

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-508416

(P2004-508416A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/09	A 6 1 K 39/09	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁)		

(21) 出願番号	特願2002-526416 (P2002-526416)	(71) 出願人	595136380 グラクソスミスクライン・バイオロジカル ス・ソシエテ・アノニム GLAXOSMITHKLINE BIO LOGICALS S. A. ベルギー国ペー-1330リクセンザルト 、リュ・デュ・ランスティテュート89番
(86) (22) 出願日	平成13年9月12日 (2001. 9. 12)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稔
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月12日 (2003. 3. 12)	(74) 代理人	100086405 弁理士 河宮 治
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/010568	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開番号	W02002/022167		
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002. 3. 21)		
(31) 優先権主張番号	0022742.1		
(32) 優先日	平成12年9月15日 (2000. 9. 15)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ワクチン

(57) 【要約】

本発明は細菌性多糖体抗原ワクチンの分野に関する。特に、本発明は、肺炎球菌多糖体抗原、典型的には、P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0およびS p 1 3 3から成る群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニ由来の肺炎球菌および、所望によりT h 1誘導アジュバントを含むワクチンに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体抗原と、P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択される少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗原またはその免疫学的機能等価物とを含んで成る免疫原性組成物。

【請求項 2】

多糖体抗原が多糖体蛋白担体接合物の形態で提供される請求項 1 記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

担体蛋白がジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、C R M 1 9 7、キーホール・リンペットヘモシアニン (K L H)、ツベルクリンの蛋白誘導体および H . インフルエンザ由来の蛋白 D から成る群から選択される請求項 2 記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

ワクチンが少なくとも4つの別の血清型由来の肺炎球菌多糖体抗原を含む請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

さらにアジュバントを含む前記請求項に記載の化合物。

【請求項 6】

アジュバントがアルミニウム塩を含む請求項 5 記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

アジュバントが T H 1 応答の優先的誘導物質である請求項 5 記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

アジュバントが少なくとも1つの 3 D - M P L、サポニン免疫活性化剤または免疫活性化 C p G オリゴヌクレオチドを含む請求項 7 記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

アジュバントが水中油型エマルジョン、リポソームおよびアルミニウム塩から成る群から選択される担体を含む請求項 8 記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

医薬として用いる前記請求項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 の免疫原性組成物を含んで成るワクチン。

【請求項 12】

5 5 歳を超える患者におけるストレプトコッカス・ニューモニエ感染症の防止または改善方法であって、有効量の、ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体および P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択される少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白、および任意に T H 1 誘発アジュバントを含むワクチンを投与することを特徴とする方法。

【請求項 13】

5 5 歳を超える患者における肺炎の予防または治療のための医薬の製造における、肺炎球菌多糖体抗原の P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗原、および任意の T H 1 誘発アジュバントとの組み合わせにおけるの使用。

【請求項 14】

幼児または小児の中耳炎の予防または治療のための医薬の製造における、肺炎球菌多糖体抗原の P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗原、および任意の T H 1 誘発アジ

10

20

30

40

50

ュバントとの組み合わせにおけるの使用。

【請求項 15】

1つまたはそれ以上の肺炎球菌多糖体抗原（複数でも可）を選択する工程；
 1つまたはそれ以上の P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、
 L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3
 3 から成る群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白を選択する工程；お
 よび
 上記多糖体および蛋白抗原を適当な賦形剤と混合する工程；
 を含む前記請求項記載の免疫原性組成物の製造方法。

【請求項 16】

幼児における中耳炎の防止または改善方法であって、安全かつ有効な量の、ストレプトコ
 ッカス・ニューモニエ多糖体抗原および P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p
 s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3
 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗
 体と、任意に T H 1 アジュバントと共に含むワクチンを幼児に投与することを特徴とする
 方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

（技術分野）

本発明は細菌性多糖体抗原ワクチン、その製造および該多糖体の医薬における使用に關す
 る。

特に、本発明は肺炎球菌多糖体抗原、典型的には、ストレプトコッカス・ニューモニエ（
S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e）由来の蛋白抗原および、所望によ
 り T h 1 誘導アジュバントと共に処方される、肺炎球菌多糖体接合抗原を含むワクチンに
 關する。

【0002】

（従来技術）

ストレプトコッカス・ニューモニエは、（特に若者および老人において）深刻な罹患率お
 よび死亡率の原因となっているグラム陽性菌であり、肺炎、菌血症および髄膜炎のような
 侵襲性疾患や、急性中耳炎のようにコロニー形成に付随する疾患を引き起こしている。米
 国での 60 歳を超える人々における肺炎球菌性肺炎の感染率は、10 万人あたり 3 ~ 8 人
 と概算されている。これらのケースの 20 % では、菌血症および髄膜炎のような症状に至
 り、抗生物質治療を用いているにも関わらず死亡率は 30 % に近い。

肺炎球菌は、化学結合した多糖体の莢膜に入れられており、この多糖体が血清特異性を決
 定している。肺炎球菌には 90 種の血清型が知られており、その莢膜が肺炎球菌の主要な
 病原性決定因子となっている。というのも、その莢膜は補体から細菌の内面を守るだけで
 なく、それ自体が殆ど免疫原性を持っていないからである。多糖体は T 細胞非依存性抗原
 であるで、M H C 分子上で T 細胞と相互作用するように抗原処理や抗原提示され得ない。
 しかしながら、多糖体は B 細胞上の表面レセプターの架橋に関わる別の機構を通して、免
 疫系を刺激し得る。

侵襲性肺炎球菌による疾患の防御は、莢膜に特異的な抗原と最も強い相関関係があり、血
 清型に特異的であることがいくつかの実験により示されている。

【0003】

多糖体抗原を用いるワクチンは当該分野でよく知られている。ヒトへの使用を認可されて
 いる 4 つのものとして、サルモネラ・チフィ（*S a l m o n e l l a t y p h i*）の V
 i 多糖体、ヘモフィルス・インフルエンザ（*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z
 a e*）由来の P R P 多糖体、血清型 A、C、W 1 3 5 および Y から成る 4 価髄膜炎菌ワク
 チン、ならびに血清型 1、2、3、4、5、6 B、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11
 A、12 F、14、15 B、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F お
 よび 33 に対応する多糖体から成る 23 価肺炎球菌ワクチン（少なくとも 90 % の肺炎球

10

20

30

40

50

菌を単離することによる)が挙げられる。

【0004】

後者の3つのワクチンは、幼児における深刻な罹患率および死亡率を与える気道感染症を引き起こす細菌から保護するが、これらのワクチンは2歳未満の小児においては、この年齢のグループにおける免疫原性が不完全であるために、その使用が認可されていない [Peltoolaら、(1984), *N. Engl. J. Med.* 310:1561-1566]。ストレプトコッカス・ニューモニエは幼児および小児における侵襲性細菌疾患および中耳炎の最も一般的な原因である。同様に、高齢者は肺炎球菌ワクチンに対する応答が乏しくなっており [Roghmannら、(1987), *J. Gerontol.* 42:265-270]、したがって、この人々において細菌性肺炎の罹患率が増加する [Verghese and Berk, (1983) *Medicine (Baltimore)* 62:271-285]。

10

【0005】

幼児において、この免疫原性の欠損を解決するよう考えられた方法は、多糖体類をラージ免疫原性蛋白に結合させることを含むものである。その蛋白は、バスタンダー細胞である、T細胞の助けを与え、結合されている多糖体抗原に対する免疫学的記憶を誘導する。肺炎球菌糖蛋白接合ワクチンは、現在、種々の年齢層において、安全性、免疫原性および有効性に関して評価されている。

23価の非結合肺炎球菌ワクチンは0%~81%という広く多様な範囲で臨床的有効性を示した (Fedsonら、(1994) *Arch Intern Med.* 154:2531-2535)。その有効性は年配のホジキン病、脾臓摘出、鎌状赤血球、無ガンマグロブリン血症のような、免疫処理されるべき、危険性のあるグループと関連しているようであり (Fineら、(1994) *Arch Intern Med.* 154:2666-2677)、更にはその患者の徴候にも関わっているように見える。その23価のワクチンは(高齢者のようなあるハイリスクグループには)肺炎球菌性肺炎や中耳炎に対する防御を示さない。

20

したがって、改良肺炎球菌ワクチン組成物、特に高齢者および幼児における肺炎球菌疾患(特に肺炎)の防止または改善により効果的であるだろう改良肺炎球菌ワクチン組成物が必要とされている。

本発明は該改良ワクチンを提供する。

30

【0006】

(発明の開示)

本発明は、少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体抗原(好ましくは、蛋白担体に結合したもの)およびポリヒスチジントライアドファミリー (Ph t; 例えば、Ph t A、Ph t B、Ph t DまたはPh t E)、Ly tファミリー(例えば、Ly t A、Ly t BまたはLy t C)、Sp s A、Sp 128、Sp 130、Sp 125、Sp 101およびSp 133から成る群から選択される少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗原、またはその末端切断物もしくは免疫学的機能等価物を、所望によりTh 1アジュバント(優先Th 1免疫応答を含むアジュバント)と共に含むワクチン組成物を提供する。好ましくは、肺炎球菌蛋白およびTh 1アジュバントの両方を含む。また、上記した本発明の肺炎球菌蛋白を互いに、および他の肺炎球菌と組み合わせて含む有利な組成物も記載する。本発明の組成物は、特に高齢者の肺炎の治療に適している。

40

【0007】

肺炎球菌多糖体ワクチン(結合または非結合)は、肺炎の罹患率が非常に高い高齢者の人々における肺炎に対して保護することができない。肺炎球菌に対する主要な防御機構はオプソニン食菌作用(体液性B細胞/肺炎球菌多糖体に対する抗体の産生により引き起こされる好中球媒介事象、細菌が最終的に食菌される)であるが、オプソニン機構のいくつかの部分、すなわち、PMN(多形核球細胞)、による過酸化産物産生、他の活性酸素種産生、PMNの起動、PMNのアポトーシス、PMNの変形性は高齢者において十分に機能を

50

果たさない。また、抗体も高齢者において十分に機能を果たすことができない。

【0008】

通常受け入れられている定説とは反対に、正常なレベルの抗莢膜多糖体抗体は、肺炎球菌が宿主細胞に侵襲し免疫系のブランチを避けることができるので、細菌の完全なクリアランスに効果的でない。

意外にも、本発明は、免疫系の体液性ブランチ（B細胞媒介）に加えて免疫系の細胞媒介ブランチ（例えば、T細胞媒介免疫性）を同時に刺激することによる、相互作用（または共同作用）により、宿主細胞からの肺炎球菌のクリアランスを増強させることができることを見出した。これは、一般的に肺炎球菌感染症の予防（または治療）を補助するであろうことの知見であるが、多糖体を用いるワクチンが効果を示さない高齢者における肺炎の予防（または治療）に関して特に重要であるだろう。

10

【0009】

理論に縛られることなく、本発明者らは、肺炎球菌多糖体（好ましくは、蛋白担体に結合したものを）を P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3（感染哺乳類細胞の表面上のクラスIIおよびMHCクラスIに関連して、処理し、与えることができる蛋白）から成る群から選択される肺炎球菌蛋白と共に投与する場合、免疫系の両方の機構がかくのごとく相互作用を与えることを見出した。1つまたはそれ以上のこれらの肺炎球菌蛋白はそれ自体細胞媒介免疫性を誘発できるが、本発明者らは、ワクチン処方中のT h 1含有アジュバントの存在がこの免疫系の機構を補助し、意外にも両方の免疫系の機構間の相互作用を増強させることも見出した。

20

【0010】

（発明を実施するための最良の形態）

本発明は、特に高齢者（および/または幼児および小児）の肺炎球菌感染症の防止または改善のための改良ワクチンを提供する。

本発明に関連して、患者が55歳以上、典型的には60歳を超える、より一般的には65歳を超える年齢である場合、高齢者とみなす。

かくして、本発明の一の具体例において、高齢者（および/または幼児および小児）における使用に適した、少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体抗原およびP h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 and S p 1 3 3 P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択される少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗原（複数でも可）を含むワクチン組成物を提供する。ワクチンは、所望によりT h 1アジュバントを含んでいてもよい。

30

【0011】

好ましい第2の具体例において、本発明は、少なくとも1つ（2、3、4、5、6、7、8、9または10）のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体抗原（複数でも可）およびP h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択される少なくとも1つのストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗原および好ましくはT h 1アジュバントを含むワクチン（高齢者における肺炎の予防に適当な）を提供する。

40

【0012】

上記具体例において、有利には本発明の上記した肺炎球菌蛋白を互いに、および他の肺炎球菌蛋白と組み合わせて含むワクチンも以下に記載するように想定する。

また、ワクチンは幼児または小児のような他の高い危険性のある人々の群における肺炎球菌感染症（例えば、中耳炎）の治療においても有用であることが想定される。

【0013】

本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体抗原

典型的には、本発明のストレプトコッカス・ニューモニエワクチンは多糖体抗原（好まし

50

くは、担体蛋白に結合したものを)を含み、ここに多糖体は少なくとも4つの肺炎球菌の血清型から誘導される。好ましくは、4つの血清型は、6B、14、19Fおよび23Fを含む。より好ましくは、少なくとも7つの血清型、例えば血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23F由来のものが組成物に含まれる。さらにより好ましくは、少なくとも11の血清型が組成物に含まれ、例えば一的具体例における組成物は、1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fおよび23F(好ましくは、担体蛋白に結合したもの)由来の莢膜多糖体を含む。本発明の好ましい具体例において、さらに多糖体抗原、例えば23価(例えば抗原型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23Fおよび33F)も本発明により考えられるが、少なくとも13の多糖体抗原(好ましくは、担体蛋白に結合したもの)が含まれる。

10

【0014】

高齢者のワクチン接種(例えば、肺炎の予防)に関しては、血清型8および12F(および最も好ましくはさらに15および22)を上記の11価の抗原性組成物に含み、15価ワクチンを形成することが有利であるのに対して、幼児または小児(中耳炎の不安がある)に関しては、有利には抗原型血清型6Aおよび19Aが13価ワクチンを形成するために含まれる。

上記多糖体は全長、天然の形態で用いることができるが、また免疫原性がある大きさを減少させた多糖体も用いることができることは理解されるだろう(例えば、EP497524および497525)。

20

【0015】

高齢者(+55歳)の人々の肺炎および幼児(18ヶ月まで)ならびに小児(典型的には18ヶ月~5歳)の中耳炎の予防/改善に関して、上記のような多価ストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体とPh t A、Ph t D、Ph t B、Ph t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0およびS p 1 3 3から成る群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白またはその免疫学的機能等価物とを組み合わせることが本発明の好ましい具体例である。また、肺炎球菌蛋白の組み合わせも以下に記載のように有利に利用できる。

【0016】

本発明の肺炎球菌蛋白

本発明の目的に関して、「免疫学的機能等価物」を本発明の蛋白由来の少なくとも1つの防御エピトープを含む蛋白のペプチドとして定義する。該エピトープは、特徴的には、表面が露出し、高保存性であり、宿主細胞の殺菌性抗体応答を誘発するか、または毒性作用を防止することができる。好ましくは、機能等価物は本発明の蛋白由来の少なくとも15個および好ましくは30個またはそれ以上の連続したアミノ酸を有する。最も好ましくは、蛋白のフラグメント、欠失、例えばその膜貫通型欠失変異体(すなわち、蛋白の細胞外ドメインの使用)、融合、化学的または遺伝学的脱毒性誘導體等を用いることができるが、ただし天然の蛋白と同様の免疫応答を実質的に惹起させることができることが条件である。蛋白配列における可能性あるB細胞エピトープの位置は、表面が露出し、抗原性であるペプチドを、2つの方法:2D構造予測および抗原指標予測を組み合わせ用いて同定することにより容易に決定できる。2D構造予測はP S I P R E Dプログラム(D a v i d J o n e s , B r u n e l B i o i n f o r m a t i c s G r o u p , D e p t . B i o l o g i c a l S c i e n c e s , B r u n e l U n i v e r s i t y , U x b r i d g e U B 8 3 P H , U Kから入手)を用いて行うことができる。抗原性指標はJ a m e s o nおよびW o l f (C A B I O S 4 : 1 8 1 - 1 8 6 [1 9 8 8])により記載された方法に基づいて計算できる。

30

40

【0017】

本発明の蛋白は以下の蛋白、肺炎球菌の外部表面に曝された全てのもの(肺炎球菌の生活環の少なくとも一部の間宿主の免疫系により認識され得るもの)または肺炎球菌により分泌されるか、または放出される蛋白である。

50

本発明のストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白は、好ましくはポリヒスチジントリアッドファミリー (P h t) 由来の蛋白、L y tファミリー由来の蛋白、コリン結合蛋白、L P X T Fモチーフ (Xはいずれかのアミノ酸)、L X X C (Xはいずれかのアミノ酸) タイプI Iシグナル配列モチーフを有する蛋白およびタイプIシグナル配列モチーフを有する蛋白から成る群から選択される。これらのカテゴリー (またはモチーフ) の中の好ましい例は、以下の蛋白 (またはその末端切断物もしくは免疫学的機能等価物) である :

【0018】

P h t (ポリヒスチジントリアッド) ファミリーはP h t A、P h t B、P h t D、P h t E蛋白を含む。このファミリーは、脂質化配列、プロリンに富む領域と金属またはヌクレオシドとの結合または酵素活性に関与している可能性のあるいくつかのヒスチジントリアッドにより分けられる二つのドメイン、(3-5) 超らせん領域、保存されたN末端と異種C末端により特徴付けられている。これは検査された肺炎球菌の全ての系で存在した。同種の蛋白が、他の肺炎球菌とナイセリア属で発見された。このファミリーの好ましいメンバーはP h t A、P h t B、P h t Dを含む。より好ましくはP h t A、P h t Dを含む。しかしながら、P h t A、B、D、Eなる語は、下記の引用文献に開示されている配列を有する蛋白、ならびに対象となる蛋白と少なくとも90%同一である配列相同性を有するその天然に存在する (および人工的な) 変異体をいう、と解釈される。好ましくは少なくとも95%同一、最も好ましくは97%同一である。

10

P h t蛋白に関して、P h t AはW O 9 8 / 1 8 9 3 0に開示されており、S p 3 6とも言う。上記したように、これはポリヒスチジントリアッドファミリー由来の蛋白で、L X X CのタイプI Iシグナルモチーフを有する。

20

【0019】

P h t DはW O 0 0 / 3 7 1 0 5に開示されており、S p 0 3 6 Dとも言う。上記したように、これもまたポリヒスチジントリアッドファミリー由来の蛋白で、L X X CのタイプI Iシグナルモチーフを有する。

P h t BはW O 0 0 / 3 7 1 0 5に開示されており、S p 0 3 6 Bとも言う。P h t Bファミリーのもう一つのメンバーはC 3 - 分解ポリペプチドであり、W O 0 0 / 1 7 3 7 0に開示されている。この蛋白もまたポリヒスチジントリアッドファミリー由来で、L X X CのタイプI Iシグナルモチーフを有する。好ましい免疫学的機能等価物は、W O 9 8 / 1 8 9 3 0に開示されているS p 4 2蛋白である。P h t B末端切断物 (おおよそ79 k D) はW O 9 9 / 1 5 6 7 5に開示されており、P h t Xファミリーのメンバーであると考えられる。

