

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7404226号

(P7404226)

(45)発行日 令和5年12月25日(2023.12.25)

(24)登録日 令和5年12月15日(2023.12.15)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/295 (2006.01)	A 6 1 K	39/295
A 6 1 K	39/05 (2006.01)	A 6 1 K	39/05
A 6 1 K	39/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/08
A 6 1 K	39/10 (2006.01)	A 6 1 K	39/10
A 6 1 K	39/29 (2006.01)	A 6 1 K	39/29

請求項の数 9 (全40頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-502265(P2020-502265)

(86)(22)出願日 平成30年7月13日(2018.7.13)

(65)公表番号 特表2020-527571(P2020-527571 A)

(43)公表日 令和2年9月10日(2020.9.10)

(86)国際出願番号 PCT/IB2018/055180

(87)国際公開番号 WO2019/016654

(87)国際公開日 平成31年1月24日(2019.1.24)

審査請求日 令和3年7月6日(2021.7.6)

(31)優先権主張番号 201721025513

(32)優先日 平成29年7月18日(2017.7.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関

インド(IN)

前置審査

(73)特許権者 519067909

セラム インステテュート オブ イン

ディア プライベート リミティド

インド 4 1 1 0 2 8 プネー ハダップ

ザー オフ ソリ プーナウォーラ ロード

2 1 2 / 2

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100092624

弁理士 鶴田 準一

(74)代理人 100114018

弁理士 南山 知広

(74)代理人 100117019

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 向上した安定性、高度の免疫原性、及び減少した反応性を有する免疫原性組成物、並びにその調製プロセス

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

免疫原性組成物であって、0.5mlの前記組成物が、

(i)少なくとも50%の吸着率を有するアルミニウム塩上に吸着される、10Lf~25Lfの範囲のジフテリアトキソイド(D);

(ii)少なくとも40%の吸着率を有するアルミニウム塩上に吸着される、2Lf~10Lfの範囲の破傷風トキソイド(T);

(iii)12IOU~16IOUの範囲で、1:1:0.25:0.25の比率にて不活性百日咳菌株134、509、25525、及び6229を含む、不活性全細胞百日咳抗原(wP);

(iv)少なくとも70%の吸着率を有するアルミニウム塩上に吸着される、7μg~15μgの範囲のB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg);

(v)7μg~13μgの範囲で、シアニル化剤としてCNBrを用いて、担体タンパク質としての破傷風トキソイドに共役したインフルエンザB型菌(Hib)莢膜サッカライド;

(vi)それぞれ1~50DUの範囲で1型、1~20DUの範囲で2型、及び1~50DUで3型の不活性ポリオウイルス(IPV)抗原を含む、不活性ポリオウイルス(IPV)抗原;

(vii)0.5mlあたりアルミニウム含有量が0.6mg以下であるリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩(A1<sup>3+</sup>)からなる群から選択される補助剤;

( v i i i ) 1 m g ~ 3 m g の範囲で防腐剤として 2 - フェノキシエタノール ; 及び  
( i x ) 0 . 5 % ~ 1 . 5 % の範囲で希釈媒体又は緩衝剤として N a C l  
を含み、 2 ~ 8 及び室温にて、向上した免疫原性、減少した反応源性、及び向上した安定性を示す完全液体混合ワクチンである、前記免疫原性組成物。

【請求項 2】

前記 I P V 抗原が、マホニー 1 型、M E F 2 型、及びソーケット 3 型からなる群から選択されるソーック株、又は 1 型、2 型、及び 3 型からなる群から選択されるセービン株である、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

不活性全細胞百日咳抗原、H i b 抗原、及び不活性ポリオウイルス抗原が、いずれの補助剤上にも実質的に吸着されない、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 4】

0 . 5 m l あたり 1 0 L f ~ 0 . 5 m l あたり 2 5 L f の量の D 抗原、0 . 5 m l あたり 2 L f ~ 0 . 5 m l あたり 1 0 L f の量の T 抗原、0 . 5 m l あたり 1 2 I O U ~ 0 . 5 m l あたり 1 6 I O U の量の w P 抗原、0 . 5 m l あたり 7  $\mu$  g ~ 0 . 5 m l あたり 1 5  $\mu$  g の量の H B s A g、0 . 5 m l あたり 7  $\mu$  g ~ 0 . 5 m l あたり 1 3  $\mu$  g の量の H i b 抗原、それぞれ 0 . 5 m l あたり 1 ~ 5 0 D U の量のソーック 1 型、1 ~ 2 0 D U の量のソーック 2 型、及び 1 ~ 5 0 D U の量のソーック 3 型の I P V 抗原、0 . 5 m l あたり アルミニウム含有量が 0 . 6 m g 以下であるリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩 ( A l <sup>3+</sup> ) からなる群から選択される補助剤、0 . 5 m l あたり 1 m g ~ 0 . 5 m l あたり 6 m g の量の 2 - フェノキシエタノール、0 . 5 % ~ 1 . 5 % の量の塩化ナトリウムを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 5】

0 . 5 m l あたり 1 0 L f ~ 0 . 5 m l あたり 2 5 L f の量の D 抗原、0 . 5 m l あたり 2 L f ~ 0 . 5 m l あたり 1 0 L f の量の T 抗原、0 . 5 m l あたり 1 2 I O U ~ 0 . 5 m l あたり 1 6 I O U の量の w P 抗原、0 . 5 m l あたり 7  $\mu$  g ~ 0 . 5 m l あたり 1 5  $\mu$  g の量の H B s A g、0 . 5 m l あたり 7  $\mu$  g ~ 0 . 5 m l あたり 1 3  $\mu$  g の量の H i b 抗原、それぞれ 0 . 5 m l あたり 1 ~ 5 0 D U の量のセービン 1 型、1 ~ 2 0 D U の量のセービン 2 型、及び 1 ~ 5 0 D U の量のセービン 3 型の I P V 抗原、0 . 5 m l あたり アルミニウム含有量が 0 . 6 m g 以下であるリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩 ( A l <sup>3+</sup> ) からなる群から選択される補助剤、0 . 5 m l あたり 1 m g ~ 0 . 5 m l あたり 6 m g の量の 2 - フェノキシエタノール、0 . 5 % ~ 1 . 5 % の量の塩化ナトリウムを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 6】

0 . 5 m l あたり 1 0 L f の量の D 抗原、0 . 5 m l あたり 2 L f の量の T 抗原、0 . 5 m l あたり 1 2 I O U の量の w P 抗原、0 . 5 m l あたり 8  $\mu$  g の量の H B s A g、0 . 5 m l あたり 8  $\mu$  g の量の H i b 抗原、それぞれ 0 . 5 m l あたり 4 0 D U の量のソーック 1 型、8 D U の量のソーック 2 型、及び 3 2 D U の量のソーック 3 型の I P V 抗原、0 . 5 m l あたり アルミニウム含有量が 0 . 6 m g 以下であるリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩 ( A l <sup>3+</sup> ) からなる群から選択される補助剤、0 . 5 m l あたり 2 . 5 m g の量の 2 - フェノキシエタノール、0 . 9 % の量の塩化ナトリウムを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

40

【請求項 7】

0 . 5 m l あたり 2 0 L f の量の D 抗原、0 . 5 m l あたり 4 L f の量の T 抗原、0 . 5 m l あたり 1 4 I O U の量の w P 抗原、0 . 5 m l あたり 1 5  $\mu$  g の量の H B s A g、0 . 5 m l あたり 1 0  $\mu$  g の量の H i b 抗原、それぞれ 0 . 5 m l あたり 4 0 D U の量のソーック 1 型、8 D U の量のソーック 2 型、及び 3 2 D U の量のソーック 3 型の I P V 抗原、0 . 5 m l あたり アルミニウム含有量が 0 . 6 m g 以下であるリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩 ( A l <sup>3+</sup> ) からなる群から選択される補助剤、0 . 5 m l あたり 2 . 5 m g の量の 2 - フェノキシエタノール、0 . 9 % の量の塩化ナトリウムを含む、請求項 1 に

50

記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

0.5 ml あたり 25 Lf の量の D 抗原、0.5 ml あたり 10 Lf の量の T 抗原、0.5 ml あたり 16 IOU の量の wP 抗原、0.5 ml あたり 15 µg の量の HBsAg、0.5 ml あたり 13 µg の量の Hib 抗原、それぞれ 0.5 ml あたり 40 DU の量のソーグ 1 型、8 DU の量のソーグ 2 型、及び 32 DU の量のソーグ 3 型の IPV 抗原、0.5 ml あたりアルミニウム含有量が 0.6 mg 以下であるリン酸アルミニウムなどのアルミニウム塩 ( $Al^{3+}$ ) からなる群から選択される補助剤、0.5 ml あたり 2.5 mg の量の 2-フェノキシエタノール、0.9% の量の塩化ナトリウムを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 9】

請求項 1 に記載される完全液体混合ワクチン組成物の製造プロセスであって、前記製造プロセスが、

以下の工程、

A. 成分 I の製剤手順：

- a) コンテナ / 容器内での、リン酸アルミニウムの転移；
- b) ジフテリアトキソイドの添加；
- c) 酢酸 / 水酸化ナトリウムによる、4.5 ~ 5.5 への pH 調整；
- d) 安定化のための待機；
- e) 水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムによる、5.5 ~ 6.5 への pH 調整；
- f) 安定化のための待機；

20

B. 成分 II の製剤手順：

- a) コンテナ / 容器内での、リン酸アルミニウムの転移；
- b) 破傷風トキソイドの添加；
- c) 酢酸 / 水酸化ナトリウムによる、4.5 ~ 5.5 への pH 調整；
- d) 安定化のための待機；
- e) 水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムによる、5.5 ~ 6.5 への pH 調整；
- f) 安定化のための待機；

C. 成分 III の製剤手順：

- a) コンテナ / 容器内での、リン酸アルミニウムの転移；
- b) B 型肝炎表面抗原の添加；
- c) 酢酸 / 水酸化ナトリウムによる、4.5 ~ 5.5 への pH 調整；
- d) 安定化のための待機；
- e) 水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムによる、5.5 ~ 6.5 への pH 調整；
- f) 安定化のための待機；

30

D. 不活性全細胞百日咳抗原の前記調製が、以下：

- a) 百日咳菌株 134 のホルムアルデヒドの存在下で、10 ~ 15 分間、56 にて不活性化させること；
- b) 百日咳菌株 509 のホルムアルデヒドの存在下で、10 ~ 15 分間、56 にて不活性化させること；
- c) 百日咳菌株 25525 及び 6229 のホルムアルデヒドの存在下で、10 ~ 15 分間、56 にて不活性化させること；
- d) 百日咳菌株 6229 のホルムアルデヒドの存在下で、10 ~ 15 分間、56 にて不活性化させること；
- e) 工程 a)、b)、c) 及び d) のそれぞれで得られた不活性百日咳菌株 134、509、25525、及び 6229 を、1:1:0.25:0.25 の比率にて、その後に混合すること；及び
- f) 所望により、アルミニウム系補助剤上に吸着させること

40

を含み、チメロサルを欠き、かつ不活性全細胞百日咳抗原が塊状ではなく均質な状態に留まり、それによって、減少された反応源性をもたらす、かつより長い持続時間に対する

50

4. 5 IU / 用量を超える潜在能を所与する；

E. Hib 抗原の調製が、以下；

a) インフルエンザ b 型菌の発酵；

b) 0. 1 % のホルムアルデヒドの存在下で、2 時間、37 にて工程 a) で得られたインフルエンザ b 型菌を不活性化させること；

c) 工程 b) で得られた Hib ポリリボシルリビトールリン酸 (PRP) 多糖類の精製；

d) アジピン酸二水和物 (ADH) 連鎖の存在下で、臭化シアンシアニル化結合化学作用を使用して、工程 c) の精製生成物を破傷風トキソイド (TT) へと共役させること

e) 工程 d) の共役体の精製；及び

f) 好ましくは 0. 22  $\mu$ m のフィルタを介して、工程 e) の精製済み共役体を濾過すること

10

を含み、遊離 PRP のパーセンテージが、総精製済み Hib バルク共役体中で 5 % 以下である；

F.、

a) ブレンド容器 / コンテナへのジフテリアトキソイドを含む成分 I の添加；

b) 室温での攪拌を伴う工程 b) の成分 I への破傷風トキソイドを含む成分 II の添加；

c) 室温での攪拌を伴う工程 c) で得られた混合物への不活性全細胞百日咳抗原の添加；

d) 室温で工程 c) で得られた混合物への B 型肝炎表面抗原を含む成分 III の添加；

e) 6 ~ 16 で工程 d) で得られた混合物への Hib 抗原の添加；

f) 6 ~ 16 で工程 e) で得られた混合物への IPV 抗原の添加；

20

g) 6 ~ 16 で工程 f) で得られた混合物への 2 - フェノキシエタノールの添加；

h) 水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムによる、工程 g) で得られた混合物の pH の 6 ~ 7. 0 への調節；及び

i) 攪拌しながら残りの通常生理食塩水 (NaCl) の添加による容積の補充

を含む、製造プロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、バイオテクノロジーの分野に関し、より詳細には、抗原 / 免疫原の群を含む混合ワクチン組成物、並びにその調製方法に関する。本開示は、更に、混合ワクチンの生成分野における向上した方法論に関する。

30

【背景技術】

【0002】

多数の疾病に対する免疫原性を提供することが可能な混合ワクチンは、所与される皮下注射数を減少させ、複数の筋肉注射と関係した合併症を減少させ、投与及び生産コストを減少させ、在庫コストを低減し、ワクチン接種の遅延及び機会取り逃しを減少させ、また多数の個別のワクチン接種を減少させることにより患者からの応諾を向上させる故に、単価ワクチン以上に常に有用である。更に、完全に液体である混合ワクチンの調製は、再構成が必要であるようなものに勝る、異なる利点を有している。平均調製時間は、完全液体ワクチンに関して、非完全液体ワクチンと比較してほぼ半分である、と見出されている。同様の研究では、ほぼ全ての健康管理職員 (97. 6 %) が、彼らの日常実務において、完全液体ワクチンを使用することが好ましくあり得る、と述べた (参照: Soubeyr and B; Assessment of preparation time with fully - liquid versus non - fully liquid paediatric hexavalent vaccines, A time and motion study; Vaccine 2015; 33: 3976 - 82)。

40

【0003】

現在周知で利用可能な混合ワクチンは、一回の皮下注射にて、多数の疾病に関して感染しやすい人間母集団における、所望の水準の安全性、有効性及び免疫原性を達成するための、適切な免疫原性形態における適切な抗原の適切な配合物を、含有していな場合がある

50

。ほんの少数の追加の抗原により作成することができる多数の異なるワクチンの組み合わせが、想到される。1～4種のその他の抗原組成物（例えば、HIB（凍結乾燥又は液体）、HBV、IPV、HAV）を、DTwP又はDTaPのどちらかへと添加することにより、生成可能な44種の異なるワクチンの組み合わせが可能である。異なる製造業者からの個々の構成成分が思われる場合、その数は数千へと増大し得る。あらゆる個々の新規混合ワクチンは（供給元に従った構成成分における差を考慮に入れ）、個別に開発されて、安全性、安定性、適合性、及び有効性を実証しなければならず、これら全てのワクチンの開発は、商船的な課題となる。

