

(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2007-516181****(P2007-516181A)**(43) 公表日 **平成19年6月21日(2007.6.21)**

(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	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/39	
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)		

(21) 出願番号	特願2006-517573 (P2006-517573)	(71) 出願人	505222705
(86) (22) 出願日	平成16年6月23日 (2004. 6. 23)		アヴェンティス パストゥール インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月24日 (2006. 2. 24)		AVENTIS PASTEUR, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/020121		アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 18370 スウィフトウォーター ディスカヴァリー ドライヴ
(87) 国際公開番号	W02005/000345	(74) 代理人	100073184
(87) 国際公開日	平成17年1月6日 (2005. 1. 6)		弁理士 柳田 征史
(31) 優先権主張番号	60/480, 925	(74) 代理人	100090468
(32) 優先日	平成15年6月23日 (2003. 6. 23)		弁理士 佐久間 剛
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 髄膜炎菌血清群AおよびCに対する免疫方法

## (57) 【要約】

本発明は、病原性細菌の髄膜炎菌血清群AおよびCにより引き起こされる髄膜炎菌疾患に対する防御を提供する結合ワクチンを使用して患者を免疫化する方法を説明する。このワクチンは、ワクチンの単回投与として調製される少なくとも2つの別個の多糖-タンパク質複合体を含む。髄膜炎菌血清群AおよびCの精製された莢膜多糖は、化学的に活性化され、共有化学結合により担体タンパク質に選択的に結合され、幼児において様々の髄膜炎菌株に対する長期間の免疫性を誘発することができる多糖-タンパク質複合体を形成する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者中で髄膜炎菌の莢膜多糖AおよびCに対する免疫応答を誘発する方法であって、免疫学的有効量のアルミニウムを含まない免疫組成物を患者に投与する工程を有し、前記組成物が2つのタンパク質 - 多糖複合体を含み、第1の複合体が1つ以上の担体タンパク質に結合した髄膜炎菌の血清群Aの莢膜多糖を含み、第2の複合体が1つ以上の担体タンパク質に結合した髄膜炎菌の血清群Cの莢膜多糖を含むことを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

前記担体タンパク質が、ジフテリアトキソイドであることを特徴とする請求項1記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記担体タンパク質および多糖が、リンカーと共有結合していることを特徴とする請求項2記載の方法。

## 【請求項 4】

前記リンカーが、アジピン酸ジヒドラジドであることを特徴とする請求項3記載の方法。

## 【請求項 5】

前記莢膜多糖AおよびCが、5から100kDaまでの平均サイズを有することを特徴とする請求項1記載の方法。

## 【請求項 6】

前記莢膜多糖AおよびCが、10から75kDaまでの平均サイズを有することを特徴とする請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記莢膜多糖AおよびCが、10から50kDaまでの平均サイズを有することを特徴とする請求項1記載の方法。

## 【請求項 8】

前記莢膜多糖AおよびCが、10から30kDaまでの平均サイズを有することを特徴とする請求項1記載の方法。

## 【請求項 9】

前記莢膜多糖AおよびCが、10から25kDaまでの平均サイズを有することを特徴とする請求項1記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記組成物が、アジュバントを含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

## 【請求項 11】

前記免疫組成物が、単回投与で患者に投与されることを特徴とする請求項1記載の方法。

## 【請求項 12】

前記患者が、前記免疫組成物が投与される際に12ヶ月未満であることを特徴とする請求項11記載の方法。

## 【請求項 13】

前記免疫組成物が、ジフテリア、破傷風、ポリオウィルス、または百日咳に対するワクチンの投与と同日にまたは6ヶ月以内に投与されることを特徴とする請求項1記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記免疫組成物が、ジフテリア、破傷風、ポリオウィルス、または百日咳に対するワクチンの投与と同日にまたは3ヶ月以内に投与されることを特徴とする請求項13記載の方法。

## 【請求項 15】

前記免疫組成物が、ジフテリア、破傷風、ポリオウィルス、または百日咳に対するワクチンの投与と同日にまたは1ヶ月以内に投与されることを特徴とする請求項14記載の方

50

法。

【請求項 16】

前記免疫組成物が、ジフテリア、破傷風、ポリオウイルス、または百日咳に対するワクチンの投与と同日に投与されることを特徴とする請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

前記ワクチンが、ポリオウイルスタイプ 1、2 または 3 であることを特徴とする請求項 14 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全開示内容がここに言及することにより完全に引用される、2003年6月23日出願の米国仮特許出願第60/480,925号に優先権を主張する。

【0002】

本発明は、概して、医学の分野に関するものであり、より詳細には、細菌学、免疫学、ワクチン、および免疫による細菌性病原菌感染の防止に関するものである。

【背景技術】

【0003】

髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)は、世界中において細菌性髄膜炎および敗血症の主な原因である。ここ30年の間における特有の髄膜炎菌性疾患の発生率は、先進国で100,000人当たり1から5人の範囲であり、開発途上国では100,000人当たり10から25人の範囲である(Reido, F.X., et al. 1995)。米国では、1年当たり約2,600症例の細菌性髄膜炎が発生し、開発途上国では平均で330,000症例である。致死率は10%から20%に及ぶ。

【0004】

病原性髄膜炎菌は、生物の外膜表面に結合した多糖莢膜によって包まれている。莢膜多糖の免疫学的特異性に基づいて、13の異なる髄膜炎菌血清群が同定された(Frasch, C.E., et al. 1985)。それら13の血清群の中で5つが、髄膜炎菌性疾患の大部分の原因となる；そのような血清群として、血清群A、B、C、W135、およびYが挙げられる。血清群Aは、ほとんどの伝染性疾患の原因である。血清群B、C、およびYは大部分の風土病および局在化された発生の原因である。

【0005】

ヒト鼻 - 口腔咽頭粘膜は、髄膜炎菌の唯一の公知の天然の貯蔵所である。鼻咽頭の粘膜細胞および上皮組織の外面の両方で定着が生じる。髄膜炎菌の運搬は数ヶ月の間続くであろう。髄膜炎菌の拡散は、直接的接触または空気飛沫を介して生じる。髄膜炎菌は、エンドサイトーシスの結果として、食胞によって粘膜上皮を通過することによって侵襲性になる。侵襲性髄膜炎菌の宿主防御は、補体介在性溶菌に依存する。補体介在性溶菌を担う血清抗体は、主に、外側の莢膜多糖に対するものである。

【0006】

莢膜多糖に対する免疫応答を誘導する、髄膜炎菌多糖に基づくワクチンについて記載する。それら抗体は、血清群特異的な髄膜炎菌の補体介在性溶菌をもたらす能力を有する。髄膜炎菌多糖ワクチンは、子供および成人において有効であることが示された(Peltola, H., et al. 1977; Artenstein, M.S., et al. 1970)が、その有効性は乳児および幼児では限られていた(Reingold, A.L., et al. 1985)。若い集団において多糖を後日に追加投与すると、弱い既往応答を誘導するかまたは全く既往応答を誘導しなかった(Goldschneider, I., et al. 1973; Gold, R., et al. 1977)。髄膜炎菌多糖ワクチンによって誘導された防御の期間は長続きせず、大人および4才を超える子供では約3年から5年の間と推定された(Brandit, B., et al. 1975, Kaeyhty, H., et al. 1980; Ceessay, S.J., et al. 1993)。1才から4才までの子供に関しては、防御の期間は3年未満である(Reingold, A.L., et al. 1985)。

【0007】

10

20

30

40

50

多糖は、T-ヘルパーリンパ球への抗原提示および刺激の必須条件である主要組織適合複合体分子に結合する能力がなく、すなわちT細胞非依存性抗原である。多糖は、T-ヘルパーリンパ球の助けなしに、抗体産生のためにBリンパ球を刺激することができる。Bリンパ球のT非依存性刺激の結果、それら抗原による免疫の後に生じる記憶誘導を欠く。多糖抗原は、大人では非常に効果的なT-依存性応答を誘導できるが、そのようなT依存性応答は、乳児および幼児の未熟な免疫系では弱い。

【0008】

多糖をタンパク質分子(「担体」または「担体タンパク質」)に共有結合させることによって、T-非依存性多糖抗原を、T依存性抗原に変換させることができる。複合ワクチンの多糖成分に結合するB細胞は、共役担体タンパク質の部分であるペプチドに特異的なヘルパーT細胞によって活性化され得る。担体タンパク質に対するT-ヘルパー応答は、多糖に対する抗体産性を増大させる働きをする。担体タンパク質への結合は、多糖に対する記憶を誘発できるワクチンを常に生じるものではない。

10

【0009】

MacLennan et al.には、6ヶ月未満の幼児に与えられた髄膜炎菌A/Cアジュバント複合体ワクチンの研究が記載されている。MacLennan, J. et al., J. Infect. Dis. 2001; 183: 97-104。複合体ワクチンは、各多糖11 $\mu$ gおよび1mgの水酸化アルミニウムで賦活されたCRM197の49 $\mu$ gを含有した。子供が18-24ヶ月の場合には各多糖または複合体を50 $\mu$ g含有する髄膜炎菌A/C多糖ワクチンで子供を追加免疫し、約5歳の時に各多糖を10 $\mu$ g含有する単一の髄膜炎菌A/Cワクチンを再接種する。ワクチン接種時およびワクチン接種10日後に血液サンプルを採取する。著者は、ワクチン接種前群A抗体濃度は全ての群で高いことに言及し、このワクチンの群A成分への免疫記憶が最終的に証明されたとは考えないと結論付けた。

20

【0010】

特許文献1には、担体タンパク質に結合された修飾された群C髄膜炎菌多糖(GCMP)を含む免疫複合体が記載される。GCMPは、様々の程度にO-脱アセチル化により修飾される。特許文献1には、OAc+菌株からの群C多糖中のシアリル成分の位置7および/または8におけるO-アセチル基の選択的な除去は、適切な試薬による処理によって髄膜炎菌群C多糖から様々の程度であることが記載される。

【0011】

アジピン酸ジヒドラジドスペーサーを使用して多糖-タンパク質複合体を産生する方法は、非特許文献1およびLance K. Gordonの特許文献2に記載される。非特許文献2に記載される2スペーサー技術のような他のリンカー方法およびAndersonにより特許文献3に記載されるような還元端方法(reducing ends methodology)が知られている。

30

【0012】

血清群Bの多糖は、人口母集団において、非免疫原性であることが示されている(Wyle, F.A., et al. 1972)。その血清群の多糖をタンパク質に化学結合させても、実験動物における免疫応答は有意に変化しなかった(Jennings, H.J., et al. 1981)。その血清群の多糖に対する免疫応答の欠如の理由は、血清群Bの多糖と例えば神経細胞接着分子のようなポリシアリル化宿主糖タンパク質との間の構造類似性によると考えられている。

40

【0013】

血清群Cの多糖に基づく髄膜炎複合ワクチンについても記載されている。その一価ワクチンは、血清群Cに相当する髄膜炎菌の菌株に存在する莢膜多糖に対する強い機能的抗体反応を誘導する。そのようなワクチンは、血清群Cの細菌によって生じる病気に対してのみ防御することができる。

【特許文献1】米国特許第5,425,946号明細書

【特許文献2】米国特許第4,644,059号明細書

【特許文献3】米国特許第4,673,574号明細書

【非特許文献1】Schneerson, R., et al, Preparation, Characterization and Immunogenicity of Haemophilus Influenzae Type b Polysaccharide-Protein Conjugates, J. Exp. Med

50

.,1952,361-476(1980)

【非特許文献2】Marburg,S.,et al, " Biomolecular Chemistry of Macromolecules:Synthesis of Bacteial Polysaccharide Conjugates with Neisseria meningitides Membrane Protein" ,J.Am.Chem.Soc.,108,5282-5287(1986)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

髄膜炎菌多糖に基づく既存のワクチンは、幼児においてその使用が限定されており、大人においても長期間の防御をもたらすことはできない。子供を含む、髄膜炎菌感染の危険を有する全ての群で長期間の防御を誘導できることが示された唯一のワクチンである髄膜炎菌ワクチンは、単一の髄膜炎菌血清群由来の多糖に基づいており、他の血清群の細菌の感染に対して防御をもたらさない。従って、髄膜炎菌感染の危険を有する子供および大人において髄膜炎菌性疾患に対する広範で持続する防御をもたらすことができる髄膜炎菌複合ワクチンへの必要性が存在する。本発明の多価髄膜炎菌多糖は、髄膜炎菌の主要な病原性血清群由来の免疫原性多糖を、担体タンパク質に結合させてT依存性抗原に変えたワクチン製剤を提供することによって、その必要性を解決する。

