

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4738339号
(P4738339)

(45) 発行日 平成23年8月3日(2011.8.3)

(24) 登録日 平成23年5月13日(2011.5.13)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	39/05	(2006.01)	A 6 1 K	39/05	Z N A
A 6 1 K	39/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/08	
A 6 1 K	39/102	(2006.01)	A 6 1 K	39/102	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 K	39/09	(2006.01)	A 6 1 K	39/09	

請求項の数 16 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-530762 (P2006-530762)
 (86) (22) 出願日 平成16年10月4日 (2004.10.4)
 (65) 公表番号 特表2007-507487 (P2007-507487A)
 (43) 公表日 平成19年3月29日 (2007.3.29)
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2004/003373
 (87) 國際公開番号 WO2005/032583
 (87) 國際公開日 平成17年4月14日 (2005.4.14)
 審査請求日 平成19年10月3日 (2007.10.3)
 (31) 優先権主張番号 0323102.4
 (32) 優先日 平成15年10月2日 (2003.10.2)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0412052.3
 (32) 優先日 平成16年5月28日 (2004.5.28)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(73) 特許権者 592243793
 ノバルティス ヴァクシinz アンド ダ
 イアグノスティクス エスアールエル
 イタリア国 イー53100 シエナ, ビ
 ア フィオレンティーナ 1
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】複数の髄膜炎菌血清群についての液体ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体への投与後に、N.meningitidis の血清群 B、血清群 C、血清群 W 135 および血清群 Y に対して殺菌性である免疫応答を誘導し得る、水性免疫原性組成物であって、該組成物は、(i) 結合体化した血清群 C 莢膜サッカリド抗原；(ii) 結合体化した血清群 W 135 莢膜サッカリド抗原；(iii) 結合体化した血清群 Y 莢膜サッカリド抗原；および(iv) 血清群 B 由来のポリペプチド抗原を含み、ここで、該ポリペプチド抗原は、オリゴマー形態の「NadA」タンパク質、「741」タンパク質、「936」タンパク質、「953」タンパク質および「287」タンパク質であり、

該 NadA は、(a) 配列番号 2 に対して 80% 以上の同一性を有するか、および/または(b) 配列番号 1 の少なくとも 7 個連続したアミノ酸のフラグメントを含み、かつ、配列番号 1 由来のエピトープを含む、アミノ酸配列を有し；

該 741 は、(a) 配列番号 3 に対して 80% 以上の同一性を有するか、および/または(b) 配列番号 3 の少なくとも 7 個連続したアミノ酸のフラグメントを含み、かつ、配列番号 3 由来のエピトープを含む、アミノ酸配列を有し；

該 936 は、(a) 配列番号 4 に対して 80% 以上の同一性を有するか、および/または(b) 配列番号 4 の少なくとも 7 個連続したアミノ酸のフラグメントを含み、かつ、配列番号 4 由来のエピトープを含む、アミノ酸配列を有し；

該 953 は、(a) 配列番号 5 に対して 80% 以上の同一性を有するか、および/または(b) 配列番号 5 の少なくとも 7 個連続したアミノ酸のフラグメントを含み、かつ、配

10

20

列番号 5 由来のエピトープを含む、アミノ酸配列を有し；

該 287 は、(a) 配列番号 6 に対して 80% 以上の同一性を有するか、および / または (b) 配列番号 6 の少なくとも 7 個連続したアミノ酸のフラグメントを含み、かつ、配列番号 6 由来のエピトープを含む、アミノ酸配列を有し；

(i)、(ii) および (iii) はキャリアタンパク質に結合体化される、組成物。

【請求項 2】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む第 1 ポリペプチド；配列番号 7 のアミノ酸配列を含む第 2 ポリペプチド；および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 3 ポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

(v) 結合体化した血清群 A 荚膜サッカリド抗原をさらに含み、該 (v) は、タンパク質に結合体化される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記血清群 A 荚膜サッカリドが、そのモノサッカリド単位の少なくとも 20% は 3 位および 4 位のいずれかに -OH を有さないように改変される、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物が、37 にて 28 日間保存され得、この期間の後、結合体化した Men A サッカリドの初期合計量の 20% 未満が結合されていない、請求項 3 または請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記結合体化したサッカリドがオリゴサッカリドである、請求項 1 ~ 請求項 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記サッカリドが、ジフェリアトキソイド、破傷風トキソイド、H. influenzae プロテイン D、および CRM₁₉₇ から選択されるキャリアタンパク質に結合体化される、請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

H. influenzae B 型 (Hi b) に対して防御するサッカリド抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

Streptococcus pneumoniae に対して防御する抗原をさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

リン酸アルミニウムアジュvantを含む、請求項 1 ~ 請求項 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

気密シールした容器に包装された、請求項 1 ~ 請求項 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記容器がバイアルまたは注射器である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

哺乳動物において免疫応答を惹起するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 15】

哺乳動物において抗体応答を惹起するための、請求項 1 ~ 請求項 13 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 16】

被験体への投与後に、N. meningitidis の少なくとも血清群 B、血清群 C、

10

20

30

40

50

血清群W135および血清群Yに対して殺菌性である免疫応答を誘導し得る細菌性髄膜炎に対して免疫するための水性免疫原性組成物であって、該組成物は、(i)結合体化した血清群C莢膜サッカリド抗原；(ii)結合体化した血清群W135莢膜サッカリド抗原；(iii)結合体化した血清群Y莢膜サッカリド抗原；ならびに(iv)配列番号2のアミノ酸配列を含む血清群B由来の第1ポリペプチド抗原、配列番号7のアミノ酸を含む血清群B由来の第2ポリペプチド抗原および配列番号8のアミノ酸を含む血清群B由来の第3ポリペプチド抗原を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本明細書中に記載される全ての文献は、それらの全体が参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、細菌性髄膜炎に対する免疫に関し、特に、複数の病原体によって引き起こされる細菌性髄膜炎に対する合わせた免疫に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景技術)

*N. meningitidis*は、咽頭にコロニーを形成して髄膜炎（および時折、髄膜炎の不存在下で敗血症（septicaemia））を引き起こす、非運動性のグラム陰性ヒト病原体である。*N. meningitidis*は、風土病および伝染病の両方を引き起こす。*Haemophilus influenzae* B型(Hib)に対する結合体ワクチンの導入後、*N. meningitidis*は、米国における細菌性髄膜炎の主な原因である。細菌性髄膜炎の原因である第3の病原体は*Streptococcus pneumoniae*であるが、有効なワクチン(PrevNarTM[1(非特許文献1)])が現在入手可能である。Hibワクチンと同様に、肺炎球菌ワクチンは、結合体化した莢膜サッカリド抗原に基づく。

20

【0004】

この生物の莢膜ポリサッカリドに基づいて、A、B、C、H、I、K、L、29E、W135、X、YおよびZを含め、*N. meningitidis*の種々の血清群が同定されている。血清群Aは、サハラ以南のアフリカにおける伝染病に最も頻繁に関与する病原体である。血清群Bおよび血清群Cは、米国および大部分の先進国における症例の大多数の原因である。血清群W135および血清群Yは、米国および先進国における残りの症例の原因である。莢膜ポリサッカリドは有効な防御免疫原であるが、各血清群は、別個のサッカリド抗原を必要とし、このアプローチは、血清群Bに対して免疫するためには不適切である。従って、血清群Cに対する結合体化サッカリドワクチン(MenjugateTM[2(非特許文献2)]，MenigitecTMおよびNeisVac-CTM)に関連した近年の成功は、血清群A、血清群B、血清群W135または血清群Yによって引き起こされる疾患には影響を有さない；これに対して、これらは、髄膜炎菌疾患の主な原因として、これらの血清群の出現に対する淘汰圧を表す。

30

【0005】

血清群A、血清群C、血清群Yおよび血清群W135由来の莢膜ポリサッカリドの注射可能四価ワクチンは、長年にわたって公知であり[3(非特許文献3)，4(非特許文献4)]、ヒトでの使用に関して認可されている。このワクチンにおけるポリサッカリドは、結合体化されておらず、各精製ポリサッカリドが50μgで、1:1:1:1の重量比で存在する[5(非特許文献5)]。青春期および成人においては有効であるが、これは、乏しい免疫応答および短い保護持続期間を誘導し、乳児には使用できない[例えば、参考文献6(非特許文献6)]。さらに、このワクチンは、使用時に凍結乾燥形態からの再構成を必要とするという欠点を有する。

40

【0006】

50

血清群Bについては、ワクチンはとらえどころがないことが証明されている。外膜小胞に基づくワクチンが試験されている〔例えば、参考文献7（非特許文献7）〕が、保護は代表的には、ワクチンを作製するために用いられた株に制限される。

【非特許文献1】DarkesおよびPlosker(2002)Paediatr Drugs 4:609-630

【非特許文献2】Jones(2001)Curr Opin Investig Drugs 2:47-49

【非特許文献3】Armandら(1982)J. Biol. Stand. 10:335-339

【非特許文献4】Cadolzら(1985)Vaccine 3:340-342

10

【非特許文献5】Baklaicら(1983)Infect. Immun. 42:599-604

【非特許文献6】MMWR(1997)46(RR-5)1-10

【非特許文献7】Bjuneら(1991)Lancet 338(8775):1093-96

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、小児において髄膜炎菌血清群A、血清群C、血清群W135および血清群Yに対して防御するワクチン、ならびにまた、投与前に再構成を必要としないワクチンについての必要性が残っている。さらに、血清群Bに対して広範に防御するワクチンについての必要性が残っている。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の開示)

本発明は、これらの種々の必要性の全てを満たし、8種類の別々の知見に基づく。第1に、本発明者らは、髄膜炎菌血清群C、血清群W135および血清群Y由来の結合体化莢膜サッカリドが、単回用量で組み合わせた場合、ヒトにおいて安全でかつ免疫原性であることを見出した。第2に、本発明者らは、血清群A由来の結合体化莢膜サッカリドが添加される場合にこの効果が保持されることを見出した。第3に、本発明者らは、これらの結合体化した抗原が、凍結乾燥を必要とせずに、水性の単回用量において安定に組み合わされ得ることを見出した。第4に、本発明者らは、血清群B感染に対する広い保護が、少数の規定ポリペプチド抗原を用いることによって達成され得ることを見出した。第5に、本発明者らは、これらのポリペプチド抗原が、5つの血清群のいずれの防御効力をも損失することなく、サッカリド抗原と組み合わされ得ることを見出した。第6に、本発明者らは、Hi b結合体が添加される場合でさえも効力が保持されることを見出した。第7に、本発明者らは、血清群W135結合体の効力が、血清群B株由来のタンパク質抗原の添加によって増強されることを見出した。最後に、本発明者らは、髄膜炎菌結合体へのHi b結合体の添加が、血清群W135の髄膜炎菌に対する全体的活性を増強することを見出した。

30

【0009】

従って、本発明は、被験体への投与後に、N.meningitidisの血清群B、血清群C、血清群W135および血清群Yに対して殺菌性である免疫応答を誘導し得る、水性免疫原性組成物を提供し、ここで、この組成物は、以下を含む：(i)結合体化した血清群C莢膜サッカリド抗原；(ii)結合体化した血清群W135莢膜サッカリド抗原；(iii)結合体化した血清群Y莢膜サッカリド抗原；および(iv)血清群B由来の1以上のポリペプチド抗原。この水性組成物はまた、N.meningitidisの血清群Aに対して殺菌性である免疫応答を誘導し得、従ってさらに(v)結合体化した血清群A莢膜サッカリド抗原を含み得る。

【0010】

40

50

本発明はまた、被験体への投与後に、(a) *N. meningitidis* の少なくとも血清群 W135 に対して殺菌性であり、そして (b) *H. influenzae* b 型疾患に対して防御性である、免疫応答を誘導し得る水性免疫原性組成物を提供し、ここで、この組成物は、(i) 結合体化した血清群 W135 荚膜サッカリド抗原；(ii) 結合体化した *H. influenzae* b 型莢膜サッカリド抗原を含む。この組成物は、血清群 C および血清群 Y、必要に応じて血清群 A 由来の結合体化した莢膜サッカリド抗原をさらに含み得る。この組成物はさらに、*N. meningitidis* 由来の血清群 B 由来のポリペプチド抗原を含み得る。

【0011】

好ましいサッカリド抗原はオリゴサッカリドである。

10

【0012】

(血清群 C、血清群 W135 および血清群 Y)

莢膜ポリサッカリドを髄膜炎菌から調製するための技術は、長年にわたって公知であり、代表的には、以下の工程を含むプロセスを含む：(例えば、カチオン性界面活性剤を用いる) ポリサッカリド沈澱、エタノール分画、(タンパク質を除去するための) 冷フェノール抽出および (LPS を除去するための) 超遠心分離 [例えば、参考文献 8 を参照のこと]。

【0013】

より好ましいプロセス [9] は、ポリサッカリド沈澱、続いて低級アルコールを用いた沈澱したポリサッカリドの可溶化を含む。沈澱は、カチオン性界面活性剤 (例えば、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) またはヘキサジメトリンプロミド (hexadimethrine bromide) 塩およびミリストリメチルアンモニウム塩) を用いて達成され得る。セチルトリメチルアンモニウムプロミド (「CTAB」) は、特に好ましい [10]。沈澱した物質の可溶化は、低級アルコール (例えば、メタノール、プロパン - 1 - オール、プロパン - 2 - オール、ブタン - 1 - オール、ブタン - 2 - オール、2 - メチル - プロパン - 1 - オール、2 - メチル - プロパン - 2 - オール、ジオールなど) を用いて達成され得るが、CTAB - ポリサッカリド複合体を可溶化するためにはエタノールが特に適切である。エタノールは、(エタノールおよび水の総含量に基づいて) 50 % と 95 % との間の最終エタノール濃度になるように、沈澱したポリサッカリドに添加され得る。

20

【0014】

再可溶化後、このポリサッカリドは、夾雑物を除去するためにさらに処理され得る。微量の夾雑物でさえも受け入れられない状況 (例えば、ヒトのワクチン生産) では、これは特に重要である。これは代表的に、1 以上の濾過工程 (例えば、深層濾過 (depth filtration)、活性炭を通した濾過が用いられ得る、サイズ濾過および / または限外濾過) を含む。

30

【0015】

一旦濾過されて夾雑物が除去されると、ポリサッカリドは、さらなる処理および / または加工のために沈澱され得る。これは、(例えば、カルシウム塩またはナトリウム塩の添加により) カチオンを交換することにより、便利に達成され得る。

40

【0016】

精製後、莢膜サッカリドは、以下に記載される通り、キャリアタンパク質に結合体化される。

【0017】

髄膜炎菌サッカリドの精製および結合体化のためのさらなる方法および代替方法は、参考文献 11 および参考文献 12 に開示される。

【0018】

精製に対する代替法として、本発明の莢膜サッカリドは、全合成または部分合成によって入手され得る。例えば、Hib 合成は、参考文献 13 に開示され、そして MenA 合成は参考文献 14 に開示される。

50

【0019】

サッカリドは、化学的に改変され得、例えば、O - アセチル化または脱O - アセチル化され得る。任意のこのような脱 - O - アセチル化または超アセチル化は、このサッカリド中の特定の位置に存在し得る。例えば、大部分の血清群C株は、O - アセチル基をシアル酸残基のC - 7位および / またはC - 8位に有するが、臨床単離株の約15%は、これらのO - アセチル基を欠く [15, 16]。このアセチル化は、防御効力に影響を与えるようには見えない（例えば、MenjugateTM 製品とは異なり、NeisVac-CTM 製品は、脱O - アセチル化サッカリドを使用するが、両方のワクチンが有効である）。血清群W135のサッカリドは、シアル酸 - ガラクトースジサッカリド単位のポリマーである。血清群Yのサッカリドは、ジサッカリド反復単位がガラクトースの代わりにグルコースを含むこと以外は、血清群W135のサッカリドに類似する。血清群Cのサッカリドのように、MenW135サッカリドおよびMenYサッカリドは、種々のO - アセチル化を有するが、シアル酸の7位および9位に有する [17]。任意のこのような化学的改変は好ましくは、結合体化の前に起こるが、あるいは、またはさらに、結合体化の間に起こり得る。

【0020】

異なる血清群由来のサッカリドは、好ましくは別々に精製され、次いで結合体化の前または後のいずれかに合わされ得る。

【0021】

(血清群A)

20

本発明の組成物は、結合体化した血清群A莢膜サッカリド抗原を含み得る。このサッカリドは、血清群C、血清群W135および血清群Yについて（上記を参照のこと）と同じように、精製および結合体化され得るが、これは、構造的に異なる - 一方、血清群C、血清群W135および血清群Yの莢膜は、周囲のシアル酸（N - アセチル - ノイラミン酸、NeuAc）に基づき、血清群Aの莢膜はN - アセチル - マンノサミンに基づき、N - アセチル - マンノサミンは、天然のシアル酸前駆体である。血清群Aのサッカリドは、特に加水分解感受性であり、水性媒体中でのその不安定性は、(a) 血清群Aに対する液体ワクチンの免疫原性が経時的に減少すること、および(b) サッカリド加水分解産物のワクチン中への放出に起因して、品質制御がより困難であることを意味する。

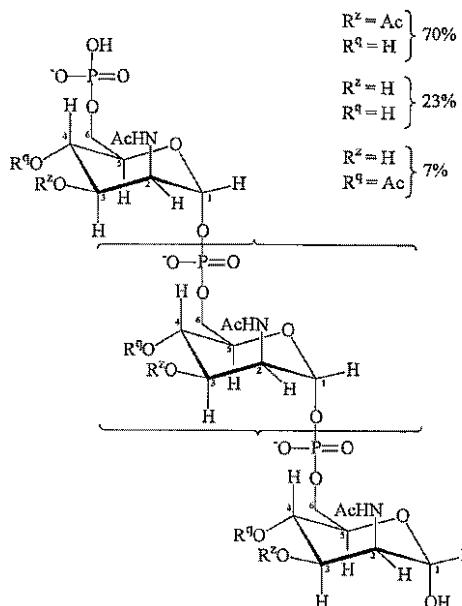
【0022】

30

ネイティブなMenA莢膜サッカリドは、(1-6)結合型N - アセチル - D - マンノサミン - 1 - ホスフェートのホモポリマーであり、C3およびC4に部分的O - アセチル化を有する。主なグリコシド結合は、C1のヘミアセタール基およびD - マンノサミンのC6のアルコール基を含む1 - 6ホスホジエステル結合である。平均鎖長は93モノマーである。これは、以下の式を有する：

