

(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 I

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) 国際出願番号	PCT/IB2004/003373
(87) 国際公開番号	W02005/032583
(87) 国際公開日	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NZ 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 . m e n i n g i t i d i s の血清群 B、血清群 C、血清群 W 1 3 5 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；(i i) 結合体化した血清群 W 1 3 5 莢膜サッカリド抗原；(i i i) 結合体化した血清群 Y 莢膜サッカリド抗原；および(i v) 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「N a d A」タンパク質、「7 4 1」タンパク質、「9 3 6」タンパク質、「9 5 3」タンパク質および「2 8 7」タンパク質であり、

該 N a d A は、(a) 配列番号 2 に対して 8 0 % 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 7 4 1 は、(a) 配列番号 3 に対して 8 0 % 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 9 3 6 は、(a) 配列番号 4 に対して 8 0 % 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 9 5 3 は、(a) 配列番号 5 に対して 8 0 % 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 2 8 7 は、(a) 配列番号 6 に対して 8 0 % 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)、(i i) および (i i i) 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 莢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 莢膜サッカリドが、そのモノサッカリド単位の少なくとも 2 0 % は 3 位および 4 位のいずれかに - O H 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、3 7 にて 2 8 日間保存され得、この期間の後、結合体化した M e n A サッカリドの初期合計量の 2 0 % 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、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、H . i n f l u e n z a e プロテイン D、および C R M _{1 9 7} 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 . i n f l u e n z a e B 型 (H i 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】

S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e 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 1 0】

リン酸アルミニウムアジュバントを含む、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 1 1】

気密シールした容器に包装された、請求項 1 ~ 請求項 1 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記容器がバイアルまたは注射器である、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 請求項 1 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

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 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 1 5】

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 1 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 6】

被験体への投与後に、N . m e n i n g i t i d i s の少なくとも血清群 B、血清群 C、

10

20

30

40

50

血清群W 1 3 5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；(i i) 結合体化した血清群W 1 3 5 莢膜サッカリド抗原；(i i i) 結合体化した血清群Y 莢膜サッカリド抗原；ならびに(i v) 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】

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。

【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、W 1 3 5、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W 1 3 5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）] ，*MeningitecTM* 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W 1 3 5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。

【0005】

血清群A、血清群C、血清群Yおよび血清群W 1 3 5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50 μg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。

【0006】

10

20

30

40

50

血清群 B については、ワクチンと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】Cadoz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 W 135 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 W 135 および血清群 Y 由来の結合体化英膜サッカリドが、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 由来の結合体化英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せら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せられ得ることを見出した。第6に、本発明者らは、Hib 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 W 135 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 Hib 結合体の添加が、血清群 W 135 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

40

【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 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 英膜サッカリド抗原; (ii) 結合体化した血清群 W 135 英膜サッカリド抗原; (iii) 結合体化した血清群 Y 英膜サッカリド抗原; 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 英膜サッカリド抗原を含み得る。

【0010】

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 W 1 3 5 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 W 1 3 5 莢膜サッカリド抗原；(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 W 1 3 5 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ブロミド (*hexadimethrine bromide*) 塩およびミリスチル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ブロミド (「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

30

【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。

【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 Men A 合成は参考文献 14 に開示される。

50

【 0 0 1 9 】

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[1 5 , 1 6]。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、MenjугateTM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[1 7]。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。

