

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-503716

(P2008-503716A)

(43) 公表日 平成20年2月7日(2008.2.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 N	4 C 0 8 5
GO 1 N 30/74 (2006.01)	GO 1 N 30/88 P	
GO 1 N 30/86 (2006.01)	GO 1 N 30/74 Z	
A 6 1 K 39/095 (2006.01)	GO 1 N 30/88 E	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-516078 (P2007-516078)	(71) 出願人	592243793
(86) (22) 出願日	平成17年6月21日 (2005.6.21)		カイロン ソチエタ ア レスボンサビリ
(85) 翻訳文提出日	平成19年1月10日 (2007.1.10)		タ リミタータ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2005/002532		イタリア国 イー53100 シエナ, ビ
(87) 国際公開番号	W02006/000920		ア フィオレンティーナ 1
(87) 国際公開日	平成18年1月5日 (2006.1.5)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	0413868.1		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成16年6月21日 (2004.6.21)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		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】 GPCおよびSEC-MALSによる結合体化糖の寸法分析

(57) 【要約】

多重角光散乱光度法 (SEC-MALS) による検出を有するGPC (ゲル透過クロマトグラフィー) およびサイズ除去クロマトグラフィーを使用して、糖結合体の分子サイズおよび分子量のそれぞれを正確に測定し得る。本発明は、(a) サンプル内の結合体化糖抗原の分子サイズを測定するためのプロセスであって、GPCによりサンプルを分析する工程を包含するプロセス、および(b) サンプル内の結合体化糖抗原の分子量を測定するためのプロセスであって、SEC-MALSによってサンプルを分析する工程を包含するプロセス、を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル内の結合体化糖抗原の分子サイズを測定するためのプロセスであって、ゲル透過クロマトグラフィーによりサンプルを分析する工程を包含する、プロセス。

【請求項 2】

サンプル内の結合体化糖抗原の分子量を測定するためのプロセスであって、SEC-MALS によってサンプルを分析する工程を包含する、プロセス。

【請求項 3】

前記糖が細菌の莢膜糖である、請求項 1 または 2 に記載のプロセス。

【請求項 4】

前記莢膜糖が、*Neisseria meningitidis* の血清型 A、C、W135、または Y に由来する、請求項 3 に記載のプロセス。

【請求項 5】

前記糖がオリゴ糖である、請求項 4 に記載のプロセス。

【請求項 6】

前記結合体がタンパク質キャリアを有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 7】

前記タンパク質キャリアが CRM197 またはジフテリア毒素である、請求項 6 に記載のプロセス。

【請求項 8】

血清型 A の *N. meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体を含む組成物であって、該結合体の分子サイズが $57.1 \pm 20\%$ であり、そして / または該結合体の分子量が $88.5 \text{ kDa} \pm 20\%$ である、組成物。

【請求項 9】

血清型 C の *N. meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体を含む組成物であって、該結合体の分子サイズが $57.0 \pm 20\%$ であり、そして / または該結合体の分子量が $85.2 \text{ kDa} \pm 20\%$ である、組成物。

【請求項 10】

血清型 W135 の *N. meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体を含む組成物であって、該結合体の分子サイズが $68.7 \pm 20\%$ であり、そして / または該結合体の分子量が $110.1 \text{ kDa} \pm 20\%$ である、組成物。

【請求項 11】

血清型 Y の *N. meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体を含む組成物であって、該結合体の分子サイズが $63.3 \pm 20\%$ であり、そして / または該結合体の分子量が $84.7 \text{ kDa} \pm 20\%$ である、組成物。

【請求項 12】

請求項 8 ~ 11 に記載される前記結合体のうちの 2 つ以上を含む、組成物。

【請求項 13】

2 つのバッチのワクチンであって、ここで：

(a) 両方のバッチのワクチンは：

(i) 血清型 A の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；

(ii) 血清型 C の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；

(iii) 血清型 W135 の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；

(iv) 血清型 Y の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；

を含み；

10

20

30

40

50

(b) 第一バッチの血清型 A の糖の分子サイズが A 1 であり、第二バッチの血清型 A の糖の分子サイズが A 2 であり；

(c) 該第一バッチの血清型 C の糖の分子サイズが C 1 であり、該第二バッチの血清型 C の糖の分子サイズが C 2 であり；

(d) 該第一バッチの血清型 W 1 3 5 の糖の分子サイズが W 1 であり、該第二バッチの血清型 W 1 3 5 の糖の分子サイズが W 2 であり；

(e) 該第一バッチの血清型 Y の糖の分子サイズが Y 1 であり、該第二バッチの血清型 Y の糖の分子サイズが Y 2 であり；

(f) A 1 / A 2 の比率、C 1 / C 2 の比率、W 1 / W 2 の比率、および Y 1 / Y 1 の比率が各々、0.90 ~ 1.10 の間である、
ワクチン。

10

【請求項 14】

2 つのバッチのワクチンであって、ここで：

(a) 両方のバッチのワクチンは：

(i) 血清型 A の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；

(ii) 血清型 C の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；

(iii) 血清型 W 1 3 5 の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；

20

(iv) 血清型 Y の *Neisseria meningitidis* 由来の莢膜糖の結合体；
を含み；

(b) 第一バッチの血清型 A の糖の分子量が A 1 であり、第二バッチの血清型 A の糖の分子量が A 2 であり；

(c) 該第一バッチの血清型 C の糖の分子量が C 1 であり、該第二バッチの血清型 C の糖の分子量が C 2 であり；

(d) 該第一バッチの血清型 W 1 3 5 の糖の分子量が W 1 であり、該第二バッチの血清型 W 1 3 5 の糖の分子量が W 2 であり；

(e) 該第一バッチの血清型 Y の糖の分子量が Y 1 であり、該第二バッチの血清型 Y の糖の分子量が Y 2 であり；

30

(f) A 1 / A 2 の比率、C 1 / C 2 の比率、W 1 / W 2 の比率、および Y 1 / Y 1 の比率が各々、0.90 ~ 1.10 の間である、
ワクチン。

【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書は、その全体が参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

40

本発明は、ワクチンの分析および品質管理の分野にあり、このワクチンとしてはキャリアと結合体化した細菌の莢膜糖が挙げられる。

【背景技術】

【0003】

キャリアタンパク質と結合体化した莢膜糖抗原を含む免疫原は、当該分野で周知である。結合体化は、T 細胞非依存性抗原を T 細胞依存性抗原へと変換し、これによって記憶応答を増強させ、そして保護免疫を展開させることを可能にし、そしてプロトタイプの結合体化ワクチンは、*Haemophilus influenzae* b 型 (Hib) に対するものであった [例えば、参考文献 1 (非特許文献 1) の第 14 章を参照のこと]。Hib ワクチン以降、*Neisseria meningitidis* (髄膜炎菌) および