30

P h t EはW O 0 0 / 3 0 2 9 9に開示されており、B V H - 3とも言う。

S p s AはW O 9 8 / 3 9 4 5 0に開示されているコリン結合蛋白 (C b p) である。

【0020】

L y tファミリーは細胞溶解と関連する細胞膜結合蛋白である。N末端ドメインはコリン結合ドメインを含む。しかしながら、L y tファミリーは、下記のコリン結合蛋白ファミリー (C b p) ファミリーにおいて見られる特徴をもっておらず、したがって本発明に関して、L y tファミリーはC b pファミリーと異なると考えられる。C b pファミリーとは対照的に、C末端ドメインはL y t蛋白ファミリーの触媒ドメインを含む。このファミリーはL y t A、BおよびCを含む。L y tファミリーに関して、L y t AはR o n d aら、E u r J B i o c h e m , 1 6 4 : 6 2 1 - 6 2 4 (1 9 8 7) において開示されている。L y t BはW O 9 8 / 1 8 9 3 0に開示されており、S p 4 6とも言う。L y t CもまたW O 9 8 / 1 8 9 3 0に開示されており、S p 9 1とも言う。ファミリーの好ましいメンバーはL y t Cである。

40

【0021】

もう一つの好ましい具体例は、L y t末端切断物であり、「L y t」とは上記したとおりであり、「末端切断物」とはコリン結合領域の50%またはそれ以上を欠く蛋白のことである。好ましくはそのような蛋白は全てのコリン結合領域を欠く。

S p 1 2 5はL P X T G (Xはいずれかのアミノ酸) の細胞壁固定モチーフを有する肺炎

50

球菌表面蛋白の一例である。このモチーフを有する肺炎球菌表面蛋白のこの種の蛋白は全て、本発明の状況において有用であることが判り、そのため本発明の付加的な蛋白と見なされる。Sp125自体はWO98/18930に開示されており、ZmpB - 亜鉛金属プロテイナーゼとして知られている。

Sp101はWO98/06734 (整理番号y85993)に開示されている。これはタイプIシグナル配列によって特徴付けられる。

Sp133はWO98/06734 (整理番号y85992)に開示されている。これもまたはタイプIシグナル配列によって特徴付けられる。

Sp128およびSp130はWO00/76540に開示されている。

本発明において用いられる蛋白は、好ましくは、Ph t DおよびPh t A群、またはこれらの両方の蛋白の組合せから選択される。 10

【0022】

本発明の1つまたはそれ以上の肺炎球菌蛋白と他の肺炎球菌蛋白との有利な組合せ
本発明のワクチンにおいて、本発明の各々の上記した蛋白(好ましくは、Ph t DおよびPh t Aのいずれかまたは両方)もまた1つまたはそれ以上の下記リスト:ニューモリシン(また、Pl yとも称される;好ましくは、化学処理または変異により弱体化させる)[WO96/05859、WO90/06951、WO99/03884]、P s a Aおよびその膜貫通型欠失変異体(Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64(12): 5255-62)、P s p Aおよびその膜貫通型欠失変異体(米国特許第5804193号、WO92/14488、WO99/53940)、
P s p その膜貫通型欠失変異体(WO97/09994、WO99/53940)、コリン結合蛋白(C b p)ファミリーの一員[例えば、C b p Aおよびその膜貫通型欠失変異体(WO97/41151; WO99/51266)]、グリセルアルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ(Infect. Immun. 1996 64: 3544)、H S O 7 0 (WO96/40928)、P c p A (Sanchez - Beat oら、F E M S Microbiol Lett 1998, 164: 207-14)、M様蛋白(S B特許出願番号E P 0 8 3 7 1 3 0)および付着因子18627(S B特許出願番号E P 0 8 3 4 5 6 8)由来の蛋白と有利に組み合わせることができる。また、本発明は該蛋白(上記のような)の免疫学的機能等価物または末端切断物も含む。 20

【0023】

コリン結合蛋白ファミリーに関して、このファミリーのメンバーは、コリンアフィニティクロマトグラフィーによって精製されることができた肺炎球菌蛋白として初めて同定された。コリン結合蛋白は全て、細胞壁のタイコ酸および細胞膜結合リポタイコ酸のホスホリルコリン部分と共有結合していない。構造的にこれらは、蛋白の正確な性質(アミノ酸配列、長さなど)は多様であるが、全てのファミリーに共通したいくつかの領域を有している。一般的に、コリン結合蛋白は、N末端領域、保存反復領域(R1および/またはR2)、プロリンに富む領域(P)、複数の反復配列で形成されており、この蛋白のおよそ二分の一を構成する保存コリン結合領域(C)を含む。本願明細書において使用されている「コリン結合蛋白ファミリー(C b p)」なる語は、WO97/41151で同定されているコリン結合蛋白であるP b c A、S p s A、P s p C、C b p A、C b p D、C b p Gからなる群より選択される。C b p AはWO97/41151に開示されている。C b p DとC b p GはWO00/29434に開示されている。P s p CはWO97/09994に開示されている。P b c AはWO98/21337に開示されている。好ましくは、コリン結合蛋白はC b p A、P b c A、S p s A、P s p Cからなる群より選択される。 40

【0024】

C b pが利用できるさらなる蛋白である場合、これはC b p末端切断物であってもよく、ここに「C b p」は上記と同意義であり、「末端切断物」はコリン結合領域(C)の50%またはそれ以上が欠失している蛋白を意味する。好ましくは、該蛋白は完全なコリン結合領域が欠失している。より好ましくは、該末端切断蛋白は(i)コリン結合領域および 50

(i i) 蛋白のN末端の半分の一部を欠失しているが、少なくとも一つの反復領域を保持する (R 1 または R 2)。さらにより好ましくは、末端切断物は2つの反復領域を有する (R 1 と R 2)。該好ましい具体例は、W O 9 9 / 5 1 2 6 6 または W O 9 9 / 5 1 1 8 8 に記載のように N R 1 x R 2 および R 1 x R 2 であるが、類似のコリン結合領域が欠失している他のコリン結合蛋白もまた、本発明の範囲内に含まれる。

【 0 0 2 5 】

また、C b p 末端切断物 - L y t 末端切断物キメラ蛋白 (または融合蛋白) も本発明のワクチンに用いることができる。好ましくは、これは C b p の N R 1 x R 2 (または R 1 x R 2) および L y t (例えば、L y t C C 末端または S p 9 1 C 末端) の C 末端部 (C 末端、すなわちコリン結合領域が欠失している) を含む。より好ましくは、C b p は C b p A、P b c A、S p s A および P s p C から成る群から選択される。さらにより好ましくは C b p A である。好ましくは、L y t は L y t C (S p 9 1 とも言う) である。

コリン結合領域 (C) が欠失しており、L y t との融合蛋白として発現される P s p A または P s a A 末端切断物も用いることができる。好ましくは、L y t は L y t C である。

【 0 0 2 6 】

本発明の目的の肺炎球菌蛋白の好ましい組合せ

好ましくは、本発明の蛋白の組合せは、2 またはそれ以上 (3 または 4) の異なるカテゴリー、例えば L X X C (X はいずれかのアミノ酸、例えばポリヒスチジントライアドファミリー (P h t)) のタイプ I I シグナル配列モチーフ、コリン結合蛋白 (C b p)、タイプ I シグナル配列モチーフ (例えば、S p 1 0 1) を有する蛋白、L P X T G モチーフ (X はいずれかのアミノ酸、例えば S p 1 2 8、S p 1 3 0) を有する蛋白、毒素 (例えば P l y) 等から選択される。これらのカテゴリー (またはモチーフ) の中の好ましい例は、上記した蛋白、またはその免疫学的機能等価物である。毒素 + P h t、毒素 + C b p、P h t + C b p および 毒素 + P h t + C b p が好ましいカテゴリーの組合わせである。

【 0 0 2 7 】

好ましい有利な組合せは、限定するものではないが、P h t D + N R 1 x R 2、P h t D + N R 1 x R 2 - S p 9 1 C 末端キメラまたは融合蛋白、P h t D + P l y、P h t D + S p 1 2 8、P h t D + P s a A、P h t D + P s p A、P h t A + N R 1 x R 2、P h t A + N R 1 x R 2 - S p 9 1 C 末端キメラまたは融合蛋白、P h t A + P l y、P h t A + S p 1 2 8、P h t A + P s a A、P h t A + P s p A、N R 1 x R 2 + L y t C、N R 1 x R 2 + P s p A、N R 1 x R 2 + P s a A、N R 1 x R 2 + S p 1 2 8、R 1 x R 2 + L y t C、R 1 x R 2 + P s p A、R 1 x R 2 + P s a A、R 1 x R 2 + S p 1 2 8、R 1 x R 2 + P h t D、R 1 x R 2 + P h t A を含む。好ましくは、N R 1 x R 2 (または R 1 x R 2) は C b p A または P s p C 由来である。より好ましくは、C b p A 由来である。

肺炎球菌蛋白の特に好ましい組合せは、P l y (またはその末端切断物もしくは免疫学的機能等価物) + P h t D (またはその末端切断物もしくは免疫学的機能等価物) + N R 1 x R 2 (または R 1 x R 2) を含む。好ましくは、N R 1 x R 2 (または R 1 x R 2) は C b p A または P s p C 由来である。より好ましくは、C b p A 由来である。

【 0 0 2 8 】

理論に縛られることなく、組成物中の本発明の肺炎球菌蛋白 (または上記したく見合わせ) は、肺炎球菌による侵襲を阻害するための免疫系の体液性ブランチと協力する、肺炎球菌疾患 - 特に肺炎に対する保護を必要とする - に対する T 細胞媒介応答を誘発すること、およびオプソニン食菌作用を刺激することに役立つ。蛋白抗原を含むことのさらなる利点は、オプソニン食菌作用プロセスに関するさらなる抗原を提示することである。

【 0 0 2 9 】

したがって、本発明の具体例において、少なくとも4の血清型、好ましくは少なくとも7の血清型、より好ましくは少なくとも11の血清型由来の多糖体抗原を含む肺炎球菌多糖体接合ワクチン、および P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B

10

20

30

40

50

、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 (または上記のような肺炎球菌蛋白組合せ) から成る群から選択される少なくとも1つ(好ましくは2、3または4)のストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白を含むストレプトコッカス・ニューモニエワクチンを提供する。好ましくは、蛋白の1つはP h t A (またはその免疫学的機能等価物)である。最も好ましくは、蛋白の1つはP h t D (またはその免疫学的機能等価物)である。

【0030】

上記したように、ワクチン接種への多糖体の用い方に関連した問題は、多糖体それ自体は免疫原性に乏しいという事実である。これを解決するため、多糖体をバスタンダー細胞であるT細胞の助けを付与する蛋白キャリアに結合させてもよい。そのため、本発明で利用される多糖体はそのような蛋白キャリアに結合されていることが好ましい。現在、一般的に多糖体の免疫原性を生むために使われる、そのような蛋白の例として、ジフテリアとテータヌストキソイド(D T、D T C R M 1 9 7、他のD T変異体)、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(K L H)、エヌ・メニンジティディス由来のO M P C、ツボクラリンの精製蛋白誘導体(P P D)が挙げられる。

10

【0031】

肺炎球菌多糖体を用いる免疫原性組成物(またはワクチン)のための他の担体は、ヘモフィルス・インフルエンザ(E P 5 9 4 6 1 0 - B)由来の蛋白D、またはそのフラグメントである。使用に適したフラグメントはヘルパーT細胞エピトープを含むフラグメントである。特に、蛋白Dフラグメントは、好ましくは、蛋白のN末端3分の1を含むであろう。蛋白D担体は、意外にも、多肺炎球菌多糖体抗原が結合しているワクチンにおける担体として有用である。エピトープ抑制は、通常には、同様の担体が各々の多糖体に対して用いられる場合に生じやすい。意外にも、本発明者らは、蛋白Dが、特に、組合せワクチンにおける該エピトープ抑制効果を最小限にするのに適していることを見出した。組合せ中の1つまたはそれ以上の肺炎球菌多糖体は、蛋白D上に有利に結合でき、好ましくはすべての抗原は、該組合せワクチンにおいて蛋白Dに結合している。

20

肺炎球菌多糖体に関するさらに好ましい担体は、肺炎球菌蛋白それ自体(「本発明の肺炎球菌蛋白」の節に上記したような)である。

多糖体は、あらゆる既知の方法(例えば、L i k h i t eによる米国特許第4,372,945号およびA r m o rらによる米国特許第4,474,757号)によって、キャリア蛋白に結合させることができる。好ましくは、C D P A結合を行う(W O 9 5 / 0 8 3 4 8)。

30

好ましくは、結合の蛋白:多糖体(重量:重量)比は、0.3:1~1:1、より好ましくは0.6:1~0.8:1および、最も好ましくは約0.7:1である。

本発明のワクチンはアジュバント処理されていることが好ましい。適当なアジュバントは水酸化アルミニウムゲル(ミョウバン)またはリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩を含むが、カルシウム、マグネシウム、鉄または亜鉛の塩であってもよく、またはアシル化されたチロシン、アシル化された糖、陽イオンまたは陰イオンに誘導された多糖体、ポリフォスファゼンの不溶性懸濁液であってもよい。

アジュバントは、免疫応答の細胞媒介ブランチを補助するためにT H 1型反応の優先的誘

40

【0032】

本発明のT H 1アジュバント

高レベルなT h 1型サイトカインは、与えられた抗原に対して細胞性免疫反応の誘発を引き起こす傾向にあるが、高レベルなT H 2型サイトカインは、抗原に対して体液性免疫反応の誘発を引き起こす傾向にある。

T h 1型、T h 2型免疫反応の区別は確固としたものでないことを認識することが重要である。現実には、個人は、優勢的にT h 1であると、または優勢的にT h 2であるとして記載される免疫反応を支持する。しかしながら、M o s m a n nとC o f f m a nにより、ネズミC D 4 + v e T細胞クローンに記載されているサイトカインである点から、サイ

50

トカインファミリーを考察することが好都合であることが多い(Mosmann, T. R および Coffman, R. L (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, 145-173頁)。伝統的に、Th1型反応は、Tリンパ球によるINF- γ とIL-2サイトカインの産生と関連している。Th1型免疫反応の誘発としばしば直接的に関連している、IL-12のような他のサイトカインは、T細胞によって産生されない。対照的に、Th2型反応は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10の分泌と関連している。Th1反応を優勢的に促進する適当なアジュバントは、モノホスホリル脂質Aまたはその誘導体、特に3-デオキシアシル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)(その調製についてのGB2220211Aを参考のこと)、およびモノホスホリル脂質A、好ましくは3-デオキシアシル化モノホスホリル脂質Aと、アルミニウム塩(例えばリン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)または水中油型エマルジョンの一方との組み合わせを包含する。そのような組み合わせにおいては、抗原と3D-MPLは同じ粒状構造物中に含まれ、抗原性シグナルと免疫刺激シグナルのより効率的なデリバリーを可能とする。研究によると、3D-MPLはミョウバン吸着抗原の免疫原性を一層亢進することができる。[Thoenenら、Vaccine(1998)16:708-14; EP689454-B1]

10

【0033】

亢進された系は、モノホスホリル脂質Aとサポニン誘導体の組み合わせ、特にWO94/00153に開示されているようにQS21と3D-MPLの組み合わせ、またはWO96/33739に開示されているようにQS21がコレステロールでクエンチされた小さい反応原性組成物を包含する。

20

水中油型エマルジョン中にQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含む特に効力のあるアジュバントの処方は、WO95/17210に記載されており、好ましい処方である。

好ましくは、ワクチンは付加的にサポニン、より好ましくはQS21を含む。処方または、水中油型エマルジョンとトコフェロールを含む(WO95/17210)。

本発明はまた、本発明の蛋白と3D-MPLのような医薬上許容される賦形剤との混合よりなるワクチンの産生の方法を与える。

30

オリゴヌクレオチドを含む非メチル化CpG(WO96/02555)はまた、TH1反応の優先誘発因子であり、本発明の利用に適している。

【0034】

本発明の特に好ましい組成物は、1つまたはそれ以上の結合肺炎球菌多糖体、1つまたはそれ以上の本発明の肺炎球菌蛋白およびTh1アジュバントを含む。理論に縛られることなく、肺炎球菌蛋白(上記した)による細胞媒介応答の惹起および両免疫系の機構の間の共同作用はTh-1アジュバントを用いて補助することができ、その結果、高齢者における、一般的には肺炎球菌疾患に対して、および重要には、肺炎球菌ニューモニエに対して特に効果的なワクチンを与える。

【0035】

本発明のさらなる態様において、医薬において用いるためのイムノゲンまたは上記したワクチンを提供する。

40

一の実例において、高齢者(+55歳)における肺炎の防止または改善方法であって、安全かつ有効な量の本明細書に記載のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体抗原およびPh t A、Ph t D、Ph t B、Ph t E、S p s A、Ly t B、Ly t C、Ly t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0およびS p 1 3 3から成る群から選択される肺炎球菌蛋白および所望によりTh1アジュバントを含むワクチンを該高齢者に投与することを含む方法を提供する。

さらなる具体例において、幼児(18ヶ月まで)または小児(典型的には18ヶ月~5歳)における中耳炎の防止または改善方法であって、安全かつ有効な量のストレプトコッカ

50

ス・ニューモニエ多糖体抗原および P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 1 2 5、S p 1 0 1、S p 1 2 8、S p 1 3 0 および S p 1 3 3 から成る群から選択されるストレプトコッカス・ニューモニエ蛋白抗原、ならびに所望により T h 1 アジュバントを含むワクチンを該幼児または小児に投与することを含む方法を提供する。

好ましくは、上記したような本明細書の方法において、多糖体抗原は多糖体蛋白接合物として存在する。

【0036】

本発明のワクチンの調製法

本発明のワクチン調製物は、当該ワクチンを全身性または粘膜性経路を介して投与することにより、感染に感受性の哺乳類（好ましくはヒト患者）を保護または治療するために使われる。これらの投与は、筋肉内、腹腔内、皮内または皮下経路を介する注射、経口/食事、呼吸、尿生殖器への粘膜投与を含む。（肺炎球菌の鼻咽頭での運搬はより効果的に妨げられ、そのためその初期段階で感染を減衰できるため）肺炎または中耳炎を治療するのにワクチンを鼻内投与することが好ましい。本発明のワクチンは単回用量として投与されるが、その成分はまた同時に、または違う時に投与することもできる（例えば、肺炎球菌多糖体は、同時に、または互いに関して免疫反応が最も良く協調するワクチンの細菌蛋白成分を投与した後 1 - 2 週間で別個に投与できる）。共投与に関しては、所望による T h 1 アジュバントは、異なる投与のいずれかまたはすべてにおいて存在できるが、ワクチンの細菌蛋白成分との組み合わせで存在することが好ましい。単一の投与経路に加えて、2 つの異なる投与経路を利用してよい。例えば、ウイルス性抗原は I D（皮内）投与され、一方細菌蛋白は I M（筋肉内）または I N（鼻内）投与することができる。多糖体は I M（または I D）投与され、細菌蛋白は I N（または I D）投与することができる。加えて、本発明のワクチンは、初回抗原用量として I M 投与され、追加抗原用量として I N 投与され得る。

