

(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2013-522287

(P2013-522287A)

(43) 公表日 平成25年6月13日(2013.6.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/095 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/095 Z N A	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 39/09 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/09	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 39/05 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/05	
<b>A 6 1 K 39/08 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-557654 (P2012-557654)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成23年3月18日 (2011. 3. 18)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成24年9月13日 (2012. 9. 13)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/051148		3 5
(87) 国際公開番号	W02012/020326	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成24年2月16日 (2012. 2. 16)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/317, 572	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成22年3月25日 (2010. 3. 25)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/315, 336		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成22年3月18日 (2010. 3. 18)	(72) 発明者	パツラオロ, ミケーレ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イタリア国 イー53100 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバ ルティス ヴァクシNZ
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 血清群B髄膜炎菌のためのアジュバント添加ワクチン

## (57) 【要約】

免疫原性組成物は、( i ) 理想的には、互いに会合して複合体を形成する、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーと、( i i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原とを含む。ほとんどの実施形態において、免疫原性組成物は、アルミニウム塩を含まず、水中油型エマルジョンを含まない。一局面において、( i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原と、( i i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントとを含む、免疫原性組成物が提供され、ここで、( i ) 該免疫原性組成物はアルミニウム塩を含まず；( i i ) 該免疫原性組成物は水中油型エマルジョンを含まず；( i i i ) 該髄膜炎菌血清群 B 抗原は、配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1 または 2 2 から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含まず；( i v ) 該免疫原性組成物は f H B P 抗原を含まない。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

( i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原と、( i i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントとを含む、免疫原性組成物であって、ここで、( i ) 該免疫原性組成物はアルミニウム塩を含まず；( i i ) 該免疫原性組成物は水中油型エマルジョンを含まず；( i i i ) 該髄膜炎菌血清群 B 抗原は、配列番号 13、14、15、16、17、18、19、20、21または22から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含まず；( i v ) 該免疫原性組成物は f H B P 抗原を含まない、免疫原性組成物。

## 【請求項 2】

( i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原と、( i i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントと、( i i i ) 肺炎球菌抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳抗原、H B s A g、H A V 抗原、H i b 抗原および / もしくは I P V から選択される 1 または複数のさらなる抗原とを含む、免疫原性組成物。

## 【請求項 3】

( i ) 精製髄膜炎菌リポオリゴ糖と、( i i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントとを含む、免疫原性組成物。

## 【請求項 4】

( i ) アルミニウム塩および( i i ) 水中油型エマルジョンの 1 または複数のさらに含む、請求項 2 または請求項 3 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドおよび前記ポリマーが、互いに会合して複合体を形成している、前記請求項のいずれかに記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 6】

前記免疫賦活性オリゴヌクレオチドが 1 本鎖であり、10ヌクレオチド～100ヌクレオチドを有する、前記請求項のいずれかに記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドが 5' - ( I C )<sub>13</sub> - 3' である、請求項 6 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 8】

前記ポリカチオン性ポリマーがペプチドである、前記請求項のいずれかに記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 9】

前記ペプチドが、1もしくは複数の L e u - L e u ジペプチド配列、1もしくは複数の L y s - L y s ジペプチド配列および / または 1 もしくは複数の A r g - A r g ジペプチド配列を含む、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 10】

前記ペプチドが、1もしくは複数の L y s - L e u ジペプチド配列および / または 1 もしくは複数の L y s - L e u - L y s トリペプチド配列を含む、請求項 8 または請求項 9 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 11】

前記ペプチドが 5 ～ 50 アミノ酸を有する、請求項 8 ～ 10 のいずれかに記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 12】

前記ペプチドがアミノ酸配列 K L K L L L L K L K を有する、請求項 11 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 13】

前記オリゴヌクレオチドおよび前記ポリマーが 1 : 25 のモル比で存在する、前記請求項のいずれかに記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 14】

前記請求項のいずれかに記載の免疫原性組成物を調製するためのプロセスであって、( i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーと、( i i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原とを混合するステップを含む、プロセス。

【請求項 15】

( i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含有する第 1 容器と、( i i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原を含有する第 2 容器とを含むキットであって、ここで、免疫原性組成物はアルミニウム塩を含まず、( i i ) 該免疫原性組成物は水中油型エマルジョンを含まず、( i i i ) 該髄膜炎菌血清群 B 抗原は、配列番号 13、14、15、16、17、18、19、20、21 または 22 を有するペプチドを含まず、( i v ) 該免疫原性組成物は f H B P 抗原を含まない、キット。

10

【請求項 16】

( i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含有する第 1 容器と、( i i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原を含有する第 2 容器とを含むキットであって、ここで、該髄膜炎菌血清群 B 抗原は精製髄膜炎菌リポオリゴ糖である、キット。

【請求項 17】

( i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含有する容器と、( i i ) 髄膜炎菌血清群 B 抗原を含有する容器と、( i i i ) 肺炎球菌糖抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳抗原、H B s A g、H A V 抗原、H i b 抗原および / もしくは I P V から選択される 1 または複数のさらなる抗原を含有する容器とを含む、キット。

20

【請求項 18】

( i ) M e n B 抗原、血清群 A N . m e n i n g i t i d i s からの結合体化莢膜糖、血清群 C N . m e n i n g i t i d i s からの結合体化莢膜糖、血清群 W 135 N . m e n i n g i t i d i s からの結合体化莢膜糖、血清群 Y N . m e n i n g i t i d i s からの結合体化莢膜糖からなる 5 価抗原成分と、( i i ) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントとを含む、免疫原性組成物であって、該免疫原性組成物は、アルミニウム塩を含まず、かつ水中油型エマルジョンを含まないことを条件とする、免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

この出願は、2010年3月18日に出願された米国仮特許出願第61/315,336号および2010年3月25日に出願された同第61/317,572号(これらの両方の完全な内容は、全ての目的のために参考として本明細書に援用される)の利益を主張する。

【0002】

本発明は、髄膜炎菌ワクチンの分野にある。

【背景技術】

【0003】

N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s の血清群 B (「M e n B」) に対する様々なワクチンが、現在、調べられている。N o v a r t i s V a c c i n e s の M E N Z B (商標) 製品、F i n l a y I n s t i t u t e の V A - M E N G O C - B C (商標) 製品および N o r w e g i a n I n s t i t u t e o f P u b l i c H e a l t h の M E N B V A C (商標) 製品のような外膜小胞 (O M V) に基づくワクチンがある。非特許文献 1 (参考文献 1) において N o v a r t i s V a c c i n e s により報告される「血清群 B 髄膜炎菌のためのユニバーサルワクチン」のような組換えタンパク質に基づくワクチンもある。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

50

【非特許文献1】Giulianiら、Proc Natl Acad Sci U S A (2006) 103(29): 10834~9

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、MenBに対する改変および改善されたワクチン、特にアジュバント添加 (adjuvanted) ワクチンを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、(i) 髄膜炎菌血清群B抗原と、(ii) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントとを含む免疫原性組成物を提供し、ここで、(i) 前記免疫原性組成物がアルミニウム塩を含まず；(ii) 前記免疫原性組成物が水中油型エマルジョンを含まず；(iii) 前記髄膜炎菌血清群B抗原が、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21または22から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含まず；(iv) 前記免疫原性組成物がfHBP抗原を含まない。

10

【0007】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーは、好ましくは、互いに会合している。これらは、オリゴヌクレオチド/ポリマー複合体を形成できる。

【0008】

20

本発明は、(i) 髄膜炎菌血清群B抗原と、(ii) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントと、(iii) 肺炎球菌抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳 (pertussis) 抗原、HBsAg、HAV抗原、Hib抗原および/もしくはIPVから選択される1または複数のさらなる抗原とを含む免疫原性組成物も提供する。免疫原性組成物は、アルミニウム塩および/または水中油型エマルジョンをさらに含むことができる。

【0009】

本発明は、(i) 精製髄膜炎菌リポオリゴ糖と、(ii) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントとを含む免疫原性組成物も提供する。免疫原性組成物は、アルミニウム塩および/または水中油型エマルジョンをさらに含むことができる。

30

【0010】

本発明はさらに、(i) MenB抗原、血清群A N.meningitidisからの結合体化莢膜糖、血清群C N.meningitidisからの結合体化莢膜糖、血清群W135 N.meningitidisからの結合体化莢膜糖、血清群Y N.meningitidisからの結合体化莢膜糖からなる5価抗原成分と、(ii) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントとを含む免疫原性組成物を提供し、ここで、この免疫原性組成物は、アルミニウム塩を含まず、かつ水中油型エマルジョンを含まないことを条件とする。

【0011】

40

本発明のある実施形態において、MenB抗原は、アジュバント中のオリゴヌクレオチドおよびポリマーにより形成された複合体に吸着できる。代わりに、MenB抗原は、アジュバント中のオリゴヌクレオチド/ポリマー複合体に吸着されない。

【0012】

本発明はまた、本発明の免疫原性組成物を調製するためのプロセスも提供し、このプロセスは、(i) 免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーの複合体を含むアジュバントと、(ii) 髄膜炎菌血清群B (「MenB」) 抗原とを混合するステップを含み、ここで、前記MenB抗原が、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21または22から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含まず、fHBP抗原を含まないことを条件とする。代替の方法において、MenB抗原と、

50

免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントは、複合体が形成される前に混合される。例えば、MenB抗原をオリゴヌクレオチドと混合し、次いでポリマーを加えることができるか、またはMenB抗原をポリマーと混合し、次いでオリゴヌクレオチドを加えることができる。複合体は、オリゴヌクレオチドとポリマーとが遭遇した後で形成されてよい。

【0013】

MenB抗原、オリゴヌクレオチドおよびポリマーは、いずれの順序で混合してもよい。

【0014】

本発明は、(i)免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含有する第1容器と、(ii)MenB抗原を含有する第2容器とを含むキットも提供し、ここで、前記MenB抗原が、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21または22から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含まず、かつfHBP抗原を含まないことを条件とする。キット中の第1容器または第2容器のいずれも、アルミニウム塩も水中油型エマルジョンも含まない。

10

【0015】

本発明は、(i)免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含有する第1容器と、(ii)精製髄膜炎菌リポオリゴ糖を含有する第2容器とを含むキットも提供する。

【0016】

本発明は、(i)免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含有する第1容器と、(ii)髄膜炎菌血清群B抗原を含有する第2容器と、(iii)肺炎球菌抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳抗原、HBsAg、HAV抗原、Hib抗原および/もしくはIPVから選択される1または複数のさらなる抗原を含有する容器とを含むキットも提供する。第(iii)部で言及する容器は、第1容器、第2容器または第3容器であり得る。

20

【0017】

これらのキット中の容器の内容物を組み合わせて(例えば使用時に)、本発明の免疫原性組成物を形成できる。これらのキットは、免疫原および/またはさらなるアジュバントを含有するさらなる容器を含むこともできる。

30

【0018】

いくつかの実施形態において、組成物またはキット中の唯一のアジュバントは、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むアジュバントである。

【0019】

血清群B髄膜炎菌免疫原

本発明の免疫原性組成物は、血清群B髄膜炎菌(「MenB」)に対する免疫応答を惹起するために有用である。抗MenB応答を惹起するために適切な免疫原は、ポリペプチド抗原、リポオリゴ糖および/または膜小胞を含む。有用な血清群B抗原のさらなる詳細を以下に示す。

【0020】

髄膜炎菌ポリペプチド抗原

本発明の免疫原性組成物は、1または複数の髄膜炎菌ポリペプチド抗原(複数可)を含んでよい。例えば、組成物は、287、NadA、NspA、HmbR、NhhA、Appおよび/またはOmp85からなる群より選択されるポリペプチド抗原を含んでよい。これらの抗原は、精製ポリペプチド、例えば組換えポリペプチドとして有用に存在する。抗原は、好ましくは、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起する。

40

【0021】

本発明の組成物は、287抗原を含んでよい。287抗原は、髄膜炎菌血清群B株MC58についての公開されたゲノム配列[2]中に、遺伝子NMB2132(GenBank受託番号GI:7227388;本明細書において配列番号3)として含まれた。多く

50

の株からの 287 抗原の配列が、それ以降公開されている。例えば、287 の対立遺伝子型は、参考文献 3 の図 5 および 15、参考文献 4 の実施例 13 および図 21 (その中の配列番号 3179 ~ 3184) で見ることができる。287 抗原の種々の免疫原性フラグメントも報告されている。本発明で用いるために好ましい 287 抗原は、(a) 配列番号 3 と 50% 以上の同一性 (例えば 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% またはそれより多い) を有し、かつ/または (b) 配列番号 3 の少なくとも「n」連続アミノ酸のフラグメント (ここで、「n」は 7 以上である (例えば 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 またはそれより多い)) を含むアミノ酸配列を含む。(b) の好ましいフラグメントは、配列番号 3 からのエピトープを含む。本発明の最も有用な 287 抗原は、被験体に投与した後に、配列番号 3 のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドと結合できる抗体を惹起できる。本発明で用いるために有利な 287 抗原は、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

10

20

30

40

50

#### 【0022】

本発明の組成物の免疫原性組成物は、NadA 抗原を含んでよい。NadA 抗原は、髄膜炎菌血清群 B 株 MC58 についての公開されたゲノム配列 [2] 中に、遺伝子 NMB1994 (GenBank 受託番号 GI: 7227256; 本明細書において配列番号 4) として含まれた。多くの株からの NadA 抗原の配列がそれ以降公開され、ナイセリアの付着因子としてのタンパク質活性は、詳細に文書化されている。NadA の種々の免疫原性フラグメントも報告されている。本発明で用いるために好ましい NadA 抗原は、(a) 配列番号 4 と 50% 以上の同一性 (例えば 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% またはそれより多い) を有し、かつ/または (b) 配列番号 4 の少なくとも「n」連続アミノ酸のフラグメント (ここで、「n」は 7 以上である (例えば 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 またはそれより多い)) を含むアミノ酸配列を含む。(b) の好ましいフラグメントは、配列番号 4 からのエピトープを含む。配列番号 6 は、1 つのそのようなフラグメントである。本発明の最も有用な NadA 抗原は、被験体に投与した後に、配列番号 4 のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドと結合できる抗体を惹起できる。本発明で用いるために有利な NadA 抗原は、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

#### 【0023】

本発明の免疫原性組成物は、NspA 抗原を含んでよい。NspA 抗原は、髄膜炎菌血清群 B 株 MC58 についての公開されたゲノム配列 [2] 中に、遺伝子 NMB0663 (GenBank 受託番号 GI: 7225888; 本明細書において配列番号 5) として含まれた。抗原は、参考文献 5 および 6 から、以前に公知であった。多くの株からの NspA 抗原の配列が、それ以降公開されている。NspA の種々の免疫原性フラグメントも報告されている。本発明で用いるために好ましい NspA 抗原は、(a) 配列番号 5 と 50% 以上の同一性 (例えば 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% またはそれより多い) を有し、かつ/または (b) 配列番号 5 の少なくとも「n」連続アミノ酸のフラグメント (ここで、「n」は 7 以上である (例えば 8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 またはそれより多い)) を含むアミノ酸配列を含む。(b) の好ましいフラグメントは、配列番号 5 からのエピトープを含む。本発明の最も有用な NspA 抗原は、被験体に投与した後に、配列番号 5 のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドと結合できる抗体を惹起できる。本発明で用いるために有利な NspA 抗原は、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

#### 【0024】

本発明の免疫原性組成物は、髄膜炎菌 H m b R 抗原を含んでよい。全長 H m b R 配列は、髄膜炎菌血清群 B 株 M C 5 8 についての公開されたゲノム配列 [ 2 ] 中に、遺伝子 N M B 1 6 6 8 ( 本明細書において配列番号 1 2 ) として含まれた。本発明は、全長 H m b R 配列を含むポリペプチドを用いることができるが、部分的な H m b R 配列を含むポリペプチドを頻繁に用いる。よって、いくつかの実施形態において、本発明に従って用いられる H m b R 配列は、配列番号 1 2 と少なくとも i % ( ここで、i の値は、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、9 5、9 9 またはそれより多い ) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでよい。別の実施形態において、本発明に従って用いられる H m b R 配列は、配列番号 1 2 からの少なくとも j 連続アミノ酸 ( ここで、j の値は、7、8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0 またはそれより多い ) のフラグメントを含んでよい。別の実施形態において、本発明に従って用いられる H m b R 配列は、( i ) 配列番号 1 2 と少なくとも i % の配列同一性を有し、かつ / または ( i i ) 配列番号 1 2 からの少なくとも j 連続アミノ酸のフラグメントを含むアミノ酸配列を含んでよい。j アミノ酸の好ましいフラグメントは、配列番号 1 2 からのエピートープを含む。このようなエピートープは、通常、H m b R の表面上にあるアミノ酸を含む。有用なエピートープは、ヘモグロビンとの H m b R の結合に関与するアミノ酸を有するものを含む。なぜなら、これらのエピートープと結合する抗体は、宿主のヘモグロビンと結合する細菌の能力を遮断できるからである。H m b R の位相幾何学およびその重要な機能的残基は、参考文献 7 において調べられた。本発明の最も有用な H m b R 抗原は、被験体に投与した後に、配列番号 1 2 のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドと結合できる抗体を惹起できる。本発明で用いるために有利な H m b R 抗原は、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