10

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、病原性髄膜炎菌血清群AおよびCにより起こる病気を、アルミニウムを含まない髄膜炎菌多糖 - タンパク質複合体を含む組成物の投与により防止する方法を提供する。

20

【0016】

本発明は、ヒトに免疫学的有効量の免疫組成物を投与することにより髄膜炎菌の莢膜多糖血清群AおよびCに対する免疫応答を誘発する方法を提供する。免疫組成物は、少なくとも2つの別個のタンパク質 - 多糖複合体であって、担体タンパク質に直接またはリンカーにより結合された血清群Aの莢膜多糖を含む第1の複合体、および担体タンパク質に直接またはリンカーにより結合された血清群Cの莢膜多糖を含む第2の複合体を含む多価髄膜炎菌ワクチンである。免疫組成物は、アルミニウムを含まない。免疫組成物は、アルミニウムを含まないアジュバントまたは防腐剤のような他の化合物を含んでもよい。

【0017】

全ての特許、特許出願、およびここに記載される他の刊行物は、参照によりここに完全に引用される。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明は、それぞれ担体タンパク質に結合した血清群AおよびCの莢膜多糖を含みアルミニウムを含まない免疫組成物の免疫学的有効量をヒトに投与することにより、髄膜炎菌の血清群AおよびCの莢膜多糖に対する免疫応答を誘発する方法を知供する。血清群AおよびCの莢膜多糖は好ましくは、個々に担体タンパク質に結合する。結合は、多糖と担体タンパク質との間の直接の化学結合でもよく、また多糖および担体タンパク質がそれぞれ化学的リンカー分子を介する間接的な結合でもよい。多糖がまずリンカー分子に共有結合され、次に担体タンパク質がリンカー分子に共有結合されてもよい。あるいは、担体タンパク質がまずリンカー分子に共有結合され、次に多糖がリンカー分子に共有結合されてもよい。免疫組成物は、アルミニウムを含まないアジュバントまたは防腐剤のような他の化合物を含んでもよい。

40

【0019】

髄膜炎菌血清群AおよびCの莢膜多糖を調製する方法は、髄膜炎菌多糖を含有するワクチンが長年使用許諾されているので、当該技術においてよく知られている。例えば、髄膜炎菌の血清群Aから莢膜多糖を得る方法は、Gotschlich et al.,Prog.Immunobiol.Standard.(1972)5:485に記載される方法を使用するMoreauの米国特許第6,045,805号に記載されている。米国特許第6,045,805号には、多糖を解重合し、クロマトグラフィカラムからより小さいオリゴ糖を溶出することにより、大きい天然の多糖からオリゴ糖を調製することが記

50

載されている。オリゴ糖は、例えばアセトンまたはアルコールのような適切な沈殿剤を使用する沈殿により、適切な分離閾値を有する膜における濾過により、排除 - 拡散によりまたはイオン交換クロマトグラフィにより、多くの従来技術を使用して単離してもよい。次に、平均溶出定数と等しいまたはそれに近い溶出定数を有する分子を含有するオリゴ糖分画を得る。

#### 【0020】

本発明による多糖は、共有結合により、ペプチドまたはタンパク質の化合物と、または例えばポリアクリレートのような別の有機ポリマーと結合して、実質的に哺乳類中で多糖の免疫原性を促進することができる複合体を形成してもよい。多糖は細菌性タンパク質に結合されるのが好ましく、より好ましくは、細菌毒素、対応するアナトキシンまたは多重結合毒素のサブユニット並びに膜タンパク質、多重結合膜タンパク質または細胞質タンパク質のサブユニットに結合してもよい。好ましい毒素は、破傷風毒素、これら毒素、百日咳毒素およびジフテリア毒素を含む。これらのタンパク質は、元の細菌から抽出してもよく、あるいは組換えにより産生してもよい。

10

#### 【0021】

多糖 - たんぱく質複合体を調整する化学的方法がよく知られている。例えば、担体タンパク質の官能基と反応することができる官能基をオリゴ糖で作成してもよい。二官能性カップリング剤をオリゴ糖と反応させ、次に担体タンパク質と反応させてもよく、逆もどうようである。W.E.Dick and M.Berurret in *Conjugates Vaccines*, J.M.Cruse, R.E.Lewis Jr Eds, *Contrib. Microbiol. Immunol. Basel*, Karger (1989) 10:48は、これらの様々の結合方法を提供する。さらに、酸化 - 還元分解工程は、還元基を特に髄膜炎菌群Aの多糖に由来するオリゴ糖に導入する。

20

#### 【0022】

好ましい実施形態において、それら髄膜炎菌血清群複合体は別個の工程で調製され、単回投与形態に製剤化される。例えば、髄膜炎菌血清群AまたはC由来の莢膜多糖を別個に精製する。

#### 【0023】

本発明の好ましい実施の形態において、精製されたAおよびC多糖は、担体タンパク質に結合させる前に別個に解重合され別個に活性化される。好ましくは、髄膜炎菌の血清群AおよびCの莢膜多糖は部分的に解重合される。

30

#### 【0024】

多糖の解重合または部分的解重合に続いて、活性化工程を実施する。「活性化」とは、担体タンパク質と反応し得る化学基を提供するための多糖の化学的処理を意味する。好ましい活性化法は、生理食塩水 (pH5.0±0.1) 中のアジピン酸ジヒドラジドで、15 から30分で約2時間処理することを含む。活性化のためのある方法が米国特許第5,965,714号に記載される。

#### 【0025】

活性化されると、莢膜多糖を1以上の担体タンパク質に結合させることができる。本発明の好ましい実施形態では、各AおよびC莢膜多糖は、個々に単一の担体タンパク質種に結合され、より好ましくは、それぞれ同じ担体タンパク質に結合される。

40

#### 【0026】

担体タンパク質として、ジフテリアトキソイド、CRM197、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、大腸菌LT、大腸菌ST、および緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の外毒素Aのような不活化細菌毒素が挙げられる。例えば外膜複合体c (OMPC)、ポーリン、トランスフェリン結合タンパク質、肺炎球菌表面プロテインA (PspA)、または肺炎球菌アドヘシンタンパク質 (PsaA) のような細菌外膜タンパク質を担体タンパク質として用いてもよい。例えば、オボアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、または精製ツベルクリンタンパク質 (PPD) のような他のタンパク質を担体タンパク質として用いてもよい。好ましくは、担体タンパク質は非毒性でかつ非反応誘導性 (non-reactogenic) であり、さらに十分な量および純度で得ることができるような

50

タンパク質である。担体タンパク質は、標準的結合方法によって使用できるものでなければならぬ。本発明の好ましい実施形態では、培養ジフテリア菌(*Corynebacteria diphtheriae*)から精製したジフテリア毒素をホルムアルデヒドで化学的に無毒化したものを担体タンパク質として用いる。

**【0027】**

莢膜多糖を担体タンパク質に結合させた後、様々な技術によって多糖 - タンパク質複合体を精製することができる(多糖 - タンパク質複合体の量を高める)。精製工程の1つの目標は、多糖 - タンパク質複合体から、非結合多糖を除去することである。硫酸アンモニウム(硫酸)の存在下での限外濾過を含む、1つの精製方法は、米国特許第6,146,902号に記載されている。あるいは、特にサイズ排除クロマトグラフィー、密度勾配遠心、疎水性相互作用クロマトグラフィー、または硫酸分画等の任意の数の標準的技術によって、未反応のタンパク質および多糖から複合体を精製して取り出すこともできる。例えば、P.W. Anderson, et al. (1986), *J. Immunol.* 137: 1181-1186およびH.J. Jennings and C. Lugowski (1981) *J. Immunol.* 127: 1011-1018を参照。

10

**【0028】**

多糖と担体タンパク質との複合体形成の後、様々な多糖 - タンパク質複合体を結合させることによって、本発明の免疫組成物を作成する。本発明の免疫組成物は、1以上の担体タンパク質に結合した2以上の異なる莢膜多糖を含む。本発明の好ましい実施形態は、別個にジフテリアトキソイド結合した血清群AおよびCの髄膜炎菌由来の莢膜多糖を含む2価免疫組成物である。

20

**【0029】**

組成物中の多糖の全量は、約0.5から約50 $\mu$ gの多糖、より好ましくは約2から約30 $\mu$ gの多糖、およびより好ましくは約5から約20 $\mu$ gの多糖を含む。与えられた組成物中のAおよびC多糖の相対的な量は変化してもよいが、好ましくは、約25%の相違内、より好ましくは約15%の相違内で等量で存在し、あるいは、A:C多糖の割合が1:3から3:1まで、より好ましくは1:2から2:1までの範囲で存在する。

**【0030】**

担体タンパク質の調製および使用、ならびに様々な可能な結合方法は当業者に周知である。本発明に含まれる教示、ならびに通常の文献で容易に利用できる情報を用いて、当業者は本発明の複合体を調製することができる。以下の任意の特許文献またはそれらの全てからガイダンスを得ることができる(米国特許第4,356,170号、米国特許第4,619,828号、米国特許第5,153,312号、米国特許第5,422,427号、米国特許第5,445,817号(参照によってそれらの教示は全て本明細書に含まれる))。

30

**【0031】**

組成物中の担体タンパク質の全量は、約20から約75 $\mu$ gの担体タンパク質、およびより好ましくは約30から約50 $\mu$ gの担体タンパク質を含む。

**【0032】**

異なる髄膜炎菌血清群から別個に多糖 - タンパク質複合体を調製し、その後で複合体を結合させることによって、本発明の免疫組成物を作成する。本発明の免疫組成物をワクチンとして用いることができる。本発明のワクチンの処方当業技術を用いて達成することができる。本発明のワクチン組成物は、1以上のアジュバントを含んでいてもよい。アジュバントとして、限定はされないが、例えば、アルミニウムアジュバント、フロイントアジュバント、BAY、DC - chol、pcpp、モノホスホリルリピドA、CpG、QS - 21、コレラ毒素、およびホルミルメチオニルペプチドが挙げられる。例えば、Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995(M.F. Powell and M. J. Newman, eds., Plenum Press, NY)を参照。

40

**【0033】**

本発明は、患者、好ましくはヒト患者中で免疫応答を誘発する方法に関する。

**【0034】**

以下に記載のように、本発明に基づくワクチンおよび免疫組成物は、様々な動物モデル

50

においてT-依存性様免疫応答(T-dependent-like immune response)を誘導するが、多糖ワクチンはT-非依存性様免疫応答を誘導する。したがって、本発明の組成物は、髄膜炎菌抗原に対するT依存性様免疫応答に関連する生物学的経路およびプロセスを研究するための有用な研究手段でもある。

#### 【0035】

ヒトまたは動物に投与するための本発明のワクチンの量および投薬計画は、特定の抗原、アジュバント(もし存在する場合には)、特定動物または患者の年齢、性別、体重、種、および状態、ならびに投与経路のような因子を考慮して、医療または獣医の分野の当業者に周知の標準的技術に従って特定することができる。本発明において、髄膜炎菌に対するワクチン接種のために効果用量を提供するための多糖-担体タンパク質の量は、約0.02  $\mu\text{g}$ から約5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の間の量であってよい。本発明の好ましい組成物および方法において、用量は約0.1  $\mu\text{g}$ から3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重である。例えば、効果用量は、感染後の経過時間が短い場合には、細菌の増殖時間があまりないため、より少ない抗体を必要とするであろう。同様に、効果用量は、診断時における細菌量に依存するであろう。数日間に亘る複数注射も治療的慣用法である。

