

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5220658号  
(P5220658)

(45) 発行日 平成25年6月26日(2013.6.26)

(24) 登録日 平成25年3月15日(2013.3.15)

(51) Int.Cl. F I  
**A 6 1 K 39/385 (2006.01)** A 6 1 K 39/385  
**A 6 1 K 39/095 (2006.01)** A 6 1 K 39/095  
**A 6 1 K 39/00 (2006.01)** A 6 1 K 39/00 H  
**A 6 1 K 39/39 (2006.01)** A 6 1 K 39/39

請求項の数 36 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2009-44924 (P2009-44924)	(73) 特許権者	592243793
(22) 出願日	平成21年2月26日 (2009.2.26)		ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダ
(62) 分割の表示	特願2003-513590 (P2003-513590) の分割		イアグノスティクス エスアールエル
原出願日	平成14年6月20日 (2002.6.20)		イタリア国 イー53100 シエナ, ビ
(65) 公開番号	特開2009-114210 (P2009-114210A)	(74) 代理人	100078282
(43) 公開日	平成21年5月28日 (2009.5.28)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成21年2月26日 (2009.2.26)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	0115176.0		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成13年6月20日 (2001.6.20)	(72) 発明者	パオロ コンスタンティーノ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イタリア国 イー53100 シエナ,
前置審査			ピア フィオレンティーナ 1, カイロ
			ン エセ. ピー. アー.
		審査官	瀬下 浩一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 莢膜性多糖類の可溶化および組合せワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 凍結乾燥した形態の、ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ A に由来の結合体化莢膜糖；ならびに (b) 液体形態の、ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ C、ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ W135 および ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ Y のうち1つ以上に由来する莢膜糖を含む、キット。

【請求項2】

(b) の糖のうち1つ以上がキャリアタンパク質に結合体化される、請求項1に記載のキット。

【請求項3】

前記キャリアタンパク質が CRM<sub>197</sub> ジフテリアトキソイドである、請求項2に記載のキット。

【請求項4】

ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ A に由来の前記莢膜糖が、細菌毒素または細菌トキソイドから選択されるキャリアタンパク質に結合体化される、請求項1～3のいずれか1項に記載のキット。

【請求項5】

10

20

前記細菌毒素または細菌トキソイドは、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドまたは CRM<sub>197</sub>ジフテリアトキソイドである、請求項4に記載のキット。

【請求項6】

前記結合体化が、前記糖へのアミノ基の導入、続くアジピンジエステルを用いる誘導化、およびキャリアタンパク質との反応を包含するプロセスによって行われる、請求項1～5のいずれか1項に記載のキット。

【請求項7】

ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*) のセログループAに由来の前記結合体化莢膜糖が、0.5:1と5:1との間の糖:タンパク質比(w/w)を有する、請求項2～6のいずれか1項に記載のキット。

10

【請求項8】

前記糖の1つ以上が、水酸化アルミニウムアジュバントに吸着される、請求項1～7のいずれか1項に記載のキット。

【請求項9】

前記成分(b)が、アルミニウム塩アジュバントを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載のキット。

【請求項10】

前記成分(b)が、リン酸アルミニウムアジュバントを含む、請求項9に記載のキット。

【請求項11】

前記糖の1つ以上が、オリゴ糖である、請求項1～10のいずれか1項に記載のキット。

20

【請求項12】

前記セログループAの糖が、10と20との間の平均重合度を有する、請求項1～11のいずれか1項に記載のキット。

【請求項13】

前記成分(b)が、セログループW135に由来の糖を含む、請求項1～12のいずれか1項に記載のキット。

【請求項14】

前記セログループW135の糖が、15と25との間の平均重合度を有する、請求項13に記載のキット。

【請求項15】

30

前記成分(b)が、セログループYに由来の糖を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載のキット。

【請求項16】

前記セログループYの糖が、15と25との間の平均重合度を有する、請求項15に記載のキット。

【請求項17】

前記成分(b)が、セログループCに由来の糖を含む、請求項1～16のいずれか1項に記載のキット。

【請求項18】

前記セログループCの糖が、12～22の繰り返し単位を有する、請求項17に記載のキット。

40

【請求項19】

セログループAの糖の、セログループCの糖に対する比(w/w)が、1より高い、請求項17または18に記載のキット。

【請求項20】

セログループAの糖の、セログループCの糖に対する比(w/w)が、2:1である、請求項19に記載のキット。

【請求項21】

前記(b)の糖が、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)のセログループC、セログループW135およびセログループYに由来

50

する、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 22】

セログループ A に由来する糖：セログループ C に由来する糖：セログループ W 135 に由来する糖：セログループ Y に由来する糖の比 (w/w) が 2 : 1 : 1 : 1 である、請求項 21 に記載のキット。

【請求項 23】

(a) 凍結乾燥した形態の、ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ A に由来の結合体化莢膜オリゴ糖；ならびに (b) 液体形態の 1 つ以上のさらなる抗原を含む、キット。

【請求項 24】

2 つのバイアルの形態である、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 25】

ヘモフィルス・インフルエンザエ (Haemophilus influenzae) B に由来の糖抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 26】

用量が、1 用量当たり 5  $\mu$ g と 20  $\mu$ g との間の各糖の用量である、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 27】

ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ A、セログループ C、セログループ W 135 およびセログループ Y のうち少なくとも 2 つに由来の結合体化莢膜糖を含むワクチンを調製するための方法であって、該方法は、(i) ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ A に由来の莢膜糖の凍結乾燥した結合体と、(ii) ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ C、セログループ W 135 およびセログループ Y のうち 1 つ以上に由来の莢膜糖の液体形態の結合体とを混合する工程を包含する、方法。

【請求項 28】

前記 (ii) の糖が、ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis) のセログループ C、セログループ W 135 およびセログループ Y に由来する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

セログループ A に由来の糖：セログループ C に由来の糖：セログループ W 135 に由来の糖：セログループ Y に由来の糖の比 (w/w) が、2 : 1 : 1 : 1 である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記糖が、CRM<sub>197</sub> ジフテリアトキソイドに結合体化される、請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

前記結合体化が、前記糖へのアミノ基の導入、続くアジピンジエステルを用いる誘導化、およびキャリアタンパク質との反応を包含するプロセスによって行われる、請求項 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

前記糖の 1 つ以上がオリゴ糖である、請求項 27 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記糖の 1 つ以上が、水酸化アルミニウムアジュバントに吸着される、請求項 27 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記ワクチンが、リン酸アルミニウムアジュバントを含む、請求項 27 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

10

20

30

40

50

前記ワクチンが、ヘモフィルス・インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*) Bに由来の糖抗原、ナイセリア・メニンギティデイス (*Neisseria meningitidis*) のセログループBに由来のタンパク質、または、OMV調製物を含む、請求項27～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

用量が、1用量当たり5 $\mu$ gと20 $\mu$ gとの間の各糖の用量である、請求項27～35のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書中に引用される全ての文書は、その全体が参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、ワクチン、特に、髄膜炎菌性感染および髄膜炎菌性疾患に対するワクチンの分野にある。

【背景技術】

【0003】

*Neisseria meningitidis* は、グラム陰性ヒト病原体である。これは、咽頭にコロニー形成をし、髄膜炎、および、時折、髄膜炎のない敗血症を引き起こす。これは、*N. gonorrhoeae* と密接に関係しているが、髄膜炎菌を明らかに区別する1つの特徴は、全ての病原性髄膜炎菌に存在する多糖性莢膜の存在である。

【0004】

生物の莢膜多糖類に基づいて、*N. meningitidis* の12のセログループ (serogroup) が同定されている (A、B、C、H、I、L、29E、W135、X、YおよびZ)。A群は、サハラ以南のアフリカでの伝染病において最も頻繁に関連している病原体である。セログループBおよびセログループCは、米国および大部分の先進国における症例の大部分の原因である。セログループW135およびセログループYは、米国および先進国における残りの症例の原因である。

【0005】

*N. meningitidis* 由来の莢膜性多糖類は、多糖類沈殿 (例えば、カチオン性界面活性剤を使用する)、エタノール分別、冷フェノール抽出 (タンパク質を除くため) および超遠心分離 (LPSを除くため) の工程を包含するプロセスによって代表的に調製される [例えば、参考文献1]。

【0006】

セログループA、セログループC、セログループYおよびセログループW135由来の莢膜性多糖類の4価のワクチンは、長年公知であり [2、3]、ヒト使用について許可されている。青年および成人において効果的であるが、このワクチンは、乏しい免疫応答および保護の短い期間を誘導し、そして乳児において使用され得ない [例えば、4]。これは、多糖類が、ブーストされ得ない弱い免疫応答を誘導するT細胞非依存性抗原であるからである。このワクチンの多糖類は、結合体化されず、1:1:1:1の比で存在する [5]。MENGEVAX ACWY<sup>TM</sup> は、一旦、その凍結乾燥された形態から再構成すると、50 $\mu$ gの各々の精製された多糖類を含む。

【0007】

結合体化されたセログループCオリゴ糖はまた、ヒト使用について許可されている [例えば、Menjugate<sup>TM</sup>; 参考文献6]。しかし、セログループA、セログループW135、およびセログループYに対する結合体ワクチンおよびそれらの製造における改善に対する必要性が残る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

10

20

30

40

50

(発明の開示)

本発明は、細菌性莢膜性多糖類を精製するためのプロセスを提供し、この方法は、(a) この多糖類の沈殿の工程、引き続く(b) エタノールを使用する沈殿した多糖類の可溶化の工程を包含する。この多糖類は、ワクチン、例えば、結合体ワクチン、特に、N. Meningitidis セログループA、セログループW135、およびセログループY に対する結合体を調製するために使用され得る。

【0009】

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

細菌莢膜多糖を精製するためのプロセスであって、該プロセスは、(a) 該多糖の沈殿工程、次いで、(b) アルコールを用いて該沈殿した多糖の可溶化工程、を包含する、プロセス。

10

(項目2)

前記工程(a)が、臭化セチルトリメチルアンモニウムを使用する、項目1に記載のプロセス。

(項目3)

工程(b)に用いられるアルコールが、エタノールを含む、項目1または2に記載のプロセス。

(項目4)

前記エタノールが、50%と95%との間の最終濃度を有する、項目3に記載のプロセス。

20

(項目5)

前記細菌莢膜多糖が、N. meningitidis 由来である、項目1~4のいずれか1項に記載のプロセス。

(項目6)

前記N. meningitidis が、セログループA、セログループW135、またはセログループY由来である、項目5に記載のプロセス。

(項目7)

前記細菌莢膜多糖が、Haemophilus influenzae または Streptococcus pneumoniae 由来である、項目1~4のいずれか1項に記載のプロセス。

30

(項目8)

(c) 工程(b)において得られた多糖を処理して、夾雑物を取除く工程、をさらに包含する、項目1~7のいずれか1項に記載のプロセス。

(項目9)

前記工程(c)が、濾過を包含する、項目8に記載のプロセス。

(項目10)

前記工程(c)が、深層濾過、活性炭を通す濾過、サイズ濾過、および/または限外濾過を包含する、項目9に記載のプロセス。

(項目11)

工程(b)または工程(c)において得られた多糖が、沈殿される、項目1~10のいずれか1項に記載のプロセス。

40

(項目12)

オリゴ糖を形成するための加水分解の工程をさらに包含する、項目1~11のいずれか1項に記載のプロセス。

(項目13)

短い長さのオリゴ糖を取除くための、サイジングの工程をさらに包含する、項目12に記載のプロセス。

(項目14)

キャリアタンパク質に対する結合体化の工程をさらに包含する、項目1~13のいずれか

50

1 項に記載のプロセス。

( 項目 1 5 )

前記キャリアタンパク質が、CRM<sub>197</sub>ジフテリアトキソイドである、項目 1 4 に記載のプロセス。

( 項目 1 6 )

他の生物学的分子と混合する工程をさらに包含する、項目 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

( 項目 1 7 )

項目 1 6 に記載のプロセスであって、ここで、前記さらなる生物学的分子が、N . m e n i n g i t i d i s のセログループ C に由来の糖抗原、および N . m e n i n g i t i d i s のセログループ B に由来のタンパク質抗原からなる群より選択される、プロセス。

10

( 項目 1 8 )

N . m e n i n g i t i d i s の A 株、C 株、W 1 3 5 株および / または Y 株由来の糖抗原が混合される、項目 1 6 に記載のプロセス。

( 項目 1 9 )

ワクチン処方工程をさらに包含する、項目 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

( 項目 2 0 )

前記ワクチン処方工程が、前記糖抗原とアジュバントを混合する工程を包含する、項目 1 9 に記載のプロセス。

( 項目 2 1 )

前記アジュバントが、リン酸アルミニウムおよび / または水酸化アルミニウムである、項目 2 0 に記載のプロセス。

20

( 項目 2 2 )

項目 1 9 、 2 0 、 または 2 1 に記載のプロセスにより得られ得る、ワクチン。

( 項目 2 3 )

患者において免疫応答を惹起させる方法であって、項目 2 2 に記載のワクチンを該患者に投与する工程を包含する、方法。

( 項目 2 4 )

エタノールが溶媒として用いられる、沈殿した細菌莢膜多糖を可溶化するためのプロセス。

30

( 項目 2 5 )

前記エタノールが、9 5 : 5 のエタノール : 水混合物の形態である、項目 2 4 に記載のプロセス。

( 項目 2 6 )

前記細菌莢膜多糖が、N . m e n i n g i t i d i s 由来である、項目 2 4 または 2 5 に記載のプロセス。

( 項目 2 7 )

前記 N . m e n i n g i t i d i s が、セログループ A 、セログループ W 1 3 5 、またはセログループ Y 由来である、項目 2 6 に記載のプロセス。

( 項目 2 8 )

少なくともセログループ A およびセログループ C の N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜多糖を含むワクチンであって、ここで、Men A 糖 : Men C 糖の比 ( w / w ) が、1 より高い、ワクチン。

40

( 項目 2 9 )

前記比が、2 : 1 、 3 : 1 、 4 : 1 、 5 : 1 、 1 0 : 1 以上である、項目 2 8 に記載のワクチン。

( 項目 3 0 )

( a ) セログループ W 1 3 5 の N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜糖と ( b ) 1 つ以上のさらなるセログループの N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜糖との混合物を含むワクチンであって、ここで、成分 ( a ) の免疫原性は、成分 ( b ) の非存在下で投与

50

される場合よりも、成分 ( b ) の存在下で投与される場合のほうがより高い、ワクチン。

( 項目 3 1 )

セログループ W 1 3 5 の N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜糖と 1 つ以上のさらなるセログループの N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜糖との相乗作用性の組合わせを含む、ワクチン。

( 項目 3 2 )

前記 1 つ以上のさらなるセログループが、セログループ A、セログループ C およびセログループ Y からなる群より選択される、項目 3 0 または 3 1 に記載のワクチン。

( 項目 3 3 )

2 つ以上のセログループの N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜糖抗原の混合物を含むワクチンであって、これらの内の 1 つは、セログループ W 1 3 5 であり、ここで、セログループ W 1 3 5 に由来の糖抗原の免疫原性は、個々の莢膜糖と比較した場合、該混合物において増大される、ワクチン。

10

( 項目 3 4 )

前記莢膜糖が、キャリアタンパク質と結合体化される、項目 2 8 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

( 項目 3 5 )

前記莢膜糖がオリゴ糖である、項目 2 8 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

( 項目 3 6 )

前記キャリアタンパク質が、CRM<sub>197</sub>ジフテリアトキソイドである、項目 3 4 または 3 5 に記載のワクチン。

20

( 項目 3 7 )

