

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-518845

(P2015-518845A)

(43) 公表日 平成27年7月6日(2015.7.6)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00	H 4 C 076
A 61 K 47/48 (2006.01)	A 61 K 47/48	4 C 085
A 61 P 31/04 (2006.01)	A 61 K 39/00 A 61 P 31/04	Z Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁)

(21) 出願番号	特願2015-513141 (P2015-513141)	(71) 出願人	504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成25年5月22日 (2013.5.22)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月16日 (2015.1.16)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/060447	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02013/174832	(72) 発明者	ロマノ, マリア ロザリア イタリア国 イー-53100 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノ バルティス ヴァクシンズ アンド ダイ アグノスティクス エスアールエル
(87) 國際公開日	平成25年11月28日 (2013.11.28)		
(31) 優先権主張番号	61/650,025		
(32) 優先日	平成24年5月22日 (2012.5.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/698,677		
(32) 優先日	平成24年9月9日 (2012.9.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/799,528		
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 隆膜炎菌血清群Xコンジュゲート

(57) 【要約】

本発明は、*Neisseria meningitidis* 血清群X 荚膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを提供する。コンジュゲートは、典型的には、(a) 荚膜多糖内の第一ヒドロキシル基を酸化して、アルデヒド基を有する酸化多糖をもたらすこと、および(b) 酸化多糖を、アルデヒド基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、コンジュゲートをもたらすことによって作製される。コンジュゲートは免疫原性組成物の一部であってよい。この組成物は、1種または複数種のさらなる抗原、特に、血清群A、W135、CおよびY由来の莢膜多糖ならびにそのコンジュゲートした形態を含んでよい。組成物は水性製剤の状態であってよい。組成物は、ワクチン、例えば、哺乳動物において免疫応答を生じさせるためのワクチンとして有用である。本発明は、コンジュゲートを作製するためのプロセスも提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Neisseria meningitidis 血清群 X 荚膜多糖とキャリア分子のコンジュゲート。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のコンジュゲートであって、

(a) 前記莢膜多糖内の第一ヒドロキシル基を酸化して、アルデヒド基を有する酸化多糖をもたらすステップと、(b) 該酸化多糖を、該アルデヒド基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、該コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスによって得ることができる、コンジュゲート。

10

【請求項 3】

前記ステップ(a)における酸化が、前記莢膜多糖内の残基の 1 ~ 10 % の間にある前記第一ヒドロキシル基の酸化である、請求項 2 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

前記ステップ(b)におけるカップリングが直接的である、請求項 2 または請求項 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のコンジュゲートであって、

(a) 前記莢膜多糖の還元末端の還元的アミノ化を行って、該末端サブユニットの C - 1 原子に第一アミン基が共有結合によって結合した改変多糖をもたらすステップと、(b) 該改変多糖を、該第一アミン基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、該コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスによって得ることができる、コンジュゲート。

20

【請求項 6】

請求項 1 に記載のコンジュゲートであって、

(a) 前記莢膜多糖の還元末端を還元して、その末端に 2 つの隣接するヒドロキシル基を有する改変多糖をもたらすステップと、(b) 該隣接するヒドロキシル基の酸化的切断を行って、該末端にアルデヒド基を有するさらなる改変多糖をもたらすステップと、(c) 該アルデヒド基の還元的アミノ化を行って、該末端に第一アミン基を有するさらなる改変多糖をもたらすステップと、(d) 該さらなる改変多糖を、該第一アミン基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、該コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスによって得ることができる、コンジュゲート。

30

【請求項 7】

前記ステップ(d)におけるカップリングがリンカーを介する、請求項 5 または請求項 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記莢膜多糖がオリゴ糖である、前記請求項のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

前記キャリア分子がジフテリアトキソイドもしくは破傷風トキソイド、CRM197 またはタンパク質 D である、前記請求項のいずれかに記載のコンジュゲート。

40

【請求項 10】

前記キャリア分子が s p r 0 0 9 6 抗原および s p r 2 0 2 1 抗原を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

血清群 X 荢膜多糖を、特に、前記請求項のいずれか一項に定義されているコンジュゲートの形態で含む免疫原性組成物。

【請求項 12】

1 種または複数種のさらなる抗原をさらに含む、請求項 11 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

血清群 A 荢膜多糖をさらに含む、請求項 11 または請求項 2 2 に記載の免疫原性組成物

50

。

【請求項 1 4】

前記血清群 A 荟膜多糖がキャリア分子とコンジュゲートしている、請求項 1 3 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 5】

水性製剤の状態である、請求項 1 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を含むワクチン。

【請求項 1 7】

哺乳動物に請求項 1 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を投与すること 10 を含む、哺乳動物において免疫応答を生じさせる方法。

【請求項 1 8】

請求項 2 から 7 のいずれか一項に定義されている通りである、血清群 X 荟膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを調製するためのプロセス。

【請求項 1 9】

前記コンジュゲートが請求項 8 から 1 0 のいずれか一項に定義されている通りである、請求項 1 8 に記載のプロセス。

【請求項 2 0】

(a) 血清群 X 荟膜多糖と (b) 薬学的に許容されるキャリアとを含み、水性製剤の状態である医薬組成物。 20

【請求項 2 1】

前記血清群 X 荟膜多糖が請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に定義されているコンジュゲートの形態である、請求項 2 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

請求項 1 3 または請求項 1 4 に定義されている 1 種または複数種のさらなる抗原をさらに含む、請求項 2 0 または請求項 2 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

血清群 X 荟膜多糖を含有する疑いがある試料をアッセイするための方法であって、(i) 試料中の任意の血清群 X 荟膜多糖を加水分解して、加水分解産物をもたらすステップと、(ii) 该加水分解産物を液体クロマトグラフィーに供するステップと、(iii) ステップ (ii) において分離された任意のグルコサミン - 4 - リン酸を検出するステップとを含む方法。 30

【請求項 2 4】

前記試料中のコンジュゲートした血清群 X 荟膜多糖とコンジュゲートしていない血清群 X 荟膜多糖を、ステップ (i) の前に互いに分離させる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

血清群 X 荟膜多糖を含有する疑いがある検体を分析するための方法であって、総血清群 X 荟膜多糖含量を請求項 2 2 または請求項 2 3 に記載の方法によって測定し、前記コンジュゲートしていない血清群 X 荟膜多糖含量を請求項 2 4 に記載の通り測定し、それによって、コンジュゲートしていない血清群 X 荟膜多糖の総血清群 X 荟膜多糖に対する比を算出することができる方法。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本願は、2012年5月22日に出願された米国仮特許出願第61/650,025号；2012年9月9日に出願された米国仮特許出願第61/698,677号；および2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第61/799,528号の利益を主張する。上述の出願の全体の内容は、あらゆる目的のために本明細書中に参考として援用される。

10

20

30

40

50

【0002】

技術分野

本発明は、細菌莢膜糖、特に、*Neisseria meningitidis*血清群X莢膜多糖の分野にある。コンジュゲートを形成するために、多糖をキャリアとコンジュゲートすることができる。多糖およびコンジュゲートは、特に、水性製剤の状態で、免疫のために有用である。

【背景技術】

【0003】

背景技術

細菌の莢膜糖は、長年にわたり、莢膜形成菌(*capsulated bacteria*)に対するワクチンに使用されている。しかし、糖はT細胞非依存性抗原であるので、免疫原性が低い。キャリアとコンジュゲートすることにより、T細胞非依存性抗原をT細胞依存性抗原に変換し、それにより、記憶応答を増強し、防御免疫の発生を可能にすることができます。したがって、最も有効な糖ワクチンは、複合糖質に基づくものであり、プロトタイプのコンジュゲートワクチンは*Haemophilus influenzae* b型(「Hib」)に対するものであった[例えば、参考文献86の14章を参照されたい]。

10

【0004】

生物体の莢膜多糖に基づいて、*N. meningitidis*の血清群が12種(A、B、C、H、I、K、L、29E、W135、X、YおよびZ)同定されている。群Aは、サハラ以南のアフリカにおいて流行性疾患に最も頻繁に関係づけられる病原体である。血清群BおよびCは、USAおよび大部分の先進国における症例の大部分に関与する。血清群W135およびYは、USAおよび先進国における残りの症例に関与する。血清群A、C、YおよびW135由来の莢膜多糖の四価ワクチンが長年公知である[1、2]。これは、青年および成人においては有効であるが、多糖は、追加免疫され得ない弱い免疫応答を誘導するT細胞非依存性抗原であるので、誘導される免疫応答が不十分であり、保護持続時間が短く、また、乳児には使用することができない[例えば、参考文献3]。このワクチンにおける多糖はコンジュゲートしていない[4]。血清群Cに対するコンジュゲートワクチンはヒトへの使用が承認されており、それらとしてMenjugate(商標)[5]、Menigitec(商標)およびNeisVac-C(商標)が挙げられる。血清群A+C由来のコンジュゲートの混合物が公知であり[6~8]、血清群A+C+W135+Y由来のコンジュゲートの混合物が報告されている[9~13]。

20

【0005】

群X莢膜多糖の構造は、1970年代以後公知であり[14]、この血清群は、例えば、サハラ以南のアフリカおよび中国におけるいくつもの髄膜炎菌性疾患の大発生に関連づけられている[15、16]。血清群Xは、5歳未満の小児の間で血清群Aよりも罹患率が有意に高いことが公知である。この血清群に対するワクチンの必要性は長年にわたって認識されているが[17]、有効なワクチンは開発されていない。血清群Xに対するコンジュゲートワクチンが提唱されてきたが[17、18]、そのようなコンジュゲートが免疫原性であるまたはこの血清群に対して防御的であるかどうかは依然として不明である。

30

【0006】

したがって、血清群X莢膜多糖のコンジュゲートが依然として必要である。さらに、この血清群によって引き起こされる疾患に対するワクチン接種のために使用することができるコンジュゲートが依然として必要である。

40

【0007】

群X莢膜多糖の構造は、O-アセチル基を伴わない、1-4ホスホジエステル結合によって結びついたN-アセチルグルコサミン-4-リン酸残基からなる[19]: {4)-D-GlcNAc-(1-OPO3)}(図1)。それらの構造間の類似性に基づいて、MenA莢膜多糖とMenX莢膜多糖の間の生合成の関係が仮定されている[14]。MenA莢膜多糖は水溶液中で著しく加水分解する傾向がある[20]。この不

50

安定性は、マンノサミンのアノマー位が関与するホスホジエステル結合および2位のN-アセチル基が存在し、これによりホスホモノエステル基の離脱が補助されることによって引き起こされると考えられている[21]。別の可能性は、6A型肺炎球菌の莢膜多糖[22]およびHaemophilus influenzae b型の莢膜多糖[23]において認められるように、N-アセチルマンノサミンサブユニットの4位のヒドロキシル基がホスホジエステル基と相互作用し、これにより内部の関与機構を介した加水分解が容易になることである。Men X莢膜多糖とMen A莢膜多糖の構造が類似していること、特に、それらのアノマーホスホジエステル結合が共通であることは、Men X多糖が水溶液中で同様の安定性問題にさらされ得ることを意味する。Men A莢膜多糖が水溶液中で内因的に不安定であることは、Men A莢膜多糖がワクチン(例えば、多糖ワクチンMen ncevax(商標)およびコンジュゲートワクチンMen A fr i V a c(商標)、Men veo(商標)およびNimennrix(商標))に含有される場合、多くの場合、凍結乾燥した形態で存在することを意味する。Men X莢膜多糖は、同様に、その安定性を改善するために凍結乾燥した形態で存在し得るが、水性製剤がより都合がよい。水性製剤中にMen A莢膜多糖コンジュゲートを含有する唯一のワクチンはMenactra(商標)であるが、このワクチンは、低い温度で貯蔵することが必要である。そのような低温貯蔵は費用がかかり、Men AおよびMen Xの大発生が一般的な国の多く(例えば、サハラ以南のアフリカ)では実用的に困難である。

10

【0008】

したがって、血清群X莢膜多糖およびそのコンジュゲートの水性製剤、特に、冷蔵を必要としない水性製剤が必要とされている。

20

【0009】

Men Xに対するワクチンの開発には、インプロセスアッセイとして使用することができる多糖定量化のためのおよび/または最終的なワクチンの特徴付けのための方法が必要である。Men X莢膜多糖にリン酸基が存在することは、総リン含量を測定する比色定量方法[24]によって多糖を定量化することができるることを意味する。しかし、この方法は選択性を欠き、したがって、ある特定のインプロセス適用、例えば、リン酸緩衝液中で、またはリン酸を含有する不純物の存在下で多糖を分析するためには適さない。NMRがより選択性のある方法であり、これはMen X多糖定量化のためにすでに提唱されている[25]。しかし、この手法には純粋な試料および大量の材料が必要である。参考文献26では、NMRよりも感度が高く、リン酸含量の測定よりも選択性がある、HPAEC-PADによってMen X多糖を定量化する代替の手法が実証されている。参考文献26の著者らは、試料を加水分解してグルコサミンを生じさせ、放出されるグルコサミンの量を、N-アセチル-グルコサミン-6-リン酸定量標準物質から導かれた較正曲線に対して比較することによってMen X多糖を定量化した。しかし、グルコサミンは、コンタミネーションに起因して存在する可能性があり、これにより不正確な結果が導かれる。したがって、Men X多糖をアッセイするための代替のまたは改善された方法、特に、Men Xに対してより選択性のある方法が必要とされている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0010】

【特許文献1】国際公開第2005/000345号

【特許文献2】国際公開第02/058737号

【特許文献3】国際公開第03/007985号

【特許文献4】国際公開第2004/013400号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の開示

本発明は、一部、血清群X莢膜多糖をキャリア分子とコンジュゲートするための方法に

50

基づく。本発明者らは、生じるコンジュゲートが免疫原性であり、殺菌性抗体応答を誘導することができることを見いだした。したがって、血清群Xコンジュゲートは、免疫原性組成物、特にワクチンにおいて有用である。本発明者らは、血清群X莢膜多糖抗原、例えば血清群Xコンジュゲートを、他の抗原と、血清群Xに対する免疫応答を失うことなく組み合わせることが可能であることも発見した。詳細には、血清群Xコンジュゲートを他のコンジュゲート、例えば、他の細菌莢膜糖抗原を含むコンジュゲートと組み合わせができる。血清群Xコンジュゲートは、他の*N. meningitidis* 血清群、例えば血清群A、C、W135およびY由来の莢膜糖抗原を含むコンジュゲートとの組合せに特に適している。これらの組合せでは、血清群Xコンジュゲートがその免疫原性を保持するだけでなく、血清群A、C、W135および/またはYコンジュゲートもそれらの免疫原性を保持する。さらに、本発明者らは、構造が血清群A莢膜多糖と類似しているにもかかわらず、血清群X由来の莢膜多糖が驚いたことに 溶液中で安定であることも見いだした。したがって、血清群X莢膜多糖およびそのコンジュゲートは、水性製剤に使用するために特に適し得る。

10

【0012】

第1の態様では、本発明は、*Neisseria meningitidis* 血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを提供する。本発明者らは、血清群X莢膜多糖とキャリア分子の特に安定なコンジュゲートを、下記の本発明の第2の態様の第1の実施形態のプロセスを使用して作製することができることを見いだした。例えば、コンジュゲートは、37度28日後に50%未満の遊離糖を含有してよい。%遊離糖は、下の安定性試験(2)に記載の通り決定することができる。したがって、本発明の第1の態様の中で、本発明は、37度28日後に50%未満の遊離糖を含む血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを提供する。詳細には、コンジュゲートは、25%未満の遊離糖、特に、20%未満の遊離糖、より詳細には15%未満の遊離糖、例えば、約10%遊離糖を含んでよい。

20

【0013】

第2の態様では、本発明は、血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを調製するためのプロセス、特に、下記の第1の実施形態、第2の実施形態および第3の実施形態のプロセスを提供する。第2の態様は、下記の第4の実施形態のプロセスも提供する。本発明の第1の態様のコンジュゲートは、典型的には、これらのプロセスの1つによって得られたまたは得ることができる。しかし、その代わりに、第1の態様のコンジュゲートは、任意の適切な方法によって作製することができる。本発明のコンジュゲートをこれらの他の方法の1つによって作製する場合、当該方法は、典型的には、a)多糖をリンカーとカップリングさせて、多糖-リンカー中間体を形成するステップであって、リンカーの遊離末端がエステル基であり、詳細には、カップリングが、間接的に、すなわち多糖をリンカーとカップリングする前に誘導体化するために使用される追加的なリンカーを用いて起こるステップ；およびb)多糖の還元末端のカルボニル基とリンカーの一方の末端の第一アミン基を反応させることによって還元的アミノ化を行うステップの一方または両方を伴わない。

30

【0014】

第3の態様では、本発明は、(a)血清群X莢膜多糖、特に本発明の第1の態様のコンジュゲートの形態の血清群X莢膜多糖と、(b)薬学的に許容されるキャリアとを含む医薬組成物を提供する。組成物は、典型的には水性製剤の状態である。

40

【0015】

他の態様では、本発明は、本発明のプロセスにおいて有用な中間体およびこれらの中間体を調製するためのプロセスを提供する。本発明は、例えば免疫原性組成物、特にワクチンへの、および哺乳動物において免疫応答を上昇させるための、本発明のコンジュゲートの使用も提供する。

【0016】

本発明の第2の態様の第1の実施形態では、本発明は、血清群X莢膜多糖とキャリア分

50

子のコンジュゲートを調製するためのプロセスであって、(a) 荚膜多糖内の第一ヒドロキシル基を酸化して、アルデヒド基を有する酸化多糖をもたらすステップと、(b) 酸化多糖を、アルデヒド基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスを提供する。このプロセスは、比較的長い多糖、例えば、重合度(DP)が20から200の間、特に、60から100の間(例えば、70から90の間、特に、約80)である多糖に特に適していると考えられている(例えば、収率に関して)。また、このプロセスは、含まれるステップが比較的少なく、それにより工業的設定にスケールアップすることが容易である。また、生じたコンジュゲートは、特に、多糖がその還元末端を介してキャリアに連結しているコンジュゲートと比較してより安定であり得る。ステップ(b)におけるカップリングは、典型的には直接的であり、例えば、アルデヒド基とキャリア分子の第一アミン基の間の還元的アミノ化によるものである。本発明の第1の態様の一部として、本発明は、このプロセスによって得られたまたは得ることができるコンジュゲートも提供する。本発明は、このプロセスの個々のステップ(a)および(b)、ならびにこのプロセスのステップ(a)によって得られたまたは得ることができる酸化多糖中間体も提供する。

10

【0017】

本発明の第2の態様の第2の実施形態では、本発明は、血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを調製するためのプロセスであって、(a) 莢膜多糖の還元末端の還元的アミノ化を行って、末端サブユニットのC-1原子に第一アミン基が共有結合によって結合した改変多糖をもたらすステップと、(b) 改変多糖を、第一アミン基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスを提供する。このプロセスは、比較的短い多糖、例えば、DPが5から50の間、特に10から20の間、例えば、約15である多糖に特に適している。ステップ(b)におけるカップリングは、典型的には間接的であり、例えば、リンカーを介する。本発明の第1の態様の一部として、本発明は、このプロセスによって得られたまたは得ることができるコンジュゲートも提供する。本発明は、このプロセスの個々のステップ(a)および(b)、ならびに、このプロセスのステップ(a)によって得られたまたは得ることができる改変多糖中間体も提供する。

20

【0018】

本発明の第2の態様の第3の実施形態では、本発明は、血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを調製するためのプロセスであって、(a) 莢膜多糖の還元末端を還元して、末端に2つの隣接するヒドロキシル基を有する改変多糖をもたらすステップと、(b) 隣接するヒドロキシル基の酸化的切断を行って、末端にアルデヒド基を有するさらなる改変多糖をもたらすステップと、(c) アルデヒド基の還元的アミノ化を行って、末端に第一アミン基を有するさらなる改変多糖をもたらすステップと、(d)さらなる改変多糖を、第一アミン基を介してキャリア分子にカップリングさせて、それにより、コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスを提供する。このプロセスにより、特に、比較的短い多糖、例えば、DPが5から50の間、特に10から20の間、例えば、約15である多糖に関して、第1の実施形態および第2の実施形態のプロセスよりもよい収率がもたらされ得る。ステップ(d)におけるカップリングは、典型的には間接的であり、例えば、リンカーを介する。本発明の第1の態様の一部として、本発明は、このプロセスによって得られたまたは得ることができるコンジュゲートも提供する。本発明は、このプロセスの個々のステップ(a)、(b)、(c)および(d)ならびにステップ(a)と(b)の組合せ、ステップ(b)と(c)の組合せ、ステップ(c)と(d)の組合せ、ステップ(a)と(b)と(c)の組合せおよびステップ(b)と(c)と(d)の組合せ、ならびにこのプロセスのステップ(a)、(b)または(c)によって得られたまたは得ることができる改変多糖中間体も提供する。

30

【0019】

本発明の第2の態様の第4の実施形態では、本発明は、血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを調製するためのプロセスであって、(a) 莢膜多糖の還元末端を還

40

50

元して、末端に2つの隣接するヒドロキシル基を有する改変多糖をもたらすステップと、(b)隣接するヒドロキシル基の酸化的切断を行って、末端にアルデヒド基を有するさらなる改変多糖をもたらすステップと、(c)キャリア分子の第一アミン基でのアルデヒド基の還元的アミノ化によってさらなる改変多糖とキャリア分子を直接カップリングして、それにより、コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスを提供する。本発明の第1の態様の一部として、本発明は、このプロセスによって得られたまたは得ることができるコンジュゲートも提供する。本発明は、このプロセスの個々のステップ(a)、(b)および(c)ならびにステップ(a)と(b)の組合せおよびステップ(b)と(c)の組合せ、ならびに、このプロセスのステップ(a)または(b)によって得られたまたは得ることができる改変多糖中間体も提供する。

10

【0020】

本発明者らは、血清群X莢膜多糖をアッセイするための方法も開発した。当該方法は、MenX多糖に特徴的であり、通常は不純物には存在しないグルコサミン-4-リン酸を検出することを伴う。したがって、なおさらなる態様では、本発明は、血清群X莢膜多糖を含有する疑いがある試料をアッセイするための方法であって、(i)試料中の任意の血清群X莢膜多糖を加水分解して、加水分解産物をもたらすステップと、(ii)加水分解産物を液体クロマトグラフィーに供するステップと、(iii)ステップ(ii)において分離された任意のグルコサミン-4-リン酸を検出するステップとを含む方法を提供する。

20

【0021】

さらなる態様では、本発明は、N-アセチルグルコサミン-4-リン酸を調製するために有用なプロセスおよび試薬を提供する。この化合物を、上記の血清群X莢膜多糖をアッセイするための方法において分析標準物質として使用することができる。

【0022】

莢膜多糖

本発明は、N.meningitis血清群Xの莢膜多糖に関する。群X莢膜多糖の構造は、O-アセチル基を伴わない、1-4ホスホジエステル結合によって結びついたN-アセチルグルコサミン-4-リン酸残基からなる[19]：{4)-D-GlcNAc-(1-OPO₃}（図1）。

30

【0023】

莢膜多糖は、公知の技法によって、例えば、参考文献19に記載されている方法によって精製することができる。一般に、髄膜炎菌性の莢膜多糖は、多糖沈殿（例えば、陽イオン界面活性剤を使用して）、エタノール分画、低温フェノール抽出（タンパク質を除去するため）および超遠心分離（LPSを除去するため）のステップを含むプロセスによって調製される[例えば、参考文献27]。しかし、血清群X莢膜多糖に対して好ましいプロセスは参考文献10に記載されている。このプロセスは、多糖沈殿、続いて、低級アルコールを使用して沈殿した多糖を可溶化することを伴う。沈殿は、テトラブチルアンモニウム塩およびセチルトリメチルアンモニウム塩（例えば、臭化物塩）、または臭化ヘキサジメトリンおよびミリスチルトリメチルアンモニウム塩などの陽イオン界面活性剤を使用して実現することができる。典型的には臭化セチルトリメチルアンモニウム（「CTAB」）が使用される[28]。沈殿した材料の可溶化は、メタノール、プロパン-1-オール、プロパン-2-オール、ブタン-1-オール、ブタン-2-オール、2-メチル-プロパン-1-オール、2-メチル-プロパン-2-オール、ジオールなどの低級アルコールを使用して実現することができるが、CTAB-多糖複合体の可溶化にはエタノールが特に適している。エタノールは、沈殿した多糖に、最終的なエタノール濃度（エタノールおよび水の総含量に基づいて）が50%から95%の間になるように添加することができる。

40

【0024】

再可溶化後、多糖をさらに処理して混入物を除去することができる。これは、軽微なコンタミネーションさえも許容されない状況において（例えば、ヒト用ワクチンを作製する

50

ために)特に重要である。これは、典型的には、1つまたは複数の濾過のステップ、例えば、活性炭を通した濾過を使用することができる深層濾過、サイズ濾過および/または限外濾過を伴う。

【0025】

濾過して混入物を除去したら、多糖を、さらに処理および/または加工するために沈殿させることができる。これは、陽イオンを交換すること(例えば、カルシウム塩またはナトリウム塩を添加することによって)によって都合よく実現することができる。

【0026】

しかしながら、本発明は、天然の供給源から精製された多糖に限定されず、多糖は、全合成または部分合成などの他の方法によって、例えば、参考文献29に記載されている酵素的合成によって得ることができる。

10

【0027】

多糖は、天然に見いだされる莢膜多糖と比較して化学的に改変することができる。例えば、多糖は、脱N-アセチル化(部分的にまたは完全に)、N-プロピオニ酸化(部分的にまたは完全に)などを受け得る。脱アセチル化は、コンジュゲーションの前、その間、またはその後に行うことができるが、典型的にはコンジュゲーションの前に行う。本発明において使用される血清群X莢膜多糖のN-アセチル化の程度は、0~100%、50~100%、75~100%、80~100%、90~100%、または95~100%であってよい。典型的には、N-アセチル化の程度は100%である。多糖のN-アセチル化の程度は、当技術分野で公知の任意の方法によって、例えば、プロトンNMR(例えば、参考文献30および31に記載されているとおり)によって決定することができる。

20

【0028】

一般に、莢膜多糖はオリゴ糖の形態で使用される。これらは、精製された莢膜多糖を断片化し(例えば、加水分解によって)、通常その後に所望のサイズの断片を精製することによって都合よく形成される。

【0029】

多糖の断片化は、オリゴ糖の最終の平均重合度(DP)が20から200の間、特に、60から100の間(例えば、70から90の間、特に、約80)になるように実施されることが好ましい。本発明者らは、この長さの多糖が上記の第1の実施形態のプロセスにおいて使用するために特に適していることを見いだした。しかし、本発明者らは、それよりも短い多糖、例えば、DPが5から50の間、特に、10から20の間、例えば、約15である多糖も使用できることを見いだした。本発明者らは、この長さの多糖が上記の第2の実施形態および第3の実施形態のプロセスにおいて使用するために特に適していることを見いだした。DPは、イオン交換クロマトグラフィー、NMRによって、または比色定量アッセイによって都合よく測定することができる[32]。

30

【0030】

多糖は、所望の範囲の多糖サイズが得られるようなサイズにすることができる[33]。これは、限外濾過し、その後イオン交換クロマトグラフィーを行うなどの種々のやり方で実現することができる。

40

【0031】

キャリア分子

本発明は、典型的にはタンパク質であるキャリア分子の使用に関する。一般に、糖とキャリアの共有結合性コンジュゲーションにより、T細胞非依存性抗原からT細胞依存性抗原に変換されるので、糖の免疫原性が増強され、したがって、免疫学的記憶を刺激することが可能になる。コンジュゲーションは小児用ワクチンに対して特に有用であり[例えば、参考文献34]、周知の技法である[例えば、参考文献35~43に概説されている]。

【0032】

好ましいキャリアタンパク質は、細菌毒素、例えば、ジフテリアまたは破傷風の毒素、またはそのトキソイドもしくは変異体、特に、ジフテリアトキソイドまたは破傷風トキソ

50

イドなどである。本発明者らは、CRM197ジフテリア毒素変異体[44]が特に適していることを見いだした。H. influenzae由来のタンパク質D[45~47]も使用することができる。

【0033】

他の適切なキャリアタンパク質としては、N. meningitidis外膜タンパク質複合体[48]、合成ペプチド[49、50]、熱ショックタンパク質[51、52]、百日咳タンパク質[53、54]、サイトカイン[55]、リンフォカイン[55]、ホルモン[55]、増殖因子[55]、ヒト血清アルブミン(典型的には組換え型)、種々の病原体由来の抗原由来の複数のヒトCD4⁺T細胞エピトープを含む人工タンパク質[56]、例えばN19[57]、肺炎球菌表面タンパク質PspA[58]、ニューモリシン[59]またはその無毒性誘導体[60]、鉄取り込みタンパク質(iron-uptake protein)[61]、C. difficile由来の毒素Aまたは毒素B[62]、GBSタンパク質[63]、GASタンパク質[64]などが挙げられる。

【0034】

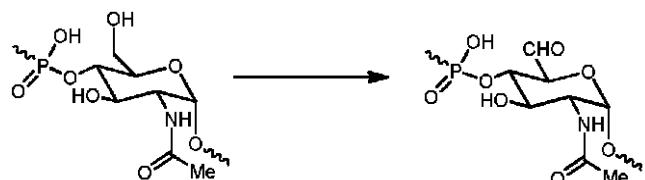
他の適切なキャリアタンパク質は参考文献65に記載されており、特に、当該文献の配列番号9のキャリアタンパク質である。これらのキャリアタンパク質は参考文献66にも記載されており、下の「例示的なキャリアタンパク質」の節でさらなる詳細が提供される。

【0035】

酸化

上記の第1の実施形態のプロセスのステップ(a)では、莢膜多糖内の第一ヒドロキシル基が酸化されてアルデヒド基がもたらされる。第一ヒドロキシル基は、MenX莢膜多糖サブユニットのC-6原子に共有結合によって結合しており、したがって、ステップは以下の通り進行する：

【化1】



このステップは2つ以上のそのような第一ヒドロキシル基の酸化が関与し得、その結果、多糖鎖に沿って2つ以上のアルデヒド基が導入される。例えば、本発明者らは、血清群X多糖内の残基の1~50%の間、特に、1~20%、および、より詳細には1~10%、例えば、約4~8%の第一ヒドロキシル基を酸化することによって適切なコンジュゲートを調製することができることを見いだした。ヒドロキシル基は種々の酸化反応(例えば、Swern酸化、Dess-Martin酸化、Cr^{VII}酸化など)によってアルデヒドに変換することができる。しかし、本発明者らは、TEMPO(2,2,6,6-テトラメチルピペリジニルオキシラジカル)媒介性酸化が特に適切であることを見いだした。TEMPO媒介性酸化は参考文献67に記載されている。アルデヒド基が酸化してカルボキシル基になることを防ぐために、非水系条件で、例えば、参考文献68に記載されているDMF溶媒を使用してTEMPO媒介性酸化を行うことが好ましい。当業者は酸化に適した条件を同定することができよう。例えば、本発明者らは、多糖を、0で一晩、TEMPO(MenX反復サブユニットに対して0.06eq)、NaHCO₃(MenX反復サブユニットに対して9eq)およびTCC(トリクロロイソシアヌル酸、MenX反復サブユニットに対して2eq)を用いて処理することが適していることを見いだした。