50

Streptococcus pneumoniae (肺炎球菌) に対して保護するための結合体化糖ワクチンが開発されている。ワクチンを結合体化する他の生物体は、*Streptococcus agalactiae* (群Bの連鎖球菌属) [2] (非特許文献2)、*Pseudomonas aeruginosa* [3] (非特許文献3)、および *Staphylococcus aureus* [4] (非特許文献4) が有益である。

【0004】

全長の莢膜糖を使用するのではなく、加水分解工程後の所望のサイズのオリゴ糖フラグメントを選択することが可能であり [例えば、参考文献5 (非特許文献5)]、そして中程度の鎖長のオリゴ糖を用いた結合体が、向上した免疫誘発 [例えば、参考文献6および7] (非特許文献6および7) を提供することが報告されている。ヒトへの使用を承認されている、3つの *N. meningitidis* 血清型C結合体化糖ワクチンのうち、*Menjugate*TM [8] (非特許文献8) および *Meningitec*TM は、オリゴ糖に基づき、*NeisVac-C*TM は全長の多糖を使用する。

10

【0005】

結合体がワクチン中に含まれる場合、製造および発売のための品質管理は一般にその結合体が規定の分子サイズおよび/または分子量を有すること、またこれらのパラメータがバッチ間で一貫していることを必要とする。分子サイズおよび分子量は、また、ワクチンの安定性をモニタリングするために使用され得る。なぜなら、結合体は時間の経過につれて凝集し得、サイズおよび分子量の増加を生じ得るからである。

20

【非特許文献1】*Vaccines* (Plotkinら、編) 第4版、ISBN: 0721696880.

【非特許文献2】Bakerら、*J Infect Dis* (2003) 188: 66-73

【非特許文献3】Theilackerら、*Infect Immun* (2003) 71: 3875-84

【非特許文献4】Anonymous *Drugs RD* (2003) 4: 383-5

【非特許文献5】Ravenscroftら、*Vaccine* (1999) 17: 2802-2816

【非特許文献6】Paollettiら、*J Clin Invest* (1992) 89: 203-9

30

【非特許文献7】Andersonら、*J Immunol* (1986) 137: 1181-6

【非特許文献8】Jones、*Curr Opin Investig Drugs* (2001) 2: 47-49

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

結合体化糖抗原について、特に髄膜炎菌の糖の結合体について、分子サイズ、分子量および関連のパラメータを測定するための新規かつ改善された方法を提供することが、本発明の目的である。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の開示)

本発明者らは、ゲル透過クロマトグラフィーおよび SEC-MALS (重角光散乱光度法による検出を備えたサイズ排除クロマトグラフィー) を使用して、糖結合体の分子サイズおよび分子量をそれぞれ正確かつ信頼性高く測定し得ることを発見した。

【0008】

従って、本発明は、サンプル内の結合体化糖抗原の分子サイズを測定するためのプロセスを提供し、このプロセスはゲル透過クロマトグラフィーによりサンプルを分析する工程を包含する。クロマトグラフィー分析の保持時間は、例えば、検量線との比較によって、

50

粘度半径 (viscosity radius (R)) に変換され、これによって分子サイズの単純な計算を可能にする。サンプル中の結合体の平均分子サイズおよび / または分子サイズ分布は、この方法で容易に決定され得る。

【0009】

本発明はまた、サンプル内の結合体化糖抗原の分子量を測定するためのプロセスを提供し、このプロセスは SEC - MALS によってサンプルを分析する工程を包含する。この SEC 保持時間が、分子量へと変換され得る。サンプル中の結合体の平均分子量および / または分子量分布 (多分散性) は、この方法で容易に決定され得る。参考文献 9 は、SEC - MALS が以前に、結合体化前の骨髄球菌の糖および結合体化前の連鎖球菌の糖の測定に使用されたことを報告するが、結合体後のデータは報告されていない。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

(糖)

本発明は、結合体化糖抗原に関するパラメータの測定を可能にする。この糖抗原は、代表的に、細菌の莢膜糖であり、例えば、Neisseria meningitidis (血清型 A、B、C、W135、または Y)、Streptococcus pneumoniae (血清型 4、6B、9V、14、18C、19F または 23F)、Streptococcus agalactiae (型 Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII または VIII)、Haemophilus influenzae (型分け可能な (typeable) 株: a、b、c、d、e または f)、Pseudomonas aeruginosa、Staphylococcus aureus、などに由来する。他の糖分析物としては、グルカン (例えば、真菌性グルカン (例えば、Candida albicans におけるグルカン))、および真菌性莢膜糖 (例えば、Cryptococcus neoformans 由来の莢膜糖) が挙げられる。本発明は、血清型 A、C、W135 および Y の N. meningitidis の莢膜糖由来の莢膜糖を分析するのに特に有用である。

20

【0011】

N. meningitidis の血清型 A の莢膜は、(16) 結合した 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、これは C3 位および C4 位に部分的に O - アセチル化を有する。N. meningitidis の血清型 B の莢膜は、(28) 結合したシアル酸のホモポリマーである。N. meningitidis の血清型 C の莢膜糖は、(29) 結合したシアル酸 (N - アセチルノイラミン酸、すなわち 'euAc') のホモポリマーであり、これは 7 位および / または 8 位において可変性の O - アセチル化を有する。N. meningitidis の血清型 W135 の糖は、シアル酸 - ガラクトースの二糖単位 [4) - D - eup5Ac (7/9OA c) - - (26) - D - Gal - - (1)] からなるポリマーであり、これはシアル酸の 7 位と 9 位とに可変性の O - アセチル化を有する [10]。N. meningitidis の血清型 Y の糖は、血清型 W135 の糖と類似であるが、二糖の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 [4) - D - eup5Ac (7/9OA c) - - (26) - D - Glc - - (1)] を除く。H. influenzae b 型の莢膜糖は、リボース、リビトールおよびリン酸のポリマー ['PRP'、(ポリ - 3 - - D - リボース - (1,1) - D - リビトール - 5 - リン酸)] である。

30

40

【0012】

他の好ましい糖抗原は、真核細胞の糖 (例えば、真菌の糖、植物の糖、ヒトの糖 (例えば、癌抗原) など) である。他の好ましい糖は、リボポリ多糖およびリボオリゴ糖である。

【0013】

糖抗原は、天然に見られるような形態であり得るか、または誘導形態であり得、例えば、化学的改変および / または脱重合に供されている糖である。本発明は、莢膜多糖のオリゴ糖断片を分析するのに特に有用である。天然の多糖は、一般的に、少なくとも重合度 2