セログループ W 1 3 5 の N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜糖の免疫原性を増大させる方法であって、ここで、該莢膜多糖は、1 つ以上のさらなるセログループの N . m e n i n g i t i d i s 由来の莢膜糖と混合される、方法。

( 項目 3 8 )

前記さらなるセログループが、セログループ A、セログループ C、およびセログループ Y からなる群より選択される、項目 3 7 に記載の方法。

( 項目 3 9 )

前記莢膜糖は、キャリアタンパク質に結合体化される、項目 3 7 または 3 8 に記載の方法。

30

( 項目 4 0 )

前記莢膜糖がオリゴ糖である、項目 3 9 に記載の方法。

( 項目 4 1 )

前記キャリアタンパク質が、CRM<sub>197</sub>ジフテリアトキソイドである、項目 3 9 または 4 0 に記載の方法。

( 項目 4 2 )

セログループ A、セログループ C、セログループ W 1 3 5 およびセログループ Y の N . m e n i n g i t i d i s の少なくとも 2 つに由来の莢膜糖を含むワクチンであって、ここで、該莢膜糖が、キャリアタンパク質に結合体化される、ワクチン。

40

( 項目 4 3 )

前記キャリアタンパク質が、CRM<sub>197</sub>ジフテリアトキソイドである、項目 4 2 に記載のワクチン。

( 項目 4 4 )

前記莢膜糖がオリゴ糖である、項目 4 2 または 4 3 に記載のワクチン。

( 項目 4 5 )

セログループ A、セログループ C、セログループ W 1 3 5 およびセログループ Y の N . m e n i n g i t i d i s の少なくとも 2 つに由来の莢膜糖を含むワクチンであって、ここで、該莢膜糖がオリゴ糖である、ワクチン。

( 項目 4 6 )

50

前記オリゴ糖が、キャリアタンパク質に結合体化される、項目45に記載のワクチン。

(項目47)

前記キャリアタンパク質が、CRM<sub>197</sub>ジフテリアトキソイドである、項目45に記載のワクチン。

(項目48)

セログループCおよびセログループYに由来の糖を含む、項目42から47のいずれか1項に記載のワクチン。

(項目49)

セログループC、セログループW135、およびセログループYに由来の糖を含む、項目42~48のいずれか1項に記載のワクチン。

10

(項目50)

前記1つ以上の糖が、水酸化アルミニウムアジュバントに吸着される、項目42~49のいずれか1項に記載のワクチン。

(項目51)

前記ワクチンが、リン酸アルミニウムアジュバントを含む、項目42~50のいずれか1項に記載のワクチン。

(項目52)

(a)凍結乾燥した形態の、N.meningitidisのセログループAに由来の荚膜糖；および(b)液体形態のセログループC、セログループW135、およびセログループYのN.meningitidisの1つ以上に由来の荚膜糖を含む、キット。

20

(項目53)

前記1つ以上の糖が、キャリアタンパク質に結合体化される、項目52に記載のキット。

(項目54)

前記1つ以上の糖が、オリゴ糖である、項目52または53に記載のキット。

(項目55)

前記1つ以上の糖が、水酸化アルミニウムに吸着される、項目52、53、または54に記載のキット。

(項目56)

前記成分(b)が、リン酸アルミニウムアジュバントを含む、項目52~55のいずれか1項に記載のキット。

30

(項目57)

凍結乾燥した形態のN.meningitidisのセログループAに由来の結合体化荚膜オリゴ糖、および(b)液体形態の1つ以上のさらなる抗原を含む、キット。

(項目58)

項目42~50のいずれか1項に記載のワクチンを調製するための方法であって、該方法は、N.meningitidisのセログループAに由来の凍結乾燥した荚膜糖と、セログループC、セログループW135、およびセログループYの1つ以上に由来の荚膜糖とを混合する工程を包含し、ここで、該1以上の糖が、液体形態である、方法。

(項目59)

前記1つ以上の糖が、キャリアタンパク質に結合体化される、項目58に記載の方法。

40

(項目60)

前記1つ以上の糖が、オリゴ糖である、項目58または59に記載の方法。

(項目61)

前記1つ以上の糖が、水酸化アルミニウムアジュバントに吸着される、項目58、59、または60に記載の方法。

(項目62)

前記ワクチンが、リン酸アルミニウムアジュバントを含む、項目58~61のいずれか1項に記載の方法。

(項目63)

セログループAのオリゴ糖結合体およびセログループCのオリゴ糖結合体を含み、かつ、

50



( i ) リン酸アルミニウムアジュバントおよびリン酸緩衝液、または ( i i ) 水酸化アルミニウムアジュバントおよびヒスチジン緩衝液をさらに含む、免疫原性組成物。

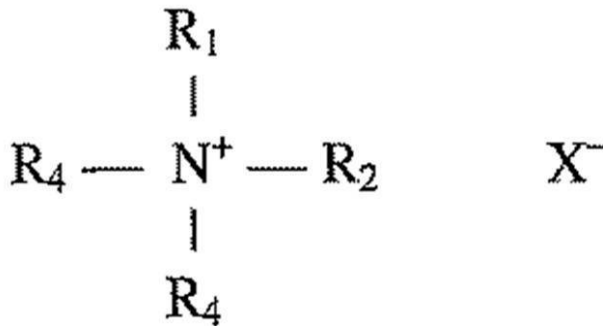
【 0 0 1 0 】

( 沈殿およびエタノール可溶化 )

可溶性多糖類を沈殿させるための多くの技術が当該分野において公知である。好ましい方法は、1種以上のカチオン性界面活性剤を使用する。界面活性剤は、好ましくは、以下の一般式を有する：

【 0 0 1 1 】

【 化 1 】



10

ここで：R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>は、同じであるかまたは異なり、そしてそれぞれは、アルキルまたはアリアルを示し；あるいは、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は、これらが結合する窒素原子と一緒にあって、5員または6員の飽和複素環式環を形成し、そしてR<sub>3</sub>は、アルキルまたはアリアルを示し；あるいは、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>は、これらが結合する窒素原子と一緒にあって、この窒素原子において不飽和な5員または6員の複素環式環を形成し、

20

R<sub>4</sub>は、アルキルまたはアリアルを示し、そして

X<sup>-</sup>は、アニオンを示す。

【 0 0 1 2 】

この方法における使用のための特に好ましい界面活性剤は、テトラブチルアンモニウム塩およびセチルトリメチルアンモニウム塩（例えば、臭化物塩）である。セチルトリメチルアンモニウムブロミド（「CTAB」）は、特に好ましい[8]。CTABはまた、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、セトリモニウムブロミド、CetavlonおよびCentimideとしても公知である。他の界面活性剤としては、ヘキサジメトリンブロミド塩およびミリスチリルトリメチルアンモニウム塩が挙げられる。

30

【 0 0 1 3 】

莢膜性多糖類は、培養の間、培地に放出される。従って、沈殿のための開始物質は、代表的に、遠心分離された細菌培養物由来の上清であるか、または濃縮された培養物である。

【 0 0 1 4 】

沈殿工程は、多糖類に対して選択的であり得るが、代表的には、他の成分（例えば、タンパク質、核酸など）もまた共沈する。

40

【 0 0 1 5 】

沈殿した多糖類は、可溶化の前に遠心分離によって収集され得る。

【 0 0 1 6 】

沈殿の後、多糖類（代表的には、カチオン性界面活性剤との複合体の形態）を、再可溶化する。混入物（例えば、タンパク質、核酸など）を最小化するために、多糖類に対して比較的選択的である溶媒を使用することが好ましい。エタノールは、これに関して有利であることが見出され、そしてCTAB多糖類複合体に対して高度に選択的である。他のより低級のアアルコールが、使用され得る（例えば、メタノール、プロパン-1-オール、プロパン-2-オール、ブタン-1-オール、ブタン-2-オール、2-メチル-プロパン-1-オール、2-メチル-プロパン-2-オール、ジオールなど）。

50

## 【 0 0 1 7 】

エタノールは、好ましくは、沈殿した多糖類に添加されて、50%と90%との間（例えば、約55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%または約90%）、好ましくは、75%と95%の間の最終エタノール濃度（エタノールおよび水の合計含有量に基づく）を与える。最適な最終エタノール濃度は、多糖類が得られる細菌のセログループに依存し得る。

## 【 0 0 1 8 】

エタノールは、純粋な形態で沈殿した多糖類に添加され得るか、または混和性溶媒（例えば、水）で希釈された形態で添加され得る。好ましい溶媒混合物は、エタノール：水混合物であり、約70：30と約95：5の間（例えば、75：25、80：20、85：15、90：10）の好ましい比である。

10

## 【 0 0 1 9 】

莢膜性多糖類を調製するための従来のプロセスと比較して、沈殿、引き続くエタノール抽出の2工程プロセスは、より迅速であり、より単純である。

## 【 0 0 2 0 】

参考文献9に記載されるプロセスと対照的に、このプロセスは、アニオン性界面活性剤よりもむしろカチオン性界面活性剤を使用する。参考文献10のプロセスとは異なり、多糖類は、カルシウム塩またはマグネシウム塩を使用するカチオン交換によるよりもむしろ、エタノールを使用して再可溶化される。参考文献11のプロセスとは異なり、沈殿は、不活性な多孔性支持体を必要としない。さらに、先行技術のプロセスとは異なり、アルコールは、多糖類を沈殿させるよりもむしろ再可溶化するために使用される。

20

## 【 0 0 2 1 】

細菌莢膜性多糖類は、通常、*Neisseria*由来である。好ましくは、これは、*N. meningitidis*由来（セログループA、セログループB、セログループC、セログループW135、およびセログループYを含む）である。好ましいセログループは、セログループA、セログループW135およびセログループYである。

## 【 0 0 2 2 】

このプロセスはまた、*Haemophilus influenzae*（特に、B型、または「Hib」）由来の莢膜性多糖類および*Streptococcus pneumoniae*（肺炎球菌）由来の莢膜性多糖類を調製するために適切である。

30

## 【 0 0 2 3 】

（可溶化多糖類のさらなる処理）

再可溶化の後に、多糖類は、混入物を除くためにさらに処理され得る。これは、微量な混入物でさえ受容可能でない場合（例えば、ヒトワクチン作製のため）に、特に重要である。これは、代表的に、1つ以上の濾過工程を含む。

## 【 0 0 2 4 】

深層濾過が使用され得る。これは、清澄化のために特に有用である。

## 【 0 0 2 5 】

活性炭を通す濾過が使用され得る。これは、色素および微量の有機化合物を除去するために有用である。これは、例えば、 $OD_{275nm} < 0.2$ まで、繰り返され得る。

40

## 【 0 0 2 6 】

サイズ濾過または限外濾過が使用され得る。

## 【 0 0 2 7 】

一旦、濾過されて混入物が除去されると、多糖類は、さらなる処理および/またはプロセスングのために沈殿させられ得る。これは、カチオンを交換することによって（例えば、カルシウム塩またはナトリウム塩の添加によって）好都合に達成され得る。

## 【 0 0 2 8 】

多糖類は、化学的に改変され得る。例えば、この多糖類は、1つ以上のヒドロキシル基をブロック基で置換するために改変され得る。これは、Men Aについて特に有用である [ 1 2 ]。セログループB由来の多糖類は、N-プロピオニル化され得る [ 1 3 ]。

50

## 【0029】

(必要に応じて改変された)多糖は、代表的に加水分解されてオリゴ糖を形成する。好ましくは、これは、30個よりも少ない(例えば、セログループAについて10個と20個の間、好ましくは10個前後;セログループW135およびセログループYについて15個と25個の間、好ましくは15~20個前後;など)オリゴ糖における重合化(DP)の最終の平均的な程度を得るために実行される。オリゴ糖は、ワクチンにおける使用のために多糖であることが好ましい。DPは、イオン交換クロマトグラフィーによってか、または比色アッセイによって簡便に測定され得る(14)。

## 【0030】

加水分解が実行される場合、加水分解は、一般的に短い長さのオリゴ糖を取り除くためのサイズにされる。これは、種々の方法(例えば、限外濾過、引き続くイオン交換クロマトグラフィー)によって達成され得る。約6以下の重合化の程度である多糖は、好ましくはセログループAから除去され、そして約4未満の重合化の程度である多糖は、好ましくはセログループW135およびセログループYから除去される。

## 【0031】

免疫原性を増強するために、本発明の多糖またはオリゴ糖は、好ましくは、キャリアに結合体化される(図18)。キャリアタンパク質への結合体化は、小児用ワクチンにとって特に有用であり(例えば、参考文献15)、そして周知の技術(例えば、参考文献16~24などに総説される)である。

## 【0032】

好ましいキャリアタンパク質は、細菌毒素または細菌トキソイド(例えば、ジフテリアまたは破傷風)である。CRM<sub>197</sub>ジフテリアトキソイド(25、26、27)が、特に好ましい。他の好ましいキャリアタンパク質としては、N. meningitidis 外膜タンパク質(28)、合成ペプチド(29、30)、熱ショックタンパク質(31、32)、百日咳タンパク質(33、34)、サイトカイン(35)、リンフォカイン(35)、ホルモン(35)、増殖因子(35)、種々の病原由来抗原に由来する複数のヒトCD4<sup>+</sup>T細胞エピトープを含む人工タンパク質(36)、H. influenzae 由来のプロテインD(37)、C. difficile 由来の毒素Aまたは毒素B(38)などが挙げられる。キャリアタンパク質の混合物を使用することは可能である。

## 【0033】

0.5:1(すなわち、過剰なタンパク質)と5:1(すなわち、過剰な糖)との間の、糖:タンパク質比(w/w)を有する結合体が好ましく、そして1:1.25と1:2.5との間の、糖:タンパク質比(w/w)を有する結合体がより好ましい。

## 【0034】

単一キャリアタンパク質は、複数の異なる糖を保有し得る(39)。結合体は、遊離のキャリアタンパク質との結合において使用され得る(40)。

## 【0035】

必要な場合、任意の適切な結合反応は、任意の適切なリンカーとともに使用され得る。

## 【0036】

糖は、代表的に、結合の前に活性化されるか、または官能基化される。活性化は、例えば、CDAP(例えば、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート(41、42など))のようなシアニル化試薬を含み得る。他の適切な技術は、カルボジイミド、ヒドラジド、活性化エステル、ノルボロン(norborane)、p-ニトロ安息香酸(p-nitrobenzoic acid)、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを使用する;参考文献22についての序論もまた参照のこと)。

## 【0037】

リンカー基を介する結合は、任意の公知の手段(例えば、参考文献43および44に記載される手順)を用いてなされ得る。結合の1つの型は、多糖の還元的なアミノ化、生じたアミノ基とアジピン酸リンカー基の一方の末端との結合、およびタンパク質とアジピン

10

20

30

40

50

酸リンカー基の他方の末端との結合を含む(20、45、46)。他のリンカーとしては、B-プロピオンアミド(47)、ニトロフェニル-エチルアミン(48)、ハロアシルハライド(49)、グリコシド結合(50)、6-アミノカプロン酸(51)、ADH(52)、C<sub>4</sub>~C<sub>12</sub>部分(53)などが挙げられる。リンカーを用いることの代替としては、直接的な結合が使用され得る。タンパク質との直接的な結合は、例えば、参考文献54および55に記載されるように、多糖の酸化、その後のタンパク質との還元的アミノ化を含み得る。

【0038】

アミノ基の糖への導入(例えば、末端の=Oと-NH<sub>2</sub>基とを置換することによる)、続くアジピンジエステル(例えば、アジピン酸N-ヒドロキスクシンイミドジエステル)を用いる誘導化、およびキャリアタンパク質との反応を包含するプロセスが好ましい。

