

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7295206号

(P7295206)

(45)発行日 令和5年6月20日(2023.6.20)

(24)登録日 令和5年6月12日(2023.6.12)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/09 (2006.01)

A 6 1 K 39/09

A 6 1 K 39/385 (2006.01)

A 6 1 K 39/385

A 6 1 K 47/64 (2017.01)

A 6 1 K 47/64

A 6 1 K 39/116 (2006.01)

A 6 1 K 39/116

A 6 1 K 47/04 (2006.01)

A 6 1 K 47/04

請求項の数 32 (全149頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-196864(P2021-196864)

(22)出願日 令和3年12月3日(2021.12.3)

(62)分割の表示 特願2017-214474(P2017-214474)
の分割

原出願日 平成29年11月7日(2017.11.7)

(65)公開番号 特開2022-24175(P2022-24175A)

(43)公開日 令和4年2月8日(2022.2.8)

審査請求日 令和3年12月21日(2021.12.21)

(31)優先権主張番号 62/419704

(32)優先日 平成28年11月9日(2016.11.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 593141953

ファイザー・インク

アメリカ合衆国 1 0 0 0 1-2 1 9 2

ニューヨーク州 ニューヨーク市 ハドソ

ン・ブルバード・イースト 6 6

(74)代理人 100133927

弁理士 四本 能尚

(74)代理人 100147186

弁理士 佐藤 真紀

(74)代理人 100174447

弁理士 龍田 美幸

(74)代理人 100185960

弁理士 池田 理愛

(72)発明者 リーナ シュリラム ベイグル

アメリカ合衆国 0 7 0 2 0 ニュージャ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫原性組成物およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

多糖-担体タンパク質コンジュゲートを含む免疫原性組成物であって、

(i) 前記コンジュゲートが、B群レンサ球菌(GBS)血清型Ia、Ib、II、III、IVおよびV由来の莢膜多糖を含み、

(ii) 前記組成物が、薬学的に許容できる賦形剤、緩衝剤および界面活性剤をさらに含み、

緩衝剤がリン酸塩およびヒスチジンからなる群から選択される、免疫原性組成物。

【請求項2】

莢膜多糖が、同じ担体タンパク質と個々にコンジュゲートしている、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項3】

六価GBSコンジュゲート組成物である、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項4】

賦形剤が、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトール、パラチニット、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、石粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、グリシン、アルギニン、リシン、塩化ナトリウム(NaCl)、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水およびエタノールからなる群から選択される、請求項1〜3のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

賦形剤が塩化ナトリウムである、請求項 4 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

塩化ナトリウムが 10 mM から 350 mM の濃度で存在する、請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

塩化ナトリウムが 225 mM から 265 mM の濃度である、請求項 5 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

塩化ナトリウムが 240 mM の濃度で存在する、請求項 6 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 9】

塩化ナトリウムが 200 mM の濃度で存在する、請求項 6 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 10】

塩化ナトリウムが 150 mM の濃度で存在する、請求項 6 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

緩衝剤がヒスチジンである、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

緩衝剤が 15 mM から 25 mM の濃度で存在するリン酸塩である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

20

界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリソルベート 80、ポリソルベート 60、ポリソルベート 40、ポリソルベート 20 およびポリオキシエチレンアルキルエーテルからなる群から選択される、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

界面活性剤がポリソルベート 80 である、請求項 13 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

さらにアジュバントを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

アジュバントがアルミニウムベースのアジュバントである、請求項 15 に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 17】

アルミニウムベースのアジュバントが、リン酸アルミニウム、アルミニウムヒドロキシルホスフェートおよび水酸化アルミニウムからなる群から選択される、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 18】

アジュバントが、リン酸アルミニウムである、請求項 17 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 19】

アジュバントが、水酸化アルミニウムである、請求項 17 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 20】

40

アルミニウムベースのアジュバントが、0.25 mg/ml から 0.75 mg/ml の濃度で存在する、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

アルミニウムベースのアジュバントが、0.5 mg/ml の濃度で存在する、請求項 16 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 22】

組成物がヒスチジン、ポリソルベート 80、塩化ナトリウム、および場合によりリン酸アルミニウムを含む、請求項 1 ～ 11、15 ～ 18、20 および 21 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 23】

50

組成物が10mMから25mMのヒスチジン、0.01%から0.03% (v/w) のポリソルベート-80、10mMから250mMの塩化ナトリウム、および場合により0.25mg/mlから0.75mg/mlのアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含む、請求項1～6および15～18のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項24】

シリンジに充填されている、請求項1から23のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項25】

シリンジが、ガラスである、請求項24に記載の免疫原性組成物。

【請求項26】

1mmから15mmのヘッドスペースを設けてシリンジに充填される、請求項24または25に記載の免疫原性組成物。

【請求項27】

2mmから6mmのヘッドスペースを設けてシリンジに充填される、請求項25に記載の免疫原性組成物。

【請求項28】

50回以下の振とうで再懸濁される、請求項1から27のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項29】

10回以下の振とうで再懸濁される、請求項27に記載の免疫原性組成物。

【請求項30】

60mcg/mlから360mcg/mlの総コンジュゲート用量を含む、請求項1から29のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項31】

総コンジュゲート用量が、120mcg/mlから240mcg/mlである、請求項30に記載の免疫原性組成物。

【請求項32】

6.5から7.5のpHを有する、請求項1から31のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、担体タンパク質とコンジュゲートしている、一般にB群レンサ球菌 (GBS) と称されるストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) 由来の莢膜多糖 (CP) を含み、アルミニウムベースのアジュバントを包含していてもよい、免疫原性組成物に関する。本発明はさらに、対象においてGBSに対する免疫応答を誘発するための、および／または本明細書において開示されている組成物を使用して、対象における侵襲性GBS疾患を低減させるもしくは予防するための方法に関する。得られた抗体は、受動免疫療法を介してGBS感染を治療するまたは予防するために使用することができる。

【背景技術】

【0002】

ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) は、B群レンサ球菌 (GBS) としても公知の、グラム陽性多糖被包性生物である。これらは、ヒト胃腸および生殖管の一般的な片利共生生物であり、乳児および高齢者における重篤な疾患の原因でもある (Baker, C. J., Vaccine, 31 (付録4): D3~D6 (2013))。乳児におけるGBS感染の主要リスク因子は、母体における定着である (Dillon, H. C. ら, J. Pediatr., 110 (1): 31~36 (1987))。4人に1人もの女性がGBSを直腸腔で保菌し、これは、出産の前または最中に、羊水または新生児に感染して、敗血症、肺炎および髄膜炎を引き起こす可能性がある (Baker 2013; Heath, P. T. ら, BMJ Clin

10

20

30

40

50

．Evid. (Online)、pii:0323 (2014))。GBS 髄膜炎を克服した乳児の25パーセントが神経学的機能障害を患い、19%が、認知遅延、脳性まひ、失明および難聴を経験する (Libster, R.ら、Pediatrics、130 (1): e8-15 2012 (2012))。GBSは、流産および早産を引き起こすこともあり、死産とも関係がある (McDonald, H. M.ら、Infect. Dis. Obstetr. Gynecol.、8 (5-6): 220~227 (2000); Randis, T. M.ら、J. Infect. Dis.、210 (2): 265~273 (2014); Kessous, R.ら、J. Matern. Fetal Neonatal Med.、25 (10): 1983~1986 (2012))。極低出生体重児は、感染リスクがはるかに高く、最大3%が感染しており、直ちに抗生物質による治療を行っても、最大30%の死亡率である (Heath 2014)。

10

【0003】

1990年代後半、米国におけるGBSスクリーニングおよび分娩時抗生物質予防的投与 (IAP) の導入は、生後1週間以内に発生する新生児疾患 (早期発症疾患 [EOD]) の率の低減を実証したが、その後に現れる生後3カ月以内の後期発症疾患 (LOD) の率に、測定可能な影響を及ぼさなかった。米国でのEODおよびLOD症例の率は、現在、出生1,000人当たりそれぞれ0.25および0.27である (疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention; CDC)、Active Bacterial Core (ABC) Surveillance Report (2013)、<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs13.pdf>において利用可能)。菌血症および髄膜炎を包含する侵襲性肺炎球菌疾患の予防のための肺炎球菌コンジュゲートワクチンの導入に続いて、ならびにGBS疾患の予防のためのIAPにもかかわらず、GBSは、米国にて、乳児における新生児敗血症 (EOD) および髄膜炎 (2カ月未満) の単一の最も一般的な原因となった (Verani, J. R.ら、MMWR、59 (RR10): 1~32 (2010); Thigpen, M. C.ら、N. Engl. J. Med.、364 (21): 2016~2025 (2011))。米国とは異なり、侵襲性GBS疾患およびIAPのための予防ガイドラインの導入は、オランダにおいても英国においてもEODの発病率を低減させなかった (Bekker, V.ら、The Lancet Infectious Dis.、14 (11): 1083~1089 (2014); Lamagni, T. L.ら、Clin. Infect. Dis.、57 (5): 682~688 (2013))。この効果の欠如は、普遍的スクリーニングの欠如および最高リスク群の母親 (例えば、発熱、長期にわたって破裂した膜) へのIAPを制限することによるものであり得る。EODの率は、IAPを使用しない国において有意に高く、出生1,000人当たり0.75の平均発病率 (95%CI 0.58~0.89) が報告された (Edmond, K. Mら、Lancet、379 (9815): 547~556 (2012))。

20

30

【0004】

GBS疾患のリスクがあるもう1つの集団は、高齢者である。リスク因子は、真性糖尿病、がん、心不全、神経学的および泌尿器科学的状態等の慢性的な医学的問題を包含する。CDC ABCサーベイランスデータによれば、2013年における侵襲性GBSの米国での年間発生率は、65歳以上の成人において、0.28/1,000人または12,400症例/年であった。この率は、高齢者における侵襲性肺炎球菌疾患の発病率 (対65歳超について0.30/1,000) に近似している。これらの率は、米国および欧州の両方において増大し続けると予測されている (CDC 2013; Lamagni 2013)。

40

【0005】

乳児および高齢者の間でのGBS疾患を予防するための1つのアプローチは、多糖ベースのワクチンの使用である。母体のGBS予防ワクチンの実施は、IAPが使用されるか否かにかかわらず、米国において乳児の間でのGBS疾患を予防する可能性を有する。多

50

糖は、それら自体が免疫原性であり得るが、多糖のタンパク質担体とのコンジュゲーションが、特に乳児および高齢者における免疫原性を改善するために使用されてきた。多糖-タンパク質コンジュゲートワクチンは、タンパク質担体と関係がある、概して細菌の外皮由来の、多糖を使用して作製される。多糖-タンパク質コンジュゲートは、それらの表面上のワクチン内に含有される多糖を表示する細菌に対して免疫応答を誘発し、故に、疾患を予防する。したがって、病原性細菌由来の多糖コンジュゲートを使用するワクチン接種は、宿主免疫を上昇させるための潜在的な戦略である。

【0006】

細菌を覆う多糖は、単一種の細菌内であっても大幅に異なっている。例えば、GBSでは、細菌多糖莢膜のバリエーションにより10の異なる血清型がある。したがって、多糖ベースのワクチンは、異なる循環血清型を確実に幅広く網羅できるような多糖の一团からなることが望ましい。

【0007】

担体タンパク質は、標的病原体由来の、その病原体に対する特異的免疫応答を上昇させる関連タンパク質抗原であってもよいし、アジュバントまたは全身的免疫応答刺激剤としてさらに役立つ、概して免疫原性のタンパク質であってもよい。

【0008】

GBS血清型Ia、Ib、II、IIIおよびVの個々の一価多糖-タンパク質コンジュゲートは、非妊娠成人における第1および第2相臨床試験にて評価されてきた(Brigtsen, A. K. ら、J. Infect. Dis.、185(9):1277~1284(2002); Baker, C. J. ら、J. Infect. Dis.、188(1):66~73(2003); Baker, C. J. ら、J. Infect. Dis.、189(6):1103~1112(2004); Baker, C. J. ら、Vaccine、25(1):55~63(2007))。二価II-TTおよびIII-TTグリココンジュゲートワクチン、ならびにIa-CRM₁₉₇、Ib-CRM₁₉₇およびIII-CRM₁₉₇グリココンジュゲートを含む三価ワクチンも研究されてきた(Baker 2003; Clinicaltrials.gov NCT01193920、NCT01412801およびNCT01446289)。しかしながら、GBSワクチンは未だ承認されていない。

【0009】

その上、三価ワクチンは、南アフリカにおいて新生児疾患を引き起こす侵襲性株の90%超をカバーする(Madzivhandila, M. ら、PloS One、6(3):e17861(2011))が、これらの同じ血清型は、チゲサイクリン評価およびサーベイランス試験(T. E. S. T.、<http://www.testsurveillance.com/>)から2004~2013年の間に収集された901の試料のグローバルコレクションからの最近の新生児分離株のサーベイランスに基づき、それぞれ北米および欧州における侵襲性分離株の62%および66%のみを表す。

【0010】

T. E. S. T. 試料から取得された株の分析は、収集された株の95%が5つの文書化された主要な血清型(Ia、Ib、II、IIIおよびV)のうちの1つに属し、さらなる3%が血清型IVであったことを示した。一連の刊行物は、過去10年間でアメリカおよび欧州における血清型IVの出現も確認した(Diedrick, M. J. ら、J. Clin. Microbiol.、48(9):3100~3104(2010); Tetero(2014); Meehan, M. ら、Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.、33(7):1155~1162(2014); Florindo, C. ら、Euro Surveillance: Bulletin European sur les Maladies Transmissibles (European Communicable Disease Bulletin)、19(23)(2014); Palmiero, J. K. ら、J. Clin. Microbiol.、48(12):4397~4403(2010))。乳児へのGBSの伝染

10

20

30

40

50

のリスク因子である、成人における直腸／膣保菌を調査する研究は、分離株の97%がこれらの6つの血清型のうちの1つに属し、血清型IVは約4%の頻度を表すことを見出した。研究は、健康な米国成人において、ベータ溶血レンサ球菌（GBSを包含する）、クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）および黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）の保菌をモニターするように設計された（Matson, M. A. ら、ICAAC、Abstract I-306（Washington, DC、Sep. 5～9、2014）を参照）。

【0011】

同様に、T. E. S. T. 試料の分析は、65歳以上の高齢者由来の米国の血液分離株の98%が、同じ6つの優勢な血清群に属することを示した。高齢者分離株と他の集団との間の最も顕著な差異は、血清群分布である。高齢者患者由来の分離株について、血清型V株は、最大の群を構成する（34%対新生児について18%または成人保菌者株について18%）。

10

【0012】

他の研究は、血清型有病率の地理的分散があることを見出した。例えば、血清型VIおよびVII分離株は、日本における健康な妊婦の優勢な外来種であることが示された（Lachenauer, C. S. ら、J. Infect. Dis.、179（4）：1030～1033（1999））。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0013】

【文献】米国特許第4,708,871号

国際特許出願公開第WO2012/035519号

国際特許出願公開第WO2014/053612号

国際特許出願公開第WO2005/033148号

国際特許出願公開第WO00/56357号

米国特許第5,614,382号

国際特許出願公開第WO2004/083251号

国際特許出願公開第WO93/15760号

国際特許出願公開第WO95/08348号

30

国際特許出願公開第WO96/29094号

国際特許出願公開第WO98/42721号

国際特許出願公開第WO2014/097099号

国際特許出願公開第WO2006/082527号

国際特許出願公開第WO2006/082530号

米国特許第5,254,339号

米国特許第6,299,884号

米国特許第4,912,094号

米国特許第6,113,918号

米国特許第6,165,995号

40

米国特許第6,610,310号

米国特許第5,057,540号

米国特許第6,207,646号

欧州特許第1,296,713号

欧州特許第1,326,634号

米国特許第7,285,281号

米国特許第7,332,174号

米国特許第7,361,355号

米国特許第7,384,640号

米国特許第6,149,919号

50

米国特許第7,115,730号

米国特許第7,291,588号

米国特許第5,723,127号

米国特許第5,078,996号

米国特許出願公開第2006/0228380号

米国特許出願公開第2006/0228381号

米国特許出願公開第2007/0184071号

米国特許出願公開第2007/0184072号

米国特許出願公開第2007/0231340号

米国特許出願公開第2008/0102498号

国際特許出願公開第WO2008/118752号

米国特許第8,652,480号

米国特許第5,360,897号

【非特許文献】

【0014】

【文献】Baker, C. J.、Vaccine、31 (付録4) : D3~D6 (2013)

Dillon, H. C. 5、J. Pediatr.、110 (1) : 31~36 (1987)

Heath, P. T. 5、BMJ Clin. Evid. (Online)、pii: 0323 (2014)

Libster, R. 5、Pediatrics、130 (1) : e8-152012 (2012)

McDonald, H. M. 5、Infect. Dis. Obstetr. Gynecol.、8 (5-6) : 220~227 (2000)

Randis, T. M. 5、J. Infect. Dis.、210 (2) : 265~273 (2014)

Kessous, R. 5、J. Matern. Fetal Neonatal Med.、25 (10) : 1983~1986 (2012)

疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention; CDC)、Active Bacterial Core (ABC) Surveillance Report (2013)、<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs13.pdf>

Verani, J. R. 5、MMWR、59 (RR10) : 1~32 (2010)

Thigpen, M. C. 5、N. Engl. J. Med.、364 (21) : 2016~2025 (2011)

Bekker, V. 5、The Lancet Infectious Dis.、14 (11) : 1083~1089 (2014)

Lamagni, T. L. 5、Clin. Infect. Dis.、57 (5) : 682~688 (2013)

Edmond, K. M 5、Lancet、379 (9815) : 547~556 (2012)

Brigtsen, A. K. 5、J. Infect. Dis.、185 (9) : 1277~1284 (2002)

Baker, C. J. 5、J. Infect. Dis.、188 (1) : 66~73 (2003)

Baker, C. J. 5、J. Infect. Dis.、189 (6) : 1103~1112 (2004)

Baker, C. J. 5、Vaccine、25 (1) : 55~63 (2007)

10

20

30

40

50

- Clinicaltrials.gov NCT01193920
 Clinicaltrials.gov NCT01412801
 Clinicaltrials.gov NCT01446289
 Madzivhandila, M. 5、PloS One、6 (3) : e17861 (2011)
 T. E. S. T.、<http://www.testsurveillance.com/>
 Diedrick, M. J. 5、J. Clin. Microbiol.、48 (9) : 3100~3104 (2010)
 Teatero (2014)
 Meehan, M. 5、Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.、33 (7) : 1155~1162 (2014) 10
 Florindo, C. 5、Euro Surveillance: Bulletin European sur les Maladies Transmissibles (European Communicable Disease Bulletin)、19 (23) (2014)
 Palmiero, J. K. 5、J. Clin. Microbiol.、48 (12) : 4397~4403 (2010)
 Matson, M. A. 5、ICAAC、Abstract I-306 (Washington, DC, Sep. 5~9, 2014)
 Lachenauer, C. S. 5、J. Infect. Dis.、179 (4) : 1030~1033 (1999) 20
 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻 (Glenn E. Morris編、1996)
) Humana Press、Totowa, NJ
 Geysen, H. M. 5、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81 : 3998~4002 (1984)
 Geysen, H. M. 5、Molec. Immunol.、23 (7) : 709~715 (1986)
 Bergmann, C. 5、Eur. J. Immunol.、23 (11) : 2777~2781 (1993) 30
 Bergmann, C. C. 5、J. Immunol.、157 (8) : 3242~3249 (1996)
 Suhrbier, A.、Immunol. and Cell Biol.、75 (4) : 402~408 (1997)
 Lewis, A. L. 5、Proceedings of the National Academy of Sciences USA、101 (30) : 11123~8 (2004)
 Lemercinier, X. 5、Carbohydrate Research、296 : 83~96 (1996)
 Jones, C. 5、Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis、30 : 1233~1247 (2002) 40
 Hestrin, S.、J. Biol. Chem.、180 : 249~261 (1949)
 Ferrieri, P. 5、Emerg. Infect. Dis. [Internet]、19 (4) (2013)、http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/4/12-1572_article
 von Hunolstein, C. 5、Infection and Immunity、6194 : 1272~1280 (1993)
 Kogan, G. 5、Carbohydrate Research、277 (1) : 1~9 (1995)
 Kogan, G. 5、The Journal of Biological Chemi 50

stry, 271 (15) : 8786~8790 (1996)
Berti, F. ら、The Journal of Biological Chemistry, 289 (34) : 23437~2348 (2014)
Pappenheimer, A. M. ら、Immunochem.、9 (9) : 891~906 (1972)
Black, W. J. ら、Science、240 (4852) : 656~659 (1988)
Bethell ら、J. Biol. Chem.、254 : 2572~2574 (1979)
Hearn ら、J. Chromatogr.、218 : 509~518 (1981)
Erickson, A. L. ら、J. Immunol.、151 (8) : 4189~4199 (1993)
Doe, B. ら、Eur. J. Immunol. 24 (10) : 2369~2376 (1994)
「Remington's Pharmaceutical Sciences」E. W. Martin 著
von Hunolstein, C. ら、Appl. Micro. Biotech. 38 (4) : 458~462 (1993)
Chaffin, D. O ら、J Bacteriol 187 (13) : 4615~4626 (2005)
Nanra, J. S. ら、Hum. Vaccin. Immunother.、9 (3) : 480~487 (2013)
Egan, P. M. ら、Vaccine、27 : 3175~3180 (2009)

10

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、世界中の幅広い集団間で、新たに出現した血清型IVによって引き起こされるものを包含するGBS疾患を予防するまたは治療するための手段として受動免疫を付与するための、多糖-タンパク質コンジュゲートワクチンまたはモノクローナル抗体が必要である。加えて、そのようなワクチンまたは免疫原性組成物は、当技術分野において公知である任意の容器内で安定かつ簡単に再懸濁可能であることが必要である。

30

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、GBS多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、アジュバントを包含していてもよい、新規免疫原性組成物に関する。下記の条項は、本発明の一部の態様および実施形態を記述するものである。

【0017】

一態様において、本発明は、担体タンパク質とコンジュゲートしているB群レンサ球菌(GBS)由来の莢膜多糖を含み、アルミニウムベースのアジュバントを包含していてもよい、免疫原性組成物に関する。一実施形態において、アルミニウムベースのアジュバントは、リン酸アルミニウム、アルミニウムヒドロキシホスフェートおよび水酸化アルミニウムからなる群から選択される。1つのそのような実施形態において、アルミニウムベースのアジュバントは、約0.25mg/mlから約0.75mg/mlの濃度である。

40

【0018】

別の実施形態において、莢膜多糖は、血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される。別の実施形態において、免疫原性組成物は、六価GBSコンジュゲート組成物である。1つのそのような実施形態において、免疫原性組成物は、GBS血清型Ia、Ib、II、III、IVおよびV由来の莢膜多糖を含む。

【0019】

また別の実施形態において、本発明は、多糖-タンパク質コンジュゲートを含む免疫原

50

性組成物に関し、コンジュゲートは、B群レンサ球菌（GBS）由来の莢膜多糖を含み、血清型I a、I b、I I、I I I、I V、V、V I、V I I、V I I IおよびI Xからなる群から選択され、組成物は、薬学的に許容できる賦形剤、緩衝剤、安定剤、アジュバント、抗凍結剤、塩、二価カチオン、非イオン性界面活性物質、フリーラジカル酸化の阻害剤、担体またはそれらの混合物のうちの1つまたは複数をさらに含む。

【0020】

さらに別の実施形態において、本発明は、本明細書において記述されている通りの免疫原性組成物に関し、莢膜多糖は、同じ担体タンパク質と個々にコンジュゲートしている。

【0021】

本発明の別の態様において、免疫原性組成物は、シリンジに充填される。一実施形態において、シリンジは、ガラスである。別の実施形態において、免疫原性組成物は、約1 mmから約15 mmのヘッドスペースを設けてシリンジに充填される。

【0022】

本発明のさらなる態様において、免疫原性組成物は、約50回以下の振とうで再懸濁される。

【0023】

一実施形態において、免疫原性組成物は、リン酸塩をさらに含む。1つのそのような実施形態において、リン酸塩は、約15 mMから約25 mMの濃度である。

【0024】

別の実施形態において、免疫原性組成物は、塩化ナトリウムをさらに含む。1つのそのような実施形態において、塩化ナトリウムは、約10 mMから約350 mMの濃度である。

【0025】

さらなる実施形態において、免疫原性組成物は、約60 mcg/mlから約360 mcg/mlの総コンジュゲート用量を含む。

【0026】

追加の実施形態において、免疫原性組成物は、約6.5から約7.5のpHを有する。

【0027】

本発明の一態様において、免疫原性組成物は、約0.25 mg/mlから約0.75 mg/mlのリン酸アルミニウム、約15 mMから約25 mMのリン酸塩、約225 mMから約265 mMの塩化ナトリウム、および約60 mcg/mlから約360 mcg/mlの総コンジュゲート用量を含み、免疫原性組成物は、約6.5から約7.5のpHを有する。

【0028】

本発明の別の態様において、免疫原性組成物は、約0.25 mg/mlから約0.75 mg/mlの水酸化アルミニウム、約15 mMから約25 mMのリン酸塩、約120 mMから約170 mMの塩化ナトリウム、および約60 mcg/mlから約360 mcg/mlの総コンジュゲート用量を含み、ここで、免疫原性組成物は、約6.5から約7.5のpHを有する。

【0029】

本発明の別の態様は、GBSに対する免疫応答を誘発する方法であって、対象に、有効量の、本明細書において記述されている通りの免疫原性組成物を投与するステップを含む方法に関する。一実施形態において、本発明は、対象においてGBSに関連する疾患または状態を予防するまたは低減させる方法であって、対象に、有効量の、本明細書において記述されている免疫原性組成物を投与するステップを含む方法に関する。特定の実施形態において、対象は、妊娠を計画している女性または妊娠中の女性である。1つのそのような実施形態において、妊娠中の女性は、少なくとも妊娠20週または少なくとも27週等、妊娠後半期である。好ましい実施形態において、妊娠中の女性は、妊娠27週から36週である。別の実施形態において、対象は、50歳以上、65歳以上、および85歳以上の成人等の高齢者である。さらなる実施形態において、対象は、免疫不全である。一態様において、対象は、肥満、糖尿病、HIV感染、がん、心血管疾患または肝疾患からなる

10

20

30

40

50

群から選択される医学的状態を有し得る。好ましい実施形態において、B群レンサ球菌は、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) である。

【0030】

本発明の追加の態様は、本発明の免疫原性組成物において、莢膜多糖と結合する抗体に関する。一部の実施形態において、抗体は、対象への免疫原性組成物の投与時に産生される。別の態様は、本発明の抗体を含む組成物に関する。

【0031】

本発明のさらなる態様は、対象に受動免疫を付与する方法であって、(a) 本明細書において記述されている免疫原性組成物を使用して、抗体調製物を産生するステップと、(b) 抗体調製物を対象に投与して、受動免疫を付与するステップとを含む方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】 GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇一価ワクチンにより免疫化されたマウス由来の血清および単離されたIgGのオプソニン活性の比較を示す図である。

【図2】 50℃における加速貯蔵(4週間)後の、GBS Ia-CRM₁₉₇の安定性 (SEC MALLSを使用する分子量における変化%によって示される通り)を示す図である。

【図3】 50℃における加速貯蔵(4週間)後の、GBS Ib-CRM₁₉₇の安定性 (SEC MALLSを使用する分子量における変化%によって示される通り)を示す図である。

【図4】 50℃における加速貯蔵(4週間)後の、GBS II-CRM₁₉₇の安定性 (SEC MALLSを使用する分子量における変化%によって示される通り)を示す図である。

【図5】 50℃における加速貯蔵(4週間)後の、GBS III-CRM₁₉₇の安定性 (SEC MALLSを使用する分子量における変化%によって示される通り)を示す図である。

【図6】 50℃における加速貯蔵(4週間)後の、GBS IV-CRM₁₉₇の安定性 (SEC MALLSを使用する分子量における変化%によって示される通り)を示す図である。

【図7】 50℃における加速貯蔵(4週間)後の、GBS V-CRM₁₉₇の安定性 (SEC MALLSを使用する分子量における変化%によって示される通り)を示す図である。

【図8】 37℃における貯蔵後の、GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇およびGBS IV-CRM₁₉₇の安定性 (遊離シアル酸によって示される通り)を示す図である。

【図9】 コハク酸塩を緩衝剤として使用する六価GBSワクチン (GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇) におけるpHの安定性を示す図である。

【図10】 ヒスチジンを緩衝剤として使用する六価GBSワクチン (GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇) におけるpHの安定性を示す図である。

【図11】 10mcg/mlの用量でのGBSコンジュゲートのアルミニウムとの結合に対する、六価GBSワクチン (GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇) 中におけるヒスチジン緩衝剤濃度の効果を示す図であ

10

20

30

40

50

る。

【図12】40mcg/mlの用量でのGBSコンジュゲートのアルミニウムとの結合に対する、六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中におけるヒスチジン緩衝剤濃度の効果を示す図である。

【図13】攪拌ストレス時の全抗原性の損失パーセントに対する、六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中におけるポリソルベート-80濃度の効果を示す図である。

10

【図14】アルミニウムとのGBSコンジュゲート結合に対する、六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中におけるアルミニウム濃度の効果を示す図である。

【図15】各血清型についての抗原性回復に対する、10mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における5.5%（w/v）スクロースの効果を示す図である。

【図16】各血清型についての抗原性回復に対する、10mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における7.0%（w/v）スクロースの効果を示す図である。

20

【図17】各血清型についての抗原性回復に対する、10mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における8.5%（w/v）スクロースの効果を示す図である。

【図18】各血清型についての抗原性回復に対する、50mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における5.5%（w/v）スクロースの効果を示す図である。

30

【図19】各血清型についての抗原性回復に対する、50mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における7.0%（w/v）スクロースの効果を示す図である。

【図20】各血清型についての抗原性回復に対する、50mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における8.5%（w/v）スクロースの効果を示す図である。

【図21】各血清型についての抗原性回復に対する、40mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における7.0%（w/v）スクロースの効果を示す図である。

40

【図22】各血清型についての抗原性回復に対する、40mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇）中における2.0%（w/v）スクロースおよび4.0%（w/v）マンニトールの効果を示す図である。

【図23】各血清型についての抗原性回復に対する、40mcg/ml用量の凍結乾燥した六価GBSワクチン（GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびG

50

BS V-CRM₁₉₇) 中における 3.0% (w/v) スクロースおよび 3.0% (w/v) マンニトールの効果を示す図である。

【図 24】各血清型についての抗原性回復に対する、40mcg/mL 用量の凍結乾燥した六価 GBS ワクチン (GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇ および GBS V-CRM₁₉₇) 中における 2.0% (w/v) スクロースおよび 4.0% (w/v) グリシンの効果を示す図である。

【図 25】各血清型についての抗原性回復に対する、40mcg/mL 用量の凍結乾燥した六価 GBS ワクチン (GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇ および GBS V-CRM₁₉₇) 中における 3.0% (w/v) スクロースおよび 3.0% (w/v) グリシンの効果を示す図である。

10

【図 26】時間 0、2 週間および 3 カ月における、先端を下にした配向で PFS 中に貯蔵した高および低用量への、GBS 6 および一価製剤の再懸濁の比較を示す図である。

【図 27】先端を下にしたおよび水平配向で PFS 中に貯蔵した高および低用量への、GBS 6 および一価製剤の再懸濁の比較を示す図である。

【図 28】pH の関数としての、ALPO₄ のゼータ電位を示す図である。

【図 29】pH の関数としての、GBS 血清型 Ia、Ib、II、III、IV および V のコンジュゲートのゼータ電位を示す図である。

【図 30】時間 0、2 週間および 3 カ月における、先端を下にした配向で pFS 中に貯蔵した高および低用量への、異なる GBS 6 および一価製剤の沈殿速度の比較を示す図である。

20

【図 31】用量レベル (血清型当たりの濃度) の関数としての、GBS 6 製剤の沈殿速度を示す図である。

【図 32】低用量 (60mcg/mL) および高用量 (240mcg/mL) における pH の関数としての、GBS 6 製剤の沈殿速度を示す図である。

【図 33】沈殿速度に対する用量および NaCl 濃度の効果を示す図である。

【図 34】45 分後の異なる抗原製剤の沈降挙動についての比較を示す図である。

【図 35 A】異なる抗原製剤の詳細な粒径分布を示す図である。

【図 35 B】10 μm 以上または 25 μm 以上のいずれかとして分類される、異なる抗原製剤の粒径分布を示す図である。

30

【図 36】様々なヘッドスペースを設けた、PFS 中の GBS 6 製剤を示す図である。

【図 37】水平位置で 2 週間貯蔵後の、様々な濃度の ALPO₄ を加えた高用量 GBS 6 製剤を再懸濁するために必要とされる振とう回数を示す図である。

【図 38】水平位置で 2 週間貯蔵後の、様々な濃度の ALPO₄ を加えた GBS 血清型 Ia、Ib、II、III、IV および V のコンジュゲートの結合を示す図である。

【図 39】再懸濁に対する、異なる凝結剤およびアルミニウム塩の効果を示す図である。

【図 40】沈降速度に対する、異なる凝結剤およびアルミニウム塩の効果を示す図である。

【図 41】高用量 GBS 6 製剤の再懸濁時間に対する、NaCl 濃度の効果を示す図である。

40

【図 42】再懸濁時間に対する、NaCl およびリン酸イオンの組合せの効果を示す図である。

【図 43 A】2 時間後の沈降に対する、NaCl およびリン酸カリウム濃度の効果を示す図である。

【図 43 B】30 分後の沈降に対する、NaCl およびリン酸カリウム濃度の効果を示す図である。

【図 44】20mM のリン酸塩および 240mM の NaCl を含む GBS 6 製剤の結合抗原性パーセントを、対照 GBS 6 製剤と比較して示す図である。

【図 45】より簡単な再懸濁 (10 回以下の振とう) を容易にする最適かつ強固な製剤条件についての予測プロファイラーの推奨事項を示す図である。

50

【図４６】予測プロファイラーの推奨事項に基づくＧＢＳ６製剤についての結合抗原性パーセントを示す図である。

【図４７】様々な濃度のＡｌ（ＯＨ）₃を加えた、ＧＢＳ血清型Ⅰa、Ⅰb、ⅠⅠ、ⅠⅠⅠ、ⅠⅣおよびⅤの結合を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００３３】

本発明は、記述されている特定の方法および実験条件に限定されず、そのような方法および条件は変更し得ることを理解されたい。本明細書において使用される専門用語は、特定の実施形態を記述することのみを目的としており、限定を意図していないことも理解されたい。

【００３４】

本明細書において記述されているものと同様または同等の任意の方法および材料を本発明の実践または試験において使用することができるが、好ましい方法および材料をここで記述する。本明細書において言及されているすべての刊行物は、参照によりその全体が組み込まれる。

【００３５】

本明細書において使用される用語は、当業者に認識されており、公知である意味を有するが、利便性および完全性のために、特定の用語およびそれらの意味を、以下でおよび明細書全体を通して説明する。

【００３６】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「１つの（a）」、「１つの（an）」および「その（the）」は、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数の参照物を包含する。故に、例えば、「方法（the method）」への言及は、１つまたは複数の方法、および／または本明細書において記述されているステップ、および／または本開示等を読めば当業者に明らかとなると予想されるものを包含する。

【００３７】

「約」または「およそ」という用語は、値の統計的に意味のある範囲内を意味する。そのような範囲は、所与の値または範囲の、一桁以内、典型的には２０％以内、またさらに典型的には１０％以内、さらに一層典型的には５％以内であってよい。「約」または「およそ」という用語によって網羅される許容偏差は、研究中の特定の系によって決まり、当業者には容易に分かり得る。本出願内で範囲が記載されている場合にはいつでも、該範囲内のすべての整数も、本発明の実施形態として企図されている。

【００３８】

本開示において、「含む」、「含まれる」、「含むこと」、「含有する」、「含有すること」等の用語は、米国特許法におけるものに帰属する意味を有し得、例えば、「包含する」、「包含される」、「包含すること」等を意味し得る。そのような用語は、任意の他の要素を除外することなく、特定の原料または原料のセットの包含を指す。「から本質的になること」および「から本質的になる」等の用語は、米国特許法におけるものに帰属する意味を有し、例えば、本発明の新規または基本的な特徴から逸脱しない追加の原料またはステップの包含を可能にする、すなわち、本発明の新規または基本的な特徴から逸脱する追加の列挙されていない原料またはステップを除外し、本明細書において引用されているまたは参照により本明細書に組み込まれる当技術分野における文書、とりわけ、この文書の目標が、特許性のある、例えば、新規の、自明でない、発明的な、従来技術を上回る、例えば、本明細書において引用されているもしくは参照により本明細書に組み込まれる文書を上回る、実施形態を定義することである場合等、先行技術の原料またはステップを除外する。また、「からなる」および「からなること」という用語は、米国特許法におけるものに属する意味を有する、すなわち、これらの用語はクローズエンドである。したがって、これらの用語は、特定の原料または原料のセットの包含および他すべての原料の除外を指す。

10

20

30

40

50

【0039】

「抗原」という用語は、概して、同族抗体が選択的に結合できる少なくとも1つのエピトープを含有する生体分子、通常はタンパク質、ペプチド、多糖、脂質もしくはコンジュゲート、または、一部の場合において、動物に注射もしくは吸収される組成物を包含する、動物において抗体もしくはT細胞応答または両方の生成を刺激することができる免疫原性物質を指す。免疫応答は、全分子に対して、または分子の1つもしくは複数の種々の部分（例えば、エピトープまたはハプテン）に対して産生され得る。該用語は、個々の分子または抗原分子の均一もしくは不均一集団を指すために使用され得る。抗原は、抗体、T細胞受容体、または特異的な体液性および／もしくは細胞性免疫の他の要素によって認識される。「抗原」という用語は、すべての関連抗原エピトープを包含する。所与の抗原のエピトープは、当業者に周知であるいくつかのエピトープマッピング技術を使用して同定することができる（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻（Glenn E. Morris編、1996）Humana Press、Totowa、NJを参照）。例えば、直鎖状エピトープは、例えば、固体支持体上の多数のペプチド、タンパク質分子の部分に対応するペプチドを同時に合成し、ペプチドが支持体に付着しているままで、ペプチドを抗体と反応させることによって、決定することができる。そのような技術は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号；Geysen, H. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:3998~4002（1984）；Geysen, H. M. ら、Molec. Immunol.、23（7）:709~715（1986）において記述されており、これらはすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。同様に、立体構造エピトープは、例えばX線結晶学および二次元核磁気共鳴によって等、アミノ酸の空間的立体構造を決定することによって同定され得る（例えば、Epitope Mapping Protocols、上記を参照）。さらに、本発明の目的のために、「抗原」は、タンパク質が免疫学的応答を導出する能力を維持する限り、欠失、付加および置換等の天然配列への修飾を包含するタンパク質（概して保存的な性質であるが、非保存的であってよい）を指すためにも使用され得る。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発を介して、もしくは特定の合成手順を介して、もしくは遺伝子工学的アプローチを介してのように意図的であってよく、または抗原を生成する宿主の突然変異を介して等、偶発的であってもよい。さらに、抗原は、微生物、例えば細菌から誘導、取得または単離されてもよいし、全生物であってもよい。同様に、核酸免疫化用途において等、抗原を発現しているオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドも、定義に包含される。合成抗原、例えば、ポリエピトープ、隣接エピトープ、および他の組換えまたは合成的に誘導された抗原も包含される（Bergmann, C. ら、Eur. J. Immunol.、23（11）:2777~2781（1993）；Bergmann, C. C. ら、J. Immunol.、157（8）:3242~3249（1996）；Suhrbier, A.、Immunol. and Cell Biol.、75（4）:402~408（1997））。

【0040】

「ワクチン」または「ワクチン組成物」という用語は、交換可能に使用され、動物において免疫応答を誘発する少なくとも1つの免疫原性組成物を含む医薬組成物を指す。

【0041】

英膜多糖

本明細書において使用される場合、「糖」という用語は、単一砂糖部分または単糖単位、ならびに、共有結合して二糖、オリゴ糖および多糖を形成する2つ以上の単一砂糖部分または単糖単位の組合せを指す。「糖」という用語は、「炭水化物」という用語と交換可能に使用され得る。多糖は、直鎖状であっても分枝鎖状であってもよい。

【0042】

「単糖」は、本明細書において使用される場合、オリゴ糖中における単一砂糖残基を指す。「二糖」という用語は、本明細書において使用される場合、グリコシド結合によって

10

20

30

40

50

一緒に結合した2つの単糖単位または部分から構成される多糖を指す。

【0043】

一実施形態において、多糖は、オリゴ糖（OS）である。「オリゴ糖」は、本明細書において使用される場合、2つ以上の単糖単位または部分を含有する化合物を指す。オリゴ糖の文脈内では、個々のモノマー単位または部分は、ヒドロキシル基を介して別の単糖単位または部分と結合しているまたはすることができる単糖である。オリゴ糖は、保護された単一残基砂糖からの化学合成によってまたは生物学的に生成された多糖の化学分解によってのいずれかで調製することができる。代替として、オリゴ糖は、インビトロ酵素法によって調製され得る。

【0044】

好ましい実施形態において、多糖PSは、少なくとも5つの単糖単位または部分の直鎖状または分枝鎖状ポリマーを指す。明瞭にするために、より多数の繰り返し単位（ここで、nは、約5超、例えば約10超等である）を、本明細書において多糖と称する。

【0045】

一実施形態において、多糖は、細胞表面多糖である。細胞表面多糖は、ペプチドグリカン層、細胞壁および莢膜を包含する最も外側の細菌細胞膜または細菌細胞表面上に位置する少なくとも一部を有する多糖を指す。典型的には、細胞表面多糖は、インビボで免疫応答を誘発することに関連する。細胞表面多糖は、「細胞壁多糖」または「莢膜多糖」であってよい。細胞壁多糖は、典型的には、細菌表面上に不連続層を形成する。

【0046】

一実施形態において、多糖は、莢膜多糖である。莢膜多糖は、グリコシド結合によって接合した1つまたは複数の単糖の繰り返し単位を包含するグリコポリマーである。莢膜多糖は、典型的には、細菌細胞の周囲に莢膜様層を形成する。「莢膜多糖（capsular polysaccharide）」または「莢膜多糖（capsule polysaccharide）」は、レンサ球菌のほとんどの分離株の細胞壁の外部にある多糖莢膜を指す。例えば、すべてのGBS莢膜多糖は、細菌の菌力に必要とされる末端 α 2-3-結合シアル酸を持つ分枝鎖状繰り返し構造を有する。莢膜関連シアル酸（HPLCアッセイによって定量化される）は、インビトロで培養したT.E.S.T.由来の侵襲性新生児分離株の94%超において検出された。

【0047】

本発明者らは、GBS莢膜多糖のシアル酸レベルが、免疫応答を生成するために重要な特徴であることを発見した。先行開示は、血清型Vについてのシアル酸レベルに関して矛盾する情報、脱シアル化血清型Vが好ましい（国際特許出願公開第WO2012/035519号）、および血清型Vについて50%超のシアル酸含有量が使用され得る（国際特許出願公開第WO2014/053612号）という所見のみを提供していた。しかしながら、これらの参考文献のうちのいずれも、GBS多糖の少なくとも大部分についてのシアル酸レベルの、免疫原性に対する重要性について記述していない。本発明者らは、驚くべきことに、GBS莢膜多糖が、天然シアル酸レベルを有する多糖に相当する免疫応答（すなわち、100%または約95%超）を提供するために、コンジュゲーションの前に約60%以上のシアル酸を必要とすることを見出した。血清型Vについて開示されている先の範囲内である58%のシアル酸レベルであっても、免疫原性に悪影響を及ぼした。

【0048】

したがって、本発明の一実施形態において、莢膜多糖は、約100%または約95%超等、それらの自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、および最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されていてもよい。

【0049】

100%のシアル酸レベルは、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸に対応することに留意すべきである。したがって、莢膜多糖は、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.85mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.9mMのシアル酸、または多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。

【0050】

一部の莢膜多糖（CP）血清型の末端シアル残基は、部分的にO-アセチル化されている（OAc）（Lewis, A. L. ら、Proceedings of the National Academy of Sciences USA、101（30）：11123～8（2004））。血清型Ib、III、IV、V、VIおよびIXは、部分的にO-アセチル化されている（最大約40%）のに対し、血清型Ia、IIおよびVIIは、O-アセチル化をほとんどまたは全く有さない（約5%未満）（Lewis 2004）。本発明の一実施形態において、莢膜多糖は、それらの自然なO-アセチル化レベル（約0%から約40%）を含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、O-脱アセチル化されていてよい（約5%未満）。多糖またはオリゴ糖のO-アセチル化の程度は、当技術分野において公知である任意の方法によって、例えば、プロトンNMRによって決定することができる（Lemercinier, X. ら、Carbohydrate Research、296：83～96（1996）；Jones, C. ら、Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis、30：1233～1247（2002）；国際特許出願公開第WO2005/033148号および同第WO00/56357号）。別の一般に使用される方法は、Hestrin, S., J. Biol. Chem., 180：249～261（1949）によって記述されている。

【0051】

また、100%のO-アセテートは、糖繰返し単位1mM当たり約1.0mMのO-アセテートに対応する。したがって、部分的にO-アセチル化されている多糖は、糖繰返し単位1mM当たり少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.35または約0.4mMのO-アセテートを含む。O-脱アセチル化されている多糖は、糖繰返し単位1mM当たり約0.01、0.02、0.03、0.04、または0.05mM未満のO-アセテートを含む。

【0052】

侵襲性疾患を引き起こすことができるレンサ球菌微生物は、概して、細菌を被包し、宿主の自然免疫系によるクリアランスに対するその抵抗を強化するCPを生成することでもできる。CPは、細菌を食作用および細胞内死滅に対して抵抗性にする保護莢膜内に細菌細胞を覆い隠すことに役立つ。莢膜を欠いている細菌は、食作用の影響をより受けやすい。莢膜多糖は、高頻度で、インフルエンザ菌（Haemophilus influenzae）、肺炎レンサ球菌（Streptococcus pneumoniae）、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）および黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）を包含する多くの細菌病原体にとって重要な菌力因子である。

【0053】

莢膜多糖を使用して、特定の種の細菌の血清型を決めることができる。莢膜多糖の特異的構造または独自のエピトープ特徴への型判定は、通常は、産生された特異抗血清またはモノクローナル抗体との反応によって遂行される。10のGBS血清型：Ia、IbおよびII～IXがある（Ferrieri, P. ら、Emerg. Infect. Dis. [Internet]、19（4）（2013）、<http://wwwnc.cdc>.