【0036】

酸化的切断

上記の第3の実施形態および第4の実施形態のプロセスのステップ(b)では、莢膜多

10

20

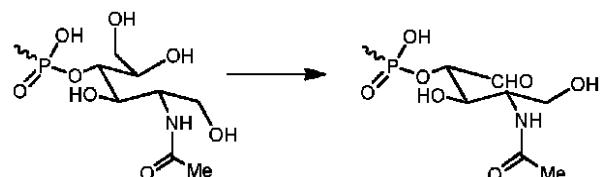
30

40

50

糖の2つの隣接するヒドロキシル基が酸化的切断を受けて、アルデヒド基がもたらされる
:

【化2】



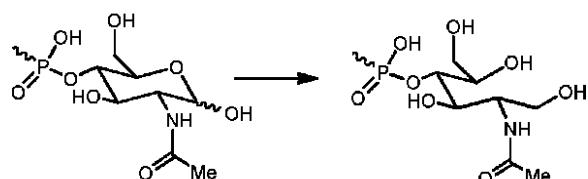
酸化的切断（例えば、 NaIO_4 、 Pb(OAc)_4 などを使用する）は当技術分野において周知である。本発明者らは、pH 7.2、10 mM の NaPi 緩衝液中 6 ~ 8 mg / ml の多糖を、 NaIO_4 (MenX の分子量に対して 10 eq、固体) と室温で 1.5 時間反応させることが適していることを見いだした。 10

【0037】

還元

上記の第3の実施形態および第4の実施形態のプロセスのステップ(a)では、莢膜多糖の還元末端を還元して、末端に2つの隣接するヒドロキシル基を有する改変多糖をもたらす：

【化3】



【0038】

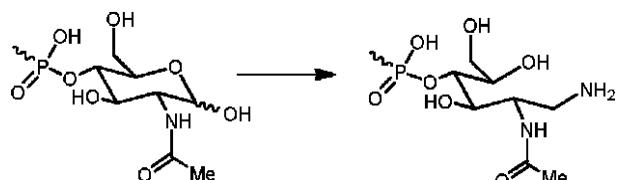
多糖の還元（例えば、 NaBH_4 などを使用する）は当技術分野において周知である。本発明者らは、pH 8、10 mM の NaPi 緩衝液中 15 mg / ml の多糖を、 NaBH_4 (MenX の分子量に対して 12 eq、固体) と室温で 1.5 時間反応させることが適していることを見いだした。 30

【0039】

還元的アミノ化

上記の第2の実施形態のプロセスのステップ(a)では、莢膜多糖の還元末端を還元的アミノ化に供して、末端サブユニットの C-1 原子に第一アミン基が共有結合によって結合した改変多糖をもたらす：

【化4】



還元的アミノ化は有機化学における標準技法である。例えば、アンモニアを使用して、還元末端のアルデヒド基を第一アミン基に変換することができる。これは、アンモニウム塩（例えば、塩化アンモニウムまたは酢酸アンモニウム）を適当な還元剤（例えば、シアノ水素化ホウ素、例えば、シアノ水素化ホウ素ナトリウム NaBH_3CN など；ボラン-ピリジン；トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム；水素化ホウ素交換樹脂）と組み合わせて使用して都合よく実現することができる。当業者は、還元的アミノ化に適した条件を同定することができよう。

【0040】

10

20

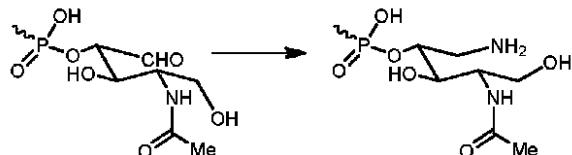
30

40

50

還元的アミノ化は、上記の第3の実施形態のプロセスのステップ(c)においても、末端に第一アミン基を有する改変多糖をもたらすために行われる。例えば、アルデヒド基を上記の通り第一アミン基に変換することができる。したがって、還元的アミノ化により、第一アミン基が末端サブユニットのC-5原子に共有結合によって結合した改変多糖がもたらされる：

【化5】



10

しかし、第3の実施形態の他の例では、還元的アミノ化は、アルデヒド基とリンカーの末端第一アミン基の間のものである。リンカーは、アルデヒド基と反応させるための第1の末端第一アミン基、および改変多糖の末端の第一アミン基としての機能を果たす第2の末端第一アミン基をもたらす二官能性リンカーである。例えば、式 $X_1 - L - X_2$ の二官能性リンカーをリンカーとして使用することができ、式中、 X_1 はアルデヒド基と反応することができる第一アミン基を含み、 X_2 は第一アミン基を含み、 L はリンカーの連結部分である。典型的な L 基は、1~10個の炭素原子を有する直鎖アルキル（例えば、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} ）、特に、 $-(CH_2)_4-$ である。式 $X - L - X$ のホモ二官能性(homobifunctional)リンカーがリンカーとして特に適しており、式中、2つの X 基は互いに同じであり、 L はリンカーの連結部分である。典型的な X 基は $-NH_2$ 基である。 L は、典型的には式 $-L' - L^2 - L'$ を有し、式中、 L' はカルボニルである。典型的な L^2 基は、1~10個の炭素原子を有する直鎖アルキル（例えば、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} ）、特に、 $-(CH_2)_4-$ である。したがって、典型的なリンカーはアジピン酸ジヒドラジド(ADH)である。それよりも短いリンカー、例えば、カルボジヒドラジン(CDH、すなわち $X - L - X$ 、式中、 X は $-NH_2$ であり、 L はカルボニルである）も使用することができる。

20

【0041】

30

還元的アミノ化は、上記の第4の実施形態のプロセスのステップ(c)においても、コンジュゲートをもたらすために行われる。還元的アミノ化は、さらなる改変多糖のアルデヒド基とキャリア分子の第一アミン基の間のものである。

【0042】

40

キャリア分子とのカップリング

上記の第1の実施形態のステップ(b)における酸化多糖とキャリア分子のアルデヒド基を介したカップリングは、直接的でもリンカーを介してもよい。しかし、カップリングは、必要な合成ステップが少ないので、直接的であることが好ましい。上記の第2の実施形態のステップ(b)における改変多糖とキャリア分子の第一アミン基を介したカップリングはまた、直接的でもリンカーを介してもよい。この実施形態では、典型的には、多糖とキャリア分子の間に空間をもたらすために、リンカーが使用される。上記の第3の実施形態のステップ(d)における改変多糖とキャリア分子の第一アミン基を介したカップリングはまた、直接的でもリンカーを介してもよい。この実施形態では、典型的には、同様に、多糖とキャリア分子の間に空間をもたらすために、リンカーが使用される。3つの実施形態全てについて、任意の適切なコンジュゲーション反応を、所望であれば任意の適切なリンカーを用いて使用することができる。

【0043】

50

多糖またはリンカー誘導体化多糖のキャリアへの結合は、典型的には、例えば、リシンの側鎖またはキャリアタンパク質の残基、またはアルギニン残基の第一アミン(-NH₂)基を介する。キャリアへの結合は、例えば、システイン残基の側鎖のスルフヒドリル(

- S H) 基を介するものであってもよい。

【 0 0 4 4 】

上記の第 1 の実施形態のプロセスについて、本発明者らは、直接カップリングを、酸化多糖のアルデヒド基とキャリアのアミン基を還元的アミノ化によって反応させることによって都合よく実現することができることを見いだした。したがって、この実施形態では、この種の直接カップリングが好ましい。上記の通り、還元的アミノ化は、標準技法であり、ワクチンに使用するための莢膜多糖のコンジュゲートの作製において広範囲にわたって使用されている。1つの手法では、酸化多糖のアルデヒド基とキャリアのアミン基を反応させる。これは、適当な還元剤（例えば、シアノ水素化ホウ素、例えば、シアノ水素化ホウ素ナトリウム Na BH₃ CN など；ボラン - ピリジン；トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム；水素化ホウ素交換樹脂など）の存在下で多糖とキャリアとを組み合わせることによって都合よく実現することができる。当業者は、還元的アミノ化に適した条件を同定することができよう。例えば、本発明者らは、酸化多糖を、pH 7.2、10 mM の Na Pi 緩衝液中、w / w 比 4 : 1 の 10 mg / ml の CRM 197 および w / w 比 1 : 1 の Na BH₃ CN を用いて処理することが適していることを見いだした。この混合物を 37

でゆっくり攪拌しながら 72 時間放置して、還元的アミノ化を実施することができる。この実施形態では、所望であれば、例えば、酸化多糖のアルデヒド基とリンカーのアミン基を還元的アミノ化によって反応させることによって、またはリンカーの結合のためのアミン基をもたらすために還元的アミノ化によってアルデヒド基をアミン基に変換することによって、リンカーを介したカップリングを使用することができる。

【 0 0 4 5 】

全ての実施形態のプロセスにおいて、任意の公知の手順を使用してリンカーを介したカップリングを行うことができる。例えば、多糖が、アルデヒド基（例えば、上記の第 1 の実施形態のプロセスのステップ（a）において生じたアルデヒド基）を含む場合、二官能性リンカーを使用して、アルデヒド基とカップリングするための第 1 の基およびキャリアとカップリングするための第 2 の基をもたらすことができる。例えば、式 X₁ - L - X₂ の二官能性リンカーを使用することができ、式中、X₁ はアルデヒドと反応することができ、X₂ はキャリアと反応することができ、L はリンカーの連結部分である。典型的な X₁ 基はアミン基である。典型的な L 基は、1 ~ 10 個の炭素原子を有する直鎖アルキル（例えば、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀）例えば、-(CH₂)₄ - または -(CH₂)₃ - である。同様に、多糖が第一アミン基（例えば、第 2 の実施形態のプロセスのステップ（a）において生じた第一アミン基または第 3 の実施形態のプロセスのステップ（c）において生じた第一アミン基）を含む場合、二官能性リンカーを使用して、アミン基とカップリングするための第 1 の基およびキャリアとカップリングするための（典型的には、キャリアのアミンとカップリングするための）第 2 の基をもたらすことができる。例えば、式 X - L - X のホモ二官能性リンカーを使用することができ、式中、2 つの X 基は互いに同じであり、アミンと反応することができ、また、式中、L はリンカーの連結部分である。典型的な X 基は N - オキシスクシンイミドである。L は、典型的には式 - L' - L² - L' - を有し、式中、L' はカルボニルである。典型的な L² 基は、1 ~ 10 個の炭素原子を有する直鎖アルキル（例えば、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀）例えば、-(CH₂)₄ - である。したがって、典型的なリンカーは、アジピン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドジエステル（S I D E A）：

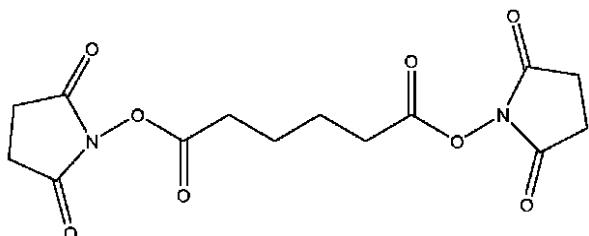
10

20

30

40

【化6】



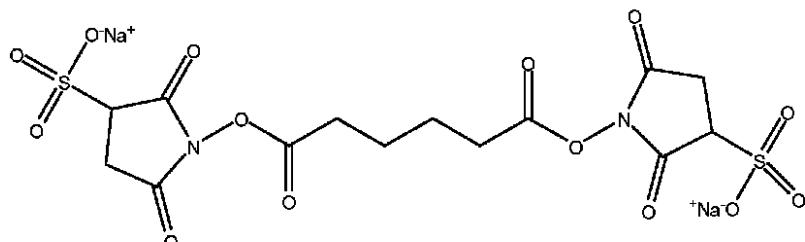
である。

他のX基は、HO-L-OHと組み合わせるとエステルを形成するもの、例えば、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、およびスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミドである。本発明で使用するための、アミンと反応するさらなる二官能性リンカーとしては、アクリロイルハロゲン化物（例えば、塩化物）[70]、ハロアシルハライド[71]、グルタル酸ジスクシンイミジル、スペリン酸ジスクシンイミジル、エチレングリコールビス[スクシンイミジルスルホネート]などが挙げられる。

【0046】

リンカーは、一般に、多糖に対してモル過剰で加えられる。リンカーは典型的には水に不溶性であるので、リンカー/多糖反応は一般に非プロトン性溶媒（例えば、DMSO、酢酸エタノール（ethanol acetate）など）中で行われる。しかし、水溶性リンカーを使用する場合には、水などのプロトン性溶媒を含めたより広い範囲の溶媒が利用可能である。適切なリンカーとしては、スルホン化された形態、例えば、スルホン化SIDEA：

【化7】



が挙げられる。

リンカーを使用する場合、コンジュゲートはリンカー部分を含む。この部分は多糖にもキャリアにも由来せず、コンジュゲート調製の間に使用される第3の分子であり、最終のコンジュゲート生成物において多糖およびキャリアタンパク質のどちらとも容易に区別することができる。リンカー部分は、炭素、水素、酸素および/または窒素などの原子を含んでよい。炭素および水素を含むリンカーが典型的であり、酸素および/または窒素をさらに含むリンカーも典型的には使用される。窒素原子を含むリンカーでは、窒素原子と結合した炭素原子を含んでよく、その窒素原子が今度は第2の炭素原子と結合している(-C-N-C-)。酸素原子を含むリンカーは、典型的には、酸素原子をカルボニル基の一部として含む。分子量が30~500Daの間のリンカー部分が一般的である。2つのカルボニル基を含有するリンカーも一般的である。

【0047】

特に有用なリンカー部分は-NH-C(O)-(CH₂)_n-C(O)-であり、式中、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である。nの値は典型的には4である。このリンカーの末端-NH-は通常、多糖部分由来の炭素原子に結合する。末端-C(O)-は通常、キャリアのアミノ酸の側鎖の窒素原子に結合する。好みのリンカー部分は、多糖の-NH₂基と、二酸(dicarboxylic acid)（例えば、アジピン酸、HOOC-(CH₂)₄-COOH）のジエステル（例えば、ジスクシンイミジルエステル）である二官能性リンカーとの反応、およびその生成物の還元的アミノ化を伴うプロセス

10

20

30

40

50

によって都合よく導入することができる（図6参照〔69〕）。

【0048】

リンカーを多糖の-NH₂基に結合させるために使用することができる他の化学作用としては、以下が挙げられる：

- アクリロイル化（例えば、アクリロイル塩化物との反応による）、続いて、アミノ酸の側鎖の-NH₂またはシスティン側鎖の-SHのいずれかへのマイケル付加〔70〕。生じるリンカーは-NH-C(=O)-(CH₂)₂-（プロピオンアミド）である。

- ハロアシルハライドとの反応、続いて、アミノ酸の側鎖の-NH₂またはシスティン側鎖の-SHとの反応〔71〕。リンカーは-NH-C(=O)-CH₂-である。

【0049】

典型的には、多糖：タンパク質比(w/w)が1:20（すなわち、タンパク質過剰）から20:1（すなわち、多糖過剰）の間であるコンジュゲートが本発明の方法によって作製される。1:10~1:1の比、特に、1:2から1:1の間の比が好ましく、約1:1.5が最も好ましい。本発明の第2の態様の第1の実施形態のプロセスによって作製されるコンジュゲートに関しては、典型的な比は、0.1から1.0の間、より詳細には0.2から0.4の間、例えば、約0.35である。本発明の第2の態様の第2の実施形態のプロセスによって作製されるコンジュゲートに関しては、典型的な比は、0.1から1.0の間、より詳細には0.1から0.3の間、例えば、約0.22である。本発明の第2の態様の第3の実施形態のプロセスによって作製されるコンジュゲートに関しては、典型的な比は、0.1から1.0の間、より詳細には0.1から0.3の間、例えば、約0.21である。

10

【0050】

組成物は、少量の遊離キャリアを含んでよい〔72〕。所与のキャリアタンパク質が本発明の組成物において遊離の形態とコンジュゲートした形態の両方で存在する場合、コンジュゲートしていない形態は、組成物全体中のキャリアタンパク質の総量の5%以下であることが好ましく、2重量%未満で存在することがより好ましい。

【0051】

コンジュゲーション後に、遊離多糖およびコンジュゲートした多糖を分離することができる。疎水性クロマトグラフィー、接線限外濾過(tangential ultrafiltration)、ダイアフィルトレーションなどを含めた多くの適切な方法が存在する〔参考文献73&74なども参照されたい〕。

20

【0052】

コンジュゲートと他の抗原の組合せ

本発明は、上記の個々のコンジュゲートを提供するだけではなく、本発明のコンジュゲートと1種または複数種のさらなる抗原とを含む組成物も提供する。組成物は、典型的には免疫原性組成物である。

【0053】

さらなる抗原（複数可）は、さらなるコンジュゲートを含んでよい。これらの実施形態では、例えばキャリア抑制のリスクを低下させるために、組成物中の異なるコンジュゲートに対して2種以上のキャリアを使用することが可能である。典型的には、本発明のコンジュゲートを含めた全てのコンジュゲートに対して同じキャリアを使用する。しかし、本発明者らは、本発明のコンジュゲートに対して異なるキャリアを使用することにより、コンジュゲートをさらなるコンジュゲート（複数可）と組み合わせた際の免疫干渉を低下させることができることを見いだした。したがって、一部の実施形態では、本発明のコンジュゲートに1種のキャリア（特に、破傷風トキソイドまたは参考文献65および参考文献66の配列番号9）を使用し、一方、さらなるコンジュゲート（複数可）には異なるキャリア（特に、CRM197）を使用する。

40

【0054】

単一のキャリアタンパク質に2種以上の多糖抗原を保有させることができる〔75、76〕。この目標を実現するために、異なる多糖をコンジュゲーションプロセスの前に混合

50

することができる。しかし、典型的には、各多糖について別々のコンジュゲートが存在し、異なる多糖をコンジュゲーション後に混合する。別々のコンジュゲートは、典型的には、上記の通り同じキャリアに基づく。

【0055】

さらなる抗原（複数可）は、詳細には、血清群A莢膜多糖、血清群C莢膜多糖、血清群Y莢膜多糖および血清群W135莢膜多糖からなる群から選択することができる。典型的には、この群から選択されるさらなる抗原（複数可）を、それぞれ別々にキャリアタンパク質とコンジュゲートする。好ましいキャリアタンパク質は、細菌毒素、例えば、ジフテリアまたは破傷風の毒素、またはそのトキソイドもしくは変異体、特に、ジフテリアトキソイドまたは破傷風トキソイドである。本発明者らは、CRM197ジフテリア毒素変異体が特に適していることを見いだした。H. influenzae由来のタンパク質Dも使用することができる。典型的には、必要に応じて本発明のコンジュゲートを含めた全てのコンジュゲートに対して同じキャリアタンパク質を使用する。本発明者らは、CRM197ジフテリア毒素変異体が特に適していることを見いだしたが、ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドも使用することができる。上記の通り、本発明者らは、本発明のコンジュゲートに対して異なるキャリアを使用することにより、コンジュゲートをさらなるコンジュゲート（複数可）と組み合わせた際の免疫干渉を低下させることができることを見いだした。したがって、一部の実施形態では、本発明のコンジュゲートに1種のキャリア（特に、破傷風トキソイドまたは参考文献65および参考文献66の配列番号9）を使用し、一方、さらなるコンジュゲート（複数可）には異なるキャリア（特に、CRM197）を使用する。10

以下の組合せが、特に本発明において使用されることが想定される：

- 1) 本発明のコンジュゲートおよび血清群A莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート；
- 2) 本発明のコンジュゲートおよび血清群W135莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート；
- 3) 本発明のコンジュゲート、血清群A莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート、および血清群W135莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート；ならびに
- 4) 本発明のコンジュゲート、血清群A莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート、血清群C莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート、血清群W135莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート、および血清群Y莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲート。30

【0056】

血清群Xおよび血清群Aおよび/または血清群W135由来の抗原を含めることによって、組合せ1)～3)を含む組成物により、アフリカにおけるN. meningitidis疾患の大多数を引き起こしている血清群に対する防御をもたらすことができる。したがって、そのような組合せが特に好ましい。さらなる抗原、例えば、組合せ4)に含まれる血清群Cおよび血清群Y由来の抗原を添加することにより追加的な防御がもたらされ得るが、それに伴う追加的な費用にこの追加的な防御の利益がまさることができない。したがって、本発明の一部の実施形態では、組成物は、血清群C由来の抗原、詳細には血清群C莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲートを含有しない。同様に、本発明の同じまたは他の実施形態では、組成物は、血清群Y由来の抗原、詳細には血清群Y莢膜多糖とキャリアタンパク質とのコンジュゲートを含有しない。40

【0057】

さらなる抗原（複数可）は、追加的な細菌抗原、ウイルス抗原または寄生虫抗原を含んでよい。これらは以下から選択することができる：

- *Streptococcus pneumoniae*由来の糖抗原 [例えば、参考文献77～79；参考文献86の22章&23章] 。
- A型肝炎ウイルス由来の抗原、例えば、不活化ウイルス [例えば、80、81；参考

10

20

30

40

50

文献 86 の 15 章]。

- B 型肝炎ウイルス由来の抗原、例えば、表面抗原および / またはコア抗原 [例えば、81、82 ; 参考文献 86 の 16 章]。

- C 型肝炎ウイルス由来の抗原 [例えば、83]。

- Bordetella pertussis 由来の抗原、例えば、B. pertussis 由来の百日咳ホロ毒素 (PT) および線維状赤血球凝集素 (FHA) 、必要に応じて、パータクチンおよび / または凝集原 2 および 3 の組み合わせ [例えば、参考文献 84 & 85 ; 参考文献 86 の 21 章]。

- ジフテリア抗原、例えば、ジフテリアトキソイド [例えば、参考文献 86 の 13 章]
。

- 破傷風抗原、例えば、破傷風トキソイドなど [例えば、参考文献 86 の 27 章]。

- Haemophilus influenzae B 由来の糖抗原 [例えば、参考文献 86 の 14 章]

- Chlamydia pneumoniae 由来の抗原 [例えば、87、88、89、90、91、92、93]。

- Chlamydia trachomatis 由来の抗原 [例えば、94]。

- Porphyromonas gingivalis 由来の抗原 [例えば、95]。

- ポリオ抗原 (複数可) [例えば、96、97 ; 参考文献 86 の 24 章] 、例えば、IPV。

- 狂犬病抗原 (複数可) [例えば、98] 例えば、凍結乾燥不活化ウイルス [例えば 99 、 RabAvert (商標)]。

- 麻疹抗原、流行性耳下腺炎抗原および / または風疹抗原 [例えば、参考文献 86 の 19 章、20 章および 26 章]。

- インフルエンザ抗原 (複数可) [例えば、参考文献 86 の 17 章 & 18 章] 、例えば、赤血球凝集素および / またはノイラミニダーゼ表面タンパク質。

- Moraxella catarrhalis 由来の抗原 [例えば、100]。

- Streptococcus pyogenes (A 群連鎖球菌) 由来の抗原 [例えば、101、102、103]。

- Streptococcus agalactiae (B 群連鎖球菌) 由来の抗原 [例えば、64、104 ~ 106]。

- S. epidermidis 由来の抗原 [例えば、参考文献 107、108 および 109 に記載の ATCC - 31432 株、SE - 360 株および SE - 10 株から得ることができる I 型莢膜多糖、II 型莢膜多糖および / または III 型莢膜多糖。

【 0058 】

糖または炭水化物抗原を使用する場合、典型的には免疫原性を増強するためにキャリアとコンジュゲートする。H. influenzae B 、 隹膜炎菌性糖抗原および肺炎球菌糖抗原のコンジュゲーションが周知である。

【 0059 】

毒性のタンパク質抗原は、必要な場合には解毒することができる (例えば、化学的手段および / または遺伝学的手段による百日咳毒素の解毒 [85])。

【 0060 】

組成物中にジフテリア抗原が含まれる場合、破傷風抗原および百日咳抗原も含まれることが一般的である。同様に、破傷風抗原が含まれる場合、ジフテリア抗原および百日咳抗原も含まれることが一般的である。同様に、百日咳抗原が含まれる場合、ジフテリア抗原および破傷風抗原も含まれることが一般的である。

【 0061 】

抗原は、アルミニウム塩に吸着させることができる。

【 0062 】

組成物中の抗原は、典型的には、それぞれ少なくとも 1 μg / ml の濃度で存在する。一般に、任意の所与の抗原の濃度は、その抗原に対する免疫応答を引き出すために十分な

10

20

30

40

50

濃度である。

【0063】

本発明の組成物においてタンパク質抗原を使用することに対する代替として、抗原をコードする核酸を使用することができる[例えば、参考文献110～118]。したがって、本発明の組成物のタンパク質構成成分を、そのタンパク質をコードする核酸(通常DNA、例えばプラスミドの形態で)で置き換えることができる。

【0064】

実際面で、本発明の組成物に含める抗原の数には上限があり得る。本発明の組成物における抗原の数は、20未満、19未満、18未満、17未満、16未満、15未満、14未満、13未満、12未満、11未満、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、または3未満であり得る。10

【0065】

医薬組成物および方法

本発明は、(a)特に本発明のコンジュゲートの形態の血清群X莢膜多糖と、(b)薬学的に許容されるキャリアとを含む医薬組成物を提供する。典型的な「薬学的に許容されるキャリア」としては、それ自体は組成物を受け取る個体に有害な抗体の産生を誘導しない任意のキャリアが挙げられる。適切なキャリアは、典型的には、大きな、ゆっくりと代謝される巨大分子、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸ポリマー、アミノ酸共重合体、スクロース[119]、トレハロース[120]、ラクトース、および脂質凝集体(例えば、油滴またはリポソームなど)である。そのようなキャリアは、当業者に周知である。ワクチンは、例えば、水、食塩水、グリセロールなどの希釈剤も含有してよい。さらに、補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などが存在してよい。滅菌された、発熱物質を含まないリン酸緩衝生理食塩水が典型的なキャリアである。薬学的に許容される賦形剤の徹底的な考察が参考文献121において入手可能である。20

【0066】

本発明の組成物は水性製剤(すなわち、液剤または懸濁剤)であってもよく、乾燥した形態(例えば、凍結乾燥)であってもよい。本発明者らは、血清群X莢膜多糖は驚いたことに水性環境で安定であることを見出したので、水性製剤が好ましい。乾燥ワクチンを使用する場合には、それを注射前に水性製剤に再構成する。コンジュゲートワクチンの凍結乾燥は当技術分野で公知であり、例えば、Menjuge(商標)製品は凍結乾燥形態で存在するが、NeisVac-C(商標)およびMeningitec(商標)は水性形態で存在する。凍結乾燥中のコンジュゲートを安定化するために、糖アルコール(例えば、マンニトール)または二糖(例えば、スクロースまたはトレハロース)を、例えば、1mg/mlから30mg/mlの間(例えば、約25mg/ml)で組成物に含めることが典型的であり得る。これらの安定剤は再構成後の水性製剤中に存在してよい。30

【0067】

組成物はバイアル中に存在してもよく、充填済み(ready-filled)シリンジ中に存在してもよい。シリンジは、針を伴ってまたは伴わずに供給することができる。シリンジは組成物の単回用量を含むが、バイアルは単回用量を含んでも複数回用量を含んでもよい。40

【0068】

本発明の水性製剤は、他のワクチンを凍結乾燥形態から再構成するために適している。本発明の組成物がそのような即時再構成のために使用するためのものである場合、本発明は、バイアルを2つ含んでもよく、充填済みシリンジを1つとバイアルを1つ含み、シリンジの内容物が、注射前にバイアルの内容物を再活性化するために使用されるものであってもよいキットを提供する。

【0069】

本発明の組成物は、単位用量形態または複数回用量形態に包装することができる。複数回用量形態については、バイアルがプレフィルドシリンジよりも好ましい。有効な投与量50

の体積は常套的に確立することができるが、組成物の典型的なヒト用量は、例えば、筋肉内注射については体積0.5mlである。

【0070】

組成物のpHは、典型的には、6から8の間、例えば、約7である。安定なpHは緩衝液を使用することによって維持することができる。例えば本発明の水性製剤において使用するための典型的な緩衝液はリン酸塩である。例えば、無水リン酸二ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムの混合物が一般的である。適切な濃度は、10mMの無水リン酸二ナトリウムと10mMのリン酸二水素ナトリウムである。組成物が水酸化アルミニウム塩を含む場合、ヒスチジン緩衝液を使用することが一般的である[122]。組成物は滅菌されており、かつ/または発熱物質を含まないものであってよい。本発明の組成物はヒトに関して等張性であってよい。

10

【0071】

本発明の組成物は免疫原性であり、ワクチン組成物であることがより好ましい。本発明によるワクチンは予防的なもの(すなわち、感染症を予防するためのもの)であっても治療的なもの(すなわち、感染症を処置するためのもの)であってもよいが、典型的には、予防的なものである。ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、免疫学的有効量の抗原(複数可)、ならびに、必要に応じて任意の他の構成成分を含む。「免疫学的有効量」とは、その量を単回用量で、または連続的なものの一部として個体に投与することが処置または予防に有効であることを意味する。この量は、処置される個体の健康および身体的状態、年齢、処置される個体の分類学的群(例えば、非ヒト霊長類、霊長類など)、抗体を合成する個体の免疫系の能力、所望の防御の程度、ワクチンの処方、医学的状況に関する処置担当医師の評価、および他の関連する因子に応じて変動する。この量は、常套的な検査によって決定することができる比較的広範な範囲に入ることが予想される。

20

【0072】

各用量の範囲内で、個々の糖抗原の分量は、一般に、1~50μgの間(糖の質量として測定する)、例えば、約1μg、約2.5μg、約4μg、約5μg、または約10μgになる。

【0073】

*N.meningitidis*は、体の種々の領域に影響を及ぼし、したがって、本発明の組成物は、さまざまな形態で調製することができる。例えば、組成物は、注射剤として、水溶液または懸濁液のいずれかとして調製することができる。組成物は、肺内投与するために、例えば、細末または噴霧剤を使用する吸入器(inhaler)として調製することができる。組成物は、坐薬または腔坐薬として調製することができる。組成物は、鼻、耳または眼への投与のために、例えば、噴霧剤、滴剤、ゲル剤または粉剤として調製することができる[例えば、参考文献123&124]。肺炎球菌糖[125、126]、Hib糖[127]、MenC糖[128]、ならびにHibおよびMenC糖コンジュゲートの混合物[129]の経鼻投与の成功が報告されている。