#### 【 0 0 2 5 】

本発明の免疫原性組成物は、N h h A 抗原を含んでよい。N h h A 抗原は、髄膜炎菌血清群 B 株 M C 5 8 についての公開されたゲノム配列 [ 2 ] 中に、遺伝子 N M B 0 9 9 2 ( G e n B a n k 受託番号 G I : 7 2 2 6 2 3 2 ; 本明細書において配列番号 6 ) として含まれた。多くの株からの N h h A 抗原の配列がそれ以降公開され ( 例えば参考文献 3 および 8 )、N h h A の種々の免疫原性フラグメントが報告されている。これは、H s f としても公知である。本発明で用いるために好ましい N h h A 抗原は、( a ) 配列番号 6 と 5 0 % 以上の同一性 ( 例えば 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 % またはそれより多い ) を有し、かつ / または ( b ) 配列番号 6 の少なくとも「 n 」連続アミノ酸のフラグメント ( ここで、「 n 」は 7 以上である ( 例えば 8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0 またはそれより多い ) ) を含むアミノ酸配列を含む。( b ) の好ましいフラグメントは、配列番号 6 からのエピートープを含む。本発明の最も有用な N h h A 抗原は、被験体に投与した後に、配列番号 6 のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドと結合できる抗体を惹起できる。本発明で用いるために有利な N h h A 抗原は、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

#### 【 0 0 2 6 】

本発明の免疫原性組成物は、A p p 抗原を含んでよい。A p p 抗原は、髄膜炎菌血清群 B 株 M C 5 8 についての公開されたゲノム配列 [ 2 ] 中に、遺伝子 N M B 1 9 8 5 ( G e n B a n k 受託番号 G I : 7 2 2 7 2 4 6 ; 本明細書において配列番号 7 ) として含まれた。多くの株からの A p p 抗原の配列がそれ以降公開されている。A p p の種々の免疫原性フラグメントが報告されている。本発明で用いるために好ましい A p p 抗原は、( a ) 配列番号 7 と 5 0 % 以上の同一性 ( 例えば 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 % またはそれより多い ) を有し、かつ / または ( b ) 配列番号 7 の少なくとも「 n 」連続アミノ酸のフラグメント ( ここで、「 n 」は 7 以上である ( 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

、90、100、150、200、250またはそれより多い))を含むアミノ酸配列を含む。(b)の好ましいフラグメントは、配列番号7からのエピートープを含む。本発明の最も有用なApp抗原は、被験体に投与した後に、配列番号7のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドと結合できる抗体を惹起できる。本発明で用いるために有利なApp抗原は、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

#### 【0027】

本発明の免疫原性組成物は、Omp85抗原を含んでよい。Omp85抗原は、髄膜炎菌血清群B株MC58についての公開されたゲノム配列[2]中に、遺伝子NMB0182(GenBank受託番号GI:7225401;本明細書において配列番号8)として含まれた。多くの株からのOmp85抗原の配列がそれ以降公開されている。Omp85についてのさらなる情報は、参考文献9および10で見出すことができる。Omp85の種々の免疫原性フラグメントも報告されている。本発明で用いるために好ましいOmp85抗原は、(a)配列番号8と50%以上の同一性(例えば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれより多い)を有し、かつ/または(b)配列番号8の少なくとも「n」連続アミノ酸のフラグメント(ここで、「n」は7以上である(例えば8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれより多い))を含むアミノ酸配列を含む。(b)の好ましいフラグメントは、配列番号8からのエピートープを含む。本発明の最も有用なOmp85抗原は、被験体に投与した後に、配列番号8のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドと結合できる抗体を惹起できる。本発明で用いるために有利なOmp85抗原は、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

#### 【0028】

本発明の組成物は、髄膜炎菌H因子結合タンパク質(fHBP)抗原を含まない。fHBP抗原は、(i)配列番号9、10もしくは11のいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有し、かつ/または(ii)配列番号9、10もしくは11からの少なくとも7隣接アミノ酸のフラグメントからなるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。いくつかの実施形態において、組成物は、参考文献11および12に記載されるアッセイにおいてH因子(例えばヒトH因子)と結合できるタンパク質を含まない。

#### 【0029】

フラグメントは、好ましくはそれぞれの配列番号の配列からのエピートープを含む。その他の有用なフラグメントは、それぞれの配列番号のC末端からの1もしくは複数のアミノ酸(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25またはそれより多い)および/またはN末端からの1もしくは複数のアミノ酸(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25またはそれより多い)を欠失しているが、その少なくとも1つのエピートープを保持している。

#### 【0030】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド(複数可)は、例えばN末端システインにて脂質付加される。脂質付加ポリペプチド(複数可)について、システインに付加される脂質は、通常、例えばトリパルミトイル-S-グリセリル-システイン(Pam3Cys)、ジパルミトイル-S-グリセリルシステイン(Pam2Cys)、N-アセチル(ジパルミトイル-S-グリセリルシステイン)などのようなパルミトイル残基を含む。

#### 【0031】

##### 髄膜炎菌リポオリゴ糖

免疫原性組成物は、1または複数の髄膜炎菌リポオリゴ糖(LOS)抗原(複数可)を含んでよい。髄膜炎菌LOSは、細菌の外膜の外側の単層で見出されるグルコサミンベースのリン脂質である。これは、リピドA部分とコアオリゴ糖領域とを含み、リピドA部分は、膜において疎水性アンカーとして作用する。オリゴ糖コア中の不均質性が、異なる髄膜炎菌株の間での構造的および抗原的多様性を生じ、これは、株を12のイムノタイプ(

10

20

30

40

50



L 1 ~ L 1 2 ) に細分するために用いられている。本発明は、任意のイムノタイプ、例えば L 1、L 2、L 3、L 4、L 5、L 6、L 7 および / または L 8 からの L O S を用いてよい。

#### 【 0 0 3 2 】

L 2 および L 3 の 鎖は、天然に、ラクト N - ネオテトラオース ( L N n T ) を含む。本発明が L 2 または L 3 イムノタイプからの L O S を用いる場合、この L N n T は存在しないことがある。この非存在は、鎖内で L N n T 四糖を合成する能力が破壊されるように操作された変異体株を用いることにより、簡便に達成できる。関連する生合成付加を担う酵素のノックアウトによりこの目的が達成されることが公知である [ 1 3、4 3 ]。例えば、L g t B 酵素のノックアウトは、L N n T の末端ガラクトースの付加を妨げるとともに、鎖の末端シアル酸の下流の付加も妨げる。L g t A 酵素のノックアウトは、L N n T の N - アセチル - グルコサミンの付加と、同様に下流の付加とを妨げる。L g t A ノックアウトは、L g t C ノックアウトを伴い得る。同様に、L g t E および / または G a l E 酵素のノックアウトは、内部ガラクトースの付加を妨げ、L g t F のノックアウトは、H e p <sup>I</sup> 残基へのグルコースの付加を妨げる。これらのノックアウトのいずれも、L 2、L 3、L 4、L 7 または L 9 イムノタイプ株における L N n T 四糖の破壊のために、単独または組み合わせて用いることができる。有用な免疫原性を保持しながら L N n T エピトープが除去された L O S を提供するので、少なくとも L g t B のノックアウトが好ましい。

10

#### 【 0 0 3 3 】

L N n T エピトープを破壊する変異に加えて、またはその代わりに、g a l E 遺伝子のノックアウトも、有用な改変 L O S を提供し、リピド A 脂肪トランスフェラーゼ ( f a t t y t r a n s f e r a s e ) 遺伝子も同様にノックアウトされ得る [ 1 4 ]。少なくとも 1 つの第一級 O 結合脂肪酸を、L O S から除去してよい [ 1 5 ]。1 L O S 分子あたりの第二級アシル鎖の数が低減された L O S を用いることもできる [ 1 6 ]。L O S は、典型的に、少なくとも G l c N A c - H e p <sub>2</sub> ホスホエタノールアミン - K D O <sub>2</sub> - リピド A 構造を有する [ 1 7 ]。L O S は、G l c N A c 1 - 3 G a l 1 - 4 G l c 三糖を含むが、L N n T 四糖を欠くことがある。

20

#### 【 0 0 3 4 】

L O S は、種々の形態で含まれ得る。これは、精製された形態にてそれ自体で用いてよい。これは、担体タンパク質と結合体化してよい。L O S が結合体化されている場合、結合体化は、L O S 中のリピド A 部分を介するか、または任意のその他の適切な部分、例えばその K D O 残基によるものであってよい。L O S のリピド A 部分が存在しない場合、このような代替の連結が必要となる。L O S についての結合体化技術は、参考文献 1 5、1 7、1 8、1 9 などから公知である。これらの結合体に有用な担体タンパク質は、例えば、ジフテリアもしくは破傷風毒素またはそのトキシドもしくは変異体のような細菌毒素を含む。

30

#### 【 0 0 3 5 】

L O S は、参考文献 2 0 に記載されるような固定 (すなわち相変動性 ( p h a s e v a r i a b l e ) でない) L O S イムノタイプを有する株 (例えば遺伝子操作された髄膜炎菌株) からであってよい。例えば、L 2 および L 3 L O S イムノタイプを固定してよい。このような株は、イムノタイプ間のスイッチング率が、元の野生型株に対して 1 / 2 未満 ( > 1 / 5 0 にさえ ) に低減されてよい。参考文献 2 0 は、l g t A および / または l g t G 遺伝子生成物の改変によりこの結果をどのようにして達成できるかについて開示している。

40

#### 【 0 0 3 6 】

L O S は、例えば L 3 について、そのヘプトース I I 残基に付加された G l c N a c 残基上で O - アセチル化されてよい [ 2 1 ]。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明の免疫原性組成物は、1 より多い型の L O S、例えば髄膜炎菌イムノタイプ L 2

50

および L 3 からの LOS を含むことができる。例えば、参考文献 2 2 に開示される LOS の組み合わせを用いてよい。

【 0 0 3 8 】

LOS 抗原は、好ましくは、被験体に投与した後に、殺菌性抗髄膜炎菌抗体を惹起できる。

【 0 0 3 9 】

膜小胞

本発明の免疫原性組成物は、髄膜炎菌外膜小胞を含み得る。これらは、髄膜炎菌外膜の破壊または髄膜炎菌外膜からのブレブ形成 (blebbing) により、外膜のタンパク質成分を含む小胞が形成されることにより得られる任意のプロテオリボソーム性小胞を含む。よって、この用語は、OMV (「ブレブ」ということがある)、微小胞 (microvesicle) (MV [ 2 3 ]) および「天然 OMV」(「NOMV」[ 2 4 ]) を含む。

10

【 0 0 4 0 】

MV および NOMV は、細菌の成長中に自発的に形成されて培養培地中に放出される、天然に存在する膜小胞である。MV は、Neisseria をプロス培養培地中で培養し、全細胞を、プロス培養培地中のより小さい MV から分離し (例えばろ過、または細胞だけをペレットにし、より小さい小胞はペレットにしない低速遠心分離により)、次いで細胞を除いた培地から MV を回収する (例えばろ過、MV の分画沈殿 (differential precipitation) もしくは凝集、MV をペレットにするための高速遠心分離により) ことにより得ることができる。MV の生成において用いるための株は、一般的に、培養で生成する MV の量に基づいて選択でき、例えば参考文献 2 5 および 2 6 は、MV 生成量が高い Neisseria について記載している。

20

【 0 0 4 1 】

OMV は、細菌から人工的に調製され、洗浄剤処理 (例えばデオキシコール酸塩を用いる) または非洗浄剤手段 (例えば参考文献 2 7 を参照されたい) を用いて調製できる。OMV を形成するための技術は、胆汁酸塩洗浄剤 (例えばリトコール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、デオキシコール酸、コール酸、ウルソコール酸などの塩、Neisseria を処理するためにデオキシコール酸ナトリウム [ 2 8 および 2 9 ]) が好ましい) を用いて、洗浄剤を沈殿させないために十分に高い pH にて [ 3 0 ] 細菌を処理することを含む。その他の技術は、洗浄剤の実質的に非存在下で [ 2 7 ]、音波処理、ホモジナイゼーション、マイクロフルイダイゼーション、キャビテーション、浸透圧性ショック、粉碎、フレンチプレス、ブレンディングのような技術を用いて行ってよい。洗浄剤を全くまたはほとんど用いない方法は、Ns p A のような有用な抗原を保持できる [ 2 7 ]。よって、方法は、約 0 . 5 % 以下、例えば約 0 . 2 %、約 0 . 1 %、< 0 . 0 5 % またはゼロのデオキシコール酸塩を含む OMV 抽出緩衝液を用いてよい。

30

【 0 0 4 2 】

OMV 調製のために有用なプロセスは、参考文献 3 1 に記載され、高速遠心分離の代わりよりもむしろ粗製 OMV に対する限外ろ過を含む。このプロセスは、限外ろ過を行った後に超遠心分離を行うステップを含むこともできる。

40

【 0 0 4 3 】

本発明で用いるための小胞は、任意の髄膜炎菌株から調製できる。小胞は、通常、血清群 B 株からであるが、これらを A、C、W 1 3 5 または Y のような B 以外の血清群から調製することが可能である (例えば参考文献 3 0 は、血清群 A についてのプロセスを開示する)。株は、任意の血清型 (例えば 1、2 a、2 b、4、1 4、1 5、1 6 など)、任意の血清サブタイプおよび任意のイムノタイプ (例えば L 1 ; L 2 ; L 3 ; L 3 , 3 , 7 ; L 1 0 など) であってよい。髄膜炎菌は、高度侵襲性 (hyperinvasive) および高度病原性 (hypervirulent) の系統、例えば以下の 7 つの高度病原性系統のいずれか：サブグループ I ; サブグループ I I I ; サブグループ I V - 1 ; E T - 5 群 ; E T - 3 7 群 ; A 4 クラスタ ; 系統 3 を含む任意の適切な系統からであってよい。

50

これらの系統は、多座位酵素電気泳動 (MLEE) により定義されているが、髄膜炎菌 [参考文献 32] を分類するために多座位配列タイピング (MLST) も用いられており、例えば ET-37 群は、MLST により ST-11 群であり、ET-5 群は、ST-32 (ET-5) であり、系統 3 は、ST-41/44 である、などである。小胞は、以下のサブタイプの 1 つを有する株から調製できる: P1.2; P1.2, 5; P1.4; P1.5; P1.5, 2; P1.5, c; P1.5c, 10; P1.7, 16; P1.7, 16b; P1.7h, 4; P1.9; P1.15; P1.9, 15; P1.12, 13; P1.13; P1.14; P1.21, 16; P1.22, 14。

#### 【0044】

本発明で用いる小胞は、野生型髄膜炎菌株または変異体髄膜炎菌株から調製することもできる。例えば、参考文献 33 は、改変 fur 遺伝子を有する *N. meningitidis* から得られた小胞の調製物を開示している。参考文献 41 は、付随する porA および cps ノックアウトにより nspA 発現が上方制御されることを教示している。OMV 生成のための *N. meningitidis* のさらなるノックアウト変異体は、参考文献 41~43 に開示されている。参考文献 34 は、fHBP が上方制御されている小胞を開示している。参考文献 35 は、6 つの異なる PorA サブタイプを発現するように改変された株からの小胞の構築を開示している。LPS 生合成に關与する酵素のノックアウトにより達成される内毒素レベルが低い変異体 *Neisseria* を用いてもよい [36、37]。これらまたはその他の変異体は全て、本発明で用いることができる。

#### 【0045】

よって、本発明で用いる株は、いくつかの実施形態において、1 より多い PorA サブタイプを発現してもよい。6 価および 9 価の PorA 株が、以前に構築されている。株は、2、3、4、5、6、7、8 または 9 の PorA サブタイプ: P1.7, 16; P1.5-1, 2-2; P1.19, 15-1; P1.5-2, 10; P1.12-1, 13; P1.7-2, 4; P1.22, 14; P1.7-1, 1 および / または P1.18-1, 3, 6 を発現してもよい。他の実施形態において、株は、PorA 発現について下方制御されてよく、ここで、例えば、PorA の量は、野生型レベルに対して (例えば参考文献 44 に開示される株 H44/76 に対して) 少なくとも 20% (例えば 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% など) 低減されているかまたはノックアウトさえされている。

#### 【0046】

いくつかの実施形態において、株は、あるタンパク質を過剰に発現してもよい (対応する野生型株に対して)。例えば、株は、NspA、タンパク質 287 [38]、fHBP [34]、TbpA および / または TbpB [39]、Cu, Zn-スーパーオキシドジスムターゼ [39]、HmbRなどを過剰に発現してもよい。

