

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6266631号
(P6266631)

(45) 発行日 平成30年1月24日(2018.1.24)

(24) 登録日 平成30年1月5日(2018.1.5)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09
A 6 1 K 39/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/10
A 6 1 K 39/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/08
A 6 1 K 39/05 (2006.01)	A 6 1 K 39/05
A 6 1 K 39/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/13

請求項の数 20 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-535023 (P2015-535023)
(86) (22) 出願日	平成25年10月3日(2013.10.3)
(65) 公表番号	特表2015-531389 (P2015-531389A)
(43) 公表日	平成27年11月2日(2015.11.2)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/070647
(87) 国際公開番号	W02014/053607
(87) 国際公開日	平成26年4月10日(2014.4.10)
審査請求日	平成28年9月30日(2016.9.30)
(31) 優先権主張番号	61/744,880
(32) 優先日	平成24年10月3日(2012.10.3)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	61/799,123
(32) 優先日	平成25年3月15日(2013.3.15)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	305060279 グラクソスミスクライン バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー-1330 リクセンサー ル リュ ドランスティテュ 89
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者	コントロールニ, マリオ 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 アンド ダイア グノスティクス エス. アール. エル. 気付

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫原性組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、 i i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、 i i i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、 i v) ジフテリアトキソイドと、 v) 破傷風トキソイドと、 v i) 細胞性または無細胞の百日咳抗原とを含む免疫原性組成物であって、 i v) ジフテリアトキソイド、および、 v) 破傷風トキソイドはコンジュゲートしていない、免疫原性組成物。

【請求項 2】

v i i) 不活化ポリオウイルス抗原をさらに含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

各 G B S 莢膜糖が単位用量あたり 0 . 1 ~ 3 0 μ g の量で存在する、請求項 1 または 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖である前記コンジュゲートが、約 1 : 1 から 1 : 2 の間の糖 : タンパク質比 (w / w) を有し、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖である前記コンジュゲートが、約 1 : 1 から 1 : 2 の間の糖 : タンパク質比 (w / w) を有し、かつ/またはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖である前

10

20

記コンジュゲートが、約 3 : 1 から 1 : 1 の間の糖 : タンパク質比 (w / w) を有する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

前記キャリアタンパク質が、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドまたは CRM 197 である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲート ; および / またはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V 由来の莢膜糖であるコンジュゲートをさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 7】

前記無細胞の百日咳抗原が、解毒された百日咳毒素、線維状赤血球凝集素およびパータクチンを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

前記不活化ポリオウイルス抗原が、ポリオウイルス 1 型株、ポリオウイルス 2 型株およびポリオウイルス 3 型株のそれぞれに由来する抗原を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

前記 コンジュゲートしていないジフテリアトキソイドが、4 L f / m l から 8 L f / m l の間、例えば、0 . 5 m l 用量あたり 4 L f の濃度で存在する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 10】

前記 コンジュゲートしていない破傷風トキソイドが、0 . 5 m l 用量あたり 5 から 10 L f の間の濃度で存在する、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

アルミニウム塩アジュバントを含有する、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 12】

ワクチンである、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

ヒトに投与するためのものである、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 14】

医薬品として用いるためのものである、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

患者における免疫応答を上昇させるための、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

請求項 1、および、請求項 1 を引用する場合の請求項 3 から 15 のいずれか一項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、前記 G B S コンジュゲートを含む第 1 の成分と、 a) 細胞性または無細胞の百日咳抗原、 b) 破傷風トキソイド、および c) ジフテリアトキソイドを含む第 2 の成分とを混合するステップを含む、プロセス。

40

【請求項 17】

請求項 2、および、請求項 2 を引用する場合の請求項 3 から 15 のいずれか一項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、前記 G B S コンジュゲートを含む第 1 の成分と、 a) 細胞性または無細胞の百日咳抗原、 b) 破傷風トキソイド、 c) ジフテリアトキソイド、および d) 不活化ポリオウイルス抗原を含む第 2 の成分とを混合するステップを含む、プロセス。

【請求項 18】

50

前記第1の成分中の前記GBSコンジュゲートが凍結乾燥されており、前記第2の成分が水性抗原を含む、請求項16または17に記載のプロセス。

【請求項19】

請求項1、および、請求項1を引用する場合の請求項3から15のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を調製するためのキットであって、前記キットは、前記GBSコンジュゲートを含む第1の成分と、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、およびc)ジフテリアトキソイドを含む第2の成分とを含み、前記2つの成分が別々の容器に入っている、キット。

【請求項20】

請求項2、および、請求項2を引用する場合の請求項3から15のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を調製するためのキットであって、前記キットは、前記GBSコンジュゲートを含む第1の成分と、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイド、およびd)不活化ポリオウイルス抗原を含む第2の成分とを含み、前記2つの成分が別々の容器に入っている、キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、混合ワクチン、すなわち、そのワクチンを投与することにより被験体を1より多い病原体に対して同時に免疫化することができるような、1より多い病原体由来の免疫原の混合物を含有するワクチンの分野にある。特に、本発明は、*Streptococcus agalactiae*の莢膜糖とキャリアタンパク質のコンジュゲートを含有する混合ワクチンに関する。

20

【背景技術】

【0002】

単回用量の中に1より多い病原性生物体由来する抗原を含有するワクチンは、「多価」または「混合」ワクチンとして公知である。ジフテリア、破傷風および百日咳に対する防御のための三価ワクチン（「DTP」ワクチン）、または麻疹、流行性耳下腺炎および風疹に対する防御のための三価ワクチン（「MMR」ワクチン）を含めた種々の混合ワクチンが、EUおよび米国において、ヒトへの使用について認可されている。混合ワクチンにより、患者に、注射を受ける回数が減るといった利点もたらされ、これにより、コンプライアンスが上昇するという臨床的な利点が生じ得る（例えば、参考文献1の第29章を参照されたい）。

30

【0003】

Streptococcus agalactiae（B群連鎖球菌、GBS）は、25～30%の健康な女性の肛門性器管（anogenital tract）にコロニー形成する溶血性、被包性、グラム陽性の微生物である。GBSは、この細菌を保持する母親から生まれた乳児において新生児感染症を引き起こし、また、新生児敗血症および髄膜炎の主要な原因になっている。この病原体は、同様に、成人における疾患、特に基礎疾患を伴う疾患および高齢者における疾患の重要な原因としてもだんだん認識されてきている。

40

【0004】

*Streptococcus agalactiae*に対するコンジュゲートワクチンは、参考文献2～10などの文書に記載されている。GBS血清型Ia、Ib、II、III、およびVのそれぞれに対するコンジュゲートワクチンは、ヒトにおいて安全かつ免疫原性であることが示されている[11]。参考文献12にも、種々のGBSコンジュゲートを含有するワクチンが開示されている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Paollettiら、*J Biol Chem* (1990) 265: 1

50

8 2 7 8 ~ 8 3

【非特許文献2】Wesselsら、J Clin Invest (1990) 86 : 1428 ~ 33

【非特許文献3】Paollettiら、Infect Immun (1992) 60 : 4009 ~ 14

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、Streptococcus agalactiaeならびにCorynebacterium diphtheriae、Clostridium tetani、Bordetella pertussisおよびポリオウイルスのうちの1または複数に対する防御のための別の改善された混合ワクチンを提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、GBSコンジュゲートと、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原とを含む混合ワクチンの研究に基づく。本発明者らは、これらの混合ワクチンにより、対応する抗原に対する特異的な抗体価が、種々の抗原間の免疫学的干渉をほとんどまたは全く伴わずに惹起されることを見いだした。

【0008】

20

したがって、本発明は、1または複数のGBSコンジュゲートと、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原とを含む免疫原性組成物であって、各GBSコンジュゲートが、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたB群連鎖球菌の莢膜糖である免疫原性組成物を提供する。

【0009】

本発明は、患者における免疫応答を上昇させるための方法であって、本発明による免疫原性組成物を患者に投与するステップを含む方法も提供する。

【0010】

本発明は、本発明による免疫原性組成物を調製するためのプロセスであって、1または複数のGBSコンジュゲートを含む第1の成分と、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原を含む第2の成分とを混合するステップを含むプロセスも提供する。

30

【0011】

本発明は、本発明の免疫原性組成物を調製するためのキットであって、1または複数のGBSコンジュゲートを含む第1の成分と、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原を含む第2の成分とを含み、2つの成分が別々の容器に入っているキットも提供する。

40

【0012】

GBSコンジュゲート

莢膜糖

本発明は、Streptococcus agalactiaeの莢膜糖に基づく。莢膜糖は、GBSのペプチドグリカン骨格と共有結合で連結し、また、ペプチドグリカン骨格に結合した別の糖であるB群抗原とは異なる。

【0013】

GBS莢膜糖は化学的に関連するが、抗原性が全く異なる。すべてのGBS莢膜糖が以下の三糖コアを共有する：

- D - Glc p N A c (1 3) - D - Gal p (1 4) - D - Glc p

50

種々のGBS血清型は、このコアの修飾のされ方が異なる。血清型IaとIIIの差異は、例えば、このコアにおいて、連続した三糖コアを連結するためにGlcNAc(Ia)またはGal(III)のいずれかが使用されることから生じる。血清型IaおよびIbはどちらも、コア内のGlcNAcに連結した[-D-NeupNAc(23) -D-Galp-(1)]二糖を有するが、連結は14(Ia)または13(Ib)のいずれかである。

【0014】

GBS関連疾患は、主に血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、およびVIIIから生じ、その85%超が5種の血清型：Ia、Ib、IIIおよびVによって引き起こされる。本発明は、典型的には、これらの4種の血清型のうちの1または複数由来の糖、特に、血清型：Ia、IbおよびIIIのうちの1または複数由来の糖を用いる。これらの4種の血清型のそれぞれの莢膜糖は、(a)すべての場合においてガラクトース残基に23で連結している末端のN-アセチル-ノイラミン酸(NeuNAc)残基(一般にシアル酸と呼ばれる)と、(b)三糖コア内部のN-アセチル-グルコサミン残基(GlcNAc)とを含む。4種の糖のすべてが三糖コア内部のガラクトース残基を含むが、血清型Ia、Ib、IIおよびIIIは、各繰り返し単位内に追加的なガラクトース残基も含有する。

【0015】

一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、1種のGBSコンジュゲートを含む。例えば、GBSコンジュゲートは、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートであってよい。GBSコンジュゲートは、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートであってよい。GBSコンジュゲートは、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートであってよい。GBSコンジュゲートは、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖であるコンジュゲートであってよい。GBSコンジュゲートは、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型II由来の莢膜糖であるコンジュゲートであってよい。

【0016】

免疫原性組成物は、1より多いGBSコンジュゲートを含んでよい。2種、3種、4種または5種のGBSコンジュゲートを含む本発明の実施形態が下に記載されている。一実施形態では、第1のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であり、第2のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖である。第2の実施形態では、第1のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であり、第2のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖である。第3の実施形態では、第1のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であり、第2のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖である。第4の実施形態では、第1のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であり、第2のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖である。第5の実施形態では、第1のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であり、第2のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖である。第6の実施形態では、第1のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であり、第2のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖である。さらなる実施形態では、第1のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であり、第2のGBSコンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型II由来の莢膜糖である。さらなる実

10

20

30

40

50

タンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であり、第 3 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V 由来の莢膜糖である。

【 0 0 1 8 】

同様に、免疫原性組成物は、4 種の G B S コンジュゲートを含んでよい。一実施形態では、第 1 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であり、第 2 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であり、第 3 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であり、第 4 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V 由来の莢膜糖である。一実施形態では、第 1 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であり、第 2 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であり、第 3 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I 由来の莢膜糖であり、第 4 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖である。一実施形態では、第 1 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であり、第 2 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であり、第 3 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I 由来の莢膜糖であり、第 4 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V 由来の莢膜糖である。一実施形態では、第 1 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であり、第 2 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I 由来の莢膜糖であり、第 3 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であり、第 4 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V 由来の莢膜糖である。一実施形態では、第 1 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であり、第 2 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I 由来の莢膜糖であり、第 3 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であり、第 4 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V 由来の莢膜糖である。

【 0 0 1 9 】

同様に、免疫原性組成物は、5 種の G B S コンジュゲートを含んでよい。例えば、第 1 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であり、第 2 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であり、第 3 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であり、第 4 の G B S コンジュゲートはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V 由来の莢膜糖であり、第 5 の G B S コンジュゲートは、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I 由来の莢膜糖である。

【 0 0 2 0 】

典型的には、上記の免疫原性組成物は、具体的に記載されているもの以外の任意の G B S コンジュゲート、特に、具体的に記載されているもの以外の G B S 血清型由来の莢膜糖を含む G B S コンジュゲートは含まない。しかし、いくつかの実施形態では、組成物は、他の G B S 血清型由来の莢膜糖を含む G B S コンジュゲートを含めた他の G B S コンジュゲートを含んでよい。例えば、組成物は、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V I 由来の莢膜糖である G B S コンジュゲートを含んでよい。別の可能性では、組成物は、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 V I I I 由来の莢膜糖である G B S コンジュゲートを含んでよい。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明に有用な糖は、それらの天然の形態であってよく、または修飾されていてよい。例えば、糖は、天然の莢膜糖よりも短くてよく、または化学的に修飾されていてよい。特に、本発明において使用される血清型Vの莢膜糖は、参考文献13および14に記載の通り修飾されていてよい。例えば、参考文献13および14に記載の通り実質的に脱シアル化された血清型Vの莢膜糖が、本発明において用いるために具体的に想定される。脱シアル化されたGBS血清型Vの莢膜糖は、参考文献13に記載の通り、精製されたGBS血清型Vの莢膜糖を弱酸性条件下で（例えば、0.1Mの硫酸、80℃で60分間）処理することによって、またはノイラミニダーゼで処理することによって調製することができる。脱シアル化されたGBS血清型Vの莢膜糖を調製するための好ましい方法は、精製された糖を1Mの酢酸を用いて、81℃で2時間処理することによる。したがって、本発明に従って使用される糖は、天然に見出されるような実質的に全長の莢膜多糖であってよく、または、天然の長さよりも短くてよい。全長の多糖は、本発明で用いるために、例えば、弱酸中での加水分解によって、加熱によって、サイズ選別クロマトグラフィー（sizing chromatography）などによって解重合させて、より短い断片を得ることができる。鎖長は、ウサギにおいてGBS糖の免疫原性に影響を及ぼすことが報告されている[5]。特に、本発明において使用される血清型IIおよび/またはIIIの莢膜糖は、参考文献15および16に記載の通り解重合させることができる。これらの文書には、II型およびIII型の莢膜糖を、穏やかな脱アミノ切断により部分的に解重合させて、還元末端の2,5-アンヒドロ-D-マンノース残基を有する抗原断片にすることが記載されている。簡単に述べると、莢膜糖を0.5NのNaOHに溶解させ、70℃で約1~4時間加熱する。このインキュベーションの長さによって解重合の程度を制御し、これは、標準の方法によって（例えば、参考文献15に記載のHPLCによって）決定することができる。試料を氷水浴内で冷却した後、氷酢酸を加えてpH4にする。次いで、部分的にN-脱アシル化された生成物を、5%（wt/vol）のNaNO₂を4℃で2時間にわたって攪拌しながら加えることによって脱アミノ化する。新たに形成された2,5-アンヒドロ-D-マンノース残基の遊離のアルデヒドは、参考文献[12]に記載の通り、キャリアタンパク質とコンジュゲートするために用いることができる。

【0022】

破傷風トキソイドキャリアとのコンジュゲートを形成するために、解重合した材料を用いることを含めた、エンド-β-ガラクトシダーゼによる血清型IIIの莢膜糖の解重合が報告されている[参考文献2&5~7]。GBS血清型IIIおよびVII由来の莢膜多糖のオゾン分解も解重合のために用いられている[17]。MW>30kDaの糖を用いることが好ましく、実質的に全長の莢膜多糖を用いることができる。血清型Iaについては、MWが150~400kDa、特に、300~350kDaの範囲である多糖を用いることが好ましい。典型的には、MWが約330kDaである血清型Iaの糖を用いる。血清型Ibについては、MWが150~400kDa、特に、250~300kDaの範囲である多糖を用いることが好ましい。典型的には、MWが約280kDaである血清型Ibの糖を用いる。血清型IIIについては、MWが50~200kDa、特に、100~150kDaの範囲である多糖を用いることが好ましい。典型的には、MWが約140kDaである血清型III糖を用いる。血清型Vについては、MWが50~200kDa、特に150~200kDaの範囲である多糖を用いることも好ましい。典型的には、MWが約180kDaである血清型Vの糖を用いる。これらの分子質量は、Polymer Standard Serviceから入手可能なものなどのデキストラン標準物質と比較してゲル濾過によって測定することができる[18]。

【0023】

糖は、天然に見出される莢膜糖と比較して化学的に修飾することができる。例えば、糖は、脱O-アセチル化（部分的にまたは完全に）、脱N-アセチル化（部分的にまたは完全に）、N-プロピオン酸化（N-propionated）（部分的にまたは完全に）などをされてよい。脱アセチル化は、コンジュゲートする前、その間、またはその後

10

20

30

40

50

こり得るが、コンジュゲートする前に起こることが好ましい。特定の糖に応じて、脱アセチル化は免疫原性に影響を及ぼす場合と影響を及ぼさない場合がある。種々の血清型のGBS糖に対するO-アセチル化の関連性は参考文献19において論じられており、いくつかの実施形態では、7位、8位および/または9位のシアル酸残基のO-アセチル化が、コンジュゲートする前、その間およびその後で、例えば、保護/脱保護によって、再アセチル化によってなどで保持される。しかし、典型的には、本発明において使用されるGBS糖は、7位、8位および/または9位のシアル酸残基のO-アセチル化を実質的に有さない。特に、GBS糖が、参考文献[12]に記載の通り塩基抽出によって精製された場合には、O-アセチル化は一般には失われる(参考文献19)。脱アセチル化の作用などは、常套的なアッセイによって評価することができる。

10

【0024】

莢膜糖は、本明細書の参考文献、例えば、参考文献3および20などに記載の公知の技法によって精製することができる。典型的なプロセスは、塩基抽出、遠心分離、濾過、RNアーゼ/DNアーゼ処理、プロテアーゼ処理、濃縮、サイズ排除クロマトグラフィー、限外濾過、陰イオン交換クロマトグラフィー、およびさらなる限外濾過を伴う。GBS細胞を、細菌の細胞壁を切断して細胞壁成分を遊離させる酵素であるムタノリシン(mutanolysin)で処理することも有用である。

【0025】

代替として、参考文献21に記載の精製プロセスを用いることができる。このプロセスは、塩基抽出、エタノール/CaCl₂処理、CTAB沈殿、および再可溶化を伴う。別の代替のプロセスが参考文献22に記載されている。

20

【0026】

しかし、本発明は、天然の供給源から精製された糖に限定されず、糖は、完全な合成または部分的な合成などの他の方法によって得ることができる。

【0027】

上記の免疫原性組成物は、単位用量あたり任意の適切な量の莢膜糖(複数可)を含んでよい。各用量の中で、個々の糖抗原の量は、一般に、0.1から50μgの間(糖の質量として測定する)、特に、1から50μgの間または0.5から25μgの間、より詳細には、2.5~7.5μg、例えば、約1μg、約2.5μg、約5μg、約10μg、約15μg、約20μgまたは約25μgになる。各用量の中で、GBS莢膜糖の総量は、一般に、70μg(糖の質量として測定する)、例えば、60μgである。特に、総量は、40μg(例えば、30μg)または20μg(例えば、15μg)であってよい。これらの総量は、免疫原性組成物が、i)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、ii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートとを含む場合に特に有効である。潜在的な毒性を低下させるために、単位用量あたりの莢膜糖(複数可)の総量を最小限にすることが有利であり得る。したがって、本発明では、一般には、20μg、例えば、15μg、7.5μgまたは1.5μgの総量を使用する。