10

【0039】

結合後、遊離および結合した糖は分離され得る。多くの適切な方法としては、疎水性クロマトグラフィー、タンジェンシャル限外濾過、ダイアフィルトレーションなどが挙げられる(参考文献56および57などもまた参照のこと)。

【0040】

(糖を含む混合物および組成物)

本発明のオリゴ糖、多糖および結合体は、他の生物学的分子と混合され得る。N. meningitidisの1つより多くのセログループに由来する糖の混合物は、例えば、セログループA+セログループC、セログループA+セログループW135、セログループA+セログループY、セログループC+セログループW135、セログループC+セログループY、セログループW135+セログループY、セログループA+セログループC+セログループW135、セログループA+セログループC+セログループY、セログループC+セログループW135+セログループY、セログループA+セログループC+セログループW135+セログループYなど由来の糖を含む組成物が好ましい。個々の糖抗原の保護的効力は、それらの結合によって除去されるが、実際の免疫原性(例えば、ELISA力価)は減少されることが好ましい。

20

【0041】

セログループC由来の糖が使用される場合、好ましくは、これは約12~約22の繰り返し単位を有する。

30

【0042】

N. meningitidisの異なるセログループ由来の糖は、同一か、または異なるキャリアタンパク質に結合体化され得る。

【0043】

混合物がセログループAおよびセログループCの両方由来の莢膜糖を含む場合、MenA糖:MenC糖の比(w/w)は、1より高い(例えば、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1またはそれより高い)ことが好ましい。驚くべきことに、MenA成分がMenC成分に対して過剰(質量/用量)に存在する場合、MenA成分の改善された免疫原性が観察された。

【0044】

混合物がセログループW135ならびにセログループA、セログループCおよびセログループYの少なくとも1つ由来の莢膜糖(例えば、オリゴ糖)を含む場合、MenW135糖の免疫原性は、驚いたことに、単独(同じ投薬量などで)で投与される場合よりも、他のセログループ由来の糖との併用で投与される場合において高くなることが発見された(参考文献58を参照のこと)。従って、MenW135抗原の免疫応答を誘発する能力は、他のセログループ由来の抗原と併せずに送達される場合の同一の抗原の等しい量によって誘導される免疫応答よりも高い。このような増強された免疫原性は、コントロール動物にMenW135抗原を、そして試験動物にこの混合物を投与し、そして標準的なアッセイ(例えば、細菌力価、放射イムノアッセイおよびELISAなど)を用いて、この2つについての抗体力価を比較することによって決定され得る。セログループW135由来

40

50

の糖と他のセログループ由来の糖との、相乗作用性の組み合わせを含むワクチンは、免疫学的に有利である。これらは、抗W135応答を増進させ、そして/またはより低いW135用量を可能にする。

【0045】

混合物が、セログループY、ならびにセログループCおよびセログループW135のうちの1つまたは両方由来の莢膜糖を含む場合、MenY糖：MenW135糖の比(w/w)は1よりも高く(例えば、2：1、3：1、4：1、5：1、10：1またはそれより高く)そして/あるいはMenY糖：MenC糖の比(w/w)は1よりも低い(例えば、1：2、1：3、1：4、1：5またはそれよりも低い)。

【0046】

セログループA：セログループC：セログループW135：セログループY由来の糖についての好ましい比(w/w)は、以下である：1：1：1：1；1：1：1：2；2：1：1：1；4：2：1：1；8：4：2：1；4：2：1：2；8：4：1：2；4：2：2：1；2：2：1：1；4：4：2：1；2：2：1：2；4：4：1：2；および2：2：2：1。

【0047】

混合物はまた、タンパク質を含み得る。N.meningitidis(例えば、参考文献59～64)もしくはOMV調製物(例えば、参考文献65～68など)のセログループB由来のタンパク質を含むことが好ましい。

【0048】

非髄膜炎菌性抗原および非ナイセリア性抗原(好ましくは、髄膜炎菌性成分に対する免疫応答を減少しない抗原)がまた、含まれ得る。例えば、参考文献69は、Hib糖とともに、N.meningitidisのセログループBおよびセログループC由来のオリゴ糖の組み合わせを開示する。肺炎球菌、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、B.pertussis、ジフテリア、破傷風、Helicobacter pylori、ポリオおよび/またはH.influenzae由来の抗原が好ましい。特に好ましい非ナイセリア抗原としては、以下が挙げられる：

- Helicobacter pylori(例えば、CagA(70～73)、VacA(74、75)、NAP(76、77、78)、HopX(例えば、79)、HopY(例えば、79)および/またはウレアーゼ由来の抗原。

- Streptococcus pneumoniae(例えば、80、81、82)由来の糖抗原。

- A型肝炎ウイルス由来の抗原(例えば、不活性化ウイルス)(例えば、83、84)。

- B型肝炎ウイルス由来の抗原(例えば、表面抗原および/またはコア抗原)(例えば、84、85)、これは、好ましくはリン酸アルミニウム上に吸着されている表面抗原である(86)。

- Haemophilus influenzae B由来の糖抗原(例えば、87)、好ましくは、リン酸アルミニウムに吸着されていないか、または吸着されている(88)。

。

- C型肝炎ウイルス由来の抗原(例えば、89)。

- N.gonorrhoeae由来の抗原(例えば、59～62)。

- Chlamydia pneumoniae由来の抗原(例えば、参考文献90～96)。

- Chlamydia trachomatis由来の抗原(例えば、97)。

- Porphyromonas gingivalis由来の抗原(例えば、98)。

- IPVのようなポリオ抗原(例えば、99、100)。

- 凍結乾燥した不活性化ウイルス(例えば、102、RabAvert<sup>TM</sup>)のような狂犬病抗原(例えば、101)。

- 麻疹、流行性耳下腺炎および/または風疹抗原(例えば、参考文献103の9、10および11章)。

10

20

30

40

50

- 血球凝集素および/またはノイラミニダーゼ表面タンパク質のようなインフルエンザ抗原（例えば、参考文献103の19章）。
- *Moraxella catarrhalis*由来の抗原（例えば、104）。
- *Streptococcus agalactiae*（連鎖球菌B群）由来の抗原（例えば、105、106）。
- *Streptococcus pyogenes*（連鎖球菌A群）由来の抗原（例えば、106、107、108）。
- *Staphylococcus aureus*由来の抗原（例えば、109）。
- RSウイルス（RSV（110、111））および/またはパラインフルエンザウイルス（PIV3（112））のようなパラミクソウイルス。
- *Bacillus anthracis*由来の抗原（例えば、113、114、115）。
- フラビウイルスファミリー（フラビウイルス属）のウイルス（例えば、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルスの4つのセログループ、ダニ媒介脳炎ウイルス、西ナイルウイルス）由来の抗原。
- ペストウイルス抗原（例えば、伝統的なブタエンテロウイルス、ウシのウイルス性下痢ウイルスおよび/またはポーター病ウイルス）。
- パルボウイルス抗原（例えば、パルボウイルスB19に由来）。
- 破傷風トキソイド（例えば、参考文献116）。
- 百日咳血液毒（PT）ならびに*B. pertussis*由来の線維状血球凝集素（FHA）、必要に応じて、パータクチン（pertactin）ならびに/または凝集原2および凝集原3との併用（例えば、参考文献117および118）。
- 細胞内百日咳抗原。

## 【0049】

混合物は、これらのさらなる1つ以上の抗原を含み得、これは、必要な場合、解毒され得る（例えば、化学的手段および/または遺伝的手段による百日咳毒素の解毒）。

## 【0050】

ジフテリア抗原がこの混合物に含まれる場合、破傷風抗原および百日咳抗原が含まれることもまた好ましい。同様に、百日咳抗原が含まれる場合、ジフテリア抗原および破傷風抗原が含まれることもまた好ましい。

## 【0051】

混合物中の抗原は、代表的に、各々少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在する。概して、任意の所定の抗原濃度は、抗原に対して免疫応答を誘発するのに十分である。

## 【0052】

混合物においてタンパク質抗原を使用することの代替として、抗原をコードする核酸が使用され得る。従って、混合物のタンパク質成分は、そのタンパク質をコードする核酸（好ましくは、DNA（例えば、プラスミドの形状である））によって置換され得る。

## 【0053】

（多価糖ワクチン）

本発明はまた、*N. meningitidis*のセログループA、C、W135およびYのうち、少なくとも2つ（すなわち、2つ、3つまたは4つ）由来の莢膜糖を含むワクチンおよび免疫原性組成物を提供し、ここで、この莢膜糖は、キャリアタンパク質に結合体化されているか、そして/またはオリゴ糖である。このワクチンが、セログループA、C、W135およびY由来のたった2つの結合体化オリゴ糖または多糖を有する場合、これらは、好ましくは、セログループAおよびC由来ではない（参考文献6、119および120を参照のこと）。好ましい組成物は、セログループCおよびY由来の糖を含む。他の好ましい組成物は、セログループC、W135およびY由来の糖を含む。

## 【0054】

本発明は、セログループAのオリゴ糖結合体およびセログループCのオリゴ糖結合体を含み、(i)リン酸アルミニウムアジュバントまたは水酸化アルミニウムアジュバント、

10

20

30

40

50

および ( i i ) 緩衝液をさらに含む、免疫原性組成物を提供する。この組成物が、リン酸アルミニウムアジュバントを含む場合、緩衝液は、好ましくはリン酸塩緩衝液であり；この組成物が水酸化アルミニウムアジュバントを含む場合、緩衝液は、好ましくはヒスチジン緩衝液である。

【 0 0 5 5 】

ワクチンが、セログループ A 由来の莢膜糖を含む場合、セログループ A の糖は、その加水分解を最小化するために、使用直前に他の糖と合わせられることが好ましい ( H i b 糖を参照のこと)。このことは、凍結乾燥形態のセログループ A 成分および液体形態の他のセログループ成分を、使用準備の際に凍結乾燥成分を再構成するために使用される液体成分と共に有することによって、簡便に達成され得る。この液体成分は、好ましくは、アルミニウム塩アジュバントを含むが、一方で、凍結乾燥されたセログループ A 成分は、アルミニウム塩アジュバントを含んでも含まなくてもよい。

10

【 0 0 5 6 】

従って、本発明は、以下を含むキットを提供する： ( a ) 凍結乾燥形態の、 N . m e n i n g i t i d i s セログループ A 由来の莢膜糖；および ( b ) 液体形態の、 N . m e n i n g i t i d i s セログループ C、W 1 3 5 および Y のうち 1 つ以上 (例えば、 1、 2、 3 ) 由来の莢膜糖。これらの糖は、好ましくは、キャリアタンパク質に結合体化されているか、そして / またはオリゴ糖である。このキットは、 2 つのバイアルの形態を取り得る。

20

【 0 0 5 7 】

本発明はまた、本発明のワクチン組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、 N . m e n i n g i t i d i s のセログループ A 由来の凍結乾燥莢膜糖を、 N . m e n i n g i t i d i s のセログループ C、W 1 3 5 および Y のうち 1 以上 (例えば、 1、 2、 3 ) 由来の莢膜糖と混合する工程を包含し、ここで、この 1 以上の糖は、液体形態である。

【 0 0 5 8 】

本発明はまた、以下を含むキットを提供する： ( a ) 凍結乾燥形態の、 N . m e n i n g i t i d i s のセログループ A 由来の結合体化莢膜オリゴ糖；および ( b ) 液体形態の 1 以上のさらなる抗原。このさらなる抗原は、 N . m e n i n g i t i d i s のセログループ C 由来の莢膜オリゴ糖に結合体化されてもされなくてもよい。

30

【 0 0 5 9 】

(免疫原性組成物およびワクチン)

本発明の多糖、オリゴ糖および結合体は、免疫原性組成物およびワクチン中に含めることに特に適する。従って、本発明のプロセスは、免疫原性組成物またはワクチンとして、多糖、オリゴ糖または結合体を処方する工程を包含し得る。本発明は、この方法で入手可能な組成物またはワクチンを提供する。

【 0 0 6 0 】

本発明の免疫原性組成物およびワクチンは、髄膜炎菌性糖に加えて、代表的に、薬学的に受容可能なキャリアを含み、このキャリアとしては、この組成物を受容する個体にとって有害な抗体の産生をそれ自体誘導しない任意のキャリアが挙げられる。適切なキャリアは、代表的には、大きい、ゆっくりと代謝される高分子 (例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、トレハロース [ 1 2 1 ]、脂質凝集物 (例えば、油滴またはリポソーム)、および不活性ウイルス粒子) である。このようなキャリアは、当業者に周知である。ワクチンはまた、希釈剤 (例えば、水、生理食塩水、グリセロールなど) を含み得る。さらに、補助的物質 (例えば、湿潤剤、または乳化剤、pH 緩衝化物質など) が存在し得る。薬学的に受容可能な賦形剤の完全な考察は、参考文献 1 2 2 において利用可能である。

40

【 0 0 6 1 】

ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、免疫学的に有効な量の糖抗原、ならびに必要なに応じて、任意の他の上記成分を含む。「免疫学的に有効な量」によって、単一用量

50

または一連の用量の一部としてかのいずれかの、処置または予防のために個体に対して有効な量の投与を意味する。この量は、処置される個体の健康状態および身体条件、年齢、処置される個体の分類学的群（例えば、非ヒト霊長類、霊長類など）、合成抗体に対する個体の免疫系の能力、所望の保護の程度、ワクチンの処方、処置を行う医師の、医学的状況の評価、および他の関連因子に依存して変化する。この量は、慣用的な手順によって決定され得る比較的広い範囲に入ることが予測される。投薬処置は、単一用量スケジュールまたは複数の用量スケジュール（例えば、ブースター用量を含む）であり得る。このワクチンは、他の免疫調節剤と共に投与され得る。

【 0 0 6 2 】

このワクチンは、他の免疫調節剤と共に投与され得る。

10

【 0 0 6 3 】

このワクチンは、アジュバントを含み得る。組成物の有効性を増強するために好ましいアジュバントとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：（１）アルミニウム塩（ミョウバン）（例えば、水酸化アルミニウム（オキシヒドロキシドを含む）、リン酸アルミニウム（ヒドロキシホスフェートを含む）、硫酸アルミニウムなど〔参考文献 1 2 3 の第 8 章および第 9 章〕；（２）水中油エマルジョン処方物（他の特異的な免疫刺激剤（例えば、ムラミルペプチド〔ムラミルペプチドとしては、N - アセチル - ムラミル - L - スレオニル - D - イソグルタミン（*thr* - MDP）、N - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン（*nor* - MDP）、N - アセチル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン - L - アラニン - 2 - ( 1' - 2' - ジパルミトイル - *sn* - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ） - エチルアミン MTP - PE）など〕または細菌細胞壁成分を含むかまたは含まない）（例えば、（a）ミクロフリューダイザを使用して、ミクロン未満の粒子へと処方された MF 5 9 <sup>T M</sup>〔参考文献 1 2 3 の第 1 0 章；1 2 4、1 2 5〕（5% Squalene、0.5% Tween 80 および 0.5% Span 85 を含む（必要に応じて、MTP - PE を含む）、（b）ミクロン未満のエマルジョンへと微小流動化されたか、またはより大きい粒子サイズのエマルジョンを生成するためにボルテックスされたかのいずれかである、SAF（10% Squalene、0.4% Tween 80、5% プルロニックブロックポリマー L 1 2 1 および *thr* - MDP を含む）、ならびに（c）Ribi <sup>T M</sup> アジュバント系（RAS）（Ribi Immunochem、Hamilton、MT）（2% Squalene、0.2% Tween 80、ならびにモノホスホリルリピド A（MPL）、トレハロースジミコレート（TDM）および細胞壁骨格（CWS）、好ましくは MPL + CWS（Detox <sup>T M</sup>）からなる群由来の 1 以上の細菌細胞壁成分を含む）；（３）単純な形態またはこれらから生成される粒子の形態のいずれかの、サポニンアジュバント〔参考文献 1 2 3 の第 2 2 章〕（例えば、QS 2 1 または Stimulon <sup>T M</sup>（Cambridge Bioscience、Worcester、MA）（例えば、ISCOM（免疫刺激複合体）；参考文献 1 2 3 の第 2 3 章）、この ISCOMS は、さらなる界面活性剤を欠き得る（例えば、参考文献 1 2 6）；（４）フロイント完全アジュバント（CFA）およびフロイント不完全アジュバント（IFA）；（５）サイトカイン（例えば、インターロイキン（例えば、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 1 2 [ 1 2 7 ] など）、インターフェロン（例えば、 $\alpha$  - インターフェロン）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）など）；（６）モノホスホリルリピド A（MPL）または 3 - O - 脱アシル化 MPL（3dMPL）（例えば、参考文献 1 2 8 および 1 2 9）（肺炎球菌の糖（例えば、参考文献 1 3 0）と共に使用する場合、必要に応じて、実質的にミョウバンの非存在下で）；（７）例えば、QS 2 1 および / または水中油エマルジョンとの 3dMPL の組み合わせ（例えば、参考文献 1 3 1、1 3 2 および 1 3 3）；（８）CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド（Romanら、Nat. Med.、1997、3、849 - 854；Weinerら、PNAS USA、1997、94、10833 - 10837；Davisら、J. Immunol.、1998、160、870 - 876；Chuら、J. Exp. Med.、1