50

0 (例えば、20、30、40、50、60またはそれ以上)を有し、そしてこれらは脱重合(例えば、加水分解)によって、(例えば、20未満の重合度を有する)オリゴ糖断片へと変換され得る。

【0014】

糖の化学的加水分解は、一般に、当該分野で標準的な条件下での酸または塩基のいずれかを用いた処理を含む。莢膜糖をその成分の単糖へと脱重合するための条件は、当該分野で公知である。血清型W135およびYの糖に対して、加水分解は好ましい。TFA(トリフルオロ酢酸)を用いた酸加水分解は、血清型C、W135およびYの全ての加水分解のために使用され得、血清型Cに対しては、シアル酸の分解を避けるためにわずかにより低いインキュベーション温度(100より90)が好ましい。代表的なTFA処置は、最終濃度2MまでのTFAの添加、続いて90~100に90分間加熱する工程を包含する。血清型Cの糖は、全体的な糖内容物分析のため、100mMのHClを用いた80で2時間の処理により加水分解され得る[11]。他の代表的な加水分解条件は、高温(例えば、70~80)においてミリモル濃度の弱酸(例えば、酢酸)を含む。

10

【0015】

本発明は、異なる長さの種々の糖(例えば、同じ親の糖の異なる断片)を含む結合体サンプルを用いた使用に特に有用である。

【0016】

(結合体)

分析されるべき糖抗原は、キャリアと結合体化される。T細胞非依存性の抗原からT細胞依存性の抗原へと糖を変換することによってその糖の免疫原性を増大させ、これによって免疫記憶を刺激する(prime)ことを可能にするため、共有結合性の結合体化が使用される。結合体化は、小児用ワクチンに特に有用であり、そしてこの結合体化は周知技術である(例えば、参考文献12~21に概説される)。糖はキャリアに直接連結され得る[22、23]が、リンカーまたはスペーサー(例えば、脂肪酸、 α -プロピオンアミド[24]、ニトロフェニル-エチルアミン[25]、ハロアシルハライド[26]、グリコシド結合[27]、6-アミノカプロン酸[28]、ADH[29]、 $C_4 \sim C_{12}$ 部分[30]、など)が一般に使用される。

20

【0017】

結合体における代表的なキャリアタンパク質は、細菌毒素またはトキシイド(例えば、ジフテリア毒素または破傷風毒素)である。CRM197ジフテリア毒素誘導体[31-33]は、MenjugateTMおよびMeningitecTMにおけるキャリアタンパク質であり、一方、破傷風毒素は、NeisVacTMにおいて使用される。ジフテリア毒素は、MenactraTMにおけるキャリアとして使用される。CRM197は、PrevnarTMにおけるキャリアタンパク質である。他の公知のキャリアタンパク質としては、N.meningitidisの外膜タンパク質[34]、合成ペプチド[35、36]、熱ショックタンパク質[37、38]、百日咳タンパク質[39、40]、サイトカイン[41]、リンホカイン[41]、ホルモン[41]、増殖因子[41]、種々の病原体由来抗原に由来する複数のヒトCD4⁺T細胞エピトープを含む人工タンパク質[42]、H.influenzae由来のタンパク質D[43、44]、肺炎球菌表面タンパク質PspA[45]、鉄取り込みタンパク質[46]、C.difficile由来の毒素Aまたは毒素B[47]、などが挙げられる。組成物は、例えば、キャリア抑制の危険性を低減させるため、1つより多くのタンパク質を使用し得、そして単独のキャリアタンパク質が1つより多くの糖抗原を保持し得る[48]。結合体は一般に、1:5(すなわちタンパク質過剰)~5:1(すなわち糖過剰)の間の糖タンパク質比率(w/w)を有する。組成物は、結合体に付加した遊離のキャリアタンパク質を含み得る[49]。

30

40

【0018】

本発明は、連鎖球菌の糖(血清型A、C、W135およびY)とCRM197キャリア

50

との結合体を分析するのに特に適している。このような結合体は、参考文献 50 ~ 53 に開示される方法により調製され得る。好ましい結合体は、参考文献 51 に従い調製されたもの、すなわち CRM 197 キャリアと脂肪酸リンカーとを有するオリゴ糖断片である。

【0019】

(ゲル透過クロマトグラフィー)

ゲル透過クロマトグラフィー (GPC) は、周知の標準的な技術である。本発明は、一般に、HPGPC (高性能 GPC) を使用する。この GPC 技術は、サンプル中の結合体の水力学的サイズ (混合物中の平均サイズおよび / またはサイズ分布) を決定するため、本発明に従って使用される。

【0020】

GPC カラムにおける保持時間は、標準的な技術によって粘度半径 (R) に変換され得る。代表的に、カラムにおける保持時間は公知の分子サイズの標準品に対して決定され、これによってこれら 2 つのパラメータの相関を可能にする。次いで、結合体の分子サイズは、カラムにおける保持時間から推測され得る。例えば、既知の分子サイズのデキストランを使用したカラムの検量、およびそれらの保持時間は、三次多項式を使用して粘度半径と相関され得る [54、55]。この粘度半径は、その分子の形状が保持に対して有する効果を説明するために、固有粘度および分子量を使用する。

【0021】

不均一混合物において、GPC 技術は、混合物中の平均分子サイズおよび / または分子サイズ分布の両方を決定するために使用され得る。

【0022】

(SEC - MALS)

サイズ除去クロマトグラフィー (SEC) は、周知技術である。分離の結果は、重角光散乱 (MALS) 光度法および示差屈折率検出法により分析され得る。この方法は、流速および固定相などのクロマトグラフィーのパラメータとは無関係に、そして分子量の検量の必要なしに、分子量の分布情報および水力学半径 (分子サイズ) を、ポリマーの確認および他の物理的パラメータを提供する [9]。分子量の検量を必要とせずに、MALS による分子量の決定は、目的のポリマーに関して、目的の溶媒中の目的の波長および温度における特定の屈折率 (dn/dc) を予め決定することに基づく。

【0023】

このようにして SEC - MALS は、結合体の分子量を決定するために使用され得る。サンプルの分子量は、代表的な Debye プロットから観察される場合の SEC ピークの各々の部分 (slice) において決定され、分子量はこのプロットの切片 (intercept) から決定される [56 - 58]。濃度に比例する屈折率シグナル、ならびに濃度および分子量に比例する 90° MALS シグナルは、分子量分布を決定するために重ね合わされ得る。

【0024】

不均一混合物において、SEC - MALS 技術は、混合物中の平均分子量および / または分子量分布 (多分散性) の両方を決定するために使用され得る。

【0025】

(結合体組成物)