30

【0074】

本発明の組成物は、特に複数回用量形式で包装される場合には、抗菌剤を含んでよい。

40

【0075】

本発明の組成物は、界面活性剤、例えば、Tween(ポリソルベート)、例えば、Tween80を含んでよい。界面活性剤は、一般に、低レベル、例えば、<0.01%で存在する。

【0076】

本発明の組成物は、張度をもたらすためにナトリウム塩(例えば、塩化ナトリウム)を含んでよい。2~20mg/ml、例えば、約10±2mg/mlまたは約5±1mg/ml(特に、約4.25mg)の濃度のNaClが一般的である。

【0077】

本発明の組成物は、一般に緩衝液を含む。リン酸緩衝液が一般的である。本発明の組成物は、一般に、他の免疫調節剤と併せて投与される。詳細には、組成物は通常、1種また

50

は複数種のアジュバントを含む。そのようなアジュバントとしては、これだけに限定されないが、以下が挙げられる：

【0078】

A．無機質含有組成物

本発明においてアジュバントとして使用するために適した無機質含有組成物としては、アルミニウム塩およびカルシウム塩などの無機塩類が挙げられる。本発明は、水酸化物（例えば、オキシ水酸化物）、リン酸塩（例えば、ヒドロキシホスフェート、オルトホスフェート）、硫酸塩などの無機塩類[例えば、参考文献130の8章&9章を参照されたい]、または異なる無機化合物の混合物（例えば、リン酸塩および水酸化物アジュバントの混合物、必要に応じて過剰リン酸塩を含む）を含み、化合物は任意の適切な形態（例えば、ゲル、結晶、非晶質など）をとり、塩（複数可）に吸着していることが一般的である。無機質含有組成物は、金属塩の粒子として製剤化することもできる[131]。

10

【0079】

アルミニウム塩を本発明のワクチンに、Al³⁺の用量が用量当たり0.2mgから1.0mgの間になるように含めることができる。

【0080】

典型的なリン酸アルミニウムアジュバントは、1ml当たりAl³⁺0.6mgで含まれ、PO₄/Alモル比が0.84から0.92の間である非晶質ヒドロキシリリン酸アルミニウムである。低用量のリン酸アルミニウムを用いた吸着を、例えば、用量当たりコンジュゲート当たり50μgから100μgの間のAl³⁺で使用することができる。リン酸アルミニウムを使用し、抗原をアジュバントに吸着させないことが望まれる場合、溶液中に遊離リン酸イオンを含めることが好ましい（例えば、リン酸緩衝液を使用することによって）。

20

【0081】

B．オイルエマルション

本発明においてアジュバントとして使用するために適したオイルエマルション組成物としては、スクアレン-水エマルション、例えば、MF59（マイクロフル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%Tween80、および0.5%Span85）が挙げられる[参考文献130の10章；参考文献132～134も参照されたい]。MF59は、FLUAD（商標）インフルエンザウイルス三価サブユニットワクチンにおいてアジュバントとして使用されている。

30

【0082】

組成物に使用するために特に有用なアジュバントはサブミクロン水中油エマルションである。本明細書で使用するために好ましいサブミクロン水中油エマルションは、必要に応じてさまざまな量のMTP-PEを含有するスクアレン/水エマルション、例えば、4～5%w/vのスクアレン、0.25～1.0%w/vのTween80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（polyoxyethyl ethersorbitan monooleate））、および/または0.25～1.0%のSpan85（ソルビタントリオレエート）ならびに、必要に応じて、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル(isoglutaminyl)-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ(hydroxyphosphophoryloxy)-エチルアミン(MTP-PE)を含有するサブミクロン水中油エマルションである。組成物に使用するためのサブミクロン水中油エマルション、それを作製する方法およびムラミルペプチドなどの免疫賦活剤は、参考文献132&135～136に詳しく記載されている。

40

【0083】

完全フロイントアジュバント(CFA)および不完全フロイントアジュバント(IFN)も、本発明におけるアジュバントとして使用することができる。

【0084】

C．サポニン製剤[参考文献130の22章]

50

サポニン製剤も、本発明におけるアジュバントとして使用することができる。サポニンは、広い範囲の植物種の樹皮、葉、茎、根、さらには花において見いだされるステロール配糖体およびトリテルペノイド配糖体の異種群である。Quillaja saponaria Molina の木の樹皮から単離されたサポニンがアジュバントとして広く研究されている。サポニンは、Smilax ornata (サルサパリラ) 、Gypsophilla paniculata (ブライダルベール) 、および Saponaria officinalis (サボンソウ根) から商業的に得ることもできる。サポニンアジュバント製剤は、QS21などの精製された製剤、ならびにISCOMなどの脂質製剤を含む。

【0085】

10

サポニン組成物はHPLCおよびRP-HPLCを使用して精製されている。これらの技法を使用して、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-BおよびQH-Cを含めた特定の精製画分が同定されている。サポニンはQS21であることが好ましい。QS21の作製方法は参考文献137に開示されている。サポニン製剤は、コレステロールなどのステロールも含んでよい [138] 。

【0086】

20

サポニンとコレステロールの組合せを使用して、免疫賦活複合体 (ISCOM) と称される独特の粒子を形成することができる [参考文献130の23章] 。ISCOMは、典型的には、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなどのリン脂質も含む。任意の公知のサポニンをISCOMに使用することができる。好ましくは、ISCOMは、QuillA、QHAおよびQHCのうちの1つまたは複数を含む。ISCOMは、参考文献138～140にさらに記載されている。必要に応じて、ISCOMは、追加的な界面活性剤 (複数可) を欠いていてもよい [141] 。

【0087】

サポニンに基づくアジュバントの開発についての総説は、参考文献142&143において見いだすことができる。

【0088】

30

D . ビロソームおよびウイルス様粒子

ビロソームおよびウイルス様粒子 (VLP) も、本発明におけるアジュバントとして使用することができる。これらの構造は、一般に、ウイルス由来の1つまたは複数のタンパク質を、必要に応じてリン脂質と組み合わせてまたはそれと一緒に製剤化して含有する。これらは、一般に、非病原性、非複製性であり、一般には、いかなるネイティブなウイルスゲノムも含有しない。ウイルスタンパク質は、組換えによって作製することもでき、ウイルス全体から単離することもできる。ビロソームまたはVLPに使用するために適したこれらのウイルスタンパク質としては、インフルエンザウイルスに由来するタンパク質 (例えば、HAまたはNA) 、B型肝炎ウイルスに由来するタンパク質 (例えば、コアタンパク質またはカプシドタンパク質) 、E型肝炎ウイルスに由来するタンパク質、麻疹ウイルスに由来するタンパク質、シンドビスウイルスに由来するタンパク質、ロタウイルスに由来するタンパク質、口蹄疫ウイルスに由来するタンパク質、レトロウイルスに由来するタンパク質、ノーウォークウイルスに由来するタンパク質、ヒトパピローマウイルスに由来するタンパク質、HIVに由来するタンパク質、RNA - ファージに由来するタンパク質、Q - ファージに由来するタンパク質 (例えば、コートタンパク質) 、GA - ファージに由来するタンパク質、fr - ファージに由来するタンパク質、AP205ファージに由来するタンパク質、およびTyに由来するタンパク質 (例えば、レトロトランスポゾンTyタンパク質p1) が挙げられる。VLPは、参考文献144～149においてさらに考察されている。ビロソームは、例えば、参考文献150においてさらに考察されている。

【0089】

40

E . 細菌誘導体または微生物誘導体

本発明において使用するために適したアジュバントとして、細菌誘導体または微生物誘

50

導体、例えば、腸内細菌リボ多糖（LPS）の無毒性誘導体、リピドA誘導体、免疫賦活オリゴヌクレオチドおよびADP-リボシリ化毒素およびその解毒された誘導体が挙げられる。

【0090】

LPSの無毒性誘導体としては、モノホスホリルリピドA（MPL）および3-O-脱アシル化MPL（3dMPL）が挙げられる。3dMPLは、4つ、5つまたは6つのアシル化された鎖を有する3-O-アシル化モノホスホリルリピドAの混合物である。3-O-アシル化モノホスホリルリピドAの好ましい「小粒子」形態は参考文献151に開示されている。そのような3dMPLの「小粒子」は0.22μmの膜を通して滅菌濾過されるのに十分に小さい[151]。他の無毒性LPS誘導体としては、モノホスホリルリピドA模倣物、例えば、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート誘導体、例えばRC-529が挙げられる[152、153]。

10

【0091】

リピドA誘導体としては、Escherichia coli由来のリピドAの誘導体、例えばOM-174が挙げられる。OM-174は、例えば、参考文献154&155に記載されている。

【0092】

本発明においてアジュバントとして使用するために適した免疫賦活オリゴヌクレオチドとしては、CpGモチーフを含有するヌクレオチド配列（リン酸結合によってグアノシンと連結したメチル化されていないシトシンを含有するジヌクレオチド配列）が挙げられる。パリンドローム配列またはポリ(dG)配列を含有する二本鎖RNAおよびオリゴヌクレオチドも、免疫賦活性であることが示されている。

20

【0093】

CpGは、ヌクレオチド改変/類似体、例えば、ホスホロチオエート改変を含んでよく、また、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。参考文献156、157および158には、可能性のある類似体置換、例えば、グアノシンを2'-デオキシ-7'-デアザグアノシンで置き換えることについて開示されている。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、参考文献159~164においてさらに考察されている。

【0094】

CpG配列は、TLR9、例えば、モチーフGTCGTTまたはTTCGTTなどを対象とするものであってよい[165]。CpG配列は、Th1免疫応答の誘導に特異的なもの、例えば、CpG-AODNであってもよく、B細胞応答の誘導により特異的なもの、例えばCpG-BODNであってもよい。CpG-AODNおよびCpG-BODNは、参考文献166~168において考察されている。CpGはCpG-AODNであることが好ましい。

30

【0095】

CpGオリゴヌクレオチドは、5'末端が受容体認識に利用可能になるように構築することが好ましい。必要に応じて、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列をそれらの3'末端に結合させて、「イムノマー(immunomer)」を形成することができる。例えば、参考文献165&169~171を参照されたい。

40

【0096】

細菌ADP-リボシリ化毒素およびその解毒された誘導体を本発明におけるアジュバントとして使用することができる。タンパク質はE.coliに由来するもの（E.coli熱不安定性エンテロトキシン「LT」）、コレラに由来するもの（「CT」）、または百日咳に由来するもの（「PT」）であることが好ましい。解毒されたADP-リボシリ化毒素の粘膜アジュバントとしての使用が参考文献172に記載されており、非経口アジュバントとしての使用が参考文献173に記載されている。毒素またはトキソイドは、AサブユニットとBサブユニットの両方を含むホロ毒素の形態であることが好ましい。Aサブユニットは解毒性変異を含有することが好ましく、Bサブユニットは変異していないことが好ましい。アジュバントは、解毒されたLT変異体、例えば、LT-K63、LT-

50

R 7 2、およびLT-G 1 9 2であることが好ましい。ADP-リボシリ化毒素およびその解毒された誘導体、特に、LT-K 6 3およびLT-R 7 2のアジュバントとしての使用は、参考文献174～181において見いだすことができる。アミノ酸置換についての数字で表された参考文献は、その全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる参考文献182に記載されているADP-リボシリ化毒素のAサブユニットとBサブユニットのアラインメントに基づくことが好ましい。

【0097】

F. ヒト免疫調節物質

本発明においてアジュバントとして使用するために適したヒト免疫調節物質としては、サイトカイン、例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 [183]など）[184]、インターフェロン（例えば、インターフェロン-）、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍死因子が挙げられる。

10

【0098】

G. 生体接着剤および粘膜接着剤

生体接着剤および粘膜接着剤も、本発明におけるアジュバントとして使用することができる。適切な生体接着剤としては、エステル化ヒアルロン酸ミクロスフェア[185]または粘膜接着剤、例えば、ポリ（アクリル酸）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖およびカルボキシメチルセルロースの架橋誘導体が挙げられる。キトサンおよびその誘導体も、本発明におけるアジュバントとして使用することができる[186]

20

【0099】

H. 微小粒子

微小粒子も、本発明におけるアジュバントとして使用することができる。生分解性であり、無毒性の材料（例えば、ポリ（-ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、ポリカプロラクトンなど）から、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）を用いて形成され、必要に応じて、負に荷電した表面を有するように処理した（例えば、SDSを用いて）または正に荷電した表面を有するように処理した（例えば、CTABなどの陽イオン界面活性剤を用いて）微小粒子（すなわち、直径が約100nm～約150μm、より好ましくは直径が約200nm～約30μm、最も好ましくは直径が約500nm～約10μmの粒子）が好ましい。

30

【0100】

I. リポソーム（参考文献130の13章&14章）

アジュバントとして使用するために適したリポソーム製剤の例は、参考文献187～189に記載されている。

【0101】

J. ポリオキシエチレンエーテル製剤およびポリオキシエチレンエステル製剤

本発明において使用するために適したアジュバントとして、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステルが挙げられる[190]。そのような製剤は、オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性物質[191]ならびにオクトキシノールなどの少なくとも1種の追加的な非イオン性界面活性物質と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステル界面活性物質[192]をさらに含む。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（ラウレス9）、ポリオキシエチレン-9-ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン（polyoxyethylene）-8-ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。

40

【0102】

K. ポリホスファゼン（PCPP）

PCPP製剤は、例えば、参考文献193および194に記載されている。

50

【0103】

L. ムラミルペプチド

本発明においてアジュバントとして使用するために適したムラミルペプチドの例としては、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (nor-MDP)、およびN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミンMTP-PE)が挙げられる。

【0104】

M. イミダゾキノロン (Imidazoquinolone) 化合物。 10

本発明におけるアジュバントとして使用するために適したイミダゾキノロン化合物の例としては、イミクアモド (Imiquamod) およびその相同体 (例えば、「Resiquimod 3M」) が挙げられ、これは参考文献 195 および 196 にさらに記載されている。

【0105】

N. チオセミカルバゾン化合物。

本発明においてアジュバントとして使用するために完全に適したチオセミカルバゾン化合物、ならびに化合物を製剤化する、製造する、およびスクリーニングする方法の例としては、参考文献 197 に記載されているものが挙げられる。TNF-などのサイトカインの産生に関してヒト末梢血単核細胞を刺激することにおいてチオセミカルバゾンが特に有効である。 20

【0106】

O. トリプタントリン化合物。

本発明においてアジュバントとして使用するために完全に適したトリプタントリン化合物、ならびに化合物を製剤化する、製造する、およびスクリーニングする方法の例としては、参考文献 198 に記載されているものが挙げられる。TNF-などのサイトカインの産生に関してヒト末梢血単核細胞を刺激することにおいてトリプタントリン化合物が特に有効である。

【0107】

本発明は、上で同定されたアジュバントの 1 つまたは複数の態様の組合せも含んでよい。例えば、以下の組合せを本発明におけるアジュバント組成物として使用することができる：(1) サポニンおよび水中油エマルション [199]；(2) サポニン (例えば、QS21) + 無毒性LPS誘導体 (例えば、3dMPL) [200]；(3) サポニン (例えば、QS21) + 無毒性LPS誘導体 (例えば、3dMPL) + コレステロール；(4) サポニン (例えば、QS21) + 3dMPL + IL-12 (必要に応じて + ステロール) [201]；(5) 3dMPL と、例えば、QS21 および / または水中油エマルションの組合せ [202]；(6) マイクロフライダイズしてサブミクロンのエマルションにしたか、またはボルテックスして粒子径がより大きなエマルションにした、10%スクアラン、0.4%Tween 80 (商標)、5%ブルロニック - ブロックポリマー L121、および thr-MDP を含有する S AF。 (7) 2%スクアレン、0.2%Tween 80、ならびにモノホスホリリピド A (monophosphoryl lipid A) (MPL)、トレハロースジミコレート (TDM)、および細胞壁の骨格 (CWS) からなる群からの 1 つまたは複数の細菌の細胞壁構成成分、好ましくは MPL + CWS (Dectox (商標)) を含有する Ribi (商標) アジュバントシステム (RAS)、(Ribi Immunochem)；ならびに (8) 1 つまたは複数の無機塩類 (例えばアルミニウム塩) + LPS の無毒性誘導体 (例えば 3dMPL)。

【0108】

免疫賦活剤としての機能を果たす他の物質は、参考文献 130 の 7 章に開示されている。

【0109】

10

20

30

40

50

アルミニウム塩アジュvantの使用が特に有用であり、一般に、抗原をそのような塩に吸着させる。Menjugate(商標)およびNeisVac(商標)コンジュゲートには水酸化物アジュvantが使用され、Meningitec(商標)にはリン酸塩アジュvantが使用されている。本発明の組成物では、一部の抗原を水酸化アルミニウムに吸着させ、他の抗原をリン酸アルミニウムに結びつけることが可能である。しかし、典型的には、単一の塩、例えば、水酸化物またはリン酸塩のみを使用するが、両方は使用しない。全てのコンジュゲートを吸着させる必要はない、すなわち、一部または全てが溶液中で遊離していてよい。

【0110】

処置方法

10

本発明は、本発明の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において免疫応答を生じさせるための方法も提供する。免疫応答は、防御的なものであることが好ましく、抗体を伴うことが好ましい。当該方法により、追加免疫応答が生じ得る。

【0111】

哺乳動物はヒトであることが好ましい。ワクチンが予防的に使用するためのものである場合、ヒトは小児(例えば、幼児もしくは乳児)またはティーンエイジャーであることが好ましく、ワクチンが治療的に使用するためのものである場合、ヒトは成人であることが好ましい。小児用ワクチンを、例えば、安全性、投与量、免疫原性などを評価するために成人に投与することもできる。

20

【0112】

本発明は、医薬として使用するための本発明の組成物も提供する。医薬は、哺乳動物において免疫応答を生じさせることができる(すなわち、免疫原性組成物である)ことが好ましく、ワクチンであることがより好ましい。

【0113】

本発明は、哺乳動物において免疫応答を生じさせるための医薬の製造における本発明のコンジュゲートの使用も提供する。

【0114】

本発明の好ましい組成物により、患者に抗体価を付与することができ、その抗体価は、各抗原性構成成分に対する、許容できる百分率のヒト被験体の抗体保有率(sero proportion)の基準よりも優れている。それを超えると宿主が抗原に対して抗体陽転すると考えられる関連する抗体価を伴う抗原は周知であり、そのような力価はWHOなどの機関により公開されている。好ましくは統計的に有意な被験体の試料の80%超、より好ましくは90%超、さらにより好ましくは93%超、最も好ましくは96~100%が抗体陽転する。

30

【0115】

本発明の組成物は、一般に、患者に直接投与される。直接送達は、非経口注射(例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内、または組織の間質腔に)によって、または直腸投与、経口投与、腔内投与、局所投与、経皮投与、鼻腔内投与、眼への投与、耳への投与、肺への投与または他の粘膜への投与によって達成することができる。大腿または上腕への筋肉内投与が好ましい。注射は針(例えば、皮下針)を介してもよいが、無針注射を代わりに使用することもできる。典型的な筋肉内用量は0.5mlである。

40

【0116】

本発明を使用して、全身性の免疫および/または粘膜免疫を引き出すことができる。

【0117】

投与処置は、単回用量スケジュールであっても複数回用量スケジュールであってもよい。複数回用量は、一次免疫スケジュールおよび/または追加免疫スケジュールにおいて使用することができる。一次用量スケジュールの後に追加免疫用量スケジュールを行うことができる。初回刺激投薬間(例えば、4~16週間)、および初回刺激と追加免疫の間の適切なタイミングは、常套的に決定することができる。

【0118】

50

例示的なキャリアタンパク質

上記の通り、本発明者らは、参考文献 6 5 および参考文献 6 6 に記載されているキャリアタンパク質、特に、これらの文献の配列番号 9 (本明細書においても配列番号 9 である) のタンパク質が本発明におけるキャリア分子として使用するために特に適することを見いだした。

【 0 1 1 9 】

これらのキャリア分子は、s p r 0 0 9 6 抗原およびs p r 2 0 2 1 抗原を含む。典型的には、キャリア分子は、s p r 0 0 9 6 抗原およびs p r 2 0 2 1 抗原を単一のポリペプチド鎖 (「ハイブリッド」ポリペプチド) として含む。s p r 0 0 9 6 抗原、s p r 2 0 2 1 抗原およびハイブリッドポリペプチドの性質を以下でより詳細に記載する。 10

【 0 1 2 0 】

s p r 0 0 9 6 抗原

元の「s p r 0 0 9 6」ポリペプチド配列は、参考文献 2 0 3 において「仮想タンパク質」とアノテートされた (G I : 1 5 9 0 2 1 4 0 参照)。参照のために、R 6 株において見いだされる全長 s p r 0 0 9 6 のアミノ酸配列が本明細書において配列番号 1 として示されている。

【 0 1 2 1 】

本発明の s p r 0 0 9 6 抗原は、少なくとも 1 種の C D 4 ⁺ T 細胞エピトープを含む。C D 4 ⁺ T 細胞は B リンパ球を援助して抗原に対する抗体を産生させる [2 0 4]。T 細胞エピトープは経験的に同定することもでき (例えば、P E P S C A N [2 0 5 、 2 0 6] または同様の方法を使用して) 、予測することもできる (例えば、J a m e s o n - W o l f 抗原性指標 [2 0 7] 、マトリックスに基づく手法 [2 0 8] 、T E P I T O P E [2 0 9] 、神経回路網 [2 1 0] 、O p t i M e r & E p i M e r [2 1 1 、 2 1 2] 、A D E P T [2 1 3] 、T s i t e s [2 1 4] 、親水性 [2 1 5] 、抗原性指標 [2 1 6] または参考文献 2 1 7 に開示されている方法などを使用して) 。 20

【 0 1 2 2 】

本発明で使用するために好ましい s p r 0 0 9 6 抗原は、(a) 配列番号 1 に対して 50 % 以上の同一性 (例えば、6 0 % 、 6 5 % 、 7 0 % 、 7 5 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、 9 9 . 5 % またはそれより高い) を有するアミノ酸配列 ; および / または (b) 配列番号 1 の少なくとも 「n」 個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」 が、7 以上 (例えば、8 、 1 0 、 1 2 、 1 4 、 1 6 、 1 8 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 9 0 、 1 0 0 、 1 5 0 、 2 0 0 、 2 5 0 またはそれより多い) であるアミノ酸配列を含む。これらの s p r 0 0 9 6 ポリペプチドは、配列番号 1 のバリエント (例えば、配列番号 2 ; 以下を参照されたい) を含む。 (b) の好ましい断片は、配列番号 1 由来の少なくとも 1 種の C D 4 ⁺ T 細胞エピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号 1 の C 末端からの 1 個もしくは複数のアミノ酸 (例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 5 個、2 0 個、2 5 個もしくはそれより多い) および / または N 末端からの 1 個もしくは複数のアミノ酸 (例えば、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 5 個、2 0 個、2 5 個もしくはそれより多い) を欠くが、配列番号 1 の少なくとも 1 種の C D 4 ⁺ T 細胞エピトープを保持する。他の断片では、1 つまたは複数のタンパク質ドメインが省かれている。1 つの適切な断片は、天然のリーダーペプチド配列が省かれている配列番号 1 4 である。s p r 0 0 9 6 抗原は、配列番号 1 由来の単一の C D 4 ⁺ T 細胞エピトープからなってよい。 30

【 0 1 2 3 】

配列番号 1 と比較して C 末端の近くに挿入を有する s p r 0 0 9 6 のバリエント形態は本明細書における配列番号 2 である。このバリエントの免疫への使用が参考文献 2 1 8 において報告されており (そこでは配列番号 1 5 0) 、そこではこのバリエントは L y s M ドメインタンパク質とアノテートされている。したがって、本発明で使用するための s p r 0 0 9 6 抗原は、(a) 配列番号 2 に対して 50 % 以上の同一性 (例えば、6 0 % 、 6 50

5%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれより高い)を有するアミノ酸配列; および/または(b)配列番号2の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」が、7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれより多い)であるアミノ酸配列を含んでよい。これらのポリペプチドは配列番号2のバリエントを含む。(b)の好ましい断片は、配列番号2由来の少なくとも1種のCD4⁺T細胞エピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号2のC末端からの1個もしくは複数のアミノ酸(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個もしくはそれより多い)および/またはN末端からの1個もしくは複数のアミノ酸(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個もしくはそれより多い)を欠くが、配列番号2の少なくとも1種のCD4⁺T細胞エピトープを保持する。他の断片では、1つまたは複数のタンパク質ドメインが省かれている。1つの適切な断片は、天然のリーダーペプチド配列が省かれている配列番号15である。配列番号2の免疫原性断片は、参考文献218の表1において同定されている。spr0096抗原は、配列番号2由来の単一のCD4⁺T細胞エピトープからなってよい。

10

【0124】

spr0096抗原は、二量体、例えばホモ二量体の形態で使用することができる。

20

【0125】

spr2021抗原

元の「spr2021」ポリペプチド配列は、参考文献203において「一般的なストレスタンパク質GSP-781」とアノテートされた(GI:15904062参照)。参照のために、R6株において見いだされる全長spr2021のアミノ酸配列が本明細書において配列番号3として示されている。

【0126】

本発明のspr2021抗原は、少なくとも1種のCD4⁺T細胞エピトープを含む。

【0127】

本発明で使用するための好ましいspr2021抗原は、(a)配列番号3に対して50%以上の同一性(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれより高い)を有するアミノ酸配列; および/または(b)配列番号3の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」が、7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれより多い)であるアミノ酸配列を含む。これらのspr2021ポリペプチドは配列番号3のバリエントを含む。(b)の好ましい断片は、配列番号3由来の少なくとも1種のCD4⁺T細胞エピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号3のC末端からの1個もしくは複数のアミノ酸(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個もしくはそれより多い)および/またはN末端からの1個もしくは複数のアミノ酸(例えば、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個もしくはそれより多い)を欠くが、配列番号3の少なくとも1種のCD4⁺T細胞エピトープを保持する。他の断片では、1つまたは複数のタンパク質ドメインが省かれている。1つの適切な断片は、天然のリーダーペプチド配列が省かれている配列番号4である。spr0096抗原は、配列番号3由来の単一のCD4⁺T細胞エピトープからなってよい。

30

【0128】

参考文献218では、spr2021がGbpBとの相同性を有する分泌型45kDaタンパク質とアノテートされており、また、免疫原としてのその使用が開示されている(そこでは配列番号243; SP2216)。spr2021の免疫原性断片は参考文献2

40

50

18の表1(73頁)において同定されている。spr2021の別の有用な断片は参考文献219の配列番号1として開示されている(本明細書では配列番号3のアミノ酸28~278)。

【0129】

ハイブリッドポリペプチド

典型的には、spr0096抗原およびspr2021抗原は、単一のポリペプチド鎖(「ハイブリッド」ポリペプチド)として表される。ハイブリッドポリペプチドは、式 $NH_2 - A - \{ - X - L - \}_n - B - COOH$ で表すことができ、式中、Aは任意選択のN末端アミノ酸配列であり、Bは任意選択のC末端アミノ酸配列であり、nは2以上の整数(例えば、2、3、4、5、6など)であり、各Xは、spr0096抗原またはspr2021抗原のアミノ酸配列であり(上記の通り)、少なくとも1つのXがspr0096抗原であり、少なくとも1つのXがspr2021抗原であり、Lは任意選択のリンカーアミノ酸配列である。通常、nは2である。nが2である場合、X₁は通常、spr0096抗原であり、X₂は通常、spr2021抗原である。nが2を超える場合、各spr0096抗原(2つ以上存在する場合)は同じであっても異なってもよく、各spr2021抗原(2つ以上存在する場合)は同じであっても異なってもよい。

10

【0130】

各Xのアミノ酸配列であるspr0096抗原またはspr2021抗原は上で定義されている通りである。これらの抗原を(a)所与の配列に対して50%以上の同一性(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれより高い)を有すること;および/または(b)所与の配列の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」が、7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれより多い)であることに関して定義する場合、(a)の同一性のレベルおよび(b)の「n」個の値は、各Xについて同じであってよい。

20

【0131】

野生型の各-X-部分内のリーダーペプチド配列はハイブリッドタンパク質に含まれていても省かれてもよい。一部の実施形態では、ハイブリッドタンパク質のN末端に位置する-X-部分のリーダーペプチド以外のリーダーペプチドは欠失させる、すなわち、X₁のリーダーペプチドは保持されるが、X₂...X_nのリーダーペプチドは省かれる。これは、全てのリーダーペプチドを欠失させ、X₁のリーダーペプチドを部分-A-として使用することと等しい。

30

【0132】

{-X-L-}の各nの場合について、リンカーアミノ酸配列-L-は存在してもしなくてもよい。例えば、n=2の場合、ハイブリッドは $NH_2 - X_1 - L_1 - X_2 - L_2 - COOH$ 、 $NH_2 - X_1 - X_2 - COOH$ 、 $NH_2 - X_1 - L_1 - X_2 - COOH$ 、 $NH_2 - X_1 - X_2 - L_2 - COOH$ などであり得る。リンカーアミノ酸配列(複数可)-L-は、典型的には短い(例えば、20アミノ酸以下、すなわち、20アミノ酸、19アミノ酸、18アミノ酸、17アミノ酸、16アミノ酸、15アミノ酸、14アミノ酸、13アミノ酸、12アミノ酸、11アミノ酸、10アミノ酸、9アミノ酸、8アミノ酸、7アミノ酸、6アミノ酸、5アミノ酸、4アミノ酸、3アミノ酸、2アミノ酸、1アミノ酸)。例は、クローニングを容易にする短いペプチド配列、ポリグリシンリンカー(すなわち、Gly_n、n=2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多くを含む)、およびヒスチジンタグ(すなわち、His_n、n=3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多く)を含む。他の適切なリンカーアミノ酸配列は当業者には明らかである。有用なリンカーはGSGGGG(配列番号5)またはGSGSGGGG(配列番号6)であり、BamHI制限部位からGly-Serジペプチドが形成され、したがって、クローニングおよび操作の助けになり、また、(Gly)₄テトラペプチドは典型的なポリグリシンリンカーである。他の適切なリンカー、特に最後のL_nとして使用するためのリ