10

20

30

40

50

gov/eid/article/19/4/12-1572__articleにおいて利用可能)。

【0054】

本発明の一実施形態において、多糖は、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) から単離される。多糖は、*S. アガラクティエ* (*S. agalactiae*) の任意の被包性株、例えば、090、A909 (ATCC受託番号BAA-1138)、515 (ATCC受託番号BAA-1177)、B523、CJB524、MB4052 (ATCC受託番号31574)、H36B (ATCC受託番号12401)、S40、S42、MB4053 (ATCC受託番号31575)、M709、133、7357、PFEGBST0267、MB4055 (ATCC受託番号31576)、18RS21 (ATCC受託番号BAA-1175)、S16、S20、V8 (ATCC受託番号12973)、DK21、DK23、UAB、5401、PFEGBST0708、MB4082 (ATCC受託番号31577)、M132、110、M781 (ATCC受託番号BAA-22)、D136C (3) (ATCC受託番号12403)、M782、S23、120、MB4316 (M-732; ATCC受託番号31475)、M132、K79、COH1 (ATCC受託番号BAA-1176)、PFEGBST0563、3139 (ATCC受託番号49446)、CZ-NI-016、PFEGBST0961、1169-NT1、CJB111 (ATCC受託番号BAA-23)、CJB112、2603V/R (ATCC受託番号BAA-611)、NCTC10/81、CJ11、PFEGBST0837、118754、114852、114862、114866、118775、B4589、B4645、SS1214、CZ-PW-119、7271、CZ-PW-045、JM9130013、JM9130672、IT-NI-016、IT-PW-62およびIT-PW-64等から単離され得る。

【0055】

本明細書において記述されている多糖は、例えば、本明細書において記述されている方法を包含する、当技術分野において公知の方法によって単離され得る。本明細書において使用される場合、「単離された」は、特定の起源から取得され、分離されることを指す。

「単離された」という用語はさらに、そのそれぞれの自然発生形態、状況および／または環境にないことを指す。例えば、「レンサ球菌から単離された」は、レンサ球菌細胞から取得され、分離された物質を指す。単離された多糖は、自然発生のものではない。「単離された」という用語は、材料がその元の環境から取り出されていることを意味する（例えば、それが自然発生のものであれば自然環境、またはそれが組換え実体であればその宿主生物から、もしくは1つの環境から異なる環境へ運ばれる）。例えば、「単離された」荚膜多糖、タンパク質またはペプチドは、タンパク質が由来する細胞もしくは組織起源からの細胞材料もしくは他の汚染タンパク質を実質的に含まない、または、化学的に合成される場合、もしくは化学反応の一部として混合物中に存在する場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。本発明において、タンパク質または多糖は、免疫原性組成物の製造において有用な形態で提供されるように、細菌細胞からまたは細胞残屑から単離され得る。「単離された」または「単離すること」という用語は、当技術分野において公知である単離された多糖を精製するための方法および／または本明細書において記述されている方法を包含する、精製することまたは精製を包含し得る。「細胞材料を実質的に含まない」という言葉は、ポリペプチド／タンパク質が、それを単離または組換えにより生成した細胞の細胞成分から分離されている、ポリペプチド／タンパク質の調製物を包含する。故に、細胞材料を実質的に含まない荚膜多糖、タンパク質またはペプチドは、約30%、20%、10%、5%、2.5%または1%（乾重量で）未満の汚染タンパク質もしくは多糖または他の細胞材料を有する、荚膜多糖、タンパク質またはペプチドの調製物を包含する。ポリペプチド／タンパク質が組換えにより生成される場合、これは、好ましくは培養培地も実質的に含まない、すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の体積の約20%、10%または5%未満を表す。ポリペプチド／タンパク質または多糖が化学合

10

20

30

40

50

成によって生成される場合、これは、好ましくは化学的前駆体も他の化学物質も実質的に含まない、すなわち、これは、タンパク質または多糖の合成に關与する化学的前駆体または他の化学物質から分離される。したがって、ポリペプチド／タンパク質または多糖のそのような調製物は、目的のポリペプチド／タンパク質または多糖断片以外に、約30%、20%、10%、5%（乾重量で）未滿の化学的前駆体または化合物を有する。

【0056】

本發明の一実施形態において、多糖は、細菌から単離される。本發明の別の実施形態において、多糖は、組換えにより生成される。さらなる実施形態において、多糖は、合成であるか、または従来する方法に従って化学的に合成される。本發明のまた別の実施形態において、多糖は、多糖を生成するための生合成経路をクローン化および発現した後の代理宿主における発現によって調製される。一実施形態において、多糖は、免疫原性である。例えば、本發明者らは、本明細書において記述されている各多糖が、免疫応答を誘発するまたは導出することができることを発見した。「免疫原性」という用語は、哺乳動物において、体液性および／または細胞媒介性免疫応答を開始する、トリガーする、引き起こす、強化する、改善する、および／または増強させる能力を指す。一実施形態において、哺乳動物は、ヒト、霊長類、ウサギ、ブタ、マウス等である。

【0057】

莢膜多糖の分子量は、免疫原性組成物における使用のための検討事項である。高分子量の莢膜多糖は、抗原表面上に存在する、より高い原子価のエピトープにより、ある特定の抗体免疫応答を誘発することができる。高分子量の莢膜多糖の単離および精製は、本發明のコンジュゲート、組成物および方法において使用するために企図されている。

【0058】

しかしながら、一実施形態において、多糖は、担体タンパク質とのコンジュゲーション前に、天然莢膜多糖の分子量より低い分子量（MW）範囲にサイズ決定されてよい。精製された莢膜多糖のサイズは、有利な濾過特性および／または収率を持つコンジュゲートを産生するために低減される。

【0059】

1つのそのような実施形態において、精製された莢膜多糖のサイズは、高圧均質化によって低減される。高圧均質化は、十分に小さい寸法を持つ流路を介してプロセス流をポンプでくみ上げることにより、高せん断速度を実現する。せん断速度は、大きな印加均質化圧力を使用することによって増大され、曝露時間は、ホモジナイザーを介して送給流を再循環させることによって増大させることができる。

【0060】

一実施形態において、本明細書において記述されている多糖は、オプソニン活性を誘発することができる。別の実施形態において、本明細書において記述されている多糖は、オプソニンおよび食作用活性（例えば、オプソニン食作用活性）を誘発することができる。

【0061】

オプソニン活性またはオプソニン化は、オプソニン（例えば、抗体または補体因子）が抗原（例えば、本明細書において記述されている単離された多糖）と結合するプロセスを指し、これは、食細胞または食作用細胞（例えば、マクロファージ、樹状細胞および多形核白血球（PMNL））との抗原の結合を容易にする。一部の細菌、例えば、莢膜の存在により典型的には貪食されていない被包性細菌等は、オプソニン抗体でコーティングされると、食細胞によって認識されやすくなる。一実施形態において、多糖は、オプソニンである免疫応答、例えば抗体等を誘発する。一実施形態において、オプソニン活性は、グラム陽性球菌に対する、好ましくはレンサ球菌（*Streptococcus*）種に対する、より好ましくは*S. アガラクティエ*（*S. agalactiae*）の少なくとも1つの株に対するものである。

【0062】

また別の実施形態において、本明細書において記述されている多糖は、殺菌免疫応答を誘発することができる。一実施形態において、殺菌活性は、グラム陽性球菌に対する、好

10

20

30

40

50

ましくはレンサ球菌 (*Streptococcus*) 種に対する、より好ましくは *S. アガラクティエ* (*S. agalactiae*) の少なくとも1つの株に対するものである。

【0063】

オプソニン化、食作用および／または殺菌活性を測定するための方法は、当技術分野において公知であり、例えば、細菌負荷の低減をインピボで計測することによるもの（例えば、レンサ球菌 (*Streptococcus*) 種を接種した哺乳動物における菌血症レベルを測定することによるもの）および／または細菌細胞死滅をインピトロで計測することによるもの（例えば、インピトロオプソニン食作用アッセイ）である。一実施形態において、多糖は、適切な対照と比較して、例えば、熱で死滅させたグラム陽性球菌に対して育てられた抗血清と比較して等、オプソニン、食作用および／または殺菌活性を誘発することができる。

10

【0064】

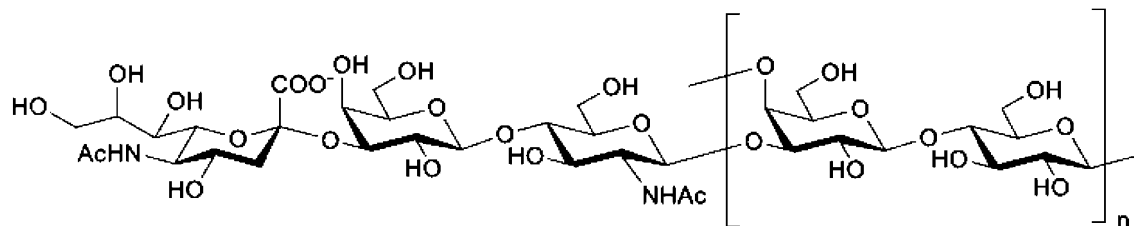
血清型 I a

一実施形態は、血清型 I a GBS 莢膜多糖を包含する。血清型 I a の構造は、次のように描写することができる：

【0065】

【化1】

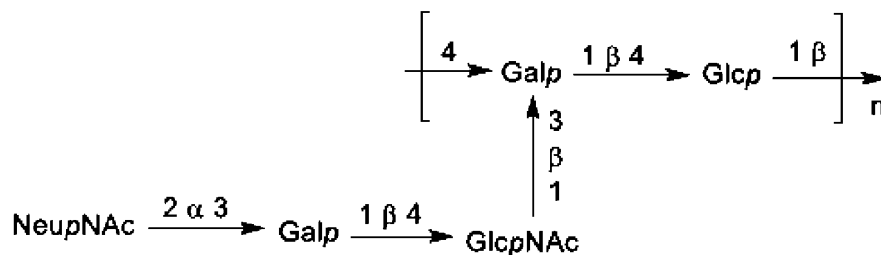
a)



20

または

b)



30

【0066】

コンジュゲーション前の血清型 I a 莢膜多糖の分子量は、約 5 kDa から約 1,000 kDa の間、例えば、約 25 kDa から約 750 kDa の間、約 25 kDa から約 500 kDa の間、約 25 kDa から約 450 kDa の間、約 25 kDa から約 400 kDa の間、約 25 kDa から約 350 kDa の間、約 25 kDa から約 300 kDa の間、約 25 kDa から約 250 kDa の間、約 25 kDa から約 200 kDa の間、約 50 kDa から約 750 kDa の間、約 50 kDa から約 500 kDa の間、約 50 kDa から約 450 kDa の間、約 50 kDa から約 400 kDa の間、約 50 kDa から約 350 kDa の間、約 50 kDa から約 300 kDa の間、約 50 kDa から約 250 kDa の間、約 50 kDa から約 200 kDa の間、約 75 kDa から約 750 kDa の間、約 75 kDa から約 500 kDa の間、約 75 kDa から約 450 kDa の間、約 75 kDa から約 400 kDa の間、約 75 kDa から約 350 kDa の間、約 75 kDa から約 300 kDa の間、約 75 kDa から約 250 kDa の間、約 75 kDa から約 200 kDa の間、約 100 kDa から約 750 kDa の間、約 100 kDa から約 700 kDa の間、

40

50

約100kDaから約650kDaの間、約100kDaから約600kDaの間、約100kDaから約550kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約450kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約350kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから750kDaの間、約200kDaから約700kDaの間、約200kDaから約650kDaの間、約200kDaから約600kDaの間、約200kDaから約550kDaの間、約200kDaから約500kDaの間、約200kDaから約450kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、の間、約250kDaから約750kDaの間、約250kDaから約700kDaの間、約250kDaから約650kDaの間、約250kDaから約600kDaの間、約250kDaから約550kDaの間、約250kDaから約500kDaの間、約250kDaから約450kDaの間、約250kDaから約400kDaの間、約300kDaから750kDaの間、約300kDaから約700kDaの間、約300kDaから約650kDaの間、約300kDaから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDaから約500kDaの間等である。1つの好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約25kDaから約200kDaの間である。別の好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約100kDaから約400kDaの間である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0067】

特定の実施形態において、多糖の構造的特色、例えばシアル酸等を保存しながら、天然GBS莢膜多糖血清型Iaのサイズを低減させるために、高圧均質化プロセスが使用される。

【0068】

本発明の一実施形態において、血清型Ia莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されていてよい。

【0069】

別の実施形態において、血清型Ia莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.85mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.9mMのシアル酸、または多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。

【0070】

血清型Ia莢膜多糖は、約5%未満O-アセチル化されている。本発明の血清型Ia莢膜多糖の一部の例示的な株は、090、A909（ATCC受託番号BAA-1138）、515（ATCC受託番号BAA-1177）、B523、CJB524およびMB4052（ATCC受託番号31574）を包含する。

【0071】

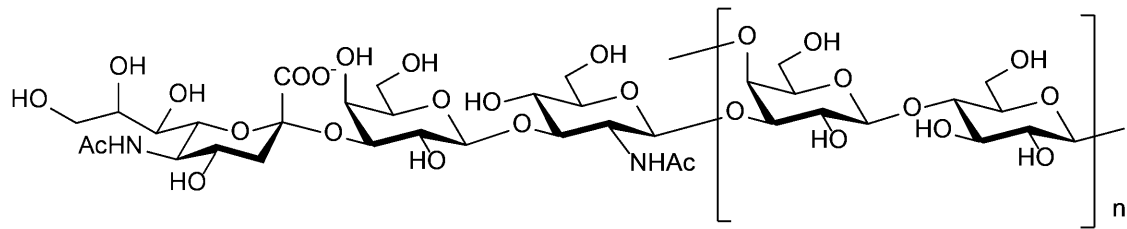
血清型Ib

一実施形態は、血清型Ib GBS莢膜多糖を包含する。血清型Ibの構造は、次のように描写することができる：

【 0 0 7 2 】

【 化 2 】

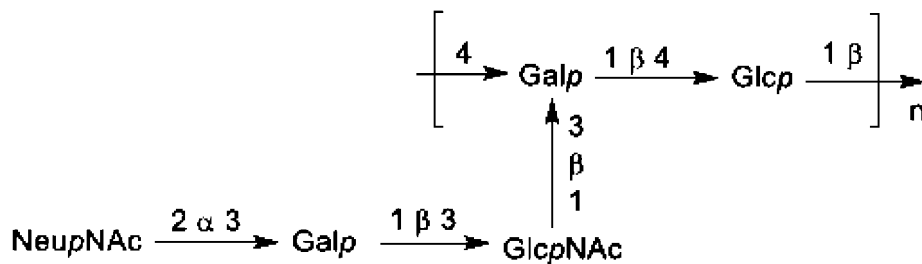
a)



10

または

b)



20

【 0 0 7 3 】

コンジュゲーション前の血清型 I b 莢膜多糖の分子量は、約 5 kDa から約 1,000 kDa の間、例えば、約 25 kDa から約 750 kDa の間、約 25 kDa から約 500 kDa の間、約 25 kDa から約 450 kDa の間、約 25 kDa から約 400 kDa の間、約 25 kDa から約 350 kDa の間、約 25 kDa から約 300 kDa の間、約 25 kDa から約 250 kDa の間、約 25 kDa から約 200 kDa の間、約 50 kDa から約 750 kDa の間、約 50 kDa から約 500 kDa の間、約 50 kDa から約 450 kDa の間、約 50 kDa から約 400 kDa の間、約 50 kDa から約 350 kDa の間、約 50 kDa から約 300 kDa の間、約 50 kDa から約 250 kDa の間、約 50 kDa から約 200 kDa の間、約 75 kDa から約 750 kDa の間、約 75 kDa から約 500 kDa の間、約 75 kDa から約 450 kDa の間、約 75 kDa から約 400 kDa の間、約 75 kDa から約 350 kDa の間、約 75 kDa から約 300 kDa の間、約 75 kDa から約 250 kDa の間、約 75 kDa から約 200 kDa の間、約 100 kDa から約 750 kDa の間、約 100 kDa から約 700 kDa の間、約 100 kDa から約 650 kDa の間、約 100 kDa から約 600 kDa の間、約 100 kDa から約 550 kDa の間、約 100 kDa から約 500 kDa の間、約 100 kDa から約 450 kDa の間、約 100 kDa から約 400 kDa の間、約 100 kDa から約 350 kDa の間、約 100 kDa から約 300 kDa の間、約 200 kDa から約 750 kDa の間、約 200 kDa から約 700 kDa の間、約 200 kDa から約 650 kDa の間、約 200 kDa から約 600 kDa の間、約 200 kDa から約 550 kDa の間、約 200 kDa から約 500 kDa の間、約 200 kDa から約 450 kDa の間、約 200 kDa から約 400 kDa の間、約 250 kDa から約 750 kDa の間、約 250 kDa から約 700 kDa の間、約 250 kDa から約 650 kDa の間、約 250 kDa から約 600 kDa の間、約 250 kDa から約 550 kDa の間、約 250 kDa から約 500 kDa の間、約 250 kDa から約 450 kDa の間、約 250 kDa から約 400 kDa の間、約 300 kDa から約 750 kDa の間、約 300 kDa から約 700 kDa の間、約 300 kDa から約 650 kDa の間、約 300 kDa

30

40

50

aから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDaから約500kDaの間等である。1つの好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約25kDaから約400kDaの間である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0074】

本発明の一実施形態において、血清型Ib莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されていてよい。

10

【0075】

別の実施形態において、血清型Ib莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.85mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.9mMのシアル酸、または多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。

20

【0076】

血清型Ib莢膜多糖は、約0%から約40%の間、O-アセチル化されている。本発明の一実施形態において、多糖は、O-脱アセチル化されている（すなわち、約5%未満、O-アセチル化されている）。本発明の血清型Ib莢膜多糖の一部の例示的な株は、H36B（ATCC受託番号12401）、S40、S42、MB4053（ATCC受託番号31575）、M709、133、7357およびPFEGBST0267を包含する。

【0077】

血清型II

30

一実施形態は、血清型II GBS莢膜多糖を包含する。血清型IIの構造は、次のように描写することができる：

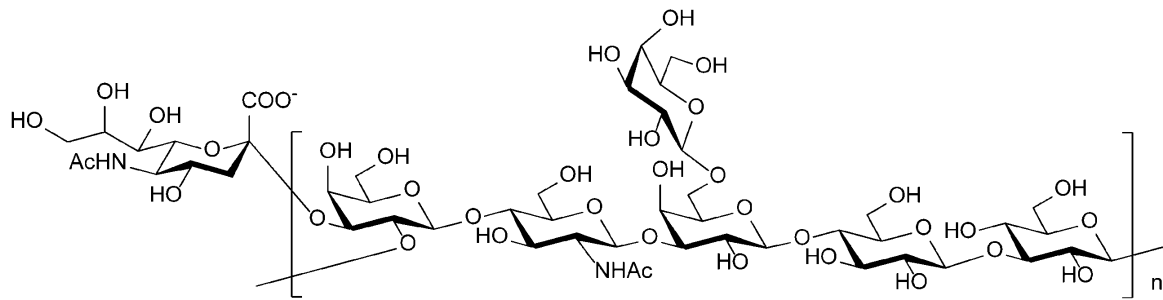
【0078】

40

50

【化 3】

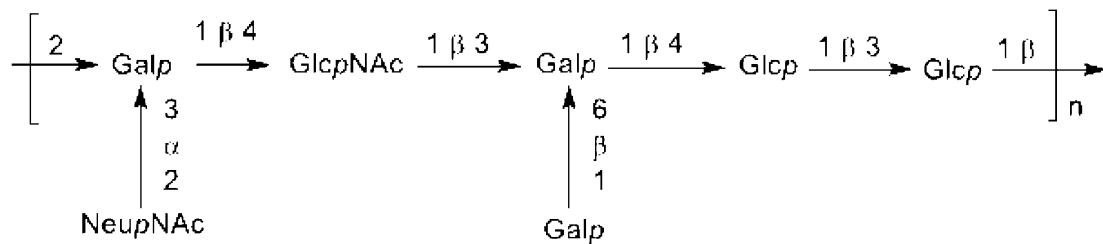
a)



10

または

b)



20

【0079】

コンジュゲーション前の血清型ⅠⅠ莢膜多糖の分子量は、約5kDaから約1,000kDaの間、例えば、約25kDaから約750kDaの間、約25kDaから約500kDaの間、約25kDaから約450kDaの間、約25kDaから約400kDaの間、約25kDaから約350kDaの間、約25kDaから約300kDaの間、約25kDaから約250kDaの間、約25kDaから約200kDaの間、約50kDaから約750kDaの間、約50kDaから約500kDaの間、約50kDaから約450kDaの間、約50kDaから約400kDaの間、約50kDaから約350kDaの間、約50kDaから約300kDaの間、約50kDaから約250kDaの間、約50kDaから約200kDaの間、約75kDaから約750kDaの間、約75kDaから約500kDaの間、約75kDaから約450kDaの間、約75kDaから約400kDaの間、約75kDaから約350kDaの間、約75kDaから約300kDaの間、約75kDaから約250kDaの間、約75kDaから約200kDaの間、約100kDaから約750kDaの間、約100kDaから約700kDaの間、約100kDaから約650kDaの間、約100kDaから約600kDaの間、約100kDaから約550kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約450kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約350kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから750kDaの間、約200kDaから約700kDaの間、約200kDaから約650kDaの間、約200kDaから約600kDaの間、約200kDaから約550kDaの間、約200kDaから約500kDaの間、約200kDaから約450kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、の間、約250kDaから約750kDaの間、約250kDaから約700kDaの間、約250kDaから約650kDaの間、約250kDaから約600kDaの間、約250kDaから約550kDaの間、約250kDaから約500kDaの間、約250kDaから約450kDaの間、約250kDaから約400kDaの間、約300kDaから750kDaの間、約300kDaから約700kDaの間、約300kDaから約650kDaの間、約300kD

30

40

50

aから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDaから約500kDaの間等である。1つの好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約25kDaから約400kDaの間である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0080】

本発明の一実施形態において、血清型II莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されていてよい。

10

【0081】

別の実施形態において、血清型II莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.85mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.9mMのシアル酸、または多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。

20

【0082】

血清型II莢膜多糖は、約5%未満O-アセチル化されている。本発明の血清型II莢膜多糖の一部の例示的な株は、MB4055（ATCC受託番号31576）、18RS21（ATCC受託番号BAA-1175）、S16、S20、V8（ATCC受託番号12973）、DK21、DK23、UAB、5401およびPFEGBST0708を包含する。

【0083】

血清型III

30

一実施形態は、血清型III GBS莢膜多糖を包含する。血清型IIIの構造は、次のように描写することができる：

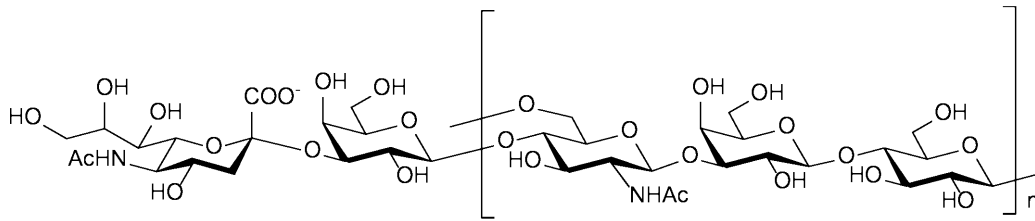
【0084】

40

50

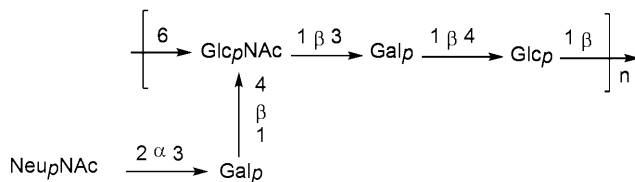
【化 4】

a)



または

b)



【 0 0 8 5 】

コンジュゲーション前の血清型ⅠⅠⅠ莢膜多糖の分子量は、約5kDaから約1,000kDaの間、例えば、約25kDaから約750kDaの間、約25kDaから約500kDaの間、約25kDaから約450kDaの間、約25kDaから約400kDaの間、約25kDaから約350kDaの間、約25kDaから約300kDaの間、約25kDaから約250kDaの間、約25kDaから約200kDaの間、約50kDaから約750kDaの間、約50kDaから約500kDaの間、約50kDaから約450kDaの間、約50kDaから約400kDaの間、約50kDaから約350kDaの間、約50kDaから約300kDaの間、約50kDaから約250kDaの間、約50kDaから約200kDaの間、約75kDaから約750kDaの間、約75kDaから約500kDaの間、約75kDaから約450kDaの間、約75kDaから約400kDaの間、約75kDaから約350kDaの間、約75kDaから約300kDaの間、約75kDaから約250kDaの間、約75kDaから約200kDaの間、約100kDaから約750kDaの間、約100kDaから約700kDaの間、約100kDaから約650kDaの間、約100kDaから約600kDaの間、約100kDaから約550kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約450kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約350kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから750kDaの間、約200kDaから約700kDaの間、約200kDaから約650kDaの間、約200kDaから約600kDaの間、約200kDaから約550kDaの間、約200kDaから約500kDaの間、約200kDaから約450kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、の間、約250kDaから約750kDaの間、約250kDaから約700kDaの間、約250kDaから約650kDaの間、約250kDaから約600kDaの間、約250kDaから約550kDaの間、約250kDaから約500kDaの間、約250kDaから約450kDaの間、約250kDaから約400kDaの間、約300kDaから750kDaの間、約300kDaから約700kDaの間、約300kDaから約650kDaの間、約300kDaから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDaから約500kDaの間等である。1つの好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約25kDaから約200kDaの間である。別の好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約100kDaから約400kDaの間である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実

10

20

30

40

50

施形態として企図されている。

【0086】

特定の実施形態において、多糖の構造的特色、例えばシアル酸等を保存しながら、天然GBS莢膜多糖血清型IIIのサイズを低減させるために、高圧均質化プロセスが使用される。

【0087】

本発明の一実施形態において、血清型III莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されていてよい。

10

【0088】

別の実施形態において、血清型III莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.85mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.9mMのシアル酸、または多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。

20

【0089】

血清型III莢膜多糖は、約0%から約40%の間、O-アセチル化されている。本発明の一実施形態において、多糖は、O-脱アセチル化されている（すなわち、約5%未満、O-アセチル化されている）。本発明の血清型III莢膜多糖の一部の例示的な株は、MB4082（ATCC受託番号31577）、M132、110、M781（ATCC受託番号BAA-22）、D136C（3）（ATCC受託番号12403）、M782、S23、120、MB4316（M-732；ATCC受託番号31475）、M132、K79、COH1（ATCC受託番号BAA-1176）およびPFEGBST0563を包含する。

30

【0090】

血清型IV

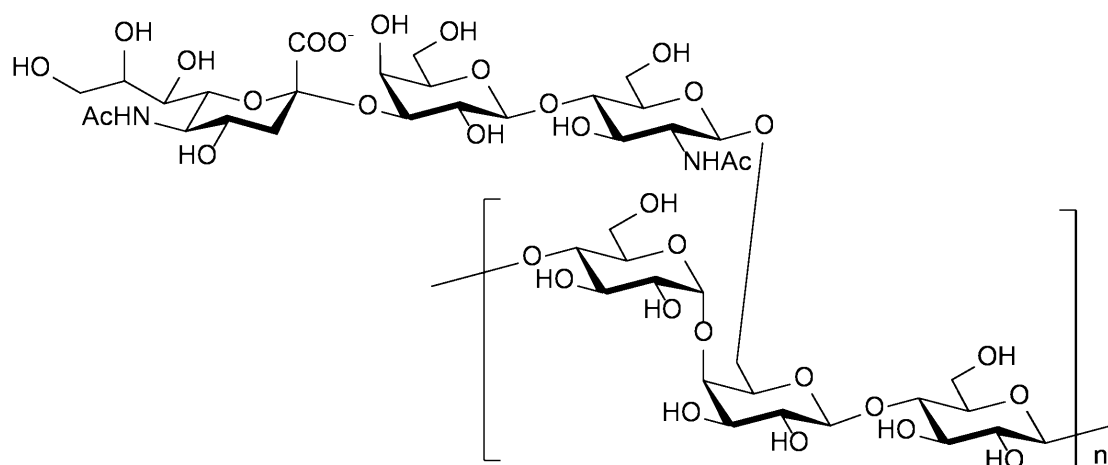
一実施形態は、血清型IV GBS莢膜多糖を包含する。血清型IVの構造は、次のように描写することができる：

【0091】

40

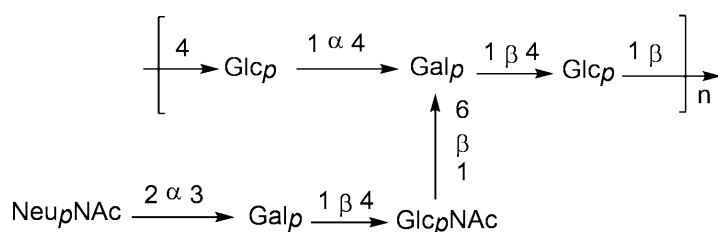
50

a)



または

b)



コンジュゲーション前の血清型ⅠⅤ莢膜多糖の分子量は、約5kDaから約1,000kDaの間、例えば、約25kDaから約750kDaの間、約25kDaから約500kDaの間、約25kDaから約450kDaの間、約25kDaから約400kDaの間、約25kDaから約350kDaの間、約25kDaから約300kDaの間、約25kDaから約250kDaの間、約25kDaから約200kDaの間、約50kDaから約750kDaの間、約50kDaから約500kDaの間、約50kDaから約450kDaの間、約50kDaから約400kDaの間、約50kDaから約350kDaの間、約50kDaから約300kDaの間、約50kDaから約250kDaの間、約50kDaから約200kDaの間、約75kDaから約750kDaの間、約75kDaから約500kDaの間、約75kDaから約450kDaの間、約75kDaから約400kDaの間、約75kDaから約350kDaの間、約75kDaから約300kDaの間、約75kDaから約250kDaの間、約75kDaから約200kDaの間、約100kDaから約750kDaの間、約100kDaから約700kDaの間、約100kDaから約650kDaの間、約100kDaから約600kDaの間、約100kDaから約550kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約450kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約350kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから750kDaの間、約200kDaから約700kDaの間、約200kDaから約650kDaの間、約200kDaから約600kDaの間、約200kDaから約550kDaの間、約200kDaから約500kDaの間、約200kDaから約450kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、の間、約250kDaから約750kDaの間、約250kDaから約700kDaの間、約250kDaから約650kDaの間、

の間、約250kDaから約600kDaの間、約250kDaから約550kDaの間、約250kDaから約500kDaの間、約250kDaから約450kDaの間、約250kDaから約400kDaの間、約300kDaから750kDaの間、約300kDaから約700kDaの間、約300kDaから約650kDaの間、約300kDaから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDaから約500kDaの間等である。1つの好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約25kDaから約400kDaの間である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0093】

本発明の一実施形態において、血清型IV莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されていてよい。

10

【0094】

別の実施形態において、血清型IV莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.85mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.9mMのシアル酸、または多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。

20

【0095】

血清型IV莢膜多糖は、約0%から約40%の間、O-アセチル化されている。本発明の一実施形態において、多糖は、O-脱アセチル化されている（すなわち、約5%未満、O-アセチル化されている）。本発明の血清型IV莢膜多糖の一部の例示的な株は、3139（ATCC受託番号49446）、CZ-NI-016およびPFEGBST0961を包含する。

30

【0096】

血清型V

一実施形態は、血清型V GBS莢膜多糖を包含する。血清型Vの構造は、次のように描写することができる：

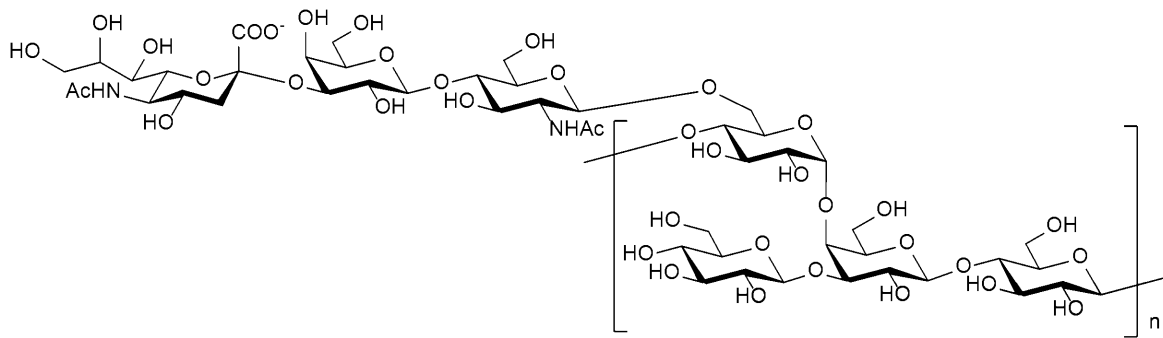
【0097】

40

50

【化 6】

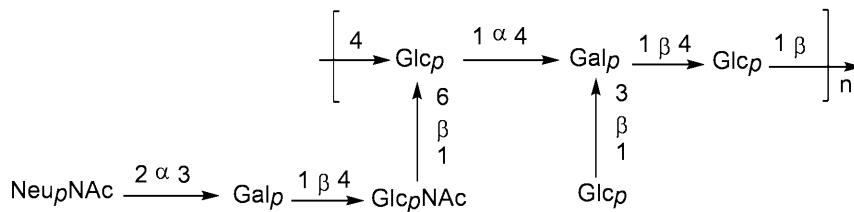
a)



10

または

b)



20

【0098】

コンジュゲーション前の血清型V莢膜多糖の分子量は、約5kDaから約1,000kDaの間、例えば、約25kDaから約750kDaの間、約25kDaから約500kDaの間、約25kDaから約450kDaの間、約25kDaから約400kDaの間、約25kDaから約350kDaの間、約25kDaから約300kDaの間、約25kDaから約250kDaの間、約25kDaから約200kDaの間、約50kDaから約750kDaの間、約50kDaから約500kDaの間、約50kDaから約450kDaの間、約50kDaから約400kDaの間、約50kDaから約350kDaの間、約50kDaから約300kDaの間、約50kDaから約250kDaの間、約50kDaから約200kDaの間、約75kDaから約750kDaの間、約75kDaから約500kDaの間、約75kDaから約450kDaの間、約75kDaから約400kDaの間、約75kDaから約350kDaの間、約75kDaから約300kDaの間、約75kDaから約250kDaの間、約75kDaから約200kDaの間、約100kDaから約750kDaの間、約100kDaから約700kDaの間、約100kDaから約650kDaの間、約100kDaから約600kDaの間、約100kDaから約550kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約450kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約350kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから約750kDaの間、約200kDaから約700kDaの間、約200kDaから約650kDaの間、約200kDaから約600kDaの間、約200kDaから約550kDaの間、約200kDaから約500kDaの間、約200kDaから約450kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、約250kDaから約750kDaの間、約250kDaから約700kDaの間、約250kDaから約650kDaの間、約250kDaから約600kDaの間、約250kDaから約550kDaの間、約250kDaから約500kDaの間、約250kDaから約450kDaの間、約250kDaから約400kDaの間、約300kDaから約750kDaの間、約300kDaから約700kDaの間、約300kDaから約650kDaの間、約300kDaから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDa

30

40

50

から約500kDaの間等である。1つの好ましい実施形態において、コンジュゲーション前の莢膜多糖の分子量は、約25kDaから約400kDaの間である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0099】

本発明の一実施形態において、血清型V莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されてよい。

10

【0100】

別の実施形態において、血清型V莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.85mMのシアル酸、多糖1mM当たり少なくとも約0.9mMのシアル酸、または多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMのシアル酸等を有し得る。

20

【0101】

血清型V莢膜多糖は、約0%から約40%の間、O-アセチル化されている。本発明の一実施形態において、多糖は、O-脱アセチル化されている（すなわち、約5%未満、O-アセチル化されている）。本発明の血清型V莢膜多糖の一部の例示的な株は、1169-NT1、CJB111（ATCC受託番号BAA-23）、CJB112、2603V/R（ATCC受託番号BAA-611）、NCTC10/81、CJ11およびPFEGBST0837を包含する。

【0102】

血清型VI

30

GBS血清型VI莢膜多糖は、von Hunolstein, C. ら、Infection and Immunity、6194）：1272～1280（1993）によって記述されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。血清型VIの構造は、次のように描写することができる：

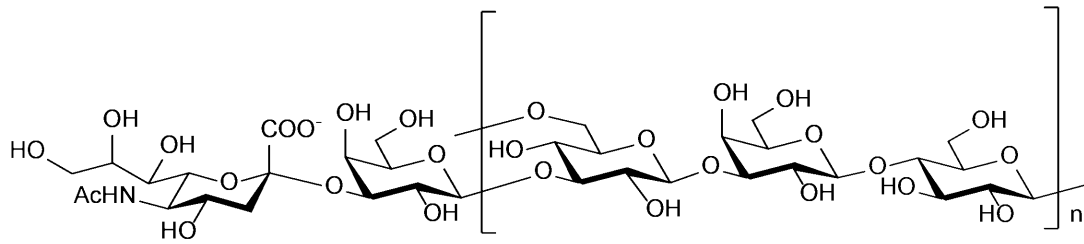
【0103】

40

50

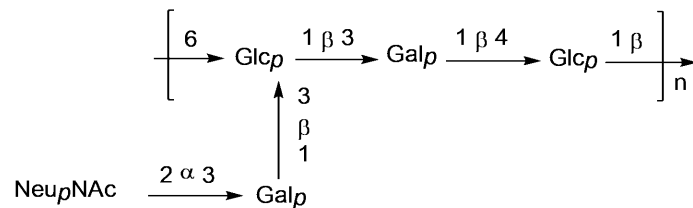
【化 7】

a)



または

b)



【0104】

コンジュゲーション前の血清型ⅤⅠ莢膜多糖の分子量は、約5kDaから約1,000kDaの間、例えば、約50kDaから約750kDaの間、約50kDaから約500kDaの間、約50kDaから約450kDaの間、約50kDaから約400kDaの間、約50kDaから約350kDaの間、約50kDaから約300kDaの間、約50kDaから約250kDaの間、約50kDaから約200kDaの間、約75kDaから約750kDaの間、約75kDaから約500kDaの間、約75kDaから約450kDaの間、約75kDaから約400kDaの間、約75kDaから約350kDaの間、約75kDaから約300kDaの間、約75kDaから約250kDaの間、約75kDaから約200kDaの間、約100kDaから約750kDaの間、約100kDaから約700kDaの間、約100kDaから約650kDaの間、約100kDaから約600kDaの間、約100kDaから約550kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約450kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約350kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから750kDaの間、約200kDaから約700kDaの間、約200kDaから約650kDaの間、約200kDaから約600kDaの間、約200kDaから約550kDaの間、約200kDaから約500kDaの間、約200kDaから約450kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、約250kDaから約750kDaの間、約250kDaから約700kDaの間、約250kDaから約650kDaの間、約250kDaから約600kDaの間、約250kDaから約550kDaの間、約250kDaから約500kDaの間、約250kDaから約450kDaの間、約250kDaから約400kDaの間、約300kDaから750kDaの間、約300kDaから約700kDaの間、約300kDaから約650kDaの間、約300kDaから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDaから約500kDaの間等である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0105】

本発明の一実施形態において、血清型ⅤⅠ莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25

【 0 1 0 6 】

10

血清型ⅤⅠ莢膜多糖は、約０％から約４０％の間、Ｏ－アセチル化されている。本発明の一実施形態において、多糖は、Ｏ－脱アセチル化されている（すなわち、約５％未満、Ｏ－アセチル化されている）。本発明の血清型ⅤⅠ莢膜多糖の一部の例示的な株は、１１８７５４、１１４８５２、１１４８６２、１１４８６６、１１８７７５、Ｂ４５８９、Ｂ４６４５、ＳＳ１２１４およびＣＺ－ＰＷ－１１９を包含する。

20

GBS血清型ⅤⅠⅠ莢膜多糖は、Kogan, G. ら、Carbohydrate Research, 277 (1) : 1~9 (1995) によって記述されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。血清型ⅤⅠⅠの繰り返し単位は、次の通りである：

【化 8】



40

50

10

20

30

血清型 V I I I

40

 α -NeuAc

50

00 kDaの間、例えば、約50 kDaから約750 kDaの間、約50 kDaから約500 kDaの間、約50 kDaから約450 kDaの間、約50 kDaから約400 kDaの間、約50 kDaから約350 kDaの間、約50 kDaから約300 kDaの間、約50 kDaから約250 kDaの間、約50 kDaから約200 kDaの間、約75 kDaから約750 kDaの間、約75 kDaから約500 kDaの間、約75 kDaから約450 kDaの間、約75 kDaから約400 kDaの間、約75 kDaから約350 kDaの間、約75 kDaから約300 kDaの間、約75 kDaから約250 kDaの間、約75 kDaから約200 kDaの間、約100 kDaから約750 kDaの間、約100 kDaから約700 kDaの間、約100 kDaから約650 kDaの間、約100 kDaから約600 kDaの間、約100 kDaから約550 kDaの間、約100 kDaから約500 kDaの間、約100 kDaから約450 kDaの間、約100 kDaから約400 kDaの間、約100 kDaから約350 kDaの間、約100 kDaから約300 kDaの間、約200 kDaから750 kDaの間、約200 kDaから約700 kDaの間、約200 kDaから約650 kDaの間、約200 kDaから約600 kDaの間、約200 kDaから約550 kDaの間、約200 kDaから約500 kDaの間、約200 kDaから約450 kDaの間、約200 kDaから約400 kDaの間、の間、約250 kDaから約750 kDaの間、約250 kDaから約700 kDaの間、約250 kDaから約650 kDaの間、約250 kDaから約600 kDaの間、約250 kDaから約550 kDaの間、約250 kDaから約500 kDaの間、約250 kDaから約450 kDaの間、約250 kDaから約400 kDaの間、約300 kDaから750 kDaの間、約300 kDaから約700 kDaの間、約300 kDaから約650 kDaの間、約300 kDaから約600 kDaの間、約300 kDaから約550 kDaの間または約300 kDaから約500 kDaの間等である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0117】

本発明の一実施形態において、血清型V I I I 莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されている。

【0118】

別の実施形態において、血清型V I I I 莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1 mM当たり約1.0 mMのシアル酸、例えば、多糖1 mM当たり少なくとも約0.95 mMのシアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1 mM当たり少なくとも約0.6 mMのシアル酸、例えば、多糖1 mM当たり少なくとも約0.65 mMのシアル酸、多糖1 mM当たり少なくとも約0.7 mMのシアル酸、多糖1 mM当たり少なくとも約0.75 mMのシアル酸、多糖1 mM当たり少なくとも約0.8 mMのシアル酸、多糖1 mM当たり少なくとも約0.85 mMのシアル酸、多糖1 mM当たり少なくとも約0.9 mMのシアル酸、または多糖1 mM当たり少なくとも約0.95 mMのシアル酸等を有し得る。

【0119】

血清型V I I I 莢膜多糖は、約0%から約40%の間、O-アセチル化されている。本発明の一実施形態において、多糖は、O-脱アセチル化されている（すなわち、約5%未満、O-アセチル化されている）。本発明の血清型V I I I 莢膜多糖の一部の例示的な株は、J M 9 1 3 0 0 1 3 および J M 9 1 3 0 6 7 2 を包含する。

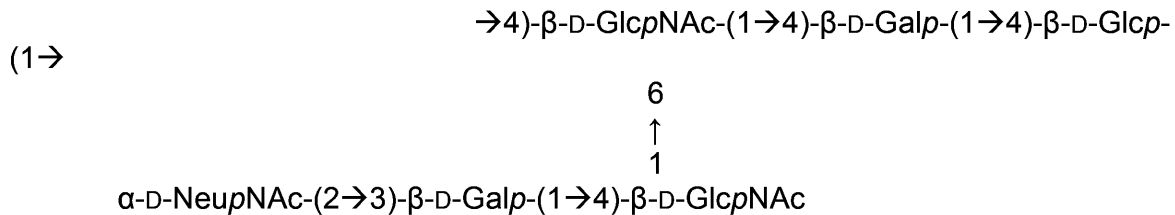
【0120】

血清型 I X

GBS血清型IX莢膜多糖は、Berti, F.ら、The Journal of Biological Chemistry、289(34):23437~2348(2014)によって記述されており、その開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。血清型IXの構造は、次のように描写することができる：

【0121】

【化10】



10

【0122】

コンジュゲーション前の血清型IX莢膜多糖の分子量は、約5kDaから約1,000kDaの間、例えば、約50kDaから約750kDaの間、約50kDaから約500kDaの間、約50kDaから約450kDaの間、約50kDaから約400kDaの間、約50kDaから約350kDaの間、約50kDaから約300kDaの間、約50kDaから約250kDaの間、約50kDaから約200kDaの間、約75kDaから約750kDaの間、約75kDaから約500kDaの間、約75kDaから約450kDaの間、約75kDaから約400kDaの間、約75kDaから約350kDaの間、約75kDaから約300kDaの間、約75kDaから約250kDaの間、約75kDaから約200kDaの間、約100kDaから約750kDaの間、約100kDaから約700kDaの間、約100kDaから約650kDaの間、約100kDaから約600kDaの間、約100kDaから約550kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約450kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約350kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから750kDaの間、約200kDaから約700kDaの間、約200kDaから約650kDaの間、約200kDaから約600kDaの間、約200kDaから約550kDaの間、約200kDaから約500kDaの間、約200kDaから約450kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、約250kDaから約750kDaの間、約250kDaから約700kDaの間、約250kDaから約650kDaの間、約250kDaから約600kDaの間、約250kDaから約550kDaの間、約250kDaから約500kDaの間、約250kDaから約450kDaの間、約250kDaから約400kDaの間、約300kDaから750kDaの間、約300kDaから約700kDaの間、約300kDaから約650kDaの間、約300kDaから約600kDaの間、約300kDaから約550kDaの間または約300kDaから約500kDaの間等である。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

20

30

【0123】

本発明の一実施形態において、血清型IX莢膜多糖は、約100%または約95%超等、その自然なシアル酸レベルを含む。別の実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、最大約40%（約60%超のシアル化レベル）、例えば最大約35%（約65%超のシアル化レベル）、最大約30%（約70%超のシアル化レベル）、最大約25%（約75%超のシアル化レベル）、最大約20%（約80%超のシアル化レベル）、最大約15%（約85%超のシアル化レベル）、最大約10%（約90%超のシアル化レベル）、または最大約5%（約95%超のシアル化レベル）等、脱シアル化されていてよい。

40

【0124】

別の実施形態において、血清型IX莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖1mM当たり約1.0mMのシアル酸、例えば、多糖1mM当たり少なくとも約0.95mMの

50

シアル酸等を有する。さらなる実施形態において、莢膜多糖は、コンジュゲーション前に、多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.6 mM のシアル酸、例えば、多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.65 mM のシアル酸、多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.7 mM のシアル酸、多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.75 mM のシアル酸、多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.8 mM のシアル酸、多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.85 mM のシアル酸、多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.9 mM のシアル酸、または多糖 1 mM 当たり少なくとも約 0.95 mM のシアル酸等を有し得る。

【0125】

血清型 I X 莢膜多糖は、約 0 % から約 40 % の間、O-アセチル化されている。本発明の一実施形態において、多糖は、O-脱アセチル化されている（すなわち、約 5 % 未満、O-アセチル化されている）。本発明の血清型 I X 莢膜多糖の一部の例示的な株は、IT-NI-016、IT-PW-62 および IT-PW-64 を包含する。

【0126】

多糖-タンパク質コンジュゲート

本明細書において使用される場合、「コンジュゲート」は、通常は所望範囲の分子量の莢膜多糖および担体タンパク質を含み、莢膜多糖は、担体タンパク質とコンジュゲートしている。コンジュゲートは、若干量の遊離莢膜多糖を含有してもしなくてもよい。本明細書において使用される場合、「遊離莢膜多糖」は、コンジュゲートしている莢膜多糖-担体タンパク質と非共有結合的に会合している（すなわち、それと非共有結合している、それに吸着しているまたはその中にもしくはそれにより捕捉されている）莢膜多糖を指す。

「遊離莢膜多糖」「遊離多糖」および「遊離糖」という用語は、交換可能に使用されてよく、同じ意味を伝えるように意図されている。担体分子の性質にかかわらず、担体分子は、直接的にまたはリンカーを介してのいずれかで、莢膜多糖とコンジュゲートすることができる。本明細書において使用される場合、「コンジュゲートする」、「コンジュゲートしている」および「コンジュゲートすること」は、細菌莢膜多糖が担体分子と共有結合するプロセスを指す。コンジュゲーションは、細菌莢膜多糖の免疫原性を強化する。コンジュゲーションは、後述する方法に従って、または当技術分野において公知のプロセスによって、実行することができる。

【0127】

「コンジュゲート免疫原性組成物」は、本明細書において使用される場合、免疫原性材料が、担体タンパク質と共有結合して多糖-タンパク質コンジュゲートを提供する抗原性多糖を包含する、免疫原性組成物を指す。一実施形態において、本発明の多糖-タンパク質コンジュゲートは、多価免疫原性組成物として製剤化され得る。

【0128】

本明細書において使用される場合、多糖のまたは担体タンパク質-多糖コンジュゲートの「分子量」という用語は、多角度レーザー光散乱検出器（MALLS）と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって算出された分子量を指す。

【0129】

本明細書において使用される場合、「多糖-タンパク質コンジュゲート」は、1 つまたは複数の共有結合を介してタンパク質担体分子とコンジュゲートしている多糖分子を指す。多糖を、標的宿主において免疫原性であることが公知の別の種由来のタンパク質とコンジュゲートすることが望ましい場合がある。したがって、一実施形態において、担体分子は、担体タンパク質である。本明細書において定義されている通り、そのような外来タンパク質を、「担体タンパク質」と称する。担体タンパク質は、多糖の抗原性および免疫原性を強化するために役立つ。本明細書において使用される場合、「担体効果」という用語は、弱免疫原性または非免疫原性分子の抗原性および免疫原性が、担体としてのより免疫原性の高い分子（例えば、異種タンパク質）と結合されることによって強化されるプロセスを指す。この場合、組み合わせた多糖-タンパク質コンジュゲート中の多糖は、単独で提示された場合よりも免疫原性が高くなる。担体タンパク質は、抗体応答を生成するのを助ける T 細胞を刺激するために、T 細胞エピトープを含有する。

【0130】

「担体タンパク質」または「タンパク質担体」は、本明細書において使用される場合、免疫応答が所望される抗原（莢膜多糖等）とコンジュゲートされ得る任意のタンパク質分子を指す。多糖等の抗原の担体タンパク質とのコンジュゲーションは、抗原を免疫原性に行うことができる。担体タンパク質は、好ましくは、非毒性および非反応源性であり、十分な量および純度で取得可能なタンパク質である。担体タンパク質の例は、毒素、トキソイド、または破傷風、ジフテリア、百日咳、シュードモナス（*Pseudomonas*）種、大腸菌（*E. coli*）、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）種およびレンサ球菌（*Streptococcus*）種由来の毒素の任意の突然変異体交差反応性材料（CRM₁₉₇）である。担体タンパク質は、標準的なコンジュゲーション手順に適していなくてはならない。本発明の特定の実施形態において、CRM₁₉₇は、担体タンパク質として使用される。

10

【0131】

交差反応材料またはCRMは、本発明の一部の実施形態にとりわけ有用である。遺伝子改変されたタンパク質を生成することができ、これは、ある特定の細菌毒素と抗原的に同様であるが、非毒性である。これらは、「交差反応材料」またはCRMと呼ばれる。CRM₁₉₇（Wyeth/Pfizer Inc.、Sanford、NC）は、天然ジフテリア毒素由来の単一アミノ酸変化を有し、それと免疫学的に区別できないことから、注目に値する。Pappenheimer, A. M. ら、Immunochem.、9（9）：891～906（1972）；米国特許第5,614,382号を参照されたく、その開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。CRM₁₉₇は、カザミノ酸および酵母抽出物ベースの培地中で成長させたジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*）株C7（β197）の培養物から単離されたジフテリア毒素の非毒性変異体（すなわち、トキソイド）である。CRM₁₉₇は、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿およびイオン交換クロマトグラフィーを介して精製される。CRM₁₉₇タンパク質を生成するジフテリア菌（*C. diphtheriae*）株C7（β197）の培養物は、American Type Culture Collection、Rockville、Marylandに寄託され、受託番号ATCC53281が割り当てられた。他のジフテリアトキソイドも、担体タンパク質として使用するために好適である。CRM3201は、百日咳毒素の遺伝子操作された変異体である。Black, W. J. ら、Science、240（4852）：656～659（1988）を参照されたく、その開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

