

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-226707

(P2017-226707A)

(43) 公開日 平成29年12月28日(2017.12.28)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| A 6 1 K 39/09 (2006.01) | A 6 1 K 39/09 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 P 31/04 (2006.01) | A 6 1 P 31/04 | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 P 11/00 (2006.01) | A 6 1 P 11/00 | |
| A 6 1 P 37/04 (2006.01) | A 6 1 P 37/04 | |
| A 6 1 P 7/00 (2006.01) | A 6 1 P 7/00 | |

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 39 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2017-195832 (P2017-195832) | (71) 出願人 | 305060279 |
| (22) 出願日 | 平成29年10月6日 (2017.10.6) | | グラクソスミスクライン バイオリジカル |
| (62) 分割の表示 | 特願2015-535025 (P2015-535025) | | ズ ソシエテ アノニム |
| 原出願日 | 平成25年10月3日 (2013.10.3) | | ベルギー ベー-1330 リクセンサー |
| (31) 優先権主張番号 | 61/744,880 | (74) 代理人 | 100078282 |
| (32) 優先日 | 平成24年10月3日 (2012.10.3) | | 弁理士 山本 秀策 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100113413 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/799,123 | | 弁理士 森下 夏樹 |
| (32) 優先日 | 平成25年3月15日 (2013.3.15) | (72) 発明者 | グイド グランディ |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 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 |
| | | | 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) 【要約】

【課題】 免疫原性組成物を提供すること。

【解決手段】 本発明は、 a) 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、 b) 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、 c) 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、 d) 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と、 e) 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とを含む免疫原性組成物を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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む免疫原性組成物の分野にある。この組成物は、免疫化に有用である。

【背景技術】

10

【0002】

細菌の莢膜糖は、長年にわたり莢膜形成菌(capsulated bacteria)に対するワクチンに使用されている。糖はT非依存性抗原であるが、その免疫原性は低い。キャリアにコンジュゲートさせることにより、T非依存性抗原をT依存性抗原に転換し、それにより、記憶応答を増強し、防御免疫の発生を可能にすることができる。したがって、最も有効な糖ワクチンは複合糖質に基づき、コンジュゲートワクチンの原型はHaemophilus influenzae b型(「Hib」)に対するものである[例えば、Vaccines(2004年)Plotkin & Orenstein編。ISBN 0-7216-9688-0の第14章を参照されたい]。

【0003】

20

コンジュゲートワクチンが記載されている別の細菌はStreptococcus agalactiaeであり、これは「B群連鎖球菌」または単に「GBS」としても公知である。この研究の大半は、Dennis Kasperおよび共同研究者によって実施され、参考文献1~9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[10 & 11]。しかし、さらに改善されたGBSコンジュゲートワクチンが依然として必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

30

【特許文献1】国際公開第2012/035519号

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Paolettiら、J Biol Chem(1990)265:18278~83

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

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

40

本発明は、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由来の莢膜糖と、iv) 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由来の莢膜糖と、v) 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由来の莢膜糖とを含む免疫原性組成物を提供する。

【0007】

典型的には、免疫原性組成物は、具体的に記載されているもの以外のコンジュゲート、特に、具体的に記載されているもの以外のGBS血清型由来の莢膜糖を含むコンジュゲートはいかなるものも含まない。しかし、一部の実施形態では、組成物は、他のGBS血清

50

型由来の莢膜糖を含むコンジュゲートを含めた他の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コンジュゲートを含んでよい。

【0008】

上記の免疫原性組成物は、単位用量当たり任意の適切な量の莢膜糖（複数可）を含んでよい。莢膜糖（複数可）の適量は、単位用量当たり 0.1 ~ 50 μ g であり得る。典型的には、各 G B S 莢膜糖は、1 ~ 30 μ g、例えば、2 ~ 25 μ g、特に、5 ~ 20 μ g の量で存在する。莢膜糖（複数可）の適量としては、単位用量当たり 5 μ g、10 μ g および 20 μ g を挙げることができる。

10

【0009】

単位用量当たりの莢膜糖（複数可）の量をさらに最小限にすることが可能であり得る。特に、莢膜糖（複数可）の適量は単位用量当たり 0.1 ~ 5 μ g であり得る。したがって、典型的には、各 G B S 莢膜糖は、単位用量当たり 0.1 ~ 5 μ g、例えば、0.5 μ g、2.5 μ g または 5 μ g の量で存在してよい。例えば、各 G B S 莢膜糖は、単位用量当たり 0.5 ~ 5 μ g、1 ~ 4 μ g、2 ~ 3 μ g、または約 2.5 μ g の量で存在してよい。

【0010】

免疫原性組成物が 1 より多い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。しかし、典型的には、G B S 血清型 I a、I b、I I、I I I および V の莢膜糖の質量比は 1 : 1 : 1 : 1 : 1 である。

20

【0011】

本発明の免疫原性組成物を投与方法を以下に考察する。簡単に述べると、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。本発明の免疫原性組成物を単回用量で投与することが有効である。したがって、単回用量で投与することは、本発明において、特に、これらの実施形態に好ましい。

【0012】

あるいは、1つの単位用量の後に第2の単位用量を続けることが有効であり得る。典型的には、第2（または第3、第4、第5など）の単位用量は第1の単位用量と同一である。第2の単位用量は、第1の単位用量の後の任意の適切な時間、特に、1カ月後、2カ月後または3カ月後に投与することができる。例えば、第1の単位用量の3カ月後に第2の単位用量を投与することができる。別の例では、第1の単位用量の1カ月後に第2の単位用量を投与することができる。典型的には、本発明の免疫原性組成物は、例えば、下記の通り、大腿または上腕への筋肉内投与により、筋肉内に投与される。

30

【0013】

下記の通り、本発明の免疫原性組成物は、1または複数のアジュバントを含んでよい。しかし、アジュバント化されていない (unadjuvanted) 組成物を使用することも有効である。潜在的な毒性を低下させるために、アジュバントを除くことが有利であり得る。したがって、本発明において使用するため、特に、これらの実施形態には、いかなるアジュバントも含有しない（特に、いかなるアルミニウム塩アジュバントも含有しない）免疫原性組成物が好ましい。

40

【0014】

莢膜糖

本発明は、Streptococcus agalactiae の莢膜糖に基づく。莢膜糖は、G B S 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。

【0015】

G B S 莢膜糖は化学的に関連するが、抗原性の見地から全く異なる。すべての G B S 莢

50

膜多糖が以下の三糖コアを共有する：

- D - G l c p N A c (1 3) - D - G a l p (1 4) - D - G l c p

種々の G B S 血清型は、このコアの修飾のされ方が異なる。血清型 I a と I I I 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 G l c N A c (I a) または G a l (I I I) のいずれかが使用されることから生じる。血清型 I a および I b はどちらも、コア内の G l c N A c に連結した [- D - N e u p N A c (2 3) - D - G a l p - (1)] 二糖を有するが、連結は 1 4 (I a) または 1 3 (I b) のいずれかである。

【 0 0 1 6 】

G B S 関連疾患は、主に血清型 I a、I b、I I、I I I、I V、V、V I、V I I、および V I I I から生じ、その 8 5 % 超が 5 種の血清型：I a、I b、I I I および V によって引き起こされる。本発明は、好ましくは、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：I a、I b および I I I 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 2 3 で連結している末端の N - アセチル - ノイラミン酸 (N e u N A c) 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 (G l c N A c) とを含む。

10

【 0 0 1 7 】

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 I a、I b、I I および I I I 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。

20

【 0 0 1 8 】

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 - p r o p i o n a t e d) (部分的にまたは完全に) などをしてよい。脱アセチル化は、コンジュゲートする前、その間、またはその後に起こり得るが、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 G B S 糖に対する O - アセチル化の関連性は参考文献 1 2 において考察されており、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 G B S 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、G B S 糖が、下記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 1 2)。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。血清型 V の莢膜糖は、参考文献 1 3 および 1 4 に記載の通り修飾することができる。例えば、参考文献 1 3 および 1 4 に記載の通り実質的に脱シアル化された血清型 V の莢膜糖が有用であり得る。脱シアル化された G B S 血清型 V の莢膜糖は、参考文献 1 3 に記載の通り、精製された G B S 血清型 V の莢膜糖を弱酸性条件下で (例えば、0 . 1 M の硫酸、8 0 度で 6 0 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 G B S 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 1 M の酢酸を用いて、8 1 ± 3 度で 2 時間処理することによる。

30

40

【 0 0 1 9 】

特に、G B S 血清型 V の莢膜多糖のシアル酸の酸化の程度は、4 0 % 未満、2 5 % 未満、2 0 % 未満、1 7 % 未満、1 5 % 未満、1 0 % 未満、例えば、約 1 2 %、約 9 %、約 8 %、約 7 % である。特に、G B S 血清型 V の莢膜多糖の N - アセチル - ノイラミン酸 (N e u N A c またはシアル酸) 含有量は、N e u N A c 含有量が約 1 0 0 % であるとみなされる天然の G B S 血清型 V の多糖と比較して 5 0 % 超、6 0 % 超、7 0 % 超、7 5 % 超、8 0 % 超、8 5 % 超、9 0 % 超、9 5 % 超である。特に、G B S 血清型 V の多糖は完全にシアル化されているまたは「天然の多糖」である。例えば、天然の G B S 血清型 V の多糖