30

40

【0028】

単位用量あたりの莢膜糖(複数可)の量をさらに最小化することが可能であり得る。特に、莢膜糖(複数可)の適量は、単位用量あたり0.1μg~5μgであり得る。したがって、典型的には、各GBS莢膜糖は、単位用量あたり0.1μg~5μg、例えば、0.5μg、2.5μgまたは5μgの量で存在してよい。例えば、各GBS莢膜糖は、単位用量あたり0.5μg~5μg、1μg~4μg、2μg~3μg、または約2.5μgの量で存在してよい。これらの量は、免疫原性組成物が、i)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、ii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の

50

莢膜糖であるコンジュゲートとを含む場合に特に有効である。

【 0 0 2 9 】

免疫原性組成物が1より多いGBSコンジュゲートを含む上記の実施形態では、所与の莢膜糖の質量と他の莢膜糖（複数可）の質量の比率は変動してよい。例えば、免疫原性組成物が、GBS血清型I a、I bおよびIIIの莢膜糖を含む場合、GBS血清型I a、I bおよびIIIの莢膜糖の質量の比率は1：1：1である。

【 0 0 3 0 】

コンジュゲーション

本発明は、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a、I b、II、IIIまたはV由来の莢膜糖であるGBSコンジュゲートを用いる。本明細書で使用される場合、「コンジュゲート」という用語は、2つの部分が共有結合して単一の構造を形成することによって形成される化合物を指し、第1の部分は抗原、特に多糖であり、第2の部分はキャリアタンパク質などの免疫原性キャリアである。結合は、分子間の共有結合性の化学結合によって、またはジアミノアルカンおよび1または複数のアミノ酸を非排他的に含み、そのうちの1つがキャリアにコンジュゲートさせるための遊離のスルフヒドリル基、カルボキシル基、アミノ基もしくは他の基をもたらず連結基を使用することによって生じさせることができる。本発明の目的に関して、一般に、「コンジュゲート」という用語は、キャリアタンパク質に共有結合で連結した細菌の抗原、特に細菌の糖または多糖を指す。一般に、糖とキャリアの共有結合性コンジュゲーションにより、T非依存性抗原からT依存性抗原に変換されるので、糖の免疫原性が増強され、したがって免疫記憶が刺激される。コンジュゲーションは、小児用ワクチンに特に有用であり[例えば、参考文献23]、これは周知の技法である[例えば、参考文献24～32に概説されている]。したがって、本発明のプロセスは、精製された糖をキャリア分子とコンジュゲートするさらなるステップを含み得る。

【 0 0 3 1 】

GBS糖のコンジュゲーションは、広く報告されている。例えば、参考文献2～103567を参照されたい。GBS糖をコンジュゲートするための典型的な先行技術のプロセスは、典型的には、精製された糖の、破傷風トキソイド(TT)またはCRM197などのキャリアタンパク質との還元アミノ化を伴う[3]。還元アミノ化には、キャリアのアミノ酸の側鎖上のアミン基および糖のアルデヒド基が関与する。GBS莢膜糖はそれらの天然の形態ではアルデヒド基を含まないので、典型的には、これを生じさせた後に、糖のシアル酸残基の一部（例えば、5%から40%間、特に、10%から30%間、好ましくは約20%）を酸化すること（例えば、過ヨウ素酸酸化）によってコンジュゲートする[3、33]。GBS血清型I a、I b、II、III、およびVのそれぞれについて、このように調製されたコンジュゲートワクチンはヒトにおいて安全かつ免疫原性であることが示されている[11]。典型的には、本発明の免疫原性組成物中のコンジュゲートのすべてがこのように調製されたものである。しかし、本発明において脱シアル化された血清型Vの莢膜糖を用いる場合には、この糖にアルデヒド基を生じさせた後に、糖のガラクトース残基の一部（例えば、5%から40%間、特に、10%から30%間、好ましくは約20%）を酸化すること（例えば、過ヨウ素酸酸化）によってコンジュゲートすることができる[2、33]。代替のコンジュゲーションプロセスは、参考文献34に記載の通り、糖の-NH₂基（脱N-アセチル化によるものか、またはアミンの導入後のもの）を、二官能性リンカーと併せて用いることを伴う。いくつかの実施形態では、本発明の免疫原性組成物中のコンジュゲートのうちの1または複数はこのように調製されたものである。別の代替のプロセスが参考文献15および16に記載されている。このプロセスでは、穏やかな脱アミノ切断によるII型またはIII型の莢膜糖の解重合に由来する、末端の2,5-アンヒドロ-D-マンノース残基の遊離のアルデヒド基を還元アミノ化によるコンジュゲーションのために用いる。いくつかの実施形態では、本発明の免疫原性組成物中のコンジュゲートのうちの1または複数はこのように調製されたものである。コンジュゲートは、別々のプロセスによって調製し、組み合わせて単一の投薬製剤にすることができる

10

20

30

40

50

【0032】

キャリアタンパク質

本発明は、キャリアタンパク質の使用に関する。多糖はそれ自体で免疫原性であるが、多糖をキャリアタンパク質にコンジュゲートすることにより、免疫原性を改善または増強することができる。したがって、本明細書で使用される場合、「キャリア」という用語は、抗原（例えば、多糖など）にコンジュゲートさせ、動物に投与すると、その動物における免疫応答、特に防御免疫応答を誘導または増強し、抗原、例えば、上記の多糖に特異的に結合する抗体の産生を惹起する免疫原性物質を指す。有用なキャリアタンパク質としては、ジフテリアトキソイドまたは破傷風トキソイドなどの、細菌の毒素または類毒素が挙げられる。毒素または類毒素の断片、例えば、破傷風トキソイドの断片Cも用いることができる[35]。

10

【0033】

ジフテリア毒素のCRM197変異体[36~38]は、本発明において使用するための特に有用なキャリアである。ジフテリアは、*Corynebacterium diphtheriae*によって引き起こされる、急性の、致死性である場合が多い細菌性疾患であり、疾患の臨床症状発現は、循環ジフテリア毒素が存在することに主に起因する。ジフテリアに対する能動免疫化プログラムは、一般に、ジフテリア毒素をホルムアルデヒドにより解毒することによって生成されたジフテリアトキソイドを含有する調製物に基づいている（以下を参照されたい）。交差反応性材料（CRM197）は、遺伝的に解毒されたジフテリア毒素の調製物である。CRM197は、ジフテリア毒素（DT）とは単一のアミノ酸のみが異なり、したがって、DTと高度に交差反応性である（CRM = 交差反応性材料）。ジフテリア毒素のこの変異体にはホルムアルデヒドを用いた解毒が必要なく、また、精製された抗原の均一な調製物を、例えば、カザミノ酸および酵母抽出物の培地で成長させた*Corynebacterium diphtheriae* C7株（ベータ197）の培養物から容易に得ることができる。あるいは、CRM197は、US5,614,382に従って、組換えによって調製することができる。CRM197は、いくつかの荚膜多糖抗原に対するキャリアタンパク質としてのヒトへの使用に関して認可されており、ホルムアルデヒド処理によって調製された従来のジフテリアトキソイドに対する潜在的な代替である。下記の通り、CRM197のキャリアとしての使用は、このキャリアによっても*Corynebacterium diphtheriae*に対する抗体の産生が惹起され得るので、有利であり得る。

20

30

【0034】

他の適切なキャリアタンパク質としては、*N. meningitidis*の外膜タンパク質[39]、合成ペプチド[40、41]、熱ショックタンパク質[42、43]、百日咳タンパク質[44、45]、サイトカイン[46]、リンフォカイン[46]、ホルモン[46]、増殖因子[46]、ヒト血清アルブミン（組換え型であることが好ましい）、種々の病原体由来抗原由来の複数のヒトCD4⁺T細胞エピトープを含む人工タンパク質[47]例えば、N19[48]、*H. influenzae*由来のタンパク質D[49、50]、肺炎球菌の表面タンパク質PspA[51]、ニューモリシン[52]、鉄取り込みタンパク質（iron-uptake protein）[53]、*C. difficile*由来の毒素Aまたは毒素B[54]、組換え型の*Pseudomonas aeruginosa*の細胞外タンパク質（exoprotein）A（rEPA）[55]、GBSタンパク質（特に、GBS67）[56]などが挙げられる。

40

【0035】

キャリアへの結合は、例えば、キャリアタンパク質のリジン残基の側鎖の-NH₂基、またはアルギニン残基の側鎖の-NH₂基、またはN末端の-NH₂基を介することが好ましい。結合は、例えば、システイン残基の側鎖の-SH基を介してもよい。

【0036】

例えば、キャリアが抑制される危険性を低下させるために、1より多いキャリアタンバ

50

ク質を用いることが可能である。したがって、異なるGBS血清型に対して異なるキャリアタンパク質を用いることができ、例えば、血清型Iaの糖をCRM197とコンジュゲートすることができ、その一方で血清型Ibの糖を破傷風トキソイドとコンジュゲートすることができる。特定の糖抗原に対して1より多いキャリアタンパク質を用いることも可能であり、例えば、血清型IIIの糖を2群にし、その一部をCRM197とコンジュゲートし、その他を破傷風トキソイドとコンジュゲートすることができる。しかし、典型的には、すべての糖に対して同じキャリアタンパク質を用いることが典型的である。

【0037】

単一のキャリアタンパク質は、1より多い糖抗原を保有してよい[57、58]。例えば、単一のキャリアタンパク質を、血清型IaおよびIb由来の糖とコンジュゲートすることができる。この目標を実現するために、コンジュゲーション反応の前に異なる糖を混合することができる。しかし、典型的には、各血清群に対してコンジュゲートを別々にし、コンジュゲートした後に異なる糖を混合することが好ましい。別々のコンジュゲートは、同じキャリアに基づいてよい。

10

【0038】

典型的には、糖：タンパク質比(w/w)が1：5(すなわちタンパク質過剰)から5：1(すなわち糖過剰)の間、特に、1：5から2：1の間の比率であるGBSコンジュゲートを用いる。本発明においてキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるGBSコンジュゲートを用いる場合には、糖：タンパク質比(w/w)は、典型的には、約1：1から1：2の間、特に、約1：1.3である。同様に、本発明においてキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートを用いる場合には、比率は、典型的には、約1：1から1：2の間、特に、約1：1.3である。本発明においてキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートを用いる場合には、糖：タンパク質比(w/w)は、典型的には、約3：1から1：1の間、特に、約2：1である。しかし、糖：タンパク質比(w/w)が約1：1~1：5、特に、約1：3.3である、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型IIIも用いることができる。本発明でキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型II由来の莢膜糖であるコンジュゲートを使用する場合には、比率は、一般には、約2：1から1：1の間である。最後に、本発明においてキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖であるコンジュゲートを用いる場合には、比率は、典型的には、約2：1から1：1の間、特に、約1.1：1である。したがって、特に、長い糖鎖では、糖の重量過剰が典型的である。

20

30

【0039】

組成物は、少量の遊離のキャリアを含んでよい[59]。所与のキャリアタンパク質が本発明の組成物中に遊離の形態およびコンジュゲートさせた形態の両方で存在する場合、コンジュゲートしていない形態は、典型的には、全体として、組成物中のキャリアタンパク質の総量の5%以下であり、例えば、2重量%未満で存在する。

【0040】

コンジュゲートした後、遊離の糖およびコンジュゲートさせた糖を分離することができる。疎水性クロマトグラフィー、タンジェンシャル限外濾過、ダイアフィルトレーションなどを含めた多くの適切な方法がある[参考文献60&61なども参照されたい]。好ましい方法は参考文献62に記載されている。

40

【0041】

本発明の組成物が解重合したオリゴ糖を含む場合、解重合がコンジュゲーションに先行することが好ましい。

【0042】

1または複数の抗原

「抗原」とは、抗体の産生および/またはT細胞応答を刺激することによって体内の免疫応答、特に防御免疫応答を刺激する化合物、組成物、または物質である。上記の細菌の

50

多糖コンジュゲートは抗原であるが、本明細書で使用される場合には、一般に、「抗原」という用語は、ジフテリアトキソイド（複数可）、破傷風トキソイド（複数可）、百日咳トキソイド（複数可）、細胞性の百日咳抗原（複数可）、無細胞の百日咳抗原（複数可）および下記の不活化ポリオウイルス抗原を含めたポリオウイルス抗原（複数可）を指すために使用される。したがって、この用語は、*Streptococcus agalactiae*に対する防御を主にもたらすコンジュゲート成分（複数可）と、*Corynebacterium diphtheriae*、*Clostridium tetani*、*Bordetella pertussis*および/またはポリオウイルスに対する防御をもたらす成分（複数可）とを区別するために使用される。「1または複数の」という用語は、本明細書で使用される場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多くを指す。

10

【0043】

ジフテリアトキソイド

ジフテリアは、胞子を形成しないグラム陽性好気性菌である *Corynebacterium diphtheriae* によって引き起こされる。この生物体は、もはや毒性ではないが抗原性は残っており、注射後に特異的な抗毒素抗体の産生を刺激することができるトキソイドが生じるように処理する（例えばホルムアルデヒドを使用して）ことができる。ジフテリアトキソイドは、参考文献63の第13章において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って調製されたものである。ジフテリアトキソイドは、*C. diphtheriae* を、ウシ抽出物を補充してもよい成長培地（例えばFenton培地、またはLinggoud & Fenton培地）で成長させ、その後、ホルムアルデヒド処理し、限外濾過し、沈殿させることによって得ることができる。次いで、トキソイド化した材料を滅菌濾過および/または透析を含むプロセスによって処理することができる。

20

【0044】

ジフテリアトキソイドの量は、国際単位（IU）で表すことができる。例えば、NIBSC [64] により、アンブルあたり160 IUを含有する「Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999」[65、66]が供給されている。IU系に対する代替として、「Lf」単位（「凝結単位（flocculating unit）」、「限界凝結量（limit of flocculation dose）」、または「凝結の限界（limit of flocculation）」）は、1国際単位の抗毒素と混合した際に、最適に凝結した混合物が生じるトキソイドの量と定義される[67]。例えば、NIBSCにより、アンブルあたり300 Lfを含有する「Diphtheria Toxoid, Plain」[68]、アンブルあたり900 Lfを含有する「The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test」[69]が供給されている。IU系とLf系との間の変換は特定のトキソイド調製物に依存する。

30

【0045】

C. diphtheriae の培養にウシの材料を使用する場合、該材料は、牛海綿状脳症（BSE）を伴わない、または他の伝染性海綿状脳症（TSE）を伴わない供給源から得るべきである。

40

【0046】

本発明の免疫原性組成物中のジフテリアトキソイドは、一般には、投与した際に免疫応答を惹起することができる量で存在する。ジフテリアトキソイドにより、防御免疫応答を惹起することができることが理想的である。本発明の免疫原性組成物中のジフテリアトキソイドの量は、一般には、用量あたり1~50 Lfである。青年および成人用の追加刺激ワクチン（booster vaccine）は、一般には、4 Lf/mlから8 Lf/mlの間、例えば、0.5 ml用量あたり2.5 Lf、好ましくは4 Lfのジフテリアト

50

キソイドを含有する。小児用ワクチンは、一般には、20から50Lf/mlの間、例えば、0.5ml用量あたり10Lfまたは25Lfのジフテリアトキシoidを含有する。

【0047】

小児用混合ワクチンに関しては、ジフテリアトキシoidと破傷風トキシoidの比は、一般には、1を超え(すなわち、小児用ワクチンでは、通常、ジフテリアトキシoidが過剰である)、一般に、2:1から3:1の間(Lf単位で測定)、例えば、2.5:1である。対照的に、青年または成人(通常、ジフテリアトキシoidおよび破傷風トキシoidを含む小児用混合ワクチンを少なくとも1回受けている)に投与される追加刺激ワクチンに関しては、ジフテリアトキシoidと破傷風トキシoidの比は、一般には、1を超え(すなわち、追加刺激ワクチンでは、通常、破傷風トキシoidが過剰である)、一般に、1.5:1から2.5:1の間、例えば、2:1である。ジフテリアトキシoidは、一般には、

10

【0048】

「ジフテリア成分」、言い換えると*Corynebacterium diphtheriae*に対する防御をもたらす免疫応答を惹起するために使用される免疫原性組成物の一部は、CRM197、ジフテリアトキシoidまたはこれらの組み合わせの形態で提供されることが当業者には理解されよう。

【0049】

一部の実施形態では、CRM197がキャリアタンパク質として、すなわち、コンジュゲートの一部として存在する場合、本発明の組成物中のコンジュゲートしていない(「遊離の」)ジフテリアトキシoidの量を減少させることができる。他の実施形態では、CRM197がキャリアタンパク質として、すなわち、コンジュゲートの一部として存在する場合、ジフテリアトキシoidは存在せず、本発明の組成物中に存在しなくてよいが、それでも免疫原性組成物により、*C. diphtheria*に対する防御をもたらす免疫応答を惹起することができ得る。したがって、免疫原性組成物がコンジュゲートしていないジフテリアトキシoidとコンジュゲートしたジフテリアトキシoidの両方および/またはCRM197を含む場合には、ジフテリアトキシoid/CRM197の総量は、4Lf/mlから8Lf/mlの間の濃度で用量あたり1~50Lf、例えば、20から50Lf/mlの間の濃度で0.5ml用量あたり2.5Lfまたは0.5ml用量あたり4Lf、例えば、0.5ml用量あたり10Lfまたは0.5ml用量あたり25Lfと同等であ

20

30

【0050】

ジフテリアトキシoidを水酸化アルミニウムアジュバントに吸着させることができる。

【0051】

一般には、ジフテリアトキシoid抗原を含む免疫原性組成物は、いかなる水銀保存剤も実質的に含まない。

40

【0052】

破傷風トキシoid

破傷風は、胞子を形成するグラム陽性桿菌である*Clostridium tetani*によって引き起こされる。この生物体は、もはや毒性ではないが抗原性は残っており、注射後に特異的な抗毒素抗体の産生を刺激することができるトキシoidを生じるように処理され得るエンドペプチダーゼ(「破傷風毒素」)を発現する。破傷風トキシoidは、参考文献1の第27章においてより詳細に開示されている。好ましい破傷風トキシoidは、ホルムアルデヒド処理によって調製されたものである。破傷風トキシoid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)で成長させ、その後、ホルムアルデヒド処理し、限外濾過し、沈殿させることによって得ることができる。

50

次いで、材料を、滅菌濾過および/または透析を含むプロセスによって処理することができる。

【0053】

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 [70]により、アンプルあたり469IUを含有する「Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000」[71、72]が供給されている。IU系に対する代替として、「Lf」単位が、1国際単位の抗毒素と混合した際に、最適に凝結した混合物が生じるトキソイドの量と定義される[73]。例えば、NIBSCにより、アンプルあたり1000Lfを含有する「The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test」[74]が供給されている。IU系とLf系との間の変換は特定のトキソイド調製物に依存する。

10

【0054】

C. tetaniの培養にウシの材料を使用する場合、該材料は、牛海綿状脳症(BSE)を伴わない、または他の伝染性海綿状脳症(TSE)を伴わない供給源から得るべきである。

【0055】

本発明の免疫原性組成物中の破傷風トキソイドは、一般には、投与した際に免疫応答を惹起することができる量で存在する。理想的には、破傷風トキソイドにより、防御免疫応答を惹起することができる。本発明の免疫原性組成物中の破傷風トキソイドの量は、一般には、用量あたり1~20Lfである。青年および成人用の追加刺激ワクチンは、一般には、0.5ml用量あたり5Lfの破傷風トキソイドを含有する。小児用ワクチンは、一般には、0.5ml用量あたり5から10Lfの間の破傷風トキソイドを含有する。

