還元剤の添加でキャップリングする。

50

【0071】

還元的アミノ化は、(1)多糖を酸化して反応性アルデヒドを形成し、(2)活性化多糖と担体タンパク質との間に形成されたイミン(シップ塩基)を還元して安定なアミン共役結合を形成するという2つの工程を含む。酸化の前に多糖をサイズ縮小させてもよい。機械的方法(例えば、均質化)または化学的加水分解を使用してもよい。化学的加水分解は酢酸を用いて実施することができる。酸化工程は過ヨウ素酸塩との反応を含み得る。本発明の目的のために、用語「過ヨウ素酸塩」は過ヨウ素酸塩と過ヨウ素酸の両方を含む。この用語はまた、メタ過ヨウ素酸塩(IO_4^-)およびオルト過ヨウ素酸塩(IO_6^-)の両方を含み、過ヨウ素酸塩の様々な塩(例えば、過ヨウ素酸ナトリウムおよび過ヨウ素酸カリウム)を含む。一実施形態において、莢膜多糖は、メタ過ヨウ素酸塩の存在下、好ましくは過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)の存在下で酸化される。別の実施形態において、莢膜多糖は、オルト過ヨウ素酸塩の存在下、好ましくは過ヨウ素酸の存在下で酸化される。

10

【0072】

一実施形態において、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で、安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物、例えば(国際公開第2014/097099号に記載されるような)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。前記反応において、実際の酸化剤は、触媒サイクルにおいてN-オキソアンモニウム塩である。1つの態様において、前記安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物は、ピペリジン-N-オキシまたはピロリジン-N-オキシ化合物である。1つの態様において、前記安定なニトロキシルまたはニトロキシドラジカル化合物は、TEMPO(2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ)またはPROXYL(2,2,5,5-テトラメチル-1-ピロリジニルオキシ)部分を有する。1つの態様において、前記安定なニトロキシルラジカル化合物はTEMPOまたはその誘導体である。1つの態様において、前記酸化剤は、N-ハロ部分を有する分子である。1つの態様において、前記酸化剤は、N-クロロスクシンイミド、N-プ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。

20

【0073】

特定の態様において、酸化剤は、(国際公開第2014/097099号に記載されるような)共酸化剤としての2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ(TEMPO)フリーラジカルおよびN-クロロスクシンイミド(NCS)である。したがって、1つの態様において、肺炎連鎖球菌由来の複合糖質は、a)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)と糖を反応させて活性化糖を生成し、b)活性化された糖を、1つ以上のアミン基を含む担体タンパク質と反応させる工程を含む方法によって得られる(以下、前記方法を「TEMPO/NCS-還元的アミノ化」と呼ぶ)。

30

【0074】

酸化反応は失活剤の添加により失活されてもよい。失活剤は、ビナルジオール、1,2-アミノアルコール、アミノ酸、グルタチオン、亜硫酸塩、重硫酸塩、亜ジチオン酸塩、メタ重亜硫酸塩、チオ硫酸塩、亜リン酸塩、次亜リン酸塩または亜リン酸(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、アスコルビン酸など)から選択され得る。

40

【0075】

コンジュゲーションプロセスの第二工程は、還元剤を用いて、活性化多糖と担体タンパク質とのイミン(シップ塩基)結合を還元して安定なコンジュゲート結合を形成すること(いわゆる還元的アミノ化)である。適切な還元剤には、シアノ水素化ホウ素(シアノ水

50

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。一実施形態において、還元剤はシアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

【0076】

本発明の方法の特定実施形態において、還元的アミノ化反応は非プロトン性溶媒(または非プロトン性溶媒の混合物)中で行われる。一実施形態において、還元反応はDMSO中またはDMF(ジメチルホルムアミド)溶媒中で行われる。凍結乾燥される場合には、DMSOまたはDMF溶媒を用いて活性化多糖および担体タンパク質を再構成することができる。一実施形態において、非プロトン性溶媒はDMSOである。

【0077】

還元反応の終わりに、コンジュゲート中に未反応のアルデヒド基が残っている可能性があり、適切なキャッピング剤を用いてこれをキャッピングすることができる。一実施形態において、このキャッピング剤は水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)である。適切な代替物としては、ブレンステッド酸またはルイス酸の存在下でのトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化ホウ素ナトリウムもしくは亜鉛、ピリジンボラン、2-ピコリンボラン、2,6-ジボラン-メタノール、ジメチルアミン-ボラン、t-BuMe'PrN-BH₃、ベンジルアミン-BH₃または5-エチル-2-メチルピリジンボラン(PEMB)などのアミンボラン、または水素化ホウ素交換樹脂が挙げられる。コンジュゲーション(還元反応および任意選択的にキャッピング)に続いて、複合糖質を、当業者に知られている様々な技術によって精製してもよい(多糖-タンパク質コンジュゲートの量に関する濃縮してもよい)。これらの技術には、透析、濃縮/透析濾過操作、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、マルチモーダル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)、および深層濾過が含まれる。一実施形態において、複合糖質は、透析濾過またはイオン交換クロマトグラフィーもしくはサイズ排除クロマトグラフィーによって精製される。

【0078】

非プロトン性溶媒中での還元的アミノ化を用いて調製された複合糖質は、一般に多価肺炎球菌コンジュゲートワクチンにおいて使用される。したがって、全ての血清型が非プロトン性溶媒中で調製されるとは限らない多価組成物についての特定実施形態において、残りの血清型の還元反応は、水性溶媒(例えば、pH 6.0~8.5、7.0~8.0、または7.0~7.5で、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)、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-トリス、ADA(N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸)、PIPES(ピペラジン-N,N')-ビス(2-エタンスルホン酸)、MOPS(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)、DIPS(3-ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ-2-ヒドロキシプロパン-1-スルホン酸)、MOBS(4-(N-モルホリノ)ブタンスルホン酸)、HEPPSO(N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N-(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)、POPSO(ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸))、TEA(トリエタノールアミン)、EPPS(4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-プロパンスルホン酸)、ビシンまたはHEPBから選択される)中で実施される。

【0079】

いくつかの実施形態において、本発明の複合糖質は、10kDa~10,000kDaの分子量を有する多糖を含む。他のかかる実施形態において、多糖は25kDa~5,000kDaの分子量を有する。他のかかる実施形態において、多糖は50kDa~1,000kDaの分子量を有する。他のかかる実施形態において、多糖は70kDa~900kDaの分子量を有する。他のかかる実施形態において、多糖は100kDa~800kDaの分子量を有する。他のかかる実施形態において、多糖は、200kDa~600kDaの分子量を有する。更なるかかる実施形態において、多糖は100kDa~1000kDaの分子量を有する。

10

20

30

40

50

kDa ; 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 ; 500kDa ~ 600kDa の分子量を有する。
10

【0080】

いくつかの実施形態において、本発明の複合糖質は、1,000kDa ~ 10,000kDa の分子量を有する。他のかかる実施形態において、多糖は1,000kDa ~ 7,000kDa の分子量を有する。他のかかる実施形態において、多糖は1,000kDa ~ 6,000kDa の分子量を有する。
20

【0081】

特定の実施形態において、コンジュゲーション反応は還元的アミノ化によって行われ、ここでニッケルはより大きいコンジュゲーション反応効率のためおよび遊離シアン化物の除去を助けるために使用される。遷移金属は、シアン化物と安定な錯体を形成することが知られており、かつ、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いて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知られている (S Gidley et al., Biochem J. 1982, 203: 331 - 334; Jentoft et al. Anal Biochem. 1980, 106: 186 - 190)。残留する阻害シアン化物を錯化することにより、ニッケルの添加は、コンジュゲーション中のタンパク質の消費を増加させ、より大きく、潜在的に免疫原性の高いコンジュゲートの形成をもたらす。
30

【0082】

シアノ水素化ホウ素ナトリウム試薬ロット中の開始シアン化物レベルの差によっても、コンジュゲーション性能にはらつきが生じ、その結果、コンジュゲートサイズやコンジュゲートのPs対CRM₁₉₇比などの製品属性が変化する。ニッケルの添加は、シアン化物を錯化することによってコンジュゲーションのばらつきを減少させ、シアノ水素化ホウ素ナトリウムロット間の差を解消した。

【0083】

適切な代替化学は、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート (CDAP) によって糖を活性化させて、シアネットエステルを形成することを含む。故に、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得る。例えば、スペーサーは、シスタミンまたはシステアミンであって、チオール化多糖を生じることができ、このチオール化多糖は、マレイミド活性化担体タンパク質 (例えば、GMB Sを用いて) 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 [エチルヨードアセトイミドHC1など] またはN-スクシンイミジルプロモアセテートまたはSIA BまたはSIAまたはSBAPを用いて)との反応後に得られるチオエーテル結合を介して担体にカップリングできる。例えば、シアネットエステル (CDAP化学によって作成されていてもよい) をヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド (ADH) とカップリングさせ、タンパク質担体上
40

のカルボキシル基を介してカルボジイミド（E D A C または E D C など）化学を用いて、アミノ誘導体化した糖を担体タンパク質にコンジュゲートさせる。かかるコンジュゲートは、国際公開第93/15760号、同第95/08348号および同第96/29094号、ならびに Chu et al., 1983, Infect. Immun. 40: 245-256に記載されている。

【0084】

他の適切な技術は、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、p-二トロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-N H S、E D C、T S T U を使用する。多くが国際公開第98/42721号に記載されている。コンジュゲーションはカルボニルリンカーを含んでいてもよく、このカルボニルリンカーは、糖の遊離ヒドロキシル基とC D Iとを反応させ（Bethell et al., 1979, J. Biol. Chem. 254: 2572-4; Hearn et al., 1981, J. Chromatogr. 218: 509-18を参照）、その後、タンパク質と反応させることによりカルバメート結合を形成することによって形成してもよい。これは、アノマー末端の第一級ヒドロキシル基への還元、第一級ヒドロキシル基の任意の保護／脱保護、第一級ヒドロキシル基とC D Iとの反応によるC D Iカルバメート中間体の形成、およびC D Iカルバメート中間体とタンパク質上のアミノ基とのカップリングを含んでいてもよい。

10

【0085】

莢膜多糖を担体タンパク質にコンジュゲートさせた後、多糖-タンパク質コンジュゲートを、様々な技術のうちの1つ以上によって精製する（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周知であり、濃縮／透析濾過操作、限外濾過、沈殿／溶出、カラムクロマトグラフィーおよび深層濾過を含む。例えば、米国特許第6,146,902号を参照のこと。

20

【0086】

本発明の複合糖質を特徴付ける別のある方法は、糖とコンジュゲートされるようになる担体タンパク質（例えば、C R M 197）中のリシン残基の数によるものであり、これは、コンジュゲートリシンの範囲（コンジュゲーション度）として特徴付けることができる。多糖への共有結合による、担体タンパク質のリシン修飾の証拠は、当業者に知られている日常的な方法を用いたアミノ酸分析によって得ることができる。コンジュゲーションは、コンジュゲート材料を生成するために使用される担体タンパク質出発材料と比較して、回収されるリシン残基数を減少させる。一実施形態において、本発明の複合糖質のコンジュゲーション度は、2~18、2~13、2~10、2~8、2~6、2~5、2~4、3~15、3~13、3~10、3~8、3~6、3~5、3~4、5~18、5~13、7~18、7~13、8~18、8~13、10~18または10~13である。一実施形態において、本発明の複合糖質のコンジュゲーション度は、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15である。一実施形態において、本発明の複合糖質のコンジュゲーション度は7~18である。いくつかのかかる態様において、担体タンパク質はC R M 197である。