50

と比較して約100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、約90%（またはこれらの値の間の任意の範囲）のシアル酸含有量。特に、V型多糖は、D-グルコース、D-ガラクトース、2-アセトアミド-2-デオキシ-グルコースおよびシアル酸を3:2:1:1のモル比で含有する。

【0020】

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[4]。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、以下に記載の通り、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。

10

20

【0021】

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1&4~6]。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150~300kDa、特に、175~275kDa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200kDaまたは約260kDaである血清型Iaの糖を用いる。血清型Ibについては、MWが150~300kDa、特に、175~250kDa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200kDaまたは約230kDa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、80~150kDa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100kDaまたは約140kDaである血清型III糖を用いる。血清型Vについては、MWが約50kDaまでの多糖を用いることも好ましい。典型的には、MWが約100kDa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]。

30

40

【0022】

莢膜糖は、本明細書の参考文献、例えば、参考文献2および19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。

【0023】

代替として、参考文献20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21に記載されている。

50

【 0 0 2 4 】

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。

【 0 0 2 5 】

コンジュゲーション

本発明は、それぞれ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、I b、I I、I I I および V 由来の莢膜糖であるコンジュゲートに関する。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 2 2]、これは周知の技 10
法である [例 えば、参 考 文 献 2 3 ~ 3 1 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 2 6 】

G B S 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 1 を参照されたい。多糖は免疫原性であるが、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 20
。G B S 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 (T T) または C R M 1 9 7 などのキャリアタンパク質との還元アミノ化を伴う [2]。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。G B S 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 4 0 % 間、特に、1 0 % から 3 0 % 間、好ましくは約 2 0 % ）を酸化することに（例えば、過ヨウ素酸酸化）よってコンジュゲートする [2、3 2]。G B S 血清型 I a、I b、I I、I I I、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 [1 0 30
]。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 4 0 % 間、特に、1 0 % から 3 0 % 間、好ましくは約 2 0 % ）を酸化すること（例えば、過ヨウ素酸酸化）よってコンジュゲートすることができる [1 4]。代替のコンジュゲーションプロセスは、参考文献 3 3 に記載の通り、糖の - N H ₂ 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 1 5 および 1 6 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 I I 型または I I I 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 40
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。

【 0 0 2 7 】

本発明は、代表的にはタンパク質である、キャリアタンパク質の使用を含む。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 [3 4]。

【 0 0 2 8 】

ジフテリア毒素の C R M 1 9 7 変異体 [3 5 ~ 3 7] は、本発明での使用のための特に 50

有用なキャリアである。交差反応性材料 (CRM 197) は、遺伝的に解毒されたジフテリア毒素の調製物である。CRM 197 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、CRM 197 は、US 5, 614, 382 に従って、組換えによって調製することができる。CRM 197 は、いくつかの莢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。

10

【0029】

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 [38]、合成ペプチド [39、40]、熱ショックタンパク質 [41、42]、百日咳タンパク質 [43、44]、サイトカイン [45]、リンフォカイン [45]、ホルモン [45]、増殖因子 [45]、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 [46] 例えば、N19 [47]、*H. influenzae* 由来のタンパク質 D [48、49]、肺炎球菌の表面タンパク質 PspA [50]、ニューモリシン [51]、鉄取り込みタンパク質 (iron-uptake protein) [52]、*C. difficile* 由来の毒素 A または毒素 B [53]、組換え型の *Pseudomonas aeruginosa* の細胞外タンパク質 (exoprotein) A (rEPA) [54] などが挙げられる。

20

【0030】

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。

【0031】

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パ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 CRM 197 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。詳細には、血清型 Ia、Ib および III の糖を CRM 197 などの第 1 のキャリアにコンジュゲートさせることができ、血清型 II および V の糖を破傷風トキソイド (-TT) などの第 2 の (異なる) キャリアにコンジュゲートさせることができる。さらに詳細には、血清型 Ia、Ib、III および V の糖を CRM 197 などの第 1 のキャリアにコンジュゲートさせることができ、血清型 II の糖を -TT などの第 2 の (異なる) キャリアにコンジュゲートさせることができる。

30

【0032】

本発明の例示的な免疫原性組成物は、(a) CRM 197 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、b) CRM 197 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、c) CRM 197 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、d) CRM 197 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と、e) CRM 197 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とを含む。本発明の別の例示的な免疫原性組成物は、(a) CRM 197 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、b) CRM 197 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、c) CRM 197 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、d) 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

40

50

るコンジュゲートと、e) 破傷風トキソイド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とを含む。本発明のさらに別の例示的な免疫原性組成物は、(a) CRM 197 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、b) CRM 197 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、c) CRM 197 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、d) 破傷風トキソイド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と、e) CRM 197 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とを含む。本発明のさらに別の例示的な免疫原性組成物は、(a) CRM 197 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、b) CRM 197 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、c) CRM 197 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、d) CRM 197 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と、e) 破傷風トキソイド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とを含む。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 I I I の糖を 2 群にし、その一部を CRM 197 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、一般的に、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好ましい。

10

【0033】

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 [55、56]。例えば、単一のキャリアタンパク質を、血清型 I a および I b 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。

20

【0034】

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 の間の比率であるコンジュゲートを用いる。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については、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。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については、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。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については、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 G B S 血清型 I I I も用いることができる。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については、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。

30

40

【0035】

脱シアル化された G B S 血清型 V の多糖を使用する場合、詳細には、種々のレベルの多糖とタンパク質の架橋が使用される。架橋のレベルは、例えば、タンパク質 - 多糖比を変動させることによって調節することができる。詳細には、糖：タンパク質比 (w / w) は、1 : 1 . 5 未満、1 : 1 未満、1 : 0 . 5 未満または約 1 : 0 . 5 である。

【0036】

組成物は、少量の遊離のキャリアを含んでよい [57]。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。

50

【0037】

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58 & 59なども参照されたい]。好ましい方法は参考文献60に記載されている。

【0038】

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。

【0039】

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[61]、トレハロース[62]、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63

【0040】

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、Menjuate(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。凍結乾燥の間、コンジュゲートを安定化するために、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64)。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。マンニトールの使用は、マンニトールがGBS莢膜糖の単糖サブユニットとは化学的に別個であるので有利である。これは、例えば品質管理分析のための莢膜糖の検出を、マンニトールに干渉されずに、上記糖のサブユニットの存在に基づいて行うことができることを意味する。対照的に、スクロースのような安定剤はグルコースを含有し、これは上記糖におけるグルコースサブユニットの検出に干渉し得る。

【0041】

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。

【0042】

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

10

20

30

40

50

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。

【0043】

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。

【0044】

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。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[65]。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。

【0045】

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。本発明の組成物は免疫原性であり、より好ましくはワクチン組成物である。本発明にしたがうワクチンは、予防的(すなわち、感染を予防する)であり得るか、または治療的(すなわち、感染を処置する)であり得るが、代表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。「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も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。

【0046】

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)、ならびに必要なに応じて、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。

【0047】

各用量の中で、個々の糖抗原の量は、一般に、0.1μgから50μgの間(糖の質量として測定する)、詳細には、1μgから50μgの間または0.5μg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、1

10

20

30

40

50

5 μg) であってよい。これらの総量が本発明で使用するために好ましい。潜在的な毒性を低下させるために、単位用量当たりの莢膜糖(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、総量は 20 μg 、例えば、15 μg 、7.5 μg または 1.5 μg であることが好ましい。

【0048】

GBSは、身体の種々の領域に影響を与えるので、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、坐薬または膣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66&67]。肺炎球菌の糖[68、69]、Hib糖[70]、MenC糖[71]、およびHib糖とMenC糖のコンジュゲートの混合物[72]の鼻投与での成功が報告されている。

10

【0049】

本発明の組成物は、aP/wP、TT、DTおよび/またはIPV抗原、すなわち無細胞の百日咳抗原、例えば、百日咳線維状赤血球凝集素(FHA)、パータクチン(PRN、69K-OMP)、百日咳線毛(FIM)、または細胞性の百日咳抗原、全細胞百日咳抗原、百日咳トキソイドまたは百日咳毒素(PT)、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドおよび/または不活化ポリオウイルス抗原と組み合わせることができる。例えば、これは、本発明の組成物を、ANATEL(登録商標)、DIFTEL(登録商標)、PENTACEL(登録商標)またはDAPTACEL(登録商標)を含めた、すでに市販されている処方物と組み合わせることによって行うことができる。

20

【0050】

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。

【0051】

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。

【0052】

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 \pm 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。

30

【0053】

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。

【0054】

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

40

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73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[74]。

【0055】

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

50

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75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（aluminium hydroxy phosphate 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。

10

【0056】

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。

【0057】

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0.5~20μm（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。

20

【0058】

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。

30

【0059】

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15mM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。

40

【0060】

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。

【0061】

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

50

どであることが好ましい。好ましい範囲は、 0.3 mg/ml から 1 mg/ml の間である。最大 0.85 mg / 用量が好ましい。

【0062】

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、 $0.6 \text{ mg Al}^{3+} / \text{ml}$ 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 $50 \mu\text{g}$ から $100 \mu\text{g}$ の間の Al^{3+} を用いた吸着を用いることができる。