【0023】

【化1】



本発明者らは、ネイティブな血清群Aサッカリドの免疫原性活性を保持するが、水中でずっと安定である改変サッカリド抗原を調製した。モノサッカリド単位の3位の炭素および4位の炭素に結合した基は、ブロッキング基によって置換される [参考文献18]。

【0024】

ヒドロキシルの代わりにブロッキング基を有するモノサッカリド単位の数は、変動し得る。例えば、全てまたは実質的に全てのモノサッカリド単位は、ブロッキング基を有し得る。あるいは、モノサッカリド単位の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%は、ブロッキング基を有し得る。少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29または少なくとも30のモノサッカリド単位は、ブロッキング基を有し得る。

【0025】

同様に、モノサッカリド単位上のブロッキング基の数は、変動し得る。例えば、任意の特定のモノサッカリド単位の数は、1または2であり得る。

【0026】

末端モノサッカリド単位は、そのネイティブヒドロキシルの代わりにブロッキング基を有しても有さなくてよい。さらなる反応（例えば、結合体化）のためのハンドルを提供するために、遊離のアノマー性ヒドロキシル基を末端モノサッカリド単位に保持することが好ましい。アノマー性ヒドロキシル基は、（例えば、NaBH₃CN/NH₄Clを用いる）還元的アミノ化によってアミノ基（-NH₂または-NH-E、ここでEは窒素保護基）に変換され得、次いで他のヒドロキシル基がブロッキング基に変換された後に再生され得る。

【0027】

ヒドロキシル基を置換するためのブロッキング基は、ヒドロキシル基の誘導体化反応によって、すなわち、ヒドロキシル基の水素原子を別の基に置き換えることによって、直接的にアクセス可能であり得る。ブロッキング基として作用するヒドロキシル基の適切な誘導体は、例えば、カルバメート、スルホネート、カルボネート、エステル、エーテル（例えば、シリルエーテルまたはアルキルエーテル）およびアセタールである。このようなブ

10

20

30

40

50

ロッキング基のいくつかの具体例は、アリル、A l o c、ベンジル、B O M、t - プチル、トリチル、T B S、T B D P S、T E S、T M S、T I P S、P M B、M E M、M O M、M T M、T H P などである。直接的にはアクセス可能でなく、ヒドロキシル基を完全に置き換える他のプロッキング基としては、C₁₋₁₂アルキル、C₃₋₁₂アルキル、C₅₋₁₂アリール、C₅₋₁₂アリール-C₁₋₆アルキル、N R¹ R² (R¹ および R² は、以下の段落で定義される)、H、F、C l、Br、CO₂H、CO₂(C₁₋₆アルキル)、CN、CF₃、CCl₃などが挙げられる。

【0028】

好ましいプロッキング基は、以下の式のものである：-O-X-Yまたは-O R³、ここで：XはC(O)、S(O)またはSO₂であり；YはC₁₋₁₂アルキル、C₁₋₁₂アルコキシ、C₃₋₁₂シクロアルキル、C₅₋₁₂アリールまたはC₅₋₁₂アリール-C₁₋₆アルキルであり、これらの各々は、F、C l、Br、CO₂H、CO₂(C₁₋₆アルキル)、CN、CF₃またはCCl₃から独立して選択される1、2または3個の基で必要に応じて置換され得るか；あるいはYは、NR¹R²であり；R¹ および R² は、H、C₁₋₁₂アルキル、C₃₋₁₂シクロアルキル、C₅₋₁₂アリール、C₅₋₁₂アリール-C₁₋₆アルキルから独立して選択されるか；またはR¹ および R² は一緒にになって、C₃₋₁₂飽和複素環式基を形成し得；R³は、C₁₋₁₂アルキルまたはC₃₋₁₂シクロアルキルであり、これらの各々は、F、C l、Br、CO₂(C₁₋₆アルキル)、CN、CF₃またはCCl₃から1、2または3個の基で必要に応じて置換され得るか；あるいはR³は、C₅₋₁₂アリールまたはC₅₋₁₂アリール-C₁₋₆アルキルであり、これらの各々は、F、C l、Br、CO₂H、CO₂(C₁₋₆アルキル)、CN、CF₃またはCCl₃から選択される1、2、3、4または5個の基で必要に応じて置換され得る。R³が、C₁₋₁₂アルキルまたはC₃₋₁₂シクロアルキルである場合、これは代表的に、上記に定義した通りの1、2または3個の基で置換される。R¹ および R² が一緒にになってC₃₋₁₂飽和複素環式基を形成する場合、R¹ および R² が窒素原子と一緒にになって、3と12との間の任意の数の炭素原子(例えば、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂)を含む飽和複素環式環を形成することが意図される。この複素環式基は、窒素原子以外に1または2個のヘテロ原子(例えば、N、OまたはS)を含み得る。C₃₋₁₂飽和複素環式基の例は、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、ピペラジニル、イミダゾリジル、アゼチジニルおよびアジリジニルである。

【0029】

プロッキング基-O-X-Yおよび-O R³は、標準的誘導体化手順(例えば、ヒドロキシル基とアシリルハライド、アルキルハライド、スルホニルハライドなどの反応)により-OH基から調製され得る。それゆえ、-O-X-Yにおける酸素原子は好ましくは、ヒドロキシル基の酸素原子であり、一方、-O-X-Yにおける-X-Y基は好ましくは、ヒドロキシル基の水素原子と置き換わる。

【0030】

あるいは、このプロッキング基は、置換反応(例えば、Mitsunobu型置換)によって接近可能であり得る。ヒドロキシル基からプロッキング基を調製するこれらの方法および他の方法は、周知である。

【0031】

より好ましくは、プロッキング基は、-OC(O)CF₃[19]、またはカルバメート基-OC(O)NR¹R²であり、ここでR¹ および R² は、C₁₋₆アルキルから独立して選択される。より好ましくは、R¹ および R² は、両方ともメチルである、すなわち、プロッキング基は、-OC(O)NMe₂である。カルバメートプロッキング基は、グリコシド結合に対して安定化効果を有し、穏やかな条件下で調製され得る。

【0032】

好ましい改変MenAサッカリドは、n個のモノサッカリド単位を含み、ここで、モノサッカリド単位の少なくともh%は、3位および4位の両方において-OH基を有さない

10

20

30

40

50

。hの値は、24以上（例えば、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、98、99または100）であり、好ましくは50以上である。存在しない-OH基は、好ましくは上記に定義した通りのブロッキング基である。

【0033】

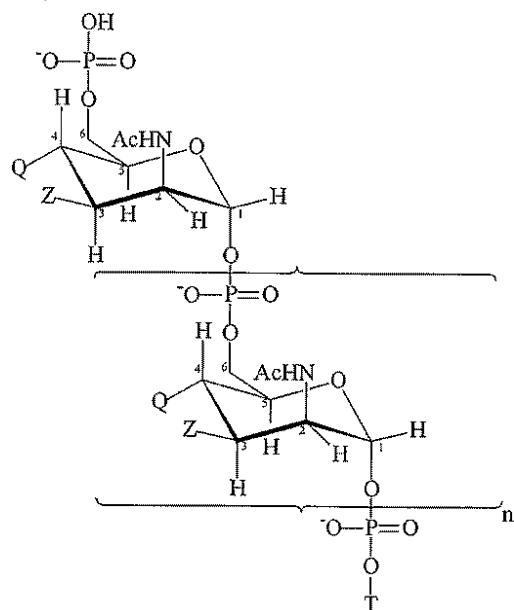
他の好ましい改変MenAサッカリドは、モノサッカリド単位を含み、ここで、モノサッカリド単位少なくともs個は、3位に-OHを有さず、4位に-OHを有さない。sの値は、少なくとも1（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90）である。
10。存在しない-OH基は、好ましくは上記に定義した通りのブロッキング基である。

【0034】

本発明での使用に適切な改変MenAサッカリドは、以下の式を有する：

【0035】

【化2】



20

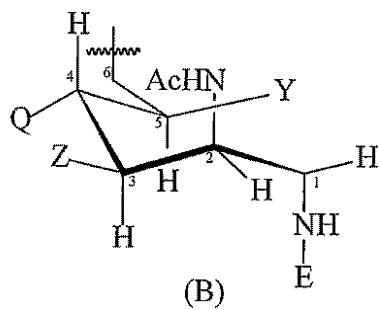
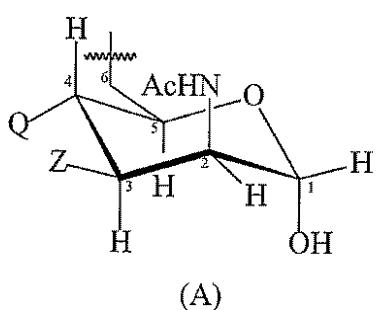
30

ここで、nは、1～100の整数（好ましくは、5～25、より好ましくは15～25の整数）であり；

Tは式(A)または(B)であり：

【0036】

【化3】



40

各Z基は、OHまたは上記で定義した通りのブロッキング基から独立して選択され；そして

各Q基は、OHまたは上記で定義した通りのブロッキング基から独立して選択され；

Yは、OHまたは上記で定義した通りのブロッキング基から選択され；

Eは、Hまたは窒素保護基であり；ここでQ基の約7%より多く（例えば、8%、9%、10%以上）がブロッキング基である。

50

【0037】

$n + 2$ 個の Z 基の各々は、互いに同じであっても異なっていてもよい。同様に、 $n + 2$ 個の Q 基の各々は、互いに同じであっても異なっていてもよい。Z 基の全ては、OH であってもよい。あるいは、Z 基の少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50% または少なくとも 60% は、OAc であってもよい。好ましくは、Z 基の約 70% は OAc であり、Z 基の残りは OH または上記で定義したブロッキング基である。Q 基の少なくとも約 7% は、ブロッキング基である。好ましくは、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90% または 100% までもがブロッキング基である。

10

【0038】

好ましいブロッキング基は、電子吸引基である。理論によって束縛されることを望まないが、グリコシド結合が、グリコシド結合におけるサッカリドヒドロキシリ基の分子内求核攻撃からの補助に起因して（すなわち、環状中間体の形成によって）、加水分解に不安定であると考えられる。ヒドロキシリ基の求核性が高くなるほど、分子内求核攻撃の傾向が高くなる。電子吸引ブロッキング基は、酸素孤立電子対を脱局在化し、それによって酸素求核性を低減して分子内求核攻撃の傾向を低下させる効果を有する。

【0039】

それゆえ、血清群 A を保護するために、水性組成物は、上記に定義した通りの MenA 改変サッカリドを含み得る。

20

【0040】

本発明の好ましい組成物は、37 にて 28 日間保存され得、その期間の後、結合体化した MenA サッカリドの初期合計量の f % 未満が未結合であり、ここで f は、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5 またはそれ未満である。

【0041】

(共有結合体化)

本発明の組成物における莢膜サッカリドは、通常、キャリアタンパク質へと結合体化される。一般に、結合体化は、サッカリドの免疫原性を増強する。なぜなら、これらを T 非依存性抗原から T 依存性抗原へと変換し、従って免疫記憶をプライミングさせるからである。結合体化は、小児用ワクチンに特に有用であり、周知の技術である [例えば、参考文献 20 ~ 29 に概説される] 。

30

【0042】

好ましいキャリアタンパク質は、細菌性トキシンまたは細菌性トキソイド (例えば、ジフテリアトキソイドもしくは破傷風トキソイド) 、または CRM₁₉₇ ジフテリアトキシン変異体 [30 ~ 32] である。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 [33] 、合成ペプチド [34, 35] 、熱ショックタンパク質 [36, 37] 、百日咳菌タンパク質 [38, 39] 、サイトカイン [40] 、リンホカイン [40] 、ホルモン [40] 、増殖因子 [40] 、種々の病原体由来抗原由來の複数のヒト CD4⁺ T 細胞エピトープを含む人工タンパク質 [41] (例えば、N19 タンパク質 [42]) 、H. influenzae 由来のプロテイン D [43, 44] 、ニューモリシン (pneumolysin) [45] 、肺炎球菌表面タンパク質 PspA [46] 、鉄取り込みタンパク質 [47] 、C. difficile 由来のトキシン A またはトキシン B [48] 、変異体細菌毒素 (例えば、コレラ毒素「 CT 」または E. coli 熱不安定性毒素「 LT 」 (例えば、G1u - 29 における置換を有する CT [49])) などが挙げられる。好ましいキャリアは、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、H. influenzae プロテイン D 、特に CRM₁₉₇ である。

40

【0043】

本発明の組成物内で、例えば、キャリア抑制の危険性を減らすために、1種より多いキャリアタンパク質を使用することが可能である。従って、異なるキャリアタンパク質が、

50

異なる血清群のために使用され得る（例えば、血清群Aサッカリドは、CRM₁₉₇に結合され得、一方、血清群Cサッカリドは、破傷風トキソイドに結合体化され得る）。特定のサッカリド抗原のために1種より多いキャリアタンパク質を使用することもまた、可能である（例えば、血清群Aサッカリドは、2種の群で存在し得、いくつかは、CRM₁₉₇に結合体化され得、そして、その他は、破傷風トキソイドに結合体化され得る）。しかし、一般的に、すべての血清群について同じキャリアタンパク質を使用することが好ましく、CRM₁₉₇は好ましい選択である。

【0044】

単一のキャリアタンパク質は、1種より多いサッカリド抗原を保有し得る[50]。例えば、単一のキャリアタンパク質は、血清群A由来のサッカリドおよび血清群C由来のサッカリドに結合体化していてもよい。この目的を達成するために、サッカリドは、結合体化反応の前に混合され得る。しかし、一般的に、各々の血清群に対して別々の結合体を有することが好ましい。

【0045】

1:5(すなわち、タンパク質過剰)と5:1(すなわち、サッカリド過剰)との間のサッカリド:タンパク質比(w/w)を有する結合体が、好ましい。1:2と5:1との間の比が好ましく、1:1.25と1:2.5との間の比がより好ましい。過剰なキャリアタンパク質は、Men AおよびMen Cについて好適であり得る。

【0046】

結合体は、遊離のキャリアタンパク質とともに使用され得る[51]。所定のキャリアタンパク質が、本発明の組成物において遊離形態および結合体化形態の両方で存在する場合、非結合体化形態は、好ましくは、全体として、この組成物におけるキャリアタンパク質総量の5重量%以下であり、そしてより好ましくは、2重量%未満で存在する。

【0047】

必要な場合は任意の適切なリンカーを用いて、任意の適切な結合体化反応が使用され得る。

【0048】

このサッカリドは、代表的に、結合体化前に活性化されるかまたは官能基化される。活性化は、例えば、シアノ化試薬（例えば、CDAP（例えば、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート[52, 53など]））を含み得る。他の適切な技術は、カルボジイミド、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを使用する；参考文献27のイントロダクションもまた参照のこと。

【0049】

リンカー基を介した結合が、任意の公知の手順（例えば、参考文献54および参考文献55に記載の手順）を用いて作製され得る。結合の1種は、ポリサッカリドを還元的アミノ化すること、得られるアミノ基をアジピン酸リンカー基の一端とカップリングすること、次いで、タンパク質をアジピン酸リンカー基の他端とカップリングすることを含む[25, 56, 57]。他のリンカーとしては、B-プロピオニアミド[58]、ニトロフェニル-エチルアミン[59]、ハロアシリルハライド[60]、グリコシド結合[61]、6-アミノカプロン酸[62]、ADH[63]、C₄-C₁₂部分[64]などが挙げられる。リンカーの使用の代替としては、直接結合が使用され得る。タンパク質への直接結合は、ポリサッカリドの酸化、その後のタンパク質による還元的アミノ化（例えば、参考文献65および参考文献66に記載される通り）を含み得る。

【0050】

このサッカリドへのアミノ基の導入（例えば、末端=O基を-NH₂に置換することによる）、その後のアジピン酸ジエステル（例えば、アジピン酸N-ヒドロキシスクシンイミドジエステル）による誘導体化およびキャリアタンパク質との反応を含むプロセスが、好ましい。別の好ましい反応は、例えば、Men AまたはMen CについてのプロテインDキャリアを用いたCDAP活性化を使用する。

10

20

30

40

50

【0051】

結合体化後、遊離のサッカリドおよび結合体化されたサッカリドは、分離され得る。多くの適切な方法が存在し、これらの方¹⁰法としては、疎水性クロマトグラフィー、接線（tangentia¹¹l）限外濾過、ダイアフィルトレーションなどが挙げられる〔参考文献67および68などもまた参考のこと〕。

【0052】

本発明の組成物が、結合体化されたオリゴサッカリドを含む場合、オリゴサッカリド調製が結合体化の前に行われることが好ましい。

【0053】

結合体化後、本発明の方法は、結合体化していないキャリアタンパク質のレベルを測定する工程を包含し得る。この測定を行う1つの方法は、キャピラリー電気泳動〔69〕（例えば、遊離溶液中）またはミセル界面動電（m¹²icellar e¹³lectrokinetic）クロマトグラフィー〔70〕を含む。

【0054】

結合体化後、本発明の方法は、結合体化していないサッカリドのレベルを測定する工程を包含し得る。この測定を行う1つの方法は、HPAEC-PAD〔67〕を含む。

【0055】

結合体化後、本発明の方法は、結合体化したサッカリドを結合体化していないサッカリドから分離する工程を包含し得る。これらのサッカリドを分離する1つの方法は、1つの成分を選択的に沈澱させる方法を使用することである。結合体化していないサッカリドを溶液中に残すために、例えば、デオキシコレート処理〔67〕による、結合体化したサッカリドの選択的沈澱が好ましい。

【0056】

結合体化後、本発明の方法は、結合体の分子の大きさおよび／またはモル量を測定する工程を包含し得る。特に、分布が測定され得る。これらの測定を行う1つの方法は、多角度光散乱測光法（multangle light scattering photometry）および示差屈折率測定法（differential refractometry）（SEC-MALS/RI）〔71〕による検出を用いるサイズ排除クロマトグラフィーを含む。

【0057】

（オリゴサッカリド）

莢膜サッカリドは、一般的に、オリゴサッカリドの形態で使用される。これらは、精製莢膜ポリサッカリドの（例えば、加水分解による）フラグメント化により都合よく形成され、通常、その後に、所望される大きさのフラグメントが精製される。

【0058】

ポリサッカリドのフラグメント化は、好ましくは、オリゴサッカリドにおいて30未満（例えば、血清群Aについては、10と20との間、好ましくは、約10；血清群W135および血清群Yについては、15と25との間、好ましくは、約15～20；血清群Cについては、12と22との間；など）の最終平均重合度（DP）を与えるように実施される。DPは、イオン交換クロマトグラフィーまたは比色定量アッセイ〔72〕により、都合よく測定され得る。