10

【 0 0 2 0 】

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。

【 0 0 2 1 】

(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。

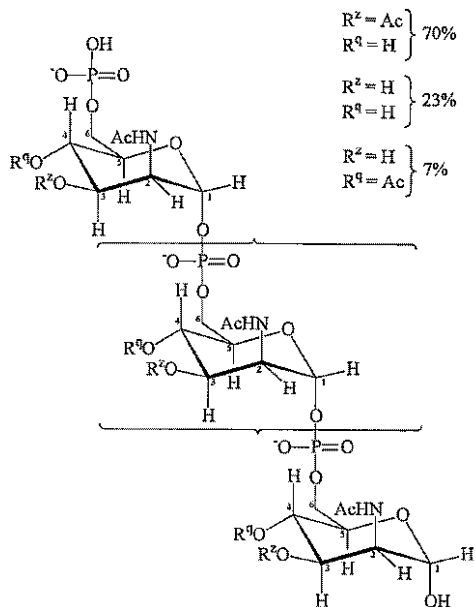
【 0 0 2 2 】

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：

【 0 0 2 3 】

【化 1】



10

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、ブロック基によって置換される [参考文献 18]。

20

【 0 0 2 4 】

ヒドロキシルの代わりにブロック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、ブロック基を有し得る。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、ブロック基を有し得る。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、ブロック基を有し得る。

30

【 0 0 2 5 】

同様に、モノサッカリド単位上のブロック基の数は、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。

【 0 0 2 6 】

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ク基を有しても有さなくてもよい。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、 $\text{NaBH}_3\text{CN} / \text{NH}_4\text{Cl}$ を用いる）還元的アミノ化によってアミノ基（ $-\text{NH}_2$ または $-\text{NH}-\text{E}$ 、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ク基に変換された後に再生され得る。

40

【 0 0 2 7 】

ヒドロキシル基を置換するためのブロック基は、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。ブロック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

50

ロックンギ基のいくつかの具体例は、アリル、Al o c、ベンジル、B O M、t - ブチル、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ブロックンギ基としては、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、B r、C O₂ H、C O₂ (C₁₋₆ アルキル)、C N、C F₃、C C l₃ などが挙げられる。

【 0 0 2 8 】

好ましいブロックンギ基は、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 S O₂ 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、B r、C O₂ H、C O₂ (C₁₋₆ アルキル)、C N、C F₃ または C C l₃ 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、N R¹ R² 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、B r、C O₂ (C₁₋₆ アルキル)、C N、C F₃ または C C l₃ 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、B r、C O₂ H、C O₂ (C₁₋₆ アルキル)、C N、C F₃ または C C l₃ 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あって、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基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、イミダゾリジニル、アゼチジニルおよびアジリジニルである。

【 0 0 2 9 】

ブロックンギ基 - 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ルハライド、アルキルハライド、スルホニルハライドなどとの反応) により - O H 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。

【 0 0 3 0 】

あるいは、このブロックンギ基は、置換反応 (例えば、M i t s o n o b u 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ブロックンギ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。

【 0 0 3 1 】

より好ましくは、ブロックンギ基は、- O C (O) C F₃ [1 9]、またはカルバメート基 - O C (O) N R¹ R² 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、ブロックンギ基は、- O C (O) N M e₂ である。カルバメートブロックンギ基は、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。

【 0 0 3 2 】

好ましい改変 M e n A 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 - O H 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

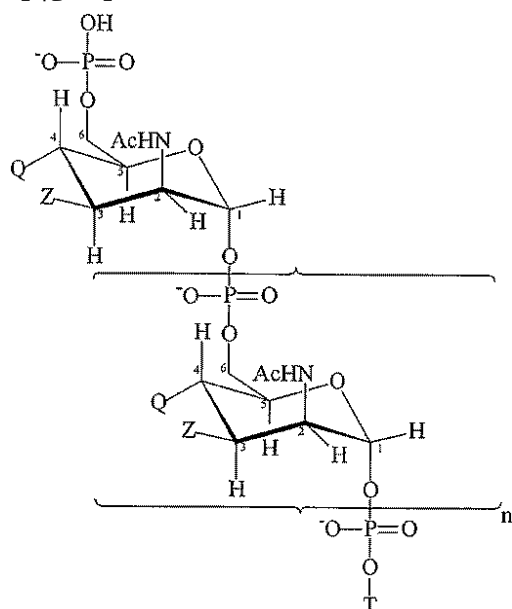
10

【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

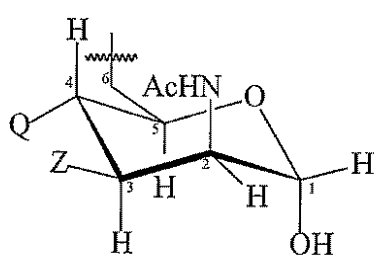
30

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；

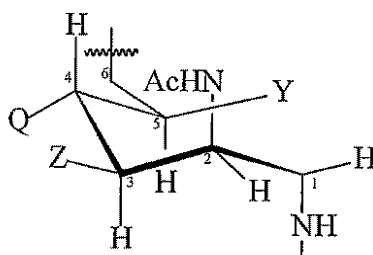
Tは式(A)または(B)であり：

【0036】

【化3】



(A)