10

20

【0037】

各ワクチン中の結合抗原の量は、典型的なワクチン中で有意な副作用がなく免疫防御反応を誘発する量として選ばれる。そのような量は、どの特定の免疫原が利用され、どのように提示されたかによって異なる。一般的には、各々の投与量は、0.1 ~ 100 μ g の多糖体、好ましくは 0.1 ~ 50 μ g、好ましくは 0.1 ~ 10 μ g を含み、1 ~ 5 μ g が

30

最も好ましい範囲であるだろうことが考えられる。ワクチン中の蛋白抗原の含有量は、典型的には 1 ~ 100 μ g、好ましくは 5 ~ 50 μ g、最も典型的には 5 ~ 25 μ g の範囲である。

特定のワクチンの成分の最適量は、対象での適当な免疫反応を観察することを含む標準的な実験で確かめることができる。最初のワクチン接種に続いて、対象は適当に時間を置いて一つまたはいくつかの追加抗原免疫処置を受ける。

ワクチン調製物は一般的に V a c c i n e D e s i g n に記載されている（「The subunit and adjuvant approach」（Power M. F. および Newman M. J. 編）（1995）Plenum Press New York）。リボソーム内での莢膜化は F u l l e r t o n の米国特許第 4, 235, 877 号に記載されている。

40

【0038】

本発明のワクチンはどんな経路でも投与されるが、本発明のワクチンの皮膚への投与（I D）は、本発明の一つの具体例を形成している。ヒトの皮膚は、角質層と呼ばれる、外側の「角質」表皮を含み、それが表皮の表面を覆っている。この表皮の真下が真皮と呼ばれる層で、これが順次皮下組織を覆っている。研究者は、皮膚、特に真皮へのワクチンの注射は免疫反応を刺激し、それは多くの付加的な有利性と関連していることを示している。本明細書に記載のワクチンでの皮内へのワクチン接種は、本発明の好ましい特徴を形成している。

皮内注射の従来技術である「マントー処置」は、皮膚の洗浄、そして一方の手を伸ばし

50

、狭いゲージの針（26 - 31ゲージ）の斜面を上に向けて、10 - 15°の間の角度で針を挿入するという工程を含む。いったん針の斜面が挿入されたら、針の筒は押し下げ、針が皮下に入っていくように小さい圧力を与えつつさらに押し進める。それから液体を極めてゆっくりと注入し、それによって皮膚の表面に小気泡または衝撃を形成させ、続いて針をゆっくりと抜く。

【0039】

さらに最近では、液体作用薬を皮膚中または皮膚を横切って投与するよう特別に設計された装置が記載されており、例えばWO99/34850とEP1092444で記載されている装置や、また例えばWO01/13977、米国特許第5,480,381号、米国特許第5,599,302号、米国特許第5,334,144号、米国特許第5,993,412号、米国特許第5,649,912号、米国特許第5,569,189号、米国特許第5,704,911号、米国特許第5,383,851号、米国特許第5,893,397号、米国特許第5,466,220号、米国特許第5,339,163号、米国特許第5,312,335号、米国特許第5,503,627号、米国特許第5,064,413号、米国特許第5,520,639号、米国特許第4,596,556号、米国特許第4,790,824号、米国特許第4,941,880号、米国特許第4,940,460号、WO97/37705、WO97/13537で記載されているジェット式注射装置である。ワクチン調製物の皮内投与の代替的な方法は、従来のシリンジと針、固形ワクチンの弾道デリバリー（WO99/27961）のために設計された装置、経皮的なパッチ（WO97/48440、WO98/28037）、皮膚の表面への塗布（経皮的デリバリー、WO98/20734、WO98/28037）を含む。

【0040】

本発明のワクチンが皮膚に投与された場合、またはより具体的には真皮に投与された場合、ワクチンは、液体容量が小さく、特に約0.05mlと0.2mlの間の容量である。皮膚にある抗原の含量、または本発明の皮内用ワクチンの含量は、筋肉内ワクチン（上記参照）で見られる従来の用量と類似していてもよい。しかしながら、処方量を「低用量」としうることが皮膚または皮内用ワクチンの特徴である。そのため、好ましくは「低用量」のワクチン中の蛋白抗原は、用量当たり0.1から10µg、好ましくは0.1から5µgとほとんど配合されない。多糖体（好ましくは接合体）抗原は用量当たり多糖体が0.01~1µg、そして好ましくは0.01µgと0.5µgの間の範囲で存在する。本明細書で使用されるように、「皮内デリバリー」なる語は、皮膚の真皮の領域にワクチンをデリバリーすることを意味する。しかしながら、ワクチンは必ずしも真皮に独占的にある必要はない。真皮は、ヒトの皮膚の表面から約1.0mmと約2.0mmの間に位置する皮膚の層であるが、個体によって、および体の異なる部位によってある程度の違いがある。一般的に、皮膚の表面の下1.5mm行くことで真皮に達すると考えられる。真皮は、表面の角質層、表皮と下にある皮下層の間に位置する。デリバリーの形態によって、ワクチンは最終的に単独でまたは優位的に真皮内に位置し、または最終的に表皮と真皮内において分配される。

【0041】

本発明はまた、一連の異なる病原体に対して防御を与える混合ワクチンを意図する。多くの小児ワクチンは、現在、子供が受けねばならない注射の数を減らすために混合型ワクチンとして投与される。かくして、小児用ワクチンの場合、他の病原体由来の他の抗原を本発明のワクチンと共に処方することができる。例えば、本発明のワクチンは、ジフテリアトキソイド（DT）、テタヌストキソイド（TT）、百日咳菌成分[典型的には任意のペルタクチン（PRN）および/または凝集素1+2により無毒化された百日咳菌毒素（PT）と糸状赤血球凝集素（FHA）]を含む、例えばDT、TT、PT、FHAおよびPRN抗原を含む市販ワクチンINFANRIX-DTPa（登録商標）（SmithKlineBeecham Biologicals）などの、周知の3価混合ワクチンと共に、または例えば、Tritanrix（登録商標）SmithKlineBeecham Biologicalsにより市販されているような全細胞百日咳菌ワクチンと共に

に、処方（または別々ではあるが同時に投与）され得る。混合ワクチンはまた、B型肝炎表面抗原（HBsAg）、ポリオウイルス抗原（例えば不活化3価ポリオウイルスであるIPV）、モラクセラ・カタラーリス膜外蛋白、分類不可能な特異的ヘモフィルス・インフルエンザ蛋白、髄膜炎菌B膜外蛋白のような他の抗原も含むことができる。

【0042】

（特に中耳炎の予防の為の）混合ワクチンに配合することができるモラクセラカタラーリス蛋白抗原の好ましい例は、OMP106 [WO 97/41731 (Antex)とWO 96/34960 (PMC)]、OMP21、LbpAおよび、またはLbpB [WO 98/55606 (PMC)]、TbpAおよび、またはTbpB [WO 97/13785とWO 97/32980 (PMC)]、CopB [Helminen MEら (1993) Infect Immun 61:2003-2010]、OmpCD、HasR (PCT/EP99/03824)、PilQ (PCT/EP99/03823)、OMP85 (PCT/EP00/01468)、Lipo06 (GB9917977.2)、Lipo10 (GB9918208.1)、Lipo11 (GB9918302.2)、Lipo18 (GB9918038.2)、P6 (PCT/EP99/03257)、D15 (PCT/EP99/03822)、Omp1A1 (PCT/EP99/06781)、Hly3 (PCT/EP99/03257)、OmpEである。（特に中耳炎の予防の為の）混合ワクチンに配合することができる非特異的ヘモフィルスインフルエンザ抗原の例は、フィンブリン蛋白 [(US5766608 - オハイオ州研究財団)] とそこから得られるペプチドよりなる融合蛋白 [例えばLB1 (f) ペプチド融合蛋白; US5843464 (OSU) またはWO 99/64067]、OMP26 [WO 97/01638 (Cortex)]、P6 [EP281673 (ニューヨーク州立大学)]、TbpAおよび、またはTbpB、Hia、Hsf、Hin47、Hif、Hmw1、Hmw2、Hmw3、Hmw4、Hap、D15 (WO 94/12641)、蛋白D (EP594610)、P2、P5 (WO 94/26304) である。

【0043】

意図される他の組み合わせは、本発明の肺炎球菌PS&蛋白と、例えばインフルエンザ（弱毒化された、スプリットまたはそのサブユニット [例えば、表面糖蛋白ノイラミニダーゼ (NA) と赤血球凝集素 (HA)]。例えばChaloupka IらEur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 15:121-127を参考のこと)、RSV (例えば、FとG抗原またはF/G融合蛋白。例えばSchmidt A. Cら、J Virol, May 2001, P4594-4603を参考のこと)、PIV3 (例えば、HNとF蛋白。前掲のSchmidtらを参考のこと)、水痘ウイルス (例えば弱毒化されたもの、糖蛋白I Vなど)、MMR (麻疹、おたふく風邪、風疹) のいずれかの (または全ての) 成分からのウイルス性抗原との組合せである。

【0044】

中耳炎の治療または予防に関して本発明により意図される好ましい小児用組合せは、1つまたはそれ以上のストレプトコッカス・ニューモニエ多糖体抗原 (複数でも可) (好ましくは蛋白Dに結合したもの)、Ph t A、Ph t D、Ph t B、Ph t E、Sps A、Lyt B、Lyt C、Lyt A、Sp125、Sp101、Sp128、Sp130およびSp133から成る群から選択される1つまたはそれ以上の肺炎球菌 (またはその免疫学的機能等価物)、および1つまたはそれ以上のモラクセラ・カタラーリスおよび/または分類不可能なヘモフィルス・インフルエンザからの表面露出抗原を含む。蛋白Dは、それ自体、分類不可能なエイチ・インフルエンザ (ntHi) に対するB細胞媒介保護を産生できるイムノゲンであるので、有利には、肺炎球菌多糖体に関する蛋白担体として用いることができ、エピトープ抑制問題 (上記した) を解決できる。モラクセラ・カタラーリスおよび/または分類不可能なヘモフィルス・インフルエンザ抗原は、サブユニット形態のワクチンに含まれることができ、または細菌由来の外膜小胞 (blebs) の表面に存在する抗原として添加してもよい。

10

20

30

40

50

【0045】

好ましくは、上記した抗原性組成物（およびワクチン）は、使用直前まで凍結乾燥され、その時点で即時に希釈剤で復元される。より好ましくは、3D-MPLの存在下で凍結乾燥され、即時に食塩水溶液で復元される。別法として、蛋白および多糖体は、ワクチン接種キット（成分のいずれか、または両方を凍結乾燥する）中に別個に貯蔵してもよく、使用前に復元して混合してもよく、または患者に別に投与してもよい。Th1アジュバント（好ましくは3D-MPL）は、成分のいずれかまたは両方と共に存在できる。

【0046】

ワクチンの凍結乾燥は、当該分野においてよく知られている。典型的には、液体ワクチンは、例えばシュークロースやラクトースのような糖（初期濃度は10~200mg/mL）などの固化防止剤の存在下で凍結乾燥される。凍結乾燥は、典型的には、一連の工程、例えば、69で始まり、徐々に3時間かけて-24とし、それからこの温度を18時間保持し、徐々に1時間かけて-16とし、この温度を6時間保持し、徐々に3時間かけて+34とし、最終的にこの温度を9時間保持する、一のサイクルで起る。

組成物を凍結乾燥するとより安定な組成物（例えば、多糖体抗原の崩壊が防止される）となる。また、意外にも、この処理は肺炎球菌多糖体に対する高い抗体力価の原因である。このことは、特にPS6B結合が十分であることを示している。したがって、本発明の別の態様は、3D-MPLとのPS6B接合アジュバント（好ましくは、アルミニウム基材アジュバントを避ける）およびPh1A、Ph1D、Ph1B、Ph1E、Sp1A、Ly1B、Ly1C、Ly1A、Sp125、Sp101、Sp128、Sp130およびSp133から成る群から選択される肺炎球菌蛋白を含む凍結乾燥した抗原性組成物である。

【0047】

実施例

実施例は本発明を説明するためのものであって、限定するものではない。

【0048】

実施例1

エス・ニューモニエ膜多糖体

11価の候補ワクチンは、実質的にEP72513に記載されているように調製した莢膜多糖体血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fおよび23Fを含む。各々の多糖体を活性化し、CDAP化学（WO98/08348）を用いて誘導体化し、蛋白担体に結合させる。すべての多糖体は、血清型3（これはその粘度を減少させるために大きさを小さくした）を除いてそれらの天然の形態で結合する。

【0049】

蛋白担体：

選択した蛋白担体は分類不可能なヘモフィルス・インフルエンザから、イー・コリで発現した組換え蛋白D（PD）である。

【0050】

蛋白Dの発現

ヘモフィルス・インフルエンザD

蛋白D発現に関する遺伝学的構築

出発物質

DNAをコードする蛋白D

蛋白Dはすべての血清型および分類不可能な株のエイチ・インフルエンザの中に多く貯蔵される。完全な蛋白D遺伝子をDNA配列を含むpHIC348ベクターは、Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmo, Swedenから得る。蛋白DのDNA配列は、Jansonら（1991）Infect. Immun. 59: 119-125により公にされている。

10

20

30

40

50

【0051】

発現ベクター pMG1

発現ベクター pMG1 は異質挿入遺伝子の転写および翻訳に関する制御要素由来のバクテリオファージを取り込んだ pBR322 の誘導體 (Grossら、1985) である。加えて、アンピシリン耐性遺伝子はカナマイシン耐性遺伝子と交換された。

【0052】

イー・コリ株 AR58

イー・コリ株 AR58N99 を SA500 誘導體 (galE::TN10、ラムダ Kill⁻cI857 H1) での P1 ファージストック予備増殖で形質導入することにより生産した。N99 および SA500 は国立保健研究所の Dr. Martin Rosenberg の研究室から由来のイー・コリ K12 株である。 10

【0053】

発現ベクター pMG1

蛋白 D の産生に関して、蛋白をコードする DNA は発現ベクター pMG1 にクローン化される。このプラスミドは挿入された異質遺伝子の複写および翻訳を誘発するラムダファージ DNA からのシグナルを利用する。ベクターはプロモーター PL、オペレーター OL および 2 つの利用部位 (NutL および NutR) を含み、N 蛋白が供給される場合、転写極性効果を軽減する (Grossら、1985)。PL プロモーターを含むベクターはイー・コリ溶原性宿主に誘導され、プラスミド DNA を安定化させる。溶原性宿主株はゲノムを取り入れた複製欠損ラムダファージ DNA を含む (Shatzmanら、1983) 20。染色体ラムダファージ DNA は、ベクターの OL リプレッサーに結合しリプレッサー蛋白の合成を導き、RNA ポリメラーゼが PL プロモーターに結合して、それにより挿入された遺伝子の転写を防止する。発現株 AR58 の cI 遺伝子は、温度感受性変異体を含み、したがって、転写を指示される PL は温度変化により制御することができ、すなわち、培養温度を増加させることによりリプレッサーを不活性化し、異質蛋白の合成が開始される。この発現系は、特に、細胞への毒性があり得るこれらの異質蛋白の制御された合成を可能にする (Shimatoka & Rosenberg, 1981)。

【0054】

イー・コリ株 AR58

蛋白 D 担体の産生に用いられる AR58 溶原性イー・コリ株は、標準 NIE イー・コリ K12 株 N99 (F⁻su⁻galK2、lacZ⁻thr⁻) の誘導體である。これは欠損溶原性ラムダファージ (galE::TN10、ラムダ Kill⁻cI857 H1) を含む。Kill⁻ 表現型は宿主マクロ分子合成の遮断を妨げる。cI857 変異体は、温度感受性障害を cI リプレッサーに与える。H1 欠失は、ラムダファージライトオペロンおよび宿主パイオ、uvr3、および chlA 座を排除する。AR58 株を SA500 誘導體 (galE::TN10、ラムダ Kill⁻cI857 H1) での P1 ファージストック予備増殖で形質導入することにより生産した。欠損溶原の N99 への導入は、近接した galE 遺伝子にテトラサイクリン耐性に関する TN10 トランスポゾンコーディングの存在の効力によりテトラサイクリンで選択された。 30

【0055】

pMGMDPPrD ベクターの構築

インフルエンザウイルス (pMGNSI) の非構造的 S1 蛋白をコードする遺伝子を含む pMG1 ベクターを pMGMDPPrD を構築するために用いた。蛋白 D 遺伝子は、pHIC348 ベクター (Jansonら、1991) から各々 5' および 3' 末端での NcoI および XbaI 制限部位を含む PCR プライマーで PCR することにより増幅させた。ついで、NcoI/XbaI フラグメントを NcoI と XbaI の間の pMGNS1 に導入し、かくして NS1 蛋白の N 末端の 81 個のアミノ酸ついで PD 蛋白を含む融合蛋白を作成した。このベクターは標識 pMGNS1PrD である。 40

【0056】

上記した構築物に基づいて、蛋白 D 発現の最終的な構築物を生成した。BamHI/Bam 50

各々の結合物を特徴付け、表2に記載した詳細に対応させた。多糖体含有量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を Resorcinol 試験により、および蛋白含有量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を Lowly 試験により測定した。最終 PS/PD 比 (w/w) を濃度の比により測定する。

【0061】

残余 DMA P 含有量 ($\text{ng}/\text{ng PS}$):

多糖体の CDAP での活性化は多糖体中のシアネート基を誘導し、DMA P (4-ジメチルアミノ-ピリジン) を遊離させる。残余 DMA P 含有量を SB で開発された特定のアッセイにより測定した。

【0062】

遊離多糖体含有量 (%):

4 に維持するか、または 37 で7日保存した結合物の遊離多糖体含有量を、-PD 抗体および飽和硫酸アンモニウムでインキュベートし、ついで遠心分離して得られた上清で測定した。

-PS / -PS ELISA を上清中の遊離多糖体の定量化に用いた。また、結合物の欠乏を -PD / -PS ELISA により制御した。遊離多糖体の量を減少させて改善結合ワクチンを得る。

【0063】

抗原性:

同様の結合物における抗原性を、抗体の捕獲および検出が、各々 -PS および -PD であるサンドイッチ型 ELISA で分析した。

【0064】

遊離蛋白含有量 (%):

「遊離」残余蛋白 D のレベルを試料の SDS 処理が有る方法を用いて測定した。結合物を 10 分間 100 に、SDS 0.1% の存在下加熱し、SEC-HPLC ゲル濾過カラム (TSK 3000-PWXL) に注入した。蛋白 D は二量体であるので、SDS との構築物を分離することによる「遊離」蛋白 D のレベルを過大評価する危険性がある。

【0065】

分子の大きさ (K_{av}):

分子の大きさは SEC-HPLC ゲル濾過カラム (TSK 5000-PWXL) で測定した。

【0066】

安定性:

安定性を 4 に維持した結合物および 37 で7日間貯蔵した結合物に関して HPLC-SEC ゲル濾過 (TSK 6000-PWXL) で測定した。

11 個特徴付けを表2に示す。

蛋白結合物をリン酸アルミニウムに吸着させ、プールして最終ワクチンを形成できる。

【0067】

結論:

免疫原性結合物は生産せ、有望なワクチンの成分であることが示されている。最良の性質の最終結合肺炎球菌多糖体生成物に関する最適化 CDAP 条件が 11 のワクチンの各々に