#### 【0047】

いくつかの実施形態において、株は、参考文献 40~43 に開示されるノックアウトおよび / もしくは過剰発現変異の 1 または複数を含むこともできる。下方制御および / またはノックアウトのための好ましい遺伝子は: (a) Cps、CtrA、CtrB、CtrC、CtrD、FrpB、GalE、HtrB / MsbB、LbpA、LbpB、LpxK、Opa、Opc、PilC、PorB、SiaA、SiaB、SiaC、SiaD、TbpA および / または TbpB [40]; (b) CtrA、CtrB、CtrC、CtrD、FrpB、GalE、HtrB / MsbB、LbpA、LbpB、LpxK、Opa、Opc、PhoP、PilC、PmrE、PmrF、SiaA、SiaB、SiaC、SiaD、TbpA および / または TbpB [41]; (c) ExbB、ExbD、rmpM、CtrA、CtrB、CtrD、GalE、LbpA、LpbB、Opa、Opc、PilC、PorB、SiaA、SiaB、SiaC、SiaD、TbpA および / または TbpB [42]; ならびに (d) CtrA、CtrB、CtrD、FrpB、Opa、Opc、PilC、PorB、SiaD、SynA、SynB および / または SynC [43] を含む。

## 【0048】

変異体株を用いる場合、いくつかの実施形態において、これは、以下の特徴の1もしくは複数または全部を有してもよい：(i) 髄膜炎菌LOSを切断するように下方制御またはノックアウトされたLgtBおよび/もしくはGalE；(ii) 上方制御されたTbpA；(iii) 上方制御されたNhhA；(iv) 上方制御されたOmp85；(v) 上方制御されたLbpA；(vi) 上方制御されたNspA；(vii) ノックアウトされたPorA；(viii) 下方制御またはノックアウトされたFrpB；(ix) 下方制御またはノックアウトされたOpa；(x) 下方制御またはノックアウトされたOpc；(xi) cps遺伝子複合体の欠失。切断型LOSは、シアリル-ラクト-N-ネオテトラオースエピトープを含まないものであり得、例えばこれは、ガラクトース欠損LOSである。LOSは、鎖を有さないことがある。

10

## 【0049】

LOSが小胞内に存在するならば、そのLOSとタンパク質成分とを連結するように小胞を処理することが可能である(「ブレブ内」結合体化[43])。

## 【0050】

本発明は、異なる株からの小胞の混合物とともに用いてよい。例えば、参考文献44は、使用する国で流行している血清サブタイプを有する髄膜炎菌株に由来する第1小胞と、使用する国に存在する血清サブタイプを有する必要がない株に由来する第2小胞とを含む、多価髄膜炎菌小胞組成物を含むワクチンを開示している。参考文献45も、異なる小胞の有用な組み合わせを開示している。L2およびL3イムノタイプのそれぞれの株からの小胞の組み合わせは、いくつかの実施形態において用いてよい。

20

## 【0051】

いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、MenB OMVを含有しない。

## 【0052】

本発明の免疫原性組成物は、動物に投与して免疫応答を誘導できる。本発明は、広範囲の疾患に対して処置または防御するために用いることができる。

## 【0053】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマー

本発明は、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを用いる。これらは、理想的には互いに会合して、粒子状複合体(これは、通常、TLR9アゴニストである)を形成する。

30

## 【0054】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、有用なアジュバントとして公知である。これらは、CpGモチーフ(グアノシンに連結した非メチル化シトシンを含有するジヌクレオチド配列)を頻繁に含有し、それらのアジュバント効果は、参考文献46~51で論じられている。TpGモチーフ、パリンドローム配列、多重連続チミジンヌクレオチド(例えばTTTT)、多重連続シトシンヌクレオチド(例えばCCCC)またはポリ(dG)配列を含有するオリゴヌクレオチドも、2本鎖RNAと同様に、公知の免疫賦活剤である。これらの様々な免疫賦活性オリゴヌクレオチドのいずれも本発明で用いることができるが、デオキシイノシンおよび/またはデオキシウリジンを含有するオリゴデオキシヌクレオチド[52]、理想的にはデオキシイノシンおよびデオキシシトシンを含有するオリゴデオキシヌクレオチドを用いることが好ましい。イノシン含有オリゴデオキシヌクレオチドは、CpIモチーフ(イノシンに連結したシトシンを含有するジヌクレオチド配列)を含み得る。オリゴデオキシヌクレオチドは、1より多い(例えば2、3、4、5、6またはそれより多い)CpIモチーフを含むこともでき、これらは、直接反復してもよい(例えば配列(CI)<sub>x</sub>(式中、xは、2、3、4、5、6またはそれより多い)を含む)、または互いに離れていてよい(例えば配列(CIN)<sub>x</sub>(式中、xは、2、3、4、5、6またはそれより多く、各Nは独立して1または複数のヌクレオチドを表す)を含む)。シトシン残基は、理想的にはメチル化されていない。

40

## 【0055】

50

オリゴヌクレオチドは、典型的に 10 ~ 100 のヌクレオチド、例えば 15 ~ 50 ヌクレオチド、20 ~ 30 ヌクレオチドまたは 25 ~ 28 ヌクレオチドを有する。これは、典型的に 1 本鎖である。

#### 【0056】

オリゴヌクレオチドは、天然ヌクレオチドのみ、非天然ヌクレオチドのみまたは両方の混合物を含むことができる。例えば、これは、1 もしくは複数のホスホロチオエート連結を含むこともでき、かつ/または 1 もしくは複数のヌクレオチドは、2' - O - メチル改変を有してもよい。

#### 【0057】

本発明で用いるための好ましいオリゴヌクレオチドは、26mer 配列 5' - (IC)<sub>13</sub> - 3' (配列番号 1) を含む 1 本鎖デオキシヌクレオチドである。このオリゴデオキシヌクレオチドは、ポリカチオン性ポリマーと安定な複合体を形成して、良好なアジュバントが得られる。

10

#### 【0058】

ポリカチオン性ポリマーは、理想的には、カチオン性抗菌ペプチドのようなポリカチオン性ペプチドである。ポリマーは、1 もしくは複数のロイシンアミノ酸残基および/または 1 もしくは複数のリジンアミノ酸残基を含むこともできる。ポリマーは、1 もしくは複数のアルギニンアミノ酸残基を含むこともできる。これは、これらのアミノ酸のうちの 1 つの少なくとも 1 つの直接反復、例えば 1 もしくは複数の Leu - Leu ジペプチド配列、1 もしくは複数の Lys - Lys ジペプチド配列または 1 もしくは複数の Arg - Arg ジペプチド配列を含むこともできる。これは、少なくとも 1 つ (好ましくは複数、例えば 2 または 3) の Lys - Leu ジペプチド配列および/または少なくとも 1 つ (好ましくは複数、例えば 2 または 3) の Lys - Leu - Lys トリペプチド配列を含むこともできる。

20

#### 【0059】

ペプチドは、配列 R<sub>1</sub> - XZ<sub>x</sub>XZ<sub>x</sub>XZ<sub>x</sub> - R<sub>2</sub> (式中、x は、3、4、5、6 または 7 であり、各 X は、独立して、正に荷電した天然アミノ酸残基および/または非天然アミノ酸残基であり、各 Z は、独立して、アミノ酸残基 L、V、I、F または W であり、R<sub>1</sub> および R<sub>2</sub> は、独立して、-H、-NH<sub>2</sub>、-COCH<sub>3</sub> または -COH からなる群から選択される) を含むこともできる。いくつかの実施形態において、X - R<sub>2</sub> は、ペプチドの C 末端アミノ酸残基のアミド、エステル、またはチオエステルであってよい。参考文献 53 も参照されたい。

30

#### 【0060】

ポリカチオン性ペプチドは、典型的に、5 ~ 50 アミノ酸、例えば 6 ~ 20 アミノ酸、7 ~ 15 アミノ酸または 9 ~ 12 アミノ酸を有する。

#### 【0061】

ペプチドは、天然アミノ酸のみ、非天然アミノ酸のみまたは両方の混合物を含むことができる。これは、L アミノ酸および/または D アミノ酸を含むこともできる。L アミノ酸が典型的である。

#### 【0062】

ペプチドは、天然の N 末端 (NH<sub>2</sub> -) または改変 N 末端、例えばヒドロキシル、アセチルなどを有することができる。ペプチドは、天然の C 末端 (-COOH) または改変 C 末端、例えばヒドロキシル、アセチルなどを有することができる。このような改変は、ペプチドの安定性を改善できる。

40

#### 【0063】

本発明で用いるために好ましいペプチドは、11mer の K L K L L L L L K L K (配列番号 2; 参考文献 54) (全て L アミノ酸) である。N 末端は、脱アミノ化されてよく、C 末端はヒドロキシル化されてよい。好ましいペプチドは、H - K L K L<sub>5</sub> K L K - OH (全て L アミノ酸) である。このオリゴペプチドは、公知の抗菌剤 [55]、好中球活性化剤 [56] およびアジュバント [57] であり、免疫賦活性オリゴヌクレオチドと安

50

定な複合体を形成して、良好なアジュバントが得られる。

【0064】

免疫賦活性オリゴヌクレオチドとポリカチオン性ポリマーとの最も好ましい混合物は、I C 3 1 (商標)として公知のT L R 9アゴニストであり[58~60]、これは、配列番号1のオリゴデオキシヌクレオチドと配列番号2のポリカチオン性オリゴペプチドとの吸着性複合体である。

【0065】

オリゴヌクレオチドとオリゴペプチドとは、様々な比と一緒に混合できるが、これらは、一般的にモル過剰の上記ペプチドと混合される。モル過剰は、少なくとも5:1、例えば10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1などであってよい。約25:1のモル比が理想的である[61、62]。この過剰の比での混合は、オリゴヌクレオチドとオリゴペプチドとの間の不溶性粒子状複合体の形成をもたらすことができる。Men B抗原が精製LOSである場合、複合体は、本明細書で記載するようにアルミニウム塩と組み合わせることができる。

10

【0066】

オリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドは、典型的に水性条件下で混合され、例えばオリゴヌクレオチドの溶液を、オリゴペプチドの溶液と所望の比で混合できる。2つの溶液は、水または緩衝液中に乾燥(例えば凍結乾燥)した材料を溶解してストック溶液を形成する(これらは次いで混合できる)ことにより調製することもできる。

20

【0067】

複合体は、参考文献63に開示される方法を用いて分析できる。1 μm ~ 20 μmの範囲の平均直径を有する複合体が、典型的である。

20

【0068】

ポリアルギニンおよびC p Gオリゴデオキシヌクレオチドは、同様に複合体を形成する[64]。

【0069】

複合体は、例えば水または緩衝液中の水性懸濁物で維持できる。複合体とともに用いるための典型的な緩衝液は、リン酸緩衝液(例えばリン酸緩衝生理食塩水)、T r i s緩衝液、T r i s /ソルビトール緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、コハク酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、ヒスチジン緩衝液などである。代替として、複合体を、時折、凍結乾燥することもできる。

30

【0070】

水性懸濁物中の複合体を遠心分離して、それらをバルクの媒体から分離できる(例えば吸引、デカンテーションなどにより)。これらの複合体は、次いで、所望により、代替の媒体に再懸濁できる。

【0071】

アルミニウム塩

本発明のほとんどの実施形態は、アルミニウム塩を含まない。いくつかの実施形態では、しかし、アルミニウム塩の使用が許容される。例えば、免疫原性組成物が精製Men B LOSを含む場合または組成物が肺炎球菌糖抗原、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳抗原、H B s A g、H A V抗原、H i b抗原およびI P Vから選択される1もしくは複数のさらなる抗原を含む場合である。アルミニウム塩は、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムとして個別に公知のアジュバントを含む。これらの名称は慣習的であるが、いずれも存在する実際の化学化合物の正確な記載ではないので、簡便のためだけに用いられている[例えば参考文献65の第9章を参照されたい]。用語「アルミニウム塩」は、アジュバントとして一般的に用いられる「水酸化物」または「リン酸塩」アジュバントのいずれかをいう。アルミニウム塩が許容されるいくつかの実施形態において、水酸化アルミニウムアジュバントの使用が好ましい。

40

【0072】

「水酸化アルミニウム」として公知のアジュバントは、典型的にはオキシ水酸化アルミ

50

ニウム塩であり、これは、通常、少なくとも部分的に結晶である。式  $Al(OH)_3$  で表すことができるオキシ水酸化アルミニウムは、水酸化アルミニウム  $Al(OH)_3$  のようなその他のアルミニウム化合物から、赤外 (IR) 分光法により、特に  $1070\text{ cm}^{-1}$  での吸収バンドおよび  $3090 \sim 3100\text{ cm}^{-1}$  での強いショルダーの存在により区別できる [参考文献 65 の第 9 章]。水酸化アルミニウムアジュバントの結晶化度は、半分の高さでの回折バンドの幅 (width of the diffraction band at half height) (WHH) により反映され、結晶化度が乏しい粒子は、より小さい晶子サイズのために、より大きな線の広がりを示す。表面積は、WHH が増加するにつれて増加し、より高い WHH の値を有するアジュバントは、抗原吸着のための能力がより大きいことが観察されている。繊維状の形態 (例えば透過型電子顕微鏡写真で観察されるような) は、水酸化アルミニウムアジュバントに典型的である。  $1 \sim 10\text{ }\mu\text{m}$  の範囲の平均粒子径が、参考文献 66 に報告されている。水酸化アルミニウムアジュバントの pI は、典型的に約 11 であり、すなわちアジュバント自体は生理的 pH にて正の表面電荷を有する。 pH 7.4 にて  $Al^{+++}$  1 mg あたり  $1.8 \sim 2.6\text{ mg}$  のタンパク質の吸着能力が、水酸化アルミニウムアジュバントについて報告されている。

#### 【0073】

「リン酸アルミニウム」として公知のアジュバントは、典型的には、少量の硫酸塩も頻繁に含有しているヒドロキシリン酸アルミニウムである (すなわち、アルミニウムヒドロキシホスフェートサルフェート (aluminium hydroxyphosphate sulfate))。これらは、沈殿により得ることができ、沈殿の間の反応条件および濃度は、塩中のヒドロキシルのホスフェートによる置換の程度に影響する。ヒドロキシリン酸塩は、通常、 $PO_4 / Al$  モル比が  $0.3 \sim 1.2$  である。ヒドロキシリン酸塩は、ヒドロキシル基の存在により厳密な  $AlPO_4$  から区別できる。例えば、 $3164\text{ cm}^{-1}$  (例えば  $200^\circ\text{C}$  に加熱時) での IR スペクトルのバンドは、構造上のヒドロキシルの存在を示す [参考文献 65 の第 9 章]。リン酸アルミニウムアジュバントの  $PO_4 / Al^{3+}$  モル比は、通常、 $0.3 \sim 1.2$ 、好ましくは  $0.8 \sim 1.2$ 、より好ましくは  $0.95 \pm 0.1$  である。リン酸アルミニウムは、特にヒドロキシリン酸塩について、一般的に、非晶質である。典型的なアジュバントは、 $0.84 \sim 0.92$  の  $PO_4 / Al$  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り、 $0.6\text{ mg } Al^{3+} / \text{ml}$  で含まれる。リン酸アルミニウムは、一般的に、粒子状である (例えば透過型電子顕微鏡写真で観察されるような板状の形態)。粒子の典型的な直径は、任意の抗原を吸着した後に  $0.5 \sim 20\text{ }\mu\text{m}$  (例えば約  $5 \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ ) の範囲である。 pH 7.4 にて  $Al^{+++}$  1 mg あたり  $0.7 \sim 1.5\text{ mg}$  タンパク質の吸着能力が、リン酸アルミニウムアジュバントについて報告されている。リン酸アルミニウムのゼロ電荷点 (PZC) は、ヒドロキシルのホスフェートによる置換の程度と反比例し、この置換の程度は、沈殿により塩を調製するために用いる反応条件および反応物の濃度に依存して変動できる。PZC は、溶液中の遊離ホスフェートイオンの濃度を変化させること (より多いホスフェート = より酸性側の PZC)、またはヒスチジン緩衝剤のような緩衝剤を加えること (PZC をより塩基性にする) によっても変更される。本発明に従って用いられるリン酸アルミニウムは、通常、 $4.0 \sim 7.0$ 、より好ましくは  $5.0 \sim 6.5$ 、例えば約  $5.7$  の PZC を有する。

#### 【0074】

水酸化アルミニウムとリン酸アルミニウムの両方の混合物を用いることもできる。この状況では、水酸化物よりも多くのリン酸アルミニウムが存在し、例えば少なくとも 2 : 1、例えば 5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1 などの重量比であってよい。

#### 【0075】

(例えば免疫原性組成物が精製 MenB LOS を含む) 本発明のいくつかの実施形態において、組成物は、(i) 水酸化アルミニウム、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマー、(ii) リン酸アルミニウム、免疫賦活性オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

およびポリカチオン性ポリマー、または ( i i i ) 水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを含むこともできる。