(B)

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、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ル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。ヒドロキシル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 [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、Glu-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。

10

【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、MenAおよびMenC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。

20

【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、シアン化試薬（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。

30

【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-プロピオンアミド[58]、ニトロフェニル-エチルアミン[59]、ハロアシルハライド[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。

40

【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、MenAまたはMenC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。

50

【 0 0 5 1 】

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、これらの方法としては、疎水性クロマトグラフィー、接線 (t a n g e n t i a l) 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 6 7 および 6 8 など] もまた参照のこと]。

【 0 0 5 2 】

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。

【 0 0 5 3 】

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 [6 9] (例えば、遊離溶液中) またはミセル界面動電 (m i c e l l a r e l e c t r o k i n e t i c) クロマトグラフィー [7 0] を含む。

10

【 0 0 5 4 】

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、H P A E C - P A D [6 7] を含む。

【 0 0 5 5 】

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 [6 7] 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。

20

【 0 0 5 6 】

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 (m u l t i a n g l e l i g h t s c a t t e r i n g p h o t o m e t r y) および示差屈折率測定法 (d i f f e r e n t i a l r e f r a c t o m e t r y) (S E C - M A L S / R I) [7 1] 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。

【 0 0 5 7 】

30

(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、所望される大きさのフラグメントが精製される。

【 0 0 5 8 】

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 3 0 未満 (例えば、血清群 A については、1 0 と 2 0 との間、好ましくは、約 1 0 ; 血清群 W 1 3 5 および血清群 Y については、1 5 と 2 5 との間、好ましくは、約 1 5 ~ 2 0 ; 血清群 C については、1 2 と 2 2 との間 ; など) の最終平均重合度 (D P) を与えるように実施される。D P 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 [7 2] により、都合よく測定され得る。

40

【 0 0 5 9 】

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 [7 3]。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 W 1 3 5 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。

【 0 0 6 0 】

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

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 H_2O_2 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、10
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（e1
usive）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20
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]、nhhA[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量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、MIItA、HpuB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA（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*）改変体または欠失改変体（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変体または欠失改変体）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、NadA^(C)、NadA^(N_L)、NadA^{(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、NadA改変体(例えば、対立遺伝子改変体、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NadA配列は、参考文献98の図9に示される。

【0070】

MenB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、リボタンパク質である。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変体または欠失改変体である(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変体または欠失改変体)。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。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変体または欠失改変体(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変体または欠失改変体)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/

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】

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 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 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 (例えば、953^(N_L)) [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。

【0073】

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 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 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

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NadA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、抗髄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、全ての髄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、改変体内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、本明細書中で、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、8