20

30

40

50



997、186、1623-1631; Lipfordら、Eur. J. Immunol.、1997、27、2340-2344; Moldoveanuら、Vaccine、1988、16、1216-1224、Kriegら、Nature、1995、374、546-549; Klinmanら、PNAS USA、1996、93、2879-2883; Ballasら、J. Immunol.、1996、157、1840-1845; Cowderyら、J. Immunol.、1996、156、4570-4575; Halpernら、Cell. Immunol.、1996、167、72-78; Yamamotoら、Jpn. J. Cancer Res.、1988、79、866-873; Staceyら、J. Immunol.、1996、157、2116-2122; Messinaら、J. Immunol.、1991、147、1759-1764; Yiら、J. Immunol.、1996、157、4918-4925; Yiら、J. Immunol.、1996、157、5394-5402; Yiら、J. Immunol.、1998、160、4755-4761; およびYiら、J. Immunol.、1998、160、5898-5906; 国際特許出願WO96/02555、WO98/16247、WO98/18810、WO98/40100、WO98/55495、WO98/37919およびWO98/52581) (すなわち、少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含み、必要に応じて、5-メチルシトシンがシトシンの代わりに使用されている); (8) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル(例えば、参考文献134); (9) オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤[135]または少なくとも1つのさらなる非イオン性界面活性剤(例えば、オクトキシノール)と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤もしくはポリオキシエチレンアルキルエステル界面活性剤[136]; (10) サポニンおよび免疫刺激オリゴヌクレオチド(例えば、CpGオリゴヌクレオチド)[137]; (11) 免疫刺激剤および金属塩の粒子(例えば、参考文献138); (12) サポニンおよび水中油エマルジョン(例えば、参考文献139); (13) サポニン(例えば、QS21)+3dMPL+IL-12(必要に応じて、+ステロール)(例えば、参考文献140); (14) E.coli熱不安定性エンテロトキシン(「LT」)、またはその解毒変異体(例えば、K63変異体またはR72変異体)[例えば、参考文献141の第5章]; (15) コレラ毒素(「CT」)またはその解毒変異体[例えば、参考文献141の第5章]; (16) リポソーム[参考文献123の第13章および第14章]; (17) キトサン[例えば、参考文献142]; (18) 二重鎖RNA; (19) 必要に応じて、負に荷電した界面を有するように(例えば、SDSで)、または正に荷電した表面を有するように(例えば、カチオン性界面活性剤(例えば、CTAB)で)処理された、生体適合性かつ非毒性の物質(例えば、ポリ( -ヒドロキシ酸)(例えば、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなど)から形成された、微粒子(すなわち、直径約100nm~約150μmの粒子、より好ましくは直径約200nm~約30μmの粒子、そして最も好ましくは直径約500nm~約10μmの粒子); あるいは(20) 組成物の効力を増強するための免疫刺激剤として作用する他の物質[例えば、参考文献123の第7章]。

#### 【0064】

アルミニウム塩(特に、リン酸アルミニウムおよび/または水酸化アルミニウム)およびMF59は、本発明の糖抗原との使用のために好ましい。リン酸アルミニウムが使用される場合、このアルミニウム塩に1以上の糖を吸着させることが可能であるが、これらの糖を塩に吸着しないことが好ましく、そしてこのことは、溶液中に遊離のリン酸イオンを含むことによって(例えば、リン酸塩緩衝液の使用によって)促進される。水酸化アルミニウムが使用される場合、糖を塩に吸着させることが好ましい。アジュバントとしての水酸化アルミニウムの使用は、特に、セログループA由来の糖について有利である。

#### 【0065】

本発明の組成物において、いくつかの抗原を水酸化アルミニウムに吸着させるが、他の

抗原はリン酸アルミニウムと共に有することが可能である。4価のN . m e n i n g i t i d i s セログループの組み合わせについて、例えば、以下の順列が利用可能である：

【 0 0 6 6 】

【表 1】

セログループ	アルミニウム塩 (H=水酸化物;P=リン酸塩)															
A	P	H	P	H	H	H	P	P	P	H	H	H	P	P	P	H
C	P	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P
W135	P	H	H	H	P	H	H	P	H	H	P	P	P	P	H	P
Y	P	H	H	H	H	P	H	H	P	P	H	P	H	P	P	P

10

3価のN . m e n i n g i t i d i s セログループの組み合わせについて、以下の順列が利用可能である：

【 0 0 6 7 】

【表 2】

セログループ	アルミニウム塩 (H=水酸化物;P=リン酸塩)							
C	P	H	H	H	P	P	P	H
W135	P	H	H	P	H	P	H	P
Y	P	H	P	H	H	H	P	P

20

一旦処方されると、本発明の組成物は、被験体に直接投与され得る。処置されるべき被験体は、動物であり得；特にヒト被験体が処置され得る。これらのワクチンは、子供および十代をワクチン接種するために特に有用である。これらは、全身的経路および/または粘膜経路によって送達され得る。

【 0 0 6 8 】

代表的に、免疫原性組成物は、液体溶液または懸濁物のいずれかとして注射可能物として調製され；注射の前の液体ビヒクル中の溶液または懸濁物に適切な固体形態もまた、調製され得る。この調製物はまた、アジュバント効果を増強するために、乳濁化され得るかまたはリポソーム中にカプセル化され得る。組成物の直接送達は、一般に、非経口的である（例えば、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射もしくは筋内注射のいずれかによるか、または組織の間隙空間に送達される）。これらの組成物はまた、病変部に投与され得る。他の投与の様式としては、経口投与および肺投与、座剤、ならびに経皮適用（transdermalまたはtranscutaneous application）（例えば、参考文献143を参照のこと）、針および皮下噴射器が挙げられる。投薬処置は、単一用量スケジュールまたは複数用量スケジュール（例えば、ブースター用量を含む）であり得る。

30

【 0 0 6 9 】

本発明のワクチンは、好ましくは滅菌されている。これらは、好ましくは発熱物質を含まない。これらは、好ましくは、例えば、pH6とpH8との間、一般には約pH7で緩衝化されている。ワクチンが水酸化アルミニウム塩を含む場合、ヒスチジン緩衝液を使用することが好ましい[144]。

40

【 0 0 7 0 】

本発明のワクチンは、界面活性剤（例えば、Tween（例えば、Tween 80））を低レベル（例えば、< 0.01%）で含み得る。本発明のワクチンは、特にこれらのワクチンが凍結乾燥される場合に、糖アルコール（例えば、マンニトール）またはトレハロース（例えば、約15mg/ml）を含み得る。

【 0 0 7 1 】

個々の抗原の最適用量は、実験的に評価され得る。しかし、一般に、本発明の糖抗原は、1用量当たり0.1μgと100μgとの間の各糖の用量で、0.5mlの代表的な投

50

薬容量で投与される。この用量は、代表的には、1用量の糖当たり5  $\mu$ gと20  $\mu$ gとの間である。これらの値は、糖として測定される。

【0072】

本発明に従うワクチンは、予防的（すなわち、感染を予防するため）または治療的（すなわち、感染後に疾患を処置するため）のいずれかであり得るが、代表的には予防的である。

【0073】

本発明は、患者において免疫応答を惹起するための方法を提供し、この方法は、本発明に従うワクチンを患者に投与する工程を包含する。免疫応答は、好ましくは、髄膜炎菌性の疾患に対して保護的であり、そして体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答を含み得る。この患者は、好ましくは子供である。

10

【0074】

この方法は、*N. meningitidis*に対してすでにプライムされた患者において、ブースター応答を惹起し得る。

【0075】

本発明はまた、動物において免疫応答を惹起するための医薬の製造における、本発明の多糖、オリゴ糖または結合体の使用を提供する。この医薬は、好ましくは、免疫原性組成物（例えば、ワクチン）である。この医薬は、好ましくは、*Neisseria*（例えば、*meningitis*、*septicaemia*、*gonorrhoea*など）、*H. influenzae*（例えば、*otitis media*、*bronchitis*、*pneumonia*、*cellulitis*、*pericarditis*、*meningitis*など）または肺炎球菌（例えば、*meningitis*、*sepsis*、*pneumonia*など）によって引き起こされる疾患の予防および/または処置のためのものである。従って、細菌性髄膜炎の予防および/または処置が好ましい。

20

【0076】

ワクチンは、標準的な動物モデルにおいて試験され得る（例えば、参考文献145を参照のこと）。

【0077】

本発明はまた、沈殿した細菌莢膜多糖を可溶化するためのプロセスを提供し、ここで、エタノールが溶媒として使用される。

30

【0078】

（定義）

用語「含む（*comprising*）」は、「含む（*including*）」ならびに「含む（*consisting*）」を意味し、例えば、Xを「含む」組成物は、排他的にXから構成され得るか、または何らかの付加物（例えば、X + Y）を含み得る。

【0079】

数値xに関して、用語「約」とは、例えば、x + 10%を意味する。

【図面の簡単な説明】

【0080】

【図1】図1は、多糖の可溶化に対する、種々のエタノール：水比の影響を示す。

40

【図2】図2は、オリゴ糖抗原に対する、マウスにおいて獲得されたIgG力価を示す。図2は、セログループAのオリゴ糖を用いた結果を示す。

【図3】図3は、オリゴ糖抗原に対する、マウスにおいて獲得されたIgG力価を示す。図3は、セログループYについての結果を示す。

【図4】図4は、オリゴ糖抗原に対する、マウスにおいて獲得されたIgG力価を示す。図4は、セログループW135についての結果を示す。

【図5a】図5aは、セログループAおよびCについてのオリゴ糖結合体の混合物を用いてマウスにおいて得られたpost-III IgG力価を示す。図5aは、抗セログループA応答を示す。

【図5b】図5bは、セログループAおよびCについてのオリゴ糖結合体の混合物を用い

50

てマウスにおいて得られた  $post - II \quad IgG$  力価を示す。図 5 b は、抗セログループ C 応答を示す。

【図 6】図 6 は、セログループ C、W 1 3 5 および Y についてのオリゴ糖結合体の混合物を用いてマウスにおいて得られた  $IgG$  力価を示す。図 6 は、抗セログループ W 1 3 5 応答を示す。

【図 7】図 7 は、セログループ C、W 1 3 5 および Y についてのオリゴ糖結合体の混合物を用いてマウスにおいて得られた  $IgG$  力価を示す。図 7 は、抗セログループ Y 応答を示す。

【図 8】図 8 は、セログループ C、W 1 3 5 および Y についてのオリゴ糖結合体の混合物を用いてマウスにおいて得られた  $IgG$  力価を示す。図 8 は、抗セログループ C 応答を示す。

10

【図 9】図 9 は、セログループ A、C、W 1 3 5 および Y についてのオリゴ糖結合体の混合物を用いてマウスにおいて得られた  $post - II \quad IgG$  力価を示す。図 9 は、抗セログループ W 1 3 5 応答を示す。

【図 10】図 10 は、セログループ A、C、W 1 3 5 および Y についてのオリゴ糖結合体の混合物を用いてマウスにおいて得られた  $post - II \quad IgG$  力価を示す。図 10 は、抗セログループ Y 応答を示す。

【図 11】図 11 は、セログループ A、C、W 1 3 5 および Y についてのオリゴ糖結合体の混合物を用いてマウスにおいて得られた  $post - II \quad IgG$  力価を示す。図 11 は、抗セログループ A 応答を示す。

20

【図 12】図 12 は、異なる加水分解時間における、試験 Men A 多糖サンプルを使用して得られた校正曲線である。この曲線は、重合の程度の逆数と旋光能との間の線形関係を示す。

【図 13】図 13 は、異なる加水分解時間における、試験 Men Y 多糖サンプルを使用して得られた校正曲線である。この曲線は、重合の程度の  $\log$  と KD (分配係数) との間の線形関係を示す。

【図 14】図 14 は、 $IgG$  サブクラスによって分割された、セログループ (14) A ; (15) C ; (16) W 1 3 5 および (17) Y についてのオリゴ糖結合体での免疫後にマウスにおいて得られた、 $post - II \quad IgG$  力価を示す。

【図 15】図 15 は、 $IgG$  サブクラスによって分割された、セログループ (14) A ; (15) C ; (16) W 1 3 5 および (17) Y についてのオリゴ糖結合体での免疫後にマウスにおいて得られた、 $post - II \quad IgG$  力価を示す。

30

【図 16】図 16 は、 $IgG$  サブクラスによって分割された、セログループ (14) A ; (15) C ; (16) W 1 3 5 および (17) Y についてのオリゴ糖結合体での免疫後にマウスにおいて得られた、 $post - II \quad IgG$  力価を示す。

【図 17】図 17 は、 $IgG$  サブクラスによって分割された、オリゴ糖結合体の 4 価混合物での免疫後にマウスにおいて得られた、 $post - II \quad IgG$  力価を示す。

【図 18】図 18 は、オリゴ糖結合体の調製を例示する。

【図 19】図 19 は、モルモットモデルにおいて得られた、(A) 抗 Men A GMT および (B) 抗 Men C GMT ( $\pm 95\%$  の信頼区画) を示す。棒上の値は、血清殺菌性アッセイ (SBA) 力価 (すなわち、 $50\%$  の殺傷を生じる血清希釈の逆数) である。

40

【発明を実施するための形態】

【0081】

(発明を実施するための様式)

(A. 髄膜炎菌性多糖の産生および精製)

セログループ A、W 1 3 5 および Y の髄膜炎菌を、 $150\text{ml}$  の Franz A を培地として含む  $500\text{ml}$  のフラスコ中で、12 時間にわたって  $35 \pm 1$  で増殖させた。攪拌を、 $35\text{mm}$  のスロー (throw) Shaker を使用して  $150\text{rpm}$  に設定した。次いで、 $85\text{ml}$  の培養物を、培地として Watson を含む  $20\text{L}$  の発酵槽に接種した。

50

## 【0082】

18.5時間後(W135およびY)または16.5時間後(A)、OD = 1.0が達成された場合、この発酵を、300mlのホルマリンを添加することによって妨害し、次いで、インキュベーションの2時間後、発酵槽を10℃まで冷却した。上清を、遠心分離、その後の濾過(0.22 μm)および30 kDaの膜を用いる限外濾過によって回収した。