#### 【0004】

混合ワクチンの抗原：

10

ジフテリア及び破傷風抗原

ジフテリア及び破傷風は、それぞれ、コリネバクテリウム・ジフテリアエ及びクロストリジウム・テタニにより引き起こされる、急性感染症である。両方の事例においても、臨床的疾患に関する原因であるこれらの細菌の、強力な細菌外毒素である。これらの毒素を含有するこれらの細菌に対する防護が可能な、化学的に改質されたワクチンは、従って、もはや毒素ではないが、依然として抗原性である。ジフテリア及び破傷風毒素は、ウシ抽出物を含有する媒体において、コリネバクテリウム・ジフテリアエ及びクロストリジウム・テタニの成長により、生成される。トキシイド[ジフテリアトキシイド(D)及び破傷風トキシイド(T)]を作製するために、熱、UV、ホルマリン/ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、アセチルエチレンジアミン、等を含む、次の処理剤を使用して、毒素を不活性化させる。ウシ海綿状脳症(BSE)、伝播性海綿様脳症(TSE)、クロイツフェルトヤコブ病(CJD及び変異型CJD病)に関する懸念が、ワクチンを介して伝搬される、ウシ抽出物を含有する増殖培地にて使用される動物性構成要素から生じ得る。(参照：生物学的及び薬学的生成物に関する、伝播性海綿様脳症におけるWHOガイドライン；2003&EMEA/CPMP/BWP/819/01；2001年4月24日)。

20

#### 【0005】

百日咳抗原

1940年代における化学的及び加熱不活性化百日咳菌微生物で構成される全細胞ワクチンの導入は、百日咳菌により引き起こされる百日咳の発生率における、劇的な減少に関して責任を負っていた。

30

#### 【0006】

全細胞DTPワクチンは、一般的に幾つかの局所的有害事象（例えば、注射箇所における紅斑、腫脹、及び痛み）、発熱、及びその他の軽い全身性事象（例えば、眠気、焦燥感、及び拒食症）に関連する（参照：Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; The Nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children, Paediatrics 1981; 68: 650 - 60）及び（参照：Long SS, DeForest A, Pennridge Pediatric Associates, Longitudinal study of adverse reactions following Diphtheria - tetanus - pertussis vaccine in infancy, Paediatrics 1990; 85: 294 - 302）。より重篤な事象（例えば、痙攣{発熱の有無を伴う}及び筋緊張低下・反応性低下発作）は、全細胞DTPワクチンを受けた小児の間で、より低頻度（投与済みの1750件の投与薬量に対して1件の事例の比率）にて発生する（参照：Cody CL, Baraff LJ, Cherry JD, Marcy SM, Manclark CR; The Nature and rate of adverse reactions associated with DTP and DT immunization in infants and children, Paediatrics 1981; 68: 650 - 60）。急性脳症は、より稀であるにもかかわらず発生する（

40

50

投与済みの百万件の投薬量に対して0～10.5件の事例の比率)。全細胞百日咳ワクチンが、場合によっては稀に、永久性能損傷を引き起こすことを、専門家達は同意している。(参照: Institute of Medicine; DPT vaccine and chronic nervous system dysfunction, a new analysis; Washington D.C., National Academy Press, 1994年)。

#### 【0007】

幾つかの報告では、ワクチン許容の減退及び結果としての新たな流行性をもたらした、全細胞百日咳ワクチン接種、反応源性、及び深刻な副作用間の関係を引用している(Miller, D.L., Ross, E.M., Alderslade, R., Bellman, M.H., and Brawson, N.S.B. (1981年). Pertussis immunization and serious acute neurological illness in children: Brit Med. J. 282: 1595-1599)。

#### 【0008】

副作用に関連する全細胞百日咳ワクチン(wP)は、それらの世界的な継続使用に関する障害であり、また従って、wP系混合ワクチンは、工業化された世界において、徐々に無細胞百日咳系混合ワクチンに置き換えられていった。より近年には、確定された構成成分の百日咳ワクチンが開発されてきた。全ての液体六価無細胞百日咳系ワクチン(DTaP IPV PRP-T-HBsAg)が、以前に報告されてきた(EP1028750)。

#### 【0009】

Infanrix (登録商標) Hexa (GSK) は、現在、世界的規模で市場にて販売されている唯一の、サークIPVを含有する六価の小児混合ワクチンである。本製品(DTaP3-IPV-HBV/Hib)は、個別のバイアル瓶内の、使用前にワクチンの残りと共に復元される凍結乾燥Hib抗原PRP-T共役体と共同包装された、五価の製品のプレフィルド注射器として、販売されている。

#### 【0010】

第2の六価ワクチン、Hexyon (登録商標) (Hexacima (登録商標) 及び Hexaxim (登録商標)) とも称される) は、Sanofi Pasteurからの全液体の六価であるが、同様に、aPも伴う。本ワクチンは、欧州及び世界的な民間市場を標的としている、と見込まれている。同様にaPを伴う、Merck及びSanofi Pasteurにより共同開発されている別の六価ワクチンは、現在、臨床研究の第三段階である。

#### 【0011】

七価の混合ワクチンは、DT、無細胞百日咳菌、セービンIPV(1型: 40DU、2型: 8DU、3型32DU)、単一株不活性ロタウイルス(G9株、即ち116E株)、共役インフルエンザb型菌、TT共役PRP、及び組換え型B型肝炎ワクチンから構成され、Bharat Biotech Internationalにより開発されている。

#### 【0012】

しかし、特に発展途上国の設定において、無細胞百日咳(aP)ワクチンの長期有効性に関する懸念が発生してきている。最近の報告は、百日咳に対する免疫は青年期に衰退し、また六ヶ月以下の年齢の乳児において、彼らが完全にワクチン接種を受ける前に、症例が増大することの原因であることを、示唆している。乳児期にaPにより免疫性を与えられた8～12歳において、ワクチンの有効性は24パーセントと推定された。オーストラリアにおける観測的研究はまた、乳児期にaPワクチンを所与された青年の間で、wPワクチンを所与された青年よりも更に高い症例率(相対リスク3.3、信頼区間2.4～4.5の95パーセント)を示した。

#### 【0013】

コストの観点から、aP抗原は、製造差及び特許権使用料コスト故に、歴史的にwP抗

10

20

30

40

50

原のコストを10～30倍で超えてきており、また従って、発展途上国に対しての経済的負担を構成してきた。結果として、wP系六価ワクチンのコストは、低資源国の公共部門において使用するために、より良好に適合し得る。

【0014】

従って、発展途上国のための六価ワクチンにおける全細胞百日咳ワクチン(wP)は、特に発展途上国の設定において、aPワクチンのコストと長期有効性に関する発生している懸念の両方故に、重要になってきている。最良の全細胞百日咳(wP)ワクチンと比較して、aPワクチンは、集団予防接種プログラムにおいてさほど効果的ではない(Vickersら、2006年; Cherry、2012年)。

【0015】

免疫を獲得した人口における激増の最近の研究は、aPワクチンの防護持続期間が短すぎ(Kleinら、2012年; Misegadesら、2012年)、より年齢の高い小児及び青年における免疫の低下をもたらし、またこの年齢群における対応する症例の増加をもたらす(Skowronskiら、2002年; Kleinら、2012年)ことを示してきた。これは、wPワクチンとは対照的であり、10代の年代に対して良好な保護を提供する(Kleinら、2012年)。これらの欠点の結果として、1990年代にaPワクチンへと切替えた国において、小児が初回抗原刺激を受けたワクチンが、後の免疫追加ワクチンに対する彼らの免疫反応を決定し得る故に、現在、百日咳に対する防護がより良好ではないだけでなく、追加免疫に対しての反応性がより少なくあり得る世代の子供たちが存在する(Poddaら、1995年; Mascartら、2007年; Sheridanら、2012年; Liko, Robission及びCieslak、2013年; Smitzら、2013年)。

【0016】

wPの反応源性に貢献する最も重要な因子の1つは、細菌外膜からの内毒素である、リポオリゴ糖(LOS)の存在である。

【0017】

多くの製造業者により実施される、wP毒素の不活性化のための全細胞百日咳ワクチン(wP)のバルクプロセスは、熱処理/ホルマリンを使用する。幾つかの報告では、wPの不活性化に関するチメロサールの使用を引用している。しかし、チメロサールの使用は、IPVの抗原性の損失を引き起こす(Vaccine 1994年 Volume 12 No. 9 851-856)。不活性ポリオウイルスワクチンの洗剤能におけるチメロサールの有毒作用は、また従って、IPVを含有する混合ワクチンの場合、チメロサール含有wPから分離されたバイアル瓶内に存在させて、時間の経過とともに、又は百日咳バルク源の不活性化の変化とともに、その潜在能を保持することが必要な場合がある。若干の抗原、即ち、活性PTも同様に免疫反応調整剤として機能し、また異なるワクチン間の種々の抗原に対する免疫反応における有意差が、観察されてきた(WHO、1993年)。

【0018】

LOSの化学的抽出は、生体外試験又は生体内試験での使用に応じて、内毒素含有量の著しい減少(20%)、及び毒性に対する内毒素における著しい低下(最大97%)をもたらした。LOS抽出は、生成物の完全性に影響を与えることはなく、より重要なことに、DTPの潜在能及び/又は安定性に低い影響を与えなかった。更に、実際には、抗体におけるいずれかの差及びT細胞応答が観察された。(参照: Waldely Oliveira Diasら; An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin; Human Vaccines & immunotherapeutics 9:2, 339-348; 2012年2月)。

【0019】

B型肝炎抗原

種々の肝炎ウイルス株が存在している。B型肝炎は、人間の肝臓に感染して、肝炎と称する炎症を引き起こす、B型肝炎ウイルス(HepB)により引き起こされる疾病である

10

20

30

40

50

。疾病に対するワクチンは、ウイルス性包膜タンパク質の1つである、B型肝炎表面抗原（HBsAg）を含有する。集団予防接種に使用されてきたワクチンは現在入手可能であり、例えば、Merckによる製品Recombivax HB（登録商標）及びComvax（登録商標）、並びにGlaxo SmithKline BiologicalsによるEngerix-B（登録商標）及びPediarix（登録商標）である。B型肝炎成分を有する混合ワクチンは、HepB単一抗原ワクチンと比較して、より高い完成度及び応諾結果の両方を伴った。（参照：Kuroskyら；Effect of Combination Vaccines on Hepatitis B Vaccine Compliance in Children in the United States；The Pediatric Infectious Disease Journal，36（7）：e189-e196 2017年7月）。幾つかの参照では、その他の抗原と組み合わせられた、リン酸アルミニウム上へのB型肝炎表面抗原の吸着を引用している。B型肝炎成分は、実質的にチオメルサルを含むべきではない（method of preparation of HBsAg without thiomersalが、以前にEP1307473にて公開されている）。B型肝炎成分の低免疫原性故に、Hexavac（登録商標）の混合ワクチンが市場から引き上げられた。従って、適切な又は高度の免疫原性を伴うB型肝炎抗原を含む混合ワクチン組成物が、必要とされている。

#### 【0020】

インフルエンザ菌（Hib）抗原

インフルエンザ菌は、上気道区系の一環であるグラム陰性球杆菌である。インフルエンザb型菌（Hib）は、若年小児における髄膜炎侵襲血行性の感染症の主要な症例であり、また人生最初の2年間における主要な症例である。インフルエンザ菌に対する予防接種は、多糖類ワクチン〔ポリリボースリビトールリン酸（PRP）〕を用いて、1987年にカナダで始まった。Hibのポリリボースリビトールリン酸（PRP）カプセルは、微生物に関する主要な毒性要因である。PRPに対する抗体は、血清殺菌活性に対する主要な貢献者であり、また抗体の増大レベルは、侵襲性の疾病リスクの減少に関連している。PRPは、T細胞独立抗原であり、また従って、a）月齢18か月未満の乳児及び小児における不十分な抗体応答の誘発、b）変異性、かつT細胞依存抗原に見られるよりも定量的により小さい抗体応答、c）より高い免疫グロブリンM（IgM）比率の生成物、並びにc）追加免疫応答を生じさせることができない、により特徴付けられる。

#### 【0021】

初期ワクチンは、乳児において効果が無いと検証されたPRP成分にのみに基づいた。PRP共役ワクチンに対する更なる試みが指導されたが、PRPは、髄膜炎菌、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、及びCRM197の外膜タンパク質などの担体タンパク質と称されるタンパク質に共役される。混合ワクチンにおけるHib共役成分の包含は、減少されたHib免疫原性と関連付けられてきた。なお、Hib共役体は水性媒体中で不安定であり、かつこの形態での持続的保管では生残が不可能である。従って、インフルエンザb型菌（Hib）のPRP多糖類は、乾燥固体として頻繁に配合され、これは、その他の抗原の液体配合物と共に送達される時に復元される。例えば、Infnrix（登録商標）hexa（PCT国際公開特許第99/48525号）である。

#### 【0022】

ポリオ抗原

異なる種類のワクチンが入手可能である。

1961年の、Dr. Albert Sabinによる、弱毒化（弱められた）経口ポリオ生ワクチン（OPV）。サービン株を含むOPVは、経口にて所与される。

1955年の、Dr. Jonas Salkによる、不活性（死滅）ポリオワクチン（IPV）。サーク株を含むIPVは、注射剤として所与される。

近年、ホルマリンにより、サービン株ポリオウイルスを不活性化させることにより調製された、サービン不活性ポリオウイルスは、注射器に関して開発されてきており、また同様に、商業製品として入手可能とされている。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 2 3 】

弱毒化（OPV）生ポリオワクチン及不活性（IPV）ポリオワクチンの両方は、世界的にポリオ疾病を制御するのに効果的であった。ポリオワクチンは、サーク株又はサービン株を含んでよい。

## 【 0 0 2 4 】

1995年に、Dr. Jonas Salkは、野生型ポリオウイルスの不活性化において成功し、従って、注射器タイプの配合を可能にし、またサーク株と命名され、これは、小児麻痺疾病に対するワクチンにて使用されてきたマホニー1型、MEF2型、及びソーケット3型を含む。サービン株は、サービン1型及びサービン2型株を含む。

## 【 0 0 2 5 】

ポリオワクチンの許容可能な標準投与量は、現在、不活性ポリオウイルス1型（マホニー）の40D抗原単位、不活性ポリオウイルス2型（MEF-I）の8D抗原単位、及び不活性ポリオウイルス3型（ソーケット）の32D抗原単位、例えば、Infanrix-hexa（PCT国際公開特許第99/48525号）を含む。

## 【 0 0 2 6 】

IPVは、現在、DT-IPV（ジフテリア及び破傷風トキソイドを伴う）、及び六価-IPVワクチン（追加で、百日咳、B型肝炎、及びインフルエンザb型菌）、例えば、Infanrix-hexa（PCT国際公開特許第99/48525号）を含む、非免疫助成単独形配合として、又は種々の組み合わせにて、入手可能である。