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
10 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種よりも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。
20 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は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
30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280 11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400 11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680 11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760 11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880 11890 11900 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100 12110 12120 12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240 12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480 12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600 12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960 12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040 13050 13060 13070 13080 13090 13100 13110 13120 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200 13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300 13310 13320 13330 13340 13350 13360 13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440 13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520 13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680 13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790 13800 13810 13820 13830 13840 13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920 13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000 14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080 14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160 14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280 14290 14300 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500 14510 14520 14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640 14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720 14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880 14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000 15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120 15130 15140 15150 15160 15170 15180 15190 15200 15210 15220 15230 15240 15250 15260 15270 15280 15290 15300 15310 15320 15330 15340 15350 15360 15370 15380 15390 15400 15410 15420 15430 15440 15450 15460 15470 15480 15490 15500 15510 15520 15530 15540 15550 15560 15570 15580 15590 15600 15610 15620 15630 15640 15650 15660 15670 15680 15690 15700 15710 15720 15730 15740 15750 15760 15770 15780 15790 15800 15810 15820 15830 15840 15850 15860 15870 15880 15890 15900 15910 15920 15930 15940 15950 15960 15970 15980 15990 16000 16010 16020 16030 16040 16050 16060 16070 16080 16090 16100 16110 16120 16130 16140 16150 16160 16170 16180 16190 16200 16210 16220 16230 16240 16250 16260 16270 16280 16290 16300 16310 16320 16330 16340 16350 16360 16370 16380 16390 16400 16410 16420 16430 16440 16450 16460 16470 16480 16490 16500 16510 16520 16530 16540 16550 16560 16570 16580 16590 16600 16610 16620 16630 16640 16650 16660 16670 16680 16690 16700 16710 16720 16730 16740 16750 16760 16770 16780 16790 16800 16810 16820 16830 16840 16850 16860 16870 16880 16890 16900 16910 16920 16930 16940 16950 16960 16970 16980 16990 17000 17010 17020 17030 17040 17050 17060 17070 17080 17090 17100 17110 17120 17130 17140 17150 17160 17170 17180 17190 17200 17210 17220 17230 17240 17250 17260 17270 17280 17290 17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360 17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430 17440 17450 17460 17470 17480 17490 17500 17510 17520 17530 17540 17550 17560 17570 17580 17590 17600 17610 17620 17630 17640 17650 17660 17670 17680 17690 17700 17710 17720 17730 17740 17750 17760 17770 17780 17790 17800 17810 17820 17830 17840 17850 17860 17870 17880 17890 17900 17910 17920 17930 17940 17950 17960 17970 17980 17990 18000 18010 18020 18030 18040 18050 18060 18070 18080 18090 18100 18110 18120 18130 18140 18150 18160 18170 18180 18190 18200 18210 18220 18230 18240 18250 18260 18270 18280 18290 18300 18310 18320 18330 18340 18350 18360 18370 18380 18390 18400 18410 18420 18430 18440 18450 18460 18470 18480 18490 18500 18510 18520 18530 18540 18550 18560 18570 18580 18590 18600 18610 18620 18630 18640 18650 18660 18670 18680 18690 18700 18710 18720 18730 18740 18750 18760 18770 18780 18790 18800 18810 18820 18830 18840 18850 18860 18870 18880 18890 18900 18910 18920 18930 18940 18950 18960 18970 18980 18990 19000 19010 19020 19030 19040 19050 19060 19070 19080 19090 19100 19110 19120 19130 19140 19150 19160 19170 19180 19190 19200 19210 19220 19230 19240 19250 19260 19270 19280 19290 19300 19310 19320 19330 19340 19350 19360 19370 19380 19390 19400 19410 19420 19430 19440 19450 19460 19470 19480 19490 19500 19510 19520 19530 19540 19550 19560 19570 19580 19590 19600 19610 19620 19630 19640 19650 19660 19670 19680 19690 19700 19710 19720 19730 19740 19750 19760 19770 19780 19790 19800 19810 19820 19830 19840 19850 19860 19870 19880 19890 19900 19910 19920 19930 19940 19950 19960 19970 19980 19990 20000 20010 20020 20030 20040 20050 20060 20070 20080 20090 20100 20110 20120 20130 20140 20150 20160 20170 20180 20190 20200 20210 202

【 0 0 7 8 】

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。

【 0 0 7 9 】

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。

【 0 0 8 0 】

- 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。

【 0 0 8 1 】

[- 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））およびヒスチジントグ（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GSSGGGG（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。

【 0 0 8 2 】

- 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、ヒスチジントグ、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。

【 0 0 8 3 】

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】

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	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	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】

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。それらは、超毒性系統のサブグループ I、サブグループ III、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。

【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 に希釈される場合、特定の株の試験細菌の少なくとも 50% を殺傷可能である。