20

【0056】

破傷風トキソイドは、一般には、コンジュゲートしていない。しかし、一部の実施形態では、破傷風トキソイドは、遊離の(コンジュゲートしていない)形態とコンジュゲートした形態の両方で存在し得るか、あるいは主にコンジュゲートした形態で存在してもよく、破傷風トキソイドの80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%超がコンジュゲートした形態で存在してもよいことが当業者には明らかであろう。したがって、本発明の免疫原性組成物中の破傷風トキソイドの量は、コンジュゲートしていない破傷風トキソイド単独、コンジュゲートした破傷風トキソイド単独またはコンジュゲートしていない破傷風トキソイドとコンジュゲートした破傷風トキソイドの合計を指す場合がある。特定の実施形態では、破傷風トキソイドはGBS莢膜糖にコンジュゲートしていない。特定の実施形態では、破傷風トキソイドは、ヘモフィルスb抗原にコンジュゲートしている。特定の実施形態では、破傷風トキソイドは、GBS莢膜多糖コンジュゲートの一部として、および非GBS抗原とのコンジュゲートの一部として存在してよい。明瞭にするために、一部の場では、コンジュゲートした形態の破傷風トキソイドは「-TT」という名称を使用して言及され得る。

30

【0057】

破傷風トキソイドを水酸化アルミニウムアジュバントに吸着させることができるが、これは必要であるとは限らない(例えば、使用することができる総破傷風トキソイドの0~10%を吸着させる)。

40

【0058】

一般には、破傷風トキソイドを含む免疫原性組成物は、いかなる水銀保存剤も実質的に含まない。

【0059】

百日咳トキソイド

Bordetella pertussisは、百日咳を引き起こす、胞子を形成しないグラム陰性好気性菌である。参考文献1の第21章においてより詳細に記載されている

50

通り、*B. pertussis*に対するワクチンは、長年利用可能であり、細胞性(wP)および無細胞(aP)の2つのカテゴリに入る。細胞性のワクチンは、死滅させ、非活性化した(例えば、ホルマリンおよび/または熱を用いて処理することによって)*B. pertussis*細胞全体を含むが、無細胞のワクチンは、ネイティブな細菌から精製されたか、または組換え宿主において発現させた後に精製された特定の精製された*B. pertussis*抗原を含む。

【0060】

細胞性の百日咳抗原

本発明は、不活化した*B. pertussis*細胞の形態の細胞性の百日咳抗原を使用することができる。細胞性の百日咳抗原の調製物は、文書で十分に裏付けられており(例えば、参考文献1の第21章を参照されたい)、例えば、*B. pertussis*のI相培養物を熱により不活化することによって得ることができる。

10

【0061】

wP抗原の量は、国際単位(IU)で表すことができる。例えば、NIBSCにより、アンプルあたり46IUを含有する「Third International Standard For Pertussis Vaccine」[75]が供給されている。各アンプルは、8リットルのM/15 Sorensenバッファ、pH7.0で希釈した細菌の懸濁物10リットルを含有した水溶液の2.0mlアリコートの凍結乾燥残留物を含有する(U.S. Opacity Standardの観点から180不透明度単位と同等である)。IU系に対する代替として、「OU」単位(「不透明度単位」)も使用される(例えば、4OUは約1IUである)。

20

【0062】

本発明の免疫原性組成物中の細胞性の百日咳抗原は、一般には、投与した際に免疫応答を惹起することができる量で存在する。理想的には、細胞性の百日咳抗原により、防御免疫応答を惹起することができる。本発明の免疫原性組成物中のwP抗原の量は、一般には、少なくとも用量あたり4IUである。

【0063】

細胞性の百日咳抗原は、リン酸アルミニウムアジュバントに吸着させることもでき、それと混合することもできる。

【0064】

無細胞の百日咳抗原

本発明では、単一のワクチン中に1より多い無細胞の百日咳(aP)抗原、例えば、以下の周知であり、よく特徴付けられた*B. pertussis*抗原のうちの2種または3種を使用することができる:(1)解毒された百日咳毒素(百日咳トキソイド、または「PT」);(2)線維状赤血球凝集素(「FHA」);(3)パータクチン(「69キログルトンの外膜タンパク質」としても公知である)。最も好ましくは、これらの3種の抗原をすべて使用すべきである。これらの3種の抗原は、改変Stainer-Scholte液体培地で成長させた*B. pertussis*の培養物から単離することによって調製することが好ましい。PTおよびFHAは発酵ブロスから単離することができる(例えば、ヒドロキシアパタイトゲルに吸着させることによって)、一方パータクチンは細胞から加熱処理および凝結(例えば、塩化バリウムを使用する)によって抽出することができる。抗原は逐次的なクロマトグラフィーステップおよび/または沈殿ステップで精製することができる。PTおよびFHAは、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティー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って精製することができる。パータクチンは、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って精製することができる。

30

40

【0065】

FHAおよびパータクチンは、本発明に従って使用する前にホルムアルデヒドを用いて処理することができる。PTは、ホルムアルデヒドおよび/またはグルタルアルデヒドを用いて処理することによって解毒することが好ましい。この化学的な解毒手順に対する代

50

替として、PTは、変異誘発によって酵素活性を低下させた変異体PTであってよいが〔76〕、化学的処理によって解毒することが好ましい。

【0066】

使用することができる別の無細胞の百日咳抗原としては線毛（例えば、凝集原2および3）が挙げられる。

【0067】

aP抗原（複数可）は、吸着していない状態で使用することができるが、使用前に1または複数のアルミニウム塩アジュバント（複数可）に吸着させることが好ましい。aP抗原は、水酸化アルミニウムアジュバントに吸着させることが好ましい。

【0068】

一般には、aP抗原を含む免疫原性組成物は、水銀保存剤（例えば、チメロサル）を実質的に含まない。

【0069】

無細胞の百日咳抗原は、一般には、本発明の免疫原性組成物中に、投与した際に免疫応答を惹起することができる量で存在する。無細胞の百日咳抗原により、防御免疫応答を惹起することができることが理想的である。無細胞の百日咳抗原の量は、一般には、マイクログラムで表される。ワクチン中のPTの濃度は、通常、5から50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間である。典型的なPT濃度は、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。ワクチン中のFHAの濃度は、通常、10から50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間である。典型的なFHA濃度は、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。ワクチン中のパータクチンの濃度は、通常、5から16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間である。典型的なパータクチン濃度は、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。例えば、青年および成人用の追加刺激ワクチンは、一般には、0.5ml用量あたり2.5~8 μg のPT、4から8 μg の間のFHAおよび2.5から8 μg のパータクチンを含む。一般には、追加刺激ワクチンは、0.5ml用量あたり4 μg のPT、4 μg のFHAおよび8 μg のパータクチン、より好ましくは5 μg のPT、2.5 μg のFHAおよび2.5 μg のパータクチンを含む。小児用ワクチンは、通常、0.5ml用量あたり7 μg のPT、10 μg のFHAおよび10 μg のパータクチンを含む。

【0070】

水性成分がPT、FHAおよびパータクチンのそれぞれを含む場合、それらの重量比は変動してよいが、例えば、約16:16:5、約5:10:6、約20:20:3、約25:25:8、または約10:5:3（PT:FHA:PRN）であってよい。

【0071】

不活化ポリオウイルス抗原

灰白髄炎は、ポリオウイルスの3種の型のうちの1種によって引き起こされる可能性がある。この3種の型は類似しており、同一の症状を引き起こすが、これらの抗原性は全く異なり、1種の型に感染することにより他の型の感染に対する防御はもたらされない。したがって、参考文献1の第24章において説明されている通り、ポリオウイルス1型（例えばMahoney株）、ポリオウイルス2型（例えばMEF-1株）、およびポリオウイルス3型（例えばSaukett株）の3種のポリオウイルス抗原を本発明の免疫原性組成物に使用することが好ましい。

【0072】

本発明の免疫原性組成物は、不活化ポリオウイルス抗原を含んでよい。

【0073】

ポリオウイルスは細胞培養物中で成長させることができる。好ましい培養物では、サル腎臓に由来する持続性細胞株であるVerocell株を使用する。Verocell細胞は、マイクロキャリアで都合よく培養することができる。ウイルス感染の前およびその間のVerocell細胞の培養は、仔ウシ血清などのウシ由来の材料の使用、およびラクトアルブミン加水分解産物（例えばラクトアルブミンの酵素による分解によって得られる）の使用を伴ってよい。そのようなウシ由来の材料は、BSEまたは他のTSEを伴わない供給源から得るべ

10

20

30

40

50

きである。ポリオウイルスは動物由来の成分を含まない培地で培養した細胞で成長させることが好ましい。成長させた後、限外濾過、ダイアフィルタレーション、およびクロマトグラフィーなどの技法を使用してビリオンを精製することができる。患者に投与する前に、ポリオウイルスは不活化されていなければならない、これは、ウイルスを本発明の免疫原性組成物に使用する前にホルムアルデヒドを用いて処理することによって達成することができる。

【0074】

3種のポリオウイルスを個別に成長させ、精製し、不活化させ、その後に組み合わせて本発明において使用するための混合物をもたらすことが好ましい。

【0075】

混合ポリオウイルスはアルミニウムアジュバントに吸着させることができる。

【0076】

一般には、IPV抗原を含む免疫原性組成物は水銀保存剤（例えば、チメロサル）を実質的に含まない。

【0077】

IPV抗原の量は、一般には、「DU」単位（「D抗原単位」[77]）で表される。本発明の免疫原性組成物中のIPV抗原は、一般には、投与した際に免疫応答を惹起することができる量で存在する。IPV抗原により、防御免疫応答を惹起することができることが理想的である。

【0078】

混合ワクチンは、通常、用量あたりポリオウイルス型あたり1~100DU、例えば、約40DUのポリオウイルス1型、約8DUのポリオウイルス2型、および約32DUのポリオウイルス3型を含むが、これらよりも低い用量[78、79]、例えば、1型については10~20DU、2型については2~4DU、および3型については8~20DUを使用することが可能である。本発明の混合ワクチンは、「低用量」のポリオウイルスを含むことが好ましい。ポリオウイルス1型に関しては、これは、組成物中のウイルスの濃度が20DU/ml、例えば、<18DU/ml、<16DU/ml、<14DU/ml、<12DU/ml、<10DU/mlなどであることを意味する。ポリオウイルス2型に関しては、これは、組成物中のウイルスの濃度が4DU/ml、例えば、<3DU/ml、<2DU/ml、<1DU/ml、<0.5DU/mlなどであることを意味する。ポリオウイルス3型に関しては、これは、組成物中のウイルスの濃度が16DU/ml、例えば、<14DU/ml、<12DU/ml、<10DU/ml、<8DU/ml、<6DU/mlなどであることを意味する。ポリオウイルス1型、2型および3型の3種すべてが存在する場合、3種の抗原は、それぞれ、5:1:4のDU比で、または任意の他の適切な比、例えば、Sabin株を使用する場合には15:32:45の比で存在してよい[80]。低用量のSabin株由来の抗原が特に有用であり、1型10DU、2型20DU、および3型30DU（単位用量、一般には0.5mlあたり）である。

【0079】

IPV成分を使用し、ポリオウイルスをVerocellで成長させる場合、ワクチン組成物は、10ng/ml未満、好ましくは1ng/ml、例えば、500pg/mlまたは50pg/mlのVerocellDNA、例えば、10ng/ml未満の50塩基対長のVerocellDNAを含有することが好ましい。

【0080】

本発明の特定の免疫原性組成物

特に想定される本発明の免疫原性組成物は、以下を含む：

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、および(iv) ジフ

10

20

30

40

50

テリアトキソイド。

【0081】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、および(iv) 破傷風トキソイド。

【0082】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、および(iv) ジフテリアトキソイドおよび(v) 破傷風トキソイド。

10

【0083】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iv) ジフテリアトキソイド、(v) 破傷風トキソイド、(vi) 細胞性の百日咳抗原。

【0084】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iv) ジフテリアトキソイド、(v) 破傷風トキソイド、(vi) 無細胞の百日咳抗原。

20

【0085】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iv) ジフテリアトキソイド、(v) 破傷風トキソイド、(vi) 解毒された百日咳毒素、(vii) 線維状赤血球凝集素、および(viii) パータクチン。

30

【0086】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iv) ジフテリアトキソイド、(v) 破傷風トキソイド、(vi) 無細胞の百日咳抗原および(vii) 不活化ポリオウイルス抗原。

【0087】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iv) ジフテリアトキソイド、(v) 破傷風トキソイド、(vi) 解毒された百日咳毒素、(vii) 線維状赤血球凝集素、(viii) パータクチンおよび(ix) 不活化ポリオウイルス抗原。

40

【0088】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I a由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型I b由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(iii) キャリアタンパク質にコンジュゲ

50

ートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(i v) ジフテリアトキソイド、(v) 破傷風トキソイド、(v i) 解毒された百日咳毒素、(v i i) 線維状赤血球凝集素、(v i i i) パータクチン、(i x) ポリオウイルス 1 型株由来の抗原、(x) ポリオウイルス 2 型株由来の抗原および (x i) ポリオウイルス 3 型株由来の抗原。

【 0 0 8 9 】

- (i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(i i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(i i i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲート、(i v) ジフテリアトキソイド、(v) 破傷風トキソイド、(v i) 無細胞の百日咳抗原、(v i i) ポリオウイルス 1 型株由来の抗原、(v i i i) ポリオウイルス 2 型株由来の抗原および (i x) ポリオウイルス 3 型株由来の抗原。

10

【 0 0 9 0 】

一般には、G B S 血清型 I a 莢膜糖由来の莢膜糖を含む G B S コンジュゲート中のキャリアタンパク質、G B S 血清型 I b 莢膜糖を含む G B S コンジュゲート中のキャリアタンパク質および G B S 血清型 I I I 莢膜糖を含む G B S コンジュゲート中のキャリア部分は C R M 1 9 7 である。

【 0 0 9 1 】

本発明の別の例示的な免疫原性組成物は、以下を含む：

20

(a) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； b) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； c) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲート；および (d) ジフテリアトキソイド、特にジフテリア毒素をホルムアルデヒドで処理することによって調製されたジフテリアトキソイド、特にジフテリアトキソイドを G B S 莢膜多糖にコンジュゲートさせていないジフテリアトキソイドを含む組成物。

【 0 0 9 2 】

(a) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； b) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； c) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲート；および (d) 破傷風トキソイド、特に G B S 莢膜多糖にコンジュゲートさせていない破傷風トキソイドを含む組成物。

30

【 0 0 9 3 】

(a) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； b) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； c) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； (d) ジフテリアトキソイド、特にジフテリア毒素をホルムアルデヒドで処理することによって調製されたジフテリアトキソイド、特にジフテリアトキソイドを G B S 莢膜多糖にコンジュゲートさせていないジフテリアトキソイド、および (e) 破傷風トキソイド、特に G B S 莢膜多糖にコンジュゲートさせていない破傷風トキソイドを含む組成物。

40

【 0 0 9 4 】

(a) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； b) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； c) C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖であるコンジュゲート； (d) ジフテリアトキソイド、特にジフテリア毒素をホルムアルデヒドで処理することによって調製されたジフテリアトキソイド、特にジフテリアトキソイドを G B S 莢膜多糖にコンジュゲートさせていないジフテリアトキソイド、(e) 破傷風トキソイド、特に G B S 莢膜多糖にコンジュゲートさせていない破傷風トキソ

50

イド；および（f）細胞性の百日咳抗原または無細胞の百日咳抗原を含む組成物。

【0095】

（a）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲート；b）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲート；c）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート；（d）ジフテリアトキソイド、特にジフテリア毒素をホルムアルデヒドで処理することによって調製されたジフテリアトキソイド、特にジフテリアトキソイドをGBS莢膜多糖にコンジュゲートさせていないジフテリアトキソイド；（e）破傷風トキソイド、特にGBS莢膜多糖にコンジュゲートさせていない破傷風トキソイド；（f）解毒された百日咳毒素；（g）線維状赤血球凝集素；（h）パータクチンおよび必要に応じて（i）不活化ポリオウイルス抗原を含む組成物。

10

【0096】

（a）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲート；b）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲート；c）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート；d）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型II由来の莢膜糖であるコンジュゲート；およびe）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖であるコンジュゲート；（f）ジフテリアトキソイド、特にジフテリア毒素をホルムアルデヒドで処理することによって調製されたジフテリアトキソイド、特にジフテリアトキソイドをGBS莢膜多糖にコンジュゲートさせていないジフ

20

【0097】

（a）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲート；b）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲート；c）CRM197にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲート；d）CRM197または破傷風トキソイドにコンジュゲートさせたGBS血清型II由来の莢膜糖であるコンジュゲート；およびe）CRM197または破傷風トキソイドにコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖であるコンジュゲート；（f）ジフテリアトキソイド、特にジフテリア毒素をホルムアルデヒドで処理することによって調製されたジフテリアトキソイド、特にジフテリアトキソイドをGBS莢膜多糖にコンジュゲートさせていないジフテリアトキソイド、および/または（g）破傷風トキソイド、特にGBS莢膜多糖にコンジュゲートさせていない破傷風トキソイド；必要に応じて（h）細胞性の百日咳抗原または無細胞の百日咳抗原；必要に応じて（i）解毒された百日咳毒素；必要に応じて（j）線維状赤血球凝集素；必要に応じて（k）パータクチンおよび必要に応じて（l）不活化ポリオウイルス抗原を含む組成物。

30

【0098】

薬学的方法および使用

本発明の免疫原性組成物は、薬学的に許容されるキャリアをさらに含んでよい。典型的な「薬学的に許容されるキャリア」としては、それ自体は、組成物を受け取る個体に対して有害な、抗体の産生を誘導しない任意のキャリアが挙げられる。適切なキャリアは、典型的には、大きな、ゆっくりと代謝される高分子、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合体のアミノ酸、アミノ酸共重合体、スクロース[81]、トレハロース[82]、ラクトース、および脂質凝集物（例えば、油滴またはリポソーム）である。そのようなキャリアは当業者に周知である。ワクチンは、例えば、水、食塩水、グリセロールなどの希釈剤も含有してよい。さらに、補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などが存在してよい。滅菌の、発熱物質を含まないリン酸緩衝生理食塩

40

50

水が典型的なキャリアである。薬学的に許容される賦形剤の詳細な論述は、参考文献 83 において入手可能である。

【0099】

本発明の組成物は、水性形態（すなわち、溶液または懸濁物）または乾燥した形態（例えば、凍結乾燥したもの）であってよい。乾燥ワクチンを用いる場合には、注射する前に液体媒体中に再構成する。コンジュゲートワクチンの凍結乾燥は当技術分野で公知であり、例えば、Menjugate（商標）製品が凍結乾燥した形態で提示される。本発明の免疫原性組成物が1より多いGBS血清型由来の莢膜糖を含むコンジュゲートを含む場合、コンジュゲートを別々に調製し、混合し、次いで凍結乾燥することが典型的である。このように、本明細書に記載のコンジュゲートを2種、3種または4種などを含む凍結乾燥した組成物を調製することができる。

10

【0100】

凍結乾燥の間、コンジュゲートを安定化するために、例えば安定剤のような非活性成分を凍結乾燥の前に添加することができる。含めるために好ましい安定剤は、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。したがって、凍結乾燥した材料を水により再構成することによって得られる最終的なワクチンは、ラクトースおよび/またはスクロースを含有する。凍結乾燥したワクチンを調製する際には非結晶性賦形剤および/または非結晶性バッファを使用することが好ましい[84]。

【0101】

20

糖アルコール（例えば、マンニトール）および/または二糖（例えば、スクロースまたはトレハロース）を、例えば、1mg/mlから30mg/mlの間（例えば、約25mg/ml）で組成物に含めることが好ましい場合がある。スクロースの使用は、GBSコンジュゲートワクチンの安定剤として推奨されている（参考文献85）。しかし、本発明の安定剤はマンニトールであることが典型的である。乾燥ワクチンを、注射する前に液体媒体中に再構成する場合、残留するマンニトールの濃度は、典型的には、約2~20mg/ml、例えば、3.75mg/ml、7.5mg/mlまたは15mg/mlになる。