## 【 0 0 2 7 】

しかし、OPVと比較した場合、IPVに関する全体生産コストは著しく高い。これは、主に、次の要件故である。（i）投与量あたりより多くのウイルス、（ii）追加のダウンストリーム処理（即ち、濃縮、精製、及び不活性化）、並びに関連するQC試験、（iii）抗原の損失又はダウンストリームにおける不十分な回復率、並びにiv）汚染現在まで、IPV技術革新並びに低所得及び中所得国における実施に関して、財政的問題が主要な欠点であった。

## 【 0 0 2 8 】

ポリオウイルスの根絶に続くIPVに対する将来的な世界規模の需要は、年あたり、現在のレベルである8,000万投与量から1億5,000万投与量へと増大し得た。従って、IPVの「大量」供給へのアプローチが必要とされると見込まれている。

## 【 0 0 2 9 】

低投与量のIPV抗原を使用して感染症に対する保護を提供する、減少された投与量の有効ワクチン配合物は、従来のワクチンの供給量が世界規模の必要性を満たすのに不十分な状況、又は従来のワクチンの製造コスト故に、発展途上国において許容可能な価格にてワクチンを販売することを妨害する状況において、好適である。同様に、市場で流通している既存の配合物と比較して、IPV低投与量への曝露はより安全であり得る。従って、より許容可能な価格が可能であるIPVを作成する、種々の戦略を評価する必要性がある。従って、投与量を減少させたIPVを含む混合ワクチンは、更に廉価で投与が容易であるように作成され得る。

## 【 0 0 3 0 】

パンデミックインフルエンザワクチンの場合、補助剤の使用が投与量の減少、入手可能性の増大、及びワクチンのコスト減少を可能にする。従って、IPV補助ワクチン配合物がコストを削減させ得、また同様に、入手可能なIPV投与量の数世界規模で増大させることが、推測されてきた。

## 【 0 0 3 1 】

なお、アルミニウム塩は安全であると考えられてきており、IPVを含有する混合ワクチンに既に使用されており、開発に関する障害が最も低く、かつ製造するのに安価である。しかし、アルミニウム補助剤は、著しい投与量の低減を可能にするかに関しては、知られていない。

## 【 0 0 3 2 】

## 他の抗原

混合ワクチンに含ませることができたその他の抗原は、インフルエンザ菌（a、c、d、e、f 抗原型、及び無莢膜化菌株）、肝炎（A 型、C 型、D 型、E 型、F 型、及び G 型株）、髄膜炎 A 型、B 型、又は C 型、インフルエンザ肺炎球菌、連鎖球菌、炭疽、デング熱、マラリア、流行性耳下腺炎、風疹、BCG、日本脳炎、ロタウイルス、天然痘、黄熱病、腸チフス、带状疱疹、水痘ウイルス、及びその他である。

### 【0033】

混合ワクチンに使用される抗原の範囲及び種類は、乳児、幼児、小児、青年、及び大人などに使用される目標の母集団年齢による。百日咳菌、クロストリジウム・テタニ、コリネバクテリウム・ジフテリアエ、及び所望により、不活性ポリオウイルス（IPV）、並びに / 又は B 型肝炎ウイルス、並びに / 又はインフルエンザ B 型菌感染症からの感染症を防ぎ得る、最も初期に知られている混合ワクチンが、周知である（例えば、PCT 国際公開特許第 93 / 24148 号、同第 97 / 00697 号、同第 2000 / 030678 号、同第 2008 / 028956 号、米国特許出願公開第 6013264 号及び PCT 国際公開特許第 2005089794 号を参照のこと）。

### 【0034】

一方で、頻回ワクチン注射は、微生物による汚染を防ぐための防腐剤を使用しなければならない。UN により準先進国へと輸出される混合ワクチン生成物等に関して、防腐剤を含有する頻回ワクチンが好ましく、ワクチンが使用される国の環境、配給方法、費用、等が考慮される。ワクチン生成物に使用される防腐剤の例は、チメロサル、2 - PE、フェノール、ホルムアルデヒドを含有することができ、また防腐剤の従来の投与量が当技術分野において周知である。

### 【0035】

本発明者らは、混合ワクチン組成物における免疫原性、反応源性、安定性、並びに抗原の適切な形態のメンテナンスが、個々の抗原の調製プロセス、抗原追加の順序、特定の抗原に関する特定の量での特定の補助剤の使用、補助剤上への抗原の個々の吸着又は組み合わせられた吸着、補助剤上への抗原吸着の程度、総ミョウバン含有量、使用される防腐剤の濃度及び種類、攪拌、温度及び pH を含む種々のパラメータの使用を含む、組成物が配合された方法に依存することを、見出した。

### 【発明の概要】

### 【0036】

向上した免疫原性及び減少された反応源性を示す液体安定混合ワクチン組成物、並びにその製造プロセスが、開示されている。本開示は、

a) 半合成培地を使用して生成され、かつその後解毒された、高精製ジフテリアトキソイド（D）及び破傷風トキソイド（T）。

b) 熱及び化学的不活性化の組み合わせ、減少された反応源性及び増大した潜在能をもたらす特定の比率での、特定の百日咳菌株を使用して調製された、不活性全細胞 B 型百日咳（wP）成分。

c) 担体タンパク質（CP）共役インフルエンザ B 型菌（Hib）莢膜多糖類抗原（PRP）。

d) ホルムアルデヒド不活性化の向上した方法を利用することにより調製され、かつ水酸化アルミニウム上に更に吸着される、標準的な投与量又は減少されたサーク若しくはサービン（不活性ポリオウイルス）IPV 投与量。

e) B 型肝炎（HepB）表面抗原がリン酸アルミニウム補助剤上に個別に吸着され、D 及び T 抗原がリン酸アルミニウム補助剤上に個別に吸着され、それにより、高度の免疫原性をもたらすような、抗原（複数可）の最適な吸着プロファイル。

f) 減少された反応源性を確実にするための、最小ミョウバン含有量。

g) 防腐剤として 2 - フェノキシエタノール（2 - PE）の最適濃度、を含む、混合ワクチン品組成物に関する。

### 【0037】

## 目的

本明細書の少なくとも一実施形態が満たす本開示のいくつかの目的を、以下に示す。

### 【0038】

本開示の目的は、先行技術の1つ以上の問題を改善すること、又は少なくとも有用な代替案を提供することである。

### 【0039】

本開示の別の目的は、1つ以上の疾病状態の予防及び治療に好適であり、かつ前記免疫原性成分のそれぞれについての抗体保有率に関する基準を満たす、液体の、安定した、減少された反応性、並びにより高い免疫原性の混合ワクチン組成物/配合物を提供することである。

### 【0040】

本開示の依然として別の目的は、混合ワクチンのこのような組成物/配合物の製造方法を提供することである。

### 【0041】

本開示のその他の目的及び利点は、本開示の範囲を制限することを意図するものではない、以下の発明の詳細な説明からより明らかとなるであろう。

### 【発明を実施するための形態】

### 【0042】

本開示の第一の実施形態によれば、混合ワクチン組成物は、ジフテリアトキソイド(D)、破傷風トキソイド(T)、全細胞B型百日咳(wP)抗原、インフルエンザB型菌(Hib)共役体、B型肝炎(HepB)、不活性ポリオウイルス(IPV)抗原から選択されるがこれらに限定されない抗原/免疫原の群からなり、また追加的に、アルミニウム系補助剤及び防腐剤からなる。

### 【0043】

本開示の第二の実施形態によれば、混合ワクチン組成物は、それぞれ、インフルエンザ菌(a、c、d、e、f抗原型、及び無莢膜化菌株)、肝炎(A型、C型、D型、E型、F型、及びG型株)、髄膜炎A型、B型、C型、Y型、W-135型、又はX型、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラチフス菌抗原(複数可)、無細胞百日咳抗原、変性アデニル酸シクラーゼ、マラリア抗原(RTS,S)、肺炎球菌、連鎖球菌、炭疽、デング熱、マラリア、麻疹、流行性耳下腺炎、風疹、BCG、ヒトパピローマ・ウイルス、日本脳炎、デング熱、ジカ熱、エボラ、チクングンヤ熱、ロタウイルス、天然痘、黄熱病、フラビウイルス、带状疱疹、水痘ウイルス抗原からなる群から選択されるがこれらに限定されない、1種以上の抗原から更になることができる。

### 【0044】

本開示の第三の実施形態によれば、混合ワクチン組成物に使用されるIPV株は、1型、2型、及び3型からなる群から選択される不活性サービン株、又はマホニー1型、MEF2型、及びソーケット3型からなる群から選択される不活性サーク株からなる。

### 【0045】

第三の実施形態の一態様では、ポリオウイルスは以下の方法により成長し得る。

CCl81-VERO(サルの腎臓)細胞株を、ポリオウイルス、即ち、サービン株及びサーク株の成長のための宿主細胞として使用する。

ポリオウイルスの所望の株による宿主細胞の感染及び72時間の培養後、ウイルスと細胞残骸を含有する培地を貯蔵して、単一の容器に収集した。

100KDaのカセットによる接線方向の流量濾過を濾液に施し、リン酸緩衝剤を使用して透析濾過し、かつ陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して精製した。

患者に投与するのに先立って、適切な不活性化法を使用して、ウイルスを不活性化させなければならない。

### 【0046】

しかし、本発明者らは、驚くべきことに、ホルムアルデヒド不活性化後のD抗原の高い割合での損失が、ポリオウイルス粒子の望ましくない凝集を予想外に引き起こす、リン酸

10

20

30

40

50

緩衝剤の存在故であり得ることを、見出した。

【0047】

従って、本開示の重要な態様は、以下の工程を含むホルマリン不活性化の向上したプロセスからなる。

- a) リン酸緩衝剤から、7 ~ 7.5 の間の pH を有する (30 ~ 50 mM) の範囲のトリス緩衝剤へと、精製したポリオウイルスプールに緩衝剤交換を施した。
- b) 上記の混合物 M - 199 へと、グリシン (5 g / l) を含有する媒体を添加した。
- c) 0.025 % のホルムアルデヒドを添加して、その後に混合した。
- d) 電磁攪拌器におけるウイルスバルクの持続的な攪拌により、混合物を、その後に 37 にて 5 ~ 13 日間培養した。
- e) 7 日目に、培養後の混合物に中間体 TFF 系 (100 KDa、0.1 m<sup>2</sup>) を施し、また不活性化後に最終の濾過を施した。
- f) その後、濾過したバルクを 2 ~ 8 にて貯蔵した。
- g) D - Ag ユニット測定に関して、D - Ag ELISA を実施する。

10

【0048】

本開示の第 4 の実施形態によれば、混合ワクチン組成物に使用される IPV 株は、1 型、2 型、及び 3 型からなる群から選択される投与量低減不活性サービン株、又はマホニー 1 型、MEF 2 型、及びソーケット 3 型からなる群から選択される不活性サーク株からなる。

【0049】

本開示の第 5 の実施形態によれば、IPV (サービン株及びサーク株) は、(例えば、存在する場合、その他の成分と混合される前において) いかなる補助剤上にも吸着されない。

20

【0050】

本開示の第 6 の実施形態によれば、IPV (サービン株及びサーク株) 成分 (複数可) は、(例えば、存在する場合、その他の成分と混合される前後において) 水酸化アルミニウム ( $Al(OH)_3$ ) 若しくはリン酸アルミニウム ( $AlPO_4$ ) などのアルミニウム塩 ( $Al^{3+}$ )、ミョウバン、リン酸カルシウム、MPLA、3D-MPL、QS21、CpG 含有オリゴデオキシヌクレオチド補助剤、リポソーム、若しくは水中油型エマルジョン、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される補助剤上に、吸着され得る。吸着される場合、1 種以上の IPV 成分が、別個に又は混合物として一緒に水酸化ミョウバン上に吸着され得る。

30

【0051】

IPV (サービン株及びサーク株) 成分 (複数可) は、次の手順によりアルミニウム塩上に吸着されてよい。

加圧滅菌された  $Al(OH)_3$  の所望の容積を取得して、50 ml の容器内に 0.1 ~ 0.8 mg / 投与量の最終ミョウバン ( $Al^{+++}$ ) 濃度を得る。

調節した D - Ag 単位と共に IPV バルクを添加して、希釈剤 (10 x M - 199 + 0.5 % グリシン) を伴う容積を構成する。

最終配合 pH を調節して、6 ~ 6.8 の pH を伴う最終配合物を得る。

40

【0052】

第 6 の実施形態の態様の 1 つでは、ホルマリン不活性 IPV の吸着は、0.1 mg / 投与量、0.2 mg / 投与量、0.3 mg / 投与量、0.4 mg / 投与量、0.5 mg / 投与量、0.6 mg / 投与量、0.7 mg / 投与量、及び 0.8 mg / 投与量、好ましくは、抗原型あたり 0.1 mg / 投与量 ~ 1.25 mg / 投与量から選択される濃度を有するミョウバン ( $Al^{3+}$ ) 上で、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7 及び 6.8、好ましくは 6.5 から選択される pH にて、行うことができる。

【0053】

第 6 の実施形態の依然として別の態様の 1 つでは、トリスの存在下におけるホルマリン不活性化後の D 抗原の回復率は、50 %、60 %、70 %、又は 80 % の一方であり得、

50

また水酸化アルミニウム吸着後の吸着率は、70%～80%、80%～90%、又は90%～99%、又は95%～99%であり得る。

【0054】

本開示の第7の実施形態によれば、ジフテリア毒素（細菌外毒素）及び破傷風毒素（細菌外毒素）は、それぞれ、コリネバクテリウム・ジフテリア及びクロストリジウム・テタニから得られ、またその後、好適な不活性化法を使用して解毒された。こうして得られたジフテリアトキシソイド（D）及び破傷風トキシソイド（T）を、ゲル濾過クロマトグラフィーを使用して、更に精製した。こうして得られた精製済みDTを、混合ワクチンの配合のために更に使用した。

【0055】

第7の実施形態の態様の1つでは、ジフテリア毒素は、以下の組み合わせのいずれかにおいて、最適な濃度にて、以下の成分からなる半合成培地内で、コリネバクテリウム・ジフテリアエにより生成される。

【0056】

組み合わせ1：

カゼイン加水分解産物、マルトースー水和物、氷酢酸、乳酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、アラニン、ピメリン酸、ニコチン酸、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化第一マンガン、L-シスチン、塩化カルシウム、二水和物、二水素オルトリン酸カリウム、D i 燐酸カリウム、硫酸第一鉄、及びW F I。

【0057】

組み合わせ2：

カゼイン加水分解産物、マルトースー水和物、氷酢酸、乳酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、アラニン、ピメリン酸、ニコチン酸、塩化第一マンガン、L-シスチン、塩化カルシウム、二水和物、二水素オルトリン酸カリウム、D i 燐酸カリウム、硫酸第一鉄、及びW F I。

【0058】

組み合わせ3：

カゼイン加水分解産物、マルトースー水和物、氷酢酸、乳酸ナトリウム、アラニン、ピメリン酸、ニコチン酸、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化第一マンガン、L-シスチン、塩化カルシウム、二水和物、二水素オルトリン酸カリウム、D i 燐酸カリウム、及びW F I。