【0068】

【表1】

10

20

30

40

PSエス・ニューモニエー蛋白D結合の詳細な活性化/カップリング/クエンチング
条件

血清型	1	3(μ 流 体)	4	5	6B	7F
PS 濃度(mg/ml)	2.0	3.0	2.0	7.5	5.4	3.0
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 濃度(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
初期 PS/PD 比 (w/w)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP 濃度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9 .0	9.0/9.0/9 .0	9.0/9.0/9 .0	9.0/9.0/9 .0	9.5/9.5/9 .0	9.0/9.0/9 .0

10

20

【 0 0 6 9 】

【 表 2 】

表 1 の続き

血清型	9V	14	18C	19F	23F
PS 濃度(mg/ml)	2.5	2.5	2.0	4.0	3.3
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD 濃度(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
初期 PS/PD 比 (w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1	1/0.5	1/1
CDAP 濃 度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	8.5/8.5/9. 0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	10/9.5/9. 0	9.0/9.0/9. 0

30

40

【 0 0 7 0 】

【 表 3 】

表2：11価肺炎球菌PS-PDワクチンの詳細

(第1のバッチコードの番号は血清型を示す。)

基準	D01PDJ227	D03PDJ236	D4PDJ228	D5PDJ235	D6PDJ209	
PS/蛋白比(w/w)	1/0.66	1/1.09	1/0.86	1/0.86	1/0.69	
遊離多糖体含有率 (%) <10 %	1	1	7	9	0	
有利蛋白含有率 (%) <15 %	8	<1	19	21	9	
DMAP 含有率 (ng/μg PS) < 0.5 ng/μg PS	0.2	0.6	0.4	1.2	0.3	
分子サイズ(K _{av})	0.18	0.13	0.12	0.11	0.13	
安定性	シフト無し	シフト無し	シフト無し	低シフト	シフト無し	
	D07PDJ225	D09PDJ222	D14PDJ202	D18PDJ221	D19PDJ206	D23PDJ212
PS/蛋白比(w/w)	1/0.58	1/0.80	1/0.68	1/0.62	1/0.45	1/0.74
遊離多糖体含有率 (%) <10 %	1	<1	<1	4	4	0
有利蛋白含有率 (%) <15 %	8	0.3	3	21	10	12
DMAP 含有率 (ng/μg PS) < 0.5 ng/μg PS	0.1	0.6	0.3	0.2	0.1	0.9
分子サイズ(K _{av})	0.14	0.14	0.17	0.10	0.12	0.12
安定性	シフト無し	シフト無し	シフト無し	シフト無し	シフト	シフト無し

10

20

30

40

50

【0071】

実施例2 - 本発明の1またはそれ以上の肺炎球菌蛋白 + / - 3D-MPLの添加の、マウスでの肺炎球菌肺コロニー形成に対するPD-接合した11-価の多糖体ワクチンの防御的効能における有益な効果

【0072】

免疫学的表示

肺炎球菌特異的血清IgGのエライザ投与量

Maxisorp Nuncイムノプレートを、37で2時間、PBSで希釈した2 μg/mlの蛋白で、100 μl/ウェルにてコーティングする。プレートをNaCl (0.9%) ツイーン-20 (0.05%) バッファーで3回洗浄する。ついで、標準曲線物として加えられた抗-蛋白血清対照 (670 ng/mlのIgGで開始する) および血清サンプル (1/10の希釈度で開始する) の連続的な二倍希釈体 (PBS/ツイーン-20 (0.05%) 中、ウェル当たり100 μl) を攪拌しながら20で30分間インキュベートする。上記したように洗浄した後、PBS/ツイーン-20 (0.05%) 中5000倍に希釈したペルオキシダーゼ接合ヤギ抗-マウスIgG (Jackson) を攪拌しながら20で30分間インキュベート (100 μl/ウェル) する。洗浄後、プレ

ートを室温で100 μ l/ウェルのレベレーション(revelation)バッファー(100mMのクエン酸バッファー(pH4.5)中のOPDA 0.4mg/mlおよびH₂O₂ 0.05%)と一緒にインキュベートする。50 μ l/ウェルの1N塩酸を添加することでレベレーションを止める。光学濃度をE_{max}イムノリーダー(Molecular Devices)を用いて490および620nmで読み取る。抗体力価をSoftMaxProソフトウェアを用いる4変数の数学的方法により算定する。

【0073】

オプソニン食菌作用アッセイ

このアッセイの目的は、CDCの公開されている標準的方法に適合する方法(Steinerら、Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 4:415, 1997)を用いて、試験血清サンプルの、ストレプトコッカス・ニューモニエ血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fまたは23Fに拮抗するオプソニンの作用能を再現的に測定することである。

このアッセイは侵入するストレプトコッカス・ニューモニエまたはニューモコッカスを排除する第一機構としてインピボにて起ることをインピトロにて再現する。それはニューモコッカスをオプソニン化し、つづいて食作用に付し、ついで殺菌するものである。「食作用」とは細胞が物質を飲み込み、細胞質にある小胞(ファゴソーム)中にそれを取り囲む過程である。肺炎球菌は健康な哺乳動物の食細胞によって食菌されると、当該細菌は死滅する。「オプソニン化」とは、オプソニン、例えば、抗体および補体を抗原上に堆積させることにより食作用が促進される過程である。

【0074】

文献にて報告されている多数のオプソニン食菌作用アッセイがある。CDCの標準的方法はマルチ-ラプセティングにて試験される(Steinerら、ICAAC、トロント、2000年9月16日-20日)。この後者のアッセイはSBで適合された。というのも、他の実験室にて比較するための基礎を提供し、それは一般に入手可能な試薬および対照を用い、生存肺炎球菌の50%の死滅を促進する能力のある血清の力価(希釈度)、この型のアッセイに一般に使用される単位としての結果を表すからである。実際、その使用されたアッセイが4カ所の別の実験室で十分によく対応する結果を形成しうることが明らかにされた(Steinerら、ICAAC、トロント、2000年9月16日-20日)。

【0075】

このアッセイで使用される食作用細胞はHL60細胞系であり、それは前骨髄球性白血病の個体から由来するものであり、Collinsらにより、1977年(Nature 270:347-9)にて連続する細胞系として確立された。この細胞系は、未分化の造血細胞、すなわち、85%の芽細胞および前骨髄球、6%の骨髄球および9%の分化細胞からなる。極性化合物は該細胞の分化を少なくとも2つの異なる系統で誘発させることができる。N,N-ジメチルホルムアミドは顆粒細胞の分化を誘発し、多形核様細胞(44%の骨髄球およびメタ骨髄球ならびに53%バンドおよびセグメントのPMN)を生成する。

該アッセイにおけるバージョンA2において、試験すべき血清を熱不活化し、1/4で開始して連続的2倍希釈を8回、96-ウェルマイクロプレートのHBSS培地(0.3%BSAを含有する)にて行った。各ウェルにおける希釈された血清の最終容量は25 μ lである。

【0076】

10⁷個の細胞/mlの4容量のHL60細胞(ジメチルホルムアミドで分化した5または6日後)、2容量のエス・ニューモニエ菌(適当な希釈度)および1容量の新生児ウサギの補体を使用直前に混合し、その25 μ lの混合物を96-ウェルのマイクロプレートの希釈血清を含有する各ウェルに加える。血清型1および6Bでは、補体の量を最終濃度12.5%にまで上げ、該アッセイのバージョンA3を得る。

軌道振盪の下、37で2時間インキュベーションした後、プレートを氷上に置き、オプ

10

20

30

40

50

ソニン食菌反応を停止させる。

【0077】

37 で一夜インキュベートすることで、各ウェルにおけるコロニー形成単位 (CFU) を評価する。「オプソニン力価」(OT)をウェル中のエス・ニューモニエ菌の数を少なくとも50%まで減少させることができる血清の相互希釈度 (reciprocal dilution) として (すなわち、50%死菌) として定義する。

%死菌 = (対照ウェルの平均CFU - サンプルのCFU) / 対照ウェルの平均CFU × 100

【0078】

OF1マウスにおける肺炎球菌鼻腔内攻撃

10

7週齢の雌のOF1マウスに、麻酔状態の下、 5×10^5 個のCFUのマウス適合エス・ニューモニエ血清型2、4または6Bを鼻腔内に接種する。肺を攻撃の6時間後に摘出し、Todd Hewith Broth (THB、Gibco) 培地にて均質化する。肺ホモジネートの連続した10倍希釈体を、酵母抽出物補足THB寒天上、37 で一夜平板培養する。肺炎球菌肺感染を、対数加重平均値として表される、CFU/マウスの数として測定する。

【0079】

実施例2A 3D-MPLアジュバントの抗蛋白免疫反応についての効果

この実施例において、本発明者らは3D-MPLアジュバント処理の本発明の蛋白に対する免疫応答の効果を評価することができる。

20

一群10匹の雌の6週齢のBalb/cマウスを、A: AIPO4 100 μ g; または B: AIPO4 100 μ g + 5 μ g 3D-MPL (3デ-O-アシル化モノホスホリル脂質A、Ribi Immunochemから購入) のいずれかを含有する1 μ gの蛋白で0、14および21日目に筋肉内に免疫処理する。エライザIgGをポスト-III血清にて測定する。

いずれの抗原であっても、3D-MPLを補足した処方でワクチン処理した動物にて最良の免疫応答が誘発されることがわかる。

【0080】

実施例2B 本発明の蛋白+/-3D-MPLアジュバントを添加した、血清型2、4または6Bで鼻腔内攻撃したOF1マウスにおける肺炎球菌肺コロニー形成に対するPD-接合の11-価の多糖体ワクチンの防御作用に対する有利な効果

30

この実施例において、本発明者らは、古典的なAIPO4吸着の11-価の多糖体-蛋白D接合体処方と比べて、11-価の多糖体-蛋白D接合体、本発明の蛋白およびAIPO4 + 3D-MPLアジュバントを含有するワクチンの予防的効能を評価することができる。

一群12匹の雌の4週齢のOF1マウスを、A: 50 μ gのAIPO4; B: 0.1 μ gのPS/PD-接合した11-価の多糖体ワクチンの血清型 + 50 μ gのAIPO4; またはC: 0.1 μ gのPS/PD-接合した11-価の多糖体ワクチンの血清型 + 10 μ gの本発明の蛋白 + 50 μ gのAIPO4 + 5 μ gの3D-MPL (Ribi Immunochemから購入) を含有する処方では0および14日目に皮下的に免疫処理する。攻撃を上記したように21日目に行う。

40

この方法から判るように、本発明の蛋白を補足し、AIPO4 + MPLでアジュバント処理した11-価の多糖体接合体ワクチンで有意な防御が得られる。反対に、11-価の多糖体接合体/AIPO4処方では有意な防御は観察されない。この結果により、本発明の蛋白および3D-MPLアジュバントの添加が11-価の多糖体接合体ワクチンの肺炎に対する効力を亢進することを明らかにすることができる。

【0081】

実施例2C 実施例2Bに示される防御の免疫相関性

本発明の蛋白および3D-MPLを補足した11-価の多糖体接合体ワクチンによる、実施例2Bで得られた防御の免疫相関性を確立するために、上記したように、多糖体2、4

50

または6Bおよび本発明の蛋白に対する攻撃前の血清抗体反応を測定することができる。ついで、抗体力価を、攻撃の6時間後に集めた対応する動物の肺で測定された細菌性コロニーの数と比較する。Log / Logの直線回帰上で R^2 を算定する。

算定された R^2 から、体液性免疫応答と両抗原の防御との間に相関関係のないことが判る。抗-6B（あるいは2または4）抗体価は、11-価の接合体ワクチンで、あるいは本発明の蛋白および3D-MPLを補足した同じワクチンで免疫処理した群にてあまり変わらない。したがって、処方Cで認められる防御の改善は、多糖体6B（あるいは2または4）に対するより高い抗体力価によるだけではない。

総合すれば、これらの結果は、防御が体液性免疫応答だけで媒介されるものではなく、むしろ蛋白抗原（好ましくは3-MPLの存在下で）誘発される細胞介在免疫性によっても媒介されることを示唆しうる。このことは、免疫系の両腕が協調して最適な防御を得るのに、肺炎球菌多糖体接合体ワクチンに蛋白抗原（複数でも可）および強力なアジュバントを添加することにさらなる支持を与えることができる。

【0082】

実施例3 - 本発明の蛋白で能動的に免疫処理され、肺炎球菌PSに対する抗体で受動的に免疫処理されたマウスにおける免疫系の両腕の協調

実施例3A - 肺炎に拮抗して保護する受動的に投与される抗-6B-多糖体（抗-PS）の濃度の測定

方法

ワクチン群：一群16匹の4群のマウスを-1日目に以下に詳説した群に従って希釈されていないラット抗-多糖体抗血清（100 μ l）で受動的免疫処理（i.p.）に付した（合計64匹のマウス）。

【0083】

【表4】

群	特異性	抗血清中のIgG濃度
G1	α -PS-6B	5 μ g/ml
G2	α -PS-6B	2 μ g/ml
G3	α -PS-6B	0.75 μ g/ml
G4	対照	0 μ g/ml

【0084】

動物：カナダ、Charles Riverから由来の64匹の雄のCD-1マウスであり、体重は約35g（約10週齢）である。

麻酔状態：イソフルラン（3%）+O₂（1L/分）でマウスを麻酔に付した。

生物：エス・ニューモニエン1387（血清型6）を5%ウマ血を補足したトリプチケース大豆寒天（TSA）プレートから収穫し、6mlのPBSに懸濁させた。感染の直前に1mlの細菌懸濁液を9mlの冷却した融解滋養寒天（BBL）中に希釈し、41で保持した。マウスに50 μ lの容量にて約6.0対数10cfu/マウスを投与した。

感染：0日目に、マウスを上記したように麻酔処理に付し、手術を伴わない気管内挿管を介する気管支内注入によりエス・ニューモニエン1387（50 μ lの冷却細菌懸濁液）に感染させた。この方法はWooduntおよびBerryによって記載されている（Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43:29（1999））。

サンプル：感染の3日目に、8匹のマウス/群をCO₂を過剰に摂取させて殺し、肺を摘出して1mlのPBSにホモジネートさせた。PBSの10倍連続希釈体を調製し、生存している細菌の数を数えた。サンプルを5%ウマ血を補足したTSAプレート上に3通りにて播種（20 μ l）し、37で一夜インキュベートし、評価した。さらに一連のマウ

10

20

30

40

50

スを7日目に殺し、上記したようにサンプリングした。

【0085】

結果：

【表5】

ラット血清中の I g G 濃度 (μ g / m l)	細菌の数 感染後の (対数10 c f u / 肺)	
	3	8
5	6.7 ± 0.7 (1/7)	7.2 ± 0.7 (5/7)
2	6.5 ± 0.7 (1/7)	6.9 ± 1.8 (4/7)
0.75	7.7 ± 0.5 (5/8)	4.8 ± 1.4 (2/8)
0	6.7 ± 1.5 (3/6)	6.3 ± 1.5 (3/9)

10

括弧内の数字はサンプリング時間の前に死んだ動物の数である。

20

【0086】

結論：一般に、いずれかの処理群より単離した細菌数には有意な違いはない。これは測定可能な防御が5 μ g / m l を含むそれまでの濃度の抗 - 多糖体抗体で得られなかったことを示す。

これは数人のヒト臨床実験で観察されたことと類似しており、すなわち、抗 - 多糖体抗体はある集団におけるニューモコッカス肺炎に対する保護を付与するのに十分ではない。

【0087】

実施例3B - 本発明の蛋白をアジュバントと共にまたは無しで能動的に投与することにより得られる肺炎からの防御、および最適下限の抗 - P S 抗体との相乗作用の測定方法

30

動物：カナダ、ケベック州、セント・コンスタント、Charles Riverからの128匹の雄のCD - 1マウス（免疫処理の際に6週齢で、感染の際に10週齢である）であり、体重は6週で約20gであり、10週で約38gであった。

免疫処理：一群16匹のマウス6群を、- 22日目および- 14日目に、以下に詳説する100 μ l のワクチンで皮下注射して免疫処理する。（合計128匹のマウス）。3D - MPLをRibi / Corixaから入手する。

- 1日目に、特定の群（以下の表を参照のこと）を4.26 μ g / m l (4 m l の5 μ g / m l + 1.3 m l の2 μ g / m l) の濃度のマウス抗 - 多糖体抗体で受動的に免疫処理 (i . p . 100 μ l) する。

【0088】

40

【表6】

群	能動的注射容量	-22、-14日目に 投与されるワクチン (投与量 μ g)	受動的注射容量	受動的IgG (-1日目)
1-1	100 μ l s.c.	蛋白/A1PO4 (10/50)		なし
1-2	100 μ l s.c.	蛋白/MPL/A1PO4 (10/5/50)		なし
1-3	100 μ l s.c.	蛋白/A1PO4 (10/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-4	100 μ l s.c.	蛋白/MPL/A1PO4 (10/5/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-5	100 μ l s.c.	MPL/A1PO4 (5/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-6	100 μ l s.c.	MPL/A1PO4 (5/50)		なし

10

20

30

【0089】

感染： 0日目に、マウスを上記したように麻酔処理（3%イソフルラン+1L/分のO₂）に付す。エス・ニューモニエン1387（血清型6）の培養体を5%ウマ血を補足したトリプチケース大豆寒天（TSA）プレートから収穫し、6mlのPBSに懸濁させることにより細菌接種体を調製する。感染直前に、冷却した溶融滋養寒天（41に保持）にて10倍希釈体（1ml+9ml）を調製する。マウスを気管内挿管を介する気管支内注入により感染させ、50 μ lの容量にて約6.0対数10cfu/マウスを投与する。この方法はWooduntおよびBerryによって記載されている（Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43:29（1999））。

サンプル：感染後72時間で、8匹のマウス/群をCO₂を過剰に摂取させて殺し、肺を摘出して1mlのPBSにホモジネートさせた。PBSの10倍連続希釈体を調製し、生存している細菌の数を数えた。サンプルを5%ウマ血を補足したTSAプレート上に3通りにて播種（20 μ l）し、37で一夜インキュベートし、評価した。さらに一連のマウスを8日目に殺し、上記したようにサンプリングした。

40

【0090】

データ分析

治療効果を比較するための指標が感染した3および7日目に肺に存在する細菌の数である。結果を平均値と標準偏差として表すことができる。統計学的分析はスチューデントt-試験（P値が<0.05で有意であると考えられる）を用いて行うことができる。

上記したように、抗-多糖体抗体単独（群1-5）では肺における肺炎球菌の増殖に対す

50

る防御を付与できないことがわかる。A1P04でアジュバント処理した肺炎球菌蛋白(群1-1)は保護を与えることができないが、蛋白を3D-MPLと組み合わせた場合(群1-2)ではその効果はよくなるであろう。

最も有意な防御が抗-多糖体抗体と蛋白の両方の群で、特に3つのすべての要素、蛋白、3D-MPLおよび受動的に投与された抗-多糖体抗体を有する群(群1-4)で認められる。この結論はまた、死亡率でも支持され得る。群1-3、特に1-4は他の群と比べて死亡率が低いであろう。

【0091】

結論：受動的に免疫処理した動物を用いて実験した場合、蛋白(+/-MPL)を用いて能動的に免疫処理した相乗作用がまた、多糖体抗原に拮抗する抗体のレベルの増加によるものとすることができない。

10

肺炎球菌肺炎に対する有意な防御が、蛋白と受動的投与した抗-多糖体抗体の両方で免疫処理した群で観察され、特に3D-MPLも存在する場合に、この組み合わせが相乗作用を示すことがわかる。