40

50

ンカーは、Leu-Gluジペプチドまたは配列番号7である。

【0133】

-A-は、任意選択のN末端アミノ酸配列である。これは、典型的には短い（例えば、40アミノ酸以下、すなわち、40アミノ酸、39アミノ酸、38アミノ酸、37アミノ酸、36アミノ酸、35アミノ酸、34アミノ酸、33アミノ酸、32アミノ酸、31アミノ酸、30アミノ酸、29アミノ酸、28アミノ酸、27アミノ酸、26アミノ酸、25アミノ酸、24アミノ酸、23アミノ酸、22アミノ酸、21アミノ酸、20アミノ酸、19アミノ酸、18アミノ酸、17アミノ酸、16アミノ酸、15アミノ酸、14アミノ酸、13アミノ酸、12アミノ酸、11アミノ酸、10アミノ酸、9アミノ酸、8アミノ酸、7アミノ酸、6アミノ酸、5アミノ酸、4アミノ酸、3アミノ酸、2アミノ酸、1アミノ酸）。例として、タンパク質輸送を導くためのリーダー配列、またはクローニングまたは精製を容易にする短いペプチド配列（例えば、ヒスチジンタグ、すなわち、His_n、n=3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多い）が挙げられる。他の適切なN末端アミノ酸配列は当業者には明らかである。X₁がそれ自体のN末端メチオニンを欠く場合、-A-はN末端メチオニンをもたらすオリゴペプチド（例えば、1アミノ酸、2アミノ酸、3アミノ酸、4アミノ酸、5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸または8アミノ酸を有する）、例えば、Met-Ala-Ser、または単一のMet残基であることが好ましい。
10

【0134】

-B-は、任意選択のC末端アミノ酸配列である。これは、典型的には短い（例えば、40アミノ酸以下、すなわち、39アミノ酸、38アミノ酸、37アミノ酸、36アミノ酸、35アミノ酸、34アミノ酸、33アミノ酸、32アミノ酸、31アミノ酸、30アミノ酸、29アミノ酸、28アミノ酸、27アミノ酸、26アミノ酸、25アミノ酸、24アミノ酸、23アミノ酸、22アミノ酸、21アミノ酸、20アミノ酸、19アミノ酸、18アミノ酸、17アミノ酸、16アミノ酸、15アミノ酸、14アミノ酸、13アミノ酸、12アミノ酸、11アミノ酸、10アミノ酸、9アミノ酸、8アミノ酸、7アミノ酸、6アミノ酸、5アミノ酸、4アミノ酸、3アミノ酸、2アミノ酸、1アミノ酸）。例として、タンパク質輸送を導く配列、クローニングまたは精製を容易にする短いペプチド配列（例えば、ヒスチジンタグ、すなわち、His_n、n=3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより多い、例えば、配列番号8を含む）、またはタンパク質安定性を増強する配列が挙げられる。他の適切なC末端アミノ酸配列は当業者には明らかである。
20
30

【0135】

ハイブリッドの例としては、spr0096-spr2021（例えば、配列番号9）またはspr2021-spr0096（例えば、配列番号10）のアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。ハイブリッドは、配列番号9または配列番号10に対して50%以上の同一性（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれより高い）を有するアミノ酸配列も含んでよい。典型的には、ハイブリッドは、配列番号9のアミノ酸配列を含む。ハイブリッドは、配列番号9に対して50%以上の同一性（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれより高い）を有するアミノ酸配列も含んでよい。
40

【0136】

特定の実施形態では、キャリア分子は、(a)配列番号2由来の1つまたは複数（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つなど）のCD4⁺T細胞エピトープ；および(b)配列番号3由来の1つまたは複数（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つなど）のCD4⁺T細胞エピトープを含む。

【0137】

試料をアッセイするための方法

特定の態様では、本発明は、血清群X莢膜多糖を含有する疑いがある試料をアッセイす

るための方法であって、(i) 試料中の任意の血清群X莢膜多糖を加水分解して、加水分解産物をもたらすステップと、(ii) 加水分解産物を液体クロマトグラフィーに供するステップと、(iii) ステップ(ii)において分離された任意のグルコサミン-4-リン酸を検出するステップとを含む方法を提供する。

【0138】

当該方法は、試料中の血清群X莢膜多糖を定量化するために使用することができる。このように、試料中の多糖の濃度を決定することが可能である。典型的には、定量化は、N-アセチルグルコサミン-4-リン酸標準物質と比較することを伴う。しかし、グルコサミン-6-リン酸を含めた他の標準物質を使用することができる。

【0139】

当該方法は、血清群X莢膜多糖のために開発されたが、構造内にグルコサミン-4-リン酸を有する物質、例えば、細菌リビドAのいずれにも適している。したがって、本発明は、構造内にグルコサミン-4-リン酸を有する物質を含有する疑いがある試料をアッセイするための方法であって、(i) 試料中のその構造内にグルコサミン-4-リン酸を有する任意の物質を加水分解して加水分解産物をもたらすステップと、(ii) 加水分解産物を液体クロマトグラフィーに供するステップと、(iii) ステップ(ii)において分離された任意のグルコサミン-4-リン酸を検出するステップとを含む方法も提供する。

【0140】

試料

試料は、例えば、当該方法をワクチン製品の特徴付けにおける多糖定量化に使用する場合は、典型的にはワクチンである。しかし、当該方法は、ワクチン製造の間のインプロセスアッセイとして使用することもできる。これらの実施形態では、試料は製造プロセスからのプロセス中間体になる。本発明の方法により、非常に低い濃度の血清群X莢膜多糖($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)を定量化することができ、したがって、本発明の方法は、例えば、製造プロセスの間にインプロセスで取得される小さな試料中の血清群X莢膜多糖をアッセイするために適している。また、当該方法は、不純物が存在する場合でさえ、血清群X莢膜多糖に特異的である。したがって、試料は、発酵プロセス、または発酵プロセスから取得した上清であってよい。

【0141】

試料は、遊離の(コンジュゲートしていない)血清群X莢膜多糖および/またはコンジュゲートした血清群X莢膜多糖を含有してよい。したがって、当該方法は、細菌から調製した多糖、精製後の多糖、コンジュゲーション前の多糖、および/またはコンジュゲーション後の多糖をアッセイするために使用することができる。

【0142】

コンジュゲートした血清群X莢膜多糖を含有する試料では、試料中の総多糖に対する遊離の多糖のレベルの比較(すなわち、コンジュゲートしていない多糖:(コンジュゲートしていない+コンジュゲートした)多糖の比)を使用して、安定性を決定することができる。コンジュゲートしていない多糖が高レベルであることは望ましくない。そのようなアッセイの時系列により、例えば、貯蔵の間にコンジュゲートが安定であるかどうかを示すことができる。遊離の多糖のレベルは、コンジュゲーション反応が完了したかどうかを確認するためにも使用することができる。

【0143】

試料は、典型的には水性であるが、乾燥した形態から、例えば、凍結乾燥物から水性形態に再構成されたものであってよい。したがって、試料は、凍結乾燥安定剤を含有してよい。これらの安定剤としては、糖アルコール(例えば、マンニトールなど)、二糖(例えば、スクロース、トレハロースなど)、および他の単純な糖類などの物質が挙げられる。本発明の方法の利点は、多糖と不純物の前分離を全く必要とせずに血清群X莢膜多糖を不純物のバックグラウンドに対してアッセイすることができるることである。

【0144】

10

20

30

40

50

試料は、分析前に希釈することができる。次いで、分析後に、試料中の多糖のレベルを元の希釈していない材料中のレベルに関連づけることができる。希釈は、例えば、試料の分析により較正曲線の所望のポーション内の結果がもたらされることを確実にするために有用である。

【0145】

血清群X莢膜多糖に加えて、試料は、他の細菌莢膜糖、例えば、Haemophilus influenzae B型由来の細菌莢膜糖、他の髄膜炎菌の血清群（例えば、A、C、W135および/またはY）由来の細菌莢膜糖、Streptococcus pneumoniae由来の細菌莢膜糖などを含有してよい。

【0146】

試料は、多くの場合ワクチンに見いだされる非抗原構成成分などの他の構成成分も含んでよい。例えば、これらとして、上記の通り、キャリア、アジュバント、賦形剤、バッファなどを挙げることができる。

【0147】

いくつかの状況では、試料を既知量の問題の分析物でスパイクすること、例えば、既知の分量の血清群X莢膜多糖をコンジュゲートした形態またはコンジュゲートしていない形態のいずれかで添加することが有用である。スパイク試験は、較正のため、および感度、変動性、回収率などを試験するために有用であり得る。

【0148】

加水分解

当該方法は、血清群X莢膜多糖の加水分解を伴う。典型的な加水分解方法は、例えば、トリフルオロ酢酸（TFA）を使用した酸加水分解を伴う。本発明者らは、特に有効な条件は、2MのTFAを用い、100で2時間～3時間（例えば、2.5時間）にわたって処理することであることを見いだした。これらの条件により、多糖の単量体サブユニットを、分解させることなく良好に放出させることが可能になる。しかし、それよりも短いまたはより長い処理、例えば、1時間～6時間にわたる処理も可能である。

【0149】

総血清群X莢膜多糖は、コンジュゲートした多糖を含む試料から、試料全体を上記の通り加水分解に供することによって調製することができる。しかし、コンジュゲートした血清群X莢膜多糖のみまたはコンジュゲートしていない血清群X莢膜多糖のみの測定が望まれる場合には、加水分解の前にコンジュゲートした多糖とコンジュゲートしていない多糖を互いから分離するべきである。適切な分離技法としては、選択的沈殿、サイズに基づく方法、固相抽出〔220〕などが挙げられる。

【0150】

液体クロマトグラフィー

血清群X莢膜多糖加水分解の結果は液体クロマトグラフィーによって分析される。したがって、本発明の方法は、典型的には、液体クロマトグラフィーカラムを利用し、そのようなカラムの産出物（output）を分析することを伴う。

【0151】

種々の液体クロマトグラフィーカラムを使用することができるが、本発明は、典型的には、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と共に使用される。本発明は、高速陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC）による、または高速陽イオン交換クロマトグラフィー（HPCEC）による分離の結果を分析するために特に有用である。HPAECは、糖を特徴付けるために使用される一般的な技法であり、多くの場合、多糖を検出し、定量化するためのパルス電流滴定検出（pulsed amperometric detection）（PAD）〔221、222〕と組み合わせて使用される。適切なHPAEC-PADシステムは、Dionex（商標）Corporation（Sunnyvale、CA）から提供され、例えば、BioLC（商標）システムである。これらのシステムでは、HPAECカラムからの溶出物を、PADを使用して、すなわち、電流に基づいて分析する。適切な（高い）pHで、陽電位を印加することによって炭水化物を電極

10

20

30

40

50

の表面で電気触媒的に酸化させることができる。このように生成された電流は炭水化物濃度に比例し、これにより、炭水化物を電流滴定によって検出し、定量化することができる。単純な電流滴定検出と比較して、P A Dでは、標準の検出電位と共にクリーニング電位および再生電位の短いパルスを分散させ、それにより、分析物の酸化生成物により電極が汚染されると生じる問題を回避する。

【0152】

溶出物を分析するために、非電流滴定的方法をP A Dと組み合わせることができる。例えば、参考文献223を参照されたい。

【0153】

したがって、加水分解された血清群X莢膜多糖を、分離のためにH P A E Cに供することができ、分離された材料を検出し、必要に応じてP A Dによって定量化することができる。下の例において示されているように、H P A E C - P A Dにより、加水分解されたグルコサミン-4-リン酸残基を試料中の他のバックグラウンド材料から分離することができる。

10

【0154】

好みのカラムは、糖類がそのカラムから溶出されなければならないように糖類を自然に保持するカラムである。クロマトグラフィーカラムからの溶出は均一溶媒溶出であっても勾配溶出であってもよい。水酸化物および/または酢酸塩を含む溶出物は、糖類のH P A E C - P A D分析の間に使用される典型的な溶出物である。しかし、硝酸、塩化物などの陰イオンを使用することも可能である。典型的にはナトリウム塩が使用される。分析物をA E Cカラムから溶出させるためには、溶出物は一般に、塩基性であり、例えば、p Hは>8、>9、>10、>11、>12、>13などである。水酸化物塩(例えばNa O H)を使用して所望のp Hを実現することができる。

20

【0155】

特に、使用される分析検出技法にイオンが干渉する場合には、溶出物を水酸化物イオンの化学的抑制に供することができる。D i o n e x(商標)からのM M S 製品などの微小膜(m i c r o m e m b r a n e)抑制因子を都合よく使用することができる。「M M S I I I」製品では連続的な化学的抑制を使用して分析物の伝導率を増強しながら、溶出物の伝導率を減少させ、広い濃度範囲にわたる均一溶媒溶出または勾配溶出を使用したイオン交換適用を用いて直接伝導率検出を可能にする。

30

【0156】

本発明で使用するための適切なH P A E Cカラムは、D i o n e xにより販売されている「C a r b o P a c」カラム、例えば、P A 1 [直径10 μm、ジビニルベンゼンと2%架橋結合したポリスチレン基材、500 nmのミクロビーズ(M i c r o B e a d)第四級アンモニウム官能化ラテックス(5%架橋結合)で凝集]、P A 1 0 0、P A 2 0、P A 1 0 [直径10 μm、ジビニルベンゼンと55%架橋結合したエチルビニルベンゼン基材、460 nmのミクロビーズ二官能第四級アンモニウムイオン(5%架橋結合)で凝集]、P A 2 0 0またはM A 1カラムである。

【0157】

分析用H P A E Cカラムをプレカラムおよび/またはトラップカラムと併せて使用することができる。例えば、P A 1 0分析カラムをインラインのP A 1 0ガードカラム、および/またはインラインのトラップ(前処理)カラムと併せて使用することができる。そのようなカラムにより、他の方法で分析に干渉する材料を除去することができる。例えば、「A m i n o T r a p」カラムにより、糖分析の前にアミノ酸を除去することができる。ホウ酸トラップも使用することができる。典型的な「A m i n o T r a p」樹脂は、二官能第四級アンモニウム陰イオン交換部位を接合した直径10 μmの基材(ジビニルベンゼンと55%架橋結合したエチルビニルベンゼン)であり、典型的な「B o r a t e T r a p」はホウ酸に対する選択性が非常に高い直径20 μmの高性能樹脂を有する。

40

【0158】

P A 1カラムおよびP A 1 0カラムはどちらも、单糖および二糖の高分解能分離をもた

50

らすために P A D で使用されるように設計された陰イオン交換カラムであり、どちらの樹脂も、官能化ミクロビーズの細かいラテックスで覆われた直径 10 μm の非多孔性ビーズである。それらの薄膜樹脂構造により、優れた物質移動が可能になり、高分解能クロマトグラフィーおよび急速な再平衡化がもたらされる。一方 P A 1 は種々のマトリックスにおいて単糖および二糖を決定するために適した汎用カラムであり、直鎖状の多糖の高分解能分離のために選択されるカラムであり、P A 10 は、哺乳動物の糖タンパク質の炭水化物部分に見いだされるアミノ単糖、中性単糖、および酸性単糖を決定するために最適化されている。P A 1 カラムと P A 10 カラムの間の主要な差異は、P A 1 の樹脂はジビニルベンゼンと 2 % 架橋結合したポリスチレンであるが、P A 10 の樹脂はジビニルベンゼンと 5.5 % 架橋結合したエチルビニルベンゼンであることである。

10

【0159】

現在まで、血清群 X 荚膜多糖に対する最も好ましい H P A E C 分離方法は、Guard P A 1 プレカラム (4 × 50 mm) と組み合わせた CarboPac P A 1 カラム (4 × 250 mm) を伴う。

【0160】

溶出および検出の後、本発明は、試料において同定された任意の血清群 X 荚膜多糖の特性、例えば、その D P (典型的には、平均 D P)、その分子量、その純度などを決定するさらなるステップを含んでよい。

【0161】

N - アセチルグルコサミン - 4 - リン酸の調製

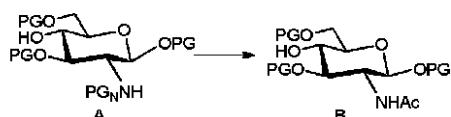
20

さらなる態様では、本発明は、N - アセチルグルコサミン - 4 - リン酸を調製するため有用なプロセスおよび試薬を提供する。上記の通り、この化合物を、血清群 X 荚膜多糖をアッセイするための方法における分析標準物質として使用することができる。

【0162】

この態様の第 1 の実施形態では、本発明は、式 A の化合物を N - 脱保護するステップと、脱保護された化合物を N - アシル化して式 B の化合物をもたらすステップとを含むプロセスを提供する。

【化 8】



30

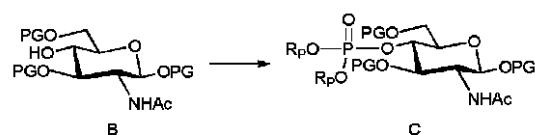
式中、P G は酸素保護基であり、P G N は窒素保護基であり、全ての P G 基が同じものである。P G および P G N は、例えば、参考文献 224 に記載されている任意の適切な保護基であってよい。

【0163】

この態様の第 2 の実施形態では、本発明は、有機リン酸エステル基 (organophosphate group) を式 B の化合物に導入して式 C の化合物をもたらすためのプロセスを提供する：

40

【化 9】



50

式中、R_p 基はどちらも同じであり、R_p は、H または例えば参考文献 224 に記載されているアリールメチルホスフェート保護基のいずれかであるか、R_p 基は一緒になって单一のアリールメチル保護基、例えば、o - キシレニルを形成する。P G は上で定義されている通りであり、全ての P G 基が同じものである。R_p が H である場合、式 B の化合物は

典型的にはリン酸化試薬および酸化剤と反応する。リン酸化剤は、典型的にはピリジンおよび塩化ピバロイルの存在下で、サリチルクロロホスファイトであってよい。リン酸化剤は PCl_3 、続いて、水または水性 NaHCO_3 であってもよい。酸化剤は I_2 または mCPBA であってよく、典型的には I_2 である。 R_p 基が一緒になって单一の保護基を形成している場合、式Bの化合物は、典型的には α -キシレン含有有機リン試薬と反応し、次いで酸化剤と反応する。 α -キシレン含有有機リン試薬は、典型的には N -ジエチル-1,5-ジヒドロ-3H-2,3,4-ベンゾジオキサホスフィン($\text{benzodioxa phosphine}$)-3-アミンなどのホスホラミダイトである。酸化剤は I_2 または mCPBA であってよく、典型的には mCPBA である。 R_p 基が一緒になって单一の保護基を形成していない場合には、式Bの化合物は、典型的には、 R_p 基を含有するピロリン酸試薬と反応する。適切なピロリン酸試薬はテトラベンジルピロホスフェート($\text{tetrabenzyl pyrophosphate}$)であり、その場合、 R_p はベンジル基である。

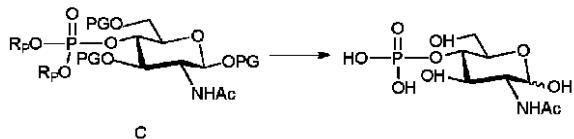
10

【0164】

この態様の第3の実施形態では、本発明は、式Cの化合物を脱保護して N -アセチルグルコサミン-4-リン酸をもたらすステップを含むプロセスを提供する：

【化10】

20



PG および R_p は上で定義されている通りであり、全ての PG 基が同じものである。典型的には、 R_p がリン酸保護基である場合、全ての PG 基および R_p 基を同じステップにおいて、例えば、水素化分解によって除去する。

30

【0165】

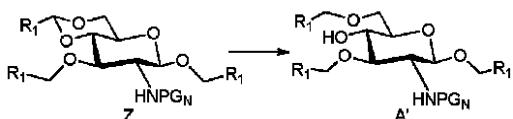
この態様のさらなる実施形態では、本発明は、第1の実施形態、その後に第2の実施形態；第2の実施形態、その後に第3の実施形態、および第1の実施形態、その後に第2の実施形態、その後に第3の実施形態を含むプロセスを提供する。これらの実施形態が第1の実施形態を含む場合、下記のさらなる実施形態が第1の実施形態に先行してよい。

【0166】

この態様のさらなる実施形態では、本発明は、上記の式Aの化合物を作製するためのプロセスであって、式Zの化合物を還元して式A'の化合物をもたらすステップを含むプロセスを提供する：

【化11】

40



式中、 R_1 はフェニル、または、メチルもしくはエチルなどのアルキル； $\text{O}-\text{メチル}$ などの $\text{O}-\text{アルキル}$ ；およびニトロから選択される1つもしくは複数の基で置換されたフェニルであり、したがって式A'の R_1CH_2 -部分は置換または非置換ベンジルエーテル酸素保護基である。保護基は、例えば、参考文献224に記載されている任意の適切な保護基であってよい。詳細には、保護基は、ベンジル、 p -メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、2,6-ジメトキシベンジル、 $\text{O}-\text{ニトロベンジル}$ 、 p -ニトロベンジルであってよく、典型的にはベンジルである。 PG_N は、上で定義されている窒素保護基である。典型的な PG_N 基は、フタルイミド； Boc および Fmoc などのカルバミン酸；ノシリル、トシリルおよびメシリルである。特に、 PG_N はフタルイミドである。典型的には、反応は、式Zの化合物（式中、 R_1 はフェニルであり、 PG_N はフタルイミド（ phth

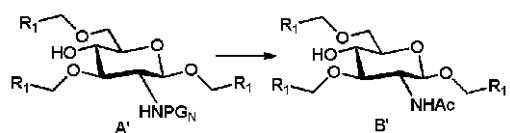
50

al imide) 基である) とホウ素含有化合物およびルイス酸を有機溶媒中で反応させて式 A' の化合物をもたらすステップを含む。ホウ素含有化合物は、水素化ホウ素 (borohydride) 試薬、例えば、トリアルキルアミノボラン、特に、トリエチルアミノボランまたはトリメチルアミノボランであってよく、典型的には、トリメチルアミノボランである。ルイス酸は AlCl₃ またはホウ素含有ルイス酸、例えば、三フッ化ホウ素複合体であってよく、典型的には BF₃ · Et₂O である。有機溶媒は、塩素化有機溶媒、例えば、CHCl₃ もしくは CH₂Cl₂ または非塩素化溶媒であってよく、典型的にはアセトニトリルである。反応は、約 -10 ~ 約 10 、約 -5 ~ 約 5 の温度範囲、典型的には、約 0 で行うことができる。

【0167】

この態様の第 1 の実施形態の例は、式 A' の化合物を N - 脱保護するステップ i) と、脱保護された化合物を N - アシル化して式 B' の化合物をもたらすステップ ii) を含む :

【化 12】

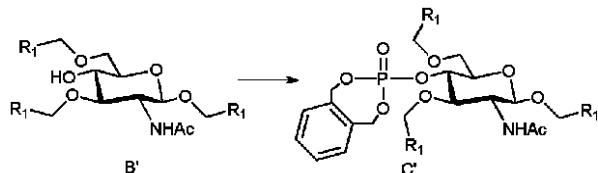


式中、R₁ および PG_N は上で定義されている通りである。典型的には、反応は、ステップ i) において式 A' の化合物 (式中、PG_N はフタルイミドである) と 1, 2 - ディアミノエタンをアルコール溶媒、例えば、MeOH または EtOH、典型的には EtOH 中で反応させることを含む。ステップ i) は、通常、室温と溶媒の還流点の間、例えば、約 25 以上、約 25 ~ 約 80 、約 35 ~ 約 80 、約 45 ~ 約 80 、約 55 ~ 約 80 、約 65 ~ 約 80 、約 75 ~ 約 80 の温度、典型的には、約 80 または溶媒の還流点付近で行う。ステップ ii) は、アシル化剤を添加することを含む。アシル化剤は、任意の適切なアシル化剤であってよく、典型的には、ピリジンまたはトリエチルアミンまたはイミダゾールなどのアミン塩基を有する Ac₂O である。あるいは、アシル化剤は EtOH : Ac₂O の約 4 : 1 混合物であってよい。ステップ ii) は、室温付近、例えば、約 25 で行うことができる。典型的には、ステップ i) とステップ ii) の間に精製ステップは存在せず、例えば、ステップ i) 由来の溶媒のみをステップ ii) を実施する前に除去する。

【0168】

この態様の第 2 の実施形態の例は、有機リン酸エステル基を式 B' の化合物に導入して式 C' の化合物をもたらすステップを含む :

【化 13】



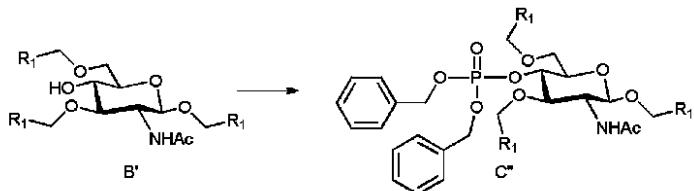
式中、R₁ は上で定義されている通りである。典型的には、式 B' の化合物をまず o - キシレン含有有機リン試薬、例えば、ホスホラミダイト、例えば、N - デエチル - 1, 5 - デヒドロ - 3H - 2, 3, 4 - ベンゾジオキサホスフィン (benzodioxaphosphorinane) - 3 - アミンと、アミン塩基、典型的には 1H - テトラゾールの存在下、有機溶媒、例えば、THF または CH₂Cl₂、典型的には、CH₂Cl₂ 中で反応させる。次いで、酸化剤、例えば、ピリジンおよび水中 I₂ または MCPBA を添加する。MCPBA は通常、約 -20 ~ 約 20 、約 -15 ~ 約 15 、約 -10 ~ 約 10 、約 -5 ~ 約 5 の温度、典型的には約 0 で使用される。MCPBA は通常、第

1のステップで使用したものと同じ反応溶媒に添加される。第1のステップの完了は、例えばTLC分析によって、mCPBAを添加する前に検出することができる。

【0169】

この態様の第2の実施形態のさらなる例は、有機リン酸エステル基を式B'の化合物に導入して式C''の化合物をもたらすステップを含む：

【化14】



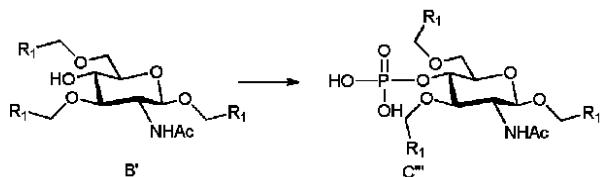
10

式中、R₁は上で定義されている通りである。典型的には、式B'の化合物をピロリン酸試薬、例えば、テトラベンジルピロホスフェートと反応させる。反応は塩基の存在下で行い、適切な塩基はLDAまたはLiHMDSなどのリチウムアミドである。反応は、有機溶媒、例えば、CH₂Cl₂などの塩素化溶媒またはエーテル溶媒、典型的には、ジエチルエーテルまたはTHF中で行う。典型的には、反応は、約0未満、例えば、約-10、約-20、約-30、約-40、約-50、約-60、約-70で行い、約-80、次いで約-30で行うことが適切である。

【0170】

この態様の第2の実施形態のさらなる例は、有機リン酸エステル基を式B'の化合物に導入して式C'''の化合物をもたらすステップを含む：

【化15】



20

式中、R₁は上で定義されている通りである。典型的には、式B'の化合物を、適切なリン酸化試薬および酸化剤を用いてリン酸化する。典型的なリン酸化試薬はサリチルクロロホスファイトまたはPCl₃および水もしくは水性NaHCO₃である。リン酸化剤がサリチルクロロホスファイトである場合、反応は、典型的にはピリジン溶媒中で行い、典型的には塩化ビバロイルが存在する。反応は通常、室温、例えば、約25で行う。次いで、酸化剤、例えば、ピリジンおよび水中I₂、またはmCPBA、典型的にはI₂を添加する。典型的には、酸化剤(oxidant)を添加する前に反応物を約0未満、例えば、約-10、約-20、約-30、約-40、約-50、典型的には、約-40に冷却する。酸化は、典型的には、約0の温度で完了する。I₂は典型的には、ピリジン／水中溶液として添加される。溶液の濃度は、典型的には、約0.1～1M、約0.2～0.9M、約0.3～0.8M、約0.4～0.7Mであり、約0.5Mであることが適切である。ピリジンと水の比は、典型的には、約10：1～30：1、約12：1～約28：1、約14：1～約26：1、約16：1～約24：1、約18：1～約22：1であり、約19：1であることが適切である。酸化剤は通常、第1のステップで使用したものと同じ反応溶媒に添加される。第1のステップの完了は、例えばTLC分析によって、酸化剤を添加する前に検出することができる。式C'''の化合物は通常、塩、典型的にはジトリエチルアンモニウム塩として単離される。

30

【0171】

リン酸化剤がPCl₃および水または水性NaHCO₃である場合、反応は、典型的には、MeCNなどの有機溶媒中で行う。PCl₃の後に水または水性NaHCO₃を添加し、これは室温で行われることが適切である。次いで、I₂またはmCPBAなどの酸化

40

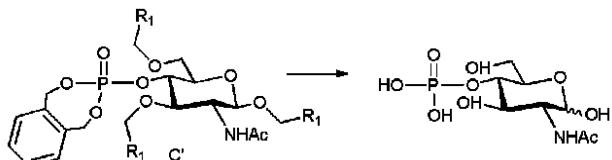
50

剤、典型的には I_2 を添加する。通常、酸化剤を添加する前に溶媒を除去し、新しい溶媒を添加する。新しい溶媒は、典型的には、ピリジンとトリエチルアミンの混合物である。ピリジンとトリエチルアミンの比は、典型的には、約 2 : 1 ~ 約 8 : 1 であり、約 4 : 1 であることが適切である。 I_2 は、典型的にはピリジン水 (pyridine water) 中溶液として添加される。溶液の濃度は、典型的には、約 0.1 ~ 1 M、約 0.2 ~ 0.9 M、約 0.3 ~ 0.8 M であり、約 0.4 M であることが適切である。式 C' の化合物は通常、塩、典型的にはジトリエチルアンモニウム塩として単離される。

【0172】

この態様の第 3 の実施形態の例は、式 C' の化合物を、典型的には水素化分解によって脱保護して N - アセチルグルコサミン - 4 - リン酸をもたらすステップを含む：

【化 16】

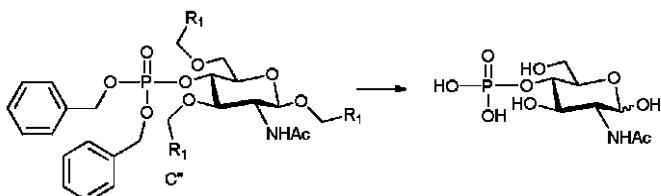


式中、 R_1 は上で定義されている通りである。典型的には、式 C' の化合物を、パラジウム触媒、例えば、アルコール溶媒、例えば、MeOH または EtOH、典型的には、MeOH 中 10 % Pd / C またはパールマン触媒 $Pd(OH)_2 / C$ の存在下で H_2 と反応させる。反応は通常、約 1 ~ 約 5 atm、約 1 ~ 約 4 atm、約 1 ~ 約 3 atm、約 ~ 約 2 atm、典型的には約 1 atm の圧力で行う。

【0173】

この態様の第 3 の実施形態のさらなる例は、式 C'' の化合物を、典型的には水素化分解によって脱保護して N - アセチルグルコサミン - 4 - リン酸をもたらすステップを含む：