20

30

【0132】

ジフテリアトキソイド（DT）、CRM₁₉₇および百日咳トキソイドに加えて、担体タンパク質のさらなる例は、破傷風トキソイド（TT）、コレラトキソイド（例えば、国際特許出願公開第WO2004/083251号において記述されている通り）、大腸菌（*E. coli*）易熱性トキソイド（LT）、大腸菌（*E. coli*）耐熱性トキソイド（ST）、肺炎レンサ球菌（*S. pneumonia*）由来の肺炎球菌溶血素（野生型または毒性を低減した突然変異体）、肺炎球菌表面タンパク質A（PspA）、肺炎球菌アドヘシンタンパク質A（PsaA）、レンサ球菌（*Streptococcus*）由来のC5aペプチダーゼ、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来の溶血素、分類不可能なインフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）（NTHi）タンパク質、インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）タンパク質D、ウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）外毒素／トキソイド、B型肝炎表面抗原、B型肝炎コア抗原、ロタウイルスVP7タンパク質、ならびに呼吸器合胞体ウイルスFおよびGタンパク質、オボアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）、ツベルクリンの精製タンパク質誘導体（PPD）、ならびにシュードモナス（*Pseudomonas*）外毒素または組換えにより生成された非毒性突然変異体緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素Aを包含するその誘導体を包含する。細菌

40

50

外膜タンパク質、例えば、外膜タンパク質複合体 c (O M P C)、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質等、または C . ディフィシル (C . d i f f i c i l e) エンテロトキシン (毒素 A) および細胞毒素 (毒素 B) を使用することもできる。他のタンパク質、例えば、オボアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、ウシ血清アルブミン (B S A) またはツベルクリンの精製タンパク質誘導体 (P P D) 等を、担体タンパク質として使用することもできる。好ましい実施形態において、担体タンパク質は、ジフテリアトキソイドである。より好ましくは、担体タンパク質は、C R M₁₉₇ である。本発明の別の実施形態において、担体タンパク質は、破傷風トキソイドである。

【0133】

多価コンジュゲート免疫原性組成物の合成のために、多糖-タンパク質コンジュゲートは、2つの異なる種の細菌から精製された多糖の混合物を、担体タンパク質とコンジュゲートすることによって生成され得る。代替として、多価コンジュゲート免疫原性組成物は、同じ細菌の2つ以上の異なる血清型の細菌から精製された多糖を組み合わせ、それらを混合物として担体タンパク質とコンジュゲートすることによって生成され得る。代替として、単一種類の多糖を担体タンパク質と、異なる多糖を使用する別個の反応において反応させることによって生成された多糖-タンパク質コンジュゲートを、混合してよい。故に、多価免疫原性組成物は、結合した多糖の均一または不均一集団を担持している担体タンパク質を包含し得る。

【0134】

莢膜多糖の担体タンパク質とのコンジュゲーション後、多糖-タンパク質コンジュゲートは、様々な技術によって精製される (多糖-タンパク質コンジュゲートの量に関しては富化される)。これらの技術は、例えば、濃縮/血液透析濾過作業、沈殿/溶離、カラムクロマトグラフィーおよび深層濾過を包含する。

【0135】

上述した通り、本発明は、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 莢膜多糖を含むコンジュゲートに関する。本発明の一実施形態は、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 I V 莢膜多糖を含むコンジュゲート、および、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 I a 莢膜多糖、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 I b 莢膜多糖、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 I I 莢膜多糖、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 I I I 莢膜多糖、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 V 莢膜多糖、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 V I 莢膜多糖、担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 V I I 莢膜多糖、または担体タンパク質とコンジュゲートしている G B S 血清型 I X 莢膜多糖を含む少なくとも1つの追加のコンジュゲートを提供する。本発明の一態様において、多糖は、約 5 k D a から 1, 0 0 0 k D a の間の分子量を有し、コンジュゲートは、約 3 0 0 k D a から約 2 0, 0 0 0 k D a の間の分子量を有し、コンジュゲートは、全多糖と比べて約 4 0 % 未満の遊離多糖を含む。一実施形態において、コンジュゲートは、全多糖と比べて、約 3 0 % 未満、約 2 5 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 5 % 未満、約 1 0 % 未満、または約 5 % 未満の遊離多糖を含む。

【0136】

一実施形態において、血清型 I a、I b、I I、I I I、I V、V、V I、V I I、V I I I および/または I X 多糖は、コンジュゲーションの前、約 5 k D a から約 1, 0 0 0 k D a の間、例えば、約 5 0 k D a から約 7 5 0 k D a の間、約 5 0 k D a から約 5 0 0 k D a の間、約 5 0 k D a から約 4 5 0 k D a の間、約 5 0 k D a から約 4 0 0 k D a の間、約 5 0 k D a から約 3 5 0 k D a の間、約 5 0 k D a から約 3 0 0 k D a の間、約 5 0 k D a から約 2 5 0 k D a の間、約 5 0 k D a から約 2 0 0 k D a の間、約 7 5 k D a から約 7 5 0 k D a の間、約 7 5 k D a から約 5 0 0 k D a の間、約 7 5 k D a から約 4 5 0 k D a の間、約 7 5 k D a から約 4 0 0 k D a の間、約 7 5 k D a から約 3 5 0 k D a の間、約 7 5 k D a から約 3 0 0 k D a の間、約 7 5 k D a から約 2 5 0 k D a の間

、約75 kDaから約200 kDaの間、約100 kDaから約750 kDaの間、約100 kDaから約700 kDaの間、約100 kDaから約650 kDaの間、約100 kDaから約600 kDaの間、約100 kDaから約550 kDaの間、約100 kDaから約500 kDaの間、約100 kDaから約450 kDaの間、約100 kDaから約400 kDaの間、約100 kDaから約350 kDaの間、約100 kDaから約300 kDaの間、約200 kDaから750 kDaの間、約200 kDaから約700 kDaの間、約200 kDaから約650 kDaの間、約200 kDaから約600 kDaの間、約200 kDaから約550 kDaの間、約200 kDaから約500 kDaの間、約200 kDaから約450 kDaの間、約200 kDaから約400 kDaの間、約250 kDaから約750 kDaの間、約250 kDaから約700 kDaの間、約250 kDaから約650 kDaの間、約250 kDaから約600 kDaの間、約250 kDaから約550 kDaの間、約250 kDaから約500 kDaの間、約250 kDaから約450 kDaの間、約250 kDaから約400 kDaの間、約300 kDaから750 kDaの間、約300 kDaから約700 kDaの間、約300 kDaから約650 kDaの間、約300 kDaから約600 kDaの間、約300 kDaから約550 kDaの間、または約300 kDaから約500 kDaの間等の分子量を有する。上記範囲のうちのいずれか内の任意の整数は、本開示の実施形態として企図されている。

【0137】

一実施形態において、コンジュゲートは、約300 kDaから約20,000 kDaの間、例えば、約300 kDaから約15,000 kDaの間、約300 kDaから約10,000 kDaの間、約300 kDaから約9,000 kDaの間、約300 kDaから約8,000 kDaの間、約300 kDaから約7,000 kDaの間、約300 kDaから約6,000 kDaの間、約300 kDaから約5,000 kDaの間、約300 kDaから約4,000 kDaの間、約300 kDaから約3,000 kDaの間、約300 kDaから約2,000 kDaの間、約300 kDaから約1,000 kDaの間、約500 kDaから約20,000 kDaの間、約500 kDaから約15,000 kDaの間、約500 kDaから約10,000 kDaの間、約500 kDaから約9,000 kDaの間、約500 kDaから約8,000 kDaの間、約500 kDaから約7,000 kDaの間、約500 kDaから約6,000 kDaの間、約500 kDaから約5,000 kDaの間、約500 kDaから約4,000 kDaの間、約500 kDaから約3,000 kDaの間、約500 kDaから約2,000 kDaの間、約500 kDaから約1,000 kDaの間、約1,000 kDaから約20,000 kDaの間、約1,000 kDaから約15,000 kDaの間、約1,000 kDaから約10,000 kDaの間、約1,000 kDaから約9,000 kDaの間、約1,000 kDaから約8,000 kDaの間、約1,000 kDaから約7,000 kDaの間、約1,000 kDaから約6,000 kDaの間、約1,000 kDaから約5,000 kDaの間、約1,500 kDaから約20,000 kDaの間、約1,500 kDaから約15,000 kDaの間、約1,500 kDaから約10,000 kDaの間、約1,500 kDaから約9,000 kDaの間、約1,500 kDaから約8,000 kDaの間、約1,500 kDaから約7,000 kDaの間、約1,500 kDaから約6,000 kDaの間、約1,500 kDaから約5,000 kDaの間、約2,000 kDaから約20,000 kDaの間、約2,000 kDaから約15,000 kDaの間、約2,000 kDaから約10,000 kDaの間、約2,000 kDaから約9,000 kDaの間、約2,000 kDaから約8,000 kDaの間、約2,000 kDaから約7,000 kDaの間、約2,000 kDaから約6,000 kDaの間、約2,500 kDaから約20,000 kDaの間、約2,500 kDaから約15,000 kDaの間、約2,500 kDaから約10,000 kDaの間、約2,500 kDaから約9,000 kDaの間、約2,500 kDaから約8,000 kDaの間、約2,500 kDaから約7,000 kDaの間、約2,500 kDaから約6,000 kDaの間、約3,000 kDaから約20,000 kDaの間、約3,000 kDaから約15,000 kD

10

20

30

40

50

aの間、約3,000kDaから約10,000kDaの間、約3,000kDaから約9,000kDaの間、約3,000kDaから約8,000kDaの間、約3,000kDaから約7,000kDaの間、または約3,000kDaから約6,000kDaの間等の分子量を有する。

【0138】

ある実施形態において、GBS血清型IV莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

【0139】

ある実施形態において、GBS血清型Ia莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

10

【0140】

ある実施形態において、GBS血清型Ib莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

【0141】

ある実施形態において、GBS血清型II莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

【0142】

ある実施形態において、GBS血清型III莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

【0143】

ある実施形態において、GBS血清型V莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

20

【0144】

ある実施形態において、GBS血清型VI莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

【0145】

ある実施形態において、GBS血清型VII莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

【0146】

ある実施形態において、GBS血清型VIII莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

30

【0147】

ある実施形態において、GBS血清型IX莢膜多糖コンジュゲートは、上記範囲のうちのいずれかの分子量を有する。

【0148】

一実施形態において、本発明のコンジュゲートは、多糖1mM当たり少なくとも約0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、0.97または0.98mMのシアル酸を有する。好ましい実施形態において、コンジュゲートは、多糖1mM当たり少なくとも約0.9または0.95mMのシアル酸を有する。

【0149】

ある実施形態において、GBS血清型IV莢膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

40

【0150】

ある実施形態において、GBS血清型Ia莢膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0151】

ある実施形態において、GBS血清型Ib莢膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0152】

ある実施形態において、GBS血清型II莢膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの

50

少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0153】

ある実施形態において、GBS血清型III英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0154】

ある実施形態において、GBS血清型V英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0155】

ある実施形態において、GBS血清型VI英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0156】

ある実施形態において、GBS血清型VII英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0157】

ある実施形態において、GBS血清型VIII英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0158】

ある実施形態において、GBS血清型IX英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちの少なくともいずれかのシアル酸含有量を有する。

【0159】

ある実施形態において、本発明のコンジュゲートは、糖繰り返し単位1mM当たり約0.01、0.02、0.03、0.04、または0.05mM未満のO-アセテートを含む。別の実施形態において、コンジュゲートは、糖繰り返し単位1mM当たり少なくとも約0.1、0.2、0.3、0.35または約0.4mMのO-アセテートを含む。

【0160】

ある実施形態において、GBS血清型IV英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0161】

ある実施形態において、GBS血清型Ia英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0162】

ある実施形態において、GBS血清型Ib英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0163】

ある実施形態において、GBS血清型II英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0164】

ある実施形態において、GBS血清型III英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0165】

ある実施形態において、GBS血清型V英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0166】

ある実施形態において、GBS血清型VI英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0167】

ある実施形態において、GBS血清型VII英膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0168】

ある実施形態において、GBS血清型VIII英膜多糖コンジュゲートは、上記値のう

10

20

30

40

50

ちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0169】

ある実施形態において、GBS血清型IX莢膜多糖コンジュゲートは、上記値のうちのいずれかのO-アセテート含有量を有する。

【0170】

さらなる実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、GBS莢膜多糖の総量と比較して、約40%未満、約35%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、または約5%未満の遊離GBS莢膜多糖を含む。好ましい実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、GBS莢膜多糖の総量と比較して、約5%未満の未反応の遊離糖を含む。

【0171】

また別の実施形態において、コンジュゲート中におけるGBS莢膜多糖対担体タンパク質の比（重量／重量）は、約0.5から約3.0の間である。一態様において、コンジュゲート中におけるGBS莢膜多糖対担体タンパク質の比は、約0.5から約2.0の間、約0.5から約1.5の間、約0.5から約1.0の間、約1.0から約1.5の間、または約1.0から約2.0の間である。好ましい実施形態において、コンジュゲート中におけるGBS莢膜多糖対担体タンパク質の比は、約0.8から約1.0の間である。

【0172】

別の実施形態において、コンジュゲートのコンジュゲーションの程度は、2から15の間、2から13の間、2から10の間、2から8の間、2から6の間、2から5の間、2から4の間、3から15の間、3から13の間、3から10の間、3から8の間、3から6の間、3から5の間、3から4の間、5から15の間、5から10の間、8から15の間、8から12の間、10から15の間、または10から12の間である。好ましい実施形態において、コンジュゲートのコンジュゲーションの程度は、2から5の間である。

【0173】

コンジュゲーション

コンジュゲーションは、直接的であってよく、ここでは、多糖からの原子がタンパク質表面からの原子と共有結合している。代替として、コンジュゲーションは、リンカー分子を介するものであってよく、これが多糖およびタンパク質の両方と反応し、2つを接続して、炭水化物をタンパク質に繋ぐ。

【0174】

担体および多糖等の1つまたは複数の抗原がコンジュゲートしている（すなわち、共有結合的に会合している）場合、コンジュゲーションは、当業者において公知である任意の化学的方法、プロセスまたは遺伝学的技術によるものであってよい。例えば、担体ポリペプチド、および、炭水化物、オリゴ糖、脂質、リポオリゴ糖、多糖、オリゴ糖-タンパク質コンジュゲート、多糖-タンパク質コンジュゲート、ペプチド-タンパク質コンジュゲート、オリゴ糖-ペプチドコンジュゲート、多糖-ペプチドコンジュゲート、タンパク質-タンパク質コンジュゲート、リポオリゴ糖-タンパク質コンジュゲート、多糖-タンパク質コンジュゲート、またはそれらの任意の組合せを含む群から選択される1つまたは複数の抗原は、（1）タンパク質官能基を介する直接的カップリング（例えば、チオール-チオール結合、アミン-カルボキシル結合、アミン-アルデヒド結合；酵素直接的カップリング）、（2）アミンのホモ二官能性カップリング（例えば、ビス-アルデヒドを使用する）、（3）チオールのホモ二官能性カップリング（例えば、ビス-マレイミドを使用する）、（4）光活性化試薬を介するホモ二官能性カップリング、（5）アミンのチオールとのヘテロ二官能性カップリング（例えば、マレイミドを使用する）、（6）光活性化試薬を介するヘテロ二官能性カップリング（例えば、 β -カルボニルジアゾ（carbonyldiaz）ファミリー）、（7）臭化シアン活性化またはカルボキシメチル化を介してアミン-反応性基を多糖またはオリゴ糖に導入すること、（8）マレイミド-ヒドラジド等のヘテロ二官能性化合物を介してチオール-反応性基を多糖またはオリゴ糖に導入すること、（9）疎水性基をタンパク質に導入することを介するタンパク質-脂質コン

10

20

30

40

50

ジュゲーションおよび（１０）反応性基を脂質に組み込むことを介するタンパク質－脂質コンジュゲーションを包含するがこれらに限定されない技術によって、コンジュゲートしてよい。また、ビオチン－アビジン相互作用等のヘテロ二官能性「非共有結合的カップリング」技術も企図されている。オリゴ糖および多糖の、免疫原性担体タンパク質とのコンジュゲーションを達成するための、当技術分野において周知である他の方法も、本発明の一部の実施形態の範囲内である。

【０１７５】

ある実施形態において、ＧＢＳ莢膜多糖－タンパク質コンジュゲートは、多糖を１－シアノ－４－ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート（ＣＤＡＰ）で活性化させて、シアン酸エステルを形成することによって取得される。活性化多糖は、担体タンパク質上のアミノ基と、直接的にまたはスペーサー（リンカー）基を介してカップリングされ得る。例えば、スペーサーは、マレイミド－活性化担体タンパク質（例えば、ＧＭＢＳを使用する）またはハロアセチル化担体タンパク質（例えば、ヨードアセトイミド、ＳＩＢ、ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＩＡＢ、ＳＩＡまたはＳＢＡＰを使用する）との反応後に取得されるチオエーテル結合を介して担体とカップリングされ得るチオール化多糖を得るために、シスタミンまたはシステアミンであってよい。

【０１７６】

一態様において、シアン酸エステル（ＣＤＡＰ化学によって作製されていてもよい）は、ヘキサンジアミンまたはアジピン酸ジヒドラジド（ＡＤＨ）とカップリングされており、アミノ誘導体化糖は、タンパク質担体上のカルボキシル基を介するカルボジイミド（例えば、ＥＤＡＣまたはＥＤＣ）化学を使用して、担体タンパク質とコンジュゲートしている。そのようなコンジュゲートは、例えば、国際特許出願公開第ＷＯ９３／１５７６０号、同第ＷＯ９５／０８３４８号および同第ＷＯ９６／２９０９４号において記述されている。

【０１７７】

他の好適な技術は、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、ｐ－ニトロ安息香酸、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、Ｓ－ＮＨＳ、ＥＤＣおよびＴＳＴＵを使用する。多くは、国際特許出願公開第ＷＯ９８／４２７２１号において記述されている。コンジュゲーションは、糖の遊離ヒドロキシル基の、１，１カルボニルジイミダゾール（ＣＤＩ）または１，１カルボニルジ１，２，４トリアゾール（ＣＤＴ）との反応（Ｂｅｔｈｅｌら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２５４：２５７２～２５７４（１９７９）；Ｈｅａｒｎら、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．、２１８：５０９～５１８（１９８１）を参照）、続いて、カルバメート結合を形成するためのタンパク質との反応によって形成され得るカルボニルリンカーを伴ってよい。これは、アノマー末端の第一級ヒドロキシル基への還元、第一級ヒドロキシル基の任意選択の保護／脱保護、ＣＤＩ／ＣＤＴカルバメート中間体を形成するための第一級ヒドロキシル基のＣＤＩ／ＣＤＴとの反応、およびＣＤＩ／ＣＤＴカルバメート中間体をタンパク質上のアミノ基とカップリングすることを伴ってよい。

【０１７８】

好ましい実施形態において、本発明のＧＢＳ莢膜多糖－タンパク質コンジュゲートは、還元的アミノ化を使用して調製される。還元的アミノ化は、２つのステップ：（１）個々の六糖単位において隣接ジオールからアルデヒド官能基を産生するための多糖の酸化、ならびに（２）コンジュゲートを形成するための活性化多糖および担体タンパク質の還元を伴う。

【０１７９】

ある実施形態において、ＧＢＳ莢膜多糖は、
（ａ）単離されたＧＢＳ莢膜多糖を酸化剤と反応させるステップと、
（ｂ）クエンチング剤の添加により酸化反応物をクエンチして、活性化ＧＢＳ莢膜多糖をもたらすステップと
を含むプロセスによって活性化（酸化）される。

【0180】

本発明のある態様において、単離された莢膜多糖の濃度は、約0.1mg/mLから約10.0mg/mLの間、例えば、約0.5mg/mLから約5.0mg/mLの間、約1.0mg/mLから約3.0mg/mLの間、または約2.0mg/mL等である。

【0181】

特定の実施形態において、酸化剤は、過ヨウ素酸塩である。過ヨウ素酸塩は、隣接ヒドロキシル基を酸化してカルボニルまたはアルデヒド基を形成し、C-C結合の開裂を引き起こす。「過ヨウ素酸塩」という用語は、過ヨウ素酸塩および過ヨウ素酸の両方を包含する。この用語は、メタ過ヨウ素酸塩(IO_4^-)およびオルト過ヨウ素酸塩(IO_6^{5-})の両方も包含する。「過ヨウ素酸塩」という用語は、過ヨウ素酸ナトリウムおよび過ヨウ素酸カリウムを包含する過ヨウ素酸塩の種々の塩も包含する。好ましい実施形態において、酸化剤は、過ヨウ素酸ナトリウムである。好ましい実施形態において、GBS莢膜多糖の酸化に使用される過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸塩である。好ましい実施形態において、血清型莢膜多糖の酸化に使用される過ヨウ素酸塩は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムである。

10

【0182】

別の実施形態において、多糖を、0.01から10.0、0.05から5.0、0.1から1.0、0.5から1.0、0.7から0.8、0.05から0.5、または0.1から0.3モル当量の酸化剤と反応させる。特定の実施形態において、多糖を、約0.05、約0.1、約0.15、約0.2、約0.25、約0.3、約0.35、約0.4、約0.45、約0.5、約0.55、約0.6、約0.65、約0.7、約0.75、約0.8、約0.85、約0.9、または約0.95モル当量の酸化剤と反応させる。さらなる実施形態において、多糖を、約0.1モル当量の酸化剤と反応させる。さらなる実施形態において、多糖を、約0.15モル当量の酸化剤と反応させる。追加の実施形態において、多糖を、約0.25モル当量の酸化剤と反応させる。また別の実施形態において、多糖を、約0.5モル当量の酸化剤と反応させる。代替的な実施形態において、多糖を、約0.6モル当量の酸化剤と反応させる。さらなる実施形態において、多糖を、約0.7モル当量の酸化剤と反応させる。

20

【0183】

本発明の一態様において、酸化反応の持続時間は、約1時間から約50時間の間、約10時間から約30時間の間、約15時間から約20時間の間、約15時間から約17時間の間、または約16時間である。

30

【0184】

本発明の別の態様において、酸化反応の温度は、約2°Cから約25°Cの間、約2°Cから約8°Cの間、または約20°Cから約25°Cの間に維持される。1つの好ましい実施形態において、反応の温度は、約23°Cに維持される。別の好ましい実施形態において、反応の温度は、約5°Cに維持される。

【0185】

さらなる態様において、酸化反応は、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)およびビスートリスからなる群から選択される緩衝剤中で行われる。好ましい実施形態において、緩衝剤は、リン酸カリウムである。

40

【0186】

追加の態様において、緩衝剤は、約1mMから約500mMの間、約1mMから約300mMの間、または約50mMから約200mMの間の濃度を有する。好ましい実施形態において、緩衝剤は、約100mMの濃度を有する。

【0187】

一態様において、酸化反応は、約4.0から約8.0の間、約5.0から約7.0の間、または約5.5から約6.5の間のpHで行われる。好ましい実施形態において、pHは、約6.0である。

【0188】

50

一実施形態において、活性化GBS莢膜多糖は、約0.5mg/Lから約5.0mg/mLの単離された莢膜多糖を、約0.05から約0.3モル当量の過ヨウ素酸塩と、約20℃から25℃の間の温度で反応させることによって取得される。

【0189】

別の実施形態において、活性化GBS莢膜多糖は、約0.5mg/Lから約5.0mg/mLの単離された莢膜多糖を、約0.05から約0.3モル当量の過ヨウ素酸塩と、約2℃から約8℃の間の温度で反応させることによって取得される。

【0190】

別の実施形態において、活性化GBS莢膜多糖は、当業者に公知の方法、例えば、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）、透析または限外濾過／血液透析濾過等に従って精製される。例えば、活性化莢膜多糖は、濃縮および限外濾過デバイスを使用する血液透析濾過によって精製される。

10

【0191】

一実施形態において、活性化GBS莢膜多糖の酸化度は、5から25の間、例えば、5から15の間、5から10の間、10から25の間、10から20の間、10から15の間等である。好ましい実施形態において、活性化GBS莢膜多糖の酸化度は、10から20の間、11から19の間、12から18の間、13から17の間、または14から16の間である。

【0192】

別の実施形態において、活性化GBS莢膜多糖は、約5kDaから約1,000kDaの間、例えば、約50kDaから約300kDaの間、約75kDaから約400kDaの間、約75kDaから約200kDaの間、約100kDaから約700kDaの間、約100kDaから約500kDaの間、約100kDaから約400kDaの間、約100kDaから約300kDaの間、約200kDaから約400kDaの間、約300kDaから約700kDaの間等の分子量を有する。好ましい実施形態において、活性化GBS莢膜多糖は、約75kDaから約400kDaの間の分子量を有する。

20

【0193】

ある実施形態において、活性化GBS莢膜多糖は、場合により糖の存在下で、凍結乾燥される。好ましい実施形態において、糖は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態において、糖は、スクロースである。次いで、凍結乾燥された活性化莢膜多糖を、担体タンパク質を含む溶液と配合することができる。

30

【0194】

別の実施形態において、活性化GBS莢膜多糖は、担体タンパク質と配合され、場合により糖の存在下で、凍結乾燥される。一態様において、糖は、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットから選択される。好ましい実施形態において、糖は、スクロースである。次いで、共凍結乾燥した多糖および担体タンパク質を、溶液に再懸濁し、還元剤と反応させることができる。

【0195】

活性化GBS莢膜多糖は、
(a) 活性化GBS莢膜多糖を担体タンパク質と配合するステップと、
(b) 配合された活性化GBS莢膜多糖および担体タンパク質を、還元剤と反応させて、GBS莢膜多糖-担体タンパク質コンジュゲートを形成するステップとを含むプロセスによって、担体タンパク質とコンジュゲートすることができる。

40

【0196】

極性非プロトン性溶媒中における還元的アミノ化による活性化GBS莢膜多糖のタンパク質担体とのコンジュゲーションは、例えば、未反応の（遊離）多糖のレベルが有意に上昇する水溶液中における還元的アミノ化と比較して、低レベルの遊離多糖を維持するため好適である。好ましい実施形態において、ステップ（a）およびステップ（b）は、極

50

性非プロトン性溶媒中で行われる。

【0197】

一実施形態において、ステップ（a）は、凍結乾燥したGBS莢膜多糖を、担体タンパク質および極性非プロトン性溶媒を含む溶液に溶解することを含む。別の実施形態において、ステップ（a）は、共凍結乾燥したGBS莢膜多糖および担体タンパク質を、極性非プロトン性溶媒に溶解することを含む。

【0198】

一実施形態において、極性非プロトン性溶媒は、ジメチルスルホキシド（DMSO）、スルホラン、ジメチルホルムアミド（DMF）およびヘキサメチルホスホルアミド（HMPA）からなる群から選択される。好ましい実施形態において、極性非プロトン性溶媒は、DMSOである。

【0199】

ステップ（a）および（b）が水溶液中で行われる場合、ステップ（a）および（b）は、好ましくは、PBS、MES、HEPES、ピストリス、ADA、PIPES、MOPSO、BES、MOPS、DIPSO、MOBS、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、ピシンまたはHEPBから選択される、約6.0から約8.5の間、約7.0から約8.0の間、または約7.0から約7.5の間のpHの水性媒体中の緩衝剤中で行われる。好ましい実施形態において、緩衝剤は、PBSである。好ましい実施形態において、pHは、約7.3である。

【0200】

一実施形態において、ステップ（b）における活性化GBS莢膜多糖の濃度は、約0.1mg/mLから約10.0mg/mLの間、約0.5mg/mLから約5.0mg/mLの間、または約0.5mg/mLから約2.0mg/mLの間である。好ましい実施形態において、ステップ（b）における活性化血清型GBS莢膜多糖の濃度は、約0.1mg/mL、約0.2mg/mL、約0.3mg/mL、約0.4mg/mL、約0.5mg/mL、約0.6mg/mL、約0.7mg/mL、約0.8mg/mL、約0.9mg/mL、約1.0mg/mL、約1.1mg/mL、約1.2mg/mL、約1.3mg/mL、約1.4mg/mL、約1.5mg/mL、約1.6mg/mL、約1.7mg/mL、約1.8mg/mL、約1.9mg/mL、約2.0mg/mL、約2.1mg/mL、約2.2mg/mL、約2.3mg/mL、約2.4mg/mL、約2.5mg/mL、約2.6mg/mL、約2.7mg/mL、約2.8mg/mL、約2.9mg/mL、または約3.0mg/mLである。

【0201】

好ましい実施形態において、活性化血清型GBS莢膜多糖対担体タンパク質の初期比（重量/重量）は、5:1から0.1:1、2:1から0.1:1、2:1から1:1、1.5:1から1:1、0.1:1から1:1、0.3:1から1:1、0.6:1から1:1の間である。好ましい実施形態において、活性化血清型GBS莢膜多糖対担体タンパク質の初期比は、約0.4:1、0.5:1、0.6:1、0.7:1、0.8:1、0.9:1、1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1である。

【0202】

ある実施形態において、還元剤は、ブレンステッドもしくはルイス酸、アミンボラン、例えば、ピリジンボラン、2-ピコリンボラン、2,6-ジボラン-メタノール、ジメチルアミン-ボラン、 $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$ 、ベンジルアミン- BH_3 または5-エチル-2-メチルピリジンボラン（PEMB）等の存在下、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウムまたは亜鉛である。好ましい実施形態において、還元剤は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである。

【0203】

別の実施形態において、ステップ（b）において使用される還元剤の分量は、約0.1から約10.0モル当量の間、約0.5から約5.0モル当量の間、または約1.0から

10

20

30

40

50

約 2.0 モル当量の間である。好ましい実施形態において、ステップ (b) において使用される還元剤の分量は、約 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9 または 2.0 モル当量である。

【0204】

好ましい実施形態において、ステップ (b) の持続時間は、1 時間から 60 時間の間、10 時間から 50 時間の間、40 時間から 50 時間の間、または 42 時間から 46 時間の間である。好ましい実施形態において、ステップ (b) の持続時間は、約 44 時間である。

【0205】

さらなる実施形態において、ステップ (b) における反応の温度は、10℃から 40℃の間、15℃から 30℃の間、または 20℃から 26℃の間に維持される。好ましい実施形態において、ステップ (b) における反応の温度は、約 23℃に維持される。

【0206】

追加の実施形態において、担体タンパク質と共有結合している GBS 莢膜多糖を含む免疫原性コンジュゲートの調製のためのプロセスは、水素化ホウ素の添加により、未反応のアルデヒドをキャップする (クエンチする) ステップ (ステップ (c)) をさらに含む。

【0207】

一実施形態において、キャッピング試薬は、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化ホウ素テトラブチルアンモニウム、水素化ホウ素カルシウムおよび水素化ホウ素マグネシウムからなる群から選択される水素化ホウ素である。好ましい実施形態において、キャッピング試薬は、水素化ホウ素ナトリウムである。

【0208】

また別の実施形態において、ステップ (c) において使用される水素化ホウ素の分量は、約 0.1 から約 10.0 モル当量の間、約 0.5 から約 5.0 モル当量の間、または約 1.0 から 3.0 モル当量の間である。好ましい実施形態において、ステップ (c) において使用される水素化ホウ素の分量は、約 2.0 モル当量である。

【0209】

1 つの好ましい実施形態において、ステップ (c) において使用される水素化ホウ素は、約 2.0 モル当量の濃度の NaBH_4 である。

【0210】

一実施形態において、ステップ (c) の持続時間は、0.1 時間から 10 時間の間、0.5 時間から 5 時間の間、2 から 4 時間の間である。好ましい実施形態において、ステップ (c) の持続時間は、約 3 時間である。

【0211】

別の実施形態において、ステップ (c) における反応の温度は、約 15℃から約 45℃の間、約 15℃から約 30℃の間、または約 20℃から約 26℃の間に維持される。好ましい実施形態において、ステップ (c) における反応の温度は、約 23℃に維持される。

【0212】

GBS 莢膜多糖の担体タンパク質とのコンジュゲーションおよびキャッピング後、多糖-タンパク質コンジュゲートは、当業者に公知である様々な技術によって精製され得る (多糖-タンパク質コンジュゲートの量に関しては富化される)。これらの技術は、透析、濃縮/血液透析濾過作業、タンジェント流濾過、沈殿/溶離、カラムクロマトグラフィー (DEAE または疎水性相互作用クロマトグラフィー) および深層濾過を包含する。

【0213】

さらなる実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、GBS 莢膜多糖の総量と比較して、約 40% 未満、約 35% 未満、約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、または約 5% 未満の遊離 GBS 莢膜多糖を含む。好ましい実施形態において、免疫原性コンジュゲートは、GBS 莢膜多糖の総量と比較して約 5% 未満の未反応の遊離糖を含む。

【0214】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態において、GBS多糖-タンパク質コンジュゲートは、約300kDaから約20,000kDaの間、例えば、約1,000kDaから約15,000kDaの間または約1,000kDaから約10,000kDaの間等の分子量を有する。

【0215】

また別の実施形態において、コンジュゲート中におけるGBS莢膜多糖対担体タンパク質の比（重量／重量）は、約0.5から約3.0の間である。一態様において、コンジュゲート中におけるGBS莢膜多糖対担体タンパク質の比は、約0.5から約2.0の間、約0.5から約1.5の間、約0.5から約1.0の間、約1.0から約1.5の間、または約1.0から約2.0の間である。好ましい実施形態において、コンジュゲート中におけるGBS莢膜多糖対担体タンパク質の比は、約0.8から約1.0の間である。

10

【0216】

別の実施形態において、コンジュゲートのコンジュゲーションの程度は、2から15の間、2から13の間、2から10の間、2から8の間、2から6の間、2から5の間、2から4の間、3から15の間、3から13の間、3から10の間、3から8の間、3から6の間、3から5の間、3から4の間、5から15の間、5から10の間、8から15の間、8から12の間、10から15の間、または10から12の間である。好ましい実施形態において、コンジュゲートのコンジュゲーションの程度は、2から5の間である。

【0217】

本発明の一態様において、GBS莢膜多糖-タンパク質コンジュゲートは、上述した還元的アミノ化方法によって取得される。例えば、一態様において、本開示は、

20

(a) 単離されたGBS莢膜多糖を酸化剤と反応させるステップと、

(b) クエンチング剤の添加により酸化反応物をクエンチして、活性化GBS莢膜多糖をもたらすステップと、

(c) 活性化GBS莢膜多糖を担体タンパク質と配合するステップと、

(d) 配合された活性化GBS莢膜多糖および担体タンパク質を、還元剤と反応させて、GBS莢膜多糖-担体タンパク質コンジュゲートを形成するステップと、場合により

(e) 水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_4)の添加により未反応のアルデヒドをキャップするステップと

を含む方法によって生成されるまたは取得可能な、担体タンパク質とコンジュゲートしている多糖を含むGBS莢膜多糖-タンパク質コンジュゲートを提供する。

30

【0218】

好ましい実施形態において、ステップ(c)および(d)は、DMSO中で行われる。

【0219】

本発明の別の態様において、本発明のGBS莢膜多糖-タンパク質コンジュゲートは、活性化／酸化ステップにおいて2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ(TEMPO)フリーラジカルおよびN-クロロスクシンイミド(NCS)を共酸化剤として用いたことを除き、上述した通りの還元的アミノ化を使用して調製される。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第WO2014/097099号を参照されたい。そのような実施形態において、GBS莢膜多糖由来のグリココンジュゲートは、実施例7および国際特許出願公開第WO2014/097099号において記述されているように、共酸化剤としてNCSを使用して糖の第一級アルコールをアルデヒドに酸化させる（以後、「TEMPO／NCS酸化」）ためにTEMPOフリーラジカルを使用して調製される。したがって、一態様において、GBS莢膜多糖のコンジュゲートは、a) GBS莢膜多糖を、溶媒中でTEMPOおよびNCSと反応させて、活性化糖を生成するステップと、b) 活性化糖を、1つまたは複数のアミン基を含む担体タンパク質と反応させるステップ（以後、「TEMPO／NCS-還元的アミノ化」）とを含む方法によって取得可能である。一実施形態において、溶媒は、水性溶媒またはDMSOであってもよい。

40

【0220】

一態様において、GBS莢膜多糖-タンパク質コンジュゲートは、前記方法によって取

50

得される。例えば、一態様において、本開示は、a) 糖を、溶媒中で2, 2, 6, 6-テトラメチル-1-ピペリジニルオキシ (TEMPO) およびN-クロロスクシンイミド (NCS) と反応させて、活性化糖を生成するステップと、b) 活性化糖を、1つまたは複数のアミン基を含む担体タンパク質と反応させるステップとを含む方法によって生成されるまたは取得可能な、担体タンパク質とコンジュゲートしている多糖を含むGBS英膜多糖-タンパク質コンジュゲートを提供する。一実施形態において、溶媒は、水性溶媒またはDMSOであってもよい。

【0221】

免疫原性組成物

個々のコンジュゲートを精製した後、これらを組み合わせて、例えばワクチンにおいて使用され得る本発明の免疫原性組成物を製剤化することができる。本発明の免疫原性組成物の製剤化は、当技術分野において認められている方法を使用して遂行することができる。

【0222】

免疫原性組成物に対する「免疫応答」は、目的の組成物中に存在する分子（例えば、タンパク質または多糖等の抗原）に対する体液性および／または細胞媒介性免疫応答の対象における発達である。本発明の目的のために、「体液性免疫応答」は、抗体媒介性免疫応答であり、本発明の免疫原性組成物中に存在する抗原に対する親和性を持つ抗体の産生を伴い、一方、「細胞媒介性免疫応答」は、T-リンパ球および／または他の白血球によって媒介されるものである。「細胞媒介性免疫応答」は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) のクラスIまたはクラスII分子と会合している抗原エピトープの提示によって導出される。これは、抗原特異的CD4+Tヘルパー細胞またはCD8+細胞毒性Tリンパ球細胞 (CTL) を活性化させる。CTLは、MHCまたはCD1によってコードされ、細胞の表面上に発現されるタンパク質と会合して提示されているペプチドまたは脂質抗原に対して特異性を有する。CTLは、細胞内微生物の細胞内破壊、またはそのような微生物に感染している細胞の溶菌を、誘発し促進するのを助ける。細胞性免疫の別の態様は、ヘルパーT細胞による抗原特異的応答を伴う。ヘルパーT細胞は、機能を刺激し、それらの表面上の古典的なまたは非古典的なMHC分子と会合しているペプチド抗原を表示している細胞に対する非特異的エフェクター細胞の活性に集中するのを助けるように作用する。

「細胞媒介性免疫応答」は、サイトカイン、ケモカイン、ならびに活性化T細胞および／またはCD4+およびCD8+T細胞に由来するものを包含する他の白血球によって生成された他のそのような分子の生成も指す。細胞媒介性免疫学的応答を刺激する特定の抗原または組成物の能力は、若干数のアッセイによって、例えば、リンパ球増殖 (リンパ球活性化) アッセイ、CTL細胞毒性細胞アッセイによって、感作された対象における抗原に対して特異的なT-リンパ球についてアッセイすることによって、または抗原による再刺激に応答したT細胞によるサイトカイン生成の測定によって等、決定され得る。そのようなアッセイは、当技術分野において周知である。例えば、Erickson, A. L. ら、J. Immunol., 151 (8) : 4189~4199 (1993); Doe, B. ら、Eur. J. Immunol. 24 (10) : 2369~2376 (1994) を参照されたい。

【0223】

「免疫原性」という用語は、体液性もしくは細胞媒介性のいずれかまたは両方の免疫応答を導出する抗原またはワクチンの能力を指す。

【0224】

「免疫原性量」または「免疫学的有効量」または「用量」は、それらのそれぞれが本明細書において交換可能に使用され、概して、当業者に公知の標準的なアッセイによって測定される通りの、細胞性 (T細胞) もしくは体液性 (B細胞または抗体) 応答のいずれかまたは両方の免疫応答を導出するのに十分な、抗原または免疫原性組成物の量を指す。

【0225】

「免疫干渉」または「有意な免疫干渉」は、本明細書において使用される場合、一価ワクチンで投与される場合の同じ抗原に対する免疫応答と比較した、多価または多成分ワク

10

20

30

40

50

チンにおける個々の抗原に対する免疫応答の統計的に有意な減少を指す。

【0226】

「保護的」免疫応答は、対象を感染から保護するために役立つ、体液性または細胞媒介性いずれかの免疫応答を導出する免疫原性組成物の能力を指す。提供される保護は絶対的である必要はない、すなわち、対象の対照集団、例えば、ワクチンも免疫原性組成物も投与されていない感染動物と比較して統計的に有意な改善があるならば、感染を完全に予防するまたは根絶する必要はない。保護は、感染の症状の発症の重症度または速さを緩和することに限定され得る。免疫応答が「保護的免疫応答」を示すものであるか否かを決定するためのいくつかのアッセイが、当技術分野において公知である。例えば、抗体レベルの増大は、さらに後述する全細胞ELISAアッセイ等の結合アッセイによって測定され得る。他のアッセイは、後述する通りのオプソニン食作用アッセイ（OPA）で試験することができる、細菌死滅の容易化等の機能的抗体応答を測定することを包含する。特定の状況において、「保護的免疫応答」は、対象の少なくとも50%において、特定の抗原に対して特異的な、抗体レベルの2倍の増大または抗体レベルの4倍の増大の誘発を包含し得る。別の状況において、「保護的免疫応答」は、少なくとも10%、25%、50%、65%、75%、80%、85%、90%、95%またはそれ以上の細菌カウントにおける減少を包含し得る。

【0227】

組成物中における特定のコンジュゲートの量は、概して、そのコンジュゲートについて、コンジュゲートしているおよびコンジュゲートしていない全多糖に基づいて算出される。例えば、20%の遊離多糖を持つGBS莢膜多糖コンジュゲートは、100mcg/mlのGBS莢膜多糖用量中に、約80mcg/mlのコンジュゲートしているGBS莢膜多糖および約20mcg/mlのコンジュゲートしていないGBS莢膜多糖を有すると予想される。コンジュゲートへのタンパク質担体の寄与は、通常、コンジュゲートの用量を算出する際には考慮されない。コンジュゲートの量は、レンサ球菌の血清型に応じて変動し得る。概して、各用量は、約0.01mg/mlから約100mcg/ml、特に約1mcg/mlから約70mcg/ml、より好ましくは約5mcg/mlから約50mcg/mlの各多糖を含むことになる。免疫原性組成物中における異なる多糖成分の「免疫原性量」は、相違していてよく、それぞれが、約0.01mcg/ml、約0.1mcg/ml、約0.25mcg/ml、約0.5mcg/ml、約1mcg/ml、約2mcg/ml、約3mcg/ml、約4mcg/ml、約5mcg/ml、約6mcg/ml、約7mcg/ml、約8mcg/ml、約9mcg/ml、約10mcg/ml、約15mcg/ml、約20mcg/ml、約25mcg/ml、約30mcg/ml、約40mcg/ml、約50mcg/ml、約60mcg/ml、約70mcg/ml、約80mcg/ml、約90mcg/ml、または約100mcg/mlの任意の特定の多糖抗原を含み得る。多価免疫原性組成物の用量または免疫原性量は、別段の指示がない限り、各多糖の用量を示すと予想される。例えば、10mcg/ml用量の六価免疫原性組成物は、60mcg/mlの総抗原またはコンジュゲート用量に対し、10mcg/mlの6つのそれぞれの多糖を含有すると予想される。

【0228】

本発明の一態様において、総コンジュゲート用量は、少なくとも約60mcg/ml、例えば、少なくとも約120mcg/mlまたは少なくとも約240mcg/ml等である。一実施形態において、総コンジュゲート用量は、約60mcg/mlから約600mcg/ml、例えば、約60mcg/mlから約540mcg/ml、約60mcg/mlから約480mcg/ml、約60mcg/mlから約420mcg/ml、約60mcg/mlから約360mcg/ml、約60mcg/mlから約300mcg/ml、約60mcg/mlから約240mcg/ml、約60mcg/mlから約180mcg/ml、約60mcg/mlから約120mcg/ml、約120mcg/mlから約600mcg/ml、約120mcg/mlから約540mcg/ml、約120mcg/mlから約480mcg/ml、約120mcg/mlから約420mcg/ml、約12

0mcg/mlから約360mcg/ml、約120mcg/mlから約300mcg/ml、約120mcg/mlから約240mcg/ml、約120mcg/mlから約180mcg/ml、約180mcg/mlから約600mcg/ml、約180mcg/mlから約540mcg/ml、約180mcg/mlから約480mcg/ml、約180mcg/mlから約420mcg/ml、約180mcg/mlから約360mcg/ml、約180mcg/mlから約300mcg/ml、約180mcg/mlから約240mcg/ml、約240mcg/mlから約600mcg/ml、約240mcg/mlから約540mcg/ml、約240mcg/mlから約480mcg/ml、約240mcg/mlから約420mcg/ml、約240mcg/mlから約360mcg/ml、または約240mcg/mlから約300mcg/ml等である。好ましい実施形態において、総コンジュゲート用量は、約60mcg/mlから約360mcg/ml、より好ましくは約120mg/mlから約240mcg/mlである。

10

【0229】

免疫原としての抗原の有効性は、イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、機能的抗体アッセイ、例えば、インビトロオブソニンアッセイ等、および当技術分野において公知である多くの他のアッセイを使用して、血清中の抗原に特異的な循環抗体のレベルを測定することにより、B細胞活性のレベルを測定することによって測定することができる。T細胞免疫原としての抗原の有効性の別の測定は、増殖アッセイによって、細胞溶菌アッセイ、例えば、その特異的標的細胞を溶菌するT細胞の能力を測定するためのクロム放出アッセイ等によってのいずれかで測定することができる。さらに、本発明において、「免疫原性量」は、抗原の投与後に誘発された抗原特異的抗体の血清中レベルを測定することによって、または、そのようにして誘発された抗体の、本明細書において記述されている通りの特定の白血球のオブソニン食作用能力を強化する能力を測定することによって、定義されてもよい。免疫応答の保護のレベルは、免疫化された宿主に、注射された抗原を接種することによって測定され得る。例えば、免疫応答が所望される抗原が細菌である場合、「免疫原性量」の抗原によって誘発される保護のレベルは、動物への細菌細胞の接種後の生存パーセントまたは死亡パーセントを検出することによって測定することができる。一実施形態において、保護の量は、細菌感染に関連する少なくとも1つの症状、例えば、感染に関連する発熱を測定することによって測定され得る。多抗原もしくは多成分ワクチンまたは免疫原性組成物中における抗原のそれぞれの量は、他の成分のそれぞれに関して変動することになり、当業者に公知の方法によって決定することができる。そのような方法は、例えば、免疫原性および/またはインビボ効力を測定するための手順を包含すると予想される。

20

30

【0230】

「免疫原性組成物」という用語は、抗原、例えば微生物、またはその成分を含有し、対象において免疫応答を導出するために使用することができる任意の医薬組成物に関する。本発明の免疫原性組成物は、全身経皮または粘膜経路を介して免疫原性組成物を投与することを利用して、GBS感染の影響を受けやすいヒトを治療するために使用することができる。これらの投与は、筋肉内(i.m.)、腹腔内(i.p.)、皮内(i.d.)もしくは皮下経路を介する注射、パッチもしくは他の経皮送達デバイスによる適用、または経口/消化、呼吸もしくは尿生殖路への粘膜投与を介するものを含有し得る。一実施形態において、免疫原性組成物は、ワクチンの製造において、または動物を受動的に保護するもしくは治療するために使用され得るポリクローナルもしくはモノクローナル抗体の導出において使用され得る。

40

【0231】

一態様において、本発明は、本明細書において記述されている通りの、有効量の少なくとも1つの多糖、オリゴ糖、多糖-タンパク質コンジュゲート、またはそれらの生物学的同等物を包含する免疫原性組成物に関する。例えば、一実施形態において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを包含し、莢膜多糖は、B群レンサ球菌血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から

50

選択され、莢膜多糖は、約60%超のシアル酸レベルを有する。別の例において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを包含し、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。別の実施形態において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも2つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。また別の実施形態において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも3つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。さらなる実施形態において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも4つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。特定の実施形態において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型Ia、Ib、II、IIIおよびV由来の莢膜多糖を含む。別の実施形態において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型Ia、Ib、II、IIIおよびIV由来の莢膜多糖を含む。また別の実施形態において、免疫原性組成物は、多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも5つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。1つのそのような実施形態において、免疫原性組成物は、6つの多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌血清型Ia、Ib、II、III、IVおよびV由来の莢膜多糖を含む。

【0232】

ある実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、S. アガラクティエ (S. agalactiae) の2から10までの異なる血清型を含む。したがって、ある実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のGBSコンジュゲート組成物である。1つのそのような実施形態において、免疫原性組成物は、5個のGBSコンジュゲート組成物である。別の実施形態において、免疫原性組成物は、6個のGBSコンジュゲート組成物である。また別の実施形態において、免疫原性組成物は、7個のGBSコンジュゲート組成物である。さらなる実施形態において、免疫原性組成物は、8個のGBSコンジュゲート組成物である。

【0233】

組成物中において6つ未満、5つ未満、または4つ未満のGBS抗原を使用するという先の教示(国際特許出願公開第WO2006/082527号および同第WO2006/082530号を参照)および特に多価組成物中における血清型Vの使用に関する免疫干渉の経験(国際特許出願公開第WO2012/035519号を参照)にもかかわらず、本発明は、多価組成物中における4つ以上のGBS抗原の使用または血清型Vの使用によるいかなる有意な免疫干渉も示さない。したがって、本発明は、少なくとも4つのGBS莢膜多糖血清型、例えば、少なくとも5つのGBS莢膜多糖血清型、少なくとも6つのGBS莢膜多糖血清型、少なくとも7つのGBS莢膜多糖血清型、少なくとも8つのGBS莢膜多糖血清型、または少なくとも9つのGBS莢膜多糖血清型等を含む多糖-タンパク質コンジュゲートを含む多価免疫原性組成物に関し、組成物は、有意な免疫干渉を有さない。特定の実施形態において、免疫原性組成物は、GBS莢膜多糖血清型Vを含む。