30

【0087】

本発明の複合糖質はまた、糖対担体タンパク質の比（重量／重量）によっても特徴付けることができる。いくつかの実施形態において、複合糖質中の多糖対担体タンパク質の比（w/w）は0.5~3.0（約0.5、約0.6、約0.7、約0.8、約0.9、約1.0、約1.1、約1.2、約1.3、約1.4、約1.5、約1.6、約1.7、約1.8、約1.9、約2.0、約2.1、約2.2、約2.3、約2.4、約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、または約3.0など）である。他の実施形態において、糖対担体タンパク質の比（w/w）は、0.5~2.0、0.5~1.5、0.8~1.2、0.5~1.0、1.0~1.5または1.0~2.0である。更なる実施形態において、糖対担体タンパク質の比（w/w）は0.8~1.2である。一実施形態において、コンジュゲート中の莢膜多糖対担体タンパク質の比は、0.9~1.1である。いくつかのかかる態様において、担体タンパク質はC R M 197である。本発明の複合糖

40

50

質および免疫原性組成物は、担体タンパク質に共有結合されていない遊離糖を含有してもよいが、それでもなお複合糖質組成物中に存在する。遊離糖は、複合糖質に非共有会合（つまり、非共有結合、吸着、またはその中にもしくはそれと共に捕捉）させてもよい。

【0088】

一実施形態において、複合糖質は、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。一実施形態において、複合糖質は、多糖の総量と比較して、約25%未満の遊離多糖を含む。一実施形態において、複合糖質は、多糖の総量と比較して、約20%未満の遊離多糖を含む。一実施形態において、複合糖質は、多糖の総量と比較して、約15%未満の遊離多糖を含む。

【0089】

多価多糖 - タンパク質コンジュゲートワクチン

多価肺炎球菌免疫原性組成物は、1つ以上の担体タンパク質にコンジュゲートさせた1、2、3、4、5、6A、6B、6C、6D、7B、7C、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15A、15B、15C、16F、17F、18C、19A、19F、20、21、22A、22F、23A、23B、23F、24F、27、28A、31、33F、34、35A、35B、35Fおよび38の少なくとも1つから選択される肺炎連鎖球菌血清型に由来する莢膜多糖を含むことができ、少なくとも1つの血清型に由来する多糖は、DMSOなどの非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を用いて調製される。本発明は、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25の血清型に由来する多糖を有する多価肺炎球菌免疫原性組成物を企図する。好ましくは、特定の血清型に由来する糖は、複数の担体タンパク質にコンジュゲートされていない。

【0090】

特定の実施形態において、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25の血清型に由来する多糖は、DMSOなどの非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を用いて調製される。

【0091】

特定の実施形態において、血清型3、6A、6B、7F、18C、19A、19Fまたは23Fのうちの1つ以上が、非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を用いて調製される。この実施形態の特定の態様において、血清型3または18Cの一方または両方は、非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を用いて調製される。

【0092】

特定の実施形態において、多価組成物中の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%が非プロトン性溶媒中で調製される。残りの血清型は、代替化学を用いておよび/または水性溶媒中で調製される。

【0093】

特定の実施形態において、血清型1、2、3、4、5、6C、6D、7B、7C、8、9N、9V、11A、12F、14、15A、15C、16F、17F、18C、20、21、22A、23A、23B、24F、27、28A、31、34、35A、35B、35Fおよび38のうちの1つ以上は、非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を用いて調製される。特定の態様において、血清型1、3、4、5、9V、11A、12Fおよび14のうちの1つ以上は、非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を用いて調製される。ある態様において、血清型2、6C、6D、7B、7C、8、9N、15A、15C、16F、17F、19F、20、21、22A、23A、23B、24F、27、28A、31、34、35B、35Fおよび38の1つ以上は、非プロトン性溶媒中の還元的アミノ化を用いて調製される。

【0094】

一実施形態において、多価組成物は、DMSOなどの非プロトン性溶媒中の還元的ア

10

20

30

40

50

ミノ化を用いて調製された血清型 6 A、6 B、7 F、18 C、19 A、19 F および 23 F に由来する多糖および水性溶媒中での還元的アミノ化を用いて調製された血清型 1、3、4、5、9 V、14、22 F および 33 F に由来する多糖からなる。

【0095】

個々の複合糖質を精製した後、それらを配合して本発明の免疫原性組成物を配合する。これらの肺炎球菌コンジュゲートは、別個の方法によって調製され、単回投与配合物にバルクで配合される。

【0096】

担体タンパク質

本発明の特定実施形態において、CRM₁₉₇が担体タンパク質として使用される。CRM₁₉₇は、ジフテリア毒素の非毒性変異体（すなわち、トキソイド）である。一実施形態において、CRM₁₉₇は、カザミノ酸および酵母抽出物ベースの媒体で増殖させたジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) 株 C7 (197) の培養物から単離される。別の実施形態において、CRM₁₉₇は、米国特許第 5,614,202 号に記載されている方法に従って組換え調製される。通常、CRM₁₉₇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み合わせによって精製される。いくつかの実施形態において、CRM₁₉₇は、Pfenex Expression Technology (商標) (Pfenex 社、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用して、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) において調製される。

【0097】

他の適切な担体タンパク質としては、DT (ジフテリアトキソイド) または DT (DT FB) の断片 B、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、国際公開第 2004/083251 号に記載されているようなもの)、大腸菌 LT、大腸菌 ST、および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の外毒素 A のような更なる不活化細菌毒素が挙げられる。細菌外膜タンパク質、例えば、外膜複合体 c (OMP C)、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質、肺炎球菌の表面タンパク質 A (PspA；国際出願公開第 02/091998 号参照)、肺炎球菌の吸着タンパク質 (PsaA)、A 群もしくは B 群の連鎖球菌由来 C5a ペプチダーゼ、またはインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) タンパク質 D、肺炎球菌のニューモリシン (Kuo et al., 1995, Infect Immun 63; 2706-13) (何らかの方法で無毒化された p1y、例えば、dPLY-GMBS (国際公開第 04/081515 号を参照) もしくは dPLY-formol)、PhtX (PhtA、PhtB、PhtD、PhtE および Pht タンパク質の融合体、例えば、PhtDE 融合体、PhtBE 融合体 (国際公開第 01/98334 号および同第 03/54007 号を参照)) を使用することもできる。他のタンパク質、例えば、オボアルブミン、スカシガイヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA) もしくはツベルクリンの精製タンパク質誘導体 (PPD)、PorB (髄膜炎菌由来)、PD (インフルエンザ菌のタンパク質 D；例えば、欧州特許第 0594610 B 号参照)、またはその免疫学的機能等価体、合成ペプチド (欧州特許第 0378881 号および同第 0427347 号参照)、熱ショックタンパク質 (国際公開第 93/17712 号および同第 94/03208 号参照)、百日咳タンパク質 (国際公開第 98/58668 号および欧州特許第 0471177 号参照)、サイトカイン、リンホカイン、成長因子もしくはホルモン (国際公開第 91/01146 号参照)、様々な病原体由来抗原から得られる複数のヒト CD4+T 細胞エピトープを含む人工タンパク質 (Falugi et al., 2001, Eur J Immunol 31: 3816-3824 を参照)、例えば、N19 タンパク質 (Baraldoi et al., 2004, Infect Immun 72: 4884-7 を参照)、鉄取込みタンパク質 (国際公開第 01/72337 号を参照)、C difficile の毒素 A もしくは B (国際公開第 00/61761 号参照)、ならびにフラジェリン (Ben-Yedid et al., 1995, Infect Immun 63: 2706-13 を参照)。

10

20

30

40

50

98, Immunol Lett 64: 9を参照)も担体タンパク質として使用できる。

【0098】

他のDT変異体、例えば、CRM176、CRM228、CRM45(Uchida et al., 1973, J Biol Chem 218: 3838-3844); CRM9、CRM45、CRM102、CRM103およびCRM107、ならびにNichollsおよびYoulueによってGenetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maece1 Dekker Inc, 1992に記載された他の変異; Glu-148からAsp、GlnもしくはSerへの、および/またはAla158からGlyへの欠失または変異、ならびに米国特許第4,709,017号または第4,950,740号に開示された他の変異; 残基Lys516、Lys526、Phe530および/またはLys534の少なくとも1つ以上の変異、ならびに米国特許第5,917,017号または第6,455,673号に開示された他の変異; あるいは米国特許第5,843,711号に開示された断片、を第二の担体タンパク質として使用することができる。また、かかるDT変異体を使用して、B断片を含むDTFB変異体にエピトープ領域を含有させることができる。

【0099】

多価ワクチンを使用する場合、多価ワクチン中の抗原のうちの1つ以上に対して第二の担体を使用することができる。第二の担体タンパク質は、好ましくは非毒性かつ非反応原性であって、十分な量および純度で得られるタンパク質である。第二の担体タンパク質もまた、抗原の免疫原性を増強するために、抗原、例えば肺炎連鎖球菌多糖とコンジュゲートまたは接合している。担体タンパク質は、標準的なコンジュゲーション手順に従うべきである。一実施形態において、第一の担体タンパク質にコンジュゲートされていない各莢膜多糖を、同じ第二の担体タンパク質にコンジュゲートさせる(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される)。別の実施形態において、第一の担体タンパク質にコンジュゲートしていない莢膜多糖を、2つ以上の担体タンパク質にコンジュゲートさせる(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される)。かかる実施形態において、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される。

【0100】

医薬/ワクチン組成物

本発明は更に、薬学的に許容される担体およびアジュバントと共に、上記の多糖血清型の組み合わせのいずれかを含む、それから本質的になる、またはそれからなる、医薬組成物、免疫原性組成物およびワクチン組成物を包含する組成物を更に提供する。

【0101】

本発明の多糖-タンパク質コンジュゲートの配合は、当技術分野において認識されている方法を使用して達成することができる。例えば、個々の肺炎球菌コンジュゲートは、組成物を調製するために生理学的に許容されるビヒクリルを配合することができる。かかるビヒクリルの例としては、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挙げられるが、これらに限定されない。

【0102】

一実施形態において、ワクチン組成物は、塩化ナトリウムを含むL-ヒスチジンバッファーにて配合される。

【0103】

本明細書で定義されるように、「アジュバント」は、本発明の免疫原性組成物の免疫原性を増強するのに役立つ物質である。免疫アジュバントは、単独で投与されると免疫原性が弱い抗原に対する免疫応答を増強する、例えば、無もしくは弱い抗体力価または細胞性免疫応答を誘導し、抗原に対する抗体力価を高め、かつ/または個々における免疫反応を達成するのに効果的な抗原の用量を低減することができる。したがって、アジュバントは、しばしば免疫応答を高めるために投与され、当業者に周知である。組成物の有効性を増

