

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-509963
(P2015-509963A)

(43) 公表日 平成27年4月2日(2015.4.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/05 (2006.01)	A 6 1 K 39/05	4 C 0 8 5
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 39/102 (2006.01)	A 6 1 K 39/102	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-560384 (P2014-560384)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月8日 (2013.3.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/054674
 (87) 国際公開番号 W02013/132043
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)
 (31) 優先権主張番号 61/608,409
 (32) 優先日 平成24年3月8日 (2012.3.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/697,745
 (32) 優先日 平成24年9月6日 (2012.9.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ブファーリ, シモーネ
 イタリア国 イー53100 シエナ,
 ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバ
 ルティス ヴァクシンズ アンド ダイア
 グノスティクス エスアールエル 気付

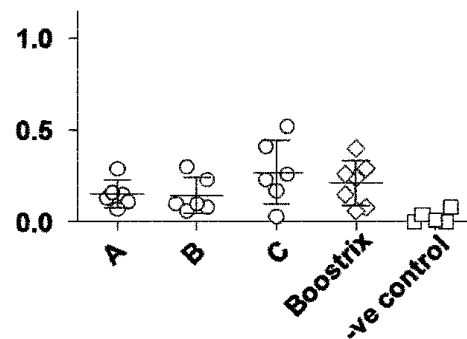
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TLR4アゴニストを含む混合ワクチン

(57) 【要約】

ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、アルミニウム塩アジュバント、およびTLR4アゴニストを含む免疫原性組成物。好ましくは、TLR4アゴニスト、および/またはトキソイドのうちの少なくとも1種が、アルミニウム塩アジュバント上に吸着されている。一局面において、この免疫原性組成物は、0.4mg/ml未満のAl⁺⁺⁺濃度を有する。別の局面において、この免疫原性組成物は、各々低用量のジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、および百日咳トキソイドを有する。

FIGURE 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、アルミニウム塩アジュバント、および T L R 4 アゴニストを含む免疫原性組成物。

【請求項 2】

前記 T L R 4 アゴニスト、および / または前記トキソイドのうちの少なくとも 1 種が、前記アルミニウム塩アジュバントに吸着されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記免疫原性組成物が、 0.4 mg/ml 未満の Al^{+++} 濃度を有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 4】

各々低用量のジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、および百日咳トキソイドを有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、および百日咳トキソイドに加えて抗原を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

結合体化 H i b 莢膜糖、B 型肝炎ウイルス表面抗原、三価の不活化ポリオウイルス、および / または結合体化髄膜炎菌莢膜糖を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

8 Lf/ml のジフテリアトキソイドを有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 8】

3.5 Lf/ml の破傷風トキソイドを有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

$5 \mu\text{g/ml}$ の百日咳トキソイドを有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

$5 \mu\text{g/ml}$ の H i b 糖を有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 11】

$5 \mu\text{g/ml}$ の H B s A g を有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

(i) 20 DU/ml の 1 型ポリオウイルスおよび / または (i i) 4 DU/ml の 2 型ポリオウイルスおよび / または (i i i) 16 DU/ml の 3 型ポリオウイルスを有する、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記アルミニウム塩アジュバントが、(i) 水酸化アルミニウムアジュバントまたは (i i) リン酸アルミニウムアジュバントまたは (i i i) 水酸化アルミニウムアジュバントとリン酸アルミニウムアジュバントとの混合物である、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 14】

髄膜炎菌血清群 A、C、W 1 3 5 および / または Y のうちの 1 種または複数に由来する結合体化莢膜糖を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

肺炎球菌血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F および / または 33 F のうちの 1 種または複数に由来する結合体化莢膜糖を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

50

(i) 髄膜炎菌 H 因子結合タンパク質抗原および / または (i i) *Neisseria* 1 のヘパリン結合抗原および / または (i i i) 髄膜炎菌 N h h A 抗原および / または (i v) 髄膜炎菌外膜小胞を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記 TLR4 アゴニストが 3d-MPL である、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

患者において免疫応答を上昇させる方法であって、上記請求項のいずれか一項に記載の組成物を前記患者に投与するステップを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

この出願は、米国仮出願第 61/608,409 号 (2012 年 3 月 8 日出願) および同第 61/697,745 号 (2012 年 9 月 6 日出願) の利益を主張する。これら出願の両方の完全な内容は、全ての目的のために参考として本明細書に援用される。

【0002】

本発明は、混合ワクチン、すなわち、ワクチンの投与により、1 種超の病原体に対して被験体を同時に免疫化することができるよう、1 種超の病原体に由来する混合免疫原を含有するワクチンの分野にある。

【背景技術】

20

【0003】

単一用量内に 1 種超の病原生物に由来する抗原を含有するワクチンが、「多価」ワクチンまたは「混合」ワクチンとして公知である。ジフテリア、破傷風および百日咳 (「DTaP」ワクチン)、またははしか、おたふく風邪および風疹 (「MMR」ワクチン) に対して防御するための三価ワクチンを含めた、様々な混合ワクチンがヒトへの使用に対して認可されてきた。これらのワクチンは、受ける注射の回数が減るという利点を患者に提供し、これが、特に小児の患者において、コンプライアンスの増大という臨床的利点につながる可能性がある (例えば、参考文献 1 の第 29 章を参照されたい。)。

【0004】

現行の混合ワクチンは、経験的な安全性の研究にもかかわらず、一部の患者の圧力団体に懸念を与えているアルミニウム塩の比較的高い量をアジュバントとして含む可能性がある [2, 3]。例えば、公知の混合ワクチンにおけるレベルは以下の通りである (以下の表 A も参照されたい) :

30

【0005】

【表 1】

商標名	抗原	1 単位用量当たりの Al ⁺⁺⁺ 含有量
Pediacel	D-T-Pa-Hib-IPV	0.33 mg
Pediarix	D-T-Pa-HBV-IPV	≤0.85 mg
Pentacel	D-T-Pa-Hib-IPV	0.33 mg
Tritanrix-HepB	D-T-Pw-HBV	0.63 mg
Quinvaxem	D-T-Pw-Hib-HBV	0.3 mg
Hexavac	D-T-Pa-IPV-Hib-HBV	0.3 mg
Boostrix (USA)	D-T-Pa	≤0.39 mg

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

50

【非特許文献1】PlotkinおよびOrenstein編、Vaccines. (2004) 第4版、ISBN: 0-7216-9688-0

【非特許文献2】Francoisら、Pediatr Infect Dis J (2005) 24: 953~61

【非特許文献3】Baylorら、Vaccine (2001) 20 (補遺3): S18~S23

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

より低レベルのアルミニウムを有するワクチンは、一部の患者群に対して有用であり、本発明の目的は、このようなワクチンを、理想的にはワクチンの効力を損失することなく提供することである。

10

【0008】

現行のワクチンに伴う別の弱点は、様々な文献では、保護効果がより少ない量の抗原で達成し得ることが示されているものの、それらのワクチンが比較的高い量の抗原を必要とすることであり、例えば、参考文献4では、D-T-Pw-Hibワクチンにおいて、免疫学的応答を損失することなく、Hib抗原の量を半減できることが示され、参考文献5では、ポリオに対する十分なレベルの防御を維持しながら、低減したIPV用量を使用することができることが主張されている。本発明の目的は、理想的には免疫保護効果を損失することなく、低減された量の抗原を有するさらなるワクチンを提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

一般に、本発明は、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、アルミニウム塩アジュバント、およびTLR4アゴニストを含む免疫原性組成物を提供する。好ましくは、TLR4アゴニストおよび/または少なくとも1種のトキソイドは、アルミニウム塩アジュバントに吸着されている。

【0010】

したがって、本発明は、様々な混合ワクチン組成物ならびにこれらの製造のための方法を提供する。TLR4アゴニストを含むことによって、組成物が比較的低い量の抗原および/または比較的低い量のアルミニウムを有することが可能になるが、それにもかかわらず比較的高い量の抗原および/または比較的高い量のアルミニウムを有する混合ワクチンと同等の免疫原性を有する。

30

【0011】

したがって、第1の実施形態では、免疫原性組成物は、0.4mg/ml未満のAl⁺⁺⁺濃度を有する。免疫原性組成物が患者への投与のための単位用量形態である場合、単位用量中のAl⁺⁺⁺の量は0.2mg未満とすることができる。

【0012】

第2の実施形態では、組成物は、各々低用量のジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、および百日咳トキソイドを有する。

【0013】

第3の実施形態では、組成物は、(a)各々低用量のジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、および百日咳トキソイドならびに(b)0.4mg/ml未満の濃度のAl⁺⁺⁺を有する。組成物が患者への投与のための単位用量形態である場合、それは、1単位用量当たり0.2mg未満のAl⁺⁺⁺を含むことができる。

40

【0014】

本発明の組成物は、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、および百日咳トキソイドに加えて抗原を含むことができ、例えば、Hib荚膜糖(理想的には、結合体化されている)、HBsAg、IPV、髄膜炎菌荚膜糖(理想的には、結合体化されている)などを含むことができる。

【0015】

50

本発明のさらなる態様は、1または2つのみの本発明のDTaP含有組成物が投与される、乳児のための免疫化スケジュールである。したがって本発明は、少なくともジフテリア、破傷風および百日咳(pertussis)(百日咳(whooping cough))に対して乳児を免疫化するための方法を提供し、この方法は、本発明の混合ワクチンの2用量以下を乳児に投与することを含む。

【0016】

ジフテリアトキソイド

ジフテリアは、グラム陽性の無芽胞性好気性細菌であるCorynebacterium diphtheriaeにより引き起こされる。この生物はプロファージコードADP-リボシル化外毒素(「ジフテリア毒素」)を発現し、その毒素は、(例えばホルムアルデヒドを使用して)処理することによって、もはや毒性はないが、抗原性のままであり、注射後に特異的な抗毒素抗体の生成を刺激することができるトキソイドが得られる。ジフテリアトキソイドは、参考文献1の第13章により詳細に開示されている。好ましいジフテリアトキソイドは、ホルムアルデヒド処理によって調製されるものである。そのジフテリアトキソイドは、C. diphtheriaeを増殖培地(例えばFenton培地、またはLinggoud & Fenton培地)(これらにウシ抽出物を補充してもよい)中で増殖させ、続いてホルムアルデヒド処理、限外濾過および沈殿を行うことによって得ることができる。次いで、トキソイド化した材料を滅菌濾過および/または透析を含むプロセスにより処理してもよい。

10

【0017】

ジフテリアトキソイドの量は、国際単位(IU)で表現することができる。例えば、NIBSC[6]は、「Diphtheria Toxoid Adsorbed Third International Standard 1999」[7、8]を供給し、それは、1アンプルあたり160IUを含有する。IU系の代替として、「Lf」単位(「凝集単位」、「限界凝集用量」、または「凝集の限界」)が、1国際単位の抗毒素と混合した場合に、最適に凝集する混合物を生成するトキソイドの量として定義される[9]。例えば、NIBSCは、1アンプルあたり300Lfを含有する「Diphtheria Toxoid, Plain」[10]および1アンプルあたり900Lfを含有する「The 1st International Reference Reagent For Diphtheria Toxoid For Flocculation Test」[11]を供給する。組成物中のジフテリア毒素の濃度は、このような基準試薬に対して校正された基準物質との比較によって、凝集アッセイを使用して容易に決定することができる。IU系とLf系との間の変換は、特定のトキソイド調製物に依存する。

20

30

【0018】

本発明の一部の実施形態では、組成物は「低用量」のジフテリアトキソイドを含む。これは、組成物中のジフテリアトキソイドの濃度が8Lf/ml、例えば<7、<6、<5、<4、<3、<2、<1Lf/mlなどであることを意味する。したがって、典型的な0.5mlの単位用量の体積では、ジフテリアトキソイドの量は4Lf未満、例えば<3、<2、<1、<1/2Lfなどである。

40

【0019】

組成物中のジフテリアトキソイドは、好ましくはアルミニウム塩上に、好ましくは水酸化アルミニウムアジュバント上に吸着されている(より好ましくは完全に吸着されている)。

【0020】

破傷風トキソイド

破傷風は、グラム陽性、芽胞形成性桿菌属である、Clostridium tetaniにより引き起こされる。この生物は、エンドペプチダーゼ(「破傷風毒素」)を発現し、これを処理することによって、もはや毒性はないが、抗原性のままであり、注射後に特異的な抗毒素抗体の生成を刺激することができるトキソイドが得られる。破傷風トキソ

50

イドは、参考文献1の第27章でより詳細に開示されている。好ましい破傷風トキソイドは、ホルムアルデヒド処理により調製されたものである。破傷風トキソイドは、C. tetaniを増殖培地（例えば、ウシカゼイン由来のLatham培地）中で増殖させ、続いてホルムアルデヒド処理、限外濾過法および沈殿を行うことによって得ることができる。次いで、材料は、滅菌濾過および/または透析を含むプロセスによって処理することができる。

【0021】

破傷風トキソイドの量は、国際単位（IU）で表現することができる。例えば、NIBSCは、「Tetanus Toxoid Adsorbed Third International Standard 2000」[12、13]を供給し、それは、1 10
 アンプルあたり469IUを含有する。ジフテリアトキソイドと同様に、「Lf」単位はIU系の代替である。NIBSCは、「The 1st International Reference Reagent for Tetanus Toxoid For Flocculation Test」[14]を供給し、それは、1アンプルあたり1000Lfを含有する。組成物中のジフテリア毒素の濃度は、このような基準試薬に対して較正された基準物質との比較によって、凝集アッセイを使用して容易に決定することができる。

【0022】

本発明の一部の実施形態では、組成物は「低用量」の破傷風トキソイドを含む。これは、組成物中の破傷風トキソイドの濃度が3.5Lf/ml、例えば<3、<2.5、<20
 2、<1.5<1、<1/2Lf/mlなどであることを意味する。したがって、典型的な0.5mlの単位用量の体積では、破傷風トキソイドの量は、1.75Lf未満、例えば<1.5、<1、<1/2、<1/4Lfなどである。

【0023】

組成物中の破傷風トキソイドは、好ましくは、アルミニウム塩上に、好ましくは水酸化アルミニウムアジュバント上に吸着されている（時には完全に吸着されている）。

【0024】

百日咳トキソイド

Bordetella pertussisは百日咳を引き起こす。ワクチン中の百日咳抗原は、細胞性（全細胞、不活化B. pertussis細胞の形態；「wP」）または無細胞性（「aP」）のいずれかである。細胞性百日咳抗原の調製は、十分に記録されており（例えば、参考文献1の第21章を参照されたい）、例えばそれは、B. pertussisの第I相培養物の熱不活化により得ることができる。無細胞性抗原を使用する場合、以下の抗原のうちの1種、2種または（好ましくは）3種が含まれる：（1）無毒化百日咳毒素（百日咳トキソイド、または「PT」）；（2）線維状赤血球凝集素（「FHA」）；（3）ペルタクチン（「69キロダルトン外膜タンパク質」としても公知）。これら3種の抗原は、改変Stainer-Scholte液体培地中で増殖させたB. pertussis培養物からの単離により調製することができる。PTおよびFHAは、発酵ブロスから（例えば、ヒドロキシアパタイトゲル上への吸着により）単離することができるのに対して、ペルタクチンは、細胞から加熱処理および凝集（例えば塩化バリウム40
 ムを使用して）により抽出することができる。抗原は、次に続くクロマトグラフィーおよび/または沈殿ステップにおいて精製することができる。PTおよびFHAは、疎水性クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製することができる。ペルタクチンは、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー、またはIMACにより精製することができる。FHAおよびペルタクチンは、本発明による使用の前に、ホルムアルデヒドで処理することができる。PTは、好ましくは、ホルムアルデヒドおよび/またはグルタルアルデヒドの処理により無毒化される。この化学的解毒作用手順の代替として、PTは、酵素活性が変異誘発によって低減した変異体PT[15]（例えば9K/129G二重変異体[16]）であってよいが、化学処理による無毒化が好ましい。50