本発明は、血清型 A の N . meningitidis 由来の莢膜糖の結合体を含む組成物を提供する。ここで、その結合体の分子サイズは 57 . 1 であり、そして / またはその結合体の分子量は 88 . 5 kDa である。本組成物はまた、血清型 A の N . meningitidis 由来の莢膜糖の結合体を含み得、ここでその結合体の分子量は 190 kDa である。

【0026】

本発明は、血清型 C の N . meningitidis 由来の莢膜糖の結合体を含む組成物を提供する。ここで、その結合体の分子サイズは 57 . 0 であり、そして / またはその結合体の分子量は 85 . 2 kDa である。

10

20

30

40

50

【0027】

本発明は、血清型W135のN.meningitidis由来の莢膜糖の結合体を含む組成物を提供する。ここで、その結合体の分子サイズは68.7であり、そして/またはその結合体の分子量は110.1kDaである。本組成物はまた、血清型W135のN.meningitidis由来の莢膜糖の結合体を含み得、その結合体の分子量は347kDaである。

【0028】

本発明は、血清型YのN.meningitidis由来の莢膜糖の結合体を含む組成物を提供する。ここで、その結合体の分子サイズは63.3であり、そして/またはその結合体の分子量は84.7kDaである。本組成物はまた、血清型YのN.meningitidis由来の莢膜糖の結合体を含み得、ここでその結合体の分子量は486kDaである。

10

【0029】

分子サイズおよび分子量に関する上記の値は単一の数量 (figure) として示されるが、本発明は、これらの数量が $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ などである結合体に及ぶ。

【0030】

本発明はまた、上記の血清型Aの結合体、血清型Cの結合体、血清型W135の結合体、および血清型Yの結合体のうちの2つ以上 (例えば、2つ、3つまたは4つ) を含む組成物を提供する。

20

【0031】

本発明はまた、多価結合体ワクチンを調製するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：(a) 本発明の方法を使用して2つ以上の結合体を分析する工程、および(b) これら分析された結合体を組合わせて多価ワクチンを形成する工程。

【0032】

本発明はまた、多価結合体ワクチンを調製するための方法を提供し、この方法は、本発明の方法を使用して分析されている2つ以上の結合体を混合する工程を包含する。

【0033】

(混合糖)

本発明は、莢膜糖の結合体を含む組成物における分析を可能にする。一般的に、本発明は1つの型の結合体 (すなわち、同じキャリアに繋がれた、同じ莢膜糖に由来する糖) を含むサンプルに対して使用される。従って、多価結合体ワクチン (例えば、MenactraTM、PrevnarTM) に関して、本発明は一般的に、最終的な多価産物を作製するために組み合わされる前の個々の結合体において使用され、その結合体自身の最終産物において使用されるのではない。しかしながら、2つの結合体が著しく異なる分子サイズおよび分子量を有する場合、並行した分析は真っ直ぐである。

30

【0034】

(保存中の安定性)

本発明は、保存の間の結合体の安定性をモニタリングするために使用され得る。従って、本発明の方法は、同じ物質由来のサンプルについて時間t1およびt2において実施され得る。そして分析の結果が比較され得る。分子量および/または分子サイズの有意な変化は、そのワクチンが完全には安定でないことを示す。従って、本発明は、安定なワクチンを選択し、そして不安定なワクチンを却下するために使用され得る。

40

【0035】

(非結合体成分)

組成物中の結合体を分析することだけでなく、本発明のプロセスは他の成分または他の特性 (例えば、浸透圧、pH、個々の糖または結合体の重合度、タンパク質 (特にキャリアタンパク質に関する) 含量、アルミニウム含量、界面活性剤含量、保存剤含量、など) の分析を含み得る。

【0036】

50

本発明は、ワクチン組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、本発明に従い結合体の分子量および／または分子サイズの分析の工程、およびその組成物のpH測定の工程、必要に応じてその後、その組成物のpHを所望の値（例えば、6～8の間、または約7）に調整する工程、を包含する。

【0037】

本発明はまた、ワクチン組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、（a）上記されたような1つ以上の結合体を提供する工程；（b）この結合体（単数または複数）をバルクのワクチンへと処方する工程；（c）pHおよび／または他の特性に関してこのバルクワクチンを分析する工程；およびそのバルクワクチンが医療使用に受容可能であることを工程（c）からの結果が示す場合、（d）このバルクからヒト使用のためにワクチンを包装する工程、を包含する。工程（c）は、最小の糖濃度の評価、非結合体化糖：結合体化糖の比率の評価、などを含み得る。工程（d）は、単位投与形態または多用量投与形態（例えば、バイアルまたはシリンジ）へと包装する工程を包含し得る。代表的なヒトの注射用量は、0.5mlの容量を有する。

10

【0038】

本発明は、ワクチン組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：

（a）上記されたような1つ以上の結合体を提供する工程；および（b）この結合体化糖と1つ以上のさらなる抗原とを混合する工程、であって、この1つ以上のさらなる抗原としては、以下である：

20

- 血清型Cの*N. meningitidis*由来の莢膜糖抗原。
- 血清型Aの*N. meningitidis*由来の莢膜糖抗原。
- 血清型Bの*N. meningitidis*由来のタンパク質抗原。
- *N. meningitidis*血清型Bのミクロ微小胞[59]、「天然のOMV」[60]、小胞(bleb)または外膜小胞(vesicle)[例えば、参考文献61～66、など]の調製物。
- *Haemophilus influenzae* b型由来の糖抗原。
- *Streptococcus pneumoniae*由来の抗原（例えば、多価結合体化糖抗原[例えば、引用文献67～69]）。
- A型肝炎ウイルス由来の抗原（例えば、不活性化ウイルス[引用文献70、71]）。
- 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、71、72]）。
- *Bordetella pertussis*由来の抗原（例えば、*B. pertussis*由来の百日咳毒素(PT)および糸状ヘマグルチニン(FHA)、また必要に応じてペルタクチンおよび／または凝集原2および凝集原3[例えば、参考文献73および74]と組み合わせられる。細胞性百日咳抗原が使用され得る。
- ジフテリア抗原（例えば、ジフテリア毒素[例えば、参考文献75の第3章]、例えばCRM₁₉₇変異体[例えば、76]）。
- 破傷風抗原（例えば、破傷風毒素[例えば、参考文献75の第4章]）。
- ポリオ抗原[例えば、参考文献77、78]、（例えば、IPV）。

30

40

【0039】

このような抗原は、アルミニウム塩アジュバント（例えば、水酸化物またはリン酸塩）に吸収され得る。好ましくは、任意のさらなる糖抗原が結合体として含まれる。

【0040】

本発明の結合体は、アルミニウム塩アジュバント（例えば、水酸化物またはリン酸塩）に同様に吸収されてもよいし、またはその結合体は吸収されなくてよい（例えば、溶液中に遊離していてもよい）。