【 0 0 7 6 】

本発明の薬学的組成物中の  $Al^{+++}$  の濃度は、通常、 $< 10 \text{ mg/ml}$ 、例えば  $5 \text{ mg/ml}$ 、 $4 \text{ mg/ml}$ 、 $3 \text{ mg/ml}$ 、 $2 \text{ mg/ml}$ 、 $1 \text{ mg/ml}$  などである。好ましい範囲は、 $0.3 \sim 1 \text{ mg/ml}$  である。

【 0 0 7 7 】

吸着

免疫賦活性オリゴヌクレオチドとポリカチオン性ポリマーとの好ましい複合体は、吸着性であり、すなわち、免疫原は、様々な機構により複合体に吸着できる。いくつかの状況において、しかし、免疫原と複合体はともに、免疫原の固有の特性によってまたは処方の間に行われるステップのため（例えば吸着が生じることを妨げるために処方の間に適当な pH を用いること）のいずれかにより、吸着せずに組成物中に存在する。

10

【 0 0 7 8 】

アルミニウム塩アジュバントも吸着性である。複合体とアルミニウム塩とがともに存在する実施形態において、よって、免疫原にとって複数の吸着の機会が存在できる。免疫原は、アルミニウム塩、オリゴヌクレオチド/ポリマー複合体、それらの両方（様々な割合で）に吸着できるか、またはいずれにも吸着しない。本発明は、このような構成 ( arrangement ) の全てを網羅する。例えば、一実施形態において、免疫原は、アルミニウム塩に吸着でき、吸着された免疫原/塩を、次いで、オリゴヌクレオチド/ポリマー複合体と混合できる。別の実施形態において、免疫原は、オリゴヌクレオチド/ポリマー複合体に吸着でき、吸着された免疫原/複合体を、次いで、アルミニウム塩と混合できる。別の実施形態において、2つの免疫原（同じまたは異なる）は、オリゴヌクレオチド/ポリマー複合体およびアルミニウム塩に別々に吸着でき、2つの吸着された成分を、次いで、混合できる。

20

【 0 0 7 9 】

いくつかの状況において、免疫原は、その吸着状態が、例えば pH もしくは温度の変化により、または成分を混合した後に変化してもよい。in vitro [ 6 7 ] および in vivo [ 6 8 ] でのアルミニウム塩からの抗原の脱離が公知である。ある吸着性粒子からの脱離、およびその後の異なる吸着性分子への再吸着が生じることができ、それにより、例えば免疫原をアルミニウム塩アジュバントから複合体へ、またはその逆に移動できる。いくつかの実施形態において、単一の抗原分子または複合体は、アルミニウム塩および複合体の両方に吸着して、2つの吸着性粒子の間にブリッジ ( bridge ) を形成する。

30

【 0 0 8 0 】

免疫原が吸着性成分に吸着するならば、免疫原の全てが吸着することは必要でない。この状況は、吸着相と可溶性相との間の免疫原の固有の平衡により、または吸着性表面が飽和されるので生じることができる。よって、組成物中の免疫原は、完全または部分的に吸着されてよく、吸着された画分は、1または複数の異なる吸着性成分上（例えばアルミニウム塩および/またはオリゴヌクレオチド/ポリマー複合体上）にあることができる。この状況において、吸着された画分は、組成物中の免疫原の全量の少なくとも 10 %（重量）、例えば  $> 20 \%$ 、 $> 30 \%$ 、 $> 40 \%$ 、 $> 50 \%$ 、 $> 60 \%$ 、 $> 70 \%$ 、 $> 80 \%$ 、 $> 90 \%$ 、 $> 95 \%$ 、 $> 98 \%$  またはそれより多くであってよい。いくつかの実施形態において、免疫原は、完全に吸着され、すなわち、複合体をバルクの液体媒体から分離するための遠心分離の後に、上清中で検出されない。他の実施形態において、しかし、具体的な免疫原はいずれも吸着されないことがある。

40

【 0 0 8 1 】

いくつかの状況において、複合体の免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよび/またはポリカチオン性ポリマー成分が、アルミニウム塩に吸着されることが可能である。好ましくは

50



、しかし、複合体は、アルミニウム塩と混合した後にインタクトなままである。また、複合体がアルミニウム塩に吸着する（またはその逆）ことを回避するために、アルミニウム塩および複合体は、同様のゼロ電荷点（等電点）、例えば互いに1 pH単位以内を有することが有用である。よって、有用な複合体は、10～12のPZCを有し、これは、約11のPZCを有する水酸化アルミニウムアジュバントと組み合わせるために有用である。

#### 【0082】

##### 水中油型エマルジョン

ほとんどの実施形態は「水中油型」エマルジョンを含有しないが、例えば、免疫原性組成物が精製MenB LOSを含むいくつかの実施形態ではそれらの存在が許容される。水中油型エマルジョンは、典型的には、少なくとも1種の界面活性剤を含み、油（複数可）および界面活性剤（複数可）は、生分解性（代謝可能）であり、生体適合性である。

10

#### 【0083】

エマルジョン中の油滴は、一般的には、直径5 μm未満であり、理想的にはサブミクロンの直径を有し、これらの小さいサイズは、マイクロフルイダイザーを用いて安定なエマルジョンを得ることにより達成される。220 nm未満のサイズの液滴は、フィルタ滅菌に供することができるので好ましい。いくつかの有用なエマルジョンにおいて、油滴の少なくとも80%（数での）は、500 nm未満の直径を有する。

#### 【0084】

エマルジョンは、動物（例えば魚類）または植物の供給源からのもののような油を含むことができる。植物油の供給源は、堅果、種子および穀粒を含む。ピーナツ油、大豆油、ヤシ油およびオリーブ油が、最も一般的に入手可能な堅果油の例である。例えばホホバ豆から得られるホホバ油を用いることができる。種子油は、紅花油、綿実油、ひまわり種子油、ごま種子油などを含む。穀粒の群において、コーン油が最も容易に入手可能であるが、コムギ、オートムギ、ライムギ、イネ、テフ、ライコムギなどのようなその他の穀類の穀粒の油も用いてよい。グリセロールおよび1,2-プロパンジオールの6～10炭素脂肪酸エステルは、種子油中に天然に存在しないが、堅果油および種子油から出発する適切な材料の加水分解、分離およびエステル化により調製し得る。哺乳動物の乳からの脂肪および油は代謝可能であり、よって本発明の実施において用いてよい。動物の供給源から純粋な油を得るために必要な分離、精製、けん化およびその他の手段の手順は、当該技術において周知である。ほとんどの魚類は、容易に回収し得る代謝可能な油を含有する。例えば、タラ肝油、サメ肝油および鯨ろうのような鯨油は、本明細書において用い得る魚油のいくつかの例である。いくつかの分岐鎖油が、5炭素イソプレヌユニットで生化学的に合成され、一般的に、テルペノイドとよばれる。サメ肝油は、スクアレン、2,6,10,15,19,23-ヘキサメチル-2,6,10,14,18,22-テトラコサヘキサエンとして公知の分岐不飽和テルペノイドを含有する。スクアレンの飽和類似体であるスクワランも用いることができる。スクアレンおよびスクワランを含む魚油は、商業的な供給源から容易に入手可能であるか、または当該技術において公知の方法により得ることができる。スクアレンが好ましい。

20

30

#### 【0085】

その他の有用な油は、トコフェロールであり、これは、高齢の被験体（例えば60歳以上の年齢）用のワクチンに有利に含まれる。なぜなら、ビタミンEは、この被験体群における免疫応答に対して正の効果を有することが報告されているからである。これらは、エマルジョンの安定化を助け得る抗酸化特性も有する。様々なトコフェロール（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、または $\epsilon$ ）が存在するが、 $\alpha$ が通常用いられる。好ましい $\alpha$ -トコフェロールは、DL- $\alpha$ -トコフェロールである。 $\alpha$ -トコフェロールスクシネートは、インフルエンザワクチンと適合性であり、水銀化合物の代替として有用な防腐剤であることが公知である。

40

#### 【0086】

油の混合物、例えばスクアレンと $\alpha$ -トコフェロールを用いることができる。

#### 【0087】

50

2 ~ 20 % (容量) の範囲の油含量が典型的である。

【0088】

界面活性剤は、それらの「HLB」(親水性/親油性比)により分類できる。本発明で有用ないくつかの界面活性剤は、少なくとも10、例えば少なくとも15または少なくとも16のHLBを有する。本発明は、それらに限定されないが、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(一般的にTweenとよばれる)、特にポリソルベート20およびポリソルベート80;線状EO/POブロックコポリマーのようなDOWFAX(商標)の商標の下で販売されるエチレンオキシド(EO)、プロピレンオキシド(PO)および/またはブチレンオキシド(BO)のコポリマー;反復エトキシ(オキシ-1,2-エタンジイル)基の数変動し得るオクトキシノール、特にオクトキシノール-9(Triton X-100またはt-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)が興味深い;(オクチルフェノキシ)ポリエトキシエタノール(IGEPAL CA-630/NP-40);ホスファチジルコリン(レシチン)のようなリン脂質;Tergitol(商標)NPシリーズのようなノニルフェノールエトキシレート;トリエチレングリコールモノラウリルエーテル(Brij 30)のようなラウリル、セチル、ステアリルおよびオレイルアルコールに由来するポリオキシエチレン脂肪エーテル(Brij界面活性剤として公知である);ならびにソルビタントリオレート(Span 85)およびソルビタンモノオレートのようなソルビタンエステル(一般的にSPANとして公知である)を含む界面活性剤を用いることができる。非イオン性界面活性剤が好ましい。エマルジョンに含めるために最も好ましい界面活性剤は、ポリソルベート80(ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート;Tween 80)である。

10

20

【0089】

界面活性剤の混合物、例えばTween 80/Span 85混合物を用いることができる。ポリオキシエチレンソルビタンエステルおよびオクトキシノールの組み合わせも適切である。別の有用な組み合わせは、ラウレス9とポリオキシエチレンソルビタンエステルおよび/またはオクトキシノールとを含む。

【0090】

界面活性剤の有用な量(重量%)は、ポリオキシエチレンソルビタンエステル(例えばTween 80)0.01~1%、特に約0.1%;オクチル-またはノニルフェノキシポリオキシエタノール(例えばTriton X-100またはTritonシリーズのその他の洗浄剤)0.001~0.1%、特に0.005~0.02%;ポリオキシエチレンエーテル(例えばラウレス9)0.1~20%、例えば0.1~10%、特に0.1~1%または約0.5%である。

30

【0091】

スクアレン含有エマルジョンが好ましい(特にポリソルベート80を含むエマルジョン)。

【0092】

本発明で有用な具体的な水中油型エマルジョンアジュバントは、それらに限定されないが、以下のものを含む:

・スクアレンとポリソルベート80とソルビタントリオレートとのサブミクロンのエマルジョン。エマルジョンの容量での組成は、約5%スクアレン、約0.5%ポリソルベート80および約0.5%Span 85であり得る。重量の点において、これらの比率は、4.3%スクアレン、0.5%ポリソルベート80および0.48%Span 85になる。このアジュバントは、参考文献65の第10章および参考文献72の第12章により詳細に記載されるように、「MF59」[69~71]として公知である。MF59エマルジョンは、有利には、シトレートイオン、例えば10mMクエン酸ナトリウム緩衝液を含む。

40

【0093】

・スクアレンとトコフェロールとポリソルベート80とのサブミクロンエマルジョン。これらのエマルジョンは、2~10%スクアレン、2~10%トコフェロールおよび0.

50

3 ~ 3 % ポリソルベート 80 を有してよく、スクアレン：トコフェロールの重量比は、より安定なエマルジョンを提供し得るので、好ましくは 1 (例えば、0.90) である。スクアレンとポリソルベート 80 とは、約 5 : 2 の容量比または約 11 : 5 の重量比で存在してよい。あるこのようなエマルジョンは、Tween 80 を PBS 中に溶解して 2 % 溶液を得て、次いで 90 ml のこの溶液を、(5 g の DL - トコフェロールおよび 5 ml スクアレン) の混合物と混合し、次いで混合物を微小流動化する (microfluidise) ことにより作製できる。得られるエマルジョンは、100 ~ 250 nm、好ましくは約 180 nm の平均直径のサブミクロンの油滴を有する。エマルジョンは、3 - 脱 - O - アシル化モノホスホリルリピド A (3d - MPL) も含んでよい。この型の別の有用なエマルジョンは、1 ヒト用量あたりに 0.5 ~ 10 mg スクアレン、0.5 ~ 11 mg トコフェロールおよび 0.1 ~ 4 mg ポリソルベート 80 を含んでよい [73]。

#### 【0094】

・スクアレンとトコフェロールと Triton 洗浄剤 (例えば Triton X - 100) とのエマルジョン。エマルジョンは、3d - MPL (下記参照のこと) も含んでよい。エマルジョンは、リン酸緩衝液を含有してよい。

#### 【0095】

・ポリソルベート (例えばポリソルベート 80) と Triton 洗浄剤 (例えば Triton X - 100) とトコフェロール (例えば - トコフェロールスクシネート) とを含むエマルジョン。エマルジョンは、これらの 3 成分を、約 75 : 11 : 10 の質量比で含んでよく (例えば 750  $\mu$ g / ml ポリソルベート 80、110  $\mu$ g / ml Triton X - 100 および 100  $\mu$ g / ml - トコフェロールスクシネート)、これらの濃度は、抗原からのこれらの成分のいずれの寄与も含むべきである。エマルジョンは、スクアレンも含んでよい。エマルジョンは、3d - MPL も含んでよい。水相は、リン酸緩衝液を含有してよい。

#### 【0096】

・スクワランとポリソルベート 80 とポロキサマー 401 (「Pluronic (商標) L121」) とのエマルジョン。エマルジョンは、リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4 中で処方できる。このエマルジョンは、ムラミルジペプチドについての有用な送達ビヒクルであり、スレオニル - MDP とともに「SAF - 1」アジュバント中で用いられている [74] (0.05 ~ 1 % Thr - MDP、5 % スクワラン、2.5 % Pluronic L121 および 0.2 % ポリソルベート 80)。これは、「AF」アジュバントでのように Thr - MDP なしで用いることもできる [75] (5 % スクワラン、1.25 % Pluronic L121 および 0.2 % ポリソルベート 80)。微小流動化が好ましい。

#### 【0097】

・スクアレンと水性溶媒とポリオキシエチレンアルキルエーテル親水性非イオン性界面活性剤 (例えばポリオキシエチレン (12) セトステアリルエーテル) と疎水性非イオン性界面活性剤 (例えばソルビタンモノオレートまたは「Span 80」のようなソルビタンエステルまたはマンニドエステル) とを含むエマルジョン。エマルジョンは、好ましくは、熱可逆性であり、かつ / または少なくとも 90 % の油滴 (容量による) が 200 nm 未満のサイズである [76]。エマルジョンは、アルジトール、凍結保護剤 (例えばドデシルマルトシドおよび / またはスクロースのような糖)、および / またはアルキルポリグリコシドの 1 または複数も含んでよい。このエマルジョンは、TLR 4 アゴニストを含んでもよい [77]。このようなエマルジョンは、凍結乾燥してよい。

#### 【0098】

・スクアレン、ポロキサマー 105 および Abil - Care [78] のエマルジョン。アジュバント添加ワクチン中のこれらの成分の最終濃度 (重量) は、5 % スクアレン、4 % ポロキサマー 105 (プルロニックポリオール) および 2 % Abil - Care 85 (Bis - PEG / PPG - 16 / 16 PEG / PPG - 16 / 16 ジメチコン; カプリル酸 / カプリン酸トリグリセリド) である。

#### 【0099】

10

20

30

40

50

・ 0.5 ~ 50 % の油と、0.1 ~ 10 % のリン脂質と、0.05 ~ 5 % の非イオン性界面活性剤とを含むエマルジョン。参考文献 79 に記載されるように、好ましいリン脂質成分は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンおよびカルジオリピンである。サブミクロンの液滴サイズが有利である。

#### 【0100】

・ 代謝不可能油（例えば軽鉱油（light mineral oil））と少なくとも 1 種の界面活性剤（例えばレシチン、Tween 80 または Span 80）とのサブミクロンの水中油型エマルジョン。Quil A サポニン、コレステロール、サポニン親油性物質結合体（例えば脂肪族アミンをデスアシルサポニンに、グルクロン酸のカルボキシル基を介して付加することにより生成される、参考文献 80 に記載される GPI-0100）、ジメチルジオクタデシルアンモニウム（dimethyldioctadecyl ammonium）プロミドおよび / または N, N - ジオクタデシル - N, N - ビス（2 - ヒドロキシエチル）プロパンジアミンのような添加物を含んでよい。

10

#### 【0101】

・ サポニン（例えば Quil A または QS 21）とステロール（例えばコレステロール）とが、らせん状ミセルとして会合しているエマルジョン [ 81 ]。

#### 【0102】

・ 鉱油と、非イオン性親油性エトキシ化脂肪アルコールと、非イオン性親水性界面活性剤（例えばエトキシ化脂肪アルコールおよび / またはポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリマー）とを含むエマルジョン [ 82 ]。