【0063】

B. 油エマルジョン

本発明においてアジュバントとして使用するのに適した油エマルジョン組成物としては、MF59 (マイクロフルイダイザーを使用してサブミクロンの粒子に処方した5%スクアレン、0.5% Tween 80、および0.5% Span 85) などのスクアレン-水エマルジョンが挙げられる [参考文献75の第10章; 参考文献76~78も参照されたい]。MF59は、FLUAD (商標) インフルエンザウイルス三価サブユニットワクチンにおいてアジュバントとして使用されている。

【0064】

組成物において使用するために特に好ましいアジュバントはサブミクロンの水中油エマルジョンである。本明細書で使用するための好ましいサブミクロンの水中油エマルジョンは、必要に応じて様々な量のMTP-PEを含有するスクアレン/水エマルジョン、例えば、4~5% w/vのスクアレン、0.25~1.0% w/vのTween 80 (ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (polyoxyethylenesorbitan monooleate))、および/または0.25~1.0% Span 85 (ソルビタントリオレート)、および、必要に応じて、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミンル (isogluatminy l) -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 (hydroxyphosphoryloxy)) -エチルアミン (MTP-PE) を含有するサブミクロンの水中油エマルジョンである。組成物において使用するためのサブミクロンの水中油エマルジョン、それを作製する方法、およびムラミルペプチドなどの免疫賦活剤は、参考文献76&79~80に詳しく記載されている。

【0065】

完全フロイントアジュバント (CFA) および不完全フロイントアジュバント (IFA) も、本発明においてアジュバントとして使用することができる。

【0066】

C. サポニン処方物 [参考文献75の第22章]

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 officinalis (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。

【0067】

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81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 [82]。

10

20

30

40

50

【0068】

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 (I S C O M) 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 75 の第 23 章]。I S C O M 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 I S C O M に用いることができる。I S C O M は、Q u i l A、Q H A および Q H C のうちの 1 または複数を含むことが好ましい。I S C O M は、参考文献 82 ~ 84 にさらに記載されている。必要に応じて、I S C O M は、追加的な洗浄剤 (複数可) を欠いてよい [85]。

【0069】

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 86 & 87 に見出すことができる。

10

【0070】

D . ビロソームおよびウイルス様粒子

ビロソームおよびウイルス様粒子 (V L P) も、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。ビロソームまたは V L P 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、H A または N A)、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、H I V、R N A - フェージ、Q - フェージ (例えば、コートタンパク質)、G A - フェージ、f r - フェージ、A P 205 フェージ、および T y (例えば、レトロトランスポゾン T y タンパク質 p 1) に由来するタンパク質が挙げられる。V L P は、参考文献 88 ~ 93 においてさらに論じられている。ビロソームは、例えば、参考文献 94 においてさらに論じられている。

20

【0071】

E . 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、腸内細菌リポ多糖 (L P S) の無毒性誘導体、リポド A 誘導体、免疫賦活性オリゴヌクレオチドおよび A D P - リポシル化毒素およびその解毒された誘導体を含む。

30

【0072】

L P S の無毒性の誘導体として、モノホスホリルリポド A (M P L) および 3 - O - 脱アシル化 M P L (3 d M P L) が挙げられる。3 d M P L は、4、5 または 6 のアシル化された鎖を有する 3 脱 - O - アシル化モノホスホリルリポド A の混合物である。好ましい 3 脱 - O - アシル化モノホスホリルリポド A の「小粒子」形態は、参考文献 95 に開示されている。そのような 3 d M P L の「小粒子」は、0 . 22 μ m の膜を通して滅菌濾過するのに十分小さい [95]。他の無毒性の L P S 誘導体としては、モノホスホリルリポド A 模倣物 (m i m i c)、例えば、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート誘導体、例えば、R C - 529 が挙げられる [96、97]。

40

【0073】

リポド A 誘導体としては、E s c h e r i c h i a c o l i 由来のリポド A の誘導体、例えば、O M - 174 などが挙げられる。O M - 174 は、例えば、参考文献 98 & 99 に記載されている。

【0074】

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、C p G 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δροーム配列またはポリ (d G) 配列を含有する二本鎖 R N A およびオリゴヌク

50

レオチドも、免疫賦活性であることが示されている。

【0075】

CpGは、ヌクレオチドの修飾ノ類似体、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100、101および102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103~108においてさらに論じられている。

【0076】

CpG配列、例えば、GTCGTTモチーフまたはTTCTGTTモチーフは、TLR9に向けられ得る[109]。CpG配列は、CpG-A ODN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-B ODNなどのB細胞応答誘導により特異的であってよい。CpG-A ODNおよびCpG-B ODNは、参考文献110~112において論じられている。CpGはCpG-A ODNであることが好ましい。

10

【0077】

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109&113~115を参照されたい。

【0078】

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116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117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-G192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118~125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126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。

20

30

【0079】

F. 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[127]など)[128]、インターフェロン(例えば、インターフェロン-)、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子が挙げられる。

40

【0080】

G. 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ミクロスフェア[129]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[130]。

【0081】

50

H. 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-c-o-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(-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톤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)。

【0082】

10

I. リポソーム(参考文献75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131~133に記載されている。

【0083】

J. 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[134]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ビタンエステル界面活性剤[135]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[136]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。

20

【0084】

K. ポリホスファゼン(PCPP)

PCPP処方物は、例えば、参考文献137および138に記載されている。

【0085】

30

L. 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-イソグルタミン-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。

【0086】

M. 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139および140にさらに記載されている。

40

【0087】

N. 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141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。

【0088】

50

0. 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142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。

【0089】

本発明は、上で識別されたアジュバントの1または複数の態様の組み合わせも含んでよい。例えば、以下の組み合わせを本発明においてアジュバント組成物として使用することができる：(1) サポニンおよび水中油エマルジョン[143]；(2) サポニン（例えば、QS21）+ 無毒性のLPS誘導體（例えば、3dMPL）[144]；(3) サポニン（例えば、QS21）+ 無毒性のLPS誘導體（例えば、3dMPL）+ コレステロール；(4) サポニン（例えば、QS21）+ 3dMPL + IL-12（必要に応じて、+ ステロール）[145]；(5) 3dMPLと、例えば、QS21および/または水中油エマルジョンの組み合わせ[146]；(6) サブミクロンのエマルジョンに微小流動化した、またはボルテックスしてより大きな粒子サイズのエマルジョンを生じさせたかのいずれかの、10%スクアラン、0.4% Tween 80（商標）、5% プルロニック-ブロックポリマーL121、およびthr-MDPを含有するSAF。(7) 2%スクアレン、0.2% Tween 80、ならびに、モノホスホリルリピドA (MPL)、トレハロースジミコレート(TDM)、および細胞壁の骨格(CWS)、好ましくはMPL + CWS (Detox (商標)) からなる群からの1または複数の細菌の細胞壁成分を含有するRibi (商標) アジュバント系(RAS)、(Ribi Immunochem)；および(8) 1または複数の無機塩類（例えば、アルミニウム塩など）+ LPSの無毒性の誘導體（例えば、3dMPLなど）。

【0090】

免疫賦活剤としての機能を果たす他の物質は、参考文献75の第7章に開示されている。

【0091】

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。

【0092】

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。

【0093】

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)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([147])は、処置するために好ましい別のヒトのクラスである。一部の実施形態では

10

20

30

40

50

、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 I a 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有する。他の実施形態では、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 I b 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有する。他の実施形態では、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 I I I 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有する。他の実施形態では、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 I I 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有する。他の実施形態では、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 V 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有する。特に、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 I a 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有し、かつ、G B S血清型 I b 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有し得る。その代わりに、またはそれに加えて、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 I I I 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有し得る。その代わりに、またはそれに加えて、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 I I 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有し得る。その代わりに、またはそれに加えて、ヒトは、薬学的組成物を投与する前に、G B S血清型 V 由来の莢膜糖に対する抗体を検出不可能なレベルで有し得る。莢膜糖（複数可）に対する抗体のレベル（複数可）は、当技術分野で公知の技法、例えば、E L I S A を使用して決定することができる。抗体のレベル（複数可）は、投与の 1 カ月前、特に、投与前の 1 カ月以内（例えば、投与の 2 週間以内、1 週間以内または当日）の時点のレベルであってよい。これらの検出不可能なレベル（複数可）の莢膜糖（複数可）に対する抗体を有する女性の新生児の G B S 感染率はより高い可能性がある。これは、母系の G B S 莢膜糖に対する抗体のレベルが高いことが、新生児における疾患リスクの低下と相関するからである [参考文献 1 4 8 および 1 4 9]。したがって、これらの女性への投与が本発明において具体的に想定される。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

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。

【 0 0 9 5 】

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。

【 0 0 9 6 】

これらの使用および方法は、S . a g a l a c t i a e によって引き起こされる疾患（例えば、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）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。

【 0 0 9 7 】

疾患が予防される被験体は、本発明のコンジュゲート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）にコンジュゲートを投与することができる（いわゆる「母体免疫化」[1 5 0 ~ 1 5 2]）。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。