【0041】

（バッチ間の一貫性）

本発明のプロセスは信頼でき、一貫しており、従って異なるバッチの結合体の有効な比

50

較を可能にする。従って、異なるバッチの結合体が調製され得、アッセイされ得、そして結合体ワクチンの調製における販売および使用のため、一貫性のあるバッチが選択され得、一方、逸脱したバッチは棄却され得る。

【0042】

本発明は、2つのバッチのワクチンを提供し、ここで：(a)両方のバッチのワクチンは：(i)血清型Aの*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体；(ii)血清型Cの*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体；(iii)血清型W135の*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体；(iv)血清型Yの*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体を含み；(b)第一バッチ中の血清型Aの糖の分子サイズは A_1 であり、第二バッチ中の血清型Aの糖の分子サイズは A_2 である；(c)第一バッチ中の血清型Cの糖の分子サイズは C_1 であり、第二バッチ中の血清型Cの糖の分子サイズは C_2 である；(d)第一バッチ中の血清型W135の糖の分子サイズは W_1 であり、第二バッチ中の血清型W135の糖の分子サイズは W_2 である；(e)第一バッチ中の血清型Yの糖の分子サイズは Y_1 であり、第二バッチ中の血清型Yの糖の分子サイズは Y_2 である；(f) A_1/A_2 の比、 C_1/C_2 の比、 W_1/W_2 の比および Y_1/Y_2 の比は各々0.90~1.10の間であり、好ましくは各々0.95~1.05の間である。

【0043】

本発明は、2つのバッチのワクチンを提供し、ここで：(a)両方のバッチのワクチンは、以下を含む：(i)血清型Aの*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体；(ii)血清型Cの*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体；(iii)血清型W135の*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体；(iv)血清型Yの*Neisseria meningitidis*由来の莢膜糖の結合体；(b)第一バッチ中の血清型Aの糖の分子量は A_1 であり、第二バッチ中の血清型Aの糖の分子量は A_2 である；(c)第一バッチ中の血清型Cの糖の分子量は C_1 であり、第二バッチ中の血清型Cの糖の分子量は C_2 である；(d)第一バッチ中の血清型W135の糖の分子量は W_1 であり、第二バッチ中の血清型W135の糖の分子量は W_2 である；(e)第一バッチ中の血清型Yの糖の分子量は Y_1 であり、第二バッチ中の血清型Yの糖の分子量は Y_2 である；(f) A_1/A_2 の比、 C_1/C_2 の比、 W_1/W_2 の比および Y_1/Y_2 の比は、各々0.90~1.10の間であり、好ましくは各々0.95~1.05の間である。

【0044】

(f)において特定された比は、比較される各々のバッチ由来の単独のサンプルに基づき得るが、代表的には各々のバッチの複数のサンプル由来の平均の値(例えば、平均値)に基づき得る。従って、これら2つのバッチは、複数回のサンプリングに供され得、そして各々のサンプルは、複数の測定(A_1 、 A_2 、 C_1 、 C_2 、 W_1 、 W_2 、 Y_1 および Y_2)に供され得、次いで各々のバッチに対する平均が計算され得、そしてこの平均を使用して必要な比を計算し得る。

【0045】

各々のバッチ(またはロット)のワクチンは、別個に調製されている。例えば、2つの異なるバッチは、同じバルクの単独の結合体についての別個の混合によってか、または別個に調製されたバルクの単独の結合体の混合によって作製され得る。同じバルク混合物の異なるサンプルは、異なるバッチにならない。なぜならこれらのサンプルは、異なる結合体の混合物を調製する場合に起こる差異から生じるバッチ間の変動に供されないからである。

【0046】

(一般則)

用語「含むこと(including)」は、「含むこと(including)」ならびに「構成すること(consisting)」を包含する。例えば、Xを「含む」組成物は、主としてXから構成されてよく、またはいくらかの付加物(例えば、X+Y)

を含んでよい。

【0047】

単語「実質的に (substantially)」とは、「完全に (completely)」を退けない。例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まなくてよい。必要な場合、語「実質的に」は本発明の定義から省略され得る。

【0048】

数値xと関係した用語「約 (about)」は、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【実施例】

【0049】

(発明の実施の形態)

血清型A、血清型C、血清型W135および血清型Yの髄膜炎菌由来のオリゴ糖のCRM197結合体は、参考文献51に一般に記載されるように調製した。これらの結合体の各々を、本発明に従ってHPGPCおよびSEC-MALSによって分析した。

【0050】

(HPGPC分析)

糖結合体ワクチンは、一般的に、複数の部位においてタンパク質キャリアと結合された、異なる長さの糖の範囲を有する糖形態のアレイから構成される。HPGPCを使用して、水力学的サイズおよびサイズ分布を決定することによって、分子サイズに関して髄膜炎糖結合体の特徴決定した。

【0051】

較正には、6種のデキストランのセットを使用し、水力学的サイズは17 ~ 115に及んだ。標準品のHPGPC分析は、図1に示される。標準の分子量および計算した分子量は以下のとおりである：

【0052】

【表1】

標準	115360	54130	26000	91840	38560	17590
計算値	115666	53847	25425	91514	39280	17767

デキストラン分析を使用し、三次多項式を使用して、粘度半径(R)とGPC保持時間とを関連付けた[54、55]： $R(\text{単位}) = (10^8)(30M_p[\text{ }]) / (\times 6.023 \times 10^{23})^{1/3}$

ここで、 M_p = 頂部の M_w 、および[] = 固有粘度(dL/g単位)。

【0053】

結合体の粘度半径を、この式から計算した。この式は、固有粘度および M_w を使用して、分子の形状が保持の際に有する効果を説明する。

【0054】

個々の結合体の分析は、図2 ~ 図5に示される。水力学的サイズを以下のように計算した：

【0055】

【表2】

血清型	A	C	W135	Y
サイズ (Å)	57.1	57.0	68.7	63.3
多分散性	1.032	1.018	1.040	1.035

分析のための実施例条件として、50 μlの注入容量中の血清群Aの結合体を、TSK-Gel G4000SW(300×7.5mm内径)に対して0.1Mリン酸ナトリウム/0.2M硫酸アンモニウムの移動相(pH7.0)を用いて分析した。流速は、0.5ml/分だった。Waters 410屈折率(refraction index)検出器を使用した。

【 0 0 5 6 】

(S E C - M A L S 分析)

S E C - M A L S 分析の前に、分析条件の下で結合体の屈折率 (dn/dc) を決定した。設定濃度に対する実施例の電圧出力を図 6 に示す。この出力は、図 7 および図 8 に示される標準曲線へと導いた。計算値は以下のとおりである：