【0234】

多糖-タンパク質コンジュゲートは、同じまたは異なるタンパク質担体を含み得る。一実施形態において、コンジュゲートは、同じタンパク質担体を含み、糖は、タンパク質担体の同じ分子(それとコンジュゲートしている2つ以上の異なる多糖を有する担体分子)

とコンジュゲートしている〔例えば、国際特許出願公開第WO2004/083251号を参照〕。別の実施形態において、多糖は、タンパク質担体の異なる分子（それとコンジュゲートしている1種類の多糖のみを有するタンパク質担体の各分子）とそれぞれ独立してコンジュゲートしている。前記実施形態において、莢膜糖は、担体タンパク質と独立してコンジュゲートしていると言われている。

【0235】

特定の免疫原性組成物に最適な量の成分は、対象における適切な免疫応答の観察を伴う標準的な研究によって解明することができる。初回ワクチン接種の後、対象は、1回または数回のブースター免疫化を、適度に間隔をおいて受けることができる。

【0236】

本発明の免疫原性組成物は、複数の莢膜多糖タンパク質コンジュゲートに加えて、1つまたは複数の保存剤をさらに含んでよい。FDAは、複数回用量（多回用量）バイアル中の生物学的製品が、わずかな例外を除いて、保存剤を含有することを求めている。本発明は、そのような多回用量バイアルの使用を企図している。保存剤を含有するワクチン製品は、塩化ベンゼトニウム（炭疽）、2-フェノキシエタノール（DTaP、HepA、ライム、ポリオ（非経口））およびフェノール（肺炎、腸チフス（非経口））を含有するワクチンを包含する。注射薬において使用することが承認された保存剤は、例えば、クロロブタノール、mクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、2-フェノキシエタノール、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、ベンジルアルコール、フェノールおよび硝酸フェニル水銀を包含する。

【0237】

別の態様において、本発明は、本明細書において記述されている任意の多糖のうちの少なくとも1つ、および薬学的に許容できる賦形剤、緩衝剤、安定剤、アジュバント、抗凍結剤、塩、二価カチオン、非イオン性界面活性物質、フリーラジカル酸化の阻害剤、希釈剤もしくは担体、またはそれらの混合物を包含する組成物に関する。

【0238】

免疫原性組成物は、HEPES、PIPES、MES、トリス（トリメタミン）、リン酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、グリシン、ヒスチジンおよびコハク酸塩から選択されるがこれらに限定されない1つまたは複数の生理学的に許容できる緩衝剤を含んでいてもよい。好ましい実施形態において、緩衝剤は、ヒスチジンまたはリン酸塩である。

【0239】

一実施形態において、免疫原性組成物は、緩衝剤を、約5mMから約50mM、約5mMから約40mM、約5mMから約30mM、約5mMから約20mM、約5mMから約10mM、約10mMから約50mM、約10mMから約40mM、約10mMから約35mM、約10mMから約30mM、約10mMから約25mM、約10mMから約20mM、約10mMから約15mM、約15mMから約50mM、約15mMから約40mM、約15mMから約35mM、約15mMから約30mM、約15mMから約25mM、または約15mMから約20mMまでの濃度で含む。好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、緩衝剤を、約10mMから約25mM、例えば、約15mMから約25mM、最も好ましくは約20mMの濃度で含む。

【0240】

1つの好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、ヒスチジンを、約20mMの濃度で含む。別の好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、リン酸塩を、約20mMの濃度で含む。

【0241】

ある特定の実施形態において、製剤は、約5.0から約7.5、例えば、5.3から約7.5、約5.5から約7.5、約6.0から約7.5、約6.5から約7.5、約5.3から約7.1、約5.5から約7.0、約6.0から約7.0、約6.0から約6.5、約6.3から約7.0、または約6.5から約7.0等のpH範囲内に緩衝されている。別の実施形態において、製剤は、約6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5

10

20

30

40

50

、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、または7.5のpHに緩衝されている。好ましい実施形態において、製剤は、約6.0から約7.5までのpH範囲、例えば、約6.5から約7.5等、最も好ましくは約6.5または約7.0に緩衝されている。

【0242】

免疫原性組成物は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリソルベート80（ツイーン80）、ポリソルベート60（ツイーン60）、ポリソルベート40（ツイーン40）、ポリソルベート20（ツイーン20）を包含するがこれらに限定されない1つまたは複数の非イオン性界面活性剤、および、BRIJ58、BRIJ35を包含するがこれらに限定されないポリオキシエチレンアルキルエーテル、ならびにその他、例えば、トリトンX-100、トリトンX-114、NP40、スパン85およびプルロニックシリーズの非イオン性界面活性剤（例えば、プルロニック121）等を含んでもよい。一実施形態において、免疫原性組成物は、ポリソルベート80またはポリソルベート40、好ましくはポリソルベート80（PS80）を含む。

【0243】

一実施形態において、免疫原性組成物は、界面活性剤を、約0.001%から約2%（v/w）、約0.001%から約1%、約0.001%から約0.5%、約0.001%から約0.1%、約0.001%から約0.05%、約0.001%から約0.01%、約0.001%から0.005%、約0.005%から約2%、約0.005%から約1%、約0.005%から約0.5%、約0.005%から約0.1%、約0.005%から約0.05%、約0.005%から約0.01%、約0.01%から約2%、約0.01%から約1%、約0.01%から約0.5%、約0.01%から約0.1%、約0.01%から約0.05%、約0.01%から約0.04%、約0.01%から約0.03%、約0.015%から約2%、約0.015%から約1%、約0.015%から約0.5%、約0.015%から約0.1%、約0.015%から約0.05%、約0.015%から約0.04%、約0.015%から約0.03%、約0.02%から約2%、約0.02%から約1%、約0.02%から約0.5%、約0.02%から約0.1%、約0.02%から約0.05%、約0.02%から約0.04%、約0.02%から約0.03%、約0.05%から約2%、約0.05%から約1%、約0.05%から約0.5%、約0.05%から約0.1%、約0.1%から約2%、約0.1%から約1%、約0.1%から約0.5%または約0.1%から0.25%までの濃度で含む。好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、界面活性剤を、約0.01%から0.03%、最も好ましくは約0.02%の濃度で含む。

【0244】

別の実施形態において、免疫原性組成物は、約0.001%から約2%まで（最大約0.25%が好ましい）の濃度のポリソルベート80または約0.001%から1%まで（最大約0.5%が好ましい）の濃度のポリソルベート40を含む。

【0245】

好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、PS80を、約0.02%の濃度で含む。

【0246】

薬学的に許容できる担体は、本発明の炭水化物をタンパク質に結合する際に使用され、その炭水化物に対する免疫応答を修飾する「担体タンパク質」と混同されるべきではない。本明細書において記述されているタンパク質担体との混同を回避するために、薬学的に許容できる希釈剤という用語を、薬学的に許容できる担体よりも好ましいとするが、これらの用語は、時折、交換可能に使用され得る。「薬学的に許容できる担体」という用語は、連邦規制機関、州政府もしくは他の規制機関によって承認されている、または、米国薬局方もしくはヒトおよび非ヒト哺乳動物を包含する動物において使用するのための他の一般に認められている薬局方に収載された担体を意味する。「担体」という用語は、医薬組成物がともに投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。好適な薬

学的に許容できる希釈剤は、ありとあらゆる従来の溶媒、分散媒、充填剤、固体担体、水溶液、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等を包含する。そのような薬学的に許容できる希釈剤は、滅菌液体、例えば、水、および石油、動物、植物または合成起源のものを包含する油等であってよい。水、注射用水（WFI）、滅菌等張生理食塩水、リン酸緩衝溶液、アジュバント懸濁液、水性デキストロースおよびグリセロール溶液、ならびにそれらの組合せを、特に注射用溶液用の液体担体として用いることができる。薬学的に許容できる希釈剤は、体内における貯蔵寿命または有効性を強化する、少量の補助物質、例えば、湿潤もしくは乳化剤、保存剤または緩衝剤等をさらに含んでよい。薬学的に許容できる希釈剤の調製および使用は、当技術分野において周知である。好適な医薬担体の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」E. W. Martin 著において記述されている。一実施形態において、希釈剤は、水、注射用水（WFI）、アジュバント懸濁液または生理食塩水である。特定の実施形態において、希釈剤は、本明細書において記述されている任意のアジュバントの懸濁液である。好ましい実施形態において、希釈剤は、リン酸アルミニウム懸濁液等のアルミニウムベースのアジュバント懸濁液である。

【0247】

好適な医薬賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトール、パラチニット、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、石粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、グリシン、アルギニン、リシン、塩化ナトリウム（NaCl）、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等を包含する。好ましい実施形態において、賦形剤は、NaClである。

【0248】

一実施形態において、免疫原性組成物は、賦形剤を、約10mMから約500mM、約10mMから約450mM、約10mMから約400mM、約10mMから約350mM、約10mMから約300mM、約10mMから約250mM、約10mMから約200mM、約10mMから約150mM、約10mMから約100mM、約10mMから約50mM、約10mMから約30mM、約10mMから約20mM、20mMから約500mM、約20mMから約450mM、約20mMから約400mM、約20mMから約350mM、約20mMから約300mM、約20mMから約250mM、約20mMから約200mM、約20mMから約150mM、約20mMから約100mM、約20mMから約50mM、約20mMから約30mM、50mMから約500mM、約50mMから約450mM、約50mMから約400mM、約50mMから約350mM、約50mMから約300mM、約50mMから約250mM、約50mMから約200mM、約50mMから約150mM、約50mMから約100mM、約100mMから約500mM、約100mMから約450mM、約100mMから約400mM、約100mMから約350mM、約100mMから約300mM、約100mMから約250mM、約100mMから約200mM、約100mMから約150mM、約120mMから約470mM、約120mMから約420mM、約120mMから約370mM、約120mMから約320mM、約120mMから約270mM、約120mMから約220mM、約120mMから約170mM、約150mMから約500mM、約150mMから約450mM、約150mMから約400mM、約150mMから約350mM、約150mMから約300mM、約150mMから約250mM、約150mMから約200mM、約200mMから約500mM、約200mMから約450mM、約200mMから約400mM、約200mMから約350mM、約200mMから約300mM、約200mMから約250mM、約225mMから約465mM、約225mMから約425mM、約225mMから約365mM、約225mMから約325mM、約225mMから約265mM、約250mMから約500mM、約250mMから約450mM、約250mMから約400mM、約250mMから約350mM、約250mMから約300mM、約300mMから約500mM、約300mMから約450mM、約300mMから約400mM

、約300mMから約350mM、約350mMから約500mM、約350mMから約450mM、約350mMから約400mM、約400mMから約500mM、約400mMから約450mMまたは約450mMから約500mMまでの濃度で含む。好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、賦形剤を、約10mMから約350mM、例えば、約130mMから約170mM、約225mMから約265mMまで、最も好ましくは約150mMまたは約245mMの濃度で含む。

【0249】

1つの好ましい実施形態において、賦形剤は、約150mMの濃度のNaClである。別の好ましい実施形態において、賦形剤は、約245mMの濃度のNaClである。

【0250】

組成物は、所望ならば、少量の湿潤、増量、乳化剤またはpH緩衝剤を含有することもできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、凍結乾燥粉末またはケーキ等の形態をとることができる。製剤は、投与モードに適合すべきである。任意の従来の媒体または作用物質が有効成分と不適合である場合を除いて、本発明の免疫原性組成物におけるそれらの使用が企図されている。

【0251】

ある実施形態において、免疫原性組成物は、場合により少なくとも1つの賦形剤の存在下で、凍結乾燥される。好ましい実施形態において、少なくとも1つの賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジットース、デキストラン、マンニトール、ラクチトール、パラチニット、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、石粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、グリシン、アルギニン、リシン、塩化ナトリウム(NaCl)、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水およびエタノールからなる群から選択される。好ましい実施形態において、少なくとも1つの賦形剤は、スクロース、マンニトールおよびグリシンからなる群から選択される。特定の実施形態において、少なくとも1つの賦形剤は、スクロースである。別の実施形態において、凍結乾燥した組成物は、追加の賦形剤を含む。1つのそのような実施形態において、追加の賦形剤は、マンニトールまたはグリシンである。

【0252】

別の実施形態において、凍結乾燥した組成物は、約1% (w/v) から約10% (w/v)、例えば、約1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%または10.0%等の少なくとも1つの糖を含む。好ましい実施形態において、凍結乾燥した組成物は、約5.5% (w/v) 超、例えば、約7.0% (w/v) 超等の少なくとも1つの賦形剤を含む。さらなる実施形態において、凍結乾燥した組成物は、約1% (w/v) から約10% (w/v)、例えば、約1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%または10.0%等の追加の賦形剤を含む。好ましい実施形態において、凍結乾燥した組成物は、約1% (w/v) から約10% (w/v) の少なくとも1つの賦形剤および約1% (w/v) から約10% (w/v) の追加の賦形剤を含む。

【0253】

また別の実施形態において、凍結乾燥した組成物は、水、注射用水(WFI)、アジュバント懸濁液または生理食塩水で再溶解される。好ましい実施形態において、希釈剤は、リン酸アルミニウム懸濁液等のアルミニウムベースのアジュバント懸濁液である。

【0254】

一実施形態において、組成物は、本明細書において記述されている単離された多糖および担体分子を包含する。好適な担体分子は、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体(油滴またはリポソーム等)および不活性ウイルス粒子を包含し得る。粒子状担体の例は、ポリメチルメタクリレート

10

20

30

40

50

ポリマーに由来するもの、ならびに、ポリ（ラクチド）およびPLGとして公知のポリ（ラクチド-*c o*-グリコリド）に由来する微粒子を包含する。

【0255】

本発明の免疫原性組成物は、免疫系を混乱させるまたは改変する作用物質である、1つまたは複数の追加の「免疫調節剤」をさらに含むことができ、そのため、体液性および／または細胞媒介性免疫の上方調節または下方調節のいずれかが観察される。1つの特定の実施形態において、免疫系の体液性および／または細胞媒介性アームの上方調節が好ましい。ある特定の免疫調節剤の例は、例えば、中でも、米国特許第5,254,339号において記述されている、アジュバントもしくはサイトカイン、またはISCOMATRIX（CSL Limited、Parkville、Australia）を包含する。
「アジュバント」という用語は、本明細書においてさらに記述されている通り、抗原に対する免疫応答を強化する化合物または混合物を指す。

【0256】

本発明の組成物において使用することができるアジュバントの非限定的な例は、RIBIアジュバント系（Ribi Inc.、Hamilton、Mont.）；鉱物ゲル、例えば、水酸化アルミニウムゲル等；油中水型エマルジョン、例えば、フロイントの完全および不完全アジュバント等；ブロックコポリマー（CytRx、Atlanta Ga.）；SAF-M（Chiron、Emeryville、Calif.）；AMPHIGEN（登録商標）アジュバント；サポニン；Quil Aまたは他のサポニン画分；モノホスホリル脂質A；およびアブリジン脂質-アミンアジュバントを包含する。本発明のワクチンにおいてアジュバントとして有用な水中油型エマルジョンの非限定的な例は、MF59（米国特許第6,299,884号）（モデル110Yマイクロフルイダイザー（Microfluidics、Newton、MA）等のマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロン粒子に製剤化された、5%スクアレン、0.5%ポリソルベート80、および0.5%スパン85（種々の量のMTP-PEを含有していてもよい）を含有する）、およびSAF（サブミクロンエマルジョンに微小流動化したか、より大きい粒径のエマルジョンを産生するためにボルテックスしたかいずれかの、10%スクアレン、0.4%ポリソルベート80、5%プルロニックブロックポリマーL121およびthr-MDPを含有する）；修飾されたSEAM62（5%（v/v）スクアレン（Sigma）、1%（v/v）SPAN（登録商標）85界面活性物質（ICI界面活性剤）、0.7%（v/v）ポリソルベート80界面活性物質（ICI界面活性剤）、2.5%（v/v）エタノール、200mcg/mlのQuil A、100mcg/mlのコレステロールおよび0.5%（v/v）レシチンを含有する）；ならびに修飾されたSEAM 1/2（5%（v/v）スクアレン、1%（v/v）SPAN（登録商標）85界面活性物質、0.7%（v/v）ポリソルベート80界面活性物質、2.5%（v/v）エタノール、100mcg/mlのQuil Aおよび50mcg/mlのコレステロールを含有する）を包含する。

【0257】

免疫応答を強化するために使用される好適なアジュバントは、限定されないが、米国特許第4,912,094号において記述されている、MPL（商標）（3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A、Corixa、Hamilton、MT）をさらに包含する。アジュバントとして使用するために、Corixa（Hamilton、MT）から入手可能であり、米国特許第6,113,918号において記述されている、合成脂質A類似体もしくはアミノアルキルグルコサミンリン酸化合物（AGP）、またはそれらの誘導体もしくは類似体も好適である。1つのそのようなAGPは、2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイルアミノ]エチル2-デオキシ-4-O-ホスホノ-3-O-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル(tetra-decanoxy-tetradecanoyl)]-2-[(R)-3-テトラデカノイルオキシテトラデカノイル-アミノ]-b-D-グルコピラノシドであり、これは、529としても公知である（以前はRC529として公知であった）。この529アジュバント

は、水性形態（A F）としてまたは安定なエマルジョン（S E）として製剤化される。

【0258】

また他のアジュバントは、シクロデキストリン誘導体（米国特許第6, 165, 995号）；ポリアニオン性ポリマー（米国特許第6, 610, 310号）；ムラミルペプチド、例えば、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）およびN-アセチル-ノルムラミル-L-アラニン-2-（1'-2'ジパルミトイル-s n-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ）-エチルアミン（MTP-PE）等；Amphigen；アブリジン；L121/スクアレン；D-ラクチド-ポリラクチド/グリコシド；プルロニックポリオール；死滅ボルデテラ属；サポニン、例えば、米国特許第5, 057, 540号において記述されているStimulon（商標）QS-21（Antigenics、Framingham、MA.）等；結核菌（Mycobacterium tuberculosis）；細菌リポ多糖；合成ポリヌクレオチド、例えば、CpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチド（例えば、米国特許第6, 207, 646号）等；欧州特許第1, 296, 713号および同第1, 326, 634号において記述されているIC-31（Intercell AG、Vienna、Austria）；百日咳毒素（PT）もしくはその突然変異体、コレラ毒素もしくはその突然変異体（例えば、米国特許第7, 285, 281号、同第7, 332, 174号、同第7, 361, 355号および同第7, 384, 640号）；または、大腸菌（E. coli）易熱性毒素（LT）もしくはその突然変異体、特にLT-K63、LT-R72（例えば、米国特許第6, 149, 919号、同第7, 115, 730号および同第7, 291, 588号）を包含する。

【0259】

ワクチンに包含され得る他の「免疫調節剤」は、例えば、インターロイキン1- α 、1- β 、2、4、5、6、7、8、10、12（例えば、米国特許第5, 723, 127号を参照）、13、14、15、16、17および18（およびその突然変異体）；インターフェロン- α 、 β および γ ；顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）（例えば、米国特許第5, 078, 996号およびATCC受託番号39900を参照）；マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）；または腫瘍壊死因子 α および β のうちの1つまたは複数を包含する。本明細書において記述されている免疫原性組成物で有用なまた他のアジュバントは、限定されないが、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β およびRANTESを包含するケモカイン；接着分子、例えば、セ렉チン、例えば、L-セ렉チン、P-セ렉チンおよびE-セ렉チン等；ムチン様分子、例えば、CD34、GlyCAM-1およびMadCAM-1；インテグリンファミリーのメンバー、例えば、LFA-1、VLA-1、Mac-1およびp150.95等；免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバー、例えば、PECAM、ICAMs、例えば、ICAM-1、ICAM-2およびICAM-3、CD2ならびにLFA-3等；共刺激分子、例えば、B7-1、B7-2、CD40およびCD40L等；血管成長因子、神経成長因子、繊維芽細胞成長因子、上皮成長因子、PDGF、BL-1および血管内皮成長因子を包含する成長因子；Fas、TNF受容体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LAR、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2およびDR6を包含する受容体分子；ならびにカスパーゼ（ICE）を包含する。

【0260】

免疫調節剤および／もしくはアジュバントを使用するか否かの決断、またはいずれの免疫調節剤および／もしくはアジュバントを使用するかを選択は、ワクチンまたは免疫原性組成物が投与される対象、注射経路、および与えられる予定の注射の数によって決まると予想されることを理解されたい。例えば、対象が病原体に自然に曝露されてきた場合、ワクチン抗原が記憶応答を有効に誘発することができるため、アジュバントは必要とされない場合がある。ある特定の実施形態において、免疫原性組成物は、1つまたは複数のアジュバントを包含することになる。一実施形態において、免疫原性組成物は、アルミニウム

10

20

30

40

50

ベースのアジュバントを含む。1つのそのような実施形態において、アルミニウムアジュバントは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムまたはアルミニウムヒドロキシルホスフェートである。特定の実施形態において、アジュバントは、リン酸アルミニウムである。本発明の別の実施形態において、免疫原性組成物は、QS-21をアジュバントとして含む。

【0261】

一実施形態において、免疫原性組成物は、アジュバントを、約0.1mg/mlから約1.0mg/ml、0.1mg/mlから約0.9mg/ml、0.1mg/mlから約0.8mg/ml、0.1mg/mlから約0.7mg/ml、0.1mg/mlから約0.6mg/ml、0.1mg/mlから約0.5mg/ml、0.1mg/mlから約0.4mg/ml、0.1mg/mlから約0.3mg/ml、0.1mg/mlから約0.2mg/ml、0.25mg/mlから約0.95mg/ml、0.25mg/mlから約0.85mg/ml、0.25mg/mlから約0.75mg/ml、0.25mg/mlから約0.65mg/ml、0.25mg/mlから約0.55mg/ml、0.25mg/mlから約0.45mg/ml、0.25mg/mlから約0.35mg/ml、0.5mg/mlから約1.0mg/ml、0.5mg/mlから約0.9mg/ml、0.5mg/mlから約0.8mg/ml、0.5mg/mlから約0.75mg/ml、0.5mg/mlから約0.7mg/ml、0.5mg/mlから約0.65mg/ml、0.5mg/mlから約0.6mg/ml、0.75mg/mlから約1.0mg/ml、0.75mg/mlから約0.95mg/ml、0.75mg/mlから約0.9mg/ml、および0.75mg/mlから約0.85mg/mlまでの濃度で含む。好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、アジュバントを、約0.25mg/mlから約0.75mg/mlまで、最も好ましくは約0.5mg/mlの濃度で含む。

【0262】

好ましい実施形態において、アジュバントは、約0.5mg/mlの濃度のアルミニウムベースのものである。1つのそのような実施形態において、アルミニウムベースのアジュバントは、リン酸アルミニウムまたはアルミニウムヒドロキシルホスフェートである。別の実施形態において、アルミニウムベースのアジュバントは、水酸化アルミニウムである。

【0263】

アルミニウムベースのアジュバントを含む免疫原性組成物は、時間の関数として相分離する傾向があり、アルミニウム粒子は、貯蔵中に沈殿物が沈降するにつれて液体から分離するであろうことに留意すべきである。投与成功を確実にするために、免疫原性組成物は、視覚的に均一でなくてはならず、投与前に再懸濁されなくてはならない。したがって、組成物は、均一に再懸濁しやすいことが重要である。本発明の一態様において、免疫原性組成物は、約50回以下の振とう、例えば、約40回以下の振とう、約30回以下の振とう、約25回以下の振とう、約20回以下の振とう、約15回以下の振とう、約10回以下の振とう、または約5回以下の振とう等で再懸濁される。好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、約10回以下の振とうで再懸濁される。本発明の別の態様において、免疫原性組成物は、約1から約50回の振とう、例えば、約1から約40回の振とう、約1から約30回の振とう、約1から約25回の振とう、約1から約20回の振とう、約1から約15回の振とう、約1から約10回の振とう、または約1から約5回の振とう等で再懸濁される。好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、約1から約10回の振とうで再懸濁される。

【0264】

本発明の一態様において、免疫原性組成物は、容器に充填される。一実施形態において、容器は、バイアル、フラスコ、バッグおよびシリンジからなる群から選択される。一実施形態において、容器は、ガラス、金属（鋼、ステンレス鋼およびアルミニウム等）、およびポリマー（熱可塑性物質、エラストマー、熱可塑性エラストマー等）製である。一実施形態において、容器は、シリコン処理されている。好ましい実施形態において、容器は

、シリンジ、最も好ましくはガラスシリンジである。

【0265】

1つの特定の実施形態において、免疫原性組成物は、約1mmから約15mm、例えば、約1mmから約11mm、約1mmから約10mm、約1mmから約9mm、約1mmから約8mm、約1mmから約7mm、約1mmから約6mm、約1mmから約5mm、約1mmから約4mm、約1mmから約3mm、約2mmから約15mm、約2mmから約11mm、約2mmから約10mm、約2mmから約9mm、約2mmから約8mm、約2mmから約7mm、約2mmから約6mm、約2mmから約5mm、約2mmから約4mm、約3mmから約15mm、約3mmから約11mm、約3mmから約10mm、約3mmから約9mm、約3mmから約8mm、約3mmから約7mm、約3mmから約6mm、約3mmから約5mm、約4mmから約15mm、約4mmから約11mm、約4mmから約10mm、約4mmから約9mm、約4mmから約8mm、約4mmから約7mm、約4mmから約6mm、約5mmから約15mm、約5mmから約11mm、約5mmから約10mm、約5mmから約9mm、約5mmから約8mm、または約5mmから約7mm等のヘッドスペースを設けてシリンジに充填される。好ましい実施形態において、ヘッドスペースは、約2mmから約6mm、最も好ましくは約4mmである。

10

【0266】

一実施形態において、免疫原性組成物は、本明細書において記述されている通りの多糖-タンパク質コンジュゲート、緩衝剤、界面活性剤、賦形剤、および場合によりアジュバントを含み、組成物は、約6.0から約7.5のpHに緩衝されている。

20

【0267】

1つのそのような実施形態において、免疫原性組成物は、GBS多糖-タンパク質コンジュゲート、緩衝剤、界面活性剤、賦形剤、および場合によりアジュバントを含み、組成物は、約6.0から約7.5のpHに緩衝されており、莢膜多糖は、約60%超のシアル酸レベルを有する。

【0268】

一実施形態において、免疫原性組成物は、GBS多糖-タンパク質コンジュゲート、ヒスチジン、ポリソルベート-80、塩化ナトリウム、および場合によりリン酸アルミニウムを含み、組成物は、約6.0から約7.0のpHに緩衝されている。

【0269】

1つの特定の実施形態において、免疫原性組成物は、GBS多糖-タンパク質コンジュゲート、ヒスチジン、ポリソルベート-80、塩化ナトリウム、および場合によりリン酸アルミニウムを含み、組成物は、約6.0から約7.0のpHに緩衝されており、莢膜多糖は、約60%超のシアル酸レベルを有する。

30

【0270】

好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、約5mcg/mlから約50mcg/mlのGBS多糖-タンパク質コンジュゲート、約10mMから約25mMのヒスチジン、約0.01%から約0.03% (v/w) のポリソルベート-80、約10mMから約250mMの塩化ナトリウム、および場合により約0.25mg/mlから約0.75mg/mlのアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含み、ここで、莢膜多糖は、約60%超のシアル酸レベルを有する。

40

【0271】

別の実施形態において、免疫原性組成物は、GBS多糖-タンパク質コンジュゲート、リン酸塩、ポリソルベート-80、塩化ナトリウム、およびリン酸アルミニウムを含み、ここで、組成物は、約6.0から約7.5のpHに緩衝されている。

【0272】

追加の実施形態において、免疫原性組成物は、GBS多糖-タンパク質コンジュゲート、リン酸塩、ポリソルベート-80、塩化ナトリウム、およびリン酸アルミニウムを含み、ここで、組成物は、約6.0から約7.5のpHに緩衝されており、莢膜多糖は、約60%超のシアル酸レベルを有する。

50

【0273】

好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、約5mcg/mlから約50mcg/mlのGBS多糖-タンパク質コンジュゲート、約10mMから約25mMのリン酸塩、約0.01%から約0.03%(v/w)のポリソルベート-80、約10mMから約350mMの塩化ナトリウム、および約0.25mg/mlから約0.75mg/mlのアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含み、ここで、莢膜多糖は、約60%超のシアル酸レベルを有する。

【0274】

1つのそのような実施形態において、免疫原性組成物は、少なくとも2つのGBS多糖-タンパク質コンジュゲート、緩衝剤、界面活性剤、賦形剤、および場合によりアジュバントを含み、組成物は、約6.0から約7.5のpHに緩衝されており、コンジュゲートは、B群レンサ球菌(GBS)血清型IVならびにIa、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。

10

【0275】

1つの特定の実施形態において、免疫原性組成物は、少なくとも2つのGBS多糖-タンパク質コンジュゲート、ヒスチジン、ポリソルベート-80、塩化ナトリウム、および場合によりリン酸アルミニウムを含み、組成物は、約6.0から約7.0のpHに緩衝されており、コンジュゲートは、B群レンサ球菌(GBS)血清型IVならびにIa、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。

20

【0276】

好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、約5mcg/mlから約50mcg/mlずつの少なくとも2つのGBS多糖-タンパク質コンジュゲート、約10mMから約25mMのヒスチジン、約0.01%から約0.03%(v/w)のポリソルベート-80、約10mMから約250mMの塩化ナトリウム、および場合により約0.25mg/mlから約0.75mg/mlのアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含み、コンジュゲートは、B群レンサ球菌(GBS)血清型IVならびにIa、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。

30

【0277】

別の特定の実施形態において、免疫原性組成物は、少なくとも2つのGBS多糖-タンパク質コンジュゲート、リン酸塩、ポリソルベート-80、塩化ナトリウム、およびリン酸アルミニウムを含み、組成物は、約6.0から約7.5のpHに緩衝されており、コンジュゲートは、B群レンサ球菌(GBS)血清型IVならびにIa、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。

【0278】

1つの好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、約5mcg/mlから約50mcg/mlずつの少なくとも2つのGBS多糖-タンパク質コンジュゲート、約10mMから約25mMのリン酸塩、約0.01%から約0.03%(v/w)のポリソルベート-80、約10mMから約350mMの塩化ナトリウム、および約0.25mg/mlから約0.75mg/mlのアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含み、ここで、コンジュゲートは、B群レンサ球菌(GBS)血清型IVならびにIa、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む。

40

【0279】

免疫原性組成物の評価

種々のインビトロ試験を使用して、本発明の免疫原性組成物の免疫原性を評定する。例えば、インビトロオプソニンアッセイは、レンサ球菌細胞、問題の抗原に対する特異的抗

50

体を含有する熱不活性化血清、および外因性補体源の混合物と一緒にインキュベートすることによって行われる。オプソニン食作用は、新たに単離された多形核細胞（PMN）またはHL60等の分化したエフェクター細胞および抗体／補体／レンサ球菌細胞混合物のインキュベーション中に進行する。抗体および補体でコーティングされた細菌細胞は、オプソニン食作用時に死滅する。オプソニン食作用から回収される生存細菌のコロニー形成単位（cfu）は、アッセイ混合物を平板培養することによって決定される。力価は、アッセイ対照との比較によって決定された際に、50%細菌死滅を与える最高希釈の逆数として報告される。

【0280】

全細胞ELISAアッセイを使用して、抗原のインビトロ免疫原性および表面露出を評価してもよく、目的の細菌株（S. アガラクティエ（*S. agalactiae*））を、96ウェルプレート等のプレート上にコーティングし、免疫化された動物由来の試験血清を、細菌細胞と反応させる。試験抗原に特異的な抗体が抗原の表面露出エピトープと反応性であれば、当業者に公知の標準的な方法によって検出することができる。代替として、フローサイトメトリーを使用して、莢膜多糖抗原の表面露出およびモノクローナル抗体を包含する抗体の特異性を測定してもよい。

【0281】

次いで、所望のインビトロ活性を実証している抗原を、インビボ動物接種モデルにおいて試験してもよい。ある特定の実施形態において、免疫原性組成物は、当業者に公知である免疫化の方法および経路（例えば、鼻腔内、非経口、経口、経直腸、膈内、経皮、腹腔内、静脈内、皮下等）により、動物（例えば、マウス）の免疫化において使用される。GBS免疫原性組成物による動物の免疫化の後、動物に、ストレプトコッカス・アガラクティエ（*Streptococcus agalactiae*）株を接種し、レンサ球菌感染に対する抵抗についてアッセイする。

【0282】

一実施形態において、病原体フリーのマウスを免疫化し、S. アガラクティエ（*S. agalactiae*）を接種する。例えば、マウスを、免疫原性組成物中の1または複数回用量の所望の抗原で免疫化する。その後、マウスにS. アガラクティエ（*S. agalactiae*）を接種し、接種後、経時的に生存をモニターする。

【0283】

使用方法

「免疫不全である」は、本明細書において使用される場合、免疫系の細胞性および／または体液性アームに関して欠損を患っている対象を指す。したがって、免疫プロセスにおけるわずかな機能障害から完全な免疫抑制まで変動する、免疫機能における欠損の程度が企図されている。

【0284】

「対象」という用語は、哺乳動物、鳥、魚、爬虫類、または任意の他の動物を指す。「対象」という用語は、ヒトも包含する。「対象」という用語は、家庭用ペットも包含する。家庭用ペットの非限定的な例は、イヌ、ネコ、ブタ、ウサギ、ラット、マウス、スナネズミ、ハムスター、モルモット、フェレット、鳥、ヘビ、トカゲ、魚、カメおよびカエルを包含する。「対象」という用語は、家畜動物も包含する。家畜動物の非限定的な例は、アルパカ、バイソン、ラクダ、ウシ、シカ、ブタ、ウマ、ラマ、ラバ、ロバ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、トナカイ、ヤク、ニワトリ、ガチョウおよびシチメンチョウを包含する。

【0285】

本明細書において使用される場合、「治療」（その変化形、例えば、「治療する」または「治療される」を包含する）は、下記のうちのいずれか1つまたは複数を指す：（i）伝統的なワクチンのような、感染または再感染の予防、（ii）症状の重症度低減または排除、および（iii）問題の病原体または障害の実質的なまたは完全な排除。それ故、治療は、予防的に（感染前に）または治療的に（感染後に）達成され得る。本発明において、予防的または治療的治療を使用することができる。本発明の特定の実施形態によれば

10

20

30

40

50

、微生物感染（例えば、*S. アガラクティエ*（*S. agalactiae*）等の細菌）に対して宿主動物を、予防的にかつ／または治療的に免疫化することを包含し、治療する組成物および方法が提供される。本発明の方法は、予防的および／または治療的免疫を対象に付与するために有用である。本発明の方法は、生物医学研究用途のために対象において実施することもできる。

【0286】

別の態様において、本発明は、対象に、有効量の本明細書において記述されている免疫原性組成物を投与することにより、対象においてGBSに対する免疫応答を誘発する方法に関する。一実施形態において、本発明は、対象に、有効量の本明細書において記述されている免疫原性組成物を投与することにより、対象においてB群レンサ球菌に関連する疾患または状態を予防するまたは低減させる方法に関する。ある態様において、本発明は、医薬として使用するための、本明細書において記述されている免疫原性組成物に関する。ある態様において、本発明は、対象においてGBSに対する免疫応答を誘発する方法において使用するための、本明細書において記述されている免疫原性組成物に関する。特定の実施形態において、対象は、妊娠を計画している女性または妊娠中の女性である。1つのそのような実施形態において、妊娠中の女性は、少なくとも妊娠20週または少なくとも27週等、妊娠後半期である。好ましい実施形態において、妊娠中の女性は、妊娠27週から36週である。別の実施形態において、対象は、50歳以上、65歳以上、および85歳以上の成人等の高齢者である。さらなる実施形態において、対象は、免疫不全である。一態様において、対象は、肥満、糖尿病、HIV感染、がん、心血管疾患または肝疾患からなる群から選択される医学的状态を有し得る。好ましい実施形態において、B群レンサ球菌は、*S. アガラクティエ*（*S. agalactiae*）である。

【0287】

一実施形態において、免疫原性組成物は、GBS血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型を含む多糖-タンパク質コンジュゲートを含む。別の実施形態において、コンジュゲートは、GBS血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも2つの追加の血清型を含む。追加の実施形態において、コンジュゲートは、GBS血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも3つの追加の血清型を含む。また別の実施形態において、コンジュゲートは、GBS血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも4つの追加の血清型を含む。特定の実施形態において、コンジュゲートは、GBS血清型Ia、Ib、II、IIIおよびIVを含む。さらなる実施形態において、コンジュゲートは、GBS血清型IVならびに血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも5つの追加の血清型を含む。さらなる実施形態において、組成物は、GBS血清型Vを含む。特定の実施形態において、コンジュゲートは、GBS血清型Ia、Ib、II、IIIおよびVを含む。好ましい実施形態において、免疫原性組成物は、GBS血清型Ia、Ib、II、III、IVおよびV由来の6つの多糖-タンパク質コンジュゲートを含む。本発明の一態様は、免疫干渉を有さない免疫原性組成物に関する。

【0288】

免疫原性組成物の免疫原性または有効量は、対象を漸増量の免疫原性組成物で免疫化し、免疫応答を分析して最適投薬量を決定する、用量応答研究を行うことにより、決定することができる。研究の出発点は、動物モデルにおける免疫化データから推測することができる。投薬量は、個体の具体的な条件に応じて変動し得る。量は、当業者に公知の手段により、日常的検査で決定することができる。

【0289】

適切な用量数の、免疫学的有効量の免疫原性組成物を対象に投与して、免疫応答を導出

する。投薬量は、年齢および体重等、個体の具体的な条件に応じて変動し得る。この量は、当業者に公知の手段により、日常的検査で決定することができる。

【0290】

一実施形態において、本発明の免疫原性組成物が投与された患者は、*S. アガラクティエ* (*S. agalactiae*) 保菌率の低減を示す。免疫原性組成物の投与後の、そのような保菌の低減または非保菌者として過ごした時間間隔の延長は、医療ニーズの視点から有意である。例えば、保菌者における *S. アガラクティエ* (*S. agalactiae*) 保菌全体の低減は、本発明の免疫原性組成物の1回用量後に評定され得る。例えば、免疫原性組成物の投与1日前に、18～50歳の成人の群を、鼻、喉、腋窩、直腸、会陰および膣スワブによって保菌についてスクリーニングし、続いて、培養して、保菌状態を決定することができる。次に、その群に本発明の免疫原性組成物を投与し、ある群には対照を受けさせることができる。免疫原性組成物の投与後、鼻、喉、腋窩、直腸、会陰および膣スワブを12週間にわたって毎週および最大6カ月間毎月実行し、プラシーボと比較する。1つのプライマリーエンドポイントは、免疫原性組成物の投与後の患者における保菌率を、免疫化後3カ月の間隔でプラシーボと比較することである。

【0291】

抗体

「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を介して、標的、例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等と特異的結合することができる、免疫グロブリン分子である。本明細書において使用される場合、文脈上別段の指示がない限り、該用語は、無傷のポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけでなく、操作された抗体（例えば、エフェクター機能、安定性および他の生物学的活性を改変するために、キメラ、ヒト化および／または誘導体化されたもの）およびその断片（Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv等）、単鎖（ScFv）ならびにサメおよびラクダ抗体を包含するドメイン抗体）、および抗体部分を含む融合タンパク質、多価抗体、多重特異性抗体（例えば、それらが所望の生物学的活性を呈する限り、二重特異性抗体）および本明細書において記述されている通りの抗体断片、ならびに抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された配置を網羅することも意図されている。抗体は、任意のクラス、例えば、IgG、IgAまたはIgM等（またはそれらのサブクラス）の抗体を包含し、抗体は、任意の特定のクラスのものである必要はない。その重鎖の定常ドメインの抗体のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラスに割り当てることができる。5つの主要なクラスの免疫グロブリン：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、ヒトにおいてはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2にさらに分けられてよい。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミューと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元配置は周知である。

【0292】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部分のみを含み、該部分は、好ましくは、無傷の抗体中に存在する場合、その部分に通例関連する機能のうちの少なくとも1つ、好ましくはほとんどまたはすべてを保持している。

【0293】

抗体の「機能的活性」または「機能的抗体」は、本明細書において使用される場合、最低でも抗原と特異的に結合することができる抗体を指す。追加の機能は当技術分野において公知であり、オプソニン化、ADCCまたは補体媒介性細胞毒性を介するもの等、病原体のクリアランスまたは死滅を達成する免疫系の追加の成分を包含し得る。抗原結合後、その後のあらゆる抗体機能は、抗体のFc領域を介して媒介され得る。抗体オプソニン食作用アッセイ（OPA）は、エフェクター細胞（白血球）による細菌のインビトロIg補体補助死滅を測定するように設計されたインビトロアッセイであり、故に、生物学的プロセスを模倣している。抗体結合は、それが結合している抗原の生物学的機能を直接的に阻

害する場合もある。一部の実施形態において、「機能的抗体」は、動物効力モデルにおける細菌の死滅または抗体が細菌を死滅させることを実証するオプソニン食作用死滅アッセイによって測定した場合に機能的である抗体を指す。

【0294】

一態様において、本発明は、本明細書において記述されている多糖と特異的に結合する単離された抗体またはその断片に関する。「単離された」抗体は、本明細書において使用される場合、その自然環境の成分から同定され、分離および／または回収された抗体を指す。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断的または治療的使用に干渉し、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を包含し得る材料である。例示的な実施形態において、抗体は、(1) ローリー法によって決定された際に、95重量%の抗体、最も好ましくは99重量%超まで、(2) スピニングカップシークエネーターの使用によってN-末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15の残基を取得するのに十分な程度まで、または(3) クマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を使用する還元もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEにより均質まで、精製されることになる。単離された抗体は、抗体の自然環境のうちの少なくとも1つの成分が存在しないと予想されることから、組換え細胞内にインサイチュで抗体を包含する。しかしながら、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製されることになる。

【0295】

特定の多糖または特定の多糖上のエピトープ「と特異的に結合している」または「に特異的な」抗体は、いかなる他の多糖または多糖エピトープとも特異的に結合することなく、特定の多糖または特定の多糖上のエピトープと結合しているものである。

【0296】

「標識」という語は、本明細書において使用される場合、「標識」抗体を産生するように抗体と直接的にまたは間接的にコンジュゲートしている、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であってもよいし(例えば、放射性同位体標識または蛍光標識)、酵素標識の場合、検出可能である基質化合物または組成物の化学的改変を触媒していてもよい。

【0297】

本発明は、本発明の免疫原性組成物の1つまたは複数の抗原と特異的にかつ選択的に結合している抗体および抗体組成物をさらに提供する。一部の実施形態において、抗体は、本発明の免疫原性組成物の対象への投与時に産生される。一部の実施形態において、本発明は、本発明の免疫原性組成物の抗原のうちの1つまたは複数に向けられた精製または単離された抗体を提供する。一部の実施形態において、本発明の抗体は、いずれかの動物効力モデルにおいて細菌を死滅させることによってまたはオプソニン食作用死滅アッセイを介して測定した場合、機能的である。一部の実施形態において、本発明の抗体は、対象に受動免疫を付与する。本発明はさらに、本発明の抗体または抗体断片をコードするポリヌクレオチド分子、ならびに、当業者に周知の技術を使用して本発明の抗体または抗体組成物を生成する細胞または細胞株(ハイブリドーマ細胞または抗体の組換え生成のための他の操作された細胞株等)およびトランスジェニック動物を提供する。

【0298】

本発明の抗体または抗体組成物は、対象においてS. アガラクティエ(S. agalactiae)に関連するレンサ球菌感染、疾患または状態を治療するまたは予防する方法であって、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体調製物を産生するステップと、前記抗体または抗体組成物を使用して、対象に受動免疫を付与するステップとを含む方法において使用され得る。本発明の抗体は、診断方法、例えば、本発明の免疫原性組成物の1つまたは複数の抗原の存在を検出することまたはそのレベルを定量化することにも有用となり得る。

【0299】

本発明の多糖等の繰り返し構造に対する抗体応答は、いくつかの独自の特色を呈し得る。例えば、繰り返し単位の規則性は、非常に様々な分子量の抗原分子が、多糖に対して特

10

20

30

40

50

異的な抗体と結合できることを意味し得る。より長い多糖の第二の繰り返し構造は、T細胞非依存性抗体応答を誘発することができる。したがって、T細胞ヘルパーエпитープを有するタンパク質担体とコンジュゲートしている多糖を使用する場合、T細胞非依存性およびT細胞依存性抗体応答の両方を刺激することができる。したがって、免疫応答は、多糖サイズの適切な選択によって、担体タンパク質が使用されるか否かにかかわらず、修飾することができる。

【0300】

ポリクローナル抗体

ある特定の実施形態において、抗多糖抗体は、ポリクローナル抗体である。本明細書において定義されている通りのポリクローナル抗体は、血清の調製物に由来し、かつ異なるB細胞クローンを起源とする異なる特異性を有する抗体の混合物を指す。ポリクローナル抗体の調製および特徴付けは、当技術分野において公知である。

【0301】

ポリクローナル抗体は、免疫原または本明細書において記述されている免疫原性組成物の1または複数回の注射、ならびに、所望ならば、アジュバント、緩衝剤および／または希釈剤を投与することによって、対象において、例えば哺乳動物において育てられる。ある範囲の動物種が、特異的抗血清の生成に有用となり得る。典型的には、抗糖ポリクローナル抗血清の生成に使用される動物は、非ヒト霊長類、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、マウス、ラット、ハムスターまたはモルモットである。典型的には、免疫原または免疫原性組成物は、アジュバントを加えてまたは加えずに、複数回の注射によって哺乳動物に注射される。免疫原性材料は、多糖、オリゴ糖、多糖、本明細書において記述されている多糖-タンパク質コンジュゲート、または免疫原のより大きい集合体を包含し得る。典型的には、初回免疫化後初めの2～6週間、免疫化された動物から血液を収集し、凝固させ、血清を採取する。血清は、免疫化された動物由来の抗糖ポリクローナル抗体を含有し、多くの場合、抗血清と称される。

【0302】

モノクローナル抗体

抗糖モノクローナル抗体は、公知のハイブリドーマ技術の使用を介して調製され得る。典型的には、モノクローナル抗体を調製することは、多糖、オリゴ糖、多糖または本発明の多糖-タンパク質コンジュゲートを含む選択された免疫原で、好適な標的動物宿主を最初に免疫化することを伴う。所望ならば、アジュバント、緩衝剤および／または希釈剤が包含されてもよい。免疫化は、多糖またはそのコンジュゲートと特異的に結合している抗体を生成するまたは発現するようにBリンパ球を導くために十分な様式で行われる。代替として、リンパ球はインビトロで免疫化される。

【0303】

次いで、リンパ球を、ポリエチレングリコール等の好適な融合剤を使用して不死化細胞株と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成する。リンパ球の起源は、モノクローナル抗体がヒトまたは動物起源のいずれであるかを決定する。概して、末梢血リンパ球（「PBL」）は、ヒト起源の抗体および細胞が所望される場合に使用され、脾臓細胞またはリンパ節細胞は、非ヒト哺乳動物起源が所望される場合に使用される。

【0304】

不死化細胞株は、典型的には、形質転換された哺乳動物細胞、特に、げっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞である。通常は、ラットまたはマウス骨髓腫細胞株が用いられる。ハイブリドーマ細胞は、融合していない不死化細胞の成長または生存を阻害する1つまたは複数の物質を好ましくは含有する好適な培養培地中で培養される。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPR T）を欠いている場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（「HAT培地」）を包含することになり、この物質は、HGPRT欠損細胞の成長を防止する。

【0305】

不死化細胞株は、起源、融合および成長特徴の種等の実施上の配慮点で選択される。例えば、好適な不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞によって抗体の安定した高レベルの発現を支持し、HAT培地等の培地に感受性であるものである。不死化細胞株の例は、ネズミ骨髄腫株を包含する。ヒト骨髄腫およびマウスーヒトヘテロミエローマ細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の生成について記述されている。

【0306】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞によって培養培地中に分泌される。次いで、培養培地を、多糖を認識し結合するモノクローナル抗体の存在についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって生成される特定のモノクローナル抗体の抗多糖結合特異性は、当業者に周知である多数の手順のうちの1つによって決定される。例えば、抗体結合特異性は、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）または表面プラズモン共鳴（例えば、ピアコア）によって決定され得る。モノクローナル抗体によって認識された正確なエピトープは、エピトープマッピングによって決定される。そのような技術およびアッセイは、当技術分野において周知である。

【0307】

所望の特異性を持つハイブリドーマ細胞生成抗体が同定された後、クローンを限界希釈によってサブクローン化し、標準的な方法を使用して培養する。この目的に好適な培養培地は、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地およびRPMI-1640培地を包含する。代替として、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水のようにインビボで成長する。サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析または親和性クロマトグラフィー等によって、培養培地または腹水液から単離し、精製する。

【0308】

代替として、所望の特異性を有する、所望の種の起源由来の抗体は、ファージディスプレイライブラリーの使用を介して取得することができる。加えて、抗体ディスプレイライブラリーを産生しスクリーニングする際に使用するのに特に適している方法および試薬の例は、当技術分野において見ることができる。

【0309】

抗体の使用

一態様において、本発明は、GBS抗体および／または抗体断片を生成するための、本明細書において記述されている免疫原性組成物の使用に関する。本明細書において記述されている多糖-タンパク質コンジュゲートおよび／またはそれから産生された抗体は、ELISAおよびマイクロアレイ関連技術を含む当業者に公知の様々な免疫診断技術において使用され得る。加えて、これらの試薬は、例えば、免疫原性多糖コンジュゲートに対する血清抗体レベルを含む抗体応答を評価するために使用され得る。本発明のアッセイ方法論は、蛍光、化学発光、放射性、酵素標識もしくは染料分子等の標識、ならびに／または生物学的試料中の抗原もしくは抗体および固体支持体と結合している対応する抗体もしくは抗原の間の複合体の直接的または間接的検出のための二次免疫学的試薬の使用を伴い得る。