【0059】

加水分解が実施される場合、その加水分解物は、一般的に、短い長さのオリゴサッカリドを除去するために、大きさが調整される〔73〕。これは、種々の方法（例えば、限外濾過、その後のイオン交換クロマトグラフィー）により達成され得る。血清群Aについては、約6以下の重合度を有するオリゴサッカリドが好ましくは除去され、そして血清群W135および血清群Yについては、約4未満の重合度を有するオリゴサッカリドが好ましくは、除去される。

【0060】

サッカリドの化学的加水分解は一般に、当該分野で標準的である条件下での酸または塩

10

20

30

40

50

基のいずれかでの処理を含む。莢膜サッカリドのそれらの構成モノサッカリドへの脱重合のための条件は、当該分野で公知である。1つの脱重合方法は、過酸化水素の使用を含む[11]。過酸化水素は、サッカリドに(例えば、1%の最終H₂O₂濃度を与えるように)添加され、次いで所望の鎖長の減少が達成されるまで、混合物が(例えば、約55で)インキュベートされる。経時的な減少は、混合物からサンプルを取り出し、次いでこのサンプル中のサッカリドの(平均)分子サイズを測定することによって追跡され得る。次いで、一旦所望の鎖長に達したら、脱重合は、迅速な冷却によって停止され得る。

【0061】

(血清群B)

病原体(例えば、B型肝炎ウイルス、ジフテリアおよび破傷風)に対するワクチンは、代表的に単一のタンパク質抗原(例えば、HBV表面抗原または破傷風トキソイド)を含む。対照的に、無細胞百日咳ワクチンは代表的に、少なくとも3種のB. pertussisタンパク質を含み、そしてPrevNarTM肺炎球菌ワクチンは、7種類の別個の結合体化サッカリド抗原を含む。他のワクチン(例えば、細胞性百日咳ワクチン、麻疹ワクチン、不活化ポリオワクチン(IPV)および髄膜炎菌OMVワクチン)は、まさにその性質から、多数の抗原の複雑な混合物である。それゆえ、1種の抗原、少数の規定された抗原、または規定されていない抗原の複雑な混合物によって防御が惹起され得るか否かは、問題となっている病原体に依存する。

【0062】

上記で言及した通り、血清群Bの髄膜炎菌に対するワクチンは、逃げられやすい(evasive)ことが証明されている。OMVに基づくワクチンは、狭い効力を示す。さらに、OFF2DV中に存在する規定されていない多数の抗原は、それらの可変の性質と合わせて、OMVが種々の品質制御の問題を有することを意味する。

【0063】

本発明者らは、血清群B感染に対する広い防御が達成され得ること、および少数の規定された血清群Bポリペプチド抗原を用いることによってこれが達成され得ることを見出した。それゆえ、本発明の組成物は、この組成物が、2以上(すなわち、2または3)の超毒性(hypervirulent)系統A4、ET-5およびN.meningitidis血清群Bの系統3に対して殺菌性である免疫応答を誘導し得るように、1以上のポリペプチド抗原を含む。

【0064】

髄膜炎菌血清群A[74]および髄膜炎菌血清群B[75, 76]についてのゲノム配列が報告されており、そして適切な抗原が、これらのコードされるポリペプチドから選択され得る[例えば、参考文献77~82]。候補抗原を操作して、異種発現が改善されている[参考文献83~85]。

【0065】

1つの好ましい組成物は、Tbpタンパク質およびHsfタンパク質を含む[86]。Hsfは、自己トランスポーター(autotransporter)タンパク質であり[87-89]、nhaA[89]、GNA0992[77]またはNMB0992[75]としても公知である。Tbpは、トランスフェリン結合タンパク質であり[90~93]、TbpAおよびTbpBの両方、ならびにTbpAおよびTbpBの高分子量形態および低分子量形態を包含する。Tbpは、上記の個々のタンパク質およびこれらのタンパク質の複合体、ならびにトランスフェリンを結合し得る、他の任意のタンパク質およびそれらの複合体を包含する。TbpはTbpAまたはTbpBの高分子形態または低分子形態のいずれをも言及し得るが、高分子量形態および低分子量形態の両方のTbpAおよび/またはTbpBが存在することが好ましい。最も好ましくは、高分子量および低分子量のTbpAが存在する。

【0066】

別の好ましい組成物は、血清群Bリポオリゴサッカリド(LOS)[94]を包含する。LOSは、血清群Bポリペプチドに加えて用いられてもよく、またはその代わり/それ

10

20

30

40

50

らの代わりに用いられてもよい。

【0067】

別の好ましい組成物は、*Neisseria*内の異なる機能を有する少なくとも2つの異なるカテゴリーのタンパク質の各々から選択された少なくとも1つの抗原を含む。このようなカテゴリーのタンパク質の例としては、以下が挙げられる：付着因子、自己トランスポータータンパク質、毒素、内在性外膜タンパク質および鉄捕獲タンパク質（iron acquisition proteins）。これらの抗原は、参考文献95の命名法を用いて、以下の通りに選択され得る：FhaB、NspA PilC、Hsf、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB0995、NMB1119およびNadAからなる群より選択される少なくとも1つの*Neisseria*付着因子；Hsf、Hap、IgAプロテアーゼ、AspA、およびNadAからなる群より選択される少なくとも1つの*Neisseria*自己トランスポーター；FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD、NM-ADPRT（NMB1343）およびLPS免疫型L2およびLPS免疫型L3のいずれかまたは両方からなる群より選択される少なくとも1つの*Neisseria*毒素；TbpA、TbpB、LbpA、LbpB、HpuA、HpuB、Lipo28（GNA2132）、Sibp、NMB0964、NMB0293、FbpA、Bcp、BfrA、BfrBおよびP2086（XthA）からなる群より選択される少なくとも1つの*Neisseria*Fe捕獲タンパク質；PilQ、OMP85、FhaC、NspA、TbpA、LbpA、TspA、TspB、TdfH、PorB、MitA、HpuB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、H1pA（GNA1946）、NMB1124、NMB1162、NMB1220、NMB1313、NMB1953、HtrA、およびPLDA（OMPLA）からなる群より選択される少なくとも1つの*Neisseria*膜会合タンパク質（好ましくは外膜タンパク質、特に内在性外膜タンパク質）。*Neisseria*抗原のこれらの組合せは、*Neisseria*感染に対するワクチンの効力の驚くべき増強につながるといわれる[95]。
。

【0068】

特に好ましい組成物は、以下の5つの抗原のうちの1以上を含む[96]：（1）「NadA」タンパク質（好ましくはオリゴマー形態（例えば、トリマー形態））；（2）「741」タンパク質；（3）「936」タンパク質；（4）「953」タンパク質；および（5）「287」タンパク質。

【0069】

MenB由来の「NadA」（*Neisseria*の付着因子A）は、参考文献80においてタンパク質「961」として開示されており（配列番号2943および配列番号2944）、そして参考文献75において「NMB1994」として開示されている（GenBank登録番号11352904および7227256もまた参照のこと）。このタンパク質の詳細な研究は、参考文献97において見出され得る。本発明に従って使用される場合、NadAは、種々の形態をとり得る。NadAの好ましい形態は、トランケーション（truncation）改变体または欠失改变体（例えば、参考文献83～85に開示されているトランケーション改变体または欠失改变体）である。特に、そのC末端膜アンカーを有さないNadA（例えば、本明細書中の配列番号1を与える、2996株についての残基351～残基405の欠失）が好ましく、これは本明細書中で、時に、例えば上付き「C」の使用（例えば、NadA（C））により区別される。その膜アンカードメインを有さないNadAのE.coliにおける発現は、培養上清へのこのタンパク質の分泌をもたらし、同時にその23マーリーダーペプチドの除去が生じる（例えば、2996株については327マーを残す[本明細書中で、配列番号2]）。そのリーダーペプチドを有さないポリペプチドは、本明細書中で、時に、上付き「NL」の使用（例えば、NadA（NL）またはNadA（C）（NL））により区別される。好ましいNadAポリペプチドは、以下のアミノ酸配列を有する：（a）配列番号2に対して50%以上の（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれより高い）同一

10

20

30

40

50

性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個連続したアミノ酸のフラグメントを含むアミノ酸配列であって、ここで、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またはそれより大きい）であるアミノ酸配列。（b）についての好ましいフラグメントは、配列番号1のC末端および／またはN末端から、1個以上（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個またはそれより多く）のアミノ酸が欠けている（例えば、N a d A（C）、N a d A（N L）、N a d A（C）（N L））。他の好ましいフラグメントは、配列番号1由来のエピトープを含み、そして配列番号1の特に好ましいフラグメントは、配列番号2である。これらの種々の配列は、N a d A改变体（例えば、対立遺伝子改变体、ホモログ、オルソログ（ortholog）、パラログ（paralog）、変異体など）を包含する。種々のN a d A配列は、参考文献98の図9に示される。

【0070】

Men B由来の「741」タンパク質は、参考文献80（配列番号2535および配列番号2536）において開示され、そして参考文献75において「NMB1870」として開示される（GenBank登録番号GI：7227128もまた参照のこと）。血清群Aにおける対応するタンパク質[74]は、GenBank登録番号7379322を有する。741は、本来、リポタンパク質である。本発明に従って使用される場合、741タンパク質は、種々の形態をとり得る。741の好ましい形態は、トランケーション改变体または欠失改变体である（例えば、参考文献83～85に開示されているトランケーション改变体または欠失改变体）。特に、741のN末端は、そのポリグリシン配列まで欠失されても、およびポリグリシン配列を含めて欠失されてもよく（すなわち、MC58株の残基1～残基72の欠失[本明細書中で、配列番号3]）、この配列は、時に、本明細書中で、接頭辞「G」の使用により区別される。この欠失は、発現を増強し得る。この欠失はまた、741の脂質化部位を除去する。好ましい741配列は、以下のアミノ酸配列を有する：（a）配列番号3に対して50%以上（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれより高い）の同一性を有するアミノ酸配列；および／または（b）配列番号3由来の少なくともn個連続するアミノ酸のフラグメントを含むアミノ酸配列であって、ここで、nは、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またはそれより多く）である、アミノ酸配列。（b）についての好ましいフラグメントは、741由来のエピトープを含む。他の好ましいフラグメントは、配列番号3のC末端および／またはN末端から、1個以上（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個またはそれより多く）のアミノ酸が欠けている。これらの配列は、741改变体（例えば、対立遺伝子改变体、ホモログ、オルソログ、パラログ、変異体など）を包含する。種々の741配列は、参考文献85の配列番号1～配列番号22、参考文献99の配列番号1～配列番号23および参考文献100の配列番号1～配列番号299において見出され得る。

【0071】

血清群B由来の「936」タンパク質は、参考文献80（配列番号2883および配列番号2884）に開示され、「NMB2091」は、参考文献75に開示される（GenBank登録番号GI：7227353もまた参照のこと）。血清群Aにおける対応する遺伝子[74]は、GenBank登録番号7379093を有する。本発明に従って使用される場合、936タンパク質は、種々の形態をとり得る。936の好ましい形態は、トランケーション改变体または欠失改变体（例えば、参考文献83～85に開示されているトランケーション改变体または欠失改变体）である。特に、936のN末端リーダーペプチドが、欠失され得る（例えば、936（N L）[本明細書中で、配列番号4]を与える、MC58株の残基1～残基23の欠失）。好ましい936配列は、以下のアミノ酸配列を有する：（a）配列番号4に対して50%以上（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれより高い）の同一性を有するアミノ酸配列；および／

10

20

30

40

50

または(b)配列番号 4 由来の少なくとも n 個連続したアミノ酸のフラグメントを含むアミノ酸配列であって、ここで、n が、7 以上(例えれば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 またはそれより多く)である、アミノ酸配列。(b)についての好ましいフラグメントは、936 由来のエピトープを含む。他の好ましいフラグメントは、配列番号 4 の C 末端および / または N 末端由来の 1 個以上(例えれば、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 またはそれより多く)のアミノ酸が欠けている。これらの配列は、936 改変体(例えれば、対立遺伝子改変体、ホモログ、オルソログ、パラログ、変異体など)を包含する。

【 0072 】

10

血清群 B 由来の「 953 」タンパク質は、参考文献 80 (配列番号 2917 および配列番号 2918) に開示され、参考文献 75 において「 NMB1030 」として開示される(GenBank 登録番号 GI : 7226269 または参照のこと)。血清群 A における対応するタンパク質 [74] は、GenBank 登録番号 7380108 を有する。本発明に従って使用される場合、953 タンパク質は、種々の形態をとり得る。953 の好ましい形態は、トランケーション改変体または欠失改変体(例えれば、参考文献 83 ~ 85 に開示されているトランケーション改変体または欠失改変体)である。特に、953 の N 末端リーダーペプチドが、欠失され得る(例えれば、953 (^NL) [本明細書中で、配列番号 5] を与える、MC58 株の残基 1 ~ 残基 19 の欠失)。好ましい 953 配列は、以下のアミノ酸配列を有する：(a)配列番号 5 に対して 50 % 以上(例えば、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、99 % またはそれより高い)の同一性を有するアミノ酸配列；および / または(b)配列番号 5 由来の少なくとも n 個連続したアミノ酸のフラグメントを含むアミノ酸配列であって、ここで、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 またはそれより多く)である、アミノ酸配列。(b)についての好ましいフラグメントは、953 由来のエピトープを含む。他の好ましいフラグメントは、配列番号 5 の C 末端由来および / または N 末端由来の 1 個以上(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 またはそれより多く)のアミノ酸が欠けている。これらの配列は、936 改変体(例えれば、対立遺伝子改変体、ホモログ、オルソログ、パラログ、変異体など)を包含する。953 の対立遺伝子形態は、参考文献 82 の図 19 において見られ得る。

20

【 0073 】

30

血清群 B 由来の「 287 」タンパク質は、参考文献 80 (配列番号 3103 および配列番号 3104) に開示され、参考文献 75 において「 NMB2132 」として開示され、そして参考文献 77 において「 GNA2132 」として開示される(GenBank 登録番号 GI : 7227388 または参照のこと)。血清群 A における対応するタンパク質 [74] は、GenBank 登録番号 7379057 を有する。本発明に従って使用される場合、287 タンパク質は、種々の形態をとり得る。287 の好ましい形態は、トランケーション改変体または欠失改変体(例えれば、参考文献 83 ~ 85 に開示されているトランケーション改変体または欠失改変体)である。特に、287 の N 末端は、そのポリ - グリシン配列までおよびポリ - グリシン配列を含めて欠失され得る(例えれば、G287 [本明細書中で、配列番号 6] を与える、MC58 株についての残基 1 ~ 残基 24 の欠失)。この欠失は、発現を増強し得る。好ましい 287 配列は、以下のアミノ酸配列を有する：(a)配列番号 6 に対して 50 % 以上(例えば、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、99 % またはそれより高い)の同一性を有する、アミノ酸配列；および / または(b)配列番号 6 由来の少なくとも n 個連続したアミノ酸のフラグメントを含むアミノ酸配列であって、ここで、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 またはそれより多く)である、アミノ酸配列。(b)についての好ましいフラグメントは、287 由来のエピトープを含む。他の好ましいフラグメントは、配列番号 6 の C 末

40

50

端由来および / または N 末端由来の 1 個以上 (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 個またはそれより多く) のアミノ酸が欠けている。これらの配列は、 287 改変体 (例えば、 対立遺伝子改変体、 ホモログ、 オルソログ、 パラログ、 変異体など) を包含する。 287 の対立遺伝子形態は、 参考文献 82 の図 5 および図 15 、ならびに参考文献 80 の実施例 13 および図 21 において見られ得る (配列番号 3179 ~ 配列番号 3184) 。

【 0074 】

好ましい MenB 抗原は、 2996 株、 MC58 株、 95N477 株および 394 / 98 株のうちの 1 種において見出されるアミノ酸配列を含む。タンパク質 287 は、 好ましくは、 2996 株由来であるか、 または、 より好ましくは、 394 / 98 株由来である。
タンパク質 741 は、 好ましくは、 血清群 B の MC58 株、 2996 株、 394 / 98 株もしくは 95N477 株由来であるか、 または、 血清群 C の 90 / 18311 株由来である。 MC58 株が、 より好ましい。タンパク質 936 、タンパク質 953 およびタンパク質 N ad A は、 好ましくは、 2996 株由来である。組成物が、 特定のタンパク質抗原 (例えば、 741 または 287) を含有する場合、 その組成物は、 1 種より多い改変体の形態で (例えば、 同じタンパク質であるが、 1 種より多い株由来である) 、 その抗原を含有し得る。これらのタンパク質は、 縦列タンパク質または別個のタンパク質として含まれ得る。

【 0075 】

しかし、 いくつかの実施形態では、 本発明の組成物は、 同じタンパク質であるが 1 種より多い株由来であるタンパク質を含む。このアプローチは、 741 タンパク質について有効であることが見出されている。このタンパク質は、 抗髓膜炎菌抗体応答を惹起するために極めて有効な抗原であり、 全ての髓膜炎菌血清群にわたって発現されている。系統発生的分析は、 これらのタンパク質が 2 つの群に分かれること、 およびそれらの分けられたもののうちの一方が、 合計 3 つの改変体をさらに与え [101] 、 そして一方で、 所定の改変体に対して惹起された血清は、 同じ改変体群内においては殺菌性であり、 他の 2 つの改変体のうちの 1 つを発現する株に対しては活性ではないこと (すなわち、 改変体の交差防御は存在するが、 改変体間の交差防御は存在しないこと) を示している [99 , 101] 。従って、 最大の株にまたがった (cross - strain) 効力のためには、 組成物が、 タンパク質 741 の 1 種より多い改変体を含有すべきことが好ましい。各々の改変体由来の例示的配列を、 本明細書内で、 配列番号 10 、 配列番号 11 および配列番号 12 に与え、 これらの配列は、 天然のリポタンパク質形態では脂質が共有結合する N 末端システイン残基で始まる。従って、 この組成物が、 以下のうちの少なくとも 2 種を含有すべきことが好ましい： (1) 配列番号 10 に対して少なくとも a % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、 そして / または配列番号 10 由来の少なくとも x 個連続するアミノ酸のフラグメントからなるアミノ酸配列を含む、 第 1 のタンパク質； (2) 配列番号 11 に対して少なくとも b % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、 そして / または配列番号 11 由来の少なくとも y 個連続するアミノ酸のフラグメントからなるアミノ酸配列を含む、 第 2 のタンパク質； ならびに (3) 配列番号 12 に対して少なくとも c % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、 そして / または配列番号 12 由来の少なくとも z 個連続するアミノ酸のフラグメントからなるアミノ酸配列を含む、 第 3 のタンパク質。 a の値は、 少なくとも 85 (例えば、 86 、 87 、 88 、 89 、 90 、 91 、 92 、 93 、 94 、 95 、 96 、 97 、 98 、 99 、 99.5 またはそれより大きい) である。 b の値は、 少なくとも 85 (例えば、 86 、 87 、 88 、 89 、 90 、 91 、 92 、 93 、 94 、 95 、 96 、 97 、 98 、 99 、 99.5 またはそれより大きい) である。 c の値は、 少なくとも 85 (例えば、 86 、 87 、 88 、 89 、 90 、 91 、 92 、 93 、 94 、 95 、 96 、 97 、 98 、 99 、 99.5 またはそれより大きい) である。 a の値、 b の値および c の値は、 本質的に、 互いに関連しない。 x の値は、 少なくとも 7 (例えば、 8 、 9 、 10 、 11 、 12 、 13 、 14 、 15 、 16 、 17 、 18 、 19 、 20 、 21 、 22 、 23 、 24 、 25 、 26 、 27 、 28 、 29 、 30 、 35 、 40 、 45 、 50 、 60 、 70 、 80) である。