10

20

30

40

50

強するのに適するアジュバントとしては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0104】

(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；

(2) 水中油型乳剤配合物(ムラミルペプチド(以下に定義される)または細菌細胞壁成分のような他の特定の免疫刺激剤を含むまたは含まない)、例えば、(a) 5%スクアレン、0.5%Tween 80 および 0.5%Span 85 を含有し(様々な量のMTP-PE を含有していてもよい)、Model 1110Yマイクロフルイダイザー(Microfluidics、マサチューセッツ州ニュートン)などのマイクロフルイダイザーを用いてサブミクロン粒子に配合されたMF 59(国際公開第90/14837号)；(b) 10%スクアレン、0.4%Tween 80、5%ブルロニックプロックポリマーL121 および th - MDP を含有し、サブミクロンの乳剤にマイクロフルイダイズされているか、またはボルテックスされてより大きな粒度の乳剤を生成するSAF；(c) 2%スクアレン、0.2%Tween 80、ならびに米国特許第4,912,094号に記載の3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A(MPL(商標))、トレハロースジミコール酸(TDM)および細胞壁骨格(CWS)、好ましくはMPL+CWS(Detox(商標))からなる群からの1つ以上の細菌細胞壁成分を含有するRibix(商標)アジュバント系(RAS)(Corixa社、マサチューセッツ州ハミルトン)；ならびに(d) Montanide ISA；

(3) サポニンアジュバント、例えば、Quail AもしくはSTIMULON(商標)QS-21(Antigenics、マサチューセッツ州フレーミングハム)(例えば、米国特許第5,057,540号を参照)が使用され得るか、またはこのアジュバントから生成される粒子、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み合わせによって形成される免疫刺激複合体)およびIscomatrix(登録商標)(ISCOMと本質的に同じ構造を有するが当該タンパク質を含まない)；

(4) 細菌リポ多糖、合成脂質A類似体、例えばアミノアルキルグルコサミンホスフェート化合物(AGP)、またはその誘導体もしくは類似体、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；かかる1つの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] - b - D - グルコピラノシドであり、529としても知られており(以前は、RC529として知られていた)、水性形態または安定な乳剤として配合されるものである；

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

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

(7) 補体、例えば、補体成分C3dの三量体。

【0105】

別の実施形態において、アジュバントは、上記のアジュバントの2、3またはそれ以上の混合物、例えば、S B A S 2(3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質AおよびQS 21も含有する水中油型乳剤)である。

【0106】

ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(th - MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニン-2-(1'-2

10

20

30

40

50

・ジパルミトイル - s n - 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) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0107】

特定の実施形態において、アジュバントはアルミニウム塩である。アルミニウム塩アジュバントは、ミョウバン沈殿ワクチンまたはミョウバン吸着ワクチンであり得る。アルミニウム塩アジュバントは当技術分野において周知であり、例えば、Harlow, E. およびD. Lane (1988; Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory) ならびにNiklas, W. (1992; Aluminum salts. Research in Immunology 143: 489 - 493) に記載されている。アルミニウム塩としては、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、ヒドロゲル、Superfoss、Amphogel、水酸化アルミニウム (III)、硫酸ヒドロキシリソ酸アルミニウム、リン酸アルミニウムアジュバント (APA)、非晶質アルミナ、三水和アルミナ、またはトリヒドロキシアルミニウムが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0108】

APAは、ヒドロキシリソ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を1:1の容量比でブレンドし、ヒドロキシリソ酸アルミニウムを沈殿させることによって製造される。ブレンドプロセスの後、その材料を高剪断ミキサーでサイズ縮小し、単分散粒度分布を達成する。次いで、生成物を生理食塩水に対して透析濾過し、蒸気滅菌する。

20

【0109】

特定の実施形態において、市販のAl(OH)₃ (例えば、ニューヨーク州ウェストベリーにあるDenmark / Accurate Chemical and Scientific社のAlhydrogelまたはSuperfoss) を使用して、タンパク質を、50 ~ 200 g タンパク質 / mg 水酸化アルミニウムの比率で吸着させる。タンパク質の吸着は、別の実施形態では、タンパク質のpI (等電pH) および媒体のpHに依存する。pIが低いタンパク質は、pIが高いタンパク質よりも強く正電荷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貯蔵部を確立し、マクロファージの非特異的活性化および補体活性化に関与し、かつ / または (おそらく尿酸の刺激により) 先天性免疫機構を刺激し得る。例えば、Lambrecht et al., 2009, Curr Opin Immunol 21: 23を参照のこと。

30

【0110】

一価のバルク水性コンジュゲートは、典型的には一緒にブレンドし、目標の16 μg / mLまで希釈するLB以外、全ての血清型を目標の8 μg / mLまで希釈する。希釈したら、バッヂを濾過滅菌し、等容量のリン酸アルミニウムアジュバントを、目標とする最終アルミニウム濃度250 μg / mLまで無菌的に添加する。アジュバントを加えた配合バッヂを、単回使用の0.5 mL / 用量バイアルに充填する。

【0111】

特定の実施形態において、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 (CpGODN) である。別の実施形態において、アジュバントは、Coley Pharmaceutical Groupから入手可能なODN1826である。

40

【0112】

「CpG含有ヌクレオチド」、「CpG含有オリゴヌクレオチド」、「CpGオリゴヌクレオチド」および類似の用語は、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指す。例えば、Wang et al., 2003, Vaccine 21: 4297を参照のこと。別の実施形態では、この用語の任意の他の技術分野で認められた定義が意図される。CpG含有オリゴヌクレオチドは、任意の合成ヌクレオシド間結合を用いた修飾オリゴヌクレオチド、修飾塩基および / または修飾糖を含む。

50

【0113】

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

【0114】

投与 / 投薬量

本発明の組成物および配合物は、全身経路または粘膜経路によりワクチンを投与することによって、感染、例えば肺炎球菌感染にかかりやすいヒトを保護または処置するためを使用することができる。一実施形態において、本発明は、免疫学的有効量の本発明の免疫原性組成物をヒトに投与することを含む、肺炎連鎖球菌莢膜多糖コンジュゲートに対する免疫応答の誘導方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、免疫学的有効量の本発明の免疫原性組成物をヒトに投与する工程を含む、ヒトに肺炎球菌感染に対するワクチンを接種する方法を提供する。

10

【0115】

特定のワクチンに最適な成分量は、被検体における適切な免疫応答の観察を伴う標準的な試験によって確認することができる。例えば、別の実施形態において、ヒトへのワクチン接種のための投薬量は、動物試験をヒトのデータに外挿することによって決定される。別の実施形態において、この投薬量は経験的に決定される。このワクチンが乳児アカゲザルの動物データにおいて免疫原性であることを証明した。

20

【0116】

本発明の組成物の「有効量」は、後の攻撃の間に、微生物、例えば肺炎連鎖球菌の感染の尤度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とされる用量を指す。

【0117】

本発明の方法は、侵襲性感染（髄膜炎、肺炎および菌血症）と非侵襲性感染（急性中耳炎および副鼻腔炎）の両方を含む、微生物、例えば肺炎連鎖球菌によって引き起こされる主要な臨床症候群の予防および / または軽減のために使用できる。

30

【0118】

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；または口道 / 消化管、気道もしくは尿生殖路への粘膜投与のうちの1つ以上を含み得る。一実施形態において、鼻腔内投与は、肺炎または中耳炎の処置に使用される（肺炎球菌の鼻咽頭保菌をより効果的に予防し、それにより、最初期段階で感染を軽減するため）。

【0119】

各ワクチン用量中のコンジュゲートの量は、著しい悪影響なしに免疫防御応答を誘導する量として選択される。かかる量は、肺炎球菌の血清型に応じて異なり得る。一般的に、多糖類をベースとするコンジュゲートについて、各用量は、各多糖を0.1 ~ 100 µg、詳細には0.1 ~ 10 µg、より詳細には1 ~ 5 µg含む。例えば、各用量は、100、150、200、250、300、400、500、または750 ngまたは1、1.5、2、3、4、5、6、7、7.5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、20、22、25、30、40、50、60、70、80、90または100 µgを含み得る。

40

【0120】

特定のワクチンに最適な成分量は、被検体における適切な免疫応答の観察を伴う標準的な試験によって確認することができる。例えば、別の実施形態において、ヒトへのワクチン接種のための投薬量は、動物試験をヒトのデータに外挿することによって決定される。別の実施形態において、この投薬量は経験的に決定される。

【0121】

一実施形態において、アルミニウム塩の用量は、10、15、20、25、30、50

50

、70、100、125、150、200、300、500もしくは700 μg 、または1、1.2、1.5、2、3、5mg以上である。更に別の実施形態において、上記のミヨウバン塩の用量は、組換えタンパク質1 μg 当たりの用量である。

【0122】

本発明のいずれかの方法によれば、かつ、一実施形態において、被検体はヒトである。特定の実施形態において、ヒト被検体は乳児(1歳未満)、幼児(約12~24ヶ月)または小児(約2~5歳)である。他の実施形態において、ヒト被検体は高齢の被検体(例えば、50歳を超えるまたは65歳を超える)である。本発明の組成物はまた、年長児、青年および成人(例えば、18~45歳または18~65歳)での使用にも適している。

【0123】

本発明の方法の一実施形態において、本発明の組成物は単回接種物として投与される。別の実施形態において、ワクチンは、十分に間隔をあけて、2回、3回、4回またはそれ以上投与される。例えば、当該組成物は、1、2、3、4、5もしくは6ヶ月間隔で、またはその任意の組み合わせの間隔で投与することができる。免疫化スケジュールは、肺炎球菌ワクチン用に指定されたものに従ったスケジュールであり得る。例えば、肺炎連鎖球菌によって引き起こされる侵襲性疾患に対する乳児および幼児の常套的なスケジュールは、年齢が2、4、6および12~15ヶ月のときである。したがって、一実施形態において、組成物は、年齢が2、4、6および12~15ヶ月のときに4回シリーズとして投与される。

【0124】

本発明の組成物はまた、肺炎連鎖球菌に由来する1つ以上のタンパク質を含んでいてもよい。含むのに適した肺炎連鎖球菌タンパク質の例としては、国際公開第02/083855号および同第02/053761号に特定されているものが挙げられる。

【0125】

配合物

本発明の組成物は、非経口的、経粘膜的、経皮的、筋肉内、静脈内、皮膚内、鼻内、皮下、腹腔内などの当業者に知られている1つ以上のこと法によって被検体に投与され、それに応じて配合され得る。

【0126】

一実施形態において、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、または気道内粘膜注射により投与される。注射用の液体配合物には溶液などが含まれる。

【0127】

本発明の組成物は、単回投与バイアル、複数回投与バイアルとして、またはプレフィルドシリンジとして配合することができる。

【0128】

別の実施形態において、本発明の組成物は経口投与されるので、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配合される。固体経口配合物としては、錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、ペレット剤などが挙げられる。液体経口配合物としては、液剤、懸濁剤、分散剤、乳剤、油剤などが挙げられる。

【0129】

液体配合物用の薬学的に許容される担体は、水性もしくは非水性溶液、懸濁液、乳濁液または油である。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体としては、水、アルコール/水溶液、乳液または懸濁液、例えば、生理食塩水および緩衝媒体が挙げられる。油の例は、動物性、植物性、または合成起源のもの、例えば、落花生油、大豆油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、別の海産物油、または牛乳もしくは卵からの脂質である。

【0130】

医薬組成物は、等張性、低張性または高張性であり得る。しかしながら、注入または注射用の医薬組成物は、投与時に本質的に等張性であることが好ましい場合が多い。したが

10

20

30

40

50

つて、保存のために、医薬組成物は、好ましくは等張性または高張性であり得る。医薬組成物が保存のために高張性である場合、投与前に等張液になるように希釈するのがよい。

【0131】

等張剤は、塩などのイオン性等張剤であっても、炭水化物などの非イオン性等張剤であつてもよい。イオン性等張化剤の例としては、NaCl、CaCl₂、KClおよびMgCl₂が挙げられるが、これらに限定されない。非イオン性等張化剤の例としては、マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールが挙げられるが、これらに限定されない。