【0310】

生成された抗体または抗体断片は、受動免疫療法において、またはレンサ球菌感染に対する予防のためにも有用であり得る。

【0311】

多糖を生成する方法

また別の態様において、本発明は、本明細書において記述されている多糖を生成するための方法に関する。方法は、GBSを培養するステップと、細菌によって生成された多糖を収集するステップとを包含する。一実施形態において、GBSは、S. アガラクティエ（S. agalactiae）を包含する。細菌は、S. アガラクティエ（S. agal

10

20

30

40

50

a c t i a e) の任意の株であってもよい。好ましい実施形態において、細菌は、S. アガラクティエ (S. a g a l a c t i a e) の被包性株である。本発明において使用するためのS. アガラクティエ (S. a g a l a c t i a e) 株は、090、A909 (ATCC受託番号BAA-1138)、515 (ATCC受託番号BAA-1177)、B523、CJB524、MB4052 (ATCC受託番号31574)、H36B (ATCC受託番号12401)、S40、S42、MB4053 (ATCC受託番号31575)、M709、133、7357、PFEGBST0267、MB4055 (ATCC受託番号31576)、18RS21 (ATCC受託番号BAA-1175)、S16、S20、V8 (ATCC受託番号12973)、DK21、DK23、UAB、5401、PFEGBST0708、MB4082 (ATCC受託番号31577)、M132、110、M781 (ATCC受託番号BAA-22)、D136C (3) (ATCC受託番号12403)、M782、S23、120、MB4316 (M-732; ATCC受託番号31475)、M132、K79、COH1 (ATCC受託番号BAA-1176)、PFEGBST0563、3139 (ATCC受託番号49446)、CZ-NI-016、PFEGBST0961、1169-NT1、CJB111 (ATCC受託番号BAA-23)、CJB112、2603V/R (ATCC受託番号BAA-611)、NCTC10/81、CJ11、PFEGBST0837、118754、114852、114862、114866、118775、B4589、B4645、SS1214、CZ-PW-119、7271、CZ-PW-045、JM9130013、JM9130672、IT-NI-016、IT-PW-62、およびIT-PW-64を包含する。

【0312】

本明細書において記述されている多糖は、GBSを適切な培地中で培養することによって生成され得る。適切な培地は、コロンビアブロスを包含し得る。培地は、デキストロース、ヘミンおよび／またはグルコースを包含し得る。好ましくは、培地は、コロンビアブロスおよびデキストロースを包含する。S. アガラクティエ (S. a g a l a c t i a e) がコロンビアブロスおよびデキストロースを使用して培養される場合、好ましくは、培養のための温度は、20から40℃、好ましくは37℃である。好ましい実施形態において、細菌は、好気条件下で培養される。別の好ましい実施形態において、細菌は、12から60時間にわたって培養される。

【0313】

多糖は、培養物から標的物質を収集するための当業者において公知の方法、例えば、加熱、酵素処理、遠心分離、沈殿、活性炭による処理、および／または濾過等を使用することにより、取得された培養物から収集され得る（例えば、米国特許出願公開第2006/0228380号、同第2006/0228381号、同第2007/0184071号、同第2007/0184072号、同第2007/0231340号および同第2008/0102498号；国際特許出願公開第WO2008/118752号を参照）。一実施形態において、細菌および多糖を含有する培養物を遠心分離し、酵素、例えば、リゾチーム、RNアーゼ、DNアーゼ、プロナーゼ、ムタノリシン、およびそれらの混合物等で処理する。例えば、一実施形態において、取得された上清に適切な有機溶媒を添加して、タンパク質を沈殿させ、沈殿物を遠心分離によって除去する。次いで、上清に適切な有機溶媒をさらに添加することによって多糖を沈殿させてよく、遠心分離によって多糖を収集してよい。より具体的には、本明細書において記述されている多糖は、エタノールを、約25体積%の最終濃度で、細菌が除去された上清に添加し、タンパク質を含有する沈殿物を遠心分離によって除去し、それにエタノールを約75体積%の最終濃度までさらに添加し、次いで、遠心分離によって沈殿物を収集することによって取得され得る。得られた沈殿物を、窒素で乾燥させてよい。得られた沈殿物を、トリスおよび0.05%アジ化Naに再懸濁してよい。

【0314】

本発明のさらなる態様は、N-およびO-アセチル基を保存しながら、ほぼ無傷の高分子量CPの単離のために誘導体化ヒドロキシルアミン化合物等の有機試薬を使用する新規

方法を提供する。この方法は、細胞を溶菌しないため、遠心分離によって単離されたCPは、細胞内成分による汚染が最小限であり、より高い全収率につながり得る。その上、これらの試薬は、その複数のホスホジエステル結合により、B群抗原不純物を非常に小さい断片に開裂し、これは、血液透析濾過によって簡単に除去することができる。

【0315】

一実施形態において、CPは、ヒドロキシルアミンを、莢膜多糖生産菌を含む細胞ペーストと反応させることによって単離される。特定の実施形態において、方法は、遠心分離するステップをさらに含む。別の実施形態において、方法は、濾過するステップをさらに含む。また別の実施形態において、莢膜多糖生産菌は、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、チフス菌 (*Salmonella typhi*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) および大便レンサ球菌 (*Enterococcus faecalis*) からなる群から選択される。

【0316】

本発明のある態様において、ヒドロキシルアミンは、実施例2の表2に記載されたものであってもよい。好ましい実施形態において、ヒドロキシルアミンは、ジベンジルヒドロキシルアミン、ジエチルヒドロキシルアミン、ヒドロキシルアミン、エチレンジアミン、トリエチレンテトラミン、1, 1, 4, 7, 10, 10ヘキサメチルトリエチレンテトラミンおよび2, 6, 10, トリメチル2, 6, 10トリアザウンデカンからなる群から選択される。

【0317】

本発明の一態様において、ヒドロキシルアミンの濃度は、約5mMから約200mM、例えば、約5mMから約150mM、約5mMから約100mM、約5mMから約75mM、約5mMから約50mM、約5mMから約25mM、約5mMから約10mM、10mMから約200mM、例えば、約10mMから約150mM、約10mMから約100mM、約10mMから約75mM、約10mMから約50mM、約10mMから約25mM、約25mMから約200mM、約25mMから約150mM、約25mMから約100mM、約25mMから約75mM、約25mMから約50mM、約50mMから約200mM、約50mMから約150mM、50mMから約100mMおよび約50mMから約75mM等である。

【0318】

別の態様において、反応のpHは、約5.5から約9.5、例えば、約5.5から約9.0、約5.5から約8.5、約5.5から約8.0、約5.5から約7.5、約5.5から約7.0、約5.5から約6.5、約6.0から約9.5、約6.0から約9.0、約6.0から約8.5、約6.0から約8.0、約6.0から約7.5、約6.0から約7.0、約6.5から約9.5、約6.5から約8.5、約6.5から約8.0、約6.5から約7.5、約7.0から約9.5、約7.0から約9.0、7.0から約8.5および約7.0から約8.0等に維持される。

【0319】

本発明のさらなる態様において、反応は、約20℃から約85℃、例えば、約20℃から約80℃、約20℃から約75℃、約20℃から約70℃、約20℃から約65℃、約20℃から約60℃、約20℃から約55℃、約20℃から約50℃、約25℃から約85℃、約25℃から約80℃、約25℃から約75℃、約25℃から約70℃、約25℃から約65℃、約25℃から約60℃、約25℃から約55℃、約25℃から約50℃、約30℃から約85℃、約30℃から約80℃、約30℃から約75℃、約30℃から約70℃、約30℃から約65℃、約30℃から約60℃、約30℃から約55℃、約30

℃から約50℃、約35℃から約85℃、約35℃から約80℃、約35℃から約75℃、約35℃から約70℃、約35℃から約65℃、約35℃から約60℃、約35℃から約55℃、約40℃から約85℃、約40℃から約80℃、約40℃から約75℃、約40℃から約70℃、約40℃から約65℃、約40℃から約60℃、約45℃から約85℃、約45℃から約80℃、約45℃から約75℃、約45℃から約70℃、約45℃から約65℃、約50℃から約85℃、約50℃から約80℃、約50℃から約75℃、約50℃から約70℃、約55℃から約85℃、約55℃から約80℃、約55℃から約75℃、約60℃から約85℃および約65℃から約85℃等の温度で起こる。

【0320】

また別の態様において、反応時間は、約10時間から約90時間、例えば、約10時間から約85時間、約10時間から約80時間、約10時間から約75時間、約10時間から約70時間、約10時間から約60時間、約10時間から約50時間、約10時間から約40時間、約10時間から約30時間、約10時間から約25時間、約10時間から約20時間、約10時間から約15時間、約15時間から約90時間、約15時間から約85時間、約15時間から約80時間、約15時間から約75時間、約15時間から約70時間、約15時間から約60時間、約15時間から約50時間、約15時間から約40時間、約15時間から約30時間、15時間から約20時間、例えば、約20時間から約90時間、約20時間から約85時間、約20時間から約80時間、約20時間から約75時間、約20時間から約70時間、約20時間から約60時間、約20時間から約50時間、約20時間から約40時間、約20時間から約30時間および約20時間から約25時間等である。

【0321】

代替として、本発明の別の実施形態において、多糖は、化学的に合成される。多糖は、従来の方法に従って、化学的に合成され得る。

【0322】

本発明のまた別の実施形態において、多糖は、多糖を生成するための生合成経路をクローン化し発現した後、代理宿主における発現によって調製される。例えば、宿主細胞は、本明細書において記述されている多糖と構造的類似性を有する多糖を生成するように修飾されてよく、宿主細胞において生成された多糖の繰り返し単位は、本明細書において記述されている多糖の繰り返し単位と部分的に同一である。多糖は、本明細書において記述されている多糖と構造的に同様であり、例えば、多糖の繰り返し単位が不明の分枝を有するならば、本明細書において記述されている多糖の繰り返し単位と比較した場合に、サイズが不均一であり、かつ／または分枝配置が不均一である。好ましくは、宿主細胞は、細菌宿主細胞である。

【実施例】

【0323】

下記の例は、本発明の一部の実施形態を実証するものである。しかしながら、これらの例は、例証のみのためのものであり、本発明の条件および範囲について完全に決定的であることを主張するものではないことを理解されたい。典型的な反応条件（例えば、温度、反応時間等）が与えられている場合、概してあまり好都合ではないが、指定された範囲の上下両方の条件も使用できることを理解すべきである。本明細書において言及されるすべての部およびパーセントは、重量ベースであり、すべての温度は、別段の定めがない限り、摂氏度で表現される。

【0324】

さらに、下記の例は、別途詳細に記述されている場合を除き、当業者に周知かつ日常的である標準的な技術を使用して行った。上記で注記した通り、下記の例は、例証を目的として提示されるものであり、本発明の範囲をいかにようにも限定するものとして解釈されるべきではない。

【0325】

（実施例1）

Ｏ－脱アセチル化されている多糖を用いる多糖－タンパク質コンジュゲートの調製

それぞれの血清型についての *S. agalactiae* (S. agalactiae) 株を、限定培地中、pH制御した深部培養において発酵させた。使用した手順および培地は、実験を介して最適化したものであり、von Hunolstein, C. ら、Appl. Micro. Biotech. 38 (4) : 458~462 (1993) において以前に記述された基本技術の拡張であった。莢膜多糖を、NaOH処理によって細胞から除去した。浄化後、一連のUF/DF、沈殿および炭素濾過ステップにより、精製された多糖を生じさせた。例えば、米国特許第8,652,480号を参照されたい。還元的アミノ化学を使用して、活性化多糖をCRM197とコンジュゲートさせた。例えば、米国特許第5,360,897号を参照されたい。

【0326】

(実施例2)

Ｏ－アセチル化されている多糖の単離

発酵ブロス(1.2L)の熱での死滅および遠心分離後に取得されたGBS莢膜多糖(CP)血清型Ia由来の細胞ペーストを、175mLの25mMリン酸カリウム緩衝剤(25mM、pH6.9)に再懸濁した。懸濁液を、10mMの最終濃度まで、ヒドロキシルアミノ－スルホン酸水溶液と混合した。懸濁液のpHは、約5.8であると決定された。懸濁液を、55℃で72時間にわたって攪拌した。その後、懸濁液を10,000rpm前後で遠心分離し、上清を収集した。粗製開裂CPを含有する上清を、分子量および収率について分析した。残りの部分を、注射用水(WFI)を使用する30kDaのMWCO膜を使用して、血液透析濾過による精製に供した。精製された多糖を、多角度光散乱検出器と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-MALS)によって、分子量についてさらに分析した(表1)。

【0327】

【表1】

表 1. 血液透析濾過による GBS 血清型 Ia の精製

試料	分子量(kDa)	多分散性(PD)
粗製	340	1.2
精製された多糖	320	1.3

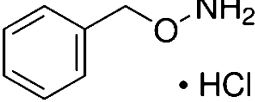
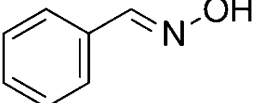
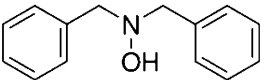
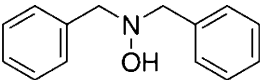
【0328】

いくつかのヒドロキシルアミン、窒素および酸素置換両方の化合物を、上述した方法を使用してそれらの活性についてスクリーニングした。収率は、屈折率(RI)応答および0.135の具体的な屈折率増分(dn/dc)の二乗値を使用する粗製上清の多角度光散乱検出と組み合わせたゲル浸透クロマトグラフィー(GPC-MALS)によって算出した。収率は、ヒドロキシルアミンの種類、ならびに濃度、温度および反応時間等の条件の最適化によって決まった(表2を参照)。概して、ヒドロキシルアミン濃度の増大、より高い温度およびより長い反応時間は、より高収率につながる。

【0329】

【表 2 - 1】

表 2. 種々のヒドロキシルアミンのスクリーニングおよび
GBS 莢膜多糖血清型 Ia の条件の最適化

実験 番号	試薬	濃度 (Mm)	温度 (°C)	時間 (時)	収 率 /1L 発酵	多糖 分子量 (kDa)	多分散 性(PD)
1	 O-ベンジルヒドロキシルア ミン塩酸塩	10	55	72	42	2240	1.2
2	 ベンズアルデヒドオキシム	10	55	72	68	1400	1.2
3	 N,N-ジベンジルヒドロキシ ルアミン	10	55	72	101	980	1.3
4	 N,N-ジベンジルヒドロキシ ルアミン	50	55	17	320	590	1.3

【 0 3 3 0 】

10

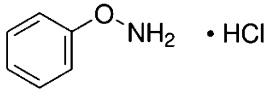
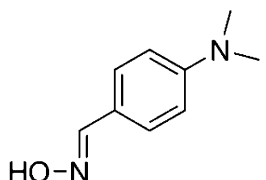
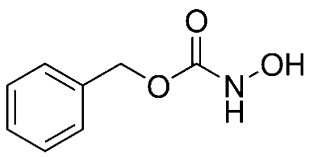
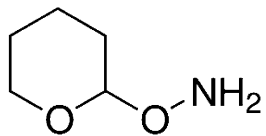
20

30

40

50

【表 2 - 2】

5	 O- フェニルヒドロキシルア ミン塩酸塩	10	55	72	109	850	1.3
6	 4-(ジメチルアミノ)ベンズ アルデヒドオキシム	10	55	72	90	1400	1.2
7	 ベンジル ヒドロキシカルバメート	10	55	84	323	1835	1.5
8	 O-(テトラヒドロ-2H-ピラ ン-2-イル)ヒドロキシルア ミン	10	55	84	304	1270	1.4

【 0 3 3 1】

10

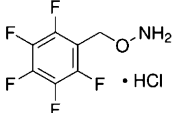
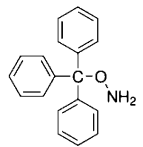
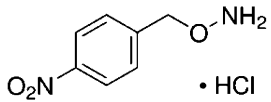
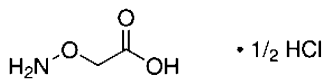
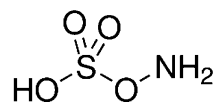
20

30

40

50

【表 2 - 3】

9	 O-((ペルフルオロフェニル)メチル)ヒドロキシルアミン	10	55	84	185	1330	1.6
10	 O-トリチルヒドロキシルアミン	10	55	84	371	1275	1.7
11	 O-(4-ニトロベンジル)ヒドロキシルアミン塩酸塩	10	55	84	190	3500	1.3
12	 2-(アミノオキシ)酢酸塩酸塩	10	55	84	252	2600	1.2
13	 (アミノオキシ)スルホン酸	10	55	84	463	490	1.4

【 0 3 3 2】

10

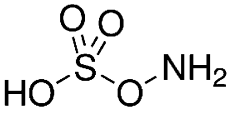
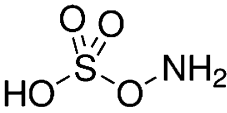
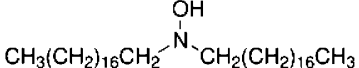
20

30

40

50

【表 2 - 4】

14	 (アミノオキシ)スルホン酸	50	55	17	460	270	1.2
15	 (アミノオキシ)スルホン酸	100	23	21	240	500	1.2
16	 N,N-ジオクタデシルヒド ロキシルアミン	10	55	84	380	4700	1.7

【 0 3 3 3 】

置換および非置換ヒドロキシルアミンは、細胞壁から G B S 莢膜多糖を放出する際に非常に有効であることが分かった。このアプローチは、高分子量 C P S の単離を N - および O - アセチル基の保存とともにもたらす。スクリーニングしたいくつかの化合物の中でも、ジベンジルヒドロキシルアミンが最も有効であることが分かった。データを表 3 に示す（ [ジベンジルヒドロキシルアミン] - 5 0 m M ; p h - 7 ~ 8 ; 温度 - 5 0 ° C ; 時間 - 2 4 時間）。

【 0 3 3 4 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. ジベンジルヒドロキシルアミンを使用する GBS CP 放出データ

GBS 型	Ia	Ib	III
多糖放出収率	86%	81%	46%
全体的な精製収率	63%	54%	30%
分子量(Mw)	330 kDa	212 kDa	171 kDa
O-アセチル化(NMR)	NA	31%	37%
N-アセチル化(NMR)	106%	104%	87%

NA—血清型 Ia は O-アセチル化されていない

【0335】

ジベンジルヒドロキシルアミンは水への溶解度が不十分であるため、ジベンジルヒドロキシルアミンよりも自由に水溶性であり、同様のまたはより高い活性を有する、ヒドロキシルアミンの代替的な誘導体が所望される。少数の化合物をスクリーニングした後、ジエチルヒドロキシルアミンが良好な代替物であることが分かった。データを表 4 に示す（[ジエチルヒドロキシルアミン] — 100 mM；pH — 7～8；温度 — 60℃；時間 — 19 時間）。

【0336】

【表 4】

表 4. ジエチルヒドロキシルアミンを使用する GBS CP 放出データ

GBS 型	Ia	Ib	III
多糖放出収率%	100	94	59
分子量(Mw)	890 kDa	560 kDa	309 kDa

【0337】

ヒドロキシルアミン（ $\text{NH}_2\text{—OH}$ ）も、細胞壁からの CPS 開裂において有効であることが分かった。データを表 5 に示す（[ヒドロキシルアミン] — 100 mM；pH — 7～7.5；温度 — 65℃；時間 — 17 時間）。血清型 III について、収率は、17 時間後には 54% であったが、収率は、3 日半後には最大 70% まで増大した。

【0338】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. ヒドロキシルアミンを使用する GBS CP 放出データ

GBS 型	Ia	III
多糖放出収率%	100	54
分子量(Mw)	1160 kDa	500 kDa

10

【0339】

細胞からの GBS 莢膜多糖の放出についてのオリゴアミンのスクリーニング

ヒドロキシルアミンおよびその置換化合物は、GBS 細胞壁からの莢膜多糖の開裂に非常に効率的であることが分かった。しかしながら、これらは、血清型 II および V についてはあまり効率的でないことが分かった。したがって、オリゴアミンを、複数のアミン官能基によってより活性になり得るという確信により試験した。

20

【0340】

エチレンジアミンは、すべての血清型から莢膜多糖を放出する際に有効であることが分かった。データを表 6 に示す（[エチレンジアミン] – 50 または 100 mM；pH 8.0；16 時間；80℃；25 mM EDTA）。

【0341】

【表 6】

表 6: エチレンジアミンを使用する GBS CP 放出データ

GBS 血清型	回収(%)	分子量(kDa)
Ia	96%	242
Ib	83%	225
II	30%	76
III	68%	94
V	30%	235

30

40

【0342】

他の代表的なオリゴアミンを、血清型 Ia および V 細胞ペーストを使用してそれらの活性について試験したが、同じく血清型 V についてはあまり効率的でないことが分かった。データを表 7（[トリエチレンテトラミン] – 100 mM；pH – 8.9；温度 – 60℃；時間 – 15 時間）、8（[1, 1, 4, 7, 10, 10ヘキサメチルトリエチレンテトラミン] – 10 mM；pH – 6.3；温度 – 60℃；時間 – 20 時間）、および 9（[2, 6, 10, トリメチル 2, 6, 10 トリアザウンデカン] – 10 mM；

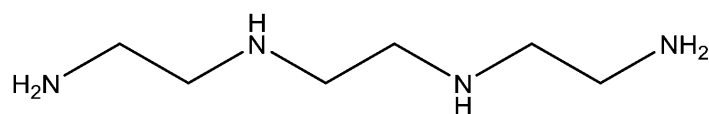
50

pH – 7 ～ 8 ; 温度 – 60℃ ; 時間 – 19時間) に示す。

【0343】

【表7】

表7. トリエチレンテトラミンを使用する GBS CP 放出データ



トリエチレンテトラミン

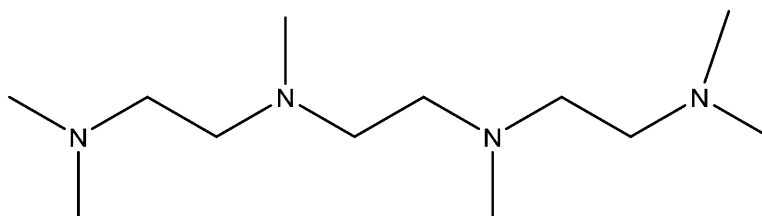
GBS 型	la	V
多糖放出収率%	100	2.5 日後、約 10
分子量(Mw)	1280	nd

nd – 決定されず

【0344】

【表8】

表8. 1,1,4,7,10,10 ヘキサメチルトリエチレンテトラミンを使用する GBS CP 放出データ



1,1,4,7,10,10ヘキサメチルトリエチレンテトラミン

GBS 型	la	V
多糖放出収率%	100	約 1%
分子量(Mw)	980	nd

nd – 決定されず

【0345】

10

20

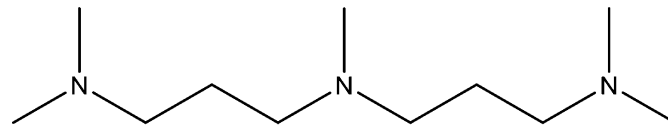
30

40

50

【表 9】

表 9. 2,6,10,トリメチル 2,6,10 トリアザウンデカンを使用する GBS CP 放出データ



2,6,10,トリメチル2,6,10トリアザウンデカン

GBS 型	la	V
多糖放出収率%	100	約 1%
分子量(Mw)	1100	nd

nd = 決定されず

【0346】

(実施例 3)

還元的アミノ化による GBS 莢膜多糖のコンジュゲーション
多糖を活性化する

多糖酸化は、100mMリン酸カリウム緩衝剤 (pH 6.0 ± 0.5) 中、計算量の 500mMリン酸カリウム緩衝剤 (pH 6.0) および注射用水 (WFI) の順次添加によって行い、2.0g/L の最終多糖濃度を得た。必要ならば、反応 pH を、およそ pH 6.0 に調整した。pH 調整後、反応温度を 23℃ に調整した。酸化は、およそ 0.25 モル当量の過ヨウ素酸ナトリウムの添加によって開始した。酸化反応は、およそ 16 時間の間、5 ± 3℃ で実行した。

【0347】

活性化多糖の濃縮および血液透析濾過は、5K MWCO 限外濾過カセットを使用して行った。血液透析濾過は、20 倍ダイアボリュームの WFI に対して実行した。次いで、精製された活性化多糖を、5 ± 3℃ で貯蔵した。精製された活性化糖を、とりわけ、(i) 比色アッセイによる糖濃度、(ii) 比色アッセイによるアルデヒド濃度、(iii) 酸化度、および (iv) SEC-MALLS による分子量によって、特徴付ける。

【0348】

活性化多糖の酸化度 (DO = 砂糖繰り返し単位のモル数 / アルデヒドのモル数) は、次のように決定された：

【0349】

砂糖繰り返し単位のモル数は、種々の比色法によって、例えば、アンスロン法を使用することによって決定される。アンスロン法 (method) により、多糖は、硫酸および熱の作用によって最初に単糖に解体される。アンスロン試薬は、ヘキソースと反応して、黄緑色の複合体を形成し、その吸光度を 625nm において分光光度的に読み取る。アッセイの範囲内で、吸光度は、存在するヘキソースの量に正比例している。

【0350】

アルデヒドのモル数も、MBTH 比色法を使用して同時に決定される。MBTH アッセイは、アルデヒド基 (所与の試料由来) を 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン (MBTH アッセイ試薬) と反応させることによる、アジン化合物の形成を伴う。過剰な 3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾンが酸化して、反応性カチオンを形成する。反応性カチオンおよびアジンが反応して、青色発色団を形成する。次いで、形成された発色団を、650nm にて分光的に読み取る。

【0351】

活性化多糖をスクロース賦形剤と配合し、凍結乾燥する

活性化多糖をスクロースと、活性化多糖 1 グラム当たり 25 グラムのスクロースの比まで配合した。次いで、配合された混合物のボトルを凍結乾燥した。凍結乾燥後、凍結乾燥した活性化多糖を含有するボトルを、 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。計算量の CRM₁₉₇ タンパク質をシェル冷凍し、別個に凍結乾燥した。凍結乾燥した CRM₁₉₇ を、 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。

【0352】

凍結乾燥した活性化多糖および担体タンパク質を再溶解する

凍結乾燥した活性化多糖を、無水ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で再溶解した。多糖が完全溶解したら、等量の無水 DMSO を、凍結乾燥した CRM₁₉₇ に、再溶解のために添加した。

【0353】

コンジュゲートし、キャップする

再溶解された活性化多糖を、再溶解された CRM₁₉₇ と反応容器中で合わせ、続いて、徹底的に混合して、透明溶液を取得した後、シアノ水素化ホウ素ナトリウムとのコンジュゲーションを開始した。反応溶液中における最終多糖濃度は、およそ 1 g/L であった。コンジュゲーションは、 $1.0 \sim 1.5\text{ MEq}$ のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを反応混合物に添加し、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で $20 \sim 48$ 時間にわたってインキュベートすることによって開始した。コンジュゲーション反応は、 2 MEq の水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) を添加して、未反応のアルデヒドをキャップすることにより、終了させた。このキャッピング反応を、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で 3 ± 1 時間にわたって続けた。

【0354】

コンジュゲートを精製する

コンジュゲート溶液を、 $100 \sim 300\text{ K}$ の MWCO 膜を使用するタンジェント流濾過による精製のために、調製物中、冷やした 5 mM コハク酸塩 -0.9% 生理食塩水 ($\text{pH } 6.0$) で $1:10$ に希釈した。

【0355】

希釈したコンジュゲート溶液を、 $5\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターに通過させ、 5 mM コハク酸塩 -0.9% 生理食塩水 ($\text{pH } 6.0$) を媒体として使用して、血液透析濾過を実行した。血液透析濾過が完了した後、コンジュゲート濃縮液を、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターを介して移した。コンジュゲートを、 5 mM コハク酸塩 -0.9% 生理食塩水 ($\text{pH } 6$) でさらに希釈して、およそ 0.5 mg/mL の標的糖濃度とした。代替として、コンジュゲートを、 $100 \sim 300\text{ K}$ の MWCO 膜を使用するタンジェント流濾過により、 20 mM ヒスチジン -0.9% 生理食塩水 ($\text{pH } 6.5$) を使用して精製した。最終 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 濾過ステップを完了させて、免疫原性コンジュゲートを取得した。

【0356】

(実施例 4)

GBS 多糖-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する様々なコンジュゲーション条件の効果

GBS 血清型 Ia、Ib、II、III、IV および V コンジュゲートは、試薬のための溶媒 (水性媒体対 DMSO)、初期多糖中における様々なレベルのシアル酸、および酸化度/糖エピトープ修飾を包含する、過ヨウ素酸酸化/還元的アミノ化化学 (PO/RAC) 条件を故意に変動させることによって産生された。概して、DMSO を溶媒として使用して生成されたコンジュゲートは、水性媒体を使用して生成されたコンジュゲートよりも、低レベルの未反応の (遊離) 多糖、より高いコンジュゲート分子量およびより高い糖/タンパク質比を有することが分かった。

【0357】

低レベルの未反応の (遊離) 多糖を持つコンジュゲートを生成するコンジュゲーションプロセスは、有利であり、好ましい。高レベルの未反応の (遊離) 多糖は、多糖-タンパク質コンジュゲートによって産生された T 細胞依存性応答を希釈する可能性を有する過度の T 細胞非依存性免疫応答を引き起こし得、それにより、コンジュゲートによって産生さ

10

20

30

40

50

れる免疫原性応答を低下させることが周知である。

【0358】

選択されたGBS多糖を、当技術分野において公知の方法によって化学的に脱シアルシ（Chaffin, D. Oら、J Bacteriol 187 (13) : 4615~4626 (2005) を参照）、コンジュゲート変異体を産生して、免疫原性に対する脱シアル化%の影響を決定した。約40%超の脱シアル化（すなわち、シアル酸レベル約60%未満）は、免疫原性に対して悪影響を及ぼした。

【0359】

同様に、ほとんどの場合において、約5未満の酸化度、または約20%超の糖エピトープ修飾は、免疫原性に対して悪影響を及ぼした。酸化は莢膜多糖上のシアル酸を介して発生するため、結果は、約20%超の糖エピトープ修飾がシアル酸含有量を低減させ、これが免疫原性の低減をもたらすことを示しているように見える。

【0360】

逆に、様々な糖／タンパク質比または多糖分子量を有するコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性応答を生成し、これらの属性に関して比較的広範囲の受容基準を示した。

【0361】

追加のコンジュゲート変異体は、代替的な化学経路を使用しても産生された。1つの代替的な化学は、多糖をカルボニルジトリアゾール（CDT）と反応させることによりコンジュゲートを産生すること、およびDMSO中でコンジュゲーション反応を行うことを包含していた。別の代替的な化学において、コンジュゲートは、（過ヨウ素酸ナトリウムの代わりに）TEMPO [（2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-1-イル）オキシル] 試薬を使用する多糖の酸化、続いて、DMSO中の還元的アミノ化化学（TEMPO／RAC）を使用するコンジュゲーションにより、上記の実施例3において詳述した通りに産生された。これらの代替的な化学によって産生されたすべてのコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であることが実証され、PO／RAC以外の代替的な化学経路の適合性を示していた。しかしながら、一部のコンジュゲーション化学は、他のものよりも、一部の血清型を用いて、より良好に実行された。

【0362】

OPAは、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）分離株をB群レンサ球菌分離株で代用し、前オプソニン化ステップを省略して、Nanra, J. S. ら、Hum. Vaccin. Immunother.、9 (3) : 480~487 (2013) のように実行した。用量3後（PD3）のOPA力価は、それぞれのコンジュゲートの各用量において1mcg/mlにより免疫化された10~20匹のマウスの群からの幾何平均として提供される。

【0363】

GBS血清型Ia多糖-CRM₁₉₇コンジュゲート

PO／RACおよび16~17のDO（およそ6%の糖エピトープ修飾）を有する活性化多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、免疫原性であると実証された（コンジュゲート1および3）。しかしながら、5.4のDO（およそ19%の糖エピトープ修飾）を有する活性化多糖を使用することは、免疫原性に対して悪影響を及ぼした（コンジュゲート2）。同様に、50%のシアル酸レベルは、免疫原性応答をほとんど生成しなかった（コンジュゲート4）。結果を表10に示す。

【0364】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10. GBS 血清型 Ia-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	1	2	3	4
溶媒	DMSO	DMSO	水性	DMSO
多糖 MW(kDa)	190	190	190	190
初期多糖中のシアル酸%	>95	>95	>95	50
修飾%	6	19	6	6
酸化度(DO)	16.8	5.4	16.2	16.4
糖/タンパク質比	0.8	0.8	2.0	1.1
遊離糖%	<5	<5	26	<5
SEC-MALLS によるコンジュゲート MW、kDa	6040	15390	806	3763
OPA 力価	300	172	406	68

【0365】

追加のコンジュゲート変異体は、代替的なコンジュゲーション化学およびコンジュゲート分子属性を使用して産生した（結果を表 11 に示す）。コンジュゲート 5 は、多糖をカルボニルジトリアゾール（CDT）と反応させることにより産生され、コンジュゲーション反応は、DMSO 中で行った。コンジュゲート 6 は、（過ヨウ素酸ナトリウムの代わりに）TEMPO 試薬を使用する多糖の酸化、続いて、DMSO 中の還元的アミノ化化学を使用するコンジュゲーションにより、上記の実施例 3 において詳述した通りに産生された。コンジュゲート 7 は、PO/RAC およびコンジュゲーションパラメーターを故意に変動させて高い糖/タンパク質比（SPR）を持つコンジュゲートを生成することにより、産生された。コンジュゲート 8 は、低 MW（40 kDa）を有する多糖を使用する PO/RAC によって産生された。これらすべてのコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であることが実証され、過ヨウ素酸酸化/還元的アミノ化化学以外の代替的なコンジュゲーション化学の適合性、ならびに初期多糖の SPR および低 MW 等の代替的なコンジュゲート属性を示していた。

【0366】

10

20

30

40

50

【表 11】

表 11. GBS 血清型 Ia-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学および代替的な化学選択肢の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	5	6	7	8
コンジュゲーション化学	CDT	TEMPO/RAC	PO/RAC	PO/RAC
多糖 MW(kDa)	383	220	383	40
初期多糖中のシアル酸%	>95	>95	>95	>95
修飾%	該当なし	11	6	8
酸化度(DO)	該当なし	9.2	17.5	12
糖/タンパク質比	1.2	0.9	2.5	1
遊離糖%	12.5	11.2	13.3	24.3
SEC-MALLS による MW、kDa	7128	1678	4347	2000
OPA 力価	1028	371	303	1484

【0367】

GBS 血清型 Ib 多糖 - CRM₁₉₇ コンジュゲート

DMSO 中において PO/RAC および 15.8 の DO (およそ 6% の糖エピトープ修飾) を有する活性化多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であると実証された (コンジュゲート 9 および 11)。DMSO 中の PO/RAC によって産生されたコンジュゲートは、他のすべてのコンジュゲート分子属性が同じである場合、水性媒体中の PO/RAC によって産生されたコンジュゲートよりもわずかに免疫原性であった (それぞれ、コンジュゲート 9 および 11)。しかしながら、4.7 の DO (およそ 21% の糖エピトープ修飾) を有する活性化多糖を使用することは、免疫原性に悪影響を及ぼした (コンジュゲート 10)。免疫原性は、ほぼ完全に消失し、PO/RAC および 95% 脱シアル化 (5% のシアル酸レベル) 多糖を使用して産生されたコンジュゲートにおいて、応答するものは非常に少数であった (コンジュゲート 12)。結果を表 12 に示す。

【0368】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 12. GBS 血清型 1b-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	9	10	11	12
溶媒	DMSO	DMSO	水性	DMSO
多糖 MW(kDa)	120	120	120	120
初期多糖中のシアル 酸%	>95	>95	>95	5
修飾%	6	21	6	9
酸化度(DO)	15.8	4.7	15.8	11.7
糖/タンパク質比	1.1	1	2	1.1
遊離糖%	11	<5	33	7
SEC-MALLS による MW、kDa	2608	7302	381	8418
OPA 力価	417	159	278	62

【0 3 6 9】

追加のコンジュゲート変異体は、代替的なコンジュゲーション化学およびコンジュゲート分子属性を使用して産生した（結果を表 1 3 に示す）。コンジュゲート 1 3 は、初期多糖において低シアル化（6 5 %）を有する多糖を使用する P O / R A C によって産生された。コンジュゲート 1 4 は、P O / R A C およびコンジュゲーションパラメーターを故意に変動させて高い糖 / タンパク質比（S P R）を持つコンジュゲートを生成することにより、産生された。コンジュゲート 1 5 は、多糖をカルボニルジトリアゾール（C D T）と反応させることにより産生され、コンジュゲーション反応は、D M S O 中で行った。コンジュゲート 1 6 は、（過ヨウ素酸ナトリウムの代わりに）T E M P O 試薬を使用する多糖の酸化、続いて、D M S O 中の還元的アミノ化化学を使用するコンジュゲーションにより、上記の実施例 3 において詳述した通りに産生された。これらすべてのコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であると実証され、過ヨウ素酸酸化 / 還元的アミノ化化学以外の代替的なコンジュゲーション化学の適合性、ならびに初期多糖の S P R および低 MW 等の代替的なコンジュゲート属性を示していた。

【0 3 7 0】

10

20

30

40

50

【表 13】

表 13. GBS 血清型 Ib-CRM₁₉₇ コンジュゲートについての過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学および代替的な化学選択肢の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	13	14	15	16
コンジュゲーション化学	PO/RAC	PO/RAC	CDT	TEMPO/RAC
多糖 MW(kDa)	141	141	141	150
初期多糖中のシアル酸%	65	>95	>95	>95
修飾%	8	7	該当なし	13
酸化度(DO)	12	14.7	該当なし	7.8
糖/タンパク質比	1.06	2.1	1.29	0.85
遊離糖%	<5%	16%	21	7
SEC-MALLS による MW、kDa	5345	1594	2760	1400
OPA 力価	246	118	287	548

【0371】

GBS 血清型 II 多糖 - CRM₁₉₇ コンジュゲート

PO/RAC および 4~15 の DO (およそ 7~23% の糖エピトープ修飾) を有する活性化多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であると実証された (コンジュゲート 17~20)。PO/RAC および 74% のシアル化レベル (26% 脱シアル化) を持つ多糖を使用して産生されたコンジュゲートも、免疫原性であると実証された (コンジュゲート 20)。結果を表 14 に示す。

【0372】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 14. GBS 血清型 II-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	17	18	19	20
溶媒	DMSO	DMSO	水性	DMSO
多糖 MW(kDa)	95	95	109	109
初期多糖中のシアル 酸%	>95	>95	>95	74
修飾%	8	23	10	7
酸化度(DO)	12.6	4.3	9.8	15.2
糖/タンパク質比	0.84	0.90	1.13	0.63
遊離糖%	16	<5	6	<5
SEC-MALLS による MW、kDa	3600	4650	1611	6140
OPA 力価	610	967	2149	684

【0 3 7 3】

追加のコンジュゲート変異体は、代替的なコンジュゲーション化学およびコンジュゲート分子属性を使用して産生した（結果を表 1 5 に示す）。コンジュゲート 2 1 および 2 2 は、P O / R A C ならびにコンジュゲーションパラメーターを故意に変動させてそれぞれ低いおよび高い糖／タンパク質比（S P R）を持つコンジュゲートを生成することにより、産生された。コンジュゲート 2 3 は、（過ヨウ素酸ナトリウムの代わりに）T E M P O 試薬を使用する多糖の酸化、続いて、D M S O 中の還元的アミノ化化学を使用するコンジュゲーションにより、上記の実施例 3 において詳述した通りに産生された。コンジュゲート 2 4 は、多糖をカルボニルジトリアゾール（C D T）と反応させることにより産生され、コンジュゲーション反応は、D M S O 中で行った。これらすべてのコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であることが実証され、過ヨウ素酸酸化／還元的アミノ化化学以外の代替的なコンジュゲーション化学の適合性、および S P R 等の代替的なコンジュゲート属性を示していた。

【0 3 7 4】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 15. GBS 血清型 II-CRM₁₉₇ コンジュゲートについての過ヨウ素酸化/
還元的アミノ化化学および代替的な化学選択肢の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	21	22	23	24
コンジュゲーション化学	PO/RAC	PO/RAC	TEMPO/RAC	CDT
多糖 MW(kDa)	109	109	109	109
初期多糖中のシアル酸%	>95	>95	>95	>95
修飾%	10	10	11	該当なし
酸化度(DO)	10	10	8.8	該当なし
糖/タンパク質比	0.61	2.03	0.66	0.87
遊離糖%	<5	25	<5%	12
SEC-MALLS による MW、kDa	8850	1480	5270	603
OPA 力価	3117	891	2167	631

【0375】

GBS 血清型 III 多糖 - CRM₁₉₇ コンジュゲート

DMSO 中において PO/RAC および 10~17 の DO (およそ 6~10% の糖エピトープ修飾) を有する活性化多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であると実証された (コンジュゲート 25 および 30)。2.9 の DO (およそ 34% の糖エピトープ修飾) または高い糖/タンパク質比 (2.1) を有するコンジュゲート (それぞれ、コンジュゲート 26 および 27) は、免疫原性が比較的低い実証された。PO/RAC および 81% のシアル化レベル (19% 脱シアル化) を持つ多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、免疫原性であると実証された (コンジュゲート 30)。しかしながら、58% のシアル化レベル (42% 脱シアル化) を持つ多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、免疫原性が乏しいと実証された (コンジュゲート 29)。DMSO 中の PO/RAC によって産生されたコンジュゲートは、他のすべてのコンジュゲート分子属性が同じである場合、水性媒体中の PO/RAC によって産生されたコンジュゲートよりもわずかに免疫原性であった (それぞれ、コンジュゲート 25 および 28)。

【0376】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 16. GBS 血清型 III-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	25	26	27	28	29	30
溶媒	DMSO	DMSO	DMSO	水性	DMSO	DMSO
多糖 MW(kDa)	263	358	358	358	355	358
初期多糖中のシア ル酸%	>95	>95	>95	>95	58	81
修飾%	10	34	6	8	6	6
酸化度(DO)	10	2.9	17	13	16	17
糖/タンパク質比	1.1	1.2	2.1	1.7	1.15	1.19
遊離糖%	10	7	24	19	<5	<5
SEC-MALLS によ る MW。kDa	2396	14340	3066	1885	5110	4643
OPA 力価	701	57	252	248	137	505

【0377】

追加のコンジュゲート変異体は、代替的なコンジュゲーション化学およびコンジュゲート分子属性を使用して産生した（結果を表 17 に示す）。コンジュゲート 31～35 は、PO/RAC およびコンジュゲーションパラメーターを故意に変動させて様々な MW を持つコンジュゲートを生成することにより、産生された。コンジュゲート 36 は、多糖をカルボニルジトリアゾール（CDT）と反応させることにより産生され、コンジュゲーション反応は、DMSO 中で行った。コンジュゲート 37 は、（過ヨウ素酸ナトリウムの代わりに）TEMPO 試薬を使用する多糖の酸化、続いて、DMSO 中の還元的アミノ化化学を使用するコンジュゲーションにより、上記の実施例 3 において詳述した通りに産生された。これらすべてのコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であると実証され、過ヨウ素酸酸化／還元的アミノ化化学以外の代替的なコンジュゲーション化学の適合性、および MW 等の代替的なコンジュゲート属性を示していた。5 の低さの DO（およそ 20% の糖エピトープ修飾）で産生されたコンジュゲートは、2.9 の DO（およそ 34% の糖エピトープ修飾）で産生されたコンジュゲート（上記の表 16 中のコンジュゲート 26）と比較して、マウスにおいて依然として免疫原性であった（表 17 中のコンジュゲート 32）。

【0378】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 17. GBS 血清型 III-CRM₁₉₇ コンジュゲートについての過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学および代替的な化学選択肢の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	31	32	33	34	35	36	37
コンジュゲーション化学	PO/RAC	PO/RAC	PO/RAC	PO/RAC	PO/RAC	CDT	TEMPO/RAC
多糖 MW(kDa)	353	350	355	50	349	355	355
初期多糖中のシアル酸%	>95	>95	>95	>95	>95	>95	>95
修飾%	6	5	6	8	20	該当なし	10
酸化度(DO)	17	19	17	12	5	該当なし	10
糖/タンパク質比	0.8	1.1	1.2	0.9	1.0	1.16	0.96
遊離糖%	<5	<5	<5	20	<5	<5	<5
SEC-MALLS による MW。kDa	9278	5291	4982	1201	8024	10740	3415
OPA 力価	646	204	176	441	1116	448	336

【0379】

GBS 血清型 IV 多糖 - CRM₁₉₇ コンジュゲート

PO/RAC および 6.9 ~ 14.2 の DO (およそ 7 ~ 14 % の糖エピトープ修飾) を有する活性化多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であると実証された (コンジュゲート 38 ~ 41)。PO/RAC および 60 % のシアル化レベル (40 % 脱シアル化) を持つ多糖を使用して産生されたコンジュゲートも、免疫原性であると実証された (コンジュゲート 41)。結果を表 18 に示す。

【0380】

10

20

30

40

50

【表 18】

表 18. GBS 血清型 IV-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	38	39	40	41
溶媒	DMSO	DMSO	水性	DMSO
多糖 MW(kDa)	143	143	133	121
初期多糖中のシアル 酸%	>95	>95	>95	60
修飾%	7	14	7	8
酸化度(DO)	14.2	6.9	13.6	13.2
糖/タンパク質比	0.80	0.91	1.92	1.0
遊離糖%	<5	<5	33.4	<5
SEC-MALLS による MW. kDa	8268	10210	657	5691
OPA 力価	3140	2379	3080	6708

【0381】

追加のコンジュゲート変異体は、代替的なコンジュゲーション化学およびコンジュゲート分子属性を使用して産生された。結果を表 19 に示す。コンジュゲート 42 および 45 は、PO/RAC およびコンジュゲーションパラメーターを故意に変動させて高い DO（より低い酸化レベル）および高い SPR をそれぞれ持つコンジュゲートを生成することにより、産生された。コンジュゲート 43 は、多糖をカルボニルジトリアゾール（CDT）と反応させることにより産生され、コンジュゲーション反応は、DMSO 中で行った。コンジュゲート 44 は、（過ヨウ素酸ナトリウムの代わりに）TEMPO 試薬を使用する多糖の酸化、続いて、DMSO 中の還元的アミノ化化学を使用するコンジュゲーションにより、上記の実施例 3 において詳述した通りに産生された。すべての血清型 IV コンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であることが実証され、過ヨウ素酸酸化／還元的アミノ化化学以外の代替的なコンジュゲーション化学の適合性、および SPR 等のコンジュゲート属性を示していた。最大少なくとも 20 の DO（より低い酸化）（およそ 5 % の糖エピトープ修飾）で産生されたコンジュゲートは、マウスにおいて依然として免疫原性であった。

【0382】

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19. GBS 血清型 IV-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学および代替的な化学選択肢の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	42	43	44	45
コンジュゲーション化学	PO/RAC	CDT	TEMPO	PO/RAC
多糖 MW(kDa)	143	133	133	140
初期多糖中のシアル酸%	>95	>95	>95	>95
修飾%	5	該当なし	7	7
酸化度(DO)	20	該当なし	13.7	14.6
糖/タンパク質比	1.0	0.9	0.52	1.96
遊離糖%	<5	<5	6	<5
SEC-MALLS による MW。kDa	3580	12390	4580	2710
OPA 力価	8614	1989	7567	3695

【0383】

GBS 血清型 V 多糖 - CRM₁₉₇ コンジュゲート

PO/RAC および 4.4 ~ 14.6 の DO (およそ 7 ~ 23 % の糖エピトープ修飾) を有する活性化多糖を使用して産生されたコンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であると実証された (コンジュゲート 46 および 47)。脱シアル化 (5 % のシアル化レベル) コンジュゲートは免疫原性ではなく (コンジュゲート 49)、水性溶媒を使用する PO/RAC プロセスを使用して産生されたコンジュゲートは、低い免疫応答を生成した (コンジュゲート 48)。結果を表 20 に示す。

【0384】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表 20. GBS 血清型 V-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	46	47	48	49
溶媒	DMSO	DMSO	水性	DMSO
多糖 MW(kDa)	132	132	132	132
初期多糖中のシアル酸%	>95%	>95%	>95%	5%
修飾%	7	23	8	6
酸化度(DO)	14.6	4.4	12.1	18
糖/タンパク質比	1.32	1.43	1.27	0.94
遊離糖%	11	<5	25.4	<5
SEC-MALLS による MW。kDa	4304	14510	573	4847
OPA 力価	335	181	93	60

【0 3 8 5】

追加のコンジュゲート変異体は、代替的なコンジュゲーション化学およびコンジュゲート分子属性を使用して産生した。結果を表 2 1 に示す。コンジュゲート 5 0 および 5 3 は、P O / R A C およびコンジュゲーションパラメーターを故意に変動させてそれぞれより低いシアル化レベル（8 1 %シアル化）および低 MW を持つコンジュゲートを生成することにより、産生された。コンジュゲート 5 1 は、多糖をカルボニルジトリアゾール（C D T）と反応させることにより産生され、コンジュゲーション反応は、D M S O 中で行った。コンジュゲート 5 2 は、（過ヨウ素酸ナトリウムの代わりに）T E M P O 試薬を使用する多糖の酸化、続いて、D M S O 中の還元的アミノ化化学を使用するコンジュゲーションにより、上記の実施例 3 において詳述した通りに産生された。C D T 化学を使用して産生されたコンジュゲートを除き、すべての血清型 V コンジュゲートは、マウスにおいて免疫原性であることが実証され、過ヨウ素酸酸化／還元的アミノ化化学以外の代替的なコンジュゲーション化学の適合性、および MW 等のコンジュゲート属性を示していた。C D T 化学を使用して産生されたコンジュゲートは、R A C によって産生された他のコンジュゲートと比較して、有意に免疫原性が低いことが示された。8 1 %のシアル化を持つコンジュゲート（コンジュゲート 5 0）は、9 5 %超のシアル化を持つコンジュゲート（コンジュゲート 5 3）と比較して低い 5 %のシアル化を持つコンジュゲート（上記の表 2 0 中のコンジュゲート 4 9）よりも高い免疫応答を提供した。