【 0 0 9 8 】

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。

【0099】

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。

10

【0100】

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。

20

【0101】

一実施形態では、*Streptococcus agalactiae*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。詳細には、*Streptococcus agalactiae*血清型Ia、Ib、III、IIおよびVによって引き起こされる早発性疾患から乳児を保護する方法。詳細には、疾患は、生後0時間および168時間以内、より詳細には、生後0時間および72時間以内、さらにより詳細には生後24時間から72時間の間、さらにより詳細には生後48時間から72時間の間に起こる敗血症である。

30

【0102】

*Streptococcus agalactiae*血清型Ia、Ib、III、IIおよびVによって引き起こされる遅発性疾患から乳児を保護する方法も提供される。詳細には、疾患は、生後7日~90日以内、またはそれよりも後に起こる。

【0103】

治療的処置の効力を調査する1つの方式は、本発明の組成物を投与した後に、GBS感染をモニターすることを伴う。予防的処置の効力を調査する1つの方式は、組成物を投与した後に、GBS抗原に対する免疫応答をモニターすることを伴う。

【0104】

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。

40

【0105】

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、膺への投与、局所投与、経皮投与、鼻腔内投与、眼への投与、耳へ

50

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。妊婦および乳児への投与は、同じ経路または異なる経路を介するものであり得る。

【0106】

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。

【0107】

投薬処置は、単回用量スケジュールまたは複数回用量スケジュールであってよい。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使用することができる。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（priming）用量の間（例えば、4～16週の間）、および初回刺激と追加免疫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。

10

【0108】

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。

【0109】

「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。

20

【0110】

「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。

【0111】

「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。

30

【0112】

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。

【0113】

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などである。

40

【0114】

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。

【0115】

別段の指定のない限り、ポリペプチド配列間の同一性は、MPSRCHプログラム（O

50

x f o r d M o l e c u l a r) において実行される S m i t h - W a t e r m a n 相同性検索アルゴリズムによって、ギャップオープンペナルティ (g a p o p e n p e n a l t y) = 1 2 およびギャップ伸長ペナルティ (g a p e x t e n s i o n p e n a l t y) = 1 のパラメータを用いたアフィンギャップ検索を使用して決定することが好ましい。

本発明は、例えば、以下を提供する。

(項目 1)

a) 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、 b) 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、 c) 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、 d) 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と、 e) 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とを含む免疫原性組成物。

(項目 2)

G B S 莢膜糖の総量が 7 0 μ g である、項目 1 に記載の免疫原性組成物。

(項目 3)

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

(項目 4)

各 G B S 莢膜糖が単位用量当たり 5 μ g 、 1 0 μ g または 2 0 μ g の量で存在する、項目 3 に記載の免疫原性組成物。

(項目 5)

単位用量当たりの前記 G B S 血清型 I a 、 I b 、 I I 、 V および I I I の莢膜糖の量が、 2 0 μ g 、 2 0 μ g 、 2 0 μ g 、 2 0 μ g および 2 0 μ g ; 1 0 μ g 、 1 0 μ g 、 1 0 μ g 、 1 0 μ g および 1 0 μ g ; ならびに 5 μ g 、 5 μ g 、 5 μ g 、 5 μ g および 5 μ g からなる群から選択される、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 6)

単位用量当たりの前記 G B S 血清型 I a 、 I b 、 I I 、 V および I I I の莢膜糖の量が、 5 μ g 、 5 μ g 、 5 μ g 、 5 μ g および 5 μ g である、項目 5 に記載の免疫原性組成物。

(項目 7)

各 G B S 莢膜糖が単位用量当たり 0 . 1 ~ 5 μ g の量で存在する、項目 1 または項目 2 に記載の免疫原性組成物。

(項目 8)

各 G B S 莢膜糖が単位用量当たり 0 . 5 μ g 、 2 . 5 μ g または 5 μ g の量で存在する、項目 7 に記載の免疫原性組成物。

(項目 9)

前記 G B S 血清型 I a 、 I b 、 I I 、 V および I I I の莢膜糖の質量比が 1 : 1 : 1 : 1 : 1 である、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 0)

1 つの単位用量を投与し、その後、第 1 の単位用量の 3 カ月後に第 2 の単位用量を投与するためのものである、項目 1 から 9 までのいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 1)

1 つの単位用量を投与し、その後、第 1 の単位用量の 1 カ月後に第 2 の単位用量を投与するためのものである、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 2)

単回用量で投与するためのものである、項目 1 ~ 9 および項目 1 1 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 3)

10

20

30

40

50

アルミニウム塩アジュバントを含有しない、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 4)

いかなるアジュバントも含有しない、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 5)

a)、b)、c)、d) および e) 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 CRM 1 9 7 である、項目 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 6)

a)、b)、c)、d) および e) 中の前記キャリアタンパク質が CRM 1 9 7 である、項目 1 5 に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 7)

G B S 血清型 I a 由来の前記莢膜糖が 1 5 0 ~ 3 0 0 k D a の範囲の MW を有し、G B S 血清型 I b 由来の前記莢膜糖が 1 5 0 ~ 3 0 0 k D a の範囲の MW を有し、G B S 血清型 I I I 由来の前記莢膜糖が 5 0 ~ 2 0 0 k D a の範囲の MW を有し、G B S 血清型 I I 由来の前記莢膜糖が 1 5 0 ~ 3 0 0 k D a の範囲の MW を有し、そして G B S 血清型 V 由来の前記莢膜糖が 1 5 0 ~ 3 0 0 k D a の範囲の MW を有する、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 8)

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、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 V 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、そして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 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 1 9)

筋肉内に投与するためのものである、項目 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 0)

注射可能な液剤または懸濁物である、項目 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 1)

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

(項目 2 2)

前記コンジュゲート (複数可) を安定化するためにマンニトールを含む、項目 2 1 に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 3)

リン酸二水素カリウムバッファを含む、項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 4)

塩化ナトリウムを含む、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 5)

ワクチンである、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 6)

10

20

30

40

50

ヒトに投与するためのものである、項目 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 7)

妊娠可能な年齢の女性、妊婦および高齢の患者から選択されるヒトに投与するためのものである、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 8)

妊婦に投与するためのものである、項目 2 7 に記載の免疫原性組成物。

(項目 2 9)

投与前に、前記ヒトが、検出不可能なレベルの、G B S 血清型 I a 由来の莢膜糖に対する抗体、G B S 血清型 I b 由来の莢膜糖に対する抗体、G B S 血清型 I I 由来の莢膜糖に対する抗体、G B S 血清型 V 由来の莢膜糖に対する抗体、および / または G B S 血清型 I I I 由来の莢膜糖に対する抗体を有する、項目 2 6 から 2 8 までのいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 0)

医薬として使用するためのものである、項目 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 1)

S . a g a l a c t i a e 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、項目 3 0 に記載の免疫原性組成物。

(項目 3 2)

前記疾患が新生児敗血症、菌血症、新生児肺炎、新生児髄膜炎、子宮内膜炎、骨髄炎または化膿性関節炎である、項目 3 1 に記載の免疫原性組成物。

【図面の簡単な説明】

【0 1 1 6】

【図 1】 図 1 は、新生仔攻撃モデルにおけるマウスの生存 (% 防御) を示す。それぞれ C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた (A) G B S I a、(B) G B S I b、(C) G B S I I I、(D) G B S I I および (E) G B S V を用いて母体免疫化を行った。対応する抗原を用いてマウスを攻撃した。

【図 2】 図 2 は、それぞれ C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた (A) G B S I a、(B) G B S I b、(C) G B S I I I、(D) G B S I I および (E) G B S に対する O P K 力価を示す。対応する抗原を用いてマウスを免疫化した。

【図 3】 図 3 は、G B S V に対する I g G 力価 (図 3 A) および O P K 力価 (図 3 B) を示す。(A) ミヨウバン、(B) C R M にコンジュゲートさせた G B S V、(C) C R M にコンジュゲートさせた G B S V + 三価ワクチン (C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I)、および (D) C R M にコンジュゲートさせた G B S V + C R M にコンジュゲートさせた G B S I I + 三価ワクチン (C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b、および I I I) を用いてマウスを免疫化した。

【図 4】 図 4 は、G B S I I に対する I g G 力価 (図 4 A) および O P K 力価 (図 4 B) を示す。(A) ミヨウバン、(B) C R M にコンジュゲートさせた G B S I I、(C) C R M にコンジュゲートさせた G B S I I + 三価ワクチン (C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I)、および (D) C R M にコンジュゲートさせた G B S I I + C R M にコンジュゲートさせた G B S V + 三価ワクチン (C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I) を用いてマウスを免疫化した。

【図 5 A】 図 5 A および 図 5 B は、G B S I a、I b、I I、I I I および V に対する I g G 力価 (5 A) および 5 1 5 I a 株、H 3 6 B 株、C O H 1 株、5 4 0 1 株、C J B 1 1 1 株に対する O P K 力価 (5 B) を示す。(A) 三価ワクチン : C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I および (B) 五価ワクチン : C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b、I I、I I I および V を用いてマウスを免疫化した。