10

20

30

40

50

0、90、100、120、140、160、180、200、225、250)である。yの値は、少なくとも7(例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、225、250)である。zの値は、少なくとも7(例えば、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、225、250)である。xの値、yの値およびzの値は、本質的に、互いに関連しない。いずれの所定の741アミノ酸配列も、分類(1)、分類(2)および分類(3)のうちの1種より多くに分類されないことが好ましい。従って、いずれの所定の741配列も、分類(1)、分類(2)および分類(3)のうちのただ1種にのみ分類される。従って、以下が好ましい:タンパク質(1)が、タンパク質(2)に対してi%未満の配列同一性を有すること;タンパク質(1)が、タンパク質(3)に対してj%未満の配列同一性を有すること;およびタンパク質(2)が、タンパク質(3)に対してk%未満の配列同一性を有する。iの値は、60以上(例えば、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90など)であり、最大がaである。jの値は、60以上(例えば、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90など)であり、最大がbである。kの値は、60以上(例えば、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90など)であり、最大がcである。iの値、jの値およびkの値は、本質的に、互いに関連しない。

【0076】

本発明の組成物は、少数(例えば、t種より少ない抗原、ここで、tは、10、9、8、7、6、5、4または3である)の精製された血清群B抗原を含む。この組成物が複雑な抗原混合物も規定されていない抗原混合物も含まないことが特に好ましい。例えば、外膜小胞を組成物中に含まないことが好ましい。この抗原は好ましくは、異種宿主において組換えにより発現され、次いで精製される。t種のMenB抗原を含む組成物については、t種の別個のポリペプチドが存在し得るが、複雑さをなおさらには減らすために、これらの抗原のうちの少なくとも2種を単一のポリペプチド鎖(「ハイブリッド」タンパク質[参考文献83~85])として発現することが好ましい。すなわち、その結果、t種の抗原は、tよりも少ない種類のポリペプチドを形成する。ハイブリッドタンパク質は、2つの主な利点を提供する:第1に、不安定であり得るかまたはそのままでほとんど発現されないかもしれないタンパク質が、この問題を克服する適切なハイブリッドパートナーを付加することによって補助され得る;第2に、2つの別々に有用なタンパク質を産生するためにたった1種の発現および精製を用いることが必要とされるので、商業的製造が単純化される。本発明の組成物中に含まれるハイブリッドタンパク質は、上記に列挙した抗原のうちの2以上(すなわち、2、3、4または5)を含み得る。5種の抗原の2種からなるハイブリッドが好ましい。

【0077】

5種の基本抗原(NaDA、741、953、936および287)の組み合わせ内で、ある抗原は、1種より多いハイブリッドタンパク質において存在し得るか、および/または非ハイブリッドタンパク質として存在し得る。しかし、抗原は、ハイブリッドとして存在するかまたは非ハイブリッドとして存在するかのいずれかが好ましいが、両方として存在することは好ましくない。しかし、ハイブリッド抗原および非ハイブリッド(好ましくは、リボタンパク質)抗原の両方としてタンパク質741を含むことは、有用であり得る(特に、1種より多い741改変体が使用される場合)。

【0078】

ハイブリッドタンパク質は、式 $\text{NH}_2 - \text{A} - [-\text{X}-\text{L}-]_n - \text{B} - \text{COOH}$ により表され得、ここで：Xは、5種の基本抗原のうちの1種のアミノ酸配列であり；Lは、必要に応じたリンカーアミノ酸配列であり；Aは、必要に応じたN末端アミノ酸配列であり；Bは、必要に応じたC末端アミノ酸配列であり；そしてnは、2、3、4または5である。

【0079】

最も好ましくは、nは2である。本発明において使用するための2抗原ハイブリッドとしては、以下が挙げられる：NadAおよび741；NadAおよび936；NadAおよび953；NadAおよび287；741および936；741および953；741および287；936および953；936および287；953および287。2種の好ましいタンパク質は、以下である：X₁が936であり、かつX₂が741である；X₁が287であり、かつX₂が953である。

【0080】

-X-部分が、その野生型形態においてリーダーペプチド配列を有する場合、これは、ハイブリッドタンパク質に含まれてもよくまたは削除されてもよい。いくつかの実施形態において、このリーダーペプチドは、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を除いて、欠失される（すなわち、X₁のリーダーペプチドは維持されるが、X₂...X_nのリーダーペプチドは、削除される）。このことは、全てのリーダーペプチドを削除し、かつ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価である。

【0081】

[- X - L -] の各々のnの場合について、リンカーアミノ酸配列-L-は、存在してもよく、存在しなくてもよい。例えば、n=2である場合、上記ハイブリッドは、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$ などであり得る。リンカーアミノ酸配列-L-は、代表的に、短い（例えば、20以下（すなわち、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）のアミノ酸）。例としては、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を含有する（n=2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれより大きい））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またはそれより大きい））が挙げられる。他の適切なリンカーアミノ酸配列は、当業者に明らかである。有用なリンカーは、Gly-SerジペプチドがBamHI制限酵素部位から形成されていてクローニングおよび操作が容易になるGGGGG（配列番号9）であり、そして(Gly)₄テトラペプチドは、代表的なポリ-グリシンリンカーである。X_{n+1}が、Gタンパク質であり、かつL_nがグリシンリンカーである場合、これは、X_{n+1}が、Gタンパク質ではなく、かつL_nが存在しないことと等価であり得る。

【0082】

-A-は、任意のN末端アミノ酸配列である。-A-は、代表的に、短い（例えば、40以下（すなわち、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）のアミノ酸）。例としては、タンパク質輸送をもたらすリーダー配列またはクローニングもしく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またはそれより大きい））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、好ましくは、N末端メチオニンを提供するオリゴペプチド（例えば、1、2、3、4、5、6、7または8アミノ酸を有する）である。

【0083】

10

20

30

40

50

- B - は、必要に応じた C 末端アミノ酸配列である。- B - は、代表的に、短い（例えば、40以下（すなわち、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）のアミノ酸）。例としては、タンパク質輸送をもたらす配列、クローニングもしく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またはそれより大きい）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、当業者に明らかである。

【0084】

10

2種の特に好ましい本発明のハイブリッドタンパク質は、以下のとおりである：

【0085】

【表1】

n	A	X₁	L₁	X₂	L₂	B	配列番号
2	MA	ΔG287	GSGGGG	953 ^(NL)	—	—	7
2	M	936 ^(NL)	GSGGGG	ΔG741	—	—	8

これらの2種のタンパク質は、（特に、配列番号2を有する）NadAと組み合わせて使用され得る。従って、本発明について使用するためのMenB抗原の好ましい組成物は、従って、配列番号2のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド、配列番号7のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドおよび配列番号8のアミノ酸配列を含む第3のポリペプチドを含む。これは、本発明について使用するためのMenB抗原の好ましい群である。

【0086】

20

上述のように、本発明の組成物は、MenBの超毒性系統A4、超毒性系統ET-5および系統3のうちの2種または3種に対して有効な血清殺菌性抗体応答を誘導し得る。これらは、超毒性系統のサブグループI、サブグループII、サブグループIV-1またはET-37複合体の1種以上に対する殺菌性抗体応答および他の系統（例えば、超侵襲性系統）に対する殺菌性抗体応答をさらに誘導し得る。これらの抗体応答は、マウスにおいて都合よく測定され、そしてワクチン効力の標準的な指標である[例えば、参考文献77の巻末の注14を参照のこと]。血清殺菌活性（SBA）は、補体によって媒介される細菌殺傷を測定し、そしてヒトまたはウサギ乳仔の補体を用いてアッセイされ得る。WHO基準は、ワクチンが、レシピエントの90%より多くにおいて、少なくとも4倍のSBA上昇を誘導することを要求している。

30

【0087】

この組成物は、これらの超毒性系統内の各々および全てのMenB株に対して殺菌性抗体応答を誘導する必要はない；むしろ、特定の超毒素系統内の血清群Bの髄膜炎菌の4種以上のさらなる株の任意の所定の群に対して、この組成物により誘導される抗体は、この群のうちの少なくとも50%（例えば、60%、70%、80%、90%またはそれより高い）に対して殺菌性である。好ましい株群は、以下の国のうちの少なくとも4つにおいて単離された株を含む：GB、AU、CA、NO、IT、US、NZ、NL、BRおよびCU。上記血清は、好ましくは、少なくとも1024（例えば、2¹⁰、2¹¹、2¹²、2¹³、2¹⁴、2¹⁵、2¹⁶、2¹⁷、2¹⁸またはそれより高い、好ましくは、少なくとも2¹⁴）の殺菌力価を有する。すなわち、この血清は、参考文献77に記載されるように、1/1024に希釀される場合、特定の株の試験細菌の少なくとも50%を殺傷可能である。

40

【0088】

好ましい組成物は、血清群Bの髄膜炎菌の以下の株に対する殺菌応答を誘導し得る：(i)クラスターA4由来の961-5945株（B：2b：P1.21, 16）および/またはG2136株（B：-）；(ii)ET-5複合体由来のMC58株（B：15：

50

P 1 . 7 , 1 6 b) および / または 4 4 / 7 6 株 (B : 1 5 : P 1 . 7 , 1 6) ; (i i i) 系統 3 由来の 3 9 4 / 9 8 株 (B : 4 : P 1 . 4) および / または B Z 1 9 8 株 (B : N T : -) 。より好ましい組成物は、 9 6 1 - 5 9 4 5 株、 4 4 / 7 6 株および 3 9 4 / 9 8 株に対する殺菌応答を誘導し得る。 9 6 1 - 5 9 4 5 株および G 2 1 3 6 株は、ともに *Neisseria* MLST 基準株である [参考文献 1 0 2 における i d s 6 3 8 および 1 0 0 2] 。 M C 5 8 株は、広範に利用可能であり (例えば、 A T C C B A A - 3 3 5) 、そして参考文献 7 5 において配列決定された株であった。 4 4 / 7 6 株は、広範に使用され、そして特徴付けられており (例えば、参考文献 1 0 3) 、そして *Neisseria* MLST 基準株の 1 つである [参考文献 1 0 2 における i d 2 3 7 ; 参考文献 1 0 4 における表 2 の 3 2 行目] 。 3 9 4 / 9 8 株は、元々、ニュージーランドにおいて 1 9 9 8 年に単離され、そしてこの株を用いたいくつかの公開された研究が存在している (例えば、参考文献 1 0 5 および 1 0 6) 。 B Z 1 9 8 株は、別の MLST 基準株である [参考文献 1 0 2 における i d 4 0 9 ; 参考文献 1 0 4 における表 2 の 4 1 行目] 。この組成物は、 E T - 3 7 複合体由来の血清群 W 1 3 5 の L N P 1 7 5 9 2 株 (W 1 3 5 : 2 a : P 1 . 5 , 2) に対する殺菌応答をさらに誘導し得る。これは、フランスにおいて 2 0 0 0 年に単離された H a j i 株である。

【 0 0 8 9 】

本発明の組成物に含まれ得る他の M e n B ポリペプチド抗原としては、以下のアミノ酸配列：参考文献 7 8 からの配列番号 6 5 0 ; 参考文献 7 8 からの配列番号 8 7 8 ; 参考文献 7 8 からの配列番号 8 8 4 ; 参考文献 7 9 からの配列番号 4 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 5 9 8 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 8 1 8 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 8 6 4 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 8 6 6 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 1 1 9 6 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 1 2 7 2 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 1 2 7 4 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 1 6 4 0 ; 参考文献 8 0 由来の配列番号 1 7 8 8 ; 参考文献 8 0 由来の配列番号 2 2 8 8 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 4 6 6 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 5 5 4 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 5 7 6 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 6 0 6 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 6 0 8 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 6 1 6 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 6 6 8 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 7 8 0 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 9 3 2 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 9 5 8 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 9 7 0 ; 参考文献 8 0 からの配列番号 2 9 8 8 、のうちの 1 個を含む M e n B ポリペプチド抗原、または (a) 上記配列に対して 5 0 % 以上の (例えば、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 9 % またはそれより高い) 同一性を有する ; および / もしくは (b) 上記配列由来の少なくとも n 個連続するアミノ酸のフラグメントを含み、 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 またはそれより高い) である、アミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。 (b) についての好ましいフラグメントは、関連配列由来のエピトープを含む。これらのポリペプチドのうちの 1 種より多く (例えば、 2 種、 3 種、 4 種、 5 種、 6 種、 7 種、 8 種、 9 種、 1 0 種、 1 1 種、 1 2 種、 1 3 種、 1 4 種またはそれより多く) が含まれ得る。

【 0 0 9 0 】

(さらなる抗原性成分)

非髄膜炎菌でかつ非ナイセリア属の抗原 (好ましくは、髄膜炎菌成分に対する免疫応答を減少させないもの) もまた、本発明の組成物に含まれ得る。例えば、参考文献 1 0 7 は、 H i b サッカリドと一緒に N . m e n i n g i t i d i s 血清群 B および血清群 C 由来のオリゴサッカリドの組み合わせを開示している。特に好ましい非髄膜炎菌抗原としては、以下が挙げられる：

- 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 1 0 8 の第 3 章] 。

【 0 0 9 1 】

- 破傷風抗原 (例えば、破傷風トキソイド) [例えば、参考文献 1 0 8 の第 4 章] 。

10

20

30

40

50

【0092】

- *B. pertussis* 由来の百日咳ホロトキシン (holotoxin) (PT) および糸状赤血球凝集素 (FHA) (必要に応じて、また、ペルタクチンならびに / または凝集原 2 および凝集原 3 と組み合わせて) [例えば、参考文献 109 および 110]。

【0093】

- 細胞性破傷風抗原。

【0094】

- A 型肝炎ウイルス由来の抗原 (例えば、不活性化ウイルス) [例えば、 111 , 112]。

【0095】

- 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、 112 , 113] (表面抗原は、好ましくは、リン酸アルミニウムに吸着される [114])。

10

【0096】

- ポリオ抗原 (例えば、 IPV) [例えば、 115 , 116]。

【0097】

この混合物は、これらのさらなる抗原のうちの 1 種以上を含有し得、これらの抗原は、必要な場合、無毒化 (例えば、化学的手段および / または遺伝的手段による百日咳トキシンの無毒化) され得る。

【0098】

ジフテリア抗原がこの混合物中に含有される場合、破傷風抗原および百日咳抗原もまた含有することが好ましい。同様に、破傷風抗原が含有される場合、ジフテリア抗原および百日咳抗原もまた含有することが好ましい。同様に、百日咳抗原が含有される場合、ジフテリア抗原および破傷風抗原もまた含有することが好ましい。

20

【0099】

この混合物中の抗原は、代表的に、少なくとも各々 1 μg / ml の濃度で存在する。一般的に、任意の所定の抗原の濃度は、その抗原に対する免疫応答を誘発するために充分である。実際の免疫原性 (例えば、ELISA 力価) は低減され得るが、これらを合わせることにより、個々のサッカリド抗原の防御効力が除去されないことが好ましい。

【0100】

この混合物中でのタンパク質抗原の使用の代替として、この抗原をコードする核酸が使用され得る。従って、この混合物のタンパク質成分は、そのタンパク質をコードする核酸 (好ましくは、 (例えば、プラスミド形態の) DNA) により置換され得る。同様に、本発明の組成物は、サッカリド抗原を模倣するタンパク質 (例えば、ミモトープ (mimotope) [117] または抗イディオタイプ抗体) を含有し得る。これらは、個々のサッカリド成分を置換し得るか、または、それらを補充し得る。一例として、ワクチンは、Men C [118] または Men A [119] の莢膜ポリサッカリドのペプチド模倣物を、そのサッカリド自体の代わりに、含有し得る。

30

【0101】

本発明の組成物に含まれるのに好ましい 2 種の非髄膜炎菌抗原は、 *H. influenzae* B 型 (Hib) を防御するものおよび *Streptococcus pneumoniae* を防御するものである。

40

【0102】

(*Haemophilus influenzae* B 型 (Hib))

この組成物が *H. influenzae* B 型抗原を含む場合、それは、代表的に、 *Hib* 莢膜サッカリド抗原である。 *H. influenzae* b 由来のサッカリド抗原は、周知である。

【0103】

有利なことに、この *Hib* サッカリドは、(特に、子供における) その免疫原性を増強するために、キャリアタンパク質に共有結合される。一般的にポリサッカリド結合体の調

50

製および特に H i b 荚膜ポリサッカリドの調製は、良く実証されている [例えば、参考文献 21 ~ 29 など]。本発明は、任意の適切な H i b 結合体を使用し得る。適切なキャリアタンパク質は、上記に記載され、そして、H i b サッカリドに関して好ましいキャリアは、CRM₁₉₇ (「HbOC」)、破傷風トキソイド (「PRP-T」) および N.meningitis の外膜複合体 (「PRP-OMP」) である。

【0104】

結合体のサッカリド部分は、ポリサッカリド (例えば、全長ポリリボシルリビトールホスフェート (PRP)) であり得るが、ポリサッカリドを加水分解してオリゴサッカリド (例えば、約 1 kDa ~ 約 5 kDa の MW) を形成することが好ましい。