## 【0083】

次いで、粗製濃縮多糖を、100 mg/mlの水溶液としてCTABの添加によって沈殿させた。添加した容量を、以下の表に示す。室温で12時間後、CTAB複合体を、遠心分離によって回収した。このCTAB複合体を、激しく攪拌しながら、16~20時間

10

## 【0084】

## 【表3】

セログループ	CTAB 容量 (ml)	95%エタノールの容量 (リットル/kg 湿性ペースト)
A	475	3.5 ~ 6
W135	200	4 ~ 6
Y	650	3.4

20

得られた懸濁物を、CUNO 10 SP深層フィルタを介して濾過した。濾液を、CUNO zeta carbon<sup>TM</sup>カートリッジを介して、OD<sub>275nm</sub> < 0.2まで再循環させた。次いで、このZeta carbon濾液を、0.22 μmフィルタを介して収集および濾過した。多糖を、最終的に、CaCl<sub>2</sub> 2M水溶液(EtOH最終溶液の10~12 ml/l)の添加によって、エタノール相から沈殿させた。次いで、精製した多糖を、遠心分離によって収集し、95%エタノールで洗浄し、そして減圧下で乾燥させた。

## 【0085】

他の実験において、抽出に使用したエタノールの最終濃度は、異なった(図1)。セログループAの多糖について、80%と95%との間のエタノール範囲が最も有効であり、抽出効率は、より低い%では、減少した。セログループW135について、良好な抽出は、75%と90%との間のエタノールで達成され、95%ではあまり有効でなかった。セログループYについて、最良の結果は、75%と85%との間のエタノールで達成され、より高い%(例えば、90%、95%)は、あまり有効でなかった。一般に、本明細書中で報告されるエタノールの%を下回る%は、混入物(例えば、タンパク質)の同時抽出を増加させる傾向があったことに留意のこと。この段落において与えられたエタノールの%は、最終濃度(エタノール+水の総容量の%としてのエタノール)として表示されており、そして約50%(すなわち、500 gのH<sub>2</sub>O/kg 湿性ペースト)の、遠心分離によ

30

40

## 【0086】

(B. セログループA多糖の結合)

a) 加水分解

セログループA髄膜炎菌多糖を、73℃にて約3時間、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.7中で加水分解した。加水分解を、平均重合度(DP)約10(総有機リンとリン酸モノエステルとの間の(w/w)比により決定される場合)のオリゴ糖を得よう制御した。

## 【0087】

50

(総有機リン)対(リンモノエステル(phosphorus monoester))のDP比は、図12に示されるように、旋光能( )に逆比例する。この関係は、直接的なリン測定よりも好都合に加水分解の程度をモニターするのに使用され得る。

【0088】

b) サイズ分け(Sizing)

この工程は、加水分解プロセスの間に生成される短鎖オリゴ糖を除去する。上記で得られた加水分解産物を、30kDaカットオフメンブレン(12ダイアフィルトレーション量の5mM酢酸緩衝液、pH6.5)を通じて限外濾過した。高いMw種を含む保持物(retentate)を廃棄し;透過物(permeate)を、5mM酢酸緩衝液、pH6.5中で平衡化したQ Sepharose Fast Flowカラムに充填した。次いで、このカラムを、5カラム量(CV)の平衡緩衝液で洗浄し、次いで、10CVの5mM酢酸緩衝液/125mM NaCl、pH6.5で洗浄して、DP6のオリゴ糖を除去した。次いで、サイズ分けされたオリゴ糖を、5CVの5mM酢酸緩衝液/0.5M NaCl、pH6.5で溶出した。

10

【0089】

溶出したオリゴ糖集団は、約15の平均DPを有する。

【0090】

c) 還元末端での一級アミン基の導入

アンモニウム塩(酢酸塩または塩酸塩)を、終濃度49~300g/Lの範囲で、サイズ分けしたオリゴ糖溶液に添加し、次いで、ナトリウム-シアノ-臭化水素を、終濃度12~73g/Lの範囲で添加した。pHを6~7.3の間に調整した後、この混合物を、37で5日間インキュベートした。

20

【0091】

次いで、アミノ-オリゴ糖を、13ダイアフィルトレーション量の0.5M NaCl、次いで、7ダイアフィルトレーション量の20mM NaClを用い、1kDaまたは3kDaカットオフメンブレンを用いてタンジェンシャルフロー限外濾過により精製した。精製したアミノ-オリゴ糖溶液を、参考文献146の手順によりリン含有量(この抗原の1つの化学活性)について分析し、そして参考文献147の手順により導入したアミノ基の量について分析した。

【0092】

次いで、精製したオリゴ糖を、ロータリーエバポレーターを用いて乾燥し、水を除去した。

30

【0093】

d) 活性エステルへの誘導体化

乾燥したアミノ-オリゴ糖を、40mMアミノ基濃度で蒸留水に溶解し、次いで、9容量のDMSOを添加し、次いで、トリエチルアミンを終濃度200mMで添加した。得られた溶液に、アジピン酸N-ヒドロキシスクシンイミドジエステルを、終濃度480mMで添加した。

【0094】

この反応を、室温にて2時間、攪拌下で維持し、次いで、活性化オリゴ糖を、アセトン(80%v/v終濃度)を用いて沈殿させた。この沈殿を遠心分離により収集し、そしてアセトンを用いて数回洗浄して未反応アジピン酸N-ヒドロキシスクシンイミドジエステルおよび副産物を除去した。最後に、活性化オリゴ糖を減圧下で乾燥させた。

40

【0095】

オリゴ糖構造に導入した活性エステル基の量を、参考文献148に記載されるように、比色法により決定した。

【0096】

e) CRM<sub>197</sub>への結合

乾燥した活性化オリゴ糖を、CRM<sub>197</sub>の45mg/ml溶液を含有する0.01Mリン酸緩衝液、pH7.2に、12:1の活性エステル/タンパク質(mole/mole)

50

e) 比で添加した。この反応を、室温にて一晚、攪拌下で維持した。この期間の後、結合体を、疎水性クロマトグラフィーまたはタンジェンシャルフロー限外濾過により精製した。精製 Men A - CRM<sub>197</sub> 結合体を滅菌濾過し、そしてワクチン処方まで - 20 または - 60 で保存した。

【0097】

この結合体を、タンパク質含有量 (microBCA Protein Assay)、Men A 糖含有量 (リンの比色分析)、遊離糖含有量、HPLC プロフィール (TSK gel G4000SW 7.5 mm ID x 30 cm において)、および SDS-PAGE について分析した。代表的な調製物の特徴を、以下の表に示す。

【0098】

【表4】

ロットコード	糖 (mg/ml)	タンパク質 (mg/ml)	グリコシル化	KD
210201/A	0,257	0,864	0,3	0,489
210201/BS	0,308	1,354	0,23	0,503
210201/BL	0,28	1,482	0,19	0,501
35I230595	0,138	0,3	0,46	
010900	0,092	0,337	0,27	
DP29	0,105	0,245	0,43	
A1 (unsized)	0,08	0,291	0,27	
A2 (sized)	0,446	2,421	0,18	

(C・セログループ W135 多糖の結合)

a) 加水分解

群 W 髄膜炎菌多糖を、80 にて約 3 時間、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 4.7 中で加水分解した。これにより、約 15 ~ 20 の平均 DP (シアル酸 (SA) と還元末端 SA との間の比により決定される場合) を有するオリゴ糖が得られた。

【0099】

(総 SA) 対 (還元末端 SA) の DP 比は、図 13 に示されるように、HPLC-SEC により決定される場合、KD に関連する。この関係は、直接的な SA 測定よりも好都合に加水分解の程度をモニターするのに使用され得る。

【0100】

b) サイズ分け

この加水分解産物を、30 kDa カットオフメンブレン (12 ~ 20 ダイアフィルトレーション量の 5 mM 酢酸緩衝液 / 15 ~ 30 mM NaCl、pH 6.5) を通じて限外濾過した。高い MW 種を含む保持物を廃棄し、透過物を、5 mM 酢酸緩衝液 / 15 mM NaCl、pH 6.5 中で平衡化した Q Sepharose Fast Flow カラムに充填した。次いで、このカラムを、10 CV の平衡緩衝液で洗浄して、DP 3 ~ 4 のオリゴ糖を除去し、そして 3 CV の 5 mM 酢酸緩衝液 / 500 mM NaCl、pH 6.5 で溶出した。

【0101】

c) 還元末端での一級アミノ基の導入

塩化アンモニウムまたは酢酸アンモニウムを、終濃度 300 g/L で、サイズ分けしたオリゴ糖溶液に添加し、次いで、ナトリウム - シアノ - 臭化水素を、49 または 73 g/L の終濃度で添加した。この混合物を、50 で 3 日間インキュベートした。

【0102】

次いで、アミノ - オリゴ糖を、セログループ A について記載されるようにタンジェンシャルフロー限外濾過により精製した。精製した物質を、シアル酸 (参考文献 149 に従う比色方法) および / またはガラクトース (HPLC) (Men W135 抗原の化学活性) の含有量について分析した。次いで、精製したオリゴ糖を、ロータリーエバポレーターを

10

20

30

40

50

用いて乾燥し、水を除去した。

【 0 1 0 3 】

d) 活性エステルへの誘導体化

乾燥したアミノ - オリゴ糖を、セログループ A について上記されるようにして誘導体化した。

【 0 1 0 4 】

e) CRM<sub>197</sub>への結合

結合を、セログループ A について上記されるように実施した (しかし、結合体を精製するために、30 kDaメンブレンによるダイアフィルトレーションを使用した (50 ダイアフィルトレーション量の 10 mMリン酸緩衝液、pH 7.2))。精製した結合体を滅菌濾過し、そしてワクチン処方まで - 20 または - 60 で保存した。

【 0 1 0 5 】

この結合体を、セログループ A について上記したのと同じのパラメータについて分析した。MenW糖含有量を、比色シアル酸決定により分析した。

【 0 1 0 6 】

【表 5】

ロットコード	糖 (mg/ml)	タンパク質 (mg/ml)	グリコシル化	KD
lot 1	5,73	3,52	1,63	0,296
lot 2/4,5	3,51	2,88	1,22	0,308
lot 3S	2,49	2,25	1,11	0,380
lot 3Sd	2,03	2,24	0,91	0,394
lot 3L	2,32	2,3	1,01	0,391
lot 3Ld	1,94	2,29	0,85	0,383
Lot 3S/pr. Glic6	0,363	0,82	0,44	0,498
Lot 3S/pr. Glic9	0,424	0,739	0,57	0,447
Lot 3S/pr. Glic12	0,479	0,714	0,671	0,414

( D . セログループ Y 多糖の結合 )

a) 加水分解

群 Y 髄膜炎菌多糖を、セログループ W 1 3 5 について上記されるように加水分解した。これにより、約 15 ~ 20 の平均 DP ( SA と還元末端 SA (上記 C ( a ) で記載されるように間接的に好都合に測定される) との間の比により決定される場合) を有するオリゴ糖を得た。

【 0 1 0 7 】

b) サイズ分け、c) アミノ基の導入、d) 活性エステルへの誘導体化、および e) 結合

これらの工程を、セログループ W 1 3 5 について上記されるように実施した。精製した結合体を滅菌濾過し、そしてワクチン処方まで - 20 または - 60 で保存した。

【 0 1 0 8 】

この結合体を、セログループ W 1 3 5 について上記されるのと同様式で分析した。

【 0 1 0 9 】



【表 6】

ロットコード	糖 (mg/ml)	タンパク質 (mg/ml)	グリコシル化	KD
lot 1A	1,16	0,92	1,26	0,303
lot 1B	4,57	3,55	1,29	0,339
Lot 2/4,5	2,32	6,1	0,38	0,467
lot 2/6	1,75	5,73	0,3	0,498

( E . 個々の結合体の免疫原性 )

凍結したバルク結合体を解凍した。それぞれを、20 µg 糖 / ml、5 mM ホスフェート、9 mg / ml NaCl、リン酸アルミニウム (0.6 mg / ml の Al<sup>3+</sup> 濃度を得るまで)、pH 7.2 の終濃度になるまで攪拌しながら希釈した。次いで、この混合物を、攪拌せずに、2 ~ 8 で一晩維持し、そして、マウス免疫のために 4 µg 糖 / ml になるまで生理食塩水でさらに希釈した。

【 0 1 1 0 】

第 2 セットのワクチンを、同一様式で各セログループについて調製した (しかし、リン酸アルミニウムを添加する代わりに、同量の水を添加した)。

【 0 1 1 1 】

各免疫群につき 10 匹の Balb / c マウスに、0.5 ml のワクチンを第 0 週および第 4 週で 2 度、s.c. 注射した。免疫前、2 度目の投薬の前日、および 2 度目の投薬の 2 週間後に、採血を行った。(a) ミョウバンを含む結合体ワクチンまたは含まない結合体ワクチン、(b) 生理食塩水コントロール、および (c) 非結合体多糖コントロールを用いて免疫を行った。

【 0 1 1 2 】

特異的な抗多糖 IgG 抗体を、本質的に参考文献 150 に記載されるように、免疫動物の血清中で決定した。個々のマウス血清を、滴定曲線により二連で分析し、そして GMT を、各免疫群について算出した。力価を、「Titerun」ソフトウェア (FDA) を用いて、Mouse Elisa Units (MEU) で算出した。抗多糖力価の特異性を、競合因子として関連する多糖を用いた競合 ELISA により決定した。

【 0 1 1 3 】

図 2 に示されるように、MenA 結合体は、動物中で高い抗体力価を誘導した。予想通り、非結合体多糖は、免疫原性ではなかった。アジュバントとしてのリン酸アルミニウムとの結合体処方物は、結合体単独により得られた力価と比較して、より高いレベルの抗体を誘導した。同様の結果を、MenY (図 3) および MenW135 (図 4) について観察した。

【 0 1 1 4 】

post - II 免疫応答の IgG サブクラスを、種々の群について測定した。特異的なサブクラスを、上記 E 節において総 IgG 力価の決定に使用したのと同じの ELISA 法を用いて決定した (しかし、二次抗体として、アルカリホスファターゼ - 抗マウス IgG 1、IgG 2a、IgG 2b、または IgG 3 (Zymed) を用いた)。力価を、1 : 3200 に希釈した血清を用いて、基質の発色の 30 分後に得られた OD<sub>405nm</sub> として表し、これを図 14 (MenA)、15 (MenW135)、および 16 (MenY) に示す。応答は、主に、サブクラス IgG 1 においてであり、これは、T 依存性抗原によりマウス中で優先的に誘導されるサブクラスである。多糖は、本来、免疫学的メモリーを誘導し得ない T 非依存性抗原であるので、これらのデータは、結合体が所望の効果を有していたことを示す。

【 0 1 1 5 】

post - II 血清をまた、細菌の補体媒介溶解を測定するインビトロアッセイを用いて、殺菌活性について試験した。post - II 血清を、アッセイで使用する前に、56

10

20

30

40

50

で30分間不活性化し、そして25%子ウサギ補体を、補体の供給源として使用した。殺菌力価を、以下の菌株に対して50%の細菌死滅を生じる相互血清希釈物として表した：MenA G8238、A1、F6124；MenW135 5554(OAc+)および242317(OAc-)；MenY 242975(OAc-)および240539(OAc+)。