【0132】

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また好ましい。いくつかの目的のために、例えば、医薬組成物が注入または注射用である場合、この組成物はバッファーを含むことがしばしば望ましく、このバッファーは溶液を処理してpH4~10、例えば5~9(6~8など)にすることができる。

10

【0133】

バッファーは、例えば、TRIS、酢酸塩、グルタミン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸塩、グリシン酸塩、ヒスチジン、グリシン、コハク酸塩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してもよい。

【0134】

更に、バッファーは、例えば、特に医薬配合物が非経口使用のためのものである場合、非経口使用のためのUSP適合バッファーから選択してもよい。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得る。

20

【0135】

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、リングルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リングル液および不揮発性油が含まれる。静脈内ビヒクルには、液体および栄養補給剤、リングルデキストロースをベースとするものなどの電解質補給剤などが含まれる。例は、界面活性剤および他の薬学的に許容されるアジュvantを添加したまたは添加していない、水や油などの無菌液体である。一般に、水、生理食塩水、水性デキストロースおよび関連する糖溶液、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコール、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)が好ましい液体担体であり、特に注射液用である。油の例は、動物性、植物性、または合成起源のもの、例えば、落花生油、大豆油、オリーブ油、ヒマワリ油、魚肝油、別の海産物油、または牛乳もしくは卵からの脂質である。

30

【0136】

本発明の配合物はまた界面活性剤を含有し得る。界面活性剤としては、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と呼ばれる)、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、例えば線状EO/POプロックコポリマー；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)基の数が異なり、オクトキシノール-9(トリトンX-100、またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)が特に興味深い；(オクチルフェノキシ)ポリエトキシエタノール(IGEPAL CA-630/NP-40)；ホスファチジルコリン(レシチン)などのリン脂質；Tergitol(商標)NPシリーズなどのノニルフェノールエトキシレート；トリエチレングリコールモノラウリルエーテル(Brij 30)のようなラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコール(Brij界面活性剤として知られる)から誘導されたポリオキシエチレン脂肪族エーテル；およびソルビantanトリオレエート(Span 85)およびソルビantanモノ

40

50

ラウレートのようなソルビタンエステル（一般にSPANとして知られている）が挙げられるが、これらに限定されない。乳剤に包含させるのに好ましい界面活性剤はPS-80である。

【0137】

PS-80／スパン85混合物などの界面活性剤の混合物を使用することができる。ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（PS-80）のようなポリオキシエチレンソルビタンエステルと、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール（Triiton X-100）のようなオクトキシノールの組み合わせも適している。別の有用な組み合わせは、ラウレス9と、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とを含む。

10

【0138】

界面活性剤の好ましい量（重量%）は以下の通りである：ポリオキシエチレンソルビタンエステル（例えばPS-80）0.01～1%、特に約0.1%。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（トリトンX-100、またはトリトンシリーズの他の洗剤など）0.001～0.1%、特に0.005～0.02%。ポリオキシエチレンエーテル（例えばラウレス9）0.1～20%、好ましくは0.1～10%、特に0.1～1%または約0.5%。

【0139】

特定の実施形態において、組成物は、ヒスチジン（20mM）、生理食塩水（150mM）、およびpH5.8の0.02%PS-20または0.04%PS-80と、250μg/mLのAPA（リン酸アルミニウムアジュvant）とから本質的になる。PS-20は、模擬製造中および一次包装を使用した出荷中の配合制御凝集においてPS-20またはPS-80の存在下で0.005%～0.1%（w/v）の範囲であり得る。プロセスは、ヒスチジン、生理食塩水、およびPS-20またはPS-80中の最大24の血清型のブレンドを組み合わせ、次いで抗菌防腐剤を用いてまたは用いずにこのブレンド材料をAPAおよび生理食塩水と組み合わせることからなる。

20

【0140】

界面活性剤の選択は、異なる医薬品および原薬に対して最適化する必要があり得る。15種以上の血清型を有する多価ワクチンについては、PS-20およびP188が好ましい。コンジュゲートを製造するために使用される化学の選択もまた配合物の安定化において重要な役割を果たし得る。特に、多価組成物中の異なる多糖タンパク質コンジュゲートを調製するために使用されるコンジュゲーション反応が水性溶媒およびDMSO溶媒の両方を含む場合、特定の界面活性剤系が安定性に有意な差をもたらすことを見出した。ポリソルベートタンパク質コンジュゲートの改善された安定性は、ポリソルベート20単独で、またはポリオールと組み合わせたポロキサマー188で見られた。

30

【0141】

特定の洗剤がどのように生物学的薬物を保護するかの正確なメカニズムはよく分かっておらず、先駆的に予測することはできない。可能な安定化メカニズムには、優先的水和、優先的排除、生物学的薬物と表面との間の空気／液体界面の競合、表面張力、および／または凝集の種として働く疎水性パッチを隠すための生物学的薬剤との界面活性剤の直接会合が含まれる。

40

【0142】

ポロキサマーも本発明の組成物に使用することができる。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つの親水性鎖が隣接したポリオキシプロピレン（ポリ（プロピレンオキシド））の中央疎水性鎖から構成される非イオン性トリプロックコポリマーである。ポロキサマーは、商品名Pluronnic（登録商標）としても知られている。ポリマープロックの長さをカスタマイズすることができるので、わずかに異なる特性を有する多くの異なるポロキサマーが存在する。一般用語「ポロキサマー」について、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）とそれに続く3桁の数字で表記され、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

50

その分子質量を示す。最後の桁の数字 × 10 はポリオキシエチレン含有量のパーセンテージを示す（例えば、P 4 0 7 = 4, 000 g / mol のポリオキシプロピレン分子質量および 70 % ポリオキシエチレン含有量を有するポロキサマー）。商品名 Pluronic (登録商標) の場合、これらのコポリマーのコーディングは、室温でのその物理的形態を定義するための文字 (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。数値表示の最初の桁の数字 (3 桁の数字のうちの 2 桁の数字) に 300 を掛けたものが、疎水性物質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パーセンテージを示す（例えば、L 6 1 = 1, 800 g / mol のポリオキシプロピレン分子質量および 10 % ポリオキシエチレン含有量を有する Pluronic (登録商標)）。米国特許第 3 7 4 0 4 2 1 号を参照のこと。

10

【0143】

ポロキサマーの例は、以下の一般式を有する：



式中、a ブロックおよび b ブロックは以下の値を有する：

Pluronic (登録商標) ポロキサマー a b 分子量

L 3 1 2 1 6 1 1 0 0 (平均)

L 3 5 1 9 0 0 (平均)

L 4 4 N F 1 2 4 1 2 2 0 2 0 9 0 ~ 2 3 6 0

L 6 4 2 9 0 0 (平均)

L 8 1 2 8 0 0 (平均)

20

L 1 2 1 4 4 0 0 (平均)

P 1 2 3 2 0 7 0 5 7 5 0 (平均)

F 6 8 N F 1 8 8 8 0 2 7 7 6 8 0 ~ 9 5 1 0

F 8 7 N F 2 3 7 6 4 3 7 6 8 4 0 ~ 8 8 3 0

F 1 0 8 N F 3 3 8 1 4 1 4 4 1 2 7 0 0 ~ 1 7 4 0 0

F 1 2 7 N F 4 0 7 1 0 1 5 6 9 8 4 0 ~ 1 4 6 0 0

本明細書で使用される場合、分子量単位はダルトン (Da) または g / mol である。

【0144】

好ましくは、ポロキサマーは一般に、1100 ~ 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 から選択することができる。配合物中のポロキサマーの終濃度は、0.001 % ~ 5 % 重量 / 容量、または 0.025 % ~ 1 % 重量 / 容量である。特定の態様において、ポリオールはプロピレングリコールであり、1 % ~ 20 % 重量 / 容量の終濃度である。特定の態様において、ポリオールはポリエチレングリコール 400 であり、1 % ~ 20 % 重量 / 容量の終濃度である。

30

【0145】

本発明の配合物に適したポリオールは、ポリマーポリオール、特に、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルを含むがこれらに限定されないポリエーテルジオールである。プロピレングリコールは、~425 から ~2700 までのモノマー分子量範囲で入手可能である。ポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコールモノメチルエーテルもまた、PEG 200、PEG 300、PEG 400、PEG 1000、PEG MME 550、PEG MME 600、PEG MME 2000、PEG MME 3350 および PEG MME 4000 を含む（がこれらに限定されない）~200 から ~35000 までの範囲の分子量範囲で入手可能である。好ましいポリエチレングリコールはポリエチレングリコール 400 である。本発明の配合物中のポリオールの終濃度は、1 % ~ 20 % 重量 / 容量または 6 % ~ 20 % 重量 / 容量であってもよい。

40

【0146】

配合物はまた、pH 緩衝生理食塩水を含有する。バッファーは、例えば、TRIS、酢酸塩、グルタミン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、炭酸

50

塩、グリシン酸塩、ヒスチジン、グリシン、コハク酸塩、H E P E S (4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸) 、 M O P S (3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸) 、 M E S (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してもよい。バッファーは、溶液を処理して 4 ~ 1 0 、 5 . 2 ~ 7 . 5 、または 5 . 8 ~ 7 . 0 の範囲の pH にことができる。本発明のある態様において、バッファーは、リン酸塩、コハク酸塩、ヒスチジン、M E S 、 M O P S 、 H E P E S 、酢酸塩またはクエン酸塩からなる群から選択される。更に、バッファーは、例えば、特に医薬配合物が非経口用である場合、非経口用途のための U S P 適合バッファーから選択してもよい。バッファーの濃度は、 1 m M ~ 5 0 m M または 5 m M ~ 5 0 m M 範囲であろう。特定の態様において、バッファーは、終濃度が 5 m M ~ 5 0 m M ヒスチジン、または終濃度が 1 m M ~ 1 0 m M コハク酸塩である。特定の態様において、ヒスチジンは終濃度が 2 0 m M ± 2 m M である。

【 0 1 4 7 】

生理食塩水（すなわち、 N a C l を含有する溶液）が好ましいが、配合物に適した他の塩には、 C a C l ₂ 、 K C l および M g C l ₂ 、ならびにそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。ショ糖、トレハロース、マンニトール、ソルビトールおよびグリセロールを含むがこれらに限定されない非イオン性等張化剤を塩の代わりに使用することができる。適切な塩の範囲としては、 2 5 m M ~ 5 0 0 m M または 4 0 m M ~ 1 7 0 m M が挙げられるが、これらに限定されない。1つの態様において、生理食塩水は N a C l であり、 2 0 m M ~ 1 7 0 m M 濃度で存在してもよい。