【0025】

本発明は、PT含有WP抗原または好ましくはPT含有aP抗原を使用する。aP抗原を使用する場合、本発明の組成物は典型的に、PTに加えて、FHAおよび、場合によって、ペルタクチンを含むことになる。それはまた場合によって、線毛タイプ2および3も含むことができる。

【0026】

無細胞性百日咳抗原の量は、典型的にはマイクログラムで表現される。本発明の一部の実施形態では、組成物は、「低用量」の百日咳トキソイドを含む。これは、組成物中の百日咳トキソイドの濃度は $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば < 4 、 < 3 、 < 2.5 、 < 2 、 $< 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ などであることを意味する。したがって、典型的な 0.5ml の単位用量の体積では、百日咳トキソイドの量は $2.5 \mu\text{g}$ 未満、例えば < 2 、 < 1.5 、 < 1 、 $< 0.5 \mu\text{g}$ などである。

10

【0027】

百日咳トキソイド、FHAおよびペルタクチンのそれぞれが本発明の組成物中に存在することは通常である。それらは、様々な比（質量で）、例えば、PT:FHA:p69比が $16:16:5$ または $5:10:6$ または $20:20:3$ または $25:25:8$ または $10:5:3$ で存在し得る。これら3種の抗原のそれぞれは一般に、 $< 60 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば、それぞれが $4 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で存在することになる。百日咳抗原の総濃度 $< 120 \mu\text{g}/\text{ml}$ は典型的である。両方が存在する場合、ペルタクチンと比べて過剰の質量のFHAを有することは通常である。

20

【0028】

組成物中の百日咳トキソイドは、好ましくはアルミニウム塩上に、好ましくは水酸化アルミニウムアジュバント上に吸着されている（時には完全に吸着されている）。いずれのFHAも水酸化アルミニウムアジュバント上に吸着されていることができる。いずれのペルタクチンもリン酸アルミニウムアジュバント上に吸着されていることができる。

【0029】

Hib 結合体

Haemophilus influenzae b型（「Hib」）は、細菌性髄膜炎を引き起こす。Hibワクチンは典型的には、莢膜糖抗原（例えば、参考文献1の第14章）に基づき、その調製は、十分に記録されている（例えば参考文献17～26）。Hib糖は、キャリアタンパク質に結合体化することによって、その免疫原性を、特に小児において増強する。典型的なキャリアタンパク質は、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、ジフテリアトキソイドのCRM197誘導體、*H. influenzae* タンパク質D、および血清群B髄膜炎菌に由来する外膜タンパク質複合体である。破傷風トキソイドは、「PRP-T」と一般に呼ばれる製品に使用される場合、好ましいキャリアである。PRP-Tは、Hib莢膜多糖を、臭化シアンを使用して活性化し、活性化した糖を、アジピン酸リンカー（例えば、（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）など、典型的には塩酸塩）にカップリングし、次いでリンカー-糖実体と破傷風トキソイドキャリアタンパク質とを反応させることによって作製することができる。結合体の糖部分は、Hib細菌から調製される場合の全長ポリリボシルリビトールホスフェート（PRP）、および/または全長PRPのフラグメントを含み得る。糖：タンパク質比（w/w）が $1:5$ （すなわち過剰なタンパク質）から $5:1$ （すなわち過剰な糖）、例えば $1:2$ から $5:1$ の比、および $1:1.25$ から $1:2.5$ の比である結合体を使用することができる。しかし、好ましいワクチンにおいて、糖とキャリアタンパク質の重量比は、 $1:2.5$ から $1:3.5$ である。破傷風トキソイドが抗原としても、キャリアタンパク質としても存在するワクチンにおいて、結合体内の糖とキャリアタンパク質の重量比は、 $1:0.3$ から $1:2$ であってよい[27]。Hib結合体の投与は、好ましくは、 $0.15 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗PRP抗体濃度を生じ、これらは標準的な応答閾値である。

30

40

【0030】

50

H i b 抗原の量は、典型的にマイクログラムで表現される。結合体抗原については、その数字は結合体の糖含有量に基づく。本発明の一部の実施形態では、組成物は、「低用量」の H i b 結合体を含む。これは、組成物中の H i b 糖の濃度が $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば < 4 、 < 3 、 < 2.5 、 < 2 、 < 1 などであることを意味する。したがって、典型的な 0.5 ml の単位用量の体積において、H i b の量は $2.5 \mu\text{g}$ 未満、例えば < 2 、 < 1.5 、 < 1 、 < 0.5 などである。

【0031】

H i b 結合体は、アルミニウム塩上に吸着されていてもよいし、または吸着されてなくてもよい。

【0032】**B 型肝炎ウイルス表面抗原**

B 型肝炎ウイルス (H B V) は、ウイルス性肝炎を引き起こす公知の因子の 1 つである。H B V ビリオンは、外側タンパク質外被またはカプシドに取り囲まれた内部コアからなり、ウイルスコアは、ウイルス DNA ゲノムを含有する。カプシドの主成分は、H B V 表面抗原または、より一般的には、「H B s A g」として公知のタンパク質であり、それは、典型的には、分子量約 24 kDa を有する 226 アミノ酸ポリペプチドである。すべての現存する B 型肝炎ワクチンは H B s A g を含有し、この抗原が正常なワクチン被接種者に投与された場合、それは、H B V 感染に対して防御する抗 H B s A g 抗体の生成を刺激する。

【0033】

ワクチン製造に関して、H B s A g は、2 つの方式で作製することができる。第 1 の方法は、慢性 B 型肝炎キャリアの血漿から粒子状形態で抗原を精製することを含む。これは、H B V 感染中に多量の H B s A g が肝臓で合成され、血流中に放出されるからである。第 2 の方式は、組換え DNA 法によりタンパク質を発現させることを含む。本発明の方法で使用するための H B s A g は、酵母細胞において組換え発現される。適切な酵母として、*Saccharomyces* (*S. cerevisiae* など) または *Hansenula* (*H. polymorpha* など) 宿主が挙げられる。

【0034】

天然の H B s A g (すなわち、血漿精製した製品の場合のような) とは異なり、酵母で発現された H B s A g は、一般にグリコシル化されておらず、これは、本発明で使用するための H B s A g の最も好ましい形態である。酵母で発現された H B s A g は、高度に免疫原性であり、血液製剤汚染のリスクなしに調製することができる。

【0035】

H B s A g は一般に、リン脂質を含む脂質マトリクスを含めて、実質的に球状の粒子 (平均直径約 20 nm) の形態となる。酵母で発現された H B s A g 粒子は、ホスファチジルイノシトールを含むことができ、これは、天然の H B V ビリオンでは見出されない。粒子はまた、免疫系を刺激するために、非毒性量の L P S を含み得る [28]。粒子は、酵母の破壊中に使用される場合、非イオン性界面活性剤 (例えばポリソルベート 20) を保持し得る [29]。

【0036】

H B s A g 精製のための好ましい方法は、細胞破壊の後に以下を含む：限外濾過法；サイズ排除クロマトグラフィー；陰イオン交換クロマトグラフィー；超遠心分離；脱塩；および滅菌濾過。溶解物は、細胞破壊後に (例えばポリエチレングリコールを使用して) 沈殿させてもよく、これによって H B s A g は溶液中に残り、これで限外濾過にかける準備ができる。

【0037】

精製後、H B s A g を透析に供してもよく (例えば、システインと共に)、この透析を使用して、H B s A g 調製中に使用された可能性があるチメロサルなどのあらゆる水銀防腐剤を除去することができる [30]。チメロサルを含まない調製物が好ましい。

【0038】

10

20

30

40

50

HBsAgは、好ましくは、HBVサブタイプadw2に由来する。

【0039】

HBsAgの量は、典型的にマイクログラムで表現される。本発明の一部の実施形態では、組成物は「低用量」のHBsAgを含む。これは、組成物中のHBsAgの濃度が、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば <4 、 <3 、 <2.5 、 <2 、 <1 などであることを意味する。したがって、典型的な 0.5ml の単位用量の体積では、HBsAgの量は $2.5\mu\text{g}$ 未満、例えば <2 、 <1.5 、 <1 、 <0.5 などである。

【0040】

HBsAgは、アルミニウム塩上に吸着されていてもよい（好ましくはリン酸アルミニウムアジュバント上に吸着されている）。

10

【0041】

不活化ポリオウイルス抗原（IPV）

灰白髄炎は、3つの型のポリオウイルスのうちの1つによって引き起こされ得る。その3つの型は類似しており、同一の症状を引き起こすが、それらは抗原的には極めて異なり、1つの型による感染は、その他による感染を防御しない。したがって、参考文献1の第24章で説明されているとおり、本発明と共に3つのポリオウイルス抗原、すなわちポリオウイルス1型（例えばMahoney菌株）、ポリオウイルス2型（例えばMEF-1菌株）、およびポリオウイルス3型（例えばSaukett菌株）を使用することが好ましい。これらの菌株（「Salik」菌株）の代替として、例えば、参考文献31および32に考察されているとおり、1型～3型のうちのSablin菌株を使用することができる。これらの菌株は通常のSalik菌株より強力であることができる。

20

【0042】

ポリオウイルスは細胞培養物中で増殖してもよい。好ましい培養物は、Vero細胞株を使用し、このVero細胞株は、サル腎臓由来の継続細胞株である。Vero細胞は、好都合には、培養されたマイクロキャリアであることができる。ウイルス感染前および感染中のVero細胞の培養物は、ウシ由来の材料、例えば、子牛血清、およびラクトアルブミン加水分解物（例えば、ラクトアルブミンの酵素分解により得られる）の使用を含み得る。このようなウシ由来の材料は、BSEも他のTSEも含まない供給源から得られるべきである。

【0043】

増殖後、ピリオンは、限外濾過法、ダイアフィルトレーション、およびクロマトグラフィーなどの技術を使用して精製することができる。患者への投与の前に、ポリオウイルスを不活化させなければならず、これは、ウイルスが本発明のプロセスで使用される前に、ホルムアルデヒドでの処理により達成することができる。

30

【0044】

ウイルスは、好ましくは、個々に増殖、精製および不活化され、次いで組み合わせることによって、本発明での使用のためのバルク混合物が得られる。

【0045】

不活化ポリオウイルス（IPV）の量は、典型的に「DU」単位（「D抗原単位」[33]）で表現される。本発明の一部の実施形態では、組成物は「低用量」のポリオウイルスを含む。1型ポリオウイルスに対しては、これは、組成物中のウイルスの濃度が、 $20\text{DU}/\text{ml}$ 、例えば <18 、 <16 、 <14 、 <12 、 <10 などであることを意味する。2型ポリオウイルスに対しては、これは、組成物中のウイルスの濃度が、 $4\text{DU}/\text{ml}$ 、例えば <3 、 <2 、 <1 、 <0.5 などであることを意味する。3型ポリオウイルスに対しては、これは、組成物中のウイルスの濃度が、 $16\text{DU}/\text{ml}$ 、例えば <14 、 <12 、 <10 、 <8 、 <6 などであることを意味する。1、2および3型の3つのすべてのポリオウイルスが存在する場合、その3つの抗原は、それぞれ5:1:4のDU比で存在することができ、または任意の他の適切な比、例えば、Sablin菌株を使用する場合には、15:32:45の比で存在することができる[31]。Sablin菌株に由来する低用量の抗原は、特に有用であり、（1単位用量当たり）1型は 10DU 、2型

40

50

は 20DU、および3型は 30DUである。

【0046】

ポリオウイルスは、好ましくは、これらが処方される前にはいかなるアジュバントにも吸着されていないが、これらは処方後に、組成物中のアルミニウム塩（複数可）に吸着させることができる。

【0047】

さらなる抗原

D、T、Pa、HBsAg、Hibおよび/またはポリオウイルス抗原を含むのと同様に、本発明の免疫原性組成物は、さらなる病原体に由来する抗原を含み得る。例えば、これらの抗原は、N. meningitidis（血清群A、B、C、W135および/またはYのうちの1種または複数）またはS. pneumoniaeに由来し得る。

10

【0048】

髄膜炎菌糖

組成物がNeisseria meningitidis荚膜糖結合体を含む場合、1種または1種超のこのような結合体が存在し得る。血清群A、C、W135およびYのうちの2、3、または4種を含めること、例えばA+C、A+W135、A+Y、C+W135、C+Y、W135+Y、A+C+W135、A+C+Y、A+W135+Y、A+C+W135+Yなどは典型的である。血清群A、C、W135およびYの4種すべてに由来する糖を含む成分は、MENACTRA（商標）およびMENVEO（商標）製品の場合のように有用である。1種超の血清群に由来する結合体が含まれる場合、それらは実質的に等しい質量で存在してもよく、例えば各血清群の糖の質量は互いに±10%以内にある。1血清群当たりの典型的な量は、1μg~20μg、例えば1血清群当たり2~10μg、または約4μgまたは約5μgまたは約10μgである。実質的に等しい比の代替として、血清群A糖の2倍の質量を使用することもできる。

20

【0049】

結合体の投与は、好ましくは、少なくとも4倍、および好ましくは少なくとも8倍という関連する血清群についての血清殺菌アッセイ（SBA）力価の増大をもたらす。SBA力価は、新生仔ウサギ補体またはヒト補体を使用して測定することができる[34]。

【0050】

血清群A髄膜炎菌の荚膜糖は、C3位およびC4位において部分的O-アセチル化を有する、(16)連結N-アセチル-D-マンノサミン-1-ホスフェートのホモポリマーである。C-3位でのアセチル化は、70~95%であることができる。糖を精製するために使用される条件は（例えば、塩基性条件下）、脱O-アセチル化を生じる可能性があるが、このC-3位においてOAcを保持することは有用である。一部の実施形態では、血清群A糖中のマンノサミン残渣のうちの少なくとも50%（例えば少なくとも60%、70%、80%、90%、95%またはそれより高い）は、C-3位においてO-アセチル化している。アセチル基は、加水分解を阻止するためにブロック基で置き換えることができ[35]、このような修飾糖は、本発明の意味の範囲内で依然として血清群A糖である。

30

【0051】

血清群C荚膜糖は、(29)連結シアル酸（N-アセチルノイラミン酸、または「NeuNAc」）のホモポリマーである。糖構造は、9)-Neu p NA c 7 / 8 OAc - (2と記載される。大部分の血清群C株は、シアル酸残渣のC-7および/またはC-8においてO-アセチル基を有するが、臨床分離株のうちの約15%は、これらのO-アセチル基を欠いている[36、37]。OAc基の存在または不在は、独自のエピトープを生成し、糖への抗体結合の特異性は、O-アセチル化(OAc-)株および脱O-アセチル化(OAc+)株に対するその殺菌活性に影響を及ぼし得る[38~40]。本発明で使用される血清群C糖は、OAc+株またはOAc-株のいずれかから調製することができる。認可されたMenC結合体ワクチンは、OAc-(NEISVAC-C(商標))糖とOAc+(MENJUGATE(商標)&MENINGITEC(

40

50

商標))糖の両方を含む。一部の実施形態では、血清群C結合体の生成のための株は、OAc+株、例えば血清型16、血清亜型P1.7a, 1などのOAc+株である。したがってC:16:P1.7a, 1OAc+株を使用することができる。血清亜型P1.1のOAc+株、例えば、C11株などもまた有用である。好ましいMenC糖は、OAc+株、例えば、株C11などから採取される。

【0052】

血清群W135糖は、シアル酸-ガラクトース二糖単位のポリマーである。それは、血清群C糖のように、ただし、シアル酸の7および9位に、可変のO-アセチル化を有する[41]。構造は、 $4) - D - Neup5Ac(7/9OAc) - - (26) - D - Gal - - (1$ と記載される。