【0116】

MenAについての結果は、以下の通りである。

【0117】

【表7-1】

キャリア	多糖／オリゴ糖	およそのαDP	アルミニウムアジュバント	GMT	殺菌活性
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	461	F8238: 2048-4096; F6124: 2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	920	F8238: 4096; F6124: 4096
-	P	-	リン酸塩	3	F8238: 8; F6124: 128
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	290	F8238: 512-1024
-	P	-	-	2	F8238: <4
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	155	F8238: 512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	393	F8238: 1024
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	396	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	1396	F8238: 4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	1461	F8238: 2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	1654	F8238: 2048
CRM <sub>197</sub>	O	29	リン酸塩	1053	F8238: 2048
CRM <sub>197</sub>	分けて 混ぜる O	10	リン酸塩	1449	F8238: 2048
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	626	F8238: 2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	742	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	-	2207	-
CRM <sub>197</sub>	O	29	-	1363	-
CRM <sub>197</sub>	分けて 混ぜる O	10	-	615	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	1515	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	876	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	1232	-
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	852	-

【0118】

【表7-2】

CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	863	F8238: 2048; A1: 2048; F6124: >2048
CRM <sub>197</sub>	O	27	リン酸塩	1733	F8238: 4096-8192; F6124: 4096-8192
CRM <sub>197</sub>	O	15	リン酸塩	172	F8238: 1024; A1: 1024-2048; F6124: 2048
CRM <sub>197</sub>	O	15	水酸化物	619	F8238: 1024; A1: 2048; F6124: 2048

MenW135についての結果は、以下の通りである。

【0119】

【表 8】

キャリア	多糖/ オリゴ糖	OAc	アルミニウム アジュバント	GMT	殺菌活性
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	14	5554: 256-512
CRM <sub>197</sub>	O	+	リン酸塩	23	5554: 256-512
-	P		-	-	5554: 4
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	45	5554: 1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	101	5554: 64-128
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	80	5554: 256-512
CRM <sub>197</sub>	O	+	リン酸塩	221	5554: 1024-2048; 242317: 1024-2048
CRM <sub>197</sub>	O	-	-	52	5554: 512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	-	リン酸塩	329	5554: 1024-2048; 242317: 1024-2048
CRM <sub>197</sub>	O	+	-	41	5554: 256-512
CRM <sub>197</sub>	O	+	リン酸塩	24	5554: 1024; 242317: 128-256
CRM <sub>197</sub>	O	-	-	116	5554: 256-512
CRM <sub>197</sub>	O	-	リン酸塩	185	5554: 1024; 242317: 512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	リン酸塩	565	5554: 2048
CRM <sub>197</sub>	O	+	リン酸塩	328	5554: 512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	リン酸塩	490	5554: 1024-2048
CRM <sub>197</sub>	O	+	水酸化物	189	5554: 512-1024; 242317: 512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	リン酸塩	80	5554: 512-1024; 242317: 512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	+	水酸化物	277	5554: 512-1024; 242317: 1024-2048

MenY についての結果は、以下の通りである。

【 0 1 2 0 】

【表 9】

キャリア	多糖/ オリゴ糖	αDP	アルミニウム アジュバント	GMT	殺菌活性
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	751	242975: 8192
CRM <sub>197</sub>	O	>15	リン酸塩	1190	242975: 8192-16384; 240539: 8192-16384
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	284	242975: 2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	>15	リン酸塩	775	242975: 2048-4096
-	P	-	-	-	242975: 256
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	1618	242975: 4096-8192
CRM <sub>197</sub>	O	>15	-	2123	242975: 2048
CRM <sub>197</sub>	O	<10	-	253	242975: 512-1024
CRM <sub>197</sub>	O	<10	-	1060	242975: 256-512
CRM <sub>197</sub>	O	>15	水酸化物	1167	242975: 8192; 240539: 8192-16384
CRM <sub>197</sub>	O	>15	リン酸塩	665	242975: 8192; 240539: 8192-16384
CRM <sub>197</sub>	O	>15	リン酸塩	328	242975: 4096; 240539: 2048-4096
CRM <sub>197</sub>	O	>15	水酸化物	452	242975: 2048; 240539: 1024-2048

( F . Men C 結合体と組み合わせた Men A 結合体の免疫原性 )

CRM - Men C 濃縮バルク ( Chiron Vaccines, Italy 製 ) を、CRM - Men A 濃縮バルク ( 上記のようにして得た ) と混合し、攪拌により希釈および混合した。3つの異なる調製物を作製した。各々は、20 μg 糖 / ml の Men A を含むが、異なる量の Men C 結合体を含んだ: ( i ) 20 μg 糖 / ml ( ii ) 10 μg 糖 / ml ; ( iii ) 5 μg 糖 / ml 。従って、Men A : Men C の比 ( w / w ) は、( i ) 1 : 1 ; ( ii ) 2 : 1 ; ( iii ) 4 : 1 であった。

10

20

30

40

50

## 【0121】

各調製物はまた、5 mMリン酸ナトリウム、9 mg/ml NaCl、リン酸アルミニウム(0.6 mg/mlの $Al^{3+}$ 濃度を与えるまで)、pH 7.2を含んだ。次いで、各混合物を、攪拌せずに、28℃で一晩維持し、そしてさらにマウス免疫前に生理食塩水で1:5に希釈した。

## 【0122】

第2セットのワクチンを、同一の様式で調製した(しかし、リン酸アルミニウムを添加する代わりに、同量の水を添加した)。

## 【0123】

6つのワクチン各々について、10匹のBalb/cマウスを、上記のように免疫した。コントロール群は、生理食塩水またはMenA結合体のみを受けた。

## 【0124】

MenAおよびMenCについての抗多糖抗体を、上記のように決定した。

## 【0125】

MenA + MenC結合体の混合物を用いて得られた結果は、A成分とC成分との間の比(w/w)が、MenAの免疫原性に対して重要な役割を果たすことを、はっきりと示している。

## 【0126】

MenA結合体コントロールを用いて得られた特異的な抗MenA pS力価は、同一投薬量で、MenA + MenCの組み合わせよりも高かった(ミョウバンアジュバントを含む場合も含まない場合も)(図5a)。より少量のMenC結合体を、この組み合わせにおいて使用した場合、より良好な抗MenA pS力価が、MenA結合体成分により誘導された。同時に、抗MenC力価は、受容可能な程度を維持した(図5b)。

## 【0127】

モルモットモデルを用いた実験もまた行った。以前のように同一のリン酸アルミニウムアジュバント(非晶質ヒドロキシリン酸、0.84と0.92との間の $PO_4/Al$ モル比、0.6 mg  $Al^{3+}/ml$ )を用いて、3つの異なる調製物を作成した。

## 【0128】

## 【表10】

調製物	Men A*	MenC*	MenA : MenC 比
A	20 µg/ml	20 µg/ml	1 : 1
B	40 µg/ml	20 µg/ml	2 : 1
C	20 µg/ml	10 µg/ml	1 : ½

\*糖として表す

これらの調製物を、生理食塩水で1:2に希釈し、そしてこれを用いてモルモットを免疫した。各免疫群につき5匹のモルモット(Hartley系統、雌、450~500グラム)に、0.5 mlのワクチンを、第0日および第28日で2度、注射した。採血を、最初の免疫前、次いで第42日に行った。血清を、ELISAおよび血清殺菌アッセイ(MenA株MK83/94またはMenC株C11に対する)による分析まで-70℃で保存した。結果を図19に示す。

## 【0129】

(G.セログループC、W135、およびYの組み合わせワクチン)

セログループC、W135、およびY由来の多糖の結合体を、上記のように混合して、各結合体につき終濃度20 µg糖/mlとした。このワクチンは、5 mMリン酸ナトリウムおよび9 mg/ml NaCl、pH 7.2の終濃度を含んだ。一晩保存した後、この混合物を、免疫のために、各結合体につき4 µg糖/mlを含むよう希釈した。

## 【 0 1 3 0 】

免疫および分析を、以前のように実施した。

## 【 0 1 3 1 】

この結果は、MenW135結合体の免疫原性が、MenW135結合体単独で得られる免疫原性と比較した場合、MenCおよびMenY結合体と組み合わせて投与された場合に増強されることを示す(図6)。MenYの免疫原性は、この組み合わせにおいて、個々の結合体で得られた免疫原性に匹敵し(図7)、そしてMenC結合体の免疫原性にも匹敵した(図8)。

## 【 0 1 3 2 】

(H.セログループA、C、W135、およびYの組み合わせワクチン)

セログループA、C、W135、およびY由来の多糖の結合体を、上記のように混合して、セログループA、W135、およびY結合体について20 $\mu$ g糖/ml、そしてセログループC結合体について5 $\mu$ g糖/mlの終濃度とした。このワクチンは、5mMリン酸ナトリウムおよび9mg/ml NaCl、リン酸アルミニウム(0.6mg/mlのAl<sup>3+</sup>濃度を与えるまで)、pH7.2の終濃度を含んだ。次いで、この混合物を、攪拌せずに、2~8で一晩維持し、そしてさらに、A、W135、およびY結合体については4 $\mu$ g糖/ml、ならびにC結合体については1 $\mu$ g糖/mlとなるよう生理食塩水で希釈した。この希釈混合物を免疫のために使用した。

## 【 0 1 3 3 】

免疫および分析を以前のように実施した(コントロールは、セログループCを除く個々の結合体を含んだ)。

## 【 0 1 3 4 】

図9は、以前のように、MenW135結合体の免疫原性が、MenA、MenC、およびMenY結合体と組み合わせて投与される場合に増強されたことを示す。図10は、MenY結合体の免疫原性が、MenA、MenC、およびMenW135結合体と組み合わせて送達される場合、有意に異なることを示す。図11は、MenA結合体の免疫原性が、MenC結合体を低用量(1/4)で投与した場合でさえも、組み合わせにおいて顕著に減少することを示す。この抗原性の競合は、非結合四価(ACWY)多糖ワクチンにおいて見られない[5]。

## 【 0 1 3 5 】

(I.凍結乾燥したセログループA抗原)

セログループA *N. meningitidis* の莢膜多糖(capsular polysaccharide)は特に、加水分解に対して感受性である。従って、MenA莢膜オリゴ糖の結合体を、投与時の再構成の容易な凍結乾燥状態で調製した。再構成後に以下の成分を単一用量で与える成分を有する凍結乾燥形態を、調製した。

## 【 0 1 3 6 】

## 【表11】

成分	濃度
CRM-MenA	20 $\mu$ g 糖/ml
リン酸カリウム緩衝液	5 mM
マンニトール	15 mg/ml

この組成物は、アジュバントを含まない。2つのアジュバントを、その再構成のために調製した。

## 【 0 1 3 7 】

10

20

30

40

【表 1 2】

成分	濃度	濃度
水酸化アルミニウム	0.68 mg Al <sup>3+</sup> /ml	-
リン酸アルミニウム *	-	0.6mg Al <sup>3+</sup> /ml
リン酸ナトリウム緩衝液	-	10 mM
ヒステジン緩衝液	10 mM	-
塩化ナトリウム	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	0.005%	0.005%
PH	7.2±0.05	7.2±0.05

\* 非晶質ヒドロキシホスフェート、0.84と0.92との間のPO<sub>4</sub>/Alモル比注入のために水で再構成した場合、糖成分の安定性は以下の通りであった。

【0138】

【表 1 3】

時間 (日)	2~8℃で保存			36~38℃で保存		
	糖総量 (µg/ml)	遊離の糖 (µg/ml)	遊離の糖 %	糖総量 (µg/ml)	遊離の糖 (µg/ml)	遊離の糖 %
0	17.72	1.04	5.9	17.72	1.04	5.9
15	17.01	0.88	5.2	16.52	2.26	13.7
30	17.82	0.89	5.0	17.29	2.64	15.3

同じ4週の期間にわたって、pHは、2~8 と36~38 との両方においてpH7.2で安定であり、タンパク質含有量は、約24.5 µg/mlで安定であり、そして水分含有量は、2.5%より下であった。

【0139】

2~8 でリン酸アルミニウムアジュバント溶液により再構成し、そしてその温度で保存した場合、安定性は以下の通りであった。

【0140】

【表 1 4】

時間 (時間)	糖総量 (µg/ml)	遊離の糖 (µg/ml)	遊離の糖 %
0	16.62	1.09	6.6
24	16.51	0.98	5.9
48	16.83	0.99	5.9

(J・セログループA、C、W135、およびY(凍結乾燥したセログループA結合体)の組み合わせワクチン)

水酸化アルミニウムアジュバント(2 mg/ml)に吸着させたかまたはリン酸アルミニウムアジュバント(10 mMリン酸緩衝液の存在下で、非晶質ヒドロキシホスフェート、0.84と0.92との間のPO<sub>4</sub>/Alモル比、0.6 mg/mlのAl<sup>3+</sup>)と混合されたかのいずれかのMenC、W135、およびY成分の三価混合物を調製した。2つの三価混合物の組成は以下の通りであった：

【0141】

10

20

30

40

【表 1 5】

成分	濃度	濃度
水酸化アルミニウム	0.68 mg Al <sup>3+</sup> /ml	-
リン酸アルミニウム*	-	0.6mg Al <sup>3+</sup> /ml
CRM-MenC	20μg 糖/ml	20μg 糖/ml
CRM-MenY	20μg 糖/ml	20μg 糖/ml
CRM-MenW135	20μg 糖/ml	20μg 糖/ml
リン酸ナトリウム緩衝液	-	10 mM
ヒスチジン緩衝液	10 mM	-
塩化ナトリウム	9 mg/ml	9 mg/ml
Tween 80	0.005%	0.005%

\* 非晶質ヒドロキシホスフェート、0.84と0.92との間のPO<sub>4</sub>/Alモル比水酸化物混合物については、糖成分の安定性は以下の通りであった：

【 0 1 4 2】

【表 1 6 - 1】

時間 (日)	2～8℃で保存		36～38℃で保存	
	遊離の糖 (μg/ml)	遊離の糖 %	遊離の糖 (μg/ml)	遊離の糖 %
MenC バルク				
0	<1.2	<6	<1.2	<6
15	<1.2	<6	<1.2	<6
30	<1.2	<6	<1.2	<6
MenC バイアル				
0	<1.2	<6	<1.2	<6
15	<1.2	<6	<1.2	<6
30	<1.2	<6	1.3	6.6
MenW135 バルク				
0	2.5	12.5	2.5	12.5
15	2.3	11.4	3.4	16.8
30	2.3	11.5	3.5	17.3
MenW135 バイアル				
0	2.1	10.6	2.1	10.6
15	2.3	11.7	2.7	13.3
30	20.	10.2	3.3	16.3
MenY バルク				

【 0 1 4 3】

【表 16 - 2】

0	1.7	8.3	1.7	8.3
15	<1.3	<6.3	2.0	10.2
30	1.3	6.3	2.4	12.2
<b>MenY バイアル</b>				
0	1.4	7.1	1.4	7.1
15	1.5	7.6	2.1	10.7
30	1.3	6.3	2.9	14.3

10

同じ4週の期間にわたり、pHは、2～8 と36～38 との両方で、 $7.15 \pm 0.05$  で安定であった。

【0144】

リン酸塩混合物については、糖成分の安定性は、以下の通りであった。

【0145】

【表 17】

時間 (日)	2～8℃で保存			36～38℃で保存		
	糖総量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	遊離の糖 ( $\mu\text{g/ml}$ )	遊離の糖 %	糖総量 ( $\mu\text{g/ml}$ )	遊離の糖 ( $\mu\text{g/ml}$ )	遊離の糖 %
<b>MenC バルク</b>						
0	22.8	<1.0	<5	22.8	<1.0	<5
15	17.2	<1.0	<5	18.6	<1.0	<5
30	18.9	<1.0	<5	20.5	<1.0	<5
<b>MenC バイアル</b>						
0	20.5	<1.0	<5	20.5	<1.0	<5
15	18.3	<1.0	<5	23.4	<1.0	<5
30	18.0	<1.0	<5	20.5	<1.0	<5
<b>MenW135 バルク</b>						
0	20.7	2.0	10.4	20.7	2.0	10.4
15	21.9	2.3	11.6	21.2	2.1	10.3
30	19.6	2.1	10.6	21.0	2.4	11.8
<b>MenW135 バイアル</b>						
0	23.4	1.7	8.4	23.4	1.7	8.4
15	21.2	1.9	9.5	20.1	2.2	11.1
30	20.1	2.2	11.2	21.3	3.2	16.1
<b>MenY バルク</b>						
0	19.1	<1.1	<5.3	19.1	<1.1	<5.3
15	20.1	1.4	6.8	18.7	1.3	6.4
30	18.6	1.4	7.6	19.2	1.7	8.3
<b>MenY バイアル</b>						
0	21.4	<1.1	<5.3	21.4	<1.1	<5.3
15	19.6	1.4	6.8	19.0	1.5	7.4
30	17.7	1.2	6.2	18.4	1.9	9.4