【0059】

組み合わせ4：

酵母菌抽出物、マルトースー水和物、氷酢酸、乳酸ナトリウム硫酸マグネシウム、アラニン、ピメリン酸、ニコチン酸、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化第一マンガン、L-シスチン、塩化カルシウム、二水和物、二水素オルトリン酸カリウム、D i 燐酸カリウム、硫酸第一鉄、及びW F I。

【0060】

第7の実施形態の第2の態様によれば、破傷風毒素は、以下の組み合わせのいずれかにおいて、最適な濃度にて、以下の成分からなる半合成培地内で、クロストリジウム・テタニにより生成される。

【0061】

組み合わせ1：

カゼイン消化物、塩化カルシウム、D 燐酸カリウム、無水デキストロース、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、リボフラビン、塩酸チアミン、塩酸ピリドキシン、パントテン酸カルシウム、ニコチン酸、L-シスチン、塩化第二鉄、ビタミンB 12 溶液、ピオチン、コンク、H C I、N a O H、無水エタノール、及びW F I。

【0062】

組み合わせ2：

カゼイン消化物、塩化カルシウム、アラニン、D 燐酸カリウム、無水デキストロース、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、リボフラビン、塩酸チアミン、塩酸

10

20

30

40

50

ピリドキシン、パントテン酸カルシウム、ニコチン酸、L - シスチン、塩化第二鉄、ビタミン B 1 2 溶液、ビオチン、コンク、H C I、N a O H、無水エタノール、及び W F I。

【 0 0 6 3 】

組み合わせ 3 :

カゼイン消化物、塩化カルシウム、D 燐酸カリウム、無水デキストロース、塩化ナトリウム、硫酸亜鉛、リボフラビン、塩酸チアミン、塩酸ピリドキシン、パントテン酸カルシウム、ニコチン酸、L - シスチン、塩化第二鉄、ビタミン B 1 2 溶液、ビオチン、コンク、H C I、N a O H、無水エタノール、及び W F I。

【 0 0 6 4 】

組み合わせ 4 :

カゼイン加水分解産物物、塩化カルシウム、D 燐酸カリウム、無水デキストロース、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化第一マンガン、リボフラビン、塩酸チアミン、塩酸ピリドキシン、パントテン酸カルシウム、ニコチン酸、L - シスチン、塩化第二鉄、ビタミン B 1 2 溶液、ビオチン、コンク、H C I、N a O H、無水エタノール、及び W F I。

【 0 0 6 5 】

第 7 の実施形態の依然として別の態様では、ジフテリア毒素及び破傷風毒素は、加熱、UV、ホルマリン / ホルムアルデヒド、アセチルエチレンジアミン等を含む以下の不活性化法のうちの 1 つ又は組み合わせを使用して、解毒される。

【 0 0 6 6 】

本開示の第 8 の実施形態によれば、混合ワクチン組成物に使用される肝炎 ( H e P ) 抗原は、B 型肝炎株 ( H B s A g ) の表面由来の H e P 抗原からなる。

【 0 0 6 7 】

第 8 の実施形態の一態様では、H B s A g は、以下の方法のうちの 1 つにより作製することができる。

H B V 感染の間に大量の H B s A g が肝臓で合成されて、血流内へと放出される際に、慢性 B 型肝炎キャリアの血漿から、粒子形態にて抗原を精製することによる。

組み換え DNA 法により、タンパク質を発現させる。

【 0 0 6 8 】

本開示の第 9 の実施形態によれば、ジフテリアトキソイド ( D )、破傷風トキソイド ( T )、及び B 型肝炎表面抗原 ( H B s A g ) は、水酸化アルミニウム ( A l ( O H ) <sub>3</sub> ) 若しくはリン酸アルミニウム ( A l P O <sub>4</sub> ) などのアルミニウム塩 ( A l <sup>3+</sup> )、ミョウバン、リン酸カルシウム、M P L A、3 D - M P L、Q S 2 1、C p G 含有オリゴデオキシヌクレオチド補助剤、リポソーム、若しくは水中油型エマルジョン、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される補助剤上に、個別に吸着される。

【 0 0 6 9 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D )、破傷風トキソイド ( T )、及び B 型肝炎表面抗原 ( H B s A g ) は、リン酸アルミニウム上に個別に吸着される。第 9 の実施形態の一態様では、ジフテリアトキソイド ( D ) 抗原は、少なくとも 5 0 % の吸着率を有するリン酸アルミニウム上に吸着された。第 9 の実施形態の別の態様では、破傷風トキソイド ( T ) 抗原は、少なくとも 4 0 % の吸着率を有するリン酸アルミニウム上に吸着された。

【 0 0 7 0 】

第 9 の実施形態の依然として別の態様では、B 型肝炎表面抗原 ( H B s A g ) は、少なくとも 7 0 % の吸着率を有するリン酸アルミニウム上に吸着された。

【 0 0 7 1 】

本開示の第 1 0 の実施形態によれば、本開示の混合ワクチンに使用される H i b 抗原は、H i b b 株 7 6 0 7 0 5 の莢膜多糖類由来である。

【 0 0 7 2 】

第 1 0 の実施形態の一態様によれば、H i b b P R P 抗原は、C R M 1 9 7、ジフテリアトキソイド、ナイセリア髄膜炎外膜複合体、破傷風トキソイドのフラグメント C、百

10

20

30

40

50

日咳トキソイド、インフルエンザ菌のタンパク質D、大腸菌LT、大腸菌ST、及び緑膿菌からの細菌外毒素A、外膜複合体c(OMPc)、ポリリン、トランスフェリン結合タンパク質、プノイモリジン、肺炎球菌表面タンパク質A(PspA)、肺炎球菌表面アドヘシンA(PsaA)、肺炎球菌PhtD、肺炎球菌表面タンパク質BVH-3及びBVH-11、炭疽菌の感染防御抗原(PA)並びに炭疽菌の解毒浮腫因子(EF)及び致死因子(LF)、卵白アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン(BSA)、及びツベルクリンの精製タンパク質誘導体(PPD)、合成ペプチド、熱ショックタンパク質、百日咳タンパク質、サイトカイン、リンホカイン、ホルモン、成長因子、N19などの種々の病原体由来抗原からの複数のヒトCD4+T細胞エピトープを含む人工タンパク質、鉄取込みタンパク質、C.ディフィシル由来のトキシンA又はB、及びS.アガラクタアタンパク質、からなるが、これらに限定されない担体タンパク質の群から選択される担体タンパク質に、共役される。

10

#### 【0073】

依然として好ましくは、Hib b PRP抗原は、CNBr化学作用、還元アミノ化化学作用、シアニル化化学作用、又は既に開示されているKniskernら、Ellisらの「Conjugation: design chemistry, and analysis」、「Development and clinical uses of Haemophilus b conjugate vaccines」(ニューヨーク州:マーセル・デッカー社(Marcel Dekker), 1994年:37-69)の任意のその他の化学作用により、破傷風トキソイド(TT)に共役される。

20

#### 【0074】

第10の実施形態の第2の態様によれば、担体タンパク質は、本開示の組成物中に遊離形態及び共役形態の両方にて存在し、非共役形態は、好ましくは、全体として、組成物中の担体タンパク質の総量の20%以下、またより好ましくは、5重量%未満で存在する。

#### 【0075】

第10の実施形態の第3の態様によれば、Hib抗原は、いかなる補助剤上にも実質的に吸着されない。

#### 【0076】

第10の実施形態の第4の態様によれば、Hib抗原は、いかなる補助剤上への故意又は意図的な吸着をも施され得ない。

30

#### 【0077】

本開示の第11の実施形態によれば、本開示の混合ワクチン組成物に使用される全細胞百日咳(wP)抗原の調製物は、好ましくは、特定の比率で混合され、かつその後、チメロサルを欠き、従って減少された反応性及び増大した潜在能をもたらす向上した不活性化法を利用することにより不活性化され、またアルミニウム系補助剤上に吸着され得る、又は吸着され得ない、百日咳菌株134、509、25525、及び6229から作製される。

#### 【0078】

第11の実施形態の一態様によれば、本開示の混合ワクチン組成物に使用される全細胞百日咳(wP)抗原の調製物は、好ましくは、1:1:0.25:0.25の比率で混合された百日咳菌株134、509、25525、及び6229から作製される。

40

#### 【0079】

第11の実施形態の第2の態様によれば、本開示の混合ワクチン組成物に使用される全細胞百日咳(wP)抗原の調製物は、加熱、UV、ホルマリン/ホルムアルデヒド、アセチルエチレンジイミン等を含む1種以上の以下の不活性化処置を使用して、不活性化された。

#### 【0080】

依然として好ましくは、混合ワクチン組成物に使用される全細胞百日咳(wP)抗原の調製物は、加熱と化学処理との組み合わせを使用して不活性化された。依然として好ましくは、ホルムアルデヒドの存在下で、 $56 \pm 2$ にて、10~15分間での加熱不活性化では、wPバルクは非塊状に留まり、また容易に均質化され、それにより、減少された反

50

応源性をもたらして、長期持続時間のためのより良好なw P 潜在能を所与する。

【 0 0 8 1 】

第 1 1 の実施形態の第 3 の態様によれば、混合ワクチン組成物に使用される全細胞百日咳 ( w P ) 抗原の調製物は、 ( 例えば、存在する場合、その他の成分との混合の前後において ) 水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、又はこれらの組み合わせなどのアルミニウム系補助剤上に吸着され得る、又は吸着され得ない。吸着された場合、 1 種以上の w P 株 ( 即ち、 1 3 4、 5 0 9、 2 5 5 2 5、及び 6 2 2 9 ) は、別個に又は混合物として一緒に吸着され得る。

【 0 0 8 2 】

本開示の第 1 2 の実施形態によれば、ジフテリアトキソイド ( D ) は 1 ~ 4 0 L f の範囲の量であり、破傷風トキソイド ( T ) は 4 ~ 2 5 L f の範囲の量であり、w P は 0 . 5 m l あたり 4 ~ 3 0 I O U の範囲の量であり、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、 0 . 5 m l あたり 1 ~ 2 0 µ g の P R P 含有量の範囲の量であり、H B s A g 抗原は、 0 . 5 m l あたり 1 ~ 2 0 µ g の範囲の量であり、 1 型、 2 型、及び 3 型を含むサービン I P V は、 1 型では 1 ~ 5 0 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、 2 型では 1 ~ 2 0 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、また 3 型では 1 ~ 5 0 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、かつ追加的に、最終の混合ワクチン組成物 / 配合物中にアルミニウム系補助剤及び防腐剤を含む。

10

【 0 0 8 3 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 5 L f の量である。

20

【 0 0 8 4 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 0 L f の量である。

【 0 0 8 5 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 1 0 L f の量である。

【 0 0 8 6 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド ( T ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 1 0 L f の量である。

30

【 0 0 8 7 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド ( T ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 4 L f の量である。

【 0 0 8 8 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド ( T ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 L f の量である。

【 0 0 8 9 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 6 I O U の量である。

【 0 0 9 0 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 4 I O U の量である。

40

【 0 0 9 1 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 2 I O U の量である。

【 0 0 9 2 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、 0 . 5 m l あたり約 1 3 µ g の P R P 含有量の量である。

【 0 0 9 3 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、 0 . 5 m l あた

50



り約 10  $\mu$ g の P R P 含有量の量である。

【 0 0 9 4 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0.5 ml あたり約 8  $\mu$ g の P R P 含有量の量である。

【 0 0 9 5 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0.5 ml あたり約 15  $\mu$ g の量である。

【 0 0 9 6 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0.5 ml あたり約 10  $\mu$ g の量である。

【 0 0 9 7 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0.5 ml あたり約 8  $\mu$ g の量である。

【 0 0 9 8 】

依然として好ましくは、1 型、2 型、及び 3 型株を含むサービン不活性ポリオワクチン ( s I P V ) は、最終の混合ワクチン組成物中で、それぞれ、0.5 ml あたり約 40 D U、8 D U、及び 32 D U の量にて存在する。

【 0 0 9 9 】

本開示の第 13 の実施形態によれば、ジフテリアトキソイド ( D ) は 1 ~ 40 L f の範囲の量であり、破傷風トキソイド ( T ) は 4 ~ 25 L f の範囲の量であり、w P は 0.5 ml あたり 4 ~ 30 I O U の範囲の量であり、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0.5 ml あたり 1 ~ 20  $\mu$ g の P R P 含有量の範囲の量であり、H B s A g 抗原は、0.5 ml あたり 1 ~ 20  $\mu$ g の範囲の量であり、マホニー 1 型、M E F 2 型、及びソーケット 3 型株を含むサーク不活性ポリオウイルス ( I P V ) は、マホニー 1 型では 1 ~ 50 D U / 0.5 ml の量にて含有され、M E F 2 型では 1 ~ 20 D U / 0.5 ml の量にて含有され、またソーケット 3 型では 1 ~ 50 D U / 0.5 ml の量にて含有され、かつ追加的に、最終の混合ワクチン組成物 / 配合物中にアルミニウム系補助剤及び防腐剤を含む。

【 0 1 0 0 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 25 L f の量である。

【 0 1 0 1 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 20 L f の量である。

【 0 1 0 2 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 10 L f の量である。

【 0 1 0 3 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド ( T ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 10 L f の量である。

【 0 1 0 4 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド ( T ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 4 L f の量である。

【 0 1 0 5 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド ( T ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 L f の量である。

【 0 1 0 6 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0.5 ml あたり約 16 I O U の量である。

【 0 1 0 7 】

10

20

30

40

50

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 4 I O U の量である。

【 0 1 0 8 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 2 I O U の量である。

【 0 1 0 9 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり約 1 3  $\mu$  g の P R P 含有量の量である。

【 0 1 1 0 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり約 1 0  $\mu$  g の P R P 含有量の量である。

10

【 0 1 1 1 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり約 8  $\mu$  g の P R P 含有量の量である。

【 0 1 1 2 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 5  $\mu$  g の量である。

【 0 1 1 3 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 0  $\mu$  g の量である。

20

【 0 1 1 4 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 8  $\mu$  g の量である。

【 0 1 1 5 】

依然として好ましくは、マホニー 1 型、M E F 2 型、及びソーケット 3 型株を含むサーク不活性ポリオワクチン ( s I P V ) は、最終の混合ワクチン組成物中で、それぞれ、0 . 5 m l あたり約 4 0 D U、8 D U、及び 3 2 D U の量にて存在する。

【 0 1 1 6 】

本開示の第 1 4 の実施形態によれば、ジフテリアトキソイドは 1 ~ 4 0 L f の範囲の量であり、破傷風トキソイドは 4 ~ 2 5 L f の範囲の量であり、w P は 0 . 5 m l あたり 4 ~ 3 0 I O U の範囲の量であり、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり 1 ~ 2 0  $\mu$  g の P R P 含有量の範囲の量であり、H e P 抗原は、0 . 5 m l あたり 1 ~ 2 0  $\mu$  g の範囲の量であり、1 型、2 型、及び 3 型を含む、混合ワクチン組成物に使用される投与量低減サービン不活性ポリオワクチン ( s I P V ) は、1 型では 2 . 5 ~ 1 0 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、2 型では 5 ~ 2 0 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、また 3 型では 1 ~ 2 0 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、かつ追加的に、最終の混合ワクチン組成物 / 配合物中にアルミニウム系補助剤及び防腐剤を含む。