【化 17】

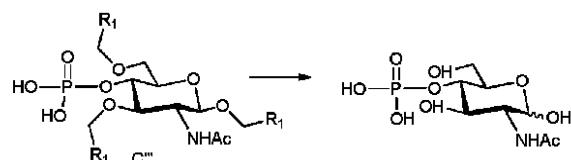


式中、 R_1 は上で定義されている通りである。典型的には、式 C'' の化合物をパラジウム触媒、例えば、アルコール溶媒、例えば、MeOH または EtOH、典型的には MeOH 中 10 % Pd / C またはパールマン触媒 $Pd(OH)_2 / C$ の存在下で H_2 と反応させる。反応は通常、約 1 ~ 約 5 atm、約 1 ~ 約 4 atm、約 1 ~ 約 3 atm、約 ~ 約 2 atm、典型的には約 1 atm の圧力で行う。

【0174】

この態様の第 3 の実施形態のさらなる例は、式 C''' の化合物、またはそのジトリエチルアンモニウム塩を、典型的には水素化分解によって脱保護して N - アセチルグルコサミン - 4 - リン酸をもたらすステップを含む：

【化 18】



10

20

30

40

50

式中、R₁は上で定義されている通りである。典型的には、式C'、'の化合物をパラジウム触媒、例えば、アルコール溶媒、例えば、MeOHまたはEtOH、典型的にはMeOH中10%Pd/Cまたはパールマン触媒Pd(OH)₂/Cの存在下でH₂と反応させる。反応は通常、約1～約5atm、約1～約4atm、約1～約3atm、約～約2atm、典型的には約1atmの圧力で行う。

【0175】

N-アセチルグルコサミン-4-リン酸は、例えば、結晶化、またはより典型的にはクロマトグラフィー、特に、疎水性に改質されたシリカ固定相を使用したクロマトグラフィー(chromotography)によって精製することができる。

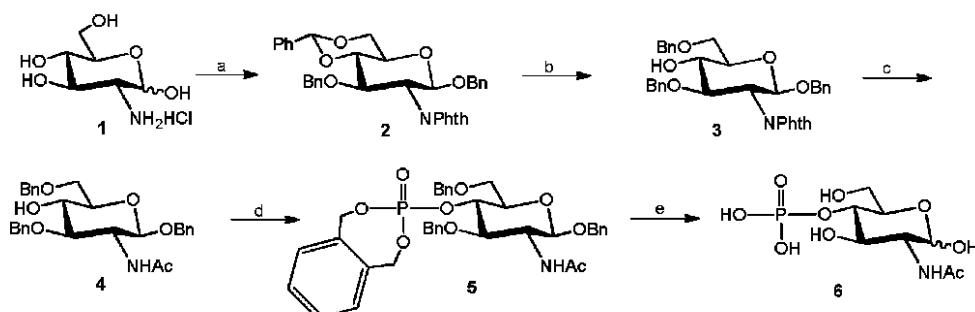
【0176】

本発明は、この態様のプロセスの化合物および中間体、詳細には、式Cの化合物、より詳細には式C'、式C''および式C'''の化合物も提供する。

【0177】

さらなる実施形態では、この態様のプロセスは以下の通りであってよい：

【化19】



この実施形態に適した反応条件は下の「発明を実施するための形態」の節(例えば、スキーム1)において提供される。

【0178】

一般

本発明の実施には、別段の指定のない限り、当技術分野の技術の範囲に入る化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の従来の方法を用いる。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、参考文献225～232などを参照されたい。

【0179】

上記では「G I」番号付けが使用されている。G I番号または「GenInfo Identifier」とは、配列がデータベースに加えられる際にNCBIにより処理される、各配列記録に連続的に割り当てられた一連の数字(digit)である。G I番号には、配列記録の受託番号との類似点はない。配列が更新されると(例えば、修正のため、またはより多くのアノテーションもしくは情報を加えるために)、新しいG I番号が与えられる。したがって、所与のG I番号に関連づけられる配列は変化しない。

【0180】

抗原「ドメイン」が省かれる場合、シグナルペプチドの省略、細胞質ドメインの省略、膜貫通ドメインの省略、細胞外ドメインの省略などが含まれ得る。

【0181】

「含む(comprising)」という用語は、「含む(including)」ならびに「からなる(consisting)」を包含し、例えば、Xを「含む(comprising)」組成物は、排他的にXからなってもよく、追加的な何かを含む、例えばX+Yであってもよい。

【0182】

「約」という用語は、数値Xとの関連では、例えば、X±10%を意味する。

【0183】

「実質的に」という単語は、「完全に」を排除せず、例えば、Yを「実質的に含まない

10

20

30

40

50

」組成物は、Yを完全に含まなくてよい。必要な場合、「実質的に」という単語は本発明の定義から省くことができる。

【0184】

本発明が複数の逐次的なステップを伴うプロセスを提供する場合、本発明は、ステップの総数未満を伴うプロセスも提供し得る。同様に、出発多糖材料がすでに部分的に処理されている場合には、本発明は、方法の後期のステップのみを伴うプロセスを包含する。これらの異なるステップは、全く異なる時間に、異なる人により、異なる場所で（例えば、異なる国で）実施されてよい。

【0185】

糖環は開いた形態で存在しても閉じた形態で存在してもよいこと、および本明細書の構造式において閉じた形態が示されていても、開いた形態も本発明に包含されることが理解されよう。同様に、糖はピラノース型で存在してもフラノース型で存在してもよいこと、および本明細書の構造式においてピラノース型が示されていても、フラノース型も包含されることが理解されよう。糖の種々のアノマー型も包含される。

10

【0186】

2つのアミノ酸配列間の百分率配列同一性への言及は、アラインメントした際に、2つの配列の比較においてアミノ酸の百分率が同じであることを意味する。このアラインメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、参考文献233の7.7.18節に記載されているものを使用して決定することができる。好ましいアラインメントは、Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムにより、ギャップオープンペナルティ12およびギャップ伸長ペナルティ2、BLOSUM行列62を用いたアフィンギャップ検索を使用して決定する。Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムは参考文献234に開示されている。

20

【0187】

本発明の特定の実施形態

本発明の特定の実施形態は以下を含む：

【0188】

1. *Neisseria meningitidis* 血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲート。

30

【0189】

2. (a) 莢膜多糖内の第一ヒドロキシル基を酸化して、アルデヒド基を有する酸化多糖をもたらすステップと、(b) 酸化多糖を、アルデヒド基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスによって得ることができる実施形態1に記載のコンジュゲート。

【0190】

3. ステップ(a)における酸化が莢膜多糖内の残基の1~10%の間にある第一ヒドロキシル基の酸化である、実施形態2に記載のコンジュゲート。

40

【0191】

4. 酸化が莢膜多糖内の残基の4~8%の間にある第一ヒドロキシル基の酸化である、実施形態3に記載のコンジュゲート。

【0192】

5. ステップ(a)における酸化がTEMPO媒介性酸化である、実施形態2から4のいずれかに記載のコンジュゲート。

【0193】

6. ステップ(b)におけるカップリングが直接的である、実施形態2から5のいずれかに記載のコンジュゲート。

【0194】

7. ステップ(b)におけるカップリングがアルデヒド基とキャリア分子の第一アミン基の間の還元的アミノ化によるものである、実施形態6に記載のコンジュゲート。

40

【0195】

50

8 . (a) 荚膜多糖の還元末端の還元的アミノ化を行って、末端サブユニットの C - 1 原子に第一アミン基が共有結合によって結合した改変多糖をもたらすステップと、(b) 改変多糖を、第一アミン基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスによって得ることができる、実施形態 1 に記載のコンジュゲート。

【 0 1 9 6 】

9 . ステップ(b)におけるカップリングがリンカーを介する、実施形態 8 に記載のコンジュゲート。

【 0 1 9 7 】

10 . (a) 荚膜多糖の還元末端を還元して、その末端に 2 つの隣接するヒドロキシル基を有する改変多糖をもたらすステップと、(b) 隣接するヒドロキシル基の酸化的切断を行って、末端にアルデヒド基を有するさらなる改変多糖をもたらすステップと、(c) アルデヒド基の還元的アミノ化を行って、末端に第一アミン基を有するさらなる改変多糖をもたらすステップと、(d)さらなる改変多糖を、第一アミン基を介してキャリア分子とカップリングさせて、それにより、コンジュゲートをもたらすステップとを含むプロセスによって得ることができる、実施形態 1 に記載のコンジュゲート。

【 0 1 9 8 】

11 . 第一アミン基が末端サブユニットの C - 5 原子に共有結合によって結合している、実施形態 10 に記載のコンジュゲート。

【 0 1 9 9 】

12 . ステップ(c)における還元的アミノ化がアルデヒド基と式 $X_1 - L - X_2$ の二官能性リンカーの末端第一アミン基の間のものであり、式中、 X_1 は末端第一アミン基を含み、 X_2 はさらなる末端第一アミン基を含み、 L は、連結部分である、実施形態 10 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 0 】

13 . X_1 基および X_2 基がどちらも - NHNH₂ である、実施形態 12 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 1 】

14 . ステップ(d)におけるカップリングがリンカーを介する、実施形態 10 から 13 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 2 】

15 . カップリングが、第一アミン基とカップリングするための第 1 の基およびキャリア分子のアミンとカップリングするための第 2 の基を有する二官能性リンカーを介する、実施形態 9 または 14 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 3 】

16 . 二官能性リンカーが式 $X - L - X$ のホモ二官能性リンカーであり、 2 つの X 基が互いに同じであり、第一アミンと反応することができ、 L がリンカーの連結部分である、実施形態 15 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 4 】

17 . X 基が N - オキシスクシンイミドである、実施形態 16 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 5 】

18 . L が式 $- L' - L^2 - L' -$ を有し、 L' がカルボニルである、実施形態 12 、 13 、 16 または 17 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 6 】

19 . L^2 が $- (CH_2)_4 -$ である、実施形態 18 に記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 7 】

20 . 荚膜多糖がオリゴ糖である、前記の実施形態のいずれかに記載のコンジュゲート。

【 0 2 0 8 】

10

20

30

40

50

21. オリゴ糖の重合度が 60 から 100 の間または 10 から 20 の間である、実施形態 20 に記載のコンジュゲート。

【0209】

22. キャリア分子が、ジフテリアトキソイドもしくは破傷風トキソイド、CRM197 またはタンパク質D である、前記の実施形態のいずれかに記載のコンジュゲート。

【0210】

23. キャリア分子が spr0096 抗原および spr2021 抗原を含む、実施形態 1 から 21 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【0211】

24. spr0096 抗原が、配列番号 1 または配列番号 2 に対して 50% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 23 に記載のコンジュゲート。 10

【0212】

25. spr2021 抗原が配列番号 3 に対して 50% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施形態 23 または実施形態 24 に記載のコンジュゲート。

【0213】

26. キャリア分子が、spr0096 抗原および spr2021 抗原を単一のポリペプチド鎖として含む、実施形態 23 から 25 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【0214】

27. ポリペプチド鎖が式 $\text{NH}_2 - \text{A} - \{ - \text{X} - \text{L} - \}_n - \text{B} - \text{COOH}$ のポリペプチド鎖であり、式中、A が任意選択の N 末端アミノ酸配列であり、B が任意選択の C 末端アミノ酸配列であり、n が 2 以上の整数であり、各 X が spr0096 抗原または spr2021 抗原のアミノ酸配列であり、少なくとも 1 つの X が spr0096 抗原であり、少なくとも 1 つの X が spr2021 抗原であり、L が任意選択のリンカーアミノ酸配列である、実施形態 26 に記載のコンジュゲート。 20

【0215】

28. n が 2 である、実施形態 27 に記載のコンジュゲート。

【0216】

29. X₁ が spr0096 抗原であり、X₂ が spr2021 抗原である、実施形態 28 に記載のコンジュゲート。

【0217】

30. ポリペプチド鎖が、配列番号 9 に対して 50% 以上の同一性を有するアミノ酸配列、特に、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、実施形態 29 に記載のコンジュゲート。 30

【0218】

31. 血清群 X 荚膜多糖を、特に前記の実施形態のいずれかに定義されているコンジュゲートの形態で含む免疫原性組成物。

【0219】

32. 1種または複数種のさらなる抗原をさらに含む、実施形態 31 に記載の免疫原性組成物。

【0220】

33. 血清群 A 荚膜多糖をさらに含む、実施形態 31 または実施形態 32 に記載の免疫原性組成物。 40

【0221】

34. 血清群 A 荚膜多糖がキャリア分子とコンジュゲートしている、実施形態 33 に記載の免疫原性組成物。

【0222】

35. 血清群 W135 荚膜多糖をさらに含む、実施形態 31 から 34 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【0223】

36. キャリア分子とコンジュゲートした血清群 A 荚膜多糖を含む、実施形態 35 に記載の免疫原性組成物。 50

【0224】

37. 血清群W135莢膜多糖がキャリア分子とコンジュゲートしている、実施形態35または実施形態36に記載の免疫原性組成物。

【0225】

38. キャリア分子が実施形態22に定義されている通りである、実施形態34、36または37に記載の組成物。

【0226】

39. 血清群C莢膜多糖をさらに含む、実施形態31から38のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【0227】

40. 血清群Y莢膜多糖をさらに含む、実施形態31から39のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【0228】

41. 莢膜多糖がキャリア分子とコンジュゲートしている、実施形態39または実施形態40に記載の免疫原性組成物。

【0229】

42. キャリア分子が実施形態22に定義されている通りである、実施形態41に記載の組成物。

【0230】

43. 水性製剤の状態である、実施形態31から42のいずれかに記載の免疫原性組成物。

【0231】

44. 実施形態31から43のいずれかに記載の免疫原性組成物を含むワクチン。

【0232】

45. 哺乳動物に実施形態31から44のいずれかに記載の免疫原性組成物を投与することを含む、哺乳動物において免疫応答を生じさせる方法。

【0233】

46. 実施形態2から19のいずれかに定義されている通りである、血清群X莢膜多糖とキャリア分子のコンジュゲートを調製するためのプロセス。

【0234】

47. コンジュゲートが実施形態20から30のいずれかに定義されている通りである、実施形態46に記載のプロセス。

【0235】

48. (a) 血清群X莢膜多糖と(b)薬学的に許容されるキャリアとを含み、水性製剤の状態である医薬組成物。

【0236】

49. 血清群X莢膜多糖が実施形態1から30のいずれかに定義されているコンジュゲートの形態である、実施形態48に記載の医薬組成物。

【0237】

50. 実施形態32から42のいずれかに定義されている1種または複数種のさらなる抗原をさらに含む、実施形態48または実施形態49に記載の医薬組成物。

【0238】

51. 血清群X莢膜多糖を含有する疑いがある試料をアッセイするための方法であって、(i)試料中の任意の血清群X莢膜多糖を加水分解して、加水分解産物をもたらすステップと、(ii)加水分解産物を液体クロマトグラフィーに供するステップと、(iii)ステップ(ii)において分離された任意のグルコサミン-4-リン酸を検出するステップとを含む方法。

【0239】

52. 試料が、コンジュゲートしていない血清群X莢膜多糖および/またはコンジュゲートした血清群X莢膜多糖を含有する、実施形態51に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0240】

53. 試料中のコンジュゲートした血清群X莢膜多糖とコンジュゲートしていない血清群X莢膜多糖を、ステップ(i)の前に互いに分離させる、実施形態51または実施形態52に記載の方法。

【0241】

54. 分離に固相抽出を使用する、実施形態53に記載の方法。

【0242】

55. ステップ(ii)が高速陰イオン交換クロマトグラフィー(HPACE)を伴う、実施形態1から54のいずれかに記載の方法。

【0243】

56. ステップ(iii)がパルス電流滴定検出(PAD)を伴う、実施形態1から55のいずれかに記載の方法。

【0244】

57. ステップ(i)が酸加水分解を伴う、実施形態1から56のいずれかに記載の方法。

【0245】

58. ステップ(iii)が定量的なものである、実施形態1から57のいずれかに記載の方法。

【0246】

59. 試料を、検体中のコンジュゲートした血清群X莢膜多糖とコンジュゲートしていない血清群X莢膜多糖を分離し、コンジュゲートしていない材料を試料として使用することによって調製する、前記の実施形態のいずれかに記載の方法。

【0247】

60. 総血清群X莢膜多糖含量を、実施形態53を除く実施形態51から59のいずれかに記載の方法によって測定し、コンジュゲートしていない血清群X莢膜多糖含量を、実施形態53から59のいずれか1つに記載の通り測定し、したがって、コンジュゲートしていない血清群X莢膜多糖の総血清群X莢膜多糖に対する比を算出することができる、血清群X莢膜多糖を含有する疑いがある検体を分析するための方法。

【図面の簡単な説明】

【0248】

【図1】図1は、血清群X莢膜多糖の反復単位を示す図である。

【0249】

【図2】図2は、ネイティブな血清群X莢膜多糖および加水分解された血清群X莢膜多糖についての超高速液体クロマトグラムを示す。

【0250】

【図3】図3は、TEMPO酸化、続いて還元的アミノ化による血清群X莢膜多糖とCRM197のコンジュゲーションについてのスキーム、および得られたコンジュゲートのSDS-PAGE分析を示す図である。

【0251】

【図4】図4は、リン酸緩衝食塩水を用いてSephadryl S300カラムに流したコンジュゲーション混合物のクロマトグラムを示す。

【0252】

【図5】図5は、SIDEAリンカーを介した血清群X莢膜多糖とCRM197のコンジュゲーションについてのスキーム、および得られたコンジュゲートのSDS-PAGE分析を示す図である。

【0253】

【図6】図6は、異なる方法を使用した、SIDEAリンカーを介した血清群X莢膜多糖とCRM197のコンジュゲーションについてのスキーム、および得られたコンジュゲートのSDS-PAGE分析を示す図である。

【0254】

10

20

30

40

50

【図7】図7は、異なるリンカーを使用して作製した血清群X莢膜多糖-CRM197コンジュゲートのSDS-PAGE分析を示す図である。

【0255】

【図8】図8は、種々のN.meningitidisコンジュゲートを用いて免疫した後の血清群X莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群Xに対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0256】

【図9】図9は、同じ実験からの血清群A莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群Aに対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0257】

【図10】図10は、同じ実験からの血清群C莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群Cに対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0258】

【図11】図11は、同じ実験からの血清群W135莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群W135に対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0259】

【図12】図12は、同じ実験からの血清群Y莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群Yに対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0260】

【図13】図13は、酸加水分解によって生成したMenAオリゴ糖(a)およびMenXオリゴ糖(b)について400MHzおよび25±0.1で記録した2D 1H-31P HMBC NMRスペクトルを示す。ピーク割り当てが標識されている。

【0261】

【図14】図14は、37および45においてMenA莢膜多糖およびMenX莢膜多糖について収集した、時間の関数としてのa)avDPおよびb)pHならびにc)MenA莢膜多糖のみについてのO-アセチルの状態を示す図である。

【0262】

【図15】図15は、37および45における安定性試験について、a)MenA莢膜多糖およびb)MenX莢膜多糖について、45で(a)0日、(b)7日、(c)10日、(d)14日、(e)21日の時点、および37で(f)7日、(g)14日、(h)21日、(i)28日の時点で収集した、時間の関数としてのavDPのプロファイルを示す図である。さらに、酸性処理(酢酸ナトリウム、pH4.0、80で約4時間)によって得た、実験的に分解させたMenX莢膜多糖のプロファイルがb)(l)に示されている。

【0263】

【図16】図16は、種々のN.meningitidisコンジュゲートを用いて免疫した後の血清群X莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群Xに対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0264】

【図17】図17は、さらなる方法を使用した血清群X莢膜多糖とCRM197のコンジュゲーションについてのスキーム、および得られたコンジュゲートのSDS-PAGE分析を示す図である。

【0265】

【図18】図18は、種々のN.meningitidisコンジュゲートを用いて免疫した後の血清群A莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群Aに対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0266】

【図19】図19は、種々のN.meningitidisコンジュゲートを用いて免疫した後の血清群C莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群Cに対する血清殺菌抗体価を示す図である。

10

20

30

40

50

【0267】

【図20】図20は、種々のN.meningitidisコンジュゲートを用いて免疫した後の血清群W135莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群W135に対する血清殺菌抗体価を示す図である。

【0268】

【図21】図21は、種々のN.meningitidisコンジュゲートを用いて免疫した後の血清群Y莢膜多糖に対するIgG抗体価を示す図である。

【0269】

【図22】図22は、種々のN.meningitidisコンジュゲートを用いて免疫した後の血清群X莢膜多糖に対する高親和性IgG抗体価を示す図である。 10

【発明を実施するための形態】**【0270】****発明の実施するための態様****血清群X莢膜多糖産生のための細菌の成長**

血清群X莢膜多糖の産生および上清中への放出のために最適な細菌の成長条件を同定するために、MenX5967(ST750)株を使用して3つの異なる培地を試験した。異なる成長をフラスコ内で実施し、プロトン核磁気共鳴分光法(¹H-NMR)によってモニターした。培養上清を、拡散フィルターを用いたNMRシーケンスによって分析して、低分子量(MW)種に由来するシグナルをカットオフし、高MW血清群X莢膜多糖のシグナルを強調した。対応するペレットの¹H高分解能マジック角回転NMR(HR-MAS-NMR)による固体状態でのさらなる分析では血清群X莢膜多糖シグナルは示されず、これにより、多糖の大部分が上清中に放出されたことが示された(このアッセイの検出限界を考慮すると、細菌に残っている多糖の最大量は出発量の1/8のはずである)。3つの培地で同様の結果が得られた。 20

【0271】

NMR方法体系に加えて、清澄化された培養プロス中の血清群X莢膜多糖を定量化するためのより正確な方法を、パルス電流滴定検出を伴う高速陰イオン交換クロマトグラフィー(High-Performance Anion-Exchange Chromatography)(HPAEC-PAD)を使用して開発した(以下を参照されたい)。下記の表に示されているように、培地#3で最高量の多糖がもたらされた。したがって、これをより大規模な(18L)発酵のために選択し、これにより上清中に356μg/mlの血清群X莢膜多糖がもたらされた。 30

【化20】

異なる培地におけるMenX5967(ST750)株の成長および相対的な多糖産生

成長培地*	OD(600nm)	糖(μg/mL)	OD当たりの糖の μg数
#1	2	22.55	13.3
#2	6	42.73	7.1
#3	2.8	62.6	22.4

*1. 改変 Catlin v.6: カザミノ酸 10g/L、NaCl 5.8g/L、グルコース 10g/L、K₂HPO₄ 4g/L、NH₄Cl 1g/L、K₂SO₄ 1g/L、MgCl₂ · 6H₂O 0.4g/L、CaCl₂ · 2H₂O 0.03g/L、クエン酸 Fe(III) 0.5mg/L、pH 7.2; 2. MCDM1: グルコース 10g/L、ダイズペプトン 15g/L、NaCl 5.80g/L、K₂SO₄ 1g/L、K₂HPO₄ 4g/L、L-グルタミン酸 5g/L、L-アルギニン 0.3g/L、L-セリン 0.5g/L、L-システィン 0.23g/L、MgCl₂ 0.19g/L、CaCl₂ 0.021g/L、FeSO₄ 0.002g/L; 3. グルコース 50g/L、MgSO₄ · 7H₂O 30g/L、25g/L の限外濾過した酵母抽出物、L-システィン 1.5g/L を補充した改変 Frantz: L-グルタミン酸 1.6g/L、Na₂HPO₄ · 2H₂O 15.5g/L、KCl 0.09g/L、NH₄Cl 1.25g/L、pH 7.6。

10

20

30

40

【0272】

血清群 X 荚膜多糖の精製

血清群 X 荚膜多糖を精製するためのプロセスは、参考文献 235 から適合させた方法によって精製した。

【0273】

コンジュゲートの作製および特徴付け

鎖長が異なる多糖および異なるコンジュゲーション化学反応を使用してコンジュゲートを作製した。

【0274】

酸化および還元的アミノ化によるコンジュゲーション（方法 A）：

精製した血清群 X 荚膜多糖を 50 mM の酢酸ナトリウム中、pH 4.7、100 °C で 1 時間加水分解した（図 2）。NMR により、生じたオリゴ糖の平均重合度は 80 であると決定され、これは分子量 25 ~ 30 kDa に対応した。多糖の解重合をインプロセスで超高速液体クロマトグラフィー - サイズ排除クロマトグラフィー (Ultra Performance Liquid Chromatography - Size Exclusion Chromatography) (UPLC - SEC) およびリン (31P) NMR 分光法によってモニターし、所望の aDP に達したところで、それを中和によってクエンチした。緩衝液をテトラブチルアンモニウムプロミドと交換してジメチルホルムアミド溶媒中で糖を溶解させた。次いで、糖を、TEMPO (MenX 反復サブユニットに対して 0.06 eq)、NaHCO₃ (MenX 反復サブユニットに対して 9 eq)、TCC (MenX 反復サブユニットに対して 2 eq) を用いて 0 °C で一晩酸化させた。この酸化により、個々のサブユニットの C-6 位にアルデヒド基が生成される（図 3）。酸化された糖を、アセトン / NaCl を用いた沈殿および Sephadex G15 カラムを使用したゲル濾過によって精製した。糖を HPAEC-PAD を使用して定量化し、NMR を使用してその構造的同一性を確認した。鎖当たりおよそ 4.5 個の基が酸化され、これは、約 80 残基鎖にわたっておよそ 6 % の程度の酸化に対応した。酸化された糖の分子量分布を UPLC - SEC によって測定した。

【0275】

還元的アミノ化によってキャリアタンパク質 CRM197 とコンジュゲートするために

50

アルデヒド基を使用した(図3)。簡単に述べると、糖をw/w比4:1の10mg/mlのCRM197およびw/w比1:1のNaBH₃CNと、pH7.2、10mMのNaPi緩衝液中で混合した。混合物を37でゆっくり攪拌しながら72時間放置した。Sephacyrly S300カラムでリン酸緩衝食塩水を用いてコンジュゲートを精製し、画分をプールへと収集した(図4)。SDS-PAGEによってコンジュゲーションを検証した(図3)。精製されたコンジュゲート(プール1)の特質が下に示されている:

【化21】

MenX (μ g/mL)	CRM197(μ g/mL)	総質 量、 MenX (mg)	総質量 、 CRM197 (mg)	MenX/CRM197 (w/w)	MenX 収率 (%)	CRM197 収率 (%)	MenX/CRM197(mol/mol)	Kd (SEC)	EU/ μ g (LAL)
104.8	151.3	1.26	1.82	0.69	12.6	72.6	1.7	0.7	1.6

この方法により、多糖が酢酸ナトリウムで加水分解されておらず、したがって、ネイティブな平均重合度を有するコンジュゲートも作製した。平均重合度が130である多糖を含有するさらなるコンジュゲートを作製した。

【0276】

この方法により、キャリアタンパク質が破傷風トキソイド(TT)または配列番号9(SEQ9)であるコンジュゲートも作製した。これらのコンジュゲート内の多糖の平均重合度は130であった。これらのコンジュゲートの他の特性が下に示されている:

【化22】

キャリア	MenX(μ g/mL)	キャリア(μ g/mL)	MenX/キャリ (w/w)	MenX/キャリ (mol/mol)	EU/ μ g (LAL)
TT	197.6	660.80	0.3	0.4	18.81
SEQ9	159.7	757.70	0.21	0.3	6.57

【0277】

還元的アミノ化、続いてSIDEAリンカーとの反応によるコンジュゲーション(方法B):

精製した血清群X莢膜多糖を、50mMの酢酸ナトリウム中、pH4.7、100で2時間加水分解した(図2)。NMRにより、生じたオリゴ糖の平均重合度は15であると決定され、これは分子量5kDaに対応した。次いで、糖を、37で5日にわたり、300mg/mlのNH₄OAcおよび49mg/mlのNaBH₃CNを含む、5mMの酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.5中、5mg/mlで可溶化した。このステップにより、末端アルデヒド基が還元的アミノ化され第一アミン基が生成した(図5)。次いで、反応混合物を1MのNaClおよび水に対する200cm²のHydrosart(セルロース)2kDa-カットオフ膜を用いた接線流filtrationによって精製した。次いで、第一アミン基を、SIDEAを用いた活性化およびその後のキャリアタンパク質CRM197とのコンジュゲーションのために使用した(図5)。簡単に述べると、改変糖を、NET₃(NET₃:総NH₂基のモル比5:1で)を含む9:1(v/v)のDMSO/水中に、12:1のSIDEAのmol:NH₂基の総molで、室温で3時間にわたって溶解させた。次いで、反応混合物を、90%ジオキサン(v/v)を用いた沈殿によって精製した。次いで、SIDEA-改変糖を25mg/mlのCRM197と、25mMのNa

10

20

30

40

50

P_i緩衝液、pH 7.2中、13:1(活性なエステル基:CRM197のモル比)の比で反応させた。混合物を室温でゆっくり攪拌しながら5時間放置した。コンジュゲートを、(NH₄)₂SO₄を用いた沈殿によって精製した。SDS-PAGEによってコンジュゲーションを検証した(図5)。これらのコンジュゲートの1つのロットの特質が下に示されている:

【化23】

MenX (μ g/mL)	CRM197(μ g/mL)	総質量、 MenX (mg)	総質量、 CRM197 (mg)	MenX/CRM197 (w/w)	MenX/CRM197 (mol/mol)	MenX 収率 (%)	Kd (SEC)	EU/ μ g (LAL)
167.3	514.4	0.17	0.51	0.33	4.22	12.6	0.32	0.8

10

【0278】

還元、酸化および還元的アミノ化、続いてSIDEAリンカーとの反応によるコンジュゲーション(方法C):

精製された血清群X莢膜糖を、10mMのNaPi緩衝液、pH 8中、15mg/mlで、NaBH₄(MenXの分子量に対して12eq、固体)と、室温で1.5時間反応させた。このステップにより、糖が還元された。次いで、還元した糖を、10mMのNaPi緩衝液、pH 7.2中、6~8mg/mlで、NaIO₄(MenXの分子量に対して10eq、固体)と室温で1.5時間反応させた。これらの二段階の組合せ効果により、糖の還元末端にアルデヒド基が生成される(図6)。次いで、改変糖を還元的アミノ化に供して、SIDEAを用いた活性化およびその後のキャリアタンパク質CRM197とのコンジュゲーションのために使用することができる第一アミン基をもたらす(図6)。簡単に述べると、改変糖を、10mMのNaPi緩衝液、pH 7中、300mg/mlのNH₄OAcおよび49mg/mlのNaBH₃CNを用いて37度5日にわたり、4~5mg/mlで可溶化した。次いで、改変糖を、NEt₃(NEt₃:総NH₂基のモル比5:1で)を含む9:1(v/v)のDMSO/水に、12:1のSIDEAのmol: NH₂基の総molで、室温で3時間にわたって溶解させた。次いで、反応混合物を、80%アセトン(v/v)を用いた沈殿によって精製した。次いで、生じたSIDEA-改変糖を、100mMのNaPi緩衝液、pH 7.2中、25mg/mlのCRM197と13:1(活性なエステル基:CRM197のモル比)の比で反応させた。混合物を室温でゆっくり攪拌しながら一晩放置した。コンジュゲートを、(NH₄)₂SO₄を用いた沈殿によって精製した。SDS-PAGEによってコンジュゲーションを検証した(図6)。これらのコンジュゲートの1つのロットの特質が下に示されている:

20

【化24】

30

MenX (μ g/mL)	CRM197 (μ g/mL)	MenX/CRM197 (w/w)	MenX/CRM197 (mol/mol)	遊離糖 (%)	EU/ μ g (LAL)
129.60	628.70	0.21	2.1	<6	0.01

40

【0279】

代替のリンカーを介したコンジュゲーション(方法D):

また、上記のとおりに、平均重合度が15である精製された血清群X莢膜多糖を、US61/534,751の図7の方法に従い、異なるリンカーを使用してCRM197とコンジュゲートした。SDS-PAGEによってコンジュゲーションを検証した(本明細書では図7)。

【0280】

還元、酸化および還元的アミノ化によるキャリアとのコンジュゲーション(方法E):

50

精製された血清群X莢膜糖を、10 mMのNaPi緩衝液、pH 8中、15 mg / mlで、NaBH₄ (MenXの分子量に対して12 eq、固体)と室温で2時間にわたって反応させた。このステップにより、糖が還元された。次いで、還元した糖を、10 mMのNaPi緩衝液、pH 7.2中、6~8 mg / mlでNaIO₄ (MenXの分子量に対して10 eq、固体)と室温で1.5時間にわたって反応させた。これらの二段階の組合せ効果により、糖の還元末端にアルデヒド基が生成される(図17)。次いで、改変糖を、キャリアタンパク質CRM197を用いた還元的アミノ化に供する。簡単に述べると、改変糖を、300 mMのNaPi緩衝液、pH 8 (糖:CRM197の重量比8:1)およびNaBH₃CN (糖:NaBH₃CNの重量比4:1)中で、37度で4日にわたり、2 mg / mlで溶解させた。SDS-PAGEによってコンジュゲーションを検証した(図17)。

10

【0281】

免疫試験(1)

一般的なアッセイプロトコール: Balb/cマウスを、下記のスケジュールに従って皮下注射によって免疫した。注射体積は200 μlであり、注射は、ミョウバンリン酸塩アジュvant (alum phosphate adjuvant) (用量当たり120 μg)を含有した。注射は1日目、14日目および28日目に行い、0日目(免疫前血清)、28日目(第2の免疫後の血清)および42日目(第3の免疫後の血清)に採血した。

20

【化25】

群	群当たりのマウス	免疫原	抗原の用量
1	8	PBS	-
2	16	MenX-CRM197(方法A)	1 μg
3	16	MenX-CRM197(方法D)	1 μg
4	16	MenX-CRM197(方法B)	1 μg
5	16	MenX-CRM197(方法A)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg
6	16	MenX-CRM197(方法D)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg
7	16	MenX-CRM197(方法B)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg
8	16	MenACWY	2,1,1,1 μg
9	16	MenX-CRM197(方法D)	0.1 μg

30

MenACWY = 参考文献10に従って調製したMenA-CRM197、MenC-CRM197、MenW135-CRM197およびMenY-CRM197の混合物。

【0282】

第3の免疫後の血清群X莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群X Z9615株に対する血清殺菌抗体価が図8に示されている。血清群Xコンジュゲートは、免疫原性であり、かつ誘導性殺菌性の抗体であった。用量を10分の1(0.1 μg)に減少させた場合、応答は減弱しなかった。コンジュゲートを血清群A、C、W135およびYに由来するコンジュゲートと組み合わせた場合、応答はわずかに低下したが、それでも対照を十分に上回った。したがって、これらのコンジュゲートと血清群Xコンジュゲートの間の免疫干渉は比較的小さいようである。

40

【0283】

第3の免疫後の血清群A、C、W135およびY莢膜多糖に対するIgG抗体価およびこれらの血清群に対する血清殺菌抗体価(それぞれF8238株、11株、240070株および860800株を使用)も群5、6、7および8について測定した。結果が図9

50

~ 1 2 に示されている。血清群 A 、 C 、 W 1 3 5 および Y コンジュゲートに対する応答は、一般に、血清群 X コンジュゲートと組み合わせた場合、減弱しなかった。再度、これらの結果により、これらのコンジュゲートと血清群 X コンジュゲートの間の免疫干渉がわざかであることが示唆される。

【 0 2 8 4 】

抗血清群 X 荚膜多糖 I g M E L I S A 単位は、 I g M から I g G への有効なアイソタイプスイッチングに起因して、コンジュゲートワクチンについて予想された通り、全てのコンジュゲートについて低いことが見いだされた。

【 0 2 8 5 】

改変 E L I S A を用いてアビディティが高い I g G 抗体のみを測定した(図 2 2)。改変 E L I S A では、カオトロピック塩を使用してアビディティが高い I g G 抗体のみを選択し、検出する。抗血清群 X 荚膜多糖 I g G E L I S A 単位は、第 2 の投薬後および第 3 の投薬後のどちらにおいても、全てのコンジュゲートについて、標準の E L I S A による単位と比較して低かったが、第 3 の投薬後に、全てのコンジュゲートについて統計的に有意な追加免疫効果が観察された(P = 0 . 0 0 0 6 ~ < 0 . 0 0 0 1)。

10

【 0 2 8 6 】

以下の表には、プールされた第 3 の免疫後の血清からの、種々の株に対するウサギ補体血清殺菌抗体価が要約されている。

【 化 2 6 】

抗原の名称	抗原の用量 (μ g)	MenX Z9615	MenA F8238	MenC 11	MenW 240070	MenY 860800
PBS+ミョウバンリン酸塩	-	<4	<16	<16	<16	32
MenX-CRM197(A)	1	4096	<16	<16	<16	32
MenX-CRM197(D)	1	4096	n/a	n/a	n/a	n/a
MenX-CRM197(B)	1	4096	n/a	n/a	n/a	n/a
MenX-CRM197(A)+MenACWY	1 + 2,1,1,1	256	4096	4096	512	1024
MenX-CRM197(D)+MenACWY	1 + 2,1,1,1	1024	2048	4096	1024	1024
MenX-CRM197(B)+MenACWY	1 + 2,1,1,1	1024	2048	4096	1024	1024
MenACWY	2,1,1,1	<4	2048	8192	1024	2048
MenX-CRM197(D)	0.1	4096	n/a	n/a	n/a	n/a

20

30

40

【 0 2 8 7 】

免疫試験(2)

一般的なアッセイプロトコール： B a l b / c マウスを、下記のスケジュールに従って皮下注射によって免疫した。注射体積は 2 0 0 μ l であり、注射はミョウバンリン酸塩アジュバントを含有した。

【化27】

群	群当たりのマウス	免疫原	抗原の用量
1	1-8	PBS	1 μg
2	9-16	MenX-CRM197(方法A、ネイティブなavDP)	1 μg
3	17-24	MenX-CRM197(方法A、80 avDP)	1 μg
4	25-32	MenX-CRM197(方法A、130 avDP)	1 μg
5	33-40	MenX-TT(方法A、130 avDP)	1 μg
6	41-48	MenX-SEQ9(方法A、130 avDP)	1 μg
7	49-56	MenX-CRM197(方法A、ネイティブなavDP)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg
8	57-64	MenX-CRM197(方法A、80 avDP)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg
9	65-72	MenX-CRM197(方法A、130 avDP)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg
10	73-80	MenX-TT(方法A、130 avDP)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg
11	81-88	MenX-SEQ9(方法A、130 avDP)+MenACWY	1 μg+2,1,1,1 μg

MenACWY = 参考文献10に従って調製したMenA-CRM197、MenC-CRM197、MenW135-CRM197およびMenY-CRM197の混合物。

【0288】

第3の免疫後の血清群X莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群X Z9615株に対する血清殺菌抗体価が図16に示されている。血清群Xコンジュゲートは、免疫原性であり、かつ誘導性殺菌性の抗体であった。MenX-CRM197コンジュゲートを血清群A、C、W135およびYに由来するコンジュゲートと組み合わせた場合、応答はわずかに低下したが、それでも対照を十分に上回った。対照的に、MenX-TTまたはMenX-SEQ9コンジュゲートをこれらのコンジュゲートと組み合わせた場合には低下はわずかであるか、または全く認められなかった。したがって、MenX多糖に対して異なるキャリアタンパク質を使用することは、血清群Xコンジュゲートとこれらのコンジュゲートの間のいかなる免疫干渉をも低下させるために役立ち得る。

【0289】

MenXコンジュゲートを血清群A、C、W135およびYに由来するコンジュゲートと混合した場合の、第3の免疫後の血清群A莢膜多糖に対するIgG抗体価および血清群A F8238株に対する血清殺菌抗体価が図18に示されている。血清群C、W135およびYについての対応するデータが図19~21に示されている。

【0290】

安定性試験(1)

材料：精製されたMenA多糖およびMenX多糖を参考文献10の方法に従って得た。多糖調製物の純度を、残留するタンパク質および核酸の含量を推定することによって評価し、これは、糖の1%w/wよりも低かった。

【0291】

10

20

30

40

50

NMR分析：¹H NMR実験、¹³C NMR実験および³¹P NMR実験を、高精度温度制御器を備えたBruker Avance III 400 MHz分光計で、5 mmの広帯域プローブ(Bruker)を使用して記録した。データの取得および処理のために、TopSpinバージョン2.6ソフトウェア(Bruker)を使用した。¹H NMRスペクトルを、25±0.1で、10 ppmスペクトル幅にわたって32kデータポイントを用い、128回のスキャンを蓄積しながら収集した。スペクトルを0.2 Hz線幅拡大で重み付けし、フーリエ変換した。トランスマッターを、参照シグナルとして使用した水の周波数(4.79 ppm)に設定した。¹³C NMRスペクトルを、100.6 MHzおよび37±0.1で、200 ppmスペクトル幅にわたって32kデータポイントを用い、4k回のスキャンを蓄積しながら記録した。スペクトルを0.2 Hz線幅拡大で重み付けし、フーリエ変換した。トランスマッターを、参照シグナルとして使用したアセトンの周波数(30.89 ppm)に設定した。³¹P NMRスペクトルを、161.9 MHz、25±0.1で、20 ppmスペクトル幅にわたって32kデータポイントを用い、およそ1k回のスキャンを蓄積しながら記録した。スペクトルを3.0 Hz線幅拡大で重み付けし、フーリエ変換した。酸化重水素(deuterium oxide)中85%リン酸を外部標準として使用した(0 ppm)。¹H NMRスペクトルおよび³¹P NMRスペクトルは全て、各シグナルの完全な回収を確実にするための総再利用時間(5×緩和時間T1)を使用して定量的に得た。Men A 荚膜多糖およびMen X 荚膜多糖の分解機構を確認し、したがって、³¹P NMRピークを割り当てるために、2次元の¹H-³¹P異核多結合相関(Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)(HMQC)実験を、予め、それぞれ50 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.8(糖濃度約10 mg/mL)中、73で約2.5時間、およびpH 4.0、80で約5.5時間(糖濃度約2.5 mg/mL)、酸加水分解することによって生成したMen Aオリゴ糖(oligosaccharide)試料およびMen Xオリゴ糖試料に関して得た。Men Aオリゴ糖およびMen Xオリゴ糖の平均重合度(avDP)は、³¹P NMR分析によって推定したところ、それぞれ約12および約10であった(下の安定性実験の段落を参照されたい)。これらのNMR分析用試料を、乾燥糖およそ10 mgを酸化重水素(99.9%D原子-Aldrich)0.75 mLに標準のパルス・プログラムを用いて可溶化することによって調製した。F2次元およびF1次元でそれぞれ4096データポイントおよび512データポイントを収集した。64回のスキャンを蓄積した後にフーリエ変換して、F2およびF1において、それぞれポイントあたり0.2 Hzおよび5.0 Hzのデジタル分解能を得た。

【0292】

HPLC分析：HPLC分析を、パルス電流滴定検出器(Pulsed Amperometric Detector)を備えたICS 3000 Dionexシステムに接続した、ガードカラム(4 mm × 50 mm; Dionex)を伴うCarboPac PA200カラム(4 mm × 250 mm; Dionex)を使用して行った。カラム平衡化のために100 mMのNaOH + 10 mMの硝酸ナトリウム緩衝液を使用し、溶出のために硝酸ナトリウムの量を増加させる3段階勾配(100 mMのNaOH + 10 mMの硝酸ナトリウム、250 mMの硝酸ナトリウム、500 mMの硝酸ナトリウムをそれぞれ80分、15分および3分)を使用した。120分の実行中ずっと0.4 mL/minの流速を使用した。試料20 μLをおよそ1 mg/mLの濃度で注射した。流出液を、電気化学的検出器をパルス電流滴定モードで使用し、金作用電極およびAg/AgCl参照電極を用いてモニターした。炭水化物に対して四重電位波形(quadrupole-potentiodial waveform)を適用した。得られたクロマトグラフィー-データを、Chromelonソフトウェア6.8(Dionex)を使用して処理した。

【0293】

安定性実験：重水を用いて調製した100 mMのリン酸カリウム緩衝液、pH 7.0中およそ1 mg/mLの濃度のMen A多糖溶液およびMen X多糖溶液をそれぞれ37および45でインキュベートした。種々の時点において試料を取り出し、NMRおよび

10

20

30

40

50

HPLCによって分析した。pHも各時点でもニターした。多糖安定性に関してMenAおよびMenXのavDPをモニターした。³¹P NMRスペクトルを積分し、[(Pde / Pme) + 1] (式中、Pdeは鎖基内のホスホジエステルのモル濃度であり、Pmeはホスホモノエステル末端基のモル濃度である)として表すことによってavDP値を算出した。³¹P NMRアッセイによって収集されたより正確な安定性評価を確認するために、HPLCプロファイルも半定量的に評価した。

【0294】

MenA多糖およびMenX多糖の分解機構

穏やかな酸加水分解によって生成したMenAオリゴ糖に関するNMR ¹H - ³¹P H MBCデータが図13(a)に報告されている。マンノサミン残基のC₃およびC₄にO-アセチル基が存在することに起因して、いくつかのスピニシステムが検出され、割り当てられた: (i) 3-O-アセチル化残基または4-O-アセチル化残基のC₁におけるプロトン(H₁-P_{de})³/4OAc; (ii) 脱O-アセチル化残基のC₁におけるプロトン(H₁-P_{de})^{deOAc}; (iii) O-アセチル基のC₃およびC₄ジエミナルにおけるプロトン(H₃/H₄-P_{de})³/4OAc; (iv) 3-O-アセチル化残基のC₂におけるプロトン(H₂-P_{de})^{3OAc}; (v) 4-O-アセチル化残基のC₂におけるプロトン(H₂-P_{de})^{4OAc}; (vi) 脱O-アセチル化残基のC₂におけるプロトン(H₂-P_{de})^{deOAc}; (vii) 3-O-アセチル化残基または4-O-アセチル化残基のC₅およびC₆におけるプロトン(H₅/6-P_{de})³/4OAc; (viii) 脱O-アセチル化残基のC₃、C₄、C₅およびC₆におけるプロトン(H₃/4/5/6-P_{de})^{deOAc}。ホスホモノエステルと、3-O-アセチル化残基または4-O-アセチル化残基のC₆におけるプロトンとのクロスピーカー(H₆-P_{me})³/4OAc、および脱O-アセチル化残基のC₆におけるプロトンとのクロスピーカー(H₆-P_{me})^{deOAc}によって確認されたC₆におけるリン酸の結合により、加水分解の間にホスホジエステル結合が切断され、それにより非還元末端に結合したリン酸基が離れることが示され、これは、リン酸-C₁連結の安定性が低いことと一致する。他の¹H - ³¹Pスカラーリングが検出されなかったので、加水分解の間にC₄またはC₃における遊離のヒドロキシル基が関与するリン酸の移動は起こらなかった。MenXオリゴ糖に関する¹H - ³¹P H MBC(図13(b))によっても、リン酸-C₁連結の安定性が低いことが示され、この場合、非還元末端はC₄に結合したリン酸基を有する: リン酸モノエステルはC₄のプロトンとのみ相互関係を示す。MenXについても、加水分解の間にC₃またはC₆における遊離のヒドロキシル基が関与するリン酸の移動は起こらなかった。³¹Pスピンシステムの全てが割り当てられ、ホスホジエステルシグナルおよびホスホモノエステルシグナルはそれぞれ-1.40 ppmおよび4.65 ppmであった。このスカラーカップリングに起因してピーク構造を減少させる³¹P - デカップリングスペクトルを収集することによってもプロトンNMRプロファイルを割り当てた。スペクトルの割り当ては全て、主に¹³C NMR分析に基づく、公開されている結果(参考文献30)と一致した。MenX莢膜多糖の¹³C NMR化学シフトは、以下の表1に示されている通り、公開されているデータ(参考文献14)と一致した:

【表1】

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	CH ₃ ^{Nac}	CO ^{Nac}
化学シフト (ppm)	95.2	54.8	71.1	75.1	73.2	61.3	23.2	175.6

表1: MenX莢膜多糖の¹³C NMR化学シフト。

【0295】

MenA多糖およびMenX多糖の熱安定性。ホスホジエステル結合における加水分解

10

20

30

40

50

の結果としてMenA 荚膜多糖およびMenX 荚膜多糖が分解されることにより、新しく形成されたホスホモノエステル末端基が露出した、avDPが低い断片が生じる。NMR実験では、これらのホスホモノエステル(phosphomonester)基により、内部のホスホジエステル基によって生じるものよりも高磁場で³¹P共鳴シグナルが生成され、したがって、上の安定性実験において記載されている通りavDPを算出することが可能になる。貯蔵の間のavDPの変動は多糖安定性の指標であり、したがって、MenA 荚膜多糖およびMenX 荚膜多糖の試料のavDPを37および45に曝露している間の種々の時点において取得し、³¹P NMRによって測定した(表2および図14(a)):

【表2】

温度(°C)	時間(日数)	MenA PS			MenX PS	
		pH	avDP	OAc(mol/mol)	pH	avDP
37	0	6.97	>100	0.932	6.96	>100
	7	6.91	88.1	0.916	6.91	>100
	14	6.91	68.2	0.916	6.89	>100
	21	7.00	46.1	0.897	6.93	>100
	28	6.96	22.9	0.883	6.91	>100
45	0	6.97	>100	0.932	6.96	>100
	7	6.95	22.4	0.891	6.94	>100
	10	6.93	15.1	0.886	6.86	>100
	14	6.91	10.5	0.851	6.85	>100
	21	6.90	5.1	0.826	6.87	>100

表2: 37および45の温度で種々の時点においてMenA試料およびMenX試料について³¹P NMR分析によって推定されたavDPおよび検出されたpH値。反復単位のmol当たりのO-アセチル基のmolとして表したMenA 荚膜多糖のO-アセチル化の状態も報告されている。

【0296】

使用した試料濃度において、この技法の感度では、どちらの多糖についても、avDPが100を超える場合にはゼロ時間においてavDPを測定することが可能にならなかつた。各時点の試料について、pHを7.0±0.1の範囲内に維持した(図14(b))。

【0297】

37では、28日間インキュベートした後にMenA 荚膜多糖がavDP 22.9まで分解されたが、45では、分解は加速され、21日後にavDPが5.1になった。同じ条件下でMenX 荚膜多糖では分解が示されなかつた(どちらのインキュベーション温度でも全ての時点でavDP > 100; アッセイ感度に基づく、100は検出可能な最大avDP値である)。37で、および45でインキュベートしたMenA 荚膜多糖のHPLCプロファイル(図15)では、次第に短いオリゴ糖の強度ピークの増加が示され、これにより、鎖の解重合が示された。比較して、全てのMenX試料に関して収集されたHPLCプロファイルは、およそ87分における長鎖多糖に起因して実際に改変されていないままであり、広範なピークを伴い、これにより、この炭水化物の安定性が高いことがさらに実証される。¹H NMR分析により、MenA 荚膜多糖およびMenX 荚膜多糖を37で、および45でインキュベートすることにより、多糖反復単位の構造は変更されないことが確認された。O-アセチル化レベル(O-アセチル基はMenA 荚膜

10

20

30

40

50

多糖にのみ存在する)の、反復単位 1 mol当たり 0.932 mol から、37 では 0.883 mol まで、45 では 0.826 mol までの限られた減少のみがそれぞれ観察された(表2および図14(c))。総合すると、これらのNMRおよびHPLCのデータにより、水溶液中のMenX 荚膜多糖の安定性がMenA 荚膜多糖と比較して高いことが確認される。

【0298】

安定性試験(2)

材料：上記の方法A、BおよびCに従ってMenX-CRM197コンジュゲートを調製した。

方法Aに従って調製したコンジュゲートは平均重合度が100である多糖を含有した。
このコンジュゲートロットの他の特性が下に示されている：

【化28】

MenX (μ g/mL)	CRM197 (μ g/mL)	MenX/CRM197 (w/w)	MenX/CRM197 (mol/mol)	遊離糖 (%)
477.3	1378	0.35	0.7	<2.3

【0299】

方法Bに従って調製したコンジュゲートは以下の特性を有した：

【化29】

MenX (μ g)	CRM197 (mg)	MenX/CRM197 (w/w)	遊離糖 (%)
383	1.71	0.22	5.8

【0300】

方法Cに従って調製したコンジュゲートは平均重合度が19である多糖を含有した。このコンジュゲートロットの他の特性が下に示されている：

【化30】

MenX (μ g/mL)	CRM197 (μ g/mL)	MenX/CRM197 (w/w)	MenX/CRM197 (mol/mol)	遊離糖 (%)
129.6	628.7	0.21	2.1	<6

【0301】

これらのコンジュゲートの安定性に関する予備情報をもたらすために加速安定性試験を実施した。安定性試験を37で28日間実施し、測定時点は7日毎であった(0日目、7日目、14日目、21日目、28日目)。コンジュゲートから放出される遊離糖を測定することによって試料をモニターした。遊離糖の分離を、溶出緩衝液としてACN10~20%+TFA 0.05%を使用し、SPE-C4カートリッジによって実施した。全糖および遊離糖をHPLC-PAD分析によって定量化し、%遊離糖の算出を可能にした。コンジュゲートの3つのロットについての値が下に示されている：

10

20

30

40

【化31】

時間(日数)	%遊離糖		
	方法Aコンジュゲート	方法Bコンジュゲート	方法Cコンジュゲート
0	<2.3	5.8	<2.1
7	4.2	29.9	24.9
14	6.2	51.2	31.5
21	8.7	48.7	34.8
28	10.0	56.1	42.8

10

【0302】

方法Aを使用して作製したコンジュゲートは、方法Bおよび方法Cによって作製したコンジュゲートよりも安定であった。

【0303】

分析試験

材料：MenX多糖をNeisseria meningitidis X5967株(ST750)の細菌成長によって産生させ、参考文献235から適合させた方法によって精製した。多糖調製物の純度を、比色定量アッセイを使用して残留するタンパク質および核酸の含量を推定することによって評価し(どちらも糖の<1%w/wで存在していた)、内毒素含量を、LALアッセイを使用して評価した(糖1μg当たり<10EU)。酢酸ナトリウム塩(Thermo Scientific Dionex)、水酸化ナトリウム50%溶液(J.T.Baker)、トリフルオロ酢酸(Sigma)、Water MilliQ grade(Millipore)はプロアナリシス(pro analysis)品質のものであった。

20

【0304】

一般的な方法：総リン含量を参考文献24の方法に従って測定した。

【0305】

シリカゲル60F254(Sigma Aldrich)の薄層クロマトグラフィー(TLC)によって反応をモニターし、UV光の下で試験した後、化合物を10%(v/v)エタノール性H₂SO₄と一緒に加熱することによって可視化した。予め充填されたシリカカートリッジRediSep(Teledyne-Isco, 0.040~0.063nm)を使用してカラムクロマトグラフィーを実施した。別段の指定がない限り、Combiflash Rf(Teledyne-Isco)計器において溶出混合物の0~100%の勾配を適用した。

30

【0306】

¹H NMR実験、¹³C NMR実験および³¹P NMR実験を、高精度温度制御器を備えたBruker Avance III 400MHz分光計で、5mm広帯域プローブ(Bruker)を使用して記録した。データの取得および処理のために、TopSpinバージョン2.6ソフトウェア(Bruker)を使用した。

40

【0307】

¹H NMRスペクトルを、25±0.1で、10ppmスペクトル幅にわたって32kデータポイントを用いて収集した。スペクトルを0.2Hz線幅拡大で重み付けし、フーリエ変換した。化学シフト値は内部Me₄Siシグナル(0.00ppm、CDCl₃)または溶媒シグナル(4.79ppm、D₂O)と比較してppmで報告された。¹³C NMRスペクトルを、100.6MHzおよび37±0.1で、200ppmスペクトル幅にわたって32kデータポイントを用いて記録した。スペクトルを0.2Hz線幅拡大で重み付けし、フーリエ変換した。化学シフト値はCDCl₃のシグナル(77.0ppm、CDCl₃)と比較してppmで報告された。

50

【0308】

³¹P NMRスペクトルを、161.9 MHz、25±0.1で、20 ppmスペクトル幅にわたって32kデータポイントを用いて記録した。スペクトルを3.0 Hz線幅拡大で重み付けし、フーリエ変換した。酸化重水素中85%リン酸を外部標準として使用した(0 ppm)。

【0309】

正確な質量を、Q-Tof micro Macromass (Waters) 計器を使用してエレクトロニスプレーイオン化カットオフ分光法により測定した。旋光度をP-2000 Jasco 旋光度計で測定した。ベンジル3,6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド--D-グルコピラノシド3。出発材料2(参考文献236)(1.8 g、3.1 mmol)を窒素下でアセトニトリル(200 ml)中に溶解させ、トリメチルアミンボラン(1.4 g、18.4 mmol)およびBF₃·Et₂O(2.6 ml、18.4 mmol)を用いて0で処理した。0で1時間攪拌した後、混合物を外界温度まで到達させ、その時点での反応を完了した(TLC、7:3シクロヘキサン-EtOAc)。MeOH(3 ml)およびトリエチルアミン(3 ml)を加え、混合物を濃縮した。水性NaHCO₃を用いて残留物を分配し、合わせた有機層を濃縮し、シリカゲル(シクロヘキサン-EtOAc)で精製して1.5 gの生成物3(83%)がもたらされた。[]_D²⁴=+1.9(c 0.5, CHCl₃)。¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz): δ=7.80-6.95(m, 19 H, Ph), 5.15(d, 1 H, J_{1,2} 8.0 Hz, H-1), 4.78, 4.47(2 d, 2 H, ²J 12.2 Hz, CH₂Ph), 4.72, 4.51(2 d, 2 H, ²J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.67, 4.59(2 d, 2 H, ²J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.26-4.18(m, 2 H, H-2, 3), 3.87-3.88(m, 3 H, H-4, 6), 3.66-3.62(m, 1 H, H-5), 2.89(d, 1 H, J_{2,OH} 2.3 Hz, OH-4). ¹³C NMR(CDCl₃, 100 MHz): δ=167.81(CO), 138.15, 137.59, 137.10, 133.67, 131.61, 128.12, 127.91, 127.86, 127.81, 127.58, 127.40(Ar), 97.35(C-1), 78.49(C-3), 74.37, 74.24(CH₂Ph), 73.78(C-5), 73.45(C-4), 70.80(CH₂Ph), 70.69(C-6), 55.37(C-2)。ESI HR-MS(C₃₅H₃₃NO₇): m/z=([M+Na]⁺実測値597.2547; 計算値597.2601): ([M+Na]⁺実測値618.1895; 計算値618.1894)。

【0310】

ベンジル2-アセトアミド-3,6-ジ-O-ベンジル-2-デオキシ--D-グルコピラノシド4。エチレンジアミン1.2 mlを含有するEtOH(20 ml)中N-フタルイミド化合物3(1 g、1.7 mmol)の混合物を一晩還流させた。TLC(トルエン-EtOAc 4:1)により反応の完了が示された後、混合物を濃縮し、4:1のEtOH-Ac₂O(25 ml)中に再溶解させた。混合物を3時間攪拌し、次いで濃縮した。残留物(シクロヘキサン-EtOAc)のクロマトグラフィーにより、740 mgの単糖4がもたらされ、そのNMRデータは文献[237]において最近報告されたものと同一であった。

【0311】

ベンジル2-アセトアミド-3,6-ジ-O-ベンジル-4-(1,5-ジヒドロ-3-オキソ-3⁵-3H-2,4,3-ベンゾジオキサホスフェピン-3-イル)--D-グルコピラノシド5。N,N-ジエチル-1,5-ジヒドロ-3H-2,3,4-ベンゾジオキサホスフェピン-3-アミン(717 mg、3 mmol)をCH₂Cl₂(9 ml)中単糖(500 mg、1 mmol)の溶液、およびアセトニトリル(9 ml)中0

10

20

30

40

50

.45Mの1H - テトラゾールに0で加えた。10分後に氷冷槽を除去し、攪拌を継続した。さらに3時間攪拌した後、反応を完了させた(TLC、1:1トルエン-EtOAc)。混合物を-20に冷却し、m-CPBAを加えた。20分後、いくらかの水性NaHCO₃を加えてクエンチした。混合物をCH₂Cl₂で希釈し、水性NaHCO₃を用いて分液漏斗中で抽出した。合わせた有機層を濃縮し、残留物をシリカゲル(シクロヘキサン-EtOAc)で精製して630mgの生成物(92%)がもたらされた。EtOAcからの白色結晶、m.p. 159~160。 δ [D]²⁴ = +34.7(c 0.1、CHCl₃)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.41-7.12 (m, 18 H, Ph), 5.90 (d, 1 H, J_{1,2} 7.6 Hz, H-1), 5.17-5.12 (m, 2 H, 2 CHPh), 5.00-4.78 (m, 4 H, 4 CHPh), 4.65-4.58 (m, 5 H, 4 CHPh, H-4), 4.32 (t, 1 H, J 9.0 Hz, H-3), 3.89 (d, 1 H, J_{6a} 5.9 Hz, H-6a), 3.76-3.69 (m, 2 H, H-5, 6b), 3.46-3.42 (m, 1 H, H-2), 1.80 (s, 3 H, CH₃C O)。¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 170.61 (C=O), 138.26, 137.36, 134.98, 128.94, 128.35, 127.95, 127.98, 127.80, 127.71, 127.57, 127.50 (Ar), 98.85 (C-1), 78.71 (C-3), 76.72 (C-4), 73.97 (C-5), 73.76, 73.42, 70.09 (CH₂Ph), 69.04 (C-6), 68.30, 60.25 (CH₂Ph), 56.95 (C-2), 23.40 (CH₃CO)。³¹P NMR (CDCl₃, 162 MHz): δ = 0.32. ESI HR-MS (C₃₇H₄₀NO₉P): m/z = ([M+H]⁺ 実測値 674.2476; 計算値 674.2519)。