20

30

40

50



同じ4週の期間にわたり、pHは、2～8 と36～38 との両方で、 $7.05 \pm 0.05$  で安定であった。

## 【0146】

三価液体組成物を希釈し、そして0.5mlを用いて凍結乾燥したMenA結合体を再構成した。得られた三価混合物を、1群あたり10匹のBalb/cマウス(雌6～8週齢)に、第0日と第28日で皮下投与した。この混合物は、1用量あたり2 $\mu$ gの各糖結合体を含んだ。これは、単一ヒト用量(SHD)の1/5を表す。コントロールは、生理食塩水または非結合相同多糖であった。採血を、免疫前、次いで第42日に実施し、血清を-70 で保存した。IgGを、上記のように決定した。

## 【0147】

使用される全ての結合体は、動物中で安全でありかつ免疫原性であった。GMT post-III ELISA力価(95%信頼区間)は以下の通りであった。

## 【0148】

## 【表18】

ワクチン	7サブタイプ	A	Y	W135	C
MenA (凍結乾燥および再懸濁)	リン酸アルミニウム	172 (69-439)	-	-	-
	水酸化アルミニウム	619 (419-906)	-	-	-
MenY	リン酸アルミニウム	-	328 (147-731)	-	-
	水酸化アルミニウム	-	452 (344-593)	-	-
MenW	リン酸アルミニウム	-	-	80 (28-225)	-
	水酸化アルミニウム	-	-	277 (185-411)	-
MenC	リン酸アルミニウム	-	-	-	317 (152-659)
	水酸化アルミニウム	-	-	-	723 (615-851)
MenA (凍結乾燥) + MenC,W135,Y	リン酸アルミニウム	32 (15-68)	397 (252-627)	99 (35-288)	114 (53-246)
	水酸化アルミニウム	206 (112-372)	141 (97-205)	139 (76-251)	163 (122-218)

図17は、(17A)MenA;(17B)MenC;(17C)MenW135;および(17D)MenYについてのIgGサブクラス分析の結果を示す。IgG1は、明らかに、最も突出したサブクラスである。

## 【0149】

血清殺菌力価は、以下の通りであった。

## 【0150】

10

20

30

40

【表 19】

ワクチン	アジュバント	抗 MenA			抗 MenY		抗 MenW135		抗 MenC
		F8238	A1	F6124	242975	240539	5554	242317	C11
MenA (凍結乾燥)	リン酸アルミニウム	512-1024	1024-2048	2048	-	-	-	-	-
	水酸化アルミニウム	1024-2048	1024-2048	2048	-	-	-	-	-
MenY	リン酸アルミニウム	-	-	-	4096	2048-4096	-	-	-
	水酸化アルミニウム	-	-	-	2048	1024-2048	-	-	-
MenW	リン酸アルミニウム	-	-	-	-	-	512	512-1024	-
	水酸化アルミニウム	-	-	-	-	-	1024	1024-2048	-
MenC	リン酸アルミニウム	-	-	-	-	-	-	-	2048-4096
	水酸化アルミニウム	-	-	-	-	-	-	-	4096
MenA (凍結乾燥) + MenC, W135, Y	リン酸アルミニウム	128-256	1024	1024-2048	2048	-	256-512	1024	512
	水酸化アルミニウム	512	1024-2048	1024-2048	2048-4096	-	256-512	1024	512-1024

( K . セログループ A、C、W135、および Y の組み合わせワクチン (異なる用量) )

マウスを上記のように免疫した (しかし、ワクチン組成物は、異なる比の種々のオリゴ糖結合体を含んだ)。用量は、0.5、1、2、または 4  $\mu\text{g}$  / 用量と様々であった。凍結乾燥 MenA - オリゴ糖結合体を、全ての実験で使用した。

【0151】

ELISA 力価は、以下の通りであった。

【0152】

【表 20 - 1】

抗原量 ( $\mu\text{g}$ / 用量)				アルミニウム アジュバント	GMT ELISA (95% 信頼区間)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	リン酸塩	177 (107-291)	367 (263-510)	239 (135-424)	239 (184-311)
4	2	2	2	水酸化物	390 (313-486)	494 (345-706)	338 (266-430)	158 (96-260)
2	2	2	2	リン酸塩	132 (59-296)	582 (268-1155)	143 (75-272)	247 (152-400)
2	2	2	2	水酸化物	337 (239-476)	569 (462-679)	171 (117-251)	100 (59-169)
4	2	1	1	リン酸塩	137 (47-397)	192 (88-421)	18 (4-75)	315 (174-571)
4	2	1	0.5	リン酸塩	152 (85-271)	207 (100-428)	51 (21-125)	220 (125-388)

【0153】

【表 20 - 2】

4	2	1	2	リン酸塩	113 (49-263)	230 (98-540)	23 (6-91)	267 (81-877)
4	2	0.5	1	リン酸塩	267 (109-656)	504 (300-847)	46 (15-134)	583 (330-1030)
4	2	2	1	リン酸塩	87 (49-155)	118 (51-278)	24 (8-72)	214 (140-326)
2	2	1	1	リン酸塩	217 (132-355)	514 (332-796)	110 (66-183)	206 (141-300)
2	2	1	0.5	リン酸塩	105 (40-279)	381 (180-808)	90 (34-236)	206 (96-445)
2	2	1	2	リン酸塩	155 (71-339)	374 (196-713)	53 (28-100)	502 (335-752)
2	2	0.5	1	リン酸塩	224 (125-400)	358 (223-577)	43 (14-128)	624 (426-914)
2	2	2	1	リン酸塩	180 (113-288)	306 (190-492)	70 (34-146)	423 (258-696)

血清殺菌力価は、以下の通りであった。

【 0 1 5 4 】

【表 21】

抗原量 (μg/用量)				アルミニウム アジュバント	殺菌抗体力価			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
4	2	2	2	水酸化物	256- 512	1024- 2048	1024- 2048	4096- 8192
4	2	2	2	水酸化物	1024- 2048	256- 512	1024- 2048	1024- 2048
2	2	2	2	リン酸塩	512- 1024	1024- 2048	128- 256	8192- 16384
2	2	2	2	水酸化物	256	1024- 2048	256	512- 1024
4	2	1	1	リン酸塩	512- 1024	2048	128	2048- 4096
4	2	1	0.5	リン酸塩	512- 1024	1024- 2048	128	2048- 4096
4	2	1	2	リン酸塩	512- 1024	2048- 4096	128	8192- 16384
4	2	0.5	1	リン酸塩	1024- 2048	8192	256- 512	8192- 16384
4	2	2	1	リン酸塩	-	2048- 4096	128	4096- 8192
2	2	1	1	リン酸塩	1024- 2048	1024- 2048	256	4096- 8192
2	2	1	0.5	リン酸塩	1024- 2048	2048- 4096	256- 512	2048- 4096
2	2	1	2	リン酸塩	512- 1024	1024- 2048	128	8192- 16384
2	2	0.5	1	リン酸塩	1024- 2048	2048	256- 512	4096- 8192
2	2	2	1	リン酸塩	128- 256	512- 1024	64- 128	1024- 2048

第2セットの実験を、Men AおよびMen Cについては2 μg/mlの糖の用量、M

10

20

30

40

50

Men Yについてはその半分の用量、そしてMen W135についてはその1/4の用量を用いて実施した。ELISA力価は、以下の通りであった。

【0155】

【表22】

抗原量 (μg/用量)				7μm 7サブユニット	GMT ELISA (95% 信頼区間)			
A	C	W135	Y		A	C	W135	Y
2	2	2	2	リン酸塩	32 (15-68)	114 (53-246)	99 (35-288)	397 (252-627)
				水酸化物	206 (112-372)	163 (122-218)	139 (76-251)	141 (97-205)
2	2	1	0.5	リン酸塩	96 (49-187)	238 (101-561)	42 (20-89)	315 (114-867)
				水酸化物	293 (144-597)	267 (158-451)	83 (43-163)	244 (152-392)

10

血清殺菌力価は、以下の通りであった。

【0156】

【表23】

抗原量 (μg/用量)				7μm 7サブユニット	A			C	W135		Y
A	C	W	Y		F8238	A1	F6124	C11	5554	242317	242975
2	2	2	2	リン酸塩	128-256	1024	1024-2048	512	256-512	1024	2048
				水酸化物	512	1024-2048	1024-2048	512-1024	256-512	1024	2048-4096
2	2	1	0.5	リン酸塩	256	-	1024-2048	512	256-512	1024	2048-4096
				水酸化物	128	-	512-1024	512-1024	512-1024	1024	1024

20

30

(L・Men A、W135、およびYオリゴ糖結合体)

以下の表は、本発明の組み合わせ組成物を作製するのに適したMen A、Men W135、およびMen Y結合体に関するデータを示す。

【0157】

【表24】

	A	W135	Y
サイズ分け後のDP	16,6	21,9	21,1
糖/タンパク質の比	0,5	1,1	0,7
KD	0,44	0,36	0,41
遊離の糖	5%	10%	5%
遊離のタンパク質	<2%	<2%	<2%

40

本発明は、例示のみの目的で記載されており、そして本発明の範囲および意図を維持しつつ変更がなされ得ることが理解される。

【0158】

(参考文献：これらの内容は、本明細書中でその全体が援用される)

【0159】

## 【表 2 5】

- [1] Frash (1990) pp.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [2] Armand *et al.* (1982) *J. Biol. Stand.* 10:335-339.
- [3] Cadoz *et al.* (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [4] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [5] Baklaic *et al.* (1983) *Infect. Immun.* 42:599-604.
- [6] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698. 10
- [7] WO02/00249.
- [8] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [9] WO98/32873.
- [10] US patent 4,753,796.
- [11] European patent 0072513.
- [12] UK patent application 0207117.3.
- [13] Pon *et al.* (1997) *J Exp Med* 185:1929-1938.
- [14] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [15] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196. 20
- [16] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [17] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [18] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [19] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [20] European patent 0477508.
- [21] US patent 5,306,492.
- [22] WO98/42721.
- [23] Dick *et al.* in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, Vol. 10, pp. 48-114.
- [24] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368. 30
- [25] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [26] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [27] Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [28] EP-A-0372501.
- [29] EP-A-0378881.
- [30] EP-A-0427347.
- [31] WO93/17712
- [32] WO94/03208.
- [33] WO98/58668. 40
- [34] EP-A-0471177.
- [35] WO91/01146
- [36] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [37] WO00/56360.

【 0 1 6 0 】

## 【表 2 6】

- [38] WO00/61761.
- [39] WO99/42130
- [40] WO96/40242
- [41] Lees *et al.* (1996) *Vaccine* 14:190-198.
- [42] WO95/08348.
- [43] US patent 4,882,317
- [44] US patent 4,695,624 10
- [45] *Mol. Immunol.*, 1985, 22, 907-919
- [46] EP-A-0208375
- [47] WO00/10599
- [48] Gevert *et al.*, *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
- [49] US patent 4,057,685.
- [50] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [51] US patent 4,459,286.
- [52] US patent 4,965,338
- [53] US patent 4,663,160. 20
- [54] US patent 4,761,283
- [55] US patent 4,356,170
- [56] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- [57] WO00/38711; US patent 6,146,902.
- [58] McLeod Griffiss *et al.* (1981) *Infect. Immun.* 34:725-732.
- [59] WO99/24578.
- [60] WO99/36544.
- [61] WO99/57280.
- [62] WO00/22430. 30
- [63] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [64] Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.
- [65] WO01/52885.
- [66] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- [67] Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- [68] Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- [69] WO96/14086.
- [70] Covacci & Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592. 40
- [71] WO93/18150.
- [72] Covacci *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5791-5795.
- [73] Tummuru *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.
- [74] Marchetti *et al.* (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- [75] Telford *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.
- [76] Evans *et al.* (1995) *Gene* 153:123-127.

## 【表 2 7】

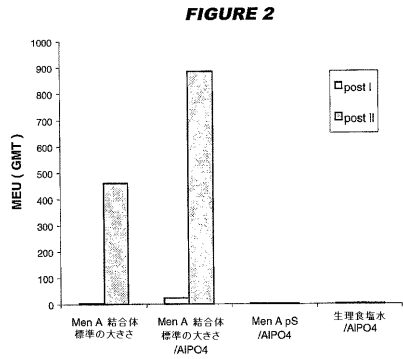
- [77] WO96/01272 & WO96/01273, especially SEQ ID NO:6.
- [78] WO97/25429.
- [79] WO98/04702.
- [80] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [81] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [82] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [83] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [84] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326. 10
- [85] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [86] WO93/24148.
- [87] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [88] WO97/00697.
- [89] Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [90] WO02/02606.
- [91] Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [92] Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406. 20
- [93] Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- [94] WO99/27105.
- [95] WO00/27994.
- [96] WO00/37494.
- [97] WO99/28475.
- [98] Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [99] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [100] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [101] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6. 30
- [102] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
- [103] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- [104] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [105] Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- [106] WO02/34771.
- [107] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [108] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [109] Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219. 40
- [110] Anderson (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S59-65.
- [111] Kahn (2000) *Curr Opin Pediatr* 12:257-262.
- [112] Crowe (1995) *Vaccine* 13:415-421.
- [113] *J Toxicol Clin Toxicol* (2001) 39:85-100.
- [114] Demicheli *et al.* (1998) *Vaccine* 16:880-884.
- [115] Stepanov *et al.* (1996) *J Biotechnol* 44:155-160.

## 【表 2 8】

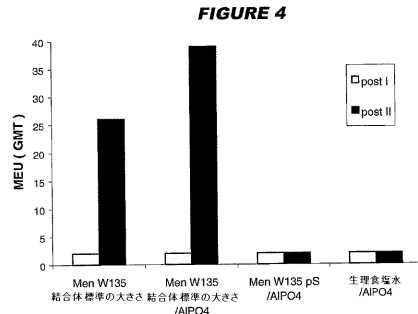
- [116] Wassilak & Orenstein, Chapter 4 of *Vaccines* (eds. Plotkin & Mortimer), 1988.
- [117] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [118] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [119] WO97/28273.
- [120] Lieberman *et al.* (1996) *JAMA* 275:1499-1503.
- [121] WO00/56365.
- [122] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th ed ISBN: 0683306472
- [123] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [124] WO90/14837. 10
- [125] US patent 6,299,884.
- [126] WO00/07621.
- [127] WO99/44636.
- [128] GB-2220221.
- [129] EP-A-0689454.
- [130] WO00/56358.
- [131] EP-A-0835318.
- [132] EP-A-0735898.
- [133] EP-A-0761231.
- [134] WO99/52549. 20
- [135] WO01/21207.
- [136] WO01/21152.
- [137] WO00/62800.
- [138] WO00/23105.
- [139] WO99/11241.
- [140] WO98/57659.
- [141] Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 19, number 1.
- [142] WO99/27960.
- [143] WO98/20734.
- [144] UK patent application 0118249.2.
- [145] WO01/30390. 30
- [146] Chen *et al.* (1956) *Anal. Chem.* (1956) 28:1756-1758.
- [147] Habeeb *et al.* (1966) *Anal. Biochem.* 14:328-336.
- [148] Miron & Wilchek (1982) *Anal. Biochem.* 126:433-435.
- [149] Svennerholm (1957) *Biochem. Biophys. Acta* 24:604-611.
- [150] Carlone *et al* (1992) *J.Clin. Microbiol.* 30:154-159.