【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：

10

20

30

40

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* M L S T 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* M L S T 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 M L S T 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。

10

【 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。

20

30

【 0 0 9 0 】

40

(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] 。

50

【0092】

- B . p e r t u s s i s 由来の百日咳ホロトキシン (h o l o t o x i n) (P T) および糸状赤血球凝集素 (F H A) (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 1 0 9 および 1 1 0]。

【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、 1 1 1 , 1 1 2]。

【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、 1 1 2 , 1 1 3] (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 [1 1 4])。

【0096】

- ポリオ抗原 (例えば、 I P V) [例えば、 1 1 5 , 1 1 6]。

【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。

【0099】

この混合物中の抗原は、代表的に、少なくとも各々 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 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、E L I S A 力価) は低減され得るが、これらを合わせるにより、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) D N A) 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 (m i m o t o p e) [1 1 7] 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、M e n C [1 1 8] または M e n A [1 1 9] の英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。

【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 . i n f l u e n z a e B 型 (H i b) を防御するものおよび S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e を防御するものである。

【0102】

(H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e B 型 (H i b))

この組成物が H . i n f l u e n z a e B 型抗原を含む場合、それは、代表的に、H i b 英膜サッカリド抗原である。H . i n f l u e n z a e 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 H i b 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

10

20

30

40

50

製および特にH i b 莢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(「H b O C」)、破傷風トキソイド(「P R P - T」)およびN . m e n i n g i t i d i s の外膜複合体(「P R P - O M P」)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(P R P))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 k D a ~ 約5 k D a 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P R P 抗体濃度をもたらす、そして、より好ましくは、1 μg / ml 以上の抗P R P 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p H、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】

(S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e)

この組成物が、S . p n e u m o n i a e 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)莢膜サッカリド抗原である[例えば、参考文献125~127]。S . p n e u m o n i a e 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、P r e v N a r^{T M}[1]は、7種の血清型(4、6 B、9 V、14、18 C、19 Fおよび23 F)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6 B)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6 B、血清型14、血清型19 Fおよび血清型23 F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]で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：P h t A、P h t D、P h t B、P h t E、S p s A、L y t B、L y t C、L y t A、S p 125、S p 101、S p 128、S p 130およびS p 130。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

【 0 1 1 1 】

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 [1 3 7]。

【 0 1 1 2 】

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

【 0 1 1 3 】

(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 [1 3 8]、トレハロース [1 3 9]、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 1 4 0 において入手可能である。

【 0 1 1 4 】

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。この型の液体処方物は、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 (r e a d y - f i l l e d) 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。

【 0 1 1 5 】

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 H i b 抗原または D T P 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。

【 0 1 1 6 】

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 . 5 m l の容量を有する。

【 0 1 1 7 】

本発明の組成物の p H は、好ましくは、p H 6 と p H 8 との間であり、好ましくは約 7 である。適切な p H 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 [1 4 1]。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。

【 0 1 1 8 】

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

10

20

30

40

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、ならびに必要なに応じて、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、非ヒト霊長類、霊長類など)、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态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 $2.5\mu\text{g}$ 、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より大きくてもよく(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】

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。

30

【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以上の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、ヒドロキシリン酸塩、オルトリン酸塩）、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もまた参照のこと。]（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。Quillaria 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（sarsapilla））、Gypsophylla paniculata（ブライドベール（brides veil））およびSaponaria officianalis（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、StimulonTM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（immunostimulating 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、QuilA、QHAおよびQHC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。

【 0 1 3 3 】

(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 (V L P) 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せら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 V L P における使用のために適切な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 フェージ由来のタンパク質、Q フェージ由来のタンパク質 (例えば、コートタンパク質) 、 G A フェージ由来のタンパク質、 f r フェージ由来のタンパク質、A P 2 0 5 フェ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。V L P は、参考文献 1 5 2 ~ 1 5 7 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 1 5 8 においてさらに考察されている。

10

20

【 0 1 3 4 】

(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、腸内細菌リボポリサッカリド (L P S) 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 A D P 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。