10

#### 【0036】

本発明は、髄膜炎菌莢膜多糖AおよびCに対する抗髄膜炎菌免疫応答をヒト患者中で追加免疫する方法を提供する。本発明の方法は通常、担体タンパク質に結合した髄膜炎菌莢膜多糖AおよびC複合体を含むアルミニウムを含まない多糖-タンパク質複合体ワクチン組成物、例えばA/C複合体ワクチンを使用する一次ワクチン摂取を必要とする。好ましい実施の形態において、髄膜炎菌血清群AおよびCについて特異的な抗髄膜炎菌免疫応答をワクチン接種された患者中で誘発するために、単一の一次ワクチン接種で十分である。一次ワクチン接種により誘発された免疫応答が防御レベル下に低下した後、追加免疫ワクチン接種を行い、追加免疫された抗髄膜炎菌免疫応答を提供する。追加免疫ワクチン接種は、髄膜炎菌AおよびC多糖ワクチン、または担体タンパク質に結合された髄膜炎菌AおよびC、例えばA/C複合体ワクチンでもよい。

20

#### 【0037】

本発明の多価複合体を単回投与でまたは連続して(すなわち、「追加免疫」する)投与してよい。例えば、現在小児疾患を予防するのに他のワクチンで推奨されているように、出生後早期に子供に単回投与し、その後、10年後までに追加投与してもよい。好ましくは、患者は1歳の前に単回投与で免疫化される。本発明により、本発明のA/C複合体ワクチンによる免疫化は、DTPおよびOPVのような他の子供のワクチンと付随して安全に投与してもよいことが示される。

30

#### 【0038】

追加投与は、初回抗原刺激を受けたB細胞から抗体を産生させるであろう(すなわち既往反応)。すなわち、多価複合ワクチンは、認可されている多糖ワクチンと比較して、若い集団において、高い初回(すなわちワクチンの単回投与後)機能的抗体反応を誘導し、さらに既往反応(すなわち、追加投与後)を誘導することができ、本発明の多価複合ワクチンによって誘導された防御免疫応答が永続することを立証する。

#### 【0039】

本発明の組成物は、例えば、懸濁液、シロップまたはエリキシル剤のような、例えば口、鼻、肛門、膈、胃内、粘膜(例えば舌粘膜、歯槽粘膜、歯肉粘膜、嗅粘膜、または呼吸粘膜)等のような開口部投与用の液体製剤;ならびに例えば滅菌懸濁液またはエマルジョンのような、非経口、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内投与(例えば注射による投与)用の製剤を含んでいてよい。静脈内投与および非経口投与が好ましい。そのような組成物は、例えば滅菌水、生理食塩水、グルコース等のような適切なキャリアー、希釈剤、または賦形剤との混合剤であってもよい。本組成物は凍結乾燥してもよい。本組成物は、所望の投与経路および製剤に応じて、例えば湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、ゲル化または粘膜増強添加剤、防腐剤、香味料、着色剤等のような補助物質を含んでいてよい。"PEMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985(参照によって本明細書中に含

40

50

まれる)のような標準的教科書は、実験無しに適切な製剤を調製することについて記載している。

#### 【0040】

本発明の組成物は、通常、選択されたpHに緩衝化され得る、例えば等張水溶液、懸濁液、エマルジョンまたは粘性組成物として提供される。消化管吸収が好ましい場合、本発明の組成物は、丸薬、錠剤、カプセル、カプレット等の「固形」であってよく、例えばゼラチンで液剤を被覆し、消化管への輸送のためにゼラチンが胃で溶解するような、徐放性または液剤充填「固形」製剤を含む。鼻または呼吸(粘膜)投与が望ましい場合、組成物は、高圧スプレイドispenser、ポンプdispenser、またはエアゾルdispenserによって分配されるものであってよい。エアゾルは、通常、炭化水素によって圧力を掛けられている。ポンプdispenserは、好ましくは、定量または特定の粒子サイズを有する分量を分配することができる。

10

#### 【0041】

液体製剤は、通常、ゲル、他の粘性組成物、および固形組成物よりも容易に調製できる。さらには、液体組成物は、特に注射または経口投与によって、子供、特により小さな子供、ならびに丸薬、錠剤、カプセル等を飲み込むのが困難である他の対象に投与したり、あるいは複数回投与するのにより都合がよい。一方、粘性組成物は、適切な粘度範囲内に処方されて、例えば胃粘膜または鼻粘膜のような粘膜とのより長い接触期間をもたらすことができる。

#### 【0042】

明らかに、適切な担体および他の添加剤の選択は、正確な投与経路、ならびに、例えば組成物を溶液、懸濁液、ゲル、または別の液剤に処方すべき場合の液体剤形、または例えば組成物を丸薬、錠剤、カプセル、カプレット、徐放性形態または液剤充填形態に処方すべき場合の固形剤形のような特定剤形の性質に依存するであろう。

20

#### 【0043】

溶液、懸濁液、およびゲルは、通常、活性原料に加えて、大量の水(好ましくは精製水)を含む。例えばpH調節剤(例えばNaOHのような塩基)、乳化剤または分散剤、緩衝剤、防腐剤、湿潤剤、ゼリー化剤(jelling agent)(例えばメチルセルロース)、着色剤および/または香味剤のような他の少量の原料も含んでいてよい。本組成物は等張であってよく、すなわち、血液および涙液と同じ浸透圧を有していてよい。

30

#### 【0044】

本組成物の等張性は、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコール、または他の無機または有機溶液を用いて達成できる。ナトリウムイオンを含有するバッファーでは、塩化ナトリウムが特に好ましい。

#### 【0045】

薬剂的に許容される濃化剤を用いて、本組成物の粘度を選択レベルに維持することができる。メチルセルロースは容易かつ経済的に利用でき、さらに取り扱いが容易であるため、メチルセルロースが好ましい。他の適切な濃化剤として、例えば、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマー等が挙げられる。濃化剤の好ましい濃度は、選択された薬剤に依存するであろう。重要な点は、選択した粘度を達成するような量を用いることである。粘性組成物は、通常、そのような濃化剤の添加によって溶液から調製される。

40

#### 【0046】

組成物の貯蔵期間を延ばすため、薬剂的に許容される防腐剤を用いることができる。ベンジルアルコールが適切であるが、例えば、パラベン、チメロサル、クロロブタノール、または塩化ベンザルコニウム等を含む様々な防腐剤も用いることができる。適切な防腐剤の濃度は、全重量に基づき0.02%から2%であるが、選択された薬剤に依存して適当に変動するであろう。

#### 【0047】

当業者は、本組成物の成分が、髄膜炎菌多糖-担体タンパク質複合体に対して化学的に

50

不活性となるように選択されなければならないことを認識するであろう。

【0048】

本発明思想の好ましい実施形態を詳細に示す以下の例示的でかつ非限定的な実施例を参照することによって、本発明をさらに説明する。本発明の他の実施例は、本発明の精神を逸脱することなく、当業者に明白であろう。

【実施例1】

【0049】

髄膜炎菌血清群AおよびCの精製莢膜多糖粉末の調製

粗製粉末の調製

髄膜炎菌血清群AおよびCの湿式凍結種細胞を解凍し、液体ワトソン・シャープ(Watson Scherp)培地を用いて解凍および回収し、ミュラー・ヒントン寒天培地を含むブレイクボトル(Blake bottle)に播いた。ブレイクボトルを35 から37 でCO<sub>2</sub> 雰囲気中において15時間から19時間インキュベートした。インキュベーション時間に続いて、ブレイクボトルから増殖細胞を取り除き、ワトソン・シャープ培地を含む4Lフラスコに添加した。プラットフォームシェーカーにおいて、フラスコを35 から37 で3時間から7時間インキュベートした。4Lフラスコの内容物を、ワトソン・シャープ培地含有発酵容器に移した。栄養補助物質の供給および消泡剤の添加によって溶解酸素含量およびpHを制御しながら、発酵容器を35 から37 で7時間から12時間インキュベートした。インキュベーション時間後に、発酵容器の内容物を500Lタンクに移し、セタブロン(Cetavlon)(登録商標)を添加し、さらに1時間混合した。セタブロン処理増殖細胞を、約15,000から17,000×gで、約30から70リットル/時間の流速で遠心した。第2のセタブロン沈殿で上清から粗多糖を沈殿させた。セタブロンを上清に添加し、室温で1時間以上混合した。材料を1 から5 で8時間から12時間保管した。約45,000から50,000×gで、300から400ml/分の流速で遠心して、沈殿多糖を採取した。集めたペーストをさらに加工するまで-60 以下で保管した。不活性のペーストをいくつかのバッチで調製し結合してもよい。

【0050】

精製多糖粉末の調製

不活化ペーストを解凍し、ブレンダーに移した。ペーストを0.9M塩化カルシウムと混合して、均一な懸濁液を得た。懸濁液を約10,000×gで15分間遠心した。上清をリントフリーのパッドを通して、第1抽出物として静かに容器に注いだ。第2容量の0.9M塩化カルシウムをペーストに添加し、さらに混合して均一懸濁液を得た。懸濁液を上記のように遠心して、その上清を第1抽出から得た上清と混ぜ合わせた。全体で4回の抽出を実施し、上清をプールした。10-30kDAMWCO渦巻状限外濾過ユニットを用いて限外濾過することによって、プールした抽出物を濃縮した。

【0051】

塩化マグネシウムを濃縮物に添加して、水酸化ナトリウムを用いてpHを7.2から7.5に調整した。DNaseおよびRNaseを濃縮物に添加し、25 から28 で、混和させながら、4時間インキュベートした。30%から50%までエタノールを添加した。沈殿した核酸およびタンパク質を、10,000×gで2時間遠心することによって除去した。上清を回収し、80%までアルコールを添加することによって沈殿した多糖を、1から5 で1晩放置した。アルコールを吸い上げ、沈殿多糖を10,000×gで5分間遠心した。沈殿多糖をアルコールで洗浄した。多糖をアセトンで洗浄し、10,000×gで15から20分間遠心した。多糖を真空下で乾燥した。最初の多糖粉末を酢酸ナトリウム溶液に溶解させた。塩化マグネシウムを添加し、水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを7.2から7.5に調整した。DNaseおよびRNaseを溶液に添加して、25 から28 で、混和させながら、4時間インキュベートして、残りの核酸を除去した。それら酵素を用いてインキュベートした後、等容量の酢酸ナトリウム-フェノール溶液を水相に添加し、上記のように抽出した。全部で4回の抽出を実施して、多糖溶液からタンパク質および内毒素を除去した。混合した水性抽出物を、注射用水で10倍まで希釈し、1

0容量の注射用水でダイアフィルトレーションした。ダイアフィルトレーション処理した多糖に塩化カルシウムを添加した。80%までエタノールを添加することによって、1から5で1晩多糖を沈殿させた。アルコール上清を回収し、10,000×gで14分間遠心することによって多糖を回収した。精製多糖をエタノールで2回、アセトンで1回洗浄した。洗浄した粉末をデシケーター中において真空下で乾燥した。乾燥粉末を複合体にさらに加工するまで30以下で保管した。

【実施例2】

【0052】

髄膜炎菌血清群AおよびCの精製莢膜多糖粉末の解重合

調製に用いられる材料は、上記の実施例により調製された髄膜炎菌血清群AおよびC由来の精製莢膜多糖粉末、滅菌50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0)、滅菌1N塩酸、滅菌1N水酸化ナトリウム、30%過酸化水素、および滅菌生理食塩水(0.85%塩化ナトリウム)を含む。あるいは、酢酸ナトリウムバッファーに代えてクエン酸バッファーでもよい。

10

【0053】

各血清群多糖を別個の反応で解重合した。ステンレス鋼タンクに60gまでの精製莢膜多糖粉末を入れた。滅菌50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0)を多糖に添加して、2.5g多糖/リットルの濃度をもたらす。溶液になるように、多糖溶液を1から5で12から24時間混合した。反応タンクを熱交換器ユニットに連結した。追加の50mM酢酸ナトリウムバッファー(pH6.0)を添加して、1.25g/リットルの反応濃度まで多糖を希釈した。多糖溶液を55±0.1まで加熱した。30%過酸化水素を反応混合物に添加して、1%過酸化水素の反応濃度にした。

20

【0054】

時間経過による多糖の分子サイズを追うことによって、反応の経過をモニターした。15から20分おきに、反応混合物から一部を取り出して、HPLCカラムに注入して多糖の分子サイズを測定した。多糖の分子サイズが目的とする分子サイズに達したとき、加熱ユニットを止め、氷水浴を介した巡回によって5まで多糖溶液を迅速に冷却した。3000MWC再生セルロースカートリッジを備えた限外濾過ユニットに反応タンクを連結させて、解重合多糖溶液を15g/リットルまで濃縮した。約5-15容量、好ましくは約6-10容量、またはより好ましくは10容量の滅菌生理食塩水(0.85%塩化ナトリウム)に