10

【0053】

血清群Y糖は、二糖繰返し単位が、ガラクトースの代わりにグルコースを含むことを除いて、血清群W135糖に類似している。それは、血清群W135のように、シアル酸7および9位に可変のO-アセチル化を有する[41]。血清群のY構造は、 $4) - D - Neup5Ac(7/9OAc) - - (26) - D - Glc - - (1$ と記載される。

【0054】

本発明に従い使用される糖は、上記に記載されている通り、O-アセチル化されていてもよい(例えば、天然の莢膜糖において見られるものと同じO-アセチル化パターンを有する)か、またはそれらは、糖環の1つもしくは複数の位置において、部分的にもしくは完全に脱O-アセチル化されていてもよく、またはそれらは天然の莢膜糖と比較して過剰O-アセチル化されていてもよい。例えば、参考文献42は、80%超が脱O-アセチル化されている血清群Y糖の使用について報告している。

20

【0055】

髄膜炎菌結合体中の糖部分は、髄膜炎菌から調製される通りの全長糖を含んでもよいし、および/または全長糖のフラグメントを含んでもよい、すなわち、糖は、細菌に見られる天然莢膜糖よりも短くてもよい。したがって、糖は、解重合されていてもよく、解重合は、糖精製中または精製後であるが、結合体化の前に生じる。解重合は、糖の鎖長を低減させる。1つの解重合法は、過酸化水素の使用を含む[43]。過酸化水素は、糖に加えられ(例えば、1%の最終 H_2O_2 濃度を得るため)、次いで、所望の鎖長の低減が達成されるまで、混合物をインキュベートする(例えば、約55で)。別の解重合方法は、酸加水分解を含む[44]。他の解重合方法は当技術分野で公知である。本発明による使用のための結合体を調製するために使用される糖は、これらの解重合方法のうちのいずれかにより入手可能であり得る。解重合は、免疫原性に対して最適な鎖長を得るために、および/または糖を物理的な扱いやすさのために鎖長を低減させるために使用することができる。一部の実施形態では、糖は、以下の範囲の平均重合度(Dp)を有する:A=10~20; C=12~22; W135=15~25; Y=15~25。Dpではなく分子量に関して、有用な範囲は、すべての血清群に対して以下の通りである:<100kDa; 5kDa~75kDa; 7kDa~50kDa; 8kDa~35kDa; 12kDa~25kDa; 15kDa~22kDa。他の実施形態では、髄膜炎菌血清群A、C、W135およびYのそれぞれに由来する糖に対する平均分子量は、特にMALLSにより決定される場合、50kDaより大きくてもよく、例えば75kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDaなどであり[45]、さらに1500kDaまでであってもよい。例えば:MenA糖は、50~500kDaの範囲、例えば60~80kDaであってよく;MenC糖は、100~210kDaの範囲であってよく;MenW135糖は60~190kDaの範囲、例えば120~140kDaであってよく;および/またはMenY糖は、60~190kDaの範囲、例えば150~160kDaであってよい。

30

40

【0056】

成分または組成物がHib結合体と髄膜炎菌結合体の両方を含む場合、一部の実施形態

50

では、H i b糖の質量は、ある特定の髄膜炎菌血清群糖の質量と実質的に同じであることができる。一部の実施形態では、H i b糖の質量は、ある特定の髄膜炎菌血清群糖の質量より大きい（例えば少なくとも1.5x）。一部の実施形態では、H i b糖の質量は、ある特定の髄膜炎菌血清群糖の質量より小さい（例えば少なくとも3分の2）。

【0057】

組成物が1種超の髄膜炎菌血清群に由来する糖を含む場合、1血清群当たりの平均糖質量が存在する。各血清群の実質的に等しい質量が使用される場合、平均質量はそれぞれ個々の質量と同じであり；等しくない質量が使用される場合、平均は異なり、例えば、MenACWY混合物に対して10:5:5:5 μ gの量であるとする、平均質量は、1血清群当たり6.25 μ gである。一部の実施形態では、H i b糖の質量は、1血清群当たりの髄膜炎菌糖の平均質量と実質的に同じである。一部の実施形態では、H i b糖の質量は、1血清群当たりの髄膜炎菌糖の平均質量より大きい（例えば少なくとも1.5x）。一部の実施形態では、H i b糖の質量は、1血清群当たりの髄膜炎菌糖の平均質量より少ない（例えば少なくとも3分の2）[46]。

10

【0058】

髄膜炎菌ポリペプチド

Neisseria meningitidis 血清群Bの莢膜糖は、有用なワクチン免疫原ではないので、ポリペプチド抗原を代わりに使用することができる。例えば、参考文献47においてNovartis Vaccinesにより報告された「血清群B髄膜炎菌のユニバーサルワクチン」、または参考文献48で考察されているBEXSERO製品を本発明で使用することができる。

20

【0059】

本発明の組成物は、H因子結合タンパク質（fHBP）抗原を含むことができる。fHBP抗原は詳細に特徴づけられている。fHBP抗原はまた、タンパク質「741」[参考文献49中、配列番号2535および2536]、「NMB1870」、「GNA1870」[参考文献50~52]、「P2086」、「LP2086」または「ORF2086」[53~55]としても公知である。それは、天然にはリポタンパク質であり、すべての髄膜炎菌血清群にわたり発現する。fHBP抗原は、3つの異なる改変体に分けられ[43]、すべての改変体に対する抗原を含むのが好ましい。

【0060】

本発明の組成物は、*Neisserial*のヘパリン結合抗原（NHBA）を含み得る[57]。この抗原は、髄膜炎菌血清群B株MC58の公開ゲノム配列[58]に、遺伝子NMB2132として含まれていた。

30

【0061】

本発明の組成物は、NadA抗原を含み得る。NadA抗原は、髄膜炎菌血清群B株MC58の公開ゲノム配列[58]に遺伝子NMB1994として含まれていた。

【0062】

本発明の組成物は、NspA抗原を含み得る。NspA抗原は、髄膜炎菌血清群B株MC58の公開ゲノム配列[58]に遺伝子NMB0663として含まれていた。

【0063】

本発明の組成物は、NhhA抗原を含み得る。NhhA抗原は、髄膜炎菌血清群B株MC58の公開ゲノム配列[58]に遺伝子NMB0992として含まれていた。

40

【0064】

本発明の組成物は、App抗原を含み得る。App抗原は、髄膜炎菌血清群B株MC58の公開ゲノム配列[58]に遺伝子NMB1985として含まれていた。

【0065】

本発明の組成物は、Omp85抗原を含み得る。Omp85は、髄膜炎菌血清群B株MC58の公開ゲノム配列[58]に遺伝子NMB0182として含まれていた。

【0066】

本発明の組成物は、髄膜炎菌外膜小胞を含み得る。

50

【0067】

肺炎球菌糖

*Streptococcus pneumoniae*は、細菌性髄膜炎を引き起こし、現存するワクチンは莢膜糖に基づく。したがって本発明の組成物は、キャリアタンパク質に結合体化した少なくとも1種の肺炎球菌莢膜糖を含むことができる。

【0068】

本発明は、1つまたは複数の異なる肺炎球菌血清型に由来する莢膜糖を含むことができる。組成物が1種超の血清型に由来する糖抗原を含む場合、これらを、好ましくは、別個に調製し、別個に結合体化し、次いで組み合わせる。肺炎球菌莢膜糖を精製するための方法は当技術分野で公知であり（例えば、参考文献59を参照されたい）、23種の異なる血清型に由来する精製糖に基づくワクチンは、長年の間公知であった。これらの方法に対する改善もまた記載されており、例えば、血清型3については参考文献60に、または血清型1、4、5、6A、6B、7Fおよび19Aについては、参考文献61に記載されている通りである。

10

【0069】

肺炎球菌莢膜糖（複数可）は、典型的に以下の血清型から選択されることになる：1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23Fおよび/または33F。したがって、全部で、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれより多い異なる血清型に由来する莢膜糖を含み得る。少なくとも血清型6B糖を含む組成物が有用である。

20

【0070】

血清型の有用な組合せは、7価の組合せ、例えば、血清型4、6B、9V、14、18C、19F、および23Fのそれぞれに由来する莢膜糖を含む。別の有用な組合せは、9価の組合せ、例えば、血清型1、4、5、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fのそれぞれに由来する莢膜糖を含む。別の有用な組合せは、10価の組合せ、例えば、血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fおよび23Fのそれぞれに由来する莢膜糖を含む。11価の組合せは、血清型3に由来する糖をさらに含み得る。12価の組合せは、10価の混合物に以下を加えてもよい：血清型6Aおよび19A；6Aおよび22F；19Aおよび22F；6Aおよび15B；19Aおよび15B；または22Fおよび15B。13価の組合せは、11価の混合物に以下を加えてもよい：血清型19Aおよび22F；8および12F；8および15B；8および19A；8および22F；12Fおよび15B；12Fおよび19A；12Fおよび22F；15Bおよび19A；15Bおよび22F；6Aおよび19Aなど。

30

【0071】

したがって、有用な13価の組合せは、血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19（または19A）、19Fおよび23Fに由来する莢膜糖を含み、例えば、参考文献62～65で開示されている通りに調製される。1つのこのような組合せは、約8 μ g/mlにおいて血清型6B糖および約4 μ g/mlの濃度において他の12種の糖をそれぞれ含む。別のこのような組合せは、約8 μ g/mlにおいてそれぞれ血清型6Aおよび6B糖、ならびに約4 μ g/mlにおいてそれぞれ他の11種の糖を含む。

40

【0072】

結合体に対して適切なキャリアタンパク質として、細菌性毒素、例えば、ジフテリアまたは破傷風の毒素、またはそのトキシドもしくは変異体などが挙げられる。これらは結合体ワクチンに一般に使用される。例えば、CRM197ジフテリア毒素変異体は有用である[66]。他の適切なキャリアタンパク質として、合成ペプチド[67、68]、熱ショックタンパク質[69、70]、百日咳タンパク質[71、72]、サイトカイン[73]、リンフォカイン[73]、ホルモン[73]、増殖因子[73]、人工タンパク

50

質、例えば、様々な病原体由来の抗原に由来する複数のヒトCD4⁺T細胞エピトープ [74]、例えば、N19 [75]、H. influenzaeに由来するタンパク質D [76 ~ 78]、ニューモリシン (pneumolysin) [79] もしくはその無毒性誘導体 [80]、肺炎球菌表面タンパク質PspA [81]、鉄取り込みタンパク質 [82]、C. difficileに由来する毒素AまたはB [83]、組換え型Pseudomonas aeruginosaエキソタンパク質A (rEPA) [84] などを含むものが挙げられる。

【 0073 】

肺炎球菌結合体ワクチンに対して、特に有用なキャリアタンパク質は、CRM197、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドおよびH. influenzaeタンパク質D 10
である。CRM197は、PREVNAR (商標) に使用されている。13価の混合物は、CRM197を、13種の結合体のそれぞれに対してキャリアタンパク質として使用してもよく、CRM197は、約55 ~ 60 μg / mlで存在し得る。

【 0074 】

組成物が1種超の肺炎球菌血清型に由来する結合体を含む場合、それぞれ別個の結合体に対して同じキャリアタンパク質を使用すること、または異なるキャリアタンパク質を使用することが可能である。しかし、どちらの場合も、異なる結合体の混合物は通常、各血清型の結合体を別個に調製し、次いでそれらを混合して別個の結合体の混合物を形成することによって形成されることになる。参考文献85は、多価肺炎球菌結合体ワクチンにおいて異なるキャリアタンパク質を使用する場合の潜在的利点について記載しているが、PREVNAR (商標) 製品は、7種の異なる血清型のそれぞれに対して同じキャリアを成功裏に使用している。 20

【 0075 】

キャリアタンパク質は、肺炎球菌糖に対して直接またはリンカーを介して共有結合的に結合体化し得る。様々なリンカーが公知である。例えば、付着はカルボニルを介してもよく、これは、修飾糖の遊離ヒドロキシル基とCDIとの反応 [86、87]、続いてタンパク質との反応によりカルバメート連結を形成することによって形成され得る。カルボジイミド縮合を使用することができる [88]。アジピン酸リンカーを使用することができ、これは、遊離 - NH₂ 基 (例えば、アミノ化によって糖に導入される) とアジピン酸とを (例えば、ジイミド活性化を使用して) カップリングし、次いでタンパク質を、生成した糖 - アジピン酸中間体にカップリングする [89、90] ことによって形成され得る。他のリンカーとして、 - プロピオンアミド [91]、ニトロフェニル - エチルアミン [92]、ハロアシルハライド [93]、グリコシド連結 [94]、6 - アミノカブロン酸 [95]、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) - プロピオネート (SPDP) [96]、アジピン酸ジヒドラジドADH [97]、C₄ ~ C₁₂ 部分 [98] などが挙げられる。 30

【 0076 】

還元的アミノ化を介して結合体化を使用することができる。糖は、最初に過ヨウ素酸塩で酸化することによって、アルデヒド基を導入してもよく、次いでこのアルデヒド基を、還元的アミノ化を介して、キャリアタンパク質への (例えばリシンの - アミノ基への) 直接共有結合を形成できる。糖が、1分子当たり複数のアルデヒド基を含む場合、この連結技法は、架橋生成物をもたらすことができ、この場合、複数のアルデヒドが、複数のキャリアアミンと反応する。この架橋結合体化技法は、特に、少なくとも肺炎球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fに対して有用である。 40

【 0077 】

肺炎球菌糖は、肺炎球菌から調製した通りの全長のインタクトな糖を含んでもよいし、および / または全長糖のフラグメントを含んでもよい、すなわち糖は、細菌中に見られる天然の莢膜糖よりも短くてもよい。したがって、糖は解重合されていてもよく、解重合は糖精製中または精製後だが、結合体化前に生じる。解重合は糖の鎖長を低減させる。解重合は、免疫原性に対して最適鎖長を提供するため、および / または糖の物理的な扱いやす 50

さのために鎖長を低減させるために使用することができる。1種超の肺炎球菌血清型が使用される場合、各血清型に対してインタクトな糖を使用し、各血清型に対してフラグメントを使用すること、またはいくつかの血清型に対してインタクトな糖を使用し、他の血清型に対してフラグメントを使用することが可能である。

【0078】

組成物が、血清型4、6B、9V、14、19Fおよび23Fのうちのいずれかに由来する糖を含む場合、これらの糖は、好ましくはインタクトである。対照的に、組成物が血清型18Cに由来する糖を含む場合、この糖は好ましくは解重合される。

【0079】

血清型3の糖は、解重合されてもよく、例えば、血清型3の糖は、例えば酢酸を使用して、解重合のために酸加水分解に供してもよい[62]。次いで、生成したフラグメントを活性化のために酸化させてもよく(例えば過ヨウ素酸塩酸化、おそらく二価カチオンの存在下、例えば $MgCl_2$ で)、還元条件下(例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウムを使用して)でキャリアに結合体化(例えばCRM197)してもよく、次いで(場合によって)糖中の任意の未反応のアルデヒドを(例えば、水素化ホウ素ナトリウムを使用して)キャッピングすることができる[62]。結合体化は、例えば、活性化した糖およびキャリアを同時に凍結乾燥した後で、凍結乾燥させた材料に対して実施してもよい。

10

【0080】

血清型1の糖は少なくとも部分的に脱O-アセチル化してもよく、これは、例えば、重炭酸塩/炭酸塩緩衝液などを使用して、例えば、アルカリ性pH緩衝液処理により達成し得る[63]。このような(部分的に)脱O-アセチル化された糖は、活性化(例えば過ヨウ素酸塩酸化)のために酸化してもよく、キャリア(例えばCRM197)に還元条件下で(例えばシアノ水素化ホウ素ナトリウムを使用して)結合体化し、次いで(場合によって)糖中の任意の未反応のアルデヒドを、(例えば水素化ホウ素ナトリウムを使用して)キャッピングすることができる[63]。結合体化は、例えば、活性化した糖およびキャリアを同時に凍結乾燥した後で、凍結乾燥させた材料に対して実施してもよい。