抗-多糖体免疫処理を(好ましくは、多糖体との接合体を用いて)能動的に行うならば、この効果は、B-細胞記憶の効果として、さらに著しくなるであろうし、実験全体を通して抗-PS抗体の定常レベルが免疫反応協調に寄与するであろう。

【0092】

実施例4-防御の相互作用による相乗効果の測定方法

人体が感染性肺炎球菌を排除するのに用いる原理機構は抗体介在のオプソニン食菌作用である(Bruynら、Clin. Infect. Dis. 14:251(1992))。防御との相関関数として莢膜多糖体に対する抗体濃度を測定するための、数種のエライザ法が開発されており、インピトロでのオプソニン食菌作用アッセイが防御とより相関していることが明らかとなった(Musherら、J. Infect. Dis. 182:158(2000))。

20

本発明の肺炎球菌蛋白は、抗体介在のオプソニン食菌作用とは異なる機構により肺炎球菌感染に対する防御を提供する。実施例2において、接合体および蛋白の両方での能動的免疫処理が、抗体濃度が両方の群で同じであるため、その違いで説明できない、相乗効果を示し得る。すなわち、観察され得る残りの防御作用は相乗作用に由来するものでなければならぬ。同様に、抗体が能動的に投与されているため、実施例3において同じ結論に到達することができる。

30

【0093】

多くの場合において、本発明の肺炎球菌蛋白は表面に結合し、それ自体がオプソニン活性を提供すると考えられる。この場合、オプソニン活性の他の防御の相乗的機構に対する相対的寄与を評価するのに用いることができる、抗-肺炎球菌蛋白のオプソニン作用能を定量的に測定することで防御機構を区別することが可能である。

マウス肺コロニー形成モデルにおいて、各ワクチンの相対的保護を細菌の肺からのクリアランスで評価することができる。あるいは別法として、ワクチンの効力を、ワクチンで一般に測定される、症状率から評価することもできる。

%防御 = (CFU/対照となる肺 - CFU/ワクチン処理した肺) / (CFU/対照となる肺)

40

%効力 = (対照となる症状 - ワクチン処理した症状) / (対照となる症状)

相乗作用に由来する防御または効力の部分を測定するために、オプソニン力価の割合に基づき、効力の部分と考えられる部分を決定することが問題である。

【0094】

上記した実施例3において、蛋白または抗-多糖体単独ではそれ自体大きな防御を提供できないため、組み合わせたことによる%防御は、蛋白/抗体成分の間の相乗作用によるものである。

オプソニンの相対活性に基づいて、相乗作用の防御の量を評価することが可能である。抗-莢膜多糖体抗体により得られるオプソニン活性がXであり、抗-肺炎球菌蛋白抗体によ

50

り得られるオプソニン活性が Y であるとしたならば、オプソニン活性の合計は $X + Y$ であることがわかり、蛋白のオプソニン活性の相対的部分は $Y / X + Y$ である。これをワクチンの相対的防御効力（ワクチンの抗 - 多糖体部分が A % の防御効力を提供し、ワクチンの多糖体 + 蛋白の防御効力が B % である）と比較する。そして、オプソニン活性により説明することができない付加的な効力を残りの防御活性（相乗作用） = $B \% - A \% - B \% * (Y / X + Y)$ として評価する。

この実施例は相乗効果を評価するための方法を限定するものではない。防御とその他の相関関係が同定されれば、この相乗作用を評価するのにその相関性を用いることができる。

【 0 0 9 5 】

本明細書に引用されている、特許および特許出願（これらの限定されない）を含め、すべての刊行物は、たとえ、個々の刊行物が、その内容を十分に開示している場合に、出典を明示することにより明細書の一部とすることを、具体的かつ個別的に意図するものであったとしても、その出典を明示することにより本明細書の一部とされる。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22167 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 39/09, 39/385, A61P 31/04
- (74) Agent: LUBIENSKI, Michael, John; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GX (GB).
- (21) International Application Number: PCT/EP01/10568
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 12 September 2001 (12.09.2001)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0022742.1 15 September 2000 (15.09.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE], Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LAFERRIERE, Craig, Antony, Joseph [CA/BE], GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE); POOLMAN, Jan [NL/BE], GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/22167 A2

(54) Title: VACCINE

(57) Abstract: The present invention relates to the field of bacterial polysaccharide antigen vaccines. In particular, the present invention relates to vaccines comprising a pneumococcal polysaccharide antigen, typically a pneumococcal polysaccharide conjugate antigen from *Streptococcus pneumoniae* selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a Th1-inducing adjuvant.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

VACCINE

FIELD OF INVENTION

The present invention relates to bacterial polysaccharide antigen vaccines,
5 their manufacture and the use of such polysaccharides in medicines.

In particular the present invention relates to vaccines comprising a
pneumococcal polysaccharide antigen, typically a pneumococcal polysaccharide
conjugate antigen, formulated with a protein antigen from *Streptococcus pneumoniae*
and optionally a Th1 inducing adjuvant.

10

BACKGROUND OF INVENTION

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacteria responsible for
considerable morbidity and mortality (particularly in the young and aged), causing
invasive diseases such as pneumonia, bacteremia and meningitis, and diseases
15 associated with colonisation, such as acute Otitis media. The rate of pneumococcal
pneumonia in the US for persons over 60 years of age is estimated to be 3 to 8 per
100,000. In 20% of cases this leads to bacteremia, and other manifestations such as
meningitis, with a mortality rate close to 30% even with antibiotic treatment.

Pneumococcus is encapsulated with a chemically linked polysaccharide which
20 confers serotype specificity. There are 90 known serotypes of pneumococci, and the
capsule is the principle virulence determinant for pneumococci, as the capsule not
only protects the inner surface of the bacteria from complement, but is itself poorly
immunogenic. Polysaccharides are T-independent antigens, and can not be processed
or presented on MHC molecules to interact with T-cells. They can however, stimulate
25 the immune system through an alternate mechanism which involves cross-linking of
surface receptors on B cells.

It was shown in several experiments that protection against invasive
pneumococci disease is correlated most strongly with antibody specific for the
capsule, and the protection is serotype specific.

30 Polysaccharide antigen based vaccines are well known in the art. Four that
have been licensed for human use include the Vi polysaccharide of *Salmonella typhi*,
the PRP polysaccharide from *Haemophilus influenzae*, the tetravalent meningococcal

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

vaccine composed of serotypes A, C, W135 and Y, and the 23-Valent pneumococcal vaccine composed of the polysaccharides corresponding to serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, and 33 (accounting for at least 90% of pneumococcal blood isolates).

5 The latter three vaccines confer protection against bacteria causing respiratory infections resulting in severe morbidity and mortality in infants, yet these vaccines have not been licensed for use in children less than two years of age because they are inadequately immunogenic in this age group [Peltola *et al.*(1984), N. Engl. J. Med. 310:1561-1566]. *Streptococcus pneumoniae* is the most common cause of invasive
10 bacterial disease and otitis media in infants and young children. Likewise, the elderly mount poor responses to pneumococcal vaccines [Roghmann *et al.*, (1987), J. Gerontol. 42:265-270], hence the increased incidence of bacterial pneumonia in this population [Verghese and Berk, (1983) *Medicine* (Baltimore) 62:271-285].

Strategies, which have been designed to overcome this lack of
15 immunogenicity in infants, include the linking of the polysaccharide to large immunogenic proteins, which provide bystander T-cell help and which induce immunological memory against the polysaccharide antigen to which it is conjugated. Pneumococcal glycoprotein conjugate vaccines are currently being evaluated for safety, immunogenicity and efficacy in various age groups.

20 The 23-valent unconjugated pneumococcal vaccine has shown a wide variation in clinical efficacy, from 0% to 81% (Fedson *et al.* (1994) *Arch Intern Med.* 154: 2531-2535). The efficacy appears to be related to the risk group that is being immunised, such as the elderly, Hodgkin's disease, splenectomy, sickle cell disease and agammaglobulinemics (Fine *et al.* (1994) *Arch Intern Med.* 154:2666-2677), and
25 also to the disease manifestation. The 23-valent vaccine does not demonstrate protection against pneumococcal pneumonia (in certain high risk groups such as the elderly) and otitis media diseases.

There is therefore a need for improved pneumococcal vaccine compositions, particularly ones which will be more effective in the prevention or amelioration of
30 pneumococcal disease (particularly pneumonia) in the elderly and in young children.

The present invention provides such an improved vaccine.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly the present invention provides a vaccine composition, comprising at least one *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen (preferably conjugated to a protein carrier) and a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of: Poly Histidine Triad family (Pht; e.g. PhtA, PhtB, PhtD, or PhtE), Lyt family (e.g. LytA, LytB, or LytC), SpsA, Sp128, Sp130, Sp125, Sp101 and Sp133, or truncate or immunologically functional equivalent thereof, optionally with a Th1 adjuvant (an adjuvant inducing a predominantly Th1 immune response). Preferably both a pneumococcal protein and Th1 adjuvant are included. Advantageous compositions comprising combinations of the above pneumococcal proteins of the invention with each other and with other pneumococcal proteins are also described. The compositions of the invention are particularly suited in the treatment of elderly pneumonia.

Pneumococcal polysaccharide vaccines (conjugated or not) may not be able to protect against pneumonia in the elderly population for which the incidence of this disease is very high. The key defense mechanism against the pneumococcus is opsonophagocytosis (a humoral B-cell / neutrophil mediated event caused by the production of antibodies against the pneumococcal polysaccharide, the bacterium eventually becoming phagocytosed), however parts of the involved opsonic mechanisms are impaired in the elderly, i.e. superoxide production by PMN (polymorphonuclear cells), other reactive oxygen species production, mobilization of PMN, apoptosis of PMN, deformability of PMN. Antibody responses may also be impaired in the elderly.

Contrary to the normally accepted dogma, normal levels of anti-capsular polysaccharide antibodies may not be effective in complete clearance of bacteria, as pneumococci may invade host cells to evade this branch of the immune system.

Surprisingly, the present inventors have found that by simultaneously stimulating the cell mediated branch of the immune system (for instance T-cell mediated immunity) in addition to the humoral branch of the immune system (B-cell mediated), a synergy (or cooperation) may result which is capable of enhancing the clearance of pneumococci from the host. This is a discovery which will aid the

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

prevention (or treatment) of pneumococcal infection in general, but will be particularly important for the prevention (or treatment) of pneumonia in the elderly where polysaccharide based vaccines do not show efficacy.

Without wishing to be bound by any theory, the present inventors have found that both arms of the immune system may synergise in this way if a pneumococcal polysaccharide (preferably conjugated to a protein carrier) is administered with a pneumococcal protein selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 (proteins which can be processed and presented in the context of Class II and MHC class I on the surface of infected mammalian cells). Although one or more of these pneumococcal proteins can trigger cell mediated immunity by itself, the inventors have also found that the presence of a Th1 inducing adjuvant in the vaccine formulation helps this arm of the immune system, and surprisingly further enhances the synergy between both arms of the immune system.

15

DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides an improved vaccine particularly for the prevention or amelioration of pneumococcal infection of the elderly (and/or infants and toddlers).

In the context of the invention a patient is considered elderly if they are 55 years or over in age, typically over 60 years and more generally over 65 years.

Thus in one embodiment of the invention there is provided a vaccine composition, suitable for use in the elderly (and/or Infants and toddlers) comprising at least one *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein antigen(s) selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133. The vaccine may optionally comprise a Th1 adjuvant.

In a second, preferred, embodiment, the present invention provides a vaccine (suitable for the prevention of pneumonia in the elderly) comprising at least one (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10) *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen(s) and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of:

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and, preferably, a Th1 adjuvant.

In the above embodiments vaccines advantageously comprising combinations of the above pneumococcal proteins of the invention with each other and with other pneumococcal proteins are also envisioned as described below.

It is envisaged that such a vaccine will be also useful in treating pneumococcal infection (for instance otitis media) in other high risk groups of the population, such as for infants or toddlers.

10 *Streptococcus pneumoniae Polysaccharide Antigens of the Invention*

Typically the *Streptococcus pneumoniae* vaccine of the present invention will comprise polysaccharide antigens (preferably conjugated to a carrier protein), wherein the polysaccharides are derived from at least four serotypes of pneumococcus. Preferably the four serotypes include 6B, 14, 19F and 23F. More preferably, at least 7 serotypes are included in the composition, for example those derived from serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F. More preferably still, at least 11 serotypes are included in the composition, for example the composition in one embodiment includes capsular polysaccharides derived from serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F (preferably conjugated to a carrier protein). In a preferred embodiment of the invention at least 13 polysaccharide antigens (preferably conjugated to a carrier protein) are included, although further polysaccharide antigens, for example 23 valent (such as serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F and 33F), are also contemplated by the invention.

For elderly vaccination (for instance for the prevention of pneumonia) it is advantageous to include serotypes 8 and 12F (and most preferably 15 and 22 as well) to the 11 valent antigenic composition described above to form a 15 valent vaccine, whereas for infants or toddlers (where otitis media is of more concern) serotypes 6A and 19A are advantageously included to form a 13 valent vaccine.

Although the above polysaccharides may be used in their full-length, native form, it should be understood that size-reduced polysaccharides may also be used which are still immunogenic (see for example EP 497524 and 497525).

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

For the prevention/amelioration of pneumonia in the elderly (+55 years) population and Otitis media in Infants (up to 18 months) and toddlers (typically 18 months to 5 years), it is a preferred embodiment of the invention to combine a multivalent *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide as herein described with a 5 *Streptococcus pneumoniae* protein selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, or immunologically functional equivalent thereof. A combination of pneumococcal proteins may also be advantageously utilised as described below.

10

Pneumococcal Proteins of the invention

For the purposes of this invention, "immunologically functional equivalent" is defined as a peptide of protein comprising at least one protective epitope from the proteins of the invention. Such epitopes are characteristically surface-exposed, highly 15 conserved, and can elicit an bactericidal antibody response in a host or prevent toxic effects. Preferably, the functional equivalent has at least 15 and preferably 30 or more contiguous amino acids from the protein of the invention. Most preferably, fragments, deletions of the protein, such as transmembrane deletion variants thereof (ie the use of the extracellular domain of the proteins), fusions, chemically or genetically detoxified 20 derivatives and the like can be used with the proviso that they are capable of raising substantially the same immune response as the native protein. The position of potential B-cell epitopes in a protein sequence may be readily determined by identifying peptides that are both surface-exposed and antigenic using a combination of two methods: 2D-structure prediction and antigenic index prediction. The 2D- 25 structure prediction can be made using the PSPRED program (from David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK). The antigenic index can be calculated on the basis of the method described by Jameson and Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]).

The proteins of the invention are the following proteins, all of which are 30 exposed on the outer surface of the pneumococcus (capable of being recognised by a host's immune system during at least part of the life cycle of the pneumococcus), or are proteins which are secreted or released by the pneumococcus.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

The *Streptococcus pneumoniae* protein of the invention is preferably selected from the group consisting of: a protein from the polyhistidine triad family (Pht), a protein from the Lyt family, a choline binding protein, proteins having an LPXTG motif (where X is any amino acid), proteins having a Type II Signal sequence motif of LXXC (where X is any amino acid), and proteins having a Type I Signal sequence motif. Preferred examples within these categories (or motifs) are the following proteins (or truncate or immunologically functional equivalent thereof):

The Pht (Poly Histidine Triad) family comprises proteins PhtA, PhtB, PhtD, and PhtE. The family is characterised by a lipidation sequence, two domains separated by a proline-rich region and several histidine triads, possibly involved in metal or nucleoside binding or enzymatic activity, (3-5) coiled-coil regions, a conserved N-terminus and a heterogeneous C terminus. It is present in all strains of pneumococci tested. Homologous proteins have also been found in other Streptococci and *Neisseria*. Preferred members of the family comprise PhtA, PhtB and PhtD. More preferably, it comprises PhtA or PhtD. It is understood, however, that the terms Pht A, B, D, and E refer to proteins having sequences disclosed in the citations below as well as naturally-occurring (and man-made) variants thereof that have a sequence homology that is at least 90% identical to the referenced proteins. Preferably it is at least 95% identical and most preferably it is 97% identical.

With regards to the Pht proteins, PhtA is disclosed in WO 98/18930, and is also referred to Sp36. As noted above, it is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II signal motif of LXXC.

PhtD is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036D. As noted above, it also is a protein from the polyhistidine triad family and has the type II LXXC signal motif.

PhtB is disclosed in WO 00/37105, and is also referred to Sp036B. Another member of the PhtB family is the C3-Degrading Polypeptide, as disclosed in WO 00/17370. This protein also is from the polyhistidine triad family and has the type II LXXC signal motif. A preferred immunologically functional equivalent is the protein Sp42 disclosed in WO 98/18930. A PhtB truncate (approximately 79kD) is disclosed in WO99/15675 which is also considered a member of the PhtX family.

PhtE is disclosed in WO00/30299 and is referred to as BVH-3.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

SpsA is a Choline binding protein (Cbp) disclosed in WO 98/39450.

The Lyt family is membrane associated proteins associated with cell lysis. The N-terminal domain comprises choline binding domain(s), however the Lyt family does not have all the features found in the choline binding protein family (Cbp) family noted below and thus for the present invention, the Lyt family is considered distinct
5 from the Cbp family. In contrast with the Cbp family, the C-terminal domain contains the catalytic domain of the Lyt protein family. The family comprises LytA, B and C. With regards to the Lyt family, LytA is disclosed in Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987). LytB is disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as
10 Sp46. LytC is also disclosed in WO 98/18930, and is also referred to as Sp91. A preferred member of that family is LytC.

Another preferred embodiment are Lyt family truncates wherein "Lyt" is defined above and "truncates" refers to proteins lacking 50% or more of the Choline binding region. Preferably such proteins lack the entire choline binding region.

15 Sp125 is an example of a pneumococcal surface protein with the Cell Wall Anchored motif of LPXTG (where X is any amino acid). Any protein within this class of pneumococcal surface protein with this motif has been found to be useful within the context of this invention, and is therefore considered a further protein of the invention. Sp125 itself is disclosed in WO 98/18930, and is also known as ZmpB - a
20 zinc metalloproteinase.

Sp101 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85993. It is characterised by a Type I signal sequence.

Sp133 is disclosed in WO 98/06734 (where it has the reference # y85992. It is also characterised by a Type I signal sequence.

25 Sp128 and Sp130 are disclosed in WO 00/76540.

The proteins used in the present invention are preferably selected from the group PhtD and PhtA, or a combination of both of these proteins.

*Advantageous combination of one or more pneumococcal proteins of the invention
30 with other pneumococcal proteins*

In the vaccine of the invention, each of the above proteins of the invention (preferably either or both of PhtD and PhtA) may also be beneficially combined with

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

one or more pneumococcal proteins from the following list: pneumolysin (also referred to as Ply; preferably detoxified by chemical treatment or mutation) [WO 96/05859, WO 90/06951, WO 99/03884], PsaA and transmembrane deletion variants thereof (Berry & Paton, *Infect Immun* 1996 Dec;64(12):5255-62), PspA and transmembrane deletion variants thereof (US 5804193, WO 92/14488, WO 99/53940), PspC and transmembrane deletion variants thereof (WO 97/09994, WO 99/53940), a member of the Choline binding protein (Cbp) family [e.g. CbpA and transmembrane deletion variants thereof (WO 97/41151; WO 99/51266)], Glyceraldehyde-3-phosphate - dehydrogenase (*Infect. Immun.* 1996 64:3544), HSP70 (WO 96/40928), PcpA (Sanchez-Beato et al. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 164:207-14), M like protein (SB patent application No. EP 0837130), and adhesin 18627 (SB Patent application No. EP 0834568). The present invention also encompasses immunologically functional equivalents or truncates of such proteins (as defined above).