【 0 1 4 8 】

一実施形態において、配合物は塩化ナトリウムを含む L - ヒスチジンバッファーを含む。

【 0 1 4 9 】

本明細書に記載の配合物の特定実施形態において、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させた 1 つ以上の肺炎球菌多糖を含む。担体タンパク質は、 C R M ₁ ₉ ₇ 、ジフテリア毒素断片 B (D T F B) 、 D T F B C 8 、ジフテリアトキソイド (D T) 、破傷風トキソイド (T T) 、 T T の断片 C 、百日咳トキソイド、コレラトキソイド、大腸菌 L T 、大腸菌 S T 、緑膿菌由来の外毒素 A 、およびそれらの組み合わせから選択することができる。1つの態様において、全ての多糖 - タンパク質コンジュゲートは水溶性化学 (c h e m i s t r y) を用いて調製される。別の態様において、1つ以上の多糖タンパク質コンジュゲートは、 D M S O 溶媒を用いて調製される。一例として、多糖 - タンパク質コンジュゲート配合物は、血清型 6 A 、 6 B 、 7 F 、 1 8 C 、 1 9 A 、 1 9 F および 2 3 F に由来する多糖タンパク質コンジュゲートが D M S O 溶媒を用いて調製され、血清型 1 、 3 、 4 、 5 、 9 V 、 1 4 、 2 2 F および 3 3 F に由来する多糖タンパク質コンジュゲートが水性溶媒を用いて調製される 1 5 倍肺炎球菌コンジュゲート (1 5 v P n C) 配合物であり得る。

【 0 1 5 0 】

別の実施形態において、医薬組成物は徐放系で送達される。例えば、薬剤は、静脈内注入、経皮パッチ、リポソームまたは他の投与様式を用いて投与することができる。別の実施形態において、ポリマー材料は、例えばミクロスフェア中またはインプラント中で使用される。

【 0 1 5 1 】

本発明の組成物はまた、肺炎連鎖球菌に由来する 1 つ以上のタンパク質を含んでいてよい。含むのに適した肺炎連鎖球菌タンパク質の例としては、国際公開第 0 2 / 0 8 3 8 5 5 号および同第 0 2 / 0 5 3 7 6 1 号に特定されているものが挙げられる。

【 0 1 5 2 】

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

【0153】

以下の実施例が例証されるが、本発明を限定するものではない。

【0154】

[実施例]

実施例1：肺炎連鎖球菌莢膜多糖の調製

肺炎球菌の培養方法は当技術分野において周知である。例えば、Chase, 1967, Methods of Immunology and Immunochimistry 1: 52 を参照のこと。肺炎球菌莢膜多糖の調製方法もまた当該分野で周知である。例えば、欧州特許第0497524号を参照のこと。肺炎球菌サブタイプの分離菌は、アメリカ培養細胞系統保存機関（バージニア州マナッサス）から入手可能である。当該細菌は、莢膜を有し、非運動性であり、グラム陽性であり、ランセット形状の双球菌（血液塞天上で - 溶血性である）として同定される。サブタイプは、特異的抗血清を用いたQuellung反応に基づいて識別することができる。例えば、米国特許第5,847,112号を参照のこと。

10

【0155】

存在する各肺炎連鎖球菌血清型を表す細胞バンクを、Merck Culture Collection (ニュージャージー州ローウェー) から凍結バイアルにて入手した。解凍した種培養物を、肺炎連鎖球菌に適切な予備滅菌した増殖媒体を入れた種発酵槽に移した。培養物を温度およびpH制御しながら種発酵槽中で増殖させた。種発酵槽の全容量を、予備滅菌した増殖媒体を入れた生産発酵槽に移した。生産発酵は、プロセスの最後の細胞増殖段階であった。温度、pHおよび攪拌速度を制御した。

20

【0156】

不活化剤の添加により発酵プロセスを終了させた。不活化後、バッチを不活化タンクに移し、制御された温度および攪拌下で保持した。遠心分離と濾過の組み合わせを用いて細胞残屑を除去した。バッチを限外濾過および透析濾過した。次いで、バッチを溶媒での分別に供し、これによって不純物を除去し、多糖を回収した。

【0157】

実施例2：水溶液中の還元アミノ化を用いた血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33FのCRM197へのコンジュゲーション

30

異なる多糖血清型を、一般的なプロセスフローを用いて、精製CRM197担体タンパク質に個々にコンジュゲートさせる。多糖を溶解させ、サイズ縮小させ、化学的に活性化させ、限外濾過によってバッファー交換する。次いで、精製CRM197を、反応混合物中のNiCl₂ (2 mM) を利用して活性化多糖にコンジュゲートさせ、得られたコンジュゲートを、限外濾過によって精製した後、0.2ミクロンフィルターで最終濾過した。pH、温度、濃度および時間などの各工程内のいくつかのプロセスパラメータは、以下の章では血清型特異的な値に制御される。

【0158】

多糖のサイズ縮小および酸化

精製した肺炎球菌莢膜多糖粉末を水に溶解し、血清型19Aを除く全ての血清型を0.45ミクロンフィルターで濾過した。血清型19Aを除く全ての血清型を均質化して多糖の分子質量を減少させた。血清型19Aは、その開始サイズが比較的小さいので、サイズ縮小させなかった。血清型特異的分子質量を達成するために、均質化圧力およびホモジナイザーを通過する回数を、血清型特異的目標値 (150 ~ 1000 bar; 4 ~ 7回通過) に制御した。サイズ縮小させた多糖を0.2ミクロンフィルターで濾過し、次いで濃縮し、10kDaのNMWC接線流限外濾過膜を使用して水に対して透析濾過した。

40

【0159】

次に、多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで血清型特異的温度 (4 ~ 22) およびpH (4 ~ 5) に調整して、活性化による多糖のサイズ減少を最小限に抑えた。全ての血清型（血清型4を除く）について、100mMメタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液を添加して

50

多糖活性化を開始した。添加したメタ過ヨウ素酸ナトリウムの量は、血清型特異的であり、多糖反復単位 1 モル当たりメタ過ヨウ素酸ナトリウム約 0.1 ~ 0.5 モルの範囲であった。メタ過ヨウ素酸ナトリウムの血清型特異的電荷は、目標レベルの多糖活性化を達成することであった（多糖反復単位 1 モル当たりのアルデヒドのモル数）。血清型 4 については、メタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加する前に、バッヂを約 50 および pH 4.1 でインキュベートして多糖を部分的に脱ケタール化した。

【0160】

血清型 5 および 7 F を除く全ての血清型について、活性化生成物を、10 kDa の 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) に対して透析濾過した。血清型 5 および 7 F を 10 mM 酢酸ナトリウムに対して透析濾過した。全ての血清型についての限外濾過は、2 ~ 8 で行われた。
10

【0161】

CRM₁₉₇への多糖のコンジュゲーション

酸化した多糖溶液を、血清型に応じて、水および 1.5 M リン酸カリウム (pH 6.0 または pH 7.0) と混合した。選択したバッファーの pH は、コンジュゲーション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。前述のように（国際公開第 2012 / 173876 号）、シードモナス・フルオレッセンスでの発現により得られた精製 CRM₁₉₇ を 0.2 ミクロンフィルターで濾過し、血清型に応じて 0.4 ~ 1.0 w/w の範囲の多糖対 CRM₁₉₇ 質量比で緩衝多糖溶液と組み合わせた。得られたコンジュゲートにおける多糖対 CRM₁₉₇ 比を制御するために質量比を選択した。多糖濃度およびリン酸濃度は、血清型特異的であり、血清型に応じてそれぞれ 3.6 ~ 10.0 g/L および 100 ~ 150 mM 範囲であった。得られたコンジュゲートのサイズを制御するべく、血清型特異的多糖濃度を選択した。次いで、溶液を 0.2 ミクロンフィルターで濾過した。100 mM 塩化ニッケル溶液を用い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）を添加した。コンジュゲーションを血清型特異的期間（72 ~ 120 時間）進行させて、多糖およびタンパク質の消費を最大にした。
20

【0162】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲーション反応後、バッヂを約 3.5 g/L の多糖濃度まで希釈し、2 ~ 8 に冷却し、1.2 ミクロンフィルターで濾過した。全ての血清型（血清型 5 を除く）を、100 kDa の NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 2 ~ 8 で 100 mM リン酸カリウム (pH 7.0) に対して透析濾過した。次いで、保持液中に回収されたバッヂを、約 2.0 g 多糖 / L まで希釈し、1.2 M 重炭酸ナトリウム (pH 9.4) の添加により pH 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）を添加した。1.5 M リン酸カリウム (pH 6.0) を後で加えた。100 kDa の NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、血清型 5 を 300 mM リン酸カリウムに対して透析濾過した。
30

【0163】

最終濾過および製品保存

次に、バッヂを濃縮し、300 kDa の NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して 4 で 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中 10 mM L-ヒスチジンに対して透析濾過した。保持液バッヂを 0.2 ミクロンフィルターで濾過した。
40

【0164】

血清型 19 F コンジュゲートを 22 で約 7 日間インキュベートし、100 kDa の NMWCO 接線流限外濾過膜を使用して、4 で 150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中 10 mM L-ヒスチジンに対して透析濾過し、0.2 ミクロンフィルターで濾過した。

【0165】

バッヂを、150 mM 塩化ナトリウム (pH 7.0) 中の更なる 10 mM L-ヒスチジンを用いて、1.0 g/L の多糖濃度に調整した。バッヂをアリコートに分注し、-60 で凍結した。
50

【0166】

実施例3：ジメチルスルホキシド中の還元アミノ化を用いた血清型3、4、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33FのCRM₁₉₇へのコンジュゲーション方法

異なる多糖血清型3、4、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F、23Fおよび33Fを、一般的なプロセスフローを用いて、精製CRM₁₉₇担体タンパク質に個々にコンジュゲートさせる。多糖を溶解させ、目標とする分子質量にサイジングし、化学的に活性化させ、限外濾過によってバッファー交換する。活性化多糖および精製CRM₁₉₇を個々に凍結乾燥させ、ジメチルスルホキシド(DMSO)に再溶解させた。次いで、再溶解した多糖溶液およびCRM₁₉₇溶液を下記のように組み合わせてコンジュゲートさせた。得られたコンジュゲートを限外濾過によって精製し、その後、0.2ミクロンフィルターで最終濾過を行った。pH、温度、濃度および時間などの各工程内のいくつかのプロセスパラメータは、以下の章では血清型特異的な値に制御される。

【0167】**多糖のサイズ縮小および酸化**

精製した肺炎球菌莢膜Ps粉末を水に溶解し、血清型19Aを除く全ての血清型を0.45ミクロンフィルターで濾過した。血清型18Cおよび19Aを除く全ての血清型を均質化してPsの分子質量を減少させた。均質化圧力およびホモジナイザーを通過する回数は、血清型特異的目標値(150~1000bar; 4~7回の通過)に制御された。血清型18Cは、90以上での酸加水分解によりサイズ縮小された。

【0168】

サイズ縮小させた多糖を0.2ミクロンフィルターで濾過し、次いで濃縮し、10kDaのNMWC接線流限外濾過膜を使用して水に対して透析濾過した。5kDaのNMWC膜を血清型18Cのために使用した。

【0169】

次に、多糖溶液を酢酸ナトリウムバッファーで血清型特異的温度(4~22)およびpH(4~5)に調整して、活性化による多糖のサイズ減少を最小限に抑えた。全ての血清型(血清型4を除く)について、100mMメタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液を添加して多糖活性化を開始した。添加したメタ過ヨウ素酸ナトリウムの量は、血清型特異的であり、多糖反復単位1モル当たりメタ過ヨウ素酸ナトリウム約0.1~0.5モルの範囲であった。メタ過ヨウ素酸ナトリウムの血清型特異的電荷は、目標レベルの多糖活性化を達成することであった(多糖反復単位1モル当たりのアルデヒドのモル数)。血清型4については、メタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加する前に、バッチを約50およびpH4.1でインキュベートして多糖を部分的に脱ケタール化した。