【0105】

好ましい結合体は、アジピン酸リンカーを介して CRM₁₉₇ へと共有結合された H i b オリゴサッカリドを含む [120, 121]。破傷風トキソイドもまた、好ましいキャリアである。

【0106】

H i b 抗原の投与は、好ましくは、0.15 μg / ml 以上の抗 PRP 抗体濃度をもたらし、そして、より好ましくは、1 μg / ml 以上の抗 PRP 抗体濃度をもたらす。

【0107】

組成物が、H i b サッカリド抗原を含有する場合、組成物は、水酸化アルミニウムアジュバントをまた含有しないことが好ましい。この組成物がリン酸アルミニウムアジュバンントを含有する場合、この H i b 抗原は、このアジュバントに吸着されてもよく [122]、または吸着されなくてもよい [123]。吸着の防止は、抗原 / アジュバント混合の間の正確な pH、適切な電荷ゼロ点を有するアジュバントおよび組成物中の種々の異なる抗原に対する適切な混合順序を選択することにより、達成され得る [124]。

【0108】

本発明の組成物は、1種より多い H i b 抗原を含有し得る。H i b 抗原は、(例えば、本発明の髄膜炎菌組成物による再構成のために) 凍結乾燥され得る。

【0109】

(*Streptococcus pneumoniae*)

この組成物が、S. pneumoniae 抗原を含む場合、それは、代表的に、(好ましくは、キャリアタンパク質に結合体化された) 荚膜サッカリド抗原である [例えば、参考文献 125 ~ 127]。S. pneumoniae の 1種より多くの血清型由来のサッカリドを含有することが好ましい。例えば、23種の異なる血清型由来のポリサッカリドの混合物が広範に使用されており、5種と 11種との間の異なる血清群由来のポリサッカリドを用いた結合体ワクチンも同様である [128]。例えば、PrevNarTM [1] は、7種の血清型 (4、6B、9V、14、18C、19F および 23F) 由来の抗原を含有し、各々のサッカリドは、個々に、還元的アミノ化により CRM₁₉₇ に結合体化され、0.5 ml 用量あたり 2 μg の各々のサッカリド (4 μg の血清型 6B) を有し、そして、結合体は、リン酸アルミニウムアジュバントに吸着される。本発明の組成物は、好ましくは、少なくとも血清型 6B、血清型 14、血清型 19F および血清型 23F を含有する。結合体は、リン酸アルミニウムに吸着され得る。

【0110】

肺炎球菌由来のサッカリド抗原の使用の代替として、この組成物は、1種以上のポリペプチド抗原を含有し得る。肺炎球菌のいくつかの株についてのゲノム配列が利用可能であり [129, 130]、そして逆ワクチン学の対象とされ [131 ~ 134] て適切なポリペプチド抗原が同定され得る [135, 136]。例えば、この組成物は、参考文献 137 で定義されたような、以下の抗原のうちの 1種以上を含有し得る : PhtA、PhtD、PhtB、PhtE、SpsA、LytB、LytC、LytA、Sp125、Sp101、Sp128、Sp130 および Sp130。この組成物は、これらの抗原のうちの 1種より多く (例えば、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、11種、12種、13種または 14種) を含有し得る。

10

20

30

40

50

【0111】

いくつかの実施形態において、この組成物は、肺炎球菌由来のサッカリド抗原およびポリペプチド抗原の両方を含有し得る。これらは、単純に混合して使用されてもよく、またはこの肺炎球菌サッカリド抗原は、肺炎球菌タンパク質に結合体化されてもよい。このような実施形態に適切なキャリアタンパク質としては、前の段落において列挙した抗原が挙げられる[137]。

【0112】

肺炎球菌抗原は、例えば、髄膜炎菌抗原および／またはHib抗原と一緒に、凍結乾燥され得る。

【0113】

10

(薬学的組成物)

本発明の組成物は、上述の成分に加えて、代表的に、1以上の「薬学的に受容可能なキャリア」を含有し、このようなキャリアとしては、それ自体ではその組成物を受容する個体に有害な抗体の生成を誘導しない、任意のキャリアが挙げられる。適切なキャリアは、代表的に、大きく、ゆっくりと代謝される高分子（例えば、タンパク質、ポリサッカリド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、スクロース[138]、トレハロース[139]、ラクトース、および脂質凝集物（例えば、油小滴またはリポソーム）である。このようなキャリアは、当業者に周知である。上記ワクチンはまた、希釈剤（例えば、水、生理食塩水、グリセロールなど）を含有し得る。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）が存在し得る。無菌で発熱物質を含まず、リン酸緩衝化された生理食塩水は、代表的なキャリアである。薬学的に受容可能な賦形剤の徹底的な考察は、参考文献140において入手可能である。

20

【0114】

本発明の組成物は、水性形態（すなわち、液体または懸濁物）である。この型の液体处方物は、水性媒質中で再構成する必要性なくこの組成物がそのパッケージングされた形態から直接的に投与されることを可能にし、従って、注射に理想的である。組成物は、バイアル中に存在してもよく、またはこれらは充填済み（ready-filled）注射器中に存在してもよい。この注射器は、針付きまたは針無しで供給され得る。注射器は、単回用量のこの組成物を含み、一方、バイアルは、単回用量または複数回用量を含み得る。

【0115】

30

本発明の液体組成物はまた、凍結乾燥形態から他のワクチンを再構成するために（例えば、凍結乾燥されたHib抗原またはDTP抗原を再構成するために）適している。本発明の組成物がこのような即座の再構成のために用いられるべき場合、本発明は、キットを提供し、このキットは、2つのバイアルを備えてもよく、またはこのキットは、1つの充填済み注射器および1つのバイアルを備えてもよく、この注射器の内容物は、注射前にこのバイアルの内容物を再活性化するために用いられる。

【0116】

本発明の組成物は、単位用量形態または複数用量形態でパッケージングされ得る。複数用量形態については、バイアルが、充填済み注射器よりも好ましい。有効投薬容量は、慣用的に確立され得るが、注射用組成物の代表的なヒト用量は、0.5mlの容量を有する。

40

【0117】

本発明の組成物のpHは、好ましくは、pH6とpH8との間であり、好ましくは約7である。適切なpHは、緩衝剤の使用によって維持され得る。組成物が水酸化アルミニウム塩を含有する場合、ヒスチジン緩衝剤を使用することが好ましい[141]。この組成物は、無菌および／または発熱物質を含まないかもしれない。本発明の組成物は、ヒトに関して等張であり得る。

【0118】

本発明の組成物は免疫原性であり、そしてより好ましくはワクチン組成物である。本発明によるワクチンは、予防的（すなわち、感染を防ぐため）または治療的（すなわち、感

50

染を処置するため)のいずれかであり得るが、代表的には予防的である。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、ならびに必要に応じて、任意の他の成分を含有する。「免疫学的有効量」により、単回用量においてかまたはある一連のものの一部としてのいずれかでの、個体に対するその量の投与が、処置または予防のために有効であることを意味する。この量は、処置されるべき個体の健康状態および身体状態、年齢、処置されるべき個体の分類学群(例えば、非ヒト靈長類、靈長類など)、その個体の免疫系の抗体合成能力、所望される防御の程度、そのワクチンの処方、処置医によるその医学的状態の評価および他の関連因子に依存して変化する。この量が、慣習的な試験を通して決定され得る比較的広範な範囲にわたることが予想される。

【0119】

10

各々の用量内で、個々のサッカリド抗原の量は、一般的に、(サッカリドの質量として測定して) $1 \mu\text{g} \sim 50 \mu\text{g}$ の間(例えば、約 $1 \mu\text{g}$ 、約 $2 \sim 5 \mu\text{g}$ 、約 $4 \mu\text{g}$ 、約 $5 \mu\text{g}$ または約 $10 \mu\text{g}$)である。

【0120】

各サッカリドは、1用量あたり、実質的に同じ量で存在し得る。しかし、MenYサッカリド:MenW135サッカリドの比(w/w)は、1より大きくてよく(例えば、 $2:1$ 、 $3:1$ 、 $4:1$ 、 $5:1$ 、 $10:1$ またはそれより大きく)、そして/またはMenYサッカリド:MenCサッカリドの比(w/w)は、1未満(例えば、 $1:2$ 、 $1:3$ 、 $1:4$ 、 $1:5$ またはより低く)であってもよい。

【0121】

20

血清群A:血清群C:血清群W135:血清群Y由来のサッカリドについての好ましい比(w/w)は、 $1:1:1:1$ 、 $1:1:1:2$ 、 $2:1:1:1$ 、 $4:2:1:1$ 、 $8:4:2:1$ 、 $4:2:1:2$ 、 $8:4:1:2$ 、 $4:2:2:1$ 、 $2:2:1:1$ 、 $4:4:2:1$ 、 $2:2:1:2$ 、 $4:4:1:2$ および $2:2:2:1$ である。血清群C:血清群W135:血清群Y由来のサッカリドについての好ましい比(w/w)は、 $1:1:1$ 、 $1:1:2$ 、 $1:1:1$ 、 $2:1:1$ 、 $4:2:1$ 、 $2:1:2$ 、 $4:1:2$ 、 $2:2:1$ および $2:1:1$ である。実質的に等価な重量の各サッカリドを用いることが好ましい。

【0122】

30

本発明の好ましい組成物は、1用量あたり $50 \mu\text{g}$ 未満の髄膜炎菌サッカリドを含有する。他の好ましい組成物は、1用量あたり $40 \mu\text{g}$ 以下の髄膜炎菌サッカリドを含有する。他の好ましい組成物は、1用量あたり $30 \mu\text{g}$ 以下の髄膜炎菌サッカリドを含有する。他の好ましい組成物は、1用量あたり $25 \mu\text{g}$ 以下の髄膜炎菌サッカリドを含有する。他の好ましい組成物は、1用量あたり $20 \mu\text{g}$ 以下の髄膜炎菌サッカリドを含有する。他の好ましい組成物は、1用量あたり $10 \mu\text{g}$ 以下の髄膜炎菌サッカリドを含有するが、理想的には、本発明の組成物は、1用量あたり少なくとも $10 \mu\text{g}$ の総髄膜炎菌サッカリドを含有する。

【0123】

本発明の組成物は、特に、複数用量様式でパッケージングされる場合、抗菌剤を含有し得る。

40

【0124】

本発明の組成物は、洗浄剤(例えば、Tween(ポリソルベート)(例えば、Tween 80))を含有し得る。洗浄剤は、一般に、低いレベル(例えば、 0.01% 未満)で存在する。

【0125】

本発明の組成物は、ナトリウム塩(例えば、塩化ナトリウム)を含有して張度を与え得る。 $10 \pm 2 \text{ mg/mL NaCl}$ の濃度が、代表的である。

【0126】

本発明の組成物は、一般的に、緩衝剤を含有する。リン酸緩衝剤が、代表的である。

【0127】

50

本発明の組成物は一般に、他の免疫調節剤とともに投与される。特に、組成物は通常、1以上アジュバントを含む。このようなアジュバントとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

(A. 無機質含有組成物)

本発明におけるアジュバントとしての使用のために適切な無機質含有組成物としては、無機塩（例えば、アルミニウム塩およびカルシウム塩）が挙げられる。本発明は、無機塩（例えば、水酸化物（例えば、オキシヒドロキシド）、リン酸塩（例えば、ヒドロキシリノン酸塩、オルトリノン酸塩）、硫酸塩など）[例えば、参考文献142の第8章および第9章を参照のこと]、または異なる無機化合物の混合物を含み、この組成物は、任意の適切な形態（例えば、ゲル、結晶、非晶質など）をとり、そして、吸着が好ましい。この無機質含有組成物はまた、無機塩の粒子として処方され得る[143]。

【0128】

(B. 油エマルジョン)

本発明におけるアジュバントとしての使用のために適切な油エマルジョン組成物としては、スクアレン・水エマルジョン（例えば、MF59）が挙げられる[参考文献142の第10章；参考文献144もまた参考のこと。]（5%スクアレン、0.5%Tween 80および0.5%Span 85、マイクロフルイダイザー（microfluidizer）を用いて、サブミクロン粒子に処方される）。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（IFA）もまた、使用され得る。

【0129】

(C. サポニン処方物 [参考文献142の第22章])

サポニン処方物はまた、本発明においてアジュバントとして使用され得る。サポニンは、広範な植物種の樹皮、葉、茎、根および花においてさえ見られる、不均一な群のステロールグリコシドおよびトリテルペノイドグリコシドである。Quillaja saponaria (モリナの木(Molina tree))の樹皮由来のサポニンは、アジュバントとして広範に研究されている。サポニンはまた、Smilax ornata (サルサパリラ(sarsaparilla))、Gypsophilla paniculata (ブライドベール(brides veil))およびSaponaria officinalis (サボンソウ(soap root))から市販され得る。サポニンアジュバント処方物としては、精製された処方物（例えば、QS21）および液体処方物（例えば、ISCOM）が挙げられる。QS21は、Stimulon™として市販される。

【0130】

サポニン組成物は、HPLCおよびRP-HPLCを用いて精製されている。これらの技術を用いて特定の精製フラクションが同定されており、これらのフラクションとしては、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-BおよびQH-Cが挙げられる。好ましくは、このサポニンは、QS21である。QS21の生成方法は、参考文献145に開示されている。サポニン処方物はまた、ステロール（例えば、コレステロール）を含有し得る[146]。

【0131】

サポニンとコレステロールとの組み合わせが使用されて、免疫刺激複合体（immuno stimulating complex）(ISCOM)と呼ばれる独特な粒子を形成し得る[参考文献142の第23章]。ISCOMとしてはまた、代表的に、リン脂質（例えば、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）が挙げられる。任意の公知のサポニンが、ISCOMにおいて使用され得る。好ましくは、このISCOMは、Quill A、QH AおよびQH Cのうちの1つ以上を含む。ISCOMは、参考文献146～148にさらに記載されている。必要に応じて、このISCOMは、さらなる洗剤を含まなくてもよい[149]。

【0132】

サポニンベースのアジュバントの開発の概説は、参考文献150および151に見られ

10

20

30

40

50

得る。

【0133】

(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) もまた、本発明においてアジュバントとして使用され得る。これらの構造体は、一般的に、必要に応じてリン脂質と組み合わされるかまたはリン脂質とともに処方されたウイルス由来の1つ以上のタンパク質を含む。それらは、一般的に、非病原性で非複製性であり、そして一般的に、あらゆる天然ウイルスゲノムを含まない。このウイルスタンパク質は、組換え的に生成されてもよく、またはウイルス全体から単離されてもよい。ビロソームまたはVLPにおける使用のために適切なこれら10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由来のタンパク質（例えば、H A またはN A）、B型肝炎ウイルス由来のタンパク質（例えば、コアタンパク質またはキャプシドタンパク質）、E型肝炎ウイルス由来のタンパク質、麻疹ウイルス由来のタンパク質、シンドビスウイルス由来のタンパク質、ロタウイルス由来のタンパク質、口蹄疫ウイルス由来のタンパク質、レトロウイルス由来のタンパク質、ノーウォークウイルス由来のタンパク質、ヒトパピローマウイルス由来のタンパク質、H I V由来のタンパク質、R N A ファージ由来のタンパク質、Q ファージ由来のタンパク質（例えば、コートタンパク質）、G A ファージ由来のタンパク質、f r ファージ由来のタンパク質、A P 2 0 5 ファージ由来のタンパク質およびT y 由来のタンパク質（例えば、レトロトランスポゾンT y タンパク質 p 1）が挙げられる。VLPは、参考文献152～157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158においてさらに考察されている。

【0134】

(E. 細菌誘導体または微生物誘導体)

本発明における使用のために適切なアジュバントとしては、細菌誘導体または微生物誘導体（例えば、腸内細菌リポポリサッカリド (LPS) の無毒性誘導体、リピドA誘導体、免疫刺激オリゴヌクレオチドならびにADPリボシル化トキシンおよびそれらの無毒性誘導体）が挙げられる。

【0135】

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、3 脱O-アシル化モノホスホリルリピドAと、4、5または6アシル化鎖との混合物である。3 脱O-アシル化モノホスホリルリピドAの好ましい「小さい粒子」形態は、参考文献159に開示されている。3dMPLのこのような「小さい粒子」は、0.22 μmメンブレンを通って滅菌濾過するために充分小さい [159]。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 [160, 161]。

【0136】

リピドA誘導体としては、Escherichia coli由来のリピドA誘導体（例えば、OM-174）が挙げられる。OM-174は、例えば、参考文献162および163に記載されている。

【0137】

本発明におけるアジュバントとしての使用のために適切な免疫刺激性オリゴヌクレオチドとしては、CpGモチーフ（グアノシンへのホスフェート結合により連結された非メチル化シトシンを含むジヌクレオチド配列）を含む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)配列を含む、二本鎖RNAおよびオリゴヌクレオチドもまた、免疫刺激性であることが示されている。

【0138】

CpGは、ヌクレオチド改変体 / アナログ（例えば、ホスホロチオエート改変体）を含み得、そして、二本鎖または一本鎖であり得る。参考文献164、165および166は、可能なアナログ置換（例えば、グアノシンの2' - デオキシ - 7 - デアザグアノシンに50

よる置換)を開示している。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、参考文献167～172において、さらに考察されている。

【0139】

このCpG配列(例えば、GTCGTTモチーフまたはTTCGTTモチーフ)は、TLR9に導かれ得る[173]。このCpG配列(例えば、CpG-AODN)は、Th1免疫応答誘導に特異的であってもよく、または、このCpG配列(例えば、CpG-BODN)は、B細胞応答誘導に、より特異的であってもよい。CpG-AODNおよびCpG-BODNは、参考文献174～176において考察されている。好ましくは、このCpGは、CpG-AODNである。

【0140】

好ましくは、このCpGオリゴヌクレオチドは、5'末端がレセプター認識のために接近可能であるように構築される。必要に応じて、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列がそれらの3'末端で結合されて、「イムノマー(immunomer)」を形成し得る。例えば、参考文献173および177～179を参照のこと。