【0312】

2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコピラノシリリン酸6。保護された単糖5(100mg、0.15mmol)をMeOH(10ml)中に溶解させ、10%Pd/C(30mg)で水素化した。混合物を1日攪拌し、次いで、セライトパッドを通して濾過した。溶媒を蒸発させ、回収した粗製材料をC-18 Isolute SPEカラムトリッジで精製した。糖を含有する画分をフリーズドライして42mgの発泡性生成物6(95%)がもたらされ、そのNMRデータは、文献[238]において報告されているものと一致した。

【0313】

MenXを定量化するための、パルス電流滴定検出を伴う高速陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD): MenX試料を、最終濃度2MのTFAで処理して、総体積600μLの、0.5~8μg/mLの範囲まで希釈した。試料を閉じたねじ口試験管中100で2.5時間加熱し、次いで2~8で約30分冷やし、2MのNaOH 700μLを添加し、0.45μmのAcrodisc(PALL)フィルターで濾過した後に分析した。比色定量方法によって総リン含量について滴定したMenX PSの純粋な調製物または合成単量体4-GlcNAc-4Pを、0.5~8μg/mLの範囲の標準物質を用いて設定する較正曲線を確立するために使用した。HPAEC-PADを、PA1ガードカラム(4×50mm; Dionex)と連結したCarboPac PA1カラム(4×250mm; Dionex)を備えたDionex ICS3000を用いて実施した。試料を、10分、100mMのNaOH中100mMから500mMまでのAcONaの勾配を使用し、1mL/分の流速で流した。電気化学的検出器をパルス電流滴定モードで使用し、金作用電極およびAg/AgCl参照電極を用いて流出液をモニターした。炭水化物に対して四重電位波形を適用した。得られたクロマトグラフィーデータを、Chromelionソフトウェア6.8を使用して処理した。

【0314】

10

30

40

50

MenX多糖およびGlcNAc-4Pの酸加水分解ならびにNMRによる特徴付け：MenX多糖および合成単量体(10mg)に対して大規模酸加水分解を行った。どちらの試料も2MのTFA 2mLに溶解させ、100で2.5時間にわたって加水分解した。試料を乾燥させ、D₂Oで3回交換した後に分析した。

加水分解条件の選択：MenX加水分解により単量体サブユニットを完全に放出させ、それらの分解を最小限にすることを可能にするための最適な条件を同定するために、2MのTFA中、100で加水分解を実施する、MenX多糖の加水分解のための種々の反応時間(1~6時間)を調査した。比色定量方法によって総リン含量について滴定したMenX多糖の純粋な調製物を2つの異なる濃度(0.5μg/mLおよび2μg/mL)で使用した。HPLC-PAD分析によって優勢なピークが1つ検出された。ピークの面積は経時的に増加し、2時間と3時間の間で最大になり、続いて、長い時間で減少した。最終的に2.5時間を加水分解に最適な時間として選択した。
10

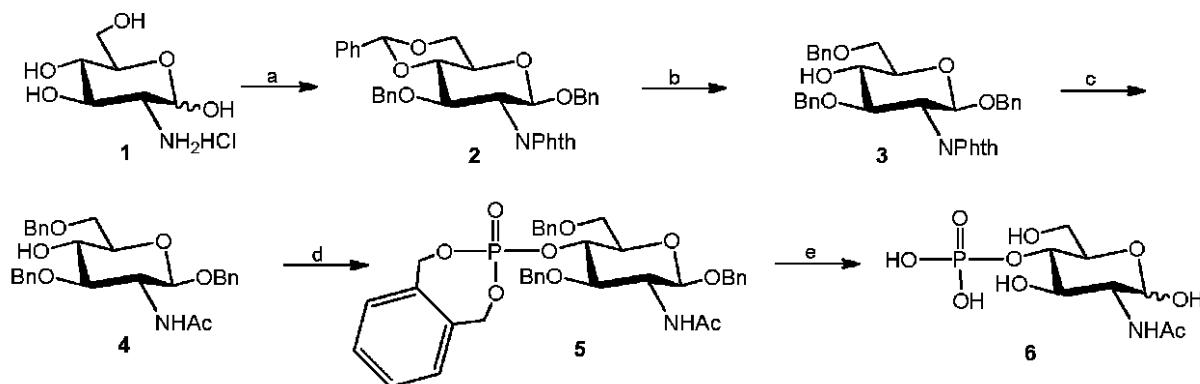
【0315】

当該方法の直線性を0.5~8μg/mLの範囲で検証した($R^2 = 99.807$)。当該方法は発酵プロセスを含めた精製プロセス中間体に首尾よく適用され、また、当該方法の正確度を決定するために回収試験を行った。既知量の多糖を標準試料に加え、それを分析に供した。スパイクした試料について決定された総濃度とスパイクしていない試料において見いだされた濃度の間の差異に基づいて回収率を算出した。平均回収率は98~102%にわたり、これは、正確度が高いことを示している。同じ試料を4回分析することによって、1%のCVおよび対応する0.5%の平均CVを有する分析間の再現性が達成された。
20

【0316】

4P-GlcNAcの合成：スキーム1に示されている通り、標的化合物6の合成を、参考文献236に記載されている通りガラクトサミン塩酸塩から調製した保護されたGlcN2の位置選択的開環から開始した(92%収率)。N-フタルイミド保護のエチレンジアミンによる除去、その後の選択的N-アセチル化により、既知の化合物4が87%の収率でもたらされた[237]。4とN,N-ジエチル-1,5-ジヒドロ-3H-2,3,4-ベンゾジオキサホスフェピン-3-アミンおよび1H-テトラゾールの反応、ならびにその後のm-クロロ過安息香酸(m-CPBA)を用いた酸化により、他の方法を用いて以前報告[238]されたものよりも有意に高い収率でリン酸基を導入することが可能になり、結晶性の常温保存可能な化合物5(m.p.159~160)がもたらされた。4.58ppmのH-4シグナルと関連する、³¹P NMRスペクトルにおける0.32ppmのホスホモノエステルピークおよび¹H-³¹P HMBC NMRスペクトルにおけるCHシステムの2つのカップリング(それぞれ5.13、4.98ppmおよび5.14、4.99ppm)により、5の構造を評価することが可能になった。10%Pd-Cでの最終的な水素化分解により、標的4P-GlcNAc6が、非保護リン酸が存在する場合に得られた50%の収率に対して優れた収率(95%)でもたらされた。最終生成物のNMRデータは、文献[239]において報告されたものとよく一致した。
30

【化32】



10

20

30

40

50

【0317】

スキーム1. a. 参考文献236; b. トリメチルアミンボラン、BF₃・Et₂O、CH₃CN、0℃、83%; c. H₂NCH₂CH₂NH₂、EtOH、還流; Ac₂O、ピリジン、87% (2段階を経て); d. N,N-ジエチル-1,5-ジヒドロ-3H-2,3,4-ベンゾジオキサホスフェピン-3-アミン、1H-テトラゾール、CH₂C_l₂; m-CPBA、CH₂Cl₂、H₂O, 92%; e. H₂、10% Pd-C、95%。

【0318】

MenX多糖または4P-GlcNAcの酸加水分解によって形成された生成物のNMRによる特徴付け: MenX多糖および合成単量体6を、HPAEC-PAD分析について最適化された手順に従って、より大きな規模で加水分解して、生じた種の構造をNMR分析によって確認した。どちらの場合も、4P-GlcNHを優勢な種として評価した。

【0319】

4P-GlcNAc 6の¹H NMRスペクトルにより、それぞれ5.19 ppmおよび4.72 ppmにおける/アノマーピーク、ならびに4.00~3.69 ppmの範囲にプロトンシグナルが示された。等核COSY NMR相関により、H-2およびH-2が3.91 ppmシグナルおよび3.72 ppmシグナルに割り当てられた。0.58 ppmにおけるリン酸モノエステルについての1つの単一ピークが³¹P NMRで検出された。

【0320】

標準物質6およびネイティブなMenX PSの両方を加水分解した後、得られた4P-GlcNの¹H NMR分析により、5.40 ppmおよび4.92 ppmにおいて、それぞれ比が5.5:4.5および6.7:3.3の/混合物に対応する2つの主要なアノマーシグナルが示された。残りの環プロトンシグナルは4.08 ppmから3.44 ppmの間にあり、一方、H-2(3.91 ppmにおいてdd, J3.7および10.3 Hz)およびH-2(3.06 ppmにおいてdd, J8.5および10.5 Hz)は、アセチル基がないことに起因して高磁場にシフトした。さらに、N-アセチルCH₃シグナルは検出されず、これは、加水分解によって完全な脱N-アセチル化がもたらされたことを示していた。

【0321】

2次元の¹H-³¹P HMBC NMRにより、³¹P NMRスペクトルの0.68 ppmおよび0.14 ppmにおけるリン酸モノエステルシグナルに割り当られる2つの重複するクロスピークが¹H NMRでのそれぞれ3.94 ppmおよび3.96 ppmにおけるH-4およびH-4と相關することが証明された。

【0322】

HPAEC-PADによるMenX定量化的標準物質としての4P-GlcNAcの使用: 合成単量体6を、比色定量方法によって総リン含量について定量化し、次いで、ネイ

ティプな Men X 多糖と比較して較正曲線（0.5～8 μg / mL の範囲）を確立するために使用した。合成単量体およびネイティブな多糖を、Men X 多糖試料について最適化した同じ加水分解条件に供した後、H P A E C - P A D によって同じピークが検出され、得られた曲線は完全に重複した。未知の試料および多糖精製プロセスの中間体の濃度は、定量化のために使用した曲線とは独立して一致していた（糖濃度値の差異は、試験した試料全てについて<2%であった）。また、加水分解した Men X 多糖と合成単量体の混合物を、CarboPac PA1カラムでの H P A E C - P A D によって 10 mM の水酸化ナトリウムを用いて溶出して分析して、使用した加水分解条件における G l c N の最終的な形成を検証した [26]。G l c N の形成はネイティブな Men X 試料および合成単量体試料のどちらについてもモルで 5% 未満であった。

10

【0323】

本発明者らは、市販のグルコサミン-6-リン酸（6 P - G l c N）を分析の標準物質として使用する可能性についても、Men X に対して最適化されたものと同じ加水分解条件を使用して検証した。生じた較正曲線はネイティブな Men X を用いて得られたものおよびその合成単量体を用いて得られたものとで重複したが、H P A E C - P A D によって検出された、生じたピークの溶出時間は異なり（Men X の 9.88 分に対して 8.97 分）、これは、4 P - G l c N A c の利用がより簡単であることを実証した。

20

【0324】

Men X 多糖定量化のためのこの方法は、精製プロセス中間体および最終のコンジュゲートワクチンの糖含量をモニターするための極めて重要な分析ツールである。定量化により、プロセス収率の算出が可能になることに加えて、どちらも最終のワクチン製剤の品質および一貫性を検証するための重要なパラメータである、コンジュゲートの糖 / タンパク質比および遊離糖の % の算出が可能になる。

30

【0325】

合成単量体を使用することは、分析のために多糖のバッチを標準化する必要性がないことを意味する。全体的な方法は迅速なものであり、最低限の試料の浄化で非常に低い濃度の糖（0.5 μg / mL の多糖）を検出することが可能であり、発酵プロセスを含めた精製プロセス中間体の特徴付けのために良好に機能することが検証されている。当該方法は、コンジュゲーションプロセスの中間体を定量化するため、および最終のワクチン製剤を特徴付けるために適し得る。

【0326】

本発明は、単に例として記載されており、本発明の範囲および主旨の範囲内で改変を行うことができる事が理解されよう。

（参考文献）

【数1】

- [1] Armand *et al.* (1982) *J. Biol. Stand.* 10:335-339.
- [2] Cadoz *et al.* (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [3] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [4] Baklaic *et al.* (1983) *Infect. Immun.* 42:599-604.
- [5] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [6] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-8.
- [7] Lieberman *et al.* (1996) *JAMA* 275:1499-503.
- [8] WO2005/000345.
- [9] WO02/058737.
- [10] WO03/007985. 10
- [11] Rennels *et al.* (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21:978-979.
- [12] WO2004/013400.
- [13] Campbell *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1848-1851.
- [14] Bundle *et al.* (1974) *J Biol Chem.* 249(15):4797-801.
- [15] Delrieu *et al.* (2011) *PLoS One.* 6(5):e19513. Epub 2011 May 20.
- [16] Chen *et al.* (2008) *Chin Med J (Engl.)* 121(7):664-6.
- [17] Gagneux *et al.* (2002) *Emerg Infect Dis.* 8(5):462-6.
- [18] WO 2008/102173
- [19] Bundle *et al.* (1974) *J Biol Chem* 249:2275-81.
- [20] Tiesjema *et al.* (1977) *Bull World Health Organ* 55:3578-48. 20
- [21] Teodorović P. *Synthesis of oligosaccharides related to the capsular polysaccharide of Neisseria meningitidis serotype A.* Doctoral Thesis - Stockholm University 2005.
- [22] Zon *et al.* (1982) *Infect Immun* 1982;37:89-103.
- [23] Egan *et al.* (1982) *J Am Chem Soc* 104:2898-910.
- [24] Chen *et al.* (1956) *Anal. Chem.* 28:1756-1758.
- [25] Garrido *et al.* (2012) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70:295-300.
- [26] Xie *et al.* (2012) *Vaccine* 2012 (30) 5812–5582.
- [27] Frash (1990) p.123-145 of *Advances in Biotechnological Processes* vol. 13 (eds. Mizrahi & Van Wezel)
- [28] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [29] WO 2011/023764. 30
- [30] Lemercinier and Jones (1996) *Carbohydrate Res.* 296:83-96.
- [31] Jones and Lemercinier (2002) *J Pharm Biomed Anal.* 30(4):1233-47.
- [32] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [33] Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [34] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [35] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [36] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [37] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [38] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [39] European patent 0477508.
- [40] US patent 5,306,492. 40
- [41] WO98/42721.
- [42] Dick *et al.* in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [43] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [44] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)

【数2】

- [45] EP-A-0594610.
- [46] Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
- [47] WO00/56360.
- [48] EP-A-0372501.
- [49] EP-A-0378881.
- [50] EP-A-0427347.
- [51] WO93/17712
- [52] WO94/03208.
- [53] WO98/58668. 10
- [54] EP-A-0471177.
- [55] WO91/01146
- [56] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [57] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
- [58] WO02/091998.
- [59] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [60] Michon *et al.* (1998) *Vaccine*. 16:1732-41.
- [61] WO01/72337
- [62] WO00/61761.
- [63] WO2004/041157. 20
- [64] WO02/34771.
- [65] US patent application no. 61/556,456.
- [66] International patent application no. PCT/IB2012/056240.
- [67] Kato *et al.* (2003) *Carbohydr. Polym.* 51:69-75.
- [68] Angelin *et al.* (2006) *Eur. J. Org. Chem.*, 4323-4326.
- [69] US patent 4711779.
- [70] WO00/10599.
- [71] US patent 4,057,685.
- [72] WO96/40242.
- [73] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
- [74] WO00/38711; US patent 6,146,902. 30
- [75] WO99/42130.
- [76] WO2004/011027.
- [77] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [78] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- [79] Jedrzejas (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [80] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [81] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [82] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [83] Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [84] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [85] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238. 40
- [86] *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- [87] WO02/02606.
- [88] Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [89] Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [90] Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.

【数3】

- [91] WO99/27105.
- [92] WO00/27994.
- [93] WO00/37494.
- [94] WO99/28475.
- [95] Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [96] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [97] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [98] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- [99] MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16;47(1):12, 19. 10
- [100] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [101] WO02/34771.
- [102] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [103] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [104] WO03/093306.
- [105] WO2004/018646.
- [106] WO2004/041157.
- [107] Ichiman and Yoshida (1981) *J. Appl. Bacteriol.* 51:229.
- [108] US4197290
- [109] Ichiman *et al.* (1991) *J. Appl. Bacteriol.* 71:176. 20
- [110] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- [111] Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [112] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- [113] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- [114] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [115] Dubensky *et al.* (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- [116] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- [117] Donnelly *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- [118] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
- [119] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [120] WO00/56365. 30
- [121] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [122] WO03/009869.
- [123] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [124] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [125] WO00/53221.
- [126] Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [127] Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [128] Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [129] Ugozzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [130] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum. 40
- [131] WO00/23105.
- [132] WO90/14837.
- [133] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80.
- [134] Frey *et al.* (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- [135] US Patent 6,299,884.
- [136] US Patent 6,451,325.

【数4】

- [137] US patent 5,057,540.
- [138] WO96/33739.
- [139] EP-A-0109942.
- [140] WO96/11711.
- [141] WO00/07621.
- [142] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [143] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [144] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
- [145] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355. 10
- [146] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [147] Gerber *et al.* (2001) *Virology* 275:4752-4760.
- [148] WO03/024480
- [149] WO03/024481
- [150] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [151] EP-A-0689454.
- [152] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [153] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [154] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [155] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [156] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400. 20
- [157] WO02/26757.
- [158] WO99/62923.
- [159] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [160] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [161] WO98/40100.
- [162] US patent 6,207,646.
- [163] US patent 6,239,116.
- [164] US patent 6,429,199.
- [165] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [166] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068. 30
- [167] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [168] WO01/95935.
- [169] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [170] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [171] WO03/035836.
- [172] WO95/17211.
- [173] WO98/42375.
- [174] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [175] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [176] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [177] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313. 40
- [178] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [179] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [180] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [181] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [182] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.

【数5】

- [183] WO99/40936.
- [184] WO99/44636.
- [185] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [186] WO99/27960.
- [187] US patent 6,090,406
- [188] US patent 5,916,588
- [189] EP-A-0626169.
- [190] WO99/52549.
- [191] WO01/21207. 10
- [192] WO01/21152.
- [193] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [194] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [195] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [196] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [197] WO04/60308
- [198] WO04/64759.
- [199] WO99/11241.
- [200] WO94/00153.
- [201] WO98/57659.
- [202] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231. 20
- [203] Hoskins *et al.* (2001) *J.Bacteriol.* 183:5709-5717.
- [204] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol.* 31(12):3816-24.
- [205] Geysen *et al.* (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [206] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [207] Jameson, BA *et al.* 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- [208] Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- [209] De Lalla *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [210] Brusic *et al.* (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
- [211] Meister *et al.* (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
- [212] Roberts *et al.* (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
- [213] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7. 30
- [214] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
- [215] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- [216] Welling *et al.* (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- [217] Davenport *et al.* (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
- [218] WO2004/092209.
- [219] WO2008/061953.
- [220] WO2005/090985
- [221] Hardy *et al.* (1988) *Anal Biochem* 170:54-62.
- [222] Wang *et al.* (1990) *Anal Biochem* 190:182-187.
- [223] WO2005/114171.
- [224] T. W. Greene and P. G. M. Wuts in "Protective groups in organic chemistry" John Wiley and Sons, 4th Edition, 2006.
- [225] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [226] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [227] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

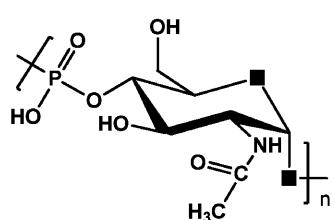
【数6】

- [228] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [229] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [230] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
- [231] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press)
- [232] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [233] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30
- [234] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [235] Micoli *et al.* (2012) *Vaccine* 30: 853–861.
- [236] Debenham *et al.* (1997) *J. Org. Chem.* 62:4591-4600.
- [237] Bera *et al.* (2011) *J. Org. Chem.* 76:3181–3193.
- [238] Bundle *et al.* (1974) *Can. J. Biochem.* 52(9):723–725.
- [239] Berti *et al.* (2012) *Vaccine* 30: 6409– 6415.

10

【図1】

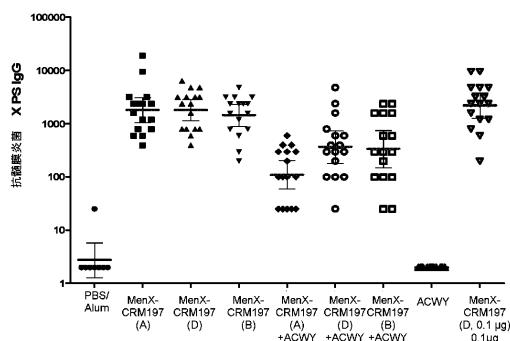
FIGURE 1



【図8】

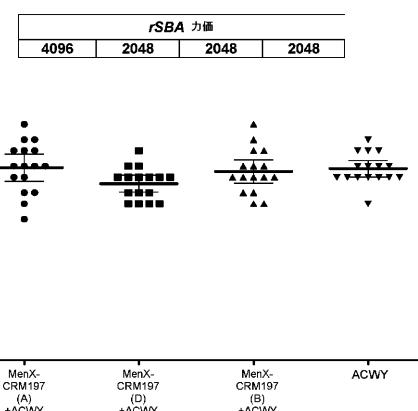
FIGURE 8

rSBA 力値	
<4	4096



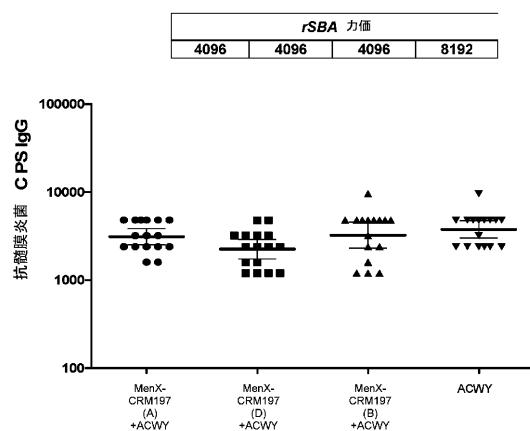
【図9】

FIGURE 9



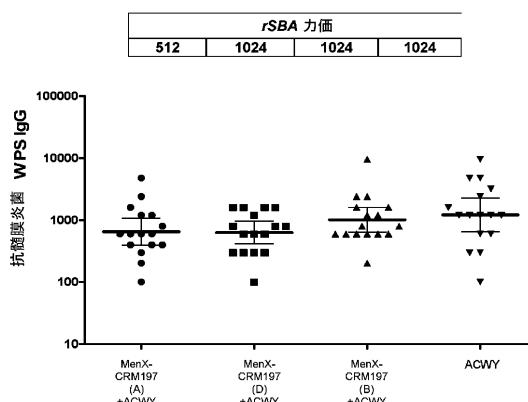
【図 10】

FIGURE 10



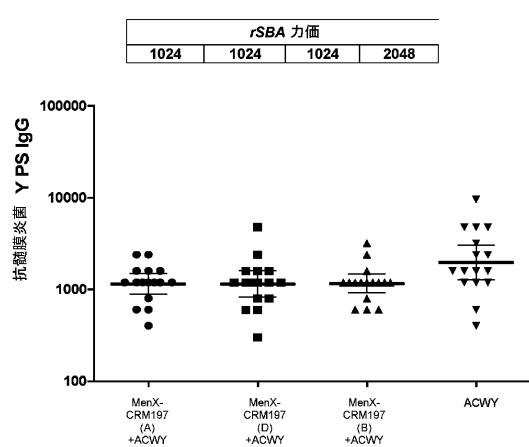
【図 11】

FIGURE 11

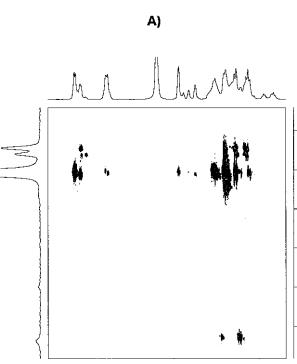


【図 12】

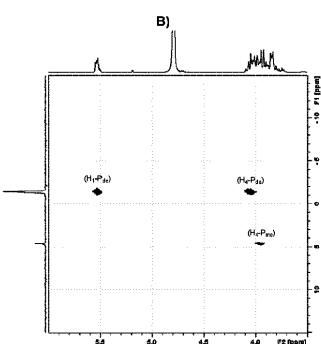
FIGURE 12



【図 13 A)】

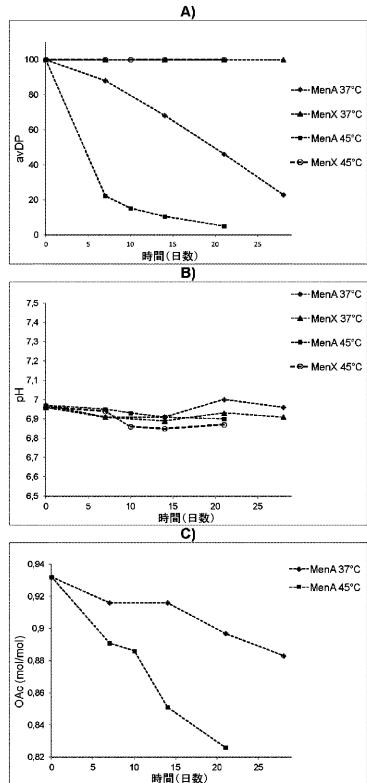


【図 13 B)】



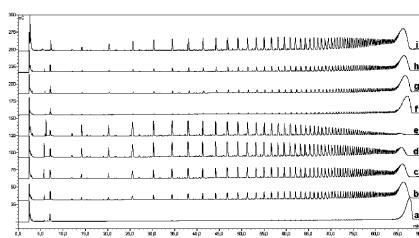
【図 14】

FIGURE 14



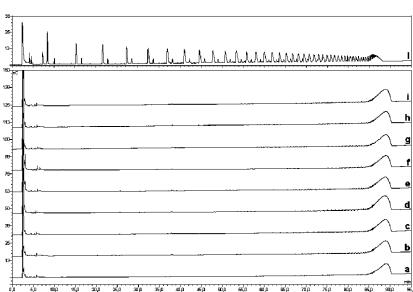
【図 15 A)】

A)

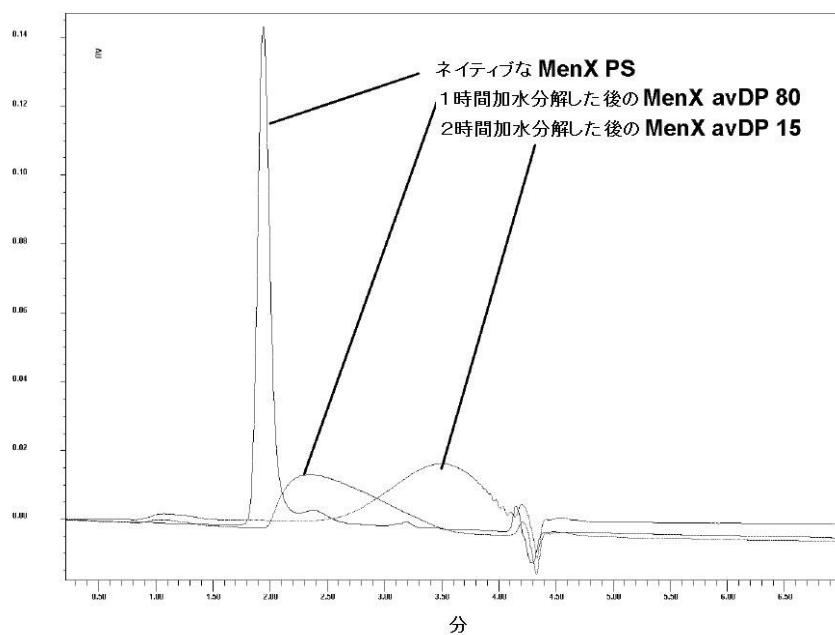


【図 15 B)】

B)

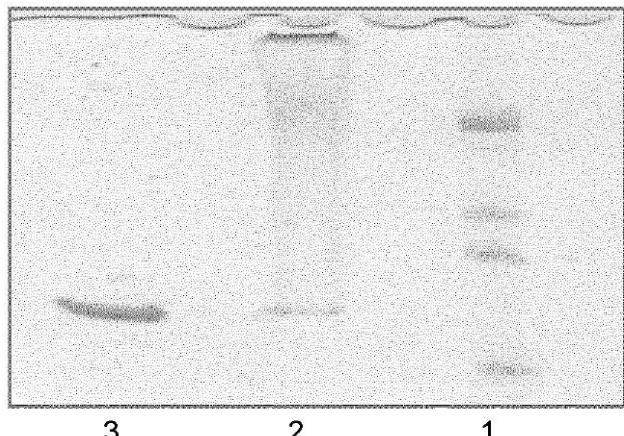
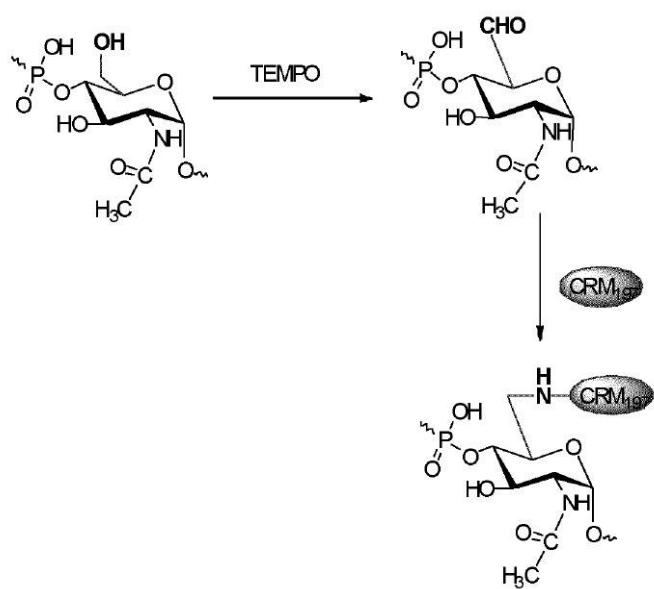