【0 3 8 6】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 21. GBS 血清型 V-CRM₁₉₇ コンジュゲートに対する過ヨウ素酸酸化/
還元的アミノ化化学および代替的な化学選択肢の様々なプロセス条件の効果

コンジュゲート	50	51	52	53
コンジュゲーション化学	PO/RAC	CDT	TEMPO	PO/RAC
多糖 MW(kDa)	159	193	193	37
初期多糖中のシアル酸%	>81%	>95%	>95%	>95%
修飾%	7	該当なし	5	10
酸化度(DO)	13.5	該当なし	18.2	10.3
糖/タンパク質比	1.2	1.14	0.71	0.53
遊離糖%	<5	<5	22.3	7.3
SEC-MALLS による MW. kDa	3037	4756	3501	3044
OPA 力価	160.3	101	320	279

【0387】

(実施例 5)

GBS III-CRM₁₉₇ および GBS V-CRM₁₉₇ 一価コンジュゲートワクチンはマウスにおいて OPA 応答を生成した

雌 CD-1 マウスを、1 mcg、0.1 mcg または 0.01 mcg の CRM₁₉₇ とコンジュゲートしている B 群レンサ球菌 (GBS) 血清型 III (GBS III-CRM₁₉₇) または CRM₁₉₇ とコンジュゲートしている GBS 血清型 V (GBS V-CRM₁₉₇) により、0、3 および 6 週目に 3 回、皮下的に免疫化した。用量 3 後 (PD 3) の血清を、オプソニン食作用アッセイ (OPA) によって評価した。OPA は、実施例 4 において記述されている通りに実行した。両方のコンジュゲートが、マウスにおいて OPA 応答を誘発した (表 2 2)。検出可能な OPA 応答のない試料に、50 の値を割り当てた。

【0388】

【表 2 2】

表 22: GBS III および GBS V コンジュゲートはマウスにおいて
OPA 応答を誘発する

コンジュゲート型	用量(mcg)	幾何平均 OPA 力価
III	1	701
	0.1	103
	0.01	50
V	1	378
	0.1	204

10

20

30

40

50

【0389】

(実施例6)

GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇一価コンジュゲートワクチンはマウスにおいてOPA応答を生成した

6セットの雌CD-1マウスを、1mcgのCRM₁₉₇とコンジュゲートしている個々のGBS莢膜多糖(CP)を含有するワクチンにより、0、3および6週目に3回、皮下的に免疫化した。初期の研究は、マウスが、試験された6つの血清型のいずれに対しても既存のOPA力価を有さないことを示していた。PD3からの血清を、ワクチン中に含有される同族GBS血清型に対するOPAにより、分析した。OPAは、実施例4において記述されている通りに実行した。結果を以下の表23および24に示す。

【0390】

【表23】

表 23: 個々の GBS CPS-CRM₁₉₇ コンジュゲートによる免疫化後のマウスの幾何平均 OPA 力価

血清型	幾何平均 OPA 力価
Ia	300
Ib	417
II	610
III	188
IV	3140
V	378

【0391】

【表 2 4】

表 24: 個々の GBS CPS-CRM₁₉₇ コンジュ
ゲートによる免疫化後のマウスの倍率上昇
OPA 力価

血清型	幾何平均 OPA 力価
Ia	6
Ib	8
II	12
III	4
IV	63
V	8

NB: 倍率上昇は、マウスが既存の力価を有さなかったと仮定して算出する

【0392】

(実施例 7)

GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇ および GBS V-CRM₁₉₇ 一価コンジュゲートワクチンにより免疫化されたマウスから単離された IgG と比較した血清のオプソニン活性

雌 CD-1 または BALB/c マウスを、1 mcg の CRM₁₉₇ とコンジュゲートしている個々の GBS CP により、0、3 および 6 週目に 3 回、皮下的に免疫化した。ALPO₄ または QS-21 のいずれかを、アジュバントとして使用した。PD3 血清を血清型特異的 OPA によって試験し、次いで、免疫グロブリン G 画分を単離し、OPA 活性について試験した。精製された IgG OPA 活性を 5 mg/ml に対して（正常マウス血清中における IgG の量の範囲内で）正規化した。6 つすべての GBS CPS コンジュゲートが、オプソニン活性を持つ IgG 抗体を誘発した（図 1）。

【0393】

(実施例 8)

GBS Ia-TT、GBS Ib-TT、GBS II-TT、GBS III-TT、GBS IV-TT および GBS V-TT、一価コンジュゲートワクチンはウサギにおいて OPA 応答を生成した

ウサギを、50 mcg/ml の破傷風トキソイドとコンジュゲートしている GBS 血清型 Ia 多糖、10 mcg/ml の破傷風トキソイドとコンジュゲートしている GBS 血清型 Ib 多糖、50 mcg/ml の破傷風トキソイドとコンジュゲートしている GBS 血清型 II 多糖、50 mcg/ml の破傷風トキソイドとコンジュゲートしている GBS 血清型 III 多糖、50 mcg/ml の破傷風トキソイドとコンジュゲートしている GBS 血清型 IV 多糖、または 50 mcg/ml の破傷風トキソイドとコンジュゲートしている GBS 血清型 V 多糖により、初回用量においては完全フロイントアジュバントならびに第 2 および 3 回用量においては不完全フロイントアジュバントでアジュバント添加して、3 回免疫化した。コンジュゲートは、95% 超のシアル酸レベルを有する多糖および CDA P（1-シアノー-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）化学を使用して生成された。PD3 免疫応答は、OPA により、実施例 4 において記述されている通りに測定した。血清力価を表 25 に示し、一方、精製された IgG 力価を以下の表 26 に示す。TT とコンジュゲートしている GBS 血清型 Ia、Ib、II、III、IV および V 多糖は、ウサギにおいて高度に免疫原性であった。

【0394】

【表25】

表 25: 個々の GBS CPS-TT コンジュゲートによる免疫化後のウサギ血清の幾何平均 OPA 力価

GBS 血清型	幾何平均 OPA 力価
Ib	11550
II	36753
IV	34345

10

【0395】

【表26】

表 26: 個々の GBS CPS-TT コンジュゲートによる免疫化後の精製されたウサギ IgG の幾何平均 OPA 力価

GBS 血清型	幾何平均 OPA 力価 (1 mg/ml pAb)
Ia	7190
Ib	2817
II	41870
III	40146
IV	15565
V	12124

20

30

【0396】

(実施例9)

六価 GBS コンジュゲートワクチンは非ヒト霊長類において OPA 応答を生成した

アカゲザルの3つの群を、六価 B 群レンサ球菌 (GBS 6) ワクチンにより、0、4 および 8 週目に 3 回、筋肉内に免疫化した。GBS 6 ワクチンは、GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇ および GBS V-CRM₁₉₇ を含んでいた。2つの群は、リン酸アルミニウム (AlPO₄) をアジュバントとして包含しており、5 mcg の各コンジュゲートまたは 50 mcg の各コンジュゲートのいずれかを投薬した。第3の群に、5 mcg の各コンジュゲートを投薬し、アジュバントを含有していなかった。以下の表 27 は、免疫化スケジュールを記述している。

40

【0397】

50

【表 2 7】

表 27: アカゲザルの免疫化スケジュール

群	NHP の数	ワクチン 用量 (各コンジ ュゲート)	AIPO4 と してのアル ミニウム (mg/mL)	ワクチン 体積	出産	免疫化 スケジュール (週)
1	10	5 µg	0.5	1.0 mL	IM	0, 4, 8
2	10	50 µg	0.5	1.0 mL	IM	0, 4, 8
3	10	5 µg	なし	1.0 mL	IM	0, 4, 8

10

【0 3 9 8】

免疫前血清およびPD3からの血清を、ワクチン中に含有される6つすべてのGBS血清型についてOPAにより分析した。OPAは、実施例4において記述されている通りに実行した。結果を以下の表28および29に示す。6つすべての血清型について、AIPO₄でアジュバント添加した処方、検出可能なOPA応答（PD3の前からの力価における増大、または1超の倍率上昇前／PD3）を導出した。アジュバント添加していない5mcg／コンジュゲート用量は、6つの血清型のうちの5つについて検出可能なOPA応答を導出した。

20

【0 3 9 9】

【表 2 8】

表 28: GBS6による免疫化の前および後のアカゲザルの幾何平均 OPA 力価

血清型	5mcg + AIPO ₄		50mcg + AIPO ₄		5mcg アジュバントなし	
	前	PD3	前	PD3	前	PD3
Ia	97	2907	118	8106	166	69
Ib	53	3821	53	2957	50	313
II	54	980	62	764	61	362
III	105	7759	204	8448	762	4515
IV	78	2350	89	3331	309	899
V	233	5556	442	16476	6192	4226

30

【0 4 0 0】

【表 2 9】

表 29: GBS6による免疫化後のアカゲザルの OPA 力価倍率上昇

血清型	5mcg + AIPO ₄	50mcg + AIPO ₄	5mcg アジュバントなし
Ia	30	69	4
Ib	72	56	6
II	18	12	6
III	74	41	6
IV	30	37	3
V	24	37	1

40

【0 4 0 1】

(実施例 10)

六価GBSコンジュゲートワクチンはラットにおいてOPA応答を生成した

50

雌スプラグ・ドーリー系ラットを、リン酸アルミニウム ($AlPO_4$) を加えてまたは加えずにのいずれかで製剤化された実施例 9 において記述されている通りの GBS 6 多糖コンジュゲートワクチン中の 5 mcg/ml の各コンジュゲートで 2 回、皮下的に免疫化した。免疫前 (ベースライン) および用量 2 後の血清を、6 つすべての同族 GBS 血清型に対する OPA アッセイ力価について評価した。OPA 力価を、GBS 384 ウェルアッセイフォーマットにおいて各血清型について測定し、倍率上昇を算出した。GBS 6 ワクチンを投与したラットは、第 2 回用量後、各血清型に対して強固な機能的抗体応答を有し、 $AlPO_4$ の非存在下では、血清型の間で 7 から 205 倍の増大が見られたのに対し、その存在下では、これは 11 から 294 倍までの範囲になった (表 30)。

【0402】

【表 30】

表 30. 六価 GBS コンジュゲートワクチンにより免疫化されたラットにおけるオプソニン食作用活性(OPA)アッセイ力価の用量 2 後(PD2)の倍率上昇

GBS 血清型	免疫前から PD2 までの幾何平均 OPA 力価における倍率上昇	
	$AlPO_4$ なし	$AlPO_4$ あり
Ia	36	11
Ib	7	39
II	205	294
III	107	141
IV	45	33
V	185	195

【0403】

(実施例 11)

一価または六価 GBS グリココンジュゲートワクチンによる妊娠中の雌親の免疫化は出生後にその子において GBS IIII または V 感染からの保護効果を示した

雌 CD-1 マウスを、 5 mcg/ml の各コンジュゲートおよび 100 mcg/ml の $AlPO_4$ を含有する実施例 9 において記述されている通りの GBS 6 ワクチン、GBS IIII もしくは V 一価グリココンジュゲートワクチン (それぞれ 10 mcg/ml のコンジュゲートおよび 100 mcg/ml の $AlPO_4$ を含有する)、またはビヒクル対照単独で 3 回、皮下的に免疫化した。マウスは、第 3 回免疫化の前に出産した。免疫化されたマウスの子に、致死用量の GBS 血清型 IIII または GBS 血清型 V 細菌のいずれかを、受けたワクチンに従って接種し、生存を 90 時間にわたってモニターした。GBS 6 + $AlPO_4$ または GBS IIII - CRM197 + $AlPO_4$ による雌親の免疫化は、致死 GBS 血清型 IIII 接種に対する有意な保護 ($p < 0.0001$) を新生仔に提供した。同様に、GBS V - CRM197 + $AlPO_4$ による雌親の免疫化は、致死 GBS 血清型 V 接種に対する有意な保護 ($p < 0.0001$) を新生仔に提供した。結果を表 31 に示す。

【0404】

10

20

30

40

50

【表 3 1】

表 31: 一価および六価 GBS ワクチンによる免疫化は
子において生存を増大させた

	生存している子/全子(生存%)		
血清型接種	GBS6 免疫化された 雌親の子	同族一価 免疫化された 雌親の子	ビヒクル 免疫化された 雌親の子
III	20/22 (91%)	28/28 (100%)	9/29 (31%)
V		35/40 (85%)	3/27 (11%)

10

【0 4 0 5】

(実施例 1 2)

乳児ラットにおける GBS III モノクローナル抗体の受動免疫化は保護効果を示した
B 群レンサ球菌血清型 III (GBS III) モノクローナル抗体 (mAb) は、マウスを、血清型 Ia、Ib、II、III および V を含む五価ワクチンで免疫化することによって産生された。GBS III 特異的 mAb クローンを選択し、標準的な手順を使用して、GBS III の CP を認識する mAb を産生した。GBS 血清型 III mAb を、臨床 GBS III 分離株の接種 16 時間前に、乳児ラット (n = 1 群当たり 10 匹；2 つの独立した実験を示す) に受動的に投与した。接種 4 時間後、血液を採取し、残りの CFU を数えた。GBS III mAb による処理は、乳児ラットにおける回収 CFU を、4 ログ以上低減させた (表 3 2)。

20

【0 4 0 6】

【表 3 2】

表 32: GBS III mAb は乳児ラットにおける回収 CFU を
低減させた

30

	処理	回収 CFU(ログ)
実験 1	GBS III mAb	1.8
	対照	7.5
実験 2	GBS III mAb	2.4
	対照	6.4

40

【0 4 0 7】

(実施例 1 3)

妊娠中のマウスにおける GBS Ib、III および V モノクローナル抗体の受動免疫化は、出生後にその子において保護効果を示した

モノクローナル抗体 (mAb) は、五価ワクチン (GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇ および GBS V-CRM₁₉₇) により免疫化されたマウスから、標準的な手順を使用して産生された。次いで、mAbs は、5 つの血清型のそれぞれの莢膜多糖を特異的に認識するもの

50

として同定された。500mcg/ml用量のGBS血清型Ib (GBS Ib) mAb、GBS血清型III (GBS III) mAb、GBS血清型V (GBS V) mAbまたはアイソタイプ適合対照mAbを、出産のおよそ24から48時間前に、妊娠中のマウスに受動的に投与した。出生24から48時間後、免疫化されたネズミ雌親の子に、致死用量のGBS Ib、GBS IIIまたはGBS V細菌を接種した。生存を96時間にわたってモニターした。GBS Ib mAb、GBS III mAbまたはGBS V mAbにより免疫化された雌親のもとに生まれた新生仔においては、GBS接種後の対照mAbと比較して、有意に高い生存が見られた (表33)。

【0408】

【表33】

10

表 33: GBS III および V mAb は子において
生存を増大させた

GBS 接種血清型	下記で受動免疫化された雌親のもとに 生まれた新生仔の生存%	
	同族 mAb	対照 mAb
Ib	80	0
III	93	0
V	100	12

20

【0409】

(実施例14)

GBSコンジュゲートの安定性

GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IIII-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇を、10mMコハク酸塩-リン酸塩および155mM NaCl中、様々なpHレベルで独立して製剤化して、加速貯蔵条件においてコンジュゲートの安定性を試験した。SEC MALLSによって決定された際の分子量における変化パーセントを、50℃で4週間の貯蔵後に測定した。結果を図2～7に示す。

30

【0410】

GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS IIII-CRM₁₉₇およびGBS IV-CRM₁₉₇コンジュゲートを、表34に示す種々の緩衝剤条件下、シアル化の安定性について試験した。遊離シアル酸 (Nアセチルノイラミン酸; NANA) を、37℃で1カ月の貯蔵後に、HPLCを使用して測定した。結果を図8に示す。

【0411】

両方の研究は、コンジュゲートが、6.0を上回るpH、最適には約pH6.5で良好な性能を発揮したことを示唆していた。

【0412】

40

50

【表 3 4】

表 34. シアル化安定性試験のための緩衝剤条件

pH	塩	塩濃度 (mM)	緩衝剤	緩衝剤濃度 (mM)
5.8	なし	0	コハク酸塩	10
6.2	なし	0	コハク酸塩	10
6.6	なし	0	コハク酸塩	10
6.9	なし	0	コハク酸塩	10
5.8	NaCl	150	コハク酸塩	10
6.3	NaCl	150	コハク酸塩	10
6.6	NaCl	150	コハク酸塩	10
6.9	NaCl	150	コハク酸塩	10
6.1	なし	0	ヒスチジン	10
6.5	なし	0	ヒスチジン	10
6.9	なし	0	ヒスチジン	10
6.1	NaCl	150	ヒスチジン	10
6.5	NaCl	150	ヒスチジン	10
6.9	NaCl	150	ヒスチジン	10

【0 4 1 3】

(実施例 1 5)

G B S 6 製剤

緩衝剤の選択を決定するために、G B S I a - C R M₁₉₇、G B S I b - C R M₁₉₇、G B S I I - C R M₁₉₇、G B S I I I - C R M₁₉₇、G B S I V - C R M₁₉₇およびG B S V - C R M₁₉₇ (G B S 6) を、上記の表 3 3 に示されているのと同じ緩衝剤条件を使用して、一緒に製剤化した。製剤の実際のpHを、下記の時点において試験した：0 (製剤が作製されたとき)、5℃で1カ月後、25℃で1カ月後、および37℃で1カ月後。コハク酸塩を緩衝剤として使用した製剤においてはpHのシフトが見られたのに対し、ヒスチジンを緩衝剤として使用した製剤においてはシフトが見られなかった。結果を図9～10に示す。

【0 4 1 4】

G B S コンジュゲートのアルミニウムとの結合に対するヒスチジン緩衝剤濃度の効果も試験した。150mMのNaCl、0.01%ポリソルベート-80、および0.5mg/mlのアルミニウムをAlPO₄として含むpH6.5の製剤を、2つの異なる濃度のコンジュゲート(10mcg/mlおよび40mg/mlの各血清型)およびいくつかの異なる濃度のヒスチジンにより試験した。アルミニウムと結合しているコンジュゲートのパーセントは、ワクチン中のコンジュゲートのそれぞれの総量およびアルミニウムと結合しているコンジュゲートのそれぞれの量を測定することによって決定した。結合しているコンジュゲートは、ワクチン製剤を遠心分離し、アルミニウムペレットを再懸濁し、アルミニウムを可溶化し、血清型のそれぞれに対する血清型特異的ポリクロナル (poly

colonial) 抗体を用いる比濁法を使用して、結合しているコンジュゲートを測定することによって測定した。結果を図11～12に示す。ヒスチジン緩衝剤の濃度は、アルミニウムと結合している各血清型のパーセントに影響を与え、影響は、高用量よりも低用量において、より顕著であることが分かった。

【0415】

望ましいと予想されるポリソルベート-80 (PS80) の量を決定するために、攪拌研究を行った。20mMのヒスチジン、150mMのNaCl、0.5mg/mlのAlPO₄ (存在する場合) を含み、PS80を含まないか、0.01% PS80、0.02% PS80または0.03% PS80のいずれかを含むpH6.5のGBS6製剤を、攪拌ストレス時の全抗原性損失のパーセンテージについて試験した。製剤を予め充填したシリンジを、500RPMにて72時間にわたって室温で攪拌した。対照試料 (攪拌されていない) を、室温で72時間にわたって貯蔵した。結果を図13に示す。

【0416】

GBS6製剤中におけるアルミニウムの濃度も研究して、アルミニウムとのGBSコンジュゲート結合に対する効果を決定した。10mMのヒスチジン、150mMのNaCl、0.02% PS80、および0.25mg/ml、0.5mg/ml、0.75mg/mlまたは1.0mg/mlいずれかのアルミニウムをリン酸アルミニウム (AlPO₄) として含むpH6.5のGBS6製剤を、アルミニウムと結合しているコンジュゲートのパーセントについて試験した。AlPO₄との結合のパーセンテージは、AlPO₄濃度が増大するにつれて増大する。結果を図14に示す。

【0417】

(実施例16)

GBS6凍結乾燥製剤

GBS6の様々な凍結乾燥製剤 (GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇およびGBS V-CRM₁₉₇) を、安定性について試験した。20mMのpH6.5のヒスチジン、0.02% PS80、約28mMのNaCl、および5.5%、7.0%または8.5% (w/v) いずれかのスクロースを含む低 (10mcg/ml) および高 (50mcg/ml) 用量製剤を、凍結乾燥した。凍結乾燥製剤の安定性は、5℃で4カ月、37℃で4カ月、および50℃で1カ月後に、pHおよび水分を測定することによって試験した。すべての製剤が、pHおよび水分に基づき、安定であった (データは示されていない)。加えて、各血清型について抗原性回復のパーセンテージを、5℃および37℃の両方で1、4および9カ月後、ならびに50℃で1、2および4週間後に、すべての製剤について試験した。結果を図15～20に示す。

【0418】

賦形剤における下記の変化形も調製し、40mcg/ml用量のGBS6製剤について評価した：1) 7% (w/v) スクロース、2) 2% (w/v) スクロースおよび4% (w/v) マンニトール、3) 3% (w/v) スクロースおよび3% (w/v) マンニトール、4) 2% (w/v) スクロースおよび4% (w/v) グリシン、または5) 3% (w/v) スクロースおよび3% (w/v) グリシン。5つすべての製剤について、5℃で3カ月、25℃で3カ月、37℃で3カ月、および50℃で1カ月後、pHおよび水分は安定であった (データは示されていない)。加えて、各血清型について抗原性回復のパーセンテージを、52～8℃、25℃および37℃で1、3および7カ月後、ならびに50℃で1、2および4週間後に、すべての製剤について試験した。結果を図21～25に示す。

【0419】

再溶解された凍結乾燥製剤および液体製剤中のGBS6ワクチンについて、リン酸アルミニウムアジュバントと結合している抗原のパーセントは、比濁法を使用して試験した。20mMのヒスチジン、0.02% PS80、7.0% (w/v) スクロース、および500mcg/mlのアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含有する、凍結乾燥製剤と液体製剤の両方を、低 (10mcg/ml) および高 (50mcg/ml) 用量で調製し

た。様々な濃度の塩化ナトリウム（NaCl）も試験して、抗原結合に対する効果を決定した。凍結乾燥製剤および液体製剤の結果を、それぞれ表35および36に示す。低用量製剤は、凍結乾燥組成物と液体組成物の両方について、約150mM以上のNaCl濃度を使用した場合に相当する結果を有していた。

【0420】

【表35】

表 35. 様々なレベルの NaCl で再溶解された凍結乾燥製剤中においてリン酸アルミニウムと結合している抗原のパーセント

	NaCl (mM)	Ia (%)	Ib (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V (%)
7.0%スクロースを加えた 10mcg/ml の各 コンジュゲート	約 23	40	36	31	34	38	39
	約 80	46	45	37	40	44	44
	約 150	78	69	63	62	82	84
	約 300	77	64	63	60	79	86
7.0%スクロースを加えた 50mcg/mL の各 コンジュゲート	約 23	21	23	24	18	27	24
	約 34	24	23	23	21	27	40
	約 150	66	58	52	46	65	67
	約 300	65	56	50	48	66	64

10

20

【0421】

【表36】

表 36. 様々なレベルの NaCl を加えた液体製剤中におけるリン酸アルミニウムと結合している抗原のパーセント

	NaCl (mM)	Ia (%)	Ib (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V (%)
10mcg/mL の各コンジ ュゲート	40	78.4	72.4	62.9	73.3	70.9	70.8
	100	61.0	63.3	52.3	51.9	49.8	53.9
	150	72.7	77.0	68.1	67.1	64.0	71.0
	200	67.7	73.0	58.6	52.3	51.9	60.1
	300	78.3	79.2	71.1	57.1	58.0	74.1
50mcg/mL の各コンジ ュゲート	100	50.5	38.3	49.0	52.8	51.7	37.9
	150	49.8	37.6	49.0	50.8	50.9	38.7
	200	40.1	35.9	45.3	47.4	44.0	34.7
	300	40.3	41.9	50.9	42.2	43.5	37.5

30

【0422】

（実施例17）

GBS6 製剤の再懸濁特性

240mcg/mL（高）または60mcg/mL（低）の総用量の多糖-タンパク質コンジュゲート、20mMのヒスチジン、150mMのNaCl、0.02%のPS80、および0.5mg/mLのALPO₄を含む、pH6.5のGBS6製剤を調製した。各血清型の同様の一価製剤も、240mcg/mL（高）または60mcg/mL（低）用量で調製した。試料を、1）2mLのガラスバイアルにバイアル当たり0.73mLの充填体積でまたは2）BD HYPACK SCF（商標）PRTC（Becton、Dickinson and Company）の1mLの短いガラス充填済みシリンジ（PFS）に0.58mLの充填体積でのいずれかにて充填し、4432/50ストッパー（We

40

50

s t P h a r m a c e u t i c a l S e r v i c e s , I n c .) でキャップし、約 $5 \pm 1 \text{ mm}$ のヘッドスペースを保った。バイアル中の製剤を立てて貯蔵し、一方、P F S 中のものを、2 つの異なる配向、すなわち先端を下にしておよび水平で、 5°C にて保持した。
【0423】

再懸濁は、2 週間および3 カ月の貯蔵後、製剤を完全に再懸濁するために必要とされる振とう回数によって測定した。2 週間および3 カ月の貯蔵後、バイアルに充填されたすべての製剤を再懸濁するために要した振とうは5 回未満であった。水平に貯蔵した場合、P F S 中の G B S 6 低用量製剤も、3 カ月の貯蔵後、3 回の振とうしか必要としなかった。しかしながら、低用量製剤は、2 週間または3 カ月いずれの貯蔵でも、先端を下にして貯蔵された P F S 中で再懸濁するために、約15 回の振とうを必要とした。比較すると、P F S 中の高用量製剤は、貯蔵のための配向に関わりなく、再懸濁することが困難であった。G B S 6 高用量製剤は、水平貯蔵であっても、50 回超の振とうを必要とした。加えて、高用量製剤を再懸濁するために必要とされる振とう回数は、経時的に増大した。充填 (T 0) 後最大16 時間にわたって先端を下にして貯蔵された P F S 中で G B S 6 高用量製剤を完全に再懸濁するためには、100 回前後の振とうが必要とされ、3 カ月の貯蔵では200 回超の振とうまで増大した。最後に、血清型 I a、I I I、I V および V 由来の多糖コンジュゲートを使用して調製された一部の二価製剤は、両方の配向で貯蔵された P F S 中で再懸濁することが困難であり、経時的に再懸濁するためにさらなる振とうを必要とし、二価製剤の再懸濁挙動が血清型特異的であることを示唆していた。T 0、2 週間および3 カ月における、先端を下にした配向で P F S 中に貯蔵した高および低用量の G B S 6 および二価製剤の再懸濁を比較するデータを、図26 に示す。先端を下にしたおよび水平配向で P F S 中に貯蔵した高および低用量の G B S 6 および二価製剤の再懸濁を比較するデータを、図27 に示す。

【0424】

バイアル、先端を下にした配向の P F S および水平配向の P F S 中での貯蔵延長によって再懸濁が影響を受けるか否かを決定するために、高および低用量の G B S 6 製剤をさらに試験した。加えて、低および高用量製剤と比較するために、中用量 (120 mcg/mL の総用量の多糖-タンパク質コンジュゲート) 製剤も試験した。低用量製剤は、先端を下にした配向の P F S 中での6 カ月の貯蔵後、再懸濁することがより困難になり、50 回超の振とうを必要とすることが発見された。中用量製剤は、先端を下にした配向の P F S 中でわずか1 カ月の貯蔵後、再懸濁することが困難であり、水平配向の P F S 中で1 カ月後、再懸濁するために30 回の振とうを必要とした。結果を表37 に示す。

【0425】

【表37】

表 37. バイアルおよび充填済みシリンジ中に貯蔵した3 つの異なる用量の GBS6 製剤の再懸濁挙動の比較

容器	2~8°Cでの 貯蔵時間 (月)	再懸濁するための振とう回数		
		低用量	中用量	高用量
PFS(先端を下にした)	6	>50	>50*	>50
PFS(水平)	6	<10	30*	>50
バイアル	11	<10	NT	<10

* 1 カ月の貯蔵時間
NT-試験しなかった

【0426】

これらの研究から、再懸濁に関連する困難は、 20 mM のヒスチジン、 150 mM の N a C l、 0.02% の P S 80 および 0.5 mg/mL の A l P O 4 を含む p H 6.5 の

製剤を、バイアルまたはPFS中、水平様式で貯蔵することによって緩和できることが決定された。しかしながら、再懸濁は、製剤が60mcg/mL以下の多糖-タンパク質コンジュゲートの総用量を有するならば、水平配向のPFS中で貯蔵された製剤については、許容限界内（すなわち、10回未満の振とう）に留まるであろう。

【0427】

再懸濁に対する3つの物理的特性の効果を試験するために、追加の研究を実行した：（1）ゼータサイザーナノZS（Malvern Instruments Ltd.）を使用して表面電荷またはゼータ電位、（2）マスターサイザー3000レーザー回折粒径分析器（Malvern Instruments Ltd.）を使用して粒径、および（3）LUMISIZER（登録商標）分散分析器（L.U.M. GmbH）を使用して沈殿または沈降速度。pHの関数としての、 $AlPO_4$ ならびにGBS血清型Ia、Ib、II、III、IVおよびV由来のコンジュゲートのゼータ電位を、それぞれ図28および29に示す。種々のGBS6および一価GBS製剤のゼータ電位および粒径を、表38にまとめる。15の製剤のゼータ電位値は、約-7から-10mVであった。これらの試料について、表面電荷と再懸濁との間に相関関係は認められなかった。他方では、再懸濁は粒径によって影響を受けた。低用量製剤の粒径は、GBS6および一価調製物における高用量製剤のものよりも大きく、概して、粒径が小さくなればなるほど、製剤を均一に再懸濁することがより困難になった。

【0428】

【表38】

表 18. 高および低用量の GBS6 および一価製剤の
ゼータ電位および粒径の比較

	製剤	濃度 (mcg/mL)	ゼータ 電位 (mV)	粒径			T0 におけ る振とう 回数
				D10 (μ m)	D50 (μ m)	D90 (μ m)	
1	GBS 六価	60	-7.1	6.3	11.6	24.5	17
2		240	-8.5	4.2	7.1	12.6	96
3	一価 Ia 型	60	-8.8	6.1	11.8	25.1	16
4		240	-10.0	4.3	7.2	14.3	33
5	一価 Ib 型	60	-8.7	6.7	12.4	23.1	21
6		240	-10.2	4.0	7.2	14.1	27
7	一価 II 型	60	-8.0	6.7	12.9	25.5	16
8		240	-7.1	3.9	7	15	29
9	一価 III 型	60	-9.6	11	20.8	37.3	16
10		240	-9.6	4.8	9.1	32.6	34
11	一価 IV 型	60	-9.0	5.4	9.1	16.4	17
12		240	-7.1	3.8	7.7	22.9	95
13	一価 V 型	60	-7.7	5.3	9.1	17.0	15
14		240	-8.3	4.1	7.2	13.0	62
15	$AlPO_4$ プラセボ	500	-9.1	4.4	7.1	11.6	11

【0429】

時間0、2週間および3カ月における、製剤中のアルミニウム粒子について、沈殿速度を測定した。高用量製剤は、低用量製剤よりも低い沈殿速度を示した。沈殿速度は、5°Cで3カ月の貯蔵後、変化しなかった。再懸濁と沈殿速度との間には直接的な相関関係が認められ、沈殿速度が速くなればなるほど、製剤は再懸濁することが簡単になった。その上、高用量製剤より大きい粒径を有する低用量製剤は、より速い沈殿速度およびより簡単な再懸濁を実証した。データを図30に示す。

【0430】

(実施例 18)

沈殿速度に対する GBS6 製剤因子の効果

再懸濁特徴に対する、抗原濃度、pH および塩濃度等の製剤因子の影響を研究した。最初に、pH 6.5 のヒスチジン緩衝剤中、種々の抗原濃度の GBS6 製剤を調査した。この研究からのデータは、より高い抗原濃度がより短い沈降速度につながることを実証し（図 31 を参照、各血清型について投薬量を示す）、これは再懸濁において困難を引き起こすと予想される。低濃度では、粒子は、衝突および／またはブラウン運動によって互いに干渉することなく、自由に沈降することができる。

【0431】

第二に、pH 6.0、6.5 および 7.0 のヒスチジン緩衝剤中、60 mcg/mL および 300 mcg/mL の総抗原濃度の GBS6 製剤の沈殿挙動を調査した。60 mcg/mL の GBS6 製剤の沈殿挙動は、pH が沈殿速度に対して有意な効果を有することを示した。しかしながら、pH は、300 mcg/mL の GBS6 製剤の沈殿速度に対しては有意な効果を有さなかった。データを図 32 に示す。pH を 7.0 から pH 6.0 に減少させると、 $AlPO_4$ の表面電荷は -10.3 mV から -7.9 mV に減少した（データは示されていない）。典型的には、高いゼータ電位は、粒子間に存在する支配的な斥力により、粒子が媒体中に完全に分散していることを示すと予想される。この場合、粒子は懸濁液中に別個の実体として存在し、沈殿速度は、粒径の広範な分布により、多くの場合遅く、粒子を異なる速度で沈降させる。

【0432】

最後に、 $AlPO_4$ の物理化学的特性に対するイオン強度の効果および懸濁液特性に対するその後の影響も検査した。GBS6 製剤は、3つの異なる用量レベル（60 mcg/mL、150 mcg/mL および 20 mcg/mL の総抗原）および2つの異なる NaCl 濃度（22 mM および 150 mM）で調製した。塩濃度が低くなると、ゼータ電位値はより負になった。最小塩濃度（22 mM）を持つ3つの用量の GBS6 製剤は、いずれも負に帯電していた。ゼータ電位値は、約 -16 から約 -17 mV であった。比較すると、150 mM の NaCl を加えた高および低用量 GBS6 製剤は、約 -8 mV である。より高い塩濃度は、表面電荷を低減させ、沈降速度を加速させており、これは、再懸濁を改善し得る。データを図 33 および表 39 に示す。

【0433】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

表 39. 異なる用量および NaCl 濃度を持つ GBS6 製剤の
ゼータ電位および粒径の比較

	製剤	ゼータ 電位 (mV)	粒径		
			D10 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)
1	GBS6 低用量および低塩 (22mM の NaCl を加えた 60mcg/mL の総抗原)	-15.9	5.4	10.0	20.2
2	GBS6 中用量および低塩 (22mM の NaCl を加えた 150mcg/mL の総抗原)	-17.0	3.8	7.8	19.7
3	GBS6 高用量および低塩 (22mM の NaCl を加えた 240mcg/mL の総抗原)	-17.0	3.9	7.0	14.3
4	GBS6 低用量および高塩 (150mM の NaCl を加えた 60mcg/mL の総抗原)	-7.1	6.3	11.6	24.5
5	GBS6 高用量および高塩 (150mM の NaCl を加えた 240mcg/mL の総抗原)	-8.5	4.2	7.1	12.6

【0 4 3 4】

(実施例 1 9)

異なる抗原およびアルミニウム塩の再懸濁挙動

抗原濃度と製剤を再懸濁する際の困難との間の相関関係が、GBS、またはタンパク質、多糖および非 GBS 多糖-タンパク質コンジュゲート等の他の抗原の一般的な属性に特異的であるのかをさらに調査するために、研究を行った。CRM₁₉₇を含む製剤；GBS 血清型 Ia、Ib、II、III、IV および V 由来の多糖の組合せ；BSA；または 20 の肺炎球菌多糖-タンパク質コンジュゲート (20 v P n C) の組合せを、実施例 17 および 18 において試験した GBS 製剤と同じ緩衝剤マトリックスおよび 0.5 mg/mL の ALPO₄ アジュバント中、同じ高用量 (240 mcg/mL の総抗原) で製剤化した。ALHYDROGEL (登録商標) 85 (Brenntag Biosector A/S) を用いて製剤化した GBS6 も、コンパレーターとして包含されていた。試料を、下記の属性について試験した：1) 再懸濁時間 (200 rpm で 30 ~ 45 分遠心分離後、手動シェイカーを使用して、1.5 mL の遠心管中でペレットを再懸濁するために必要とされる時間)、2) 目視観察によるシリンダー中での沈降 (異なる時間間隔での沈殿床高さ)、3) 粒径、4) 表面電荷、および 5) MICRO-FLOW IMAGING (登録商標) (MFI) フロー DPA 4200 顕微鏡 (Brightwell Technologies Inc.) を使用する粒径分布。

【0 4 3 5】

異なる抗原は、多様な沈降および再懸濁挙動を実証した (データをそれぞれ図 34 および表 40 に示す)。より早く沈降した製剤は、先に認められた通り、再懸濁することがより簡単であった。再懸濁と平均粒径または粒径分布との間に相関関係は認められなかった。粒径分布データを図 35 A および 35 B に示す。しかしながら、ALHYDROGEL (登録商標) 85 を含む GBS6 製剤は、再懸濁することが最も簡単であり、有意に大きい粒径、より速い沈降速度および低い表面電荷を示し、粒径および表面電荷が再懸濁と相関することを示唆していた。水酸化アルミニウムは pH 6.5 で正に帯電しており、一方、コンジュゲートは負に帯電しており、強い静電相互作用および電荷のより高い中和につ

ながることに留意すべきである。それに反して、 $AlPO_4$ は、 $pH 6.5$ で負に帯電している。

【0436】

【表40】

表 40. 異なる抗原製剤の、粒径、再懸濁時間およびゼータ電位の比較

抗原	粒径			再懸濁時間 (秒)	ゼータ電位 (mV)
	D10	D50	D90		
GBS6	4.5	7.4	12.6	75	-8.1
CRM ₁₉₇	5.1	7.4	11.1	20	-6.4
GBS 多糖	4.8	6.9	9.7	10	-7.1
BSA	4.8	6.9	10.1	15	-6.6
20vPnC	7.7	14.8	28.9	25	-6.9
GBS6 + ALHYDROGEL® 85	15.0	26.8	46.9	15	-5

【0437】

(実施例20)

デバイス配置の修正

研究は、製剤が、バイアル中で簡単に再懸濁するがPFS中ではせず、それらはいずれも1型ガラスから作製されており、ゴムストッパーを使用することを示した。しかしながら、2つの系の間の主な差異は、製剤の自由混合を可能にする、利用可能なヘッドスペースであり、これは、より均一に再懸濁された生成物につながる。したがって、PFS中のより高いヘッドスペースがさらなる混合を可能にするか否かを理解するために、PFS中での再懸濁に影響を及ぼす因子として、ヘッドスペースの効果を調査した。シリンジに高用量GBS6製剤を($AlPO_4$ とともに)充填し、様々なヘッドスペース(2mm、6mmおよび10mm; 図36に示す)を設けてストッパーをし、水平配向で2~8℃にて貯蔵した。2週間の貯蔵時間後、再懸濁挙動(振とう回数)を試験した。データは、ヘッドスペースを増大させることにより、再懸濁に必要とされる振とう回数が減少することを示した。データを表41に示す。再懸濁の簡単さは、より簡単な混合を可能にするより高いヘッドスペースによる、乱流の増大に起因していた。この挙動は、バイアル中でも明白であり、(より大きいヘッドスペースによる)いかなる再懸濁の課題も示さない。

【0438】

【表41】

表 41. GBS6 製剤の再懸濁特徴に対する、ヘッドスペースを増大させることの効果

ヘッドスペース(±1 mm)	振とう回数*
2	>50
6	17
10	10

貯蔵時間:2~8℃で2週間

*3つの試料の平均

【0439】

(実施例 2 1)

アルミニウム濃度の影響

製剤を再懸濁する能力に対するアルミニウム濃度の影響を決定するために、研究を行った。これは、 AlPO_4 濃度の減少とともに GBS6 製剤を評価することによって為された。GBS6 製剤は、 $0.5 \sim 0.05 \text{ mg/mL}$ の範囲のアルミニウムレベルの濃度を持つ同じ緩衝剤マトリックス中、高用量 (240 mcg/mL の総抗原) で調製した。試料を、BD HYPACK SCF (商標) PRTC (Becton, Dickinson and Company) の 1 mL の短いガラス PFS に 0.58 mL の充填体積で充填し、4432/50 ストッパー (West Pharmaceutical Services, Inc.) でキャップし、約 0.4 mm のヘッドスペースを保ち、水平に貯蔵した。再懸濁を、 5°C にて 0、1、2 および 4 週間で試験した。個々の製剤における血清型のそれぞれについての全および結合抗原性を、血清型特異的ポリクローナル抗体を使用する比濁法によって分析した。

【0440】

アルミニウムレベルの減少は再懸濁に対してプラスの効果をも有していたが、 0.3 mg/mL のアルミニウムを加えた製剤は、T0 では 20 回超の振とう、2 週間では 50 回超の振とうを依然として必要とした。 0.05 mg/mL のアルミニウムを含有する製剤は、2 週間の水平貯蔵後、約 20 回の振とうを必要とした。データを図 37 に示す。

【0441】

アルミニウムと結合している抗原の量の減少も認められた。データを図 38 に示す。

【0442】

(実施例 2 2)

異なる凝結剤のスクリーニング

微粒子を伴う懸濁液は、遅い沈降速度を示し、再懸濁することを困難または不可能にすると予想される、低体積高密度の沈降をもたらすことになる。再懸濁特性は、懸濁粒子上の表面電荷を中和するために凝結剤を添加する等の薬学的操作によって制御することができ、より大きい粒子綿状団粒、またはクラスターの形成を可能にし、それ故、沈殿速度を増大させ、再懸濁を改善する。非凝結および凝結懸濁液間の沈殿挙動における差異を、表 42 に例証する。

【0443】

【表 42】

表 42. 非凝結および凝結懸濁液の比較

	非凝結	凝結
1	個々の粒子として存在する固体、低凝集	凝集体として存在する固体
2	粒子は斥力を呈する	粒子は引力または低い斥力を呈する
3	沈殿の速度は遅く、粒径は小さい	沈殿の速度は高く、粒子は疎性凝集体を形成する
4	粒子はケーキとして沈降する	粒子はフロックとして沈降する

【0444】

GBS6 製剤への凝結剤の組み込みを、再懸濁特性を改善するためのアプローチとして採用した。下記の凝結剤およびアルミニウムベースの塩を、高用量 GBS6 製剤の沈殿速度および再懸濁に対するそれらの効果について評価した：

凝結剤：

1. GBS6 対照 (20 mM の His 緩衝剤、 150 mM の NaCl 、 0.02% の PS80 および 0.5 mg/mL の AlPO_4 を含む $\text{pH } 6.5$ の GBS6)
2. 硫酸アンモニウム (0.25 mg/mL)
3. 硫酸アンモニウムおよび KCl (0.25 mg/mL および 20 mM)

4. CaCl_2 (0.25 mg/mL)
5. SDS (1%)
6. リン酸カリウム (50 mM)
7. NaCl (1M)

アルミニウムベースの塩：

1. ALHYDROGEL (登録商標) 85 (Brenntag Biosector A/S) [$\text{Al}(\text{OH})_3$; 0.25 mg/mL]
2. ADJUPHOS (登録商標) (Brenntag Biosector A/S) (0.5 mg/mL)
3. AlPO_4 および $\text{Al}(\text{OH})_3$ (0.25 mg/mL ずつの 1:1 混合物)
【0445】

10

20 mM のヒスチジン、150 mM の NaCl、0.02% の PS80 および 0.5 mg/mL の AlPO_4 を、上記に挙げた凝結剤の 1 つまたは上記に挙げたアルミニウムベースの塩の 1 つのいずれかとともに含む、pH 6.5 の高用量 (240 $\mu\text{g/mL}$) の GBS6 製剤を調製した。試料を、加速再懸濁時間 (試料を、1.5 mL の遠心管中、200 rpm で 45 分間にわたって回転させた後)、沈降速度、粒径、表面電荷、ならびに全および結合コンジュゲートについて試験した。

【0446】

試験したすべての凝結剤の中でも、NaCl およびリン酸カリウムは、GBS6 対照の 180 秒と比較して、再懸濁時間を 20 秒未満まで大きく低減させることができた。データを図 39 および表 42 に示す。これらの 2 つの試料の沈降速度も、カルシウムもしくはアンモニウム塩または SDS を加えた他の製剤よりも速かった。データを図 40 に示す。1M NaCl を含有する製剤は、凝結の理論に基づいて予測された通り、大きい粒径および低い表面電荷を有していた。しかしながら、50 mM のリン酸塩を含有する試料では同じことが認められず、リン酸塩が NaCl とは異なる機構を介して再懸濁を容易にしたことを示唆していた。データを表 42 に示す。

20

【0447】

試験した 2 つのアルミニウム塩の中でも、ALHYDROGEL (登録商標) 85 は、ADJUPHOS (登録商標) よりも優れた再懸濁挙動を実証した。ALHYDROGEL (登録商標) 85 を含有する製剤についての主要な懸案事項は、抗原との、 AlPO_4 と比較して高い結合強度によって示される通り、抗原と密接に結合することである。データを表 43 に示す。この現象は、ワクチンの免疫応答に対して不利な影響を有することが報告されている。Egan, P. M. ら、Vaccine、27:3175~3180 (2009)。

30

【0448】

40

50

【表 4 3】

表 43. 凝結剤またはアルミニウム塩を加えた GBS6 製剤の再懸濁特徴

バッチ 00708311-114		粒径(μm)			再懸濁時間(秒)	ゼータ 電位 (mOsm)	結合 (%)
		D10	D50	D90			
1	GBS6 対照	4.46	7.25	12.27	180	-7.9	40.8
2	0.25mg/mL の硫酸 アンモニウム	4.40	7.23	11.90	47	-7.2	36.8
3	硫酸塩+KCl	4.62	7.81	15.83	33	-7.8	37.1
4	0.25 mg CaCl_2	4.47	7.34	13.27	90	-6.9	40.5
5	ALHYDROGEL [®] 85 および AlPO_4	4.96	6.95	9.76	40	-9.2	68.2
6	1.0 % SDS	5.13	6.94	9.52	155	-20.0	17.6
7	50mM のリン酸緩 衝剤	4.53	7.27	12.33	20	-12.5	10.8
8	1M NaCl	7.10	13.10	25.13	17	-1.5	11.2
9	0.25 mg/mL ALHYDROGEL [®] 85	12.80	23.20	42.10	10	-5.3	93.1
10	0.25 mg/mL ADJU- PHOS [®]	2.37	5.27	18.87	120	-8.5	16.2

【0 4 4 9】

(実施例 2 3)

NaCl およびリン酸塩レベルの最適化

NaCl およびリン酸カリウムの濃度を、所望の再懸濁特徴だけでなく、ワクチンの反応源性および効能に関連する 2 つの重要な側面である、オスモル濃度およびアルミニウムとの抗原結合等の他の属性も満たすと予想されるレベルに最適化するために、研究を行った。

【0 4 5 0】

様々な濃度の NaCl (150 ~ 690 mM)、20 mM のヒスチジン、0.02 % の PS80 および 0.5 mg/mL の AlPO_4 を含む、pH 6.5 の高用量 (240 mcg/mL の総抗原) の GBS6 製剤を調製した。2 つの塩の組合せ効果を調査するために、様々なリン酸カリウム濃度 (10 ~ 50 mM) および 2 つの異なる NaCl 濃度 (150 mM および 240 mM) を含む製剤も調製した。製剤化されたバルク試料を、沈降速度、遠心分離後の再懸濁時間、粒径および表面電荷について試験した。

【0 4 5 1】

NaCl 濃度を増大させることにより、再懸濁時間が有意に低減した。データを図 4 1 に示す。300 mM の NaCl で再懸濁時間の急激な減少があり、製剤が脱凝結から凝結状態になり、300 mM の NaCl 濃度がこの遷移のための臨界凝集濃度 (CCC) であることを示唆していた。CCC は、10 mM 以上のリン酸塩の存在下では 240 mM に低減し、NaCl およびリン酸塩との相乗効果があったことを示唆していた。データを図 4 2 に示す。図 4 3 A および 4 3 B に示す通り、10 ~ 30 mM のリン酸塩を 240 mM の NaCl とともに含有する試料を用いて、速い沈降および凝結沈殿物が認められた。ゼータ電位および粒径データは、NaCl 濃度の増大が、表面電荷の低減および粒径の増大につながることを明らかにし、これは、凝結理論を裏付けるものであった。この傾向は、リン酸塩では明らかでなかった。データを表 4 4 に示す。この研究からの結果に基づき、240 mM の NaCl および 20 mM のリン酸塩を最適な標的濃度とみなした。

【 0 4 5 2 】

【表 4 4】

表 44. ゼータ電位および粒径に対する NaCl およびリン酸塩の効果

	ゼータ電位		粒径		
	ZP (mV)	標準偏差	D10	D50	D90
150mM NaCl	-9.1	0.5	2.6	5.5	16.3
200mM NaCl	-7.6	0.8	3.3	6.3	12.4
250mM NaCl	-8.2	0.9	3.5	6.6	15.4
300mM NaCl	-5.5	0.5	4.3	7.1	11.9
390mM NaCl	-6.8	0.9	4.6	7.2	11.5
540mM NaCl	-5.1	0.5	5.3	9.3	19.9
690mM NaCl	-3.4	0.5	5.9	10.8	22.9
150mM NaCl + 10mM リン酸塩	-8.9	0.4	3.4	6.3	11.1
150mM NaCl + 20mM リン酸塩	-8.3	0.8	3.2	6.2	12.6
150mM NaCl + 30mM リン酸塩	-9.9	0.9	3.2	6.2	12.2
240mM NaCl + 10mM リン酸塩	-6.0	0.4	5.3	6.5	7.9
240mM NaCl + 20mM リン酸塩	-10.5	0.9	4.3	7.1	11.6
240mM NaCl + 30mM リン酸塩	-5.5	2.1	4.5	7.4	13.4