【 0 0 5 7 】

【表 3】

血清型	A	C	W135	Y
dn/dc	0.163	0.190	0.159	0.201

10

S E C - M A L S によってこれらの結合体を分析した。図 9 の代表的な D e b y e プロットから分かるように、S E C ピークの各々のデータ部分 ($slice$) におけるサンプルのモル質量を決定した。モル質量を、プロットの切片 ($intercept$) から決定した [5 6 - 5 8]。濃度に比例する R I シグナル (青) と、濃度およびモル質量に比例する 90° M A L S 検出器 (赤) とを、重ね合わせ得る (図 1 0)。

【 0 0 5 8 】

モル質量 (モルあたりのグラム) の分析を、図 1 1 ~ 図 1 4 に示す。M e n A 糖結合体、M e n W 1 3 5 糖結合体および M e n Y 糖結合体は、より高い MW に関する低濃度の段部 ($shoulder$) を有する主要なピークを有するが、M e n C 結合体はより均一な物質の単独のピークを有することを、この分析は示す。

20

【 0 0 5 9 】

これらのピークの分析結果 (kDa 単位での MW ; Mw/Mn での多分散性) は以下のとおりである：

【 0 0 6 0 】

【表 4】

		A	C	W135	Y
主要なピーク	MW	88.540	85.230	110.100	84.650
	多分散性	1.012	1.011	1.049	1.050
段部	MW	190.000	-	485.800	347.200
	多分散性	1.053	-	1.090	1.096

30

本発明は例示によってのみ記載されており、本発明の範囲および精神の中に在るままに改変がなされ得ることが理解される。

【 0 0 6 1 】

【表 5】

参考文献 (これらの内容は、参考として本明細書により援用される)

- [1] *Vaccines* (eds. Plotkin *et al.*) 4th edition, ISBN: 0721696880.
- [2] Baker *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:66-73.
- [3] Theilacker *et al.* (2003) *Infect Immun* 71:3875-84.
- [4] Anonymous (2003) *Drugs R D* 4:383-5.
- [5] Ravenscroft *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2802-2816.
- [6] Paoletti *et al.* (1992) *J Clin Invest* 89:203-9.
- [7] Anderson *et al.* (1986) *J Immunol* 137:1181-6. 10
- [8] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [9] D'Ambra *et al.* (2000) *Dev Biol Basel* 103:241-242.
- [10] WO2005/033148.
- [11] Jumel *et al.* (2002) *Biotechnol Appl Biochem* 36:219-226.
- [12] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [13] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [14] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [15] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [16] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567. 20
- [17] European patent 0477508.
- [18] US patent 5,306,492.
- [19] WO98/42721.
- [20] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
- [21] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- [22] US patent 4,761,283
- [23] US patent 4,356,170
- [24] WO00/10599
- [25] Gevert *et al.* *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
- [26] US patent 4,057,685. 30
- [27] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [28] US patent 4,459,286.
- [29] US patent 4,965,338
- [30] US patent 4,663,160.
- [31] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [32] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [33] Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [34] EP-A-0372501.
- [35] EP-A-0378881. 40
- [36] EP-A-0427347.
- [37] WO93/17712
- [38] WO94/03208.
- [39] WO98/58668.
- [40] EP-A-0471177.
- [41] WO91/01146
- [42] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.

【表 6】

- [43] EP-A-0594610.
 [44] WO00/56360.
 [45] WO02/091998.
 [46] WO01/72337
 [47] WO00/61761.
 [48] WO99/42130
 [49] WO96/40242
 [50] WO02/058737.
 [51] WO03/007985. 10
 [52] Rennels *et al.* (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21:978-979.
 [53] Campbell *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1848-1851.
 [54] Kunitani *et al.* (1991) *J Chrom* 588:125ff.
 [55] Kunitani *et al.* (1993) *J Chrom* 632:19ff.
 [56] Wyatt (1997) *Instrumentation Science & Technology* 25(1):1ff.
 [57] Wen *et al.* (1996) *Anal Biochem* 240:155ff.
 [58] Rollings (1992) in *Laser Light Scattering in Biochemistry*, chapter 19.
 [59] WO02/09643.
 [60] Katial *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:702-707. 20
 [61] WO01/52885.
 [62] European patent 0301992.
 [63] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 [64] Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
 [65] WO02/09746.
 [66] Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 [67] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 [68] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 [69] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207. 30
 [70] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 [71] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 [72] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
 [73] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 [74] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [75] *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 [76] Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
 [77] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [78] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126. 40

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図 1】図 1 は、既知の水力学的サイズの 6 種のデキストランの校正曲線を示す。

【図 2】図 2 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W 1 3 5 および血清型 Y 由来の CRM 1 9 7 結合体の HPGPC 分析を示す。

【図 3】図 3 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W 1 3 5 および血清型 Y 由来の CRM 1 9 7 結合体の HPGPC 分析を示す。

【図 4】図 4 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W 1 3 5 および血清型 Y 由来の CRM 1 9 7 結合体の HPGPC 分析を示す。

【図 5】図 5 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W 1 3 5 および血清型 Y 由来の CRM 1 9 50

7 結合体の HPGPC 分析を示す。

【図 6】図 6 は、図 7 および図 8 の dn/dc 較正に対する、既知濃度の調整した出力電圧を示す。

【図 7】図 6 は、図 7 および図 8 の dn/dc 較正に対する、既知濃度の調整した出力電圧を示す。

【図 8】図 6 は、図 7 および図 8 の dn/dc 較正に対する、既知濃度の調整した出力電圧を示す。

【図 9】図 9 は、SEC - MALS からの Debye プロットを示す。

【図 10】図 10 は、RI シグナルおよび 90° MALS シグナルの重ね合わせを示す。

【図 11】図 11 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W135 および血清型 Y 由来の CRM 197 結合体に関する SEC - MALS による分子量分析を示す。

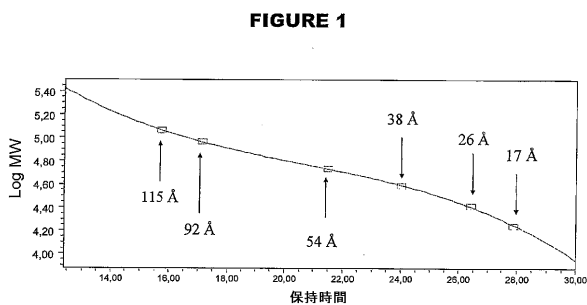
【図 12】図 12 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W135 および血清型 Y 由来の CRM 197 結合体に関する SEC - MALS による分子量分析を示す。

【図 13】図 13 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W135 および血清型 Y 由来の CRM 197 結合体に関する SEC - MALS による分子量分析を示す。