【0141】

細菌ADP-リボシル化トキシンおよびその無毒化誘導体は、本発明においてアジュバントとして使用され得る。好ましくは、このタンパク質は、E.coli由来(E.coli熱不安定性エンテロトキシン「LT」)、コレラ由来('CT')または百日咳由来('PT')である。粘膜アジュバントとしての無毒化ADP-リボシル化トキシンの使用は、参考文献180に記載されており、そして、非経口的アジュバントとしての無毒化ADP-リボシル化トキシンの使用は、参考文献181に記載されている。このトキシンまたはトキソイドは、好ましくは、AサブユニットおよびBサブユニットの両方を含むホロトキシンの形態である。好ましくは、このAサブユニットは、無毒化変異を含み；好ましくは、このBサブユニットは、変異していない。好ましくは、このアジュバントは、無毒化LT変異体(例えば、LT-K63、LT-R72およびLT-G192)である。ADP-リボシル化トキシンおよびその無毒化誘導体(特に、LT-K63およびLT-R72)のアジュバントとしての使用は、参考文献182～189において見出され得る。アミノ酸置換についての多くの参考文献は、好ましくは、参考文献190に記載のADP-リボシル化トキシンのAサブユニットおよびBサブユニットの整列に基づく。参考文献190は、特に、本明細書中で、その全体が参考として援用される。

【0142】

(F.ヒト免疫調節因子)

本発明におけるアジュバントとしての使用のために適切なヒト免疫刺激因子としては、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[191]など)[192]、インターフェロン(例えば、インターフェロン-γ)、マクロファージコロニー刺激因子および腫瘍壊死因子)が挙げられる。

【0143】

(G.生体接着因子および粘膜接着因子)

生体接着因子および粘膜接着因子もまた、本発明においてアジュバントとして使用され得る。適切な生体接着因子としては、エステル化ヒアルロン酸マイクロスフェア[193]または粘膜接着因子(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、ポリサッカリド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また、本発明においてアジュバントとして使用され得る[194]。

【0144】

(H.微粒子)

微粒子もまた、本発明においてアジュバントとして使用され得る。生分解性かつ無毒性の材料(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、ポリ無水物、ポリカプロラクトンなど)と、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)とか

10

20

30

40

50

ら形成される微粒子（すなわち、直径約100nm～約150μm、より好ましくは、直径約200nm～約30μm、そして、最も好ましくは、直径約500nm～約10μmの粒子）が好ましく、必要に応じて処理されて、（例えば、SDSによって）負に荷電した表面または（例えば、カチオン性洗剤（例えば、CTAB）によって）正に荷電した表面を有する。

【0145】

（I. リポソーム（参考文献142の第13章および第14章））

アジュバントとしての使用のために適切なリポソーム処方物の例は、参考文献195～197に記載されている。

【0146】

（J. ポリオキシエチレンエーテル処方物およびポリオキシエチレンエステル処方物）

本発明における使用のために適切なアジュバントとしては、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[198]。このような処方物は、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剤[199]、ならびに少なくとも1つのさらなる非イオン性界面活性剤（例えば、オクトキシノール）と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤またはポリオキシエチレンアルキルエステル界面活性剤[200]をさらに含む。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群より選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル(laureth 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-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。

【0147】

（K. ポリホスファゼン（PCPP））

PCPP処方物は、例えば、参考文献201および202において記載されている。

【0148】

（L. ムラミルペプチド）

本発明におけるアジュバントとしての使用のために適切な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。

【0149】

（M. イミダゾキノロン化合物）

本発明におけるアジュバントとしての使用のために適切なイミダゾキノロン化合物の例としては、参考文献203および204にさらに記載される、Imiquamodおよびそのホモログ（例えば、「Resiquimod 3M」）が挙げられる。

【0150】

本発明はまた、上に同定されるアジュバントの1つ以上の局面の組み合わせを含み得る。例えば、以下のアジュバント組成物が、本発明において使用され得る：(1) サポニンおよび水中油型エマルジョン[205]；(2) サポニン（例えば、QS21）+無毒性LPS誘導体（例えば、3dMPL）[206]；(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）[207]；(5) 3dMPLと、例えば、QS21および/または水中油型エマルジョンとの組み合わせ[208]；(6) マイクロフルイダイズされてサブミクロンエマルジョンにされるか、またはポルテックスされてより大きい粒子サイズのエマルジョンを生じるかのいずれかの、10%スクアレン、0.4%Tween 80TM、5%ブルロニックブロック（pluronic block）ポリマーL121およびthr-MDPを含有す

10

20

30

40

50

る S A F ; (7) 2 % スクアレン、0 . 2 % T w e e n 8 0 、ならびにモノホスホリピド A (M P L) 、トレハロースジミコレート (T D M) および細胞壁骨格 (C W S) からなる群由来の 1 つ以上の細菌細胞壁成分を含む R i b i ^{T M} アジュバント系 (R A S) (R i b i I m m u n o c h e m) (好ましくは、M P L + C W S (D e t o x ^{T M})) ；ならびに (8) 1 つ以上の無機塩 (例えは、アルミニウム塩) + L P S の無毒性誘導体 (例えは、3 d M P L) 。

【 0 1 5 1 】

免疫刺激因子として作用する他の物質は、参考文献 1 4 2 の第 7 章に開示されている。

【 0 1 5 2 】

アルミニウム塩アジュバントの使用が特に好ましく、そして抗原は一般に、このような塩に吸着される。M e n j u g a t e ^{T M} 結合体およびN e i s V a c ^{T M} M e n C 結合体は、水酸化物アジュバントを使用し、一方、M e n i n g i t e c ^{T M} は、ホスフェートを使用する。一部の抗原を水酸化アルミニウムに吸着するが、他の抗原はリン酸アルミニウムに会合させることができ本発明の組成物において可能である。しかし、一般に、単一の塩のみ (水酸化物またはリン酸塩であって、両方ではない) を使用することが好ましい。水酸化アルミニウムは好ましくは、アジュバントとしては避けられる。特に、この組成物が H i b 抗原を含む場合には、アジュバントとしては避けられる。水酸化アルミニウムを含まない組成物は、このように好ましい。むしろ、リン酸アルミニウムが用いられ得、そして代表的アジュバントは、0 . 6 m g A l ^{3 +} / m l にて含まれる、0 . 8 4 と 0 . 9 2 との間の P O ₄ / A l モル比を有する非晶質ヒドロキシリノン酸アルミニウムである。低用量のリン酸アルミニウムの吸着が、例えは、5 0 μ g / 結合体 / 用量と 1 0 0 μ g / 結合体 / 用量との間の A l ^{3 +} で使用され得る。リン酸アルミニウムが使用され、抗原をこのアジュバントに吸着しないことが所望される場合、これは、(例えは、リン酸緩衝液の使用により) 遊離のリン酸イオンを溶液中に含むことによって促進される。

【 0 1 5 3 】

全ての結合体が吸着される必要はない。すなわち、一部または全てが溶液中に遊離してもよい。

【 0 1 5 4 】

リン酸カルシウムは、別の好ましいアジュバントである。

【 0 1 5 5 】

(処置の方法)

本発明はまた、本発明の薬学的組成物を哺乳動物に投与する工程を包含する、哺乳動物において抗体応答を惹起するための方法を提供する。

【 0 1 5 6 】

本発明は、有効量の本発明の組成物を投与する工程を包含する、哺乳動物において免疫応答を惹起するための方法を提供する。この免疫応答は好ましくは防御性であり、好ましくは抗体を含む。この方法は、追加免疫応答を惹起し得る。

【 0 1 5 7 】

この哺乳動物は好ましくはヒトである。ワクチンが予防的用途のためのものである場合、ヒトは好ましくは小児 (例えは、よちよち歩きの幼児または乳児) または十代の少年少女である ; このワクチンが治療用途のためのものである場合、ヒトは好ましくは成人である。小児が意図されるワクチンはまた、例えは、安全性、投薬量、免疫原性などを評価するために、成人にも投与され得る。

【 0 1 5 8 】

本発明はまた、医薬として使用するための本発明の組成物を提供する。この医薬は好ましくは、哺乳動物において免疫応答を惹起し得 (すなわち、これは、免疫原性組成物である) 、そして好ましくはワクチンである。

【 0 1 5 9 】

本発明はまた、哺乳動物における免疫応答を惹起するための医薬の製造における以下の使用を提供する : (i) 結合体化した血清群 C 荚膜サッカリド抗原 ; (i i) 結合体化し

10

20

30

40

50

た血清群W 1 3 5 荚膜サッカリド抗原；(i i i) 結合体化した血清群Y 荚膜サッカリド抗原；(i v) 血清群B 由来の1以上のポリペプチド抗原；および必要に応じて(v) 結合体化した血清群A 荚膜サッカリド抗原。

【 0 1 6 0 】

これらの使用および方法は、以下によって引き起こされる疾患の予防および／または処置のために好ましい：*N e i s s e r i a*（例えば、髄膜炎、敗血症（s e p t i c a e m i a）、菌血症、淋病など）。細菌性および／または髄膜炎菌性の髄膜炎の予防および／または処置が好ましい。

【 0 1 6 1 】

治療処置の効力をチェックする1つの方法は、本発明の組成物の投与後に*N e i s s e r i a*の感染をモニタリングすることを含む。予防的処置の効力をチェックする1つの方法は、この組成物の投与後に5つの基本抗原に対する免疫応答をモニタリングすることを含む。本発明の組成物の免疫原性は、この組成物を、試験被験体（例えば、12ヶ月齢～16ヶ月齢の小児、または動物モデル[2 0 9]）に投与し、次いで抗莢膜I g G全体および高アビディティ抗莢膜I g Gの血清殺菌性抗体（S B A）およびE L I S A力価（G M T）を含む標準的なパラメータを決定することにより、決定され得る。これらの免疫応答は、一般的に、この組成物の投与後約4週間で決定され、そして、この組成物の投与前に決定された値と比較される。少なくとも4倍または8倍のS B A增加が好ましい。1用量より多くのこの組成物が投与される場合、1回より多くの投与後決定が行われ得る。

【 0 1 6 2 】

本発明の好ましい組成物は、患者において、容認可能な百分率のヒト被験体に対して各々の抗原成分についての血清防御基準より優れた抗体力価を与え得る。宿主がその力価より上ではその抗原に対してセロコンバージョンされると考えられる関連する抗体力価を有する抗原は周知であり、そしてこのような力価は、W H Oのような機関により公開されている。好ましくは、被験体の統計学的に有意なサンプルのうちの80%より多く、より好ましくは90%より多く、さらにより好ましくは93%より多く、そして最も好ましくは96～100%が、セロコンバージョンされる。

【 0 1 6 3 】

本発明の組成物は一般に、患者に直接的に投与される。直接的な送達は、非経口注射（例えば、皮下に、腹腔内に、静脈内に、筋肉内に、または組織の間隙空間への）、または直腸投与、経口投与、膣投与、局所投与、経皮投与、鼻腔内投与、眼内投与、耳投与、肺投与もしくは他の粘膜投与によって達成され得る。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）を介し得るが、針なしでの注射が、代替的に使用され得る。代表的な筋肉内用量は、0.5m lである。

【 0 1 6 4 】

本発明は、全身免疫および／または粘膜免疫を惹起するために用いられ得る。

【 0 1 6 5 】

投与量処置は、単回用量スケジュールまたは複数回用量スケジュールであり得る。複数回用量は、初回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用いられ得る。初回投与スケジュールには、追加免疫投与スケジュールが続き得る。初回免疫投との間（例えば、4～16週間の間）および初回免疫投与と追加免疫投与との間の適切なタイミングは、慣用的に決定され得る。

【 0 1 6 6 】

*N e i s s e r i a*感染は、身体の種々の領域に罹患し得、それゆえ、本発明の組成物は、種々の形態で調製され得る。例えば、この組成物は、液体溶液または液体懸濁物のいずれかとしての、注射可能物として調製され得る。この組成物は、微細粉末またはスプレーを用いて（例えば、吸入器として）肺投与のために調製され得る。この組成物は、坐剤またはペッサリーとして調製され得る。この組成物は、例えば、スプレー、点滴剤、ゲルまたは散剤として、鼻腔投与、耳投与または眼投与のために調製され得る[例えれば、参考文献210および211]。肺炎球菌サッカリド[2 1 2 , 2 1 3]、肺炎球菌ポリペプ

10

20

30

40

50

チド [214] 、 H i b サッカリド [215] 、 M e n C サッカリド [216] 、 および H i b サッカリド結合体および M e n C サッカリド結合体の混合物 [217] の鼻投与に関する成功が報告されている。

【 0167 】

(保存安定性)

本発明の組成物は、特に、血清群 A サッカリド成分に関して、改善された安定性を提供する。本発明は、ワクチン組成物を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、以下の工程を包含する：(1) (i) 結合体化した血清群 C 荚膜サッカリド抗原、(i i) 結合体化した血清群 W 1 3 5 荚膜サッカリド抗原、(i i i) 結合体化した血清群 Y 荚膜サッカリド抗原、および(i v) 血清群 B 由来の 1 以上のポリペプチド抗原を混合する工程；(2) 工程(1)から得られる組成物を少なくとも 1 週間保存する工程；(3) 工程(2)からの保存された組成物を含む、患者への注射の準備ができた注射器を調製する工程；ならびに必要に応じて、(4) この組成物をこの患者に注射する工程。

10

【 0168 】

工程(1)はまた、(v) 結合体化した血清群 A 荚膜サッカリド抗原を混合することを包含し得る。工程(1)はまた、(v i) 結合体化した H i b 抗原を混合することを包含し得る。工程(1)はまた、(v i i) 肺炎球菌抗原を混合することを包含し得る。工程(2)は好ましくは、少なくとも 2 週間、少なくとも 4 週間、少なくとも 6 週間、少なくとも 8 週間、少なくとも 10 週間、少なくとも 12 週間またはそれよりも長期の保存を含む。保存工程(2)は、室温(例えば、 10 ± 10)未満であってもよく、またはそうでなくともよい。

20

【 0169 】

本発明はまた、ワクチン組成物を調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは、以下の工程を包含する：(1) (i) 結合体化した血清群 C 荚膜サッカリド抗原、(i i) 結合体化した血清群 W 1 3 5 荚膜サッカリド抗原、(i i i) 結合体化した血清群 Y 荚膜サッカリド抗原、および(i v) 血清群 B 由来の 1 以上のポリペプチド抗原を混合する工程；ならびに(2) この混合した抗原から単位用量体積を抽出する工程；ならびに(c) この抽出された単位用量を、気密シールした容器にパッケージングする工程。

【 0170 】

工程(1)はまた、(v) 結合体化した血清群 A 荚膜サッカリド抗原を混合することを包含し得る。工程(1)はまた、(v i) 結合体化した H i b 抗原を混合することを包含し得る。工程(1)はまた、(v i i) 肺炎球菌抗原を混合することを包含し得る。この気密シールした容器は、バイアルまたは注射器であり得る。

30

【 0171 】

本発明は、本発明の組成物を含む、気密シールした容器を提供する。

【 0172 】

(一般論)

用語「含む(c o m p r i s i n g)」とは、「含む(i n c l u d i n g)」および「なる(c o n s i s t i n g)」を意味する(例えば、X を「含む」組成物は、X のみからなってもよく、またはさらなる何かを含んでもよい(例えば、X + Y))。

40

【 0173 】

数値 x に関する用語「約(a b o u t)」とは、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【 0174 】

単語「実質的に(s u b s t a n t i a l l y)」は、「完全に(c o m p l e t e l y)」を除外しない(例えば、「実質的に」Y を含まない組成物は、Y を完全に含まなくてよい)。必要な場合、単語「実質的に」は、本発明の定義から除外され得る。

【 0175 】

2 つのアミノ酸配列の間での配列同一性百分率に対する言及は、整列した場合に、その百分率のアミノ酸が、これらの 2 つの配列を比較して同一であることを意味する。この整列および相同性パーセントまたは配列同一性は、当該分野で公知のソフトウェアプログラ

50

ム（例えば、参考文献 218 のセクション 7.7.18 に記載されるもの）を用いて決定され得る。好ましい整列は、ギャップオープンペナルティ (gap open penalty) 12 およびギャップ伸長ペナルティ (gap extension penalty) 2、BLOSUMマトリクス 62 でアフィンギャップ検索を用いる Smith-Waterman 相同性検索アルゴリズムによって決定される。Smith-Waterman 相同性検索アルゴリズムは、参考文献 219 において教示される。

【0176】

用語「アルキル」とは、直鎖形態および分枝鎖形態の両方のアルキル基をいう。このアルキル基は、-O-、-NH- または -S- より選択される、1個、2個または3個のヘテロ原子によって中断され得る。このアルキル基はまた、1個、2個または3個の二重結合および / または三重結合によって中断され得る。しかし、用語「アルキル」は、通常、ヘテロ原子による中断も二重結合もしくは三重結合による中断も有さないアルキル基をいう。C_{1~12} アルキルに対して言及がなされる場合、そのアルキル基は、1と12との間の任意の数の炭素原子（例えば、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂）を含み得ることが意味される。同様に、C_{1~6} アルキルに対して言及がなされる場合、そのアルキル基は、1と6との間の任意の数の炭素原子（例えば、C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆）を含み得ることが意味される。

【0177】

用語「シクロアルキル」は、シクロアルキル基、ポリシクロアルキル基およびシクロアルケニル基、ならびにこれらとアルキル基との組み合わせ（例えば、シクロアルキルアルキル基）を包含する。このシクロアルキル基は、-O-、-NH- または -S- より選択される、1個、2個または3個のヘテロ原子によって中断され得る。しかし、用語「シクロアルキル」は、通常、ヘテロ原子による中断を有さないシクロアルキル基をいう。シクロアルキル基の例としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキシルメチル基およびアダマンチル基が挙げられる。C_{3~12} シクロアルキルに対して言及がなされる場合、そのシクロアルキル基は、3と12との間の任意の数の炭素原子（例えば、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂）を含み得ることが意味される。

【0178】

用語「アリール」とは、芳香族基（例えば、フェニルまたはナフチル）をいう。C_{5~12} アリールに対して言及がなされる場合、そのアリール基は、5と12との間の任意の数の炭素原子（例えば、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、C₁₂）を含み得ることが意味される。

【0179】

用語「C_{5~12} アリール-C_{1~6} アルキル」とは、ベンジル、フェニルエチルおよびナフチルメチルのような基をいう。

【0180】

窒素保護基としては、シリル基（例えば、TMS、TES、TBS、TIPS）、アシリル誘導体（例えば、フタルイミド、トリフルオロアセトアミド、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、t-ブトキシカルボニル（Boc）、ベンジルオキシカルボニル（Z または Cbz）、9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル（Trroc））、スルホニル誘導体（例えば、-トリメチルシリルエタンスルホニル（SES））、スルフェニル誘導体、C_{1~12} アルキル、ベンジル、ベンズヒドリル、トリチル、9-フェニルフルオレニルなどが挙げられる。好ましい窒素保護基は、Fmoc である。