15 Concerning the Choline Binding Protein family, members of that family were originally identified as pneumococcal proteins that could be purified by choline-affinity chromatography. All of the choline-binding proteins are non-covalently bound to phosphorylcholine moieties of cell wall teichoic acid and membrane-associated lipoteichoic acid. Structurally, they have several regions in common over
20 the entire family, although the exact nature of the proteins (amino acid sequence, length, etc.) can vary. In general, choline binding proteins comprise an N terminal region (N), conserved repeat regions (R1 and/or R2), a proline rich region (P) and a conserved choline binding region (C), made up of multiple repeats, that comprises approximately one half of the protein. As used in this application, the term "Choline
25 Binding Protein family (Cbp)" is selected from the group consisting of Choline Binding Proteins as identified in WO 97/41151, PbcA, SpsA, PspC, CbpA, CbpD, and CbpG. CbpA is disclosed in WO 97/41151. CbpD and CbpG are disclosed in WO 00/29434. PspC is disclosed in WO 97/09994. PbcA is disclosed in WO 98/21337. Preferably the Choline Binding Proteins are selected from the group
30 consisting of CbpA, PbcA, SpsA and PspC.

If a Cbp is the further protein utilised it may be a Cbp truncate wherein "Cbp" is defined above and "truncate" refers to proteins lacking 50% or more of the Choline

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

binding region (C). Preferably such proteins lack the entire choline binding region. More preferably, the such protein truncates lack (i) the choline binding region and (ii) a portion of the N-terminal half of the protein as well, yet retain at least one repeat region (R1 or R2). More preferably still, the truncate has 2 repeat regions (R1 and
 5 R2). Examples of such preferred embodiments are NR1xR2 and R1xR2 as illustrated in WO99/51266 or WO99/51188, however, other choline binding proteins lacking a similar choline binding region are also contemplated within the scope of this invention.

Cbp truncate-Lyt truncate chimeric proteins (or fusions) may also be used in
 10 the vaccine of the invention. Preferably this comprises NR1xR2 (or R1xR2) of Cbp and the C-terminal portion (Cterm, i.e., lacking the choline binding domains) of Lyt (e.g., LytCCterm or Sp91Cterm). More preferably Cbp is selected from the group consisting of CbpA, PbcA, SpsA and PspC. More preferably still, it is CbpA. Preferably, Lyt is LytC (also referred to as Sp91).

15 A PspA or PsaA truncate lacking the choline binding domain (C) and expressed as a fusion protein with Lyt may also be used. Preferably, Lyt is LytC.

Preferred combinations of pneumococcal proteins for the purposes of this invention

Preferably the combination of proteins of the invention are selected from 2 or
 20 more (3 or 4) different categories such as proteins having a Type II Signal sequence motif of LXXC (where X is any amino acid, e.g., the polyhistidine triad family (Pht)), choline binding proteins (Cbp), proteins having a Type I Signal sequence motif (e.g., Sp101), proteins having a LPXTG motif (where X is any amino acid, e.g., Sp128, Sp130), toxins (e.g., Ply), etc. Preferred examples within these categories (or motifs)
 25 are the proteins mentioned above, or immunologically functional equivalents thereof. Toxin + Pht, toxin + Cbp, Pht + Cbp, and toxin + Pht + Cbp are preferred category combinations.

Preferred beneficial combinations include, but are not limited to, PhtD + NR1xR2, PhtD + NR1xR2-Sp91Cterm chimeric or fusion proteins, PhtD + Ply, PhtD
 30 + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + NR1xR2-Sp91Cterm chimeric or fusion proteins, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, NR1xR2 + LytC, NR1xR2 + PspA, NR1xR2 + PsaA, NR1xR2 + Sp128, R1xR2 +

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

LytC, R1xR2 + PspA, R1xR2 + PsaA, R1xR2 + Sp128, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. Preferably, NR1xR2 (or R1xR2) is from CbpA or PspC. More preferably it is from CbpA.

- 5 A particularly preferred combination of pneumococcal proteins comprises Ply (or a truncate or immunologically functional equivalent thereof) + PhtD (or a truncate or immunologically functional equivalent thereof) + NR1xR2 (or R1xR2). Preferably, NR1xR2 (or R1xR2) is from CbpA or PspC. More preferably it is from CbpA.

- 10 Without wishing to be bound by any theory, within the composition the pneumococcal protein (or combinations described above) of the invention can help to induce a T-cell mediated response against pneumococcal disease – particularly required for protection against pneumonia – which cooperates with the humoral branch of the immune system to inhibit invasion by pneumococci, and to stimulate
15 opsonophagocytosis. A further advantage of including the protein antigen is the presentation of further antigens for the opsonophagocytosis process.

- Accordingly in an embodiment of the invention there is provided a *Streptococcus pneumoniae* vaccine comprising a pneumococcus polysaccharide conjugate vaccine comprising polysaccharide antigens derived from at least four
20 serotypes, preferably at least seven serotypes, more preferably at least eleven serotypes, and at least one, but preferably 2, 3, or 4, *Streptococcus pneumoniae* proteins selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 (or a pneumococcal protein combination as described above). Preferably one of the proteins is PhtA (or an
25 immunologically functional equivalent thereof). Most preferably one of the proteins is PhtD (or an immunologically functional equivalent thereof).

- As mentioned above, a problem associated with the polysaccharide approach to vaccination, is the fact that polysaccharides *per se* are poor immunogens. To overcome this, polysaccharides may be conjugated to protein carriers, which provide
30 bystander T-cell help. It is preferred, therefore, that the polysaccharides utilised in the invention are linked to such a protein carrier. Examples of such carriers which are currently commonly used for the production of polysaccharide immunogens include

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

the Diphtheria and Tetanus toxoids (DT, DT CRM197 and TT respectively), Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), OMPC from *N. meningitidis*, and the purified protein derivative of Tuberculin (PPD).

5 A preferred carrier for the pneumococcal polysaccharide based immunogenic compositions (or vaccines) is protein D from *Haemophilus influenzae* (EP 594610-B), or fragments thereof. Fragments suitable for use include fragments encompassing T-helper epitopes. In particular a protein D fragment will preferably contain the N-terminal 1/3 of the protein. A protein D carrier is surprisingly useful as a carrier in vaccines where multiple pneumococcal polysaccharide antigens are conjugated.
10 Epitope suppression is usually likely to occur if the same carrier is used for each polysaccharide. Surprisingly, the present inventors have found protein D is particularly suitable for minimising such epitopic suppression effects in combination vaccines. One or more pneumococcal polysaccharides in a combination may be advantageously conjugated onto protein D, and preferably all antigens are conjugated
15 onto protein D within such a combination vaccine.

A further preferred carrier for the pneumococcal polysaccharide is the pneumococcal protein itself (as defined above in section "Pneumococcal Proteins of the invention").

The polysaccharide may be linked to the carrier protein by any known method
20 (for example, by Likhite, U.S. Patent 4,372,945 and by Armor *et al.*, U.S. Patent 4,474,757). Preferably, CDAP conjugation is carried out (WO 95/08348).

Preferably the protein:polysaccharide (weight:weight) ratio of the conjugates is 0.3:1 to 1:1, more preferably 0.6:1 to 0.8:1, and most preferably about 0.7:1.

The vaccines of the present invention are preferably adjuvanted. Suitable
25 adjuvants include an aluminium salt such as aluminium hydroxide gel (alum) or aluminium phosphate, but may also be a salt of calcium, magnesium, iron or zinc, or may be an insoluble suspension of acylated tyrosine, or acylated sugars, cationically or anionically derivatised polysaccharides, or polyphosphazenes.

It is preferred that the adjuvant be selected to be a preferential inducer of a
30 TH1 type of response to aid the cell mediated branch of the immune response.

TH1 Adjuvants of the Invention

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

High levels of Th1-type cytokines tend to favour the induction of cell mediated immune responses to a given antigen, whilst high levels of Th2-type cytokines tend to favour the induction of humoral immune responses to the antigen.

It is important to remember that the distinction of Th1 and Th2-type immune response is not absolute. In reality an individual will support an immune response which is described as being predominantly Th1 or predominantly Th2. However, it is often convenient to consider the families of cytokines in terms of that described in murine CD4 +ve T cell clones by Mosmann and Coffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Traditionally, Th1-type responses are associated with the production of the INF- γ and IL-2 cytokines by T-lymphocytes. Other cytokines often directly associated with the induction of Th1-type immune responses are not produced by T-cells, such as IL-12. In contrast, Th2-type responses are associated with the secretion of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. Suitable adjuvant systems which promote a predominantly Th1 response include: Monophosphoryl lipid A or a derivative thereof, particularly 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) (for its preparation see GB 2220211 A); and a combination of monophosphoryl lipid A, preferably 3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A, together with either an aluminium salt (for instance aluminium phosphate or aluminium hydroxide) or an oil-in-water emulsion. In such combinations, antigen and 3D-MPL are contained in the same particulate structures, allowing for more efficient delivery of antigenic and immunostimulatory signals. Studies have shown that 3D-MPL is able to further enhance the immunogenicity of an alum-adsorbed antigen [Thoenen *et al.* Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].

An enhanced system involves the combination of a monophosphoryl lipid A and a saponin derivative, particularly the combination of QS21 and 3D-MPL as disclosed in WO 94/00153, or a less reactogenic composition where the QS21 is quenched with cholesterol as disclosed in WO 96/33739.

A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil in water emulsion is described in WO 95/17210, and is a preferred formulation.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

Preferably the vaccine additionally comprises a saponin, more preferably QS21. The formulation may also comprises an oil in water emulsion and tocopherol (WO 95/17210).

5 The present invention also provides a method for producing a vaccine formulation comprising mixing a protein of the present invention together with a pharmaceutically acceptable excipient, such as 3D-MPL.

Unmethylated CpG containing oligonucleotides (WO 96/02555) are also preferential inducers of a Th1 response and are suitable for use in the present invention.

10

Particularly preferred compositions of the invention comprise one or more conjugated pneumococcal polysaccharides, one or more pneumococcal proteins of the invention and a Th1 adjuvant. Without wishing to be bound by any theory, the induction of a cell mediated response by way of a pneumococcal protein (as described above) and the cooperation between both arms of the immune system may be aided using such a Th-1 adjuvant, resulting in a particularly effective vaccine against pneumococcal disease in general, and, importantly, against pneumococcal pneumonia in the elderly.

15 In a further aspect of the present invention there is provided an immunogen or vaccine as herein described for use in medicine.

In one embodiment there is a method of preventing or ameliorating pneumonia in an elderly human (+55 years) comprising administering a safe and effective amount of a vaccine, as described herein, comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and a pneumococcal protein selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a Th1 adjuvant, to said elderly patient.

25 In a further embodiment there is provided a method of preventing or ameliorating otitis media in Infants (up to 18 months) or toddlers (typically 18 months to 5 years), comprising administering a safe and effective amount of a vaccine comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB,

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a Th1 adjuvant, to said Infant or toddler.

Preferably in the methods of the invention as described above the polysaccharide antigen is present as a polysaccharide protein conjugate.

5

Vaccine Preparations of the Invention

The vaccine preparations of the present invention may be used to protect or treat a mammal susceptible to infection, by means of administering said vaccine via systemic or mucosal route. These administrations may include injection *via* the intramuscular, intraperitoneal, intradermal or subcutaneous routes; or *via* mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory, genitourinary tracts. Intranasal administration of vaccines for the treatment of pneumonia or otitis media is preferred (as nasopharyngeal carriage of pneumococci can be more effectively prevented, thus attenuating infection at its earliest stage). Although the vaccine of the invention may be administered as a single dose, components thereof may also be co-administered together at the same time or at different times (for instance pneumococcal polysaccharides could be administered separately at the same time or 1-2 weeks after the administration of the bacterial protein component of the vaccine for optimal coordination of the immune responses with respect to each other). For co-administration, the optional Th1 adjuvant may be present in any or all of the different administrations, however it is preferred if it is present in combination with the bacterial protein component of the vaccine. In addition to a single route of administration, 2 different routes of administration may be used. For example, any viral antigens may be administered ID (intradermal), whilst bacterial proteins may be administered IM (intramuscular) or IN (intranasal). Polysaccharides may be administered IM (or ID) and bacterial proteins may be administered IN (or ID). In addition, the vaccines of the invention may be administered IM for priming doses and IN for booster doses.

The amount of conjugate antigen in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccines. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. Generally, it is expected that each

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

dose will comprise 0.1-100 µg of polysaccharide, preferably 0.1-50 µg, preferably 0.1-10 µg, of which 1 to 5 µg is the most preferable range.

The content of protein antigens in the vaccine will typically be in the range 1-100µg, preferably 5-50µg, most typically in the range 5 - 25µg.

5 Optimal amounts of components for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects may receive one or several booster immunisations adequately spaced.

10 Vaccine preparation is generally described in Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Encapsulation within liposomes is described by Fullerton, US Patent 4,235,877.

15 Although the vaccines of the present invention may be administered by any route, administration of the described vaccines into the skin (ID) forms one embodiment of the present invention. Human skin comprises an outer "horny" cuticle, called the stratum corneum, which overlays the epidermis. Underneath this epidermis is a layer called the dermis, which in turn overlays the subcutaneous tissue. Researchers have shown that injection of a vaccine into the skin, and in particular the dermis, stimulates an immune response, which may also be associated with a number
20 of additional advantages. Intradermal vaccination with the vaccines described herein forms a preferred feature of the present invention.

The conventional technique of intradermal injection, the "mantoux procedure", comprises steps of cleaning the skin, and then stretching with one hand, and with the bevel of a narrow gauge needle (26-31 gauge) facing upwards the needle is inserted at
25 an angle of between 10-15°. Once the bevel of the needle is inserted, the barrel of the needle is lowered and further advanced whilst providing a slight pressure to elevate it under the skin. The liquid is then injected very slowly thereby forming a bleb or bump on the skin surface, followed by slow withdrawal of the needle.

30 More recently, devices that are specifically designed to administer liquid agents into or across the skin have been described, for example the devices described in WO 99/34850 and EP 1092444, also the jet injection devices described for example in WO 01/13977; US 5,480,381, US 5,599,302, US 5,334,144, US 5,993,412, US

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

5,649,912, US 5,569,189, US 5,704,911, US 5,383,851, US 5,893,397, US 5,466,220, US 5,339,163, US 5,312,335, US 5,503,627, US 5,064,413, US 5,520, 639, US 4,596,556, US 4,790,824, US 4,941,880, US 4,940,460, WO 97/37705 and WO 97/13537. Alternative methods of intradermal administration of the vaccine
5 preparations may include conventional syringes and needles, or devices designed for ballistic delivery of solid vaccines (WO 99/27961), or transdermal patches (WO 97/48440; WO 98/28037); or applied to the surface of the skin (transdermal or transcutaneous delivery WO 98/20734; WO 98/28037).

When the vaccines of the present invention are to be administered to the skin,
10 or more specifically into the dermis, the vaccine is in a low liquid volume, particularly a volume of between about 0.05 ml and 0.2 ml.

The content of antigens in the skin or intradermal vaccines of the present invention may be similar to conventional doses as found in intramuscular vaccines (see above). However, it is a feature of skin or intradermal vaccines that the
15 formulations may be "low dose". Accordingly the protein antigens in "low dose" vaccines are preferably present in as little as 0.1 to 10 μ g, preferably 0.1 to 5 μ g per dose; and the polysaccharide (preferably conjugated) antigens may be present in the range of 0.01-1 μ g, and preferably between 0.01 to 0.5 μ g of polysaccharide per dose.

As used herein, the term "intradermal delivery" means delivery of the vaccine
20 to the region of the dermis in the skin. However, the vaccine will not necessarily be located exclusively in the dermis. The dermis is the layer in the skin located between about 1.0 and about 2.0 mm from the surface in human skin, but there is a certain amount of variation between individuals and in different parts of the body. In general, it can be expected to reach the dermis by going 1.5 mm below the surface of the skin.
25 The dermis is located between the stratum corneum and the epidermis at the surface and the subcutaneous layer below. Depending on the mode of delivery, the vaccine may ultimately be located solely or primarily within the dermis, or it may ultimately be distributed within the epidermis and the dermis.

30 The present invention also contemplates combination vaccines which provide protection against a range of different pathogens. Many Paediatric vaccines are now given as a combination vaccine so as to reduce the number of injections a child has to

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

receive. Thus for Paediatric vaccines other antigens from other pathogens may be formulated with the vaccines of the invention. For example the vaccines of the invention can be formulated with (or administered separately but at the same time) the well known 'trivalent' combination vaccine comprising Diphtheria toxoid (DT), tetanus toxoid (TT), and pertussis components [typically detoxified Pertussis toxoid (PT) and filamentous haemagglutinin (FHA) with optional pertactin (PRN) and/or agglutinin 1+2], for example the marketed vaccine INFANRIX-DTPa™ (SmithKlineBeecham Biologicals) which contains DT, TT, PT, FHA and PRN antigens, or with a whole cell pertussis component for example as marketed by SmithKlineBeecham Biologicals s.a., as Tritanrix™. The combined vaccine may also comprise other antigen, such as Hepatitis B surface antigen (HBsAg), Polio virus antigens (for instance inactivated trivalent polio virus - IPV), *Moraxella catarrhalis* outer membrane proteins, non-typeable *Haemophilus influenzae* proteins, *N meningitidis* B outer membrane proteins.

Examples of preferred *Moraxella catarrhalis* protein antigens which can be included in a combination vaccine (especially for the prevention of otitis media) are: OMP106 [WO 97/41731 (Antex) & WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA &/or LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA &/or TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, *et al.* (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 and/or UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468); lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpLA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257); and OmpE. Examples of non-typeable *Haemophilus influenzae* antigens which can be included in a combination vaccine (especially for the prevention of otitis media) include: Fimbrin protein [(US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] and fusions comprising peptides therefrom [eg LB1(f) peptide fusions; US 5843464 (OSU) or WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA and/or TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); protein D (EP 594610); P2; and P5 (WO 94/26304).

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

Other combinations contemplated are the pneumococcal PS & protein of the invention in combination with viral antigens, for example, from influenza (attenuated, split, or subunit [e.g., surface glycoproteins neuraminidase (NA) and haemagglutinin (HA)]. See, e.g., Chaloupka I. et al, Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996, 5 15:121-127), RSV (e.g., F and G antigens or F/G fusions, see, eg, Schmidt A. C. et al, J Virol, May 2001, p4594 – 4603), PIV3 (e.g., HN and F proteins, see Schmidt et al. supra), Varicella (e.g., attenuated, glycoproteins I-V, etc.), and any (or all) component(s) of MMR (measles, mumps, rubella).