30

【0055】

解重合多糖についての好ましい標的サイズは、約5から75kDa、好ましくは約5から40kDa、およびより好ましくは約10から25kDaである。

【0056】

デキストラン分子サイズスタンダードを用いて校正された商品名"Ultahydrogel(登録商標)250"で販売されているゲル濾過クロマトグラフィーカラムを通過させ、さらに多角レーザー光散乱によって、解重合多糖の分子サイズを特定した。Bartlet, G.R.J. (1959) Journal of Biological Chemistry, 234, pp466-468に記載の方法を用いて血清群Aに関してリン含量によって、さらにSvennerholm, L.(1955) Biochimica Biophysica Acta 24, pp604-611の方法を用いて血清群C、W135、およびYに関してシアル酸含量によって、多糖の量を特定した。Hesterin, S.(1949) Journal of Biological Chemistry 180, p249の方法によってO-アセチル含量を特定した。Park, J.T. and Johnson, M.J.(1949) Journal of Biological Chemistry 181, pp149-151の方法によって還元活性を特定した。プロトン<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRによって解重合多糖の構造の健全性を特定した。LAL(内毒素)含量および残りの過酸化水素含量を測定することによって解重合多糖の純度を特定した。

40

【実施例3】

【0057】

50

### 髄膜炎菌血清群A、C、W-135、およびYの解重合多糖の誘導体化

この調製で用いられる材料として、上記の実施例2により調製された髄膜炎菌血清群AおよびCの過酸化水素解重合莢膜多糖、アジピン酸ジヒドラジド、血清群Aのみに関して1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)、シアノボロ水素化ナトリウム(sodium cyanoborohydride)、滅菌1N塩酸、滅菌1N水酸化ナトリウム、滅菌塩化ナトリウム、および滅菌生理食塩水(0.85%塩化ナトリウム)が挙げられる。

#### 【0058】

各血清群多糖を別個の反応で誘導体化(derivatized)した。ステンレス鋼タンクに精製解重合多糖を入れ、6g多糖/リットルの最終反応濃度になるように、滅菌0.85%生理食塩水で希釈した。1g/リットルの反応濃度になるように、その溶液に、滅菌0.85%生理食塩水中に溶解したアジピン酸ジヒドラジドの濃縮液を添加した。血清群Aのみに関して、1g/リットルの反応濃度になるように、滅菌0.85%生理食塩水中に溶解した濃縮液としてEDACを添加した。pHを $5.0 \pm 0.1$ に調整し、滅菌1N塩酸および滅菌1N水酸化ナトリウムを用いて、室温(15から30)で2時間、そのpHを維持した。2時間後、0.85%生理食塩水中に溶解したシアノボロ水素化ナトリウムの濃縮液を反応混合物に添加して、2g/リットルの反応濃度にした。pHを $5.5 \pm 0.5$ に維持しながら、室温(15から30)で44時間±4時間反応液を攪拌した。その反応時間の後、pHを $6.0 \pm 0.1$ に調整し、3000MWC0再生セルロースカートリッジを備えた限外濾過ユニットに反応タンクを連結させて、誘導体化多糖溶液を12g/リットルまで濃縮した。10容量の1M塩化ナトリウム、続いて10容量の0.15M塩化ナトリウムに対して濃縮誘導体化多糖溶液を限外濾過する。あるいは、濃縮誘導体化多糖は、約10-約30容量の1M塩化ナトリウム、続いて約10-約30容量の生理食塩水に対して透析する。

#### 【0059】

誘導体化多糖の分子サイズ、多糖の量、およびO-アセチル含量は、解重合多糖で用いたのと同じ方法で測定した。Snyder, S.L. and Sobocinski, P.Z.(1975) Analytical Biochemistry 64, pp282-288に記載の2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸法によってヒドラジド含量を測定した。プロトン<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRによって誘導体化多糖の構造の健全性を特定した。非結合ヒドラジド、LAL(内毒素)含量および残りのシアノボロ水素含量を測定することによって誘導体化多糖の純度を特定した。

#### 【実施例4】

#### 【0060】

### 担体タンパク質の調製

#### 粗ジフテリアトキソイドタンパク質の調製

凍結乾燥種細胞を再生させて16から18時間インキュベートした。培養液の一部を、増殖培地を含有する0.5リットルフラスコに移し、回転式振とう培養器において、34.5から36.5で7から9時間培養フラスコをインキュベートした。増殖培地を含有する4リットルフラスコに培養フラスコから一部を移し、回転式振とう培養器において、34.5から36.5で14から22時間培養フラスコをインキュベートした。4リットルフラスコからの培養液を用いて、増殖培地含有発酵槽に播種した。発酵槽を34.5から36.5で70から144時間インキュベートした。発酵槽の内容物を、デプスフィルターを通して回収容器に濾過した。0.2%濃度になるように、回収物に37%ホルムアルデヒド溶液を添加した。pHを7.4から7.6に調整した。0.2μmフィルターカートリッジを通して滅菌20リットルボトルに回収物を濾過した。34.5から36.5で7日間ボトルをインキュベートした。0.4%濃度になるように、各20リットルボトルに37%ホルムアルデヒド溶液を添加した。混合物のpHを7.4から7.6に調整した。振とう攪拌器において、34.5から36.5で7日間ボトルをインキュベートした。0.5%濃度になるように、各20リットルボトルに37%ホルムアルデヒド溶液を添加した。混合物のpHを7.4から7.6に調整した。34.5から36.5で8週間ボトルをインキュベートした。無毒化に関して粗トキソイドを試験した。試験期間の間、1から5

でボトルを保管した。

【0061】

粗ジフテリアトキソイドタンパク質の精製

粗トキソイドを室温まで暖め、20リットルボトルの内容物を合わせて精製タンクに入れた。トキソイドのpHを7.2から7.4に調整し、活性炭を粗トキソイドに添加して2分間混合した。活性炭-トキソイド混合物を1時間放置し、その後デプスフィルターカートリッジを通して第2精製タンクに濾過した。70%飽和になるように固形硫酸アンモニウムを濾液に添加した。pHを6.8から7.2に調整し、溶液を16時間放置した。沈殿したタンパク質を濾過によって回収し、70%飽和硫酸アンモニウム溶液(pH7.0)で洗浄した。沈殿物を滅菌蒸留水中に溶解させ、タンパク質溶液をステンレス回収容器に濾過した。pHを6.8から7.2に調整し、40%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加した。溶液のpHを7.0から7.2に調整し、溶液を16時間放置した。濾過によって沈殿物を除去し、捨てた。60%飽和になるように濾液に硫酸アンモニウムを添加し、さらにpHを7.0から7.2に調整した。混合物を16時間放置し、沈殿したタンパク質を濾過によって回収した。沈殿物を滅菌蒸留水に溶解させ、溶けていないタンパク質を濾過によって除去し、さらに0.85%生理食塩水に対して限外濾過した。

10

【0062】

精製ジフテリアトキソイドタンパク質の濃縮および滅菌濾過

15g/リットルまでタンパク質溶液を濃縮し、3000MWC再生セルロースカートリッジを用いて、10容量の0.85%生理食塩水に対して限外濾過した。0.2μmメンブランを通して濾過することによって、濃縮タンパク質を滅菌した。複合体に加工するまで、タンパク質溶液を1から5で保管した。

20

【0063】

Lowry, O.H. et al(1951) Journal of Biological Chemistry 193, p265-275の方法によってタンパク質濃度を特定した。無菌性、LAL(内毒素)含量、および残りのホルムアルデヒド含量によってタンパク質の純度を特定した。

【実施例5】

【0064】

髄膜炎菌血清群AおよびC多糖とジフテリアトキソイドタンパク質との一価複合体の調製

この調製に用いられる材料として、上記の実施例により調製された髄膜炎菌血清群AおよびCのアジピン酸誘導体化多糖、上記の実施例により調製された滅菌ジフテリアトキソイドタンパク質、EDAC、硫酸アンモニウム、滅菌1N塩酸、滅菌1N水酸化ナトリウム、および滅菌生理食塩水(0.85%)が挙げられる。

30

【0065】

各血清群の多糖複合体は別個の反応によって調製した。以下の工程によって、4つ全ての複合体を調製した。700から1000μmolの反応性ヒドラジド/リットルの反応濃度の精製アジピン酸誘導体化多糖、および3.8から4.0gタンパク質/リットルの反応濃度の精製ジフテリアトキソイドタンパク質をステンレス鋼タンクに入れた。生理食塩水(0.85%)を用いて開始材料を目的の反応濃度まで希釈し、さらにpHを5.0±0.1に調製した。2.28から2.4g/リットルの反応濃度になるようにEDACを多糖タンパク質混合物に添加した。滅菌1N水酸化ナトリウムを用いて反応液のpHを7.0±0.1に調整し、反応液を1から5で16から20時間保管した。

40

【0066】

反応混合物を15から30まで暖め、3000MWC再生セルロースカートリッジを備えた限外濾過ユニットに反応容器を連結させた。血清群Aについて60%飽和になるまで固形硫酸アンモニウムを添加し、血清群Cについて50%飽和になるまで固形硫酸アンモニウムを添加した。血清群Aについて、20容量の60%飽和硫酸アンモニウム溶液に対して複合体反応混合物を限外濾過し、血清群Cについて、20容量の50%飽和硫酸アンモニウム溶液に対して複合体反応混合物を限外濾過し、続いて20容量の生理食塩水0.85%に対して、複合体反応混合物を限外濾過した。限外濾過した複合体を、最初に1.2μmおよび0.

50

45  $\mu\text{m}$  フィルターを備えたフィルターカプセルを通して濾過し、続いて0.22  $\mu\text{m}$  フィルターを備えた第2のフィルターカプセルを通して濾過した。あるいは、複合体反応産物は、いくつかの、好ましくは約3つの硫酸アンモニウム沈殿により精製してもよい。

【0067】

多糖の量および0-アセチル含量は、解重合および誘導体化多糖において用いられたのと同じ方法によって測定した。タンパク質の量はLowry法によって特定した。複合体の分子サイズは、空隙容量マーカーとしてDNAを用い、全容量マーカーとしてATPを用い、さらに参照マーカーとしてウシチログロブリンを用いて、商品名"TSK6000PW"で販売されているゲル濾過クロマトグラフィーカラムを通過させて特定した。さらに、多角レーザー光散乱によって、TSK6000PWカラムから溶出された複合体の分子サイズを測定した。ダブルサンドイッチELISA法を用いて、抗多糖血清群特異的抗体への結合によって、複合体の抗原特性を測定した。疎水性相互作用クロマトグラフィーカラムを介した溶出によって非結合（非複合体形成）多糖の量、キャピラリー電気泳動によって非結合タンパク質の量、無菌性、LAL（内毒素）含量、残っているEDAC含量、および残っているアンモニウムイオン含量を測定することによって、複合体の純度を特定した。

10

【実施例6】

【0068】

アルミニウムを含まない多価髄膜炎菌AおよびC多糖ジフテリアトキソイド複合体ワクチンの形成

髄膜炎菌AおよびC複合体の調製で使用される材料は、上記の方法により調製されてもよい。好ましくは、ワクチン組成物は、滅菌された発熱物質のない、リン酸緩衝生理食塩水中で形成される。生理食塩水濃度は、0.9%の15mM塩化ナトリウムおよび10mMリン酸ナトリウムにより達成されてもよい。好ましくは、ワクチン組成物はアルミニウムを含まない。

20

【実施例7】

【0069】

ヒト患者におけるアルミニウムを含まない多価髄膜炎菌AおよびC多糖ジフテリアトキソイド複合体ワクチンの免疫原性

二価A/C多糖ワクチン対二価A/C複合体ワクチンに対する免疫応答を比較する臨床研究を、幼児の被験者で行った。この研究において、幼児の第3グループは対照群として機能するよう登録され、インフルエンザ菌タイプb複合体を受けた。全ての3つのワクチングループは、同じ小児ワクチンを受ける。二価A/C複合体グループは、6、10、および14週にジフテリア複合体ワクチン（投与量ごとに4 $\mu\text{g}$ 多糖）の3回投与を受けた。二価A/C多糖グループは、10および14週にA/C多糖ワクチン（投与量ごとに50 $\mu\text{g}$ 多糖）の2回投与を受けた。インフルエンザ菌タイプb複合体グループは、6、10、14週に複合体ワクチンの3回投与を受けた。6週、ワクチン接種前、およびワクチン接種後4週である18週に、血液標本を採取する。子供が11-12ヶ月である時、血液標本を採取し、二価AC複合体または二価AC多糖ワクチンを受けた子供は、AC多糖の追加免疫投与を受けた。多糖の追加免疫投与の理由は、被験者が既往（anamnestic）反応を誘発するか否かを評価するためである。