20

#### 【0103】

・ 鉱油と、非イオン性親水性エトキシ化脂肪アルコールと、非イオン性親油性界面活性剤（例えばエトキシ化脂肪アルコールおよび / またはポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロックコポリマー）とを含むエマルジョン [ 82 ]。

#### 【0104】

上記のように、スクアレンを含む水中油型エマルジョンが特に好ましい。いくつかの実施形態において、ワクチン用量中のスクアレン濃度は、5 ~ 15 mg の範囲（すなわち、0.5 ml の用量の容量と仮定して 10 ~ 30 mg / ml の濃度）であってよい。スクアレンの濃度 [ 83、84 ] を、例えば用量あたり < 5 mg または用量あたり < 1.1 mg さえ含むように低減することが可能である。例えば、ヒト用量は、用量あたり 9.75 mg スクアレンを含むこともできる（FLUAD（商標）製品におけるように：0.5 ml の用量の容量中に 9.75 mg スクアレン、1.175 mg ポリソルベート 80、1.175 mg ソルビタントリオレエート）か、またはこれは、その部分的な量、例えば 3 / 4、2 / 3、1 / 2、2 / 5、1 / 3、1 / 4、1 / 5、1 / 6、1 / 7、1 / 8、1 / 9 もしくは 1 / 10 を含むこともできる。例えば、組成物は、用量あたり 4.875 スクアレン（よってポリソルベート 80 およびソルビタントリオレエートをそれぞれ 0.588 mg）、3.25 mg スクアレン / 用量、2.438 mg / 用量、1.95 mg / 用量、0.975 mg / 用量などを含むこともできる。FLUAD（商標）濃度の MF 59 のこれらの部分的な希釈物のいずれも、スクアレン：ポリソルベート - 80：ソルビタントリオレエートの比を 8.3 : 1 : 1（質量）に維持しながら本発明で用いることができる。

30

40

#### 【0105】

本発明で用いるためのさらなる抗原

本発明の組成物およびキットは、他の病原体、特に細菌および / またはウイルスからの 1 または複数のさらなる抗原を含むこともできる。好ましい 1 または複数のさらなる抗原は：

- ・ 肺炎球菌抗原
- ・ ジフテリアトキソイド（「D」）
- ・ 破傷風トキソイド（「T」）

50

- ・百日咳抗原（「P」）、これは、典型的に無細胞性である（「aP」）
- ・B型肝炎ウイルス（HBV）表面抗原（「HBsAg」）
- ・A型肝炎ウイルス（HAV）抗原
- ・結合体化Haemophilus influenzae b型莢膜糖（「Hib」）
- ・不活化ポリオウイルスワクチン（IPV）
- ・結合体化N.meningitidis血清群A莢膜糖（「MenA」）
- ・結合体化N.meningitidis血清群W135莢膜糖（「MenW135」）
- ・結合体化N.meningitidis血清群Y莢膜糖（「MenY」）

から選択される。

#### 【0106】

1または複数のさらなる抗原を用いることができる。抗原の以下の組み合わせは、本発明の組成物およびキットにおいて用いるために特に好ましい：

- ・MenC - PnC。
- ・D - T - Pa - MenC。
- ・D - T - Pa - Hib - MenC；D - T - Pa - IPV - MenC；D - T - Pa - HBsAg - MenC；D - T - Pa - MenC - PnC。
- ・D - T - Pa - HBsAg - IPV - MenC；D - T - Pa - HBsAg - MenC - PnC。
- ・D - T - Pa - HBsAg - IPV - Hib - MenC；D - T - Pa - HBsAg - Hib - MenC - MenA。
- ・D - T - Pa - HBsAg - IPV - Hib - MenC - MenA；D - T - Pa - HBsAg - IPV - Hib - MenC - PnC。

#### 【0107】

これらの組成物は、列挙した抗原からなるか、または追加の病原体からの抗原をさらに含むこともできる。よって、これらは、個別にまたはさらなるワクチンの成分として用いることができる。

#### 【0108】

結合体化N.meningitidis糖

さらなる抗原は、結合体化髄膜炎菌抗原を含むことができる。結合体化髄膜炎菌抗原は、担体タンパク質と結合体化したNeisseria meningitidisからの莢膜糖抗原を含む。血清群Cに対する結合体化1価ワクチンは、ヒトへの使用について承認されており、MENJUGATE（商標）[85]、MENINGITEC（商標）およびNEISVAC - C（商標）を含む。血清群A + Cからの結合体の混合物が公知であり[86、87]、血清群A + C + W135 + Yからの結合体の混合物が報告されており[88～91]、2005年にMENACTRA（商標）製品として承認された。

#### 【0109】

本発明は、血清群A、C、W135および/もしくはYの1または複数、例えばA、C、W135、Y、A + C、C + W135、C + Y、A + C + W135、A + C + Y、C + W135 + Y、A + C + W135 + Yからの糖を含むこともできる。

#### 【0110】

髄膜炎菌血清群Aの莢膜糖は、C3位およびC4位に部分的O - アセチル化を有する（16）結合N - アセチル - D - マンノースアミン - 1 - ホスフェートのホモポリマーである。C3位でのアセチル化は、70～95%であり得る。糖を精製するために用いる条件は、脱O - アセチル化をもたらし得る（例えば塩基性条件下で）が、このC3位にてOAcを保持することが好ましい。よって、好ましくは、マンノースアミン残基の少なくとも50%（例えば少なくとも60%、70%、80%、90%、95%またはそれより多い）が、C3位にてO - アセチル化される。

#### 【0111】

髄膜炎菌血清群Cの莢膜糖は、C7残基またはC8残基にて典型的にO - アセチル（OAc）基を有するシアル酸（N - アセチルノイラミン酸）の29結合ホモポリマーで

10

20

30

40

50

ある。この化合物は、 $9) - \text{NeupNAc}7/8\text{OAc} - (2$  と表される。いくつかのMenC株（侵襲性単離株の約12%）は、このOAc基を欠く多糖を生成する。OAc基の存在または非存在は、ユニークエピトープを生じ、糖と結合する抗体の特異性は、O-アセチル化された株（OAc-）および脱O-アセチル化された株（OAc+）に対するその殺菌性活性に影響し得る[92~94]。許諾されたMenC結合体ワクチンは、OAc-（NEISVAC-C（商標））およびOAc+（MENJUGATE（商標）およびMENINGITEC（商標））糖の両方を含む。本発明で用いる血清群Cの糖は、OAc+またはOAc-株のいずれから調製してもよい。血清群C結合体の生成のために好ましい株は、好ましくは血清型16、好ましくは血清サブタイプP1.7a, 1のものである。よって、C:16:P1.7a, 1 OAc+株が好ましい。C11株のような血清サブタイプP1.1でのOAc+株も有用である。

10

#### 【0112】

血清群W135の糖は、シアル酸-ガラクトース二糖単位のポリマーである。血清群Cの糖と同様に、これは、変動性のO-アセチル化を有するが、シアル酸7位および9位においてである[95]。この構造は、 $4) - \text{D} - \text{Neup}5\text{Ac}(7/9\text{OAc}) - (26) - \text{D} - \text{Gal} - (1$  と記載される。

#### 【0113】

血清群Yの糖は、二糖反復単位がガラクトースの代わりにグルコースを含む以外は、血清群W135の糖と同様である。血清群W135と同様に、これは、シアル酸7位および9位において変動性のO-アセチル化を有する[95]。血清群Yの構造は：

20

$4) - \text{D} - \text{Neup}5\text{Ac}(7/9\text{OAc}) - (26) - \text{D} - \text{Glc} - (1$

と記載される。

#### 【0114】

MENJUGATE（商標）およびMENINGITEC（商標）製品は、CRM197担体タンパク質を用い、この担体は、本発明に従って用いることもできる。NEISVAC-C（商標）製品は、破傷風トキソイド担体タンパク質を用い、この担体も、ジフテリアトキソイドを用いることができるのと同様に本発明に従って用いることができる。髄膜炎菌結合体のための別の有用な担体タンパク質は、既存する承認された結合体ワクチンのいずれにも存在しない、Haemophilus influenzaeからのプロテインDである。

30

#### 【0115】

さらなる抗原の糖は、髄膜炎菌から調製される全長糖を含むこともでき、かつ/またはこれは、全長の糖のフラグメントを含むこともできる。さらなる抗原の糖は、好ましくは、細菌で見られる天然の莢膜糖より短い。よって、さらなる抗原の糖は、好ましくは解重合されており、この解重合は、糖の精製の後であるが、結合体化の前に生じる。解重合は、糖の鎖長を低減する。ある解重合法は、過酸化水素の使用を伴う[88]。過酸化水素を糖に加え（例えば1%の最終 $\text{H}_2\text{O}_2$ 濃度を得るまで）、混合物を、次いで、所望の鎖長の低減が達成されるまでインキュベートする（例えば約55℃にて）。別の解重合法は、酸加水分解を伴う[89]。その他の解重合法は、当該技術において公知である。本発明に従って用いるための結合体を調製するために用いる糖は、これらの解重合法のいずれによっても得ることができる。解重合は、免疫原性のために最適な鎖長を提供し、かつ/または糖の物理的な管理のしやすさのために鎖長を低減するために用いることができる。好ましい糖は、以下の範囲の平均重合度（Dp）を有する：A = 10~20；C = 12~22；W135 = 15~25；Y = 15~25。Dpよりもむしろ分子量の点において好ましい範囲は、全ての血清群について<100kDa；5kDa~75kDa；7kDa~50kDa；8kDa~35kDa；12kDa~25kDa；15kDa~22kDaである。

40

#### 【0116】

1:10（すなわち過剰のタンパク質）~10:1（すなわち過剰の糖）の糖：タンバ

50

ク質比 (w/w)、例えば 1:5 ~ 5:1、1:2.5 ~ 2.5:1 または 1:1.25 ~ 1.25:1 の比を有する髄膜炎菌結合体を、さらなる抗原において用いてよい。1:1 の比を用いることができる。

【0117】

典型的に、組成物は、用量あたり 1 µg ~ 20 µg (糖として測定) の、存在するそれぞれのさらなる抗原血清群を含む。

【0118】

髄膜炎菌結合体は、アルミニウム塩アジュバントに吸着されていてよいし、吸着されていなくてもよい。

【0119】

髄膜炎菌結合体は、本発明に従って用いる前に凍結乾燥されてよい。凍結乾燥されるならば、組成物は、マンニトールのような安定化剤を含むこともできる。これは、塩化ナトリウムも含むこともできる。

【0120】

結合体化肺炎球菌の糖

さらなる抗原は、結合体化肺炎球菌抗原を含むことができる。結合体化肺炎球菌抗原は、担体タンパク質と結合体化した *Streptococcus pneumoniae* からの荚膜糖抗原を含む [例えば参考文献 96 ~ 98]。1 種より多い血清型の *S. pneumoniae* からの糖を含むことが好ましい。23 の異なる血清型からの多糖の混合物が、5 ~ 11 の異なる血清型からの多糖を有する結合体ワクチン [99] と同様に、広く用いられている。例えば、PREVNAR (商標) [100] は、7 つの血清型 (4、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F) からの抗原を含有し、各糖は、還元的アミノ化により CRM 197 と個別に結合体化しており、0.5 ml 用量あたり 2 µg の各糖 (4 µg の血清型 6 B) を有する。

【0121】

さらなる抗原は、好ましくは、少なくとも血清型 6 B、14、19 F および 23 F についての糖抗原を含む。さらなる血清型は、好ましくは、1、3、4、5、7 F、9 V および 18 C から選択される。肺炎球菌血清型の 7 価 (PREVNAR (商標) におけるように)、9 価 (例えば PREVNAR からの 7 つの血清型と 1 および 5)、10 価 (例えば PREVNAR からの 7 つの血清型と 1、5 および 7 F) および 11 価 (例えば PREVNAR からの 7 つの血清型と 1、3、5 および 7 F) を網羅することが、特に有用である。

【0122】

結合体の糖部分は、肺炎球菌から調製される全長の糖を含むこともでき、かつ/またはこれは、全長の糖のフラグメントを含むこともできる。本発明に従って用いる糖は、好ましくは、髄膜炎菌結合体について上で記載したように、細菌で見られる天然の荚膜糖より短い。

【0123】

1:10 (すなわち過剰のタンパク質) ~ 10:1 (すなわち過剰の糖) の糖:タンパク質比 (w/w)、例えば 1:5 ~ 5:1、1:2.5 ~ 2.5:1 または 1:1.25 ~ 1.25:1 の比を有する肺炎球菌結合体を用いてよい。

【0124】

PREVNAR (商標) 製品は、CRM 197 担体タンパク質を用い、この担体も、本発明に従って用いることができる。肺炎球菌の糖と用いるための代替の担体は、それらに限定されないが、破傷風トキソイド担体、ジフテリアトキソイド担体および/または H. influenzae プロテイン D 担体を含む。混合肺炎球菌血清型について複数の担体を用いることは、例えば H. influenzae プロテイン D 担体と、例えば破傷風トキソイド担体および/またはジフテリアトキソイド担体との両方を含むために有用であり得る [101]。例えば、血清型 1、4、5、6 B、7 F、9 V、14 および 23 F の 1 または複数 (好ましくは全て) は H. influenzae プロテイン D 担体と結合体化

10

20

30

40

50

し、血清型 18C は破傷風トキソイドと結合体化し、血清型 19F はジフテリアトキソイド担体と結合体化することもできる。

【0125】

典型的に、組成物は、用量あたり  $1\mu\text{g} \sim 20\mu\text{g}$  (糖として測定) の、存在するそれぞれの血清型を含む。

【0126】

百日咳抗原

さらなる抗原は、百日咳抗原を含むことができる。Bordetella pertussis は、百日咳 (whooping cough) を引き起こす。ワクチン中の百日咳抗原は、細胞性 (不活化 B. pertussis 細胞の形態での全細胞) または無細胞性のいずれかである。細胞性百日咳抗原の調製は、よく文書化されており [例えば参考文献 102 の第 21 章を参照されたい]、例えばこれは、B. pertussis の第 I 相培養物の熱不活化により得ることができる。好ましくは、しかし、本発明は、無細胞性抗原を用いる。

【0127】

無細胞性抗原を用いる場合、以下の抗原の 1、2 または (好ましくは) 3 つを用いることが好ましい: (1) 解毒化百日咳毒素 (百日咳トキソイドまたは「PT」); (2) 繊維状ヘマグルチニン (「FHA」); (3) ペルタクチン (「69 キロダルトン外膜タンパク質」としても公知)。これらの 3 つの抗原は、好ましくは、改変 Steiner-Scholte 液体培地中で成長した B. pertussis 培養物からの単離により調製される。PT および FHA は、発酵ブロスから単離でき (例えばヒドロキシアパタイトゲルへの吸着により)、一方、ペルタクチンは、熱処理および凝結 (例えば塩化バリウムを用いて) により細胞から抽出できる。抗原は、連続的なクロマトグラフィーおよび/または沈殿ステップにおいて精製できる。PT および FHA は、例えば、疎水性クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製できる。ペルタクチンは、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製できる。FHA およびペルタクチンは、本発明に従って用いる前にホルムアルデヒドで処理することもできる。PT は、好ましくは、ホルムアルデヒドおよび/またはグルタルアルデヒドで処理することにより解毒化される。この化学的解毒化手順の代替として、PT は、酵素活性が変異誘発により低減されている [103] 変異体 PT であってよいが、化学処理による解毒化が好ましい。

【0128】

無細胞性百日咳抗原は、好ましくは、1 または複数のアルミニウム塩アジュバント上に吸着される。代替として、これらは、吸着していない状態で加えてよい。ペルタクチンを加える場合、これは、好ましくは、水酸化アルミニウムアジュバント上に既に吸着されている。PT および FHA は、水酸化アルミニウムアジュバントまたはリン酸アルミニウム上に吸着され得る。PT、FHA およびペルタクチンの全てを水酸化アルミニウムに吸着させることが最も好ましい。

【0129】

組成物は、典型的に、 $1 \sim 50\mu\text{g}$  / 用量の PT;  $1 \sim 50\mu\text{g}$  / 用量の FHA; および  $1 \sim 50\mu\text{g}$  のペルタクチンを含む。好ましい量は、約  $25\mu\text{g}$  / 用量の PT、約  $25\mu\text{g}$  / 用量の FHA および約  $8\mu\text{g}$  / 用量のペルタクチンである。

【0130】

PT、FHA およびペルタクチンとともに、線毛 (例えば凝集原 2 および 3) を、無細胞性百日咳ワクチンに含めることが可能である。

【0131】

不活化ポリオウイルスワクチン

さらなる抗原は、不活化ポリオウイルス抗原を含むことができる。ポリオウイルスは、灰白髄炎を引き起こす。経口ポリオウイルスワクチンを用いるよりもむしろ、さらなる抗原は、参考文献 102 の第 24 章により詳細に開示されるように、IPV を用いる。