【0181】

クローニングまたは精製などを容易にするために含まれる配列は、本発明に必ずしも寄与せず、そして、除外または除去されてもよい。

【0182】

糖環が開環形態および閉環形態で存在し得ること、ならびに閉環形態が本明細書中の構

10

20

30

40

50

造式で示されるが、開環形態もまた本発明に含まれることが理解される。

【0183】

本発明のポリペプチドは、種々の手段（例えば、組換え発現、細胞培養物からの精製、（少なくとも部分的な）化学合成など）により、種々の形態（例えば、天然、融合体、非グリコシリ化、脂質付加（*lipidated*）など）で調製され得る。本発明のポリペプチドは、好ましくは、実質的に純粋な形態で調製される（すなわち、他の*N. meningitidis*タンパク質も宿主細胞タンパク質も実質的に含まない）。このポリペプチドの発現は*Neisseria*において起こり得るが、異種宿主が好ましい。異種宿主は、原核生物性（例えば、細菌）または真核生物性であり得る。異種宿主は好ましくは*E. coli*であるが、他の適切な宿主としては、*Bacillus subtilis*、*Vibrio cholerae*、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*、*Neisseria lactamica*、*Neisseria cinerea*、マイコバクテリア（例えば、*M. tuberculosis*）、酵母などが挙げられる。10

【0184】

本発明に従う核酸は、多くの方法（例えば、（少なくとも部分的な）化学合成により、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、生物自体からなど）で調製され得、そして種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プローブなど）を採り得る。これらは、好ましくは、実質的に純粋な形態で調製される（すなわち、他の*N. meningitidis*核酸も宿主細胞核酸も実質的に含まない）。用語「核酸」は、DNAおよびRNA、ならびにまた、それらのアナログ（例えば、改変された骨格（例えば、ホスホロチオエートなど）を含むDNAおよびRNA、ならびにまた、ペプチド核酸（PNA）など）を包含する。本発明は、（例えば、アンチセンス目的またはプロービング（probing）目的で）上に記載されている配列に対して相補的な配列を含む核酸を包含する。20

【0185】

血清群に統いて、髄膜炎菌分類は、血清型、血清サブタイプ（serosubtype）を、次いで免疫型（immunotype）を含み、そして、標準的な命名法は、血清群、血清型、血清サブタイプおよび免疫型を列挙し、各々は、コロンにより隔てられる（例えば、B : 4 : P1.15 : L3, 7, 9）。血清群Bにおいて、いくつかの系統が、しばしば、疾患を引き起こし（超侵襲性）、いくつかの系統は、他よりも重篤な疾患形態を引き起こし（超毒性）、そして、その他は、ほとんど稀にしか疾患を引き起こさない。7種の超毒性系統、すなわち、サブグループI、サブグループIIおよびサブグループIV-1、ET-5複合体、ET-37複合体、A4クラスターおよび系統3が認識されている。これらは、マルチローカス酵素電気泳動（multilocus enzyme electrophoresis）（MLEE）により規定されているが、マルチローカス配列分類（multilocus sequencing typing）（MLST）もまた、髄膜炎菌を分類するために使用されている[参考文献104]。30

【実施例】

【0186】

（発明を実施する形態）

（G287-953ハイブリッドタンパク質）

髄膜炎菌血清群Bの394/98株由来のタンパク質287および髄膜炎菌血清群Bの2996株由来のタンパク質953をコードするDNAを消化し、そして短いリンカー配列と一緒に連結して、配列番号7のアミノ酸配列をコードするプラスミドを得た。このプラスミドを*E. coli*にトランスフェクトし、そして細菌を増殖させてこのタンパク質を発現させた。適切な増殖の後に、細菌を収集し、そしてこのタンパク質を精製した。培養物から、細菌を遠心分離し、そしてペレットを、ペレット：緩衝液の体積比が1:8で、50mM酢酸緩衝液（pH5）の存在下で均質化した。高圧ホモジナイザー（AVESTIN、14000psiにて4サイクル）を用いて溶解を行った。溶解後、尿素を5M4050

の最終濃度で添加し、続いて室温にて1時間攪拌した。200 mM酢酸緩衝液(pH 4) + 5 M尿素を用いて、pHを6から5へと低下させた。混合物を16800 gにて60分間、2~8において遠心分離した。上清を収集し、そしてSARTOBRAN P(0.45~0.22 μm SARTORIUS)によって濾過した。濾過した上清中のタンパク質は、-20にて少なくとも30日間、そして2~8にて少なくとも15日間安定であった。

【0187】

タンパク質を、溶出に350 mM NaCl + 50 mMアセテート + 5 M尿素(pH 5.00)を用いたカチオン交換カラム(SPF, Amersham Biosciences)にてさらに精製した。大部分の不純物は素通り画分(flow-thru)に存在した。より低いNaCl濃度(180 mM)を用いた事前溶出洗浄は、夾雜する2つのE.coliタンパク質を有利に除去した。10

【0188】

溶出した物質を、(200 mM TRIS/HCl + 5 M尿素(pH 9)を用いて)pH 8に調整し、そして溶出に5 M尿素中の150 mM NaCl + 20 mM TRIS/HCl(pH 8.00)を用いてQ Sepharose HPカラム(Amersham)でさらに精製した。さらに、減少した塩(90 mM)を用いた事前溶出洗浄は、不純物を除去するために有用であった。

【0189】

Q HPカラムからの濾過した溶出物質を、PBS(pH 7.00)(150 mM NaCl + 10 mMリン酸カリウム、pH 7.00)を用いて1:2希釈し、次いで接線方向の濾過によって10体積のPBS(pH 7.00)に対してダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーションの終わりに、この物質を1.6倍濃縮して、約1.2 mg/mlの総タンパク質とした。30,000 Daカットオフメンブレン(Regenerated Cellulose membrane 50 cm², Millipore PLCTK 30)を用いて、この物質を約90%の収率で透析することが可能であった。20

【0190】

(936-G741ハイブリッドタンパク質)

髄膜炎菌血清群Bの2996株由来のタンパク質936および髄膜炎菌血清群BのMC58株由来のタンパク質741をコードするDNAを消化し、そして短いリンカー配列と一緒に連結して、配列番号8のアミノ酸配列をコードするプラスミドを得た。このプラスミドをE.coliにトランスフェクトし、そして細菌を増殖させてこのタンパク質を発現させた。この組換えタンパク質は分泌されなかったが、この細菌内で可溶性のままであった。

【0191】

適切な増殖の後、細菌を遠心分離し、湿ったペーストを得て、そして以下の通りに処理した：

- 20 mMリン酸ナトリウム(pH 7.00)の存在下での、高圧システムによるホモジナイゼーション。40
- 遠心分離および直交方向の(orthogonal)濾過による清澄化。
- 20 mMリン酸ナトリウム(pH 7.00)中の150 mM NaClによる溶出を用いたカチオン性カラムクロマトグラフィー(SP Sepharose Fast Flow)。
- 素通り画分を収集する、アニオン性カラムクロマトグラフィー(Q Sepharose XL)。
- 20 mMリン酸ナトリウム(pH 7.00)による溶出を用いた疎水性カラムクロマトグラフィー(Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub)。
- 10 Kdのカットオフでの、PBS(pH 7.4)に対するダイアフィルトレショ50

ン。

- - 20 での最終滅菌濾過および保存。

【0192】

最終物質中のタンパク質は、-20 および 2~8 の両方において少なくとも 3 ヶ月間にわたって安定であった。

【0193】

(NadA (NL) (C) タンパク質)

髓膜炎菌血清群 B の 2996 株由来の NadA タンパク質をコードする DNA を消化して、その C 末端をコードする配列を除去して、配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするプラスミドを得た。このプラスミドを E. coli にトランスフェクトし、そして細菌を増殖させてこのタンパク質を発現させた。組換えタンパク質を培養培地中に分泌させ、そしてリーダーペプチドは、この分泌されたタンパク質（配列番号 2）中に存在しなかった。上清を以下の通りに処理した：

- 7 倍濃縮および直交流 UF（カットオフ 30 Kd）による緩衝液 20 mM TRIS / HCl (pH 7.6) に対するダイアフィルトレーション。
- 20 mM TRIS / HCl (pH 7.6) 中の 400 mM NaCl による溶出を用いたアニオン性カラムクロマトグラフィー (Q Sepharose XL)。
- TRIS / HCl (pH 7.6) 中の 50 mM NaCl による溶出を用いた疎水性カラムクロマトグラフィー工程 (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub)。
- 200 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) による溶出を用いたヒドロキシルアパタイトセラミックカラムクロマトグラフィー (HA Macro. Prep)。
- PBS (pH 7.4) に対するダイアフィルトレーション（カットオフ 30 Kd）。
- 最終滅菌濾過および -20 での保存。

【0194】

最終物質中のタンパク質は、-20 および 2~8 の両方において少なくとも 6 ヶ月間安定であった。

【0195】

NadA タンパク質は、分解感受性であり、そして短縮形態の NadA は、ウェスタンプロットまたは質量分析法（例えば、MALDI - TOF による）によって検出されて、10 kDa までの分子量低下を示し得る。分解産物は、ネイティブ NadA から（例えば、カラム TSK 300 SWXL、プレカラム TSK SWXL、TOSOH AAS を用いる）ゲル濾過によって分離され得る。このような濾過によって、以下の 3 つのピークが得られる：

(i) 保持時間 12.637 分および見かけの MW 885.036 Da を有する第 1 のピーク；(ii) 保持時間 13.871 分および見かけの MW 530.388 Da を有するピーク；(iii) 保持時間 13.871 分および見かけの MW 530.388 Da を有するピーク。これらの 3 つのピークの光散乱分析は、(i) 208500 Da、(ii) 98460 Da、(iii) 78760 Da という実際の MW 値を示す。従って、この第 1 のピークは、NadA 凝集物を含み、そして第 3 のピークは分解産物を含む。

【0196】

NadA (NL) (C) の推定分子量は 34.113 Da であるので、ピーク (ii) は、所望の抗原である、三量体タンパク質を含む。

【0197】

（抗原の組合せ）

マウスを、これらの 3 つのタンパク質を含む組成物で免疫し、そして比較の目的のために、3 のタンパク質をまた単独で試験した。1 群あたり 10 匹のマウスを用いた。この混合物は、種々の株に対して高い殺菌性力値を誘導し得た：

【0198】

【表2】

	皰膜炎菌株(血清群)							
	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C11 ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	—	—	—	8000	—	32000
混合	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000

「—」は、この株がNadA遺伝子を含まないことを示す

個々のマウスを見ると、三重混合物は、個々の抗原を得た3つの血清群B株に対して高
くかつ一貫した殺菌力価を誘導した：

【0199】

【表3】

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

(組合せおよびOMVとの比較)

さらなる実験では、これらの抗原(1用量あたり20μgの各抗原)を、H44/76株(Norway)または394/98株(New Zealand)のいずれかから調製した10μgのOMVと組み合わせて投与した。ポジティブコントロールは、血清群Bについては抗莢膜SEAM-3mAbまたは他の株についてはCRM197結合体化莢膜サッカリドであった。この混合物はほぼ常に、単独のOMVよりも良好な力価を与え、そしてこの混合物をOMVに添加することはほぼ常に、OMVの効力を有意に増強した。多くの場合、この抗原混合物は、ポジティブコントロールを用いて見られる応答と一致したかまたはその応答を超えた。

【0200】

(超毒性系統試験)

以下の抗原を、種々の超毒性系統由来の種々の血清群B株に対して試験した：

(a) NadA(NL)(C)

(b) G287-953

(c) 936-G741

(d) (a)、(b)および(c)の混合物

(e) H44/76株(Norway)から調製したOMV

(f) 394/98株(New Zealand)から調製したOMV

(g) G287と(e)との混合物

(h) (d)と(e)との混合物

(i) (d)と(f)との混合物。

【0201】

SEAM-3をポジティブコントロールとして用いた。

【0202】

結果は、以下の通りであった。結果を、示した超毒性系統における、血清殺菌性力価が1024を超えた株の百分率として表す：

【0203】

10

20

30

40

【表4】

	株数	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	4	50	50	0	100	25	25	25	100	100	+
ET-5	8	25	75	88	100	71	14	71	100	100	+
系統3	13	0	75	15	93	8	85	8	92	93	+
ET-37	4	11	22	0	33	0	0	0	22	25	+

特定の参照株に対しては、殺菌性力価は以下の通りであった：

【0204】

10

【表5】

	株	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	S-3
A4	961-5945	128	2048	<8	2048	262144	8192	262144	262144	4096	8192
ET-5	44/76	<4	2048	32768	131072	524288	8192	524288	524288	524288	16384
系統3	394/98	<4	1024	32	4096	<4	16384	256	16384	16384	16384
ET-37	LPN17592	2048	1024	256	4096	<8	<8	512	16384	65536	1024

それゆえ、組成物(d)、組成物(h)および組成物(i)は、超毒性系統A4、超毒性系統ET-5および超毒性系統3由来の広範囲の種々の株の血清群Bの肺炎球菌に対して殺菌性抗体応答を誘導する。組成物(h)および組成物(i)を用いた力価は、一般に、(d)を用いるよりも高かったが、超毒性系統A4、超毒性系統ET-5および超毒性系統3内の株の有効範囲はより優れているというわけではなかった。

【0205】

20

分類されていない株の有効範囲もまた、組成物(d)、組成物(h)および組成物(i)を用いて高かった。

【0206】

(髄膜炎菌結合体および/またはHib結合体との組合せ)

三重MenB組成物を、血清群C、血清群W135および血清群Yについてのオリゴサッカリド結合体の混合物と組み合わせて、以下の抗原を含むワクチンを得る：

【0207】

【表6】

成分	0.5ml用量あたりの量
血清群C結合体	10 µg サッカリド + 12.5~33 µg CRM ₁₉₇
血清群W135結合体	10 µg サッカリド + 6.6~20 µg CRM ₁₉₇
血清群Y結合体	10 µg サッカリド + 6.6~20 µg CRM ₁₉₇
ΔG287-953	20 µg ポリペプチド
936-ΔG741	20 µg ポリペプチド
NadA	20 µg ポリペプチド

MenA結合体(10 µg サッカリド + 12.5~33 µg CRM₁₉₇)および/またはHbOC-Hib結合体(10 µg サッカリド + 2~5 µg CRM₁₉₇)を含め、類似のワクチンを調製する。

【0208】

1つの一連の試験において、血清群C、血清群W135および血清群Yの結合体を組合せた。各結合体は、40 µg / mlで存在した(サッカリドとして測定した)。MenB抗原を用いた使用の前の保存については、組み合わせた結合体を、15 mgスクロース、10 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)の存在下で[-45]で3時間、50 m Torr減

30

40

50

圧での - 35 で 20 時間、 50 mTorr にて 30 で 10 時間、 125 mTorr にて 30 で 9 時間] 凍結乾燥した。凍結乾燥前の最終体積は 0.3 ml であった。それゆえ、 0.6 ml の水溶液中の再懸濁後、このサッカリドは、 1 血清群あたり 12 µg で存在する。凍結乾燥を、便宜のためにのみ用いた。そして、最終産物の通常の保存の間の効力も安定性も、凍結乾燥を必要としない。

【 0209 】

第 2 のバッチの物質を、血清群 C 、血清群 W 135 および血清群 Y についてと同じサッカリド投与量にて血清群 A 結合体もまた含むこと以外は同様にして調製した。

【 0210 】

第 3 のバッチの物質を、髄膜炎菌についてと同じサッカリド投与量にて Hib-CRM 10 197 結合体もまた含むこと以外は（血清群 A 、血清群 C 、血清群 W 135 および血清群 Y ）と同様にして調製した。

【 0211 】

比較のために、血清群 A および血清群 C の結合体の凍結乾燥した調製物を調製した。 MenA 物質を、上記の通り、 15 mg のスクロースを用いて凍結乾燥して、再構成後に 12 µg の用量のサッカリドを与えた。 MenC 物質を、 9 mg のマンニトールを用いて凍結乾燥して、再構成後に 12 µg の用量のサッカリドを与えた。

【 0212 】

これらの物質を 600 µl の血清群混合物 (d) (または、コントロールとして、すなわち、抗原を欠くこと以外は同一の組成の群 2 および群 3) と組合せて、 8 つの組成物を得た :

【 0213 】

【表 7】

成分	1	2	3	4	5	6	7	8
NadA ^{(NL)(C)} µg/用量	20			20	20	20	20	20
936-741 µg/用量	20			20	20	20	20	20
287-953 µg/用量	20			20	20	20	20	20
MenA-CRM µg/用量*		2.4	2.4	2.4			2.4	2.4
MenC-CRM µg/用量*		2.4	2.4		2.4	2.4	2.4	2.4
MenW-CRM µg/用量*		2.4	2.4			2.4	2.4	2.4
MenY-CRM µg/用量*		2.4	2.4			2.4	2.4	2.4
Hib-CRM µg/用量*			2.4					2.4
水酸化アルミニウム mg/用量	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
ヒスチジン mM	10	10	10	10	10	10	10	10
スクロース mg/用量		3	3	3		3	3	3
マンニトール mg/用量					1.8			
リン酸カリウム pH 7.2 mM		3	3	3		3	3	3
リン酸ナトリウム pH 7.2 mM					3			
塩化ナトリウム mg/用量	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8

* 示した量はサッカリドである

これらの組成物を、 200 µl の体積で CD / 1 マウス (1 群あたり 8 匹) に 0 日目、 21 日目および 35 日目に腹腔内投与し、最終的に 49 日目に出血させた。 49 日目の血清を、 SBA アッセイにおいて、血清群 A 、血清群 B 、血清群 C 、血清群 W 135 および血清群 Y における種々の髄膜炎菌株に対して試験した。結果は以下であった :

【 0214 】

【表8】

群	B				A F6124	C				W135 LPN17592	Y 860800
	2996	MC58	394/98	44/76		C11	312294	C4678	M1569		
1	1024	4096	1024	8192	2048	2048	<16*	64*	128*	512	65536
2	<4	<4	128	<16	4096	8192	—	—	—	32	32768
3	<4	<4	<4	<16	4096	16384	—	—	—	512	32768
4	64	4096	512	8192	8192	128	—	—	—	256	32768
5	256	4096	1024	8192	256	8192	>8192	>8192	>8192	512	32768
6	128	1024	256	8192	128	8192	8192	>8192	>8192	512	16384
7	256	512	512	16384	1024	8192	4096	>8192	>8192	1024	16384
8	256	2048	512	8192	1024	8192	2048	>8192	>8192	512	32768