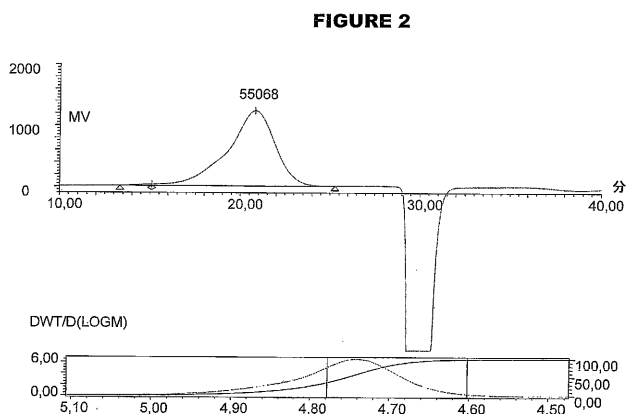
【図 14】図 14 は、血清型 A、血清型 C、血清型 W135 および血清型 Y 由来の CRM 197 結合体に関する SEC - MALS による分子量分析を示す。

10

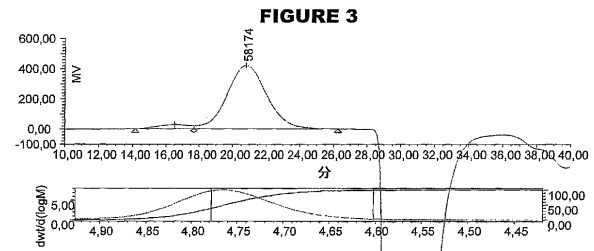
【図 1】



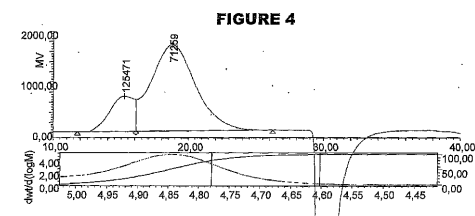
【図 2】



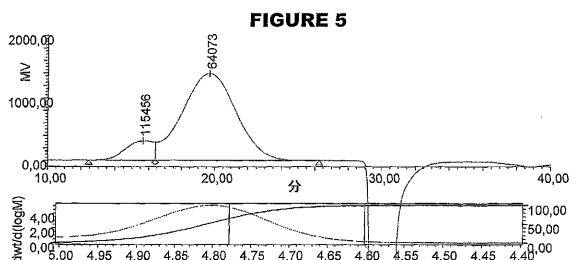
【図 3】



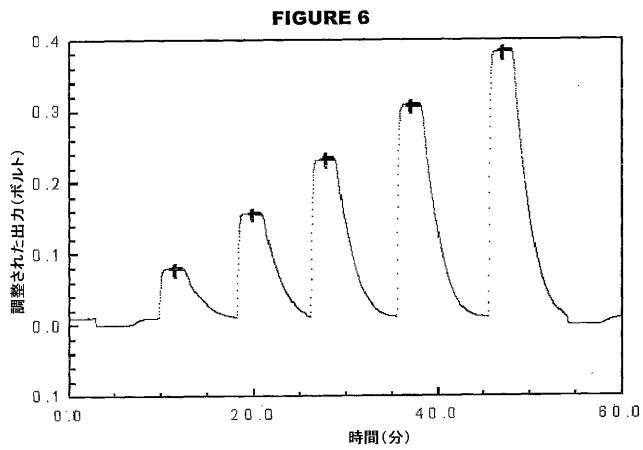
【図 4】



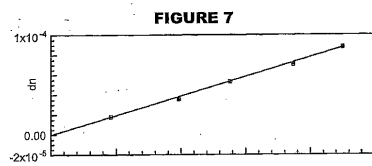
【図 5】



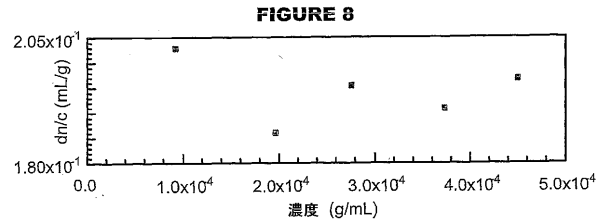
【 図 6 】



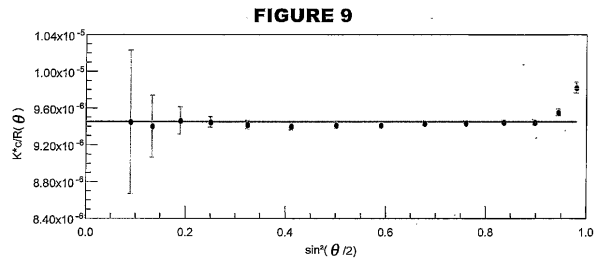
【 図 7 】



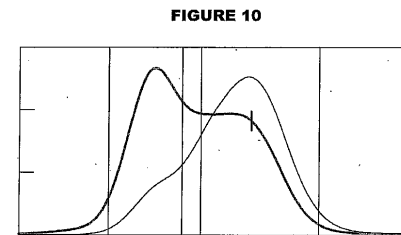
【 図 8 】



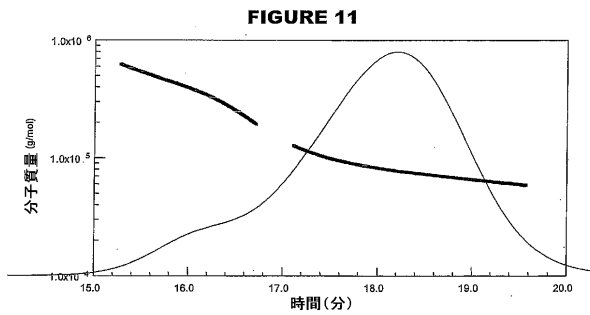
【 図 9 】



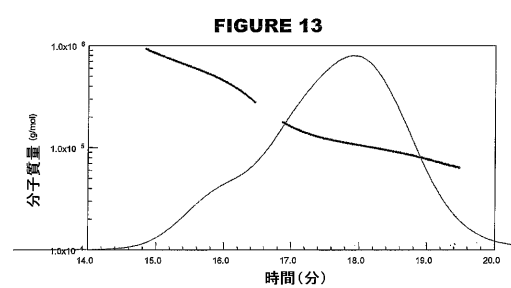
【 図 10 】



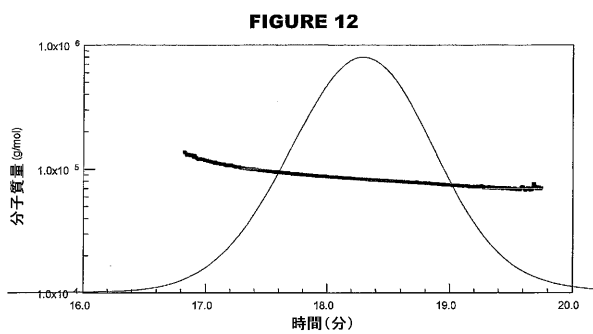
【 図 11 】



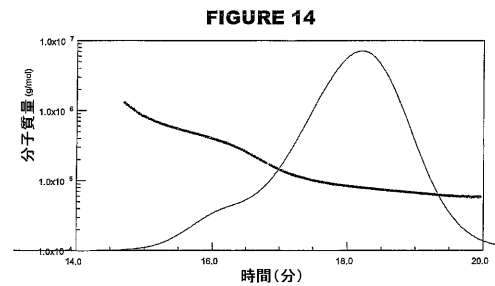
【 図 13 】



【 図 12 】



【 図 14 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB2005/002532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/095 A61K39/08 B01D15/00 A61K47/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/058737 A (AVENTIS PASTEUR; RYALL, ROBERT, P) 1 August 2002 (2002-08-01) abstract page 4, paragraph 21-23 page 5, paragraph 26 - page 6, paragraph 29 page 11, paragraphs 51,52 page 14, paragraph 60 - page 15, paragraph 63 page 16, paragraph 65 page 17, paragraph 68 --- -/--	1,3-7,14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'I' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 December 2005		19/12/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montrone, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB2005/002532

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	D'AMBRA A J ET AL: "Absolute molecular-size and molar-mass analysis of meningococcal and pneumococcal conjugates and polysaccharide intermediates by size-exclusion chromatography with detection by multiangle light-scattering photometry and differential refractometry." DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS. 2000, vol. 103, 2000, pages 241-242, XP009058013 ISSN: 1424-6074 page 241, line 1 - page 242, paragraph 3	1-14
X	JUMEL KORNELIA ET AL: "Evaluation of meningococcal C oligosaccharide conjugate vaccines by size-exclusion chromatography/multi-angle laser light scattering." BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 36, no. 3, December 2002 (2002-12), pages 219-226, XP009058011 ISSN: 0885-4513 abstract page 219, column 1, paragraph 2 - page 220, column 1, paragraph 1 page 221, column 1, paragraph 3 - column 3, paragraph 3 page 224, column 1, paragraph 2 - page 225, column 1, paragraph 1	1-7,9
X	LEMERCINIER X ET AL: "Analytical procedures used in the control of bacterial glycoconjugate vaccines" PHARMACEUTICAL SCIENCES 1997 UNITED KINGDOM, vol. 3, no. 1, 1997, pages 19-23, XP009058020 ISSN: 1356-6881 abstract page 20, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 4 page 21, column 2, paragraph 2 page 22, column 2, paragraph 5; figure 4	1,3-7
E	WO 2005/103230 A (CHIRON SRL; MARSHALL, CAMERON, JOHN) 3 November 2005 (2005-11-03) page 6, lines 1-5 page 7, lines 11,12 page 9, lines 16-24 page 19, lines 13-18	1-7,14

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/IB2005/002532