## 【 0 1 3 2 】

ポリオウイルスは、細胞培養において成長させてよく、好ましい培養は、サル腎臓に由来する V e r o 細胞株を用いる。V e r o 細胞は、微小担体上で簡便に培養できる。成長後に、ピリオンを、限外ろ過、ダイアフィルトレーションおよびクロマトグラフィーのような技術を用いて精製することもできる。患者に投与する前に、ポリオウイルスは不活化されなければならない、これは、ホルムアルデヒドでの処理により達成できる。

## 【 0 1 3 3 】

灰白髄炎は、3つの型のポリオウイルスのうちの1つにより引き起こされ得る。3つの型は類似しており、同一の症状を引き起こすが、これらは抗原として非常に異なり、1つの型による感染は、その他による感染に対して防御しない。よって、本発明において3つのポリオウイルス抗原：ポリオウイルス1型（例えば M a h o n e y 株）、ポリオウイルス2型（例えば M E F - 1 株）およびポリオウイルス3型（例えば S a u k e t t 株）を用いることが好ましい。ウイルスは、好ましくは、個別に成長、精製および不活化され、次いで、組み合わせ、本発明で用いるためのバルクの3価混合物を得る。

10

## 【 0 1 3 4 】

I P V の量は、典型的に「D U」単位（「D 抗原単位」[ 1 0 4 ]）で表される。用量あたりウイルスの型あたり1 ~ 1 0 0 D U、例えば約80 D Uの1型ポリオウイルス、約16 D Uの2型ポリオウイルスおよび約64 D Uの3型ポリオウイルスを用いることが好ましい。

20

## 【 0 1 3 5 】

ポリオウイルス抗原は、好ましくは、本発明の組成物を作製するために用いる前にいかなるアルミニウム塩アジュバントにも吸着されないが、これらは、貯蔵の間にワクチン組成物中のアルミニウムアジュバント（複数可）上に吸着されるようになってよい。

## 【 0 1 3 6 】

## ジフテリアトキソイド

さらなる抗原は、ジフテリアトキソイド抗原を含むことができる。C o r y n e b a c t e r i u m d i p h t e r i a e は、ジフテリアを引き起こす。ジフテリア毒素を処理して（例えばホルマリンまたはホルムアルデヒドを用いて）、注射後に特異的抗毒素抗体を誘導する能力を保持しながら、毒性を除去できる。これらのジフテリアトキソイドは、ジフテリアワクチンにおいて用いられ、参考文献102の第13章により詳細に開示されている。好ましいジフテリアトキソイドは、ホルムアルデヒド処理により調製されるものである。ジフテリアトキソイドは、C . d i p h t e r i a e を、成長培地（例えば F e n t o n 培地または L i n g g o u d および F e n t o n 培地）中（これにウシ抽出物を補充することもできる）で成長させ、その後、ホルムアルデヒド処理、限外ろ過および沈殿を行うことにより得ることができる。トキソイド化した材料は、次いで、滅菌ろ過および/または透析を含むプロセスにより処理することもできる。

30

## 【 0 1 3 7 】

ジフテリアトキソイドの量は、国際単位（I U）で表すことができる。例えば、N I B S C は、「D i p h t e r i a T o x o i d A d s o r b e d T h i r d I n t e r n a t i o n a l S t a n d a r d 1 9 9 9」[ 1 0 5、1 0 6 ] を供給し、これは、アンプルあたり160 I U を含有する。I U 系の代替として、「L f」単位（「凝結単位（f l o c c u l a t i n g u n i t）」または「限界凝結用量（l i m e s f l o c c u l a t i n g d o s e）」）は、1国際単位の抗毒素と混合した場合に、最適に凝結した混合物を生成するトキソイドの量として定義される[ 1 0 7 ]。例えば、N I B S C は、「D i p h t e r i a T o x o i d , P l a i n」[ 1 0 8 ] を供給し、これは、アンプルあたり300 L F を含有し、「T h e 1 s t I n t e r n a t i o n a l R e f e r e n c e R e a g e n t F o r D i p h t e r i a T o x o i d F o r F l o c c u l a t i o n T e s t」[ 1 0 9 ] も供給し、これは、アンプルあたり900 L F を含有する。

40

## 【 0 1 3 8 】

50

組成物は、典型的に、20～80Lfのジフテリアトキソイド、典型的に約50Lfを含む。

【0139】

IU測定により、組成物は、典型的に、少なくとも30IU/用量を含む。

【0140】

ジフテリアトキソイドは、好ましくは、水酸化アルミニウムアジュバント上に吸着される。

【0141】

破傷風トキソイド

さらなる抗原は、破傷風トキソイド抗原を含むことができる。Clostridium tetaniは、破傷風を引き起こす。破傷風毒素は、防御的トキソイドを得るように処理できる。トキソイドは、破傷風ワクチンにおいて用いられ、参考文献102の第27章により詳細に開示されている。好ましい破傷風トキソイドは、ホルムアルデヒド処理により調製されたものである。破傷風トキソイドは、C. tetaniを、成長培地（例えばウシカゼインに由来するLatham培地）中で成長させ、その後、ホルムアルデヒド処理、限外ろ過および沈殿を行うことにより得ることができる。材料は、次いで、滅菌ろ過および/または透析を含むプロセスにより処理することもできる。

【0142】

破傷風トキソイドの量は、国際単位（IU）で表すことができる。例えば、NIBSCは、「Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000」[110、111]を供給し、これは、アンプルあたり469IUを含有する。IU系の代替として、「Lf」単位（「凝結単位」または「凝結用量限界」）は、1国際単位の抗毒素と混合した場合に、最適に凝結した混合物を生成するトキソイドの量として定義される[107]。例えば、NIBSCは、「The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test」[112]を供給し、これは、アンプルあたり1000LFを含有する。

【0143】

組成物は、典型的に、5～50Lfのジフテリアトキソイド、典型的に約20Lfを含む。

【0144】

IU測定により、組成物は、典型的に少なくとも40IU/用量を含む。

【0145】

破傷風トキソイドは、水酸化アルミニウムアジュバント上に吸着されてよいが、このことは必要でない（例えば全破傷風トキソイドの0～10%の吸着を用いることができる）。

【0146】

A型肝炎ウイルス抗原

さらなる抗原は、A型肝炎ウイルス抗原を含むことができる。A型肝炎ウイルス（HAV）は、ウイルス性肝炎を引き起こす公知の作用物質の1つである。HAVワクチンは、参考文献102の第15章に開示されている。好ましいHAV成分は、不活化ウイルスに基づき、不活化は、ホルマリン処理により達成できる。ウイルスは、MRC-5細胞のようなヒト胚性肺二倍体線維芽細胞上で成長できる。好ましいHAV株はHM175であるが、CR326Fも用いることができる。細胞は、ウイルス成長を可能にする条件下で成長できる。細胞を溶解し、得られた懸濁物を、限外ろ過およびゲル透過クロマトグラフィーにより精製できる。

【0147】

HAV抗原の量は、EU（Eliisa単位）において測定して、典型的に、少なくとも約500EU/mlである。

【0148】

### B型肝炎ウイルス表面抗原

さらなる抗原は、B型肝炎ウイルス抗原を含むことができる。B型肝炎ウイルス(HBV)は、ウイルス性肝炎を引き起こす公知の作用物質の1つである。HBVピリオンは、外側のタンパク質コートまたはカプシドにより囲まれた内側のコアからなり、ウイルスコアはウイルスDNAゲノムを含有する。カプシドの主要成分は、HBV表面抗原またはより一般的に「HBsAg」として公知のタンパク質であり、これは、典型的に、約24kDaの分子量を有する226アミノ酸のポリペプチドである。全ての既存するB型肝炎ワクチンは、HBsAgを含有し、この抗原が正常なワクチン被接種者に投与される場合、これは、HBV感染に対して防御する抗HBsAg抗原の生成を刺激する。

#### 【0149】

ワクチン製造のために、HBsAgは2つの方式で作製されている。第1の方法は、粒子状の形態の抗原を、慢性B型肝炎キャリアの血漿から精製することを含む。なぜなら、大量のHBsAgが肝臓で合成され、HBV感染の間に血流中に放出されるからである。第2の方法は、タンパク質を組換えDNA法により発現させることを含む。本発明の方法で用いるためのHBsAgは、好ましくは、酵母細胞で組換え発現される。適切な酵母は、例えば、*Saccharomyces* (例えば*S. cerevisiae*) または *Hansenula* (例えば*H. polymorpha*) 宿主を含む。

#### 【0150】

HBsAgは、好ましくは、グリコシル化されていない。天然HBsAg(すなわち血漿から精製された生成物におけるような)とは異なって、酵母で発現されたHBsAgは、一般的にグリコシル化されておらず、これは、本発明で用いるためのHBsAgの最も好ましい形態である。なぜなら、これは免疫原性が非常に高く、血液生成物汚染の危険性なく調製できるからである。

#### 【0151】

HBsAgは、通常、リン脂質を含む脂質マトリクスを含む実質的に球状の粒子の形態である(約20nmの平均直径)。酵母で発現されたHBsAg粒子は、天然HBVピリオンでは見出されないホスファチジルイノシトールを含むことがある。粒子は、免疫系を刺激するために非毒性量のLPSも含むこともできる[113]。好ましいHBsAgは、リン脂質、ホスファチジルイノシトールおよびポリソルベート20を含む脂質マトリクスを含む粒子の形態にある。

#### 【0152】

全ての公知のHBVサブタイプは、共通決定因子「a」を含有する。その他の決定因子および副決定因子(subdeterminant)と組み合わせ、9つのサブタイプが同定されている: ayw1、ayw2、ayw3、ayw4、ayr、adw2、adw4、adrq- および adrq+。これらのサブタイプの他に、免疫化された個体で検出されたHBV変異体(「エスケープ変異体」)のようなその他の変種が出現している。本発明で用いるための最も好ましいHBVサブタイプは、サブタイプadw2である。

#### 【0153】

「S」配列に加えて、表面抗原は、プレS1および/もしくはプレS2配列の全体または一部分のようなプレS配列の全体または一部分を含むこともできる。

#### 【0154】

HBsAg精製のための好ましい方法は、細胞破壊の後に: 限外ろ過; サイズ排除クロマトグラフィー; アニオン交換クロマトグラフィー; 超遠心分離; 脱塩; および滅菌ろ過を含む。溶解物は、細胞破壊の後に沈殿させ(例えばポリエチレングリコールを用いて)、HBsAgを溶液のままにして、限外ろ過の準備ができるようにしてもよい。

#### 【0155】

精製の後に、HBsAgは、透析(例えばシステインとともに)に供してよく、これは、HBsAg調製の間に用いられた可能性があるチメロサールのようなあらゆる水銀防腐剤を除去するために用いることができる[114]。

#### 【0156】

10

20

30

40

50

H B s A g の量は、典型的にマイクログラムで表され、ワクチン用量あたりの H B s A g の典型的な量は、5 ~ 5  $\mu$  g、例えば 10  $\mu$  g / 用量である。

【0157】

H B s A g は、最終ワクチンにおいて（周知の E N G E R I X - B（商標）製品におけるように）水酸化アルミニウムアジュバントに吸着されてよいが、または吸着されないままでもよいが、これは、一般的にリン酸アルミニウムアジュバントに吸着される [ 1 1 5 ]。

【0158】

結合体化 H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e b 型抗原

さらなる抗原は、結合体化 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」）抗原を含むことができる。H i b は、細菌性髄膜炎を引き起こす。H i b ワクチンは、典型的に莢膜糖抗原に基づき [ 例えば参考文献 1 0 2 の第 1 4 章 ]、その調製は、よく文書化されている [ 例えば参考文献 1 1 6 ~ 1 2 5 ]。

【0159】

H i b 糖は、特に小児におけるその免疫原性を増進するために担体タンパク質と結合体化させることができる。典型的な担体タンパク質は、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、ジフテリアトキソイドの C R M 1 9 7 誘導体、H . i n f l u e n z a e プロテイン D、血清群 B 髄膜炎菌からの外膜タンパク質複合体である。H i b 結合体における担体タンパク質は、好ましくは髄膜炎菌結合体（複数可）における担体タンパク質（複数可）とは異なるが、いくつかの実施形態において同じ担体を用いることができる。

【0160】

破傷風トキソイドは、「P R P - T」と一般的によばれる製品において用いられるように、好ましい担体である。P R P - T は、臭化シアンを用いて H i b 莢膜多糖を活性化し、活性化された糖をアジピン酸リンカー（例えば（1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）、典型的に塩酸塩）とカップリングさせ、次いで、リンカー - 糖の実体を破傷風トキソイド担体タンパク質と反応させることにより作製できる。

【0161】

結合体の糖部分は、H i b 細菌から調製される全長ポリリボシルリビトールホスフェート（P R P）および / または全長 P R P のフラグメントを含むこともできる。

【0162】

1 : 5（すなわち過剰のタンパク質）~ 5 : 1（すなわち過剰の糖）の糖 : タンパク質比（w / w）、例えば 1 : 2 ~ 5 : 1 の比および 1 : 1 . 2 5 ~ 1 : 2 . 5 の比を有する H i b 結合体を用いてよい。好ましいワクチンにおいては、しかし、担体タンパク質に対する糖の重量比は、1 : 2 ~ 1 : 4、好ましくは 1 : 2 . 5 ~ 1 : 3 . 5 である。破傷風トキソイドが抗原および担体タンパク質の両方として存在するワクチンにおいて、結合体中の担体タンパク質に対する糖の重量比は、1 : 0 . 3 ~ 1 : 2 であってよい [ 1 2 6 ]。

【0163】

H i b 結合体の量は、通常、担体の選択による変動を回避するために、糖の質量で示される（すなわち、結合体（担体 + 糖）全体の用量は、述べられる用量よりも多い）。用量あたりの H i b 糖の典型的な量は、1 ~ 30  $\mu$  g、好ましくは約 10  $\mu$  g である。

【0164】

H i b 結合体の投与は、好ましくは、0 . 1 5  $\mu$  g / m l、より好ましくは 1  $\mu$  g / m l の抗 P R P 抗体濃度をもたらす、これらは、標準的な応答閾値である。

【0165】

H i b 結合体は、本発明に従ってそれらを用いる前に凍結乾燥されてよい。さらなる成分、例えば安定化剤を凍結乾燥する前に加えてもよい。含めるために好ましい安定化剤は、ラクトース、スクロースおよびマンニトール、ならびにそれらの混合物、例えばラクトース / スクロース混合物、スクロース / マンニトール混合物などである。最終ワクチンは、よって、ラクトースおよび / またはスクロースを含有することもできる。スクロース /

10

20

30

40

50

マンニトール混合物を用いることにより、乾燥プロセスを速めることができる。

【0166】

H i b 結合体は、アルミニウム塩アジュバントに吸着されても、吸着されなくてもよい。それらを水酸化アルミニウムアジュバントに吸着させないことが好ましい。

【0167】

オリゴヌクレオチドおよびポリマーとM e n B 抗原との混合

本発明の免疫原性組成物は、オリゴヌクレオチド/ポリマー複合体の水性懸濁物を抗原と混合することにより簡便に調製できる。複合体は、典型的に液体の形態で維持されるので、それらを共に処方する簡単な方式を提供する。

【0168】

いくつかの実施形態において、一方または両方の懸濁物は、混合が本発明の免疫原性組成物を提供するように免疫原を含む。

【0169】

2つの液体を混合する場合、混合のための容量比は、変動できる（例えば20：1～1：20、10：1～1：10、5：1～1：5、2：1～1：2など）が、理想的に約1：1である。2つの懸濁物中の成分の濃度は、混合の後に所望の最終濃度が達成されるように選択でき、例えば、1：1の混合により最終の所望の濃度が提供されるように両方を2×強度で調製することもできる。

【0170】

様々な濃度、例えば参考文献58、61、62または127で用いられる濃度のいずれかのオリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーを用いることができる。例えば、ポリカチオン性オリゴペプチドは、1100μM、1000μM、350μM、220μM、200μM、110μM、100μM、11μM、10μM、1μM、500nM、50nMなどで存在できる。オリゴヌクレオチドは、44nM、40nM、20nM、14nM、4.4nM、4nM、2nMなどで存在できる。2000nM未満のポリカチオン性オリゴペプチド濃度が典型的である。1：25のモル比で混合される配列番号1および2について、本発明の3つの実施形態におけるmg/mLでの濃度は、よって、0.311と1.322、または0.109と0.463、または0.031と0.132であってよい。