【0102】

組成物はバイアルで提示されてもよく、または組成物は充填済み注射器で提示されてもよい。注射器は、針を伴って、または伴わずに供給することができる。注射器は、組成物の単回用量を含み、一方バイアルは、単回用量または複数回用量を含むことができる。

30

【0103】

本発明の組成物は、0.5mlの単位用量で患者に投与されることが好ましい。0.5ml用量への言及は、通常分散、例えば、0.5ml±0.05mlを包含するものと理解されよう。複数回投薬の状況では、複数の投薬量を抽出し、単一の容器内に一緒に、例えば、10用量の複数回投薬用の容器に5ml（または10%過充填で5.5ml）を包装する。

【0104】

本発明の水性組成物は、他のワクチンを凍結乾燥した形態から再構成するためにも適している。本発明の組成物がそのような即時の再構成のために用いるものである場合、本発明は、バイアル2つを含み得るキット、または、充填済み注射器1つとバイアル1つを含み、注射する前に注射器の内容物を用いてバイアルの内容物を再活性化することができるキットを提供する。

40

【0105】

ワクチンは、使用する時間/点で2つの成分を一緒に混合することによってワクチンを即時調製することができる形態で調製することもできる。そのような2成分の実施形態は、例えば、水性材料と凍結乾燥した材料を混合することによる液体/液体混合および液体/固体混合を含む。

【0106】

したがって、本発明のために有用なキットは、1または複数のGBSコンジュゲートを

50

含む第1の成分；およびa)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原を含む第2の成分を含み、2つの成分は別々の容器に入っている(例えば、バイアルおよび/または注射器)。第1の成分中のGBSコンジュゲートは、凍結乾燥されていてよい。一部の実施形態では、第1の成分はアジュバントを含まない。第2の成分は水性抗原を含んでよい。一部の実施形態では、第2の成分は、アジュバント、例えば、アルミニウム塩アジュバントを含む。

【0107】

本発明のために有用な別のキットは、抗原を含まない第1の成分を含んでよく、したがって、最終的な免疫原性組成物中の抗原性成分はすべて、第2の成分に由来する。例えば、キットは、(i)1または複数のGBSコンジュゲートおよび(ii)a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原を含む水性抗原を含む第1の成分と、水性アジュバントを含む第2の成分とを含んでよい。本発明の免疫原性組成物は、第1の成分と第2の成分を混合することによって調製することができる。

10

【0108】

本発明は、本発明の免疫原性組成物を調製するためのプロセスであって、1または複数のGBSコンジュゲートを含む第1の成分と、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原を含む第2の成分とを混合するステップを含むプロセスも提供する。第1の成分中のGBSコンジュゲートは、凍結乾燥されていてよい。第2の成分は水性抗原を含んでよい。該プロセスは、第1の成分中の凍結乾燥されたGBSコンジュゲートを、第2の成分の水性抗原を用いて再構成するさらなるステップを含んでよい。第1の成分はアジュバントを含まなくてもよい。第2の成分は、アジュバント、例えば、アルミニウム塩アジュバントを含んでよい。

20

【0109】

本発明の組成物は、単位用量形態または複数回用量形態に包装することができる。複数回用量形態には充填済み注射器よりもバイアルの方が好ましい。有効な投与体積は常套的に確立することができるが、組成物の典型的なヒト用量は、例えば、筋肉内注射するためには、体積0.5mlである。

30

【0110】

組成物のpHは、6から8の間であることが好ましく、約7であることが好ましい。安定なpHは、バッファを用いることによって維持することができる。患者に投与される水性組成物のpHは、5.0から7.5の間、より一般には、最適な安定性のために5.0から6.0の間であってよく、ジフテリアトキソイドおよび/または破傷風トキソイドが存在する場合には、pHは6.0から7.0の間であることが理想的である。

【0111】

典型的には、本発明の免疫原性組成物はリン酸二水素カリウムバッファを含む。リン酸二水素カリウムバッファは、約1~10mM、例えば、1.25mM、2.5mMまたは5.0mMのリン酸二水素カリウムを含んでよい。組成物が、水酸化アルミニウム塩を含む場合、ヒスチジンバッファを用いることが好ましい[86]。組成物は、滅菌で有り得、かつ/または発熱物質を含まない可能性がある。本発明の組成物は、ヒトに対して等張性であり得る。

40

【0112】

本発明の組成物は免疫原性であり、ワクチン組成物であることがより好ましい。本発明によるワクチンは、予防的(すなわち、感染を予防するためのもの)または治療的(すなわち、感染を処置するためのもの)のいずれかであり得るが、典型的には、予防的である。予防的なワクチンでは、患者が抗体を生じたとしても免疫系が感染を撃退することができるまでに遅れまたは遅延があり得るので、疾患に対する完全な防御は保証されない。したがって、また、疑いを回避するために、予防的なワクチンという用語は、将来の感染の

50

影響を、例えば、そのような感染の重症度または持続時間を軽減することによって緩和するワクチンを指す場合もある。

【0113】

「感染に対する防御」および/または「防御免疫をもたらす」という用語は、被験体の免疫系が、免疫応答を誘発し、感染に抵抗するための初回刺激を受けている（例えばワクチン接種によって）ことを意味する。特に、誘発される免疫応答により、細菌の種々の株などのいくつかの病原体に対する感染症に抵抗することができる。したがって、ワクチン接種された被験体は、感染するが、その感染に対して対照の被験体よりも良好に抵抗することができる。ワクチンとして用いる免疫原性組成物は、免疫学的有効量の抗原（複数可）、ならびに必要に応じて、任意の他の成分を含む。「免疫学的有効量」とは、その量を個体に単回用量または一連のものの一部として投与することが、処置または予防に有効であることを意味する。一般に、所望の結果は、病原体に対して被験体を防御することができる、またはそれに寄与する抗原（例えば、病原体）特異的な免疫応答が生じることである。この量は、処置される個体の健康および身体の状態、処置される個体の年齢、分類群（例えば、非ヒト霊長類、霊長類など）、抗体を合成する個体の免疫系の能力、所望の防御の程度、ワクチンの処方、処置にあたる医師による医学的な状況に関する評価、および他の関連因子に応じて変動する。常套的な試行によって決定することができる量は比較的広範囲に入ることが予想される。

10

【0114】

本発明の組成物は、様々な形態で調製することができる。例えば、組成物は、注射剤として、液剤または懸濁物のいずれかとして調製することができる。組成物は、肺への投与のために、例えば、微細な粉末または噴霧剤を用いて吸入器（inhaler）として調製することができる。組成物は、坐薬または腔坐薬として調製することができる。組成物は、鼻、耳または眼に投与するために、例えば、噴霧剤、滴剤（drop）、ゲル剤または散剤として調製することができる [例えば、参考文献87&88]。肺炎球菌の糖 [89、90]、Hib糖 [91]、MenC糖 [92]、およびHib糖とMenC糖のコンジュゲートの混合物 [93] の鼻投与での成功が報告されている。

20

【0115】

本発明の組成物は、特に、複数回用量形式で包装する場合には、抗菌薬を含んでよい。

【0116】

本発明の組成物は、洗浄剤、例えば、Tween 80などのTween（ポリソルベート）を含んでよい。洗浄剤は、一般に、低レベルで、例えば、< 0.01%で存在する。

30

【0117】

本発明の組成物は、張度を与えるためにナトリウム塩（例えば、塩化ナトリウム）を含んでよい。10 ± 2 mg/mlのNaClの濃度が典型的である。いくつかの実施形態では、4 ~ 10 mg/ml、例えば、9.0 mg/ml、7.0 mg/ml、6.75 mg/mlまたは4.5 mg/mlのNaClの濃度を用いることができる。

【0118】

一般に、組成物の質量オスモル濃度は、200 mOsm/kgから400 mOsm/kgの間、好ましくは240 ~ 360 mOsm/kgであり、280 ~ 320 mOsm/kgの範囲内であることがより好ましい。質量オスモル濃度はワクチン接種によって引き起こされる疼痛には影響しないことが以前報告されているが [94]、それにかかわらず質量オスモル濃度をこの範囲内に保つことが好ましい。

40

【0119】

本発明の組成物は、一般に、バッファを含む。リン酸バッファが典型的である。

【0120】

本発明の組成物は、他の免疫調節剤と併せて投与することができる。特に、組成物は、1または複数のアジュバントを含んでよい。そのようなアジュバントとしては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる：

A. 無機質を含有する組成物

50

本発明においてアジュバントとして用いるのに適した、無機質を含有する組成物としては、無機塩、例えば、アルミニウム塩およびカルシウム塩（またはそれらの混合物）が挙げられる。カルシウム塩としては、リン酸カルシウム（例えば、参考文献95に開示されている「CAP」粒子）が挙げられる。アルミニウム塩としては、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩などが挙げられ、塩は任意の適切な形態（例えば、ゲル、結晶、非晶質など）を取る。これらの塩への吸着が好ましい。無機質を含有する組成物は、金属塩の粒子として処方することもできる[96]。

【0121】

水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムとして公知のアジュバントを用いることができる。これらの名称は慣習的であるが、どちらも、存在する実際の化合物についての正確な記載ではないので、利便性のためだけに使用される（例えば、参考文献97の第9章を参照されたい）。本発明では、アジュバントとして一般に使用される任意の「水酸化物」アジュバントまたは「ホスフェート」アジュバントを用いることができる。「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。「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、アルミニウムヒドロキシホスフェートであり、多くの場合、少量の硫酸塩も含有する（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（aluminum 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。

【0122】

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。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なpHにおいて正の表面電荷を有する。pH7.4でAl⁺⁺⁺1mgあたり1.8~2.6mg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。

【0123】

リン酸アルミニウムアジュバントは、一般に、0.3から1.2の間、好ましくは0.8から1.2の間、より好ましくは0.95±0.1のPO₄/Alモル比（molar ratio）を有する。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は一般に非晶質である。典型的なアジュバントは、0.84~0.92のPO₄/Alモル比を有する非晶質アルミニウムヒドロキシホスフェートであり、0.6mg Al³⁺/mlで含まれる。リン酸アルミニウムは、一般に、粒子状（例えば、透過型電子顕微鏡写真で観察されるようなプレート状の形態）である。粒子の典型的な直径は、任意の抗原が吸着した後に0.5~2.0μm（例えば、約5~10μm）の範囲である。pH7.4でAl⁺⁺⁺1mgあたり0.7から1.5mgの間の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。

【0124】

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し得る。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）、またはヒスチジンバッファのようなバッファを加えること（PZCをより塩基性にする）によっても変更される。本発明に従って使用されるリン酸アルミニウムは、通常、4.0から7.0の間、より好ましくは5.0から6.5の間、例えば、約5.7のPZCを有する。

【0125】

本発明の組成物を調製するために用いるアルミニウム塩の懸濁物は、バッファ（例えば、リン酸バッファまたはヒスチジンバッファまたはトリスバッファ）を含有してよいが、これは必ずしも必要ではない。懸濁物は、滅菌であり、そして発熱物質を含まないことが好ましい。懸濁物は、例えば、1.0mMから20mMの間、好ましくは5mMから15

10

20

30

40

50

mMの間、およびより好ましくは約10mMの濃度で存在する遊離の水性ホスフェートイオンを含んでよい。懸濁物は、塩化ナトリウムも含んでよい。

【0126】

本発明では、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ができる。この場合、リン酸アルミニウムが水酸化アルミニウムよりも多く、例えば、少なくとも2:1、例えば、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1などの重量比で存在してよい。

【0127】

患者に投与するための組成物中の Al^{+++} の濃度は、10mg/ml未満、例えば、5mg/ml、4mg/ml、3mg/ml、2mg/ml、1mg/mlなどであることが好ましい。好ましい範囲は、0.3mg/mlから1mg/mlの間である。最大0.85mg/用量が好ましい。

10

【0128】

典型的なアジュバントであるリン酸アルミニウムアジュバントは、0.84から0.92の間の PO_4/Al モル比を有する非晶質のアルミニウムヒドロキシホスフェートであり、0.6mg Al^{3+}/ml で含まれる。低用量のリン酸アルミニウム、例えば、用量あたりコンジュゲートあたり50 μ gから100 μ gの間の Al^{3+} を用いた吸着を用いることができる。

【0129】

B. サポニン処方物 [参考文献97の第22章]

20

サポニン処方物も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。サポニンは、広範囲の植物種の樹皮、葉、茎、根、さらには花において見出されるステロール配糖体およびトリテルペノイド配糖体の不均一な群である。Quillaria saponaria Molinaの木の樹皮から単離されたサポニンがアジュバントとして広く研究されている。サポニンは、Smilax ornata (サルサパリラ)、Gypsophylla paniculata (ブライダルベール (brides veil))、およびSaponaria officianalis (カスミソウ)から、商業的に得ることもできる。サポニンアジュバント処方物としては、QS21などの精製された処方物、ならびにISCOMなどの脂質処方物が挙げられる。

【0130】

30

サポニン組成物は、HPLCおよびRP-HPLCを用いて精製されてきた。これらの技法を用いて特異的に精製された画分が同定されており、それらとしては、QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-BおよびQH-Cが挙げられる。サポニンはQS21であることが好ましい。QS21の生成方法は参考文献98に開示されている。サポニン処方物は、コレステロールなどのステロールも含んでよい[99]。

【0131】

サポニンとコレステロールの組み合わせを用いて、免疫賦活複合体 (ISCOM) と呼ばれる独特の粒子を形成することができる [参考文献97の第23章]。ISCOMは、典型的には、リン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンも含む。任意の公知のサポニンをISCOMに用いることができる。ISCOMは、QuilA、QHAおよびQHCのうちの1または複数を含むことが好ましい。ISCOMは、参考文献99~101にさらに記載されている。必要に応じて、ISCOMは、追加的な洗浄剤 (複数可) を欠いてよい [102]。

40

【0132】

サポニンに基づくアジュバントの開発についての総説は、参考文献103 & 104に見出すことができる。

【0133】

C. ビロソームおよびウイルス様粒子

ビロソームおよびウイルス様粒子 (VLP) も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。これらの構造は、一般に、必要に応じてリン脂質と組み合わせられ、ま

50

たはリン脂質と一緒に処方される、ウイルス由来の1または複数のタンパク質を含有する。これらは、一般に、非病原性、非複製的であり、概して、いかなる天然のウイルスのゲノムも含有しない。ウイルスタンパク質を、組換え生成することができ、またはウイルス全体から単離することができる。ピロソームまたはVLPにおいて用いるのに適したこれらのウイルスタンパク質としては、インフルエンザウイルス(例えば、HAまたはNA)、B型肝炎ウイルス(例えば、コアタンパク質またはカプシドタンパク質)、E型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビスウイルス、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒトパピローマウイルス、HIV、RNA-ファージ、Q-ファージ(例えば、コートタンパク質)、GA-ファージ、fr-ファージ、AP205ファージ、およびTy(例えば、レトロトランスポゾンTyタンパク質p1)に由来するタンパク質が挙げられる。VLPは、参考文献105~110においてさらに論じられている。ピロソームは、例えば、参考文献111においてさらに論じられている。

10

【0134】

D. 細菌誘導体または微生物誘導体

本発明において用いるのに適したアジュバントは、細菌誘導体または微生物誘導体、例えば、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよびADP-リボシル化毒素およびその解毒された誘導体を含む。

【0135】

本発明においてアジュバントとして用いるのに適した免疫賦活性オリゴヌクレオチドとしては、CpGモチーフを含有するヌクレオチド配列(リン酸結合によってグアノシンと連結した、メチル化されていないシトシンを含有するジヌクレオチド配列)が挙げられる。パリンドローーム配列またはポリ(dG)配列を含有する二本鎖RNAおよびオリゴヌクレオチドも、免疫賦活性であることが示されている。

20

【0136】

CpGは、ヌクレオチドの修飾/類似体、例えば、ホスホロチオエート修飾を含んでよく、また、二本鎖または一本鎖であってよい。参考文献112、113および114には、可能性のある類似体の置換、例えば、グアノシンの、2'-デオキシ-7-デアザグアノシンによる置き換えが開示されている。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、参考文献115~120においてさらに論じられている。

【0137】

CpG配列、例えば、GTCGTTモチーフまたはTTCGTTモチーフは、TLR9に向けられ得る[121]。CpG配列は、CpG-AODNなどの、Th1免疫応答の誘導に特異的であってよく、または、CpG-BODNなどのB細胞応答誘導により特異的であってよい。CpG-AODNおよびCpG-BODNは、参考文献122~124において論じられている。CpGはCpG-AODNであることが好ましい。

30

【0138】

CpGオリゴヌクレオチドは、受容体を認識するために5'末端を利用できるように構築することが好ましい。必要に応じて、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列を、それらの3'末端で結合させて、「イムノマー(immunomer)」を形成することができる。例えば、参考文献121&125~127を参照されたい。

40

【0139】

細菌性のADP-リボシル化毒素およびその解毒された誘導体を、本発明においてアジュバントとして用いることができる。タンパク質は、E.coli(E.coli熱不安定性エンテロトキシン「LT」)、コレラ(「CT」)、または百日咳(「PT」)に由来することが好ましい。解毒されたADP-リボシル化毒素の、粘膜アジュバントとしての使用は、参考文献128に記載されており、非経口的なアジュバントとしての使用は参考文献129に記載されている。毒素または類毒素は、AサブユニットおよびBサブユニットの両方を含むホロ毒素の形態であることが好ましい。Aサブユニットは、解毒性変異を含有することが好ましく、Bサブユニットは変異していないことが好ましい。アジュバントは、解毒されたLT変異体、例えば、LT-K63、LT-R72、およびLT-G

50

192であることが好ましい。ADP-リボシル化毒素およびその解毒された誘導体、特にLT-K63およびLT-R72の、アジュバントとしての使用は、参考文献130～137に見出すことができる。アミノ酸置換についての数値での参照は、その全体が参照により具体的に本明細書に組み込まれる参考文献138に記載のADP-リボシル化毒素のAサブユニットとBサブユニットのアラインメントに基づくことが好ましい。

【0140】

E. ヒト免疫調節物質

本発明においてアジュバントとして用いるのに適したヒト免疫調節物質としては、サイトカイン、例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 [139] など） [140]、インターフェロン（例えば、インターフェロン- α ）、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子が挙げられる。

10

【0141】

F. 生体接着剤 (bioadhesive) および粘膜接着剤 (mucoadhesive)

生体接着剤および粘膜接着剤も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。適切な生体接着剤としては、エステル化されたヒアルロン酸マイクロスフェア [141] または粘膜接着剤、例えば、ポリ(アクリル酸)、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖およびカルボキシメチルセルロースの架橋した誘導体が挙げられる。キトサンおよびそれらの誘導体も、本発明においてアジュバントとして用いることができる [142]。

20

【0142】

G. 微小粒子

微小粒子も、本発明においてアジュバントとして用いることができる。ポリ(ラクチド-co-グリコリド)を用いて、生分解性かつ無毒性の材料（例えば、ポリ(ε-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、ポリカプロラクトンなど）から形成された微小粒子（すなわち、直径約100nm～約150μm、より好ましくは直径約200nm～約30μm、最も好ましくは直径約500nm～約10μmの粒子）が好ましく、必要に応じて、それを、負に荷電した表面を有するように処理する（例えば、SDSを用いて）または正に荷電した表面を有するように処理する（例えば、CTABなどの陽イオン洗剤を用いて）。