A preferred Paediatric combination vaccine contemplated by the present invention for global treatment or prevention of otitis media comprises: one or more *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen(s) (preferably conjugated to protein D), one or more pneumococcal proteins selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133 (or an immunologically functional equivalent thereof), and one or more surface-exposed antigen from *Moraxella catarrhalis* and/or non-typeable *Haemophilus influenzae*. Protein D can advantageously be used as a protein carrier for the pneumococcal polysaccharides to overcome epitope suppression problems (as mentioned above), and because it is in itself an immunogen capable of producing B-cell mediated protection against non-typeable *H. influenzae* (ntHI). The *Moraxella catarrhalis* or non-typeable *Haemophilus influenzae* antigens can be included in the vaccine in a sub-unit form, or may be added as antigens present on the surface of outer membrane vesicles (blebs) made from the bacteria.

Preferably the antigenic compositions (and vaccines) hereinbefore described are lyophilised up until they are about to be used, at which point they are extemporaneously reconstituted with diluent. More preferably they are lyophilised in the presence of 3D-MPL, and are extemporaneously reconstituted with saline solution. Alternatively, the protein and polysaccharide may be stored separately in a vaccination kit (either or both components being lyophilised), the components being reconstituted and either mixed prior to use or administered separately to the patient. A Th1 adjuvant (preferably 3D-MPL) may be present with either or both of the components.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

The lyophilisation of vaccines is well known in the art. Typically the liquid vaccine is freeze dried in the presence of an anti-caking agent for instance sugars such as sucrose or lactose (present at an initial concentration of 10-200 mg/mL). Lyophilisation typically occurs over a series of steps, for instance a cycle starting at -69 °C, gradually adjusting to -24 °C over 3 hours, then retaining this temperature for 18 hours, then gradually adjusting to -16 °C over 1 hour, then retaining this temperature for 6 hours, then gradually adjusting to +34 °C over 3 hours, and finally retaining this temperature over 9 hours.

Lyophilising the compositions results in a more stable composition (for instance it prevents the breakdown of the polysaccharide antigens). The process is also surprisingly responsible for a higher antibody titre against the pneumococcal polysaccharides. This has been shown to be particularly significant for PS 6B conjugates. Another aspect of the invention is thus a lyophilised antigenic composition comprising a PS 6B conjugate adjuvanted with 3D-MPL (preferably devoid of aluminium-based adjuvants) and a pneumococcal protein selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133.

20 EXAMPLES

The examples illustrate, but do not limit the invention.

Example 1

S.pneumoniae capsular polysaccharide:

25 The 11-valent candidate vaccine includes the capsular polysaccharides serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F which were made essentially as described in EP 72513. Each polysaccharide is activated and derivatised using CDAP chemistry (WO 95/08348) and conjugated to the protein carrier. All the polysaccharides are conjugated in their native form, except for the serotype 3 (which 30 was size-reduced to decrease its viscosity).

Protein carrier:

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

The protein carrier selected is the recombinant protein D (PD) from Non typeable *Haemophilus influenzae*, expressed in *E. coli*.

EXPRESSION OF PROTEIN D

5 *Haemophilus influenzae* protein D

Genetic construction for protein D expression

Starting materials

The Protein D encoding DNA

10 Protein D is highly conserved among *H. influenzae* of all serotypes and non-typeable strains. The vector pHIC348 containing the DNA sequence encoding the entire protein D gene has been obtained from Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Sweden. The DNA sequence of protein D has been published by Janson et al. (1991) Infect. Immun. 59: 119-125.

15

The expression vector pMG1

The expression vector pMG1 is a derivative of pBR322 (Gross *et al.*, 1985) in which bacteriophage λ derived control elements for transcription and translation of foreign inserted genes were introduced (Shatzman *et al.*, 1983). In addition, the 20 Ampicillin resistance gene was exchanged with the Kanamycin resistance gene.

The E. coli strain AR58

The *E. coli* strain AR58 was generated by transduction of N99 with a P1 phage stock previously grown on an SA500 derivative (galE::TN10, lambdaKil' cI857 Δ H1). 25 N99 and SA500 are *E. coli* K12 strains derived from Dr. Martin Rosenberg's laboratory at the National Institute of Health.

The expression vector pMG 1

30 For the production of protein D, the DNA encoding the protein has been cloned into the expression vector pMG 1. This plasmid utilises signals from lambda phage DNA to drive the transcription and translation of inserted foreign genes. The vector contains the promoter PL, operator OL and two utilisation sites (NutL and

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

NuR) to relieve transcriptional polarity effects when N protein is provided (Gross *et al.*, 1985). Vectors containing the PL promoter, are introduced into an *E. coli* lysogenic host to stabilise the plasmid DNA. Lysogenic host strains contain replication-defective lambda dphage DNA integrated into the genome (Shatzman *et al.*, 5 1983). The chromosomal lambda dphage DNA directs the synthesis of the cI repressor protein which binds to the OL repressor of the vector and prevents binding of RNA polymerase to the PL promoter and thereby transcription of the inserted gene. The cI gene of the expression strain AR58 contains a temperature sensitive mutant so that PL directed transcription can be regulated by temperature shift, i.e. an increase in culture 10 temperature inactivates the repressor and synthesis of the foreign protein is initiated. This expression system allows controlled synthesis of foreign proteins especially of those that may be toxic to the cell (Shimatake & Rosenberg, 1981).

The E. coli strain AR58

15 The AR58 lysogenic *E. coli* strain used for the production of the protein D carrier is a derivative of the standard NIH *E. coli* K12 strain N99 (F⁻ su⁻ galK2, lacZ⁻ thr⁻). It contains a defective lysogenic lambda dphage (galE::TN10, lambdaKil' cI857 ΔH1). The Kil phenotype prevents the shut off of host macromolecular synthesis. The cI857 mutation confers a temperature sensitive lesion to the cI repressor. The ΔH1 20 deletion removes the lambda dphage right operon and the hosts bio, uvr3, and chlA loci. The AR58 strain was generated by transduction of N99 with a P1 phage stock previously grown on an SA500 derivative (galE::TN10, lambdaKil' cI857 ΔH1). The introduction of the defective lysogen into N99 was selected with tetracycline by virtue of the presence of a TN10 transposon coding for tetracyclin resistance in the adjacent 25 galE gene.

Construction of vector pMGMDPPrD

The pMG I vector which contains the gene encoding the non-structural S1 protein of Influenzae virus (pMGNSI) was used to construct pMGMDPPrD. The 30 protein D gene was amplified by PCR from the pHIC348 vector (Janson *et al.* 1991) with PCR primers containing NcoI and XbaI restriction sites at the 5' and 3' ends, respectively. The NcoI/XbaI fragment was then introduced into pMGNS1 between

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

ionic interaction and is eluted by a step increase of the ionic strength of the elution buffer.

In a second purification step impurities are retained on an anionic exchange matrix (Q Sepharose Fast Flow). PD does not bind onto the gel and can be collected in the flow through.

In both column chromatography steps fraction collection is monitored by OD. The flow through of the anionic exchange column chromatography containing the purified protein D is concentrated by ultrafiltration.

The protein D containing ultrafiltration retentate is finally passed through a 0.2 μm membrane.

Chemistry:

Activation and coupling chemistry:

The activation and coupling conditions are specific for each polysaccharide. These are given in Table I. Native polysaccharide (except for PS3) was dissolved in NaCl 2M or in water for injection. The optimal polysaccharide concentration was evaluated for all the serotypes.

From a 100 mg/ml stock solution in acetonitrile, CDAP (CDAP/PS ratio 0.75 mg/mg PS) was added to the polysaccharide solution. 1.5 minute later, 0.2M triethylamine was added to obtain the specific activation pH. The activation of the polysaccharide was performed at this pH during 2 minutes at 25 °C. Protein D (the quantity depends on the initial PS/PD ratio) was added to the activated polysaccharide and the coupling reaction was performed at the specific pH for 1 hour. The reaction was then quenched with glycine for 30 minutes at 25 °C and overnight at 4 °C.

The conjugates were purified by gel filtration using a Sephacryl 500HR gel filtration column equilibrated with 0.2M NaCl.

The carbohydrate and protein content of the eluted fractions was determined. The conjugates were pooled and sterile filtered on a 0.22 μm sterilizing membrane. The PS/Protein ratios in the conjugate preparations were determined.

30

Characterisation:

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

Each conjugate was characterised and met the specifications described in Table 2. The polysaccharide content ($\mu\text{g/ml}$) was measured by the Resorcinol test and the protein content ($\mu\text{g/ml}$) by the Lowry test. The final PS/PD ratio (w/w) is determined by the ratio of the concentrations.

5

Residual DMAP content (ng/ μg PS):

The activation of the polysaccharide with CDAP introduces a cyanate group in the polysaccharide and DMAP (4-dimethylamino-pyridin) is liberated. The residual DMAP content was determined by a specific assay developed at SB.

10

Free polysaccharide content (%):

The free polysaccharide content of conjugates kept at 4°C or stored 7 days at 37°C was determined on the supernatant obtained after incubation with α -PD antibodies and saturated ammonium sulfate, followed by a centrifugation.

15

An α -PS/ α -PS ELISA was used for the quantification of free polysaccharide in the supernatant. The absence of conjugate was also controlled by an α -PD/ α -PS ELISA. Reducing the quantity of free polysaccharide results in an improved conjugate vaccine.

20 Antigenicity:

The antigenicity on the same conjugates was analyzed in a sandwich-type ELISA wherein the capture and the detection of antibodies were α -PS and α -PD respectively.

25 Free protein content (%):

The level of "free" residual protein D was determined by using a method with SDS treatment of the sample. The conjugate was heated 10 min at 100°C in presence of SDS 0.1 % and injected on a SEC-HPLC gel filtration column (TSK 3000-PWXL). As protein D is dimer, there is a risk of overestimating the level of "free" protein D by dissociation the structure with SDS.

30

Molecular size (K_{av}):

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

The molecular size was performed on a SEC-HPLC gel filtration column (TSK 5000-PWXL).

Stability:

5 The stability was measured on a HPLC-SEC gel filtration (TSK 6000-PWXL) for conjugates kept at 4°C and stored for 7 days at 37°C.

The 11-valent characterization is given in Table 2

The protein conjugates can be adsorbed onto aluminium phosphate and pooled to form the final vaccine.

10

Conclusion:

Immunogenic conjugates have been produced, that have since been shown to be components of a promising vaccine. The optimised CDAP conditions for the best quality final conjugated pneumococcal polysaccharide product was discovered for each of the 11 valencies.

15

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

Table 1
Specific activation/coupling/quenching conditions of PS *S.pneumoniae*-Protein D conjugates

Serotype	1	3 (μ fluid.)	4	5	6B	7F
PS conc.(mg/ml)	2.0	3.0	2.0	7.5	5.4	3.0
PS dissolution	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD conc.(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Initial PS/PD Ratio (w/w)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP conc. (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _i =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

5

Serotype	9V	14	18C	19F	23F
PS conc.(mg/ml)	2.5	2.5	2.0	4.0	3.3
PS dissolution	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD conc.(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Initial PS/PD Ratio (w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1	1/0.5	1/1
CDAP conc. (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _i =pH _c =pH _q	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	10/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

Example 2 – Beneficial impact of the addition of one or more of the pneumococcal proteins of the invention +/- 3D-MPL on the protective effectiveness of PD-conjugated 11-valent polysaccharide vaccine against pneumococcal lung colonization in mice

Immunological read-outs

ELISA dosage of pneumococcal protein-specific serum IgG

Maxisorp Nunc immunoplates are coated for 2 hours at 37°C with 100 µl/well of 2 µg/ml protein diluted in PBS. Plates are washed 3 times with NaCl 0.9% Tween-20 0.05% buffer. Then, serial 2-fold dilutions (in PBS/ Tween-20 0.05%, 100 µl per well) of an anti-protein serum reference added as a standard curve (starting at 670 ng/ml IgG) and serum samples (starting at a 1/10 dilution) are incubated for 30 minutes at 20°C under agitation. After washing as previously described, peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson) diluted 5000x in PBS/ Tween-20 0.05% are incubated (100 µl/well) for 30 minutes at 20°C under agitation. After washing, plates are incubated for 15 min at room temperature with 100 µl/well of revelation buffer (OPDA 0.4 mg/ml and H₂O₂ 0.05% in 100mM pH 4.5 citrate buffer). Revelation is stopped by adding 50 µl/well HCl 1N. Optical densities are read at 490 and 620 nm by using Emax immunoreader (Molecular Devices). Antibody titre is calculated by the 4 parameter mathematical method using SoftMaxPro software.

Opsonophagocytosis assay

The purpose of this assay is to reproducibly measure the opsonising capacity of test serum samples against *Streptococcus pneumoniae* serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F or 23F using a method adapted from the published standardized method of the CDC (Steiner et al, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 4: 415, 1997).

This assay reproduces *in vitro* what occurs *in vivo* as the primary mechanism of eliminating invading *Streptococcus pneumoniae* or pneumococci. That is opsonization of the pneumococci followed by phagocytosis and then killing. "Phagocytosis" is the process by which cells engulf material and enclose it within a vacuole (phagosome) in the cytoplasm. Pneumococci are killed when they are

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

phagocytised by healthy mammalian phagocytes. "Opsonization" is the process by which phagocytosis is facilitated by the deposition of opsonins, e.g. antibody and complement, on the antigen.

There have been numerous opsonophagocytic assays reported in the literature.

5 The standardized method of the CDC was tested in a multi-lab setting (Steiner et al, ICAAC, Sept 16- 20, 2000, Toronto). This latter assay was adapted at SB since it provided a basis for comparison to other laboratories, it used reagents and controls that are generally available, and it expressed the results as the titre (dilution) of serum able to facilitate killing of 50% of viable pneumococci, a unit that is commonly used
10 for this type of assay. Indeed, it was shown that the adapted assay could generate results that corresponded quite well with 4 other laboratories (Steiner et al, ICAAC, Sept 16- 20, 2000, Toronto).

The phagocytic cell used in the assay is the HL60 cell line, which originated from an individual with promyelocytic leukemia and was established as a continuous
15 cell line by Collins et al. in 1977 (Nature 270: 347-9). This cell line is composed of undifferentiated hematopoietic cells, that is 85% blast cells and promyelocytes, 6% myelocytes and 9% differentiated cells. Polar compounds can induce the differentiation of the cells into at least two different lineages. N,N-dimethylformamide induces granulocytic differentiation which yield polymorphonuclear-like cells (44%
20 myelocytes and metamyelocytes and 53% banded and segmented PMNs).

In Version A2 of the assay, the sera to be tested are heat-inactivated and 8 two-fold serial dilutions starting at 1/4 are made in 96-well microplates in HBSS medium containing 0.3% BSA. The final volume of diluted serum in each well is 25µl.

25 Four volumes of HL60 cells at 10^7 cells /ml (5 or 6 days post differentiation with Dimethyl formamide), 2 volumes of *S.pneumoniae* bacteria (at the appropriate dilution) and 1 volume of baby rabbit complement are mixed just prior to use, and 25 µl of the mixture is added to each well of the 96-well microplate containing the diluted sera. For serotypes 1, and 6B, the amount of complement is increased to
30 12.5% final concentration, giving Version A3 of the assay.

After two hours incubation at 37°C under orbital shaking, the plate is put on ice in order to stop the opsonophagocytosis reaction.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

An estimate is made of the the colony forming units (CFU) in each well by overnight incubation at 37°C. The "opsonic titre" (OT) is defined as the reciprocal dilution of the serum able to reduce by at least 50% the number of *S. pneumoniae* bacteria in the wells (ie., 50 % killing). The % killing is calculated by the following

5 fomulae:

$$\% \text{ killing} = (\text{Mean CFU control wells} - \text{CFU sample}) / \text{Mean CFU control wells} \times 100$$

Pneumococcal intranasal challenge in OF1 mice

10 Seven week-old OF1 female mice are intranasally inoculated under anesthesia with $5 \cdot 10^5$ CFU of mouse-adapted *S. pneumoniae* serotype 2, 4 or 6B. Lungs are removed at 6 hours after challenge and homogenized (Ultramax, 24000 rpm, 4°C) in Todd Hewith Broth (THB, Gibco) medium. Serial 10-fold dilutions of lung homogenates are plated overnight at 37°C onto Petri dishes containing yeast extract-supplemented THB agar. Pneumococcal lung infection is determined as the number
15 of CFU/mouse, expressed as logarithmic weighted-average. Detection limit is 2.14 log CFU/mouse.

Example 2A *3D-MPL adjuvant effect on anti-protein immune response*

20 In the present example, we can evaluate the impact of 3D-MPL adjuvantation on the immune response to the protein of the invention.

Groups of 10 female 6 week-old Balb/c mice are intramuscularly immunized at days 0, 14 and 21 with 1 µg protein contained in either A: AIPO4 100 µg; or B: AIPO4 100 µg + 5 µg 3D-MPL (3 de-O-acylated monophosphoryl lipid A, supplied by Ribi Immunochem). ELISA IgG is measured in post-III sera.

25 Whichever the antigen, best immune responses can be shown to be induced in animals vaccinated with 3D-MPL-supplemented formulations.

Example 2B *Beneficial impact of the addition of a protein of the invention +/- 3D-MPL adjuvant on the protective effectiveness of PD-conjugated 11-valent
30 polysaccharide vaccine against pneumococcal lung colonization in OF1 mice intranasally challenged with serotype 2, 4 or 6B.*

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

In the present example, we can evaluate the prophylactic efficacy of a vaccine containing the 11-valent polysaccharide-protein D conjugate, a protein of the invention and AIPO4 + 3D-MPL adjuvants, compared to the classical AIPO4-adsorbed 11-valent polysaccharide-protein D conjugate formulation.

- 5 Groups of 12 female 4 week-old OF1 mice are immunized subcutaneously at days 0 and 14 with formulations containing A: 50 µg AIPO4; B: 0.1 µg PS/serotype of PD-conjugated 11-valent polysaccharide vaccine + 50 µg AIPO4; or C: 0.1 µg PS/serotype of PD-conjugated 11-valent polysaccharide vaccine + 10 µg protein of the invention + 50 µg AIPO4 + 5 µg 3D-MPL (supplied by Ribi Immunochem).
- 10 Challenge is done at day 21 as described above.

- As can be shown by this method, a significant protection is conferred by the 11-valent polysaccharide conjugate vaccine supplemented with the protein of the invention and adjuvanted with AIPO4 + MPL. On the contrary, no significant protection is observed in animals immunized with the 11-valent polysaccharide conjugate / AIPO4 formulation. This result can prove that the addition of the protein of the invention and 3D-MPL adjuvant enhances the effectiveness of the 11-valent polysaccharide conjugate vaccine against pneumonia.
- 15

Example 2C, immune correlates of the protection showed in example 2B

- 20 In order to establish the immune correlates of protection conferred in example 2B, by the 11-valent polysaccharide conjugate vaccine supplemented with a protein of the invention and 3D-MPL, pre-challenge serological antibody responses to polysaccharide 2, 4 or 6B, and the protein of the invention can be measured as described above.

- 25 Antibody titers are then compared to bacteria colony numbers measured in lungs of the corresponding animals collected at 6 hours post-challenge. R^2 are calculated on Log/Log linear regressions.

- 30 Calculated R^2 can show the absence of correlation between humoral immune responses and protection for both antigens. Anti-6B (or 2 or 4) antibody titers are not significantly different in the groups immunized with the 11-valent conjugate vaccine or with the same vaccine supplemented with the protein of the invention and 3D-

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

MPL. Therefore, the protection improvement seen with formulation C is not solely due to a higher antibody response to polysaccharide 6B (or 2 or 4).