30

【0070】

この研究の結果、一次および多糖追加免疫応答は、IgG抗体反応について表1に、およびSBA抗体反応について表2に示される。一次系の後のIgG抗体反応は、多糖および複合体ワクチンについて概略同じである。しかしながら、複合体ワクチン接種をされた被験者における殺菌性抗体反応は、多糖ワクチン接種された被験者についてよりもずっと高かった。1歳の被験者について観察されるように、多糖による幼児のワクチン接種は機能的殺菌性抗体をほとんど誘発しない。多糖ワクチンに対して幼児により誘発される抗体は、おそらく低い親和力の抗体であるのに対し、複合体ワクチンは、高い親和力の抗体を誘発し、それによりずっと高いタイトルの殺菌性抗体を生じるようである。一次ワクチン接種系において複合体ワクチンを受けた被験者における多糖ワクチンの追加免疫投与により誘発された高レベルの機能的抗体は、これらの被験者が記憶またはT細胞依存性抗体反応を受け

40

50

たことを示す。一次ワクチン接種系で多糖ワクチンを受けた被験者は、多糖追加免疫投与に対する穏やかな反応を誘発し、これはT細胞依存性反応を示す。

【0071】

表1は、一次系免疫（6、10および14週）および11-12ヶ月における二価AC多糖による追加免疫ワクチン接種の前および後の血清群AおよびCに対する幼児における抗多糖IgG GMC（群平均濃度）を示す。

【表1】

表1

ワクチン群による免疫応答	一次ワクチン接種 GMC [95% CI]			PS追加免疫ワクチン接種 GMC [95% CI]		
	N	Pre	Post	N	Pre	Post
血清群 A:						
AC複合体	34	3.4 [2.2-5.4]	5.8 [4.3-8.0]	31	0.2 [0.1-0.3]	7.0 [4.0-12.0]
AC多糖	35	3.0 [1.7-5.3]	5.5 [4.1-7.3]	30	0.9 [0.5-1.4]	3.1 [2.0-4.7]
HIB複合体	36	3.2 [2.2-4.5]	0.6 [0.4-0.8]	NA	NA	NA
血清群 C:						
AC複合体	31	1.6 [0.9-2.8]	2.8 [2.0-3.9]	31	0.1 [0.1-0.2]	8.1 [4.5-14.5]
AC多糖	35	2.3 [1.4-3.9]	5.3 [3.8-7.4]	30	0.6 [0.3-1.0]	2.8 [1.7-4.7]
HIB複合体	36	2.0 [1.2-3.5]	0.5 [0.3-0.7]	NA	NA	NA

10

20

【0072】

表2は、一次系免疫（6、10および14週）および11-12ヶ月における二価AC多糖による追加免疫ワクチン接種の前および後の血清群AおよびCに対する幼児におけるSBA抗体GMT（群平均タイター）を示す。

【表2】

表2

ワクチン群による免疫応答	一次ワクチン接種 GMT [95% CI]			PS追加免疫ワクチン接種 GMT [95% CI]		
	N	Pre	Post	N	Pre	Post
血清群 A:						
AC複合体	34	11.8 [7.2-19.3]	177 [101-312]	24	10.1 [5.6-18.0]	373 [162-853]
AC多糖	32	14.7 [8.5-25.4]	7.0 [4.7-10.5]	26	6.1 [3.9-9.5]	24.1 [11-53]
HIB複合体	35	11.2 [6.8-18.3]	6.7 [4.3-10.5]	NA	NA	NA
血清群 C:						
AC複合体	34	50.8 [24-107]	189 [128-278]	27	4.6 [3.6-5.6]	287 [96.2-858]
AC多糖	32	62.7 [29-131]	25.4 [14.4-44.6]	26	4.1 [3.9-4.3]	14.4 [7.9-26.1]
HIB複合体	36	45.3 [21.9-133]	7.3 [4.7-11.3]	NA	NA	NA

30

40

【0073】

本発明が提供する若い母集団における髄膜炎菌疾患に対する改良された防御および血清群A、C、W-135およびYに対するより広い防御という利点に加えて、四価複合体は、担体

50

タンパク質に対する抗体反応を誘発することにより他の病原に対する防御を提供するかもしれない。ジフテリアトキソイド複合体を使用して四価複合体ワクチンを幼児に投与する場合、これらの被験者は、ジフテリアトキソイドを含む通常の小児免疫も受ける。したがって、これらの被験者において、ジフテリアトキソイドに対する抗体反応における明らかな改良はない。しかしながら、ワクチンを含有する付随ジフテリアトキソイドを受けていない被験者にジフテリアトキソイド複合体を投与する場合、ジフテリアトキソイドに対する強い追加免疫応答が観察される。これらの被験者は、2、3、および4ヶ月にDTPの3回投与計画を受けている。この研究において、被験者は、2-3歳の間に、二価AC複合体の単回投与または二価AC多糖ワクチンの単回投与を受けた。ワクチン接種時およびワクチン接種後30日に血液標本を採取する。二価AC複合体は、担体タンパク質としてジフテリアトキソイドを使用した。

10

## 【0074】

2つの免疫グループにおけるジフテリアトキソイドの免疫応答が表3に示される。多糖は、予想通りこれらの被験者において抗ジフテリア免疫応答を刺激する作用をしなかったが、しかしながら、AC複合体を受けた被験者について強い抗ジフテリア免疫応答が観察される。したがって、髄膜炎菌複合体ワクチンは、担体タンパク質に対する免疫応答を刺激し、それによりジフテリアトキソイドを担体タンパク質として使用する場合にコリネバクテリアジフテリア (*Corynebacteria diphtheriae*) により生じる疾患に対する防御を提供するという追加の利点を提供するかもしれない。

## 【0075】

表3は、投与量ごとに4 $\mu$ gの多糖として調製された二価ACジフテリアトキソイド複合体ワクチンまたは投与量ごとに50 $\mu$ gで調製された二価AC多糖ワクチンでワクチン接種された和解健康な子供におけるELISA GMT (群平均タイター) による抗ジフテリア抗体をIU/mlで示す。

20

## 【表3】

表3

ワクチン群による 免疫応答	N <sub>pre</sub> /N <sub>post</sub>	抗ジフテリア抗体 (ELISA - IU/ml) [95%CI]	
		Pre	Post
AC複合体	104/103	0.047 [0.036 - 0.060]	21.2 [11.6 - 38.6]
AC多糖	103/102	0.059 [0.045 - 0.076]	0.059 [0.045 - 0.077]

30

## 【実施例8】

## 【0076】

幼児における非アジュバント化髄膜炎菌A/Cジフテリアトキソイド複合体ワクチンの異なる日程の免疫原性、安全性、および記憶

40

通常の幼児免疫と同時にジフテリアトキソイドに結合された多糖AおよびCのワクチン (A/C複合体) または標準的なA/C多糖 (A/C PS) ワクチンの1-4投与を受けるニジェルにおける618人の幼児の非盲検無作為化対照臨床試験における臨床研究が示される。24ヶ月において、A/C PSワクチンが与えられ、記憶反応を1週間後に測定した。ELISAにより、血清殺菌活性 (SBA) およびIgG抗体を測定する。

## 【0077】

ワクチンは、ジフテリアトキソイドに結合された髄膜炎菌血清群AおよびCの莢膜多糖を含む。ワクチンは、48 $\mu$ gのジフテリアトキソイドに結合された2つの多糖をそれぞれ4 $\mu$ g含有する0.5mlの使い捨て注射器に入れる。非アジュバント化A/C複合体ワクチンを、発

50

熱物質のない、防腐剤、特に0.9%の15mM塩化ナトリウムおよび10mMリン酸ナトリウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水0.5mlに調製する。

【0078】

この研究に登録された618人の幼児を等しいサイズの6つのグループに無作為化する。試験対象患者基準は以下のようである：1) 直腸温が38 未満の健康な幼児；2) 5-11週間；3) 36週間より長い妊娠で分娩された；4) ニアマーで家族が永続的に居住；5) 親が書面による同意を提供。除外基準は以下のようである：深刻な慢性疾患；別の臨床試験の登録；以前にDTPワクチン、髄膜炎菌PS、またはインフルエンザ菌b (Hib) 複合体ワクチンでワクチン接種された；過去3週間以内のBCGの投与またはコルチコステロイド治療；またはワクチン接種への忌避。

10

【0079】

対照群に無作為化された子供は、各多糖を50 µg含有した髄膜炎菌A/C多糖 (MenPS、Aventis Pasteur)、またはHib複合体ワクチン (Act-Hib、Aventis Pasteur) を受けた。前外側右大腿において、MenD、MenPsおよびAct-Hibの筋肉内注射を行う。子供は、生まれたときにBCGおよび経口ポリオワクチン (OPV) を受けた。免疫化における拡大プログラム (EPI) 日程に従い、6、10、および14週において、15ヶ月の追加免疫と共にETPおよびOPVを受けた。麻疹および黄熱ワクチンを9ヶ月に与える。EPI注射を左の三角筋の筋肉内に与える。

【0080】

通常のEPIワクチンと付随して最初の9ヶ月にA/C複合体を4 (グループ1)、3 (グループ2)、2 (グループ3)、または1投与 (グループ4および5) またはA/C PSを1投与 (グループ6) 受けた103人の幼児の6つのグループが示される、表4参照。

20

【表 4】

表4

グループの割当、試験日程、および評価できる血液試料を有する被験者の数

	Visit 1 6 週間	Visit 2 10 週間	Visit 3 14 週間	Visit 4 18 週間	Visit 5 9ヶ月	Visit 6 10 ヶ月	Visit 7 15ヶ月	Visit 8 24 ヶ月	Visit 9 24 ヶ月 + 1 週間
グループ1 N=104	MenD	MenD	MenD		MenD			MenPS	
				N=98		N=99		N=84	N=77
グループ2 N=103	MenD	MenD	MenD					MenPS	
				N=97		N=92		N=85	N=74
グループ3 N=103			MenD		MenD			MenPS	
				N=94		N=89		N=73	N=66
グループ4 N=103			MenD					MenPS	
				N=97		N=93		N=83	N=70
グループ5 N=103	Act-Hib	Act-Hib	Act-Hib		MenD			MenPS	
				N=101		N=97		N=87	N=76
グループ6 N=102	Act-Hib	Act-Hib	Act-Hib		MenPS			MenPS	
				N=97		N=88		N=82	N=73
他の ワクチン	DTP OPV	DTP OPV	DTP OPV		Yellow fever Measles			DTP OPV	
試料、 全ての グループ				血液 サンプル		血液 サンプル		血液 サンプル	血液 サンプル

10

20

## 【0081】

30

24ヶ月において、既往反応を評価し髄膜炎菌に対する免疫応答を刺激するために、被験者はA/C PSの単回投与を受けた。18週、10ヶ月、24ヶ月、および1週間後に、4つの3mL血液標本を採集する。

## 【0082】

超過敏反応を示すかもしれない即時反応について、各注射後30分間子供を観察する。追跡評価は、試験注射後24および72時間の往診中に行った。

## 【0083】

生まれたてのウサギの補体を使用する標準的な方法により、血清殺菌活性をAおよびC血清群について測定する、Maslanka SE, et al., Clin Diagn Lab Immunol 1997;4:155-67。殺菌活性は、対照培養と比較して50%以上の細菌成長を生じる相互血清希釈として定められる。IgG濃度を標準化ELISAにより測定し、 $\mu\text{g/mL}$ で示す、Carlone GM, et al., J Clin Microbiol 1992;30:154-9およびGheesling LL, et al., J Clin Microbiol, 1994;32:1475-82。18週の血清におけるジフテリア、破傷風、百日咳、およびポリオウィルスタイプ1、2、および3に対する抗体を、標準的な方法を使用して測定する。投与の30分以内に少なくとも1つの局所反応、または投与後24または72時間以内に1つの局所または全身反応を有した幼児の割合に基づいて、各投与回の投与後にそれぞれの試験グループについて反応原性を評価する。