【0170】

活性化生成物を、10kDaのNMWC接線流限外濾過膜を使用して10mMリン酸カリウム(pH6.4)に対して透析濾過し、次いで、10kDaのNMWC膜を使用して水に対して透析濾過または透析した。5kDaのNMWC膜を血清型18Cのために使用した。全ての血清型についての限外濾過または透析は、2~8で行われた。

【0171】**CRM₁₉₇への多糖のコンジュゲーション**

以前に記載されたように(国際公開第2012/173876号)、シュードモナス・フルオレッセンスでの発現を通して得られた精製CRM₁₉₇を、5kDaのNMWC接線流限外濾過膜を使用して2~5mMリン酸(pH7.0)バッファーに対して透析濾過し、0.2ミクロンフィルターで濾過した。

【0172】

血清型3以外の血清型については、酸化多糖を水中において6mg Ps/mLおよび5%w/vショ糖(50mgショ糖/mL)で配合した。血清型3については、酸化多糖を水中において2mg Ps/mLおよび10%w/vショ糖(100mgショ糖/mL)で配合した。タンパク質溶液を、リン酸バッファー中において6mg Pr/mLおよ

10

20

30

40

50

び 1 % w / v ショ糖 (1 0 m g ショ糖 / m L) で配合した。

【 0 1 7 3 】

配合した P s および C R M 1 9 7 溶液を個々に凍結乾燥した。凍結乾燥した P s および C R M 1 9 7 材料を D M S O に再溶解し、混合ティーを用いて組み合わせた。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) を添加し、コンジュゲーションを血清型特異的期間 (1 ~ 4 8 時間) 進行させて、目標とするコンジュゲートサイズを達成した。

【 0 1 7 4 】

水素化ホウ素ナトリウムによる還元

コンジュゲーション反応後に、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) を添加した。約 4 で約 0 . 0 2 5 % (w / v) のポリソルベート 2 0 を用いてまたは用いずに、バッヂを 1 5 0 m M 塩化ナトリウム中に希釈した。次に、リン酸カリウムバッファーを加えて pH を中和した。血清型 3 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 9 V 、 1 8 C 、 1 9 A 、 1 9 F 、 2 2 F 、 2 3 F および 3 3 F については、バッヂを濃縮し、3 0 k D a の N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して、約 4 で 2 5 m M リン酸カリウム (pH 7) を用いてまたは用いずに、1 5 0 m M 塩化ナトリウムに対して透析濾過した。

10

【 0 1 7 5 】

最終濾過および製品保存

血清型 3 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 9 V 、 1 8 C 、 1 9 A 、 2 2 F 、 2 3 F および 3 3 F を濃縮し、3 0 0 k D a の N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して、4 で 0 . 0 1 5 % (w / v) ポリソルベート 2 0 を用いてまたは用いずに、1 5 0 m M 塩化ナトリウム (pH 7 . 0) 中 1 0 m M ヒスチジンに対して透析濾過した。保持液バッヂを 0 . 2 ミクロンフィルターで濾過した。

20

【 0 1 7 6 】

血清型 1 9 F を約 5 日間インキュベートし、3 0 0 k D a の N M W C O 接線流限外濾過膜を使用して約 4 で 1 5 0 m M 塩化ナトリウム (pH 7 . 0) 中 1 0 m M ヒスチジンに対して透析濾過し、0 . 2 ミクロンフィルターで濾過した。

【 0 1 7 7 】

血清型 3 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 9 V 、 1 8 C 、 1 9 A 、 1 9 F 、 2 2 F 、 2 3 F および 3 3 F を、1 5 0 m M 塩化ナトリウム (pH 7 . 0) 中の更なる 1 0 m M ヒスチジンで希釈し、アリコートに分注し、- 6 0 で凍結した。

30

【 0 1 7 8 】

血清型 4 および 1 4 を、3 0 0 k D a の N M W C O 膜を使用して、約 4 で 1 5 0 m M 塩化ナトリウムに対して透析し、0 . 2 ミクロンフィルターで濾過し、アリコートに分注し、- 6 0 で凍結した。

【 0 1 7 9 】

実施例 4 : コンジュゲートの分析

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

コンジュゲート試料を注入し、高性能サイズ排除クロマトグラフィー (H P S E C) によって分離した。検出は、直列の紫外線 (U V) 、多角度光散乱 (M A L S) および屈折率 (R I) 検出器を用いて達成された。タンパク質濃度は、吸光係数を用いて U V 2 8 0 から計算した。溶液の屈折率の変化と溶質濃度の変化 (m L / g で報告) である d n / d c 係数を使用して、多糖濃度を R I シグナル (タンパク質と多糖の両方によって寄与) からデコンボリュートした。試料の平均分子量は、全試料ピークにわたる測定濃度および光散乱情報を使用して、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 、カリフォルニア州サンタバーバラ) により計算した。

40

【 0 1 8 0 】

多糖活性化度アッセイ

コンジュゲーションは、活性化アルデヒドと、主に担体タンパク質上のリシン残基との

50

還元的アミノ化によって生じる。多糖反復単位 1 モル当たりのアルデヒドのモル数で表される活性化のレベルは、コンジュゲーション反応を制御するために重要である。活性化度を測定するためのアッセイは、米国特許公開第 2017 / 0021006 号に記載されている。

【 0181 】

アルデヒド基（多糖の過ヨウ素酸塩酸化中に生成される）とチオセミカルバジド（商業的供給源から入手可能）との反応に基づいて活性化度を測定するために内部アッセイを開発した。

【 0182 】

定量化は、NMR（核磁気共鳴）によって、または誘導体化多糖を適切な参照標準と比較することによって、および／または誘導体の吸光係数を使用することによって達成することができる。このアッセイの吸光係数の使用は、HPLC / UV / MALS / RI 法での使用と似ている。

10

【 0183 】

一般に、アッセイは、以下の反応条件下で実行することができる。

【 0184 】

時間：0.5 時間～3.5 時間（これは血清型特異的であるが、反応は完了まで、すなわち時間経過においてプラトーになるまで続けられる）

温度：15～37、好ましくはおよそ 21～27

20

TSC 濃度：1～5 mg / mL

反応の pH：pH 3～5.5、好ましくは 4.0

実施例 4 については、多糖を 1.25～2.5 mg / mL のチオセミカルバジド (TSC) を用いて pH 4.0 で誘導体化して発色団を導入した（血清型 1、5、および 9V 用の活性化多糖の誘導体化は 1.25 mg / mL の TSC を使用）。誘導体化反応をプラトーに達するまで進行させた。実際の時間は、各血清型の反応速度に応じて異なった。次いで、TSC-Ps を、高性能サイズ排除クロマトグラフィーによって TSC および他の低分子量成分から分離した。シグナルは 266 nm の UV 吸光度により検出された。活性化アルデヒドのレベルは、Monoo-TSC の標準曲線注入に対して、または所定の吸光係数を直接用いて計算される。Monoo-TSC は、単糖の合成チオセミカルバゾン誘導体である。次いで、HPLC / UV / MALS / RI アッセイにより測定された Ps 濃度を用いて、アルデヒドレベルを反復単位 1 モル当たりのアルデヒドのモル数 (Ald / RU) に変換する。

30

【 0185 】

誘導体が有意な UV 吸収を有する限り、チオセミカルバジド構造類似体、ヒドラジド、ヒドラジン、セミカルバジド、セミカルバジド構造類似体、アミノオキシ化合物または芳香族アミンを用いて同様の誘導体化を行うことができる。UV 吸光度は、誘導体化剤に結合した発色団、またはチオセミカルバジドの場合のようにアルデヒド誘導体化の結果として生成される発色団からのものであり得る。

【 0186 】

多糖と担体タンパク質との共有結合数の尺度としてのコンジュゲートタンパク質中のリシン消費量の決定

40

Waters AccQ-Tag アミノ酸分析 (AAA) を用いて、コンジュゲート試料中のコンジュゲーションの程度を測定した。担体タンパク質をそれらの成分アミノ酸に分解するために、Edelweiss 分解法（エーデルワイス）で気相酸加水分解を用いて試料を加水分解した。遊離アミノ酸は、6-アミノキノリル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート (AQCN) を用いて誘導体化した。次に、誘導体化した試料を、C18 カラムでの UV 検出を伴う HPLC を使用して分析した。平均タンパク質濃度は、リシン以外の代表的なアミノ酸を用いて得た。コンジュゲーション中のリシン消費量（すなわち、リシン損失）を、コンジュゲート中の平均測定リシン量と出発タンパク質中の予想リシン量との差によって決定した。

50

【 0 1 8 7 】

水溶液中およびD M S O 溶液中の還元的アミノ化を用いて製造したコンジュゲートの属性

実施例 2 および 3 に記載のプロセスを用いて製造したコンジュゲートについての多糖活性化およびリシン消費量（すなわち、リシン損失）の結果を表 1 に列挙する。D M S O 中で製造したコンジュゲート（実施例 3 ）は、水溶液中で製造したコンジュゲート（実施例 2 ）よりも高いリシン消費量を有し、低い多糖活性化を有するという明らかな相違点がある。これは、コンジュゲートを D M S O 溶液中で調製することにより、天然の多糖構造への活性化または破壊を少なくしつつ、多糖が担体タンパク質上のより多くのコンジュゲーション部位に結合するのを可能にすることを示唆する。結果として、水溶液中よりも D M S O 溶液中で調製したコンジュゲートにおける架橋の方がより高いために、このコンジュゲートは、多糖反復単位当たりより多くのグリコペプチドを平均して含有する。グリコペプチドは、免疫応答が生じる抗原性ドメインであると考えられている。結果として、D M S O 中で生成されたコンジュゲートは、水溶液中で生成されたコンジュゲートよりも免疫原性が高いと予想される。

【 0 1 8 8 】

表 1 中のコンジュゲートの平均分子量 (M_w) は、H P S E C U V - M A L S - R I アッセイによって測定された。水溶液中の還元的アミノ化によって生成されたコンジュゲートは 9 9 0 ~ 3 4 1 0 k D a の範囲であった。D M S O 中で生成されたコンジュゲートは、一般により大きく、サイズは 1 3 0 0 ~ 5 8 2 2 k D a の範囲であった。

10

20

30

40

50

【表1】

表1: 水溶液中またはDMSO中の還元的アミノ化を用いて製造した肺炎球菌血清型3、4、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19Fおよび23F-CRM₁₉₇コンジュゲートについてのリシン損失