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2005/032583 A (CHIRON SRL; CONTORNI, MARIO) 14 April 2005 (2005-04-14) abstract page 2, lines 1-5,30 page 8, lines 1-7 page 9, lines 15-18 page 21, lines 13-20 page 33, line 14 - page 34, line 16	1-7,14
A	WO 2004/032958 A (CHIRON SRL; PIZZA, MARIAGRAZIA) 22 April 2004 (2004-04-22) abstract page 20, line 15 - page 21, line 21 page 25, line 6 - page 26, line 3 page 28, line 2 - page 29, line 23	
A	PELTOLA H: "MENINGOCOCCAL VACCINES CURRENT STATUS AND FUTURE POSSIBILITIES" DRUGS, ADIS INTERNATIONAL LTD, AT, vol. 55, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 347-366, XP008022620 ISSN: 0012-6667 page 359, column 1, paragraph 3 - page 360, column 1, paragraph 3	
P,A	WO 2004/067030 A (CHIRON SRL; COSTANTINO, PAOLO) 12 August 2004 (2004-08-12) abstract page 1, line 30 - page 2, line 24 page 15, line 20 - page 17, line 7 page 25, lines 25-30 page 29, line 33 - page 30, line 13	
X	HO M M ET AL: "Assessment of the stability and immunogenicity of meningococcal oligosaccharide C-CRM197 conjugate vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC, GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 7-8, 22 November 2000 (2000-11-22), pages 716-725, XP004225388 ISSN: 0264-410X abstract page 717, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 4 page 719, column 2, paragraph 1 page 722, column 2, paragraph 1 - page 723, column 1, paragraph 1	1-7

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/IB2005/002532

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>VON HUNOLSTEIN C ET AL: "A routine high-performance size-exclusion chromatography to determine molecular size distribution of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 2, January 1999 (1999-01), pages 118-125, XP004139966 ISSN: 0264-410X abstract page 118, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 3 page 119, column 1, paragraph 2-4 page 124, column 1, paragraphs 2,3</p>	1,3,5-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PC171B2005/002532

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02058737	A	01-08-2002	BR 0206672 A	10-05-2005
			CA 2435681 A1	01-08-2002
			CN 1610560 A	27-04-2005
			EP 1355673 A2	29-10-2003
			HR 20030598 A2	30-06-2005
			HU 0302999 A2	29-12-2003
			JP 2005504718 T	17-02-2005
			LT 2003071 A	25-08-2004
			LV 13128 B	20-07-2004
			NO 20033816 A	11-09-2003
			SI 21352 A	30-06-2004
			ZA 200306176 A	13-01-2005
WO 2005103230	A	03-11-2005	NONE	
WO 2005032583	A	14-04-2005	NONE	
WO 2004032958	A	22-04-2004	AU 2003274511 A1	04-05-2004
			CA 2501812 A1	22-04-2004
			EP 1549338 A1	06-07-2005
WO 2004067030	A	12-08-2004	CA 2514328 A1	12-08-2004
			EP 1587537 A2	26-10-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 30/86 J
 A 6 1 K 39/095
 A 6 1 P 31/04

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

(72)発明者 カパンノリ, ジョルジオ
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ビア フィオレンティナ 1, カイロン ソチエタ
 ア レスポンサビリタ リミタータ

(72)発明者 カリンチ, パレリア
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ビア フィオレンティナ 1, カイロン ソチエタ
 ア レスポンサビリタ リミタータ

(72)発明者 ダセンツィ, サンドロ
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ビア フィオレンティナ 1, カイロン ソチエタ
 ア レスポンサビリタ リミタータ

(72)発明者 マガノーリ, クラウディア
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ビア フィオレンティナ 1, カイロン ソチエタ
 ア レスポンサビリタ リミタータ

Fターム(参考) 4C085 AA03 BA16 CC07