5 Taken together, the results can suggest that protection is not mediated by humoral immune responses alone, but rather also by a cell-mediated immunity induced by the protein antigen (preferably in the presence of 3D-MPL). This can give additional support to the addition of protein antigen(s) and potent adjuvant(s) in the pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine, so as to coordinate both arms of the immune system for optimal protection.

10 **Example 3 – The Cooperation of both arms of the Immune System in mice actively immunised with a protein of the invention and passively immunised with antibodies against pneumococcal PS**

15 **Example 3A - Find the Concentration of Passively Administered Anti-6B- Polysaccharide (anti-PS) Antibody Protecting Against Pneumonia**

Method

20 Vaccine Groups: Four groups of 16 mice were passively immunised (i.p.) on day -1 with 100 µl of undiluted rat anti-polysaccharide antisera according to the groups detailed below. (total 64 mice)

Group	Specificity	IgG Concentration in Antisera
G1	α-PS -6B	5 µg/ml.
G2	α-PS -6B	2 µg/ml.
G3	α-PS -6B	0.75 µg/ml.
G4	Control	0 µg/ml.

Animals: 64 male CD-1 mice from Charles River, Canada, weighing approx 35g (approx 10 weeks old).

25 Anesthesia: Mice were anesthetized with isoflurane (3%) plus O₂(1 L/min).

Organism: *S. pneumoniae* N1387 (serotype 6) was harvested from trypticase soy agar plates (TSA) supplemented with 5% horse blood and suspended in 6 ml of PBS. Immediately prior to infection, 1 ml bacterial suspension was diluted into 9 ml

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

of cooled molten nutrient agar (BBL) and kept at 41°C. Mice received approx 6.0 log₁₀ cfu/mouse in a volume 50 ul.

Infection: On day 0 mice were anesthetized as described above and infected with *S. pneumoniae* NI387 (50 µl cooled bacterial suspension) by intra-bronchial instillation via non-surgical intra-tracheal intubation. This method was described by Woodnut and Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43: 29 (1999)).

Samples: On day 3 post infection, 8 mice/group were sacrificed by CO₂ overdose and lungs were excised and homogenized in 1 ml PBS. Tenfold serial dilutions were prepared in PBS to enumerate viable bacterial numbers. Samples were inoculated (20 µl) in triplicate onto TSA plates supplemented with 5% horse blood and incubated overnight at 37 °C prior to evaluation. Further sets of mice were sacrificed on day 7 and sampled as above.

Results:

IgG conc (µg/ml) in rat sera	Bacterial numbers (log ₁₀ cfu/lungs) at days post infection	
	3	8
5	6.7 ± 0.7 (1/7)	7.2 ± 0.7 (5/8)
2	6.5 ± 0.7 (1/7)	6.9 ± 1.8 (4/7)
0.75	7.7 ± 0.5 (5/8)	4.8 ± 1.4 (2/8)
0	6.7 ± 1.5 (3/6)	6.3 ± 1.5 (3/9)

Figures in parenthesis are numbers of animals that died prior to sample time.

Conclusion: In general, there was no significant difference in bacterial numbers isolated from any of the treatment groups. This indicates that no measurable protection was afforded by the anti-polysaccharide antibody at concentrations up to and including 5 µg/ml.

This is similar to what is observed in some human clinical trials, that is, anti-polysaccharide antibody is insufficient to protect against pneumococcal pneumonia in some populations.

Example 3B - Determine the protection from pneumonia afforded by active administration of a protein of the invention with or without adjuvant, and synergy with sub-optimal anti-PS antibody.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

Method

Animals: 128 male CD-1 mice (6 weeks old at old at immunisation, 10 weeks old at infection) from Charles River, St. Constant, Quebec, Canada. Animals weighed approx 20 gm at 6 weeks and 38g at 10 weeks.

Immunisations: Six groups of 16 mice are immunised by subcutaneous injection on days -22 and -14 with 100 μ l of vaccine as detailed below. (Total 128 mice). 3D-MPL is obtained from Ribic/Corixa.

On day -1, specific groups (see Table below) are immunised (i.p. 100 μ l) passively with a concentration of 4.26 μ g/ml (4 ml of 5 μ g/ml + 1.3 ml of 2 μ g/ml) mouse anti-polysaccharide antibody.

Group	Injection Volume Active	Vaccine given days -22, -14 (Dosage μ g)	Injection Volume Passive	Passive IgG (day-1)
1-1	100 μ l s.c.	Protein/AIPO4 (10/50)		None
1-2	100 μ l s.c.	Protein/MPL/AIPO4 (10/5/50)		None
1-3	100 μ l s.c.	Protein/AIPO4 (10/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-4	100 μ l s.c.	Protein/MPL/AIPO4 (10/5/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-5	100 μ l s.c.	MPL/AIPO4 (5/50)	100 μ l i.p.	α -PS
1-6	100 μ l s.c.	MPL/AIPO4 (5/50)		None

Infection: On day 0, mice are anesthetized (3% isoflurane plus 1 L/min O₂). Bacterial inocula are prepared by harvesting growth of *S. pneumoniae* N1387 (serotype 6) from trypticase soy agar plates (TSA) supplemented with 5% horse blood and suspending in 6 ml of PBS. A ten-fold dilution (1ml plus 9ml) is prepared in cooled molten nutrient agar (kept at 41 °C) immediately prior to infection. Mice are infected by intra-bronchial instillation via intra-tracheal intubation and receive approximately 6.0 log₁₀ cfu/mouse in a volume of 50 μ l. This method was described by Woodnut and Berry (Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43: 29 (1999)).

Samples: At 72 post infection, 8 mice/group are sacrificed by CO₂ overdose and the lungs are excised and homogenized in 1 ml PBS. Tenfold serial dilutions are prepared in PBS to enumerate viable bacterial numbers. Samples are inoculated (20 μ l) in triplicate onto TSA plates supplemented with 5% horse blood and incubated

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

overnight 37 °C prior to evaluation. Further sets of mice are sacrificed on day 8 post-infection and samples as above.

Analysis of Data

5 The outcome measure for comparison of treatment is the number of bacteria in the lungs at 3 and 7 day post infection. Results can be presented as group means with standard deviations. Statistical analysis should be performed using the Students t-test where a P value of <0.05 is considered significant.

10 As demonstrated above, anti-polysaccharide antibody alone (Group 1-5) can be shown not to afford protection against growth of pneumococci in the lung. Pneumococcal protein adjuvanted with AIPO4 (Group 1-1) may not confer protection either, but will do to a better extent when Protein is combined with 3D-MPL (Group 1-2).

15 Most significant protection can be seen in groups with both anti-polysaccharide antibody and protein, particularly in the group having all three elements, Protein, 3D-MPL and passively administered anti-polysaccharide antibody (Group 1-4). This conclusion can also be supported by the mortality rate. Groups 1-3 and, particularly, 1-4 will have fewer deaths compared to the other groups.

20 Conclusion:

 As the experiment is done with passively immunised animals, the synergistic effect of also actively immunising with protein (+/- MPL) cannot be due to an increase in the level of antibodies against the polysaccharide antigen.

25 Significant protection against pneumococcal pneumonia can be seen in groups immunised with both protein plus passively administered anti-polysaccharide antibody, particularly if 3D-MPL is also present, indicating the synergy of this combination.

30 If the anti-polysaccharide immunisation is carried out actively (preferably with conjugated polysaccharide), this effect will be even more marked, as the effect of B-cell memory, and constant levels of anti-PS antibody throughout the experiment will contribute to the immune response cooperation.

Example 4 - Method to determine synergy by correlate of protection

The principle mechanism of protection that the human body uses to eliminate infecting pneumococcus is antibody mediated opsonophagocytosis (Bruyn et al. Clin. Infect. Dis. 14: 251 (1992)). Whereas several ELISA methods have been developed to measure the antibody concentration to capsular polysaccharide as a correlate of protection, it has become apparent that the *in vitro* opsonophagocytosis assay is a better correlate of protection (Musher et al. J. Infect. Dis. 182: 158 (2000)).

The Pneumococcal proteins of the invention provide protection against pneumococcal infection by mechanisms that are different from antibody mediated opsonophagocytosis. In example 2, active immunisation with both conjugate and protein can show a synergic effect, which can not be explained by the antibody concentration differences since they are the same in both groups. Thus the residual protection that can be observed must come from a synergistic effect. Similarly, since the antibody is added passively, the same conclusion can be reached in example 3.

In many cases, the pneumococcal proteins of the invention are surface associated, and are expected to provide some opsonic activity themselves. In this case it is possible to distinguish the mechanism of protection via a quantitative measure of the opsonising capacity of the the anti-pneumococcal protein, which can be used to estimate the relative contribution of opsonic activity to other synergeic mechanisms of protection.

In the mouse lung colonisation model, the relative protection of each vaccine can be estimated from the clearance of bacteria from the lungs. Or alternatively, the vaccine efficacy can be estimated from case rates, as normally determined for vaccines.

$$\% \text{ Protection} = (\text{CFU/lung Control} - \text{CFU/lung Vaccine}) / (\text{CFU/lung Control})$$

$$\% \text{ Efficacy} = (\text{Cases Control} - \text{Cases Vaccine}) / (\text{Cases Control})$$

To determine the portion of the protection or efficacy that originates from the synergistic effect, it is a matter of determining which portion of the efficacy would be expected based on the ratio of the opsonic titres.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

In Example 3 above, the % protection by the combination is due to synergy between the protein/antibody components as neither the protein nor the anti-polysaccharide antibody alone can provide much protection themselves.

5 It is possible to estimate the amount of protection of the synergetic effect on the basis of the relative opsonic activity. If the opsonic activity afforded by a anti-capsular polysaccharide antibody is X, and the opsonic activity afforded by anti-pneumococcal protein antibody is Y, then the total opsonic activity can be shown to be X + Y, and the relative portion of the opsonic activity of the protein would be Y/X+Y. This is compared to the relative protective efficacy of a vaccine, where the
10 anti-polysaccharide portion of the vaccine provides a protective efficacy of A%, and the protective efficacy of the vaccine of polysaccharide plus protein is B%. The additional efficacy that can not be accounted by opsonic activity is then estimated as
Residual Protective Activity (Synergy) = B% - A% - B% * (Y/X+Y)

15 This example is not intended to limit the ways to estimate the effect of synergy. Once other correlates of protection have been identified, they could be used to estimate this synergistic effect.

All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual
20 publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

Claims:

1. An immunogenic composition comprising at least one *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of: PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA,
5 LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, or immunologically functional equivalent thereof.
2. The immunogenic composition of claim 1, wherein the polysaccharide antigen is presented in the form of a polysaccharide-protein carrier conjugate.
10
3. The immunogenic composition of claim 2, wherein the carrier protein is selected from the group consisting of: Diphtheria toxoid, Tetanus toxoid, CRM197, Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), protein derivative of Tuberculin (PPD), and protein D from *H. influenzae*.
15
4. An immunogenic composition as claimed in any of claims 1 to 3 wherein the vaccine comprises at least four pneumococcal polysaccharide antigens from different serotypes.
- 20 5. An immunogenic composition as claimed herein additionally comprising an adjuvant.
6. An immunogenic composition as claimed in claim 5, wherein the adjuvant comprises an aluminium salt.
25
7. An immunogenic composition as claimed in claim 5, wherein the adjuvant is a preferential inducer of a TH1 response.
8. An immunogenic composition as claimed in claim 7, wherein the adjuvant
30 comprises at least one of the following: 3D-MPL, a saponin immunostimulant, or an immunostimulatory CpG oligonucleotide.

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

9. An immunogenic composition as claimed in claim 8, wherein the adjuvant comprises a carrier selected from the group comprising: an oil in water emulsion, liposomes, and an aluminium salt.
- 5 10. An immunogenic composition composition as claimed herein for use as a medicament.
11. A vaccine comprising the immunogenic composition of claims 1-9.
- 10 12. A method of preventing or ameliorating *Streptococcus pneumoniae* infection in a patient over 55 years, comprising administering an effective amount of a vaccine comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide and at least one *Streptococcus pneumoniae* protein selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and
15 optionally a TH1 inducing adjuvant.
13. Use of a pneumococcal polysaccharide antigen in combination with a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and
20 Sp133, and optionally a TH1 inducing adjuvant, in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of pneumonia in patients over 55 years.
14. Use of a pneumococcal polysaccharide antigen in combination with a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of
25 PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a TH1 inducing adjuvant, in the manufacture of a medicament for the prevention or treatment of otitis media in infants or toddlers.
15. A method of making an immunogenic composition as claimed herein,
30 comprising the steps of:
selecting one or more pneumococcal polysaccharide antigen(s);

WO 02/22167

PCT/EP01/10568

selecting one or more pneumococcal protein antigen(s) from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC, LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133; and

mixing said polysaccharide and protein antigens with a suitable excipient.

5

16. A method of preventing or ameliorating Otitis media in Infants, comprising administering a safe and effective amount of a vaccine comprising a *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide antigen and a *Streptococcus pneumoniae* protein antigen selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LytB, LytC,
10 LytA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, optionally with a TH1 adjuvant, to said Infant.

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22167 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 39/09, 39/385, A61P 31/04
- (21) International Application Number: PCT/EP01/10568
- (22) International Filing Date: 12 September 2001 (12.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0022742.1 15 September 2000 (15.09.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors; and Inventors/Applicants (for US only): LAFERRIERE, Craig, Antony, Joseph [CA/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE); POOLMAN, Jan [NL/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (74) Agent: LUBIENSKI, Michael, John; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GX (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 27 June 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/22167 A3

(54) Title: VACCINE AGAINST STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

(57) Abstract: The present invention relates to the field of bacterial polysaccharide antigen vaccines. In particular, the present invention relates to vaccines comprising a pneumococcal polysaccharide antigen, typically a pneumococcal polysaccharide conjugate antigen formulated with a protein antigen from *Streptococcus pneumoniae* selected from the group consisting of PhtA, PhtD, PhtB, PhtE, SpsA, LysB, LysC, LysA, Sp125, Sp101, Sp128, Sp130 and Sp133, and optionally a Th1-inducing adjuvant.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/10568
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/09 A61K39/385 A61P31/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90 06951 A (PATON JAMES CLELAND ; HANSMAN DAVID JOHN (AU); MITCHELL TIMOTHY JOH) 28 June 1990 (1990-06-28) page 3, line 35 -page 4, line 20 page 9, line 9 - line 13 page 10, line 1 - line 3 claims 9,10	1-4, 10-16
X	WO 99 03884 A (MINETTI CONCEICAO ; LIANG SHU MEI (US); MICHON FRANCIS (US); TAI JO) 28 January 1999 (1999-01-28) page 7, line 20 - line 28 page 11, line 26 -page 12, line 8 page 41, line 7 -page 42, line 19 examples 9,10	1,2,4-6, 10,12-16
--- /---		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 April 2002		Date of mailing of the international search report 03/05/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3340, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Noë, V

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/10568

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 17210 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;MOMIN PATRICIA MARIE (BE); GARCON NATHA) 29 June 1995 (1995-06-29) cited in the application the whole document ----	5,7-9
A	WO 98 18930 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;CHOI GIL H (US); HROMOCKYJ ALEX (US); J) 7 May 1998 (1998-05-07) cited in the application page 5, line 7 - line 13 page 36, line 4 - line 37 page 39, line 29 - line 36 ----	
X,P	BRILES D E ET AL: "The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by Streptococcus pneumoniae" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, 8 December 2000 (2000-12-08), pages S87-S95, XP004227955 ISSN: 0264-410X page S88, column 2, last paragraph -page S89, column 1, paragraph 2 -----	1,2, 10-16

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/EP 01/10568

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9006951	A	28-06-1990	AT 205534 T 15-09-2001			
			AU 626961 B2 13-08-1992			
			AU 4756490 A 10-07-1990			
			WO 9006951 A1 28-06-1990			
			BG 51358 A3 15-04-1993			
			CA 2005704 A1 16-06-1990			
			DE 68929323 D1 18-10-2001			
			DE 68929323 T2 18-04-2002			
			DK 115591 A 14-08-1991			
			EP 0449856 A1 09-10-1991			
			ES 2160570 T3 16-11-2001			
			FI 103122 B1 30-04-1999			
			HU 58804 A2 30-03-1992			
			JP 4503948 T 16-07-1992			
			JP 3237842 B2 10-12-2001			
			MC 2178 A 22-05-1992			
			NO 304317 B1 30-11-1998			
			RU 2121481 C1 10-11-1998			
WO 9903884	A	28-01-1999	AU 740956 B2 15-11-2001			
			AU 8407898 A 10-02-1999			
			EP 0998557 A2 10-05-2000			
			HU 0002475 A2 28-10-2000			
			JP 2001510031 T 31-07-2001			
			NO 20000257 A 21-03-2000			
			WO 9903884 A2 28-01-1999			
			US 2001014332 A1 16-08-2001			
			WO 9517210	A	29-06-1995	AT 177322 T 15-03-1999
AU 1316495 A 10-07-1995						
AU 687494 B2 26-02-1998						
AU 1316695 A 10-07-1995						
AU 705521 B2 27-05-1999						
AU 6803198 A 09-07-1998						
AU 705519 B2 27-05-1999						
AU 6803298 A 09-07-1998						
CA 2179779 A1 29-06-1995						
CN 1138298 A 18-12-1996						
DE 69417063 D1 15-04-1999						
DE 69417063 T2 28-10-1999						
DK 735898 T3 23-08-1999						
WO 9517209 A1 29-06-1995						
WO 9517210 A1 29-06-1995						
EP 0735898 A1 09-10-1996						
EP 0868918 A2 07-10-1998						
ES 2129801 T3 16-06-1999						
GR 3029750 T3 30-06-1999						
HK 1012243 A1 12-05-2000						
JP 9506887 T 08-07-1997						
NZ 277802 A 27-04-1998						
SG 49257 A1 18-05-1998						
SG 73578 A1 20-06-2000						
SI 735898 T1 30-06-1999						
US 6146632 A 14-11-2000						
ZA 9410176 A 17-11-1995						
WO 9818930	A	07-05-1998				AU 5194598 A 22-05-1998
						AU 6909098 A 22-05-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/EP 01/10568	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 9818930	A	EP 0942983	A2	22-09-1999	
		EP 0941335	A2	15-09-1999	
		JP 2001505415	T	24-04-2001	
		JP 2001501833	T	13-02-2001	
		WO 9818930	A2	07-05-1998	
		WO 9818931	A2	07-05-1998	
		US 6159469	A	12-12-2000	
		US 2002032323	A1	14-03-2002	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1996)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 クレイグ・アンソニー・ジョゼフ・ラファリリー
ベルギー、ベ - 1 3 3 0 リクセンザルト、リュ・デュ・ランスティテュート 8 9 番、グラクソス
ミスクライン・バイオロジカルス・ソシエテ・アノニム

(72)発明者 ヤン・ポールマン
ベルギー、ベ - 1 3 3 0 リクセンザルト、リュ・デュ・ランスティテュート 8 9 番、グラクソス
ミスクライン・バイオロジカルス・ソシエテ・アノニム

Fターム(参考) 4C085 AA03 BB11 BB24 DD86 EE03 EE06 FF02 FF12 FF30