30

【 0 1 1 7 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 5 L f の量である。

40

【 0 1 1 8 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 0 L f の量である。

【 0 1 1 9 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド ( D ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 1 0 L f の量である。

【 0 1 2 0 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド ( T ) は、最終の混合ワクチン組成物中で約 1 0 L f の量である。

【 0 1 2 1 】

50

依然として好ましくは、破傷風トキソイド（Ｔ）は、最終の混合ワクチン組成物中で約 4 L f の量である。

【 0 1 2 2 】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド（Ｔ）は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 L f の量である。

【 0 1 2 3 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 6 I O U の量である。

【 0 1 2 4 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 4 I O U の量である。

【 0 1 2 5 】

依然として好ましくは、w P は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 2 I O U の量である。

【 0 1 2 6 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり約 1 3  $\mu$  g の P R P 含有量の量である。

【 0 1 2 7 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり約 1 0  $\mu$  g の P R P 含有量の量である。

【 0 1 2 8 】

依然として好ましくは、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり約 8  $\mu$  g の P R P 含有量の量である。

【 0 1 2 9 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 5  $\mu$  g の量である。

【 0 1 3 0 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 1 0  $\mu$  g の量である。

【 0 1 3 1 】

依然として好ましくは、H B s A g 抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で 0 . 5 m l あたり約 8  $\mu$  g の量である。

【 0 1 3 2 】

依然として好ましくは、1 型、2 型、及び 3 型株を含む投与量低減サービン不活性ポリオワクチン（s I P V）は、最終の混合ワクチン組成物中で、それぞれ、0 . 5 m l あたり約 5 D U、1 6 D U、及び 1 0 D U の量にて存在する。

【 0 1 3 3 】

本開示の第 1 5 の実施形態によれば、ジフテリアトキソイドは 1 ~ 4 0 L f の範囲の量であり、破傷風トキソイドは 4 ~ 2 5 L f の範囲の量であり、w P は 0 . 5 m l あたり 4 ~ 3 0 I O U の範囲の量であり、インフルエンザ B 型菌 P R P - T T 共役体は、0 . 5 m l あたり 1 ~ 2 0  $\mu$  g の P R P 含有量の範囲の量であり、H e P 抗原は、0 . 5 m l あたり 1 ~ 2 0  $\mu$  g の範囲の量であり、マホニー 1 型、M E F 2 型、及びソーケット 3 型株を含む投与量低減サーク不活性ポリオワクチンは、マホニー 1 型では 5 ~ 1 5 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、M E F 2 型では 1 ~ 1 8 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、またソーケット 3 型では 5 ~ 1 5 D U / 0 . 5 m l の量にて含有され、かつ追加的に、最終の混合ワクチン組成物 / 配合物中にアルミニウム系補助剤及び防腐剤を含む。

【 0 1 3 4 】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド（D）は、最終の混合ワクチン組成物中で約 2 5 L f の量である。

【 0 1 3 5 】

10

20

30

40

50

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド（D）は、最終の混合ワクチン組成物中で約20Lfの量である。

【0136】

依然として好ましくは、ジフテリアトキソイド（D）は、最終の混合ワクチン組成物中で約10Lfの量である。

【0137】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド（T）は、最終の混合ワクチン組成物中で約10Lfの量である。

【0138】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド（T）は、最終の混合ワクチン組成物中で約4Lfの量である。

【0139】

依然として好ましくは、破傷風トキソイド（T）は、最終の混合ワクチン組成物中で約2Lfの量である。

【0140】

依然として好ましくは、wPは、最終の混合ワクチン組成物中で0.5mlあたり約16IOUの量である。

【0141】

依然として好ましくは、wPは、最終の混合ワクチン組成物中で0.5mlあたり約14IOUの量である。

【0142】

依然として好ましくは、wPは、最終の混合ワクチン組成物中で0.5mlあたり約12IOUの量である。

【0143】

依然として好ましくは、インフルエンザB型菌PRP-TT共役体は、0.5mlあたり約13μgのPRP含有量の量である。

【0144】

依然として好ましくは、インフルエンザB型菌PRP-TT共役体は、0.5mlあたり約10μgのPRP含有量の量である。

【0145】

依然として好ましくは、インフルエンザB型菌PRP-TT共役体は、0.5mlあたり約8μgのPRP含有量の量である。

【0146】

依然として好ましくは、HBsAg抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で0.5mlあたり約15μgの量である。

【0147】

依然として好ましくは、HBsAg抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で0.5mlあたり約10μgの量である。

【0148】

依然として好ましくは、HBsAg抗原は、最終の混合ワクチン組成物中で0.5mlあたり約8μgの量である。

【0149】

依然として好ましくは、マホニー1型、MEF2型、及びソーケット3型株を含む投与量低減サーク不活性ポリオワクチンは、最終の混合ワクチン組成物中で、それぞれ、0.5mlあたり約10DU、2DU、及び10DUの量にて存在する。

【0150】

本開示の第16の実施形態によれば、最終の混合ワクチン組成物の1種以上の抗原は、いかなる補助剤上にも実質的に吸着されない場合がある。

【0151】

本開示の第17の実施形態によれば、組成物は、水酸化アルミニウム（Al（OH）<sub>3</sub>）

10

20

30

40

50

）若しくはリン酸アルミニウム（ $\text{AlPO}_4$ ）などのアルミニウム塩（ $\text{Al}^{3+}$ ）、ミョウバン、リン酸カルシウム、MPLA、3D-MPL、QS21、CpG含有オリゴデオキシヌクレオチド補助剤、リボソーム、又は水中油型エマルジョンからなる群から選択される、1種以上の補助剤を含む。

【0152】

依然として好ましくは、組成物は、補助剤としてリン酸アルミニウム（ $\text{AlPO}_4$ ）を含む。

【0153】

第17の実施形態の一態様では、最終配合物の抗原は、その場でのリン酸アルミニウムゲル、又は既製のリン酸アルミニウムゲル、又はこれらの組み合わせ上に吸着され得る。

10

【0154】

第17の実施形態の好ましい一態様では、本開示の組成物は、 $2.5\text{ mg} / 0.5\text{ ml}$ 以下の補助剤、及び具体的には、 $1.5\text{ mg} / 0.5\text{ ml} \sim 0.1\text{ mg} / 0.5\text{ ml}$ の量の補助剤を含み得る。

【0155】

依然として第17の実施形態の別の好ましい一態様では、最終の混合ワクチン組成物 / 配合物中のアルミニウム含有量（ $\text{Al} + 3$ ）は、 $0.5\text{ ml}$ あたり $1.25\text{ mg}$ 超ではない場合があり、好ましくは $0.5\text{ ml}$ あたり $1\text{ mg}$ 、また最も好ましくは $0.5\text{ ml}$ あたり $0.1\text{ mg} \sim 0.5\text{ ml}$ あたり $0.63\text{ mg}$ の量であり得る。

【0156】

20

本開示の第18の実施形態によれば、混合ワクチン組成物 / 配合物は、2-フェノキシエタノール、塩化ベンゼトニウム（フェメロール）、フェノール、チオメルサル、ホルムアルデヒド、メチル及びプロピルパラベン、若しくはベンジルアルコール、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される防腐剤を含んでよい。依然として好ましくは、混合ワクチン組成物 / 配合物は、防腐剤として2-フェノキシエタノール（2-POE）を含んでよい。

【0157】

本発明の別の一態様によれば、本発明の混合ワクチン中の2-フェノキシエタノールの量は、好ましくは $3.5\text{ mg} / 0.5\text{ ml}$ 超ではない場合があり、より好ましくは $3.0\text{ mg} / 0.5\text{ ml}$ 、また最も好ましくは $2.5\text{ mg} / 0.5\text{ ml}$ である。

30

【0158】

本開示の第19の実施形態によれば、本開示の混合ワクチン組成物 / 配合物は、糖及びポリオール、界面活性剤、ポリマー、塩、アミノ酸、pH変性剤（ワクチン組成物のpHを調節する）等からなる群から選択される、製薬上許容できる賦形剤を含んでよい。使用される糖及びポリオールの例としては、スクロース、トレハロース、ラクトース、マルトース、ガラクトース、マンニトール、ソルビトール、グリセロール等を挙げてよい。界面活性剤の例としては、ポリソルベート20、ポリソルベート80等などの非イオン性界面活性剤を挙げてよい。ポリマーの例としては、デキストラン、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、シクロデキストリン等を挙げてよい。塩の例としては、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 等を挙げてよい。アミノ酸の例としては、アルギニン、グリシン、ヒスチジン等を挙げてよい。pH変性剤の例としては、水酸化ナトリウム、塩酸等を挙げてよい。

40

【0159】

本開示の第20の実施形態によれば、当該混合ワクチンは、凍結乾燥配合物又は液体配合物であり得、好ましくは液体配合物である。

【0160】

本開示の第21の実施形態によれば、当該混合ワクチンは、摂氏 $2 \sim 8$ にて $12 \sim 36$ ヶ月、摂氏 $25$ にて $2 \sim 6$ ヶ月、摂氏 $37$ にて1週間～4週間安定し得、 $\text{pH} 6.0 \sim \text{pH} 7.0$ の範囲、より好ましくは $\text{pH} 6.2 \sim \text{pH} 6.8$ の範囲、また最も好ましくは $\text{pH} 6.3 \sim \text{pH} 6.7$ の範囲の最終pHを有する。

50

## 【0161】

本開示の第22の実施形態によれば、向上した免疫原性及び減少された反応性を伴う安定した多価ワクチンは、ワクチンが以下に開示されたプロセス、i) 個々の抗原の作製プロセス、ii) 抗原の添加の順序、iii) 特定の抗原に関する、特定の量での特定の補助剤の使用、iv) 補助剤上への抗原の個々の吸着又は組み合わせられた吸着、v) 補助剤上への抗原の吸着の程度、vi) 最小ミョウバン濃度の使用、vii) 最適な濃度及び防腐剤種類の使用、並びにviii) 攪拌、温度、及びpHを含む種々のパラメータの使用を考慮に入れて、これらにより製造される場合に得ることができる、ということを申請者は見出した。

## 【0162】

SIIPPL混合ワクチンにて使用される株の生物源：  
ジフテリアトキソイド：

コリネバクテリウム・ジフテリアエPW8 CN2000株を、National Control Authority Central Research Institute (C.R.I.) (Kasauli, Himachal Pradesh, インド) により、凍結乾燥形態にて、1973年にWellcome Research Laboratory (ロンドン、英国) から入手した。株を受領して、C.R.I. Kasauliにおいて、Master Seed Lot - C、ジフテリアエCN2000A1下で更に冷凍乾燥させた。

## 【0163】

破傷風トキソイド：

クロストリジウム・テタニ株ハーバード株No. 49205を、National Control Authority C.R.I. Kasauliにより、凍結乾燥形態にて、Rijks Instituut Voor de Volksgezondheid (オランダ) から入手した。

## 【0164】

百日咳：

SIIPPLでの百日咳ワクチンバルクの製造は、4種の百日咳菌株、即ち、134、509、6229、及び25525株の使用を伴う。134株及び509株のMaster Seedは、元々、Rijks Instituut (オランダ) からのものであり、National Control Authority, Central Research Institute (Kasauli, Himachal Pradesh, インド) を介して入手したものである。6229株及び25525株のMaster Seedは、元々、Lister Institute (イングランド) からのものである。

## 【0165】

B型肝炎：

Rhein Biotech (ドイツ) は、HBsAg表面抗原遺伝子を含有する組換え型ハンゼヌラ・ポリモルファ株を作製した。Rhein Biotechはまた、Master Cell Bank (MCBハンゼヌラ・ポリモルファK3/8-1株ADW, 12/94) を作成し、また本バンクにおいて全ての特性試験を実施した。

## 【0166】

インフルエンザB型菌：

細胞基質発生に関する微生物源は、インフルエンザb型菌760705株である。株は、元々、1976年11月に、2歳2ヶ月の男児(1974年8月14日生まれ) から隔離された。株の3つの継代は、Academic Medical Centre (AMC), University of Amsterdamにおいて、-70にて貯蔵される前に発生した。本株は、SIIPPLとNetherlands Vaccines Institute (NVI, オランダ) との間の共同研究の一部として、SIIPPLへと移された。

## 【0167】

I P V :

株及びポリオウイルス源を、以下に所与する。

ポリオウイルス 1 型 :

株 : マホニー型

供給元 : Dr . J . S a l k ( P i t m a n & M o o r e c o m p a n y )

ポリオウイルス 2 型 :

株 : M E F 1 型

供給元 : S t a t e n s S e r u m I n s t i t u t e ( コペンハーゲン )

ポリオウイルス 3 型 :

株 : ソーケット型

供給元 : S t a t e n s S e r u m I n s t i t u t e ( コペンハーゲン )

10

【 0 1 6 8 】

本明細書全体を通して、用語「含む ( c o m p r i s e )」、又は「含む ( c o m p r i s e s )」若しくは「含む ( c o m p r i s i n g )」などの変形形態は、述べられた要素、整数若しくは工程、又は要素、整数若しくは工程の群の包含を意味するが、いずれのその他の要素、整数若しくは工程、又は要素、整数若しくは工程の群の除外をも意味するものではない、と理解されよう。

【 0 1 6 9 】

表現「少なくとも ( a t l e a s t )」又は「少なくとも 1 つ ( a t l e a s t o n e )」の使用は、1 つ以上の所望の目的又は結果を達成するために本発明の実施形態において使用され得る際に、1 つ以上の要素又は成分又は量の使用を示唆するものである。本発明の特定の実施形態が記載されている一方で、これらの実施形態は、例示目的のみにより提示されており、また本発明の範囲を制限することを意図するものではない。本発明の範囲内の、本発明の配合に対する変形形態又は変更は、本明細書の開示の考察の際に、当業者に対して発生し得るものである。このような変形形態又は変更は、本発明の精神において適切である。

20

【 0 1 7 0 】

種々の物理的パラメータ、寸法、及び量に関して所与される数値は、おおよその値のみであり、また物理的パラメータ、寸法、及び量に対して指定された数値よりも高い値は、本明細書中で特に異議を唱えない限り、本発明の範囲内に収まるものと見なされる。

30

【 0 1 7 1 】

考慮すべき強調が、本明細書における好ましい実施形態の特定の特徴においてなされてきたが、本開示の原理を逸脱することなく、好ましい実施形態において多くの追加の特徴が追加され得、かつ多くの変更がなされ得ることを、理解されよう。本開示の好ましい実施形態におけるこれらの及びその他の変更は、本明細書の開示から当業者には明白であり、それにより、前述の記述事項が、単に本開示の例示として解釈され、かつ限定されるものではないことが、明確に理解されよう。

【 0 1 7 2 】

利点

上記で本明細書に記載された本開示は、D、T、w P、H B s A g、H i b P R P - T T 共役体、及び I P V を含む混合ワクチン組成物の実現、並びにそれらの製造方法を含むがこれらに限定されない、幾つかの技術的進歩及び利点を有する。その他の混合ワクチン組成物と比較した場合、本開示は、以下の利点を提供する。