【0171】

本発明のいくつかの免疫原性組成物は、アルミニウム塩と、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーの複合体とを含む。このような組成物において、アルミニウム塩と、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーの複合体とは、典型的にともに粒子状である。アルミニウム塩アジュバントの平均粒子径は、典型的に1～20μm程度である[66、128]。これは、IC31（商標）で見られる複合体についてのサイズ範囲でもある。このような粒子を組み合わせる場合、塩粒子の平均直径は、複合体の平均直径と実質的に同じであってよい。他の実施形態において、塩粒子の平均直径は、複合体の平均サイズよりも小さくてよい。他の実施形態において、塩粒子の平均直径は、複合体の平均サイズよりも大きくてよい。平均直径が異なる場合、より大きい直径は、少なくとも1.05×、例えば1.1×、1.2×、1.3×、1.4×、1.5×、2×、2.5×、3×またはそれより大きい係数だけ大きくてよい。塩または複合体のいずれかが、ある範囲の直径を有する粒子を有するが、平均直径が異なるならば、それらの範囲は重複しても重複しなくてもよい。よって、最大の塩の粒子は、最小の複合体粒子よりも小さいか、または最大の複合体粒子は、最小の塩の粒子よりも小さくてよい。

【0172】

粒子は、一般的に滅菌ろ過するには大きすぎるので、本発明の免疫原性組成物の無菌性は、複合体と適当であればアルミニウム塩とを、滅菌条件下で調製し、次いで、それらを滅菌条件下で混合することにより典型的に達成される。例えば、複合体の成分は、滅菌ろ過できる。いくつかの実施形態において、これらの滅菌複合体を、次いで、オートクレー

10

20

30

40

50

ブした（滅菌）アルミニウム塩アジュバントと混合して、滅菌アジュバント組成物を得ることができる。この滅菌アジュバントを、次いで、滅菌免疫原と混合して、患者への投与のために適切な免疫原性組成物を得ることができる。

【0173】

アルミニウム塩粒子の密度は、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびポリカチオン性ポリマーの複合体の密度と典型的に異なり、このことは、2つの粒子を、密度、例えばスクロース勾配により分離できることを意味する。

【0174】

薬学的組成物

本発明の免疫原性組成物は、MenB抗原とオリゴヌクレオチドおよびポリマーとに加えて、通常、成分を含み、例えば、これらは、1または複数の薬学的に許容される成分を典型的に含む。このような成分は、アジュバント組成物または別の組成物のいずれかを起源として、本発明の免疫原性組成物に存在してもよい。このような成分についての徹底的な議論は、参考文献129において入手可能である。

【0175】

組成物は、チオメルサルまたは2-フェノキシエタノールのような防腐剤を含むこともできる。ワクチンは、水銀物質を実質的に含まない（例えば $< 10 \mu\text{g/ml}$ ）、例えばチオメルサルを含まないことが好ましい。水銀を含有しないワクチンは、より好ましい。防腐剤を含まないワクチンは、特に好ましい。 - トコフェロールスクシネートは、インフルエンザワクチン中に水銀化合物の代替として含めることができる。

【0176】

張度を制御するために、組成物は、ナトリウム塩のような生理的な塩を含むこともできる。塩化ナトリウム（NaCl）が好ましく、これは、 $1 \sim 20 \text{mg/ml}$ で存在してもよい。存在し得るその他の塩は、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二ナトリウムおよび/または塩化マグネシウムなどを含む。

【0177】

組成物は、 $200 \text{mOsm/kg} \sim 400 \text{mOsm/kg}$ 、例えば $240 \sim 360 \text{mOsm/kg}$ （ $280 \sim 330 \text{mOsm/kg}$ または $290 \sim 310 \text{mOsm/kg}$ の範囲であってよい）の重量オスモル濃度を有してもよい。

【0178】

組成物のpHは、一般的に $5.0 \sim 8.1$ であり、より典型的に $6.0 \sim 8.0$ 、例えば $6.5 \sim 7.5$ または $7.0 \sim 7.8$ である。

【0179】

組成物は、好ましくは無菌性である。例えば用量あたり $< 1 \text{EU}$ （内毒素単位、標準的尺度）、好ましくは用量あたり $< 0.1 \text{EU}$ を含有する組成物は、好ましくは、非発熱性である。組成物は、好ましくはグルテンを含まない。

【0180】

免疫原性組成物は、単回免疫化のための材料を含むこともでき、または多回免疫化のための材料を含むこともできる（すなわち「多回用量」キット）。多回用量の構成において、防腐剤を含むことが有用である。多回用量組成物において防腐剤を含む代替として（または追加で）、組成物は、材料の取り出すための無菌アダプタを有する容器中に含まれることがある。

【0181】

組成物は、一般的に投与の時点で水性の形態にある。ワクチンは、典型的に約 $0.5 \text{ml}$ の投薬容量で投与されるが、半分の用量（すなわち約 $0.25 \text{ml}$ ）は、時折、例えば小児に投与されることがある。本発明のいくつかの実施形態において、組成物は、より高い用量、例えば約 $1 \text{ml}$ で、例えば2つの $0.5 \text{ml}$ 容量を混合した後に投与されることがある。

【0182】

組成物またはキット成分の包装

10

20

30

40

50

本発明の免疫原性組成物およびキット成分のために適切な容器は、バイアル、シリンジ（例えばディスポーザブルシリンジ）などを含む。これらの容器は、無菌でなければならない。容器と一緒に包装して、例えば同じ箱の中でキットを形成できる。

【0183】

成分がバイアル中にある場合、バイアルは、ガラスまたはプラスチック材料で作製できる。バイアルは、好ましくは、組成物をそこに加える前に滅菌される。ラテックス感受性の被験体に関する問題を回避するために、バイアルは、好ましくは、ラテックスを含まないストッパーで密閉され、全ての包装材料においてラテックスが存在しないことが好ましい。バイアルは、単回用量のワクチンを含むこともでき、またはこれは1回より多い用量（「多回用量バイアル」）、例えば10回用量を含むこともできる。有用なバイアルは、無色のガラスで作製される。ホウケイ酸ガラスが、ソーダ石灰ガラスよりも好ましい。バイアルは、ブチルゴムで作製されたストッパーを有してもよい。

10

【0184】

バイアルは、シリンジをキャップの中に挿入できるように適合されたキャップ（例えばルアーロック）を有することができる。バイアルキャップは、シールまたはカバーの内部にあり得、キャップにアクセスできる前にシールまたはカバーが除去されなければならない。バイアルは、特に多回用量バイアルについて、その内容物を無菌的に取り出すことを可能にするキャップを有してもよい。

【0185】

成分がシリンジ中に包装される場合、シリンジは、それに取り付けられた針を有してもよい。針が取り付けられていない場合、別個の針を、組み立てて使用するためにシリンジとともに供給することもできる。このような針は、鞘に入っているもよい。シリンジのプランジャーは、吸引中にプランジャーが偶発的に外れることを防止するためにストッパーを有してもよい。シリンジは、ラテックスゴムキャップおよび/またはプランジャーを有してもよい。ディスポーザブルシリンジは、単回用量のワクチンを含有する。シリンジは、一般的に針の取り付け前に先端部を密閉するための先端部キャップを有し、先端部キャップは、ブチルゴムで作製されてよい。シリンジおよび針が別個に包装されているならば、針は、好ましくは、ブチルゴムの遮蔽物が装着される。有用なシリンジは、「Tip-Lock（商標）」の商標の下で市販されている。

20

【0186】

容器は、例えば小児への送達を容易にするために、半用量の容量を示すように印がつけられていてよい。例えば、0.5 ml 用量を含有するシリンジは、0.25 ml 容量を示す印を有してもよい。

30

【0187】

複数成分の製品において、被験体への投与に必要とされる材料よりも多い材料を含み、材料の移動におけるいずれの非効率性にもかかわらず完全な最終用量の容量が得られるようにすることが通常である。よって、個別の容器は、例えば5~20容量%、過剰に充填されていてもよい。

【0188】

処置の方法および免疫原性組成物の投与

40

本発明の組成物は、ヒト被験体への投与のために適切であり、本発明は、本発明の免疫原性組成物を被験体に投与するステップを含む、被験体における免疫応答を高める方法を提供する。

【0189】

本発明は、本発明のキットの容器の内容物を混合するステップと、混合された内容物を被験体に投与するステップとを含む、被験体における免疫応答を高める方法も提供する。

【0190】

本発明は、医薬品として用いるため、例えば被験体における免疫応答を高めることに用いるための本発明の組成物またはキットも提供する。

【0191】

50

本発明は、被験体における免疫応答を高めるための医薬品の製造における、MenB抗原（上で定義されるとおり）、免疫賦活性オリゴヌクレオチド、およびポリカチオン性ポリマーの使用も提供する。

【0192】

これらの方法および使用は、概して、抗体応答、好ましくは防御抗体応答を生成させるために用いられる。

【0193】

本発明の免疫原性組成物は、様々な方式で投与できる。通常免疫化経路は、筋肉内注射（例えば腕または脚への）によるが、その他の利用可能な経路は、皮下注射、鼻内、経口、頬側、舌下、皮内、経皮（transcutaneous）、経皮（transdermal）などを含む。

10

【0194】

本発明に従って調製される免疫原性組成物は、小児および成人の両方を処置するためのワクチンとして用いてよい。被験体は、1歳未満、1～5歳、5～15歳、15～55歳または少なくとも55歳であってよい。ワクチンを受容する被験体は、高齢者（例えば50歳、60歳および好ましくは65歳）、若年者（例えば5歳）、入院している被験体、健康管理従事者、軍人および軍関係者、妊娠している女性、慢性に疾病を有する人、免疫不全被験体、外国に旅行する人などであってよい。アルミニウム塩アジュバントは、乳児集団において日常的に用いられ、IC31（商標）は、この年齢群においても有効である[127、130]。しかし、ワクチンは、これらの群だけに適切なわけではなく、集団においてより一般的に用いてよい。

20

【0195】

処置は、単回用量計画または多回用量計画によることができる。多回用量は、一次免疫化計画および/または追加免疫化計画で用い得る。多回用量計画において、様々な用量を、同じまたは異なる経路、例えば非経口の初回刺激（prime）および粘膜の追加刺激（boost）、粘膜の初回刺激および非経口の追加刺激などにより与えてよい。1回より多い用量（典型的に2回用量）の投与は、免疫学的にナイーブな被験体において特に有用である。多回用量は、典型的に、少なくとも1週間（例えば約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約12週間、約16週間など）離して投与される。

30

【0196】

全般

用語「含む（comprising）」は、「含む（including）」および「からなる」を包含し、例えばXを「含む（comprising）」組成物は、Xのみからなり得るか、または何か追加のものを含み得る（例えばX+Y）。

【0197】

「実質的に」との語は、「完全に」を除外せず、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まないことがある。必要であれば、「実質的に」との語を、本発明の定義から省くことができる。

【0198】

数値xに関する用語「約」は、任意選択であり、例えば $x \pm 10\%$ を意味する。

40

【0199】

特に明記しない限り、2つ以上の成分を混合するステップを含むプロセスは、混合のいずれの特定の順序も必要としない。よって、成分は、任意の順序で混合できる。3つの成分がある場合、2つの成分を互いに組み合わせることができ、次いでこの組み合わせを第3成分と組み合わせるとよい、などである。

【0200】

動物（特にウシ）材料を細胞の培養において用いる場合、これらは、伝染性海綿状脳症（TSE）を含まず、特にウシ海綿状脳症（BSE）を含まない供給源から得られなければならない。全体的に、細胞を、動物由来材料の完全な非存在下で培養することが好ましい。

50



## 【0201】

化合物を、組成物の一部として身体に投与する場合、その化合物は、適切なプロドラッグで代わりに置き換えてよい。

## 【0202】

細胞基質を再集合もしくは逆遺伝学の手順のため、またはウイルス成長のために用いる場合、これは、好ましくは、例えばPh Eur総則第5.2.3章にあるようなヒトワクチン生成における使用のために承認されたものである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0203】

アジュバント

10

IC31複合体を、参考文献62に開示されるようにして調製した。水酸化アルミニウムアジュバント懸濁物を、標準的な方法により調製する。組成物が水酸化アルミニウムアジュバントとIC31とを含む場合、アジュバントの組み合わせを、水酸化アルミニウムアジュバントをIC31複合体と混合することにより作製した。

## 【0204】

以下の髄膜炎菌(i i i)および(i v)のために、参考文献62に開示されるようにして高濃度および低濃度(10倍の違い)でIC31を調製し、そして水中スクアレンエマルジョンを調製した。髄膜炎菌(i v)のために、参考文献65の第10章に開示されるようにしてMF59を調製した。アジュバントの組み合わせを、MF59をIC31<sup>high</sup>またはIC31<sup>low</sup>と1:1容量比または5:1容量比のいずれかで混合することにより作製した。

20

## 【0205】

髄膜炎菌(i)

参考文献1に開示される「5CVMB」ワクチンを構成する3つのポリペプチドに、水酸化アルミニウムおよび/またはIC31をアジュバント添加した。ポリペプチドは、配列番号13、配列番号14および配列番号15のアミノ酸配列を有する(参考文献1および131を参照されたい)。

## 【0206】

第1組の実験において、9群のマウスに10μgの抗原、3mg/mlの水酸化アルミニウムおよび様々な用量のIC31を与えた。群に以下の9つの組成物を与え、群7~9に1~6と同じであるが異なって処方した抗原を与えた。

30

## 【0207】

【表 1】

	抗原用量 (μg)	IC31 容量* (μl)	Al-H (mg/ml)
1	10	100	3
2	10	50	3
3	10	25	3
4	10	10	3
5	10	0	3
6**	10	100	0
7	10	0	3
8	10	100	3
9**	10	100	0

標準 IC31 懸濁物を用いた。100 μl のこの懸濁物は、完全な強度（full-strength）を与えた。より低い容量は、より低い強度を与えた。より低い強度の組成物についての容量を保つために、緩衝液を 100 μl まで加えた。

\*\*本発明の実施形態

マウスからの血清を、殺菌活性について髄膜炎菌株のパネルに対して試験した。

【0208】

実験 M P 0 3 からの殺菌性力価は、6 つの異なる株 A ~ F に対して、以下のとおりであった：

【0209】

【表 2】

	A	B	C	D	E	F
1	>65536	4096	8192	4096	256	32768
2	>65536	8192	8192	8192	512	>65536
3	>65536	4096	4096	8192	512	32768
4	>65536	2048	4096	4096	512	8192
5	>65536	2048	4096	8192	256	32768
6	>65536	4096	>8192	8192	1024	>65536
7	>65536	2048	4096	4096	256	4096
8	>65536	>8192	>8192	>8192	512	>65536
9	32768	8192	>8192	>8192	4096	>65536

よって、唯一のアジュバントとして A 1 - H を用いて得られた力価（群 5）は、様々な比で I C 3 1 を加えることにより（群 1 ~ 4）パネルにわたって全般的に改善された。同じ効果は、異なる抗原処方を用いて見られた（群 7 および 8 を比較されたい）。

【0210】

さらに、I C 3 1 を唯一のアジュバントとして用いた場合（群 6 および 9）、殺菌性力価は、6 つ全ての株において高い、または A 1 - H および I C 3 1 + A 1 - H よりも高いことが見出された。

【0211】

9 つの組成物を、p H および重量オスモル濃度について試験した。組成物 1 ~ 5、7 お

よび 8 について、pH は 6.2 ~ 6.6 の範囲にあった。組成物 6 および 9 は、わずかに  
より高い pH を 6.9 ~ 7.3 の範囲に有した。全ての組成物の重量オスモル濃度は、2  
80 mOsm/kg ~ 330 mOsm/kg の範囲にあった。

#### 【0212】

髄膜炎菌 (ii)

fHBP の 3 つの変種を I I - I I I - I の順序で含有する 3 重融合ポリペプチド (参  
考文献 60 に開示されるとおり；本明細書において配列番号 17) に、水酸化アルミニウ  
ムおよび / または IC31 をアジュバント添加した。

#### 【0213】

第 1 組の実験において、6 群のマウスに 20  $\mu$ g の抗原 (精製タグありまたはなし)、  
3 mg/ml の水酸化アルミニウムおよび 100  $\mu$ l の IC31 を与えた。群に、以下の  
ものを与えた：

#### 【0214】

#### 【表 3】

	抗原用量 ( $\mu$ g)	抗原タグ	IC31 容量 ( $\mu$ l)	Al-H (mg/ml)
1**	20	なし	100	0
2**	20	あり	100	0
3	20	なし	100	3
4	20	あり	100	3
5	20	なし	0	3
6	20	あり	0	3

\*\*本発明の実施形態

マウスからの血清を、殺菌性活性について髄膜炎菌株のパネルに対して試験した。

#### 【0215】

実験 MP05 からの血清を、株のパネルに対して再び試験した (合計 25)。群 1 (I  
C31、タグなし) および群 3 (IC31 + Al-H、タグなし) の株の 56% は、1  
: 1024 の力価を有したが、群 5 (Al-OH、タグなし) の株の 36% だけが 1  
: 1024 の力価を有した。同様に、群 1 および 3 の株の 76% は、1 : 128 の力価を  
有したが、この力価は、群 5 の株の 64% でのみ観察された。よって、精製タグの非存在  
下では、最高の殺菌性力価は、IC31 を用いて達成された。