20

【0081】

血清型19Aの糖は、活性化(例えば過ヨウ素酸塩酸化)のために酸化されてもよく、DMSO中のキャリア(例えばCRM197)に還元条件下で結合体化し、次いで(場合によって)糖中の任意の未反応のアルデヒドを、(例えば水素化ホウ素ナトリウムを使用して)キャッピングすることができる[99]。結合体化は、例えば、活性化した糖およびキャリアを同時に凍結乾燥した後で、凍結乾燥させた材料に対して実施してもよい。

30

【0082】

1つまたは複数の肺炎球菌莢膜糖結合体は、凍結乾燥形態で存在し得る。

【0083】

肺炎球菌結合体は、理想的には、関連する糖類に結合する抗莢膜抗体を誘発でき、例えば、抗糖抗体レベル $0.20 \mu g/mL$ を誘発し得る[100]。抗体は、酵素免疫アッセイ(EIA)および/またはオプソニン作用活性(opsonophagocytically activity)(OPA)の測定により評価することができる。EIA法は、十分に検証されてきており、抗体濃度とワクチン効力との間に関連性がある。

40

【0084】

アルミニウム塩アジュバント

本発明の組成物はアルミニウム塩アジュバントを含む。現在使用されているアルミニウム塩アジュバントは典型的に、「水酸化アルミニウム」または「リン酸アルミニウム」アジュバントのいずれかと言及される。これらは便利な名称ではあるが、どちらも、存在する実際の化学化合物の正確な記載ではない(例えば、参考文献101の第9章および参考文献102の第4章を参照されたい)。本発明は、アジュバントとして有用な「水酸化物」または「ホスフェート」塩のいずれも使用することができる。ヒドロキシドイオンを含むアルミニウム塩は、これらのヒドロキシドイオンが、抗原および/またはTLRアゴニストの吸着のために容易にリガンド交換できることから、本発明で使用するのに好ましい

50

不溶性塩である。したがって、TLR4アゴニストの吸着に好ましい塩は、水酸化アルミニウムおよび/またはヒドロキシリン酸アルミニウムである。これらは、リン含有基（例えばホスフェート、ホスホネート）と容易にリガンド交換して、安定的な吸着をもたらす得る表面ヒドロキシル部分を有する。水酸化アルミニウムアジュバントが最も好ましい。

【0085】

「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、通常は少なくとも部分的に結晶質であるオキシ水酸化アルミニウム塩である。式 $AlO(OH)$ によって表すことができるオキシ水酸化アルミニウムは、赤外(IR)分光法によって、詳細には 1070 cm^{-1} での吸着バンドおよび $3090\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ での強いショルダーの存在によって、水酸化アルミニウム $Al(OH)_3$ などの他のアルミニウム化合物から識別することができる(参考文献101の第9章)。水酸化アルミニウムアジュバントの結晶化度は、ハーフハイトでの回折バンド幅(the width of the diffraction band at half height)(WHH)に反映され、その際、結晶性が乏しい粒子は、結晶子のより小さなサイズのため、より大きな線の広がり示す。WHHが大きくなるほど、表面積は大きくなり、かつより高いWHH値を有するアジュバントが、抗原吸着についてより高い能力を有することが判明している。繊維状形態(例えば透過電子顕微鏡写真において見られるとおりの)が、例えば直径約2nmを有する針様粒子を伴う水酸化アルミニウムアジュバントでは典型的である。水酸化アルミニウムアジュバントのPZCは、典型的には、約11であり、即ちそのアジュバント自体が、生理学的pHで正の表面電荷を有する。pH7.4で Al^{+++} 1mg当たりタンパク質1.8~2.6mgの吸着能が、水酸化アルミニウムアジュバントでは報告されている。

10

20

【0086】

「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、ヒドロキシリン酸アルミニウムであり、多くの場合に少量の硫酸塩も含む。それらは沈殿によって得ることができ、沈殿の間の反応条件および濃度が、その塩中のヒドロキシルに対するホスフェートの置換の程度に影響する。ヒドロキシリン酸塩は一般に、0.3から0.99の PO_4/Al モル比を有する。ヒドロキシリン酸塩は、ヒドロキシル基の存在によって厳密な $AlPO_4$ からは区別することができる。例えば 3164 cm^{-1} でのIRスペクトルバンド(例えば、200に加熱した場合)が、構造的ヒドロキシルの存在を示す(参考文献101の第9章)。

30

【0087】

リン酸アルミニウムアジュバントの PO_4/Al^{+++} モル比は、一般に0.3から1.2、好ましくは0.8から1.2、より好ましくは 0.95 ± 0.1 である。リン酸アルミニウムは一般に、特にヒドロキシリン酸塩では非晶質である。典型的なアジュバントは、0.84から0.92の PO_4/Al モル比を有する非晶質のヒドロキシリン酸アルミニウムであり、0.6mg Al^{+++}/ml で含まれる。そのリン酸アルミニウムは一般に、粒子状である。その粒子の典型的な直径は、任意の抗原の吸着後に、 $0.5\sim 20\mu m$ の範囲(例えば約 $5\sim 10\mu m$)である。pH7.4で Al^{+++} 1mgあたりタンパク質0.7~1.5mgの吸着能が、リン酸アルミニウムアジュバントで報告されている。

40

【0088】

リン酸アルミニウムのPZCは、ヒドロキシルに対するホスフェートの置換の度合いに逆比例し、この置換度は、沈殿によって塩を調製するために使用される反応条件および反応物の濃度に応じて変えることができる。他にも、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によって(より多くのリン酸塩=より酸性のPZC)、またはヒスチジン緩衝液などの緩衝液を添加する(PZCをより塩基性にする)ことによって、PZCを変える。本発明によって使用されるリン酸アルミニウムは一般に、4.0から7.0、より好ましくは、5.0から6.5、例えば約5.7のPZCを有するであろう。

【0089】

50

溶液であると、リン酸アルミニウムおよび水酸化アルミニウムアジュバントの両方もが、直径1～10 μmの安定的な多孔性凝集体を形成する傾向がある[103]。

【0090】

組成物は、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウムの両方の混合物を含むことができ、かつ成分は、これらの塩の一方または両方に吸着されていてよい。

【0091】

本発明の組成物を調製するために使用されるリン酸アルミニウム溶液は、緩衝液（例えば、リン酸緩衝液またはヒスチジン緩衝液またはトリス緩衝液）を含有し得るが、これは常に必要とは限らない。リン酸アルミニウム溶液は、好ましくは無菌であり、発熱物質を含まない。リン酸アルミニウム溶液は、例えば、1.0～20 mM、好ましくは5～15 mM、より好ましくは約10 mMの濃度で存在する、遊離の水性ホスフェイトイオンを含み得る。リン酸アルミニウム溶液はまた塩化ナトリウムも含む。塩化ナトリウムの濃度は、好ましくは0.1～100 mg/ml（例えば0.5～50 mg/ml、1～20 mg/ml、2～10 mg/ml）の範囲であり、より好ましくは約3±1 mg/mlである。NaClの存在は抗原の吸着の前に、pHの正確な測定を容易にする。

10

【0092】

本発明の組成物は、理想的には、1単位用量当たり0.85 mg未満のAl⁺⁺⁺を含む。本発明の一部の実施形態では、組成物は、1単位用量当たり0.5 mg未満のAl⁺⁺⁺を含む。Al⁺⁺⁺の量はこれより少ない、例えば<250 μg、<200 μg、<150 μg、<100 μg、<75 μg、<50 μg、<25 μg、<10 μgなどであってもよい。

20

【0093】

本発明の一部の実施形態では、組成物は、1.7 mg/ml未満のAl⁺⁺⁺濃度を有する。Al⁺⁺⁺の濃度は、これより少ない、例えば<1 mg/ml、<800 μg/ml、<600 μg/ml、<500 μg/ml、<400 μg/ml、<300 μg/ml、<250 μg/ml、<200 μg/ml、<150 μg/ml、<100 μg/ml、<75 μg/ml、<50 μg/ml、<20 μg/mlなどであってもよい。

【0094】

本発明の組成物がアルミニウムベースのアジュバントを含む場合、成分の沈降が貯蔵中に生じ得る。したがって、組成物は、患者への投与前に振盪させるべきである。振盪させた組成物は濁った白色の懸濁物となる。

30

【0095】

トール様受容体4アゴニスト

本発明の組成物はTLR4アゴニストを含み、最も好ましくはヒトTLR4アゴニストである。TLR4は従来は樹状細胞およびマクロファージを含めた先天免疫系の細胞によって発現される[104]。TLR4を介したトリガー(triggering)により、MyD88依存性経路およびTRIF依存性経路の両方を利用するシグナル伝達カスケードが誘発され、それぞれNF-κBおよびIRF3/7活性化をもたらす。TLR4の活性化は、典型的に確固としたIL-12p70の生成を誘発し、Th1-タイプ細胞免疫応答および液性免疫応答を強く強化する。

40

【0096】

様々な有用なTLR4アゴニストが当技術分野で公知であり、このうちの多くは内毒素またはリポ多糖類(LPS)の類似体である。例えば、TLR4アゴニストは以下であってよい：

(i) 3d-MPL(すなわち3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A; 3-de-O-アシル化モノホスホリル脂質Aまたは3-O-デアシル-4'-モノホスホリル脂質Aとしても公知)。内毒素のモノホスホリル脂質A部分のこの誘導体は、グルコサミンの還元末端の脱アシル化した3位を有する。それは、Salmonella minnesotaのヘプトース欠損変異体から調製され、脂質Aと化学的に同様であるが、酸に不安定なホスホリル基および塩基に不安定なアシル基が欠如している。3d-MPLの調製

50

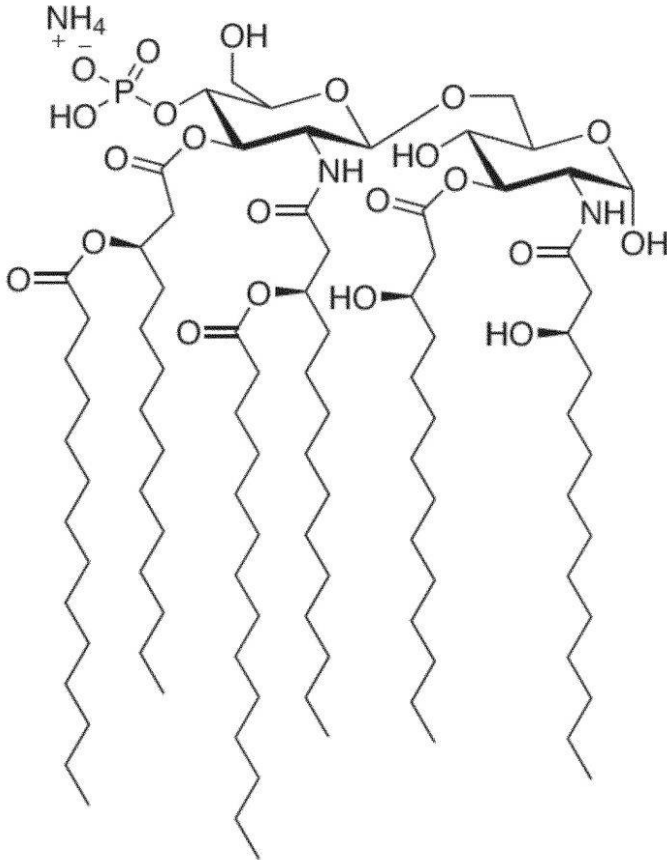
は、参考文献105にもともと記載されており、製品は、Corixa Corporationにより製造および販売されている。それはGSKの「AS04」アジュバント中に存在する。さらなる詳細は参考文献106～109において見出すことができる。

【0097】

(ii) グルコピラノシル脂質A (GLA) [110] またはそのアンモニウム塩、例えば：

【0098】

【化1】



10

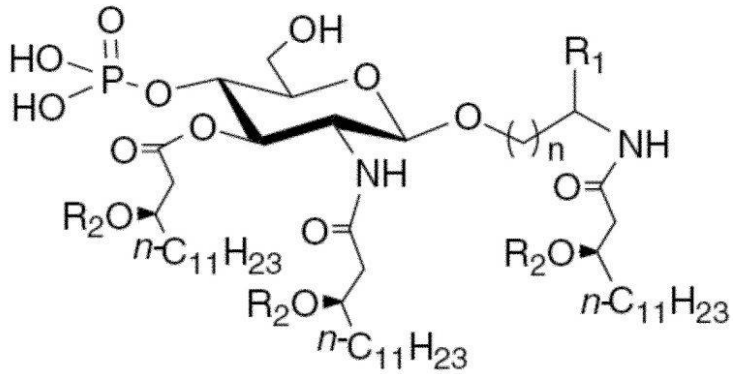
20

30

(iii) アミノアルキルグルコサミニドホスフェート、例えば、RC-529またはCRX-524 [111～113] など。RC-529およびCRX-524は、これらのR₂基が異なる以下の構造：

【0099】

【化2】



10

$R_1 = H, R_2 = n-C_{13}H_{27}CO, n=1$ (RC-529)

$R_1 = H, R_2 = n-C_9H_{19}CO, n=1$ (CRX-524)

【0100】

を有する。

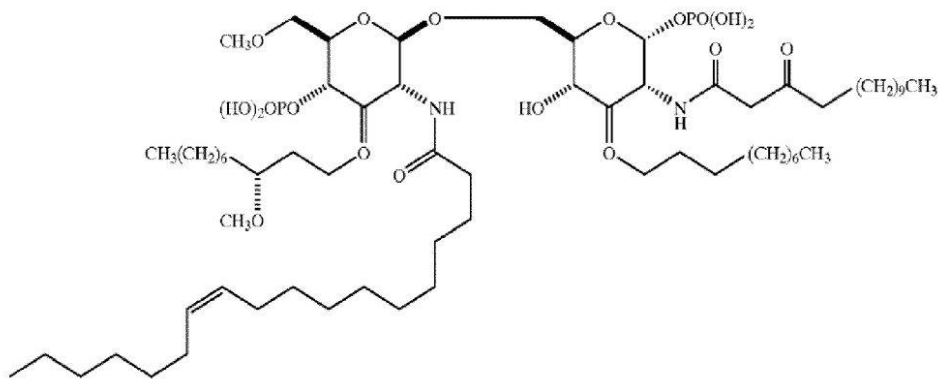
【0101】

(iv) ホスフェート含有非環式骨格に連結している脂質を含有する化合物、例えば、TLR4アンタゴニストE5564など[114、115]：

20

【0102】

【化3】



30

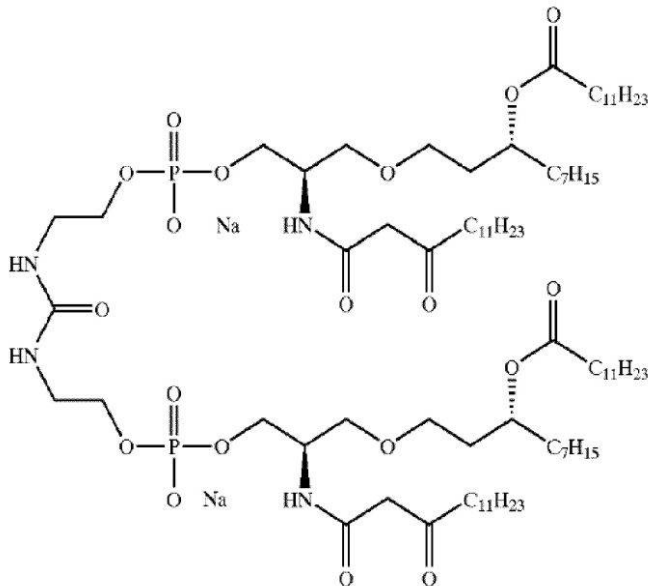
【0103】

(v) 参考文献116に定義されているとおりの式I、IIもしくはIIIの化合物、またはその塩、例えば、化合物「ER803058」、「ER803732」、「ER804053」、「ER804058」、「ER804059」、「ER804442」、「ER804680」、「ER803022」、「ER804764」または「ER804057」など。ER804057はまた、E6020としても公知であり、以下の構造：