【 0 1 3 5 】

L P S の無毒性誘導体としては、モノホスホリルリピド A (M P L) および 3 - O - 脱アシル化 M P L (3 d M P L) が挙げられる。3 d M P L 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 1 5 9 に開示されている。3 d M P L のこのような「小さい粒子」は、0 . 2 2 μ m メンブレンを通して滅菌濾過されるために充分小さい [1 5 9] 。他の無毒性 L P S 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、R C - 5 2 9)) が挙げられる [1 6 0 , 1 6 1] 。

30

【 0 1 3 6 】

リピド A 誘導体としては、E s c h e r i c h i a c o l i 由来のリピド A 誘導体 (例えば、O M - 1 7 4) が挙げられる。O M - 1 7 4 は、例えば、参考文献 1 6 2 および 1 6 3 に記載されている。

40

【 0 1 3 7 】

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、C p G 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 (d G) 配列を含む、二本鎖 R N A 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。

【 0 1 3 8 】

C p G 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 1 6 4 、 1 6 5 および 1 6 6 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TTCTTモチーフ)は、TLR9に導かれ得る[173]。このCpG配列(例えば、CpG-A ODN)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-B ODN)は、B細胞応答誘導に、より特異的であってもよい。CpG-A ODNおよびCpG-B ODN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-A ODN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シドは、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-)、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．リボソーム（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ボ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ピ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、またはボ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% プ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
 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 (例えば、アルミニウム塩) + L P S の無毒性誘
 導体 (例えば、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、例えば、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、(例えば、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
 いてもよい。

【 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 (例えば、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、例えば、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 莢膜サッカリド抗原 ; (i i) 結合体化し

10

20

30

40

50

た血清群W 1 3 5 莢膜サッカリド抗原；(i i i) 結合体化した血清群Y 莢膜サッカリド抗原；(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 莢膜サッカリド抗原。

【0160】

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：Neisseria（例えば、髄膜炎、敗血症（septicaemia）、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。

【0161】

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Neisseria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[209]）に投与し、次いで抗莢膜IgG全体および高アビディティ抗莢膜IgGの血清殺菌性抗体（SBA）およびELISA力価（GMT）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SBA増加が好ましい。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。

【0162】

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、WHO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。

【0163】

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、0.5mlである。

【0164】

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。

【0165】

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。初回免疫投与の間（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。

【0166】

Neisseria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[例えば、参考文献210および211]。肺炎球菌サッカリド[212, 213]、肺炎球菌ポリペ

チド[214]、Hibサッカリド[215]、MenCサッカリド[216]、およびHibサッカリド結合体およびMenC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莢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、(vi)結合体化したHib抗原を混合することを包含し得る。工程(1)はまた、(vii)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、またはそうでなくてもよい。

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莢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、(vi)結合体化したHib抗原を混合することを包含し得る。工程(1)はまた、(vii)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(including)」とは、「含む(including)」および「なる(consisting)」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(about)」とは、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0174】

単語「実質的に(substantially)」は、「完全に(completely)」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。C₁₋₁₂ 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、C₁₋₆ 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。C₃₋₁₂ 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。C₅₋₁₂ 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「C₅₋₁₂ アリール - C₁₋₆ 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（Troc）、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、C₁₋₁₂ 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、非グリコシル化、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】

血清群に続いて、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、コロンのにより隔てられる（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 III 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 sequence 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、50 mM 酢酸緩衝液（pH 5）の存在下で均質化した。高圧ホモジナイザー（AVES T IN、14000 psi にて 4 サイクル）を用いて溶解を行った。溶解後、尿素を 5 M

40

50

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 において少なくとも30日間、そして2~8 において少なくとも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 (SPFF, 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-through) 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、夾雑する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 PLCK 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。

30

【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。
- 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ーショ

40

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)

髄膜炎菌血清群 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、ウェスタンブ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価を誘導し得た：

【0198】

【表 2】

	髄膜炎菌株 (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20 μ g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10 μ g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-3 mAb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 8	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 内で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。