30

【0143】

H. リポソーム（参考文献97の第13章&第14章）

アジュバントとして用いるのに適したリポソーム処方物の例は、参考文献143～145に記載されている。

【0144】

I. ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル処方物

本発明において用いるのに適したアジュバントは、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル [146] を含む。そのような処方物としては、さらに、オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルピタンエステル界面活性剤 [147] ならびに少なくとも1つの追加的な非イオン性界面活性剤、例えば、オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステル界面活性剤 [148] が挙げられる。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、以下の群より選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（ラウレス9）、ポリオキシエチレン-9-ステアリル (stearyl) エーテル、ポリオキシエチレン (polyoxyethylene) -8-ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。

40

【0145】

J. ポリホスファゼン (PCPP)

50

PCPP処方物は、例えば、参考文献149および150に記載されている。

【0146】

K. ムラミルペプチド

本発明においてアジュバントとして用いるのに適したムラミルペプチドの例としては、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル(normuramyl)-L-アラニル-D-イソグルタミン(nor-MDP)、およびN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミンMTP-PE)が挙げられる。

【0147】

L. イミダゾキノロン(Imidazoquinolone)化合物

本発明においてアジュバントとして用いるのに適したイミダゾキノロン化合物の例としては、イミキモド(Imiquamod)およびその同族化合物「レシキモド(Resiquimod)3M)が挙げられ、参考文献151および152にさらに記載されている。

【0148】

M. チオセミカルバゾン化合物

すべてが本発明においてアジュバントとして用いるのに適したチオセミカルバゾン化合物、ならびに化合物を処方、製造、およびスクリーニングする方法の例としては、参考文献153に記載のものが挙げられる。チオセミカルバゾンは、ヒト末梢血単核細胞を、TNF-などのサイトカイン産生について刺激することにおいて特に有効である。

【0149】

N. トリプタントリン化合物

すべてが本発明においてアジュバントとして用いるのに適したトリプタントリン化合物、ならびに化合物を処方、製造、およびスクリーニングする方法の例としては、参考文献154に記載のものが挙げられる。トリプタントリン化合物は、ヒト末梢血単核細胞を、TNF-などのサイトカイン産生について刺激することにおいて特に有効である。

【0150】

本発明は、上記で同定したアジュバントの1または複数の態様の組み合わせも含んでよい。

【0151】

免疫賦活剤としての機能を果たす他の物質は、参考文献97の第7章に開示されている。

【0152】

アルミニウム塩アジュバントの使用が特に好ましく、一般に、抗原はそのような塩に吸着される。本発明の組成物では、いくつかの抗原は水酸化アルミニウムに吸着させるが、他の抗原はリン酸アルミニウムと会合させることが可能である。しかし、一般には、単一の塩、例えば、水酸化物またはリン酸塩を用いるがその両方は用いないことが好ましい。すべてのコンジュゲートが吸着する必要はない、すなわち、一部またはすべてが溶液中で遊離してよい。

【0153】

処置方法

本発明は、哺乳動物における免疫応答を上昇させるための方法であって、本発明の薬学的組成物を哺乳動物に投与する工程を含む方法も提供する。免疫応答は、防御的であることが好ましく、抗体を伴うことが好ましい。この方法により、追加免疫応答を生じさせることができる。本発明の組成物は、0.5ml用量で患者に投与されることが好ましい(上記で検討された通り)。

【0154】

哺乳動物はヒトであることが好ましい。ワクチンが予防的に使用するためのものである場合、ヒトは、小児(例えば、よちよち歩きの小児(toddler)または乳児、特に

10

20

30

40

50

新生児)またはティーンエイジャーであることが好ましく、ワクチンが治療的に使用する
ためのものである場合、ヒトは、成人であることが好ましい。例えば、安全性、投与量、
免疫原性などを評価するために小児のために意図されたワクチンを成人に投与することも
できる。処置するために好ましいヒトのクラスは、妊娠可能な年齢の女性(例えば、ティ
ーンエイジャー以上)である。別の好ましいクラスは妊婦である。高齢の患者(例えば、
50歳超、60歳超、70歳超、80歳超または90歳超など、特に、65歳超の高齢の
患者)、特に、GBS感染の危険性が増す可能性があるナーシングホームで生活している
高齢の患者([155])は、処置するために好ましい別のヒトのクラスである。

【0155】

いくつかの実施形態では、患者は、ジフテリアトキソイドまたはその誘導体を用いて予
備免疫化されている。他の実施形態では、患者は、破傷風トキソイドまたはその誘導体
を用いて予備免疫化されている。

10

【0156】

本発明は、医薬品として使用するための本発明の組成物も提供する。医薬品は、哺乳動
物における免疫応答を生じさせることができること(すなわち、免疫原性組成物である)
が好ましく、ワクチンであることがより好ましい。

【0157】

本発明は、哺乳動物における免疫応答を上昇させるための医薬品の製造における本発明
の組成物の使用も提供する。

【0158】

20

これらの使用および方法は、*Streptococcus agalactiae*なら
びに*Corynebacterium diphtheriae*、*Clostridium*
tetani、*Bordetella pertussis*およびポリオウイルスの
うちの1または複数によって引き起こされる疾患を予防および/または処置するためのも
のであることが好ましい。*S. agalactiae*によって引き起こされる疾患は、新
生児敗血症または菌血症、新生児肺炎、新生児髄膜炎、子宮内膜炎、骨髄炎、化膿性関節
炎などであってよい。*C. diphtheria*によりジフテリアが引き起こされる可能
性があり、*C. tetani*により破傷風が引き起こされる可能性があり、*B. pert*
*ussis*により百日咳が引き起こされる可能性があり、ポリオウイルスによりポリオが
引き起こされる可能性がある。

30

【0159】

疾患が予防される被験体は、本発明の免疫原性組成物を受ける被験体と同じでなくてよ
い。例えば、子を保護するために、女性(妊娠前または妊娠中の)に免疫原性組成物を投
与することができる(いわゆる「母体免疫化」[156~158])。妊婦を免疫化する
ことにより、抗体に媒介される免疫が受動母体免疫を通じて乳児にもたらされる。受動免
疫は、母体の抗体が胎盤を通じて胎児に移行すると自然に起こる。乳児は、能動的に獲得
した免疫は何も有さずに生まれてくるので、受動免疫が乳児にとって特に重要である。本
発明の組成物を妊婦に投与することにより、その女性における免疫が増強され、また、抗
体が胎盤を通じて新生児に渡され、それにより、受動母体免疫が乳児に付与される。しか
し、乳児における受動免疫は単に一過性のものであり、生後の最初の数週間、または数カ
月で減少し始める。受動免疫は単に一過性のものであるため、受動免疫が減少する前に、
乳児における能動免疫を誘導するために乳児が本発明の組成物の投与を受けることが重要
であり得る。生後の乳児に2回目の免疫原性組成物を投与することにより、乳児における
能動免疫が誘導され、妊娠中の母親から渡された免疫が延長される。

40

【0160】

本明細書で使用される場合、乳児は、1歳未満(例えば、生後1日未満、生後1週間、
生後2週間、生後3週間、生後4週間、生後2カ月、生後3カ月、生後4カ月、生後5カ
月、生後6カ月、生後7カ月、生後8カ月、生後9カ月、生後10カ月、生後11カ月、
生後12カ月未満)の個体である。

【0161】

50

妊婦には、妊娠中のいかなる時点においても本発明の組成物を投与することができる。例えば、妊娠の第1三半期、第2三半期または第3三半期の女性に組成物を投与することができる。一部の実施形態では、妊娠の最後の6～12週間（例えば、妊娠28週、妊娠29週、妊娠30週、妊娠31週、妊娠32週、妊娠33週、妊娠34週、妊娠35週、妊娠36週、妊娠37週、妊娠38週、妊娠39週）の女性に組成物を投与する。特に、乳児を出産する少なくとも4週間前の妊婦に本発明の組成物を投与する。一部の実施形態では、妊娠32週から36週の間妊婦に1用量レジメンを投与する。他の実施形態では、妊婦に2用量レジメンを投与し、その場合、第1の用量をおよそ妊娠32週に投与し、第2の用量をおよそ妊娠36週に投与する。

【0162】

乳児には、生後1年間、および所望であればその後のいかなる時点においても組成物を投与することができる。一般に、組成物は、乳児に、生後1年間で1回、2回、3回、4回またはそれ以上投与される。例えば、本発明の組成物は、乳児に、誕生時、生後2週間、生後4週間、生後6週間、生後2カ月、生後3カ月、生後4カ月、生後6カ月、生後9カ月、および生後12カ月から選択される1つまたは複数のときに投与することができる。特に、本発明の組成物は、乳児に、母体の抗体が非防御的な力価まで低下する前の時点で投与される。その後の投与は、任意の所望のスケジュールで行うことができる。

【0163】

一実施形態では、*Streptococcus agalactiae*ならびに*Corynebacterium diphtheriae*、*Clostridium tetani*、*Bordetella pertussis*およびポリオウイルスのうちの1または複数によって引き起こされる疾患から乳児を保護する方法であって、(a)前記乳児を有する妊娠中の女性に本発明の組成物を投与するステップと、(b)必要に応じて、妊娠から生まれた乳児に本発明の組成物を投与するステップとを含む方法が提供される。

【0164】

したがって、*S. agalactiae*によって引き起こされる疾患ならびにジフテリア、破傷風、百日咳およびポリオのうちの1または複数から乳児を保護する方法であって、(a)前記乳児を有する妊娠中の女性に本発明の組成物を投与するステップと、(b)必要に応じて、妊娠から生まれた乳児に本発明の組成物を投与するステップとを含む方法も提供される。

【0165】

本発明の好ましい組成物は、各抗原性成分に対する抗体保有率(seroprotection)の基準よりも優れている患者における抗体価を、ヒト被験体の許容できる百分率で付与することができる。関連する抗体価が、宿主が抗原に対して抗体陽転すると考えられる抗体価を超える抗原は周知であり、そのような力価は、WHOなどの組織により公開されている。被験体の統計的に有意な試料の80%超、より好ましくは90%超、さらに好ましくは93%超、最も好ましくは96～100%が抗体陽転することが好ましい。

【0166】

本発明の組成物は、一般に、患者に直接投与される。直接的な送達は、非経口的な注射（例えば、皮下に、腹腔内に、静脈内に、筋肉内に、もしくは組織の間質腔へ）、または直腸投与、経口投与、腔への投与、局所投与、経皮投与、鼻腔内投与、眼への投与、耳への投与、肺への投与は他の粘膜投与によって達成することができる。大腿または上腕への筋肉内投与が好ましい。注射は、針（例えば、皮下針）を介してよいが、その代わりに無針注射を用いることができる。典型的な筋肉内用量は0.5mlである。

【0167】

本発明は、全身免疫および/または粘膜免疫を惹起するために用いることができる。

【0168】

本発明の免疫原性組成物は、単回用量または複数回用量で投与することができる。本発明では、単回用量の投与が好ましい。あるいは、別の1つの単位用量の後に第1の単位用量が続くことが有効であり得る。一般には、第2（または第3、第4、第5など）の単位

10

20

30

40

50

用量は、第1の単位用量と同一である。一般には、本発明の免疫原性組成物は、3つの単位用量で投与される。一般には、本発明の免疫原性組成物は、筋肉内に、例えば、大腿または上腕への筋肉内投与によって投与される。

【0169】

複数回用量は、一次免疫化スケジュールおよび/または追加免疫化スケジュールで用いることができる。一次用量スケジュールの後に、追加免疫用量スケジュールを続けることができる。初回刺激用量の間(例えば、4~16週の間)、および初回刺激(priming)と追加刺激(boosting)との間の適切なタイミングは、常套的に決定することができる。

【0170】

十分な効力を有するために、典型的な一次免疫化スケジュール(特に小児に関して)は、1より多い用量を投与することを伴ってよい。例えば、用量は、0カ月および6カ月の時点(時間0が第1の用量になる);0カ月、1カ月、2カ月および6カ月の時点;0日目、21日目の時点、次いで6カ月から12カ月の間に第3の用量;2カ月、4カ月および6カ月の時点;3カ月、4カ月および5カ月の時点;6週間、10週間および14週間の時点;2カ月、3カ月および4カ月の時点;または0カ月、1カ月、2カ月、6カ月および12カ月の時点のものであってよい。小児用組成物は、例えば、生後2年目の小児に対する追加刺激用量としても使用することができる。

【0171】

組成物は、例えば、生後2年目の小児に対する追加刺激用量としても使用することができる。本発明の青年用の追加刺激ワクチン組成物は、10歳以上の人に単回用量で投与される。本発明の免疫原性組成物は、以前にジフテリアと破傷風の両方に対して、好ましくは百日咳に対してもワクチン接種された患者に追加刺激ワクチンとして投与することができる。これらの患者は、一般的な集団とは、以前のワクチンに対する免疫記憶応答を有することで区別することができる。患者は、直近のジフテリアおよび/または破傷風ワクチンを、本発明のワクチンを受ける少なくとも5年前に受けていてよい。ワクチンを受ける患者は、4歳から65歳の間、例えば、11~64歳、10~18歳などであってよい。

【0172】

任意の適切な投与経路を使用することができる。例えば、組成物は、筋肉内に、腹腔内に、皮下に、経皮的に、または皮内に投与することができる。所望であれば、組成物は、口腔内、鼻腔内、膻内、および直腸内などの粘膜内経路によって投与することができる。妊婦および乳児への投与は、同じ経路によるものであっても異なる経路によるものであってもよい。本発明の組成物は、筋肉内注射によって、例えば、腕または脚に投与することができる。

【0173】

本発明によって生成されるワクチンは、患者に、別個のワクチンと同時に、例えば、PREVNAR(商標)などの肺炎球菌コンジュゲートワクチンと同時に、インフルエンザワクチンと同時に、ロタウイルスワクチンと同時に、MMRワクチンと同時になどで投与することができる。

【0174】

本発明の組成物がアルミニウムに基づくアジュバントを含む場合、貯蔵している間に成分の沈降が起こり得る。したがって、患者に投与する前に組成物を振とうするべきである。振とうされた組成物は、混濁した白色の懸濁物である。

【0175】

一般

「含む(comprising)」という用語は、「含む(including)」ならびに「からなる(consisting)」を包含し、例えば、Xを「含む(comprising)」組成物は、Xから独占的になり、または、追加的な何か、例えば、X+Yを含んでよい。

【0176】

10

20

30

40

50

「からなる」という用語は、「のみからなる」を意味する。「Xからなる」組成物は、他の構成要素はいかなるものも含んではならないかもしれない。「Xから本質的になる」組成物は、他の活性成分はいかなるものも含んではならないかもしれない。「から本質的になる」という用語は、組成物、方法または構造が、追加的な成分、ステップおよび/または部分を含み得るが、それは追加的な成分、ステップおよび/または部分が特許請求された組成物、方法または構造の基本的な特性および新規の特性を実質的に変更しない場合のみであることを意味する。

【0177】

「約」という用語は、数値xとの関連では、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0178】

「実質的に」という単語により、「完全に」は排除されず、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まなくてよい。必要な場合、「実質的に」という単語を本発明の定義から除くことができる。

【0179】

糖環(sugar ring)は、開いた形態および閉じた形態で存在できること、ならびに、本明細書の構造式において閉じた形態が示されていても、開いた形態も本発明に包含されることが理解されよう。同様に、糖は、ピラノース型およびフラノース型で存在できること、ならびに、本明細書の構造式においてピラノース型が示されていても、フラノース型も包含されることが理解される。糖の異なるアノマー形態も包含される。

【0180】

具体的に記述されていない限り、2つまたはそれより多くの成分を混合するステップを含むプロセスは、いかなる特定の混合の順序も必要としない。したがって、成分を任意の順序で混合することができる。3つの成分が存在する場合には、2つの成分を互いに組み合わせることができ、次いでその組み合わせ物を、第3の成分と組み合わせることができるとなるなどである。

【0181】

抗体は、一般に、それらの標的に特異的である。したがって、抗体は、標的に対して、無関連の対照タンパク質、例えば、ウシ血清アルブミンに対する親和性よりも高い親和性を有する。

【0182】

「約」という用語は、数値xとの関連では、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0183】

成分がアジュバントに「吸着している」と記載されている場合、その抗原の少なくとも50%（重量で）、例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%またはそれ以上が吸着していることが好ましい。成分が完全に吸着している場合には、遠心分離した後に組成物の上清中では全く検出できない。

【0184】

具体的に規定されていない限り、2つまたはそれより多くの成分を混合するステップを含むプロセスは、いかなる特定の混合の順序も必要としない。したがって、成分を任意の順序で混合することができる。3つの成分が存在する場合には、2つの成分を互いに組み合わせることができ、次いでその組み合わせ物を、第3の成分と組み合わせることができるとなるなどである。

【0185】

コンジュゲートの量は、一般に、キャリアの選択に起因する変動を回避するために糖の質量に関して示されている（すなわち、全体としてのコンジュゲートの用量（キャリア+糖）は明示されている用量よりも多い）。

【0186】

本発明で使用される亜リン酸含有基は、周囲環境のpH、例えばそれらが溶解している溶媒のpHに応じて、いくつものプロトン化された形態および脱プロトン化された形態で存在してよい。したがって、本明細書では特定の形態が例示されている場合があるが、別

10

20

30

40

50

段の指定のない限り、これらの例示は、ただ単に代表的なものであり、特定のプロトン化された形態または脱プロトン化された形態に限定するものではないことが意図されている。例えば、リン酸基の場合は、 $-OP(O)(OH)_2$ として例示されているが、定義には、酸性条件下で存在し得るプロトン化された形態の $-[OP(O)(OH_2)(OH)]^+$ および $-[OP(O)(OH_2)_2]^{2+}$ ならびに塩基性条件下で存在し得る脱プロトン化された形態の $-[OP(O)(OH)(O)]^-$ および $[OP(O)(O)_2]^{2-}$ が包含される。本発明は、そのような形態のすべてを包含する。

【0187】

化合物を組成物の一部として身体に投与する場合には、その化合物は、その代わりに、適切なプロドラッグで置き換えることができる。

10

【0188】

動物（特に、ウシ）材料を細胞の培養に使用する場合、当該材料は、伝染性海綿状脳症（TSE）を伴わない、特に牛海綿状脳症（BSE）を伴わない供給源から得るべきである。

例えば、本発明は、以下の項目を提供する。

（項目1）

1または複数のGBSコンジュゲートと、a)細胞性または無細胞の百日咳抗原、b)破傷風トキソイド、c)ジフテリアトキソイドおよびd)不活化ポリオウイルス抗原から選択される1または複数の抗原とを含む免疫原性組成物であって、各GBSコンジュゲートが、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたB群連鎖球菌の莢膜糖である、免疫原性組成物。

20

（項目2）

前記GBSコンジュゲートが、i)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲート；ii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲート；および/またはiii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートを含む、項目1に記載の免疫原性組成物。

（項目3）

i)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、ii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iv)ジフテリアトキソイドとを含む、項目1または2に記載の免疫原性組成物。

30

（項目4）

i)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、ii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iv)破傷風トキソイドとを含む、項目1または2に記載の免疫原性組成物。

（項目5）

i)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、ii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iv)ジフテリアトキソイドと、v)破傷風トキソイドとを含む、項目1または2に記載の免疫原性組成物。

40

（項目6）

i)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、ii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iii)キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iv)ジフテリアトキソ

50

イドと、v) 破傷風トキソイドと、vi) 無細胞の百日咳抗原とを含む、項目1または2に記載の免疫原性組成物。

(項目7)

i) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、ii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iii) キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖であるコンジュゲートと、iv) ジフテリアトキソイドと、v) 破傷風トキソイドと、vi) 無細胞の百日咳抗原と、vii) 不活化ポリオウイルス抗原とを含む、項目1または2に記載の免疫原性組成物。

(項目8)

GBS莢膜糖の総量が70μgである、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目9)

各GBS莢膜糖が単位用量あたり0.1~30μgの量で存在する、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目10)