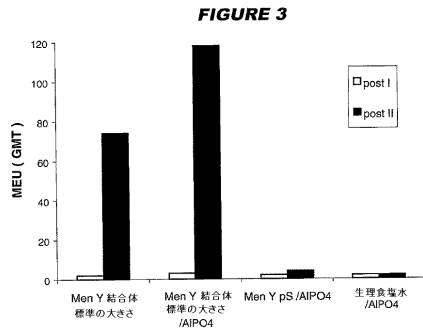
【 図 2 】



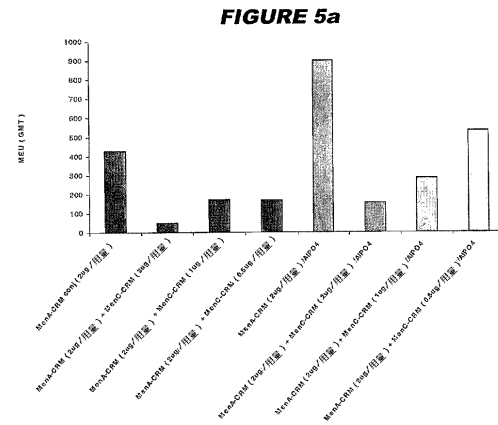
【 図 4 】



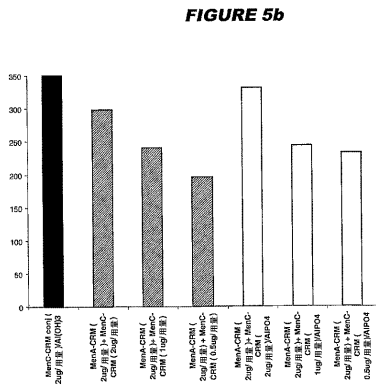
【 図 3 】



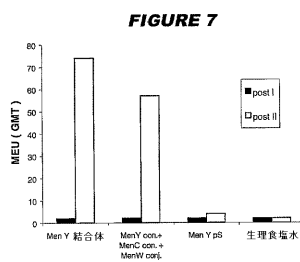
【 図 5 a 】



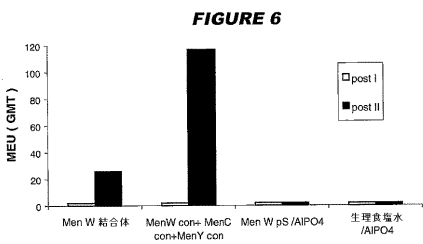
【 図 5 b 】



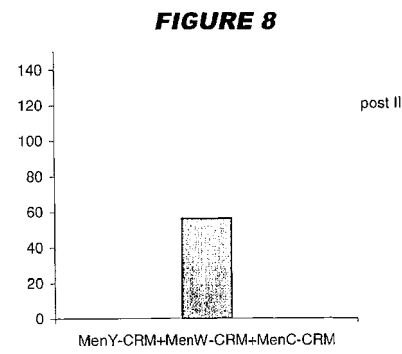
【 図 7 】



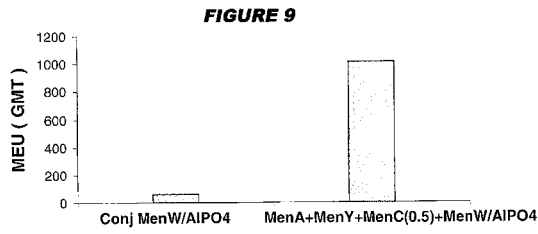
【 図 6 】



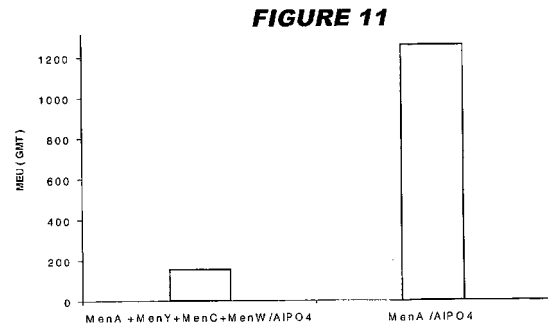
【 図 8 】



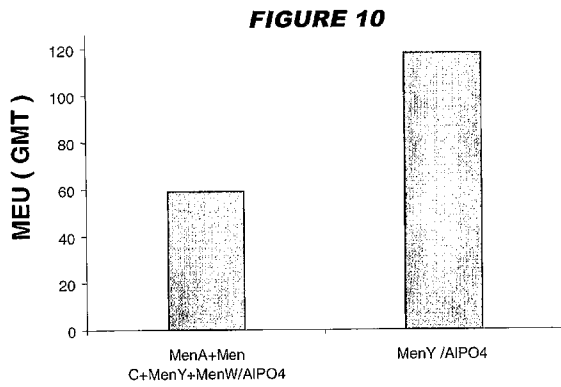
【 9 】



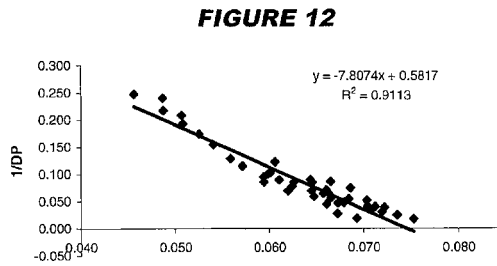
【 1 1 】



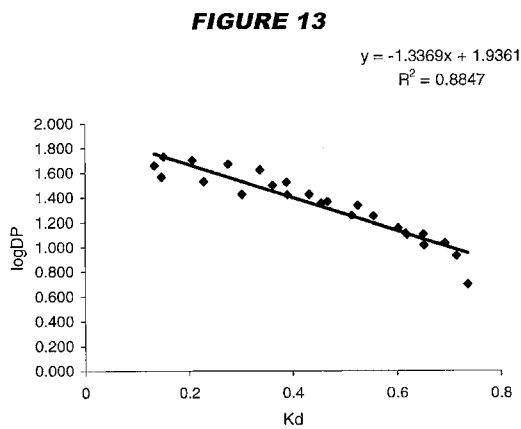
【 1 0 】



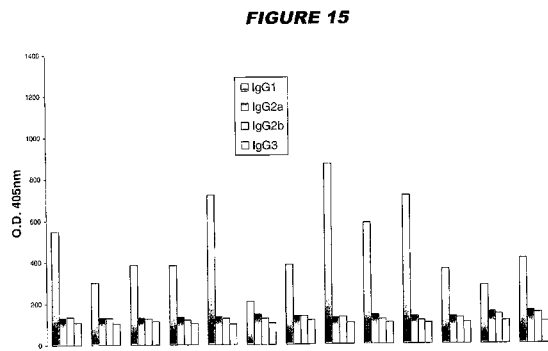
【 1 2 】



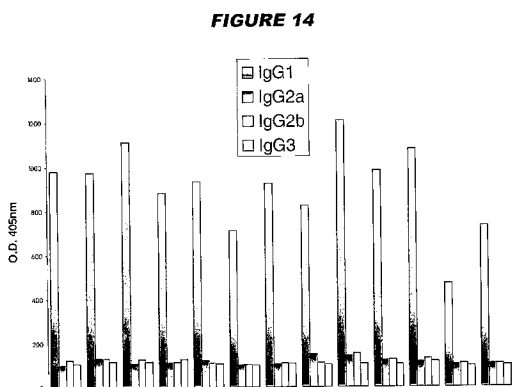
【 1 3 】



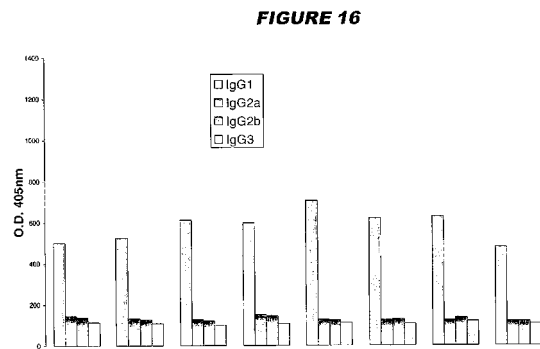
【 1 5 】



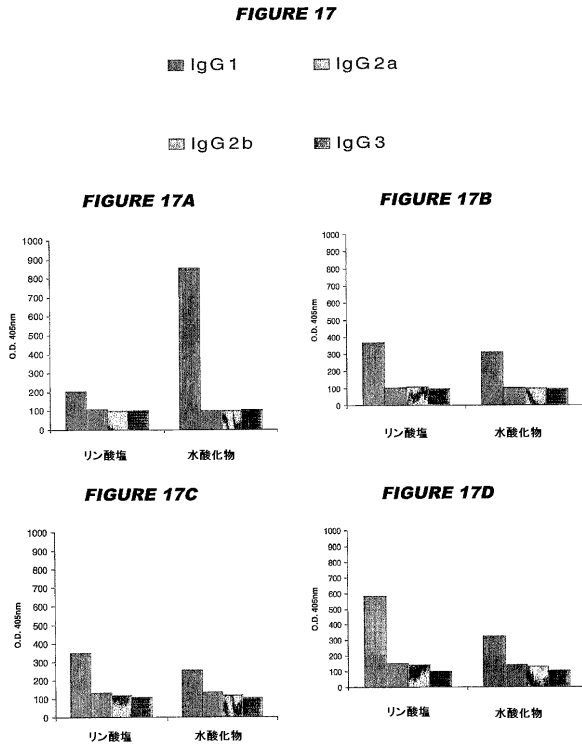
【 1 4 】



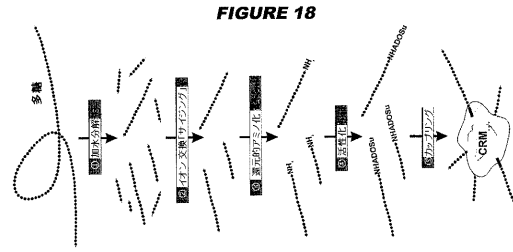
【 1 6 】



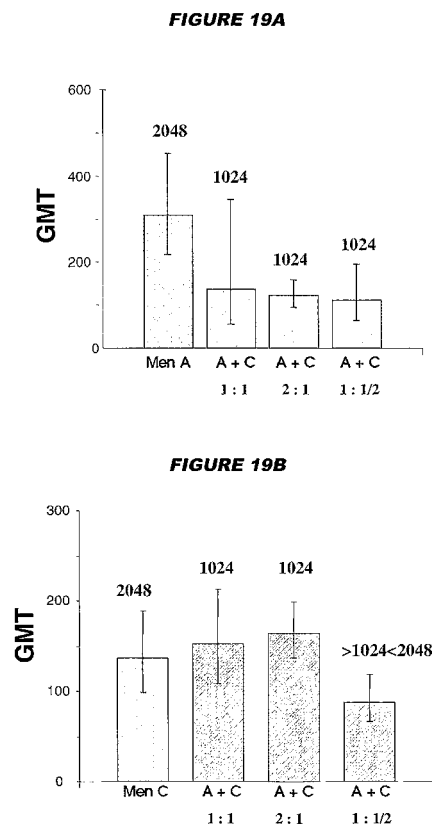
【 図 17 】



【 図 18 】

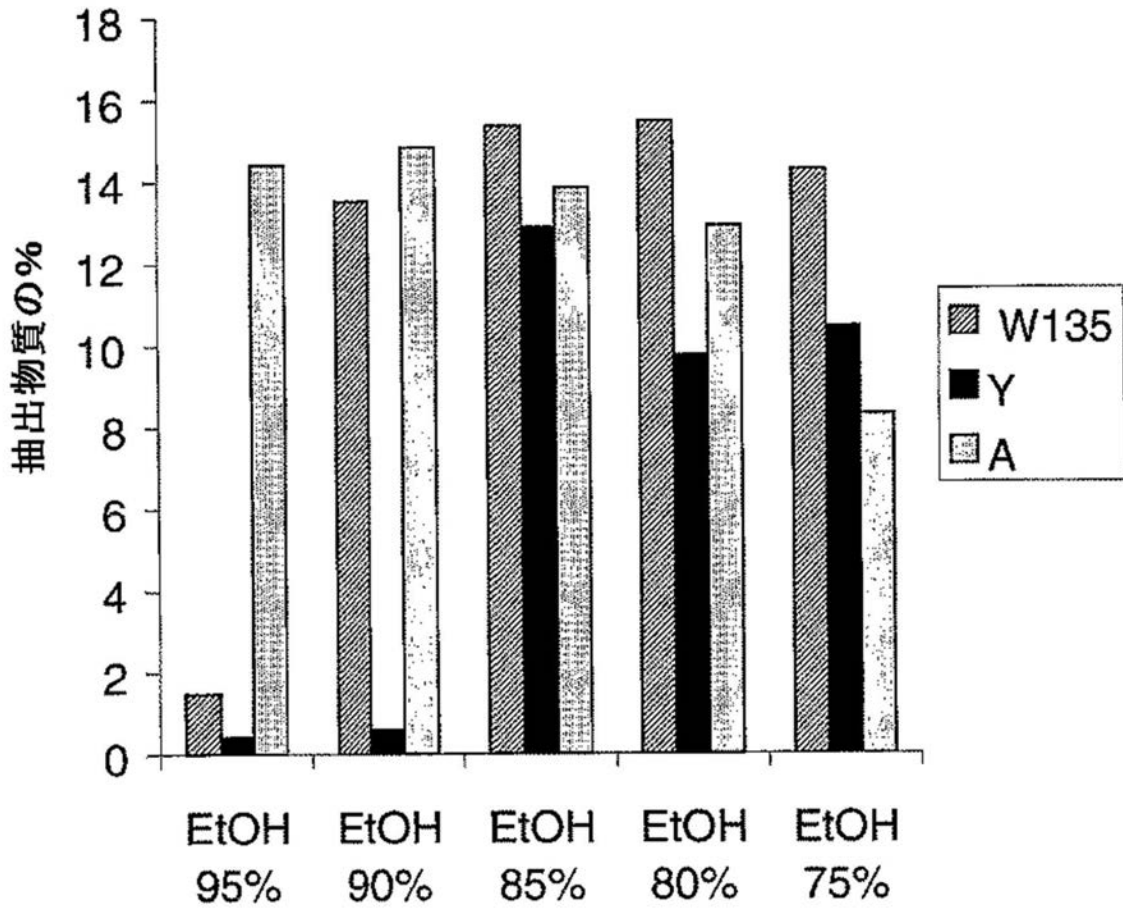


【 図 19 】



【図1】

**FIGURE 1**



---

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第01/041800(WO, A1)  
国際公開第00/056360(WO, A1)  
国際公開第99/010372(WO, A1)  
特表平10-509701(JP, A)  
Drugs, 1998年, Vol.55, No.3, p.347-366  
Journal of Biological Standardization, 1982年, Vol.10, p.335-339  
Vaccine, 1985年, Vol.3, p.340-342  
Infection and Immunity, 1994年, Vol.62, No.8, p.3391-3395  
Vaccine, 1995年, Vol.13, No.5, p.463-470

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/385

A61K 39/00

A61K 39/095

A61K 39/39

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)