40

1 . 完全な液体混合ワクチン

2 . 向上した免疫原性

3 . 減少された反応源性

4 . 1 2 ヶ月にわたって試験した、2 ~ 8 及び室温における向上した安定性

5 . 伝播性海綿様脳症 ( T S E ) 又はウシ海綿状脳症 ( B S E ) を含まない、半合成培地を使用して生成された、高度に精製されたジフテリアトキソイド ( D ) 及び破傷風トキソイド ( T ) 。

50

6. 全細胞B型百日咳(wP)抗原は、1:1:0.25:0.25の比率にて、百日咳菌株134、509、25525、及び6229を含み、それにより、B型百日咳に対する潜在能及び免疫原性を向上させる。加熱とホルムアルデヒド不活性化とを組み合わせで使用した、全細胞B型百日咳(wP)成分の不活性化の向上した方法。

7. 本プロセスはチメロサルを欠き、かつ不活性全細胞百日咳抗原が塊状ではなく均質な状態に留まり、それにより、減少された反応性をもたらし、かつより長い持続時間に対するより良好な洗剤能を所与する。

8. 総インフルエンザb型菌PRP-TT共役体バルクにおける、低遊離PRP(7%未満)。

9. リン酸アルミニウム補助剤上に個別に吸着され、それにより、潜在能及び免疫原性を向上させる、ジフテリアトキソイド抗原(D)、破傷風トキソイド(T)抗原、及びB型肝炎(HePB)表面抗原の向上した吸着プロファイル。

10. 総ミョウバン含有量(A1=+3)が最小であり、それにより、減少された反応性を確実にする。

11. 防腐剤として2-フェノキシエタノール(2-PE)の最適濃度。

#### 【実施例】

#### 【0173】

本発明の好ましい実施形態を実証するために、以下の実施例が含まれる。代表する技術に従った実施例に開示されている組成物及び技術は、本発明者により発見され、本発明の実施に際して良好に機能し、また従って、その実施に関して好ましい様式を構成すると考えることができると、当業者により理解されなければならない。しかし、当業者は、本開示の見地から、開示されている特定の実施形態において多くの変更を行うことができ、かつ依然として、本発明の精神及び範囲から逸脱することなしに、同様の又は類似した結果を得ることができる、と理解しなければならない。

#### 【0174】

実施例1:

#### 【0175】

10

20

30

40

50



【表 1】

表 1：本表は、12ヶ月にわたった、2～8℃での、S I I P L混合ワクチンにおける個々の抗原の吸着率、個々の抗原の潜在能及び安定性プロファイルの概要を所与する

試験	制限/規格	0日	6ヶ月	12ヶ月
B型肝炎 生体内潜在能R.P (95% CL)	NLT1.0	適合	NA	適合
Hib PRP含有量 (μg/0.5ml) (総PRP)	実際値	8.1 μg/0.5 ml	8.46 μg/0.5ml	10.03
ジフテリア成分潜在能 (IU/投与量)	NLT 30IU/投与量	98.5120IU/投与量 (69.9650-137.247)	NA	95.8463 IU/投与量
破傷風成分潜在能 (IU/投与量)	NLT 40IU/投与量	139.030IU/投与量 (88.2850-208.688)	NA	382.079 IU/投与量
百日咳成分潜在能 (IU/投与量)	NLT 4IU/投与量	4.6749IU/投与量 (2.6492-8.2763)	4.8410IU/投与量 (2.7331-8.6081)	5.131
B型肝炎の吸着 (%)	実際値	89.44	82.65	75.52
吸着： 破傷風成分 (%)	実際値	59.0	41.0	NA
吸着： ジフテリア成分 (%)	実際値	79.0	72.0	NA
D抗原 (DU/0.5ml)	1型=40DU/0.5ml、2型=8DU/0.5ml、及び3型=32DU/0.5ml (=75%の公称値が許容可能)	適合	適合	適合

NA = 無効

【 0 1 7 6 】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 2：12ヶ月にわたった、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ での、混合ワクチンにおける個々の抗原の吸着率、個々の抗原の潜在能及び安定性プロファイルの概要

試験	制限/規格	0日	6ヶ月	12ヶ月
B型肝炎 生体内潜在能R.P (95%CL)	NLT1.0	適合	N.A	適合
Hib PRP含有量 ( $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$ ) (総P RP)	実際値	$8.6 \mu\text{g}/0.5\text{ml}$	$8.20 \mu\text{g}/0.5\text{ml}$	NA
ジフテリア成分潜在能 (IU/投与量)	NLT 30IU/投与量	98.5120IU/投与量 (69.9650–137.247)	N.A	96.5482IU/投与量 (65.9292–137.687)
破傷風成分潜在能 (IU/投与量)	NLT 40IU/投与量	139.030IU/投与量 (88.2850–208.688)	N.A	N.A
百日咳成分潜在能 (IU/投与量)	NLT 4IU/投与量	4.6749IU/投与量 (2.6492–8.2763)	4.5170IU/投与量 (2.4894–8.2672)	3.4899IU/投与量 (1.8699–6.4750)
B型肝炎の吸着 (%)	実際値	89.44	83.92	83.00
吸着： 破傷風成分 (%)	実際値	59.0	31.0	40.0
吸着： ジフテリア成分 (%)	実際値	79.0	72.0	69.0
D抗原 (DU/0.5ml)	1型=40DU/0.5ml、2型=8DU/0.5ml、及び3型=32DU/0.5ml (=75%の公称値が許容可能)	適合	適合	適合

NA = 無効

## 【0177】

実施例 2：

本実施例は、種々の混合ワクチン組成物における概要を所与する。

## 【0178】

10

20

30

40

50

## 【表 3】

表 3：混合ワクチン組成物 1

Sr. NO.	配合物成分	抗原単位/0.5ml投与量
1	ジフテリアトキソイド(D)	10-25Lf
2	破傷風トキソイド(T)	02-10Lf
3	不活性百日咳B型抗原(wP)	12-1610U
4	HBs抗原	7-15 $\mu$ g
5	Hib PRP-TT共役体抗原	7-13 $\mu$ gのPRP
6	IPV1型(D抗原単位)	40
	2型(D抗原単位)	8
	3型(D抗原単位)	32
7	リン酸アルミニウム( $Al^{3+}$ )上の吸着	0.6mg以下
8	2-フェノキシエタノール	2.5mg
9	塩化ナトリウム	4.5mg

10

## 【0179】

## 【表 4】

表 4：混合ワクチン組成物 2

Sr. NO.	配合物成分	抗原単位/0.5ml投与量
1	ジフテリアトキソイド(D)	10-25Lf
2	破傷風トキソイド(T)	02-10Lf
3	不活性百日咳B型抗原(wP)	12-1610U
4	HBs抗原	7-15 $\mu$ g
5	Hib PRP-TT共役体抗原	7-13 $\mu$ gのPRP
6	IPV1型(D抗原単位)	40
	2型(D抗原単位)	8
	3型(D抗原単位)	32
7	リン酸アルミニウム( $Al^{3+}$ )上の吸着	0.6mg以下
8	塩化ナトリウム	4.5mg

20

30

## 【0180】

40

50

## 【表 5】

表 5 : 混合ワクチン組成物 3

Sr. NO.	配合物成分	抗原単位/0.5ml投与量
1	ジフテリアトキソイド(D)	10Lf
2	破傷風トキソイド(T)	02Lf
3	不活性百日咳B型抗原(wP)	1210U
4	HBs抗原	8 $\mu$ g
5	Hib PRP-TT共役体抗原	8 $\mu$ gのPRP
6	IPV1型(D抗原単位)	40
	2型(D抗原単位)	8
	3型(D抗原単位)	32
7	リン酸アルミニウム(Al <sup>3+</sup> )上の吸着	0.6mg以下
8	2-フェノキシエタノール	2.5mg
9	塩化ナトリウム	4.5mg

10

## 【0181】

## 【表 6】

表 6 : 混合ワクチン組成物 4

Sr. NO.	配合物成分	抗原単位/0.5ml投与量
1	ジフテリアトキソイド(D)	10Lf
2	破傷風トキソイド(T)	02Lf
3	不活性百日咳B型抗原(wP)	1210U
4	HBs抗原	8 $\mu$ g
5	Hib PRP-TT共役体抗原	8 $\mu$ gのPRP
6	IPV1型(D抗原単位)	40
	2型(D抗原単位)	8
	3型(D抗原単位)	32
7	リン酸アルミニウム(Al <sup>3+</sup> )上の吸着	0.6mg以下
8	塩化ナトリウム	4.5mg

20

30

## 【0182】

40

50

## 【表 7】

表 7 : 混合ワクチン組成物 5

Sr. NO.	配合物成分	抗原単位/0.5ml投与量
1	ジフテリアトキソイド(D)	20Lf
2	破傷風トキソイド(T)	04Lf
3	不活性百日咳B型抗原(wP)	1410U
4	HBs抗原	15 $\mu$ g
5	Hib PRP-TT共役体抗原	10 $\mu$ gのPRP
6	IPV1型(D抗原単位)	40
	2型(D抗原単位)	8
	3型(D抗原単位)	32
7	リン酸アルミニウム(Al <sup>3+</sup> )上の吸着	0.6mg以下
8	2-フェノキシエタノール	2.5mg
9	塩化ナトリウム	4.5mg

10

## 【0183】

## 【表 8】

表 8 : 混合ワクチン組成物 6

Sr. NO.	配合物成分	抗原単位/0.5ml投与量
1	ジフテリアトキソイド(D)	20Lf
2	破傷風トキソイド(T)	04Lf
3	不活性百日咳B型抗原(wP)	1410U
4	HBs抗原	15 $\mu$ g
5	Hib PRP-TT共役体抗原	10 $\mu$ gのPRP
6	IPV1型(D抗原単位)	40
	2型(D抗原単位)	8
	3型(D抗原単位)	32
7	リン酸アルミニウム(Al <sup>3+</sup> )上の吸着	0.6mg以下
8	塩化ナトリウム	4.5mg

20

30

## 【0184】

## 【表 9】

表 9 : 混合ワクチン組成物 7

Sr. NO.	配合物成分	抗原単位/0.5ml投与量
1	ジフテリアトキソイド(D)	25Lf
2	破傷風トキソイド(T)	10Lf
3	不活性百日咳B型抗原(wP)	1610U
4	HBs抗原	15 $\mu$ g
5	Hib PRP-TT共役体抗原	13 $\mu$ gのPRP
6	IPV1型(D抗原単位)	40
	2型(D抗原単位)	8
	3型(D抗原単位)	32
7	リン酸アルミニウム(Al <sup>3+</sup> )上の吸着	0.6mg以下
8	塩化ナトリウム	4.5mg

40

50

## 【 0 1 8 5 】

ワクチンは、製造プロセス中に使用される、微量のグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、ネオマイシン、ストレプトマイシン、及びポリミキシンBを含有し得る。

## 【 0 1 8 6 】

実施例 3 :

インフルエンザ b 型菌共役体バルクの製造プロセス

インフルエンザ b 型菌共役体バルクの製造プロセスの工程の広範な視点が、要約的に以下に説明する、プロセスの 5 3 の工程の手助けと共に、提示される。

## 【 0 1 8 7 】

工程 1 : 種菌ステージ I フラスコ振盪 ( S 1 ) :

10

作業用シードロットバイアル瓶を使用して、 $0.22\ \mu\text{m}$  の濾過済み種培地を含有するフラスコ振盪段階の接種材料を、播種する。 $25\ \text{mL}$  の作業容積を伴う使い捨ての PET  $125\ \text{mL}$  のフラスコを、使用する。本段階は、制御された攪拌 ( $200 \pm 50\ \text{rpm}$ ) 及び温度 ( $36 \pm 2$ ) にて、培養振盪器中にて実施される。適切な細菌の成長が達成された後 ( $\text{OD}_{590} = 1.0$ )、培養物を、工程 2 に記載されている次の接種材料段階 ( S 2 段階 ) へと移動させる。処理中制御としてグラム染色を実施して、培養物の純度を確実にする ( グラム陰性短桿菌 ) 。

## 【 0 1 8 8 】

工程 2 : 種菌ステージ I I フラスコ振盪 ( S 2 ) :

20

S 2 接種材料段階は、 $800\ \text{mL}$  の作業容積を伴う L フェルンバッハフラスコ ( S 2 A 及び S 2 B ) からなる。 $\text{OD}_{590}$  が許容基準内になるまで、 $\text{OD}_{590}$  測定に関して S 2 フラスコを使用し、また S 3 段階の接種材料に関して S 2 B フラスコを使用する。両方のフラスコは、フィルタ滅菌済み培地と共にバッチ付けされるが、これは、S 1 接種材料段階と同一である。S 1 段階のフラスコは、段階 I I の両方の振盪フラスコを播種するために使用される。本段階は、制御された攪拌 ( $200 \pm 50\ \text{rpm}$ ) 及び温度 ( $36 \pm 2$ ) にて、培養振盪器中にて実施される。適切な細菌の成長が達成された後 ( $\text{OD}_{590} = 1.0$ )、培養物を、工程 3 に記載されている次の接種材料段階 ( S 3 段階 ) へと移動させる。処理中制御としてグラム染色を実施して、培養物の純度を確実にする ( グラム陰性短桿菌 ) 。

## 【 0 1 8 9 】

30

工程 3 : 種菌ステージ I I I 発酵槽 :

S 3 接種材料段階は、 $35\ \text{L}$  の作業容積を伴う  $120\ \text{L}$  の発酵槽からなる。発酵槽は、前回の接種材料段階と同一である培地と共に、バッチ付けされる。S 2 段階のフラスコは、接種材料発酵槽を播種するために使用される。温度 ( $36 \pm 2$ )、DO ( 設定値  $10\%$  )、攪拌 ( $300 \sim 600\ \text{rpm}$ )、エアレーション ( $1 \sim 5\ \text{LPM}$ )、及び背圧 ( $0.2$  パール) にて、接種材料発酵槽中で実施される。適切な細菌の成長が達成された後 ( $\text{OD}_{590} = 1.0$ )、培養物を、工程 4 に記載されている次の生成段階 ( S 4 段階 ) へと移動させる。処理中制御としてグラム染色を実施して、培養物の純度を確実にする ( グラム陰性短桿菌 ) 。

## 【 0 1 9 0 】

40

工程 4 :  $1200\ \text{L}$  規模の生成物発酵 :

$1200\ \text{L}$  の接種材料発酵槽は、 $800\ \text{L}$  の作業容積を有する。これは、基底の培地と共にバッチ付けされて、その場で蒸気滅菌される。その後、 $0.22\ \mu\text{m}$  のフィルタを通過した後に、種々の培地追加物が追加される。工程 3 から得られた S 3 段階の培養物と共に、発酵槽を播種する。制御された溶存酸素 ( 設定値  $-20\%$  )、温度 ( $36 \pm 2$ )、pH ( $7.1 \sim 7.4$ )、攪拌 ( $40 \sim 400\ \text{rpm}$ )、エアレーション ( $50 \sim 300\ \text{LPM}$ )、及び背圧 ( $0.2$  パール) 下で、発酵が実施される。発酵過程の間に、2 つの別個の養分スパイクを追加する。 $\text{OD}_{590}$  ( $\text{OD}_{590} = 3.5$ ) を測定することにより成長を監視し、また固定相に達した後に発酵が完了したと見なす。成長中及び固定相では、多糖類生成物が分泌され、かつ培養液体培地中に蓄積される。処理中制御としてグラム