単位用量あたりの前記GBS血清型Ia、IbおよびIIIの莢膜糖の量が、20μg、20μgおよび20μg; 10μg、10μgおよび10μg; ならびに5μg、5μgおよび5μgからなる群より選択される、項目2から9のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目11)

前記GBS血清型Ia、IbおよびIIIの莢膜糖の質量比が1:1:1である、項目2から10のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目12)

キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ia由来の莢膜糖である前記コンジュゲートが、約1:1から1:2の間の糖:タンパク質比(w/w)を有し、キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型Ib由来の莢膜糖である前記コンジュゲートが、約1:1から1:2の間の糖:タンパク質比(w/w)を有し、かつ/またはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型III由来の莢膜糖である前記コンジュゲートが、約3:1から1:1の間の糖:タンパク質比(w/w)を有する、

(項目13)

GBS血清型Ia莢膜糖由来の莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質、GBS血清型Ib莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質および/またはGBS血清型III莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質が、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドまたはCRM197である、項目2から12のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目14)

GBS血清型Ia莢膜糖由来の莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質、GBS血清型Ib莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質およびGBS血清型III莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質が、CRM197である、項目13に記載の免疫原性組成物。

(項目15)

キャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型II由来の莢膜糖であるコンジュゲート; および/またはキャリアタンパク質にコンジュゲートさせたGBS血清型V由来の莢膜糖であるコンジュゲートをさらに含む、項目2から14のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目16)

GBS血清型II莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質および/またはGBS血清型V莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリア

10

20

30

40

50

タンパク質がジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドまたはCRM197である、項目15に記載の免疫原性組成物。

(項目17)

GBS血清型II莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質および/またはGBS血清型V莢膜糖を含む前記GBSコンジュゲート中の前記キャリアタンパク質がCRM197である、項目16に記載の免疫原性組成物。

(項目18)

前記無細胞の百日咳抗原が、解毒された百日咳毒素、線維状赤血球凝集素およびパータクチンを含む、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目19)

不活化百日咳毒素、線維状赤血球凝集素およびパータクチンが16:16:5の比(重量により測定)で存在する、項目18に記載の免疫原性組成物。

(項目20)

前記不活化ポリオウイルス抗原が、ポリオウイルス1型株、ポリオウイルス2型株およびポリオウイルス3型株のそれぞれに由来する抗原を含む、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目21)

前記不活化ポリオウイルス抗原が5:1:4の1型:2型:3型比(D抗原単位により測定)で存在する、項目20に記載の免疫原性組成物。

(項目22)

前記ジフテリアトキソイドが、4Lf/mlから8Lf/mlの間、例えば、0.5ml用量あたり4Lfの濃度で存在する、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目23)

前記ジフテリアトキソイドが、20から50Lf/mlの間、例えば、0.5ml用量あたり25Lfの濃度で存在する、項目1から21のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目24)

破傷風トキソイドが、0.5ml用量あたり約5Lfの濃度で存在する、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目25)

破傷風トキソイドが、0.5ml用量あたり5から10Lfの間の濃度で存在する、項目1から23のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目26)

ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドを含み、これらが、1を超える、例えば、2.5:1など、2:1から3:1の間(Lf単位で測定)のジフテリアトキソイド:破傷風トキソイド比で存在する、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目27)

破傷風トキソイドおよびジフテリアトキソイドを含み、これらが、1を超える、例えば、2:1など、1.5:1から2.5:1の間(Lf単位で測定)の破傷風トキソイド:ジフテリアトキソイド比で存在する、項目1から25のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目28)

アジュバントを含有する、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目29)

アルミニウム塩アジュバントを含有する、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目30)

注射可能な液剤または懸濁物である、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

。

10

20

30

40

50

(項目 3 1)

凍結乾燥されている、項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 2)

前記コンジュゲートを安定化するためにマンニトールを含む、項目 3 1 に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 3)

リン酸二水素カリウムバッファを含む、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 4)

塩化ナトリウムを含む、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

(項目 3 5)

保存剤を含まない、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 6)

ワクチンである、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 7)

ヒトに投与するためのものである、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 8)

医薬品として用いるためのものである、前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 9)

20

患者における免疫応答を上昇させるための方法であって、前記項目のいずれか一項に記載の組成物を前記患者に投与するステップを含む、方法。

(項目 4 0)

前記項目のいずれか一項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、1 または複数の G B S コンジュゲートを含む第 1 の成分と、a) 細胞性または無細胞の百日咳抗原、b) 破傷風トキソイド、c) ジフテリアトキソイドおよび d) 不活化ポリオウイルス抗原から選択される 1 または複数の抗原を含む第 2 の成分とを混合するステップを含む、プロセス。

(項目 4 1)

前記第 1 の成分中の前記 G B S コンジュゲートが凍結乾燥されている、項目 4 0 に記載のプロセス。

30

(項目 4 2)

前記第 2 の成分が水性抗原を含む、項目 4 0 または項目 4 1 に記載のプロセス。

(項目 4 3)

前記第 1 の成分中の凍結乾燥された前記 G B S コンジュゲートを、前記第 2 の成分の前記水性抗原を用いて再構成するさらなるステップを含む、項目 4 2 に記載のプロセス。

(項目 4 4)

前記第 1 の成分がアジュバントを含まない、項目 4 0 から 4 3 のいずれか一項に記載のプロセス。

(項目 4 5)

40

前記第 2 の成分が、アジュバント、例えば、アルミニウム塩アジュバントを含む、項目 4 0 から 4 4 のいずれかに記載のプロセス。

(項目 4 6)

前記項目のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を調製するためのキットであって、前記キットは、1 または複数の G B S コンジュゲートを含む第 1 の成分と、a) 細胞性または無細胞の百日咳抗原、b) 破傷風トキソイド、c) ジフテリアトキソイドおよび d) 不活化ポリオウイルス抗原から選択される 1 または複数の抗原を含む第 2 の成分とを含み、前記 2 つの成分が別々の容器に入っている、キット。

(項目 4 7)

前記第 1 の成分中の前記 G B S コンジュゲートが凍結乾燥されている、項目 4 6 に記載

50

のキット。

(項目48)

前記第2の成分が水性抗原を含む、項目46または47に記載のキット。

(項目49)

前記第1の成分がアジュバントを含まない、項目46から48のいずれか一項に記載のキット。

(項目50)

前記第2の成分が、アジュバント、例えば、アルミニウム塩アジュバントを含む、項目46から49のいずれかに記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図1-1】図1は、表1に記載の Maus 群における (A) GBS Ia に対する IgG 力価、(B) GBS Ib に対する IgG 力価および (C) GBS III に対する IgG 力価を示す。群5および群6のすべての Maus について血清をプールした。中央の棒により GMT 力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図1-2】図1は、表1に記載の Maus 群における (A) GBS Ia に対する IgG 力価、(B) GBS Ib に対する IgG 力価および (C) GBS III に対する IgG 力価を示す。群5および群6のすべての Maus について血清をプールした。中央の棒により GMT 力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図2-1】図2は、表1に記載の Maus 群における (A) ジフテリアトキソイドに対する IgG 力価、(B) 破傷風トキソイドに対する IgG 力価、(C) 百日咳トキソイドに対する IgG 力価、(D) 百日咳 FHA に対する IgG 力価および (E) 百日咳 69K に対する IgG 力価を示す。統計的有意性が * ($p < 0.05$) によって示されている。中央の棒により GMT 力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図2-2】図2は、表1に記載の Maus 群における (A) ジフテリアトキソイドに対する IgG 力価、(B) 破傷風トキソイドに対する IgG 力価、(C) 百日咳トキソイドに対する IgG 力価、(D) 百日咳 FHA に対する IgG 力価および (E) 百日咳 69K に対する IgG 力価を示す。統計的有意性が * ($p < 0.05$) によって示されている。中央の棒により GMT 力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図2-3】図2は、表1に記載の Maus 群における (A) ジフテリアトキソイドに対する IgG 力価、(B) 破傷風トキソイドに対する IgG 力価、(C) 百日咳トキソイドに対する IgG 力価、(D) 百日咳 FHA に対する IgG 力価および (E) 百日咳 69K に対する IgG 力価を示す。統計的有意性が * ($p < 0.05$) によって示されている。中央の棒により GMT 力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図3】図3は、表1に記載の Maus 群における (A) GBS Ia に対する OPK 力価、(B) GBS Ib に対する OPK 力価および (C) GBS III に対する OPK 力価を示す。各実験 (実験は2回繰り返した) のために各群のすべての Maus から血清をプールした (群5および群6以外)。群5および群6のそれぞれについて両方の実験からの血清をプールした。中央の棒により GMT 力価が示されている。

【図4】図4は、表3に記載の Maus 群における (A) GBS Ia に対する IgG 力価、(B) GBS Ib に対する IgG 力価および (C) GBS III に対する IgG 力価を示す。統計的有意性が * ($p < 0.05$) によって示されている。中央の棒により GMT 力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図5-1】図5は、表3に記載の Maus 群における (A) ジフテリアトキソイドに対する IgG 力価、(B) 破傷風トキソイドに対する IgG 力価、(C) 百日咳トキソイドに対する IgG 力価、(D) 百日咳 FHA に対する IgG 力価および (E) 百日咳 69K に対する IgG 力価を示す。統計的有意性が ** ($P < 0.01$) および * ($p < 0.05$)

10

20

30

40

50

)によって示されている。中央の棒によりGMT力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図5-2】図5は、表3に記載の Maus群における(A)ジフテリアトキソイドに対するIgG力価、(B)破傷風トキソイドに対するIgG力価、(C)百日咳トキソイドに対するIgG力価、(D)百日咳FHAに対するIgG力価および(E)百日咳69Kに対するIgG力価を示す。統計的有意性が** ($P < 0.01$)および* ($p < 0.05$)によって示されている。中央の棒によりGMT力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図5-3】図5は、表3に記載の Maus群における(A)ジフテリアトキソイドに対するIgG力価、(B)破傷風トキソイドに対するIgG力価、(C)百日咳トキソイドに対するIgG力価、(D)百日咳FHAに対するIgG力価および(E)百日咳69Kに対するIgG力価を示す。統計的有意性が** ($P < 0.01$)および* ($p < 0.05$)によって示されている。中央の棒によりGMT力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

10

【図6-1】図6は、表3に記載の Maus群における(A)GBS Iaに対するOPK力価、(B)GBS Ibに対するOPK力価および(C)GBS IIIに対するOPK力価を示す。各実験のために各群のすべてのマウスから血清をプールした。中央の棒によりGMT力価が示されている。

【図6-2】図6は、表3に記載の Maus群における(A)GBS Iaに対するOPK力価、(B)GBS Ibに対するOPK力価および(C)GBS IIIに対するOPK力価を示す。各実験のために各群のすべてのマウスから血清をプールした。中央の棒によりGMT力価が示されている。

20

【図7-1】図7は、表5に記載の Maus群における(A)GBS Iaに対するIgG力価、(B)GBS Ibに対するIgG力価および(C)GBS IIIに対するIgG力価を示す。群5、群6および群7について血清をプールした。統計的有意性が* ($p < 0.01$)によって示されている。中央の棒によりGMT力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図7-2】図7は、表5に記載の Maus群における(A)GBS Iaに対するIgG力価、(B)GBS Ibに対するIgG力価および(C)GBS IIIに対するIgG力価を示す。群5、群6および群7について血清をプールした。統計的有意性が* ($p < 0.01$)によって示されている。中央の棒によりGMT力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

30

【図8】図8は、表5に記載の Maus群における(A)破傷風トキソイドに対するIgG力価、および(B)ジフテリアトキソイドに対するIgG力価を示す。統計的有意性が* ($p < 0.05$)によって示されている。中央の棒によりGMT力価が示されている。上の棒および下の棒は、95%信頼区間を示す。

【図9-1】図9は、表5に記載の Maus群における(A)GBS Iaに対するOPK力価、(B)GBS Ibに対するOPK力価および(C)GBS IIIに対するOPK力価を示す。各実験のために各群のすべてのマウスから血清をプールした。中央の棒によりGMT力価が示されている。

40

【図9-2】図9は、表5に記載の Maus群における(A)GBS Iaに対するOPK力価、(B)GBS Ibに対するOPK力価および(C)GBS IIIに対するOPK力価を示す。各実験のために各群のすべてのマウスから血清をプールした。中央の棒によりGMT力価が示されている。

【発明を実施するための形態】

【0190】

材料および方法

ワクチン

以下の実験において使用するGBS三価ワクチンは、それぞれCRM197にコンジュゲートさせた3種の主要な血清型：Ia、IbおよびIIIに由来する莢膜多糖で構成さ

50

れる。T d a P (H 4) ワクチンは、水酸化アルミニウムでアジュバント化 (a d j u v a n t e d) され、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドおよび無細胞の百日咳抗原 (P T 、 F H A および 6 9 K) を含有する。

【 0 1 9 1 】

T d a P (H 4) - I P V ワクチンは、水酸化アルミニウムでアジュバント化され、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、無細胞の百日咳抗原 (P T 、 F H A および 6 9 K) およびポリオ抗原 (I P V 1 、 I P V 2 および I P V 3) を含有する。

【 0 1 9 2 】

市販の破傷風および破傷風 / ジフテリア液体ワクチンを使用した。

【 0 1 9 3 】

E L I S A

免疫化されたマウス由来の血清中の G B S 多糖 I a 、 I b および I I I に対する I g G 力価を、参考文献 1 5 9 において説明されている通り、E L I S A によって測定した。一般に、E L I S A による I g G A b 力価と O P K 力価の間には良好な相関が存在する。

【 0 1 9 4 】

オプソニン作用性死滅 (O P K) アッセイ

防御はオプソニン作用性死滅によってもたらされる可能性があるので、血清抗体のオプソニン化活性を測定することはワクチン活性の有用な指標である。このオプソニン作用性死滅アッセイでは、補体の存在下でエフェクター細胞による死滅のために G B S をオプソニン化する血清抗体の能力を測定する。G B S 多糖 I a 、 I b および I I I に対して免疫化されたマウスにおいて惹起された抗体の機能活性を測定するための O P K アッセイを、American Type Culture Collection (A T C C 、 C C L - 2 4 0) から入手した前骨髄球性白血病細胞株である H L - 6 0 を使用して実施した。血清型 I a 分離株、血清型 I b 分離株および血清型 I I I 分離株の死滅を測定するために、それぞれ G B S 5 1 5 株、G B S H 3 6 b 株および G B S C O H 1 株を使用した。陰性対照反応を、熱失活させた補体の存在下で、または抗体もしくはエフェクター細胞の不在下で、または免疫前の血清またはプラセボ血清を使用してのいずれかで実施した。反応物をトリプチケースソイ寒天プレートに蒔き、細菌数を決定した。死滅の百分率を (T 0 における平均 C F U - T 6 0 における平均 C F U) / (T 0 における平均 C F U) として算出した。O P K 力価を、細菌の 5 0 % 死滅を生じる逆数血清希釈度として表した。O P K アッセイは、参考文献 1 6 0 に記載されている死滅に基づくオプソニン作用アッセイ (k O P A) プロトコールに従って実施した。

【 0 1 9 5 】

ルミネックスに基づく多重アッセイ

破傷風抗原、ジフテリア抗原および百日咳抗原に関する I g G を定量化するために、ルミネックスに基づく多重アッセイを使用した。ジフテリアトキソイド (D T) 、破傷風トキソイド (T T) 、百日咳トキソイド (P T) 、百日咳 F H A および百日咳 6 9 K 抗原をそれぞれマイクロスフェア (L u m i n e x C o r p o r a t i o n 、 A u s t i n 、 T X) に共有結合によりコンジュゲートさせた。マウス血清試料を分析して各抗原に特異的な抗体価を評価した。実験は 2 連で実施し、2 連の値を平均した。参照血清を、T d a P 抗原 + ミョウバンを用いて免疫化した C D 1 マウス由来の血清をプールすることによって調製した。

【 0 1 9 6 】

試験 1 : T d a P および T d A P - I P V 中に再構成された G B S

この試験では、(i) ミョウバンでアジュバント化された、破傷風抗原、ジフテリア抗原および無細胞の百日咳抗原を含有する液体ワクチン (T d a P) および (i i) ミョウバンでアジュバント化された、破傷風抗原、ジフテリア抗原、無細胞の百日咳抗原およびポリオ抗原を含有する液体ワクチン (T d a P - I P V) を用いて再構成した、凍結乾燥 G B S 三価ワクチン (C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた I a 多糖、I b 多糖、I I I 多糖) の免疫原性を調査した。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 7 】

免疫化プロトコールは表 1 に報告されており、これを 2 回繰り返した。各実験において、雌 C D 1 マウス 8 匹の 6 つの群を、0 日目および 2 1 日目に、2 用量の表 1 に示されているワクチンを腹腔内に用いて免疫化し、0 日目および 3 5 日目に採血した。

【 0 1 9 8 】

【 表 1 】

表1.試験1の免疫化プロトコール

群番号	ワクチンの種類	ワクチンの組成	体積、 経路	抗原の用量	アジュ バント の用量	マウス数
1	GBS + TdaP(H4)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 8 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	i.p. 200 µl	PSIa-CRM 1µg PSIb-CRM 1µg PSIII-CRM 1µg T 2 Lf D 1.6 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg	ミョウ バン 400 µg	8
2	GBS + TdaP(H4)-IPV	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 8 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml IPV1 80 dU/ml IPV2 16 dU/ml IPV3 64 dU/ml ミョウバン 2 mg/ml	i.p. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 2 Lf D 1.6 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg IPV1 16 dU IPV2 3.2 dU IPV3 12.8 dU	ミョウ バン 400 µg	8
3	GBSのみ	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	i.p. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	ミョウ バン 400 µg	8
4	GBSのみ	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	i.p. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	ミョウ バン 400 µg	8
5	抗原なし	ミョウバン 2 mg/ml	i.p. 200 µl	-	ミョウ バン 400 µg	8
6	TdaP(H4)-IPV	T 10 Lf/ml D 8 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml IPV1 80 dU/ml IPV2 16 dU/ml IPV3 64 dU/ml ミョウバン 2 mg/ml	i.p. 200 µl	T 2 Lf D 1.6 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg IPV1 16 dU IPV2 3.2 dU IPV3 12.8 dU	ミョウ バン 400 µg	8

【 0 1 9 9 】

免疫化されたマウス由来の血清を、各 G B S 血清型特異的抗原 (I a 型、 I b 型、および I I I 型) に対する I g G 抗体の存在について E L I S A によって分析した。破傷風トキソイド (T T) に対する抗体、ジフテリアトキソイド (D T) に対する抗体および無細胞の百日咳抗原 (P T 、 F H A および 6 9 K) に対する抗体をルミネックスアッセイによって定量化した。 G B S 抗原に対する抗体の機能活性を、オプソニン作用性死滅 (O P K

10

20

30

40

50

) アッセイによって評価した。

【0200】

図1および図2には、試験1において試験されたマウスの6つの群の種々の抗原に対するIgG力価が示されている(2つの実験からの8+8マウスからの統合結果)。GMT力価が以下の表2に示されている。

【0201】

【表2】

表2:試験1において試験されたマウスの、2回免疫化した後のGMT血清IgG力価

	群1	群2	群3	群4	群5	群6
GBS Ia	112	97	87	82	13	13
GBS Ib	561	97	229	185	13	13
GBS III	683	537	625	762	13	13
DT	187.55	48.94	N/A	N/A	<LLOQ	89.95
TT	560.67	268.97	N/A	N/A	<LLOQ	626.72
PT	280.43	121.10	N/A	N/A	2.10	232.60
FHA	789.00	450.81	N/A	N/A	<LLOQ	749.95
69K	789.0	450.8	N/A	N/A	<LLOQ	88.6