従って、これらの髄膜炎菌タンパク質抗原は、結合体化した髄膜炎菌およびHibサッカリド抗原の添加後でさえも有効なままである。同様に、これらの髄膜炎菌結合体は、これらのタンパク質抗原の添加後でさえも、効力を保持する。実際、このデータは、これらの結合体へのこれらのタンパク質抗原の添加が抗MenW135効力を（群2および群7と比較して）増強することを示唆する。さらに、これらのタンパク質抗原は、群4および群5がそうであるように、単独で良好な抗MenY効力を与える[参考文献220を参照のこと]ので、特に、血清群Yに対して、あるレベルの交差反応性が存在する。

【0215】

このデータはまた、髄膜炎菌結合体へのHib結合体の添加が抗W135活性を（群2および群3と比較して）増強することを示す。

【0216】

（改変されたMenAサッカリドの使用）

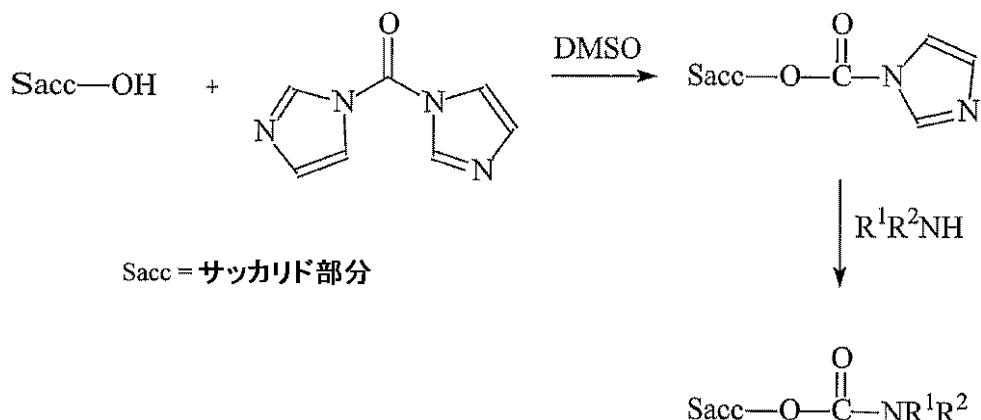
莢膜ポリサッカリドをMenAから精製し、そして凍結乾燥してMenAオリゴサッカリドを得た。このポリサッカリド（2g）を、10mg/mLのポリサッカリド濃度にて、50mM酢酸緩衝液（pH4.75）中で50にて約4時間加水分解した[73]。加水分解後、この溶液を回転エバボレーションによって乾燥した。

【0217】

このオリゴサッカリドを、以下の反応スキームを用いて活性化した：

【0218】

【化4】



このオリゴサッカリドをDMSO中に溶解して、10mg/mLのサッカリド濃度を得た。1:20であるオリゴサッカリド:CDIのモル比に従って、次いで、21.262gのCDIを添加し、そして反応混合物を室温にて16時間攪拌した。得られたMenA-CDI化合物を、80:20(v/v)のアセトン:DMSO混合物中での選択的沈澱、続いて遠心分離によって精製した。結合したイミダゾールに対する遊離イミダゾールの比を決定することによって、活性化反応の効率は、約67.9%であると算出された。

10

20

30

40

50

【0219】

第2の反応工程において、Men A - C D I オリゴサッカリドを、約 10 mg / mL のサッカリド濃度で DMSO 中に可溶化した。1 : 100 である Men A - C D I 単位 : DMA のモル比に従って、36.288 g の 99% 塩酸ジメチルアミン（すなわち、R¹ および R² = Me）を添加し、そして反応混合物を室温にて 16 時間攪拌した。反応産物を凍結乾燥し、そして 10 mg / mL 水の溶液に再可溶化した。

【0220】

低分子量反応試薬（特に、ジメチルアミン（DMA））をこのオリゴサッカリド調製物から除去するために、3.5 kDa MWCO メンブレン（Spectra/PorTM）を通して透析工程を行った。以下の4回の透析工程を実施した：(i) 2 L の 1 M 塩化ナトリウムに対して 16 時間（透析係数 1 : 20）、(ii) 2 L の 0.5 M 塩化ナトリウムに対して 16 時間（透析係数 1 : 20）、(iii) および(iv) 2 L の WF I に対して 16 時間（透析係数 1 : 20）。精製を改善するために、1 kDa MWCO メンブレン（CentrificonTM）を通じたダイアフィルトレーショーン工程もまた実施した。

【0221】

精製された Men A - C D I - DMA 産物を、pH 6.5 において、25 mM L - ヒスチジン（FlukaTM）中で緩衝化した。

【0222】

変更された Men A サッカリドの結合体（Men A - C D I - DMA）を調製するためには、プロセス全体は以下の通りであった：

- オリゴサッカリドフラグメントを生じる、ポリサッカリドの加水分解
- このオリゴサッカリドフラグメントのサイズ分け
- サイズ分けしたオリゴサッカリドの末端アルデヒド基の還元的アミノ化
- C D I 反応前の、Fmoc 基による末端 - NH₂ 基の保護
- DMA 反応の間の - NH₂ 基の固有の脱保護
- SIDEA (N - ヒドロキシスクシンイミドアジピン酸) による末端 - NH₂ 基の活性化
- CRM₁₉₇ タンパク質への共有結合。

【0223】

変更された Men A オリゴサッカリド結合体は、上昇した温度において、その天然対応物よりもずっと加水分解耐性が高かった。例えば、37 において 28 日後、放出されたサッカリドの百分率は、変更したオリゴサッカリドについて 6.4 % であり、一方、天然抗原については 23.5 % である。さらに、変更されたオリゴサッカリドによって誘導された力価は、ネイティブな糖構造体を用いて得られる力価よりも有意に低くはない。

【0224】

変更された Men A 結合体を、未変更のオリゴサッカリドの結合体の代替物としての Men C 結合体、Men W 135 結合体および Men Y 結合体と組み合わせる。この四価混合物を 3 つの Men B ポリペプチドと混合して、単回用量で N. meningitidis の血清群 A、血清群 B、血清群 C、血清群 W 135 および血清群 Y に対して有効なワクチンを得る。

【0225】

（肺炎球菌の組合せ）

組み合わされた 3 つの Men B タンパク質は肺炎球菌サッカリド結合体と混合して、各々の肺炎球菌血清群の 2 μg / 用量の最終濃度を得る（血清群 6B については二倍）。従って、再構成したワクチンは、以下の抗原を含む：

【0226】

【表9】

成分	0.5ml用量あたりの量
血清群 A 結合体	5 µg サッカリド + 6.25-16.5 µg CRM ₁₉₇
血清群 C 結合体	5 µg サッカリド + 6.25-12.5 µg CRM ₁₉₇
血清群 W135 結合体	5 µg サッカリド + 3.3-10 µg CRM ₁₉₇
血清群 Y 結合体	5 µg サッカリド + 3.3-10 µg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 4 結合体	2 µg サッカリド + 2.5 µg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 9V 結合体	2 µg サッカリド + 2.5 µg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 14 結合体	2 µg サッカリド + 2.5 µg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 18C 結合体	2 µg サッカリド + 2.5 µg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 19F 結合体	2 µg サッカリド + 2.5 µg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 23F 結合体	2 µg サッカリド + 2.5 µg CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 6B 結合体	4 µg サッカリド + 5 µg CRM ₁₉₇

本発明が、例示のみのために記載されており、本発明の範囲および趣旨内にあるままに改変が行われ得ることが理解される。

【0227】

(参考文献) (これらの内容は、本明細書中に参考として援用される)

【0228】

【表10】

- [1] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [2] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [3] Armand ら (1982) *J. Biol. Stand.* 10:335-339.
- [4] Cadoz ら (1985) *Vaccine* 3:340-342.
- [5] Baklaic ら (1983) *Infect. Immun.* 42:599-604.
- [6] MMWR (1997) 46(RR-5) 1-10.
- [7] Bjune ら (1991) *Lancet* 338(8775):1093-96
- [8] Frash (1990) *Advances in Biotechnological Processes* 13巻の p.123-145 (Mizrahi & Van Wezel 編)
- [9] WO03/007985.
- [10] Inzana (1987) *Infect. Immun.* 55:1573-1579.
- [11] WO02/058737.
- [12] UK 特許出願 GB-0408978.5. [代理人整理番号: P037501GB].
- [13] Kandil ら (1997) *Glycoconj J* 14:13-17.
- [14] Berkin ら (2002) *Chemistry* 8:4424-4433.
- [15] Glode ら (1979) *J Infect Dis* 139:52-56
- [16] WO94/05325; US 特許 5,425,946.
- [17] PCT/IB04/_____ (UK特許出願GB-0323103.2を優先権主張して2004年10月4日に出願された).
- [18] WO03/080678.
- [19] Nilsson & Svensson (1979) *Carbohydrate Research* 69: 292-296
- [20] Ramsay ら (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [21] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [22] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [23] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [24] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [25] 欧州特許 0477508.
- [26] US 特許 5,306,492.
- [27] WO98/42721.
- [28] *Conjugate Vaccines* (Cruse ら編) ISBN 3805549326, 特に10号 :48-114.
- [29] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 または 012342335X.
- [30] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [31] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [32] Anderson ら (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [33] EP-A-0372501.
- [34] EP-A-0378881.
- [35] EP-A-0427347.
- [36] WO93/17712
- [37] WO94/03208.
- [38] WO98/58668.
- [39] EP-A-0471177.
- [40] WO91/01146
- [41] Falugi ら (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [42] Baraldo ら (2004) *Infect Immun.* 72:4884-7
- [43] EP-A-0594610.
- [44] WO00/56360.
- [45] Kuo ら (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [46] WO02/091998.
- [47] WO01/72337

【0229】

【表 1 1】

- [48] WO00/61761.
- [49] WO2004/083251.
- [50] WO99/42130
- [51] WO96/40242
- [52] Lees ら (1996) *Vaccine* 14:190-198.
- [53] WO95/08348.
- [54] US 特許 4,882,317
- [55] US 特許 4,695,624
- [56] Porro ら (1985) *Mol Immunol* 22:907-919. 10
- [57] EP-A-0208375
- [58] WO00/10599
- [59] Gever ら Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
- [60] US 特許 4,057,685.
- [61] US 特許 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [62] US 特許 4,459,286.
- [63] US 特許 4,965,338
- [64] US 特許 4,663,160.
- [65] US 特許 4,761,283
- [66] US 特許 4,356,170
- [67] Lei ら (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264. 20
- [68] WO00/38711; US 特許 6,146,902.
- [69] Lamb ら (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:251-258.
- [70] Lamb ら (2000) *Journal of Chromatography A* 894:311-318.
- [71] D'Ambra ら (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:241-242.
- [72] Ravenscroft ら (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [73] Costantino ら (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- [74] Parkhill ら (2000) *Nature* 404:502-506.
- [75] Tettelin ら (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [76] WO00/66791.
- [77] Pizza ら (2000) *Science* 287:1816-1820. 30
- [78] WO99/24578.
- [79] WO99/36544.
- [80] WO99/57280.
- [81] WO00/22430.
- [82] WO00/66741.
- [83] WO01/64920.
- [84] WO01/64922.
- [85] WO03/020756.
- [86] WO2004/014419.
- [87] WO99/31132; US 特許 6,495,345. 40
- [88] WO99/58683.
- [89] Peak ら (2000) *FEMS Immunol Med Microbiol* 28:329-334.
- [90] WO93/06861.
- [91] EP-A-0586266.
- [92] WO92/03467.
- [93] US 特許 5912336.
- [94] WO2004/015099.
- [95] WO2004/014418.

【表12】

- [96] UK 特許出願 0223741.0, 0305831.0 & 0309115.4; および WO2004/032958.
- [97] Comanducci ら (2002) *J. Exp. Med.* 195:1445-1454.
- [98] WO03/010194.
- [99] WO2004/048404
- [100] WO03/063766.
- [101] Massignani ら (2003) *J. Exp. Med.* 197:789-799.
- [102] <http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>
- [103] Pettersson ら (1994) *Microb. Pathog.* 17(6):395-408.
- [104] Maiden ら (1998) *PNAS USA* 95:3140-3145.
- [105] Welsch ら (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. *Genome-derived antigen (GNA) 2132 elicits protective serum antibodies to groups B and C Neisseria meningitidis strains.* 10
- [106] Santos ら (2002) Thirteenth International Pathogenic Neisseria Conference, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway; Sept. 1-6, 2002. *Serum bactericidal responses in rhesus macaques immunized with novel vaccines containing recombinant proteins derived from the genome of N. meningitidis.*
- [107] WO96/14086.
- [108] *Vaccines* (Plotkin & Mortimer 編), 1988. ISBN: 0-7216-1946-0
- [109] Gustafsson ら (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [110] Rappuoli ら (1991) *TIBTECH* 9:232-238. 20
- [111] Bell (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:1187-1188.
- [112] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [113] Gerlich ら (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [114] WO93/24148.
- [115] Sutter ら (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:287-308.
- [116] Zimmerman & Spann (1999) *Am. Fam. Physician* 59:113-118, 125-126.
- [117] Charalambous & Feavers (2001) *J. Med. Microbiol.* 50:937-939.
- [118] Westerink (2001) *Int. Rev. Immunol.* 20:251-261.
- [119] Grothaus ら (2000) *Vaccine* 18:1253-1263.
- [120] Kanra ら (1999) *The Turkish Journal of Paediatrics* 42:421-427.
- [121] Ravenscroft ら (2000) *Dev. Biol. (Basel)* 103: 35-47. 30
- [122] WO97/00697.
- [123] WO02/00249.
- [124] WO96/37222; US 特許 6,333,036.
- [125] Watson (2000) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:331-332.
- [126] Rubin (2000) *Pediatr. Clin. North Am.* 47:269-285, v.
- [127] Jedrzejas (2001) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:187-207.
- [128] Zielen ら (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- [129] Tettelin ら (2001) *Science* 293:498-506.
- [130] Hoskins ら (2001) *J. Bacteriol.* 183:5709-5717.
- [131] Rappuoli (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* 3:445-450
- [132] Rappuoli (2001) *Vaccine* 19:2688-2691. 40
- [133] Massignani ら (2002) *Expert Opin. Biol. Ther.* 2:895-905.
- [134] Mora ら (2003) *Drug Discov. Today* 8:459-464.
- [135] Wizemann ら (2001) *Infect. Immun.* 69:1593-1598.
- [136] Rigden ら (2003) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38:143-168.
- [137] WO02/22167.
- [138] Paoletti ら (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [139] WO00/56365.

【表13】

- [140] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [141] WO03/009869.
- [142] *Vaccine Design...* (1995) 編 Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [143] WO00/23105.
- [144] WO90/14837.
- [145] US 特許 5,057,540.
- [146] WO96/33739.
- [147] EP-A-0109942.
- [148] WO96/11711. 10
- [149] WO00/07621.
- [150] Barr ら (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [151] Sjolanderet ら (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [152] Niikura ら (2002) *Virology* 293:273-280.
- [153] Lenz ら (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [154] Pinto ら (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [155] Gerber ら (2001) *Virol* 75:4752-4760.
- [156] WO03/024480
- [157] WO03/024481
- [158] Gluck ら (2002) *Vaccine* 20:B10-B16. 20
- [159] EP-A-0689454.
- [160] Johnson ら (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [161] Evans ら (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [162] Meraldi ら (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
- [163] Pajak ら (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [164] Kandimalla ら (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [165] WO02/26757.
- [166] WO99/62923.
- [167] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [168] McCluskie ら (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [169] WO98/40100. 30
- [170] US 特許 6,207,646.
- [171] US 特許 6,239,116.
- [172] US 特許 6,429,199.
- [173] Kandimalla ら (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [174] Blackwell ら (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [175] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [176] WO01/95935.
- [177] Kandimalla ら (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [178] Bhagat ら (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [179] WO03/035836. 40
- [180] WO95/17211.
- [181] WO98/42375.
- [182] Beignon ら (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [183] Pizza ら (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [184] Pizza ら (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [185] Scharton-Kersten ら (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [186] Ryan ら (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.

【表 1 4】

- [187] Partidos ら (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [188] Peppoloni ら (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [189] Pine ら (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [190] Domenighini ら (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [191] WO99/40936.
- [192] WO99/44636.
- [193] Singh ら (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [194] WO99/27960.
- [195] US 特許 6,090,406 10
- [196] US 特許 5,916,588
- [197] EP-A-0626169.
- [198] WO99/52549.
- [199] WO01/21207.
- [200] WO01/21152.
- [201] Andrianov ら (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [202] Payne ら (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [203] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [204] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [205] WO99/11241. 20
- [206] WO94/00153.
- [207] WO98/57659.
- [208] 欧州特許出願 0835318, 0735898 および 0761231.
- [209] WO01/30390.
- [210] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [211] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [212] WO00/53221.
- [213] Jakobsen ら (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [214] Wu ら (1997) *J Infect Dis* 175:839-846.
- [215] Bergquist (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [216] Baudner ら (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790. 30
- [217] Uguzzoli ら (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [218] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel ら編, 1987) Supplement 30.
- [219] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [220] UK 特許出願 0408977.7. [代理人整理番号 P037500GB].

【配列表】

0004738339000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 61 K 39/39 (2006.01) A 61 K 39/39

(72)発明者 コントルニ, マリオ
イタリア国 イ-53100 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, カイロン ソチエタ
ア レスポンサビリタ リミタータ

審査官 安居 拓哉

(56)参考文献 国際公開第2004/067030 (WO, A1)
国際公開第2002/058737 (WO, A1)
特表2003-514868 (JP, A)
特表2002-516292 (JP, A)
国際公開第2003/020756 (WO, A1)
特表2003-525049 (JP, A)
特表2003-525050 (JP, A)
国際公開第2002/000249 (WO, A1)
VEGA MASNIGANI, JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, 2003年 3月17日, V197 N6, P78
9-799
MARIAGRAZIA PIZZA, SCIENCE, 2000年 3月10日, V287, P1816-1820
JEANNETTE ADU-BOBIE, VACCINE, 2003年 1月, V21, P605-610
MARIROSA MORA, DRUG DISCOVERY TODAY, 2003年 5月, V8 N10, P459-464
LEI, Q.P., et al.(BROWN, F., et al.(eds.)), Physico-Chemical Procedures for the Characterization of Vaccines (Dev. Biol.), Basel, Karger, 103, pp.259-264 (2000)
RENNELS, M. et al, Dose escalation, safety and immunogenicity study of a tetravalent meningococcal polysaccharide diph, Pediatr Infect Dis J, 2002年, Vol.21, No.10, p.9
78-9

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/05
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)