50

染色を実施して、培養物の純度を確実にする（グラム陰性短桿菌）。

【0191】

工程5：ホルマリン処理：

化学薬剤（ホルマリン）を使用することにより、本工程においてバイオバーデン還元を達成する。0.1%のホルマリンを添加して、NLTのために、発酵した液体培地を2時間、37℃にて培養する。ホルマリン処理後、容器を速やかに<15℃まで冷却する。ホルマリンの添加を確認して、バイオバーデン還元を達成する。これは、培養期間後に、培養プレートにより確認する。工程6に記載するように、収集のためにバイオバーデン還元液体培地を準備する。

【0192】

工程6：持続的遠心分離機による収集：

主要収取工程として、持続的遠心分離機を用いる。本工程は、粗製液体培地を含有する多糖体を不活性バイオマスから分離するために実施される。OD590還元により測定した際に、>90%のバイオマス除去の目的で、持続的遠心分離機が使用される。遠心分離機はおよそ15000gにて、また200~500L/hの液体流量にて操作される。遠心分離された上澄みは、工程7にて記載されているように、更に処理される。

【0193】

工程7：50LP深層濾過：

遠心分離された上澄みを50LP深層フィルタに通し、細胞残骸などの粗大な物質を除去する。本工程は、生成物が濾液を通過することを可能にし、また工程8にて記載されているように、追加の深層フィルタとインラインである。

【0194】

工程8：90LP深層濾過：

50LPの深層フィルタからの濾液は、更に90LPの深層フィルタ（0.22μmの公称評点）を更に通過して、前回の深層フィルタにより保持されなかったあらゆる不溶性物質を、更に除去する。本工程は、濾液が本質的に細胞残骸を有せず、また0.22μmのフィルタを確実に通過することを保証する。後続の濾過工程は、工程9に記載されている。

【0195】

工程9及び10：0.22μm濾過：

90LPの深層フィルタからの濾液は、0.22μmのフィルタを更に通過し、また濾液は保持タンク内に収集される。

【0196】

工程11及び12：100kD濃縮及び膜分離精製法：

本工程は、培地成分及び低分子量の不純物を除去するために実施される。更に、作業容積を減少させるために、濃縮が実施される。Hib多糖類（PRP）の分子量が500kDである際に、100kDの分子量のカットオフが選択される。液体培地をおよそ10倍に濃縮し、その後、NLT5容積について、0.01M PBS緩衝剤（pH7.2）を使用して透析濾過する。濃縮水における得られた生成物は、「粗製PRP」と称され、また工程13に記載されているように、更に処理される。濃縮された液体培地は、0.22μmのフィルタを介して転送ポートを通過してDSP領域へと移動し、細菌がDSP領域へと持ち越されないことを確実にする。

【0197】

工程13：CTAB析出：

CTAB（臭化セチルトリメチルアンモニウム）はカチオン性洗剤であり、これは、多糖類の析出のために使用される。CTABは、親水性領域並びに疎水性部分、及び沈殿タンパク質、核酸、及び多糖類からなる。工程12から得られた粗製PRPは、1%のCTAB濃度にて析出され、かつ>2時間の間培養される。CTABペレット収集は、工程14に記載されている。

【0198】

10

20

30

40

50

工程 14、15、及び 16：CTAB ペレット濃縮、収集、及び貯蔵：

SEZ-3では、持続的遠心分離機を使用して、15000rpmにて、FF、CTAB ペレットが遠心分離される。CTAB ペレットを収集し、重量を量り、アリコートし、かつ更なる処理のために 20 にて貯蔵する。これは、第 1 の処理間保持工程である。

【0199】

工程 17 及び 18：CTAB ペーストの解凍及び溶解：

冷凍CTAB ペーストを、室温へと解凍する。解凍したペレットを、5.85%のNaCl 溶液中に溶解させる。攪拌タンク中で溶解を実施して、水相中で多糖類生成物を可溶化する。タンクは若干の未溶解物質を含有し、これは、沈殿したタンパク質及び核酸故である。工程 19 に記載されているように、懸濁液を更に処理する。

【0200】

工程 19：遠心分離：

工程 18 にて得られた物質を、2~8 にて、5000~6500rpmで20~30 分間遠心分離し、未溶解物質を除去する。遠心分離された上澄みを収集し、工程 20 に記載されているように、更に処理する。

【0201】

工程 20：72%エタノール析出：

72%のエタノールを使用して、PRPを析出する。96%のエタノールを使用して、工程 19 で得られた上澄みに対して最終濃度が72%のエタノールを生成する。本析出は、2~8 にて一晩実施される。工程 21 に記載されているように、得られた沈殿物を収集する。

【0202】

工程 21 及び 22：遠心分離及びペレット溶解：

2~8 にて、5000~6500rpmで20~30分間、遠心分離により、72%のエタノール沈殿物を収集する。目視による透明度が得られるまで、得られたペレットをW.F.I. 中で溶解させる。可溶化されたペレットの後続の処理は、工程 23 に記載されている。

【0203】

工程 23：DOC 及び 32%エタノール析出：

工程 22 から得られた物質へと、22.6%の酢酸ナトリウム及び1%のデオキシコール酸ナトリウムを添加する。96%のエタノールを使用して、32%のエタノールの最終濃度を生成する。DOCと32%のアルコールの両方が、タンパク質不純物の析出を押し進める一方で、多糖類を液相にすることを可能にする。本析出は、2~8 にて一晩(NLT 8 時間)実施される。

【0204】

工程 24：遠心分離：

工程 23 にて得られた物質を、2~8 にて、5000~6500rpmで20~30 分間遠心分離し、沈殿物を除去する。遠心分離された上澄みを収集し、工程 25 に記載されているように、更に処理する。

【0205】

工程 25：深層濾過及び炭素濾過：

工程 24 にてえられた上澄み溶液は、可溶性のPRPを含有し、深層濾過を施され、続いて炭素濾過を施されて核酸及び色素を除去する。核酸の除去は、260nm(A260)にて断続的な吸収度を測定することにより、監視される。目標のA260に達した後、0.22µmのフィルタに通して溶液を濾過し、また工程 26 に記載されているように、この濾過済み溶液を更に処理した。

【0206】

工程 26：64%エタノール析出：

工程 25 にて得られた濾過済み物質を、64%のエタノールの最終濃度にて、96%のエタノールで更に析出する。本析出は、2~8 にて一晩実施される。得られた沈殿を遠

10

20

30

40

50



心分離により収集し、工程 27 に記載されているように、更に処理する。

【0207】

工程 27：ペレット収集及び溶解：

上澄みをデカントして、ペレットを収集するために廃棄する。ペレットは、室温にて W . F . I . 中に溶解される。

【0208】

工程 28：300 k D 濃縮及び膜分離精製法：

300 k D N M W C O 膜を使用して、溶解済みペレット溶液を遠心分離する。これは、W . F . I を使用して、( N L T ) 8 X 以上、更に透析濾過される。工程 29 に記載されているように、得られた濃縮水を更に処理する。

【0209】

工程 29 及び 30：0.22 μ m 濾過及び精製済み P R P の貯蔵：

バイオバーデンを最小化する浄化工程として、300 k D U F 濃縮水を 0.22 μ m のフィルタに通過させる。得られた精製済み P R P をアリコートして、工程 31 に記載されているように、更なる使用まで 20 にて貯蔵する。精製済み P R P のサンプルを、Q . C 分析のために発送する。

【0210】

工程 31：解凍及び貯蔵：

共役バッチサイズに基づいて、工程 30 から得られた天然多糖類の適切な量を解凍する。プールされた物質を P R P 含有量に関して検定するが、これは、工程 32 に記載されているように、更なる処理のために必要である。

【0211】

工程 32：100 k D 濃縮：

プールされた精製済み多糖類は、更なる処理のために最小濃度 ( 8 ~ 12 m g / m L ) となる必要がある。プールされた多糖類の濃度が目標を下回る場合、100 k D U F N M W C O 膜を使用することにより、プールされた多糖類溶液を濃縮する。濃縮後にサンプルを絞り、後続の工程 ( 工程 33 ) のために最小濃度を達成することを確実にする。

【0212】

工程 33：アルカリ性脱重合：

工程 32 から得られた濃縮済みの多糖類 ( 74 g / 110 g 相当 ) を、炭酸水素塩緩衝液を使用して、弱アルカリ性状況下で解重合する。目標の多糖類サイズを達成した後、工程 34 に記載されているように、解重合済みの多糖類を活性化させる。

【0213】

工程 34：多糖類の活性化：

工程 33 にて得られた解重合済みの多糖類を、臭化シアンを使用して活性化させる。窒素環境下で、活性化を行う。臭化シアンは高毒性化学薬品であり、また本化学薬品を取り扱う間には適切な注意が取られる。

【0214】

工程 35：リンカー吸着：

新鮮な調製済みアジピン酸ジヒドラジド ( A D H ) 溶液を、6 ~ 10 分間のうちに、工程 34 から得られた反応混合物へと添加する。N L T に関して、16 時間、2 ~ 10 にて、反応を実施する。A D H リンカーの役割は、共役反応に必要とされる、多糖類におけるアミン基を提供することである。

【0215】

工程 36：濃縮及び膜分離精製法：

工程 35 から得られた反応混合物を濃縮し、かつ 10 k D N M W C O U F 膜を使用して、リン酸緩衝食塩水 ( P B S ) を伴う容積により、容積を透析濾過し、遊離 A D H を除去する。A D H の除去を H P L C にて監視し、かつ遊離 A D H レベルが 5 % 未満に達するまで透析濾過を継続する。得られた濃縮水を、N L T 5 X M E S - N a C l 緩衝剤を用

10

20

30

40

50

いて更に透析濾過する。これは、 $NLT\ 20\text{ mg/mL}$ の濃度を達成するために、更に濃縮される。濃縮済みの処理済みPRPを、工程37に記載されているように、更なる使用まで、2～8 にて保持する。

【0216】

工程37及び38：0.22  $\mu\text{m}$ 濾過及び処理済みPRPの貯蔵：

工程36からの濃縮水を0.22  $\mu\text{m}$ のフィルタに通すが、これは浄化工程として役立つ。これはまた、処理の間にバイオバーデンレベルを制御することを確実にし、グレードC領域において実施される。濾過済みの活性化多糖類を収集し、サンプル抽出し、アリコートして、更なる処理まで2～8 にて貯蔵する。PRP分子サイズ(kD)、PRP含有量、及びPRP活性化の程度を含む分析のために、処理済みの多糖類プールからサンプルを絞り出す。処理済みPRP更なる処理は、工程40に記載されている。

10

【0217】

工程39：TT10 kD濃縮及び膜分離精製法：

共役反応は、2つの成分、即ち、処理済みの多糖類及び担体タンパク質(TT)を必要とする。担体タンパク質を濃縮し、また10 kD UF NMWCO膜を使用して、MES-NaCl緩衝剤により、透析濾過する。本透析濾過済みの担体タンパク質を、次に、同一の膜を使用して、 $NLT\ 20\text{ mg/mL}$ へと更に濃縮する。

【0218】

工程40：共役体：

共役反応は、2つの成分、即ち、処理済みの多糖類及び担体タンパク質(TT)を必要とする。活性化多糖類成分は、工程38から得られる。担体タンパク質は、工程39から得られる。PRPの比率にて、適切な量にて2種の成分を混合する。攪拌下、EDCの存在下にて $TT = 1 : 1\ (w/w)$ である。HPLCにおいて共役反応を監視し、また85%の(共役体への遊離タンパク質変換に基づいた)タンパク質変換まで、監視を継続する。

20

【0219】

工程41：急冷：

共役反応が、変換に関するその許容基準まで処理された後に(工程40)、冷却により反応を停止させる。リン酸EDTA緩衝剤を使用して、共役反応物を冷却する。工程42に記載されているように、その後に共役反応物を処理する。

30

【0220】

工程42：30 SP及び0.22ミクロン濾過：

30 SPフィルタを介して、工程41から得られた共役体を濾過し、続いて0.22  $\mu\text{m}$ の濾過を行う。これは、あらゆる大きな凝集塊の除去を確実にする。工程43に記載されているように、濾過済みの共役体を処理する。

【0221】

工程43：300 kD限外濾過及び膜分離精製法：

300 kD UF NMWCO膜を使用して、0.05%の食塩水を用いて、工程42から得られた共役反応混合物を透析濾過する。透析濾過を実施して、共役試薬及び未反応TTを除去する。工程44に記載されているように、得られた濃縮水を更に処理する。

40

【0222】

工程44及び45：0.22  $\mu\text{m}$ 濾過及び粗製共役体の貯蔵：

工程43からの濃縮水を0.22  $\mu\text{m}$ のフィルタに通すが、これは浄化工程として役立つ。これはまた、処理の間にバイオバーデンレベルを制御することを確実にし、グレードC領域において実施される。濾過済みの粗製共役体を収集し、サンプル抽出して、更なる処理まで2～8 にて貯蔵する。粗製共役体の更なる処理は、工程46に記載されている。

【0223】

工程46：粗製共役体希釈法：

必要な場合に、W.F.Iを用いて、 $4 \pm 1\text{ mg/mL}$ の目標濃度まで工程45からの粗製共役体を希釈し、また工程47に記載されている析出工程により、更に処理する。

50

## 【 0 2 2 4 】

工程 4 7 : 硫酸アンモニウム析出法 :

希釈済みの共役反応混合物を更に処理して、硫酸アンモニウム ( 5 0 重量体積 % の原液 ) を使用することにより、遊離 P R P を除去する。攪拌下で、1 5 未満にて、析出工程を実施する。析出工程は沈澱物における共役を押し進め、また上澄みにおける遊離 P R P を残す。硫酸アンモニウムの添加後、N L T 1 2 時間の間、攪拌することなく、1 5 未満にて、得られた懸濁液を貯蔵する。

## 【 0 2 2 5 】

工程 4 8 : ペレット収集及び溶解 :

工程 4 7 から得られた懸濁液を、~ 7 0 0 0 g にて、2 ~ 8 で、4 0 ± 1 0 分間、遠心分離する。デカンテーションにより上澄みを廃棄して、得られたペレットをトリス食塩水中に溶解させる。

## 【 0 2 2 6 】

工程 4 9 : 3 0 0 k D 膜分離精製法 :

3 0 S P 深層フィルタを介して工程 4 8 から得られた溶液を濾過し、また 3 0 0 k D N M W C O 膜を使用して、2 0 m M のトリス食塩水を用いて、透析濾過する。

## 【 0 2 2 7 】

工程 5 0 : G P C クロマトグラフィー精製 :