<LLOQ=定量化の下限未満

【0202】

全体的に、すべてのワクチン処方物により、対照と同等の免疫原性をもたらされ、有意な免疫学的干渉は観察されなかった。GBS Ia、IbおよびIIIに対する2回目の免疫化後のIgG力価に関して、血清型のいずれのワクチン群の間にもIg応答にマン-ホイットニーのU検定によって有意差は検出されず、これにより、干渉が存在しないことが示された。DT、TT、PT、FHAおよび69Kに対する2回目の免疫化後のIgG力価に関しては、GBS+TdAPにより、GBS+TdAP+IPVよりも約2倍高いGMT力価が惹起され(マン-ホイットニーのU検定により $P < 0.05$)、これにより、すべてのTdAP抗原に対してIPVの軽微な負の影響があることが示唆された。さらに、TTに関しては、ワクチンTdAP+IPVにより、TdAP+IPV+GBSよりも2倍高い力価がもたらされ(U検定、 $P < 0.026$)、これにより、IPVの存在下でTTに対してGBSの軽微な負の影響があることが示唆された。

【0203】

図3には、試験1において試験された動物の6つの群の、GBS Ia、IbおよびIIIに対するOPK力価が示されている。示されている通り、GBS Ia、IbまたはIIIに対するOPK力価の主要な差異(アッセイおよび生物学的変動性の範囲内)は、いずれのワクチン処方物についても検出されなかった。

【0204】

試験2: TdAP中に再構成されたGBS

この試験では、ミョウバンでアジュバント化された、破傷風抗原、ジフテリア抗原および無細胞の百日咳抗原(TdAP)を含有する液体ワクチンを用いて再構成した、凍結乾燥GBS三価ワクチン(CRM197にコンジュゲートさせたIa多糖、Ib多糖、III多糖)の種々の量での免疫原性を調査した。

【0205】

雌CD1マウス16匹の群8つを、0日目、21日目および35日目に、3用量のワクチンを皮下に用いて免疫化し、0日目、35日目(2回目後(post-2))および49日目(3回目後(post-3))に採血した。免疫化プロトコールが表3に報告されている。

【0206】

10

20

30

40

【表3】

表3 試験2の免疫化プロトコール

群番号	ワクチンの種類	ワクチンの組成	体積、 経路	抗原の用量	アジュバ ントの 用量	マウス 数
1	GBS + TdaP(H2)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	s.c. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 2 Lf D 0.8 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg	ミョウバン 400 µg	8
2	TdaP(H2)	T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 8 µg/ml FHA 8 µg/ml 69K 16 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	s.c. 200 µl	T 2 Lf D 0.8 Lf PT 1.6 µg FHA 1.6 µg 69K 3.2 µg	ミョウバン 400 µg	8
3	GBS + TdaP(L2)	PSIb-CRM 0.25 µg PSIII-CRM 5 µg/ml T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 2 µg/ml FHA 2 µg/ml 69K 4 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	s.c. 200 µl	PSIII-CRM 0.25 µg T 2 Lf D 0.8 Lf PT 0.4 µg FHA 0.4 µg 69K 0.8 µg	ミョウバン 400 µg	8
4	TdaP(L2)	T 10 Lf/ml D 4 Lf/ml PT 2 µg/ml FHA 2 µg/ml 69K 4 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	s.c. 200 µl	T 2 Lf D 0.8 Lf PT 0.4 µg FHA 0.4 µg 69K 0.8 µg	ミョウバン 400 µg	8
5	GBS (H)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml ミョウバン 2 mg/ml	s.c. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	ミョウバン 400 µg	8
6	GBS (L)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml	s.c. 200 µl	PSIa-CRM 0.25 µg PSIb-CRM 0.25 µg PSIII-CRM 0.25 µg	ミョウバン 400 µg	8
7	抗原なし (1)	ミョウバン 2 mg/ml	s.c. 200 µl	-	ミョウバン 400 µg	8
8	抗原なし (2)	ミョウバン 2 mg/ml	s.c. 200 µl	-	ミョウバン 400 µg	8

10

20

30

40

【0207】

図4および図5には、試験2において試験されたマウスの群についての3回免疫化した後の全群についての種々の抗原に対するI g G力価が示されている。GM T力価が以下の表4に示されている。

【0208】

【表4】

表4:試験2において試験されたマウスにおける3回免疫化した後のGMT血清IgG力価

	群1	群2	群3	群4	群5	群6	群7	群8
GBS Ia	155.5	12.5	237.0	N/A	598.6	418.3	20.4	12.5
GBS Ib	107.5	15.1	90.6	N/A	250.4	271.7	15.7	12.5
GBS III	588.2	12.5	677.7	N/A	958.9	946.4	23.1	12.5
DT	141.3	164.3	164.5	228.2	N/A	N/A	N/A	0.1
TT	333.6	382.1	457.2	509.6	N/A	N/A	N/A	0.1
PT	191.4	187.1	149.9	128.1	N/A	N/A	N/A	0.2
FHA	423.8	544.6	476.1	314.9	N/A	N/A	N/A	0.1
69K	374.7	435.4	328.2	337.9	N/A	N/A	N/A	0.1

10

【0209】

GBS Ia、IbおよびIIIに対する3回目の免疫化の後のIgG力価に関しては、まず、群7のマウス2匹がおそらくワクチンを間違えて受けたことが観察された(3種の抗原すべてに対してIgG力価が高く、これは同様のプラセボ群では以前に観察されることがない)。第2に、Tdapを用いて再構成した群では、Tdapを伴わないGBSワクチンと比較して3種のGBS抗原すべてに対してIgG力価が低い傾向が観察された(この場合の一部で2~4倍のGMT、 $P < 0.05$)。すべての血清型に対する2回目後のIgG力価についても同じ傾向が観察された。

【0210】

20

それぞれDT、TT、PT、FHAおよび69Kに対する3回目の免疫化の後のIgG力価に関しては、群のいずれの間でもIgG応答に有意差はマン-ホイットニー検定によって検出されず、これにより、干渉が完全に存在しないことが示された。DTおよびTTについて用量反応は観察されなかったが、百日咳PT、FHAおよび69K抗原の高用量について、低用量と比較してわずかに高い力価が観察された。

【0211】

1 μ g(高、L)および0.25 μ g(低、L)ワクチン用量のGBSに対する応答を比較した群5および群6におけるGBS Ia、IbおよびIIIに対するIgG力価の場合、GBS IaおよびIbに対する個々の応答の変動性はGBS IIIに対するものよりも高かった。血清型のいずれについても低用量と高用量の間で有意差は観察されなかったが、すべての血清型について3回目後では2回目後と比較して非応答者の数が少なく、応答が有意に高いことが検出された(マン-ホイットニーのU検定)。

30

【0212】

図6には、試験2において試験されたマウスの7つの群のGBS Ia、IbおよびIIIに対するOPK力価が示されている。Tdapと一緒に処方されたGBSワクチンではGBS単独と比較して力価がわずかに低い傾向がある。

【0213】

試験3:破傷風液体ワクチン中に再構成されたGBSおよび破傷風/ジフテリア液体ワクチン中に再構成されたGBS

この試験では、ミョウバンでアジュバント化された、(i)破傷風抗原または(ii)破傷風およびジフテリア抗原を含有する液体ワクチンを用いて再構成した、凍結乾燥GBS三価ワクチン(CRM197にコンジュゲートさせたIa多糖、Ib多糖、III多糖)の免疫原性を調査した。

40

【0214】

免疫化プロトコールが表5に報告されており、これを2回繰り返した。

【0215】

各プロトコールにおいて、雌CD1マウス8匹の群7つを、0日目および21日目に、表5に示されている2用量のワクチンを皮下に用いて免疫化し、0日目および35日目に採血した。

【0216】

50

【表5】

表5:試験3の免疫化プロトコール

群番号	ワクチンの種類	ワクチンの組成	体積、経路	抗原の用量	アジュバントの用量	マウス数
1	GBS + T	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 40 UI/ml ミヨウバン 3 mg/ml	s.c. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 8 UI	ミヨウバン 600 µg	8
2	GBS + TD	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml T 40 UI/ml D 4 UI/ml ミヨウバン 3 mg/ml	s.c. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg T 8 UI D 0.8 UI	ミヨウバン 600 µg	8
3	GBSのみ (1)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml ミヨウバン 3 mg/ml	s.c. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	ミヨウバン 600 µg	8
4	GBSのみ (2)	PSIa-CRM 5 µg/ml PSIb-CRM 5 µg/ml PSIII-CRM 5 µg/ml ミヨウバン 3 mg/ml	s.c. 200 µl	PSIa-CRM 1 µg PSIb-CRM 1 µg PSIII-CRM 1 µg	ミヨウバン 600 µg	8
5	抗原なし	ミヨウバン 3 mg/ml	s.c. 200 µl	-	ミヨウバン 600 µg	8
6	Tのみ	T 40 UI/ml ミヨウバン 3 mg/ml	s.c. 200 µl	T 8 UI	ミヨウバン 600 µg	8
7	TDのみ	T 40 UI/ml D 4 UI/ml ミヨウバン 3 mg/ml	s.c. 200 µl	T 8 UI D 0.8 UI	ミヨウバン 600 µg	8

10

20

30

【0217】

図7および図8には、試験3において試験されたマウスのすべての群についての種々の抗原に対するIgG力価が示されている(2つの実験からの8+8マウスからの統合結果)。GMT力価が以下の表6に示されている。

【0218】

【表6】

表6:試験3において試験されたマウスにおける、2回免疫化した後のGMT血清IgG力価

	群1	群2	群3	群4	群5	群6	群7
GBS Ia	65	162	458	235	13	13	13
GBS Ib	217	402	550	417	13	13	13
GBS III	854	1018	1186	924	13	13	13
TT	742.00	882.70	N/A	N/A	6.60	1295.00	1038.00
DT	7.49	111.6	N/A	N/A	<LLOQ	<LLOQ	28.52

<LLOQ=定量化の下限未満

40

【0219】

ELISAによって測定されたGBS Ia、IbおよびIIIに対するIgG力価について、マン-ホイットニー検定では、GBS単独で構成されたワクチン(群3)でGBSとそれに加えて破傷風トキソイドを含有するワクチンよりも有意に高い力価がもたらされた血清型Ia以外は、ワクチン群間でいかなる有意差も示されなかった。OPKアッセ

50

イでは、GBS Ia、IbまたはIIIに対するOPK力価の主要な差異（アッセイおよび生物学的変動性の範囲内）はいずれのワクチン処方物についても検出されなかった。

【0220】

TTに対するIgG力価は、GBSワクチンおよびTTを含有する群において、TT単独と比較して有意に低かったが（ $P = 0.03$ ）、GMT力価の差異は2倍未満であった。DTに対するIgG応答に関しては、予測通り、CRM197（解毒されたDT）の影響により、GBSワクチンを含有する群において高かった。

【0221】

図9には、試験3において試験されたマウスのすべての群由来の血清におけるGBS Ia、IbおよびIIIに対するOPK力価が示されている。示されている通り、GBS Ia、IbまたはIIIに対するOPK力価の主要な差異（アッセイおよび生物学的変動性の範囲内）はいずれのワクチン処方物についても検出されなかった。

10

【0222】

結論

調査したワクチン処方物の免疫原性に関して以下の観察がなされた：

- GBS三価、ジフテリア、破傷風および百日咳ワクチンにより、調査した処方物すべてについて、処方物を用いて免疫化されたマウスにおいて対応する抗原に対する特異的な抗体価が惹起された。

【0223】

- GBSと破傷風/ジフテリア/百日咳/ポリオワクチンの組み合わせとの間の免疫学的干渉を試験1（2つのワクチン用量を用いた腹腔内免疫化）および試験2（2つのワクチン用量および3つのワクチン用量を用いた皮下免疫化）において調査した。試験1では、GBS抗原、ジフテリア抗原、破傷風抗原および百日咳抗原に対するIgGおよび機能性抗体の応答は、それらを単独で使用するか組み合わせて使用するかに関係なく同等であり、干渉は観察されなかった。試験2では、GMT力価の差異は決して4倍を超えないにもかかわらず、TdAP中に再構成された3種のGBS抗原すべてに対するIgG力価がGBS単独と比較して低い傾向が観察された。

20

【0224】

- GBSと破傷風または破傷風/ジフテリアワクチンとの間の免疫学的干渉を試験3において調査した。マン-ホイットニー検定では、GBS単独で構成されたワクチンにより、GBSとそれに加えて破傷風トキソイドを含有するワクチンよりも有意に高い力価がもたらされた血清型Ia以外は、ワクチン群のいずれの間でもGBS応答に有意差は示されなかった。同じ試験により、GBSワクチンのTTに対するわずかな干渉が明らかになった（TT単独と比較して、GBSワクチンを含有する群において、GMTの差異が2倍、TTに対するIgG力価の差異について $P = 0.03$ ）。DTに対するIgG応答に関しては、予測通り、CRM197（解毒されたDT）の影響により、GBSワクチンを含有する群において高かった。

30

【0225】

結論として、調査したワクチンのいずれの間にも強力な干渉の証拠はなかった。

40

【0226】

本発明は、例としてのみ記載されており、本発明の範囲および精神の範囲内に依然としてありながら改変を行うことができることが理解される。

【0227】

【化 1】

参考文献

- [1] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] Paoletti *et al.* (1990) *J Biol Chem* 265:18278-83.
- [3] Wessels *et al.* (1990) *J Clin Invest* 86:1428-33.
- [4] Paoletti *et al.* (1992) *Infect Immun* 60:4009-14.
- [5] Paoletti *et al.* (1992) *J Clin Invest* 89:203-9.
- [6] Wessels *et al.* (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9170-4.
- [7] Wang *et al.* (2003) *Vaccine* 21:1112-7.
- [8] Wessels *et al.* (1993) *Infect Immun* 61:4760-6 10
- [9] Wessels *et al.* (1995) *J Infect Dis* 171:879-84.
- [10] Baker *et al.* (2004) *J Infect Dis* 189:1103-12.
- [11] Paoletti & Kasper (2003) *Expert Opin Biol Ther* 3:975-84.
- [12] WO2012/035519
- [13] WO2006/050341
- [14] Guttormsen *et al.* (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(15):5903-8. Epub 2008 Mar 31.
- [15] WO96/40795
- [16] Michon *et al.* (2006) *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Aug;13(8):936-43.
- [17] US patents 6027733 & 6274144.
- [18] www.polymer.de
- [19] Lewis *et al.* (2004) *PNAS USA* 101:11123-8. 20
- [20] Wessels *et al.* (1989) *Infect Immun* 57:1089-94.
- [21] WO2006/082527.
- [22] US patent application US 61/008,941, entitled "FERMENTATION PROCESSES FOR CULTIVATING STREPTOCOCCI AND PURIFICATION PROCESSES FOR OBTAINING CPS THEREFROM" filed on 20th December 2007 and international patent application WO 2009/081276.
- [23] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [24] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [25] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-68.
- [26] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [27] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-7.
- [28] European patent 0477508. 30
- [29] US patent 5,306,492.
- [30] WO98/42721.
- [31] Dick *et al.* in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [32] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [33] US patent 4356170.
- [34] WO2006/082530.
- [35] WO2005/000346
- [36] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [37] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238.
- [38] Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [39] EP-A-0372501. 40
- [40] EP-A-0378881.
- [41] EP-A-0427347.

【 0 2 2 8 】

【化2】

- [42] WO93/17712
 [43] WO94/03208.
 [44] WO98/58668.
 [45] EP-A-0471177.
 [46] WO91/01146
 [47] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-24.
 [48] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:4884-87.
 [49] EP-A-0594610.
 [50] WO00/56360.
 [51] WO02/091998. 10
 [52] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
 [53] WO01/72337
 [54] WO00/61761.
 [55] WO00/33882
 [56] WO2004/041157.
 [57] WO99/42130.
 [58] WO2004/011027.
 [59] WO96/40242.
 [60] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
 [61] WO00/38711; US patent 6,146,902.
 [62] International patent application PCT/IB2008/02690, 'CONJUGATE PURIFICATION', 20
 claiming priority from GB-0713880.3 (NOVARTIS AG), published as WO 2009/010877.
 [63] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
 [64] *National Institute for Biological Standards and Control*; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk
 [65] Sesardic *et al.* (2001) *Biologicals* 29:107-22.
 [66] NIBSC code: 98/560.
 [67] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka).
 [68] NIBSC code: 69/017.
 [69] NIBSC code: DIFT.
 [70] *National Institute for Biological Standards and Control*; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk
 [71] Sesardic *et al.* (2002) *Biologicals* 30:49-68. 30
 [72] NIBSC code: 98/552.
 [73] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka).
 [74] NIBSC code: TEFT.
 [75] NIBSC code: 66/303.
 [76] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [77] Module 6 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Robertson)
 [78] WO2008/028956
 [79] WO2008/028957
 [80] Liao *et al.* (2012) *J Infect Dis.* 205:237-43
 [81] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
 [82] WO00/56365.
 [83] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472. 40
 [84] WO01/41800.
 [85] Paoletti (2001) *Vaccine* 19(15-16):2118-26.
 [86] WO03/009869.

【0229】

【化3】

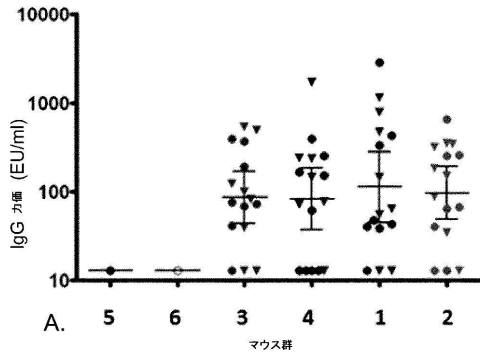
- [87] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [88] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.
- [89] WO00/53221.
- [90] Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [91] Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [92] Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [93] Ugozzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [94] Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [95] US patent 6355271.
- [96] WO00/23105. 10
- [97] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [98] US patent 5,057,540.
- [99] WO96/33739.
- [100] EP-A-0109942.
- [101] WO96/11711.
- [102] WO00/07621.
- [103] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [104] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [105] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
- [106] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355. 20
- [107] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [108] Gerber *et al.* (2001) *Viol* 75:4752-4760.
- [109] WO03/024480
- [110] WO03/024481
- [111] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [112] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [113] WO02/26757.
- [114] WO99/62923.
- [115] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [116] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [117] WO98/40100. 30
- [118] US patent 6,207,646.
- [119] US patent 6,239,116.
- [120] US patent 6,429,199.
- [121] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
- [122] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [123] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [124] WO01/95935.
- [125] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [126] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
- [127] WO03/035836.
- [128] WO95/17211. 40
- [129] WO98/42375.
- [130] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [131] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [132] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.