【 0 4 5 3 】

40mcg/mLの多糖濃度の各血清型（240mcg/mLの総抗原）、20mMのリン酸塩、240mMのNaCl、0.02%のPS80および0.5mg/mLのALPO₄を含む、pH6.5の3つのバッチのGBS6製剤を、さらに特徴付けた。20mMのHis緩衝剤、150mMのNaCl、0.02%のPS80および0.5mg/mLのALPO₄を含むpH6.5のGBS6の製剤を、対照として包含した。追加のNaClおよびリン酸塩を加えたpH6.5の3つの製剤はすべて、16秒の平均再懸濁時間（対照の120秒と比較して）および500mOsmを上回るオスモル濃度で簡単な再懸濁を実証した。結合抗原性は、血清型のそれぞれについて、対照より約20%低かった。データを表45に示す。

【 0 4 5 4 】

10

20

30

40

50

【表 4 5】

表 45. 追加の NaCl およびリン酸塩を加えた GBS6 製剤の特徴付け

	再懸濁 (秒)	オスモル 濃度 (mOsm)	ゼータ 電位 (mV)	AlPO ₄ との抗原結合 (%)						粒径 (μ m)		
				Ia	Ib	II	III	IV	V	D10	D50	D90
GBS6 対照	120	316	-9.1	41	43	51	34	41	51	2.6	5.5	16.3
20mMの リン酸塩 および 240mMの NaClを加えた pH6.5の GBS6	16	519	-6.0	24	21	23	21	22	29	5.3	6.5	7.9

*3 つのバッチの平均。

【0 4 5 5】

(実施例 2 4)

2 4 0 m M の N a C l および 2 0 m M のリン酸塩を含有する G B S 6 製剤の短期安定性

2 0 m M のリン酸塩、2 4 0 m M の N a C l、0. 0 2 % のポリソルベート 8 0 および 0. 5 m g / m L の A l P O₄ を含む、p H 6. 5 の 3 つの用量 (6 0 m c g / m L、1 2 0 m c g / m L および 2 4 0 m c g / m L の総抗原) の G B S 6 製剤を、B D H Y P A K S C F (商標) P R T C (Becton, Dickinson and Company) の 1 m L の短いガラス P F S に 0. 5 8 m L の充填体積で充填し、4 4 3 2 / 5 0 ストッパー (West Pharmaceutical Services, Inc.) でキャップし、約 0. 4 m m のヘッドスペースを保った。先端を下にしたおよび水平配向両方の再懸濁を、室温で 1 カ月間および 5 °C で 3 カ月間にわたって、安定性についてモニターした。

【0 4 5 6】

1 カ月のデータは、水平に貯蔵された P F S が、3 つの用量レベルすべてについて、1 0 回以下の振とうで再懸濁され得ることを示した。しかしながら、先端を下にして貯蔵された P F S は、4 0 回以上の振とうを依然として必要とした。データを表 4 6 に示す。各血清型の全抗原性および A l P O₄ との結合は、室温で 1 カ月間にわたって安定であった。データを表 4 7 に示す。

【0 4 5 7】

【表 4 6】

表 46. 水平に対先端を下にして貯蔵された PFS の再懸濁挙動の比較

用量	pH	2~8°Cでの 貯蔵時間 (月)	水平 (振とう回数)	先端を下にし た(振とう回数)
低	6.5	1 カ月	3	40
中	6.5		8	> 45
高	6.5		7	> 50
高	6.0		10	50

【0 4 5 8】

【表 47】

表 47. GBS 製剤の全抗原性

用量	時点	全抗原性($\mu\text{g/mL}$)					
		Ia	Ib	II	III	IV	V
高	0	40	41.2	41.1	42.0	40.4	39.1
	1 カ月室温	44.8	43.1	44.6	44.3	43.7	44.6
中	0	18.3	17.9	19.0	18.2	18.4	17.9
	1 カ月室温	19.5	19.3	21.7	20.4	20.0	20.6
低	0	10.4	11.6	9.5	8.6	9.2	9.9
	1 カ月室温	9.0	9.1	9.5	9.2	9.0	9.3
AIPO ₄ との結合%							
高	0	30.8	24.6	26.2	18.7	22.3	31.2
	1 カ月室温	33.3	29.7	33.3	19.9	25.9	35.0
中	0	39.9	40.0	29.1	20.0	25.5	37.9
	1 カ月室温	45.0	40.5	39.9	33.6	34.0	40.8
低	0	49.3	52.5	38.0	25.3	31.2	45.2
	1 カ月室温	51.5	42.8	41.4	30.1	37.6	45.3

【0459】

(実施例 25)

PFS 中の凝結剤を加えた GBS 製剤のための実験計画法 (DOE) およびクオリティ・バイ・デザイン (QbD) 概念の適用

PFS に最適な GBS 6 製剤を決定するために、実験計画法 (DOE) を実施した。応答曲面法 (ボックスベーンケン計画) を使用して、3 つの因子を評価した: 1) pH (6.0、6.5 および 7.0)、2) NaCl 濃度 (220 mM、240 mM および 260 mM)、および 3) リン酸塩濃度 (15 mM、20 mM および 25 mM)。すべての製剤は、他には、240 mg/mL 用量 (60 $\mu\text{g/mL}$ の各血清型、0.02% の PS80、原薬から持ち越された約 10 mM のヒスチジン、および 0.5 mg/mL の AIPO₄) を含んでいた。合計 15 の製剤を、再懸濁の簡単さについて調査した (表 48 を参照)。

【0460】

10

20

30

40

50

【表 4 8】

表 48. DoE 研究製剤

製剤	NaCl (mM)	リン酸 Na (mM)	pH
1	240	20	6.5
2	260	15	6.5
3	240	15	7.0
4	220	25	6.5
5	260	25	6.5
6	240	25	6.0
7	240	20	6.5
8	240	15	6.0
9	220	20	7.0
10	240	20	6.5
11	260	20	6.0
12	240	25	7.0
13	220	15	6.5
14	220	20	6.0
15	260	20	7.0

【0 4 6 1】

あらゆる関連変動を説明するために、研究は、3 連でおよび 2 名のオペレーターによって実行した。試料を、BD HYPAK SCF（商標）PRTC（Becton, Dickinson and Company）の 1mL の短いガラス PFS に 0.58mL の充填体積で充填し、4432/50 ストッパー（West Pharmaceutical Services, Inc.）でキャップし、約 0.4mm のヘッドスペースを保った。充填したシリンジを、2～8℃および 25℃で 3 カ月間にわたって水平に貯蔵した。再懸濁を 5℃でのみモニターし、比濁法による強度を、5℃および 25℃でモニターした。再懸濁結果を表 49 に示す。

【0 4 6 2】

【表 4 9】

表 49. 3 カ月における再懸濁に必要とされる振とう回数

製剤	オペレーター1*	オペレーター2*
1	11	8
2	8	6
3	7	4
4	11	8
5	8	8
6	19	12
7	7	7
8	19	14
9	10	6
10	8	6
11	11	13
12	8	4
13	11	11
14	28	17
15	5	5

*3 つの試料の平均

【0 4 6 3】

JMP 統計ソフトウェア (SAS Institute) を使用して、データを分析し、再懸濁するために 10 回以下の振とうを必要と予想される最適かつ最も強固な製剤を予測した。オペレーターのうちの 1 名についての再懸濁データに基づく JMP からの予測プロファイラーを、図 4 5 に示す。pH および塩は、振とう回数に影響を及ぼした有意な個々の要因であった。加えて、リン酸塩と pH との間の相互作用が有意であった。望ましき指数に基づき、下記の条件が、より簡単な再懸濁 (振とう回数 10 回以下) を可能にした: pH 7.0 ± 0.5 、 245 ± 20 mM の NaCl および 20 ± 5 mM のリン酸塩。第 2 のオペレーターからのデータを分析した際にも、同様の結果を取得した。

【0 4 6 4】

しかしながら、推奨される製剤パラメーターによれば、結合の程度は低かった。図 4 6 に示す通り、GBS 血清型のそれぞれについて、コンジュゲートの結合は、10 ~ 20 % の間で変動した。加えて、推奨される製剤は、より高いオスモル濃度 (約 500 mOsm / kg) を有していたが、依然として十分にワクチンの範囲内であった。

【0 4 6 5】

(実施例 2 6)

Al(OH)₃ ベースの GBS 6 製剤

実施例 2 2 において記述されている通り、Al(OH)₃ を加えた GBS 6 製剤は、優れた再懸濁挙動を有していたが、抗原とのより高い結合強度を有しており、これは、免疫応答に対して不利な影響を有し得る。したがって、GBS コンジュゲートとの Al(OH)₃ の結合を特徴付け、Al(OH)₃ の吸着強度を変調するために、実験を行った。

【0 4 6 6】

20 mM のヒスチジン、150 mM の NaCl および 0.02 % の PS80 を含む pH 6.5 の高用量 (240 mcg / mL の総コンジュゲート) の GBS 6 製剤を、様々な濃度の Al(OH)₃ (0.7 mg / mL、0.6 mg / mL、0.5 mg / mL、0.4 mg / mL、0.3 mg / mL、0.2 mg / mL、0.15 mg / mL、0.1 mg / mL および 0.05 mg / mL) を用いて調製した。比濁法により全および上清抗原性を測定することによって、結合を決定した。図 4 7 に示す通り、Al(OH)₃ との結合は、6 つすべての血清型について、0.5 mg / mL の Al(OH)₃ で横ばいになった。

吸着容量および吸着係数は、ラングミュア式によって決定した。データを、コンパレーターとしての $AlPO_4$ についてのデータとともに、表 50 に示す。

【0467】

【表 50】

表 50. $AlPO_4$ および $Al(OH)_3$ との GBS コンジュゲート結合の特徴

GBS 血清型	吸着容量 mcg 血清型/ mg Al	吸着係数 mL/mg タンパク質
$AlPO_4$ を用いる		
Ia	39.5	1488.2
Ib	38.6	1786.2
II	41.8	377.6
III	25.6	1649.8
IV	29.8	1407.6
V	41.7	1403.5
$Al(OH)_3$ を用いる		
Ia	109.9	5352.9
Ib	117.6	3400.0
II	161.3	3263.2
III	122.0	2411.8
IV	138.9	3428.6
V	147.1	2956.5

【0468】

$Al(OH)_3$ の結合強度を変調するために、製剤中の緩衝剤を、リン酸ナトリウムに変更して、水酸化アルミニウム上の表面ヒドロキシルをリン酸塩で置き換え、配位子交換を低減させた。150 mM の $NaCl$ 、0.02% の $PS80$ および 0.15 mg/mL の $Al(OH)_3$ を含む pH 6.5 の GBS 6 製剤を、3つの異なるリン酸塩濃度（10 mM、20 mM および 30 mM）および種々の用量（15 mcg/mL、30 mcg/mL、60 mcg/mL、90 mcg/mL、120 mcg/mL、150 mcg/mL および 210 mcg/mL の総コンジュゲート）で調製した。全および上清抗原性によって、結合を決定した。吸着容量および係数は、ラングミュア式によって決定した。データを、コンパレーターとしての $AlPO_4$ 製剤についてのデータとともに、表 51 に示す。

【0469】

10

20

30

40

50

【表 5 1】

表 51. $\text{Al}(\text{OH})_3$ との GBS コンジュゲート結合に対するリン酸塩濃度の効果

GBS 血清型	リン酸 Na 濃度 (mM)*	吸着係数 (ml/mg)	吸着容量(μg 血清型/ mg Al)	Al との 結合 (%)**	抽出%***
Ia	0	5353	110	>95	14
	10	890	32	66	103
	20	665	26	52	101
	30	429	19	45	109
	AlPO_4 製剤	40	1488	46	該当なし
Ib	0	3400	118	>95	6
	10	1622	56	66	93
	20	520	21	63	105
	30	338	15	44	103
	AlPO_4 製剤	39	1786	50	該当なし
II	0	3263	161	>95	2
	10	1333	86	80	99
	20	852	79	75	105
	30	711	67	66	103
	AlPO_4 製剤	42	378	57	該当なし
III	0	2412	122	>95	10
	10	878	37	66	104
	20	478	23	47	107
	30	207	7	30	109
	AlPO_4 製剤	26	1650	37	該当なし
IV	0	3429	139	>95	4
	10	2571	62	73	102
	20	1509	39	63	104
	30	1114	29	47	95
	AlPO_4 製剤	30	1408	44	該当なし
V	0	4957	147	>95	3
	10	2040	65	77	104
	20	1982	45	64	106
	30	1758	47	58	95
	AlPO_4 製剤	42	1404	53	該当なし

* AlPO_4 製剤は、原薬から持ち越された約 10mM のヒスチジンを含有する。

** AlPO_4 製剤の結合は、3 つのバッチから平均化される。

*** 抽出条件:0.1N NaOH、室温で 24 時間にわたって回転。

【0 4 7 0】

$\text{Al}(\text{OH})_3$ との GBS 6 の結合容量および係数は、 AlPO_4 とのものよりも 3 ～ 4 倍高かった。しかしながら、GBS 6 との水酸化アルミニウムの吸着強度は、製剤にリン酸塩を導入することによって変調した。リン酸塩濃度は、吸着強度および容量に不利な影響を与えた。リン酸塩は、抗原結合パーセントにも影響を及ぼしたが、 AlPO_4 のレベルを依然として上回っていた。加えて、GBS は、リン酸塩の存在下で、アルミニウムから完全に抽出することができた。結果に基づき、水酸化アルミニウムでは、20 mM のリン酸塩、150 mM の NaCl および 0.2 % の PS80、pH 6.5 が最適であることが決定された。

【0 4 7 1】

本発明の態様

下記の条項は、本発明の追加の実施形態を記述するものである。

【0472】

C1. B群レンサ球菌（GBS）莢膜多糖と担体タンパク質とを含む免疫原性多糖－タンパク質コンジュゲートであって、前記莢膜多糖が、約60%超のシアル酸レベルを有する、免疫原性多糖－タンパク質コンジュゲート。

【0473】

C2. 莢膜多糖が、血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される、C1の免疫原性コンジュゲート。

【0474】

C3. 莢膜多糖が血清型Iaである、C2の免疫原性コンジュゲート。

10

【0475】

C4. 莢膜多糖が血清型Ibである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0476】

C5. 莢膜多糖が血清型IIである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0477】

C6. 莢膜多糖が血清型IIIである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0478】

C7. 莢膜多糖が血清型IVである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0479】

C8. 莢膜多糖が血清型Vである、C2の免疫原性コンジュゲート。

20

【0480】

C9. 莢膜多糖が血清型VIである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0481】

C10. 莢膜多糖が血清型VIIである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0482】

C11. 莢膜多糖が血清型VIIIである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0483】

C12. 莢膜多糖が血清型IXである、C2の免疫原性コンジュゲート。

【0484】

C13. 莢膜多糖が、約95%超のシアル酸レベルを有する、C1～C12のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

30

【0485】

C14. 莢膜多糖が、約100%のシアル酸レベルを有する、C1～C13のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0486】

C15. 莢膜多糖が、多糖1mM当たり少なくとも約0.6mMのシアル酸を有する、C1～C14のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0487】

C16. 莢膜多糖が、多糖1mM当たり少なくとも約0.65mMのシアル酸を有する、C1～C15のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

40

【0488】

C17. 莢膜多糖が、多糖1mM当たり少なくとも約0.7mMのシアル酸を有する、C1～C16のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0489】

C18. 莢膜多糖が、多糖1mM当たり少なくとも約0.75mMのシアル酸を有する、C1～C17のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0490】

C19. 莢膜多糖が、多糖1mM当たり少なくとも約0.8mMのシアル酸を有する、C1～C18のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0491】

50

C 2 0 . 莢膜多糖が、多糖 1 m M 当たり少なくとも約 0 . 8 5 m M のシアル酸を有する、C 1 ~ C 1 9 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 2 】

C 2 1 . 莢膜多糖が、多糖 1 m M 当たり少なくとも約 0 . 9 m M のシアル酸を有する、C 1 ~ C 2 0 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 3 】

C 2 2 . 莢膜多糖が、多糖 1 m M 当たり少なくとも約 0 . 9 5 m M のシアル酸を有する、C 1 ~ C 2 1 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 4 】

C 2 3 . 莢膜多糖が、約 5 k D a から約 1 , 0 0 0 k D a の間の分子量を有する、C 1 ~ C 2 2 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 5 】

C 2 4 . 莢膜多糖が、約 2 5 k D a から約 7 5 0 k D a の間の分子量を有する、C 1 ~ C 2 3 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 6 】

C 2 5 . 莢膜多糖が、約 2 5 k D a から約 4 0 0 k D a の間の分子量を有する、C 1 ~ C 2 4 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 7 】

C 2 6 . 莢膜多糖が、約 2 5 k D a から約 2 0 0 k D a の間の分子量を有する、C 1 ~ C 2 5 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 8 】

C 2 7 . 莢膜多糖が、約 1 0 0 k D a から約 4 0 0 k D a の間の分子量を有する、C 1 ~ C 2 6 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 4 9 9 】

C 2 8 . コンジュゲートの分子量が、約 3 0 0 k D a から約 2 0 , 0 0 0 k D a の間である、C 1 ~ 2 7 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 0 】

C 2 9 . コンジュゲートの分子量が、約 1 , 0 0 0 k D a から約 1 5 , 0 0 0 k D a の間である、C 1 ~ C 2 8 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 1 】

C 3 0 . コンジュゲートの分子量が、約 1 , 0 0 0 k D a から約 1 0 , 0 0 0 k D a の間である、C 1 ~ C 2 9 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 2 】

C 3 1 . 莢膜多糖が、約 0 % から約 4 0 % の間、O - アセチル化されている、C 1 ~ C 3 0 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 3 】

C 3 2 . 莢膜多糖が、約 5 % 未満 O - アセチル化されている、C 1 ~ C 3 1 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 4 】

C 3 3 . 莢膜多糖が、約 4 % 未満 O - アセチル化されている、C 1 ~ C 3 2 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 5 】

C 3 4 . 莢膜多糖が、約 3 % 未満 O - アセチル化されている、C 1 ~ C 3 3 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 6 】

C 3 5 . 莢膜多糖が、約 2 % 未満 O - アセチル化されている、C 1 ~ C 3 4 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【 0 5 0 7 】

C 3 6 . 莢膜多糖が、約 1 % 未満 O - アセチル化されている、C 1 ~ C 3 5 のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

10

20

30

40

50

【0508】

C37. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり少なくとも約0.1mMのOーアセテートを含む、C1～C36のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0509】

C38. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり少なくとも約0.2mMのOーアセテートを含む、C1～C37のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0510】

C39. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり少なくとも約0.3mMのOーアセテートを含む、C1～C38のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0511】

C40. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり少なくとも約0.35mMのOーアセテートを含む、C1～C39のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0512】

C41. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり少なくとも約0.4mMのOーアセテートを含む、C1～C40のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0513】

C42. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり約0.01mM未満のOーアセテートを含む、C1～C41のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0514】

C43. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり約0.05mM未満のOーアセテートを含む、C1～C42のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0515】

C44. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり約0.04mM未満のOーアセテートを含む、C1～C43のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0516】

C45. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり約0.03mM未満のOーアセテートを含む、C1～C44のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0517】

C46. 莢膜多糖が、糖繰り返し単位1mM当たり約0.02mM未満のOーアセテートを含む、C1～C45のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0518】

C47. 多糖が、それぞれ独立して担体タンパク質とコンジュゲートしている、C1～C46のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0519】

C48. 担体タンパク質が、CRM₁₉₇または破傷風トキシソイドである、C1～C47のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0520】

C49. 担体タンパク質が、CRM₁₉₇である、C1～C48のいずれか一項の免疫原性コンジュゲート。

【0521】

C50. 莢膜多糖を単離する方法であって、有機試薬を、莢膜多糖生産菌を含む細胞ブロスと反応させるステップを含む方法。

【0522】

C51. 細菌を溶菌しない、C50の方法。

【0523】

C52. 細菌を熱で死滅させる、C50またはC51の方法。

【0524】

C53. 遠心分離して細胞ペーストを提供するステップをさらに含む、C50～C52のいずれか一項の方法。

【0525】

10

20

30

40

50

C 5 4 . 濾過するステップをさらに含む、C 5 0 ~ C 5 3 のいずれか一項の方法。

【0526】

C 5 5 . 前記濾過するステップが、血液透析濾過である、C 5 4 の方法。

【0527】

C 5 6 . 莢膜多糖生産菌が、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、チフス菌 (*Salmonella typhi*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) および大便レンサ球菌 (*Enterococcus faecalis*) からなる群から選択される、C 5 0 ~ C 5 5 のいずれか一項の方法。

10

【0528】

C 5 7 . 細菌が、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) である、C 5 6 の方法。

【0529】

C 5 8 . 前記有機試薬が、誘導体化ヒドロキシルアミン化合物である、C 5 0 ~ C 5 7 のいずれか一項の方法。

【0530】

C 5 9 . ヒドロキシルアミンが、実施例 2 の表 2 に記載された任意のヒドロキシルアミンである、C 5 0 ~ 5 8 のいずれか一項の方法。

20

【0531】

C 6 0 . ヒドロキシルアミンが、ジベンジルヒドロキシルアミン、ジエチルヒドロキシルアミン、ヒドロキシルアミン、エチレンジアミン、トリエチレンテトラミン、1, 1, 4, 7, 10, 10ヘキサメチルトリエチレンテトラミンおよび2, 6, 10, トリメチル2, 6, 10トリアザウンデカンからなる群から選択される、C 5 0 ~ C 5 9 のいずれか一項の方法。

【0532】

C 6 1 . ヒドロキシルアミンの濃度が、約 5 mM から約 200 mM である、C 5 0 ~ C 6 0 のいずれか一項の方法。

30

【0533】

C 6 2 . 反応の pH が、約 5.5 から約 9.5 である、C 5 0 ~ C 6 1 のいずれか一項の方法。

【0534】

C 6 3 . 反応が、約 20 °C から約 85 °C の温度で起こる、C 5 0 ~ C 6 2 のいずれか一項の方法。

【0535】

C 6 4 . 反応反応時間が、約 10 時間から約 90 時間である、C 5 0 ~ C 6 3 のいずれか一項の方法。

40

【0536】

C 6 5 . C 1 ~ C 4 9 のいずれか一項の免疫原性多糖-タンパク質コンジュゲートを作製する方法であって、莢膜多糖が、C 5 0 ~ C 6 4 のいずれか一項の方法に従って単離される方法。

【0537】

C 6 6 . C 5 0 ~ C 6 4 のいずれか一項の方法によって調製された莢膜多糖を含む、免疫原性多糖-タンパク質コンジュゲート。

【0538】

C 6 7 . C 1 ~ C 4 9 または C 6 6 のいずれか一項の免疫原性多糖-タンパク質コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

50

【0539】

C68. 多糖－タンパク質コンジュゲートを含み、前記コンジュゲートが、B群レンサ球菌（GBS）血清型IVならびにIa、Ib、II、III、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される少なくとも1つの追加の血清型由来の莢膜多糖を含む、免疫原性組成物。

【0540】

C69. 少なくとも1つの追加の血清型が、Iaである、C68の免疫原性組成物。

【0541】

C70. GBS血清型Ib由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69の免疫原性組成物。

【0542】

C71. GBS血清型II由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69またはC70の免疫原性組成物。

【0543】

C72. GBS血清型III由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69～C71のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0544】

C73. GBS血清型V由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69～C72のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0545】

C74. GBS血清型VI由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69～C73のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0546】

C75. GBS血清型VII由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69～C74のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0547】

C76. GBS血清型VIII由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69～C75のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0548】

C77. GBS血清型IX由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C69～C76のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0549】

C78. 少なくとも1つの追加の血清型が、Ibである、C68の免疫原性組成物。

【0550】

C79. GBS血清型II由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C78の免疫原性組成物。

【0551】

C80. GBS血清型III由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C78またはC79の免疫原性組成物。

【0552】

C81. GBS血清型V由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C78～C80のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0553】

C82. GBS血清型VI由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C78～C81のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0554】

C83. GBS血清型VII由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C78～C82のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0555】

C84. GBS血清型VIII由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、

10

20

30

40

50

C 7 8 ~ C 8 3 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 5 6 】

C 8 5 . G B S 血清型 I X 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 7 8 ~ C 8 4 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 5 7 】

C 8 6 . 少なくとも1つの追加の血清型が、I I である、C 6 8 の免疫原性組成物。

【 0 5 5 8 】

C 8 7 . G B S 血清型 I I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 8 6 の免疫原性組成物。

【 0 5 5 9 】

C 8 8 . G B S 血清型 V 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 8 6 または C 8 7 の免疫原性組成物。

【 0 5 6 0 】

C 8 9 . G B S 血清型 V I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 8 6 ~ C 8 8 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 6 1 】

C 9 0 . G B S 血清型 V I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 8 6 ~ C 8 9 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 6 2 】

C 9 1 . G B S 血清型 V I I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 8 6 ~ C 9 0 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 6 3 】

C 9 2 . G B S 血清型 I X 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 8 6 ~ C 9 1 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 6 4 】

C 9 3 . 少なくとも1つの追加の血清型が、I I I である、C 6 8 の免疫原性組成物。

【 0 5 6 5 】

C 9 4 . G B S 血清型 V 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 3 の免疫原性組成物。

【 0 5 6 6 】

C 9 5 . G B S 血清型 V I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 3 または C 9 4 の免疫原性組成物。

【 0 5 6 7 】

C 9 6 . G B S 血清型 V I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 3 ~ C 9 5 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 6 8 】

C 9 7 . G B S 血清型 V I I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 3 ~ C 9 6 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 6 9 】

C 9 8 . G B S 血清型 I X 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 3 ~ C 9 7 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 7 0 】

C 9 9 . 少なくとも1つの追加の血清型が、V である、C 6 8 の免疫原性組成物。

【 0 5 7 1 】

C 1 0 0 . G B S 血清型 V I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 9 の免疫原性組成物。

【 0 5 7 2 】

C 1 0 1 . G B S 血清型 V I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 9 または C 1 0 0 の免疫原性組成物。

【 0 5 7 3 】

10

20

30

40

50

C 1 0 2 . G B S 血清型 V I I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 9 ~ C 1 0 1 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 7 4 】

C 1 0 3 . G B S 血清型 I X 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 9 9 ~ C 1 0 2 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 7 5 】

C 1 0 4 . 少なくとも1つの追加の血清型が、V I である、C 6 8 の免疫原性組成物。

【 0 5 7 6 】

C 1 0 5 . G B S 血清型 V I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 1 0 4 の免疫原性組成物。

【 0 5 7 7 】

C 1 0 6 . G B S 血清型 V I I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 1 0 4 または C 1 0 5 の免疫原性組成物。

【 0 5 7 8 】

C 1 0 7 . G B S 血清型 I X 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 1 0 4 ~ C 1 0 6 のいずれか一項の免疫原性組成物。

【 0 5 7 9 】

C 1 0 8 . 少なくとも1つの追加の血清型が、V I I である、C 6 8 の免疫原性組成物。

【 0 5 8 0 】

C 1 0 9 . G B S 血清型 V I I I 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 1 0 8 の免疫原性組成物。

【 0 5 8 1 】

C 1 1 0 . G B S 血清型 I X 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 1 0 8 または C 1 0 9 の免疫原性組成物。

【 0 5 8 2 】

C 1 1 1 . 少なくとも1つの追加の血清型が、V I I I である、C 6 8 の免疫原性組成物。

【 0 5 8 3 】

C 1 1 2 . G B S 血清型 I X 由来の莢膜多糖を含むコンジュゲートをさらに含む、C 1 1 1 の免疫原性組成物。

【 0 5 8 4 】

C 1 1 3 . 少なくとも1つの追加の血清型が、I X である、C 1 1 2 の免疫原性組成物。

【 0 5 8 5 】

C 1 1 4 . 多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、前記コンジュゲートが、G B S 血清型 I a、I b、I I、I I I および I V 由来の莢膜多糖を含む、免疫原性組成物。

【 0 5 8 6 】

C 1 1 5 . 多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、前記コンジュゲートが、G B S 血清型 I a、I b、I I、I I I および V 由来の莢膜多糖を含む、免疫原性組成物。

【 0 5 8 7 】

C 1 1 6 . 多糖-タンパク質コンジュゲートを含み、前記コンジュゲートが、G B S 血清型 I a、I b、I I、I I I、I V および V 由来の莢膜多糖を含む、免疫原性組成物。

【 0 5 8 8 】

C 1 1 7 . I a、I b、I I、I I I、I V、V、V I、V I I、V I I I および I X からなる群から選択される少なくとも4つの G B S 莢膜多糖血清型を含む多糖-タンパク質コンジュゲートを含む、免疫原性組成物。

【 0 5 8 9 】

C 1 1 8 . 少なくとも5つの G B S 莢膜多糖血清型を含む、C 1 1 7 の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

【0590】

C119. 少なくとも6つのGBS莢膜多糖血清型を含む、C117またはC118の免疫原性組成物。

【0591】

C120. 少なくとも7つのGBS莢膜多糖血清型を含む、C117～C119のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0592】

C121. 少なくとも8つのGBS莢膜多糖血清型を含む、C117～C120のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0593】

C122. 少なくとも9つのGBS莢膜多糖血清型を含む、C117～C121のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0594】

C123. GBS莢膜多糖血清型Vを含む、C117～C122のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0595】

C124. 免疫干渉を有さない、C117～C123のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0596】

C125. 薬学的に許容できる賦形剤、緩衝剤、安定剤、アジュバント、抗凍結剤、塩、二価カチオン、非イオン性界面活性物質、フリーラジカル酸化の阻害剤、担体、またはそれらの混合物をさらに含む、C67～C124のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0597】

C126. 緩衝剤をさらに含む、C67～C125のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0598】

C127. 緩衝剤が、HEPES、PIPES、MES、トリス（トリメタミン）、リン酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、グリシン、ヒスチジンおよびコハク酸塩からなる群から選択される、C126の免疫原性組成物。

【0599】

C128. 緩衝剤が、ヒスチジンである、C127の免疫原性組成物。

【0600】

C129. 界面活性剤をさらに含む、C67～C128のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0601】

C130. 界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリソルベート-80、ポリソルベート-60、ポリソルベート-40、ポリソルベート-20およびポリオキシエチレンアルキルエーテルからなる群から選択される、C129の免疫原性組成物。

【0602】

C131. 界面活性剤が、ポリソルベート-80である、C130の免疫原性組成物。

【0603】

C132. 賦形剤をさらに含む、C67～C131のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0604】

C133. 賦形剤が、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトール、パラチニット、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、石粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、グリシン、アルギニン、リシン、塩化ナトリウム（NaCl）、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水およびエタノールからなる群から選択される、C132の免疫原性組成物。

【0605】

10

20

30

40

50

- C 1 3 4. 賦形剤が、塩化ナトリウムである、C 1 3 3 の免疫原性組成物。
【0 6 0 6】
- C 1 3 5. アジュバントをさらに含む、C 6 7 ~ C 1 3 4 のいずれか一項の免疫原性組成物。
【0 6 0 7】
- C 1 3 6. アジュバントが、アルミニウムベースのアジュバントまたは Q S - 2 1 である、C 1 3 5 の免疫原性組成物。
【0 6 0 8】
- C 1 3 7. アルミニウムベースのアジュバントが、リン酸アルミニウム、アルミニウムヒドロキシルホスフェートおよび水酸化アルミニウムからなる群から選択される、C 1 3 6 の免疫原性組成物。
【0 6 0 9】
- C 1 3 8. アジュバントが、リン酸アルミニウムである、C 1 3 7 の免疫原性組成物。
【0 6 1 0】
- C 1 3 9. アジュバントが、アルミニウムヒドロキシルホスフェートである、C 1 3 8 の免疫原性組成物。
【0 6 1 1】
- C 1 4 0. 緩衝剤、界面活性剤、賦形剤、および場合によりアジュバントを含み、約 6 . 0 から約 7 . 0 の pH に緩衝されている、C 6 7 ~ C 1 3 9 のいずれか一項の免疫原性組成物。
【0 6 1 2】
- C 1 4 1. ヒスチジン、ポリソルベート - 8 0、塩化ナトリウム、および場合によりリン酸アルミニウムを含み、約 6 . 0 から約 7 . 0 の pH に緩衝されている、C 6 7 ~ C 1 4 0 のいずれか一項の免疫原性組成物。
【0 6 1 3】
- C 1 4 2. 約 1 0 m M から約 2 5 m M のヒスチジン、約 0 . 0 1 % から約 0 . 0 3 % (v / w) のポリソルベート - 8 0、約 1 0 m M から約 2 5 0 m M の塩化ナトリウム、および場合により約 0 . 2 5 m g / m l から約 0 . 7 5 m g / m l のアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含む、C 6 7 ~ C 1 4 1 のいずれか一項の免疫原性組成物。
【0 6 1 4】
- C 1 4 3. 約 5 m c g / m l から約 5 0 m c g / m l の用量を含む、C 6 7 ~ C 1 4 2 のいずれか一項の免疫原性組成物。
【0 6 1 5】
- C 1 4 4. 場合により少なくとも 1 つの賦形剤の存在下で、凍結乾燥される、C 6 7 ~ C 1 4 3 のいずれか一項の免疫原性組成物。
【0 6 1 6】
- C 1 4 5. 少なくとも 1 つの賦形剤が、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトール、パラチニット、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、石粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、グリシン、アルギニン、リシン、塩化ナトリウム (N a C l)、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水およびエタノールからなる群から選択される、C 1 4 4 の免疫原性組成物。
【0 6 1 7】
- C 1 4 6. 少なくとも 1 つの賦形剤が、スクロースである、C 1 4 5 の免疫原性組成物。
【0 6 1 8】
- C 1 4 7. 約 1 % (w / v) から約 1 0 % (w / v) の少なくとも 1 つの賦形剤を含む、C 1 4 4 ~ C 1 4 6 のいずれか一項の免疫原性組成物。
【0 6 1 9】
- C 1 4 8. 追加の賦形剤を含む、C 1 4 4 ~ C 1 4 7 のいずれか一項の免疫原性組成

10

20

30

40

50

物。

【0620】

C149. 追加の賦形剤が、マンニトールまたはグリシンである、C148の免疫原性組成物。

【0621】

C150. 約1% (w/v) から約10% (w/v) の追加の賦形剤を含む、C148またはC149の免疫原性組成物。

【0622】

C151. 水、注射用水(WFI)、アジュバント懸濁液または生理食塩水で再溶解される、C143～C150のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0623】

C152. 医薬として使用するための、C67～C151のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0624】

C153. 対象においてGBSに対する免疫応答を誘発する方法において使用するための、C67～C152のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0625】

C154. 対象が、妊娠を計画している女性または妊娠中の女性である、C153の免疫原性組成物。

【0626】

C155. 女性が、妊娠後半期である、C154の免疫原性組成物。

【0627】

C156. 妊娠中の女性が、少なくとも妊娠20週である、C155の免疫原性組成物。

【0628】

C157. 妊娠中の女性が、妊娠27週から36週である、C156の免疫原性組成物。

【0629】

C158. 対象が、50歳以上の成人である、C157の免疫原性組成物。

【0630】

C159. 対象が、65歳以上の成人である、C158の免疫原性組成物。

【0631】

C160. 対象が、85歳以上の成人である、C159の免疫原性組成物。

【0632】

C161. 対象が、免疫不全である、C153～C160のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0633】

C162. 対象が、肥満、糖尿病、HIV感染、がん、心血管疾患または肝疾患からなる群から選択される医学的状態を有する、C161の免疫原性組成物。

【0634】

C163. B群レンサ球菌が、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) である、C153～C162のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0635】

C164. B群レンサ球菌に対する免疫応答を誘発する方法であって、対象に、有効量のC67～C150のいずれか一項の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

【0636】

C165. 対象においてB群レンサ球菌に関連する疾患または状態を予防するまたは低減させる方法であって、対象に、有効量のC67～C151のいずれか一項の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

10

20

30

40

50

【0637】

C166. 対象が、妊娠を計画している女性または妊娠中の女性である、C164またはC165の方法。

【0638】

C167. 女性が、妊娠後半期である、C166の方法。

【0639】

C168. 妊娠中の女性が、少なくとも妊娠20週である、C166またはC167の方法。

【0640】

C169. 妊娠中の女性が、妊娠27週から36週である、C166～C168のいずれか一項の方法。

10

【0641】

C170. 対象が、50歳以上の成人である、C164またはC165の方法。

【0642】

C171. 対象が、65歳以上の成人である、C170の方法。

【0643】

C172. 対象が、85歳以上の成人である、C170またはC171の方法。

【0644】

C173. 対象が、免疫不全である、C164～C172のいずれか一項の方法。

【0645】

C174. 対象が、肥満、糖尿病、HIV感染、がん、心血管疾患または肝疾患からなる群から選択される医学的状態を有する、C173の方法。

20

【0646】

C175. B群レンサ球菌が、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) である、C164～C174のいずれか一項の方法。

【0647】

C176. C1～C49またはC66のいずれか一項の免疫原性コンジュゲートにおいて、莢膜多糖と結合する抗体。

【0648】

C177. C176の抗体を含む組成物。

30

【0649】

C178. 抗体を生成する方法であって、C67～C151のいずれか一項の免疫原性組成物を、対象に投与するステップを含む方法。

【0650】

C179. C178の方法によって生成された抗体。

【0651】

C180. 対象に受動免疫を付与する方法であって、

(a) C67～C151のいずれか一項の免疫原性組成物を使用して、抗体調製物を産生するステップと、

40

(b) 抗体調製物を対象に投与して、受動免疫を付与するステップとを含む方法。

【0652】

C181. C1～C49またはC66のいずれか一項の免疫原性多糖-タンパク質コンジュゲートを作製する方法であって、

(a) GBS莢膜多糖を酸化剤と反応させて、活性化多糖をもたらすステップと、

(b) 活性化多糖を担体タンパク質と反応させて、多糖-タンパク質コンジュゲートをもたらすステップと

を含む方法。

【0653】

50

- C 1 8 2. ステップ (b) が、極性非プロトン性溶媒中で行われる、C 1 8 1の方法。
【0 6 5 4】
- C 1 8 3. 溶媒が、ジメチルスルホキシド (D M S O)、スルホラン、ジメチルホルムアミド (D M F) およびヘキサメチルホスホルアミド (H M P A) からなる群から選択される、C 1 8 2の方法。
【0 6 5 5】
- C 1 8 4. 溶媒が、ジメチルスルホキシド (D M S O) である、C 1 8 3の方法。
【0 6 5 6】
- C 1 8 5. 多糖を、0. 0 1 から 1 0. 0 モル当量の酸化剤と反応させる、C 1 8 1 ~ C 1 8 4 のいずれか一項の方法。
【0 6 5 7】
- C 1 8 6. 酸化剤が、過ヨウ素酸塩である、C 1 8 1 ~ C 1 8 5 のいずれか一項の方法。
【0 6 5 8】
- C 1 8 7. 過ヨウ素酸塩が、過ヨウ素酸ナトリウムである、C 1 8 6の方法。
【0 6 5 9】
- C 1 8 8. ステップ (a) の酸化反応が、1 時間から 5 0 時間の間である、C 1 8 1 ~ C 1 8 7 のいずれか一項の方法。
【0 6 6 0】
- C 1 8 9. 酸化反応の温度が、約 2 °C から約 2 5 °C の間に維持される、C 1 8 1 ~ C 1 8 8 のいずれか一項の方法。
【0 6 6 1】
- C 1 9 0. 酸化反応が、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (M E S) およびビスートリスからなる群から選択される緩衝剤中で行われる、C 1 8 1 ~ C 1 8 9 のいずれか一項の方法。
【0 6 6 2】
- C 1 9 1. 緩衝剤が、約 1 m M から約 5 0 0 m M の間の濃度を有する、C 1 9 0の方法。
【0 6 6 3】
- C 1 9 2. 酸化反応が、約 4. 0 から約 8. 0 の間の p H で行われる、C 1 8 1 ~ C 1 9 1 のいずれか一項の方法。
【0 6 6 4】
- C 1 9 3. 酸化剤が、2, 2, 6, 6 - テトラメチル - 1 - ピペリジニルオキシ (T E M P O) である、C 1 8 1の方法。
【0 6 6 5】
- C 1 9 4. N - クロロスクシンイミド (N C S) が、共酸化剤である、C 1 9 3の方法。
【0 6 6 6】
- C 1 9 5. ステップ (a) が、クエンチング剤の添加により酸化反応物をクエンチするステップをさらに含む、C 1 8 1 ~ C 1 9 4 のいずれか一項の方法。
【0 6 6 7】
- C 1 9 6. 多糖の濃度が、約 0. 1 m g / m L から約 1 0. 0 m g / m L の間である、C 1 8 2 ~ C 1 9 5 のいずれか一項の方法。
【0 6 6 8】
- C 1 9 7. 活性化多糖の酸化度が、5 から 2 5 の間である、C 1 8 1 ~ C 1 9 6 のいずれか一項の方法。
【0 6 6 9】
- C 1 9 8. 活性化多糖を凍結乾燥するステップをさらに含む、C 1 8 1 ~ C 1 9 7 のいずれか一項の方法。
【0 6 7 0】

10

20

30

40

50

C 1 9 9 . 活性化多糖が、スクロース、トレハロース、ラフィノース、スタキオース、メレジトース、デキストラン、マンニトール、ラクチトールおよびパラチニットからなる群から選択される糖の存在下で凍結乾燥される、C 1 8 8 の方法。

【0 6 7 1】

C 2 0 0 . ステップ (b) が、

(1) 活性化多糖を担体タンパク質と配合するステップと、

(2) 配合された活性化多糖および担体タンパク質を、還元剤と反応させて、G B S 英膜多糖-担体タンパク質コンジュゲートを形成するステップとを含む、C 1 8 1 ~ C 1 9 9 のいずれか一項の方法。

【0 6 7 2】

C 2 0 1 . ステップ (2) における活性化多糖の濃度が、約 0 . 1 m g / m L から約 1 0 . 0 m g / m L の間である、C 2 0 0 の方法。

【0 6 7 3】

C 2 0 2 . 活性化多糖対担体タンパク質の初期比 (重量 / 重量) が、5 : 1 から 0 . 1 : 1 の間である、C 2 0 0 または C 2 0 1 の方法。

【0 6 7 4】

C 2 0 3 . 還元剤が、ブレンステッドもしくはルイス酸、ピリジンボラン、2-ピコリンボラン、2, 6-ジボラン-メタノール、ジメチルアミン-ボラン、 $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$ 、ベンジルアミン- BH_3 または 5-エチル-2-メチルピリジンボラン (PEMB) の存在下、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素ナトリウムまたは亜鉛からなる群から選択される、C 2 0 0 ~ C 2 0 2 のいずれか一項の方法。

【0 6 7 5】

C 2 0 4 . 還元剤が、シアノ水素化ホウ素ナトリウムである、C 2 0 3 の方法。

【0 6 7 6】

C 2 0 5 . 還元剤の分量が、約 0 . 1 から約 1 0 . 0 モル当量の間である、C 2 0 0 ~ C 2 0 4 のいずれか一項の方法。

【0 6 7 7】

C 2 0 6 . ステップ (2) の還元反応の持続時間が、1 時間から 6 0 時間の間である、C 2 0 0 ~ C 2 0 5 のいずれか一項の方法。

【0 6 7 8】

C 2 0 7 . 還元反応の温度が、1 0 °C から 4 0 °C の間に維持される、C 2 0 0 ~ C 2 0 6 のいずれか一項の方法。

【0 6 7 9】

C 2 0 8 . 水素化ホウ素の添加により、未反応のアルデヒドをキャップするステップ (ステップ (c)) をさらに含む、C 1 8 1 ~ C 2 0 7 のいずれか一項の方法。

【0 6 8 0】

C 2 0 9 . 水素化ホウ素の分量が、約 0 . 1 から約 1 0 . 0 モル当量の間である、C 2 0 8 の方法。

【0 6 8 1】

C 2 1 0 . 水素化ホウ素が、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化ホウ素テトラブチルアンモニウム、水素化ホウ素カルシウムおよび水素化ホウ素マグネシウムからなる群から選択される、C 2 0 8 の方法。

【0 6 8 2】

C 2 1 1 . 水素化ホウ素が、水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) である、C 2 0 8 の方法。

【0 6 8 3】

C 2 1 2 . キャップするステップの持続時間が、0 . 1 時間から 1 0 時間の間である、C 2 0 7 ~ C 2 1 1 のいずれか一項の方法。

10

20

30

40

50

【0684】

C213. キャップするステップの温度が、約15℃から約45℃の間に維持される、C207～C212のいずれか一項の方法。

【0685】

C214. 多糖-タンパク質コンジュゲートを精製するステップをさらに含む、C181～C213のいずれか一項の方法。

【0686】

C215. 多糖-タンパク質コンジュゲートが、多糖の総量と比較して約40%未満の遊離多糖を含む、C181～C214のいずれか一項の方法。

【0687】

C216. コンジュゲート中における多糖対担体タンパク質の比（重量／重量）が、約0.5から約3.0の間である、C181～C215のいずれか一項の方法。

【0688】

C217. コンジュゲートのコンジュゲーションの程度が、2から15の間である、C181～C216のいずれか一項の方法。

【0689】

C218. 多糖-タンパク質コンジュゲートを作製する方法であって、
(a) 単離されたGBS莢膜多糖を酸化剤と反応させるステップと、
(b) クエンチング剤の添加によりステップ(a)の酸化反応物をクエンチして、活性化GBS莢膜多糖をもたらすステップと、
(c) 活性化GBS莢膜多糖を担体タンパク質と配合するステップと、
(d) 配合された活性化GBS莢膜多糖および担体タンパク質を還元剤と反応させて、GBS莢膜多糖-担体タンパク質コンジュゲートを形成するステップと、
(e) 水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)の添加により、未反応のアルデヒドをキャップするステップと
を含み、
ここで、ステップ(c)および(d)はDMSO中で行われる方法。

【0690】

C219. 担体タンパク質とコンジュゲートしているB群レンサ球菌(GBS)由来の莢膜多糖と、アルミニウムベースのアジュバントとを含む、免疫原性組成物。

【0691】

C220. アルミニウムベースのアジュバントが、リン酸アルミニウム、アルミニウムヒドロキシルホスフェートおよび水酸化アルミニウムからなる群から選択される、C219の免疫原性組成物。

【0692】

C221. アジュバントが、リン酸アルミニウムである、C219またはC220の免疫原性組成物。

【0693】

C222. アジュバントが、水酸化アルミニウムである、C219またはC220の免疫原性組成物。

【0694】

C223. アルミニウムベースのアジュバントが、約0.25mg/mlから約0.75mg/mlの濃度である、C219～C222のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0695】

C224. アルミニウムベースのアジュバントが、約0.5mg/mlの濃度である、C223の免疫原性組成物。

【0696】

C225. 莢膜多糖が、血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIIIおよびIXからなる群から選択される、C219～C224のいずれか一項の免疫原性組成物。

10

20

30

40

50

【0697】

C226. 六価GBSコンジュゲート組成物である、C219～C225のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0698】

C227. GBS血清型Ia、Ib、II、III、IVおよびV由来の莢膜多糖を含む、C225の免疫原性組成物。

【0699】

C228. シリンジに充填される、C219～C227のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0700】

C229. シリンジが、ガラスである、C228の免疫原性組成物。

【0701】

C230. 約1mmから約15mmのヘッドスペースを設けてシリンジに充填される、C219～C229のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0702】

C231. 約2mmから約6mmのヘッドスペースを設けてシリンジに充填される、C230の免疫原性組成物。

【0703】

C232. 約50回以下の振とうで再懸濁される、C219～C231のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0704】

C233. 約10回以下の振とうで再懸濁される、C232の免疫原性組成物。

【0705】

C234. リン酸塩をさらに含む、C219～C233のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0706】

C235. リン酸塩が、約15mMから約25mMの濃度である、C234の免疫原性組成物。

【0707】

C236. リン酸塩が、約20mMの濃度である、C235の免疫原性組成物。

【0708】

C237. 塩化ナトリウムをさらに含む、C219～C236のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0709】

C238. 塩化ナトリウムが、約10mMから約350mMの濃度である、C219～C237の免疫原性組成物。

【0710】

C239. 塩化ナトリウムが、約225mMから約265mMの濃度である、C238の免疫原性組成物。

【0711】

C240. 塩化ナトリウムが、約240mMの濃度である、C239の免疫原性組成物。

【0712】

C241. 塩化ナトリウムが、約200mMの濃度である、C219～C238の免疫原性組成物。

【0713】

C242. 塩化ナトリウムが、約150mMの濃度である、C241の免疫原性組成物。

【0714】

C243. 約60mcg/mlから約360mcg/mlの総コンジュゲート用量を

10

20

30

40

50

含む、C 2 1 9～C 2 4 2のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0 7 1 5】

C 2 4 4. 総コンジュゲート用量が、約1 2 0 m g / m l から約2 4 0 m c g / m l である、C 2 4 3の免疫原性組成物。

【0 7 1 6】

C 2 4 5. 約6 . 5 から約7 . 5 のp Hを有する、C 2 1 9～C 2 4 4のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0 7 1 7】

C 2 4 6. 約7 . 0 のp Hを有する、C 2 4 5の免疫原性組成物。

【0 7 1 8】

C 2 4 7. 約0 . 2 5 m g / m l から約0 . 7 5 m g / m l のリン酸アルミニウム、約1 5 m M から約2 5 m M のリン酸塩、約2 2 5 m M から約2 6 5 m M の塩化ナトリウム、および約6 0 m c g / m l から約3 6 0 m c g / m l の総コンジュゲート用量を含む免疫原性組成物であって、約6 . 5 から約7 . 5 のp Hを有する、免疫原性組成物。