40

## 【0084】

免疫応答は、ELISAについて抗体濃度として、およびSBAについて抑制希釈の相乗平均タイター (GMT) として示される。抗体レベルは、ヒト補体を使用してELISAにより $2\mu\text{g/mL}$

50

異常およびSBAについて1:4以上に基づいて防御的であると考えられていた、Goldschneider I, et al., J. Exp. Med., 1969, 129:1327-48およびLepow ML, et al., Pediatrics 1977; 60:673-680。さらに、この結果は、2  $\mu$ g/mL以上のELISA抗体濃度および1:128以上のSBAタイターを有する幼児の割合を示す、Jodar L, et al., Biologicals 2002, 30:323-9。信頼区間は、GMTおよび抗体濃度について計算する。

【0085】

訪問6において、血清群AおよびCに対するSBAについてのログタイターの分布により、変化のANOVA分析によりグループを比較する。Student-Newman-Keulsテストを多重比較に使用する。割合および95%信頼区間の比較により既往反応を評価し、グループ6について血清防御を有する幼児のGMTの割合をSBAおよびELISAの基準と比較した。この研究により与えられたワクチンに帰する深刻な有害事象はない。

10

【0086】

表5は、6つのグループについて、18週、10ヶ月、24ヶ月および24ヶ月の期間後1週間における血清群AおよびCについてのSBAタイターを示す。1:128以上のSBAタイターを有する被験者の割合が各グループについて示される。

【表5】

表5  
血清殺菌活性血清群AおよびC多糖

	Visit 4 (18 週間)		Visit 6 (10 ヶ月)		Visit 8 (24 ヶ月)		Visit 9 (24ヶ月 +1週間)	
	GMT (n)	% ≥1/128	GMT (n)	% ≥ 1/128	GMT (n)	% ≥ 1/128	GMT (n)	% ≥ 1/128
血清群 A								
グループ 1	87.4 (55) [62.2 - 117]	56.1 [45.7 - 66.1]	309 (78) [229 - 417]	88.6 [80.1 - 94.4]	48.3 (32) [30.6 - 76.4]	38.1 [27.7 - 49.3]	3351 (76) [2585 - 4345]	100 [95.3 - 100]
グループ 2	84.6 (54) [61.4 - 117]	55.7 [45.2 - 65.8]	7.65 (6) [5.88 - 9.94]	6.5 [2.4 - 13.7]	35.3 (33) [21.8 - 57.0]	38.8 [28.4 - 50.0]	1421 (71) [978 - 2066]	95.9 [88.6 - 99.2]
グループ 3	152 (64) [107 - 215]	68.1 [57.7 - 77.3]	415 (76) [302 - 570]	85.4 [76.3 - 92.0]	81.1 (35) [49.5 - 133]	47.9 [36.1 - 60.0]	2761 (65) [2182 - 3492]	100 [94.5 - 100]
グループ 4	98.3 (59) [69.3 - 139]	60.8 [50.4 - 70.6]	8.37 (4) [6.66 - 10.5]	4.3 [1.2 - 10.8]	55.5 (37) [33.2 - 92.9]	44.6 [33.7 - 55.9]	2376 (70) [1809 - 3121]	100 [94.9 - 100]
グループ 5	5.19 (3) [4.38 - 6.16]	3.0 [0.6 - 8.4]	129 (60) [84.2 - 197]	61.9 [51.4 - 71.5]	69.3 (42) [41.8 - 115]	48.3 [37.4 - 59.2]	2549 (76) [1913 - 3397]	100 [95.3 - 100]
グループ 6	4.65 (2) [4.08 - 5.29]	2.1 [0.3 - 7.3]	7.22 (4) [5.63 - 9.27]	4.5 [1.3 - 11.2]	32.8 (30) [20.1 - 53.7]	36.6 [26.2 - 48.0]	1250 (71) [883 - 1770]	97.3 [90.5 - 99.7]
血清群 C								
グループ 1	289 (82) [205 - 406]	83.7 [74.8 - 90.4]	215 (64) [138 - 337]	72.7 [62.2 - 81.7]	8.41 (8) [6.01 - 11.8]	9.5 [4.2 - 17.9]	711 (72) [482 - 1049]	94.7 [87.1 - 98.5]
グループ 2	304 (83) [222 - 415]	85.6 [77.0 - 91.9]	6.98 (8) [5.43 - 8.97]	8.8 [3.9 - 16.6]	12.7 (19) [8.22 - 19.7]	22.4 [14.0 - 32.7]	617 (61) [383 - 996]	82.4 [71.8 - 90.3]
グループ 3	111 (60) [74.4 - 166]	63.8 [53.3 - 73.5]	553 (76) [373 - 821]	85.4 [76.3 - 92.0]	16.6 (18) [9.68 - 28.5]	24.7 [15.3 - 36.1]	1655 (62) [1064 - 2574]	95.4 [87.1 - 99.0]
グループ 4	79.9 (55) [53.7 - 119]	56.7 [46.3 - 66.7]	6.58 (7) [5.32 - 8.13]	7.6 [3.1 - 15.1]	16.8 (20) [10.3 - 27.4]	24.1 [15.4 - 34.7]	1855 (65) [1146 - 3003]	92.9 [84.1 - 97.6]
グループ 5	6.83 (7) [5.41 - 8.62]	6.9 [2.8 - 13.8]	19.1 (25) [13.4 - 27.3]	25.8 [17.4 - 35.7]	13.4 (19) [8.53 - 21.1]	21.8 [13.7 - 32.0]	2244 (75) [1579 - 3188]	98.7 [92.9 - 100]
グループ 6	5.29 (2) [4.44 - 6.30]	2.1 [0.3 - 7.3]	9.97 (10) [7.31 - 13.6]	11.4 [5.6 - 19.9]	5.33 (3) [4.41 - 6.45]	3.7 [0.8 - 10.3]	68.4 (38) [42.1 - 111]	52.1 [40.0 - 63.9]

GMT相乗平均タイター、[95%信頼区間]

10

20

30

40

表 6 は、各グループについてのELISAの結果を示す。

【表 6】

表6  
群AおよびC多糖についてのELISA抗体濃度

	Visit 4 (18 週間 )		Visit 6 (10 ヶ月 )		Visit 8 (24 ヶ月 )		Visit 9 (24 ヶ月 +1 週間 )	
	GMC	% ≥ 2 $\mu$ g·mL <sup>-1</sup>	GMC	% ≥ 2 $\mu$ g·mL <sup>-1</sup>	GMC	% ≥ 2 $\mu$ g·mL <sup>-1</sup>	GMC	% ≥ 2 $\mu$ g·mL <sup>-1</sup>
血清群 A								
グループ 1	3.84 [3.37 - 4.38]	84.7 [76.0 - 91.2]	3.01 [2.42 - 3.74]	67.0 [56.2 - 76.7]	0.35 [0.27 - 0.46]	8.3 [3.4 - 16.4]	10.0 [7.80 - 12.9]	98.7 [92.9 - 100]
グループ 2	3.90 [3.34 - 4.56]	75.3 [65.5 - 83.5]	0.24 [0.20 - 0.29]	0 [0 - 3.9]	0.39 [0.27 - 0.56]	21.2 [13.1 - 31.4]	6.78 [5.21 - 8.83]	87.8 [78.2 - 94.3]
グループ 3	4.82 [4.05 - 5.73]	86.2 [77.5 - 92.4]	3.68 [2.92 - 4.64]	71.9 [61.4 - 80.9]	0.66 [0.43 - 1.01]	27.4 [17.6 - 39.1]	12.0 [9.30 - 15.6]	92.3 [83.0 - 97.5]
グループ 4	3.87 [3.27 - 4.58]	80.4 [71.1 - 87.8]	0.25 [0.21 - 0.29]	1.1 [0 - 5.9]	0.46 [0.31 - 0.67]	20.5 [12.4 - 30.8]	9.04 [6.98 - 11.7]	91.4 [82.3 - 96.8]
グループ 5	0.42 [0.33 - 0.53]	9.9 [4.9 - 17.5]	2.47 [1.93 - 3.18]	60.8 [50.4 - 70.6]	0.52 [0.35 - 0.77]	20.7 [12.7 - 30.7]	13.2 [10.3 - 17.0]	93.4 [85.3 - 97.8]
グループ 6	0.47 [0.38 - 0.59]	10.3 [5.1 - 18.1]	1.64 [1.28 - 2.10]	44.3 [33.7 - 55.3]	0.56 [0.41 - 0.77]	20.7 [12.6 - 31.1]	5.74 [4.49 - 7.34]	82.2 [71.5 - 90.2]
血清群 C								
グループ 1	9.34 [7.98 - 10.9]	96.9 [91.3 - 99.4]	6.70 [5.27 - 8.50]	85.2 [76.1 - 91.9]	0.44 [0.32 - 0.60]	11.9 [5.9 - 20.8]	9.79 [6.74 - 14.20]	76.3 [65.2 - 85.3]
グループ 2	9.45 [7.88 - 11.3]	92.8 [85.7 - 97.0]	0.79 [0.63 - 0.99]	23.9 [15.6 - 33.9]	0.64 [0.42 - 0.96]	27.1 [18.0 - 37.8]	9.73 [6.82 - 13.9]	82.4 [71.8 - 90.3]
グループ 3	5.59 [4.60 - 6.78]	84.0 [75.0 - 90.8]	8.62 [6.70 - 11.1]	87.6 [79.0 - 93.7]	0.73 [0.48 - 1.11]	24.7 [15.3 - 36.1]	15.8 [11.6 - 21.6]	92.3 [83.0 - 97.5]
グループ 4	4.38 [3.60 - 5.33]	79.4 [70.0 - 86.9]	0.68 [0.55 - 0.84]	15.2 [8.6 - 24.2]	0.48 [0.34 - 0.67]	15.7 [8.6 - 25.3]	17.0 [12.5 - 23.2]	94.3 [86.0 - 98.4]
グループ 5	0.38 [0.30 - 0.49]	9.9 [4.9 - 17.5]	1.95 [1.58 - 2.41]	50.5 [40.2 - 60.8]	0.31 [0.21 - 0.44]	18.4 [10.9 - 28.1]	9.18 [7.03 - 12.0]	90.8 [81.9 - 96.2]
グループ 6	0.33 [0.27 - 0.41]	4.1 [1.1 - 10.2]	7.84 [6.45 - 9.52]	90.9 [82.9 - 96.0]	0.48 [0.35 - 0.64]	13.4 [6.9 - 22.7]	2.61 [1.93;3.5 3]	54.8 [42.7 - 66.5]

【 0 0 8 8 】

GMC相乗平均濃度、 [ 95% 信頼区間 ]

EPIワクチン接種に対する反応

6つのグループ間で、EPIワクチン（ジフテリア、破傷風、ポリオウィルス1、2および3、百日咳）に対する抗体濃度において違いはない。結果は、以下の表7 - 18に示される

10

20

30

40

50

。A/C複合体は、EPIプログラムに含まれる他の抗原に対する免疫原性に影響を与えない。

【表 7】

表7  
V4における抗ジフテリア抗体の記述結果(血清中和-IU/mL)-Per protocol analysis

抗ジフテリア(SN - IU/mL)	グループ #1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	63 (=63-0)	64 (=65-1)	64 (=64-0)	69 (=69-0)	81 (=81-0)	63 (=63-0)
Log10 Dist. {IU/mL}						
平均	-0.442	-0.627	-0.462	-0.425	-0.543	-0.567
標準偏差	0.488	0.547	0.700	0.589	0.493	0.503
分布 [IU/mL]						
GMT	0.361	0.236	0.345	0.376	0.286	0.271
[95% CI]	[0.272;0.479]	[0.173;0.324]	[0.231;0.516]	[0.271;0.521]	[0.223;0.368]	[0.203;0.363]
最小;最大	0.010;2.56	0.020;5.12	0.005;10.2	0.020;5.12	0.020;5.12	0.020;2.56
Median=Q2	0.320	0.160	0.320	0.320	0.320	0.320
Q1;Q3 {Quantiles}	0.160;0.640	0.080;0.640	0.160;1.28	0.160;1.28	0.160;0.640	0.160;0.640
>= 0.01 IU/mL						
% (n)	100 (63)	100 (64)	98.4 (63)	100 (69)	100 (81)	100 (63)
[95% CI]	[94.3;100]	[94.4;100]	[91.6;100]	[94.8;100]	[95.5;100]	[94.3;100]
>= 0.1 IU/mL						
% (n)	85.7 (54)	70.3 (45)	76.6 (49)	81.2 (56)	79.0 (64)	77.8 (49)
[95% CI]	[74.6;93.3]	[57.6;81.1]	[64.3;86.2]	[69.9;89.6]	[68.5;87.3]	[65.5;87.3]
>= 1 IU/mL						
% (n)	22.2 (14)	12.5 (8)	29.7 (19)	29.0 (20)	11.1 (9)	15.9 (10)
[95% CI]	[12.7;34.5]	[5.6;23.2]	[18.9;42.4]	[18.7;41.2]	[5.2;20.0]	[7.9;27.3]