【図 5 B】 図 5 A および 図 5 B は、G B S I a、I b、I I、I I I および V に対する

10

20

30

40

50

I g G力価 (5 A) および 5 1 5 I a 株、H 3 6 B 株、C O H 1 株、5 4 0 1 株、C J B 1 1 1 株に対する O P K 力価 (5 B) を示す。(A) 三価ワクチン : C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I および (B) 五価ワクチン : C R M にコンジュゲートさせた G B S I a、I b、I I、I I I および V を用いてマウスを免疫化した。

【図 6】図 6 は、G B S V に対する I g G 力価を示す。(A) P B S / ミョウバン、(B) C R M にコンジュゲートさせた G B S V、(C) C R M にコンジュゲートさせた G B S V + 三価ワクチン (C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I)、(D) C R M にコンジュゲートさせた G B S I I および V + 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、I b、I I I)、(E) T T にコンジュゲートさせた G B S V、(F) T T にコンジュゲートさせた G B S V + 三価ワクチン (C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I)、(G) T T にコンジュゲートさせた G B S I I および V + 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、I b、I I I) を用いてマウスを免疫化した。

10

【図 7】図 7 は、G B S I I に対する I g G 力価を示す。(A) P B S / ミョウバン、(B) C R M にコンジュゲートさせた G B S I I、(C) C R M にコンジュゲートさせた G B S I I + 三価ワクチン (C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I)、(D) C R M にコンジュゲートさせた G B S I I および V + 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、I b、I I I)、(E) T T にコンジュゲートさせた G B S I I、(F) T T にコンジュゲートさせた G B S I I + 三価ワクチン (C R M 1 9 7 にコンジュゲートさせた G B S I a、I b および I I I)、(G) T T にコンジュゲートさせた G B S I I および V + 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、I b、I I I) を用いてマウスを免疫化した。

20

【図 8 - 1】図 8 は、マウス当たりコンジュゲート $1 \mu\text{g}$ を 2 つの用量で用いて免疫化することにより生じた、C R M - I a 由来のシアル酸含有量が異なる試料の有効性分析について示す。A) O P K A 力価、3 つのプロトコルからの平均値が横棒で示されている。B) : 3 つのプロトコルからの、攻撃を受けた仔の累積パーセント生存 % である。C) : 投与したロットの I V R P の有効性の値である。

【図 8 - 2】図 8 は、マウス当たりコンジュゲート $1 \mu\text{g}$ を 2 つの用量で用いて免疫化することにより生じた、C R M - I a 由来のシアル酸含有量が異なる試料の有効性分析について示す。A) O P K A 力価、3 つのプロトコルからの平均値が横棒で示されている。B) : 3 つのプロトコルからの、攻撃を受けた仔の累積パーセント生存 % である。C) : 投与したロットの I V R P の有効性の値である。

30

【図 9 - 1】図 9 は、脱シアル化 C R M - I b 試料 (マウス当たりコンジュゲート $1 \mu\text{g}$ を用いて免疫化することにより生じた) の有効性分析について示す。パネル A は、ミョウバンを用いて処方した脱シアル化 I a - C R M 1 9 7 試料を 2 つの用量で用いて免疫化したマウスにおける O P K A 力価 (プールした血清) を示す。調製物 # 1 からのデータが三角形で示されており、調製物 # 2 からのデータが丸で示されている。2 つの調製物におけるパーセント S A が X 軸に示されている。横棒は、E L I S A による G M T および O P K A 力価の平均を示す。B) : 攻撃を受けた仔のパーセント生存 (3 つのプロトコルの平均) である。C) 調製物の I V R P の有効性の値である。

40

【図 9 - 2】図 9 は、脱シアル化 C R M - I b 試料 (マウス当たりコンジュゲート $1 \mu\text{g}$ を用いて免疫化することにより生じた) の有効性分析について示す。パネル A は、ミョウバンを用いて処方した脱シアル化 I a - C R M 1 9 7 試料を 2 つの用量で用いて免疫化したマウスにおける O P K A 力価 (プールした血清) を示す。調製物 # 1 からのデータが三角形で示されており、調製物 # 2 からのデータが丸で示されている。2 つの調製物におけるパーセント S A が X 軸に示されている。横棒は、E L I S A による G M T および O P K A 力価の平均を示す。B) : 攻撃を受けた仔のパーセント生存 (3 つのプロトコルの平均) である。C) 調製物の I V R P の有効性の値である。

【図 10】図 10 は、脱シアル化 C R M - I I I 試料 (マウス当たりコンジュゲート 0 .

50

2 μ g を用いて免疫化することにより生じた)の有効性分析について示す。パネルAは、ミョウバン中に処方した調製物#1由来のI a - CRM 197脱シアル化試料の2つの0.2 μ g用量を用いて免疫化したマウス由来の血清におけるOPKA力価を示す。(A)丸は単一のマウスそれぞれからのIgG力価を示し、横棒は、ELISAによるGMTの平均を示す。(b)丸は、同じプロトコールからの、プールした血清のOPKA力価を示す。パネルBは、免疫化した雌マウス由来の攻撃を受けた仔のパーセント生存を示す。

【発明を実施するための形態】

【0117】

ワクチン

試験1~4において使用するGBS一価ワクチンは全て、CRM197にコンジュゲートさせたものである。

10

【0118】

全ての試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血清型：I a、I bおよびIIIに由来する荚膜多糖で構成される。

【0119】

試験1

新生仔攻撃モデル(Maioneら、Science、2005年7月1日：309巻、5731号、148~150頁)において、マウスの防御のレベルを調査した。3つの用量の、アルミニウム塩(400 μ g)でアジュバント化されたGBS一価ワクチン(抗原1 μ g)を母親に与えた。試験したGBS一価ワクチンは、それぞれCRM197にコンジュゲートさせたGBS I a、I b、II、IIIおよびVであった。図1に結果が示されている。

20

【0120】

OPKアッセイも行い、その結果が図2に示されている。ワクチンの効力を評価するための実行可能な手法は、防御の代わり、GBSの場合では血清抗体のオプソニン化活性を使用することである。オプソニン作用性(opsonophagocytosis)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GBSをオプソニン化する血清抗体の能力を測定する。一般に、ELISAによるIgG Ab力価とOPK力価の間には良好な相関が存在する。GBS IIおよびGBS Vによる防御およびOPAレベルは、GBS I a、I bおよびIIIによる防御およびOPAレベルと同等であることがわかる。

30

【0121】

試験2

3つの用量の、アルミニウム塩(400 μ g)でアジュバント化された一価ワクチンまたは多価ワクチン(各抗原1 μ g)を用いてマウスを免疫化した。試験したワクチンは、(1)GBS V、(2)GBS VおよびGBS三価ワクチンを含有する四価ワクチン、ならびに(3)GBS II、GBVおよびGBS三価を含有する五価ワクチンであった。陰性対照として、アルミニウム塩を単独で用いてマウスを免疫化した。ELISAおよびOPKアッセイ(V型CJB111株を使用した)を行った(2回繰り返した)。

【0122】

これらの実験の結果が図3に示されている。GBS Vと他の抗原との間に有意な免疫干渉は観察されないことがわかる。

40

【0123】

免疫化したマウスを、GBS Vを用いて攻撃し、その結果が表1に提供される。

【0124】

【表 1】

表1.GBS V型株(V型CJB111)に対する攻撃の結果

| 抗原 | GBS Vを用いた攻撃 | |
|--------------------------------|-------------|-----|
| | 防御された/処置された | %防御 |
| PBS | 39/100 | 39 |
| CRM-V | 108/119 | 91 |
| CRM-Ia/Ib/III | 32/102 | 31 |
| CRM-Ia/Ib/III + CRM-V | 60/70 | 86 |
| CRM-Ia/Ib/III + CRM-II+ CRMV-V | 89/95 | 94 |

10

【 0 1 2 5 】

試験 3

3つの用量の、アルミニウム塩(400 μg)でアジュバント化された一価ワクチンまたは多価ワクチン(各抗原1 μg)を用いてマウスを免疫化した。試験したワクチンは、(1)GBS II、(2)GBS IIおよびGBS三価ワクチンを含む四価ワクチン、ならびに(3)GBS II、GBVおよびGBS三価ワクチンを含む五価ワクチンであった。陰性対照として、アルミニウム塩を単独で用いてマウスを免疫化した。ELISAおよびOPKアッセイ(II型5401株を使用した)を行った(2回繰り返した)。

20

【 0 1 2 6 】

図4に結果が示されている。GBS IIと他の抗原との間に有意な干渉は観察されなかった。

【 0 1 2 7 】

免疫化したマウスを、GBS IIを用いて攻撃し、その結果が表2に提供される。

【 0 1 2 8 】

【表 2】

表2.GBS II型株(II型5401)に対する攻撃の結果

| 抗原 | GBS IIを用いた攻撃 | |
|--------------------------------|--------------|-----|
| | 防御された/処置された | %防御 |
| PBS | 37/120 | 31 |
| CRM-II | 55/80 | 69 |
| CRM-Ia/Ib/III | 15/100 | 15 |
| CRM-Ia/Ib/III + CRM-II | 72/99 | 73 |
| CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V | 62/129 | 48 |