20

【0205】

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：

30

【0207】

【表 6】

成分	0.5ml 用量あたりの量
血清群 C 結合体	10 μ g サッカリド + 12.5-25 μ g CRM ₁₉₇
血清群 W135 結合体	10 μ g サッカリド + 6.6-20 μ g CRM ₁₉₇
血清群 Y 結合体	10 μ g サッカリド + 6.6-20 μ g CRM ₁₉₇
Δ G287-953	20 μ g ポリペプチド
936- Δ G741	20 μ g ポリペプチド
NadA	20 μ g ポリペプチド

40

MenA 結合体 (10 μ g サッカリド + 12.5 ~ 33 μ g CRM₁₉₇) および / または Hib 結合体 (10 μ g サッカリド + 2 ~ 5 μ g 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 μ g / 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 mTorr 減

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 の水溶液中での再懸濁後、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W135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-CRM₁₉₇結合体もまた含むこと以外は(血清群A、血清群C、血清群W135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W135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	C				W135	Y
	2996	MC58	394/98	44/76	F6124	C11	312294	C4678	M1569	LPN17592	860800
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H i b 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M e n W 1 3 5 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M e n Y 力価を与える〔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H i b 結合体の添加が抗W 1 3 5 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M e n A サッカリドの使用）

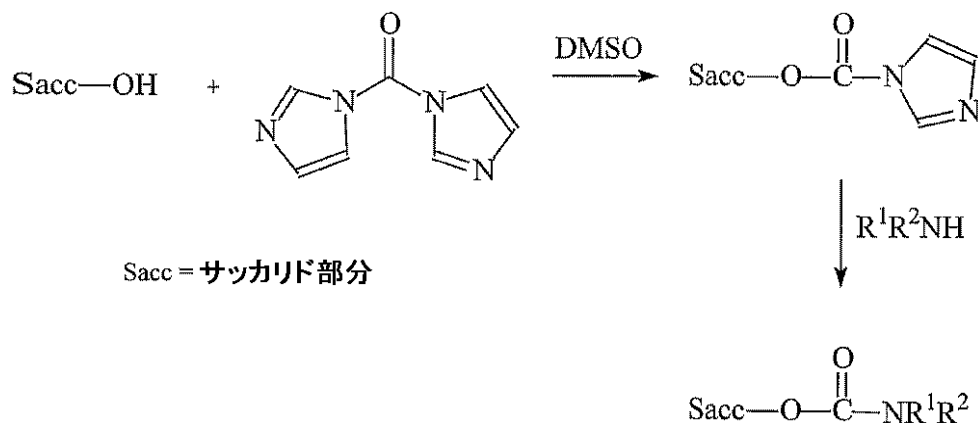
莢膜ポリサッカリドをM e n A から精製し、そして凍結乾燥してM e n A オリゴサッカリドを得た。このポリサッカリド（2 g）を、10 mg / mL のポリサッカリド濃度にて、50 mM 酢酸緩衝液（pH 4.75）中で50 にて約4時間加水分解した〔73〕。加水分解後、この溶液を回転エバポレーションによって乾燥した。

【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、10 mg / 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：C D I のモル比に従って、次いで、21.262 g のC D I 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M e n A - C D I 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。

【0219】

第2の反応工程において、MenA-CDIオリゴサッカリドを、約10mg/mLのサッカリド濃度でDMSO中に可溶化した。1:100であるMenA-CDI単位:DMAのモル比に従って、36.288gの99%塩酸ジメチルアミン(すなわち、 R^1 および $R^2 = Me$)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10mg/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、3.5kDa 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)2Lの1M塩化ナトリウムに対して16時間(透析係数1:20)、(ii)2Lの0.5M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)2LのWFIに対して16時間(透析係数1:20)。精製を改善するために、1kDa MWCOメンブレン(CentriconTM)を通したダイアフィルトレーション工程もまた実施した。

10

【0221】

精製されたMenA-CDI-DMA産物を、pH6.5において、25mM L-ヒスチジン(FlukaTM)中で緩衝化した。

【0222】

改変されたMenAサッカリドの結合体(MenA-CDI-DMA)を調製するために、プロセス全体は以下の通りであった:

20

- 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
- CDI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】

30

改変されたMenA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、改変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、改変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】

改変されたMenA結合体を、未改変のオリゴサッカリドの結合体の代替物としてのMenC結合体、MenW135結合体およびMenY結合体と組み合わせる。この四価混合物を3つのMenB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W135および血清群Yに対して有効なワクチンを得る。

40

【0225】

(肺炎球菌の組合せ)

組み合わされた3つのMenB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2μg/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 μ g サッカリド + 6.25-16.5 μ g CRM ₁₉₇
血清群 C 結合体	5 μ g サッカリド + 6.25-12.5 μ g CRM ₁₉₇
血清群 W135 結合体	5 μ g サッカリド + 3.3-10 μ g CRM ₁₉₇
血清群 Y 結合体	5 μ g サッカリド + 3.3-10 μ g CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 4 結合体	2 μ g サッカリド + 2.5 μ g CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 9V 結合体	2 μ g サッカリド + 2.5 μ g CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 14 結合体	2 μ g サッカリド + 2.5 μ g CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 18C 結合体	2 μ g サッカリド + 2.5 μ g CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 19F 結合体	2 μ g サッカリド + 2.5 μ g CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 23F 結合体	2 μ g サッカリド + 2.5 μ g CRM ₁₉₇
肺炎球菌血清型 6B 結合体	4 μ g サッカリド + 5 μ g CRM ₁₉₇

10

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)

20

【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] Frasch (1990) *Advances in Biotechnological Processes* 13巻のp.123-145 (Mizrahi & Van Wezel 編)
- [9] WO03/007985. 10
- [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. 20
- [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. 30
- [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. 40
- [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

【表 1 1】

[48] WO00/61761.	
[49] WO2004/083251.	
[50] WO99/42130	
[51] WO96/40242	
[52] Lees ら (1996) <i>Vaccine</i> 14:190-198.	
[53] WO95/08348.	
[54] US 特許 4,882,317	
[55] US 特許 4,695,624	
[56] Porro ら (1985) <i>Mol Immunol</i> 22:907-919.	10
[57] EP-A-0208375	
[58] WO00/10599	
[59] Gever ら <i>Med. Microbiol. Immunol</i> , 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	20
[67] Lei ら (2000) <i>Dev Biol (Basel)</i> 103:259-264.	
[68] WO00/38711; US 特許 6,146,902.	
[69] Lamb ら (2000) <i>Dev Biol (Basel)</i> 103:251-258.	
[70] Lamb ら (2000) <i>Journal of Chromatography A</i> 894:311-318.	
[71] D'Ambra ら (2000) <i>Dev Biol (Basel)</i> 103:241-242.	
[72] Ravenscroft ら (1999) <i>Vaccine</i> 17:2802-2816.	
[73] Costantino ら (1999) <i>Vaccine</i> 17:1251-1263.	
[74] Parkhill ら (2000) <i>Nature</i> 404:502-506.	
[75] Tettelin ら (2000) <i>Science</i> 287:1809-1815.	
[76] WO00/66791.	
[77] Pizza ら (2000) <i>Science</i> 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) <i>FEMS Immunol Med Microbiol</i> 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 1 2】

- [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] Masignani 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. 10
- [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.*
- [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] Jedrzejewski (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] Masignani 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 1 3】

- [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) *Virology* 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.
- [206] WO94/00153. 20
- [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] Ugozzoli 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 6 1 K 39/39 (2006.01) A 6 1 K 39/39

(72)発明者 コントルニ, マリオ
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ビア フィオレンティーナ 1, カイロン ソチエタ
 ア レスボンサビリタ 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 MASIGNANI, 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 Charac
 terization of Vaccines (Dev. Biol.), Basel, Karger, 103, pp.259-264 (2000)
 RENNELS, M. et al, Dose escalation, safety and immunogenicity study of a tetravalent me
 ninogoccal 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)