#### 【0216】

精製タグ付加抗原の殺菌性力価比較により、群 2 (IC31、タグ) の株の 84% が  
1 : 128 の力価を有したことが明らかになった。これとは対照的に、群 4 (IC31 +  
Al-H) の株の 80% および群 6 (Al-OH) の株の 76% だけが 1 : 128 の力  
価を有した。よって、精製タグの存在下では、最高の殺菌性力価は、IC31 単独を用い  
て達成された。

#### 【0217】

タグを含まない組成 (1、3 および 5) を、pH および重量オスモル濃度について試験  
した。pH は、6.87 ~ 7.00 の範囲であった。重量オスモル濃度は、302 mOsm/kg  
~ 308 mOsm/kg の範囲であった。

#### 【0218】

さらなる免疫原性実験は、fHBP I I - I I I - I 抗原を、NadA および 287 -  
953 抗原 (配列番号 13 および 15) との組み合わせで実験 MP04 において、同じ群  
分けおよび株パネルで用いた。群 1 および 3 は、群 5 におけるほんの 84% と比較して、

試験した株の100%において1:128の殺菌性力価を有した。1:1024のより厳しい閾値では、群1および3からの血清は、群5のほんの56%と比較して、株の88%に対して殺菌性であった。

【0219】

同様の結果が精製タグ付加抗原を用いて観察され、群2および4の88%が、群6のほんの80%と比較して、1:128の殺菌性力価を有した。

【0220】

よって、最高の抗髄膜炎菌免疫応答は、IC31単独を用いて得られ、これは、少なくとも、IC31+A1-Hと同様に良好であり、A1-H単独よりも良好であった。

【0221】

髄膜炎菌 (i i i)

参考文献1に開示される「5CVMB」ワクチンを構成する3つのポリペプチドを、血清群A、C、W135およびYに対する髄膜炎菌結合体の4価混合物と組み合わせた。混合物に、A1-Hおよび/またはIC31(高濃度または低濃度にて)をアジュバント添加した。殺菌性力価は、血清群A、C、W135およびYのそれぞれからの1つの株を含むパネルに対して、以下のとおりであった：

【0222】

【表4】

	A	C	W135	Y
非免疫化	<16	<16	<16	<16
アジュバントなし	1024	256	128	512
IC31 <sup>high**</sup>	32768	16384	4096	4096
IC31 <sup>low**</sup>	16384	8192	1024	2048
水酸化 Al	16384	8192	1024	4096
Al-H+IC31 <sup>high</sup>	16384	32768	4096	8192
Al-H+IC31 <sup>low</sup>	8192	65536	2048	8192

\*\*本発明の実施形態

よって、血清群Aに対する最良の力価は、IC31単独を用いた場合に見られ、血清群C、W135およびYに対する力価は、A1-H単独を用いた場合よりも高かった。

【0223】

髄膜炎菌 (i v)

参考文献1の髄膜炎菌血清群Bワクチンからの抗原に、MF59、IC31<sup>high</sup>、IC31<sup>low</sup>またはそれらの組み合わせをアジュバント添加した。免疫化したマウスからの血清を、様々な髄膜炎菌株に対するそれらの殺菌活性について試験した。代表的な結果は、以下を含む：

【0224】

10

20

30

40

【表 5】

株→	A	B	C	D	E	F	G	H
IC31 <sup>low**</sup>	1024	256	4096	2048	256	64	512	<16
MF59 + IC31 <sup>low</sup>	4096	1024	4096	2048	1024	128	4096	<16
MF59	32768	1024	32768	4096	2048	128	4096	<16
MF59 + IC31 <sup>high</sup>	8192	2048	8192	32768	2048	128	8192	<16
IC31 <sup>high**</sup>	16384	<b>2048</b>	16384	<b>32768</b>	<b>2048</b>	<b>512</b>	4096	<16

\*\*本発明の実施形態

10

IC31 単独の使用は、株 B、D、E および F において最高の殺菌性力価を、そして株 A、C および G において 2 番目に高い力価を惹起した。

## 【0225】

これらの髄膜炎菌 B タンパク質抗原は、血清群 A、C、W135 および Y 抗原からの結合体化糖抗原とも組み合わせ、同じアジュバント混合物を用いて試験した。各血清群からの試験株に対する殺菌性力価は、以下のとおりであった：

## 【0226】

【表 6】

抗原→	A	C	W135	Y
IC31 <sup>low**</sup>	16384	8192	1024	2048
MF59 + IC31 <sup>low</sup>	4096	8192	4096	8192
MF59	16384	8192	2048	4096
MF59 + IC31 <sup>high</sup>	8192	16384	4096	4096
IC31 <sup>high**</sup>	<b>32768</b>	<b>16384</b>	<b>4096</b>	4096

\*\*本発明の実施形態

20

よって、最高の殺菌性力価は、IC31 を血清群 A、C および W135 について用いた場合に見られた。

## 【0227】

髄膜炎菌 (v)

fHBP の 3 つの変種 (II - III - I の順序) + 961 + 287 - 953 を含有する組成物 (rMenB1 と称する) に、A1 - H、IC31 または IC31 + A1 - H をアジュバント添加した。これらの組成物を、A1 - H をアジュバント添加した 936 - 741 + 961 + 287 - 953 + OMV を含む組成物 (rMenB2) と比較した。

## 【0228】

免疫化したマウスからの血清を、12 の髄膜炎菌株に対するそれらの殺菌性活性について試験した。IC31 単独をアジュバント添加した rMenB1 は、いずれのその他の組成物よりも、試験した 12 の株にわたってより高い % の適用範囲 (coverage) を惹起したことが見出された (例えば rMenB2 についての 50 % の適用範囲と比較して > 90 % の適用範囲)。

40

## 【0229】

本発明は、例としてのみ記載され、本発明の範囲および精神内に留まったまま改変を行うことができることが理解される。

## 【0230】

参考文献

## 【0231】

50

## 【 化 1 】

- [1] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10834-9.
- [2] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- [3] WO00/66741.
- [4] WO99/57280
- [5] Martin *et al.* (1997) *J Exp Med* 185(7):1173-83.
- [6] WO96/29412.
- [7] Perkins-Balding *et al.* (2003) *Microbiology* 149:3423-35.
- [8] WO01/55182.
- [9] WO01/38350.
- [10] WO00/23595.
- [11] Madico *et al.* (2006) *J. Immunol.* 177:501-10.
- [12] Schneider *et al.* (2006) *J. Immunol.* 176:7566-75.
- [13] Ram *et al.* (2003) *J Biol Chem* 278:50853-62.
- [14] WO98/53851
- [15] US-6531131
- [16] WO00/26384.
- [17] US-6645503
- [18] WO03/070282.
- [19] WO94/08021
- [20] WO2004/015099.
- [21] WO2007/144316.

10

20

## 【 0 2 3 2 】

## 【化 2】

- [22] WO2007/144317.
- [23] WO02/09643.
- [24] Katial *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70:702-707.
- [25] US 6,180,111.
- [26] WO01/34642.
- [27] WO2004/019977.
- [28] EP-0011243.
- [29] Fredriksen *et al.* (1991) *NIPH Ann.* 14(2):67-80.
- [30] WO01/91788. 10
- [31] WO2005/004908.
- [32] Maiden *et al.* (1998) *PNAS USA* 95:3140-3145.
- [33] WO98/56901.
- [34] WO2006/081259.
- [35] Claassen *et al.* (1996) 14(10):1001-8.
- [36] WO99/10497.
- [37] Steeghs *et al.* (2001) *The EMBO Journal* 20:6937-6945.
- [38] WO01/52885.
- [39] WO00/25811.
- [40] WO01/09350. 20
- [41] WO02/09746.
- [42] WO02/062378.
- [43] WO2004/014417.
- [44] WO03/105890.
- [45] WO2006/024946
- [46] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [47] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [48] WO98/40100.
- [49] US 6,207,646.
- [50] US 6,239,116. 30
- [51] US 6,429,199.
- [52] WO01/93905.
- [53] WO02/32451.
- [54] Aichinger *et al.* (2008) *Cell Biology International* 32:1449-58.
- [55] Alvarez-Bravo *et al.* (1994) *Biochem J* 302:535-8.
- [56] Nakajima *et al.* (1997) *FEBS Letts* 415:64-66.
- [57] Fritz *et al.* (2004) *Vaccine* 22:3274-84.
- [58] Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24:5461-72.
- [59] Lingnau *et al.* (2007) *Expert Rev Vaccines* 6:741-6.
- [60] WO2004/084938. 40
- [61] Kamath *et al.* (2008) *Eur J Immunol* 38:1247-56.
- [62] Riedl *et al.* (2008) *Vaccine* 26:3461-8.
- [63] Kritsch *et al.* (2005) *J Chromatography B* 822:263-70.
- [64] Lingnau *et al.* (2003) *Vaccine* 20:3498-508.
- [65] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Powell & Newman) 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [66] Clausi *et al.* (2008) *J Pharm Sci* DOI 10.1002/jps.21390
- [67] WO2009/081172.
- [68] Seeber *et al.* (1991) *J Parenteral Sci Technol* 45:156-9.
- [69] WO90/14837.

## 【化 3】

- [70] Podda & Del Giudice (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [71] Podda (2001) *Vaccine* 19: 2673-2680.
- [72] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
- [73] WO2008/043774.
- [74] Allison & Byars (1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [75] Hariharan *et al.* (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [76] US-2007/0014805.
- [77] US-2007/0191314. 10
- [78] Suli *et al.* (2004) *Vaccine* 22(25-26):3464-9.
- [79] WO95/11700.
- [80] US patent 6,080,725.
- [81] WO2005/097181.
- [82] WO2006/113373.
- [83] WO2007/052155.
- [84] WO2008/128939.
- [85] Jones (2001) *Curr Opin Investig Drugs* 2:47-49.
- [86] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-8.
- [87] Lieberman *et al.* (1996) *JAMA* 275:1499-503. 20
- [88] WO02/058737.
- [89] WO03/007985.
- [90] Rennels *et al.* (2002) *Pediatr Infect Dis J* 21:978-979.
- [91] Campbell *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1848-1851.
- [92] Arakere & Frasch (1991) *Infect. Immun.* 59:4349-4356.
- [93] Michon *et al.* (2000) *Dev. Biol.* 103:151-160.
- [94] Rubinstein & Stein (1998) *J. Immunol.* 141:4357-4362.
- [95] WO2005/033148.
- [96] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- [97] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v. 30
- [98] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [99] Zielen *et al.* (2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440.
- [100] Darkes & Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630.
- [101] WO98/51339.
- [102] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [103] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [104] Module 6 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Robertson)
- [105] Sesardic *et al.* (2001) *Biologicals* 29:107-22.
- [106] NIBSC code: 98/560.
- [107] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka). 40
- [108] NIBSC code: 69/017.
- [109] NIBSC code: DIFT.
- [110] Sesardic *et al.* (2002) *Biologicals* 30:49-68.
- [111] NIBSC code: 98/552.
- [112] NIBSC code: TEFT.
- [113] Vanlandschoot *et al.* (2005) *J Gen Virol* 86:323-31.
- [114] WO03/066094.
- [115] WO93/24148.
- [116] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.



## 【化 4】

- [117] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [118] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [119] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [120] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [121] European patent 0477508.
- [122] US patent 5,306,492.
- [123] WO98/42721.
- [124] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
- [125] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- [126] WO96/40242.
- [127] Olafsdottir *et al.* (2009) *Scand J Immunol* 69:194-202.
- [128] Hem & HogenEsch (2007) *Expert Rev Vaccines* 6:685-98.
- [129] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [130] Kamath *et al.* (2008) *PLoS ONE* 3(11):e3683.
- [131] WO2004/032958.

10

## 【配列表】

2013522287000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/051148

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/00 C07K14/22  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/104097 A2 (NOVARTIS AG [CH]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]; SCARSELLI MARIA [IT]; GIULIA) 27 August 2009 (2009-08-27) pages 12,13,15 - page 16; claims 1, 15, 17; sequence 82	1,5-15, 18
Y	----- GIULIANI MARZIA M ET AL: "A universal vaccine for serogroup B meningococcus", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, DC; US, vol. 103, no. 29, 18 July 2006 (2006-07-18), pages 10834-10839, XP002450501, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0603940103 cited in the application Introduction * Results * Discussion ----- -/-	1,5-15, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier 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

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 2011

Date of mailing of the international search report

03/01/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heder, Andreas

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/051148

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	W0 2004/084938 A1 (INTERCELL AG [AT]; BUSCHLE MICHAEL [AT]; HABEL ANDRE [AT]; FRITZ JOERG) 7 October 2004 (2004-10-07) cited in the application -----	1,5-15, 18
A	W0 2004/032958 A1 (CHIRON SRL [IT]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]) 22 April 2004 (2004-04-22) cited in the application -----	1,5-15, 18
A	RIEDL K ET AL: "The novel adjuvant IC31<(>R) strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 26, no. 27-28, 25 June 2008 (2008-06-25), pages 3461-3468, XP022710553, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2008.04.029 [retrieved on 2008-05-05] cited in the application -----	1,5-15, 18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/051148

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009104097	A2	27-08-2009	AU 2009215364 A1
		CA 2716212 A1	27-08-2009
		EP 2245048 A2	03-11-2010
		US 2011020390 A1	27-01-2011
		WO 2009104097 A2	27-08-2009
-----			
WO 2004084938	A1	07-10-2004	AT 485056 T
		AU 2004224746 A1	15-11-2010
		AU 2009202420 A1	07-10-2004
		CA 2517673 A1	09-07-2009
		EP 1608402 A1	07-10-2004
		EP 2345420 A1	28-12-2005
		EP 2345420 A1	20-07-2011
		JP 4676426 B2	27-04-2011
		JP 2006521320 A	21-09-2006
		JP 2011042678 A	03-03-2011
		US 2006263386 A1	23-11-2006
		US 2010297170 A1	25-11-2010
		WO 2004084938 A1	07-10-2004
-----			
WO 2004032958	A1	22-04-2004	AT 492288 T
		AU 2003274511 A1	15-01-2011
		BR 0315228 A	04-05-2004
		CA 2501812 A1	11-04-2006
		DK 1549338 T3	22-04-2004
		EP 1549338 A1	28-03-2011
		EP 2351579 A1	06-07-2005
		EP 2353608 A1	03-08-2011
		EP 2353608 A1	10-08-2011
		JP 4697706 B2	08-06-2011
		JP 2006512402 A	13-04-2006
		JP 2010215628 A	30-09-2010
		MX PA05003863 A	08-09-2005
		NZ 562998 A	30-05-2008
		PT 1549338 E	23-02-2011
		SI 1549338 T1	29-04-2011
		US 2006171957 A1	03-08-2006
		WO 2004032958 A1	22-04-2004
-----			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2011/051148

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☐  
☒

on paper

in electronic form

b. (time)

☒  
☐  
☐

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IB2011/051148**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 15, 18(completely); 5-14(partially)

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/ IB2011/ 051148

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 1, 15, 18(completely); 5-14(partially)

Immunogenic composition comprising (i) meningococcal serogroup B antigen, and (ii) adjuvant comprising oligonucleotide and polycationic polymer (peptide) but no aluminum salt or oil-in-water emulsion

Technical problem: provision of immunogenic composition comprising a meningococcal serotype B antigen and an oligonucleotide and polycationic polymer but no aluminum salt or oil-in-water emulsion as adjuvants

---

2. claims: 2, 17(completely); 4-14(partially)

Immunogenic composition comprising (i) meningococcal serogroup B antigen, (ii) adjuvant comprising oligonucleotide and polycationic polymer (peptide), and (iii) one or more further antigens

Technical problem: provision of immunogenic composition comprising a meningococcal serotype B antigen and further antigen(s), and an oligonucleotide and polycationic polymer as adjuvants

---

3. claims: 3, 16(completely); 4-14(partially)

Immunogenic composition comprising (i) purified meningococcal lipooligosaccharide, and (ii) adjuvant comprising oligonucleotide and polycationic polymer (peptide)

Technical problem: provision of immunogenic composition comprising a meningococcal lipooligosaccharide, and an oligonucleotide and polycationic polymer as adjuvants

---

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/10	
A 6 1 K 39/116 (2006.01)	A 6 1 K 39/116	
A 6 1 K 39/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/13	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	
A 6 1 K 39/295 (2006.01)	A 6 1 K 39/295	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G
C 0 7 K 14/22 (2006.01)	C 0 7 K 14/22	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	

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

(72)発明者 オハーガン, デレク  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, シドニー ストリート 4  
5, ノバルティス ヴァクシンズ

(72)発明者 ラブオーリ, リーノ  
イタリア国 イ - 53100 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴ  
ァクシンズ

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 HA17  
4C085 AA03 AA04 AA38 BA10 BA12 BA13 BA16 BA17 BA53 BA88  
BA89 BA90 CC07 CC08 DD86 EE01 EE03 EE06 FF02 FF12  
FF13 FF17 FF30  
4H045 AA30 BA10 BA16 CA11 DA86 EA31