30

【 0 1 2 9 】

試験 4

3つの用量の、アルミニウム塩(400 μg)でアジュバント化された三価ワクチンまたは五価ワクチン(各抗原1 μg)を用いてマウスを免疫化した。試験したワクチンは、(1)GBS II、(2)GBS三価ワクチン(CRM197にコンジュゲートさせたGBS Ia、IbおよびIII)、(3)GBS四価ワクチン(CRM197にコンジュゲートさせたGBS Ia、Ib、IIおよびIIIまたはCRM197にコンジュゲートさせたGBS Ia、Ib、およびIII+TTにコンジュゲートさせたGBS II)、ならびに(4)(CRM197にコンジュゲートさせたGBS Ia、Ib、II、IIIおよびVまたはCRM197にコンジュゲートさせたGBS Ia、Ib、およびIII+TTにコンジュゲートさせたGBS IIおよびV)を含む五価ワクチンであった。陰性対照として、アルミニウム塩を単独で用いてマウスを免疫化した。ELISAおよびOPKアッセイ(II型5401株を使用した)を行った(2回繰り返した)

40

50

。

【 0 1 3 0 】

免疫化したマウスを、G B S I I を用いて攻撃し、その結果が表 3 に提供される。

【 0 1 3 1 】

【 表 3 】

表3.GBS II型株(II型5401)に対する攻撃の結果

| 抗原 | GBS IIを用いた攻撃 | |
|--------------------------------|--------------|-----|
| | 防御された/処置された | %防御 |
| PBS | 19/60 | 31% |
| CRM-II | 23/30 | 77% |
| CRM-Ia/Ib/III | 8/30 | 26% |
| CRM-Ia/Ib/III + CRM-II | 40/50 | 80% |
| CRM-Ia/Ib/III + CRM-II + CRM-V | 32/77 | 41% |
| CRM-Ia/Ib/III + TT-II | 62/77 | 80% |
| CRM-Ia/Ib/III + TT-II + TT-V | 75/77 | 97% |

10

【 0 1 3 2 】

試験 5

3つの用量の、アルミニウム塩(400 μg)でアジュバント化された三価ワクチンまたは五価ワクチン(各抗原1 μg)を用いてマウスを免疫化した。E L I S A および O P K アッセイ(I I 型 5 4 0 1 株を使用した)を行った(2回繰り返した)。

20

【 0 1 3 3 】

結果が図 5 A および 5 B に示されている。三価ワクチンと五価ワクチンとの間に有意な干渉は観察されなかった。

【 0 1 3 4 】

コンジュゲート I a、I b および I I I の免疫原性および防御は、P S - I I および V の添加によって影響を受けない。五価の処方物における各 P S に対する同等の E L I S A および O P K 力価。

30

【 0 1 3 5 】

試験 6

種々のキャリアタンパク質にコンジュゲートさせた G B S 糖の免疫原性を調査した。

【 0 1 3 6 】

CRM 1 9 7 (「CRM」)または破傷風トキソイド(「TT」)にコンジュゲートさせた G B S I I および / または G B S V を含有する組成物を用いてマウスを免疫化した。G B S V に対する抗体価を、E L I S A によって分析した。結果が図 6 および図 7 に示されている。陰性対照として P B S / アルミニウム塩のみを用いてマウスを免疫化した。

【 0 1 3 7 】

CRMコンジュゲートとTTコンジュゲートのどちらによっても対応する抗原に対する有意な免疫応答がもたらされることがわかる。G B S I I については、CRMにコンジュゲートさせたかTTにコンジュゲートさせたかに関係なく、G B S I I と多価ワクチン中の他の抗原との間に有意な免疫干渉は観察されない。同様に、G B S V について、CRMにコンジュゲートさせたかTTにコンジュゲートさせたかに関係なく、G B S V と多価ワクチン中の他の抗原との間に有意な免疫干渉は観察されない。

40

【 0 1 3 8 】

試験 7

シアル酸成分の寄与を調査するために、CRM 1 9 7 にコンジュゲートさせた S t r e p t o c o c c u s a g a l a c t i a e の莢膜多糖抗原 I a、I b および I I を試験した。シアル酸含有量が異なるワクチンロットを調製し、それを使用してマウスを免疫化

50

し、マウス母体免疫化 / 新生仔攻撃モデルにおける G B S に対する I g G 力価、誘導された抗体の機能活性および惹起された防御を決定した。100% から < 5% までの異なるシアル酸含有量を有する多糖 - C R M 1 9 7 コンジュゲートの一価ロットを、天然のコンジュゲートを弱酸性条件で (例えば、pH 4 . 7 5、8 0 で種々のインキュベーションの時間にわたって) 処理することによって生成した。有効性を I V R P によって評価した。ワクチンの免疫原性および誘導された抗体の機能活性をそれぞれ試験するために、脱シアル化ロットを用いて免疫化したマウス由来の血清を E L I S A およびオプソニン作用性アッセイ (O P K A) によって分析した。ワクチンを受けた雌マウスから生まれた仔における防御を試験するために生存実験も行った。

【 0 1 3 9 】

簡単に述べると、G B S コンジュゲートを、重水素化酢酸ナトリウムを用いて処理することによって脱シアル化した。シアル酸含有量を N M R 技術によってモニターした。全ての調製物について、コンジュゲート 3 m g (総糖含有量によって決定する) を真空下で乾燥し (G e n e v a c m o d . E Z - 2 P l u s)、重水素化した (D 2 O - A l d r i c h 1 5 1 8 8 2 - 1 0 0 G L o t # S T B C 0 4 4 6 2 V) 5 0 m M の酢酸ナトリウム、pH 4 . 7 5 (S i g m a S 8 0 7 5 0 - 5 0 0 G L o t # 0 5 0 M 0 2 1 3 V) 3 m L に溶解させ、混合物を異なる時間に 8 0 でインキュベートし、得られた調製物のアリコートを下の通り特徴付けた: (1) 結合 / 遊離シアル酸含有量の比率を推定するための ^1H N M R 分析、(2) ガラクトース (G a l) 決定に基づく糖含有量の推定、(3) タンパク質含有量の決定、(4) S D S - P A G E 分析および (5) キャ

【 0 1 4 0 】

100% (天然の処理していない材料) から 0% までの異なる S A を有する多糖 - C R M 1 9 7 コンジュゲートの一価ロットをミョウバン中に処方し、1日目および21日目に5週齢の C D 1 雌マウスの群に腹腔内 (i . p .) 注射することによって投与した。21日目の2回目の免疫化後、雌を交配し、同じ血清型の L D 9 0 用量の G B S を用いて仔を攻撃した (血清型 I a に対して G B S 0 9 0、血清型 I b に対して G B S H 3 6 b、および血清型 I I I に対して G B S M 7 8 1)。攻撃後3日間、毎日死亡率を記録した。最後のワクチン注射の2週間後に採取した血清を血清型特異的抗原 (I a、I b および I I I) のそれぞれに対する抗体の存在について分析することにより、ワクチンの免疫原性を試験した。各多糖に対する特異的な I g G 抗体価を E L I S A によって定量化した。同じワクチンを受けた動物由来の血清のプールに対してオプソニン作用性アッセイ (O P K A) を使用し、新生仔攻撃によって、機能性抗体活性を評価した。

【 0 1 4 1 】

多糖 I a - C R M 1 9 7 に関しては、1 μg のワクチン用量を用いて免疫化した動物における I g G 力価は、天然の多糖と比較して約 4 分の 1 の統計的に有意な低下 (P = 0 . 0 0 6 7、マン・ホイットニー検定) が生じた < 5% 以外は全ての試料について同様であった。19% および < 5% (O P K A 死滅) ならびに < 5% シアル酸含有量 (生存) で抗体の機能活性の低下を認めることができた。I V R P の結果に関して、シアル酸含有量が 33% 以下の試料の有効性の値は 10 分の 1 未満に低下した (図 8)。

【 0 1 4 2 】

多糖 I b - C R M 1 9 7 に関しては、5% 未満の S A を含有する試料ではシアル酸含有量がより高い試料と比較して低い E L I S A 力価、O P K A 力価および生存が誘導された (図 9)。

【 0 1 4 3 】

多糖 I I I - C R M 1 9 7 に関しては、66% 未満の S A を含有する試料を受けた動物において、S A 含有量がより高い試料を用いて免疫化した動物と比較して P S I I I に対する I g G G M T が有意に高かった (P < 0 . 0 1 マン・ホイットニー検定)。機能性抗体のレベルは、1 μg 用量の天然の試料を受けた動物と 1 μg 用量の脱シアル化された試料を受けた動物で同様であった。しかし、0 . 2 μg 用量のコンジュゲートを受け

10

20

30

40

50

た動物ではかなりの差異があり、39%SAの試料を受けた動物ではOPKA力価が著しく低下し、24%より低いSAでは生存率が低かった(図10)。

【0144】

試験8

シアル酸成分の寄与を調査するために、CRM197にコンジュゲートさせたStreptococcus agalactiaeの莢膜多糖抗原Vを試験した。シアル酸含有量が異なるワクチンロットを調製し、それを使用してマウスを免疫化した。100%から25%までの異なるシアル酸含有量を有する多糖-CRM197コンジュゲートの一価ロットを、天然のコンジュゲートを弱酸性条件で(例えば、pH4.75、80で種々のインキュベーションの時間にわたって)処理することによって生成した。