【0230】

【化4】

- [133] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [134] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [135] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
- [136] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [137] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [138] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [139] WO99/40936.
- [140] WO99/44636.
- [141] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276. 10
- [142] WO99/27960.
- [143] US patent 6,090,406
- [144] US patent 5,916,588
- [145] EP-A-0626169.
- [146] WO99/52549.
- [147] WO01/21207.
- [148] WO01/21152.
- [149] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [150] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [151] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [152] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218. 20
- [153] WO04/60308
- [154] WO04/64759.
- [155] Hennings *et al.* (2001) *J Infect Dis.* 183(7):1138-42. Epub 2001 Mar 1.
- [156] Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224
- [157] Madoff *et al.* (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.
- [158] Paoletti *et al.* (1994) *Infect Immun* 62:3236-43.
- [159] GB patent application no. 1121301.4
- [160] Fabbrini *et al.* (2012) *J Immun Methods* 378:11-19

【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】

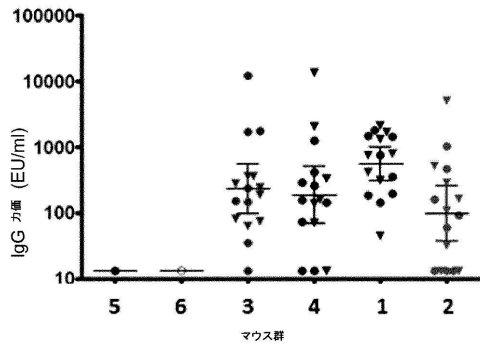
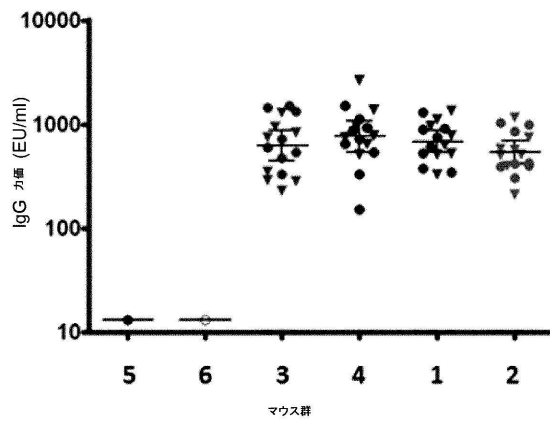


Fig.1

Fig.1 (続き)

【 図 2 - 1 】

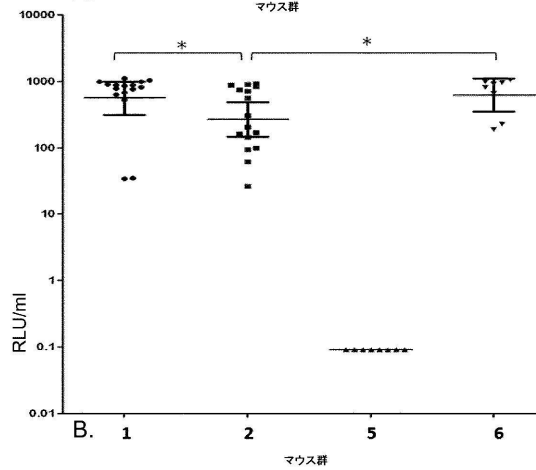
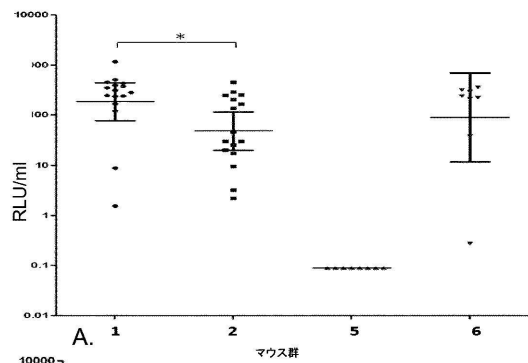


Fig.2

【 図 2 - 2 】

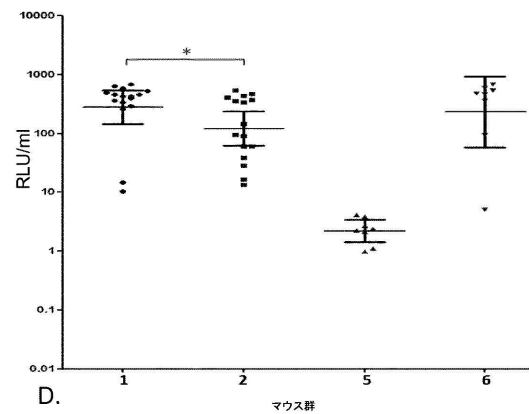
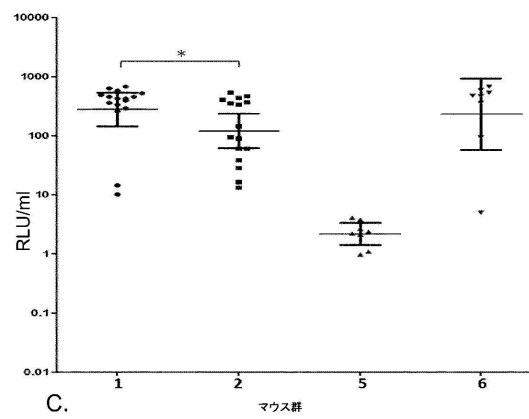


Fig.2 (続き)

【 図 2 - 3 】

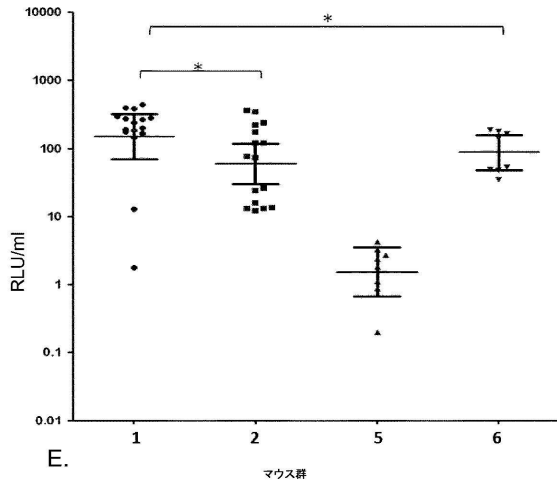


Fig.2 (続き)

【 図 3 】

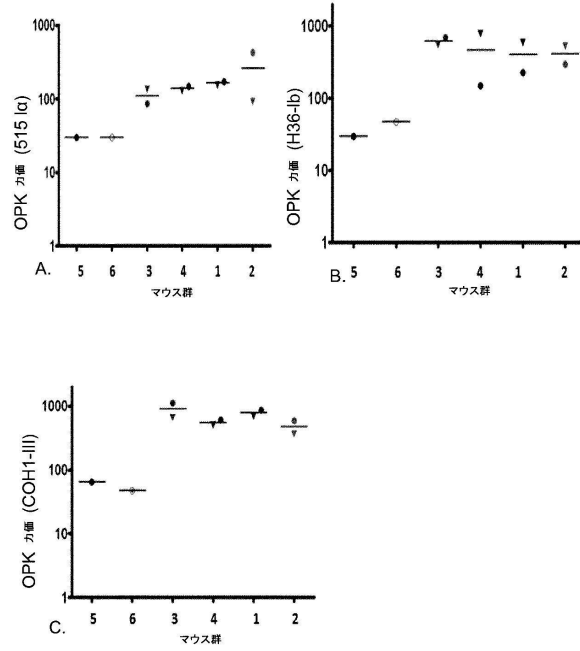


Fig.3

【 図 4 】

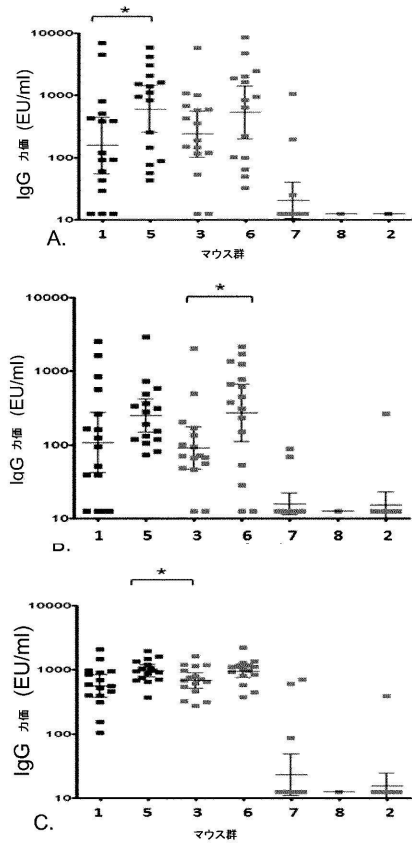


Fig. 4

【 図 5 - 1 】

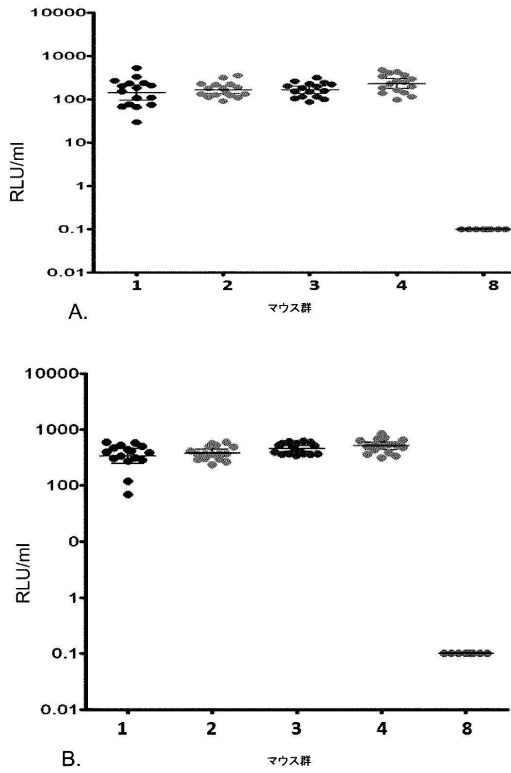
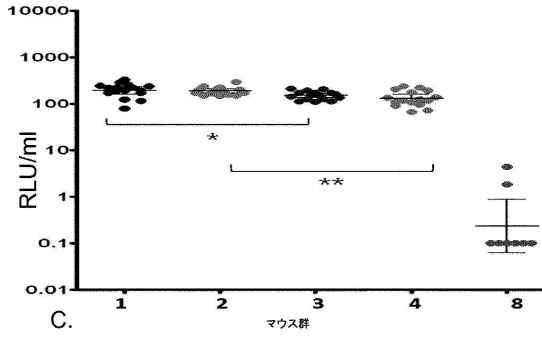


Fig.5

【 図 5 - 2 】



【 図 5 - 3 】

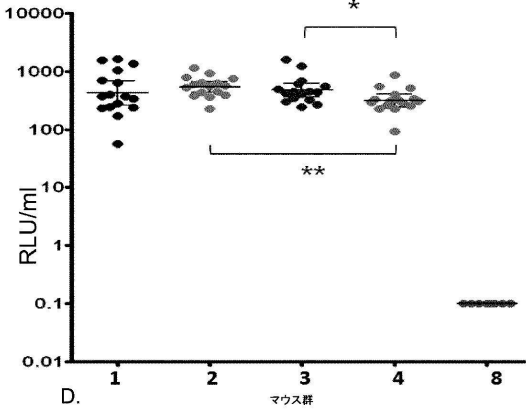
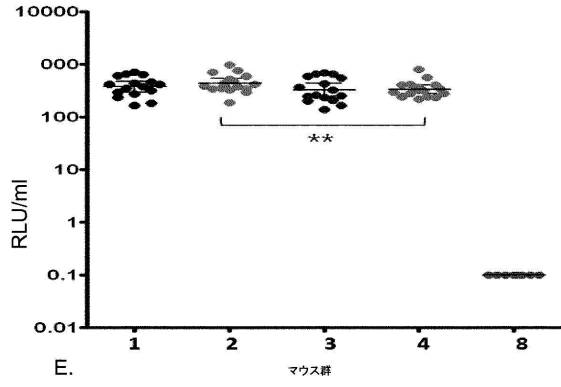
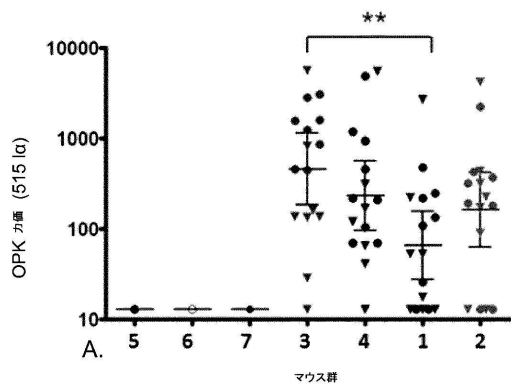


Fig. 5 (続き)

Fig. 5 (続き)

【 図 6 - 1 】



【 図 6 - 2 】

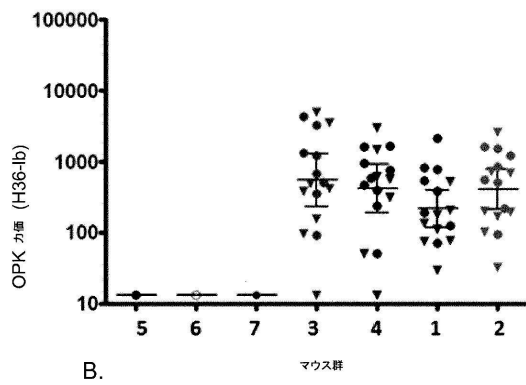
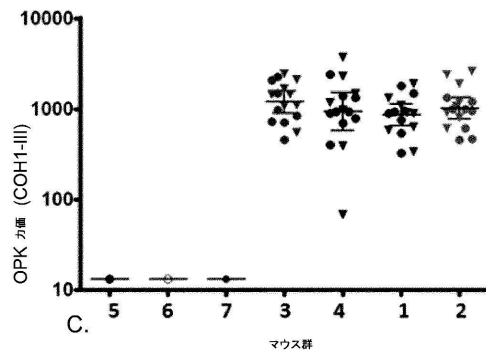
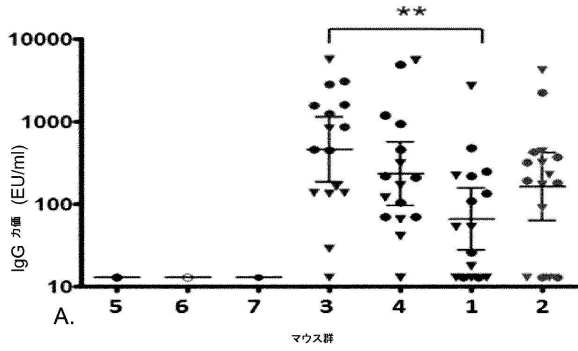


Fig. 6 (続き)

Fig.6

【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】

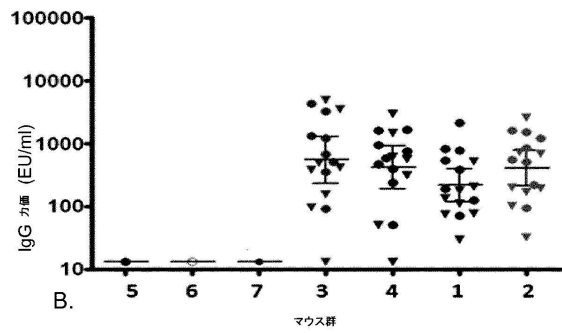
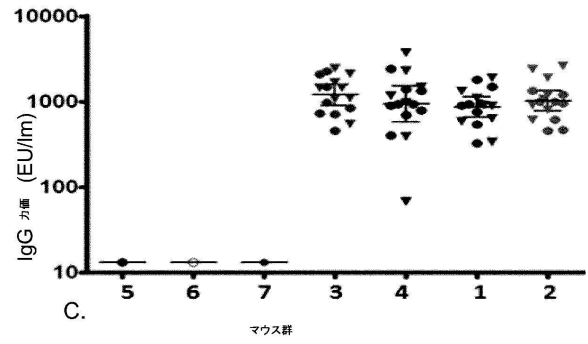


Fig.7 (続き)

Fig.7

【 図 8 】

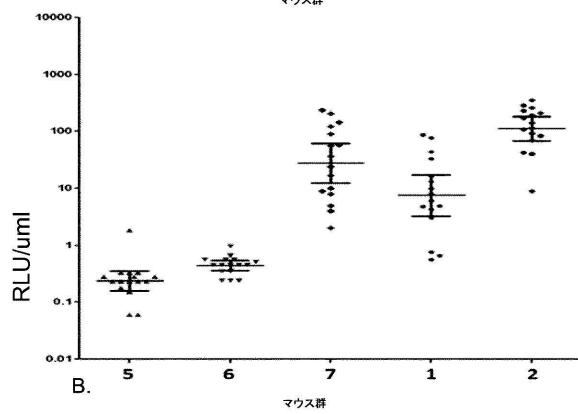
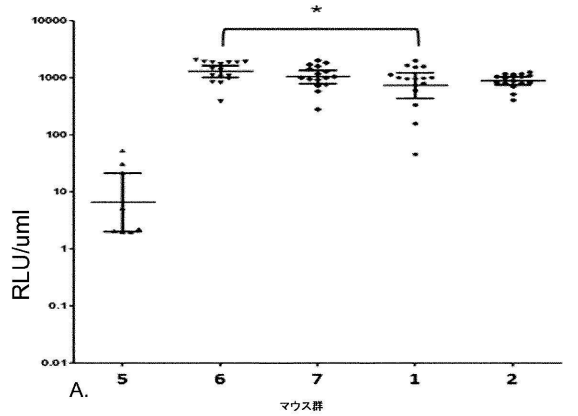


Fig. 8

【 図 9 - 1 】

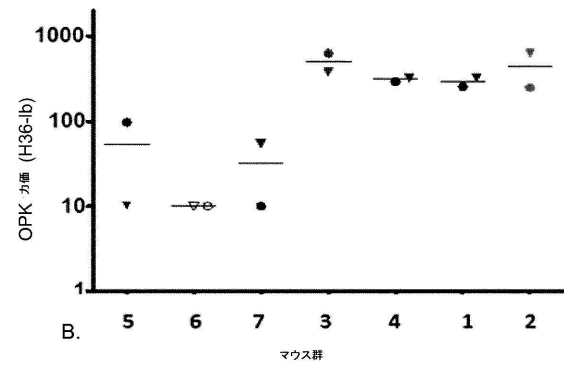
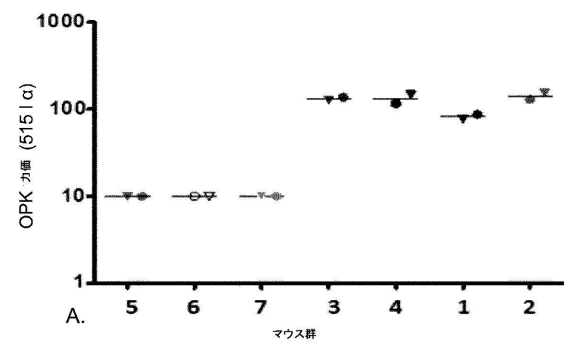


Fig.9

【 図 9 - 2 】

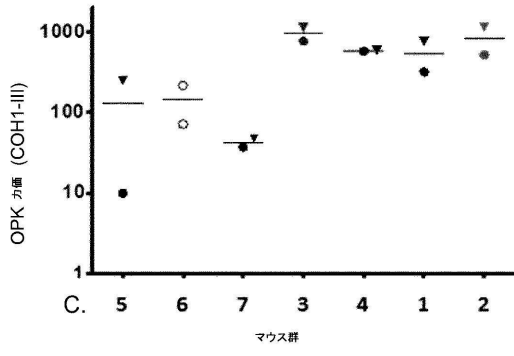


Fig.9 (続き)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/64	(2017.01)	A 6 1 K 47/64
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 9/19	(2006.01)	A 6 1 K 9/19
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04

- (72)発明者 グランディ, グイド
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 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 アンド ダイアグノスティクス エス.アール.エル. 気付
- (72)発明者 マイオーネ, ドミニコ
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 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 アンド ダイアグノスティクス エス.アール.エル. 気付
- (72)発明者 マルガリート イ ロス, イマクラータ
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 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 アンド ダイアグノスティクス エス.アール.エル. 気付

審査官 馬場 亮人

- (56)参考文献 国際公開第2012/035519(WO, A1)
 欧州特許出願公開第00866133(EP, A1)
 特表2008-528052(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- A 6 1 K 3 9 / 0 9
 - A 6 1 K 9 / 1 9
 - A 6 1 K 3 9 / 0 5
 - A 6 1 K 3 9 / 0 8
 - A 6 1 K 3 9 / 1 0
 - A 6 1 K 3 9 / 1 3
 - A 6 1 K 3 9 / 3 9
 - A 6 1 K 4 7 / 6 4
 - A 6 1 P 3 1 / 0 4
 - A 6 1 P 3 7 / 0 4
 - JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 - CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)