10

20

【表 8】

表8  
 V4における抗ジフテリア抗体の記述結果(血清中和-IU/mL) Intent-to-treat analysis

抗ジフテリア(SN - IU/mL)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	98 (=104-6)	96 (=103-7)	94 (=103-9)	97 (=103-6)	101 (=103-2)	97 (=102-5)
Log10 Dist. {IU/mL}						
平均	-0.501	-0.639	-0.476	-0.427	-0.522	-0.594
標準偏差	0.510	0.535	0.642	0.589	0.487	0.506
分布 {IU/mL}						
GMT	0.316	0.230	0.334	0.374	0.301	0.255
[95% CI]	[0.249;0.399]	[0.179;0.295]	[0.247;0.453]	[0.285;0.492]	[0.241;0.375]	[0.201;0.322]
最小;最大	0.010;2.56	0.020;5.12	0.005;10.2	0.020;10.2	0.020;5.12	0.020;2.56
Median-Q2	0.320	0.160	0.320	0.320	0.320	0.320
Q1;Q3 {Quantiles}	0.160;0.640	0.080;0.640	0.160;0.640	0.160;1.28	0.160;0.640	0.160;0.640
>= 0.01 IU/mL						
% (n)	100 (98)	100 (96)	98.9 (93)	100 (97)	100 (101)	100 (97)
[95% CI]	[96.3;100]	[96.2;100]	[94.2;100]	[96.3;100]	[96.4;100]	[96.3;100]
>= 0.1 IU/mL						
% (n)	81.6 (80)	69.8 (67)	77.7 (73)	82.5 (80)	80.2 (81)	76.3 (74)
[95% CI]	[72.5;88.7]	[59.6;78.7]	[67.9;85.6]	[73.4;89.4]	[71.1;87.5]	[66.6;84.3]
>= 1 IU/mL						
% (n)	20.4 (20)	11.5 (11)	24.5 (23)	27.8 (27)	12.9 (13)	15.5 (15)
[95% CI]	[12.9;29.7]	[5.9;19.6]	[16.2;34.4]	[19.2;37.9]	[7.0;21.0]	[8.9;24.2]

10

20

【表 9】

表9

V4における抗破傷風抗体の記述結果(ELISA-IU/mL) Per protocol analysis

抗破傷風 (ELISA-IU/mL)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)
BS SCHEDULE	Visit V4	Visit V4	Visit V4	Visit V4	Visit V4	Visit V4
N Data (=All-Missing)	62 (=63-1)	63 (=65-2)	64 (=64-0)	68 (=69-1)	79 (=81-2)	63 (=63-0)
Log10 Dist. {IU/mL}						
平均	0.692	0.583	0.557	0.581	0.487	0.386
標準偏差	0.268	0.347	0.328	0.364	0.356	0.348
分布 [IU/mL]						
GMT	4.92	3.82	3.61	3.81	3.07	2.43
[95% CI]	[4.21;5.76]	[3.13;4.68 ]	[2.99;4.36]	[3.11;4.66]	[2.56;3.69 ]	[1.99;2.98]
最小:最大	1.00;15.3	0.150;17.9	0.427;17.9	0.075;13.7	0.431;20.7	0.243;13.8
Median=Q2	4.97	4.31	4.13	4.46	3.28	2.74
Q1;Q3 {Quantiles}	3.61;7.56	2.14;6.15	2.21;6.43	2.48;6.60	1.84;5.36	1.60;4.18
>= 0.01 IU/mL						
% (n)	100 (62)	100 (63)	100 (64)	100 (68)	100 (79)	100 (63)
[95% CI]	[94.2;100]	[94.3;100]	[94.4;100]	[94.7;100]	[95.4;100]	[94.3;100]
>= 0.1 IU/mL						
% (n)	100 (62)	100 (63)	100 (64)	98.5 (67)	100 (79)	100 (63)
[95% CI]	[94.2;100]	[94.3;100]	[94.4;100]	[92.1;100]	[95.4;100]	[94.3;100]
>= 1 IU/mL						
% (n)	100 (62)	95.2 (60)	93.8 (60)	97.1 (66)	89.9 (71)	88.9 (56)
[95% CI]	[94.2;100]	[86.7;99.0 ]	[84.8;98.3]	[89.8;99.6]	[81.0;95.5 ]	[78.4;95.4]

10

20

30

【表 10】

表10  
 V4における抗破傷風抗体の記述結果 (ELISA-IU/mL)- Intent-to-treat analysis

抗破傷風(ELISA-IU/mL)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Randomised )	(Randomised )	(Randomise d)	(Randomise d)	(Randomise d)	(Randomised )
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	97 (=104-7)	95 (=103-8)	92 (=103-11)	96 (=103-7)	99 (=103-4)	97 (=102-5)
Log10 Dist. {IU/mL}						
平均	0.656	0.559	0.510	0.565	0.466	0.418
標準偏差	0.306	0.358	0.406	0.343	0.343	0.344
分布 {IU/mL}						
GMT	4.52	3.62	3.24	3.67	2.93	2.62
[95% CI]	[3.93;5.21]	[3.06;4.29]	[2.67;3.93]	[3.13;4.31]	[2.50;3.43]	[2.23;3.07]
最小;最大	0.596;15.3	0.075;17.9	0.075;17.9	0.075;13.7	0.431;20.7	0.243;18.1
Median=Q2	4.73	4.10	4.00	3.90	3.02	2.82
Q1;Q3 {Quantiles}	2.89;7.47	2.58;5.91	2.08;6.07	2.39;6.47	1.81;5.03	1.66;4.33
>= 0.01 IU/mL						
% (n)	100 (97)	100 (95)	100 (92)	100 (96)	100 (99)	100 (97)
[95% CI]	[96.3;100]	[96.2;100]	[96.1;100]	[96.2;100]	[96.3;100]	[96.3;100]
>= 0.1 IU/mL						
% (n)	100 (97)	98.9 (94)	97.8 (90)	99.0 (95)	100 (99)	100 (97)
[95% CI]	[96.3;100]	[94.3;100]	[92.4;99.7]	[94.3;100]	[96.3;100]	[96.3;100]
>= 1 IU/mL						
% (n)	95.9 (93)	94.7 (90)	90.2 (83)	95.8 (92)	90.9 (90)	90.7 (88)
[95% CI]	[89.8;98.9]	[88.1;98.3]	[82.2;95.4]	[89.7;98.9]	[83.4;95.8]	[83.1;95.7]

10

20

30

40

【表 1 1】

表11  
V4における抗ポリオウィルス型1抗体の記述結果(1/dil.) - Per protocol analysis

抗ポリオ1(1/dil.)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	61 (=63-2)	62 (=65-3)	63 (=64-1)	68 (=69-1)	79 (=81-2)	63 (=63-0)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	1.76	1.87	1.89	2.05	1.93	1.99
標準偏差	0.758	0.864	0.891	0.838	0.905	0.812
分布 {1/dil.}						
GMT	57.8	74.0	78.0	112	84.8	96.7
[95% CI]	[37.0;90.4]	[44.7;123]	[46.5;131]	[69.9;178]	[53.1;135]	[60.4;155]
最小:最大	2.00;2048	2.00;23170	2.00;5793	2.00;8192	2.00;5793	2.00;4096
Median=Q2	64.0	90.5	90.5	90.5	128	128
Q1;Q3 {Quantiles}	22.6;181	22.6;181	22.6;362	45.3;512	32.0;256	22.6;256
>= 4 1/dil.						
% (n)	91.8 (56)	91.9 (57)	90.5 (57)	95.6 (65)	87.3 (69)	96.8 (61)
[95% CI]	[81.9;97.3]	[82.2;97.3]	[80.4;96.4]	[87.6;99.1]	[78.0;93.8]	[89.0;99.6]

10

【表 1 2】

表12  
V4における抗ポリオウィルス型1抗体の記述結果(1/dil.) - Intent-to-treat analysis

抗ポリオ1(1/dil.)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	95 (=104-9)	94 (=103-9)	91 (=103-12)	96 (=103-7)	99 (=103-4)	96 (=102-6)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	1.78	1.85	1.88	1.96	1.89	1.96
標準偏差	0.769	0.890	0.867	0.891	0.906	0.830
分布 {1/dil.}						
GMT	59.9	71.2	75.4	91.5	76.8	90.5
[95% CI]	[41.8;86.0]	[46.8;108]	[49.8;114]	[60.4;139]	[50.6;116]	[61.5;133]
最小:最大	2.00;5793	2.00;23170	2.00;5793	2.00;8192	2.00;5793	2.00;8192
Median=Q2	64.0	90.5	64.0	90.5	90.5	90.5
Q1;Q3 {Quantiles}	16.0;181	22.6;256	22.6;256	26.9;512	22.6;256	22.6;256
>= 4 1/dil.						
% (n)	92.6 (88)	89.4 (84)	91.2 (83)	92.7 (89)	87.9 (87)	96.9 (93)
[95% CI]	[85.4;97.0]	[81.3;94.8]	[83.4;96.1]	[85.6;97.0]	[79.8;93.6]	[91.1;99.4]

30

40

【表 1 3】

表13  
 V4における抗ポリオウイルス型2抗体の記述結果(1/dil.) - Per protocol analysis

抗ポリオ2 (1/dil.)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	62 (=63-1)	63 (=65-2)	62 (=64-2)	66 (=69-3)	79 (=81-2)	63 (=63-0)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	2.46	2.66	2.61	2.77	2.59	2.59
標準偏差	0.664	0.756	0.712	0.656	0.748	0.600
分布 {1/dil.}						
GMT	286	456	407	584	388	387
[95% CI]	[194;422]	[294;707]	[269;617]	[403;846]	[264;571]	[273;548]
最小;最大	2.00;8192	2.00;8192	2.00;8192	11.3;32768	4.00;13107	5.70;8192
Median=Q2	256	512	609	512	362	362
Q1;Q3 {Quantiles}	128;724	181;1448	181;1024	256;1448	181;1024	181;1024
>= 4 1/dil.						
% (n)	98.4 (61)	98.4 (62)	98.4 (61)	100 (66)	100 (79)	100 (63)
[95% CI]	[91.3;100]	[91.5;100]	[91.3;100]	[94.6;100]	[95.4;100]	[94.3;100]

10

20

【表 1 4】

表14

## V4における抗ポリオウイルス型2抗体の記述結果(1/dil.) - Intent-to-treat analysis

抗ポリオ2 (1/dil.)	グループ#1 (Randomised)	グループ#2 (Randomised)	グループ#3 (Randomised)	グループ#4 (Randomised)	グループ#5 (Randomised)	グループ#6 (Randomised)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	97 (=104-7)	95 (=103-8)	90 (=103-13)	94 (=103-9)	98 (=103-5)	97 (=102-5)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	2.50	2.65	2.61	2.73	2.52	2.59
標準偏差	0.621	0.823	0.714	0.685	0.824	0.672
分布 {1/dil.}						
GMT	314	446	411	535	333	389
[95% CI]	[235;419]	[303;656]	[291;580]	[387;739]	[227;487]	[285;531]
最小;最大	2.00;8192	2.00;92682	2.00;92682	2.00;32768	2.00;13107 2	2.00;8192
Median=Q2	362	362	512	431	362	362
Q1;Q3 {Quantiles}	128;724	181;1448	128;1024	181;1448	128;1024	181;1024
>= 4 1/dil.						
% (n)	99.0 (96)	97.9 (93)	98.9 (89)	98.9 (93)	96.9 (95)	99.0 (96)
[95% CI]	[94.4;100]	[92.6;99.7]	[94.0;100]	[94.2;100]	[91.3;99.4]	[94.4;100]