10

【0145】

【表4】

| PSV-CRM197 ワクチン | %NeuNAc | %防御 (CJB111) |
|-----------------|---------|--------------|
| ロット1 + ミヨウバン | 100 | 66 |
| ロット2 + ミヨウバン | 100 | 81 |
| ロット3 + ミヨウバン | 100 | 69 |
| ロット4 + ミヨウバン | 100 | 73 |
| ロット5 + ミヨウバン | 75 | 45 |
| ロット6 + ミヨウバン | 50 | 22 |
| ロット7 + ミヨウバン | 50 | 36 |
| ロット8 + ミヨウバン | 50 | 46 |
| ロット9 + ミヨウバン | 25 | 38 |
| ロット10 + ミヨウバン | 25 | 17 |
| ロット11 + ミヨウバン | 25 | 10 |
| 対照 (ミヨウバンのみ) | - | 11 |
| 対照2 (ミヨウバンのみ) | - | 2 |

20

30

【0146】

NeuNAcの除去は、マウスにおけるワクチン接種後の防御に影響を及ぼすと思われる。これらの実験は、NeuNAcの含有量が75%超である多糖V型コンジュゲートが有用であることを示唆している。

40

【0147】

【表 5】

| CRM197:PSV | %NeuNAc | %防御 (CJB111) | 架橋レベル |
|--------------|---------|--------------|--|
| 0.25:1.0 | 0 | 100 | <div style="text-align: center;">低い</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="text-align: center;">高い</div> |
| 0.5:1.0 | 0 | 79 | |
| 0.5:1.0 | 0 | 48 | |
| 1.0:1.0 | 0 | 32 | |
| 1.0:1.0 | 0 | 46 | |
| 1.5:1.0 | 0 | 42 | |
| 1.5:1.0 | 0 | 43 | |
| 2.0:1.0 | 0 | 13 | |
| 3.0:1.0 | 0 | 37 | |
| 4.0:1.0 | 0 | 31 | |
| 対照 (ミョウバンのみ) | 0 | 5 | |

10

20

【0148】

多糖 V - CRM197 脱シアル化多糖コンジュゲートの免疫原性は、その架橋レベルに反比例する。したがって、免疫原性組成物が多糖 V 型、特に、脱シアル化多糖を含む場合、タンパク質：多糖の架橋レベルがより低いコンジュゲートが有益であり得る。

【0149】

本発明は単に例として記載されており、本発明の範囲および主旨から逸脱せずに改変を行うことができることが理解されよう。

30

【0150】

【化 1】

参考文献

- [1] Paoletti *et al.* (1990) *J Biol Chem* 265:18278-83.
- [2] Wessels *et al.* (1990) *J Clin Invest* 86:1428-33.
- [3] Paoletti *et al.* (1992) *Infect Immun* 60:4009-14.
- [4] Paoletti *et al.* (1992) *J Clin Invest* 89:203-9.
- [5] Wessels *et al.* (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9170-4.
- [6] Wang *et al.* (2003) *Vaccine* 21:1112-7.
- [7] Wessels *et al.* (1993) *Infect Immun* 61:4760-6
- [8] Wessels *et al.* (1995) *J Infect Dis* 171:879-84. 10
- [9] Baker *et al.* (2004) *J Infect Dis* 189:1103-12.
- [10] Paoletti & Kasper (2003) *Expert Opin Biol Ther* 3:975-84.
- [11] WO2012/035519
- [12] Lewis *et al.* (2004) *PNAS USA* 101:11123-8.
- [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. 20
- [18] www.polymer.de
- [19] Wessels *et al.* (1989) *Infect Immun* 57:1089-94.
- [20] WO2006/082527.
- [21] 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.
- [22] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [23] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [24] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-68.
- [25] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [26] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-7. 30
- [27] European patent 0477508.
- [28] US patent 5,306,492.
- [29] WO98/42721.
- [30] Dick *et al.* in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [31] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [32] US patent 4356170.
- [33] WO2006/082530.
- [34] WO2005/000346
- [35] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077.
- [36] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238. 40
- [37] Anderson *et al.* (1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59.
- [38] EP-A-0372501.
- [39] EP-A-0378881.
- [40] EP-A-0427347.

【 0 1 5 1 】

【化 2】

- [41] WO93/17712
- [42] WO94/03208.
- [43] WO98/58668.
- [44] EP-A-0471177.
- [45] WO91/01146
- [46] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-24.
- [47] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:4884-87.
- [48] EP-A-0594610. 10
- [49] WO00/56360.
- [50] WO02/091998.
- [51] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [52] WO01/72337
- [53] WO00/61761.
- [54] WO00/33882
- [55] WO99/42130.
- [56] WO2004/011027.
- [57] WO96/40242.
- [58] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264. 20
- [59] WO00/38711; US patent 6,146,902.
- [60] International patent application PCT/IB2008/02690, 'CONJUGATE PURIFICATION', claiming priority from GB-0713880.3 (NOVARTIS AG), published as WO 2009/010877.
- [61] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126.
- [62] WO00/56365.
- [63] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [64] Paoletti (2001) *Vaccine* 19(15-16):2118-26.
- [65] WO03/009869.
- [66] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [67] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16. 30
- [68] WO00/53221.
- [69] Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [70] Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [71] Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [72] Ugozzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [73] US patent 6355271.
- [74] WO00/23105.
- [75] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [76] WO90/14837.
- [77] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80. 40
- [78] Frey *et al.* (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- [79] US Patent 6,299,884.
- [80] US Patent 6,451,325.
- [81] US patent 5,057,540.
- [82] WO96/33739.

【 0 1 5 2 】

【化3】

- [83] EP-A-0109942.
 [84] WO96/11711.
 [85] WO00/07621.
 [86] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
 [87] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
 [88] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280.
 [89] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
 [90] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338. 10
 [91] Gerber *et al.* (2001) *Virol* 75:4752-4760.
 [92] WO03/024480
 [93] WO03/024481
 [94] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
 [95] EP-A-0689454.
 [96] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
 [97] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
 [98] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491.
 [99] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
 [100] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400. 20
 [101] WO02/26757.
 [102] WO99/62923.
 [103] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
 [104] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
 [105] WO98/40100.
 [106] US patent 6,207,646.
 [107] US patent 6,239,116.
 [108] US patent 6,429,199.
 [109] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658.
 [110] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068. 30
 [111] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
 [112] WO01/95935.
 [113] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
 [114] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.
 [115] WO03/035836.
 [116] WO95/17211.
 [117] WO98/42375.
 [118] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
 [119] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
 [120] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461. 40
 [121] Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
 [122] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
 [123] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216.
 [124] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
 [125] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.

【0153】

【化 4】

- [126] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [127] WO99/40936.
- [128] WO99/44636.
- [129] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [130] WO99/27960.
- [131] US patent 6,090,406
- [132] US patent 5,916,588
- [133] EP-A-0626169. 10
- [134] WO99/52549.
- [135] WO01/21207.
- [136] WO01/21152.
- [137] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [138] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [139] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [140] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [141] WO04/60308
- [142] WO04/64759.
- [143] WO99/11241. 20
- [144] WO94/00153.
- [145] WO98/57659.
- [146] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.
- [147] Hennings *et al.* (2001) *J Infect Dis.* 183(7):1138-42. Epub 2001 Mar 1.
- [148] Lin *et al.* (2001) *J Infect Dis.* 184(8):1022-8.
- [149] Lin *et al.* (2004) *J Infect Dis.* 190(5):928-34
- [150] Glezen & Alpers (1999) *Clin. Infect. Dis.* 28:219-224
- [151] Madoff *et al.* (1994) *J Clin Invest* 94:286-92.
- [152] Paoletti *et al.* (1994) *Infect Immun* 62:3236-43. 30