40

【0104】

【化4】



10

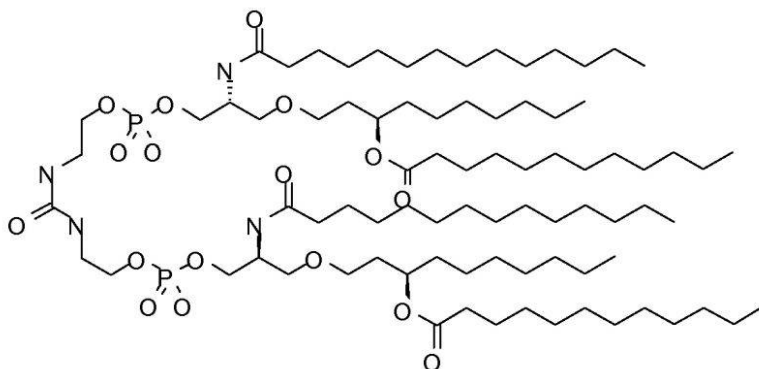
【0105】

を有し、一方で、ER803022は以下の構造：

【0106】

20

【化5】



30

【0107】

を有する。

【0108】

(vi) 参考文献117に開示されているポリペプチドリガンドのうちの1種。

【0109】

これらのTLR4アゴニストのいずれも本発明で使用することができる。

【0110】

TLRアゴニストがアルミニウム塩に吸着し、これにより、アジュバントの免疫増強効果を改善することが可能である[118]。これは、より良い(より強い、またはより迅速に達成される)免疫応答をもたらすことができ、および/または等価なアジュバント効果を維持しつつ、組成物中のアルミニウムの量の低減を可能にする。したがって、本発明の組成物は、TLR4アゴニストが吸着されているアルミニウム塩を含むことができる。アゴニストおよび塩は、抗原を吸着する塩の能力(少なくともある程度)を保持する安定したアジュバント複合体を形成することができる。

40

【0111】

吸着性の特性を有するTLR4アゴニストは典型的に、アルミニウム塩の表面基、特に表面ヒドロキシル基を有する塩とリガンド交換され得るリン含有部分を含む。したがって有用なTLR4アゴニストは、ホスフェート、ホスホネート、ホスフィネート、ホスホニ

50

ト、ホスフィニト、ホスフェートなどを含み得る。好ましいTLR4アゴニストは、少なくとも1個のホスフェート基 [1 1 8]、例えば上記に列挙したアゴニスト (i) ~ (v) を含む。

【 0 1 1 2 】

単位用量中のTLR4アゴニストの量は、比較的広範囲にあり、これは、慣用的な治験を介して決定することができる。1 ~ 1 0 0 0 μg / 用量の量、例えば1用量当たり5 ~ 1 0 0 μg または1用量当たり1 0 ~ 1 0 0 μg 、理想的には1用量当たり 3 0 0 μg 、例えば、1用量当たり約5 μg 、1 0 μg 、2 0 μg 、2 5 μg 、5 0 μg または1 0 0 μg を使用することができる。したがって、本発明の組成物中のTLRアゴニストの濃度は、2 ~ 2 0 0 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、例えば1 0 ~ 2 0 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、または約5、1 0、2 0、4 0、5 0、1 0 0 または2 0 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、および理想的には 6 0 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であってよい。

10

【 0 1 1 3 】

一般に、組成物中のTLR4アゴニストとAl⁺⁺⁺との重量比は、5 : 1 未満、例えば、4 : 1 未満、3 : 1 未満、2 : 1 未満、または1 : 1 未満となる。したがって、例えば、Al⁺⁺⁺濃度0 . 5 mg / ml では、TLR4アゴニストの最大濃度は2 . 5 mg / ml となる。しかし、より高いまたはより低いレベルを使用することができる。Al⁺⁺⁺より少ない質量のTLR4アゴニストが最も典型的となり得、例えば、1用量当たり、1 0 0 μg のTLRアゴニストに対し0 . 2 mg のAl⁺⁺⁺ などである。例えば、F e n d r i x 製品は、1用量当たり5 0 μg の3 d - M P L および0 . 5 mg のAl⁺⁺⁺ を含む。

20

【 0 1 1 4 】

組成物中の少なくとも5 0 % (質量で) のTLR4アゴニスト、例えば 6 0 %、 7 0 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 2 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %、またはさらに1 0 0 % のTLR4アゴニストがアルミニウム塩に吸着されていることが好ましい。

【 0 1 1 5 】

本発明の組成物が、金属塩に吸着されているTLR4アゴニストを含み、さらに緩衝液も含む場合、緩衝液中の任意のホスフェートイオンの濃度は、高濃度のホスフェートイオンは脱離を引き起こす可能性があるため、5 0 mM 未満 (例えば、1 ~ 1 5 mM) とすべきであることが好ましい。ヒスチジン緩衝液の使用が好ましい。

30

【 0 1 1 6 】

3 d - M P L

本発明での使用のための好ましいTLR4アゴニストは3 d - M P L である。それは、リン酸アルミニウムアジュバントに、水酸化アルミニウムアジュバントに、または両方の混合物に吸着され得る [1 1 9]。

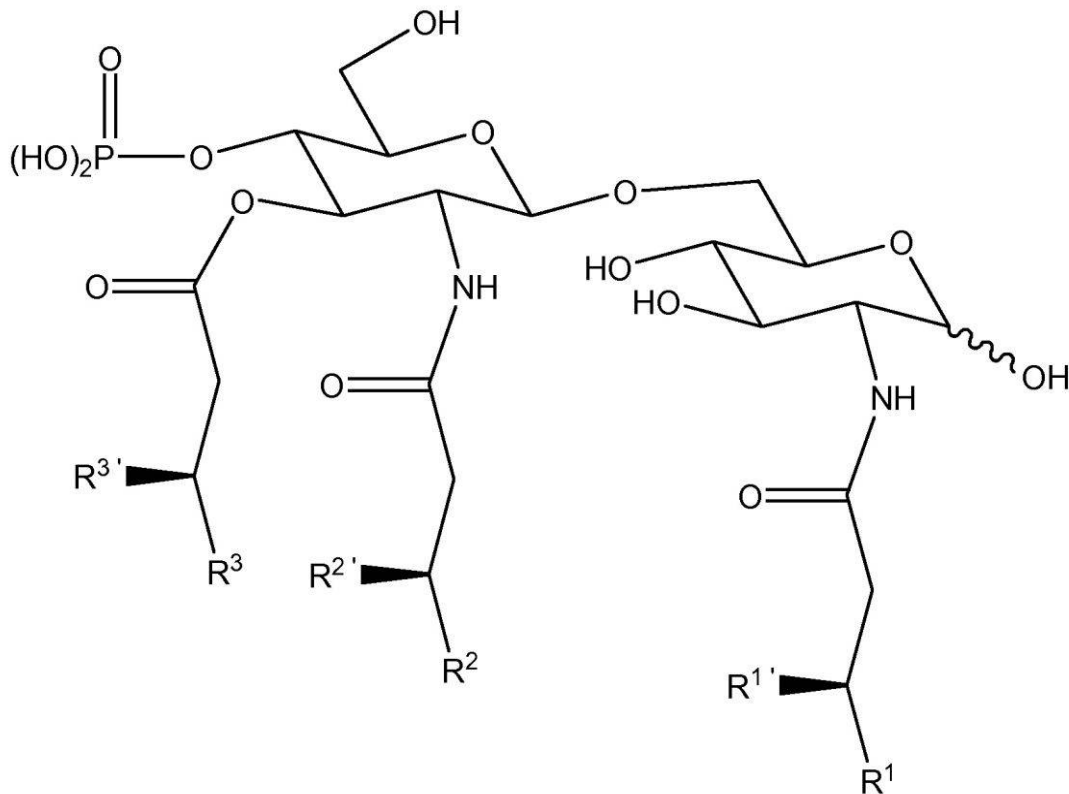
【 0 1 1 7 】

3 d - M P L は、それらのアシル化 (例えば、3、4、5 または6 個のアシル鎖を有し、その鎖の長さは異なってもよい) により異なる、関連する分子の混合物の形態をとることができる。2 種のグルコサミン (また2 - デオキシ - 2 - アミノ - グルコースとしても公知) 単糖は、これらの2 位の炭素 (すなわち、2 および2 ' 位) においてN - アシル化しており、3 ' 位にもまたO - アシル化が存在する。炭素2 に付加している基は、式 - N H - C O - C H ₂ - C R ¹ R ¹ ' を有する。炭素2 ' に付加している基は式 - N H - C O - C H ₂ - C R ² R ² ' を有する。炭素3 ' に付加している基は式 - O - C O - C H ₂ - C R ³ R ³ ' を有する。代表的な構造は：

40

【 0 1 1 8 】

【化6】



10

20

【0119】

である。基 R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ独立に、 $-(CH_2)_n-CH_3$ である。 n の値は、好ましくは 8 から 16、より好ましくは 9 から 12、最も好ましくは 10 である。

【0120】

基 $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ および $R^{3'}$ は、それぞれ独立に：(a) $-H$ ；(b) $-OH$ ；または (c) $-O-CO-R^4$ (式中、 R^4 は、 $-H$ または $-(CH_2)_m-CH_3$ のいずれかであり、 m の値は好ましくは 8 から 16 であり、より好ましくは 10、12 または 14 である) であることができる。2' 位において、 m は好ましくは 14 である。2' 位において、 m は好ましくは 10 である。3' 位において、 m は好ましくは 12 である。したがって、基 $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ および $R^{3'}$ は、好ましくは、ドデカン酸、テトラデカン酸またはヘキサデカン酸からの $-O-$ アシル基である。

30

【0121】

$R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ および $R^{3'}$ のすべてが $-H$ である場合、3d-MPL は 3 個のアシル鎖しか有さない (2、2' および 3' 位のそれぞれの上に 1 個)。 $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ および $R^{3'}$ のうちの 2 個だけが $-H$ である場合、3d-MPL は 4 個のアシル鎖を有することができる。 $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ および $R^{3'}$ のうちの 1 個だけが $-H$ である場合、3d-MPL は 5 個のアシル鎖を有することができる。 $R^{1'}$ 、 $R^{2'}$ および $R^{3'}$ のいずれも $-H$ でない場合、3d-MPL は 6 個のアシル鎖を有することができる。本発明に従い使用される 3d-MPL は、3 ~ 6 個のアシル鎖を有するそれらの形態の混合物であってよいが、混合物中に 6 個のアシル鎖を有する 3d-MPL を含むこと、特に 6 個のアシル鎖形態が 3d-MPL 全体の少なくとも 10 重量%、例えば 20%、30%、40%、50% またはこれ以上を占めることを確実にすることが好ましい。6 個のアシル鎖を有する 3d-MPL が最もアジュバント活性のある形態であることが判明している。

40

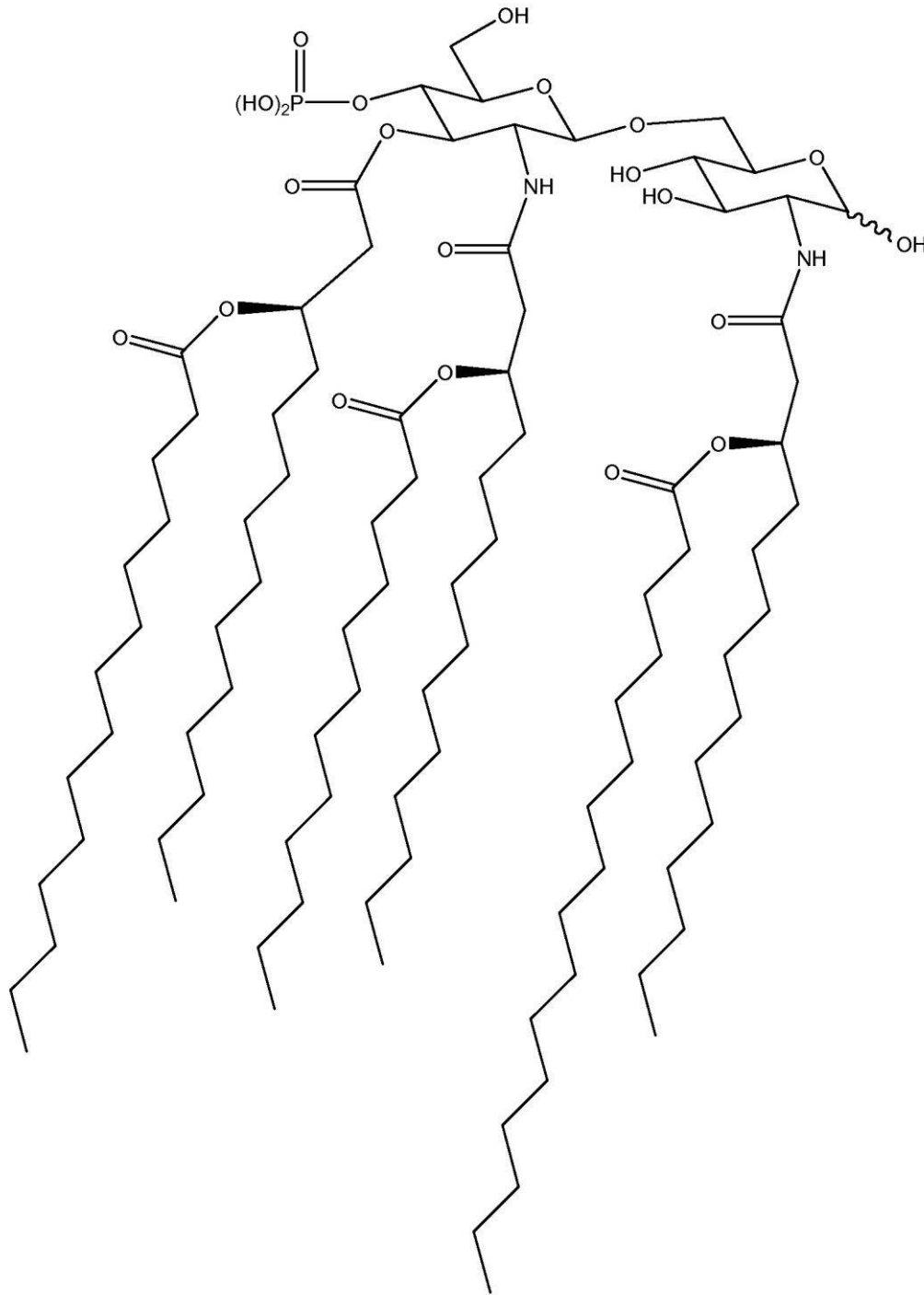
【0122】

したがって、本発明での使用に対して最も好ましい形態の 3d-MPL は：

【0123】

50

【化7】



10

20

30

【0124】

である。3d-MPLが混合物の形態で使用される場合、本発明の組成物において、3d-MPLの量または濃度に関する言及は、混合物中で組み合わせた3d-MPL種を指す。

40

【0125】

典型的な組成物は、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、例えば $50 \sim 150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $75 \sim 125 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $90 \sim 110 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲、または約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で3d-MPLを含む。1用量あたり $25 \sim 75 \mu\text{g}$ の3d-MPL、例えば1用量あたり $45 \sim 55 \mu\text{g}$ 、または約 $50 \mu\text{g}$ の3d-MPLを投与することが通常である。