コンジュゲート	コンジュゲートロット番号	水溶液またはDMSO溶液中のコンジュゲーション反応	多糖活性化(アルギニトのモル数/反復単位のモル数)	リシン損失(mol/molタンパク質)
血清型3-CRM ₁₉₇	1	水性	0.10	3.1
	2		0.10	2.5
	3		0.10	3.1
	4	DMSO	0.092	16.3
	5		0.053	9.6
血清型4-CRM ₁₉₇	1	水性	0.43	2.7
	2	DMSO	0.25	3.0
血清型6A-CRM ₁₉₇	1	水性	0.19	4.5
	2	DMSO	0.11	9.1
血清型6B-CRM ₁₉₇	1	水性	0.18	4.6
	2	DMSO	0.11	9.6
血清型7F-CRM ₁₉₇	1	水性	0.26	2.0
	2	DMSO	0.22	10.6
血清型9V-CRM ₁₉₇	1	水性	0.30	4.7
	2	DMSO	0.15	7.9
血清型14-CRM ₁₉₇	1	水性	0.22	6.4
	2	DMSO	0.22	12.7
血清型18C-CRM ₁₉₇	1	水性	0.12	3.5
	2	DMSO	0.11	9.2
血清型19A-CRM ₁₉₇	1	水性	0.38	4.9
	2	DMSO	0.14	9.5
血清型19F-CRM ₁₉₇	1	水性	0.13	2.7
	2	DMSO	0.15	9.6
血清型22F-CRM ₁₉₇	1	水性	0.12	1.7
	2	DMSO	0.15	7.2
	3		0.15	7.0
血清型23F-CRM ₁₉₇	1	水性	0.39	3.2
	2	DMSO	0.19	10.8
血清型33F-CRM ₁₉₇	1	水性	0.23	4.5
	2	DMSO	0.14	7.0

【0189】

CRM₁₉₇上の異なる部位におけるコンジュゲーションの程度の定量化

多糖は、担体タンパク質のN末端のアミン基、またはCRM₁₉₇中の39個のリシン残基の側鎖のいずれかにコンジュゲートさせることができる。CRM₁₉₇のアミノ酸配列は表2に提供されており、この表において、リシン(Kと略記される)には下線を引いて太字で示す。CRM₁₉₇タンパク質上の異なる部位での多糖コンジュゲーションの程度を特定し定量化するために、LC/UV/MSペプチドマッピング法を使用した。代表的なコンジュゲート試料(DMSOまたは水溶液を用いて調製)をトリプシンで二重に消化し、トリプシンペプチドを生成した。次に、混合物を逆相C₁₈カラムで分離し、UVおよび質量分析計で分析した。CRM₁₉₇タンパク質試料(多糖とコンジュゲートしていない)もまた、対照と同時に三重に処理した。トリプシンはリシンおよびアルギニン残基のC末端側のタンパク質を切断するので、リシン残基でのコンジュゲーションはその部位をプロテアーゼ耐性にする。特定の部位でのコンジュゲーションの程度は、CRM₁₉₇対照と比

10

20

30

40

50

較したトリプシンペプチドのピーク強度の減少を計算することによって決定された。切断部位および配列に応じて、特定のペプチドのシグナル減少は、先行するペプチドでのリシンの誤った切断、またはペプチド末端でのリシンの誤った切断、またはペプチド配列の中間でのコンジュゲーションに起因し得る。

【0190】

C R M₁₉₇ 対照と比較した血清型 19A コンジュゲートについてのペプチドシグナル減少の相対パーセンテージを、図 1 の可能なコンジュゲーション部位に対してプロットした。
x 軸に列挙されたリシン位置は、C R M₁₉₇ タンパク質配列上のそれらの順序に基づいて番号付けされ、分析したペプチドの可能なコンジュゲーション部位を表す。例えば、「33」は、ペプチドのシグナルの減少が 33 番目のリシンでのコンジュゲーションに起因するものであったことを意味し、「6, 7」は、ペプチドのシグナルの減少が 6 番目もしくは 7 番目、またはその両方のリシン (lysines) でのコンジュゲーションに起因するものであったことを意味する。図 1 のデータは、水溶液と比較して、DMSO 中で調製されたコンジュゲートについて、各部位におけるコンジュゲーションの程度が一般的に高いだけでなく、DMSO 中のコンジュゲーション部位も多いことを示唆した。それらの異なるコンジュゲーション部位には 29、30、31 および 32 番目のリシンが含まれ、これらは以前に同定された一般的なヒト T 細胞ペプチドエピトープにあるリシンのみであった (Raju et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25: 3207 - 3214 を参照; C R M₁₉₇ 配列のペプチド 411 ~ 430 およびペプチド 431 ~ 450 にある)。試験した他の血清型でも同様の結果が観察された。

【表 2】

表2: CRM₁₉₇ アミノ酸配列

アミノ酸	アミノ酸配列
1-535	GADDVVDS <u>S</u> K SFVMENFSSY HGT <u>K</u> PGYVDS I <u>Q</u> <u>K</u> GI <u>Q</u> <u>K</u> P <u>K</u> S GTQGNYDDDW <u>K</u> EFYSTD <u>N</u> <u>K</u> Y DAAGYSVDNE NPLSG <u>K</u> AGGV V <u>K</u> VTVYPGLT <u>K</u> VLALKVDNAE TI <u>K</u> KELGLSL TEPLMEQVGT EEFI <u>K</u> RFGDG ASRVVVLSPF AEGSSSVEYI NNWEQ <u>A</u> <u>K</u> ALS VELEINFETR G <u>K</u> RGQDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSLS CINLDWDVIR D <u>K</u> T <u>K</u> T <u>K</u> IESTL K <u>E</u> HGP <u>I</u> <u>K</u> N <u>K</u> M SESPN <u>K</u> TVSE E <u>K</u> A <u>K</u> QYLEEF HQTALEHPEL SEL <u>K</u> TVGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLE <u>K</u> T TAALSI <u>L</u> PGI GSVMGIADGA VHHNTTEEEVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGH <u>K</u> TQPFL HDGYAVSWNT VEDSIIRTGF QGESGH <u>D</u> <u>I</u> <u>K</u> I TAENTPLPIA GVLLPTIP <u>G</u> <u>K</u> LDVN <u>K</u> S <u>K</u> THI SVNGR <u>K</u> IRMR CRAIDGDVT <u>F</u> CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSS <u>E</u> <u>K</u> IH SNEISSDSIG VLGY <u>Q</u> <u>K</u> TVDH T <u>K</u> VNS <u>K</u> LSLF FEI <u>K</u> S (SEQ ID NO: 1)

【0191】

実施例 5：水溶液中で調製した血清型 3Ps - C R M₁₉₇ コンジュゲートと、DMSO 中で調製した血清型 3Ps - C R M₁₉₇ コンジュゲートとを比較するマウス免疫原性試験

全ての動物実験は、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針の勧告に従つて厳密に行われた。プロトコールは、ペンシルベニア州ウェストポイントにある MRL の動物実験委員会 (IACUC) によって承認された。

【0192】

8 週齢のメス CD1 マウスを、ペンシルベニア州ウェストポイントにある MRL の動物施設のマイクロアイソレータケージ (n = 10 / ケージ) に収容した。食物と水は自由に摂取可能であった。マウス (n = 10 / 群) を、表 3 に記載されるようにリン酸アルミニウムアジュvant (APA) を用いて配合した ST3 - C R M₁₉₇ コンジュゲート (0.4 μg の ST3 多糖) で筋肉内 (IM) 免疫化した。陰性対照動物には APA のみを与えた。免疫化を 0 日目、14 日目および 28 日目に行った。6 日目および 34 日目に、血液

10

20

30

40

50

を尾静脈を介して血清分離チューブ（B D、ニュージャージー州フランクリンレイクス）内に採取した。

【表 3】

表 3: 水溶液中で調製した血清型 3Ps-CRM₁₉₇ コンジュゲートと、DMSO 溶液
中で調製した血清型 3Ps-CRM₁₉₇ コンジュゲートとを比較するマウス試験群

群番号	群	コンジュゲートの説明	配合物の説明
1	APA	対照、コンジュゲート未使用	250 μg/mL の APA、 20mM L-ヒスチジン (pH5.8) および 150mM NaCl と、 0.2%w/v の PS-20
2	ST3-CRM ₁₉₇ (水性)/APA	実施例 2 に記載されている ような水溶液中での還元的 アミノ化によって調製した 一価 ST3-CRM ₁₉₇ コンジ ュゲート(表 1 中のロット 番号 1)	0.4 μg の ST3-CRM ₁₉₇ 、 250 μg/mL の APA、 20mM L-ヒスチジン (pH5.8) および 150mM NaCl と、 0.2%w/v の PS-20
3	ST3- CRM ₁₉₇ (DMSO)/APA	実施例 3 に記載されている ような DMSO 中での還元 的アミノ化によって調製し た一価 ST3-CRM ₁₉₇ コン ジュゲート(表 1 中のロッ ト番号 4)	0.4 μg の ST3-CRM ₁₉₇ 、 250 μg/mL の APA、 20mM L-ヒスチジン (pH5.8) および 150mM NaCl と、 0.2%w/v の PS-20

【0193】

電気化学発光 (ECL) 免疫原性アッセイ

マウス抗体応答は、96 ウェルマルチプレックス電気化学発光アッセイにおいて、わずかな修正を加えて以前に記載されたように測定した。Marchese et al., 2009, Clin Vaccine Immunol 16(3): 387-96; Skinner et al., 2011, Vaccine 29(48): 8870-6 および Caro-Aguilar et al., 2017 Vaccine 35(6): 865-72 を参照のこと。簡潔には、Meso-Scale Discovery プレート (Meso Scale Diagnostics、メリーランド州ロックビル) 上で 1 時間試験血清インキュベーションを行い、洗浄した後、25 μl の 2 μg/ml Sulfo-tag (Meso Scale Diagnostics、メリーランド州ロックビル) 標識ヤギ抗マウス IgG を各ウェルに加えた。プレートを振盪しながら室温で 1 時間インキュベートし、次いで前述のように処理し、MESO Sector S600 で読み取った。

【0194】

カットオフ値（所定の陽性対照プールマウス血清の肺炎球菌多糖 ECL 幾何平均シグナル）に対応する線形補間した希釈の逆数として ECL 力価を計算した。ECL の対数目盛および希釈を用いて補間を行った。次いで、線形補間した希釈を逆変換することによって力価を得た。カットオフラインを完全に上回る試料曲線についての最後 3 つの ECL データ点の切片および勾配を用いた、または、カットオフラインを完全に下回る試料曲線についての最初 2 つの ECL データ点の切片および勾配を用いた線形外挿（対数 - 対数目盛）に基づいて、試験希釈範囲 100 ~ 1, 562, 500 から外れる試料について力価を外挿した。次いで、線形外挿した希釈を逆変換することによって力価を得た。

【0195】

オプソニン食作用性死滅アッセイ (OPA)

肺炎球菌血清型 3 のオプソニン食作用性死滅アッセイ (OPA) を、わずかな修正を加えて以前に記載されたように行った (Caro-Aguilar et al., 2017 Vaccine 35(6): 865-72 および Burton et al., 2006

10

20

30

40

50

, Clin Vaccine Immunol 13(9):1004-9)。血清、細菌、補体およびHL-60細胞のインキュベーション後、 $10\mu l$ のオプソニン食作用性反応物を $200\mu l$ / ウェルの滅菌水を含有するMilliporeの96ウェルフィルタープレート上の個々のウェルに移した。プレートを真空濾過し、 $100\mu l$ のTodd Hewett酵母抽出物(THYE、Teknova)プロスを添加した。媒体を濾過し、湿ったプレートを密封したプラスチックバッグに27度一晩置いた。次いで、プレートフィルターを $100\mu l$ / ウェルの0.1%クマシーブルー溶液(Bio-Rad、カリфорニア州ハーキュリーズ)で染色した。染色物をプレートを通して濾過し、コロニーをクマシー脱色溶液(Bio-Rad)で脱色し、乾燥するまで再度真空濾過した。染色した細菌コロニーをCTL Immuno spotリーダー(オハイオ州シェーカーハイツ)で計数した。OPK力価は、補体対照(無血清対照)ウェルにおける平均増殖と比較した、少なくとも50%の死滅を伴う血清希釈の逆数として定義され、そのシグナルが50%の死滅を示す(bracket)連続した希釈の間を線形補間することによって計算した。