サイズ排除クロマトグラフィーのための、T o y o p e a r l H W - 6 5 F ヒドロキシル化メタクリルポリマービーズゲルを含有するおよそ 7 0 L G P C カラムに、工程 4 9 から得られた溶液を装填する。処理済みの共役体 ( 硫酸アンモニウム後 ) における G P C クロマトグラフィーの使用により、得られた物質中の遊離 P R P レベルが減少する。2 0 m M のトリス 0 . 9 % N a C l によりカラムを溶出して、A 2 8 0 に基づいて留分を収集する。遊離 P R P に対する適切な基準に基づく適切な留分、比率、及び分離サイズがプールされ、また工程 5 1 に記載されているように、プールを更に処理する。

## 【 0 2 2 8 】

工程 5 1 : 3 0 0 k D 膜分離精製法 :

3 0 0 k D U F N M W C O 膜を使用して、2 0 m M のトリスを用いて、工程 5 0 から得られたプール済み共役体溶出液を透析濾過する。本濃縮水の容積は、その内部の P R P 含有量がおおよそ 1 m g / m L となるように、目標が定められる。

## 【 0 2 2 9 】

工程 5 2 及び 5 3 : 0 . 2 2 μ m 濾過 :

グレード A の環境下で、0 . 2 2 μ m のフィルタを介して、工程 5 1 から得られたバルク共役体を濾過し、無菌状態を確実にする。0 . 2 2 μ m のフィルタを完全に試験する。濾過されたバルク共役体からのサンプルを、完全な分析のために Q . C . に発送する。濾過済みの共役体を「無菌 H i b バルク共役体」としてラベル付けし、かつ 2 ~ 8 にて貯蔵する。バルク共役体は 2 ~ 8 にて最大 3 か月まで貯蔵され得、またその後使用されない場合、最大 1 年の総持続時間、- 7 0 にて貯蔵され得る。

## 【 0 2 3 0 】

得られた H i b P R P - T T 共役体抗原の品質特性は、以下の通りである。

P R P 含有量 ( μ g / 0 . 5 m l ) : 8 . 1

比率 ( P R P : T T ) : 0 . 5

遊離 P R P ( % ) : 4 . 8 %

P M W ( k D ) : 9 8 3

A v g M W ( k D ) : 7 5 2

## 【 0 2 3 1 】

実施例 4 :全細胞百日咳 ( w P ) 抗原の不活性化法 :

不活性化法の最適化は、ホルムアルデヒドの存在下において 5 6 で 1 0 分間、ホルムアルデヒドの存在下において 5 6 で 1 5 分間、ヒミンの存在下において 5 6 で 1 0 分

10

20

30

40

50

間、ヒミンの存在下において56で15分間の不活性化、及び56にて30分間の加熱のみを含む、種々の実験を実施した後になされる。潜在能における著しい差は、これらの方法では観察されていない。これらの方法の範囲外では、前述のその他の方法と比較して、本方法を使用して生成された百日咳細胞塊がより均質である故に、ホルムアルデヒドの存在下において56で10分間が選択される。

#### 【0232】

以下の工程を含む、不活性wP抗原の製造プロセス：

a) 百日咳菌株134のホルムアルデヒドの存在下で、10～15分間、56にて不活性化させること

b) 百日咳菌株509のホルムアルデヒドの存在下で、10～15分間、56にて不活性化させること

10

c) 百日咳菌株25525及び6229のホルムアルデヒドの存在下で、10～15分間、56にて不活性化させること

c) 百日咳菌株6229のホルムアルデヒドの存在下で、10～15分間、56にて不活性化させること

d) 不活性百日咳菌株134、509、25525、及び6229を、1:1:0.25:0.25の比率にて、その後に混合すること

e) 所望により、アルミニウム系補助剤上に吸着させること

#### 【0233】

本プロセスはチメロサルを欠き、かつ不活性全細胞百日咳抗原が塊状ではなく均質な状態に留まり、それにより、減少された反応源性をもたらし、かつより長い持続時間に対するより良好な洗剤能を所与する。

20

#### 【0234】

実施例5：

不活性ポリオウイルス(IPV)の製造プロセス：

ポリオウイルスは、以下の方法により成長し得る。

CCl81-VERO(サルの腎臓)細胞株を、ポリオウイルス、即ち、サービン株及びサーク株の成長のための宿主細胞として使用する。

ポリオウイルスの所望の株による宿主細胞の感染及び72時間の培養後、ウイルスと細胞残骸を含有する培地を貯蔵して、単一の容器に収集した。

30

100KDaのカセットによる接線方向の流量濾過を濾液に施し、リン酸緩衝剤を使用して透析濾過し、かつ陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して精製した。

患者に投与するのに先立って、適切な不活性化法を使用して、ウイルスを不活性化させなければならない。

#### 【0235】

以下の工程を含むホルマリン不活性化：

a) リン酸緩衝剤から、7～7.5の間のpHを有する(30～50mM)の範囲のトリス緩衝剤へと、精製したポリオウイルスプールに緩衝剤交換を施した。

b) 上記の混合物M-199へと、グリシン(5gm/l)を含有する媒体を添加した。

c) 0.025%のホルムアルデヒドを添加して、その後に混合した。

40

d) 電磁攪拌器におけるウイルスバルクの持続的な攪拌により、混合物を、その後に37にて5～13日間培養した。

e) 7日目に、培養後の混合物に中間体TFF系(100KDa、0.1m<sup>2</sup>)を施し、また不活性化後に最終の濾過を施した。

f) その後、濾過したバルクを2～8にて貯蔵した。

g) D-Agユニット測定に関して、D-AgELISAを実施する。

#### 【0236】

実施例6：

本実施例は、D、T、wP、HBsAg、Hib、PRP-TT共役体、及びIPVを含む混合ワクチン組成物の、製造プロセスの概要を所与する。

50

## 【 0 2 3 7 】

## 1 . 成分 I の配合手順 :

- a ) . コンテナ / 容器内での、リン酸アルミニウムの転移
- b ) . ジフテリアトキソイドの添加
- c ) . 酢酸 / 水酸化ナトリウムによる、4 . 5 ~ 5 . 5 への p H 調整
- d ) . 安定化のための待機
- e ) . 水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムによる、5 . 5 ~ 6 . 5 への p H 調整
- f ) . 安定化のための待機

## 2 . 成分 I I の配合手順 :

- a ) . コンテナ / 容器内での、リン酸アルミニウムの転移
- b ) . 破傷風トキソイドの添加
- c ) . 酢酸 / 水酸化ナトリウムによる、4 . 5 ~ 5 . 5 への p H 調整
- d ) . 安定化のための待機
- e ) . 水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムによる、5 . 5 ~ 6 . 5 への p H 調整
- f ) . 安定化のための待機

## 3 . 成分 I I I の配合手順 :

- a ) . コンテナ / 容器内での、リン酸アルミニウムの転移
- b ) . B 型肝炎表面抗原の添加
- c ) . 酢酸 / 水酸化ナトリウムによる、4 . 5 ~ 5 . 5 への p H 調整
- d ) . 安定化のための待機
- e ) . 水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムによる、5 . 5 ~ 6 . 5 への p H 調整
- f ) . 安定化のための待機

## 4 . 成分 I と成分 I I との混合、及び R T による撈拌。

## 5 . 不活性 w P 抗原を、上記混合物に添加し、続いて R T にて撈拌した。

## 6 . R T にて、成分 I I I を、工程 5 で得られた混合物に添加した。

## 7 . H i b P R P 共役体を、6 ~ 1 6 にて、工程 6 で得られた混合物に添加した。

## 8 . I P V 抗原を、6 ~ 1 6 にて、工程 6 で得られた混合物に添加した。

## 9 . 2 - フェノキシエタノールを、6 ~ 1 6 にて、工程 7 で得られた混合物に添加した。

## 1 0 . p H を確認し、必要な場合には、水酸化ナトリウム / 炭酸ナトリウムを用いて、p H を 6 . 0 ~ 7 . 0 に調節する。

## 1 1 . N a C l を、工程 1 0 で得られた混合物に添加し、続いて、3 時間撈拌した。

## 【 0 2 3 8 】

## 実施例 7 :

## 六価ワクチン毒性の研究 :

スケジュール「Y」及びワクチンの非臨床評価に基づくWHOのガイドラインを遵守した研究計画に従って、また優良実験室規範のOEC D基準に従って、DTwP - Hep B - IPV - Hib ワクチンを用いて、以下の毒性研究を実施した。

## 【 0 2 3 9 】

## 1 . 皮下経路による、SDラット ( S p r a g u e D a w l e y R a t s ) における単一投与毒性試験

処置の開始時点で年齢 5 ~ 6 週間の、合計 2 0 匹のオス及び 2 0 匹のメスのラットを、無作為に 4 つのグループに分けた。各グループは、5 匹のオス及び 5 匹のメスのラットからなる。偽薬、補助剤、DTwP - Hep B - IPV - Hib の単一ワクチンの使用を準備して、副皮膚経路を介して多数回使用ワクチンを投与した。投与後 1 4 日間、ラットを観察した。

## 【 0 2 4 0 】

## 2 . 筋肉内経路による、SDラット ( S p r a g u e D a w l e y R a t s ) における頻回投与毒性試験

合計 1 0 0 匹のオス及び 1 0 0 匹のメスのラットを、主要グループと回復グループへと

10

20

30

40

50

無作為に割り当てた。偽薬制御剤、補助剤制御剤、D T w P - H e p B - I P V - H i b の単一ワクチンの使用を準備して、1日目、29日目、57日目、及び85日目に、深筋肉注射により多数回使用ワクチンをゆっくりと注射した。回復グループにおける動物を処置せず、28日間観察した。

【0241】

3．皮下経路による、ニュージーランド白ウサギにおける単一投与毒性試験

合計16匹のオス及び16匹のメスのウサギを、4つのグループへと無作為に分けた。偽薬、補助剤、D T w P - H e p B - I P V - H i b の単一ワクチンの使用を準備して、副皮膚経路を介して、それぞれのグループの各動物に多数回使用ワクチンを投与した。ウサギに単一皮下投与量を投与して、15日間観察した。

10

【0242】

4．筋肉内経路による、ニュージーランド白ウサギにおける頻回投与毒性試験

合計40匹のオス及び40匹のメスのウサギを、主要グループと回復グループへと無作為に割り当てた。偽薬制御剤、補助剤制御剤の使用を準備して、異なる投与量の単一及び多数回使用D T w P - H e p B - I P V - H i b ワクチンを、1日目、29日目、57日目、及び85日目に、深筋肉注射によりゆっくりと注射した。回復グループにおける動物にはいかなる処置もせず、28日間観察した。結果に基づいて、用いられる試験条件下にて、単一の人投与量(0.5mL)が副皮膚経路又は筋肉内経路により投与された場合に、単一及び多数回使用の六価ワクチン[ジフテリア、破傷風、百日咳(全細胞)、B型肝炎、ポリオ(不活性)、及びインフルエンザb型菌共役体ワクチン(吸着)]が、S D ラット(Sprague-Dawley rats)及びニュージーランドシロウサギにおいて、いかなる全身性副作用をも発生させなかったことが、結論付けられた。ワクチン処置グループにて観察された局部注射部位の炎症反応及び免疫応答の発見が予測され、また一般に、アルミニウム補助ワクチン投与による毒性研究において観察される。従って、最も多い投与量0.5mL/動物(1ヒト投与量)における試験項目「D T w P - H e p B - I P V - H i b ワクチン」が、用いられる試験条件及び投与量下で「非観察副作用レベル(NO A E L)」として考慮される。

20

【0243】

実施例8：

【0244】

30

40

50

【表 10】

表 10：本表は、個々の抗原の吸着率、潜在能、SIIPL's 混合ワクチンと Easy Six (Panacea) との間の遊離 PRP 含有量の比較を提供する。

	SIIPL's 混合ワクチン	Panacea Easy-Six(商標) 混合ワクチン
「D」Ads. (%)	79.0	38.0
「T」Ads (%)	59.0	30
HBsAg Ads. (%)	95.44	95.0超
「D」潜在能 (IU/投与量)	98.5120	40超
「T」潜在能 (IU/投与量)	139.030	50超
「HBsAg」 生体外潜在能 ( $\mu\text{g/ml}$ )	35.490 (34.210-36.818)	23.167
「HBsAg」 生体内潜在能 (R/P)	1.07 (0.74-1.57)	0.71 (0.42-1.13)
「wP」潜在能 (IU/投与量)	4.6749 (2.6492-8.2763)	3.2221 (1.8032-5.7706)
HIB(総PRP) $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$	8.1	13.20
HIB(遊離PRP) %	4.8	18.45
遊離ホルムアルデヒド (%W/V)	0.0013	0.0011
2-フェノキシエタノール 含有量 (mg/0.5ml)	2.71	3.3
総アルミニウム含有量 (mg /0.5ml)	0.2863	0.6034
「IPV」D抗原 (DU/0.5ml)	1型=39.046 2型=7.280 3型=33.058	1型=43.504 2型=8.056 3型=39.840

D = ジフテリアトキソイド抗原

T = 破傷風トキソイド抗原

wP = 全細胞百日咳抗原

HBsAg = B型肝炎表面抗原

IPV = 不活性ポリオウイルス抗原

Ads. (%) = アルミニウム塩 ( $\text{Al}^{3+}$ ) 上への抗原の吸着率

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/145 (2006.01)	A 6 1 K	39/145
A 6 1 K	39/13 (2006.01)	A 6 1 K	39/13
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39
A 6 1 K	47/10 (2017.01)	A 6 1 K	47/10
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/08 (2006.01)	A 6 1 K	47/08
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(72)発明者 クマール ラケシュ

インド国, マハーラシュトラ 4 1 1 0 2 8, プネー, ハダップザー, オフ ソリ プーナワラ ロード, 2 1 2 / 2, セラム インスティテュート オブ インディア プライベート リミティド

(72)発明者 インダー ジット シャルマ

インド国, マハーラシュトラ 4 1 1 0 2 8, プネー, ハダップザー, オフ ソリ プーナワラ ロード, 2 1 2 / 2, セラム インスティテュート オブ インディア プライベート リミティド

(72)発明者 アニル プヤンカトラオ シトール

インド国, マハーラシュトラ 4 1 1 0 2 8, プネー, ハダップザー, オフ ソリ プーナワラ ロード, 2 1 2 / 2, セラム インスティテュート オブ インディア プライベート リミティド

(72)発明者 マノハール ドッダパーネニ

インド国, マハーラシュトラ 4 1 1 0 2 8, プネー, ハダップザー, オフ ソリ プーナワラ ロード, 2 1 2 / 2, セラム インスティテュート オブ インディア プライベート リミティド

(72)発明者 ヒット ジョーティ シャルマ

インド国, マハーラシュトラ 4 1 1 0 2 8, プネー, ハダップザー, オフ ソリ プーナワラ ロード, 2 1 2 / 2, セラム インスティテュート オブ インディア プライベート リミティド

審査官 平井 裕彰

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 0 6 4 2 1 ( J P , A )

特開 2 0 0 8 - 1 2 0 8 3 3 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 2 / 0 9 3 4 0 6 ( W O , A 2 )

特表 2 0 1 2 - 5 0 6 4 2 0 ( J P , A )

国際公開第 2 0 0 8 / 0 2 0 3 2 2 ( W O , A 2 )

MJA, 2006年, Vol. 184, No. 4, pp. 170-175

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 ~ 3 9 / 4 4

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

P u b M e d