【0126】

水性条件では、3d-MPLは、異なるサイズ、例えば、直径 $< 150 \text{nm}$ または > 5

50

00 nmを有するミセル凝集体または粒子を形成することができる。それらのうちのいずれかまたは両方を本発明に使用することができ、より良い粒子は、慣用的なアッセイにより選択することができる。それらの優れた活性のため、より小さな粒子（例えば、3d-MPLの透明な水性懸濁物を得るために十分に小さい）が本発明による使用に対して好ましい[120]。好ましい粒子は、150 nm未満、より好ましくは120 nm未満の平均直径を有し、100 nm未満の平均直径さえも有することができる。しかし、ほとんどの場合には、平均直径は、50 nm以上である。3d-MPLがアルミニウム塩に吸着されている場合、3D-MPLの粒径を直接測定することができないこともあるが、粒径は吸着が行われる前に測定することができる。粒子直径は、動的光散乱の慣用的な技法で評価することができ、これによって平均粒子直径が明らかとなる。粒子がx nmの直径を有するということであれば、一般に、この平均の周囲に粒子の分布が存在することになり、少なくとも50%の数（例えば60%、70%、80%、90%、またはそれ以上）の粒子が $x \pm 25\%$ の範囲内の直径を有することになる。

10

20

30

40

50

【0127】**免疫原性組成物**

本発明の組成物は、以下を含み得る：(a) 抗原性成分；および(b) 非抗原性成分。抗原性成分は、上記で考察された抗原を含むことができる、または上記抗原からなる。非抗原性成分は、アルミニウム塩およびTLR4アゴニストを含めた、キャリア、アジュバント、賦形剤、緩衝液などを含むことができる。これらの非抗原性成分は様々な供給源を有し得る。例えば、それらは、製造中に使用される上記抗原またはアジュバント材料のうちの1つに存在していてもよいし、またはそれら成分とは別個に加えられてもよい。

【0128】

本発明の好ましい組成物は、1つまたは複数の薬学的キャリアおよび/または賦形剤を含む。

【0129】

張度を制御するためには、生理学的塩、例えば、ナトリウム塩などを含めることが好ましい。塩化ナトリウム(NaCl)が好ましく、これは、1~20 mg/mlで存在し得る。

【0130】

組成物は一般に、200 mOsm/kg~400 mOsm/kg、好ましくは240~360 mOsm/kgの質量オスモル濃度を有し、より好ましくは280~320 mOsm/kgの範囲内に入ることになる。質量オスモル濃度は、ワクチン接種によって引き起こされる疼痛に対して影響を及ぼさないことが以前に報告されているが[121]、それにもかかわらず、質量オスモル濃度をこの範囲内に保つことが好ましい。

【0131】

本発明の組成物は、1つまたは複数の緩衝液を含み得る。典型的な緩衝液としては以下が挙げられる：リン酸緩衝液；トリス緩衝液；ホウ酸緩衝液；コハク酸緩衝剤；ヒスチジン緩衝液；またはクエン酸緩衝剤。緩衝液は、典型的に、5~20 mMの範囲に含まれることになる。

【0132】

本発明の組成物は、(いかなるエマルジョンアジュバントと混合する前に)界面活性剤を実質的に含まないことができる。特に、本発明の組成物は、ポリソルベート80を実質的に含まないことができ、例えば組成物は、0.1 μg/ml未満のポリソルベート80を含有し、好ましくは検出可能なポリソルベート80を含有しない。しかし、組成物がHBsAgを含む場合、組成物は通常、例えばそれが酵母破壊中に使用された場合、ポリソルベート20を含む[29]。

【0133】

本発明の組成物のpHは、一般に6.0から7.5である。したがって、製造プロセスは、包装前に組成物のpHを調整するステップを含むことができる。患者に投与する水性組成物は、最適な安定性のため、5.0から7.5、より典型的には5.0から6.0の

pHを有することができる；ジフテリアトキソイドおよび/または破傷風トキソイドが存在する場合、pHは理想的には6.0から7.0である。

【0134】

本発明の組成物は好ましくは無菌である。

【0135】

本発明の組成物は好ましくは非発熱性であり、例えば、1用量あたり<1EU（内毒素単位、標準的な尺度；1EUは、1用量あたり0.2ngのFDA参照標準内毒素EC-2「RSE」と等しい）、好ましくは1用量あたり<0.1EUを含有する。

【0136】

本発明の組成物は好ましくはグルテンを含まない。

10

【0137】

抗原の吸着される性質に起因して、ワクチン製品は、濁った外観をもつ懸濁物であってよい。この外観は、微生物の混入が容易に目に見えないことを意味するので、ワクチンは好ましくは抗菌剤を含有する。ワクチンが複数回用量容器に包装されている場合、これは特に重要である。包含するのに好ましい抗菌剤は、2-フェノキシエタノールおよびチメロサルである。しかし、本発明のプロセスの間に水銀防腐剤（例えばチメロサル）を使用しないことが好ましい。したがって、このプロセスで使用する成分のうちの1種からすべてが、水銀防腐剤を実質的に含まなくてもよい。しかし、微量の存在は、本発明において使用される前にある成分がこのような防腐剤で処理されていた場合、不可避となり得る。しかし安全性のため、最終組成物が約25ng/ml未満の水銀を含有することが好ましい。より好ましくは、最終ワクチン製品は、検出可能なチメロサルを含有しない。これは、一般に水銀防腐剤を、本発明のプロセスにおいて抗原を添加する前に抗原調製物から除去することによって、または組成物を作製するために使用される成分の調製中にチメロサルの使用を回避することによって達成される。水銀を含まない組成物が好ましい。

20

【0138】

本発明の組成物は一般に水性形態である。

【0139】

製造中に、所望の最終濃度を得るための成分の希釈は、通常WFI（注射用蒸留水（water for injection））を用いて実施されることになる。

30

【0140】

本発明は、個々の用量への包装に対して適したバルク材料を提供することができ、次いでこれらを患者への投与のために分配することができる。上記で考察された濃度は、典型的には、最終の包装された用量における濃度であり、よって、バルクワクチン中の濃度はより高くてもよい（例えば、希釈により最終濃度へ低減されるものとする）。

【0141】

本発明の組成物は、好ましくは、0.5ml単位用量で患者に投与される。0.5ml用量についての言及は、通常分散、例えば0.5ml±0.05mlを含むと理解されるはずである。複数回用量の状況に対しては、複数回用量の量を単一容器内に、例えば、10回用量の複数回用量容器には5ml（または10%の過剰充填を入れて5.5ml）を一緒に抽出および包装することになる。

40

【0142】

個々の抗原性成分に由来する残留材料もまた、本発明のプロセスによって生成される最終ワクチンにおいて微量で存在し得る。例えば、ホルムアルデヒドがジフテリア、破傷風および百日咳のトキソイドを調製するために使用された場合、最終ワクチン製品は、微量のホルムアルデヒド（例えば、10μg/ml未満、好ましくは<5μg/ml）を保持し得る。媒体または安定剤がポリオウイルス調製中に使用された可能性があり（例えばMedium 199）、これらは最終ワクチンへと持ち越されることもある。同様に、遊離アミノ酸（例えばアラニン、アルギニン、アスパルテート、システインおよび/もしくはシスチン、グルタメート、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、プロリンおよび/もしくは

50

はヒドロキシプロリン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンならびにノまたはバリン)、ビタミン(例えば、コリン、アスコルベートなど)、リン酸水素二ナトリウム、リン酸一カリウム、カルシウム、グルコース、硫酸アデニン、フェノールレッド、酢酸ナトリウム、塩化カリウムなどは、最終ワクチン中にそれぞれ $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $<10\mu\text{g}/\text{ml}$ で保持され得る。抗原調製物に由来する他の成分、例えば、ネオマイシンなど(例えば硫酸ネオマイシン、特にポリオウイルス成分に由来するもの)、ポリミキシンB(例えば、硫酸ポリミキシンB、特にポリオウイルス成分に由来するもの)などもまた、1用量当たりナノグラム以下(sub-nanogram)の量で存在し得る。抗原調製物を起源とする最終ワクチンのさらなる可能な成分は、抗原の完全未満の精製から生じる。したがって、少量のB. pertussis、C. diphtheriae、C. tetaniおよびS. cerevisiaeのタンパク質およびノまたはゲノムDNAが存在し得る。これらの残留成分の量を最小限に抑えるため、抗原調製物は、好ましくは、抗原が本発明で使用される前に、残留成分を除去するために除去される。

10

【0143】

ポリオウイルス成分が使用される場合、ポリオウイルスは一般に、Ver o細胞上で増殖されている。最終ワクチンは、好ましくは、 $10\text{ng}/\text{ml}$ 未満、好ましくは $1\text{ng}/\text{ml}$ 、例えば $500\text{pg}/\text{ml}$ または $50\text{pg}/\text{ml}$ のVer o細胞DNA、例えば $10\text{ng}/\text{ml}$ 未満のVer o細胞DNA(50塩基対長である)を含有する。

20

【0144】

本発明の組成物は、使用のため容器で提示される。適切な容器として、バイアルおよび使い捨てシリンジ(好ましくは無菌のもの)が挙げられる。本発明のプロセスは、使用のために、ワクチンを容器に包装するステップを含み得る。適切な容器として、バイアルおよび使い捨てシリンジ(好ましくは無菌のもの)が挙げられる。

【0145】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物を含有する、例えば単位用量を含有する送達デバイス(例えばシリンジ、ネブライザー、噴霧器、吸入器、皮膚パッチなど)を提供する。このデバイスは、組成物を脊椎動物被験体に投与するために使用することができる。

【0146】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物を含有する、例えば単位用量を含有する滅菌容器(例えばバイアル)を提供する。

30

【0147】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の単位用量を提供する。

【0148】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物を含有する気密密閉容器を提供する。適切な容器には例えば、バイアルが含まれる。

【0149】

本発明の組成物がバイアルで提示される場合、バイアルは好ましくはガラスまたはプラスチック材料から作製される。バイアルは好ましくは、組成物がこれに加えられる前に滅菌されている。ラテックス感受性患者に伴う問題を回避するため、バイアルは、ラテックスを含まないストッパーで密封し得る。バイアルは単一用量のワクチンを含んでもよいし、または1回超の用量(「複数回用量」バイアル)例えば10用量を含んでもよい。複数回用量バイアルを使用する場合、各用量は、バイアル内容物の汚染を回避するように注意を払いながら、滅菌針およびシリンジで、厳重な無菌条件下で取り出すべきである。好ましいバイアルは、無色のガラスで作製される。

40

【0150】

バイアルは、予備充填されたシリンジがキャップに挿入され、シリンジの内容物がバイアル中へ排出され(例えば、その中の凍結乾燥材料を再構成するために)、バイアルの内容物がシリンジへ戻されることが可能となるように、適合したキャップ(例えば、ルアーロック)を有することができる。バイアルからシリンジを外した後、針を取り付けること

50

ができ、組成物を患者に投与することができる。キャップは、好ましくは、シールまたはカバーの内側に位置し、これによって、シールまたはカバーは、キャップがアクセスされ得る前に外さなければならない。

【0151】

組成物がシリンジへと包装される場合、シリンジは通常、これに針が取り付けられてはいないが、別個の針が組立および使用のためにシリンジと共に供給されてもよい。安全針が好ましい。1 - インチ 23 - ゲージ、1 - インチ 25 - ゲージおよび 5 / 8 - インチ 25 - ゲージの針が典型的である。シリンジは、記録保持を促進するために、内容物のロット番号および使用期限が印刷されていてもよい剥離式ラベルと共に提供され得る。シリンジ内のプランジャーは好ましくは、プランジャーが吸引中に偶発的に外れることを防止するためにストッパーを有する。シリンジは、ラテックスゴムキャップおよび/またはプランジャーを有していてもよい。使い捨てシリンジは、単一用量のワクチンを含む。シリンジは一般に、針を取り付ける前に先端を密封する先端キャップを有し、先端キャップは好ましくは、ブチルゴムで作製される。シリンジおよび針が別個に包装される場合、針は好ましくは、ブチルゴムシールドにはめ込まれている。灰色のブチルゴムが好ましい。好ましいシリンジは、商標名「Tip - Lock」(商標)で市販されているものである。

10

【0152】

ガラス容器(例えばシリンジまたはバイアル)が使用される場合、ソーダ石灰ガラスではなく、ホウケイ酸ガラスから作製された容器を使用することが好ましい。

20

【0153】

組成物が容器に包装された後、容器は、分配のために箱の中、例えば厚紙の箱の中に封入することができ、箱には、ワクチンの詳細、例えばその商標名、ワクチン中の抗原のリスト(例えば「B型肝炎組換え型」など)、提示容器(例えば「使い捨て充填済みTip - Lockシリンジ」または「10 x 0.5 ml単一用量バイアル」)、その用量(例えば「それぞれ0.5 mlの1用量を含む」)、注意事項(例えば「成人のみの使用」または「小児のみの使用」)、使用期限、適応症、特許番号などがラベル付けされている。各箱は、1種超の包装されたワクチン、例えば5または10個の包装されたワクチン(特にバイアルに対する)を含むし得る。

【0154】

ワクチンは、ワクチンの詳細、例えば投与のための使用説明書、ワクチン内の抗原の詳細などを含むリーフレットと一緒に(例えば、同じ箱の中に)包装されることになる。使用説明書はまた、注意事項、例えば、ワクチン接種後のアナフィラキシー反応の場合にすぐに利用可能なアドレナリンの溶液を保持することなどを含むし得る。

30

【0155】

包装されたワクチンは、好ましくは2 から8 で保存する。ワクチンを、凍結してはいけない。

【0156】

ワクチンは、製造後に、完全な液体形態で(すなわち、すべての抗原性成分が水溶液または懸濁物中にある)で提供することができるか、またはワクチンは、2つの成分を一緒に混合することによって、ワクチンを使用するとき/使用する場所で即時調製することができる形態で調製することができる。このような2成分の実施形態は、例えば、水性材料と凍結乾燥材料とを混合することによる、液体/液体混合および液体/固体混合を含む。例えば、一実施形態では、ワクチンは、以下を混合することによって作製することができる:(a)水性抗原および/またはアジュバントを含む第1成分;ならびに(b)凍結乾燥抗原を含む第2成分。別の実施形態では、ワクチンは、以下を混合することによって作製することができる:(a)水性抗原および/またはアジュバントを含む第1成分;ならびに(b)水性抗原を含む第2成分。別の実施形態ではワクチンは、以下を混合することによって作製することができる:(a)水性抗原を含む第1成分;および(b)水性アジュバントを含む第2成分。この2つの成分は好ましくは別個の容器(例えば、バイアルお

40

50

よび/またはシリンジ)の中にあり、本発明は、成分(a)および(b)を含むキットを提供する。

【0157】

別の有用な液体/凍結乾燥フォーマットは、(a)アルミニウム塩およびTLR4アゴニストの水性複合体ならびに(b)1つまたは複数の抗原を含む凍結乾燥成分を含む。患者への投与に対して適切なワクチン組成物は、成分(a)および(b)を混合することによって得られる。一部の実施形態では、成分(a)は抗原を含まず、これによって、最終ワクチン中のすべての抗原性成分は成分(b)に由来する；他の実施形態では、成分(a)は1つまたは複数の抗原を含み、これによって、最終ワクチン中の抗原性成分は、成分(a)および(b)の両方に由来する。

10

【0158】

したがって、本発明は、混合ワクチンを調製するためのキットを提供し、このキットは、上述の通りの成分(a)および(b)を含む。キットの構成要素は、典型的にバイアルまたはシリンジであり、単一のキットが、バイアルおよびシリンジの両方を含有し得る。本発明はまた、このようなキットを調製するためのプロセスを提供し、このプロセスは以下のステップを含む：(i)上記に記載通りの水性成分ワクチンを調製するステップ；(ii)前記水性混合ワクチンを第1の容器、例えばシリンジ内に包装するステップ；(iii)抗原含有成分を凍結乾燥形態で調製するステップ；(iv)前記凍結乾燥抗原を第2の容器、例えばバイアル内に包装するステップ；ならびに(v)第1の容器および第2の容器を一緒にキットの中に包装するステップ。次いで、キットは医師へ分配することができる。