【図2】

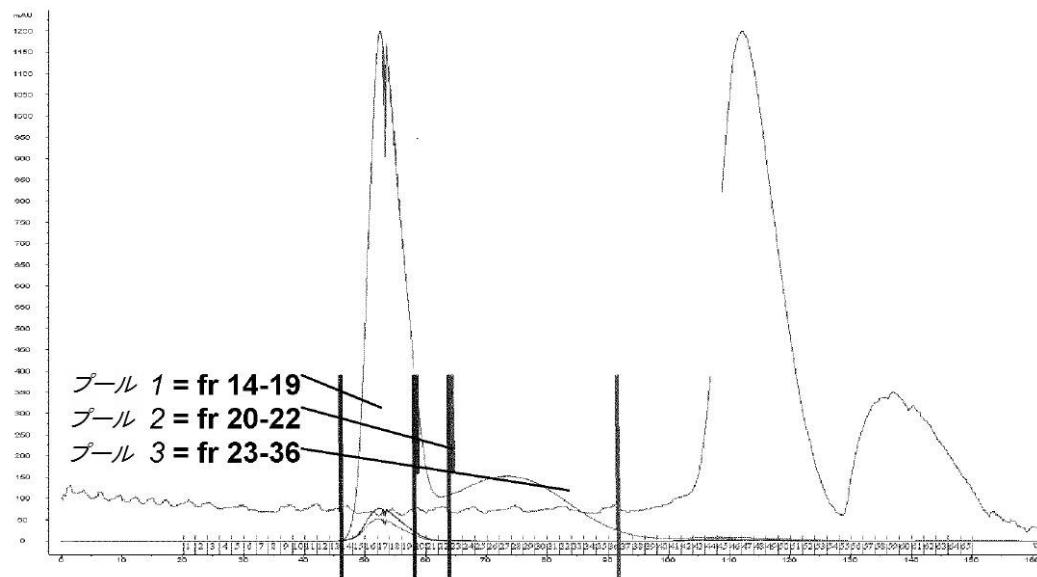
FIGURE 2

Acquity UPLC BEH200 1.7 μ m (4.6 x 150 mm), 214 nm 検出,
100mM NaCl 100mM NaPi 30% CH₃CN pH 7.2; Vtot 4.343 min

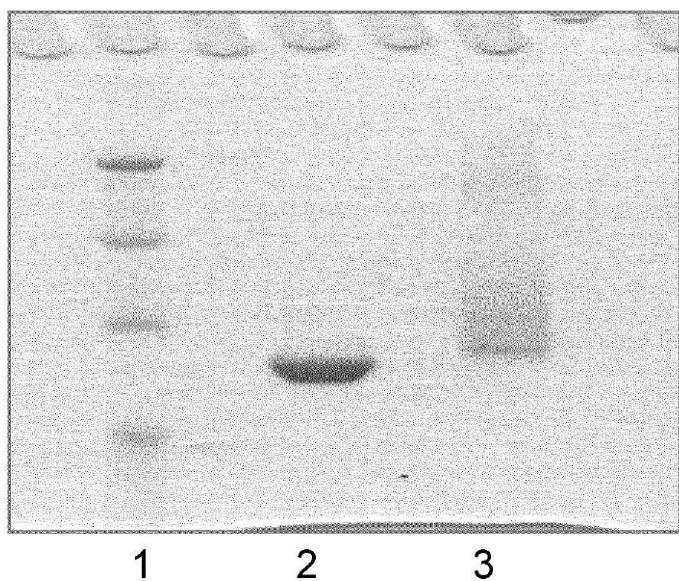
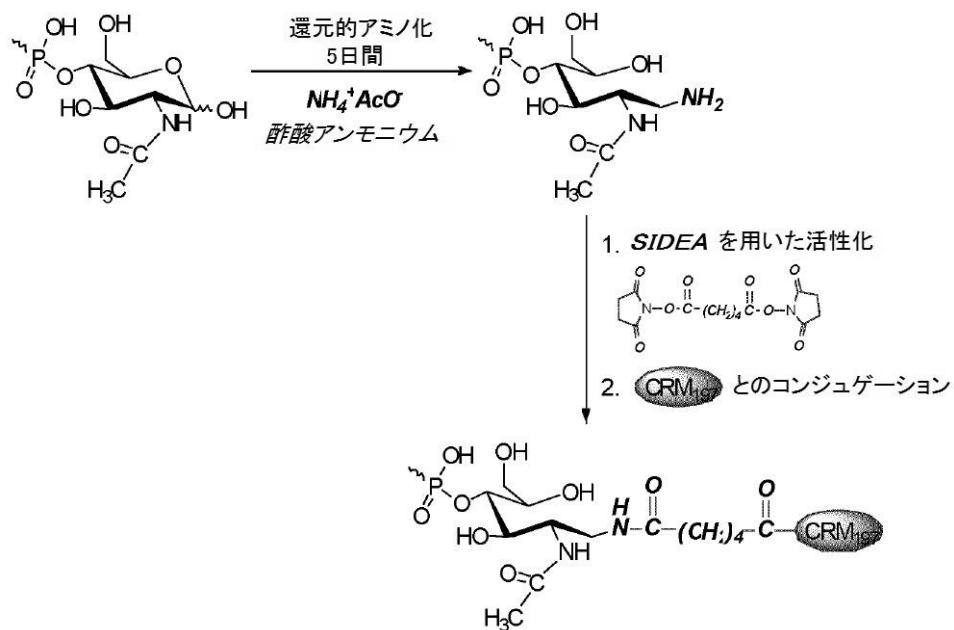
【図3】

FIGURE 3

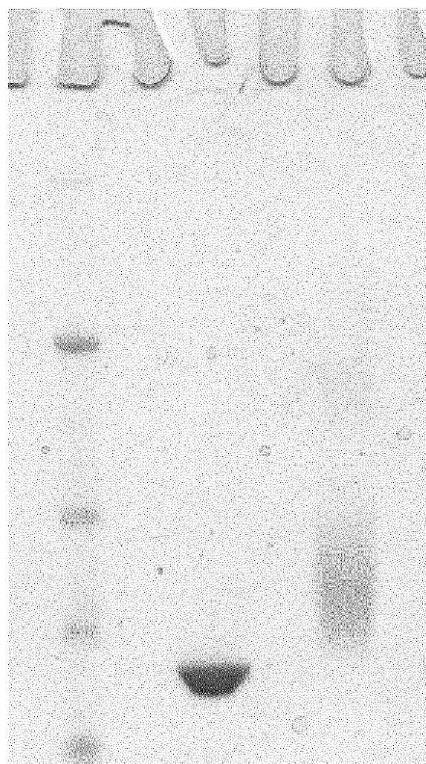
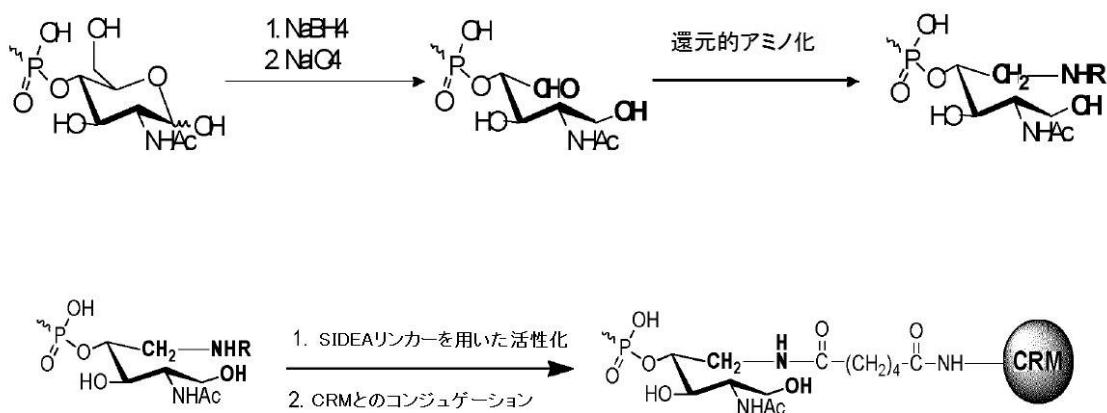
【図4】

FIGURE 4

【図 5】

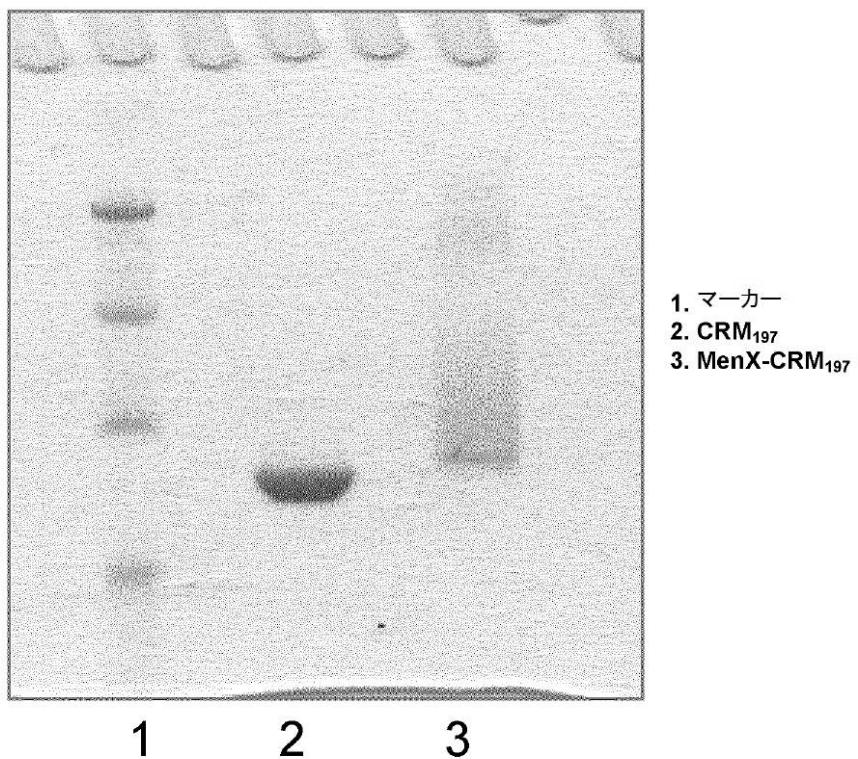
FIGURE 5

【図 6】

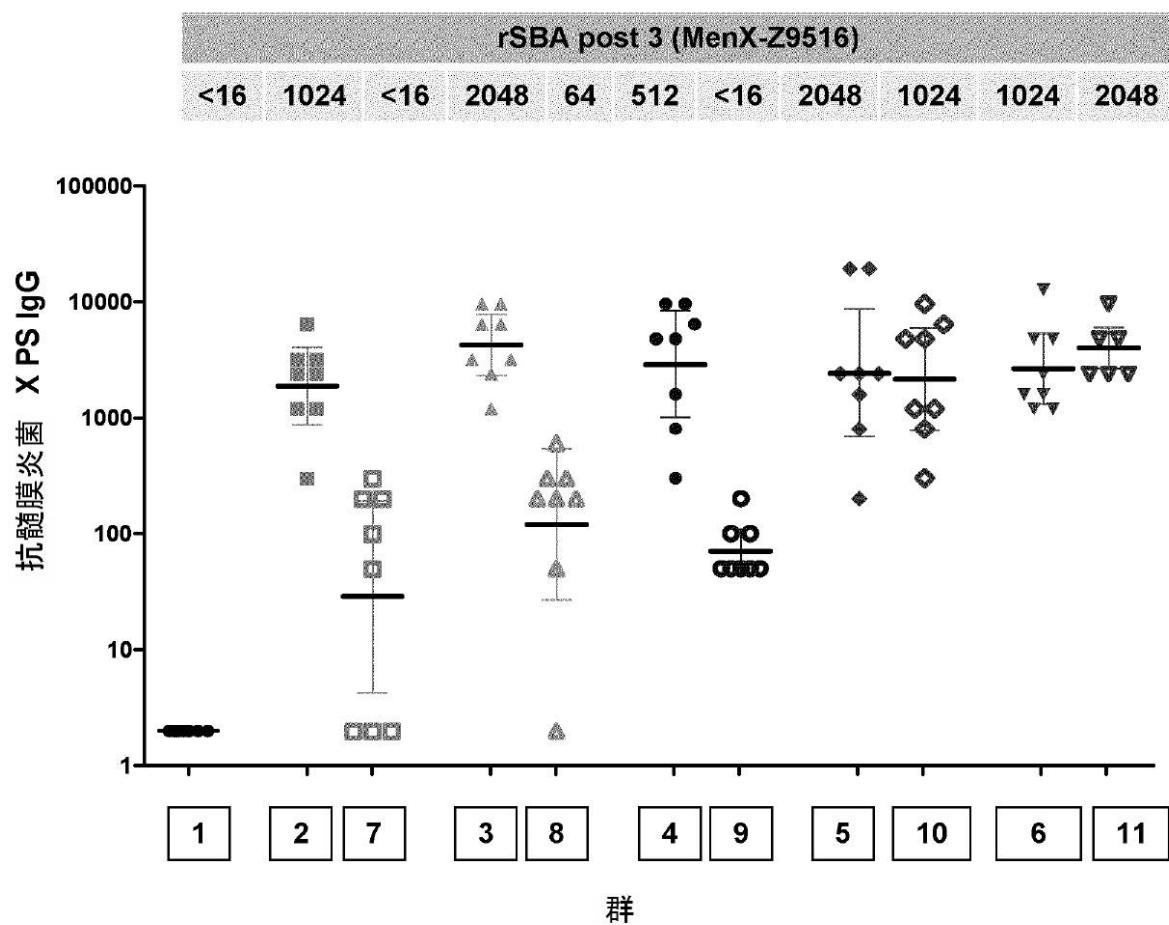
FIGURE 6**SDS-PAGE 7%TA**

- マーカー
- CRM_{197}
- MenX-CRM_{197}

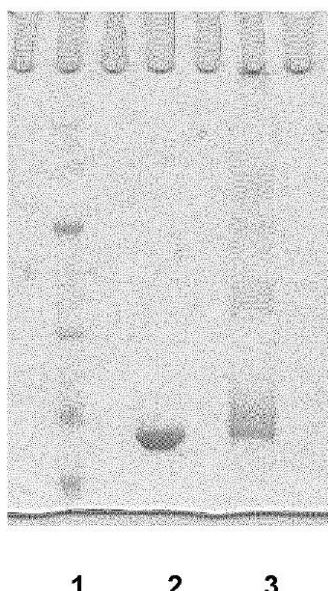
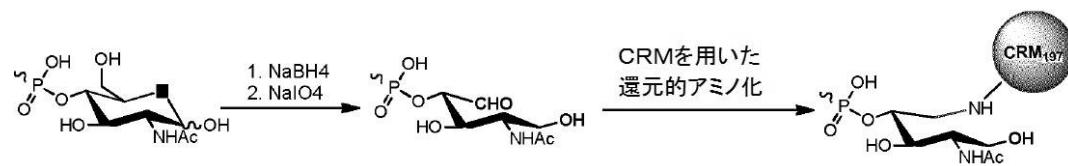
【図 7】

FIGURE 7

【図 16】

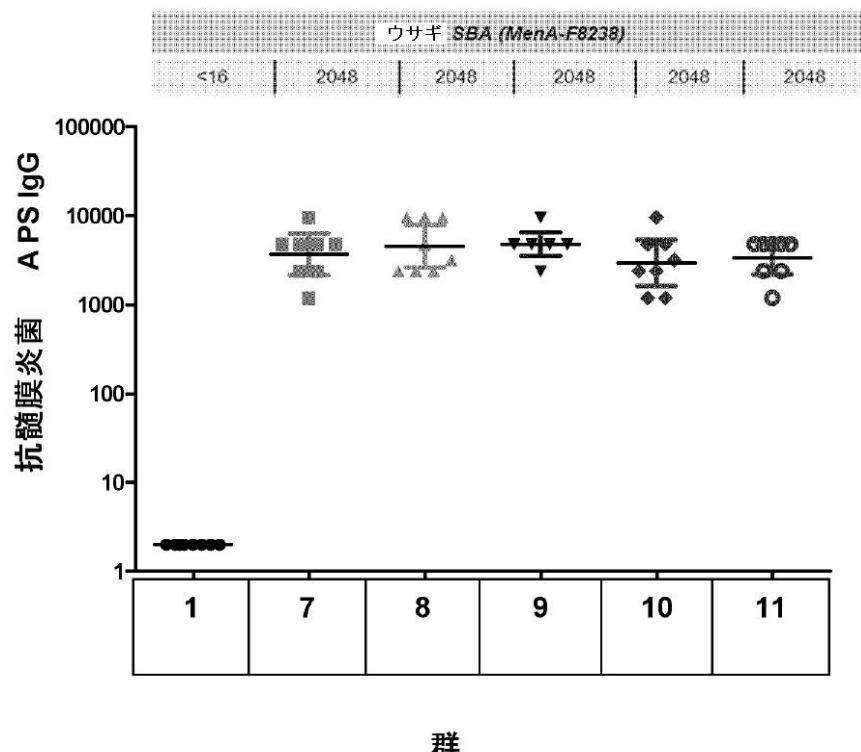
FIGURE 16

【図 17】

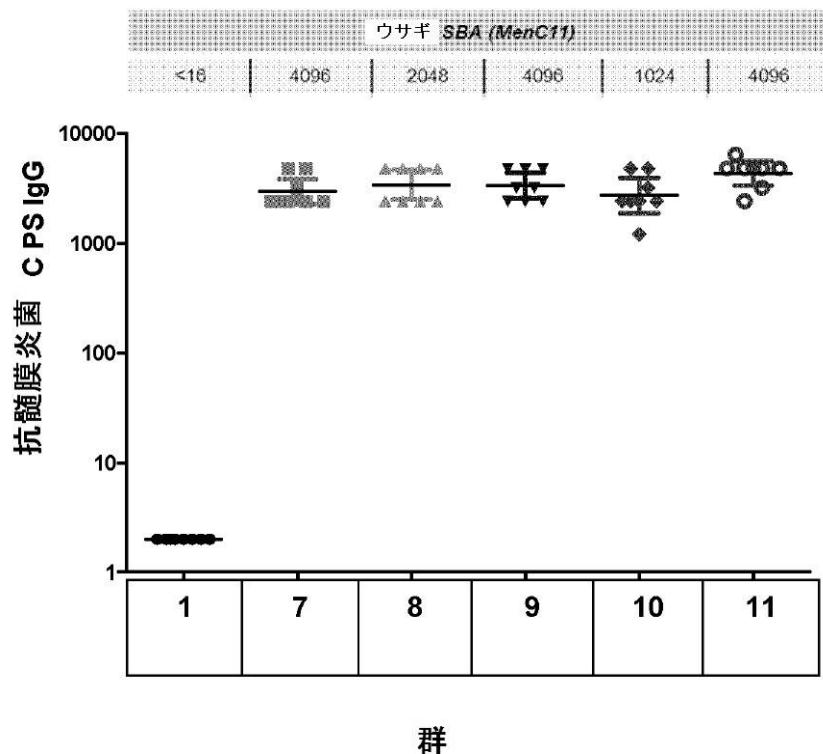
FIGURE 17**SDS-PAGE 3-8%TA**

1. マーカー
2. CRM₁₉₇
3. MenX-CRM₁₉₇

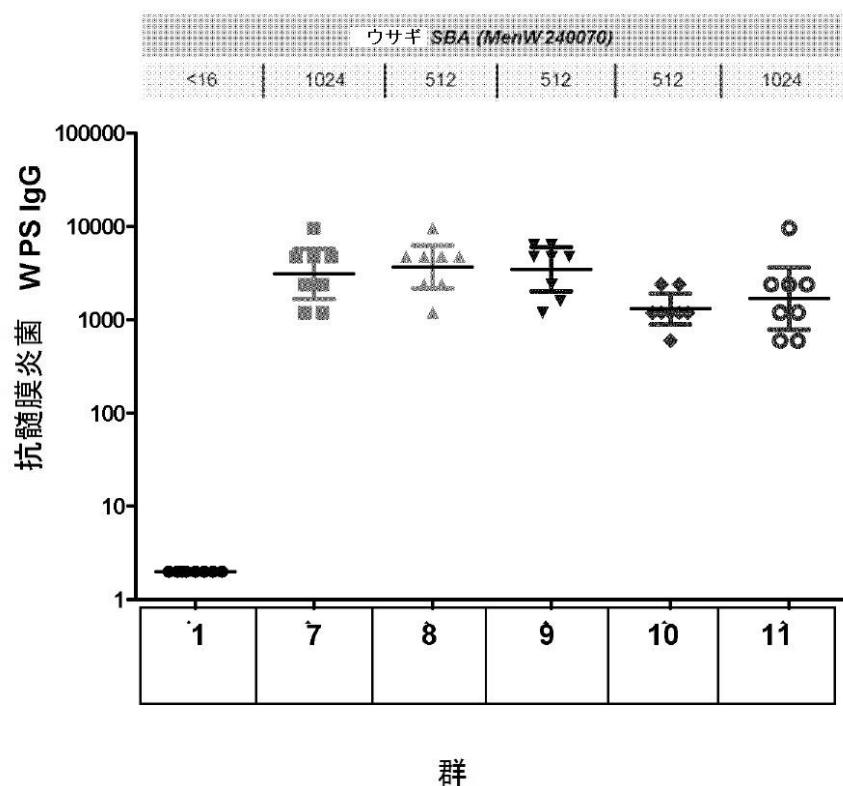
【図 18】

FIGURE 18

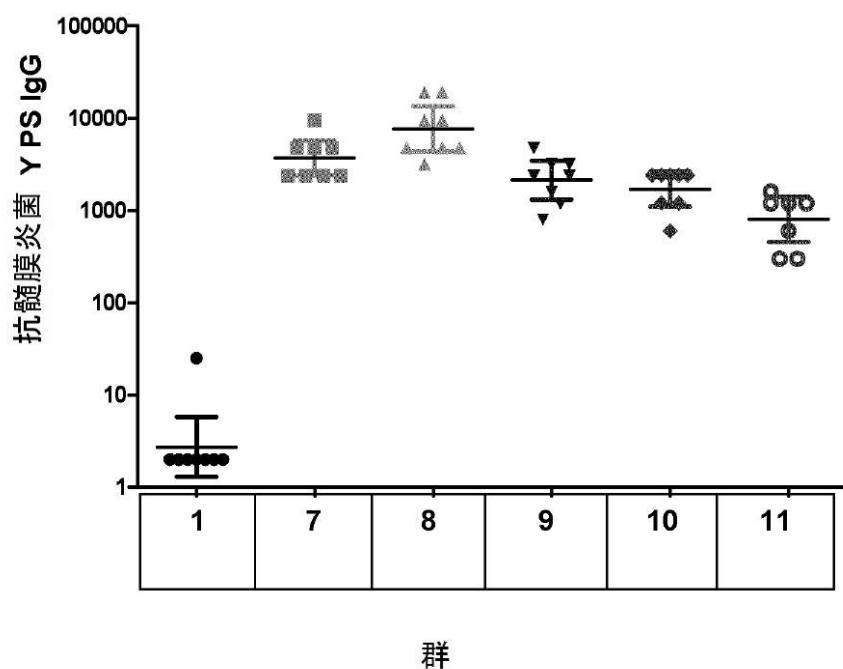
【図 19】

FIGURE 19

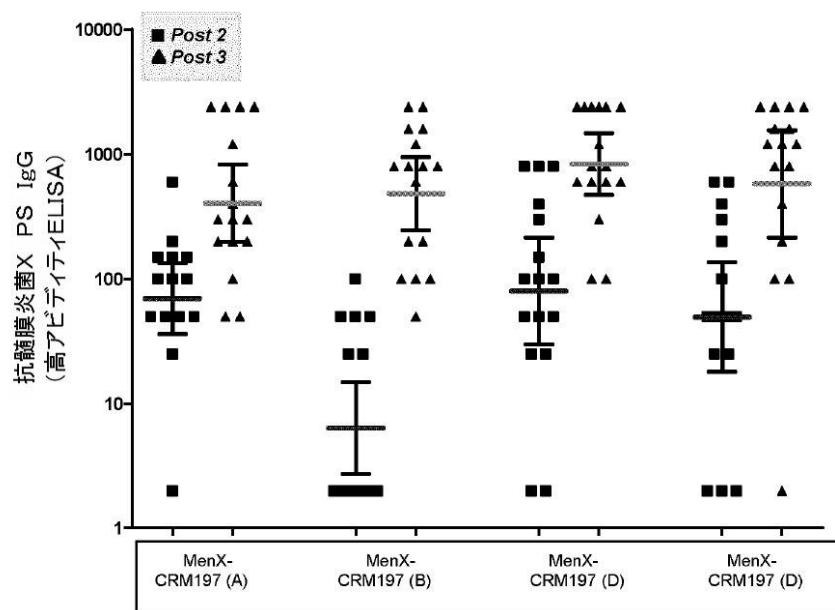
【図 20】

FIGURE 20

【図 21】

FIGURE 21

【図 22】

FIGURE 22

【配列表】

2015518845000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2013/060447									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 A61K39/095 A61P31/04 G01N30/06 G01N30/96 ADD.											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P G01N											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, INSPEC											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2008/102173 A1 (HEALTH PROT AGENCY [GB]; SERUM INST OF INDIA LTD [IN]; KAPRE SUBHASH V) 28 August 2008 (2008-08-28) page 5, line 15 - page 6, line 5 page 8, lines 30-32 page 13, line 7 - page 14, line 28 claim 23</td> <td style="padding: 2px;">1-4,8-22</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">----- -/-</td> <td style="padding: 2px;">6,7,18, 19</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2008/102173 A1 (HEALTH PROT AGENCY [GB]; SERUM INST OF INDIA LTD [IN]; KAPRE SUBHASH V) 28 August 2008 (2008-08-28) page 5, line 15 - page 6, line 5 page 8, lines 30-32 page 13, line 7 - page 14, line 28 claim 23	1-4,8-22	Y	----- -/-	6,7,18, 19
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 2008/102173 A1 (HEALTH PROT AGENCY [GB]; SERUM INST OF INDIA LTD [IN]; KAPRE SUBHASH V) 28 August 2008 (2008-08-28) page 5, line 15 - page 6, line 5 page 8, lines 30-32 page 13, line 7 - page 14, line 28 claim 23	1-4,8-22									
Y	----- -/-	6,7,18, 19									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.											
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 11 September 2013	Date of mailing of the international search report 24/09/2013										
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Villard, Anne-Laure										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/060447

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/061400 A2 (UNIV MARYLAND [US]; SIMON RAPHAEL [US]; LEES ANDREW [US]) 10 May 2012 (2012-05-10) page 2, lines 2-10 page 4, lines 16-23 page 8, lines 12-16 page 9, lines 15,16 page 13, line 10 page 13, line 17 - page 14, line 4 page 16, lines 1-2 page 17, lines 1-4 claims 1,28,33,34,43 -----	1-4, 8-12, 15-22 6,7,18, 19 23-25
Y		
A		
X	WO 2011/023764 A1 (HANNOVER MED HOCHSCHULE [DE]; GERARDY-SCHAHN RITA [DE]; MUEHLENHOFF MA) 3 March 2011 (2011-03-03) claims 1,11,30,34-37 -----	1,8, 11-17, 20-22
X, P		
Y, P	WO 2013/038375 A2 (NOVARTIS AG [CH]; SAUL ALLAN [IT]; MICOLI FRANCESCA [IT]) 21 March 2013 (2013-03-21) page 8, lines 29-30 page 12, line 23 - page 14, line 10 page 14, line 23 page 32, lines 14-17 figure 7 claims 8,15 -----	1-5, 7-12, 15-22 6
Y	Wei Zou and Harold Jennings: "Preparation of Glycoconjugate Vaccines" In: "Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapy", Eds Zhongwu Guo and Geert-Jan Boons", 2009, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, XP002705361, pages 55-88, section 2.2.3 "Neisseria meningitidis" -----	6,7,18, 19
T	COSTANTINO P ET AL: "The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines", EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY 2011 INFORMA HEALTHCARE GBR, vol. 6, no. 10, October 2011 (2011-10), pages 1045-1066, XP008163752, ISSN: 1746-0441 pages 1047-1049, section 2.2 "Chemistry of glycoconjugate vaccines" page 1055, section "Characterization of glycoconjugate vaccines" -----	5,7,18, 19,23-25
		-/-
2		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/060447

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIANG J ET AL: "Simultaneous determination of glucosamine and glucosamine 4-phosphate in Lipid A with high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC)", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 312, no. 1-2, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 73-76, XP004204821, ISSN: 0008-6215, DOI: 10.1016/S0008-6215(98)00226-2 the whole document -----	23-25
X,P	XIE O ET AL: "Characterization of size, structure and purity of serogroup X Neisseria meningitidis polysaccharide, and development of an assay for quantification of human antibodies", VACCINE 20120831 ELSEVIER LTD GBR, vol. 30, no. 40, 31 August 2012 (2012-08-31), pages 5812-5823, XP002705005, ISSN: 0264-410X cited in the application pages 5814-5815, section 2.8 pages 5817-5818, section 3.4 -----	23-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP2013/060447

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2013/ 060447

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-22

A conjugate of *Neisseria meningitidis* serogroup X capsular polysaccharide and a carrier molecule;
An immunogenic composition thereof;
A vaccine comprising said immunogenic composition;
A process for preparing a conjugate of serogroup X capsular polysaccharide and a carrier molecule involving an oxidation, a reductive amination and/or an oxidative cleavage; a pharmaceutical composition comprising (a) a serogroup X capsular polysaccharide and (b) a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the composition is in an aqueous formulation.

2. claims: 23-25

A method for assaying a sample suspected to contain serogroup X capsular polysaccharide, comprising the steps of: (i) hydrolysing any serogroup X capsular polysaccharide in the sample, to give a hydrolysate; (ii) subjecting the hydrolysate to liquid chromatography; and (iii) detecting any glucosamine-4-phosphate separated in step (ii);
A method for analysing a specimen suspected to contain serogroup X capsular polysaccharide, wherein the total serogroup X capsular polysaccharide content, as well as the content of conjugated and unconjugated serogroup X capsular polysaccharide content, are measured by using the aforementioned method, and thus the ratio of unconjugated to total serogroup X capsular polysaccharide can be calculated.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/060447

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2008102173	A1	28-08-2008	AU	2008217420 A1	28-08-2008	
			CA	2675262 A1	28-08-2008	
			EP	2117585 A1	18-11-2009	
			US	2010092519 A1	15-04-2010	
			WO	2008102173 A1	28-08-2008	

WO 2012061400	A2	10-05-2012	NONE			

WO 2011023764	A1	03-03-2011	CA	2771672 A1	03-03-2011	
			CN	102596241 A	18-07-2012	
			EP	2470203 A1	04-07-2012	
			US	2013012471 A1	10-01-2013	
			WO	2011023764 A1	03-03-2011	

WO 2013038375	A2	21-03-2013	NONE			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 ミコーリ , フランチェスカ
イタリア国 イー- 5 3 1 0 0 シエナ , ヴィア フィオレンティーナ 1 , ノバルティス
ヴァクシンズ インスティテュート フォー グローバル ヘルス

(72)発明者 ベルティ , フランセスコ
イタリア国 イー- 5 3 1 0 0 シエナ , ヴィア フィオレンティーナ 1 , ノバルティス
ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス エスアールエル

(72)発明者 アダモ , ロベルト
イタリア国 イー- 5 3 1 0 0 シエナ , ヴィア フィオレンティーナ 1 , ノバルティス
ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス エスアールエル

(72)発明者 コスタンティーノ , パオロ
イタリア国 イー- 5 3 1 0 0 シエナ , ヴィア フィオレンティーナ 1 , ノバルティス
ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス エスアールエル

F ターム(参考) 4C076 EE41 EE59 FF02
4C085 AA03 CC07 CC33 EE01 GG01