【0196】

免疫化前および3回目の投与後の結果を、ECL免疫原性については図2および表4に、OPAについては図3に示す。水溶液およびDMSO溶液を使用するプロセスによって調製した両方のコンジュゲートは免疫原性であり、細菌に対して機能的な死滅活性を提供する。興味深いことに、DMSO溶液を使用するプロセスによって調製したコンジュゲートは、水溶液を使用して調製したコンジュゲートよりもECL免疫原性およびOPA応答の両方が高かった。ECL免疫原性の差は統計学的に有意である。群2に対する群3のGMT比は3.41である(95%信頼区間の下限値および上限値はそれぞれ1.26および9.26)。

【表4】

表4: 水溶液中で調製した血清型3Ps-CRM₁₉₇コンジュゲートと、DMSO溶液中で調製した血清型3Ps-CRM₁₉₇コンジュゲートとを比較する、マウス試験群の3回目の投与後のECL免疫原性の結果

群番号	群	幾何平均力価(GMT)	95%信頼区間の下限	95%信頼区間の上限
1	APA	368	227	596
2	ST3-CRM ₁₉₇ (水性)/APA	355,207	187,905	671,466
3	ST3-CRM ₁₉₇ (DMSO)/APA	1,211,654	719,297	2,041,028

【0197】

実施例6: 水溶液中で還元アミノ化を用いて調製した肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲートと、DMSO中で還元アミノ化を用いて調製した肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲートとを比較した成人の免疫原性試験

本実施例では、50歳以上の健康な肺炎球菌ワクチン未接種成人における2つの15価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV15)の免疫原性および安全性について説明する。

【0198】

試験設計

健康な50歳以上の成人被検体(基礎慢性疾患があれば、それが安定した状態にあることを文書に記す必要がある)において、2種類の異なるPCV15配合物(PCV15-AおよびPCV15-B)とPrevnar 13(商標)(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社の子会社であるWy

10

20

30

40

50

eth Pharmaceuticals社(米国ペンシルベニア州フィラデルフィア)の単回投与の安全性、忍容性および免疫原性を比較するために、無作為化多施設二重盲検試験を、Good Clinical Practicesに準拠して実施した。

【0199】

50歳以上の合計690人の健康な肺炎球菌ワクチン未接種者を登録し、3つの異なるワクチン接種群: Prevnar 13(商標)、PCV15-AおよびPCV15-Bに1:1:1の比で無作為に分けた。無作為化を、試験参加時の年齢(50~64歳、65~74歳、および75歳以上)で層別化した。

【0200】

PCV15は、CRM197にコンジュゲートさせた2 μ g/0.5mL用量の以下の各血清型(1, 3, 4, 5, 6A, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F, 33F)の肺炎球菌多糖、CRM197にコンジュゲートさせた4 μ g/0.5mL用量の血清型6Bの肺炎球菌多糖、125 μ g/0.5mL用量のリン酸アルミニウムアジュvant、20mM L-ヒスチジン、150mM塩化ナトリウム(pH 5.8)を含有していた。PCV15-Aは0.2%w/vのP188を用いて配合した。PCV15-Bは0.1%w/vのPS-20を用いて配合した。

10

【0201】

PCV15-Aについては、15種の多糖血清型(1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23Fおよび33F)全てを、実施例2に記載の水溶液中での還元的アミノ化を用いてCRM197にコンジュゲートさせた。これらのコンジュゲート(コンジュゲートロット番号1の材料)のいくつかについての属性を表1に列挙する。

20

【0202】

PCV15-B、血清型6A、6B、7F、18C、19A、19Fおよび23Fを、実施例3に記載のDMSO中での還元的アミノ化を用いてCRM197にコンジュゲートさせた。これらのコンジュゲート(コンジュゲートロット番号2の材料)の属性を表1に列挙する。残りの血清型(1, 3, 4, 5, 9V, 14, 22Fおよび33F)のコンジュゲートは、PCV15-Aで使用されたものと同じコンジュゲートである。

【0203】

両方のPCV15配合物は、累積安全性評価(データは示さず)に基づいて、一般にPrevnar 13(商標)と同等の安全性プロファイルを有していた。血清型特異的IgGのGMCおよびOPAのGMTを30日目に測定した。(OPAの結果は含まれていない)。

30

【0204】

結果

IgG幾何平均濃度(GMC)および信頼区間(CI)を表6に要約する。PCV15-AおよびPCV15-B中の血清型6A、6B、7F、18C、19A、19Fおよび23Fコンジュゲートを、上記のように異なるコンジュゲーションプロセスを用いて製造した。表4に示される結果と一致して、表6に示される各血清型についての免疫原性応答は、多糖血清型がDMSO中でCRM197にコンジュゲートさせたときに改善された。PCV15-B中の血清型18C、19A、19Fおよび23FのGMCは、PCV15-A中のものよりも有意に高かった(両側 $=0.05$)。これらのデータは、免疫原性を改善するためにDMSO中でコンジュゲートさせる利点を強く実証している。この発見は、肺炎球菌ワクチンまたは他のコンジュゲートワクチンについてはこれまで実証されていない。

40

【表 5】

表 6: 血清型6A、6B、7F、18C、19A、19Fおよび23FについてのPCV15-AおよびPCV15-B配合物のIgG抗体応答のまとめ。これらの血清型のコンジュゲートは、水溶液中での還元的アミノ化(PCV15-A)を用いて、またはDMSO中での還元的アミノ化(PCV15-B)によって製造した。

血清型	PCV15-A (N = 231), GMC [†] (30日目)		PCV15-B (N = 231), GMC [†] (30日目)		推定GMC比 [PCV15-B / PCV15-A] [†]
	n	推定応答	n	推定応答	
6A	217	3.74	217	4.93	1.32 (0.96, 1.81)
6B	217	3.69	217	4.95	1.34 (0.98, 1.85)
7F	217	4.09	217	4.53	1.11 (0.86, 1.43)
18C	217	6.61	217	10.99	1.66 (1.27, 2.18)
19A	217	8.77	217	13.83	1.58 (1.23, 2.02)
19F	217	4.11	217	6.80	1.66 (1.26, 2.17)
23F	217	3.92	217	5.53	1.41 (1.04, 1.91)

[†] 推定GMC、GMC比および95%CIは、cLDAモデルから取得されている。

N = 無作為化され、ワクチン接種を受けた被験者数

n = 分析に寄与するワクチン接種後30日目の血清学的結果を有する被験者数

GMC = 幾何平均濃度

CI = 信頼区間

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

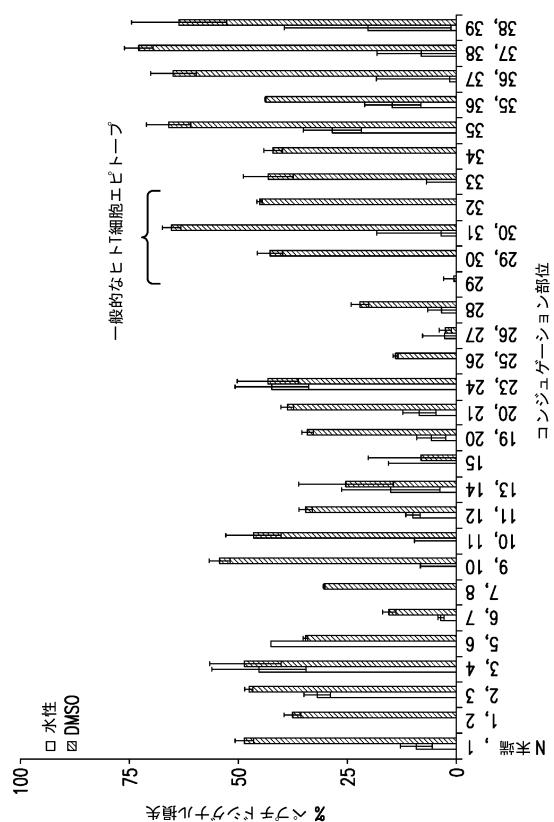


FIG.1

【図 2】

□ APA (Pre)
 ▨ APA (PD3)
 ▨ ST3-CRM197 (水性)/APA (Pre)
 ▨ ST3-CRM197 (水性)/APA (PD3)
 ▨ ST3-CRM197(DMSO)/APA (Pre)
 ▨ ST3-CRM197(DMSO)/APA (PD3)

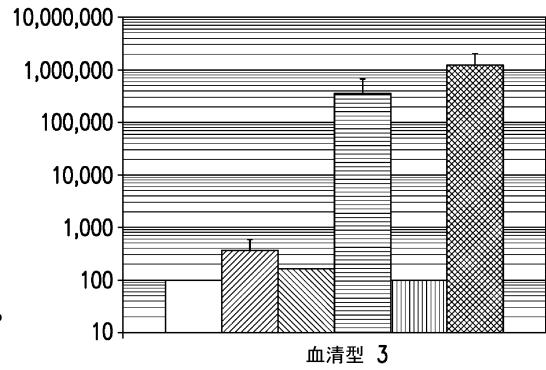


FIG.2

【図 3】

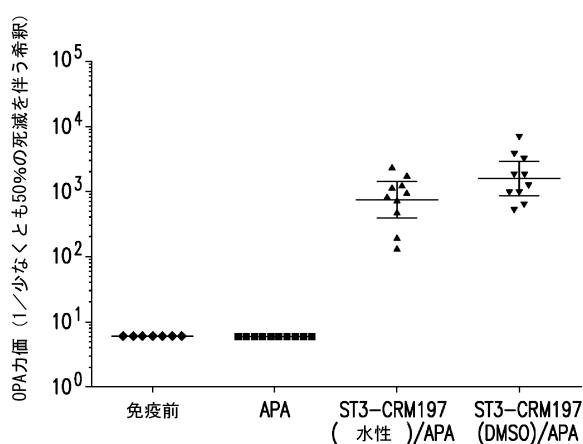


FIG.3

【配列表】

0007680185000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 62/555,444

(32)優先日 平成29年9月7日(2017.9.7)

(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 川寄 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 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(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 スミス , ウィリアム · ジェー

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 ジョイス , ジョセフ · ジー

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 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 プージャー , ハリ

アメリカ合衆国、 19312 · ペンシルバニア、 バーウィン、 ドラル・サークル · 527

(72)発明者 ランカスター , キャサリン

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 マクネア , ジョン · イー

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 ウィンターズ , マイケル · エー

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 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

(72)発明者 ウェン , エミリー
アメリカ合衆国、19486・ペンシルバニア、ウェスト・ポイント、サムニータウン・パイク・
770

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

(72)発明者 ウィリアムズ , ジョン・マイケル
アメリカ合衆国、08844・ニュージャージー、ヒルズボロ、マクメイナス・ドライブ・8

合議体

審判長 松波 由美子

審判官 富永 みどり

審判官 田村 直寛

(56)参考文献 国際公開第15/110941号(WO, A1)
特表2010-513559号公報(JP, A)
国際公開第15/110941号(WO, A1)
特表2010-513559号公報(JP, A)
特表2017-509656号公報(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)
A61K
MEDLINE/CAplus/BIOSIS/EMBASE(STN)