20

【0159】

液体/凍結乾燥フォーマットは、結合体成分、特にHibおよび/または髄膜炎菌および/または肺炎球菌の結合体を含むワクチンに対して特に有用である。なぜならこれらは凍結乾燥形態でより安定であり得るからである。したがって結合体は、本発明でのこれらの使用の前に凍結乾燥されていてもよい。

【0160】

成分が凍結乾燥される場合、それは一般に、凍結乾燥の前に、例えば安定剤として加えられる非活性成分を含む。包含するのに好ましい安定剤は、ラクトース、スクロースおよびマンニトール、ならびにこれらの混合物、例えばラクトース/スクロース混合物、スクロース/マンニトール混合物などである。したがって、凍結乾燥材料の水性の再構成により得た最終のワクチンは、ラクトースおよび/またはスクロースを含有し得る。凍結乾燥ワクチンを調製する際に、非晶質賦形剤および/または非晶質緩衝剤を使用するのが好ましい[122]。

30

【0161】

本発明の組成物は、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドおよび百日咳トキソイドを含む。一部の実施形態では、組成物は、破傷風トキソイドと比較して、過剰のジフテリアトキソイドを含む(Lf単位で測定した場合)。この過剰分は理想的には少なくとも1.5:1、例えば5Lfのジフテリアトキソイドが、破傷風トキソイド2Lfごとにある(すなわち5:2比)。これらの実施形態は乳児および小児において最も有用である。青年および成人に(追加免疫(boosters)として)最も有用な他の実施形態では、組成物は、ジフテリアトキソイドと比較して、過剰の破傷風トキソイドを含む(Lf単位で測定した場合)。この過剰分は理想的には少なくとも1.5:1、例えば、2Lfの破傷風トキソイドが、ジフテリアトキソイド1Lfごとにある(すなわち2:1比)。他の実施形態では、等しい量のジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドが使用される(Lf単位)。ジフテリアまたは破傷風のうちの一方が過剰に存在する場合、過剰分は、理想的には少なくとも1.5倍、例えば2倍、または2.5倍であるべきだが、過剰分は5倍を超えないものとする。

40

【0162】

本発明の一部の組成物は、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイドおよび百日咳トキ

50

ソイド、1型、2型および3型に対する不活化ポリオウイルス、B型肝炎ウイルス表面抗原ならびにHib結合体を含む。これらの組成物の抗原性部分は、このリストの中の抗原からなってもよく、または追加の病原体（例えば髄膜炎菌）に由来する抗原をさらに含んでもよい。したがって組成物はそれ自体ワクチンとして使用することができ、またはさらなる混合ワクチンの成分として使用することもできる。

【0163】

処置方法およびワクチンの投与方法

本発明の組成物は、ヒト患者への投与に適しており、本発明は、本発明の組成物を患者に投与するステップを含む、患者において免疫応答を上昇させる方法を提供する。

【0164】

本発明はまた、医療における使用のための本発明の組成物を提供する。組成物は、本明細書中に様々に記載されているように、例えば一部の実施形態では、2用量以下の混合ワクチンを乳児に与えることによって、投与することができる。

【0165】

本発明はまた、患者において免疫応答を上昇させるための医薬の製造における、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、アルミニウム塩アジュバント、およびTLR4アゴニストの使用を提供する。医薬品は、理想的には、本明細書中の他の箇所様々に記載されている組成物であり、医薬品は、本明細書で様々に記載されている通り投与することができる。

【0166】

これらの方法、使用および組成物で上昇させる免疫応答は、理想的には保護的であり、本発明の免疫原性組成物は好ましくは、少なくともジフテリア、破傷風、および百日咳の予防に使用するためのワクチンである。これらの抗原成分に応じて、ワクチンはまた細菌性髄膜炎、ポリオ、肝炎などに対して防御することもできる。

【0167】

完全な効力を有するために、典型的な一次免疫化スケジュール（特に小児用）は、1回超の用量を投与するステップを含み得る。例えば、用量は以下であってよい：0カ月および6カ月（時間0は最初の用量である）において；0カ月、1カ月、2カ月および6カ月において；0日目、21日目において、次いで第3の用量を、6カ月から12カ月の間に；2カ月、4カ月および6カ月において；3カ月、4カ月および5カ月において；6週、10週および14週において；2カ月、3カ月および4カ月において；または0カ月、1カ月、2カ月、6カ月および12カ月において。

【0168】

組成物はまた、追加免疫用量として、例えば、1歳から2歳までの小児に対して、青年に対して、または成人に対して、使用することができる。

【0169】

本発明の組成物は、例えば、腕または脚への筋肉注射によって投与することができる。

【0170】

上述されているように、本発明のさらなる態様は、1つまたは2つのみのDTP含有組成物が投与される、乳児（すなわち、誕生から1歳の間の小児）のための免疫化スケジュールである。したがって、一部の実施形態では、本発明は、現行の通常の3回用量スケジュールと比較してより少ない用量を送達するが、免疫保護効果の損失はない。この態様に従い、ワクチンの2回以下の用量が乳児に与えられる、すなわち乳児には、単回用量または2回用量のワクチンが与えられるが、3回（またはそれより多い）用量は与えられない。しかし、乳児には、後年、すなわち乳児の第1回目の誕生日の後または第2回目の誕生日の後、第3の用量（さらなる用量であり得る）が与えられてもよい。1回または2回の用量は、好ましくは、(i) 1カ月から5カ月の間の月齢(ii) 2カ月から4カ月の間の月齢(iii) 3カ月から5カ月の間の月齢(iv) 6週から16週の間の週齢、または(v) 0カ月から3カ月の間の月齢の乳児に与えられる。例えば、2回の用量が(i) 1カ月および2カ月の月齢(ii) 2カ月および4カ月の月齢(iii) 3カ月および4

10

20

30

40

50

カ月の月齢 (i v) 2 カ月および 3 カ月の月齢 (v) 0 カ月から 1 カ月の月齢などにおいて与えられ得る。

【 0 1 7 1 】

一般

「含むこと」という用語は、「含むこと」および「からなること」を内包し、例えば、Xを「含む」組成物は、Xから専らなることも、または追加の何か、例えば、X + Yを含むこともある。

【 0 1 7 2 】

「実質的に」という語は、「完全に」を排除するものではない。例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まないこともある。必要に応じて、「実質的に」という言葉は、本発明の定義から省かれていることもある。

10

【 0 1 7 3 】

数値 x に関連して、「約」という用語は、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【 0 1 7 4 】

特に述べられていない限り、2つ以上の成分を混合するステップを含む方法は、特定の順序での混合を何ら必要としない。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、その組合せを、第3の成分などと組み合わせ得る。

【 0 1 7 5 】

抗原がアジュバントに「吸着されている」と記載されている場合、その抗原の少なくとも 50% (重量による)、例えば 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% またはそれより多くが吸着されていることが好ましい。ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドは両方とも完全に吸着されている、すなわち上清中に何も検出できないことが好ましい。HBsAgの完全吸着を使用することができる。

20

【 0 1 7 6 】

結合体の量は一般に、キャリアの選択による変動を回避するために、糖の質量 (すなわち、全体としての結合体の用量 (キャリア + 糖) は述べられている用量より高い) に関して与えられる。

【 0 1 7 7 】

組成物がアルミニウム塩アジュバントを含む場合、この組成物はまた、好ましくは水中油型エマルジョンアジュバントを含まない。逆に、組成物が水中油型エマルジョンアジュバントを含む場合、この組成物はまた、好ましくはアルミニウム塩アジュバントを含まない。

30

【 0 1 7 8 】

本発明で使用されるリン含有基は、周辺環境の pH、例えばそれらが溶解している溶媒の pH に応じていくつかのプロトン化および脱プロトン化形態で存在することがある。したがって、本明細書において特定の形態を例示することはできるが、別段に述べられていない限り、これらの例示は、単なる代表であり、具体的なプロトン化または脱プロトン化形態に限定するものではないことが意図されている。例えば、ホスフェート基の場合には、これは、 $-OP(O)(OH)_2$ として例示されているが、定義には、酸性条件で存在し得るプロトン化形態 $-[OP(O)(OH)_2(OH)]^+$ および $-[OP(O)(OH)_2]^2+$ ならびに塩基性条件で存在し得る脱プロトン化形態 $-[OP(O)(O)]^-$ および $[OP(O)(O)_2]^2-$ が含まれる。本発明は、全てのそのような形態を包含する。

40

【 0 1 7 9 】

TLR4 アゴニストは、薬学的に許容される塩として存在してよい。したがって、化合物は、その薬学的に許容される塩、すなわち生理学的または毒物学的に容認できる塩 (適切には、薬学的に許容される塩基付加塩および薬学的に許容される酸付加塩が含まれる) の形態で使用され得る。

【 0 1 8 0 】

50

互変異性体形態で存在し得る本明細書に示されている TLR アゴニストの場合、化合物は、すべてのこのような互変異性体形態で使用することができる。

【0181】

化合物が組成物の一部として身体に投与された場合、その化合物は、適切なプロドラッグで代わりに置き換えられてもよい。

【0182】

動物（および特にウシ）材料が細胞の培養に使用される場合、それらは、伝染性海綿状脳症（TSE）を含まず、かつ特に牛海綿状脳症（BSE）を含まない供給源から得られるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0183】

【図1】図1は、示された処置群に対する FHA 特異的記憶 B 細胞の % を示している。

【発明を実施するための形態】

【0184】

ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、ペルタクチン（p69）、および線維状赤血球凝集素を従来の方法で調製する。これらを、以下の最終濃度（1 ml 当たり）で、緩衝液中で合わせることによって、バルクワクチン「#1」および「#2」を作製する：

【0185】

【表2】

	Dt	Tt	Pt	p69	FHA
#1	100 Lf	40 Lf	100 µg	32 µg	100 µg
#2	10 Lf	20 Lf	32 µg	10 µg	32 µg

【0186】

ワクチン #1 は、小児での使用のために意図されているのに対して、ワクチン #2 は、青年での使用のために意図されている。

【0187】

さらなるバルクワクチン #3 および #4 を同じように得るが、これらはまた、ポリオウイルス 1 型、2 型および 3 型を、160、32 および 128 DU/ml で含む。

【0188】

HBsAg をワクチン #3 に加える（40 µg/ml）ことによって、さらなるバルクワクチン #5 を得る。

【0189】

抗原の比を維持しながら、例えば用量を低減させるための希釈により、これら 4 種のワクチンから他のワクチンを調製することができる。したがって 2 倍、2.5 倍、3 倍などの希釈物を作製できる。

【0190】

ワクチン #1、#2、#3、#4、および #5、またはこれらの希釈物を、モノホスホリル脂質の類似体を、水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムのいずれかの上に吸着させることによって得たアジュバント複合体と合わせる。この組合せは 1 : 1 の体積比で行われ、これによって、上記抗原濃度は、最終ワクチンで半減されるようになる。混合後の最終 Al⁺⁺⁺濃度は 1 mg/ml である。

【0191】

成分を合わせた後、容量オスモル濃度および pH を測定する（および、必要に応じて、調整する）ことによって、生理学的な受諾可能性を確実にする。

【0192】

合わせた抗原の完全性および免疫原性を試験することによって、抗原のいずれもが、組み合わせ物として処方された後、分析用プロファイルの変化を示していないか、すなわち

10

20

30

40

50

抗原およびアジュバントがともに物理的に適合性であるかチェックする。

【0193】

次いでワクチンを使用して、試験動物を免疫化し、免疫応答を評価する。マウスにおける典型的な投薬体積は0.1mlである(ヒト投薬体積の1/5)。

【0194】

追加免疫強度のワクチン

それぞれ(0.5ml当たり)が2Lfのジフテリアトキソイド、5Lfの破傷風トキソイド、および16μgの無細胞性百日咳抗原(精製したPT-9K/129G、FHAおよびp69ペルタクチンの混合物)を含有する3種のワクチンを試験した。Dtと比較して、過剰のTtが、青年および成人において最も有用な投薬を提供する。

10

【0195】

ワクチンは、(A)アジュバント添加していない(unadjuvanted)(B)2mg/mlの水酸化アルミニウムでアジュバント添加した(adjuvanted)(「Al-H」)または(C)2mg/mlのAl-Hおよび100μg/mlのTLR-4アゴニストでアジュバント添加した。TLR-4アゴニストは合成モノホスホリル脂質Aであり、Al-Hに吸着されていた。すべての抗原は、処方物(B)および(C)中でAl-Hに吸着されていた。

【0196】

比較のため、BOOSTRIX(商標)製品もまた試験した。これは、(0.5ml当たり)2.5Lfのジフテリアトキソイド、5Lfの破傷風トキソイド、および18.5μgの無細胞性百日咳抗原(精製したPT、FHAおよびp69ペルタクチンの混合物)を含有し、リン酸アルミニウムおよび水酸化物塩の混合物でアジュバント添加している。緩衝液とAl-Hの混合物を陰性対照として使用した。

20

【0197】

4種のワクチンは、100μlの筋肉内用量で、メスのBalb/Cマウス(6週齢)に、第0、21および35日目に投与した。各用量から2週間後、血清を試験した。

【0198】

血清の全IgG力価を各抗原について測定すると、以下の通りであった(幾何平均)：

【0199】

【表3】

30

日	Ag	(A) Unadj	(B) Al-H	(C) AL-H+MPL	Boostrix	-ve対照
14	Dt	0.030	0.537	2.698	1.308	0.03
	Tt	0.064	1.448	8.700	2.48	0.03
	PT	7.255	5.549	10.27	1.629	1.52
	FHA	0.035	0.161	3.938	0.844	0.14
	p69	1.365	5.730	44.65	14.46	1.67
35	Dt	0.030	45.36	95.18	85.55	0.03
	Tt	24.31	64.30	142.7	83.61	0.03
	PT	247.4	219.5	275.3	112.7	3.58
	FHA	7.433	43.94	97.00	37.58	0.07
	p69	11.44	241.7	397.7	398.3	3.81
49	Dt	0.517	43.80	116.6	92.18	0.05
	Tt	40.21	54.20	213.9	99.09	0.03
	PT	353.6	297.6	509.2	162.8	5.23
	FHA	13.32	46.59	133.7	65.34	0.12
	p69	36.91	256.9	474.6	403.6	1.95

40

50

【0200】

したがって、すべての場合において、かつすべての時点で（第35日でのp69を除いて）、これらの5つの群の中で最も高い力価は、吸着されているTLR4アゴニストでアジュバント添加した抗原を与えたマウスに見られた。重要なことに、認可されたBOOSTRIXワクチンと比較してもこの改善が見られた。さらに、A1-H単独またはBOOSTRIX（商標）とは異なり、吸着されているTLR4アゴニストは、アジュバント添加していない群と比較して、抗PT力価を改善することができた。

【0201】

TLR4アゴニストもまたより迅速な応答をもたらす。第2の用量は、すべての抗原についてIgG応答の明白な増大を示したが、第3の用量後の改善はあまり有意ではなかった。

10

【0202】

FHA特異的記憶B細胞

第3の用量から4～5カ月後、FHA特異的記憶B細胞を、免疫化されたマウスにおいて測定した。マウスを屠殺し、それらの脾臓細胞を、5日間、IL-2およびCpGの存在下で培養することによって、すべての記憶B細胞を増殖させた。次いで脾臓細胞を収集し、事前にFHA抗原（10mg/ml）または抗マウスIgのいずれかでコーティングされた96-ウェルELISPOTプレートに播種した。一晚のインキュベーション後、プレートを洗浄することによって、付着していない脾臓細胞を除去し、FHA特異的記憶B細胞および全記憶B細胞の両方をビオチン化した抗マウスIgおよびHRP-ストربتアビジンで検出した。個々の記憶B細胞を表す有色のスポットをELISPOTリーダー装置でカウントした。次いで、全B細胞と比較した、FHA特異的なB細胞のパーセンテージを各試料に対して計算した。図1は、各群に対する結果を示す。これら5つの群の中で、最も高い割合は、TLR4アゴニストを有する群（C）で見られる。