【0 7 1 9】

C 2 4 8. 約0 . 2 5 m g / m l から約0 . 7 5 m g / m l の水酸化アルミニウム、約1 5 m M から約2 5 m M のリン酸塩、約1 2 0 m M から約1 7 0 m M の塩化ナトリウム、および約6 0 m c g / m l から約3 6 0 m c g / m l の総コンジュゲート用量を含む免疫原性組成物であって、約6 . 5 から約7 . 5 のp Hを有する、免疫原性組成物。

【0 7 2 0】

C 2 4 9. 医薬として使用するための、C 2 1 9～2 4 8のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0 7 2 1】

C 2 5 0. 対象においてG B Sに対する免疫応答を誘発する方法において使用するための、C 2 1 9～2 4 9のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0 7 2 2】

C 2 5 1. 対象が、妊娠を計画している女性または妊娠中の女性である、C 2 5 0の免疫原性組成物。

【0 7 2 3】

C 2 5 2. 女性が、妊娠後半期である、C 2 5 1の免疫原性組成物。

【0 7 2 4】

C 2 5 3. 妊娠中の女性が、少なくとも妊娠2 0 週である、C 2 5 2の免疫原性組成物。

【0 7 2 5】

C 2 5 4. 妊娠中の女性が、妊娠2 7 週から3 6 週である、C 2 5 3の免疫原性組成物。

【0 7 2 6】

C 2 5 5. 対象が、5 0 歳以上の成人である、C 2 5 0の免疫原性組成物。

【0 7 2 7】

C 2 5 6. 対象が、6 5 歳以上の成人である、C 2 5 5の免疫原性組成物。

【0 7 2 8】

C 2 5 7. 対象が、8 5 歳以上の成人である、C 2 5 6の免疫原性組成物。

【0 7 2 9】

C 2 5 8. 対象が、免疫不全である、C 2 5 0～C 2 5 7のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0 7 3 0】

C 2 5 9. 対象が、肥満、糖尿病、H I V感染、がん、心血管疾患または肝疾患からなる群から選択される医学的状態を有する、C 2 5 8の免疫原性組成物。

【0 7 3 1】

C 2 6 0. B群レンサ球菌が、ストレプトコッカス・アガラクティエ (S t r e p t

10

20

30

40

50

ococcus agalactiae)である、C 2 5 0～2 5 9のいずれか一項の免疫原性組成物。

【0 7 3 2】

C 2 6 1. B群レンサ球菌に対する免疫応答を誘発する方法であって、対象に、有効量のC 2 1 9～C 2 4 8のいずれか一項の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

【0 7 3 3】

C 2 6 2. 対象においてB群レンサ球菌に関連する疾患または状態を予防するまたは低減させる方法であって、対象に、有効量のC 2 1 9～C 2 4 8のいずれか一項の免疫原性組成物を投与するステップを含む方法。

【0 7 3 4】

C 2 6 3. 対象が、妊娠を計画している女性または妊娠中の女性である、C 2 6 1またはC 2 6 2の方法。

【0 7 3 5】

C 2 6 4. 女性が、妊娠後半期である、C 2 6 3の方法。

【0 7 3 6】

C 2 6 5. 妊娠中の女性が、少なくとも妊娠20週である、C 2 6 3またはC 2 6 4の方法。

【0 7 3 7】

C 2 6 6. 妊娠中の女性が、妊娠27週から36週である、C 2 6 3～2 6 5のいずれか一項の方法。

【0 7 3 8】

C 2 6 7. 対象が、50歳以上の成人である、C 2 6 1またはC 2 6 2の方法。

【0 7 3 9】

C 2 6 8. 対象が、65歳以上の成人である、C 2 6 7の方法。

【0 7 4 0】

C 2 6 9. 対象が、85歳以上の成人である、C 2 6 7またはC 2 6 8の方法。

【0 7 4 1】

C 2 7 0. 対象が、免疫不全である、C 2 6 1～C 2 6 9の方法。

【0 7 4 2】

C 2 7 1. 対象が、肥満、糖尿病、HIV感染、がん、心血管疾患または肝疾患からなる群から選択される医学的状態を有する、C 2 7 0の方法。

【0 7 4 3】

C 2 7 2. B群レンサ球菌が、ストレプトコッカス・アガラクティエ (Streptococcus agalactiae) である、C 2 6 1～C 2 7 1のいずれか一項の方法。

【0 7 4 4】

C 2 7 3. 抗体を生成する方法であって、C 2 1 9～C 2 4 8のいずれか一項の免疫原性組成物を対象に投与するステップを含む方法。

【0 7 4 5】

C 2 7 4. C 2 7 3の方法によって生成される抗体。

【0 7 4 6】

C 2 7 5. 対象に受動免疫を付与する方法であって、

(a) C 2 1 9～C 2 4 8のいずれか一項の免疫原性組成物を使用して、抗体調製物を産生するステップと、

(b) 抗体調製物を対象に投与して、受動免疫を付与するステップとを含む方法。

10

20

30

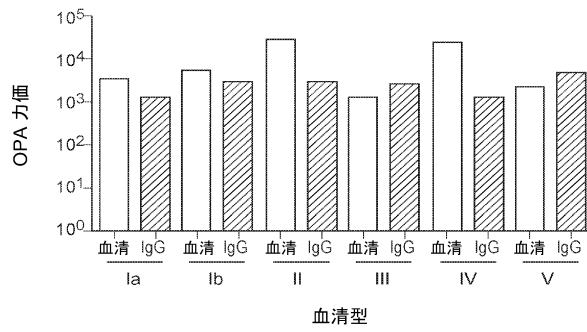
40

50

【図面】

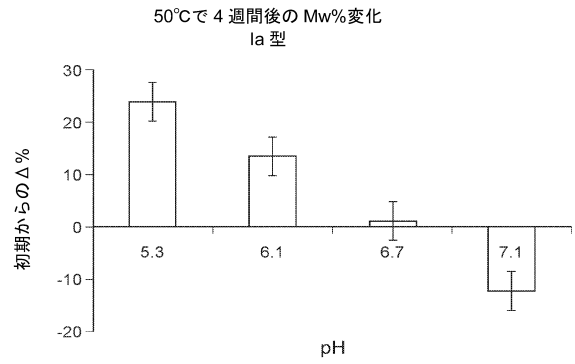
【図 1】

図1



【図 2】

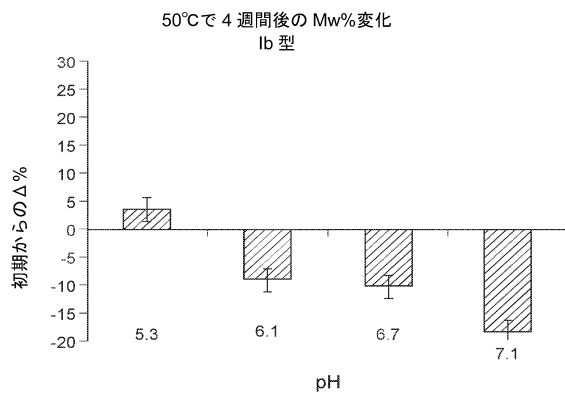
図2



10

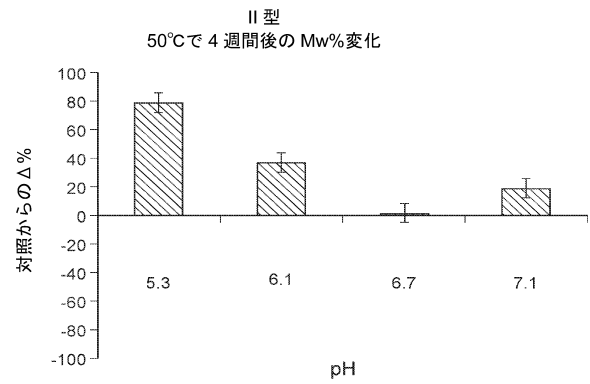
【図 3】

図3



【図 4】

図4



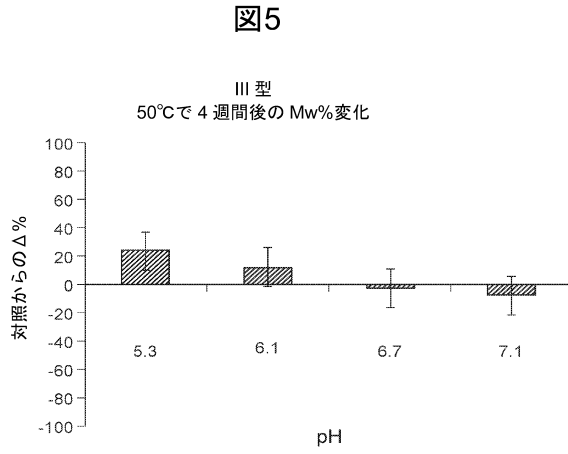
20

30

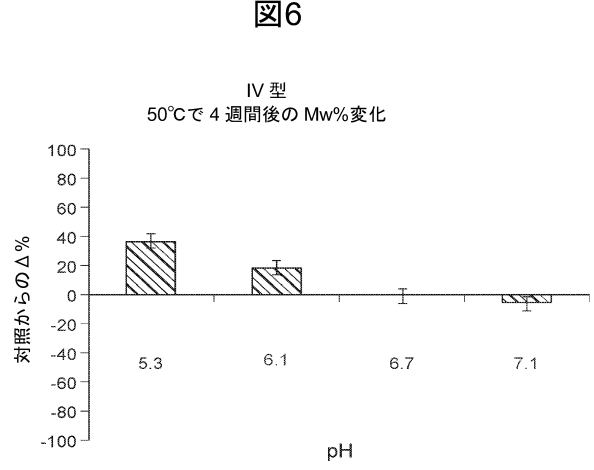
40

50

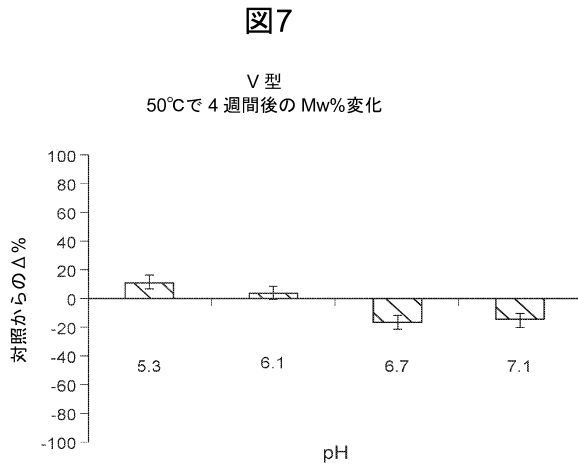
【図 5】



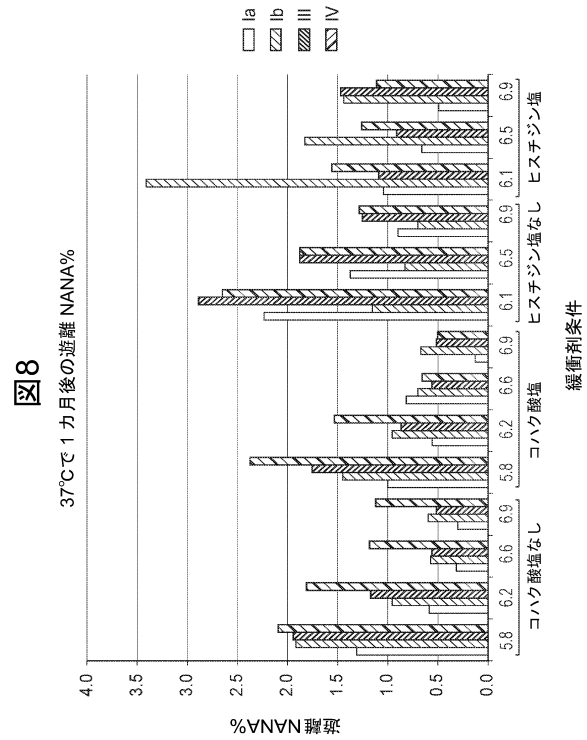
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

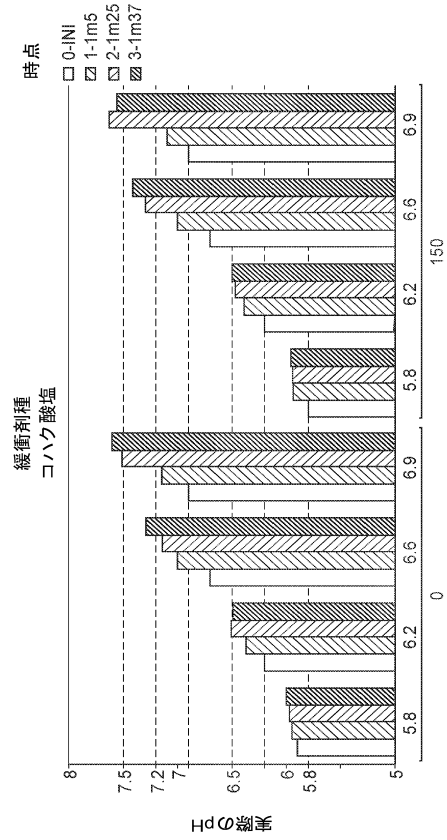
30

40

50

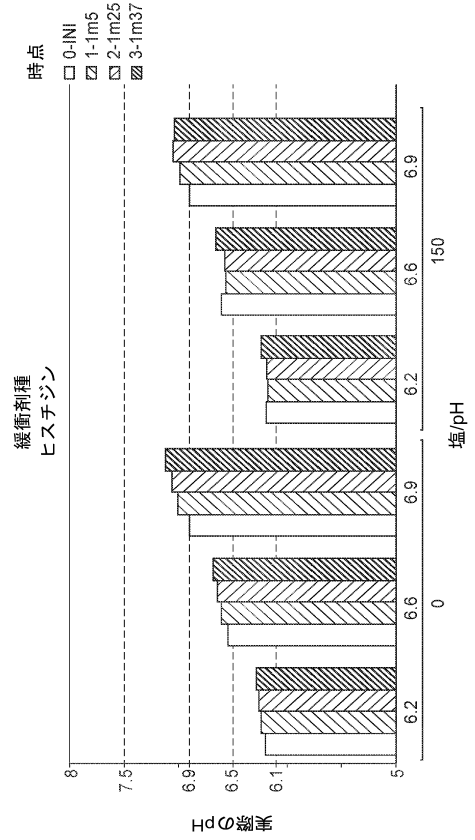
【図 9】

図9



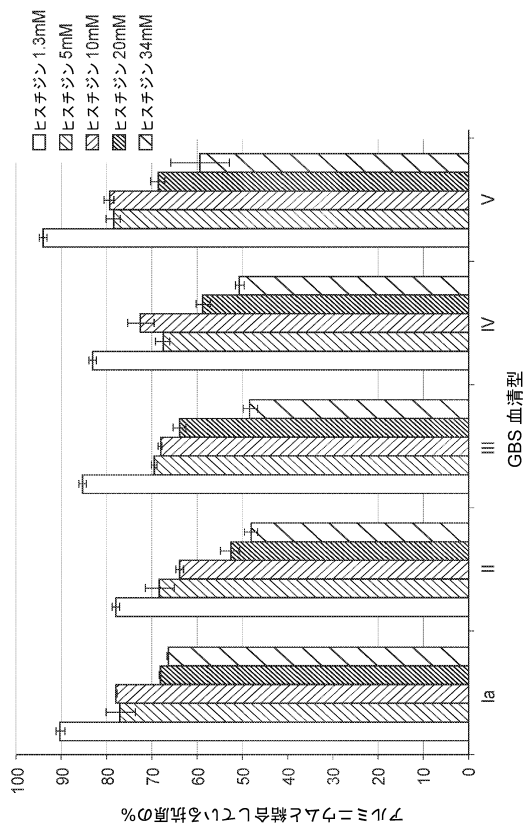
【図 10】

図10



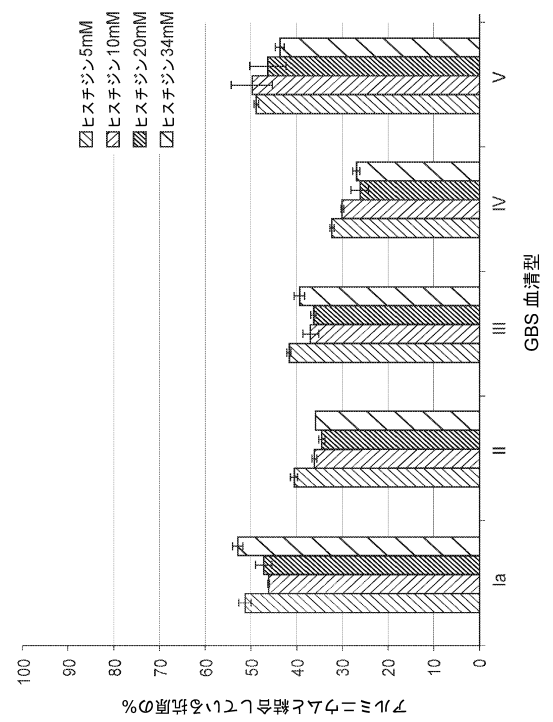
【図 11】

図11



【図 12】

図12



10

20

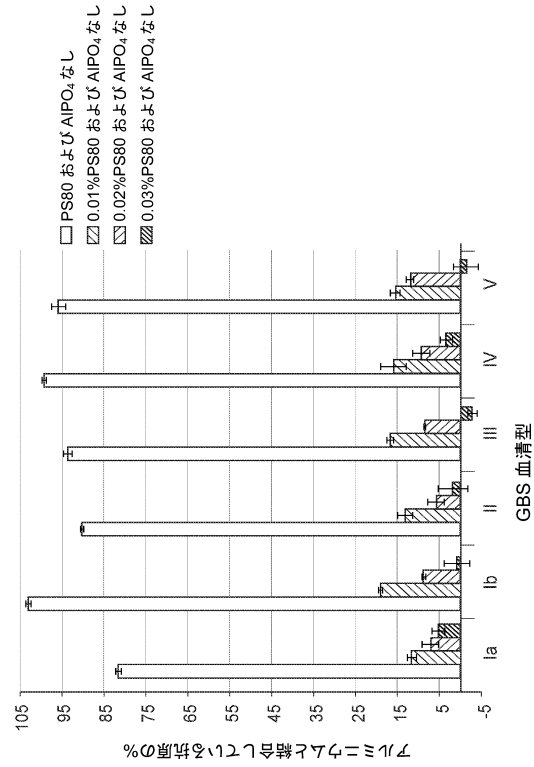
30

40

50

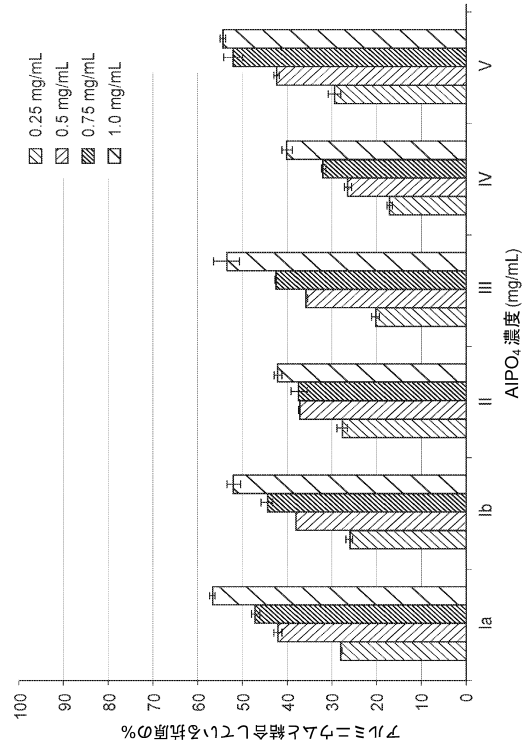
【図 13】

図13



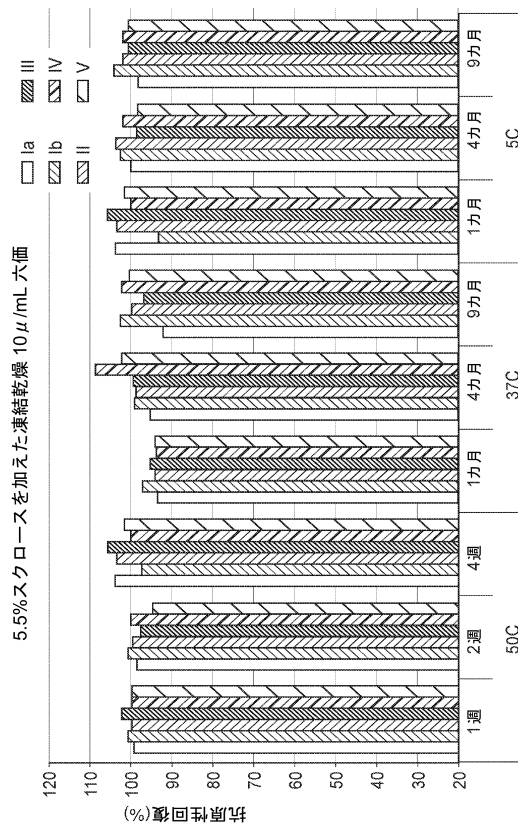
【図 14】

図14



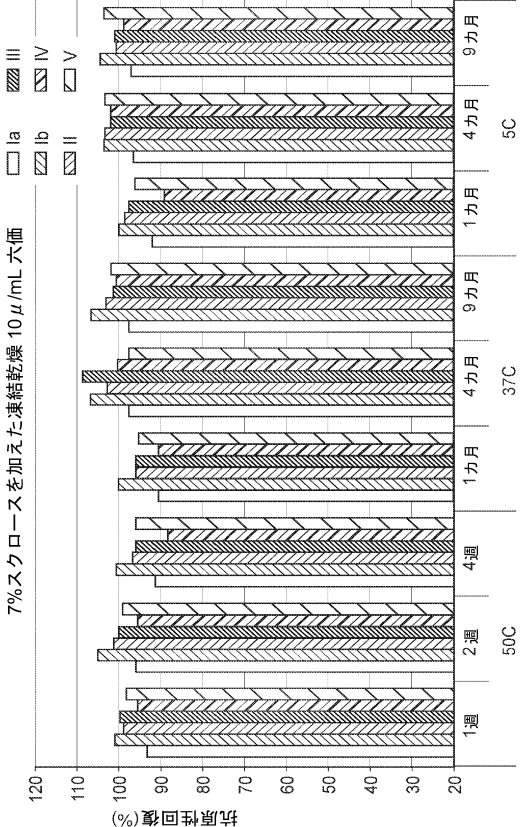
【図 15】

図15



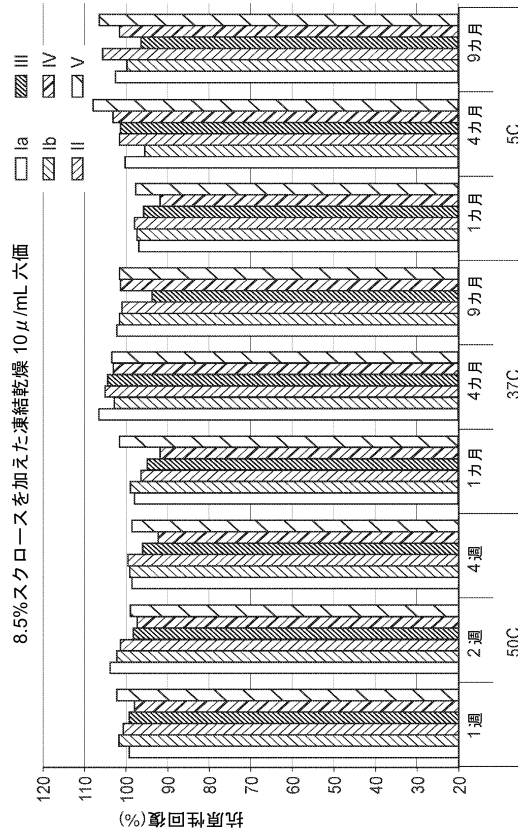
【図 16】

図16



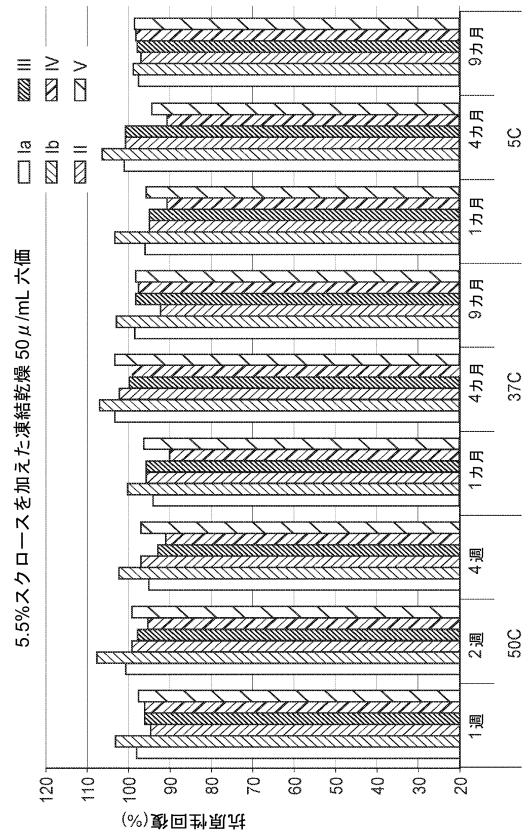
【図 17】

図17



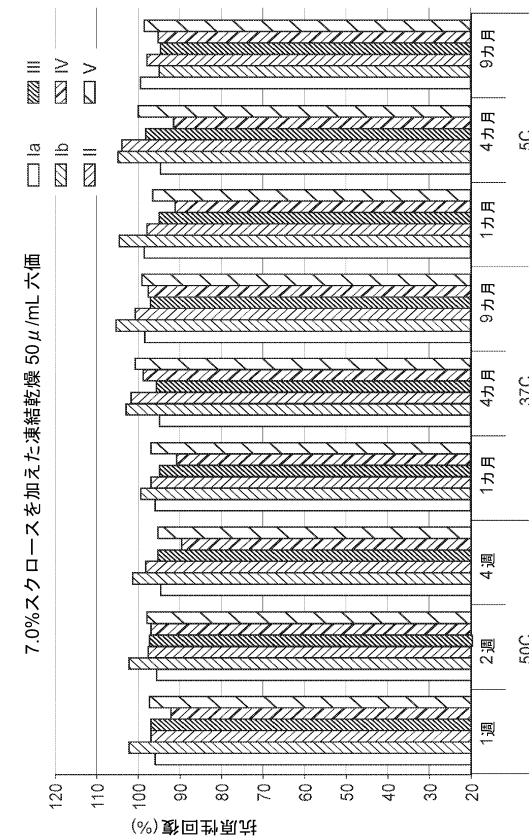
【図 18】

図18



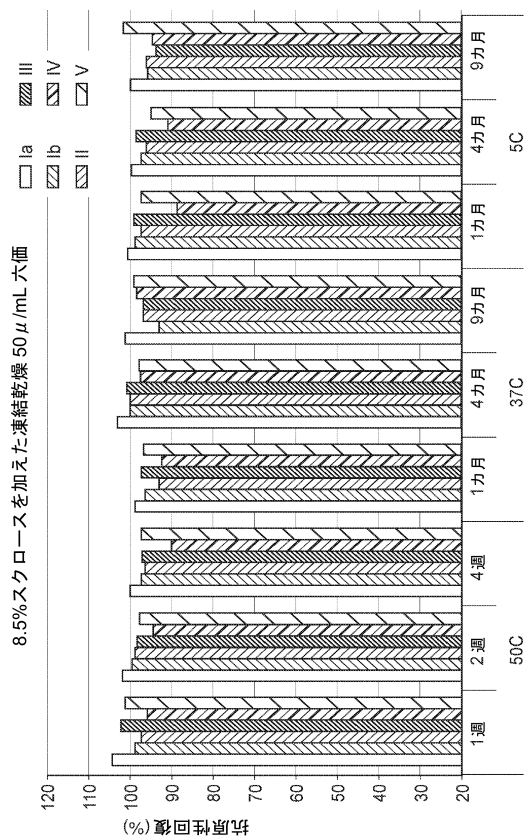
【図 19】

図19



【図 20】

図20



10

20

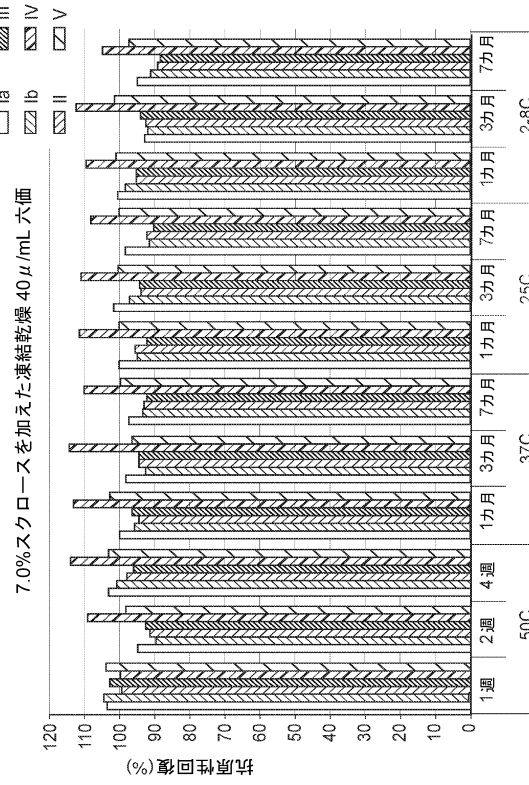
30

40

50

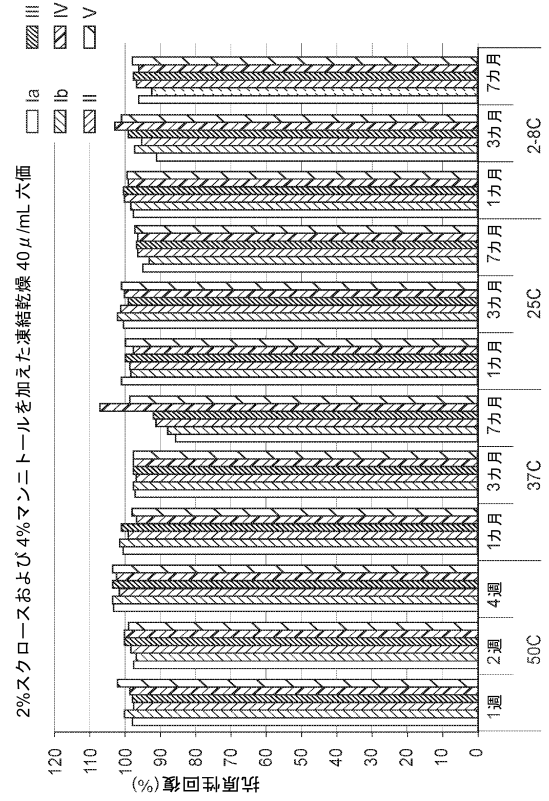
【図 2 1】

図21



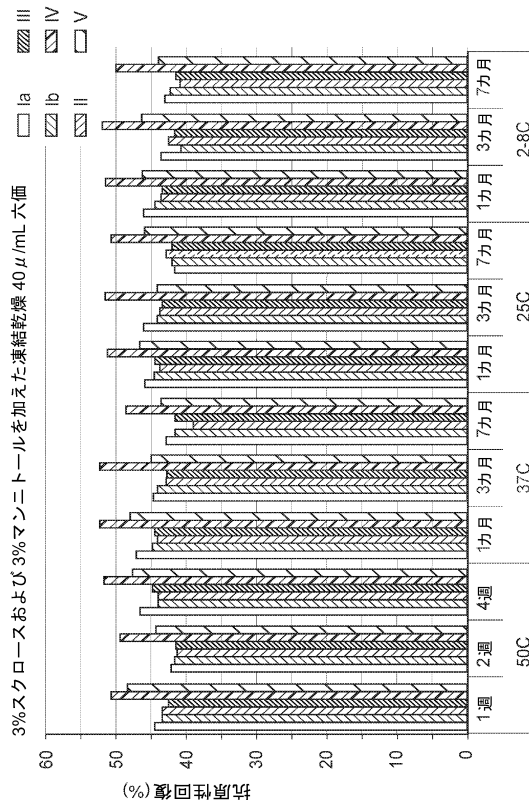
【図 2 2】

図22



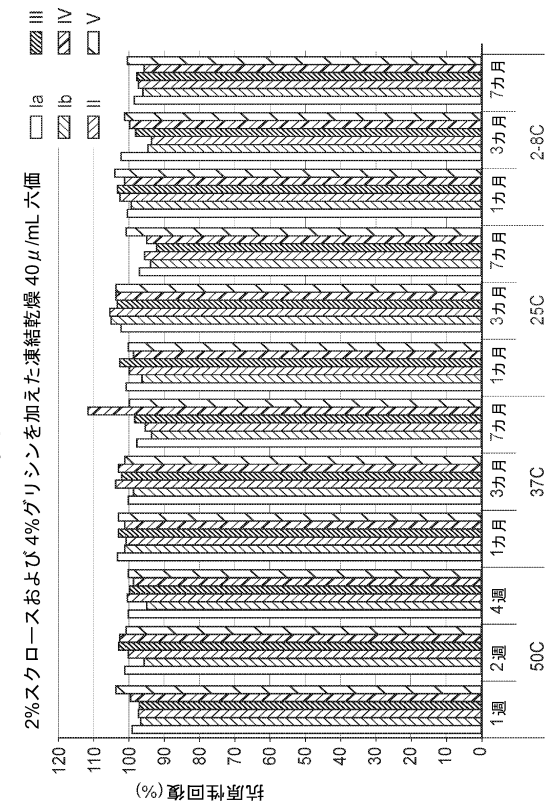
【図 2 3】

図23



【図 2 4】

図24



10

20

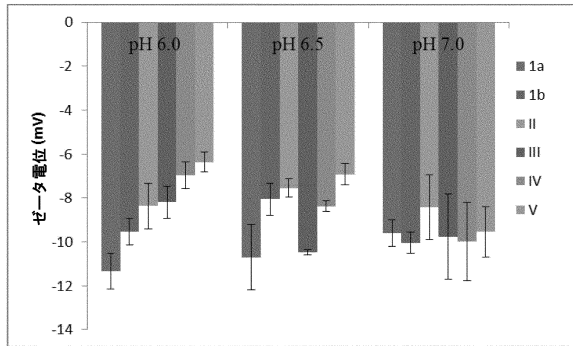
30

40

50

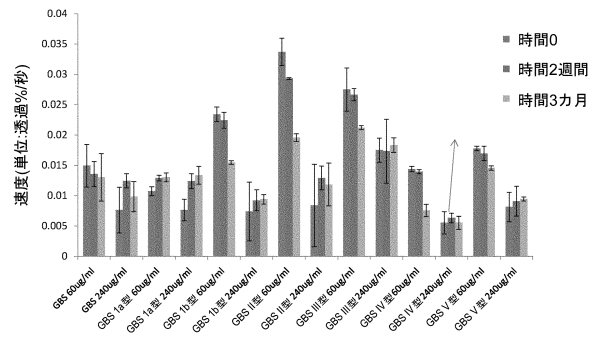
【図 29】

図29



【図 30】

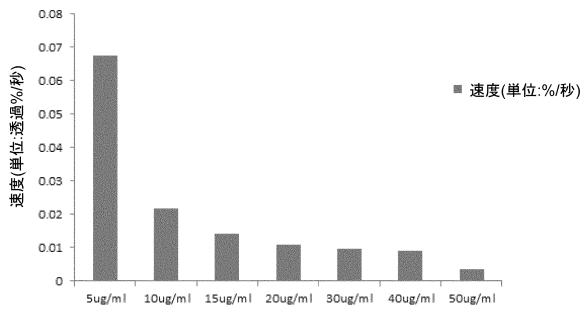
図30



10

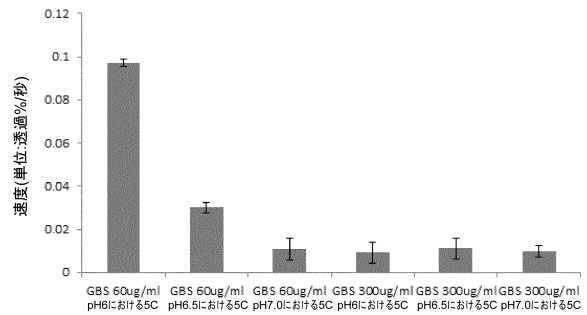
【図 31】

図31



【図 32】

図32



20

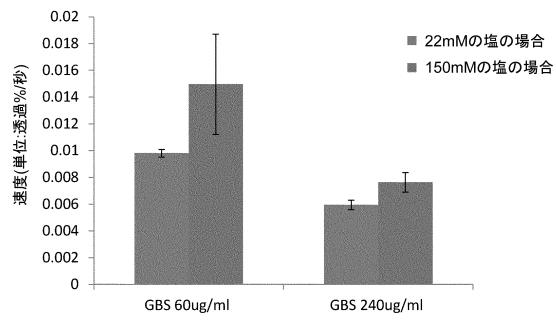
30

40

50

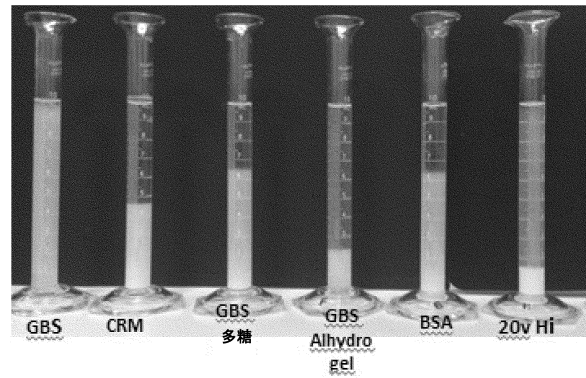
【図 3 3】

図33



【図 3 4】

図34



10

【図 3 5】

図35A

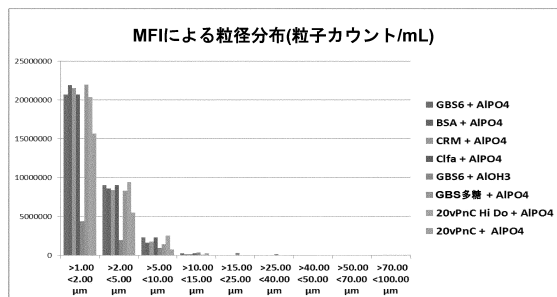
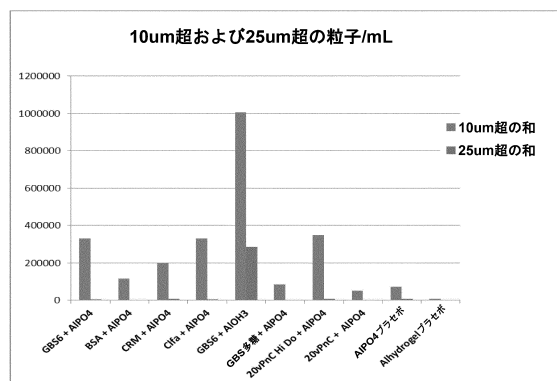


図35B



【図 3 6】

図36



20

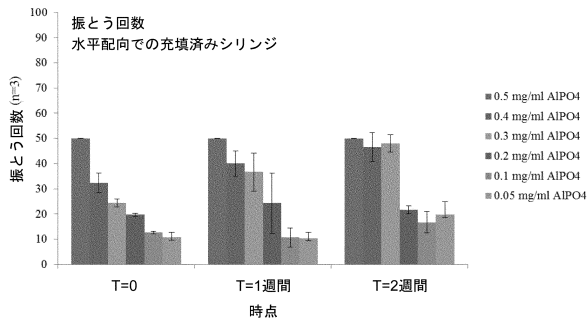
30

40

50

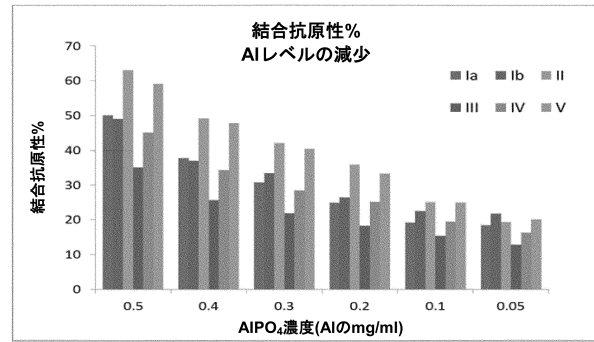
【図 37】

図37



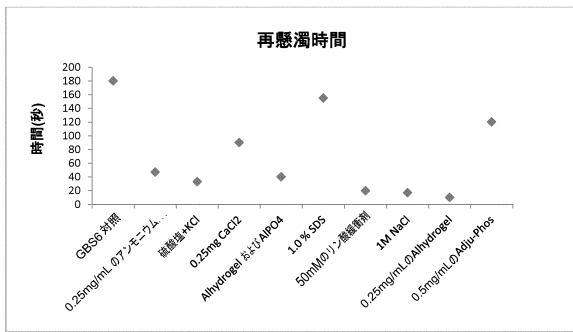
【図 38】

図38



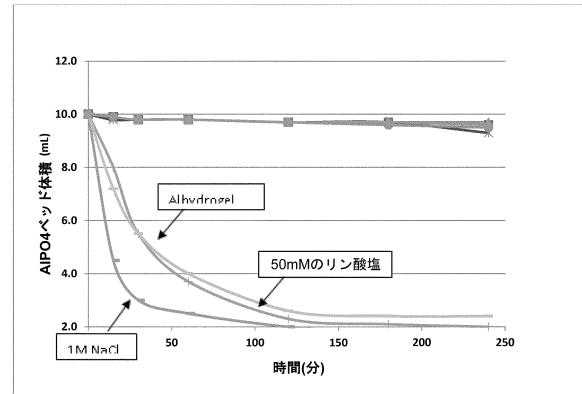
【図 39】

図39



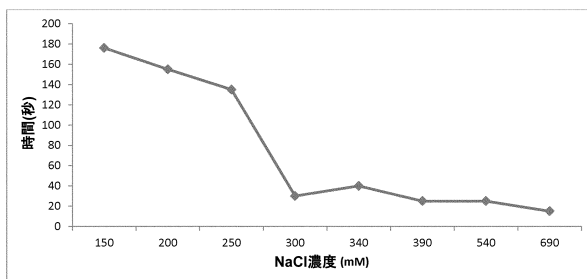
【図 40】

図40



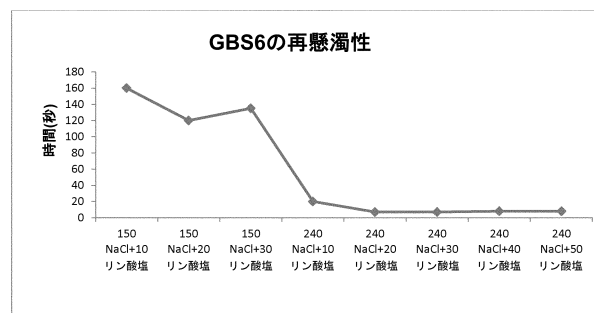
【図 41】

図41



【図 42】

図42



10

20

30

40

50

【図 4 3】

図43A

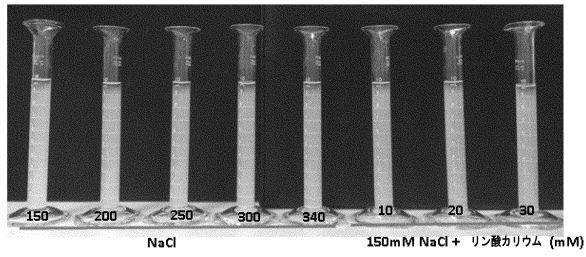
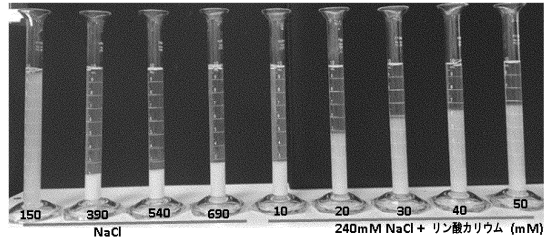
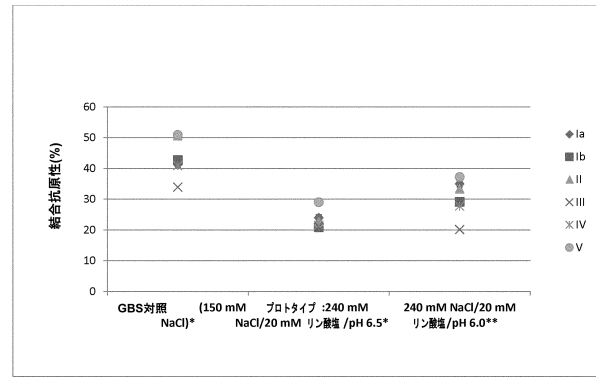


図43B



【図 4 4】

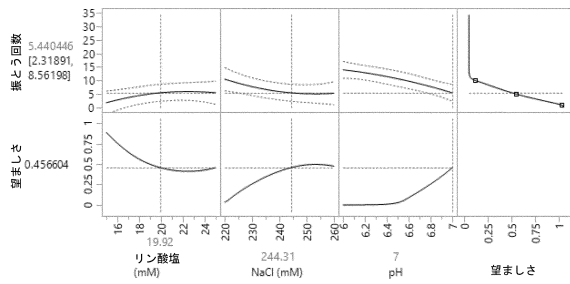
図44



10

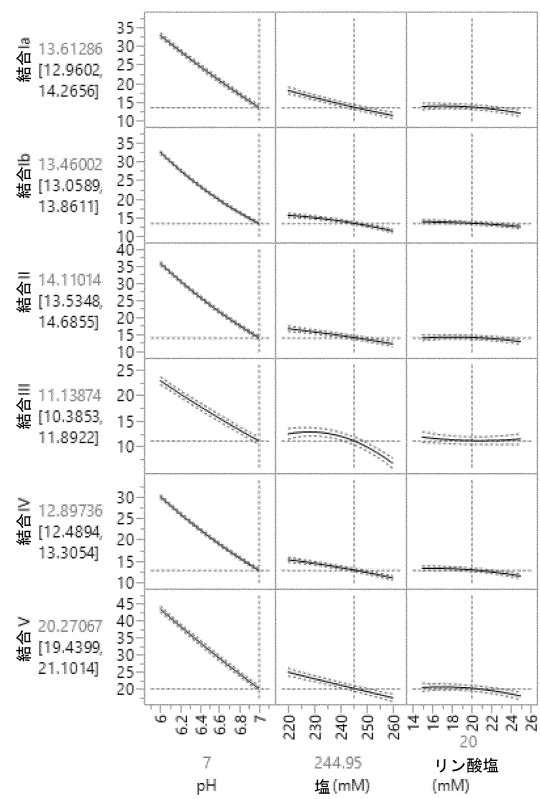
【図 4 5】

図45



【図 4 6】

図46



20

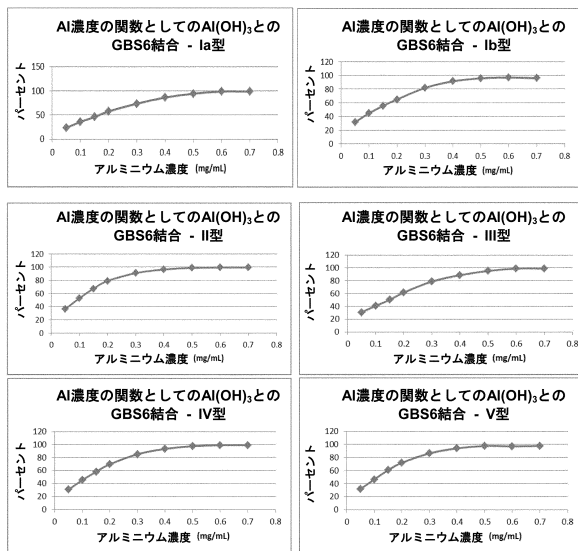
30

40

50

【図 47】

図47



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/22	(2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 K	39/39	(2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10

ーギー州 エッジウォーター市 アダムズ・コート 3 0 1

(72)発明者 アマディーブ シン ブペンダー バーラ

アメリカ合衆国 0 7 6 4 5 ニュージャージー州 モントヴァール市 フォーシー・サークル 3 7

(72)発明者 ミゲル エンジェル ガーシア

アメリカ合衆国 0 7 4 3 2 ニュージャージー州 ミドゥランド・パーク市 ヴァン・ブラーコム
・アヴェニュー 3 8

(72)発明者 レイ フ

アメリカ合衆国 1 0 9 5 6 ニューヨーク州 ニューシティー市 グランド・ストリート 5 7

(72)発明者 ラクシュミ カンドキー

アメリカ合衆国 1 0 9 5 4 ニューヨーク州 ナヌエット市 アリソン・アヴェニュー 1 2 0 イー

(72)発明者 シンディ ゾドン グヤング

アメリカ合衆国 1 0 9 8 3 ニューヨーク州 タッパン市 ランラム・ロード 6

(72)発明者 アナリサ シビル アンダーソン

アメリカ合衆国 0 7 4 5 8 ニュージャージー州 アッパー・サドル・リヴァー市 ヒルクレスト
・ドライブ 4 9

(72)発明者 アッヴァリ クリシュナ プラサド

アメリカ合衆国 2 7 5 1 6 ノースキャロライナ州 チャペル・ヒル市 ウォーシャム・ドライブ
1 0 5

審査官 福山 則明

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 7 (WO, A 1)

特表 2 0 1 5 - 5 3 1 3 9 0 (JP, A)

特開 2 0 1 8 - 0 8 7 1 8 1 (JP, A)

The Journal of Infectious Diseases, 2002年, Vol. 186, pp. 123-126

Expert Review of Vaccines, 2005年, Vol. 4, No. 2, pp. 207-218

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9