10

20

【表 1 5】

表15

## V4における抗ポリオウイルス型3抗体の記述結果(1/dil.) - Per protocol analysis

抗ポリオ3 (1/dil.)	グループ#1 (Injected)	グループ#2 (Injected)	グループ#3 (Injected)	グループ#4 (Injected)	グループ#5 (Injected)	グループ#6 (Injected)
BS SCHEDULE >	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	58 (=63-5)	61 (=65-4)	61 (=64-3)	64 (=69-5)	75 (=81-6)	61 (=63-2)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	2.11	2.13	1.98	2.07	2.31	2.14
標準偏差	0.776	0.962	0.927	0.828	0.753	0.824
分布 {1/dil.}						
GMT	130	135	95.3	118	205	137
[95% CI]	[81.0;207]	[76.4;238]	[55.2;165]	[73.3;190]	[138;306]	[84.3;223]
最小;最大	2.00;2048	2.00;23170	2.00;4096	2.00;5793	2.00;4096	2.00;4096
Median=Q2	181	181	128	152	256	181
Q1;Q3 {Quantiles}	64.0;362	32.0;512	22.6;362	64.0;362	90.5;724	64.0;512
>= 4 1/dil.						
% (n)	93.1 (54)	90.2 (55)	86.9 (53)	90.6 (58)	96.0 (72)	91.8 (56)
[95% CI]	[83.3;98.1]	[79.8;96.3]	[75.8;94.2]	[80.7;96.5]	[88.8;99.2]	[81.9;97.3]

30

40

【表 16】

表16  
V4における抗ポリオウイルス型3抗体の記述結果(1/dil.) - Intent-to-treat analysis

抗ポリオ3 (1/dil.)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)	(Randomised)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	93 (=104-11)	92 (=103-11)	90 (=103-13)	92 (=103-11)	95 (=103-8)	94 (=102-8)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	2.10	2.10	2.02	2.11	2.26	2.10
標準偏差	0.795	0.928	0.897	0.871	0.759	0.812
分布 {1/dil.}						
GMT	125	127	106	128	182	126
[95% CI]	[85.9;183]	[81.6;198]	[68.5;163]	[84.5;194]	[128;260]	[86.0;185]
最小;最大	2.00;5793	2.00;23170	2.00;4096	2.00;5793	2.00;4096	2.00;4096
Median=Q2	181	181	128	181	181	181
Q1;Q3 {Quantiles}	45.3;362	45.3;431	45.3;362	76.1;362	90.5;512	64.0;362
>= 4 I/dil.						
% (n)	93.5 (87)	89.1 (82)	88.9 (80)	89.1 (82)	94.7 (90)	89.4 (84)
[95% CI]	[86.5;97.6]	[80.9;94.7]	[80.5;94.5]	[80.9;94.7]	[88.1;98.3]	[81.3;94.8]

10

20

【表 17】

表17  
V4における百日咳に対する抗凝集素の記述結果(1/dil.) - Per protocol analysis

抗凝集素、百日咳 (1/dil.)	グループ#1	グループ#2	グループ#3	グループ#4	グループ#5	グループ#6
	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)	(Injected)
BS SCHEDULE	Visit V4	Visit V4				
N Data (=All-Missing)	62 (=63-1)	63 (=65-2)	61 (=64-3)	67 (=69-2)	77 (=81-4)	63 (=63-0)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	2.43	2.42	2.40	2.44	2.38	2.42
標準偏差	0.423	0.494	0.566	0.495	0.551	0.382
分布 {1/dil.}						
GMT	271	265	250	275	240	262
[95% CI]	[211;347]	[199;352]	[179;349]	[208;363]	[180;321]	[210;327]
最小;最大	16.0;2048	4.00;4096	4.00;2048	16.0;2048	2.00;2048	16.0;1024
Median=Q2	256	256	256	256	256	256
Q1;Q3 {Quantiles}	128;512	128;512	128;512	128;512	128;512	128;512
>= 40 I/dil.						
% (n)	93.5 (58)	93.7 (59)	91.8 (56)	91.0 (61)	90.9 (70)	98.4 (62)
[95% CI]	[84.3;98.2]	[84.5;98.2]	[81.9;97.3]	[81.5;96.6]	[82.2;96.3]	[91.5;100]

30

40

## 【表 18】

表18  
V4における百日咳に対する抗凝集素の記述結果(1/dil.) - Intent-to-treat analysis

抗凝集素、百日咳 (1/dil.)	グループ#1 (Randomised)	グループ#2 (Randomised)	グループ#3 (Randomised)	グループ#4 (Randomised)	グループ#5 (Randomised)	グループ#6 (Randomised)
BS SCHEDULE	Visit V4					
N Data (=All-Missing)	96 (=104-8)	94 (=103-9)	90 (=103-13)	94 (=103-9)	97 (=103-6)	97 (=102-5)
Log10 Dist. {1/dil.}						
平均	2.44	2.45	2.41	2.42	2.36	2.41
標準偏差	0.468	0.473	0.524	0.508	0.550	0.431
分布 {1/dil.}						
GMT	277	282	256	266	232	254
[95% CI]	[223;345]	[225;352]	[199;330]	[209;338]	[179;299]	[208;310]
最小;最大	16.0;4096	4.00;4096	4.00;2048	2.00;2048	2.00;2048	16.0;2048
Median=Q2	256	256	256	256	256	256
Q1;Q3 {Quantiles}	128;512	128;512	128;512	128;512	128;512	128;512
>= 40 I/dil.						
% (n)	92.7 (89)	94.7 (89)	92.2 (83)	91.5 (86)	90.7 (88)	94.8 (92)
[95% CI]	[85.6;97.0]	[88.0;98.3]	[84.6;96.8]	[83.9;96.3]	[83.1;95.7]	[88.4;98.3]

10

20

## 【0089】

血清群Aについて、10ヶ月における平均SBAタイターは、4回のA/C複合体投与（6、10、14週および9ヶ月）または2回の投与（14週および9ヶ月）を受けた子供の間で異ならなかったが、他の日程のそれぞれのタイターよりも著しく高い。血清群Cについて、14週および9ヶ月におけるA/C複合体は、他の投薬計画よりも高い平均SBAタイターを誘発した。24ヶ月におけるA/C PSの投与により、単回投与複合体日程を受ける2つのグループを含む、A/C複合体被験者において著しく高いSBAタイターを生じた。血清群CについてAよりも反応は低い、超感応性の徴候はない。

## 【0090】

髄膜炎菌A/C複合体ワクチンは、特に14週および9ヶ月において2回投与がされる場合に、若い幼児において安全かつ免疫原性である。1歳におけるA/C複合体の単回投与は、記憶を誘発するようである。

30

## 【0091】

この研究により、血清群AおよびCに対する免疫原性が、多くの異なる投与方法により得られるということが示される。例えば、血清群AおよびCに対する免疫原性は、子供が、14週において1回目のA/C複合体によりおよび9ヶ月に2回目の投与によりワクチン接種される場合に得られる。6および10週に与えられる2回のA/C複合体の一次投与は、任意の追加の利点を提供しないようであった。14週または9ヶ月における単回投与の注射は、24ヶ月における多糖ワクチン接種に対する反応に基づいて、十分長期間の防御を提供するようであった。

40

## 【0092】

DTP3の時である14週において、および麻疹ワクチンが与えられる9ヶ月において、A/C複合体ワクチンが投与される2回投与日程により、AおよびC血清群に対する免疫原性が生じた。

## 【0093】

この研究により、A/C複合体ワクチンは、血清群AおよびCについて持続する免疫原性記憶を提供することが示された。Borrow R et al., J Infect Dis 2002;186:1353-7は、血清群C複合体のみについて、13-16ヶ月または4歳と比較して2、3、および4ヶ月にワクチン接種された幼児について比較できる結果を示している。幼児における血清群C髄膜炎菌複合

50

体ワクチンの3回投与系についてイギリスで重要な経験が蓄積されているが、本研究は、1歳における多重回投与は、少なくともいくつかの複合体製剤については必ずしも必要でないことを示す。

【0094】

本研究はまた、DTPおよびOPVのような通常の幼児免疫と付随してA/C複合体を投与することは、他の抗原に対する免疫応答を妨害しないことを示す。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US2004/020121		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/095 A61P31/00				
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) IPC 7 A61K				
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, WPI Data, EMBASE, PAJ, BIOSIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	CAMPAGNE G ET AL: "SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF THREE DOSES OF A NEISSERIA MENINGITIDIS A + C DIPHTHERIA CONJUGATE VACCINE IN INFANTS FROM NIGER" PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASE JOURNAL, WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 19, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 144-150, XP008015581 ISSN: 0891-3668 page 145 - page 146	1-17		
X	WO 02/058737 A (AVENTIS PASTEUR ; RYALL ROBERT P (US)) 1 August 2002 (2002-08-01) tables 4,5	1-17		
-/--				
<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 : <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           *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         </td> <td style="vertical-align: top;">           *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.            *Z* document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			*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. *Z* document member of the same patent family
*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. *Z* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search  20 December 2004		Date of mailing of the international search report  29/12/2004		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Wagner, R		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter-  
 al Application No  
 PCT/US2004/020121

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/00249 A (DESMONS PIERRE MICHEL ; LEMOINE DOMINIQUE (BE); SMITHKLINE BEECHAM BIO) 3 January 2002 (2002-01-03)	1
A	page 12	2-17
E	WO 2004/067030 A (CHIRON SRL ; COSTANTINO PAOLO (IT)) 12 August 2004 (2004-08-12)	1-3
T	page 30 - page 31	
T	CHIPPAUX J-P ET AL: "Immunogenicity, safety, and memory of different schedules of Neisseria meningitidis A/C-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infants in Niger" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 22, no. 25-26, 3 September 2004 (2004-09-03), pages 3303-3311, XP004526904 ISSN: 0264-410X the whole document	1-17
A	BARTOLONI A ET AL: "Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM197 via adipic acid dihydrazide" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 13, no. 5, 1995, pages 463-470, XP004057721 ISSN: 0264-410X the whole document	4
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 the whole document	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2004/020121

**Box 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:  
Although claims 1-17 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US2004/020121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02058737 A	01-08-2002	CA 2435681 A1	01-08-2002
		EP 1355673 A2	29-10-2003
		HU 0302999 A2	29-12-2003
		LT 2003071 A , B	25-08-2004
		NO 20033816 A	11-09-2003
		SI 21352 A	30-06-2004
		WO 02058737 A2	01-08-2002
		US 2003068336 A1	10-04-2003
		WO 0200249 A	03-01-2002
BG 107422 A	30-09-2003		
BR 0112057 A	17-06-2003		
CA 2412497 A1	03-01-2002		
CN 1449293 T	15-10-2003		
CZ 20024224 A3	14-05-2003		
WO 0200249 A2	03-01-2002		
EP 1296715 A2	02-04-2003		
HU 0301413 A2	28-08-2003		
JP 2004501873 T	22-01-2004		
MA 25824 A1	01-07-2003		
NO 20026175 A	26-02-2003		
PL 360265 A1	06-09-2004		
SK 18432002 A3	05-08-2003		
US 2003180316 A1	25-09-2003		
ZA 200300755 A	28-04-2004		
CA 2442865 A1	17-10-2002		
WO 02080965 A2	17-10-2002		
EP 1390066 A2	25-02-2004		
HU 0303996 A2	01-03-2004		
MX PA03008961 A	12-02-2004		
NO 20034410 A	25-11-2003		
US 2004202668 A1	14-10-2004		
WO 2004067030 A	12-08-2004	WO 2004067030 A2	12-08-2004

## フロントページの続き

(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, IT, 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ライアル, ロバート ピー

アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア州 18360 ストロースバーグ メイン ストリート 4  
11

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA05 AA38 BA16 CC07 DD03 DD23 DD26 DD37 DD41  
DD52 DD57 DD59 DD81 EE03 GG01