20

【0203】

本発明は単なる例で説明されており、本発明の範囲および意図の範囲内にとどまりながら変更がなされ得ることが理解されるはずである。

【0204】

【表4】

表A：様々な市販されているワクチンの抗原およびA1⁺⁺⁺含有量（1単位用量当たり）

	D	T	Pa ⁽¹⁾	Hib ⁽²⁾	IPV ⁽³⁾	HBsAg	Vol	AI ⁺⁺⁺
Pediacel	15 Lf	5 Lf	20/20/3	10	40/8/32	-	0.5ml	0.33mg
Pediarix	25 Lf	10 Lf	25/25/8	-	40/8/32	10 μ g	0.5ml	\leq 0.85mg
Pentacel	15 Lf	5 Lf	20/20/3	10	40/8/32	-	0.5ml	0.33mg
Tritan ^x HB	\geq 30 IU	\geq 60 IU	- ⁽⁴⁾	-	-	10 μ g	0.5ml	0.63mg
Quinvaxem	\geq 30 IU	\geq 60 IU	- ⁽⁴⁾	10	-	10 μ g	0.5ml	0.3mg
Hexavac	30 Lf	10 Lf	25/25/-	12	40/8/32	5 μ g	0.5ml	0.3mg
Boostrix	2.5 Lf	5 Lf	8/8/2.5	-	-	-	0.5ml	\leq 0.39mg
Adacel	2 Lf	5 Lf	2.5/5/3	-	-	-	0.5ml	0.33mg
Daptacel	15 Lf	5 Lf	10/5/3	-	-	-	0.5ml	0.33mg
Pentavac	\geq 30 IU	\geq 40 IU	25/25/-	10	40/8/32	-	0.5ml	0.30mg
SII QVac	20-30 Lf	5-25 Lf	- ⁽⁴⁾	-	-	\geq 10 μ g	0.5ml	\leq 1.25mg
TripVacHB	\geq 30 IU	\geq 60 IU	- ⁽⁴⁾	-	-	10 μ g	0.5ml	\leq 1.25mg

注記：

(1) Paの用量は、百日咳トキソイド、次いでFHA、次いでペルタクチン (μ g) の量を示す。Pediacel、DaptacelおよびAdacelのPa成分は、線毛タイプ2および3も含有する。

(2) Hib用量は、PRP莢膜糖の量を示す (μ g)。

(3) IPV用量は、1型、次いで2型、次いで3型の量を示す (DUで測定)。

(4) Tritanrix-HepB、Quinvaxem、TripVac HBおよびSII Q-Vacは、全細胞の百日咳抗原を含む。

【0205】

10

20

【化 8】

参考文献

- [1] *Vaccines*. (eds. Plotkin & Orenstein). 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
- [2] François *et al.* (2005) *Pediatr Infect Dis J* 24:953-61.
- [3] Baylor *et al.* (2001) *Vaccine* 20 (Supplement 3):S18-S23
- [4] Tamm *et al.* (2005) *Vaccine* 23:1715-19.
- [5] WO2008/028956.
- [6] *National Institute for Biological Standards and Control*; Potters Bar, UK. www.nibsc.ac.uk
- [7] Sesardic *et al.* (2001) *Biologicals* 29:107-22. 10
- [8] NIBSC code: 98/560.
- [9] Module 1 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Galazka).
- [10] NIBSC code: 69/017.
- [11] NIBSC code: DIFT.
- [12] Sesardic *et al.* (2002) *Biologicals* 30:49-68.
- [13] NIBSC code: 98/552.
- [14] NIBSC code: TEFT.
- [15] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [16] Nencioni *et al.* (1991) *Infect Immun.* 59(2): 625-30.
- [17] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [18] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36. 20
- [19] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- [20] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- [21] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [22] European patent 0477508.
- [23] US patent 5,306,492.
- [24] WO98/42721.
- [25] *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
- [26] Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- [27] WO96/40242.
- [28] Vanlandschoot *et al.* (2005) *J Gen Virol* 86:323-31. 30
- [29] WO2007/054820.
- [30] WO03/066094.
- [31] Liao *et al.* (2012) *J Infect Dis.* 205:237-43.
- [32] Verdijk *et al.* (2011) *Expert Rev Vaccines.* 10:635-44.
- [33] Module 6 of WHO's *The immunological basis for immunization series* (Robertson)
- [34] *W.H.O. Tech. Rep. Ser.* 594:51, 1976.
- [35] WO03/080678.
- [36] Glode *et al.* (1979) *J Infect Dis* 139:52-56
- [37] WO94/05325; US patent 5,425,946.
- [38] Arakere & Frasch (1991) *Infect. Immun.* 59:4349-4356. 40
- [39] Michon *et al.* (2000) *Dev. Biol.* 103:151-160.
- [40] Rubinstein & Stein (1998) *J. Immunol.* 141:4357-4362.
- [41] WO2005/033148
- [42] WO2005/000347.
- [43] WO02/058737.
- [44] WO03/007985.
- [45] WO2007/000314.
- [46] WO2007/000322.
- [47] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29):10834-9.

【化9】

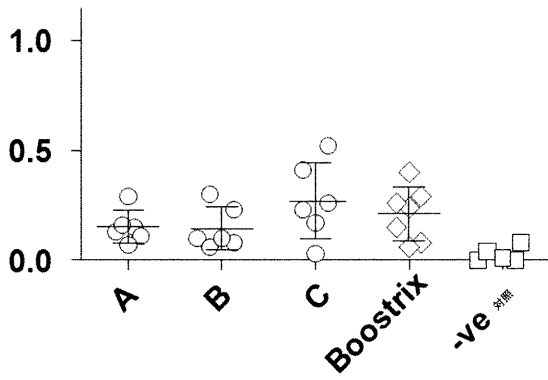
- [48] Bai *et al.* (2011) *Expert Opin Biol Ther.* 11:969-85.
- [49] WO99/57280.
- [50] Masignani *et al.* (2003) *J Exp Med* 197:789-799.
- [51] Welsch *et al.* (2004) *J Immunol* 172:5605-15.
- [52] Hou *et al.* (2005) *J Infect Dis* 192(4):580-90.
- [53] WO03/063766.
- [54] Fletcher *et al.* (2004) *Infect Immun* 72:2088-2100.
- [55] Zhu *et al.* (2005) *Infect Immun* 73(10):6838-45.
- [56] WO2004/048404 10
- [57] Serruto *et al.* (2010) *PNAS USA* 107:3770-5.
- [58] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-15.
- [59] *WHO Technical Report Series* No. 927, 2005. Pages 64-98.
- [60] US-2008/0102498.
- [61] US-2006/0228381.
- [62] US-2007/0231340.
- [63] US-2007/0184072.
- [64] US-2006/0228380.
- [65] WO2008/143709.
- [66] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002) 20
- [67] EP-A-0378881.
- [68] EP-A-0427347.
- [69] WO93/17712
- [70] WO94/03208.
- [71] WO98/58668.
- [72] EP-A-0471177.
- [73] WO91/01146
- [74] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
- [75] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
- [76] EP-A-0594610. 30
- [77] Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
- [78] WO00/56360.
- [79] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
- [80] Michon *et al.* (1998) *Vaccine*. 16:1732-41.
- [81] WO02/091998.
- [82] WO01/72337
- [83] WO00/61761.
- [84] WO00/33882
- [85] WO2007/071707
- [86] Bethell G.S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 2572-4 40
- [87] Hearn M.T.W., *J. Chromatogr.*, 1981, **218**, 509-18
- [88] WO2007/000343.
- [89] *Mol. Immunol.*, 1985, **22**, 907-919
- [90] EP-A-0208375
- [91] WO00/10599
- [92] Gevert *et al.*, *Med. Microbiol. Immunol*, 165 : 171-288 (1979).
- [93] US patent 4,057,685.
- [94] US patents 4,673,574; 4,761,283; 4,808,700.
- [95] US patent 4,459,286.

【化 1 0】

- [96] US patent 5,204,098
- [97] US patent 4,965,338
- [98] US patent 4,663,160.
- [99] US-2007/0184071.
- [100] Jodar *et al.* (2003) *Vaccine* 21:3265-72.
- [101] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
- [102] *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan. 10
- [103] Clausi *et al.* (2008) *J Pharm Sci* DOI 10.1002/jps.21390.
- [104] Steinhagen *et al.* (2011) *Vaccine* 29:3341-55.
- [105] GB-A-2220211.
- [106] Myers *et al.* (1990) pages 145-156 of *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*.
- [107] Ulrich (2000) Chapter 16 (pages 273-282) of reference 102.
- [108] Johnson *et al.* (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
- [109] Baldrick *et al.* (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
- [110] Coler *et al.* (2011) *PLoS ONE* 6(1):c16333.
- [111] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [112] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229. 20
- [113] Bazin *et al.* (2006) *Tetrahedron Lett* 47:2087-92.
- [114] Wong *et al.* (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42.
- [115] US2005/0215517.
- [116] WO03/011223.
- [117] WO2007/053455.
- [118] WO2012/031140.
- [119] Garçon *et al.* (2007) *Expert Rev Vaccines* 6:723-39.
- [120] WO 94/21292.
- [121] Nony *et al.* (2001) *Vaccine* 27:3645-51.
- [122] WO01/41800. 30

【 図 1 】

FIGURE 1



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/054674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/116 A61K39/05 A61K39/08 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. GEURTSSEN ET AL: "Lipopolysaccharide Analogs Improve Efficacy of Acellular Pertussis Vaccine and Reduce Type I Hypersensitivity in Mice", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 14, no. 7, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 821-829, XP055060805, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00074-07	1-5,7-9, 17,18
Y	abstract page 822, left-hand column, paragraph 4 - last paragraph	10-16
Y	----- WO 2008/020328 A2 (NOVARTIS AG [CH]; FRINGS ERIC [DE]) 21 February 2008 (2008-02-21) claims; examples -----	6,12
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 May 2013		05/06/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Loubradou, Gabriel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/054674

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/48525 A1 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; ARTOIS CLAUDE [BE]; HEYDER KOEN DE [BE]) 30 September 1999 (1999-09-30) claims; examples -----	6,10-16
Y	WO 02/00249 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; BOUTRIAU DOMINIQUE [BE]; CAPIAU CARINE) 3 January 2002 (2002-01-03) page 6, line 28 - page 9, line 33; claims; examples -----	6,10-16
Y	SAENGER R ET AL: "Booster vaccination with hexavalent DTPa-HBV-IPV/Hib vaccine in the second year of life is as safe as concomitant DTPa-IPV/Hib + HBV administered separately", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 23, no. 9, 19 January 2005 (2005-01-19), pages 1135-1143, XP027652453, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2005-01-19] abstract -----	6,10-12
A	FOLKERT STEINHAGEN ET AL: "TLR-based immune adjuvants", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 29, no. 17, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 3341-3355, XP028380413, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2010.08.002 [retrieved on 2010-08-07] page 3344, right-hand column, paragraph 1 - page 3346, left-hand column, paragraph 4 -----	1-18
A	BANUS SANDER ET AL: "The role of Toll-like receptor-4 in pertussis vaccine-induced immunity", BMC IMMUNOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 9, no. 1, 22 May 2008 (2008-05-22), page 21, XP021033213, ISSN: 1471-2172 abstract -----	1-18
A	GARCON-N ET AL: "Development and evaluation of AS04, a novel and improved adjuvant system containing MPL and aluminum salt", 1 January 2006 (2006-01-01), IMMUNOPOTENTIATORS IN MODERN VACCINES,, PAGE(S) 161 - 177, XP009140248, the whole document -----	1-18
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/054674

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	WO 2012/117377 A1 (NOVARTIS AG [CH]; BAUDNER BARBARA [IT]; SKIBINSKI DAVID A G [SG]; SING) 7 September 2012 (2012-09-07) claims; examples -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/054674

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
WO 2008020328	A2	21-02-2008	CN 101522217 A	02-09-2009			
			EP 2073841 A2	01-07-2009			
			JP 5090452 B2	05-12-2012			
			JP 2010500398 A	07-01-2010			
			JP 2012236864 A	06-12-2012			
			US 2010158940 A1	24-06-2010			
			WO 2008020328 A2	21-02-2008			
WO 9948525	A1	30-09-1999	AR 014762 A1	28-03-2001			
			AT 335509 T	15-09-2006			
			AU 735619 B2	12-07-2001			
			AU 3417299 A	18-10-1999			
			BR 9909037 A	05-12-2000			
			CA 2325436 A1	30-09-1999			
			CN 1295481 A	16-05-2001			
			CO 4820442 A1	28-07-1999			
			CZ 20003536 A3	15-08-2001			
			DE 69932709 T2	16-08-2007			
			EP 1066053 A1	10-01-2001			
			ES 2270590 T3	01-04-2007			
			HU 0101323 A2	28-08-2001			
			JP 2002507581 A	12-03-2002			
			MY 133780 A	30-11-2007			
			NO 20004758 A	08-11-2000			
			NZ 506604 A	28-02-2003			
			PL 343065 A1	30-07-2001			
			TR 200002737 T2	21-12-2000			
			WO 9948525 A1	30-09-1999			
			ZA 200004956 A	27-02-2002			
			WO 0200249	A2	03-01-2002	AP 1695 A	17-12-2006
						AT 534402 T	15-12-2011
AU 8189501 A	08-01-2002						
AU 2001281895 B2	28-04-2005						
BG 66238 B1	31-08-2012						
BG 66249 B1	28-09-2012						
BR 0112057 A	17-06-2003						
CA 2412497 A1	03-01-2002						
CA 2783274 A1	03-01-2002						
CN 1449293 A	15-10-2003						
CN 101708333 A	19-05-2010						
CZ 20024224 A3	14-05-2003						
DK 1296715 T3	13-02-2012						
DK 1946769 T3	16-07-2012						
EG 24742 A	14-07-2010						
EP 1296715 A2	02-04-2003						
EP 1946769 A2	23-07-2008						
EP 2277541 A1	26-01-2011						
EP 2279748 A1	02-02-2011						
ES 2375704 T3	05-03-2012						
ES 2385100 T3	18-07-2012						
HK 1055244 A1	27-04-2012						
HU 227613 B1	28-09-2011						
HU 227893 B1	29-05-2012						
HU 0301413 A2	28-08-2003						
IL 153506 A	15-06-2009						
JP 4870895 B2	08-02-2012						
JP 2004501873 A	22-01-2004						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/054674

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2010163453 A	29-07-2010
		KR 20070091698 A	11-09-2007
		KR 20080052700 A	11-06-2008
		MA 25824 A1	01-07-2003
		MX PA03000198 A	13-09-2004
		NO 20026175 A	26-02-2003
		NZ 523319 A	27-01-2006
		OA 12302 A	24-10-2003
		PE 01262002 A1	27-04-2002
		PL 360265 A1	06-09-2004
		PT 1296715 E	19-01-2012
		PT 1946769 E	27-06-2012
		SI 1296715 T1	30-03-2012
		SI 1946769 T1	31-07-2012
		SK 18432002 A3	05-08-2003
		US 2003180316 A1	25-09-2003
		US 2012207780 A1	16-08-2012
		UY 26801 A1	31-01-2002
		WO 0200249 A2	03-01-2002

WO 2012117377	A1	07-09-2012	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/13	
A 6 1 K 39/095 (2006.01)	A 6 1 K 39/095	
A 6 1 K 39/116 (2006.01)	A 6 1 K 39/116	

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

(72) 発明者 パウドナー, バールバラ
 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 オーヘイガン, デレク
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー 3 5 0, ノバルティス ヴァクシズ アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

(72) 発明者 シン, マンモハン
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 5 4 0, ホーリー スプリングス, グリーン オークス パークウェイ 4 7 5, ノバルティス ヴァクシズ アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 4C085 AA04 AA05 BA10 BA12 BA16 BA17 BA18 BA38 BA43 BA53
 BA90 CC24 DD03 EE03 EE06 EE10 FF02 FF14 GG03