【 図 1 】

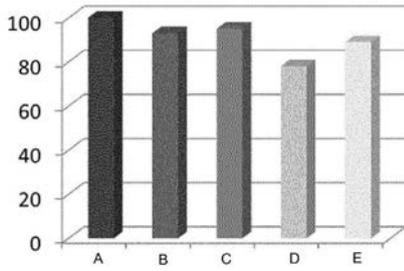


Fig. 1

【 図 2 】

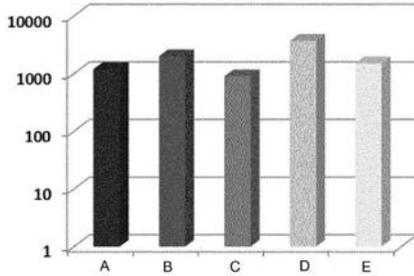


Fig. 2

【 図 3 】

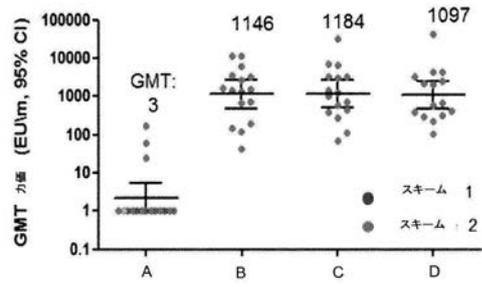


Fig. 3A

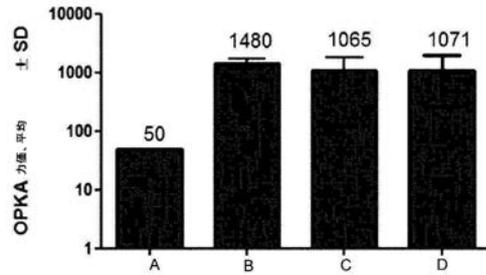


Fig. 3B

【 図 4 】

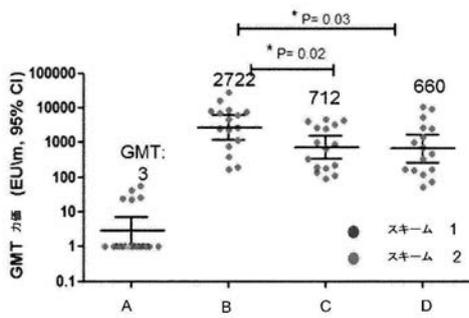


Fig. 4A

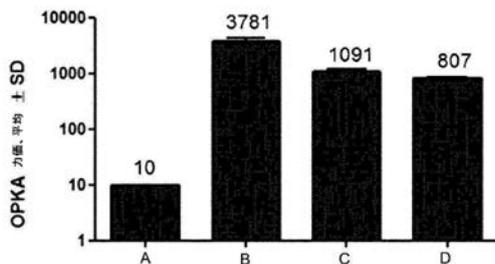


Fig. 4B

【 図 5 A 】

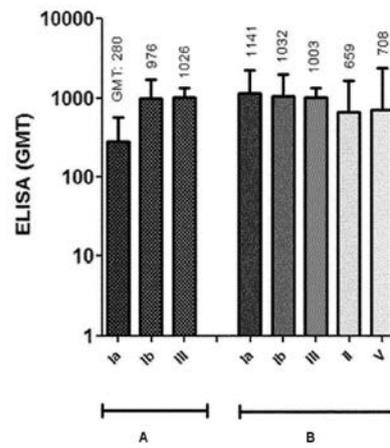


Fig. 5A

【 図 5 B 】

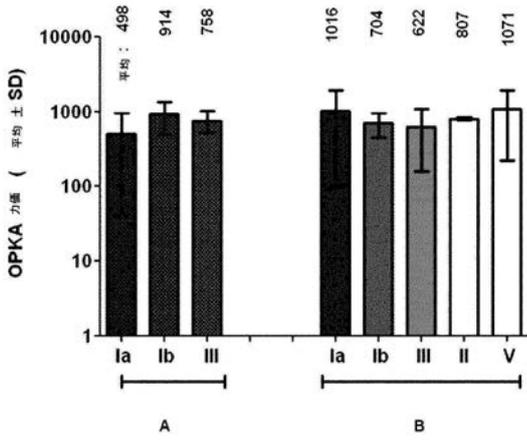


Fig. 5B

【 図 6 】

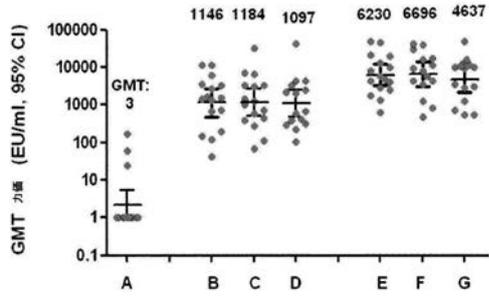


Fig. 6

【 図 7 】

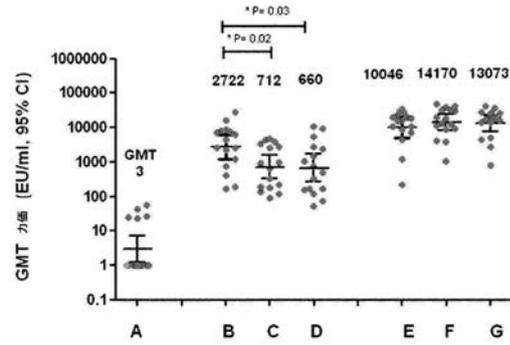


Fig. 7

【 図 8 - 1 】

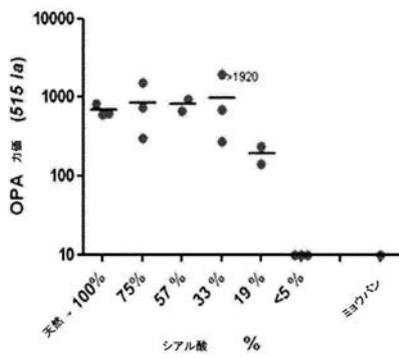


Fig. 8A

【 図 8 - 2 】

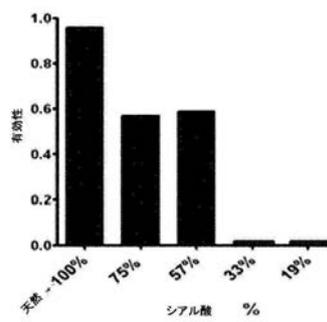


Fig. 8C

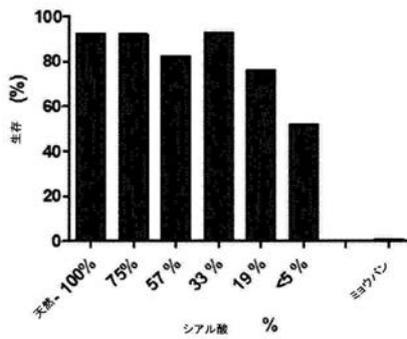


Fig. 8B

【 図 9 - 1 】

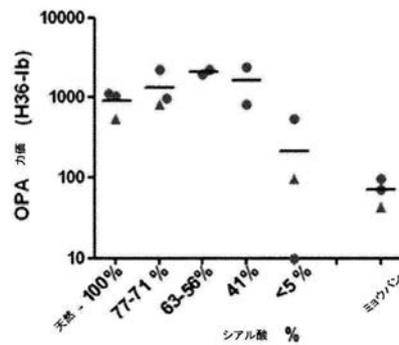


Fig. 9A

【 図 9 - 2 】

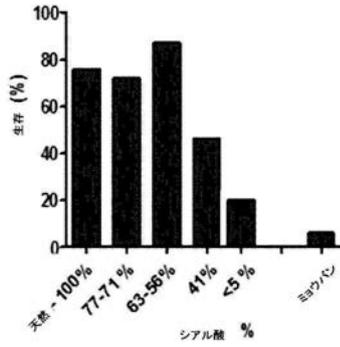


Fig. 9B

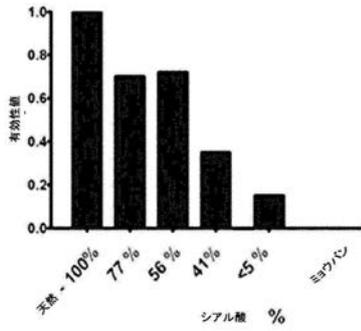


Fig. 9C

【 図 1 0 】

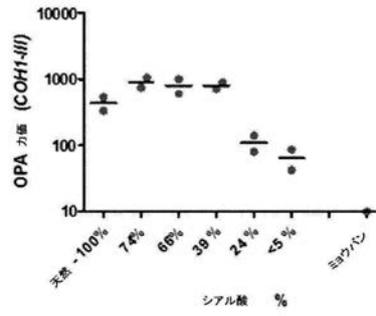


Fig. 10A

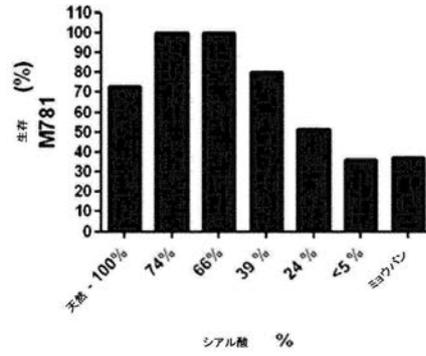


Fig. 10B

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード(参考) |
|-------------|-----------------|---------|-------|------------|
| A 6 1 P | 25/00 (2006.01) | A 6 1 P | 25/00 | |
| A 6 1 P | 15/00 (2006.01) | A 6 1 P | 15/00 | |
| A 6 1 P | 19/02 (2006.01) | A 6 1 P | 19/02 | |
| A 6 1 K | 9/08 (2006.01) | A 6 1 K | 9/08 | |
| A 6 1 K | 9/10 (2006.01) | A 6 1 K | 9/10 | |
| A 6 1 K | 9/19 (2006.01) | A 6 1 K | 9/19 | |
| A 6 1 K | 47/26 (2006.01) | A 6 1 K | 47/26 | |
| A 6 1 K | 47/02 (2006.01) | A 6 1 K | 47/02 | |

(72)発明者 イマクラダ マルガリータ イ ロス
 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 ドミニコ マイオーネ
 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

Fターム(参考) 4C076 AA11 AA12 AA22 BB15 CC06 DD26Z DD38Q GG06
 4C085 AA03 AA04 BA10 BA12 BA14 BA38 CC07 EE01 EE03 GG02

【外国語明細書】

2017226707000001.pdf